連載第 20 回　ワイン醸造の基礎 第２回　ー窒素と酸素の話ー

text：後藤 奈美

窒素と酸素といっても空気のことではありません。今回はワイン酵母の増殖を促進し、活性を保つのに大切な窒素分と酸素の話です。もし、あなたのワイナリーでブドウ果汁のホルモール窒素を計ったり、発酵助成剤を使ったり、発酵中の通気に気をつけたり、ということがなくて、どうも発酵後半のキレが悪いとか、アルコール発酵をもう少し早く終わらせることができれば効率的なのに、とお感じでしたら、参考にしていただけると思います。

●▲■　果汁の資化性窒素（ホルモール窒素）の測定

乾燥酵母を説明書どおりに添加すると酵母数は 1 ～ 4 x 10^6 cells/mL になります。酵母は発酵初期に増殖して、大体 10^8 cells/mL ぐらいになりますから、25 倍～ 100 倍ぐらいに増殖することになります。酵母の増殖には、糖分だけでなく、窒素分やビタミン、ミネラルなどの栄養素も必要です。ブドウは米や麦のような穀類よりもタンパク質やアミノ酸などの窒素分が少なく、しかも酵母添加量が少ない（ビールの仕込み時や清酒の留め時では 10^7 cells/mL ぐらい）ので、ワイン酵母は清酒やビール酵母よりも窒素不足の状態で増殖・発酵していることになります。

窒素不足で酵母の増殖が足りないと、発酵がスムーズに進まなかったり（スラギッシュ）、最悪の場合途中で止まったり（スタック）する原因になります。ブドウ果汁の窒素分のうち、60 ～ 80%がアミノ酸で、酵母が利用できる窒素分（資化性窒素分）は、主にアミノ酸とアンモニウム塩です。資化性窒素量は、ホルモール滴定（清酒のアミノ酸度と同じ方法）で簡単に分析できます。方法は次のとおり、途中までは pH と酸度の分析と同じです。

ホルモール窒素の分析方法

1. ホルマリン（ホルムアルデヒド 35%）を水で 1/2 に希釈する。
2. pH メーターを校正し、1/2 に希釈したホルマリンを 0.1N NaOH で pH 8.2 に合わせる。
3. サンプル 10mL を小型ビーカーに取る。
4. pH を測定する
5. 0.1N NaOH まで酸度を滴定する。（酒石酸 g/100mL = 0.075 x 滴定値）
6. 5mL の 1/2 希釈ホルマリン pH 8.2 を混合し、約 1 分間おく
7. 0.1N NaOH でサンプルを pH 8.2 まで滴定する。

資化性窒素量 =14 x ホルモール指数 (10 x 滴定値)
=140 x 滴定値（mg N/L）

（注）

- pH メーターを使用せず、フェノールフタレイン（pH 8.2 付近で薄いピンク）を指示薬として測定してもOKです。
- 希釈したホルマリンは密栓して保存できますが、徐々に酸化されてギ酸になるため、使用の都度、pH を 8.2 に合わせてください。
- 実験書では、ホルマリンは原液を pH 8.2 にあわせて 4mL 使用することになっていますが、希釈液の方が扱いやすいと思います。上の方法は、清酒のアミノ酸度と同じ分析方法です。ホルマリンの量が実験書より少なくなっていますが、もともと大過剰ですから、250mg/L 位の窒素量を測定する場合は問題ありません。
- サンプルが亜硫酸を含んでいる場合は、30%過酸化水素水を 2-3 滴落として硫酸に酸化させると影響がなくなります。ざっとした実験ですが、果汁に亜硫酸を 350mg/L 添加すると、資化性窒素量の測定値が約 80mg N/L 低くなりました。

★ ホルマリンと過酸化水素水は劇物です。取り扱いには注意して、絶対にピペットで吸わないようにしてください。ホルマリンの量はそれほど正確である必要はありません。また、ホルマリンは強制排気できるドラフト等で扱い、極力ガスを吸わないようにしてください。

- 実験書によって、滴定の終点が pH 8.0 だったり 8.5 だったりしますが、結果はほとんど同じです。ここでは、国税庁所定分析法の酸度の分析方法が pH 8.2 まで滴定となっていますから、その後でホルモール窒素を分析できるように終点を pH 8.2 にしました。（1回目の滴定が行きすぎて pH 8.5 になってしまったら、2回目の滴定の終点を 8.5 にすれば OK です。）
- 0.1N NaOH のファクターが 1 でない場合は、滴定値にファクターを掛けてください。（実際はほとんど影響がない場合がほとんどですが••）

この分析方法で「pH 8.2 のワインに pH 8.2 のホルマリンを加えて、pH 8.2 まで滴定する」というのは不思議に思われるかも知れませんが、ホルマリンがアミノ酸のアミノ基をブロックするので、ホルマリンを入れるとアミノ基の分だけ pH が下がります。下がった分を NaOH で滴定することになります（図）。

