



[Original Paper]

***Torulaspora delbrueckii*を用いたMixed culture法による
ワイン醸造中の酵母叢及び製成ワインの特徴**

後藤奈美*・西堀奈穂子・高橋正之

独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-7-1

**Characterization of Wine and Microbial Flora in Mixed Culture with
*Torulaspora delbrueckii***

Nami GOTO-YAMAMOTO*, Nahoko NISHIBORI, and Masayuki TAKAHASHI

National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

Abstract

The application of the mixed culture method that uses non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces* wine yeast in winemaking has been widely reported. However, we found that the fermentation speed was lower when small-scale wine-making was carried out using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* than when using a pure culture of *S. cerevisiae*. The low cell density of *S. cerevisiae* observed in the mixed culture seems to be due to unknown factors and not the inhibition by alcohol or the shortage of assimilable nitrogen. Red wine produced by the mixed culture method has a light red color and a low ratio of stabilized pigments, both of which are probably caused by the low acetaldehyde production by *T. delbrueckii*. Thus, even though the mixed culture method has several benefits, careful consideration of winemaking methods is necessary for the application of this method.

Keywords: mixed culture, non-*Saccharomyces* yeast, *Torulaspora delbrueckii*

* Corresponding author (E-mail: gotoh_n@nrib.go.jp)

受付日：2022年8月16日

受理日：2022年12月7日

緒 言

現在、ワインの発酵には市販の乾燥酵母を使用することが一般的になっているが、もともとワインの発酵はブドウや発酵容器などに存在する酵母によって行われていた。このような酵母を添加しない spontaneous な発酵の場合、発酵初期には *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida* など種々の酵母が発酵を担い、その後、アルコール耐性の高い *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* 等が優勢となることが多くの研究によって示されている（例えば Combina et al. 2005）。しかし、醸造微生物学の発展とともに、優良な性質を持つワイン酵母が分離・市販されるようになり、現在では原料ブドウや目指すワインのタイプに合わせた多くの菌株が使い分けられている。

一方、spontaneous な発酵による複雑な微生物叢によって、ワインの香味に複雑さ及び産地やヴィンテージの特徴を与えるという考え方もある。しかし、spontaneous な発酵では優勢となる酵母の種類をコントロールできないため、オフフレーバーの発生や発酵遅延・停止を起こす恐れがある。そこで、近年両者のメリットを活かすため、優良な非 *Saccharomyces* 酵母を添加したのち、従来の *Saccharomyces* 属のワイン酵母を添加して発酵させる、Mixed culture 法が提唱されている。このような非 *Saccharomyces* 酵母としては、*Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima* など、42 の菌株が市販されていると報告されている（総説として Vejarano and Gil-Calderón 2021）。これらの内、*T. delbrueckii* は以前は *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces rosei* と呼ばれていた酵母で、ワインの発酵中に高頻度で検出される酵母である。また、一部パンの発酵にも利用されており、食経験のある微生物である。*T. delbrueckii* は糖濃度が高い高浸透圧条件でも揮発酸（酢酸）の生成が低い（Moreno et al. 1991）、アセトアルデヒドの生成が低い（Bely et al. 2008）、ブドウ品種の特徴香を強く発現させる、などのメリットがあると報告されている（総説として Ciani et al. 2010, Vejarano and Gil-Calderón 2021）。一般に非 *Saccharomyces* 酵母はアルコール生成能及びアルコール耐性が低いため、単独で使用するのではなく、後から添加する

Saccharomyces 属のワイン酵母が増殖して、アルコール発酵をスムーズに終了させる、とされている。ただし、*T. delbrueckii* の菌株によっては単独でもアルコール分 12–13 % までの発酵能を示すと報告されている（Vejarano and Gil-Calderón 2021）。

このように非 *Saccharomyces* 酵母を用いたワイン醸造については海外で多くの研究が行われているが、国内での検討はあまり報告されておらず、酵母メーカー以外からの情報が乏しい状態にある。そこで、*T. delbrueckii* と *S. cerevisiae* の Mixed culture でワインを醸造した場合の注意点を明らかにするとともに、酵母叢や成分について検討を行うこととした。

