

## [ 研 究 報 文 ]

## 甲州ワイン中の揮発性フェノール化合物濃度に影響を与える因子

小林弘憲<sup>1</sup>・富永敬俊<sup>2</sup>・勝野泰朗<sup>3</sup>・安蔵光弘<sup>3</sup>・味村興成<sup>3</sup>・  
鈴木由美子<sup>1</sup>・デュブルデュー・デウニ<sup>2</sup>・大久保敏幸<sup>1</sup><sup>1</sup>メルシャン株式会社商品開発研究所 〒251-0057 藤沢市城南 4-9-1<sup>2</sup>ボルドー第二大学醸造学部 351, cours de la libération, 33405, Talence, Bordeaux<sup>3</sup>メルシャン株式会社勝沼ワイナリー 〒409-1313 甲州市勝沼町下岩崎 1425-1

## Influence of Volatile Phenol Concentration on Koshu Wine Quality

Hironori KOBAYASHI<sup>1</sup>, Takatoshi TOMINAGA<sup>2</sup>, Yasuaki KATSUNO<sup>3</sup>, Mitsuhiro ANZO<sup>3</sup>, Kousei AJIMURA<sup>3</sup>,  
Yumiko SUZUKI<sup>1</sup>, Denis DUBOURDIEU<sup>2</sup> and Toshiyuki OKUBO<sup>1</sup><sup>1</sup>Mercian Corporation, Jyonan, Fujisawa, Kanagawa 251-0057, Japan<sup>2</sup>Faculté d'Oenologie Université Victor Segalen Bordeaux 2, cours de la libération, 33405, Talence, Bordeaux, France<sup>3</sup>Mercian Katsunuma Winery, Shimoiwasaki, Katsunuma, Koshu, Yamanashi 409-1313, Japan

Aroma is one of the important factors for the evaluation of wine quality. The present study revealed that almost all of the commercial Koshu wines analyzed had high levels of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol that are responsible for the well-known olfactory defect called "phenolic off flavor." Microvinification in the laboratory using Koshu grapes harvested at different stages of maturity showed that the maturity of grapes influenced phenol content in wines. Wines made with grapes harvested at a later date had higher phenol concentration. The concentrations of phenols in wines were affected by fermentation conditions such as temperature, yeast strain, and must preparation. To avoid the formation of excess phenols, our finding showed that free-run juice fraction prepared without pectolytic enzyme from raisins harvested should be fermented relatively rapidly around 20°C than around 16°C. Use of yeast strains having phenolic off flavor negative (*Pof*-) activity such VL1 completely inhibited the production of volatile phenols.

**Key words:** Koshu grape, Koshu wine, phenolic off flavor, 4-vinylguaiacol, 4-vinylphenol, volatile phenol

## 緒 言

日本古来のブドウ品種である「甲州」は香味ともに中庸であるとの理由から、山梨県における甲州ブドウの生産量は過去 10 年間に振り返ると半量以下に減少している (1)。香味改善策としてシュール・リ、スキンコンタクト、冷凍濃縮等、甲州ブドウの香味特徴を引き出す醸造法が各々試みられている一方で、甲州の香り成分分析に基づいた甲州ワインの特色把握も急務であると考えられる。我々の研究グループは最近、甲州ワインのヴァラエタルアロマのひとつと思われる 3-

メルカプトヘキサノールという硫黄化合物の同定に成功した (2, 3, 4)。グレープフルーツ様の香りを持つ本化合物を視野に入れた、新しいスタイルの甲州ワイン醸造の確立に向けて今後の研究の動向が期待される。また、3-メルカプトヘキサノールの同定過程において、我々は非常に高濃度に存在する揮発性フェノール化合物を甲州ワイン中から見だし、これを報告した (5)。この揮発性フェノール化合物である、4-ヴィニルフェノール (4VP) および 4-ヴィニルグアイヤコール (4VG) はそれぞれ生ゴム臭、カーネーション様の香りをその嗅覚的特徴として持っていることから、フェノール臭の欠点はワイン中でのこれら揮発性フェノールの量だ

