

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏名 高橋 宗一郎

学位の種類 博士（食品栄養科学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 伝統容器クヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性と品質管理

審査委員	主査	教授	山口 昭弘	（食品微生物管理学）
	副査	教授	竹田 保之	（食品加工特性学）
	副査	教授	小野寺 秀一	（食品栄養機能化学）

## 学位論文要旨

### 【目的】

クヴェヴリは、ワイン文化発祥の地と言われているジョージアで使用される伝統発酵容器である。クヴェヴリは素焼きの甕(かめ)の内部を蜜ろうでコーティングしただけの簡素な容器で、多くの場合は地中に埋めた状態で使用される。近年、ステンレスタンクやオーク樽といった、従来主流であった発酵容器だけではなく、古典的なコンクリートタンクや、クヴェヴリのような土製の甕を使用するワイン生産者が、国内外問わず増えている。これには、複雑な味わいを付与し、ワイン造りの哲学を反映するといった目的があり、発酵容器がワインに影響を与えるということを、生産者は感覚的に認識している証である。しかしながら、容器の醸造学的影響は、未だ十分には明らかになっていない。なかでも、市販酵母を用いず、野生酵母によって自発的発酵を促す自然発酵ワインは、科学的知見も少なく、生産者は経験則で醸造管理を行っているのが現状である。

本研究では、クヴェヴリの醸造特性を明らかにすることを目的とし、北海道内でクヴェヴリを用いた自然発酵ワインを生産する2社のワイナリーと共同で試験醸造を行った。醸造中のワインを定期的にサンプリングし、発酵の経過に伴う微生物叢の変化をモニタリングするとともに、主要成分のグルコース、エタノール、グリセロールおよび有機酸、香気成分と金属元素への影響を評価した。

また、クヴェヴリのカビ汚染対策を目的とした衛生管理方法として、容器内部の拭き取りによる培養およびDNAベースの微生物解析を導入した。さらに、品質管理に貢献することを目的として、自然発酵ワインで高値を示すことが多く、一定濃度以上で不快臭を呈する揮発酸(酢酸)を、迅速かつ簡便に定量できる、酢酸エチル抽出を用いたGC法の開発を行った。

### 【方法】

KONDO ヴィンヤード(岩見沢市)産オーセロワ種のブドウを原料とし、ステンレスタンクおよびクヴェヴリを用い、異なる3条件で試験醸造を行った(Fig. 1)(Photo 1)。SCはステンレスタンクを用い、市販 *Saccharomyces cerevisiae* を添加し、SSはステンレスタンク、QSはクヴェヴリを用いてそれぞれブドウに着生する野生酵母による自然発酵を行った。発酵初期段階から瓶詰め後にかけて、定期的にサンプリングし、凍結保存したものを測定用試料とした。

微生物の分離培養には、ワイン試料のストマッキング処理液について、YPD、MRS および Tomato 寒天培地を用いた。分離した微生物の増菌培養は、それぞれの液体培地を用いて、微生物種の同定にはMALDI-TOF/MS および rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列解析を使用した。微生物叢および菌種の多型解析には、抽出DNAをPCR増幅し、自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) を実施した。

グルコース、エタノールおよびグリセロールは酵素比色法により測定した。有機酸の測定は、蒸留水と1%リン酸で2倍希釈した試料をHPLCで測定した。香気成分はエーテル:ヘキサンによる溶媒抽出の後、GC/MSで測定した。金属元素は、ワイン試料を硝酸、過酸化水素によるマイクロウェーブ分解の後、希釈しICP/MSで測定した。

### 【結果】

ステンレスタンク-市販酵母(SC)、ステンレスタンク-自然発酵(SS)、クヴェヴリ-自然発酵(QS)いずれの条件においても、発酵、熟成は健全な状態で進み、各条件において明らかに異なる微生物叢

が見られた (Fig. 2). 発酵 0 日において, SC にのみ, 添加した市販酵母固有のダブルピーク (821.3, 824.2bp) が見られた. 発酵 7 日において, QS では分離培養後 MALDI-TOF/MS により同定された *S. cerevisiae* 野生株 A のピークが見られ, 代表的な野生酵母 *Kloeckera apiculata* のピークが自然発酵ワイン双方で現れ始めた. 発酵 30 日では, すべての条件で非常に類似したピークパターンを示し, *K. apiculata* および *S. cerevisiae* 野生株 A のピークがともに確認された. SC において, 添加した市販酵母のピークは, 30 日以降見られなくなった. *K. apiculata* はその後, ボトリング後の 261 日まで, すべての条件で一定のピークが存在した. ARISA による微生物叢解析と MALDI-TOF/MS による菌種同定の結果, *S. cerevisiae* の野生株が少なくとも 3 種類ワイン中に存在していることが分かった. 発酵 130 日以降から, マロラクティック発酵を行う *Oenococcus oeni* のピークが現れており, もっとも早くピークが見られたのは SC であった.

