

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 30, 9~17 1995]

山梨県内ワイナリーの赤ワイン仕込みにおける乳酸菌の分布

柳田藤寿¹、後藤亜紀人¹、芦沢 忠²、内田多加夫²、篠原 隆¹
(山梨大学工学部発酵化学研究施設¹、白百合醸造(株)²)

Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated during Red Wine Making at a Winery in Yamanashi Prefecture

FUJITOSHI YANAGIDA¹, AKIHITO GOTO¹, TADASHI ASHIZAWA²,
TAKAO UCHIDA², and TAKASHI SHINOHARA¹

Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan¹
Shirayuri Wine Co., Ltd., Todoroki, Katsunuma-cho 409-13, Japan²

Abstract

Thirty-nine strains of lactic acid bacteria were isolated during the making of red wine from Muscat Bailey A grapes at Shirayuri Winery, Yamanashi prefecture from 1992 to 1994. The strains isolated were classified as *Lactobacillus plantarum* (25 strains), *Leuconostoc oenos* (6 strains), *Leuconostoc mesenteroides* (5 strains), *Lactobacillus yamanashiensis* (1 strain), *Lactobacillus brevis* (1 strain), *Lactobacillus fermentum* (1 strain), *Lactobacillus* sp. (4 strains). Eight *L. plantarum* strains were found in the first stage of the wine-making process, and four *Leu. oenos* strains in the later stage. In 1993 and 1994, malo-lactic fermentation occurred in the red wine as a result of wild-type lactic acid bacteria activity, but this did not take place in 1992.

緒 言

ワイン醸造における酸味の調節は、品質上重要である。酸度を構成する各種有機酸のうち、L-リンゴ酸は、乳酸菌によるマロラクティック発酵 (MLF) によって発酵中や新酒の貯蔵中にL-乳酸と二酸化炭素に分解される^{1)・2)}。この現象によりワインの酸味は低減されてまろやかになり、微生物学的に安定化すると同時に、MLFの副産物が酒質に複雑性を与え芳醇な香味を形成する。本工程は赤ワインおよび一部の白ワインに重要とされている³⁾。

伝統的ワイン生産国である欧米ではMLFに関する研究が活発に行われており、いくつかの総説も出されている^{1)・2)・4)・5)}。ワイン醸造中における乳酸菌のフローラについても数多く研究され、フランスのLafon-Lafourcadeら⁶⁾はボルドー地方の赤

ワインについて調べ、仕込み前期より *Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus plantarum* が多く分離され、後期より *Leuconostoc oenos* のみが分離されたと報告している。Fleetら⁷⁾も、ボルドー地方の赤ワインについて調べ、仕込み前期より *Pediococcus cerevisiae*、*Leuconostoc mesenteroides* が多く分離され、後期より *Leu. oenos* のみが分離されたと報告している。Sieiroら⁸⁾は、スペインのワインについて調べ、仕込み前期より *L. plantarum*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus curvatus* が分離され、後期より *L. plantarum*、*Leu. oenos*、*L. curvatus* が分離されたと報告している。日本の赤ワインについて、Yoshizumiは⁹⁾ ワイン醸造中から嫌気性細菌を分離し、*L. planta-*

Table 1. Analysis of 1992 Shirayuri winery musts during experimental red wine making

Sampling number	Fermentation days	pH	T.A. (g/l)	L-M.A. (g/l)	Alcohol (V/V)%	Brix %	R.S. (g/l)	Bacterial population(CFU/ml)
A	1	3.50	6.38	3.50	NT	18.7	NT	2.74×10^4
B	1	3.50	6.08	3.66	NT	17.9	NT	2.08×10^4
C	13	3.40	7.05	2.62	9.70	NT	NT	1.90×10^5
D	13	3.49	6.83	2.65	9.80	NT	NT	5.60×10^2

* Harvest data: Sept. 18, 1992.

T.A. : Total acid; L-M.A. : L-Malic acid; R.S. : Reducing sugar; NT: Not tested

Table 2. Analysis of 1993 Shirayuri winery musts during experimental red wine making

Sampling number	Fermentation days	pH	T.A. (g/l)	L-M.A. (g/l)	Alcohol (V/V)%	Brix %	R.S. (g/l)	Bacterial population(CFU/ml)
A	1	3.40	6.75	4.54	NT	16.6	NT	4.00×10^5
B	14	3.59	6.44	1.18	8.40	NT	NT	9.00×10^6
C	14	3.79	6.61	0.16	7.00	NT	NT	1.30×10^7
D	21	3.75	6.08	0.43	10.00	NT	1.31	5.10×10^6

* Harvest data: Sept. 22, 1993.

