

[研究報文]

ワイン酵母のリンゴ酸生産性と分解性および高生産性株の造成

篠原 隆・岡田英明・柳田藤寿

山梨大学ワイン研究センター（工学部附属発酵化学研究施設）

〒400-0005 甲府市北新1丁目13-1

Malic Acid Production and Decomposition Ability of Selected Wine Yeasts

Takashi SHINOHARA, Hideaki OKADA, and Fujitoshi YANAGIDA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400-0005, Japan

The L-malate content in grape musts plays an important role in the acidity and taste of wine. Thus, the acid composition of wine can be altered appropriately by the production or decomposition of malate by wine yeasts. We examined the acid productivity of 105 strains of wine yeasts and 470 strains of wild yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) during alcoholic fermentation of grape juice, pH 3.2. The acid content of the fermented juices ranged from 121 to 200% of the initial grape juice levels. Fermentation tests for the production of malate revealed that 25 of 180 strains tested were malate-productive and 155 strains were malate-decomposing. During grape juice fermentation, 5 of the productive strains produced 0.35-0.61 g/L of malate, whereas 6 of the decomposing strains degraded 1.44-2.69 g/L of malate. The addition of ammonium phosphate and mineral nutrients to the grape juice accelerated the fermentation rate without affecting the production or decomposition of malate. Respiratory-deficient mutants were derived from wine yeast RIFY 1218 by treatment with ethidium bromide to improve the malate productivity. These mutants increased the malate production to 0.47-1.55 g/L. The properties of the yeast strains were influenced by the fermentation temperature and initial pH of the grape juice. Selected strains and mutants showed malate-productive or malate-decomposing activity during fermentation in experimental wine-making. Since different wine yeast strains demonstrated either high malate-productivity or malate-decomposing activity, selection of appropriate strains or malate-productive mutants may be useful in wine production.

Key words: wine yeast, malic acid, acidity, wine-making, respiratory-deficient

緒 論

ブドウの酸度は糖度と同様に、その品種、栽培法、生産地の地理的および気象的条件によって変動するものであり、これに対応した酸度調整が、ワインの香味バランスの点から必要である。L-リンゴ酸はブドウ果実の主要有機酸の一つであり、ワインの風味と品質に関係している。白ワインではリンゴ酸濃度が風味特性に影響するために、必要により補酸あるいは除酸が行われる。また、赤ワインでは、アルコール発酵後にマロラクティック発酵を発生させて、リンゴ酸を減少させる。このようにワイン醸造において、リンゴ酸濃度の調整が酸度および風味の改良のために重要である(1, 10)。ワイン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、細胞増殖およびアルコール発酵において、L-リン

ゴ酸を合成および分解しており、この代謝機能を発酵もろみの酸度調整に利用することが考えられた(8,13)。すなわち、ワイン酵母の基本的性質であるアルコール発酵能、亜硫酸耐性、中低温発酵性に加えて、リンゴ酸の生産性あるいは分解性の性質は、ブドウ果汁（ブドウもろみ）の補酸あるいは減酸工程を補完させるために有用である。ワイン酵母を始めとした関連の酵母は、一般に、リンゴ酸を分解、利用する性質を有する。ワイン酵母はリンゴ酸の10～40%を分解し、*Schizosaccharomyces pombe*, *Kloeckera javanica*などは、ほぼ全量を分解した(4, 11, 17)。一方、リンゴ酸生成に関しては生産性野生酵母 (*S. cerevisiae*) の分離と発酵試験(5)、および低温発酵性酵母による生成(2,6)が報告された。しかし、発酵もろみの酸度調整に対する有用性については、さらに検討が必要と考えられる。最近、清酒酵母 (*S. sake*) においては、清

1999年3月16日受理

酒の酸度増強を目的としたL-リンゴ酸、コハク酸などの高生産性株の造成、ならびにその利用性が検討された(7,18)。

筆者らは、これまでワイン酵母の選抜育種、および野生酵母の分布と発酵特性の研究を行ってきた(13-15)。今回、ワイン酵母および野生酵母のリンゴ酸生産性と分解性を試験して高活性株を選出し、さらに呼吸能欠損変異によって高生産性株を造成した。また、育種株のワイン醸造特性を、小規模試験醸造により検討した。その結果、有用なリンゴ酸生産性株および分解性株が取得されたので報告する。

材料と方法

1. 供試酵母

当研究室に保存されているワイン酵母105株および野生酵母470株を供試した。ワイン酵母は国産および外国産酵母であり、実際の醸造に使用されるものである。野生酵母は、山梨県内のブドウ園やブドウ果汁から分離されたものである(3)。これらの供試酵母は、すべて *S. cerevisiae* に属した。

2. 供試培地

YM培地(0.3%酵母エキス、0.5% ポリペプトン、0.3%麦芽エキス、1%グルコース)、ブドウ果汁(甲州ブドウ果汁、糖分18~20%、pH3.2)および栄養源補添ブドウ果汁(0.1% KH_2PO_4 、0.044% $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%(NH_4) $_2\text{HPO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を補添)を使用した。

3. 酸生産性、リンゴ酸生産性およびリンゴ酸分解性試験

供試酵母はYM寒天培地で前培養したのち、15mL(あるいは5mL)のブドウ果汁に接種して25℃で15~30日間、静置培養した。この発酵液をpH、滴定酸度およびL-リンゴ酸の分析に供した。選択された高生成株および高分解性株については、200mLスケールの発酵試験をブドウ果汁と栄養源補添ブドウ果汁を用いて行った。この場合の発酵温度は20℃とし、また、リンゴ酸分解性試験のブドウ果汁には、L-リンゴ酸を2~3g/Lを加えた。さらに発酵温度10~30℃、および初発pH3.0~4.0の発酵条件について試験した。これらの200mLスケール試験の場合、供試酵母株は予め6mLのブドウ果汁で25℃、2日間培養し、これを種母として使用した。

