

2022 年度
修士論文

ハスカップ果皮を原料とするワイン醸造条件の基礎検討
Basic Study of Winemaking Conditions using Haskap Peel
as a Raw Material

22034002 前野 奈緒子
Maeno Naoko

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とハスカップ果皮の発酵試験	
緒言 (I)	2
方法 (I)	3
1. 野生酵母の分離培養	3
(1) 培地調製	
(2) 集積培養	
(3) 選択培養	
(4) 増菌培養	
2. MALDI-TOF/MS を用いた酵母種の同定	4
(1) 試薬	
(2) タンパク質抽出	
(3) 酵母種の同定	
(4) 同定酵母の保存	
3. ハスカップ果皮発酵試験	5
(1) ハスカップ果皮の前処理	
(2) 酵母の準備	
(3) 発酵・搾汁	
4. 発酵特性の評価	6
(1) Brix 糖度・pH	
(2) EtOH 濃度	
(3) 吸光度測定	
(4) 官能評価	
結果 (I)	
1. MALDI-TOF/MS を用いた酵母種の同定	10
2. 発酵特性の評価	10

- (1) Brix 糖度・pH
- (2) EtOH 濃度
- (3) 吸光度 (525 nm)
- (4) 官能評価

考察 (I)	15
--------	----

第 II 章 ハスカップ果皮の貴腐化とワイン風味への影響

緒言 (II)	18
---------	----

方法 (II)	19
---------	----

1. ヴィンヤードからの <i>B. cinerea</i> 分離	19
-----------------------------------	----

- (1) 分離源試料
- (2) 分離培養
- (3) DNA 塩基配列解析による菌種同定

2. ハスカップ果皮の貴腐化	20
----------------	----

- (1) 使用菌株
- (2) 胞子の採取
- (3) *B. cinerea* 胞子噴霧による貴腐化
- (4) *B. cinerea* 菌体ディスクによる貴腐化

3. 貴腐化ハスカップ果皮の酵母発酵	22
--------------------	----

- (1) 使用酵母
- (2) 発酵特性の評価

結果 (II)	23
---------	----

1. <i>B. cinerea</i> の分離同定	23
----------------------------	----

2. <i>B. cinerea</i> によるハスカップ果皮の貴腐化	23
-------------------------------------	----

- (1) 使用菌株の選定
- (2) ハスカップ果皮の貴腐化

3. 貴腐化ハスカップ果皮の酵母発酵	24
--------------------	----

(1) Brix糖度・pH	
(2) EtOH濃度	
(3) 吸光度 (525 nm)	
(4) 官能評価	
考察 (Ⅱ)	29
要約	31
Summary	33
謝辞	35
引用文献	36

緒論

ハスカップは主に北海道に自生し、厚真町をはじめ一部地域で栽培されている北方系小果実である。さわやかな酸味と甘みのバランスが取れた風味で人気があり、果実にはビタミンCやミネラルが含まれ、果皮にはアントシアニンなどのポリフェノールが豊富に含まれている¹⁾。ポリフェノールのうち8割程度をシアニジン-3-グルコシドが占め、ハスカップ特有の赤紫色はこの色素に起因している²⁾。

ハスカップは果実が柔らかく傷みやすいことから生の状態での流通は限られており、主に凍結果実やジャムなどの加工食品として流通されている。また、近年の健康志向においてその機能性への注目が集まり、果汁飲料に使用されるなど全国的に需要が高まりつつある。その一方で栽培地域が限られていること、さらに2019年の胆振東部地震の影響や生産者の高齢化により、今後、一層生産量が減少する可能性がある。

ハスカップ果汁の搾汁歩留まりは60%程度で、その残さはほとんどが果皮部分であり、アントシアニンを依然、豊富に含むが、これまで食素材としての有効利用はなされてこなかった。そのため、本研究ではハスカップ搾汁残さの高付加価値化による有効利用を目的とし、さわやかな酸味と鮮やかな色調を持つハスカップ搾汁残さの特徴を十分に活かしたワインの醸造を目指した。

本研究の第Ⅰ章では、ブドウよりもpHが低く^{3,4)}ポリフェノール濃度の高いハスカップ果皮においても十分なアルコール発酵が可能な野生酵母の探索と試験醸造を行った。ハスカップ果実から採取した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)により同定した酵母と、一般的なワイン酵母である*Saccharomyces cerevisiae*等の酵母を用い、発酵能と風味への影響を評価した。

第Ⅱ章では果皮特有の酸味とポリフェノールによる渋みを抑え風味を向上させること、およびpHを上昇させアルコール発酵を促進させることを目的とし、貴腐菌として知られる*Botrytis cinerea*を用いたハスカップ果皮の貴腐発酵条件について検討した。

第 I 章 野生酵母の分離同定とハスカップ果皮の発酵試験

緒言 (I)

ワイン醸造に用いられている一般的な酵母は *S. cerevisiae* であるが、自然界には *Hanseniaspora* 属や *Candida* 属など多種多様な野生酵母が生息し、酵母によって発酵特性が大きく異なる。ゆえに、一般的なブドウの pH 3~4 に比べて低く pH 2.7 程度^{3,4)} であるハスカップを用いた発酵では、ワイン醸造に汎用される市販酵母 *S. cerevisiae* を用いた場合にアルコール発酵の阻害される懸念がある。よって、本研究ではブドウと異なる成分組成で pH もより低値であるハスカップ果皮に適した酵母を探索することを目的とする。また、使用する酵母の分離をハスカップ果実から試みることでハスカップをテーマとし存在感を強調し、独自性を持ったワインの製品化を目指す。酵母を 10% のグルコースを含む集積培地で増菌培養後、糖資化性による選択性を高めるためのラフィノース添加とアルコール耐性の高い酵母を得るための 99.5% 特級エタノール (EtOH) 8% を添加した選択培地 (RE8.0 培地) を用いて培養した。酵母種の同定には、微生物中のリボソームタンパク質のマススペクトルプロファイルデータベースと照合する簡便・迅速な微生物同定法として注目されている MALDI-TOF/MS を用いる⁵⁾。

酵母種の選抜に関しては、ワインとして風味が好ましいだけでなく、色調が美しいこと、ハスカップの特徴的な風味を損なわないこと、さらに製品として醸造する上で一定の品質が保持できることを考慮する。これらの条件を満たしたワインを醸造するためにハスカップ果実から分離した酵母のほか、研究室保有の野生酵母と市販のワイン用酵母を含め、それぞれの酵母につき発酵前後の Brix 糖度、pH、EtOH 濃度および色調や風味などの発酵特性を評価する。

方法 (I)

1. 野生酵母の分離培養

(1) 培地調製

集積培養にはYPD (10% グルコース) 培地を、選択培養にはRE8.0培地を使用した (Table 1, 2)。各試薬と蒸留水を混合しオートクレーブ (LBS-325, Tomy)で121 °C-20 min 滅菌した。また、官能評価の試飲のため、ワインの醸造試験に用いる酵母の増菌培養に用いるYPD (2% グルコース) 培地はクロラムフェニコールやプロピオン酸ナトリウムなどの抗菌剤を加えずに作成した (Table 1)。RE8.0寒天培地は各試薬と蒸留水を混合しオートクレーブで121 °C-20 min 滅菌後、恒温槽で55 °Cに保温した状態で99.5% 特級エタノール (EtOH)を加え混合して作成した (Table 2)。

(2) 集積培養

分離源試料としてハスカップの生果実 (はすかつぷサービス提供)を用いた。YPD (10% グルコース) 培地 25 mLを50 mLチューブ入れ、果実2〜3粒を浸漬しフタを緩め25 °Cで3〜10日間培養した (Photo. 1)。

(3) 選択培養

集積培養後の白色沈さ(菌体)を白金耳でRE8.0寒天培地に画線し25 °Cで11日間培養した。一部のチューブでは浮遊した果実にかびが発生していたため、パスツールピペットを用いて注意深く菌体を取り出した。

