

[連 載 講 座]

乳酸菌によるマロラクティック発酵 (3)

山梨大学工学部発酵化学研究施設

柳 田 藤 寿

9. MLF スターターカルチャーについて

ワインにおけるマロラクティック発酵において、微生物は木樽や、工場などの醸造設備の中に住みついており、これらにより新酒などの仕込みを行った時に MLF 菌が製品の中に入り、自然に MLF を生起させていた。しかし、ステンレスタンク等の醸造設備の使用や、衛生管理の徹底、醸造技術の進歩などにより、自然の MLF の生起が少なくなってきた。これらの理由等から、スターターカルチャーの研究が進み多くの優良菌株の研究が行われるようになり、乾燥粉末乳酸菌の市販品も見られるようになってきた。特に、新酒赤ワイン (MBA) などの減酸には、MLF が有効とされており、新酒販売開始時期の関係から時間的制約を受けるために、早期に MLF が終了する必要がある。

市販のスターターカルチャーには、ラルバン社、クリスチャンハンセン社などがある。

このように、純粹培養した菌や乾燥粉末菌を添加する方法は、ワイン醸造用酵母においてはよく行われているが、MLF 用乳酸菌ではいくつかの問題がある。1つは接種した乳酸菌が生育しないという問題点がある。原因はワイン中が、高アルコール、低 pH で亜硫酸が存在し、さらに乳酸菌の生育因子が少ない事などである。2つめは乳酸菌を接種する時期である。添加する時期は、次の3つが考えられる。(1) 酒母と同時に加える。(2) アルコール発酵の盛んな時に加える。(3) アルコール発酵終了後に加える。

(1) と (2) については、原料に添加された亜硫酸により死滅したり、原料中の糖を乳酸菌が資化して乳酸が多くなる、添加した乳酸菌が生育しなかったなど乳酸菌添加の時期として適していないとの報告もある。(3) においては、まれに酵母の生産したエタノールや脂質の影響で生育が阻害される事があることから、一般的には (3) の条件で添加する。例外として、Prahl ら¹⁾ は、*L. plantarum* の凍結乾燥菌体 (5×10^7 cells/ml) を酒母と同時に果汁に添加することでアルコール発酵初期に MLF を終了させるとができるので、本菌は仕込み初期の段階で使用される。

10. 試験醸造について

山梨大学発酵化学研究施設において1993年度 MBA 仕込みに関して、スターター添加による小規模試験醸造を行った。当研究施設育種試験地にて栽培された1993年度のマスカットベリーA (MBA) 26.6 kg を破碎、除梗後、亜硫酸25 ppm を添加し2区分に分けた。それぞれに酒母 (*S. cerevisiae* W-3) を3%添加した。乳酸菌のスターターを添加していないものをA区、压榨、補糖後に市販乳酸菌 (クリスチャンハンセン社、ビニフローラエノス) を添加したものをB区とした。

小規模試験醸造における仕込み後の経過日数ごとの一般分析結果を Table-1、Table-2 に乳酸菌数、L-リンゴ酸および総酸の推移を Fig-1 に示した。乳酸菌無添加のA区は、仕込み15日目ごろから菌数の増加が見られ、仕込み37日目に残存するL-リンゴ酸が0.38 g/l となり、野生乳酸菌によるMLFが終了した。压榨後 (仕込み8日目)、スターターを添加したB区は、スターター添加3日後の仕込み11日目には、L-リンゴ酸が压榨後の10.17 g/l から1.19 g/l まで減少した。仕込み15日目にはL-リンゴ酸量が0.21 g/l となり、MLFが終了し、官能評価においてもA区より高い評価であった。

