

2020 年度  
修士論文

学内野生酵母の分離と赤ビートワイン醸造への応用

Isolation of Wild Yeasts from the University Campus and  
Their Application to Red Beet Wine Brewing

21834003 南 典子  
Minami Noriko

指導教員 食品微生物管理学 教授 山口 昭弘

酪農学園大学大学院酪農学研究科

## 目次

緒論	1
第 I 章 野生酵母の分離同定	3
緒言 (I)	
材料と方法 (I)	
1. 野生酵母の分離培養	4
(1) 分離源試料	
(2) 分離培養	
1) 培地調製	
2) 集積培養	
3) 選択培養	
4) 増菌培養	
2. MALDI-TOF/MS による酵母種の同定	7
(1) 試薬	
(2) タンパク質抽出	
(3) MALDI-TOF/MS による酵母種同定	
3. 同定酵母の増菌培養および保存	9
結果 (I)	
1. 野生酵母の分離同定結果	10
考察 (I)	11
第 II 章 赤ビートワインの醸造	12
緒言 (II)	
材料と方法 (II)	
1. 試料	13
(1) 赤ビート根茎	
(2) 赤ビートジュース	

2. 発酵試験	13
(1) 市販酵母予備発酵試験	
(2) 野生酵母発酵試験	
1) 野生酵母	
2) 赤ビートワインの試験醸造	
(3) 発酵特性の評価	
1) EtOH 濃度	
2) pH・Brix 糖度	
3) 吸収スペクトル	
4) 官能試験	
5) 香気成分 GC/MS 分析 (SPME 法)	
6) ゲオスミン測定	
3. 赤ビートワイン製造	17
(1) 赤ビート搾汁液	
(2) 野生酵母	
(3) グルコース	
(4) 混醸用赤ワイン	
(5) 赤ビートワイン醸造	
結果 (II)	
1. 市販酵母予備発酵試験結果	19
2. 野生酵母発酵試験結果	19
(1) EtOH 濃度・Brix 糖度	
(2) 吸収スペクトル・色調	
(3) 官能評価	
3. 赤ビートジュースとブドウ果汁の混合発酵試験結果	22
(1) EtOH 濃度・Brix 糖度	
(2) pH 変化	
(3) 香気成分分析	
(4) 成分比率	

4. 製品化赤ビートワインのゲオスミン測定結果	27
考察 (II)	28
要約	31
Summary	32
謝辞	33
引用文献	34

## 略号一覧

ADH ; アルコール脱水素酵素、 Brix 糖度 ; 糖度、 DP ; 酸化還元酵素ジアホラーゼ、  
EtOH ; エタノール、 GCMS ; ガスクロマトグラフ-質量分析計、 MALDI-TOF/MS ; マ  
トリックス支援レーザー  
脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (Matrix- Assisted Laser Desorption-Ionization  
Time-of-Flight Mass Spectrometry) 、 NTB ; ニトロブルーテトラゾニウム、 RE8.0 培  
地 ; *S. cerevisiae* 選択培地、 SPME ; 固相マイクロ抽出、 YPD 培地 ; 酵母汎用集積培地

## 学内野生酵母の分離と赤ビートワイン醸造への応用

### 緒論

ワインの特徴は味と香りによって表され、特に香りはワインの価値を大きく左右する。このワインの香りはアロマと呼ばれ、第1アロマ、第2アロマおよび第3アロマに区別される。第1アロマは原料由来の香り、第2アロマは発酵過程で作り出される香り、第3アロマは発酵後工程の熟成中に生成する香りである。これらの中でもワインの総合的かつ複雑な香りは発酵過程の酵母に拠るところが大きいと考えられている<sup>1-6)</sup>。

野生酵母は、土壌、空気や水中など自然界に幅広く分布し、樹木、葉、枝、樹液、花、蜜腺や果実などの植物体表面に普遍的に存在する<sup>1,4)</sup>。酵母は、人類史上古くから利用されてきた微生物であり、日本の伝統食品である清酒をはじめ、ビール、ワイン、味噌、醤油やパンなど多くの発酵食品に利用されている。それぞれの生息環境に順応して、醸造用酵母とは異なる芳香性や資化性などをもつ地域に特徴的な野生酵母の存在が注目されている<sup>2,6)</sup>。一般的なワイン醸造では、スターター酵母として糖資化能力およびエタノール産生能に優れた *Saccharomyces cerevisiae* が主に用いられる一方で、様々な野生酵母種を利用することで、より多様な風味を醸成できるとする数多くの研究がある<sup>5-8)</sup>。

赤ビートはテーブルビートとも言われ、鮮やかな赤紫色のベタシアニンと橙黄色のベタキサンチンからなるベタレイン色素、および独特の土壌臭を与えるゲオスミンを含むことが特徴である。その根茎はヨーロッパを中心に古くから食されてきたが、近年、国内においても新たな機能性野菜として注目が高まってきている<sup>9-11)</sup>。

本研究では、これまで例のない赤ビートを原料としたワイン醸造を目的に、市販のワイン用酵母 *S. cerevisiae* と道産小果実から分離した様々な野生酵母を用いて、その発酵能と色素および風味への影響を評価した。本研究の第I章においては、北海道内および学内で採取された小果実から様々な野生酵母を分離培養し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF/MS) により酵母種を同定した<sup>12,13)</sup>。また第II章においては、

第Ⅰ章で分離同定した酵母を使用して，赤ビート搾汁液を原料としたワイン醸造を目的に，発酵基礎条件を検討するとともに、製品化を視野にブドウ果汁を添加した際の発酵能と色素および風味への影響を評価した。

## 第 I 章 野生酵母の分離同定

### 緒言(I)

パン、清酒やワインなど発酵食品に利用されるスターター酵母は、その多くが *S. cerevisiae* であり、長年馴養されてきた純粋培養酵母である。しかし、自然界には *S. cerevisiae* の他にも多くの *Saccharomyces* 属の酵母や *Hanseniaspora* 属、*Candida* 属など多種多様な野生酵母が生息し、*S. cerevisiae* とは異なる発酵特性を持つことが知られている<sup>14)</sup>。

これら自然環境に生息している様々な有用野生酵母を分離培養するため、本研究では、原生林に隣接する本学キャンパスおよびむかわ町のシーベリーや洞爺湖町のブルーベリーなどの小果実を分離源として、MALDI-TOF/MSを用いて酵母種を同定した。MALDI-TOF/MSは、現在、使用されている質量分析法のなかでは、最も高質量領域まで測定可能であり、分子量分布の測定と構造解析が同時かつ短時間に行えることなどから、タンパク質やペプチドなどの生体高分子や合成高分子の研究分野で急速に普及するようになってきた<sup>12)</sup>、その特徴を活かして、最近では、細菌、酵母から糸状菌を含めた微生物の同定手法としても注目されている<sup>12,13)</sup>。



## 材料と方法 (I)

### 1. 野生酵母の分離培養

#### (1) 分離源試料

分離源試料として学内で採取したシーベリー果実，むかわ町(フォレストベリー農園)で栽培されているシーベリー果実4種(ロシア種赤，ロシア種黄，フィンランド種，中国種)，余市町産アロニア，長沼町(栄坂農園)産ブラックベリー，洞爺湖町産のブルーベリーの道産小果実8種を用いた (Table 1, Fig. 1)。

Table 1. 北海道の小果実から分離された酵母の同定結果

分離源	同定酵母種
シーベリー (学内)	<i>Hanseniaspora vineae</i> <i>Candida krusei</i>
シーベリー (むかわ) ロシア種黄	—
ロシア種赤	<i>Kloeckera apiculata</i>
フィンランド種	<i>Kloeckera apiculata</i>
中国種	—
ブルーベリー (洞爺湖)	<i>Candida valida</i>
ブラックラズベリー (長沼)	—
アロニア (余市)	<i>Geotrichum candidum</i>



Fig. 1. 酵母分離源試料

## (2) 分離培養

### 1) 培地調製

酵母の汎用培地であるYPD培地および*S. cerevisiae* 選択培地であるRE8.0 (1 % Raffinose, 8 % EtOH)培地を用いた (Table 2)。*S. cerevisiae* 選択培地は、高濃度のEtOHを含み、さらに糖資化性を利用した選抜を行うため、グルコースの代わりにオリゴ糖であるラフィノースが添加されている。蒸留水と各試薬を混合し、オートクレーブ (LBS-325, Tomy) を用いて 121 °C、20分間滅菌した。冷却後、RE8.0培地には99.5 % EtOHを添加した。分離培養用には、これらの組成に2 % のアガロースを加えて調製した各寒天培地を用いた (Table 2)。

Table 2. 野生酵母分離培地

酵母汎用集積培地: YPD20培地		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 選択培地: RE8.0培地	
酵母エキス (212750, BD)	2.0 g	イースト ニトロゲン ベース (239210, BD)	1.34 g
ポリペプトン (394-00115, 日本製薬)	4.0 g	ラフィノース (36000-30, 関東化学)	2.0 g
グルコース (特級, Wako)	4.0 g *	クロラムフェニコール (08027-14, ナカライテスク)	0.1 g
クロラムフェニコール (08027-14, ナカライテスク)	0.02 g	プロピオン酸ナトリウム (198-03015, Wako)	0.4 g
プロピオン酸ナトリウム (198-03015, Wako)	0.4 g	[寒天培地調製時 アガロース (BA-10, 伊那食品)]	4 g]
[寒天培地調製時 アガロース (BA-10, 伊那食品)]	4 g]	蒸留水	184.0 mL
蒸留水	200 mL	99.5% エタノール (特級, Wako)	16.0 <sup>mL</sup> *
オートクレーブ121 °C・20 min滅菌処理		* オートクレーブ滅菌後、55°C以下に冷却し加えた	
* 10% Glucose YPD培地調製時 20.0g			