4. 呼吸能欠損変異株の造成

リンゴ酸生産性の酵母(*S. cerevisiae*)は、呼吸能欠損である事例が報告(5,7)されたことから、次の酵母株に適用した。供試菌株は、代表的ワイン酵母のRIFY 1001(W-3)とRIFY 1022(OC-2)、およびリンゴ酸高生産性として選択されたワイン酵母RIFY 1218(YM-126)である。供試菌株はYM寒天培地で前培養し、その一白金耳を10mLのEtBr液体培地(0.67%Yeast Nitrogen Base(Difco Laboratories)、1%グルコース、0.0001%エチジウムブロミド)に接種して、25℃で24時間、静置培養した。この培養液は、菌数が $10^3 \sim 10^6$ となるようにM/15リン酸緩衝液(pH 7.4)で希釈したのち、その0.5mLをYM平板培地上に塗布して、25℃で3日間培養した。本平板培地上に現れた小コロニーをYM平板培地に移植して25℃で培養し、生育したコロニーの呼吸能をTTC寒天重層法により判別した。本法で呼吸能欠損株のコロニーは白色を呈するので、これを呼吸能欠損変異株として分離した。取得された変異株はYM寒天培地で10代の継代培養を行った後に、その呼吸能欠損をTTC寒天重層法(20)およびグリセロール培地(16)の生育試験で確認した。

5. 小規模試験醸造

本ワイン研究センター附属の育種試験地(山梨県甲府市)で収穫された甲州ブドウを用いて、1996年および1997年秋期に白ワイン醸造を行った。常法により得た搾汁をおり下げて清澄果汁とした。このブドウ果汁7Lをガラス容器(10L容)に入れて酒母200mLを加え、発酵栓を付して地下セラー(15~20℃)で発酵させた。発酵終了後にワインをろ過してビン詰した。試験における供試酵母は、対照区:RIFY 1001、リンゴ酸生産性区:RIFY 1218、呼吸能欠損変異株YRDE5、YRDE8、YRDE10、野生酵母MNB-5、およびリンゴ酸分解性区:RIFY 1026、野生酵母IB14-1、とした。

6. 発酵液およびワインの分析

(1) L-リンゴ酸:試料1mLを試験管にとり、これに蒸留水4mLと2N-NaOH 4mLを加えて混合し、栓をして100℃で30分間、加水分解した。この分解液を2N- H_2SO_4 で中和して50mLとした後、その0.1mLをベーリンガー・マンハイムF-キット[リンゴ酸]で分析した。

(2) 酢酸、コハク酸、クエン酸:試料を適宜に希釈

して、ベーリンガー・マンハイムF-キット[酢酸]および[コハク酸]で分析した。クエン酸の場合、試料を2N-KOHで加水分解し、2N-H₂SO₄で中和して定容とした後、ベーリンガー・マンハイムF-キット[クエン酸]で分析した。

(3) 一般成分：国税庁所定分析法(21)に従って分析した。総フェノールはフォリン・シオカルト法(18)に従った。

(4) 芳香成分：直接注入法および溶媒抽出法によるガスクロマトグラフィー(14)で分析した。

(5) ワインの官能評価：試験醸造されたワインを12名の研究員により、20点満点法(12)で利き酒、評価した。

結果および考察

1. 酸生産性試験

供試果汁の酸度（酒石酸換算値として5.01g/L）を100%として、発酵試験における発酵液の酸度を表示した（Table 1）。供試ワイン酵母105株について、その酸度は121~170%の範囲にあり、151%を越える菌株が21株であった。野生酵母470株の酸度は121~200%であり、より高い酸生産性が示された。その中で酸度151%を越える菌株は、133株であった。供試575菌株のうち、酸度151%以上の高生産性株は154株であった。一方、低生産性の菌株（酸度121~130%）は、29株であった。

pHの変化について、供試ワイン酵母の場合、初発pH3.16から発酵後に3.18~3.40となり、わずかに上

昇する傾向であった。野生酵母の場合、初発pH3.16から発酵後に3.10~3.47と変化した。大部分の菌株は、pH0.1~0.2の上昇を示した。（実験データは示していない）

本発酵試験における酸生成は、ワイン酵母の二次的代謝産物である有機酸類（酢酸、乳酸、コハク酸、リンゴ酸など）の生成に由来したものである。従って、高酸度の菌株におけるリンゴ酸の生産性が、また、低酸度の菌株ではリンゴ酸の分解性が推定された。そこで高酸度株および低酸度株を選択して、リンゴ酸生成と分解性試験を以下に行った。

2. 選択酵母株によるリンゴ酸の生産性および分解性試験

本試験は、上述の発酵試験の結果（Table 1）から選抜した高酸度株154株および低酸度株26株を供試して、ブドウ果汁5mLスケールで行った。その結果をTable 2に示す。この場合に発酵液のL-リンゴ酸濃度は、供試果汁の濃度（1.06 g/L）を100%として表した。リンゴ酸の生産性（101~140%の濃度）が示されたのは、高酸度株の中の25株であり、低酸度株には生産性株がみられなかった。反対に、リンゴ酸分解性（41~100%の濃度）を示したのは、低酸度株および高酸度株由来の26および129株であった。すなわち、供試酵母180株の中の155株（86%相当）がリンゴ酸分解性であった。この結果は、ワイン酵母および野生酵母が一般的にリンゴ酸分解性であるとした、従来の報告(5, 17)に合致した。リンゴ酸の高生産性株お

Table 1. Acid production by various yeast strains during grape juice fermentation.

Yeast strains		Relative acidity (%) ^{a)}							
Source	Number	121 ~130	131 ~140	141 ~150	151 ~160	161 ~170	171 ~180	181 ~190	191 ~200
Wine yeast	105	14	31	39	16	5	0	0	0
Wild yeast	470	15	106	216	87	29	10	4	3
Total	575	29	137	255	103	34	10	4	3

a) Expressed as a production of the initial acidity, which was assumed to be 100.

