

[Original Paper]

醸し発酵の温度及び期間が赤ワインのアントシアニン及び プロアントシアニジンに及ぼす影響

後藤(山本)奈美^{1,2*}・平野晶子^{1,2}・川田真悠子^{1,2}・沼田美子代¹・小山和哉¹

¹独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山3-7-1

²広島大学大学院生物圏科学研究科 〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4

Influence of Maceration Temperature and Duration on Anthocyanin and Proanthocyanidin of Red Wine

Nami GOTO-YAMAMOTO^{1,2*}, Akiko HIRANO^{1,2}, Mayuko KAWADA^{1,2},
Mineyo NUMATA¹ and Kazuya KOYAMA¹

¹National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashihirosima. 739-0046 Japan

²Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4, Kagamiyama, Higashihirosima. 739-8528 Japan

The effects of maceration temperature and duration on anthocyanin and proanthocyanidin of red wine were examined using Merlot cultivated in Japan. First, an extraction experiment using model wine solutions showed that the concentration of proanthocyanidin was enhanced by ethanol concentration, temperature and maceration duration. On the other hand, the anthocyanin concentration was enhanced by ethanol concentration and temperature, but suppressed by duration. Second, small scale vinification test showed that a short (3 days) maceration at a high temperature (30°C) resulted in a stronger red color and lower proanthocyanidin concentration than the control (25°C for 8 days). Also, a combination of cold maceration (15°C for 2 days) with the short maceration at a high temperature resulted in a stronger red color and similar proanthocyanidin concentration compared with the control. The difference in the color of produced wine was maintained ever after aging for one year in bottles. We need further investigation to know the difference of the effects among cultivars and the applicability of such temperature conditions in wineries.

Keywords: anthocyanin, proanthocyanidin, condensed tannin, maceration temperature

諸 言

赤ワインに含まれるアントシアニン及びその誘導体は赤色の、プロアントシアニジン(縮合タンニン)は渋味やボディ感に関与する重要な成分である。赤

ワインの醸し発酵中に、アントシアニンはブドウの果皮から、プロアントシアニジンはブドウの果皮と種子から抽出される。これまでに醸しの長さや温度条件等、種々の検討が行われ、これらの条件によってアントシアニンやプロアントシアニジンの抽出及びアントシアニンの誘導体化による安定化が異なることが知られている (Sacchi et al. 2005)。

日本の赤ワイン用ブドウは、高温多湿な気象条件

* Corresponding author (e-mail: gotoh_n@nrib.go.jp)

受付日：2020年9月25日

受理日：2020年12月9日

から、着色が不十分になりやすいと言われており、海外の情報がそのまま適用できない場合も想定される。そこで、まず、種子・果皮からの抽出に及ぼす温度、エタノール濃度、期間の影響をモデルワインを用いて確認するとともに、種々の温度・醸し期間の条件で小規模発酵試験を行い、その影響を検証した。

材料及び方法

1. 分析

ワインのアルコール分、エキス分、pH、及び総酸(遊離酸、滴定酸度)は国税庁所定分析法に従って分析し、総酸は酒石酸(g/100 mL)に換算した。小規模試験醸造の発酵途中のアルコール分は、ロシュ社製エタノールFキットを用いて酵素法で分析した。赤ワインの総アントシアニン(吸光度分析)は、Somers and Evans (1977)の方法を一部改変し、亜硫酸とpHの影響を排除するため、ワイン100 μ Lに900 μ Lの0.2 M酢酸・塩酸緩衝液(pH 1.0)と20 μ Lの10%アセトアルデヒドを添加・混合し、45分後に光路長2 mmのセルを用いて A_{520} を測定し、光路長10 mmに換算して示した。また、亜硫酸の影響を排除した赤ワインの赤色は、サンプル2 mLに10%アセトアルデヒド水溶液20 μ Lを添加し、45分後に光路長1 mmのセルを用いて A_{520} を測定し、光路長10 mmに換算して示した。アントシアニンモノマー及びプロアントシアニジンはKoyama et al. (2007)の方法で分析した。すなわちアントシアニンモノマーは、0.45 μ m PTFEフィルターでろ過したサンプルを、HPLCで分析し、検量線はマルビジン-3-グルコシドを用いて作成した。プロアントシアニジンは、ワインをSep-Pakカートリッジで固相抽出し、得られたポリマー画分をフロログシノール分解し、HPLCで分析した。

