亜硫酸耐性酵母の分離とワイン醸造への利用

中野敏夫・薄井 隆・杉本仁太郎・根元 茂

(合同酒精株式会社)

昭和 56 年 6 月 15 日受理

Isolation of Sulfur Dioxide-Resistant Yeasts and Their Utilization for Wine Making

Toshio NAKANO, Takashi USUI, Nitarō SUGIMOTO, and Shigeru NEMOTO
Godo Shusei CO., LTD.

Six strains of SO_2 -resistant yeasts were isolated from the imported concentrated grape musts.

One strain (CJ-1) was identified as *Schizosaccharomyces pombe*, which could ferment grape juice containing 1,000 ppm of SO_2 . Taste of the wine made with CJ-1 was not acceptable.

The other 5 strains (CJ-2~CJ-6) identified as *Saccharomyces rouxii* were more resistant to SO_2 than OC-No.2 (IAM 4274). The wine made with CJ-2 was better than those made with other 4 strains, although it contained about 9% residual sugars. A fine dry wine was made from the concentrated grape must containing a relatively large amount of SO_2 (about 300 ppm) by mixed-culture of CJ-2 and OC-No.2.

緒 言

我国に於けるワインの消費量は近年著しく増加しており、国内産のぶどう果実のみではその需要に応ずることは出来ない。これを補うため、外国産の濃縮ぶどう榨汁を輸入してワインをつくることも行われている。濃縮ぶどう榨汁は輸送中に変敗し易く、それを防ぐために一般には輸出時に多量の亜硫酸が添加されている。それ故、輸入後 $B \times 20 \sim 26^\circ$ まで水で希釈した後でもまだ亜硫酸濃度が高いものがあり、通常のワイン酵母では発酵が途中で止ったり、全く発酵しない場合がある。

果醪中の亜硫酸を除去するには脱亜硫酸装置を用いる方法や過酸化水素水を添加する方法¹⁾があるが、前者は装置が高価であり後者は酒税法で許可されていない。また亜硫酸に馴養して耐性をつけたワイン酵母を用いる方法も行われているが、馴養には手間がかかり、亜硫酸濃度の高い果醪に対しては必ずしも安全な方法ではない。

筆者らは亜硫酸濃度が高い濃縮ぶどう榨汁の中でも生育している酵母が存在することに着目し、これらの亜硫酸耐性の強い酵母の分離を試みた。その結果 6 株の酵母

を得、これらのワイン醸造への利用を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

日本醸造協会ぶどう酒酵母 No.1 (OC-2) 及び濃縮ぶどう榨汁より分離した 6 株を用いた。

2. 酵母の分離及び同定

スペイン産及びアルゼンチン産の濃縮ぶどう榨汁を麦汁培地に接種、培養し、生育した酵母を常法により純粋分離した。また同定は飯塚、後藤²⁾及び Lodder³⁾の成書に従って行った。

3. 亜硫酸耐性試験

水で希釈して $B \times 26^\circ$ に調製した 3 種類の濃縮ぶどう榨汁 (アルゼンチン産赤搾汁 2 種とスペイン産白搾汁 1 種) 及び $B \times 26^\circ$ まで補糖した山形産デラウェア果汁を 120°C 10 分間殺菌した後、メタ重亜硫酸カリウムを加えて総亜硫酸が 100, 200, 300, 500, 700, 1,000 ppm になるように調整し亜硫酸耐性試験用の培地とした。これらの培地 300 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、

第1表 分離酵母の形態的及び培養的性質

	CJ-1	CJ-2	CJ-3	CJ-4	CJ-5	CJ-6
Shape	cylindrical	spheroidal	spheroidal	spheroidal	spheroidal	spheroidal
Size (μ)	10~16×4~6	6~7×4~6	6~7×4~6	6~7×4~6	6~7×4~6	6~7×4~6
Vegetative reproduction	fission	bullding	bullding	bullding	bullding	bullding
Pseudo mycelium	-	-	-	-	-	-
True mycelium	-	-	-	-	-	-
Chlamydospore	-	-	-	-	-	-
Arthro spore	-	-	-	-	-	-
Blasto spore	-	-	-	-	-	-
Asco spore	+	+	+	+	+	+
Film formation	-	-	-	-	-	-
Streak culture	smooth	wrinkled	wrinkled	rough	rough	rough

