

水産醗酵食品の酵母に関する研究（第6報）：無胞子酵母の培養的並びに生理学的性質について

銭谷，武平
九州大学農学部水産学教室

<https://doi.org/10.15017/21343>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (1), pp.53-61, 1955-02. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



水産醱酵食品の酵母に関する研究 (第6報)

無孢子酵母の培養的並びに生理学的性質について

銭 谷 武 平

Yeasts occurring in fishery-fermentation
products. Part 6

On the cultural and physiological characteristics
of asporogenous yeasts

Buhei Zenitani

先に無孢子酵母の形態学的特徴について報告¹⁾したが、本報においては分類学的研究特に培養的並びに生理学的性質と醱酵食品の製造・保蔵などに 関係のあるこれら酵母の発育条件、耐塩力等について検討した結果を報告する。

一般菌学的性質

I. 無孢子酵母の研究手法

無孢子酵母の分類には Will 以来諸氏の研究があり、その内 Lodder (1934)²⁾の分類が最も重要視されたが *Mycotoruloideae* 亜科は未完であつた。従つて著者は本亜科の分類には Dodge³⁾, Ciferri & Redaelli⁴⁾及び Martin⁵⁾を参考にし Lodder の方法を基にして研究を進めたが、その後 Skinner (1948)⁶⁾や完結した Diddens & Lodder (1942)⁷⁾の研究をも参考にした。又最近 Lodder & van Rij (1952)⁸⁾が酵母菌全般についての研究を発表したのでこれにより若干の補足を行つた。本研究は単に分類のみを目的としなかつたので諸種の試験法を検討して結局下記の如き研究方法に従つた。供試菌は前に報告した8菌株である。

(A) 培養的性質の試験法

- 1) 液体培養 :— 麦芽汁 B11g. 15°, 25 °C.
- 2) 劃線培養 :— 麦芽汁寒天 B11g. 12°, 25 °C, 7 日.
- 3) 穿刺培養 (溶膠性) :— 麦芽汁膠 B11g. 10°, 20 % 膠.
- 4) 巨大集落 :— 同上培養基.

1~4) の各試験は真正酵母⁹⁾と全く同様に行つた。Lodder & van Rij は穿刺培養及び巨大集落の特徴を標式に採用していないが著者は既往の研究と比較検討する必要から実施した。

また Sabouraud medium を用いて液体、斜面及び巨大集落の特徴を確めた。

(B) 生理学的性質の試験法

- 1) 各種糖類醱酵試験 :— Lindner 小醱酵法.
- 2) 各種糖類同化試験 :— Lodder は非醱酵性菌株のみにこの試験を行つたが、其後更に酵母菌全般に広く採用された。基本培養基は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 %, KH_2PO_4 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 % 及び洗滌寒天 2 % を用い Auxanograph 法によるかあるいは供試糖 2 % を加えて斜面とし発育の有無を 25 °C に培養して観察したが後者の場合は無糖のものを対照とした。葡萄糖、ガラクトース、蔗糖、麦芽糖及び乳糖を用いて試験した外、別にキシロース、アラビノース等のペントースをも試験した。
- 3) 糖類生酸試験 :—
- 4) 窒素化合物同化試験 :—
- 5) 酒精同化試験 :—
- 6) 皮膜生産試験 :— 3~6 は真正酵母の試験法に同じ。
- 7) エステル生産試験 :— この試験は *Hansenula* 属の不完全期に相当すると認められる *Candida* 属の識別に有効である。酵母エキス (パン酵母 200 g に水 1 l を加えて 120 °C において 15 分間加熱後濾過) に葡萄糖 5 % を加えて 20 cc 宛を 50 cc 容三角コルベンに分注し殺菌後、新鮮培養から接種し 25 °C に 1 週間培養してから検査した。
- 8) 澱粉 (類似物質) 生成試験 :— Lodder & van Rij と Wickerham¹⁰⁾ の試験法は多少異なるが前者に従ひ下法のようにした。基本培養基は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 %, KH_2PO_4 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, 葡萄糖 1 % 及び寒天 2.5 % から成り稀塩酸で pH 4.5 に調整した。平板培養には酵母エキスを 1 平板当り 2 滴加えた。25 °C に 2 週間培養した後ルゴール液を加えて澱粉質生成の有無を検査した。
- 9) リトマス牛乳培養 :— 2 種の培養基、即ち a) 脱脂乳 10 cc に 1 % リトマス液を 1 cc 加えたもの、b) a) に 5 % 乳酸石灰液を 1 cc 追加したものを用意した。25 °C において 30 日間培養し凝固、ペプトン化及び色調の変化を観察した。
- 10) 脂肪分解試験 :— Lodder & van Rij は *Candida lipolytica* 等の少数菌株のみに牛脂分解試験を行つているが著者は次の如くトリブチリンを基質とし乳濁油脂の透明化により判定する方法を採つた。葡萄糖 0.5 %, ペプトン 0.5 %, 魚肉エキス 0.3 %, トリブチリン 1 % 及び寒天 1.5 % の基本培養基を加熱溶解し強く振盪して乳濁させてから小試験管に分注し加圧殺菌した。直立固化してから寒天表面に一樣に接種し 25 °C に 10 日間培養して透明層の深さを測り強弱を判定した。またオリーブ油と牛脂を基質として Peter & Nelson¹¹⁾ の改変培養基を用いて試験した。
- 11) 発育最適 pH :—
- 12) 発育最適温度 :—
- 13) 死滅温度 :—
- 14) 食塩抵抗発育試験 :— 11~14) の試験法は真正酵母の場合に同じ。

