

# 赤ワイン製造工程におけるフェノレ原因微生物の発生防止法の確立

恩田 匠・小松 正和 (ワインセンター)

## Technical Development of Prevention of Contamination with Phenolic Off-flavors Producing Yeast on Red Wine Making

Takumi ONDA and Masakazu KOMATSU (Wine Center)

### 要 約

ワイン製造現場におけるフェノレの発生源を調べ、分離されたフェノレ原因菌の同定試験を行い、フェノレ原因菌の除去方法について検討した。フェノレ原因菌の発生源を調べた結果、それが原料ブドウに由来し、製造工程では樽貯蔵工程中に汚染が蓄積されることが分かった。この樽におけるフェノレ原因菌の除去に有効な澱下げ方法について検討した結果、キトサン系の澱下剤が有効であることが分かった。さらに赤ワインの仕込みにおいて、酸度管理と亜硫酸の適正利用を行うことにより、フェノレ発生のないワイン製造を実現できることを実証した。

### 1. 緒 言

近年、本邦の赤ワイン製造において、品質劣化の原因である「フェノレ」<sup>1~11)</sup>と呼ばれるオフフレーバー(異臭)の発生防止が急務となっている。我々は、既に本邦におけるフェノレの発生頻度を明らかにし、原因菌の発生防止方法について検討を行ってきた。本研究では、ワイン製造現場におけるフェノレの発生源を調べ、分離されたフェノレ原因菌の同定試験を行い、フェノレ原因菌の除去方法について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 フェノレ生成酵母の検出と定量

製造現場におけるフェノレ生成酵母の検索と菌数測定には、市販の市販拭き取り検査器具(ふきふきチェック、栄研器材社製)と、ブレタノミセス属酵母検出キット(EASY SNIFF *Brettanomyces* Detection, UNITECH SCIENTIFIC CALIFORNIA 社製)を用いた。

#### 2-2 フェノレの定量

赤ワインのフェノレ(4-エチルフェノールおよび4-エチルグアイアコール)の定量は、既報<sup>8~10)</sup>に従って行った。

#### 2-3 酵母の同定試験

酵母の同定試験は、The Yeast(第5版)<sup>12)</sup>に記載の方法をはじめとした定法<sup>13~15)</sup>に従って実施した。

また、酵母の遺伝子レベルの同定試験として、26S rDNA 配列(LSU rDNA の D1/D2 領域の塩基配列に基づく解析)を調べ、国際塩基配列データベース

(GenBank/DDBJ/EMBL)を用いて解析を行った。

#### 2-4 澱下実験

YM 液体培地に生育させたブレタノミセス属酵母分離株の培養液に、各種澱下剤を各種の濃度で添加し、10日間 15℃で放置した後に澱引きし、得られた上清および澱の酵母を評価した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1 ワイン製造工程におけるフェノレ原因微生物 (ブレタノミセス属酵母)の発生源の特定

赤ワイン製造工程におけるブレタノミセス属酵母の発生源の特定を目的として、ワイン製造現場において、収穫した原料ブドウから、製品に至るまでの、各段階の様々なサンプルからのブレタノミセス属酵母の検索を実施した。

まず、ワイン原料ブドウから調製した果汁 41 サンプル(7品種, 4圃場)からブレタノミセス属酵母の検索を行った。その結果、集積培養により、10 サンプルから当該酵母が検出された。このことから、ワイン原料ブドウには、生菌数は低いものの、ブレタノミセス属酵母が広く分布することが明らかになった。

次に、ワイン製造現場における各種の製造設備から当該酵母の分離を行った。衛生管理が十分に実施されている製造現場では、除梗破砕機や圧搾機、発酵タンクなどの設備からはブレタノミセス属酵母が検出できなかった。しかしながら、樽貯蔵熟成工程の樽中のサンプルから、高い頻度で当該酵母の生存が検出された。一企業におけ

表1 ワイン製造現場における赤ワイン試料のフェノレとブレタノミセス属酵母菌数

サンプル No	4EP	4EG	ブレタノミセス属 (個/ml)
	( mg/L)		
1	0.31	0.08	10の6乗個
2	ND	ND	10の6乗個
3	0.07	0.02	10の5乗個
4	0.02	0.01	不検出
5	0.01	0.01	不検出
6	0.04	0.01	10の4乗個
7	0.27	0.07	10の5乗個
8	0.06	0.02	10の5乗個
9	0.01	0.01	不検出
10	0.01	ND	不検出
11	ND	ND	不検出
12	0.01	ND	不検出
13	ND	ND	不検出
14	0.01	ND	不検出
15	0.01	ND	10の5乗個
16	0.01	ND	不検出
17	ND	ND	不検出
18	0.04	ND	不検出
19	ND	ND	不検出
20	ND	ND	不検出
21	ND	ND	不検出
22	ND	ND	不検出

