

[研究 報 文]

パプリカ種子抗菌性物質添加によるスパークリングワインの二次発酵の停止

横塚弘毅¹、松土俊秀¹、奥田 徹¹、高柳 勉¹、矢嶋瑞夫²¹山梨大学大学院医学工学総合研究部・ワイン科学研究センター、²アサマ化成株式会社

Termination of Bottle Fermentation of Sparkling Wine Using Paprika Seed Antimicrobial Substance

Koki Yokotsuka¹, Toshihide Matsudo¹, Tohru Okuda¹, Tsutomu Takayanagi¹
and Mizuo Yajima²¹The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan²Asama Chemical Co., Ltd., 20-3 Nihonbashi-Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0001, Japan

Sparkling wine was produced by bottle fermentation of Chardonnay base wine using *Saccharomyces bayanus* immobilized in double-layered calcium alginate gel beads, followed by termination of the fermentation using paprika seed antimicrobial substance (PSAS). An antimicrobial fraction was extracted from paprika seeds using 50% aqueous ethanol solution, followed by fractionation with ODS gel. The PSAS obtained exhibited strong antimicrobial activity against wine yeast, *Saccharomyces bayanus* (minimum inhibitory concentration was approximately 20 mg/L). Alcohol fermentation was terminated immediately after the addition of PSAS to give a concentration of 50 mg/L to the fermenting must when the pressure in the bottle reached 310 kPa (the residual sugar content was 12 g/L). The number of free viable yeast cells in the wine and that of viable yeast cells in the gel beads were decreased abruptly after the addition of PSAS. Dosage is not necessary before corking because prompt termination of bottle fermentation in order to realize the desired sugar content (the desired sweetness) was achieved by the addition of PSAS.

Key words: sparkling wine, antimicrobial substance, immobilized yeast, terminating fermentation

緒 論

伝統的方法によるスパークリングワイン製造において、酵母沈殿の除去は、多大の時間と労力を必要とし、その結果ワインのコストを上げる要因になっている。先に我々は、ボトル内二次発酵に固定化酵母を用いれば、ワイン中に存在する遊離酵母を最小限に抑えることができ、また固定化酵母の除去を従来法 (riddlingとdisgorging) によって容易に行うことができるので、製造コストをかなり軽減できることを報告した(8)。遊離酵母を用いて二次発酵を行った場合、糖が完全に消費された後10ヶ月目でさえ約10² cfu (cell forming unit) /mLの遊離酵母が存在した。多くのスパークリングワインはコルク打栓前に、高濃度の糖溶液を添加して甘味をつけるので (1)、糖溶液添加の際、ワイン中に全く生酵母細胞が存在しないことが必要である。しかし、すべてのボトル中の遊離酵母数をチェックすることは商業的、産業的に不可能である。

従って、ボトル内で完全発酵を行い、さらに数ヶ月貯蔵してボトル内生酵母細胞の死滅を行った後、

開栓し、甘味付け (dosage、ドサーージュ) を行うのが一般的な製法である。前報 (8)で、我々は、パプリカ種子より抽出した抗菌性物質は、ワイン酵母に対して抗菌性を示し、その効果は殺菌的であり、スイートワイン製造において任意に発酵を停止することができることを報告した。

そこで、二重層ゲルビーズに固定化した酵母を用いたスパークリングワインのビン内二次発酵の途中で、パプリカ種子抗菌性物質を添加することによって発酵を停止できるか否か、また遊離の生酵母細胞を完全に殺菌できるか否かを目的として本研究を行った。

材料と方法

パプリカ種子抗菌性物質 (PSAS) の調製

パプリカ種子抗菌性物質の調製は前報に従って行った(3-5)。パプリカ種子粉末 1 kgに蒸留水 3 Lを加え、室温で3時間抽出し、99%エタノール 4 Lを加えて、さらに1時間攪拌抽出を行った。抽出物を木綿布を通して濾過後、12,000 ×g、20分間、遠心分離した。得られた上清を40℃、減圧下、ロータリーエ

