顆粒状酵母及び乳酸菌の使用法と ワインの品質

仕込時期の変動が大きく、また期間も短いワインの製造において、使用時期が自由な乾燥酵母の利用が増加している。そこで本稿醸造関連微生物の研究に長年たずさわっておられる筆者に、今後の導入が待たれる乾燥乳酸菌も併せて、その製法から実際の取扱方法について解説していただいた。

北 野 一 好

1. はじめに

微生物は、種類により難易はあるものの、細胞内の水分を除いて乾燥菌体とすることにより、生体としての機能を長期間安定に保存することができる。ワイン醸造に利用される酵母や乳酸菌もこのような取扱いが可能であり、近年、その有用性が評価され急速に普及しつつある。

ワインの場合、醸造期間がブドウの収穫される短い期間に限られること、しかも、ブドウの収穫は天候の影響を受けやすく、収穫時期と収穫量が変動しやすい。その上、果実は保存性に乏しく、直ちに処理する必要があるといった特徴がある。このため、酵母にしろ、乳酸菌にしる必要な時期に必要な量を確保することが容易ではなかった。

乾燥酵母や乾燥乳酸菌は保存性や輸送性に優れており、ワイン醸造における困難な要求に対して、柔軟に対応できるためその利用が増加しているものと考えられる。

本稿では、乾燥酵母や乾燥乳酸菌をワイン醸造に利用するに際し、注意すべき事柄や酒質への影響について述べる。

2. 顆粒状酵母

ワインの醸造工程で中心的な働きをするのは酵母である。酵母は自然界に広く分布する単細胞微生物で、原料のブドウや醸造場の設備や器具等にも付着している。果汁を放置するとこれらの酵母が増殖し、発酵をはじめ。古くは、このような自然発酵によるワイン醸造が行われ、今日でも地域によってはこうした方法が残っている。しかしながら、自然発酵は人為的に制御することが難しく、近年では、優れた性質を持った酵母を添加する方法が一般化している。添加する酵母も、これまでは醸

造場で培養したものを使用することが多かったが、近年では先にも述べたように、ワイン醸造の特殊性もあって顆粒状乾燥酵母を使用することが多くなっている。

以後、ワイン醸造に利用される顆粒状乾燥酵母を ADY (Active dry yeast) と略す。なお、ADY は国内で製造されていない。国内の市場規模が小さいこと、欧米の場合、パン酵母として同様な需要があり、その設備や技術を生かして効率的に製造できるといった理由が挙げられる。現在、100 種類以上の酵母が ADY として販売されている。

(1) ワイン酵母の性質

通常、ワイン醸造に使用される酵母は *Saccharomyces cerevisiae* に属する。この種の酵母は、直径 5~10 μm の球~楕円体の単細胞微生物で、出芽により増殖する。糖の発酵能に優れ、アルコール耐性も大きい。清酒、ビール等の醸造に使用される酵母も同種の酵母である。ワイン酵母の場合、更に *cerevisiae* タイプと *bayanus* タイプに区別されることがある。前者はガラクトース資化・発酵性を有するが、後者は有しない。実用上、両者を区別するだけの明確な差異はないが、従来よりスパークリングワインの醸造には *bayanus* タイプを用いることが多い。ワイン酵母として要求される性質を第 1 表に示す。

ワイン酵母は、20% を超える果汁中の糖分を速やかに、かつ、糖分がなくなるまで完全に発酵する能力を必要とされる。更に、白ワイン用酵母としては、低温発酵性に優れることも重視される。

ワイン醸造では、通常、原料処理の段階で、野生微生物による汚染防止や、果汁の酸化防止を目的として亜硫酸が添加される。ワイン酵母には、このような条件下においても健全に発酵できるだけの亜硫酸耐性が必要とされる。

The Use of Active Dry Yeasts and Freeze-dried MLF Starter Cultures in Wine Making
Kazuyoshi KITANO(Ste. Neige Wine Co., Ltd.)

