

[連載講座]

ワイン醸造環境における酵母相及び
有用酵母株の選択育種

山梨大学発酵化学研究施設 篠原 隆

ワイン(葡萄酒)はブドウを原料として醸造される。熟期のブドウには糖分が15~25%含有され、それは主にグルコースとフルクトースである。これらの糖質は微生物が容易に摂取、利用できる。従って、収穫した原料ブドウがワイナリー(ワイン醸造場)に搬入され、破碎・圧搾して得られた果汁では、直ちに微生物が増殖して自然発酵が起こる。通常、ブドウ果実自体に野生微生物が生息しており、また、収穫容器、仕込み設備などに付着した微生物がその果もろみに移行する。この様にワインの発酵工程は、微生物の影響を受けやすい環境下であり、野生微生物の制御ならびに優良酵母や乳酸菌などの有用微生物の利用が重要な課題である。ここに当研究室で進めているワイン酵母の選択と育種研究について紹介する。なお、ワ

イン酵母の特性および育種に関する総説が既にあるので参考にされたい^{1,2,3)}

1. ワイン醸造工程と関与する微生物

ブドウ原料から製品に至るまでの醸造工程と作業および関係する微生物を表1に示す。

収穫ブドウの段階では、野生微生物として酵母、乳酸菌、酢酸菌、黴などが生息しており、アルコール発酵からマロラクティック発酵に関与している。これらの発酵工程においては、一般に酒母あるいはスターターが使用される。しかし、伝統的なワイナリーでは、自然発酵法を実施する場合があります。そのときの果もろみの酵母相あるいは乳酸菌相の制御が必要である。

ワインの熟成、貯蔵および瓶詰した製品の貯蔵

表1 ワイン醸造工程と関係する微生物

醸造工程	作業・管理	関係する微生物
ブドウ ↓	収穫・搬入 :	健全果/腐敗・損傷果/貴腐果 野生酵母, 乳酸菌, 酢酸菌, カビなど
アルコール発酵 ↓	仕込み : 発酵管理 :	自然発酵/酒母添加 野生酵母あるいは優良ワイン酵母の利用
マロラクティック発酵 ↓	発酵管理 :	野生乳酸菌/スターター乳酸菌の添加
貯酒, 熟成 ↓	変敗防止 :	微生物汚染 再発酵, 産膜形成, 微生物混濁など
製品	品質管理 :	微生物混濁, コルクカビ

表2 ブドウ果実に分布する野生酵母

	ブドウ試料*										
	Niagara		Chardonnay		Zenkoji			Koshu			
	N-1	N-2	C-1	C-2	Z-1	Z-2	Z-3	K-1	K-2	K-3	K-4
全菌数(×10 ³ cfu/ml)	990	1100	1.4	110	2.3	6.0	240	0.25	510	0.07	0.45
菌群および菌種の分布比率(%)**											
K. A.											
<i>K. apiculata</i>	—	100	—	—	—	—	76	100	100	78	—
<i>H'spora occidentalis</i>	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C. R.											
<i>Cr. albidus</i>	—	—	—	—	15	20	—	—	—	10	70
<i>Cr. laurentii</i>	6	—	70	75	40	30	4	—	—	12	30
R.											
<i>R. glutinis</i>	—	—	30	17	—	50	—	—	—	—	—
<i>R. minuta</i>	—	—	—	—	9	—	—	—	—	—	—
O. A.											
<i>C. pulcherrima</i>	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. steatolytica</i>	—	—	—	—	—	—	20	—	—	—	—
<i>Candida sp.</i>	—	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—
O. B.											
<i>Candida sp.-1</i>	—	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—
<i>Candida sp.-2</i>	4	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—

* ブドウ採取地： N-1,2: 長野県塩尻市; C-1,2: 長野県小諸市; Z-1,2,3: 長野県小諸市; K-1,2: 山梨県甲府市; K-3,4: 山梨県勝沼町。1990年9-10月。

** 菌群および菌種： K. A.: apiculate yeasts; C. R.: *Cryptococcus* species; R.: *Rhodotorula* species; O. A.: other ascomycetous yeasts; O. B.: other basidiomycetous yeasts; K.: *Kloeckera*; *H'spora*: *Hanseniaspora*; *Cr.*: *Cryptococcus*; *R.*: *Rhodotorula*; *C.*: *Candida*.

