

## 知床自生果実から分離した 酵母によるワインの試作

中川良二, 濱岡直裕

Trial Wine Production Using Yeast Separated  
from Fruit Growing Naturally in Shiretoko

Ryoji Nakagawa, Naohiro Hamaoka

In this study, 2 yeast strains (Shiretoko yeast nos. 10 and 18) with 10% alcohol tolerance were selected from 25 strains separated from fruit growing naturally at the registered World Natural Heritage site in Shiretoko. These were assumed to be *S. paradoxus* based on the results of applying two PCR method approaches to identify bacterial species within the *Saccharomyces sensu stricto* group containing *S. cerevisiae*, as well as a homology search in the D1/D2 range of 26S rDNA.

The two strains of Shiretoko yeast selected were used as starters, and grape juice chaptalized to obtain 23 degrees Brix was fermented at 20°C for 21 days in trial wine production. The resulting alcohol concentration was around 9%, which was slightly lower than that achieved using Kyokai yeast no. 1 (just over 10%). A large amount of added glucose remained, making the wine sweet and fruity. Ratings in a tasting survey with 14 subjects indicated that the wine was as good as or better than two commercially available types, highlighting the feasibility of practical use for these types of Shiretoko yeast.

酒類の消費低迷が深刻化している中、他県では地域の花や果実などから分離した独自酵母を用いた酒類開発が進展し、成果を上げている。当センターでは2007年～2008年に実施した知床由来の食品製造向け微生物の探索に関する研究において2005年7月に世界自然遺産に登録された知床世界自然遺産登録地域内に自生する植物の実や花等を採取し、食品製造に利用可能な酵母や乳酸菌株の分離を行った<sup>1)</sup>。今後はこれらの微生物菌株を用いた試作試験等の実用化研究が期待される。

一方、道内ではワイナリー設立、道産原料によるワイン造り、ワインツーリズムなどワインによる地域ブランド化への取り組みが活発になっている。そこで、本研究では北海道の豊かな自然をイメージした「北海道ブランド酒」の開発を目指し、知床世界自然遺産の登録地域内で採取した自生果実由来酵母のワイン用スターターとしての可能性を明らかにするために酒類の試作を行った。

事業名：経常研究

課題名：道産原料および独自分離微生物を用いた北海道ブランド酒の開発

### 1. 実験方法

#### (1) 供試酵母株

2008年10月に知床国立公園(羅臼, ウトロ地域)の国有林内で採取した果実から分離した酵母25株(これらを知床酵母1号～25号と名付けた)を用いた<sup>1)</sup>。

#### (2) 酵母の培養

酵母の培養にはYPD培地(2%グルコース, 2%ポリペプトン, 1%酵母エキス)に、カビや細菌の生育抑制のために0.2%プロピオン酸ナトリウムおよび0.01%クロラムフェニコールを添加して用いた。培養は25°Cで3日間から5日間行った。アルコール耐性試験では、10%エタノールを含むYPD培地を用い、25°Cで4日間培養した。

#### (3) 分離酵母株の菌種推定

分離酵母株の菌種推定は、Josepaら<sup>2)</sup>およびTorrianiら<sup>3)</sup>により示されたPCR法を用いて行った。また、26S rRNA遺伝子(rDNA)D1/D2領域の塩基配列(566塩基)を決定し、NCBIのDNAデータベースでこれらの配列の相同性を検索することにより行った。

#### (4) ワイン醸造試験

供試酵母株には知床自生果実から分離された、10%エタノール含有YPD培地で増殖可能な2株(知床酵母10号と同18号)および、対照としてワイン用きょうかい酵母1号(日本醸造協会)を用いた。市販の道産ブドウ果汁(720ml, 赤および白)にBrixが23になるようにブドウ糖を添加し、これに菌数として $7 \times 10^6$  CFUの各酵母株を加え、20°CでBrixが一定となるまでの期間発酵させた。

#### (5) 有機酸分析

有機酸分析は、Shim pack SCR102H(300mm×8mm I.D, 島津製作所)を2本直列接続したHPLC有機酸分析システム(島津製作所)を用いて実施した。各サンプルは水で10倍希釈した後、遠心分離(8,000rpm, 5分間)により固液分離し、上清をシリンジフィルター(ポアサイズ0.45 $\mu$ m, Millipore)で濾過後、HPLCに供した。移動相には5mmol/L *p*-トルエンスルホン酸水溶液を用い、検出試薬は5mmol/L *p*-トルエンスルホン酸および100 $\mu$ mol/L EDTAを含む20mmol/L Bis-tris水溶液とし、電気伝導度により検出した。注入量:10 $\mu$ L, 流速:0.8mL/分, カラム温度:40°Cの条件で行った。各有機酸濃度は、標準品(和光純薬)のピーク面積と比較して算出した。

