

## 固定化酵母を用いたワイン醸造

岸本 憲明・村上 恭美・藤田 藤樹夫

(近畿大学農学部応用生命化学科)

# Production of Wine Using Yeast Immobilized in Double-Layer Calcium Alginate and kappa- Carrageenan Gel Beads

Noriaki KISHIMOTO, Kumi MURAKAMI, Tokio FUJITA

*Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University*

### Synopsis

Three types of wines were produced using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized within double-layer calcium alginate and kappa-carrageenan gel beads and using free *S. cerevisiae*. The double-layer alginate gel beads were prepared using 0.85 and 1.0% (w/v) sodium alginate and the flow rates at 2.75 and 1.87 ml/min for inner and outer gels, respectively, under the conditions of the drop length at 1.5 cm between the nozzle and the surface of the CaCl<sub>2</sub> solution. Wine yeast was suspended in the inner alginate solution. The kappa-carrageenan gel beads were obtained when 2.0% (w/v) kappa-carrageenan solution incubated at 45°C was dropped into 2.0% (w/v) KCl solution at 20°C. These gel beads ranged in diameter from 3.4 to 3.5 cm and had sufficient strength for wine brewing. The red grape juice was fermented to wine for thirty days by two types of gel beads containing *S. cerevisiae* and free yeast. The pH, the decrease of glucose and the production of ethyl alcohol in the fermented solutions were the same as those of free yeast except for the turbidity. The free yeast showed higher turbidity than the immobilized yeast. The wine produced by immobilized yeast within kappa-carrageenan gels had the quality nearly equal to the commercial wine in terms of flavor and taste by sensory test.

## 緒 言

近年、生体触媒を固定化する様々な技術が確立されてきている。微生物や細胞を固定化すると、その触媒能力を安定化することが可能で、触媒活性を長時間維持し、くり返し使用できる利点がある。生体触媒を固定化する技術を活用して、バイオリアクター中で微生物変換や酵素変換を行って有用物質を生産する技術も実用化され、またバイオセンサーを用いてさまざまな物質を定量できるようになってきた。たとえば、固定化酵母によるバイオエタノール、アミノ酸、ビタミンや抗生物質の生産、ステロイドの水酸化、環境汚染物質の分解、生体成分の臨床検査など、多くの報告がある<sup>1)</sup>。

最近、酒類醸造分野でも固定化生体触媒の導入が進んできている。醸造分野へバイオリアクターを導入する利点は、麦汁や果汁中の糖分をそのまま発酵基質として利用できることと、通常発酵に比べて発酵温度や速度を容易に制御できるようになり、一定品質のビールやワインを安定して製造することができる点にある。すでに固定化酵母を用いて連続醸造したビールが商業生産され<sup>2)</sup>、またパイロットスケールでのワイン醸造<sup>3)</sup>やスパリングワインの二次発酵<sup>4)</sup>に固定化酵母が導入されている。

近畿大学農学部は2006年8月に酒類試験製造免許を取得した。そして、赤ブドウ果汁から遊離ワイン酵母と固定化酵母を用いて赤ワインの醸造をおこなった。ワイン醸造に固定化酵母を用いる最大の利点は、発酵液の澄清化である。既存のワイン製法では、酵母は一度発酵した後に澱として除去されるが、澱が沈殿するのに時間がかかる上、澱の除去に手間がかかる。しかし、酵母を固定化すると、容易に酵母を添加あるいは除去することができ、また繰り返し酵母を利用できるので、低コスト・低労力でワインを製造することが可能となる。

そこで本実験では、二種類のゲル化剤（アルギン酸カルシウムゲルと $\kappa$ カラギーナンゲル）を用いてワイン酵母を包括固定した。アルギン酸カル

シウムゲルでは、固定化酵母が発酵液に漏れ出てこないように酵母を包埋したアルギン酸カルシウムゲルビーズをさらに同じゲルで包埋する二重ゲルを調製した。

まず、適度な硬さと大きさをもつゲルビーズを作成する条件（アルギン酸ナトリウムと $\kappa$ カラギーナン溶液の濃度と流速、溶液が滴下する距離）を検討した。次にブドウ果汁に遊離酵母と二重アルギン酸ゲル固定化酵母、 $\kappa$ カラギーナンゲル固定化酵母を加えて、アルコール発酵させた。そして発酵液の濁度とpH、スクロース濃度、エタノール濃度を経時的に測定した。