2. モデルワインによる抽出実験

ブドウは2009年、長野県産‘メルロ’を用い、健全果20果粒分の果皮(2.82 $\pm$ 0.093 g, 平均 $\pm$ 標準偏差, 以下同様)、または40果粒分の種子(1.30 $\pm$ 0.066 g)を20 mLのモデルワインで抽出した。モデルワインは、NaOHでpH 3.5に調整した0.3%酒石酸溶液で、ピロ亜硫酸カリウムを200 mg/L添加した。エタノールを含まない溶液と12%含む溶液の2種類

を用い、抽出温度は10℃と32℃、抽出期間は1日と3日の計8条件とし、それぞれ、50 mLコニカルチューブ中で軽く振とうした。果皮はメスとピンセットを用いてできるだけ果肉が付かないように採取した。また、微生物の影響を避けるため、果皮と種子は水洗いした後、水をよく切って24等分(8条件 $\times$ 3回繰り返し)し、1%次亜塩素酸ナトリウムに15分浸漬し、再度水洗、ペーパータオルで水切りしたのち、モデルワインに加えた。

抽出液は、15,000 rpmの遠心分離後、総アントシアニン(吸光度分析)、アントシアニンモノマー及びプロアントシアニジン濃度を分析した。

3. 温度及び醸し期間を変えた小規模試験醸造

2008年、山梨県産‘メルロ’、各1.2 kgを用い、次に示す6種類の醸し条件で小規模試験醸造を行った。各条件の設定温度経過をFig. 3 (A)に示す(コントロールは6回、それ以外は3回繰り返し)。

- (1) 高温短期 30℃, 3日後に搾汁, 以降25℃
- (2) 高温一定 30℃一定
- (3) 段階的降温 30℃から15℃まで徐々に降温
- (4) 初期低温・高温短期 15℃2日間の後, 30℃で3日間の後搾汁, 以降25℃
- (5) 初期低温 15℃2日間の後, 25℃
- (6) コントロール 25℃一定

ブドウは手で除梗し、混合した後、等分し、手で押し付けるようにして破碎してガラス瓶に入れ、ピロ亜硫酸カリウムを100 mg/L添加、比重換算糖度で22%まで補糖し、リン酸水素二アンモニウムを資化性窒素250 mg/Lまで添加した。酵母はUvafarm CMを標準的な使用方法に従って添加し、各温度に設定した培養室またはインキュベーターで発酵させた。発酵2日目に発酵助成剤(Fermaid K, 125 mg/本)を添加し、(1)は3日後、(4)は5日後、その他は8日後にネットを用いて搾汁率が重量ベースで約75%になるよう搾汁した。また、発酵途中で3 mLずつサンプリングし、15,000 rpmの遠心上澄をエタノール及び吸光度分析に使用した。

製成後のワインはピロ亜硫酸カリウムを200 mg/L添加後、滓引きをして分析に供するとともに、360 mL瓶に詰め、15℃で保存した。

結 果

1. モデルワインによる抽出実験

温度、アルコール分及び期間がアントシアニン、並びに果皮・種子のプロアントシアニジンの抽出に及ぼす影響を検証するため、モデルワインによる抽出実験を行った。各分析値に対し、三元配置の分散分析で各条件の影響を解析するとともに、各条件を説明変数とする重回帰分析（強制投入法）によって標準化偏回帰係数を求め、各条件の影響の正負とその大きさを解析した。

その結果、アントシアニンモノマーの濃度 (Fig. 1 (A)) に対しては、温度及びアルコール分は正の影響、期間は負の影響を示し、温度よりもアルコール濃度の影響が強く表れた。総アントシアニン（吸光度分析, Fig. 1 (B)) も同様の傾向であった。

プロアントシアニジンの濃度 (Fig. 2) に対しては、果皮、種子とも、温度、アルコール分及び期間がいずれも正の影響を示し、この3条件では温度の影響が最も強く表れた。

