

(J.Inst.Enol.Vitic.Yamanashi Univ.32,5~ 14,1997)

品種別赤ワイン仕込経過中の乳酸菌の分布と分離同定

— 1991年度 試験醸造 —

柳田藤寿、篠原 隆、後藤昭二
(山梨大学工学部附属発酵化学研究施設)

Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Four Varieties of Grapes

FUJITOSHI YANAGIDA, TAKASHI SHINOHARA, and SHOJI GOTO

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400-0005, Japan

Abstract

Red wines were made from Muscat Bailey A, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, and Merlot grapes, respectively, in 1991. Thirty-eight strains of lactic acid bacteria were isolated during the experimental red wine-making process. The strains isolated during wine making from MBA grapes were classified as *Lactobacillus plantarum* (6 strains), and *Oenococcus oeni* (4 strains). The isolates from CS grapes were classified as *O. oeni* (6 strains), and *Lactobacillus paracasei* (1 strain). The isolates from PN grapes were classified as *Lb. plantarum* (6 strains), and *Lactobacillus reuteri* (3 strains). The isolates from Merlot grapes were classified as *O. oeni* (7 strains), *Lb. reuteri* (2 strains), *Lb. plantarum* (1 strain), and *Leuconostoc mesenteroides* (1 strain). The isolates were examined for malolactic fermentation (MLF) ability. Microflora in the lactic acid bacteria varied according to the grape variety and time of harvest.

緒 言

赤ワイン醸造において、乳酸菌によるマロラクティック発酵 (MLF) は、その減酸作用により酸味が低減されてまろやかになり、また、MLFの副産物が酒質に複雑性を与え、良好な香味を形成する上で望ましいとされている。ワイン中の酸度を構成する各種有機酸のうち、レーリング酸は、乳酸菌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),3),4)}。従来MLFは、野生乳酸菌による自然発生に依存しており安定なMLFは得られていなかった。現在、欧米では培養乳酸菌をスターターとして使用することが普及している。日本においては、1996年度よりMLFのための乳酸菌添加による人工的生起について許可となった⁵⁾。

そこで著者らは、1991年度マスカット・ベリーA (MBA)、カベルネ・ソービニオン (CS)、ピノ・ノワール (PN)、メルロー (Mer) の4品種における赤ワイン仕込経過

中より乳酸菌の分離同定を行い、乳酸菌の分布を調べた。また、これら分離乳酸菌のL-リンゴ酸分解能を調べ、優良MLF菌の検索を行った。

実験方法

1、赤ワインの仕込方法およびサンプル採取経過

本研究施設育種試験地で栽培された1991年度産マスカット・ベリーA (MBA)、カベルネ・ソービニオン (CS)、ピノ・ノワール (PN)、メルロー (Mer) の4品種のブドウを用いて赤ワインの仕込を行った。仕込方法は各ブドウ約26kgを破碎、除梗後、果もろみを13kgに分け、亜硫酸水を25ppm、酒母 (*Saccharomyces cerevisiae* W-3) を3%添加したものをS区、酒母を3%添加のみのものをN区 (亜硫酸無添加) とした。また、分離された菌株は、果もろみを1とし、圧搾後をS-2、N-2、その後 S-3、N-3と分離回数ごとに番号を

つけた。仕込は発酵化学研究施設、試験工場で行った。

2. 果汁およびワインの一般分析

果もろみのpH、総酸、比重、アルコール生成量について経時的に調べた。採取果もろみは東洋濾紙No. 2およびNo. 5で濾過を行い、分析は所定の方法⁶⁾に従って行った。

