

## ブドウ酒のマロラクチック醱酵に関する知見

榎 田 忠 衛

(昭和32年9月10日受理)

### Recent Advance in Studies on the Malo-lactic Fermentation of Wine

By Tadae KUSHIDA

#### 緒 言

ブドウ酒は単に酵母の酒精醱酵ばかりでなく、ある種の細菌の作用によって芳醇な香味が形成される。微生物学発達の頭初から、ブドウ酒の熟成中に細菌が関与して減酸することが問題にされ、初期の研究 (NÖLLNER, 1841; NICKLES, 1862; PASTEUR, 1873), はおもに酒石酸に関するものであったが、MÜLLER-THURGAU (1891) がリンゴ酸を分解して乳酸と  $\text{CO}_2$  をつくる細菌を発見して以来、リンゴ酸の分解現象が注目されるに至った。(KOCH, 1900; SEIFERT, 1901, 1903; MÜLLER-THURGAU, 1908). この研究は、更に独、スイスを初め、米、仏、伊、アルゼンチン、ポルトガル等のブドウ酒について盛んに行われた。結果、細菌の減酸作用によって、酸の多いブドウ酒の香味が著しく改良されることが一般に認められるようになった (RIBEREAU-GAYON, 1947; BENVEGNIN, 1952; GOMES et al., 1953)。

ブドウ酒中のリンゴ酸が細菌によって乳酸と  $\text{CO}_2$  に分解される作用は普通 Malolactic fermentation (MLF と略記) と呼ばれ、または生物的酸分解 (Biological acid destruction), 時には酒精醱酵に次いで重要であるから第2醱酵 (Second fermentation) ともいわれる。この醱酵の特徴は、酵母の酒精醱酵と違って、どんなブドウ酒にも、自然状態に放置して、いつも確実に起るものとは限らない。従って、この醱酵を随時行なわせるための幾多の基礎的研究がなされて来た。特に近年に至り、MLF に関する細菌の分類、生長促進因子、醱酵化学および二次生産物の形成等の重要な研究が随々発表されるようになった (VAUGHN et al., 1949; 1955, 1957; SALLES & OCHOA, 1950; KORKES et al., 1950; OCHOA, 1951; CHARPENTIE et al., 1951; PEYNAUD & LAFOURCADE, 1954, 1955; JÉRCHÉL et al., 1956)。

本邦産ブドウの酸分は独、スイス等のものに比較してある品種を除き一般に少ないので、ブドウ酒の除酸のことは余り考慮する必要がないかも知れない。しかし著者ら(1956)の研究によれば貯蔵された古いブドウ酒の中にはリンゴ酸が消失し、乳酸が増加している事実が認められるので、本邦産ブドウ酒の MLF 就中、そのブドウ酒の品質に及ぼす影響や、醱酵助成または制御等の実際問題を解決しなければならない。わが国に於ては MLF

の問題に関して何らの報告も見当たらないので、ここに欧米諸国に於て今日までに得られている研究成果を簡単に総説した。

### 1. MLF に影響を及ぼす諸条件

原料ブドウ、醗酵温度、通気、酒精分、圧搾および滓引時期、 $\text{SO}_2$  と生長促進物質の有無等ブドウ酒の内外の諸条件によって MLF に難易を生ずる。赤ブドウ酒では大抵酒精醗酵と同時に起りやすいが、白ブドウ酒では主醗酵の後、ずっと遅れておこる (FRANCOT & GEOFFROY, 1954) Toulouse 地方の品質優良な 16 種の古い赤ブドウ酒では全部に MLF が起り、その中 15 種にはリンゴ酸がなくなっていたが、同地方の 5 種の Vin rosé では 4 種までリンゴ酸が残存していることが報告されている (LAMAZOU-BETBEDER & PECH, 1955)。著者ら (1956) の研究によれば本邦産のものでも赤ブドウ酒には MLF が起りやすいが白ブドウ酒は起っていなかった。白ブドウ酒は一般に酸が多く MLF を起す細菌の栄養分が不足するためと思われる。

ブドウ酒の滴定酸度の高いことと、pH の低いことは MLF の開始を強く引き延ばし、時には阻害する。従って果膠を炭酸石灰で一部除酸すると MLF を起しやすくなる (FRANCOT & GEOFFROY, 1954, 1956)。多くの研究によって MLF に決定的影響を与えるのはブドウ酒の pH で、普通 pH 3.0 以下のブドウ酒には起らないとされている (PEYNAUD, 1955; FRANCOT & GEOFFROY, 1954, 1956; JARINO-CANINA, 1954)。

MLF に必要な温度は  $18\sim 20^\circ$  で  $10^\circ$  以下では起り難い (FRANCOT & GEOFFROY, 1954, 1956)。 $20^\circ$  以上では酢酸菌の如き有害菌の方が生えやすいので実施の際には注意を要する。ブドウ酒を第 1 回滓引後 2 分し、一方は  $20^\circ$  に他方は  $0\sim 5^\circ$  に保ち、15 日後、初めに冷した方を  $20^\circ$  に暖めた実験 (FRANCOT & GEOFFROY, 1956) では MLF は冷却酒には起らないが、それを  $20^\circ$  に暖めると直ちに起り、初めから  $20^\circ$  に暖めた方は反って醗酵が遅れた。これは冷却によって酒石が析出され、MLF に都合がよいことを示している。

