

# 耐塩性酵母について

第2報 耐塩性と細胞の特性

山 縣 敬\*・藤 田 藤 樹 夫\*

## Studies on NaCl-tolerance yeasts

(2) Salt-tolerance and the Cellular Characteristics in *Torulopsis* Yeasts.

Kei YAMAGATA\* and Tokio FUJITA\*

Most of the strains of high NaCl-tolerant yeast belonged to genera *Torulopsis*. The stability of NaCl-tolerance, which had been considered to be gained by growing yeast in a medium containing sodium chloride (0–22%), was examined. We classified these yeast strains into four types by their NaCl-tolerance. They were halotolerant type, halophilic type, low-halophilic type and halophobic type. Two strains of wild yeasts, viz. *T. glabrata* and *T. etchellsii* were found very highly NaCl-tolerant (up to 22% NaCl) and both of them were very small in cell size. These yeasts were isolated from soya mash.

Cell size of the halotolerant and halophilic type strains of *Torulopsis* yeasts isolated from sake cake pickle and soya mash were much smaller than these of low-halophilic or halophobic ones. Almost strains of halophilic, low-halophilic, halophobic and some of halotolerant strains showed smaller cell size if they were grown in the medium supplemented with high concentration of sodium chloride (15–20%). Some of halotolerant strains, however, did not show any significant difference in cell size by the addition of sodium chloride to the growth medium.

### 緒 言

著者らは前報<sup>1) 2)</sup>で食塩濃度の異なる粕漬製造工程中の醪と醤油熟成諸味より酵母菌類を分離同定しその耐塩性について報告した。分離株のほとんどは *Torulopsis* 属の酵母菌種で耐塩性の大きな株は cell size が耐塩性の小なる株よりも小さい傾向を示した。耐塩性酵母に関する最近の報告は佐々木<sup>3)</sup>, 加藤<sup>4)</sup>, M. P. Scarr<sup>5)</sup>, D. R. Roy<sup>6)</sup> らの報文がある。Scarr & Rose<sup>5)</sup> らは蔗糖汁 (Brix 75~79°) の試料より Osmophilic yeasts を分離し *Torulopsis apicola*, *Torulopsis globosa*, *Torulopsis lactis-condensi*, *Torulopsis bacillaris* 4種と1新種 *Torulopsis kestoni*; 又 *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces florentinus* を同定した。これらの中で耐性株は

\* Laboratory of Applied Microbiology, Agricultural Chemistry (農芸化学, 応用微生物学研究室)

麦芽汁寒天斜面上での発育が不良で栄養細胞の大きさは  $1.5\mu\sim 3.5\mu$  の範囲で小さくなる現象を著者らと同様認めている。今回は粕漬、醤油諸味より分離した *Torulopsis* 属を中心とし耐塩性と食塩濃度による cell size の変化並びに *Saccharomyces cerevisiae* を対称とし耐塩性株との cytochrome pattern について検討した。

## 実 験 方 法

### 1 培地組成および培養方法

使用培地はグルコース 10g, ペプトン 0.45g, 酵母エキス 0.25, 硫酸マグネシウム 0.05g, 磷酸一カリウム 0.01g, NaCl (0~22%), 蒸留水 100 ml の組成で pH4.8~5.0 に調整し内径 18 mm の試験管に 10 ml 分注した。前培養は同一培地で 40 時間前培養しその log phase の洗滌菌体を稀釈して inoculum size は  $10^4$  cells/ml になるごとく調整,  $30^\circ\text{C}$  で培養を行った。なお前培養における培地中の食塩濃度は前報<sup>2)</sup> に準じ 5% とした。

### 2 生育度の測定

乾燥菌体重量 mg/100 ml で表した。

### 3 菌体計測

細胞の大きさは常法により micrometer を用い水道水に懸濁して直接顕微鏡下 600 倍で任意に約 250 個以上の細胞についてその長径および短径を測定し, 平均値を算出し細胞を卵体又は球形と考へ平均体積を計算した。