YPD および MRS 培地への塗抹培養によって得られたシングルコロニーを増菌培養した 20 試料について, MALDI-TOF/MS による測定を行った結果, すべてにおいてスコア値が 2.0 を超え, 3 コロニーが *K. apiculata*, 17 コロニーが *S. cerevisiae* であると同定された. Tomato 培地による分離培養によって得られたシングルコロニーを増菌培養した 11 試料について, シーケンス解析を実施し, BLAST による相同性検索を行った結果, すべて *O. oeni* であると同定された (一致率 100%) (Fig. 3).

グルコースおよびエタノールは共通して, 発酵初期において顕著に減少もしくは増加し, その後一定となる傾向にあった (Fig. 4). グルコースは, 0 日において  $9.1 \sim 9.7\%$  であったが, 7 日には SC および QS でそれぞれ 1.2, 1.6% へと減少し, SS では 4.6% と, 他 2 条件と比べてやや高値であった. 発酵 15 日にはすべての条件で  $0.2 \sim 0.3\%$  となり, その後一定であった. エタノールは 0 日において SC, SS, QS でそれぞれ 1.5, 0.9, 0.6% であり, 7 日において SC は 11.2% まで上昇し, SS および QS ではそれぞれ 3.3, 5.1% と, QS がやや高値となったが, いずれも 15 日で著増した. グリセロールは発酵条件で違いはあるものの, おおよそエタノールと同様の増加を示し, 一定値となる傾向にあった.

香気成分は, 発酵 0 日では全ての条件において, 香りに関わる化合物はほとんど見られなかったが, 7 日には, SC でイソアミルアルコールおよびフェネチルアルコールが著増し, SS では緩やかに, QS は SS に比べやや大きく増加した (Fig. 5).

金属元素は, ボトリング後 2 週間にあたる発酵 261 日において, 0 日と比較して全ての条件において Mg が増加, Sn は減少, Cu は著減しており, 0 日には検出されなかった Sb が見られた (Fig. 6). 各条件を比較すると, Mg, Ca, Mn, Fe, Sr は QS において特徴的に上昇していた.

クヴェヴリ内壁を拭き取った試料の培養および微生物叢解析の結果は, おおよそ一致しており, 複数の真菌が認められたが, バーナーによる焼き付けと硫黄燻蒸を行ったクヴェヴリからは, 微生物は確認されなかった. 酢酸エチル抽出による GC 法は, 良好な再現性と回収率を示し, HPLC および水蒸気蒸留滴定法との有意な相関を認めた.

以上, クヴェヴリの醸造学的特性の一部を初めて明らかにし, カビ汚染対策として有効な衛生管理法を提案するとともに, 品質管理の指標となる酢酸を定量する新たな GC 法を開発した.

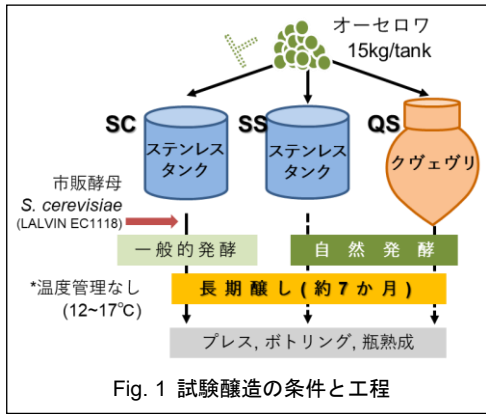


Photo. 1 栗沢ワインズにおける試験醸造条件と工程  
 (左) 醸造に用いた白ブドウ品種オーセロワ,  
 発酵0日のクヴェヴリ(中央)およびステンレスタンク(右)

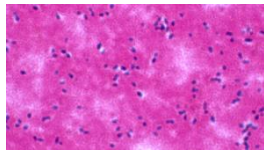


Fig. 3 試験醸造ワインより分離された乳酸菌 *Oenococcus oeni* のグラム染色像

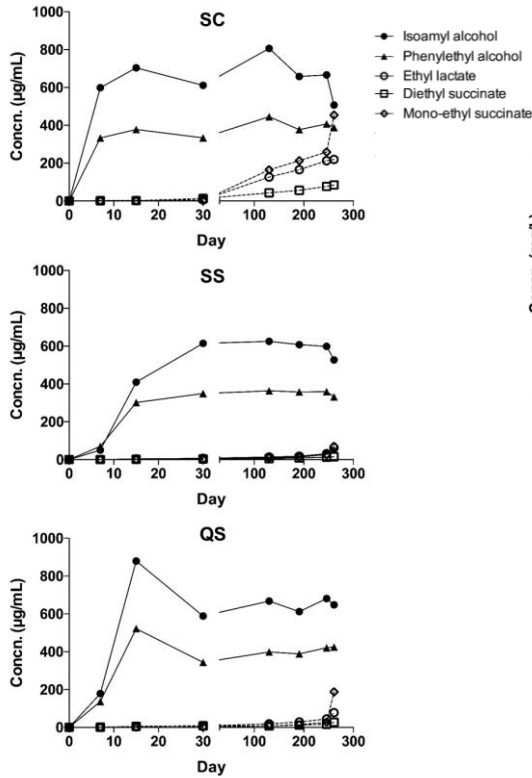


Fig. 5 発酵および熟成に伴う香気成分の変化 (GC/MS)