酒精醗酵後若いブドウ酒を早期に遠心、濾過、または清澄すると、常に MLF を遅らせるか、全く制止してしまう。これと反対に滓引を延期したり、沈澱酵母を攪拌したりして、濁ったブドウ酒をそのまま放置すると MLF が進みやすい (FRANCOT & GEOFFROY, 1954; GOMES et al., 1956; LAMAZOU-BETBEDER & PECH, 1956)。これは酵母中の高分子化合物 (SCHANDERL, 1943)、またはビタミン類 (FRANCOT & GEOFFROY, 1954) が酒中に溶出して酸分解菌の繁殖を促進するものと考えられている。

$\text{SO}_2$  は MLF に敏感に作用する。特に酒精醗酵の末期に  $\text{SO}_2$  が添加されると菌の繁殖は著しく阻害される (FRANCOT & GEOFFROY, 1954) 従って若いブドウ酒に  $\text{SO}_2$  を添加するのは MLF を必要としない場合に限るべきである。 $\text{SO}_2$  の量は MLF のためには出来るだけ少ない程よいのは当然であるが、他に有害菌や香味との関係もあるから適量を決定する必要がある。果汁に  $0\sim 200\text{ mg/l}$   $\text{SO}_2$  を添加して醗酵し、貯蔵されたブドウ酒について MLF を試験した結果によれば白ブドウ酒に添加する量は  $100\text{ mg/l}$   $\text{SO}_2$  を越えてはならない (GALLAY & FLEURY, 1946)。遊離  $\text{SO}_2$  の代りにメタカリ ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) を用いる場合には MLF が起りやすい (GOMES et al., 1953)、これは後述の如くカリが

菌の繁殖を助けるためであろう。

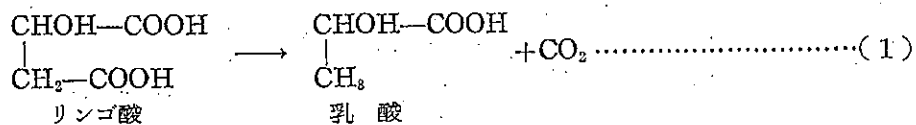
なおブドウ酒に  $\text{PO}_4$  イオンや  $\text{NH}_4$  イオンを添加した試験ではその濃度によって明らかな変化が認められず (RIBEREAU-GAYON & PEYNAUD, 1938), またブドウ酒のタンニンがこの酸酵に関係するかどうかわかっていない (LAMAZOU-BETBEDER & PECH, 1956)。以上のほか, 近年 PEYNAUD ら (1954, 1955) の次のような報告がある。

- 1) 普通のブドウ酒に適量の酸分解菌を植付けた実験によれば,  $25^\circ$  では4~6日後に MLF が始まり, 5~8日間で終わった。
- 2) 酒精分を  $10^\circ$  から  $13.5^\circ$  まで上げてても MLF の速度は変わらず, また酢酸を  $1\text{g/l}$  以下加えても変化なし。
- 3) マンガンを硫酸塩の形で  $2\sim 5\text{mg/l}$  加えると, 時には MLF を促進し,  $1\sim 2$  日間短縮する。
- 4)  $5\sim 50\text{g/l}$  のブドウ糖添加によって速かに  $\text{CO}_2$  を発生し, その量はブドウ糖の量に比例する。この際, 短期間内では酸分の増加は認められず, これはブドウ糖がエネルギー源として利用されることを示す。
- 5) 既に強調されたように MLF を最もよく左右するものは pH で, 最適 pH は  $4.1\sim 4.5$  である。これ以下ではガスの発生が妨げられ, pH  $3\sim 4$  では pH が高ければ高い程 MLF が非常に早く始まり, pH  $3$  以下では行なわれなかった。
- 6) 注意深く通気すると菌の繁殖を助ける。若いブドウ酒を空気で飽和すると24時間早く MLF を起す。しかし酸素で飽和することは有害で, MLF はかなり妨げられる。
- 7) ブドウ酒に含まれるサイアミン, パントテン酸, ニコチン酸, ビリドキシン, ビオチン, メソイノシット等の生長促進物質を単独または併用して, 自然量の倍量にすると明らかに MLF を促進する。またリボフラビンの添加は特によい。
- 8) 酒精酸酵の促進剤例えば粉末乾燥麹の菌絲 (Vinibon), 酵母エキス製剤 (Zymosan) 等は MLF を促進する。

## 2. MLF によって起るブドウ酒成分の変化

ブドウ酒の MLF は条件がよければ酒精酸酵と同時に始まることもあるが, 一般には主酸酵後または翌春になって起る。

この酸酵は次式の如く, リンゴ酸が乳酸と  $\text{CO}_2$  に分解する現象であるから, 二塩基性のリンゴ酸が当量的に一塩基性の乳酸に変化するので滴定値は半分に減じ, また  $100\text{g}$  のリンゴ酸が消失して  $67\text{g}$  の乳酸が生ずることになる。



若いブドウ酒にはリンゴ酸がかなり多いので (著者, 1956 の研究では総酸の  $30\%$  内外リンゴ酸を含む), MLF を起したブドウ酒の第一の特徴は酸分が減少して, 味が温和になることである。リンゴ酸の消失と共に他の酸も影響を受けて増減するので, 総酸の減少割合は一様ではない。FRANCOT ら (1954) の報告によればフランスのブドウ酒で  $30\%$  も減少するものがあるといわれる。