Table 2. L-Malate production and decomposition by various yeast strains during grape juice fermentation.

Yeast strains		Relative malic acid content (%) ^{a)}				
Acid productivity	Number	41 ~60	61 ~80	81 ~100	101 ~120	121 ~140
Low productive	26	11	11	4	0	0
High productive	154	25	57	47	19	6

a) Expressed as a production of the initial malate content in the fermented grape juice, which was assumed to be 100.

よび分解性株を選抜して、次のスケールアップした発酵試験に供試した。

3. 選抜されたリンゴ酸生産性および分解性株による発酵試験

初めに、上述の発酵試験 (Table 2) から選抜されたリンゴ酸の生産性株6株および分解性株17株について、200mLスケールの発酵試験によってその活性を調べた。その結果、発酵後のリンゴ酸濃度は初発濃度に対して、生産性株が123~136%であり、一方、分解性株が44~55%であった (実験データは示していない)。本試験における供試酵母株のリンゴ酸生産

性および分解性は、上述の5mLスケールの結果とほぼ一致した。

次に、以上の発酵試験の結果に基づいて、リンゴ酸高生産性株5株および高分解性株6株を選択し、その発酵特性をブドウ果汁および栄養源補添ブドウ果汁を用いて200mLスケールで試験した。供試酵母株および試験結果をTable 3に示す。

まず、生産性株について、ブドウ果汁の発酵後のリンゴ酸濃度は、初発濃度に対して102~147%であった。この中で高生産性株はRIFY 1218、MNB-5、およびNS-3であった。そのリンゴ酸増加量は0.35~

0.61g/Lであった。総酸については1.50~3.56g/L (酒石酸換算値として)と顕著に増加しており、また、そのpHが0.2~0.4低下した。この結果から、供試5株は酸高生成であることが認められた。発酵日数は菌株により相違した。リンゴ酸を高生成したRIFY 1218は、対照株(RIFY 1001)と同等に早い発酵速度を示したが、多少アルコール生成が低かった。栄養源補添果汁の場合、供試生産性株の発酵速度は早められており、その補添成分の栄養的効果が示された。しかし、リンゴ酸生産性を示したのは、RIFY 1218のみであった。以上のようにRIFY 1218は、安定したリンゴ酸生産性および良好な発酵性を示した。

リンゴ酸分解性株について、ブドウ果汁の発酵後のリンゴ酸濃度は、初発濃度の36~66%に低下した。供試株中で高分解性株はRIFY 1026およびIB14-1であり、それらのリンゴ酸減少量が2.36~2.69g/Lであった。他の分解性株のリンゴ酸減少量は1.44~1.91g/Lであった。

Table 3. L-Malate production and decomposition by selected yeast strains during grape juice fermentation with nutrient addition.

Lot	Strain ^{a)}	Fermentation time (days)	Alc. ^{d)} (v/v%)	pH	Total acid (g/L)	L-Malic acid (%)
[Productive strains]						
I. Grape juice (control)	(Juice)	—	—	3.40	4.02	1.30 (100)
	RIFY 1001	17	12.2	3.30	4.92	0.83 (64)
	RIFY 1218	16	11.8	3.02	7.58	1.91 (147)
	D2-b	23	11.9	3.11	6.34	1.44 (111)
	NS-3	24	11.8	3.19	5.71	1.65 (127)
	MNB-5	30	9.3	3.09	6.04	1.70 (131)
	YMT31-2	23	11.6	3.22	5.52	1.32 (102)
II. Nutrient addition ^{b)}	(Juice)	—	—	3.30	5.16	1.32 (100)
	RIFY 1001	12	12.2	3.09	6.12	0.80 (61)
	RIFY 1218	12	11.8	3.00	7.85	1.63 (123)
	D2-b	15	11.5	2.95	6.83	0.85 (64)
	NS-3	15	11.8	2.95	6.72	1.09 (83)
	MNB-5	18	11.3	2.99	6.76	1.16 (88)
	YMT31-2	14	11.5	3.00	6.61	0.90 (68)
[Decomposing strains]						
III. Grape juice (control) ^{c)}	(Juice)	—	—	3.29	5.93	4.23 (100)
	RIFY 1001	18	12.2	3.35	6.79	3.07 (73)
	RIFY 1025	23	11.9	3.32	6.38	2.79 (66)
	RIFY 1026	24	11.6	3.48	5.97	1.54 (36)
	HKS-1	19	11.9	3.42	6.19	2.48 (59)
	LSI-2	20	11.9	3.42	5.78	2.32 (55)
	MTK-71	19	11.9	3.45	6.04	2.58 (61)
	IB14-1	18	11.9	3.40	5.63	1.87 (44)
IV. Nutrient addition ^{b), c)}	(Juice)	—	—	3.18	6.75	4.21 (100)
	RIFY 1001	11	12.1	3.22	7.88	3.14 (75)
	RIFY 1025	14	11.9	3.31	7.43	2.60 (62)
	RIFY 1026	14	11.8	3.33	7.58	1.98 (47)
	HKS-1	13	11.7	3.32	7.47	2.84 (67)
	LSI-2	13	11.8	3.30	7.24	2.72 (65)
	MTK-71	11	11.7	3.37	7.47	2.67 (63)
	IB14-1	12	11.6	3.40	7.13	2.46 (58)

a) Wine yeasts: RIFY 1001, 1025, 1026, and 1218. Wild yeasts: D2-b, NS-3, MNB-5, YMT31-2, HKS-1, LSI-2, MTK-71, and IB14-1.

b) Nutrient: 0.1% KH₂PO₄, 0.044% CaHPO₄ · 2H₂O, 0.05% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O.

c) L-Malic acid (3 g/L) was added to the grape juice.

d) Ethanol content.