3. 乳酸菌の分離

BM寒天培地⁷⁾ (カビサイジン (日本製薬(株)) を10ppm添加したもの) に採取果もろみ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°C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に顕微鏡で観察して、純粋な形状の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⁸⁾より形態観察、グラム染色、孢子形成、カタラーゼ、乳酸の生成、生成乳酸の立体異性、発酵形式⁹⁾、DNAのGC含量、培地の初発pH試験、アルコール耐性試験、生育温度試験を行った。生成乳酸の立体異性はOkadaら¹⁰⁾の方法を参考に行った。乳酸生成は、BM培地に分離株を接種して、30°Cにて培養し、培養液を遠心 (3000rpm, 10 min) したのち、その上澄液を分析試料とした。乳酸の測定にはペーパークロマトグラフィーを用いた。スタンダードとして、1%酒石酸、1%リンゴ酸、乳酸ナトリウム (乳酸ナトリウム1g、1N-HClを混合し、50mlに定容したもの) の1:1:1混合液を用いた。スタンダードとサンプルを東洋ろ紙No.50上に0.01ml塗布し、酢酸エチル:酢酸:水 (3:1:1) の展開剤を用いて90分間展開させた。そのろ紙を乾燥させた後、0.1mlBPB (ブロムフェノールブルー) アルコール溶液を噴霧し発色させた。本発色法では、有機酸は黄色のスポットとして現れた。

[培地の初発pH試験] BM培地のpHを3.0, 3.3, 3.5, 4.0, 4.8のそれぞれに調整した後、オートクレーブ (121°C 15min) した。pHが変動したのものについては、殺菌した6N NaOHと6N HClで無菌的にpHを修正した。その培

地5mlに供試菌株を接種し、30°C、7日間培養した。生育度は肉眼観察及びBTB混合指示薬を用いた。1/10N NaOHの滴定量で、判定した。[アルコール耐性試験] BM培地5mlにエタノールを添加して、その濃度を0, 5, 10, 11.5, 13(V/V)%にそれぞれ調整した後、供試菌株を接種し、30°C、7日間培養した。生育度は肉眼観察及びBTB混合指示薬を用いた。1/10N NaOHの滴定量で判定した。

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を調整し、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°C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°C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°C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°Cの乾熱機に5~10分入れて発色させた。DNAのGC含量の測定は、柳田ら¹¹⁾の方法に

従った。菌種の同定はBergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2¹²⁾ および The Prokaryotes¹³⁾ の記載に従った。

5. 分離乳酸菌のL-リンゴ酸分解能の測定¹⁴⁾

91年度MBAワインに5g/lになるように0.2μmのメンブランフィルターを用いて無菌的にL-リンゴ酸を加え、2N NaOHにてpHを3.5に調整し、BM培地で前培養を行った分離乳酸菌をパスツールピペットで2滴接種して18°Cで14日間培養し、経時的にL-リンゴ酸を測定し、分解能を調べた。

実験結果および考察

(1) 分離乳酸菌の同定

分離乳酸菌の形態学的、生理生化学的性質および化学分類学的試験の結果をTable2.に示した。これらの結果にもとずいて菌種の同定を行った。

1) MBAから分離された乳酸菌の同定

分離菌91MBA-1-1, 91MBA-1-4, 91MBA-N-2-2, 91MBA-S-2-1, 91MBA-S-2-2, 91MBA-S-2-4 は、桿菌でホモ型発酵にてD-L-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44%であることから*Lactobacillus plantarum*と同定した。91MBA-N-2-1, 91MBA-N-2-3, 91MBA-N-3-1, 91MBA-S-3-1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37~38%であることから*Oenococcus oeni*と同定した。

2) CSから分離された乳酸菌の同定

分離菌91CS-1-2は、桿菌でホモ型発酵にてL-乳酸を生成し、細胞壁組成にLYSを持ち、糖類の発酵性およびDNAのGC含量が45%であることから*Lactobacillus paracasei*と同定した。91CS-N-2-1, 91CS-N-2-2, 91CS-N-3-1, 91CS-N-3-2, 91CS-S-2-1, 91CS-S-3-2の6株は、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37~39%であることから*O. oeni*と同定した。

3) PNから分離された乳酸菌の同定

分離菌91PN-1-1, 91PN-1-2, 91PN-N-2-3, 91PN-S-2-2, 91PN-S-2-3, 91PN-S-2-4は、桿

菌でホモ型発酵にてD-L-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44~45%であることから*Lb. plantarum*と同定した。91PN-S-2-1, 91PN-S-3-1, 91PN-S-3-2の3株は、桿菌でヘテロ型発酵にてD-L-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40~42%であることから*Lactobacillus reuteri*と同定した。

