

[Technical Brief]

瓶内二次発酵のための酵母発酵種の調製

恩田 匠*・小松正和・中山忠博

山梨県工業技術センター支所ワインセンター 〒400-0864 山梨県甲州市勝沼町勝沼 2517

Preparation of 'Levain', The Yeast Starter Culture for The Production of Sparkling Wine Made by The Traditional Method

Takumi ONDA*, Masakazu KOMATSU and Tadahiro NAKAYAMA
Yamanashi Wine Center, Yamanashi Industrial Technology Center

We examined the optimum conditions for making domestic high-quality sparkling wines made by the traditional method. In this study, we studied the preparation method of 'Levain', which is the yeast starter culture for the in-bottle secondary fermentation. According to recommended standard method by Comité Champagne Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, the acclimation of dry yeast tests, the expanding culture of yeast tests and in-bottle fermentation tests were performed. As a result of this study, it was clarified that the stable secondary fermentation in bottle could be achieved according to the standard method recommended in Champagne region.

Key words: sparkling wine, Champagne, In-bottle secondary fermentation, *Levain*, Koshu

緒言

我々は、「瓶内二次発酵法」による国産スパークリングワイン製造の高品質化のための研究に取り組んでいる。特に、フランス・シャンパーニュ地方におけるシャンパーニュ製造についての実地調査（恩田 2013a, 恩田 2013b, 恩田 2014, 恩田 2016a, 恩田 2016b, 恩田 2016c）によって得られた、シャンパーニュの標準製法（恩田 2016a）を基本にした実証試験を実施している。既に、「甲州」と「シャルドネ」を原料ブドウとしたスパークリングワイン製造試験を行っており、その製造工程における成分の推移（恩田ら 2015a）や、

「甲州」を原料としたときの压榨によって得られる果汁成分の特徴（恩田ら 2015b）を明らかにした。

瓶内二次発酵法によるスパークリングワイン製造においては、当然のことながら、瓶内における二次発酵を安定的に達成することが最も重要である。このためには、二次発酵のための瓶詰め時、すなわちティラージュ時に、原酒ワインに添加する、酵母の調製が重要である。この酵母の調製とは、確実な瓶内二次発酵を達成するために、高い活性と適切な生菌数を保持した培養液（以下、「酵母発酵種」；シャンパーニュ製造では「ルバン(*levain*)」と呼ばれる）をつくることである。

フランス・シャンパーニュ地方のシャンパーニュ地方ワイン生産同業委員会（以下、シャンパーニュ委員会と略称）の醸造部では、古くから、このルバンの調製方法についての研究が行われてきた。1983年に初めて提唱されたルバンの調製法は、当時市販されるようになった乾燥酵母製剤から調製する方法として開発されたもので、その後1994年と1998年に改変法が発表され、2007年に現在の推奨法（恩田 2016a, Valade *et al.* 2015a, Valade *et al.* 2015b）が提唱されるに至っている。

*Corresponding author (email: onda-wkk@pref.yamanashi.lg.jp)

†我が国では、フランス・シャンパーニュ地方 (la Champagne) でつくられるワインのことを「シャンパン(le champagne)」と呼んできた。しかしながら、原産地呼称に基づく立場から、本論文では「シャンパーニュ」と記載した。

2017年1月31日受理

本研究では、この推奨法を基にして、日本ワインを原酒ワインとして用いた場合の、酵母発酵種の調製方法について検討を行って得られた成果について報告する。

材料および方法

1. 供試ワイン

酵母発酵種調製に用いるワイン、および瓶内二次発酵試験のための原酒ワインとして、‘甲州’（2013年収穫）を原料として製成したワインを用いた。当該ワインの成分は、アルコール 10.9 % (w/v)、比重 0.993 (15/4°C)、総酸度 8.1 g/L (酒石酸換算)、pH 3.10、遊離亜硫酸 8 mg/L、総亜硫酸 25 mg/L である。この成分値は、シャンパーニュ原料としてのワインとほぼ同等の組成である (恩田 2016c)。