第1表 ワイン酵母の選択規準¹⁾

主に発酵管理的な性質	主に直接酒質にかかわる性質
1. 増殖・発酵速度	1. 芳香成分の生産性
2. 低温発酵性	2. 揮発酸低生産性
3. 二酸化イオウ耐性	3. オフ・フレーバー非生産性
4. キラー活性	4. リンゴ酸代謝分解性
5. 低泡性	5. 生酸性
6. 凝集性	6. その他
7. その他	

酵母の中には、仲間の酵母を殺したり、生育を阻害する物質を分泌する性質（キラー性）を有するものが知られている（キラー酵母自身は、キラー物質に免疫を持つため影響を受けない）。ワイン酵母自身がキラー性を備えれば野生酵母の汚染防止に有効なことから、ADYの中にはキラー性を持ったものが少なくない。なお、分泌されたキラー物質は不安定で容易に失活すること、その作用を受けるのはワイン酵母と同種、または、近縁の酵母に限られるといった特徴がある。キラー性を持ったワイン酵母を使用するに際しては、キラー性を持たないワイン酵母を使った果もろみへの混入防止に十分な注意を払うとともに両者を混用することのないようにする。

ワイン酵母は、発酵中、エタノール以外にも、品質に好影響を及ぼす高級アルコールやエステル類、悪影響を与える揮発酸、硫化水素、亜硫酸等を生成する。その生成量は使用する酵母の種類によるだけでなく、使用するブドウの品質や発酵管理の方法によっても影響を受ける。従って、ワイン酵母の選択に当たっては実際に試験醸造を行い、もっとも目的に合致したものを選ぶ必要がある。なお、亜硫酸のように、乳酸菌の生育に悪影響を与える物質を酵母が生成することが知られており、場合によってはこうした点も留意する必要がある²⁾。

(2) ADY 製造法

ADY に使用されるワイン酵母の培養はパン酵母等の場合と同様、蔗糖蜜を主な栄養源とし、好気条件下で行われる。酵母の生産効率を上げるため、酵母の増殖により消費された培地成分を順次追加する流加法（Fed batch system）が用いられる。培養酵母は遠心分離により集菌後、バキュームフィルターやフィルタープレスにより脱水され、固形分 30～35% の圧搾酵母となる。これをエクストルーダーで押し出し成形し、乾燥機で、乾燥空気を使用して水分を 6% 程度としたものが ADY である。酵母の活性を維持するため乾燥時の菌体温度が 40℃ を超えないような条件下で乾燥される。乾燥には、①トンネル型乾燥機を使用したベルト乾燥、②ドラム乾燥機による回転乾燥、③多孔支持板の下から乾燥空気を吹上げる流動層乾燥が知られている。

製品の形状は乾燥方法によって異なり、①では不定形の扁平体、またはこれを粉砕したもの、②ではペレット状、③では細い円筒状のものとなる。現在、市販されているものは③によるものが多い。乾燥された ADY は吸湿や酸化を防止するため、アルミのラミネートパウチや缶に入れ、真空あるいは不活性ガス置換して製品となる。なお、OIV の国際規約では製造時の生菌数が 1×10^9 個/g 以上、水分 8% 以下、細菌数が全生菌数の 0.01% 以下となっている。現在市販されているものは、生菌数約 2×10^{10} 個/g、水分約 6% である。

(3) ADY と取扱法

保存中の ADY は温度の影響を受けやすいので、活性継続には低温で保存することが好ましい。未開封で冷蔵（5℃）保存した場合、1 年経過後も活性低下は 10% 程度であることが報告もされている³⁾。一旦開封されたものは、気密性が失われ、活性低下を生じやすいことから長期の保存は好ましくない。保存期間が長くなったものについては、外観による活性の判定が困難であり、後述の活性試験により確認することが望ましい。

