

甲州種白ワインにおける亜硫酸使用量の低減化

— 亜硫酸低減化ワインの酒質に及ぼす発酵温度及び使用酵母の影響 —

飯野 修一・中山 忠博・荻野 敏

Studies on The Reductive Use of SO₂ in White Wines using Grape 'Koshu'

— The Effects of Used Yeast and Fermentation Temperature to the Quality of Wines Produced without SO₂ —

Shuichi IINO, Tadahiro NAKAYAMA and Satoshi OGINO

要 約

亜硫酸無添加で製成した甲州種白ワインにおいて、香気は比較的良好であったが、味については発酵温度が30℃と高い場合、15℃の低温または亜硫酸添加で発酵した場合に比べて、評価は低く、酸化と雑味が指摘され、成分的にも、530nmに対する430nmの割合、即ち、褐変度が高かった。また、モロミにおける酵母純度や好気性バクテリアの生菌数における異常は認められなかったことから、味の劣化原因は酸化と思われた。さらに、使用酵母による酒質への影響については、我々が、既に造成した香気高生産性CE酵母は、かもし発酵すれば完全発酵し、製成ワインはエステルの香気が強く、香味に特徴が認められ、EC1118酵母使用ワインは最も良好な酒質を示した。なお、CE酵母は通常の液発酵ではアルコール7~9% (v/v)、エキス7~10g/100mLで自然に発酵が停止する不完全発酵性を有するので、この酵母を用いれば発酵停止に用いる多量の亜硫酸使用が不要となり、甘口ワイン醸造における亜硫酸使用量の低減化が期待される。

On the test white wines making without sulfur dioxide addition using Koshu grapes, all of wines produced had fairly good quality on flavour, but on taste the only wine which fermented at high temperature (30℃) was not good because of oxidative and unpleasent tastes. This wine had a little high browning degree (0.33 as the rate of 430 nm to 530 nm), the high purity of yeasts used on Moromi and less the number of aerobic bacteria. Therefore we drawed that the cauce of disorder on this wine was oxidation. Furthermore on the effect of yeast used, Moromi using CE yeast which hybridized by us before fermented completely by means of the fermentation on skins and seeds. On this wine as flavour of ester was very storong, this quality was very characterisics. And the wine produced by EC1118 strain showed the best quality. Furter the Moromi using this yeast by the fermentation without skins and seeds showed the imperfect fermentation on alcohol content of 7~9% (v/v) and extract of 7~10 g/100mL. Therefore the reductive use of SO₂ on the production of sweet wine is expected because the use of SO₂ in order to stop fermentation on the way become unnecessary by using this yeast.

1. 緒 言

最近、シユルリーや樽発酵、樽貯蔵などが行われ、甲州種白ワインの多様化が盛んである。さらに、消費者における健康志向の高まりから、県内ワインメーカーにおいては亜硫酸無添加ワインの製造が活発化している。しかしながら、通常、市販されている無添加ワインの酒質は必ずしも良好とは言えない。この酒質劣化の原因は、亜硫酸を使用しないので、酵母やバクテリアなどの野生微生物の繁殖や酸化、褐変などによる香味変化が考えられる。1995年に舟橋らは甲州種を用いて遠心分離による果汁の清澄や低温発酵を行いながら、亜硫酸無使用で醸造し、比較的良好なワ

インが得られることを報告している¹⁾が、野生酵母の検出や酒質劣化が予想される高温発酵での試験は行っていない。そこで、我々は、甲州種白ワインの仕込み時に亜硫酸を使用しない場合における発酵温度(30℃, 15℃)の違いが製成ワインの酒質に及ぼす影響を調べた。併せて使用酵母としてモロミ中で野生酵母の淘汰が予想されるキラーク酵母2菌株、即ち市販の乾燥酵母及び我々が既に造成したカブロン酸エチル高生産性酵母²⁾を用いた場合の香味への影響についても調べたので報告する。