II. 試 験 結 果

- (A) 1) 液体培養 2) 劃線培養及び穿刺培養の特徴はそれぞれ Table 1, 2 及び 3 に

Table 1. Fluid culture at 25°C (Wort, Bllg. 15°).

Strain	Note
D ₁	Turbid after 24 hours, and a little sediment after 6 days.
K ₁	Clear after 3 days, slight ring and a little sediment after 6 days. Ring and floating thick pellicle after 10 days.
M ₁	Some islets and ring after 3 days, a light yellow ring and slightly turbid after 6 days.
M ₂	Turbid after 3 days, becoming clear with a sediment after 6 days. Ring formed slightly after 10 days.
N ₂	Clear, a little sediment after 3 days. Greyish white ring after 10 days.
O ₂	Clear, a little sediment after 3 days. Greyish white ring after 10 days.
S ₁	White powdery pellicle, turbid slightly and a moderate sediment.
S ₅	Ring formed slightly and a little sediment after 6 days.

Table 2. Streak culture at 25°C (Wort agar, Bllg. 12°).

Strain	Note
D ₁	White porcelainous, smooth, raised slowly and entire edges.
K ₁	Greyish white, glistening, flat and entire edges.
M ₁	Greyish white, sebaceous, smooth generally, raised slowly and entire edges.
M ₂	Milky white, sebaceous, smooth, flat and undulate.
N ₂	Greyish white, waxy, flat, slightly striped at the border and the margin slightly sinuous.
O ₂	Greyish white, sebaceous, smooth, raised slowly and entire edges.
S ₁	Dry, brownish grey, many folds at the surface, raised generally and irregular edges.
S ₅	Moist, greyish white, waxy, generally raised, finely granular, slightly striped at the border and slightly sinuous edges.

Table 3. Stab culture with wort gelatin.

Strain	Liquefaction (Cult. days)	Note
D ₁	—(50)	Circular with radial sectors on the surface.
K ₁	—(70)	Sebaceous, slowly raised, yellow at the center. No growth in the stab line.
M ₁	—(70)	Dull, yellow and raised slowly.
M ₂	—(70)	Greyish white, glistening and flat.
N ₂	—(70)	Greyish white and poor growth.
O ₂	—(70)	Greyish white and raised slowly.
S ₁	+(30)	White powdery, irregular, dark brown at the center and growth in the stab line (depth of growth: 8mm.).
S ₅	+(30)	Greyish white, many folds at the surface and merged growth into the stab line.

Table 4. Form and texture of giant colonies of asporogenous yeasts.
(Wort gelatin).

Strain (days)	Form (dia. mm.)	Color	Elevation and crater	Concentric ring	Radial sector	Edges
D ₁ (70)	Circular. (9)	Greyish white, sebaceous.	Generally raised. Indistinct crater.	None.	None.	Entire.
K ₁ (60)	Irregular. (19)	Light yellowish grey at the center and greyish white, waxy at the border.	Raised at the centre only, double crater form.	Indistinct some rings.	Many at the border.	Undulate.
M ₁ (60)	Circular. (12)	Ditto.	Generally flat.	Indistinct rings.	None.	Entire.
M ₂ (60)	Irregular. circular. (19)	Ditto.	Generally flat, raised slowly. Small crater.	Ditto.	Many at the border.	Undulate.
N ₂ (60)	Circular. (13)	Greyish yellow at the center, greyish white at the border.	Raised slowly.	Indistinct some rings.	Many folded lines.	Ditto.
O ₂ (60)	Circular. (11)	White waxy at the center, grey at the border.	Raised at the center only.	Indistinct many rings.	Some at the border.	Ditto.
S ₁ (70)	Irregular. (21)	Dry, white. Many folds at the sur- face.	Raised generally, and merged irregu- larly at crater.	One.	Indistinct.	Irregular.
S ₂ (70)	Irregular. (12)	Dry, grey at the center and white at the margin.	Raised at the center and small crater.	Wrinkled at the center.		The irregular mar- gin, surrounding by pseudomycelia.