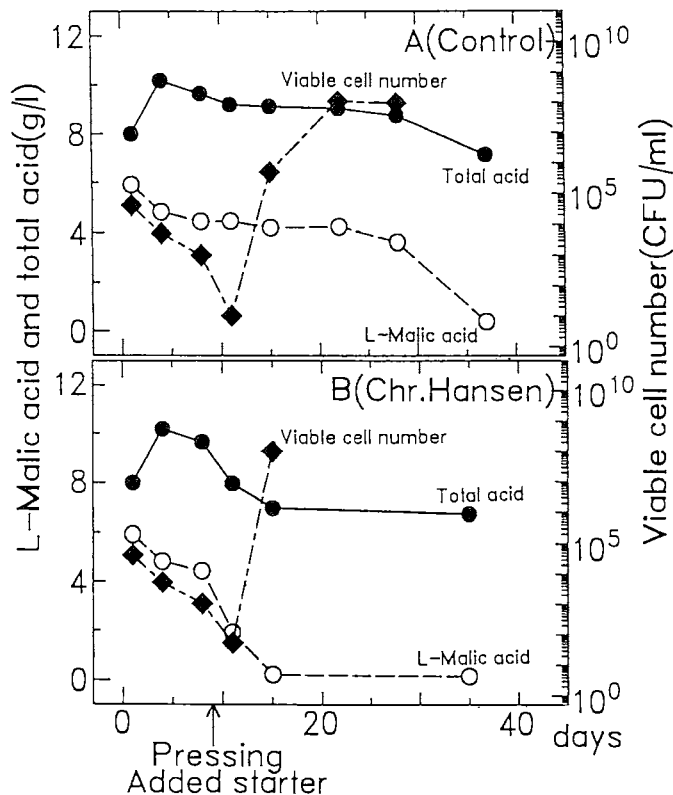


Fig - 1 Malolactic fermentation in Muscat Bailey A 1993 inoculated with MLF starter culture

Table-1 Analysis of 1993MBA-A musts during experimental red wine-making

Sampling number	Fermentation days	pH	T.A. (g/l)	L-M.A. (g/l)	Alcohol (V/V)%	Bacterial population(CFU/ml)
1-A	1	3.39	7.89	5.91	Brix17.0%	4.0X10 ⁴
2-A	4	3.31	10.17	4.82	—	—
3-A	8	3.50	9.64	4.44	8.60	1.0X10 ³
4-A	11	3.42	9.19	4.45	10.90	1.0X10 ¹
5-A	15	3.40	9.12	4.18	11.60	5.0X10 ⁵
6-A	22	3.40	9.04	4.23	—	1.1X10 ⁸
7-A	28	3.47	8.74	3.61	12.00	9.5X10 ⁷
8-A	37	3.60	7.13	0.38	—	—
9-A	64	3.60	6.79	0.32	11.00	—
D-L.A. 0.53(g/l)、L-L.A. 2.63(g/l)、A.A. 0.16(g/l)、V.A. 0.41(g/l) T-SO ₂ 11(mg/l)、Color X10 A ₄₃₀ 0.206 A ₅₃₀ 0.289、T-Phe 1111(mg/l) R.S. 2.10(g/l)						

T.A.:Total acid L-M.A.:L-Malic acid D-L.A.:D-Lactic acid L-L.A.:L-Lactic acid
A.A.:Acetic acid V.A.:Volatile acid T-Phe:Total Phenol R.S.:Reducing sugar

Table-2 Analysis of 1993MBA-B musts during experimental red wine-making

Sampling number	Fermentation days	pH	T.A. (g/l)	L-M.A. (g/l)	Alcohol (V/V)%	Bacterial population(CFU/ml)
1-C	1	3.39	7.89	5.91	Brix17.0%	4.0X10 ⁴
2-C	4	3.31	10.17	4.82	—	—
3-C	8	3.50	9.64	4.44	8.60	1.0X10 ³
4-C	11	3.48	7.95	1.91	11.20	5.0X10 ¹
5-C	15	3.60	6.79	0.21	11.10	9.8X10 ⁷
6-C	35	3.61	6.74	0.16	11.30	—
D-L.A. 0.53(g/l)、L-L.A. 2.55(g/l)、A.A. 0.11(g/l)、V.A. 0.30(g/l) T-SO ₂ 25(mg/l)、Color X10 A ₄₃₀ 0.190 A ₅₃₀ 0.299、T-Phe 1306(mg/l) R.S. 2.31(g/l)						

