

〔J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 19 1~5 1984〕

*Botrytis* 菌の生育したブドウ果における酵母相

後藤 昭二・小栗 博幸\*・山崎 真司・

## Yeast Populations in Botrytised Grapes

SHOJI GOTO, HIROYUKI OGURI,\* MASASHI YAMAZAKI

*The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400*

Yeast flora in botrytised and sound grapes obtained, 1979, 1980, and 1981, at Yamanashi Prefecture was studied qualitatively and quantitatively using 7 varieties and 9 samples, respectively. Total counts of yeasts in botrytised grapes showed  $600\sim 9.300\times 10^3$  colonies/ml in must and  $3.031\times 10^3$  colonies/ml on an average. That of sound grapes was  $0.02\sim 68\times 10^3$  colonies/ml and  $8.65\times 10^3$  colonies/ml on an average. The isolates were divided into four major groups: proportions of four groups in botrytised grapes are 10~70% (average 36.4% and isolating frequency 100%) of apiculate yeasts, 0~50% (8.6% and 33.3%) of *Cryptococcus-Rhodotorula* group, 11~90% (50% and 100%) of other fermented yeasts, and 0~19% (5% and 66.6%) of other nonfermented yeasts. In sound grapes, *Cryptococcus-Rhodotorula* group is predominant yeast group: 0~100% (average 57.1%, isolating frequency 88.9%) and other fermented yeast group is minor group; 0~52% (9.4% and 33.3%). Eighty two strains isolated from botrytised and sound grapes in 1979 and 1980 were identified with 16 species belonging to 9 genera.

著者らは先にわが国の代表的なワイン用ブドウである甲州種とマスカット・ベリーA種を供試して収穫期別の酵母相を、また山ブドウにおける酵母相について研究、報告してきた<sup>1,2)</sup>。近年、ヨーロッパ系ワイン用ブドウの栽培が盛んになるとともに *Botrytis* 菌の発生頻度も高くなり、一部では貴腐ワインの製造も行なわれている。著者は山梨県下のブドウ園から分離した *Botrytis* 菌の分類学的研究とその薬剤耐性な

どについても報告した<sup>3,4)</sup>が、本報では *Botrytis* 菌が発生、生育した灰色かび病果ないし貴腐果における酵母相の定性、定量的な研究を1971~1981年の3カ年間にわたって行ってきたのでそれらの結果を報告する。

## 実験方法

供試ブドウ Table 1に示したような1979, 1980, 1981年の3カ年間、山梨大学発酵化学研究施設、育種試験地で栽培中のブドウで *Botrytis* 菌の発生、生育がみられた(以下BOT果と略す)7品種、9試料

\*現在 大塚食品工業株式会社

Table 1. The varieties of botrytised and sound grapes and harvest times.

| Symbols | Varieties                      | Harvest times  |
|---------|--------------------------------|----------------|
| S B-9   | Semillon, botrytised           | 25, Oct. 1979  |
| S S-9   | " , sound                      | " 1980         |
| S B-0   | Semillon, botrytised           | 13, Sept. 1980 |
| S S-0   | " , sound                      | "              |
| C B-0   | Cabernet Sauvignon, botrytised | 13, Sept. 1980 |
| C S-0   | " sound                        | "              |
| R B-0   | Riesling, botrytised           | 13, Sept. 1980 |
| R S-0   | " , sound                      | "              |
| R B-1   | " , botrytised                 | 18, Sept. 1981 |
| R S-1   | " , sound                      | "              |
| D B-1   | Delaware, botrytised           | 15, July. 1981 |
| D S-1   | " , sound                      | "              |
| RLB-1   | Riesling Lyon, botrytised      | 23, Sept. 1981 |
| RLS-1   | " , sound                      | "              |
| CHB-1   | Chardonnay, botrytised         | 23, Sept. 1981 |
| CHS-1   | " , sound                      | "              |
| Z B-1   | Zala Gyongye, botrytised       | 28, Sept. 1981 |
| Z S-1   | " , sound                      | "              |

のブドウを供試した。また、同一圃場、同一品種の健全果9試料も比較のため供試した。ブドウ品種、収穫年月日などは Table 1 に一括して表示した。

**総酵母数** BOT果および健全果をそれぞれに5~10粒、殺菌大型試験管(φ25mm×200mm)に摘みとり殺菌ガラス棒でよく破碎、撈拌した。この果汁を殺菌水で0~10<sup>7</sup>倍に希釈し、その0.1mlをあらかじめ用意した Na-propionate 0.2%添加YM (yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 20g, water 1.000ml) 寒天培地上に平板し20°C、3~7日間培養した。培養後、出現コロニー数を計数し総酵母数を colonies/mlとして表示した。

