

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20579

研究課題名（和文）高速シーケンサーで紐解くワイン発酵メカニズムの多様性

研究課題名（英文）Microbial Diversity in Wine Fermentation Mechanisms Unraveled by High-Speed Sequencer

研究代表者

佐藤 朋之（sato, tomoyuki）

北海道大学・農学研究院・特任准教授

研究者番号：30549895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、市販酵母を使用しないワイン発酵過程の微生物多様性を解析し、自然発酵の頑健性を支える微生物群を明らかにすることを目的とした。北海道の4つの醸造所から採取したサンプルに対し、メタバーコーディング解析とノンターゲットメタボローム解析を実施した。結果、ブドウ品種間よりも地域間や醸造所間で微生物群集の類似性が高く、発酵の中心的役割は醸造所由来の微生物が担っていると推察された。多変量解析により、微生物群集構造と成分分析結果の相関性も明らかにした。この成果は、自然発酵ワインの微生物学的・化学的特性の理解を深め、品質管理や新技術開発に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、自然発酵ワインの製造過程における微生物群集の動態と代謝物質の関係性を明らかにした点にある。特に、地域によりことなる微生物が発酵過程で重要な役割を果たすことを示唆した知見は、ワイン醸造学の発展に貢献する。社会的意義としては、この研究が自然発酵ワインの品質管理や新たな醸造技術の開発に応用できる可能性を有している。地域特有の微生物群集が醸造に及ぼす影響を理解することで、地域性を活かしたワイン生産の促進や、高付加価値化につながる可能性がある。これは、地域の醸造産業の発展や、消費者に対する多様な風味のワイン提供にも寄与しうる。

研究成果の概要（英文）：This study analyzes microbial diversity in natural wine fermentation (without commercial yeast), identifying key and minor yet crucial microbial groups. We developed methods to suppress mitochondrial/chloroplast gene amplification and performed metabarcoding on ribosomal RNA genes. Samples from four Hokkaido breweries underwent microbial community and non-targeted metabolome analysis. While microbial communities did not differ significantly among grape varieties, regional similarities and similarities within breweries were found, suggesting fermentation microbes originate more from breweries than grapes. This year, gene and component analyses were conducted, and multivariate analysis was performed to elucidate the correlation between microbial community structure and component analysis results.

研究分野：微生物生態学

キーワード：ワイン 自発発酵 醸造学 テロワール

### 1 . 研究開始当初の背景

一般に、ワインの醸造には、スターターとして市販酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を接種するが、海外をはじめとした小規模ワイナリーでは、ブドウの果実や醸造機器等に付着する野生酵母を用いて発酵を行う ( 自然発酵 ) 。このような発酵を行うと、市販酵母を接種した発酵と比較し、味わいや香りに複雑さが生じ、高品質のワインを醸造できることが知られている。

しかしながら、自然発酵は発酵不良が多く生じるため、品質の担保が困難である。従って、自然発酵における発酵過程の制御は重要な課題である。また、大規模なワイナリーでは、発酵不良による損失が著しいため、大規模な自然発酵に着手することが困難である。

通常のスターターを添加した発酵では、添加した酵母が速やかに支配的となりアルコール発酵が開始されるものの、自然発酵では、アルコール発酵が開始されるまでの期間が長い。この間に、ブドウに由来する微生物による発酵が起こり、その後活性化した酵母が卓越し、アルコール発酵を行う。これらの微生物と酵母が調和的に発酵作業を行うことにより、酵母単独では成し得ない複雑な発酵過程を経てワインが醸造される。

一方で、発酵不良はブドウの糖度ならびにアミノ酸の含有量等にも起因するが、酵母が支配的になる前段で起こる、競合微生物の混入ならびに、糖やアルコールを消費する微生物の混入に起因する。従って、発酵過程及び原料のブドウ中に存在する微生物種の解明は、複雑な発酵機序の解明に直結するのみならず、発酵管理のためにも極めて重要な課題である。

