

酵母菌体を利用するブドウ酒の醸造について

(第2報) 滓の酵母菌体破壊処理について

増田 博, 村木弘行

(昭和39年9月10日受理)

Utilization of Yeast Cells in Wine-Making

Part 2. Mechanical Disintegration of Yeast Cells in Wine Lees with Decompression Rupture for Improving the Quality of Table Wines

By Hiroshi MASUDA and Hiroyuki MURAKI

The lees which settled after fermentation of white wine prepared from the grape (Kōsyū variety) must were diluted with one-fourth volume of wine, sulfited by 100 ppm of sulfur dioxide, and put in a stainless steel vessel (autoclave) with an excess of dry ice.

The refrigerated lees were thawed (up to 15°C) under carbon dioxide pressure of 61 to 63 kg/cm², then the lees were suddenly ejected through a nozzle (dia. 3 mm), with the result that the yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, OC-2) cells became ruptured, and the supernatant was centrifuged.

The results of analyses showed that considerable amounts of nitrogenous and phosphoric compounds originated in the cells were dissolved in the supernatant, which was found to be effective to improve the qualities of table wines. The addition of the supernatant to the normal table wine in a ratio between 10 and 60 per cent by volume gave wine of a rich body and a fine mellowness.

After the treatments, the yeast cells in the lees readily suffered enzymic degradation, and the addition of a hydrolytic enzymes (Takadiastase) eased off the release of the nitrogenous compounds from the cells and increased the yield of the supernatant.

緒 論

前報¹⁾においては、滓とブドウ酒とを長期間にわたって接触させ、酵母菌体から窒素化合物その他の溶出によって酒質の改良を試みたが、本報では常法によって通常の時期に分離した滓に対して酵母菌体破壊処理を加えて菌体成分を溶出させ、その処理液の上澄を元のブドウ酒に還元添加する酒質改良法を試みた。従来にもブドウ酒の香味改良その他に滓を利用した例は見受けられるが²⁻⁶⁾、これらはすべて滓中の酵母を自己分解させるか、ある

いは単なる抽出操作によるもので、滓に特別な菌体破壊処理を加えた例は見当たらない。しかし菌体破壊処理は、滓とブドウ酒とを単に接触させる場合のように数カ月もの長時間を必要とせず、また溶出される成分も、自己分解物とは組成が多少ちがっていることが予想されるので、この点からも興味のある方法と思われる。

ただしこの方法で最も問題になるのは、酵母菌体破壊の方法およびその効果である。一般に微生物の菌体破壊のために、これまで主として用いられてきた方法は、助剤とともに磨砕する方法、超音波を用いる方法、菌体に高压をかける方法、凍結融解法、酵素を用いて細胞壁を溶解する方法などである。しかし酵母細胞壁を溶解する酵素は、最近研究されはじめたばかりで^{7,8)}、なお実用に至らず、その他の方法も工業的に一時に大量の試料を処理するためにはそれぞれ難点がある。Ross⁹⁾は機械的な振動による、大量処理が可能な菌体破壊法を報告しているが、著者らは本報において新たな試みとして、ドライアイスを用いて凍結させた滓を耐圧タンク内に入れて密閉し、温度を上げて融解させると共に炭酸ガスによる高压を生じさせ、これをノズルから急激に噴出させる菌体破壊法を採用した。この方法は凍結融解による菌体破壊とともに、高压によって溶けこんだ炭酸ガスが噴出によって急激に気化膨張することによる破壊効果を併用したもので、著者ら¹⁰⁾が数年来、ガスを用いた加圧による菌体破壊法を検討して、その効果を認めたものである。この方法によれば、比較的低温で処理できるため、滓の汚染や酸化の危険が少なく、また工業的に大規模な処理も可能だと思われる。以下にその実験結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試ブドウ酒の調製

昭和38(1963)年度の山梨県産甲州種ブドウ果40kgをSO₂(メタ重亜硫酸カリを使用)100ppmを加えつゝ破碎し、果梗0.9kgを除き、ただちに压榨して粕10.1kgを分け、果汁23.0lを採取した。果汁の常法による分析値は次の通りである。

還元糖	Reducing sugars as glucose	18.3 g/dl
総酸	Total acids as tartaric acid	4.2 g/l
揮発酸	Volatile acids as acetic acid	0.2 g/l

これにシヨ糖2.2kgを加えて補糖し、1%の容量の酒母(ブドウ酒酵母OC-2)を加えて発酵せしめた。15日後に主発酵が終了し、40日後には完全に清澄したので、滓引きを行い、滓3.0lを分離し、上澄にはSO₂100ppmを加えて貯蔵に移した。

