

[連 載 講 座]

乳酸菌によるマロラクティック発酵 (2)

山梨大学工学部発酵化学研究施設

柳 田 藤 寿

前号 (Vol. 5, No. 3) では、乳酸菌の取り扱い、乳酸菌の分布など、マロラクティック発酵 (MLF) の基礎的な部分を中心にまとめたので、今回は、多少応用的な立場から、MLFの機構やMLFに対する各種要因、L-リンゴ酸分解能などについて簡単にまとめた。

5. マロラクティック発酵能について

乳酸菌によるマロラクティック発酵 (MLF) の経路については、次の2つが考えられている。1つ目は、図1 (1) のリンゴ酸酵素 (Malic enzyme) 経路でリンゴ酸から脱炭酸によりピルビン酸を經由して乳酸を生成する経路である。2つ目は、図1 (2) のL-リンゴ酸を直接脱炭酸してL-乳酸を生成するマロラクティック酵素 (MLE) 経路である¹⁾。このMLEはワインから分離された多くの乳酸菌が持っており、 NAD^+ と Mn^{2+} を必要とする。また、このMLEは多くの乳酸菌から精製されており、分子量6万から7万ダルトンの2つのサブユニットからなっている¹⁾。図1 (1) の反応においても減酸は起こるが、ワインから分離される優良MLF菌である Leu. oenos や Leu. mesenteroides の生成する乳酸はすべてD乳酸であり、L乳酸を生成するL-LDH (乳酸脱水素酵素) をもっていないため、ワイン中では図1 (2) の反応が主体である。他にリンゴ酸からオキザロ酢酸、ピルビン酸をへて乳酸を生じる経路 (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) も考えられるが、この系に関与する酵素の至適pHがかなり異なることや代謝中間体が検出されないことからMLFに関与してないと考えられる。また、マロラクティック発酵によるエネルギー獲得については直接ATPを生成して、エネルギーを獲得出来ないと言われていたが、近年Coxら³⁾により、Leu. oenosによるMLFがATPを生成すること、さらにOlsenら⁴⁾も、ATPを生成する事を報告している。

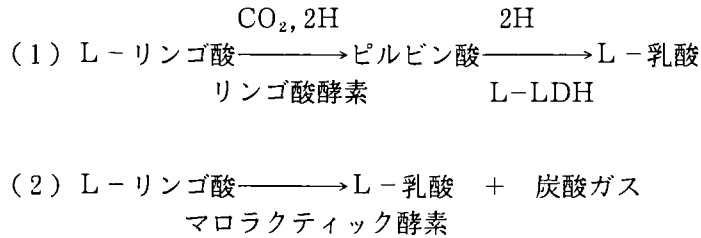


図1 乳酸菌によるL-リンゴ酸の代謝

6. MLFに対する各種要因について

MLF菌は一般に亜硫酸やアルコール耐性が弱く低pHで生育が抑えられるため、MLF菌の増殖やMLFの生起には、各種要因の検討がなされてきた。最も影響する要因は亜硫酸とpHである。

亜硫酸については、果もろみへの過度の添加がアルコール発酵終了後のMLF菌の生育を遅らせたり、MLF生起のための菌数 (10^6 cells/ml)²⁾ に達しないなどの影響が現れる。また、Lafon-Lafourcadeら⁵⁾は、亜硫酸50ppmの添加では、貯蔵200日でもMLFが生起しないと報告し、Peynaud⁶⁾はMLFは亜硫酸100~150ppmでは起こらないとしている。阻害を受ける亜硫酸量は約30~50ppmであるがpH、アルコール濃度など他の条件も関与するので、これらの影響も考える必要がある。また、ワイン中では、遊離型の亜硫酸濃度が、結合型亜硫酸濃度よりもMLF菌の生育に影響している⁷⁾。

果もろみおよびワインのpHもMLF生起にとって重要な因子の1つである。pH3.3~3.5を境にして低い場合は生起せず、pHが高くなるに従って生起する傾向にある⁸⁾。Peynaud⁶⁾はMLF菌の最適増殖pHは4.1~4.5であり、pH3.0以下においてMLFが生起しないと報告している。また、オーストラリアおよびイタリアのワインでは、野生乳酸菌によるMLFが終了するまでにpH3.5以上のワインで6週間以内に終了するが、pH3.5以下のワインでは12週間かそれ以上かかっている^{9)・10)}。大塚ら⁷⁾はMLF酵素反応はpH3.2~3.5ではほとんど阻害は無く、pH3.0で完全に阻害されたと報告している。このようにpHに対する影響は大きく、pH3.5以上のワインでは、MLFが終了したら、直ちにおりびきおよびろ過をする必要がある。これはMLFが終了し、pHが上昇する事により、多くの細菌や産膜酵母にとって生育し易い条件となり、汚染発生の危険があるためである。