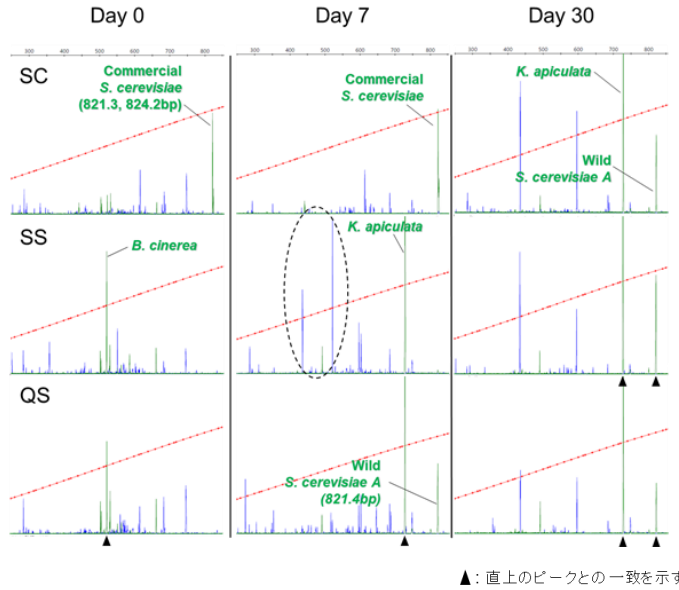


Fig. 2 各条件における発酵初期段階の菌叢パターン (ARISA)

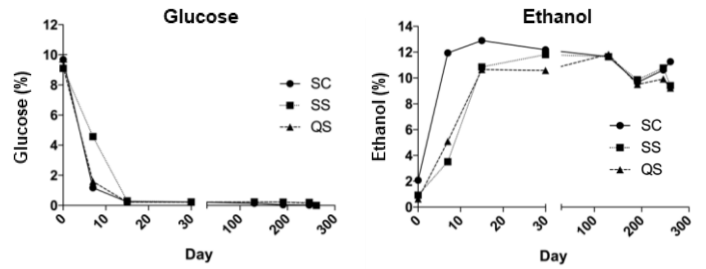


Fig. 4 発酵および熟成による主要成分の変化 (HPLC)

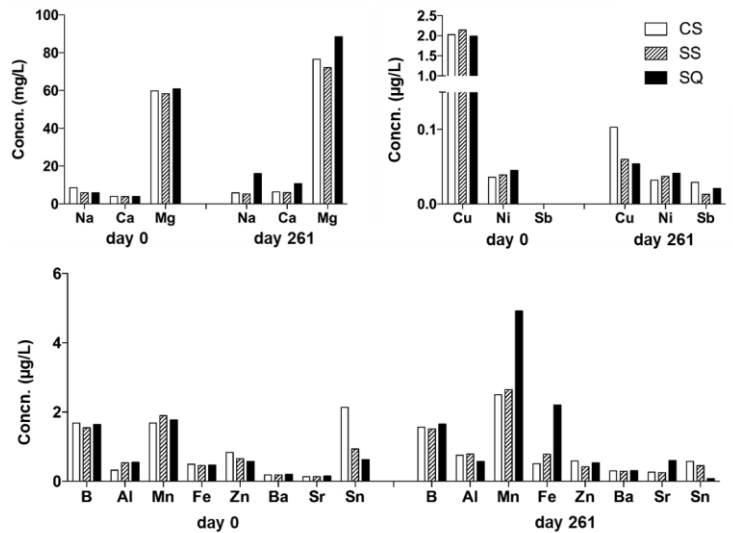


Fig. 6 発酵0日および261日におけるワイン中金属元素の変化 (ICP/MS)

SC: Stainless steel tank-Commercial yeast  
 SS: Stainless steel tank-Spontaneous fermentation  
 QS: Qvevri-Spontaneous fermentation

## 論文審査の要旨および結果

### 1. 論文評価点数

評価項目	主査（山口教授）	副査（竹田教授）	副査（小野寺教授）
テーマのたて方	5	5	5
研究の背景	5	5	5
研究の方法	5	5	5
研究の結果	3	5	5
考察と結論	3	3	3
参考論文	5	5	5
合計	26	28	28