Table 3. Analysis of 1994 Shirayuri winery musts during experimental red wine making

Sampling number	Fermentation days	pH	T.A. (g/l)	L-M.A. (g/l)	Alcohol (V/V)%	Brix %	R.S. (g/l)	Bacterial population(CFU/ml)
A	1	3.56	5.33	3.05	NT	18.6	NT	1.00×10^4
B	8	NT	NT	NT	12.20	NT	NT	5.30×10^6
C	16	3.84	5.37	0.21	11.80	NT	2.90	7.40×10^5

* Harvest data: Sept. 28, 1994.

rum、および*Lactobacillus*属の菌種が分離されたと報告している。野々村ら^{10)・11)}はワインなどからMFL菌を分離し、*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属など多くの菌種を報告している。最近、著者ら¹²⁾も1990年度山梨大学における赤ワインの試験醸造から乳酸菌の分離を行い、仕込み前期から*L. plantarum*が、仕込み後期から*Leu. oenos*が多く分布していたと報告した。

以上のように、日本におけるワイン醸造中の乳酸菌のフローラの研究は、約30年も前のものである。そこで著者らは、1992年から1994年に山梨県のワイナリー（白百合醸造）における赤ワイン製造工程における乳酸菌の分布を調べたので報告する。

実験方法

1. 赤ワインの仕込み方法およびサンプル採取経過

1992年秋に山梨市で収穫された黒ブドウ（マスカット・ベリーA(MBA)）を破碎、除梗した後の果もろみをA、Bとし、これに補糖を行い、アルコール発酵とマセレーションを10～14日間行った。仕込みより12日間たった発酵タンクの上層液をCと

し、この上層液をフィルター濾過し亜硫酸を添加したものをDとした。

1993年秋に山梨市で収穫された黒ブドウ(MBA)を破碎、除梗した後の果もろみをAとし、これに補糖を行い、アルコール発酵とマセレーションを10～14日間行った。仕込みより14日間たった圧搾後のフリーランマストをB、プレスランマストをCとし、仕込み21日目の赤ワインをフィルター濾過し亜硫酸を添加したものをDとした。

1994年秋に勝沼町で収穫された黒ブドウ(MBA)を破碎、除梗した後の果もろみをAとし、これに補糖を行い、アルコール発酵とマセレーションを16日間行った。仕込みより8日間たった発酵タンクの上層液をBとし、この上層液を圧搾したものをCとした。収穫期日はTable 1.～3.に示した。

2. 果汁およびワインの一般分析

サンプル採取時に果もろみのpH、総酸、L-リンゴ酸、D、L-乳酸、糖度、アルコール生成量について調べた。サンプルは東洋濾紙No.2およびNo.5で濾過を行った。分析は、所定の方法¹³⁾に従って行った。なお、L-リンゴ酸は、検体1mlに蒸留水4

ml、2N NaOH 4mlをテフロンスクリーキャップ付き試験管 (13×100mm) に採り混合した後、ヒートブロックTA-2H(Taiyo社製) を用いて100℃、30分間加水分解を行った。分解終了後、分解液を室温に戻し、2N硫酸にて中和し、50mlのメスフラスコにとり定容した。この液0.1mlを試料とし、ベーリンガー・マンハイム山之内社製F-キット・L-リンゴ酸にて測定を行った。

D, L-乳酸は、検体2mlに蒸留水4ml, 2N NaOH 2mlをテフロンスクリーキャップ付き試験管 (13×100mm) に採り混合した後、ヒートブロックTA-2H (Taiyo社製) を用いて100℃、15分間加水分解を行った。分解終了後、分解液を室温に戻し、2N硫酸にて中和し、25mlのメスフラスコにとり定容した。この液0.1mlを試料とし、ベーリンガー・マンハイム山之内社製F-キット・D-乳酸/L-乳酸にて測定を行った。

3. 乳酸菌の分離

BM寒天培地¹⁴⁾ (カビサイジン (日本製薬㈱) を10ppm添加したもの) に試料の原液または希釈したものを0.5ml接種し、BBL社製の嫌気ジャーおよびガスパック (水素、炭酸ガス発生袋) を用いて嫌氣的にし、30℃で1週間培養を行った。コロニーが形成したら、形状、色などの特徴が異なったものを釣菌し、BM液体培地で培養を行った。次に、これらを画線培養して純化を行った。さらに形成した単コロニーを液体培地で培養後、顕微鏡で観察して、純粋になったものを分離菌株とした。

