

# 醸造用ブドウ，ワイン製造工程および市販赤ワイン製品からのフェノレ生成酵母の分離とその性状

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	恩田,匠 小松,正和
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	44巻6号
掲載ページ	p. 285-292
発行年月	2018年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 醸造用ブドウ、ワイン製造工程および市販赤ワイン製品からのフェノレ生成酵母の分離とその性状

恩田 匠\*<sup>§</sup>・小松正和\*

\* 山梨県産業技術センターワイン技術部

## Isolation and Characterization of *Phénolé*-Producing Yeasts from Grapes, Domestic Wine-Making Process and Red Wine Products

ONDA Takumi\*<sup>§</sup> and KOMATSU Masakazu\*

\* Wine Technology department, Yamanashi Industrial Technology Center,  
2517 Katsunuma, Katsunuma-cho, Koshu-shi, Yamanashi 409-1316

A survey was conducted on the ecological distribution of the *Phénolé*-producing yeasts in wine-making environments, which included yeasts from grapes, musts, domestic commercial red wines. The *Phénolé*-producing isolates were divided into 2 groups by phenotypic characteristics. Representative strains from two groups were identified by 26S rDNA analysis. Group I, most of the isolates from grapes were identified as *Meyerozyma caribbica*. This is the first study reporting the *Phénolé*-producing *M. caribbica*. Group II, the isolates from grapes, musts and commercial wines, were identified as *Brettanomyces bruxellensis*, which is a typical contaminants of red wine. It was cleared that strains of *B. bruxellensis* grew without involvement of the barrel. Furthermore, this is the first study to report the presence of *B. bruxellensis* in commercial domestic red wines.

(Received Jun. 7, 2018; Accepted Aug. 27, 2018)

**Key words** : red wine, flavor, *phénolé*, contamination, *brettanomyces*  
赤ワイン, 香り, フェノレ, 微生物汚染, プレタノミセス

赤ワイン製造においては、白ワインと比較しても各種の汚染菌が増殖しやすいことから、従来は酢酸エチルやアセトアルデヒドなどの強い劣化臭が発生することがしばしばあった。しかしながら、近年は製造環境の微生物管理や亜硫酸管理技術が徹底されたことなどから、著しい品質劣化の頻度は少なくなっている。一方で、従来は強く認識されることがなかった、「フェノレ」<sup>1)~7)</sup>と通称されるフェノール系のオフフレーバーの発生に注意が注がれるようになってきている。

我々<sup>8)~10)</sup>は、この発生防止についての研究に取り組んできた。既に、現状の市販国産赤ワイン製品におけるフェノレの発生頻度<sup>8),9)</sup>について調べ、現状(2011年に行った調査)において一定の頻度、すなわち約20%の市販ワインにフェノレが発生<sup>8)</sup>していることを初めて明らかにした。また、国内のワイン製造現場における樽熟成中の赤ワインから、その生理生化学的性状から *Brettanomyces bruxellensis* と推定されるフェノレ原因酵

母を初めて分離<sup>9),10)</sup>し、その増殖抑制に有効な亜硫酸濃度とpH条件など<sup>9),10)</sup>について明らかにした。

本報では、ワイン原料ブドウ、ワイン製造工程および市販製品においてフェノレ生成酵母の検索を行い、その分布を調査し、得られた分離株の同定を行った結果について報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試試料

フェノレ生成酵母の分離源として、以下に示す、醸造用ブドウ果実、製造工程中のワインのもろみ、および市販赤ワイン製品を用いた。

(1) 供試ブドウ試料 ブドウ果実として、山梨県内で収穫された醸造用ブドウ41点を供試した。これらは、山梨県内の5圃場A~E(山梨県甲州市3圃場および山梨県北杜市2圃場)で栽培された5品種(甲州, シャルドネ, カベルネ・ソーヴィニヨン, メルロ, マスカット

