赤ワイン醸造における低温醸し (Prefermentation Cold Soak) の アントシアニン色素抽出効果

大久保圭祐*・後藤 (山本) 奈美・岡崎直人
((独)酒類総合研究所, 葛巻高原食品加工株式会社*)

平成 14 年 7 月 26 日受理

Effect of prefermentation cold soak on extraction of anthocyanin during red wine making

Keisuke OKUBO, Nami GOTO-YAMAMOTO and Naoto OKAZAKI

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046)

Effects of a prefermentation cold soak on extraction of color and phenolic compounds during red wine making were examined. Cabernet Sauvignon and Merlot wine made on a small-scale test with a cold soak at 10°C for 2 days resulted in higher A_{520} (red color), A_{420} (yellow color), and A_{520} at pH 0.25 (anthocyanin concentration) than the control wine without the cold soak. There was no significant difference in A_{280} (index of total phenol concentration) with or without the cold soak. To exclude microorganism activities, a non-fermentation test was performed with addition of 10 mg/l of cycloheximide, 500 mg/l of chloramphenicol, and 200 mg/l of potassium pyrosulfite to crushed grapes. A non-fermentation cold soak at 10°C for 2 days without ethanol followed by soaking at 25°C for 6 days with 5 or 10% ethanol showed higher A_{520} , A_{420} and A_{520} at pH 0.25 than the control kept at 25°C for 8 days with ethanol and another control with a cold soak after addition of ethanol. There was no significant difference in A_{280} with or without the cold soak, or with or without ethanol during the cold soak. Thus, keeping crushed grapes for 1 or 2 days without ethanol seemed to be effective for good color extraction during fermentation without excessive extraction of phenolic compounds.

Key words : 低温醸し, 赤ワイン, アントシアニン

緒 言

赤ワインの色調は, 品質を評価する上で, 最も重要な要素のひとつである。赤ワインの色は, ブドウ果皮に含まれるアントシアニン色素に由来するが, わが国では, 赤ワイン醸造用ブドウの十分な着色が得られない場合が多い。従って, 色素の抽出効果が高く, 他に悪影響のない醸造方法があれば, 有効と考えられる。

赤ワインの醸造では, 通常ブドウを除梗・破碎後, 比較的速やかに酒母, または再水和した乾燥酵母を添加し, 発酵を開始することが, 有害微生物の増殖を防ぐためにも重要であると考えられる。しかし, 近年, 発酵開始前に 1~数日間, 低温で果醪を醸し, 水溶性の

色素や香気成分の抽出を促進させる試みがなされている。この方法は, Cold Maceration, Prefermentation Cold Soak などと呼ばれており, 本稿では低温醸し法と呼ぶ。Cuénat ら¹⁾ は, ピノ・ノアールの果醪を 15°C で 3~4 日間低温醸しを行うことで, ワインの赤色が濃くなるとともに, 香りが高く, また香りが良好になると報告している。また, Raynolds ら²⁾ も, シラーの低温醸しによってクロスグリの香り (flavor) が強くなり, 発酵温度が低い場合には色も有意に増強されると報告している。他方, 低温醸しをおこなったピノ・ノアールは, フルーティな香りが増強されたが, アントシアニン量は多くならなかった, という報告³⁾ や, 低温醸し中の酸化防止策をとらなかった場合, 対照よりも

官能評価結果が低くなったという報告もある⁴⁾。

低温醸し法は、既に多くのワイナリーで実践されているにもかかわらず、その機作については不明の点が多い⁵⁾。そこで本研究では、低温醸し法が、国産ブドウを用いた赤ワイン醸造中の色素抽出にどの程度の影響を及ぼすのかを検討した。また、低温醸し法と通常の仕込み方法を比較して、果醪を低温に置くことが重要なのか、アルコール発酵を遅らせることが重要なのか、を検討した。

