

産膜酵母の発生防止法の開発

—各種産膜酵母の有機酸資化性の比較—

木村 英生・乙黒 親男

Technical Development for Prevention of Contamination with Film-Forming Yeast in Foods

— Comparative Studies on Assimilation Ability of Organic Acids with Film-Formation Yeasts Isolated from *Ume-zuke* —

Hideo KIMURA and Chikao OTOGURO

要 約

梅漬から分離した産膜酵母の有機酸資化性をより詳細に解明するため、炭素源欠培地（カーボンフリー培地）を用い、炭素源として有機酸（クエン酸）のみを添加し、各菌株の有機酸資化性を比較検討した。主要な産膜酵母である *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, 及び *Kloeckera* 属の酵母では、皮膜形成後、酸の減少及びpHの上昇が見られた。特に強い産膜性を示す菌株において、高い有機酸資化性を示す傾向があることが明らかとなった。

Abstract

For the detailed study of the assimilation of organic acids by film-forming yeasts isolated and purified from "Ume-zuke", salted ume processed product, we investigated assimilation ability of the yeast strains in the carbon-free media containing only citric acid as organic acid. After incubation, decrease of the acid content and pH rise were found for the main film-forming yeasts of genus, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, and *Kloeckera*. The yeast strains which showed strong film-formation, were exhibited strong assimilation of organic acid. This tendency between film-formation ability and assimilation ability of the acid was confirmed in the film-forming yeasts.

1. 緒 言

漬物類において、産膜酵母は乳酸を主とした有機酸を消費して酸度を下げ、腐敗を早めるとされている。有機酸の減少については幾つかの報告がある^{1)~4)}が、具体的な菌株について、資化性の傾向を調べた例はなかった。

我々はこれまで、梅漬から分離した酵母について、その梅酢液中の有機酸に対する資化の傾向を検討してきた。主要な産膜酵母である *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, 及び *Kloeckera* 属の酵母では、強い産膜性を示す菌株ほど酸の減少は著しく、高い有機酸資化性を示すことが明らかとなった。⁵⁾

本研究では、これらの酵母の有機酸資化性についてより詳細に検討するため、有機酸をクエン酸に限定し、他の炭素源を除いたカーボンフリー培地を用いた。pH及び塩濃度を数種設定し、各環境条件下での酸含量及びpH値の変化を測定することにより、各産膜酵母の有機酸資化性の傾向を比較検討した。

2. 実験方法

2-1 試料調製

数種のDifco Yeast Nitrogen Baseを用いて、炭素源欠培地の

作成を行った。また、対照としてDifco Yeast Carbon Baseを用いた培地を作成した。

有機酸として、クエン酸を1%添加した。食塩濃度は、0%、2.5%、あるいは5%とした。また、各培地についてpHを1.5~6.0（0.5毎の10段階）に調整した。調製した培地6種類をTable1に示した。

2-1-1 培地1-1

Yeast Carbon Base (1.17g) にクエン酸 (1.09g) を加え、蒸留水 90 ml に溶解させた。その後、10%NaOH及び10%HCl溶液を用いて目的のpHに調整し、蒸留水を加えて全量を100 mlとした。以上の方法で、pHの異なる10種類の培地（各100 ml）を調製した。

2-1-2 培地2-1

Yeast Nitrogen Base (0.67g) にクエン酸 (1.09g) を加え、蒸留水 90mlに溶解させた。その後2-1-1と同様に、10% NaOH及び10%HCl溶液を用いて、pHの異なる10種類の培地（各100 ml）を調製した。

2-1-3 培地3-1, 3-2, 3-3

Yeast Nitrogen Baseに対してアミノ酸のみを含有しない、Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (0.67g) に、クエン酸 (1.09g) 及び、NaCl (3-1:0g, 3-2:2.5g, 3-3:5g) を加え、蒸

