果実飲料の微生物に関する研究 (第2報)

市販みかん果実飲料から分離した酵母の同定

(昭和 53 年 5 月 15 日受理)

小 島 満 子^{*1} 駒 形 和 男^{*2} 倉 田 浩^{*1}

Microbiological Studies on Fruit Juice (II)

Determination of Yeasts Isolated from Commercial Orange Juice

Michiko KOBATAKE^{*1}, Kazuo KOMAGATA^{*2} and Hiroshi KURATA^{*1}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo;

^{*2}Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo: Bunkyo-ku, Tokyo)

The yeasts isolated from 24 samples of commercial orange juice were studied taxonomically. The following 72 strains were identified as the members of 9 different genera: *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder (13 strains), *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner (10 strains), *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner (9 strains), *Cryptococcus infirmus* (Okunuki) Phaff et Fell (9 strains), *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison (4 strains), *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij (3 strains), *Trichosporon cutaneum* (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota (3 strains), *Candida sake* (Saito et Ota) van Uden et Buckley (3 strains), *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison (2 strains), *Trichosporon pullulans* (Lindener) Diddens et Lodder (2 strains), *Trichosporon variabile* (Lindner) Delitsch (2 strains), *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice (2 strains), *Candida diddensii* (Phaff, Mrak et Williams) Fell et Meyer (1 strain), *Candida intermedia* (Cifferri et Ashford) Langeron et Guerra (1 strain), *Candida freyschussii* Buckley et van Uden (1 strain), *Candida santamariae* Montrocher (1 strain), *Candida valida* (Leberle) van Uden et Buckley (1 strain), *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Klöcker) Janke (1 strain), *Hansenula anomala* (Hansen) H. et P. Sydow (1 strain), *Pichia etchellsii* Kreger-van Rij (1 strain), *Cephaloscypha fragrans* Hanawa (1 strain) and *Candida* sp. (1 strain).

(Received May 15, 1978)

紙容器に詰められた市販みかん果実飲料は酵母、糸状菌、細菌などの微生物によって、かなり汚染されており、酵母がその微生物分布の主位を占めていることを前報¹⁾で報告した。これらの酵母は *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Kloeckera*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Cephaloscypha* の9属であった。本報においては、これら分離酵母の同定の詳細について報告する。

実験方法

1. 供試菌株

市販みかん果実飲料 24 試料から分離した 72 株の酵母を用いた。分離方法は前報¹⁾に記載した。 *Cephaloscypha fragrans*²⁾ については別に報告したので省略する。

2. 同定実験

酵母の同定は "The Yeasts, A Taxonomic Study"³⁾ および、「微生物の分類と同定」⁴⁾ に記載されている方法に準拠した。

細胞形態および産膜性は 2% グルコース-イースト・エキストラクト-ペプトン (G.Y.P. と略記) 水, 25° 3 日培養で観察し、偽菌糸菌糸の形態はコーンミール寒天

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 東京大学応用微生物研究所: 東京都文京区弥生 1-1-1

Table 2. Physiological Characteristics of Yeasts Isolated from Orange Juice (2). Assimilation of Carbon Compounds

Species	Number of isolates																																
<i>Cr. albidus</i>	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Cr. infirmo-minutius</i>	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Cr. laurentii</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>R. glutinis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. minuta</i>	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. rubra</i>	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. cutaneum</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. pullulans</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. variabile</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. anomala</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>D. hansenii</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. etchellsii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. apiculata</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. diddensii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freyschussii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. intermedia</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. sake</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. santamariae</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. varida</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida</i> sp.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative; V, variable; L, latent; W, weak. ^{a)} Sometimes latent or weak; ^{b)} Sometimes negative

Table 2. Physiological Characteristics of Yeasts Isolated from Orange Juice (2). Assimilation of Carbon Compounds

Species	Number of isolates																																
<i>Cr. albidus</i>	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cr. infirmo-minutius</i>	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cr. laurentii</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. glutinis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. minuta</i>	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. rubra</i>	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. cutaneum</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. pullulans</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. variabile</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. anomala</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>D. hansenii</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. etchellsii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. apiculata</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. diddensii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freyschussii</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. intermedia</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. sake</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. santamariae</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. varida</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida</i> sp.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative; V, variable; L, latent; W, weak. ^{a)} Sometimes latent or weak; ^{b)} Sometimes negative

