

耐塩性酵母について (第4報)

奈良漬材料とその製造工程中における微生物の動態

山縣 敬*・藤田藤樹夫*・持田 恭*

Studies on NaCl-tolerance Yeasts (4)

The Change in Microflora during the Manufacturing Process of Narazuke

Kei YAMAGATA, Tokio FUJITA, and Kyo MOTIDA

Synopsis

The authors set up these studies in order to determine the amount of NaCl-tolerance yeasts in several manufacturing processes of Narazuke containing large quantities of NaCl. Many strains of NaCl-tolerance yeasts were isolated from Sake mashes, salt-pickles, pickles melon (Katura Sirouri) and soil, using a selective medium containing 0.2% Na-propionate.

The results obtained were as follows;

- 1) NaCl-tolerance yeasts showed a larger population number than bacteria and moulds in pickle melon.
- 2) Fermentation of glucose and maltose in NaCl (2–10%) containing medium were clearly positive as compared with NaCl free medium.
- 3) Growth temperature of Halotolerant yeast Sy-F-13 strain in NaCl containing medium was thought to be affected by changing NaCl concentration (0, 5, 10, 15%) in medium. Consequently, optimum temperature for growth of Halotolerant yeast Sy-F-13 strain was changed 30°C to 25°C in NaCl containing medium.
- 4) The ratio of intracellular Na⁺ to extracellular Na⁺ concentration increased in proportion to the decrease of Na⁺ concentration.
- 5) Na⁺ influx-content of Halotolerant yeast and Halophobic yeast was decreased by extracellular K⁺ concentration.
- 6) The ratio of intracellular K⁺ to Na⁺ increased by high concentration of K⁺ of extracellular concentration.

I 緒 言

著者らは昭和43年より醤油、溜、味噌等の諸味より耐塩性酵母を分離同定し、更に奈良漬工程中の諸味からも分離しそれらの菌株を塩耐性より4型式¹⁾に分類した。これらの分離酵母は殆んど野生酵母に属し、Pseudomyceliumを形成しない特徴よりTorulopsis属酵母で栄養細胞は比較的小形なるにつれ耐塩性が大なることを認た。同じTorulopsis属の酵母でも栄養細胞が5μ~7μ以上になると塩耐性の劣る傾向を示した。耐塩性酵母(4型式)の食塩添加培

地中でのgrowth responses又、高食塩濃度におけるエネルギー代謝、特に呼吸酵素系についてのCytochrome pattern並びに食塩添加培地中における耐塩性株のNa⁺ Transportについては醸酵工学雑誌²⁾、日本醸酵工学会大会^{3,4,5)}、近畿大学農学部紀要^{6,7,8)}にすでに報告した。好塩酵母に関する研究は国内では野田産研の大西⁹⁾を始め大阪府大の大亦¹⁰⁾、愛知県食品工試の好井ら¹¹⁾の報告があり最近では大阪市大の高田¹²⁾はCandida pelliculosa KY 11の菌株を用いて食塩高張下での成長に対してはトリメチル

*農芸化学科応用微生物学研究室 (Lab. of Applied Microbiology, Dept. of Agricultural Chemistry, Kinki Univ., Higashi-Osaka, Osaka 577, Japan)

アミンの効果が大なる事を報告している。又、徳島工試の富田¹³⁾は耐浸透圧性酵母(Osmo-tolerance yeasts)に関する研究で赤色辛口味噌より*Saccharomyces rouxii* K122菌株を分離し、この菌株は30°C、NaCl 0~18%において生育可能で4%において最大の発育を認めた。又馴化により22~24% NaCl 添加培地中でも発育可能なことを報告しており、又富田・福永¹⁴⁾は同菌株を用いてNaClの対温度保護作用について興味ある報告をしている。欧文雑誌でも最近の研究ではBRULNE and STEVENINCK¹⁵⁾は酵母細胞のL-xyloseに対する透過性に関してdimethylsulfoxideが関与されL-xyloseのmedium添加量40%においてその濃度平衡は70~85%で達せられることを報告している。又NORKRANS and KYLIN¹⁶⁾らは酵母の耐塩性の関係でK, Naの関係について²²Na-²⁴Naと⁴²K-⁸⁶Rbの同位元素ペアを用いてNaとKのuptakeとretentionについてsalt-tolerant *Debaryomyces hansenii*とNaCl耐性の低い*Saccharomyces cerevisiae*を用いて検討を加えNa:Kは培地中より細胞内により高い値を*Debaryomyces hansenii*について認め2菌種間のこの差は*Debaryomyces hansenii*においてK uptakeがより良いことに起因しion-TransportのKineticsについて更に検討を加えている。その他にSCARR and ROSE¹⁷⁾、WINDISH¹⁸⁾らの報告があり又、酵母細胞膜のNaイオン濃度とNaの取り込みとの関係に関する最近の報告はDEE and CONWAY¹⁹⁾の報告がある。

著者らは昨年(1972年)の6月上旬に阪急食品奈良漬製造工場と調味食品会社の製品中に灰白色のカ

ビ状の出現より菌の分離依頼を受け、撰択培地を用いて分離検討したところ耐塩性の*Torulopsis*属菌種であることを確認した。これらの菌株の特徴として通常の有孢子酵母(真正酵母)よりも培養温度が比較的高温なる為、夏季に出現されたものと考えられそのほかの食品類にもおそらく広く出現されており、その対策にせまられている食品工場の多いことが予想される。そこでこれらの分離菌株の由来を調査するために昨年6月から10月にかけて畑地土壌、白瓜、塩漬加工工程、下漬から上漬、製品に至る醸造工程中の微生物の動態と分離された菌株の特徴として食塩存在下のglucoseの酸酵性、生育温度、高食塩、高糖濃度(耐浸透圧)条件における栄養細胞の動態を染色法で追跡すると共に膜透過のNa⁻influxにおけるKの関連性について知見を得たので発表する。

