

[研究報文]

白ワインにおけるアスコルビン酸添加による
マロラクティック醗酵の効率的誘導

小谷恭弘, 花牟礼研一, 佐藤充克*

メルシャン(株)酒類技術センター・基盤研究室
〒251 神奈川県藤沢市城南4丁目9-1

Stimulation of Malolactic Fermentation in White Wines by Addition of Ascorbic Acid.

Yasuhiro KOTANI, Ken'ichi HANAMURE, and Michikatsu SATO*

Fundamental Research Laboratory, Wines & Spirits Research Centre,
Mercian Corporation, 9-1, Johnan 4-chome, Fujisawa 251, Japan

The effects of the individual addition of several nutrients on the growth of commercially available strains of *Oenococcus oeni* were examined. Addition of ascorbic acid, yeast extract, or a yeast cell suspension stimulated the growth of lactic acid bacteria in a synthetic medium in which the pH was changed from 5.0 to 3.5. When ascorbic acid was added to an imported bulk white wine at 150 mg/L, the malic acid in the wine was almost completely consumed within 33 days. Malolactic fermentation (MLF) was completed in wine supplemented with 0.1% yeast extract within a 40-day incubation period. In contrast, MLF was not induced in the wine without addition of nutrients during the 40-day incubation period. In a bulk white wine to which ascorbic acid was added at concentrations from 50 to 500 mg/L, MLF was induced within 34 days. In the same wine without addition of ascorbic acid, MLF was not induced in the incubation period. The consumption of malic acid was dependent upon the amount of ascorbic acid added, the residual malic acid being at the lowest level in wine with 500 mg/L of ascorbic acid after a 34-day incubation period. MLF could be induced in a Koshu wine with a low pH of 3.2 within 22 days by the addition of 150 mg/L ascorbic acid. The organoleptic properties of the Koshu wine were improved by the MLF; it had a richer aroma and milder flavour than the original wine.

Key words: malolactic fermentation, ascorbic acid, white wine, lactic acid bacteria.

1997年6月12日受理

緒 論

ワイン醸造において、乳酸菌によってL-リンゴ酸がL-乳酸とCO₂に分解されるマロラクティック発酵(MLF)は、ワインの酸度を低下させ、風味を改善すると同時に微生物学的に安定化する重要な工程である。

MLFを誘導する乳酸菌としては、*Leuconostoc* 属、*Oenococcus* 属、*Lactobacillus* 属、あるいは*Pediococcus* 属の細菌が挙げられる。一般に、ワイン中におけるMLFでは、乳酸菌の耐酸性及び耐アルコール性より*Oenococcus oeni*(旧名*Leuconostoc oenos*)が優勢となる(6)。*Oenococcus oeni*の栄養要求性は複雑で、アミノ酸としては、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、およびトリプトファンを必須に要求し、至適な増殖には更にグリシン、メチオニン、システイン、ロイシン、アスパラギン酸を要求する(7)。更に、パントテン酸、ニコチン酸、チアミン、ピオチンあるいはパントテン酸の誘導體(1)等も要求する。MLF菌の生育はpH、亜硫酸、アルコールおよび発酵温度によって影響をうけ、pHは3.3~3.5を境にして低い場合はMLFが生起せず、pHが高くなるに従って誘導され傾向にある(4)。また、野生乳酸菌によるMLFはpH 3.5以上では6週間以内に終了するが、pH 3.5以下のワインでは12週間以上を要する(5,6)。亜硫酸に関しては、亜硫酸濃度が100~150 ppmのワインではMLFは起こらない(10)等の報告がある。これ等の点で、ワイン、特に白ワインでは低pH、不十分な栄養分のため乳酸菌の生育には困難な条件が多く、MLFのスターターを用いてもMLFを制御することは困難であるのが現状である。

そこで我々は、*Oenococcus oeni*の生育促進因子の検索を行い、アスコルビン酸が菌の生育およびMLFの誘導に効果があることを見出したので報告する(11)。

材料と方法

1. 供試乳酸菌菌株

Oenococcus oeni [Viniflora Oenos (Christian Hansen's Lab.)] と *Oenococcus oeni* [Ey-2d (8) (OSU-2, WYeast Lab., Oregon)] の2株を供試した。

