耐塩性キラー酵母の分離と同定

鬼頭幸男・北本則行・細川信男
大島克己・岡田安司・木村哲哉

味噌、醤油の醸造は開放系のタンクで発酵を行うため，産膜酵母などの有害な酵母が醸造中に混入して品質の低下を招くことがある。また，火入れ後の保存料的な効果を期待してアルコールを添加している場合がある。一方，酵母の中に自分以外の酵母を殺すキラー酵母と呼ばれる酵母が存在している。このキラー性を利用して醸造中の有害酵母の汚染を防ぐ試みが既にワインの醸造などでは行われている。そこで味噌，醤油に用いる耐塩性酵母の中でこのようなキラー酵母を分離すれば醸造に利用できるのではないかと考え味噌，醤油の諸味の中からスクリーニングを行った。

実　験　方　法

1．耐塩性酵母の分離及び分類方法

県内メーカーの協力を得て，発酵中あるいは熟成した味噌，醤油諸味，生引き溜，白醤油諸味，生揚げ白醤油を収集し試料とした。試料を15％食塩水で10倍希釈し，更に必要に応じて連続希釈し，希釈液の0.1mlを基本培地（pH5.2）[1]に塗抹した後，30℃，５日間培養して単コロニー分離した。コロニーカウンターで出現したコロニー数を性状別に計数するとともに，同一菌株の釣菌を少なくするため各性状のコロニーを50個ずつ竹串にて釣菌し，10％塩化ナトリウムＭＧ培地に移植し保存した。このコロニーを，森ら[1]の醤油諸味中の酵母の分別計数法で使用されている４種類の培地に移植し，30℃で６日間培養し，コロニーの生育状況を調べた。またα－ナフチルリン酸とファーストブルーＢ塩を用いて酸性フォスファターゼ（ＡＣＰ活性）を検出した。

2．キラー酵母の分離及び分類

各食塩濃度のＭＢＭプレート上に約10^6となるように検定菌（*Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0517, *Hansenula anomala* IFO 0569）を噴霧し，単離した耐塩性酵母を竹串を用いて植菌して25℃にて培養し，ハローの形成を観察した。

分離したキラー酵母についてThe Yeast[2]の方法により分類を行った。

3．分離耐塩性キラー酵母の培養及び生理試験

3．1　生育温度試験　分離耐塩性キラー酵母H－18，22，43，47，O－38，39株を2％ぶどう糖・酵母エキス・ペプトン培地で1日間前培養を行い，同培地が10mlずつ注入されたL型試験管に菌数が5×10^4／mlとなるように前培養液の10倍希釈液を添加した。このL型試験管を振盪温度勾配培養装置（東洋）へ差込み，振盪培養（モノー式，33rpm）した。H－18，22は9日間，H－43，47は10日間振盪培養した。O－38，39は7日間振盪培養した。定期的に比濁計により吸光度を測定した。次いで生育最高温度と生育最適温度に相当するL型試験管の培養液の総菌数を測定し，平板塗抹法により単コロニー分離するとともに生菌数を測定した。塗抹プレートの培養温度はH－18，22，43，47は25℃で行い，O－38，39は25℃と37℃で行った。ここで得られたコロニーについて，後で述べるようにキラー欠落試験を行った。

3．2　食塩含有培地での生育　食塩を0～20％まで添加したYM培地10mlに，3％食塩を含むYM培地で前培養（28℃，1日）した前培養液を菌体濃度が1×10^5／mlとなるように接種して生育試験（25℃，静置培養）を行った。定期的に吸光度を測定して生育を観察した。

3．3　シクロヘキシミドに対する抵抗性試験　1.675gのBacto yeast nitrogen baseと2.5gのぶどう糖を水に溶解して25mlに定容し，0.22μmのメンブランフィルターで滅菌濾過した。別に直径18mmの試験管に5.4ml，5.28ml，5.16ml，5.04ml，4.92mlのイオン交換水を加えて高圧滅菌し，これに先きに調製した濾液を各0.6mlと，シクロヘキシミド溶液（1mg／ml）をそれぞれ0（0ppm），120（20ppm），240（40ppm），360（60ppm），480（80ppm）μl添加し，6mlの培地として生育試験を行った。同様に最終濃度で2，6，10，100ppmの濃度でも抵抗性試験を行った。上記培地に前者では2％ぶどう糖・酵母エキス・ペプトン培地で，後者では5％食塩MG培地で前培養した菌体を菌体濃度が5×10^5／mlとなるように接種後，25℃で振盪培養し，経時的に濁度により増殖度を測定した。この溶液から単コロニー分離するとともにキラー欠落試験を行った。