温度との関係は、Peynaud⁶⁾はMLFの最適温度は25℃であるとしている。また大塚ら¹¹⁾はMLF菌を培養して集めたリンゴ酸適応洗浄菌体を果汁に添加した実験で、最適温度は15~20℃であると報告している。このようにワインの二次発酵における温度も影響

があり、低温（5～10℃）でもMLFは起こる事もあるが、長い期間を要する。従ってMLFを生起させるならアルコール発酵終了後は、ある程度高い温度（15～20℃）に置く必要がある。

アルコール濃度との関係について、Peynaud⁶⁾ はアルコール10～13.5%の間では影響がないとし、野々村ら¹²⁾ は甲州果もろみでは13%以上で阻害されるとした。また、大塚ら¹¹⁾ のMLF酵素反応試験では6%までは影響がなく、以後アルコールの増加とともに強く阻害を受け、17%以上で完全に阻害された。このようにアルコール濃度との関係は、ワインの最終アルコール濃度（9～13%）ではあまり影響はないが、一般に乳酸菌は低濃度でよく生育する。

MLF菌の生育因子として発酵後のオリ中の酵母の自己消化物、トマトジュース、Mn⁺やフルクトースなどが有効であると言われている。Amachiら¹³⁾ はトマトジュースからMLF菌である *Leuconostoc* sp. の生育因子の分離を行い、4'-O-(β-D-glucopyranosyl)-DL-pantothenic acidが生物活性をもち、0.05 μg/mlで有効なことを報告した。

また、仕込みの方法によってもMLFの生起に差がみられ、果皮との発酵期間（かもし発酵）が3日の場合はMLFが生起せず、5日の場合には完全に終了すると報告している¹⁴⁾。さらに、MLF菌との生育因子との関係で、発酵後のオリ引きが遅いときにMLFが生起するが、オリ引きが早い時にはMLFの生起が遅れたり、起こらない事が見られるとの報告がある^{14)・15)}。

また、MLFの生起はブドウの品種によって異なる。一般に赤ワインは白ワインに比べて生起しやすいとの報告がある¹³⁾。野々村らはミルズ>マスカット・ベリーA、ブラック・クイーン>メルロー>デラウェア>レッドミレニウム>甲州の順にMLFが生起し易いことを報告している¹²⁾。著者は当研究施設のワインの試験醸造において、天候がよくブドウの状態が健全化のもので仕込みを行ったときは、乳酸菌が少なくMLFは生起せず、天候が悪くブドウの損傷化が激しいときは、初発の乳酸菌が多くMLFは生起したという結果を得ている。このように、ブドウの健康状態も大きな要因となる。

7. MLFの防止について

気候の温暖な酸度の低いワインではMLFが起こりやすく、酒質を低下させることからMLFの防止が必要となっている。MLFの防止は前述の促進とは逆に亜硫酸添加やアルコール発酵終了後のおり引きと澄清化を早くすることである。野々村によれば甲州種果もろみではアルコール13%、亜硫酸100ppm、早期おりびきの3つの条件の内、1つの条件が満たされればMLFの自然発生を防止できるという。また約20年前フマル酸添加によ

るMLF菌の生育阻害の研究がカリフォルニアで行われていたが、所用コスト、阻害メカニズムがはっきりせず、また化学物質の添加が望ましく無いことなどから、現在ではあまり使用されていない。

以上のように、MLFを起こさせないためには、使用する亜硫酸の濃度を高めればよいと思われる。しかし、過度の亜硫酸添加は、製品の品質を低下させるので多くとも100 ppm 前後がよいと考えられる。

