

ブドウ酒醱酵中の酵母について

(第1報) 野生酵母の消長

小原 巖・野々村英夫

(昭和30年5月20日受理)

Dynamic Aspect of Yeast-flora during vinous Fermentation.

Part 1. On the Wild Yeasts Population.

Yuwao OHARA and Hideo NONOMURA

(Received May 20, 1955)

The authors trace the populations of wine yeasts and wild yeasts in the grape musts, during fermentation trying a established differential count method where identification of wild yeasts were made on a dilute grape juice agar.

Effects of sulfur-dioxide on the population of wine yeasts and wild yeasts were also examined.

ブドウ果に附着している野生酵母は一般に酒精及び亜硫酸に対する耐性が少なく醱酵中に減少するもので

ある。Kloeckera や Pichia がブドウ酒酵母より亜硫酸に弱いことは CRUSSI¹⁾ 等の他、BALDWIN²⁾ も確認している。普通これらの野生酵母はブドウ酒の品質に有害とされているが Apiculate 酵母などは適当な割合であれば却つてよい影響を与えたという報告³⁾ もある。しかし実際のブドウ酒醸造において各酵母群を動的、数量的に追究しようとする試みは、古く MÜLLER THURGAU⁴⁾ の報告がある他、余りなされていない。ただ最近 LAFOURCADE⁵⁾ が乾ブドウ果醗について、平板培養法で簡単に活性酵母曲線を得、リンゴ酒製造で BEECH 等⁶⁾ が亜硫酸添加、濾過等による自然酵母の減少傾向を懸濁液の検鏡によつて観察した報告等がある。著者等は当研究所で仕込まれたブドウ酒について、亜硫酸の影響及び醗酵経過と関連して全酵母数及び野生酵母の消長を調査試験し、また野生酵母の割合を簡易に検査する方法を試みたので、その概要を報告する。

供 試 果 醗

第1表のように甲州種は液仕込とし、ミルズは除梗破砕果を皮仕込にした。酒母はブドウ酒酵母 OC-2 を使用し、亜硫酸添加後 KS では 4.5 時間、MS では 6 時間経過して添加した。醗酵中の品温及び酒精生成量は第1図の通りである。

実 験 及 び 考 察

1. 全酵母数の測定 THOMA の血球計数器で、仕込後時間的に、果醗 1 ml 中の全酵母数を測定した結

Table 1. Vinification Records.

Type grapes	vintage	Type Wine	Weight grapes kg.	Bllg. a)	SO ₂ ppm	Starter %	Original Sugar	T. Acid
KC Koshyu (Katsunuma)	Oct. 22, '54	Dry White	224	25	—	1	14.72	0.527
KS Koshyu	Oct. 22, '54	Dry White	244	24	50 ^{b)}	1		
MC Mills (Shiozaki)	Sep. 20, '54	Dry Red	375	24	—	1	19.0 ^{d)}	
MS Mills	Sep. 20, '54	Dry Red	375	24	100 ^{c)}	1		

a) Balling degree after sugar added. b) Fresh solution of sulfurous acid is used.
c) K₂S₂O₅ is used. d) Hand refractometer reading.

果は第1図に示した通りである。最初の自然酵母数は、甲州がミルズに比して著るしく少なかった(約 1/3)が、これは坂口氏等⁷⁾ の報告されている様に、早生ブドウに多く、晩生ブドウに少ない為と考えられる。全酵母数の最高は甲州では KC, KS 共に 3 億/ml 近くに達したがミルズは何れも 1.7 億/ml 程度に止まった。ミルズの仕込は当初品温 27°C、醗酵最高温度 35°C という高温のため増殖阻害条件が通常より早く現われた故だろうとも考えられる。気温が低く醗酵期間が比較的長くて調査に適した甲州種については次の様なことがみられる。増殖誘導期間は品温 18°C で亜硫酸を 50 ppm 加えた KS は対照 (KC) より約 20 時間永くなつた。また KC では酒精 11~12% 頃に酵母数は最高に達し、以後自己分解して徐々に減少したが KS は亜硫酸のため増殖曲線は少々ゆるやかとなるが酒精 14% 以上までも増殖を続け、KC と大差ないまでに上昇した。仕込後最高数に達するまでの時間は KC は約 120 時間であつたが KS は 240 時間を要した。対数期間中 KC は酒精 2%, KS は 1.5% 付近で全酵母数の増加率の弱くなるのが認められたが、これは野生酵母群の消長と関係するためであることが次の実験で明らかとなつた。

