

## [研究報文]

## 市販ワイン酵母の種の同定と醸造特性間の相関

JEONG Seok Tae<sup>1,2</sup>・後藤(山本)奈美<sup>1</sup><sup>1</sup>独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山3-7-1<sup>2</sup>National Horticultural Research Institute, 475 Imok-dong, Jangan-gu, Suwan-si, Kyunggi-do 440-310, Korea

## Species Identification and Fermentation Characteristics of Commercial Wine Yeasts

JEONG Seok Tae<sup>1,2</sup> and Nami GOTO-YAMAMOTO<sup>1</sup><sup>1</sup>National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046, Japan<sup>2</sup>National Horticultural Research Institute, 475 Imok-dong, Jangan-gu, Suwan-si, Kyunggi-do 440-310, Korea

Identification of 25 commercial wine yeast strains by the PCR and PCR-RFLP methods revealed that all the strains tested except for S6U, reported to be a hybrid between *Saccharomyces cerevisiae* and *S. bayanus*, were *S. cerevisiae* species, including three strains labeled as *S. bayanus*. Red wine made on a small scale showed significant positive correlation coefficients between the absorbance at 520 nm ( $A_{520}$ ) at pH 0.25, an index of the anthocyanin concentration,  $A_{420}$ , and the flavonoid and total phenol concentrations. Correlation coefficients between  $A_{530}$ , which is influenced by pH, and  $A_{520}$  at pH 0.25,  $A_{420}$ , and the flavonoid and total phenol concentrations were not significant. There would thus appear to be some variations in polygalacturonase or related enzymatic activity among wine yeasts. The correlation coefficient between the sulfite and acetaldehyde concentrations of fermented wines was also significant. Significant positive correlation coefficients were observed between the  $A_{660}$  6 cm from the surface 9 days after resuspension of yeasts, which is an index of the yeast sedimentation speed, and the glycerol concentration and specific gravity. However, there was no significant correlation between glycerol concentration and specific gravity. The sedimentation speed of yeasts without flocculation ability in wine, as well as that of spheroids in liquid, seemed to be explained by the specific gravity and coefficient of viscosity of wine, because glycerol is a highly viscous substance.

**Key words:** wine yeast, species identification, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, fermentation characteristics, polyphenol extraction, sedimentation speed

## 緒言

同じ原料ブドウを使用しても、使用する酵母によって醸造されたワインの品質が異なることは良く知られており、酵母メーカーからは種々の醸造特性を示す酵母が市販されている。近年、*Saccharomyces bayanus*は低温発酵性に優れ、 $\beta$ -フェニルエチルアルコール、チロソール及び酢酸 $\beta$ -フェニルエチルの生成量が多いこと、*S. bayanus*の中には、グリセロール、リンゴ酸、コハク酸の生成量が多く、酢酸の生成量が少ない菌株が多いなど、*S. cerevisiae*とは異なる醸造特性を示すことが報告されている(3, 10)。*S. bayanus*は*S. cerevisiae*と比較してエタノール収得率が低く、グリセロール、リンゴ酸、コハク酸の高生産とバランスを取っていると考察されている(4)。また、ワイン酵母のS6Uは*S. cerevisiae*

と*S. bayanus*の自然交雑株であり、S6Uの $\beta$ -フェニルエチルアルコール生成量は、*S. cerevisiae*と*S. bayanus*の中間の値を示すことが報告されている(13)。ここで、*S. bayanus*や*S. cerevisiae*は、DNA類似度や交雑実験における雑種株の不稔性に基づく新しい分類による種名であり、以前の糖類の資化・発酵性に基づく分類とは対応していないことが報告されている(27)。しかし、市販酵母には、種名が表示されていなかったり、古い分類に基づく種名が表示されていたりして、現在の種名を知ることが一般ユーザーには困難である。また、各菌株の性質についても、十分な情報が提供されていないのが現状である。そこで、市販ワイン酵母の同定を行うとともに、種々の醸造特性を比較し、これらの間の相関関係を調べたので報告する。

## 材料と方法

1) **ワイン酵母** 酵母の種の同定には、Table 1の25株を供試した。試験醸造には、OC-2、W-3、UCD530も使用した。

2) **酵母の種の同定** Ryuら(22)の報告によるRPL2領域のPCR解析、及びMasneufら(12)の報告によるMET2領域のPCR-RFLP解析により同定した。酵母DNAはQiagen Genomic TipとDNA Buffer Setを用いて抽出した。サーマルサイクラーはGeneAmp 2400 PCR System (Perkin Elmer)、DNAポリメラーゼはEx Taq (Takara)を用い、RPL2領域のPCRは、次のプログラムで行った：94℃4分；94℃20秒、66℃(55℃まで1サイクルごとに1℃降温)30秒、72℃30秒を12サイクル；94℃20秒、55℃30秒、72℃30秒を10サイクル；72℃10分。

*S. cerevisiae*と*S. bayanus*のRPL2遺伝子の非翻訳

領域には、染色体の組み換えによって生じたと考えられる配列の差異があるため、*S. cerevisiae*と*S. bayanus*の配列に共通な上流域のプライマーと、*S. cerevisiae*の下流域特異的プライマー、及び*S. bayanus*の下流域特異的プライマーの3種類のプライマーを用いてPCRを行うと、*S. cerevisiae*からは1.1 kbp、*S. bayanus*からは1.9 kbpのフラグメントが増幅されると報告されている(22)。

また、*S. cerevisiae*のMET2遺伝子の580 bpの配列にはEcoRIサイトがあってPstIサイトがないが、*S. bayanus*の配列にはEcoRIサイトがなく、PstIサイトがあるため、MET2領域のPCR産物をEcoRI及びPstIでそれぞれ消化して、電気泳動することで、両者を識別できると報告されている(12)。

3) **亜硫酸耐性試験** Uzukaらの方法(23)に従い、0.1M酒石酸ナトリウムバッファーでpH 3.0に調製したWickerham培地に、オートクレーブ後、亜硫酸を