自然発酵については、これまで多くの学術的な研究がなされ、様々な議論がなされているが、その多くは発酵の中心的役割を担う酵母に関するものである。自然発酵では 醸造機器に付着している酵母 ( 蔵付き酵母 ) が中心的な役割を担っていること、酵母が亜硫酸に触れると休眠状態となり、数か月間は死滅しないこと、死滅しない期間は pH に依存すること、等がごく最近になり明らかとなってきた。一方で、発酵過程において重要な役割を担っていると考えられる、酵母以外の微生物種についての情報はほとんどない。

### 2 . 研究の目的

本研究課題では、高速シーケンサーを活用し、ワイン醸造過程の微生物多様性をこれまでにない高い解像度で解明し、主要微生物群ならびに、存在量としてはごく少数ではあるが、発酵過程に極めて重要な役割を担っている微生物群を同定し、自然発酵の頑健性の基幹となる微生物群 ( core microbiome ) を明らかとする。さらに同定した微生物情報に基づき、将来的には自然発酵の技術評価のためのプラットフォームを作成しようとするものである。これまでに自然発酵過程における微生物叢については、培養法による検討が行われているものの、超高速シーケンサーを用いた解析は行われていない。本検討で行う微生物叢解析は、複数の発酵試行における微生物叢の比較解析を行い、自然発酵の頑健性を基幹微生物の同定を志向したものであり、このような試みは、本邦のみならず世界的に見ても例がない。

### 3 . 研究の方法

本研究の最大の目的は、自然発酵における基幹微生物群の同定にある。本研究課題では、複数のワイナリーの発酵試料から、発酵前のブドウならびに、各発酵段階における試料中の、細菌ならびに酵母などの真核生物を標的とした、超高速シーケンサーを用いたアンブリコンシーケンス解析を行い、高い解像度で各試料中の微生物群を同定を試みた。

試料採取の時期は、アルコール濃度、pH、および糖度の指標となる比重から、試料採取の時期を見極め、各試料について、初期のブドウを含め、発酵期間中を通じ、5 回程度の試料採取を行った。各試料から全 DNA を抽出し、16S rRNA（細菌）ならびに 18S rRNA（真核生物）をそれぞれ PCR により増幅し、Miseq を用いた、アンブリコンシーケンス解析を行い、各試料中の群集構造解析を行い、各種統計処理ならびに比較解析を行った。発酵終了後に、アルコール濃度、酸度、残糖度および、各種官能評価を行い、当該結果と群集構造解析ならびに定量 PCR 結果に基づき、主成分解析をはじめとした統計解析を実施し、官能評価と、群集構造解析結果のならびに定量 PCR の結果に関する相関性の有無を調査した。

#### 4．研究成果

修飾遺伝子配列を用いて植物体に由来するミトコンドリアおよび葉緑体の遺伝子配列の増幅を抑制する解析手法を構築し、自然発酵過程におけるワインの醪について、リボソーム RNA 遺伝子配列を対象としたメタバーコーディング解析を実施し、微生物群集を特定した。また、北海道内複数の醸造所から採取した試料について、微生物群集構造解析、アルコール、ポリフェノール、揮発酸および脂肪酸などの成分分析や LCMS を用いたノンターゲットメタボローム解析を実施した。ブドウの品種ごとの微生物群集の違いは少なかったものの、地域間で微生物群集が類似する傾向が認められた。一方で、醸造所ごとに微生物群集が類似していたことから、発酵に中核的役割を担う微生物種は、原料のブドウに由来する微生物より、各醸造所に由来する微生物の寄与が大きいものと考えられた。これまで得られた試料について、遺伝子および成分解析を中心に実施し、これらの分析結果を用いて多変量解析を行い、微生物群集構造と成分分析結果との相関性を明らかにした。この研究成果は、自然発酵ワインの製造過程における微生物学的および化学的特性の理解を深め、品質管理や新たな醸造技術の開発に寄与する可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------