

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05878

研究課題名(和文) 日本ワインの酒質向上に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The study for quality improvement of Japanese wine

研究代表者

斉藤 史恵 (WATANABE-SAITO, Fumie)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：00625254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では日本ワインの酒質向上を目標とし、1つの対策として微生物汚染に対するMBAワインの酒質評価と微生物汚染(産膜)抑制に有効な成分を探索することを目的とした。では、微生物由来のオフフレーバーに市販MBAとMRワインとで有意差はなかったが、微生物試験によりMBAワインの方が産膜汚染を受けやすいことを明らかにした。では、産膜形成しにくいワインではエタノール、総ポリフェノール、タンニン濃度が高いことが主成分分析により明らかになり、産膜抑制にポリフェノールやタンニンが寄与する可能性が考えられた。産膜抑制成分については、引き続きカラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワイン品質維持にとって、微生物汚染の防止は大きな課題の1つである。また近年の温暖化によるブドウ果汁のpH上昇や亜硫酸未使用でのワイン醸造も微生物汚染のリスクを上昇させている。本研究結果により、日本ワインの主力品種MBAは微生物汚染を受けやすいことが明らかとなり対策の必要性が明示された。一方で、ワイン由来成分で産膜形成を抑制する新たな手段を構築する足掛かりも得られ、ワイン産業にとって非常に有益な知見となった。産膜形成については、ワイン成分との関係性について研究がほとんどなされておらず、学術的にも新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to clarify differences in susceptibility to red wine pellicle formation by pellicle-forming yeast between two wine grape cultivars, and to investigate wine components affecting pellicle formation. Twenty each of Muscat Bailey A (MBA) and Merlot (MR) wines, the major grape cultivars of Japanese red wine, were used. Pellicle formation occurred more often in MBA wines than in MR wines, and almost all MBA wine surfaces were covered with pellicle after incubation for five days. Principal component analysis revealed the relationships between pellicle formation and the concentrations of ethanol, phenolics, and tannins. Wine grape cultivar having low concentration of tannins may be highly susceptible to pellicle formation by pellicle-forming yeast during winemaking.

研究分野：食品科学

キーワード：微生物汚染 ワイン 産膜性酵母

1. 研究開始当初の背景

ワイン品質を保つうえで、微生物汚染は避けなければならない必須事項である。マスカット・ベリーA(MBA)は日本ワインの主力ブドウ品種であるが微生物安定性の低さが指摘されている。しかし、酒質が弱いという説明のみで原因解明や改善策などは懸案事項のままとなっている。研究代表者は、日本ワインの実態把握のために揮発酸(酢酸)測定を行い、MBAが他品種よりも酢酸含有量が高い傾向であることを確認した。そこで本研究は、まず微生物汚染で生じる酢酸や酢酸エチル、アセトアルデヒド、アセタールなどのオフフレーバー(POF)が品種によって異なるか現状を明らかにする。次に、微生物安定性に寄与するpHおよび抗菌活性成分について品種間差の検証を行う。抗菌活性成分については、ポリフェノール化合物(PP)やタンニン類であると予想されるため、これら成分を分取精製して活性成分の同定と作用機構の解明を試みる。対象とする微生物は、ワインにおける微生物汚染の1つ産膜を引き起こす産膜酵母とした。本課題は、微生物安定性のメカニズム解明や最終的なワイン品質の向上に繋げるための、重要な知見を得るために実施する基礎的研究と位置付けている。

2. 研究の目的

本研究課題では、MBAの酒質評価と微生物安定性への寄与成分探索により日本ワインの現状把握と微生物汚染の原因解明を行う。次にpHおよび抗菌活性成分のコントロールによる酒質向上方法の検討を行い、同時に抗菌活性成分の評価を行って改善策を考案する。研究代表者は白ワインでpHに品種差があることを明らかにしており、赤ワインでも品種差が存在する可能性はある。また研究代表者の所属研究部門は、これまでにMBAが他品種と異なるタンニン組成や抽出挙動を示すことを報告しており、これらの違いが微生物安定性に影響を与えていると推測される。本課題は、MBAの酒質向上をひとつめの目標地点とするが、品質の向上はすべての品種および世界中で求められている課題であり、本課題解決は新たな酒質改善法を提案するための有効な知見を提示することができる。