#### (6) 糖質分析

糖質分析は、CARBOSep COREGEL-87N(300mm×

7.8 mm I.D, Transgenomic) を装備した HPLC (島津製作所) を用いて実施した。各サンプルは遠心分離(8,000 rpm, 5 分間)により固液分離し, 上清をシリンジフィルター(ポアサイズ 0.20  $\mu\text{m}$ , Millipore)で濾過後, HPLC に供した。移動相には水を用い, 注入量: 10  $\mu\text{L}$ , 流速: 0.6 mL/分, カラム温度: 85°C, 検出: RI の条件にて行った。各糖質濃度は, 標準品(和光純薬)のピーク面積と比較して算出した。

#### (7) その他の分析

pH, 比重, 吸光度 ( $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ), アルコール濃度, 糖濃度を測定した。pH はガラス電極 pH メーター (HM-50G, TOA) を用いて測定した。比重の測定には標準比重計を用いた。吸光度 ( $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ) 測定は分光光度計 (UV-1200, 島津製作所) を用いて行った。アルコール濃度は F-キット (Roche) を使用し, 添付マニュアルに従って測定した。

#### (8) 試飲アンケート

試飲アンケートは「北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」及び「産業技術研究本部 人間工学実験取扱要領」に基づき実施した。アンケート参加者は食品加工研究センターの職員 14 名で, 「香りはどうですか」, 「味わいはどうですか」, 「このワインは好きですか」という 3 項目について 5 点法で行った。1 がとても良い又は大好き, 2 が良い又は好き, 3 が普通またはどちらでもない, 4 が悪い又は嫌い, 5 が非常に悪い又は大嫌いとした。なお, 白ワインおよび赤ワインともに市販 2 品 (量販店ワインと道産のハウスワイン) を対照ワインとして用いた。得られたデータについて平均値と標準偏差を算出し, 危険率 5% で ( $P < 0.05$ ) 有意差を Student's t-検定により検定した。

#### (9) 塩基配列のアクセッション番号

知床酵母 10 号の 26 S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列 (566 塩基) は DDBJ データベースにアクセッション番号 (accession number) は AB778768 として登録されている。なお, 知床酵母 18 号の当該塩基配列は同 10 号と同一である。

## 2. 実験結果および考察

### (1) 酒類試作のための酵母株の選抜と菌種の推定

知床自生果実から分離した酵母 25 株について, アルコール耐性試験により選抜を行った結果, 2 菌株が 10% アルコール耐性を有していた。これらはマタタビ由来の知床酵母 10 号とコクワ由来の知床酵母 18 号であった。

*Saccharomyces cerevisiae* は *S. pastorianus*, *S.*

*bayanus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae* とともに *Saccharomyces sensu stricto* という分類学上のグループを形成している<sup>2)</sup>。これらの菌種は非常に類似しているため, 様々な糖の資化能や発酵能を調べる伝統的な酵母同定法では, 区別する事が難しい。これらの菌種を見分ける簡単な分子生物学的なアプローチとして PCR を用いた幾つかの方法が報告されているが, 結論づけるだけの確かな方法は示されていない。従って, 知床酵母 10 号と同 18 号の菌種の推定には Josepa ら<sup>2)</sup> および Torriani ら<sup>3)</sup> により示された PCR 法と 26 S rDNA 部分塩基配列の相同性検索の 3 種類の方法により行った。図 1 には, Josepa らと Torriani らの PCR 法での結果を示している(それぞれ, 図 1 A と 1 B)。知床酵母 10 号と同 18 号は, 図 1 A で 1,200 bp の(図 1 A のレーン 2 と図 1 B のレーン 3), 図 1 B で 1,710 bp の(図 1 A のレーン 4 と図 1 B のレーン 5) 特異バンドを示した。

Josepa らの方法では *S. pastorianus* および *S. bayanus* からの区別は可能であるが, *S. paradoxus* および *S. mikatae* からの区別はできない。Torriani らの方法では *S. bayanus* および *S. mikatae* からの区別は可能であるが, *S. pastorianus* および *S. paradoxus* からの区別はできない。従って, 上記の結果から, 知床酵母 10 号と同 18 号は *S. cerevisiae* か *S. paradoxus* であると推定された。

一方, 26 S rDNA の部分塩基配列の相同性検索では, 2 菌株ともに *S. cerevisiae* と *S. paradoxus* に対して 99% 以上の高い相同性を示したが, 僅かに *S. paradoxus* の方が相同性が高かったことから, 最終的に知床酵母 10 号と同 18 号は *S. paradoxus* であると推定した。

