



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

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 53 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。

2020-2021 年度はコロナ禍のため、前年度ほどのサンプリングを行うことができなかったため、新規 *Saccharomyces* 属酵母の分離だけでなく、昨年度までに分離した株についてさらなる解析も行った。

(1) 北海道内のブドウから微生物の分離

<分離材料>サンプリングに行くことがほとんどできなかった為、他プロジェクト(ブドウ果汁の分析)で使用した後の、ブドウの搾りかすをサンプルとした。これらのサンプルは余市町3箇所5種類、仁木町2箇所4種類、鶴沼(浦臼町)4種類、富良野3種類、山崎ワイナリー(三笠市)4種類、道総研中央農試(長沼町)3種類、国立研究開発法人農

業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター（札幌市）2 種類から複数回サンプリングした合計 155 サンプルを使用した。他に、余市町のワイナリー1 箇所（品種と栽培場所の違いで 17 種）と北大余市果樹園（品種の違いで 2 種）からのブドウサンプルを使用した。

<方法>搾りかすのサンプル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。ブドウをサンプルとした場合は果汁と搾りかすに分け、果汁はそのまま発酵を待った。発酵が見られたサンプルについては酵母をコロニー分離する為に WL ニュートリエントプレート（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 プレート（シクロヘキシミド含有）へ、酢酸菌を分離する為に GYP プレート（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 培地で集積培養も行なった。

<結果>ブドウの搾りかす 155 サンプルから *Saccharomyces* 属の分離ができたのは、*S. cerevisiae* が分離された 2 サンプルと *S. paradoxus* が分離された 1 サンプル、*S. cariocanus* が分離された 1 サンプルの 4 サンプルのみであった。これらの分離源のサンプリング時期、場所、ブドウの種類は異なっていた。155 サンプル中、発酵が起こらなかったのは 26 サンプルのみで、搾りかすをブドウ果汁に添加すると、炭酸ガスの発生や濁りなどが見られた。これらのサンプルから分離された酵母は多くが *Hanseniaspora uvarum* で他に *H. vineae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metchnikowia viticola*, *M. ziziphicola*, *M. citriensis*, *Debaryomyces prosopidis*, *Starmerella davenportii*, *Rhodotorula babjevae*, *Papiliotrema flavescens*, *Pichia kudriavzevii*, *Lachancea fermentati*, *Nakazawaea* sp., *Candida pseudolambica*, *Schizosaccharomyces japonicus* が分離された。

ブドウサンプルは 10 房以上をサンプリングできたので、1 サンプルを 2 つに分けてそれぞれ果汁を絞り発酵が起きるか観察した。果汁を絞った後の残渣も市販果汁を加えて発酵が起きるのを待った。果汁については全てのサンプルから炭酸ガスの発生が認められたが搾りかすについては発酵が見られないもの、カビが表面を覆ってしまったものがあった。*Saccharomyces* 属の分離ができたのは、*S. cerevisiae* が分離された 6 サンプル（全て果汁サンプル）と *S. paradoxus*（残渣サンプル）が分離された 1 サンプルの 7 サンプルであった。他に分離された酵母は *H. uvarum* が最も多く、*H. pseudoguilliermondii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *S. davenportii* などで上記の 155 サンプルから分離された酵母と同様であった。

発酵サンプルを培地上でコロニーを形成させ、3 個程度ずつコロニーダイレクト PCR で ITS 塩基配列を増幅し、その塩基配列を確認した。*S. cerevisiae* が確認されたサンプルについてはさらに複数株の *S. cerevisiae* を単離し、昨年同様に 3 種類の SSR プライマーを用いたマルチプレックス PCR を行った。泳動パターンが同じものはクローン株とし、パターン

の違うものを AHU 保存菌株として登録した。今年度は *S. cerevisiae* を 27 株登録した。他に *S. paradoxus* を 1 株, *S. cariocanus* を 1 株登録した (表 1)。 *Saccharomyces* 属以外の酵母は 27 株を登録した。

