

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 1, P. 1~9, 1974]

本邦産有孢子性樹液酵母について*

小玉 健吉・京野 忠司

小玉醸造株式会社研究室

Ascosporegenous Yeasts Isolated from Tree Exudates in Japan

Kenkichi Kodama and Tadashi Kyono

Laboratory of Kodama Brewing Co., Ltd., Akita

Abstract

A taxonomic survey has been made of ascosporegenous yeasts found in exudates occurring on tree stumps of broad-leaved trees in Japan during the periods of April and July of 1967, 1968, 1972, and 1973. The samples were collected in test tubes by using cotton pieces. Usually within 2 to 7 days after collecting, a loopful of the sample was streaked directly on carrot juice-*koji* extract agar medium containing 100 ppm of chloramphenicol. At the same time, samples were enriched by 2 kinds of liquid media besides the *koji* extract, *i.e.*, sodium acetate-peptone-yeast extract, and glucose-nitrate media, both supplemented with 100 ppm of chloramphenicol, for 3-7 days at 25°C followed by streaking on the agar media mentioned above. The pure cultures were identified mainly by the procedures described in "The Yeasts" edited by Lodder (1970). Out of 334 strains identified, this paper deals with the species belonging to the genera *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, and *Debaryomyces*.

Among these a new species of *Pichia naganishii* is proposed based on the reasons mentioned below.

Pichia naganishii Kodama sp. n.

The strain studied resembles *Pichia angophorae* Miller et Barker and *Pichia bovis* van Uden et do Carmo-Sousa, in both the shape of the ascospore and the assimilation pattern of the routine five sugars.

However, in contrast to *P. angophorae*, this strain does not form pseudomycelium, nor does it ferment sucrose and maltose but assimilates L-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, glycerol and erythritol, and can grow at 37°C. Also, this strain is differentiated from *P. bovis*, in that it assimilates in addition to the above carbon compounds, ribitol and galactitol, and furthermore heterogamous conjugation precedes its ascus formation.

Single strain (LKB-747) of this species was isolated from exudate of *Camellia* sp. in Nagasaki prefecture.

* 本研究は著者の一人小玉が1967および68年の両年にわたり行なわれた日本列島と北米の西部海岸の樹木に棲息する日米共同研究として始めたものであるが、その後小玉の個人的な事情により、試料を所在現地で採取後直ちに固体培地に画線塗布しコロニーを形成させ検索する事を目的とする米国および日本の主な野外採取旅行に参加する事が出来なくなり、主として日本の各大学農学部の方先生始め

官民の醸造ないし醸酵技術者各位の御協力の下に後述する方法により採取し研究室へ送られた試料について日米の共同研究の場合と生態学的に若干異なる方法により実施したものである。従って本実験の結果については共同研究者の了解をいただき共同研究報告と別個に報告することにした。

緒 言

高等植物と酵母との類縁関係を追求する分野において生態学的に重要な位置をしめると考えられるものの一つに樹幹の切幹や樹木の傷口に浸出する樹液に棲息する酵母菌群がある。これらの酵母については過去50年来内外の分類学者により報告され本邦においても斎藤¹⁾、大谷¹⁾、斎藤^{2,3)}、Kobayashi⁴⁾、Yoneyama⁵⁾、Soneda⁶⁾、Kodama *et al.*⁷⁾、Nakase and Komagata⁸⁾らの報文がある。それらの中には *Endomycopsis monospora* Saito, *Pichia saitoi* Kodama *et al.* 等の新種も発表されているがいずれも限られた個々の試料を対象としたもので緯度の異った本邦の全域にわたる樹液酵母の分布については未だ明かにされていない。著者らは本邦の各地の広葉樹の樹液に棲息する酵母のうち有孢子性酵母の分類学的研究を行い併せて醸造ないし醸酵工業に有用な菌種の検索を試みた。

本報では分離した334株のうち *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* および *Debaryomyces* の各属の菌株併せて247株について述べる。

実験方法

試料の採取

1. 試料： 各種の広葉樹を伐採した切株または樹皮をはいだ傷口に流出する樹液を対象とした。
2. 採取の時期および場所： 1967, 1968, 1972および1973年の4月中旬から7月中旬にわたり Fig. 1の地図に点で示した108個所の各試料から採取されたものである。
3. 採取の方法： Fig. 2に示す様な綿栓試験管内に、先端に綿片をつけた金属棒を挿入し試料を郵送の途中乾燥を防ぎ酵母の定着をはかるため管底に約1mlの米麴汁 (Bg. 12°, 100 ppmのクロランフェニコールを含む) を入れ常法により殺菌したものを準備する。採取現地で綿栓をとり、試験管内から引き抜いた金属棒の先端につけた綿片に樹液を塗布し、しみ込ませた後金属棒を管内におさめ綿栓し速達便で研究室へ送られたものである。