2. 供試酵母

本実験には、乾燥酵母製剤として、IOC 18-2007 (Institut Œnologique de Champagne 社製) を用いた。本 IOC 18-2007 株は、シャンパーニュ委員会がシャンパーニュ製造に向けた酵母 (恩田 2016a, 恩田 2016c) として推奨している *Saccharomyces cerevisiae* の 4 菌株のうちの 1 株である。

3. 酵母発酵種の調製

酵母発酵種の調製は、シャンパーニュ委員会の推奨法 (恩田 2016a) に従って、以下のように、酵母の馴化培養と、その馴化培養液からの拡大培養を行った。この酵母発酵種は、シャンパーニュ製造において一般的に行われているように、瓶内二次発酵を行う原酒ワイン量に対して、3%容量になるように調製した (恩田 2016a)。

(1) 馴化培養

10 L 分の原酒ワインのための馴化培養としては、まず、0.01 L のリキュール溶液 (原酒ワインと水とを等量に混合し、シヨ糖を 500 g/L になるように調整したもの) と 0.04 L の水の混合液に、リン酸 2 アンモニウム 0.1 g を添加し、その品温を 40°C に調製した。この培養液に、0.15 g の乾燥酵母を水和すること無く、直接添加 (初発の酵母添加量 3 g/L) した。このものを、初発は 35°C で 6 時間後に 20°C 付近になるように順次温度を下げ、穏やかに攪拌 (60 rpm) しながら 6~8 時間

培養した。この間、経時的に、比重 (15/4°C)、密度 (g/cm³, 20°C) と酵母菌数の測定を行った。また、本実験では、初発の乾燥酵母添加量を 0.3 g および 0.6 g (初発の酵母添加量はそれぞれ 6 g/L および 12 g/L となる) に増量した場合の影響も調べた。なお、各試験区は、複数回の 3 反復の実験を行った。

(2) 拡大培養

0.18 L の原酒ワインに対し、0.045 L の 3. (1) と同じリキュール、0.025 L の水、0.1 g のリン酸 2 アンモニウムを混合し、3. (1) で調製した馴化培養液 0.05 L を添加した。この混合物を、20°C で 2~4 日間、穏やかに攪拌 (60 rpm) しながら培養した。この間、経時的に、比重 (15/4°C)、密度 (g/cm³, 20°C) と酵母菌数の測定を行った。また、本実験では、拡大培養時に攪拌しない場合、およびリン酸 2 アンモニウムを添加しない場合の影響も調べた。なお、各試験区は、複数回の 3 反復の実験を行った。

4. ティラージュ

シャンパーニュ製造において、瓶内二次発酵のための、原酒ワインに酵母や糖分を添加して瓶詰めする工程を「ティラージュ (tirage)」という。このティラージュ作業は、シャンパーニュ委員会の推奨法 (恩田 2016a) にしたがって、以下のとおり行った。

ティラージュの前に、原酒ワインや瓶などの品温を計測し、それぞれ 13°C 以下ではないことを確認した。まず、原酒ワイン 10 L に対して、二次発酵終了後に 6 気圧 (bar) の圧力を得るために、3. (1) と同じリキュールを 0.45 L、すなわち終濃度が 1 L あたり 24 g の糖濃度になるように添加した。次に、ルミアージュ (動瓶) の補助剤としてベントナイト製剤 (Adjuvant83, Station Œnologique de Champagne 社製) を終濃度 20 mg/L となるように添加した。さらに、3. (2) で調製した、酵母発酵種の酵母生細胞を計測した後、300 mL 添加した。このティラージュにより調製した混合液を、洗浄した瓶に 750 mL 注入した。この後、瓶口にビデウルと呼ばれるポリエチレン製のキャップ (酵母カップ, 29 mm, Sclocap MAB 社製) をした後に、スチール製の王冠 (29 mm, Sclocap MAB 社製) を王冠用の打栓機を用いて打栓した。本実験では、拡大培養 2 日目、3 日目および 4 日目の酵母発酵種を用いて、ティラージュ試験を行った。なお、各試験区は、複数回

の実験を行った。

5. 瓶内二次発酵

ティラージュ後の瓶内二次発酵は、15°Cに調整した恒温庫内で実施した。ティラージュした瓶を恒温庫内に水平において、二次発酵を促した。このとき、一つの試験区につき、3本の瓶に圧力計をつけ、瓶内の圧力の推移を経時的に調べた。