舟橋ら²⁾は、人為的 MLF 誘発について検討し、酒母添加 1 日後に乳酸菌を接種した区では、乳酸発酵に伴い通常量より多い酢酸が生成したと報告した。また、Lonfon-Lafourcade ら³⁾は酒母と同時に *Leu. oenos* を 10⁷ (CFU/ml) 添加したことにより、酵母の発酵が阻害され、さらに乳酸発酵に伴い D-乳酸と酢酸が通常量より多く生成したと報告し、酒母と同時に乳酸菌を添加し MLF をより早く終了させることは可能であるが、乳酸菌による糖の消費、発酵の遅れ、通常量以上の酢酸の生成があるため危険であると述べている⁴⁾。

我々の行った試験結果においても、B 区は A 区に比べ D 乳酸が 0.91 g/l、L 乳酸が 1.01 g/l 多くなり、さらに酢酸も、0.27 g/l 多くなっていた。このことから、乳酸菌の添加時期としては、圧搾後（アルコール発酵が 9 割近く進んだマセレーション後）またはアルコール発酵終了後が適切であることが示唆された。

11. ダイアセチルの測定について

乳酸菌はクエン酸を分解して、酢酸、エタノール、乳酸、ブタンジオール、アセトイン、ダイアセチルを生産する。ワイン中においても Leu. oenos により多量のダイアセチルが生産され（通常 1～4 mg / l）、この香りはバター様の風味をもち、この濃度が 5～7 mg / l 以上ある時ワインの品質をかなり劣化させる⁵⁾。ダイアセチルのワイン中での閾値は 2 ppm 程度である。なお、ビール、清酒では 0.1 ppm 程度の量で酒質に悪影響をおよぼす。しかし、ダイアセチル様異臭はアルコール発酵後に残存する酵母の活性で消去される⁹⁾。従って、アルコール発酵終了後の早い時期でのおりびきについては、注意が必要である。

ワイン中のダイアセチル定量方法としては、ガスクロマトグラフィー法⁶⁾が一般的であるが、他に比色法⁷⁾や高速液体クロマトグラフィーを用いた定量法⁸⁾などがある。

最後に、最近発表された論文から、L. M. T. Dicks らは⁹⁾、Leu. oenos の 16SRNA の系統分類学的研究から、本菌は Leuconostoc 属の他の菌種と系統的にかなり遠い関係にある事から、新属、新種の Oenococcus oeni を命名し、提唱した。今後上述の菌種名で MLF 用のスターターが販売される可能性があるが Leu. oenos と同じ菌株である。

終わりに

以上、3回にわたり乳酸菌によるマロラクティック発酵について簡単な解説を行ってきたが、市販スターターの利用は、市販のワイン酵母用スターターの利用と同様に、ワインの品質やタイプにとって重要な要因である。今後、国産ワインに対してもこのようなスターターの利用が望まれる。

参 考 文 献

1. C. Prah, A. Lonvaud-Funel, S. Koragaard, E. Morrison and A. Joyeux : Conn. Vigne Vin, **22**, 197 (1988)
2. 舟橋章、伊藤文雄：雪印乳業技術研究所報告、**95**, 93 (1991)
3. Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, A. Lonvaud-Funel, and P. Ribereau-Gayon : Conn. Vigne Vin, **17**, 55 (1983)
4. Lafon-Lafourcade, S. : In Biotechnology., **5**, 81 (1983)
5. Rankine, B. C. : Am. J. Enol. Vitic., **23**, 152 (1972)
6. G. de Revel, A. Bertrand and A. Lonvaud -Funel:Conn. Vigne Vin, **23**,

- 39 (1989)
7. Inoue, T. : J. Am. Soc. Chem., **36**, 139(1978)
 8. 松浦弘明、藤山勝二、皆川憲夫、澤潤一 : 分析化学、**39**, 405 (1990)
 9. Dittrich, H. H., Kerner, E., Wein-Wiss., **19**, 528(1964)
 10. L. M. T. Dicks, F. Dellaglio, and M. D. Collins: Int. J. Syst. Bacterio 1., **45**, 398 (1995)