### 4 死滅略胞の検定

Fink-Kühles の染色法<sup>7)</sup> により生細胞と死細胞を顕微鏡下で判定した。

## 実 験 結 果 お よ び 考 察

### 1 分離菌株

各種試料より分離した 68 株を Lodder & Kreger-van Rij<sup>8)</sup> に準じて同定した結果を Table. 1 にまとめた。

*Saccharomyces cerevisiae* は粕漬醪中最低食塩濃度の醪 (NaCl 0.73%) にのみ出現した。分離菌株のほとんどは *Torulopsis* 属であり *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis etchellsii*, *Torulopsis pinus*, *Torulopsis globosa*, *Torulopsis magnoliae* の各菌株はすべて高食塩濃度 (NaCl 18~20%) の醤油諸味より分離され *Torulopsis candida*, *Torulopsis inconspicua* は NaCl 3~15% 濃度の酒粕醪, 醤油諸味より分離された。即ち試料中の食塩濃度の差により同属の *Torulopsis* でもその出現が異なる傾向を認めた。

### 2 耐塩性の種類

Table 1. Isolated strains.

Identification	Strain No.	Isolated mash
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	S-A-1, S-A-2, S-A-6, S-A-9, S-A-23, S-A-31, S-A-37, S-A-36, S-A-42	Sake mash
<i>Saccharomyces rouxii</i> Boutroux var <i>halomembranis</i>	S-C-83, S-D-43, Sy-E-10, Sy-E-100, Sy-E-101, Sy-E-103, Sy-E-104, Sy-F-105, Sy-F-106, Sy-F-107	Sake and soya mash
<i>Torulopsis famata</i> (Harrison) Lodder et Kreger-van Rij	S-A-4, S-A-9, S-B-1, S-B-11, S-B-21, S-B-27, S-B-27, S-B-49, S-B-54, S-B-86, S-B-91, S-C-55, S-C-124, S-D-2, S-D-6, S-D-13, S-D-20	Sake mash
<i>Torulopsis candida</i> (Saito) Lodder	S-C-3, S-C-27, S-C-93, S-D-25, Sy-E-1, Sy-E-2, Sy-E-9, Sy-E-109, Sy-E-112, Sy-E-113, Sy-E-115, Sy-E-121	Sake and Soya mash
<i>Torulopsis magnoliae</i> Lodder et Kreger-van Rij	S-A-7, S-A-8, S-B-79	Sake mash
<i>Torulopsis glabrata</i> (Anderson) Lodder et de Vries	Sy-F-6, Sy-F-8	Soya mash
<i>Torulopsis etchellsii</i> Lodder et Kreger-van Rij	Sy-F-3, Sy-F-13	Soya mash
<i>Torulopsis globosa</i> Olson et Hammer	Sy-E-4, Sy-E-14, Sy-E-15, Sy-E-119, Sy-E-102, Sy-F-2, Sy-F-114, Sy-F-123, Sy-F-124, Sy-F-126	Soya mash
<i>Torulopsis pinus</i> Lodder et Kreger-van Rij	Sy-F-5, Sy-F-116	Soya mash
<i>Torulopsis inconspicua</i>	S-D-14, Sy-E-7, Sy-E-11, Sy-E-102, Sy-E-117, Sy-E-118, Sy-E-120, Sy-E-125	Sake and Soya mash
<i>Torulopsis aerea</i> (Saito) Lodder	Sy-E-108, Sy-E-110, Sy-E-111	Soya mash
<i>Torulopsis molischiana</i> (Zikes) Lodder	S-C-137	Sake mash

分離菌株の食塩耐性については次のように実験を行った。まず 5% NaCl 添加の glucose nutrient medium に 48 時間前培養した分離菌株の菌体を NaCl 添加量の異なる (NaCl 0~22%) 培地に接種し 30°C, 72 時間後の発育 (乾燥菌量) を測定し 3 つの型に整理した。Fig. 1. に示すように Sy-F-3, Sy-F-6 株は NaCl 20% まで食塩無添加の場合とほとんど変わりなく耐性が保持されている。高濃度 22% でその差が現われているが, Sy-F-3 株ではなお 50% 附近の発育を保持している。Sy-F-5 株は食塩の存在により発育が旺盛になる型で食塩無添加に比し NaCl 10% 附近で発育が最大となり 15% NaCl 附近では急激に発育が阻害され高濃度の食塩ではほとんど発育しえない菌株である。S-A-1, Sy-E-4 では食塩添加と同時に発育が遅れるか, あるいは阻害される耐性の小なる型で NaCl 5% 附近より急激に減少する。このように耐性を大きく 3 つの型に分類できる。