以上のことから、プロアントシアニジン濃度は種子、果皮とも温度及びアルコール分が高く、醸し期間が長いほうが高くなるが、アントシアニン濃度は

期間が長くなりすぎると低下することが確認された。

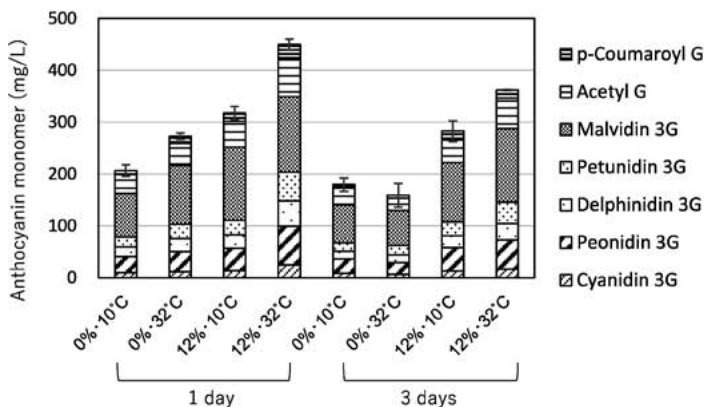
2. 温度及び醸し期間を変えた小規模試験醸造

上記の結果及びこれまでの知見 (Sacchi et al. 2005) から、赤ワインの色を濃くするには高温で短期間の醸しが有効であることが予想された。また、初期低温醸しがアントシアニン等の果皮からの抽出を促進することが国内でも報告されている (大久保ら 2003, Koyama et al. 2007)。そこで、これらの方法を組み合わせた醸し条件 (Fig. 3 (A)) を考え、小規模試験醸造を実施した。6条件間の多重比較は Tukey-Kramer法で行った。

試験醸造中のエタノール濃度 (Fig. 3 (B)) は、温度条件から予想される発酵速度と矛盾しない変化を示し、製成酒のアルコール分、酸度、pH及びエキス分 (Table 1) は6条件ともほぼ同じ値となった。

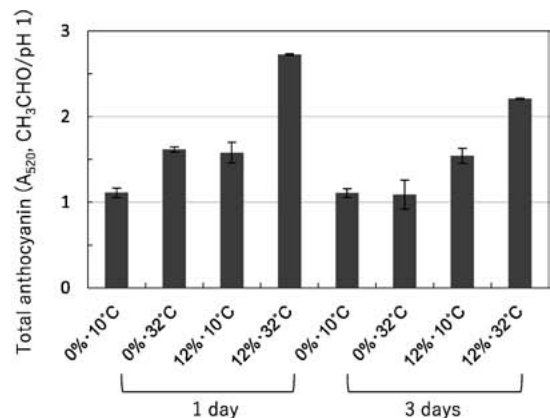
発酵液の赤色を示す A_{520} の変化 (Fig. 3 (C)) では、(2) 高温一定では醸し期間が長くなるに伴い、赤色が薄くなっていったが、(1) 高温短期仕込みでは、搾汁後の色が比較的一定であった。これまでの報告どおり (5) 初期低温醸しは (6) コントロール

(A)



	Temperature	Alcohol	Duration
ANOVA (<i>p</i>)	0.000	0.000	0.001
Standardized partial regression coefficient	0.387	0.758	-0.344

(B)



	Temperature	Alcohol	Duration
ANOVA (<i>p</i>)	0.000	0.000	0.012
Standardized partial regression coefficient	0.523	0.711	-0.246

Fig. 1 Anthocyanin extraction from berry skin in model wine solutions with 0% and 12% ethanol. Concentrations of anthocyanin monomers (A) were determined by HPLC. G: glucoside. Total anthocyanin (B) was determined as A_{520} after the addition of acetaldehyde and dilution with 0.2 M buffer solution, pH 1.0 to suppress the effects of SO_2 and pH. Standardized partial regression coefficients were obtained by multiple regression analysis (forced entry). Bars indicate standard deviations.