けでなく存在比も問題となる (6)。一般にワイン中における 4VP および 4VG は、それぞれ *p*-クマル酸、フェルラ酸を前駆物質として酵母の Phenyl acrylic Acid Decarboxylase (PAD) により生成されることから (7)、揮発性フェノール量は原料としてのブドウの性質、そして発酵条件に大きく依存している。そこで本研究では主に発酵条件、果汁調整法の違い、が甲州ワイン中のフェノール化合物濃度に与える影響を検討した結果、フェノール臭による品質劣化 (8) の回避について若干の知見を得たので報告する。

## 材料と方法

### 供試ワイン

分析に供した市販甲州ワインは山梨県産でシュール・リとして明記してあるもの 8 点、樽発酵 5 点、その他 10 点で、それらワインのヴィンテージは 2001 年から 2005 年であった。研究室スケールでの小規模試験には 2005 年産の甲州ブドウを用いた。またワイナリースケールの発酵試験ではメルシャン勝沼ワイナリーで醸造された 2004 年および 2005 年のワインを使用した (下記参照)。

### 経時的サンプリングと小規模発酵試験

2005 年山梨県内の一区画の畑から中央部分に位置するブドウの木を定め、8 月の第 3 週から 10 月の第 2 週目まで 1 週間に 1 度の頻度で定期的にサンプリングを行い、小規模試験発酵に用いた。1 回 2.0 kg のブドウから搾汁率として果粒重量の 60% を果汁として得た。得られた果汁に遊離型の亜硫酸として 20 mg/L となるよう 5% 亜硫酸水を添加した。5°C、18 時間以上の清澄化を行い、最終的に Nephelometric Turbidity Unit (NTU) 300 の濁度になるように調整した。清澄化された果汁を資化性窒素量 200 mg/L、潜在アルコール度数 12% (糖度換算 22 度) となるようにそれぞれリン酸水素二アンモニウムおよびショ糖で補正後、果汁約 1 L を 1.5 L 容のマグナム瓶に炭酸ガス封入下で充填し、ワイン酵母 (VL3 または VL1 : Laffort 社製) 300 mg/L を添加した。アルコール発酵は温度 20°C で行い、比重 0.993 以下になったことを確認した後、再び遊離型の亜硫酸として 60 mg/L になるように 5% 亜硫酸水で調整し、分析に用いるまで 4°C で保存した。また、果汁の調整および発酵条件の違いによる揮発性フェノールの挙動を確認するため、生育区画の同一である甲州ブド

ウを収穫後 (9 月 28 日採取)、清澄化後の NTU を 300 に調整し、上記条件に加え、1. 発酵温度を 16°C に設定した系、2. 果汁の清澄化に清澄化酵素であるスクラーゼ (三共株式会社製) またはラファジム CL (Laffort 社製) を 5 mg/L 濃度となるように添加した系の試験区を設けた。果汁調整後の発酵手順は、上記の小規模発酵試験と同様に行った。

### ワイナリー醸造

2004 年山梨県内の 1 区画 (9 月 21 日収穫) から果房重量の 60% を果汁として得たものをフリーラン区分とした。バルーン式圧搾機の中で約 3 時間果汁と果皮を接触させ、搾汁したものをスキンコンタクト区分とした。さらに赤ワインと同様に果皮ごとアルコール発酵終了時まで浸漬させた区分をマセレーション区分とした。ブドウ破碎時に遊離型亜硫酸が 30 mg/L となるように亜硫酸を加え果汁の酸化を防ぎ、フリーランおよびスキンコンタクト区分は、搾汁後 12°C、18 時間以上の清澄化を行った。得られた果汁上清に市販ワイン酵母 (VL3) 300 mg/L を添加し、アルコール発酵は温度 18~22°C の範囲を保持した。アルコール発酵終了後、遊離型亜硫酸が 80 mg/L となるように亜硫酸を添加し発酵を終了した。マセレーション区分はブドウ破碎後直ちに市販ワイン酵母 300 mg/L を投入し、発酵温度 20~28°C の範囲で行った。アルコール発酵終了後バルーン式圧搾機で搾汁し、搾汁率として果房重量の 75% を得、再び亜硫酸を 80 mg/L 添加した。また、2005 年は 2004 年と同一区画において 9 月下旬および 10 月中旬に甲州ブドウを収穫し、搾汁率として果房重量の 60% を果汁として得た。得られたフリーラン区分は、12°C、18 時間以上の清澄化後 NTU300 に調整し、酵母 (VL3 または VL1) 300 mg/L を用いて 2004 年度と同様に醸造管理を行った。このようにして得られたワインを香気成分の分析に用いた。

