

2020 年度

博士論文

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

**Oenological Characteristics of Spontaneously Fermented Wine
using Traditional Clay Vessel Qvevri and
its Quality Control**

21834101 高橋 宗一郎

Takahashi Soichiro

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 クヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性	
緒言(I)	4
材料と方法(I)	5
1. 試料	5
(1) 2018 年試験醸造(予備試験)	
(2) 2019 年試験醸造(本試験)	
(3) ワイン試料	
2. ARISA による微生物叢解析	7
(1) DNA 抽出	
(2) PCR 増幅	
(3) アガロースゲル電気泳動	
(4) ARISA 解析	
3. 微生物の集積および増菌培養	8
(1) 培地調製	
(2) 汎用培地	
(3) 選択培地	
(4) 増菌培養	
4. MALDI-TOF/MS による微生物種の同定	10
(1) 試薬	
(2) タンパク質抽出	
(3) MALDI-TOF/MS 測定	
5. DNA 塩基配列解析による同定	10
(1) DNA 抽出および PCR 増幅	
(2) DNA 塩基配列解析	
6. ARISA による微生物固有フラグメント解析	11
7. 酵素法によるグルコース、エタノールおよびグリセロールの測定	11
(1) 試料	
1) 酵素	

2) 緩衝液	
3) 基質液に用いる試薬	
(2) 標準溶液	
1) グルコース溶液	
2) エタノール溶液	
3) グリセロール溶液	
(3) 試料前処理	
(4) 酵素反応液の調製	
(5) 酵素法による測定	
1) 標準液希釈系列	
2) 試料液希釈系列	
3) 発色反応	
8. HPLC による有機酸測定	14
(1) 試料前処理	
(2) 標準溶液	
(3) HPLC 測定	
9. GC/MS による香気成分分析	15
(1) 試薬	
1) 溶媒抽出液	
2) 内部標準溶液	
(2) 試料前処理	
(3) GC/MS 分析	
8. ICP/MS による金属元素分析	15
(1) 試料前処理	
(2) ICP/MS 分析	
結果(I)	17
1. 試験醸造	17
(1) 2018 年(予備試験)	
(2) 2019 年(本試験)	
2. ARISA による菌叢解析	17
3. 微生物の分離培養および同定	20
(1) 汎用培地	

(2) 選択培地	
(3) MALDI-TOF/MS による同定	
(4) DNA 塩基配列解析による同定	
4. ARISA フラグメント解析	20
5. 酵素法による主要成分分析	22
6. HPLC による有機酸測定	23
7. GC/MS による香気成分分析	23
8. ICP/MS による金属元素分析	24
考察(I)	31

第II章 クヴェヴリの衛生管理

緒言(II)	35
材料と方法(II)	36
1. 試料	36
2. 培養試験および微生物分離	36
(1) 培地調製	
(2) 塗抹培養	
(3) 画線培養	
(4) 増菌培養	
3. DNA 塩基配列解析による微生物種の同定	37
(1) DNA 抽出および PCR 増幅	
(2) DNA 塩基配列解析	
4. ARISA による微生物叢解析	37
5. ARISA による微生物固有フラグメント解析	37
結果(II)	39
1. 塗抹培養	39
2. DNA 塩基配列解析による微生物種の同定	39
3. ARISA による菌叢および固有フラグメント解析	39
考察(II)	42

第III章 酢酸エチル抽出を用いた GC によるワイン中酢酸の定量

緒言(III)	44
---------	----

材料と方法(III)	45
1. 試薬	45
2. ワイン試料	45
3. 測定用溶液の調製	45
(1) ワイン試料液	
(2) 検量線用酢酸標準溶液	
(3) 酢酸添加ワイン試料液	
4. 酢酸測定	46
(1) GC 法	
(2) HPLC 法	
(3) 水蒸気蒸留滴定法	
5. 統計処理	
結果(III)	47
1. 酢酸検量線	47
2. 酢酸添加回収率および同時再現性	47
3. HPLC 法との相関	47
4. 蒸留滴定法との相関	
考察(III)	50
要約	53
Summary	55
謝辞	57
引用文献	58

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

緒論

ワインが人々に飲用されてきた歴史は長い。最古の痕跡が見つかっているのは東欧ジョージアであり、紀元前 6000 年頃にはブドウを栽培し、ワインを醸造していたとされる¹⁾。イタリア、シチリア島やギリシャでも、紀元前 4000 年頃からワイン醸造の証拠が見ついている等、西ヨーロッパの国々においても、ワイン造りは脈々と行われてきた。ローマ帝国の繁栄で需要が拡大し、その後ワインがキリスト教にとって重要な役割を持ったことで、西ヨーロッパでは修道院において栽培と醸造の技術が向上していった。ルネサンス期以降、宮廷を中心に高品質のワインが求められたことで、その技術はさらに磨かれていく。近代では、1855 年のパリ万博に合わせてフランス、ボルドーのワイン生産者の格付けが行われ、世界において、フランスワインが大きな基準のひとつとなった。こうして、歴史に大きく影響を受けながら、ワインは今日の姿に至っている²⁾。

ワインは、嗜好品である一面の他に、ある意味で芸術的な側面を持つ。年間数百万本を生産する大型ワイナリーがある一方、数 ha の畑に心血を注ぎ、時として奇抜な手法を取り入れながら希少なワインを生み出す生産者もいる。現在では、地域あるいは畑の特徴をワインに反映させることを目指すワイナリーが、その規模を問わず世界中で増えており、消費者もまた、そういった多様なワインを楽しんでいる。量だけが求められていた時代から、コストパフォーマンスが重視されるようになり、今日では、より魅力的な個性を持つ高品質なワインが求められていると言える。

ブドウのみを原料として造られるワインの品質は、言うまでもなくブドウの品質に大きく左右される。そのため高級ワインの多くは、自社畑において、ワイナリーの理念のもとで栽培されたブドウを原料としている。栽培方法は、認められた基準内で農薬や化学肥料を使用する慣行農法と、それらを使わない有機農法に大別される。有機農法については、各国の認証機関の基準を満たす栽培を行うことで、オーガニックワインとして販売することができる。また、農薬や化学肥料を用いないだけでなく、ブドウ畑を含めた周囲の環境を 1 つの生態系として捉え、その調和を保つことを基本理念とした、バイオダイナミック農法も浸透しつつある³⁾。天体の動きと連動して農作業を行うことや、特殊な調剤剤を使用するといったことなどから、時に宗教的と言われる農法であるが、ボルドー格付け 1 級のシャトー・ラトゥールや、ブルゴーニュのドメヌ・ド・ラ・ロマネコンティをはじめ、高品質なワインを生み出す著名な生産者たちが、バイオダイナミック農法を取り入れた栽培を行

っているのは事実である。

こうした、農薬や化学肥料を使用しない農法を取り入れるメリットは多くあるが、中でも発酵に関わる微生物への影響について語る生産者が多い。独自の理念でワイン造りを行う生産者の多くは、市販酵母を添加せず、自発的な発酵を促す自然発酵を行っており、これには野生酵母の量と質が求められる。農薬や化学肥料を使用することで微生物が減少することが知られており、それを避けるためにも、彼らは薬品を使用しない農法を取り入れている。栽培と醸造は分けて考えられることが多いが、実はこのように、密接に結びついた工程なのである。

これまで、ワイン用酵母の研究は世界各国で行われてきた⁴⁾。近年では、アルコール発酵を担う *Saccharomyces cerevisiae* の中でも、市販スターター酵母による発酵だけでなく、野生株を用いる発酵が注目されている⁵⁾。*S. cerevisiae* 単体による発酵のみならず、併用することでワインの風味を向上させる数々の non-*Saccharomyces* 属酵母が研究されており⁶⁾、既にマルチスターターとして、醸造に活用されている⁷⁾⁸⁾。こうした多様な酵母による発酵は、一般的なスティールワインにとどまらず、スパークリングワインにも応用されている他⁹⁾、過剰な酸を取り除く操作(除酸)¹⁰⁾や、多糖類の増加によるテクスチャーの変化を目的とすることもある¹¹⁾。多くの先行研究で示されているのは、単一の市販酵母(*S. cerevisiae*)で発酵を行うよりも、多様な微生物種を用いることで、ワインに複雑さや、異なる風味が生まれるという利点である¹²⁾。単調な味わいは、ワインを評価する上で非常にネガティブな要素であり、複雑さがありつつもバランスのとれた、立体的な味わいが好ましいとされる。ブドウに元々着生している多種多様な微生物をそのまま有効利用する自然発酵は、その点において理にかなった手法である。自然発酵には数多くの微生物が関与し、発酵段階によって優勢菌が移り変わることが報告されており、発酵初期には *Kloeckera* 属や *Hanseniaspora* 属といった野生酵母が活発に代謝を行い、3~4日ほどで *S. cerevisiae* が優勢となるとされる¹³⁾。その他にも、アルコール発酵中あるいは発酵を終えたワインから、*Candida* 属、*Pichia* 属、*Zygosaccharomyces* 属、*Torulaspora* 属といった酵母が分離されており、発酵および熟成に影響を与えていることが示唆されている。それに加え、土着の微生物による発酵を行うことで、ワイナリーの個性をワインに付与できる可能性があり、自然発酵にはこうした多くのメリットがあると言える。しかしながら、自然発酵にはコントロールが難しいという大きな課題があり、研究が行われているものの、十分な知見は得られていない。

近年、北海道産ワインが大きな注目を集めており、41か所のワイナリー(2019年10月現在)の中には、自然発酵を行う小、中規模生産者が一定数存在している。道産ワインが話題となる一方、ヨーロッパ諸国と比較すると湿度が高いことや、冷涼で、積雪量が多いことな

ど、他の産地とは異なる課題も多く抱えているため、それぞれのワイナリーでは経験則にもとづいて、思考錯誤が行われているのが現状である¹⁴⁾。

こうした背景から、本研究では、自然発酵ワインの中でも、特に知見の少ない土製発酵容器クヴェヴリを使用したワインの醸造学的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。

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。

第I章 クヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性

緒言(I)

ユネスコ無形文化遺産に指定されたジョージアのクヴェヴリによる伝統的な醸造は、近代的なワイン醸造とは一線を画す。通常の赤ワイン醸造では、ブドウの果皮、種や果梗を数日~1 か月ほど果汁とともに漬け込み、色素やタンニンといった重要な成分を抽出する、醸しと呼ばれる操作を行う。白ワインにおいては、醸しをまったく行わないことが多いが、低温で数~24時間、短時間の醸しを行う生産者が増えている。ワインの香りをつくる前駆体の多くが、果肉と接している果皮の組織に含まれており、白ワインの醸しには、それらを抽出する目的がある。こうして目的が異なるために、赤ワインにおける醸しはマセレーション、白ワインではスキンコンタクトと呼ばれ、明確に区別されている。醸し期間が長い赤ワインであっても、通常、2 か月以上行われることはないが、クヴェヴリを用いた伝統的な方法(カヘティ地方方式)で白ワインを醸造する際には、秋から翌年の4月頃まで、約6か月間醸しが続く¹⁵⁾。その後、果皮や種を取り除いてボトリングするか、液体だけを別のクヴェヴリに移して熟成させることになる。これによって、白ワインはオレンジ色となり、特に高いクオリティを期待させる場合には琥珀色(アンバー)と表現され、評価される。この手法は、単に伝統的であるだけでなく、ワインに複雑さと熟成感を付与し、特有の味わいを生む。

クヴェヴリを用いたワイン造りに感銘を受けたヨーロッパの生産者が、2000年以降、自らの製法にジョージアの方式(クヴェヴリ、長期醸し)を取り入れはじめた。これにより、赤、白、ロゼに次いで、オレンジワインという第4のジャンルが世界に広がっていった。それと並行して、クヴェヴリのような甕(かめ)を用いる醸造家が増え始め、実際に北海道においても数軒のワイナリーが取り入れて、オレンジワインを醸造している。醸造家の多くは、容器の違いがワインに影響を与えることを理解し、甕を用いることで、より品質の高い、ユニークなワインを醸造できる、あるいは、土地の味(テロワール)を表現できるとしている。

甕を用いたワインづくりへの科学的なアプローチも進んでおり、甕の内側の凹凸によって微酸素供給が行われ、アルコール発酵時に有用であることや、ワインの香りや、“タンニンの熟成(滑らかな質感へ変化すること)”に良い影響を与えることがわかってきている¹⁶⁾。しかしながら、醸造方法が生産者によって千差万別であることや、ブドウ品種および栽培地域が多岐にわたることから、汎用性の高い醸造学的な知見が十分に得られているとは言い難い。

本章では、クヴェヴリを用いた醸造がワインに与える影響を調べるとともに、品質と独自性が高いワインを安定して造るための科学的な知見を得ることを目的とし、小型のクヴ

エヴリを用いたモデル実験を行った。試験醸造は、北海道におけるクヴェヴリ醸造の先駆者である農事組合法人 栗澤ワインズ・KONDO ヴィンヤード(以下、栗澤ワインズ)の近藤氏および、2016 年ヴィンテージから自社醸造のクヴェヴリワインを販売しているさっぽろ藤野ワイナリー株式会社(以下、藤野ワイナリー)の浦本氏と共同で実施した。

材料と方法(I)

1. 試料

(1) 2018 年試験醸造(予備試験)

北海道産黒ブドウ、ツヴァイゲルトレーベ種を用い、20 Lステンレスタンクおよびクヴェヴリを発酵容器として、それぞれに約 15 kg のブドウを入れて試験醸造を行った(Fig. 1)。市販酵母を添加し、ステンレスタンクで発酵させたものを SC (Stainless steel tank-Commercial yeast)、ステンレスタンクで自然発酵させたものを SS (Stainless steel tank-Spontaneous fermentation)、クヴェヴリで自然発酵させたものを QS (Qvevri-Spontaneous fermentation)とし、藤野ワイナリー醸造所内で醸造した。乾燥市販酵母は *S. cerevisiae* (Red Star Pasteur, Fermentis) 5 g を、添加 30 分前に 35 °C の水 50 mL に懸濁させて使用した。熟成時に発酵容器の空隙を満たし、酸化を防ぐ必要があるため、中間条件である SS のタンクを 2 つ用意し、1 つはそれぞれのタンクを充填するために使用した。ブドウの収穫は 2018 年 10 月 18 日、破碎および発酵容器への投入は 10 月 20 日に行い、醸造所内の室温(12~18 °C)で発酵および熟成を進めた。その後、2019 年 6 月 16 日にプレスを行うまで、長期醸しを行い、得られたワインをボトリングした。この間、発酵容器の上部から約 10 cm の部分から、発酵液約 20 mL のサンプリングを定期的に行った。

(2) 2019 年試験醸造(本試験)

KONDO ヴィンヤード(北海道、岩見沢市)産白ブドウ、オーセロワ種約 15 kg を用い、発酵容器および条件は予備試験と同じく、SC、SS (2 タンク)および QS とし、栗澤ワインズ(岩見沢市)醸造所内で醸造した(Scheme 1, Fig. 2)。市販酵母は *S. cerevisiae* (EC1118, Lallemand) 5 g を、上記と同様に使用した。ブドウの収穫、選果、除梗、破碎および発酵容器への投入は 2019 年 10 月 7 日に実施し、醸造所内の室温(12~18 °C)で発酵および熟成を進め、サンプリングを 2018 年と同様に行った。

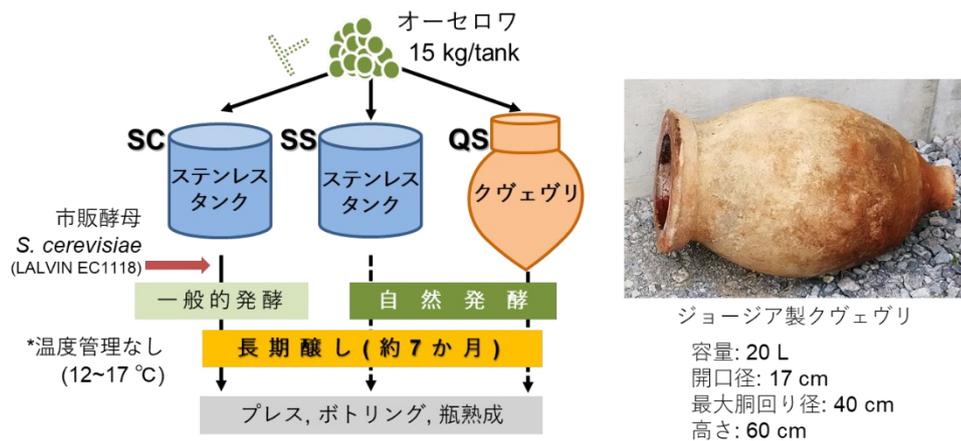
(3) ワイン試料

2019 年に試験醸造した 3 条件のワインについて、発酵 0, 7, 15, 30, 130, 191, 246 日(ボトリング時)および 261 日(ボトリング後 2 週間)時点、計 24 試料を採取した。



Fig. 1 藤野ワイナリーにおける試験醸造(2018)

(左) クヴェヴリおよびステンレスタンク
 (右) 発酵0日のステンレスタンク(上)とクヴェヴリ(下)



Scheme 1 試験醸造の条件と工程および醸造に使用したクヴェヴリ



Fig. 2 栗澤ワインズにおける試験醸造(2019)

(左) 醸造に用いた白ブドウ品種オーセロワ
 (中央) 発酵0日におけるクヴェヴリ
 (右) 発酵0日におけるステンレスタンク

2. ARISA による微生物叢解析

(1) DNA 抽出

ワイン試料に直接滅菌綿棒を入れ、かくはんして菌体を採取した後、2 % 臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB, 富士フィルム和光純薬)-TEN 800 μL , 極小ガラスビーズ(BZ01) 300 mg およびガラスビーズ(BZ05) 2 個 (以上アズワン)を含む 2 mL スクリューキャップチューブ(T-204, BM)に入れてかくはんし、液中に菌体を分散させた。菌体の細胞壁を破壊するため、細胞破碎装置(BC-20, セントラル科学貿易)で破碎(2,000 r/分, 3 分) 後、ボイル処理(100 °C, 10 分)を行い、遠心上清(20,600 g, 5 分, 25 °C) 400 μL を自動核酸抽出装置(magLEAD 12gC)にセットし、専用キット(magLEAD Consumable kit, Magtration Reagent MagDEA Dx SV, 以上 PSS)を用いて、50 μL の DNA 抽出液を得た。