材料と方法

1. 使用菌株

Lallemand 社及び Laffort 社の市販 *T. delbrueckii* 及び *S. cerevisiae* のワイン酵母、各 1 株を使用した。ここでは Lallemand 社から Level 2 TD として販売されていた *T. delbrueckii* 及び *S. cerevisiae* を Td1 及び Sc1, Laffort 社の *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha を Td2, *S. cerevisiae* Zymaflore X5 を Sc2 と表記する。なお、Td1 は現在は Biodiva TD291 の名称で販売されている。両社の菌株とも、*S. cerevisiae* のみ、*T. delbrueckii* のみの単独区と両菌株の併用区を設定した。

2. ワインの小規模試験醸造

当所圃場で栽培した‘カベルネ・ソーヴィニヨン’を用い、酵母叢を解析するため、均一系としやすいブラッシュのロゼワインの 150 mL～1 L の小規模試験醸造、及び、凍結保存した‘カベルネ・ソーヴィニヨン’を用いた赤ワインの小規模試験醸造を行った。また、官能評価用に‘カベルネ・ソーヴィニヨン’及び‘マスカット・ベリー A’の混合果汁を用いたロゼワインの試験醸造を *S. cerevisiae* 単独区及び併用区で行った。ガラス容器に蓋をした状態で発酵させた場合を開放系、発酵栓を付けた容器で発酵させた場合を閉鎖系とし、容器は発酵液や醪の量に合わせて三角フラスコや梅酒瓶を用いた。発酵条件は次のとおり。

果汁糖度は 23 % (w/v) まで上白糖で補糖した。資化性窒素分（フォルモール窒素）は発酵開始時、及び併用区では *S. cerevisiae* 添加時に 200 mg/L になる

よう、リン酸水素二アンモニウム（食品添加物）を添加した。また、1回目の酵母添加時、及び併用区の*S. cerevisiae*添加時に酵母用発酵助成剤、Fermaid K（Lallemand）を125 mg/Lずつ添加した。2回目の添加は単独区にも行った。果汁のpHは3.6にリンゴ酸で調整し、亜硫酸濃度は酵母添加時の分子状亜硫酸が0.2 mg/L以下となるよう、遊離亜硫酸濃度を調整した。

酵母はメーカーの取扱い説明書に従い、乾燥酵母として200～300 mg/Lを加水性活性化して添加した。併用区ではロゼは*T. delbrueckii*添加の3日後、赤ワインは2日後に*S. cerevisiae*を添加した。ロゼワインは17℃、赤ワインは25℃で発酵させた。

3. ワイン成分の分析

一般分析（アルコール分、エキス、pH、総酸）は酒類総合研究所標準分析法、有機酸は高速液体クロマトグラフ有機酸分析計（LC-10AD、島津製作所）で分析を行った。赤ワインの吸光度分析は、Sommers and Evans (1977)を参考に、pH 1.0での A_{520} は、ワイン100 μ Lに0.2M酢酸/塩酸緩衝液（pH 1）900 μ L及び10%アセトアルデヒド20 μ Lを添加・混合し、45分後に A_{520} を測定して総アントシアニンの指標とした。また、ワイン2 mLに5%ピロ亜硫酸カリウム水溶液（ SO_2 ）又は蒸留水（DW）160 μ Lを添加・混合、1分後に A_{520} を測定し、 $A_{520} (SO_2) / A_{520} (DW)$ を SO_2 で脱色されない、安定化した赤色の割合とした。

4. 酵母叢の解析

平板培養法による酵母数の測定には、総酵母数用のYPD寒天培地（ペプトン20 g/L、酵母エキス10 g/L、グルコース20 g/L、寒天17 g/L）及び*T. delbrueckii*数用のリジン培地（シグマ・アルドリッチ）を用いた。リジン培地はリジンのみを窒素源とする合成培地で、*Saccharomyces*属酵母は生育できないことが知られている（Lin 1975）。総酵母数及び死滅率を求める場合は、顕微鏡観察下で血球計測盤を用い、死滅率としてメチレンブルー染色率を求めた。

次世代シーケンサーを用いたrDNAの増幅産物のシーケンスによる酵母叢の解析のため、発酵液の沈殿画分からNucleospin Soil DNAキット（マッハライ・ナーゲル社）を用いてDNAを抽出した。得