2. 実験方法

2-1 原料ブドウ

平成12年10月5日に収穫した山梨県東山梨郡勝沼町産の甲州種ブドウを用いた。ブドウを破碎、除梗して得た果汁の成分を表1に示した。

2-2 醸造方法

表2に示した様に各種条件で仕込みを行い、亜硫酸を使用しない場合の酒質への影響を調べた。甲州種ブドウ27.5kgを破碎・除梗した後、その15kgを圧搾し、9Lの果汁を得た(圧搾率60%)。この1.5Lずつを乾熱殺菌した1.8L瓶2本に入れ、酒母としてのW-3酵母前培養果汁75mL(酒母歩合5%,v/v)及び砂糖113g(22%補糖)を添加して、発酵栓を付し、15℃及び30℃で発酵してそれぞれL-0区、H-0区とした。また、市販のEC-1118株(ラルバン社製)についても同様に行い、15℃で発酵し、これをL-0(K)区とした。なお、対照として、30℃発酵区分では亜硫酸添加のL-Sを設定し、これにはピロ亜硫酸カリウムを225mg/L(亜硫酸として75mg/Lに相当)添加し、5時間後に酒母W-3酵母を同様に添加した。一方、残りの破碎・除梗した果モロミ2.5kgずつ3本のポリバットに分取し、いずれも600mg/L濃度になるように5%ゼラチンを18mLずつ添加し、W-3酵母及び香気高生産性酵母(CE酵母)²⁾の前培養液を同様に添加し、15℃のかもし発酵を3日間行い、その後、モロミを小型圧搾機で搾汁が1.5Lになるように圧搾(圧搾率60%)、モロミを1.8L瓶に採取、発酵栓を付して、15℃で後発酵して、それぞれをLM-0区、LM-0(CE)区とした。なお、この時W-3酵母使用では対照として亜硫酸添加のLM-S区も行った。なお、ゼラチンは常法どおり50~60℃の熱水に溶解して5%(w/v)液としてから、よく攪拌してこれを添加した。発酵停止は、モロミの比重が0.995になった時(辛口)、4℃の冷蔵庫に移して行った。なお、CE酵母についてはW-3酵母を対照として解凍して加熱殺菌(65℃、30分間)した甲州種果汁

500mLずつを用いて液仕込みの発酵試験を同様に行った。仕込み区分を表7に示した。

2-3 分析方法

2-3-1 一般成分

比重、アルコール、エキス、総酸及び亜硫酸(ランキン法)は国税庁所定分析法³⁾によった。

2-3-2 Brix(屈折計示度)、pH、色調及び全フェノール

Brix(屈折計示度)はデジタル屈折計(Atago, DBX-50)、pHは堀場製作所のpHメーター(F-21)及び色調は島津製作所製分光光度計(UV-1200)で測定した。全フェノールはSingletonらの方法⁴⁾に準じて行った⁵⁾。

2-3-3 有機酸

有機酸は昭和電工(株)の高速液体クロマトグラムShodex LCを用いて分析し、分析方法は辻らの方法⁶⁾と同様に行った。なお、検出器は日立UV-VISL-7420を用いた。

2-3-4 高級アルコール、アセトアルデヒド及びエステル

ガスクロマトグラフィー法によった。即ち、高級アルコール及びアセトアルデヒドはSHINOHARAら⁷⁾及び清水ら⁸⁾の方法に準じた既報⁹⁾の直接注入法により行った。またエステルは溶媒抽出(濃縮)後、分析する篠原らの方法¹⁰⁾で行った。即ち、後者の分析は装置:島津GC-9A、カラム:20%PEG20M(クロモゾルブW, 3.1m)、カラム温度:70℃~210℃、4℃/minで試料2μLを注入して行った。

2-3-5 モロミにおける酵母純度及び好気性バクテリア生菌数の測定

酵母純度の測定は、使用した酵母がウイークキラー性またはキラー性を有するので、モロミから分離した30菌株についてキラー性の有無を既報¹¹⁾により、調べて、行った。また、好気性バクテリアの生菌数は、シクロヘキシミド添加の普通寒天培地使用の平板塗抹培養法により、30℃で7日間培養して調べた。