(2) PCR 増幅

真菌用のプライマーFun-1 および細菌用プライマーBac-2(Table 1)を用いた。PCR 反応液は 1 試料あたり注射水(日本薬局方, 大塚製薬) 14.1 μL , 10 \times Ex Taq 緩衝液 2.0 μL , 2.5 mmol/L dNTP Mixture 1.6 μL , Ex Taq 0.1 μL (BR006A, 以上 TaKaRa), 各 25 $\mu\text{mol/L}$ Primer Mix (Forward + Reverse) 0.2 μL を混合した。この反応液 18 μL を 8 連チューブに分注後、DNA 抽出液 2 μL を加え転倒混和し、サーマルサイクラー (MiniAmp, ABI) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 条件は、予備加熱(94 °C, 10 分), 熱変性(94 °C, 0.5 分), アニーリング(55 °C, 0.5 分), 伸長(72 °C, 0.5 分)とし、熱変性から伸長までの工程を 35 サイクル行った。

(3) アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅およびバンドサイズを 2 % アガロースゲル電気泳動により確認した。200 mL 三角フラスコにアガロース粉末(ultra PURE Agarose, Gibco) 4 g および 1 \times Tris Acetate EDTA 緩衝液(TAE, ニッポンジーン) 200 mL を混合後、電子レンジを用いて加熱溶解し、2 % アガロース TAE 溶液を調製した。このアガロース溶液 30 mL に 2.5 mg/mL エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) 6 μL を加え転倒混和した後、トレーに流し込み泳動ゲルを作成した。泳動には、2.5 mg/mL エチジウムブロマイド 60 μL を混合した TAE 緩衝液 300 mL を用いた。泳動時、試料に添加する $\times 6$ Loading 緩衝液は、グリセロール 15 g, ブロモフェノールブルー(以上富士フィルム和光純薬) 15 mg, 1.5 mol/L EDTA (ニッポンジーン) 3 mL に水を加え、全量を 50 mL として調製した。電気泳動装置 (Mupid-2 plus, Advance)にゲルを入れ、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 100 bp DNA Ladder (DM003-R500, GeneDireX)および $\times 6$ Loading 緩衝液 2 μL と PCR 産物 10 μL の混合液をそれぞれ 10 μL , ウェルにアプライし、100 V で 25 分電気泳動を行った。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 (FAS-III, Toyobo) を用いて増幅バンドを確認した。

(4) ARISA 解析

増幅バンドが確認された PCR 産物 10 μ L について、自動 DNA シーケンサによるフラグメント解析をファスマック社に依頼した。解析の結果、フラグメント長が ± 0.1 %の範囲にあるものは、同一種(株)の可能性があると判断した。

3. 微生物の集積および増菌培養

(1) 培地調製

汎用培地として、酵母は YPD 培地、一般細菌は SAP 培地および乳酸菌は MRS 培地を用いた。選択培地として、*Oenococcus oeni* の分離培養に M17 および Tomato 培地を用いた(Table 2)。

(2) 汎用培地

発酵 0, 7, 15, 30 および 246 日のワイン試料 2 mL に滅菌生理食塩水 18 mL を加え、ストマッキング処理(Seward Medical)を行った。滅菌生理食塩水による希釈液 0.2 mL を、各寒天培地にコンラージ棒を用いて塗抹し、YPD および SAP 培地はそれぞれ 37, 25 $^{\circ}$ C の好気条件下で 3~7 日、MRS 培地はアネロパックケンキ(三菱ガス化学)を用いて、嫌気条件下で 7~14 日培養した。

(3) 選択培地

クヴェヴリで発酵させたワイン中の乳酸菌を分離するため、乳酸菌用の MRS および M17 培地、さらに *O.oeni* の培養に適した Tomato 培地を用いて分離培養を行った。QS の内、ARISA 菌叢解析によって特異的な細菌のピークが確認された発酵 130 日、*Lactobacillus* 属のピークが確認された 191 日、*O.oeni* のピークが確認された 246, 261 および 261 日時点のワイン(結果 (I), 17 頁)と澱の混液を試料とした。3.(2)にしたがいストマッキング処理を行い、各培地に画線した後、アネロパックケンキを用いて、嫌気条件下で 7~14 日培養した。

(4) 増菌培養

各寒天培地に認められた単一コロニーを、滅菌綿棒あるいは白金線で釣菌した後、YPD、MRS または Tomato 液体培地に菌体を接種し、寒天培地と同じ条件で培養を行った。SAP 培地の細菌については新しい寒天培地に画線し、増菌培養を行った。M17 培地については、コロニーが確認できなかつたため、増菌培養は実施しなかつた。

Table 1 遺伝子解析に用いた PCR プライマー

対象	Primer mix	Target	Forward	Reverse	Annealing (°C)	文献
細菌	Bac-2	ITS	ITSF	ITSReub	55	日微生物誌2007 ¹⁷⁾
真菌	Fun-1	ITS	2234C	3126T	55 or 60	
	Fun-2	ITS	1406F	3126T	55	
	Fun-3	ITS	ITS1F	ITS1R	55	HUDAGLA ¹⁸⁾ (修士論文, 2019)
	Fun-5	D1/D2	NL1	NL4	55	

Table 2 微生物の培養に用いた培地

酵母汎用培地: YPD		標準寒天培地: SAP	
蒸留水	200 mL	蒸留水	500 mL
酵母エキス(Bacto)	2.0 g	標準寒天培地(栄研化学)	11.8 g
ポリペプトン(日本製薬)	4.0 g		
グルコース(富士フィルム和光純薬)	4.0 g		
クロラムフェニコール(ナカライテスク)	0.02 g		
プロピオン酸ナトリウム(富士フィルム和光純薬)	0.4 g		
[寒天培地調製時 アガロース(伊那食品)]	4 g]		
乳酸菌用培地: MRS		理研 BRC 143 Leuconostoc Oenos medium: Tomato	
蒸留水	500 mL	蒸留水	900 mL
MRS寒天培地(関東化学)	31 g	カゼインペプトン(Becton Dickinson)	10.0 g
炭酸カルシウム(富士フィルム和光純薬)	5 g	酵母エキス(Bacto)	5.0 g
		グルコース*	7.0 g
		フルクトース*	5.0 g
		リボース*	3.0 g
		硫酸マグネシウム七水和物*	0.2 g
		硫酸マンガン五水和物*	0.05 g
		クエン酸二アンモニウム*	3.5 g
		Tween 80(Sigma)	1.0 mL
		トマトジュース(市販品, ろ過)	100 mL
		L-システイン(日本理化学薬品)	0.5 g
		[寒天培地調製時 アガロース(伊那食品)]	20 g]
乳酸菌用培地: M17			
A			
蒸留水	270 mL		
M17 Agar(関東化学)	14.5 mL		
B			
蒸留水	30 mL		
乳糖(富士フィルム和光純薬)	3 g		
A,Bはそれぞれ調製し, オートクレーブ後に混合			
		* 富士フィルム和光純薬	
		各培地はオートクレーブにより滅菌(121 °C-20分)	

4. MALDI-TOF/MS による微生物種の同定

(1) 試薬

マトリックス(HCCA, α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)およびキャリブレーションスタンダード(BTS: Bacterial Test Standard, 以上 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) 50 mL に蒸留水 21.4 mL を加えた 70 % ギ酸溶液およびアセトニトリル(HPLC 用, 以上富士フイルム和光純薬)を使用した。

(2) タンパク質抽出

YPD, MRS および Tomato 液体培地においては、菌体増殖が確認された培養液を用いてタンパク質抽出を行った。菌体(白色沈き)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(9,200 g, 5 分, 25 °C)後、上清をデカンテーションにより除去した。注射水(日本薬局方, 大塚製薬) 300 μ L を加え、沈きをボルテックスにより良くかくはんした後、99.5 % エタノール(特級, 富士フイルム和光純薬) 900 μ L を加え、再度良くかくはんした。遠心上清(20,600 g, 2 分, 25 °C)を除去し、再度チューブをスピンドウンし、残液を完全に除去した後、70 % ギ酸溶液 20 μ L を加えかくはんし、アセトニトリル 20 μ L を添加した。再度かくはん後、遠心上清(20,600 g, 2 分, 25 °C) 10 μ 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 測定

YPD, MRS および Tomato 培地によって分離された菌については、上述のタンパク質抽出液 1 μ 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-ECIIB, Hitachi)内で送風乾燥させた。SAP 培地については、寒天培地上のコロニーから、滅菌した爪楊枝を用いて菌体を採り、Target Plate に直接塗布するセルスマ法を適用した。これらの菌体スポット上にマトリックス 1 μ 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)の分子量範囲を解析に用い、菌種に固有のタンパク質マスマスペクトルパターンから菌種を同定した。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た(一致率=スコア値(Score Value) 2.0 以上で種レベルの同定)。

5. DNA 塩基配列解析による同定

(1) DNA 抽出および PCR 増幅

増菌培養を行った液体培地 200~500 μL を 1.5 mL チューブに採り、遠心(20,600 g, 5 分, 25 $^{\circ}\text{C}$)後、上清を除き、0.2% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.2, 以上富士フイルム和光純薬) 800 μL を加え、かくはんした後、全量をガラスビーズ入りの 2 mL スクリューキャップチューブに移した。以降、第I章 2.(1)~(3)にしたがって、DNA 抽出、PCR 増幅およびアガロースゲル電気泳動を行った。このとき、PCR 増幅には、細菌用プライマーBac-2 (Table 1)を使用し、サイクル数は 30 とした。

(2) DNA 塩基配列解析

電気泳動によって確認したバンドの強度に基づき、PCR 産物 2 μL を注射水で 10~50 倍希釈した。PCR 増幅に使用したプライマーBac-2 に対応する、1.61 pmol/ μL forward プライマー ITSF あるいは reverse プライマーITSReub 4 μL を含む 8 連チューブに、希釈した PCR 産物 10 μL を入れ、よく混和した後、DNA 塩基配列解析をファスマック社に依頼した。

得られた塩基配列データを用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST により相同性検索を行い菌種同定した。この際、97% 以上の一致率を示した場合、同種であると判断した。

6. ARISA による微生物固有フラグメント解析

増菌培養を行った液体培地 200 μL を 1.5 mL チューブに採り、遠心(20,600 g, 5 分, 25 $^{\circ}\text{C}$)後、上清を除き、0.2% SDS-PBS 800 μL を加え、かくはんした後、全量をガラスビーズ入りの 2 mL スクリューキャップチューブに移した。以降、2.(1)~(4)にしたがって DNA 抽出、PCR 増幅およびアガロース電気泳動を行い、フラグメント解析を依頼した。ただし、PCR 増幅は同様の条件で 30 サイクルとした。

7. 酵素法によるグルコース、エタノールおよびグリセロールの測定

各脱水素酵素により基質が酸化される際、 $\beta\text{-NAD}^+$ と酸化還元酵素ジアホラーゼ(DP)の共存下、ニトロテトラゾリウムブルー(NTB)から青紫色のホルマザンが生成することを利用した酵素法を用いた。

(1) 試薬

1) 酵素

グルコース脱水素酵素(GlcDH), エタノール脱水素酵素(ADH), DP(以上富士フイルム和光純薬)およびグリセロール脱水素酵素(GlyDH, Sigma)を用いた。GlcDH 100 U, GlyDH 250 U,

DP 1,000 U をそれぞれ、PBS 14, 5 および 10 mL に溶かし、7.1, 50 および 100 U/mL 酵素液を調製し、0.6 mL チューブに分注後、-30 °Cで保存した。ADH は-30 °C保存の原液 1,940 U 20 μ L を PBS 3,200 μ L で希釈し、用時調製した。

2) 緩衝液

グルコースおよびエタノール測定には、Tris 12.1 g に蒸留水 400 mL を加え、1 mol/L HCl で pH 8.9 に調整し、10 % Triton X-100 5 mL を加えた後、全量を 500 mL とした 0.2 mol/L Tris \cdot HCl - 0.1 % (W/V) Triton X-100 緩衝液(pH 8.9)を用いた。

グリセロール測定には、0.2 mol/L 炭酸緩衝液(pH 10.0)を用いた。それぞれ Na₂CO₃ 10.6 g および NaHCO₃ 8.4 g (以上富士フィルム和光純薬)を、蒸留水で溶解し、全量を 500 mL とした。ビーカー(500mL)に 0.2 mol/L NaHCO₃ を入れ、0.2 mol/L Na₂CO₃ を加え、pH 10.0 に調整した。無水硫酸ナトリウム 11.2 g を蒸留水で溶解し、全量を 250 mL とし 0.34 mol/L 硫酸ナトリウムを調製した。

3) 基質液に用いる試薬

β -NAD⁺(富士フィルム和光純薬) 0.2 g を蒸留水 50 mL に溶かして 6 mmol/L β -NAD⁺溶液を調製し、1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注した後、-30 °Cで保存した。Nitro-TB(富士フィルム和光純薬) 0.4 g を蒸留水 50 mL に溶かして 10 mmol/L NTB 溶液を調製し、1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注した後、-30°Cで保存した。

(2) 標準溶液

1) グルコース溶液

グルコース(富士フィルム和光純薬) 1 g を蒸留水 50 mL に溶かし、-30 °Cで保存した 2 % グルコース原液 100 μ L に蒸留水 400 μ L を加え、0.4 %グルコース標準溶液を用時調製した。

2) エタノール溶液

エタノール(特級 99.5 %，富士フィルム和光純薬) 400 μ L を蒸留水で 50 mL に希釈調製し、0.8 %エタノール標準溶液とした。

3) グリセロール溶液

グリセロール(富士フィルム和光純薬) 0.368 g を蒸留水 100 mL に溶かし 40 mmol/L グリセロール標準溶液とした。

(3) 試薬前処理

グルコースおよびエタノールについては、蒸留水 900 μ L を含む 1.5 mL チューブに、ワイン試料の遠心上清(20,600 g, 5 分, 25 °C) 100 μ L を採り、活性炭 0.02~0.025 g を加えた。ボルトテックス 15 秒の後、遠心上清を新しい 1.5 mL チューブに採り、10 倍希釈試料液とした。新しい 1.5 mL チューブに蒸留水 700 μ L と 10 倍希釈試料液 100 μ L を入れ、混合し、測定用

80 倍希釈試料液とした。

グリセロールについては、ワイン中に含まれるグリセロール脱水素酵素の活性阻害因子を確実に除去するため、試料のボイル処理を行い、試料に対する活性炭量と振とう時間を増やした。ボイル処理(100 °C, 5 分)を行った試料の遠心上清(20,600 g, 5 分, 25 °C) 100 μ L を、蒸留水 4,900 μ L を含む 15 mL チューブに採り、活性炭約 0.2 g を入れ、かくはん機(ダイレクトミックス TS-50, サーマル化学産業)で 5 分間激しく振とうした。遠心上清(10,400 g, 5 分) 2,500 μ L を、蒸留水 2,500 μ L を含む新しい 15 mL チューブに採り、同様の振とうと遠心分離を繰り返した後、活性炭を除くため、上清を 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、測定用 100 倍希釈試料液とした。

(4) 酵素反応液の調製

グルコースおよびエタノールの測定は、6 mol/L β -NAD⁺ 1mL を含む 15 mL チューブに、0.2 M Tris \cdot HCl - 0.1 %(w/v) Triton X-100 緩衝液 3 mL, 10 mmol/L NTB 0.5 mL を加えたものを、基質試液とした。グリセロール測定には、Tris-Triton 緩衝液 3 mL を、0.2 mol/L 炭酸緩衝液 2.5 mL と 0.34 mol/L Na₂SO₄ 0.5 mL に置き換えたものを用いた。

酵素試液は、グルコース、エタノール、グリセロールそれぞれについて、蒸留水(0.2, 0.17, 0.32 mL), 各脱水素酵素(0.1, 0.03, 0.08 mL), 100 U/mL DP (0.2, 0.3, 0.1 mL)を合わせて調製した。

試料の着色あるいは非特異反応の影響を防ぐため、酵素試薬の脱水素酵素と DP を蒸留水に置き換えたブランク試液を併せて調製した。

(5) 酵素法による測定

1) 標準液希釈系列

各標準溶液を 96 ウェル平底マイクロプレート(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、各測定に合わせた希釈系列を作成した。

2) 試料液希釈系列

前処理した測定試料を各ウェルへ 50 μ 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。

3) 発色反応

マイクロプレートウェル内の標準および試料希釈溶液 50 μ L に、酵素反応試液およびブランク試液 50 μ L を分注した。プレートを遮光し、使用する酵素 GlcDH, ADH および GlyDH に応じて、室温-30 分, 37 °C-30 分および 37 °C-2 時間の反応を行い、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。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き、検量線から求めた試料

希釈液の濃度に希釈倍率を乗じ、元試料中の濃度を算出した。

8. HPLC による有機酸測定

(1) 試料前処理

蒸留水 400 μL および 1 % リン酸 100 μL を含む 2 mL スクリューキャップチューブに試料 500 μL を加え、ボイル処理 (100 $^{\circ}\text{C}$, 10 分) の後、遠心(20,600 g, 10 分, 25 $^{\circ}\text{C}$)して得られた上清約 800 μL を 0.45 μm メンブレンフィルターを用いてろ過した。ろ液をオートサンプラー用ガラスバイアル瓶(Thermo)に集め、プラスチックキャップで密封した。

(2) 標準溶液

測定に用いる有機酸は、L-乳酸、DL-リンゴ酸(いずれも特級、富士フィルム和光純薬)を用い、それぞれ 90 mg, 134 mg を蒸留水 10 mL に溶かして 10 mmol/L とした後、ガラスバイアル瓶に入れ-30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。測定時には融解後、よく混和しそのまま使用した。

(3) HPLC 測定

測定には、送液ポンプ(LC-6A)、オートサンプラー(SIL-10ADVP)、検出器(SPD-6A、以上島津製作所)、カラム(InertSustain C18, 5 μm , 4.6 \times 150 mm, ジーエルサイエンス)を使用した。オートサンプラーに、蒸留水、有機酸標準溶液、前処理した試料、標準溶液の順にセットし測定を行った(Table 3)。

Table 3 HPLC による有機酸の測定条件

サンプル注入量	: 10 μL		
注入サイクル	: 45分		
カラム温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$		
検出波長	: 210 nm		
溶離液A	: 0.1 %リン酸水溶液		
溶離液B	: 0.1 %リン酸アセトニトリル溶液		
グラジェント	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	99	1
	15.0	50	50
	25.0	50	50
	25.1	99	1
	30.0	99	1

9. GC/MS による香気成分分析

(1) 試薬

1) 溶媒抽出液

共栓三角フラスコに、用時、ジエチルエーテル(特級, ナカライテスク)およびヘキサン(特級, 純正化学)を等量混合し, 溶媒抽出液(エーテル:ヘキサン)とした。

2) 内部標準溶液

3-オクタノール (東京化成工業) 611 μL にヘキサン 50 mL を加え, 10 mg/mL の 1 次ストックを調製し 5 mL バイアル瓶に分注して $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。測定試料調製時には, 10 mg/mL 3-オクタノール溶液 1 mL をヘキサン 4 mL で希釈した 2.5 mg/mL 3-オクタノール溶液を内部標準として使用した。

