HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	一般水産加工食品における真菌類に関する研究：第2報 酵母分布の特異性と各種糖および食塩濃度に対する分離酵母の感受性
Author(s)	信濃, 晴雄; 坂井, 稔
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(2), 110-120
Issue Date	1967-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23310
Type	bulletin (article)
File Information	18(2)_P110-120.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

一般水産加工食品における真菌類に関する研究
第2報　酵母分布の特異性と各種糖および食塩濃度に対する分離酵母の感受性

信濃　晴雄*・坂井　稔*

Studies on the True Fungi in Processed Sea Foods
II. Specific distribution of yeast in processed sea foods and the behaviour of yeast for the growth to the various concentration of sugar and salt

Haruo SHINANO and Minoru SAKAI

Abstract

In the previous report, the authors showed the distribution of yeast in various processed sea foods and observed the specificity between the distribution of yeast and spcial sea foods, such as "Tsukudani" foods.

In this study, the spcifiic relationship between some sea foods and the distribution of yeasts which were isolated from sea foods collected in 3 different markets was investigated and the growth of yeast in various concentrations of sugar and salt was studied.

A total of 140 strains of yeast were isolated from 17 of 30 smaples collected in 3 different markets. Of these isolates, 134 strains were identified by the method of classification set up by Lodder and van Rij, but 16 strains could not be identified by their method.

Relatively large amounts of yeast were observed in "Shiokara", "Momijiko" and "Taimiso", especially, *Saccharomyces rouxii* in "Taimiso", *Debaryomyces hansenii* in "Shiokara", *Debaryomyces kloeckeri* in "Momijiko" and "Shiokara" and *Debaryomyces nicotianae* in "Shiokara" and "Momijiko".

The growth rate of isolates in various concentrations of sugar and salt was observed. As a basal medium for this test the yeast nitrogen base (Difco) was adopted and prepared in concentrations of 40, 50 and 60 per cent glucose (W/V), 10, 15 and 20 per cent NaCl (W/V) and in mixed concentrations of 10, 10, 15 and 15 per cent NaCl (W/V) to 20, 30, 20 and 30 per per cent glucose (W/V). The results of the experiment showed that sporogenous yeast grew better than asprogoneous yeasts in most concentrations of glucose and NaCl. Of the sporogneous yeast, the so-called osmophilic yeast, *Saccharomyces rouxii*. showed most tolerance than other yeasts.

緒　　言

前報において[1]，著者らは函館市内の一百貨店で購入した各種の一般水産加工食品から酵母を分離・同定し，それらの食品別分布状態を検討した結果，検体の品目により酵母の分布に或る程度の偏在的傾向の認められることを知った。本報ではその点を更に明らかにするとともに，分離酵母の各種糖濃度及び食塩濃度に対する感受性についても検討を加えたのでその結果について報告する。

* 北海道大学水産学部微生物学講座

実　　験

1 供試菌

供試菌は函館市内における3カ所の百貨店で市販中の一般水産加工食品30検体から分離した140株で，検体は各百貨店から10検体宛，それぞれ類似した食品を選び購入したものである(Table 1)。また酵母の分離は前報において報告した方法に拠った。

2 分類学的検査法

分類学的検査法はすべて前報において報告した方法と同様である。

3 各種糖濃度及び食塩濃度に対する分離酵母の感受性試験

使用した基礎培地は Difco 社製の yeast ntirogen base (糖同化試験用培地) で，基礎培地にグルコース及び食塩を一定量添加し，滅菌後あらかじめ前培養(25°C，2日間)しておいた供試菌の滅菌生理的食塩水浮遊液の一定量を移植し，一週間後の発育程度を肉眼的に観察した。なお，著者らは第1報と同様に Lodder らの記載とりまとめ Key-1 および2 (稿尾参照) を作製し，これらに従って供試菌の同定を行なった。

結 果 及 び 考 察

1 供試菌の同定 (Table 2 参照)