3．4　キラー欠落試験　キラー感受性株として*H. anomala* IFO 0569を用いて食塩を含むMBMプレート上でキラー活性を調べた。キラー活性についてはスクリーニングに用いた方法をそのまま行った。各条件について50株ずつを選んでキラー活性を調べた。また，比較試験として*S. cerevisiae* 007と*K. lactis* IFO 1267について食塩の存在しない培地で，感受性株として*C. glabrata* IFO 0622を用いてキラー性の欠落を調べた。

その他の試薬については市販の特級あるいは一級品を用いた。また使用した培地を第13表にまとめて示した。

実験結果及び考察

1．耐塩性キラー酵母のスクリーニング

県内メーカーより収集した33検体の試料より森らの醤油諸味中酵母の分別法にしたがって試料中に存在する酵母を分類したところ，白醤油以外は*Zygosaccharomyces*属及び*Candida*属Ⅴグループが非常に多く存在していた（第１表）。しかし，米味噌や白醤油に関しては試料数が少なかったため，この結果が一般的に見いだされる結果かどうかは更に検討が必要と思われる。

第１表　分離醸造食品中の耐塩性酵母の分別計数

試料の種類	収集試料数	試料中の平均酵母数（酵母数範囲）	試料中酵母の群分類（割合）				
			*Zygosaccharomyces*属及び*Candida*属（Ⅴ）グループ	*Candida*属（Ⅲ）グループ	*Pichia*-*Debaryomyces*属	*Hansenula*属	*Candida*属（Ⅳ）グループ
味噌							
米味噌	3	5.7×10^{6}/g（3.3×10^{5}～1.6×10^{7}/g）	100%	0%	0%	0%	0%
豆味噌	5	4.3×10^{5}/g（7.5×10^{2}～5.6×10^{5}/g）	98.2%	0.1%	0%	0%	1.7%
溜醤油							
諸味	2	4.5×10^{6}/g（2.0×10^{6}～7.0×10^{6}/g）	49.4%	11.1%	13.1%	0%	26.4%
生引き溜	19	8.0×10^{5}/ml（1.9×10^{3}～6.0×10^{6}/ml）	49.3%	11.4%	25.7%	4.9%	8.7%
白醤油							
諸味	2	1.3×10^{7}/g（3.7×10^{5}～2.6×10^{7}/g）	29.3%	0%	7.0%	0%	63.7%
生揚醤油	2	2.6×10^{7}/ml（8.5×10^{6}～4.4×10^{7}/ml）	100%	0%	0%	0%	0%
計	33						

キラー酵母を分離するため，試料中に存在する酵母の種類をより広く拾い，各試料より単離した約2500株の耐塩性酵母をコロニーの性状でグループ分けして，これらを上記の方法で分類した。味噌，溜，白醤油いずれにおいても最も多く分類された菌株は，*Zygosaccharomyces*属及び*Candida*属Ⅴグループであった。森らは，分類用培地プレートに菌懸濁液を塗抹し，５日間培養後のコロニーの形成により生育を判断し，両属の分類をしているが，本実験では竹串にて接種して生育を見たため両属を分別できなかった（第２表）。

これらの株についてキラー性を調べたところ同一メーカーの八分溜諸味より，耐塩性キラー酵母，H－18，22，43，47を（ただしH－22のみ異なる諸味より分離），また別のメーカーの白醤油諸味よりO－

第２表　分離源別試料数と分離菌株数

分離源	収集試料数	総　数	分離菌株数				
			群別内訳（割合％）[2]				
			*Zygosaccharo-myces*属及び*Candida*属（Ⅴ）グループ	*Candida*属（Ⅲ）グループ	*Pichia-Debaryo-myces*属	*Hansenula*属	*Candida*属（Ⅳ）グループ
味噌[1]							
米味噌	3	299	299 (100%)	0	0	0	0
豆味噌	5	340	287 (84.4%)	3 (0.9%)	0	0	50 (14.7%)
溜醤油							
諸味	2	156	82 (52.6%)	13 (8.3%)	16 (10.3%)	0	45 (28.8%)
生引き溜	１９	1280	628 (49.1%)	155 (12.1%)	245 (19.1%)	46 (3.6%)	206 (16.1%)
白醤油							
諸味	2	249	105 (42.2%)	0	22 (8.8%)	0	122 (49.0%)
生揚醤油	2	170	170 (100%)	0	0	0	0
計	33	2494	1571 (63.0%)	171 (6.9%)	283 (11.3%)	46 (1.8%)	423 (17.0%)