8. L-リンゴ酸分解能測定について

優良なMLF菌を探す目的でL-リンゴ酸分解能を調べるが、この測定培地組成は、研究者によって異なり、それには、培地¹⁷⁾、培地および果汁¹⁸⁾、果汁¹⁹⁾、果汁にYeast ex.を加えた培地¹⁴⁾、ワイン²⁰⁾など多くの測定培地がある。望ましくは一定の条件下において測定し、比較する必要がある。そこで、著者らはMLF測定の諸条件の検討を行い、L-リンゴ酸分解能を測定したので報告する²¹⁾。合成培地、果汁、殺菌ワインおよびワインの4つの試験培地についてL-リンゴ酸を添加してL-リンゴ酸分解能の測定を行った。その結果を表1、表2に示す。使用した菌株は、リンゴ酸分解能の高い順に Leu. dextranicum var. vinarium、Leu. oenos、L. plantarum、L. brevis var. otakiensis である^{16)・20)}。リンゴ酸分解能がないとされる L. brevis var. otakiensis において、BM培地でL-リンゴ酸分解能があった。L. plantarum については、殺菌したワインでは分解能が高かったが、果汁培地、ワイン培地では分解能がなかった。Leu. oenos ではワイン培地について低い分解能であったが、そのほかの培地において高い分解能を示していた。Leu. dextranicum var. vinarium は、すべての培地において高い分解能がみられた。著者は、以上の結果から測定培地を変えることによって、活性が異なることから、測定培地については一定の同一条件で測定する必要があると考え、赤ワインにL-リンゴ酸を無菌的に添加したワイン培地をL-リンゴ酸分解能測定培地とした。

以上、MLF能、MLFに対する各種要因、MLFの防止、L-リンゴ酸分解能測定について説明を行った。次回(最終回)は、MLFスターターカルチャーの利用および試験醸造などの実際のワイン醸造への応用について説明を行う。

表1 MLF ability of lactic acid bacteria
in BM medium and MBA juice

Strain number	Malic acid degradation(%)			
	BM medium		MBA juice	
	1	3	3	5days
" <u>Leu. dextranicum</u> var. <u>vinarium</u> "	94	96	62	72
<u>Leu. oenos</u> JCM 6125 ^T	35	96	79	81
<u>L. plantarum</u> 91PN-S-2-4	N	N	12	14
" <u>L. brevis</u> var. <u>otakiensis</u> "	37	38	0	0

N: No test

表2 MLF ability of lactic acid bacteria
in sterilized wine and MBA wine 1991

Strain number	Malic acid degradation(%)			
	Sterilized wine		MBA wine	
	3	5	3	5days
" <u>Leu. dextranicum</u> var. <u>vinarium</u> "	35	55	45	59
<u>Leu. oenos</u> JCM 6125 ^T	56	N	25	27
<u>L. plantarum</u> 91PN-S-2-4	43	44	3	22
" <u>L. brevis</u> var. <u>otakiensis</u> "	0	4	0	0

N: No test

参 考 文 献

1. G. Caspritz and F.Radler, J.Biol.Chem.,**258**,4907 (1983)
2. A.C.Rice and L.R.Mattick, Am.J.Enol.Vitic.,**21**,145 (1970)
3. D.J.Cox and T.Henick-kling. J.Bacteriol.,**171**,5750 (1989)
4. E.B.Olsen, J.B.Russel and T.Henick-kling, J.Bacteriol.,**173**,6199 (1991)
5. S. Lafon-Lafourcade, E. Carre, P. Ribereau-Gayon, Appl. Environ. Microbiol.,**46**,874 (1983)
6. M.E.Peynaud,Am.J.Enol.Vitic.,**7**,150 (1956)
7. Carr,J.G., P.A.Davies, and A.H.Sparks. J.Appl.Bacteriol.,**40**,201 (1976)
8. Bousbouras, G.E., and R.E.Kunkee, Am.J.Enol.Vitic.,**22**,121 (1971)
9. Castino,M.,L.Usseglio-Tomasset, and A.Gandini. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. J.G.Carr, C.V.Cutting, and G.C. Whiting (Eds.). pp139-148 . Academic Press,London (1975)
10. Costello,P.J., G.Morrison,T.H.Lee, and G.H.Fleet. Food Technol.Aust.,**35**,14 (1983)
11. 大塚謙一、原 昌道 : 醸協、**58**,727 (1963)
12. 野々村英夫、小原巖、加々美久、風間敬一 : 醸協、**58**,743 (1963)
13. T.Amachi, S.Imamoto, H.Yoshizumi, Agric.Biol.Chem. , **35**,1222 (1971)
14. R.B.Beelman and J.F.Gallander, Am.J.Enol.Vitic.,**21**,193 (1970)
15. C.J.van Wyk, Am.J.Enol.Vitic.,**27**,181 (1976)
16. H.Nonomura, Y.Ohara, Mitt.Klosterneuburg,**17**,449 (1967)
17. Y.Chalfan, I.Goldberg, R.I.Mateles, J.Food.Science,**42**,939 (1977)
18. 野々村英夫、小原巖、加々美久、風間敬一 : 醸協、**59**,513 (1964)
19. 舟橋 章、伊藤文雄 : 雪印乳業技術研究所研究報告、**95**,93 (1991)
20. J.Silver and T.Leighton, Am.J.Enol.Vitic.,**32**,64 (1981)
21. 柳田未発表