**分離酵母のグルーピングと同定** 約100個のコロニーが出現した平板の任意の一定区画から30コロニーを釣菌し、chloramphenicol 0.05mg/ml 添加YM寒天培地上に平板培養を3回くり返した後、以下の実験に供した。

形態的特徴、孢子形成、発酵性、ウレアーゼ活性などの各性質から分離酵母のグルーピングを行ない、また1979と1980年の試料から分離した82菌株については The Yeasts (第2版)<sup>5)</sup>、後藤<sup>6)</sup>の方法に準じて

同定実験を行ない、The Yeasts (第2版)<sup>5)</sup> および Barnettら<sup>7)</sup>の検査書に従って同定した。

#### 結果および考察

**総酵母数** BOT果および健全果各9試料における総酵母数を Table 2 に示した。これから解るようにBOT果9試料における総酵母数は600~9,300×10<sup>3</sup> colonies/mlの範囲にあり、平均3,031×10<sup>3</sup> colonies/mlであった。同時に採取して供試した健全果9試料の総酵母数は0.02~68×10<sup>3</sup> colonies/mlの範囲にあり、平均8.65×10<sup>3</sup> colonies/mlであり、BOT果における総酵母数が圧倒的に多かった。一般にワイン用ブドウないしマストにおける総酵母数は10~10<sup>6</sup> colonies/mlと報告されている<sup>1,6,9,10)</sup>が、これらのデータと比較しても多い。これは *Botrytis* 菌糸の果皮貫通<sup>11)</sup>にともなう果表への浸出物があり、ここに野生酵母が増殖したためと考えられる。このことは後述するように分離された酵母を健全果のそれと比較することからも推論された。BOT果における総酵母数は試料ごとにバラツキがみられるが、これはブドウ果の損傷の程度や採取時期の天候などによるもの

Table 2. Total yeast counts and proportions of the four yeast groups in the botrytised and sound grape samples.

| Samples | Total yeast counts<br>(colonies/ml, $\times 10^3$ ) | Yeast groups (%) |              |                 |         |
|---------|-----------------------------------------------------|------------------|--------------|-----------------|---------|
|         |                                                     | KA               | CR           | OF              | ONF     |
| SB-9    | 700                                                 | 70 (1, 2, 3)*    | 0            | 11 (9, 11, 14)  | 19 (16) |
| SS-9    | 0.1                                                 | 0                | 100 (5, 7)   | 0               | 0       |
| SB-0    | 4,400                                               | 33 (1, 4)        | 0            | 60 (10, 12, 13) | 7 (16)  |
| SS-0    | 0.4                                                 | 0                | 100 (5, 7)   | 0               | 0       |
| CB-0    | 4,700                                               | 25 (1)           | 0            | 70 (10)         | 5 (16)  |
| CS-0    | 0.8                                                 | 62 (1)           | 19 (5, 7, 8) | 15 (12)         | 4 (15)  |
| RB-0    | 1,030                                               | 52 (1, 4)        | 2 (6, 7)     | 43 (13)         | 2 (16)  |
| RS-0    | 0.4                                                 | 0                | 84 (6, 7)    | 0               | 16 (16) |
| RB-1    | 9,300                                               | 50               | 0            | 50              | 0       |
| RS-1    | 68                                                  | 100              | 0            | 0               | 0       |
| DB-1    | 750                                                 | 33               | 0            | 60              | 7       |
| DS-1    | 0.06                                                | 25               | 23           | 52              | 0       |
| RLB-1   | 1,400                                               | 10               | 0            | 90              | 0       |
| RLS-1   | 8                                                   | 0                | 86           | 0               | 14      |
| CHB-1   | 4,400                                               | 25               | 25           | 50              | 0       |
| CHS-1   | 0.02                                                | 7                | 72           | 18              | 3       |
| ZB-1    | 600                                                 | 30               | 50           | 15              | 5       |
| ZS-1    | 0.1                                                 | 57               | 30           | 0               | 13      |

\* Composition of yeast species: 1) *K. apiculata*, 2) *K. corticis*, 3) *K. javanica*, 4) *H'spora uvarum*, 5) *Cr. albidus*, 6) *Cr. laurentii*, 7) *R. glutinis*, 8) *Sp. roseus*, 9) *Zygos. bailii*, 10) *C. krusei*, 11) *C. diversa*, 12) *C. parapsilosis*, 13) *C. pintolopesii*, 14) *C. stellata*, 15) *P. carsonii*, 16) *C. valida*.