表1 甲州種ブドウの果汁成分

比重	1.066
比重換算糖度(g/100mL)	15.3
Brix	15.5
総酸(g/L,酒石酸として)	6.4
pH	3.30

1)10月4日収穫

表2 仕込み区分

区分	SO2添加	使用酵母	発酵温度	発酵方法
L-0	0	W-3	15℃	液仕込み
L-0(K)	0	EC1118	同上	同上
H-0	0	W-3	30℃	同上
H-S	75mg/L添加	W-3	同上	同上
LH-0	0	W-3	15℃	かもし発酵(*)
LH-0(CE)	0	CE	同上	同上
LM-S	75mg/L添加	W-3	同上	同上

1) 甲州種ブドウ、仕込み1.5L (*2.5kg)

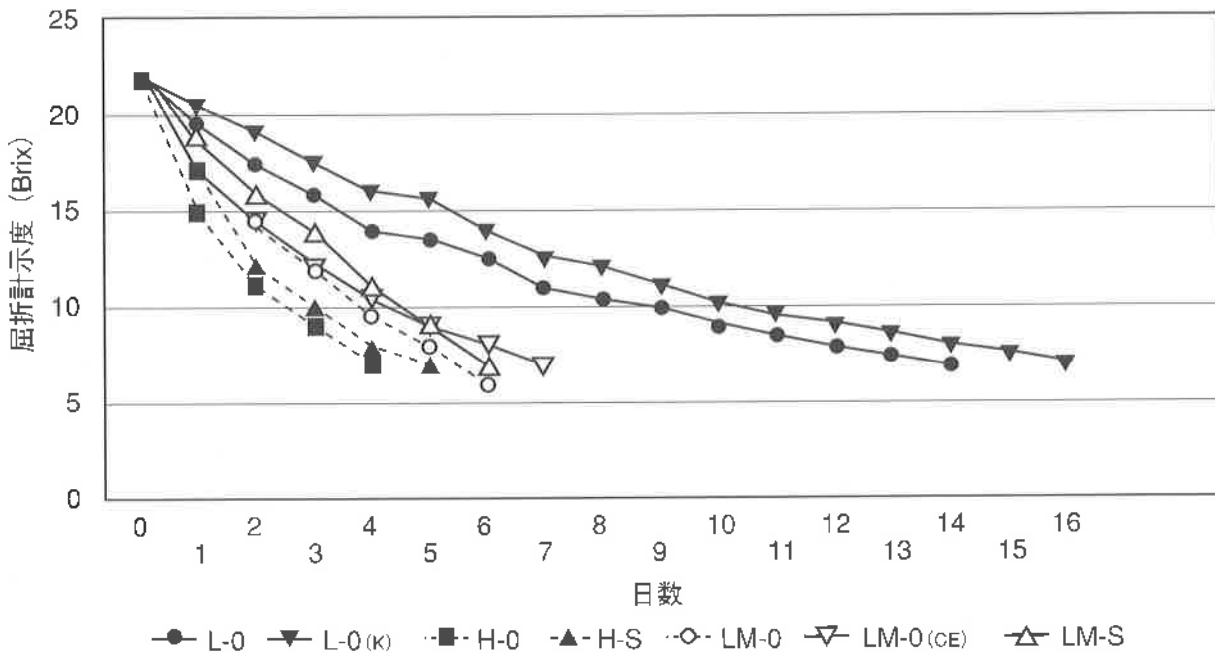


図1 発酵経過

2-3-6 官能審査

当工業技術センター支所ワインセンターの専門パネリスト3名で行った。

3. 結果及び考察

3-1 亜硫酸を使用しない場合における発酵温度や使用酵母の違いが製成ワインの酒質に及ぼす影響

3-1-1 発酵経過

モロミの発酵経過を図1に示した。いずれも発酵経過は順調であったが、発酵温度が高い場合、発酵経過は急速であった。即ち、比重が目標の0.995まで低下するまでのモロミ日数は、30℃発酵ではSO₂添加モロミのH-SはSO₂無添加モロミのL-0に比べて半日程度の遅れは認められたが、いずれのモロミも4日間と非常に短かった。また、15℃モロミでは、かもし発酵でも亜硫酸添加のLM-Sが、無添加のLM-0に比べて半日程度の遅れがあったが、いずれも6日間であった。一方、15℃発酵の液仕込みのL-0及びL-0(K)はそれぞれ15日と16日で通常のモロミ日数となった。香り高生産性酵母使用のLM-0(CE)モロミは15℃発酵であったが、後半にややもたついて、9日間を要した。このCE酵母(DLK14-C株)¹⁾は既存の報告^{14,15)}ではその親株が、不完全発酵を示しているが、今回行ったかもし発酵では、辛口まで発酵した。かもし発酵では果皮からの栄養成分が豊富なため、発酵が促進されることは既に報告している^{14,15)}。また、かもし発酵したワインはいずれも澱下がりが悪かった。この原因はかもし発酵中の攪拌を手で強行ったため、蛋白が果皮から過剰に抽出され、蛋白混濁したものと思われた。

3-1-2 モロミの酵母純度及び好気性細菌の生菌数