4-EP; 4-エチルフェノール,  
4-EG; 4-エチルグアイアコール

る製造現場での解析結果を表1に示す。併せて、液体クロマトグラフ-質量分析計を用いた解析を行った結果、フェノレ（4-エチルフェノール、4-エチルグアイアコール）を検出された（表1）。

以上のことから、衛生管理が十分に実施されている製造現場においても、(i)原料ブドウの搬入とともに、当該酵母が持ち込まれていること、(ii)製造設備の衛生管理を徹底することで、当該酵母は除去が容易であること、(iii)製造工程における最も汚染頻度が高いのは、樽貯蔵熟成に用いる樽の内部であることなどが明らかとなった。すなわち、原料調製を行う仕込み工程と樽熟成工程の当該酵母の除去が可能であれば、フェノレ発生のない赤ワイン製造が可能であると考えられた。

一方で、今回の研究の中で、一部の製造現場由来の赤ワインの新酒（樽熟成を行わないもの）からフェノレが検出される場合があることが明らかになった。さらに、一部の製造現場において、アルコール発酵工程におけるタンク内のもろみから、ブレタノミセス属酵母を検出した。これは、発酵タンクに木材などが使用されていたことから、当該酵母が汚染、蓄積された結果であることが

推察された。このことから、これまで発生例のなかった、アルコール発酵工程でブレタノミセス属酵母が増殖する可能性があることが初めて明らかになった。ワイン製造には、木材など完全な洗浄・除菌が困難な資材は用いないことも重要であると考えられた。

### 3-2 フェノレ生成酵母の同定試験

本研究で分離された汚染酵母は、その表現形質からブレタノミセス属酵母であるものと推定した。26S rDNA配列解析の結果から、ブレタノミセス・ブルセレンシス (*Brettanomyces bruxellensis*; デッケラ・ブルセレンシス; *Dekkera bruxellensis* の不完全世代)<sup>6)</sup> であることを明らかにした（図1）。このことから、本研究が、本邦において、ブレタノミセス・ブルセレンシス汚染を確認した初めての例となった。

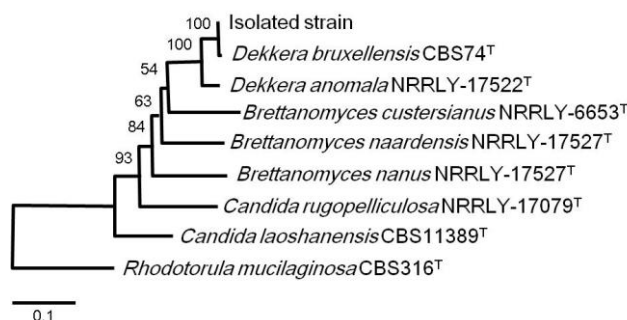


図1 分離したブレタノミセス属酵母 SK-01 株の系統樹

### 3-3 ワイン製造設備のブレタノミセス属酵母の除去

#### (I)製造設備からのブレタノミセス属酵母の除去

除硬破砕機や圧搾機、サーマルタンクなどは、一般的な洗浄を行うことで、汚染微生物を容易に除去できることを、設備の拭き取り試験などにより確認した。

一方で、製造工程で最も衛生管理が困難な設備は、樽であることが分かった。この樽の洗浄には、いくつかの方法が提唱されている。本研究では、フランスの樽メーカー（Seguin Moreau 社）での調査を行い、ブレタノミセス属酵母汚染除去に最も効果的と考えられている、専用設備を用いた樽洗浄のための手法に関する情報を得た。本方法を参考として、各種条件での樽の洗浄実験を行った。すなわち、分離ブレタノミセス属酵母 SK-01 株の培養液（YPD 液体培地で生育させた培養液;10の6乗個/g）を樽（28.5L）に約80%容量になるように添加し、2ヶ月常温で放置した。その後、各種条件で、専用設備（H.S. HD Flex, MOOG 社製）を用いた洗浄実験を行った。すなわち、専用設備による常温の水洗浄（数回繰り返す）、80℃の温水を用いて圧力洗浄（約80 bar, 15

表2 液体培地におけるキトサン系澱下剤NBIの添加のプレタノミセス属酵母菌の除去効果

	キトサン系澱下剤添加濃度 (g/L)						
	0.01	0.03	0.05	0.07	0.08	0.1	0.15
上清	+ 1)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
沈殿(澱)	+ 2)	+ 2)	+ 2)	+ 2)	+ 2)	+ 2)	N.D.