Table1 Used media

No.	Composition
1-1	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate /Citric acids(1%)
2-1	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids /Citric acid(1%)
2-2	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids /Citric acid(1%) /NaCl(2.5%)
2-3	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids /Citric acid(1%) /NaCl(5%)
3-1	Yeast Nitrogen Base /Citric acid(1%)
4-1	Yeast Carbon Base /Citric acid(1%)
5-1	Ume-vinegar solution

留水90 mlに溶解させた。その後、10%NaOH及び10%HCl溶液を用いてpHの異なる10種類の培地（各100 ml）を調製した。

2-1-4 培地4-1

Yeast Nitrogen Baseに対してアミノ酸及び硫酸アンモニウムを含有しない、Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids and Ammonium Sulfate (0.17g) にクエン酸 (1.09g) を加え、蒸留水90 mlに溶解させた。その後、10%NaOH及び10%HCl溶液を用いて、pHの異なる10種類の培地（各100 ml）を調製した。

2-2 供試菌株

梅漬製造工程より分離した菌株10株を供試した。また、対照として標準菌株7株、ワイン酵母菌株3株を用いた。

以上の20菌株をTable2に示した。

2-3 有機酸の資化試験

上述した各培地に、YM液体培地を用いて前培養した各菌

Table2 Numbers and names of yeast strains

YITC No.	Yeast
266	<i>Kloeckera apiculata</i> (isolated from "Ume-zuke")
203	<i>Kloeckera apiculata</i> (isolated from "Ume-zuke")
204	<i>Pichia anomala</i> (isolated from "Ume-zuke")
256	<i>Pichia anomala</i> (isolated from "Ume-zuke")
241	<i>Pichia anomala</i> (isolated from "Ume-zuke")
223	<i>Pichia anomala</i> (isolated from "Ume-zuke")
213	<i>Candida guilliermondii</i> (isolated from "Ume-zuke")
222	<i>Candida guilliermondii</i> (isolated from "Ume-zuke")
215	<i>Debaryomyces hansenii</i> (isolated from "Ume-zuke")
225	<i>Debaryomyces hansenii</i> (isolated from "Ume-zuke")
001	<i>Debaryomyces hansenii</i> (RIFY 4196)
006	<i>Pichia anomala</i> (Hasenula anomala, JCM 3585)
009	<i>Saccharomyces fermentati</i> (WF107, <i>kluuyveromyces servazzii</i> , RIFY 2011)
010	<i>Saccharomyces servazzii</i> (JCM 5200)
015	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (RIFY YT05)
022	<i>Candida krusei</i> (RYFT YTa3)
037	<i>Pichia membranaefaciens</i> (<i>Candida mycoderma</i> , IFY 2024)
A3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IAM 4043)
A29	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OC-2, IAM 4272)
A52	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (W-3)

YITC: The Yamanashi Industrial Technology Center

RIFY: The Institute of Fermentation, Yamanashi University

IAM: Institute of Applied Microbiology, Tokyo University

JCM: Japan Collection of Microorganism, RIKEN

(the institute of Physical and Chemical Research)

株酵母を生菌数 10^6 CFU/mlになるように接種し、その後10~12日間、25℃で静置培養した。生育状況及び膜形成を観察した後、各条件下の培地のpH値及び酸含量を測定した。pH値は、pHメーター (HORIBA B-212) を用いて、また酸含量は中和滴定法によって求めた。

3. 結果及び考察

膜が良好に形成する培地を選ぶために、まず、Table1の培地1-1, 2-1, 3-1, 4-1を用いて、各菌株の培養を行った。

培養後、pHを測定した。その結果をFig.1に示した。培地1-1, 4-1では、いずれの菌株の場合も、培養前後でpHはほとんど変化せず、直線となっている。しかし、培地2-1, 3-1では、産膜性酵母を用いた場合、pHが大きく上昇した。これらは、いずれもpH 3.0の条件下から大きく変化した。非産膜性酵母では、培地2-1, 3-1も培地1-1, 4-1と同様にpHの変化をほとんど示さなかった。

