

ニガイチゴを用いたワイン醸造と エタノール耐性酵母の分離

Study on the wine brewing with Nigaichigo (*Rubus microphyllus*) fruits
and isolation of ethanol-tolerant yeast from the fruit.

西田淑男*、田中諒平*、水野加菜*、稲益和子**

横山あゆ美**、三井俊***、伊藤彰敏***

Yoshio NISHIDA, Ryohei TANAKA, Kana MIZUNO, Kazuko INAMASU

Ayumi Yokoyama, Shun MITSUI and Akitoshi ITO

キーワード：ニガイチゴ、醸造、アルコール耐性酵母、分離

Key words : Nigaichigo (*Rubus microphyllus*) fruit, brewing, ethanol-tolerant yeast, isolation

要約

ニガイチゴ果汁を原料としたワインを製造することを目的として、醸造試験を行った。酵母は、ワイン用酵母 W3 または OC2 を用いた。ニガイチゴは糖分が少ないため、アルコール発酵が十分行われるように、適宜 5 回に分けて補糖（ブドウ糖またはショ糖）を行った。ワインのアルコール濃度（v/v）は、10～13%となった。ワインの pH は果実酒として適していると考えられた。ワインの有機酸はクエン酸が最も多く含まれていた。発酵が進むにつれて、クエン酸とピルビン酸濃度は低くなっていったが、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸濃度は高くなっていった。ニガイチゴ由来の酵母を食品開発に利用することを目的とし、アルコールを含む培地で集積培養を繰り返すことにより、アルコール耐性酵母を 2 株分離した。

Abstract

This study describes the production of wine using Nigaichigo (*Rubus microphyllus*) fruit juice as the raw material. Brewing tests were carried out using the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* W3 or *S. cerevisiae* OC2 to five times supplement the sugars (glucose or sucrose). The alcohol concentration of the resulting wine was 10 to 13% (v/v). The pH of the wine was considered suitable for a fruit wine. Citric acid was the predominant

* 東海学園大学健康栄養学部管理栄養学科 ** 株式会社縄文生物研究所

*** あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センター

organic acid in the wine. As fermentation progressed, the concentration of citric acid and pyruvic acid decreased, while that of malic acid, succinic acid, lactic acid and acetic acid increased. Two strains of ethanol-tolerant yeast were isolated by repeating the enrichment culture in a medium containing ethanol derived from Nigaichigo fruit juice.

緒言

ニガイチゴはバラ科キイチゴ属の落葉低木で、日本在来野生種の一つで、生育地は低地から山地の林縁、路傍、畑地、芝地などと広く、茎は長く伸び、分岐し、さらには鋭い棘をもつため、畑地などでは害草となることもある^{1) 2) 3)}。その果実は甘いが、種子を噛み潰すと苦いことからこの名がつけられている。

成分組成および機能性について、キイチゴ類は抗酸化能^{4) 5)}、糖質分解酵素(α -グルコシターゼ、 α -アミラーゼ)阻害による血糖上昇抑制作用^{5) 6)}、血圧上昇抑制作用⁵⁾などを有することが報告されていることから、機能性が大いに期待できるものと考えられる。その中でもニガイチゴはビタミンC含量が低い果実ではあるが総ポリフェノール含有量は高い値を示していた。また、キイチゴ属の中で考えても特に抗酸化能が強く、血糖上昇抑制に有効な素材であることが示唆されている⁷⁾。

このようにニガイチゴについては植物地理・分類⁸⁾や機能性などについての報告はあるが食用として研究に用いた例は少ない。そこで、本研究ではニガイチゴを原料としたワインを製造することを目的として醸造試験を行い、各種の成分の変化や飲料としての実用性を検討した。また、地域振興、地産地消の観点で、地域素材から分離した酵母を利用した食品開発が全国的に展開されていることから、将来的にニガイチゴ由来の酵母を食品開発に利用することを目的とし、ニガイチゴから酵母を分離することも試みた。尚、ワインは酒税法上、果実のみを原料として製造された果実酒と果実に糖を添加し醸造された甘味果実酒が存在するが、どちらも一般的にはワインと命名され市販されている。今回は、酒税法上は甘味果実酒として検討を行ったが、ワインとして表現する。

