

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05873

研究課題名(和文) 乳酸菌分離基盤技術の構築と自然発酵ワイン醸造に関わる微生物叢の解明

研究課題名(英文) Development of basic technology for isolating lactic acid bacteria and Elucidation of the microbial flora involved in spontaneous fermentation winemaking

研究代表者

乙黒 美彩 (Otoguro, Misa)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：20635099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：運動性乳酸菌の分離がサンプル依存적ではあるもののマルチウェルプレート法でも運動性乳酸菌を分離することができることを示した。さらにサンプル依存적である課題を解決する方法として *L. vini* JCM 14280T の *fliG* 遺伝子の配列をもとに設計したプライマーを使用した PCR がサンプルのスクリーニングに有用である可能性を示した。ブドウの自然発酵液中に生息する酵母には、属種および株レベルで地域差が認められること、またその違いはワインの香味成分に異なる特徴を与えることが明らかになった。ワイン醸造において、「その土地の特徴」を持つテロワールを反映したワインを作ることが出来る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワインの自然発酵中に存在する多数の乳酸菌や酵母が取得できるとともに、分離報告例のない新規微生物群を取得でき、持続的な研究開発につなげることが可能となる。特に運動性乳酸菌は遺伝子や薬剤の新たなベクターとして利用できる可能性も秘めている。考案した種々の分離方法は独自性が高く、国内の醸造用ブドウ畑などの環境中から土着の酵母や乳酸菌といった多様な微生物を取得することで日本ワインのテロワール・産地の個性に新たに「微生物という概念」を導入することができ、ワインに複雑性を付与するための日本独自のワイン醸造技術の確立に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Although the isolation of motile lactic acid bacteria is sample-dependent, it was shown that it is possible to isolate motile lactic acid bacteria using the multi-well plate method. Furthermore, as a way to solve the problem of sample dependency, it was shown that PCR using primers designed based on the sequence of the *fliG* gene of *L. vini* JCM 14280T may be useful for screening samples.

It was revealed that regional differences at the genus, species and strain levels are observed in the yeasts that inhabit the natural fermentation liquid of grapes, and that these differences impart different characteristics to the aroma and flavor components of wine. In winemaking, it was shown that it is possible to create wines that reflect the terroir, which has the "characteristics of the land."

研究分野：応用微生物学

キーワード：自然発酵 ワイン 酵母叢 運動性乳酸菌

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年報告されている運動性乳酸菌は焼酎やココア、ワインなどの発酵過程より分離されている例が数多く認められる。しかし、その生息数は極めて少なく、細胞が鞭毛による運動性を示すという特徴を有する乳酸菌の分離方法が求められている。

そこで、申請者はこれまでに運動性乳酸菌 *Liquorilactobacillus nagelii* に有効な分離法として、誘引剤にワイン中の香味成分の一種であるフェネチルアルコールを用いた毛細管捕集法を開発し、ワイン醸造用のブドウ果汁および醪から多数の運動性乳酸菌を取得することに成功した。しかし、この方法は *L.nagelii* のみに有効であり、その他の運動性乳酸菌群の取得には至らず課題が残った。

海外の研究ではワイン発酵醪中から *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* などの non-*Saccharomyces* 属酵母が、また乳酸菌では *Oenococcus*, *Lactobacillus* 属などの乳酸菌の分離報告例があり、運動性乳酸菌の *L.mali* や *L.vini* といった種類も分離されている。従って、ワイン醸造醪は運動性乳酸菌をはじめとする多様な微生物を取得するための分離源として有効であると考えられる。

ワインの発酵は複雑な微生物反応の連続であり、多種多様な酵母や乳酸菌が次々と発生しワインの複雑性に寄与していると考えられている。特にブドウ畑やブドウ果実に生息している酵母や乳酸菌などを用いて行う自然発酵は発酵の制御が困難で、時に意図しない微生物が増殖し、ワインの品質に多大な影響を及ぼす。しかし、我が国における自然発酵に関する知見は極めて少ない。