(1) genus *Saccharomyces*

Ladder[2] らの分類法により，本属と認められたものは供試菌140株中の28株で，その形態学的並びに生化学的性状により19株が *S. rouxii* に，9株が *S. exiguus* に同定された。

(2) genus *Debaryomyces*

Lodder らの分類法によれば，酵母の属の決定は主として胞子の有無，菌形または偽菌糸の有無などの形態学的性状により，種は糖類の醗酵性或いは糖の同化性及び硝酸塩の同化性などの生化学的性状によって決定されている。しかしながらこの genus *Debaryomyces* に属する酵母は，種の同定に当り重要な役割を果す糖類の醗酵性が極めて微弱で，且つまた不安定であるために，糖の醗酵性は種の決定要素とはなり得ず，却って糖の醗酵性の弱いことは胞子壁にいぼ状突起を有し，且つ胞子中央に油滴を有することなどの特異的な形状とともにこの属の特徴ともなっている。また，種の決定には糖の同化性，皮膜の形成およびその性状が重要な Key になっている。供試菌中この属と認められたものは42株で，前述の各種性状から，4株が *D. hansenii* に，12株が，*D. nicotianae*，25株が *D. kloeckeri*，1株が *D. subglobosus* に同定された。

(3) genus *Hansenula*

皮膜の形成，或いは帽子状の胞子の産生などその特異的な性状から本属と認められたものは供試菌中4株である。その中1株は *H. subpelliculosa* に，2株は *H. anomala* に同定された。残り1株については genus *Hansenula* の特性の一つとされている皮膜の形成が極めて微弱であるが，胞子の形状，糖類に対する態度など，各種形態学的並びに生化学的性状などから *H. anomala* に同定すべきが妥当と考えられる菌株である。

(4) genus *Candida*

本属と認められた菌株は供試菌中24株で，それぞれ Lodder らの記載による *C. parapsilosis* (2株)，*C. rugosa* (10株)，*C. melibiosi* (10株) に一致した。残り2株は，ともに胞子形成態なく，偽菌糸はよく発達，菌形は卵形または長卵形を呈し，グルコースのみを醗酵し，グルコース，ガラクトースを同化するも，硝酸塩の同化性が認められないなど *C. catenulata* に類似するが，ガラクトースの醗酵性の認められない点が Lodder らの記載と異なる。しかしながら Lodder らの記載にもガラクトースの醗酵性は微弱とされているので，各種形態学的並びに生化学的性状を勘案して，この2株は *C. catenulata* のガラクトース醗酵性を失なったものと考えるのが適当であろう。

Table 1. Numbers of the yeasts isolated from various processed sea foods

	No.	Trade name	Main material	No. of isolate
A	1	"Fish-sausage"	Tuna, flat-fish and etc.	2
	2	〃	〃	3
	3	"Fish-ham"	〃	0
	4	"Shiokara"	Squid	16
	5	"Momijiko"	Egg of cod	10
	6	"Taimiso"	Miso and sea bream	10
	7	"Hanakatsuo"	Bonito	0
	8	"Shishamo"	A Smelt	0
	9	"Konago"	Sand eel	1
	10	"Iwashi-no-yakiboshi"	Sardine	3
B	11	"Fish-sausage"	Tuna, flat-fish and etc.	2
	12	〃	〃	0
	13	"Fish-ham"	〃	0
	14	"Shiokara"	Squid	11
	15	"Momijiko"	Egg of cod	8
	16	"Taimiso"	Miso and sea bream	8
	17	"Hanakatsuo"	Bonito	0
	18	"Fish-sausage"	Tuna, flat-fish and etc.	0
	19	〃	〃	0
	20	"Iwashi-no-niboshi"	Sardine	0
C	21	"Fish-sausage"	Tuna, flat-fish and etc.	3
	22	〃	〃	0
	23	"Fish-ham"	〃	1
	24	"Shiokara"	Squid	15
	25	"Momijiko"	Egg of cod	15
	26	"Taimiso"	Miso and sea bream	14
	27	"Hanakatsuo"	Bonito	0
	28	"Shishamo"	A smelt	18
	29	"Konago"	Sand eel	0
	30	"Iwashi-no-niboshi"	Sardine	0