バクテリアに関しては *Acetobacter* 属を 3 株, *Gluconobacter* 属を 25 株, *Asaia* 属を 3 株, *Lactobacillus* 属を 2 株, *Oenococcus oeni* を 2 株, *Bacillus* 属を 3 株登録した。 *Asaia* 属の細菌は過去数年間で初めての分離であった。特に *Oenococcus oeni* に関しては, グレープジュース培地プレートに生育してきたコロニーを 1 サンプルあたり 10~16 個分離し, 16S rDNA 塩基配列を解析 *O. oeni* であることを確かめた。それぞれについて DNA 抽出を行い, RAPD 解析を行った。プライマーは M13, M14, Coc, 1283 の 4 種類を使用し, 泳動パターンの異なる株を保存株とした (表 2)。

表 1 *Saccharomyces* 属分離数

年度	<i>S. ludwigii</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. cariocanus</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Total
2018	8	45	0	18	1	63	135
2019	0	3	3	32	0	101	139
2020	0	1	1	0	0	27	29

表 2 *Oenococcus oeni* 分離数

年度	分離数
2018	27 (6)
2019	6
2020	2

※2018 年度はスターター無添加のワイン発酵中サンプルから分離された数。カッコ内がブドウサンプルから分離された数

(2) 北海道内から分離された微生物菌株の生理学的, 遺伝学的解析

(a) *Saccharomyces cerevisiae* および *S. mikatae* の胞子形成能

発酵のスターターとして用いる場合において胞子形成を行うことは性質の変化をもたらす可能性があることを意味している。そのため, 分離された株について胞子形成能を確かめた。

<方法>胞子形成培地 (酢酸カリウム 10g, 酵母エキス 1g, グルコース 0.5g, 寒天 20g) 上で生育させ、顕微鏡観察を行った。

<結果>分離された株のほとんど (*S. cerevisiae* 90.6%, *S. mikatae* 96.9%) が胞子形成能を有していた (表 3)。

表3 *S. cerevisiae* および *S. mikatae* の胞子形成能 (胞子形成菌株数/試験菌株数)

分離年度	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. mikatae</i>
2018	54/63	15/18
2019	90/101	31/32
2020	26/27	0/0

(b) *Saccharomyces cerevisiae* および *S. mikatae* のキラー活性

キラー活性は酵母の持つ性質で、キラー毒素を産生することで感受性をもつ他の菌株の生育を抑制する性質のことである。ワイン醸造に用いる際に、キラー活性を持つ菌株は他の菌株よりも優占して生育する事が期待出来るため、その活性の有無は重要な情報となる。そのため、登録した株についてキラー 活性を持っているかを確認した。

<方法>キラー活性を持っていない Primeur 株を YPD 培地 (酵母エキス 10g/L, ポリペプトン 20g/L, グルコース 20g/L, 寒天 15g/L, pH4.6) に混ぜ込みプレートを作成した。登録した株を同液体培地で1晩培養したものを 20 μ l ずつスポットして、27 $^{\circ}$ Cで3日間培養して、スポットの周囲にクリアゾーンが見られたものをキラー 活性有りとした。同様に K1 キラー 活性を持つ株 (RIB1071)または K2 キラー 活性を持つ株 (EC1118)を混ぜ込んで作成したプレートにスポットしてクリアゾーンが出来るか確かめ、そのキラー タイプを確認した。

<結果>分離された *S. cerevisiae* および *S. mikatae* はキラー活性を持っている株と持っていない株があった。またキラー活性を持っている株は全て K2 活性を持っている株であった (表4)。

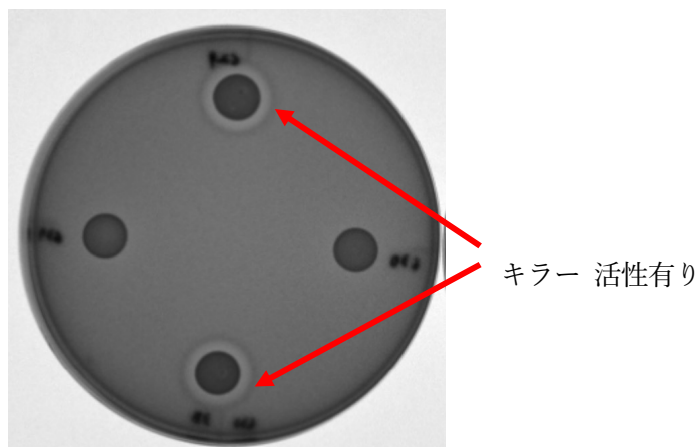


図1 キラー活性を示した株

表4 分離株のキラー活性

分離年	<i>S. cerevisiae</i>			<i>S. mikatae</i>		
	供試数	Killer 活性有	K2 活性※	供試数	Killer 活性有	K2 活性※
2016	16	3	3	0	0	0
2017	12	2	2	0	0	0
2018	63	19	19	18	10	10
2019	101	41	41	32	13	13
2020	27	19	19	0	0	0

※RIB1071(K1)に活性を示した.