(4) 増菌培養

RE8.0寒天培地上のシングルコロニー (Photo. 2) をYPD (2% グルコース)液体培地 3 mLに釣菌し、25 °Cで3〜7日間培養した。

2. MALDI-TOF/MSを用いた酵母種の同定

(1) 試薬

マトリックス (HCCA: α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)(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) は添付書にしたがって調製した。タンパク質抽出溶媒にはギ酸 (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

YPD2%液体培地で約1週間培養した菌体懸濁液0.2～0.5 mL (菌体量により調整)を1.5 mLチューブに分取し、10000 r/min－5 min－25 °Cの条件で遠心分離した (3700, Kubota)。遠心上清を除去し、注射水 (日本薬局方, 大塚製薬) 300 μ Lを加え、沈さをボルテックスミキサーで良くかくはんし分散させた。その後、99.5% EtOH (特級, Wako) 900 μ Lを加え、転倒混和し再度良くかくはんした。遠心分離 (15000 r/min － 5 min－25 °C) 後の上清を除き、さらにチューブをスピンドウンして残液を完全に除去した後、70% ギ酸溶液 20 μ Lを加え良くかくはんした。アセトニトリル 20 μ Lを添加し再度かくはん後、遠心分離 (15000 r/min－5 min－25 °C) 後の上清10 μ Lを0.6 mLチューブに分取した。このタンパク質抽出液は、用時調製とした。

(3) 酵母種の同定

Target Plate (MTP384 target plate polished steel BC, Bruker) にBTS 1 μ Lおよびタンパク質抽出液1 μ Lをスポットし、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 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スポット調製し、各スポットを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。菌体タンパク質のマスペクトルパターンをデータベース上の特定の菌種と照合し、一致率によりスコアが示される。スコア2.0以上で菌種が、1.7以上では属までの同定が可能である⁵⁾。

(4) 同定酵母の保存

MALDI-TOF/MSによる同定後の酵母懸濁液 1 mLを遠心分離 (3000 r/min－10 min－25 °C) し上清をデカンテーションにより捨てた。YPD2%液体培地と滅菌30% グリセロールを等量混合した保存液約 1 mLを菌体に加え分散させた。この菌体懸濁液約0.2 mLを1.5 mL滅菌チューブに分注し、- 80 °Cで凍結保存した。

3. ハスカップ果皮発酵試験

(1) ハスカップ果皮の前処理

冷凍保存されたハスカップ果皮を解凍後オートクレーブで加熱殺菌 (60 °C－30 min) した。殺菌した果皮100 gに対して蒸留水100 mL、D-グルコース40 gを加えてミルサー粉砕し、ペースト状としジップロックに入れて - 30 °Cで冷凍保存した。

なお、発酵試験における比較対照としてブドウ果汁を用いた。学内栽培ブドウのピノ・ノワール果実 (ワインサークルROWP提供) を搾汁し、得られた果汁を加熱殺菌 (60 °C－30 min) 後、100 mLチューブに50 mLずつ分注して - 30 °Cで冷凍保存した。

(2) 酵母の準備

酵母は、ハスカップ果実から分離した *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* および研究室保有の野生酵母 *C. parapsilosis*, *Hanseniaspora vineae* ならびに市販のワイン用スターター酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Pasteur Red, Fermentis) を使用した。各菌体保存液 2白金耳をYPD2%培地4 mLに加え、25 °Cで1週間増菌培養した。

官能評価用に調製したクロラムフェニコールおよびプロピオン酸ナトリウムを添加していないYPD2%培地100 mLに各菌体の増菌培養液0.1 mLを加え、25°Cで60時間振とう培養した後、4 °Cの冷蔵庫で24時間静置して酵母菌体を沈降させた。上清を吸引除去し、菌体と合わせて100 mLになるように滅菌生理食塩水を加え、良くかくはん懸濁させた後、セルカウンター (バイオメディカルサイエンス) により各酵母の菌数を計測した。この懸濁液を40 mLず

つ50 mLチューブに分注し、遠心分離 (10000 r/min－10 min－25 °C) した上清を捨て、滅菌生理食塩水を加え、最終的に 1.8×10^9 cells/mLの酵母懸濁液を調製した。

(3) 発酵・搾汁

解凍した前処理後のハスカップ果皮に、 1.8×10^9 cells/mL 酵母懸濁液1 mLを加え、良く混合し20 °Cの恒温器内で14日間発酵させた。発酵当日、3、7および14日に発酵物の一部を採取した。発酵14日にはハスカップ果皮固形物を含む発酵物をガーゼと手動式圧搾機（しぼりーな、一興）を用いて搾汁した。

4. 発酵特性の評価

(1) Brix 糖度・pH

凍結保存した発酵試料を解凍後ボルテックス混合し Brix 糖度(POCKET PAL-1, Atago) および pH (F - 54S, Horiba)を測定した。

(2) EtOH 濃度

アルコール脱水素酵素 (ADH, Wako) により EtOH がアセトアルデヒドに酸化される際、酸化還元酵素であるジアフオラーゼ (DP, Wako) によりニトロブルーテトラゾリウム (NBT, Wako) が青紫色に発色することを利用した酵素法により測定した。

解凍した発酵試料 100 μ L と蒸留水 900 μ L を 1.5 mL スクリューチューブに加えてかくはんし、酵素反応系への妨害を防ぐため 5 分間沸騰水中で加熱した。さらに色素成分による発色反応系への妨害を防ぐため活性炭 0.04 g (ブドウ果汁は半量)を加え 15 秒間ボルテックスかくはんし、遠心分離 (15000 r/min－5 min－25 °C) した。遠心上清 100 μ L を蒸留水 700 μ L で希釈し測定試料とした。

EtOH 標準溶液および試料溶液の濃度系列は全ウェルに 50 μ L の蒸留水を加えた 96 well プレート内で段階希釈し調製した。標準溶液は 0.8% EtOH 溶液 50 μ L と蒸留水 50 μ L を順次混合し 0.4 および 0.2%濃度を作成した。試料溶液は 160～1280 倍の希釈液を作成した。

酵素反応試液は、6 mmol/L NAD 1 mL、0.2 mol/L Tris (pH 8.9)–1% Triton X100 3 mL、10 mmol/l NBT 0.5 mL を混合した基質・緩衝液と、蒸留水 0.17 mL、12 U/mL ADH 0.03 mL、100 U/mL DP 0.3 mL を混合した酵素液 (ブランク試液は蒸留水 0.5 mL とする) それぞれを使用直前に混合し 96well プレートに 50 μ L ずつ分注した。プレートを 37 $^{\circ}$ C アルミブロック上で 30 分間反応させ、550 nm における吸光度を測定した (Emax, Molecular Devices)。

これらの反応液の吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値と標準液の検量線を用いて試料溶液の EtOH 濃度を求めた。試料溶液の EtOH 濃度に希釈倍率を乗算して元の発酵試料の EtOH 濃度を算出した。

(3) 吸光度測定

ハスカップ果皮 1 g に蒸留水 9 mL を加え 5 分間激しく振とう後 (ダイレクトミックス, サーマル化学産業)、遠心分離 (10000 r/min–10 min–25 $^{\circ}$ C) により得られた上清を分取し、蒸留水で 5 倍に希釈後、吸光度を測定した (U-2900, Hitachi)。測定波長はこの試料液の吸収スペクトルとシアニジンのスペクトル特性⁶⁾を考慮し 525 nm とした。ハスカップ果皮の発酵試料は 20 μ L を蒸留水 4980 μ L で希釈し吸光度を測定した。

(4) 官能評価

白ワインの官能表現チャート⁷⁾ (日本ソムリエ協会) を参考に一般的な白ワインの風味と発酵試料の風味を比較した。また、発酵試料において特有にみられた苦みや退色の程度について酵母ごとに評価した。