表示したように酸酵性は本試験ではほとんど認められなかつた。5% 葡萄糖ペプトン水においても酸酵性はほとんど見られず*僅に数菌株が Lindner 小酸酵法においてのみ弱い酸酵性を示すに過ぎなかつた。塩辛中の無孢子酵母は概して酸酵型でなく酸化的分解を行うものと考えられる。溶膠性はほとんど認められないが S₁ 及び S₂ は膠内に没入して特徴のある発育を示した。

4) 巨大集落：— 供試 *Candida* 属酵母のうちに Rough 集落が現れることがあつた。既に *Candida albicans* (Robin) Berkhout⁹⁾で観察されているが Smooth 集落に較べ細胞は Mycel 状に伸長し、また巨大集落は古くなると R 部と S 部では細胞形が異なり R 部には一層伸長した細胞が見られた。Lodder に依れば累代培養によつて S 型から R 型へ移行すると。

(B) 1~9) の試験結果は Table 5 に一括表示した。

Table 5. Physiological properties of asporogenous yeasts.

Test	Strain	D ₁	K ₁	M ₁	M ₂	N ₂	O ₂	S ₁	S ₂
1-3) Sugar-fermentation and assimilation. Acid production.	Glucose	GAS	-As	-As	GAs	GAs	-As	-A	GAS
	Galactose	? -	-	-A	-A	-A	-A	-	-
	Saccharose	? AS	-A	-As	-As	-As	-A	-	-A
	Maltose	-As	-A	-A	-As	-As	-A	-	-A
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
4) Assimilation of nitrogen-compounds.	KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+	+	+	+	+	+	+
	Urea	+	+	+	+	+	+	+	+
	Asparagin	+	+	+	+	+	+	+	+
	Peptone	+	+	+	+	+	+	+	+
5) Assimilation of ethyl alcohol.		+	+	-	+	+P	+	-	+
6) Pellicle formation in wort.		+R	-	+R	-	-	-	+	-
7) Ester (Ethyl acetate) formation.		-	-	-	-	-	-	-	-
8) Starch-like substance production.		-	/	/	-	-	-	/	-
9) Litmus milk culture.		blue	/	/	blue	blue	n.c	/	n.c
Ditto (with calcium lactate).		n.c	/	/	blue	n.c	n.c	/	n.c

Note: G... gaseous fermentation, A... assimilation, S or s... acid, P... Pellicle, R... ring and n.c... no visible change.

The methods employed are the same as described in the case of true yeasts, unless otherwise stated.

無孢子酵母の酸酵性は麦芽汁あるいは5% 葡萄糖ペプトン水においても認められず Lindner 小酸酵法で認知される如く極めて弱く *Debaryomyces* 属の酸酵能に類似するようである。葡萄糖、麦芽糖及び蔗糖は多くの菌によつて同化されたが乳糖は全く同化されなかつた。前に¹²⁾*Candida* sp. No 2 (N₂) はペントース、マンニットをよく同化し海

* 葡萄糖 2.0%, 肉エキス 0.3%, ペプトン 1.0%, 食塩 0.5% (pH = 7.2) の場合に 30°C で D₁, N₂ 及び M₂ は弱いガス発生を見た。

藻を原料として酵母製造に有用であることを報告したが O_2 も同様にペントーズを同化し S_1 は葡萄糖のみを同化したにすぎなかった。

窒素化合物の同化性は真正酵母の場合と全く同様で、酒精同化性も S_1 と K_1 を除く全菌株に認められた。皮膜生産は麦芽汁 B11g. 12° と Sabouraud 液とでは違い後者の場合は M_2 , N_2 両菌に薄膜の形成を認めた。

エステル形成試験の結果、臭気はむしろ酸臭又は味噌臭に近く *Hansenula* 属の如き顕著なエステル香は感知されなかった。澱粉類似物質生成試験の結果はルゴール試薬でグリコーゲン形成を認めたものもあつたが澱粉質形成はいずれも認められなかった。

Table 6. The lipolytic activities on tributyrin agar.