\* 〒409-1316 山梨県甲州市勝沼町勝沼2517

§ Corresponding author, E-mail: onda-wkk@pref.yamanashi.lg.jp

・ベリーA)を含んだ。これらのブドウ果実を、圧搾して調製した果汁を供試試料 (Table 1) とした。

(2) 製造工程におけるもろみ試料 製造工程にあるワインのもろみは、4つの製造場F~Iから収集した32点 (Table 2) を用いた。これらのもろみは、アルコール発酵中、あるいはアルコール発酵が終了しマロラクティック発酵中のものであり、樽発酵や樽熟成などの樽の関与がないものである。製造場Fおよび圃場Gは、それぞれTable 1の圃場Cおよび圃場Eからのブドウを原料としてワインを製造したものである。製造場HとIは、Table 1記載の圃場以外からのブドウを原料として用いた。この試料のうち、M22およびM31は、その製造工程で、既にフェノレの臭気が認められたものである。

(3) 市販赤ワイン製品試料 赤ワイン試料として、2011年から2013年の間に、無作為に購入した市販国産赤ワイン124点を用いた。この供試赤ワインの内訳としては、原料ブドウで大別して、カベルネ・ソーヴィニオンやメルロなどのいわゆる欧州系原料を主要品種とした、いわゆる「欧州系 (*Vitis vinifera* grape varieties)」64点、マスカット・ベリーAやブラック・クイーンなどの国内改良系や北米系を主要品種とした、「非欧州系 (non-*Vitis vinifera* grape varieties)」60点 (Table 3) である。サンプルの醸造年は最も古いもので2005年、新しいもので2012年、2010年のものが最も多く、2011年が次に多かった。

## 2. もろみおよびワインの化学成分分析

供試もろみおよびワイン試料の一部は、遊離亜硫酸濃度、pHおよびフェノレ濃度を計測した。赤ワインのフェノレ、すなわち4-エチルフェノールと4-エチルグアイアコール (および白ワインのフェノレ; 4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール) の定量は既報<sup>9)</sup>に従った。

## 3. 培地と培養方法

酵母の培養には、既報<sup>10)</sup>と同様に、YM液体培地あるいは平板培地 (いずれもDifco社製) を用いた。

*Brettanomyces* 属酵母の分離用培地としては、既報と同様に、RODRIGUESら<sup>9)</sup>が開発したDekkera/*Brettanomyces* Differential培地 (DBDM培地と略称) を用いた。

## 4. フェノレ生成酵母の分離

フェノレ生成酵母の検索は、次のように実施した。すなわち、40mlのYM液体培地に、原料ブドウ果汁、もろみまたは赤ワイン試料を約10ml添加して、2日間25℃で増菌培養を行った。この培養液2mlをDBDM培地8mlに添加して、25℃で7日間培養を行った。培養後、DBDM培地の色調の変化 (黄変) と官能的にフェノレの臭気が認められたサンプルについて、DBDM培地でストリークカルチャーによる純粋分離を繰り返した。得られた純粋分離株は、グリセロールストックとして、-80℃下で凍結保存した。

## 5. 分離酵母の同定

分離酵母の生理生化学的性状に基づく同定試験<sup>11)~14)</sup>は既報<sup>10)</sup>に従った。また、既報<sup>10)</sup>と同様に、エタノール耐性と亜硫酸耐性についても調べた。

さらに、分離酵母の一部について、26S rDNA塩基配列の遺伝解析に基づく同定試験を実施した。すなわち、YM平板培地上のコロニーから、直接DNAを抽出し、NL1およびNL4プライマー<sup>15)</sup>を用いて、26S rDNAのD1/D2ドメインをPCR法により増幅した。この増幅産物はサーマルシークエンスキット (BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems社製)) を用いてシークエンス反応を行い、DNAシークエンサーにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報について国際塩基配列 (DDBJ) データベースを用いて、相同性検索を行い、菌種の同定を行った。また、同配列情報をもとに、MEGA (Molecular Evolutionary Gene Analysis) ver.7.0プログラムを用いて、近隣結合法による系統樹解析を行った。

なお、この遺伝解析には、既報<sup>9)</sup>において分離したフェノレ生成酵母SK-01株 (表現形質から*Brettanomyces bruxellensis*と推定) も、同時に参考菌株として供試した。

## 実験結果

### 1. 原料ブドウからのフェノレ生成酵母

供試ブドウ41点から調製した果汁のうち、19点 (46%) から、DBDM培地を黄変し、官能的にフェノレ生成が認められる微生物が検出された (Table 1)。それら19点から、25株の酵母を純粋分離した (Table 1)。