4) Merから分離された乳酸菌の同定

分離菌91Mer-N-2-3は、桿菌でホモ型発酵にてD-L-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44%であることから*Lb. plantarum*と同定した。91Mer-S-2-1, 91Mer-S-2-2は、桿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40%であることから*Leuconostoc mesenteroides*と同定した。91Mer-1-1, 91Mer-N-3-2, 91Mer-N-3-3, 91Mer-N-4-1, 91Mer-S-3-1, 91Mer-S-3-2, 91Mer-S-4-1の7株は、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37~39%であることから*O. oeni*と同定した。

(2) 品種別赤ワイン仕込経過中における分離乳酸菌の分布

果もろみ及びワインからの分離総コロニー数を表2に示した。品種別に分離総コロニー数を比較してみると、PN、CSの方がMBA、Merよりも分離総コロニー数が多かった。これは供試したPN、CSに天候不順のため腐敗果が多かったためと思われる。MBA、Merは、PN、CSの2品種に比べ健全果が多かった。

MBAの仕込み初期には*Lb. plantarum*が分離され、仕込8日目(圧搾後)でS区 3.0×10^3 (CFU/ml)、N区で 1.5×10^4 (CFU/ml)の乳酸菌が存在し、S区からは*Lb. plantarum*が、N区から*O. oeni*が主に分離された。仕込27日目(アルコール発酵終了後)では、S区、N区とも 1.0×10^{13} (CFU/ml)以上まで乳酸菌が増殖し、*O. oeni*のみが分離された。

CSでは、仕込初期に*Lb. paracasei*が分離され、仕込8日目(圧搾後)でS区 2.77×10^7 (CFU/ml)、N区で 1.0×10^{13} (CFU/ml)以上まで乳酸菌が増え、この時期からは、*O. oeni*が分離された。仕込27日目(アルコール発酵終了後)では、S区 1.97×10^{12} (CFU/ml)、

Table 1. Analysis of musts during experimental red wine-making in 1991

Must Samples (SO ₂ added)	Fermentation days	pH	Total acid (g/l)	Specific gravity	Alcohol (V/V)%	Bacterial population (CFU/ml)	Must Samples (non SO ₂)	Fermentation days	pH	Total acid (g/l)	Specific gravity	Alcohol (V/V)%	Bacterial population (CFU/ml)
MBA-S ¹¹	1	3.85	5.94	1.080	NT ¹²	3.50 × 10 ⁵		1	3.85	5.94	1.080	NT	3.50 × 10 ⁵
	8	3.70	7.35	NT	10.3	3.00 × 10 ³		8	3.70	7.21	NT	10.1	1.50 × 10 ⁴
	26	3.65	6.76	0.991	10.6	1.00 × 10 ⁷	MBA-N	26	3.85	5.45	0.993	11.0	1.00 × 10 ⁷
	40	3.70	5.49	NT	NT	NT		40	3.75	5.35	NT	NT	NT
	43	3.86	5.49	0.992	11.0	NT		43	3.85	5.41	0.993	11.0	NT
CS-S ¹²	1	3.30	8.57	NT	NT	2.40 × 10 ⁸		1	3.30	8.57	NT	NT	2.40 × 10 ⁸
	8	3.60	7.74	0.997	8.0	2.77 × 10 ⁷	CS-N	8	3.62	5.71	0.997	8.0	5.70 × 10 ⁸
	25	3.75	5.29	NT	NT	1.99 × 10 ¹²		25	3.75	6.08	NT	NT	1.10 × 10 ¹⁰
	61	3.78	5.07	0.993	11.2	NT		61	3.85	5.41	0.993	11.2	NT
PN-S ¹³	1	3.60	8.42	1.080	NT	NT		1	3.60	8.42	1.080	NT	NT
	8	3.95	5.86	NT	NT	1.54 × 10 ⁸		8	3.93	5.75	NT	NT	1.22 × 10 ⁸
	13	4.00	5.26	0.997	9.8	8.60 × 10 ⁷	PN-N	13	4.00	4.73	0.997	9.8	1.07 × 10 ⁸
	22	4.05	5.05	NT	NT	NT		22	4.10	4.96	NT	NT	NT
	58	4.00	4.58	0.996	10.6	NT		58	4.05	4.66	0.996	10.4	NT
Mer-S ¹⁴	1	3.30	10.71	1.069	NT	NT		1	3.30	10.71	1.069	NT	NT
	8	3.48	8.19	NT	NT	1.80 × 10 ¹⁰		8	3.41	8.27	NT	NT	2.00 × 10 ¹⁰
	13	3.48	8.12	0.995	10.0	NT		13	3.54	8.19	0.994	10.4	NT
	20	3.55	8.00	NT	NT	2.00 × 10 ⁴	Mer-N	20	3.55	8.00	NT	NT	2.73 × 10 ⁵
	30	3.40	7.52	NT	NT	7.48 × 10 ⁷		30	3.60	7.14	NT	NT	1.00 × 10 ⁸
	41	3.70	5.64	0.992	10.2	NT		41	3.80	5.75	0.991	10.6	NT
	55	3.70	5.49	NT	NT	NT		55	3.70	5.56	NT	NT	NT
	58	3.81	5.52	0.992	11.0	NT		58	3.78	5.60	0.992	11.0	NT