リンゴ酸が分解されてしまうと、次に新酒中に含まれるクエン酸が分解されて揮発酸を生成する (RIBEREAU-GAYON & PEYNAUD, 1938)。ブドウ酒にはクエン酸の含量が少ないので生成する揮発酸の量は余り問題にならない。菌の種類によってはリンゴ酸よりも酒石酸を強く分解するものもあるが、この種の細菌はブドウ酒には望ましくない (ARENA, 1936; MÜLLER-THURGAU & OSTERWALDER, 1914, 1919)。

MLF によって酸分が減少すると pH が上昇し、ブドウ酒中の酒石、タンニン、色素等の析出が促進される (FERRE, 1922)。この結果、エキス分の著しい減少をきたすことは MLF の第二の特徴である。

なお CO<sub>2</sub> の生成はブドウ酒に爽快味を与え、有害酵母等の発生を防止し、貯蔵に好影響を与えるが時にコルク栓を飛ばし、ブドウ酒を流出するおそれもある。スイスのブドウ酒では一般に MLF が行われ、消費ブドウ酒の多くは弱い発泡酒であるという (CRUESS, 1955)。

RIBEREAU-GAYON (1951) は MLF を起したブドウ酒成分の変化を、細菌によるブドウ酒のトルン病 (tourne) の場合と比較して MLF では酸分が著しく減少するが、グリセリンは変化せず、トルン病では酒石酸は減少するが揮発酸が著しく増加するため総酸分が増加し、グリセリンは減少することを明らかにした。

ブドウ酒の MLF とトルン病による成分変化

ブドウ酒	グリセリン	糖分	pH	総酸	揮発酸	酒石酸	リンゴ酸	クエン酸	乳酸	差引計
	mM.	g								
						mequiv.				
I	MLF をしないもの	2.0	3.38	98	8.1	44.2	36.8	5.4	3.8	
	“ を起したもの	1.7	3.47	79	13.1	39.7	0.0	0.9	24.5	
	差引			-19	+5.0	-4.5	-36.8	-4.5	+20.7	-17.8
II	MLF をしないもの	67	2.6	3.15	110	3.7	47.4	40.8	5.6	4.3
	“ を起したもの	68	1.9	3.23	84	6.2	41.3	0.0	1.0	25.2
	差引				-26	+2.5	-6.1	-40.8	-4.6	+20.9
III	健全なもの	70	1.5	3.93	54	11.2	40.0	0.0	0.9	16.2
	トルン病を起したもの	46	0.5	3.96	74	33.8	26.9	0.0	0.7	25.2
	差引				+20	+22.6	-13.1	0	-0.2	+9

上述の如く、MLF によってリンゴ酸ばかりでなくブドウ酒の色々な成分も変化するものであるが、天然の場合には殆んど常に味覚の醇化が行われる (RIBEREAU-GAYON, 1947; BENVENIGNIN et al., 1952; GOMES et al., 1953)。このことは MLF の最大の特徴である。

しかし、カリフォルニアの条件ではブドウ酒の酸味が少く、それ以上の酸の減少は有抑で、MLF は望ましくないといわれ (AMERINE, 1951)、また VAUGHN ら (1957) の報告によれば、早期に MLF が起ったブドウ酒の多くは、硫化水素臭を生じたり、キャベツの醗酵を思わせる特別の臭気を生ずることがある。彼らはこの臭気の原因として、冷凍濃縮オレンジジュースの腐敗の場合の如く、中性揮発性物質、アセトイン、ダイアセチル等を想定している。

既に MÜLLER-THURGAU ら (1912) が報告したように、彼らの分離した菌でも 100 g のリンゴ酸から 60~65 g の乳酸をつくり、理論量には達しないし、また常にわずかの揮発酸を生成し、いくらか不純な酸酵を伴うものである。従ってある条件でたまたま不快な臭気を与えることがあっても、ブドウ酒の MLF の価値は低下するものではなく、適当な菌の種類と酸酵条件の選択によって、ブドウ酒品質の改良ができるものと信ぜられている。

### 3. MLF の細菌学

1) 細菌の純粋分離と培養法、主として培地について：上述のように、ブドウ酒の MLF の条件に関する研究が多いことからわかる通り、マロラクチック菌 (ML 菌と略記) の繁殖条件は複雑で、従って菌の純粋分離や培養はかなり困難とされている MÜLLER-THURGAU ら (1912) は初め変敗果実酒から後には変敗ブドウ酒から種々の細菌を分離した。分離のため固体培地として常に酸味の少ない梨汁や除酸ブドウ汁のゼラチンまたは寒天培地を用い、平板培養を繰返して菌を純粋にした。保存のためには固体培地よりも液体培地を用いているが古い培養を新しい培地に植え付けても旺盛な繁殖をするには 2~3 週乃至 2 ヶ月を要するとしている。菌の生理化学的研究には主として次の如き培地が用いられている。

培地 A：酵母エキス (100 g の圧搾ブドウ酒酵母に水 1 l を加えて煮沸した濾液) 1% リンゴ酸または酒石酸と、2~3% 蔗糖、果糖またはブドウ糖を添加する。