発酵が盛んである5日目におけるモロミの酵母純度を調べ、表3に示したが、いずれも100%で良好であった。即ち、W-3酵母使用のモロミのL-0、H-0及びH-Sから分離したそれぞれ32、32及び27菌株はすべてW-3酵母の形質であるウイークキラーを示し、またEC1118株使用のモロミL-0(K1)及びEC株使用のモロミL-0(CE)からのそれぞれ30菌株及び25菌株はいずれもキラー性を示した。また、好気性細菌生菌数は発酵中を通じて1mL当たり10⁴個以下であり、急激な増加は認められなかった。なお、好気性細菌生菌数は、この時、シクロヘキシミド添加の普通寒天培地使用の平板塗抹培養法により調べたが、出現したコロニーが塊になることが多く、詳細な計数は困難であり、検討を要する。船橋ら¹⁶⁾も、清澄果汁で低温発酵を行えば、発酵中の酢酸菌及び乳酸菌の汚染は少ないことを報告している。

表3 発酵モロミの酵母純度と好気性細菌生菌数

区分	酵母純度1)		好気性細菌生菌数2)
	約菌数	酵母純度	
L-0	32	W-3酵母100%	10 ⁴ CFU/mL以下
L-0(K)	30	EC1118酵母100%	同上
H-0	32	W-3酵母100%	同上
H-S	27	同上	同上
LH-0	25	同上	同上
LH-0(CE)	25	CE酵母100%	同上
LM-S	31	W-3酵母100%	同上

1) 検出方法：W-3酵母（ウイークキラー）、EC1118酵母とCE酵母（キラー）が否か感受性酵母と交叉培養して確認

2) シクロヘキシミド添加の普通培地で平板培養

3-1-3 製成ワインの成分

発酵終了時の製成ワインの一般成分を表4に示した。いずれも辛口に揃っていた。成分的に違いが認められたのは褐変度であり、30℃発酵で亜硫酸無添加のH-0は0.33で、新酒の白ワインとしてはやや高い値であり、酸化が進行していることが伺われた。また、全フェノールは亜硫酸添加のH-S及びLM-Sで含量がやや多いので、亜硫酸使用により酸化が抑制され、フェノール物質の沈降が少なかったとも推察された。次に、有機酸組成を表5に示したが、酢酸量及び乳酸量はいずれも少なかったもので、亜硫酸使用の有無に関わらず酢酸菌及び乳酸菌の強い汚染はなかったことになる。香気成分量を表6に示した。野生酵母が増殖すると酢酸エチルやアセトアルデヒドが多量になり、好ましくな

