

[ 研究報告 ]

## 交雑育種酵母によるぶどう酒製造試験

平野 高広<sup>\*</sup>、中沢 伸重<sup>\*\*</sup>、畑山 誠<sup>\*</sup>

大川 久美子<sup>\*\*</sup>、佐藤 利次<sup>\*\*</sup>、江井 仁<sup>\*\*</sup>

櫻井 廣<sup>\*</sup>

2種類の薬剤耐性を利用した新規交雑育種法を用いて、県内で広く使用されているワイン酵母 EC-1118とL-2226を親株として、4種類の交雑育種株を育成した。これらの酵母を用いてナイアガラ種ぶどう果汁でワイン醸造試験を行い、醸造適性を検討したところ、交雑育種株全てが岩手県産ぶどうに適した低酸性であっただけでなく、数株が親株にない性質も有していることが明らかとなった。官能試験の結果から、香りが高いものや味がきれいで素直なものなど親株よりも優れた酵母を育種できることが明らかとなり、数種は岩手県の優良ワイン酵母となることが示唆された。

キーワード：交雑育種、ワイン酵母、*Saccharomyces cerevisiae*

## Enological Characteristics of New Wine Yeasts

constructed by Hybridization

between *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118 and L-2226

HIRANO Takahiro, NAKAZAWA Nobushige, HATAKEYAMA Makoto

OKAWA Kumiko, SATO Toshitugu, ENEI Hitoshi

and SAKURAI Hiroshi

Four hybrids were constructed from two wine yeast strains, *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118 and L-2226, generally used for wine making in Iwate prefecture, by crossing in combination with two drug-resistant markers. Enological characteristics of the hybrids were investigated by 5.4 l-scale brewing with Niagara grape must. Total acids of wines produced by all the hybrids were lower than that by the parents. The sensory test indicated that some of the hybrids made an aromatic or an honest wine in comparison to the parents. It was suggested that some of the hybrids were suitable for wine brewing in Iwate prefecture, Japan.

**key words: hybridization breeding, wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae***

### 1 緒 言

ワインの酒質は原料となるブドウの品種・品質に大きく左右され、酒質向上の研究もブドウの品種、栽培技術、果汁の前処理、ワインの精製などの製造プロセスの改良

がほとんどで、主発酵を担うワイン酵母のワイン品質への傾向は過小評価される傾向にあった。しかし、近年、ワインの品質や性質を大きく左右する味や香りの成分は、原料ブドウ由来だけではなく、酵母の代謝により変化

\* 醸造技術部

\*\* (財)岩手生物工学研究センター

するとの報告が相次いでおり<sup>1-4)</sup>、ワイン醸造における酵母の重要性が見直されるようになってきた。

岩手県内では白ワイン用酵母としてEC-1118、赤ワイン用としてL-2226が主に使用されているが、ワインの高品質化、個性化の両面から、オリジナルワイン酵母の出現が望まれている。著者らはこれまでもゲノムリニューアル法<sup>5)</sup>や1種類の薬剤耐性を用いた交雑育種法によりオリジナルワイン酵母の造成を検討してきたが、今回、2種類の薬剤耐性を用いることで、より簡便な酵母の孢子-孢子間の交雑を可能にした。本報告では、得られた交雑育種株をぶどう酒の醸造試験に用いることで、その醸造適性を明らかにした。

## 2 実験方法

### 2-1 供試菌株

L-2226にはG418耐性を付与する単コピープラスミドpK06を、EC-1118にはTaKaRaのオーレオバシジンA耐性を付与する単コピープラスミドpAUR112を、それぞれ酢酸リチウム法により導入した。得られた形質転換体は各々薬剤耐性を保持することを確認した後、それらの孢子細胞をマイクロマニピレーターで組み合わせた。生育したコロニーからG418耐性およびオーレオバシジンA耐性を有する株を選択し、四分子分析により交雑体であることを確認した。交雑体は4株作成し(K0-10、K0-11、K0-12、K0-13と呼ぶ)、各試験に用いた。また、対照としてL-2226、EC-1118を使用した。

### 2-2 ワインの醸造試験

前培養菌株は、121 で15分間殺菌したぶどう果汁に供試菌株を接種し、25 で3日間静置培養して調製した。亜硫酸100 ppmを含むナイアガラ種ぶどう果汁5.4 lを10 l容ステンレス製発酵容器に入れ、各供試酵母菌株の前培養液5 v/v%を接種し、15 で発酵させた。補糖は結晶ブドウ糖を使用し、補糖後の糖度(Brix°)が22になるように発酵3日目に行った。発酵期間中、果醪の糖度(Brix°)を毎日測定した。完全発酵を目標とし、糖度(Brix°)が

8.0以下になったところで発酵を終了した。発酵終了後、メタ重亜硫酸カリウムを亜硫酸量で50 ppm添加し、麻布で濾過して10 で保存した。分析には主に膜濾過(孔径0.20~1.0 μm)したワインを用いた。