培地 B：FLESH ら (1956) は、培地 A は酒石のために菌がうまく繁殖しないとし、次の

培地を用いてブドウ酒から *Bacterium gracile* を分離した。

成分(1)：酵母エキス (生のビール酵母とブドウ酒酵母各 50 g と、水 50 ml を混合し、0.1 ml の 2N-硫酸を加えて10分間煮沸した後、遠心分離した液) ……………100 ml	水……………250 ml
Casein-peptone (E. Merk, Darmstadt) : 水 (1:10) ……………300 ml	成分(2)：梨汁 (Vitabornwerk, Kirm/Nahe) を水で2倍にうすめたもの……………450 ml
苛性ソーダで前処理し、Pancreatinで消化したカゼイン (SKEGGS et al., 1948) ……………150 ml	使用法：成分(1) 100 ml と成分(2) 900 ml を合し1.5~3 g の d,l-リンゴ酸を加え、苛性カリで pH 5 に調整し、硅藻土で濾過したものを加圧釜で、120°, 3 度殺菌して使用する。

培地 C：FLESH ら (1956) は分離した *B. gracile* の物質代謝の研究用として次の培地を用いている。

苛性ソーダで前処理し、Pancreatin で消化したカゼイン (SKEGGS et al., 1948) ……1 ml	硫酸マグネシウム……………0.02 g
l-リンゴ酸 (または d, l-リンゴ酸) ……3g(6g)	ブドウ糖……………3 g
酸性磷酸一カリ ……………0.1 g	水を加えて 1 l とし、pH 5.5~6 に調整して使用する。
塩化石灰……………0.02 g	

2) ML 菌の種類：MÜLLER-THURGAU ら (1912) は ML 菌として、SEIFERT の菌と自己の分離した菌を比較して、次のように記述している。

*Micrococcus malolacticus* Seifert, 1903

単，双または四連球菌，1.0  $\mu$ ，ブドウ糖より揮発酸をつくるが乳酸をつくらず，果糖は分解しない。

*Micrococcus acidovorax* Müller-Thurgau et Osterwalder, 1912

四連球菌のことが多い，0.5~0.7  $\mu$ ，ブドウ糖および果糖より乳酸をつくる。Amygdalin を分解せず，乳糖，麦芽糖を分解する。

*Micrococcus variococcus* Müller-Thurgau et Osterwalder, 1919

鎖状をなしやすい，0.7~1.5  $\mu$ ，ブドウ糖および果糖より乳酸をつくる。Amygdalin を分解する。乳糖および麦芽糖を分解しない。

*Bacterium gracile* Müller-Thurgau, 1908

桿状菌，0.4×0.6  $\mu$ ，糖を分解して乳酸と酢酸をつくる。

これらの菌はリンゴ酒，梨酒およびスイスのブドウ酒に存在し，リンゴ酸およびその塩を分解するが，クエン酸，酒石酸，乳酸，コハク酸およびそれらの塩を分解しない。ブドウ酒において酢酸を殆んどつくり，香味をよくする特性がある。その後これらの菌は独，スイスに限らず仏，米，オランダ，ポルトガル等至る所のブドウ酒に発見された。

以上4菌のうち *B. gracile* は他のものと違って桿状菌であるが，その形態は今日まだ論議の的となっていて，PEDERSON ら (1938) は桿状を支持しているが，CHARLTON (1934) らは球形で *Leuconostoc* に属することを証明し，近年 PEYNAUD ら (1955) がそれを支持している。MÜLLER-THURGAU は *B. gracile* の中に a, g, i, s, w の五つの型を挙げているが，以後多くの学者によって分離された桿状のリンゴ酸分解菌は，そのいずれかに同定されるものと考えられている (VAUGHN & TCHLISTCHEFF, 1957)。

以上のほかリンゴ酸を分解する細菌として，ARENA (1936) はアルゼンチンのブドウ酒から2種の細菌を分離した，そのうち *B. acidovorax* は *B. tartarophthorum* と同様にリンゴ酸を分解する他に，グリセリンを醸酵して酢酸，プロピオン酸，乳酸をつくり，酒石酸を分解して酢酸と CO<sub>2</sub> をつくるので，ブドウ酒のトルン病を起す有害菌と見なされる。*M. multivorax* は MÜLLER-THURGAU らの *Micrococcus* に類し MLF をおこす細菌である。

LÜTHI (1936) はスイスのブドウ酒の粘質化について研究し *St. mucilaginosus* var. *vini* を分離し HOCHSTRASSER (1955) はリンゴ酸を分解する *St. malolacticus* を分離し，その中でブドウ酒を粘質化するものを *St. malolacticus* var. *mucilaginosus* と名付けている。

VAUGHN (1955) はカリフォルニアのブドウ酒の細菌による変質を研究し *Leuc. dextranicum* と *Leuc. mesenteroides* および *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermenti*, *L. hilgardii* がいずれもリンゴ酸を分解して乳酸と CO<sub>2</sub> をつくることを報告している。なお従来のリンゴ酸分解菌の分類に言及し，4種の *Micrococcus* が形態的に互に類似し，生理的にはいずれもホモ型乳酸菌に類似している点を指摘し，*Streptococcus* と関係深いことを強調しているが，まだ現在ではブドウ酒より分離された *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* 間の区別が明瞭でないとしている。また *B.*

*acidovorax* は恐らくホモ型の *L. plantarum* の類似菌であり, *B. tartarophthorum* はヘテロ型の *Lactobacillus* に属するものであろうと報告している。

以上今日までに報告されている ML 菌は次の 17 種類である。

*Bacterium gracile* Müller-Thurgau

*B. tartarophthorum* Müller-Thurgau et Osterwalder

*B. acidovorax* Arena

*Lactobacillus plantarum* Orla-Jensen

*L. brevis* Bergey et al.

