

**[ Technical Brief ]**

## 市販乳酸菌スターターを用いたマロラクティック発酵試験

恩田 匠・小松正和・中山忠博

山梨県工業技術センター支所ワインセンター 〒409-1316 山梨県甲州市勝沼町勝沼 2517

Malo-lactic fermentation tests using commercial starter cultures of lactic acid bacteria

Takumi ONDA, Masakazu KOMATSU, and Tadahiro NAKAYAMA

Yamanashi Wine Center, Yamanashi Industrial Technology Center, 2517, Katsunuma, Katsunuma-cho, Koshu-shi, Yamanashi Japan

We performed malo-lactic fermentation tests by using commercial starter cultures of lactic acid bacteria. Most of the starter cultures decomposed malic acid within 30 days. Chemical analysis and sensory evaluation of wines produced in this study were performed.

**Key words:** malo-lactic fermentation, lactic acid bacteria, starter culture

**緒 言**

赤ワイン製造の重要な工程としてマロラクティック発酵(柳田 1994, 柳田 1995a,b, 横塚 2000)がある。このマロラクティック発酵は、赤ワイン製造において、(i)減酸(酸味を和らげる)作用、(ii)香味の改良・複雑性の付与、(iii)微生物学的な安定化に寄与する効果を果たすものと説明されている。我が国では、ワイン製造に乳酸菌スターターの添加が認められるようになったのは比較的近年のことであり、現在でも自然に生起するマロラクティック発酵に依存している製造現場も散見される。一方で、最近主にヨーロッパのワイン産地で用いられている、多種の乳酸菌スターターが市販されるようになり、それらの国産ワインにおける効果や製品の特徴の違いの検証を求める要望が強くなってきた。しかしながら、我が国における赤ワインのマロラクティック発酵については、柳田ら(柳田 1994, 柳田 1995a,b)の研究があるのみで、その情報は限られ

ていた。

本研究では、各種の市販赤ワイン用乳酸菌スターターを用いた、マロラクティック発酵試験を実施し、その効果や特徴の違いを明らかにすることを目的とした。

**材料と方法****供試原料ブドウ**

供試原料ブドウとして、2012年産(10月1日収穫)の、山梨県韮崎市産カベルネ・ソーヴィニオンを用いた。

**ワインの生成**

原料ブドウを除梗後、果粒をできるだけ潰さないよう留意し発酵容器に移した。果汁には、ピロ亜硫酸カリウム(SO<sub>2</sub>として 50 ppm)およびL-酒石酸(2 g/L)を添加し醸造用原料とした。この果もろみに対して低温醸し処理(5°C, 7日間)を行った。低温醸し期間中は必要に応じて果もろみを攪拌した。その後、冷却を止め液温が15°C程度になった時点で、市販の乾燥酵母 Zymaflore RX60(Laffort社製)を10<sup>6</sup>個/mL以上の密度

2014年5月7日受理

になるように添加し、7日間醸し発酵（液温が20°C以上27°C以下になるようにブライン・ヒーター制御）を行った。醸し発酵後、搾汁率65%で圧搾した後、元の果汁の比重から換算して、転化糖分22%となるように上白糖（フジ日本精糖、純度97.2%）を添加した。その後、22°C一定で後発酵させた。

### 供試乳酸菌スターター

供試乳酸菌スターターとして、9種の市販製品；MBR-31, MBR-PN4, MBR-beta（以上、3株はLallemand社製）、Lactoenos-SB3, Lactoenos-B16（以上、2株はLaffort社製）、Viniflora-Oenos, Viniflora-CH35, Viniflora-CH11, および Viniflora-CiNe（以上、4株はChr. Hansen社製）を用いた。本論文では、それぞれ、31, PN4, beta, SB3, B16, Oenos, CH35, CH11, および CiNeのように略称する。これらは、平成24年5月の時点で、本邦で一般に市販されていた製剤である。

### マロラクティック発酵試験

カベルネ・ソーヴィニオンを用いて醸造し、アルコール発酵が終了（残糖が0.1g/L未満）したもろみを10Lずつ斗瓶に分注した。このもろみに対し、各市販乳酸菌スターター製品の処方に従い、乳酸菌スターターを添加し、18°Cに調整した室内でマロラクティック発酵を促した。このとき、コントロール試験区として、乳酸菌スターターを添加せずに、自然マロラクティック発酵を促した。なお、ブランク試験区として、アルコール発酵が終了した後に亜硫酸を添加し、マロラクティック発酵を阻止した。