¹¹ Muscat Bailey A (MBA) ¹² Cabernet Sauvignon (CS)¹³ Pinot Noir (PN) ¹⁴ Merlot (Mer) ¹⁵ Not tested

N区 1.10×10^{10} (CFU/ml)まで乳酸菌が増殖し、*O. oeni*が分離された。

PNの仕込み初期からは*Lb. plantarum*が分離され、仕込8日目(圧搾後)でS区 1.54×10^9 (CFU/ml)、N区で 1.22×10^9 (CFU/ml)の乳酸菌が存在し、*Lb. plantarum*が分離された。仕込13日目(アルコール発酵終了後)では、S区 8.60×10^7 (CFU/ml)、N区 1.07×10^9 (CFU/ml)となり、S区から*Lb. reuteri*が分離された。

Merの仕込み初期からは*O. oeni*が分離され、仕込8日目(圧搾後)でS区 1.00×10^{10} (CFU/ml)以上の、N区で 2.00×10 (CFU/ml)の乳酸菌が存在し、S区から*O. oeni*、*Lb. reuteri*が分離されN区から*Leu. mesenteroides*、*Lb. plantarum*が分離された。仕込20日目(アルコール発酵終了後)では、S区 2.00×10^4 (CFU/ml)、N区 2.73×10^3 (CFU/ml)となり、また仕込31日目では、S区 7.84×10^7 (CFU/ml)、N区 1.00×10^{10} (CFU/ml)以上に乳酸菌数が増加し、*O. oeni*が7株分離された。

1991年度赤ワイン製造工程における乳酸菌の分布をブドウの品種別に見ると、健全果が多くブドウの状態が良かったMBAでは仕込前期から*Lb. plantarum*6株、仕込後期から*O. oeni*が4株が分離された。Merでは仕込前期から*Lactobacillus*属3株が中期から後期にかけては*O. oeni*が7株が分離された。また、腐敗果の多かったCSからは、仕込み前期に*Lb. paracasei*1株が分離され、中期から後期にかけて*O. oeni*が6株が分離された。PNからは、*Lb. plantarum*6株、*Lb. reuteri*が3株分離された。PNとCSで特異的な分布が示されたが、これはPNとCSのブドウ状態が悪かった為なのか、ブドウの品種によるものなのか、今後検討する必要がある。