2. 滓の処理方法

(1) 滓の前処理：前項で分離した滓は、そのままでは粘度が大きすぎて処理しにくかったので、滓400mlに対して100mlの比率で上澄ブドウ酒を加えて希釈し、また同時にSO₂100ppmを加えて酸化や細菌の作用を防止した。

(2) 処理区分：TABLE I に示すような4区分とした。すなわちC区は無処理の対照区、P区は菌体破壊処理区とし、その他に、この菌体破壊処理によって酵母菌体がどれくらい酵素作用を受けて分解しやすくなるか、またその酵素分解が呈味にどのように影響するかを検討するために、破壊処理を加えないものと加えたものについて、それぞれ0.05%のタカジアスターゼ(三共株式会社製)を添加し、これをE区およびPE区とした。

TABLE I
Treatment of the Lees

Sign	Lees	Method of Mechanical Cell-disintegration ^{a)}	Addition ^{b)}	Amount Added	Amount of Supernatant Obtained ^{c)}
	<i>ml</i>			<i>%</i>	<i>ml</i>
C	500	None	None	None	370
E	500	None	Takadiastase	0.05	375
P	270	Decompression rupture	None	None	182
PE	230	Decompression rupture	Takadiastase	0.05	166

- a) By holding with dry ice in a closed vessel, followed by thawing under CO₂ pressure of 61 to 63 kg/cm², and then rupturing by ejecting (50 ml/sec) through a nozzle.
- b) Addition was made before (E) and after (PE) the mechanical cell-disintegration.
- c) The lees were centrifuged for 10 min at 3,000 r. p. m.

(3) 菌体破壊処理の方法：250 ml の滓に細かく砕いたドライアイスを入れて冷却、凍結させ、その氷塊を砕いて約 105 g のドライアイスとともに、容量 900 ml、ステンレス製の耐圧タンクに入れて密閉し、加温して室温 (約 15°C) まで温度を上昇せしめた。タンク内の圧力は 61~63 kg/cm² となった。これをそのまま約 1 時間保持したのち、内径 3 mm のノズルから約 50 ml/sec の速度で噴出せしめた。

2 回の処理によって合計 500 ml の滓を処理し、処理液をあわせたとこ、435 ml の収量がえられたので、その 235 ml を P 区とし、200 ml にはタカジアスターゼを加えて PE 区とした。

(4) 上澄の採取：各区分とも処理後、8 日間室温に放置したのち、3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離して上澄を採取した。収量は TABLE I に示した通りである。処理によって SO₂ およびアルコール分の損失が起るので、上澄には SO₂ 50 ppm を加えると同時にアルコールを添加して、もとのアルコール濃度まで補強した。

3. 分析 方法

滓の処理液上澄は、まだ完全に清澄していなかったため、分析用の試料としては、さらに 15,000 r. p. m. で 20 分間遠心分離して、完全に清澄せしめたものを使用した。定量の方法は、全タンニンは RIBERAU-GAYON 法¹¹⁾、全窒素は KJELDAHL 法、遊離アミノ態窒素はニンヒドリンによる比色法¹²⁾、アンモニア態窒素は微量拡散法、プロリン態窒素は CHINARD 法¹³⁾、全リンおよびオルソリン酸は ALLEN 法¹⁴⁾、ペプチド態窒素は、試料を 3 倍量の 20% 塩酸と共に 8 時間煮沸、加水分解し、加水分解による遊離アミノ態窒素の増加量を測定してペプチド態窒素とした。またアミド態窒素は、試料 2 ml に濃硫酸 0.1 ml を加えて湯浴で 30 分間加熱、加水分解し、アンモニア態窒素の増加量を測定してアミド態窒素とした。その他の分析法はすべて常法によった。