るなど Phaff ら⁹⁾の記載と一致した。Phaff らは、本菌種を上記の性質により、現在一応 *Cryptococcus* に分類しているが、Lodder の成書³⁾では将来、別の属に移されることが示唆されている。

- 3) *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner
0-72-H-2 他9株

分離株は標準記載によく一致した。

- 4) *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison
0-68-Y-4 他1株

発育にビタミンを要求せず、硝酸カリウムを強く同化し、テクトース、メリピオース、エリスリトールを同化しない本株は、*R. glutinis var glutinis* に分類されるが、*Cryptococcus* の場合と同様な理由から単に *R. glutinis* にとどめた。

- 5) *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison
0-99-Y-1 他3株

分離株は Phaff ら⁹⁾の記載によく一致した。

- 6) *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder
0-63-Y-1 他12株

分離株は Phaff ら⁹⁾の記載によく一致した。

- 7) *Trichosporon cutaneum* (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota
0-79-H-2 他2株

G.Y.P. 寒天斜面、1か月、25° 培養の分離株は湿潤粘稠性で、部分的にしわのある様相を呈し、Dalmau plate 培養では、多くの真正菌糸、分裂胞子が観察される。尿素を加水分解し、デンプン類似物質を生成し、発育の際にチアミンを要求する。糖の同化性も do Carmo-Sousa¹⁰⁾ の記載と一致した。

- 8) *Trichosporon pullulans* (Lindner) Diddens et Lodder
0-68-Y-9 他1株

分離株は真正菌糸、分裂胞子を形成する。硝酸カリウムを同化し、油脂を分解する。ビタミンの要求性がなく、糖の同化性も do Carmo-Sousa¹⁰⁾ の記載と一致した。

- 9) *Trichosporon variabile* (Lindner) Delitsch
0-75-P-1 他1株

分離株は真正菌糸、分裂胞子を形成し、軸に垂直な側枝が観察されるが、3か月培養後においても子のう胞子は観察されないで、*Endomycopsis* の不完全世代である *Tr. variabile* に同定した。発酵性、尿素の加水分解、デンプン類似物質の生成はいずれも陰性であり、糖の同化性は、ラフィノースを除いては Kreger-van Rij¹¹⁾ の記載と一致した。

- 10) *Hansenula anomala* (Hansen) H. et P. Sydow
0-75-H-8

分離株は光沢がなく、山高帽子形胞子を有し、発育の際ビタミンを要求しない。シュクロースを発酵し、ラ

フィノースをよく同化することなどから Wickerham¹²⁾ の記載した *H. anomala var anomala* と一致した。

- 11) *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij
0-75-H-2 他2株

表面が、いぼ状の球形子のう胞子を形成する。分離株の菌学的性状は Kreger-van Rij¹³⁾ の記載とよく一致した。

- 12) *Pichia etchellsii* Kreger-van Rij
0-75-H-6

球形の子のう胞子を形成し、Dalmau plate 培養では、未発達な偽菌糸を形成する。Kreger-van Rij¹⁴⁾ の記載と一致した。

- 13) *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Klöcker) Janke
0-72-P-1-a

両極性出芽分裂により増殖し、硝酸カリウムを同化しない。分離株は Phaff¹⁵⁾ の記載と一致した。

- 14) *Candida diddensii* (Phaff, Mrak et Williams) Fell et Meyer
0-75-H-4

Dalmau plate 培養では、二つのタイプの偽菌糸が観察された。すなわち、カーブ状の枝分かれした偽菌糸の先端に球形の細胞がみられるタイプと、芽出胞子を伴った *Mycotorula* 形の偽菌糸である。生理、生化学的性状も van Uden¹⁶⁾ らの記載と一致した。

- 15) *Candida freyschussii* Buckley et van Uden
0-75-H-7

細胞および偽菌糸の形態、ならびに生理、生化学的性状は van Uden ら¹⁶⁾の記載とほぼ一致した。分離株はチアミンとピオチンを要求する。

- 16) *Candida intermedia* (Ciferri et Ashford) Langeron et Guerra
0-67-Y-2

分離株は標準記載とほぼ一致した。

- 17) *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice
0-67-Y-4 他1株

分離株は標準記載とほぼ一致した。ただしシュクロースとマルトースを発酵し、サリシンを同化する。発育のためにビタミンを必要としない。

- 18) *Candida sake* (Saito et Ota) van Uden et Buckley
0-79-Y-1 他2株

分離株は標準記載と一致した。

- 19) *Candida santamariae* Montrocher
0-72-Y-2

G.Y.P. 水、3日培養の細胞は、だ円または長だ円で、Dalmau plate 培養では同筒形の連鎖した偽菌糸を形成

する。生理, 生化学的性状も標準記載と一致した。分離株は発育のためにピオチンを要求する。

20) *Candida valida* (Leberle) van Uden et Buckley

0-72-Y-1

分離株の細胞および偽菌糸の形態, ならびに生理, 生化学的性状は標準記載と一致した。

21) *Candida* sp.

