

【2023年日本ブドウ・ワイン学会 技術賞】

ワインの産膜汚染防止のための基礎的研究

渡辺(斉藤)史恵¹・中川洋史²・岸本宗和¹・久本雅嗣¹・奥田 徹¹

¹山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新1-13-1

²山梨大学大学院総合研究部 〒400-8510 山梨県甲府市武田4-4-37

Fundamental study to prevent pellicle formation by pellicle-forming yeast in wine

Fumie WATANABE-SAITO¹, Youji NAKAGAWA², Munekazu KISHIMOTO¹,
Masashi HISAMOTO¹ and Tohru OKUDA¹

¹ The Institute of Enology and Viticulture, Graduate Faculty of Interdisciplinary Research,
University of Yamanashi, 13-1 Kitashin-1-Chome, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

² Faculty of Life and Environmental Sciences, Graduate Faculty of Interdisciplinary Research,
University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan

1. 産膜汚染について

産膜とは産膜酵母（主に *Saccharomyces* 属）がワイン表面に形成する膜であり、産膜臭とよばれる不快なオフフレーバーを発生させる。原料ブドウなどに付着していた産膜酵母は、アルコール発酵過程ではほかのワイン酵母（非産膜性）と同様に糖を資化してエタノールを産生する。ワイン酵母は糖がなくなると減少するのに対し、産膜酵母はエタノールを資化して増殖する能力をもち、その際に酸素を必要とするためワイン液面に産膜を形成する。産膜酵母についてはその分類や遺伝子発現、形質についてすでに多くの報告がある（Alexandre 2013, Nakagawa et al. 2017）。一方、産膜形成に関するワイン側の要因について研究例はなく、それ故、醸造現場では産膜汚染の問題に対して酒質の弱さが原因であるという曖昧な理解のまま今日に至っていた。このような背景を受け、我々は産膜形成の有無とブドウ品種およびワイン成分との間に関係性があるのか科学的データから明らかにすることを目指した。

2. 産膜形成とブドウ品種

日本固有ブドウ品種マスカット・ベーリーA（MBA）は日本赤ワインの主力品種であり、最も多く栽培されかつワイン醸造に利用されている。2013年には国際ブドウ・ワイン機構に品種登録されて知名度をあげており、日本ワインを支える重要なブドウ品種となっている。一方、ワインの醸造現場では、MBAは他の品種と比較して産膜形成のしやすさが指摘されてきたものの、その原因説明はなされてこなかった。我々は、MBAワインが本当に産膜形成しやすい品種であるのかを明らかにするため、比較対象としてメルロー（MR）ワインを用い、各品種20本の市販ワインに産膜酵母を接種して培養し、産膜形成を観察した。その結果、培養3日目において20本中8本のMRワインで産膜形成が認められたのに対し、MBAワインは20本中15本で産膜形成が認められた（Fig. 1）（Watanabe-saito et al. 2021）。さらに培養5日目になるとほぼすべてのMBAワインで産膜が形成した。このことから、確かにMBAワイン