方法

1. 試料の材料

材料はニガイチゴ、2種類のワイン酵母(W3, OC2)、2種類の糖(ブドウ糖、シヨ糖)を使用した。ニガイチゴは株式会社縄文生物研究所にて収穫されたもの⁷⁾を使用した。酵母は、一般に国内でブドウワイン製造に用いられている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W3 (協会4号) 及び OC2 (協会1号) を用いた。これらは酒類総合研究所から分譲していただき、あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センターで麹エキスをを用いて前培養後、発酵試験に使用した。ブド

ウと比較するとニガイチゴに含まれる糖の量は少ないため今回は補糖を行いながら発酵を進めることとした。補糖に用いた糖はサンエイ糖化株式会社製のブドウ糖または、伊藤忠製糖株式会社のショ糖を使用した。

2. ワイン発酵試験

ニガイチゴに2種類のワイン酵母（W3、OC2）および2種類の糖（ブドウ糖、ショ糖）を表1に示した配合で組み合わせ、4種類のワインを醸造した。なお、補糖は、糖を1度に大量に加えると酵母の発育を遅らせてしまうため、毎日糖度を測定・確認しながら発酵開始前、3日目、7日目、9日目、12日目に100gずつ5回に分けて行った。発酵は20℃で行った。発酵試験の成分としてBrix、アルコール濃度、pH、酸度、アミノ酸度、有機酸組成、色度を測定した。

表1 酵母と補糖に用いた糖の配合割合

酵母-補糖 種類	W3-ブドウ糖補糖	OC2-ブドウ糖補糖	W3-ショ糖補糖	OC2-ショ糖補糖
果汁(g)	3200	3200	3200	3200
W3(mL)	40	-	40	-
OC2(mL)	-	80	-	80
ブドウ糖(g)	500	500	-	-
ショ糖(g)	-	-	500	500

Brix は Brix 計（デジタル糖度計 PR-101 a、株式会社アタゴ）を用いて測定した。ブランクとして純水を滴下し、ゼロ点設定を行った後、各サンプルの測定を行った。酸度、アミノ酸度、アルコール濃度は、国税庁所定分析法に準じて測定した。pH は pH 計を用いて測定した。有機酸組成の分析は、孔径 0.45 μ m のセルロースアセテートフィルターでろ過したものを分析試料として、有機酸分析システム（株式会社島津製作所）を用いて測定した。分析条件は、カラム：Shimadzu SCR101H、検出器：電気伝導度検出器、移動相：4 mM p-トルエンスルホン酸、緩衝相：4 mM p-トルエンスルホン酸（100 mM EDTA、20 mM Bis-Tris）、流速：0.8 mL/min で行った。色調は分光色差計（SE6000、日本電色工業株式会社）を用いて測定した。

3. アルコール耐性微生物の分離

植物体に存在するアルコール発酵性の酵母を分離するために、清酒発酵用の酵母を「萬三の白モッコウバラ」から分離した方法に準拠して行った⁹⁾。植物体に存在する酵母を大量に培養するため、集積培養を行った。1次集積培地ではアルコール3%（v/v）を含むボーメ5.65の麴エキス培地750mLにニガイチゴを添加し、30℃、7日間静置培養した。培養後、けん濁した液の一部を2次集積培地に添加した。清酒酵母には強いアルコール耐性が求められるため、2次集積培地ではアルコール10%（v/v）を含む1次集積培養と同じような培地で30℃、7日間静置培養した。2次集積培養地のけん濁した液を3次集積培地に添加した。3次集積培養では文献情報に

もとづき、糖をラフィノースに限定し、アルコール8% (v/v) を含む Yeast Nitrogen Base 培地で30℃、10日間静置培養した。培養後、けん濁が確認された培養液を 10^4 から 10^6 倍希釈し、TTC下層培地に塗抹した。

結果および考察

1. ワイン発酵試験

ニガイチゴワインの発酵過程による Brix の変化を図1に示した。酵母が糖による濃度圧迫を受けることがないように、毎日糖度を測定・確認しながら Brix が下がるにつれ補糖を繰り返した。