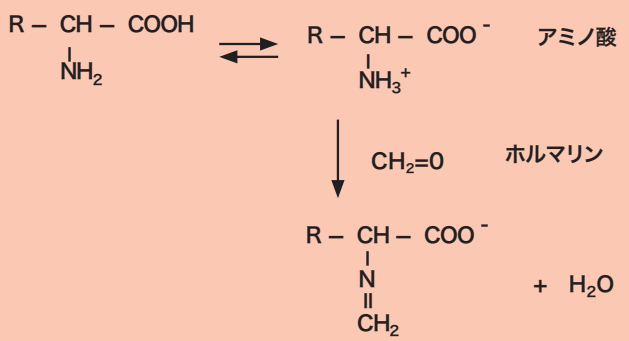


図　ホルモール滴定の原理

発酵条件の酵母は、アミノ酸のうちブドウに多いプロリンを利用できませんが、都合の良いことにホルモール滴定ではプロリンは測定されず、酵母が利用できるアンモニウム塩も一緒に測定されます。

資化性窒素量 130 ～ 150 mg/L 以下では窒素不足で特に清澄果汁を低温で嫌気的に発酵させる場合にはスラギッシュになる危険性があるとされています。健全な発酵に必要な資化性窒素量は、大体 200 ～ 250 mg/L と言われていますが、初発の濃度は 150 mg/L 程度がよいという意見もあります。窒素分が不足した場合、酒税法で認められているリン酸アンモニウム（食品添加物規格のリン酸水素2アンモニウム）などで窒素分を補強すると発酵をスムーズに終了させるのに有効でしょう。リン酸水素2アンモニウムの重さの 21% が窒素分です。適切な窒素分の確保は、海外でも重視されていて、EU ではリン酸アンモニウムや硫酸アンモニウムが合計 300 mg/L（添加窒素分としては Max 63 mg/L）まで添加が認められています。

また、菌株によって窒素の要求性が異なることも報告されており、Lallemand 社の場合は次のサイトで情報が得られます。
http://www.lallemandwine.us/products/yeast_chart.php

資化性窒素量は酵母の代謝にも影響を与えるため、香気成分の生成にも影響し、資化性窒素量が多いほど酢酸や酢酸エチルも増えるという報告があります。初めて使用される場合は、資化性窒素濃度 150 mg/L までの補強を目処に試してみてください。また、資化性窒素が極端に少ない場合は、ビタミンなど他の栄養素も不足することが多く、発酵助成剤の併用が勧められています。

●▲■　発酵助成剤について

酵母の増殖と健全な発酵のためには、窒素分も大切ですが、ビタミン類や、サバイバルファクターと呼ばれる成分 (ステロールや不飽和脂肪酸) も大切であることが知られています。サバイバルファクターを多く含む酵母細胞壁画分（というと難しそうですが、酵母エキスを作った残りだそうです）や各種ビタミン、リン酸アンモニウムなどを含む発酵助成剤が、海外では広く使用されていて、日本でも使用が認められています。また、ミネラルやビタミン類の微量栄養源となる不活性化した酵母を、乾燥酵母をぬるま湯で戻す際に添加すると酵母の増殖に有効、と報告されており、これも日本で使用が認められています。

リン酸アンモニウムなどを含む市販の発酵助成剤の取り扱い説明には、酵母が増殖を始める酵母添加後 6 ～ 12 時間後と、糖の約 1/3 が消費された頃（酵母の増殖が終わり、定常期に入るころ）の2回添加するとよい、と書かれています。もう酵母の増殖が終わる頃になぜ2回目の添加が必要なのか、と思われた方もいらっしゃるでしょう。酵母が増殖を停止するころにはマスト中の窒素分は枯渇していますが、この頃に窒素分を添加すると、酵母が活性化され、発酵が早く終わることが報告されているからです。アルコール濃度が高くなっているので、窒素分を加えてもほとんど増殖しませんが、増殖が止まっても酵母は生きていて、代謝しているからでしょうか。人間が大人になって成長しなくなってもタンパク質を食べる必要があるのと似ていると思います。

なお、代表的な発酵助成剤の Fermaid K の場合は、資化性窒素含量が 10% で、標準的な使用量（12.5 g/100 L）では 12.5mg N/L になります。果汁の資化性窒素量が少ない場合は、リン酸アンモニウムとの併用が勧められています。詳しくはこちらのサイトをご参照ください。
http://www.sonic.net/~vinquiry/pdf/Nutrient%20Chart-FermaidK.pdf

以前は、海外で広く使用されている発酵助成剤が日本で使用できないので、日本のワインメーカーは困っている、との声がありましたが、ワイン関係者の申請手続きなどの努力の甲斐があって、日本でも使用できるようになりました。発酵助成剤メーカーの宣伝をする訳ではありませんが、必要な場合には有効に活用して頂ければと思います。

