

〔研究報文〕

乳酸菌によるL-リンゴ酸分解能の測定方法について

柳田藤寿*¹⁾、篠原 隆¹⁾、後藤昭二²⁾

¹⁾ 山梨大学工学部発酵化学研究施設、〒400 甲府市北新1丁目13-1

²⁾ 東京農業大学、〒156 東京都世田谷区桜丘1丁目1-1

Optimal Conditions for Measuring L-malic Acid Degradation
by Lactic Acid Bacteria.

Fujitoshi YANAGIDA*¹⁾, Takashi SHINOHARA¹⁾, and Shoji GOTO²⁾

¹⁾ Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, 13-1, kitashin
1-chome, Kofu 400, Japan

²⁾ Tokyo University of Agricultural Chemistry, 1-1, Sakuragaoka 1-chome,
Setagaya-ku 156, Japan

緒 論

赤ワイン醸造における乳酸菌によるマロラクティック発酵 (MLF) は、赤ワイン中に含まれるL-リンゴ酸を乳酸に分解する。このMLFは、酸味の低減や良好な風味を形成するという面から重要である。我々は、L-リンゴ酸を効率よくL-乳酸に分解する、優良MLF菌を検索する目的で、L-リンゴ酸分解能を調べた。その測定方法は研究者によって異なり、乳酸菌培養には、培地(1)、培地および果汁(2)、果汁(3)、果汁にYeast ex.を加えた培地(4)、ワイン(5)など多くの測定培地が使用された。従って、多くの乳酸菌株から、優良MLF菌を検索するには、一定の条件下においてL-リンゴ酸分解

能を測定し、比較する必要がある。そこで我々はMLF測定の試験培地および諸条件の検討を行い、好適と思われるL-リンゴ酸分解能測定法を見出したので報告する。

材料と方法

1. 供試乳酸菌菌株

Leuconostoc oenos JCM 6125^T (T: Type strain) の基準株1株、野々村により(6、7、8)ワインから分離された乳酸菌“*Lactobacillus brevis* var. *otakiensis*” No. 4、“*Leuconostoc dextranicum* var. *vinarium*” No. 7の2株、著者らがワインより分離同定した*Lactobacillus plantarum* 91 PN-S-2-4の1株、および市販のマロラクティックスターターLALVINから分離した乳酸菌の計5菌株を供試した。

*連絡先 Corresponding author.

2. L-リンゴ酸分解能測定培地の調製

① 合成培地 ワインの製造工程中から乳酸菌分離に用いる BM 培地中の DL-リンゴ酸の代わりに L-リンゴ酸を 5 g/L になるように加えて用いた。

② MBA 果汁 1991年度当研究施設育種試験地で栽培されたマスカット・ベリー A (MBA) の压榨果汁 (赤) を 90°C、10 min 殺菌したものをを用いた。なお、MBA 果汁の成分は、糖度 18.6%、L-リンゴ酸 2.32 g/L、pH 3.85 であった。

③ 殺菌ワイン 1991年度当研究施設で醸造したマスカット・ベリー A (MBA) 赤ワイン (以下 91年度 MBA 赤ワインとする) に L-リンゴ酸を 5 g/L になるように加え、121°C、15 min にて殺菌を行ったものをを用いた。なお、91年度 MBA 赤ワインの一般分析結果は、アルコール 11.0%、エキス 2.16%、pH 3.85、総酸 5.41 g/L、揮発酸 0.33 g/L、総亜硫酸 46 mg/L、L-リンゴ酸 0.47 g/L であった。

④ 91年度 MBA 赤ワイン 上記 91年度 MBA 赤ワインに L-リンゴ酸を 5 g/L になるように 0.2 μm のメンブランフィルター (ゲルマン社製) にて無菌的に加え、pH が低下したものを 2 N NaOH にて pH を 3.5 に調整したものをを用いた。なお、果汁およびワインの一般分析は、所定の方法 (10) に従った。

3. 培養方法

供試菌株は BM 培地 (9) で 30°C、2 日間前培養を行った後、各試験培地 5 mL にパスツールピペットで 2 滴 (約 10^7 cells/mL) 接種した。いずれも培養は 30°C にて行った。

4. L-リンゴ酸分解に影響する各種要因の検討

① 培養温度の影響

91年度 MBA 赤ワインに L-リンゴ酸を 5 g/L になるように 0.2 μm のメンブランフィルター (ゲルマン社製) にて無菌的に加えた培地を用い、供試菌株を接種後 12.5°C、18°C、20°C、30