添加した。亜硫酸濃度は、5 mg/L間隔で0~60 mg/Lを設定し、亜硫酸水素ナトリウム0.15 g/mLを1%亜硫酸として計算した。Wickerham培地で25℃、3日間静置培養した菌体を集菌・洗浄後、培地に亜硫酸添加後2時間以上してから、OD<sub>660</sub> = 0.01になるように添加し、25℃で静置培養し、3日後に1/10希釈後のA<sub>660</sub>を測定した。

4) **小仕込み試験** 白ワインの小仕込みには、凍結保存したシャルドネを用い、果汁を24°Brixまでグルコースで補糖し、100 mg/Lのピロ亜硫酸カリウムを添加した。酵母は、UCD530、EC1118、S6U、AC-、CY3079、W-3、CEG、及びCS2を用いた。市販ワイン酵母はメーカーの指示通り復水し、4 × 10<sup>6</sup> cells/mLになるように添加した。保存菌株はYEPD培地中、25℃で2日間振とう培養し、OD<sub>660</sub> = 0.1の水懸濁液の酵母密度を5 × 10<sup>6</sup> cells/mLとして市販酵母と同等の酵母密度になるように添加した。1

Table 1. Species identified of commercial wine yeasts by PCR and PCR-RFLP methods.

Strain	Trade name or producer	Indicated species	Identified species
K1(V1116)	Lalvin <sup>Z</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Wädenswil 27	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
EC1118 Prise de Mousse	Lalvin	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
S6U	Lalvin	<i>S. uvarum</i>	Hybrid*
RC212	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
R2	Lalvin	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
T73 Valencia	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
AC-	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
71B	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Bourgoblanc CY3079	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
ICV D254	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Brunello M (BM) 45	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
L2056	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Bourgorouge RA17	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
L2323	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
L2226	Lalvin	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Montrachet	Red Star <sup>Y</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Beaujolais	Red Star	unknown	<i>S. cerevisiae</i>
CM	Uvaferm <sup>X</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
BC	Uvaferm	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
CEG	Uvaferm	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
CS2	Uvaferm	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SIHA3	Begerow <sup>W</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SIHA4	Begerow	unknown	<i>S. cerevisiae</i>
SIHA7	Begerow	unknown	<i>S. cerevisiae</i>

<sup>Z</sup> Lallemand Inc. Montreal, Canada

<sup>Y</sup> Red Star Yeast & Products, Milwaukee, USA

<sup>X</sup> Danstar Ferment AG, Zug, Switzerland

<sup>W</sup> E. Begerow GmbH & Co., Langenlonsheim, Germany

\* Hybrid, *S. cerevisiae* x *S. bayanus*.

仕込みあたり果汁1Lを1.5 L容ガラス瓶（マヨネーズ瓶）に入れ、15℃の水浴中で発酵させた。

赤ワインの小仕込みには、凍結保存したカベルネ・ソービニオンを用い、16 kgのブドウを手で除梗・破碎したのち、22°Brixまでグルコースで補糖し、ピロ亜硫酸カリウムを200 mg/L 添加した。その後、メッシュの布を用いて果汁と固形分に分け、それぞれを8等分して、4 L容ガラス瓶（梅酒瓶）に入れた。酵母は、OC-2、K1(V1116)、RC212、T73、D254、BM45、RA17及びCMを用い、白ワインと同様の方法で添加し、20℃恒温室内で発酵させた。アルコール発酵がほぼ終了した9日目に、メッシュの布を用いて手で可能なところまで搾汁し、11日目に100 mg/Lのピロ亜硫酸カリウムを添加した。

5) 分析 比重は京都電子工業（株）製振動密度計DA-300で、生成酒のアルコール分は蒸留後、振動密度計で測定した。また、発酵途中のアルコール分は、新日本無線（株）製バイオセンサー、バイオ・フレッシュNJZ1240を用いて測定した。赤ワインの $A_{420}$ 及び $A_{530}$ は2 mmセルで、白ワインの $A_{420}$ は10 mmセルで測定した。pH 0.25での $A_{520}$ は、試料を1N HClで1/20に希釈し、10 mmセルで $A_{520}$ を測定し、アントシアニン量の指標とした（28）。有機酸濃度は、Sim-packを装着したHPLC（11）で測定した。ただし、ピルビン酸と酒石酸が分離しないため、ピルビン酸は酵素法（F-キット、Boehringer Mannheim）で定量し、ピルビン酸のピーク面積を差し引いて酒石酸濃度を算出した。グリセロール濃度、アセトアルデヒド濃度、及び総亜硫酸濃度は酵素法（F-キット、Boehringer Mannheim）で測定した。総フェノール及びフラボノイド・フェノール濃度は、フォーリン・シオカルト法（17）で測定した。酵母の沈降速度の指標として、発酵終了後に亜硫酸を添加して攪拌、酵母を再懸濁させた後、液面から6 cmのサンプルを経日的に採取し、 $A_{660}$ を測定した。サンプルの採取には、先端から6 cmの位置にマークした自動ピペッターのチップを用

いた。メチレンブルー染色率はアルコール発酵が終了したと判断された日に測定した。その他の分析項目は、国税庁所定分析法（5）に基づいて分析した。

## 結果

1) ワイン酵母の種の同定 *RPL2*領域のPCR解析の結果（Fig. 1）、S6Uからは*S. cerevisiae*（1.1 kbp）と*S. bayanus*（1.9 kbp）の両方のフラグメントが検出されたが、他の供試菌株からは、すべて*S. cerevisiae*のフラグメントのみが検出された。

*MET2*領域のPCR-RFLPの結果（Fig. 2）、S6U

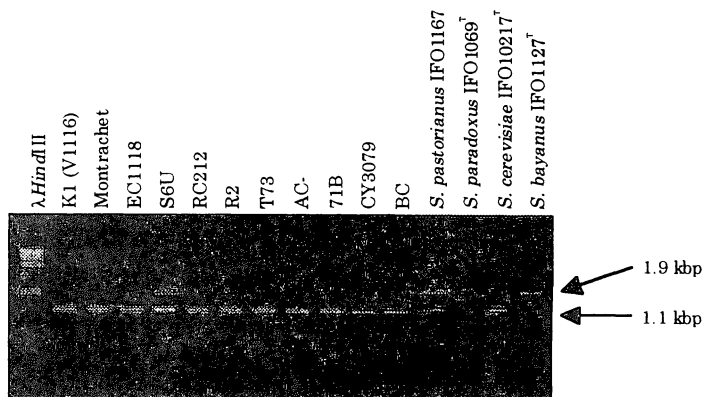


Fig. 1. PCR analysis of *RPL2* region of commercial wine yeasts and control strains. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