### 2. ワイン製造工程中のもろみからのフェノレ生成酵母

ワインの発酵工程にあるもろみ32点のうち、6点 (19%) の赤ワインのもろみから、DBDM培地を黄変し、官能的にフェノレ生成が認められる微生物が検出された (Table 2)。白ワインのもろみからは、フェノレ生成酵母が検出されなかった。それら6点から、6株の酵母を純粋分離した (Table 2)。発酵工程において官能的にフェノレの臭気が認められたもろみM22およびM31は、いずれも閾値以上のフェノレ (4-エチルフェノールと4-エチルグアイアコール) が検出され、いずれの試料からもフェノレ生成酵母が得られた。

### 3. 市販赤ワインからのフェノレ生成酵母

市販赤ワイン124点のうち、5点 (4.0%) から、DBDM培地を黄変し、官能的にフェノレ生成が認められる微生物が検出された (Table 3)。5点のワインから、それぞれ5株の酵母を純粋分離した (Table 3)。この分離源となった5点のワインには、閾値<sup>9)</sup> (エチルフェノール0.605g/l, エチルグアイアコール0.110mg/l) 以上のフェノレ、すなわちエチルフェノール0.910~1.805およびエチルグアイアコール0.160~0.328が検出された。

### 4. 分離フェノレ生成酵母の同定

本研究で得られたフェノレ酵母の生理生化学的性状をTable 4に示した。分離された酵母は、基本的な性状、

Table 1 *Phénolé*-producing yeasts isolated from the grape tested

Sample No.	Vinyards (Location)	Grape species	Detection of yeasts on DBDM	No. of isolated yeasts
G 1	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	A001
G 2	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	A003, A004
G 3	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G 4	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G 5	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G 6	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	A009
G 7	A (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	A012, A019
G 8	B (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G 9	B (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G10	B (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	B030
G11	B (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	B032, B033
G12	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	C001
G13	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G14	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	+	C002, C005
G15	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	-	
G16	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	+	C009
G17	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	+	C010
G18	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	-	
G19	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G20	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	+	D022
G21	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	+	D025, D026
G22	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G23	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G24	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
G25	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	+	D002
G26	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	-	
G27	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	-	
G28	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	-	
G29	D (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	+	D003, D004
G30	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	+	E001
G31	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	+	E002
G32	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	+	E006
G33	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
G34	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
G35	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
G36	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	
G37	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	
G38	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	+	E012
G39	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	
G40	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	+	E023
G41	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	

特に細胞とコロニーの形態的特徴から、2つのグループ I および II に分かれた。

(1) グループ I このグループの分離株は、卵型 (あるいはやや伸長した卵形) で、出芽型の栄養細胞形態を示した。YM平板培地上では、やや褐色がかった白色で、バター様の光沢のある外観で、比較的大きく、縁

がシワシワしたコロニーを形成した。また、偽菌糸を形成し、グルコースを発酵してガスを生産した。0.01% シクロヘキシミド濃度で増殖が認められたが、0.1% での増殖は認められなかった。37℃での増殖も良好であった。硝酸塩資化性、ウレアーゼ活性、DBB反応はともに陰性であり、5%食塩を含んだ培地には生育せず、パント

Table 2 *Phénolé*-producing yeasts from the musts tested in alcohol fermentation

Sample No.	Wine production site (Location)	Vinyards of used grape	Grape species	Detection of yeasts on DBDM	No. of isolated yeasts
M 1	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M 2	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M 3	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M 4	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	-	
M 5	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	-	
M 6	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	+	F001
M 7	F (Yamanashi)	C (Koshu-shi, Yamanashi)	Mascat Bailey A	-	
M 8	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M 9	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M10	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M11	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Koshu	-	
M12	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	-	
M13	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Chadonnay	-	
M14	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
M15	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
M16	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Cabernet sauvignon	-	
M17	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	
M18	G (Yamanashi)	E (Hokuto-shi, Yamanashi)	Merlot	-	
M19	H (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M20	H (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M21	H (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M22	H (Yamanashi)	others	Mascat Bailey A	+	H001
M23	H (Yamanashi)	others	Mascat Bailey A	+	H003
M24	H (Yamanashi)	others	Mascat Bailey A	+	H004
M25	I (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M26	I (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M27	I (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M28	I (Yamanashi)	others	Koshu	-	
M29	I (Yamanashi)	others	Mascat Bailey A	-	
M30	I (Yamanashi)	others	Mascat Bailey A	+	H005
M31*	I (Yamanashi)	others	Cabernet sauvignon	+	H006
M32	I (Yamanashi)	others	Cabernet sauvignon	-	

