パン酵母の分類に関する研究 (第2報)*

形態学的性質及び一般的生理的性質について

山口辰良, 古屋 晃 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 33 年 9 月 5 日 受理

緒 言

前報⁽¹²⁾に於て内外 12 か国のパン酵母及びパン酵母と称して保存されている菌株合計 85 の試料より, *S. cerevisiae* に属するパン酵母菌株 79 株を分離し, それ等菌株の同定に用いられた菌学的諸性質につき記載した. その際菌株により *Pseudomycel* を形成する傾向・細胞の大きさ・胞子形成力等に可成りの差異が存在し, 実用菌株間にもこの差異が存在することを観察したので, 其等菌株間の分類に使用すべき更に一層明確なる特徴を究明する為酵母の基礎的性質の研究に一般に行われる所のその他の形態学的性質及び一般的生理的性質について詳細に比較検討した.

一般に酵母菌種の分類に関する研究は, Stelling-Dekker⁽⁹⁾, Lodder⁽²⁾, Diddens and Lodder⁽¹⁾, Mrak and Phaff⁽⁴⁾, Wickerham^(10,11), Lodder and Kreger-van Rij⁽⁸⁾ 等多数により試みられているが, 同一菌種内に於ける菌株間の分類に関する研究は比較的少く, Schultz 等^(6,8,7,9)による研究もあるが主としてその実用的性質によっている感がある. 著者等は *S. cerevisiae* 内に属するパン酵母菌株間に更に基礎的諸性質により細分類すべく以下の実験を行い, 二三の知見を得たのでそれ等につき報告する.

実 験

I. 形態学的性質

1) 巨大集落 (写真 1 参照): ゼラチン 14% を含む Ballg 10° 麦汁ゼラチンに菌を接種し 21°, 1 か月後に於ける集落の状貌を観察した結果, 之等パン酵母菌株の巨大の集落は以下の如く大別された.

1. **Smooth type**: 表面及び辺縁は共に平滑であり, 褶を有しないが少数の浅い放射状或は同心円状の褶を有する.

a. 中位の大きさの集落 (直径 12~14 mm) で中心やや隆起……(11), 14 a, 16 a, 17, 22, 25, 26, 34, 35 a, 310, 41, 42, 48, 49, 410, 51 b, 52 a, 53 b, 54, 55 d, 56, 57, 58 a, 59, 510 a, 61, 62, 63 a, 64, 101, 102, 103, 104, (107), 1010, 111

日本のパン酵母始め, 各国実用パン酵母の大部分は之に属する.

b. 小さい集落 (直径 9~10 mm) で中心堪た隆起し放射状に少数のやや深い褶を有する……(15 b), (16 b), (79), (710), (81), (82), (83), (85), (108)

保存株及び同じ試料より分離された小型集落の菌株が之に属する.

2. **Intermediate type**: Smooth type と Rough type との中間に位置し, 辺縁は平滑乃至それに近いが表面に放射状或は同心円状の褶を有する.

a. 主として同心円状の褶を有する……15 a, 21, 24 a, 28, (210), 31, 36, 37, 39, (74), (76)

b. 主として放射状の溝を有する……(13), 23, (29), (77), (87), (88), (810)

c. 中央隆起し放射状の溝を有する小集落……(46), (47 a), (89)

此の type には米国・西独・デンマークの市販酵母より分離した菌株の一部と保存株が含まれる.

3. **Rough type**: 表面が rough で辺縁は irregular, 多数の放射状或は同心円状の褶を有する.

a. 大きな集落 (直径 18 mm 以上)……(12), 18, 19, 110, (27), (71), (72 a), (75), (84), (86), 105

b. 中位の集落 (直径 12~14 mm)……(24 b), (45)

c. 極く小さい集落 (直径 3 mm)……(47 d)

此の type には米国の Fleischmann 研究所及び Anheuser-Busch 研究所より送られた菌株及び保存株が

* Studies on the Classification of Baker's Yeast. Part II. Macromorphological Characters and General Physiological Characters.