2. 研究の目的

ワインの自然発酵工程中に存在する酵母および乳酸菌を取得し、自然発酵に関与する微生物叢を明らかにすることを本研究の目的としている。そのために、多くの運動性乳酸菌が存在すると推察されるワイン醸造醪から運動性乳酸菌を効率的に取得するための新たな分離方法を開発する。加えていまだ未解明な部分の多いワインの自然発酵において酵母・乳酸菌に代表される微生物叢を明らかにし、ブドウ由来の微生物がワインに与える影響と複雑性の解明を試みる。

3. 研究の方法

乳酸菌が走化性を示す誘引剤の探索とマルチウェルプレート法の開発：

運動性乳酸菌の既知種である *L. ghanensis*, *L. mali* を用いてアミノ酸類、香氣成分であるテルペノール類、アルコール類、エステル類、アセートエステル類などの化合物から誘引剤としての有効性を検討する。効果が認められた化合物を用いて、図に示した走化性を利用した分離方法を構築し、自然発酵ワインの醸造工程より運動性乳酸菌の分離を試みた。運動性の有無は軟寒天培地を用いて評価し、分離株の同定には迅速性および簡便性から研究室で保有している MALDI-TOF MS 微生物同定システムを用いた。

【乳酸菌の分離】開発したマルチウェルプレート法の有効性を評価するため、自然環境中や様々な醸造用ブドウ品種から分離を行い、分離株の同定を行った。

【酵母の分離】

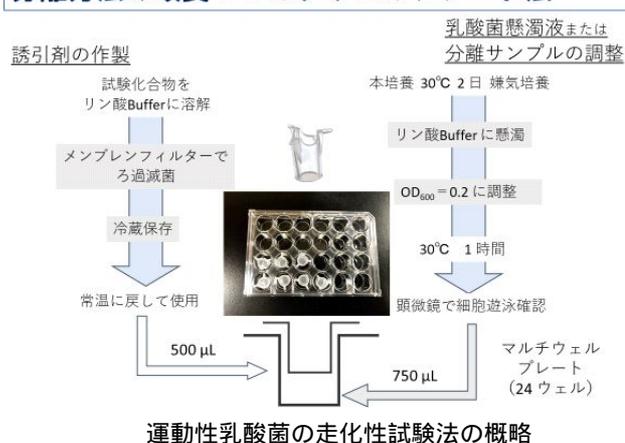
自然発酵ワインではブドウ果実に由来する野生酵母を利用してワインを醸造している。そのため、野生酵母のバラエティーがワインの風味に強く影響をおよぼす。そこで、ブドウ果実および畑土壌に由来する野生の発酵性酵母を選択的集積培養法にて分離し、乳酸菌と同様に分離株の同定を行った。また生成されたワインの香味成分分析と分離株との比較によりワインの複雑性に微生物が寄与しているか検討した。

4. 研究成果

運動性乳酸菌の分離・同定および運動性の発現について

2022年に収穫されたマスカット・ベリーA種を用いた自然にマロラクティック発酵が起きたワインをサンプルとして、マルチウェルプレート法と毛細管捕集法の2種類の方法で誘引剤をフェネチルアルコール 50 mM、フェネチルアルコール 5 mM、プロピオン酸エチル 50 mM、プロピオン酸エチル 5 mM の4条件用意して運動性乳酸菌の分離を行った。計80株の分離株

