

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 24 1~6 1989]

ワイン貯蔵庫内かびの生育に及ぼす温度、
水分活性及びエタノールと酢酸気相の影響

後藤昭二・高山公章・篠原 隆

Effects of Temperature, Water Activity,
and the Vapors of Ethanol
and Acetic Acid on Growth of Wine Cellar Molds

SHOJI GOTO, KIMIYAKI TAKAYAMA, and TAKASHI SHINOHARA

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

Abstract

Growth temperature, water activity for growth and growth in ethanol and acetic acid vapors of cellar molds isolated from 11 wine storage cellars of France, Germany, and our Institute at Japan are studied. One group of the high frequency of occurrence, unidentified Black mold and *Cladosporium cladosporioides* are characterized by its a narrow range of growth temperature, xerophilic and growing in 10% ethanol vapor. Other group of the high frequency of occurrence, *Penicillium glabrum* and *P. decumbens* was mesohydrophilic and non-growth in ethanol vapor.

著者らは先にフランス・6、ドイツ・4ワイナリー及び当発酵化学研究施設ワイナリーの各ワイン貯蔵庫内の庫かび (cellar molds) の分布状態を調査した¹⁾。その結果、*Penicillium*ほか5属、24種及び未同定のBlack molds, White moldsが分離され、*Penicillium*属かびは全ての貯蔵庫から分離され、そのうち*P. glabrum* (*P. frequentans*) (73%)、*P. decumbens* (45%) の分離頻度が高く、また*Cladosporium cladosporioides* (54%)、Black molds (73%) も高頻度で分離されたことを報告した。

本報では分離した庫かびの生育温度範囲、生育と水分活性 (A_w) との関係及びエタノールと酢酸気相中での生育状況について検討した結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

Table IIに示した11ワイナリーのワインセラーから分離した庫かびを供試した。それらはTable 2に一括表示したように *Penicillium* 属 16種 63菌株、*Cladosporium* 属 3種 20菌株、その他4属5種8菌株及び未同定の“Black molds” 7菌株、“White molds” 2菌株の100菌株である。*Penicillium* 属はPitt²⁾、*Aspergillus* 属はRaper, Fennell³⁾、*Cladosporium* 属は箕浦⁴⁾、*Verticillium* 属はGams⁵⁾、その他宇田川、椿ら⁶⁾に従って同定したものである。なお、*P. chrysogenum*、*P. expansum*、*P. glabrum* (*P. frequentans*)、*P. sclerotiorum* (*P. multicolor*)、*C. cladosporioides*、

Table 1. Location of wineries isolated cellar molds.

Cellar No.	Sampling location
F 01	Chinon, Loire, France
F 03	Premières Côtes de Bordeaux, France
F 05	Beaune, Côte de Beaune, France
F 06	Aloxe-Corton, Côte de Beaune, France
F 07	Meursault, Côte de Beaune, France
F 08	Mercurey, Côte Chalonnaise, France
G 01	Bingen, Rheinhessen, Germany
G 03	Hattenheim, Rheingau, Germany
G 05	Johannisberg, Rheingau, Germany
G 06	Würzburg, Franken, Germany
IFY	The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu, Japan

*Zasmidium cellare*⁷⁾ (*C. cellare*⁸⁾, *Rhinochlaidiella cellaris*⁹⁾) の保存菌株を対照として供試した。

2. 生育温度試験

Malt extract (MA: malt extract 20g, glucose 20g, polypepton 1g, agar 20g, D.I. water 1,000ml, pH 6.0), Czapek-Dox (CA)及びSabouraud (SA)各寒天平板培地の中央に供試かびをスポット状に接種し、5~35°Cの各温度で2週間培養した。

3. 水分活性下での生育試験

10%セラチン溶液0.5mlをカバーグラス(18×18mm)上に広げ固化させた後、デシケーター中で充分乾燥する。このセラチン膜上にMA培地に前培養したかびを接種した。あらかじめ下記の各過飽和塩溶液5ml

Table 2. Fungi isolated from wine storage cellars.