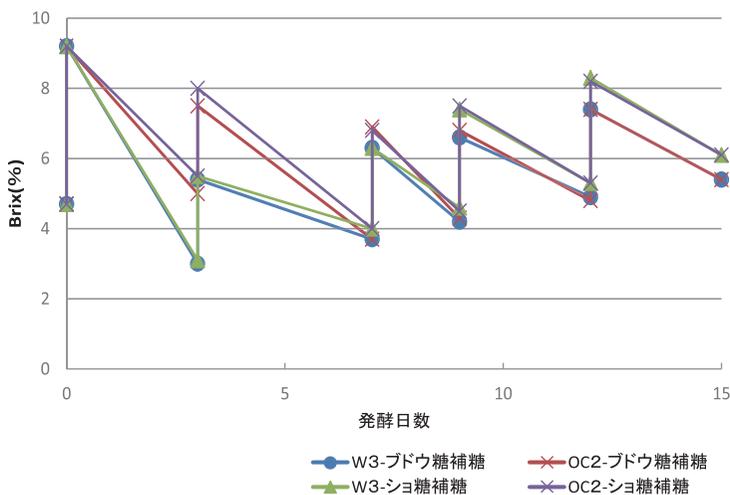


図1 発酵過程における Brix の変化

ニガイチゴワインのアルコール度数の変化を図2に示した。3日目の Brix の値において OC2 のほうが W3 よりも高い値になりアルコール発酵が進まなかったのは OC2 の生育が遅れていたためと考えられた。アルコール濃度については、補糖に用いた糖の種類の違いによる影響がみられ、シヨ糖のほうがブドウ糖より若干高い値になったが、どのサンプルも補糖を繰り返すことにより、順調に度数が上昇し、10~13%程度の濃度になった。テーブルワインのエタノール濃度は、9~15%の範囲にあり、大半の製品は11~13%の範囲に含まれるという報告がある¹⁰⁾。このことから補糖を行った際の1回当たりの量や間隔は適切であったと考えられた。

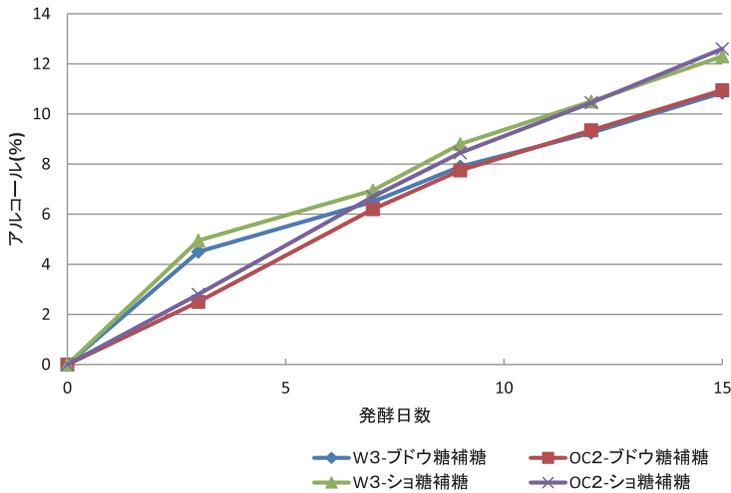


図2 発酵過程におけるアルコール度数の変化

pHの変化を図3に示した。pHについては発酵が進むにつれ低下していき、OC2を用いたワインのほうが若干低い値となった。補糖に用いた糖の違いによる差は見られず、pHは3.4~3.5であった。通常のワインのpH3~4の間では生物に対して活性のある二酸化硫黄 (SO_2) の濃度は小さくなり、それよりもpHが低すぎると SO_2 量が多くなる¹¹⁾。また、pHが高すぎるとタンニンの重合や色素を含んだ巨大分子が早く生成して沈殿するため、発酵前の果汁及びワインのpHが高すぎる場合には品質に悪影響を及ぼすという報告があり¹¹⁾、今回のpHは果実酒として適していると考えられた。