\*These musts were detected *Phénolé* odor.

テン酸を要求した。なお、今回の試験では、胞子形成は認められなかった。以上のことから、日本国内の果実からも分離される<sup>14)</sup>ことが多い、*Candida*属あるいは*Debaryomyces*属に近縁の酵母菌種であることが考えられた。本グループの分離株は、アルコールや亜硫酸に耐性が低かった。

(2) グループII このグループの分離株は、いびつな卵型、伸長した楕円の弓形、あるいはミサイル形の特異的な形状をした、出芽型の栄養細胞形態を示した。この酵母細胞の特異的な形状は、既報<sup>10)</sup>の分離酵母とよく類似した。伸張した細胞は、しばしばいくつものクラスターを形成した。YM平板培地では、クリーム色の滑らかな外観の、中央が隆起したコロニーを形成し、偽菌糸を形成した。YM液体培地では産膜性が認められ、グ

ルコースを発酵してガスを生産した。強いシクロヘキシミド耐性をもち0.1%濃度でも良好な増殖が認められた。37℃での増殖も良好であった。硝酸塩資化性、ウレアーゼ活性、DBB反応はともに陰性であり、5%食塩を含んだ培地には生育せず、パントテン酸を要求した。なお、胞子形成は認められなかった。以上の生理生化学的性状から、本グループの分離酵母は、既報において、樽熟成工程から分離された酵母SK-01株の同定結果にも近似したことから、*Brettanomyces*属酵母<sup>16)</sup>であると同定した。

#### 5. 26S rDNA D1/D2塩基配列解析による同定

本研究で得られた酵母のうちの10株(グループIの4株、グループIIの6株)、および既報における分離株SK-01株について、得られた26S rDNA D1/D2塩基配列を用いた相同性解析の結果、次のように同定された。ま

Table 3 *Phénolé*-producing yeasts from the domestic commercial domestic wines tested

Categoris of wines	Numbers of wine samples	Numbers of samples which dectectd yeast on DBDM	No. of isolated yeasts
Vitis vinifera grape varieties	64	2 <sup>1)</sup>	VR41, VR43
non-Vits vinifera grape varieties	60	3 <sup>1)</sup>	HR32, HR43, HR101

1) All 5 wines contained *Phénolé* above the thewshold.

Table 4 Identification of isolated *Phénolé*-producing yeasts

Groups	No.of isolated strains	Morphological characters	Some key characters*	Additional characters	Source of isolated strains
I	A001, A003, A009, A012, A019, B030, B032, C001, C002, C005, C009, C010, D002, D003, D022, D026, E001, E002, E012, E023	Ovoid cell (to elongate) in pairs (or short chains). Multilateral budding. Tannish-white colored, butyrous, large colony with lobate margins. Pseudohyphate are formed.	Gas production from sugars + Growth in 0.01% cycloheximide + (no growth in 0.1% cycloheximide) Growht at 37°C + Assimilation ability of nitrite - Urease - DBB reaction -.	Growth in 12.5% etanol ± Growth in 20g/ℓ free SO <sub>2</sub> -	grapes
	A004, B033, D025, D004, E006	Ellipoidal, cylindrial, ogival or missile-sharpedcell to elongate. Multilateral budding. Cream colored, rised in center colony with entire margins. Pseudohyphate are formed.	Gas production from sugars + Growth in 0.1% cycloheximide + Growht at 37°C + Assimilation ability of nitrite - Urease - DBB reaction -	Growth in 12.5% etanol + Growth in 20g/ℓ free SO <sub>2</sub> ±	
II	F001, H001, H003, H004, H005, H006	same avbove	same avbove	Growth in 12.5% etanol + Growth in 20g/ℓ free SO <sub>2</sub> ± ~ +	musts
	VR041, VR043, HR032, HR043, HR101	same avbove	same avbove	Growth in 12.5% etanol + Growth in 20g/ℓ free SO <sub>2</sub> +	wines

\*+: positive, ±: weak, -: negative.