Table 1 酵母汎用集積培地：YPD 2%・10 % 培地

蒸留水	200 mL
酵母エキス (212750, BD)	2.0 g
ポリペプトン (392-02115, 日本製薬)	4.0 g
D- グルコース (和光, 特級)*	4.0 g
クロラムフェニコール (0827-14, ナカライテスク)**	0.02 g
プロピオン酸ナトリウム (198-03015, 和光)**	0.4 g

→オートクレーブ121℃-20 min滅菌処理

*10%時は20 gとした

**ワイン発酵試験用の酵母増菌時には加えない

Table 2 酵母選択培地：RE8.0 寒天培地

蒸留水	184 mL
イーストニトロゲンベース (239210, BD)	1.34 g
D(+)-ラフィノース (36000-30, 関東化学)	2.0 g
クロラムフェニコール (0827-14, ナカライテスク)	0.1 g
アガロース (BA-10, 伊那食品)	4 g
99.5 %特級エタノール (特級, 和光)*	16 mL

→オートクレーブ121℃-20 min滅菌処理後温浴内で55℃に冷却

*滅菌処理後55℃冷却して加えた



Photo. 1 YPD10%培地による集積培養

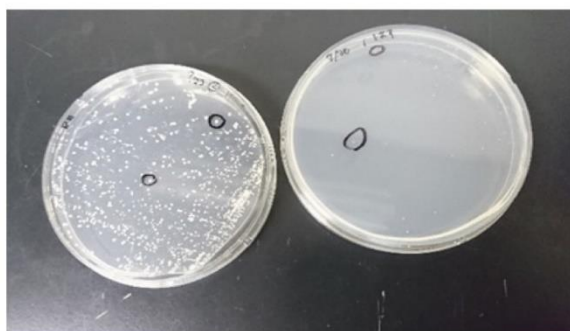


Photo. 2 RE8.0寒天培地上の分離コロニー

結果 (I)

1. MALDI-TOF/MSによる酵母種の同定

ハスカップ果実から、*Kloeckera apiculata* 1株、*Candida krusei* 2株、*C. sorbosa* 1株および *Candida* 属の酵母6株の合計11株の野生酵母が同定されたが、2菌株はデータベースに含まれず同定不能であった (Table 3)。

2. 発酵特性の評価

(1) Brix糖度・pH

ハスカップ果皮、ブドウ果汁ともに *H. vineae*, *S. cerevisiae* および *K. apiculate* は発酵7日までにBrix糖度は大きく低下し約10%でほぼ一定となった。これに対し、*C. krusei* は発酵7日まで緩やかに低下し14日で先の酵母種と同程度の10%まで低下した (Fig. 1)。また *C. parapsilosis* は数%程度の低下に留まった。

一方、pHについては、ハスカップ果皮、ブドウ果汁ともに *H. vineae* と *K. apiculate* は発酵7日で上昇を認めたが、他の酵母種ではほぼ変化はなかった (Fig. 2)。

(2) EtOH 濃度

発酵 14 日でハスカップ果皮は *C. krusei* が 12.4%と最も EtOH 濃度が高く、次いで *H. vineae* 12.1%、*S. cerevisiae* 10.1% および *K. apiculate* 8.7%であった (Fig. 3)。一方、ブドウ果汁では、*S. cerevisiae* が 14.6%と最も高く、次いで *H. vineae* 13.2%、*C. krusei* 13.1%、および *K. apiculate* 10.0%を示した。Brix 糖度がほぼ低下していなかった *C. parapsilosis* ではあるが、EtOH 濃度はハスカップ果皮 8.7%、ブドウ果汁 7.6 %まで上昇を認めた (Fig. 3)。

(3) 吸光度 (525 nm)

目視でもハスカップに特徴的な赤色の退色が感じられた *K. apiculate* の吸光度は 0.170 と最も低く、退色をほとんど感じなかった *C. krusei* は 0.235 および *S. cerevisiae* が 0.232 であった (Fig. 4)。

(4) 官能評価

C. krusei のハスカップ果皮ワインでは、ハスカップ果実特有の香り、酸味および色調が保たれ、さわやかで野性味がありバランスの取れた風味が特徴であった (Table 4)。しかしながら *C. krusei* はブドウ果汁ワインでは、フルーティーな香りが見られた一方で浮遊物が多く雑味となった。*K. apiculate* は、ハスカップ果皮、ブドウ果汁いずれもフレッシュな酸味を感じたが酢酸エチル様のエステル刺激臭と退色が見られた。*C. parapsilosis* は、ほのかな酵母臭を感じたが、ハスカップ果皮、ブドウ果汁いずれも発酵前とほとんど風味が変わらなかった。*H. vineae* では、ハスカップ果皮、ブドウ果汁いずれも強いアルコール臭があり、素材特有の香りや風味が褪せた上に強いえぐみを感じた。*S. cerevisiae* のブドウ果汁ワインは一般的な白ワインの風味であり、ハスカップ果皮も同様に白ワインに近い味わいとなったが、ハスカップ果実特有の風味が褪せて苦味が目立った。

Table 3 ハスカップ果実分離酵母のMADI-TOF/MS同定結果

菌種	株数	Score
<i>Kloeckera apiculata</i>	2	2.584
<i>Candida krusei</i>	2	2.345
<i>C. sorbosa</i>	1	2.000
<i>Candida</i> sp.	6	1.918
not reliable identification	2	—
合計	13	

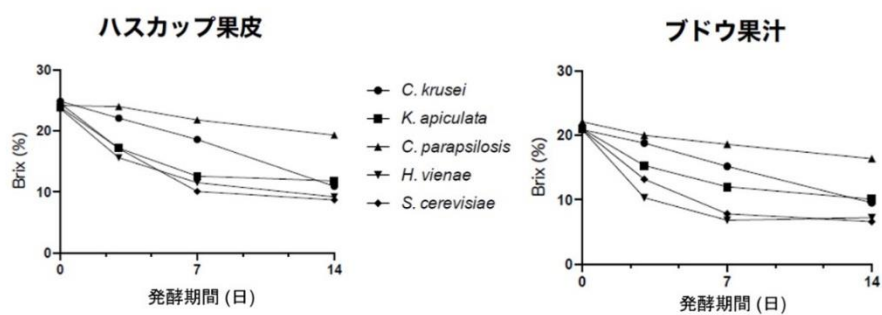


Fig. 1 酵母の発酵特性評価 - Brix糖度

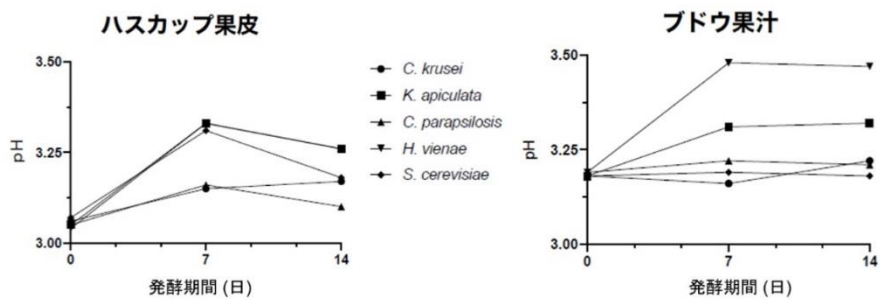


Fig. 2 酵母の発酵特性評価 - pH

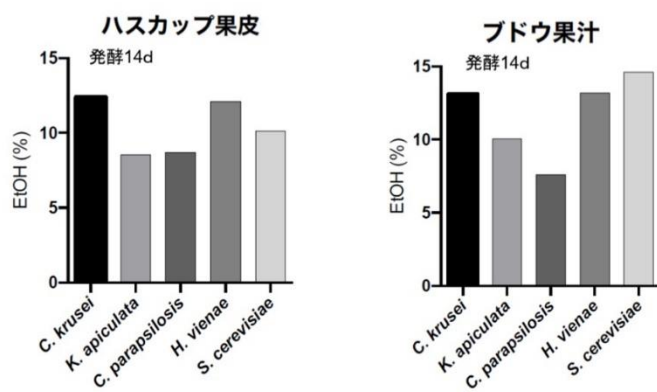


Fig. 3 酵母の発酵特性評価 - EtOH濃度

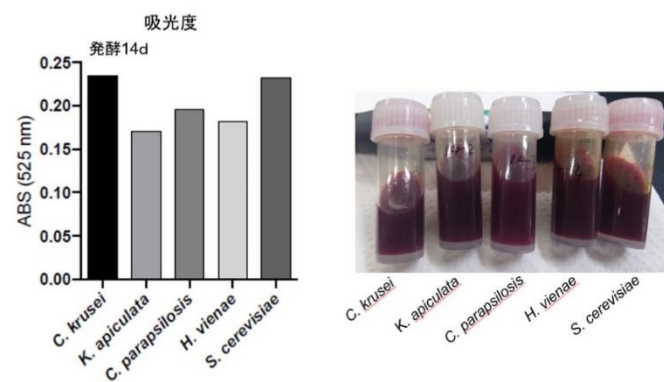


Fig. 4 酵母の発酵特性評価 - 吸光度 (525 nm)