### 2-3 果汁、ワインの一般分析

分析は常法<sup>6、7)</sup>により、比重は浮ひょう計で測定した。エキス分は比重より計算法で求めた。アルコール度は蒸留後浮ひょう計で、pHはガラス電極pHメーターで測定した。直接還元糖はソモギーネルソン法で測定した。総酸度は0IVの分析法に従いNaOHによる滴定値を酒石酸度に換算した。低沸点香気成分はガスクロマトグラフィー(HEWLETT PACKERD、HP5890)を用いて測定した。色度は分光光度計(BECKMAN、DU7500)で10mmのセルを用い420 nmの吸光度で測定した。また、フェノール性化合物の目安として試料を蒸留水で100倍希釈した後、280nmの吸光度を測定した。総亜硫酸(t-SO<sub>2</sub>)及び遊離型亜硫酸(f-SO<sub>2</sub>)はRankine法で定量した。有機酸は(株)東京理科のS-3000型カルボン酸分析計で測定した。

### 2-4 官能試験

官能評価は、山梨県果樹試験場で行っている官能検査法<sup>8)</sup>に従って行った。すなわち、色調1点、清澄度1点、香り6点、味10点の計18点満点で採点したものを10点満点に換算して評価した。パネラーは当センター職員の5人で1999年4月12日に行った。

## 3 実験結果

### 3-1 ワインの醸造試験

発酵中の糖度(Brix°)の日変化を表1に示した。K0-11、K0-12の2株は発酵が緩やかでL-2226と同様の発酵経過をとり、醪日数13日で発酵が終了した。K0-10はEC-1118と同様の発酵経過をとり(醪日数10日)、低温発酵性が高いことが明らかとなった。K0-13はL-2226とEC-1118の中間の発酵性を示し、醪日数は12日であった。

表1 発酵経過(糖度Brix°の日変化)

菌株	発酵時間 (日)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
L-2226	15.5	13.0	12.0	16.8	14.8	13.7	12.0	10.6	9.9	9.0	8.3	8.0	7.7
EC-1118	15.2	14.6	12.6	18.0	15.7	13.2	11.2	9.7	8.5	7.7			
K0-10	15.5	14.6	12.8	16.8	14.4	12.8	10.8	9.3	8.5	7.6			
K0-11	15.4	14.4	12.7	17.6	15.6	14.2	12.4	11.0	10.1	9.2	8.4	8.0	7.8
K0-12	15.3	14.3	12.3	17.4	15.3	13.7	12.0	10.9	9.8	9.0	8.4	8.0	7.8
K0-13	15.5	14.4	12.8	16.8	14.7	13.2	11.4	10.3	9.4	8.7	8.0	7.6	

交雑育種酵母によるぶどう酒製造試験

表2 ワインの一般成分

	アルコール (%)	比重	エキス分	直接還元糖 (g/100ml)	pH	総酸度 (g-酒石酸/100ml)	A <sub>420</sub>	A <sub>280</sub> (x100)	f-SO <sub>2</sub> (mg/l)	t-SO <sub>2</sub> (mg/l)
果汁		1.064		13.3	3.25	0.728	0.400	0.144		
L-2226	13.4	0.997	3.63	0.508	3.19	0.705	0.153	0.103	0.6	75.0
EC-1118	13.3	0.993	2.56	0.212	3.22	0.716	0.164	0.098	1.9	128.9
K0-10	13.7	0.992	2.42	0.208	3.24	0.672	0.155	0.094	1.6	97.1
K0-11	14.0	0.996	3.55	1.040	3.24	0.655	0.158	0.075	1.6	125.9
K0-12	13.3	0.994	2.82	0.851	3.21	0.600	0.144	0.092	2.9	100.0
K0-13	13.2	0.994	2.80	0.488	3.23	0.629	0.155	0.088	1.8	107.2

表3 ワインの低沸点香気成分(mg/l)および有機酸成分(g/l)

菌株	アセトアルデヒド	酢酸エチル	n-プロパノール	イソブタノール	酢酸イソアミル	イソアミルアルコール	カプロン酸エチル	高級アルコール	乳酸	酢酸	ピルリッソ酸	酒石酸	リンゴ酸	クエン酸	コハク酸
L-2226	17.64	29.39	29.07	36.33	0.65	154.31	0.34	219.7	0.11	0.49	0.00	3.35	1.46	0.01	0.81
EC-1118	43.15	49.84	59.69	19.77	0.62	117.42	0.48	196.9	0.14	0.62	0.05	3.87	1.55	0.00	0.66
K0-10	30.61	41.65	39.61	18.14	0.82	112.83	0.42	170.6	0.11	0.47	0.00	3.78	1.55	0.00	0.57
K0-11	71.61	35.32	36.23	16.74	0.42	84.32	0.35	137.3	0.10	0.77	0.00	3.07	1.48	0.00	0.00
K0-12	33.87	44.03	34.91	13.59	0.66	88.29	0.42	136.8	0.08	0.56	0.01	2.97	1.49	0.01	0.32
K0-13	105.27	53.33	43.20	16.32	0.63	90.75	0.51	150.3	0.08	0.49	0.04	3.08	1.35	0.00	0.38