### ワイン中からの揮発性フェノール成分の抽出、定量

ワイン 50 mL にエタノール溶液に溶解した 50  $\mu$ L の 1-オクテン-3-オール (1 mg/L) を内部標準物質として添加し、ジクロロメタンで 2 回抽出した (4 mL、2 mL  $\times$  5 min)。得られた有機溶媒層を合わせた後、5% 炭酸水素ナトリウム溶液 2 mL を加え、脂肪酸画分の除去を行った。洗浄後の有機溶媒層は、無水硫酸ナトリウムを加え水分除去を施し、窒素ガス気流下で約 300  $\mu$ L まで濃縮し、その 2  $\mu$ L を GC/MS 装置 (HEWLETT

PACKARD HP6890 Series) を用いて分析した。内部標準物質のピーク高に対し各揮発性フェノールのピーク高の比率を濃度ごとにプロットし、検量線を作成した。

**GC/MS 条件**

カラムには DB-XLB (50 m × 0.25 μm × 0.25 μm ; J&W Scientific 社製) を用い、GC サイクルは 40°C で 5 min 保持した後、4°C/min の上昇割合で 170°C まで、8°C/min の上昇割合で 230°C まで上昇させ、最後に 5 min 維持することで 1 サイクルとした。内部標準物質及び揮発性フェノール化合物 2 種類の標準品におけるマススペクトルとリテンションタイムを SCAN MODE で確認後、SIM MODE に切り替え、*m/z* = 121、135、72 で 4VP、4VG および内部標準物質を検出した。

**ポリフェノールの定量**

トータルポリフェノールの定量は Singleton と Rossi らの方法に従い (9) ガリク酸換算で算出した。この定量方法は、ガリク酸に含まれる水酸基換算で定量を行なうためフラボノイド系のみならず、非フラボノイド系 (ヒドロキシシナム酸類など) も含めた全てのフェノール化合物が定量される。

**結果と考察**

**市販甲州ワインのフェノール香評価**

市販甲州ワイン中の 4VP および 4VG 量を測定した結果 (Fig. 1)、その濃度は 25 から 2500 μg/L と広範囲に分布していた。また一例を除き、生ゴム臭を放つ 4VP

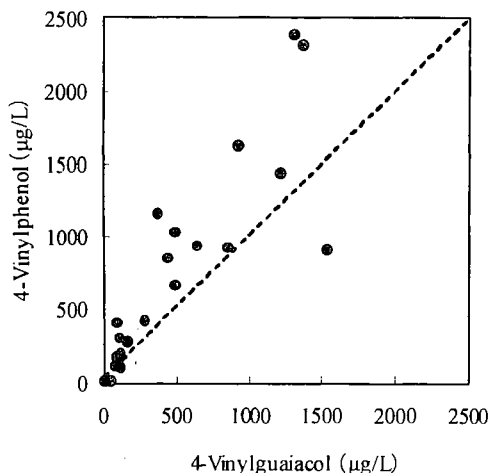


Fig. 1 Assessment of phenolic off flavor in commercial Koshu wines.