3. 研究の方法

(1) 試料ワイン

揮発性成分分析および微生物試験には、市販MBAおよびメルロー(MR)ワインを各20本を使用した。揮発性成分の分析直前に抜栓し、その後、180 mL容器に満量分注して保存し微生物試験に使用した。成分分析では、別の市販MBAワイン51本、MRワイン48本、およびカベルネ・ソーヴィニヨン(CS)ワイン20本の合計119本を用いた。なお、試料ワインはすべて日本産ブドウを原料とした日本ワインである。

(2) 成分分析

2-1 揮発性成分の分析: 酢酸は有機酸分析装置(島津製作所)、アセトアルデヒドは酵素法を採用した自動分析装置Y-15(BioSystems)、酢酸エチルとアセタールはガスクロマトグラフ質量分析計(島津製作所)を用いて定量を行った。

2-2 ワインの基礎成分の分析: アルコール、pH、滴定酸度、亜硫酸は国税庁所定分析法に従って測定を行った。有機酸(クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸)は、有機酸分析装置(島津製作所)を用いて定量を行った。ミネラルは原子吸光光度計(日立)を用いて測定した。

2-3 総ポリフェノール化合物はフォーリンチオカルト法で測定した。タンニンは、牛血清アルブミン(BSA)沈殿法を一部改変しフォーリンチオカルト(FC)法を用いて測定した。すなわち、試料ワインにBSAを添加してタンニンを結合させ、遠心分離により沈殿・除去した。残った上清のポリフェノール濃度をFC法により測定し、総ポリフェノール濃度から差し引くことでタンニン濃度を算出した。総ポリフェノールおよびタンニン濃度は没食子酸換算で表した。

(3) 供試菌株および産膜形成試験

産膜性酵母は、MBAワイン醸造過程で形成した産膜から採取し純化を行った。AXIMA微生物

同定システム(島津製作所)により *Saccharomyces cerevisiae* であることを確認した。また山梨大学生命環境学部生命工学科 中川 洋史准教授より産膜 *S. cerevisiae* YFY-1 株の供試を受けた。なお、*S. cerevisiae* YFY-1 が最も産膜性が高かったため本菌株を用いて微生物試験を実施した。本菌株を YPD 平板培地で培養したものを、SD 平板培地で前々培養し、さらに SD 液体培地で前培養した。得られた菌体を産膜形成試験に使用した。24 穴マイクロプレートに、flor 培地またはろ過滅菌処理を行ったワインを 1.8 mL 分注し、菌懸濁液 0.2 mL を接種した。30 で静置培養し、液面での産膜形成を観察した。同様の試験を全量 6 mL にスケールアップした産膜形成試験を 15 mL 容チューブで実施し、ワイン液面に形成された産膜とチューブ底に沈殿した酵母を別々に回収して重量を測定した。

(4) 活性成分の抽出・分離

ワインを減圧濃縮装置で脱アルコール処理した後、Diaion HP-20 カラムにアプライした。0.1% トリフルオロ酢酸溶液、50%メタノール溶液、70%アセトン溶液を各 300 mL 順次展開し、溶出液は 50 mL ずつ回収した。得られたフラクションについてそれぞれ産膜形成試験を行った。

(5) 統計解析

統計処理は統計ソフト(JMP®13,SAS Institute Inc.)を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) MBA ワインの酒質評価

