

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0031

研究課題名(和文) 新たな農資源としての醸造後の酵母資源の利用とその生理活性発現機構の解明

研究課題名(英文) Utilization of post-brewing yeast resources as a new agricultural resource and elucidation of its mechanism of physiological activity

研究代表者

松浦 英幸 (Matsuura, Hideyuki)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20344492

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)：地球上の埋蔵エネルギーには限りがあり、未利用バイオマス資源の有効活用は人類永続の一助となる。本資源の有効活用の観点から、これらを原料とした多く農業資材が市販され、利用されている。しかし、学術的な裏付けが乏しく、その使用が一部に限られている。大量に産出される未利用バイオマスの一事例として、ビール、日本酒、ブドウ酒、焼酎などの醸造過程の副産物があげられる。本課題ではワイン酒醸造後の残渣種子を中心に研究を行い、パレイシヨ増収効果に期待がもたれる資材であるところを報告する。本研究の成果は資源循環型の社会構築に向けた研究事例のモデルケースとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業、林業、水産業、畜産業におけるほぼすべての農資源において、短期的な生産性や収益性が重視され、一方の方向にエネルギーが流れる画一的な農資源の利用がまかり通っている。身近な事例として日本人の主食とするコメでは稲藁、籾殻、米糠があげられ、毎年、大量に産出されるにも関わらず、潜在するエネルギーの再回収は活発でない。これらの現状を鑑み、更には地球上の埋蔵エネルギーには限りがあることから、再利用できる部位は再利用する資源循環型の社会構築は持続的な社会を目指すうえで必須の項目である。本課題では、市場に受け入れられ、かつ循環型社会形成に役立つ新たな農資源を見出すべく研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：It is thought that the energy reserving on the earth are limited, and the effective utilization of unutilized biomass resources will help sustain the human race. From the viewpoint of effective utilization of these resources, many agricultural materials originated from the unutilized biomass resources are commercially available and in use. However, their use is limited to a few events due to a lack of evidence supported by academic support. One example of unutilized biomass produced in large quantities is by-products originated from brewing processes such as beer, sake, grape wine, and shochu. In this project, we focus on the seed residue from wine brewing and report that it is a promising material for increasing the yield of potatoes. The results of this research will serve as a model case study for the construction of a resource-recycling society.

研究分野：天然物化学

キーワード：未利用バイオマス ワイン醸造 残渣種子 パレイシヨ 植物傷害応答

## 1. 研究開始当初の背景

農業、林業、水産業、畜産業におけるほぼすべての農資源において、短期的な生産性や収益性が重視され、一方の方向にエネルギーが流れる画一的な農資源の利用がまかり通っている。身近な事例として日本人の主食とするコメでは稲藁、籾殻、米糠があげられ、毎年、大量に産出されるにも関わらず、潜在するエネルギーの再回収は活発でない。環境負荷が少ないと評価されているバイオエタノールでさえ、その主たる原料となるトウモロコシの子実部はエネルギーとして変換されるが、有用物質を含む芯は廃棄されている。これらの現状を鑑み、更には地球上の埋蔵エネルギーには限りがあることから、再利用できる部位は再利用する資源循環型の社会構築は持続的な社会を目指すうえで必須の項目である。本課題では、大量に産出される醸造過程の副産物の有効利用を模索する。副産物の利用法として、具体的にはバレイショ栽培における葉面散布剤としての用途を見出し、『バレイショ塊茎の増収効果』を実証する。葉面散布に関しては、実際の農家が年間に行える施与回数を考慮しつつ行った、我々のビール酵母を用いた予備実験では所望の効果があることが示唆されている。上記の効果はビール酵母澱の葉面散布により、植物が澱に含まれる何らかの成分を病原菌の襲来と勘違いし、地上部で JA 類縁体の生合成量が上昇し、蓄積した JA 類縁体が地下部へ移動して上記の効果が発揮されると想定している。本課題が扱う生物現象は『澱に含まれる何らかの成分を植物が病原菌の襲来と勘違いする』ことが肝となることから、日本酒、ワイン、焼酎等の製造で生まれる澱資源にも適用可能で、これらの利用法が見出されれば、未利用バイオマスの新規な用途の発見に結びつき、産業界への波及効果は多大なものである。よって、本課題では日本酒、ワイン醸造で生まれる澱資源に関しても研究を進める。醸造過程で生まれる澱は元をたどれば、米、大麦、ブドウ等の農資源より得られる未利用バイオマスであるから農資源としての位置付けが可能で、更に飲料および食用生産に用いられた経緯から、安全面も十分である。よって、『市場に受け入れられ、かつ循環型社会形成に役立つ新たな農資源』として有用であり、今後の持続可能な社会の構築に向けた社会を築く上で、何らかの情報を与えるものと期待できる。