がカーネーション様の香りを持つ 4VG より多量に (1.5 から 2 倍量) 存在していた。2 つの化合物の閾値を考慮すると (4VP : 180 μg/L、4VG : 130 μg/L) 分析に供したワインの大部分が揮発性フェノールによる汚染を受けていると判断された。従って甲州ワインは日本で醸造されたワインでフェノール臭による汚染が指摘された初めての例と思われた。

**2005 年の甲州ブドウ生育状況**

2005 年山梨県内の 1 区画における甲州ブドウを 8 月の第 3 週から 10 月の第 2 週目まで 1 週間に 1 度ずつサンプリングを行い、その糖度、酸度およびポリフェノールの経時変化を追跡したところ、酸度は徐々に低下し 10 月の第 2 週目には 5.2 g/L (酒石酸換算) となった。一方、糖度は 9 月の下旬 (Brix として 16 を越えた頃) 以降ほぼ横ばいとなった。また、ポリフェノール量はブドウの成熟と共に増加していた (Fig. 2)。

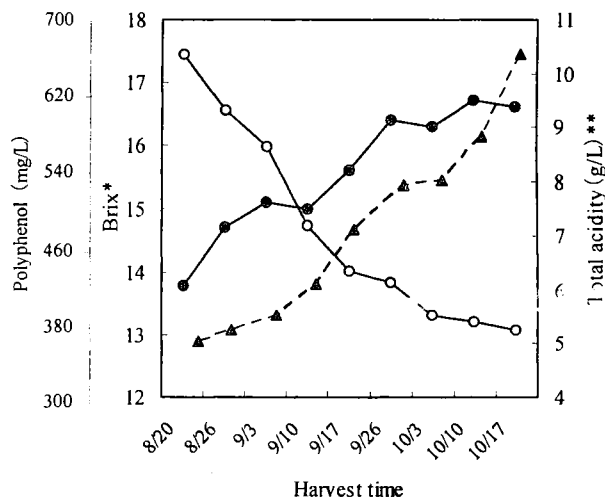


Fig. 2 Evolution of Brix, total acidity and polyphenol content in Koshu grape during ripening in 2005.

● : Brix, ○ : Total acidity, ▲ : Polyphenol  
\* ... g/100 mL, \*\*... g/L (Tartaric acid calculation)

**ブドウの成熟度合いおよび Pof 活性の異なる酵母の揮発性フェノール化合物濃度への影響 (研究室スケール)**

Fig. 2 に示された日付でサンプリングされた果汁を用いて小規模発酵試験を行い、ワイン中の揮発性フェノール化合物量を測定した (Fig. 3)。Phenolic Off Flavor

positive (*Pof+*) 活性を有する VL3 酵母を用いた時、8 月下旬に採取された未成熟ブドウから得られたワイン中には揮発性フェノールは僅かにしか検出されなかったが、ブドウの成熟とともにその濃度は上昇した。9 月の下旬まで (Brix16 近辺) は 4VG 量が 4VP 量を上回っていたが、それ以降は両者の存在比は逆転した。それはこの例では糖の上昇が緩慢になり始めた時点と符合する印象を与えた。また同様の小規模発酵試験を Phenolic Off Flavor negative (*Pof-*) で知られている VL1 酵母を用いた場合では、ブドウの収穫時期にかかわらず揮発性フェノール濃度は低い値を推移しながらも、4VG 量が常に 4VP 量を上回った。

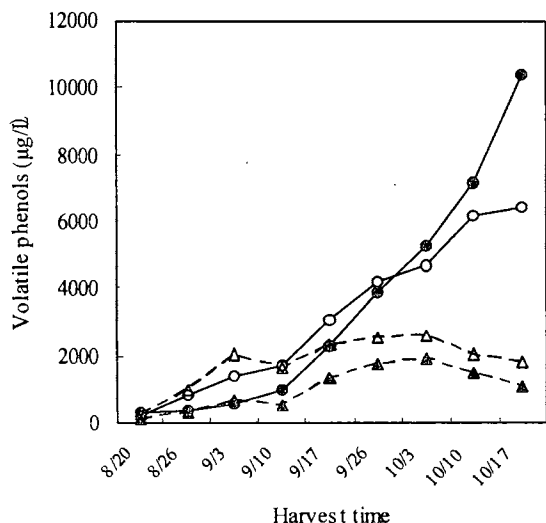


Fig. 3 Content of volatile phenols in wines made from Koshu grapes harvested at different stages of maturity (Laboratory Scale).  
Using *Pof+* Yeast (VL3) ● : 4VP, ○ : 4VG  
Using *Pof-* Yeast (VL1) ▲ : 4VP, △ : 4VG