2. 培地

菌株の保存、生菌数測定用寒天平板培地および前培養培地にはApple Rogosa培地を用いた。その組成はリンゴ果汁200 mL、トリプトン(Difco) 20 g、酵母エキス(Difco) 5 g、ペプトン(Difco) 5 g、グルコース 5 g、Tween 80 (5%水溶液) 1 mL、蒸留水 800 mLでpHを5.5にリン酸で調整し、121℃、15分滅菌して用いた。なお滅菌後の培地pHは5.2であった。酒母培地としてブドウ果汁培地を用いた。その組成はブドウ果汁(10°Brix) 1000 mL、酵母エキス(Difco) 1 g、ペプトン(Difco) 1 g、肉エキス 1 g、Tween 80 (5%水溶液) 1 mLでpHを炭酸カルシウムで4.0に調整し、121℃、15分滅菌した。生育因子の検索はFourcassieらの合成培地(2)をpH 3.5に改変して用いた。MLFの試験は次の3種のワインを使用した。ルーマニア産輸入バルク白ワインはアルコール分12.1% (v/v)、酸度0.82% (w/v、酒石酸換算)、エキス分2.8% (w/v)、pH 3.5、遊離亜硫酸3.0 ppm、総亜硫酸108 ppm、リンゴ酸4325 mg/Lであった。アルゼンチン産輸入バルク白ワインはアルコール分11.9%、酸度0.51% (w/v、酒石酸換算)、エキス分2.3% (w/v)、pH 3.5、遊離亜硫酸4.0 ppm、総亜硫酸110 ppm、リンゴ酸1625 mg/Lであった。甲州白ワインは'94年産甲州果汁を常法により発酵し、試験に供した。

3. 培養方法

Viniflora Oenosは凍結乾燥菌体を10倍量の30℃の滅菌水で懸濁し、30℃、15分静置させた後、1L当り10~100 mgになるように試験培地に添加した。Ey-2dはApple Rogosa培地で30℃、4日間前培養を行い、それを2%量になるようブド

ウ果汁培地に接種し, 30℃, 3日間培養を行って酒母とした。その酒母を2% および0.2% になるように試験培地に接種した。合成培地による添加物の検索は50 mL/100 mL 三角フラスコで30℃で行った。ワインを用いたMLFの試験は20℃で行った。

4. 分析方法

合成培地による添加物の検索は, 定期的にサンプリングを行い, 生菌数を測定した。ワインのMLFの分析は定期的にサンプリングを行い, 有機酸と生菌数を測定した。ワイン中の有機酸量はイオン排除液体クロマトグラフと電気伝導度検出器による液体クロマトグラフ有機酸分析システム(株島津製作所製)を用いて測定した。分離条件はカラムはShim-pack SCR-102H (8 mm I.D. × 300 mm L.)を2本直列接続し, 移動相には5 mM *p*-トルエンスルホン酸を用いた。検出条件は緩衝液に5 mM *p*-トルエンスルホン酸, 0.1 mM EDTAを含む20 mM Bis-tris水溶液を用い, 電気伝導度検出

器で検出した。

乳酸菌の生菌数の測定はApple Rogosa培地を用いたViable count法で測定した。測定範囲は 10^3 CFU/mL以上とした。

その他のワインの分析は国税庁所定分析法(13)に基づいて測定した。

実験結果および考察

1. 合成培地を用いたMLF菌の生育に有効な添加物の検索

Fourcassieらの合成培地をpH 3.5に改変し, MLF菌の生育に有効な添加物の検索を行った。添加物は, ビタミン, 微量元素, 酵母エキス, リン安, Tween 80, 酵母菌体懸濁物等を供試した。酵母菌体懸濁物はワイン発酵後の酵母を遠心集菌し, 10分の1量の蒸留水で懸濁した。それを滅菌後, 培地に10%添加した。MLF菌はViniflora Oenosの乾燥菌体を1L当たり10mgになるよう接種した。接種した生菌数は 1.0×10^6 CFU/mLであった。その結果, 添加物を加えていない培地で

Table 1. Effects of nutrient addition on growth of Viniflora Oenos.

