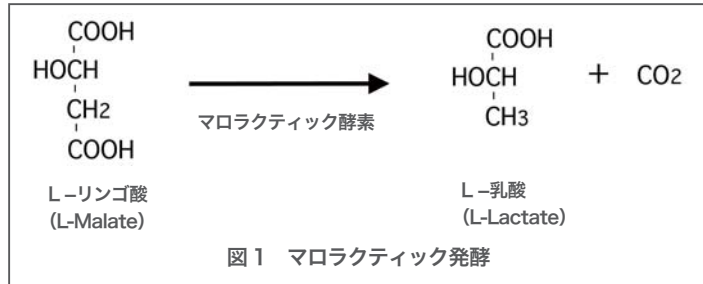


乳酸菌がワインのリンゴ酸を乳酸と炭酸ガスに分解するマロラクティック発酵 (MLF、図1) は、大部分の赤ワインと、白ワインの一部に必要な工程と考えられています。今回は、MLF 乳酸菌の性質と、比較的簡単にできる MLF のモニタリング方法 (ペーパークロマトグラフィー) をご紹介します。



●▲■ MLF について

今さら・・・ですが、MLF の影響についての復習です。

1. 酸度が下がる・・・酸性を示す COOH がリンゴ酸には2つありますが、乳酸には1つしかありませんから、MLF によって酸度が低くなり、酸味が和らぎます。pH は少し高くなります。
2. 香味に複雑さを与える・・・という聞こえがいいですが、生成されるダイアセチルの影響が大きいです。クエン酸が代謝されるとダイアセチルが生成されます。ダイアセチルは清酒やビールでは嫌われる成分で、日本人には低濃度でも嫌う人が多い、といわれていますが、ずいぶんダイアセチル臭の強いヨーグルトも売られていますから、案外大丈夫なのかもしれません。なお、酵母の生菌体にはダイアセチルを無臭にする働きがありますから、ダイアセチルを少なくしたい時は、アルコール発酵後早いうち、つまり酵母がまだ生きていうちに MLF を終わるようにします。
3. 微生物学的に安定化させる・・・MLF 乳酸菌がワイン中のリンゴ酸の他、ビタミンやアミノ酸などの栄養素を使ってしまうので、他の雑菌が生えにくくなる、ということです。MLF が一般的に行われるようになる前は、野生微生物の汚染を避けるために、赤ワインに補酸して pH を下げることが行われていたそうです。

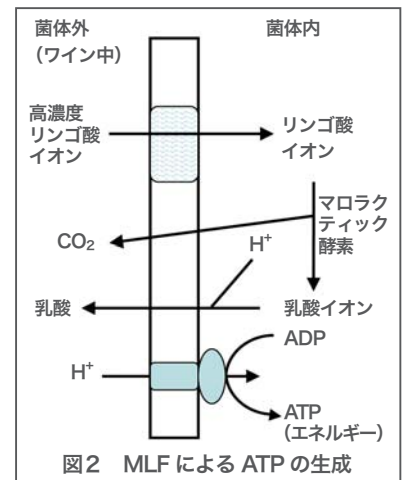
●▲■ MLF 乳酸菌の性質

MLF 乳酸菌の代表は *Oenococcus oeni* (旧名 *Leuconostock oenos*) です。アルコールを含み、pH が低いワインで増殖する MLF 乳酸菌は、清酒の火落ち菌と同じぐらい変わり者。耐アルコール性では火落ち菌に負けますが、耐酸性では MLF 乳酸菌が上です。MLF を起こすために必要なマロラクティック酵素は *Lactobacillus plantarum* など色々な乳酸菌が持っていますが、他の乳酸菌は耐アルコール性や耐酸性が低く、ワイン中での増殖が難しいのだとか。pH3.5 以下では *O. oeni* が主要な MLF 乳酸菌になりますが、pH3.5 以上になると他の乳酸菌も増殖して、場合によっては酒石酸やグリセロールを代謝し、揮発酸が増えるなどの問題を起こすことがあります。

このように、酸性とアルコールに強い MLF 乳酸菌 (*O. oeni*) ですが、亜硫酸には弱く、また、MLF 乳酸菌はアセトアルデヒドを吸収・利用するため、アセトアルデヒドと結合型になっていた亜硫酸が遊離し、生育を阻害することがあると報告されています。

MLF 乳酸菌もブドウ糖などがあると普通の乳酸発酵をしますが、アルコール発酵が終わったワインにはほとんどブドウ糖・果糖が残っていません。そこでわずかに残った果糖などの他、アセトアルデヒドや、ワイン酵母が利用できないキシロースなどの糖を利用して増殖するのだそう

です。なお、なぜ乳酸菌が MLF を起こすのかが謎とされてきましたが、実は MLF によって乳酸菌はエネルギーを獲得しているのだそうです。MLF の際、乳酸菌はリンゴ酸のイオンを取り込み、イオンになっていない (解離していない) 乳酸を排出します。つまりエネルギーを使わずに H⁺ を菌体外に排出することになり、この分の H⁺ を菌体内に取り込むときにエネルギー (ATP) を獲得できると報告されています (図2)。