と思われる。Semillon, Riesling など損傷程度の大きいものは菌数が多く、同一品種でも収穫時期が10月を過ぎると少なくなる傾向がみられる。

**分離酵母の同定と酵母相** 1979, 1980年のBOT果4試料から分離した82菌株を同定した結果 Table 3に示したように9属, 16種であった。他方, 3カ年間のBOT果と健全果からの分離菌株をコロニーと細胞の形態的特徴, 胞子形成の有無, 発酵性, 硝酸塩資化性, ウレアーゼ活性, でん粉類似物質形成などの生理的性質から次の4群に大別した。1) KA (apiculate yeasts) 群: レモン型細胞, 弱発酵性,  $KNO_3$  非資化性などの性質をもつ, 2) CR (*Cryptococcus-Rodotorula* yeasts) 群: 粘性コロニー, 胞子非形成, 非発酵性, ウレアーゼ活性陽性などの性質をもつ, 3)

OF (other fermented yeasts) 群: その他の発酵性酵母, 4) ONF (other non-fermented yeasts) 群: その他の非発酵性酵母。

**各酵母群の構成菌種** 1979と1980年の2年間, BOT果と健全果の各4試料における各酵母群の構成菌種は Table 3に示したように9属16種であった。

KA群は *Kloeckera apiculata*, *K. corticis*, *K. javanica*, *Hanseniaspora uvarum* から成る。ブドウないしマストにおける普遍的な酵母の一つとして知られる *K. apiculata* はBOT果試料の全てから分離され, かつ優勢酵母の一つであった。*K. corticis* と *K. javanica* はSB-9試料, *H'spora uvarum* はSB-0とRB-0の2試料から少数が分離されただけであった。なお, *K. corticis* と同定された

Table 3. Yeast species in the four yeast groups.

| Yeast groups | Species                         |
|--------------|---------------------------------|
| KA           | <i>Kloeckera apiculata</i>      |
|              | <i>K. corticis</i>              |
|              | <i>K. javanica</i>              |
|              | <i>Hanseniaspora uvarum</i>     |
| CR           | <i>Cryptococcus albidus</i>     |
|              | <i>Cr. laurentii</i>            |
|              | <i>Rhodotorula glutinis</i>     |
| OF           | <i>Sporobolomyces roseus</i>    |
|              | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> |
|              | <i>Candida krusei</i>           |
|              | <i>C. diversa</i>               |
|              | <i>C. parapsilosis</i>          |
| ONF          | <i>C. pintolopesii</i>          |
|              | <i>C. stellata</i>              |
|              | <i>Pichia carsonii</i>          |
|              | <i>C. valida</i>                |

No. 983とNo. 993の両菌株は、両極出芽によるほか多極出芽増殖が良く観察される菌株であった。<sup>12)</sup> CR群は *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* から成る。しかし、BOT果においてはRB-Oの1試料だけから *Cr. laurentii* と *R. glutinis* が分離されたのみで、大部分は健全果由来であった。OF群は *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida krusei*, *C. diversa*, *C. parapsilosis*, *C. pintolopesii*, *C. stellata* の3属6種からなる。このうち *C. krusei*, *C. stellata*, *C. pintolopesii* はBOT果試料における優勢酵母の一つであった。ONF群は、BOT果からは *Pichia carsonii* の1種だけ、健全果からは *P. carsonii* と *C. valida* の2種が分離された。

**酵母フローラ** 4酵母群の3カ年間の18各試料における構成比を Table 2 に示し、BOT果と健全果における平均構成比を Table 4 に示した。また、全供試料に対する各酵母群の分離頻度を Table 5 に示した。

BOT果試料における各酵母群の構成比は、KA群は10~70%の範囲にあり平均36.4%；CR群は0~50

Table 4. Proportions of the four yeast groups in botrytised and sound grapes.

| Grape samples | Yeast groups (%) |      |      |     |
|---------------|------------------|------|------|-----|
|               | KA               | CR   | OF   | ONF |
| botrytised    | 36.4             | 8.6  | 50.0 | 5.0 |
| sound         | 27.9             | 57.1 | 9.4  | 5.6 |

Table 5. Isolating frequency of the four yeast groups in grape samples used.

| Grape samples | Yeast groups (%) |      |      |      |
|---------------|------------------|------|------|------|
|               | KA               | CR   | OF   | ONF  |
| botrytised    | 100              | 33.3 | 100  | 66.6 |
| sound         | 55.6             | 88.9 | 33.3 | 55.6 |