1. <i>Penicillium</i> Link ex Gray	13) <i>P. chrysogenum</i> Thom
Monoverticillate (<i>Aspergilloides</i> Pitt)	F03-2-1, G03-2, J16-1, J16-2
1) <i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	14) <i>P. camembertii</i> Thom
F01-2-2, F05-2-1, F05-2-2, F06-1, F08-5, G01-1, G03-3, G06-5, J10-2, J21-2, J02, J07-1, J013, J026	F05-2-3, F05-4, J15
2) <i>P. thomii</i> Maire	Biverticillate (<i>Biverticillium</i> Dierckx)
F01-3-1, F01-3-2, G05-6-1, J01, J05, J09-2, J23, J028	15) <i>P. funiculosum</i> Thom
3) <i>P. sclerotiorum</i> van Beyma	J18-2B
F03-3	16) <i>P. rugulosum</i> Thom
4) <i>P. implicatum</i> Biourge	G05-6-2, J011-1, J017
F08-8-1, F08-8-2, J12, J06, J07-2	2. <i>Geosmithia putterilli</i> Pitt
5) <i>P. restrictum</i> Gilman & Abbott	F08-7
F05-3	3. <i>Cladosporium</i> Link ex Fries
6) <i>P. decumbens</i> Thom	1) <i>C. cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries
F03-1, F05-6-2, F07-4-2, F07-4-3, G01-2, G06-3	F03-1-1, F07-1, F07-4-1, G01-5-2, G05-3, J8, J08, J010, J013, J015, J020, J021, J027
7) <i>P. adametzii</i> Zaleski	2) <i>C. herbarum</i> Link ex Fr.
J022	F07-3, J09-1, J019, J025
Biverticillate (<i>Furcatum</i> Pitt)	3) <i>C. sphaerospermum</i> Penzig
8) <i>P. canescens</i> Sopp	F03-1, J18-2A, J018
F06-2-1, J14, J16-2	4. <i>Alternaria alternata</i> (Fres.) Keissler
9) <i>P. janczewskii</i> Zaleski	J7, J03, J03-2, J024
J9-1	5-1. <i>Aspergillum niger</i> van Tieghem : F05-1.
10) <i>P. jensenii</i> Zaleski	5-2. <i>Aspergillum ustus</i> (Bain.) Thom & Church : J017
F01-4, G01-6, J10-1	6. <i>Verticillium fungicola</i> (Preuss) Hassebrauk
11) <i>P. citrinum</i> Thom	F06-1
F6-5-1, F06-5-2, F08-2, F08-11, J21-1, J25, J014-2	7. Black mold group (unidentified black colony fungi)
Tervercillate (<i>Penicillium</i>)	F01-6, F05-9, F06-9-1, G01-4-4, G05-7-7, G06-8-5, J27
12) <i>P. expansum</i> Link ex Gray	8. White mold group (unidentified white colony fungi)
F08-12, G01-4, J014-1, J015-5	F06-4-3, F08-9-2

Fig. 1. Growth temperature and water activity for growth of wine cellar molds.

Molds		Growth temperature (°C)						Water activity for growth					
		5	10	15	20	25	30	35	1.0	.95	.86	.75	.68
<i>Penicillium</i>													
<i>adametzii</i>	1*	—————						—————					
<i>camembertii</i>	3	—————						—————					
<i>canescens</i>	3	—————						—————					
<i>chrysogenum</i>	4	—————						—————					
	RIFY T-1	—————						—————					
<i>citrinum</i>	7	—————						—————					
<i>decumbens</i>	6	—————						—————					
<i>expansum</i>	4	—————						—————					
	CBS 150.45	—————						—————					
<i>glabrum</i>	14	—————						—————					
	CBS 213.28	—————						—————					
	CBS 787.70	—————						—————					
<i>funiculosum</i>	1	—————						—————					
<i>implicatum</i>	5	—————						—————					
<i>janczewskii</i>	1	—————						—————					
<i>jensenii</i>	3	—————						—————					
<i>restrictum</i>	1	—————						—————					
<i>rugulosum</i>	1	—————						—————					
<i>sclerotiorum</i>	1	—————						—————					
	CBS 287.36	—————						—————					
	CBS 351.48	—————						—————					
<i>thomii</i>	8	—————						—————					
<i>Geosmithia</i>													
<i>putterillii</i>	1	—————						—————					
<i>Cladosporium</i>													
<i>cladosporioides</i>	13	—————						—————					
<i>herbarum</i>	4	—————						—————					
<i>sphaerospermum</i>	3	—————						—————					
<i>cellare</i>	ATCC 36951	—————						—————					
<i>Rhinocladiella</i>													
<i>cellaris</i>	IFO 4842	—————						—————					
<i>Aspergillus niger</i>	1	—————						—————					
<i>ustus</i>	1	—————						—————					
<i>Alternaria</i>													
<i>alternata</i>	4	—————						—————					
<i>Verticillium</i>													
<i>fungicola</i>	1	—————						—————					
Black mold	7	—————						—————					
White mold	2	—————						—————					

* Number of strain used.