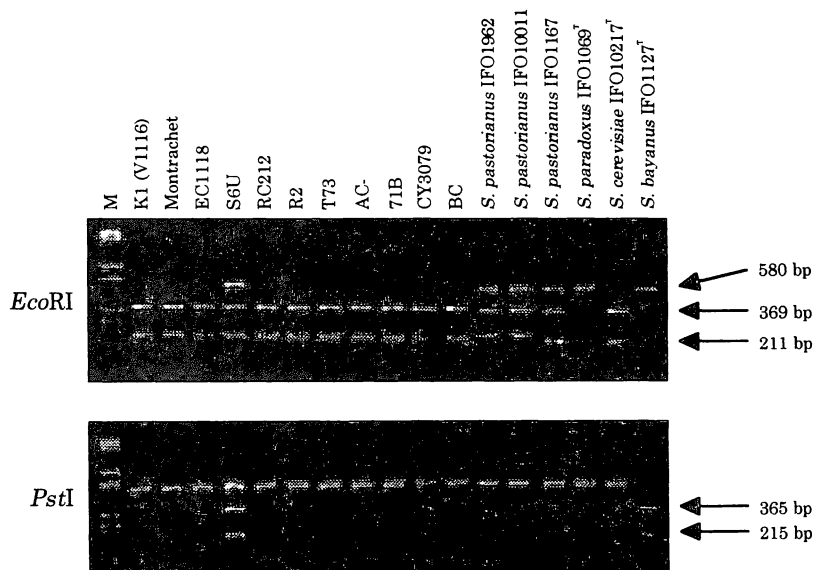


Fig. 2. PCR-RFLP analysis of *MET2* region of commercial wine yeasts and control strains. *Pst*I- and *Eco*RI-digested *MET2* fragments were analyzed by electrophoresis on a 1.8% agarose gel. M, DNA size standards—low range (pBR322/*Ava*II x pBR322/*Eco*RI, *Ava*II; Bio-Rad).

以外の供試菌株は全て *S. cerevisiae* のパターンを示し、S6Uは *EcoRI*、*PstI*消化とも *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の両者のフラグメントを示した。なお、他で報告したとおり、コントロールとして供試した *S. pastorianus* 3株は、*EcoRI*消化では *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の両者のフラグメントを示したが、*PstI*消化では *S. cerevisiae* と同じフラグメントのみを示

した (2)。

以上の結果から、S6UはMasneufらの報告 (13) どおり、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の自然交雑株と考えられた。その他の供試菌株については、*S. bayanus* と表示されているEC1118、R2及びBCを含む全ての株が *S. cerevisiae* と同定された (Table 1)。

なお、Kishimoto ら (9) によって、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果、OC-2 及び W-3 は *S. cerevisiae*、UCD530は *S. bayanus* と同定されている。

2) ワイン酵母の亜硫酸耐性 生育最大亜硫酸濃度 (Fig. 3) には、5 mg/Lから35~40 mg/Lまで大きな差異が認められた。亜硫酸耐性の高い酵母はBM45、L2056及びR2、低い酵母はBeaujolais、Wädenswil 27及び71Bであった。メーカーの資料には、L2056及びK1 (V1116)が亜硫酸耐性が高く、71Bは低温にして亜硫酸を添加すると、容易に発酵を停止できると記載されており、記載のある株については、一致する結果であった。なお、K1 (V1116)は亜硫酸耐性遺伝子を高発現しており、高い亜硫酸耐性を示すことを、以前に報告

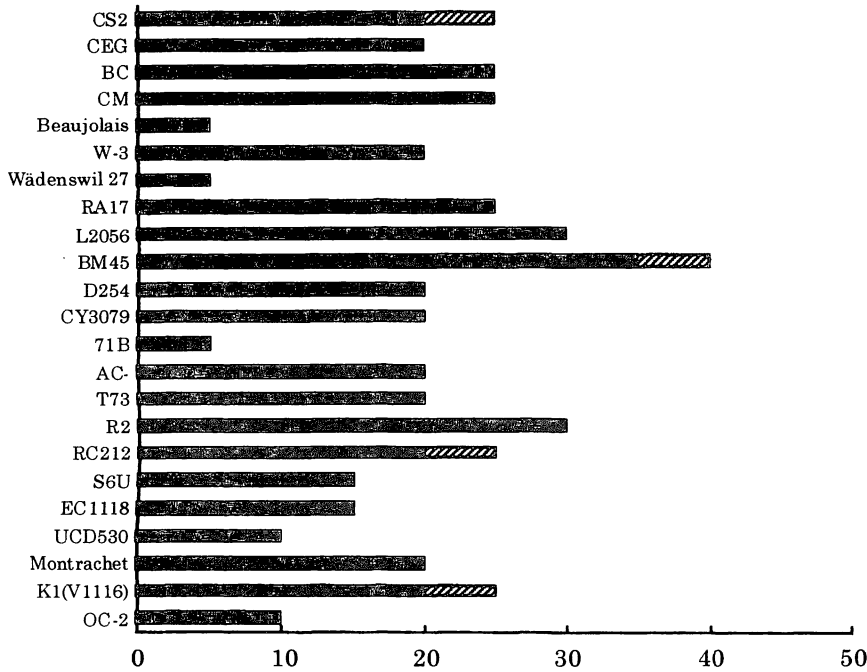


Fig. 3. Maximum concentrations of initial  $\text{SO}_2$  permitting yeast growth after 72 h in Wickerham's medium buffered with 0.1 M sodium tartrate at pH 3.0. ■,  $A_{660} > 1.5$ ; ▨,  $A_{660} > 0.5$ .