By Tatsuro YAMAGUCHI and Akira FURUYA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

(Rough type)

(Intermediate type)

(Smooth type)

写真 1 実用菌株の巨大集落

含まれる。

2) 麦汁寒天斜面集落 : 常法通り 17°, 1 か月後に於ける集落の状貌を観察した結果は次の如くに分類せられた。

1. **Smooth type** : 表面及び辺縁共に平滑である。

a. クリーム色……(11), 36, 37, (74), (76), (77), (85), (108)

b. 白クリーム色……その他全菌株。但し 18, 19, 110, 28 は斜面集落底部に微かに褶を有し, (89) は生育が他に比し一段劣る。

2. **Intermediate** : 集落の辺縁部は smooth であるが中央部に明瞭なる褶を有する。

(Rough type) 但し 19 を除く

(Intermediate type)

(Smooth type)

写真 2 実用菌株の Malt ex.-Yeast ex. agar に於ける集菌 (20°, 2 週間)

a. クリーム色……(13), (24 b), (45), (46)

b. 灰クリーム色……(72 a)

3. **Rough type** : 多数の不規則なる褶を有する……(12), (27), (47 a), (71), (75)

3) 麦汁エキス-酵母エキス寒天斜面培養に於ける集落 : 麦汁ゼラチンと麦汁寒天に於ける集落の状貌を比較すると、麦汁寒天斜面に於ては麦汁ゼラチン培地に於て現われた各菌株の特徴が押えられており、特に実用菌株で明瞭に rough type 乃至 intermediate type に属した菌株が何れも smooth type となり、僅かに 36, 37 が smooth type であるが、クリーム色が強いという点で差があるのみである。此の為各菌株の colony type を決定するには麦汁ゼラチンの集落を観察せねばならず非常に不便であるので、ゼラチンを含まない斜面寒天培地で実用菌株が最もその特徴を示すような培地及び培養条件を検討した。その結果麦汁エキス-酵母エキス寒天斜面培地 (malt ex. 3 g, yeast ex. 3 g, ペプトン 5 g, グルコース 10 g, agar 20 g, aqua dist. 1000 ml) に於て 20°, 2 週間培養すると可成り菌株の特徴が現われることが分った。本培地に於ける各菌株の状貌を記載すると次の如くである (写真 2 参照)。

1. **Smooth type** : 表面及び辺縁共に平滑であり大部分の菌株は之に属する。但し (89) は生育悪く、36, (72 a) は集落がやや茶味を帯び、19 は辺縁のみやや褶が出来ており、310, 55 d, 58 a, 510 a, 61, 64, 101, 111 は集落中央部に微かに褶を有する。

2. **Intermediate type** : 何れも辺縁は smooth であるが、28, 37 は細かな褶を有し、23, (29), (210), 39, (810) は集落の中央部が rough, (45) は多数の扇形の sectors を有する如き集落を示した。37 の集落はやや茶味を有する。

3. **Rough type** :

a. 不規則に褶を有する……(12), (13), (24 b), (27), (71), (75), (77), (88)

b. 主として横の褶を有する……18, 110, (86), 105

c. a, b の中間……(76), 24 a

麦汁ゼラチンの巨大集落には劣るが麦汁寒天斜面に比し遙かに菌株の特徴が表われていることが分る。麦汁ゼラチンで rough type に属した実用菌株である 19 は本培地に於ては smooth type であるが、集落の辺縁に出来始めている褶は rough type b に記載されている横の褶と全く同一傾向を示していた。従って実用菌株で麦汁ゼラチンで rough type あった菌株は本培地に於ても同一傾向を示すことが分る。又実用菌株で麦汁ゼラチンにて intermediate type に属した菌株中、23, 24 a, 28, 37, 39 は同じく intermediate 又は rough type に属するが 15 a, 21, 31, 36 は smooth type に属した。

第 1 表 各菌株の 15° (3 days) 及び 40° (2 days) に於ける発育 (G) 及び醗酵 (F)