(4) ADY と復元法

ADY を使用するに際して、まずは水分を与え元の状態に戻してやる必要がある。ADY を乾燥状態のまま果汁に添加しても果汁中の水分で元に戻り生育するため、直接添加もできるが、ADY が吸水する過程は菌体が外部環境の影響を非常に受けやすい状態にあることから、酵母に負担の少ない条件下で復元させた後、果汁に添加するのが好ましいと考えられる。復元方法の一例を第 1 図に示す。使用する水の温度が低いと菌体内成分の漏出が起こり、活性低下の原因となることが報告されている⁴⁾。また、均一に吸水させるために温水へ ADY を加えることが好ましい。温水で復元させた酵母は、生育に必要な成分が供給されないで復元後は速やかに使用する。果汁への添加量は ADY の品質にもよるが、通常、ADY 1 kg を復元し、5 kl の果汁に添加すれば、3～5% の酒母を添加したのと同程度の菌数となる。なお、復元に果汁や、水で希釈した果汁を用いることもできる。この際は、酵母に悪影響を及ぼす亜硫酸等が混入しないよう注意が必要である。

第1図 顆粒状酵母の復元方法

(5) ADY と評価法

ADY の活性を知る方法として以下の方法があり、これにより ADY の品質をみることができる。

1) 生菌数

ADY に含まれる増殖可能な酵母数をみる方法で、プレート培養法とメチレンブルー染色法が知られている。いずれも ADY を復元させたものを用いる。プレート培養法は試料を正確に希釈し、その一定量を寒天培地に接種、数日間培養して出現するコロニーの数より生菌数を知る方法で細胞が凝集しやすい酵母では誤差が大きく、また、培養によるため時間を要する欠点がある。メチレンブルー染色法は死細胞がメチレンブルーにより染色されることを利用して顕微鏡下で計数する方法で、短時間で結果が得られるが、中間的な挙動を示すものがあり、誤差の原因となる。これら生菌数による方法は簡便で良く用いられるが、実際の発酵管理に必要な指標とはなりにくい欠点がある。

2) 発酵試験

復元後の ADY を使用し、実際に発酵を行い、その程度を糖の消費量や発生する炭酸ガス量により知る方法で、ADY の評価法として実際に即しているが、装置や、その操作が煩雑で時間を要する欠点がある。なお、糖分を屈折計で測定したり、炭酸ガス量を圧力変化や発酵液の重量変化として測定する簡便法も知られている。

(6) 発酵管理と酒質への影響

ADY は菌体に悪影響を与えない温和な条件で復元させるとともに、果汁に添加する際も取扱いに注意を要する。特に、品質の低い果汁に加える場合、復元した酵母液の温度を徐々に下げ、果汁との温度差を 10°C 以下とすることが望ましい。また、通常の酒母添加の場合と同じく、亜硫酸を添加した果汁は、十分時間が経過してから酵母を添加する必要がある。

ADY を使用した際の発酵開始の遅れは、主として、これまで述べてきたような使用方法の不備に原因があるとされる。その後の発酵管理については、従来法と同様で、特別な注意を要しない。ステロール（酵母の場合、主としてエルゴステロール）や不飽和脂肪酸は、酵母の細胞膜構成成分として重要であり、酵母の活性やアルコール耐性等に大きな影響を与える。酵母はこれらを好気条件下では合成できるが、嫌気条件下では合成できないことから、好気条件下で培養された菌体を用いる ADY の方を高く評価する意見もある⁵⁾。

酒質への影響についてみると、同じ酵母で従来の酒母と ADY を調製し、これらで醸造したワインを比較した結果では、高級アルコールの量に差があるとする報告⁶⁾や酒質にいくらかの違いがあるとする報告⁷⁾もあるが、