すなわち、NaCl 20% 濃度までほとんど無添加の場合と変わらない耐塩性株 (Sy-F-3, Sy-F-6 株) NaCl 添加によって発育がむしろ刺激される好塩株 (Sy-F-5 株) 食塩の添加と同時に発育の遅延, あるいは阻害される耐性の小さな株の型である。耐性の小さな株をさらに整理すると S-A-1 株に認められるように NaCl の添加と同時に発育阻害が起り 5% 濃度でほとんど発育しえない菌株でそれを嫌塩性とした。同様に Sy-E-4 株は食塩耐性の小さな株であるが S-A-1 株に比し NaCl 低濃度 3% 附近までは食塩無添加の場合とほとんどその発育は変わりなく 5% 附近

より急激にその阻害が起る株で前者と区別しこのような発育を示す株を弱塩性とした。したがって粕漬醪, 醤油諸味より分離した菌株を食塩耐性から 4 型式に分類した。すなわち, 耐塩性株は *Torulopsis etchellsii*, *Torulopsis glabrata*, *Saccharomyces rouxii* である。好塩性株は *Torulopsis pinus*, *Torulopsis famata*, *Torulopsis molischiana* である。弱塩性株は *Torulopsis globosa*, *Torulopsis inconspicua*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis magnoliae* である。嫌塩性株は *Saccharomyces cerevisiae* に認められた。

### 3 食塩濃度による細胞の変化

分離した *Torulopsis* 属菌種の中で *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis etchellsii* の耐塩性株は食塩無添加培地で細胞は  $3.63 \pm 1.25 (\mu^3)$ , *Torulopsis pinus* 即ち好塩性株は  $26.51 \pm 2.16 (\mu^3)$  で *Torulopsis* 属菌種の中でも小さな菌株である。弱塩性の *Torulopsis* 属菌種の細胞は  $113.04 \pm 8.79 (\mu^3)$  で比較的大きく, 食塩の耐性は低く 22% 濃度ではほとんど発育できない。蔗糖高濃度で分離された Osmophilic yeasts も麦芽汁寒天斜面での栄養細胞は比較的小さいことを Scarr<sup>5)</sup> らは指摘している。そこで食塩による細胞の影響について NaCl 0~22%, 72 時間後の細胞の変化を計測して調べた。

Fig. 2 の 1) は耐塩性 Sy-F-3 株, 食塩濃度の 0%, 72 時間後の発育細胞であり, その細胞は  $7.47 \pm 1.99 (\mu^3)$  の小さな酵母である。それが食塩を添加すると Fig. 2 の 2) のごとく NaCl 20% 添加培地では  $1.30 \pm 0.67 (\mu^3)$  とさらに細胞が小さくなる。Fig. 2 の 3) は弱塩性酵母 Sy-E-102 株の食塩濃度 0%, 72 時間後の栄養細胞で  $113.04 \pm 8.79 (\mu^3)$  の比較的大きな菌株である。これが

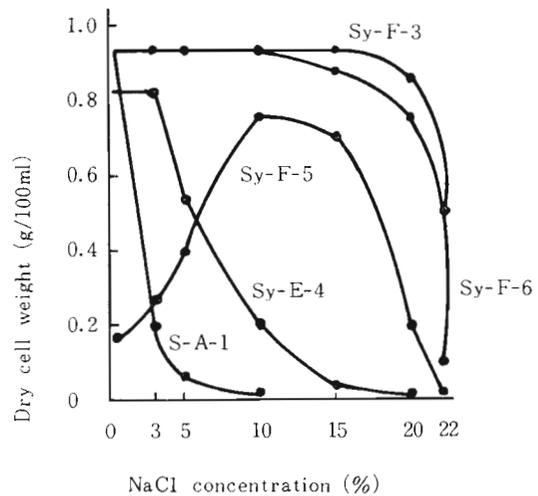
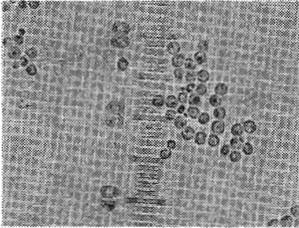


Fig. 1. Growth curve of salt-tolerant yeasts in the media of various concentration of sodium chloride.