菌株 番号	15°		40°		菌株 番号	15°		40°		菌株 番号	15°		40°		菌株 番号	15°		40°	
	G	F	G	F		G	F	G	F		G	F	G	F		G	F	G	F
(11)	+	—	±	—	28	+	+	±	—	53b	+	±	—	—	(81)	±	—	—	—
(12)	+	+	+	±	(29)	+	+	—	—	54	+	±	—	—	(82)	—	—	—	—
(13)	+	+	+	—	(210)	+	±	—	—	55d	+	+	—	—	(83)	±	—	—	—
14a	+	+	+	—	31	+	—	±	—	56	+	+	—	—	(84)	±	±	—	—
15a	+	+	+	±	34	+	+	—	—	57	+	+	—	—	(85)	±	—	—	—
(15b)	+	—	+	+	35a	+	±	+	—	58a	+	—	—	—	(86)	+	+	—	—
16a	+	—	+	—	36	+	—	—	—	59	+	+	—	—	(87)	+	—	—	—
(16b)	+	—	+	—	37	+	+	+	—	510a	+	+	—	—	(88)	+	—	—	—
17	+	+	+	+	39	+	+	—	—	61	+	—	—	—	(89)	±	—	—	—
18	+	+	+	—	310	+	+	—	—	62	+	—	—	—	(810)	+	+	—	—
19	+	+	+	—	41	+	+	±	—	63a	+	+	—	—	101	+	—	±	—
110	+	+	+	—	42	+	—	—	—	64	+	—	—	—	102	+	+	±	—
21	+	+	+	+	(45)	—	—	—	—	(71)	+	+	—	—	103	+	+	—	—
22	+	+	+	—	(46)	—	—	—	—	(72a)	—	—	—	—	104	+	+	—	—
23	+	+	±	—	(47a)	±	—	—	—	(74)	+	+	—	—	105	+	+	—	—
24a	+	+	+	—	48	+	±	—	—	(75)	+	—	—	—	(107)	+	+	—	—
(24b)	+	—	—	—	49	+	+	—	—	(76)	+	+	—	—	(108)	+	+	±	—
25	+	+	+	—	410	+	±	—	—	(77)	+	—	—	—	1010	+	+	±	—
26	+	+	—	—	51b	+	—	±	—	(79)	+	+	—	—	111	+	±	±	—
(27)	+	+	—	—	52a	+	+	—	—	(710)	+	±	—	—					

II. 一般的生理的性質

1) 最適温度 : Bllg 10° の麦汁に之等パン酵母菌株を接種し, 3°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45° にて培養し, 肉眼的に濁濁及び沈澱量によって生育の良否, 炭酸ガスの発生の有無を観察した. その結果何れの菌株も最適温度は 25~30° であった. 又大部分の菌株は 2 日目には 20~35° に於て発育・醗酵共に旺盛であったが, 一部の保存株即ち (72a) は 35° に於て発育が見られず, (46), (47a), (82), (83) は 20° に於て微しか発育が観察されなかった. 15°, 3 日目及び 40°, 2 日目に於ける各菌株の発育の差は最も顕著に現われたのでそれ等を第 1 表に示した. 猶 3° 及び 45°, 1 週間に於ては何れの菌株も発育しなかった.

2) 最適 pH : 麦汁に乳酸及び枸橼酸ソーダを加えて種々な pH の溶液を作り, 之に各菌株を接種し 30° に放置し, 同様に肉眼的にその濁濁及び沈澱量によって生育の良否及び炭酸ガス発生の有無を検討した. pH 測定は Beckmann の pH メーターを使用し, 滅菌後の pH が 2.6, 3.0, 3.5, 4.0, 4.3, 4.9, 5.3, 5.7, 6.2, 6.5, 6.7 の溶液を用いた. その結果各菌株共最適 pH は 4.0~5.5 の間にあり, 最低発育 pH は 3.0, 一週間目には 2.6 でもやや発育するが醗酵せず, 各菌株共大体同様な傾向を示した.

3) 耐糖性 : 市販砂糖を 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% 夫れぞれ添加した Bllg 10° 麦汁に各菌株を接種して生育に対する高濃度砂糖の影響を観察した. 観察は 7 日間に亘って行ったが 2 日目に於ける酵母の生育を記載すると

10%迄 (46)	60%迄	その他の菌株
30 " (47a)	70 "	(15b), 21, 28, 31, 37, 41, 410, 56, 61, 63a, (74), (79), (710), (85), 101, 102, 105, 1010, 111
40 " (11)		
50 " 22, (24b), 26, (45), (72a), (77), (82)	80 "	49, (87), (810)

大部分の菌株は 60% 砂糖添加培地迄生育したが, 一部保存株は比較的少量の砂糖添加により非常に生育を阻害された.

4) エタノールの利用性 : Wickerham の方法⁽¹⁰⁾に従ってエタノールを唯一の炭素源とする完全合成培地に菌を接種して静置培養を行い, エタノールの利用性を検討した. この結果培養 3, 4 日目に於ては各菌株共殆ど生育が見られないが, 後徐々に生育し始め第 2 表に示す如く 12 日目頃に菌株毎による生育の差が最も顕著に現れた.

5) その他の性質 : esculin 又は arbutin を 0.5% 及び少量の FeCl₃ を含む酵母エキス寒天に各菌株を接種し, それ等の分解を観察したが, 各菌株共 esculin を分解し arbutin を分解しなかった. 耐滲透圧性は 5%.

