

産膜酵母の発生防止法の開発

—ワイン産膜酵母の同定—

乙黒 親男・飯野 修一・歌田 誠・後藤 昭*

Technical Development for Prevention of Contamination with Film-Forming Yeast in Foods

—Identification of Film-Forming Yeast Isolated from Wine—

Chikao O'FOGURO, Shuuichi IINO, Makoto UTADA and Shoji GOTO*

要 約

ワインの貯蔵管理に有害な産膜酵母発生防止の手掛かりを得るため、ワインから分離し保存中の産膜酵母の同定を行い、仮性産膜酵母の *Saccharomyces cerevisiae* 6 株と真性産膜酵母である *Candida* sp. 1 株を得た。一方、既知ワイン産膜酵母 *Candida mycoderma* (RIFY2024) は異名の *Candida vini* と再同定された。

Summary

For the purpose of preventing of film-formation by film-forming yeast during storage of wine, we identified stored film-forming yeasts which were isolated from contaminated wine. The one group of the isolates (six strains) was identified as *Saccharomyces cerevisiae* as pseudo film-forming yeast, the other group of isolates (one strain) belonging to *Candida* sp. as true film-forming yeast.

On the other hand, *Candida mycoderma* (RIFY2024) of established film-forming yeast isolated from wine was reidentified as *Candida vini*, which was synonym of *Candida mycoderma*.

1. 緒 言

貯蔵中のワインに産膜酵母が繁殖することは古くから知られており、これらは、微生物汚染の代表的なものでワインの香味を著しく劣化させ、商品価値を低下させる。このような背景からわが国においてもワイン産膜酵母については横塚ら¹⁾、後藤²⁾、飯村ら³⁾の報告がある。

産膜汚染防止には二酸化硫黄の添加とかワイン表面と空気との接触がないような貯酒容器の構造を工夫するなどの対策があるが、なお完全とは言い難いのが現状である。

一方、ユッカ抽出物は多くの酵母に対して抗菌活性をもつことが知られている^{4,5)}。著者らは、ワインの産膜汚染防止に関してユッカ抽出物適用の検討を開始したところである。そこで本研究では、産膜酵母の発生したワインより酵母を分離し、分離保存中の未同定産膜酵母および既知ワイン産膜酵母から選定したものについて菌株の同定、再同定を行ったので、その結果を報告する。

2. 実験材料および方法

2-1 供試菌株 (ワイン産膜酵母)

供試した菌株は、1980年、山梨県工業技術センターで県内数ワイン醸造場の産膜汚染されたワインから分離し、保存しておいた産膜酵母7菌株、山梨大学発酵化学研究施設より分譲されたシェリー酵母1菌株およびワイン産膜酵母2菌株の計10菌株である。なお、分離保存中の未同定7菌株はYM培地を用いて平板希釈培養を3回行った後、同定試験に供した。各菌株の来歴はTable 1に示した。

Table 1 Yeast strains used in this study

YITC	Origin
301	isolated from grape and wine at Katsunuma
302	〃
303	〃
305	〃
306	〃
307	〃
304	〃
008	RIFY 3012, Sherry yeasts SJ75
022	RIFY YTd3, Yamazaki Strain, <i>Candida krusei</i>
037	RIFY 2024, <i>Candida mycoderma</i>

YITC: The Yamanashi Industrial Technology Center
RIFY: The Institute of Fermentation, Yamanashi University

* 山梨大学 工学部発酵化学研究施設

2-2 保存菌株の同定

同定試験は飯塚・後藤⁷⁾ およびBennett⁸⁾の方法に準じて行った。

2-2-1 形態観察

コロニーは、YM寒天固体培地に25℃、30日間培養後、マクロの形状観察を行った。細胞形態は、YM液体培地に25℃、3日間培養後、顕微鏡観察した。偽菌糸形成の有無、形状の観察は、PDA寒天培地を使用し25℃、3～7日間、スライド培養の後、顕微鏡観察した。皮膜はYM液体培地およびワイン培地(2倍希釈の赤ワイン:エタノール6.3%、還元糖0.04%、亜硫酸0 mg/l、pH3.74)を用い、20℃～25℃において3～14日間培養後、皮膜形成状況を観察した。

2-2-2 有性胞子形成試験

胞子形状の有無、胞子の形態、個数はMcClary'sの酢酸培地⁹⁾およびYM寒天培地⁷⁾を用い、25℃に3日ないし14日間培養後、検鏡した。

2-2-3 炭素源発酵能および資化能試験

発酵試験は、ダーラム管を使用し、glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinoseについて、資化能には、固体及び液体試験法を併用し、galactose, sucrose, maltose, lactose, cellobiose, melibiose, xylose, arabinose, inositolについて試験した。

