

【平成 24 年度 ASEV 日本ブドウ・ワイン学会セミナー報告】

Good Malolactic Fermentation Practices  
 – Impact on Diacetyl and Spoilage Organism Management –

佐藤充克

日時：2012 年 11 月 16 日（金）15:00～16:00

場所：レンブラントホテル大分 2F 久住の間

講演者：Gordon Specht (LALLEMAND Inc.)/ 通訳 佐藤充克

最初に、Gordon Specht（ゴードン・スぺイ）氏の紹介を行った。氏は Pennsylvania State University で Food Science を専攻、卒業後、Scott Laboratory に入社、11 年勤務しました。その後 Lallemand Inc. に移り (Lallemand が Scott Lab. を吸収合併)、17 年勤務しており、現在、北米、日本、インド担当マネージャーである。ワイン用酵母、乳酸菌、発酵助剤などの技術指導を行っている。

今回のテーマは Malolactic Fermentation (MLF) 全体的話と最近の Co-inoculation (コ・イノキュレーション) について、特徴香である Diacetyl (ダイアセチル) の制御に関し詳しく説明した。内容は、MLF の基礎、MLF とダイアセチルの管理、MLF 菌添加タイミング、変敗菌の管理である。以後、図表を示して説明するが、図表は全てセティ(株)の清水慶氏が翻訳し、講演で使用したものである。

MLF の基礎

まず、Oenococcus, Lctobacillus, Pediococcus など乳酸菌について示し、O. oeni の形態、L-リンゴ酸から L-乳酸と炭酸ガスへの変換について説明、ワイン発酵に含まれる種々の代謝系について (図 1) 簡潔に解説した。

次に、MLF に影響を与える環境因子について、詳しく説明した。即ち、アルコール濃度は <13% が好適、13～15% が許容範囲内、15～17 が困難、>17% は極めて困難である。pH は >3.4 が好適、3.1～3.4 が許容範囲内、2.9～3.1 が困難、<2.9 未満は極めて困難である。遊離亜硫酸(mg/L)は <8 が好適、8～12 が許容範囲内、12～15 が困難、>15 は極めて困難である。総亜硫酸(mg/L)

は、<30 が好適、30～40 が許容範囲内、40～60 が困難、>60 は極めて困難である。温度は 18～22℃ が好適、14～18℃ または 22～24℃ は許容範囲内、10～14℃ または 24～29℃ は困難、<10℃ または >29℃ は極めて困難である。

また、酵母の栄養要求性も重要な因子であり、栄養要求性が低ければ MLF に好適で、中程度は許容範囲であり、高いと困難、極めて高いと極めて困難である。酵母の栄養要求性は Lallemand のパンフレットに示されているので参照されたい。アルコール発酵(AF)状態も MLF に影響し、AF が中程度の安定した発酵状態が MLF には好適で、AF が遅くても、早すぎても (温度が上昇する) MLF には良くない。MLF の基質であるリンゴ酸濃度も影響する。リンゴ酸の初期濃度(g/L)が 2～4 は好適、4～5 または 1～2 は許容範囲内、5～7 または 0.5～1 は困難、>7 または <0.5 は極めて困難である。

Lallemand は MLF 難易度をスコアにして、MLF にと

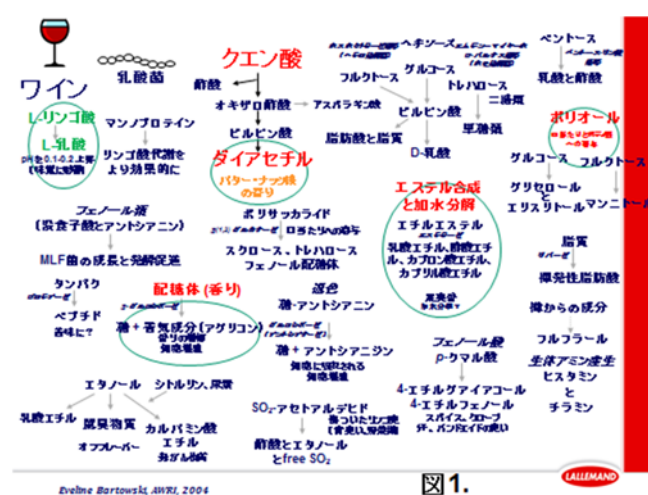


図 1.