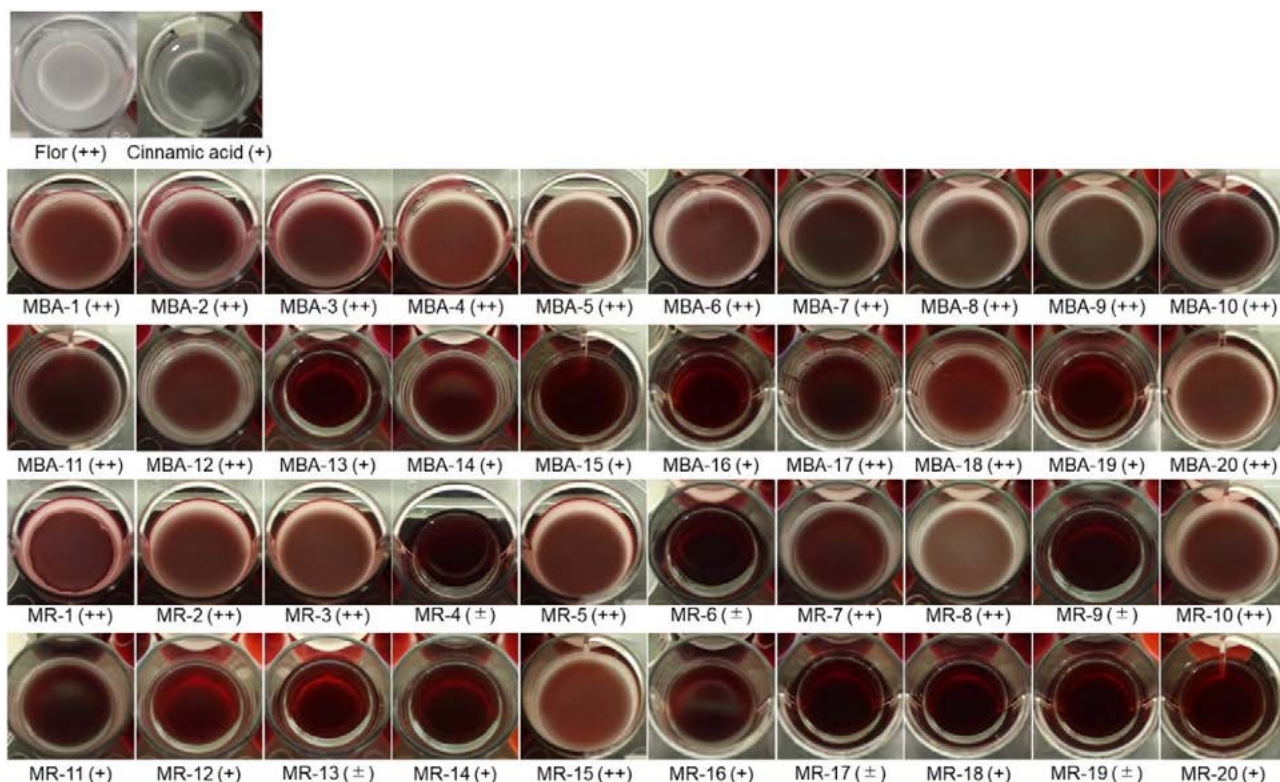


Fig. 1 Pellicle formation in MBA and MR wines after incubation for three days.

A 0.2 mL aliquot of pellicle yeast cell suspension was added to 1.8 mL each of MBA and MR wines after filter sterilisation. The flor media containing 60 mg/L cinnamic acid or not were also used. After static incubation for three days at 30°C, the wells were photographed and the degree of pellicle formation was judged. The symbols in parentheses show the degree of pellicle formation (\pm : a very thin pellicle was formed on some portion of the wine surface; +: a very thin pellicle was formed on the entire wine surface, and ++: a very thick and well-defined pellicle was formed on the entire wine surface).

は産膜形成しやすい品種であることがデータで裏付けられた。品種による産膜形成のしやすさはおそらく品種によるワイン成分値の違いと関係すると推定し、次の段階として産膜形成に影響するワイン成分を明らかにすることを目指した。

3. 産膜形成とワイン成分

産膜形成に影響を与えると推測されるファクターとして、pH、滴定酸度、亜硫酸（遊離型、結合型、分子状亜硫酸）、糖（グルコース、フルクトース）およびポリフェノール化合物とタンニンの濃度と産膜形成との関係性について解析を行うこととした。まず、40本のワインの各測定値と産膜形成試験で得られた産膜重量との相関分析を行った。その結果、産膜重量と高い相関性を示すものはなかった。そこで主成分分析を行ったところ、産膜形成しなかったワインのプロットが第二象限に位置し、産膜形成した

ワインと区別された(Fig. 2)。また、エタノール、ポリフェノール化合物およびタンニンのベクトルが第二象限に向いていることから、この3つの成分が産膜形成に影響する可能性が示唆された。エタノールは、予備試験において6%エタノールを含む培地よりも12%エタノールを含む培地で有意に産膜形成が阻害されたことから、エタノールが抑制効果を示したと考えられた。タンニンを含むポリフェノール化合物は、抗酸化活性、抗炎症活性そして抗菌活性など様々な生理活性を有することが知られている。さらに、MBAはほかの品種と比べてポリフェノール化合物含有量が低いことが知られており (Ichikawa et al., 2011)、これが産膜形成のしやすさに関わっている可能性が示唆された。そこで、ポリフェノール化合物を含め、ワイン中に含まれるどのような成分が産膜抑制しているのかを明らかにすることとした。