2-2-4 硝酸塩資化能試験

KNO₃を用い、固体培養試験法によって試験した。

2-2-5 ビタミン欠培地、シクロヘキシミド培地および37℃における生育能

ビタミン欠培地における生育能は、Difco vitamin-free培地およびYM完全培地を使用し、各培地における生育状況を、またシクロヘキシミド耐性は、シクロヘキシミド100

および1,000ppm含有YM培地における生育状況を観察することによって判定した。

2-2-6 ウレアーゼ試験およびユビキノロン・タイプ同定試験

ウレアーゼ試験は、Christensen培地を用いSeeliger法によって行い、ウレアーゼ活性の有無は、培地の変色によって判定した。またユビキノロン(Co・Q)の同定はYAMADA・KONDO⁶⁾の方法に従って行った。

3. 実験結果および考察

コロニー形状、細胞形態、偽菌糸形成の有無、皮膜形成の有無および子嚢胞子形成の有無は一括してTable 2に示した。供試10菌株は、いずれも多極出芽法によって増殖をしたが、真菌糸および分裂子を形成しなかった。

生理・生化学的性質のうち糖類発酵能、炭素源および硝酸塩資化能の結果はTable 3に、ビタミン欠培地とシクロヘキシミド培地における生育能、ウレアーゼ活性の有無およびユビキノロン測定の結果はTable 4に示した。供試菌株はいずれも硝酸塩を資化しなかった。

供試菌株は、これらの各試験結果に基づいて、The Yeasts; a taxonomic study, (3rd ed.)¹⁰⁾ およびBennett⁸⁾らの検索表に従って以下のように同定した。なお各菌株ごとの性質は以下に説明する。

(1) *Saccharomyces cerevisiae*

YITC 301, YITC 302, YITC 303, YITC 305, YITC 306, YITC 307, YITC 008 (RIFY 3012: Sherry yeast) の未同定6菌株およびシェリー酵母の1菌株は、いずれも平滑、クリーム色し、細胞は卵型であった。YITC 305, YITC 306は偽菌糸を形成しなかったが、YITC 301, YITC 302,

Table 2 Morphological properties and formation of ascospore

Strain YITC No.	Vegetative cells	Slide cultures on PDA	Film formation on		Formation of ascospores
			YM	winc	
301	round to oval	primitive pseudomycelium	—	+	1-2/ascus, round spores
302	"	"	—	+	1-3/ascus, round spores
303	"	no pseudomycelium	—	+	1-4/ascus, round spores
305	"	abundant pseudomycelium	—	+	1-4/ascus, round spores
306	"	no pseudomycelium	—	+	1-4/ascus, round spores
307	"	no pseudomycelium	—	+	1-4/ascus, round spores
008	"	primitive pseudomycelium	—	+	1-3/ascus, round spores
304	elliptical cell chains	good formation	+	+	no detection
022	oval to elongate	abundant pseudomycelium	+	+	no detection
037	oval to elliptical	abundant pseudomycelium	+	+	1-4/ascus, round

Table 3 Utilization of carbon compounds and nitrate

Strain YITC No	Fermentation						Assimilation										
	Glc	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Cel	Mel	Xyl	Ara	Ino	KNO ₃
301	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
302	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—
303	+	—	+/s	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—
305	+	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
306	+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
307	+	—	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—
008	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—
304	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
022	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
037	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 4 Physiological and biochemical properties

Strain YITC No.	Growth in			Urease test	CoQ
	vitamin-free	cycloheximide 0.01 and 0.1%	Growth at 37°C		
301	—	—	+	—	6
302	—	—	+	—	6
303	—	—	+	—	6
305	—	—	+/s	—	6
306	—	—	+/s	—	6
307	—	—	+	—	6
008	—	—	+	—	6
304	+	—	+	—	9
022	+	—	+	—	7
037	+	—	+	+/w	7

YITC 305は未発達の偽菌糸を形成した。また7菌株ともにYM液体培地上では皮膜の形成がみられなかった。ワイン培地上では皮膜の形成がみられ、1子嚢当たり1ないし4個の円形胞子を形成した。また、いずれもglucose発酵能があり、硝酸塩を資化せず、ビタミン欠培地およびシクロヘキシミド培地に生育しなかった。またユビキノンはCoQ 6であった。これらの結果から*Saccharomyces cerevisiae*と同定した。

しかし、発酵能と炭素源の資化能にはバラツキが見られ、それらは4グループに分けられた。301と306はglucose以外の糖を発酵せず、sucroseを資化、302, 303, 008の3菌株はsucrose, raffinoseを発酵、資化、305はsucrose, maltoseを発酵、資化、307はsucrose, maltose, raffinoseを発酵、資化した。なお、*S.cerevisiae*においては炭素源の利用能にバラツキのあることが知られている。