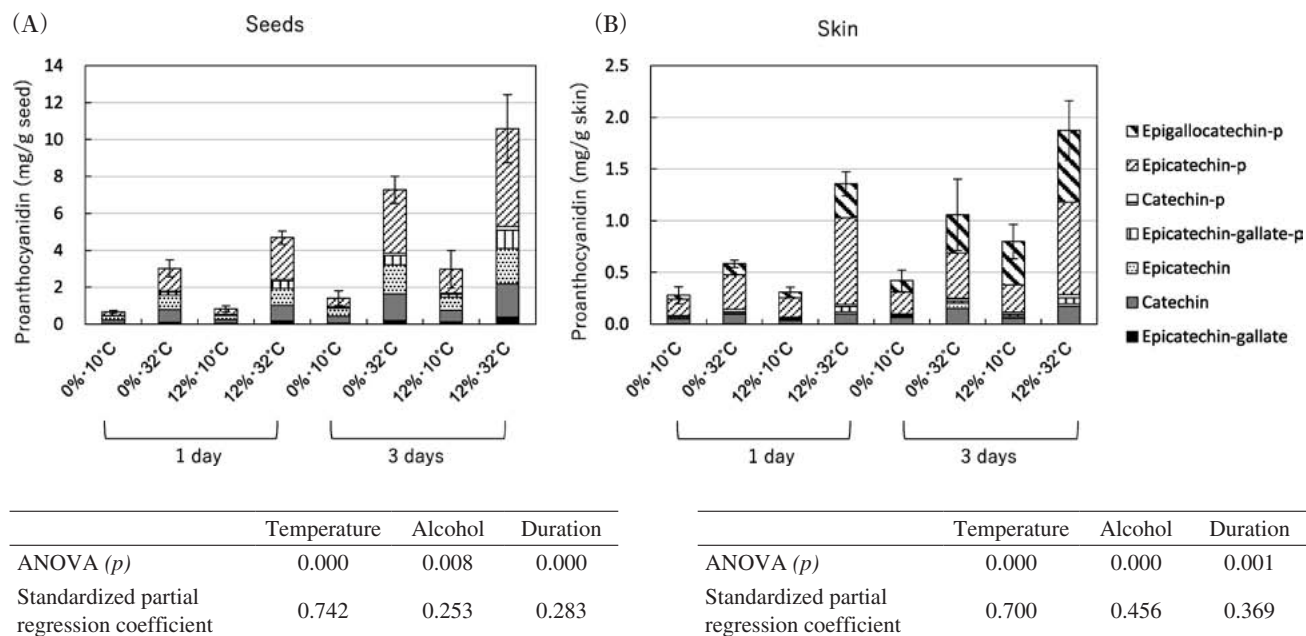


Fig. 2 Proanthocyanidin extraction from seeds (A) and berry skin (B) in model wine solutions with 0% and 12% ethanol. See legends of Fig. 1 for details. Proanthocyanidin composition was analyzed by HPLC after phloroglucinolysis. P in the graph legend means phloroglucinol adduct of proanthocyanidin degradation products.