### 2) 集積培養

YPD培地 25 mLを50 mL遠心チューブに採り、分離源試料を浸漬し、フタを緩めた状態で、25 °Cで3～14日間集積培養を行った。同様にRE8.0液体培地 25 mLを50 mL各遠心チューブに採り、分離源試料を浸漬しフタを緩めた状態で、25 °Cで7日間集積培養を行った (Fig. 2)。

### 3) 選択培養

YPD液体培地およびRE8.0液体培地による集積培養後の白色沈さ(菌体)を白金耳でYPD寒天培地およびRE8.0寒天培地に画線し、25 °Cで3～7日間培養した(Fig. 3)。

#### 4) 増菌培養

寒天培地上のシングルコロニーをYPD2液体培地 3 mLに釣菌し、25 °Cで3～7日間培養した。

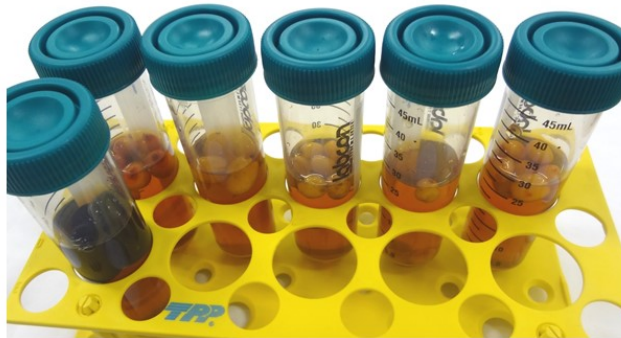


Fig. 2. YPD液体培地による酵母集積培養



Fig. 3. RE8.0(左)およびYPD10.0(右)寒天培地上の酵母コロニー

## 2. MALDI-TOF/MSによる酵母種の同定

### (1) 試薬

マトリックス (HCCA:  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮) (8255344, Bruker) およびキャリブレーションスタンダード(BTS: Bacterial Test Standard) (8255343, Bruker) は、添付書の指示にしたがい調製した。タンパク質抽出溶媒は、ギ酸 (LC/MS用, Wako) 50 mLに蒸留水21.4 mLを加えて調製した70 % ギ酸溶液およびアセトニトリル (HPLC用, Wako) を用いた。

### (2) タンパク質抽出

酵母菌体の増殖が確認されたYPD2液体培地培養液を用いた。酵母菌体 (白色沈さ) をスポイトで懸濁させた培養液1 mLを1.5 mLチューブに分取し、遠心分離した(10000 r/min, 5min, 25 °C) (3700, Kubota)。上清をデカンテーションにより除去し、注射水 (日本薬局方, 大塚製薬) 300  $\mu$ Lを加え、沈さをボルテックスにより良くかくはんした後、99.5 % EtOH (特級, Wako) 900  $\mu$ Lを加え、再度良くかくはんした。遠心分離(13000 r/min, 2 min, 25 °C) 後、上清を除去し、再度チューブをスピンドウンにより残液を完全に除去した後、70 % ギ酸溶液 20  $\mu$ Lを加えかくはんし、アセトニトリル 20  $\mu$ Lを添加した。再度かくはん後、遠心 (13000 r/min, 2 min, 25 °C) 上清10  $\mu$ Lを0.6 mLチューブに分取しタンパク質抽出液とした。本抽出液は用時調製とした。

### (3) MALDI-TOF/MSによる酵母種同定

タンパク質抽出液 1  $\mu$ LをTarget Plate (MTP384 target plate polished steel BC, Bruker) のスポット位置に滴下し、安全キャビネット (SCV-EC II B, Hitachi) 内で送風乾燥させた。同じスポット上にマトリックス1  $\mu$ Lを重ねて滴下し、再度乾燥させた後、MALDI-TOF/MS測定を行った。測定は1試料につき2スポットを調製し、各スポット1回ずつ測定した。測定機器はAutoflex、測定用ソフトウェアはFlex ControlおよびMALDI Biotyper Real Time Classification (RTC)、(以上Bruker) を使用した。約2,000 ~ 20,000ダルトン (Da) の分子量 (横軸) 範囲を解析に用い、菌種に固有のタンパク質マスペクトルパターンから菌種

を同定した (Fig. 1)。各タンパク質フラグメント量に比例するピークのシグナル強度 (縦軸) を加味した上で特定菌種のパターンと一致した場合、その菌種として同定される。その一致率は、スコア値 (Score Value) で示され、スコア値が2.0以上あれば、菌種レベルの同定として信頼性が高く、1.7~2.0未満では属レベルでの一致と判断される<sup>12,13)</sup>。

ここで用いたMALDI-TOF/MSのデータベースは臨床材料から分離される細菌を中心に構成されており、酵母やカビなどの真菌に関しては典型的な一部の菌種が含まれるのみであるが、当研究室において構築した野生酵母5種17株を追加したインハウスデータベースを併用した (Fig.4, 5)<sup>15)</sup>。

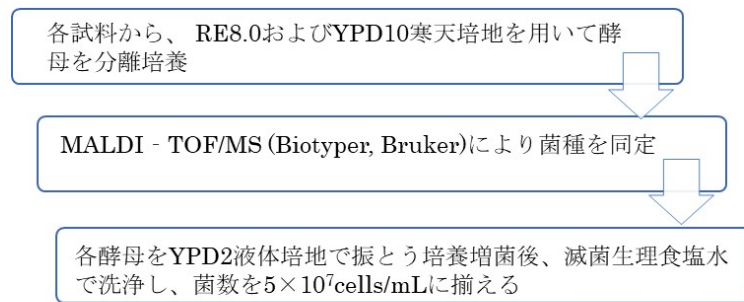


Fig. 4. YPD10およびRE8.0培地を用いた酵母の分離培養同定フロー

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value
1 (+++)	Hanseniaspora vineae170523	2.381
2 (+++)	Hanseniaspora osmophila170523	2.374
3 (+++)	Hanseniaspora vineae170523-2	2.371
4 (+++)	Hanseniaspora vineae170523-1	2.362
5 (-)	Candida_lambica[ana] (Pichia_fermentans[teleo]#) DSM 70095 DSM	1.405
6 (-)	Rhodotorula bogoriensis DSM 70872T DSM	1.403
7	180424Klebsiella pneumoniae16121600	1.348

Fig. 5. MALDI-TOF/MSによる菌種同定と精度

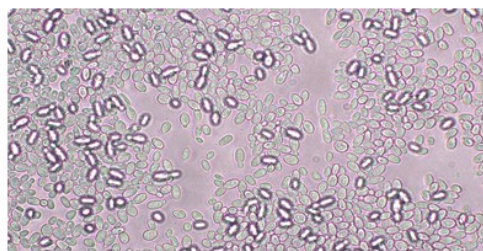
### 3. 同定酵母の増菌培養および保存

各酵母懸濁液 1mLを滅菌スポイトでYPD液体培地250mLが入った振とうフラスコ内に加え、25 °Cで3日間振とう培養した。各酵母菌体は培養後、滅菌生理食塩水で洗浄し、菌数をセルカウンターで計測した。遠心分離(10.000r/min, 10min, 25 °C)による集菌後、上清を捨てYPD2液体培地と30%グリセロールの等量混合液約 2 mLを添加し菌体を分散させた。菌体懸濁液約0.2 mLずつを1.5 mL滅菌チューブに分注し-80 °Cで凍結保存した。

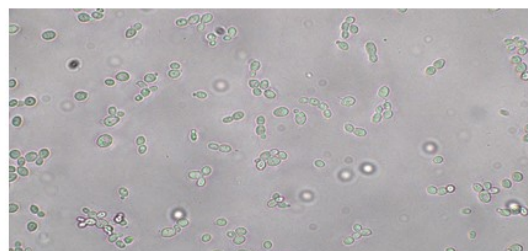
## 結果 (I)

### 1. 野生酵母の分離同定結果

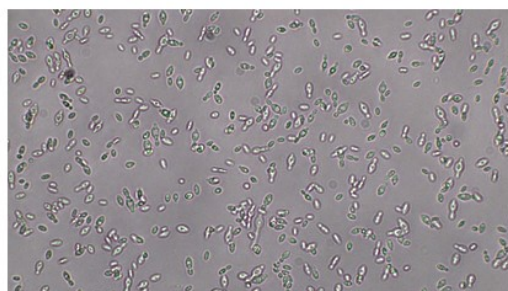
学内で採取したシーベリーからは*Candida krusei*、*Hanseniaspora vineae* の2種、むかわ町産シーベリーからは*Kloeckera apiculata*、洞爺湖町産ブルーベリーからは*Candida valida*、余市町産のアロニアからは*Geotrichum dandidum*等の酵母が同定された (Table 1、Fig. 6)。



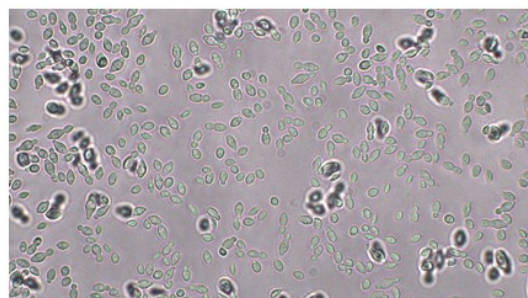
1. *Candida krusei*  
(学内産シーベリー)



2. *Candida valida*  
(洞爺湖町産ブルーベリー)



3 *Kloeckera apiculata*  
(むかわ産シーベリー)