分離方法の改良：マルチウェルプレート法



を獲得し、分離株に対して軟寒天培地試験と AXIMA 微生物同定システムによる簡易同定を行った。その結果 80 株のうち 22 株が軟寒天培地試験で運動性を示しそのうちの 3 株は AXIMA 微生物同定システムで *L. nagelii* と同定された(表 1)。残りの 19 株は AXIMA 微生物同定システムでは同定されなかった。軟寒天培地試験で運動性を示さなかった 58 株のうち 3 株は同定されなかったため、運動性が確認された 22 株と合わせて運動性遺伝子の有無を確認した。25 株に対して *L. vini* JCM 14280^T の *fliG* 遺伝子の配列をもとに設計したプライマーを使用した PCR による運動性遺伝子有無の判別を実施したところ 25 株のうち 24 株が運動性遺伝子を保有していることが示された。これら 24 株について 16S rRNA 遺伝子配列解析による同定を行った。24 株のうち 22 株が運動性既知の乳酸菌である *Liquorilactobacillus nagelii* に同定された。今回分離方法、分離条件の違いによる運動性乳酸菌の分離への影響については見られなかったものの、マルチウェルプレート法でも運動性乳酸菌を分離可能であることが示された。様々なサンプルから分離を試みたが 1 サンプルからしかマルチウェルプレート法による運動性乳酸菌を分離できなかったことをふまえるとやはり運動性乳酸菌の分離はサンプル依存的事であることが考えられる。また、サンプルに対して *L. vini* JCM 14280^T の *fliG* 遺伝子の配列をもとに設計したプライマーを使用した PCR による運動性乳酸菌有無の判別を行った結果、目的の位置にバンドが確認されたためサンプル中に運動性乳酸菌が存在する可能性が示された。実際に運動性乳酸菌が分離できたことを踏まえると *L. vini* JCM 14280^T の *fliG* 遺伝子の配列をもとに設計したプライマーを使用した PCR はサンプルのスクリーニングに有用であると考えられる。

自然発酵ワイン由来酵母の微生物叢の解明と土着酵母のワイン香味成分への影響

北海道、長野県、山梨県、山口県の 4 つの地域、9 つのブドウサンプルを用いた自然発酵液からの酵母の分離と酵母叢の比較、山梨県内 5 つのブドウサンプルを用いて自然発酵液中の酵母叢の比較を行った。またそれら酵母叢の違いがワインの香味成分に与える影響を調べるための分離株を用いた発酵試験を実施した。分離された *S. cerevisiae* に対し、地域差や株間での発酵能の違いを調査するために、Inter-delta PCR を用いた遺伝型の比較を行った。

4 つの道県のブドウを自然発酵した醪から 2,507 株の酵母を分離した。そのうち長野県のカベルネソーヴィニヨンと山梨県のメルロー 2 つのサンプルからのみ *S. cerevisiae* が分離された(図 1)。またすべてのサンプルで異なる酵母叢が確認され、特に地理的に距離が遠い北海道と山口県のサンプルからは異なる属種が分離された。距離の近い長野県と山梨県では同じ属が優勢種として分離されたが、種レベルでは違いがあり、発酵が進む中で属レベルの違いも現れ、メルローとカベルネソーヴィニヨンのでは同一ブドウ品種のサンプルでも 2 つのサンプルで酵母叢の違いが確認できた。このことから地域間および品種間に酵母層の差があると認められたが、ブドウ品種が様々だったため酵母叢の違いを地域差のみに絞れないことが課題となった。

次いでこの課題をクリアするためにブドウ品種を揃えることを優先し、山梨県内 3 つの地域のワイナリー 5 か所から MBA を提供していただき、同様に実験を行った。計 226 株が分離され、そのうち甲州市塩山のサンプルでのみ *S. cerevisiae* が分離された。この実験では属レベルで差が出ることはなかったが、サンプルごとに異なる種が分離され、発酵後期にかけてその違いは顕著になった。また同一市内のサンプルでも違いが確認され、今後は気候のちがいでなく土壌成分や防除剤などの項目も含めて検討する必要があると考えられた。

これまでに分離された *S. cerevisiae* および non-*Saccharomyces* 属酵母を用いた発酵試験を行った。これらの結果より、同属同種の *S. cerevisiae* であっても株ごとに異なる特徴を示すことが分かり、それらの違いは市販ワイン用酵母 *S. cerevisiae* EC1118 との間にも認められた。また non-*Saccharomyces* 属酵母との共接種により *S. cerevisiae* の単独接種とは異なる香氣成分の特徴が現れた。またこの違いは接種方法の間にも表れ、同時接種と順次接種では順次接種の方が他のサンプルとの差が大きくなった。このことから自然発酵のように先に non-*Saccharomyces* 属酵母が優勢種として発酵できる環境がワインの香味成分に特徴を与えるために有益であることが示唆された。