その結果、遊離酵母を添加した発酵液の濁度は高かったが固定化酵母で発酵させた液の濁度は低く、また発酵液のpH、スクロースおよびエタノール濃度に差異は認められなかった。また30日間発酵させたワインと市販赤ワインを10人のパネラーを対象に2点比較法で官能検査したところ、 $\kappa$ カラギーナンゲルで固定化した酵母で発酵させたワインが、香りと味で市販ワインと有意差が認められなかった。これらの結果から、ワイン酵母を $\kappa$ カラギーナンゲルに包括固定することによって、市販ワインと有意差のないワインをつくらることができることを明らかにした。

## 実験方法

### 1. 材料

供試ワイン酵母には *S. cerevisiae* SW-3株を使用し、前培養にはYM培地 (Becton, Dickinson and Company, USA) を用いた。固定化担体に使用したアルギン酸ナトリウム (300 ~ 400 cp) と $\kappa$ カラギーナンは和光純薬工業 (大阪) から購入した。

### 2. 二重アルギン酸カルシウムゲルビーズの作成

アルギン酸ナトリウムは水溶性だが、カルシウム塩はゲル化する。そこで酵母を懸濁したアルギン酸ナトリウム溶液を塩化カルシウム溶液に滴下して、酵母固定化ゲルビーズを作成した。

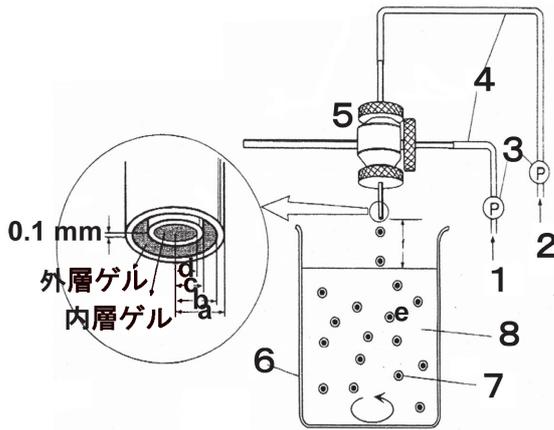


図1. 二重アルギン酸カルシウムゲルビーズ作成装置

1 ; 外層ゲル用アルギン酸Na溶液, 2 ; 酵母を懸濁した内層アルギン酸Na溶液, 3 ; ペリスタポンプ, 4 ; シリコンチューブ, 5 ; 二重ノズル, 6 ; ビーカー, 7, 二重アルギン酸Caゲル, 8 ; 0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液, a ; 2.1 mm, b ; 1.73 mm, c ; 0.75 mm, d ; 0.43mm, e ; 塩化カルシウム溶液, f ; 1~3 cm.

二重ゲルビーズは、図1に示した二重ノズルをもつゲル作成器を用いて作成した<sup>5)</sup>。内層と外層アルギン酸ナトリウム溶液は、マイクロチューブポンプ MPSJ (東京理化学器械株式会社、東京) とペリスタポンプ SJ1211 (アトー株式会社、東京) を用いてノズルまで液を輸送し、ノズルから攪拌している0.1M塩化カルシウム溶液1000mlに滴下してゲルビーズを作成した。前培養した酵母は、内層ゲル作成用アルギン酸ナトリウム溶液に懸濁した。

アルギン酸ナトリウム濃度と溶液の流速、ノズルから塩化カルシウム溶液面までの距離を変えて、酵母の固定化に適したゲルビーズの作成条件を検討した。

### 3. κカラギーナンゲルの作成

κカラギーナンは熱水に可溶で45℃以上ではゲル化しないが、20℃以下に冷却するとゲル化する。さらにカリウムイオンが存在するとゲル化が進行する特性をもっている。

そこで、図2に示した装置を用いて、κカラギーナンに蒸留水を加え100℃で加熱溶解した後、45℃に保ったκカラギーナン溶液を20℃に保った2% (w/v) 塩化カリウム溶液中に滴下してゲルビーズを作成した<sup>6)</sup>。