また、経時的な乳酸菌相の変化についても調べてみた。その結果、仕込1週目では、*Lb. plantarum*が多く、2週目では*Lb. plantarum*のほかに、*Lb. reuteri*、*O. oeni*も多く分離された。3週目以降では*O. oeni*のみが分離された。著者らは、1990年度の赤ワイン製造工程における乳酸菌の分布を調べており、仕込前期で*Lb. plantarum*が、仕込後期で*O. oeni*が多く分離されたと報告した。本試験の1991年度も経時的な乳酸菌相の変化については、1990年度と同様の傾向が見られた。

前報の90年度の仕込みにおいては¹⁰⁾、MBA、CSともアルコール発酵終了後、乳酸菌数

はかなり減少していた。しかし、91年度仕込においてはMLFに必要とされる 10^6 (CFU/ml)以上に乳酸菌数が増加しており、また、L-リンゴ酸の減少と乳酸生成が確認され、MLFが生じた。乳酸菌の分布は、分離培地、ブドウの品種、更にワインのPH、亜硫酸濃度によっても異なるが、仕込に用いるブドウの状態にも影響された。91年度仕込のように腐敗果が多いと乳酸菌は多数生息した。90年度仕込のように健全果が多いと乳酸菌数が極端に少なくなり、それに従って乳酸菌の分離や分布状況も異なると考えられた。

(3) 分離乳酸菌のL-リンゴ酸分解能

91年度分離乳酸菌のL-リンゴ酸分解能をTable 3に示した。MBA仕込前期から分離された91MBA-N-2-2(*Lb. plantarum*)は、7日目で42%、14日目で57%とMBA分離株中で最も高い分解能を示した。また、*Lb. plantarum*である91MBA-S-2-1、91MBA-1-4も14日目でそれぞれ40、45%の分解率を示した。仕込後半から分離された*O. oeni*には分解能は見られなかった。CSの仕込前期から分離された*Lb. paracasei*(91CS-1-2)には分解活性はなかったが、中期および後期より分離された*O. oeni*(91CS-N-2-1、91CS-N-2-2、91CS-N-3-1、91CS-N-3-2、91CS-S-2-1、91CS-S-3-2)は7日目で28~49%、14日目で47~85%と高い分解率を示し、特に91CS-S-3-2は14日目で85%と供試菌株中で最も高い分解率を示した。PNの仕込前期から分離された*Lb. plantarum*(91PN-1-2、91PN-S-2-2、91PN-S-2-3、91PN-S-2-4)は、7日目で23~41%、14日目で33~45%の分解率を示し、その中でも91PN-1-2は7日目で41%、14日目で45%と高い分解率を示した。また、*Lb. reuteri*である91PN-S-2-1は、7日目で28%、14日目で35%であり、仕込後期から分離された91PN-S-3-1、91PN-S-3-2は、活性を示さなかった。Merから分離された*O. oeni*、*Leu. mesenteroides*、*Lb. reuteri*、*Lb. plantarum*は、7日目で0~15%、14日目で0~27%と低い分解能であった。

以上の結果から分離した数株について、L-リンゴ酸分解能という観点から非常に有用なMLF菌であった。しかし、MLFの重要な役割の一つである”良好な風味の形成”という面からの検索は行っていないために、全てが優良MLF菌であるかは不明であり、検討の必要がある。今後の課題として、実際の赤ワイン醸造に