°C の各培養区で 5 日および 14 日間培養し、各培養区における L-リンゴ酸分解を測定した。

② pH および亜硫酸の影響

91年度 MBA 赤ワインに L-リンゴ酸を 5 g/L になるように無菌的に加え、2 N NaOH にて pH を 3.0、3.5 に調整した。それぞれに、6% 亜硫酸水を 100 ppm なるように 0.2 μm のメンブランフィルター (ゲルマン社製) を用いて無菌的に加えた培地と亜硫酸無調整 (対照区、亜硫酸 46 ppm) の培地を用い、供試菌株を接種後、18°C で 7 日および 14 日間培養し、各試験区における L-リンゴ酸分解を測定した。

なお、すべての試験および測定は、1 回の測定結果である。

5. L-リンゴ酸分解能の測定方法

試験培地に乳酸菌を接種して、培養したものを、経時的にサンプリングした。試料は、1.5 mL サンプリングし、1.8 mL 用マイクロチューブで遠心分離した上清を用いた。上清液中の L-リンゴ酸は、検体 1 mL に蒸留水 4 mL、2 N NaOH 4 mL をテフロンスクリューキャップ付き試験管 (13×100 mm) に採り混合した後、ヒートブロック TA-2 H (Taiyo 社製) を用いて 100°C、30 分間加水分解を行った。分解終了後、分解液を室温に戻し、2 N 硫酸にて中和し、50 mL のメスフラスコにとり定容した。この液 0.1 mL を試料とし、ベーリンガー・マンハイム山之内社製 F-キット・L-リンゴ酸にて測定を行った。これより以下の式により分解率を求めて、L-リンゴ酸分解能 (MLF 能) として表した。

分解率 (%) : (培養前の L-リンゴ酸量 - 培養後の L-リンゴ酸量) / 培養前の L-リンゴ酸量 × 100

実験結果および考察

1. 合成培地および MBA 果汁での L-リンゴ酸分解試験

Table 1 に示した結果より合成培地の BM 培地において JCM 6125、No. 7 は 3 日間で 96% と高い分解活性があった。No. 4 は、野々村により甲州種の果もろみ (pH 3.30) に 2% 接種し、L-リンゴ酸分解活性がないとの報告 (6) がある株であるが、3 日間で 38% の L-リンゴ酸分解活性があった。このように本合成培地において、甲州種の果もろみ中で活性のない株に分解活性が見られた事は、L-リンゴ酸の分解能測定には適切ではないと判断した。

MBA 果汁において JCM 6125、No. 7 は 5 日間でそれぞれ 81%、72% と高い分解活性があっ

た。野々村は、No. 4 の菌株に対して甲州種の果もろみ (pH 3.30) に供試菌株の培養液 2% を接種して MLF 活性の測定を行い、ほとんど活性がないと報告した (6)。今回、同株は MBA 果汁においても L-リンゴ酸分解活性が全くなかった。

我々の分離株 91N-S-2-4 は 5 日目において 14% と弱い分解活性しかなかった。

従って、MBA 果汁は L-リンゴ酸の分解能測定に適切でないと判断した。

2. 殺菌ワインおよび 91 年度 MBA 赤ワインでの L-リンゴ酸分解試験

Table 2 に示した結果より殺菌ワインにおいて JCM 6125、No. 7 は 3 日間で 56%、5 日間で 55% の分解活性があった。分離株 91PN-S-2-4

Table 1. MLF ability of lactic acid bacteria in BM medium and MBA grape juice.

Strain number	Malic acid degradation ability (%)			
	BM medium		MBA grape juice	
	1	3	3	5 days
" <i>Leu. dextranicum</i> var. <i>vinarium</i> " No.7*	94	96	62	72
<i>Leu. oenos</i> JCM 6125 ^T	35	96	79	81
<i>L. plantarum</i> 91PN-S-2-4	N	N	12	14
" <i>L. brevis</i> var. <i>otakiensis</i> " No.4*	37	38	0	0

N : Not tested

T : Type strain

MBA : Muscat Bailey A

* : Isolated by H. Nonomura

Table 2. MLF ability of lactic acid bacteria in sterilized wine and MBA red wine 1991.