なお各経過時間 (t) 毎に測定した全酵母生菌数 (n) から、その増殖率 (Δn/Δt) を算出することが出来るが、KC についての結果を表示すれば第2表の通りである。

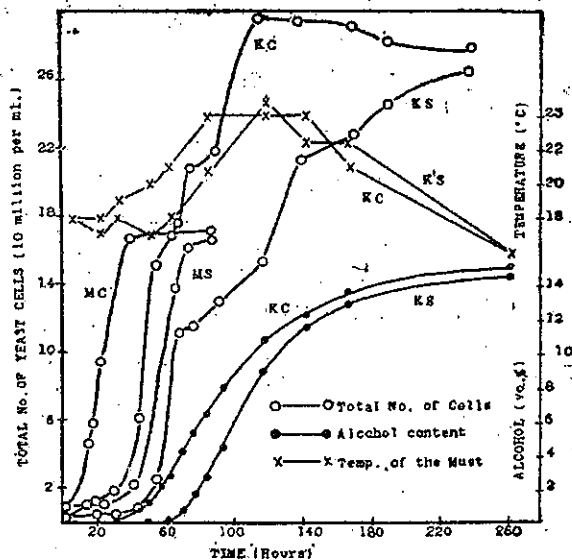


Fig. 1. Total Numbers of Yeast Cells during Fermentation of the Musts.

Table 2. Total Numbers (n) and Multiplication velocities ($\Delta n/\Delta t$) of Yeasts in the Fermenting Must (KC).

Successive times t	Δt	n $\times 10^6$	Δn $\times 10^6$	$\Delta n/\Delta t$ $\times 10^4$
0 hrs				
19	19	3.8	9.2	48.4
30	11	13.0	5.8	52.7
43	13	18.8	42.2	324.6
54	11	61.0	90.0	818.2
67	13	151.0	24.8	190.8
75	8	175.8	31.9	398.7
91	16	207.7	10.1	63.1
116	25	217.8	79.9	319.6
140	24	297.7	-2.0	-8.3
165	15	295.7	-3.4	-22.6
189	24	292.3	-8.1	-33.7
239	50	284.2	-3.7	-7.4

2. 全酵母生菌数中の野生酵母数の割合 ブドウ果に附着する全酵母群の内、いわゆるブドウ酒酵母群を除いて Apiculate 酵母, 産膜酵母, *Torulopsis* 及び *Rhodotorula* 属等の酵母群を一括して、ここでは野生酵母と呼称し、全酵母数に対する割合を調査した。これらの野生酵母は寒天培地上の集落の標徴から明らかに区別出来るものもあるが、それ丈では容易に識別出来ぬものも多い。調査の第1の方法として、醸酵の各時期毎に平板培養(果汁寒天 30°C, 3日)して40~50集落宛斜面に分離し、約500集落を集め、形態的及び培養的性質から8群に大別した。各群から代表株を4~5株ずつ選び純粋分離をした後、分類学的諸性質を試験したが、この方法によつて分離した全酵母集落の内、野生酵母と認められたものの割合は第2図に点線で示した通りである。(分類学的諸性質の試験結果及び属種の同定は別に報告する予定である)。この方法では分離した酵母の同定は満足に出来るが、被試験集落は限定され平板上の分布の不均一に基く誤差も少なく、なによりも手数に非常に多くかかる方法である。

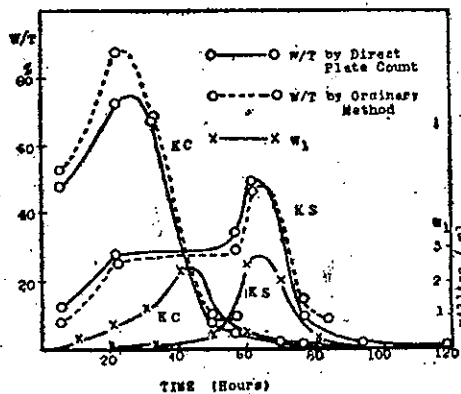


Fig. 2. Ratios (W/T) of wild yeast colonies (W) to total colonies (T) and Numbers of Active wild yeast (W_1)

