

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 25, 1~4 1990]

## ワイン酵母W3の低孢子生存率

山崎豊彦・野々村英夫

## Low Spore Viability in Wine Yeast Strain W3

TOYOHICO YAMAZAKI and HIDEO NONOMURA

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,  
Yamanashi University, Takeda 4, Kofu 400*

## Abstract

Wine yeast strain W3 which was determined as a diploid strain produced asci with no more than two viable spores in 40 asci dissected by micromanipulator. From this, spore viability of the strain W3 was 40%, less than that (100%) of strain OC2 used as a standard diploid strain. Two spores in an ascus of the strain W3 germinated with a few cells before they definitely ceased growing and died.

The fused hybrids obtained between the strain W3 and a haploid laboratory strain yielded spores with relatively high viability (73~75%). In contrast, some progenies (spore clones) derived from the hybrids had low spore viability (8~23%).

These results relating to spore viability in the strain W3 could be accounted for by assuming the presence of recessive lethal gene (*let*) in the strain.

高次倍数体の多いビール酵母やパン酵母では、子のう孢子（以下孢子と記す）の形成率や生存率が低く<sup>1)</sup>、その原因として高次倍数体の減数分裂における染色体不分離が考えられている<sup>2)</sup>。これに対して、ワイン酵母は二倍体株が多く<sup>3,4,5)</sup>、国産の標準的ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC2も二倍体で高い孢子形成率と生存率を示した<sup>6)</sup>。

ところが現在、甲州種ブドウを原料としたワイン醸造に広く利用されているワイン酵母W3<sup>7)</sup>は、OC2と同じ二倍体と考えられながら、孢子の生存率が低く、その原因として致死因子の存在が考えられる結果を得たので報告する。

## 実験材料及び方法

## 1. 酵母

Table 1に供試菌株を示した。供試ワイン酵母は、前記のW3とOC2である。また、W3の呼吸能欠損株

W3-RD1aとOC2の一倍体研究室派生株B2-1-3A<sup>8)</sup>との細胞融合雑種OCAW23及びOCAW25（投稿中）を供試した。

Table 1. Strains used (*Saccharomyces cerevisiae*).

Strains	Remarks
W3	Wine yeast
W3-RD1a	Petite form of W3
OC2	Wine yeast, diploid strain <sup>6)</sup>
B2-1-3A	Spore clone from the back-crossed diploid hybrid "Labo. strain DK-13D(H)" × OC2 (recurrent parent) <sup>8)</sup>
OCAW23	Protoplast fused hybrids (W3-RD1a + B2-1-3A) obtained by the Ca <sup>2+</sup> PEG method. See also text
OCAW25	

\* Obtained through courtesy of Prof. Y. Oshima, Osaka University.

## 2. 培地

菌体増殖用の基本培地にはYEED<sup>9)</sup>を使用した。また、2%酢酸カリウムと2%寒天を含む培地は胞子形成用として使用した。

## 3. 細胞の体積, DNA含量測定法

いずれも既報の方法<sup>6)</sup>に従った。

## 4. 四分子分析法と胞子生存率測定法

胞子形成法及び四分子分析法はいずれも既報<sup>10)</sup>に従った。胞子生存率は22~40個の子のうをマイクロマニピュレーターで解剖し、88~160個の胞子を単離培養(30℃ 3日間)して、肉眼的集落を形成した胞子数を基に算出した。

## 結果及び考察

### 1. 倍数性の判定

ワイン酵母W3及び融合株OCAW23とOCAW25の倍数性を、二倍体株OC2<sup>6)</sup>を基準にして検討した。結果はTable 2に示したように、W3の細胞体積がやや大きい、いずれの供試株も二倍体と推定できた。

### 2. 四分子分析

次にW3の40個の子のうを四分子分析し、OC2を対照として、四分子の発芽形式を調べた。その結果(Table

3), 29個(73%)の子のうは、4胞子中の2個だけが生存し(発芽形式は2/4), 4/4, 3/4の発芽形式を示す子のうはなく、結局、W3の胞子生存率は40%であった。対照のOC2は、解析したすべての子のう(22個)が4/4の発芽形式を示し、胞子生存率は100%であった。また、生育しなかった胞子は、いずれも写真(Fig. 1)に示したように、2, 3回の細胞分裂後に増殖を停止した。MortimerとHowthorneら<sup>11)</sup>は、劣性致死因子をヘテロに持つ二倍体からは2個以上の発芽胞子を持つ子のうは得られないと報告している。また、WingeとLaustsenら<sup>12)</sup>は、供試株 *Saccharomyces ludwigii* の四分子は、2個が正常に発芽増殖するが残りの2個は、2, 3細胞期以後の増殖が停止し、致死することを観察し、その後Phaff<sup>13)</sup>がこの現象を致死因子(*m*)を用いて説明している。したがってここで観察された、ワイン酵母W3の胞子における特異な発芽形式と低い生存率は、このW3に致死因子の存在を示唆する結果であると考えた。

### 3. 単胞子株における胞子生存率

W3及び融合株OCAW23とOCAW25の単胞子株を第3代目まで繰り返し分離できた(供試株がホモタリズムであると考えられるがここでは論議の対象外とした)ので、各世代における胞子の生存率を比較した。その結果(Table 4), W3では第1代目から胞子

Table 2. Cellular characteristics and degree of ploidy in wine yeast W3 and fused hybrids.