ATCC: American Type Culture Collection, U.S.A.,

RIFY: Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu, Japan,

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands,

IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan.

Table 3. Growth of cellar molds in ethanol and acetic acid vapors.

Molds		Growth in vapors of			
		Ethanol		Acetic acid	
		10	20(%) ¹⁾	0.5	1.0(%) ¹⁾
<i>Cladosporium</i>					
<i>cladosporioides</i>	J010	+	+	+	-
	IFO 30313	+	-	-	-
<i>herbarum</i>	J091	+	-	-	-
<i>sphaerospermum</i>	F03-1-2	-	-	+	-
<i>cellare</i>	ATCC 36951	+	-	-	-
<i>Rhinocladiella</i>					
<i>cellaris</i>	IFO 4842	+	-	-	-
Black molds	F01-6	+	+	-	-
	F05-9	-	-	-	-
	G01-4-4	+	+	-	-
	G05-7-7	+	+	-	-
	G06-8-5	+	+	-	-
	J27	+	+	-	-
<i>Penicillium</i>					
<i>adametzii</i>	J022	-	-	-	-
<i>camembertii</i>	F05-2-3	-	-	-	-
<i>canescens</i>	J14	-	-	-	-
<i>chrysogenum</i>	G03-2	-	-	+	-
	RIFY T-1	-	-	-	-
<i>citrinum</i>	F06-5-1	-	-	-	-
<i>decumbens</i>	F03-1	-	-	-	-
<i>expansum</i>	G01-4	-	-	-	-
	CBS 150.45	-	-	-	-
<i>glabrum</i>	F05-2-2	-	-	-	-
	CBS 213.28	-	-	-	-
	CBS 787.70	-	-	-	-
<i>funiculosum</i>	J18-2B	-	-	-	-
<i>implicatum</i>	J06	-	-	-	-
<i>janczewskii</i>	J9-1	+	-	-	-
<i>jensenii</i>	J10-1	-	-	-	-
<i>restrictum</i>	F05-3	-	-	-	-
<i>rugulosum</i>	G05-6-2	-	-	-	-
<i>sclerotiorum</i>	F03-3	-	-	-	-
	CBS 287.36	-	-	-	-
	CBS 351.48	-	-	-	-
<i>thomii</i>	J01	+	-	-	-
<i>Geosmithia</i>					
<i>putterilli</i>	F08-7	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i>					
<i>niger</i>	F05-1	-	-	-	-
<i>ustus</i>	J017	-	-	-	-
<i>oryzae</i>	RIFY T-2	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>					
<i>alternata</i>	J7	-	-	-	-
<i>Verticillium</i>					
<i>fungicola</i>	F06-1	-	-	-	-
White mold	F06-4-3	-	-	-	-

1): concentration in vapor phase.

+: positive, -: negative.

を注入した10ml容小円筒容器(D=10mm, H=20mm)の開口部に、前記カバーガラスのゼラチン膜面が内側になるようにのせる(円筒容器とカバーガラス面はシリコングリスで密着させた)。これを20℃、4週間培養し、分生子や菌糸形成状況を観察し生育の有無を判定した。

使用した塩類はMg. (NO₃)₂ · 6H₂O (AW=0.57), NH₄NO₃ (AW=0.68), NaCl (AW=0.75), KCl (AW=0.86), KNO₃ (AW=0.95)である。

4. エタノール及び酢酸気相中での生育試験

前項同様に用意し、かびを接種したゼラチン膜付カバーガラスをペトリ皿(d=85mm)中に置く。別にエタノールの1%, 5%W/V溶液(それぞれ気相濃度10%, 20% · 20℃)及び酢酸の1%, 3%W/V溶液(それぞれ気相濃度0.5%, 1.0% · 20℃)各10mlを入れた小容器を用意し、前記ペトリ皿内に入れた。ペトリ皿は広幅ゴムバンドで密封し20℃、4週間培養した後、生育の有無を観察した。