Table 4 ハスカップ果皮ワインの官能評価結果

酵母種	EtOH濃度	風味	苦味	色調	特徴
<i>C. krusei</i>	12.4	+++	+	+++	ハスカップ特有の風味を残しバランスの取れた味わい
<i>K. apiculata</i>	8.5	++	+	+	酢酸エチル臭 退色
<i>C. parapsilosis</i>	8.7	+	+	+++	アルコールが感じられない
<i>H. vienae</i>	12.1	+	+++	+	風味の消失 えぐみ
<i>S. cerevisiae</i>	10.1	++	++	+++	若干の風味の褪せ、苦みがみられる色調を保つ

*風味は一般的な白ワインとの比較

考察（I）

本研究ではハスカップ特有の風味と鮮やかな赤色を活かした上で、微生物汚染からワイン品質を守るために EtOH 濃度 8%以上までアルコール発酵が可能な酵母を探索することとした。ハスカップの pH は 2.7 程度といわれており、一般的なブドウの pH 3~4 に比べて低い^{3,4)} ため、ワイン醸造に汎用される市販酵母 *S. cerevisiae* ではアルコール発酵が阻害されることが懸念された。しかし、実際のハスカップ果皮ワイン（発酵開始時 pH 3.1）においてもブドウ果汁（発酵開始時 pH 3.2）と同様に *S. cerevisiae* を含め *C. parapsilosis* 以外の酵母は、問題なくアルコール発酵が進むことが確認できた（Fig. 1-3）。

ハスカップ果実から分離した酵母 *K. apiculate* は EtOH に加え酸を生成するヘテロ発酵型の酵母である^{8,9)}。また *C. krusei* は自然界に広く分布する酵母⁹⁾でありリンゴ酸を分解することで pH を上昇させる特徴がある¹⁰⁾。この酵母のテレオモルフ *Pichia kudriavzevii* は *Candida* 属ではあるが、病原性が広く知られる *Candida albicans* とは遺伝的にはかなり遠縁の関係にある¹¹⁾。また、高温、低 pH や発酵阻害剤への耐性を示す株が報告されているが、*S. cerevisiae* に比べ EtOH 耐性が低いことが示されている¹¹⁾。これらの酵母は自然発酵ワインにおいても良くみられるもので、*Kloeckera* 属は発酵初期に、*Candida* 属および *Pichia* 属はアルコール発酵中から発酵後に分離されており、ワインの発酵や熟成に深く関与していると言われている¹²⁾。

ハスカップ果皮ワインの風味については、ハスカップ果実のさわやかでライトな味わいが赤ワインよりも白ワインに近い⁷⁾ため、一般的な白ワイン用の官能表現チャート⁷⁾を元に評価することとした（Table 4）。*C. krusei* のハスカップ果皮ワインは果実特有の香りや色調を保ち、さわやかな酸味がみられ風味のバランスのとれた仕上がりであった。ブドウ果汁ワインにおいてはフルーティーな香りがみられた一方、液面に酵母の浮遊物が生じ雑味が感じられた。*K. apiculate* はハスカップ果皮、ブドウ果汁ともにフレッシュな酸味を感じた一方、エステル刺激臭と色素の退色がみられた。*C. parapsilosis* ではハスカップ果皮、ブドウ果汁ともに残糖が多くほとんどアルコールを感じられなかった。*H. vineae* は、発酵 7 日からメルカプタ

ン臭がみられたが、発酵14日には目立たなくなった。また、ハスカップ果皮、ブドウ果汁ともに強いアルコール臭とえぐみがみられ、素材特有の風味や香りはほとんど消失していた。*S. cerevisiae*はハスカップ果皮、ブドウ果汁ともに最も一般的な白ワインの風味に近い印象であったが、ハスカップ果皮では果実特有の風味が消失し、フラットな味わいであった。

ハスカップワインの色調について、アントシアニンはpH 3 付近では安定なものの、pH 4 を超えると淡紅色を呈し520 nmの吸光度は徐々に減少する¹³⁾ が、このとき糖濃度が高いほど濃色化効果が大きいとされている¹⁴⁾。実際、pHの上昇が大きい*H. vineae*と*K. apiculata*のハスカップ果皮ワインは、ほかの酵母よりも525 nmにおける吸光度が低い結果となっている

(Fig. 2, 4)。これらの結果より、EtOH産生濃度が最も高く、ハスカップ固有の色調を保ちながらさわやかな風味を与える*C. krusei*はハスカップ果皮ワインの醸造に最も適した酵母であると考えられる。以上の基礎検討を受けて、ハスカップ果皮のアルコール発酵に最も適した野生酵母*C. krusei*を大量培養し(湿重量 20 g)、ばんけい峠のワイナリーにおいて、冷凍ハスカップ果皮20 kg、D-グルコース 4 kgおよび水道水18 Lに加えて、約一ヶ月間室温で醸造した。搾汁から瓶詰めを経て、ハスカップの特徴的な風味と色調を残したアルコール分9%の果実酒として製品化され「はすかつぶクルゼイワイン」と命名した (Photo. 3)。

なお、ばんけい峠のワイナリーにて試験的な醸造を委託した際には、本研究と同様に発酵開始時に果皮をミルサー粉砕した場合と通常のブドウワインの仕込みのように粉砕せずに果皮を浸漬した場合の二通りを行ったが、作業効率面に加えて果皮由来の苦味・渋みなどの雑味を抑制できることから、製品化においては果皮を粉砕せずにそのまま浸漬する方法をとった。

以上、本研究の当初の目的である未利用資源のハスカップ果皮に付加価値を与え有効利用することについて、この「はすかつぶクルゼイワイン」の製品化により達成することができた。



Photo. 3 製品化した『はすかつぶクルゼイワイン』

第Ⅱ章 ハスカップ果皮の貴腐化とワイン風味への影響

緒言（Ⅱ）

第Ⅰ章で醸造したハスカップ果皮ワインは、ハスカップ特有の酸味が特徴的な風味となっているが、一般的なブドウのワインに比べややシャープで単調な印象を受ける。ワインにおいては、単調な味わいよりも複雑な風味をバランス良く合わせもった製品が優れているとされる。このことから最近では、単一の酵母による発酵ではなく、ブドウ果実に着生する多様な酵母を利用した自然発酵ワインに代表される複雑な味わいを特徴とするワイン醸造への関心が高まっている¹⁵⁾。一方、ブドウを原料とするワインの中には濃厚な甘みと特徴的な香りを持った貴腐ワインと呼ばれる伝統的な製品がある。この貴腐ワインは灰色カビ病の原因菌としても知られる糸状菌の*Botrytis cinerea*が、登熟期のブドウ果実で増殖し果皮表面のろう質を溶かすことで穴が空き内部の水分が蒸発して糖分が濃縮されたブドウ果実を原料とする点が特徴である。貴腐ワインの成否は、*B. cinerea*が適度に増殖するための温湿度や、果実が乾燥するための日中の気候条件をはじめとするヴィンヤードの自然環境に大きく左右される¹⁶⁾。