試料から酵母の分離

試料から酵母を分離するには次の2つの方法によ

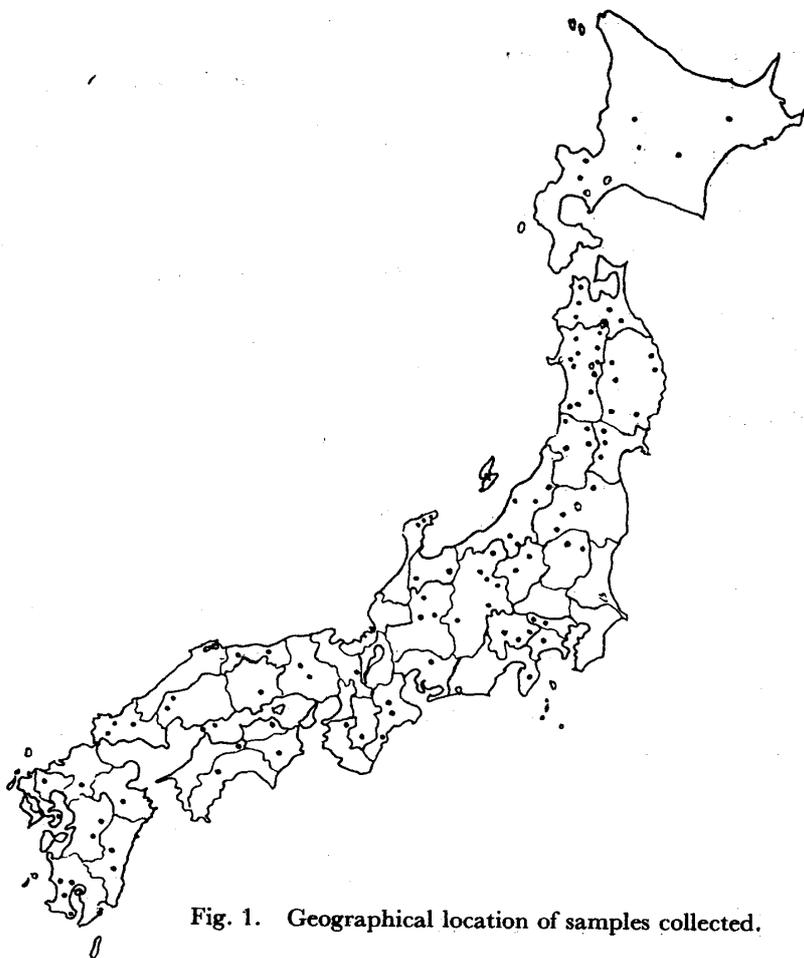


Fig. 1. Geographical location of samples collected.

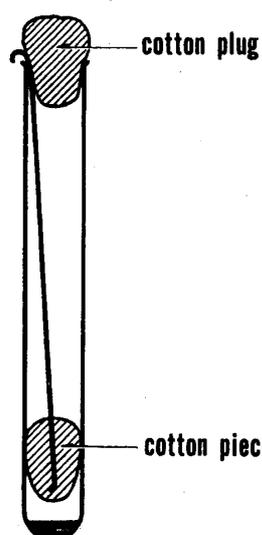


Fig. 2. Tool for sampling containing 1 ml of rice-koji extract with chloramphenicol (100 ppm).

った。

1 予め濃厚ニンジンエキス**と Bg. 12 の米麴汁エキスの等量混合培地 (以下 CK 培地と略称する) に 3% の粉末寒天を加えた固体培地を加熱溶解し, 予め殺菌したペトリシャーレに流し込み固化したものを準備し, この培地表面に試料の白金耳を直接画線塗布し 15°C および 25°C に 4~5 日保ち出現したコロニーのうち外観および検鏡により細胞形態の異なるものを鉤取し常法により純粋に分離した。

2 試料を次の 3 種の液体培地に混ぜ 25°C に 3~7 日間保ち酵母の集殖をはかった後 1 に準じ酵母を純粋に分離した。a) 本邦の醸造ないし醸酵工業に有用な *Saccharomyces* 属の酵母を優先的に分離する目的で Bg. 12 の米麴汁を用いた。b) 酢酸を資化する酵母を分離

Table 1. Selective media.

Media	Composition	
AC	CH ₃ COONa·3H ₂ O	5.0 g
	Peptone	5.0 g
	Yeast extract (dried)	3.0 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	(Chloramphenicol)	100 ppm
Distilled water	1,000 ml	
H	Glucose	10.0 g
	KNO ₃	1.0 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	(Chloramphenicol)	100 ppm
	Distilled water	1,000 ml

Both media contained Lodder's vitamin mixtures as follows: Biotin, 20μg; Ca-pantothenate, 2,000μg; Folic acid, 2μg; Inositol, 10,000μg; Niacin, 400μg; p-aminobenzoic acid, 200μg; Pyridoxine hydrochloride, 400μg; Riboflavin, 200μg; and Thiamine hydrochloride, 400μg.

する目的で Table 1 に示す AC 培地を用いた。c) *Hansenula* 属の酵母を分離する目的で硝酸加里を単一窒素源とする Table 1 に示す H 培地を用いた。

なお上述 A, B 何れの場合にもバクテリアの発育を抑えるため 100 ppm のクロランフェニコールを加えた。

純化した菌株を主として The Yeasts¹⁰⁾ の方法と命名法により分類した。

実験結果

分離した酵母の属種, 樹種および採取地 (都道府県名) を Table 2 に示す。

Table 2. Species isolated and their habitats

A. <i>Saccharomyces</i>					
		i. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen			
Scientific name of tree	Geographic site	Scientific name of tree	Geographic site	Scientific name of tree	Geographic site
<i>Acer mono</i>	Hokkaido	<i>Aesculus turbinata</i>	Aomori	<i>Alnus japonica</i>	Akita
<i>Tilia japonica</i>	"	<i>Vitis coignetiae</i>	"	<i>Quercus acutissima</i>	"
<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Cornus controversa</i>	"
<i>Tilia japonica</i>	"	<i>Fagus crenata</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	"
<i>Ulmus</i> sp.	"	<i>Fagus crenata</i>	"	<i>Aralia elata</i>	"
<i>Quercus</i> sp.	Aomori	<i>Celastrus orbiculatus</i>	Akita	<i>Acer</i> sp.	"