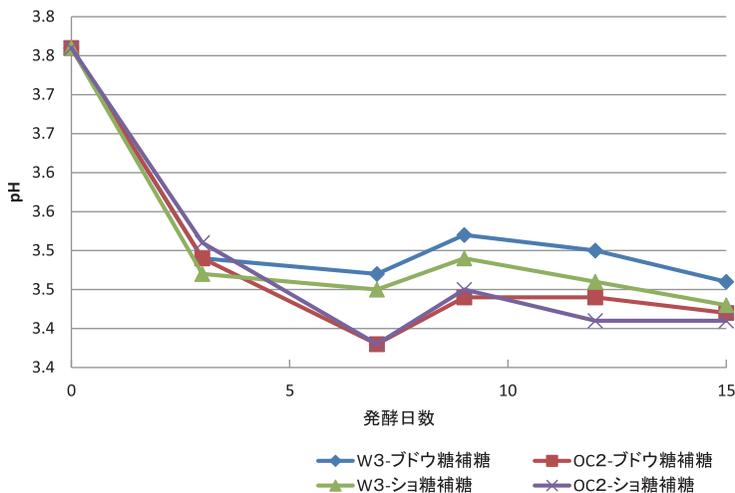


図3 発酵過程におけるpHの変化

酸度の変化を図4に示した。酸度については酵母間においてOC2のほうがやや高いものの、全体的に差は小さく発酵が進むにつれ、高い値となった。

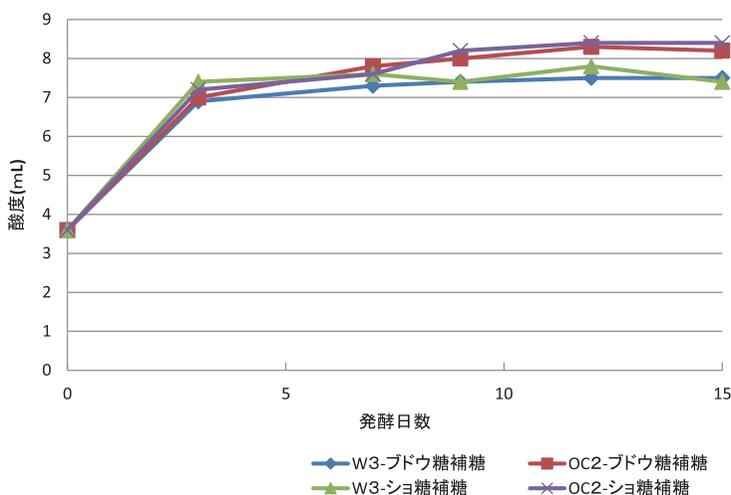


図4 発酵過程における酸度の変化

アミノ酸度の変化を図5に示した。アミノ酸度においては糖の種類及び酵母間に差は見られず、発酵したワイン中にはほとんど含まれないという結果となった。

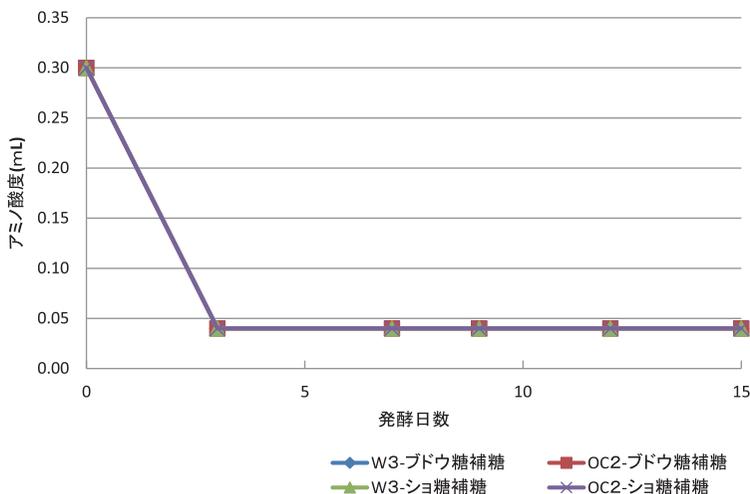


図5 発酵過程におけるアミノ酸度の変化

ニガイチゴワインの発酵過程におけるクエン酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸の6種類の有機酸における組成の変化を図6~11に示した。有機酸組成については最も含有量が高い有機酸はクエン酸で、発酵により多少値は低くなったが、顕著な変化は見られず、ピルビン酸は発酵を行うことで5分の1程度まで低くなった。リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸については発酵が進むにつれて値は高くなっていった。リンゴ酸、コハク酸は果汁には含まれていなかったが発酵することで増加した。原料の大部分がブドウを用いるワインではリンゴ酸を乳酸と炭酸ガスに分解するマロラクティック発酵があるが、今回はマロラクティック発酵が起きなかつ

たため、リンゴ酸の含量はやや上昇するという結果となった。また、リンゴ酸、コハク酸とも W3 よりも OC2 の方が高くなる傾向が認められ、糖による差は認められなかった。

乳酸、酢酸についても果汁にはほとんど含まれていなかったが、発酵が進むことで生成され、値が上昇した。乳酸は W3 を使用した方が高くなる傾向が認められ、酢酸は OC2 を使用した方が高くなる傾向が認められた。糖による差は認められなかった。