- ・各評価項目を5点、3点、1点で評価
- ・全ての審査委員が20点以上（30点満点）をつけたことをもって、本審査終了

### 2. 論文審査の要旨および結果

#### 学位論文の背景

近年、北海道におけるワイン用ブドウ栽培が世界的にも注目される中、2018年にはワインとしては山梨に次いで全国2番目となる「GI(地理的表示)北海道制度」の指定を受け、ワイン品質の向上について関係者の精力的な取り組みがなされている。

また、岩見沢をはじめとする空知地域には、スターター酵母を用いずブドウ果実に着生する野生酵母を活かした自然発酵ワインの醸造を手掛けるワイナリーが集約している。この自然発酵ワインのルーツとされるのが8千年の歴史を誇る東欧ジョージアのクヴェヴリワインである。クヴェヴリは底部が円錐形に尖った独特の形状をした土製のカメであり、ブドウ果実のみを原料として着生する野生酵母による発酵を利用した伝統的なクヴェヴリワインの醸造に用いられてきた。国内で先駆的にこのクヴェヴリを輸入し北海道の気候に合ったクヴェヴリワインの醸造を試みる、KONDO ヴィンヤードとの共同研究として、2019年度の予備試験を経て、2020年度の本試験を実施した。

本論文は、クヴェヴリ、ステンレスタンクおよび市販スターター酵母有無の条件で比較醸造を行いクヴェヴリワインの醸造特性を明らかにする(第I章)とともに、クヴェヴリ容器の殺菌方法(第II章)とワイン品質に影響を及ぼす酢酸の新たなGC定量法の開発(第III章)についての研究成果をまとめたものである。

#### 発表会報告内容

タイトル「伝統容器クヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性と品質管理」

- I. クヴェヴリの醸造学的特性として、クヴェヴリ容器の形状が発酵を促進するとともに、容器材質由来の金属元素がタンニンの熟成を促しバランスの良いまろやかな風味を醸成することを明

らかとした。

- II. クヴェヴリのカビ汚染対策に有効な衛生管理法として、亜硫酸水の浸漬ではクヴェヴリ容器のカビ発生を防ぐことはできず、バーナーによる加熱および硫黄燻蒸による殺菌が必要であることを示し、ワイナリーに提案した。
- III. GCによる新たな酢酸の定量方法を開発し、「GI 北海道制度」におけるワイン品質の認証試験としての運用を可能とした。

### 発表会質疑応答

Q1. 自然酵母，クヴェヴリ容器など，各設定条件の再現性についてはどう考えるか？

→ ジョージアから取り寄せたクヴェヴリ容器 1 個についての実験データであり限定的なものではあるが傾向を確認することはできたと考えている。

Q2. 酢酸の GC 測定について，プロピオン酸等，他の揮発酸を測定することはできないのか？

→ 酢酸にターゲットを絞っていたが，ピークを拾えている可能性もあり確認したい。

Q3. 各容器の殺菌方法は同じか？

→ クヴェヴリは亜硫酸水，ステンレスタンクは洗剤洗浄のみでありスタート時の微生物叢は影響を受けた可能性はあるが，アルコール発酵が進む過程で淘汰されたと考えられる。

Q4. 香気成分の測定結果では各条件間に大差はないようだが官能評価で差が出ているのは何か？

→ ワインの風味は単一の成分によるものではなく複数の成分が相まってもたらさせるものであり，より高感度の香気成分分析により測定対象を拡大すれば差が出る可能性はある。

Q5. クヴェヴリでは Mn が高値とのことであるが何故なのか？

→ 文献的にも粘土成分由来と考えられるが実際に測定して確認してはいない。

Q6. クヴェヴリ底部の形状が酵母の発酵を促進したと推測しているが，サンプリング等により実証できないのか？

→ ブドウ果実が表面にフタをした状態となっており，現実には底部の試料採取は困難であるが，上部と下部での発酵状況は異なる可能性は否定できない。

Q7. 発酵の進行が早い遅いは何を持って判断しているのか？

→ 酵母がグルコースを資化しエタノールと炭酸ガスを産生するので，表面の泡の発生状況で判断している。

Q8. ワイン熟成の過程で *S. cerevisiae* の菌株交代が起こっているとのことだが，それがワイン品質のどのように影響するのか？

→ 菌株交代が現象として確認できたものの，何故起こるのか？どのような役割があるのか？今後の重要な課題と考える。

上記の発表に関して，膨大なデータを組み合わせ多角的かつ解りやすく自分の言葉でまとめあげており，質疑に対して，いずれも誠実かつ的確に応答できていたことから，博士の学位を授与するに十分であると判断した。

### 3. 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果, 合格と認める.

2021年 2 月 9 日

審査員

主査 教授 山口 昭弘

副査 教授 竹田 保之

副査 教授 小野寺 秀一