いことが知られている¹⁴⁾が、両成分はいずれも少なかった。イソアミルアルコール及びイソブタノールは15℃発酵のいずれも200mg/L前後であったが、30℃発酵(H-0, H-S)では亜硫酸使用の有無に関わらず、300mg/L前後に達しており、雑味の増加が予想された¹⁴⁾。エステルである酢酸イソアミル、カプロン酸エチル(EtC6)、カプリル酸エチル(EtC8)及びカプリン酸エチル(EtC10)については15℃発酵でW-3酵母使用のL-0が最も多かったが、H-0, H-S, L-0(K)では少ないことから、発酵温度や使用酵母の影響が認められ、また、かもし発酵ワインのいずれも少なかった。なお、LM-0(CE)はEtC6が特に多く(2.6mg/L)、CE酵母使用の特徴が明らかに認められた。

3-1-4 製成ワインの官能審査結果

図2及び図3に、各々の製成ワインにおける香り及び味の評価(信頼区間95%)を示した。いずれも香気は比較的良好であったが、味については信頼区間が狭く、明らかに評価の低いH-0及びLM-0が認められた。H-0は、酸化と雑味が指摘されたが、前述のように成分的に褐変度がやや高かった。発酵経過は急速であり、イソアミルアルコールが多く、これも雑味を与えていると思われる¹⁴⁾が、味が良好であったH-Sでも、その量は同程度であったことから、劣化の原因は、官能審査でも指摘された様に、酸化の進行によるものと推察された。30℃と高温であった上に亜硫酸を使用しなかったもので、フェノール物質の酸化が急速に進行したものと思われた。低温の15℃発酵のL-0及びL-0(K)は、良好な評価で

表4 製成ワインの成分

区分	S.G	ALc. %v/v	E.x g/dL	pH	T.A g/L	色調(吸光度)			T.F mg/L
						430nm	530nm	褐変度 1)	
L-0	0.994	12.0	2.71	3.26	5.0	0.051	0.012	0.24	162
L-0(K)	0.994	12.0	2.71	3.23	5.6	0.068	0.018	0.26	202
H-0	0.995	11.6	2.86	3.22	5.9	0.057	0.019	0.33	197
H-S	0.994	11.4	2.52	3.23	6.4	0.057	0.012	0.21	224
LM-0	0.994	10.4	2.24	3.47	5.5	0.182	0.058	0.32	195
LM-0(CE)	0.996	10.0	2.63	3.41	5.7	0.166	0.054	0.33	157
LM-S	0.996	10.0	2.63	3.44	5.0	0.173	0.056	0.32	215

S.G.(比重), ALc.(アルコール), Ex(エキス), TA(総酸), T.F(総フェノール)
1) 530nm/430nm

表5 製成ワインの有機酸組成

区分	乳酸 g/L	リンゴ酸 g/L	酢酸 g/L	酒石酸 g/L	コハク酸 g/L	クエン酸 g/L	合計 g/L
L-0	0	1.75	痕跡	1.66	0.90	1.06	5.37
L-0(K)	0	1.88	0.43	1.89	1.05	1.03	6.28
H-0	0.26	1.94	0.22	1.96	1.07	0.71	6.16
H-S	0.30	1.93	0.27	1.77	1.01	0.75	6.03
LM-0	0	1.74	0	1.48	1.14	1.19	5.55
LM-0(CE)	0.35	2.12	0	1.51	1.18	1.16	6.32
LM-S	0	1.68	0	1.38	1.10	1.21	5.37

表6 製成ワインの香気成分組成

区分	高級アルコール			エステル					AcH mg/L
	i-AmOH	i-BuOH	n-PrOH	EtOAc	AmOAc	EtC6	EtC8	EtC10	
	mg/L			mg/L					
L-0	222	35	12	42	4.8	1.1	4.3	1.6	19
L-0(K)	192	20	34	50	0.6	0.6	2.2	0.7	48
H-0	324	69	13	35	3.6	0.4	1.5	0.3	13
H-S	286	49	13	60	2.9	0.3	1.5	0.2	35
LM-0	200	47	31	43	1.5	0.3	0.8	0.5	24
LM-0(CE)	198	28	27	43	1.5	2.6	2.0	0.6	23
LM-S	179	41	25	40	0.9	0.3	0.8	0.9	12