(5) genue *Rhodotorula*

胞子形成能，糖の醗酵能共になく，著明な赤色，橙赤色或いはピンク色の色素を産生するなど，明らかに genus *Rhodotorula* と認められたものは 14 株で，その中 7 株は *Rho. mucilaginosa*，他の 7 株は *Rho. glutinis* に同定された。

(6) genus *Trichosporon*

胞子嚢胞子を形成せず，true-mycelium を作るとともに節胞子を形成し，糖の醗酵能が認められないなど，本属と認められたものは 9 株で，いずれも *Tri. cutaneum* に同定された。

(7) genus *Torulopsis*

供試菌中本属と認められたものは 2 株で，いずれも Lodder らの記載による *T. famata* に一致した。なほこの種は胞子形成能の認められない点のみが *Debaryomyces kloeckeri* と異なる点で *D. kloeckeri* の不完全型とされている。

(8) 同定し得なかった菌株

同定し得なかった菌株は全部で 16 株で，その中 7 株は胞子を形成し，偽菌糸を作らず，薄い皮膜を形成し，糖類に対してはグルコース，ガラクトース，シュークロースを同化するとともにグルコース，シュークロースを醗酵，ラフィノースも 1/3 を醗酵する。また明らかに硝酸塩の同化性認められる。これらの菌株に類似した種としては，*Saccharomyces chevalieri* があるが，この種が明らかに偽菌糸を形成することと，硝酸塩の同化性がないことから，これら 7 株を *S. chevalieri* と同定するにはいささか疑義がもたれる。また，他の 4 株についても，糖類および硝酸塩に対する態度は，前述の *S. chevalieri* と同様であるが菌形，偽菌糸，胞子の産生など，Lodder らの記載とはやや異なる点が多い菌株であった。残り 5 株中 2 株は，その形態学的性状，生化学的性状とともに *Saccharomyces bisporus* に類似するが，ただ胞子産生能の認められない点のみが異なり，*S. bisporus* の胞子産生能を失なった不完全型と考えるのが妥当であろう。また残り 3 株中，2 株については帽子状の特徴ある胞子を産生することと，硝酸塩の同化性が認められることから genus *Hansenula* に属すべき菌株と考えられるが，その他の諸性状においてこの 2 株は Lodder らの記載による種のいずれとも一致しなかった。残り 1 株は胞子を産生し，グルコース，マルトースを醗酵するとともに，グルコース，ガラクトース，マルトースを同化するなど，*Saccharomyces rouxii* に類似するが，ただ硝酸塩の同化性が認められた点のみが異なり，*S. rouxii* とは極めて近縁の酵母と考えられる。

2 酵母分布の特異性

食品中におけるマイクロフローラは，食品の性状と存在する微生物の性質によりかなり安定した様相を示すであろうことが推察される。一般水産加工食品についても，前報において報告したごとく，食品中における酵母の分布については食品の種類によってかなりの偏在性が認められた。本実験においても，その点については Table 2 に見られるごとく，極めて明瞭な結果が出ている。すなわち，ソーセージ，ハム類などのネリ製品や，花カツオ，鰯煮干しなどの乾製品においては，酵母の分布は殆んど見られないが，塩辛或いは鯛味噌などのいわゆる醗酵食品や，もみじ子などの塩蔵食品には酵母の分布が広く，供試菌の殆んどはこれらの食品から分離されたものである。これら醗酵食品および塩蔵食品の中でも，塩辛，もみじ子のような食塩濃度のかなり高い食品には，耐塩性酵母と称される *Debaryomyces* 属に含まれる酵母が優勢で，中でも塩辛における *D. hansenii*，もみじ子における *D. kloeckeri* などは，検体購入の場所にかかわらず同種の検体のすべてから検出されている。このような現象は鯛味噌においても観察され，*Saccharomyces rouxii* などの耐浸透圧性酵母とよばれる酵母が検体購入場所に関係なく検出されている。これら水産加工食品における酵母のフローラの特異性については，それら食品の保蔵，熟成或いは風味などと考え併せ興味ある点である。なほ，乾燥食品（グループ II）中で，シシヤモ（燻製）における酵母の分布はかなり広いが，この検体は便宜上このグループに入れたものであって，この検体の製造法及び製品の性状からみて別個に考慮すべき検体で