実験方法

1. 小仕込み試験

凍結保存したカベルネ・ソービニオンとメルローブドウ各 3 kg を自然解凍しながら、それぞれ除梗・破碎し、ピロ亜硫酸カリウム 200 mg/l を添加、比重換算糖度 24 度になるよう結晶ブドウ糖で補糖した後、品温を約 10°C に保ち、2 日間低温醸しを行った。その後、再水和した乾燥ワイン酵母、K 1-V 1116 (Lallemand 社) を添加して 20°C の恒温室に移し、醸し発酵を行った（低温醸し区）。対照区は、低温醸しを行わず、通常の醸し発酵を行った。なお、対照区の醸し発酵は、初め 2 日間は速やかに発酵を開始させるため 25°C 恒温室で行い、その後は低温醸し区と同じ 20°C 恒温室で行った。低温醸し区、対照区ともに除梗・破碎の 10 日後に圧搾し、20°C 恒温室で発酵を続けたのち、アルコール発酵終了後（圧搾後 6 日目）にピロ亜硫酸カリウム 60 mg/l を添加し、分析を行った。

2. 試験醸造

低温室で冷却したカベルネ・ソービニオンブドウ 147 kg を除梗・破碎し、ピロ亜硫酸カリウムを 100 mg/l 添加した後、比重換算糖度 24 度になるよう補糖し、チラー付きタンクで、品温を約 10°C に保ち 1 日間低温醸しを行った。その後酵母 K 1-V 1116 を添加し、9 日間醸し発酵を行った。これを低温醸し区とし、通常の方法で 10 日間醸し発酵させたものを対照区とした。最高温度は 26°C とした。両区ともアルコール発酵終了後、マロラクティック発酵 (MLF) スターター (Vini-flora oenos, Christian Hansen 社) を添加し、MLF 終了後、自然沈降させた上澄にピロ亜硫酸カリウム 150 mg/l を添加して 1.8 l 瓶に保存し、約 50 日後に製成酒の分析を行った。

3. 非発酵系抽出試験 1

凍結保存したカベルネ・ソービニオン及びメルローブドウ各 1.5 kg を自然解凍しながら除梗・破碎し、メッシュの袋に入れて手で圧搾して果皮・種子と果汁に分け、それぞれを 6 等分してガラス製試薬瓶に入れ、醸し状態とした。酵母及び糸状菌に抗菌活性を示すクロヘキシミド 10 mg/l、グラム陰性菌に抗菌活性を示すクロラムフェニコール 500 mg/l、及びピロ亜硫酸カリウム 200 mg/l を添加して、微生物の増殖を抑制した。果醪の体積に対して 0%, 5% 又は 10% (v/v) エタノールとなるよう、エタノール及び／または水（各区の添加量は同じ、以下同様）を添加し、10°C 又は 25°C で、2 日間醸しを行った後、遠心沈澄を分析した。

4. 非発酵系抽出試験 2 (Fig. 1)

凍結保存したカベルネ・ソービニオンブドウ 1.5 kg を用い、非発酵系抽出試験 1 と同様に 6 区に分けて非発酵系とした。エタノール非存在下低温醸し区は、低温醸し (10°C, 2 日) の後、5% 又は 10% になるようエタノールを添加し、25°C, 6 日間醸しを行った。エタノール存在下低温醸し区は、5% 又は 10% (v/v) になるようエタノールを添加後、低温醸し (10°C, 2 日間) に続いて 25°C で 6 日間醸しを行った。対照区は、低温醸しを行わず、5% 又は 10% になるようエタノールを添加し、25°C, 8 日間醸しを行った。

5. 分析及び官能評価

赤色 (A_{520})、及び黄色 (A_{420}) の吸光度は光路長 2 mm のセルで測定し、測定値を 10 mm セルの測定値の 1/5 として表記した。フェノール化合物濃度の指標となる A_{280} は、試料を純水で 1/100 に希釈した後、光路長 10 mm の石英セルで測定した。アントシアニンの発色は pH に依存するため、横塚の報告⁶⁾に従い、1.0 N HCl で試料を 1/20 に希釈した pH 0.25 での A_{520} ($A_{520\text{at pH } 0.25}$) をアントシアニン濃度の指標とした。リンゴ酸及び酢酸濃度は、酵素法のキット (ロッシュ社) を用いて測定した。その他の分析は、国税庁所定分析法に従った。

官能検査は、瓶詰め約 4 ヶ月後に他の試験醸造酒とともに当所員 22 人を審査員とし、1: 良 ~ 5: 不可とする 5 点法で採点を行うとともに、短評を記載した。

Fig. 1 Scheme of non-fermentation cold soak test 2.