1) i-AmOH(イソアミルアルコール) i-BuOH(イソブタノール) n-PrOH(ノルマルフロパノール)
EtOAc(酢酸メチル) AmOAc(酢酸イソアミル) EtC6(カプロン酸エチル) EtC8(カプリル酸エチル)
EtC10(カプリン酸エチル) AcH(アセトアルデヒド)

あった。舟橋らも、清澄果汁の使用と低温発酵を行い、比較的良好的なワインを得られることを報告している¹¹⁾。L-0 (K) 即ち、EC-1118株酵母使用のワインは味の評価が最も高く、ノルマルプロパノール¹⁴⁾及び酢酸エチル^{14), 15), 16)}が多いことから、これらの成分による味への好影響も考えられた。また、酢酸イソアミル、カブロン酸エチル、カプリル酸エチル及びカブリン酸エチル含量はいずれも少なかった。また、かもし発酵ワインはいずれも蛋白混濁しており、官能審査時に、ゼラチンを1,200mg/Lと多く添加して清澄したためか、M-0の味の評価は味が薄いことで評価が落ちたが、我々が造成した既存の香気高生産性酵母CE株使用のLM-0 (CE) はカブロン酸エチルが2.6mg/Lで、エステル香気が顕著に高く(表6)、香味は特徴的で香味の評価は高まった。なお、亜硫酸を使用したLM-SはLM-0と比較してEtC10がやや多く、官能評価では香味は良好であった。

3-2 CE酵母の液仕込み発酵

CE酵母 (DLK14-C株)²⁾ は既存の報告^{12), 13)} ではその親

株が、不完全発酵を示している。加熱殺菌果汁を用いた通常の液仕込みにおけるCE酵母使用モロミの発酵経過を図4に示した。W-3酵母使用で完全発酵したのに対して、CE酵母使用では25℃発酵及び15℃発酵でそれぞれ6日目と16日目に発酵は、いずれも自然に停止した。その時の製成ワインの一般成分と香気成分について表7に示した。W-3酵母使用ではいずれの発酵温度でもアルコール13%(v/v)、エキス2g/100mL以下であったが、CE酵母使用のモロミでは不完全に発酵し、アルコール7~9%(v/v)、エキス7~10g/100mLとなった。香気成分のカブロン酸エチルは5mg/L前後と非常に多く、官能的にも特徴ある香気であった。

従って、CE酵母を使用すれば、甘口のワイン製造で発酵停止に用いる多量の亜硫酸使用が不要となる。また、CE酵母はキラー性を有するので、製成ワインは低アルコールの甘口であり、亜硫酸を使用しなくても、野生微生物による再発酵や産膜病が起こりにくいと思われるが、できれば低温貯蔵や早期の加熱殺菌処理が望まれる。