●▲■　ワイン酵母にも酸素が必要

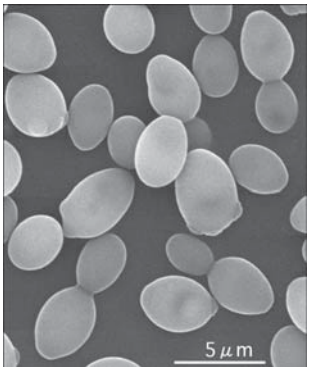
発酵に酸素は要らないでしょう？と思われた方、実はそうではありません。先に述べたサバイバルファクターと呼ばれる成分が、酵母の細胞膜に多く含まれる方が、発酵後半にアルコール分が多くなっても死滅しにくく、スタックやスラギッシュになりにくいのですが、酵母がサバイバルファクターを造るには、酸素（溶存酸素）が必要なのです。ですから、発酵前半は櫂入れやポンピングオーバーのときに、ある程度酸素（空気）を供給してやったほうが、発酵がスムーズに進むと報告されています。この場合の酸素は、栄養素の一つと考えるべきだと言われています。通気の目的が酵母にサバイバルファクターを造らせることならば、酵母の増殖中が効果的だろうと思われますが、意外なことにこれも増殖末期が一番効果的なのだそうです。その理由として、発酵初期に酸素を供給しても大部分は呼吸に使われてしまうからだろうと報告されています。ワイン醸造中に呼吸？！糖濃度が高いと酵母は酸素があってもアルコール発酵する（これをクラブツリー効果と呼びます）、と教科書には書かれていますが、市販の乾燥ワイン酵母は呼吸条件で培養されていますから、酸素があると呼吸もするのでしょうか。さらに、増殖中のワイン酵母では、わずかながら呼吸系の遺伝子も発現しているという報告があります。これらの報告を読んだ時には、ワイン酵母に対する考え方が少し変わったような気がしました。

実際には発酵中の酵母密度を測るのには手間がかかるので、糖濃度の 1/3 程度が消費されるまで、が目安になるようです。糖濃度をエキス分で代用することも可能でしょう。

酸素供給量の目安は難しいところですが、今回紹介した一連の研究を行ったフランス、国立農業研究所（INRA）の Sablayrolles らの報告では、5mg/L の酸素を1回供給しています。ワインをタンクから樽詰めする作業で溶解する酸素が 6mg/L、エアレーションを伴う澱引き作業で 5mg/L と報告されていますので、結構激しいエアレーションに相当します。もっともポンピングオーバーは毎日行いますから、もっと控えめで充分でしょう。

酸素添加の効果は、途中のアルコール発酵のスピードよりも、発酵後半のキレに効果があるそうです。サバイバルファクターの効果でアルコール濃度が高くなっても死滅しにくいから、と考えられます。ただし、発酵後半の酸素供給は酸化の原因になりますから避けましょう。

窒素分や酸素の供給がワインの健全な発酵に重要だということが報告された当初は、スタックしてから窒素分や酸素を添加しても効果がなく、発酵初期に添加することが大切、と考えられていました。スタックしてからでは遅い、ということは今でも変わりませんが、窒素分は発酵初期でないと酵母に吸収されない、と書かれている教科書もありますから、発酵が 1/3 ほど進んだところで窒素分や酸素を添加するのが効果的、というのは一歩進んだ知見といえるでしょう。ワイン酵母は、発酵初期は高糖濃度（高浸透圧）、低 pH に加えて亜硫酸、発酵後期は高アルコール分、時には低温、と酵母にとってはつらい環境で頑張ってワインを発酵してくれています。健気な酵母をさらに窒素不足とサバイバルファクター不足でいじめないよう、窒素と酸素に気をつけてやってください。　*(Text. N.Goto)*



酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の電顕写真（写真提供：荒巻 功）

後藤 奈美（ごとうなみ　旧姓 山本）
（プロフィール）
1983 年　京都大学大学院農学研究科修士課程（食品工学）修了　同年国税庁醸造試験所入所（東京 滝野川）
1985 年　大阪国税局鑑定官室
1988 年　国税庁醸造試験所第3研究室研究員
1991 年　東京大学農学博士　同年ワイン醸造学の研究のため、ボルドー大学にフランス政府給費留学生として1年間留学
1997 年　国税庁醸造研究所が東広島市に移転
1998 年　酒類理化学研究室主任研究員
2001 年　独立行政法人酒類総合研究所に改組
2007 年から、醸造技術基盤研究部門副部門長

QA?　本稿に関するご質問・ご意見等は、きた産業（info@kitasangyo.com）にご連絡ください。筆者に転送いたします。