の段階では、酸化および微生物汚染の防止が課題である。さらに、ワインセラー内の湿度と温度条件によっては、ワインコルクやラベルに黴の生えることがある。これは外見を損なうだけでなく、ワインの風味を害する危険があり、セラー内を換気して黴発生を防止する。

2. ブドウ果実由来の野生酵母

収穫されたブドウの熟度と健全性は、微生物相に大きく影響している。健全な果実であれば、そこに生息する微生物数は少ないが、病害果のあるときに著しく菌数が増加する。筆者ら⁴⁾が山梨県および長野県のブドウ畑で採取して調査した結果を表2に示す。健全果の場合、100～6,000 cfu/ml・果汁の酵母数であった。しかし、病害果の場合、110,000～1,100,000 cfu/ml・果汁であり、健全果に比較して、100～1000倍の菌数増加がみ

られた。

これらのブドウから分離された野生酵母の主要なもの、*Kloeckera apiculata*, *Cryptococcus* 属、*Rhodotorula* 属および *Candida* 属酵母であった(表2)。これらの酵母は、一般的にブドウ果実に分布するものである。これら野生酵母268株のうち68株がキラー活性を有し、そのうち16株が *Saccharomyces cerevisiae* に対してキラー性を示した³⁾。

しかし、この研究段階では *S. cerevisiae* が分離されなかった。このとき野生酵母の分離にはYM培地を使用し、好氣的条件下で行った。

次に *S. cerevisiae* 野生株の分離を目的として、選択培地を用い嫌氣的条件下で集積培養を行った。ブドウなどの果実、果汁、压榨粕などの87試料から34株が分離された。その経過を表3に示す。これらの分離株の間にはエタノール生成、銅耐性、

表3 ブドウ果実などの分離源と分離菌株数

分離源	試料数*	分離酵母		
		<i>S. cerevisiae</i> **	その他	合計
ブドウ果実	35	12	4	16
ブドウ果もろみ	10	10	0	10
ブドウ粕	7	8	0	8
柿	15	2	1	3
その他の果実	20	2	0	2
合計	87	34	5	39

* 採取地：山梨県および近県，1992-1993年。

***S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*.

キラ活性などに差異がみられた⁵⁾。キラ活性が25株(分離菌株全体の74%)に検出された。その多くが複数のキラ活性を有し、キラタイプは13種に分かれた(表4)。酵母のキラはプラスミド由来のもの(K₁, K₂, K₃)と核遺伝子由来のもの(KHR, KHR)が知られる。今回、分離した*S. cerevisiae* 野生株にみられる広いキラスペクトルは、生物的多様性の一端を示すものとする。

その後、山梨県内の勝沼町、一宮町を中心に約600菌株の*S. cerevisiae* 野生株が分離されており、その出現の季節的変動およびその性質を調査した^{6,7)}。分離した396菌株のキラ性を調べたところ

171菌株(43%)が活性を有しており、そのうち*S. cerevisiae* 酵母に対してキラ性を示すものが61菌株(15%)あった。このように広範囲なキラ性野生酵母の分布は、ワイン醸造管理において注意すべきことである。現在、これらの野生酵母の醸造学的性質を検討中である。

3. 優良ワイン酵母の選択と使用

上述のように、ブドウ果もろみには、原料果実および醸造環境に由来する野生酵母などが常在している。よって、自然発酵においては、健全なアルコール発酵の場合があり、また反対にアルコー

表4 分離した野生酵母のキラタイプ

キラタイプ	感受性酵母*							菌株数
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁₀	K ₁₁	OC2	0622	
Killer:								
T ₁	+	+	+	-	-	+	+	1
T ₂	+	+	+	-	-	-	-	1
T ₃	+	-	+	+	+	+	+	1
T ₄	+	-	+	-	+	+	+	3
T ₅	+	-	-	+	+	-	+	1
T ₆	+	-	-	-	+	-	+	1
T ₇	+	-	-	-	+	+	+	1
T ₈	-	-	+	-	-	-	+	1
T ₉	-	-	-	-	+	+	+	2
T ₁₀	-	-	-	-	+	-	+	9
T ₁₁	-	-	-	-	+	-	-	2
T ₁₂	-	-	-	-	-	+	+	1
T ₁₃	-	-	-	-	-	-	+	1

* 感受性酵母：標準キラ酵母, K_{1,2,3}: *S. cerevisiae* A8209, NCYC 1001, NCYC 761;

K₁₀: *Kluyveromyces drosophilum* NCYC 575; K₁₁: *C. glabrata* ATCC 15126;

OC2: *S. cerevisiae* IAM 4274; 0622, *C. glabrata* IFO 0622.