1日放置して亜硫酸を安定させた後、Ballg 10°の麦汁 10 ml に 25℃ 48 時間培養しておいた供試酵母を麦汁ごと接種し 25℃ で培養し湧きつくまでの日数を観察し、また3週間後の糖消費率を求めた。

4. アルコール耐性試験

ニチルアルコールを加えてアルコール濃度を 0, 2, 4, 6, 8, 10% に調整した YM 培地²⁾ (pH 5.6) 10 ml に CJ-2 を一白金耳接種し、25℃ で7日間培養した後、660m μ 10 mm セルにおける吸光度を測定し増殖の有無を調べた。

5. 分析方法

- (1) 一般分析：国税庁所定分析法⁴⁾によった。
- (2) 亜硫酸：Rankine 法⁵⁾によった。
- (3) 還元糖：ベルトラン改良法⁶⁾によった。
- (4) エステル、フーゼル油：AOAC⁷⁾によった。

実験方法及び考察

1. 酵母の分離及び同定

前述の方法によって CJ-1~CJ-6 の6株の酵母を分離した。これらの形態的及び培養的性質を第1表に生理的性質を第2表に示す。これによると CJ-1 は栄養細胞が

分裂により増殖し、1つの子のうちに通常4個の子のう胞子をつくり、マルトースを発酵する。このことから CJ-1 は *Schizosaccharomyces pombe* であると同定した。CJ-2~CJ-6 はいずれも菌糸体を形成せず、子のう胞子をつくる。また 60% グルコースに生育しグルコースとマルトースを発酵するが、メリビオースを発酵しない。よってこれらは *Saccharomyces rouxii* であると同定した。

2. 分離酵母の亜硫酸耐性試験

6株の分離酵母及び OC-2 について、前述の4種の果膠を用いて亜硫酸耐性試験を行った。その結果を第1~4図に示す。なお、CJ-2~6 の亜硫酸耐性は殆んど同様

第1図 亜硫酸耐性試験 (1)

赤-A搾汁での初発亜硫酸濃度と糖消費率

第2図 亜硫酸耐性試験 (2)

B-赤搾汁での初発亜硫酸濃度と糖消費率

第2表 分離酵母の生理的性質

	CJ-1	CJ-2	CJ-3	CJ-4	CJ-5	CJ-6
Fermentation test						
glucose	+	+	+	+	+	+
galactose	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	-	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-	-	-
raffinose	+	-	-	-	-	-
melibiose	-	-	-	-	-	-
Assimilation carbon sources						
glucose	+	+	+	+	+	+
galactose	-	+	+	+	+	+
sucrose	+	-	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-	-	-
Assimilation						
KNO ₃	-	-	-	-	-	-
Splitting arbutin						
Osmo-tolerance	-	-	-	-	-	-
60% glucose	-	+	+	+	+	+

第3図 亜硫酸耐性試験 (3)
白-A搾汁での初発亜硫酸濃度と糖消費率

第3図 亜硫酸耐性試験 (4)
デラウェア果汁の初発亜硫酸濃度と糖消費率

度であったので、CJ-2 のみを図示し他は省略した。この結果によれば、CJ-1 はデラウェアで 750 ppm、他では 1,000 ppm でも発酵し糖消費率も高い値を示した。CJ-2 はデラウェアで 184 ppm、赤-A で 1,000 ppm、赤-B と白では 300 ppm まで発酵したが、いずれも糖消費率は低く 42~73% であった。また OC-2 は赤-A の場合は 319 ppm まで発酵したが、他では 100 ppm 程度までしか発酵できなかった。このことより、酵母によって亜硫酸耐性に大きな差があり、特に CJ-1 が非常に強いことが判った。CJ-2 は OC-2 に比べて耐性が強いが糖消費率が低かった。これは第5図に示したように CJ-2 のアルコール耐性によるものと考えられる。CJ-3 ~6 についても同様の結果であった。

次に結合型亜硫酸に比べて毒性が強い遊離亜硫酸の影響について調べるために、本実験で測定した遊離亜硫酸濃度と、それに対する各酵母の発酵の状態及び湧きつきまでの日数を示せば第3表の通りである。これによれば CJ-1 はいずれの果醪においても遊離亜硫酸 380 ppm 以上でも発酵し、また湧きつきも早かった。CJ-2 は赤-A では 384 ppm 以上でも発酵し、その他の果醪でも 60~80 ppm までは発酵し得た。また OC-2 では赤-A では比較的強い耐性を示し、67 ppm でも発酵したがその他

