

産膜酵母の発生防止法の開発

—変敗した梅加工品から分離した産膜酵母の同定とその諸性状—

恩田 匠・乙黒 親男・飯野 修一・後藤 昭二*

Technical Development of Prevention of Contamination with Film-forming Yeast in Foods

—Identification and Characterization of Film-forming Yeasts

Isolated from Decomposing Ume-processed Products—

Takumi ONDA, Chikao OTOGURO, Shuichi IINO and Shoji GOTO*

要 約

各種食品において、産膜酵母による汚染、いわゆる産膜汚染の発生は深刻な問題であり、その防止法の開発が重要である。本報告では、梅加工品に焦点を絞り、その汚染産膜酵母について検討を行った。産膜酵母により汚染された梅加工品からの酵母の分離を行い、25株の酵母菌株を得た。分離酵母について、形態学および生理・生化学的同定試験を行った結果、*Debaryomyces*、*Torulasporea*、*Pichia*、*Kloeckera* および *Candida* 属の酵母であることが分かった。それらの分離酵母の中には、食塩濃度20%のYM培地に良好に生育可能な耐塩性を示す菌株やpH2.0の梅酢溶液に良好に生育可能な低pH耐性を有する菌株が存在した。

Summary

Because of potential importance of prevention of contamination with film-forming yeasts in various foods, we investigated about film-forming yeast in ume-processed product. Twenty five of yeast strains were isolated and purified from some decomposing ume-processed products. These strains were identified as being of genus, *Debaryomyces*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Kloeckera* and *Candida*. Some isolates could grow well on YM liquid media contained with 20% NaCl and grow well on 'Ume-zu', ume-vinegar adjusted at pH2.0.

1. 緒 言

各種の食品において、その製品中や製造工程の半製品に産膜汚染による汚染、いわゆる産膜汚染が発生し、しばしば問題となっている。近年、梅漬をはじめとする梅加工品は、消費者嗜好の変化などにより低塩化の傾向にあることから、産膜酵母による汚染の被害が多発する傾向にある。ワインなど他の発酵食品を汚染する産膜酵母¹⁻⁴⁾については、古くから詳細な検討がなされているが、梅漬を汚染する産膜酵母については、系統的な検討がほとんど行われてこなかった。特に、各食塩濃度が高く、高濃度の酸を含み、低pHの、微生物にとって過酷な生育条件にある梅漬に旺盛に生育する酵母は、その耐塩性および耐酸性などの生理学的な性状においても興味もたれた。

この梅加工品における産膜酵母による汚染防止法の確立

のためには、原因微生物である産膜酵母を特定することが必要であると考えた。そこで、梅加工品の製品および半製品からの産膜酵母の分離を行い、分離酵母の同定を行った。さらに、分離酵母の各種食塩濃度およびpHにおける生育試験を行い、その諸性状の解明を行った。

2. 実験材料および方法

2-1 酵母の分離用試料

産膜酵母が発生した梅加工品の製品および製造工程中の半製品を産膜酵母の分離用試料とした。試料は、山梨県内の梅加工品製造業社数社から収集した。

2-2 酵母の分離

分離用試料を生理食塩水に均一になるように懸濁し、その懸濁液の一白金耳量を5%食塩濃度にしたYM寒天培地(グルコース1%、バクトペプトン [Difco Lab] 0.5%、酵母エキス [Difco Lab] 0.3、麦芽エキス0.3%、寒天1.8%)

* 当センター客員研究員、山梨大学名誉教授。

を用いて作製した平板培地上に画線した。この平板培地を25℃で培養し、平板上に生育したコロニーを釣菌し、平板塗抹培養を3回から5回繰り返すことにより、純粋分離を行った。

2-3 供試菌株の培養および保存方法

純粋分離により得られた供試菌株の保存は、特記しない限り、5%食塩を添加したYM寒天培地（以下、食塩添加YM培地と略記）により作製した斜面培地を用いた。すなわち、斜面培地に供試菌株を一白金耳量接種し、25℃で3日間培養した。また、各種の実験の対照菌株として、*Saccharomyces cerevisiae* IAM4027, *Candida versatilis* RIFY2075, *Debaryomyces hansenii* RIFY4196, *Zygosaccharomyces rouxii* IAM12879および*Rhodotorula glutinis* RIFY4185を用いた。

全ての供試菌株は、培養液にグリセロールを25%になるように添加して、-80℃の超低温フリーザー（日立製作所製）を用いて保存した。また、比較的短期間の保存には、斜面培地を用いて得た菌体を4℃で放置した。

2-4 分離菌株の同定

分離した酵母菌株の同定試験は、‘酵母の分類同定法’などの成書^{5,6)}を参考にして、常法により以下の項目について調べた。得られた結果については、‘The Yeasts (第3版)’などの分類便覧^{7,8)}に照らし合わせて、菌種を決定した。この同定試験のための各種試験培地にも食塩を5%になるように添加し、25℃で培養した。