って好適なワイン発酵かどうか容易に判断できるソフトを提供している。iPhone アプリとなっているので、必要な方はセティ(株)に問い合わせして下さい。図2にスコア表と例が示されている。スコア合計点で MLF の難易度が分かるようになっている。

その他、あまり知られていない環境因子として、乳酸菌の接種量がある。MLF は菌数が $>10^6$  CFU/mL ないと誘導されないので、接種量が少ないと、MLF 誘導の必要菌数に達するまで時間がかかり、ダイアセチルや他の菌の増殖の為、異臭が多くなることがある。また、溶存酸素量も重要で、あまりに嫌氣的だと MLF が誘導されない。赤ワインは比較的酸素の入る機会が多いので、MLF が惹起しやすい。ポリフェノールも、種子由来のものはガリック酸誘導体を多く含み、乳酸菌に増殖阻害を示すことがある。一方、果皮由来ポリフェノールは毒性が低い。滓の凝集度も MLF に影響する。余りにコンパクトに凝集した滓の状態は、MLF に良くない。銅イオンも乳酸菌に阻害的に働く。ブドウの残留農薬も MLF 菌増殖を阻害する事がある。

図2. マロラクティック発酵 難易度評価スコア

	1 point each	2 points each	8 points each	10 points each	Score
Alcohol (% vol)	>13	13-15	15-17	>17	1
pH	>3.4	3.1-3.4	2.9-3.1	<2.9	2
Free SO2 (mg/L)	<8	8-12	12-15	>15	2
Total SO2 (mg/L)	<30	30-40	40-60	>60	2
Temperature (°C)	18-22	14-15 18-24	10-14 or 24-29	<10 or >29	2
Yeast's nutritional needs	Low	Medium	High	Very high	8
Ease of alcoholic fermentation	No problems	Transient yeast stress	Sluggish / stuck AF	Prolonged yeast contact	1
Initial level of malic acid (g/L)	2-4	4-5 or 1-2	5-7 or 0.5-1	>7 or <0.5	2
Maximum AF rate (maximum loss of bris/day)	<2	2-4	4-6	>6	1

**Total Points Interpretation**

< 13      13 to 22      23 to 40      > 40

↑      ↓

The conditions for malolactic fermentation are:

Favourable      Not so favourable      Difficult      Extreme

21

**MLF とダイアセチルの管理**

ダイアセチルは、主としてクエン酸代謝により生成される。ブドウ中のクエン酸濃度は 0.1~0.7 g/L と少ないが、これがダイアセチルの基質となる。最近ではクエン酸代謝酵素を欠失した *O. oeni* が市販されており、ダイアセチルを生成しない。市販乳酸菌により、ダイアセチルの生成が多いものと少ないものがある。これは、クエン酸代謝が、MLF が終了してから起こるか、同時に起こるかなど、クエン酸代謝の誘導時期により

左右される。Lallemand の MLF 菌では、MT01 は、クエン酸代謝は MLF 後に誘導され、ダイアセチルが少ない。Alpha や Lalvin31 はダイアセチル生成が中程度である。Beta および PN4 はクエン酸代謝が早期に誘導され、生成ダイアセチルは多い。醸造中種々の因子とダイアセチル生成量について、まとめたものを図3に示す。

遊離の亜硫酸はダイアセチルと結合し、官能的に不活性化する。この不活性化はそれほど強くはなく、遊離の亜硫酸が多いと官能的なダイアセチル量が80%程度になるというデータがある。温度は、低温(18°C)の方が高温(25°C)より、ダイアセチルが多くなる。ワインの酸素レベルも MLF に影響する。α-アセト乳酸はダイアセチルに酸化されるときに、酸素を必要とする。従って、赤ワインは白ワインよりも、一般的に溶存酸素が多いので、MLF によりダイアセチルが多くなる。しかし、ダイアセチルの官能閾値は、シャルドネで 0.2 ppm、ピノ・ノワールで 0.9 ppm、カベルネ・ソービニオンでは 2.8 ppm である。従って、白ワインは MLF でダイアセチル生成量は少ない傾向だが、香りとしては感じやすいことが分かる。