To prevent the growth of microorganisms, 10 mg/l of cycloheximide, 500 mg/l of chloramphenicol, and 200 mg/l of potassium pyrosulfite were added to grape must. Ethanol concentration of the must was adjusted to 0, 5, or 10% (v/v). After storage at 10 or 25°C for 2 days, ethanol concentration was adjusted to 5 or 10%. Then the must was kept at 25°C for 6 days. The same volume of ethanol and/or distilled water was added to the must each time. EtOH, ethanol; sol., solution.

Table 1 Effect of a prefermentation cold soak on wine composition made on a small-scale wine-making test

	Cabernet Sauvignon		Merlot	
	Cold soak	Control	Cold soak	Control
Alcohol(%, v/v)	11.6	11.6	12.2	12.1
Extract(%, w/v)	2.1	2.1	2.0	1.9
pH	3.76	3.83	3.81	3.86
Titrateable acidity(%, w/v) *	0.79	0.75	0.56	0.60
A ₄₂₀ (1/5)	0.323	0.285	0.323	0.289
A ₅₂₀ (1/5)	0.425	0.327	0.394	0.310
A ₅₂₀ at pH 0.25(1/20)	1.259	1.069	1.333	1.178
A ₂₈₀ (1/100)	0.306	0.287	0.380	0.358

*Calculated as tartaric acid concentration.

実験結果

1. 小仕込み試験 (Table 1)

カベルネ・ソービニオン、メルローとも、低温醸し

を行うことで、製成酒の赤色 (A₅₂₀)、及び黄色 (A₄₂₀) の吸光度、並びにアントシアニン濃度 (A₅₂₀at pH 0.25) が対照区よりも高くなることが示された。フェノール化合物濃度の指標となる A₂₈₀ も低温醸し区

Fig. 2 Changes in alcohol concentration and temperature(A), absorbance at 520 nm and at 420 nm $\times$ 1/5 (B), and absorbance at 280 nm $\times$ 1/100(C) of cold soak (●, ▲) and control (○, △) red wine of Cabernet Sauvignon during maceration

の方が高い傾向を示したが、 A_{420} 、 A_{520} 及び A_{520} at pH 2.5 よりも差は小さかった。遊離のアントシアニンに由来する若い赤ワインの色は、アントシアニン濃度だけでなく pH や亜硫酸濃度の影響を受けることが知られている。しかし、製成酒の pH に大差がなく、亜硫酸添加量も同じであること、 A_{520} at pH 0.25 の値も低温醸し区の方が高いことから、低温醸しを行うことで、製成した赤ワインのアントシアニン系色素が増加したと考えられた。

2. 試験醸造

147 kg のカベルネ・ソービニヨンブドウを用いて、試験醸造を行った (Fig. 2)。低温醸し区は対照区に比べ、仕込み初期は低い A_{520} を示したが、中期以降は対照区よりも高い値を示した。低温醸し区、対照区とも 5 日目に最も高い A_{520} を示し、その後は減少した。 A_{420} も A_{520} と同様の傾向を示したが、 A_{280} は低温醸

し区の方がやや低い値で推移した。MLF 終了後、亜硫酸を添加して 50 日間貯蔵した後 (Table 2) も、低温醸し区は対照区よりも高い A_{420} 及び A_{520} を示した。また、低温醸し区は対照区よりも酵母が高浸透圧条件に長く置かれることで、酢酸濃度が高くなる可能性がある⁷⁾と懸念されたが、製成酒の酢酸濃度には違いが認められなかった。また官能評価の結果 (Table 3)、評点の有意差は認められなかったが、低温醸し試験酒は軽い、うすいという評価が対照酒よりも少なく、ボディがあるという評価が多くあった。今後、低温醸し法がワインの香りやボディ感などの品質に及ぼす影響についても、詳細な検討が必要と考えられる。