総酸の変化は供試株により異なったが、初発総酸に対して0.30～0.45g/Lの増減にとどまった。発酵速度は供試株間に相違がみられており、これらのアルコール生成が対照株より僅かに低かった。栄養源補添果汁の場合、供試株の発酵速度は果汁区より促進されたが、そのリンゴ酸分解活性は変化なし、あるいは減退した。以上の発酵試験において、安定したリンゴ酸高分解性および発酵性を示したのは、RIFY 1026およびIB14-1であった。

ブドウ果汁（もろみ）の成分組成は、ブドウの品種や栽培条件で変動するものであり、そのような変動に対する酵母菌株の挙動を明確にする必要があると考

Table 4. L-Malate production and decomposition by respiratory-deficient mutants of wine yeasts during grape juice fermentation.

Strains	L-Malic acid	
	Content (g/L)	(%)
(Juice)	1.54	(100)
RIFY 1218 a) : parental	1.98	(128)
YRDE1 : RD b)	2.01	(131)
YRDE2 : RD	2.67	(173)
YRDE3 : RD	2.84	(184)
YRDE4 : RD	2.69	(175)
YRDE5 : RD	2.90	(188)
YRDE6 : RD	2.74	(178)
YRDE7 : RD	2.80	(182)
YRDE8 : RD	3.09	(201)
YRDE9 : RD	2.89	(188)
YRDE10 : RD	2.72	(177)
RIFY 1001 c) : parental	0.76	(49)
WRDE1 : RD	1.06	(69)
WRDE2 : RD	0.95	(62)
WRDE3 : RD	0.97	(63)
WRDE4 : RD	1.04	(68)
WRDE5 : RD	1.06	(69)
WRDE6 : RD	0.92	(60)
WRDE7 : RD	0.75	(49)
WRDE8 : RD	1.00	(65)
WRDE9 : RD	0.88	(57)
WRDE10 : RD	0.78	(51)
RIFY 1022 c) : parental	0.92	(60)
ORDE1 : RD	1.28	(83)
ORDE2 : RD	1.30	(84)
ORDE3 : RD	1.18	(77)
ORDE4 : RD	1.16	(75)
ORDE5 : RD	1.25	(81)
ORDE6 : RD	1.22	(79)
ORDE7 : RD	1.27	(82)
ORDE8 : RD	1.27	(82)
ORDE9 : RD	1.22	(79)
ORDE10 : RD	1.27	(82)

a) L-Malate-productive strain.

b) RD: Respiratory-deficient mutant.

c) L-Malate-decomposing strain.

えた。今回の発酵試験において、栄養源補添によって供試菌株のアルコール発酵は活性化されたが、リンゴ酸の生成／分解の代謝活性に対する効果が、菌株により相違した。従って従って果汁成分などの変化に対して、安定した性質の菌株を選択することが重要である。リンゴ酸の代謝に影響する条件として好気条件、糖濃度、栄養成分などが報告(17)されたが、さらに実際のワイン発酵条件下の検討が必要と考えた。

4. リンゴ酸高生産性を有する呼吸能欠損変異株の造成

今回のエチジウムブロミド処理による呼吸能欠損変異の発生率は、供試3菌株(RIFY 1001, 1022, 1218)において71.6～98.9%と高かった。本処理法はミトコンドリアDNAを効率よく破壊して、呼吸能欠損とすることが知られる(16)。本法により、3供試株(RIFY 1001, 1022, 1218)から各々10株の変異株を取得した。さらにまた、自然突然変異および紫外線照射による変異を検討したが、その変異生成率は0.01～21.9%と低く、また、取得された変異株のリンゴ酸生産性は改良されないか、あるいは低生産性であった(実験データは示していない)。

エチジウムブロミド処理により造成された呼吸能欠損変異株について、リンゴ酸の生産性試験(5mLスケール)を行った。その結果をTable 4に示す。リンゴ酸生産性ワイン酵母RIFY 1218株からの変異株は、すべてリンゴ酸生産性が改良されており、そのリンゴ酸増加量が0.47～1.55g/Lであった。とくにYRDE5、8および9の生産性(リンゴ酸生成量 1.35～1.55g/L)は、その親株(生成量 0.44g/L)に対して約3倍ほど高められた。一方、リンゴ酸分解性であったワイン酵母2株(RIFY 1001, RIFY 1022)からの呼吸能欠損突然変異株は、発酵液中のリンゴ酸濃度が親株より高くなった。しかし、初発濃度を上回るリンゴ酸の生成が見られないことから、これらの変異株ではリンゴ酸分解活性の低下が示唆された。

リンゴ酸の生成および分解(8)には、第1の経路としてミトコンドリアにおけるTCA (Tricarboxylic acid) サイクルの反応系があり、これに関与する酵素としてリンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびフマル酸ヒドラターゼがある。第2の経路として、リンゴ酸酵素によるピルビン酸と二酸化炭素への分解系がある。よって、

Table 5. Fermentation test on selected strains and respiratory-deficient mutants at 20°C.

Strain ^{a)}	Fermentation		pH	Total acid		L-Malic acid (%)
	Time (days)	Alc. ^{b)} (v/v%)		(g/L)	L-Malic acid (%)	
(Juice)	—	—	3.20	4.06	1.72	(100)
RIFY 1218	30	10.4	3.40	5.73	1.85	(108)
YRDE1	33	8.7	3.30	6.14	1.75	(102)
YRDE2	33	9.5	3.20	6.81	2.39	(138)
YRDE3	33	10.2	3.20	6.61	2.03	(118)
YRDE4	33	10.6	3.30	7.18	2.48	(144)
YRDE5	33	10.3	3.20	7.16	2.60	(151)
YRDE6	33	9.9	3.20	7.04	2.76	(160)
YRDE7	33	10.5	3.20	6.54	1.94	(112)
YRDE8	33	10.5	3.20	6.87	2.74	(159)
YRDE9	33	10.3	3.30	7.68	3.02	(175)
YRDE10	33	10.4	3.30	6.94	2.95	(171)
RIFY 1001	22	10.8	3.50	5.50	1.32	(77)
RIFY 1026	28	10.6	3.50	5.47	0.76	(44)

a) RIFY 1218: L-Malate-productive strain. YRDE1-10: respiratory-deficient mutants of RIFY 1218. RIFY 1001 (control strain) and RIFY 1026: L-Malate-decomposing strains.

b) Ethanol content.