られたDNAはナノドロップ微量分光光度計（サーモ・フィッシャー社）を用いて濃度を測定し、使用時まで-30℃で保存した。PCRはKOD-plus Neo（東洋紡）を用いた50 μ Lの系で、50 ngのゲノムDNA、及び28S rDNAのD1/D2領域を増幅する真核微生物用NL1, NL4プライマー（Boekhout et al. 1994）を用いて行った。なお、両プライマーにはそれぞれ10 bpのサンプル識別用タグ配列MIDを5'末端側に付加した。PCRは96℃ 3分間の予備変性の後、96℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 1分を1サイクルとして40サイクル実施した。得られた増幅産物はQiaquick PCR purification kit（キアゲン）を用いて精製した。各増幅産物を500 ngずつ混合し、Roche/454 FLX Titanium systemによる次世代シーケンスを実施した。得られた配列はQIIME（Caporaso et al. 2010）を用いてデフォルト設定で情報解析を実施した。出力されたOTU（Operational Taxonomic Unit、菌種に相当する）の代表配列をBLASTで検索し、相同性の高い上位10位以内の結果のうち最も頻度が高い菌種として同定した。なお、次世代シーケンスから菌種同定までは株式会社ジナリスに依頼した。

結果と考察

1. 開放系及び閉鎖系の発酵経過（Fig. 1）

*T. delbrueckii*の菌株によってはある程度アルコール耐性及びアルコール発酵能が高いと報告されているが、開放系の試験醸造では、*S. cerevisiae*単独区及び併用区からやや遅れる程度で発酵を終了し、予想以上の発酵能（発酵速度及び生成アルコール濃度）を示した（Fig. 1 A-1, A-2）。これは、開放系の小規模試験醸造によるやや好氣的な条件が原因と推察されたことから、実際のワイン醸造に近い条件となるよう、同じロットの果汁を用い、発酵栓を用いた閉鎖系で試験醸造を行ったところ、*T. delbrueckii*単独区では発酵遅延を生じ、特にTd2株で顕著であった（Fig. 1 B-1, B-2）。併用区では*T. delbrueckii*単独区より発酵が早くなり、*S. cerevisiae*の添加効果が認められたが、発酵終了は*S. cerevisiae*単独区より数日遅くなった。

Brandam et al. (2013)は、*T. delbrueckii*の生育は酸素濃度の影響を強く受け、酸素供給量が多くなるとアルコール生成が低下し、呼吸や菌体増殖への炭素