この報文の一部は1972年11月14日好塩微生物研究会²⁰⁾(第八回)講演で発表したものである。

II 実験方法

分離試料

1. 粕漬醪 試料は粕漬製造工程中の醪即ち上揚漬(A)、上漬(B)、中漬(C)、下漬(D)の4種を用いその醪50g及び材料瓜50gをそれぞれ殺菌水500mlにfill upしあらかじめ殺菌したミキサーにて5分間粉砕し試料とした。

2. 塩瓜 1972年6月徳島県板野郡藍住町の瓜栽培農家での地下塩漬貯蔵タンクより塩漬中の白瓜(E2)と現地での塩漬加工終了後、奈良漬製造工

Table 1. Composition of isolated medium.

Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5
Grind pickle 50 g	Malt extract agar	Malt extract agar	Malt extract agar	Distil. water 1000 ml
Sake-mash 50 g (by sake-mash of each process)				Peptone 10 g
Distilled water 400 ml	Balling 10 ^o	Balling 10 ^o	Balling 8 ^o	Yeast extract 4 g
Extraction with 50 ^o C at 2 hrs. Filter	Agar 2%	Agar 2%	Agar 2%	Glucose 3 g
Fill up 1000 ml	Na-propionate 0.2%		Eurocidine 3/10 ⁶ (final conc.)	NaCl 10 g
Add glucose 40 g	pH 5.0	pH 5.0	pH 6.8 - 7.0	CaCO ₃ 2 g
NaCl 10 g				Agar 20 g
Agar 20 g				pH 6.8 - 7.0
pH 4.8 - 5.0				Eurocidine 3/10 ⁶ (final conc.)
Na-propionate 2 g				

場へ輸送後の塩瓜(E1)の2種について実施した。

3. 畑地土壤及び白瓜 上記畑地土壤の表面にはあらかじめ保温と土壤中の瓜病原菌防除の為黒色ビニールを敷き、瓜苗を移植してあるため瓜と土壤とは隔離されている。そこで畑地土壤(G)の採集について地表から10~15cmについて実施した。白瓜は径10~15cm、長さ25~30cmの未熟成で組織のかたい瓜(F)を用い、その表皮より中心部にむかって50gの試料をとり上記の如く粉碎して用いた。

分離培地

分離培地はTable 1に示す如く Selective mediaを調整し一般細菌類、酸化細菌及び糸状菌類、酵母菌類をそれぞれ異った培地に撰択的に分離培養した。酵母の分離には糸状菌、細菌類の発育阻止のため撰択薬剤として0.2% Na-propionate (最終濃度)を添加し、細菌類、酸化細菌の分離にはEurocidine 0.003% (pH 1の溶液にて溶解)を添加した。粕漬醪より酵母の分離にはmedium 1を用いた。尚、試料中には相当量の食塩が含まれているので食塩が1%に満たないものについては食塩を添加し、最終濃度を5~10%とした。畑地土壤、及び白瓜より酵母の分離にはmedium 2を用い、カビ類はmedium 3を用いた。又、一般細菌類はmedium 4、酸化細菌の分離培地をmedium 5としpH6.8~7.0で実施した。

糖類醱酵試験

可検糖類としてglucose, sucrose, maltose, galactose, raffinose, lactoseの6種を用い試験培地はyeast extract 0.45%, peptone 0.75%, これに培地が濃緑色となるまでbromothymolblueを加え実施した。培地中の食塩濃度は常法の如く食塩無添加を対称とし、更に食塩濃度2%, 高食塩濃度10%における醱酵性についてDurham醱酵管並びにV字管で確認した。先ず試験培地に2mlを醱酵管(外管150×12mm, 内管50×6mm)に入れ殺菌後1mlの6%糖液(raffinoseのみ12%)を添加する。これに麦芽汁斜面寒天上で24時間前培養した酵母殺菌水4.5mlに 10^8 cells/mlとなる如く懸濁したもの0.1mlを接種した。28℃に保ち1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20および24日後、管を振盪して内管中のガス蓄積量または指示薬の色の変化で確認した。

生活細胞及び死滅細胞の染色判別

先ず染色液として0.02% methylen blue 100mlにリン酸緩衝液(0.2N $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0.25\text{ml} : 0.2\text{N KH}_2\text{PO}_4 \cdot 99.75\text{ml}$) 100mlを混合、0.01%溶液(pH5.0

~5.5)として使用した。染色液をあらかじめカバーガラス上に滴下し約 $\frac{1}{2}$ 量の菌体を取り良く混和する。これをスライドガラス上にふせた後余分の液を濾紙で吸いとり鏡検する。染色時間は3~5分までとし死滅細胞は青色に、生活細胞は染色されない。なお別にクロロホルム蒸気にさらして死滅させた同一酵母菌体についても同様の染色を行い染色されることを確認して試験酵母と鏡検対比した。

Na-Transport

1 供試菌株

Halotolerant type……*Torulopsis etchellsii* (Sy-F-3), Halophobic type……*Saccharomyces cerevisiae* (S-A-2)を供試菌株としglucose-peptone-yeast extract基本培地を用い、pH4.8~5.0に調整し500ml肩付コルベンに80mlづつ分注して24時間振盪培養後の菌体を10ml接種した。Na-influxの試験には30℃で72時間培養後の菌体を使用した。