●▲■ MLF を起こしたいときは

O. oeni がアルコールや酸性に強い、とは言っても、やはりほどほどの条件の方が増殖しやすく、MLF が起こりやすくなります。菌株にもよりますが、アルコール分 13% 以下、pH3.2 以上、品温 18°C 以上、総亜硫酸 20 mg/L 以下が望ましいとされています。どれかの条件がこの範囲を超えている場合でも、他の条件がより生育に適している場合は MLF を起こすことができます。例えば、シャンパーニュのベースワインは pH3.0 以下と低いですが、アルコール分が低いので瓶内二次発酵の前に MLF を終了できるのだそうです。また、アルコール発酵後もシュール・リーや荒い澱を引いたシュール・リー状態でパトナーージュすると、酵母から漏出するアミノ酸やビタミンなどが MLF 乳酸菌の増殖を促進すると報告されています。また、仕込み時の亜硫酸の添加も可能な範囲で低めにし、亜硫酸の分泌が多い酵母は避けた方が無難です。当然のことながら、発酵終了後の亜硫酸添加は、MLF が終わるまで待ちましょう。

MLF が起こりにくい場合などは、市販の MLF スターターを使用することが薦められています。乳酸菌を実験用の培地で培養してワインに添加しても、アルコールや低 pH に適応できずに死んでしまいますが、現在市販されている MLF 乳酸菌の凍結乾燥菌体は、あらかじめワインの環境に適応させているそうです。また、pH が高く、色々な乳酸菌が増殖しやすい場合も、MLF スターターを利用して不良乳酸菌を数で圧倒した方がよい、という意見もあります。MLF スターターには、ワインにそのまま添加するもの、水で戻してから添加するもの、前培養が必要なもの等があります。また、高アルコール条件に強い菌、低 pH に強い菌、β-ダマセノンの甘い香りを発揮する菌など色々な性質のスターターが市販されていますので、酵母ほどではありませんが、MLF スターターも使い分ける時代に入っています。

なお、日本では、乳酸菌は酵母と同様、原料として取り扱わない物品になっていますので、ワインの製成前にご使用ください。アルコール発酵終了後、MLF スターターを添加してから製成になります。記帳も忘れないようにお願いします。

●▲■ MLF を起こしたくないときは

アルコール発酵終了後、亜硫酸を添加し、品温を下げ、早めに澱引きをします。MLF を起こしたいときと反対に、アルコール分が低く、pH が高いワインでは MLF が起こりやすいので、分子状 SO₂ 濃度 (Tips for B.F.D.、第 19 回をご参照ください。) に注意が必要です。完全に MLF を抑制するには分子状 SO₂ で 0.8 mg/L が必要とされています。

pHが高く、MLFが必要とされないワインの方がMLFが起こりやすいのは皮肉なことです。

●▲■ MLFのモニター方法

MLFが起こっているかどうかは、炭酸ガスの細かい泡（ワインの表面に小さな泡の固まりができることが多い）を観察することが多いのですが、MLFが終わったかどうか確認したいのだが・・・、というご質問を受けます。MLFが終わったかどうかは、乳酸が生成し、リンゴ酸がほぼ無くなっていることで確認できます。

リンゴ酸や乳酸の分析方法には次のような方法があります。

1. ペーパークロマトグラフィー（ペークロ）や薄層クロマトグラフィー・・・有機溶媒を使用しますが、高価な機器は必要ありません。定性的な分析です。
2. 酵素法による分析・・・定量的に分析できますが、キットの他、分光光度計が必要です。自治体の試験機関等で分光光度計が使用できる場合は便利な方法です。試験紙を使う比較的手頃な価格の測定機器とキットも販売されています。
3. 液体クロマトグラフィーによる有機酸分析・・・装置が必要で、たくさんサンプルを分析する場合に適しています。

●▲■ ペークロによる有機酸分析

では、もっとも簡単にお金を掛けずにできるペークロによる方法を紹介します。ペークロの原理は、緑の水溶性ペンで紙にマークして、端を水に浸けてしみ込めると、インクが水に溶けて青と黄色に分かれるのと同じことです。水の代わりにギ酸で酸性にした有機溶媒（n-ブタノール）を展開溶媒に使用します。pH指示薬のプロモクレゾールグリーンを展開溶媒に入れておくと、展開後は溶媒がしみ込んだところ全体が黄色になりますが、乾燥させてギ酸が蒸発すると地の部分は緑に、有機酸がある部分だけが酸性で黄色になります。

（準備）

- ・ 標準溶液
乳酸・リンゴ酸・酒石酸各0.5%液 または
リンゴ果汁（リンゴ酸）かブドウ果汁（リンゴ酸と酒石酸）、飲むヨーグルト（乳酸と場合によってはクエン酸）