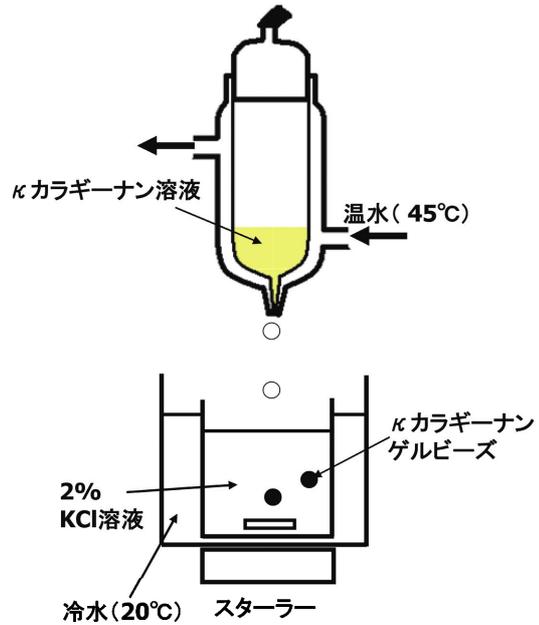


図2. κカラギーナンゲル作成装置

κカラギーナン溶液の濃度とノズルから液面までの距離を変えて、最適な硬さと大きさをもつゲルビーズの作成条件を検討した。

### 4. 酵母埋設ゲルビーズの作成

YM培地で前培養したワイン酵母を $1.4 \times 10^5$  cfu/mlとなるように、0.85% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液、または45℃に保ったκカラギーナン溶液に懸濁した。それぞれのゲル作成条件は上記に従った。

### 5. 赤ブドウ果汁を用いたワインの醸造

ステンレス製寸胴鍋に赤ブドウ果汁 (コンコード種、神田屋から供与、大阪府) を4000ml入れ、メタ重亜硫酸カリウム0.294gと糖度が21% (w/v) となるようにグルコースを添加した。ビーカーに1000mlずつ分注し、ワイン酵母を固定化したゲルビーズ16gあるいは遊離酵母を $1.0 \times 10^4$  cfu/mlとなるように添加した後、蓋をして21.5℃で5日間保った。この液をガロン瓶に移しエアロック栓をして21.5℃に25日間保った。発酵液を経時的にサンプリングし、pH (pHメータF-22、堀場製作所、京都)、濁度 (OD<sub>660</sub>、UV-1200、島津製作所)、グルコース残量 (F-キット、ロッシュ・ダイアグノスティック社、ス

イスと糖度計、株式会社アタゴ、東京)とエタノール濃度(蒸留法と酒精度浮ひょう)を経時的に測定した。

## 6. 官能検査

エアロック栓をしたガロン瓶の中で21.5℃、25日間醸造した3種類のワインは、上澄をろ過(ろ紙No.2)してから、官能検査に供した。官能検査は市販赤ワインと今回作製したワイン1点をサンプルA、Bとして、色、香り、味の3項目について二点比較法で実施した。残りのワイン2点も同様にして市販ワインと比較する方法で官能検査を行った。パネラーには飲酒経験のある10人(22～27才、男性6名、女性4名)を選出した。検査結果から求めた $X_0^2$ 値を基に、2つのサンプル間に有意差の有無を調べた。 $X_0^2$ 値は次式より算出した<sup>7)</sup>。

$$X_0^2 = \sum \frac{(実測値 - 期待値)^2}{期待値}$$

ただし、期待値： $\frac{\text{判定人数}}{\text{試料数}}$ 、k：試料数

## 実験結果および考察

### 1. 二重アルギン酸ゲルビーズの作成

内層ゲルを外層ゲルと判別しやすくするために、あらかじめ内層アルギン酸ナトリウム溶液に墨汁を数滴滴下して着色した。まず内層と外層アルギン酸溶液の濃度を0.8と1.0% (w/v) に固定し、ゲル溶液の流速(内層と外層ゲル溶液のペリスタポンプの目盛りを30～100と2～10)とノズルから塩化カルシウム液面までの距離(0.5～2.0cm)を変えて二重ゲルビーズを作成した。各条件で作成したゲルビーズの中から30粒選出し、その直径、硬さ、割れ易さを測定した。硬さと割れ易さはビーズを指で挟んで力を加え、破損程度を評価した。