** 曾根田⁹⁾ の濃厚ニンジンエキス寒天培地の調製法に準じ水洗し細片にしたニンジン (鮮紅株) 1.0kg に 1.5l の水道水を加え果物用ミキサーですりつぶした後二重鍋の中で 1 時間煮沸後ガーゼで粗濾し

たものである。子ノウ胞子形成用にはこの鮮紅色を呈する粗濾液に 2% の寒天を加えたものを準備する。

<i>Quercus</i> sp.	Akita	<i>Acer matumurae</i>	Miyagi	<i>Betula</i> sp.	Miye
<i>Morus</i> sp.	Iwate	<i>Symplocos myrtacea</i>	"	<i>Magnolia</i> sp.	"
<i>Platycarya rhoifolia</i>	"	<i>Magnolia</i> sp.	"	<i>Stewartia monadelphha</i>	"
<i>Quercus monogolica</i>	"	<i>Quercus acutissima</i>	"	<i>Acer</i> sp.	Nara
<i>Acer mono</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	Gunma	<i>Acer mono</i>	"
<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Rhus</i> sp.	"	<i>Quercus acutissima</i>	"
<i>Quercus myrsinaefolia</i>	"	<i>Lagerstroemia indica</i>	Saitama	<i>Betula grossa</i>	"
<i>Betula ermnai</i>	"	<i>Camellia japonica</i>	Kanagawa	<i>Paulownia</i> sp.	"
<i>Acer mono</i>	"	<i>Celtis sinensis</i> var. <i>japonica</i>	"	<i>Quercus myrsinaefolia</i>	"
<i>Alnus japonica</i>	"	<i>Quercus acutissima</i>	"	<i>Quercus glauca</i>	Hyogo
<i>Betula ermani</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Quercus dentata</i>	Hiroshima
<i>Magnolia obovata</i>	Yamagata	<i>Quercus actissima</i>	Tokyo	<i>Quercus variabilis</i>	"
<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Quercus dentata</i>	"	<i>Quercus mongolia</i>	"
<i>Camellia japonica</i>	"	<i>Betula ermani</i>	Nagano	<i>Quercus</i> sp.	"
<i>Prunus grayana</i>	"	<i>Acer</i> sp.	"	<i>Quercus mongolica</i>	"
<i>Aralia elata</i>	"	<i>Acanthopanax sciadophylloides</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	Yamaguchi
<i>Acer mono</i>	"	<i>Betula</i> sp.	"	<i>Morus alba</i>	"
<i>Prunus</i> sp.	"	<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Camellia japonica</i>	"
<i>Sorbus alnifolia</i>	"	<i>Betula maximowiczii</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	Kochi
<i>Micromeles alnifolia</i>	"	<i>Quercus myrsinaefolia</i>	Ishikawa	<i>Ilex integra</i>	Kumamoto
<i>Quercus mongolica</i>	"	<i>Carpinus</i> sp.	"	<i>Quercus dentata</i>	Saga
<i>Quercus myrsinaefolia</i>	Fukushima	<i>Fagus japonica</i>	Gifu	<i>Rhus</i> sp.	"
<i>Platycarya strobilacea</i>	"	<i>Prunus</i> sp.	Shizuoka	<i>Quercus dentata</i>	Kagoshima
<i>Acer pyenanthum</i>	"	<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Rhus</i> sp.	"
<i>Prunus</i> sp.	"	<i>Quercus serrata</i>	"	<i>Camellia japonica</i>	"
<i>Castanea crenata</i>	"	<i>Castana crenata</i>	"	<i>Camellia</i> sp.	"
<i>Stewartia monadelphha</i>	Miyagi	<i>Betula grossa</i>	Miye	<i>Cornus controversa</i>	Miyasaki

ii. *Saccharomyces montanus* Phaff, Miller et Shifrine

<i>Quercus</i> sp.	Akita	<i>Prunus sargentii</i>	Yamagata	<i>Acer</i> sp.	Miye
<i>Micromeles alnifolia</i>	"	<i>Fagus</i> sp.	Miyagi	<i>Quercus</i> sp.	"
<i>Sorbus commixta</i>	"	<i>Cornus obovata</i>	Fukushima	<i>Aesculus</i> sp.	Tottori
<i>Platycarya rhoifolia</i>	"	<i>Actinidia polygama</i>	"	<i>Zelokowa serrata</i>	Hiroshima
<i>Juglans</i> sp.	"	<i>Salix</i> sp.	Niigata	<i>Quercus</i> sp.	Yamaguchi
<i>Kalopanax</i> sp.	"	<i>Fagus</i> sp.	"	<i>Magnolia obovata</i>	Tokushima
<i>Aesculus turbinata</i>	Iwate	"	"	<i>Quercus glauca</i>	Kagoshima
<i>Prunus persica</i>	"	"	"	<i>Celtis</i> sp.	Miyasaki
<i>Carpinus</i> sp.	"	<i>Fagus crenata</i>	Nagano	<i>Celtis sinensis</i>	"
<i>Prunus persica</i>	"	<i>Quercus serrata</i>	Ishikawa		