このpH上昇の条件下では、膜形成が著しく、産膜性酵母による有機酸の消費がpHの上昇の原因であると考えられた。

培地2-1, 3-1と培地1-1, 4-1との違いは、窒素源となる硫酸アンモニウムの有無のみであり、硫酸アンモニウムを含有する培地2-1, 3-1で大きなpH変化を示した。このことから硫酸アンモニウムがこの産膜性酵母の有機酸の資化に大きく影響していることが明らかとなった。

培地2-1, 3-1の違いは、アミノ酸の有無であるが、ここでは大きなpHの差はなかった。各菌株の膜形成の状態から、培地3-1の方がわずかに良好な産膜性を示した。培地3-1について、培養後の酸含量の測定結果をFig.2に示す。図中には各属種の菌株の代表例を6種示した。

産膜性酵母では、膜形成が著しい条件下で相対値は低く、酸含量が減少した。一方、非産膜性酵母では相対値は全て1.0付近を示し、酸含量は培養前後でほとんど変化せず、膜形成も見られないことが明らかであった。

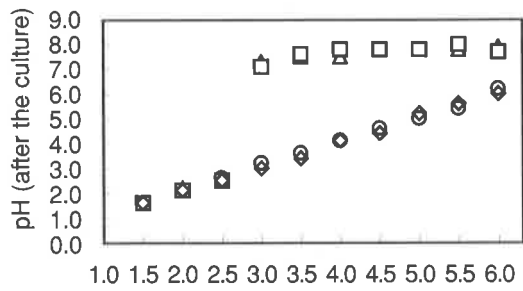
各条件下における各菌株の有機酸の減少度は、同一属種であれば、ほぼ同様な傾向を示した。また、属種の違いによる資化傾向の差異も見られた。

次に培地3-1 (NaCl:0%), 3-2 (NaCl:2.5%), 3-3 (NaCl:5%) を用いて、塩濃度の差による膜形成及び酸含量の減少度への影響を検討した。Fig.3に膜形成の強弱を示した。

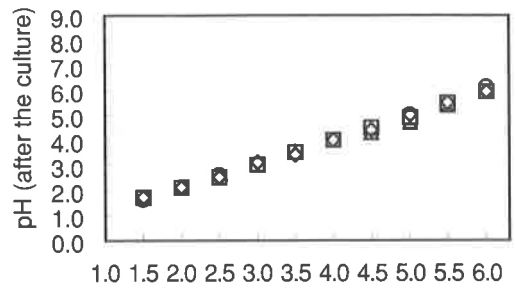
*Kl. apiculata*では、膜形成は全体的に微弱で、5%の条件下で最も微弱であった。

*P. anomala*では、pH 1.5~6.0まで良好な膜形成を示したが、塩濃度が高くなるに従って、高pH側から膜形成が抑制される傾向を示した。

*C. guilliermondii*では、pH 2.0~4.5で特に良好な膜形成を示した。塩濃度が高くなるほど低pH、高pH側で膜形成は、微弱になる傾向を示した。

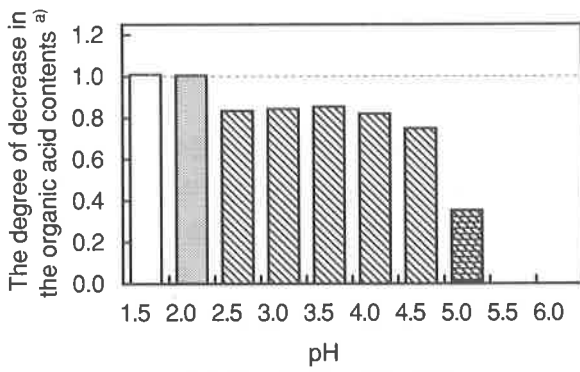


pH (before the culture)
(a)

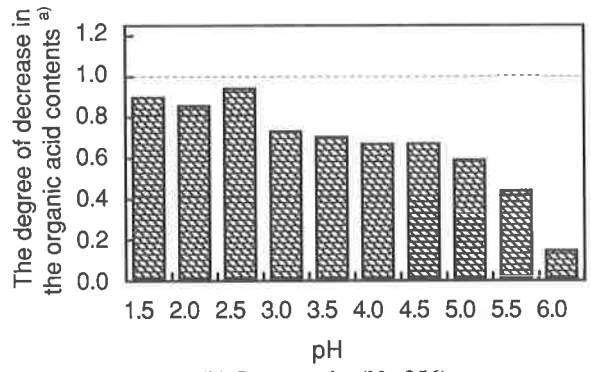


pH (before the culture)
(b)