培地: ブドウ(甲州)果汁を水道水で3倍程に薄め蔗糖を加えて Bllg.8 とし、苛性ソーダで pH 5.8 にした後2%の寒天を溶解して 120°C, 15分殺菌。
方法: 供試果醪を適当に稀釈し、シャーレ1枚に200~600程度の集落を目標とし30°C, 1週間以上平板培養する。出現する全酵母数を数え、また膜状の集落、*Rhodotorula*, 長く発達した擬似菌糸を造るもの等の他に、集落の中央部が次第に褐色化してくるものを数えて野生酵母数とする。本法の有利な点は、麹汁寒天や麦芽汁寒天ではブドウ酒酵母と区別出来ないような集落でもシャーレを裏から観察してみると、中央部が次第に明らかに着色することである。今回甲州及びミルズ果醪から分離された野生酵母主要群は以上の点で区別され、区別出来ないものは醸酵初期に野生酵母の4%以下の頻度で現れた群に止まつた。実施に当つては、シャーレ4枚程度の各割合の平均が望ましい。また培養中培地が著るしく乾燥すればブドウ酒酵母も部分的に着色することがあるので、寒天培地層が薄くなり過ぎぬようにし、恒温器中の湿度に留意する。なおシャーレ1枚当りの集落数が少ない(50個程度以下)と発育が盛んで一般に着色効果は少ない。

醸酵の始まる頃までは糸状菌のため分離や計数が妨げられることが多いので、ETCHELL⁶⁾, 大西⁹⁾等の結

果に従いプロピオン酸ソーダを0.2%添加して、pHが比較的高いけれどその目的を達することを知ったが前記野生酵母群の混合培養はブドウ酒酵母に比して生菌数が著るしく減少(約 $\frac{1}{3}$ まで)する結果を示したので、汚染の少ないシャーレを選ぶか、糸状菌を発育初期に除去するようにした。

甲州種について本法を行なった結果は第2図の通りで第1の方法と殆んど一致し、野生酵母の少ない場合にはむしろ信頼度の一層高いことが想像された。

これらの結果からKCの野生酵母の割合は最初ブドウ酒酵母より、はるかに急激に増加し24時間で最高(80%)まで上昇したが、48時間内には既に著るしく減少する(10%)のが認められた。しかし野生酵母の実数の増加は仕込後40時間位続いており推定最高数0.25億/mlとなつた。これに対しKSでは最初亜硫酸の打撃で急激に野生酵母群は減少し50%から10%位になつたのが確認されたが、矢張りブドウ酒酵母群より速やく増殖し、その割合は増加して60時間後最高(50%)に達した。その実数はKCと大差なく推定0.28億/mlとなつた。この点亜硫酸で野生酵を抑制しようとする場合充分考慮すべきである。醱酵経過と比較すると、酒精の生成が始まり糖分屈折度が僅かに低下することが認められる頃に何れも野生酵母の割合は最高を示し、酒精1~3の間にその大部分は著るしく活性を失ない酒精12%で活性酵母は消失した。

なお先に指摘した全酵母数曲線の対数期に一旦停滞する時期はこれら野生酵母群の生菌実数の著るしく減少する頃から起ることが判明した。

3. 酒母添加時の野生酵母とブドウ酒酵母数 KC及びMCについて酒母を添加する前後の酵母全数、野生酵母の割合(但し生菌数中の割合を以つて代用)を基として算出すれば全酵母数は次表の様に分けられる。

Table 3. Yeast Populations at Pitching Times.

Musts	KC		MC	
	before	after	before	after
Wine Yeasts, natural	0.53	0.53	0.37	0.37
" cultured	0	1.44	0	0.38
Wild yeasts	1.82	1.82	7.60	7.60
Total yeasts	2.35	3.79	7.97	8.33

甲州種では全酵母数がミルズの約 $\frac{1}{3}$ であつたが、その内ブドウ酒酵母は比較的多く22.5%を占め、酒母添加によつてその割合は52%となつた。ミルズではブドウ酒酵母は4.6%、酒母添加によつて9%となつたが、培養ブドウ酒酵母の少ないのは酒母が若く酵母数の少なかつたことに依る。

4. 野生酵母群とブドウ酒酵母の亜硫酸耐性について 亜硫酸添加果醪の仕込後約20時間経過した試料では全酵母数は殆んど増加しておらず、むしろやや減少しているが野生酵母の割合は一旦上昇している(第2図)。野生酵母はブドウ酒酵母より亜硫酸耐性が低いことからだけではこの点は説明されないで、野生酵母群とブドウ酒酵母を別々に培養して亜硫酸に耐する挙動を追加実験した。