結果 および 考察

1. 滓処理液の分析値による菌体破壊効果の判定

各区分の滓処理液の分析値を, 上澄のブドウ酒の分析値と共に TABLE II に示した。定量した窒素成分およびリン成分のすべてについて, 上澄のブドウ酒よりも滓の処理液の方が大きな値を示すが, その中では無処理の対照区 (C) が最も小さい。また無処理のものにタカジアスターゼを加えても (E), C区と比べてほとんど窒素成分の増加を示さず, 酵母菌体は酵素による分解作用をほとんど受けないことを示している。菌体破壊処理を加えたもの (P) では各成分ともC区に比べて明確な増加を見せ, 酵母菌体成分がある程度溶出したことを示す。この増加はタカジアスターゼを加えることによって (PE) さらに著しくなり, 処理によって菌体が, 酵素分解を受けやすくなったことが認められる。したがって本報で試みた菌体破壊処理は, ある程度の破壊効果をあげることができたと考える。しかし, その効果はまだ充分満足できるものとは考えられないので, 今後は加圧をさらに高圧にしたり, あるいは処理を1回のみでなく反復して行う等の試験を行って効率の向上を試みたい。また処理によって増加した窒素やリン成分がどのような化合物であるか, それが酵母の自己消化のみによる場合とどのように異なるか等の点についても今後の検討をまちたい。

TABLE II
Analyses of the Wine Used and the Supernatants Obtained

	Wine ^{a)}	Supernatant obtained from ^{b)}				
		Lees	C	E	P	PE
Alcohol	Vol. %	15.4	—	—	—	—
Sugar-free extracts	g/dl	1.55	—	—	—	—
Reducing sugars	"	0.82	—	—	—	—
Total acids	g/l	6.45	—	—	—	—
Volatile acids	"	1.07	—	—	—	—
Aldehydes	mg/l	17	—	—	—	—
Volatile esters	"	169	—	—	—	—
Total tannins	N·KMnO ₄ ml/l	6.70	—	—	—	—
Total nitrogen	mg/l	172	214	219	242	258
Free NH ₂ -N	"	12	24	28	38	44
Peptide-N	"	5	23	25	35	34
NH ₃ -N	"	6	8	8	12	13
Amide-N	"	8	10	11	11	12
Proline-N	"	122	125	125	127	128
Total phosphorus	"	97	101	126	154	170
Ortho-Phosphate-P	"	85	88	108	106	119

a) The white wine from which the lees were obtained.

b) Recentrifuged for 20 min at 15,000 r.p.m.

2. 利き酒による酒質改良効果の判定

上澄のブドウ酒に各区分の滓処理液を, 試みに 50% 添加して利き酒を行った結果を TABLE III に示す。通常のブドウ酒 (O) に比べると各区分とも明らかに コク味がゆたかで, 味が丸く, 調熟したような感じを与え, すくれた利き酒成績を示した。滓処理液の 4

つの区分間の比較では、それほど大きな差は認められなかったが、どれかといえばP区が最もすぐれ、PE区はやゝ劣っていた。もちろん酒質に関する正確な判定は新酒についてのみでなく酒の熟成を待つ下さなければならないが、本実験の結果からは、滓の菌体破壊処理によって酒質改良に有効な調味料が得られる見込みは充分と考える。なおブドウ酒に対する滓処理液の添加比率は自由に変えることができるが、本実験の利き酒の結果では10—60%の間で好成績を与えた。

また滓についてしばしば感じられるような酵母臭は、本実験の試料については各区分とも全く認められなかった。この点は前報¹⁾にも指摘した通りで、SO₂、低温などの利用により、酵母臭の発生は防止することができると思われる。

TABLE III
Organoleptic Ranking of the Wines
Added with the Supernatant after Storage for Two Months

Wine	Supernatant Added	Ranking	Remarks
	% by volume		
O	None	4	Thin, rough
C	50	2	Rich body, round
E	50	2	
P	50	1	Rich body, fine mellowness
PE	50	3	Rich body

3. 菌体に対する酵素分解の効果

菌体破壊処理によって滓中の酵母菌体は酵素による分解を受けやすくなり、したがって酵素添加によりTABLE IIに示したように溶出窒素成分が増加すること、およびTABLE Iに示したように処理液からの上澄の収量が増大することが認められる。しかし利き酒の結果では、酵素を添加したもの(P E)は、添加しないもの(P)に比べて、かえって酒質がやゝ劣っていた。ただし、香味にそれほど異状があるわけではなく、通常のブドウ酒に比べればなおすぐれた利き酒成績を与えているので、収量に重点をおいて考えた場合には酵素添加は有効な方法といえることができる。また本報では、最も入手使用の簡単な総合酵素剤としてタカジアスターゼを使用した。添加酵素の種類を検討することによって酒質を向上させる見込みもあると思われる。特に酵母菌体中のヌクレオチド系呈味物質を問題とする場合には、使用酵素の適切な選択が必要となる。これらの点についても今後検討の予定である。