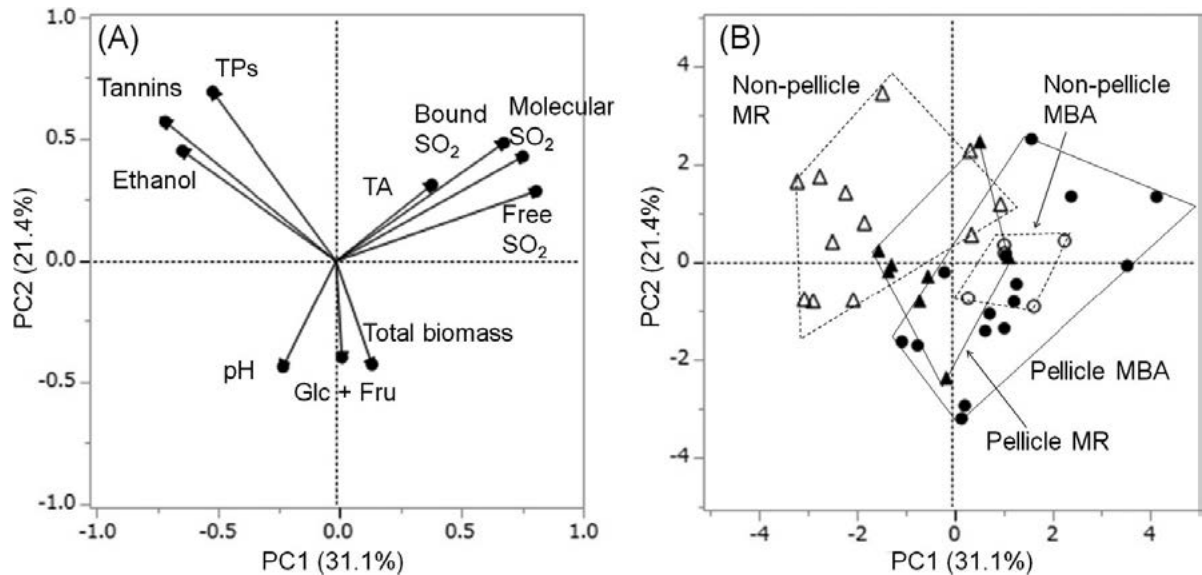


Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of MBA and MR wines.

(A) Plot of loadings of PC1 versus PC2.

(B) Plot of scores of PC1 versus PC2. Wines classified into 'pellicle wine' and 'non-pellicle wine' after incubation for three days are represented by closed and open symbols, respectively. MBA and MR wines are shown by circles and triangles, respectively.

4. 産膜抑制成分の探索

ワインに含まれる成分が産膜形成に影響しているか検証するために、産膜酵母を接種しても産膜形成しないワインを活性炭処理し、産膜酵母を接種して培養を行ったところ産膜を形成するようになった。さらに処理後の活性炭に吸着した成分を有機溶媒抽出し、再度ワインに添加すると再び産膜形成しなくなった。このことから、産膜形成しないワインには産膜抑制成分が存在すると断定した。この産膜抑制成分を同定するために、Diaion HP-20, Toyopearl HW-40およびシリカゲルを担体としたカラムで順次成分を分離し、産膜形成試験を実施して活性画分の絞り込みを行っている。現段階では、まだ同定までは至っていないもののおそらく非常に極性の低い化合物であることが推察されている。

5. 産膜形成抑制メカニズムの推定

産膜抑制成分の同定と並行し産膜形成抑制メカニズムの推定にも着手している。まず産膜酵母を接種し6時間後に生菌率を測定したところ、産膜形成するワインは約42%, 産膜形成しないワインは約14%であった。さらに産膜酵母接種から産膜形成までの経時的な様子を観察したところ、産膜形成するワイ

ンでは浮上した産膜酵母が液面で薄い膜状となり、培養日数が経つにつれ膜が厚く生長した。一方、産膜形成しないワインでは、産膜酵母が液面に浮上して薄く小さな膜を形成するものの、培養日数が経っても膜の生長は認められなかった。このことから産膜形成しないワインにおいては、産膜酵母の生菌率が低下することおよび膜の生長が抑制されることにより、産膜形成がおこらなかったと考えた。現在はさらに詳細なメカニズムについて検討を行っている。

6. 謝辞

技術賞の受賞にあたり、推薦や選考に携わっていただきました大滝敦史会長をはじめ理事の先生方、選考委員の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 JP19K05539 (2019年~2021年) およびJSPS 科学研究助成事業 JP22K05878 (2022年~2025年) の助成を受け遂行することができました。この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究課題をはじめたきっかけは、ワイン醸造家の皆様とのワイン醸造における課題を議論する中で生まれました。多くの経験談は本研究を遂行する上で貴重な情報となりました。ここに感謝の意を表します。最後

に、本受賞は、山梨大学ワイン科学研究センター機能成分学研究部門の卒業生および在校生がともに研究に力を注いでくださった賜物であると心より感謝申し上げます。

引用文献

- Alexandre H. 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* — Their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.*, **167**(2): 269–275.
- Ichikawa M, Ono K., Hisamoto M, Matsudo T, and Okuda T. 2012. Effect of cap management technique on the concentration of proanthocyanidins in Muscat Bailey A wine. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**(2): 201–207.
- Nakagawa Y, Arai Y, Toda Y, Yamamura H, Okuda T, Hayakawa M and Iimura Y. 2017. Glucose repression of FLO11 gene expression regulates pellicle formation by a wild pellicle-forming yeast strain isolated from contaminated wine. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **31**: 120–127.
- Watanabe-Saito F, Nakagawa Y, Kishimoto M, Hisamoto M, and Okuda T. 2021. Influence of wine components on pellicle formation by pellicle-forming yeasts. *OENO One*, **55**(3): 363–375.