iii. *Saccharomyces uvarum* Beijerinck

<i>Platycarya rhoifolia</i>	Hokkaido	<i>Quercus mongolica</i>	Akita	<i>Fagus crenata</i> B	Tottori
<i>Quercus</i> sp.	Aomori	<i>Cornus controversa</i>	"	<i>Quercus mongolica</i>	"
<i>Aesculus turbinata</i>	"	<i>Quercus mongolica</i>	Yamagata	<i>Camellia sasanqua</i>	Yamaguchi
<i>Acer mono</i>	"	<i>Aralia elata</i>	Kanagawa	<i>Quercus dentata</i>	Kochi
<i>Alnus japonica</i>	Akita	<i>Juglans</i> sp.	Nagano	<i>Lagerstroemia</i> sp.	Saga
<i>Quercus acutissima</i>	"	<i>Betula</i> sp.	Nara	<i>Quercus dentata</i>	Kagoshima

iv. *Saccharomyces chevalieri* Guilliermond

<i>Vitis vinifera</i>	Akita	<i>Acer</i> sp.	Hyogo	<i>Quercus actissima</i>	Kagoshima
<i>Betula</i> sp.	Nagano				

v. *Saccharomyces florentianus* (Castelli) Lodder et Kreger-van Rij

<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	Hokkaido	<i>Acer</i> sp.	Miyasaki	<i>Machilus thumbergii</i>	Miyasaki
<i>Rhododendron</i> sp.	Iwate				

vi. <i>Saccharomyces pretoriensis</i> Van der walt et Tscheuschner					
<i>Cornus controversa</i>	Akita	<i>Rhus</i> sp.	Yamagata	<i>Magnolia obovata</i>	Miye
<i>Fagus crenata</i>	"				
vii. <i>Saccharomyces kluveri</i> Phaff, Miller et Schifrine					
<i>Aralia elata</i>	Kanagawa				
viii. <i>Saccharomyces rosei</i> (Guilliermond) Lodder et Kreger-van Rij					
<i>Prunus sargentii</i>	Kyoto				
B. <i>Schizosaccharomyces</i>					
ix. <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> Yukawa et Maki var. <i>japonicus</i>					
<i>Aesculus</i> sp.	Akita	<i>Quercus mongolica</i>	Yamagata	<i>Rhus</i> sp.	Hiroshima
<i>Quercus</i> sp.	"	<i>Castanea crenata</i>	"	<i>Quercus actissima</i>	"
<i>Fagus crenata</i>	"	<i>Acer sieboldianum</i>	"	<i>Carpinus</i> sp.	"
<i>Styrax japonica</i>	Iwate	<i>Platycarya</i> sp.	Fukushima	<i>Quercus controversa</i>	"
<i>Quercus mongolica</i>	"	<i>Fagus crenata</i>	"	<i>Rhus succedanea</i>	Ehime
<i>Betula ermnai</i>	"	<i>Magnolia obovata</i>	"	<i>Cleyera japonica</i>	Miyasaki
<i>Aesculus</i> sp.	Yamagata	<i>Prunus</i> sp.	Tokyo	<i>Quercus acctissima</i>	Kagoshima
<i>Prunus</i> sp.	"				
C. <i>Pichia</i>					
x. <i>Pichia saitoi</i> Kodama, Kyono et Kodama					
<i>Viburnum dilatatum</i>	Aomori	<i>Cinnamomum camphora</i>	Fukuoka	<i>Acer</i> sp.	Kumamoto
<i>Hamamelis japonica</i>	"	<i>Machilus japonica</i>	"	<i>Camellia</i> sp.	"
<i>Platycarya</i> sp.	Akita	<i>Machilus thunbergii</i>	"	<i>Machilus thunbergii</i>	"
<i>Betula platyphylla</i>	Nagano	<i>Cinnamomum japonicum</i>	Nagasaki	<i>Rhus sylvesteris</i>	Kagoshima
<i>Cornus controversa</i>	Wakayama	<i>Quercus acutissima</i>	"	<i>Castanea crenata</i>	"
<i>Acer</i> sp.	Yamaguchi				
xi. <i>Pichia dispersa</i> (Dekker) Kreger-van Rij					
<i>Betula ermani</i>	Hokkaido	<i>Prunus</i> sp.	Akita	<i>Betula ermani</i>	Nagano
<i>Betula maximowiczii</i>	"	<i>Acer mono</i>	"	<i>Clethra barbinervis</i>	Yamanashi
<i>Cornus controversa</i>	Akita	<i>Castanea cretana</i>	Yamagata	<i>Betula grossa</i>	Gifu
<i>Zelkova serrata</i>	"	<i>Quercus mongolica</i>	Tochigi	<i>Betula</i> sp.	Wakayama
<i>Fagus crenata</i>	"	<i>Betula platyphylla</i>	Nagano	<i>Quercus</i> sp.	Yamaguchi
xii. <i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen					
<i>Aesculus turbinata</i>	Aomori	<i>Castanea cretana</i>	Nagano	<i>Carpinus</i> sp.	Yehime
<i>Magnolia obovata</i>	Yamagata	<i>Prunus</i> sp.	Yamanashi	<i>Prunus</i> sp.	"
<i>Prunus</i> sp.	Fukushima	<i>Cornus macrophylla</i>	Miye	<i>Machilus thunbergii</i>	Miyasaki
<i>Acer</i> sp.	Nagano	<i>Zelkova serrata</i>	"		
xiii. <i>Pichia pinus</i> (Holst) Phaff					
<i>Betula maximowiczii</i>	Hokkaido	<i>Zelkova serrata</i>	Miyagi	<i>Alnus japonica</i>	Gumma
<i>Betula</i> sp.	"	<i>Prunus</i> sp.	"	<i>Betula ermani</i>	Gifu
<i>Zelkova serrata</i>	Akita	<i>Quercus</i> sp.	Gumma		
xiv. <i>Pichia toletana</i> (Socias Ramirez et Pelaez) Kreger-van Rij					
<i>Betula</i> sp.	Akita	<i>Acer mono</i>	Iwate	<i>Acer</i> sp.	Miye
xv. <i>Pichia naganishii</i> Kodama sp. n.					
<i>Camellia japonica</i>	Nagasaki				
xvi. <i>Pichia fermentans</i> Lodder					
<i>Zelkova serrata</i>	Iwate				