4. 分離乳酸菌の同定

乳酸菌同定マニュアルにより¹⁵⁾ 形態観察、グラム染色、孢子形成、カタラーゼ、生育温度試験を行った。乳酸の生成能および光学異性体はOkadaら¹⁶⁾ の方法を参考に行った。DL-リンゴ酸を除いたBM培地に分離株を接種し、前培養を行い、本培養は、同培地を用いて桿菌が2日間、球菌が5日間それぞれ30℃にて行った。培養液を遠心(3000rpm, 10min) し、その上澄液を桿菌は100倍、球菌は50倍希釈したものを分析試料とした。乳酸の測定にはベーリンガー・マンハイム山之内社製F-キット・D-乳酸/L-乳酸を用いた。乳酸光学異性体の判定基準はD乳酸とL乳酸の比率より以下に示す。 $4 \leq D/L(D)$, $2 \leq D/L < 4(DL+D)$, $0.5 \leq D/L < 2(DL)$, $0.25 \leq D/L < 0.5(DL+L)$, $D/L < 0.25(L)$ 。

乳酸発酵形式は、乳酸測定と同様の試料を用い、ベーリンガー・マンハイム山之内社製F-キット・エタノールにより生成エタノール量を測定した。また、乳酸の生成能で測定したD-乳酸量とL-乳酸量を加算したものを生成乳酸量とした。生成エタ

ノール量 (E:g/l) と生成乳酸量 (L:g/l) の比率から発酵形式を判定した。判定基準は岡田ら¹⁷⁾ の基準を若干変更し、以下の式に従った。 $E/L < 0.05$: homo fermentation type、 $0.2 \leq E/L < 0.51$: hetero fermentation type。

糖類発酵性試験はBM培地中のglucose, fructose, tomato juiceを除く成分を溶解した後、pHを修正し、指示薬溶液を培地1L当たり20ml添加した。指示薬溶液は1g C. P. R. (chloro phenol red) を6N NaOHで微アルカリ性にして500mlの蒸留水に溶解させた。この培地に対して供試糖類を1%濃度に溶解させた後、約3mlずつ分注し、121℃で15分間滅菌した。ただし、arabinose, ribose, xylose, fructose, mannose, rhamnose, maltose, sorbitolは、それぞれ20%の水溶液とし、これを濾過滅菌して基本培地 (121℃で15分間滅菌) に無菌的に添加した。また、糖を含まない培地を対照として用いた。細胞壁組成は、供試菌株を50mlのBM培地で培養し集菌した。得られた菌体を蒸留水で洗浄し、凍結乾燥菌体とした。このうち約50mgをテフロンスクリーキャップ付き試験管にとり、これに1mlの6N HClを加え100℃で18時間保ち加水分解した。加水分解後、予め湿らせた直径4cmの濾紙 (東洋濾紙5C) を用いてろ過した。濾紙に残った固形物を1mlの蒸留水で洗浄し、濾液を10mlのナス型フラスコに受けた。これをロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。さらに1mlの蒸留水を加え懸濁し、再び濃縮乾固した。これを塩酸臭がなくなるまで繰り返し、この残渣を300 μ lの蒸留水に溶かし、分析試料とした。分析はセルロースパウダーを塗布した20cm角のTLCプレート (メルク社製No. 5716) を用いた。TLCの底辺から2.5cmのところをベースラインとし、両端を2.5cmあけて1.5cmおきに分析試料と標準物質0.01M DL-ジアミノピメリン酸 (シグマ社製) を3 μ lスポットした。展開層には展開溶媒 (メタノール: 水: 6N HCl: ピリジン=80: 26: 4: 10) を1cm位の深さに入れ、約3時間展開した。展開後、ドラフト中で1時間乾燥させた後ニンヒドリンスプレー (東京化成工業社製) をかけ、100℃の乾燥機に5~10分入れて発色させた。

DNAのGC含量の測定は、まずDNAの取得を行った。一般に定常増殖期に入った菌体は溶菌酵素に対し、抵抗性を示すようになる。そこで比較的溶菌しやすく、収量の多い対数増殖後期の菌体を使用した。また人為的に不完全な細胞壁を作らせる目的でグリシン添加培養を行った。本実験では、5ml, 200mlと2段階の前培養を繰り返し、ホモ型発酵桿

