

# 甲州ワイン高品質化のための各種醸造技術の検証

小松正和・佐藤憲亮・恩田匠

## Verification of Winemaking Technics for High-Quality Koshu Wine

Masakazu KOMATSU, Kensuke SATO and Takumi ONDA

### 要 約

甲州ワインの高品質化や多様化する市場ニーズへの対応を目的として、本研究では、従来から行われている醸造技術の検証および新規技術の適用について検討する。今年度は、シュール・リー条件の違いにより、ワインの色調に差異が生じた。また、仕込み条件の違いにより、全フェノール含有量が 10 倍以上異なる甲州ワインを醸成できた。次に、甲州ブドウ果汁の自然発酵モロミから *Non-Saccharomyces* 属酵母の分離を試みた。さらに、LC/MS/MS 装置を用いて、ワイン中のオーク由来の複数成分を簡便に分析する手法を確立し、市販甲州ワインを樽使用有無で比較した。

### 1. 緒 言

経済連携協定をはじめ世界経済の自由化・円滑化が進むなか、国内のワイン消費が拡大する一方で産地間競争は激しさを増している。日本ワインを代表する甲州ワインは、近年、めざましい高品質化を遂げ海外への輸出も進んでいるが、本県ワイン産業が伸展するためには競争力を高める必要がある。

本研究では、今後の更なる高品質化や多様化する市場ニーズに対応すべく、従来から行われている各種醸造技術の検証や新規技術の適用について検討することを目的とした。従来技術の検証として、「シュール・リー中の甲州ワインの成分変化（以下、シュール・リー試験）」および「甲州ワインの醸造方法と熟成の関係調査（以下、醸造方法試験）」について、新規技術の適用として、「*Non-Saccharomyces* 属酵母が甲州ワインの酒質に与える影響（以下、*Non-saccharomyces* 属酵母の分離試験）」および「オークチップを用いた甲州ワイン醸造（以下、オークチップ試験）」について検討する。いずれの試験も 2 カ年計画で実施しており、本報では、初年度の試験結果について報告する。

### 2. 実験方法

#### 2-1 シュール・リー試験

シュール・リー法は、辛口甲州ワインの代表的な製法の 1 つである。1980 年代にフランスから大手ワイナリーにより本県に導入され、中堅ワイナリーに広く普及した。近年では、世代交代した小規模ワイナリーを中心に導入が進んでいる。本法は、アルコール発酵後にオリを含んだ状態で数ヶ月間タンク貯蔵する必要があり、この

期間の貯酒管理がワイン品質を左右する。老朽化した設備の小規模ワイナリーなど、貯蔵期間中のワイン品質への悪影響が懸念される。本試験では、小規模ワイナリーの製造環境を念頭に種々のシュール・リー条件を設定し、貯蔵期間における甲州ワイン中の成分変化を分析し、貯酒管理条件を最適化することにより品質向上を図る。

表 1 に、平成 30 年度の試験区を示す。温度制御ができないタンクや醸造量に合わないサイズのタンク等を想定し、貯蔵温度、攪拌頻度、酸化リスク等の異なる 11 種類の試験区を設定した。貯蔵期間の変化を把握しやすくするため、アルコール発酵終了後に分割することとした。詳細は次のとおり。

除梗破砕した甲州ブドウに酵素（Lafazym Press, Laffort 社, 40 ppm）を添加し、搾汁率 60%まで圧搾した。搾汁液に亜硫酸塩（SO<sub>2</sub> として 50 ppm のピロ亜硫酸カリウム）と発酵助剤（Nutrisutart, Laffort 社, 400 mg/L）を添加し一晩静置（デブルバージュ）した。上清にオリを加え NTU 150 に調整した後、上白糖（転化糖換算 21 度分）と酵母（VL2, Laffort 社）を加え、18°C一定でアルコール発酵した。残糖 1 g/L 未満を確認し、11 試験区に 5 L ずつ分割し、SL05 区以外は亜硫酸塩（SO<sub>2</sub> として 80 ppm）を添加し、SL01~06 および SL10~11 は約 6 L の容器に、SL07~09 は約 11 L の容器に、それぞれ充填した。SL11 は充填前に 0.8 μm のメンブレンフィルターでろ過した。各条件下で貯蔵、貯酒管理（攪拌（バトナージュ）等）を開始し、貯蔵期間中の成分変化を 1 か月ごとに分析した。このうち、430 nm および 530 nm の吸光度は、採取したワインを 0.2 μm の Dismic フィルタでろ過し、10 mm の透過セルを用いて