6. 分析

液体試料の比重 (15/4°C) および密度 (g/cm³, 20°C) の測定は、振動式密度比重計 (DA-505, 京都電子社製) を用いた。

酵母の生菌数測定は、光学顕微鏡観察により、トーマ氏血球計を用いたメチレンブルー染色法によって計数した。

瓶内の圧力の計測は、瓶装着型の圧力計 (type1207, Barby+Kühner 社製) を用いて、経時的に調べた

結果

Fig. 1 に、複数回実施したうちの、乾燥酵母の馴化培養試験の典型的な結果 (1回の実験における3反復試験の平均値) を示した。シャンパーニュ委員会の推奨法 (恩田 2016a) どおり、初発の酵母添加量 3 g/L のときに、培養 6 時間後に、比重 (15/4°C) が 1.027 付近 (密度は 1.026 g/cm³ (20°C) 付近) に達した。初発の添加量を 6 g/L あるいは 12 g/L に増量した試験区では、推奨法の 3 g/L の場合よりさらに比重が低下した。

Fig. 2 に、複数回実施したうちの、拡大培養試験の典型的な結果 (1回の実験における3反復試験の平均値) を示した。シャンパーニュ委員会の推奨法 (恩田 2016a) どおり、リン酸 2 ナトリウムを添加し、穏やかな攪拌を行うことで、その比重 (15/4°C) は、2 日後に 1.015 (密度 1.014 g/cm³ (20°C)) 付近、3 日後に 1.003 (密度 1.002 g/cm³ (20°C)) 付近、4 日後に 0.994 (密度 0.992 g/cm³ (20°C)) 付近に達した。このときの酵母の生細胞数は、2 日後に 5.4 × 10⁷ cells/mL 付近、3 日後に 6.2 × 10⁷ cells/mL 付近、4 日後には 6.9 × 10⁷ cells/mL 付近に達した。データには示さないが、培養が進むにつれて、酵母の死細胞が占める割合が増加した。酵母発酵種の調製において、リン酸 2 アンモニウムを添加しない場合、および攪拌を行わない場合には

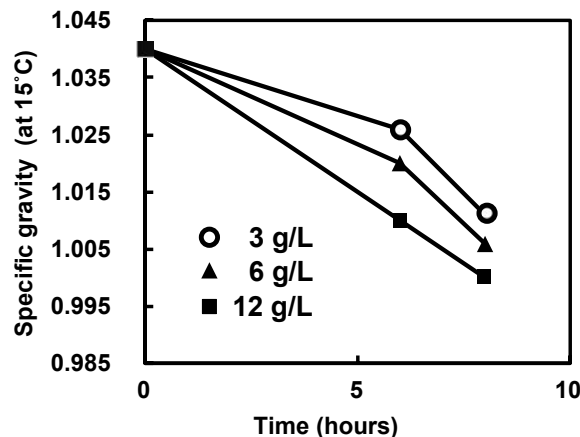


Fig. 1 Effect of added amount of active dry yeast on the change in specific gravity during acclimation phase of active dry yeast.

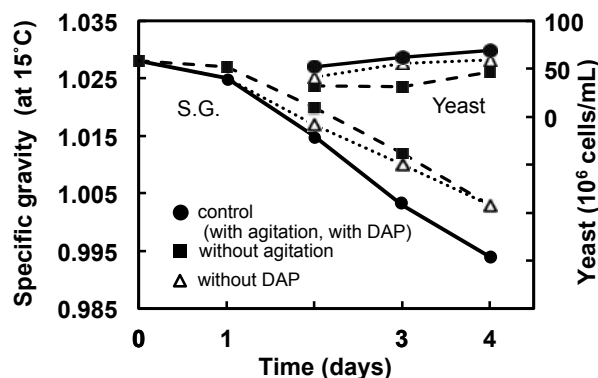


Fig.2 Effect of agitation and addition of diammonium phosphate (DAP) on the change in specific gravity (S.G.) and yeast counts during expanding culture phase of yeast