Strain	Cult. days		
	4	8	10
D_1(<i>Candida</i> species)	±	+	+
M_2 , N_2 , X_2(<i>Candida</i> species)	+	++	+++
S_3(<i>Candida</i> species)	—	—	—
O_2(<i>Torulopsis</i> species)	—	—	—
<i>Debaryomyces hansenii</i> (R_4)	+	++	+++
<i>Debaryomyces kloekeri</i> (A_2 and S_4)	+	++	+++
<i>Debaryomyces nicotianae</i> (P_2)	+	++	+++
<i>Debaryomyces nicotianae</i> var. <i>salsus</i> (C_2)	+	++	+++
<i>Debaryomyces</i> species V_1	+	++	+++
<i>Saccharomyces rouxii</i> (N_1 and Q_2)	—	±	+

Medium: Glucose 0.5%, peptone 0.5%, fish-extract 0.3%, tributyrin 1% and agar 1.5%. These constituents were emulsified, poured into small test tubes and allowed to harden. The activity was measured by the depth of clear zone.

Depth of clear zone: +++ 4 mm <, ++ 3 mm <, + weak and — negative.

10) 無孢子酵母の脂肪分解能は従来専ら牛脂を用いて *Candida*, *Trichosporon* 属の小數菌株に認められているがトリブチリン基質では *Candida* 属の大部分と同時に試験した *Debaryomyces* 属の全菌株に分解力を認めた。なお牛脂とオリーブ油の場合は分解を認めた菌株はあつたがいずれも微弱であつた。

11~13) の結果は Table 7 に表示したが発育至適 pH は概ね 5.0~7.0 で真正酵母の 4.1~6.0 よりも幾分高く D_1 のみは 3.3~5.0 であつた。発育温度並びに死滅温度の関係は真正酵母におけるとほぼ同様であるが M_2 と N_2 のみは 38~41°C においても発育することは注目値する。また K_1 は 50°C, 10 分間の加熱で死滅し塩辛酵母中で最も低い値を示した。

14) 塩辛酵母のうち真正酵母は食塩を 15% 含有する培養基中でもよく発育したが無孢子酵母は一般に耐塩力がやや劣る。Mycoderma 属 (*Candida mycoderma* Lodder et van Rij) もまた Mrak & Bonar¹³⁾ の研究では *Debaryomyces* 属より耐塩力が弱く其他含塩食品から分離された *Candida krusei* (cucumber brine)¹⁴⁾, *Torulopsis uvae* var. *misu* Mogi 及び *Pseudomonilia* (共に味噌¹⁵⁾ から分離され Lodder & van

Table 7. Optimum-pH and -temperature of growth, and thermal death point.

Strain	Growth pH									Opt. pH	Growth temp.					Opt. temp.	Death temp.
	2.0	3.0	3.3	4.1	5.0	6.0	6.3	7.2	7.6		21~23	25	30	35	38~41		
D ₁	—	+	+	+	+	+	+	+	+	3.3~5.0	+	+	+	—	—	25~30	55°C, 10 min.
K ₁	—	—	+	+	+	+	+	+	+	6.0~6.3	+	+	+	±	—	25	50
M ₁	—	—	+	+	+	+	+	+	+	6.3~7.2	±	+	+	±	—	25~30	55
M ₂	±	+	+	+	+	+	+	+	+	4.1~5.0	+	+	+	+	+	30~35	60
N ₂	—	+	+	+	+	+	+	+	+	5.0~6.0	+	+	+	+	+	30~35	60
O ₂	—	—	±	±	+	+	+	±	±	6.0	—	+	+	—	—	30	55
S ₁	—	—	—	+	+	+	+	+	+	6.0~7.2	+	+	+	—	—	25~30	55
S ₅	—	—	—	+	+	+	+	+	+	5.0~7.2	+	+	+	±	—	30	60

Table 8. The results of salt-tolerant test.

Strain	NaCl g/100 cc						Note
	0.5	5	10	15	20	25	
D ₁ , M ₂	+	+	+	+	±	—	Turbid at 0.5—10, ring at 5—10 and slight sediment at 20%.
K ₁	+	+	R	R	+	±	Turbid at 0.5—10, slight ring at 5—10, sediment decreasing due to salt concentration.
M ₁	+	R	R	R	+	±	Turbid at 0.5—15, ring at 0.5—10. Slight ring and moderate sediment at 15%.
N ₂	+	+	+	+	+	±	Turbid at 0.5—10, clear at 15—20 and abundant sediment at 0.5%.
O ₂	+	+	+	+	+	±	All clear, slight ring at 5 and sediment at 0.5—10.
S ₁	+	P	P	P	+	±	Light yellowish white, dry heavy folded pellicle at 0.5—15, and slight sediment. Small islets at 20—25 and a little sediment at 20.
S ₅	+	Pr	Pr	Pr	+	±	Pellicle at 0.5—15, slight ring at 0.5, ring and abundant sediment at 5—10. Thin pellicle and a little sediment at 15—20.