		xvii. <i>Pichia trehalophila</i> Phaff, Miller et Spencer
<i>Fagus crenata</i>	Aomori	
		xviii. <i>Pichia strasburgensis</i> (Ramirez et Boidin) Phaff
<i>Quercus</i> sp.	Akita	

D. *Debaryomyces*

		xix. <i>Debaryomyces hanseii</i> (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij	
<i>Magnolia obovata</i>	Aomori	<i>Fagus crenata</i> Iwate	<i>Prunus sargentii</i> Nagano
<i>Zelkova serrata</i>	Akita	<i>Magnolia obovata</i> Yamagata	<i>Quercus serrata</i> Kagawa
<i>Prunus mume</i>	"	<i>Prunus</i> sp. Nagano	

Saccharomyces 属

i *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 本菌種に属するものはコナラ属のクヌギ始め各種の樹液から99株分離され最も広く分布しており、ことに1子ノウ中4ケの胞子を有する *S. cerevisiae* Hansen var. *tetrasporus* 型¹¹⁾のものが多く認められた (Fig. 3)。前述の様に本菌種群は野生の清酒酵母を分離する目的で試料を一度米麴に混ぜ集殖を試みた後分離されたものであるが竹田(私信)によれば分離した菌株群は竹田, 塚原^{12,13)}により確認されている清酒酵母の諸特性を示さないものである。この点蒸米や米麴などの存在しない環境には *S. cerevisiae* のうち清酒酵母群が棲息しない事実は生態学的な見地から興味深い。

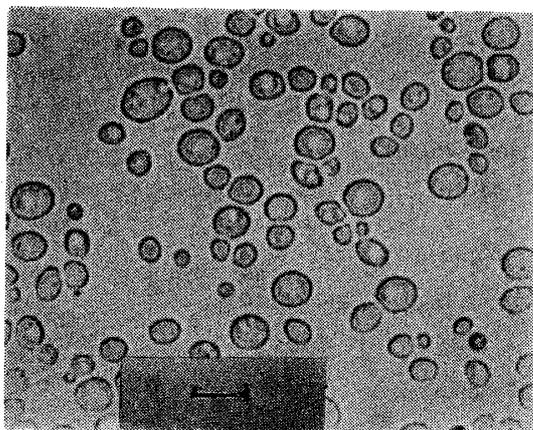
ii *Saccharomyces montanus* Phaff, Miller et Schiffrine 本菌株に属するものは29株分離され *S. cerevisiae* について広く分布していることが認められた。本菌種は Phaff ら¹⁴⁾によりカリフォルニア州の *Drosophila* の消化管から分離されたものであるが Phaff ら¹⁴⁾により米国の西部海岸地域の樹液から分離されなかった事実から、同氏らは樹液が *Drosophila* の餌となっていないものと推定している。この点本菌種がよく分離される本邦の

樹液と *Drosophila* の餌との関係を追求する必要がある様に思う。

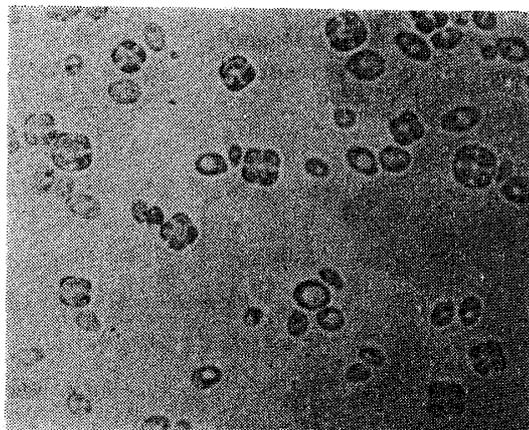
iii *Saccharomyces uvarum* Beijerinck メリビオースを醸酵する性質を除き他のすべての性質において *S. cerevisiae* に類似する本菌種に属するものが18株分離された。以上の3種が本邦の樹液酵母のうち *Saccharomyces* 属の代表的なものと認められるがこれらの species に混って (iv) *S. chevalieri* (v) *S. florentianus* (vi) *S. pretoriensis* (vii) *S. kluyveri*, (viii) *S. rosei* 等の菌種も散見的に分離された。

Schizosaccharomyces 属

(ix) *Schizosaccharomyces japonicus* Yukawa et Maki var. *japonicus* 本菌種は戦前斎藤, 大谷¹⁵⁾により静岡県のクヌギの樹液から分離されたものであるが今回の試料からも22株分離された。本属の菌種は一般に熱帯ないし亜熱帯地方に棲息するものとされていたが本邦の樹液については中国, 四国, 九州地方だけでなく秋田, 岩手, 山形等東北地方の試料からも分離され広く分布していることが認められた。また本菌種は Yoneyama¹⁶⁾も指摘している様にやや嫌気性を有し平板培地の表面にコロニーを形成し難く米麴汁の試験管