2 Na^+ , K^+ の測定方法

前報⁸⁾より細胞内へのNa, Kの取り込みについては特に記載なき場合は、乾燥菌体1gに相当する菌体を蒸溜水にて1回洗浄し、蒸溜水2mlを含む高濃度懸濁液を用いBraunのmechanical homogenizerで5分間菌体を破碎し、4000 r. p. m. 10分遠心分離して得られた上澄液中の Na^+ , K^+ 濃度を細胞内 Na^+ , K^+ 濃度とみなし、細胞外 Na^+ , K^+ 濃度はmediumを直接日本ジャーレルアシュ社製AA-70型原子吸光器を用いて測定した。

呼吸活性

呼吸活性は柳本自記呼吸酸素測定装置PO-100型を用い、反応セル3ml中にM/15リン酸緩衝液(pH5.0)に懸濁した菌体1ml, 基質1/10M glucose 2mlを加え30℃にて測定した。

III 実験結果及び考察

原素材の由来について

奈良漬は低食塩濃度(2~5%)で短期間漬込んだ即席漬や浅漬と異なり長期間貯蔵出来る二次加工漬物である。その工程には塩漬加工工程、粕漬工程があり原料瓜から製品に至る醸造期間は14~15ヶ月を限度としている。Plate 1の1は徳島県板野郡監住町における奈良漬原料瓜即ち、白瓜(柱白瓜)の栽培写真である。収穫は毎年6~7月に行われ組織の堅い未熟成の瓜である。Plate 1の2はその白瓜でありPlate 1の3の如く収穫当日瓜をたて割にし

内容物を除去し1昼夜20%食塩水にて浸漬した後Plate 1の4の塩漬加工に入る。塩漬は現地農家での地下コンクリート槽にて食塩濃度24~25%で3~6ヶ月間貯蔵する。その間、瓜細胞液の脱水と食塩の細胞肉への浸透がおこなわれ、脱水作用により原形質の分離現象を起こし細胞は死滅し瓜の組織は或る程度柔軟になり一定の固さを保持する。塩漬された瓜は粕漬工程即ち下漬から順次上揚漬へと移動し脱塩される。これとは逆に醪(即ち酒粕6:味淋粕4)は上揚漬から下漬へと移動しその間、粕中の化学的組成は微生物等による酵素作用により特有な奈良漬となる。

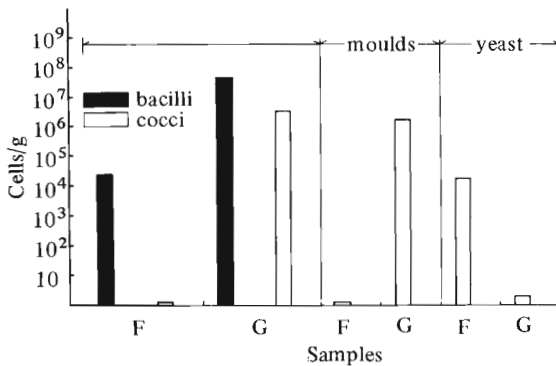


Fig. 1. Microflora in the soil and pickle melon.

Microflora

白瓜栽培においては他のイチゴビニール促成栽培と同様畑地土壤と白瓜とは黒色塩化ビニールによって断遮されている。ブドウや他の果樹類の果皮に生育する微生物は土壤から直接由来されるが白瓜においては畑地土壤より由来する微生物の頻度は他の果

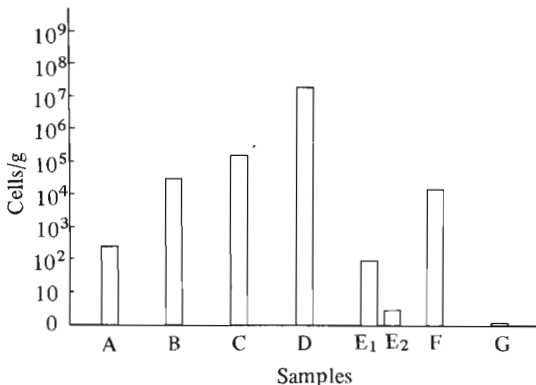


Fig. 2. Yeast flora in each processes.

樹と比べ低い事が予想される。そこで先ず畑地土壤と瓜(桂白瓜)のmicrofloraについて検討した。その結果をFig. 1に示した。Fは瓜でありGは畑地土壤である。分離菌株は桿菌(bacilli)、球菌(cocci)、カビ類(moulds)、酵母菌類(yeast)の4種に区別した。畑地土壤(G)における桿菌及び球菌は $10^6 \sim 10^8$ cells/g、カビ類の 10^6 cells/gであり酵母の1~2 cells/g. に比べいちじるしく多い。瓜(F)ではこれとは逆に球菌、カビ類が急激な減少を示した。しかし乍ら酵母菌類においては畑地土壤から瓜になるにつれ 10^4 cells/gと急激な増加現象を示し桂白瓜には酵母菌類が生育可能な環境となることがわかった。