(2) 試料前処理

ワイン試料の遠心上清(16,200 g, 5 分, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 2 mL を, 塩化ナトリウム約 0.5 g, 溶媒抽出液 0.6 mL, 2.5 mg/mL 3-オクタノール溶液 40 μL を含む 5 mL 共栓ガラス試験管に入れ, かくはん機で 5 分間激しく振とう後, 遠心上清(1,460 g, 10 分, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) を, 無水硫酸ナトリウム約 1 g を入れた新しい 5 mL 共栓ガラス試験管に分取した。試験管中の水層に再び溶媒抽出液 0.6 mL を加え, 振とうから遠心上清分取までを行った。同様の操作をもう一度, 合計 3 回行い, 2 mL バイアル瓶に合わせた抽出液を測定試料とした。

(3) GC/MS 分析

測定には, GC (6890N, Agilent Technologies), カラム(InertCap Pure-Wax, 0.25 mm i.d. \times 30 m, 膜厚 0.25 μm), MS (JMS-K9, 日本電子)を用いた(Table 4)。得られた各化合物の面積値と, 内部標準である 3-オクタノールの比から, 簡易的な濃度を算出し, 濃度レベルによって 2 グループに分け, 解析を行った。

10. ICP/MS による金属元素分析

(1) 試料前処理

ワイン試料 0.9 mL を硝酸, 過酸化水素によるマイクロウェーブ分解の後, 全量を 25 mL として測定に用いた。

(2) ICP/MS 分析

ICP/MS (7800), オートサンプラー(I-AS, 以上 Agilent Technologies)を用いた(Table 5)。測定後, 化合物を濃度レベルによって 4 グループに分け, 解析を行った。

Table 4 GC/MS による香気成分分析条件

GC

キャリアガス : He
サンプル注入量 : 1 μ L
注入法 : スプリットレス
注入口温度 : 230 $^{\circ}$ C
昇温条件 : 50 $^{\circ}$ C-5分, 3 $^{\circ}$ C/分, 240 $^{\circ}$ C-20分

MS

イオン源温度 : 240 $^{\circ}$ C
インターフェース温度 : 240 $^{\circ}$ C
イオン化電流 : 300 μ A
イオン化エネルギー : 70 eV
検出器電圧 : 1300 V

Table 5 ICP/MS による金属元素分析条件

測定モード : スペクトル分析(6ポイント)
繰り返し回数 : 1回
スイープ回数/繰り返し : 100
チューンモード(セルガス) : He
サンプル導入 : ペリポンプ
ネブライザタイプ : マイクロミスト

結果(I)

1. 試験醸造

(1) 2018 年(予備試験)

気泡が発生し、アルコール発酵は進んだものの、熟成の早い段階で、すべてのタンクに産膜を認めた(Fig. 3). ボトリング時の試飲では、揮発酸(酢酸)臭が強く感じられた。

(2) 2019 年(本試験)

発酵から熟成にかけて、強い揮発酸臭は感じられなかった。発酵約 200 日時点で産膜が認められたが、その影響は表面に留まっており、プレス後のワインに、産膜酵母特有(シェリー酒、アーモンド様)のにおいはほとんど感じられなかった。醸造家 3 名および著者でテイastingを行った結果、発酵 3 条件で明らかな風味の違いが感じられた(Fig. 4, Table 6).

2. ARISA による微生物叢解析

発酵および熟成にしがたい、各条件において明らかに異なる微生物叢が見られた(Fig. 5). 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, 824.2 bp)が見られ、自然発酵を行った SS および QS には灰色カビ病および貴腐化を引き起こす *Botrytis cinerea* のピークが見られた。しかし、7 日では *B. cinerea* のピークは見られなくなり、SS では細菌類が増殖し、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(Tabel 7)が見られた。また、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 15 日では SC において、市販酵母および *S. cerevisiae* 野生株と思われる未同定酵母のピーク(823.9 bp)が見られ、SS においても *S. cerevisiae* 野生株 A のピークが現れた。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。*K. apiculata* はその後、ボトリング後の 261 日まで、一定してピークが維持された。発酵 130 日では、SC にのみ、マロラクティック発酵を行うことで知られる *O. oeni* のピークが見られ、以降 261 日まで大きなピーク高を示し続けた。*S. cerevisiae* は野生株 A のピークが全ての条件で存在するが、SS においてのみ野生株 B 固有のダブルピークも見られた。発酵 191 日ではすべての条件において、*S. cerevisiae* の異なる野生株と思われる未同定酵母のピーク(825.2 bp)が、QS にのみ *Lactobacillus* 属細菌のピークが見られた。ボトリングを行った発酵 246 日では、SS と QS においても *O. oeni* のピークが出現するようになった。*S. cerevisiae* はすべての条件で野生株 A のピークが見られたが、SC においては、15 日の SC に見られた未同定酵母と一致するピーク(823.5 bp)が再び確認された。発酵 261 日では、SC および SS において *S. cerevisiae* 野生株 B のピークが見られたものの、QS にはこれらの *S. cerevisiae* のピークは認められなかった。

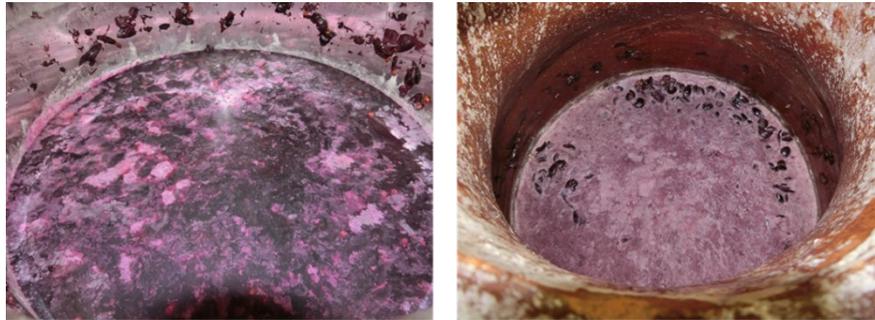


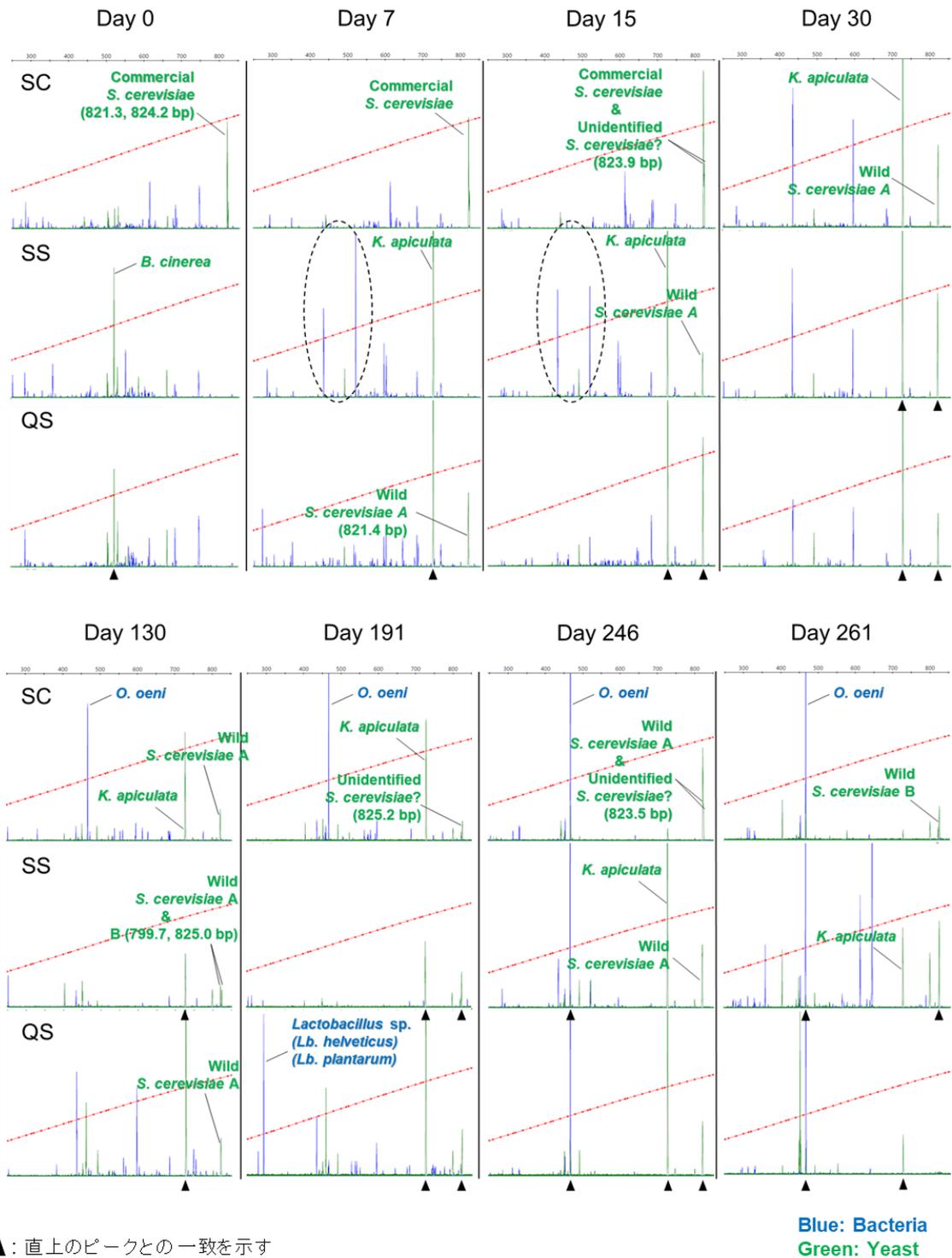
Fig. 3 熟成中に産膜が認められた試験醸造ワイン(2018年)



Fig. 4 瓶内熟成を終えた試験醸造ワイン(2019年)

Table 6 試験醸造ワインのテイastingコメント

条件	容器	酵母	テイastingコメント
SC	ステンレスタンク	市販	突出したアルコール香, やや高い揮発酸, フラットな味わい, 酸化臭, 産膜臭, さわやか
SS	ステンレスタンク	野生	強い揮発酸, 産膜臭, ポリューム感, さわやか
QS	クヴェヴリ	野生	杏子や梅のような有核果実, ジャスミンのような香り 口に入れた後の広がりがある, まとまり(一体感)がある



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

Fig. 5 発酵および熟成による ARISA 微生物叢の変化

3. 微生物の分離培養および同定

(1) 汎用培地

発酵および熟成段階に応じて、いくつかの酵母、カビの増殖が見られた(Fig. 6). YPD および SAP 培地においては、発酵 0 日で多様なコロニーが見られ、特にカビ様の真菌が多かった。7 日では、YPD 培地の SS および QS で酵母様コロニーが見られた。発酵 15 日および 30 日の試料からは、全ての培地においてコロニーが確認されなかった(結果は 30 日のみを示した)。発酵 246 日では、いずれの培地においても、特に QS から多くの酵母様コロニーが見られた。MRS 培地には、すべての発酵期間を通して、ほとんどコロニーが見られなかったが、246 日の QS において多数のコロニーが出現した。

(2) 選択培養

クヴェヴリを用いたワイン試料の内、発酵 246 および 261 日のワインと澱の混液を使用した培地から、多数のコロニーが確認された(Fig. 7)。このとき、澱との混液を用いた培地には特に多数のコロニーが密集して存在していた。QS、246 日の培地からシングルコロニーを釣菌し、Tomato 液体培地で増菌培養を行った後、TOF/MS および DNA 塩基配列解析によって菌種を同定した。ARISA 菌叢解析で、*Lactobacillus* 属のピークが見られた 191 日および *O.oeni* のピークが確認されている 261 日の培地においては、この培養条件では、いかなるコロニーも認められなかった。

(3) MALDI-TOF/MS による同定

YPD および MRS 培地から得られたシングルコロニーを増菌培養した 20 試料の MALDI-TOF/MS 同定結果は、すべてスコア値が 2.0 以上であり、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(Table 7)。

(4) DNADNA 塩基配列解析による同定

Tomato 培地から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、DNA 塩基配列解析から BLAST による相同性検索を行った結果、すべてにおいて 100 % の一致率で *O.oeni* であると同定された(Fig. 8)。なお、これらのコロニーは MALDI-TOF/MS ではシグナル不足のため同定不能であった。

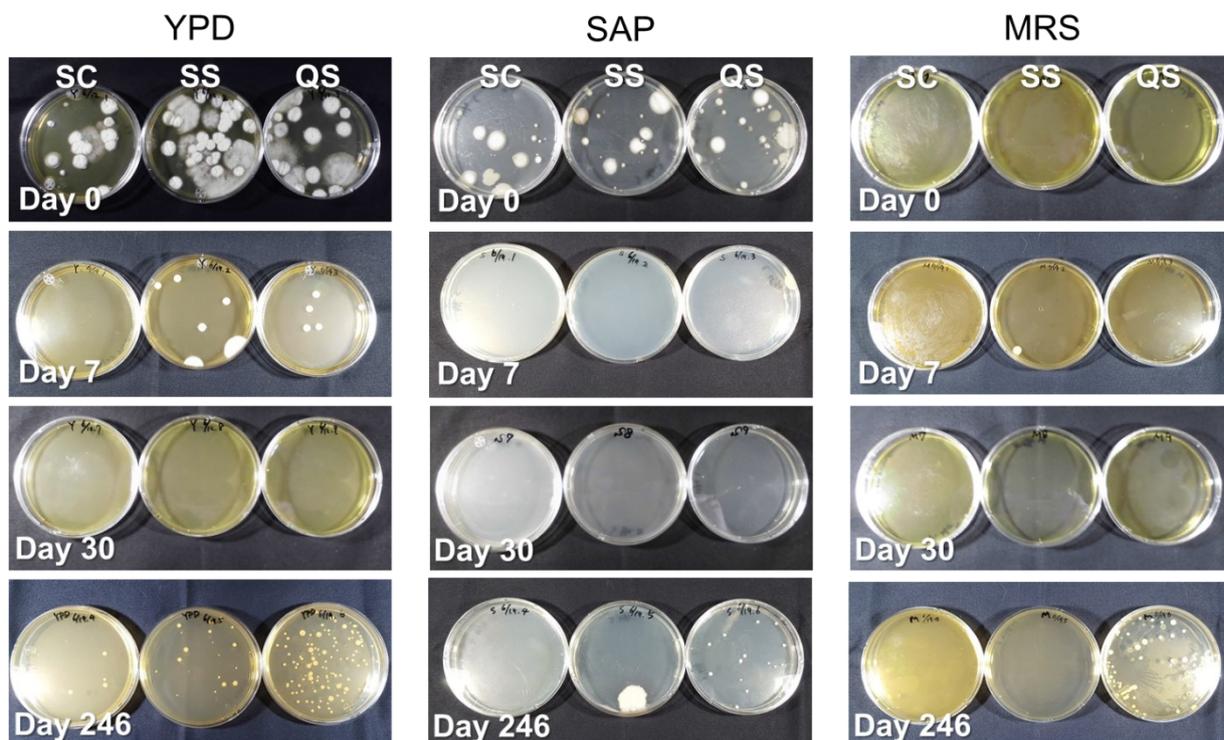
4. ARISA フラグメント解析

MALDI-TOF/MS により同定された *K. apiculata* 3 株および *S. cerevisiae* 17 株について、ARISA フラグメント解析を行った結果、*K. apiculata* は同一株と判断され、*S. cerevisiae* は 3 株にタイピングされた(Table 7)。

Table 7 MALDI-TOF/MS による微生物の同定と
ARISA 固有フラグメントサイズ

株	種	同定スコア	ARISA固有	
			フラグメントサイズ (Fun-1 Primer)(bp)	分離源
-	<i>Kloeckera apiculata</i>	2.601	728.3	Day 7 SS, QS
A	<i>S. cerevisiae</i>	2.136	821.4	Day 246 SC, QS
B	<i>S. cerevisiae</i>	2.189	799.7, 825.0	Day 246 SC, SS, QS
C	<i>S. cerevisiae</i>	2.161	820.7	Day 246 SS, QS

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



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

Fig. 6 汎用培地による酵母(YPD), 細菌(SAP)および
乳酸菌(MRS)の培養結果



Fig. 7 Tomato 培地による *O.oeni* 分離培養結果

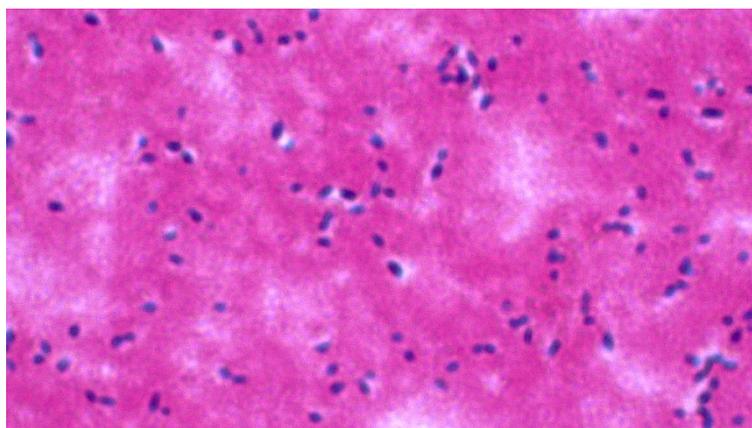


Fig. 8 試験醸造ワイン 2019 より分離された *O.oeni* のグラム染色像

5. 酵素法による主要成分分析

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. 9).

グルコースは、発酵 0 日において 9.1~9.7 %であったが、7 日には SC および QS でそれぞれ 1.2, 1.6 %まで減少し、SS では 4.6 %と、他 2 条件と比べてやや高値であった(Fig. 9). 発酵 15 日にはすべての条件で 0.2~0.3 %に低下し、その後一定であった.