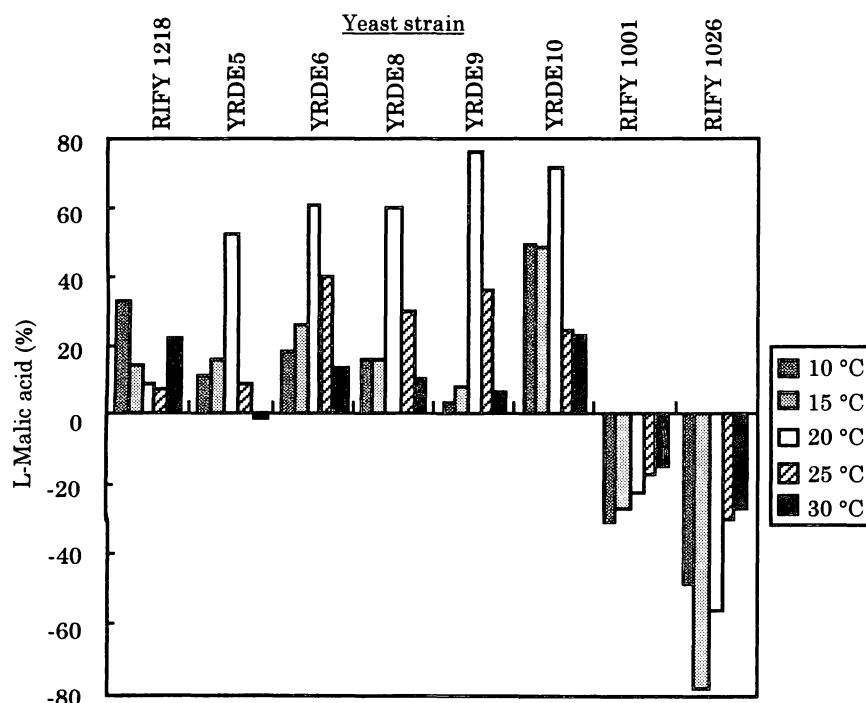


Fig. 1. Influence of fermentation temperature on L-Malate production and decomposition. Productive yeast strains: RIFY1218; YRDE5, 6, 8, 9, and 10. Decomposing yeast strains: RIFY 1001, RIFY 1026.

リンゴ酸分解性株は、TCAサイクルへのリンゴ酸の取込みと利用性、およびリンゴ酸酵素の分解活性が高いと考えられた。一方、リンゴ酸生産性株は、TCAサイクルへの取り込みを上回るリンゴ酸生成系の存在すること、ならびにリンゴ酸酵素が低活性、あるいは合成反応に働くことが考えられた。すなわち、リンゴ酸生産性株では、リンゴ酸生成系が強力であり、とくに

TCAサイクルにリンゴ酸およびオキサロ酢酸を補充する反応系の酵素群(ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等)が、高活性で機能していることが推定された。本実験で取得された呼吸能欠損変異株の場合、TCAサイクルの酵素群に様々の変異が発生したことにより、有機酸代謝系は変化してリンゴ酸蓄積が促進されたこと、ならびに有機酸の補充反応系がより活性化されたことが、リンゴ酸生産性の改変に寄与したと推察した。今回、関係する酵素活性を測定していないので、各反応経路のリンゴ酸生成への関与は明確にされなかったが、今後の研究課題と考えた。

5. リンゴ酸の生産性および分解性に及ぼす発酵温度および果汁pHの影響

選抜された酵母菌株および取得された呼吸能欠損突然変異株について、発酵温度および初発pHの影響をブドウ果汁200mLスケールで試験した。初めに、発酵温度20°Cにおける呼吸能欠損変異株10株とその親株、分解性株および対照株の結果を示す(Table 5)。供試変異株9株のリンゴ酸生産性は、親株RIFY 1218より高生産性があることが示された。そのリンゴ酸生成量は0.22~1.30g/Lであり、初発濃度に対して113~176%の増加であった。

それらの変異株の中で高生産性株は、YRDE-5、6、8、9および10であった。

次いで高生産性変異株5株と親株、分解性株および対照株について、10~30°Cにおける発酵温度の影響をみた(Fig.1)。供試変異株のうち4菌株(YRDE-5、6、8、9)が20、25°Cでより高生産性であり、1菌株

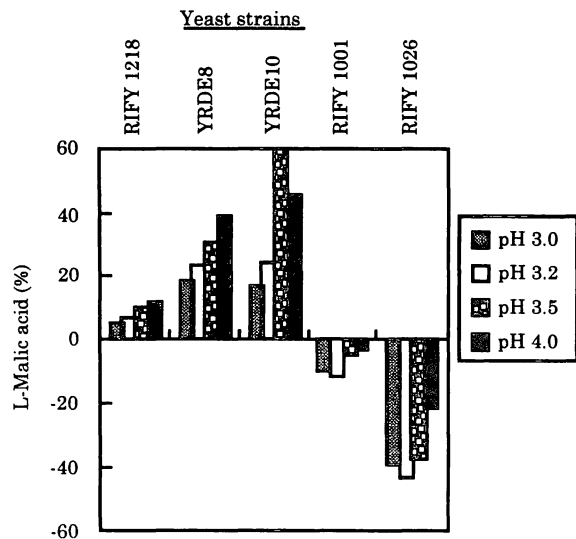


Fig. 2. Influence of initial pH of grape juice on L-malate production and decomposition. Productive yeast strains: RIFY 1218, YRDE8, YRDE10. Decomposing yeast strains: RIFY 1001, RIFY 1026.