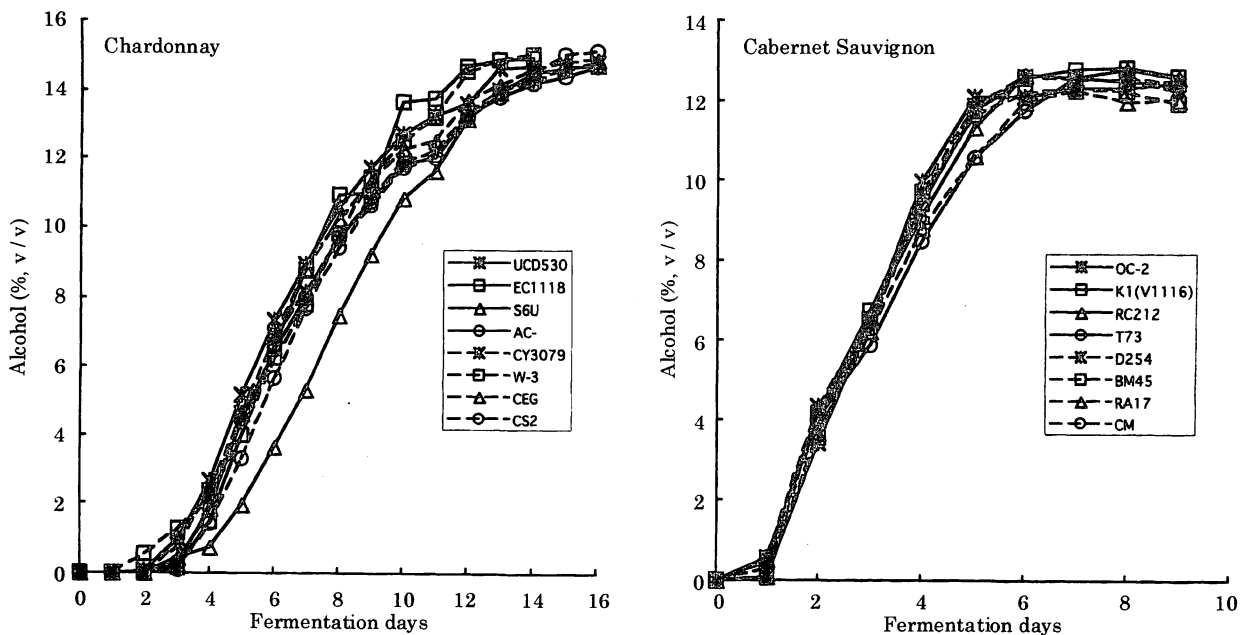


Fig. 4. Changes in alcohol concentrations during fermentation of Chardonnay and Cabernet Sauvignon wines using commercial wine yeasts.

している (7)。

3) 白ワインの小仕込み結果 補糖後の供試果汁は、総酸0.84%、pH 3.29、比重換算糖度26.7% (w/v)であった。発酵経過をFig. 4、生成酒の成分をTables 2, 3に示す。*S. bayanus*のUCD530は、これまでの報告と同様、*S. cerevisiae*の供試菌株と比較して、生成酒のアルコール分が低く、グリセロール濃度、コハク酸濃度が高かった。また、エキスが高く、メチレンブルー染色率が高いことから、アルコール耐性の低いことが確認された。さらに酢酸濃度は供試菌株のなかでは低い値を示したが、リンゴ酸濃度は高くなかった。また、*S. cerevisiae*と*S.*

*bayanus*の交雑株であるS6Uの生成酒は、グリセロール濃度とコハク酸濃度は*S. cerevisiae*と*S. bayanus*の中間的な値を示したが、酢酸濃度が最も高く、他の成分に関しては*S. cerevisiae*に近い値を示した。S6Uは、メーカーの資料にslow starterと記載されているとおり、発酵速度がやや遅かったため、高浸透圧によって酢酸生成量が高くなったもの(1)と推定される。

メチレンブルー染色率はEC1118、及びCY3079が低い値を示し、アルコール耐性が強いことを示した。EC1118はシャンパン方式の2次発酵、及びstuck fermentation (発酵遅延)を起こしたワインの救済

Table 2. Analytical data for Chardonnay white wines fermented with commercial wine yeasts.

Strain	Alcohol (%,v/v)	Total acid (%,w/v) <sup>Z</sup>	pH	Extract (g/100mL)	M.B.dyeing ratio (%) <sup>Y</sup>	A <sub>420</sub> (10mm)	Glycerol (g/L)	Acetaldehyde (mg/L)
UCD530	13.3	0.86	3.59	3.26	64.1	0.100	13.2	27
EC1118	14.3	0.86	3.28	2.63	12.5	0.095	8.4	50
S6U	14.3	0.89	3.32	2.73	25.0	0.083	10.0	23
AC-	13.9	0.86	3.32	3.22	32.3	0.083	7.9	27
CY3079	14.1	0.84	3.31	2.73	14.7	0.098	6.9	27
W-3	14.3	0.75	3.38	2.50	35.7	0.069	7.5	21
CEG	14.1	0.81	3.36	2.78	35.9	0.133	7.4	33
CS2	14.2	0.86	3.31	2.55	53.3	0.145	6.7	39

<sup>Z</sup> Calculated as tartaric acid.

<sup>Y</sup> Methylene blue dyeing ratio determined just after fermentation has completed.

Table 3. Organic acid concentrations of Chardonnay white wine fermented with commercial wine yeasts.

Strain	Organic acid (mg/L)						
	Pyruvate	Citrate	Lactate	Tartrate	Malate	Succinate	Acetate
UCD530	51	404	465	1782	3769	2004	99
EC1118	60	382	213	1425	4775	1056	158
S6U	65	358	259	1377	4070	1306	449
AC-	39	382	301	1394	4475	1063	87
CY3079	42	386	204	1422	4302	1060	138
W-3	41	387	154	1382	3843	966	90
CEG	47	382	206	1439	4069	866	338
CS2	102	373	169	1535	4409	802	347

Table 4. Analytical data for Cabernet Sauvignon red wines fermented with commercial wine yeasts (1).