第Ⅱ章では*B. cinerea*による貴腐発酵によりハスカップ果皮のpHを上昇させ、酵母によるアルコール発酵を促進させる効果に加え、第Ⅰ章のハスカップ果皮ワインに複雑な風味と香りを与えることを目的とする。そのため*B. cinerea*を用いたハスカップ果皮の貴腐発酵および、それに続く酵母によるアルコール発酵の基礎条件を検討する。ハスカップ果皮の貴腐発酵には*B. cinerea*菌糸体を直接接種する簡便な方法が考えられるが、菌糸体を乗せた部分から徐々に菌糸体が広がるために、局所的に発酵が進みムラが生じてしまう難点がある。このことから実際のワイン製造時、大量の原料を均一に発酵させる必要を鑑みて*B. cinerea*の胞子を回収し噴霧する方法についても検討する。また、貴腐化したハスカップ果皮を原料としたときのアルコール発酵特性について、第Ⅰ章のハスカップ果皮ワインの醸造に選抜した*C. krusei*を用いて評価する。

方法(Ⅱ)

1. ヴィンヤードからの *B. cinerea* 分離

(1) 分離源試料

B. cinerea の分離源試料として灰色カビ病に罹患した疑いのあるブドウ果実 4 試料； 学内栽培ブドウのキャンベルとピノ・ノワール， ROWP 豊沼ヴィンヤード（砂川市） のソービニヨン・ブランおよび KONDO ヴィンヤード（岩見沢市） のピノ・ノワールを用いた。

(2) 分離培養

ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) (E-MF21, 栄研) 中央に分離源試料の果実を一粒乗せ 25 °C で 14 日間培養後、菌糸体を採取し新たな PDA 培地の中央に接種し 25 °C で 3 日間培養した。

(3) DNA 塩基配列解析による菌種同定

以下の操作にしたがい、分離培養した菌体から DNA を抽出し、PCR 増幅した ITS 領域の DNA 塩基配列を BLAST により検索し菌種を同定した。

培地上の菌体をコルクボーラー (6 mm Φ) で打ち抜き、極小ガラスビーズ (BZ-01, アズワン) 0.3g、ガラスビーズ (BZ-5, アズワン) 2 個を含む 2 mL スクリューキャップチューブ (T-204, BM) に入れ、0.2% SDS-PBS 800 μL を加えて細胞破碎装置 (BC-20, セントラル科学貿易) で激しく振とう (2000 r/min – 3min) した。次に沸騰水中で 10 分間加熱し遠心分離 (15000 – r/min – 5min) 後、上層 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 MagDEADx SV, 以上 PSS) を用いて DNA を抽出した⁵⁾。

PCR 増幅には真菌類 DNA 塩基配列解析用の ITS 領域に対するプライマー Fun-3 ((Forward 5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT / Reverse 5'-CGTTCTTCATCGATG) または Fun-5 (Forward 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG / Reverse 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) を用いた⁵⁾。PCR 反応液の組成は、1× Ex Taq Buffer, 0.22mmol/ L dNTP Mixture, 0.6% Ex Taq (以上, タカラバイオ), 各 0.56 μmol/L Primer Mix (Forward+Reverse, ファスマック) となるよう、注射用水を用いて希釈調製した。この

反応液 18 μ L を 8 連チューブに分注後、DNA 抽出液 2 μ L を加え転倒混和、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、94 $^{\circ}$ C - 10 min の予備加熱後、94 $^{\circ}$ C - 0.5 min (熱変性)、55 $^{\circ}$ C - 0.5 min (アニーリング)、72 $^{\circ}$ C - 0.5 min (伸長) の工程を 30 サイクルとした。PCR 増幅をアガロースゲル電気泳動により確認した。電気泳動は、2%アガロース \times 1 Tris Acetate EDTA Buffer (TAE) (ニッポンジーン) に 2.5 mg/mL エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を加えて調製したゲルおよび 1 \times TAE, 2.5 mg/mL エチジウムブロマイドを混合した泳動液を用いた。泳動に用いる \times 6 Loading Buffer は、グリセリン 15 g, ブロモフェノールブルー 15 mg, 1.5 mol/L EDTA (ニッポンジーン) 3 mL に水を加えた後、全量 50 mL として調製した。PCR 産物 10 μ L に \times 6 Loading Buffer 2 μ L を混合したものと、0.5 μ g/ μ L の 100 bp DNA Ladder (GeneDireX) をそれぞれ 10 μ L ずつゲル内のウェルにアプライし、100 V で 25 分間、電気泳動 (Mupid-2 plus, Advance) を行った。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 (FAS-201, Toyobo) を用いて増幅バンドを確認した。

電気泳動での PCR 増幅確認後、バンドの濃さに応じて 10~50 倍に注射用水で希釈した PCR 産物 10 μ L と 1.61 pmol/ μ L Forward または Reverse プライマー 4 μ L を混合した。この混合液の DNA 塩基配列解析をファスマックに依頼した。得られた塩基配列データを National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST 検索により菌種を同定した⁵⁾。

2. ハスカップ果皮の貴腐化

(1) 使用菌株

B. cinerea は、学内栽培ブドウのキャンベルおよびピノ・ノワール果実から分離した学内ブドウ分離 2 株、砂川市の ROWP 豊沼ヴィンヤードのソービニオン・ブラン果実から分離した砂川ブドウ分離株および岩見沢市の KONDO ヴィンヤードのピノ・ノワール果実から分離した KONDO 株に加えて NBRC 標準株 5964 の合計 5 菌株を使用し、それぞれの菌糸体を PDA 培地中央に接種し 25 $^{\circ}$ C で 2 週間培養し孢子形成を促した。

(2) 孢子の採取

培養後の PDA 培地に滅菌水 10 mL を加えてコンラージ棒で培地表面の菌体をこすり取り、滅菌スポイトを用いて 50 mL チューブに回収した。この操作を合計 3 回行った。回収した菌液 30 mL を 10 分間超音波処理し、乾熱滅菌したグラスウール (Fine 10, Tosoh) を詰めた ガラスロートで菌糸体をろ過除去後、孢子を含むろ液を新たな 50 mL チューブに回収した。b ろ液を遠心分離 (5000 r/min-10min-25 °C) し上清を除去した。沈さに滅菌水 20 mL を加えボルテックス混合し、再度遠心分離して得られた上清を除いた後、滅菌水 2 mL を加えボルテックス混合により孢子懸濁液を調製した。孢子数はセルカウンターを用いて計測した。

(3) *B. cinerea* 孢子噴霧による貴腐化

冷凍ハスカップ果皮約100 gを解凍後、ステンレス製のバットに載せて平らにならし、アルミホイルをかけてオートクレーブを用いて加熱殺菌 (60°C-30 min) した。スプレーボトルで *B. cinerea* 孢子懸濁液約500 μ Lを噴霧し25 °Cで5日間発酵させ、果皮の表面全体を菌体が覆っている状態とした。貴腐発酵を止めるため、アルミホイルをかけて再度、オートクレーブで加熱殺菌 (60°C-30 min) した。この貴腐化果皮100 gに対して蒸留水100 mLとグルコース40 gを加えミルサー粉碎し、ジップロックに入れ、-30 °C 冷凍保存した。

(4) *B. cinerea* 菌体ディスクによる貴腐化

簡便な貴腐化方法として、*B. cinerea* 菌糸体をPDA培地中央に接種し、25 °Cで2週間培養後、孢子形成が進んだ培地上の菌体を6 mm Φ コルクボーラーで打ち抜いた菌体ディスクを用いる方法についても検討した。菌体ディスク4枚を上記同様に加熱殺菌したハスカップ果皮上に載せて25 °Cで発酵後、冷凍保存した。

