

[連載講座]

ワイン酵母の取扱い方

山中秀樹、横森洋一、清水健一（DH1(株)研究所）

1. はじめに

ごく最近に至るまで、ワインを醸造する上で、最も重要な工程であるブドウ果汁の発酵工程は、ブドウ果皮にもともと付着している野生酵母を利用する、いわゆる自然発酵によって行われる場合が大勢を占めていた。自然発酵は、うまく行った場合、香味共に複雑なワインができることがあるというメリットを有する反面、発酵が開始するまでに時間がかかる、発酵が途中で停止することがある、優位を占める酵母菌株の差異によって製成ワインの品質が異なるなどの問題点を有する。特に、発酵を担うワイン酵母の良否が、製成ワインの品質の重要な決定因子であるとの認識は、近年、ワイン生産者の間に、急速に定着しつつある。

これらの理由から、近年、純粹培養した優良なワイン酵母（酒母）を果汁に大量に添加して発酵させる方法を採用する醸造所が急速に増加している。

この純粹培養ワイン酵母は、ただ単純に培養して添加すればよいわけではなく、その使用に関しては、様々な注意が必要である。本稿では、初心者を対象として、ワイン酵母の取扱い方、ワイン醸造への利用法について簡単な解説を行なう。

2. ワイン酵母とは、

微生物は、比較的高等な真核微生物を下等な原核微生物に大別されるが、酵母は前者に属する（細菌は後者）。一口に酵母といっても、パン酵母、醸造用酵母、食用酵母など人類に有用なものから、Candida 症などの難病の病原菌となるものまで多種多様であり、その性質もかなり多岐にわたっている。産業用酵母の中で酒類の醸造に用いられる醸造用酵母は、その対象となる酒類に応じて、清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母、ウイスキー酵母などに分類されているが、この分類は便宜的なものであり、これらの間に明確な境界はない（分類学的にみても、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* に属する）。しかしながら、それぞれの酒類の原料特性、醸造方法に応じて、各酒類に比較的適合したものが、選抜され使用されている傾向は否定できない。

ワイン酵母は5～10ミクロン程度の大きさ（当然肉眼では見えない）を有する球形または卵型の微生物であり、低いpHや高い糖度での発酵、増殖能が比較的優れている、亜硫酸耐性が強いなどの性質を備え持っているものが多い。前述のように、優良なワイン酵母はブドウ果皮上にも存在するが（この場合、果皮上の酵母すべてが優良とは限らない

が)、近年では、分離され、優秀さが確認された後に植え継がれ、純粋培養ワイン酵母として利用されているものも少なくない。また、当然のことながら、各々のワイン酵母間で、発酵速度、エキスの食い切り度合い、製成ワインの香味などにかなりの差異がみられる。国際的には、広く用いられているワイン酵母として、Prise de Mousse, montrachet, Epernay, Montpellier, kl, Champagne, Geisenheim74などが挙げられるが、この他にも数多くのワイン酵母が実際のワイン醸造に用いられている。これらのうち大部分は、乾燥ワイン酵母として市販されており、カナダの Lallmand 社、オランダの Gist Brocado 社、アメリカの Universal Foods 社、オーストリアの Intek 社などが主な供給者である。又、わが国においては、日本醸造協会から、OC-2, W-3などの株を、より利用しやすい形で入手することが可能である。

3. ワイン酵母の培養、保存法

1) 培地

微生物を培養するための培地の種類は、多岐にわたるが、ワイン酵母の培養、保存によく用いられるものをいくつか例示する。培地の形態としては、液状の培地（液体培地）と、寒天を加えて固化させた固体培地がある。

・ブドウ果汁

ブドウ果実を破碎し、压榨して得られる果汁を、原液のままか、あるいは適宜希釈して用いる。通常ブドウ果汁は、液体培地として、培養、酒母用に使用される。純粋培養を目的とした場合は、0.2 μ のメンブランフィルター濾過による除菌または、加熱殺菌（オートクレーブまたは、5分以上沸騰させる）したブドウ果汁を用いる。西欧においては、ワイン酵母の保存に領用されている。