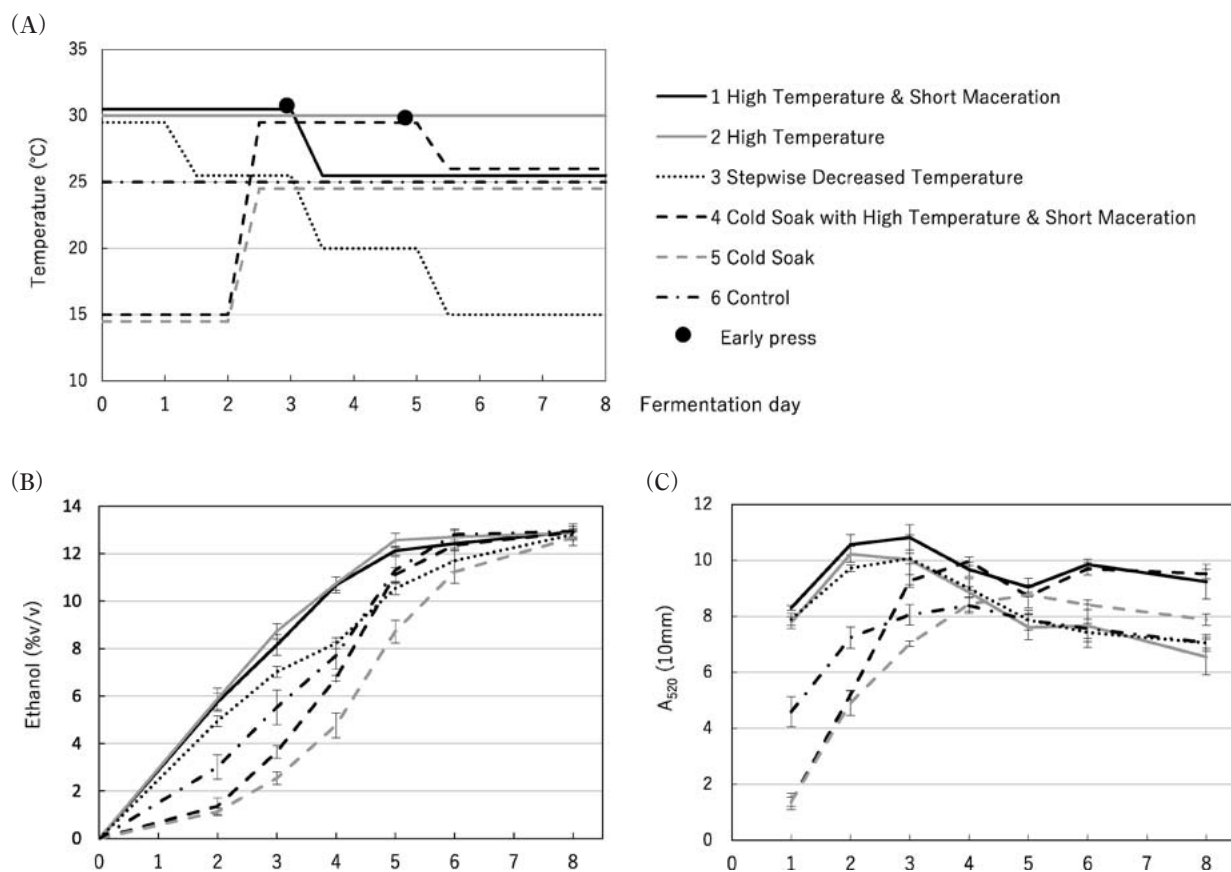


Fig. 3 Small-scale vinification of Merlot under different temperature conditions (A). Changes in ethanol concentration (B) and in absorbance at 520 nm (C). N = 3 for conditions 1–5, and n = 6 for condition 6.

Table 1 Analytical data of Merlot wine made through different maceration conditions

Maceration condition*	Alcohol (% v/v)	Extract	Titrateable acidity g/100 mL as tartaric acid	pH
1	12.3 ± 0.03	2.5 ± 0.03	0.69 ± 0.024	3.51 ± 0.012
2	12.0 ± 0.01	2.5 ± 0.04	0.64 ± 0.007	3.60 ± 0.025
3	12.0 ± 0.04	2.8 ± 0.26	0.77 ± 0.065	3.50 ± 0.010
4	12.1 ± 0.06	2.6 ± 0.06	0.68 ± 0.014	3.54 ± 0.012
5	12.1 ± 0.05	2.5 ± 0.04	0.70 ± 0.018	3.53 ± 0.015
6	12.0 ± 0.09	2.5 ± 0.05	0.71 ± 0.017	3.51 ± 0.019

* See Fig. 3 (A).

Values are means ± standard deviations.