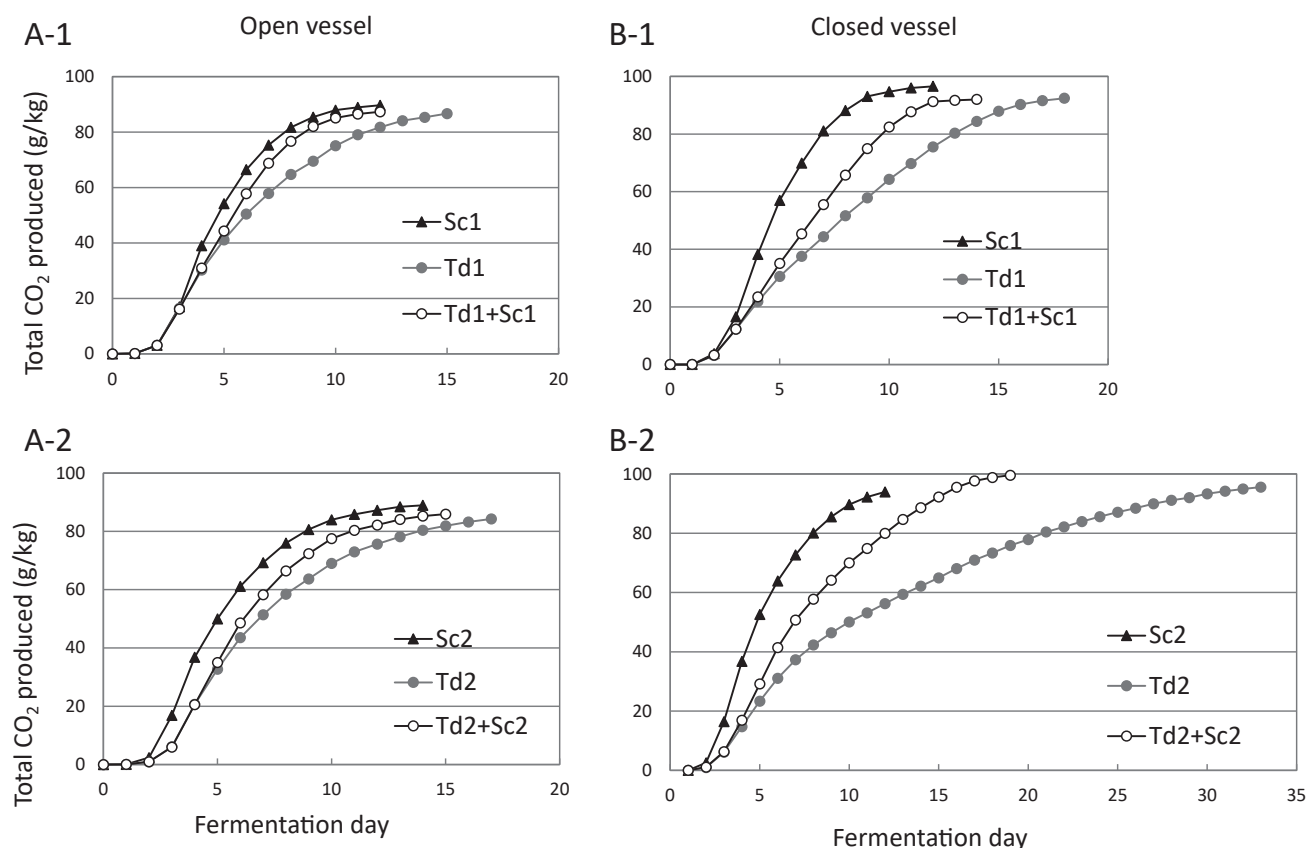


Fig. 1 Total CO₂ produced during blush wine fermentation using *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture in an open vessel (A-1, A-2) or a closed vessel (B-1, B-2) with an airlock. Each data point is the average of $n = 2$. Td1 and Sc1 are strains of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* commercialized in Level 2 TD (Lallemand), respectively. Td2 and Sc2 are *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha and *S. cerevisiae* Zymaflore X5 (Laffort), respectively.

のフラックスが増大することを報告している。本実験でも、*T. delbrueckii*による発酵は閉鎖系では開放系よりも発酵が遅延したことから、*S. cerevisiae*より酸素濃度の影響を強く受けたことが推察される。

2. 酵母叢の解析

Fig. 1A（開放系）の試験醸造の発酵途中及び終了時に平板培養法による菌数測定を行ったところ、*T. delbrueckii*単独区及び併用区の発酵後半及び終了時の総菌数は*S. cerevisiae*単独区よりも低い値を示した。また、併用区ではYPD培地とリジン培地のコロニー数の差がほとんどなく、*S. cerevisiae*の菌数が少ないことが示された（Fig. 2）。

そこでFig. 1 A-1とA-2の7日目（発酵中期）と12日目（発酵後期）の各1サンプルを用いて、真核微生物を対象とした28S rDNAの増幅産物による次世

代シーケンス解析を行い、酵母叢を解析した。その結果（Table 1）、大部分の配列は*T. delbrueckii*であり、*S. cerevisiae*の増殖が抑制されていることが確認された。両酵母以外で検出された真核微生物は、*Botrytis* sp.や*Cladosporium* sp.など、ブドウに由来すると考えられる微生物であったが、検出頻度は両酵母と比較するとごく低い値であった。

Fig. 1B（閉鎖系）の試験醸造では血球計測盤を用いて発酵終了時の菌数の計測を行った（Table 2）。その結果、*T. delbrueckii*単独区では総酵母数が*S. cerevisiae*単独区及び併用区よりも低く、また死滅率が高く、これは*T. delbrueckii*が*S. cerevisiae*よりもアルコール耐性が低いためと考えられた。Td1の併用区では*S. cerevisiae*単独区と同等以上の生菌数を示したが、Td2の併用区では発酵終了時の生菌数が低く、これがTd2併用区ではTd1併用区より発酵が緩