・YPD培地

YPD培地の組成を表-1に示した。液体培地、固体培地の両方が用いられる。本培地でのワイン酵母の増殖は、きわめて良好であり、ワイン酵母の培養保存に広く用いられる。また、寒天を加え、オートクレーブ殺菌（オートクレーブのない時は30分間の沸騰でもよい）した後、市販の滅菌シャーレに分注し、固化させたYPD平板（プレート）培地は、新しい酵母の分離や単一菌株の分離用としても有効である。

・YM培地

YM培地の組成を表2に示した。本培地でのワイン酵母の増殖もYPD培地と同様に良好であり、YPD同様に、固体培地培養、菌株保存用などとして広く使用される。

2) 無菌操作

前述のようにワイン酵母を取り扱う際、重要な注意点は、他の微生物に汚染されることなく、純粋な単一株として、操作、維持することである。他の微生物に汚染されたワイン

酵母を用いて、ワイン醸造を行うと、酒母立ての期間中および果汁発酵中に、汚染した微生物が増殖し、発酵の異常や品質の劣化などにつながることが多い。そこで、他の微生物による汚染を避け、ワイン酵母を純粋に取り扱うために、無菌的な操作が重要である。そのためには、まず、外部と隔離して菌株を扱えるできる限り無菌的なスペースを作る装置としては、カステンと呼ばれている小型のガラス張りの無菌箱から、クリーンルームやバイオハザードのような大型設備にいたるまで数々の装置が工夫されているが、ここでは、安価で手軽に利用できるカステンの使用を紹介する。

カステンは図-1に示すように、木製の木枠にガラスを組み込んだ箱であり、内部の隔離された空気で操作することにより、微生物の進入を阻止する。通常、前面または両側面が、上下にスライドする様になっており、そこから手を挿入して無菌操作を行なう。

使用前にカステン内部を無菌状態にするため、通常、希釈したオスバン溶液（医薬用消毒液として市販）を噴霧する。内部に漂う微生物は、噴霧したオスバン液とともに落下し、内部空気は無菌的となる。噴霧後、オスバン液が完全に沈降するまで5～10分以上待ち、操作を開始する。手は、内部に挿入する前に、オスバン液中で良く洗

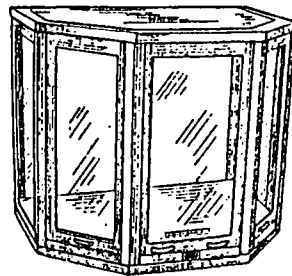


図-1 カステン

浄する。また、内部で使用する器具なども、オスバン液の浸み込んだガーゼで殺菌後内部に入れることにより、内部の無菌状態を保つ。カステンのない場合には、できる限り無風で清潔な場所を選び、ガスバーナーの炎上（場合によっては炎中）で操作を行ってもよいが、試験を上に向けない、シャーレは寒天面を下にして扱うなどの注意が必要な上、かなりの熟練が必要となる。

3) 接種、培養、

ワイン酵母を、スラントからスラントへ、あるいは、スラントから液体培地や果汁へと移植する際、良く用いられる器具は、白金耳と呼ばれる接種針である。白金耳は図-2に示すように、小さなループを有する細かいハリガネ（実際には白金耳が高価なので細かいハリガネが代用される）と、金属性の柄（市販されている）からなり、使用に先立ち、火炎上で殺菌される（図-3）（通常、火炎中で真っ赤になるまで熱し、火炎中から出して5～10秒カステン中で自然放冷してから操作を行なう。この場合、放冷中に白金耳がカステンの上下面、側面などに触れないように注意）。なお、操作の前後には、スラント試験管口や液体培地を入れたフラスコの口の周辺部を火炎上で殺菌し（図-3）、他の微生物に