エタノールは、発酵 0 日において SC, SS および QS で、それぞれ 1.5, 0.9 および 0.6 %であった. 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 %であり、QS がやや高値となった. 発酵 15 日においては、SC, SS および QS で、それぞれ 12.4, 10.6 およ

び 10.6 %となり、自然発酵条件(SS, QS)のエタノール濃度が顕著に増加した。発酵 130 日まででは、おおよそ一定レベルで推移したが、それ以降漸減し、最終的にはそれぞれ 10.0, 8.9, 9.1 %となった。

グリセロールは、発酵 0 日で SC, SS および QS において、10.3, 8.3 および 5.9 mmol/L であったが、7 日でそれぞれ 40.3, 26.4 および 34.3 mmol/L まで上昇しており、SC, QS, SS の順で高値となった(Fig. 9)。発酵 15 日ではそれぞれ 43.3, 41.8, 32.7 mmol/L, 30 日では 31.2, 29.6, 32.7 mmol/L となり、発酵条件による差はほとんど見られなくなった。しかし、発酵 130 日で SC および SS はそれぞれ 45.3, 42.7 mmol/L まで再び増加し、191 日で 40.0, 42.7 mmol/L であったが、QS はそれぞれの時点で 31.5 mmol/L と、一定値を維持した。発酵 246 日では 40.0, 37.3, 37.1 mmol/L となり、市販酵母を添加した条件(SC)と、自然発酵条件(SS, QS)で傾向が分かれる形となった。発酵 261 日でも同様の傾向が続き、それぞれ 42.7, 37.3, 34.4 mmol/L であった。

6. HPLC による有機酸測定

リンゴ酸は、発酵 0 日において、いずれも約 4 mg/g であり、7 日に SC, SS および QS それぞれで 5.2, 5.1 および 4.9 mg/g となった後、以降は漸減する傾向にあった(Fig. 10)。SC については 15 日と 130 日で、自然発酵条件(SS, QS)に比べて明らかな減少が見られた。

乳酸は、発酵 0 日では確認されず、SC および QS では 7 日(0.85, 0.59 mg/g), SS では 15 日(0.68 mg/g)に産生が認められた(Fig. 10)。発酵 30 日ですべての条件において約 0.3mg/g まで減少した後、SC は 130 日で 1.74 mg/g まで急増し、以降漸増した。一方 SS は 30 日以降漸減し、QS は一定の傾向にあったが、261 日に両者で著増が見られ、最終的には、いずれも 2.19~2.32 mg/g, まで上昇した。

7. GC/MS による香気成分分析

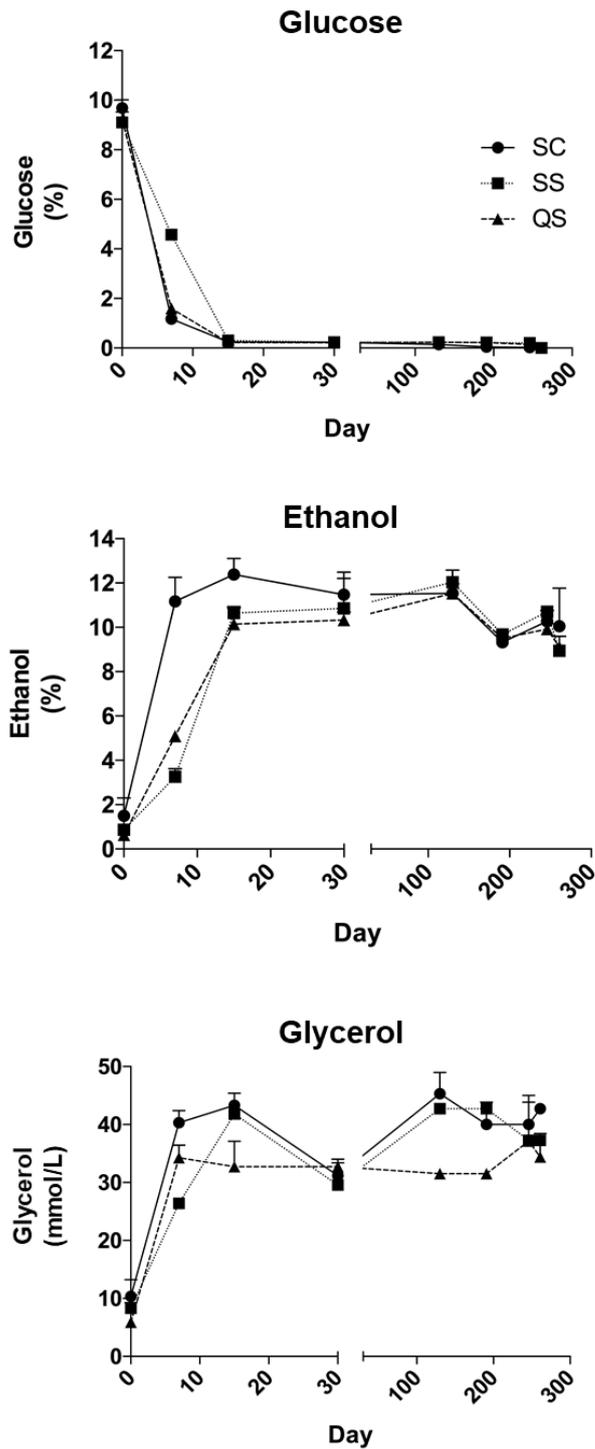
発酵 0 日ではすべての条件において、ワインの香りに関わる化合物はほとんど見られなかったが、7 日には、30 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度レベルで、イソアミルアルコールおよびフェネチルアルコールが SC で著増し、SS では緩やかに、QS は SS に比べやや大きく増加した(Fig. 11)。発酵 15 日ではすべての条件で、これら 2 つの化合物が一定値まで増加し、30 日にかけて SC および QS ではやや低下、SS ではやや増加の傾向を示し、以降はほぼ一定であった。乳酸エチル、コハク酸モノエチルおよびコハク酸ジエチルは、SC で 30 日以降から漸増したのに対し、自然発酵条件(SS, QS)では SC に比べ、かなり緩やかであった。

これに対し、より濃度が低い化合物(30 $\mu\text{g/mL}$ 未満)については、各条件で差がなく、お

よそ同様の傾向を示した(Fig. 12). プロパノールは SC において発酵 7 日, SS および QS では 7~15 日にかけて著増し, 以降はほぼ一定であった. その他の化合物については, 15~30 日までに大きく増加し, 以降は微増もしくは一定であった. その中で 4-エチルフェノールのみ, 発酵 261 日で増加が見られたが, それ以外は 246 日の値より減少していた. ワイン中に認められた代表的な化合物の閾値と香りについて, 文献をもとに Table 8 にまとめた.

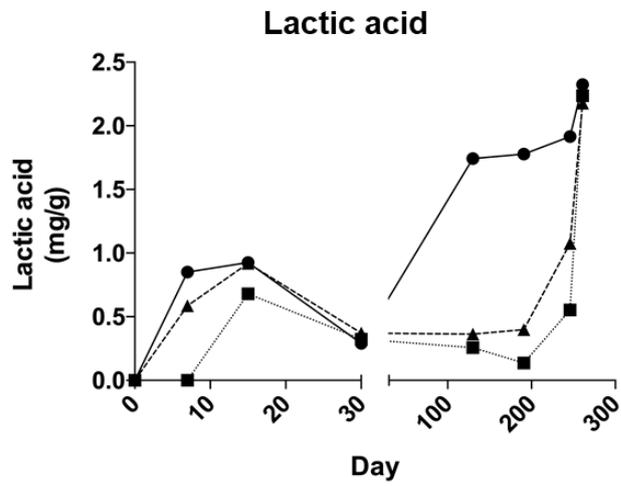
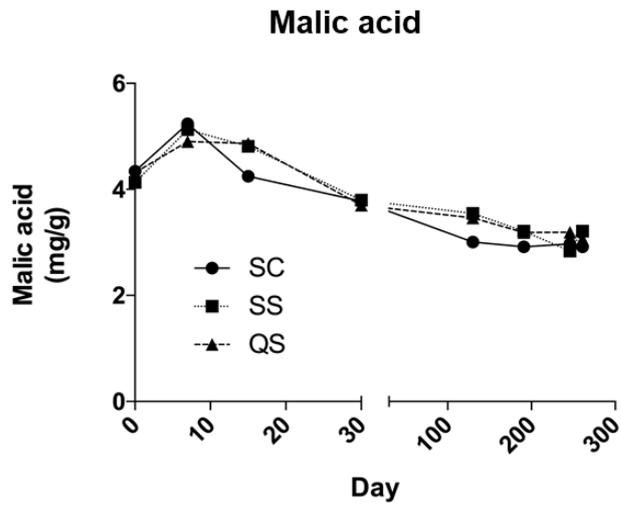
8. ICP/MS による金属元素分析

発酵 0 日では, 各発酵条件によって金属元素の組成に大きな違いは見られないものの, 市販酵母を添加した SC において, Sn が他よりもやや高値であった(Fig. 13). ボトリングを終えた 261 日は, 0 日と比較してすべての条件において 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. 発酵 261 日の各条件を比較すると, Mg, Ca, Mn, Fe および Sr は QS において特徴的に増加していた.



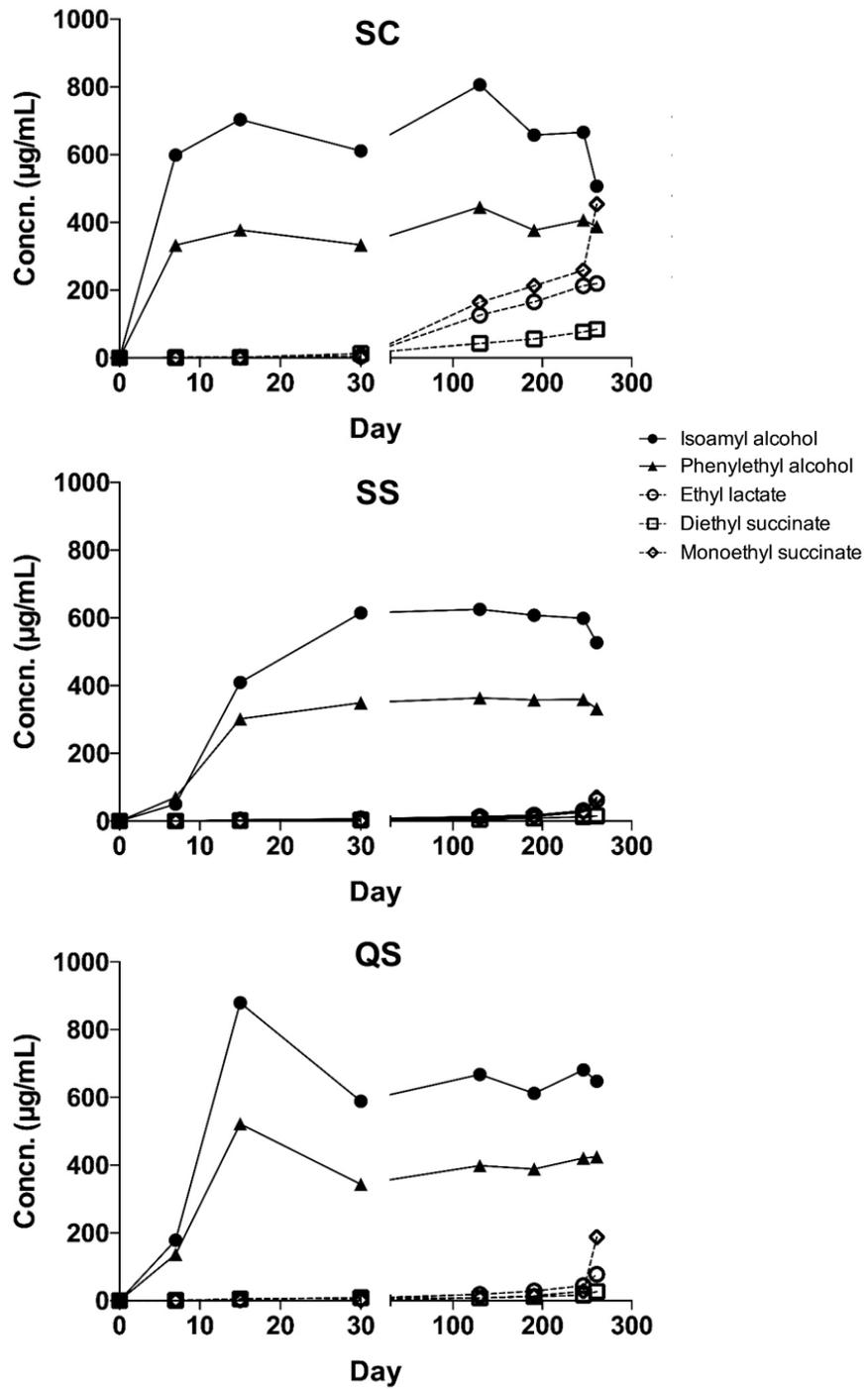
SC: Stainless steel tank-Commercial yeast
 SS: Stainless steel tank-Spontaneous fermentation
 QS: Qvevri-Spontaneous fermentation

Fig. 9 発酵および熟成による主要成分の変化



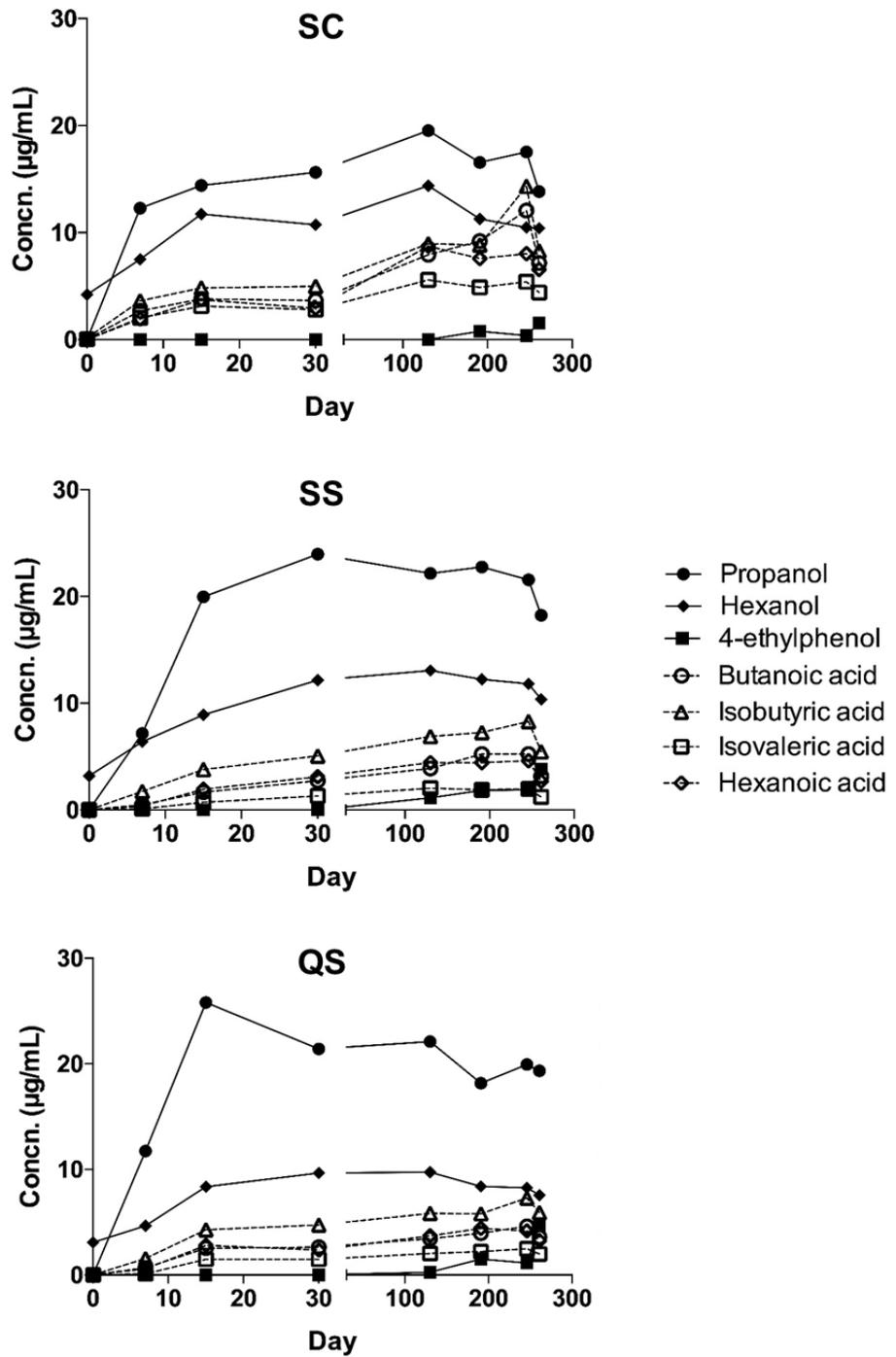
SC: Stainless steel tank-Commercial yeast
 SS: Stainless steel tank-Spontaneous fermentation
 QS: Qvevri-Spontaneous fermentation

Fig. 10 発酵および熟成による有機酸の変化



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

Fig. 11 発酵および熟成による香気成分の変化 1/2 (30 µg/mL以上)



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

Fig. 12 発酵および熟成による香気成分の変化 2/2 (30 µg/mL未満)

Table 8 代表的な香気成分の香りおよび閾値

Compound	Odour descriptor	Threshold (µg/mL)
Isoamyl alcohol	alcohol, harsh ^{*1} , bitter	30
Phenylethyl alcohol	rose, honey	14
Propanol	alcohol, fresh, ripe fruit	50
Hexanol	green, grass	8
4-ethylphenol	animal, leather,	0.035
Ethyl lactate	buttery, raspberry	14
Diethyl succinate	fruity, floral, winelike	200
Butanoic acid	cheese, rancid ^{*2} , floral	0.17
Isobutyric acid	phenolic, fatty	2.3
Isovaleric acid	rancid ^{*2}	0.033
Hexanoic acid	cheese, rancid ^{*2} , green	0.42

Li, H., et al., Eur Food Res Technol, 2008.¹⁹⁾
 Culleré, L., et al., Red Wine Technology, 2019.²⁰⁾
 Moyano, L. et al., J. Agric. Food Chem., 2002.²¹⁾