### (2) 知床酵母によるワインの試作と評価

知床酵母 10 号, 同 18 号および対照としてワイン用きょうかい酵母 1 号をスターターに道産ブドウ果汁を用いてワインの試作を行なった。これらの試作ワインの Brix は発酵 21 日間ではほぼ一定になったことから, この時点で発酵を止めた。表 1 に Brix, pH, 比重, 吸光度 ( $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ), アルコール濃度の各測定結果を示した。Brix は知床酵母によるワインでは 11.6~12.4 であり, 対照ワイン (Brix: 10.0~10.8) よりも高い値であった。また, アルコール濃度は 9% 前後で, 対照ワインよりもやや低く, その分, 糖の残存量が多くなった(表 2) ことから, 甘口ワインとなった。有機酸組成をみると(表 2), 発酵によりリンゴ酸が減少し, コハク酸, 乳酸, 酢酸が生成した。酢酸に関しては対照よりも生成量が少なかった。

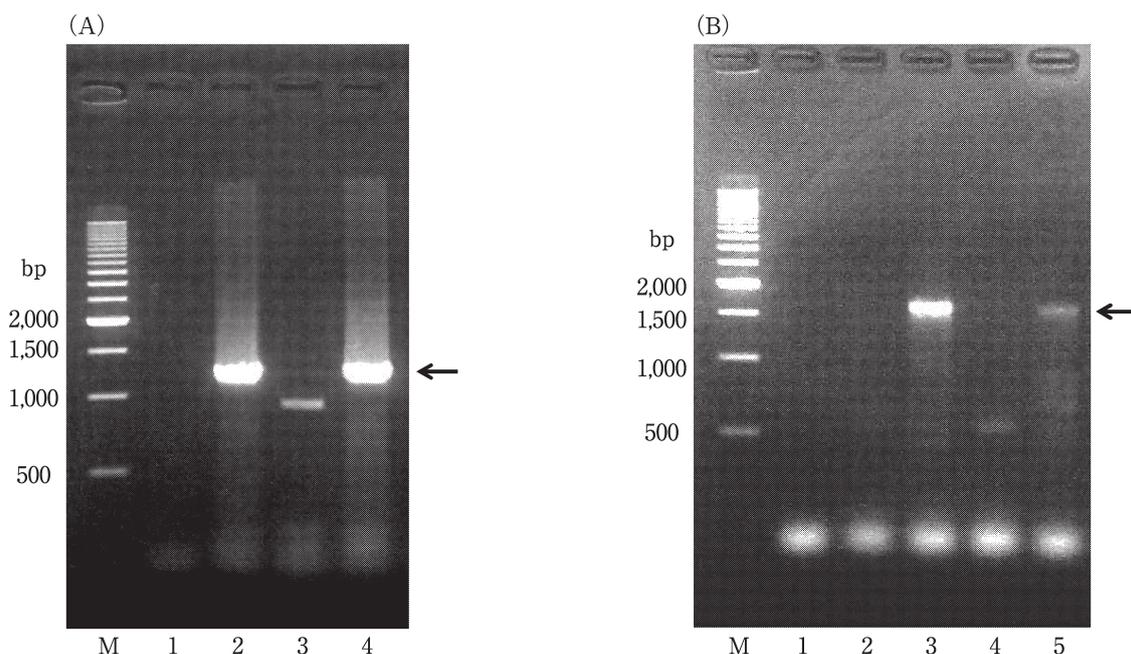


図1 知床酵母10号と同18号の Josepa ら<sup>2)</sup> (A) および Torriani ら<sup>3)</sup> (B) の方法による PCR の結果  
 (A), M: 分子量マーカー, 1: 知床酵母4号, 2: 知床酵母10号, 3: 知床酵母11号, 4: 知床酵母18号.  
 (B), M: 分子量マーカー, 1: 知床酵母24号, 2: 知床酵母4号, 3: 知床酵母10号, 4: 知床酵母11号,  
 5: 知床酵母18号.  
 矢印は特異バンドの位置を示している.