菌は2L、ヘテロ型発酵桿菌及び球菌は3Lで本培養を行った。なお、本培養はいずれも静置培養で行った。ホモ型発酵桿菌は、本培養4時間後に1.5%となるようにグリシン溶液を添加し、さらに4時間培養した後集菌した。ヘテロ型発酵桿菌は、本培養12時間後にグリシン添加し、さらに12時間培養後集菌した。ヘテロ型発酵桿菌は、本培養16時間後にグリシン添加し、さらに16時間培養後に集菌した。集菌した菌体は、0.1M Saline-EDTA (0.15M NaCl, 0.1M EDTA) にて洗浄し、次に10×TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) にて3回洗浄した。得られた菌体は10×TEに懸濁して、-20°Cで保存した。溶菌反応には湿菌体5g用いた。10×TEに懸濁凍結してある菌体を融解後、遠心して上澄みを除いた。新たに10mlの10×TEを加え懸濁し、lysozyme (生化学工業社製) を1スパーテル、N-acetylmuramidase SG (生化学工業社製) (50µg/ml, 10×TE) 0.5mlを添加し、37°Cで90分間溶菌反応させた。溶菌したものはprotenase K (メルク社製) 処理を行った。また溶菌しなかったものは以下に示すアルカリ処理を行った。溶菌反応後の菌体洗浄液を遠心し、上澄みを除いた。菌体に0.1M glycine-NaOH buffer (pH 11.4) を15ml加え懸濁し、2N NaOH でpHが11.0-11.5となるように調製した後、37°Cで10分間保温した。その後、5mlの2.0 M Tris-HCl (pH8.0) を加え中和し遠心した。上澄みを除き、10×TEにて2回洗浄した。新たに、10mlの10×TEを加え、lysozyme, N-acetylmuramidase SGにより溶菌反応を行った。溶菌反応後、protenase K (1mg/ml, 10×TE) 0.5mlを添加し、37°C30分間反応させた。反応後、細胞壁にダメージを与える目的で-80°Cで一晩凍結させた。次にTris-SDS (0.1M Tris-HCl, 1% SDS) を10ml加え完全に溶解させ、60°Cで10分間保温した。溶解したものを50mlの遠沈管に移し、フェノール/クロロフォルム溶液(phenol:chloroform:iso-amylalcohol) を10ml加え、氷上にて時々攪拌しながら20分間静置した。次にこれを遠心し上層を新たな遠沈管に回収した。再びフェノール/クロロフォルム溶液10mlを加え、遠心し上層を100mlのビーカーに回収した。この溶液に2倍量のエタノールを注ぎガラス棒にてDNAを巻きとった。巻きとったDNAは、70%、80%、90%エタノールに順に10分間浸し脱水及びフェノール除去を行った。その後、DNAを減圧乾燥させ、10mlのTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) に懸濁させ一晩静置した。この溶液に対し50µg/mlとなるようにRNase A (シグマ社製) を加え、37°Cで30分間保温した。

その後、フェノール/クロロフォルム処理、エタノール沈殿を行い、乾燥後10mlの1×TEに懸濁させ一晩静置した。なお、この行程は2回行った。DNA溶液を、同様にRNase処理、除タンパク処理、遠心し上層を50mlビーカーに回収した。0.1倍量のAcetate EDTA (3M NaOAc, 1mM EDTA) を加え軽く攪拌した。これに0.6倍量のイソプロパノールを加え、巻き取り、エタノールでリンスし、乾燥後、3mlのTEに懸濁した。取得したDNA溶液を脱イオン水で10-30倍に希釈後、紫外外部吸収(200-300nm)を測定した。純粋なDNAの紫外外部吸収は、 $OD_{260}:OD_{230}:OD_{280}=1:0.45:0.515$ であるとされ¹⁸⁾この値を目安とした。また簡便な方法としては $OD_{260}/OD_{280}=1.8$ を目安とした。DNAの純度が低い場合はさらにRNase処理、除タンパク、イソプロパノール沈殿を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるGC含量の測定

Tamaoka¹⁹⁾らの方法を基に以下のように行った。精製DNA溶液(O.D.260=5を濃度の目安とした)をマイクロチューブに25µlとり、100°Cで10分間加熱処理した後急冷し、一本鎖DNAとした。これにNuclease P1溶液(ヤマサ醤油社製) (0.1mg/ml, 40mM CH₃COONa+2mM ZnSO₄(pH5.3))を10µl加え、50°Cで1時間反応させ、ヌクレオチドに分解した。さらに、bacterial alkaline phosphatase溶液(Takara社製、2.4units/ml in 0.1M Tris-HCl (pH8.1))を10µl加え、37°Cで一晩反応させてヌクレオチドまで分解し、これを分析試料とした。また標準物質として、ヤマサ醤油社製標準ヌクレオチド溶液10µlにnuclease P1用緩衝液25µlを添加したのち、分析試料と同様にphosphatase処理したものを準備した。なお、試料は調製後直ちに分析し、冷蔵保存は避けた。HPLC条件をTable 4.に示す。