図3. 醸造中のダイアセチル管理

影響因子	ダイアセチル ↑	ダイアセチル ↓
乳酸菌株	乳酸菌株によるダイアセチル生成の違い	
ワインのタイプ	赤	白
MLF 菌の添加レート	低 (10 <sup>4</sup> cfu/mL)	高 (10 <sup>6</sup> cfu/mL)
酵母主種の由来 (醸造の環境)	清潔化もしらぬ酒 酵母活性のない液	醸造の環境 酵母活性のある液
MLF 中のワインの酸度調整	酸を量産	還元的環境
SO2量		追加することでダイアセチルと結合し、官能的に不活性化
クエン酸濃度	高いほどダイアセチル高生成だが、同時に酢酸も生成	
MLF の温度	低 (例: 18°C)	高 (例: 25°C)
MLF 誘導時のワインの pH	低 pH	高 pH

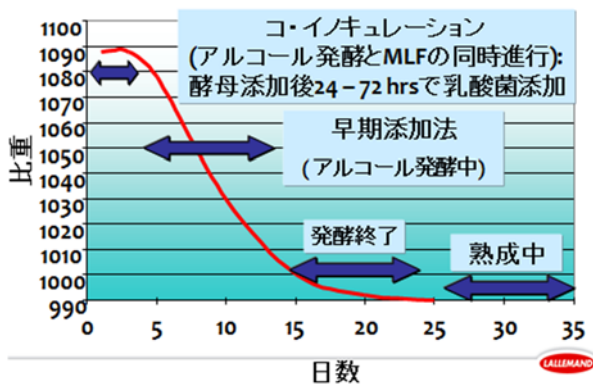
Eveline Bartowsky, AWRI, Trier 2008 を一筆改題



**MLF と菌接種のタイミング**

MLF 菌接種タイミングの定義を図4に示す。従来のアルコール発酵(AF)後の乳酸菌添加は、発酵終了時点である。発酵が終了し、熟成中に追加することも行われてきた。ここでは、コ・イノキュレーション(CoI)について説明する。CoI は AF 中に MLF 菌を接種する方法である。通常 CoI では、酵母添加後、24~72 時間に

図4. 添加タイミングの定義



MLF 菌を添加する(図 4)。AF 中は、乳酸菌にとって、温度や亜硫酸濃度など、発酵終了後よりも好適であり、また、AF 中に MLF 菌はワインの条件に馴化するの、糖を食いきると同時に MLF 発酵が起き、極めて短時間に MLF が終了する利点がある。

CoI を行う上で、ワインのアルコール濃度が<14.5% であれば、28℃が MLF の最高温度であるが、アルコール濃度が高く>14.5 の時は、MLF 最高温度は 23℃である。また、ブドウ破碎時の亜硫酸添加濃度によって、MLF 菌の接種時間が異なる。ワイン中の遊離の亜硫酸濃度が低下するのに要する時間を考慮する必要がある。亜硫酸添加量が<50 ppm の時、乳酸菌の添加時期は、酵母添加後 24 時間であり、亜硫酸添加量が 50~80 ppm の時、48 時間、亜硫酸添加量が>80~100 ppm の時は 72 時間が良い。

CoI による乳酸菌添加法は既に各国で行われている。ニュージーランド、Howke's Bay の 2000 年収穫のシャルドネの発酵試験では、酵母は CY3079 を使用しているが、MLF 菌 A および B を使用した場合、CoI では MLF 終了までに 26 日および 19.5 日であったが、AF 終了後添加では 74 日以上および 68 日を要した。これらのワインの揮発酸量を測定したところ、乳酸菌 A および B で各々、0.195 および 0.187 g/L、AF 終了後添加では各々、0.147 および 0.168 g/L であり、両者に有意の差は認められず、酸臭もなかった。

ドイツ・モーゼルの 2003 年リースリングの試験で、酵母は EC1118、乳酸菌 A および B を用い、CoI の場合は MLF 終了に両株で 23 日であったが、AF 終了後添加では A が 42 日、B が 52 日を要した。AF 終了後添加ワインは、バター香、乳酸香が強くなり、逆に品

