

赤ワイン貯蔵・熟成工程におけるオフフレーバーの発生防止に関する研究

恩田 匠・小松 正和

Technical Development of Prevention of Contamination with Phenolic Off-Flavors Producing Yeast in Red Wines

Takumi ONDA and Masakazu KOMATSU

要 約

国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバー（フェノレ）汚染の現状把握とその発生防止法の確立を目的とした。現状の市販国産赤ワインには、約 20%のワインから 4-エチルフェノールと 4-エチルグアイアコールが検出されることが分かった。また、赤ワイン製造現場からフェノレ生成微生物の検索を行い、ブレタノマイセス属酵母を分離した。分離されたブレタノマイセス属酵母の増殖性試験から、適切な pH と亜硫酸濃度の管理を行うことで、フェノレの発生を防止できることが確認された。

1. 緒 言

赤ワイン製造は、白ワインと比べても、より煩雑な工程を経て、製品化されるまでに長期間を要する。特に、赤ワイン製造には、醸し発酵や乳酸菌によるマロラクティック発酵、特に貯蔵・熟成工程があることから、酸化や雑菌類の汚染などの劣化を受ける機会が多くなる。その結果として、香味の不調和、特にオフフレーバー（欠陥香）による品質の低下が認められることがあった。従来は、山梨県産ワインにおいても、産膜酵母や酢酸菌などの微生物汚染と酸化劣化をともなう劣化が指摘されることがしばしばあったが、近年ではこれらの著しく劣化したワインの頻度はきわめて少なくなっている。

赤ワインのオフフレーバーの一つに、古くはフランス・ボルドー地方のワインの特徴香とも考えられていたフェノール系オフフレーバー（以下、フェノレと略記）がある。近年では、このフェノレの本体は、*Brettanomyces*（ブレタノマイセス）属酵母¹⁻³⁾が生成する4-エチルフェノールと4-エチルグアイアコールであることが分かっており、官能的には、「馬小屋臭」、「動物臭」、「薬品臭」あるいは「燻製臭」と表現されるオフフレーバーであることが認識されている。最近になって、国内のワイン審査会においても、このフェノレによる欠陥を指摘することが多くなってきた。

そこで、本研究では、国産赤ワインのフェノレとその発生原因微生物の調査を行い、フェノレ発生防止方法の検討を行うことを目的とした。

昨年度は、平成21年度山梨県ワイン鑑評会出品酒を用いた各種分析法の確立と、フェノレの定量分析ならびに微生物分析を実施⁴⁾した。本年度は、国産赤ワインにおけるフェノレの定量分析を行い、現状の国産赤ワインにおけるフェノレ汚染の頻度の調査を行った。また、赤ワイン製造の、特に貯蔵熟成工程におけるフェノレの定量分析と、フェノレ発生原因微生物の検索と分離、その諸性状を調べ、フェノレ発生防止法の検討を行った。

2. 実験方法

2-1 供試ワイン試料

供試ワイン試料として、平成 22 年度の山梨県ワイン鑑評会⁵⁾に出品された赤ワイン 31 点、平成 23 年度同鑑評会⁶⁾出品ワイン 32 点を用いた。

さらに、上述した山梨県ワイン鑑評会出品酒以外に、市販されている国産赤ワイン 253 点（山梨県産 96 点を含む）を供試した。この国産市販赤ワインの内訳として、カベルネ・ソーヴィニヨンやメルロなどの欧州系原料を主要品種とした、いわゆる「欧州系」が 138 点、マスカット・ベリーA などの国内改良品種や北米系を主要品種とした、「非欧州系」が 115 点含まれる。

2-2 フェノール系オフフレーバーの分析

供試赤ワイン中のフェノレ 4 成分：4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール、4-エチルフェノールおよび 4-エチルグアイアコールの定量分析は、既報⁴⁾に従