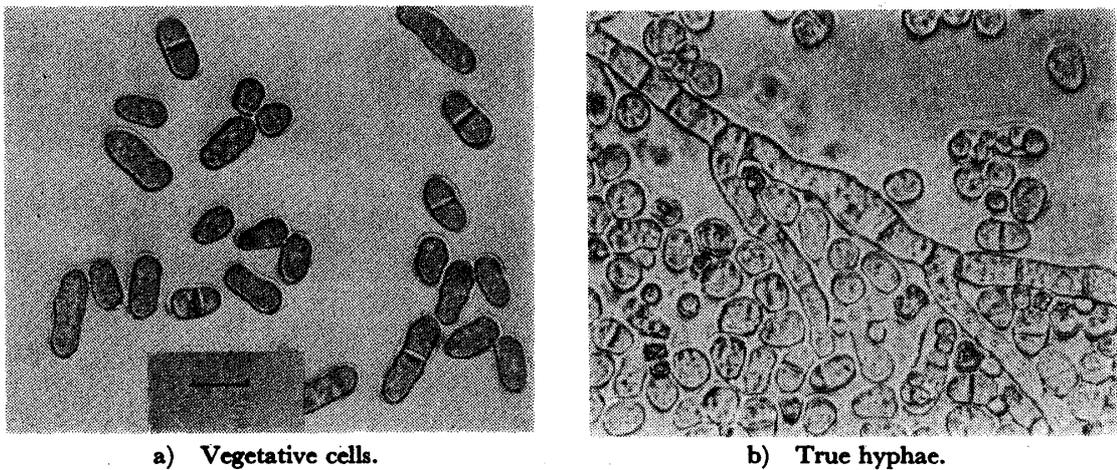
a) Vegetative cells.



b) Ascospores.

Fig. 3. *S. cerevisiae*.

Scale: ——— indicates 10 μm.

Fig. 4. *Schizosaccharomyces japonicus*.Scale: ——— indicates 10 μm .

培地に集殖したフロック状の沈渣から分離されたものが多い (Fig. 4). 本菌種の菌株を *Saccharomyces* 属の酵母(とくに *S. cerevisiae* 群)の混在する試料から集殖を試みるにあたり後者の酵母が優先的に発育し本菌種のもを分離出来ない場合が多かったので本菌種が高温でもよく発育出来る性質に着眼し 40–42°C で集殖を試み他の酵母の発育を抑え本菌種を容易に分離することが出来た。

Pichia 属

(x) *Pichia saitoi* Kodama, Kyono et Kodama 本菌種は三重県のシデの樹液から始めて分離されたものであるが今回の試料からも16株分離され広く分布している事が確認されたが Phaff ら¹⁴⁾により北米およびアラスカの西部海岸の樹液からは分離されていないので本邦の樹液に特有なものとして推定される。

(xi) *Pichia dispersa* (Dekker) Kreger-van Rij 本菌種は古く Beijerinck¹⁶⁾によりカシの樹液から分離され *S. dispersus* 戦後, 中瀬, 駒形⁸⁾により本邦のカシの樹液から分離され *Pichia zaruensis* とそれぞれ命名されたものであるが, 今回の試料からも15株分離され *Pichia saitoi* とともに本邦の樹液に特有な *Pichia* 属の酵母として広く分布していることが認められる。

(xii) *Pichia membranaefaciens* Hansen 本菌種は酢酸を資化することが小玉¹⁷⁾により確認されているもので酢酸ソーダを単一の炭素源とする AC 培地に集殖を試み選択的に11株分離されたもので前述の2種と共にかかなり広く分布しているものと認められる。

(xiii) *Pichia pinus* (Holst) Phaff 本菌種は Phaff ら¹⁴⁾により本邦の樹液から分離されていないが前述の様な各種の液体培地に集殖を試み8株分離された。

(xiv) *Pichia toletana* (Socias, Ramirez et Peláez) Kreger-van Rij 本菌種も3株分離された。

(xv) *Pichia naganishii* Kodama sp. n. 本菌種は長崎県のツバキの樹液から唯一株分離されたもので異胎接合および単性生殖により子ノウを形成し1子ノウ中2~4ケのフチの短い帽子型(電子顕微鏡下の超切片像ではヘルメット型)の胞子を形成する (Fig. 5). 糖類の資化性からその類縁を求めると *Pichia angophorae* Miller et Barker¹⁸⁾ および *Pichia bovis* van Uden et do Carmo Sousa¹⁹⁾ がある。しかし本菌種は前者と異なり仮菌糸を形成せずサッカロースおよびマルトースを醸酵しないが L-アラビノース, D-リボース, L-ラムノース, グリセロールおよびエリスリトールを資化し 37°C で発育する。又後者とは上述の炭素化合物の外, リビトール, ガラクチトールを資化し胞子の形成に先立ち異胎接合をすることで区別される。依って本菌種を *Pichia* 属の一新種と見做し酵母の分類学に功労のあった長西広輔の名に因み *Pichia naganishii* と命名し