^{*1} 鼻を突くにおい
^{*2} 腐敗臭, 悪臭

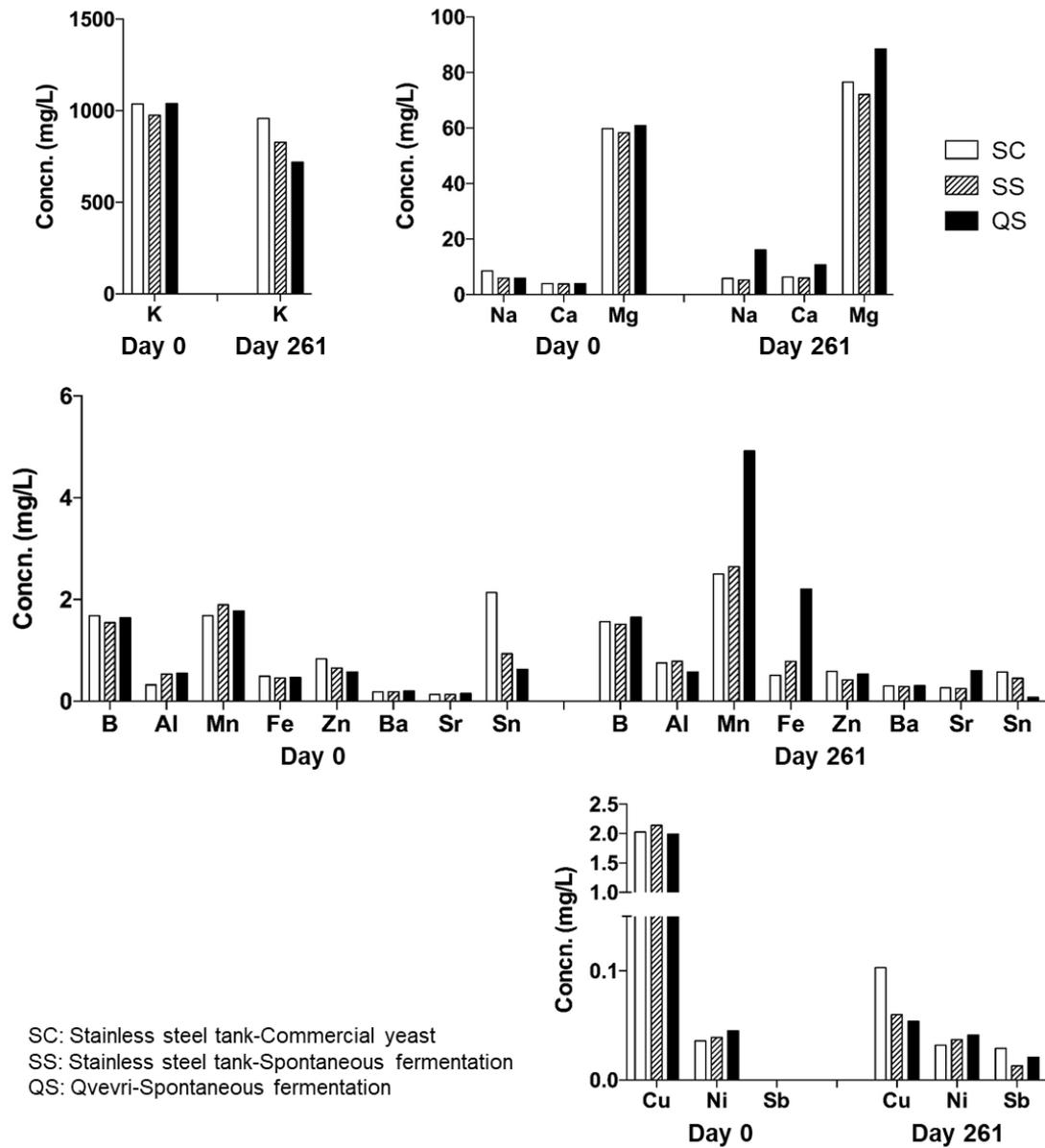


Fig. 13 発酵 0 および 261 日における金属元素の変化

考察(I)

最初の醸造試験(予備試験)を行った 2018 年は悪天候が続き、全道的にブドウ栽培が難しい年であった。試験醸造に使用したツヴァイゲルトレーベの収穫時期にも雨天が続き、原料ブドウのコンディションを整えられなかったことや、小ロットでの醸造であったことが影響し、揮発酸濃度の高いワインとなったことが考えられる。ARISA 微生物叢解析では、発酵初期から灰色かび病原菌である *B. cinerea* や、酢酸菌である *Acetobacter aceti* の存在が認められた(データ示さず)。このため、試験醸造には可能な限り健全なブドウを用いる必要があると判断し、2019年の試験醸造(本試験)では成熟が早い白ブドウ品種を用いることとした。

本試験を行った 2019 年は、天候に恵まれた良いヴィンテージとなり、健全な醸造用ブドウ(オーセロワ)が収穫された。予備試験のときのような揮発酸の異常高値などは認められず、ワインの味わいに明らかな差が生じたこと(Table 6)は、発酵条件が影響を与えたものと考えられる。

ARISA 微生物叢解析の結果、市販酵母を添加した場合においても、*S. cerevisiae* 野生株が優勢になる菌叢交代が起こっている可能性が高いことがわかった(Fig. 5)。培養と MALDI-TOF/MS で分離同定された野生 *S. cerevisiae* は、ARISA フラグメント解析によって 3 株にタイピングされており(Table 7)、微生物叢解析では、*S. cerevisiae* と考えられる未同定酵母のピーク(823.5, 823.9 および 825.2 bp)が認められている。これらの結果から、発酵および熟成中に、複数の *S. cerevisiae* による菌叢交代が起こっている可能性が示唆された。SC において、発酵 15 および 246 日で見られた未同定酵母(823.5, 823.9 bp)は、フラグメント長が±0.1%の範囲にあり、同一株と考えられた。さらに、自然発酵条件(SS, QS)においては認められなかった *O. oeni* が SC では先行して出現したことも含め、スターター酵母がアルコール発酵終了後の菌叢にも影響を与えていること(Fig. 5)は、非常に興味深い新たな知見と言える。これは、試験に用いた市販酵母が、澱との熟成を必要とするシャンパンに適したスターター酵母であったことが 1 つの要因であったと考えられる。

市販スターター酵母を添加することで、SC では早い段階でグルコースが消費され、エタノールが生成されていた(Fig. 9)。ARISA 微生物叢解析においても、市販酵母は発酵 0~15 日まで優勢を保っており(Fig. 5)、自然発酵条件(SS, QS)と比べて迅速にアルコール発酵が行われたことを裏付けていた。この急激なアルコール発酵によって、SC には突出したアルコール臭(Table 6)が付与されたものと考えられるが、最終的なエタノール量はすべての条件で大差がなかった(Fig. 9)。プロパノールも、アルコール香を呈する成分であるが、SC においては自然発酵条件(SS, QS)よりも低く推移しており、突出したアルコール臭は、こうしたアルコール類と他成分のバランスが強く影響していることが考えられる。

SCに次いでエタノールの生成が速かったのはQSであった。グルコース量は、発酵7日でSCと同等まで減少していたが、エタノール量には約6%の差が見られた。これは、両者においてグルコースが優先的にアルコール発酵に使用されたことを示しており、SCではフルクトースを糖源として、さらに発酵が進んだことが考えられる。ARISA微生物叢解析でも、QSではSSよりも早く*S. cerevisiae*野生株Aのピークが出現しており(Fig. 5)、エタノール量の増加と一致する。これは、クヴェヴリ特有の形状によって、下部先端で微生物の密度が高まり、発酵が促された結果であると考えられ、クヴェヴリを用いることで、市販酵母を添加することなくアルコール発酵を促進できる可能性が示唆された。微生物叢解析においてSSでは、発酵7および15日で、SCとQSには見られない細菌のピークが認められており、アルコール発酵の開始が遅いことで細菌汚染のリスクが増加する可能性が考えられた。

グリセロールは、ワインの口当たりや甘味に影響を与える成分であり、一般的な濃度は76 mmol/L程度(約7 g/L)とされている²²⁾。今回試験醸造したワインの測定値は、これをやや下回っていた(Fig. 9)。グリセロールは、発酵温度が高いほど生成量が増加するという報告があり⁵⁾²²⁾、今回の試験醸造は12~17 °Cと、一般的な白ワインの発酵温度の中でも、やや低い温度帯で行われていたため、グリセロール生成が少なかった可能性がある。通常、自然発酵を行うことでグリセロール量は増加すると言われている²²⁾。しかし、今回の試験醸造においては、市販酵母を添加したSCにおいて、むしろやや高い傾向にあった。この理由としては、自然発酵条件において、グリセロールとは異なる化合物の生成が優位であったこと、微生物によってグリセロールが消費された可能性などが考えられる。

*O. oeni*はリンゴ酸を乳酸に代謝し、酸味を和らげる目的で行われる、マロラクティック発酵(MLF)のスターターとして市販されている²³⁾。SCにおいて、発酵130日で突出して乳酸量が増加したことは、ARISA微生物叢解析でもっとも早く、野生*O. oeni*の存在が認められた結果と一致し、MLFが起きていたことが示唆される。しかし、一般的にはMLFを行うとリンゴ酸は検出できないレベルまで濃度が低下する²⁴⁾。*O. oeni*の至適温度は20~30 °Cとされており²³⁾、今回の醸造ではやや温度が低く、特にSCに*O. oeni*のピークが現れた時期は冬場で、ワイナリー内の室温が低かったため、リンゴ酸が残存し、MLFが完全に終了しなかったことが考えられる(Fig. 10)。

多くのエステル類は酵母によってアルコール発酵中に生成されるが、ワイン中の乳酸菌も、エステル類を増加させる酵素活性を持つことが報告されており、特に脂肪酸エステルの組成に影響を与えるとされている²³⁾。乳酸エチル、コハク酸モノエチルおよびコハク酸ジエチルについて、SCにおいてのみ、130日から明らかな増加が認められたことは、早期に確認された*O. oeni*(Fig. 5)がこれらの生成に関与したのと考えられる。SSおよびQSにおい

でも、*O. oeni* が出現した発酵 246 日から微増しており、261 日でさらに増加していた。発酵 246 日にボトリングし嫌気条件となったことで、嫌気性菌である *O. oeni* の代謝が活性化され、エステル類生成が促進されたものと考えられる (Fig. 11)。GC/MS 分析で認められた化合物は、発酵 261 日の各条件で、SS におけるコハク酸ジエチルを除き、すべてが閾値を超えていた (Table 8)。今回の香気成分分析は、発酵の経過に伴う変化の概要を調べるための簡易的な定量ではあるが、多くの化合物が知覚可能な濃度レベルで存在していたと考えられる。香気成分については今後、Headspace (HS) – Solid Phase Micro Extraction (SPME) GC/MS を用いて発酵 261 日試料の分析を行い、より詳細な解析を行う予定である。

ワイン中の金属元素は、主にブドウが栽培された場所に影響を受ける²⁵⁾。しかし今回、まったく同じ畑から収穫したブドウを使用したにもかかわらず、発酵 261 日のワインでは、金属組成が大きく異なっていた (Fig. 13)。主要成分、有機酸および香気成分については、市販酵母添加条件(SC)と自然発酵条件(SS, QS)に大きく分かれる傾向にあったが、金属元素は、ステンレスタンク(SC, SS)とクヴェヴリ(QS)に分かれる傾向にあった。すべての条件において Cu が発酵後に著減していたが、これは Cu が多くの酵素の活性中心として多様な微生物に使用された後、死菌となって容器下部に体積したために、ワイン中の濃度は著しく減少したものと考えられる。

QS において特徴的に高値を示した金属元素のうち Mn は、クヴェヴリをはじめとする、土を原料とした甕を用いた醸造で、やや高値となる傾向がある²⁵⁾²⁶⁾ものの、原料ブドウに大きく影響を受けるため、甕を使用することで必ず高値になるとは言い難い。QS で特徴的に高値を示した Fe および Mn は、Cu とともに酸化還元に関与する金属である²⁷⁾。ワイン中では Fe(III)/Fe(II)の酸化還元電位により、Fe(II)は酸素と反応し、この時生じた過酸化水素は、亜硫酸イオンと反応して硫酸イオンを生成する。Fe(III)はポリフェノールを酸化させ、Cu は Fe(II)の酸化を促進し、ワインの酸化を大幅に加速させることが知られている。Mn はこれらの触媒反応に関与し、Fe および Cu の存在下で、ポリフェノールの酸化に関与することが示唆されている²⁷⁾。ワイン中の代表的なポリフェノールであるタンニンは、熟成にしたがって重合し、口当たりを変化させていく。長期熟成させた赤ワインの口当たりが滑らかになるのは、重合によってタンニンの構造が変化することによるものである。今回の醸造試験では長期醸しを行ったため、通常の白ワインよりも多くのポリフェノールがワイン中に存在していると考えられ、Mn を多く含む QS 条件において、それらのポリフェノールが酸化され、重合が促進された可能性がある。テイスティングにおいては、QS はまとまりが良い(一体感がある)と評価され、ジャスミンなどの香りが感じられている (Table 6)が、これらはいずれも、熟成したワインから感じられる味わいである²⁸⁾²⁹⁾。前述したとおり、実際にクヴェヴ

リをはじめとした甕による発酵・醸造では、“タンニンの熟成(重合)”が促進されるという報告があり¹⁶⁾、これには金属元素組成の違いが影響を与えていることが示唆された。

検討した発酵3条件について、多くの成分は市販酵母条件(SC)と自然発酵条件(SS, QS)で傾向が分かれた。これは、有機酸、エタノール、脂肪酸、エステルといった化合物の生成が、酵母の影響を強く受けたものであると考えられた。一方、金属元素は、容器の違いを反映した結果となった。以上の結果から、醸造にクヴェヴリを用いることで、市販酵母を使用することなく、アルコール発酵を促進することができ、安定した熟成を行える可能性があると考えられた。また、甕による醸造のメリットとされているタンニンの熟成促進効果は、容器の素材に含まれる金属の影響を受けている可能性が示唆された。

第II章 クヴェヴリの衛生管理

緒言(II)

ワインの品質管理において、カビ臭による汚染は深刻な問題である。中でも、最も一般的なカビ臭原因物質とされているアニソールの代表格が 2, 4, 6-トリクロロアニソール(TCA) であり³⁰⁾、古くからコルクが原因となって、ワインがカビ臭を帯びることが分かっていた。そのため、フランス語でコルク栓を意味するブション(bouchon)と、鼻を意味するネ(nez)から、ブショネ(bouchonne)という言葉ができ、ワイン業界では現在もワインのカビ臭を指す一般的な用語となっている。ワインのボトルリングや品質管理技術が発展した今日においても、流通しているワインの2~7%から、コルクに不快なカビ臭が感じられるとされている³¹⁾。TCA は、それ自体に毒性を持たないものの、嗅細胞上のチャンネルをブロックすることで、本来ワインが持っている香りを感じにくくさせるマスキング作用を持ち³²⁾、自身がレセプターに到達することでカビ臭を強く感じさせる。さらに、閾値が 1.4~10.0 ng/L と非常に低いことから、10~40 ng/L の低濃度でも、ワインに致命的な欠陥を生む³³⁾。TCA に汚染されると、ワインの品質を変えずにカビ臭を除去することは不可能であるため、もはや飲用には適さない。そのため、消費者が購入したワインがブショネであった場合、ワイン専門店では通常、返金あるいは交換の対応を行う。これは、生産者やインポーターを含めたワイン業界に大きな打撃となるため、現在ではコルクの殺菌方法が改良され、人工コルクやガラス栓、スクリュューキャップの導入が進むなど、様々なブショネ対策が、生産現場で行われている。しかし現実には、特に長期熟成を見込むワインについては、なおも天然コルク栓が多く使われている。

コルクのTCAは前駆体である2,4,6-トリクロロフェノール(TCP)から直接生成される。コルク断面が特定の真菌に汚染され、かつ、TCPが存在していると、真菌によってTCAが生成されることが分かっている。TCAが検出されたコルクからは、*Aspergillus niger*, *A. orizae* といった *Aspergillus* 属や、*Penicillium chrysogenum*, *Pe. glabrum* といった *Penicillium* 属の他、*Paecilomyces* 属真菌などが見つかっており、これらの多くが、液体培地およびコルク上で、TCPをTCAに代謝する能力を持つことが分かっている³¹⁾。また、TCA以外には、2,3,4,5-テトラクロロアニソール、2,4,6-トリブロモアニソールといった化合物も、同様にワインにカビ臭やコルク臭を与える物質として知られている。

本研究の背景は、共同研究を行っている栗澤ワインズの近藤氏より、醸造したボトルリング前のワインからカビ臭と思われる異臭が感じられたため、発酵と熟成に用いたクヴェヴリ容器について、カビ汚染の調査を依頼された経緯がある。ステンレスタンクなど、新しい

素材の容器と異なり、発酵の残さを取り除く作業や、衛生管理が煩雑であるという問題があるクヴェヴリ¹⁶⁾は、ジョージアにおいて、火をつけた松明で内部を焼く、硫黄燻蒸といった殺菌方法が用いられているが、栗澤ワインズにおいては、これまで、クヴェヴリを亜硫酸水で満たす処置に留めていた。これは、熱をかけることで、クヴェヴリ内部に塗られている密ろうが溶け出してしまうことを避けるためであった。瓶詰後であればコルク汚染が疑われるが、本件はボトリング前のワインから異臭が感じられており、最も疑わしいのはクヴェヴリであると考えられた。異臭が感じられたワインに使用されていたのは、ジョージア産のクヴェヴリ(No. 07)であるが、これに合わせて、北海道産のものを含めた合計 6 基の内部から拭き取りによるサンプリングを行った。真菌の培養と DNA 解析の手法を用いて、容器内の微生物を調査し、TCA が産生された可能性について検討した。

材料と方法(II)

1. 試料

栗澤ワインズで使用されているクヴェヴリ 6 基 (No. 01, 02, 03, 05, 06, 07) (Fig. 14) を、高圧スチームで殺菌し、上部および下部の内壁を拭き取った綿棒 12 本に加え、その後バーナーによる焼き付けと硫黄燻蒸による殺菌を行ったクヴェヴリ 2 基 (No. 02, 07)の内壁上下部を拭き取った綿棒 4 本、計 16 本を用いた。滅菌生理食塩水 10mL を含む 50mL チューブに先端の綿を入れ、かくはん機で 5 分間振とう後、ピンセットで綿を絞りながら取り出して得られた、浸出液を試料とした(Fig. 15)。

2. 培養試験および微生物分離

(1) 培地調製

真菌培養に適した PDA 培地(Table 9)を用いた。

(2) 塗抹培養

浸出液 0.2 mL を PDA 培地上に滴下し、コンラージ棒で塗抹後、25 °C で 7 日間培養した。一試料につき 2 枚の培地を用いた。

(3) 画線培養

塗抹培養で得られた単一コロニーを白金耳で釣菌し、PDA 培地に画線した後、25 °C で 4 日間培養した。

(4) 増菌培養

画線培養により得られた単一コロニーを、綿棒あるいは白金線で釣菌し、PDB 液体培地 (Table 7) 3 mL を含む 5 mL チューブに接種 25 °C で 7~10 日間培養した。このうち増殖が遅

いものについては回転培養を行った(Rotator RT-5, タイテック).

3. DNA 塩基配列解析による微生物種の同定

(1) DNA 抽出および PCR 増幅

増菌培養を行った液体培地 200~500 μL を第 1 章 5. (1) にしたがって, DNA 抽出, PCR 増幅およびアガロースゲル電気泳動を行った. ただし, PCR 増幅には, 真菌用のプライマー Fun-3 および Fun-5 (Table 2)を使用し, サイクル数は 30 とした.

(2) DNA 塩基配列解析

電気泳動によって確認したバンドの強度に基づき, PCR 産物 2 μL を注射水で 10~50 倍希釈した. PCR 増幅に使用したプライマー Fun-3 あるいは Fun-5 に対応する, 1.61 pmol/ μL forward プライマー ITS1F あるいは NL1 4 μL を含む 8 連チューブに, 希釈した PCR 産物 10 μL を入れ, 良く混和した後, DNA 塩基配列解析をファスマック社に依頼した.

得られた塩基配列データを用いて, National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST により相同性検索を行い, 菌種を同定した. この際, 97 %以上の一致率を示した場合, 同種であると判断した.