菌種の同定はBergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2²⁰⁾ および The Prokaryotes²¹⁾の記載に従った。

Table 4. HPLC operating conditions

Instrument	Hitachi L-6000
Column	Hitachi gel #3056(4×250mm)
Eluent	0.2M NH ₄ H ₂ PO ₄ -CH ₃ CN(19:1, v/v)
Flow rate	1ml/min
Temperature	35°C
Sample volume	5µl
Detector	Hitachi L-4000(UV270nm)
Data analyzer	Hitachi D-2500

実験結果および考察

(1) 果もろみの一般成分と乳酸菌数

仕込み経過における果汁およびワインの一般成分の分析値と乳酸菌の推移を仕込み年度別にTable 1. ~3. に示した。1992年度はブドウ収穫時期の天候が良好であったため、果汁A、Bは健全なブドウ果であり、乳酸菌数に差はみられなかった。仕込み13日目において乳酸菌数の増加がみられたが、総酸および、L-リンゴ酸の分析結果からMLFは生起していなかった。

1993年度はブドウ収穫時期の天候が不順であったため、糖度が低く、酸度の高いブドウ果であった。果汁の段階で乳酸菌数は 4.00×10^5 (CFU/ml) と高かった。これは仕込みの時かなり損傷した(被害を受けた)ブドウ果も一緒に仕込まれた為と考えられる。仕込み14日目においてサンプルB、Cは乳酸菌数がそれぞれ 9.00×10^6 (CFU/ml)、 1.30×10^7 (CFU/ml) に増加した。また、L-リンゴ酸の減少およびpHの上昇からもすみやかにMLFが生起していた。

1994年度はブドウ収穫時期の天候が良好であったため、仕込みに用いたブドウは健全なブドウ果であり、乳酸菌数は 1.00×10^4 (CFU/ml) であった。仕込み8日目において乳酸菌数の増加 5.30×10^6 (CFU/ml) がみられた。また、仕込みから16日目のサンプルCにおいては、L-リンゴ酸の減少およびpHの上昇からもすみやかにMLFが生起していた。

以上のように、収穫年において天候が良く、ブドウが健全果の1992年においてはMLFが生起しなかったが、それ以外の年はMLFが生起した。この理由としてMLFに必要とされる乳酸菌数 (10^6 CFU/ml以上)^{6), 22), 23)} に達していたためと考えられる。

(2) 分離乳酸菌の同定

1992年度から1994年度に、白百合醸造における赤ワイン製造(MBA) 工程中から、乳酸菌39株が分離された。以下に各年度別に同定結果を示す。

1992年分離菌株: 92 SHI-A-1, 92 SHI-A-2, 92 SHI-B-1, 92 SHI-C-1, 92 SHI-C-2, 92 SHI-C-3, 92 SHI-C-4, 92 SHI-C-5, 92 SHI-D-2, 92 SHI-D-3, 92 SHI-D-4, 92 SHI-D-5は、桿菌でホモ型発酵にてDL-乳酸を生成し、細胞壁組成にDAPを持ち、糖類の発酵性およびDNAのGC含量が43~45%であることから*L. plantarum*と同定した。92 SHI-D-1は、桿菌でホモ型発酵にてL-乳酸を生成し、細胞壁にDAPを持ち、また、糖類の発酵性およびGC含量37%から*Lactobacillus yamanashi-*

*ensis*と同定した。92 SHI-A-5は、桿菌でヘテロ型発酵にてDL-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、15°Cで生育せず45°Cで生育し、また、糖類の発酵性およびGC含量52%から*Lactobacillus fermentum*と同定した。92 SHI-A-4は、球菌でヘテロ型発酵にてD-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、15°Cで生育し、糖類の発酵性およびGC含量39%から*Leu. mesenteroides*と同定した。

1993年分離菌株: 93 SHI-A-2, 93 SHI-A-3, 93 SHI-C-3は、桿菌でホモ型発酵にてDL-乳酸を生成し、細胞壁組成にDAPを持ち、糖類の発酵性およびDNAのGC含量が43~45%であることから*L. plantarum*と同定した。93 SHI-A-5は、桿菌でヘテロ型発酵にてDL-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、糖類の発酵性およびGC含量44%から*Lactobacillus brevis*と同定した。93 SHI-B-1, 93 SHI-C-1, 93 SHI-C-4は、球菌でヘテロ型発酵にてD-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、15°Cで生育し、糖類の発酵性およびGC含量38%より*Leu. mesenteroides*と同定した。93 SHI-B-3, 93 SHI-D-1, 93 SHI-D-2, 93 SHI-D-3は、球菌でヘテロ型発酵にてD-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、15°Cで生育せず、糖類の発酵性およびGC含量38%から*Leu. oenos*と同定した。

