

## 〔連載講座〕

## 乳酸菌によるマロラクティック発酵（1）

山梨大学工学部発酵化学研究施設

柳田 藤 寿

## 1. マロラクティック発酵（MLF）について

ワイン醸造において、アルコール発酵終了後、乳酸菌によってリンゴ酸が乳酸と炭酸ガスに分解されるマロラクティック発酵は（図1）、その減酸作用によってワインの酸味を低減させ（MLFによって2価のリンゴ酸が1価の乳酸に代謝される。）て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り、赤ワインと一部の白ワインで行われている。また、伝統的ワイン生産国である欧米では、MLFが活発に行われ、多くの研究がなされている<sup>1)・2)</sup>。しかし、日本では人為的MLFはあまり行われておらず、MLF工程は野生乳酸菌による自然発生に任されている状況にあり、これらに関する研究報告も少ない<sup>3)・4)</sup>。本稿では、乳酸菌による赤ワイン製造におけるマロラクティック発酵について、基礎から応用まで、3回に分け解説を行う。

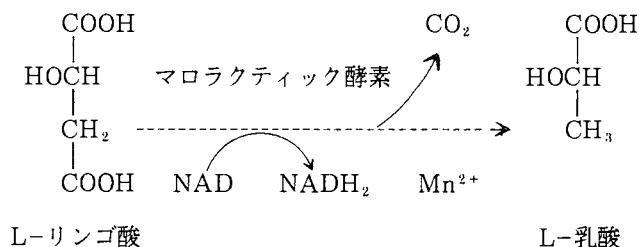


図1 マロラクティック発酵（MLF）

## 2. 乳酸菌とは

乳酸菌は、古くから人類の生活と密接に関係し、乳製品、アルコール飲料、調味食品など表1に示したように広範囲に利用されている。乳酸菌の利用に関する歴史は長いが、乳酸菌の研究に関する歴史は比較的新しく、1857年フランスのパスツールによって、テンサイ糖を原料としてアルコール発酵を行う際の酸敗の原因菌として発見されて以来多くの研究がなされている。利用としては最近話題となっている“ヨーグルトきのこ”などの乳製

品の利用が多い。アルコール飲料では、清酒、ワインにおけるマロラクティック発酵さらに近年ではウイスキーの発酵もろみの中に増殖して風味に影響を与えているのではないかととの報告もある。さらに味噌、醤油などの発酵食品、食肉加工、製パンなど食生活に密接に関係している。

次に乳酸菌とはどのような菌かを説明すると、糖を発酵し、乳酸を生産する細菌群の総称である。乳酸菌を分類学的に表現するとグラム陽性（細菌をグラム染色すると染まるものと染まらないものに分けられる）、桿菌か球菌（大きさは桿菌 $0.5\sim 1\times 1\sim 2.5\mu\text{m}$ 、球菌 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ）、カタラーゼ陰性（嫌気性菌であるが、酸素が存在していても生育できる通性嫌気性菌である）、胞子がなく、運動性もない。また、糖類を唯一のエネルギー源とし、取り込まれたブドウ糖1モルが2モルの乳酸に分解されるホモ型乳酸発酵と、1モルのブドウ糖が1モルの乳酸と1モルのエタノールと1モルの炭酸ガスに分解されるヘテロ型乳酸発酵のどちらかの発酵形式を取る。

分類学的には複数の属（genus）*Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属、*Lactococcus* 属が含まれる。そして各属は数種から数十種の種（species）に分類されている。この中で *Lactococcus* 属はこれまで *Streptococcus* 属に含まれていたものが1985年に再分類されたものである。

表1 乳酸菌の利用

1. 乳製品（ヨーグルト、乳酸菌飲料、チーズ）
2. アルコール飲料（ワイン、清酒、果実酒、ウイスキー）
3. 調味食品（醤油、味噌）
4. 食肉加工（ハム、ドライソーセージ）
5. 製パン（サワーブレッド）
6. 漬物（糠味噌漬、ピクルス、ザワークラウト）
7. 飼料（サイレージ）
8. 薬剤（整腸剤、デキストラン、抗菌性物質）
9. 乳酸製造
10. 微生物定量法

### 3. 乳酸菌の培養、保存法<sup>5)</sup>

#### 1) 培地

一般に細菌は単純な栄養培地（ブドウ糖と無機質だけ）でも生育できるが、乳酸菌は生

育するために、糖類、アミノ酸、ビタミン、無機質がなければ生育出来ない。

乳酸菌を培養するための培地の種類は、多いが通常使われる培地とMLF用乳酸菌に用いられるものを紹介する。培地の形態としては、液体培地と寒天を加えて固化させた固形培地とがある。