って実施した。

2-3 ワインの一般成分分析

ワインの亜硫酸濃度や pH などの一般成分の分析は、国税庁所定分析法による。

2-4 微生物分析

ブレタノマイセス属酵母の検出は、既報⁴⁾に従って、市販の簡易検査キットを用いて行った。

2-5 汚染酵母の分離と同定試験

2社のワイン製造現場において、樽熟成工程にある赤ワインを調査し、官能検査でフェノレが認められる樽からサンプルを採取した。それら16点のサンプルについて、フェノレの定量とブレタノマイセス属酵母の検出キットによる汚染調査を行った。

また、各赤ワインサンプルは、YM液体培地(Difco社製、pH5.0)を用いて集積培養を行い、酵母の生育が認められたものについて、YM寒天培地(YM液体培地に1.5%寒天として調整)でストリークカルチャーを行うことにより、純粋分離を行った。分離株は、グリセロールストックとして、-80℃で凍結保存した。

2-6 汚染微生物の簡易同定

赤ワインから純粋分離した微生物について、光学顕微鏡による細胞の形態観察、コロニーの形態観察、液体培地における生育、糖類の発酵性などの諸性状を調べた。また、YNB培地⁷⁾における増殖性(シクロヘキシミド耐性)、フェノレ前駆体(フェルラ酸、p-クマル酸)からのフェノレ生成を調査した。

2-7 汚染微生物の増殖性

YP液体培地(酵母エキス0.5%、ペプトン0.5%)に、エタノールを12%になるように添加し、酒石酸を用いてpHを調整した後、亜硫酸塩(ピロ亜硫酸カリウム)を各種の濃度で添加した試験培地を調整した。この試験培地に、純粋分離したブレタノマイセス属酵母株の前培養液を、生菌数 10^3 個/mlになるように添加し、20℃で培養した後の増殖性を調べた。

また、赤ワイン(山梨県工業技術センター支所ワインセンターで製造した「山梨ワイン」2008、エタノール12.5%)を用いて、酒石酸でpH調整した後に、各種の濃度で亜硫酸塩を添加したものでも同様に、分離ブレタノマイセス酵母株の18℃における増殖性を調べた。

3. 結果および考察

3-1 山梨県ワイン鑑評会出品酒の分析

表1に、平成22年度(1-1)と平成23年度(1-2)の出品赤ワインにおけるフェノレの定量分析結果を示す。平成22年度出品赤ワインの4-エチルフェノールの平均値は0.007 mg/L、4-エチルグアイアコールの平均値は0.000であった。平成23年度出品赤ワインの4-エチルフェノールの平均値は0.033 mg/L、4-エチルグアイアコールの平均値は0.026であった。いずれも、平成21年度のデータと比較して、検出される頻度とその濃度が低くなっており、短い期間ではあるが、山梨県産赤ワインの高品質化が示される結果となった。なお、データには

表1 山梨県ワイン鑑評会出品赤ワインのフェノレ分析

1-1 平成22年度				
	4-ヴィニルフェノール	4-ヴィニルグアイアコール	4-エチルフェノール	4-エチルグアイアコール
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
平均値	0.000	0.000	0.007	0.000
最大値	N.D. ¹⁾	N.D.	0.053	N.D.
最小値	N.D.	N.D.	N.D. ²⁾	N.D. ³⁾
1-2 平成23年度				
	4-ヴィニルフェノール	4-ヴィニルグアイアコール	4-エチルフェノール	4-エチルグアイアコール
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
平均値	0.000	0.000	0.033	0.026
最大値	0.003	0.010	0.195	0.064
最小値	N.D.	N.D.	N.D. ⁴⁾	N.D. ⁵⁾

1)ND:検出限界(0.005mg/L)以下。

2)供試ワイン31点中20点。3)31点中31。4)32点中16点。5)32点中10点。

表2 国産赤ワインにおけるフェノレ分析

	4-ヴィニルフェノール	4-ヴィニルグアイアコール	4-エチルフェノール	4-エチルグアイアコール
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
平均値	0.005	0.007	0.068	0.033
最大値	0.094	0.062	0.747	0.337
最小値	N.D.	N.D.	N.D. ²⁾	N.D. ³⁾