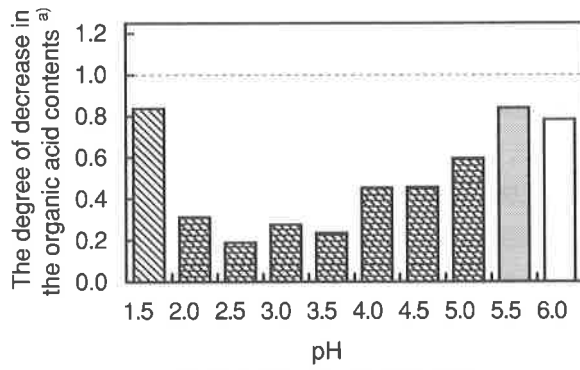
Fig.1 Changes of pH in the carbon-free media with various pH conditions. (a) Film-forming yeasts. (b) No film-forming yeasts. Yeast strains were inoculated into the media to 10^5 CFU/ml. After inoculation, these culture were incubated at 25°C for 12 days. ◇: Medium 1-1, □: Medium 2-1, △: Medium 3-1, ○: Medium 4-1.



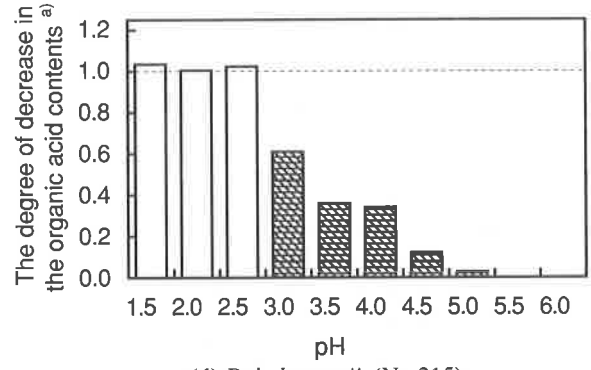
(a) *Kl. apiculata* (No.266)



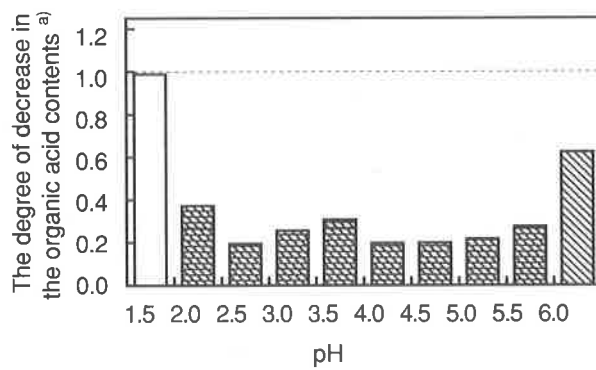
(b) *P. anomala* (No.256)



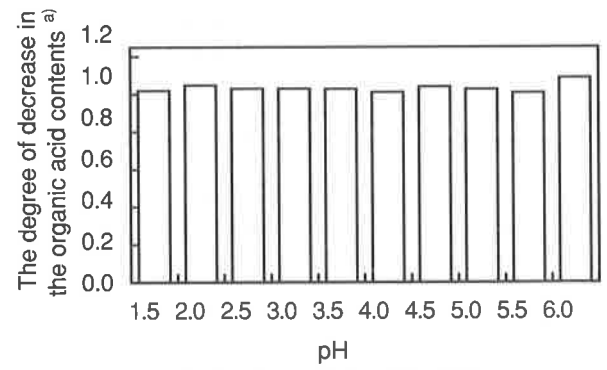
(c) *C. guilliermondii* (No.213)



(d) *Deb. hanseni* (No.215)



(e) *C. krusei* (No.022)



(f) *Sacch. cerevisiae* (No.A52)

Fig.2 The degree of decrease of the organic acid contents under the various pH conditions (Medium 3-1).

a) The ratio between the organic acid contents after and before the culture.