Strains <sup>a)</sup>	Cell volume ( $\mu\text{m}^3$ )	DNA content (mg/10 <sup>11</sup> cells)	Degree of ploidy			Inferred <sup>b)</sup> ploidy
			Volume	DNA	Average	
W3	168	3.9	2.5	2.0	2.3	2n
OCAW23*	133	3.7	2.0	1.9	2.0	2n
OCAW25*	128	3.6	1.9	1.8	1.9	2n
OC2** (control)	136	3.9	2.0	2.0	2.0	2n

a) \* Protoplast fused hybrids. See Table 1.

\*\* Diploid strain<sup>6)</sup>

b) Ploidies of yeast strains were inferred as described before<sup>6)</sup>.

Table 3. Fractional viability of spore tetrads from wine yeast strains.

Strains	Sporulation (%)	No. of asci dissected	Fractional viability					Spore viability (%)
			4/4	3/4	2/4	1/4	0/4	
W3	8	40	0	0	29	6	5	40
OC2	68	22	22	0	0	0	0	100

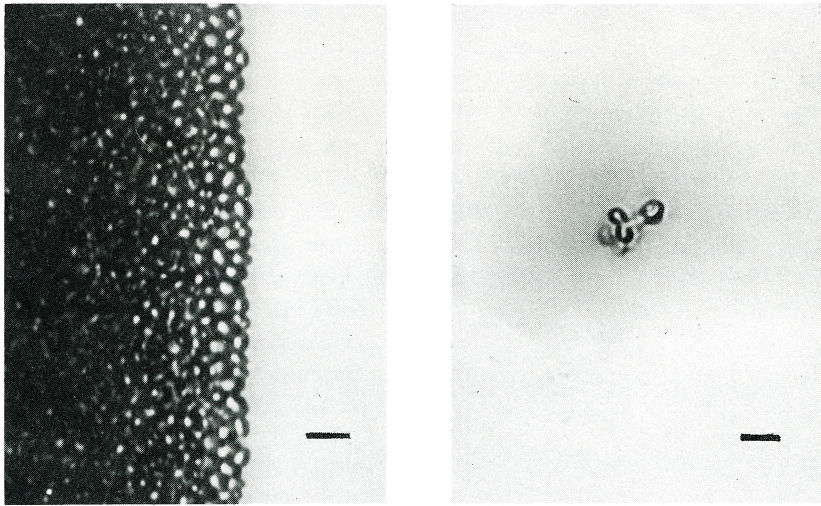


Fig. 1. Photomicrographs of normal growing (left) and dead (right) spore clones from an ascus of wine yeast W3 incubated for 2d at 30°C. Bar represents 10 $\mu$ m.

Table 4. Comparison of spore viability (%) among used strains and their progenies (spore clones).

Strain used	1st generation		2nd generation		
	Spore viability	Strains	Spore viability	Spore viability	
W3	40	8A	87	1B	96
OCAW23*	75	10A	8	2A	60
OCAW25*	73	5A	42	2A	23

\* Protoplast fused hybrids. See Table 1.

の生存率が急上昇(40%→87%)した。これはW3の致死因子が減数分裂分離し排除されたためと考えられた。また、融合株の孢子は比較的良好に発芽した(生存率73~75%)のに対し、第1代または第2代目の子孫(単孢子株)で生存率の低い(8~23%)ものが出現した。これは、W3の劣性致死因子が融合によりマスクされるが、その子孫で再び形質分離して発現するためとも考えられた。

酵母の孢子における低生存率は高次倍数性(特に奇数倍数性)、染色体の逆位や転座、劣性致死因子などに起因すると考えられている<sup>11)</sup>。供試株W3は二倍体である。また、染色体の逆位や転座は、突然変異により起こる現象であり、ワイン酵母W3の低孢子生存率の原因としては一般に考え難い。また、解析した孢子のうちの73%が、その4孢子中2個(2/4)しか発芽せず、孢子生存率が40%であった。更にW3とその

派生株における孢子生存率の大きな変動も、致死因子の存在を想定することにより良く説明ができた。

これらのことを考え合わせた場合、ワイン酵母W3に致死因子が存在すると考えるのが妥当であろう。

劣性の致死因子は減数分裂で発現する。したがって、劣性致死因子を持つ酵母菌株では孢子を形成すると、その特性が失われる危険性が多分にある。ワイン酵母W3の持つ大切な醸造特性を保護するためには、その保存条件に十分な注意が必要である。

### 要 旨

2倍体と考えられたワイン酵母W3における孢子のうち(四分子)の73%は、2/4の発芽形式を示し、その生存率は、二倍体OC2(100%)にくらべ、かなり低い値(40%)であった。また、死滅する孢子は、2-3細胞期以後の増殖が停止した。また、一倍体研究