4. ARISA による微生物叢解析

綿棒の浸出液(Fig. 15)を遠心(16,200 g, 10 分, 25°C)し, 上清を取り除いた. この時, 沈さはほとんど見られなかったため, 3 mL スポイトを使用し, 慎重に上清を除去した. 0.2 % SDS-PBS 800 μL を加え, かくはんした後, 全量をガラスビーズ入りの 2 mL スクリューキャップチューブに移した. 以降, 第 1 章 2.(1)~(4)にしたがって DNA 抽出, PCR 増幅およびアガロース電気泳動を行い, フラグメント解析を行った. ただし PCR 増幅には, 真菌用のプライマー Fun-1 (Table 2)を使用した.

5. ARISA による微生物固有フラグメント解析

増菌培養した菌体(2. (4))については, 3.(1)にしたがって DNA 抽出液を PCR 増幅しアガロースゲル電気泳動によりバンドを確認した後, フラグメント解析を依頼した. ただし PCR 増幅には, 真菌用のプライマー Fun-1 および Fun-2 (Table 2)を使用した.



Fig. 14 地下に埋まった状態で使用されているクヴェヴリとその内部(栗澤ワインズ)



Fig. 15 クヴェヴリ内壁を拭き取った綿棒と浸出液

Table 9 真菌の分離培養に用いた培地

ポテトデキストロース寒天培地: PDA

蒸留水	500 mL
ポテトデキストロース寒天培地(栄研化学)	19.5 g
クロラムフェニコール(ナカライテスク)	0.05 g

ポテトデキストロース液体培地: PDB

蒸留水	100 mL
ポテトデキストロース寒天培地(栄研化学)	2.4 g
クロラムフェニコール(ナカライテスク)	0.01 g

各培地はオートクレーブにより滅菌(121 °C-20分)

結果(II)

1. 塗抹培養

綿棒浸出液の PDA 培地による塗抹培養の結果は、クヴェヴリごとに異なり、このうち特徴的であったクヴェヴリ 4 基の結果を示した(Fig. 16). No. 01 は上下部双方から、カビの増殖が見られた。No. 02 では、上部にのみ酵母あるいはカビ様の真菌が多数見られたが、下部にはコロニーは見られなかった。No. 05 では、上部には黄色を帯びたクリーム色の、盛り上がったコロニーが見られ、下部にはオレンジ色の酵母様コロニーおよび一方からは明らかなカビが見られた。No. 07 では、上下部ともに、無数の酵母様コロニーが見られ、カビも混在していた。バーナーによる焼き付けおよび硫黄燻蒸による殺菌を行った No. 02, 07 からは、微生物のコロニーは見られなかった。

2. DNA 塩基配列解析による微生物種の同定

塗抹培養により得られたコロニーを画線・増菌培養により分離し、DNA 塩基配列解析から BLAST 相同性検索を行った結果、5 種のカビおよび 5 種の酵母が同定された。このとき、すべてにおいて一致率は 100 %であったが、*Pe. chrysogenum / rubens* および *Candida oleophila / railenensis* においては、100%の一致率を示す種が 2 種存在していたため、併記した(Table 10).

3. ARISA による菌叢および固有フラグメント解析

拭き取り試料浸出液には、目視で残さを確認できなかったものの、それぞれの試料から DNA を抽出することができ、一定の微生物叢を把握することができた(Fig. 16)。さらに、分離した微生物種の固有フラグメント解析を行い、菌叢解析結果と照らし合わせることで、多くのピークの微生物種を同定することができた。No. 01 においては、培養および菌叢解析の結果は一致しており、上下部双方に見られたカビは *Pe. echinulatum* であるとわかった。No. 02 において上部にのみ見られた酵母は *Meyerozyma guiliermondii* であり、混在していたカビは *Pe. paneum* および(もしくは) *Pe. roqueforti* であった。培養においてコロニーが見られなかった下部からは、菌叢解析においても、ピークは検出されなかった。特徴的なコロニーが見られた No. 05 では、上部の酵母が *Pichia membranifaciens*、下部の酵母が *Rhodotorula mucilaginosa* であることがわかった。上下部それぞれから *Pn. roqueforti* のピークが検出されており、下部においては培養と一致した結果であった。培養において多数の微生物種が確認された No. 07 においては、菌叢解析でも多種多様な酵母のピークが見られた。*Wicherhamomyces anomalus* および *Candida* 属酵母のピークは、No. 07 のみで見られ、上下部に共通して存在していた。下部には 562.2 bp のピークが見られたが、これは *Pe. echinulatum*

および *Pe. roqueforti* 双方に一致するピークであるため、両種を併記して示した。焼き付けと硫黄燻蒸による殺菌を行った No. 02, 07 においては、上下部ともに微生物のピークは検出されなかった。

Table 10 クヴェヴリ容器から分離された真菌種

Isolated Fungi Species	Detected Qvevri Number											
	01		02		03		05		06		07	
	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
Mold												
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum / rubens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-	-
<i>Penicillium paneum</i>	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	○	△
<i>Penicillium echinulatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	●	●	●	-	●	○	○	●	-	-	-	-
Yeast												
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	●	●
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	●	-	-	●	●
<i>Wicherhamomyces anomalus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
<i>Candida oleophila / railenensis</i>	-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	●	●

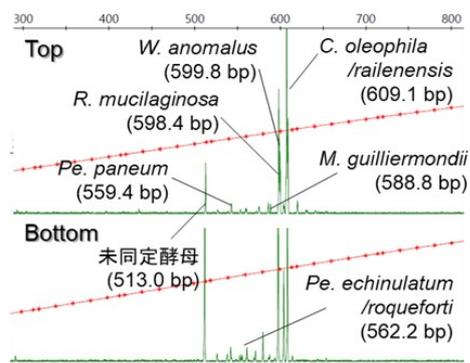
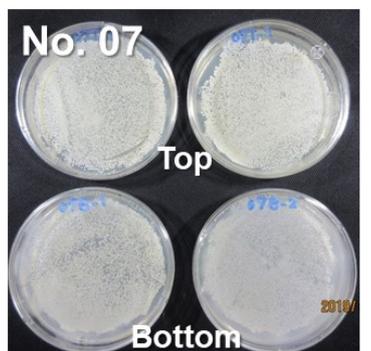
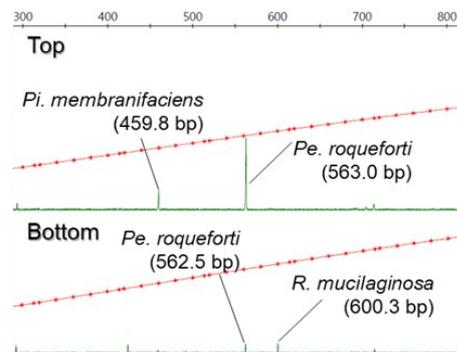
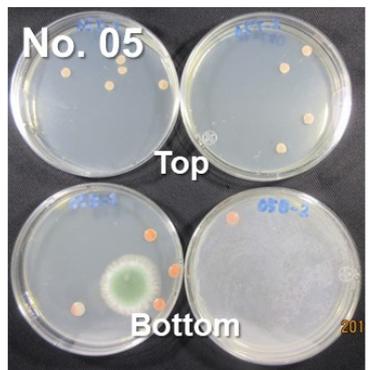
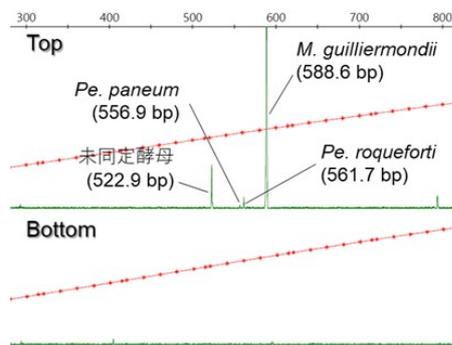
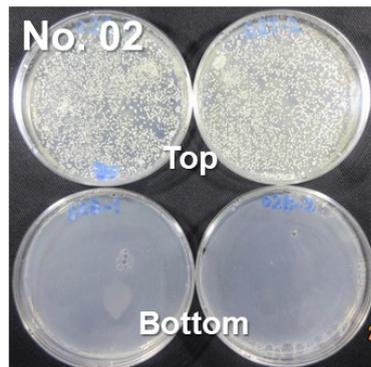
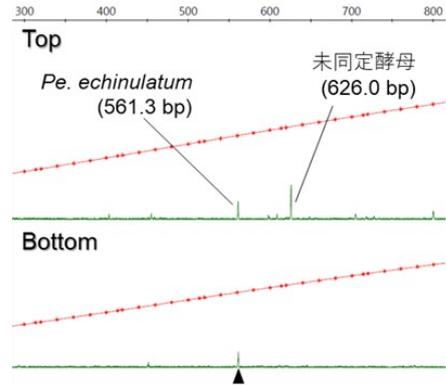
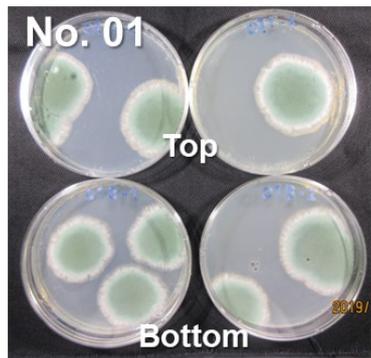
○: ARISA微生物叢解析により確認

●: 培養および微生物叢解析により確認

△: 微生物叢解析では確認されず、培養でのみ確認

T: 上部

B: 下部



▲: 直上のピークとの一致を示す

Fig. 16 クヴェヴリ容器拭き取り試料の培養(左)および ARISA 微生物叢解析結果(右)

考察(II)

一般的に培養ベースによる試験においては、その培地条件に適する微生物が増殖しやすいため、限られた生菌の情報しか得ることができず、全体の微生物叢を知ることは難しい。これに対し、ARISAによるDNAベースの試験は、DNAが残存していれば死菌であっても解析の対象となり、より広く微生物叢を把握することができる。しかしその一方で、菌種を判別するには、それぞれの微生物種の固有フラグメント長データベースが必要となる。

本章では、原理の異なるこれら2手法を平行して実施した。その結果、概ね、両者で一致する結果が得られたと言える(Fig. 16)。寒天培地による塗抹培養において、多数のコロニーが密集し、目視での判別がつかないNo. 07のような場合においても、ARISAを用いることで、多様な酵母が存在していたことを確認できた。また、培養において得られたシングルコロニーをDNA塩基配列解析によって同定し(Table 10)、ARISAの固有フラグメント解析を行ったことで、多くの真菌および酵母の固有ピークデータを得ることができた。微生物の培養とDNA解析という異なる原理のアプローチにより、それぞれの短所を補完しつつ、信頼性の高い結果が得られたものと考えられる。

クヴェヴリ内壁から見つかった酵母種は、すべてがワインあるいはセラーに存在していることが知られている。このうち、*Pi. membranifaciens* は β -グルコシダーゼ、 β -キシロシダーゼ活性によってテルペン類および揮発性フェノールを増加させ、風味に関与することが報告されている³⁴⁾。同様に *R. mucilaginosus* も β -グルコシダーゼ活性が確認されており、スターター酵母として *S. cerevisiae* と同時あるいは段階的な添加によってワイン風味を向上させる研究が行われている³⁵⁾³⁶⁾。*W. anomalus* は、テルペン類や揮発性フェノールを増加させ、*S. cerevisiae* とのシーケンシャル発酵において、イソアミルアルコールやエステル類を増加させる³⁴⁾。これらはいずれも、ワインに対して良い影響を与える酵母として、各国で研究が行われている。*M. guiliermondii* (アナモルフ: *Candida guiliermondii*) はブドウ畑やセラー等の環境中に存在し、腐敗したブドウからも分離されており³⁷⁾、フェノール臭の生成に関与する³⁸⁾。フェノール臭とは、一般に馬小屋や濡れた動物を連想させるオフフレーバーを指し、*Brettanomyces* 属酵母がその主たる原因菌として知られている³⁹⁾。*M. guiliermondii* は、この *Brettanomyces* 属と比較して、フェノール臭産生能は低いとされている⁴⁰⁾。*C. olophila* / *railenensis* はいずれもワイン中に存在することが確認されており⁴¹⁾、特に *C. oleophila* は、灰色かび病原菌の *B. cinerea* に対する抗菌活性を持つことが報告されている⁴²⁾。

分離された真菌のうち、*E. nigrum* は、菌叢解析においてはピークが確認できておらず、培養時のコンタミの可能性も考えられる。しかし、一般的にはセラー内に存在していることがわかっているため、実際にクヴェヴリ内に存在していた可能性も十分にあると考えられ

る⁴³⁾. *Pe. chrysogenum* / *rubens* については、DNA 塩基配列解析の結果では、どちらの種であるか鑑別できなかった。*Pe. chrysogenum* は、セラーおよび TCA に汚染されたコルクから発見されており、TCP のメチル化によって TCA を合成することがわかっている³¹⁾。*Pe. paneum* はコルクから分離されているカビであるが、人工的に *Pe. paneum* で汚染したコルクからは有意に高い TCA は検出されず、TCA 産生能は無いか、非常に低いとされている⁴⁴⁾。*Pe. echinulatum* および *Pe. roqueforti* もブドウに存在することが知られているが、TCA 産生には関与しないと考えられている⁴⁵⁾。今回のクヴェヴリ容器から分離された真菌の中で、明らかに TCA 産生能を持つのは *Pe. chrysogenum* だけであったが、実際にカビ臭が問題となっていた No. 07 には、微生物叢解析において、この菌種の固有ピークは認められなかった。このことから、No. 07 で感じられたカビ臭の原因は TCA 以外のものであったと考えられた。実際、No. 07 のクヴェヴリで醸造したワインのカビ臭は時間経過とともに大きく軽減され、感知できないレベルまで弱まった。TCA は自然減少しないという性質を持っていることから、TCA 以外のカビ臭物質が存在していた可能性が考えられた。

クロロアニソール類以外に、ワイン中に含まれることがあり、カビ臭を呈する成分としては、ゲオスミンおよび 2-メチルイソボルネオール⁴⁶⁾が知られている。特にゲオスミンは、*Streptomyces* 属や *Penicillium* 属真菌によって生成されることがわかっている⁴⁷⁾。しかし、これらの化合物についても、安定性が高く、人為的に分解、除去を行うのは困難であるため⁴⁸⁾、自然に減少していったことは考えにくい。2-エチルフェンコールおよびいくつかの第三級アルコールも、ワイン中でカビ臭を呈する化合物とされている⁴⁶⁾が、これらも反応性は低く、今回のカビ臭原因物質である可能性は低いと考えられる。コルク由来のカビ臭、ブシヨネと判断されたワイン中から TCA が検出されず、原因物質が特定できないことは、実際にも報告されている²⁹⁾。一方で、1 種類の化合物ではなく、いくつかの化合物を複合的に捉えて香り感じる場合もある。そのため、本件においては、上述のように単体でカビ臭を呈するものが原因だったわけではなく、複数の化合物が作用していたことが考えられる。そして、それらが熟成のある時点では閾値を超えて存在していたが、その後の時間経過によって閾値を下回る濃度に減少した可能性が示唆される。

以上の結果から、栗澤ワインズで用いられた、亜硫酸水による充填および、高圧スチームでは、クヴェヴリ内の微生物を十分に殺菌することができないこと、しかし、ジョージアでの殺菌方法に近い、火を用いた焼き付けと硫黄燻蒸には十分な殺菌効果があることが確認できた。このことは、クヴェヴリおよび土製発酵容器を使用するワイナリーにとっては、非常に重要性の高い知見であると言える。

第III章 酢酸エチル抽出を用いた GC によるワイン中酢酸の定量

緒言(III)

カビ臭と同様、生産者が注意を払う成分の 1 つに揮発酸がある。その 95 %以上を酢酸が占め、他にはギ酸やプロピオン酸が含まれる。酢酸が高濃度に存在すると、ワインには特有の刺激臭が生じ、エステル化することで酢酸エチルとなり、ボンドや除光液のにおいを感じさせるようになる。ワインのスタイルによって、揮発酸の感じ方は異なり⁴⁹⁾⁵⁰⁾、長期熟成させて複雑味が増したワインは酢酸の不快感においがマスキングされることが知られている⁵¹⁾。10 %エタノール混合液における酢酸臭の閾値は 200~300 $\mu\text{g/mL}$ ⁵²⁾⁻⁵⁴⁾とされ、実際のワインでは、酢酸 700~1,100 $\mu\text{g/mL}$ 付近の濃度で、酢酸特有の鼻につく刺激臭を感じ、ワインに不快なニュアンスを与えられている⁵⁰⁾。一方で、ワインの味わいにおける酢酸の役割は悪いものばかりではなく、一定量存在すべきという研究も存在する⁴⁹⁾。しかし、過剰に存在すると酸化臭と表現され、オフフレーバーとして扱われることが多いため²⁹⁾、酢酸生成を抑えるための研究もなされており⁵⁵⁾、国際ブドウ・ワイン機構(OIV)は揮発酸の上限値を 1,200 $\mu\text{g/mL}$ (酢酸値)と設定している⁵⁶⁾。

揮発酸は、スターター酵母を添加しない自然発酵ワインにおいて、やや高値となる傾向にある。これは、ワインの発酵が進み、一定のアルコール濃度に達する前に、多様な微生物が代謝することで、酢酸が生成されるためと考えられる。実際に、2018 年の予備試験醸造(第 I 章)では ARISA による微生物叢解析において *A. aceti* の存在が確認されており、完成したワインは揮発酸が強く感じられた。代表的な野生酵母である *K. apiculata* も、酢酸生成に関与することが知られており¹²⁾、自然発酵は、揮発酸が高値となる複数のリスクを抱えている。

北海道は、地域のブランドを保護する地理的表示(GI)制度の指定を、2018 年 6 月に国税庁より受けた。この制度に基づきワインに「北海道」を表示するためには、原材料や製造場所および工程の基準を満たし、大学などで構成される地理的表示「北海道」管理委員会(以下 GI 北海道)の官能試験と理化学分析を受け、品質の基準を満たす必要がある¹⁾。それにより GI 北海道では、理化学分析の項目のうち、総揮発酸の基準値を 1,500 $\mu\text{g/mL}$ 以下と設定している¹⁾。また、公定法の水蒸気蒸留滴定法⁵⁷⁾では一度に多数の試料を測定することが困難であるため、簡易検定法として、ポストカラム pH 緩衝化法と電気伝導度検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー(HPLC 法)⁵⁸⁾を利用できるとしており、基準値をより厳しく 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 未満と定めている。したがって、HPLC による酢酸測定値が 1,000 $\mu\text{g/mL}$ を超えた場合は、公定法である水蒸気蒸留滴定法により再度、揮発酸を測定し確認する運用となっている。本章では、GI 北海道認証の理化学分析において揮発酸の簡易検定法として採用さ

れている HPLC 法とは原理的に異なる酢酸エチル抽出を用いたガスクロマトグラフィー (GC)によるワイン中の酢酸定量法の開発を検討した。

なお, HPLC 法については特殊な検出系が必要であり, ワインのような複雑なマトリックス試料の場合, 夾雑物の影響を受ける危険性もあることから, 多種多様なワインの品質管理に貢献できる新たな手法としての GC 法の可能性を併せて検証した。

材料と方法(III)

1. 試薬

塩化ナトリウム(関東化学), 酢酸エチル(ナカライテスク), 2-プロパノール, 塩酸, 無水硫酸ナトリウムおよび容量分析用酢酸($f=1.000$, 以上富士フイルム和光純薬)を用いた。

2. ワイン試料

GI 北海道の認証を 2019 年 6 月までに受けたワイン 35 種, ワインビネガー添加前後のワイン 6 種および, スパークリングワインを含む国内産 3 種, 国外産 7 種のワインを試料とした。この内, 酢酸濃度が低い白ワイン W1, 中程度の赤ワイン R1 および高い赤ワイン R2 の 3 種を条件検討に使用した。

3. 測定用溶液の調製

(1) ワイン試料液

共栓ガラス試験管(5 mL)にワイン試料 250 μL , 0.1 mol/L 塩酸 50 μL , 蒸留水 680 μL , 塩化ナトリウム約 0.5 g, 内部標準物質として 10 mg/mL 2-プロパノール 20 μL および酢酸エチル 1,000 μL を加え, かくはん機を用いて激しく 5 分振とうし, 1,460 g, 10 分, 25 $^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心分離した。酢酸エチル層を, 無水硫酸ナトリウム約 1 g を含む新しい共栓ガラス試験管に採り, 10 分静置後, 2 mL バイアル瓶(Thermo scientific)に移した。

(2) 検量線用酢酸標準溶液

容量分析用酢酸を用い, 12 mg/mL 酢酸標準溶液を調製した。共栓ガラス試験管に蒸留水 920, 910 および 890 μL を採り, 12 mg/mL 酢酸標準溶液をそれぞれ 10, 20 および 40 μL 加えた後, 試料液の調製手順にしたがい同様に抽出した。これらの酢酸標準溶液はワイン試料 250 μL 中の酢酸濃度として, 480, 960 および 1,920 $\mu\text{g/mL}$ に相当する。なお, 実際のワイン試料測定においては, 酢酸 480 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の一点検量線により定量した。

(3) 酢酸添加ワイン試料液

添加回収試験のため, ワイン試料 3 種(W1, R1, R2)につき, 試料液の調製手順において, 蒸

留水 680 μL の内, 250 μL を 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酢酸溶液に置き換えた添加試料を調製し, 同様の抽出操作を行った.