*L. buchneri* Bergey et al.

*L. fermenti* Beijerinck

*L. hilgardii* Douglas et Cruess

*Leuconostoc dextranicum* (Hucker et Pederson) Vaughn

*Leuc. mesenteroides* (van Tieghem) Vaughn

*Micrococcus malolacticus* Seifert

*M. acidovorax* Müller-Thurgau et Osterwalder

*M. variococcus* Müller-Thurgau et Osterwalder

*M. multivorax* Arena

*Streptococcus mucilaginosus* var. *vini* Lüthi.

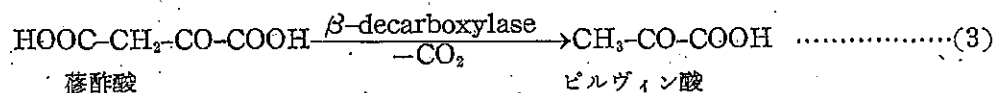
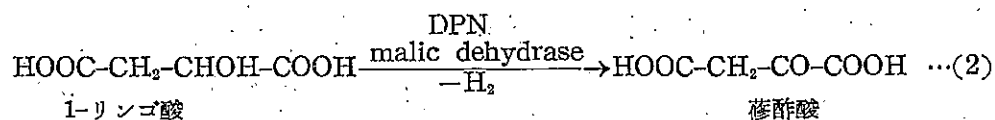
*St. malolacticus* Hochstrasser

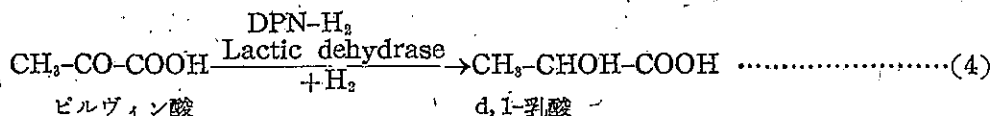
*St. malolacticus* var. *mucilaginosus* Hochstrasser

#### 4. MLF の化学反応機構

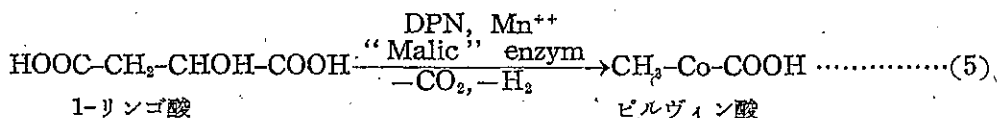
リンゴ酸が細菌によって乳酸と CO<sub>2</sub> に分解される式は長は間、前記(1)式の如く簡単に考えられていた。しかしその反応式は熱力学的に吸熱反応でエネルギーの吸収を必要とし、微生物によっては起り難いので疑問とされるに至った (RIPPER, 1942)。

酵素化学の進歩により、種々の動植物組織中の L-リンゴ酸が Malic dehydrase によって蓚酢酸になること、蓚酢酸が β-decarboxylase によって、適当な pH で金属イオンを触媒とし、ピルヴィン酸になること、およびピルヴィン酸が Lactic dehydrase によって乳酸に変化すること等が解明せられ、リンゴ酸より乳酸に変化する一つの経路が次の如く考えられるようになった。





所が OCHOA ら (1951) は初めハトの肝臓から (SALLES & OCHOA, 1950), 次いでリンゴ酸に馴養された *L. arabinosus* の細胞から (KORKES, et al., 1950), リンゴ酸に脱水素反応と脱カルボキシ反応を同時に起させる酵素を抽出し, これを "Malic" enzyme と名付けた。"Malic" enzyme はかなり純粋にされたが前記 Lactic dehydrase を含んでいて, その二つの酵素が一つの複合体として働き, ピルヴィン酸を蓄積せず, 直ちに還元して乳酸を生ずるため反応は(4)式のように簡単に表わされること, および "Malic" enzyme の作用は DPN (または Co-enzyme-I),  $\text{Mn}^{++}$  イオン, オルソ磷酸塩等を必要とし,  $\text{K}^+$  イオンによって著しく促進されること等を報告している。



以上の如く, リンゴ酸より乳酸に変化する経路の中リンゴ酸から蓚酢酸を経てピルヴィン酸になる場合と, リンゴ酸から直接ピルヴィン酸になる場合の二通りが明らかにされたが, ML 菌によってはどちらの経路を通るものであろうか。

PEYNAUD (1951) らは初め ML 菌によるクエン酸代謝機構の研究において, リンゴ酸分解の場合にも蓚酢酸を中間物と推定したが, 最近の論説 (1955) では, "Malic" enzyme によるリンゴ酸と,  $\beta$ -decarboxylase による蓚酢酸の脱カルボキシ反応の最適 pH は一致しないことやアイソトープを利用した研究から蓚酢酸は ML 菌によるリンゴ酸分解の中間物となり得ないと結論し, 暗にリンゴ酸から直接ピルヴィン酸になる経路を支持している。