N.D.:不検出, +:検出, 1)10の2乗個/g以下, 2)澱を直接培地に添加して生育の有無を評価した。

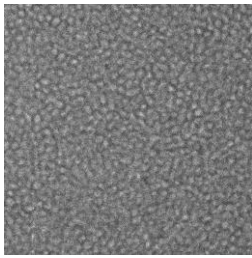


図2 赤ワイン樽熟成工程中の澱の蛍光顕微鏡写真

分間), 蒸気処理 (10 分間) を行った。その結果, プレタノミセス属酵母が有効に除去できることを確認した。

樽の利用, 洗浄・メンテナンス方法については, 本邦における情報が乏しいのが実情である。本研究で得られた知見をさらに製造現場で検証し, 実用化していく必要がある。

(2)澱下剤を用いた樽内の赤ワインからのプレタノミセス属酵母の除去

酒税法の範囲内で利用可能な亜硫酸塩添加以外の化学的処理について検討した。特に, 樽熟成工程における当該菌の除去が重要であることから, 各種の澱下剤の効果について調べた。YM 液体培地に生育させたプレタノミセス属酵母分離株の培養液に, 各種澱下剤を各種の濃度で添加し, 1 週間 15°C で放置した後の, 上清の酵母菌数を評価した。その結果, 実験室レベルでの実験から, 澱下剤として利用可能なキトサン系の製剤 NBI (Lallemand 社製) が, プレタノミセス属酵母の除去実験に有効であることが分かった。このとき, NBI 0.03g/L 添加以上の澱下げ後の上清には, プレタノミセス属酵母が検出されなくなることを確認した (表 2)。さらに, 澱下剤を 0.15g/L 添加した場合, 沈殿した澱からもプレタノミセス属酵母が検出されなかった。これは, 澱下剤に含まれるキトサン成分の抗菌力によるものと考えられた。また, 赤ワイン製造現場において, 樽熟成工程中の赤ワインの澱下げの実証実験 (NBI 0.07g/L 添加) を行った結果, 有効にプレタノミセス属酵母が沈殿,

除去できることを確認した。澱下げされた澱について, 共焦点スキャナーユニット顕微鏡システムを用いた観察により, プレタノミセス属酵母の細胞を確認した (図 2)。本澱下剤の効果については, 今後も長期的に確認試験を行っていく必要がある。なお, 澱下げ後のワインは, 官能的な面での影響は認められなかった。

#### 4. 結 言

フェノレ原因菌の発生源を調べ, それが原料ブドウに由来し, 製造工程では樽貯蔵工程中に汚染が蓄積されることが分かった。この樽におけるフェノレ原因菌の除去に有効な澱下げ方法について検討した結果, キトサン系の澱下剤が有効であることが分かった。さらに赤ワインの仕込みにおいて, 酸度管理と亜硫酸の適正利用を行うことにより, フェノレ発生のないワイン製造を実現できることを実証した。

#### 謝 辞

蛍光顕微鏡観察において, 技術のご支援をいただきました。繁富英治助教授に御礼申し上げます。

本研究は, 独立行政法人 科学技術振興機構 平成 24 年度研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) フィージビリティ・ステージ 探索タイプ採択課題 (AS242Z02860N) として実施しました。

#### 参考文献

- 1) Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D.: 8.4.1 Les phénols volatils responsables des certaines déviations olfactives de type <phénolé> des vins, *Traité d'oenologie Tome 2 - Chimie du vin, Stabilisation et tritements* 5e edition (Dunod, Paris), p.307-324 (2004)
- 2) Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-N., Pons, M.: The origin of ethylphenols in wines. *J.*

- 3) Licker, J. L., Acree, T. E. and Henick-Kling, T.: What is "Brett" (Brettanomyces) Flavor?: A preliminary investigation, ACS Symposium Series (American Chemical Society), 714, 96-115 (1999)
- 4) Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. and Calderón, F.: The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: A review, Food Chemistry, 102, 10-21 (2007)
- 5) 篠原隆: ワインのフェノール性異臭の成因について, 日醸協誌, 96, 182-188 (2001)
- 6) Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.: Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera Dekkera/Brettanomyces, J. Appl. Microbiol., 90, 588-599 (2001)
- 7) Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Sefton, M. A.: Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine, J. Chromatogr A, 31, 101-109 (2000)
- 8) 恩田匠・小松正和: 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 (第1報), 山梨県工業技術センター研究報告, 25, 139-141 (2011)
- 9) 恩田匠・小松正和: 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 (第2報), 山梨県工業技術センター研究報告, 26, 89-92 (2012)
- 10) 恩田匠・小松正和: 国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバーの発生頻度, 日食保蔵誌, 39, 343-346 (2013)
- 11) 恩田匠: 国産ワインにおけるフェノール系オフフレーバー「フェノレ」について, 日本醸造協会誌 108(12) 881-889 (2013)
- 12) Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., Robert, V.: Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 1 (5th ed.) (Elsevier Science, Amsterdam). p. 87-110 (2011)
- 13) 飯塚広・後藤昭二: 酵母の分類同定法 (第3版) (東京大学出版会, 東京), (1984)
- 14) 長谷川武治編集: 微生物の分類と同定 (上), (学会出版センター, 東京), (1984)
- 15) 恩田匠・乙黒親雄・飯野修一・後藤昭二: 梅加工品から分離した産膜酵母の同定とその症状, 日食科工