Strain number	Malic acid degradation ability (%)			
	Sterilized wine		MBA red wine	
	3	5	3	5 days
" <i>Leu. dextranicum</i> var. <i>vinarium</i> " No.7	35	55	45	59
<i>Leu. oenos</i> JCM 6125 ^T	56	N	25	27
<i>L. plantarum</i> 91PN-S-2-4	43	44	3	22
" <i>L. brevis</i> var. <i>otakiensis</i> " No.4	0	4	0	0

N : Not tested

は5日目で44%のL-リング酸分解活性があり、No. 4は5日目で4%の分解活性であった。

91年度 MBA 赤ワインにおいて No. 7は5日目で59%と高い分解活性があった。JCM 6125、分離株 91PN-S-2-4は5日目で、それぞれ27%、22%のL-リング酸分解活性があった。No. 4に関しては、L-リング酸分解活性が全くなかった。通常の赤ワインでの活性は、殺菌ワインより低かった。すなわち分離株 91PN-S-2-4は5日目において22%の分解活性しかなく、JCM 6125、No. 7はMBA 果汁培地よりも、低い分解活性であった。殺菌ワインはブドウ果汁よりワインに近い成分組成と考えられるが、殺菌(121°C、15 min)によるタンパク変性など、多少組成の異なるものである。事実、オートクレーブ殺菌により沈殿物がみられ、アルコールは11%から3%に、総亜硫酸も46 ppmから25 ppmに減っていた。この環境下で高いMLF能があっても、実際のワイン中で生育してMLFを行うことができるのか疑問である。供試ブドウ果汁にはアルコールおよび亜硫酸は含まれておらず、乳酸菌にとって殺菌ワインおよび赤ワインより生育しやすい環境であった。実際の赤ワイン中でL-リング酸分解能を調べる必要があると考えた。

以上のように、より簡便に優良MLF菌を検索する目的で、4つの培地を用いて、L-リング酸分解能を調べた。その結果合成培地、ブドウ果汁、殺菌ワイン中で良好な分解能を示しても実際のワイン醸造中のMLF能は不明である。そこで、次に、91年度 MBA 赤ワインを用いて諸条件の検討を行った。

3. 91年度 MBA 赤ワインを用いた各培養温度でのL-リング酸分解試験

上記のL-リング酸分解試験では、乳酸菌の最適生育温度の30°Cにおいて活性の測定を行った。しかし、実際のワイン醸造においてMLFは15°C~18°Cで発生させ、さらにはそれ以下の温度域が重要である。そこで12.5°C~30°Cにおいて

のL-リング酸分解能を91年度 MBA ワイン培地を用いて調べた結果をTable 3に示した。

12.5°C区の5日目では、JCM 6125を除いた他の3株の分解率は0%であった。また、14日目では、分離株 91PN-S-2-4を除き、約30%の分解活性を示した。

18°C区の5日目でNo. 7、LALVINは低い活性であった。18°C、20°C、30°C区の14日目では38~70%の分解率であり、菌株により差が認められた。

以上のように、12.5°Cの低温区において菌株によって大きな差が見られた。18°C区で差が見られ、20°Cおよび30°C区において差が小さかったことから、L-リング酸分解能測定は乳酸菌生育適温の30°Cではなく、実際のワイン醸造である18°Cを測定用の温度とした。

MLFの温度について、Peynaud (11)はMLFの最適温度は25°Cとした。また、大塚ら(12)はMLF菌を培養して集めたリング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°Cであると報告した。以上のことから18°Cを適温と考えた。

4. 91年度 MBA ワインを用いた pH および総亜硫酸濃度の違いによるL-リング酸分解試験

pH および亜硫酸濃度の影響について試験した結果をTable 4に示した。pH 3.0において、L-リング酸分解活性は、ほとんどの菌株において低い活性であったが、JCM 6125の46 ppmの14日目において13%、LALVINにおいては全ての条件において10%~14%の分解活性が見られた。また、pH 3.5の亜硫酸46 ppmにおいては、すべての株にL-リング酸分解活性が見られた。しかし、亜硫酸100 ppmでは活性がなかった。

MLF生起にとってpHは重要な因子の1つであるが、pH 3.3~3.5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(13)。Peynaud (11)はMLF菌の最適増殖pHは4.1~4.5であり、pH 3.0以下において

Table 3. MLF ability of lactic acid bacteria in MBA red wine incubated at different temperatures.