Yeasts flora

畑地土壤(G)から桂白瓜(F)、塩漬(E)更に粕漬工程(D—下漬, C—中漬, B—上漬, A—上揚漬)に至る各工程におけるyeasts floraをFig. 2に示した。即ちGからFに従いその数も急激に増加しEでは食塩により淘汰され食塩耐性の比較的高い株のみ生存するものと思われる。E₂は現地での塩漬でありE₁は現地より粕漬工場へ移動し保存中の瓜である。即ち、E₁に於ては工場内の耐塩性酵母菌類が天井、容器、空気中等より混入したものと思われE₂に比し増加を示した。塩漬後の瓜は次の粕漬工程Dに移動する。即ちこの工程には食塩耐性の高い酵母菌類が多く原料瓜、塩漬から由来するものと、上揚漬から粕の移動に伴い耐性の高いものが存在するものと思われる。A工程では酒粕味淋粕から由来する食塩耐性の低い酵母菌類が多く、中間B、Cの工程ではA、D工程の両方、更に粕漬原料瓜の漬け替え中に混入する酵母菌類等で属、種共に多種多様の結果を得た。

酸酵性糖類の酸酵試験

酵母の同定には生理的特徴として先ず酸酵性糖類の酸酵能が同定のKeyとなっているFamily Cryptococaceaeの或るgenusのspeciesの菌株では全く糖類を酸酵しないものもあり、glucose fermentationが1つの指標になっている。一般にはFamily Endomycetaceaeではglucoseの酸酵は程ほどの菌株でも認められ、lactose fermentationが認められないspeciesの菌株が多い。糖類酸酵試験では一般にはpeptone, yeast extract, test sugarの組成で試験され、食塩無添加で実施されるのが通常である。Wild yeastのように食塩に対して多様性のgrowth responsesを示す菌株では糖類酸酵試験に食塩の存在の有無が必要と考えられ、食塩無添加の培地と食塩低濃度(2%)

Table 2. Fermentation Tests.

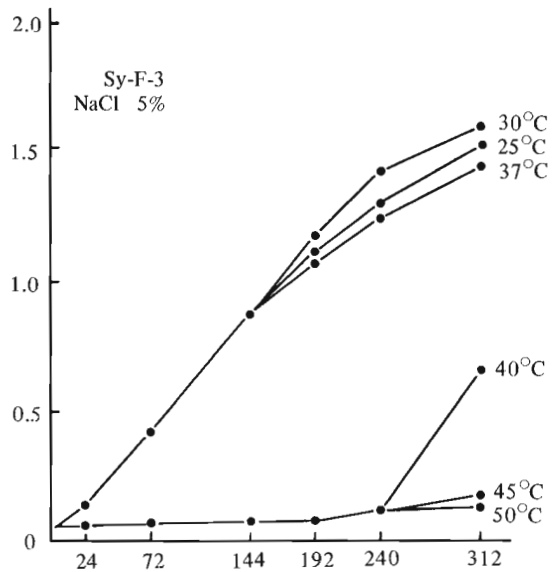
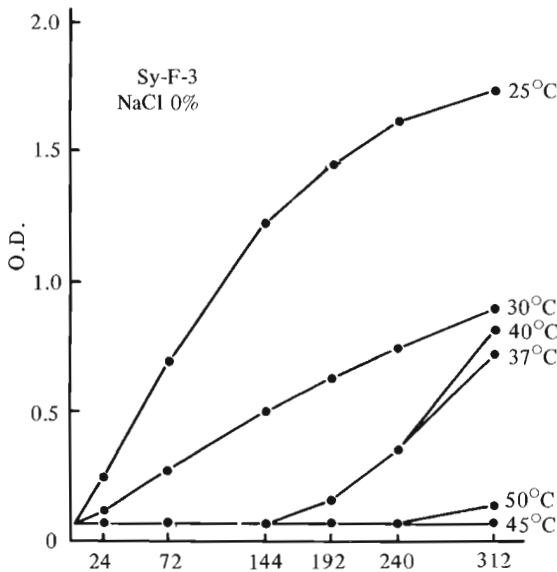
Strain No.	Sy-F-6	Sy-F-8	Sy-F-3	Sy-F-13	Sy-F-5	Sy-F-116	Sy-F-4	Sy-F-2	SA-2
% NaCl	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10	non, 2 10
Glucose	W W +	W W +	W + +	W + +	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
Sucrose	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ - -	+ - -	+ + +
Maltose	- - +	- - +	+ + +	+ + +	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
Galactose	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +
Raffinose	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +
Lactose	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

添加，及び10%濃度の培地で耐性株の醗酵性を検討した。使用菌株は粕漬，醬油諸味より分離した食塩耐性株，Halotolerant type yeasts (Sy-F-6, Sy-F-8, Sy-F-3, Sy-F-13) 4 菌株，Low-halotolerant type yeasts (Sy-F-5, Sy-F-116) 2 菌株，Halophilic type yeasts (Sy-E-4, Sy-F-2) 2 菌株とHalophobic type yeasts (S-A-2) の計9 菌株を用いた。Table 2はその実験結果であり食塩耐性の高いHalotolerant type yeastsの4 菌株ではglucose, maltoseの醗酵性は食塩無添加での醗酵能よりもむしろ食塩添加培地2%~10%添加することにより醗酵性が明らかにpositiveの結果を認めた。塩耐性の低いLow-Halotolerant type yeasts, Halophilic type yeasts, Halophobic type yeastsの3 typeの菌株では食塩の存在の有無にかかわらず同一の結果を得た。Family

Cryptococaceae特にWild yeastの糖類醗酵試験では食塩存在いかんによってspeciesの変わるおそれがあるので酵母の同定には糖類醗酵試験に食塩の存在が必要なる事を強調する。

生育温度

真正酵母の生育温度はカビ類の30℃，細菌類の通常30℃~37℃(高温細菌では37℃以上)に比し20℃~25℃と低い。著者らの分離株はOmnivorous, salt-tolerantで生育温度は25℃~30℃と高いのが特徴である。Fig. 3は食塩耐性の高いHalotolerant type yeasts Sy-F-13菌株の食塩無添加と食塩濃度5%，10%，15%培地における結果で生育温度は25℃，30℃，35℃，37℃，40℃，45℃，50℃である。食塩無添加培地における生育温度は25℃がOptimum temp.であり30℃以上の発育は劣る。しかし乍らNaCl 5%添加培地



cultivation time (hrs.)