4 *Hanseniaspora vineae*  
(学内産シーベリー)

Fig. 6. 野生酵母の顕微鏡写真

## 考察 (I)

地域を代表する野生酵母を分離するため、本学キャンパスをはじめ道内のむかわ町、洞爺湖町、余市町などで採取された小果実を分離源として用いた (Table 1)。YPD培地およびRE培地による分離培養後、MALDI-TOF/MSを用いて野生酵母種を同定し、ワイン発酵に適した野生酵母を選抜した。シーベリーは、果実収穫後、プラスチック袋に密封すると発生したガスで膨張することが知られており、果皮表面に粘着性があり、野生酵母が高密度に着生しているためと考えられる (Fig. 1)。実際、シーベリーからは多種多様な酵母が分離同定されており、このうち、*H. vineae*はアロマティックでフルーティーな香気成分の生成能<sup>16)</sup>、*Kloeckera apiculata*は酢酸エチルの生成能が高い酵母である<sup>17)</sup>。また、*Candida krusei*やブルーベリーから同定された *Candida valida*を含め、いずれもワイン醸造に深く関係する酵母である<sup>18)</sup> (Table 1, Fig. 6)。

第II章では、ワイン醸造との関連性が明らかな、これら4種の野生酵母を用いて赤ビートワイン醸造における有用性について検討した。



## 第Ⅱ章 赤ビートワインの醸造

### 緒言(Ⅱ)

赤ビートはハウレンソウと同じアカザ科の植物で、ほのかな甘みと濃い赤色を特徴とする根菜である。ロシア料理の「ボルシチ」などに良く使われており、鉄分をはじめとするミネラル、ビタミン、食物繊維などが多く含まれることから、“奇跡の野菜”、“食べる輸血”とも言われる。国内でも、抗酸化作用、高血圧や動脈硬化の予防<sup>10,11,19,20)</sup>など機能性の高いスーパーフードとして、最近人気が高まってきている。その特徴は、鮮やかな赤紫色のベタシアニンと橙黄色ベタキサンチンからなるベタレイン色素とゲオスミンによる独特の土壌臭にある<sup>9,11)</sup>。赤ビートを使用した蒸留酒<sup>21)</sup>や乳酸菌飲料<sup>22)</sup>は海外では存在するが、醸造酒である赤ビートワインは知られていないため、本研究では、赤ビートワインの開発を目的に酵母による発酵基礎条件について検討することとした。

一般的なワイン醸造では、スターター酵母として糖資化能力およびエタノール産生能に優れた *S. cerevisiae* を代表とする *Saccharomyces* 属酵母が主に用いられているが、発酵初期においては非 *Saccharomyces* 属酵母がワイン風味の形成に大きく関与しているとされ、その多様性に注目した数多くの研究が行われている<sup>7,8,14)</sup>。本研究の第Ⅱ章では、第Ⅰ章において同定された野生酵母4種 (*Candida krusei*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata* および *Hanseniaspora vineae*) と市販スターター酵母である *S. cerevisiae* を用い、糖原としてグルコースまたはブドウ果汁を添加した赤ビート搾汁液を発酵させ、経日的にエタノール(EtOH)濃度および Brix 糖度を測定するとともに吸収スペクトルから色素の変化を調べた。さらに、ワインを特徴づける香気成分と赤ビートの土壌臭の原因であるゲオスミンをガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS)を用いて測定<sup>23)</sup>するとともに、官能評価<sup>24)</sup>を行った。

## 材料と方法 (II)

### 1. 試料

#### (1) 赤ビート根茎

生の赤ビート根茎 (2019 年 10 月南幌または十勝産、(同)アグマリンプロテック提供)を水洗後、オートクレーブを用いて加熱 (105 °C, 30min) し、剥皮、細断した。しばりーな(一興)または大型圧搾機(新駒形機械)を用いて搾汁液を得た。なお、一部は加熱なし、剥皮なしの条件とした。

#### (2) 赤ビートジュース

赤ビート根茎をスチームオーブンで加熱(200 °C, 30min)し、剥皮、細断、摩砕、圧搾により得られた赤ビートジュース((株)札幌アンジェイソングラボラトリー提供)を用いた。

### 2. 発酵試験

#### (1) 市販酵母予備発酵試験

赤ビート搾汁液 100 mL に同量の 30%グルコース液と市販の赤ワイン用乾燥酵母 Red Star Pasteur (*S. cerevisiae*) 0.05g を添加し、25°Cで 1 日間発酵させ、赤ビート搾汁液の発酵適性を確認した。

#### (2) 野生酵母発酵試験

##### 1) 野生酵母

第 I 章において同定した学内産シーベリー、むかわ町産シーベリーロシア種赤、洞爺湖町産ブルーベリーから分離した野生酵母 4 種(*C. krusei*, *C. valida*, *K. apiculate* および *H. vineae*) を YPD 培地 200 mL に植菌し、5 日間振とう培養した。その後、冷蔵(4 °C)に移し翌日まで静置後、上澄み液を捨て滅菌生理食塩水を加え、遠心により集菌・洗浄した (Fig. 7)。

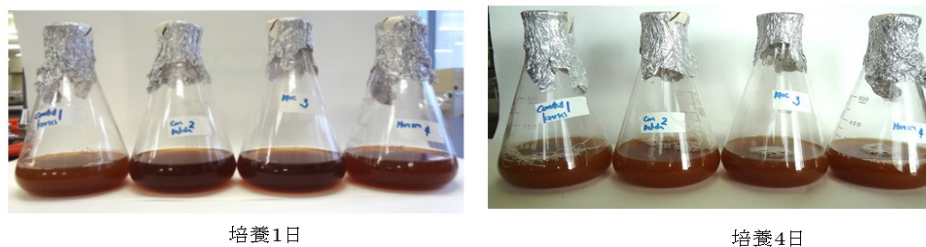


Fig. 7. 野性酵母の増菌培養

## 2) 赤ビートワインの試験醸造

赤ビートジュース(−30 °C冷凍保存)を前日に冷蔵に移し解凍後、同量の滅菌 30%グルコース液または学内で採れたワイン用赤ブドウのピノノワール果汁液との混合液 100~180 mL に、野性酵母懸濁液は  $5 \times 10^7$  cells/mL、市販酵母は  $1 \times 10^8$  cells/mL となるように添加し、25°Cで発酵させた。

## (3) 発酵特性の評価

### 1) EtOH 濃度

アルコール脱水素酵素(ADH)により、EtOH がアセトアルデヒドに酸化される際、 $\beta$ -NAD と酸化還元酵素ジアホラーゼ(DP)の共存下、ニトロブルーテトラゾニウム(NTB)から青紫色のホルマジンが生成することを利用した酵素法を用いた。

・標準液希釈系列: EtOH 標準溶液(0.8%)を 96 ウェル平底マイクロプレート(655101, Greiner)の所定のウェルへ分注後、蒸留水を用いて 2 倍希釈を繰り返し、0.05%までの濃度希釈系列を作成した。

・試料液希釈系列: 発酵中の液体試料を遠心分離し、上清を蒸留水で 10 倍希釈した試料液を用意した。これを各ウェルへ 50  $\mu$ L 分注した後、蒸留水で 2 倍希釈を繰り返し、希釈系列を作成した。

・発色反応：標準および試料希釈溶液をブランクの蒸留水とともに、所定のウェルへ 50  $\mu$ L 分注し希釈後、酵素反応試液および Blank 試液 50  $\mu$ L を各ウェルに分注した。プレートを遮光し、室温で 10 分静置後、マイクロプレートリーダー(Emax, Molecular Devices)を用いて 550 nm における吸光度を測定した。このとき試料液の着色あるいは非特異反応を補正するため、酵素反応試液の調製時に、ADH を蒸留水で置き換えたブランク試液を分注したウェルの吸光度を、対応するウェルの吸光度から差し引いた。検量線から求めた希釈後の EtOH 濃度に希釈倍率を乗じ、試料中の EtOH 濃度を算出した。

## 2) pH・Brix 糖度

凍結保存した発酵試料を融解後、ボルテックス混合により均一とし、pH (F - 54S, Horiba) および Brix 糖度 (POCKET PAL-1, Atago) を測定した。

## 3) 吸収スペクトル

発酵液 1 mL を 1.5 mL チューブに採り、遠心分離(15000r/min, 10min, 25°C)して得られた上清を分取した。上清 0.5 mL を石英セルに分取し、マッキルベイン緩衝液<sup>25)</sup> 2 mL を加え希釈混合した。石英セルをダブルビーム分光光度計(U-2900, Hitachi) にセットし、400 ~700 nm の吸収スペクトルを測定した。赤紫色のベタシアニン<sup>10)</sup>は吸収極大 538 nm、橙黄色のベタキサンチン<sup>25)</sup>は 480 nm の吸光度を測定し、それぞれの含有量を推測した<sup>10,25)</sup>。

## 4) 官能試験

ワイン官能試験法<sup>24)</sup>に基づいて、味わい、香りについて、テイスティングを行った。味わいはワインを口に含み、甘味、酸味、苦み、フレーバーを確かめ、香りは、ワインを分注した試験管を軽く回し、原料由来の第 1 アロマ、発酵過程で生まれる第 2 アロマを確認した。

## 5) 香気成分 GC/MS 分析 (SPME 法)

赤ビートワイン 520  $\mu$ L、水 9.88 mL、内標準物質 3-オクタノール/エタノール溶液 26  $\mu$ L を混合し、0.8 g の塩化ナトリウムを入れた 20 mL バイアルに 2 mL ずつ分注後、加熱 (40 , 30min)し、ヘッドスペース GC/MS により 5 重測定を行った(Table 3)。試料バイアルは測定までの間、酵母の働きを抑えるため冷却した。