ワイン酵母を固定化するのに適したゲルビーズ作成条件として、固定化酵母の量を多くするために内層ゲル容積を大きく、ビーズの破損に伴う酵母の漏出を最小限に抑えるために、ゲル強度を高



図3. 検討した固定化条件で作成した二重アルギン酸カルシウムゲルビーズ  
内層ゲルは墨汁で着色して外層ゲルと区別した。

めることを考慮した。そこで、ビーズ全体の大きさは小さく、内層ゲル容積は大きくするように試みた。

多数のゲルビーズを作成して試験した結果、内層と外層のアルギン酸ナトリウム溶液の濃度は0.85と1.0% (w/v)、また溶液の流速は2.75と1.87 ml/min (ペリスタポンプの目盛り100と8)に調整し、ノズルと液面の距離を1.5cmに設定したとき、ゲルビーズ外層の直径は3.50cm、内層ゲル容積が大きく、指でゲルを挟んで力を加えても簡単に割れない二重ゲルビーズを作成することができた(図3)。

### 2. $\kappa$ カラギーナンゲルの作成

45℃に保持した $\kappa$ カラギーナン溶液を45℃のまま二重ノズルから滴下する装置を作成することができなかったため、 $\kappa$ カラギーナンゲルは一重ゲルを作成した。酵母の生育を阻害せず、かつ $\kappa$ カラギーナン溶液がゲル化しない最低温度を調べたところ、45℃であった。そこで、 $\kappa$ カラギーナン溶液の濃度(2.0～3.5%、w/v)とノズルから液面までの距離(0.5～2.0cm)を変えてゲルを作成した。得られたゲルの直径と硬さ、割れ易さをアルギン酸ゲルビーズと同じ方法で評価した。

その結果、45℃に保った2.0% (w/v)  $\kappa$ カラギーナン溶液をノズルから1.5cm離れた2.0% (w/v) 塩化カリウム溶液(20℃)に滴下すると、直径3.4cmの $\kappa$ カラギーナンゲルを作成することができた。このゲルの硬さもアルギン酸カルシウムゲ

ルと同程度の硬さをもっていた。

### 3. 赤ブドウ果汁を用いたワインの醸造

糖度21% (w/v) に補糖した赤ブドウ果汁4000 mlにメタ重亜硫酸カリウムを0.294 g添加した。ビーカーに1000 mlずつ分注し、ワイン酵母を固定化した2種類のゲルビーズ16 gあるいは遊離酵母を $1.0 \times 10^4$  cfu/mlとなるように添加した後、蓋をして21.5℃で5日保った。1つはワイン酵母を接種しないコントロールとした。酵母を接種したブドウ果汁は、2日後から活発に発泡し始めた。これらの液をガロン瓶に移しエアロック栓をして21.5℃に25日保った。酵母を接種したブドウ果汁はガロン瓶に移してから7日ぐらい活発に発泡していた(図4)。

ブドウ果汁のpHは3.2で、アルコール発酵が進行しても発酵液のpHは3.0～3.1の間であって大きく変動しなかった(図5)。これはアルコール発酵が有機酸発酵と違って、生成物が発酵液のpHに変動を与えないエタノールと炭酸ガスであるためと考えられる。