## 2. 研究の目的

地球上の埋蔵エネルギーには限りがあり、未利用バイオマス資源の有効活用は人類持続の一助となる。本資源の有効活用の観点から、これらを原料とした多く農業資材が市販され、利用されている。しかし、学術的な裏付けが乏しく、その使用が一部に限られている。大量に産出される未利用バイオマスの一事例として、ビール、日本酒、ブドウ酒、焼酎などの醸造過程の副産物である澱(おり)があげられる。本課題では酒醸造後の副産物に焦点を当て資源循環型の社会構築に向けた研究事例のモデルケースを構築する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) JA 類の定量

人工気象機を用いて 4 週間育種したベンタミアーナ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた。醸造後のブドウ果皮を、オートクレーブを用い熱水中抽出液 (ブドウ果皮 1g/ 1 mL) を作成し葉面散布液として、1 週間の間に 3 回処理、最終処理後 2 日目に葉部を刈り取り、UPLC MS/MS を用い、既

報(Sato et al., *PCP*, **52**, 509~517, 2018)に従い分析を行った。

## 2) 圃場試験

実験圃場は、北大北方圏フィールドセンター、実験圃場を用いた。播種はその年の気候により一定ではないが、北方圏フィールドセンター技術職員の方の助言のもと適期に行った。施肥、土壌管理、作物管理もお手伝いいただいた。葉面散布には北海道ワイン株式会社から提供の醸造後分離したブドウ果皮を用いた。オートクレーブを用い熱水中抽出液(ブドウ果皮 1g/ 10 mL)を作成した。葉面散布の実施は表土に植物体が現れた時期、開花前、開花後 2 週間に行った。具体的には、2019 年では、1 区画あたり、10 個体；播種、5/10；散布、6/21、7/9、7/22；収穫、8/30であった。葉面散布の量は葉部から液が滴るまで行った。収穫後のバレイショは全て掘り上げ、サイズ分けし、S, ~50g；M, 50~150；L, 150~250；2L, 250~350；3L, 350~, それぞれのサイズでの総量として収量を示した。

## 3) ブドウ果皮熱水抽出液に含まれる生理活性物質の単離

ブドウ果皮熱水抽出液を塩酸を用いて、弱酸性としたのち酢酸エチルを用いて抽出した。酢酸エチル可溶画分については、種々のシリカゲルからムクロマトグラフィー条件で単離精製を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 資材の選定

未利用資源として、日本酒、ビール等の醸造後に残る、酵母澱、ワイン醸造後の酵母澱、皮、種子残渣を対象とした。この中から資材を選定する際に、『何らかの成分を植物が病原菌の襲来と勘違いする』ことを念頭に資材散布後のジャスモン酸(JA)類の内生量の上昇を指標とした。その結果、図に示すように、ワイン醸造後の残渣のうち、ブドウ果皮残渣の熱水抽出に良好な活性を見出した。また、北海道の本来の気候は元来、寒冷に敏感なブドウ樹には不向きで、この中には高級ワイン醸造には欠かせない、ピノ・ノワール、ソーヴィニヨン・ブラン等が含まれていた。しかし、昨今の温暖化の影響で、道内でも高級ワイン醸造に適した非耐寒性ブドウ樹の栽培が可能になった。これを背景とし昨今、ワイン醸造産業は北海道の新しい産業として期待が持たれている。実際のところ、2021 年 10 月の時点で 53 箇所ものワイナリーが道内に所在し、北海道庁の主導する『北海道ワインアカデミー』が毎年開講され、更には北大農学部にも『北海道ワインのヌーヴェルヴァーグ研究室』の寄付講座が立ち上がるなど、産学官あげでの取り組みがなされている。また、平成 30 年 6 月には国税庁から国内で 2 番目のぶどう酒の地理的表示「北海道」が指定されるなど、国内でも有数のワイン産地と格付けされ、超追い風状態である。よって、醸造後のブドウ果皮残渣の利用は、北海道の新産業育成にも役立つことから、本課題ではワイン醸造後のブドウ果皮残渣に主眼を向けた。



図 1. 北海道ワイン株式会社の自社技術により分別されたワイン醸造後の副産物  
左：酵母澱（ナイヤガラ）  
中央：醸造後のブドウ果皮（ツヴァイゲルト）  
右：醸造後のブドウ種子（ツヴァイゲルト）