Table 3. 香気成分のGC/MS測定条件

機 種	: GERSTEL MPS2[GERSTEL]
ファイバー	: 50/30 $\mu\text{m}$ <u>StableFlex DVB/Carboxen/PDMS</u>
	[シグマアルドリッチジャパン株式会社]
インキュベーション温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$
インキュベーション時間	: 10 min
かくはん速度	: 300 r/min
抽出時間	: 30 min
脱着時間	: 3 min

<ガスクロマトグラフ-質量分析計操作条件>

機 種	: 7890A/5975C [Agilent <u>Technologies, Inc.</u> ]
カ ラ ム	: DB-WAX UI[Agilent <u>Technologies, Inc.</u> ]
	$\phi$ 0.25 mm $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 $\mu\text{m}$
注入方法	: スプリットレス
温 度	: 試料注入口 240 $^{\circ}\text{C}$
カラム	: 40 $^{\circ}\text{C}$ (3 min保持) $\rightarrow$ 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow$ 250 $^{\circ}\text{C}$ (10 min保持)
ガス流量	: ヘリウム (キャリアーガス) 1 mL/min
イオン源温度	: 230 $^{\circ}\text{C}$
イオン化法	: EI

#### 6) ゲオスミン測定

・標準溶液の調製 : 2-メチルイソボルネオール・ジオスミン混合標準液(水質試験用) 100 mg/L メタノール溶液を標準原液とし、0.0005 mg/L $\sim$ 2 mg/L の標準溶液(内標準物質濃度: 0.05 mg/L)を調製した。

・内標準溶液の調製 : 安息香酸 n-ブチル 50 mg を正確に量り取り、ヘプタンに溶解し 100 mL に定容して 500 mg/L の内部標準原液を調製後、さらに希釈し、5 $\sim$ 50 mg/L の内標準溶液を調製した。

・試液の調製 : 赤ビート搾汁液または赤ビートワインを 5 $\sim$ 25g 採取し、水 200 mL、内標準溶液 2 mL、消包剤 3 滴を加えて、製油定量用蒸留装置で蒸留後、ヘプタン層に硫酸ナトリウム(無水)約 0.5 g を加え脱水した。Sep-Pak カラムを用いてアセトンおよびヘキサンの混液(3:7)で溶出し、溶出液を窒素気流化において濃縮し、ヘプタンで定容した液を GC/MS にて測定した(Table 4)。

Table 4. ゲオスミンの GC/MS 測定条件

---

機 種 : 7890B/5977B [Agilent Technologies ] <sup>4)</sup>
カラム : DB-WAX UI [Agilent Technologies] 内径 0.25 mm 長さ 30 m 膜厚 0.25 $\mu\text{m}$ <sup>4)</sup>
注入方法 : パルスドスプリットレス <sup>4)</sup>
注入量 : 2 $\mu\text{L}$ <sup>4)</sup>
温 度 : 試料注入口 200 $^{\circ}\text{C}$ <sup>4)</sup>
カラム : 80 $^{\circ}\text{C}$ (1 min 保持) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow$ 115 $^{\circ}\text{C}$ (4 min 保持) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow$ 140 $^{\circ}\text{C}$ (5 min 保持) $\rightarrow$ 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow$ 200 $^{\circ}\text{C}$ (5 min 保持) <sup>4)</sup>
ガス流量 : ヘリウム (キャリアーガス) 1.0 mL/min <sup>4)</sup>
イオン源温度 : 230 $^{\circ}\text{C}$ <sup>4)</sup>
イオン化法 : EI <sup>4)</sup>
設定質量数 : $m/z$ 112, 125 (ゲオスミン) <sup>4)</sup>

---

### 3. 赤ビートワイン製造

ばんけい峠のワイナリー協力のもと、赤ビートワインの醸造および製品化を試みた。

#### (1) 赤ビート搾汁液

十勝産の赤ビート根茎 50 kg を水洗し、オートクレーブを用いて加熱処理(105  $^{\circ}\text{C}$ , 30min)した後、剥皮、細断し搾汁した。

#### (2) 野生酵母

製品化には試験醸造の結果から、学内のシーベリーから分離した野生酵母 *H. vineae* を選択した。

#### (3) グルコース <sup>26)</sup>

でん粉を酵素で分解したものを使用した業務用のブドウ糖粉末 (JAS 規格/昭和産業) を使用した <sup>24)</sup>。

#### (4) 混醸用赤ワイン

キャンベル種を使用した赤ワイン(アルコール 8%、ばんけい峠のワイナリー製)を用いた。

#### (5) 赤ビートワイン醸造

赤ビート搾汁液 17L を濾過(ファイバーネット)したものにグルコース<sup>26)</sup> 2.55 kg(赤ビート搾汁液に対して 15 %)および野生酵母 *H. vineae* を  $5 \times 10^7$  cells/mL となるように添加し、1 次発酵として 22~25 °C で 8 日間発酵させた。続いて、赤ワインと 1 : 1 の比率で混合し、火入れ (60 °C, 30min) 後、13~15°C で約 1 ヶ月醸成した。その後、ろ過、ビン詰を行い冷蔵保存した (360 mL ビン 80 本)。

## 結果 (Ⅱ)

### 1. 市販酵母予備発酵試験結果

生の赤ビート根茎の皮剥き、皮付きから得られた搾汁液に同量の 30% ショ糖溶液を加え、市販酵母を添加し、25℃ で発酵させたところ、翌日には勢いよく泡立ちが認められたことから、アルコール発酵は問題なく進行することが確認された。このときゲオスミンの土壌臭は皮付きの搾汁液により強く感じられた(Fig. 8)。



Fig. 8. 赤ビートの市販酵母による予備発酵試験結果

### 2. 野生酵母発酵試験結果

#### (1) EtOH 濃度・Brix 糖度

EtOH 濃度は発酵 4 日で対照の *S. cerevisiae* 13.7%、*H. vineae* 9.1% と、それぞれ最大値を示した(Fig. 5)。その他の酵母はゆるやかに発酵が進み、最高値に達したのは、*C. krusei* は発酵 12 日において 5.3%、*C. valida* と *K. apiculate* は発酵 21 日でそれぞれ、2.2、4.6 %であった。また、Brix 糖度は、EtOH 濃度の変化と対比的に減少し、発酵開始時の約 20 %から、発酵 21 日においては、*S. cerevisiae* 6.3%、*H. vineae* 10.1 %、その他の酵母については 9～15 %となった (Fig. 9)。



## (2) 吸収スペクトル・色調

赤紫色のベタシアニンとは、発酵開始時、吸光度(538nm)<sup>10,23)</sup>3.1~3.2 あったが、すべての野生酵母において、発酵が進むにつれて徐々に低下し、発酵 12 日で EtOH 産生能が高かった *S. cerevisiae* は吸光度 1.2、*H. vineae* は吸光度 0.8 と低く、その他の酵母では 2.8~3.2 を維持していた(Fig. 10, 11)。橙黄色のベタキサンチンは発酵開始時、すべての酵母において吸光度(480nm)<sup>10,23)</sup>約 3.0 であったが、発酵 12 日では、吸光度 1.6~2.4 となった。EtOH 濃度が高くなると赤紫色の色素の退色が認められ、橙黄色については、どの酵母も一定量の色素が残っていることを目視でも同様に確認できた(Fig. 12)。