MBA ワインが実際の醸造現場で微生物汚染を受けているのかを明らかにするために、市販ワインを対象に、オフフレーバーの分析(アセトアルデヒド、アセタール、酢酸エチル、酢酸)を行った。比較として MR ワインも同様に分析し、MBA ワインとの比較を行った。ワインにおける閾値は、アセトアルデヒド 10 mg/L、アセタール 1 mg/L、酢酸エチル 7.93 mg/L、酢酸 200 mg/L と報告されている。試料ワイン 40 本のうち、MR ワイン 1 本のみアセトアルデヒド、アセタール、酢酸エチル、酢酸がそれぞれ 80.1、492、378、700 mg/L と閾値を大幅に超える高い濃度を示した。実際に臭いを確認したところ、産膜臭様の臭いが確認できた。残りの 39 本のワインについては官能的に問題となる値ではなく、微生物汚染が疑われるワインはなかった。また MBA と MR ワイン間で揮発性成分の濃度に有意差は認められなかった。追加試験として、酢酸について検体数を増やして分析比較したところ、MBA、MR、CS ワインの酢酸平均値は、638、546、540 mg/L と、MBA が MR や CS ワインよりもやや高い値を示したものの有意差はなかった。この理由として、供試ワインが品評会に出品されるような高品質のものであったため、産膜汚染を受けている可能性が低いワインを限定的に調査してしまった可能性が考えられる。また、市販ワインのオフフレーバー分析では、MBA の微生物安定性の低さを検証することはできないと考えられた。

新たな方法として、市販ワインに汚染酵母(産膜性酵母)を接種して培養し、産膜形成のしやすさを評価した。その結果、培養 3 日目に MR ワインでは 20 本中 8 本で産膜形成が確認されたのに対し、MBA ワインでは 20 本中 15 本で産膜形成が確認された(Fig. 1)。このことより、MR ワインに比べて MBA ワインは産膜汚染を受けやすい微生物的環境であることがわかった。これは、今まで醸造現場で経験的に述べられていたことを、初めて実験的に証明したものである。

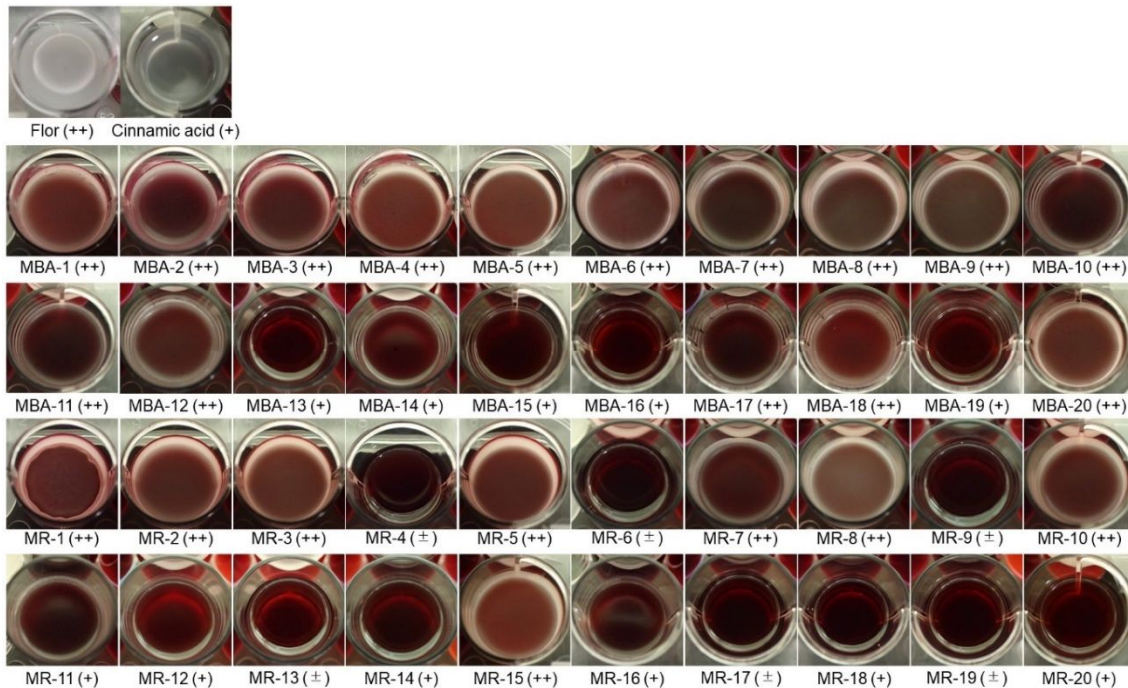


Figure 1. Pellicle formation in MBA and MR wines after incubation for three days (Watanabe-Saito et al. 2021).