1994年分離菌株: 94 SHI-A-4, 94 SHI-B-1, 94 SHI-B-2, 94 SHI-C-1, 94 SHI-C-2, 94 SHI-C-3は、桿菌でホモ型発酵にてDL-乳酸を生成し、細胞壁組成にDAPを持ち、糖類の発酵性から*L. plantarum*と同定した。94 SHI-A-1, 94 SHI-B-3, 94 SHI-B-4, 94 SHI-C-4は、桿菌でホモ型発酵にてL-乳酸を生成し、15°Cで生育し、また、糖類の発酵性から*Lactobacillus sp.*と同定した。94 SHI-A-2は、球菌でヘテロ型発酵にてD-乳酸を生成し、細胞壁にLysを持ち、15°Cで生育し、糖類の発酵性およびGC含量38%から*Leu. mesenteroides*と同定した。94 SHI-B-5, 94 SHI-C-5は、球菌でヘテロ型発酵にてD-乳酸を生成し、15°Cで生育せず、糖類の発酵性およびGC含量38%から*Leu. oenos*と同定した。

(3) 分離乳酸菌の分布

1992年度について、仕込み1日目の果もろみA、Bは比較的きれいな健全果で 2×10^4 (CFU/ml) の乳酸菌が存在し、*L. plantarum* 3株、*L. fermentum* 1株、*Leu. mesenteroides* 1株が分離された。アルコール発酵13日目のCは、かなり損傷したブドウ果と一緒に混入したため菌数が約 2×10^6 まで増加したと考えられ、*L. plantarum* 5株が分離された。Dは、フィルター濾過し亜硫酸を添