いずれもその差はわずかで、両者の優劣に言及するには至らない。

以上、ワインに使用される顆粒状酵母 (ADY) の概要について述べた。なお、ADY については優れた総説^{5,6)}があるので参考としていただきたい。

3. 顆粒状乳酸菌

乳酸菌もワイン醸造において有用な働きをする。特に、乳酸菌によるワイン中のリンゴ酸から乳酸への代謝は、マロラクティック発酵 (Malolactic fermentation, MLF) と呼ばれ、その有用性が広く知られている。MLF には、減酸効果で酸味が緩和されるほか、乳酸菌によって生成される成分により香味が向上すること、また、MLF が行われたワインは、微生物学な安定性を増すといった効果が期待できる。こうした乳酸菌による MLF は以前から知られていたが、酵母に比べ、微生物としての取扱いが難しいこともあって、これまでは乳酸菌の生育に都合の良い環境を整えることに主眼において MLF の制御が行われてきた。近年、MLF に対する関心の高まりと、乳酸菌の利用技術の進歩により、乳酸菌を添加して積極的に促進させる方法が普及しつつある。そして添加される乳酸菌も、酵母と同じく取扱いの簡便な乾燥菌体を使用することが多くなっている。以後、ワイン醸造において MLF を目的として使用される顆粒状乳酸菌を FDB (Freeze-dried bacteria) と略す。

(1) MLF 乳酸菌の性質

乳酸菌はエネルギー代謝の結果、多量の乳酸を生成する細菌の総称で、グラム陽性、球菌も桿菌も含まれる。孢子形成、運動性、カタラーゼ活性のいずれをも欠く。通性嫌気性菌であるが、呼吸能を欠くため好気条件下においても専ら発酵によって生育する。糖の発酵形式により乳酸のみを生成するホモ型と、乳酸のほかエタノール等を副生するヘテロ型に区別される。ワイン醸造に関与するものとして、桿菌では *Lactobacillus* 属、球菌では *Leuconostoc* 属や *Pediococcus* 属の乳酸菌が知られている。このうち MLF に関係するのは、一部例外はあるものの大半は *Leuconostoc oenos* に分類される乳酸菌である。*L. oenos* はヘテロ型球菌で、ワインのような 10 % を超えるエタノールが存在し、pH 3.5 を下回るような酸性条件下においても生育できることを特徴とする。

MLF に使用される乳酸菌は、いずれもワインから分離されたものの中から MLF 菌としての適性に優れた菌株を選抜したものである。MLF 菌としての選択基準を第 2 表に示す。まず、ワイン中で良好に生育する必要がある、阻害要因となるエタノールや亜硫酸に耐性が大きいこと、低 pH、低温条件下でも生育するといったことが

第2表 MLF 乳酸菌を選抜する際の規準⁹⁾

エタノール耐性	(15%)
亜硫酸耐性	(50 ppm)
低 pH での生育	(3.0)
低温での生育	(10°C)
香味物質の生成	
ファージ感染に対する抵抗性	
粘質物の非生産性	

含まれる。また、ワインから分離された乳酸菌の中にはファージに感染したものが広く存在することが知られている。ファージによる感染は MLF の進行を妨げる可能性があることから、その危険性の低い菌株を選抜したり、ファージ感受性の異なる複数の菌株を混用する方法がとられている。以上のような生育に関与する要因のほか、MLF の能力に優れていること、また、副生される成分のうち酒質向上に役立つものが多く、反対に、酒質に悪影響を与えるものがないことが必要とされる。また FDB 用としては、その製造工程で失活しにくいことも必要な条件である。

(2) FDB 製造法

乳酸菌は、酵母とは異なり FDB の製造に多くの困難が伴い、これが FDB の開発を遅らせ、高価な原因ともなっている。製造上の問題として、大別すると培養に関するものと、乾燥に関するものがある。培養についてみると、FDB の製造に用いられる乳酸菌は、生育にビタミンをはじめ各種の成分を必要とするばかりか、培養条件により、ワインに添加した際の生存率や MLF の能力が影響を受ける。このため培地として価格の高いリンゴ果汁等を使用する必要がある、製品価格を押し上げる原因ともなっている。また、乳酸菌の生育は遅く、培養に長時間を要するばかりか雑菌による汚染を受けやすく、微生物管理の上でも多くの労力を必要とする。培養した菌体は遠心分離により集菌される。一方、菌の乾燥についても、菌は非常に損傷を受けやすいため、ADY の製造のときのような簡便な方法を用いることはできない。凍結乾燥法は、菌体を凍結させたまま減圧し、氷結した水分を直接昇華させて除去する方法で、菌体への悪影響の少ない乾燥法として知られており、研究用の菌株の保存にも広く用いられている。FDB は、この凍結乾燥法により製造される。