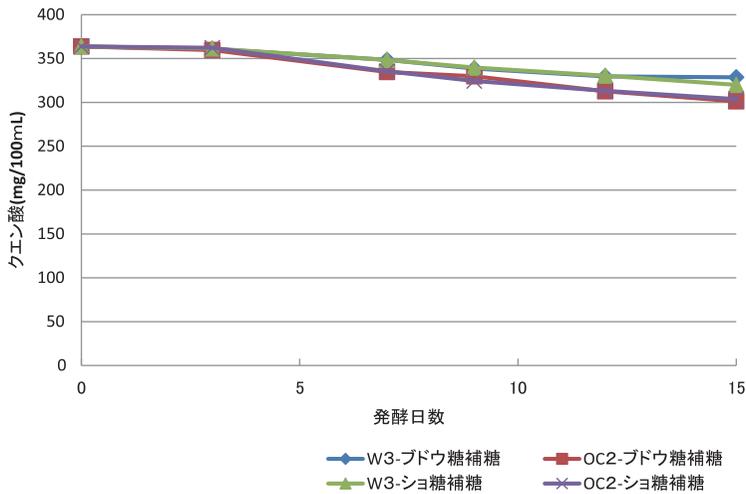


図 6 発酵過程におけるクエン酸含量の変化

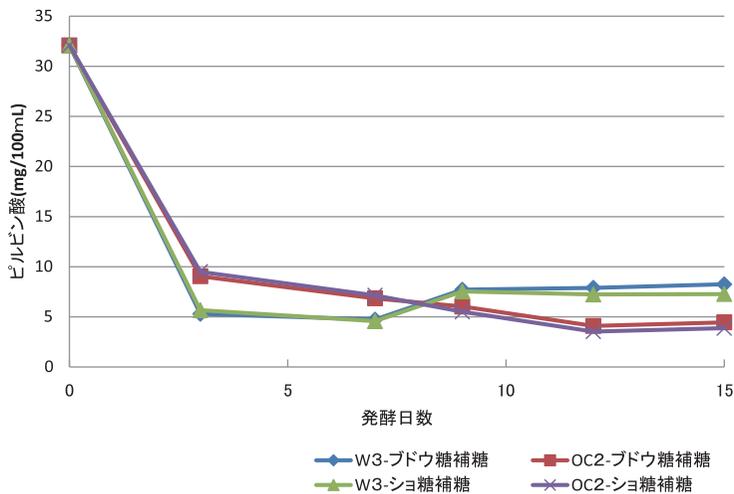


図 7 発酵過程におけるピルビン酸含量の変化

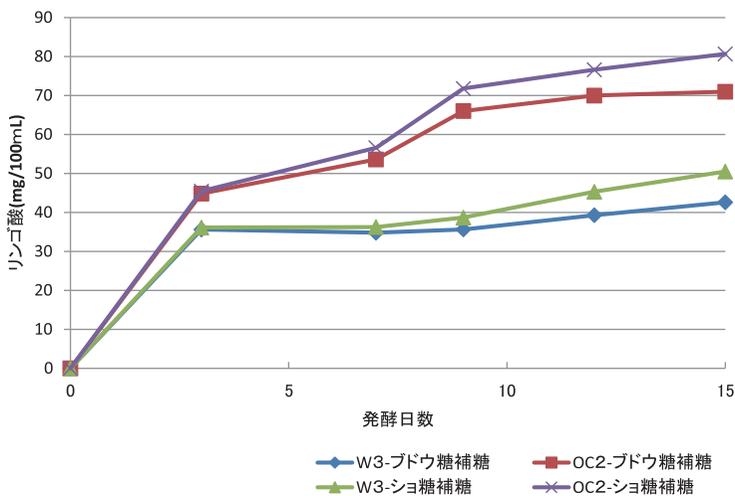


図8 発酵過程におけるリンゴ酸含量の変化

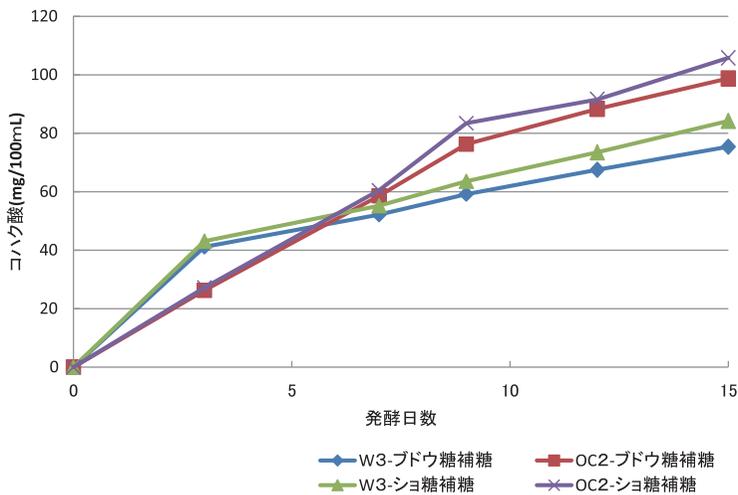


図9 発酵過程におけるコハク酸含量の変化

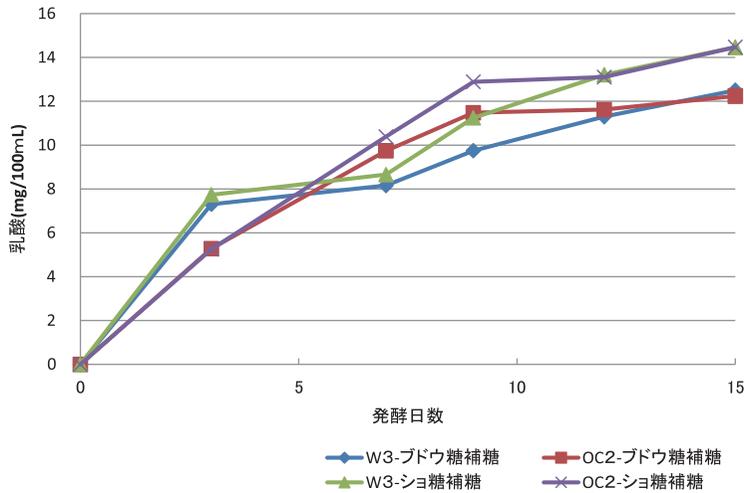


図 10 発酵過程における乳酸含量の変化

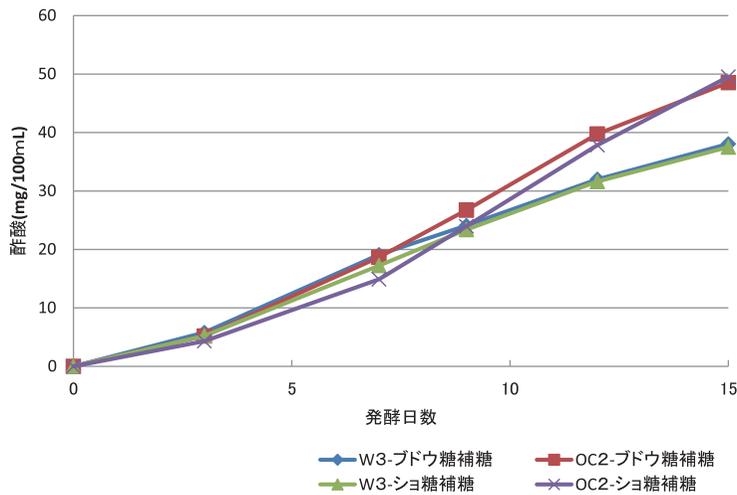


図 11 発酵過程における酢酸含量の変化

色度の変化を表 2 に示した。L*は明度を示しており、発酵することにより、果汁の時と比べ明るくなった。色相と彩度について、a*は値が高いほど赤みが強く、b*は値が高いほど黄色が強くなる。双方とも果汁の際には高い値を示していたが、発酵をはじめたことで値が低下した。

以上の結果から、ニガイチゴを材料としたワインを醸造する際に酵母や補糖する糖の種類を変えることで、出来上がったワインの成分値に若干違いが生じることが分かった。また、研究に携わった 6 名と鶴見酒造株式会社（愛知県津島市）のスタッフ 1 名の計 7 名で、発酵終了後のニガイチゴワインのテイスティングを行った結果、どのワインもフレッシュ感があふれるワインとなったが、ブドウを原料としたワインと比較すると、やや味の深みにかけると感じられた。また、