一般の乳酸菌を培養する時は、表2のGYP培地を用いる。ワインなどから乳酸菌を分離するときおよびMLF菌を培養するときは、表3のBM培地および表4の291培地を用いる。この培地は通常の培地よりもpHが低く、またトマトジュースを遠心分離した上澄みを加えられており、この中に含まれる生育因子をMLF菌が必要とするためにこのような組成となっている。いずれの培地もpHを調整した後に加熱殺菌121°C、15分行う。固形培地の場合は、pH調整後に寒天を1.5%添加し殺菌後、使用する。

表2 GYP 培地		表3 BM 培地		表4 291培地	
ブドウ糖	10g	ブドウ糖	10g	ブドウ糖	10g
酵母エキス	10g	フラクトース	5g	酵母エキス(Difco)	5g
ペプトン	5g	酵母エキス(Difco)	5g	ペプトン	10g
肉エキス	2g	肝臓エキス(Difco)抽出液	20ml	MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	200mg
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	200mg	トリプトン(Difco)	5g	MnSO <sub>4</sub> ・4H <sub>2</sub> O	50mg
MnSO <sub>4</sub> ・4H <sub>2</sub> O	10mg	ポリペプトン	20g	トマトジュース	250ml
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	10mg	Tween 80	0.1g	PH	4.8g
NaCl	10mg	DL リンゴ酸	1g	蒸留水	750ml
pH	6.8	MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	80mg		
蒸留水	1000ml	トマトジュース	250ml		
		pH	5.4		
		蒸留水	750ml		

## 2) 保存法

乳酸菌の保存法には、一般の微生物株の保存と同じように、継代培養保存法、凍結保存法、凍結乾燥保存法などがある。いずれの場合も、保存中に他の微生物に汚染されないこと、保存中に乳酸菌の死滅や変異を防ぐこと、さらに出来るだけ長期間保存できることなどが望ましい。

### ① 継代培養保存法

乳酸菌保存用高層培地 先ほどの、GYP, BM, 291培地に、生育に伴って生成される乳酸を中和する目的で沈降性炭酸カルシウム (CaCO<sub>3</sub>) を1%、寒天を1.5%添加し培地

を作成する。乳酸菌の接種は、この培地に先がまっすぐな白金線を用いて試験管の底に到達するまで刺す。培養は乳酸菌の至適温度である30～37℃で2～5日培養し、乳酸菌の生育（白色の菌体）を確認した後、5℃の冷蔵庫で保存する。

この方法で、2～3ヶ月保存することが出来、その後新しい培地に植え継ぎを行う。

#### ② 凍結保存法

液体培地で生育した乳酸菌を遠心分離によって菌体を集めて、これを凍結障害防止剤の媒体（10%スキムミルク水溶液）に懸濁し、-80℃のディープフリーザーにに入れて保存する方法である。この方法で、菌株にもよるが数年～5年ぐらい保存する事が出来るが、高価なディープフリーザーが必要である。

#### ③ 凍結乾燥法

乳酸菌菌体を凍結障害防止剤の媒体に懸濁し、凍結した後、真空乾燥して保存する方法である。この方法で、菌株にもよるが5～10年、またはそれ以上保存することが出来る。しかし、この方法には真空乾燥機やアンプル溶封の設備など、特殊なものが必要なので、一般向きではない。

### 4. 乳酸菌の分布

ブドウ果実には野生酵母、カビ、乳酸菌、酢酸菌等多くの微生物が存在している。中でも乳酸菌は赤ワインの二次発酵に関与し MLF を行う。また、ワインの汚染菌としても知られており、清酒の火落菌と同様にアルコール耐性菌がワイン中に生育したり、粘質物質を生産する *Pediococcus damnosus* によってワイン中の粘度が高くなることもある<sup>6)</sup>。

MLFに関与する乳酸菌としては、*Leuconostoc oenos*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus brevis*、*Pediococcus damnosus* 等数多く報告されている<sup>7)・8)</sup>。主となるのは球菌の *Leu. oenos* と桿菌の *L. plantarum* である。

この乳酸菌の遷移は、以下のように説明される。かもし発酵から発酵終了後における乳酸菌数の推移について、アルコール発酵中は、酵母により生産されるエタノールおよび阻害物質（脂肪酸）と添加した亜硫酸の影響で乳酸菌の増殖阻害が見られ、乳酸菌数は減少する。アルコール発酵終了後に酵母の自己消化によるビタミン、アミノ酸、ペプチドの溶出により乳酸菌数の増加が起こり MLF が発生する。この間リンゴ酸が分解されて、総酸が減少する。