酵母菌数の増加と比重の低下が緩慢になることが分かった。

なお、データは示さないが、馴化培養時に、初発の添加量を 6 g/L あるいは 12 g/L に増量して拡大培養を行った場合も、3 日~4 日後に得られる酵母の菌数には大きな差は無かった。

Fig. 3 に、複数回実施した瓶内二次発酵試験の典型的な結果 (1回の実験における3本の瓶の平均値) を示した。本実験では、拡大培養 2 日後、3 日後および 4 日後の発酵種を用いて、ティラージュを行い、二次発酵試験を実施した。その結果、2 日後の発酵種を用いた場合には、やや二次発酵が緩慢になるものの、瓶内二次発酵開始 50 日後までには、いずれも 7.1 気圧まで瓶内圧力が得られることを確認した。

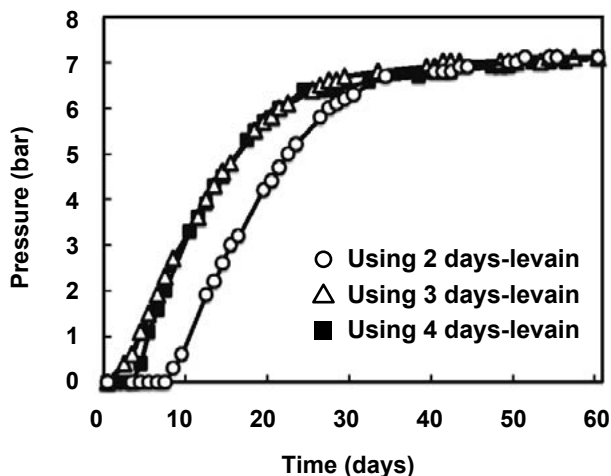


Fig. 3 Changes of pressure in bottle using 3 levains with different expanding fermentation period during In-bottle secondary fermentation

考 察

シャンパーニュ製造の瓶内二次発酵は、高いアルコール濃度かつ高い酸度（低い pH）の、酵母の増殖にとって厳しい環境にあるワインを培養基質として、二度目のアルコール発酵を達成しなければならない。この瓶内二次発酵を確実に実施するには、3つの重要な要件（恩田 2016a, Valade et al.2015a, Valade et al.2015b）があるとされている。一つは、瓶内二次発酵を行うワインの物理化学的な特性、特に pH、アルコール含量、遊離亜硫酸およびその品温が適した値（pH 2.9 以上、遊離亜硫酸含量 10 mg/mL 未満、品温 12~15°C）であることである。二つ目は、ティラージュ時に混合される各種溶液、すなわち原酒ワイン、ベントナイト製剤溶液、酵母活性剤、糖溶液（一般的にはリキュール、最近ではブドウ果汁の濃縮精製液も用いられる）、およびルバンが正しい計算のもとに混合されることである。三つ目は、適切な酵母生菌数の、二次発酵を完全に達成し得る活性の高いルバンを準備することである。

シャンパーニュ委員会によって提唱されたルバン（酵母発酵種）調製の推奨方法は、製造現場の様々な日程的な制約（週末、機械の停止、半日におけるティラージュ作業の実施、ルバン調製設備の交換など）の中で、短期間（馴化培養開始から 2 日と数時間）に、常に一定の菌数の活性が高い酵母の培養液が再現性良く得られることが特徴であるとされている。また、この推奨法を開発する取り組みにおいては、さらに経済的な観点から乾燥酵母の使用量の設定や、リン酸 2 ア

ンモニウムの添加量、酵母の良好な増殖と均一性を確保するための培養時の攪拌の重要性などが綿密に調べられてきた。

シャンパーニュ委員会のルバン（酵母発酵種）推奨法では、乾燥酵母の馴化培養は、6~8 時間後に、培養液の密度が初発の 1.040 g/cm³ (20°C) 付近から 1.015~1.025 g/cm³ (20°C) に達したことを確認することが目安とされている。今回の検討でも、初発の酵母添加量 3 g/L のときに、培養 6 時間後に、比重 (15/4°C) が 1.027 付近（密度は 1.026 g/cm³ (20°C) 付近）に達することが確認できた。データは示さないが、初発添加量 1g/L では、8 時間培養後も比重は 1.027 付近には達しなかった。したがって、酵母発酵種調整時の酵母使用量は、100 L の原酒ワインのためには 1.5 g（馴化培養時の初発の添加量は 3 g/L）で十分であることが確認できた。