発酵液中のグルコースは発酵の経過とともに消費されて、ガロン瓶に移したときには50 g/Lに低下していた。グルコースはガロン瓶内でもゆっくり



図4. エアロック栓を装着したガロン瓶内で発砲するブドウ果汁液  
κカラギーナンに固定化したワイン酵母を接種

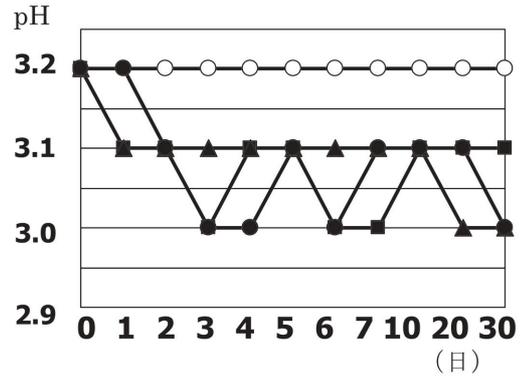


図5. アルコール発酵中のpHの変動

○；コントロール，■；遊離酵母，▲；二重アルギン酸Caゲル固定化酵母，●；κカラギーナンゲル固定化酵母。

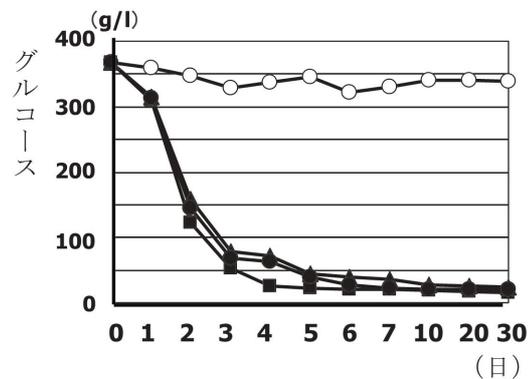


図6. アルコール発酵中のグルコース濃度

シンボルは図5と同じ。

りと消費され、発酵30日後にはいずれの発酵液でも20 g/L以下に低下していた(図6)。

発酵液中のグルコース濃度の減少に対応してエタノール濃度が上昇した。ガロン瓶に移したときにはすでに8～10% (v/v) のエタノールが生成し、ガロン瓶内でも徐々にエタノール濃度が上昇した。30日間発酵させると10～11% (v/v) のエタノールが生成された(図7)。

3種類の発酵液でエタノール生成パターンが異なっていた。最もエタノール生成速度が遅かったのは遊離酵母で、次いで二重アルギン酸カルシウムゲル固定化酵母、最もエタノール生成速度と生成量が多かったのはκカラギーナンゲル固定化酵母であった。

遊離酵母より固定化酵母でアルコール生成速度が速く生成量も多かったのは、遊離酵母は自身が生成したアルコールによってタンパク変性、酵素失活を受け易く代謝活性が低下するのに対して、

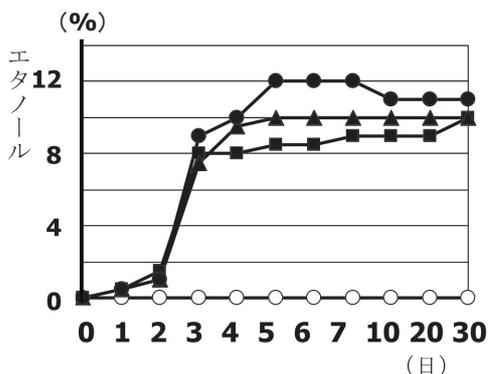


図7. アルコール発酵中のアルコール濃度  
シンボルは図5と同じ。

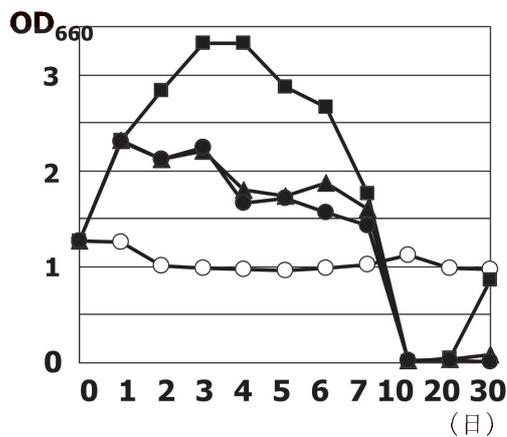


図8. アルコール発酵中のアルコール濃度  
シンボルは図5と同じ。

固定化酵母はゲル化剤に守られているため、アルコールによる害を直接受けなかったためと考えられる。アルギン酸二重ゲルより  $\kappa$  カラギーナン一重ゲルで固定化した酵母のアルコール生成量が高かったことから、アルコール発酵に使用する固定化剤には  $\kappa$  カラギーナンが適していると考えられる。

アルコール発酵液の濁度は遊離酵母が最も高く、固定化酵母では低い値に抑えられた。注目すべき点は、発酵10日目を過ぎると、いずれの発酵液でも濁度が大きく低下し、清澄な発酵液になることである(図8)。この発酵液を観察すると瓶の底に澱が沈殿していた。澱の量は遊離酵母で最も多く、固定化酵母で発酵させた液では少量であった。遊離酵母で発酵した液は、ガロン瓶を移動させるときなど、取り扱いによって沈殿していた澱が浮遊して発酵液の濁度が上昇することがあった。