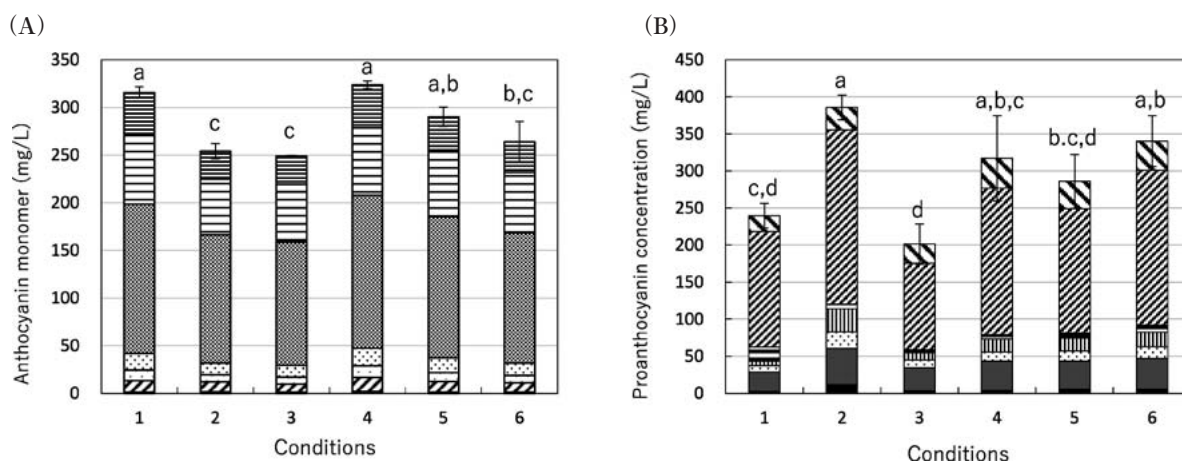


Fig. 4 Concentrations of anthocyanin monomer (A) and proanthocyanidin (B) in Merlot wine made under different temperature conditions. See Fig. 3 for conditions 1 to 6. See Fig. 1 and Fig. 2 for graph legends for anthocyanin monomers and proanthocyanidins, respectively. Different letters mean significant difference at $p < 0.05$.

よりも赤色が濃くなり、(4) 初期低温と高温短期を組み合わせて、さらに赤色が濃くなった。(3) 段階的降温は赤色に関してはポジティブな効果は認められず、(2) 高温一定とほぼ同様に徐々に赤色が減少した。製成後のアントシアニンモノマーの分析 (Fig. 4 (A)) でも、同様の傾向が認められ、(1) 高温短期と (4) 初期低温・高温短期のアントシアニン濃度は、(2) 高温一定、(3) 段階的降温及び (6) コントロールより有意に高く、(5) 初期低温醸しは両グループの中間的な値となった。

プロアントシアニジン濃度 (Fig. 4 (B)) は (2) 高温一定が最も高く、(1) 高温短期と (3) 段階的降温が有意に低い値を示した。これは 1. で得られたプロアントシアニジンの抽出には温度、アルコール分、期間がそれぞれ正に作用するという結果 (Fig.

2) を裏付けるものと言える。(4) 初期低温・高温短期と (5) 初期低温は、(6) コントロールと有意な差は認められなかった。また、プロアントシアニジンの組成には顕著な影響は認められなかった。なお、ワインのプロアントシアニジンは加水分解率が低いことが知られており、フロログルシノール分解法による測定値は他分の析法と比較して低くなる傾向にあった。しかし、ある程度正の相関は保たれており、実験区間の比較は可能と考えられる (Koyama et al. 2007)。

製成後のワイン、及び 360 mL 瓶で 15℃、1 年間保存したワインについて、亜硫酸の影響を排除した A_{520} を Fig. 5 に示す。製成後の値は、発酵中の最終サンプルの A_{520} 及びアントシアニンモノマー濃度とほぼ同じ傾向を示した。1 年間保存後のサンプルは全