Table 5. Phenotypic characteristics of lactic acid bacteria isolated during

Strain number	Shape	Gram staining	Spore formation	Catalase	Production of lactic acid	Cell wall type	GC content (%)	D-lactic acid (mg/ml)	L-lactic acid (mg/ml)	D/L	Optical form of lactic acid	Lactic acid produced (mg/ml)			Fermentation type	Growth Temperature (°C)			
												Lactic acid produced (mg/ml)	EtOH produced (mg/ml)	E/L		15	20	30	40
92 SHI-A-1	R	+	-	-	+	DAP	43	4.18	6.65	0.63	D L	10.83	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-A-2	R	+	-	-	+	DAP	NT	4.46	5.68	0.79	D L	10.15	0.00	0.00	Homo	+	+	+	-
92 SHI-A-4	C	+	-	-	+	Lys	39	4.11	1.23	3.18	DL+D	5.40	1.55	0.28	Hetero	+	+	+	-
92 SHI-A-5	R	+	-	-	+	Lys	52	2.38	2.69	0.88	D L	5.08	1.33	0.26	Hetero	-	+	+	+
92 SHI-B-1	R	+	-	-	+	DAP	NT	5.34	4.88	1.10	D L	10.23	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-C-1	R	+	-	-	+	DAP	NT	7.78	6.06	1.28	D L	13.84	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-C-2	R	+	-	-	+	DAP	45	5.10	5.68	0.90	D L	10.79	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-C-3	R	+	-	-	+	DAP	NT	6.95	7.91	0.88	D L	14.87	0.20	0.01	Homo	+	+	+	+
92 SHI-C-4	R	+	-	-	+	DAP	44	8.87	8.01	1.11	D L	16.88	0.16	0.01	Homo	+	+	+	+
92 SHI-C-5	R	+	-	-	+	DAP	NT	6.47	7.62	0.85	D L	14.09	0.19	0.01	Homo	+	+	+	+
92 SHI-D-1	R	+	-	-	+	DAP	37	2.14	11.34	0.19	L	13.49	0.29	0.02	Homo	+	+	+	+
92 SHI-D-2	R	+	-	-	+	DAP	44	6.50	8.17	0.80	D L	14.67	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-D-3	R	+	-	-	+	DAP	NT	7.14	8.01	0.89	D L	15.15	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-D-4	R	+	-	-	+	DAP	NT	6.88	8.01	0.86	D L	14.90	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
92 SHI-D-5	R	+	-	-	+	DAP	NT	6.56	7.66	0.86	D L	14.22	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
93 SHI-A-2	R	+	-	-	+	DAP	44	9.72	5.66	1.78	D L	15.38	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
93 SHI-A-3	R	+	-	-	+	DAP	NT	2.10	6.76	0.31	DL+L	8.85	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
93 SHI-A-5	R	+	-	-	+	Lys	44	3.00	4.51	0.66	DL	7.51	1.43	0.19	Hetero	+	+	+	+
93 SHI-B-1	C	+	-	-	+	Lys	NT	6.31	0.00	∞	D	6.31	1.44	0.23	Hetero	+	+	+	+
93 SHI-B-3	C	+	-	-	+	Lys	NT	5.33	0.00	∞	D	5.33	0.88	0.16	Hetero	-	-	+	-
93 SHI-C-1	C	+	-	-	+	Lys	38	6.53	0.00	∞	D	6.53	1.30	0.20	Hetero	+	+	+	+
93 SHI-C-3	R	+	-	-	+	DAP	NT	5.30	4.69	1.13	DL	9.99	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
93 SHI-C-4	C	+	-	-	+	Lys	NT	5.88	0.00	∞	D	5.88	1.28	0.22	Hetero	+	+	+	+
93 SHI-D-1	C	+	-	-	+	Lys	NT	3.36	0.73	4.63	D	4.09	1.90	0.46	Hetero	-	-	+	-
93 SHI-D-2	C	+	-	-	+	Lys	38	4.93	0.00	∞	D	4.93	0.78	0.16	Hetero	-	-	+	-
93 SHI-D-3	C	+	-	-	+	Lys	NT	4.76	0.00	∞	D	4.76	0.84	0.18	Hetero	-	-	+	-
94 SHI-A-1	R	+	-	-	+	Lys	45	0.00	5.11	0.00	L	5.11	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-A-2	C	+	-	-	+	NT	38	6.29	0.61	10.25	D	6.91	1.45	0.21	Hetero	+	+	+	+
94 SHI-A-4	R	+	-	-	+	DAP	NT	10.47	5.95	1.76	DL	16.42	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-B-1	R	+	-	-	+	DAP	NT	11.02	5.20	2.12	DL+D	16.22	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-B-2	R	+	-	-	+	DAP	NT	10.73	5.07	1.87	DL	15.80	0.05	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-B-3	R	+	-	-	+	DAP	35	1.12	7.82	0.14	L	8.94	0.07	0.01	Homo	+	+	+	+
94 SHI-B-4	R	+	-	-	+	DAP	43	1.22	10.67	0.11	L	11.88	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-B-5	C	+	-	-	+	NT	38	5.61	0.44	12.86	D	6.04	1.01	0.17	Hetero	-	-	+	-
94 SHI-C-1	R	+	-	-	+	DAP	NT	10.44	6.30	1.66	DL	16.74	0.04	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-C-2	R	+	-	-	+	DAP	NT	10.89	6.11	1.78	DL	17.00	0.06	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-C-3	R	+	-	-	+	DAP	NT	6.79	7.11	0.95	DL	13.90	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-C-4	R	+	-	-	+	DAP	43	1.06	10.76	0.10	L	11.82	0.00	0.00	Homo	+	+	+	+
94 SHI-C-5	C	+	-	-	+	NT	38	5.88	0.29	20.20	D	6.17	1.08	0.18	Hetero	-	-	+	+

R : Rod C : Coccus NT : Not tested

the red wine-making process at Shirayuri Winery (1992 to 1994).

L-arabinose	D-ribose	D-Xylose	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	Rhamnose	Cellobiose	Lactose	Maltose	Melibiose	Sucrose	Raffinose	Salicin	Trehalose	Mannitol	Sorbitol	Starch α-methyl-D- glucoside	Inulin	Control	Species
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. mesenteroides</i>
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. fermentum</i>
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. yamanashiensis</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. brevis</i>
+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	<i>Leu. mesenteroides</i>
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Leu. mesenteroides</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	<i>Leu. mesenteroides</i>
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>
-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Leu. mesenteroides</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. plantarum</i>
-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leu. oenos</i>

加したため菌数が 5.6×10^2 まで減少したと考えられ、*L. plantarum* 4株、*L. yamanashiensis* 1株が分離された。一般に仕込み初期においては*L. plantarum*が多く分離される傾向にあるが、1992年度において、仕込み後半においても*L. plantarum*が多く分離された、これは仕込みによりかなり損傷したブドウ果も一緒に混入したことおよび仕込み後半においてもアルコール濃度が低かった（Cで9.7%、Dで9.8%）などが原因と考えられた。