第5図 CJ-2 のアルコール耐性

第3表 初発遊離亜硫酸濃度と各酵母の耐性

果 醪	遊離亜硫酸 ppm	酵 母		
		OC-2	CJ-1	CJ-2
赤-A	1	14	+	+
	2	35	+	+
	3	67	+	+
	4	137	+	+
	5	256	+	+
	6	384	+	+
赤-B	1	5	+	+
	2	16	+	+
	3	60	+	+
	4	147	+	+
	5	280	+	+
	6	445	+	+
白	1	11	+	+
	2	40	+	+
	3	70	+	+
	4	198	+	+
	5	320	+	+
	6	480	+	+
デラウェア	1	29	+	+
	2	80	+	+
	3	144	+	+
	4	269	+	+
	5	390	+	+
	6	595	+	+

＋は発酵したこと、－は発酵しなかったことを示す。

() 内は湧きつきまでの日数を示す。

果醪の欄の数字 1~6 はそれぞれ総亜硫酸濃度が 100, 200, 300, 500, 700, 1,000ppm であることを示す。

では 5~29 ppm までしか発酵できなかった。このように遊離亜硫酸耐性についてみても、CJ-1, CJ-2 は OC-2 に比べて非常に強いことが判った。

また各酵母の示す亜硫酸耐性は果醪の種類によって異なり、赤-A は他のものに比べて特に発酵し易かった。これは果醪の成分の相違によるものと推察される。

3. ワイン醸造への利用

前の実験から分離酵母は OC-2 より亜硫酸耐性が強いことが判ったので、亜硫酸濃度の高い濃縮ぶどう搾汁からワインを製造する際に、これらの酵母を利用できるかを検討した。

(1) 分離酵母の選択

B×23° に希釈した赤-B搾汁(総亜硫酸 290 ppm, 遊離亜硫酸 60 ppm)を分離酵母 6 株を用いて発酵させ、

第6図 CJ-2 による発酵経過と亜硫酸の変化

生成したワインの香味を咽酒した。この結果 CJ-2 を用いたものが最も良く、CJ-6 がこれに次いだ。その他のものは異臭が強く不適当であった。CJ-2 は前述の通り残糖が多く単独ではドライワインを製造できないので、次に OC-2 との併用について検討した。

(2) CJ-2, OC-2 の併用による発酵試験

a. CJ-2 の発酵経過と亜硫酸の変化

果醪中の遊離亜硫酸は一般に発酵が始まると急速に減少する。このことより、亜硫酸濃度の高い果醪を始めに CJ-2 で発酵させて遊離亜硫酸を除去し、次いで OC-2 を接種してドライワインを製造することを検討した。まず CJ-2 によって遊離亜硫酸がいつ消失するかを調べるため、赤-B 搾汁を用いて発酵試験を行った。その結果を第6図に示す。これによれば、遊離亜硫酸は CJ-2 の発酵に伴って減少し、3日目に殆んど消失することが判った。しかし総亜硫酸は遊離亜硫酸が消失した後も果醪中に残存し、その量は無接種のものより多かった。

b. OC-2 の接種時期の検討

前の実験から、CJ-2 を接種して3日後以降に OC-2 を接種することが望ましいと思われるが、これを確認するために次の実験を行った。即ち OC-2 の接種時期を ① CJ-2 と同時、② 3日後、③ 6日後、④ CJ-2 の発酵の終了する14日後、に変えて発酵試験を行った。実験 a で用いたのと同じ搾汁 2l を 5l 容三角フラスコに入れ、CJ-2 酵母 5% を添加し、各時期に合わせて OC-2 の菌体を接種し 25℃ で発酵させた。OC-2 の菌体は、醪の 5% になるように 100ml の麦汁で 48 時間前培養