3. 貴腐化ハスカップ果皮の酵母発酵

(1) 使用酵母

酵母は第I章のハスカップ果皮ワインの試験醸造に用いた *C. krusei* の同じ株を使用した。

アルコール発酵に用いる酵母懸濁液を第 I 章 3.(2)にしたがい調製した。

(2) 発酵特性の評価

第 I 章 4. 発酵特性の評価と同じ方法で Brix 糖度、pH 、EtOH 濃度および吸光度 (525 nm) を測定するとともに官能評価を行った。

結果(Ⅱ)

1. *B. cinerea* の分離同定

学内栽培キャンベルおよびピノ・ノワール、ROWP 豊沼ヴィンヤードおよび KONDO ヴィンヤードの灰色カビ病罹患ブドウ果実から各 1 株の合計 4 株が分離され、いずれも *B. cinerea* と同定された。

2. *B. cinerea* によるハスカップ果皮の貴腐化

(1) 使用菌株の選定

B. cinerea の灰色カビ病罹患ブドウ果実から分離された 4 菌株と NBRC 標準株のハスカップ果皮における貴腐発酵能を比較した結果、NBRC 株および学内キャンベル株ともに灰色の胞子形成は確認できたが、砂川ブドウ株が最も生育速度が速かった。一方、学内ピノ・ノワール株はこれらに比べ胞子形成が少なく KONDO 株ではほとんど認められなかった (Photo. 4)。このことから以下の学内ブドウ株はキャンベル分離株を用いることとした。

(2) ハスカップ果皮の貴腐化

ハスカップ果皮上で生育速度が速かった砂川ブドウ株、NBRC 株および学内キャンベル株の胞子懸濁液を用いた。各懸濁液の胞子数は、学内ブドウ株 2.5×10^6 個/mL、砂川ブドウ株では 7.2×10^6 個/mL、NBRC 株では 1.3×10^6 個/mL であり、やはり砂川ブドウ株が最も多かった。貴腐化果皮は、発酵 5 日において学内キャンベル株、NBRC 標準株は灰色の胞子形成がみられたが、砂川分離株は白い菌糸体が全体に薄く広がった状態であった (Photo. 5)。

一方、簡便法の菌体ディスクによる貴腐発酵を *B. cinerea* 学内ピノ・ノワール株と KONDO 株を用いて検討した結果、*B. cinerea* 菌糸体はディスク部分を中心に局所的に増殖し、貴腐化が果皮表面全体に進まずムラが生じた (Photo. 6)。

3. 貴腐化ハスカップ果皮の酵母発酵

(1) Brix 糖度・pH

Brix 糖度は砂川ブドウ株が発酵 7 日に先行して減少したが発酵 14 日ではいずれの株においても 10%程度とほぼ一定の値を示し、貴腐化なしに比べやや低値となった (Fig. 5)。一方、pH は発酵開始時点で、学内キャンベル株 3.12、NBRC 標準株 3.12 および砂川ブドウ株 3.10 といずれも貴腐化なしの pH 3.06 よりはやや高い値であった (Fig. 5)。その後、発酵 14 日でも学内キャンベル株 3.24、NBRC 標準株 3.20 および 砂川ブドウ株 3.21 と貴腐化なしの pH3.17 よりもやや高値を示した。

(2) EtOH 濃度

発酵 14 日の EtOH 濃度は、貴腐化なしの 12.4%に対し、学内キャンベル株 12.0%および砂川ブドウ株 11.2%はほぼ同程度であったが、NBRC 標準株は 7.7%と明らかに低値を示した (Fig. 6)。

(3) 吸光度 (525 nm)

貴腐化なしの 525 nm における吸光度 0.235 に対し、学内キャンベル株 0.089 は最も低く、NBRC 株および砂川ブドウ株はそれぞれ 0.118 および 0.145 と一定の色調を維持していた (Fig. 7)。

(4) 官能評価

貴腐化ハスカップ果皮ワインの官能評価結果を *B. cinerea* 株間で比較した (Table 5)。学内キャンベル株は強い苦味と渋みが感じられハスカップ特有のさわやかな味や香りが損なわれていた。NBRC 株では不快なカビ臭とエステル刺激臭が感じられた。砂川ブドウ分離株は、ハスカップ果皮ワインにみられる果実特有の風味や香りを保ちつつ、熟成したワインのような深みのある複雑な風味が感じられた。

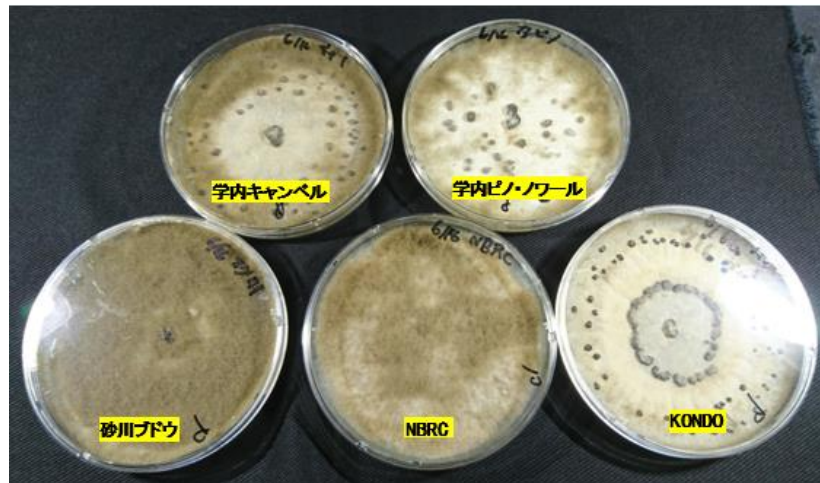


Photo. 4 *B. cinerea* 菌株の選定

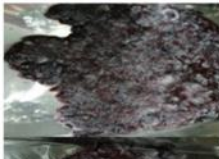

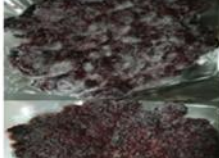

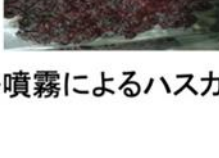
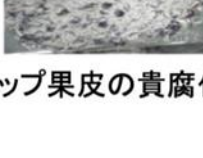
	<胞子数(cells/mL)>	<発酵2日>	<発酵5日>
NBRC	1.3×10^6		
学内ブドウ (キャンベル)	2.5×10^6		
砂川ブドウ	7.2×10^6		