結果及び考察

1. 庫かびの生育温度範囲及び生育と水分活性

供試庫かびの生育温度範囲及び生育と水分活性との関係をFig. 1に図示した。

分離頻度が75%と高かった¹⁾ *P. glabrum* (*P. frequentans*)とBlack moldsの生育温度は10~25℃の範囲にやや狭かった。他方、やや分離頻度の高い*C. cladosporioides* (54%), *P. decumbens* (45%), その他の低分離頻度の多くの菌種、Schanderl¹⁰⁾によって代表的な庫かびとされた*C. cellare*, *R. cellaris*などは10~30℃の範囲であった。

庫かびの生育と水分活性との関係をみると、高頻度分離庫かびのうちBlack molds, *C. cladosporioides*の生育最低水分活性は0.68で好乾性、*P. glabrum*, *P. decumbens*の水分活性は0.75で中湿ないし好乾性であった。他方、低分離頻度の多くの庫かび、*C. cellare*, *R. cellaris*は中湿ないし好湿性であった。

本実験に供試したBlack molds, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *C. cladosporioides*といった高頻度分離庫かびは生育温度範囲がやや狭く、生育最低水分活性値も低い傾向にあった。ワインセラー内の温度は平均約15℃といわれ、変動幅は一般に少ない。他方、温度は庫ごとに差があり、一様でない。今回、庫かび分離の対象としたワインセラー個々の温度、湿度は明らかでないので、今後庫内環境と庫内かびとの関係に留意して研究することが必要である。

2. エタノール及び酢酸気相中での生育

供試した分離庫かび31菌株及び対照に供試した保存11菌株のエタノール及び酢酸気相中における生育の有無をTable 3に示した。

高頻度分離かびのうちBlack moldsの6菌株中5菌株及び*C. cladosporioides*は10, 20%エタノール気相中において生育し、保存中の代表的庫かびとされている*C. cellare*, *R. cellaris*も10%エタノール気相中で生育した。しかし、他の高頻度分離庫かびの*P. glabrum*, *P. decumbens*は他の多くの低頻度分離庫かびと同様に生育しなかった。

酢酸気相中で生育がみられたのは*P. chrysogenum*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*のみで他の菌株は生育しなかった。

Schanderl¹⁰⁾は、*C. cellare*が庫内でアルコール、エステル、揮発酸等を基質として生育するものと報告している。アルコール気相中での庫かび生育に関する本実験において、*C. cellare*が生育したことはSchanderlの結果と一致する。高頻度分離庫かびの一つBlack moldsも良く生育した。このBlack moldsは分生子形成が不明確なため同定するには至らなかったが、アルコール気相中での生育のほか、生育温度、生育最低水分活性、コロニー形状などから*Zasmidium cellare* (Syn. *C. cellare*=*R. cellaris*)と推定される。

要 約

フランス、ドイツ及び当研究施設ワイナリーの11ワイン・セラーから分離した庫かびの生育温度、生育最低水分活性及びエタノール、酢酸気相中での生育について検討した。

分離頻度が高かった未同定のBlack moldsと*C. cladosporioides*は生育温度10~25℃、好乾性で、10%エタノール気相中で生育した。分離頻度が高かった*P. glabrum*, *P. decumbens*は中湿性、エタノール気相中では生育しなかった。

本研究中、最低水分活性とエタノール、酢酸気相中の生育に関する実験について種々ご教示下さいました東京国立文化財研究所新井英夫氏に感謝致します。

文 献

- 1) Goto, S., Takayama, K., Shinohara, T. : *J. Ferment. Bioeng.*, 68, 230 (1989).
- 2) Pitt, J. I. : The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *talaromyces*, Academic Press, Now York (1979).
- 3) Raper, K. B., Fennell, D. I. : The genus

- Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore (1965).
- 4) 箕浦 : 醸工, 41, 401, 621 (1963); 42, 723 (1964); 44, 137 (1966).
 - 5) Gams, W. : *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes), pp.167~195, Gestav Fischer Verlag, Stuttgart (1971) .
 - 6) 宇田川, 椿, 堀江, 三浦, 箕浦, 山崎, 横山, 渡辺 : 菌類図鑑, 講談社, 東京, (1978) .
 - 7) Hoog, G.S. : The Black Yeasts and Allied Hyphomycetes, p. 42, Studies in Mycology No.15, Centrralbureau voor Schimmelcultures, Baarn (1977) .
 - 8) Schanderl, H. : *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt.II*, 94, 112 (1936).
 - 9) Ellis, M.B. : Dematiaceous Hyphomycetes, p.246, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England (1971).

(1989・9・4 受理)