馴化培養に続く拡大培養においては、シャンパーニュ委員会の推奨法（恩田 2016a）では、培養液の密度が初発の 1.025 g/cm³ (20°C) 付近から 1.000 g/cm³ (20°C) 付近に達したことを確認することが目安とされている。また、ティラージュ時の瓶内の酵母生菌数を、1.5~2.0×10⁷ cell/mL に制御することが重要であるとされている。この菌数よりも低い場合は安定した二次発酵が達成できない可能性があり、菌数が高い場合には製品の酵母臭が強くなったり、ルミアージュ工程で酵母のオリが沈降しにくくなるなどの問題が生じる可能性が高くなる。したがって、拡大培養により得られる酵母発酵種は、酵母菌数が 5.4~7.2×10⁷ cell/mL であることが重要であることになる。今回の実験でも、拡大培養 2 日には、比重の低下はやや緩慢であるものの、ティラージュに適した酵母菌数に達し、4 日後も適した菌数を保持することが分かった。なお、拡大培養時におけるリン酸 2 アンモニウム添加と穏やかな攪拌が重要であることが確認できた。

瓶内二次発酵では、原酒ワインの物理化学的な特性、特に酸度、pH、遊離亜硫酸濃度および品温の制御が重要であるとされている。今回用いた原酒ワインの内容成分は、シャンパーニュ製造原料としての典型的な値であり、二次発酵が困難なものではなかったと判断した。瓶内二次発酵期間は、シャンパーニュ委員会の推奨法（恩田 2016a）では、15°C において 7.1 気圧（この値は 10°C 下で 6 気圧に相当する）に達するまでに 40~50 日間を要するものとされている。今回の実験でも、

調製した，異なる拡大培養期間の酵母発酵種（拡大培養 2 日後，3 日後および 4 日後）をそれぞれ用いることで，いずれも 50 日までに二次発酵が終了することが確認できた。

以上のことから，シャンパーニュ委員会の推奨法（恩田 2016a）にしたがって，発酵種の調製を行い安定した瓶内二次発酵のための酵母発酵種を調製することができることを明らかにした。

要 約

瓶内二次発酵法によるスパークリングワイン製造における，ティラージュのための酵母発酵種の調製方法を，シャンパーニュ委員会の推奨法を基にして検討した。その結果，安定した瓶内二次発酵を達成するための酵母の発酵種の調製方法を確認することができた。

文 献

- 恩田匠. 2013. シャンパーニュ地方でブランド性の確立について考えたこと. 食品工業. 56 : 39-50.
 恩田匠. 2013. シャンパーニュにおけるシャンパン造り. 葡萄酒技術研究会講演要旨集. 56 : 5-14.
 恩田匠. 2014. アサンブラージュ；シャンパン製造における最大の秘密. 日本醸造協会誌. 109 : 168-180.

恩田匠・小松正和・中山忠博, 2015. 瓶内二次発酵法によるスパークリングワイン製造における成分の推移について. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 26 : 82-83.

恩田匠・小松正和・中山忠博. 2015. 瓶内二次発酵法によるスパークリングワイン製造のための圧搾とその果汁成分. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 26 : 5-9.

恩田匠. 2016a. シャンパーニュ地方におけるシャンパン製造. 山梨県葡萄酒製造マニュアル（山梨県ワイン酒造組合. 山梨）. 60-71.

恩田匠. 2016b. シャンパーニュ地方におけるシャンパーニュ製造（前編）；ブドウの収穫から果汁の調製まで. 日本醸造協会. 111 : 266-301.

恩田匠. 2016c. シャンパーニュ地方におけるシャンパーニュ製造（中編）；原酒ワインの製成. 日本醸造協会. 111:712-727.

Valade, M., Laurent, M and Monocomble, D. 2015a. La réussite de la prise de mousse (partie 1). Le Vigneron Champenois 48-63.

Valade, M., Laurent, M and Monocomble, D. 2015b. La réussite de la prise de mousse (partie 2). Le Vigneron Champenois. 54-71.