



教授
曾根 輝雄

- ・経歴
- 平成9 北海道大学大学院農学研究科博士
後期課程修了, 博士(農学)
- 平成9 ブリティッシュコロンビア大学 PD
- 平成10 日本学術振興会特別研究員 (PD)
- 平成13 北海道大学大学院農学研究科助手
- 平成15 同講師
- 平成19 同農学研究院 准教授
- 平成28 同 教授

北海道産有用微生物の収集とワイン等醸造産業への応用 に関する研究

【目的】

近年、北海道ではワイン産業が著しい発展を遂げており現在 40 のワイナリーがワイン生産を行っている。小規模なワイナリーでは、独自性を高めるために自然発酵による醸造を行なっている場合が多い。市販のワイン用酵母を使用しない自然発酵では有害菌の混入リスクを伴う一方で、独自のフレーバーを付与できる可能性もある。そこで本研究では、北海道の醸造用ブドウ等由来の微生物を収集し、醸造産業への応用を視野にそれらの特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 微生物の分離

北海道産の果物が市場に多く出回り始める 9 月からサンプルを収集した。大学内で行なわれたマルシェや札幌市内スーパーで地元果物として販売されていたものに加え、北海道内のワイナリーの協力により入手した醸造用ブドウおよびその搾りかすをサンプルとした。果汁が多くとれるもの(ブドウ)については、除梗した後、滅菌したさらし布の中で果実を破碎し、果汁と搾りかすに分けた。果汁は滅菌したメジューム瓶内で常温で発酵が起きるのを待った。果汁が少ないもの(いちご、プルーンなど)や搾りかすについては滅菌したメジューム瓶に入れた後、市販のブドウ果汁(濃縮還元)を加えて常温で発酵が起こる

のを待った。炭酸ガスの産生が見られたものを発酵サンプルとして微生物の分離を試みた。酵母の分離には WL ニュートリエント培地（クロラムフェニコール含有）へ、乳酸菌を分離するために MRS 培地（シクロヘキシミド含有）および *Oenococcus oeni* の分離にはブドウジュース培地を用いた。酢酸菌を分離する為に GYP 培地（シクロヘキシミド含有）に塗布した。また、*S. cerevisiae* 分離の為に 30% Glucose 培地、麴培地、Sucrose 培地、Raffinose 培地で集積培養を行なった。

使用した市販果実はいずれも北海道産で、比布産イチゴ、札幌産および仁木産ブルーベリー、旭川産サクランボ、札幌産シーベリー、仁木産プラム、札幌産姫リンゴ、夕張産ヤマブドウ、北広島産キイチゴ、富良野産蜂蜜およびミニトマト、北海道産西洋梨（パートレット）、余市産および北大果樹園産リンゴ、北海道産ブドウ（ナイヤガラ、キャンベル、デラウェア、旅路、ポートランド）を使用した。醸造用ブドウは、富良野産ケルナー（搾りかす）、カベルネソービニオン、ふらの2号、余市産ロンド、ピノ・ノワール、ゲヴェルツトラミネーナー（果実および搾りかす）、レгент、ソービニオンブラン、ケルナー、ピノブラン、北大果樹園のツヴァイゲルト、ケルナーを使用した。加えて北大果樹園サンプルではシードル用に果汁を搾ったリンゴの搾りかすもを使用した。

発酵サンプルは適宜希釈して、プレートに塗布し、コロニーを形成させた。酵母については ITS 領域をプライマー ITS4 および ITS5 で、乳酸菌および酢酸菌については 16SrDNA をプライマー 27F と 1525R を用いてコロニーダイレクト PCR 法で増幅した。PCR 酵素はクルードサンプルから高効率で増幅できる KOD FX Neo（東洋紡）を用いた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動でサイズを確認し、酵母では 800bp 以上に増幅が見られたもの、乳酸菌および酢酸菌では約 1.5kbp に増幅を確認できたものについて、Microspin S-300HR（Cytiva）で精製し、BigDye Terminator v1.1（Thermo Fisher）を使用して塩基配列を決定した。

2. *S. cerevisiae* の SSR 解析

同一のサンプルから 10 株以上の *S. cerevisiae* を分離したが、これらの株がいくつかのクローンからなるかを明らかにするために、SSR (Simple Sequence Repeat) 解析を行なった。Enrico らの方法により、3つのプライマーペア（表 1）、PCR 酵素として KOD-Multi&Epi-（東洋紡）を使用してマルチプレックス PCR を行い、アガロースゲル電気泳動のパターンを比較した。同一のパターンを持つものは同一クローンと判定した。

表 1 SSR 解析に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
SC8132XFW	ctgctcaacttgatgggttttg
SC8132RV	cctcgttactatcgtcttcattcttgc
YOR267CFW	ggtgactctaacggcagagtgg
YOR267CRV	ggatctacttgagcagatatacggg
SCPTS7FW	aaaagcgaagcaatgggttagat
SCPTS7RV	aatgatgccaatattgaaaaggt