甲州ブドウ果汁(補糖してBllg. 24°) 70 ml 宛を100 ml 容三角瓶にとり加熱殺菌後、亜硫酸水(SO₂として50 ppm)を加え、これに今回分離したブドウ酒酵母(S-1)及び野生酵母(混合培養)をそれぞれ別に斜面培養から接種し20°Cに培養し、経過時間毎に一定量の試料を採り平均生菌数を調査した結果は(第3図)のようになつた。この結果によれば野生酵母群全体としては、亜硫酸により最初に強い打撃を受けるが、その後増殖の対数期まで徐々に増加傾向を示す、これに対しブドウ酒酵母は最初殆んど亜硫酸による被害は認められないが、増殖対数期(約30時間後)になる前に、次第に活性酵母数が減少するのが認められた。即ち両者の間には亜硫酸に対する抵抗性に差があるのみでなく反応にもズレのあることが考えられた。従つてKSにおいて、野生酵母の増殖対数期以前に比較的高い割合を示したのは丁度その時期にブドウ酒酵母の生菌数が減少したことによるものと推定された。

要 旨

甲州種及びミルズを原料とする果醪について、醱酵経過及び亜硫酸添加と連関して酵母群の動態を調査した。

1. 全酵母数の増加は亜硫酸添加果醪では増殖誘導期間が延長

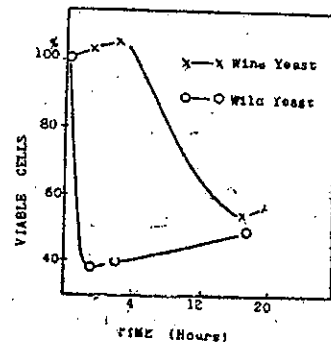


Fig. 3. Survival curve of wine yeast and wild yeasts in a sulfited must.

し、また増殖速度は酒精生成速度に対して対照醗よりおくれ、やや高濃度酒精果醗中では行なわれたが、いずれも到達した最高数には大差がなかった。

2. 甲州種とミルズは最初の自然酵母数やブドウ酒酵母の割合等に著しい差があつた。また全酵母数の最高はミルズでは甲州種の $\frac{1}{2}$ 程度に止まつたが、これは高温醗酵が主原因の一つに考えられた。

3. 野生酵母群の生菌数割合を得るに稀釈果汁寒天を用い、Plate count する方法を試み、従来の斜面採取法と比較したが、極めて簡易であり且つ信頼度の高い結果が得られた。

4. 野生酵母の割合は SO_2 50 ppm 添加の果醗 (KS) では、最初明らかに著るしく打撃を受けて減少するが、その後急速に増加し、その生菌実数の最高は対照と同程度まで増加した。このことは亜硫酸で野生酵母を抑制する観点からは注目しなければならない。いずれも糖分 (屈折度) が低下し始めた頃その割合は最高に達し、実数の増加はその後も続く場合もあるが酒精濃度 1~3% の間に著るしく活性を失わない 12% に到つて活性野生酵母は全く消失した。

5. 全酵母数曲線の対数期の初め屈曲点を認めたが、この時期は多くの野生酵母が活性を失う時期と一致した。また野生酵母の割合が亜硫酸添加試料において 20 時間後頃比較的高い値を示した原因の一つとしてブドウ酒酵母群の活性が低下することが推定された。

文 献

- 1) CRUESS, W. V.: Principles and Practice of wine making. p.172, Avi Publ. Co. New York(1949)
- 2) BALDWIN, G.N.: Proc. Am. Soc. Enologists, 2nd Annual Open Meeting, Davis, Calif., Aug. 9-10, p.43~53 (1951); Reviewed by M. A. JOSLYN: Wines & Vines, 35(12), 31 (1954)
- 3) SAENKO, N.F.: Vinodelie i vinogradarstvo s. s. s. R., 6 (2), 12 (1946)
- 4) SCHANDEL, H.: Die Mikrobiologie des Weines. E. Ulmer, Stuttgart (1950)
- 5) LAFOURCADE, S.: Ind. agr. et aliment., 71, 15 (1954)
- 6) BEECE, I. F. W. et al.: Ann. Rep. Ag. and Hort. Res. Sta., Long Aston, Bristol, 1951(1952);
- 7) 坂口謙一郎: 園雑, 29 (1934)
- 8) ECHHELLS, J. L. et al.: App. Microbiol., 2, 296 (1954)
- 9) 大西博: 農化, 28, 134 (1954)

(山梨大学工学部醗酵研究所)