Substrate added	Concentration (%)	Number of viable cells (CFU/mL)	
		7 days	20 days
None		N. D.* ¹	N. D.
Vitamin mixture* ²	10.0	N. D.	N. D.
Inositol	0.05	N. D.	N. D.
Ascorbic acid	0.15	2.6×10^4	2.1×10^6
Yeast extract	0.5	4.6×10^5	1.5×10^8
Tween 80	0.1	N. D.	N. D.
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1	4.0×10^3	N. D.
Mineral mixture (1)* ³	10.0	4.3×10^4	N. D.
Mineral mixture (2)* ⁴	10.0	2.0×10^3	N. D.
Yeast cell suspension* ⁵	10.0	2.8×10^4	2.0×10^6

*1: Below 10^3 CFU/mL

*2: The vitamin mixture was an aqueous solution of the following composition (mg/mL): pyridoxal, 150; pantothenic acid, 75; biotin, 7.5; nicotinic acid, 7.5; riboflavin, 7.5; folic acid, 7.5.

*3: Mineral mixture (1) was an aqueous solution of the following composition (mg/mL): MgSO₄·7H₂O, 5.0; MnSO₄·4-6H₂O, 0.5; FeSO₄·7H₂O, 0.5.

*4: Mineral mixture (2) was an aqueous solution of the following composition (mg/mL): CuSO₄·5H₂O, 5.0; KI, 5.0; Na₂MoO₄·2H₂O, 10; ZnSO₄·7H₂O, 20.

*5: The yeast cell suspension was made from wine fermentation broth. Cells obtained by centrifugation of 100 mL-broth were suspended in 10 mL distilled water and autoclaved at 121°C for 15 min.

は培養 20 日を経過しても生菌数は 10^3 CFU/mL 以下であったが、酵母エキス、アスコルビン酸の添加により、20 日で 10^8 CFU/mL 以上の生菌数になった。酵母菌体懸濁液では 20 日目で生育の兆しが認められた (Table 1)。

酵母エキスについては、その含まれるビタミン、アミノ酸等の影響で *Oenococcus oeni* の生育及び MLF の誘導に効果があることが報告されている (12)。酵母菌体についても同様の報告がある (3, 14)。今回の結果は、それを再現し、検索法の妥当性を示す結果と思われる。なお、この両者の効果の差は添加量に起因すると思われる。すなわち今回の酵母菌体の添加量は、実際のアルコール発酵後の酵母量を想定した添加量であったが、酵母エキスの添加量は Tracy らの報告 (12) に基づいた濃度であり、その量は酵母菌体の数倍量に相当する。一方、アスコルビン酸が酵母エキスと同様 MLF 菌の生育に効果を示したことから、MLF 誘導に効果を示す可能性が示唆された。また酵母エキスの添加はワインの酒質を損なうため実用には適さないが、アスコルビン酸の添加はワインの酒質には影響を及ぼさないので、MLF の誘導に効果があれば、有用な技術になると思われる。

2. 添加物の MLF 誘導に及ぼす影響

MLF 菌の生育に効果の認められた、酵母エキスとアスコルビン酸のワインに於ける効果をルーマニア産輸入バルク白ワインを用いて検討した。酵母エキスは 0.1%、アスコルビン酸は 150 mg/L を添加濃度とした。発酵は 600 mL のワインを 720 mL 瓶に分注し、20℃で発酵を行った。MLF 菌は *Viniflora Oenos* の乾燥菌体 9 mg を接種した。接種した生菌数は 1.5×10^6 CFU/mL であった。ワインのリンゴ酸量の経時変化を Fig. 1 に、生菌数の経時変化を Fig. 2 に示す。供試ワインにおける MLF の進行は、添加物がない対照区では MLF 菌接種後 40 日経過しても MLF の進行は認められず、生菌数は接種後速やかに減少し、40 日まで 10^3 CFU/mL 以下であった。酵母エキスを 0.1% 添加した場合、生菌数は対照区と同様、接種後速やかに減少するが、30 日頃以降生菌数が増加し、40 日目には 10^7 CFU/mL 以上になった。リンゴ酸の減少は、生菌数が 10^6 CFU/mL 程度まで増加した 34 日目～40 日目の間に認められ、MLF が進行した。一方、アスコルビン酸を添加した場合、生菌数は 7 日目には 10^4 CFU/mL まで減少するが、その後速やかに増殖し、22 日目には 10^6 CFU/mL に達した。