(YRDE-10) が10~20℃でより高生産性であった。親株RIFY 1218は、10および15℃でより高生産性であった。しかし、30℃において変異株5株の発酵が停滞し、それらのアルコール生成は約6%で止まった(実験データは示していない)。この発酵停滞現象は、親株RIFY 1218においても発生しており、本菌株の中高温感受性(6)に起因すると考えられた。以上のように、リンゴ酸生産性株は発酵温度に影響されること、とくに発酵の上限温度(25℃付近)を管理する必要が示された。一方、リンゴ酸分解性株(RIFY 1026)および対照株(RIFY 1001)は、発酵温度20℃以下の条件が高活性であって、30℃の場合より約2倍のリンゴ酸分解性を示した。このように、分解性株においても、その活性は発酵温度に影響されており、温度制御の必要性が認められた。

初発pH試験では、pH3.0~4.0の範囲を検討しており、リンゴ酸生産性変異株2株と親株、分解性株および対照株の5菌株を供試した(Fig.2)。リンゴ酸生産性株(YRDE-8,10,RIFY 1218)は、高pH側においてリンゴ酸生産性が高くなった。一方、リンゴ酸分解性株(RIFY 1026)および対照株(RIFY 1001)は、低pH側においてリンゴ酸分解性が高い傾向であった。すなわち、供試した生産性株は、高pHにおいてリンゴ酸高生産性となり、一方、分解性株は、低pHにおいてリンゴ酸高分解性となる性状を示した。これら供試菌株の性質は、ブドウ果汁(もろみ)の酸度調整に有利

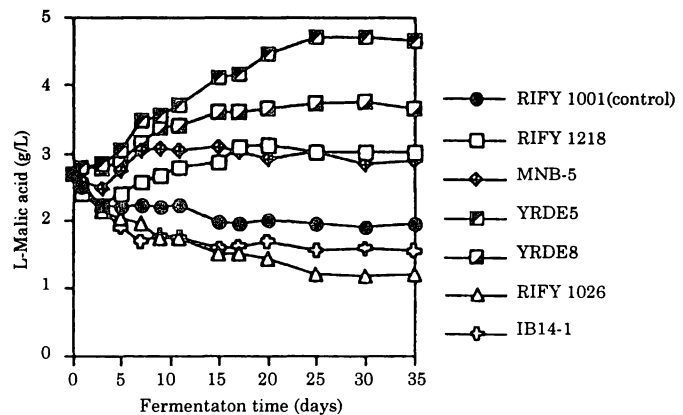


Fig. 3. Changes in L-malate content of Koshu musts during fermentation with selected strains and respiratory-deficient mutants. Productive yeast strains: RIFY 1218, YRDE5, YRDE8, MNB-5. Decomposing yeast strains: RIFY1001 (control), RIFY 1026, IB14-1.

と認めた。リンゴ酸の生成/分解に対するpHの影響は、酵母菌株および菌種により異なることが報告(17)されており、今回の結果からも、果もろみ条件に対応した酵母選択が重要と考えられた。

6. リンゴ酸生産性株および分解性株による小規模試験醸造

小規模試験醸造は1996年および1997年に実施した。発酵中のリンゴ酸濃度の変化をFig.3に示す(1996年度試験醸造)。リンゴ酸生産性変異株のYRDE-5およびYRDE-8は、発酵時間と共にリンゴ酸が生成されており、発酵終了時において1~2g/Lほど増加した。リンゴ酸生産性のワイン酵母RIFY 1218および野生酵母MNB-5は、発酵初期にリンゴ酸濃度が低下し、のちにその濃度は上昇したが発酵後半に停滞した。これら2株のリンゴ酸濃度は、初発濃度より0.1~0.3g/Lの増加に止まった。リンゴ酸分解性株のワイン酵母RIFY 1026および野生酵母IB14-1、ならびに対照のワイン酵母RIFY 1001は、発酵時間と共にリンゴ酸が消費され減少した。これら3株の場合、リンゴ酸濃度が0.8~1.6g/Lほど低下した。

発酵日数および試験醸造ワインの分析結果をTable 6に示す。発酵日数について、リンゴ酸生産性株RIFY 1218および対照株RIFY 1001が約25日であった。しかし、リンゴ酸生産性変異株3株が約40日であり、また、リンゴ酸分解性2株が36~40日と長時間

Table 6. Analysis of white wines produced by selected strains and respiratory-deficient mutants.