第2表 エタノールの利用性 (25°, 12 days)

(11)	(+)	23	(+)	39	(-)	55d	(-)	(76)	+	101	(-)
(12)	(+)	24a	+	310	(+)	56	(-)	(77)	+	102	+
(13)	+	(24b)	(+)	41	(-)	57	(+)	(79)	(+)	103	(-)
14a	(-)	25	+	42	(+)	58a	(+)	(710)	+	104	(-)
15a	(-)	26	+	(45)	-	59	(+)	(81)	-	105	+
(15b)	-	(27)	(+)	(46)	-	510a	(-)	(82)	(-)	(107)	(+)
16a	(+)	28	+	(47a)	-	61	(+)	(83)	-	(108)	+
(16b)	(+)	(29)	+	48	(+)	62	(+)	(84)	+	1010	(+)
17	(+)	(210)	(+)	49	(+)	63a	(+)	(85)	(-)	111	(-)
18	+	31	(-)	410	(+)	64	(+)	(86)	+		
19	+	34	(-)	51b	(-)	(71)	+	(87)	+		
110	+	35a	(-)	52a	(-)	(72a)	-	(88)	+		
21	(-)	36	(-)	53b	(+)	(74)	+	(89)	-		
22	(+)	37	+	54	(-)	(75)	+	(810)	+		

10% 食塩を含む培地に植えて試験したが、一部保存株を除き何れも同様に 5% 食塩で僅かな生育を示し、10% では不生育であった。その他澱粉の生成は何れの菌株も一、milk に於ける生育は各菌株による差異は見られなかった。

考 察 及 び 要 約

以上パン酵母菌株を基礎的性質により細かく分類する為の key となるべき性質を検討すべく、肉眼的形態学的性質及び一般的生理的性質を観察した。その中で実用菌株間に最も顕著なる差異が観察されたのは麦汁ゼラチンに於ける巨大集落である。一般にパン酵母の巨大集落は smooth type であるとせられ、事実日本始め諸外国パン酵母菌株の大部分は smooth type であるが、予想に反して相当褶を有する intermediate type が多く、就中米国の Fleischmann 研究所より "These are typical of good baker's yeast cultures now in use in this country but do not correspond exactly with the current Fleischmann yeast culture" として送られた三菌株及び Anheuser-Busch 中央研究所より "a culture of the baker's yeast used in our yeast plant" という名称で送られた一菌株は全く rough type に属し、之等菌株は日本では良く知られていない実用菌株であるので非常に興味深い。之等の巨大集落に於ける菌株の特徴は培地及び培養条件を適当に選択すれば可成り斜面培養に於ても観察されるが、例えば rough type の 19, intermediate type の 15 a, 21, 31, 36 は smooth type という具合に菌株の特徴を充分現わさない場合もある。従って逆にそれ等集落の肉眼的形態観察を組合せることにより実用菌株間を可成り細かく分類し得る訳である。

一般的性質の中ではエタノールの利用性及び生育に対する耐糖性に可成りの差異が観察されたが、之等の性質は分類を行う際の補正的性質として使用し得ると思われる。

摺筆するに当り終始御懇篤なる御指導を賜りました坂口名誉教授、飯塚助教授に心から御礼申し上げます。猶本研究は昭和 32 年 2 月 23 日、日本農芸化学会関東支部第 171 回講演会に於て発表した。

- (1) H. A. Diddens, J. Lodder : Die anasko-sporogenen Hefen, II Hälfte (1942).
- (2) J. Lodder : Die anaskosporogenen Hefen, I. Hälfte (1934).
- (3) J. Lodder, N. J. W. Kreger-van Rij : The yeasts, a taxonomic study (1952).
- (4) E. M. Mrak, H. J. Phaff : *Ann. Rev. Microbiol.*, 2, 1~46 (1948).
- (5) A. S. Schultz, L. Atkin : *Arch. Biochem.*, 14, 369 (1947).
- (6) A. S. Schultz, D. K. McManus : *ibid.*, 25, 401 (1950).
- (7) A. S. Schultz, D. K. McManus, S. Pomper : *ibid.*, 22, 412 (1949).
- (8) A. S. Schultz, S. Pomper : *ibid.*, 19, 184 (1948).
- (9) N. M. Stelling-Dekker : Die Sporogenen Hefen (1931).
- (10) L. J. Wickerham : *U. S. Dept. Agric. Tech. Bull.*, No. 1029, 1~56 (1951).
- (11) L. J. Wickerham : *Ann. Rev. Microbiol.*, 6, 317~332 (1952).
- (12) 山口辰良, 古屋 晃 : 本誌, 33, 406(1959).