1)ND:検出限界(0.005mg/L)以下。

2)供試ワイン253点中108点。3)253点中101点。

示さないが、フェノレが検出されたサンプルからは、簡易検査キットを用いた解析から、高い菌数のブレタノマイセス酵母が検出された。

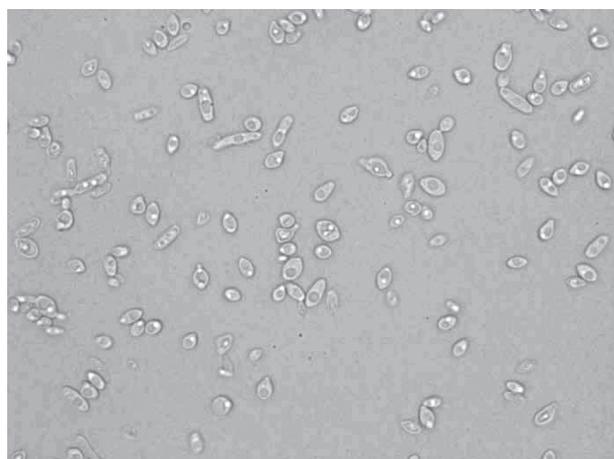


図1 Brettanomyces属酵母分離株 SK-01の光学顕微鏡写真(400倍で撮影)

表3 国産赤ワイン253点におけるエチルフェノール濃度の分布

	欧州系	非欧州系
	(本数)	(本数)
N. D.	46	62
検出限界以下~0.100mg/L未満	66	30
0.100 mg/L~0.200mg/L未満	12	10
0.200 mg/L~0.300mg/L未満	5	4
0.300 mg/L~0.400mg/L未満	7	1
0.400 mg/L~0.500mg/L未満	2	2
0.500 mg/L~0.600mg/L未満	0	1
0.600 mg/L~0.700mg/L未満	0	3
0.700 mg/L~	0	2
	138	115

3-2 国産市販赤ワインについての分析

市販国産赤ワイン 253 点の 4-エチルフェノールの平均値は 0.068 mg/L、4-エチルグアイアコールの平均値は 0.033 mg/L であった (表 2)。4-エチルフェノールが最も高かったもので 0.747 mg/L、4-エチルグアイアコールが最も高いもので 0.337 mg/L であった。この分析結果の 4-エチルフェノールにおける、品種グループ別の本数の分布を、表 3 に示す。欧州系と非欧州系ともに、0.100 mg/L 以下の極めて健全なものが、全体の約 80% を占めた。Chatonnet ら⁸⁾によると、4-エチルフェノール、4-エチルグアイアコールの閾値は、赤ワイン中においてそれぞれ、0.605 mg/L、0.110 mg/l (水中ではそれぞれ、0.130 mg/l、0.025 mg/l) とされている。一方で、山梨県ワイン鑑評会における審査員のコメントから判断すると、0.200 mg/L 以上の濃度で、フェノレを指摘する可能性が考えられた。0.200 mg/L 以上のサンプルは、欧州系および非欧州系ともに 10% 存在したが、非欧州系のサンプルには、高いフェノレ濃度を示すサンプルが多く存在した。これら高いフェノレ濃度を示すサンプルは、試料全体の平均 pH が 3.55 のところ、3.7 以上の高い値を示した。同じ遊離亜硫酸濃度であっても、pH が高いと殺菌効力をもつ分子状亜硫酸濃度が低くなることから、pH の管理が重要である可能性が示唆された。

なお、データには示さないが、フェノレが検出されたサンプルからは、簡易検査キットを用いた解析から、高い菌数のブレタノマイセス酵母が検出された。

比較対象として、無作為に選抜したボルドーワイン 10 点について、フェノレの調査を行った結果、4-エチルフェノールおよび 4-エチルグアイアコールの平均値は、それぞれ 0.142 mg/L、0.041 mg/L であった。

3-3 ワイン製造現場におけるフェノレ汚染調査

ワイン製造現場の樽から採取した 16 個のサンプルのうち、11 個のサンプルから高い濃度のフェノレが検出され、簡易検査キットを用いた検出から、高い濃度のブレタノマイセス属酵母が検出された。