Photo. 5 *B. cinerea* 胞子噴霧によるハスカップ果皮の貴腐化



Photo. 6 *B. cinerea* 菌体ディスクによるハスカップ果皮の貴腐化

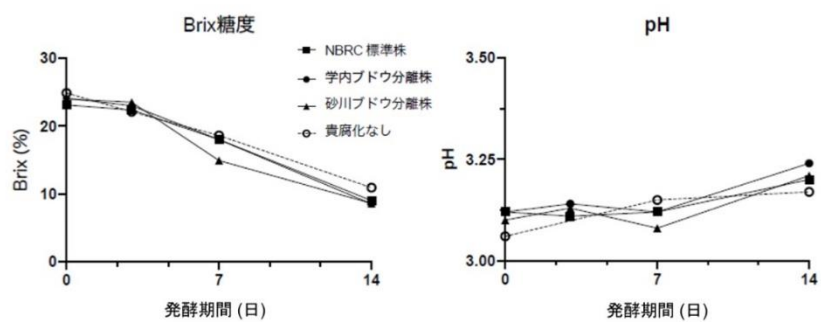


Fig. 5 貴腐化果皮における酵母の発酵特性評価 - Brix糖度・pH

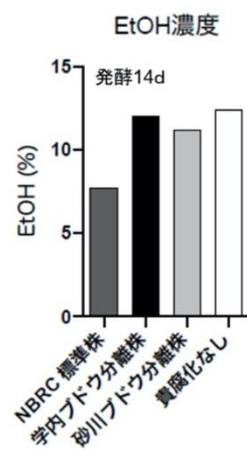


Fig. 6 貴腐化果皮における酵母の発酵特性評価 – EtOH濃度

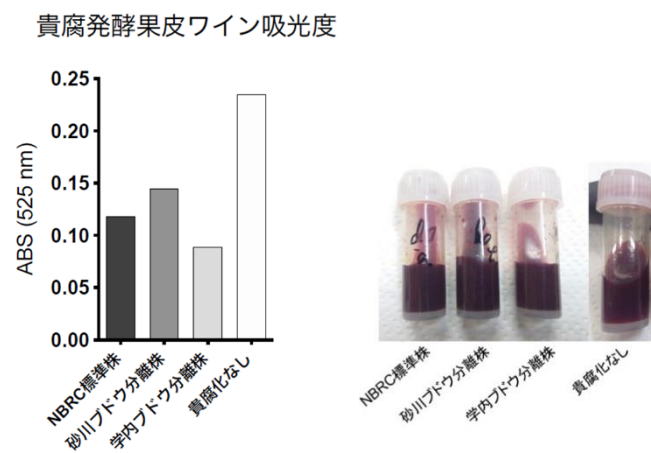


Fig. 7 貴腐化果皮における酵母の発酵特性評価 – 吸光度 (525nm)

Table 5 貴腐化ハスカップ果皮ワインの官能評価結果

<i>B. cinerea</i> 分離株	風味	苦味	色調	総評
NBRC標準株	+	++	+	酢酸エチル臭・カビ臭
学内ブドウ分離株	++	+++	++	苦味・渋み
砂川ブドウ分離株	+++	+	+++	複雑な風味・深みが出た

考察(Ⅱ)

ハスカップ果皮の貴腐化方法として *B. cinerea* 胞子懸濁液を噴霧することで菌糸体を均一に果皮全体に広げることが可能であることがわかった (Photo. 4-6)。*B. cinerea* は株ごとに胞子形成の量や速度が大きく異なっており、胞子をより多くかつ早く形成する株を選抜した。PDA 培地で培養した際の胞子数が最も多かったのは砂川ブドウ株であったが (Photo 4)、ハスカップ果皮に噴霧した状態では生育の速度が最も遅く、白い菌糸体が薄く広がる状態を維持し胞子形成が進まない状態であった (Photo. 5)。したがって PDA 培地とハスカップ果皮の栄養状態や pH の違いが *B. cinerea* の菌糸体増殖や胞子形成に大きく影響していると考えられる。ワイン風味に関しては、この胞子形成を抑制し菌糸体が十分に増殖できたことが、カビ臭や苦味を強く感じた他の 2 株に対して、砂川ブドウ株が優れた風味を与えたことと関係すると考えられる (Table 5)。

貴腐化ハスカップ果皮ワインの pH は発酵開始時および発酵 14 日において、貴腐化していないハスカップ果皮ワインよりも pH は 0.1 程度高い値を示したが、Brix 糖度の低下および EtOH の産生については貴腐発酵していないハスカップ果皮ワインと大差はみられなかった (Fig. 5, 6)。当初、アルコール発酵の促進効果を期待した貴腐発酵による pH 上昇であったが、少なくとも酵母に *C. krusei* を用いた場合はアルコール発酵能を上昇させる効果は認められなかった。なお、NBRC 株の EtOH 濃度が低い結果 (Fig. 6) となっている点に関しては、Brix 糖度が他株とほとんど同じ値で減少 (Fig. 5) していることから、発酵過程で *B. cinerea* が産生する酵素などが EtOH 濃度測定に用いた酵素法の呈色反応に影響した可能性がある。

貴腐化ハスカップ果皮ワインの色調について、525 nm における吸光度は、貴腐発酵していないハスカップ果皮ワインに比べてかなり低い結果となった (Fig. 7)。ハスカップ特有の赤色を一定程度は保持しているものの *B. cinerea* による貴腐発酵過程が果皮の色素成分に影響を及ぼすことがわかった。

果実酒ワインとしての風味については、学内キャンベル株は苦味と渋みが、NBRC 株がエステル臭とカビ臭がみられた一方で、砂川ブドウ株では熟成ワインのような複雑な風味が感

じられた (Table 5)。したがって、*B. cinerea* 株の選抜や発酵状態をコントロールすることによってハスカップ特有の風味に貴腐化による深みを付与することは可能ではあるが、逆に貴腐化が進み過ぎると不快な風味や香りを与える危険性もあることがわかった。学内キャンベル株と NBRC 株は生育速度が速く、発酵 5 日時点で既にハスカップ果皮表面に灰色の胞子形成がみられており、このことが苦味やカビ臭のもとになった可能性が考えられる。

要約

ハスカップ(*Lonicera caerulea*)は北海道の湿原などに自生し、厚真町をはじめ一部の地域で栽培されている北方系小果実の代表である。さわやかな酸味と甘みのバランスが取れた上品な風味で人気が高いものの、果実が柔らかく傷みやすいことから生の状態での流通は限られており、主に凍結果実や果汁などの加工食品として利用されている。本研究ではアントシアニンなどの機能性成分を果実よりも豊富に含む搾汁残さ(果皮)の高付加価値化を目的とし、ハスカップ果実から分離した野生酵母によるワイン醸造を目指した。そのため、ブドウよりも pH が低くポリフェノール濃度の高いハスカップ果皮においても十分なアルコール発酵が可能な酵母を探索するとともに、ワイン醸造において、より複雑な風味を与える貴腐菌 (*Botrytis cinerea*) を利用した発酵条件についても検討を加えた。

ハスカップ果実(はすかつぷサービス提供)を分離源とし YPD (10% グルコース) 集積培地および RE8.0 (1% Raffinose, 8% EtOH) 選択培地を用いて野生酵母を分離した。果実を集積培地に浸漬し、25 °Cで静置培養後の白色沈さを選択培地に画線培養した。得られたコロニーを YPD (2% グルコース) 液体培地で増菌培養し、MALDI-TOF/MS (Biotyper, Bruker) にて酵母種を同定した。ワインの試験醸造には冷凍ハスカップ果皮を解凍し 60 °C-30 min 殺菌後、100 g に対して蒸留水 100 mL とグルコース 40 g を加えてミルサー粉碎した。このペーストに酵母を 1.8×10^9 cells 加え 20 °Cで 14 日間発酵後、圧搾機(しぼり一な)で搾汁した。*B. cinerea* を用いた貴腐発酵には学内および ROWP 豊沼ヴィンヤード(砂川市)のブドウから分離した菌株を使用し、分離した菌種の同定には DNA 塩基配列解析を用いた。*B. cinerea* を PDA 培地で 2 週間培養後、採取して作成した胞子の水懸濁液 ($1.3 \sim 7.2 \times 10^6$ cells/mL) 500 μ L をハスカップ果皮にスプレーし 25°Cで 5 日間発酵させ 60 °C-30 min 殺菌した後、前述のハスカップ果皮ワインと同様に *C. krusei* を用いてアルコール発酵を行った。

ハスカップ果実から *Kloeckera apiculata* 2 株、*Candida krusei* 2 株、*C. sorbosa* 1 株が分離同定された。研究室保有の野生酵母あるいは市販酵母を含め、ハスカップ果皮の発酵試験を行ったところ *C. krusei*, *Hanseniaspora vineae*, *Saccharomyces cerevisiae* および *K. apiculata* の順