バポレーターを用いて濃縮し、エタノールを除去した。濃縮液 (2.1 L) を脱イオン水 50 L に対して 4℃ で 6 日間透析した。この間、透析外液は一日毎に 6 回交換した。透析前の濃縮液は着色していたが、透析後の内液はほとんど色がなかった。透析内液を 12,000 × g、20 分間、遠心分離し、その上清に終濃度が 5% (v/v) になるようにエタノールを加えた。この画分にエタノールで洗浄した ODS ゲル (Cosmosil 140 C₁₈-OPN、ナカライテスク) 260 g を添加後、1.5 時間攪拌し、ODS ゲルに抗菌性物質を吸着させた。この ODS ゲルをブフナーオートを用い、Advantec No. 5c 濾紙上に集め、5% エタノール 3 L で洗浄した。洗浄後の ODS ゲルを 60% エタノール 3 L に加え、1.5 時間攪拌して抗菌性物質を溶出させ、ブフナーオートを用い、Advantec No. 5c 濾紙で濾過した。濾液中のエタノールを上述のようにロータリーエバポレーターを用いて除去後、凍結乾燥して、抗菌性物質とした。本物質は *Saccharomyces bayanus* に対して最小生育阻止濃度 20 mg/L を示した。

供試酵母

スパークリングワインの二次発酵に *Saccharomyces bayanus* (EC 1118, Lalvin) を用いた。500-mL 容坂口フラスコに液体培地 (4% グルコース、1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% KH₂O₄、0.2% MgSO₄ · 7H₂O) 100 mL を分注し、オートクレーブ殺菌を行った。これに約 1 mg の乾燥酵母を加え、30℃ で 42 時間振盪培養した。培養液を 3,000 rpm、10 分間遠心分離して酵母菌体を分離した。この菌体を滅菌水で洗浄し、同様に遠心分離して洗浄酵母菌体を得た。

固定化酵母の調製

二重層アルギン酸カルシウムゲルビーズを前報 (6) に従って作成した。すなわち、前項で調製した洗浄酵母菌体を 20 mL の滅菌水に懸濁した (5.84 × 10⁹ cfu/mL)。ゲルビーズ作成装置の外側ノズルから 2% アルギン酸ナトリウム溶液を、内側ノズルから 2.5% アルギン酸溶液と酵母懸濁液の混合液 (4 : 1, v/v) を、ペリスタポンプを用いて、0.1 M 塩化カルシウム溶液中に同時に滴下した。外側ノズルと内側ノズルからの各溶液の流速は、それぞれ 2.80 と 1.40 mL/min とした (外側と内側ゲル容量は 2 : 1 となる)。ビーズは 0.1 M 塩化カルシウム溶液中に 4℃、24 時間放置後、滅菌水で洗浄した。

ベースワインの調製と二次発酵

本研究センターで 1995 年に収穫したシャルドネブドウより常法によって白テーブルワイン (アルコール 10.5%, v/v) を製造し、これをスパークリングワイン製造用のベースワインとした。ワインの還元糖量を測定し、総還元糖量が 24 g/L になるようにスクロースを添加、さらにリン酸二アンモニウム ((NH₄)₂HPO₄) 0.5 g/L (窒素にして約 100 mg/L) を加えて溶解後、メンブランフィルター (0.45 μm) で濾過した。濾液 750 mL をスパークリングワイン用耐圧ボトルに入れ、60℃、30 分間加熱殺菌した。これに 9.34g の固定化酵母ビーズを加え、全量が 750 mL になるように液量を調整 (少量のベースワインを除去) し、王冠で密栓後圧力計を装着した。各温度に対するボトル内圧力 (kPa) の値 (換算) と発生した炭酸ガス量は、Vogt による炭酸ガス量/温度/圧力関連図から求めた (1)。