### 成分分析と微生物分析

果汁と生成ワインの分析は、次のとおり行った。アルコール、比重、エキスは、国税庁所定分析法に従った。果汁糖度、pHと総酸（酒石酸換算）は、定法により分析した。有機酸組成は、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。ジアセチルとアセトインは、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析計（Turbo Matrix Trap 40+Clarus 680GC+Clarus SQ8T, パーキン・エルマー社製）を用いて分析した。Turbo Matrix Trap 40は、加熱温度70°C, ニードル温度150°C, トランスファー温度200°C, トラップ温度は最高で280°C, 最低で

40°C, 抽出回数4回, トラップ管としてTenaxTAを用い、そのカラム圧を30Psi, ドライパージ時間7分間として制御した。Clarus 680GC-Clarus SQ8TはカラムPe Elite-WAXETER (60m×0.25mm×0.25μm)を用い、GCカラムオープン温度の設定は、50°C3分間-8°C/分-150°C5分間-10°C/分-230°C5分間として制御し、イオンソース温度230°C, 注入口温度200°C, 取り込みモード「scan」および「sim」, マスレンジ35-550scan（ジアセチルはm/z=53, nT=6.7分, アセトインはm/z=88, nT=12.9分）, PM電圧1700-1900Vとした。

乳酸菌数は、柳田ら（柳田1994, 柳田1995a,b）の方法に従い、BM寒天培地を用いて計数した。

### 官能試験

試験醸造した赤ワイン11種について、山梨県内のワイン製造従事者40人を評価者とした官能試験を実施した。官能試験は、色調・外観、香り、味、総合評価をそれぞれ5点法（5, きわめて良好；4, 良好；3, 普通；2, 可；1, 不可）にて審査した。また、個別の評価項目として、フルーティさ、青臭さ、酸味の強さ、マロラクティック発酵の風味の強さを、5点法（5, きわめて強い；4, 強い；3, 適度；2, やや感じる；1, 感じない）にて審査した。

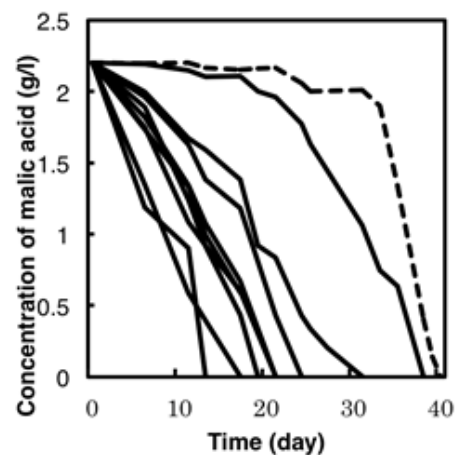


Fig. 1. Changes in concentration of malic acid during malolactic fermentation of red wine made from 'Cabernet Sauvignon'. Broken line: control (no addition starter), solid line: CiNe, VF-oenos, PN4, CH11, CH35, beta, 31, SB3, and B16 in order of the declining degradation rate of malic acid.

## 結果と考察

### 1. 原料果汁ともろみの分析値

原料果汁の成分分析値は、果汁糖度 17.3°Brix, 比重 1.074, pH3.37, 総酸度 7.0 g/L, 酒石酸換算, リンゴ酸 2.2 g/L, 酒石酸 2.9 g/L およびホルモール態窒素 84 mg/L (いずれも補糖と補酸前の値) であった。

アルコール発酵後の乳酸菌添加を行ったもろみの成分分析値は、アルコール 12.3% (v/v), 総酸度 8.3 g/L, 酒石酸換算, pH 3.35, 総亜硫酸 12 mg/L (遊離亜硫酸 0 mg/L) であった。マロラクティック発酵が生起される要件 (Peynaud 1956, 横塚 2000) としては、もろみが pH3.25~3.50 にあること, 総亜硫酸 30 mg/L 以下であること, アルコール濃度が 10~13.5% (v/v) にあることなどとされている。したがって、今回のもろみは、乳酸菌スターターの増殖が困難なものではないことを確認した。