に EtOH 産生能が高かった。中でも *C. krusei* はアルコール発酵能の高さに加え、ハスカップ特有の風味と色調を保ち、ワインとしてバランスの取れた仕上がりであった。一方、*K. apiculata* は酢酸エチル臭と退色、*H. vineae* は苦みを、市販のワイン用酵母 *S. cerevisiae* はハスカップの風味が減少し渋みを、いずれもハスカップ特有の風味が消失していた。したがって、ハスカップ果皮ワインの醸造には *C. krusei* が最も適していることが確認できた。この研究成果をもとにばんけい峠のワイナリーの協力を仰ぎ、ワインの製品化に結び付いた。一方、ハスカップ果皮の貴腐発酵において、*B. cinerea* の学内ブドウ（キャンベル）株は苦み・渋みが、NBRC 標準株はエステル臭・カビ臭がみられた。これに対し、砂川ブドウ株は、熟成ワインのような複雑な風味を与えた。以上のことから、ハスカップ果皮のワイン醸造において *C. krusei* は最も適した酵母であること、さらに *B. cinerea* による貴腐発酵がワインの風味に深みと固有の香りをもたらすことが確認できた。

Summary

Haskap (*Lonicera caerulea*) is a representative northern small fruit that grows wild in the marshlands of Hokkaido and is cultivated in Atsuma and some other areas. Although it is popular for its elegant flavor that balances refreshing acidity and sweetness, its fresh distribution is limited due to its soft and easily damaged fruit, and it is mainly used as processed food such as frozen fruit and fruit juice. In this study, we aimed to produce wine using wild yeast isolated from haskap fruit with the aim of adding value to the remaining juice (rind), which is richer in anthocyanins and other functional ingredients than the fruit. To this end, we searched for a yeast capable of sufficient alcoholic fermentation even in the huskap, which has a lower pH and higher polyphenol concentration than grapes, and also investigated fermentation conditions using *Botrytis cinerea*, a noble rot fungus that gives a complex flavor in winemaking.

Wild yeasts were isolated using YPD (10% Glucose) accumulation medium and RE8.0 (1% Raffinose, 8% EtOH) selective medium with haskap fruits (provided by Haskap Service) as the isolation source. Fruits were immersed in accumulation medium and white sediments after static incubation at 25 °C were fractionated and cultured on selective medium. The resulting colonies were then boosted on YPD (2% Glucose) liquid medium and the yeast species were identified by MALDI-TOF/MS (Biotyper, Bruker). For the wine test, frozen haskap peels were thawed and sterilized at 60 °C–30 min, then milled with 100 mL of distilled water and 40 g of Glucose per 100 g of peel. For noble rot fermentation using *B. cinerea*, strains isolated from grapes on campus and at ROWP Toyonuma Vineyard (Sunagawa City) were used, and DNA sequencing was used to identify the isolates. After *B. cinerea* was cultured in PDA medium for 2 weeks, 500 µL of water suspension of spores ($1.3\text{--}7.2 \times 10^6$ cells/mL) was sprayed on haskap peels and fermented at

25 °C for 5 days, then sterilized at 60 °C for 30 min. Alcoholic fermentation was performed with *C. krusei* as in the case of hascup peel wine.

Two strains of *Kloeckera apiculata*, two strains of *Candida krusei*, and one strain of *C. sorbosa* were isolated and identified from haskap fruit. Fermentation tests of haskap peels with wild yeast and commercial yeast strains in our laboratory showed that *C. krusei*, *Hanseniaspora vineae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *K. apiculata* had the highest ethanol-producing capacity, in that order. Among them, *C. krusei* showed not only high alcoholic fermentation capacity, but also retained the flavor and color characteristic of haskap and showed a well-balanced finish as a wine. On the other hand, *K. apiculata* showed ethyl acetate odor and faded color, *H. vineae* showed bitterness, and *S. cerevisiae*, a commercial wine yeast, showed a decrease in haskap flavor and astringency. Therefore, it was confirmed that *C. krusei* was the most suitable for brewing haskap peel wine, and commercialization was realized with the cooperation of the winery in Bankei Touge. On the other hand, in the noble rot fermentation of haskap peel, the Intramural-Campbell grape isolate of *B. cinerea* showed bitter and astringent taste, while the NBRC standard strain showed ethyl acetate and moldy odor. In contrast, the Sunagawa grape isolate gave a complex flavor similar to that of aged wine. These results confirm that *C. krusei* is the most suitable yeast for winemaking of haskap peels, and that noble rot fermentation by *B. cinerea* brings depth and unique aroma to the wine flavor.

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、ご指導いただきました酪農学園大学大学院酪農学研究科の山口昭弘教授に深くお礼申し上げます。また、ハスカップ果皮・果実を提供していただいたはすかつぶサービスの大西 陽一 開発研究部長、はすかつぶクルゼイ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 嶺 取締役、ブドウ果実を提供していただいたROWP豊沼ヴィンヤード 高橋 祥二 農場長、砂川市地域おこし協力隊 新保 里佳 様、KONDOヴィンヤード 近藤 亮介 代表に心よりお礼申し上げます。

最後に本研究に際し、多方面にわたりご協力いただいた研究室の皆様に心からお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 坂本 恵, 荒川 義人, 三好 考二, 金沢 康子, 森谷 紜 (2012). 北海道産ハスカップ茶の創製と官能評価. 日本食品科学工学会誌, **59**, 456–464.
- 2) Chaovanalikit, A., Thompson, M.M., Wrolstad, R.E. (2004). Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 848–852.
- 3) 田中 常雄, 田中 彰 (1998). ハスカップの品種・系統別化学成分含量と特性値. 日本食品科学工学会誌, **45**, 129–133.
- 4) 大塚 謙一, 清水 理通, 青柳 尚徳, 柴崎 茂郎 (1985). 国産オーディナリーワインの品質と成分. 日本醸造協会会誌, **80**, 867–874.
- 5) HUDAGULA, 南 典子, 高橋 宗一郎, 吉田 訓子, 近藤 良介, 山口昭弘 (2021). ブドウ灰色カビ病に対する微生物農薬としてのヴィンヤード野生酵母の探索. 日本食品科学工学会誌, **68**, 328–338.
- 6) 立澤 文見, 篠田 浩一 (2004). フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアントシアニンの同定と薄層クロマトグラフィーおよび分光光度計出の吸収スペクトル特性を併用したアントシアニンの同定の比較. 園学研(Hort. Res. Japan), **4**, 225–228.
- 7) 森 寛 (2020). 味わいの官能表現チャート, (一社)日本ソムリエ協会 教本 2020.
- 8) Morata, A., González, C., Tesfaya, W., Loira, I. and Suárez-Lepe, A. (2019). Chapter 4 Use of non-Saccharomyces Yeasts in Red Wine, in "Red Wine Technology," ed. by Morata, A., Academic Press, UK, p.57. Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun Boekhout.
- 9) The Yeasts, a Taxonomic Study volume 2 Fifth Edition. 429–430, p.696–697.
- 10) Del, Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C., Caballero, A.C. (2014). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal*

of Applied Microbiology, **117**, 451–464.

- 11) Douglass A.P., Offei B., Braun-Galleani, S., Coughlan, S.Y., Martos, A., Ortiz-Merino, R.A., Byrne, K.P., Wolfe, K.H. (2018). Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*. PLoS Pathog, **14**, e1007138.
- 12) 杉山 峰崇, 松下 青葉, Moon J, 呂 洙煥 (2019). 韓国の伝統的麴 Nuruk から単離された酵母 *Pichia kudriavzevii* N77-4 の発酵能力およびエタノールストレス適応機構の解析と改良. 日本醸造協会会誌, **114**, 324–329.
- 13) 松坂 裕子, 知地 英征 (1994). ハスカップ色素の安定性に及ぼす pH, 温度, 光の影響. 藤女子大学・藤女子短期大学紀要, **32**, II 7–11.
- 14) 松坂 裕子, 知地 英征 (1996). ハスカップ色素の安定性に及ぼす糖, 有機酸, L-アスコルビン酸の影響. 藤女子大学・藤女子短期大学紀要, **34**, II 27–31.
- 15) 高橋 宗一郎. 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. 酪農学園大学大学院, 2020 年度 博士論文.
- 16) 多田 史人, 高橋 秀昌, 佐々木 泰子 (2012). 醸造用ブドウの貴腐化促進技術. 東北農業研究 (Tohoku Agric. Res.), **65**, 131–132.