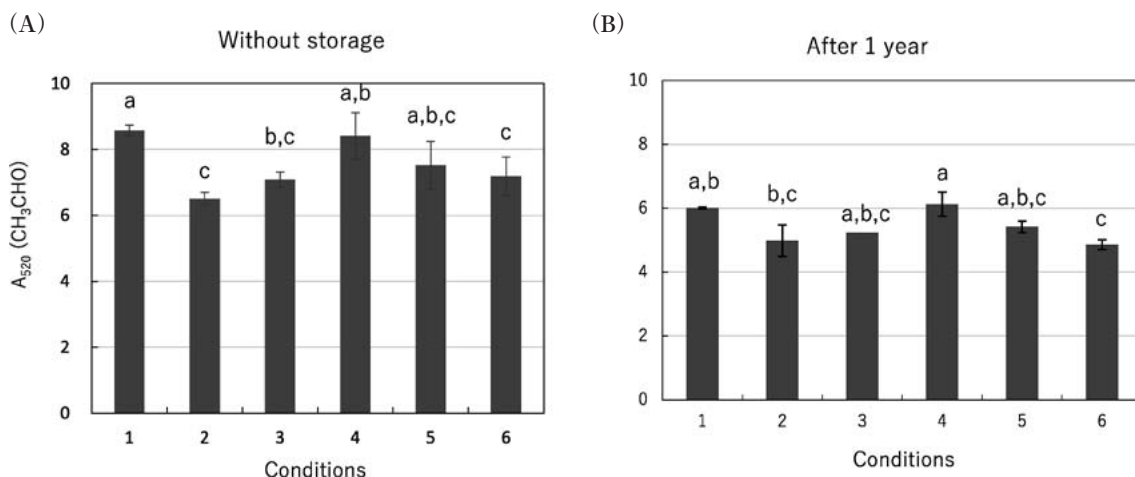


Fig. 5 Red color of Merlot wine made under different temperature conditions immediately after vinification (A) and after 1-year storage (B). Absorbance at 520 nm was determined after the addition of acetaldehyde. See Fig. 3 for conditions 1 to 6. After one year, the sample number for conditions 1, 2, 4, and 5 was 2, that for condition 3 was 1, and that for condition 6 was 3.

体に製成後より値が低くなっているもののほぼ同じ傾向を示し、製成後の差異を維持していることが示唆された。

以上の結果から、(6) コントロールの25℃一定と比較すると、(1) 高温短期醸しは赤色が濃く、プロアントシアニジンの抽出が少ない方法、(4) 初期低温と高温短期を組み合わせた醸し条件は、赤色が濃く、コントロールと同程度のプロアントシアニジンの抽出が得られる方法であることが示された。

考 察

1. モデルワインを用いた抽出実験で、アントシアニン、プロアントシアニンともに温度及びアルコール分が高い方が抽出が促進されることが確認された。同様に、Canals et al. (2005) は、‘テンプラニーリョ’の果皮、種子を0、6.5及び13% エタノールを含むモデルワインで抽出し、アントシアニンは0%エタノールより6.5%及び13%エタノールの方が、プロアントシアニンはアルコール分が高い方が抽出量が多いことを報告している。アントシアニンは水溶性であるが、果皮の細胞中で液胞膜及び細胞膜に囲まれて存在しており、プロアントシアニンと同様、アントシアニンもエタノール及び温度によって抽出が促進されることは理にかなっていると考えられる。

また、抽出実験でプロアントシアニン濃度は、各条件とも1日目より3日目の方が高くなったが、アントシアニン濃度は3日目の方が低くなった。醸し発酵が長くなるとアントシアニン濃度及び赤色の強度が低下することは、多くの研究で報告されている (Casassa and Harbertson 2014)。その理由として、酵母や酒石、懸濁物質への吸着や構造の変化、分解、エタノール濃度が高くなることによるコピグメンテーションの減少などが考えられている。今回、アルコール濃度が一定の抽出実験でもアントシアニン濃度の減少が観察されたことから、コピグメンテーションの減少だけが理由ではないと考えられる。最近、井上ら (2020) は、アントシアニンは抽出された後、疎水性の違いによって減少率が異なるが、果皮への再吸着は認められなかったと報告している。しかし、小規模試験醸造では、(2) 高温一定では徐々にA₅₂₀が減少したが、(1) 高温短期ではプレス後のA₅₂₀の変化が少なかったことから、果皮・種子が何らかの影響を及ぼしていることが推定される。今後、その機作の解明が望まれる。

醸し温度及び期間の影響について、Budić-Leto et al. (2003) はクロアチアの品種 ‘Babić’ を用いて、最高温度29℃で4、6、13日の醸しと、最高温度23℃で7日間の醸しを比較し、製成後の総アントシアニンは29℃、6日間の醸しが最も高く、29℃、13日の

醸しが最も低いこと、6か月後には29℃、4日と6日が、29℃、13日と23℃、7日より有意に高かったことを報告した。なお、醸し温度の影響として、Gao et al. (1997) は、30℃での醸し発酵で得られたワインは、20℃のものと比較して高分子化した色素が多いことを報告しており、高めの醸し発酵温度及び適度な醸し期間は色素の安定化にも有効であると考えられる。