The growth state on glucose nutrient medium, 3 days cultivation at 28–30°C.

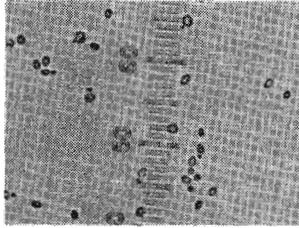
食塩を添加すると Fig. 2 の 4) のごとく NaCl 20% 添加培地では明らかに  $23.72 \pm 3.16(\mu^3)$  と細胞が小さくなっている。食塩により細胞が不定形を呈するものも認められる。このような細胞は耐塩性 Sy-F-6 株には認められない。弱塩性 Sy-E-102 株の KCl 20% 添加培地の細胞においても

1) Sy-F-3



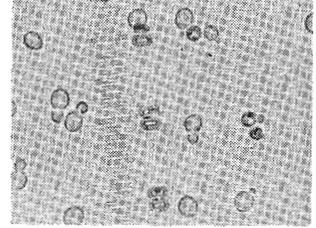
Cells cultivated in NaCl-free medium for 72 hrs.

2) Sy-F-3



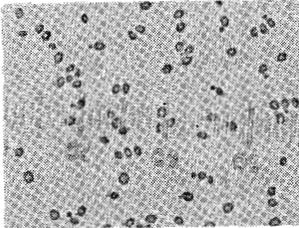
Cells cultivated in 20% NaCl medium for 72 hrs.

3) Sy-E-102



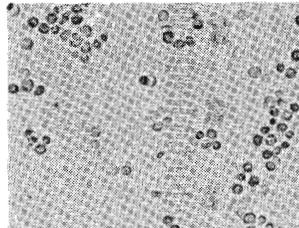
Cells cultivated in NaCl-free medium for 72 hrs.

4) Sy-E-102



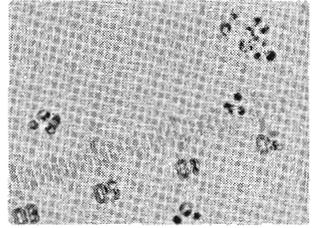
Cells cultivated in 20% NaCl medium for 72 hrs.

5) Sy-E-102



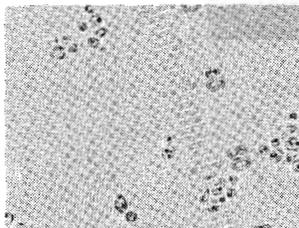
Cells cultivated in 20% KCl medium for 72 hrs.

6) Sy-E-102



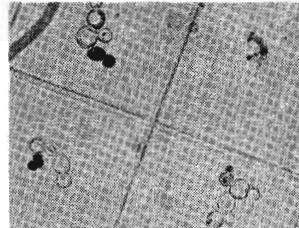
Cells cultivated in 15% NaCl medium for 72 hrs.

7) Sy-E-102



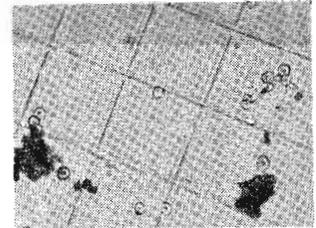
Cells cultivated in 15% NaCl medium for 24 hrs.

8) Sy-E-102



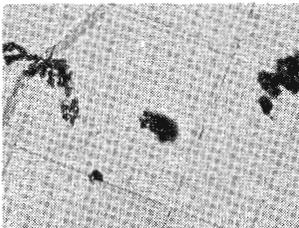
Dead cells, after 72 hrs in 20% NaCl medium.