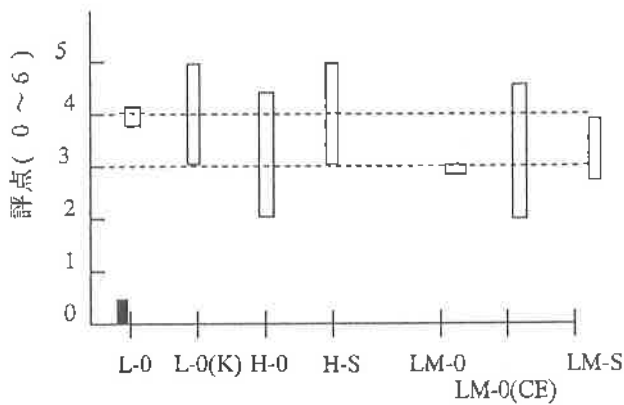


図2 製成ワインの香の評価

0 (不可)、1~2 (可)、3~4 (良)、5~6 (優)
信頼区間 (信頼度95%)、専門パネリスト3名

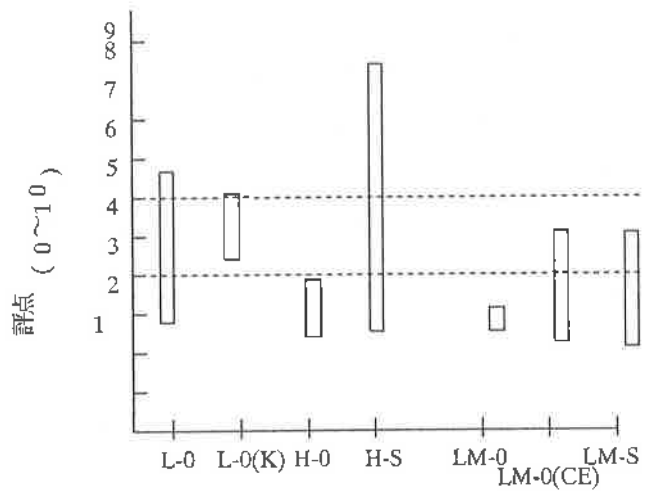


図3 製成ワインの味の評価

0 (不可)、1~3 (可)、4~6 (良)、7~8 (優)、9~10 (秀)
信頼区間 (信頼度95%)、専門パネリスト3名

表7 不完全発酵性CE酵母使用による製成ワインの成分

使用酵母	発酵温度	発酵日数	S.G	ALc %(v/v)	Ex g/100mL	高級アルコール			エステル			
						i-AmOH	i-BuOH	n-prOH	EtOAc	AmOAc	EtC6	AcH
CE	25C	6	1.016	8.8	7.46	118	15	13	10	0.9	4.5	54
	15	16	1.026	7.6	9.57	129	12	13	13	1.4	5.8	55
W-3	25	7	0.988	13.1	1.46	367	62	8	40	3.9	0	29
	15	20	0.988	13.2	1.48	249	37	9	23	4.5	0.1	39

1) 略号: S.G (比重), ALc (アルコール), EXx (エキス), その他は表6を参照
2) 仕込み容量: 500mL, 加熱殺菌甲州種果汁を使用。