試料ボトルを 10、15、あるいは 25℃ で発酵させ、圧力計のゲージが約 310 kPa になったとき、ボトルを氷冷後開栓した。氷冷しながらパプリカ種子抗菌性物質を 0、10、20、50、あるいは 100 mg/L の濃度になるように加え、再び王冠で密栓して発酵を続けた。その後 0、6、10、14、24、及び 41 日目までボトル 2 本づつを開栓し、ワインのエタノール、還元糖、滴定酸度 (以上は必要に応じて)、遊離酵母生細胞数、並びにゲルビーズ中の酵母生細胞数を測定した。それゆえ、各発酵温度につき、ベースワイン 750 mL を含む 60 本のボトル (このうち、3 本に圧力計をつけた) を同時に発酵させた。

分析は、それぞれのボトルにつき 2 回行って平均値 (全く同じ条件のボトルが 2 本あるので 4 つの測定値を得た) で示した。統計分析はエクセル統計 2000 を用いて行った。

平板培養法による酵母コロニー数の測定

二次発酵中のワインを適当な倍率に希釈し、希釈試料 1 mL を滅菌シャーレに注入した。その上から、加熱溶解して約 60℃ にした寒天培地を直接希釈液にかからないように約 9 mL 注ぎ、シャーレを静かに揺り動かして攪拌後、放冷した。これを 25℃ で 2 日間培養し、生じたコロニー数を測定した。平板培養用の培地として YM 寒天培地 (0.3% 酵母エキス、0.3% 麦芽エキス、0.5% ペプトン、1% グルコース、1.5%

寒天、pH 6.0) を使用した。

ゲルビーズ中の酵母生細胞数を測定するために、ゲルビーズを5~10倍量の0.2 Mクエン酸緩衝液 (pH 5.0) に加え、30℃で24時間穏やかに攪拌しながら完全に溶解させた。この試料液中の生酵母数を上記と同じ方法で測定した。

エタノール、還元糖及び滴定酸度の分析

エタノールはガスクロマトグラフィー(6)によって、滴定酸度と還元糖の定量はAmerine and Oughによる方法によった (2)。

結果及び考察

一般にスパークリングワインに必要なビン内圧力は10℃で5 (507kPa) ~ 6 気圧 (608kPa) であり、二次発酵のためのベースワインに必要な発酵可能な糖濃度は、1 気圧 (101.3 kPa) あたり約0.4% (4 g/L) であるので(1)、本実験では24 g/Lの糖濃度となるようにベースワインにスクロースを添加し、10、15、25℃で発酵を行った。ボトル内圧力は各発酵温度で測定したので、同じ炭酸ガス量るとき、ボトル内圧力は温度が高いほど大きいので発酵速度を、発生した炭酸ガス量で比較すると、発酵温度が高いほど発酵速度は大きかった (Fig. 1)。25℃で発酵し、同温度で測定したボトル内圧力は、酵母添加後6日目に540 kPa (炭酸ガス量、約10.1 g/L) であったが、これは10℃での圧力に換算すると330 kPaに相当する。同様な換算を行って、10℃での圧力、330 kPa (炭酸ガス量、約9.1 g/L) を得るために必要とする発酵日数は、発酵温度15℃で酵母添加後12日、10℃で28日であった。ボトル内発酵で高品質スパークリングワインを製造するための最高発酵温度は約15.6℃ (60°F) といわれているが(1)、固定化酵母を用いて製造したスパークリングワインの官能検査結果は、必ずしも低温発酵で得たスパークリングワインの酒質のほうがよいというわけではなく、25℃での発酵のほうがよい品質のワインが得られた (8)。すなわち、二重層ゲルビーズに固定化した酵母を用いて15℃と25℃でボトル内二次発酵を行い、製造したスパークリングワインの官能検査を行った結果、2つのスパークリングワイン間で色、フレーバー、あるいは味にはほとんど差異はないが、25℃で発酵したスパークリングワインのほうが、よりアロマティックでシャンパン様

ブーケが高かった (8)。また、種々の温度 (4、15、25℃) でパプリカ種子抗菌性物質のワイン酵母に対する抗菌性を調べると、高い温度でより強い抗菌性をもった (7)。