表1 試作ワインの Brix, pH, 比重, 吸光度 (A<sub>420</sub>, A<sub>520</sub>) およびアルコール濃度

項目	赤ワイン				白ワイン			
	原料果汁	知床酵母10号	知床酵母18号	きょうかい酵母1号	原料果汁	知床酵母10号	知床酵母18号	きょうかい酵母1号
Brix	17.0	11.6	11.6	10.0	15.7	12.4	11.9	10.8
pH	3.16	3.37	3.37	3.38	3.17	3.20	3.19	3.18
比重	1.075	1.025	1.026	1.013	1.067	1.028	1.024	1.015
A <sub>420</sub>	2.50	1.91	1.76	1.87	0.28	0.19	0.19	0.25
A <sub>520</sub>	4.23	2.67	2.48	2.70	0.09	0.09	0.05	0.06
アルコール(%)	0.09	9.99	9.64	10.21	0.17	8.95	9.48	10.51

表2 試作ワインの有機酸および糖の組成

サンプル名	g/L									
	クエン酸	酒石酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸	ピログルタミン酸	グルコース	スクロース	
白ワイン	原料果汁	0.7	8.6	11.4	0.0	0.0	0.8	7.4	8.8	
	知床酵母10号	0.2	8.1	7.6	0.7	0.1	0.6	3.8	2.2	
	知床酵母18号	0.2	8.2	7.5	0.8	0.1	0.6	3.2	2.1	
	きょうかい酵母1号	0.3	8.1	8.1	0.8	0.2	0.6	1.7	0.7	
赤ワイン	原料果汁	0.3	8.9	10.5	0.0	0.0	0.6	7.5	8.6	
	知床酵母10号	0.6	8.0	8.2	0.6	0.1	0.7	3.8	3.3	
	知床酵母18号	0.5	8.0	8.1	0.8	0.1	0.7	3.5	3.1	
	きょうかい酵母1号	0.6	7.9	8.8	0.7	0.0	0.8	3.2	2.7	

白ワインおよび赤ワインの各試作品について試飲アンケート調査により官能評価を行った。参加人数は14名で、白ワインと赤ワインの市販品それぞれ2点（市販ワインAとBおよび市販ワインCとD）とともに実施した。その結果を図2に示した。白ワインでは、ワイン用きよ

うかい酵母1号をスターターとした試作品（以下、きょうかいワインと略す）が「香り」、「味」、「好み」の何れの評価項目においても最も高い評価であった。知床酵母10号ワインは（以下、10号ワインと略す）は、何れの評価項目においてもきょうかいワインに比べて有意に低い

