

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。本年度は、山梨県産赤ワインにおけるフェノレの定量と原因微生物の調査を実施した。その結果、約 80%の供試県産赤ワイン中に、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た。また、ブレタノマイセス属酵母の検出キットを用いた分析から、フェノレが高濃度で含まれるサンプルからは、高濃度のブレタノマイセス属酵母が検出された。

1. 緒 言

国産ワインの人気の高まる中、本県ワイン業界では、主力の甲州種白ワインのみならず、赤ワインの高品質化も大きな課題となっている。

この赤ワイン製造には、醸し発酵工程や乳酸菌による二次発酵、特に貯蔵・熟成工程があることから、白ワインと比較しても酸化や雑菌類の汚染などの劣化を受けやすい。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）が生じることも少なくない。従来は、産膜酵母や酢酸菌による酸化劣化をともなう酢酸エチル、酢酸、アセトアルデヒドなどのオフフレーバー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い欠陥香をともなう劣化したワインの頻度は少なくなってきた。一方で最近、汚染微生物により生成されるオフフレーバーのひとつとして、フェノレ¹⁻³⁾と総称されるフェノール系のオフフレーバーが注目されるようになってきた。赤ワインにおけるフェノレは、4-エチルフェノールおよび4-エチルグアイアコールであり、これらは、*Brettanomyces*（ブレタノマイセス）属酵母¹⁻³⁾により生成されることが分かっている。

このブレタノマイセス属酵母が生成するフェノレ¹⁻³⁾については、従来はボルドー地方のワインの特徴香¹⁻³⁾などとも認識されていたが、近年の研究からオフフレーバーであることが認識されている。本邦では、このフェノレについては、製造現場においても、正確に認識されていないことが考えられた。このことは、結果として本県産ワインの品質の低下につながっている可能性があっ

た。そこで、本研究では、国産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。

本年度は、まず、現状の山梨県産の市販赤ワイン製品におけるフェノレの定量分析と微生物の調査を実施した。

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 21 年度の山梨県ワイン鑑評会に出品された赤ワイン 30 点を用いた。なお、参考として、同鑑評会に出品された白ワイン 57 点およびロゼワイン 5 点も同様に用いた。

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、UPLC-MS/MS 法により実施した。

すなわち、まずは供試ワインについて、0.20 μm のメンブランフィルターでろ過し、分析試料とした。次に、分析試料を、UPLC-MS/MS 装置（Waters 社、Acquity）を用いて、専用カラム（Waters 社、BEH C18 1.7 μm, 2.1 × 50mm）を装着した超高速液体クロマトグラフ（UPLC）で分離を行い、四重極型質量分析計（MS/MS）で定量した。溶離液には、水-アセトニトリル混合溶液を用い、その溶出条件については、(1)流速 0.6mL/min.、(2)グラジェント（0 min. から 95:5 , 3min. 後まで

Table 1 供試赤ワインのフェノレ濃度、酵母菌数、亜硫酸濃度、官能評価コメント

サンプル	フェノレ(mg/l)				酵母菌数 ¹⁾ (CFU/ml)	遊離亜硫酸 (mg/l)	pH	官能評価 ²⁾ コメント
	4VP	4VG	4EP	4EG				
21-1	ND	ND	0.161	0.037	10 ⁴	8	3.55	+++
21-2	ND	ND	0.075	0.029	10 ⁴	14	3.66	±
21-3	ND	ND	0.651	0.06	10 ⁴	6	3.73	+++
21-4	ND	ND	0.038	ND	10 ⁴	22	3.55	+
21-5	ND	ND	0.116	0.027	10 ⁴	19	3.7	-
21-6	ND	ND	ND	ND	ND	1	3.64	-
21-7	ND	ND	ND	ND	ND	3	3.83	+
21-8	0.029	ND	1.665	0.108	10 ⁶	34	3.86	+++
21-9	ND	ND	0.132	0.028	10 ⁴	19	3.66	+
21-10	ND	ND	0.039	ND	ND	27	3.68	-
21-11	ND	ND	0.042	ND	ND	14	3.91	-
21-12	ND	ND	0.04	ND	ND	1	3.59	+
21-13	ND	ND	0.08	ND	10 ⁴	24	3.67	+++
21-14	ND	ND	0.251	0.024	10 ⁵	10	3.73	+++
21-15	ND	ND	0.041	ND	ND	37	3.69	+
21-16	ND	ND	0.098	ND	ND	11	3.64	-
21-17	ND	ND	0.041	ND	ND	66	3.67	-
21-18	ND	ND	0.047	ND	ND	16	3.61	+
21-19	ND	ND	0.041	ND	ND	27	3.52	-
21-20	ND	ND	0.038	ND	ND	7	3.37	-
21-21	ND	ND	ND	ND	ND	19	3.76	+
21-22	ND	ND	0.057	ND	10 ⁴	34	3.75	-
21-23	ND	ND	ND	ND	ND	26	3.71	-
21-24	ND	ND	0.13	ND	10 ⁴	10	3.62	+
21-25	0.014	ND	0.155	0.03	10 ⁴	38	3.55	-
21-26	ND	ND	ND	ND	ND	11	3.45	+
21-27	ND	ND	0.044	ND	ND	21	3.72	-
21-28	ND	ND	0.042	ND	ND	21	3.89	+
21-29	ND	ND	ND	ND	ND	56	3.82	+
21-30	ND	ND	ND	ND	10 ⁴	32	3.67	-