Strain	Alcohol (%,v/v)	Total acid (%,w/v)	pH	Extract (g/100mL)	M.B.dyeing ratio (%)	Glycerol (g/L)	Sulfite (mg/L)	Acetaldehyde (mg/L)
OC-2	11.9	0.85	3.76	4.34	16.2	9.9	24	7
K1(V1116)	11.8	0.88	3.74	3.10	17.8	8.2	32	12
RC212	11.9	0.87	3.68	3.07	2.5	8.6	24	8
T73	11.8	0.93	3.69	3.12	7.1	8.8	26	9
D254	11.7	0.83	3.73	2.99	16.8	4.2	18	9
BM45	11.3	1.04	3.60	3.17	22.7	8.9	40	21
RA17	11.4	0.98	3.64	3.25	3.7	8.5	26	9
CM	11.8	0.86	3.70	3.04	6.9	8.2	20	8

にも使用されるアルコール耐性の強い酵母とされている。

4) 赤ワインの小仕込み結果 補糖後の供試果醪は、総酸0.83%、pH 3.41、比重換算糖度23.0% (w/v)であった。発酵経過 (Fig. 4) や生成酒のアルコール分 (Table 4) には大きな差異が認められなかった。また、発酵温度は、2日目が21.5~22.0℃と最も高い値で、菌株による大きな違いは認められなかった。BM45は、メーカーの資料にはslow starterと記載されており、予備試験として行った、合成培地を用いた25℃での発酵試験 (data not shown) では、炭酸ガス減量による発酵経過がUCD530の次に緩慢であったが、今回の小仕込み試験ではそのような傾向は認められなかった。

メチレンブルー染色率は、この小仕込み試験では補糖後の糖度が比較的low、アルコール分が12%弱と低かったため、全般に低い値であったが、中でもRC212、RA17、及びCMが低い値を示した。なお、メーカーの資料では、RC212とRA17がアルコール15%まで、BM45は15%以上、D254は16%まで耐性を示す、と記載されている。また、K1(V1116)とT73も高いアルコール耐性を示すと記載されており、K1(V1116)はstuck fermentationの救済にも使用が推奨されているが、今回の実験条

件では、K1(V1116)とBM45は他の株よりも高いメチレンブルー染色率を示した。

5) 赤色とポリフェノール濃度 赤色の吸光度 ( $A_{530}$ ) には酵母菌株によってかなりの差が認められた (Fig. 5)。新酒のアントシアニン量の指標となる  $A_{520}$  at pH 0.25 の値はOC-2、RC212及びK1 (V1116)の生成酒が高く、これらのワインでは総フェノールやフラボノイド・フェノールも高い値を示した (Table 5)。  
 $A_{520}$  at pH 0.25と総フェ

ノール、フラボノイド・フェノール及び  $A_{420}$ 、並びに  $A_{420}$  と総フェノール、フラボノイド・フェノール間には有意な相関が認められた (Table 6)。RC212は、メーカーの資料にfull extraction が必要な赤ワインに適している、と記載されているとおり、OC-2と並んで高いフラボノイド・フェノール濃度や  $A_{520}$  at pH 0.25を示した。酵母の菌株によって赤ワインのcolor intensityとポリフェノール量が異なること

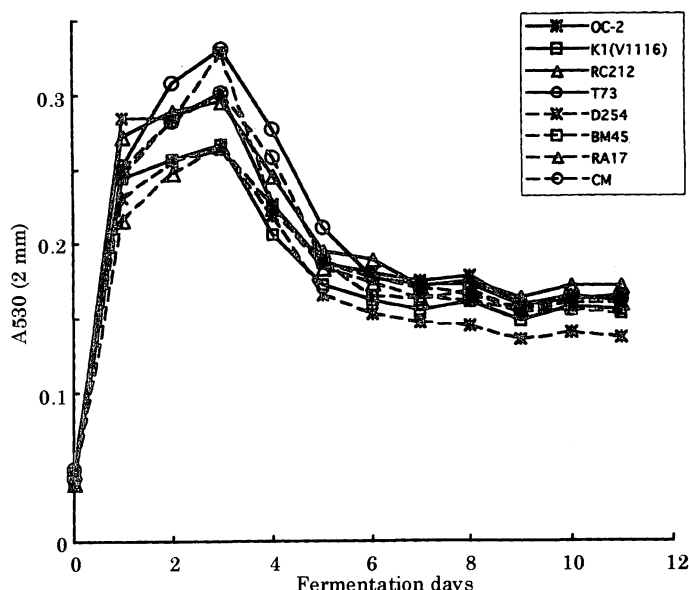


Fig. 5. Changes in red color ( $A_{530}$ ) during red wine fermentation using commercial wine yeasts.

Table 5. Analytical data for Cabernet Sauvignon red wines fermented with commercial wine yeasts (2).

Strain	$A_{420}$ (2mm)	$A_{530}$ (2mm)	$A_{520}$ at pH 0.25	Total phenol (mg/L) <sup>Z</sup>	Flavonoid phenol (mg/L) <sup>Z</sup>
OC-2	0.131	0.123	5.8	487	300
K1(V1116)	0.115	0.125	5.6	450	286
RC212	0.121	0.132	5.7	461	290
T73	0.114	0.118	5.2	423	248
D254	0.115	0.112	4.9	440	273
BM45	0.114	0.130	5.1	441	261
RA17	0.101	0.114	4.9	421	234
CM	0.113	0.120	5.3	418	238

<sup>Z</sup> Calculated as gallic acid.

Table 6. Correlation coefficients among analytical data for color and polyphenols of red wines fermented commercial wine yeasts.

	$A_{420}$	$A_{530}$	$A_{520}$ at pH 0.25	Total phenol	Flavonoid phenol
$A_{530}$	0.4507				
$A_{520}$ at pH 0.25	0.7860*	0.6483			
Total phenol	0.8727**	0.4838	0.7591*		
Flavonoid phenol	0.8327*	0.4875	0.7364*	0.9396***	
pH	0.5839	-0.2314	0.5172	0.4797	0.5582

\*  $\alpha < 0.05$ ; \*\*  $\alpha < 0.01$ ; \*\*\*  $\alpha < 0.001$ .