以上の本抗菌性物質の抗菌性及び製造したスパークリングワインの (官能的) 品質に及ぼす発酵温度の影響の実験結果 (7, 8) から、本研究では25℃で二次発酵を行った。Fig. 2に示したように、第二次発酵後約40日目で、抗菌性物質無添加のボトル内圧力は

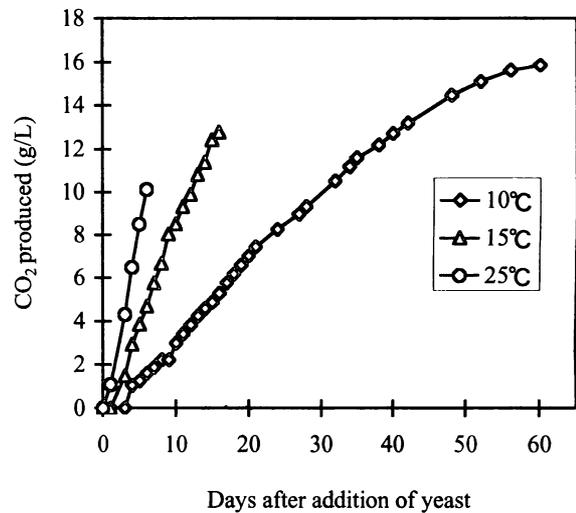


Fig. 1. Changes in internal CO₂ pressure during bottle fermentation using double-layered gel beads at 10°C (◇), 15°C (△), and 25°C (○).

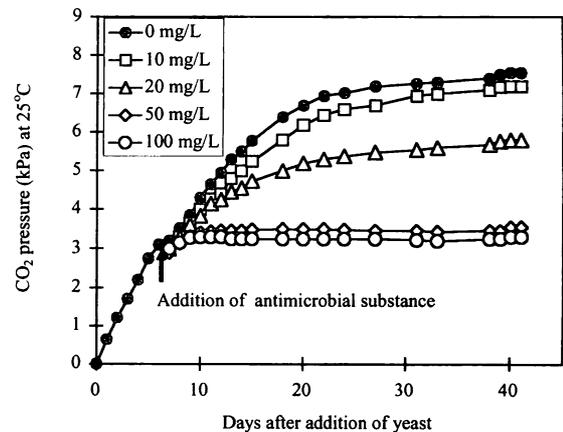


Fig. 2. Changes in internal CO₂ pressure during bottle fermentation using double-layered gel beads followed by termination of the fermentation by the addition of PSAS to give a concentration of 0 (●), 10 (□), 20 (△), 50 (◇), or 100 mg/L (○).

約780 kPaになり、以後わずかに上昇する傾向にあった。存在する糖 (24 g/L) が完全に発酵すれば、10°Cで600 kPa、25°Cで940 kPaとなるはずである。ボトル内圧力が約310 kPa (酵母添加後7日目) のとき、発酵中のすべてのボトルを氷冷中で冷却開栓し、抗菌性物質を添加した。このときのワイン中の残糖量

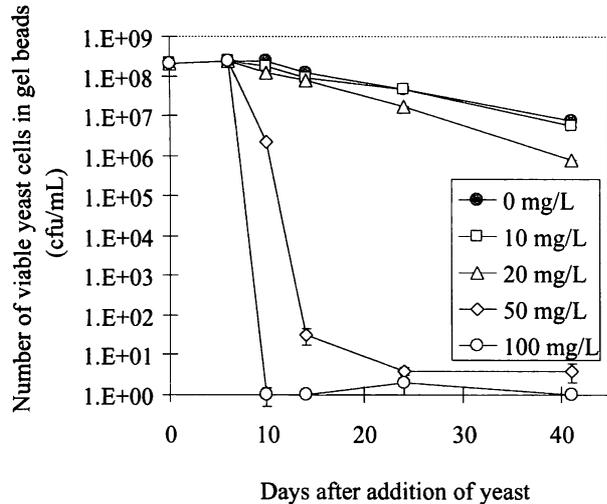


Fig. 3. Changes in number of viable yeast cells in gel beads during bottle fermentation at 25°C using double-layered gel beads followed by termination of the fermentation by the addition of PSAS to give a concentration of 0 (●), 10 (□), 20 (△), 50 (◇), or 100 mg/L (○).