１）半熟成品も含む

２）森らの醤油諸味中酵母の分別計数法を利用して群分類した。本法では分離菌株を分類プレート上に竹串にて接種したためコロニー形成の判別が不正確となり*Zygosaccharomyces*属と*Candida*属（Ⅴ）グループの分別ができなかった。

38，39を分離した。いずれも*H. anomala*を標的菌にして，高濃度食塩培地でのみキラー活性が観察された。これら分離されたキラー酵母を上記の方法で分類したところ*Candia*属Ⅳのグループに属することがわかった（第３，４表）。この属に入る酵母は第４表に示すように味噌醤油醸造における雑酵母とされている。味噌醤油醸造において重要とされている後熟酵母（*C. versatilis*,*C. etchellsii*）は*Candida*属Ⅲグループに属しており今回単離した酵母とは異なっていた。現在までに報告されている耐塩性のキラー酵母は*Debaryomyces hansenii*[3], *Hansenula anomala*[4~7]と*Pichia farinosa*, *Candia*属酵母[8, 9]であるが，今回単離したようなキラースペクトル（第５表）を示すキラー酵母は報告されておらず，新しいタイプのキラー酵母と思われる。

２．単離したキラー酵母の同定

単離したキラー酵母の同定をThe Yeastの方法にしたがって行った。第６表に示すように形態的特徴

第３表　分離耐塩性キラー酵母の分類

菌株＼培地	A （ＡＣＰ活性）	B （ＡＣＰ活性）	C	D
Ｈ－18	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
Ｈ－22	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
Ｈ－43	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
Ｈ－47	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
Ｏ－38	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
Ｏ－39	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋
*Candida*属 ＩＶグループ	＋ （＋）	＋ （＋）	＋	＋

＋：生育　　（＋：ＡＣＰ活性陽性）

培地：Ａ，基本培地（pH5.2），Ｂ；1/15M塩化リチウム添加基本培地（pH5.2）

Ｂ，基本培地（pH6.5），Ｄ；1/15M塩化リチウム添加基本培地（pH6.5）

第４表　*Candida*属ＩＶグループ

C. entomophila	*C. membranaefaciens*
C. famata	*C. rhagii*
C. fennica	*C. silvanorum*
C. friendrichii	*C. silvicultrix*
C. insectorum	*C. variabilis*

第5表　分離耐塩性キラー酵母のキラースペクトル

分離耐塩性キラー酵母		H－18			H－22			H－43			H－47			O－38			O－39		
食塩濃度																			
検定菌	IFO	0	4	12	0	4	12	0	4	12	0	4	12	0	4	12	0	4	12
C. etchellsii	10037	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
C. versatilis	10056	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋
C. versatilis	10038	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
D. hansenii	0855	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
D. tamarii	0854	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
H. anomala	0144	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋
H. anomala	0569	－	－	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	＋	－	＋	＋	－	＋	＋
Z. rouxii	0494	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋
Z. rouxii	0510	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋
Z. rouxii	0517	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	－	＋	＋
Z. rouxii	1130	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
Z. rouxii	1730	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋
Z. rouxii	1877	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	－	＋	＋

食塩濃度　％（W／V）　　＋：死菌帯形成

第6表　耐塩性キラー酵母の性質

	H－18	H－22	H－43	H－47	O－38	O－39
形態	4 μm 球形－楕円	4 μm 球形－楕円	4 μm 球形－楕円	4 μm 球形－楕円	2 μm 球形	2 μm 球形
胞子	－	－	－	－	－	－
偽菌糸	－	－	－	－	＋	＋
硝酸塩資化能	－	－	－	－	－	－