分光光度計（日本分光，V650型）で測定した。

表1 シュール・リー試験の試験区

試験区	シュール・リー条件
SL01	10℃，静置
SL02	18℃，静置
SL03	10℃，攪拌（月2回）
SL04	18℃，攪拌（月2回）
SL05	18℃，攪拌（月2回），SO <sub>2</sub> 無添加
SL06	10℃，攪拌（月2回），オリ増量
SL07	10℃，攪拌（月2回），HSあり
SL08	18℃，攪拌（月2回），HSあり
SL09	10℃，攪拌（月2回），HSありCO <sub>2</sub> 置換
SL10	4℃，攪拌（月2回）
SL11	4℃，オリなし（濾過後，満量貯蔵）

HS：ヘッドスペース，CO<sub>2</sub>：雪状ドライアイス，  
オリ増量：分割時のNTU2倍（NTU300）。

## 2-2 醸造方法試験

白ワイン用原料ブドウの多くは緑色果粒であるが，甲州ブドウは淡紫色の果皮をもつため，ワイン中のフェノール成分が多く長期熟成に向かないとされている。また，白ワイン用ブドウを‘かもし発酵’により果皮の色素を抽出して醸造したワインは，果皮や種に由来する色，香り，味わいをもついわゆる「オレンジワイン」として新スタイルワインとして世界中で注目されており，本県においても，‘甲州’を中心にオレンジワインを製品化するワイナリーが増加している。本試験では，長熟化や市場ニーズに対応した製品開発に資する知見を得ることを目指した。フェノール成分に着目した種々の仕込み条件（かもし発酵，スキンコンタクト，ハイパーオキシデーション等）を設定し，熟成過程における成分変化を分析した。

表2に，平成30年度の試験区を示す。3種類の甲州ブドウ（A：葦崎地区，BおよびC：勝沼地区）を用いて，仕込み条件や発酵条件の異なる7試験区を設定した。KJ01～03は，仕込み時の果汁処理条件が異なる。KJ01は，2-1項と同様に搾汁率60%の搾汁液を得た。KJ02は，KJ01と同じ搾汁液をハイパーオキシデーション処理（液面約80cmの高さから流速42L/minで2時間液循環させ強制酸化）した。KJ03は，酵素を添加した破碎果を10℃で5時間スキンコンタクト処理した後，2-1項と同様に搾汁した。KJ04～05は，搾汁液の採取区分が異なり，KJ04は搾汁前半の搾汁率0～60%のフリーラン区分。KJ05は搾汁後半の搾汁率69～75%のプレスラン区分の搾汁液を用いた。いずれも同一条件（21

度補糖，酵母VL2，18℃一定）でアルコール発酵させた。KJ06～07は，ブドウの産地や収穫日は異なるが，いずれも酵素，発酵助剤，亜硫酸塩を添加した破碎果に酵母（VL2）を添加し，20℃で5日間かもし発酵を行った。搾汁率65%で搾後，補糖し，18℃で液発酵を継続した。全試験区で，残糖1g/L未満で発酵を停止（SO<sub>2</sub>添加，冷却）し，酒石処理，オリ引き後，0.8μmのメンブレンフィルターでろ過し瓶詰した。ワインの色調（L\*a\*b\*およびL\*C\*h），吸光度（430nmおよび530nm）および全フェノールを分析した。色調および吸光度は，2-1項の吸光度と同様に，全フェノールは既報<sup>1)</sup>に示す方法を用いた。

表2 醸造方法試験の試験区

試験区	ブドウ・仕込み・発酵条件
KJ01	甲州A，通常仕込み
KJ02	甲州A，ハイパーオキシデーション
KJ03	甲州A，スキンコンタクト
KJ04	甲州B，フリーラン（搾汁率0～60%）
KJ05	甲州B，プレスラン（搾汁率69～75%）
KJ06	甲州C，かもし発酵（5日間）
KJ07	甲州A，かもし発酵（5日間）

## 2-3 Non-Saccharomyces 属酵母の分離試験

ワイン製造用に選抜された乾燥酵母（Saccharomyces属）は，簡素な醸造管理で酒質が安定したワインが製造できるため世界中で多用される一方で，画一的なワインになるとの指摘もある。近年，乾燥酵母を使用せず亜硫酸等を添加しない，いわゆる「自然発酵」をスタイルとする新規ワイナリーも増加している。Non-Saccharomyces 属酵母を用いた醸造技術は，多様化する現場や市場のニーズへの対応が期待されている。本試験では，もろみ中から各種酵母の分離検索を行うとともに，Non-Saccharomyces 属酵母が甲州ワインの酒質に与える影響等について科学的な知見を得ることを目的とした。