は以前から知られており (6)、矢内ら (22) はペクチン分解酵素活性の高い酵母の中には、生成した赤ワインの color density が上昇する菌株のあることを報告している。これらの報告及び今回の結果から、OC-2、RC212、K1 (V1116) は、ポリガラクトナーゼなどの酵素活性が高く、ブドウ果皮からのポリフェノール類の抽出効率が他の酵母よりも高いのではないかと推察される。今回は供試したブドウの着色が悪く、発酵温度やアルコール分もやや低かったため、生成酒の赤色やポリフェノール濃度が全体に低い値を示した。今後、より適した条件で小仕込み試験を行うとともに、ポリガラクトナーゼ活性等の検討を行う必要があると考えられる。

一方、 $A_{530}$  は  $A_{520}$  at pH 0.25 と正の相関は示したものの、相関係数は比較的 low、有意な値とならなかった。これは、新酒赤ワインの赤色はアントシアニン量だけでなく pH の影響を受けるためと考えられる。なお、メーカーの資料には BM45 は多糖類を多く分泌するため、アントシアニン-タンニン-多糖複合体を形成し、色の安定性に優れると記載されているが、この点については今回は検討できなかった。

**6) 酵母の沈降速度** 酵母の沈降速度は、アルコール発酵後のオリ引きなどの作業に影響を及ぼすと考えられる。赤ワインのアルコール発酵終了後、亜硫酸の添加及び攪拌を行って、酵母を懸濁させた後、液面から 6 cm の位置での  $A_{660}$  の経日変化を調べたところ、菌株によって大きな差異を示した (Fig. 6)。攪拌後 9 日目の  $A_{660}$  と、他の分析項目の単相関を調べたところ (Table 7)、グリセロール濃度、エキス分及び比重が有意な正の相関を示した。一方、グリセロール濃度と、エキス分及び比重の相関係数は有意ではなかった。

球形粒子の沈降速度は、粒子と媒質 (溶液) の密度の差、及び半径の 2 乗に比例し、

媒質の粘性率に反比例することが知られている。今回の供試菌株には凝集性が認められなかったため、酵母の比重や大きさには菌株差がないと仮定すると、ワインの比重が高く、酵母の比重との差が小さいほど、また、グリセロール濃度が高く、粘性率が高いほど酵母の沈降速度が小さいと考えられる。今後、ワインの粘度の測定や、オリゴ糖、ペクチン質等の粘度に關する他の成分の寄与も検討する必要があると考えられる。

グリセロールは高浸透圧条件での浸透圧調節物質として、また発酵のように酸素供給が少ない条件下で  $NAD^+/NADH$  のバランスを取るために生合成されると考えられている (8)。また、グリセロールの生成量は酵母菌株によって大きく異なることが報告されている (21)。従って、発酵終了後の澱引を早く行う必要がある場合は、ワインの比重が低くなるよう

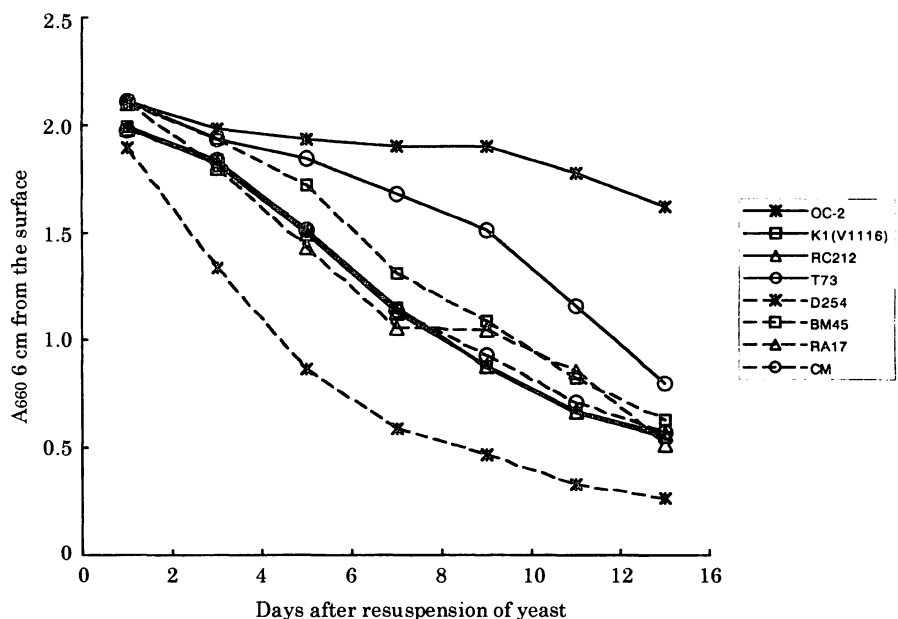


Fig. 6. Changes in turbidity ( $A_{660}$  6 cm from the surface) of red wines fermented using commercial wine yeasts and pressed.

Table 7. Correlation coefficients among glycerol concentration, extract, specific gravity, and yeast sedimentation speed in Cabernet Sauvignon red wines fermented with commercial wine yeasts.

	Sedimentation speed <sup>z</sup>	Glycerol	Extract
Glycerol	0.7793*		
Extract	0.8041*	0.5155	
Specific gravity	0.7856*	0.5083	0.9869***

<sup>z</sup>  $A_{660}$  6 cm from the surface 9 days after resuspension of yeasts.  
\*  $\alpha < 0.05$ ; \*\*\*  $\alpha < 0.001$ .

な品質設計、発酵管理を行う、グリセロール生産性の低い酵母を使用する、若しくは凝集性の酵母を使用して酵母の沈降を早めることが可能であると考えられる。

7) 亜硫酸とアセトアルデヒド 赤ワインのアルコール発酵終了後の亜硫酸濃度とアセトアルデヒド濃度の間には、高い正の相関が認められた (Fig. 7)。白ワインの小仕込み試験では、亜硫酸濃度の測定を行っていないが、この実験とは別に行った14株を用いた白ワインの小仕込み試験でも、亜硫酸濃度とアセトアルデヒド濃度は、0.8558と高い相関係数を示した (data not shown)。メーカーの資料にはRC212、RA17、L2056 (今回は不使用) が亜硫酸の生産が低い、D254とWädenswil 27 (今回は不使用) が亜硫酸とアセトアルデヒドの生産が低い、K1 (V1116) は亜硫酸の生産が中程度、と記載されており、今回供試した記載のある株については、生成酒の亜硫酸濃度と矛盾しない傾向を示した。発酵前に添加された亜硫酸は、発酵中に、硫酸に還元されたり、不可逆的な結合型となったり、酵母に吸収されるなどして失われていく一方で、発酵中に酵母によって生成されることが知られている (20)。従って、今回測定した亜硫酸濃度は、添加した亜硫酸が発酵終了後に残存した濃度と酵母によって生成された濃度の合計値と考えられる。アセトアルデヒドは亜硫酸イオンに結合して抗菌活性を低下させる作用があり、培養液に添加された亜硫酸によって、酵母の