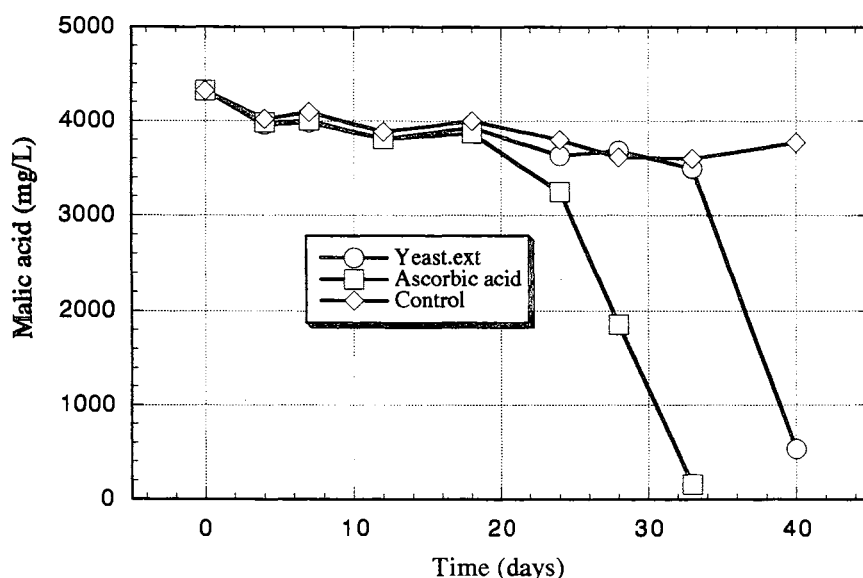


Fig. 1. Effects of nutrient addition on the rate of malic acid reduction in bulk white wine.

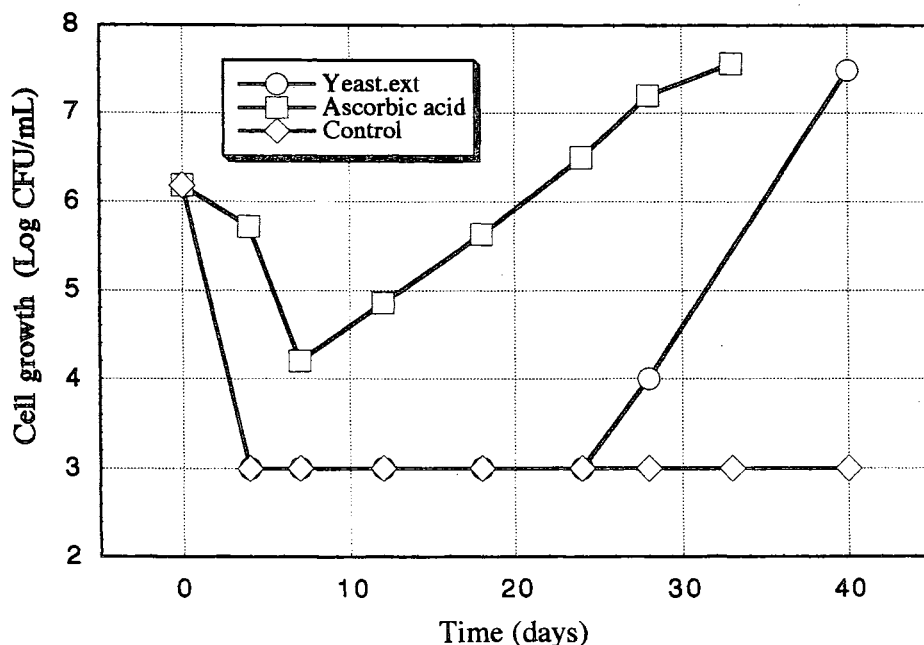


Fig. 2 Effects of nutrient addition on bacterial growth in bulk white wine.