平成30年度は，「自然発酵もろみ」，すなわち搾して得たブドウ果汁に，亜硫酸および乾燥酵母を添加せずに発酵させたもろみからの，酵母菌株の単離と同定を試みた。平成30年8月15日に収穫したマスカット・ベリーA（以下MBA）1点および平成30年9月12日に収穫した甲州1点の果実を60%の搾汁率で搾し，室温（約25℃）で静置させて発酵を促した。果汁調整後0～2日後の発酵による気泡が生じていない時期を発酵初期，3～8日の激しく気泡を生じている時期を発酵中期，その後発酵が緩慢になり，気泡が少なくなった時期を発酵後期として，各時期にもろみを適宜採取して分離

源試料とした。

表3 酵母分離源果汁の一般成分

果汁	比重	糖度 (Brix)	総酸 (g/L)	pH
MBA <sup>1)</sup>	1.054	12.9	13.6	2.75
甲州	1.059	14.0	13.4	2.86

1) MBA：マスカット・ベリーA

分離源試料を適宜希釈し、クロラムフェニコールを0.1 g/L含有するポテトデキストロース寒天（以下PDA）培地（ニッスイ社製）に塗布し、25℃で1～2週間培養した。培地上に生育したシングルコロニーを釣菌し、新しいPDA培地にストリークし、25℃、1週間培養した。このとき生じたコロニー形状から、糸状菌あるいはバクテリアに由来すると推察されるものは除外した。この操作を繰り返し、酵母菌株を取得した。

取得した酵母菌株について、光学顕微鏡観察を行い、糖類の資化性試験による簡易同定を実施した。糖類の資化性は、培養同定・真菌キット（BIOMEREUX社製、API 20C AUX）を用い、The Yeasts（5th eds.）に記載の方法をはじめとした定法<sup>2)</sup>に従い、糖類の資化性および顕微鏡観察により簡易同定を実施した。糖類の資化性が不明瞭な菌株は同定不能とした。

#### 2-4 オークチップ試験

ワイン樽と同じオーク材の小片をワインに添加する本法は、安価かつ簡便な作業で、樽発酵・貯蔵ワインに類似したオークの風味を付与できるため、県内ワイン製造業者の関心は高いが酒税法上国内では使用できなかった。本試験では、同法改正より平成30年4月から使用が可能となったことから、甲州ワイン製造における本法の効果を科学的に検証することを目指す。

平成30年度は、オークチップを利用したワインを分析する前段の試験として、オーク由来の代表的な成分<sup>3)</sup>とされるβ-メチル-γ-オクタラクトン（ウイスキーラクトン）、シリングアルデヒド、バニリン、バニリン酸を分析対象とし、LC/MS/MS装置（Waters社、ACQUITY TQD）を用いて、一斉分析できる分析条件を検討した。和光純薬、東京化成またはSantaCruz Biotechnology社の分析用試薬を用いた。さらに、市販の甲州ワイン129点（うち、樽使用38点、樽不使用91点）を分析し、オーク由来成分の含量や比率について調べた。