Strains ^{a)}	FT ^{b)} (days)	Alc (%)	RS (g/L)	pH	TA	VA	L-MA (g/L)	(%)	CA	SA	AA
1996-Koshu wines											
(Juice)	nt ^{e)}	nt	213.0	3.20	7.17	nt	2.69	(100)	0.21	0.02	0.02
(1) RIFY1218	25	11.0	11.0	3.00	9.50	0.48	3.05	(113)	0.26	1.22	0.04
(2) YRDE5	38	11.0	17.6	2.91	12.16	0.42	4.63	(174)	0.32	1.60	0.05
(3) YRDE8	38	11.1	15.1	2.90	10.89	0.42	3.69	(137)	0.34	1.28	0.07
(4) MNB-5	50	9.0	44.7	2.88	8.71	0.60	2.84	(106)	0.27	0.55	0.25
(5) RIFY1001	23	12.4	1.6	2.98	7.06	0.52	1.92	(71)	0.21	0.55	0.22
(6) RIFY1026	36	12.3	4.2	3.07	6.83	0.90	1.11	(41)	0.27	0.58	0.62
(7) IB14-1	37	11.7	11.0	3.08	7.02	0.54	1.49	(55)	0.27	0.78	0.17
1997-Koshu wines											
(Juice)	nt	nt	208.0	3.12	6.25	nt	2.36	(100)	nt	0.05	nt
(8) RIFY1218	25	11.6	9.0	3.00	8.72	0.30	2.65	(112)	nt	1.33	0.02
(9) YRDE8	40	10.4	30.8	2.95	10.91	0.30	3.35	(142)	nt	1.06	0.03
(10) YRDE10	40	10.5	27.2	2.90	11.63	0.30	3.69	(156)	nt	1.61	0.04
(11) RIFY1001	25	12.2	1.9	3.10	6.36	0.57	1.54	(65)	nt	0.54	0.18
(12) RIFY1026	40	12.1	3.2	3.20	6.28	0.86	0.92	(39)	nt	0.58	0.60
1996											
(1)	390	0.043	9	30	470	6.5	328	2.9	4.1	12.6	
(2)	425	0.045	9	21	408	3.4	224	1.8	2.2	13.2	
(3)	380	0.043	5	22	528	2.0	182	3.6	2.2	14.1	
(4)	370	0.050	8	10	190	6.2	92	1.5	2.2	12.7	
(5)	350	0.038	2	32	307	6.1	44	5.0	3.4	14.0	
(6)	345	0.043	5	58	323	5.3	62	4.3	1.7	13.0	
(7)	395	0.053	25	20	217	10.5	127	1.2	3.8	11.8	
1997											
(8)	420	0.042	3	23	421	3.9	314	3.4	2.8	12.5	
(9)	400	0.046	26	24	499	3.1	208	1.4	1.9	14.1	
(10)	410	0.045	26	27	667	4.0	245	1.5	2.5	14.4	
(11)	420	0.042	4	30	389	4.2	83	3.3	3.4	14.0	
(12)	410	0.050	10	57	425	3.5	44	5.0	1.0	12.9	

a) L-Malate-productive strains: RIFY 1218, YRDE5, YRDE8, YRDE10, and MNB-5. L-malate-decomposing strains: RIFY 1001 (control), RIFY 1026, and IB14-1.

b) FT: fermentation time; Alc: ethanol content; RS: reducing sugar; TA: total acid (as tartaric acid); VA: volatile acid (as acetic acid); L-MA: L-malic acid; CA: citric acid; SA: succinic acid; AA: acetic acid.

c) Tph: total phenol; AcH: acetaldehyde; EA: ethyl acetate; THA: total higher alcohol (n-propanol + i-butanol + i-amyl alcohol); A/B: i-amyl alcohol / i-butanol; 2Ph: 2-phenylethyl alcohol; iAA: i-amyl acetate; FE: ethyl ester of fatty acid (ethyl caproate + ethyl caprylate + ethyl caprate).

d) Sensory evaluation, using a 20-point quality scale.

e) nt: Not tested.

であり、実際的には使用菌株に対応した温度条件の設定により、発酵促進が可能と考えられた。

発酵後のリンゴ酸濃度について、リンゴ酸生産性2株およびリンゴ酸生産性変異株3株は、初発濃度に対して106～174%の増加であった。

とくに変異株3株のリンゴ酸濃度は、初発濃度に対して137～174%であり、小試験の結果(Table 5)と同様に高生産性が示された。野生酵母MNB-5を除いたリンゴ酸生産性株4株の総酸は、初発濃度より2.3～5.4g/Lほど増加した。そのような総酸の増加は、主にリンゴ酸およびコハク酸の高生成に起因した。一方、これらのリンゴ酸生産性株の酢酸濃度は0.02～0.07g/Lであり、対照株の濃度(0.18、0.22g/L)より低かった。親株(RIFY 1218)の醸造特性(6)である酢酸低生成の性質が、リンゴ酸生産性と共にこれらの変異株においても認められた。

を要した。アルコール生成について、対照株および分解性株RIFY 1026は、見込み通りに12%以上を生成した。しかし、他の供試株の生成量は、対照株より0.5～3%ほど低い値であった。リンゴ酸生産性変異3株は、発酵速度が緩慢であり、また、アルコールが低生成であったが、これは呼吸能欠損であることが、発酵能に影響したと考えた。今回の場合、試験醸造ワインを地下セラー(気温15～20℃)で一様に発酵させた結果

リンゴ酸分解性2株(RIFY 1026, IB14-1)のリンゴ酸濃度は、初発濃度の39～55%に低下しており、予想した分解性が示された。その中でワイン酵母RIFY 1026は、リンゴ酸分解性および発酵能に優れていた。しかし、発酵後の総酸濃度は初発濃度と同程度であり、リンゴ酸の減少に比例した減酸が示されなかった。本菌は酢酸が比較的到高生成であることも含めて、これら有機酸生成の制御が必要と考えた。

芳香成分の分析結果は同じくTable 6に示した。リンゴ酸生産性株RIFY 1218およびその変異株3株の高級アルコールおよび2-フェネチルアルコールは、対照株と比較して高生成であった。とくに2-フェネチルアルコールは182~328mg/Lと高濃度に生成されており、本菌株由来の芳香的特徴(6)が認められた。

試験醸造ワインの官能評価について、その結果をTable 6に示す。野生酵母IB14-1を除いた供試7株は、12点以上の良好な評価を得た。その中でリンゴ酸生産性変異株のYRDE-8および10は、ワイン酵母RIFY 1001 (対照株) と同等の良い評価であった。

以上のように、供試したリンゴ酸の生産性変異株3株ならびに分解性1株は、それらの性質が試験醸造において有効に発現されており、また、そのワインの品質が良好であった。これらの選択株および育種株は、ブドウ果汁 (もろみ) の酸度調節のために利用できる有用酵母と認められた。