Table 2. Distribution of the yeast in 3 groups

Group / Sample No. / Sample / Species	No. of isolate	I (fish-ham and fish-sausage)										
		1	11	21	2	12	22	3	13	23	18	19
		Fish-sausage	〃	〃	〃	〃	〃	Fish-ham	〃	〃	Fish-sausage	〃
Saccharomyces :												
rouxii	19											
exiguus	9											
Hansenula :												
anomala	3											
subpelliculosa	1											
Debaryomyces :												
hansenii	4											
nicotianae	12											
kloeckeri	25											
subglobosus	1											
Candida :												
parapsilosis	2											
rugosa	10											
catenulata	3											
melibiosi	10			3						1		
Rhodotorula :												
mucilaginosa	7	1										
glutinis	7											
Trichosporon :												
cutaneum	9		2		3							
Torulopsis :												
famata	2											
Unidentified :	16	1										
Total	140	2	2	3	3					1		

of processed sea foods

II (dried foods)										III (fermented and salted foods)								
7	17	27	8	28	9	29	10	20	30	4	14	24	5	15	25	6	16	26
Hanakatsuo	〃	〃	Shishamo	〃 (smoked)	Konago	〃	Iwashi (yakiboshi)	〃 (niboshi)	〃	Shiokara	〃	〃	Momijiko	〃	〃	Taimiso	〃	〃
										4					9	8	1	6
				1						1		2						
				4			1			2 7	1 1 8 1	1 2 1	1 4	2 4	2		1	
				4						1		1 1 1	3	2	3	2	2	1
				2 7	1							1	2					
												4						
												2						
							2			1					1		4	7
				18	1		3			16	11	15	10	8	15	10	8	14

ある。

3 分離酵母の各種糖濃度，食塩濃度に対する感受性

一般水産加工食品の中には日本古来の歴史の古いものから，比較的最近になって製造されるようになったものまで，その種類は多岐多様であるが，その中には醗酵食品，塩蔵食品或いは調味食品など一般にその性状から嗜好品或いは副食物としての性格の強いものが多く，食塩或いは糖含有量の高いものが多い。Fig. 1 及び Fig. 2 は，これら一般水産加工食品から分離された 140 株中，それらの形態的並びに生化学的性状において同一の性状を有する菌株を整理除去した 56株の酵母について各種糖濃度，食塩濃度に対する感受性を示したものである。この結果からも明らかなように，一般に無胞子酵母よりも有胞子酵母の方が各種糖濃度，食塩濃度に対する感受性が低く，かなり高い浸透圧にも耐えて発育する酵母が有胞子酵母の中には多い。すなわち，有胞子酵母ではその殆んどが糖濃度 50% (グルコース；W/V) 以上で発育が見られ，しかもその約半数は濃度 60% においても発育し得る。これに対し，無胞子酵母では糖酵度 60% において発育可能のものはなく，40% および 50% において発育し得るものが，それぞれ相半ばしている。食塩濃度に対する感受性については，*Saccharomyces exiguus* の1株を除き他の供試酵母の全部が 15% において発育が認められ，中でも *Hansenula subpelliculosa*, *Debaryomyces nicotianae*, *D. kloeckeri*, *D. subglobosus* の中には 20% においても発育の認められるものが存在する。最近，佐々木，吉田[3)4)] らは北海道内 35 工場の醤油諸味について酵母群の検索を行ない，分布および製品品質との関連性を検討するとともに，分離酵母の各種食塩濃度における発育と醗酵能力についての報告を行なっている。それによれば，酵母の分布については類似性は認められず，このことは検体の成分組成などの差による酵母フローラの違いと考えられるが，それらの生育と食塩濃度との関係については，佐々木，吉田らによって分離された *Saccharomyces rouxii* と *Rhodotorula mucilaginosa* では，その発育態度において著者らの分離した *S. rouxii* および *Rho. mucilaginosa* と同様な結果を示してはる。次に各種濃度の糖および食塩の混合培地における発育度では，有胞子酵母と無胞子酵母との間に極めて明瞭な差が認められた。すなわち，無胞子酵母では食塩 10%，グルコース濃度 20% の混合培地で発育したものは *Candida parapsilosis* (2株)，*C. melibiosi* (3株) および *Torulopsis famata* (1株) で，その他の酵母はこの混合濃度