** キラ活性：+, 有り；-無し。

ル発酵の遅延、不快な臭味成分の生成などの危険がある。現在、ワイナリーの仕込みには選抜されたワイン酵母 (*S. cerevisiae*) を培養し、酒母として添加することが一般的である。ワイン酵母は、次の性質に優れた菌株が選択されて使用される。

ワイン酵母の選択基準

- アルコール発酵能／増殖能
- 糖類の発酵率
- 亜硫酸耐性
- 低温発酵性
- 芳香成分の生成能
- キラー活性
- リンゴ酸の生産性／分解性
- 凝集性／低泡性
- 酢酸などの不快香成分の低生成
- 良い風味の生成

日本のワイナリーで一般に使用されているワイン酵母として、次のものがある。

日本産酵母：

W-3 (山梨酵母／日本醸造協会 KW-4),
OC-2

日本醸造協会 KW-1, 2

外国産酵母：

Lalvin-V, 71B,
Uvaferm - CM, CS2
日本醸造協会 KW-3

酒母添加したブドウ果もろみにおける酵母相の推移について、図1に示す⁸⁾。酒母 (W-3 株) 添加区においては、酵母数が 10^5 cells/ml から 10^6 cells/ml となり、添加酵母の割合が約 95 % となった。それが速やかに増殖して、2日以降、98 ~ 100 % を占めるに至った。一方、自然発酵区における野生酵母群の大部分は、*Kloeckera* 属や *Candida* 属で占められた。*Saccharomyces* 属酵母の割合は発酵初期に約 1 % であったが、緩やかに増

加してゆき6日目で10%になり、9日目で約70%を占めた。自然発酵区は、酒母添加区より6日はど発酵が遅れた。酒母添加区における W-3 株の判別には、KHR キラーを利用した。

酒母の使用によって、健全で速やかなアルコール発酵と安定したワイン品質が保証される。酒母としては、優良酵母を液体培養してスケールアップしたもの、酒母添加して旺盛に発酵している果もろみ、および乾燥酵母を加水して活性化したものがあ

4. 有用菌株の選択と育種

ワイン酵母 W-3 株あるいは OC-2 株の醸造的性質の改変を試みた育種試験について述べる。

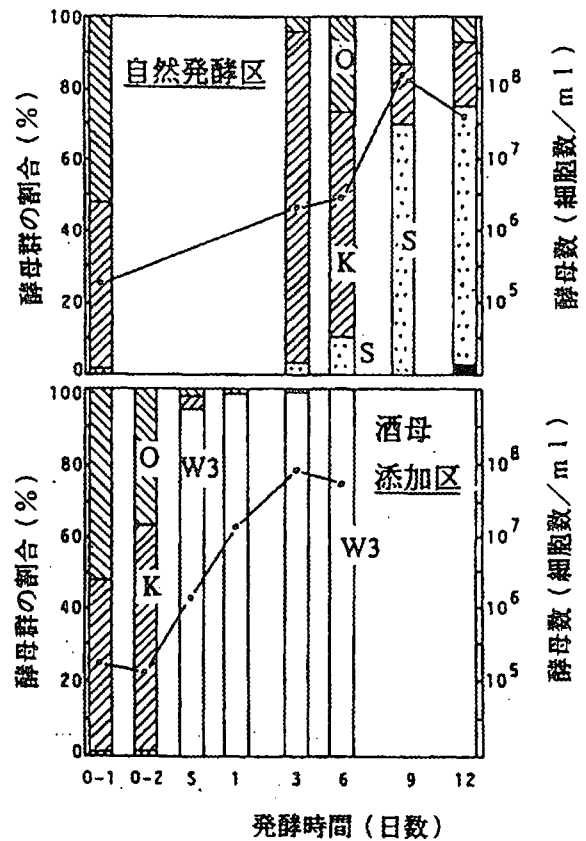


図1 アルコール発酵中の酵母相および酵母数の推移
酵母群：W3, ワイン酵母 W-3 株；
S., *Saccharomyces*；K., *Kloeckera*；
O., その他の酵母。
棒グラフ:酵母群の割合;折れ線グラフ:酵母数。