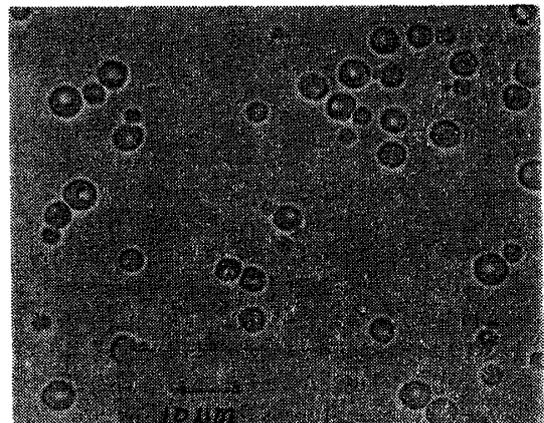
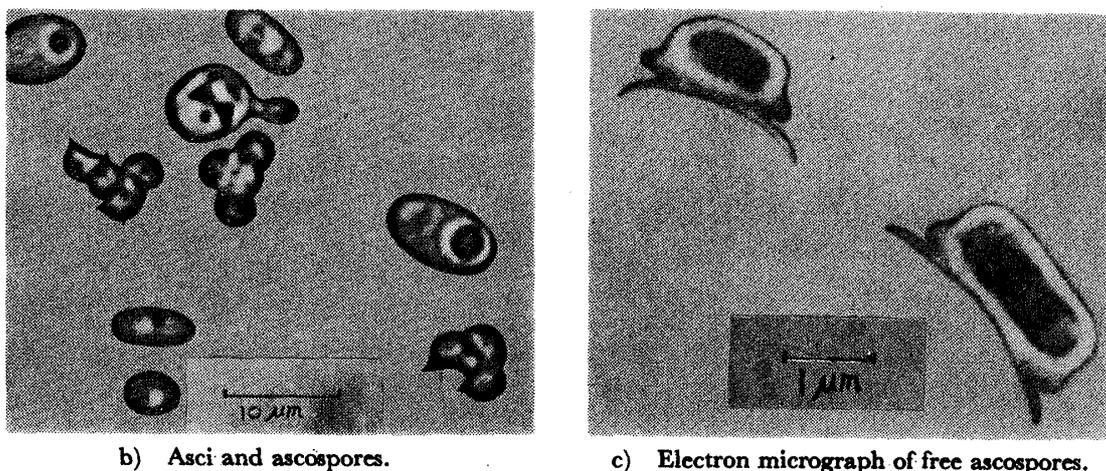


Fig. 5. a) Vegetative cells.



b) Asci and ascospores.

c) Electron micrograph of free ascospores.

Fig. 5. *Pichia naganishii* sp. nov.Table 3. Description of *Pichia naganishii* Kodama sp. n.

Growth in malt extract: After 3 days at 25°C, the cells are short oval to oval, (2.5–5.0) × (3.0–7.0) μ; single or in pairs. No early formation of ring or pellicle is observed. After one month at 17°C a slight ring and sediment are present.

Growth on malt agar: Cell morphology is similar to that observed in malt extract. After one month at 17°C, the streak culture is dull, cream-colored, soft, and smooth.

Slide culture on potato agar: No pseudomycelium is formed.

Formation of ascospores: Asci are formed after heterogamic conjugation or without apparent conjugation, forming only protuberances. Spores are hat-shaped with a short brim and a lipid globule. Two to four spores are formed per ascus. The asci rupture upon maturity, easily liberating the spores. The presence of many spores give the culture a reddish-brown color.

Fermentation:

Glucose	+	Sucrose	–	Lactose	–
Galactose	–	Maltose	–	Raffinose	–

Assimilation of carbon compounds:

Glucose	+	Melezitose	+	Ribitol	+
Galactose	– or + (latent)	Inulin	–	Galactitol	+
L-Sorbose	+	Soluble starch	–	D-Mannitol	+
Sucrose	+	D-Xylose	+	D-Glucitol	+
Maltose	+	L-Arabinose	+	α-Methyl-D-glucoside	+
Cellobiose	+	D-Ribose	+	Salicin	+
Trehalose	+	L-Rhamnose	+	Lactic acid	+
Lactose	–	Ethanol	+	Succinic acid	+
Melibiose	–	Glycerol	+	Citric acid	+
Raffinose	–	i-Erythritol	+	i-Inositol	–

Splitting of arbutin: Positive.

Assimilation of potassium nitrate: Negative.

Growth in vitamin-free medium: Negative.

Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar: Negative.

Growth at 37°C: Positive.

DNA Base Composition: Tm (°C) 88.2, GC content (mol. %) 46.1

Source: Isolated from exudate of *Camellia japonica* L. in Nagasaki Prefecture, Japan.

Type: Type culture is deposited as No. 6429 in the collection of the Yeast Division of the Central-bureau voor Schimmelcultures in Delft, Holland.

Table 4. Latin diagnosis of *Pichia naganishii* Kodama sp. n.

In extracto malti cellulae subovoideae aut ovoideae $(2.5-5.0) \times (3.0-7.0) \mu$, singulae aut binae. Sedimentum et annulus formantur. Pellicula nulla. Cultura in agro malti (post unum mensem 17°C) non-nitida, flavida-albida mollis, glabra. Pseudomycelium nullum. Asci formantur ex conjugatione cellularum haploidearum aut ex transformatione cellurum vegetativarum diploidearum. Ascosporeae pileiformae, 2-4 in quoque asco. Glucosum fermentatur. In medio minerali glucosum galactosum (var.) L-sorbosum maltosum, cellobiosum, trehalosum, melezitium, D-xylosum, L-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, ethanolum, glycerolum, *i*-erythritolum, ribitolum, galactitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, α -methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum lacticum, acidum succinicum et acidum citricum assimilantur at non lactosum, melibiosum, raffinoseum, inulinum, amyllum solubile, nec *i*-inositolum.