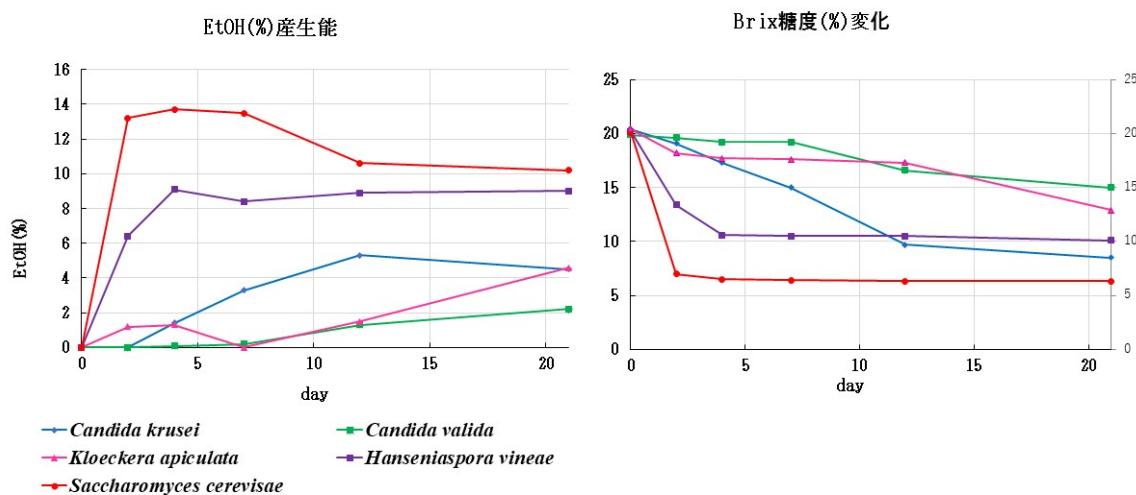


Fig. 9. 赤ビートの野生酵母による発酵能の比較

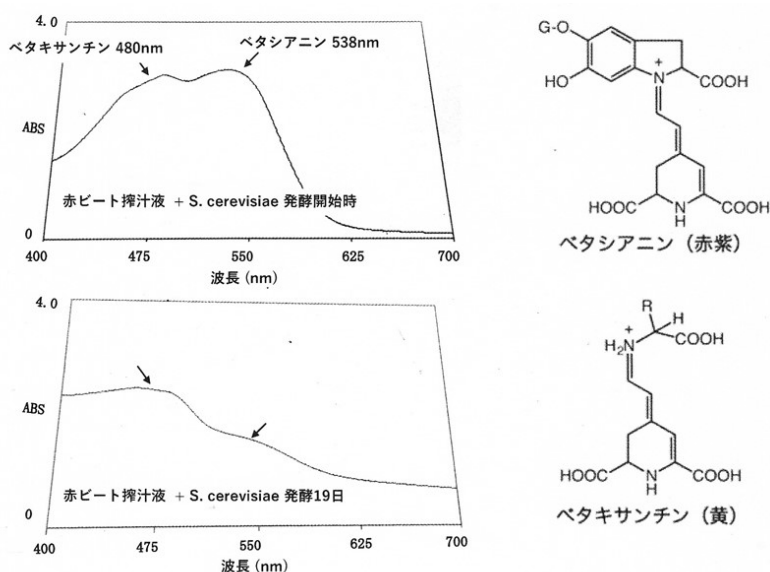


Fig. 10. ベタレイン色素の構造と吸収スペクトル

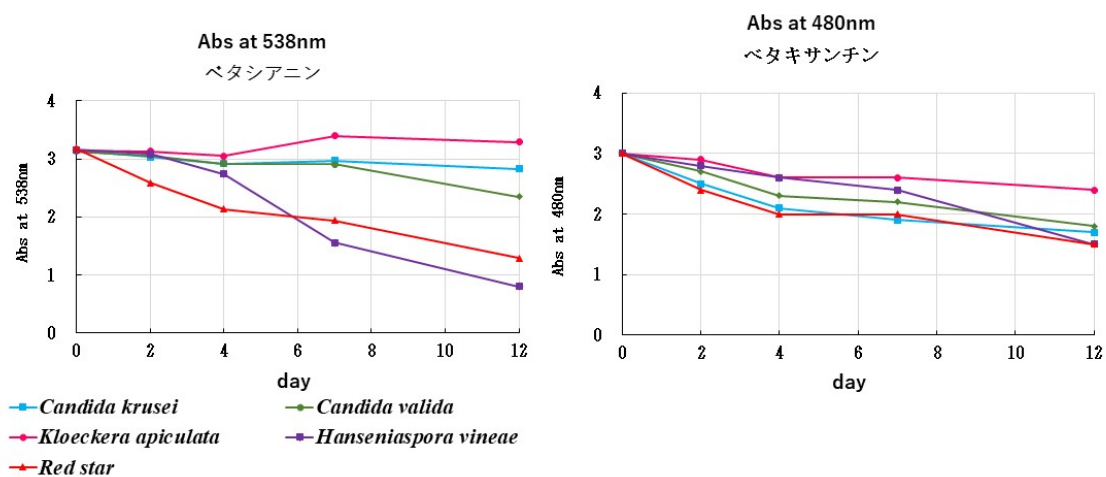


Fig. 11. 発酵による赤ビートジュースの吸光度変化

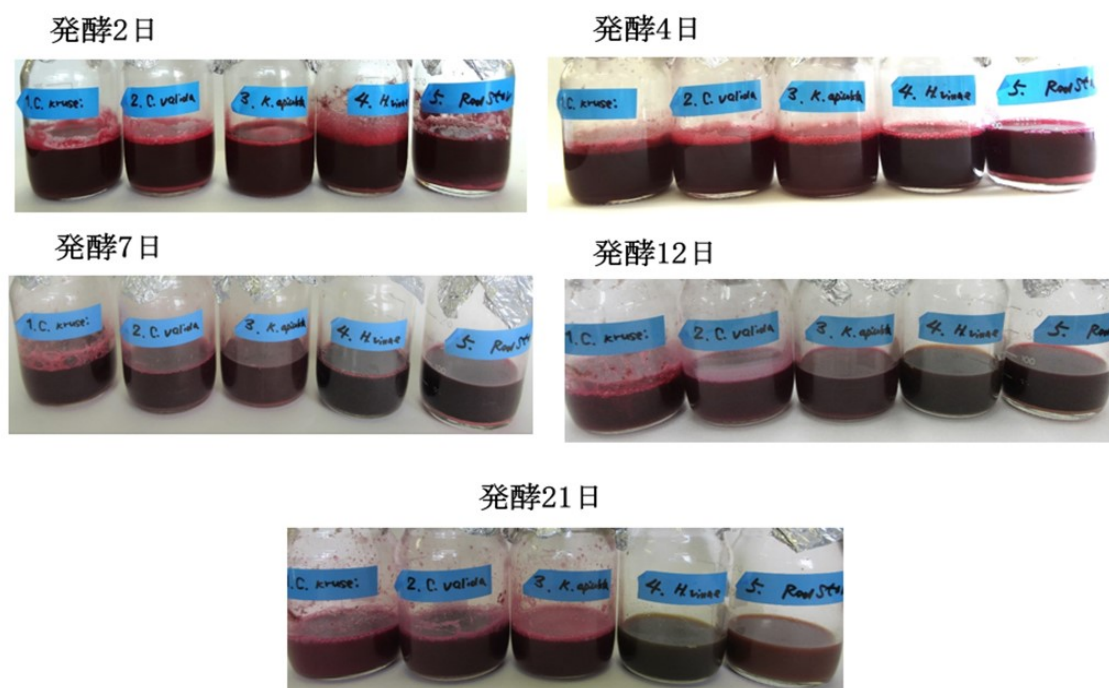


Fig. 12. 赤ビートジュースの発酵による色調変化

### (3) 官能評価

官能評価の結果、酵母ごとに味わいと香りについての違いが明瞭に認められた (Table 5)。

EtOH の産生が約 14% と最も高かった *S. cerevisiae* はアルコールの香り、苦みが強く感じら

れた。EtOH の産生が 9%と次に高かった *H. vineae* は香り、味わいともに、バランスが良く、飲みやすい印象であった。EtOH 産生 2~5%と低かった *C. krusei*、*C. valida*、*K. apiculata* は、残糖が多いため甘味が強く、香りに赤ビートの特徴が残っており、口当たりとしては滑らかであった(Table 5)。

Table 5. 野生酵母発酵による赤ビートワインの官能評価

酵母種	香り	味わい
<i>Candida krusei</i> 学内産シーベリー (EtOH 5%)	赤ビートの特徴的な香りと 甘い果実の香り	甘味が弱く酸味が強い、苦みは少ない。
<i>Candida valida</i> 洞爺湖町産ブルーベリー (EtOH 2%)	赤ビートの香りに加えて、 サツマイモのような甘い香 り	甘味が程よく、酸味、苦みが少ない。
<i>Kloeckera apiculata</i> むかわ産シーベリー (EtOH 5%)	ラズベリーの様な赤い果実 の爽やかな香り	甘味、酸味のバランスが良く、飲んだ後の余韻が ワインと似ている。
<i>Hanseniaspora vineae</i> 学内産シーベリー (EtOH 9%) (製品化に使用した酵母)	イモ焼酎に似た甘い香り	甘味、酸味、苦みのバランスが良く、飲んだ後の 余韻に日本酒の様な旨味が感じられる。
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 市販ワイン用酵母 (EtOH 14%)	強いアルコールの香り	甘味がなく、苦みが強く、酸味もある。 後味が感じられず、嗜好品としては適していない。

### 3. 赤ビートジュースとブドウ果汁の混合発酵試験結果

#### (1) EtOH 濃度・Brix 糖度

赤ビートジュースと学内で採れたワイン用赤ブドウピノノアール果汁の等量混合液において、EtOH 濃度は発酵 8 日で、*S. cerevisiae* と *H. vineae* が 7.1%と最も高く、続いて *C. krusei* が 6.9%、*K. apiculata* が 5.7%となった(Fig. 8)。発酵 23 日においては、*S. cerevisiae* が 8.2%と高値を維持しており、*H. vineae* と *C. krusei*は、それぞれ約 6%まで低下した(Fig. 12)。*K. apiculata* はゆるやかに EtOH 産生が進み 6.8%まで上昇した。Brix 糖度は発酵開始時の約 15%から、EtOH 産生を反映して、発酵 23 日にそれぞれ 5~7%まで低下した(Fig.13, 14)。

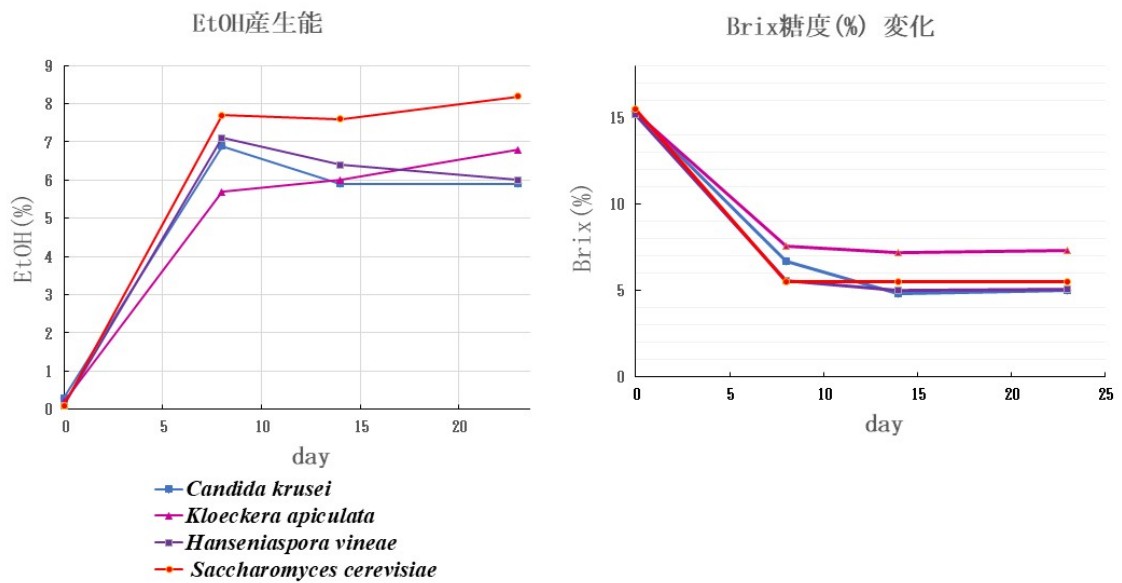


Fig. 13. 赤ビートジュースとブドウ果汁混合発酵におけるEtOH濃度とBrix糖度の変化



Fig. 14. 赤ビートジュースとブドウ果汁混合液の発酵経過

## (2) pH 変化

混合前の赤ビートジュースの pH は 6.2 と中性に近く、ピノノワール果汁が 3.2 と低値であった。発酵 15 日と 23 日でそれぞれ pH を測定したところ、pH 3.8~4.3 と、おおむね一定の値を示した(Table 6)。