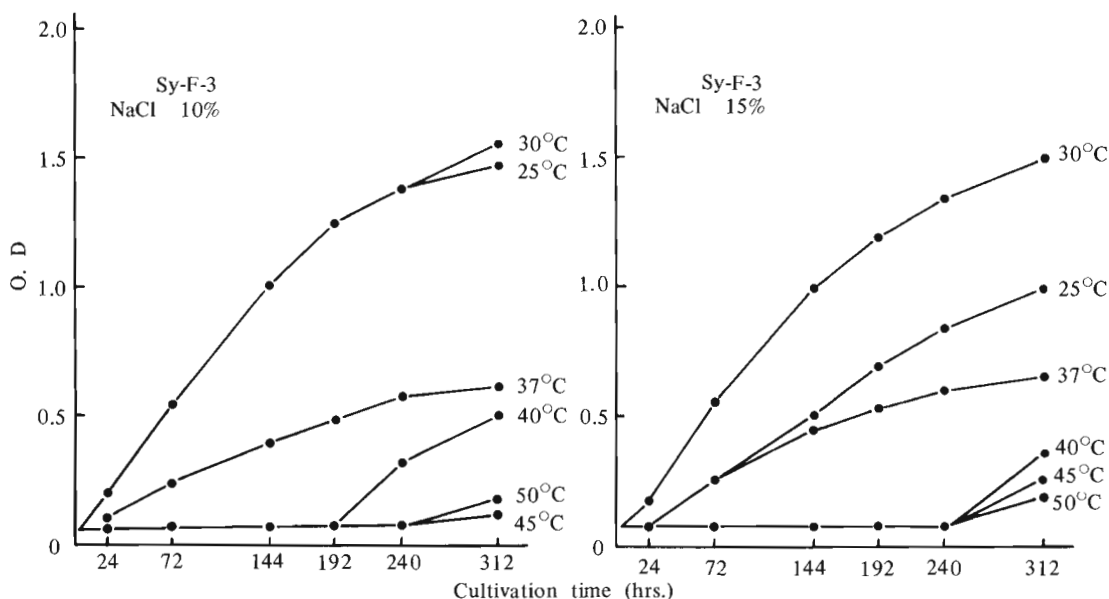


Fig.3. Relation between sodium chloride concentration and cultivated temperature on the growth of salt tolerance yeast.

では25°, 30°, 37°Cの発育は旺盛で、高濃度食塩添加培地10%, 15%になるに従いOptimum temp.は30°Cでその生育温度は30°, 25°, 37°Cの順となる。即ち培地中の食塩濃度が高くなるほど生育可能な温度30°Cに制限され、食塩無添加培地でのOptimum temp. 25°Cと異なる結果となり温度の選択性を認めた。このような現象は室温30°C付近の6月末から9月末までの食品製造工場での微生物管理にWild yeast typeの対策が必要であると考えられる。

細胞の死滅過程

著者らは前報⁷⁾で培養液中に高濃度の塩類(4M NaCl, 2.7M KCl)及び糖類(levulose 75%)を添加することより、栄養細胞のcell sizeは小さくなり、細胞内に顆粒が出現し、歪から死滅細胞に至ることを報告した。これは接種後lag phaseからlog phaseまでの培養菌体には死滅細胞はみられなくすべてviable cellである。log phaseの後期からstationary phaseにかかる約72時間培養頃よりdead cellの出現を認めた。そこで今回は更にviable cellからdead cellに至る過程を確認するために接種後経時的にその追跡試験を行いその結果をFig 4に示す1, 2a~2dの5 typeのDiagramに整理した。即ちviable cellが直接塩類等によりdead cellになり後、不定形の集合状態、clusterになる1-typeとbud cellが死

滅する2-typeに分れる。2-typeには2a-typeの如くbud cellが先に死滅した後mather cellが死滅するものと2b-typeのように先ずbud cellが死滅しそのすぐそばに新しく出芽するviable cellも続いて死滅し、後mather cellも死滅するtype、2c-typeでは2b-typeと異なり接近せるbud cell 2個が死滅後、randomに新しく出芽するviable cell更に2d-typeの如き第1 bud cellが死滅後各々multipolar buddingにより第2, 第3のbud cellが死滅しつつにmather cellも死滅しclusterを形成する。この結果よりviable cellがdead cellに至る過程には5 typeに分類された。

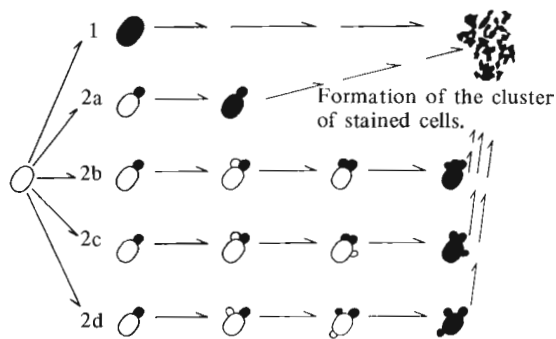


Fig.4. Diagram of the process from viable cells to dead cells.