はH－18，22，43，47については楕円形で，その大きさは比較的大きく4 μm程度あった。これに対して，O－38，39はやや小さく2 μm前後の球形をしていた。胞子の形成については，McClary培地，酢酸ナトリウム培地で調べたが観察されなかった。酵母の同定では胞子の形成の有無が重要な鍵となることが多い[10, 11]。今回用いた培地では胞子の形成は確認できなかったので，厳密にはこの他の培地でも調べてみる必要があるかも知れないが，胞子の形成がないと云うことで，今回分離された酵母は*Candida*属に属すると推論した。*Candida*属は偽菌子を形成するものが多いが，O－38，39についてはYM培地で偽菌子が観察された。硝酸塩の資化性についてはすべての株でマイナスであった。さらに詳細に分類

をするために様々な糖についての資化性と発酵特性を調べたが（第７，８表），これだけでは種を同定するまでには至らなかった。しかしながら，その特徴からＨ－18，43，47は同じグループとしてまとめることができるものと考えられ、Ｏ－38，39についても同じグループに属する可能性が示唆された。さらに次の３項に述べるようにそれらの培養上の特徴からもこのことが推察された。

第７表　分離耐塩性キラー酵母の糖資化性

	Ｈ－18	Ｈ－22	Ｈ－43	Ｈ－47	Ｏ－38	Ｏ－39
グルコース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
ガラクトース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
シュクロース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
マルトース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
ラクトース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
メリビオース	－	－	－	－	－	－
ラフィノース	＋	＋	＋	＋	－	－

第８表　分離耐塩性キラー酵母の糖発酵性

	Ｈ－18	Ｈ－22	Ｈ－43	Ｈ－47	Ｏ－38	Ｏ－39
グルコース	＋	＋	＋	＋	＋	＋
ガラクトース	－	－	－	－	＋	＋
シュクロース	＋	－	＋	＋	－	－
マルトース	－	－	－	－	－	－
ラクトース	－	－	－	－	－	－
メリビオース	－	－	－	－	－	－
ラフィノース	＋	＋	＋	＋	－	－

３．単離したキラー酵母の培養上の特徴

３．１　液体培地における培養上の特徴　０～24％の食塩を含むＹＭ培地で試験管を用いて静置培養したとき，次のような特徴を示した。

Ｈ－18，43，47株は２日後には０～９％食塩培地ではっきりした皮膜を形成し，産膜酵母の特徴を示した。３週間後にはさらに増殖にともない，いずれの食塩濃度でも皮膜を形成した。Ｈ－22株は２週間後６～12％の範囲の食塩濃度であまり厚くない皮膜を形成し，３週間後には６～15％で皮膜の形成が観

察された。O－38，39株ははっきりとした皮膜の形成は認められず，増殖とともに全食塩濃度で薄くて不完全な膜を生成した。いずれの株についても，増殖のよい試験区ほど多量の沈降した菌体が観察された。

3．2　生育温度について　　2％ぶどう糖・酵母エキス・ペプトン培地における最高生育温度はO－38，39が37～38℃，H－22は28～29℃，H－18，43，47は26℃であった（第1図）。O－38，39株は，37℃で，YM培地，5％食塩MG培地，酵母用完全培地など寒天培地上でも生育が可能であった。

第1図　分離耐塩性キラー酵母の生育に及ぼす温度の影響

3．3　**食塩を含んだ培地での生育について**　　H－18，43，47株，O－38，39株は2％の食塩濃度が最も生育が良かったが，食塩の存在しない培地や高濃度の食塩（21％）まで生育の良好な通性好塩性菌であった。これらの株はいずれも15％前後の食塩濃度で一度増殖の低下する点が存在した（第2図）。

第2図　種々の食塩濃度における分離耐塩性キラー酵母の生育状態

これはこれらの菌株の細胞が高濃度の食塩に順応するため，細胞内の環境を変化させるポイントではないかと考えられる。これらの株に対してH－22株だけは約6％の食塩濃度で最も生育がよく，それよりも食塩濃度が高くなるにしたがって生育が悪くなることから，好塩性菌ではあるがその他の株とは浸透圧に適応するメカニズムが少し異なっていることが示唆される。*Z. rouxii*は3％の食塩濃度で最もよく生育し，食塩濃度が上がるにしたがって生育が落ちることから，H－22株はこのタイプの耐塩メカニズムを持っているものと推察される。