Table 6. 赤ビートジュースとブドウ果汁混合発酵におけるpHの変化

酵母種	発酵15日(pH)	発酵23日(pH)
<i>Candida krusei</i> 学内産シーベリー	4.18	4.25
<i>Kloeckera apiculata</i> むかわ産シーベリー	3.90	3.88
<i>Hanseniaspora vineae</i> 学内産シーベリー (製品化に使用した酵母)	4.20	4.21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 市販ワイン用酵母	3.80	3.96

- ・赤ビートジュース : pH 6.16
- ・ブドウ (ピノワール) 果汁 : pH 3.24

### (3) 香気成分分析

野生酵母 3 種および対照酵母の *S. cerevisiae* を用いて、赤ビートジュースとグルコースまたはピノワール果汁混液を発酵させた際に生成する香気成分の特性を主成分分析で確認した。すべての酵母において、X 軸の第 1 主成分(寄与率 26.2%)は、グルコース液に対してピノワール果汁がプラス方向にシフトしており、Y 軸の第 2 主成分 (寄与率 22.2%)では、*S. cerevisiae* に対して野生酵母はいずれもプラス方向にシフトしていた(Fig. 15)。

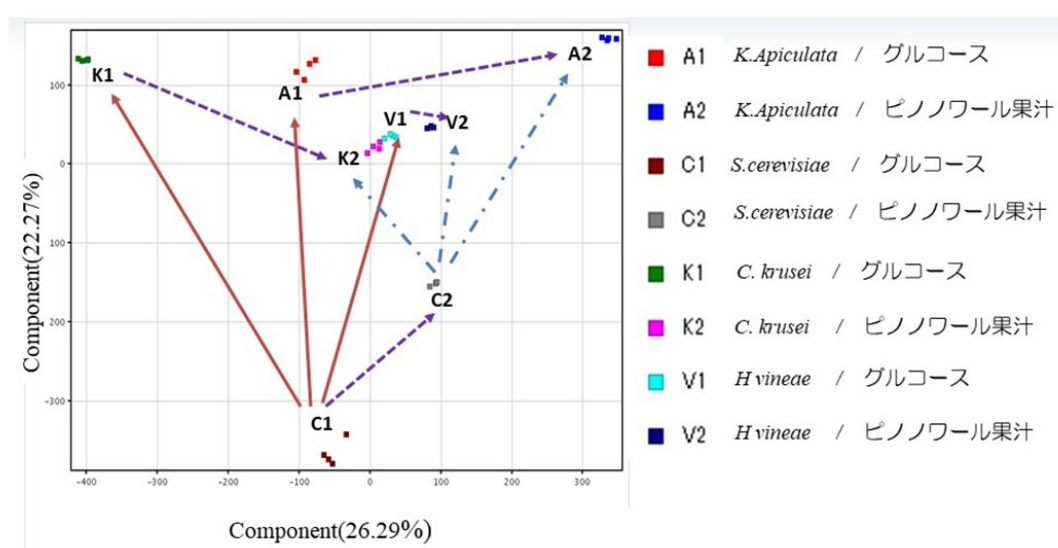


Fig. 15. 酵母種および糖原が異なる赤ビートワインの香気成分主成分分析結果

主成分分析結果の再現性を確認するため、野生酵母 *H. vineae* と対照酵母の *S. cerevisiae* を用い、グルコース液またはピノノワール果汁混液の赤ビートワインについて、再度、香気成分の GC/MS 測定を行った。その結果、寄与率 30%を超える成分が同様に抽出されてくることを確認できた。第 1 主成分(寄与率 36.1%)は酵母種の違いを、第 2 主成分(寄与率 31.7%)はグルコースとブドウ果汁成分の違いを明確に示した(Fig. 16)。

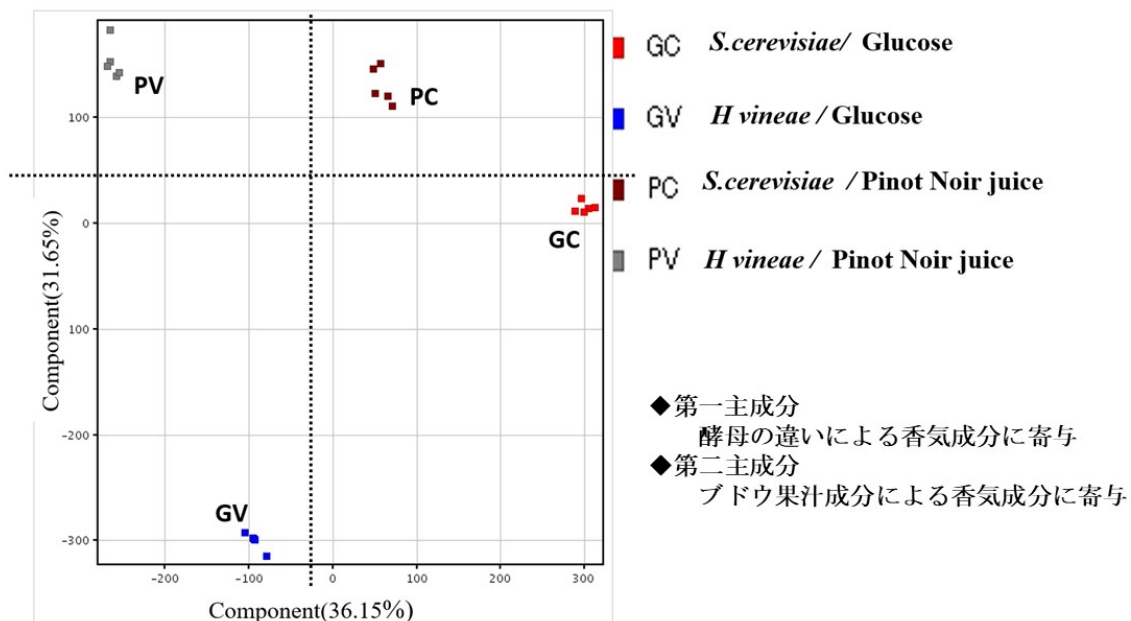


Fig. 16. *H. vineae*および*S. cerevisiae*を用いた糖原が異なる赤ビートワインの香気成分主成分分析結果

#### (4) 成分比率

*H. vineae* を用いてグルコース液またはピノノワール果汁混合液で発酵した各赤ビートワインの香気成分を、対照酵母*S. cerevisiae* を用いた場合の生成量に対する比率を求め比較した。

グルコース液を混合した赤ビートワインでは、*H. vineae* は *S. cerevisiae*と比較してバナナ、パイナップル、バター、ラム酒香の3-Methyl-1-propanoic acid butyl ester、マスカット、フローラル香のLinalool、およびバナナ、パイナップル香のPropanoic acid ethyl esterの上昇が顕著であった(Table 7)。また、ピノノワール果汁を混合した場合には、フローラル、バラ、フルーティー、ハチミツ香の2-Phenylethyl propionate、フルーティー、ハーブ、



ワイン、グリーン香の2-Methyl-butanoic acid、ベリー、パイナップル、バナナ香の Propyl propionate、コニャック、ラム酒。パイナップル香のEthyl heptanoateなどの芳香を与える多くのエステル類の増加が認められた(Table 8)<sup>27)</sup>。これに対して*S. cerevisiae*を使用した赤ビートワインでは、グルコース液、ピノノワール果汁液のどちらも、1-Octanol、2-Nonanol、1-Pentanol、n-Decanoic acidなど、刺激臭となる中鎖脂肪酸アルコールが多く生成されていた(Table 7, 8)。

Table 7. 赤ビートジュースとグルコース液混合試作ワイン香気成分の比較

	香気成分	*比率	香りの特徴
<i>H. vineae</i> > <i>S. cerevisiae</i>	3-Methyl-1-propanoic acid butyl ester	172000	バナナ、パイナップル、バター、ラム酒
	Linalool	170001	マスカット、フローラル
	Propanoic acid ethyl ester	5.9	バナナ、パイナップル
<i>S. cerevisiae</i> > <i>H. vineae</i>	1-Propanol	-3.1	アルコール臭、テキーラ
	1-Heptanol	-3.3	刺激臭、カビ臭
	1-Octanol	-4.8	
	1-Hexanol	-17.1	
	2-Undecanol	-90000	
	3-Hydroxymethyl-2-nonanone	-102000	
	2-Nonanol	-213000	アルデヒド臭、オイリー
	1-Pentanol	-219000	燃料臭、刺激臭