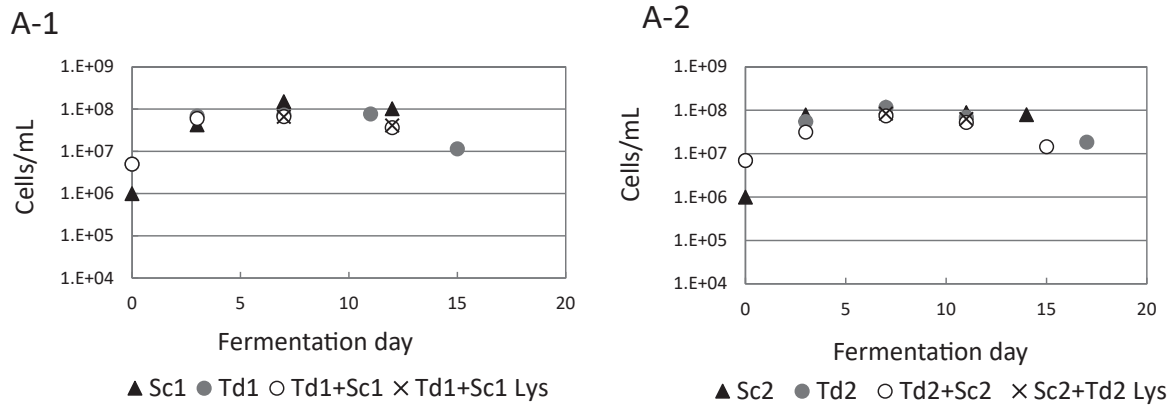


Fig. 2 Yeast cell density during open-vessel wine fermentation using *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture. The fermentation experiment is the same as Figs. 1 A-1 and A-2. Cell densities were determined using the plate culture method, as follows. Lysine plates (Lys) were used for the detection of *T. delbrueckii* in the mixed culture. YPD (no indication) was used to detect all yeast species. Each data point is the average of $n = 2$.

Table 1 Percentages of D1/D2 sequences in *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, and other fungi in wine samples collected from open-vessel mixed culture fermentation.

	Td1+Sc1		Td2+Sc2	
	day 7	day 12	day 7	day 12
<i>T. delbrueckii</i> (%)	85.3	85.5	88.6	86.6
<i>S. cerevisiae</i> (%)	12.2	13.7	7.7	11.9
Other fungi (%)	2.5	0.9	3.7	1.5
Total reads	4070	3927	3671	4562

Samples were collected from each one batch of the open-vessel mixed culture fermentation shown in Figs. 1 A-1 and A-2. DNA was extracted from each sediment after centrifugation, and yeast and fungal identification was carried out by sequencing the amplified D1/D2 region of 28S rDNA.

慢となった原因と考えられた。

なお、非 *Saccharomyces* 酵母はアルコール耐性が低いため、発酵後期には死滅し、*S. cerevisiae* が 100 % になる、との報告 (Combina et al. 2005) もあるが、*T. delbrueckii* の場合は比較的アルコール耐性が強い株があるという報告 (Vejarano and Gil- Calderón 2021) がある。本実験でも開放系、閉鎖系ともに *T. delbrueckii* 単独区の生菌数は発酵後期に減少するものの、生存することが確認された。