2-4-1 形態観察

栄養細胞、孢子および偽菌糸（または菌糸）の形態観察を行った。孢子形成は、供試菌をマクラリーの培地（酢酸ナトリウム0.82%, グルコース0.1%, 酵母エキス0.25%, 塩化カリウム0.05M, 硫酸マグネシウム0.0029M）を用いて培養し、メチレンブルー染色を行い、顕微鏡観察に供した。偽菌糸は、ポテトデキストロース寒天培地（栄研化学）を用いて作製したスライドカルチャーに得られた菌体を観察した。

2-4-2 グルコースの発酵性試験

ダーラム発酵管法により発酵性の有無を調べた。すなわち、試験培地（グルコース2%, イーストニトロゲンベース [Difco Lab.] 0.67%および食塩5%）を、ダーラム管を入れた小試験管に5ml分注し、110℃で15分間加圧滅菌したものに、一白金耳量の前培養菌体を接種し、25℃で14日間培養を行い、ダーラム管内のガスの発生の有無を観察した。

2-4-3 皮膜形成試験

食塩添加YM培地に一白金耳量の前培養菌体を接種し、25℃で7日間培養を行い、皮膜の形成状態を観察した。

2-4-4 ウレアーゼ試験

クリステンセンの培地（バクトペプトン [Difco Lab.] 0.1%, グルコース0.1%, リン酸二水素一カリウム0.2%, 寒天1.5%およびフェノールレッド0.012g/ml）にオートクレーブ滅菌後、尿素を20%になるように添加して固化させた斜面培地に供試菌株を接種、培養した。培養後、培地の色調変化を観察し、深紅色に変化した菌株をウレアーゼ陽性とした。

2-4-5 硝酸塩資化性試験

試験培地（イーストカーボンベース [Difco Lab.] 1.17%, 硝酸カリウム0.78%および寒天1.5）に供試菌の菌体を一白金耳量接種し、25℃7日間培養を行い、その生育を観察した。

2-4-6 シクロヘキシミド耐性試験

YM培地にシクロヘキシミド（和光純薬）を0.01および0.1%になるように添加して調製した食塩添加YM寒天平板培地を用いて、25℃で培養し、生育状態を観察した。

2-4-7 ユビキノンの判定

常法⁹⁾により供試菌のユビキノンの判定を行った。まず、食塩添加YM培地に供試菌の前培養液を1/10量接種し、25℃で72時間振盪培養（100strokes/min.）した。このとき培地には、ツイーン80を0.5mg/mlになるように添加した。培養終了後、遠心分離（7,000r.p.m., 15min.）により集菌し、蒸留水により洗浄した。ユビキノンの抽出は、YAMADAとKONDO¹⁰⁾の方法に準じて行った。すなわち、洗浄菌体約10g（湿重量）を50mlの蒸留水に懸濁し、水酸化ナトリウム20g, ピロガロール5gおよびメタノール150mlを順次添加して、90℃の温浴中で1時間環流操作することにより、けん化処理した。けん化処理後、氷水中で急冷し、ヘキサン抽出を行った。ヘキサン画分に残る水酸化ナトリウムは、水抽出により除去した。得られたヘキサン画分のヘキサンをエバポレーターにより留去させ、乾固物を少量のアセトンに融解して、ユビキノンの試料とした。このユビキノンの試料は逆層クロマトグラフィー（PR-18, F254S, MERCK）により、アセトン：水（95:5 v/v）を展開溶媒として展開させた。展開後、可視光の下で黄色を示し、紫外光の下で発色（黒色）の認められたスポットをユビキノンの試料とした。展開時には、供試菌株と同時にユビキノンの既知の標準菌株5株：CoQ6; *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4017, CoQ7; *Pichia anomala* JCM3585, CoQ8; *Saccharomycopsis fibuligera* JCM7609, CoQ9; *Debaryomyces hansenii* RIFY 4196, CoQ10; *Rhodotorula rubra* RIFY4164を同時に供試してそのユビキノンのスポットの相対移動度（Rf値）を比較することにより、ユビキノンの型を判定した。

2-5 各種食塩濃度における生育試験

本試験は、食塩濃度を0~20%に調整したYM培地（pH6.0）に一白金耳量の培養菌体を接種して、14日間の生

育状態を観察した。

2-6 各種pHにおける生育試験

本試験は、梅酢液を用いて行った。梅酢液は、加工適熟期にある梅果実（甲州小梅）20kgに対して、17%食塩（w/w）を添加して、1週間浸出した液をろ紙でろ過して得た梅酢（食塩15.94%、総酸3.77%、pH2.1）を2倍に希釈したものを用いた。この梅酢液のpHを2.0~5.0となるように水酸化ナトリウム溶液および塩酸溶液を用いて調整し、一白金耳量の培養菌体を接種して、14日間の生育状態を観察した。