Naの細胞内への取込み

耐塩・好塩性菌は非耐塩性菌に比し菌体内濃度が高く、又耐塩性菌よりは好塩性菌の方が塩濃度が高いことを上野²¹⁾、上瀬²²⁾らは乳酸菌を用いて報告している。そこでHalotolerant type Sy-F-13菌株の細胞内へのNaの取り込み量についてHalophobc type S-A-2菌株を対称とし検討した。Table 3

Table 3. Relation of the intracellular Na⁺ concentration in salt tolerance yeast to the various Na⁺ concentration in glucose nutrient medium.

Strains	Extracellular Na ⁺ conc. (mM)	Intracellular Na ⁺ conc. *(mM)	I/E**
Sy-F-13	21.55	78.02	3.62
	190.83	100.01	0.52
	550.16	142.39	0.26
	2760.17	328.26	0.12
S-A-2	22.34	63.04	2.82
	185.99	81.71	0.44
	551.45	92.39	0.17

* Concentration calculated on the basis of 2 ml internal/g. dry wt. cells.

** Ratio of intracellular to extracellular Na⁺ concentration.

はBasal mediumに低濃度(20mM~500mM)、高濃度(2500mM)、の72時間培養後の菌体の細胞内へのNaの取り込み量をそれぞれ比較した結果である。Iは細胞内、Eは細胞外のNaの量をmMで示し、I/Eは細胞内と細胞外に取り込まれたNaをその比であらわした。Halotolerant typeのSy-F-13菌株は培地中のNa濃度2500mMにおいてI/Eは0.12で細胞内への取り込みは少なく、500~20mMへとNa濃度の減少とともにI/Eは増加し、最低濃度20mMではI/Eは3.62と明らかに菌体内にNaの蓄積が認められた。Halophobc typeのS-A-2菌株は2.5MのNa⁺濃度では菌体発育不能のため省略した。500mM~20mMまでのNa濃度ではI/Eは小であるが最低濃度20mMでは2.82と急激なる蓄積を示した。すなわち、耐塩性、嫌塩性ともに細胞内へのNaの取込みは低濃度になるに従い増加しHalotolerant type Sy-F-13菌株はHalophobc type S-A-2菌株に比較して細胞内へのNaの取込みが高い結果を得た。

Naの細胞内への取込みに及ぼす培地K⁺の影響

培地中のNa濃度を一定にし、K濃度を変化させ72時間30℃で培養したHalotolerant type Sy-F-13菌

株とHalophobc type S-A-2菌株を用いて細胞内へのNaの取込みについて検討した結果をFig. 5, 6, 7に示した。Fig. 5は培地のNa濃度を20mMに一定

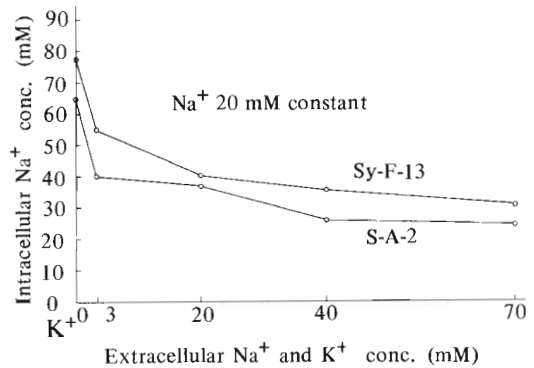


Fig. 5. Effect of extracellular K⁺ concentration on the Na⁺ influx-content.

にし、K濃度を0~70mMに変化させたときの細胞内Na濃度を示した。Halotolerant type Sy-F-13菌株は培地中のNa濃度20mM、K濃度70mMにおける細胞内Na濃度は30mM、40mM~0へとK濃度の減少とともに細胞内Na濃度は増加し、K濃度0では細胞内Na濃度は78mMと明らかに細胞内Na濃度はK濃度により減少することを認めた。

Halophobc type S-A-2菌株もHalotolerant type Sy-F-13菌株同様、細胞内Na濃度はK濃度により減少する傾向を示した。このようにK濃度が高い程、細胞内Na濃度が小なる傾向を示したのは、細胞膜のNa-K flux機構に関係するものと考えられる。Fig. 6, 7は更に培地中のNa, Kの高濃度における細胞内Na濃度について示したが、Fig. 5と同傾向の結果を得た。耐塩性の点からHalotolerant type Sy-F-13菌株はHalophobc type S-A-2菌株に比較して細胞内Na濃度が高い結果を得た。細胞内に取り込まれたNa, KについてはNORKRANSら¹⁰⁾、CHRISTIANら²³⁾又、TAKACSら²⁴⁾の報告がある。Fig. 8は培地中のNaを一定にしKの濃度を変えた場合の細胞内Na, K濃度を測定した結果である。Halotolerant type Sy-F-13菌株は培地中のK濃度が20mM以下の場合には細胞内にK濃度は低く、反面細胞内にNaが流入された。更に培地中のK濃度が20mM以上を増加すると細胞内K濃度は増し、細胞内Na濃度は減少し、細胞内にはNaよりKが多く存在することを確認した。Halophobc type S-A-2菌株もHalotolerant

type Sy-F-13菌株と同じ傾向を示した。Table 4は培地のK濃度の変化による。

細胞内K/Naの比をあらわしたもので、培地のK濃度が低い程、細胞内K/Naの比は低い値を示し、Halotolerant type Sy-F-13菌株はHalophobic type S-A-2菌株に比し高い値を示した。