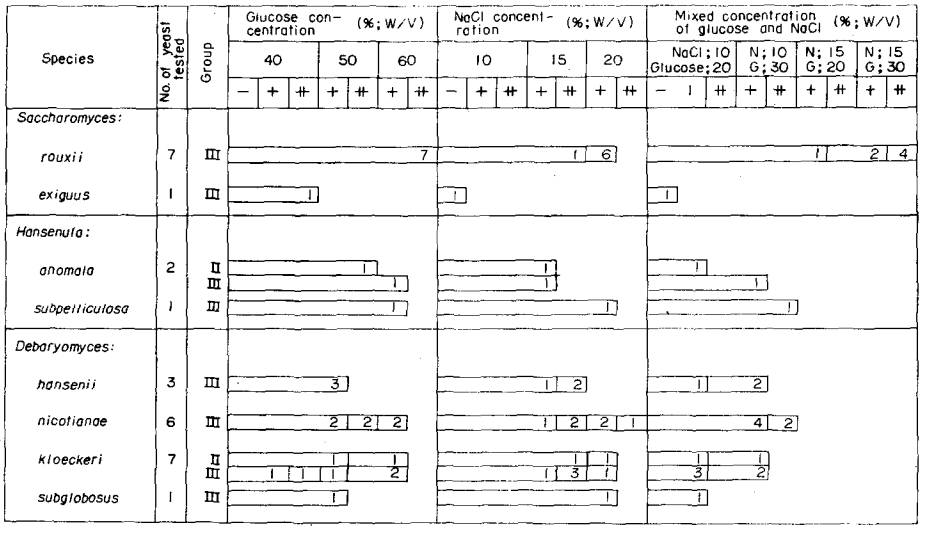

Fig. 1. Growth rate of sporogenous yeasts in various concentrations of glucose and salt

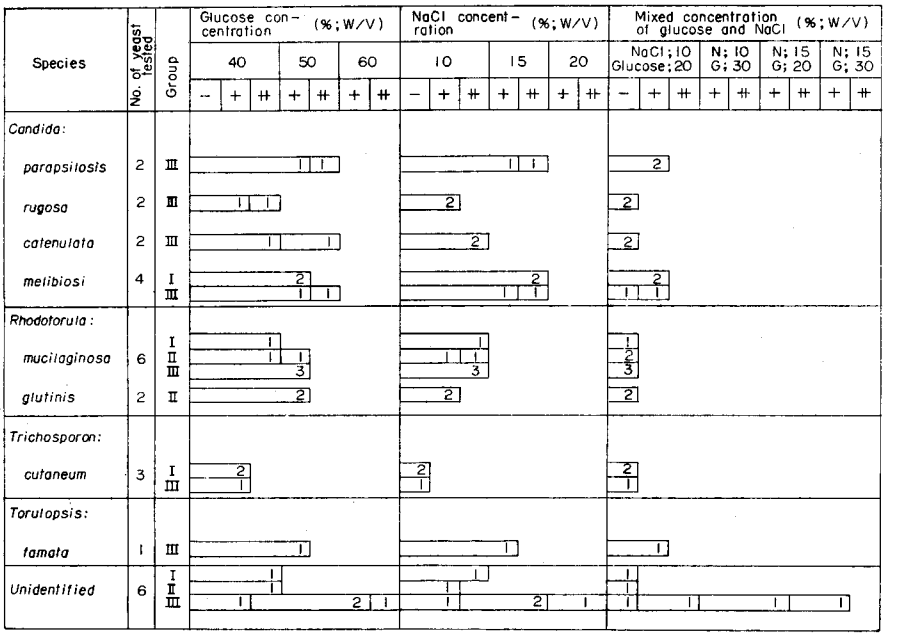

Fig. 2. Growth rate of asporogenous yeasts in various concentrations of glucose and salt