FDB は、ADY と同様、吸湿と酸素の透過を防止するため、アルミラミネートパウチに入れて販売されている。この状態では安定であり、冷凍庫で保存した場合、通常1年以上の保存が可能である。ただし、一旦開封したものは活性の低下が著しいため保存は困難である。なお、OIV の国際規約では、生菌数は 10^8 cfu/g (1 グラムの

FDB を希釈し、培養したとき生育するコロニーの数) 以上、*L. oenos* 以外の菌の含有は 0.01% 以下、好気性細菌、カビ、酵母は各々について 10^3 個/g 以下といった規格がある。市販の FDB には通常 10^{11} cfu/g のオーダーの生菌が含まれている。

(3) FDB の使用法

現在市販されている FDB には、ADY と同じくワインに使用する前に復元操作を行うものと、これを必要としない2種類がある。前者の場合、水で2倍に希釈した果汁に必要な応じて酵母エキス (0.5%) を加えた後、炭酸カルシウムで pH を 4.0~4.5 とした復元液に FDB を加え、20~25°C で2~3 日間培養してから使用する。この場合、復元中に雑菌汚染を起こす可能性があることから十分な注意が必要である。後者は、直接投入が可能のように改善されたもので、復元作業が省力化され汚染の危険もないが、MLF に要する費用が割高となる。

FDB の添加は、酵母による発酵が終了した直後に行うのが一般的である。この時期には酵母の活動が停止し、乳酸菌の生育と競合しないばかりか、酵母菌体の消化によって生じた成分が乳酸菌の生育に好影響を及ぼすこと、また、必要に応じて MLF の制御に必要な対応ができるといった利点がある。しかし、酵母による発酵が終わる頃には気温も下がり、品温の維持に注意することのあること、MLF が遅れた場合、この間、ワインは酸化的条件下におかれるため、酒質に悪影響を及ぼす危険がある。一方、FDB を主発酵開始前に酵母と一緒に添加する方法も知られている。この方法は、発酵期間が短縮され醸造工程を簡略化できる利点がある。しかし、両者を同時に管理するのは難しく、特に乳酸菌の生育が先行した場合、酵母の生育が抑制されるばかりか、添加した乳酸菌が糖を代謝し、酢酸や異臭原因物質を生成し酒質を損なう可能性がある。また、ワイン酵母は菌株により、亜硫酸の生成等により乳酸菌の MLF を阻害することが知られている²⁾。使用に際しては酵母菌株の性質についても注意を払う必要がある。主発酵開始前に FDB を添加する方法としては、更に別な方法も知られている。この場合は *Lactobacillus plantarum* のようなアルコール耐性のない乳酸菌が使用される。これらの乳酸菌はアルコール分が5% 程度になると活動を停止するため、それまでに MLF を完了させる必要がある。なお、この乳酸菌はホモ型発酵を行うため酢酸等の副生は少なく、先述のような問題は起きにくい。

MLF を行うためには、実施する環境にも注意が必要で、特に pH、品温および亜硫酸量は重要である。pH は、乳酸菌の生育および MLF 活性に影響を与える。pH の下限は 3.1 付近で、これを下回る場合 MLF は困難