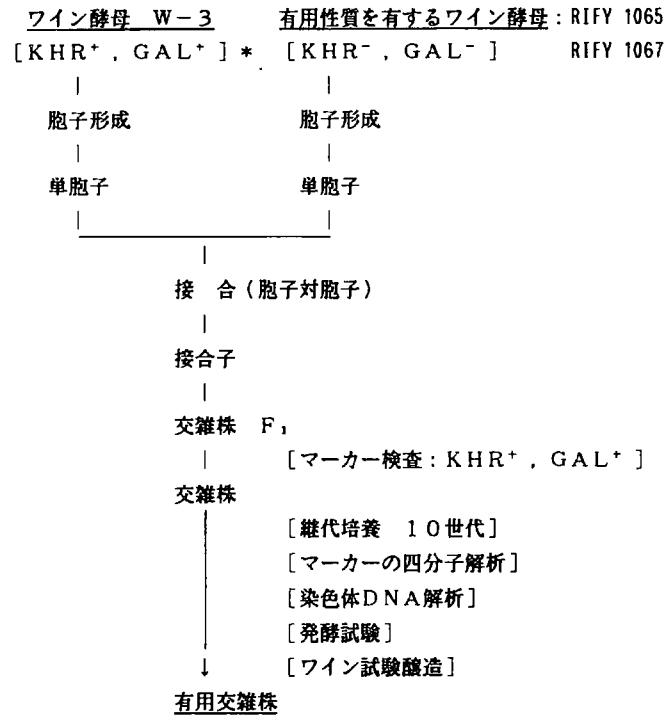


図2 ワイン酵母の育種プログラム.

* マーカ- : KHR キラー, ガラクトース資化性.

(1) 発酵速度および芳香成分生成能の改良⁹⁾

国産および外国産のワイン酵母31株について、アルコール発酵速度と亜硫酸耐性に基づき5グループに大別し、これより特徴のある16菌株を選択して小規模試験醸造を行って優良菌株6株を選抜した。その中から有用性質および交雑におけるマーカ-を有した2株を選び、W-3株との交雑試験に供した：すなわちRIFY1065株は脂肪酸エステル生成能に、また、RIFY1067株はアルコール発酵速度に優れたことから選択した。マーカ-はガラクトース資化性およびKHRキラーである。育種プログラムを図2に示す。二組の交雑組合せにおける各々300組の胞子対胞子接合試験から、安定した交雑株12株を得た。それらの発酵試験から各組合せの1株ずつを選抜して、小規模試験醸造を行った。試醸ワインの分析結果を表5に示す。交雑株(HY17-108, HY41-308)による試醸ワインは、高級アルコール、酢酸イソアミルおよび脂肪酸エチルエステルなどの芳香成分の高生成が認められ、

良好な酒質であった。しかし、発酵速度については親株(W-3, RIFY1067, 1065)との差がみられなかった。

(2) 凝集性の導入¹⁰⁾

凝集性は発酵後期の酵母おり下と清澄に関係する有用性質である。ワイン酵母173株および野生酵母74株の凝集性を調べた結果、強い凝集性を示したのはワイン酵母において1菌株であり、野生酵母で5菌株にとどまった。なお、供試菌株はすべて*S. cerevisiae*に属した。ワイン酵母2株(非凝集性, W-3株およびOC-2株)に凝集性を導入すべく、凝集性酵母3株(ABXL-1D, RIFY1029, RES-5)と接合により交雑した。交雑プログラムは上述の方法(図2)に準じた。有用な凝集性を示す交雑株が、W-3×RES-5(凝集性野生酵母)の組合せから取得された。交雑一代株WR-9とW-3株を戻し交雑して、交雑二代株WWR-2が造成された。ワインの小規模試

表5 ワイン酵母および交雑育種株*による試験醸造白ワインの成分値**

菌株	発酵日数	Al (%)	TA (g/L)	VA (g/L)	Ac	EA	HA (mg/L)	Ph (mg/L)	iAA	FE	FA	WQ
甲州ワイン 1991												
W-3	26	11.0	6.64	0.41	26	28	221	25	4.6	2.7	30.3	5
RIFY1067	24	11.0	6.56	0.65	32	59	138	42	2.5	3.2	34.8	4
HY17-108	24	11.0	6.43	0.32	27	55	223	45	4.8	3.3	36.1	4
RIFY1065	30	11.0	6.64	0.41	28	40	171	36	2.1	4.3	49.4	3
HY41-308	30	10.6	6.93	0.34	23	40	188	31	3.4	4.5	56.4	4

* 交雑株: HY17-108=W-3 x RIFY1067; HY41-308=W-3 x RIFY1065.