それと同時に MLF が生起し, 33 日目にはリンゴ酸がほぼ消失した。

MLF の生起には 10^6 CFU/mL 以上の菌数が必要とされる(2)。以上の結果より, アスコルビン酸の添加がワインにおいても MLF 菌の生育促進に効果を示し, その結果 MLF の誘導を早めることが出来たと思われる。またアスコルビン酸が MLF

の早期誘導に酵母エキスより効果があることが判明した。なお, アスコルビン酸が MLF 菌の生育に効果を示す原因としては, 栄養素としての効果, あるいは酸化防止剤として乳酸菌, 特にその細胞膜の酸化的ストレスからの防御効果が考えられる。

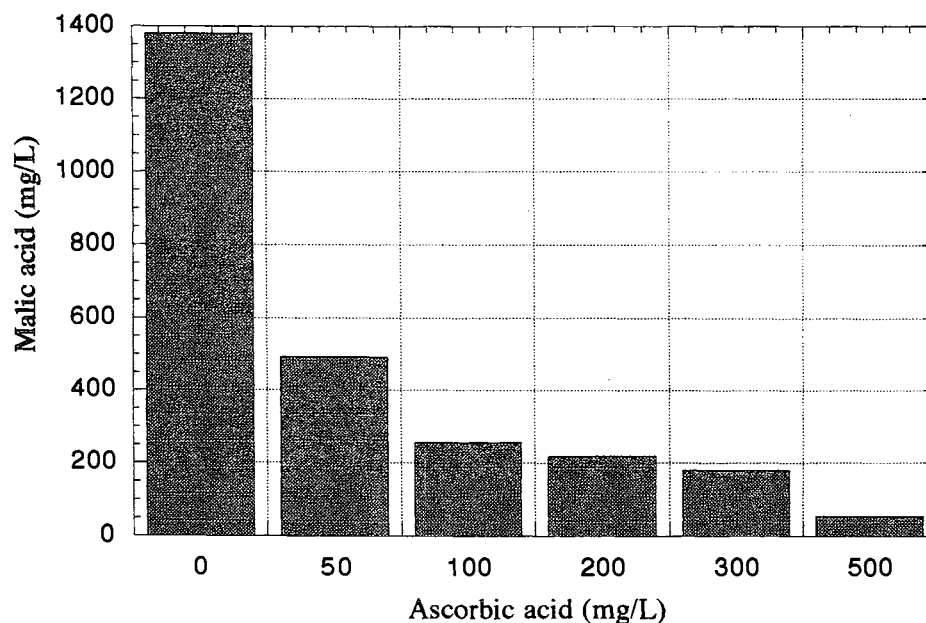


Fig. 3. Time course of malolactic fermentation in Koshu wine.

3. アスコルビン酸濃度の検討

アルゼンチン産輸入バルク白ワインを用いて、アスコルビン酸添加濃度が MLF の誘導に及ぼす影響を調べた。発酵は 600 mL のワインを 720 mL 瓶に分注し、20 °C で行った。MLF 菌は *Viniflora Oenos* の乾燥菌体 9 mg を接種した。定期的にサンプリングを行って、ワインのリンゴ酸量を測定し、MLF の生起を調べたが、26 日目までは、全ての試験区で MLF は誘導されなかった。34 日目にはアスコルビン酸を添加したワインではリンゴ酸の減少が認められ、その時のリンゴ酸量を Fig. 3 に示す。

アスコルビン酸 50 mg/L 以上の添加で明らかに MLF の誘導に効果があることが分かり、添加濃度の増加とともにリンゴ酸の減少量は増加する傾向を示した (Fig. 3)。但し、供試したワインにおいては 100 mg/L 程度の添加量で充分であると思われた。以上より、MLF を生起しにくいワインでも、アスコルビン酸の添加量を増加すれば、MLF を早期に誘導できることが示唆された。

4. 菌株によるアスコルビン酸添加効果の比較

Oenococcus oeni の *Viniflora Oenos* と Ey-2d の 2 種類の菌株について、アスコルビン酸添加効果の比較を、アルゼンチン産輸入バルク白ワインを用いて行った。アスコルビン酸の添加濃度は 150 mg/L で、各菌株とも接種生菌数約 10^6 と 10^7 CFU/mL について試験した。全試験ワインにおい

て 26 日目までは MLF の生起が認められなかったが、34 日目にはアスコルビン酸の添加により菌株にかかわらず MLF が誘導され、*Viniflora Oenos* ではリンゴ酸がほとんど消失した。一方、Ey-2d では 10^6 CFU/mL 接種したワインにおいて、リンゴ酸の消失は約 6 割程度であった (Table 2)。菌株により進行速度に差は認められたが、無添加に比べて、いずれの菌株においてもアスコルビン酸の添加効果が認められた。

