Botrytis cinerea によるラッカーゼの生成

篠原 隆・後藤昭二

(山梨大学発酵化学研究施設)

平成2年11月8日受理

Formation of Laccase by *Botrytis cinerea*

Takashi SHINOHARA and Shoji GOTO

(Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu, 400, Japan)

The formation of laccase by 12 strains of *Botrytis cinerea*, which are isolated from vineyards in Yamanashi Prefecture, is studied. The production of laccase was influenced by the strains and the culture media. The culture of *B. cinerea* with grape juice showed higher activity of laccase than that cultured in potato-dextrose medium, and the cultivation in potato-dextrose medium with the addition of phenolic compounds and copper salt increased laccase activity.

Key words : *Botrytis cinerea* ・ ラッカーゼ

緒言

Botrytis cinerea (以下 BC と略す) は成熟中のブドウの灰色かび病原菌であり特に欧州系ブドウ品種は罹病しやすい。RIBERAU-GAYON らは BC のラッカーゼの諸性質を研究するとともにラッカーゼ活性の迅速な測定法を報告した^{1,2)}。後藤ら^{3,4)} は先に山梨県下の各ブドウ園から多数の BC を分離し、各分離菌株の生理的性質および病原性を検討した。本報では BC 各菌株によるラッカーゼの生成およびラッカーゼ生成に及ぼす 2,3 の因子について検討した結果を報告する。

実験方法

供試菌株 当研究室で分離³⁾保存中の BC 12 菌株を供試した (Table 1 参照)。

培地および培養 ブドウ果汁。甲州種, グルコース 16.4%, 総酸 0.75%, pH 3.16), Potato-Dextrose 液体培地 (グルコース 10%, 以下 PD 培地と略す) および PD 培地にタンニン酸 100 ppm, 没食子酸 100 ppm, 硫

酸銅 40 ppm を単独あるいは混合して添加したもの, また pH 3.2 と 6.2 に調整した培地を使用した (Table 2 参照)。各培地 50 ml を 100 ml 容三角フラスコに採り, 綿栓を付し殺菌した。別に PD 寒天斜面培地に 20°C, 5 日間前培養した BC 菌体の 1 白金耳を, 各培地に接種し, 20°C, 10 日間培養した。培養後, 培養濾液についてラッカーゼ活性, グルコースおよびグリセロールの分析を行い, 生成菌体は乾燥重量として測定した。なおグリセロールは *B. cinerea* の増殖に伴う代謝生産物であり, その生成能をみるために分析した。

ラッカーゼ活性の測定 DUBOURDIEU^{2,5)}の方法に準じて測定した。即ち, 培養濾液 1 ml と M/10 クエン酸バッファー (pH 4.8) 1.5 ml を試験管に採り混合した後, 基質 syringaldazine (100 mg/l エタノール溶液) 溶液 1.5 ml を加え充分攪拌する。これを 30°C に 3 分間保持した後, 530 nm で吸光度を測定した。対照として基質の代わりにエタノール 0.5 ml を加え反応後, 同様に吸光度を測定した。ラッカーゼ活性は次式から求めた。

$$u \text{ laccase/ml} = OD \ 530 \text{ nm} \times 46.15/\text{min}$$

なお, 検体が濃褐色を呈するときやフェノール含量の高い場合には Novo 社製ラッカーゼ活性測定用キットを使用した。

グルコースおよびグリセロールの定量 グルコースはソモギー法によって定量した。グリセロールは試料にエタノール (0.4 ml/ml 検体) および内部標準物質 (1,4-ブタンジオール 2 g/l) を加えたのち, 溶媒 (酢酸メチル: 酢酸メチル=4:1) で振盪抽出し, 抽出溶媒層の一定量をガスクロマトグラフ (日立 263-30 型, FID) に注入して定量した。ガスクロマトグラフィーの諸条件は既報⁶⁾に準じた。

結果および考察

1. BC 各菌株によるラッカーゼの生成 供試 12 菌株によるブドウ果汁と PD 培地でのラッカーゼ活性, グルコース, 菌体量測定の結果を Table 1 に示した。12 菌株中, 両培地でラッカーゼ活性を示したものは BC 100 の 1 菌株のみであり, ブドウ果汁でのみ活性の認められたものは 6 菌株, 両培地で活性不検出のものは 5 菌株であった。このようにラッカーゼ生成は菌株により差のあることが明らかになった。ラッカーゼ生成株はグリセロール生産量や菌体生産量が多い傾向にあるが, 必ずしも明確ではなかった。また, 先に報告した病原性^{3,4)}との相関性も認められなかった。圃場におけるブドウの BC による汚染はラッカーゼ活性と相関性があるものとされているが²⁾本実験の結果はそれを必ずしも肯定するものではなかった。

Table 1 Laccase activity of 12 strains of *Botrytis cinerea* cultured with grape juice and potato-dextrose media.