【結果および考察】

1. 微生物の分離

プラスチックバッグやメジューム瓶に入れた果汁から炭酸ガスを生成したものを発酵あり（図 1）とみなし微生物の分離を行なった。市販の果実から分離された酵母は *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora vineae*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia* sp. であった。 *S. cerevisiae* は市販果実のブドウ（旅路）からのみ分離することができた。昨年度も果実や花、樹木などから分離を試みたがブドウ以外から *S. cerevisiae* を分離することは出来なかった。これらのことから *S. cerevisiae* を分離するサンプルとしてはブドウが最も適していると考えられた。

市販の果実から分離された乳酸菌および酢酸菌は *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Gluconobacter cerinus*, *G. frateurii*, *G. cerevisiae*, *G. oxydans*, *Acetobacter cerevisiae* であった。

醸造用ブドウおよび搾りかすからは多くの *S. cerevisiae*, *S. mikatae* および *S. paradoxus* を分離することができた。乳酸菌および酢酸菌としては、*Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Oenococcus oeni*, *Acetobacter fabarum*, *A. pomorum*, *A. cerevisiae*, *Gluconobacter oxydans* が分離された。

乳酸菌および酢酸菌は分離源ごとに 1 株または 2 株を保存株とし、再度単コロニー分離した後、46 株を AHU (Agriculture Hokkaido University: 北海道大学大学院農学研究院菌株保存施設) 保存菌株として登録した。登録株については、DNA 抽出を行い 16S rDNA 塩基配列全長を解析して、種名まで確定した。酵母については *Saccharomyces* 属以外は昨年度多くの分離株を保存したので、今年度は *Saccharomyces* 属について保存を行うことにした。分離されたコロニーについて ITS4 プライマーでシーケンスを行ない、BLAST 検索して *S. cerevisiae* に相同性を示した株は 1 サンプルから 10-16 個程度仮保存した。



図1 プラスチックバッグおよびメジュームビンでの発酵が起こっているサンプル

2. *S. cerevisiae* の SSR 解析

分離された *S. cerevisiae* は同じ株が増殖して得られたクローン株である可能性があるため、株識別に用いられる SSR 解析を行なった。

同じワイナリーH の異なったブドウ品種から分離された *S. cerevisiae* を比較した (図2)。

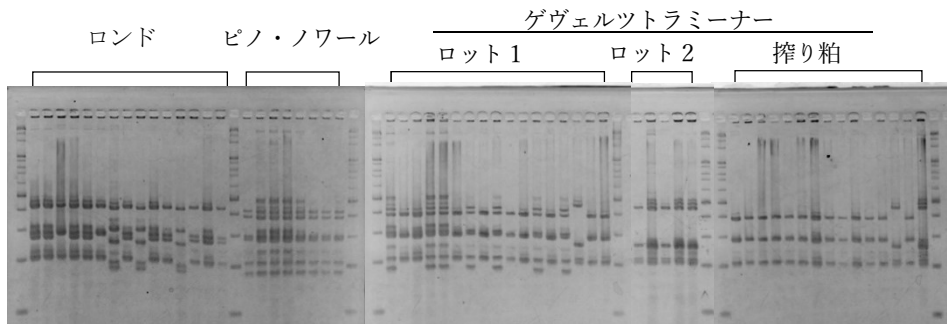


図2 ワイナリーHのブドウから分離された *S. cerevisiae*

その結果、ピノ・ノワールとゲヴェルツトラミーナーから分離された株のパターンに共通性が見られるが、ロンドとは共通していなかった。これは開花、結実時期や物理的な距離が影響を与えている可能性が考えられた。また、同じ品種でもロットにより分離される種類が異なっていた。搾りかす置き場から分離された株は同じ品種のブドウ果汁発酵物から分離された株と同一であった。