\* 各成分の波高比

赤字は*H. vineae*の方が2倍以上存在比が高い主要香気成分

青字 (-) は*S. cerevisiae*の方が2倍以上存在比が高い主要香気成分

Table 8. 赤ビートジュースとピノノワール果汁混合試作ワイン香気成分の比較

	香気成分	比率	香りの特徴
<i>H. Vineae</i> > <i>S. cerevisiae</i>	2-Phenylethyl propionate	134000	フローラル、バラ、フルーティー、ハチミツ
	(S)-(+)-3-Methyl-1-pentanol	658000	
	Ethyl 2-acetylbutyrate	112000	フルーティー、ハーブ、ワイン、グリーン
	Propyl propionate	51400	ベリー、パイナップル、バナナ
	Ethyl heptanoate	20300	コニャック、ラム酒、パイナップル
<i>S. cerevisiae</i> > <i>H. vineae</i>	Nonanoic acid	-2.1	ワックス臭
	2-Methyl-butanoic acid	-3.5	
	Octanoic acid ethyl ester	-3.6	
	1-Octen-3-one	-4.2	
	n-Decanoic acid	-4.5	
	Octanoic acid	-5.7	
	3-Methyl butanoic acid ethyl ester	-9.2	
	Dimethyl sulfide	-12200	キャベツ、ベジタブル、トリュフ、硫黄臭
	2-Nonanol	-126000	ワックス臭、せっけん臭
	2-Octen-1-ol	-402000	

#### 4. 製品化赤ビートワインのゲオスミン測定結果

製品化赤ビートワインのゲオスミンが0.7 ppbであったのに対して、赤ビート搾汁液では定量限界付近の0.1 ppbであった。赤ビートワインは赤ビート搾汁液と赤ワインの等量混合液でありゲオスミンの理論値は搾汁液の半量0.35 ppbとなることから、発酵によりゲオスミンが1/3以下に低下したことを確認された(Fig.17)。

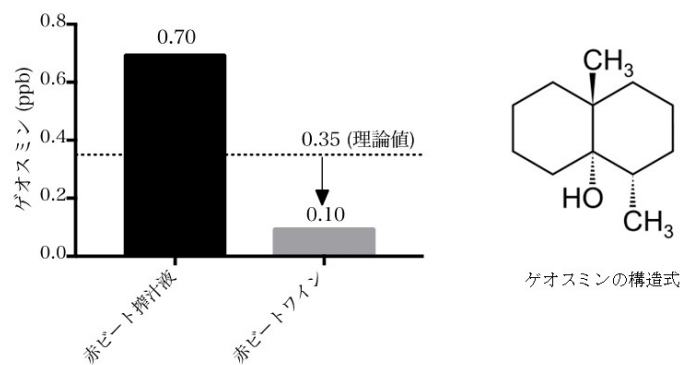


Fig. 17. 赤ビート搾汁液ゲオスミン量のワイン発酵による変化



## 考察 (II)

赤ビート根茎搾汁液と市販酵母*S. cerevisiae* を用いた予備発酵試験の結果から、赤ビートの成分が酵母のアルコール発酵を阻害しないことが確認できたが、風味の上では赤ビート由来の刺激臭が強く好ましいものではなかった。したがって独特の発酵特性を持つ野生酵母の適用を試みることにした。赤ビートに着生する微生物の殺菌と風味も考慮し、赤ビート根茎は搾汁作業に先立ち加熱処理を行うことにした。第 I 章で同定した野生酵母4種(*C. krusei*, *C. valida*, *K. apiculata* および *H. vineae*) と対照の市販酵母*S. cerevisiae* を用いてグルコース液で補糖し発酵能を評価した。アルコール発酵能は最終EtOH濃度10.2 %の*S. cerevisiae* が最も高く、野生酵母の中では、学内シーベリーから分離された*H. vineae* が9%と最も高く、*C. krusei*, *K. apiculata*は約4.5%ではあるが一定のアルコール発酵が認められた (Fig. 5)。*C. valida* については、EtOH濃度が2.2%と低く、赤ビートのアルコール発酵には適していないことがわかった。

一方、赤ビート特有の赤紫色色素ベタシアニンは、目視および吸収スペクトルの結果から、アルコール発酵が進みEtOH濃度が高くなるほど退色するが、橙黄色色素のベタキサンチンは退色せずに残存することが判明した (Fig. 10, 11)。発酵による酵素の発現や代謝物変動の様々な影響下、それぞれの色素の安定性が大きく異なるためと考えられる<sup>10)</sup>。

発酵21日の官能評価では、*S. cerevisiae* は強いアルコール臭に加え、苦みや酸味が顕著であり風味については好ましいものではなかった。これに対して野生酵母は、果実香と甘味が感じられ苦みが少なく飲みやすいワインとなっていた。特に*H. vineae* は、いも焼酎様の甘い香りに加え、甘味、酸味、苦みのバランスが良く、赤ビートワインにはもっとも適している酵母と考えられた (Table 5)<sup>28,29)</sup>。

赤ビートワインの製品化を視野に、発酵能の高い野生酵母3種と*S. cerevisiae* について、グルコース液の代わりにピノノワール果汁を用いて発酵試験を行った。赤ビートジュースはpHが中性付近で糖度も高く微生物学的に不安定な組成である。よって保存性を高めるためpHを下げる必要があることから、赤ビートジュースに学内で採れたワイン用ブドウのピノノ

ワール果汁を添加した。発酵期間を通して、pHはいずれも4前後であり酵母による違いは認められなかった(Table 6)。

EtOH濃度は、*S.cerevisiae* 8.2%に対して、野生酵母は6~7 %とやや低いものの、ブドウ果汁を用いた場合も一定のアルコール発酵は認められた(Fig. 13)。ブドウ果汁との混液における発酵能と官能評価の結果から赤ビートワインの製品化には*H. vineae* を使用することとした。

発酵過程で生成された香気成分をGC/MSにより測定し、主成分分析により酵母やブドウ果汁の影響を検証した。主成分分析では、赤ビートワイン中の多数の香気成分を複数のデータ項目に置き換え新しい合成変数（軸）を生み出して解釈する。最も寄与率の高い軸を第1主成分とし、2番目の軸を第2主成分として、生成された香気成分を集約的に解析する手法である。

グルコース液またはピノノワール果汁を赤ビートジュースに添加し野生酵母3種と*S. cerevisiae* を用いて発酵させた8種類の赤ビートワインについて主成分分析を行ったところ、合計寄与率約50%ではあるが、第一主成分はブドウの成分を特徴づける軸、第2主成分は酵母種の違いによる発酵代謝物を特徴付ける軸であることが示唆された(Fig. 15)。再現性の確認に加え、より情報量を集約した条件で解析するため、*H. vineae* と *S. cerevisiae* について、グルコース液またはピノノワール果汁を赤ビート搾汁液に添加して発酵させた赤ビートワインの香気成分を同様に測定した。その結果、合計寄与率が約70 %とより高く、第一主成分(寄与率36.1%)が果汁成分を、第二主成分(寄与率31.7 %)が酵母代謝物を特徴付ける成分を示していることが確認できた(Fig. 16)。この結果から、従来からよく知られているようにブドウ品種の違いが風味に大きく影響することに加え、酵母種の違いもやはり大きく影響することが理解できる。

さらに、個々の香気成分含量について、Volcano Plot解析<sup>30)</sup>を用いて酵母種の違いを比較した。Volcano Plot解析とは、2つのグループ間で「量差」がある化合物を効率的に抽出する解析手法であり、一般的には  $-\log p$  値をプロットする。ここでは、便宜的に5重測定のRSD

値が50%を超える成分を除外して解析した。野生酵母の*H. vineae*を使用した赤ビートワインは、*S. cerevisiae* に比べ、フルーティーでアロマティックな揮発性物質がより多く検出されたのに対して、*S. cerevisiae* は、刺激臭となる中鎖脂肪酸アルコールや硫黄化合物が多く検出されている(Table 7, 8)。このことは官能試験で*S. cerevisiae* に対し*H. vineae* の方がより好ましいという結果であったことと一致する(Table 5)。これまでの研究でも、*H. vineae* はフローラルでフルーティー、アロマティックな香気成分を生成する酵母であり、テルペンや揮発性フェノールを増加させ、ワイン品質を向上させる酵母であることが知られている<sup>16)</sup>。

また、赤ビートに特有の土壌臭であるゲオスミンについては、発酵によって1/3以下に減少することが確認されたことは、分解機序は不明なもののやはり官能試験の結果を裏付けるものと考えられる(Fig. 17, Table 5)。