Table 2. Phenotypic characteristics of lact

Strain number	Shape	Gram staining	Spore formation	Catalase	Production of lactic acid	Cell wall type	GC content (%)	Optical form of lactic acid	Fermentation type	Growth of temperature (°C)					Growth of pH								
										5	15	20	25	30	40	45	50	3.0	3	4	4.0	5	
91 MBA-1-1	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	†	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
91 MBA-1-4	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-N-2-1	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-N-2-2	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-N-2-3	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-N-3-1	C	+	-	-	+	non-DAP	NT	D	Hetero	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-S-2-1	R	+	-	-	+	meso-DAP	44	DL	Homo	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-S-2-2	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
91 MBA-S-2-4	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
91 MBA-S-3-1	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
91 CS-1-2	R	+	-	-	+	non-DAP	45	L	Hetero	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
91 CS-N-2-1	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
91 CS-N-2-2	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 CS-N-3-1	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 CS-N-3-2	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 CS-S-2-1	C	+	-	-	+	non-DAP	39	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 CS-S-3-2	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-1-1	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
91 PN-1-2	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-N-2-3	R	+	-	-	+	meso-DAP	44	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
91 PN-S-2-1	R	+	-	-	+	non-DAP	41	DL	Hetero	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-S-2-2	R	+	-	-	+	meso-DAP	45	DL	Homo	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-S-2-3	R	+	-	-	+	meso-DAP	44	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-S-2-4	R	+	-	-	+	meso-DAP	NT	DL	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-S-3-1	R	+	-	-	+	non-DAP	40	DL	Hetero	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 PN-S-3-2	R	+	-	-	+	non-DAP	42	DL	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 Mer-1-1	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 Mer-N-2-1	C	+	-	-	+	non-DAP	40	D	Hetero	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 Mer-N-2-3	R	+	-	-	+	meso-DAP	44	DL	Homo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91 Mer-N-3-2	C	+	-	-	+	non-DAP	NT	D	Hetero	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-N-3-3	C	+	-	-	+	non-DAP	NT	D	Hetero	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-N-4-1	C	+	-	-	+	non-DAP	39	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-S-2-1	R	+	-	-	+	non-DAP	40	DL	Hetero	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-S-2-2	R	+	-	-	+	non-DAP	42	DL	Hetero	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-S-3-1	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-S-3-2	C	+	-	-	+	non-DAP	38	D	Hetero	-	-	±	±	+	+	±	-	-	-	-	-	+	+
91 Mer-S-4-1	C	+	-	-	+	non-DAP	37	D	Hetero	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+

Symbols : C, Coccus; R, Rod; NT, Not Tested.

a) *Lactobacillus plantarum*, b) *Oenococcus oeni*, c) *Lactobacillus paracasei*, d) *Lactobacillus reuteri*, e) *Leuconostoc*

acid bacteria isolated from red wine-making process in 1991

5	Growth in EtOH(% V/V)				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	
	10	11.5	13																									
+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i> ²⁾	
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>O. oeni</i> ³⁾
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>O. oeni</i>
+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. paracasei</i> ⁴⁾
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. reuteri</i> ⁴⁾
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. reuteri</i>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Leu. mesenteroides</i> ⁴⁾
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. reuteri</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. reuteri</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>O. oeni</i>

nteroides

Table 3. MLF ability of lactic acid bacteria isolated from red wine-making process in 1991

Strain Number	Species	Malic acid degradation ability(%) ^{a)}	
		Incubation time (days)	
		7	14
91 MBA-1-1	<i>Lb. plantarum</i>	8	38
91 MBA-1-4	<i>Lb. plantarum</i>	10	45
91 MBA-N-2-1	<i>O. oeni</i>	3	5
91 MBA-N-2-2	<i>Lb. plantarum</i>	42	57
91 MBA-N-2-3	<i>O. oeni</i>	9	39
91 MBA-N-3-1	<i>O. oeni</i>	5	21
91 MBA-S-2-1	<i>Lb. plantarum</i>	13	40
91 MBA-S-2-2	<i>Lb. plantarum</i>	0	0
91 MBA-S-2-4	<i>Lb. plantarum</i>	0	0
91 MBA-S-3-1	<i>O. oeni</i>	0	0
91 CS-1-2	<i>Lb. paracasei</i>	0	0
91 CS-N-2-1	<i>O. oeni</i>	33	62
91 CS-N-2-2	<i>O. oeni</i>	28	47
91 CS-N-3-1	<i>O. oeni</i>	23	48
91 CS-N-3-2	<i>O. oeni</i>	45	<u>71</u>
91 CS-S-2-1	<i>O. oeni</i>	42	<u>79</u>
91 CS-S-3-2	<i>O. oeni</i>	49	<u>85</u>
91 PN 1-1	<i>Lb. plantarum</i>	11	19
91 PN 1-2	<i>Lb. plantarum</i>	41	45
91 PN-N-2-3	<i>Lb. plantarum</i>	0	0
91 PN-S-2-1	<i>Lb. reuteri</i>	28	35
91 PN-S-2-2	<i>Lb. plantarum</i>	32	36
91 PN-S-2-3	<i>Lb. plantarum</i>	34	46
91 PN-S-2-4	<i>Lb. plantarum</i>	23	33
91 PN-S-3-1	<i>Lb. reuteri</i>	0	21
91 PN-S-3-2	<i>Lb. reuteri</i>	0	10
91Mer-1-1	<i>O. oeni</i>	6	26
91Mer-N-2-1	<i>Leu. mesenteroides</i>	0	0
91Mer-N-2-3	<i>Lb. plantarum</i>	0	13
91Mer-N-3-2	<i>O. oeni</i>	0	0
91Mer-N-3-3	<i>O. oeni</i>	12	27
91Mer-N-4-1	<i>O. oeni</i>	0	13
91Mer-S-2-1	<i>Lb. reuteri</i>	3	19
91Mer-S-2-2	<i>Lb. reuteri</i>	15	22
91Mer-S-3-1	<i>O. oeni</i>	10	18
91Mer-S-3-2	<i>O. oeni</i>	15	24
91Mer-S-4-1	<i>O. oeni</i>	0	0