最後に分離された *S. cerevisiae* の株多様性を検討した。いずれのサンプルでも *S. cerevisiae* EC1118 株とは異なる株が分離されており、長野県と山梨県の間にも違いが見られた。また同一サンプル内でも山梨県のメルローからの分離株では分離日ごとに異なる株が出現していることが分かり、常に単独の株のみで発酵が行われているわけではない、ということが明らかになった。さらにこの遺伝型の相同性の高低はワインの香味成分の差の大きさと比例しており、異なる株を用いることで完成したワインに特徴を付与与できることが示唆された。

以上の研究成果より、ブドウの自然発酵液中に生息する酵母には、属種および株レベルで地域差が認められること、またその違いはワインの香味成分に異なる特徴を与えることが分かった。今後これら微生物の存在をテロワールの一部と定義するためには、同一地域での経年観察とその畑のもつ特徴の解明や、その違いに關与しうる気候や土壌、品種による違いのもつ影響を調べることが必要となってくる。そのうえでその地域、畑に特有の“土着酵母”の探索には株レベルでの観察が必要である。また自然発酵でその土地の特徴を安定的に作り出すことは非常に難しいが、今回のように分離された酵母の株性を調べその株をスターター酵母として添加することで、ほかの商品と差別化した「その土地の特徴」を持つワインを作ることが出来る可能性が示さ

れた。

表1 分離株の同定と運動性

菌株番号	AXIMA 同定結果 ¹⁾	運動性発現 ²⁾	菌株番号	AXIMA 同定結果 ¹⁾	運動性発現 ²⁾
22KJMBAML-MF50-1	-	-	22KJMBAML-CF50-1	no matches	+
22KJMBAML-MF50-2	-	-	22KJMBAML-CF50-2	-	-
22KJMBAML-MF50-3	-	-	22KJMBAML-CF50-3	-	-
22KJMBAML-MF50-4	-	-	22KJMBAML-CF50-4	no matches	+
22KJMBAML-MF50-5	-	-	22KJMBAML-CF50-5	-	-
22KJMBAML-MF50-6	-	-	22KJMBAML-CF50-6	-	-
22KJMBAML-MF50-7	-	-	22KJMBAML-CF50-7	no matches	+
22KJMBAML-MF50-8	-	-	22KJMBAML-CF50-8	-	-
22KJMBAML-MF50-9	-	-	22KJMBAML-CF50-9	<i>L. nagelii</i>	+
22KJMBAML-MF50-10	-	-	22KJMBAML-CF50-10	-	-
22KJMBAML-MF5-1	-	-	22KJMBAML-CF5-1	no matches	+
22KJMBAML-MF5-2	-	-	22KJMBAML-CF5-2	-	-
22KJMBAML-MF5-3	-	-	22KJMBAML-CF5-3	-	-
22KJMBAML-MF5-4	-	-	22KJMBAML-CF5-4	-	-
22KJMBAML-MF5-5	-	-	22KJMBAML-CF5-5	no matches	+
22KJMBAML-MF5-6	no matches	+	22KJMBAML-CF5-6	-	-
22KJMBAML-MF5-7	-	-	22KJMBAML-CF5-7	no matches	+
22KJMBAML-MF5-8	-	-	22KJMBAML-CF5-8	-	-
22KJMBAML-MF5-9	-	-	22KJMBAML-CF5-9	<i>L. nagelii</i>	+
22KJMBAML-MF5-10	-	-	22KJMBAML-CF5-10	-	-
22KJMBAML-MP50-1	no matches	+	22KJMBAML-CP50-1	no spectrum	+
22KJMBAML-MP50-2	-	-	22KJMBAML-CP50-2	no matches	+
22KJMBAML-MP50-3	-	-	22KJMBAML-CP50-3	-	-
22KJMBAML-MP50-4	-	-	22KJMBAML-CP50-4	no matches	+
22KJMBAML-MP50-5	-	-	22KJMBAML-CP50-5	-	-
22KJMBAML-MP50-6	no matches	-	22KJMBAML-CP50-6	-	-
22KJMBAML-MP50-7	no matches	+	22KJMBAML-CP50-7	no matches	+
22KJMBAML-MP50-8	<i>L. nagelii</i>	+	22KJMBAML-CP50-8	-	-
22KJMBAML-MP50-9	no matches	-	22KJMBAML-CP50-9	-	-
22KJMBAML-MP50-10	-	-	22KJMBAML-CP50-10	-	-
22KJMBAML-MP5-1	no matches	+	22KJMBAML-CP5-1	-	-
22KJMBAML-MP5-2	-	-	22KJMBAML-CP5-2	no matches	+
22KJMBAML-MP5-3	-	-	22KJMBAML-CP5-3	-	-
22KJMBAML-MP5-4	-	-	22KJMBAML-CP5-4	データカウント不足	+
22KJMBAML-MP5-5	-	-	22KJMBAML-CP5-5	-	-
22KJMBAML-MP5-6	-	-	22KJMBAML-CP5-6	no matches	-
22KJMBAML-MP5-7	-	-	22KJMBAML-CP5-7	-	-
22KJMBAML-MP5-8	データカウント不足	+	22KJMBAML-CP5-8	データカウント不足	+
22KJMBAML-MP5-9	-	-	22KJMBAML-CP5-9	データカウント不足	+
22KJMBAML-MP5-10	-	-	22KJMBAML-CP5-10	-	-