Note: R---ring, P---pellicle.

Rij の分類では *Candida* 属と考えられる）も耐塩力は概ね 10% 食塩であつて食塩濃度の低い製品に分布するものと思う。

要 約

塩辛酵母の内、無孢子酵母 8 菌株の培養的並びに生理学的性質について検討した結果を記載した。

醱酵性は全く欠除するか微弱で *Debaryomyces* 属の醱酵能に類似し、その他窒素化合物同化性、酒精同化性も真正酵母のそれと大差はなかつた。特に脂肪分解能はトリブチリ

ンを基質とする場合可成り強く、同時に試験した *Debaryomyces* 属の全菌株が強く分解したことは注目に値する。発育の最適 pH は 6.0~7.0, 温度は 30°C 前後で耐塩力は真正酵母よりもやや低いようであった。

概言すれば無孢子酵母の一般菌学的性質は塩辛中の *Debaryomyces* 属のそれに類似するようで、少くとも塩辛中の *Candida* 属酵母は *Saccharomyces* 属や *Hansenula* 属の不完全期のものではないと思われる。

本研究は九大農学部水産化学教室で行ったもので終始御指導を賜った 恩師富安教授に感謝の意を表する。なお文部省科学研究費(富安教授)に依った、記して謝意を表する。

文 献

- 1) 銭谷武平：九大農・学芸雑誌, 14, 589 (1954).
- 2) Lodder, J. : Die anaskosporogenen Hefen, I. Heft (1934).
- 3) Dodge, C. W. : Medical Mycology (1935).
- 4) Ciferri, R. et P. Redaelli : Arch. f. Mikrobiol., 6, 9 (1935).
- 5) Martin, D. S. et al. : J. Bact., 34, 99 (1937) 39, 607 (1940).
- 6) Skinner, C. E. et al. : Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes. 2nd Edit., (1948).
- 7) Diddens, H. A., und J. Lodder : Die anaskosporogenen Hefen, II. Heft (1942).
- 8) Lodder, J., and N. J. W. Kreger-van Rij : The Yeasts, a taxonomic study (1952).
- 9) 銭谷武平：九大農・学芸雑誌, 12, 375, 383 (1952).
- 10) Wickerham, L. J. : Tech. Bull., No 1029, U. S. Dept. Agric., (May 1951).
- 11) Peters, I. I., and Nelson, F. E. : J. Bact., 55, 581 (1948).
- 12) 富安・銭谷：農化, 25, 406, 479 (1952), 26, 6 (1952).
- 13) Mrak, E. M. and Bonar, L. Zentral. Bakt., II, 100, 289 (1939).
- 14) Etchells, J. L., and Bell, T. A. : Food Technology, 4(3), 77 (1951).
- 15) 茂木正利：農化, 14, 1191 (1938), 18, 739 (1942).

Résumé

The present study was designed from the taxonomic and practical standpoint to secure the general features of asporogenous yeasts, whose morphological characteristics had already been reported.

Further observations on the cultural characteristics are described in Tables 1~4. The physiological characteristics are listed in Table 5 summarily, which brought out the fact that the test-yeasts dissimilate sugars rather oxidatively than fermentatively, i. e. gaseous fermentation was not observed in the liquid cultures but some strains showed it by Lindner's method only, and no remarkable difference from the true yeasts was observed on the assimilabilities of

nitrogen compounds and ethyl alcohol. Most of the yeasts tested showed the lipolytic abilities when tributyrin agar was used as substrate (Table 6). Their growth-pH, -temperature and thermal death points are shown in Table 7. The optimum pH of their growth (5.0~7.0) is comparatively higher than in the case of true yeasts (4.0~6.0). The salt tolerance was apparently lower than in the case of true yeasts (Table 8).

Generally speaking, the properties of asporogenous yeasts in "Shiokara" seem to have some resemblances to those of *Debaryomyces* species, and these *Candida* species, at least in "Shiokara", are not considered belonging to an imperfect stage of *Saccharomyces* or *Hansenula* species.