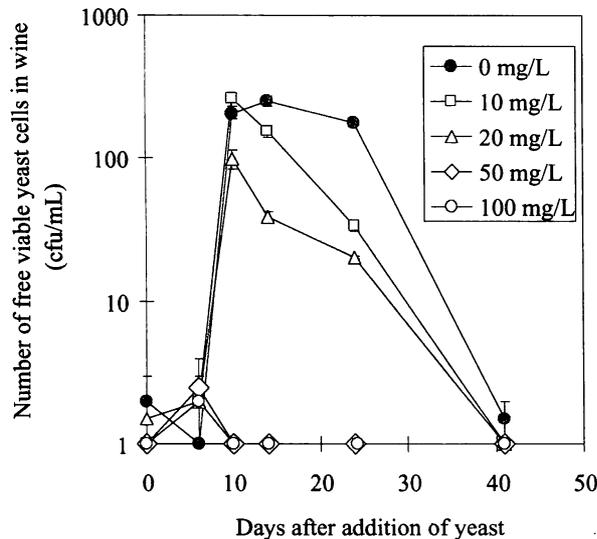


Fig. 4. Changes in number of free viable yeast cells in wines during bottle fermentation using double-layered gel beads followed by termination of the fermentation by the addition of PSAS to give a concentration of 0 (●), 10 (□), 20 (△), 50 (◇), or 100 mg/L (○).

は約12 g/Lであった。抗菌性物質無添加のボトルもまた同様に開栓し、再び密栓して測定したときのボトル内圧力は、開栓前の圧力よりもやや下回った (その差は16 kPa)。

固定化酵母ゲルビーズ作成直後のビーズ中の酵母生菌数は 2.1×10^8 cfu/mLであった。ワインにビーズを添加後二次発酵を行い、ボトル内圧力が304 kPa (7日目) に達したときのワイン中の遊離酵母生菌数とビーズ中の酵母生菌数はそれぞれ < 3 cfu/mLと 2.4×10^8 cfu/mLであった。同様に、ボトル内圧力が436 kPa、557 kPa、721 kPa、及び765 kPaのときのワイン (ビーズ) 中の酵母生細胞数は、それぞれ202 cfu/mL (2.5×10^8 cfu/mL)、252 cfu/mL (1.2×10^8 cfu/mL)、177 cfu/mL (4.5×10^7 cfu/mL)、及び < 3 cfu/mL (7.7×10^6 cfu/mL) であった。これらのことからボトル内圧力が約300 kPaのとき、ビーズ内酵母生菌数が最高に達し、ビーズよりワインへ酵母が漏出を始めたときと考えられたので、ボトル内圧力が約300 kPaに達した直後 (酵母添加後7日目) に抗菌性物質を添加した。50あるいは100 mg/Lの抗菌性物質を添加したとき、添加後2日間わずかに発酵が続き、圧力は約330 kPaに上昇したが、それ以降は一定の圧力を示した。しかし、10あるいは20 mg/Lの抗菌性物質を添加したときには徐々に圧力が増し、41日後には10 mg/L添加の場合720 kPa、20 mg/L添加の場合580 kPaとなり、添加効果はあるものの、酵母を完全に殺菌できず、穏やかな発酵が継続した。

Fig. 3は、Fig. 2の第二次発酵におけるゲルビーズ内の生酵母細胞数の変化を示している。抗菌性物質を50あるいは100 mg/L添加したとき、急激な生菌数の低下が認められ、100 mg/L添加した場合には添加後3日目で、50 mg/L添加の場合には8日目で生菌は全く認められなくなった。しかし、抗菌性物質を10あるいは20 mg/L添加したときには急激な生菌数の変化はなかった。これらの結果は、ボトル内圧力変化をよく反映していた。

Fig. 4は、Fig. 2の第二次発酵におけるワイン中の生酵母細胞数の変化を示している。固定化酵母で発酵しているために、抗菌性物質無添加のワイン中でも最大約200 cfu/mLの生菌数しか認められなかった。50あるいは100 mg/Lの抗菌性物質を添加した場合には1~2 cfu/mLの生菌数しか検出できず、高圧下で