表4 ワインの官能試験結果

菌株	総合得点	短評
L-2226	4.7	不調和、酸味、渋味
EC-1118	6.1	まろやか
K0-10	5.7	味きれい、渋味
K0-11	6.0	原料香強い、まろやか
K0-12	5.4	まろやか、渋味、甘味残る
K0-13	4.4	まろやか、渋味、香り強い

3 2 ワイン分析および官能試験

果汁およびワインの一般成分を表2に、ワインの低沸点香気成分および有機酸成分を表3に、官能試験結果を表4に示した。

官能評価の総合得点は、K0-11が6.0、K0-10が5.7でありEC-1118の6.1にならぶ結果であった。K0-13は両親株を下回る4.4であった。

アルコール生成量は13.2~14.0 vol.%の範囲で、K0-10とK0-11はアルコール生産量が若干多かった。K0-10は、短い発酵日数でアルコール生産量が多かったことから、EC-1118よりも発酵力が高いことが明らかになった。

交雑株のワインは全て親株よりも総酸度が低く、交雑株が低酸性であることが示された。総酸度が高く、pHが若干低かったL-2226は、酢酸が少なかったにもかかわらず、酸味を感じると評価された。

交雑株は親株に比べ香気成分である高級アルコール(n-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコ

ールの総和)が低かった。香りが強いと評価されたK0-13株はアセトアルデヒド、酢酸エチル、n-プロパノール、カプロン酸エチルが比較的多く検出された。特にアセトアルデヒドは閾値である100 mg/l<sup>9)</sup>以上含まれる場合に異臭(変敗臭)となる成分でありK0-13の評価を下げた原因の一つと考えられる。原料香が強いと評価されたK0-11株はアセトアルデヒドが若干多かったものの、他の低沸点香気成分は平均的な濃度であった。

4 考 察

酵母の発酵速度は発酵温度と関係があり、ワイン酵母の発酵型は、低温発酵型、中温発酵型、低・中温の両方で発酵旺盛な3つに分けられる<sup>10)</sup>。L-2226は20 付近の中温で発酵力が高く、15 付近の低温では発酵力が低いことから、県内では主に中温で発酵させる赤ワインに用いられている。これに対してEC-1118は15 の低温発酵性が高く、低温で発酵させる白ワインに主に使用されている。本試験では15 の低温で発酵させたことから、発酵力が低かった菌株でも中温では発酵力が旺盛になる可能性がある。また、ワイン酵母の発酵速度は、原料ブドウの品種によって異なるため<sup>11)</sup>、他品種での検討も必要である。

交雑株はすべて親株よりも低酸性であった。岩手県などの積算温度が低い地域で栽培されたぶどうは、総酸度が高くなる傾向がある<sup>12)</sup>。酸は他の成分とのバランスにもよるが、多く含まれると香味に影響しワインの品質を低下させる。このような理由から岩手県産ぶどうには、

交雑株のような低酸性の酵母が適している。

交雑株のワインはすべて親株のものに比べ香気成分である高級アルコールが少なかったが、ワイン酵母の香気成分生産性は原料ブドウの品種によって異なることから<sup>11)</sup>、他品種ぶどうについても検討する必要がある。

交雑株の中でもK0-10は低酸性、発酵力が親株よりも高い、芳香成分や高級アルコールが他の交雑株より多いなどの点で優れていた。また、K0-11は発酵力がL-2226と同等で比較的良かったものの、低酸性、味がまろやか、原料香が強いなどの評価を得ており、原料の風味を生かしたワインに好適と思われた。以上の結果から、これらの交雑株が多酸傾向にある岩手県産ブドウと相性が良く、本県の優良ワイン酵母となりうることが示唆された。

## 5 結 語

2種類の薬剤耐性を利用した新規交雑育種法を用いて、EC-1118とL-2226から4種の交雑育種株K0-10～13を育成した。交雑育種株の醸造試験をおこなったところ、親株とは異なる特性を有し、有望と思われる株を見出すことができた。

現在、新規交雑育種法について特許申請中である。

## 文 献

- 1) 大塚謙一：醸協，70(11)，800(1975)
- 2) 篠原隆：農化，52，309(1978)
- 3) 乙黒親男：醸協，78(3)，214(1983)
- 4) 宇井定春：醸協，72(6)，449(1977)
- 5) 小澤麻由美、中沢伸重、櫻井廣：岩手工技セ研報，5，127(1998)
- 6) 注解編集委員会編：第4回改正 国税庁所定分析法注解，日本醸造協会(1993)
- 7) M. A. Amerine and C. S. Ough: Wine and must analysis, John Wiley & Sons, New York (1974)
- 8) 山梨県食工試編：葡萄醸造法，p.23(1974)
- 9) 篠原隆：化学工業，48(2)，35(1997)
- 10) 押田明成：醸協，90(5)，381(1995)
- 11) ワイン学編集委員会：ワイン学，p.101，産業調査会(1991)
- 12) ワイン学編集委員会：ワイン学，p.61，産業調査会(1991)