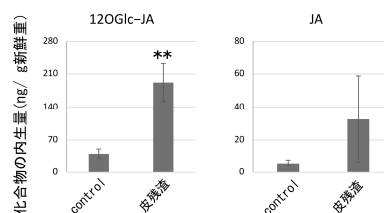


図 2. 皮残渣熱水抽出液のベンタミアナ葉面散布による JA 類の内生量の上昇

## 2) 北大北方圏フィールドセンター実験圃場を用いた、葉面散布によるバレイショ収量調査

北海道の新産業として有望で、残渣の確保が容易になりつつある点と、熱水抽出物葉面散布による JA 類の内生量の上昇が確認されたことから、醸造後のブドウ果皮の熱水抽出物 (0.1g/mL) の葉面散布を、2021、2020、2019 年の 3 年間、計 3 回の圃場実験を行なった。2019 年度のデータを図 3 に示した。規格ごとの収量を図に示した。2019 年では、商品として流通する M、L サイズに限った

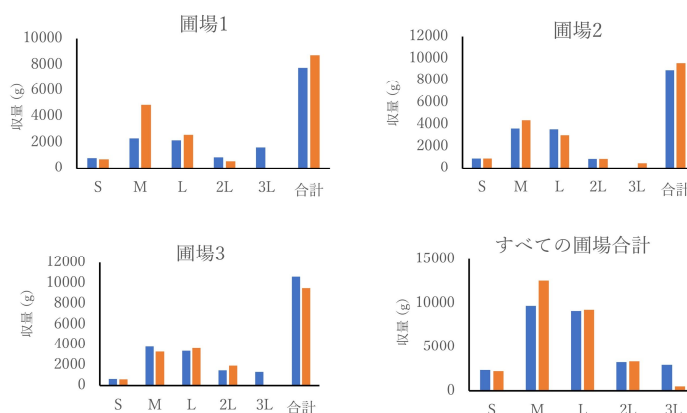


図 3. 2019 年の収量調査の結果

場合では、全体的な収量増加が確認できた。ブドウ皮の熱水抽出物 (0.1g/mL) の葉面散布で特徴的であった点として、ほぼ規格外の 2L、3L サイズのバレイショの個数が、コントロール区と比べて少なかった。仮に全体の収量を流通しやすい、S、M、L サイズに絞って総重量を求めると、ブドウ果皮の熱水抽出物 (0.1g/mL) の葉面散布区において、収穫量の増加が確認できた。この傾向は 2021、2020 年の散布試験でも再現性良く観察され、S、M、L サイズに絞っての総重量に関しては、コントロール区と比べて、ブドウ果皮の熱水抽出物 (0.1g/mL) の葉面散布区で、1~2 割増しの収量増加が確認できた。

## 3) 醸造後のブドウ果皮に含まれる有用物質の探索

先行研究では、ethyl gallate 等のフェノール性化合物は、植物の傷害応答反応を誘導する活性が報告されている (Pascale Goupil et al., *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 9006-9012, 2017)。この報告を考慮しつつ、化合物の探索を行った。ブドウ皮の熱水抽出物の酢酸エチル可溶画分から、右記の化合物の単離に成功した (図 4)。それぞれの化合物の構造決定は  $^1\text{H}$ -、 $^{13}\text{C}$ -NMR の 1 次元データ、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC などの 2 次元データおよび質量分析データ

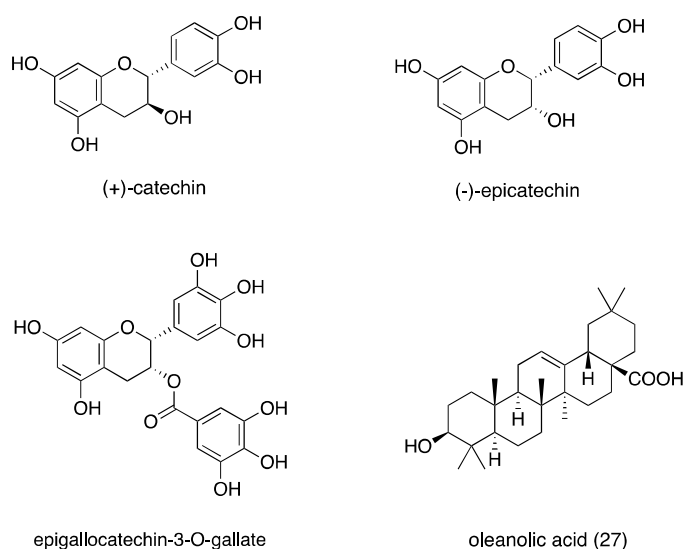


図 4. ブドウ果皮熱水抽出液に含まれる生理活性物質

よりその化学構造を明らかとした。(+)-catechin および(-)-epicatechin については、3 : 2 の混合物として得られた。Oleanolic acid に関しては上記で用いた方法で化合物の構造を決定した。化学構造の再確認のために、oleanolic acid の標品と今回単離したサンプルをどちらもジアゾメタン処理し、カルボン酸部位をメチル化した後、GC-MS を測定した。GC-MS の保持時間、