### 2. 乳酸菌の増殖性

乳酸菌スターター添加した試験区のもろみにおける添加 1 日後の乳酸菌数は、 $2.2 \sim 6.8 \times 10^6$  CFU/mL であり、マロラクティック発酵が生起される菌濃度 (柳田 1995a, 横塚 2000, Rice et al 1970) に達したことを確認した。乳酸菌添加後の各試験区のリンゴ酸含量の推移を、Fig. 1 に示した。乳酸菌スターターを添加しないコントロール試験区では、完全にリンゴ酸を消費するために、38 日間を要した。乳酸菌スターターを用いた試験では、2 株を除き、ほとんどが 30 日以内に完全にリンゴ酸を消費した。

今回の試験では、リンゴ酸の分解速度が最も早かったのは、CiNe 株であり、ついで Oenos, PN4, CH11,

CH35, beta, 31, SB3, B16 株であった。既報 (恩田ら 2013) の、マスカット・ベリーA を用いた試験では、最も消費が早かったのが CH11, ついで CiNe, Oenos, PN4, CH35, beta, 31, SB3, B16 の順であった。このことから、9 種の乳酸菌スターターの中では、CiNe, Oenos, PN4, CH11 が比較的早くリンゴ酸を消費することが分かった。山梨県内でよく用いられている CH35 は中間的な速度を示した。SB3 と B16 株は緩慢な消費速度であった。

### 3. 生成ワインの成分分析

生成ワインの分析値を Table 1 に示した。ジアセチル (Ribéreau-Gayon et al 2012) は、官能的にはバターやヘーゼルナッツ様の香りを示し、ワイン中では 2 mg/L 付近から認知 (Ribéreau-Gayon et al 2012) され、5~7 mg/L 付近を超えると品質劣化 (Rankine 1972) につながるものと報告されている。アセトイン (Ribéreau-Gayon et al 2012) は、約 10 mg/L の濃度において乳様の香りを呈すると説明されている。マロラクティック発酵を阻止したブランク試験区のワインは、ジアセチルやアセトインの生成が、乳酸菌スターター添加区およびコントロール区と比較してやや低い値を示した。コントロール試験区は、ジアセチルおよびアセトイン生成がやや高い値を示した。乳酸菌スターター添加区において、CiNe 株を除き、ジアセチルは 3~4 mg/L, アセトイン 4~18 mg/L の生成が認められ、特に B16 株が高い値を示した。ジアセチル生成が低いことが訴求されている CiNe 株は、ジアセチルおよびアセトイン生成がやや低い値を示した。

Table 1 Chemical compositions and pH of red wines made of using different starter cultures of lactic acid bacteria.

	Citrate (g/L)	Tartrate (g/L)	Succinate (g/L)	Malate (g/L)	Lactate (g/L)	Acetate (g/L)	pH	Ethanol (%, v/v)	Extract	OD 430 nm	OD 530 nm	Free SO <sub>2</sub> (mg/L)	Total SO <sub>2</sub> (mg/L)	Diacetyl (mg/L)	Acetoin (mg/L)
Blank	0.9	1.8	1.4	2.5	0.7	0.1	3.36	12.0	2.50	0.432	0.603	14	69	2	1
Control	0.6	1.4	1.4	N.D	2.7	0.3	3.42	12.1	2.46	0.384	0.747	8	82	4	17
MBR-31	0.7	1.5	1.4	N.D	2.4	0.3	3.42	11.9	2.27	0.350	0.534	22	73	3	4
MBR-PN4	0.7	1.4	1.5	N.D	2.6	0.3	3.38	12.0	2.29	0.380	0.500	26	74	4	7
MBR-beta	0.7	1.3	1.5	N.D	2.7	0.3	3.39	12.1	2.31	0.283	0.429	27	74	4	6
SB3	0.6	1.3	1.4	N.D	2.9	0.3	3.40	12.1	2.34	0.309	0.458	23	74	4	7
B16	0.6	1.6	1.4	N.D	2.6	0.2	3.41	12.2	2.40	0.347	0.534	8	72	4	18
VF-oenos	0.6	1.3	1.3	N.D	2.6	0.4	3.40	12.2	2.29	0.293	0.446	26	73	3	4
CH35	0.7	1.5	1.3	N.D	2.4	0.3	3.37	12.0	2.32	0.304	0.463	14	63	3	7
CH11	0.7	1.4	1.4	N.D	2.6	0.4	3.38	12.1	2.33	0.298	0.461	26	76	3	4
CiNe	0.9	1.3	1.4	N.D	2.7	0.3	3.41	12.2	2.34	0.299	0.466	30	70	1	2

Table 2 Sensory evaluation of red wines made by using different starter cultures of lactic acid bacteria.