3. 非発酵系抽出試験

そこで、どのような条件で醸すことに色素抽出促進効果があるのかを調べるため、抗生物質及び亜硫酸を添加して微生物の増殖を抑制した状態で、アルコール

Table 2 Effect of a prefermentation cold soak on the composition of wine made from Cabernet Sauvignon on a pilot plant-scale test

	Alcohol (%)	Extract (v/v) (%)	A ₄₂₀ (1/5)	A ₅₂₀ (1/5)	A ₂₈₀ (1/100)	pH	TA* (%, w/v)	Malate (mg/l)	Acetate (mg/l)	Total SO ₂ (mg/l)
Cold soak	12.9	2.5	0.414	0.561	0.358	3.9	0.51	54	461	85
Control	12.4	2.7	0.372	0.474	0.397	3.9	0.52	50	464	78

*Titratable acidity, calculated as tartaric acid concentraion.

After malolactic fermentation and natural settling, 150 mg/l of potassium pyrosulfite was added to the wine, and the wine was bottled. Wine analyses were carried out 50 days after the bottling.

Table 3 Sensory evaluation of Cabernet Sauvignon wine made on a pilot plant-scale test

	Comments	Cold soak	Control
Color	Good color	1	0
	Light color	0	1
Smell & Flavor	Good flavor	1	2
	Stemy or green	2	2
	Low flavor	0	1
	Sulfurous	2	4
	Smoky	1	0
Taste & Total quality	Full body	3	0
	Excessive tannin	0	2
	Astringency	2	1
	Bitter	2	0
	Acid	4	6
	Low acidity	1	1
	Thin or light body	2	5
	Well balanced	2	3
	Soft	1	1
	Clear	1	0
	Heavy	1	0
	Not clear	1	0
Points*		2.32±0.87	2.50±0.84

*Total quality of wine was evaluated as 1, good, -5, poor by 22 panellists. Figures are average±standard deviation.

度数を 0.5, 及び 10%, 醸し温度を 10 及び 25°C として 2 日間醸し状態を保った（非発酵系抽出試験 1）。その結果（Table 4），カベルネ・ソービニオン，メルローとも，アルコール濃度が高いほど，また醸し温度が高いほど，色の強度及び A₂₈₀ が高い値を示した。すなわち，低温醸しの間に，多量の色素が抽出されるわけで

はないことが明らかになった。これは，試験醸造の初期には低温醸し区の A₅₂₀ が低いことと一致する結果である。

次に，10°C，2 日間低温醸しを行った後に，発酵中の果醪を想定して 5 及び 10% エタノール存在下で 25°C，6 日間醸しを行った。このとき，エタノールを低温醸し

Table 4 Effects of temperature and ethanol concentration on extraction of anthocyanin and total phenols during soaking

	Cabernet Sauvignon						Merlot					
	10°C			25°C			10°C			25°C		
	0%	5%	10%	0%	5%	10%	0%	5%	10%	0%	5%	10%
A ₄₂₀ (1/5)	0.037	0.042	0.048	0.055	0.070	0.074	0.052	0.058	0.066	0.066	0.073	0.087
A ₅₂₀ (1/5)	0.061	0.068	0.073	0.111	0.125	0.117	0.069	0.069	0.071	0.108	0.107	0.116
A ₅₂₀ at pH 0.25 (1/20)	0.432	0.572	0.674	0.552	0.769	0.845	0.440	0.546	0.628	0.522	0.682	0.819
A ₂₈₀ (1/100)	0.237	0.266	0.290	0.279	0.344	0.380	0.293	0.313	0.348	0.327	0.375	0.445

Antibiotics and potassium pyrosulfite were added to grape must (see Fig. 1). The must was adjusted to 0, 5, or 10% (v/v) of ethanol, and kept for 2 days at 10 or 25°C.