アセトアルデヒドの分泌が促進されることが報告されている (16, 18)。今回の結果は、生産された亜硫酸を含む生成酒の亜硫酸濃度とアセトアルデヒド濃度が正の相関を示すものである。今後、亜硫酸を添加しない条件での発酵試験を行い、亜硫酸とアセトアルデヒドの生産性を検討する必要があると考えられる。

## 考察

*Saccharomyces cerevisiae* complex や *Saccharomyces sensu stricto* と呼ばれるいわゆる醸造用酵母の分類は、ここ20年ほどの間に2回変更されており、第2版のThe Yeast; A Taxonomic Study (1970)では、糖類の資化性、発酵性などの生理的性質の違いに基づき*S. chevalieri*、*S. diastaticus*など17種あった種名が、1984年の第3版ではYarrowによって*S. cerevisiae* 1種に統合された。しかし、Vaughan-MartiniらはDNAの相同性や交雑株の稔性によって*S. cerevisiae*、*S. bayanus*、*S. paradoxus*が独立した種であることを示し、*S. cerevisiae*と*S. bayanus*の交雑株であるラガービール酵母にも*S. pastorianus*の種名を認めた(23, 24)。この分類が第4版のThe Yeast (1998) や、第3版のYeasts: Characteristics and Identification (ed. Barnett et al. 2000)にも記載され、現在一般に用いられている。

今回、25株の市販ワイン酵母のDNA多型解析による種の同定を行ったところ、*S. bayanus*と表示されているEC1118など3株を含む24株が、*S. cerevisiae*であった。また、*S. bayanus*と*S. cerevisiae*の自然交雑株と報告されているS6Uも、*S. uvarum*と表示されており、分類方法が変更になったにも関わらず、酵母メーカーが旧来の種名表示を続けていることが示された。近年、*S. bayanus*と*S. cerevisiae*は異なる醸造特性を示すことが報告されており、新しい情報がユーザーに提供されることが望まれる。また、種々のタイプのワインに適した酵母が使用できるよう、*S. bayanus*に属するワイン酵母が国内でも容易に入手できるようになることが望ま

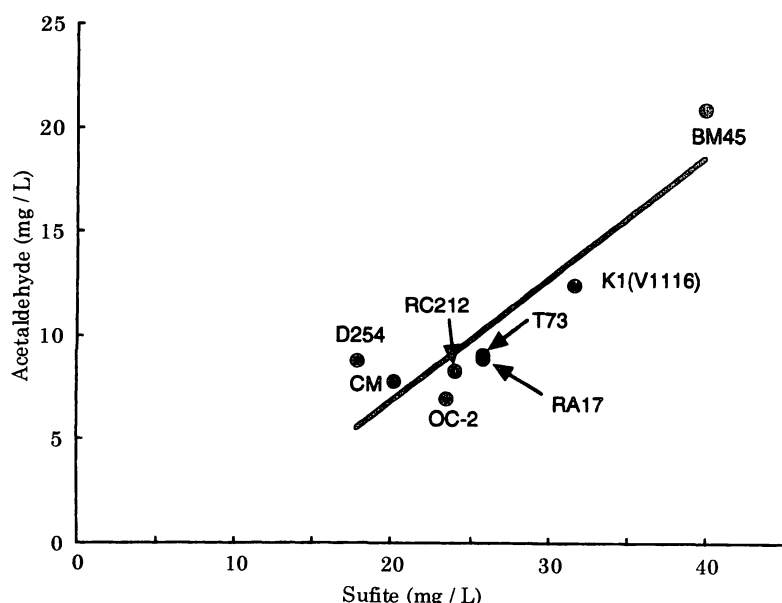


Fig. 7. Correlations between acetaldehyde and  $\text{SO}_2$  concentrations in red wines fermented with commercial wine yeasts.



れる。

最近、低温発酵性ワイン酵母の一群は *S. bayanus* のタイプストレインとの交雑株の稔性が低いことや、電気泳動的核型や生理的性質の違いから、*S. bayanus* var. *uvorum* とすべきであるという報告 (14) や、*S. uvorum* として独立した種とするべきであるという報告 (19) が出されている。さらに、*S. bayanus* は *S. cerevisiae* と *S. uvorum* の交雑株であるという報告 (15) も出されており、これらの種の分類が再度変更されることも予想される。

市販ワイン酵母の種々の醸造特性のうち、亜硫酸耐性の程度、亜硫酸生成の多少、及び色素やフェノール化合物の抽出について、メーカーの資料に記載のあるものについては矛盾しない小仕込み試験の結果が得られた。また、71B はリンゴ酸を代謝して減少させると記載されており、合成培地を用いた発酵試験で、リンゴ酸濃度の減少が確認されている (data not shown)。一方、アルコール耐性については必ずしもメーカーの資料と一致しない結果も得られた。この他、ワイン酵母の選定のためには、発酵に適した温度、硫化水素などの異臭の生成の程度、どのような品種特性香の発揮にすぐれるか、など種々の醸造特性の情報が必要とされる。今回の供試菌株は国内に常時輸入されている株と、海外のメーカーから直接取り寄せたものである。海外にはまだ多種類の市販ワイン酵母が流通しているが、それらを全て取り寄せて性質を比較することはユーザーにとってなかなか困難である。現在、これらの情報は断片的にしか提供されていないが、酵母メーカーによるより多くの情報の提供や、複数の酵母メーカーの市販ワイン酵母の比較・検討、さらにこれらの情報の共有が望まれる。