(c) *Oenococcus oeni* の MLST (multi locus sequence typing) 解析

北海道から分離された *O. oeni* の遺伝的バックグラウンドを明らかにし、これまで他地域から分離された菌株との相違を明らかにするため、MLST 法による系統解析を行った。

＜方法＞*O. oeni* の保存株を用いて、ハウスキーピング遺伝子でシングルコピーである8つの遺伝子について、PCR 増幅を行い、塩基配列を決定した。解析した配列を ClustalW で整理し長さを揃えた後、8つの遺伝子配列を連結して再度 ClustalW で整理、MEGA7 を用いて neighbor-joining 法でクラスター解析を行った。

表5 *O. oeni* の MLST 解析に使用した遺伝子

遺伝子名	遺伝子産物
<i>gyrB</i>	Gyrase, β subunit
<i>G6pd</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
<i>Pgm</i>	Phosphoglucomutase
<i>Ddl</i>	D-Ala-D-Ala ligase
<i>dnaE</i>	DNA polymerase III, α subunit
<i>purK</i>	Phosphoribosylamino-imidazole carboxylase
<i>rpoB</i>	RNA polymerase, β subunit
<i>recP</i>	Transketolase

<結果>

Neighbor-Joining 法による系統樹を図2に示した。北海道分離株のみでクラスターを形成したものがいくつかあったので、特徴的な性質がないかさらなる調査を現在も継続中である。

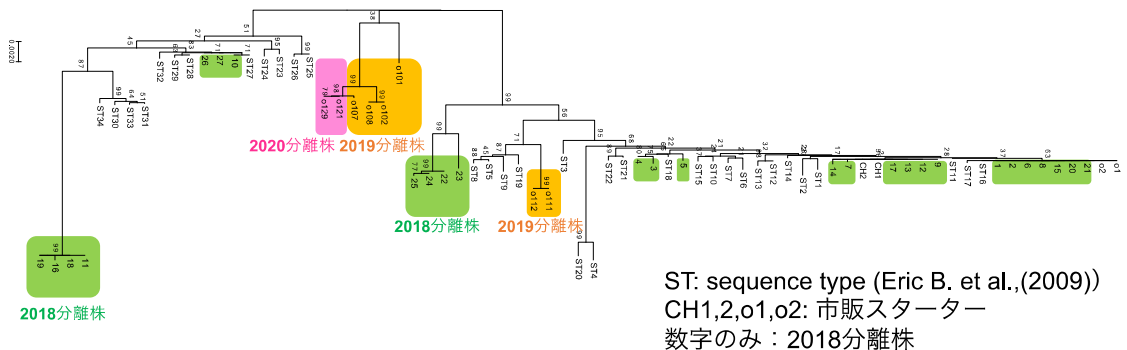


図2. *O. oeni* の MLST 解析による系統樹

まとめ

本研究では、北海道の材料からワイン等の醸造に用いる可能性をもつ酵母及びバクテリアの菌株を多数収集することが出来た。 *S. cerevisiae* に関しては、合計 200 を超える菌株を収集することが出来、その遺伝的特性も SSR 解析により多様なものであることがわかった。また、その中にはキラー活性をもち、共存する他の酵母より優先して生育出来る可能性があるものも多くあった。 *O. oeni* に関しては、MLST 解析により、これまでに他の地域から分離された菌株とは明らかに異なる遺伝的特性を持った菌株がある事が明らかになった。今後これらの菌株の醸造特性などを明らかにすることにより、北海道におけるワインやその他の酒類の醸造に「北海道独自菌株」として応用出来る可能性が高い。さらにその生理学的特性は新たな学術的知見をもたらす可能性もあり、今後も研究を続けていくことが非常に重要である。

謝辞

この度、2年間にわたり、菌株の分離という非常に基礎的な研究にご支援頂き、深く感謝申し上げます。今後これらの菌株の特性を明らかにし、北海道の産業、学術の発展に役立てていきたいと思っております。誠にありがとうございました。