1)市販検査キットを用いた分析結果。2)山梨県ワイン鑑評会の評価結果(-:指摘無し、+:1名が指摘、++:2~3名が指摘、+++ :4名以上が指摘)

55:45, 3.1min. 後まで 4min. 後まで 5:95, その後 95:5) とした。

各種濃度に調整した標準液について、本法により分析し、ピーク面積から検量線を作成して、各フェノレ成分の定量を行った。標準液は、4成分の市販試薬を100%エタノールに溶解した後、13%エタノール水溶液に調整したものをを用いた。

2-3 微生物分析

供試ワイン中の、フェノレの発生原因微生物である、*Brettanomyces* (ブレタノマイセス) 属酵母の検出を、抗原抗体反応を用いて特異的に検出する市販検査キット (Unitech Scientific LLC 社, Z-Wine Assay) を用いて行った。

すなわち、供試ワイン 1ml について、遠心分離 (8,000rpm, 5 分間) を行い、上清を取り除き、沈殿に、脱色液 A 1ml を加え、よく混和した。この混和液を遠心分離して、上清を取り除く洗浄操作を繰り返した。得られた沈殿に、懸濁溶液 B を 40 μ l 加え、よく混和した。Z-brett チップのウエル部分に 5 μ l 添加した。このチップをシャーレに入れ、45°C で最低 30 分間乾燥させた。次に、ブロック/脱色液 C 10ml をシャーレに入れ、チップを液体中に沈め、15 分間放置した。ピペットで、ウエル部分の色素を洗い流した後、抗ブレット液 D 240 μ l と接合液 F 240 μ l をシャーレに加え、混和後

30 分間放置した。シャーレから液体を除去し、緩衝液 E 10ml を加え、結合液 F 240 μ l を添加した。シャーレから液体を除去し、緩衝液 E を用いて、洗浄を繰り返した。反応液 G-1 10ml と活性反応液 G-2 0.1ml を混合した。この混合液をシャーレに加え、20 分間放置し、シャーレから液体を除去した。チップを蒸留水で洗浄して、5 分間風乾した。ウエル部分に現れるシグナル (紫色の染色スポット) の強度を、チップにあらかじめ設置されている標準シグナルと比較して、陰性か陽性 (および菌濃度) を判断した。

3. 結果および考察

3-1 赤ワイン

表 1 に、供試赤ワイン、すなわち平成 21 年度山梨県ワイン鑑評会出品サンプル 30 点のフェノレ定量値、ブレタノマイセス属酵母検出の有無 (および菌数)、遊離亜硫酸濃度および pH を Table 1 に示した。また、Table 1 には、同鑑評会における審査員の評価コメント⁴⁾のうち、フェノレに関する記述の頻度を示した。

供試赤ワイン中の 4-エチルフェノール含量は、平均値で 0.134 mg/l, 最大値 1.665 mg/l, 最小値は検出限界以下であった。エチルグアイアコール含量は、0.014 mg/l, 最大値 0.108 mg/l, 最小値は検出限界以下であった。4-エチルフェノールと 4-エチルグアイアコールがともに検出限界以下のサンプルは 6 点のみであった。なお、2 点のサンプルのみ 4-ビニルフェノールが検出された。