	Color	Flavor	Taste	Total	Fruity	Greenness	Acidity	Character of MLF
Blank	3.2	2.7	2.6	2.6	2.3	2.4	3.3	2.1
Control	3.4	2.2	2.2	2.3	1.9	2.5	2.8	2.0
MBR-31	3.1	2.9	2.7	2.8	2.5	2.4	3.2	2.3
MBR-PN4	3.1	3.0	2.9	2.9	2.5	2.3	3.1	2.5
MBR-beta	3.1	3.0	3.0	3.0	2.6	2.4	3.2	2.5
SB3	3.1	3.0	3.1	3.1	2.7	2.4	3.1	2.8
B16	3.3	3.2	3.1	3.1	2.8	2.3	2.9	2.7
VF-oenos	3.0	3.2	3.2	3.1	2.8	2.3	2.9	2.6
CH35	3.2	3.0	3.0	3.0	2.5	2.4	3.0	2.5
CH11	3.2	3.1	3.1	3.2	2.6	2.2	3.1	2.8
CiNe	3.1	3.0	3.0	3.0	2.7	2.1	3.0	2.5

#### 4. 生成ワインの官能試験

官能評価結果として、各評価スコアの平均値を Table 2 に示す。今回の試験では、ブランク試験とコントロール試験のワインは、香り、味および総評価ともやや低いスコアを示し、マロラクティック発酵の風味においてやや低いスコアを示した。特に、コントロール試験のワインは、フルーティさのスコアがやや低く、酸味のスコアが低い傾向を示した。これは、リンゴ酸完全消費までに長期間を要したため、酸化などの劣化が生じた結果である可能性も示唆された。

一方で、乳酸菌スターターを用いた試験区では、ブランク試験およびコントロール試験区のワインよりも、香り、味および総評価とも比較的良好なスコアを示した。特にフルーティさのスコアがやや大きくなり、酸味がやや軽減し、マロラクティック発酵の適度な風味が得られた可能性が示唆された。

このことから、乳酸菌スターターを用いることは、マロラクティック発酵をブロックしたり、自然発酵にまかせるよりも、高品質な赤ワイン醸造において有効である可能性が示された。

#### 要 約

カベルネ・ソーヴィニオンを原料ブドウとして、市販乳酸菌 9 種を用いて、マロラクティック発酵試験を行った。その結果、乳酸菌スターターの違いによるマロラクティック発酵の進行速度や生成されたワインの

成分および官能評価結果に差異が認められた。

#### 文 献

- 恩田匠・小松正和・中山忠博. 2013. 赤ワインにおける乳酸菌スターターを用いた品質向上. 山梨県工技セ研究報告. 27 : 88-91.
- Peynaud, M. E. 1956. New information concerning biological degradation of acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 7: 150-156.
- Rankine, B. C. 1972. Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 23: 152-158.
- Ribéreau-Gayon, P., Y., Glories, A., Maujean, D., Dubourdieu. 2012. *Traité d'oenologie Tome 2 - Chimie du vin, Stabilisation et tritements* 6e edition. p.72-73. Dunod. Paris.
- Rice, A. C. and L.R., Mattick. 1970. Natural Malo-Lactic Fermentation in New York State Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21: 145-152.
- 柳田藤寿. 1994. 乳酸菌によるマロラクティック発酵 (1). *日本ブドウ・ワイン学会誌.* 5 : 225-230.
- 柳田藤寿. 1995a. 乳酸菌によるマロラクティック発酵 (2). *日本ブドウ・ワイン学会誌.* 6 : 23-28.
- 柳田藤寿. 1995b. 乳酸菌によるマロラクティック発酵 (3). *日本ブドウ・ワイン学会誌.* 6 : 81-85.
- 横塚弘毅. 2000. ワイン製造 (その 3). *日本醸造協会誌.* 95 : 17-22.