著者は1990年度の赤ワイン仕込み経過中の乳酸菌の分布、生態を調べた。乳酸菌の分離方法として当研究施設育種試験地において収穫したマスカット・ベリーA (MBA)、カベルネソービニオン (CS) を用いて赤ワインの仕込を行い各工程において嫌氣的に乳酸菌

の分離を行った。その結果、乳酸菌26菌株を分離した。それらの菌株の同定を行い、仕込前半には *L. plantarum* が、仕込後半には *Leu. oenos* が多く分離された<sup>9)</sup>。これらの菌株の生育温度、エタノール耐性、L-リンゴ酸分解活性などは菌株によりかなり異なっていた。

また、図2は当研究室における1993年度のMBA およびCSの仕込経過中の乳酸菌数と総酸およびL-リンゴ酸の変化を示した図である。MBAにおいては、圧搾後から菌数の上昇が見られ、それに伴いL-リンゴ酸の減少が見られ、総酸も減少している。仕込みから37日目にMLFが終了していた。CSにおいては、圧搾後菌数はゼロとなったが、その後菌数は徐々に増え、87日間かかってMLFが終了した。

このように、一般的にはアルコール発酵終了後から乳酸菌は増加し、MLFが終了する。しかし、ブドウ果実の状態および添加する亜硫酸の濃度、発酵温度などの条件によってはMFLが起こらない場合がある。これらの事については次回の連載講座で説明を行う。

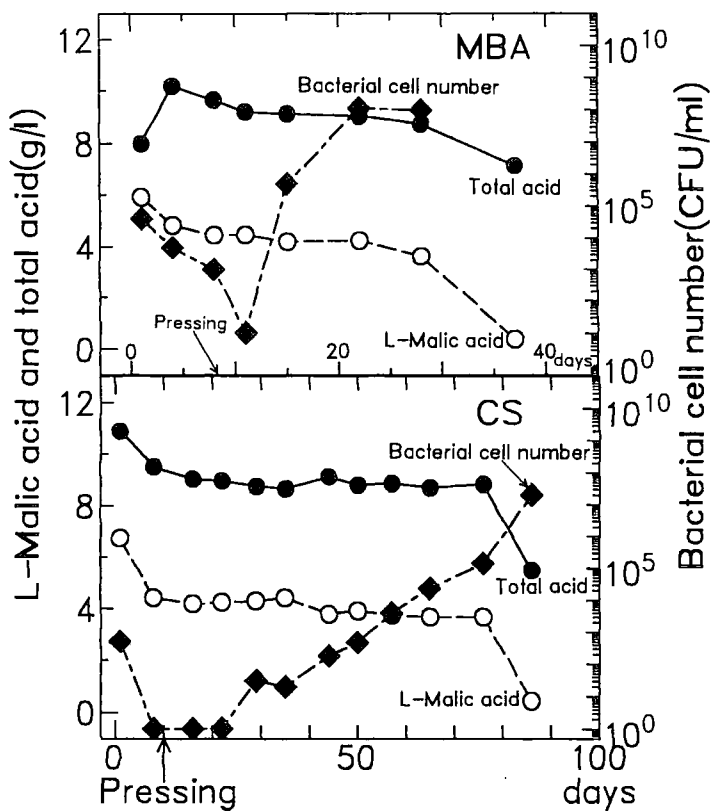


図2 Malolactic Fermentation in MBA and CS(1993)

参 考 文 献

- 1) R.E.Kunkee: Microbiol. Rev., **88**, 55 (1991)
- 2) D.Wibowo. et al: Am. J. Enol. Vitic., **36**, 302 (1985)
- 3) 原 : 醸協、**62**, 803 (1967)
- 4) 野々村ら : 醸協、**65**, 868 (1970)
- 5) 小崎監修 : 乳酸菌実験マニュアル、朝倉書店 (1992)
- 6) A. Lonvaud-Funel et al : Sci. Aliments, **8**, 33 (1988)
- 7) S.Lafon-Lafourcade et al: Appl. Environ. Microbiol., **46**, 874 (1983)
- 8) L.M.T.Dicks et al: J. Appl. Bacteriol., **64**, 505 (1988)
- 9) 柳田ら : 醸協、**88**, 238 (1993)