ブレタノマイセス属酵母検査キットを用いた微生物分析の結果、フェノレが検出されたサンプルには、陽性反応が示されるものが多かった。フェノレが含まれるサンプルには、原因微生物が検出されることが確認された。なお、フェノレ含量の高いサンプルからは、菌濃度として、10⁶CFU/ml 検出された。本キットによる判定では、生菌と死菌体の判別はできないため、今後、サンプルからの酵母の分離や生菌数の確認が必要である。

また、フェノレ含量の高いサンプルについての審査員 14 名の評価コメントは、フェノレやブレタノ臭を指摘する記述が多かった。4-エチルフェノールと 4-エチルグアイアコールの閾値は、Chatonnet ら³⁾ によると、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。今回のサンプルには、エチルフェノール 0.605 mg/L を越えたものが 2 点、エチルグアイアコール 0.110 mg/l を越えたものは存在しなかった。一方で、同鑑評会における審査員の審査評価コメントから判断すると、サンプル 1 のように、4-エチルフェノール 116 mg/l, 4-エチルグアイアコール 27 mg/l の濃度で、フェノレを強く指摘す

Table 2 供試白ワインのフェノレ濃度、酵母菌数、亜硫酸濃度、官能評価コメント

サンプル	フェノレ(mg/l)				酵母菌数 (CFU/ml)	遊離亜硫酸 (mg/l)	pH	官能評価 コメント
	4VP	4VG	4EP	4EG				
21-31	0.103	0.041	ND	ND	NT	29	3.75	—
21-32	0.045	0.046	ND	ND	NT	51	3.22	+++
21-33	0.03	0.055	ND	ND	NT	34	3.21	+
21-34	0.033	0.023	ND	ND	NT	22	3.13	—
21-35	0.037	0.037	ND	ND	NT	16	3.12	++
21-36	0.025	0.033	ND	ND	NT	10	3.16	—
21-37	0.035	0.057	ND	ND	NT	13	3.16	+
21-38	0.024	0.028	0.062	0.093	NT	2	3.26	—
21-39	0.018	0.018	ND	ND	NT	8	3.36	+
21-40	0.019	0.023	ND	ND	NT	30	3.38	+
21-41	0.027	0.065	ND	ND	NT	11	3.31	++
21-42	0.016	0.018	ND	ND	NT	16	3.22	++
21-43	0.017	0.016	0.038	ND	NT	71	3.19	++
21-44	0.046	0.038	ND	ND	NT	6	3.37	—
21-45	0.053	0.063	ND	ND	NT	14	3.10	+
21-46	0.029	0.072	ND	ND	NT	21	3.07	+
21-47	0.03	0.041	ND	ND	NT	19	3.06	+
21-48	0.069	0.057	ND	ND	NT	27	3.29	++
21-49	0.075	0.121	ND	ND	NT	61	3.13	+
21-50	0.066	0.064	ND	ND	NT	24	3.21	++
21-51	0.031	0.047	ND	ND	NT	11	3.33	++
21-52	0.061	0.078	ND	ND	NT	14	3.15	++
21-53	0.017	0.053	ND	ND	NT	29	3.09	—
21-54	0.374	0.216	ND	ND	NT	38	3.15	+
21-55	0.044	0.061	ND	ND	NT	30	3.11	+
21-56	0.102	0.139	ND	ND	NT	29	3.09	++
21-57	0.039	0.032	ND	ND	NT	18	3.23	—
21-58	0.026	0.049	ND	ND	NT	16	3.19	+
21-59	0.019	0.016	ND	ND	NT	8	3.09	—
21-60	0.165	0.107	ND	ND	NT	32	3.22	++
21-61	0.039	0.041	0.044	0.044	NT	10	3.48	—
21-62	0.022	0.014	0.038	ND	NT	37	3.65	—
21-63	0.09	0.073	ND	ND	NT	13	3.24	++
21-64	0.032	0.016	0.041	ND	NT	29	3.66	+
21-65	0.058	0.086	ND	ND	NT	24	2.99	++
21-66	0.041	0.025	ND	ND	NT	16	3.14	—
21-67	0.023	0.041	ND	ND	NT	24	3.09	++
21-68	0.043	0.072	ND	ND	NT	42	3.23	++
21-69	0.03	0.061	ND	ND	NT	16	3.16	++
21-70	0.112	0.17	ND	ND	NT	26	3.28	++
21-71	0.02	0.021	ND	ND	NT	2	3.30	—
21-72	0.081	0.082	ND	ND	NT	2	3.37	+++
21-73	ND	0.015	ND	ND	NT	14	3.14	+
21-74	0.018	0.015	0.038	ND	NT	10	2.48	—
21-75	0.025	0.024	ND	ND	NT	35	3.18	+++
21-76	0.052	0.072	ND	ND	NT	32	3.10	++
21-77	0.016	0.014	ND	ND	NT	16	3.18	+
21-78	0.051	0.064	ND	ND	NT	5	3.36	+
21-79	0.024	0.025	ND	ND	NT	43	3.40	++
21-80	0.035	0.02	ND	ND	NT	6	3.27	—
21-81	0.021	0.024	ND	ND	NT	34	3.30	++
21-82	0.151	0.256	ND	ND	NT	29	3.13	++
21-83	0.051	0.047	ND	ND	NT	35	3.10	+
21-84	0.042	0.029	ND	ND	NT	34	3.11	—
21-85	0.039	0.026	ND	ND	NT	51	3.30	—
21-86	0.059	0.05	ND	ND	NT	27	3.01	++
21-87	ND	0.013	ND	ND	NT	5	2.79	+
21-88	0.025	0.017	ND	0.017	NT	27	3.55	+
21-89	0.016	0.013	ND	ND	NT	38	3.25	—
21-90	0.025	0.013	ND	ND	NT	42	3.15	±
21-91	0.019	ND	ND	ND	NT	10	3.42	—
21-92	ND	ND	ND	ND	NT	26	3.04	—