以上のことから、野生酵母の*H. vineae*を利用することにより、香り、味わいに優れた、特徴のある赤ビートワインの醸造が可能であることが確認できた。

なお、本修士論文執筆中に、海外において赤ビートワインについての研究論文の投稿が認められた<sup>31)</sup>。

## 要約

赤ビートは、ヒユ科の根菜類で水溶性の高い含窒素赤色色素ベタシアニンを高濃度に含むことに加え、ゲオスミンによる土壌臭を持つことが特徴である。北欧圏を中心にボルシチなどの伝統料理に使われることが多く、国内では、抗酸化作用、高血圧や動脈硬化の予防など機能性の高いスーパーフードとして、最近人気が高まってきている。その搾汁液を利用して、本研究では、これまで例のない赤ビートを原料としたワイン醸造を目的に、市販のワイン用酵母 *S. cerevisiae* と道産小果実から分離した様々な野生酵母を用いて、その発酵能と色素および風味への影響を評価した。シーベリー学内産果実 1 種およびむかわ産果実 4 種に加え、洞爺湖町産ブルーベリー等の小果実から、YPD10 および RE8.0 培地を用いて酵母を分離培養した。得られたコロニーを YPD 液体培地で増菌後、MALDI-TOF/MS により菌種を同定した。各酵母を YPD 液体培地で振とう培養増菌後、滅菌生理食塩水で洗浄し酵母懸濁液を調製した。同定された野生酵母 4 種(*C. krusei*, *C. valida*, *K. apiculata* *H. vineae*) と対照の市販酵母 *S. cerevisiae* を用いてグルコース液で補糖し発酵能を評価した結果、*H. vineae* が *S. cerevisiae* に次いで高い発酵能を示した。次に一定の発酵能を示した *C. krusei* と *K. apiculata* を含めた官能評価の結果、野生酵母を用いた赤ビートワインはいずれも、香り、味わいともに *S. cerevisiae* より飲みやすいものとなった。また赤ビートワインの製品化を視野に、グルコース液の代わりにピノノワール果汁を用いて同様に発酵試験を行った。製品化には、発酵能および官能試験ともに最も良好であった *H. vineae* を用いることとした。発酵過程で生成された香気成分については、主成分分析および Volcano Plot 解析を用いて検証したところ、酵母種や混合液ごとに違いが見られ、*H. vineae* は、*S. cerevisiae* よりもフルーティーでフローラルなアロマティック香気成分量が実際に増加していた。また、赤ビートに特有の土壌臭であるゲオスミンについては、発酵によって 1/3 以下に減少することも確認された。以上のことから、赤ビートワイン醸造には、野生酵母 *H. vineae* が適していることが確認された。

## Summary

In common winemaking, as starter yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* is mainly used because of its higher ethanol-producing abilities. However recently, several studies have reevaluated the role of non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation for making different aroma compounds in comparison to *S. cerevisiae*. We focused on non-*Saccharomyces* yeast for making novel "Red Beet Wine". Red beetroot is one of the most popular vegetables as a valuable source of bioactive compounds. The main bioactive compounds are betaleins composed of betacyanins (red-violet pigments) and betaxanthins (yellow-orange pigments). In addition to these pigments Red beetroot is specified as earthy or mold-like odors.

Wild yeasts, from berries harvested at Hokkaido; Seaberry, Blueberry, Blackrasberry and Chokeberry, were isolated and cultured using YPD10 and RE8 media, then identified by MALDI-TOF/MS. Four wild yeasts such as *Hanseniaspora vineae*, *Kloeckera apiculate*, *Candida krusei* and *C. valida* were finally identified. Red beet juice with sterilized 30% glucose solution or Pino noir grape juice were fermented at 25°C for 23days with the wild yeasts and commercial *S. cerevisiae* (as a reference yeast). Ethanol and Brix (sugar content) were measured for monitoring fermentation ability and absorption spectrum (400-700nm) was also measured for checking the color tone change of the pigments. Further, volatile aroma compounds with earthy odorous geosmin were measured by GC-MS accompanied with a sensory test.

The combination of the wild yeasts with the red beet juice was rather preferable than *S. cerevisiae* especially from the point of its provocative taste. Among the wild yeasts, *H. vineae* was proved to be the most suitable yeast for making "Red Beet Wine" from the ethanol producing ability and excellent fruity-aroma taste.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験および実験データの評価に関して、ご指導、ご助言をいただいた酪農学園大学大学院酪農学研究科の山口昭弘教授、船津保浩教授および岩崎智仁教授、ならびに赤ビートに関して専門的なご指導をいただいた知地英征 藤女子大学名誉教授に深くお礼申し上げます。また、本研究で赤ビート根茎をご提供いただいた(同)アグマリンプロテック西村太輔氏、赤ビートジュースをご提供いただいた(株)札幌アンチエイジングラボラトリー 信平 強氏、赤ビートワイン製品化にご尽力くださいましたばんけい峠のワイナリーの田村修二氏、嶺氏、赤ビートワインの香気成分およびゲオスミン分析と主成分分析に関する専門的なご指導をいただいた(一財)日本食品分析センター彩都研究所 横関俊昭氏に心より感謝いたします。最後に本研究に際し、多方面にわたりご協力いただいた応用微生物学研究室の高橋宗一郎氏はじめ研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 松田義弘, 上木厚子, 上木勝司. 各種果実から分離された香気生産性野生酵母の同定と香気生産特性. 日本醸造協会誌. 2009, 104(1), p.57-74.
- 2) 渡邊悟, 篠原尚子, 中村健人, 雨宮義人, 時友裕紀子, 小宮山美弘. レーズン起源酵母によるワイン醸造. 日本食生活学会誌. 2012, 22(4), 284-292.
- 3) 田村學造, 秋山裕一, 野白喜久雄, 他. 酵母からのチャレンジ「応用酵母学」. 技報堂出版, 1997, 265.
- 4) 山本歩. 清酒醸造用野生酵母の桜花からの単離清酒醸造用野生酵母の桜花からの単離. 八戸工業高等専門学校紀要. 2010, 45, 45-48.
- 5) Benito S. The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. Applied Microbiol and Biotech. 2018, 102, 6775-6790.
- 6) 篠原隆. ワイン醸造環境における酵母相及び有用酵母株の選択育種. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 1997, 8 (2), 119-126.
- 7) 松田義弘, 上木厚子, 上木勝司. 各種果実から分離された香気生産性野生酵母の同定と香気生産特性. 日本醸造協会誌. 2009, 104(1), 57-74.
- 8) 渡邊悟, 篠原尚子, 中村健人, 雨宮義人, 時友裕紀子, 小宮山美弘. レーズン起源酵母によるワイン醸造. 日本食生活学会誌. 2012, 22(4), 284-292.
- 9) 知地英征. 中心子目植物の Betalain 類色素に関する研究 : 主としてあつけしそう (*Salicornia europaea* L.)の紫赤色色素について. 北海道大学農学部邦文紀要. 1976, 9(4), 303-372.
- 10) 高橋あずさ, 奥村純子, 森田祐二, 知地英征. テーブルビートおよびカクタスペア果汁中の含窒素色素ベタレインの抗酸化性と吸収動態. 日本食品科学工学会誌. 2017, 64(2), 51-58.
- 11) 株式会社わかさ生活. “赤ビート”. <http://www.wakasanohimitsu.jp/seibun/beet/>, (参照 2020-01-31).

- 12) 小林恒夫, 仲村仁浩, 打矢裕己, 他. マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOFMS) 法による樹脂の構造解析. DIC Technical Review. 2002, No.8, 13-18.
- 13) 大楠清文. 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. モダンメディア, 2012, 58(4), 113-122.
- 14) Oliveria I, Ferreria V et al. Modulating fermentative, varietal and aging aromas of wine using non-*Saachromyces* yeasts in a sequenital inoculation approach. Microorganisims. 2019, 7, 164.
- 15) HUDAGULA. 野生酵母の MALDI-TOF/MS 同定用データベース構築およびブドウ灰色カビ病に対する微生物農薬候補の探索. 酪農学園大学大学院, 2018 年度 修士論文
- 16) Tristezza M, Tafariello M, et al. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* is simultaneous and sequential co-fermentation with *Saachromyces cerevisiae* for industrial wine production. Front Microbiol 2016, 7, 670.
- 17) Rojas V, Gil J V,. Acetate ester formation in wine by mixed culture in laboratory fermentations. Int J et al Food microbiol 2003, 86(1), 81-188.bio
- 18) D.E Zohre, H Erten et al The Influence of *Klockner apiculate* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation Process Biochemistry 2002
- 19) Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N, MacAllister R, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertension. 2008, 51(3), 784-790.
- 20) Czyżowska A, Klewicka E, Libudzisz Z. The influence of lactic acid fermentation process of red beet juice on the stability of biologically active colorants. European Food Research and Technology, 2006, 223, 110-116.
- 21) Tamworth Distilling “Beet root vodka” <http://tamworthdistilling.com/spirits/art-in-the-age-series/beet-root/>



- 22) Czyżowska A, Klewicka E, Libudziś Z. The influence of lactic acid fermentation process of red beet juice on the stability of biologically active colorants. *European Food Research and Technology*, 2006, 223, 110-116.
- 23) Tracy E, Hsather E, et al. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Anal Bioanal Chemistry* 2004, 381, 937-947.
- 24) 石田博 (一社)日本ソムリエ協会教本 一般財団法人日本ソムリエ協会(JSA) テイスティング 680-691 2020
- 25) Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 2004, 69(6), 491-498.
- 26) Kurtzman CP, Fell LW, Boekhout T. Descriptions of teleomorphic Ascomycetous Genera and Species, Yeasts : Characteristics and identification. 2011 Part IVB, 432-433.
- 27) Chen K, Escott C, et al. Use of non-*Sachromyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking : Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol* 2018, 69, 51-63.
- 28) Silvia P, Ricard L, et al. Revealing the usefulness of aroma networks to explain wine aroma properties: A case study of Portuguese wines. *Molecules* 2020, 25,.272.
- 29) Martin V, Ferina L, et al. Oenological attributes of the yeast *Hanseniaspora vineae* and its application for white and red winemaking. *Bio Web Conferences* Dec. 2019.
- 30) アジレントテクノロジー株式会社. “GC/MS 分析における多変量解析の活用-日本酒保管試験をモデルとした Volcano Plot による解析手法-”. <https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=GCMS-201010SG-001>, (参照 2020-7-31).
- 31) BO. Otegbayo, LM.Akwa et al Physico-Chemical Properties of beetroot(*Beta Vulgaris* L) wine produced at varying fermentation days *Scientific African* 2020