### 3. 結果および考察

#### 3-1 シュール・リー試験

図1に、6か月間発酵容器で貯蔵した11試験区の430 nmおよび530 nmの吸光度を示す。

波長によらず、試験区間で吸光度に差異が認められた。吸光度の高い試験区のワインほど、黄褐色が濃く、貯蔵期間が長くなるにつれて濃さが増す傾向がみられた。

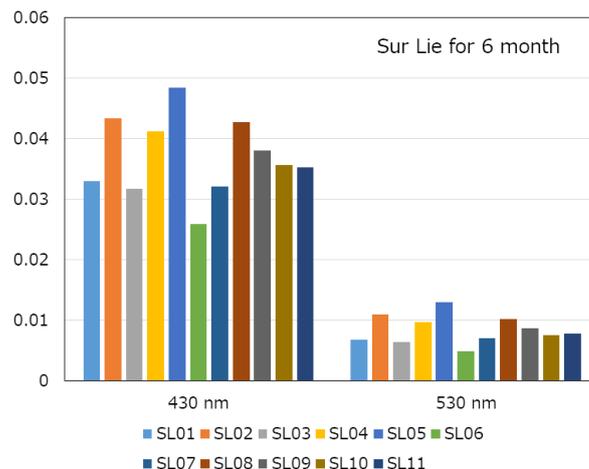


図1 6か月貯蔵した甲州ワインの吸光度

表4 仕込み・発酵条件の異なる甲州ワインの分析結果

試験区	色調					吸光度		全フェノール [mg/L]
	L*	a*	b*	C*	h	430 nm	530 nm	
KJ01	99.3	-0.4	4.3	4.3	95.4	0.043	0.010	263
KJ02	99.6	-0.9	3.9	4.0	103.3	0.040	0.002	118
KJ03	98.8	-0.4	6.0	6.0	93.9	0.058	0.013	329
KJ04	99.8	-0.3	2.3	2.3	97.0	0.015	-0.005	177
KJ05	95.0	-0.1	19.8	19.8	90.3	0.231	0.069	562
KJ06	97.1	-0.2	12.2	12.2	90.9	0.126	0.036	888
KJ07	95.0	2.7	13.6	13.8	78.7	0.165	0.076	1458

シュール・リー条件のうち、貯蔵温度、酸化リスク (SO<sub>2</sub> や CO<sub>2</sub>) およびオリ量は色調変化に影響を与えるが、攪拌 (パトナーージュ) は影響を与えない可能性が示唆された。今後は、成分分析や醸造試験を継続して、シュール・リー条件の最適化を目指す。

### 3-2 醸造方法試験

図 2 に、各試験区の外観写真を示す。甲州ブドウを原料として仕込み・発酵条件を変えることにより、緑がかった淡黄色から黄色味あるいは赤味を帯びたオレンジ色まで変化に富んだ色調の甲州ワインを醸成できることを確認した。



図 2 甲州ワインの外観写真  
(左から, KJ01, 02, 03, 04, 05, 06, 07)

表 4 に、色調 (L\*a\*b\*および L\*C\*h) , 吸光度 (430 nm および 530 nm) および全フェノールの分析結果を示す。KJ01 と KJ02 の比較から、ハイパーオキシデーションにより、緑がかった色調となったが、その要因がフェノール分の減少によるものと推察された。一方、KJ01 と KJ03 の比較から、スキンコンタクトでは、黄色みが増した色調となったが、その要因として果皮成分の抽出にともなうフェノール分の増加が考えられた。KJ04 と KJ05 の比較から、搾汁率の高い画分の果汁を用いると、褐色系の色調が濃さを増し、フェノール分も約 3 倍に増加した。データは示さないが、KJ04 と KJ05 の間の搾汁区分では徐々に色調が濃くなっており、原料果汁の搾汁率がワインの色調や味わいに与える影響は大きいと実感した。KJ06 と KJ07 はともにかもし発酵した甲州ワインであるが、色調には差異があり、KJ07 は赤みが強かった。フェノール分も多く、渋味などの味わいにも差異が出るものと推察される。今後、官能評価結果を加味した解析を実施したい。

### 3-3 Non-Saccharomyces 属酵母の分離試験

MBA および甲州原料の 2 種類の果汁を室温で発酵させた場合、多くは 3~5 日で発酵による気泡が観察された。その後発酵による気泡の形成が多い時期を発酵中期、発酵が緩慢になった時期を発酵後期として、それぞれの時期にもろみを採取し、分離操作に用いた。表 5 にもろみから取得した菌株の同定結果を示す。

MBA からは発酵初期から 6 株の酵母菌株が取得され、*Candida* 属酵母が 5 株、*Cryptococcus* 属酵母が 1 株と同定された。また発酵中期からは 7 株の酵母が取得され、*Saccharomyces* 属酵母 4 株、*Candida* 属酵母 1 株が同定され、同定不能菌株が 2 株取得された。発酵終期からは酵母 3 菌株が取得されすべて *Saccharomyces* 属酵母と同定された。甲州からは発酵初期には 10 菌株取得され、3 株が *Rhodotorula* 属酵母、3 株が *Candida* 属酵母と同定された。また発酵中期から後期にかけて 8 株の酵母が取得され、3 株が *Candida* 属酵母、3 株が *Saccharomyces* 属酵母、*Kloeckera* 属酵母 2 株と同定された。