よる汚染を防止する。

自らの醸造所でワイン酵母の培養を行わない場合は、すぐに使用可能な、前述の日本酒協会のアンプル詰め液状ワイン酵母や種々の市販乾燥ワイン酵母を利用するとよい。

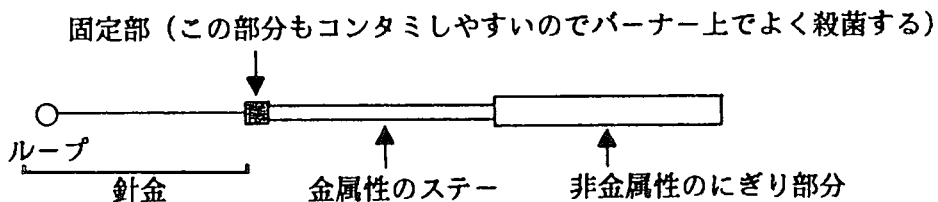


図-2

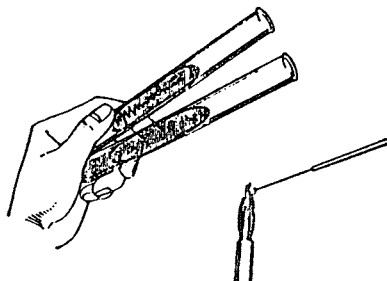


図-3

4) ワイン酵母の保存法

ワイン酵母の保存に際しての重要なポイントとして、保存中に他の微生物により汚染されないこと、保存中のワイン酵母の死滅や変異を防ぐこと、なるべく長い期間保存が可能なこと、操作や容器がなるべく簡便であること、接種源として必要なときすぐに使用が可能なことなどが挙げられるが、以下に、よく行われているワイン酵母の保存法を示した。

(1) 継代培養保存法

必要なときにすぐに菌株を利用でき、また、観察しやすい点で広く一般的に行われている方法であり、試験管中に作成した斜面培地（スラント）やシャーレ中の寒天平板を用いて、一定期間ごとに植え継ぐことにより、菌株の保存を行う。培地としては、前述のYM培地のような、比較的炭水化物の濃度が低い培地がふさわしい。通常、安全のために、植え継ぎは、1菌株につき2本以上行い、1本は保存用として次の継代の時のために残し、他は必要時に接種源として利用する。菌株は、植え継ぎ後、25℃～30℃で3～5日間培養

し、良好なコロニーの形成を確認した後、低温下（5～15℃）で保存する。

本法では、保存中の寒天培地の乾燥とワイン酵母の生存率の低下のためにおよそ半年ごとに新しい培地に植え継ぎを行う。なお、植え継ぎに際し、菌株名をよく確認して、菌株の取り違えのないよう注意が必要である。また、本法による保存中に、菌株が遺伝子ZYで変化することがたまにあるので、この点留意が必要である。

(2) 冷凍保存法

菌株の遺伝的変化の危険があまりなく、比較的長期間安定に保存できる方法として、新鮮な細胞を冷凍し保存する方法がある。以下に簡単な実施例を示す。YPD液体培地中で、25～30℃で2～3日間培養したワイン酵母培養懸濁液を滅菌済みのスクリーキャップ付き小型試験管に分注し、等量の20～80%グリセリン水溶液（滅菌済み）を加え、混合後（最終グリセリン濃度10～40%）、冷凍庫で保存する（-20～-30℃で保存する場合は、グリセリン最終濃度10～20%、-80℃の場合は、最終濃度40%が望ましい）。本法によれば、菌株の種類によっても異なるが、2～3年間の保存は可能である。ただし、冷凍保存した菌株は、一度解凍したら、再度冷凍して保存すべきではない（凍結、融解の繰り返しによる菌数の顕著な低下あり）。また、本法によれば、遺伝的には安定に保存できるが生菌数は保存中に低下するので、保存後使用する場合は、解凍後、YPD寒天平板上などで一度培養してから使用すべきである。

(3) 乾燥ワイン酵母の保存法

乾燥ワイン酵母は、室温で保存すると1年間で生菌数が1/20から1/100に低下する。菌株によっても異なるが、5℃前後で保存すると1年ぐらいはかなり安定に保存できるものが多い（当然、容器は滅菌した密封容器を用いる）。

表-1 YPD培地組成

ブドウ糖	2 g
ポリペプトン	2 g
酵母エキス	2 g

1 1 蒸留水

※寒天培地の場合、寒天粉末 2 % 添加

表-2 YM培地組成

ポリペプトン	5 g
酵母エキス	3 g
マルトエキス	3 g
ブドウ糖	10 g

1 1 蒸留水

※寒天培地の場合、寒天粉末 2 % 添加