9) Sy-E-102



Dead cells, after 96 hrs in 20% NaCl medium.

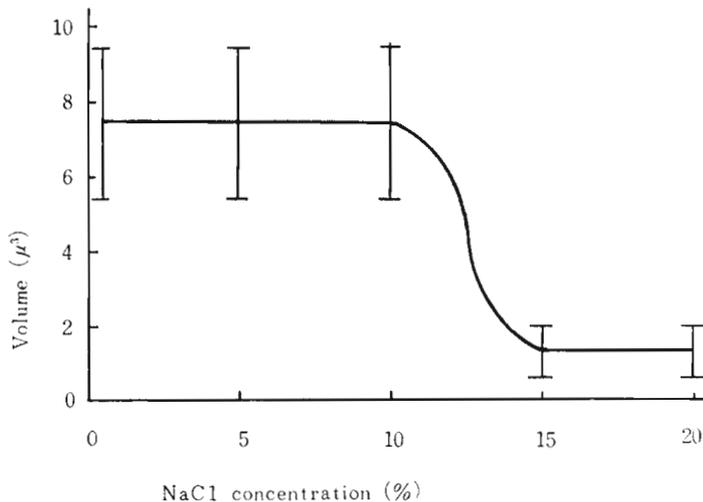
10) Sy-E-102



Dead cells, after 120 hrs in 20% NaCl medium.

**Fig. 2.** Effect of the sodium or potassium chloride concentration on the cell shape and the cellular characteristics.

Fig. 2 の 5) に示すごとく栄養細胞は  $23.72 \pm 3.16 (\mu^3)$  で NaCl と同様小さくなり, 中には不定形の細胞も認められた。なお二価の塩類  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$  等による影響については本報告では省略した。さらに食塩濃度 20% で栄養細胞の明らかに変化する Sy-F-3 (Halotolerant type), Sy-E-102 (Low-halophilic type) の両株を用い食塩濃度 0~20% での細胞の変化について調べた。Fig. 2 の 3) は Sy-E-102 株の食塩無添加, 72 時間培養後の細胞で  $113.04 \pm 8.79 (\mu^3)$  で大である。しかしながら食塩濃度 15% になると Fig. 2 の 6) に示すごとく  $23.72 \pm 3.16 (\mu^3)$  となり明らかに細胞が小さくなる。さらに細胞数も減少し細胞内に多数の顆粒が認められ細胞も不定形になる。Fig. 3 は Sy-F-3 株の食塩濃度 0~20% に発育する細胞の変化である。食塩濃度 10% までの



**Fig. 3.** Effect the salt concentration for cell size on the halotolerant strain (Sy-F-3) of *Torulopsis* yeast.

Cells were cultivated at 30°C for 72 hours in glucose nutrient medium supplemented with various different concentration of sodium chloride.

細胞の容積は  $7.47 \pm 1.99 (\mu^3)$  で変化は認められない。しかしながら 15% より  $1.30 \pm 0.67 (\mu^3)$  と明らかに差を生じた。さらに食塩により細胞が変化する Sy-E-102 株の NaCl 0~20% で培養中における発育細胞の変化を調べた。lag phase から log phase までの培養菌体には死滅細胞は認められなく, すべて生細胞である。log phase の後期から stationary phase にかかる 72 時間培養頃より死滅細胞があらわれる。Fig. 2 の 8) は高濃度 20%, 72 時間培養後の細胞で死細胞は初め 1 個の daughter cell のみである。それが 96 時間後になると Fig. 2 の 9) の細胞のごとく第 2., 第 3 の daughter cell は死滅し次いで mother cell も死滅し死細胞はクラスター, 或いは不定形の状態となる。Fig. 4 はその状態を図示した。すなわち, 死細胞は数個の daughter cell と mother cell の不定形集合状態で振盪攪拌のみでは容易に細胞を切り離すことが出来なかった。Fig. 2 の 10) は 120 時間後の細胞で数個の daughter cell をもつ mother cell が更に集合し歪んだ塊りとなる。