3．4　シクロヘキシミドに対する抵抗性　前培養したキラー酵母をシクロヘキシミドを含む培地に接種して耐性を調べたところ，分類同定の指標となる100ppmではいずれの株も増殖が認められなかった。培養後3週間では，H－18，22，43，47は0から60ppmまで増殖が認められたが，O－38，39は20ppmまでしか増殖が認められなかった（第9表）。これらの濃度がシクロヘキシミド耐性濃度を示しているのか，あるいは耐性変異株の出現によるものかは，さらに検討を進めなければ明らかにすることができない。

第9表　シクロヘキシミドに対する抵抗性

菌株	100ppmのシクロヘキシミド存在での生育[1]	培養後3週間での増殖が認められたシクロヘキシミド濃度[2]
H－18	－	60ppm
H－43	－	60ppm
H－47	－	60ppm
H－22	－	60ppm
O－38	－	20ppm
O－39	－	20ppm

1）cyh抵抗性試験培地：Bacto-Yeast Nitrogen Base 6.7g，グルコース10g シクロヘキシミド0～100mg，水1l

2）試験区：0，10，20，40，60，80，100ppm

4．キラー因子の遺伝情報の所在

4．1　シクロヘキシミドを用いたキラー因子の欠落試験　シクロヘキシミド（0.05～0.2ppm）はプラスミドを欠落させる作用があることが知られており，これを利用して分離耐塩性キラー酵母のキラー因子が核遺伝子支配なのか，あるいはプラスミド支配なのかを検討した。その結果，生育が認められた最高濃度のシクロヘキシミドを含む液体培養を経てシクロヘキシミド培地で単コロニー分離した場合（第10表），あるいは液体培養せずに単コロニー分離した場合（第11表）のいずれについてもキュアリ

ング後の総ての分離コロニーにキラー性がみられた。したがってキラー遺伝子はプラスミド上ではなく，核遺伝子に支配されていると考えられた。

一方，ＲＮＡプラスミドを有している*S. cerevisiae* 007株は100％キラー性を消失したが，他方二本鎖ＤＮＡ線状プラスミドを有している*K. lactis*はキラー性がキュアリング後も消失しなかった。これは*K. lactis*はシクロヘキシミド濃度1000ppmでも生育することができるためと考えられる。

４．２　培養温度によるキラー性の欠落試験　一般に37℃～42℃の高温でプラスミドが欠落することが知られており，そのことを利用してキラー因子がプラスミド支配であるか核遺伝子支配であるかを調べた。Ｈ－18，43，47については，単コロニー分離培地（37℃）で生育しなかったため，37℃培養による欠落試験はできなかった。分離耐塩性キラー酵母の生育温度試験でも見られたようにＯ－38，39は37℃の単コロニー分離培地でも生育することができたが，キラー性の消失は認められなかった（第12表）。しかし*S. cerevisiae 007*でも10％しかキラー性が消失せず，また，*K. lactis*は全くキラー性が消失しなかった。この結果から高温によるプラスミドのキュアリングは，はっきりとした結果が得られにくい可能性があるが，シクロヘキシミドによる結果とも併わせ考えると，分離耐塩性キラー酵母のキラー性は核遺伝子支配である可能性が示唆された。

第10表　シクロヘキシミドによるプラスミドの欠落試験

菌　株	液体培養[1]		プラスミドの脱離率[2]
	シクロヘキシミド濃度	培養日数	
Ｈ－18	20ppm	6日	０％
	60ppm	25日	０％
Ｈ－43	20ppm	6日	０％
	60ppm	25日	０％
Ｈ－47	20ppm	6日	０％
	60ppm	25日	０％
Ｈ－22	20ppm	6日	０％
	60ppm	25日	０％
Ｏ－38	20ppm	6日	０％
	20ppm	25日	０％
Ｏ－39	20ppm	6日	０％
	20ppm	25日	０％

1）培養条件：cyh抵抗性試験培地，25℃，振盪培養
　単コロニー分離：２％ＮａＣｌ　ＹＭ（+0.1ppm cyh）寒天培地上への平板塗抹
2）検定コロニー数：50　キラー活性検索用培地：10％ＮａＣｌ　ＭＢＭ
　標的菌：*H. anomala* IFO 0519