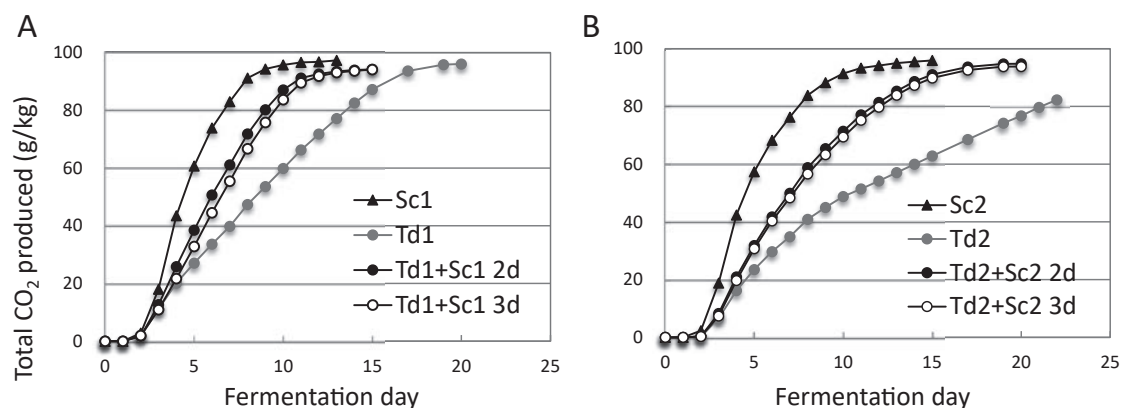
3. *S. cerevisiae* の添加時期の影響及び増殖阻害に関する考察

併用区の発酵が *S. cerevisiae* 単独区より緩慢であるのは *T. delbrueckii* が何らかの栄養素を枯渇させる、または何らかの阻害物質を生成することが原因ではないかと考えられた。そこで、*S. cerevisiae* 添加時期を早めた 2 日後に添加する区を設けて併用区の発酵速度が速まるかを閉鎖系の発酵試験で検討したが、3 日後に添加した区との差は認められなかった。

Table 2 Total and living cell densities at the end of fermentation using *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture in closed vessels.

	Total cell density ($\times 10^7$ cell/mL)	Ratio of methylene blue stained cells (%)	Living cell density ($\times 10^7$ cell/mL)
Sc1	12.7	36.0	8.1
Td1	10.5	78.3	2.3
Td1 + Sc1	17.2	43.6	9.7
Sc2	10.5	13.0	9.1
Td2	4.9	59.3	2.0
Td2 + Sc2	13.1	68.7	4.1

A hemocytometer was used for cell counting. The ratio of methylene blue stained cells indicates the percentage of dead cells. Samples were collected from each fermentation batch shown in Figs. 1 B-1 and B-2 on the last day of fermentation. Each data is the average of $n = 2$.

**Fig. 3** Total CO₂ produced during blush wine fermentation using *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture in closed vessels where *S. cerevisiae* was inoculated 2 days (2d) or 3 days (3d) after the inoculation of *T. delbrueckii*. Each data point is the average of $n = 2$.

(Fig. 3).

S. cerevisiae 添加時のアルコール分は、炭酸ガス減量から推定して1%以下であり、アルコール分が高いために *S. cerevisiae* の増殖が阻害されたとは考えにくい。

また、Taillandier et al. (2014) は、*T. delbrueckii* と *S. cerevisiae* を同時に添加すると *T. delbrueckii* の増殖が抑制されるとともに死滅が早まり、*T. delbrueckii*

の添加2日後に *S. cerevisiae* を添加すると *S. cerevisiae* の増殖が抑制されることを報告している。この報告では、*S. cerevisiae* の増殖抑制の理由を資化性窒素が *T. delbrueckii* によって消費されるからと考察しているが、本研究では *S. cerevisiae* 添加時に資化性窒素濃度を調整しており、資化性窒素のみが原因とは考えにくい。*T. delbrueckii* 以外の非 *Saccharomyces* 酵母の mixed culture の効果を検討した報告でも *S. cerevisiae*

の増殖抑制が観察されており (Binati et al. 2020), Mixed cultureでは*S. cerevisiae*単独の発酵とは異なる, 未知の要因が関与する可能性も想定される。

実用的な観点からは, Mixed cultureによるワイン醸造を行う場合は発酵期間が長くなることを想定し, 特に白ワインやロゼワインの場合は酸化を避けるために密封タンクを使用するなどの対応が必要と考えられる。

4. ワインの成分に及ぼす影響

Fig. 1の試験醸造で得られたワインの分析結果をTable 3に示す。アルコール分, エキス分, 総酸には顕著な差異は認められず, 酢酸濃度は今回の実験条件では*T. delbrueckii*併用区が低くなるわけではなかった。酢酸濃度は0.72 g/Lワイン以下では検知が難しいとされており (Ribéreau-Gayon et al. 2006), いずれも問題にならない濃度であった。その他の有機

Table 3 Analytical values of blush wine produced by fermentation with *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture in an open vessel or a closed one.