このことから高濃度食塩 (NaCl 20%) 存在下では daughter cell の外層膜の化学組成に変化を生じその結果死滅するものと考える。

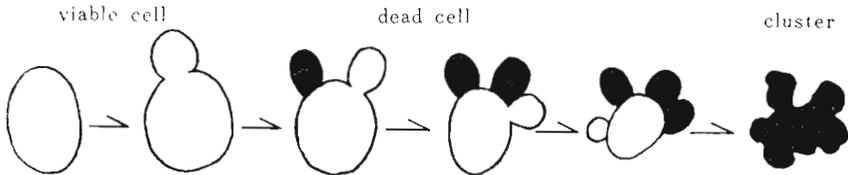


Fig. 4. Process of dyeing cluster.

4 培養時間による細胞の変化

食塩添加により細胞の著しく変化する Sy-F-3 株 (Halotolerant type) と Sy-E-102 株 (Low-halophilic type) を用い NaCl 0~22% 濃度を添加した glucose nutrient medium における培養時間による発育の状態を調べた。まず、接種菌量を  $5 \times 10^2 \sim 10^5$  cells/ml で行ったが菌量による影響は認められなかったので本実験では  $10^4$  cells/ml を用いた。Fig. 5 は食塩濃度による耐塩性 Sy-F-3 株の growth curve である。この株は食塩濃度 5~20% まではむしろ無添加培地での発育よりも良好で高濃度 22% でその減少を認めた。高濃度 20~22%, 食塩無添加培地での発育は低濃度 5~15% に比し lag phase が長くなった。Fig. 6. は弱塩性 Sy-E-102 株の growth curve で Fig. 5 に比べさらに lag phase が長くなり高濃度 20~22% での発育は非常に劣った。低濃度食塩添加培地での発育も前者に比し劣った。さらに Sy-E-102 株を用い培養時間による細胞の影響を調べた。接種時の細胞は球形  $113.04 \pm 0 (\mu^3)$  であるが Fig. 7, Fig. 2 の 7) に示すことく 24 時間培養後になると  $23.72 \pm 0 (\mu^3)$  となり明らかに細胞が小さくなる。このように変化した栄養細胞は通常の細胞に比べ先ず osmotic pre-

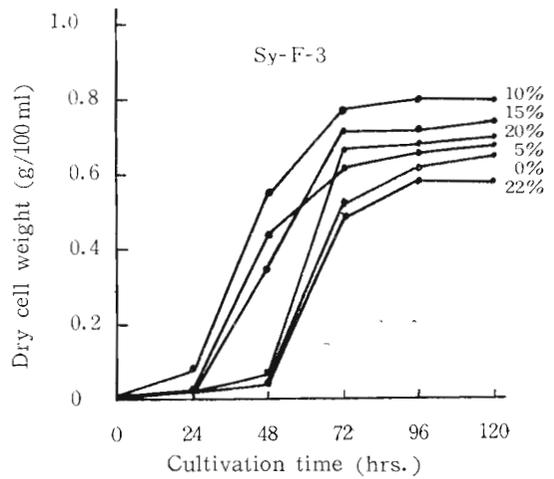


Fig. 5 Effect of sodium chloride concentration on the growth of Sy-F-3 strain.

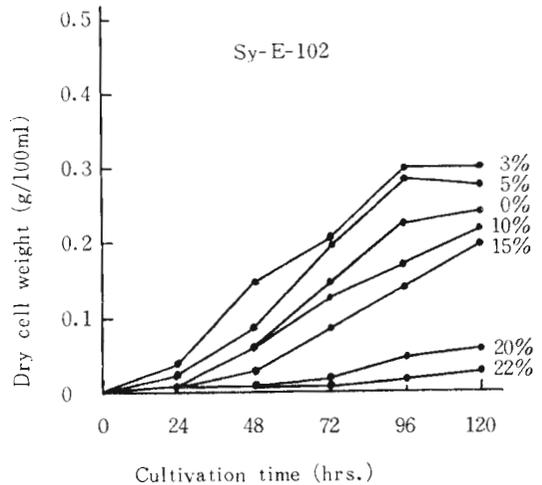


Fig. 6 Effect of sodium chloride concentration on the growth of Sy-E-102 strain.