た, それら塩基配列を用いた, 分子系統解析から得られた系統樹をFig. 1に示した。

グループ I の, 原料ブドウから分離された酵母は, 全て *Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Martini et al.) Kurtzman and Suzuki (*Candida fermentati* (Saito) Bal のアナモルフ (不完全型)) であること (タイプストレインとの相同率は, それぞれ99.8~100%) がわかった。

一方で, グループ II の, 主に赤ワイン製造工程, 市販赤ワイン製品から得られた酵母分離株は, 赤ワインの汚染酵母であり, 典型的なフェノレ生成酵母である *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath and van Laer

(*Dekkera bruxellensis* van der Walt のアナモルフ (不完全型)) であること (タイプストレインとの相同率は, それぞれ99.5~100%) がわかった。また, 既報における樽熟成工程から分離したフェノレ生成酵母SK-01も *B. bruxellensis* であることが確認された。

## 考 察

ワイン原料ブドウからのフェノレ生成酵母の検索を行った結果, 特定の圃場あるいはブドウ品種 (白あるいは赤ワイン原料) に特異的ではなく, 一定の頻度で広く分布することがわかった。それら果実由来のフェノレ生成

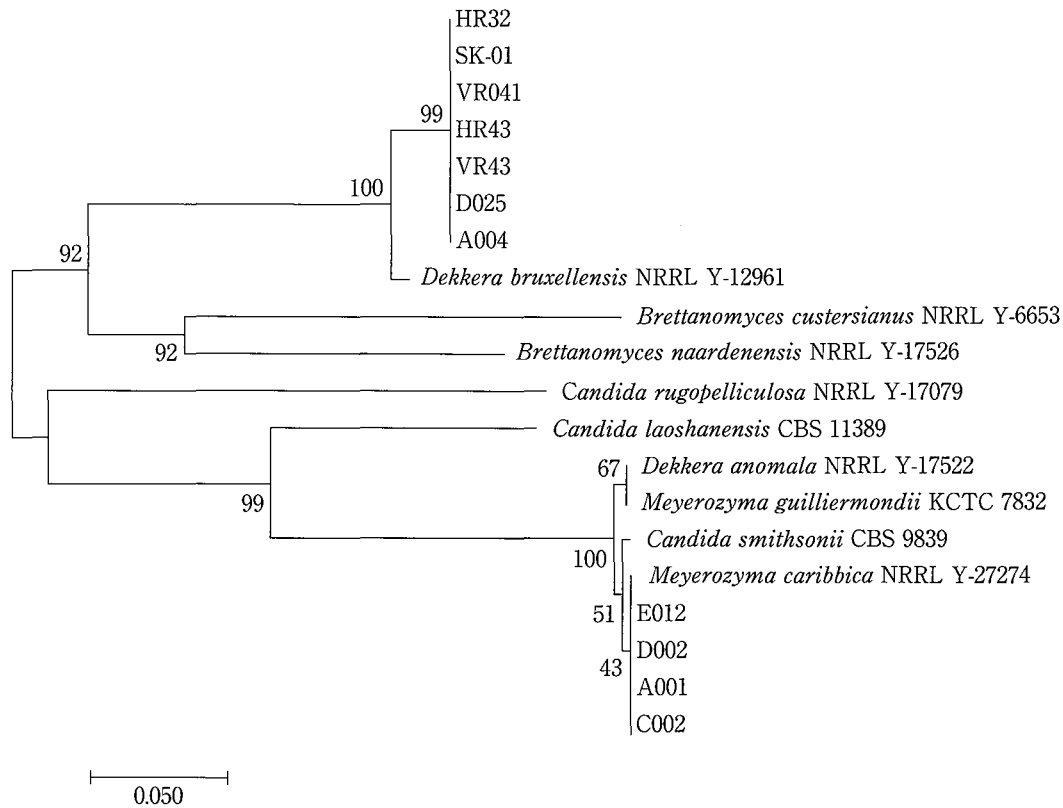


Fig. 1 Neighbor-joining tree based on the D1/D2 region of the 26S rDNA sequence showing the phylogenetic relationships between isolated *Phénolé*-producing yeast strains and type strains of related genera.