A 0.2 mL aliquot of pellicle yeast cell suspension was added to 1.8 mL each of MBA and MR wines after filter sterilisation. The flor media containing 60 mg/L cinnamic acid or not were also used. After static incubation for three days at 30°C, the wells were photographed and the degree of pellicle formation was judged. The symbols in parentheses show the degree of pellicle formation (\pm : a very thin pellicle was formed on some portion of the wine surface; +: a very thin pellicle was formed on the entire wine surface; and ++: a very thick and well-defined pellicle was formed on the entire wine surface).

(2) 微生物安定性への寄与成分探索

微生物安定性に寄与する要因としては、pH や抗菌活性成分である亜硫酸がある。産膜形成には、ワイン中のエタノールおよび糖濃度が影響することが報告されている。また、ワインに含まれるポリフェノール化合物には抗菌活性を有するものもある。そこでこれら成分値と産膜形成試験の結果(産膜形成の有無)を主成分分析を用いて検証した(Fig. 2)。産膜形成しなかった MR ワイン (, Fig. 3B)は、エタノール、総ポリフェノール化合物およびタンニンのベクトル方向に位置しており(Fig. 3A), すなわちこれら成分の濃度が高い MR ワインは産膜形成しにくいことが考えられた。一方、MBA ワインではほとんどすべてのワインで産膜形成が生じたため、産膜形成の有無とエタノール、総ポリフェノール化合物およびタンニン濃度との関連性を検証することができなかった。しかしながら、総ポリフェノール化合物およびタンニン濃度がそれぞれ MBA ワインで 1470 mg/L, 139 mg/L に対し、MR ワインが 2084 mg/L, 570 mg/L と有意に高いことからこれら成分が産膜形成のしやすさに影響していることが示唆された。また、産膜形成に影響を与えると考えられる pH や亜硫酸については、本試験で使用したワイン中の値および濃度範囲では影響を与えなかった。

次の段階として、産膜形成の有無がポリフェノール化合物およびタンニンによるものか検証するため、産膜形成が認められなかったワインからポリフェノール化合物を抽出して flor 培地に添加し産膜形成に影響を与えるか検証を行った。事前試験として、ワインを様々な成分を吸着する活性炭で処理して産膜形成試験を行ったところ、処理前では産膜形成が生じなかったが、処理後では産膜形成が生じた。すなわち、ワイン中に何かしらの産膜抑制成分が存在することが確認された。

そこで、同様のワインを Diaion HP-20 カラムに処理し、ポリフェノールを含む吸着成分をアセトンで溶出して得られた粗精製物を flor 培地に添加して産膜形成試験を行った。その結果、予想に反して産膜形成抑制効果は認められなかった。そこで、粗精製物を再度 Diaion HP-20 カラムに処理し溶媒組成を変えて分画を行ったところ、70%アセトンで溶出される画分に産膜抑制効果が認められた。このことから、産膜抑制成分は、比較的疎水性の高い化合物であることが示唆された。本化合物については、さらに精製を行い活性成分の同定を行う。