最近 JERCHER ら (1956) は彼らの分離した *B. gracile* の酵素化学的研究において, 酵素の抽出方法を変えると, 一方では Lactic dehydrase と  $\beta$ -decarboxylase が, 他方では "Malic" enzyme がとれることを確認し, リンゴ酸の分解は蓚酢酸の段階を経過し, "Malic" enzyme は特別な条件で現われるものであると報告している。

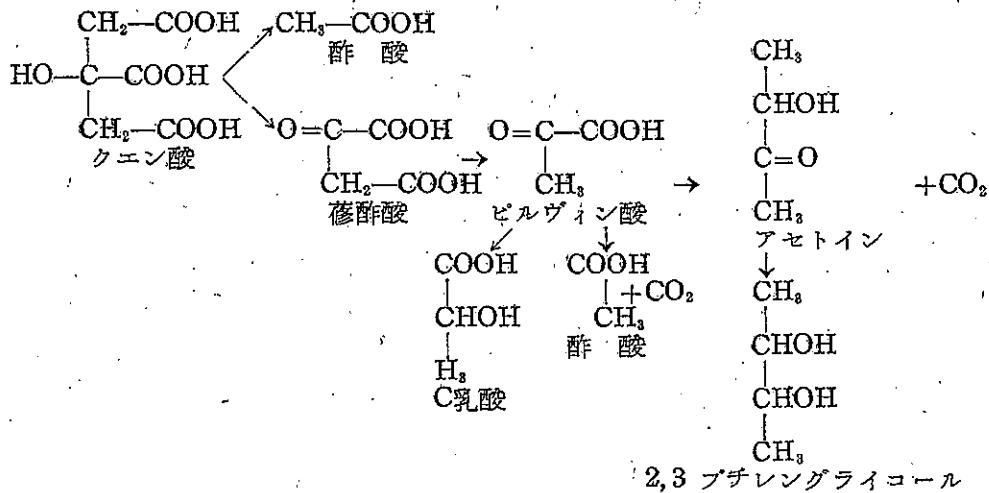
VAUGHN ら (1957) は OCHOA の "Malic" enzyme に言及し, MLF が単に "Malic" enzyme のみによってリンゴ酸が分解されるならば何らブドウ酒の香味を害する物質は出来ないので問題は起らないが, OCHOA の結果は唯, ホモ型乳酸菌の一種によって得られたもので, ブドウ酒中の MLF の反応の唯一の結論であるかどうか疑いを持っている。彼らは各種の乳酸菌や *Leuconostoc* 属の菌がリンゴ酸を分解すること, およびホモ型乳酸菌の *L. plantarum* が蓚酢酸よりアセトインをつくることを験調し, MLF によってブドウ酒の香味を害するアセトインの生成の可能性を暗示している。

クエン酸分解機構: MLF は同時に新酒中のクエン酸量を多少低下させることが知られている (RIBEREAU-GAYON & PEYNAUD, 1938) DEFFNER ら (1939) は乳酸菌による中性培地中のクエン酸の分解状況を研究し, 1分子のクエン酸は 1.3~1.8 分子の酢酸,



0.1~0.33 分子の糠酸, 0.11~0.22 分子のコハク酸, 2 分子の CO<sub>2</sub> および痕跡の酒精とアセトアルデヒドをつくり, 同じ条件で蓆酢酸からは酢酸が 1 分子少ない他はクエン酸と同じ分解をすることより, クエン酸分解の第 1 段階は蓆酢酸と酢酸になると仮定した。

CHARPENTIE ら (1951) と PEYNAUD (1955) はクエン酸を含んだ培地やクエン酸の多いブドウ酒に ML 菌を植え付けると, クエン酸 1 分子の減少に対して, 極く少量の乳酸と 1.25~1.5 分子の酢酸のほかに, 0.25~0.32 分子のアセトイン様の物質 (2,3 ブチレングライコールとアセトインの混合物) が生ずることを認め, 初め 5 mequiv. のクエン酸を含むブドウ酒にはこの方式によれば 45 mg の 2,3 ブチレングライコールが形成されることを報告した。なおクエン酸分解の量的バランスより次式の如く中間物として蓆酢酸とピルヴィン酸の生成を仮定した。



### 5. ブドウ酒における MLF の実験方法

ブドウ酒の MLF を研究するには初めのブドウ酒中の有機酸とそれより生ずる最終生産物の迅速な測定を必要とする。しかしブドウ酒中の成分が少ない時には可成り困難な仕事である。

PEYNAUD ら (1954, 1955) は MLF によって生ずる CO<sub>2</sub> を測定する方法を案出した。この方法は LANGERON-GUERRA の酒精酸酵を CO<sub>2</sub> 発生で検出する方法よりヒントを得たもので, ある条件下ではうまく実施される。その方法は目盛つき, 長頸 100 ml 容フラスコの目盛までブドウ酒を充し, これに 1 cm の厚さにパラフィンとパラフィン油 (2:1 重) の混合物を徐々に加熱して溶したものを入れる。培養温度は 25° に限る。これ以上の温度ではパラフィンが溶けてガスの保留ができないし, それ以下の温度では CO<sub>2</sub> の溶解度が大で, 酸分解が起ってもガス発生が認められないことがある。ブドウ酒は真空中で振とうして充分 CO<sub>2</sub> を追い出しておき, 残糖分のある場合には酵母が働かないように 1~2 mg/l の Actidion を入れる。この方法は MFL の開始を認め, 強さを比較するのに便利である。