4. 菌体破壊処理と自己消化との比較

前報¹⁾においてブドウ酒を滓と長時間接触せしめ、滓中の酵母の自己消化によって酒質の改良を試みた結果と、本報の結果とを比較してみると、酒質改良効果はほぼ似たもので、利き酒の結果、香味の質については両者の間に大きな差は認められない。しかし本報の方法ではブドウ酒と処理液とを自由な比率で混和することができ、したがって効果の強弱を調節することができる点で有利である。また本報の方法は特殊な設備、資材を必要とする

けれども、その半面、前報¹⁾の方法のように数カ月もの長時間を必要としないことは一つの利点といえることができる。

要 約

甲州種ブドウ果およびブドウ酒母 OC-2 を用いて醸造した白ブドウ酒の滓を、ドライアイスを用いて凍結し、過剰のドライアイスと共にステンレス製耐圧タンクに入れ、密閉して温度を上げ、融解させると共に炭酸ガスによって $61-63 \text{ kg/cm}^2$ の圧力を生じさせこれをノズルから急激に噴出せしめた後、遠心分離によって上澄を採取してブドウ酒調味液を製造した。この処理によって滓中の酵母菌体はある程度破壊され、上澄の中には窒素およびリンをふくむ菌体成分が多量に溶出された。この処理液をブドウ酒に混和すると、ブドウ酒のkokumiを増すと共に調熟したような丸みを与え、異香味もなく、酒質改良に有効であることを認めた。また処理によって滓中の酵母菌体が酵素による分解作用を受けやすくなるため、酵素添加によって窒素成分の溶出を増加させると共に、処理液からの上澄収量を増大させることができる。しかし調味液としての酒質改良効果は、単に菌体破壊処理を加えたのみのもの方がよくていた。

この方法は処理に長時間を要せず、また滓の酸化、汚染、酵母臭の発生等の防止が容易で、すぐれた滓の利用方法と思われる。

終りに分析を担当された斎藤隆子、小川忠男、稲森和夫の3君に感謝するとともに利き酒その他に御協力を戴いた小原巖先生はじめ本研究所の諸先生に御礼申し上げます。また本実験に使用した耐圧装置は、味の素株式会社から御貸与戴いたものであることを附記して謝意を表します。

文 献

- 1) 増田博, 村木弘行: 酵母菌体を利用するブドウ酒の醸造について (第1報) 白ブドウ酒醸造における滓引時期について 本誌 10, 15 (1963)
- 2) POPOVA, E. M.: L'utilisation des autolysats de levure. *Vinod. Vinog.*, No. 4 (1959); Ref. *Bull. l'O.I.V.*, 32 (343), 97 (1959)
- 3) POPOVA, E. M. and M. G. PUCHKOVA: Autolysates of yeasts. *Biokhim. Vinodeliya* 6, 53 (1960); Ref. *C. A.*, 55, 5861 (1961)
- 4) CAROV, D.: Qualitätsverbesserungen des Schaumweins durch Autolysate. *Minist. zeměd. i gorite*, 2, 353 (1959/60); Ref. *Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch.*, 114, 429 (1961)
- 5) LOZA, V. M.: Utilization of yeast autolysates in the production of white table wines. *Tr. Krosnodarsk. Inst. Pishchevoi Prom.* No. 22, 180 (1961); Ref. *C. A.*, 57, 17203 (1962)
- 6) NILOV, V. I. and E. N. DATUNASHVILI: Fermentation concentrates from wine sedimentation yeasts for improving the quality of table wines and Champagnes. *Sadovodstvo, Vinog. Vinod. Moldavii*, 16 (10), 29 (1961); Ref. *C. A.*, 56, 3916 (1962)
- 7) 田端司郎, 照井堯造, 酵母細胞壁溶解酵素に関する研究 醸工, 40, 366 (1962);

- 41, 390 (1963)
- 8) 阿部重雄, 古屋晃 : 発酵法による酵母細胞膜溶解酵素の製法 特許公告 No. 8691, 昭36, 6, 26 ; No. 9933, 昭38, 6, 21
 - 9) ROSS, J. W. : Continuous-flow mechanical cell disintegrator. *Appl. Microbiol.*, **11**, 33 (1963)
 - 10) 増田博, 村木弘行 : 未発表
 - 11) RIBEREAU-GAYON, J. et E. PEYNAUD : *Analyse et controle des vins*. p. 405, Lib. Polytechnique Ch. Béranger, Paris (1951)
 - 12) YEMM, E. W. and E. C. COCKING : The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, **80**, 209 (1955)
 - 13) CHINARD, F. P. : Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.*, **199**, 91 (1952)
 - 14) ALLEN, R. J. L. : The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940)