第7図 OC-2, CJ-2 の併用による発酵経過

したものゝ遠心分離して得た。この果醪の初発総亜硫酸は 240 ppm、遊離亜硫酸は 58 ppm であった。この結果を第7図に示す。図中の曲線Aは、OC-2 単独接種の結果で糖の減少がなくこの搾汁では発酵できなかったことを示している。Bは CJ-2 単独接種のもので約 14 日で発酵は終了し、この時の残糖は 8.9% であった。この場合の糖消費率は約 60% であり、今までの実験結果とほぼ同様であった。CJ-2, OC-2 同時接種Cは糖の切れが悪く 18 日目でも 4% 以上の糖分があった。3日後接種Dは順調な発酵を示し、14 日目には糖分 0.7% となった。6日後接種も 18 日目には糖分 0.7% となり主発酵を終えた。14 日後接種Fは 30 日を経ても糖分が 1% 以上残り、好ましい発酵経過でなかった。以上のことから、CJ-2 を接種して3日後に OC-2 を接種するのが安全でしかも主発酵の期間が短かく、最も良い方法であると判断した。

(3) 試醸ワインの酒質

前の実験により、CJ-2, OC-2 の併用によってドライワインを製造できることが判ったので、次に酒質を調べるために前記搾汁 (赤-B) を用いて、この方法と OC-2 単独で試醸した。併用の場合にはCJ-2 の3日後に OC-2

第4表 試醸ワインの酒質

成分		使用した酵母		
		OC-2	OC-2, CJ-2 併用	CJ-2
アルコール	v/v%	13.7		13.5
比重		0.9940		0.9950
エキス		3.20		3.38
総酸	g/l (酒石酸として)	6.6		6.6
揮発酸	g/l (酢酸として)	0.75		0.6
全糖	g/l (グルコースとして)	6.1		6.7
総亜硫酸	ppm	59.2		112.0
アルデヒド	ppm (アセトアルデヒドとして)	45.7		89.2
テストル	ppm (酢酸エチルとして)	53.0		62.0
フーゼル油	ppm	235.0		320.0
pH		3.35		3.38
咽酒結果	評点*	1.75		1.92
	批評			やや雑味がある

* 3点法で採点し、パネル6名の平均をとった。

を接種し、OC-2 単独のものは総亜硫酸が 20 ppm 程度になるように、過酸化水素水を添加した搾汁（実測で総亜硫酸 16 ppm、遊離亜硫酸 0 ppm であった。）を用いた。試醸しワインの分析値と酎酒結果を第 4 表に示す。なお酎酒は総亜硫酸を 150 ppm に調整し 10 ケ月間壺蔵したものについて、当工場技術員 6 名をパネルにして行った。これによると併用のものは、アルデヒド、フーゼル油が多いが、アルコール、残糖、酸などは殆んど差がなかった。香味については、OC-2 単独のものに比較してやや雑味を感じたが、香りの点では特に欠点はなかった。

以上のことから、CJ-2、OC-2 の併用によって高濃度亜硫酸のぶどう搾汁から、ワインを製造できることが判った。

終りに本研究の発表を許可された合同酒精株式会社野口社長に深謝致します。

なお本研究は昭和 52 年度農芸化学学会大会に於いて講演した。

要 約

外国産濃縮ぶどう搾汁から、高濃度亜硫酸の存在下で

も発酵する酵母の分離を試み 6 株を得た。その中の CJ-1 は *Schizosaccharomyces pombe* に属する酵母で総亜硫酸 1,000 ppm でも発酵したが、これを用いて試醸した結果良いワインは得られなかった。他の 5 株 CJ-2 ~ 6 は *Saccharomyces rouxii* で、いずれもワイン酵母 OC-2 より亜硫酸耐性が強かった。CJ-2 を使用したワインは、特に悪い香味はなかったが、残糖分が多かった。よって CJ-2 と OC-2 との併用を検討した。その結果、OC-2 では発酵できなかった高濃度亜硫酸の濃縮ぶどう搾汁から、良質のワインを製造することができた。

文 献

- 1) 山梨県食品業指導所：葡萄酒醸造法，17（1974）
- 2) 飯塚 広，後藤昭二：酵母の分類同定法（第二版）東大出版（1973）
- 3) Lodder, J.: *The Yeasts*, 2ed., North-Holland Pub. Co.-Amsterdam-London（1970）
- 4) 国税庁所定分析法注解（1974）
- 5) Rankine, B. C.: *Aust. Wine, Brew & Spir Rev.*, 80 (5) 14 (1962)
- 6) 東大農芸化学実験書上巻 p.129 朝倉書店（1961）
- 7) Amerine, M. A., Ough, C. S.: *Wine and Must Analysis* p.56（1974）
- 8) A. O. A. C. p.144（1970）