%, 平均8.6%; OF群は11~90%, 平均50%; ONF群は0~19%, 平均5%であった。これから解るようにKA群とOF群は優勢酵母群であると同時に分離頻度100%, すなわち, 全試料から分離された。これに反し, CR群とONF群の構成比は平均8.6%, 5.0%と低く, またCR群はBOT果9試料中3試料のみから, ONF群は6試料から少数が分離されただけの劣勢酵母群であった。一方, 健全果における構成比は, CR群の構成比が最も高く平均57.1%, 分離頻度55.6%であった。BOT果において高い構成比を示しているOF群の構成比は9.4%と低く, 分離頻度も33.3%であった。

BOT果と健全果における酵母フローラを比較すると, BOT果ではOF群の構成比が高くCR群が低率であり, 健全果では逆に, CR群の構成比が高くOF群が低率である, という相違によって特徴付けることができよう, 健全果や未熟果あるいは山ブドウなどではKA群のほかCR群が高い頻度で分離されており<sup>2, 13, 14</sup>; また一般に成熟した健全果からOF群の酵母が多数分離されることは少ない<sup>1, 9, 10, 13</sup>。本実験において健全果からCR群が優勢に分離されたのは, 完熟試料でなかったためとも思われるが既知報告と一致する。他方, BOT果試料からCR群が分離されずOF群が優勢となったのは, 果皮損傷に伴ってOF群に適した生育環境に変化したことからCR群がOF群に圧倒されたためとも思われる。なお, 果汁発酵の主役を演ずる *Saccharomyces cerevisiae* 系の酵母が分離されなかったことについては今後さらに検討する必要がある。

## 要 旨

*Botrytis* 菌が生育した7品種, 9試料のブドウ果および同一品種の健全果試料を供試し1979, 1980, 1981年の3カ年間にわたり酵母相を定性, 定量的に比較検討した。

*Botrtis* 菌が生育したブドウ果(BOT)の総酵母数は600~9,300×10<sup>3</sup> colonies/ml, 平均3,031×10<sup>3</sup> colonies/mlで, 健全果における平均8.65×10<sup>3</sup> colonies/mlに比べ著しく多かった。

分離酵母をKA (apiculate 酵母) 群, CR (*Cryptococcus-Rhodotorula* 酵母) 群, OF (その他の発酵性酵母) 群およびONF (その他の非発酵性酵母) 群の4群にグルーピングしたとき, BOT果における構成比はKA群36.4%, CR群8.6%, OF群50.0%, ONF群5.0%であり, また全試料に対する分離

頻度はそれぞれ100, 33.3, 100および66.6%であった。健全果における構成比, KA群27.9%, CR群57.1%, OF群9.4%, ONF群5.6%と比較すると, BOT果ではOF群が優勢であるのに反し, 健全果ではOF群は劣勢, CR群が優勢酵母であるという特徴が認められた。各酵母群の構成菌種は9属, 16種と同定された。

## 文 献

- 1) Goto, S., Yokotsuka, I. : *J. Ferment. Technol.*, **55**, 417 (1977).
- 2) Goto, S., Oguri, H. : *Trans. mycol. soc. Japan*, **24**, 151 (1983).
- 3) 後藤, 寺林, 横塚 : 農化, **54**, 117 (1980).
- 4) 後藤, 寺林, 横塚 : 農化, **54**, 123 (1980).
- 5) Lodder, J. (ed) : *The Yeasts, a taxonomic study*, 2nd ed., North Holland Publ. Co Amsterdam (1970).
- 6) 後藤 : 酵母の分類と同定試験法, 長谷川編, 微生物の分類と同定(上), p.153, 東大出版会 (1984).
- 7) Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. : *Yeasts, Characteristics and identification*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1983).
- 8) Amerine, M. A., Kunkee, R. E. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **23**, 323 (1968).
- 9) Davenport, R. : *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*, Dickinson, C. H., Preece, T. F. eds., p. 325, Academic Press, London (1976).
- 10) 後藤 : ぶどう酒醸造に關する酵母, 秋山編, 酵母の利用と開発, p.73, 学会出版センター (1979).
- 11) Pucheu-Plante, B., Seguin, G. : *Connaissance Vigne Vin*, **12**, N°1, 21 (1978).
- 12) Goto, S. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 349 (1981); **28**, 303 (1982).
- 13) Barnett, J. A., Delaney, M. A., Jones, E., Magson, A. B., Winch, B. : *Arch. Mikrobiol.*, **83**, 52 (1972).
- 14) Parle, J. N., DiMenna, M. E. : *New-Zealand J. Agr. Res.*, **9**, 98 (1966).

(1984; 8・30 受付)