第11表　シクロヘキシミドによるプラスミドの欠落試験

菌　株	キラー活性消失率(%)[1]		標的菌	キラー活性検索用培地
	2%NaClYM[2] (+0.1ppm cyh)	5%NaClMG[2] (+2.0ppm cyh)		
H－18	0	0	*H.anomala*	8及び12%NaCl MBM
H－43	0	0		
H－47	0	0		
H－22	0	0		
O－38	0	0		
O－39	0	0		
S.cerevisiae 007	100	－[3]	*C.glabrata* IFO 0622	MBM
K. lactis IFO 0167	0	0	*H.anomala*	MBM

1）検定コロニー数；20
2）単コロニー分離を行った寒天培地
3）コロニー生育不良

第12表　培養温度によるプラスミドの欠落試験

菌　株	単コロニー分離培地（37℃）における生育の有無[1]	欠　落　試　験		
		キラー活性の消失率(%)[2]	標的菌	キラー活性検索用培地
H－18	－	－	－	－
H－43	－	－	－	－
H－47	－	－	－	－
H－22	－	－	－	－
O－38	＋	0	*H. anomala* IFO 0569	8%及び10%NaCl MBM
O－39	＋	0		
S.cerevisiae 007	＋	10	*C. glabrata* IFO 0622	MBM
K. lactis IFO 1267	＋	0	*H. anomala* IFO 0569	MBM

1）寒天培地：2％NaCl　YM，酵母用完全，5％NaCl　MG
2）検定コロニー数：20

第13表　各種培地組成一覧

培地	組　成	g／ℓ	pH	滅菌方法
2％ぶどう糖・酵母エキス・ペプトン水	ぶどう糖 ペプトン 酵母エキス	20 10 5	未調整	オートクレーブ
5％NaCl MG[1]	生揚げ醤油 ぶどう糖 NaCl	約 100ml 40 50	5.4	オートクレーブ
YM培地	麦芽エキス ぶどう糖 ペプトン 酵母エキス	3 10 5 3	5.4	オートクレーブ
MBM ブループレート	ぶどう糖 酵母エキス ポリペプトン 1Mクエン酸－燐酸緩衝液（pH4.5） メチレンブルー	20 10 10 100ml 30mg	4.5	オートクレーブ 緩衝液は後から加える

1）生揚げ醤油の実際の所要量は全窒素2gを含む容量とする。食塩所要量は醤油中の食塩量も含む値である。

要　　約

味噌醤油の醸造に有効利用可能なキラー酵母を育種するための基本となる耐塩性のあるキラー酵母のスクリーニングを行った。

その結果

1．6株の耐塩性キラー酵母を分離した。

2．キラースペクトルや生理的特徴から3つのグループに分けることができた。

3．それらはすべて*Candida*属に分類された。

4．キラー性を支配する遺伝子は核遺伝子に存在するものと推察された。

本研究を行うに当り分離源となったサンプルを提供していただいた愛知県味噌溜醤油工業協同組合員の皆様に深く感謝致します。また，研究生として熱心に実験に参加していただいた愛知工業大学の飯田高之氏と駒中広明氏に深く感謝します。

文　　献

1）　森治彦・鳥海博次：発酵工学，63，47－53(1985)

2） N. J. W. Kreger-van Rij : The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd revised and enlarged edition, Elsevier, Amsterdam(1984)

3） 三輪昭生・伊藤　寛・姫野国夫：味噌の化学と技術，36，25－31(1988)

4） 鍵山省吾・相羽富夫・門脇　清・茂木孝也：醤研，14，6－10(1988)

5） 鍵山省吾・相羽富夫・門脇　清・茂木孝也：醤研，14，43－46(1988)

6） S. Kagiyama, T. Aiba, K. Kadowaki, and K. Mogi : *Agric. Biol. Chem.*, 52，1－7(1988)

7） 門脇　清：醸協，83，379－383(1988)

8） C. Suzuki, K. Yamada, N. Okada, and S. Nikkuni : *Agric. Biol. Chem.*, 53，2593－2597(1989)

9） C. Suzuki and S. Nikkuni : *Agric. Biol. Chem.*, 53，2599－2604(1989)

10） 飯塚　廣・後藤昭二：酵母の分類同定法（第2版），p29，67，70，東京大学出版会(1973)

11） 長谷川武治：改訂版，微生物の分類と同定（上），p166，190，学会出版センター(1984)