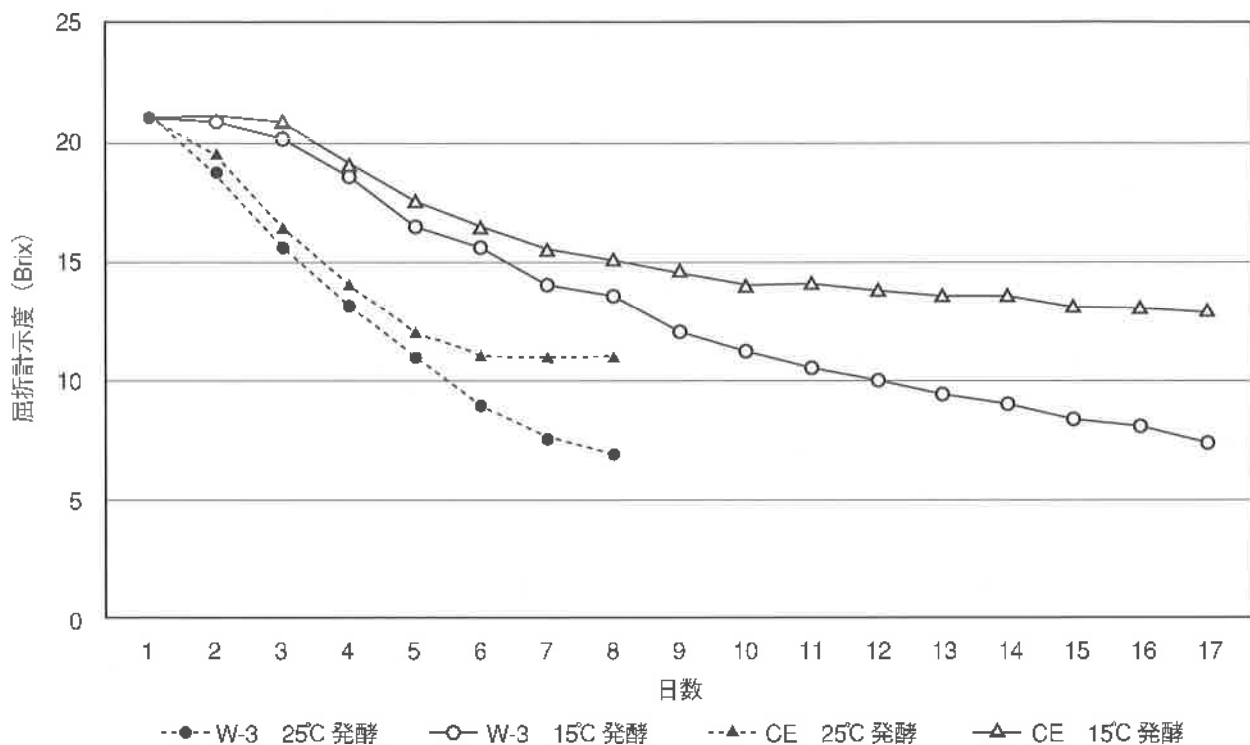


図4 CE酵母使用モロミの発酵経過

4. 結 言

亜硫酸無添加で製成した甲州種白ワインにおいて、香気は比較的良好であったが、味については30℃と発酵温度が高い場合、15℃と低温で発酵した場合に比べて、評価は低く、酸化と雑味が指摘された。成分的にも、530nmに対する430nmの割合、即ち、褐変度が高く、発酵中における酵母純度や好気性バクテリアの生菌数における異常は認められなかったことから、味の劣化原因は酸化と思われた。従って、亜硫酸使用量の低減化にあたっては、最も酸化に注意することが必要であり、15℃前後の低温で発酵するか、果汁の段階でフェノール物質の除去を行う等が有効と思われた。また、我々が、既に造成した香気高生産性CE酵母は、かもし発酵では完全発酵し、その製成ワインはエステルの香気が強く、香味に特徴が認められた。なお、このCE酵母は通常の液発酵ではアルコール7～9% (v/v)、エキス7～10g/100mLで自然に発酵が停止する不完全発酵性を示すので、この酵母を用いれば発酵停止に用いる多量の亜硫酸使用が不要となり、甘口ワイン醸造における亜硫酸使用量の低減化も期待できる。

参考文献

- 1) 舟橋 章, 桑原秀夫, 菊池 敬: ASEV Jpn. Rep., 6 (3), 226 (1995)
- 2) 飯野修一, 乙黒親男, 恩田 匠, 後藤昭二: 山梨工技セ研究報告, 10, 84 (1996)
- 3) 日本醸造協会編: 国税庁所定分析法注解 (1974)
- 4) Singleton, V.L, Rossi, J.A.Jr: Am. J. Enol. Vitic. 16, 144 (1965)
- 5) 山梨県工業技術センター編: 葡萄酒醸造法, 79 (2000)
- 6) 辻 政雄, 原川 守, 中山忠博, 荻野 敏: 山梨工技セ研究報告, 8, 46 (1994)
- 7) T. Shinohara and M. Watanabe: Agric. Biol. Chem., 40, 2475 (1976)
- 8) 清水純一, 渡辺正澄: 園学雑, 50, 386 (1981)
- 9) 飯野修一, 小宮山美弘: 山梨工技セ研究報告, 5, 69 (1991)
- 10) 篠原 隆, 川本康裕, 柳田藤寿: 醸協, 93 (3), 215 (1998)
- 11) S. GOTO, K. KITANO and T. SHINOIARA: J. Ferment. Bioeng., 73, (1) 70 (1992)
- 12) 飯野修一, 乙黒親男, 恩田 匠, 後藤昭二: 山梨工技セ研究報告, 9, 87 (1995)