Strains	Laccase activity (u/ml)		Glycerol (g/l)		Glucose content (%)		Mycerium (dry weight, g)	
	GJ ^{a)}	PD ^{b)}	GJ ^{a)}	PD ^{b)}	GJ ^{a)}	PD ^{b)}	GJ ^{a)}	PD ^{b)}
BC 002	0	0	0.7	0.4	14.4	8.6	0.75	0.59
BC 012	3	0	1.7	0.6	12.6	8.2	0.34	0.25
BC 045	11	0	8.9	1.3	14.1	9.0	0.78	0.40
BC 091	11	0	0.8	0	14.2	9.0	0.99	0.39
BC 093	0	0	0.2	0	14.3	8.0	0.26	0.23
BC 099	0	0	0.2	0	14.2	9.0	0.19	0.17
BC 100	11	7	0.6	0	14.0	8.8	0.88	0.53
BC 102	12	0	0.5	0	14.2	9.0	0.40	0.31
BC 103	0	0	2.0	0.7	14.0	9.0	0.53	0.41
BC 126	0	0	1.9	0.2	14.6	7.8	0.78	1.09
BC 127	11	0	0.5	0	14.1	9.2	1.50	0.50
BC 201	11	0	0.6	0	14.2	9.0	0.81	0.42

a) : grape juice of Koshu grape (glucose content 16.4%, total acid 0.75%, pH 3.16)

b) : potato-dextrose (glucose 10%, pH 6.0)

ブドウ果汁と PD 培地でのラッカーゼ生成を比較すると、PD 培地でラッカーゼを生成したものは BC 100 の 1 菌株のみであった。ブドウ果汁では 7 菌株がラッカーゼを生成した。なお、BC 100 は PD 培地でラッカーゼ活性を示したがグリセロール生成は認められなかった。また、ラッカーゼ活性不検出の培養からグリセロールの生成が認められるものもあった。

2. ラッカーゼ生成に及ぼすフェノール物質、銅塩および pH の影響 前項の結果から果汁と PD 培地においてラッカーゼ生成に差のあることが明らかになったので、ラッカーゼ生成に影響を及ぼすと思われるフェノール物質（タンニン酸、没食子酸）と銅塩の添加効果、さらに pH の影響を検討した。結果は Table 2 に示した。

BC 100（ブドウ果汁，PD 両培地でラッカーゼを生成）は全培地でラッカーゼ活性が検出された。特に培地Ⅲ（PD 培地に銅塩単独添加）において活性が著しく高かった。また培地Ⅴ（フェノール物質と銅塩添加）でも僅かに効果が認められた。BC 127（ラッカーゼ活性はブドウ果汁で検出されたが PD 培地では不検出）においては BC 100 と同様、培地ⅢとⅤにおいてラッカーゼ活性が検出されたが、他の培地では不検出であった。BC 002（ブドウ果汁，PD 両培地でラッカーゼ活性不検出）では培地ⅣとⅤにおいて僅かなラッカーゼ活性が検出された。以上のことからラッカーゼ生成には、銅塩の単独添加および低 pH における銅塩とフェノール物質の添加が有効なことが分かった。これらのことは銅の存在が銅酵素であるラッカーゼ⁷⁾の安定化または活性化すること、あるいはフェノール物質の存在がポリフェノールオキシダーゼであるラッカーゼの生成を誘導することが考え

Table 2 Effects of phenolic compounds, copper sulfate and pH on the formation of laccase by *B. cinerea* (laccase activity: unit/ml).

Strains	Media ^{a)}				
	I	II	III	IV	V
BC 002	0	0	0	1	1
BC 100	6	5	19	7	9
BC 127	0	0	4	0	7

a) : I. Potato-Dextrose (PD), pH 6.0; II. PD+gallic acid 100 ppm, pH 6.0; III. PD+CuSO₄ 40 ppm, pH 6.0; IV and V. Medium III+gallic acid 100 ppm+tannic acid 100 ppm, pH 6.0 (IV) and 3.2 (V)

られる。ラッカーゼ活性はブドウの BC 汚染の指標となることが報告されている^{2,5)}。しかし、本実験の結果からラッカーゼ生成は菌株により、また銅塩の有無により差のあることが明らかになったので、BC がブドウ果に繁殖した場合のラッカーゼ生成に及ぼす因子について再検討が必要であろう。このことについて現在検討中であり別に報告する。

要 約

ブドウ由来の *B. cinerea* 12 菌株によるラッカーゼの生成とその生成に及ぼす 2, 3 の因子について検討した。ラッカーゼ生成は菌株毎に差があり、ブドウ果汁培地では 7, PD 培地では 1 菌株のみに生成が認められた。ラッカーゼ生成には銅塩およびフェノール物質の存在が有効であった。

文 献

- 1) J. RIBÉREAU-GAYON, P. RIBÉREAU-GAYON, E. PEYNAUD, P. SUDRAUD : *Sciences et Techniques du Vin*, Vol. 3, p. 42, Dunod, Paris(1976)
- 2) D. DUBOURDIEU, C. GRASSIN, C. DERUCHE, P. RIBÉREAU-GAYON : *Conn. Vigne Vin*, 18, 237 (1984)
- 3) 後藤昭二, 寺林隆志, 横塚 勇 : 農化, 54, 117 (1980)
- 4) 後藤昭二, 青野力三 : 山梨大学発研報告, 16, 1 (1981)
- 5) C. GRASSIN, D. DUBOURDIEU : *J. Sci. Food Agric.*, 48, 369 (1989)
- 6) 篠原 隆, 渡辺正澄 : 醸協, 71, (11) 888 (1976)
- 7) 赤塚四郎編 : 酵素研究法, 第2巻, p. 374, 朝倉書店 (1956)