室株との融合株とその子孫（単胞子株）の胞子生存率には、大きな変動（74%→8～23%）が観察された。これらの結果は、ワイン酵母W3に劣性致死因子の存在を想定することにより説明ができた。

終わりに、貴重な菌株を分譲して戴いた大阪大学大嶋泰治教授、山梨大学後藤昭二教授、山梨県工業技術センター渡辺正平博士に感謝いたします。本研究の一部は山梨県果実酒造組合研究助成金により行った。

#### 文 献

- 1) Freeman, R. F., Peberdy, J. F. :Yeast Genetics, (Spencer, J. F. T., Spencer, D. M., Smith, A. R.W), pp. 243-253, Springer-Verlag, New York (1983).
- 2) Miller, J. J. :The Yeast,(Rose, A. H., Harrison, J. S.), 2nd ed., Vol. 3, pp. 489-550, Academic Press, New York (1989).
- 3) 大嶋泰治:発酵工学, **56**, 413-424 (1978).
- 4) Snow, R. :Yeast Genetics,(Spencer, J. F. T., Spencer, D. M., Smith, A. R. W.), pp. 439-459, Springer-Verlag, New York (1983).
- 5) 後藤昭二:農化, **63**, 1885-1887 (1989).
- 6) 山崎豊彦, 石川 貢, 野々村英夫:山梨大発研報, **17**, 1-10 (1982).
- 7) 横塚 勇, 後藤昭二, 向角磊喜:山梨大発研報, **9**, 89-98 (1962).
- 8) 山崎豊彦, 広田明人, 野々村英夫:山梨大発研報, **19**, 19-28 (1984).
- 9) 微生物研究法懇談会編:微生物学実験法, p. 432, 講談社(1975).
- 10) Yamazaki, T., Ohara, Y., Oshima, Y. :J. Bacteriol., **125**, 461-466 (1976).
- 11) Mortimer, R. k., Hawthorne, D. C. :The Yeasts, (Rose, A. H., Harrison, J. S.), 1st ed., Vol. 1, pp. 385-460, Academic press, New York (1969).
- 12) Winge, O., Laustsen, O. :Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol., **22**, 357-380 (1939).
- 13) Phaff, H. J. :The Yeasts, a tasonomic study, (Kreger van RIJ, N. J. W.), 2nd ed., pp. 719-724, North-Holland Pub. Co., Amsterdam-London (1970).

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 25; 5~14 1990]

## ワイン中のインベルターゼ活性と その性質

中西載慶・横塚弘毅

### Invertase Activity and its Properties in wines

KOTOYOSHI NAKANISHI and KOKI YOKOTSUKA

*Laboratory of Wine Chemistry, The Institute of Enology and Viticulture  
Yamanashi University, Kofu 400.*

#### Abstract

The levels of invertase activity in juice, must, and wine were examined during vinification and aging processes. The remaining activity levels in white wines were significantly higher than those in red wines. In red wines, a lowering of the level in the enzyme activity was mainly observed during the processes of the fermentation and aging. Invertase activity was also detected in many commercial imported white wines. On the other hand, invertases from Semillon, Sylvaner, Chardonnay, and Riesling wines were purified to homogeneity on polyacrylamid slab gel electrophoresis. The invertases from the four sources showed similar enzymatic properties. In addition, these invertases had very similar molecular weights and amino acid composition.

インベルターゼは、微生物、植物、動物等広く自然界に分布し、古くから極めてよく調べられている酵素の1つである。果実のインベルターゼについても、これまで、ミカン、ナツメヤシ、キウイフルーツ、バナナ、カキなどについて報告がなされているが<sup>1-6)</sup>、ブドウのインベルターゼに関する研究は、比較的少なく<sup>7,8)</sup>、その酵素化学的性質などについてはあまり明らかにされていない。さきに我々は、当研究施設育種試験地で栽培されている14品種の醸造用ブドウのインベルターゼについて調べ、その活性は品種によりかなり異なるものの、酵素的性質は何れもよく類似し、特に耐熱性に優れ、また安定性の高い酵素であることを既に報告した<sup>9)</sup>。また、このインベルターゼの一部はワインに移行し、特に白ワインではかなりの活性が熟成後のワイン中に検出されることも明らかにした<sup>9,10)</sup>。

一般にワイン醸造において、ブドウ果汁中に存在する多くの酵素(蛋白質)は、果実の圧搾・搾汁時、あるいは発酵や熟成中に、果実中に存在するフェノール化合物(タンニン)などと不溶性の複合体を形成し、沈殿したり、あるいはSO<sub>2</sub>の添加などにより失活する 경우가多く<sup>11,12)</sup>、インベルターゼのように熟成後のワインにも活性が残存する例は、ブドウ果実中の他の酵素では、あまり知られていない。それ故、酵素化学的あるいはブドウの生理学的観点から、ブドウインベルターゼの諸性質を明らかにすることは興味あるものと考えられる。また、ブドウインベルターゼが熟成後のワインにも残存するという事実は、ワイン醸造プロセス中のブドウ蛋白質の挙動を知るうえで重要であると思われ、また、それらの検討にあたり本酵素が1つのマーカー蛋白質として利用することができれば、さらに興味深いものと考えられる。