Numbers at the branch nodes are bootstrap values (percentages of 1,000 replicates). Bar 1 substitution per 1,000 nucleotide positions.

酵母の同定試験の結果、ワインの典型的な汚染酵母の *B. bruxellensis*ではなく、遺伝解析を行った4株は全て *M. caribbica*であることがわかった。DBDM培地を開発したRODRIGUESら<sup>9)</sup>は、同培地では一部のフェノレ非生成の *Zygosaccaromyces* 属酵母は増殖が可能であるが、ほとんど *B. bruxellensis*のみが選択的に分離されると説明されている。一方で、DIAS<sup>10)</sup>らは、ワイン製造環境から、*B. bruxellensis*以外にも、DBDM培地で検出されるフェノレ生成酵母として、*Brettanomyces anomala*と *Pichia guilliermondii*があることを報告している。今回の研究では、ワイン製造環境において、DBDM培地で検出されるフェノレ生成酵母として、*M. caribbica*があることが初めて明らかになった。この *M. caribbica*は、アルコールや亜硫酸耐性が低いことから、ワイン製造工程やワイン製品には検出されなかったことが推察された。ワイン製造環境から分離される *B. bruxellensis*以外のフェノレ生成酵母についての報告は少ない。フェノレを生成する *M. caribbica*が、ブドウの圃場に広く分布するか否かについては今後も検討していく必要がある。

また、果実からも、赤ワイン汚染に典型的な *B. bruxellensis*が検出された。果実から分離された *B. bruxellensis*株は、亜硫酸耐性が比較的弱い菌株が含まれ

た。

既報<sup>10)</sup>において、樽熟成工程にある赤ワインからは、比較的高い頻度で、*B. bruxellensis*が検出されることを示した。今回の研究では、アルコール発酵あるいはマロラクティック発酵途上にある赤ワインのもろみにおいても、*B. bruxellensis*が増殖することがあることを明らかにした。白ワインはpHが低いことなどから、*B. bruxellensis*が生育しない<sup>9)</sup>ことが定説となっているが、今回の検討でもこのことが裏付けられた。

市販赤ワインには、低い頻度ではあるものの、*B. bruxellensis*が存在することが、日本国内では初めて明らかになった。ワインから分離された分離株は高い遊離亜硫酸耐性を示した。RENOUFら<sup>18)</sup>によるボルドーワインの検討から、*B. bruxellensis*が長期熟成後のボトルワインにおいても生残することが報告されている。*B. bruxellensis*が検出された4つのワインのうち、2つは「無ろ過」であることをラベル上に訴求した製品であった。UBEDAとBRIONES<sup>19)</sup>が報告しているように、「無ろ過」の製品は、瓶内に汚染酵母が生残する可能性も示唆された。

なお、今回分離された2つのグループの分離株は、いずれもDBDM培地において旺盛に増殖し、培地の色調

を黄変して、強いフェノレ臭を生成した。一方で、それら分離株の、赤ワイン製造工程あるいは赤ワインにおける増殖性あるいはフェノレ生成量には違いがあることが予想され、今後検討していきたい。

今回の日本国内におけるワイン製造環境における調査において、原料ブドウから製品に至るまで、*B. bruxellensis*が検出されたことから、今後、本汚染菌の発生防止法の確立が望まれた。

### 要 約

山梨県内でのワイン原料ブドウ、製造工程および市販赤ワインからの、フェノレ生成酵母の検索とその同定を行い、以下の知見を得た。

- ① ワイン原料用ブドウから多く検出されたフェノレ生成酵母は、*M. caribbica*であったが、一部、*B. bruxellensis*が検出された。ワイン製造環境で検出され得るフェノレ生成酵母として、*M. caribbica*の存在を初めて明らかにした。
- ② ワイン製造工程におけるフェノレ生成酵母は、*B. bruxellensis*であった。樽が関係しない発酵期間中においても、*B. bruxellensis*が増殖することを明らかにした。
- ③ 日本国内の市販赤ワイン製品中にも、低頻度ではあるが、*B. bruxellensis*が存在することを初めて明らかにした。