種香が弱くなり、バランスも良くなかった。CoI のワインは品種香、ボディ感が強く、バター香、乳酸香は弱く、バランスがとれていた。一方、MLF をしないワインは、品種香は強かったが、酸味が強く、還元的で、バランスが悪かった。

発酵における乳酸菌の添加タイミングの違いが、残存クエン酸量および生じる酢酸に及ぼす影響を調べた。Rheinlandpfalz の 2004 年リースリング (果汁 pH 3.26) を CY3079 で発酵した時、生成される酢酸量は、MLF 未実施を含め、どのタイミングで乳酸菌を添加しても有意の差はなかった。クエン酸量は、MLF 未実施で 0.3 g/L であったが、CoI で 0.2 g/L、AF 1/3 終了時添加で 0.1 g/L、AF 終了時添加でも 0.1 g/L であった。

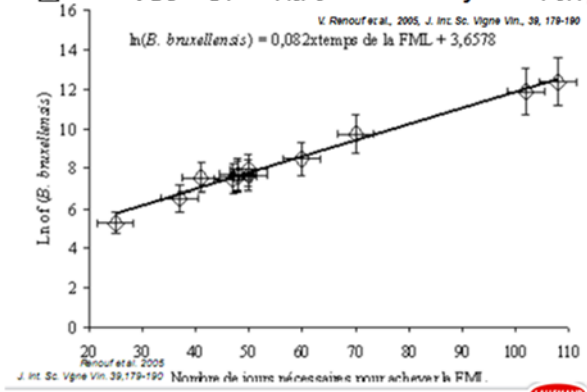
#### 変敗菌の管理

ワインの pH が 3.5 以上になると、*Lactobacillus* や *Pediococcus* による自然発生 MLF のリスクが大きくなり、オフ・フレーバーが生成されてしまうことがある。また、MLF が速やかに終了しないと、ヒスタミンなど、生体アミンの生成量が多くなることが報告されている。発酵物の生成するモノアミンは、頭痛の原因ともなる。AF 終了後添加、AF1/3 終了時添加に比べ、CoI は生体アミン生成量が顕著に少ないことが判明した。

所謂、獣臭として知られるフェノレの原因菌 *Brettanomyces* 菌量は、MLF 終了までに要する時間と高い正の相関を示すことが分かっている(図 5)。

フェノレの原因物質である 4-エチルフェノール

図5. MLF完了に要する期間とBrettanomycesの関係



(4EP)および4-エチルグアイアコール(4EG)量は、MLF 終了までに要した時間58日(18~19℃)および124日(14

～15℃)の場合、各々、4EP 870 ppb、4EG 404 ppb および 4EP 1119 ppb、4EG 551 ppb であった。同条件の CoI では、13～16 日(18～19℃) および 27～31 日(14～15℃) で MLF が終了し、4EP および 4EG 量は、いずれも 7～40 ppb と低い値であった。

カベルネ・フランにおける AF 後乳酸菌添加 MLF では *Brettanomyces* の菌量は 660 CFU/mL であったが、CoI では 35 CFU/mL であった。同時に AF 後添加 MLF ワインの揮発性フェノール (フェノレ) 量は 680 ppb であったが、CoI では 5 ppb と顕著に少なかった。

#### まとめ

以上まとめると、CoI を行うと、①早期に MLF を完了できるため、時間の節約になると共に、ワインをより早く市場に出せるメリットがある。②*Brettanomyces* や望まない雑菌増殖のリスクが低減される。③難しい

環境で MLF が成功しやすく、また、ワインの香味が向上する。④エネルギーと経費が節減できる。また、加温や発酵後添加の為のワインの分析が省略できる。

以上、乳酸菌のコ・イノキュレーションは、従来考えられてきたような、オフ・フレーバーや多量の揮発酸発生危険はないので、今後、積極的に取り入れるべき技術であると思われる。

本講演は Lallemand Inc. の Gordon Specht 氏のご厚意とセティ(株)の清水氏のご協力により実現したものである。ここに、深甚な謝意を表します。MLF の要点と、従来からの AF 終了後の乳酸菌添加と CoI の比較が分かり易く示され、今後の MLF の方法に新たな視点を与えて頂きました。潜在観念と昔からの方法が、必ずしも正しいとは限らないことを思い知らされた、非常に示唆に富む講演でありました。