の培地では発育し得なかった。一方，有胞子酵母ではこれに反し上記の混合濃度で発育し得なかった酵母は *Saccharomyces exiguus* 1株のみで，その殆んどが食塩濃度 10%，グルコース濃度 30% の混合濃度においても発育し，中でも *Saccharomyces rouxii* は，食塩濃度 15%，グルコース濃度 30% のかなり高い浸透圧下においても発育可能であり，いわゆる"耐浸透圧性酵母"としての特性が見られる。また genus *Hansenula*, genus *Debaryomyces* に含まれる供試菌もかなり高い浸透圧下において発育し得るものが多い。このような結果から *Saccharomyces rouxii* や genus *Hansenula* および genus *Debaryomyces* に属する供試菌などは，かなり高い浸透圧を有する食品中においても発育増殖が可能で，このような環境中でその菌自体が本来の代謝活動を行なうとともに，これら食品の熟成に大きな影響を与えるであろうことがうかがえる。なほ，最近研究開発が盛んに行なわれている各種防腐剤に対する態度，或いは熟成初期から熟成後期に至るまでのフローラの変遷など，問題とすべき点は多々見られるが，これらの点については次の機会に報告する。

要　　約

函館市内の3カ所の百貨店よりそれぞれ類似した検体10検体宛，計30検体を購入し，それらの培養から140株の酵母を分離して食品の性状による酵母分布の偏在性を明らかにするとともに，各種糖濃度および食塩濃度に対する分離菌の発育度を検討し，次の結果を得た。

(1) 酵母の分布は，醗酵食品或いは塩蔵食品に広く認められ，ハム，ソーセージ類または乾燥食品などからは殆んど酵母は分離されなかった。

(2) *Saccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii* および *D. nicotianae* はいずれもある種の検体，すなわち調味噌，塩辛，もみじ子から共通に分離され，これらはこの種の食品に常在し，食品の熟成に極めて重要な影響を与えるものと思われる。

(3) 各種糖濃度および食塩濃度における発育態度については，分離菌は，いづれもかなりの高浸

透圧下において発育可能であったが，有胞子酵母は無胞子酵母よりも各種浸透圧に対する感受性が低く，いわゆる"耐浸透圧性酵母"或いは"耐塩性酵母"は有胞子酵母に多い傾向が認められた。

Key-1. Key to the species of yeast which are able to ferment a sugar

A. Glucose, galactose, sucrose, maltose and lactose are assimilated.
  a. A very slight fermentation of glucose and saccharose, occasionally also of galctose and maltose.
    KNO_3 is not assimilated.
      Cells are usually round to short-oval seldom oval, single or in pairs. A pseudomycelium is seldom formed. A dull and dry creeping pellicle is formed which is usually wrinkled.
        The spores are round with an oildrop in the middle.
        ..... *Debaryomyces hansenii* (ZIOF) nob. comb.
  b. A very weak fermentation of glucose and usually also of saccharose occurs. Seldom maltose is very weakly fermented.
    KNO_3 is not assimilated.
      Cells are round to oval, single or in pairs. Generally there is hardly any pseudomycelium. Occasionally a thin ring and a sediment are formed.
        The spores are round with an oildrop in the middle. Occasionally the spore wall may look warty.
        ..... *Debaryomyces subglobosus* (ZACH) nob. comb.
B. Gloucse, galactose, sucrose and maltose are assimilated.
  a. Glucose, galactose, sucrose and maltose are fermented.
    1/3 Raffinose is fermented.
      KNO_3 is assimilated.
        Cells are round to oval, multilateral budding. Psuedomycelium is well developed. Dry, dull creeping pellicle is formed on liquid media.
          Hat- or saturn-shaped ascospores are formed.
          ..... *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.
  b. Glucose, sucrose and maltose are fermented.
    1/3 Raffinose is fermented.
      KNO_3 is assimilated.
        Cells are round to oval, multilateral budding. Pseudomycelium is well developed.
          Hat-shaped ascospores are formed.
          ..... *Hansenula subpelliculosa* BEDFORD.
  c. Glcuose and sucrose are fermented. Galactose and matlose are variable.
    2/3 Raffinose is fermented.
      KNO_3 is not assimilated.
        Cells are round to short-oval, multilateral budding.
        Pseudomycelium is well developed.
          Spores not formed.
          ..... *Candida melibiosi* LODDER et VAN RIJ.
  d. Glucose and galactose are fermented.
      KNO_3 is not assimilated.
        Cells are round to oval. Pseudomycelium is well developed.
          Spores not formed.
          ..... *Candida parapsilosis* (ASHF.) LANGERON et TALICE.
  e. A slight fermentation of glucose occurs, often also of galactose, sucrose and maltose.
      KNO_3 is not assimilated.
        Cells are usually round, seldom oval, single, in paris. A dry, dull, creeping pellicle is formed which is wrinkled or smooth. Usually no pseudomycelium.