Arbutinum finditur.

Kalium nitricum non-assimilantur.

Ad crescentiam vitaminarum externarum necessariae sunt.

Crescit in 37°C .

Isolata ex exsudato *Camellia japonica* L. in Praefectura Nagasaki Japoniae.

た。Table 3 および Table 4 にそれぞれ本菌種の標徴およびラテン語の記載を示す。その後 Phaff ら¹³⁾も本菌種に同定される 1 株を宮崎県のサカキの樹液から分離しているが米国の西部海岸の試料からは分離していない。恐らく本邦の樹液に特有のものと推定される。以上の菌種の外に (xvi) *Pichia fermentans*, (xvii) *pichia trehalophila*, (xviii) *Pichia strasburgensis* 等の菌種も稀に分離された。

Debaryomyces 属

本属の菌種としては唯 1 種 (xix) *Debaryomyces hansenii* に属するものが 8 株分離された。

要 約

本邦産の樹液酵母のうち有胞子性の 4 属の酵母を検索した結果について述べた。Saccharomyces 属の酵母として *S. cerevisiae* が最も広くついで *S. montanus*, *S. uvarum* の 2 種が分布しておりこれらの 3 種が代表的なものであるが稀に *S. chevalieri*, *S. florentianus*, *S. pretoriensis*, *S. kluyveri* *S. rosei* 等の菌種も分離された。Schizosaccharomyces 属の酵母としては *Schizosacch. japonicus* が広く分布している。*Pichia* 属の酵母としては *P. saitoi* と *P. dispersa* の 2 種が代表的なものでしかも本邦の樹液に特有なものと推定される。この 2 種と共に *P. membranaefaciens* もかなり広く分布しておりついで *P. pinus*, *P. toletana* 稀に *P. fermentans*, *P. trehalophila*, *P. strasburgensis* 等の菌種も分離された。なお長崎県のツバキの樹液から分離された 1 種は炭素化合物の資化性および多くの菌学的性質において既知菌種に該当するものがないので新種と認め *Pichia naganishii* Kodama sp.n. と命名した。*Debaryomyces* 属の酵母としては唯一種 *Debaryomyces hansenii* が分離された。

本研究を実施するにあたり樹液試料の採取に協力下された岩手大学塩田日出夫, 山形大学林部正也, 東北大学高橋宏明, 宇都宮大学渡辺竜雄, 山梨大学後藤昭二, 富山大学根井邦二, 三重大学山本潔

美, 鳥取大学梅津雅裕, 九州大学上田誠之助, 長崎大学銭谷武平の諸先生始め官民の醸造ないし醸造技術者の各位併せて 77 名の方々に衷心から感謝の意を表します。又討論および助言をいただいた Dr. N. J. W. Kreger-van Rij, Dr. J. P. van der Walt および Prof. H. J. Phaff, G. C. 含有量測定の方をとりた味の素 K. K. 中央研究所中瀬崇氏および今回樹液から分離された *S. cerevisiae* 群について清酒酵母の特性の有無を検討された東京農大, 竹田正久の各位に厚くお礼申し上げます。本報の概要は 1972 年 3 月京都で開かれた第 4 回国際醸造会議の general paper session で発表した。

文 献

- 1) 斎藤, 大谷: 醸造, 9, 178 (1931).
- 2) 斎藤: 醸造, 10, 11 (1932).
- 3) 斎藤: 醸造, 16, 599 (1938).
- 4) Kobayashi, Y.: *Bull. Natr. Sci, Mus., Tokyo.*, 33, 31 (1953).
- 5) Yoneyama, M.: *Bull. Biol. Soc. Hiroshima Univ.*, 10, 21 (1956).
- 6) Soneda, M.: *J. Jap. Bot.*, 32, 347 (1957).
- 7) Kodama, K., Kyono, T., Kodama, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 8, 52 (1962).
- 8) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12, 347 (1966).
- 9) 曾根田: 長研報 No. 5 (1955).
- 10) Lodder, J. (ed): *The Yeasts* (2nd Ed), North Holland Publ. Co., Amsterdam (1970).
- 11) Phaff, H. J., Miller, M. W. Shifrine, M.: *Anotomie van Leeuwenhoek*, 22, 145 (1956)
- 12) 竹田, 塚原: 醸協, 8, 352 (1965).
- 13) 竹田, 塚原: 醸協, 10, 449 (1965).
- 14) Phaff, H. J. Miller, M. W., Yoneyama, M., Soneda, M.: *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*, 759, Soc. Ferment. Technol., Japan Osaka (1972).
- 15) Yoneyama, M.: *J. Sci. Hiroshima Univ. Biol. Div.*, 27, 91 (1956).
- 16) Beijerinck, M. W.: *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, 4, 728 (1908).
- 17) 小玉: 醸協, 22, 491 (1964).
- 18) Miller, M. W., Barker, E. R.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 34, 183 (1968).
- 19) Uden, N., do Carmo-Sousa, L.: *J. Gen. Microbiol.*, 16, 385 (1957).

(昭48.8.10受付)