となる。また、前培養を行う場合、低い pH(3.5) で培養したものの方が高い pH(5.5) で培養したものより MLF の能力が高いことが知られている¹⁰⁾。MLF を行う温度は、FDB の種類やアルコール濃度により影響を受けるが、通常 20℃ 前後が適当である。15℃ を下回る場合は加温が必要である。亜硫酸は乳酸菌の生育を著しく阻害する。乳酸菌の場合、結合型亜硫酸も影響を有するため、果汁処理の段階から使用量を制限する必要がある。亜硫酸の影響は pH が低いほど大きい。通常総亜硫酸が 50 ppm を超えないことが必要である。このほか MLF を促進させるためには、オリ引きを遅らせ、清澄化処理を行わないことも必要である。

FDB の添加量は、メーカーのマニュアルによるが、健全に MLF を進行させるためには、初発生菌数が 10⁶ cfu/ml 程度必要とされる。

添加後は品温の保持に注意が必要である。また、MLF が始まる前のワインは不安定な状態にあり、開始が遅れるとワインの酸化ばかりか、産膜酵母や酢酸菌の増殖を許す危険がある。

(4) 酒質への影響

1) 減酸効果

二塩基酸のリンゴ酸が脱炭酸され一塩基酸の乳酸になることで、酸度が 0.1~0.3% 減少し、pH が 0.1~0.3 上昇する。このため酸味が緩和され、まろやかになる。

2) 香味の改善

MLF の過程で乳酸菌は種々の香味成分を副生する。このうちダイアセチルは、5~7 ppm 以上では、バター様臭として好ましくないが、MLF で生成される濃度(1~4 ppm) ではワインの香りに幅を持たせることから好ましい評価を受ける。同様な性質を示すものとして乳酸エチルがある。また、新酒の持つ未熟臭を弱める効果があるとされる¹⁰⁾。

3) 微生物学的安定性

ワインに生育する乳酸菌の中には MLF に関与する有用なものほか、製品中に混入して酒質を損なうものもある。こうしたものを含め、乳酸菌は亜硫酸の管理が適切に行われていれば問題とならないが、たとえ亜硫酸の

使用方法に不備があったとしても、MLF を行ったワインには生育に必要な成分が消費され減少しているため、これらの汚染に対して安定性が高くなる。

以上、MLF に使用される顆粒状乳酸菌(FDB)の概要について述べた。なお、MLF 乳酸菌についても優れた総説^{10,11)}がある、参考としていただきたい。

また、ワイン醸造に FDB を使用することは、現行酒税法では認められていない。山梨県ワイン酒造組合からの要望により、現在、当局において検討中の段階であり、その取扱いには注意が必要である。

<サントネージュワイン(株)>

本稿は平成7年7月に開催された第11回ワインセミナーの講演要旨に加筆、修正を加えたものである。

文 献

- 1) 後藤昭二：ワイン学，p.97，産業調査会（1991）
- 2) T.HENICK-KLING and Y.H. PARK： *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 464 (1994)
- 3) G. REED and S. L. CHEN： *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, 165 (1978)
- 4) J. H. CROWE, L. M. CROWE and F. A. HOEKSTRA： *J. Bioenerg. Biomem.*, 21, 71 (1989)
- 5) R. DEGRE： *Wine Microbiology and Biotechnology*, p.421, Harwood Academic Publishers (1993)
- 6) K. YOKOTSUKA and T. MATSUDO： *J. Inst. Enol. Vitic, Yamanashi Univ.*, 27, 1 (1992)
- 7) P. BIDAN and J. MAUGENET： *Bull. OIV*, 54, 241 (1981)
- 8) J. K. KRAUS, G. REED and J. C. VILLETIAZ： *Connaissance de la Vigne et du Vin*： 17, 93 (1983)； 18, 1 (1984)
- 9) C. R. DAVIS, D. WIBOWO, R. ESCHENBRUCH, T. H. LEE and G. H. FLEET： *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 290 (1985)
- 10) T. HENICK-KLING： *Wine Microbiology and Biotechnology*, p.289, Harwood Academic Publishers (1993)
- 11) S. LAFON-LAFOURCADE： *Biotechnology Vol. 5*, p.81, Weinheim. Verlag Chemie (1983)