Table 5 Effect of ethanol concentration during a cold soak on extracted anthocyanin and total phenol concentrations after the following soak at 25°C

Final ethanol concn.	Cold soak w/o ethanol		Cold soak with ethanol		w/o cold soak (control)	
	5%	10%	5%	10%	5%	10%
A ₄₂₀ (1/5)	0.176	0.214	0.158	0.209	0.158	0.204
A ₅₂₀ (1/5)	0.182	0.204	0.160	0.188	0.162	0.196
A ₅₂₀ at pH 0.25 (1/20)	0.227	0.280	0.203	0.249	0.209	0.256
A ₂₈₀ (1/100)	0.245	0.270	0.237	0.293	0.257	0.290

The experimental scheme is shown in Fig. 1.

期から加えた区（エタノール存在下低温醸し区）と、低温醸しにはエタノールを加えない区（エタノール非存在下低温醸し区）を設け、低温醸しを設けない区を対照区とした（非発酵系抽出試験2, Fig. 1）。その結果（Table 5）、非発酵系抽出試験1と同様、エタノール濃度が高い方が、色の強度及びA₂₈₀が高くなったが、同じエタノール濃度であれば、対照区よりもエタノール非存在下低温醸し区の方がA₄₂₀、A₅₂₀及びA₅₂₀ at pH 0.25が高い値となり、小仕込み試験及び試験醸造の結果が再現された。エタノール存在下低温醸し区のこれらの値は対照区と大きな差がなかった。A₂₈₀はエタノール存在下、非存在下ともに低温醸しを行っても対照区とほぼ同等、またはやや低い値であった。

考 察

以上の結果から、除梗・破砕後エタノール非存在下で醸しを行うことで発酵中の色素抽出を促進し、A₂₈₀

はほとんど対照と変わらないことが明らかになった。過剰なフェノール化合物、特にタンニン前駆体であるプロシアニジンやカテキン類の抽出は、ワインに過度の渋味を与えるため、望ましくないと考えられる。赤ワイン醸造用に色素抽出効果をうたった酵素剤が市販されているが、赤色色素とともに他のフェノール化合物の抽出も促進されることが報告されている^{8,9)}。従って、色素の抽出は促進されるが、他のフェノール化合物の抽出は促進されない点で、低温醸し法は優れていると考えられる。Cuénat ら¹⁾の報告では、低温醸しでタンニンや総フェノール濃度も上昇しているが、低温醸し中にポンピングを行ったことが原因ではないかと推察される。

また、Cuénat ら¹⁾は低温醸し中に野生酵母、*Hanseniaspora uvarum*が増殖することを報告しており、これらの野生酵母が色素抽出促進効果を持つ可能性も想定された。しかし、非発酵系抽出試験2の結果

(Table 5), 微生物の増殖を抑制した条件でも、低温醸し区では色素抽出が促進された。従って、エタノールの存在しない低温醸し中に、ブドウ果皮中または果醪中で生じる変化も、色素抽出に対して、少なくとも何らかの促進効果を持つものと推定される。

本研究では、小仕込み試験や非発酵系抽出試験に凍結保存したブドウを使用しており、果皮組織が凍結によって損傷を受け、果皮成分が生果よりも抽出されやすい条件になっている可能性も考えられる。しかし、試験醸造には生果を使用しており、低温醸し法によって色素抽出が促進されることは、他年度の試験醸造でも確認された（結果省略）。

アントシアニンと、タンニン前駆体であるロイコシアニジンやカテキン類は、類似した構造を持ち、ともにフラボノイド合成系で生成されるが、アントシアニンが液胞に存在するのに対し、タンニンは液胞内に遊離で存在するものと、液胞膜及び細胞壁多糖類と結合して存在するものがあることが報告されている¹⁰⁾。このような存在様式の違いが、低温醸しを行った場合のアントシアニン濃度と A_{280} の変化の違いの一因となっているのではないかと推定される。