Strain number	Incubation temp. (°C)			
	12.5	18	20	30
	5 ^{b)} 14	5 14	5 14	5 14
" <i>Leu. dextranicum</i> var. <i>vinarium</i> " No.7	0 32 ^{a)}	3 58	45 61	57 60
<i>Leu. oenos</i> JCM 6125 ^T	23 32	37 53	49 61	47 59
<i>L. plantarum</i> 91PN-S-2-4	0 0	23 38	23 41	24 40
LALVIN	0 30	4 65	46 70	48 70

a) : MLF ability (%).

b) : Days incubated.

Table 4. MLF ability of lactic acid bacteria in MBA red wine with different total sulfur dioxide concentrations and pH.

Strain number	Malic acid degradation ability (%)			
	pH 3.0		pH 3.5	
	46 ^{a)}	100	46	100
	7 ^{b)} 14	7 14	7 14	7 14
" <i>Leu. dextranicum</i> var. <i>vinarium</i> " No.7	4 7	5 5	45 47	0 23
<i>Leu. oenos</i> JCM 6125 ^T	0 13	0 0	33 64	0 0
<i>L. plantarum</i> 91PN-S-2-4	N ^{c)} N	N N	23 33	N N
LALVIN	10 14	12 14	12 68	11 20

a) : SO₂(ppm).

b) : Days incubated.

c) : Not tested.

MLFが生起しないと報告した。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pH 3.5以上のワインで6週間以内に終了するが、pH 3.5以下のワインでは12週間かそれ以上要した(14、15)。大塚ら(12)はMLF酵素反応がpH 3.2~3.5でほとんど阻害されないが、pH 3.0で完全に阻害されたと報告した。このようにpHに対する影響は大きい。今回の結果からpH 3.5をL-リング酸分解測定用培地のpHとした。

総亜硫酸濃度の影響について、100 ppm区ではすべての株が、46 ppmより分解活性が低下した。JCM 6125は、pH 3.0およびpH 3.5の100 ppmにおいて活性は全くみられなかった。

果もろみへの過度の亜硫酸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(10⁶ cells/mL)(16)に達しないなどの影響を及ぼす。また、Lafon-Lafourcadeら(17)は、亜硫酸50 ppmの添加により、貯蔵200日でもMLFが生起しないと報告した。Peynaud(11)はMLFが亜硫酸100~150 ppmで起こらないとした。阻害を及ぼす亜硫酸量は約30~50 ppmである。しかし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(18)。今回の結果から亜硫酸46 ppmをL-リング酸分解測定

用培地の亜硫酸濃度とした。

以上の結果より、91年度 MBA 赤ワインに L-リング酸を 5 g/L になるように 0.2 μm のメンブランフィルターで無菌的に加え、2 N NaOH にて pH を 3.5 に調整し、総亜硫酸濃度を約 46 ppm にした培地を L-リング酸分解活性測定用培地とした。また分解活性は、乳酸菌を前培養し、前述の培地に接種して、18°C にて 14 日間培養を行い、分解した L-リング酸量から L-リング酸分解活性を求めた。

このことより、赤ワイン醸造における優良 MLF 菌を検索するための L-リング酸分解能測定法を見い出した。

要 約

各種培地および培養温度、pH、亜硫酸などの諸条件において、乳酸菌による L-リング酸分解能の測定を行った。合成培地、MBA 果汁、殺菌ワイン、91年度 MBA 赤ワインの 4 つの培地を用いて検討したところ、91年度 MBA 赤ワインにおいて MLF 菌の検索に良好な培地であることを見い出した。

12.5°C、18°C、20°C、30°C の温度において分解活性測定したところ、20°C、30°C では多くの株に分解活性が見られ、12.5°C では菌株によって低い活性であって大きな差が見られた事から、18°C を培養温度とした。pH および総亜硫酸濃度の影響について、低 pH および高亜硫酸濃度で分解活性阻害が見られた。

以上の結果より、91年度 MBA 赤ワインに L-リング酸を 5 g/L になるように 0.2 μm のメンブランフィルターで無菌的に加え、pH を 3.5 に調整し、総亜硫酸濃度を約 46 ppm にした培地を用いて、18°C にて 14 日間培養を行ったときの測定値を L-リング酸分解活性とした。このことより、赤ワイン醸造における優良 MLF 菌を検索するための L-リング酸分解能測定法を見い出した。