1) 空欄はこれまで当研究室 AXIMA 微生物同定システムで分析された株と近似であることが示された

2) + : 軟寒天培地で運動性発現あり、- : 軟寒天培地で運動性発現なし

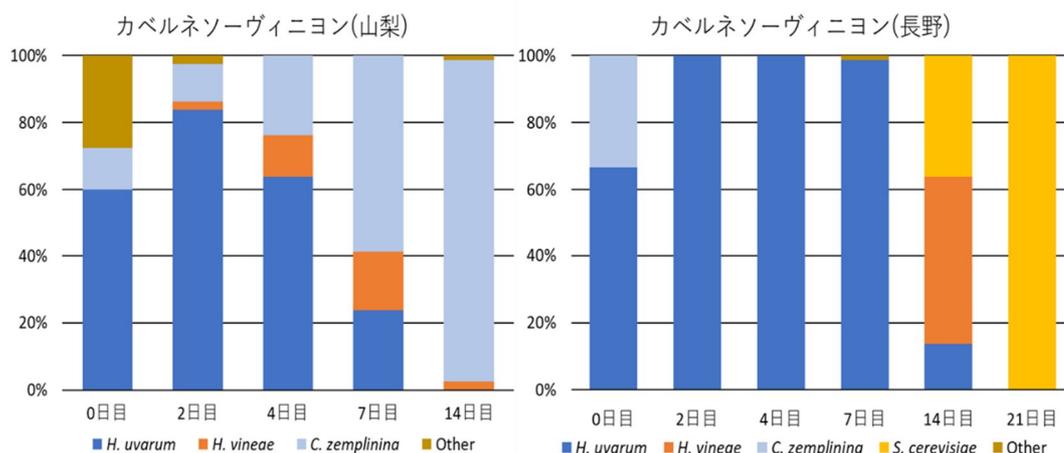


図1 自然発酵中の酵母叢の変化(山梨県および長野県のカベルネ・ソーヴィニヨンとメルロー)