ssure のかかった培地中での発育からおそらく原形質内の mitochondria に極在する cytochrome の組成が正常細胞に比し異なるのではないかという点である。次に外層膜の組成構造の変化があげられる。そこで今回は cytochrome について検討した。

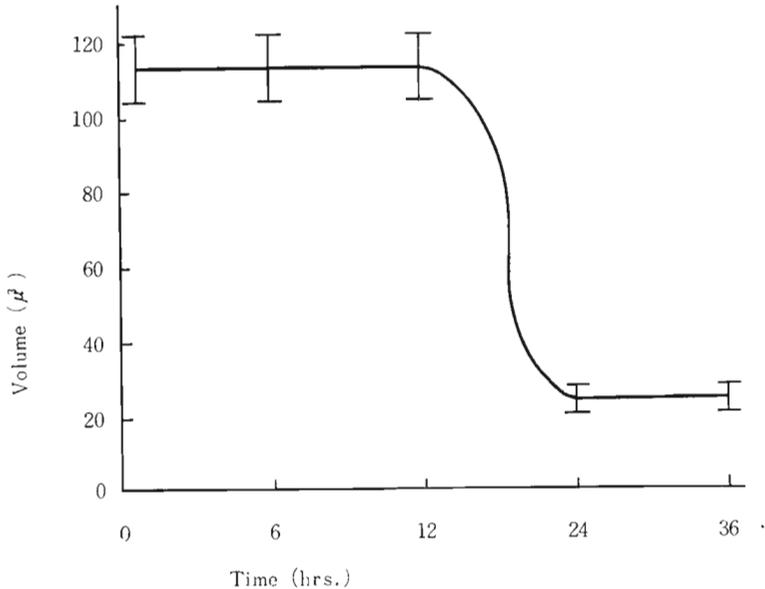


Fig. 7. Appearance of small cells during the cultivation of low-halophilic strain (Sy-E-102) of *Torulopsis* yeast in glucose nutrient medium supplemented with sodium chloride (15%).

## 5 耐塩性酵母の Cytochrome について

耐塩性株は食塩添加により細胞が変化する株 (Sy-F-3) と全く変化しない株 (Sy-F-8) 又対称

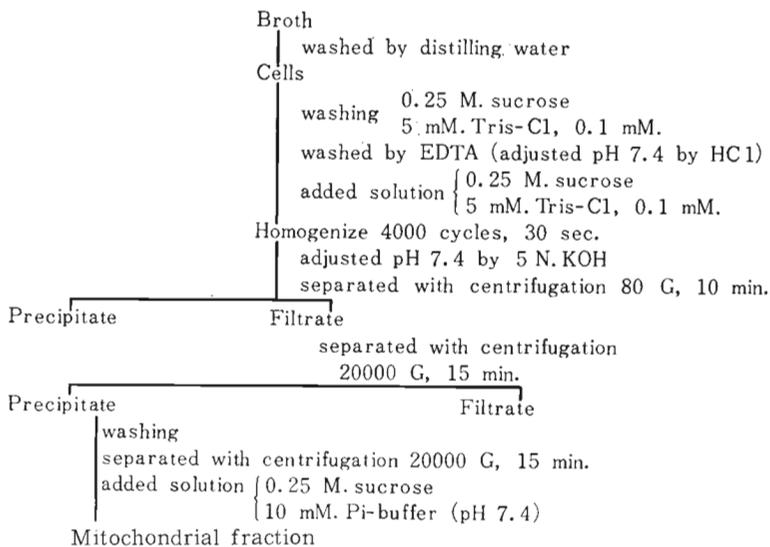


Fig. 8. Mitochondrial fraction

として *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。mitochondria の調整は蔗糖密度勾配法により行った。Fig. 8 に示す如く先づ培養液を 3000 r. p. m. で菌体を集菌，蒸留水で洗滌し洗滌菌体を得る。次に 0.25 M. Sucrose, 0.5 mM. E. D. T. A. 添加 Tris 緩衝液 5 mM で 1 回洗滌し菌体重量と同量の 0.25 M. Sucrose (pH 7.4) 液に懸濁し BROWILL MECHANICAL HOMOGENIZER にて 4000 cycle, 30 sec, ホモジネートして後 80 G, 10 min 遠心，濾液と残渣とに分離する。分離した濾液は 20000 G, 15 min 遠心し更に濾液と残渣に分け，その残渣に 0.25 M. Sucrose, 10 mM. phosphate buffer (pH 7.4) を加え 20000 G, 15 min 遠心して mitochondria の分画を得た。Cytochrome 吸収帯の測定は日立分光光度計 STS-3T 型，透過型積分球で測定しその結果を Fig. 9 に示した。