3. 実験結果および考察

3-1 分離酵母の同定

同定試験により得られた形態学的諸性質から、類似したもののグルーピングを行い、YITC101, 102, 103, 105, 108, 110-2, 112, 114, 119, 123 および124を代表菌株とする11のグループに分別した（Table 1）。この各グループの菌株を生理・生化学的同定試験の結果（Table 2）とあわせ、The Yeastsの記載に基づき以下のように同定した。

(1) *Debaryomyces* 属：YITC119を代表株とするグループ

これらの菌株は、球形の子嚢胞子を形成し、硝酸塩資化陰性、ユビキノン型が9であることから、*Debaryomyces*

Table 1 Sporulation and Morphological Properties of Isolates

Strain	Asop spore	Cell	Pellicle*	Pseudomycel.
YITC101	round	oval	thin	primitive
YITC102	hat-sharped	oval-elong.	wrinked	tree-like
YITC103 ^{104,118}	hat-sharped	oval-elong.	smooth	tree-like
YITC105 ^{106,107}	ND ^b	oval-elong.	wrinked,	tree-like
YITC108 ^{109,110-1}	ND	oval	wrinked/thin	tree-like
YITC110-2 ¹¹¹	ND	lemon	thin	primitive
YITC112 ¹¹³	ND	oval	thin	primitive
YITC114 ^{115,116}	ND	round-oval	thin	primitive
YITC119 ^{119,120,121,122}	ND	round	smooth/wrinked	primitive
YITC123	ND	oval	thin pellicle	no/primitive
YITC124 ¹²⁴	ND	round	no/thin	no/primitive

a) on 5% NaCl media, b) Not detected.

Table 2 Bio-chemical Properties of Isolates

Strain	Fement of glucose	Assimil of KNO ₃	Growth in cycloheximide		Urease	CoQ
			0.01%	0.10%		
YITC101	+	-	-	-	-	6
YITC102	+	+	-	-	-	7
YITC103	-	-	-	-	+	7
YITC105	+	+	+	+	-	7
YITC108	+	-	-	-	-	7
YITC110-2	+	-	+	+	-	6
YITC112	+	-	-	-	-	9
YITC114	+	+	-	-	-	7
YITC119	+	-	-/SW	-	-	9
YITC123	-	-	-	-	-	9
YITC124	+	-	-	-	-	6

Table 3 Growth of Isolates at Various NaCl Concentration

Strain	% of NaCl						
	2.0	2.5	5.0	7.5	10	15	20
YITC101	1	2	2	—	—	—	—
YITC102	2f ^{a)}	2f	2f	2f	2f	1f	—
YITC103	2f	2f	2f	2f	2f	1	—
YITC105	2f	2f	3f	3f	1f	—	—
YITC108	2f	2f	2f	2f	1	—	—
YITC110-2	1f	1f	1f	1f	1f	—	—
YITC112	3f	3f	3f	2f	2f	1f	1f
YITC114	3f	3f	3f	3f	2f	2f	2f
YITC119	2	3	3	3	3f	3f	3f
YITC123	2f	2f	2f	2f	1f	1f	1f
YITC124	2f	3f	3f	3f	3f	3f	1f
<i>S. cerevisiae</i> ^{b)}	1	1	1	1	—	—	—
<i>Z. rouxii</i> ^{c)}	2	2	2	2	1	1	1
<i>C. versatilis</i> ^{d)}	2f	3f	3f	3f	3f	1	1

a) film formed,
b) *Saccharomyces cerevisiae* IAM4064,
c) *Zygosaccharomyces rouxii* IAM12879,
d) *Candida versatilis* RIFY4013.

Table 4 Growth of Isolates at Various pH

Strain	pH					
	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
YITC101	1	2	2	2	2	1
YITC102	1	1f ^{a)}	2f	3f	3f	3
YITC103	1	1f	2f	2f	2f	2f
YITC105	1	1f	1f	1f	1f	1f
YITC108	3f	3f	3f	3f	3f	3f
YITC110-2	1	1	1	1f	1f	1f
YITC112	3f	3f	3f	3f	3f	2f
YITC114	3f	3f	3f	3f	3f	3f
YITC119	1	1f	3f	3f	3f	3f
YITC123	3f	3f	3f	2f	1f	1f
YITC124	1	1	1f	1f	1f	1f
<i>S. cerevisiae</i> ^{b)}	—	±	±	±	±	±
<i>Z. rouxii</i> ^{c)}	—	—	—	—	±	±
<i>C. versatilis</i> ^{d)}	1	2	2f	2f	2f	2f

a) film formed,
b) *Saccharomyces cerevisiae* IAM4064,
c) *Zygosaccharomyces rouxii* IAM12879
d) *Candida versatilis* RIFY4013.