要 約

ワイン発酵中におけるブドウ果汁 (もろみ) の酸度調整を目的として、ワイン酵母および野生酵母 (いずれも*S. cerevisiae*) の中から、リンゴ酸生産性およびリンゴ酸分解性に優れた菌株の選択育種を行った。

1. ワイン酵母105株および野生酵母470株を供試して、ブドウ果汁を用いた小発酵試験 (5、15mLスケール) を行い、その中から酸高生成であった154菌株および酸低生成であった26菌株を選択した。これら180菌株のリンゴ酸生産性と分解性を試験した結果、リンゴ酸生産性株は25菌株に止まり、残りの155菌株 (86%相当) がリンゴ酸分解性であった。

2. リンゴ酸生産性5株および分解性6株を選択して、発酵試験 (200mLスケール) を行った結果、生産性株のリンゴ酸生成量が0.35~0.61g/Lであり、また、分解性株のリンゴ酸減少量が1.44~2.69g/Lであった。高活性の生産性2株 (ワイン酵母RIFY 1218、野生酵母 MNB-5) および分解性2株 (ワイン酵母RIFY 1026、野生酵母IB14-1) について、発酵における栄養源補添 (無機塩類を使用) の効果を試験した。その補添によりアルコール発酵は促進されたが、リンゴ酸の生産性あるいは分解性への効果が見られなかった。

3. リンゴ酸生産性の改良を目的として、ワイン酵母3株のエチジウムブロミド処理を行い、呼吸能欠損変異

株を造成した。ワイン酵母RIFY 1218由来の突然変異株10株は、リンゴ酸を0.47~1.55 g/L生成しており、親株 (生成量 0.44g/L) に対してリンゴ酸生産性が改良された。

4. リンゴ酸生産性株 (RIFY 1218、その変異株) および分解性株RIFY 1026の性質は、発酵温度ならびに果汁pHに影響された。発酵温度は、使用菌株に対応して制御する必要性が認めれた。果汁の高pHは生産性株の活性を、また、果汁の低pHは分解性株の活性を高める傾向であり、果汁 (もろみ) の酸度調整に対して有用な性状が示された。

5. 選択されたリンゴ酸生産性5株およびリンゴ酸分解性2株を用いて、小規模試験醸造を実施した。発酵過程において、生産性変異株3株および分解性1株の性質は有効に発現されており、また、得られたワインの官能評価が良好であった。以上の結果から、これらの選択育種された酵母菌株は、発酵果汁 (もろみ) の酸度調節に有用と認められた。

今後の課題として、今回の選択育種株がワイン酵母RIFY 1001 (対照株) に比較して、アルコール発酵能に劣る傾向であり、その使用に際しては、原料ブドウや酵母菌株に対応した発酵管理 (温度、期間など) を要することである。

引用文献

1. Amerine M. A. and M. A. Joslyn. Table Wines, pp.242-249. University of California Press, Barkeley (1970).
2. Castellari L., Ferruzzi M., Magrini A., Giudici P., Passerelli P. and C. Zambonelli. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 33: 49-52 (1994).
3. 古屋博一・篠原 隆・柳田藤寿・農化, 70:講演要旨集, p.114 (1996).
4. 後藤昭二・山崎真司・山川祥秀・横塚 勇. ぶどう酒酵母と野生酵母のリンゴ酸分解能. 醸工, 56: 133-135 (1978).
5. 飯野修一・渡辺正平・春日徳彦・後藤昭二. リンゴ酸高生産性ワイン酵母の選択. 醸協, 89: 557-562 (1994).
6. 岸本宗和・篠原 隆・相馬英一・後藤昭二. 低温醗酵性ワイン酵母の同定及び醸造特性. 醸協, 88:

- 708-713 (1993).
7. Magarifuchi T., Goto K., Iimura Y., Tadenuma M. and G. Tamura. Effect of yeast fumarase gene(FUM1) disruption on production of malic, fumaric and succinic acids in sake mash. J Ferment. Bioeng. 80: 355-361 (1995).
 8. Radler F. Yeasts-Metabolism of Organic Acids. In: Wine Microbiology and Biotechnology, ed. by G.H.Fleet, pp.165-182, Harwood Academic Publishers, Australia (1993).
 10. Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et P.Ribéreau-Gayon. Sciences et Techniques du Vin -Tome 1. pp.131-140, Dunod, Paris (1982).
 11. 島津善美・上原三喜夫・渡辺正澄. 酵母および乳酸菌によるワイン中の有機酸分解. 醸協, 77: 117-122 (1982).
 12. 篠原 隆. ワイン学入門, 山梨大学編, pp.213-228, 山梨日々新聞社 (1994).
 13. 篠原 隆・柳田藤寿. ワイン醸造における微生物相及び有用菌株の選択育種. 農化, 70: 680-683 (1996).
 14. 篠原 隆・川本康裕・柳田藤寿. ワイン酵母のグリコシダーゼ活性およびその発酵におけるテルペノール濃度への効果. 醸協, 93: 215-223 (1998).
 15. Shinohara T., Mamiya S. and F. Yanagida. Introduction of flocculation property into wine yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) by hybridization. J. Ferment. Bioeng. 83: 96-101 (1997).
 16. 高木正道監訳. 酵母の実験技術, (Yeast - A Practical Approach, -ed. by Campbell I. and J. H. Duffus), pp.90-96, 208-212, 広川書店(1994).
 17. Whiting G. Organic Acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages - A Review. J. Inst. Brew. 82: 84-92 (1976).
 18. 吉田 清. 少酸性および多酸性清酒酵母の育種. 醸協, 90: 751-758 (1995).
 19. Office International de la Vigne et du Vin. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts. pp.269-270, O.I.V. (1990).
 20. 微生物研究法懇談会編: 微生物学実験法 p.300, 講談社(1990).
 21. 注解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解 p.62-79, 日本醸造協会(1993).