表 5 単離同定した酵母菌株

分離源	採取時期	酵母菌株 <sup>2)</sup>	細胞形態	菌数
MBA <sup>1)</sup>	発酵初期	<i>Candida</i> sp.	球状	5
		<i>Cryptococcus</i> sp.	卵型	1
	発酵中期	<i>Saccharomyces</i> sp.	卵型	4
		<i>Candida</i> sp.	球状	1
		Unkwn <sup>3)</sup>		2
発酵終期	<i>Saccharomyces</i> sp.	卵型	3	
甲州	発酵初期	<i>Rhodotorula</i> sp.	桿状	3
		<i>Candida</i> sp.	卵型	3
		Unkwn		4
	発酵中期	<i>Candida</i> sp.	球状	3
		<i>Kloeckera</i> sp.	垂球状	1
		<i>Saccharomyces</i> sp.	球状	1
	発酵終期	<i>Saccharomyces</i> sp.	球状	2
<i>Kloeckera</i> sp.		垂球状	1	

- 1) MBA : マスカット・ベリー A
- 2) 酵母菌株 : API 20C AUX による同定結果
- 3) Unkwn : API 20C AUX で同定不能判定の菌株

今回の試験では、2 点の「自然発酵もろみ」サンプルでは発酵が進行するにつれて、*Saccharomyces* 属酵母が比較的高頻度で検出された。一般的に自然界からの *Saccharomyces* 属酵母の検出頻度は少ないことが報告されている<sup>4)</sup>。これは醸造環境中からの混入によるものと推察され、発酵が進行するとともに、もろみ中で優位

に増殖したものと推察される。

### 3-4 オークチップ試験

表 6 に、分析対象 4 成分を LC/MS/MS 装置を用いて同時分析するための主な分析条件を、図 3 に、標準物質各 1 ppm の分析結果 (MS クロマトグラム、縦軸の倍率は物質ごと異なる) を示す。各物質のリテンションタイム (以下、rT) は、バニリン酸が 3.68 min, バニリンは 4.33 min, シリンガアルデヒドが 4.51 min, cis-ウイスキーラクトンが 7.95 min, trans-ウイスキーラクトンが 8.11 min となり、良好な分離が得られたことが確認された。また、0.01~3.0 mg/L の濃度範囲では相関係数の高い検量線が作成でき、繰り返し再現性も高く、定量性に問題がないことが確認できた。

図 4 に、樽使用有無の異なる市販甲州ワインの分析結果例 (MS クロマトグラム、縦軸はオークラクトンのみ 0.1 倍に縮小) を、表 6 に、樽使用の有無で分類した市販甲州ワインの各成分の含有量平均値および濃度範囲を示す。

表 6 LC/MS/MS の分析条件

項目	内容															
カラム	CORTECS UPLC T3, 2.1×100 mm, 1.6 μm															
カラム温度	40°C															
注入量	3 μL															
送液速度	0.30 mL/min															
溶離液 A	水 95% : アセトニトリル 5% + 0.1%ギ酸															
溶離液 B	100%アセトニトリル + 0.1%ギ酸															
グラジェント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time[min]</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>0.1</td> <td>99.9</td> </tr> <tr> <td>9.00</td> <td>60.0</td> <td>40.0</td> </tr> <tr> <td>10.50</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>13.00</td> <td>0.1</td> <td>99.9</td> </tr> </tbody> </table>	Time[min]	%A	%B	0.00	0.1	99.9	9.00	60.0	40.0	10.50	95.0	5.0	13.00	0.1	99.9
Time[min]	%A	%B														
0.00	0.1	99.9														
9.00	60.0	40.0														
10.50	95.0	5.0														
13.00	0.1	99.9														
MS 条件	バニリン酸 : Ion Mode : ES-, MRM : 166.8 > 122.7 バニリン : Ion Mode : ES-, MRM : 150.9 > 135.9 シリンガアルデヒド : Ion Mode : ES-, MRM : 180.9 > 165.7 ウイスキーラクトン : Ion Mode : ES+, MRM : 157.0 > 96.8															

ウイスキーラクトン, シリンガアルデヒドおよびバニリンは、樽使用ワインにおいて非使用ワインと比較して高い濃度で検出されており、オーク由来成分の分析対象として適当であると確認された。一方、バニリン酸は、樽使用有無で濃度範囲に明確な差異はないことから、オーク由来成分ではなく、甲州ワインに含まれている成分であると考えられた。今後はオークチップを用いた甲州ワインを試験醸造し、オーク由来成分の分析を実施する予定である。