次に同じワイナリーHの同じ品種のブドウから得られた *S. cerevisiae* の分離年での比較を行なった (図3)。

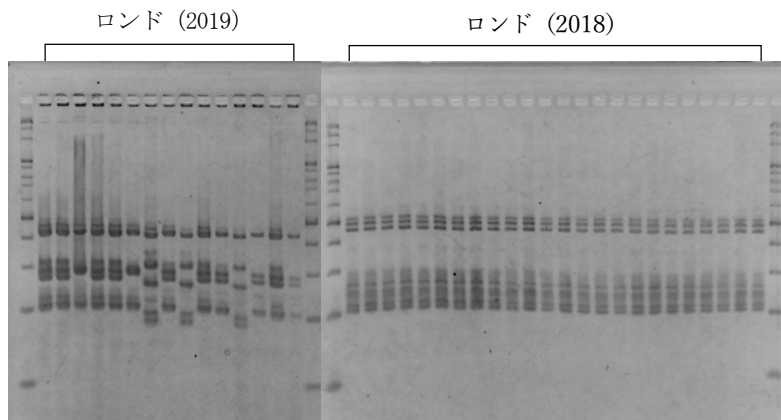


図3 ワイナリーHのブドウから分離された *S. cerevisiae* の分離年での比較

その結果、昨年度と今年度で分離された株に共通点はなく、毎年異なる株が定着していることが考えられた。

同様の比較を北大果樹園のブドウについても比較を行なった (図4, 5)。

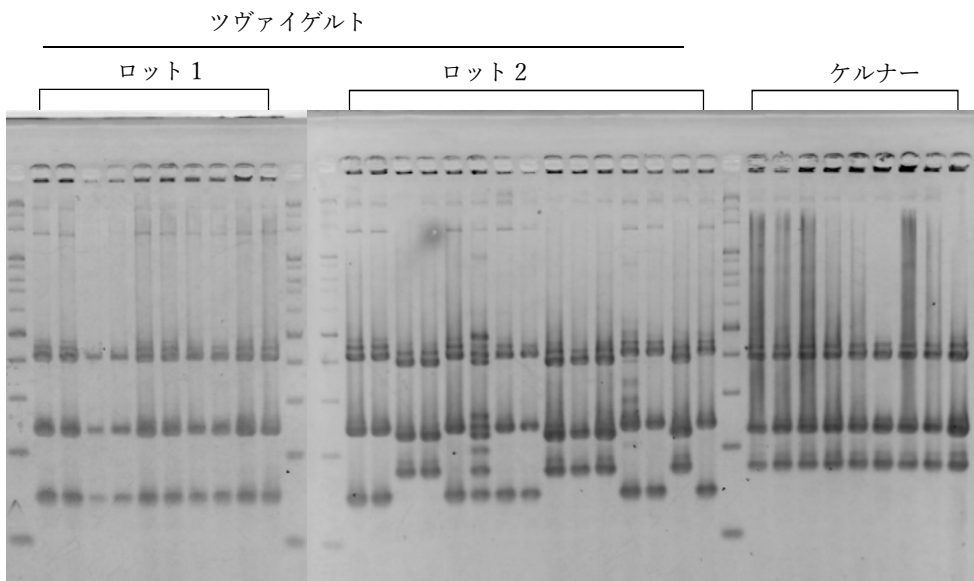


図4 北大果樹園のブドウから分離された *S. cerevisiae*

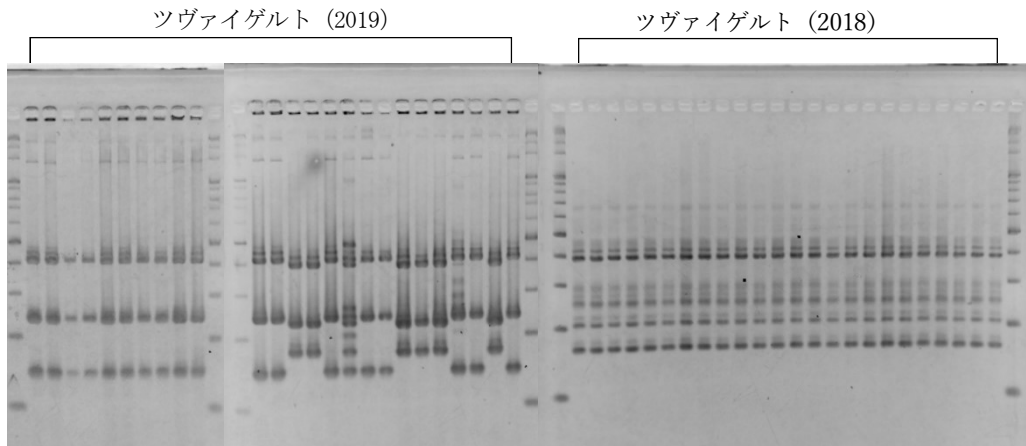


図5 北大果樹園のブドウから分離された *S. cerevisiae* の分離年での比較

図4の結果から、ツヴァイゲルトとケルナーから分離された株のパターンには共通性が見られた。この理由として2つの品種が並んで栽培されているという物理的な距離が影響している可能性が考えられた。また、同じ品種でもロットにより分離される種類の数が異なっていた。図5の結果から、同じ品種でも昨年度と今年度で分離された株に共通点はなく、毎年異なる株が定着していることが考えられた。

これらの結果を踏まえて、同じサンプルから分離された株のうちパターンの異なる株をそれぞれ1株ずつ選んだ。分離された培地が異なるものについては、パターンが同じものもそれぞれ1株ずつ選び、計135株をAHUに保存した。

【まとめ】

ブドウから *S. cerevisiae* 135株、ブドウおよびその他果実からバクテリアを46株分離し、保存を行なった。分離された *S. cerevisiae* をSSR解析で比較したところ、同一ワイナリー、品種間でも異なる株が存在する一方で、異なる品種間で共通する株も存在していた。また、年ごとに異なる株が定着していることが示された。今後、さらに分離を行うとともにアルコール産生能など分離株の生理学的性質について調べていく予定である。

(参考文献)

E. Vaudano, E. G-Moruno. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25, 56-64, 2008