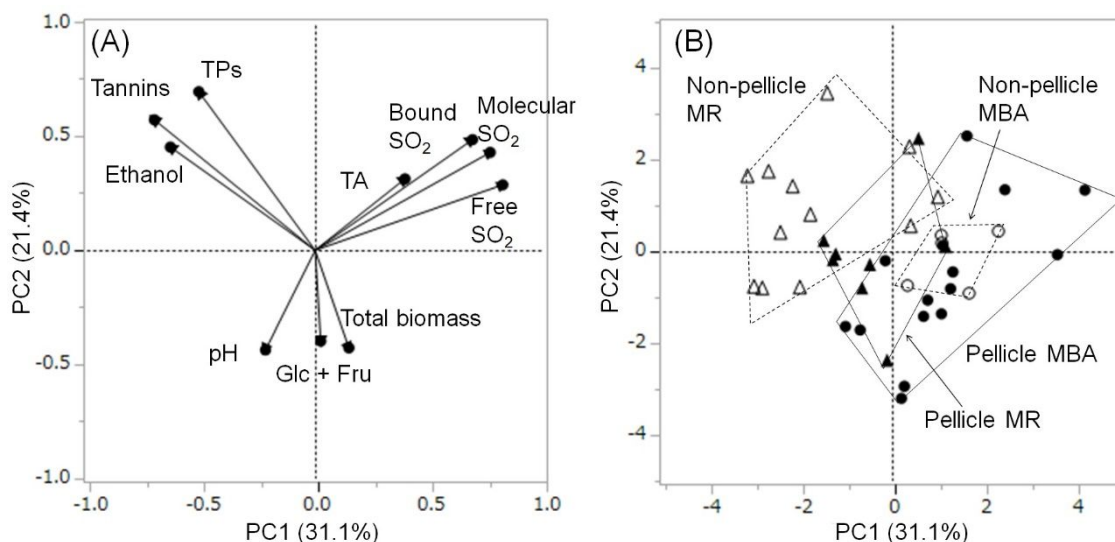


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of MBA and MR wines.

(A) Plot of loadings of PC1 versus PC2. (B) Plot of scores of PC1 versus PC2. Wines classified into 'pellicle wine' and 'non-pellicle wine' after incubation for three days are represented by closed and open symbols, respectively. MBA and MR wines are shown by circles and triangles, respectively.

(3) 酒質向上方法の検討

研究代表者は、微生物安定性の低さは pH の高さに起因すると推測していた。pH は、有機酸およびミネラル組成により変動するため、これら成分をコントロールすることで pH を調整し最終的に微生物汚染を防ぐことを考えていた。しかしながら、今回使用したワインでの産膜形成の有無に pH が関与していなかった。一方で、ポリフェノール化合物およびタンニンに産膜抑制の可能性が考えられたため、これら成分を制御することにより産膜抑制できるかを検討することとした。試験的に、市販のブドウ由来タンニンの産膜抑制効果を検証したが、抑制活性は認められなかった。(2)の試験において、粗生成物の状態では産膜抑制効果が認められなかったことから、まずは活性成分を明らかにし、後に活性成分のワイン中の含有量や醸造過程での抽出挙動について検証することとした。

(4) 抗菌活性成分の評価

ワインにおける産膜形成のメカニズムとして、ワイン中での産膜性酵母の増殖、酵母同士の接着と産膜の発達がある。これまでの結果で、産膜形成が生じなかった要因が産膜性酵母の増殖が抑えられたこと(抗菌活性)によるか検証するために、抗菌活性試験を行った。ワインから得た粗抽出物を SD 培地に添加し 30 で振盪培養して酵母増殖を測定したところ、添加無しの培地と差はなく、酵母増殖は抑えられなかった。そこで、産膜形成試験においてワイン液面に形成された産膜とチューブ底に沈殿した酵母(沈殿酵母)の重量を測定したところ、産膜形成が抑えられた培地において、チューブ底の沈殿酵母重量は増加していることがわかった。すなわち、産膜性酵母の増殖は抑えられていないが、産膜形成は抑えられていることが推測された。ワイン醸造において、抗菌活性成分を添加した場合、通常のアアルコール発酵に必要な微生物にも影響する可能性がある。本研究で得られた産膜抑制成分は、微生物に抗菌活性を示すことなく産膜形成のみ抑制できる可能性が考えられる。引き続き、活性メカニズムについて検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe-Saito Fumie, Nakagawa Youji, Kishimoto Munekazu, Hisamoto Masashi, Okuda Tohru	4. 巻 55
2. 論文標題 Influence of wine components on pellicle formation by pellicle-forming yeasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OENO One	6. 最初と最後の頁 363 ~ 375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20870/oeno-one.2021.55.3.4730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川沙也・渡辺（斉藤）史恵・松下 創・中川洋史・岸本宗和・久本雅嗣・奥田 徹
2. 発表標題 ワイン由来フェノール性化合物による産膜形成抑制効果
3. 学会等名 日本ブドウ・ワイン学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学研究者総覧 http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/337/0033697/profile.html
--

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	奥田 徹 (OKUDA Tohru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中川 洋史 (NAKAGAWA Youji)		
研究協力者	岸本 宗和 (KISHIMOTO Munekazu)		
研究協力者	久本 雅嗣 (HISAMOTO Masashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関