ることがあることが分かった。一方で、サンプル 25 のように、サンプル 1 と同程度の 4-エチルフェノール 155 mg/l、エチルグアイアコール 30 mg/l の濃度であるにもかかわらず、フェノレの指摘がなかったものも存在した。これは、サンプル 25 が著しく酸化劣化し、酢酸エチルやアセトアルデヒドなどを含んでおり、これらのオフフレーバーの影響で、フェノレが感知できなかった可能性

が考えられた。今後も、日本におけるフェノレの閾値については、検討していく必要がある。

また、フェノレや酵母が検出されたサンプルは、遊離の亜硫酸が低い、あるいは pH が高いものが多かった。

以上のことから、現状の山梨県産赤ワインが、ブレタノマイセス属酵母の汚染によるフェノレ発生により、品質の劣化が起こっていることを明らかにすることができた。

3-2 白ワインおよびロゼワイン

白ワイン 57 点およびロゼワイン 5 点についての、フェノレ定量値、遊離亜硫酸濃度および pH、鑑評会における審査員の評価コメント⁴⁾のうち、フェノレ(4-エチルフェノール、4-エチルグアイアコール)に関する記述の頻度を示した。Chatonnet ら⁵⁾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、白ワイン中においてそれぞれ、0.770 mg/L、0.440 mg/l (水中ではそれぞれ、0.085 mg/l、0.032 mg/l) とされている。

白ワインは、甲州種が主体であるため、白のフェノレである 4-ビニルフェノールと 4-ビニルグアイアコールを含むサンプルは多く、その濃度も比較的高かった。

今後は、山梨県産以外の国産ワインや外国産ワインの分析なども行い、国産赤ワインのフェノレ汚染の現状を明らかにする。また、ワインからの汚染酵母の検出を試み、その汚染防止方法の確立につなげていく。

4. 結 言

山梨県産赤ワインにおけるフェノレの定量と原因微生物の調査を実施した。その結果、80%の供試県産赤ワイン中に、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た。また、ブレタノマイセス属酵母の検出キットを用いた分析から、フェノレが高濃度で含まれるサンプルからは、ブレタノマイセス属酵母が検出された。

参考文献

- 1) 篠原 隆：日本醸造協会誌，No.96，p.182-188 (2001)
- 2) Takashi SHINOHARA, Shinki KUBODERA and Fujitoshi YANAGIDA: Journal of Bioscience and Bioengineering, No.90, p.90-97 (2000)
- 3) Chatonnet P, Dubourdiou D, Boidron J N, Pons M: J. Sci. Food Agric., 60, 165(1992)
- 4) 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.24, p.163-169 (2010)
- 5) Chatonnet P, Dubourdiou D, Boidron J N, Lavigne V: J. Sci. Food Agric., 62, 191(1993)