Sproes are round with an oildrop in the middle. They may look warty.
..... *Debaryomyces nicotianae* GIOVANNOZZI.

f. No fermentation or a very weak fermentation of glucose only or of glucose and saccharose.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are round to oval. Pellicle is not formed on malt extract or only after a very long time of incubation. Pseudomycelium is not formed.
Round and warty ascospores are formed.
..... *Debaryomyces kloeckeri* GUILLIERMOND et PËJU.
Spores not formed.
..... *Torulopsis famata* HARISON

C. Glucose, galactose and sucrose are assimilated.
Glucose, galactose and sucrose are fermented.
1/3 Raffinose is fermented.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are oval, single or in pairs. No pseudomycelium is formed.
Spore formation is a very difficult.
..... *Saccharomyces exiguus* HANSRN.

D. Glucose, galactose and maltose are assimilated.
Glucose and matlose are fermented.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are round to oval. Pseudomycelium is not formed.
Round ascospores are formed.
..... *Saccharomyces rouxii* BOUTROUX.

E. Glucose and galactose are assimilated.
Glucose and galactose are fermented.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are oval to cylindrical. Pseudomycelium is well developed.
Spore is not formed.
..... *Candida catenulata* DIDDENS et LODDER.

Key-2. Key to the species of yeast which are not able to ferment a sugar

A. Glucose, galactose, sucrose, maltose and lactose are assimilated.
KNO_3 is assimilated.
Cells are oval, multilateral budding. A primitive pseudomycelium consisting of tree-like formation is occasionally formed.
The color of streak culture is red to orange.
..... *Rhodotorula glutinis* (FRES.) HARRISON.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are oval to cylindrical. True mycelium is formed.
Arthrospore is formed.
..... *Trichosporon cutaneum* (DEBEURM., GOUGEROT et VAUCHER) OTA.

B. Glucose, galactose, sucrose and maltose are assimilated.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are short-oval to oval, multilateral budding. Generally no pseudomycelium; occasionally primitive development occures.
The color is red.
..... *Rhodotorula mucilaginosa* (JORG.) HARRISON.

C. Glucose and galactose are assimilated.
KNO_3 is not assimilated.
Cells are oval, long-oval or cylindrical. A pellicle is formed.

The pseudomycelium usually develops well on potato agar.
Spores not formed.
.... *Candida rugosa* (ANDERSON) DIDDENS et LODDER.

文 献

1) 信濃晴雄・坂井 稔 (1967). 北大水産彙報 **18**, 35.
2) Lodder, J. and Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). The yeasts. 713p. Amsterdam; North Holland Publishing Co.
3) 佐々木酉二・吉田 忠 (1966). 醗酵工学雑誌, **44**, 61.
4) ———・——— (1966). 同 誌 , **44**, 158.