** ワイン成分: Al, アルコール; TA, 総酸; VA, 揮発酸; Ac, アセトアルデヒド; EA, 酢酸エチル; HA, 高級アルコール; Ph, 2-フェネチルアルコール; iAA, 酢酸イソアミル; FE, 脂肪酸エステル (脂肪酸C₆, C₈, C₁₀のエチルエステルの和); FA, 脂肪酸 (C₆, C₈, C₁₀の和)。WQ, ワインの品質評価: 5, 優; 4, 良質; 3, 平均的品質。

醸造において, WR-9株は両親株の中間的な凝集力と発酵速度を示し, WWR-2株は強い凝集力と親株であるW-3株と同等の発酵速度を示した(図3)。

(3) リンゴ酸生産性酵母およびリンゴ酸分解性酵母の選択と育種⁷⁾

ワイン酵母のリンゴ酸生成およびリンゴ酸分解の性質は, 発酵もろみの補酸あるいは減酸の工程を補完するための有用性質である。ワイン酵母105株および野生酵母470株の酸生成試験から180菌株を選択して, そのリンゴ酸生成と分解性を調べた。供試菌株はすべて*S. cerevisiae*に属した。リンゴ酸生産性株は25株であり, そのリンゴ酸生成量は0.6 g/L程度にとどまった。一方, リンゴ酸分解性株は155株と多く, その分解量は約2 g/Lに達した。そこでリンゴ酸生産性のより高い酵母株を造成するために, ワイン酵母3株(W-3, OC-2, YM-126)を変異処理して呼吸能欠損株を分離した。その呼吸能欠損変異株の多くはリンゴ酸生産性が改良されており, とくにYM-126由来の変異株が1-1.5 g/Lの生産性を示した(表6)。試験醸造により, それらの性質を検討中である。

(4) 低温発酵性酵母の選択¹¹⁾

低温発酵性は新鮮な果実香を保持し, また, 芳香性エステルを生成させる白ワイン発酵に望まれ

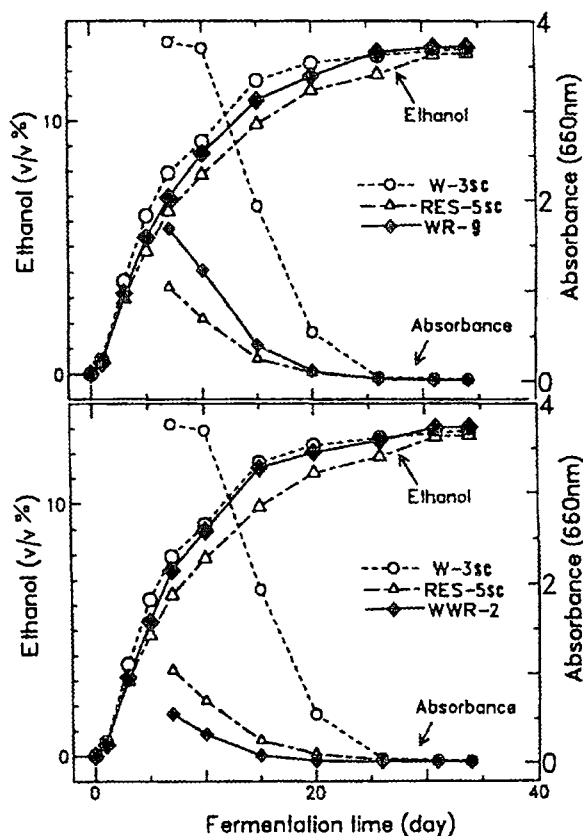


図3 ワイン酵母, 凝集性野生株および凝集性交雑株の発酵経過-エタノールの生成および発酵もろみ吸光度の変化。
W-3SC: ワイン酵母W-3のクローン株;
RES-5SC: 凝集性野生酵母のクローン株;
WR-9: 凝集性交雑一代株;
WWR-2: 凝集性交雑二代株(戻し交雑株)。
甲州ブドウを使用した白ワイン試験醸造。

表6 呼吸能欠損変異株*のリンゴ酸生産性**

	酵母菌株		
	W-3	OC-2	YM-126
	リンゴ酸 (g/L)		
親株	0.76	0.92	1.98
変異株 -1	1.06	1.30	3.09
変異株 -2	1.00	1.25	2.84
供試果汁	1.54	1.54	1.54

* エチジウムブロマイド処理による変異株.