4. 酢酸測定

(1) GC 法

ガスクロマトグラフ(GC353B), オートサンプラー(ASI-240), 高極性カラム InertCap WAX-HT(0.25 mm i.d. \times 30 m, df=50 μm , 以上ジーエルサイエンス)を用いて GC 分析を行った. 試料液注入量は 1 μL (スプリット比 1:10), キャリアガスはヘリウムを流速 1.4 mL/分で使用した. 注入口温度および検出器温度はともに 240 $^{\circ}\text{C}$ とし, 昇温プログラムは, 40 $^{\circ}\text{C}$ を 10 分保持後, 16 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で上昇, 220 $^{\circ}\text{C}$ に達した時点で冷却を開始した. 再び 40 $^{\circ}\text{C}$ となってから 10 分以上経過した後, 次の測定を行った. 検出器は水素炎イオン化検出器(FID)を使用し, 測定 1 サイクルを 40 分とした. 測定後のデータ処理には Chromato-PRO(ランタイムインストルメンツ)を使用した.

(2) HPLC 法

HPLC 法による酢酸測定は, GI 北海道認証ワイン 22 試料および国産 2 試料, 国外産 6 試料について, ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法により行った. カラムは Shim-pack SCR-102H (300 mm \times 8 mm I.D., 島津製作所), 移動相は 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液, 検出試薬は 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EDTA および 20 mmol/L Bis-Tris を含む 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液を用いた. 試料は遠心上清(9,170 g, 5 分)を水で 20 倍に希釈し, フィルター(0.45 μm)ろ過後, 10 μL を注入した.

(3) 水蒸気蒸留滴定法

水蒸気蒸留滴定法による揮発酸の分析は, GI 北海道認証ワイン 19 試料を用い, 公定法⁵⁷⁾にしたがった. 試料 10 mL を水蒸気蒸留後, 留液約 100 mL をとり, フェノールフタレイン指示薬を加え, 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて滴定した.

5. 統計処理

統計処理には Prism 6 (Graph Pad Software)を用いた.

結果(III)

1. 酢酸検量線

GC 測定によって得られたクロマトグラム(Fig. 17)のピーク高と面積値それぞれについて内部標準物質である 2-プロパノールとの比をとり、検量線を作成した(Fig. 18). ピーク高および面積値双方において良好な比例関係が見られ、相関係数はともに 0.999 と高く、p 値は 0.0001 以下であった。定量範囲は下限 100 $\mu\text{g/mL}$ (S/N=2.5)～上限 1,920 $\mu\text{g/mL}$ であった。以降の測定には面積値を用いた。

2. 酢酸添加回収率および同時再現性

酢酸濃度が低い白ワイン(W1)、中程度の赤ワイン(R1)および高濃度の赤ワイン(R2)を使用し、それぞれ 480 $\mu\text{g/mL}$ の酢酸を添加した試料とともに GC 測定した(Table 11)。このとき、1 種類につき 3 つの測定試料を調製して測定を行った。添加回収率は 98~102 %、再現性は RSD 2.1~4.4 %と、ともに良好であった。

3. HPLC 法との相関

GI 北海道認証を受けた 22 種および国内産 2 種、国外産 6 種のワイン試料について、今回の GC 法による測定値と、HPLC 法による測定値(ともに 1 回測定)との相関を調べた(Fig. 19)。一次回帰式は $Y=1.202X+29.93$ であり、相関係数は 0.987、p 値は 0.0001 以下と、有意な相関関係が認められた。

4. 蒸留滴定法との相関

GI 認証を受けた北海道産ワイン 19 試料の GC 測定値と、公定法に指定されている水蒸気蒸留滴定法により測定した値(ともに 1 回測定)との相関を調べた(Fig. 20)。一次回帰式は $Y=1.252X-146.6$ であり、相関係数は 0.974、p 値は 0.0001 以下と、有意な相関関係を示した。

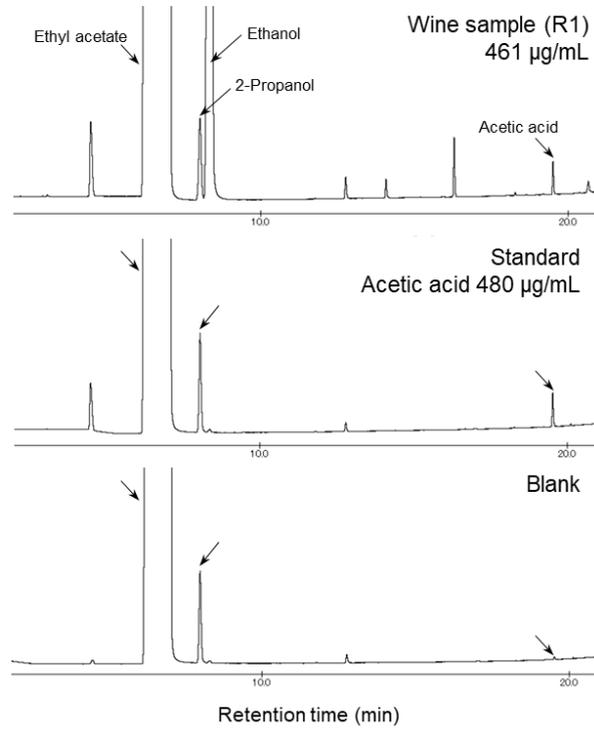


Fig. 17 GC 法による典型的な酢酸のクロマトグラム

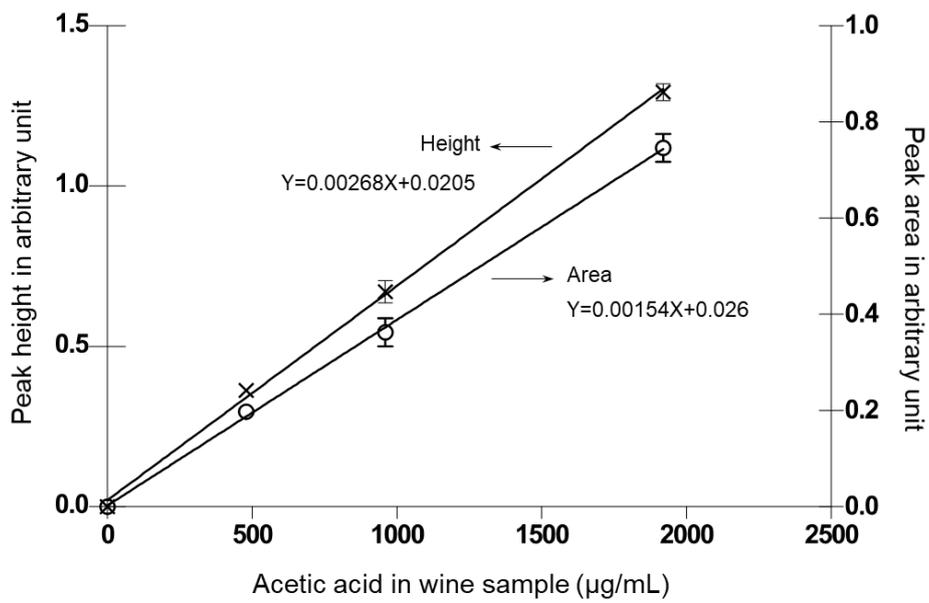


Fig. 18 酢酸検量線

Table 11 酢酸の添加回収率および再現性

Wine sample	Spiked (μg/mL)	Found (μg/mL)	RSD (%) (n=3)	Recovery (%)
W1	0	254	4.4	-
	480	730	2.7	101
R1	0	471	2.1	-
	480	951	3.8	98
R2	0	756	3.5	-
	480	1236	4.3	102

Data represent mean of three independent runs.

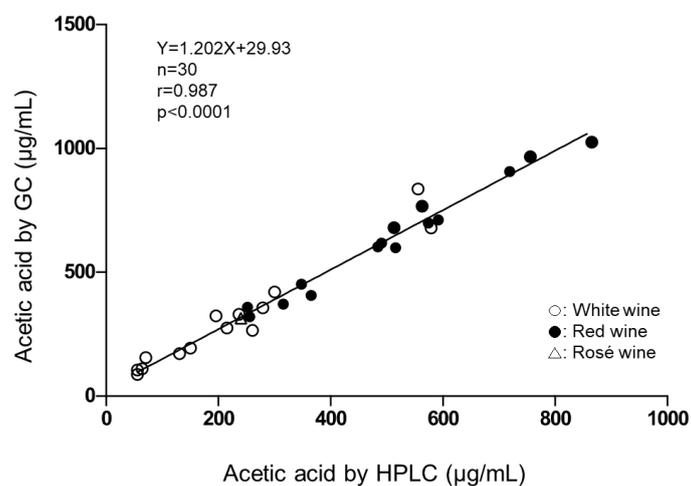


Fig. 19 HPLC 法との相関

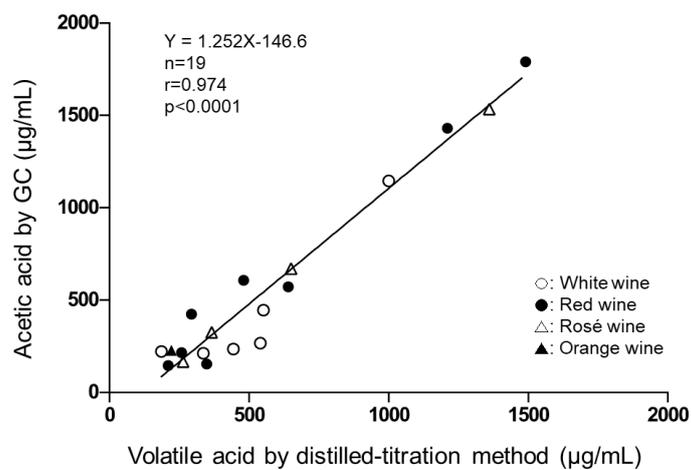


Fig. 20 蒸留滴定法との相関

考察(III)

ワインの品質評価に関連して、揮発酸を含めたワイン中の数百の香気成分の測定が様々な手法で行われてきた²⁰⁾。本研究においても、酢酸エチル抽出の検討に先駆け、当初、GCへ直接注入する Direct Injection 法⁵⁹⁾や、一般的にタンパク除去の目的で使用されるアセトンを加え、-30℃で1時間凍結させる冷アセトン法を検討した。しかし、Direct Injection 法においては、酢酸ピークが突然半減する現象が度々見られ安定した測定ができなかった。一方、冷アセトン法においても、ある程度の測定精度は得られたものの、HPLC 法との相関は $r=0.359$ と低く定量法としての課題が多かった。マイクロシリンジのプランジャやカラム注入口への水溶性成分の残存に加え、ガラス容器への酢酸の吸着ロスが変動要因と考えられた。

酢酸エチル抽出を検討するにあたり、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、0.1 mol/L 塩酸を加える操作を取り入れた。塩化ナトリウムは飽和状態にすることにより塩析効果で酢酸の抽出効率を上げるとともに、エマルジョン形成を予防し⁶⁰⁾、実際に 2-プロパノールと酢酸の抽出量が増大した。無水硫酸ナトリウムは酢酸エチル層に残存する水溶性成分を除くために加えており⁶¹⁾、冷アセトン法で問題となっていた水溶性成分のシリンジへの吸着も大きく改善した。また、使用後にはプランジャを抜き、完全に乾燥させることで、プランジャのさびつきを効果的に防ぐことができた。0.1 mol/L 塩酸は、ワインの pH に依存し酸型とイオン型で存在する酢酸(酸解離定数 4.8)を、ワイン自体の pH に左右されず確実に $\text{pH}<2$ とすることで定量性を確保するために加えたものである。

新たに加えたこれらの操作により測定精度が向上し、良好な再現性と回収率(Table 11)に加え、HPLC 法および蒸留滴定法との高度に有意な相関(Fig. 19, 20)が認められるようになった。なお、一般的に、色素成分を除去するために活性炭が用いられるが⁶²⁾、活性炭の微粉末を加えたところ、遠心後の水層と溶媒層の間に残存し上清分取の妨げとなり、かつ、色素除去の効果もあまり見られなかったため、加えないこととした。これまで本法により約 20 種類の赤ワイン試料の測定を計 60 回以上行ってきたが、酢酸測定への影響は認められなかった。こうした、塩酸酸性とすることで酢酸抽出率が向上すること、および活性炭による色素除去操作が不要であることは、本研究において得られた新たな知見である。測定作業の簡便化は、多数試料に対して迅速な結果報告が求められる簡易検定法において特に重要である。

ワイン試料中の酢酸量を定量するにあたり、面積値とピーク高それぞれを用いて濃度計算を行ったとき、ピーク高から算出した値の方が、面積値を用いた値より高くなる傾向にあった。これは、内部標準物質 2-プロパノールの保持時間が、ワイン中に大量に存在するエ

タノールと近いことで、より鋭敏に動くピーク高は影響を受け易いためと考えられた。実際、2-プロパノールを除いて酢酸量を算出すると、面積値との差はほとんどなくなった。2-プロパノールはワイン中には自然に存在しない物質であり、GC を使用したエタノール測定の公定法においても内部標準物質として用いられている⁵⁷⁾。

本 GC による簡易検定法においては一点検量線を採用している。これは、GI 北海道の採否に関わる揮発酸 1,500 µg/mL を確実に担保できる 1,000 µg/mL を簡易検定(スクリーニング)における基準値に設定していること、および 3 点検量線の濃度範囲にわたる十分な直線性 (Fig. 18)、良好な再現性および添加回収率 (Table 9) が確認できていることに加え、基準値を超えた際には公定法による再測定を要するため、より迅速な結果が得られることを優先したものである。したがって、さらに正確な測定値を求める必要がある場合は、3 点検量線の使用が望ましい。

本 GC 法と HPLC 法 (Fig. 19) および公定法の蒸留滴定法 (Fig. 20) との間には有意な相関が認められたものの、回帰式の傾きが示すように、GC 法による測定値はこれらの手法に比べて系統的に高値となる傾向にあった。HPLC 法の前処理は希釈のみであるが、GC 法では酢酸エチル抽出を行っていることが測定値に影響を与えていると考えられる。実際、酢酸エチルブランクにおいても、わずかながら酢酸ピークが確認されており、試薬あるいは作業環境由来の一定量の酢酸混入の可能性が示唆されている。一方、蒸留滴定法については、水蒸気蒸留の段階における一定の損失と、滴定時の変動が定量精度に影響するため、特に低濃度域では相関が劣ることとなったと考えられる。むしろ、GC 法が他の手法よりも高値を示す傾向にあることは、公定法に先立つ簡易検定法として運用するにあたって、偽陰性を確実に避けることに繋がると考えられる。

これまで GI 北海道の認証を受けたワインの揮発酸量は 100 µg/mL 程度から 1,000 µg/mL を超えるものまで様々であった。これは多種多様な各国のワインにおいても酢酸値には大幅な開きが認められていることと共通する²⁰⁾⁵⁰⁾⁵⁴⁾⁶³⁾。ヘテロ発酵性の野生酵母による自発的発酵を行う生産者が世界的に増えている中、国内においても同様の傾向が見られ、それに伴い酢酸濃度の範囲はより広がってきている。酢酸は酢酸菌による汚染だけではなく、野生酵母や乳酸菌により生成されることもあり、市販の培養酵母を使用しない醸造においては、酢酸濃度が高くなるリスクが付きまとう⁶⁴⁾。また、エタノール産生を担う酵母である *S. cerevisiae* の発酵による副産物としても酢酸は知られており⁵³⁾、特に高糖度条件下で発酵が行われることによって、多量に生成されることが分かっている⁶⁵⁾⁶⁶⁾。国内においても、収穫時期を冬まで遅らせ、ブドウの糖度を上げてつくられるアイスワインが製造されており、実際にこうしたアイスワインでは酢酸濃度が高くなる傾向にある。このように北海道をは

じめ全国的にも、ワイナリーごとに様々な製法でワインが醸造されており、酢酸が高濃度になるリスクが少なくないことから、品質管理として簡便に揮発酸量をモニタリングする必要性も高まってきている。

以上、本 GC 法は、様々なワインの酢酸濃度を多数試料においても簡便に測定可能であることから、GI 認証における簡易検定法として、あるいは、揮発酸が高値となり易い、クヴェヴリをはじめとした自然発酵ワインに対する品質管理法の 1 つとして適した手法であると考えられる。

要 約

近年、ジョージア伝統の発酵容器クヴェヴリをはじめとした土製の甕を醸造に用いる生産者が増えている。甕による醸造には、微酸素供給や熟成の促進といった醸造学的メリットが知られているものの、その影響はまだ十分には明らかになっておらず、コントロールの難しい自然発酵ワインにおいては、特に科学的知見が少ない。そのため本研究では、代表的な甕であるクヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性を明らかにすることを目的とし、北海道内のワイナリーと共同で試験醸造を行った。サンプリングしたワインの発酵経過に伴う微生物叢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。

醸造条件によって、明らかに異なる微生物叢が認められ、市販酵母を添加した場合においても、*Saccharomyces cerevisiae* 野生株が優勢となること、および複数株の *S. cerevisiae* による菌叢交代が起こっている可能性が示唆された。クヴェヴリでは市販酵母を添加した条件に次いで発酵が速く進み、ステンレスタンクで自然発酵を行った条件よりも発酵の開始が早かったことから、その形状が発酵を促進する可能性が考えられた。主要成分および香気成分の多くは発酵条件(市販酵母もしくは自然発酵)に依存する傾向にあったが、金属元素は、容器の違い(ステンレスタンクもしくはクヴェヴリ)を反映した結果となった。クヴェヴリワインにおいて特徴的に多く含まれていた Mn は、同じく特徴的であった Fe および Cu とともにポリフェノールの酸化に関わるとされている。そのため、クヴェヴリワインにおいて、ワイン中の代表的なポリフェノールであるタンニンの酸化および重合が促進され、熟成されたワインに現れる「味わいの一体感」をもたらした可能性が示唆された。

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、クヴェヴリを使用したワインの醸造学的特性について、クヴェヴリ醸造によるタンニンの酸化重合促進効果には、容器由来の金属が影響している可能性および、それによりワインの風味に熟成感を付与できることがクヴェヴリの利点であることを提言した。さ

らに、ジョージアの一般的な衛生管理法である、焼き付けおよび硫黄燻蒸が、カビ汚染対策として有効であることを確認するとともに、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。

Summary

In the recent two decades, a clay vessel such as the traditional Georgian vessel Qvevri has been using by winemakers. Although fermenting with the vessel is known to have oenological merits such as micro-oxygenation from the porosity of the clay and promotion of aging, the effect has not been fully clarified. In particular, spontaneous fermentation is difficult to control its condition and has little scientific knowledge.