a) Malic acid consumed (%)

おける減酸作用の確認および添加時期の検討、それに伴い良好なフレーバーを発現するMLF菌の検索などが挙げられる。

要 約

本研究施設育種試験地にて収穫された1991年度MBA、CS、PN、Merの4品種について、それらの赤ワイン仕込経過中より乳酸菌の分離同定を行い、乳酸菌の分布を調べた。MBAの仕込より*Lactobacillus plantarum* (6 strains)と*Oenococcus oeni* (4 strains)が分離された。CSの仕込より*O. oeni* (6 strains)と*Lactobacillus paracasei* (1 strain)が分離された。PNの仕込より*Lb. plantarum* (6 strains)と*Lactobacillus reuteri* (3 strains)が分離された。Merの仕込より*O. oeni* (7 strains)と*Lb. reuteri* (2 strains)と*Lb. plantarum* (1 strain)と*Leuconostoc mesenteroides* (1 strain)が分離された。また、これら分離乳酸菌のL-リング酸分解能を調べたところ、数株について高分解能であることが認められた。

最後に、本研究遂行に当たり実験にご協力賜りました斎藤真紀(旧小宮山)さん、後藤亜紀人さん、鎌田 勉さんに感謝いたします。

文 献

- 朝倉書店(1992).
- (9) 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).
 - (10) Okada, S., Toyoda, T., and Kozaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1781-1783 (1978).
 - (11) 柳田藤寿、後藤亜紀人、芦沢 忠、内田多加夫、篠原 隆：山梨大学発酵研究所報告、30、9-17 (1995).
 - (12) Kandler, O., and Weiss, N. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins., Baltimore (1986).
 - (13) Hammes, W. P., Weiss, N. & Holzapfel, W. : *The Prokaryotes*, 2nd ed., Vol. 2, Springer-Verlag (1992).
 - (14) 柳田藤寿、篠原 隆、後藤昭二：ASEV日本ブドウ・ワイン学会誌、7、108-114 (1996).
 - (15) 柳田藤寿、鎌田 勉、篠原 隆、後藤昭二：醸協、88、238-244 (1993).
- (1) Kunkee, R. E. : *Microbiol. Rev.*, 88, 55-72 (1991).
 - (2) Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., and Lee, T.H. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 302-313 (1985).
 - (3) Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., and Fleet, G. H. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 290-301 (1985).
 - (4) Amerine, M.A., and Kunkee, R. E. : *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 323-358 (1968).
 - (5) 平成8年6月5日付 国税庁酒税通信第8号
 - (6) 注解編集委員会編：国税庁所定分析法注解(1984)
 - (7) 柳田藤寿：ASEV Japan Reports, 5, 225-230 (1994).
 - (8) 小崎道雄監修：乳酸菌実験マニュアル、