発酵液の濁度を除くと、遊離酵母と固定化酵母できわめてよく似たアルコール発酵過程を示し、固定化酵母を使用しても遊離酵母と同じように発酵が進行することを確認することができた。

#### 4. 官能検査

今回作成したワイン3点の色調と香り、味をそれぞれ市販赤ワインと比較する二点比較法で官能検査した。その結果、遊離酵母で作成したワインの評価は、

Table 1. 市販ワインと今回作成したワインの官能検査 (二点比較法)

	二重アルギン酸 Ca 固定化酵母で作成したワイン	非固定化酵母で作成したワイン	$\kappa$ カラギーナン固定化酵母で作成したワイン
色調	0.2	9.8*	5.0*
香り	3.2	5.0*	0.2
味	5.0*	5.0*	0.2

\* 有意差あり  $X_0^2 \leq 3.84$

いずれの項目でも市販ワインより有意に低かった。また、 $\kappa$  カラギーナンゲルで作成したワインでは色調が、二重アルギン酸カルシウムゲルで作成したワインでは味の評価が市販ワインより有意に低かった (Table 1)。 $\kappa$  カラギーナンの色調評価が低かったのは、市販ワインより濁っていたため、これはろ過法の違いによると思われる。今回は1枚のろ紙 (No.2) を通過させただけで、細かな浮遊物を取り除くことはできなかったが、市販ワイン製造に用いられているろ過装置を使用すれば、市販ワインと同等の透明度をもったワインをつくることができると期待される。

#### 要約

アルギン酸ナトリウムと  $\kappa$  カラギーナンをゲル化剤に用いて、アルコール発酵用酵母の固定化に適したゲルビーズを作成した。その結果、二重アルギン酸カルシウムゲルの作成は、内層と外層ゲルに0.85と1.0% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液を、また溶液の流速は2.75と1.87 ml/minに調整し、ノズルと液面の距離を1.5cmに設定すると、ゲルビーズ外層の直径は3.50cm、内層ゲル

容積が大きく、硬さも充分固い二重ゲルビーズを作成することができた。また、45℃に保った2.0% (w/v)  $\kappa$ カラギーナン溶液をノズルから1.5cm離れた2.0% (w/v) 塩化カリウム溶液 (20℃) に滴下すると、直径3.4 cmの $\kappa$ カラギーナンゲルを作成することができた。このゲルの硬さもアルギン酸カルシウムゲルと同程度の硬さをもっていた。

2種類のゲルで包括固定したワイン酵母と遊離酵母で赤ブドウ果汁をアルコール発酵させたところ、固定化酵母と遊離酵母でグルコース減少速度とエタノール生成速度に違いは認められなかった。遊離酵母で発酵させると濁度が上昇したが、固定化酵母では濁度の上昇が抑えられた。30日間発酵させたワインを市販ワインと官能検査で比較したところ、 $\kappa$ カラギーナンで固定化した酵母で発酵させたワインが、香りと味で市販ワインと有意差が認められず、固定化酵母で市販ワインに近いものが製造できることを確認することができた。

(2004) 国産キウイフルーツワインの製造に関する研究 IV. 固定化酵母と新規抗酵母性物質を用いたキウイフルーツスパーリングワインの製造 日本醸造協会誌 99: 64-72.

- 7) 川北兵蔵、山田光江：食品検査シリーズ 5. 食品の官能検査、医歯薬出版株式会社、1978.

## 参考文献

- 1) 福井三郎監修：バイオリアクター 講談社サイエンティフィック、1985.
- 2) 岡本隆典 (1994) ついに商業生産II 固定化酵母によるビール連続醸造 生物工学会誌 72 (3) : 211.
- 3) 熊田順一、須田幹夫 (1986) キラー酵母の育種とバイオリアクターへの応用 Bioindustry. 3 : 13-21.
- 4) M. Ciani and G. Rossini, (1991) Sparkling wine production by cell- recyclefermentation system. Biotechnolical Letter 13 : 533-536.
- 5) K. Yokotsuka, M. Yajima and T. Matsudo (1997) Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. American Journal of Enology and Viticulture 48:471-481.
- 6) 横塚弘毅、松土俊秀、関 忠司、福井正一