供試6菌株は、YM液体培地では皮膜せず、ワイン培地上に皮膜することから、再同定に供したシェリー酵母と同様、仮性産膜酵母に属する菌株と判定した。

(2) *Candida* sp. YITC 304

コロニーはやや皺だったクリーム色であり細胞は長楕円型で連鎖し、偽菌糸を良く形成したが、真菌糸を形成しない。YM液体およびワイン培地上に皮膜を形成した。子嚢胞子の形成は観察されず、ウレアーゼ試験は陰性である。これらのことから本菌株は*Candida*に属するものと同定し

た。発酵能はないが、galactose, sucrose, maltose, cellobiose, melibiose, raffinose, lactose, inositolを資化した。硝酸塩は資化しなかった。ビタミン欠培地に生育したが、シクロヘキシミド培地には生育しなかった。ウレアーゼ試験は陰性、ユビキノンはCoQ 9であった。形態的特徴やCoQ 9をもち、ワインや発酵果汁から分離されている*Candida*属の酵母には*C. cantarellii*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. saitoana*, *C. sake*, *C. zeylanoides*などが知られている。しかし、供試酵母YITC 304は、糖類の発酵能、各種炭素源の資化能、ビタミン欠培地とシクロヘキシミド培地における生育能などにおいて上記の既知酵母と著しく異なる。これらのことから供試酵母の種の同定は、GC含量の測定やDNA-DNA交雑試験のDNAレベルによることが必要と考え、本報では*Candida* sp.にすることにとどめた。

(3) *Candida vini*

YITC 037 (RIFY 2024, *Candida mycoderma* WF 10)

帯褐色のクリーム色のコロニーであり、伸長形の細胞で偽菌糸を良く形成し、YM液体培地およびワイン培地上に皮膜を形成した。発酵能はなく、glucoseのみを資化するが、他の炭素源を資化しなかった。硝酸塩を資化せず、ビタミン欠培地に生育するが、シクロヘキシミド培地に生育しなかった。また、ウレアーゼ試験は僅かに陽性を示したが、ユビキノンはCoQ 7であった。本菌株はYM培地およびワイン培地上に皮膜することから真性産膜酵母と判定される。

以上のことから*Candida vini*と再同定した。前の種名*Candida mycoderma*は*C. vini*のsynonymである。

(4) *Candida krusei*

YITC 022 (RIFY YTd3, *Candida krusei*)

帯褐色—クリーム色のコロニーであり楕円形—伸長形の連鎖した細胞で、偽菌糸を良く形成した。YM液体培地上では良く皮膜したが、ワイン培地上でのそれは微弱であったが、子嚢胞子は観察できなかった。Glucoseのみを発酵、資化し、他の炭素源を利用せず、また、窒素源としての硝

酸カリを資化しなかった。ビタミン欠培地に良く生育したが、シクロヘキシミド培地には生育しなかった。ウレアーゼ活性はなく、ユビキノンはCoQ7であった。

以上の結果から本菌株を*Candida krusei* (完全型*Issatchenkia orientalis*) と同定した。

4. 結 言

ワインから分離・保存中の産膜酵母の同定を行い、仮性産膜酵母である*Saccharomyces cerevisiae* 6株と真性産膜酵母である*Candida sp.* 1株の2属7株を得た。また、既知ワイン産膜酵母*Candida mycoderma* (RIFY2024) はsynonymである*Candida vini*と再同定された。

参考文献

- 1) 横塚 勇・後藤昭二：農化, 29, 39 (1955)
- 2) 後藤昭二：酵工, 37, 85 (1959)
- 3) 飯村 謙・大塚謙一・原 昌道：酵工, 58, 449 (1980)
- 4) IIMURA, Y., HARA, S. and OTSUKA, K.: Agric. Biol. Chem., 44, 1215 (1980)
- 5) 田村幸吉：食品工業, 38(2), 27 (1995)
- 6) 山本正次：月刊フードケミカル, 1996-10, 105 (1996)
- 7) 飯塚 廣・後藤昭二：酵母の分類同定法 (東京大学出版会, 東京), (1977)
- 8) BERNETT, J. A., PYNER, R. W. and YARROW, D.: YEASTS, characteristics and identification, (Camdridge Univ. Press, Cambridge), (1993)
- 9) YAMADA, A. and KONDO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., 19, 189 (1981)
- 10) KREGER-VAN RIIJ N. J. W.: The yeasts; a taxonomic study 3rd edition, (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), p.1082 (1984)