▨ ; Strong growth ▧ ; Good growth ▩ ; Weak growth □ ; No growth

*Deb. hansenii*では、pH3.0以上で良好な膜形成を示した。塩濃度による変化はほとんど見られず、pH 2.5以下では膜は形成されなかった。

*Sacch. cerevisiae*は3種の菌株を用いたが、いずれも膜形成は見られなかった。ワイン酵母A52 (W-3) は、有機酸生産能を示すが、今回の有機酸限定条件下では、その傾向は確認できなかった。

各属種によって膜形成の傾向は異なるが、膜形成が著しい条件下ではFig.2と同様に大幅な酸の減少が見られた。

4. 結 言

梅漬から分離した産膜酵母の有機酸に対する資化性をpH及び酸含量の変化で比較した。初期pH値及び塩含有量などの条件により、各菌株の資化性は異なり、各属種はそれぞれ独自の資化傾向を示すことが明らかとなった。また、産膜性が強いほど、高い資化性を示す傾向が認められた。

参考文献

- 1) 加藤司郎, 中瀬 崇: 日食工誌, 33, 659 (1986)
- 2) BROWN, C.W.J.: J. Bacteriol., 1, 104 (1916)
- 3) 小川敏男, 小畑正行, 鈴木 晋, 浅見利造, 青木陸夫: 東京都農業試験場報告, 3, 139 (1964)
- 4) 宮尾茂雄, 青木陸夫: 日食工誌, 26, 28 (1979)
- 5) 恩田 匠, 乙黒親男, 飯野修一, 後藤昭二: 日食工誌 44, 643 (1997)
- 6) 飯野修一, 渡辺正平, 春日徳彦, 後藤昭二: 醸協, 89, 557 (1994)

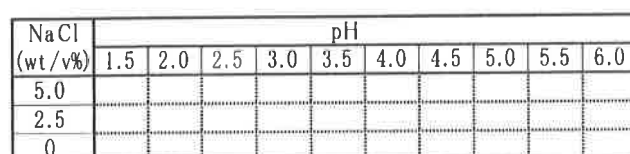
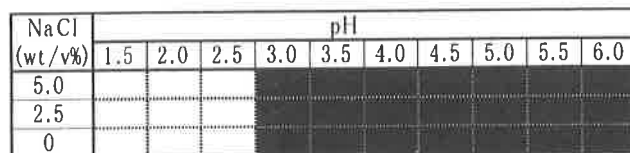
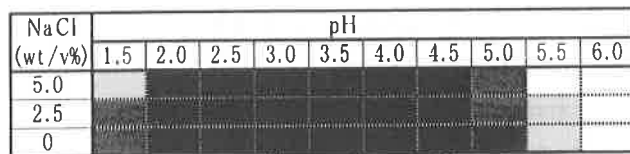
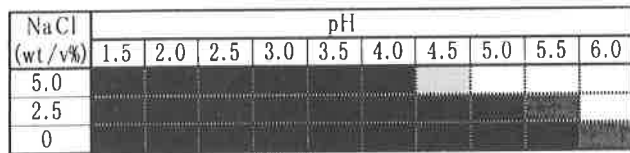
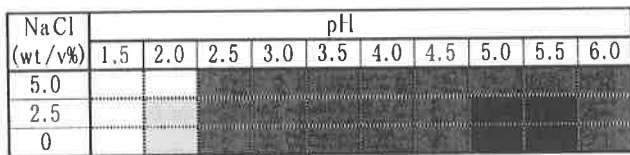


Fig. 3 Growth and film-formation of yeast strains at various pHs and concentrations of NaCl.

Yeast strains were inoculated into the media to 10^5 CFU/ml. After the inoculation, these culture were incubated at 25°C for 10 days.

Symbols: ■; strong growth ■; good growth
 ■; weak growth □; no growth