一方、Gómez-Plaza et al. (2001) は、‘Monastrell’を用いた試験醸造で、4日、5日の醸しよりも10日間の醸しが最も Wine color の値が高く、12か月後も同様であったと報告している。上述の Budić-Leto et al. (2003) の報告とは温度条件などが同じではないが、品種の違いも影響しているものと推定される。なお両報告とも、製成時の色の違いが6か月又は12か月の貯蔵後も維持されており、本研究も同様であった。

初期低温醸しについては、以前に‘カベルネ・ソーヴィニヨン’を用いてフェノール化合物の果皮からの抽出を促進し、種子からの抽出を抑制する効果を報告している (Koyama et al. 2007)。今回の実験でも、(5) 初期低温区と (6) コントロールのアントシアニン濃度及び主に種子から抽出されるプロアントシアニジン濃度を比較すると、有意差はなかったが前報と同様の傾向が認められた (Fig 4)。 (4) 初期低温・高温短期区ではよりアントシアニン濃度が高く、(1) 高温短期と並ぶ値となった。

以前は、アントシアニンとプロアントシアニジンは、どちらもフェノール化合物としていっしょに考えられていたが、現在では両者の抽出挙動、特に醸し期間の影響が異なることやアントシアニンには安定化も重要であることが広く認識されるようになった。加えて、今回の検討のように、初期低温醸しや高めの醸し温度、短期間の醸し期間の影響に関する知見も多くなってきており、香味のバランスをとりつつ、目指すワインの酒質と収穫されたブドウに適した醸し条件を選択することが重要と考えられる。今後は、国内で赤ワイン醸造に用いられるブドウ品種による効果の差異があるか、また実際の醸造現場でこれらの温度コントロールが可能か、検証が必要と考えられる。

要 約

赤ワインのアントシアニンとプロアントシアニジンの抽出に及ぼす醸し条件の影響を国産の‘メルロ’を使用して検証した。まず、果皮・種子からの抽出実験で、アントシアニンには温度とエタノール濃度が正に、期間が負に影響すること、プロアントシアニジンにはこの3条件がいずれも正に影響することを確認した。次に、種々の温度条件や醸し期間を変えた小規模試験醸造を行い、25℃、8日間の醸しの対照と比較して、30℃、3日間の高温短期条件では、赤色が強く、プロアントシアニジンが少なくなり、15℃、2日間の初期低温醸しと高温短期を組み合わせた方法では、赤色が強く、プロアントシアニジンは対照と同定度になった。得られた赤色の違いは、1年間の貯蔵後も同様の傾向であった。今後は、品種による差異や、実用化の可能性を検証する必要がある。

謝 辞

統計解析に協力いただいた当所、清水秀明主任研究員に感謝します。

文 献

- Budić-Leto I, Lovrić T and Vrhovšek U. 2003. Influence of different maceration techniques and ageing on pranthocyanidins and anthocyanins of red wine cv. Bavić (*Vitis vinifera*, L.). Food Technol Biotechnol **41**: 299–303.
- Canals R, Llaudy MC, Valls J, Canals JM and Zamora F. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. J Agric Food Chem **53**: 4019–4025.
- Casassa LF and Harbertson JF. 2014. Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration. Ann Rev Food Sci Technol **5**: 83–109.
- Gao L, Girard B, Mazza G and Reynolds AG. 1997. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wine during different vinification process. J Aric Food Chem **45**: 2003–2008.
- Gómez-Plaza E, Gil-Muñoz R, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A and Fernández- Fernández JI. 2001. Phenolic

Compounds and color stability of red wines; effect of skin maceration time. *Am J Enol Vitic* **52**: 266–270.

Koyama K, Goto-Yamamoto N and Hashizume K. 2007.

Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seed of grapes (*Vitis vinifera*). *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 958–965.

Sacchi KL, Bisson L and Adams DO. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am J Enol Vitic* **56**: 197–206.

Somers TC and Evans ME. 1977. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age”. *J Sci Food Agric* **28**: 279–287.

井上絵梨, 久本雅嗣, 渡辺(斉藤)史恵, 奥田徹. 2020. 赤ワイン醸造時のマスト・果皮中のフェノール濃度の変化. *J. ASEV Jpn* **31**: 21–29.

大久保圭祐, 後藤(山本)奈美, 岡崎直人. 2003. 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. *醸協* **98**: 193–200.