謝 辞

最後に、本研究遂行に当たり実験にご協力賜りました鎌田勉君に感謝いたします。

文 献

1. Chalfan, Y., I. Goldberg, and R. I. Mateles. Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from israel red wines. *J. Food Sci.* 42:939-968 (1977).
2. 野々村英夫、小原 巖、加々美 久、風間敬一、ブドウ酒のマロラクチック発酵に関する研究 (第 3 報)、*日本醸造協会誌*、59 : 513-516 (1964).
3. 舟橋 章、伊藤文雄、マロラクティック発酵に関する研究—マロラクティック発酵乳酸菌の選択と醸造への応用—、*雪印乳業技術研究所研究報告*、95 : 93-112 (1991).
4. Beelman, R. B., and J. F. Gallander. The effect of grape skin treatments on induced malo-lactic fermentation in Ohio wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21:193-200 (1970).
5. Silver, J., and T. Leighton. Control of malolactic fermentation in wine. 2. isolation and characterization of a new malolactic organism. *Am. J. Enol. Vitic.* 32:64-72 (1981).
6. 野々村英夫、小原 巖、本邦産ブドウ酒のマロラクティック発酵、*日本醸造協会誌*、65 : 868~872 (1970).
7. Nonomura, H., T. Yamazaki, and Y. Ohara. Die Apfelsaure-Milchsaure-Bakterien, welche aus japanischen Weinen isoliert wurden. *Mitt. Klosterneuburg.* 14A:241-254 (1965).
8. Nonomura, H., and Y. Ohara. Die Klassifikation der Apfelsaure-

- Milchsaure-Bakterien. Mitt. Klosterneuburg. 17:449-465 (1967).
9. 柳田藤寿、鎌田 勉、篠原 隆、後藤昭二、赤ワイン仕込経過中に分離された野生乳酸菌の同定、日本醸造協会誌、88 : 238-244 (1993).
 10. 注解編集委員会編 : 国税庁所定分析法注解 (1984).
 11. Peynaud, M. E. New information concerning biological degradation of acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 7: 150-156 (1956).
 12. 大塚謙一、原 昌道、マロラクチック発酵に関する研究 (第1報) 外的条件の影響について、日本醸造協会誌、58 : 727-730 (1963).
 13. Bousbouras, G. E., and R. E. Kunkee. Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22:121-126 (1971).
 14. Castino, M., L. Usseglio-Tomasset, and A. Gandini. In : *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. J. G. Carr, C.V. Vutting, and G.C. Whiting (Eds.). pp.139-148. Academic Press, London (1975)
 15. Costello, P.J., G. Morrison, T. H. Lee, and G. H. Fleet. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.* 35:14-18 (1983).
 16. Rice, A. C., and L. R. Mattick. Natural malo-lactic fermentation in New York State wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21:145-152 (1970).
 17. Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribereau-Gayon. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:874-880 (1983).
 18. Carr, J. G., P. A. Davies, and A. H. Sparks. The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *J. Appl. Bacteriol.* 40:201-212 (1976).

ABSTRACT

Optimal conditions for measuring L-malic acid degradation by lactic acid bacteria.

Fujitoshi YANAGIDA*¹⁾, Takashi SHINOHARA¹⁾, and Shoji GOTO²⁾

¹⁾ Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, 13-1, Kitashin 1-chome, Kofu 400, Japan

²⁾ Tokyo University of Agricultural Chemistry, 1-1, Sakuragaoka 1-chome, Setagaya-ku 156, Japan

The present study investigated the optimal conditions for measuring L-malic acid degradation by lactic acid bacteria by manipulating the medium, temperature, pH, and total sulfite level. Four medias were used: a synthetic medium, Muscat Bailey A (MBA) grape juice, sterilized wine, and 91 MBA red wine. Of these, the most active degradation was found in the 91 MBA red wine medium. The experiment was conducted at 12.5°C, 18°C, 20°C, and 30°C. Significant degradation was observed at both 20°C and 30°C. However, little activity was seen at 12.5°C. Based on the large difference in temperature between 20°C and 12.5°C, 18°C was chosen as the cultivation temperature. Degradation activity was inhibited at a low pH and high total sulfite level. These results indicate that the degree of L-malic acid degradation by lactic acid bacteria can be most accurately determined under the following conditions: 91 MBA red wine medium with 5 g/l germless L-malic acid passed through a 0.2 μ m membrane filter, pH adjusted to 3.5 using 2N NaOH, total sulfite level of 46 ppm, and a cultivation temperature of under 18°C for 14 days.

Key words : Malolactic fermentation, Lactic acid bacteria, Red wine