表2 色度 (明度 (L*)・色相 (a*)・彩度 (b*)) の発酵における変化

発酵日数(日)		0	3	7	9	12	15
L*	W3-ブドウ糖補糖	65.10	81.16	84.73	81.88	81.39	84.82
	OC2-ブドウ糖補糖	65.10	85.12	83.51	86.73	86.10	81.55
	W3-ショ糖補糖	65.10	81.59	83.81	82.87	81.00	85.57
	OC2-ショ糖補糖	65.10	82.31	86.82	86.77	84.51	86.68
a*	W3-ブドウ糖補糖	65.10	7.59	5.05	5.32	5.67	5.93
	OC2-ブドウ糖補糖	65.10	5.66	4.58	5.09	5.75	5.87
	W3-ショ糖補糖	65.10	7.82	5.98	5.91	6.70	6.56
	OC2-ショ糖補糖	65.10	5.13	4.84	5.51	6.22	6.81
b*	W3-ブドウ糖補糖	65.10	20.57	19.83	20.91	21.72	22.64
	OC2-ブドウ糖補糖	65.10	16.17	18.04	20.13	21.29	21.15
	W3-ショ糖補糖	65.10	20.71	20.28	20.91	23.03	23.71
	OC2-ショ糖補糖	65.10	14.27	18.90	20.74	22.41	24.05

補糖にブドウ糖ではなく、ショ糖を用いたほうがすっきりとした味で飲みやすく、酵母においては W3 に比べ、OC2 の方が酸味がまろやかに感じられた。

発酵試験結果とテイasting結果を総合的に判断して、補糖にショ糖を用いて、酵母として OC2 を使用して、プラントレベルでのニガイチゴワインを醸造することを決定した。鶴見酒造株式会社、今回の発酵試験と同様に醸造することを依頼し、得られたワイン (種別: 甘味果実酒) を、東海学園大学 20 周年の学内イベントなどで配布した (図 12)。



図 12 鶴見酒造株式会社で醸造されたニガイチゴワイン

2. アルコール耐性微生物の分離

アルコール 8% (v/v) を含む Yeast Nitrogen Base 培地のシャーレに培養した結果の一部を図 13 に示した。コロニーの様子が異なる酵母と考えられる 2 株 (N1 株、N2 株) を分離した。この分離菌株を用いた醸造を目標として、分離菌株の同定と発酵特性については今後の検討課題とし

たい。



図 13 アルコール耐性微生物のシャーレでの培養

引用文献

- 1) 六角見孝, 「樹木辞典 鮮明なカラーのオリジナル図鑑」, (株)月刊さつき研究社, p.115, 1989.
- 2) 橋本郁三, 「食べられる野生植物大辞典—草本・木本・シダ」, 柏書房株式会社, p.394, 2003.
- 3) 國武久登, NHK 趣味の園芸 よくわかる栽培 12 か月 ラズベリー、ブラックベリー, 日本放送出版協会, p.71, 2006.
- 4) 中村理恵, 柚木崎千鶴子, 酒井美穂, 山崎正夫, 西山和夫, 黒木義一, 坂寄潮, 小松春喜, 國武久登, キイチゴ属植物の機能性評価に関する研究, 園学雑(別冊), 75, 501, 2006.
- 5) Cheplick, S., Kwon, Y.I., Bhowmik, P. and Shetty, K., Clonal Variation in Raspberry Fruit Phenolics and Relevance for Diabetes and Hypertension Management. J. Food. Biochem., 31, 656-679, 2007.
- 6) McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. and Stewart, D., Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. J. Agric. Food. Chem., 53, 2760-2766, 2005.
- 7) 高山侑樹, 稲益和子, 横山あゆ美, 西田淑男, 古市幸生, ニガイチゴ果実の一般成分, DPPH ラジカル消去活性および血糖上昇抑制作用, 日本食品科学工学会誌, 57, 483-488, 2010.
- 8) 鳴橋直弘, アジア産キイチゴ属の分類学的ノート(2)新品種, キノミニガイチゴ, 植物地理・分類研究, 56, 24-26, 2008.
- 9) 三井俊, 小野奈津子, 安田(吉野)庄子, 伊藤彰敏, 山本晃司, 「萬三の白モッコウバラ」から分離した酵母の清酒醸造特性評価, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 3, 68-71, 2015.
- 10) 石川雄章, 醸造物の成分, 財団法人 日本醸造学会, p306, 1999.
- 11) 石川雄章, 醸造物の成分, 財団法人 日本醸造学会, p292, 1999.