なお、ワイン中のアントシアニンは、高分子化したフラボノイド（タンニン）と複合体を形成して安定化すること¹¹⁾、遊離のアントシアニンの割合は醸し発酵中にも減少し、複合体を形成すること¹²⁾、など複雑な消長を取ることが報告されており、低温醸しを行ったワイン色素の、醸造中、並びに貯蔵・熟成中の変化や安定化は、今後の重要な検討課題と考えられる。

また、低温醸しには、ブドウに由来するワインの香りを高める作用があると報告されている¹⁻³⁾。McMahon ら¹³⁾ は、カベルネ・ソービニヨンの低温醸し中に、配糖体成分が増加しており、これがワインの香りに関連しているのではないかと報告している。今回の試験醸造では、香氣成分に及ぼす影響を検討していないが、試験醸造酒の官能評価の結果、低温醸し区は対照区よりもボディがあるという意見が多くあった。低温醸しの香りへの影響や貯蔵・熟成後のワインに及ぼす影響などが、今後の検討課題と考えられる。

要 約

赤ワイン醸造における低温醸し法がワインの色やフェノール化合物の抽出に及ぼす影響を検討した。小仕

込み試験で、10°C、2 日間の低温醸しを行ったものは、対照よりも A_{520} （赤色）、 A_{420} （黄色）及びアントシアニン濃度が高く、 A_{280} （フェノール化合物濃度の指標）には有意な差がなかった。パイロットスケールでの試験醸造でも同様の結果が得られた。低温醸しは、色素の抽出は促進するが、その他のフェノール化合物の抽出を促進しない点で、すぐれた方法と考えられる。2 日間の低温醸しの後に、エタノールを添加して 25°C で 6 日間、非発酵条件で醸した場合、低温醸しを行わない対照区や、エタノールを加えた状態で低温醸しを行った場合よりも A_{520} 、 A_{420} 、アントシアニン濃度が高くなったが、 A_{280} には有意な変化が認められなかった。従って、エタノール非存在下で低温醸しを行うことで、それに続く発酵中の色素の抽出が促進されることが示唆された。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、貴重な助言を戴いた当所荒巻功研究室長、試験醸造をご指導戴いた橋爪克己主任研究員、並びに官能評価にご協力戴いた審査員各位に深謝致します。

文 献

- 1) P. Cuénat, F. Lorenzini, C. A. Brégy and E. Zufferey : *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **28**, 259-265 (1996)
- 2) A. Reynolds, M. Cliff, B. Girard and T. G. Kopp : *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**, 235-240 (2001)
- 3) M. Feuillat : *Rev. des Oenologue*, **82**, 29-31 (1997)
- 4) V. Gerbaux, R. Naudin, O. Meurgues and C. Monamy : *Rev. Francaise d'Oenologie*, **166**, 10-15 (1997)
- 5) R. B. Boulton, V. L. Singleton, L. F. Bisson and R. E. Kunkee : *Principles and practices of winemaking*, p. 222, Chapman & Hall, New York (1995)
- 6) 横塚弘毅：醸協，**90** (3)，222-229 (1995)
- 7) S. Akamatsu, H. Kamiya, N. Yamashita, T. Motoyoshi, N. Goto-Yamamoto, T. Ishikawa, N. Okazaki and A. Nishimura : *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 555-560 (2000)
- 8) 高原康生・安井 孝・後藤（山本）奈美・鈴木 崇・戸塚 昭：醸協，**89** (10)，831-833 (1994)

9) J. Bakker, S. J. Bellworthy, H. P. Reader and S. J. Watkins : <i>Am. J. Enol. Vitic.</i> , 50 , 271-276 (1999)	<i>Enol. Vitic.</i> , 43 , 63-70 (1992)
10) K. A. Joutei, Y. Glories and M. Mercier : <i>Vitis</i> , 33 , 133-138 (1994)	12) K. Yokotsuka, M. Sato, N. Ueno and V. L. Singleton : <i>J. Wine Res.</i> , 11 , 7-18 (2000)
11) V. L. Singleton and E. K. Trousdale : <i>Am. J.</i>	13) H. M. McMahon, B. W. Zoecklein and Y. W. Jasinski : <i>Am. J. Enol. Vitic.</i> , 50 , 385-390 (1999)
-