5. MLF 甲州ワインの試験

アスコルビン酸が MLF の早期誘導に効果があることが認められたので、従来 MLF の誘導が困難であった低 pH の甲州ワインで MLF 誘導を試みた。甲州果汁 10 L を常法により発酵し、これに 150 mg/L の L-アスコルビン酸を添加後、MLF 用凍結乾燥菌体 *Viniflora Oenos* を 1 g 添加し、20 °C にて MLF 発酵を行った。Table 3 に MLF 前の甲州ワインおよび MLF 後の甲州ワインの分析結果を示す。またリンゴ酸及び乳酸量の経時変化を Fig. 4 に示す。

通常 pH 3.4 以下のワインでは MLF が完了するには 40 日以上要し (9)、さらに pH 3.15 のワインでは 164 日要するとされる (6)。アスコルビン酸を添加した pH 3.2 の甲州ワインは 10 日目頃からリンゴ酸の減少が始まり、それに従って乳酸の生成が認められ、22 日目にはほぼ MLF が完了した (Fig. 4)。このように、pH 3.2 の甲州ワインにおいても

Table 2. Effect of ascorbic acid addition on malic acid degradation and bacterial cell growth of *Viniflora Oenos* and Ey-2d.

Strain	Inoculum size (CFU/mL)	Control		Ascorbic acid added	
		Malic acid (mg/L)	Bacteria (CFU/mL)	Malic acid (mg/L)	Bacteria (CFU/mL)
<i>Viniflora Oenos</i>	1.5×10^6	1,447	N. D.	144	3.0×10^7
	1.5×10^7	1,380	N. D.	75	3.9×10^7
Ey-2d	1.3×10^6	1,501	N. D.	605	6.7×10^6
	1.3×10^7	1,324	N. D.	115	3.4×10^7

N. D. : Below 10^3 CFU/mL.

Table 3. Analytical data of Koshu wine before and after MLF.

Item analyzed	Koshu wine	
	before MLF	after MLF
pH	3.2	3.3
Alcohol (% v/v)	13.1	12.8
Titrateable acidity (% as tartaric acid)	0.62	0.47
Malic acid (mg/L)	1800	92
Lactic acid (mg/L)	275	1320

アスコルビン酸の添加効果が明らかに認められた。MLF前後のワインを官能評価により比較したところ、MLF前のワインは爽やかな酸味とクリーンな香味で良好なワインであった。一方、MLF後のワインは、リンゴ酸が乳酸に変換したためと考えられるが、酸味がまろやかになり、フレーバーに広がりが出て、飲みやすく高級感があるとの評価であった。

要約

ワインに於けるMLFの誘導を早めることを目的にpH 3.5に改変した合成培地を用いて、MLF菌である*Oenococcus oeni*の生育促進因子の検索を行った。アスコルビン酸、酵母エキス、酵母菌体において生育促進効果が認められた。アスコルビン酸に関しては、従来その報告例がなかったので、

MLFの誘導に及ぼす効果を検討し、以下のことが明らかとなった。

1. ワインに、アスコルビン酸を150 mg/L添加することでMLF誘導に効果があることが判明した。また、その効果は酵母エキスを0.1%添加した場合より有効であることが判明した。
2. アスコルビン酸添加によるMLFの誘導効果は、その濃度が50 mg/L以上で認められ、500 mg/Lまでは濃度依存的であった。
3. アスコルビン酸の添加効果は、3種の異なる白ワインにおいて確認された。このことから、本効果は一般的なワインにおいて応用できるものと推察される。
4. *Oenococcus oeni*に分類される2種の菌株について、アスコルビン酸の添加効果を調べた結果、MLFの進行に若干の違いがあったが、その添加効