0-79-P-1

“The Yeasts, A Taxonomic Study”³⁾において, 硝酸カリウムを同化する *Candida* は20種類記載されているが, 分離株の菌学的性状は, これらのいずれとも一致しなかった。さらに研究を行う予定であるが, 本報では *Candida* sp. にとどめておく。

要 約

市販みかん果実飲料より分離した72株の酵母を9属22種に同定し, 分類学的研究を行った結果, 下記のようになった。

<i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) Skinner	9
<i>Cryptococcus infirmo-miniatus</i> (Okunuki) Phaff et Fell	9
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) Skinner	10
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fres.) Harrison	2
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	4
<i>Rhodotorula rubra</i> (Demme) Lodder	13
<i>Trichosporon cutaneum</i> (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota	3
<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Diddens et Lodder	2
<i>Trichosporon variabile</i> (Lindner) Delitsch	2
<i>Hansenula anomala</i> (Hansen) H. et P. Sydow	1
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij	3
<i>Pichia etchellsii</i> Kreger-van Rij	1
<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke	1
<i>Candida diddensii</i> (Phaff, Mrak et Williams) Fell et Meyer	1
<i>Candida freyschussii</i> Buckley et van Uden	1
<i>Candida intermedia</i> (Ciferri et Ashford) Langeron et Guerra	1
<i>Candida papasilis</i> (Ashford) Langeron et Talice	2
<i>Candida sake</i> (Saito et Ota) van Uden et Buckley	3
<i>Candida santamariae</i> Montrocher	1

Candida valida (Leberle) van Uden et

Buckley 1

Candida sp. 1

Cephaloscyus fragrans Hanawa 1

謝 辞

終わりに, 御指導, 御助言をいただいた山梨大学工学部発酵化学研究施設の後藤昭二博士および東京大学医科学研究所真菌室の吉村建治氏に深謝致します。

文 献

- 1) 小島満子, 倉田 浩, 駒形和男: 食衛誌. **19**, 417 (1978).
- 2) 宇田川俊一, 小島満子, 吉村建治: 日菌報. **18**, 399 (1977).
- 3) Lodder, J. ed.: “The Yeasts, A Taxonomic Study”, (1970), 2nd ed., North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- 4) 後藤昭二: “酵母の分類と同定”; 長谷川武治編著, “微生物の分類と同定”, p. 67 (1975) 東京大学出版会.
- 5) 駒形和男, 中瀬 崇: 食衛誌. **8**, 53 (1967).
- 6) Phaff, H.J., Fell, J.W.: “Genus *Cryptococcus* Kützing, In “The Yeasts, A Taxonomic Study” p. 1088 (1970), 2nd ed., Lodder, J., North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- 7) 中瀬 崇, 後藤昭二, 小山洋之介, 駒形和男, 飯塚 広: 食衛誌. **18**, 353 (1977).
- 8) Ahearn, D.G.: “Genus *Cryptococcus* Kützing, In “The Yeasts, A Taxonomic Study” p. 1115 (1970), 2nd ed., Lodder, J., North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- 9) Phaff, H.J., Ahearn, D.G.: Genus *Rhodotorula* Harrison, *ibid.*, p. 1194.
- 10) do Carmo-Sousa, L.: Genus *Trichosporon* Behrend, *ibid.*, p. 1309.
- 11) Kreger-van Rij, N.J.W.: Genus *Endomycopsis* Dekker, *ibid.*, p. 166.
- 12) Wickerham, L.J.: Genus *Hansenula* H. et P. Sydow, *ibid.*, p. 245.
- 13) Kreger-van Rij, N.J.W.: Genus *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij, *ibid.*, p. 129.
- 14) Kreger-van Rij, N.J.W.: Genus *Pichia* Hansen, *ibid.*, p. 455.
- 15) Phaff, H.J.: Genus *Kloeckera* Janke, *ibid.*, p. 1150.
- 16) van Uden, N., Buckley, H.: Genus *Candida* Berkhout., *ibid.*, p. 893.