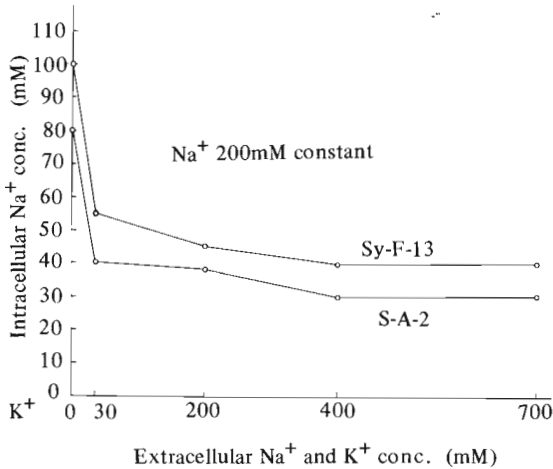


Fig. 6. Effect of extracellular K^+ concentration on the Na^+ influx-content.

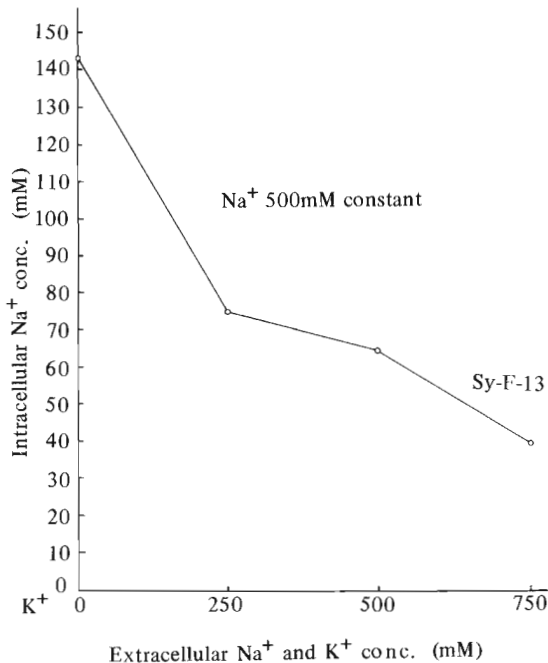


Fig. 7. Effect of extracellular K^+ concentration on the Na^+ influx-content.

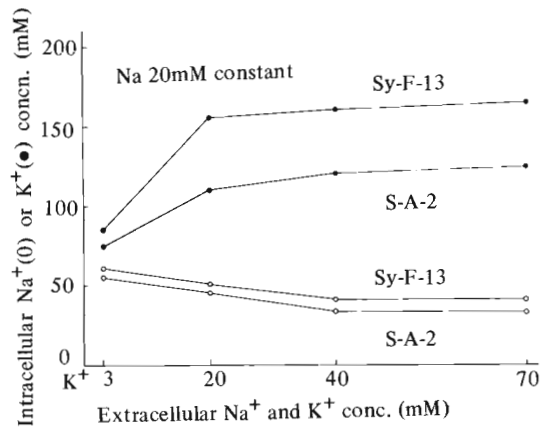


Fig. 8. Intracellular Na^+ and K^+ concentration in salt tolerance yeast.

Table 4. Intracellular molar ratio of K^+ to Na^+ in salt tolerance yeast.

Strains	Extracellular K^+ conc. (mM)			
	3	20	40	70
Sy-F-13	1.5	3.1	4.0	4.1
S-A-2	1.3	2.4	3.2	3.4

呼吸活性

最近 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて PENDER²⁰ が呼吸活性に及ぼす K^+ の影響、又細菌類では *Tet-racoccus* を用いて上瀬²² らが Na^+ と呼吸活性についての報告がある。そこで耐塩性酵母の呼吸活性に及ぼす Na^+ 、 K^+ の影響について検討し、Fig. 9、10にその結果を示した。耐塩性 Sy-F-13 菌株は Na^+ 1 M において 80% の呼吸活性を維持し、2 M で 20% と呼吸活性が減少した。嫌塩性菌 S-A-2 では Na^+ 1 M において 40% の呼吸活性を示し、明らかにその間に耐塩性型 (Sy-F-13 菌株) と嫌塩性型 (S-A-2 菌株) の活性の差を認めた。この結果より食塩耐性と呼吸活性とは密接な関係をもつことがわかった。Fig. 11 は Na^+ を一定濃度とし K^+ の濃度変化による呼吸活性を示したもので、 K^+ の増加に伴って呼吸活性が減少し Na^+ Transport に膜透過の K^+ の influx 又は enflux とその uptake によってエネルギー代謝に直接関与することがわかった。

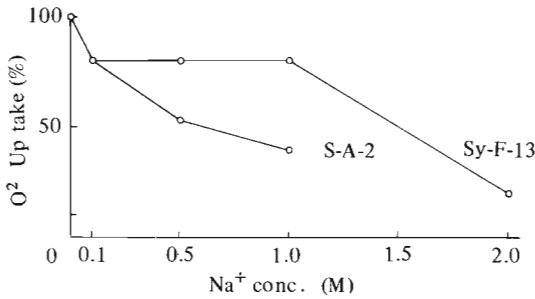


Fig.9. Effect of Na^+ on the respiration of salt tolerance yeasts.

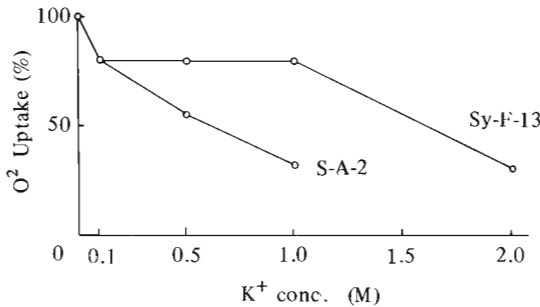


Fig.10. Effect of K^+ on the respiration of salt tolerance yeast.