属の酵母であると同定した。

(2) *Torulaspora* 属：YITC101を代表株とするグループ

この菌株は、丸形の子嚢胞子を形成し、グルコースを発酵、硝酸塩資化陽性、ユビキノン型が6であることから、*Torulaspora* 属と同定した。

(3) *Pichia* 属：YITC102および103を代表株とするグループ

この菌株は、帽子形の子嚢胞子を形成、グルコースを発酵、硝酸塩資化陽性、ユビキノン型7であることから、*Pichia* 属と同定した。

(4) *Kloeckera* 属：YITC110-2を代表株とするグループ

これらの菌株は、レモン型の栄養細胞を示し、子嚢胞子の形成が認められず、グルコースを発酵、硝酸塩資化陰性、ユビキノン型が6であることから、*Kloeckera* 属と同定した。

(5) *Candida* 属

上記の菌種以外の菌株は、全て子嚢胞子を形成せず、YITC105および107を代表菌株とするグループのみがグルコースを発酵（他のグループは非発酵性）し、YITC105、YITC106、YITC107、YITC114、YITC115およびYITC116を代表菌株とするグループが硝酸塩資化陽性（他のグループは資化陰性）などの結果から、*Candida*属と同定した。

今後、糖の資化性および発酵性試験や染色体DNAのGC含量などの検討から、菌種レベルの同定が必要であると考えられた。いずれにしても、梅加工品を汚染する酵母として、上記のような多種の酵母群が存在することが明らかになった。

3-2 分離菌株の諸性状

3-2-1 各種食塩濃度における生育

本試験の結果をTable 3に示した。YITC101、YITC102およびYITC110-2を代表菌株とするグループの4株は、5~10%の食塩濃度で生育が悪くなり、非耐塩性を示した。その他の11株は、15%以上の食塩濃度で良好な生育を示し、耐塩性の性質を示した。特に、YITC114、119および124を代表株とするグループの9株は、耐塩性酵母*Z.rouxii* IAM 12879や*Candida versatilis* RIFY4013と比較しても著しい耐塩性を示した。

3-2-2 各種pHにおける生育

本試験の結果をTable 4に示した。対照菌株として用いた3株は、pH3.0以下では生育が弱くなっが、分離菌株の多くはpH3.0以下でも良好な生育を示した。特に、YITC108、112、114および123を代表菌株としたグループは、pH2.0でも良好な生育を示し、かつ強い産膜性を示した。

以上のことから、今回の研究で得られた分離株の中には、強い耐塩性および低pH耐性を示す菌株が多く含まれており、これらの株は高い食塩濃度および高濃度で酸を含み低pH下の特殊な条件にある梅加工品の製造工程や製品中に旺盛に生育が可能であることが示唆された。また特に実験データは示さないが、梅漬塩蔵工程の初期から分離される

酵母は、非耐塩性を示し、塩蔵後期または製品から分離された菌株は、耐塩性および低pH耐性を示す菌株が多かった。特に*Candida* sp.YITC114を代表株とするグループは、著しい耐塩性と低pH耐性を合わせ持つ特異的な菌株であることが分かり、これらの菌株の耐塩性・低pH耐性を示す生理機構については、生化学的な見地からも興味深く、今後詳細な諸性状の解明が望まれる。

4. 結 言

産膜汚染の発生した梅加工品からの産膜酵母の分離および同定を行い、5属25株の酵母を得た。また、それらの酵母菌株の中には、高い耐塩性および耐酸性を示す菌株が存在することが明らかになった。今後は、分離菌株の詳細な同定試験による菌種の確定、諸条件の解明、さらに産膜汚染の発生機構の解明を行う必要がある。

参考文献

- 1) 後藤昭二：発工，37，85（1959）
- 2) 後藤昭二：発工，37，390（1959）
- 3) 後藤昭二：発工，37，412（1959）
- 4) 渡辺正平・飯野修一・後藤昭二：醸協，77，923（1982）
- 5) 飯塚 廣・後藤昭二：酵母の分類同定法（第三版），東京大学出版会（東京）（1984）
- 6) 長谷川武治編：微生物の分類と同定，学会出版センター（東京）（1984）
- 7) KREGER-VAN RIJ N.J.W. : The yeast, a taxonomic study (3rd ed.), Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1984)
- 8) BERNETT, J.A., PAYNE R.W. and YARROW, D. : Yeasts, characteristics and identification, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1983)
- 9) 駒形和男編：微生物の化学分類実験法，学会出版センター（東京）（1982）
- 10) YAMADA, A. and KONDO, K : J. Gen. Appl. Microbiol., 19, 189 (1981)