また、今回の小仕込み試験で、アントシアニン系色素とフラボノイド・フェノール濃度、亜硫酸濃度とアセトアルデヒド濃度、及び酵母の沈降速度の指標となる懸濁後9日目の濁度と比重及びグリセロール濃度間に有意な正の相関が見出された。このような検討をより詳細に行うことで、種々の醸造特性が酵母のどのような性質に基づいているのかを明らかにすることができ、有用酵母のスクリーニングや育種に役立つものと考えられる。

## 要約

1. 市販ワイン酵母25株の種を同定したところ、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑株と報告されている S6U 以外の供試菌株は、*S. bayanus* と表示されている3株を含め、すべて *S. cerevisiae* であった。
2. 市販ワイン酵母を用いて小仕込み試験を行ったところ、赤ワインのアントシアニン量の指標である  $A_{520}$  at pH 0.25 と、 $A_{420}$ 、総フェノール及びフラボノイド・フェノール濃度間に有意な正の相関が見出され、酵母による果皮成分の抽出効率の違いが示唆された。また、生成酒の亜硫酸濃度とアセトアルデヒド濃度間に正の相関が認められた。酵母の沈降速度の指標とした懸濁9日後の表面から6 cm の  $A_{660}$  と比重及びグリセロール濃度間に有意な正の相関が見出され、凝集性のない酵母の沈降速度の違いは、球形粒子の沈降速度と同様、ワインの比重と粘性率によって説明されると考えられた。

## 文献

1. Akamatsu, S., H. Kamiya, N. Yamashita, T. Motoyoshi, N. Goto-Yamamoto, T. Ishikawa, N. Okazaki and A. Nishimura. Effect of aldehyde dehydrogenase and acetyl-coA synthetase on acetate in sake mash. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 555-560 (2000).
2. Azumi, M. and N. Goto-Yamamoto. AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* (投稿中).
3. Bertolini, L., C. Zambonelli, P. Giudici and L. Castellari. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 343-345 (1996).
4. Castellari, L., M. Ferruzzi, A. Magrini, P. Giudici, P. Passarelli and C. Zambonelli. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 33: 49-52 (1994).
5. 注解編集委員会 (編). 第4回改正国税庁所定分析法注解. (財)日本醸造協会、東京. (1993).
6. Cuinier, C. Influence des levures sur le

- composés phénoliques du vin. Bulletin de l'O. I. V. 61: 689-690 (1988).
7. Goto-Yamamoto, N., K. Kitano, K. Shiki, Y. Yoshida, T. Suzuki, T. Iwata, Y. Yamane and S. Hara. *SSU1-R*, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of *SSU1* with a different upstream sequence. J. Ferment. Bioeng. 86: 427-433 (1998).
  8. Hohmann, S. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. In: Yeast stress responses. S. Hohmann and W. H. Mager (Eds.). pp 101-145. R. G. Landes company, Austin (1997).
  9. Kishimoto, M., E. Soma and S. Goto. Classification of cryophilic wine yeasts based on electrophoretic karyotype, G+C content and DNA similarity. J. Gen. Appl. Microbiol., 40: 83-93 (1994).
  10. 岸本宗和 · 相馬英一 · 篠原隆 · 後藤昭二. *Saccharomyces bayanus* と *Saccharomyces cerevisiae* のワイン醸造学的特性比較. 醸協 93: 231-237 (1998).
  11. 木崎康造 · 福田央 · 高橋康次郎. 貴醸酒の熟成における成分変化. 醸協 93: 148-152 (1998).
  12. Masneuf, I., M. Aigle and D. Dubourdieu. Development of a polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. FEMS Microbiol. Lett. 138: 239-244 (1996).
  13. Masneuf, I., J. Hansen, C. Groth, J. Piskur and D. Dubourdieu. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3887-3892 (1998).
  14. Naumov, G. I. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. Microbiol. 69: 338-342 (2000).
  15. Nguyen, H-V., A. Lepingle and C. Gaillardin. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. System. Appl. Microbiol. 23: 71-85 (2000).
  16. 乙黒親男 · 渡辺正平. 発酵によるアセトアルデヒド、ピルビン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成と酵母菌株の関係. 醸協 73: 962-967 (1978).
  17. Ough, C. S. and M. A. Amerine. Phenolic compounds. In: Methods for analysis of musts and wines, second edition. pp 196-221. Wiley Interscience, New York. (1987).
  18. Pilkington, B. J. and A. H. Rose. Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to sulphite. J. Gen. Microbiol. 134: 2823-2830 (1988).
  19. Rainieri, S., C. Zambonelli, J. E. Hallsworth, A. Pulvirenti and P. Giudici. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. FEMS Microbiol. Lett. 177: 177-185 (1999).
  20. Rauhut, D. Yeasts - Production of sulfur compounds. In: Wine microbiology and biotechnology. G. H. Fleet (Ed.). pp 183-223. Harwood Academic Publishers, Chur (1993).
  21. Remize, F., J. M. Sablayrolles and S. Dequin. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. J. Appl. Microbiol. 88: 371-378 (2000).
  22. Ryu, S-L., K. Mikata, Y. Murooka and Y. Kaneko. A simple PCR method for distinguishing *Saccharomyces cerevisiae* from its sibling species by amplification of the RPL2 region. J. Ferment. Bioeng. 86: 249-252 (1998).
  23. Uzuka, Y., R. Tanaka, T. Nomura and K. Tanaka. Method for the determination of sulfite resistance in wine yeasts. J. Ferment. Technol. 63: 107-114 (1985).
  24. 矢内隆章 · 花牟礼研一 · 佐藤充克. ポリガラクチュロナーゼ高活性ワイン酵母のスクリーニングとワイン醸造への応用. J. ASEV Jpn. 9: 177-178

- (1998).
25. Vaughan Martini, A. and C. P. Kurtzman. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. Int. J. System. Bacteriol. 35: 508-511 (1985).
26. Vaughan Martini, A. *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a new separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies. System. Appl. Microbiol. 12: 179-182 (1989).
27. 山田より子・金子嘉信・見方洪三郎. 発酵研究所に保存されている醸造酵母の同定. Bull. JFCC 6: 76-85 (1990).
28. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA赤ワインの熟成中における色調の変化 I. 色素パラメータのスペクトル分析. 醸協 90: 222-229 (1995).