- ・ 展開溶媒
33 mL n-ブタノール + 33 mL 純水 + 3.6 mL ギ酸 + 5 mL 1%(w/v) プロモクレゾールグリーン（BCG）水溶液（懸濁液）、この割合で必要量にあわせて変更

↓
分液漏斗に入れ、混合・脱気、静置して分離させる

↓
下層（水層・不要）はコックから出して捨てる

↓
残った溶媒層（上層）は、数枚のろ紙を重ねた漏斗を通して、残った水を除く過された溶媒は蓋のできるガラス瓶に入れて冷蔵保存（分液漏斗の代わりに栓のできるガラス瓶を使って混合し、分離させた上層をガラススポイトで取り、ろ過してもOK。試薬の取り扱いには注意し、ドラフトか換気の良い場所で扱ってください。）

- ・ 展開槽 深さが22cm程度あるガラス製のフタのできる容器。ピクルス用などの容器でOK。
- ・ ろ紙 横23cm x 縦20cm位に切る。（丸めて上端を留め、展開槽に入る大きさ）濾紙に指紋が付かないよう、上端だけを持つ、または使い捨てのポリ手袋をして扱う。
- ・ サンプルをスポットするもの。竹串や爪楊枝でOK。

（方法）

- ・ スポット
ろ紙の下2cmに鉛筆で線を引き、線上に2.5cm間隔でスポット位

置を記入する。

線の下にサンプルまたは標準溶液名を鉛筆で記入する。（ボールペンのインクは溶媒に溶けるので不可）

ろ紙の下に鉛筆やガラス棒をいれて下端を浮かせる。

竹串等を用いて、サンプルを小さく（直径1cm以下）スポットする。

スポットが乾燥したら、同じ位置に再度スポットする。（計4回）

スポットが乾燥したら、ろ紙を上端同士・下端同士が少し重なるように筒状に丸めて、上端のみをクリップかホチキスで留める。

- ・ 展開（図3）

展開槽に展開溶媒が0.5cm程度になるように入れる。

展開槽に丸めたる紙を入れ、下端を溶媒に浸ける。（ろ紙が展開槽の壁につかないよう注意）

展開槽の蓋をして、溶媒がろ紙に18cm程度吸収されるまで静置する。（3時間程度）

- ・ 乾燥・検出

ろ紙を取り出して、換気の良い場所で乾燥させる。

溶媒を吸収した部分が緑、酸のある部分が黄色になる。

標準溶液と比較して、ワインの乳酸、リンゴ酸の位置を求め、スポットの有無や大きさを比較する。

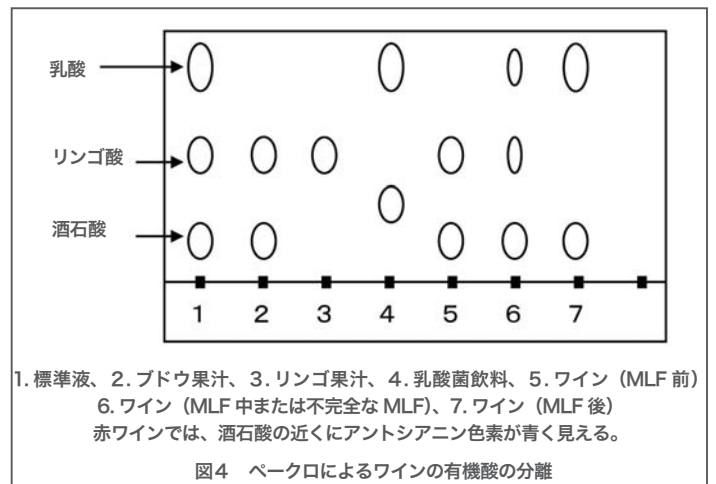
スポットの位置は、下から酒石酸、（クエン酸）、リンゴ酸、乳酸。（図4）展開溶媒は回収して再利用可能。

薄層クロマトグラフ（TLC）でも同様に分析できますが、よく使われるシリカゲルではなく、セルロースの薄層を使用してください。

(Text. N.Goto)



図3 ペークロ展開中



1. 標準液、2. ブドウ果汁、3. リンゴ果汁、4. 乳酸菌飲料、5. ワイン（MLF前）
6. ワイン（MLF中または不完全なMLF）、7. ワイン（MLF後）
赤ワインでは、酒石酸の近くにアントシアニン色素が青く見える。

図4 ペークロによるワインの有機酸の分離

（参考）

Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, ISBN: 0-412-06411-1
Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts. Patric Iland Wine Promotions PTY LTD. ISBN: 0-9581605-1-1
http://www.lallemandwine.com/IMG/pdf_LALLEMAND_MLF_IN_WINE.pdf

後藤 奈美（ごとうなみ 旧姓 山本）

独立行政法人酒類総合研究所、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。