Open vessel	Alcohol (v/v%)	Extract (w/v%)	pH	Total acidity ^{a)} (g/100 mL)	Acetic acid (mg/L)
Sc1	13.3	2.5	3.61	0.69	73
Td1	13.2	3.0	3.58	0.71	54
Td1+Sc1	13.2	2.8	3.56	0.71	45
Sc2	13.4	2.5	3.49	0.80	36
Td2	12.8	3.6	3.59	0.75	39
Td2+Sc2	13.1	3.0	3.59	0.73	138
Closed vessel	Alcohol (v/v%)	Extract (w/v%)	pH	Total acidity ^{a)} (g/100 mL)	Acetic acid (mg/L)
Sc1	13.3	2.5	3.56	0.71	169
Td1	13.0	2.9	3.54	0.75	61
Td1 + Sc1	13.0	2.7	3.53	0.75	61
Sc2	12.5	2.5	3.44	0.80	84
Td2	12.5	3.6	3.66	0.71	469
Td2 + Sc2	13.0	3.0	3.60	0.79	234

^{a)} Total acidity is expressed as tartaric acid equivalent.

Wine samples collected from the fermentation shown in Fig. 1 were analyzed. Each data is the average of n = 2.

酸濃度にも顕著な差異は認められなかった。

次に‘カベルネ・ソーヴィニヨン’の冷凍果実を用い、Mixed culture法の報告が少ない赤ワインの試験醸造を開放系で行ったところ、炭酸ガス減量はFig. 1のA-1, A-2（開放系）に類似の経過を示した（データ省略）。一般分析及び吸光度分析の結果をTable 4に示す。総フェノールの指標であるA₂₈₀は*S. cerevisiae*単独区がやや高い値を示した。総アントシアニンの指標であるpH 1.0でのA₅₂₀は*T. delbrueckii*単独区及び併用区の方が*S. cerevisiae*単独区より高かったが、赤色の強さ（A₅₂₀）は逆に*S. cerevisiae*単独区の方が高い値であった。併用区でA₅₂₀が低くなる傾向は、‘カベルネ・ソーヴィニヨン’、‘マス

カット・ベリーA’の混合果汁を用いたロゼの試験醸造のTd2 + Sc2の場合でも認められた（Table 5）。

これは*T. delbrueckii*単独区及び併用区では、安定化した赤色色素の指標であるSO₂で脱色されないA₅₂₀の割合、A₅₂₀ (SO₂) / A₅₂₀ (DW) が低く、同じpHであっても発色していないアントシアニンの割合が高いことが理由と考えられる。*T. delbrueckii*はアセトアルデヒドの生成が低いと報告されており（Bely et al. 2008）、アセトアルデヒドを介してアントシアニンとカテキン類やプロアントシアニジンが反応して生成する安定化色素（Timberlake and Bridle 1976）が少なくなるものと推察される。

また、Table 5に示したロゼワインの官能評価（自

Table 4 Analytical values of red wine of Cabernet Sauvignon produced by fermentation with *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or their mixed culture in open vessels.

	Alcohol (v/v%)	Extract (w/v%)	pH	Total acidity ^{a)} (g/100 mL)	Acetic acid (mg/L)	A ₂₈₀ (1/100)	A ₄₂₀	A ₅₂₀	A ₅₂₀ at pH 1.0 ^{b)}	A ₅₂₀ (SO ₂)/ A ₅₂₀ (DW) ^{c)}
Sc1	12.2	2.9	3.64	0.76	107	0.140	0.646	0.854	0.357	0.665
Td1	12.1	3.1	3.62	0.77	165	0.127	0.591	0.772	0.404	0.559
Td1 + Sc1	12.0	3.1	3.60	0.78	146	0.124	0.575	0.769	0.387	0.538
Sc2	12.2	3.1	3.59	0.82	164	0.154	0.677	0.874	0.332	0.705
Td2	11.9	3.4	3.65	0.79	636	0.149	0.559	0.643	0.389	0.576
Td2 + Sc2	12.0	3.2	3.62	0.77	344	0.127	0.565	0.712	0.361	0.602

^{a)}See footnote of Table 3. ^{b)}A₅₂₀ was measured 45 min. after the addition of 900 µL of 0.2 M acetic acid/HCl buffer, pH 1.0 and 20 µL of 10% acetaldehyde into 100 µL of wine. This value indicates the total anthocyanin content. ^{c)}A₅₂₀ was measured 1 min. after mixing 160 µL of 5% potassium pyrosulfite or distilled water (DW) with 2 mL of wine, and the ratio of A₅₂₀ (SO₂)/A₅₂₀ (DW) is shown. This value indicates the ratio of stable red pigments. Each data is the average of n = 2.