酵母の生育が抑制され、また本抗菌性物質の活性は殺菌的で、さらに抗菌活性は長期間維持されることを考慮すると、事実上遊離の酵母生細胞は存在しないと見なすことができた。

以上の結果は、パプリカ種子抗菌性物質を第二次発酵中のワインに添加すれば、迅速に発酵が停止できるので、再発酵の危険を伴わないで完全発酵直後の甘味付け (dosage) が可能となり、さらに、二次発酵途中の任意の時点で発酵が停止できるので、望まれる糖量を残すことが可能と思われ、dosageそのものが不要であるかもしれない。また、従来法によれば、二次発酵終了後数ヶ月貯蔵して酵母細胞をボトル口に集める必要があったが、本法では発酵に用いた固定化酵母ビーズは極めて短時間に集めることができるので、製造期間を大幅に短縮でき、製造コストの削減が可能になるであろう。

この研究では、二次発酵停止が抗菌性物質添加で可能か否かを実験したので、スパークリングワインの酒質分析を行わなかった。パプリカ種子抽出物は、わが国で食品添加物として認可され、すでに販売されているが、ワインに対する適用例はまだ少ないので、今後種々の添加及び貯蔵試験を行い、実用性を検証する予定である。

要 約

シャルドネワインをベースワインとし、二重層アルギン酸ナトリウムゲルビーズに固定化した *Saccharomyces bayanus* でボトル内二次発酵を行った。これに、パプリカ種子から50%エタノールで抽出後、ODSゲルで分離した抗菌性物質 (*Saccharomyces bayanus* に対する最小生育阻止濃度は20 mg/L) を添加して発酵を停止することによってスパークリングワインを製造した。ボトル内圧力が310kPa (残糖量、約12g/L) に達したとき、50 mg/Lの抗菌性物質を添加した直後に発酵を停止することができた。ワインとゲルビーズ中の酵母生菌数は抗菌性物質添加後急激に低下した。望ましい糖濃度 (甘味) を残すために、パプリカ種子抗菌性物質を添加することによってボトル内発酵の迅速な停止を行うことができるので、コルク打栓前の甘味付け (ドサーージュ) は不要となることが期待される。

文 献

1. Amerine, M. A., H. W. Berg, R. E. Kunkee, C. S. Ough, V. L. Singleton, and A. D. Webb. Technology of Wine Making (4th ed). pp. 451-482. AVI Publishing Co., Inc. Westport, Connecticut. USA (1980).
2. Amerine, M. A. and C. S. Ough. Methods for Analysis of Musts and Wines. 341 pp. John Wiley & Sons. New York (1989).
3. Yajima, M., C. Ootoguro, T. Matsudo, T. Okuda, T. Takayanagi, and K. Yokotsuka. Inhibitory effect of paprika seed extract on the growth of film-forming yeasts isolated from wines. J. Brew. Soc. Japan. 93:671-676 (1998). (In Japanese with English abstract).
4. Yajima, M., T. Takayanagi, T. Matsudo, and K. Yokotsuka. Isolation and structure of antimicrobial substances from paprika seeds. Food Sci. Technol. Res. 6: 99-101 (2000).
5. Yajima, M., T. Takayanagi, K. Nozaki, and K. Yokotsuka. Inhibitory effect of paprika seed extract on the growth of yeast. Food Sci. Technol. Int. 2: 234-238 (1996).
6. Yajima, M. and K. Yokotsuka. Volatile compounds formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. Am. J. Enol. Vitic. 52: 210-218 (2001).
7. Yokotsuka, K., T. Takayanagi, T. Okuda, and M. Yajima. Production of sweet table wine by termination of alcohol fermentation using paprika seed antimicrobial substance. Am. J. Enol. Vitic. under submission.
8. Yokotsuka, K., M. Yajima, and T. Matsudo. Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. Am. J. Enol. Vitic. 48: 471-481 (1997).