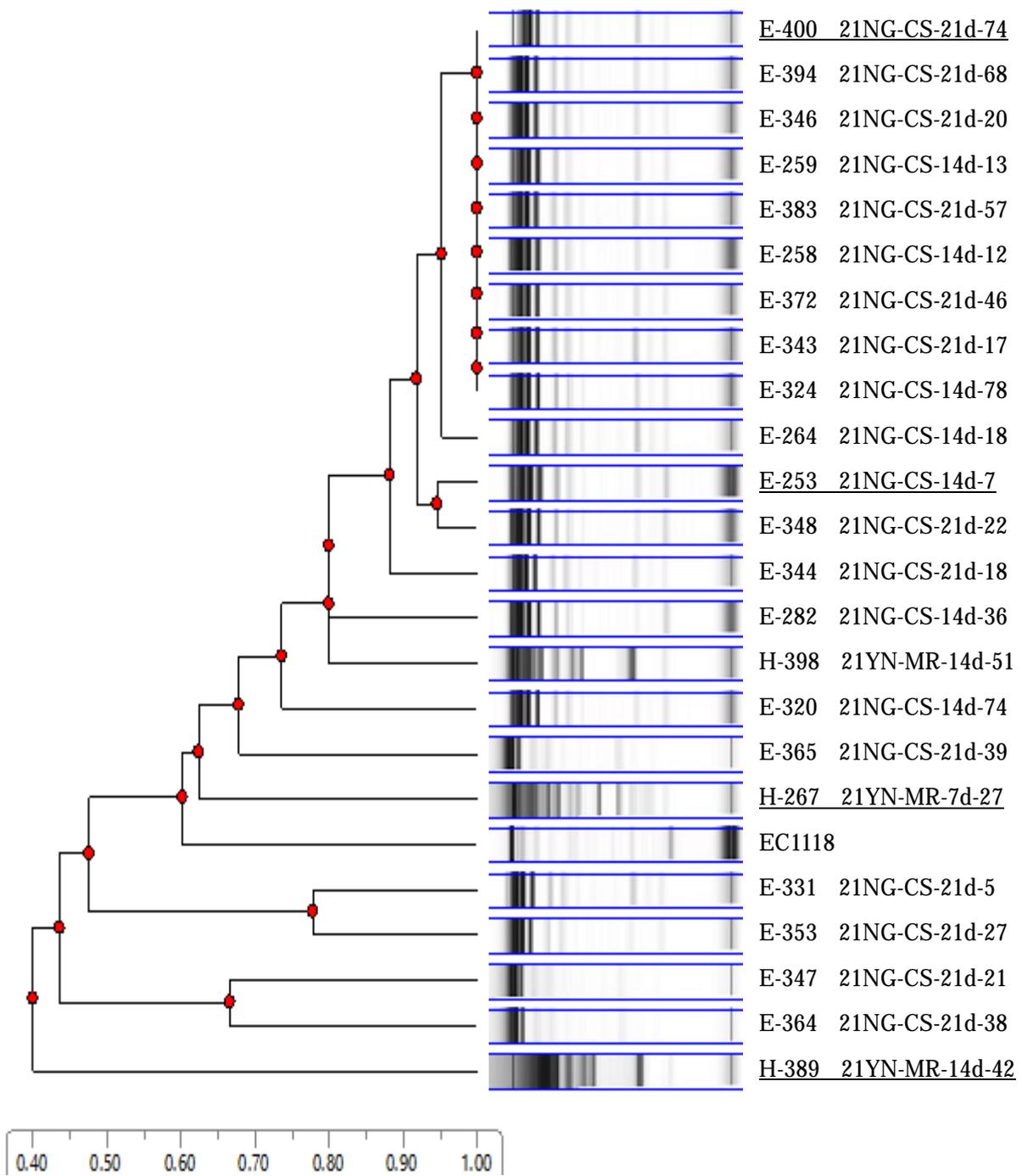


図2 山梨県および長野県の分離株の Inter-delta PCR から作成したデンドログラム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 近藤梢、柴山洋翔、奥村ゆい、乙黒美彩
2. 発表標題 ワインに地域特性を付与する酵母の探索と醸造特性
3. 学会等名 日本ブドウ・ワイン学会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------