Table 5 Analytical values of rose wine produced by fermentation with *S. cerevisiae* or a mixed culture of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*.

	Alcohol (v/v%)	Extract (w/v%)	pH	Total acidity ^{a)} (g/100 mL)	A ₂₈₀ (1/100)	A ₅₂₀
Sc1	13.8	2.8	3.66	0.67	0.117	0.371
Td1 + Sc1	13.2	3.3	3.62	0.63	0.112	0.366
Sc2	13.5	3.1	3.61	0.74	0.116	0.425
Td2 + Sc2	13.5	3.	3.64	0.67	0.112	0.291

^{a)}See footnote of Table 3.

由記述)の結果では、色に関するコメントの他、Td1 + Sc1区では香りが低いというコメントが複数みられたが、特に目立った異味異臭の指摘はなかった。

*T. delbrueckii*のMixed cultureは、酵母メーカーの資料では貴腐ワイン等、酢酸濃度が高くなりやすい高糖濃度のワイン醸造、並びに‘ソーヴィニヨン・ブラン’等の白ワイン及びロゼワインでの使用が推奨されているが、赤ワインにも用いることができると記載されている。しかし、赤ワインやロゼではA520が低くなる傾向が認められたことから、赤色の濃いワインを目指す場合には、注意が必要であることが示された。

要 約

以上の検討の結果、*T. delbrueckii*と*S. cerevisiae*の併用区では*S. cerevisiae*単独区よりも発酵速度がやや緩慢となり、これは*S. cerevisiae*の菌体密度が低いことが原因であろうと考えられた。これはアルコール分による阻害や資化性窒素の不足が原因ではないと考えられ、未知の要因の関与が想定された。

また、赤ワインでは*S. cerevisiae*単独区と比較して併用区では安定化した色素の割合と赤色の低下が認められた。

以上のことから、Mixed cultureには種々のメリットが報告されているが、実用化に当たっては原料ブドウの状態や醸造方法等を考慮する必要があることが明らかになった。

謝 辞

本研究は2012年度 公益財団法人高木俊介パン科学技術振興財団の研究助成を受けて行った。ここに記して謝意を表する。

文 献

Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomaré and Dubourdieu D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122: 312–320

Binati RL, Lemos Junior WJF, Luzzini G, Slaghenaufer D, Ugliano M and Torriani S. 2020. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*,

Metschnikowia spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *Int J Food Microbiol* 318: 108470.

Boekhout T, Kurtzman CP, O'Donnell K and Smith MT. 1994. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int J System Bacteriol* 44: 781–786.

Brandam C, Lai QP, Julien-Ortiz A and Taillandier P. 2013. Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: Kinetics and carbon mass balance. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1848–1853.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JJ, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J and Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336.

Ciani M, Comitini F, Mannazzu I and Domizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10: 123–133.

Combina M, Elía A, Mercado L, Catania C, Ganga A and Martinez C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* 99: 237–243.

Lin Y. 1975. Detection of wild yeasts in the brewery. Efficiency of different media. *J Inst Brew* 81: 410–417.

Moreno JJ, Millán C, Ortega JM and Medina M. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J Ind Microbiol* 7: 181–190.

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. 2006. 8 Chemical nature, origin and consequences of the main organoleptic defects. *In Handbook of Enology*, Vol. 2, 2nd Ed. Wiley.

Sommers TC and Evans ME. 1977. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical ages”. *J Sci Food*

Agric 28: 279–287.

Taillandier P, Lai QP, Julien-Ortiz A and Brandam C.

2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. World J Microbiol Biotechnol 30: 1959–1967.

Timberlake CF and Bridle P. 1976. Interactions between

anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. Am J Enol Vitic 27: 97–105.

Vejarano R and Gil-Calderón A. 2021. Commercially

available non-*Saccharomyces* yeasts for winemaking: Current market, advantages over *Saccharomyces*, biocompatibility, and safety. Fermentation 7: 171.