**ブドウの成熟度合いおよび *Pof* 活性の異なる酵母の揮発性フェノール化合物濃度への影響 (ワイナリースケール)**

ワイナリー醸造において、9 月下旬と 10 月中旬の 2 点において収穫された甲州ブドウ果汁中のポリフェノール量と、そのブドウから *Pof* 活性の異なる酵母 (VL1 および VL3) を用いて醸造されたワインの揮発性フェノール化合物を定量した (Fig. 4)。研究室スケールと同様に VL3 株では揮発性フェノールの生成量は収穫時期に大きく左右されることが確認された。10

月中旬収穫のブドウから得られた果汁中のポリフェノール量の増大は揮発性フェノールの前駆体増大を意味すると考えられ、揮発性フェノール量と相関を示すと考えられた。一方、*Pof-* 酵母である VL1 株では揮発性フェノール量は収穫時期の影響を受けず、常に低い値を示した。すなわち研究室スケールで得た知見がそのままワイナリースケールでも反映された。従って収穫時期によっては *Pof-* 酵母の使用はワイン中の揮発性フェノール化合物の過剰な生成を抑制すると考えられた。

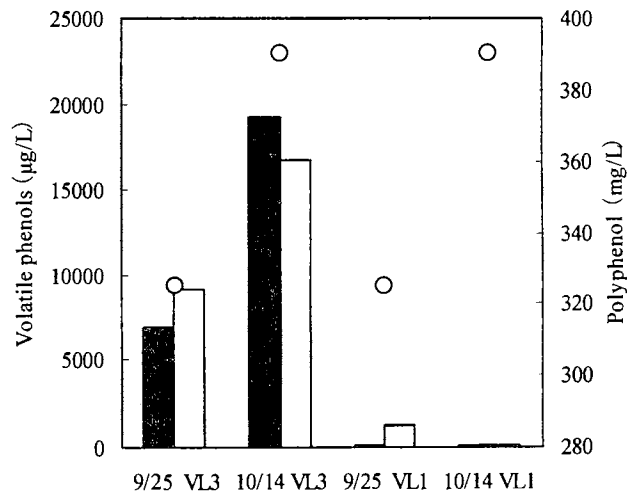


Fig. 4 Content of volatile phenols in wines made from Koshu grapes harvested at different stages of maturity and fermented with two different yeast strains (Winery scale).  
■ : 4VP, □ : 4VG, ○ : Polyphenol

**潜在アルコール度数、果汁の調整および発酵温度の違いが揮発性フェノール化合物濃度へ与える影響**

9 月下旬に収穫した潜在アルコール度数 9% のブドウを、発酵 2 日目にシヨ糖で潜在アルコール度数が 10.5 と 12% になるように調整した系と合わせて 3 つの系をそれぞれトリプリケートで発酵を行なった。発酵期間は 9% で 8 日、10.5%、12% でそれぞれ 12 日、15 日を要した。発酵終了直後の 4VG、及び 4VP 量は潜在アルコール度数に影響を受けることなく、また発酵期間にかかわらずすべての系でほぼ同様の値を示した (Fig. 5)。補糖を受ける可能性が高い甲州ブドウのワイン醸造ではあるが、これにより補糖はフェノール臭の欠点を引き起こさないことが示された。

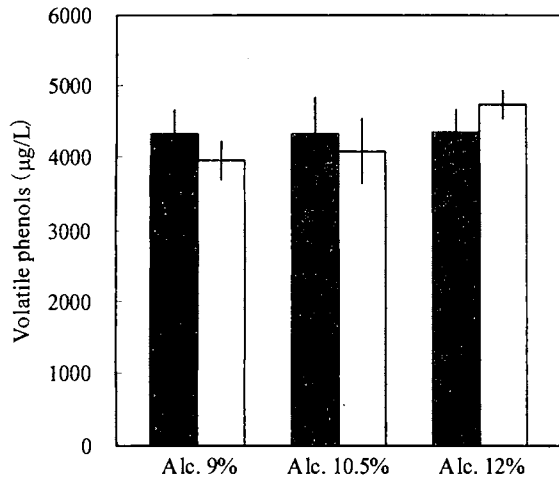


Fig. 5 Influence of sugar addition to must on production of volatile phenols. ■ : 4VP, □ : 4VG