RIBEREAU-GAYON ら (1954) はブドウ酒を大部分前処理しないで直接ペーパークロマトグラフ法によって有機酸を検出できることを報告した。MLF の経過はブドウ酒のリン

ゴ酸と乳酸の消長を測定すればわかるが、それらの迅速な化学分析は困難である。従って簡単なペーパークロマトグラフ法が有利である。展開には Propanol : Eucalyptol (または Cineole) : 蟻酸=5:5:2 の混合物を水で飽和したものを、上昇法で行い、指示薬に BPB を使用する。この方法では乳酸とコハク酸は分離できないが、リンゴ酸は 0.2 g/l まで分離検出できる。彼はこの方法をブドウ酒工場で実施し MLF を適切にコントロールすることを推奨している。

### む す び

MÜLLER-THURGAU らによって始められたブドウ酒の MLF に関する研究は各国の学者によって引き継がれ、菌の分離、培養、栄養素の要求、醸酵条件、および代謝機構の研究等各方面に於て近年長足の進歩をし、ブドウ酒工業の実際面に於て、酒精醸酵と並び考慮せられるようになった。しかしまだ菌学の面ではいずれの ML 菌も常に容易に分離培養される域に達しておらず、最も多く分離報告されている *B. gracile* の形態学に於てすら混乱が生じており、また従来の乳酸菌との関係、あるいは区別について充分明確な分類がなされていない。リンゴ酸分解機構については実際ブドウ酒中の ML 菌の中、*B. gracile* のみについてわずかに研究が行われたのみで他の細菌類については未開拓である。また独、仏、スイス等では MLF によってブドウ酒の香味が改善されるというのが定説であるが酸の少ないカルフォルニアでは有害であるといわれる。その理由は専ら経験的なもので理論的根拠は不充分である。なお、ブドウ酒工業の実際面に於て、MLF を特に希望している地方ですらこの醸酵を、酵母の場合の如く、容易に利用しうる所まで、まだ研究が進んでいないのが現状の様である。

終りに臨み、本稿を草するにあたり、種々御教示を戴いた小原巖先生に深謝します。

## 文 献

- AMERNE, M. A. and M. A. JOSLYN :  
1951 *Table wine. The technology of their production in California.*  
Univ. Calif. Press.
- ARENA, A. :  
1936 Alteraciones bacterianas de vinos argentinos. *Rev. agr. vet.* (Buenos Aires), 8, 155.
- BENVEGNIN, L., E. CAPT et G. FIGUET:  
1952 *Traite de vinification.* 2 ed. Payot, Lausanne.
- CHARLTON, D., B. NELSON and WERKMAN:  
1934 Physiology of *L. fructovorans* sp. nov. isolated from spoiled salad dressing. *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 9, 1.
- CHARPENTIE, Y., J. RIBEREAU-GAYON et E. PEYNAUD:  
1951 Sur la fermentation de l'acide citrique par les bactéries malolactiques. *Bull. Soc. chim. biol.*, 33, 1369.
- CRUESS, W. V. :  
1955 Notes on the bacteria of wine. *Wines & Vines*, 36 (1), 27.
- DEFNER, M. and W. FRANKE:  
1939 Degradation of citric acid by bacteria. *Lieb. Ann Chem.*, 541, 85  
(*Chem. Abst.*, 34, 3873, 1940)
- FERRE, M. L. :  
1922 The influence of the retrogression of malic acid upon the composition of white wines. *Bot. Abst.*, 13, 308.
- FRANCOT, P. et P. GEOFFROY:  
1954 La fermentation malolactique des vins. *Le vigneron Champenois*, 75, 425.  
1956 Essai concernant l'évolution de la fermentation malolactique dans les conditions d'époques et de températures différentes. *Ibid.*, 77, 366
- GALLAY, R. and C. FLEURY:  
1946 Sulfiting of musts and malolactic fermentation of wine. *Rev. rom. Agric. Vitic. Arboric.*, No. 5, 37 (*Chem. Abst.*, 41, 3255, 1947)
- GARINO-CANINA, E. :  
1954 The microbiological removal of acid from wine (trans. title). *Atti Accad. ital. vite vino*, 4, (*Chem. Abst.*, 49, 8551, 1955)
- GOMES, J. V. M., M. F. da SILVA BABO e A. F. GUIMARAES :  
1953 Estudos bacteriológicos da fermentação maloláctica dos Vinhos Verdes. *Estudos Notas e Relatórios* (Portugal), 4, 17 (*Chem. Abst.*,  
1956 Use of selected bacteria in the malic acid fermentation of wine. *Bull. V. O. I. V.*, 29 (299), 349 (*Am. J. Enol.*, 7, 166, 1956)
- HOCHSTRASSER, R. :  
1955 Über einige Bedingungen beim Lindwerden der Weine. *Promotionsarbeit*, Eidg. Tech. Hochschule, Zurich.