3-4 ワイン製造現場からのブレタノマイセス酵母の分離とその性状調査

ワイン製造現場の樽から採取した 16 個のサンプルのうち、7 個のサンプルから、酵母を検出し、純粋分離した。分離された酵母は、いびつな卵型あるいは伸長した楕円の細胞形態を示した (図 1)。YM 平板培地を用いて培養した結果、クリーム色の滑らかな外観のコロニーを形成し、偽菌糸を形成した。液体培地では、産膜性は認められず、グルコースを発酵してガスを生産した。また、ブレタノマイセス酵母の選択培地として用いられる YNB 培地に良好に生育した。さらに、p-クマル酸とフェルラ酸を含んだ培地で増殖した結果、フェノレを生成した。以上のことから、本分離株は、ブレタノマイセス属酵母であると推定された。

分離ブレタノマイセス属酵母をもちいて、YP 培地と赤ワインを用いて、亜硫酸濃度に対する増殖性を調べた結果を、表 4 と表 5 に示す。いずれの培地を用いて検討

表4 YP培地におけるブレタノマイセス属酵母分離株SK-01の増殖性

4-1 pH3.5に調整した培地

pH	3.53	3.51	3.50	3.50	3.50
遊離亜硫酸(mg/L)	0	10	21	23	28
分子状亜硫酸(mg/L)	0.00	0.27	0.59	0.64	0.78
汚染酵母の増殖性	++	+	±	-	-

4-2 pH3.3に調整した培地

pH	3.33	3.31	3.29	3.33
遊離亜硫酸(mg/L)	0	10	17	24
分子状亜硫酸(mg/L)	0.00	0.43	0.76	0.98
汚染酵母の増殖性	++	+	-	-

表5 赤ワインにおけるブレタノマイセス属酵母分離株SK-01の増殖性

5-1 pH3.6に調整した培地

	3.63	3.53	3.60	3.63	3.61	3.62
遊離亜硫酸(mg/L)	0		11	20	32	41
分子状亜硫酸(mg/L)	0.00		0.22	0.37	0.62	0.78
汚染酵母の増殖性	++		+	±	-	-

5-2 pH3.3に調整した培地

pH	3.29	3.30	3.31	3.30
遊離亜硫酸(mg/L)	0	7	15	24
分子状亜硫酸(mg/L)	0.00	0.27	0.57	0.94
汚染酵母の増殖性	++	+	-	-

した場合でも、分子状亜硫酸濃度が 0.6 mg/L 付近以上で、その生育が阻害される結果が得られた。

4. 結 言

国内産市販赤ワインにおけるフェノレの定量分析と微生物検査を実施した。市販国産赤ワイン 253 点の 4-エチルフェノールの平均値は 0.068 mg/L、4-エチルグアイアコールの平均値は 0.033 mg/L であった。ワイン製造現場から、原因微生物を分離し、その性状を調べた。分子状亜硫酸濃度 0.6 mg/L 以上で、分離ブレタノマイセス属酵母の増殖抑制ができることを確認した。

参考文献

- 1) 篠原 隆：日本醸造協会誌，96，p.182-188 (2001)
- 2) Takashi SHINOHARA, Shinki KUBODERA and Fujitoshi YANAGIDA：Journal of Bioscience and Bioengineering, 90, p.90-97 (2000)
- 3) Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J-N, Pons, M.：J.Sci. Food Agric., 60, p.165 (1992)
- 4) 恩田 匠，小松 正和，：山梨県工業技術センター研究報告，No.25，p.139-141 (2011)
- 5) 恩田 匠，小松 正和，中山 忠博：山梨県工業技術センター研究報告，No.25，p.143-149 (2011)
- 6) 恩田 匠，小松 正和，中山 忠博：山梨県工業技術センター研究報告，No.26，p.131-135 (2012)
- 7) Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-de-Silva, M., malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.：J. Appl. Microbiol., 90, p.588-599 (2001)
- 8) Chatonnet, P., Dubourdieu, D. Boidron, J-N, Lavigne, V.：J.Sci. Food Agric., 62, p.191 (1993)