発酵温度が揮発性フェノール化合物に与える影響を調べたところ、16°Cでの発酵では20°Cと比較して発酵期間が約9日間長く、そして有意に4VGおよび4VP量が高い値を示した (Fig. 6)。この値は上記の結果 (Fig. 5) と合わせて考慮すると、発酵期間の相違ではなく発酵速度の低下の為であると考えられた。また、果汁の清澄化の為にペクチン分解酵素の使用は、収穫年、収穫時期によっては必須である。そこで、日本で使用されている酵素剤スクラーゼとフランス、ラフォール社製ラファジム CL を果汁の清澄化剤として使用し、酵素無添加系を対照としてワイン中の揮発性フェノール化合物の濃度に与える影響を観察した (Fig. 6)。スクラーゼにより清澄化した果汁から得られたワイン中には酵素無添加系からのそれに比較して2倍量の4VG、4VPが測定された。一方でラファジム CL による清澄化では揮発性フェノール濃度は酵素無添加系よりも僅かに高濃度である程度にとどまった。スクラーゼとラファジム CL の揮発性フェノール生成能における差は一般にいわれているところの不純物として混在しているシンナミル酸エステラーゼ活性の差であると推察された。これらのことから、可能な限り清澄化酵素を使用せずに果汁の調整を行い、速やかに発酵を終了することが不必要な揮発性フェノール化合物の生成の抑制につながるものと思われた。

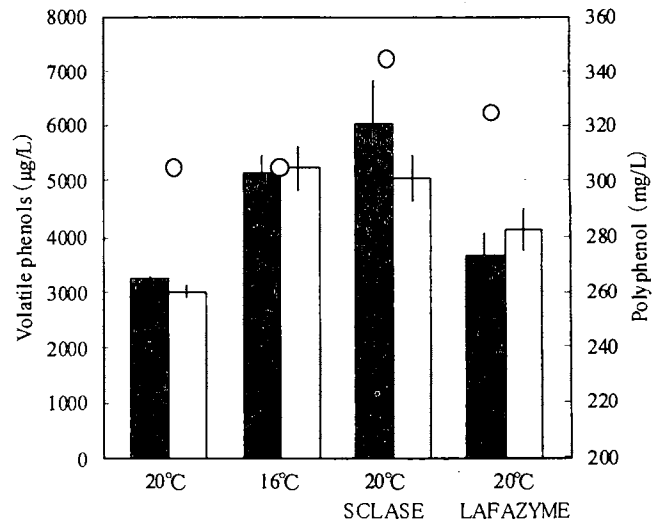


Fig. 6 Influence of fermentation temperature and use of clarification enzyme on volatile phenol content.

■ : 4VP, □ : 4VG ○ : Polyphenol

### 醸造方法が揮発性フェノール濃度に与える影響 (ワイナリー醸造)

果汁調整技術の一つであるスキンコンタクト法、また果皮浸漬状態での発酵 (マセレーション) は香味改善手段としてしばしば試みられている方法である。そこでこれらの方法が揮発性フェノール化合物濃度に与える影響を観察した (Fig. 7)。ワイナリー規模ではこの3つの系の同時調整は困難であることから、同じ区画からフリーラン果汁は9月21日、スキンコンタクト用ブドウは9月30日、そしてマセレーション用ブドウは10月21日に入荷したものをを使用した。スキンコンタクト法で得られた果汁はフリーランにより得られた果汁に比較して僅かに高濃度のポリフェノールを含有するが、フリーランに比較して2倍以上の非常に高濃度の4VG、4VPが定量された。またマセレーション区分ではそれに使用したブドウの収穫期を考慮した時、Fig. 3 および4から得た知見から、高濃度の揮発性フェノール化合物の生成を予測したにもかかわらず、4VP および 4VG 濃度は極めて低濃度であった。これは高濃度に存在するポリフェノールがプロシアニジンと同様に *Pof* 酵母における PAD 活性を阻害した結果と推測された。以上のことにより香味改善手段としてしばしば用いられているこれら手法はフェノール化合物の生成助長という点から、操作にあたっては一定の