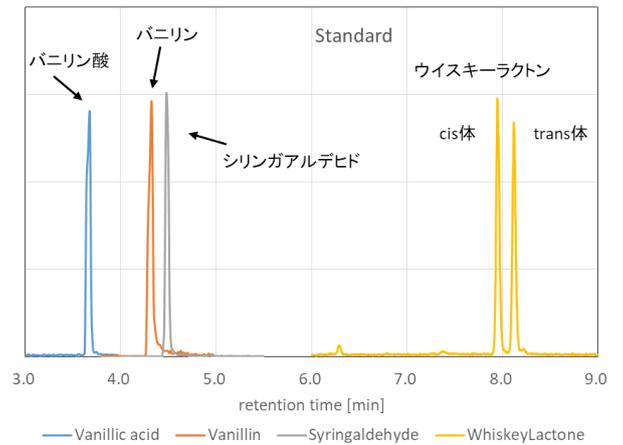


図 3 オーク由来 4 成分の標準物質

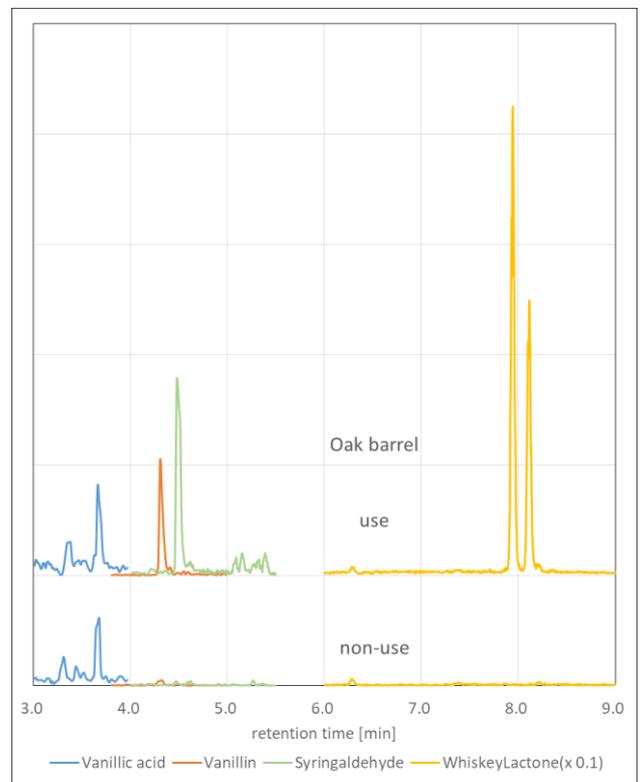


図 4 市販甲州ワインの分析例

表7 市販甲州ワインのオーク由来成分（平均値，単位：mg/L，括弧内は濃度範囲）

	cis-ウイスキー ラクトン	trans-ウイスキー ラクトン	シリング アルデヒド	バニリン	バニリン酸
樽不使用 (91点)	0.00	0.01	0.01	0.03	0.16
樽使用 (38点)	0.27 (0.02~0.87)	0.13 (0.01~0.40)	0.21 (0.01~0.63)	0.11 (0.00~0.63)	0.12 (0.06~0.19)

## 5. 結 言

今年度は、シュール・リー試験，醸造方法試験，*Non-saccharomyces* 属酵母の分離試験およびオークチップ試験の4試験を実施した。シュール・リー条件の違いにより，ワインの色調に差異が生じることを確認した。仕込み・発酵条件の違いにより，緑がかった淡黄色から黄色味あるいは赤味を帯びたオレンジ色まで変化に富んだ色調をもち，全フェノール含有量が10倍以上異なる甲州ワインを醸成できた。甲州ブドウ果汁の自然発酵モロミから *Non-Saccharomyces* 属酵母の分離を試み，採取時期により異なる菌株が取得された。LC/MS/MS装置を用いて，ワイン中のオーク由来の複数成分を簡便に分析する手法を確立し，市販甲州ワインを樽使用の有無で比較した。

## 参考文献

- 1) 小松正和，恩田匠，中山忠博，三宅正則，齋藤浩：山梨県における欧州系ブドウ品種の果実特性とワイン醸造技術に関する研究（第2報），No.27，pp.10-21（2013）
- 2) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Teun Boekhout：The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 2（5th eds）（2011）
- 3) P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu：Handbook of Enology, Vol. 2（2nd eds），pp.414-415（2006）
- 4) 後藤昭二：ブドウ酒醸造微生物学の進歩（1），日本醸造協会誌，80，pp.392-398