** 甲州果汁を用いた発酵試験.

表7 低温発酵性酵母および中温耐性変異株の発酵性*

菌株	性質	発酵温度 (°C)	発酵日数 (日)	エタノール (v/v %)
YM-84	低温発酵性	10	40	11.4
		25	14	8.9
5e-1065	変異株	10	40	11.5
		25	14	10.7
OC-2	中温発酵性	10	40	10.2
		25	14	11.4

* 甲州果汁を用いた発酵試験.

る性質である。これは低温条件 (7 - 13 °C) で順調に発酵する性質を有するものであり、ワイン酵母 100 株から低温発酵性株 2 菌株が選択された。これらは *S. bayanus* に属しており、中温 (22 - 30 °C) での発酵性が低下した。そこで中温耐性の変異株を UV 照射によって造成した。得られた変異株は低温発酵性を保有し、中温度でも良好な発酵性を示した (表 7)。また、本低温性酵母と OC - 2 株との交雑株は、中低温で良好な発酵能を有した¹²⁾。

5. 今後の研究について

以上、当研究室におけるワイン酵母の研究内容を概説した。ワイン酵母に望まれる性質は多様であり、これに対応するためには明確な有用形質を有する酵母株の分離、選択が重要と考える。また、最近の有機農法に準じた有機ワイン (Organic wine) の製造において、自然発酵によるアルコール発酵およびマロラクティック発酵が要件であり、この場合には各生産地および各ワイナリーの野生微生物相の解析と制御が課題である。従来の変異法や

交雑法は、その成果が直ぐに適用できるために実用的育種方法である。しかし、一つの細胞に種々の性質を導入して利用する方法は限度があると考えられる。その対策として複数の酵母株を利用する方法が挙げられよう。今日、遺伝子操作法は微生物の遺伝的性質の改変に最も有効とされており、酵母を始めとしたワイン微生物においても本研究の進展が待たれている。

今後、従来の育種法あるいは分子育種法によって新規な有用酵母が研究開発され、これが利用されることにより、醸造方法ならびに生産品の風味的、栄養成分的、安全衛生的品質が改良されてゆき、ワイン産業に貢献することが期待される。

参考文献

1. 後藤昭二, 原 晶道, 北野一好, 清水健一, 篠原 隆: 農化, 63, 1885-1903 (1989)
2. 後藤昭二: 醸協, 80, 392-398, 454-461 (1985)
3. 篠原 隆, 柳田藤寿: 農化, 70, 680-683 (1996)
4. Yanagida, F., Ichinose, F., Shinohara, T., Goto, S. : J. Gen. Appl. Microbiol., 38, 501-504 (1992)

5. 内藤憲二, 篠原 隆, 柳田藤寿, 後藤昭二 :
ASEV Jpn. Rep., 4, 182-185 (1993)
 6. 古屋博一, 篠原 隆, 柳田藤寿 : 日本農芸化学会
1996 年度大会, 農化, 70(No. 3), 114 (1996)
 7. 岡田英明, 篠原 隆, 柳田藤寿 : 日本生物工学会
1996 年度大会講演要旨集, p. 133 (1996)
 8. Goto, S., Kitano, K., Shinohara, T. : J.
Ferment. Bioeng., 73, 70-72 (1992)
 9. Shinohara, T., Saito, K., Yanagida, F., Goto, S. : J.
Ferment. Bioeng., 77, 428-431 (1994)
 10. Shinohara, T., Mamiya, S., Yanagida, F. : J.
Ferment. Bioeng., 83, 96-101 (1997)
 11. 押田明成, 岸本宗和, 柳田藤寿, 篠原 隆,
後藤昭二 : 醸協, 90, 381-386 (1995)
 12. Kishimoto, M. : J. Ferment. Bioeng. 77, 432-435
(1994)
-