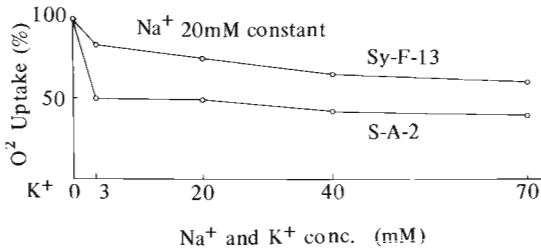


Fig.11. Respiration of salt tolerance yeasts by the different K^+ concentration in the constant condition of Na^+ concentration.

IV 要 約

1 畑地土壌における桿菌，球菌，カビ類は酵母に比べいちじるしく多く出現し，瓜（桂白瓜）では逆に急減した。酵母菌類は畑地土壌より瓜（桂白瓜）に多く出現した。

2 食塩耐性の高いHalotolerant type yeastsの4菌株ではglucose, maltoseの醗酵性は食塩無添加での醗酵能よりもむしろ食塩添加培地，すなわち2%～10%添加することにより醗酵性が明らかにpositiveの結果を認めた。

3 Halotolerant type Sy-F-13株は培地中の食塩濃度が高くなるほど生育可能な温度30℃に制限され、

食塩無添加培地でのOptimum temp. 25℃と異なる結果となり温度の選択性を認めた。

4 viable cellからdead cellに至る過程を確認するために接種後経時的にその追跡試験を行いその結果5 typesのDiagramに整理した。

5 耐塩性，嫌塩性ともに細胞内へのNaの取込みは低濃度になるに従い増加し，Halotolerant type Sy-F-13菌株はHalophobic type S-A-2菌株に比較して細胞内へのNaの取込みが高い結果を得た。

6 Halotolerant type Sy-F-13菌株，Halophobic type S-A-2両菌株とも細胞内Na濃度はK濃度の増加により減少する傾向を示した。

7 培地中のK濃度が低い程細胞内 K/Naの比は低い値を示し，Halotolerant type Sy-F-13菌株はHalophobic type S-A-2菌株に比し高い値を示した。

8 Na^+ を一定濃度とし K^+ の濃度変化による呼吸活性では K^+ の増加に伴って呼吸活性が減少し Na^+ Transportに膜透過の K^+ influx又はEnfluxとそのuptakeによってエネルギー代謝に直接関与することがわかった。

文 献

- 1) 山縣 敬・藤田藤樹夫：醸工，48，485～492（1970）。
- 2) 山縣 敬・藤田藤樹夫：醸工，49，385～389（1971）。
- 3) 山縣 敬・藤田藤樹夫：昭和43年度日本醸酵工学会大会講演（大阪）。
- 4) 山縣 敬・藤田藤樹夫：昭和45年度日本醸酵工学会大会講演（大阪）。
- 5) 山縣 敬・藤田藤樹夫：昭和46年度日本醸酵工学会大会講演（大阪）。
- 6) 山縣 敬・藤田藤樹夫：本誌，（4），27～36（1971）。
- 7) 山縣 敬・藤田藤樹夫：本誌，（5），75～83（1972）。
- 8) 山縣 敬・藤田藤樹夫：本誌，（5），85～91（1972）。
- 9) 大西 博：野田醤油株式会社研究報告，2，（1961）。
- 10) 大亦正次郎：昭和45年度日本農芸化学会大会講演（福岡）。
- 11) 加藤 熙・好井久雄：醸工，45，197～203（1967）。

- 12) 高田英夫：昭和47年度日本農芸化学会大会講演 (仙台).
- 13) 富田 実：昭和46年度日本農芸化学会大会講演 (東京).
- 14) 富田 実・福永 芳秋：昭和47年度日本農芸化学会大会講演 (仙台).
- 15) A. W. DE BRULINE and J. VAN STEVENINCK: *Biochem. Biophys., Acta*, **196**, 45 (1970).
- 16) B. NORRANS and A. KYLIN: *J. Bact.*, **100**, 838
- 17) M. P. SCARR and D. ROSE: *J. Gen. Microbiol.*, **45**, 9 (1966).
- 18) S. WINDISH: The Proceeding of the IInd Symposium on yeasts held in Bratislava, **21**, 127 (1966).
- 19) E. DEE and E. J. CONWAY: *Biochem. J.*, **107**, 265 (1968).
- 20) 山縣 敬・藤田藤樹夫：第八回好塩微生物研究会講演 (大阪) (1972).
- 21) 上野照雄：大阪府立大学紀要, **15**, 67~113 (1964).
- 22) 上瀬弘和・杉森恒武：酸工, **49**, 302~312 (1971).
- 23) J. H. B. CHRISTIAN and J. A. WALTHO: *J. Gen. Microbiol.*, **25**, 97 (1961).
- 24) F. P. TAKACS, T. I. MATULA, and R. A. MACLEOD: *J. Bacteriol.*, **87**, 510~518 (1964).
- 25) A. PENA, G. CINCO, A. G. PUYOU, and M. TUENA: *Biochim. Biophys., Acta*, **180**, 1 (1969).

(昭和48年1月19日受理)



1. Cultivation of Pickle melon (Kathura Sirouri) in Tokushima.



2. Pickle melons.



3. Cutting of pickle melons.



4. Salt-Pickle melons.