謝 辞 酵母の遺伝子解析に技術のご支援をいただいた、山梨県産業技術センターの佐藤憲亮研究員に御礼申し上げます。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP; Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through target-driven R&D) フィージビリティスタディ【FS】探索タイプ (Exploratory Research) における成果を含みます。

### 文 献

- 1) RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A. and DUBOURDIEU, D.: 8.4.1 Les phénols volatils responsables des certaines deviations olfactives de type <phénolé> des vins, *Traité d'oenologie Tome 2-Chimie du vin, Stabilisation et tritements* 5 e edition (Dunod, Paris), pp.307~324 (2004)
- 2) CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J.-N. and PONS, M.: The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165~178 (1992)
- 3) LICKER, J. L., ACREE, T. E. and HENICK-KLING, T.: What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor?: A preliminary investigation, *ACS Symposium Series* (American Chemical Society), **714**, 96~115 (1999)
- 4) SUÁREZ, R., SUÁREZ-LEPE, J.A., MORATA, A. and CALDERÓN, F.: The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review, *Food Chemistry*, **102**, 10~21 (2007)
- 5) 篠原 隆: ワインのフェノール性異臭の成因について, *日醸協誌*, **96**, 182~188 (2001)
- 6) RODRIGUES, N., GONÇALVES, G., PEREIRA-DA-SILVA, S., MALFEITO-FERREIRA, M. and LOUREIRO, V.: Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*, *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588~599 (2001)
- 7) POLLNITZ, A. P., PARDON, K. H. and SEFTON, M. A.: Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine, *J. Chromatogr A*, **31**, 101~109 (2000)
- 8) 恩田 匠・小松正和: 国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバーの発生頻度, *日食保蔵誌*, **39**, 343~346 (2013)
- 9) 恩田 匠: 国産ワインにおけるフェノール系オフフレーバー「フェノレ」について, *日醸協誌*, **108**, 881~889 (2013)
- 10) 恩田 匠・小松正和: 国産赤ワイン製造工程におけるフェノレ生成酵母の分離とその性状, *日食保蔵誌*, **40**, 103~108 (2014)
- 11) KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., BOEKHOUT, T. and ROBERT, V.: Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol. 1 (5th ed.) (Elsevier Science, Amsterdam). pp.87~110 (2011)
- 12) 飯塚 広・後藤昭二: 酵母の分類同定法 (第3版) (東京大学出版会, 東京), (1984)
- 13) 長谷川武治編集: 微生物の分類と同定 (上), (学会出版センター, 東京), (1984)
- 14) 恩田 匠・乙黒親雄・飯野修一・後藤昭二: 梅加工品から分離した産膜酵母の同定とその症状, *日食科工誌*, **44**, 407~417 (1997)
- 15) VOIGT, K., CIGELNIK, E. and O'DONNELL, K.: Phylogeny and PCR Identification of Clinically Important Zygomycetes Based on Nuclear Ribosomal-DNA Sequence Data, *American Society for Microbiology*, **37** (12), 3957~3964 (1999)
- 16) SMITH, M. T.: Chapter 25; *Dekkera* van der Walt; *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol. 1 (5th ed.) (Elsevier Science, Amsterdam). pp.373~377 (2011)
- 17) DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO, V.: Identification of yeasts isolated from wine-



- related environments and capable of producing 4-ethylphenol, *Article in Food Microbiology*, **20**, 567~574 (2003)
- 18) RENOUF, V., PERELLO M.-C., de REVEL, GILLES and LOUVAUD - FUNEL, A. : Survival of wine microorganism in bottle during storage, *Am J Enol Vitic.*, **58** (3), 379~386 (2007)
- 19) UBEDA, J.F. and BRIONES, I. : Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines, *Food Control*, **10** (1), 41~45 (1999)  
(平成30年6月7日受付, 平成30年8月27日受理)
-