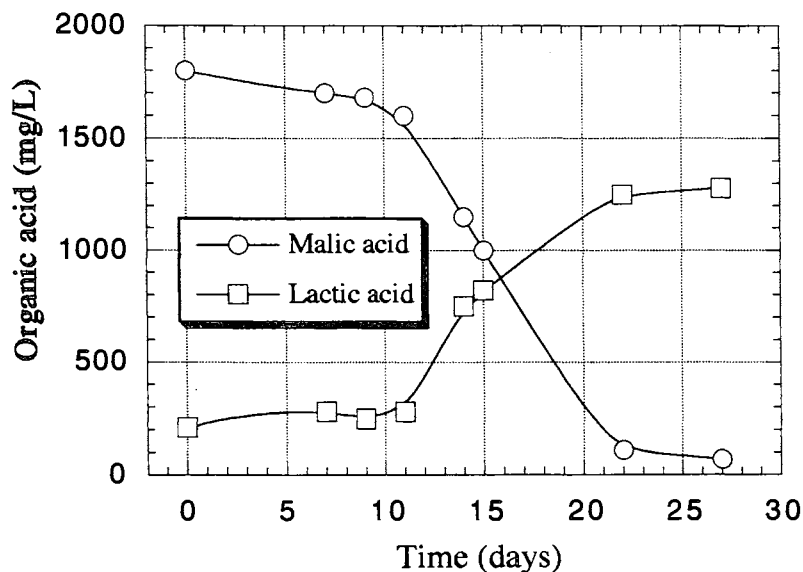


Fig. 4. Time course of malolactic fermentation in Koshu wine.

果はいずれの菌株においても認められた。

5. 従来 MLF の誘導が困難であった、低 pH の甲州ワインにアスコルビン酸を添加することにより、比較的短期間で MLF を完了させることができた。その結果、まろやかな酸味の飲みやすい、従来とタイプの異なる甲州ワインを製造することができた。

以上、ワインに 50 ~ 500 mg/L のアスコルビン酸を添加することで、MLF の誘導促進に効果があることが判明した。また、アスコルビン酸は、従来報告されている酵母エキス等と異なり、ワインの酒質に与える影響が少なく、有用な MLF の誘導方法と思われる。但し、アスコルビン酸の MLF 菌の生育因子としての使用は、酒税法上認められていないので、現在のところ実用には問題がある。将来、これが認められ、実用的な MLF の誘導方法になることを期待したい。

文 献

- Amachi, T., Chemical structure of a growth factor (TJF) and its physical significance for malo-lactic bacteria. *In: Lactic acid Bacteria in Beverages and Food*, edited by J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting, pp. 103-118, Academic Press, London (1975).
- Beelman, R. B., F. J. Mc Ardle, and G. R. Duke. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML-34 and PSU-1 to induce malo-lactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 269-276 (1980).
- Beelman, R. B., and J. F. Gallander. The effect of grape skin treatments on induced malo-lactic fermentation in Ohio wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21: 193-200 (1970).
- Bousbouras, G. E., and R. E. Kunkee. Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 121-126 (1971).
- Castino, M., L. Usseglio-Tomasset, and A. Gandini. Factors which affect the spontaneous initiation of the malo-lactic fermentation in wines. The possibility of transmission by inoculation and its effect on organoleptic properties. *In: Lactic acid Bacteria in Beverages and Food*, edited by J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting, pp. 139-148, Academic Press, London (1975).
- Costello, P. J., G. Morrison, T. H. Lee, and G. H. Fleet. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.* 35: 14-18 (1983).
- Fourcassie, P., E. Makaga-Kobinda-Massard, A. Belarbi and A. Maujean. Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 489-496 (1992).
- Henick-Kling, T., W. E. Sandine, and D. A. Heatherbell. Evaluation of Malo-lactic Bacteria Isolated from Oregon Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2010-2016 (1989).
- Mayer, K., and U. Vetsch. pH und biologischer Säureabbau in Wein. *Schweiz. Z. Obst. Weinbau.* 109: 635-639 (1973).
- Peynaud, M. E. New information concerning biological degradation of acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 7: 150-156 (1956).
- 佐藤充克, 小谷恭弘, 花牟礼研一, 刀根弘: マロラクティック発酵の誘導方法. 特開平 8-214862 (1996).
- Tracey, R. P., and T. J. Britz. The effect of amino acids on malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 589-595 (1989).
- 注解編集委員会編: 国税庁所定分析法注解 (1984).
- van Wyk, C. J. Malo-lactic fermentation in South African table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27: 181-185 (1976).