1993年度について、仕込み1日目の果もろみは、かなり損傷したブドウも一緒に混入したため 4×10^5 (CFU/ml)と多くの乳酸菌が存在し、この中から*L. plantarum* 2株、*L. brevis* 1株が分離された。アルコール発酵後半の仕込み14日目には、菌数が約 10^7 (CFU/ml)に増加し、MLFが生じた。これらから*L. plantarum* 1株、*Leu. mesenteroides* 3株、*Leu. oenos* 1株が分離され、アルコール発酵中に*Leu. mesenteroides*が比較的多く存在した。アルコール発酵終了後の仕込み21日目に、*Leu. oenos* 3株が分離された。

1994年度について、仕込み1日目の果もろみAは比較的きれいな健全果で 1×10^4 (CFU/ml)の乳酸菌が存在し、*L. plantarum* 1株、*Leu. mesenteroides* 1株、*Latobacillus sp.*が分離された。アルコール発酵8日目のBは、菌数が 5.3×10^6 まで増加し、*L. plantarum* 2株、*Latobacillus sp.* 2株、*Leu. oenos* 1株が分離された。アルコール発酵終了後の16日目のCからは、*L. plantarum* 3株、*Latobacillus sp.* 1株と*Leu. oenos* 1株が分離され、MLFが生じた。

要 約

1992年度から1994年度の3年にわたり、白百合醸造の赤ワイン製造(MBA)工程中の果もろみから乳酸菌の分離を行い39株を分離した。それらの菌株の同定を行ったところ*L. plantarum* 21株、*Leu. oenos* 6株、*Leu. mesenteroides* 5株、*L. yamanashiensis* 1株、*L. brevis* 1株、*L. fermentum* 1株、*Latobacillus sp.* 4株となった。分布を調べたところ、仕込み初期からは、*L. plantarum* 8株が、仕込み後期からは、*Leu. oenos* 4株が分離された。MLFは1993年および1994年において野生乳酸菌により生じたが、1992年度では、生じなかった。

最後に、本研究遂行に当たり実験にご協力賜りました水上正子さん、滝本恵利子さんに感謝いたします。

文 献

- (1) R.E. Kunkee: *Microbiol. Rev.*, 88, 55-72 (1991).
- (2) D.Wibowo, R.Eschenbruch, C.Davis, G.H.Fleet, and T.H.Lee: *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 302-313 (1985).
- (3) 清水理通、青柳尚徳、柴崎茂郎、井上 浩、大塚謙一: **醸協**, 81, 113-120 (1986).
- (4) C.R.Davis, D.Wibowo, R.Eschenbruch, T.H.Lee, and G.H.Fleet: *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 290-301 (1985).
- (5) M.A.Amerine, and R.E.Kunkee: *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 323-358 (1968).
- (6) S.Lafon-Lafourcade, E.Carre, and P.Ribereau-Gayon: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 874-880 (1983).
- (7) G.Fleet, S.Lafon-Lafourcade, and P.Ribereau-Gayon: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1034-1038 (1984).
- (8) C.Sieiro, J.Cansado, D.Agrelo, J.B.Velazquez, and T.G.Villa: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2936-2938 (1990).
- (9) H.Yoshizumi: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 590-595 (1963).
- (10) H.Nonomura, T.Yamazaki, and Y.Ohara: *Mitt. Klosterneuburg*, 14A, 241-254 (1965).
- (11) H.Nonomura, and Y.Ohara: *Mitt. Klosterneuburg*, 17, 449-465 (1967).
- (12) 柳田藤寿、鎌田 勉、篠原 隆、後藤昭二: **醸協**, 88, 238-244 (1993).
- (13) 注解編集委員会編: 国税庁所定分析法注解 (1984).
- (14) 柳田藤寿: *ASEV Japan Reports*, 5, 225-230 (1994).
- (15) 小崎道雄監修: 乳酸菌実験マニュアル、朝倉書店 (1992).
- (16) S.Okada, T.Toyoda, and M.Kozaki: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1781-1783 (1978).
- (17) 岡田早苗、細井陽子、高橋正明、小崎道雄: 日本微生物株保存連盟会誌, 7, 6-10 (1991).
- (18) 駒形和男編: 微生物の化学分類実験法、学会出版センター (1982).
- (19) J.Tamaoka, and K.Komagata: *FEMS Microbiol. Letters*, 25, 125-128 (1984).
- (20) O.Kandler, and N.Weiss: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2, Williams & Wilkins., Baltimore (1986).
- (21) W.P.Hammes, N.Weiss, & W.Holzappel:

-
- The Prokaryotes*, 2nd ed., Vol.2, Springer-Verlag (1992).
- ② R.B.Beelman, A.Gavin, and R.M.Keen: *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 159-165 (1977).
- ③ R.E.Kunkee: *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, 71-77 (1967).