- JERCHEL, D., P. FLESCHE und E. BAUER :  
 1956 Untersuchungen zum Abbau der l-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. *Lieb. Ann. Chem.*, 601, 40.
- KOCH, A.:  
 1900 Über die Ursachen des Verschwindens der Säure bei Gärung und Lagerung des Weines. *Weinbau. u. Weinhandel*, 18, 40.
- KORKES, S., A. del CAMILLO and S. OCHOA:  
 1950 Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation IV. Isolation and properties of an adaptive "malic" enzyme from *L. arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, 187, 891.
- 梶田忠衛 :  
 1956 ブドウ及びブドウ酒中の有機酸に関する研究 (I) 農産加工技研報 3(4), 15  
 1956 同上 (II) 本誌 3, 7.
- LAMAZOU-BETBEDER, M. et R. PECH:  
 1955 Application des techniques chromatographiques à l'étude de la fermentation malolactique dans les vins délimités de qualité supérieure de la région de Toulouse. *Ann. Inst. nat. Rech. agron.*, Paris Sér. E. *Ann. Tech. agric.*; 4, 293.  
 1956 La fermentation malolactique et l'assouplissement des vins de la récolte 1954. *Vignes et Vins*, No. 45, Pratique, 2 (*Wein. u. Keller*, 3, 204)
- LÜTHI, H.:  
 1953 Beitrag zur Kenntnis fadenziehender (linder) Weine und Obstweine. *Mitt. Lebensm. untersuch. Hyg.*, 44, 30.
- MÜLLER-THURGAU, H.:  
 1890 Über die Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiet der Weinbereitung. XII. *Deut. Weinbaukongress*. Worms., 128 S.  
 1908 Bakterienblasen. *Zbl. Bakt.*, II. Abt.; 20, 353; 449
- MÜLLER-THURGAU, H. und A. OSTERWALDER:  
 1912 Die Bakterien im Wein und Obstwein, und die dadurch verursachten Veränderungen. *Ibid.*, 36, 129.  
 1914 Über die Säureabnahme in Schweizerweinen. *Landw. Jahrb. Schweiz.*, 28, 465.  
 1919 Über die durch Bakterien verursachte Zersetzung von Weinsäure und Glycerin im Wein. *Ibid.*, 33, 313.
- MUTH, F.:  
 1922 Influence of tartaric acid on bacterial malic acid fermentation, the behavior of this acid on blending and its disappearance from wine (tran. title). *Wein u. Rebe*, 4(3), 1; (*Chem. Abst.*, 17, 2933, 1923)
- NICKLES, J.:  
 1862 Sur le vin tourné. *Compt. rend.*, 54, 1219.
- NÖLLNER, C.:  
 1841 Die Pseudo-essigsäure. *Ann. Chem. Pharm.*, 38, 299.
- OCHOA, S.:  
 1951 Biological mechanism of carboxylation and decarboxylation. *Phy. Rev.*, 31, 56.

- PASTEUR, L.:  
1873 *Etude sur le vin*. 2 ed. Savy, Paris,
- PEDERSON, C. S.:  
1938 The gas-producing species of the Genus *Lactobacillus*. *J. Bact.*, 35,95
- PEYNAUD, E.:  
1955 New information concerning biological degradation of acids (trans. title). *Mitt. Klosterneuburg*, 5 (4), 183; (*Am. J. Enol.*, 7 (4), 150, 1956)
- PEYNAUD, E. et S. LAFOURCADE:  
1954 Etudes récentes de la station oenologique de Bordeaux sur les facteurs de croissance et sur l'application de antibiotiques en oenologie. *Xe Congres Intern. Ind. agric. alim.*, Madrid.
- RIBEREAU-GAYON, J.:  
1947 *Trate d' oenologie*. Polytechnique, Paris,
- RIBEREAU-GAYON, J. et E. PEYNAUD:  
1938 Bilan de la fermentation malolacique. *Ann. ferm.*, 4, 559.  
1951 *Analyse et controle de vins*. Polytechnique, Paris.
- RIBEREAU-GAYON, P. :  
1954 Estimation of malic acid in wine by paperchromatography (trans. title). *Ann Falsif.*, 47, 3 (*Chem. Abst.*, 48, 7255, 1954)
- RIPPEL, R.:  
1944 Bactreial destruction of malic acid in wine caused by biologically active substances in the fruit (trans. title). *Ber. deut. botan. ges.*, 60, 108 (*Zbt. Bakt. II. Abt.*, 106, 217, 1944: *Chem. Abst.*, 38, 5356, 1944)
- SALLES, J. B.V. and S. OCHOA:  
1950 Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbondioxioxide fixation. II. Further study of the properties of the "malic" enzyme of pigeon. *J. Biol. Chem.*, 187, 879.
- SCHANDERL, H. :  
1943 Destruction of acid in wine by bacteria (trans. title). *Deut. Weinz.*, 80 (43/46). (*Chem. Abst.*, 38, 5356, 1944)
- SEITERT, W.:  
1901~1903 Über die Säureabnahme im Wein und dem dabei stattfindenden Gärungsprozess. *Zeits. f. d. Landw. Versachswesen in Ostereich.*
- SKEGGS, H. R., J. W. HUFF, L. D. WRIGHT and D. K. BOSSHARDT:  
1948 *L. leichmannii* in the microbiological assay of the "animal protein factor". *J. Biol. Chem.*, 176, 1459.
- VAUGHN, R. H.:  
1955 Bacterial spoilage of wine with special refence to California conditions. *Adv. in Food Research*, 6, 67.
- VAUGHN, R. H., H. C. DOUGLAS and J. C. M. FORNACHON:  
1949 The taxonomy of *L. hilgardii* and related heterofermentative lactobacilli. *Hilgardia*, 19, 133.
- VAUGHN, R. H. and A. TCHELISTCHEFF:  
1957 Studies on the malic acid fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. *Am. J. Enol.*, 8, 74.