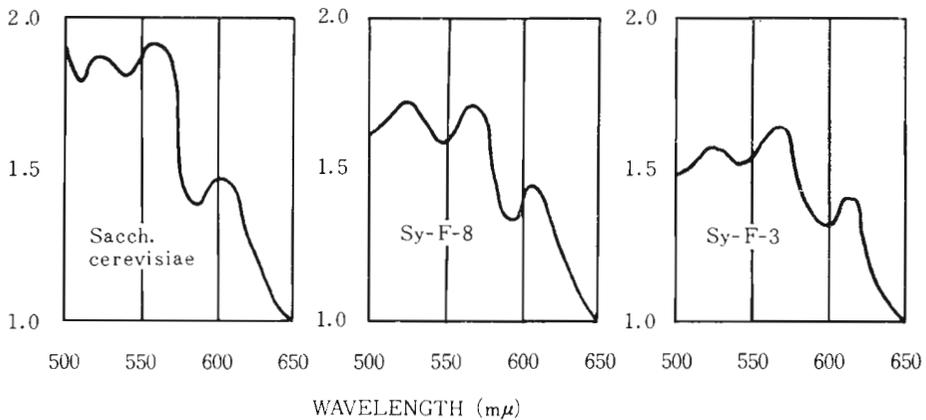


Fig. 9. Absorption spectra of Cytochrome pattern.

*Saccharomyces cerevisiae* の Cytochrome の pattern は 610 mμ, 560 mμ (α 帯), 530 mμ (β 帯) 附近に peak を示しそれと比較して耐塩性株 (Sy-F-8), (Sy-F-3) の吸収帯はその量に差が認められるが水素伝達系の Cytochrome 組成には全くその差がなく 610 mμ, 560 mμ, 530 mμ の波長の位置に peak を認めた。このような結果より osmotic pressure 下で発育した細胞は常用培地で発育した正常細胞と比べ全く同じ呼吸系によって活性を得ることを知った。

## 要 約

- 耐塩性により分離株を 4 型式に分類した。
  - 耐塩性 T. glabrata, T. etchellsii, S. rouxii
  - 好塩性 T. pinus, T. famata, T. molischiana
  - 弱塩性 T. globosa, T. inconspicua, T. aerea, T. candida, T. magnoliae
  - 嫌塩性 Sacch. cerevisiae
- 耐塩性株は弱塩性株に比し栄養細胞は一般に小さい。
- 高濃度食塩添加培地では耐塩性株には細胞の変化するものと変化しないものとに分れた。好塩

性, 弱塩性株は全て変化し細胞が小さくなった。

4 死滅細胞の出現は先ず daughter cell が死滅し続いてその両側に Budding cell が形成したただちに死滅して終には Mother cell も同様活性を失い染色され cluster を形成する。

## 文 献

- 1) 山縣・藤田: 近畿大学食品科学研究所報告, 4, 1 (1967)
- 2) 山縣・藤田: 醸工, 48, 485 (1970)
- 3) 佐々木: 醸工, 44, 61 (1961)
- 4) 加藤・好井: 醸工, 45, 191 (1967)
- 5) M. P. Scarr & D. Rose: J. Gen. Microbiol., 45, 9 (1966)
- 6) D. R. Roy: Comptes rendus des seances de la Socöle de Biologie Extrait du Tom 164, n 2, 278 (1970)
- 7) 岩波書書: 応用菌学 (下巻), 295
- 8) Lodder, J., Kreger-van Rij. N. J. W.: a Taxonomic Study, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1967).