配慮が不可欠であると思われた。

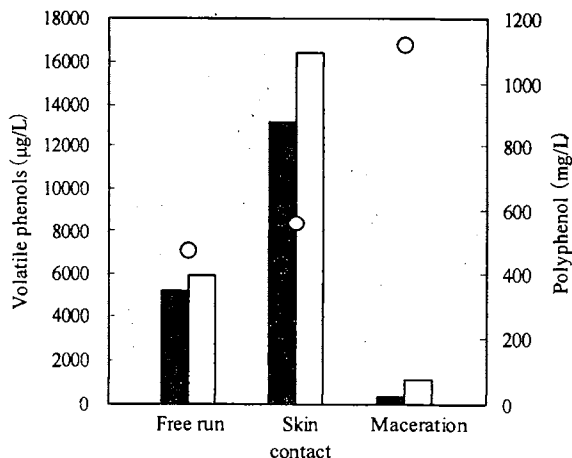


Fig. 7 Impact of skin contact and maceration methods on volatile phenol content in wines.

■ : 4VP, □ : 4VG, ○ : Polyphenol

### 要約

ワインにおける香气成分はワインの品質を評価する上で重要な項目の一つである。今回、市販甲州ワイン中の4VPと4VGを定量することにより香りの面から品質評価を行った結果、分析に供した市販甲州ワインの大部分がこれら揮発性フェノール化合物による、いわゆるフェノール臭の欠点を持つことが示された。成熟過程の異なる甲州ブドウを用いた小規模発酵試験の結果、収穫時期が遅くなるにつれ揮発性フェノール物質が高濃度で検出され、すなわちフェノール臭の印象が強くなることが示された。果汁の調整法（清澄化酵素の有無、スキンコンタクト）、発酵条件（使用酵母、発酵温度、浸漬発酵法）の違いはフェノール化合物濃度に敏感に影響を与えた。即ち、清澄化酵素の使用、スキンコンタクト、低温発酵法は、ワイン中のフェノール化合物の生成を促し、*Pof*-酵母の使用はその濃度を有意に抑制した。得られた知見から、フェノール化

合物生成によるフェノール臭汚染は適切に収穫期を見極めたブドウから清澄化酵素を用いずにフリーラン区分を得て、速やかに発酵を終了することで軽減、また発酵に *Pof*-酵母を用いることで回避できる可能性が示唆された。

### 文 献

1. 内藤欽一. 山梨県におけるぶどう・ぶどう酒産業の50年. 平和プリント社 (1997).
2. 小林弘憲・富永敬俊他. 日本ブドウ・ワイン学会誌 15(3):109-110 (2004).
3. 富永敬俊. Aroma Research No.22(6):148-151 (2005).
4. 小林弘憲・富永敬俊. バイオサイエンスとインダストリー 64(4):36-37 (2006).
5. 小林弘憲・富永敬俊他. 日本ブドウ・ワイン学会誌 16(3):120-121 (2005).
6. Chatonnet, P., D. Dubourdieu, J. Noel and V. Lavigne. Synthesis of Volatile Phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in Wines. J. Sci. Food Agric. 62: 191-202 (1993).
7. Smit, A., R. Ricardo, C. Otero, M. G. Lambrechts, I. S. Pretorius and P. van Rensburg. Enhancing Volatile Phenol Concentrations in Wine by Expressing Various Phenolic Acid Decarboxylase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food Chem. 51: 4909-4915 (2003).
8. Coghe, S., K. Benoot, F. Delvaux, B. Vanderhaegen and F. R. Delvaux. Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation. J. Agric. Food Chem. 52: 602-608 (2004).
9. Singleton, V.L and Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. Am. J. Agric. Enol. Vitic. 16: 144 (1965).