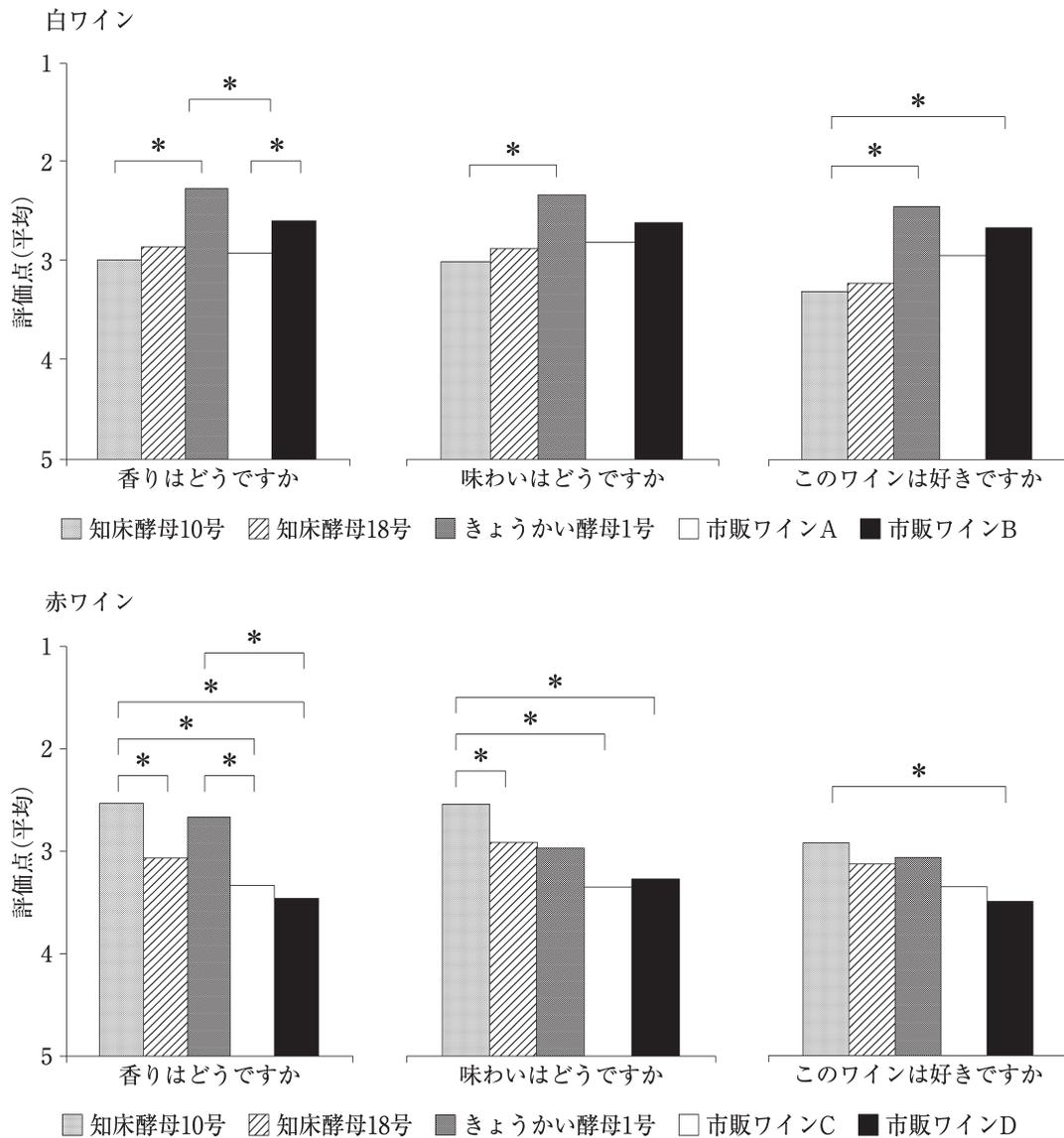


図2 試作ワインの試飲アンケート結果

14名の参加者に対して、「香りはどうですか」、「味わいはどうですか」、「このワインは好きですか」という3項目について5点法で行った。

1：とても良い又は大好き，2：良い又は好き，3：普通またはどちらでもない，  
4：悪い又は嫌い，5：非常に悪い又は大嫌い。

＊， $P < 0.05$  で有意差があることを示している。

評価であったが、18号ワインの場合は評価に有意な差はなかった。市販ワインとの比較においては、10号ワインの「好み」の評価が市販ワインBに比べて有意に低かった以外は、10号および18号ワインの評価は2種類の市販ワインと有意な差はなかった。

赤ワインでは、10号ワインが何れの評価項目においても最も高い評価であったが、きょうかいワインとは有意差はなかった。10号ワインは、「香り」、「味」の項目で2種類の市販ワインよりも有意に評価が高く、「好み」の項目では市販ワインDよりも有意に評価が高かった。一方、18号ワインは何れの評価項目においても、きょうかいワ

インおよび2種類の市販ワインと有意な差はなかった。

以上の結果より、知床酵母10号および同18号ワインは2種類の市販ワインと同等あるいはそれ以上の評価であり、当該知床由来酵母株の実用化の可能性が示された。

### 3. 要約

知床世界自然遺産の登録地域内で採取した自生果実から分離した25株の酵母から10%アルコール耐性を有する2菌株(知床酵母10号と知床酵母18号)を選抜した。これらは、*S. cerevisiae*を含む*Saccharomyces sensu stricto*グループ内の菌種を識別する2種類のPCR法の結果と26 rDNAのD1/D2領域の相同性検索の結果か

ら *S. paradoxus* と推定された。

選択された知床酵母2菌株をスターターとして用い、Brixが23になるように補糖したブドウ果汁を20°Cで21日間発酵させてワインを試作した。その結果、アルコール濃度は9%前後となり、きょうかい酵母1号を使ったワイン(10%強)よりもやや低く、添加したグルコースが多く残存して甘くフルーティーなワインになった。試飲アンケート調査(参加人数:14名)では、2種の市販ワインと同等あるいはそれ以上の評価が得られ、当該知床酵母の実用化の可能性が示された。

## 文 献

- 1) 熊林義晃, 河野慎一, 柿本雅史, 奥村幸広, 川上 誠, 八十川大輔, 長島浩二, 知床由来の食品製造向け微生物の探索に関する研究, 北海道立食品加工研究センター 平成20年度事業報告, 8-9, (2009).
- 2) Josepa, S., Guillamon, J. M. and Cano, J., PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers, *FEMS microbiology letters*, **193**, 255-259, (2000).
- 3) Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G. and Dellaglio, F., Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR, *Letters in Applied Microbiology*, **38**, 239-244 (2004).
- 4) 能登裕子, 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二, 福土宗光, 植物発酵エキスの熟成過程における菌叢解析と攪拌の影響, 北海道立食品加工研究センター報告, **6**, 31-35, (2005).
- 5) Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J. and Roberts, I. N., Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1931-1942, (2000).