Therefore, in this study, trial vinifications to aim to clarify the oenological characteristics of spontaneous fermentation in Qvevri, typical clay vessel, were carried out in cooperation with two wineries in Hokkaido. The sampled wines were monitored temporal changes of the microbial flora over the course of fermentation and analyzed for the major components such as glucose, ethanol, glycerol and organic acids, aroma components and mineral components. In addition, as a safety management method for the purpose of controlling mold contamination in Qvevri, culture and DNA analysis were carried out using samples wiping the inside. Moreover, for the purpose of contributing to quality control, new application of gas chromatography (GC) followed by ethyl acetate extraction was examined as a simple and reliable method to measure acetic acid which contributes to objectionable off flavors of wine.

As a result, differences of the microbial flora were observed depending on the fermenting conditions, and even though commercial yeast was added, the wild *Saccharomyces cerevisiae* was predominant, and it seems that microbial substitutions were happen by multiple wild strains of *S. cerevisiae*. Since the fermentation of Qvevri wine proceeded faster next to the commercial yeast condition, it was considered that shape of the vessel may promote fermentation. Most of the main components and aroma components were tended to depend on the fermentation conditions (commercial yeast or spontaneous fermentation), in contrast, the mineral components were reflected the difference in the vessel (stainless steel tank or Qvevri). Mn, included characteristically much in Qvevri wine, is involved in redox potential with Fe and Cu, and it has been reported that is relate the oxidation of polyphenols. Therefore, it was indicated that since oxidation and polymerization of tannins, typical polyphenols in wine, were promoted, the taste like an aged wine appeared in Qvevri condition.

The results, such as multiple fungi observation, of culture and DNA analysis using the samples from inside of Qvevri were approximately in agreement. However, any fungi were not detected from Qvevri which is baked by burner and fumigated with sulfur. A simple and reliable GC method was developed to measure acetic acid, with higher reproducibility and satisfactory recoveries. In addition, significant

correlations were recognized between the GC and HPLC method, and also the distilled-titration method.

Thus, some of the oenological characteristics of Qvevri were clarified for the first time, the effective management method with the aims of controlling mold contamination was proposed and the proposed GC method for the determination of acetic acid as an indicator of quality control in wine was proposed as simple and reliable.

謝辞

本研究の遂行にあたり、実験、データ解析および論文執筆のご指導を賜りました、酪農学園大学大学院酪農学研究科 山口昭弘教授、小野寺秀一教授、竹田保之教授および上野敬司准教授、ならびに、2年にわたり共同で試験醸造を実施し、貴重なご意見を賜りました、(有)栗澤ワインズ・KONDO ヴィンヤード近藤良介氏およびさっぽろ藤野ワイナリー(株)浦本忠幸氏に、厚く御礼申し上げます。

GC/MS と ICP/MS による測定およびデータ解析に関して、専門的なご指導を頂きました、(一財)北海道薬剤師会公衆衛生検査センター 試験検査部 花井潤師技術顧問、中村次也部長、飛山毅次長および田中稔泰所長に心から御礼申し上げます。

また、酢酸測定に関して、御協力、御助言を頂きました、(地独)北海道立総合研究機構 産業技術環境研究本部 食品加工研究センター 川上誠氏、佐藤理奈氏、(特非)ワインクラスター北海道 阿部眞久氏、酪農学園大学 阿部茂教授、札幌国税局 課税第二部 鑑定官室 橋口知一室長、北山賀隆主任、酒税課 団体企業係 神高章弘係長ならびに、北海道ワイナリー(株)製造本部 河西由喜部長に、深く御礼申し上げます。

最後に、本研究に際し、多方面で御協力頂きました、応用微生物学研究室 HUDAGLA 氏、前野奈緒子氏、吉田訓子氏および研究室の皆様に、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Maghradze, D., Aslanishvili, A., Mdinradze, I., Tkemaladze, D., Mekhuzla, L., Lordkipanidze D., Jalabadze, M., Kvavadze, E., Rusishvili, N., McGovern, P., This, P., Bacilieri, R., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Toffolatti, S.L., De Lorenzis, G., Bianco, P.A., Quaglino, F., Wales, N., Gilbert, M.T.P., Bouby L., Kazeli, T., Ujmajuridze L., Mamasakhlisashili, L., Batiuk, S., Graham, A., Boaretto, E., Cheishvili A. and Davitashvili. L. (2019). Progress for research of grape and wine culture in Georgia, the South Caucasus. *BIO Web of Conferences*, **12**, 03003
- 2) ジュール・ゴベール=テュルパン (2018). 「ワインの世界地図」, 株式会社パイ インターナショナル, 東京, pp.6-23.
- 3) アントワーン・ルプティ・ド・ラ・ヴィーニュ (2015). 「ビオダイナミ・ワイン 35のQ&A」, 白水社, 東京, pp. 19-62.
- 4) Barata, A., Malefeito, M. F. and Loureiro V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 243-259.
- 5) Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M. and Comitini, F. (2018). Fitness of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for white wine Piceno DOC wines production. *Fermentation*, **4**, 37
- 6) Jolly N. J., Varela, C. and Pretorius, I. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces cerevisiae* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res*, **14**, 215-237
- 7) Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.*, **33**, 271-281
- 8) Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M., (2011). Selected non-*Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, **28**, 873-882.
- 9) Canonico, L., Comitini, F. and Ciani, M. (2018). *Torulaspora delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiol.*, **74**, 100-106.
- 10) Monaco, S. M., Barda, N. B., Rubio, N. C. and Caballero, A. C. (2014). Selected and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *J. Appl.*

Microbiol., **117**, 451–464.

- 11) Romani, C., Lencioni, L., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M. and Domizio, P. (2018). *Schizosaccharomyces japonicus*: A polysaccharide-overproducing yeast to be used in winemaking. *Fermentation*, **4**, 14.
- 12) Ciani, M. and Comitini, F. (2019). Chapter 4 Use of non-*Saccharomyces* yeasts in red winemaking, in "Red Wine Technology," ed. by Morata, A., Academic Press, UK, pp. 51–68.
- 13) Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res*, **10**, 123–133.
- 14) Hirota, T., Yamazaki, T., Yasui, Y., Furukawa, J., Niwa, K., Nemoto, M., Hamasaki, T., Shimoda, S., Kanno, H., and Nishino, Z. (2016). Climate change favors viticulture and wine production in Hokkaido, Japan. -An example of Pinot Noir cultivation since 1998-. *Climate in Biosphere*, **17**, 34–45.
- 15) 島村菜津, 合田泰子, 北嶋裕 (2017). 「ジョージアのクヴェヴリワインと食文化」, 誠文堂新光社, 東京, pp. 4–21.
- 16) Morata, A., González, C., Tesfaya, W., Loira, I. and Suárez-Lepe, A. (2019). Chapter 3 Maceration and fermentation: new technology to increase extraction, in "Red Wine Technology," ed. by Morata, A., Academic Press, UK, pp. 35–49.
- 17) Saito, A., Ikeda, S., Noritake, C., Akasaka, M., Fujishiro, K., Ando, K. and Minamisawa, K. (2007). Evaluation of microbial diversity using ribosomal intergenic spacer analysis. *JSME, microbes and environments*, **22**, 59–71. (斎藤朝美, 池田成志, 則武ちあき, 赤坂真理子, 藤城圭輔, 安藤勝彦, 南澤究. RISA法による微生物多様性評価. 日本微生物生態学会誌)
- 18) HUDAGULA. (2019). Construction of a Database for MALDI-TOF / MS Identification of Wild Yeast and Screening of Wild Yeast Habitated in Vinyard as Microbial Pesticide Candidates against Grape Gray Mold Disease. 酪農学園大学大学院修士論文.
- 19) Li, H., Tao, Y. S. and Wang, H. (2008). Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli county (China). *Eur Food Res Technol*, **227**, 287–292.
- 20) Culleré, L., Lopéz, R. and Ferreira, V. (2019). Chapter 20 The instrumental analysis of aroma-active compounds for explaining the flavor of red wine. in "Red Wine Technology," ed. by Morata, A., Academic Press, UK, pp. 283–307.

- 21) Moyano, L., Zea, L., Moreno, J. and Medina, M. (2002). Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7356–7361.
- 22) Ivit, N. N., Longo, R. and Kemp, B. (2020). The effect of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces non-cerevisiae* yeasts on ethanol and glycerol levels in Wine. *Fermentation*. **6**, 77.
- 23) Sánchez, G. I., Suáldea, B. B. and Moreno, V. M. (2019) Chapter 6 Malolactic fermentation. in "Red Wine Technology," ed. by Morata, A., Academic Press, UK, pp. 85–98.
- 24) Benito, A., Calderon, F., Palomero, F. and Benito, S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces thermotolerans* yeast strain as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, **20**, 9510–9523.
- 25) Cabrita, M. J., Martins, N., Barrulas, P., Garcia, Dias. C. B., Álvarez, E. P. P., Freitas, A. M. C. and Cerdán, T. G. (2018). Multi-element composition of red, white and palhete amphora wines from Aletejo by ICPMS. *Food Control*, **92**, 80–85.
- 26) Díaz, C., Laurie, V. F., Molina, A. M., Bücking, M. and Fischer, R. (2013). Characterization of Selected Organic and Mineral Components of Qvevri Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **64**, 532–537.
- 27) Danilewicz, J. C. (2016). Chemistry of Manganese and Interaction with iron and Copper in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **67**, 377–384.
- 28) 谷宣英. (2014). 「ワイン テイスティングバイブル」, 株式会社ナツメ社, 東京, pp. 20–84.
- 29) 東原和成, 佐々木佳津子, 渡辺直樹, 鹿取みゆき, 大越基裕 (2017). 「日本のワインアロマホイール&アロマカードでわかる! ワインの香り」, 虹有社, 東京, pp. 41–74.
- 30) Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. and Labadie, M. D. (2004). Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1255–1262.
- 31) Prak, S., Gunata, Z., Guiraud, J. P. and Galindo, S. S. (2007). Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiol.*, **24**, 271–280.
- 32) Kato, H. (2014). Effect and mechanism of TCA to wine flavor. *J. of Brew. Soc. Japan*, **109**, 426–432.

- 33) Patil, S. H., Banerjee, K., Utture, S. C., Fontana, A. R., Altamirano, J. C., Oulker, D. P., Wagh, S. S., Dasgupta, S., Patil, S. B., Jadhav, M. R., Ugare, B.R., Adsule, P. G. and Deshmukh, M. B. (2011). Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by GC-MS. *Food Chem.*, **124**, 1734–1740.
- 34) López, M. C., Mateo, J. J. and Maicas, S. (2015). Screening of β -glucosidase and β -xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. *J. Food Sci.* **80**, 1696–1704.
- 35) Hu, K., Zhu, X.L., Ma, Y., Ullah, N. and Tao, Y.S. (2015). A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement. *Lett. Appl. Microbiol.*, **62**, 169–176.
- 36) Wang, X.C., Li, A. H., Dazy, M., Ullah, N., Sun, W. X. and Tao, Y. S. (2017). Evaluation of aroma enhancement for “Ecolly” dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.*, **228**, 550–559.
- 37) Berata, A., González, S., Ferreira, M. M., Querol, A. and Loureiro, V. (2008). Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1008–1017.
- 38) Porutugal, C., Pinto, L., Ribeiro, M., Tenorio, C., Igrejas, G. and Larrea, F. R. (2015). Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii*. *Int. J. Food Microbiol.*, **210**, 113–120.
- 39) Kobayashi, H. (2012). Control of volatile Compounds in Winemaking. *BIO INDUSTRY*, **29**, 37–44.
- 40) Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Ferreira, M. M. and Loureiro, V. (2006). Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guiliermondii* in grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 133–138.
- 41) Chovanová, K., Kraková, L., Ženišova, K., Turcovská, V., Brežná, B., Kuchta, T. and Pangallo, D. (2011). Selected and identification of autochthonous yeasts in slovakian wine samples using a rapid and reliable three-step approach. *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 231–237.
- 42) Raspor, P., Milek, D. M., Avbelj, M. and Čadež N. (2010). Biocontrol of gray mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technol. Biotechnol.*, **48**, 336–343.
- 43) Haas, D., Galler, H., Habib, J., Melkes, A., Schlacher, R., Buzina, W., Friedl, H., Marth, E. and Reinthaler, F. F. (2010). Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars. *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 126–132.

- 44) Barreto, B. C., Boas, L.V., Carneiro, L. C. and Romão, M. V. S. (2011). Volatile compounds in samples of cork and also produced by selected fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 6568–6574.
- 45) Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. and Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin a producers in Portuguese wine grapes. *Food Microbiol.*, **88**, 63–68.
- 46) Darriet, P., Pons, M., Lamy, S. and Dubourdieu, D. (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4835–4838.
- 47) Darriet, P., Lamy, S., Guerche, L., Pons, M., Dubourdieu, D., Blancard, D., Steliopoulos, P. and Mosandl, A. (2001). Stereodifferentiation of geosmin in wine. *Eur Food Res Technol*, **213**, 122–125.
- 48) Sugiura, N., Okano, K., Burns, B. P., Utsumi, M., Inamori, Y., Nishimura, O. and Sudo, R. (2006). Adsorption and biodegradation characteristics of musty odorous compounds, 2-methylisoborneol and geosmin. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, **42**, 85–91.
- 49) Moura, A. V., Schuller, D., Faia, A. M., Silva, R., Chaves, S., Sousa, M. J. and Real, M. C. (2011). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 271–280.
- 50) Lambrechts, M. G. and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, **21**, special issue 97.
- 51) Miranda, A., Pereuda, V., Pontes, M., Albuquerque, F. and Marques, J. C. (2017). Acetic acid and ethyl acetate in Madeira wine: Evolution with ageing and assessment of the odour rejection threshold. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **32**, 1–11.
- 52) Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R. and Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4048–4054.
- 53) Siebert, T. E., Smyth H. E., Capone, D. L., Neuwöhner, C., Pardon, K. H., Skouroumounis, G. K., Herderich, M. J., Sefton, M. A. and Pollnitz, A. P. (2005). Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 937–947.
- 54) Juan, F. S., Cacho, J., Ferreira, V. and Escudero, A. (2012). Aroma chemical composition

- of red wines from different price categories its relationship to quality. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 5045–5056.
- 55) Moura, A. V., Schuller, D., Faia, A. M. and Real, M. C. (2008). Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 881–890.
- 56) International Organization of Vine and Wine. (2019). International Code of Oenological Practices. OIV, Paris, pp. 429–430.
- 57) 公益財団法人 日本醸造協会. (2017). 「酒類総合研究所標準分析法注解」, 初版, 東京, pp. 7–44, 78–102.
- 58) 株式会社島津製作所 (2014). 有機酸分析法. 特開 2014-48137, 3月17日.
- 59) Villén, J., Señoráns, J. F., Reglero, G. and Herraiz, M. (1995). Analysis of wine aroma by direct injection in gas chromatography without previous extraction. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 717–722.
- 60) Pinu, F. R. and Boas, S. G. (2017). Rapid quantification of major volatile metabolites in fermented food and beverages using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites*, **7**, 37.
- 61) Louw, L., Roux, K., Tredoux, A., Tomic, O., Nase, T., Nieuwoudt, H. H. and Rensburg, P. V. (2009). Characterization of selected South African young cultivar wine using FT-MIR spectroscopy, gas chromatography, and multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2623–2632.
- 62) Kobayashi, R., Matsumoto, M., Takahara, Y. and Tanaka, T. The methylene blue adsorption properties by kanpyo product. *J. Technology and Education*, **25**, 7–11. (小林稜, 松本将弥, 高原美規, 田中孝国. 紐状干瓢製品の示すメチレンブルー吸着特性, 技術・教育研究論文誌).
- 63) Juan, F. S., Ferreira, V., Cacho, J. and Escudero, A. (2011). Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 7916–7924.
- 64) Goto, N. (2013). Terminology of wine aroma evaluation. *Journal of Japan Association on Odor Environment.*, **44**, 390–396. (後藤奈美. ワインの香りの評価用語, におい・かおり環境学会誌).
- 65) Bely, M., Rinaldi, A. and Dubourdieu, D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. biosci. bioeng.*, **96**, 507–512.

- 66) Erasmus, D. J., Cliff, M. and Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 371–378.

引用 URL

- i) 国税庁 酒類の表示地理的表示 「北海道」生産基準
https://www.nta.go.jp/taxes/sake/hyoji/chiri/1806_besshi01.htm (2018. 6.28)