マスパターンが互いにより一致を示した。よって、今回単離した化合物は oleanolic acid であると断定した。Epigallocatechin-3-*O*-gallate に関しては、その存在がブドウ属ではよく知られていることから、質量分析法をもちいてその存在を確かめることとした。まずは標準品を用いて、質量分析に最適な条件を設定した。その後、酢酸エチル可溶画分を分析に供したところ、保持時間が一致し、設定した分析条件により検出できる化合物が存在した。よって、ブドウ皮の熱水抽出物の酢酸エチル可溶画分に、epigallocatechin-3-*O*-gallate が含まれていることが明らかとなった。

#### 4) 単離した化合物の生理活性

上記の実験で単離した化合物の葉面散布実験をおこなった。化合物の効力の評価は、『何らかの成分を植物が病原菌の襲来と勘違いする』ことが重要であることから、JA 類の内生量の上昇効果を指標とした。葉面散布を行なった化合物の中では、epigallocatechin-3-*O*-gallate に所望の活性が確認できた。その結果を図 5 に示した。当該の化合物を含む水溶液 (100  $\mu$ M) を処理した際に、JA の生合成上流の化合物である OPDA (12-oxo-phytodienoic acid) および、JA の 12 位の炭素が水酸化を受け、さらにグルコピラノースが付加した代謝産物 (TAG: tuberonic acid glucoside) の内生量の有意な上昇が確認できた。

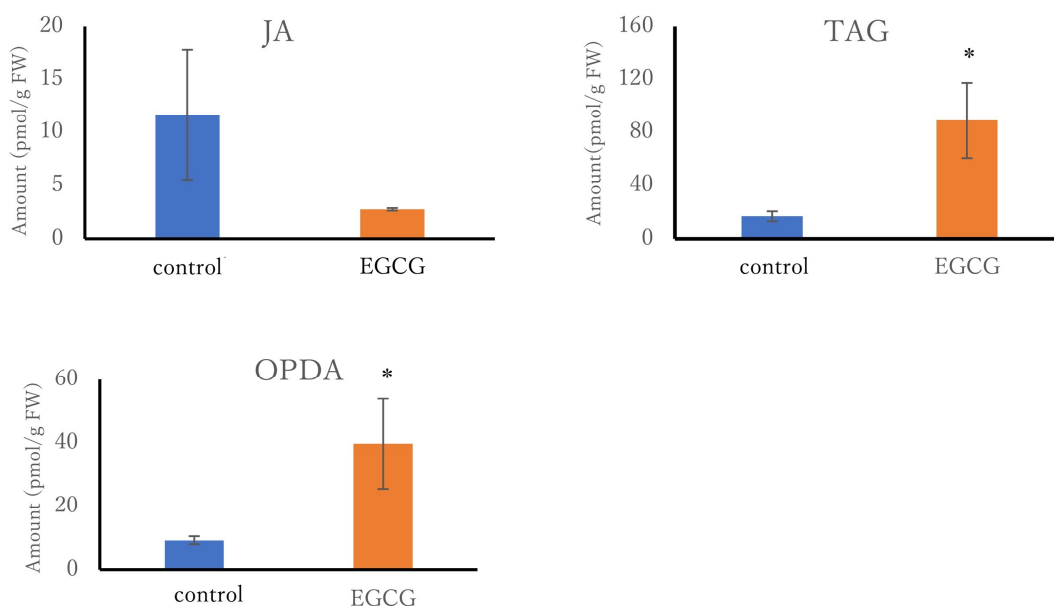


図 5. Epigallocatechin-3-*O*-gallate(100 $\mu$ M)含有水溶液の葉面散布効果.

#### 5) 研究成果のまとめ

本課題の遂行により、未利用な有効資源として、ワイン醸造後のブドウ果皮が有効であることが示唆できた。

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
研究分担者	柏木 純一  (Kashiwagi Jyunichi)  (60532455)	北海道大学・農学研究院・講師    (10101)	

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