



Managing Director,  
Sakkie Pretorius.

AWRI   
The Australian Wine  
Research Institute

# Nitrogen management is critical for wine flavour and style

Maurizio Ugliano, Paul A. Henschke, Markus J. Herderich, Isak S. Pretorius  
The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond (Adelaide), South Australia 5064, Australia

(訳注及び免責事項) この記事は、Australian and New Zealand Wine Industry Journal の同意を得て翻訳したものです。

なお、翻訳には細心の注意を払っていますが、完全性及び正確性を保証するものではありません。

## 窒素分の管理はワインの風味とスタイルにとって重要である

**Managing Director, Sakkie Pretorius.**

**Maurizio Ugliano, Paul A. Henschke, Markus J. Herderich, Isak S. Pretorius**

**The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond (Adelaide), South  
Australia 5064, Australia**

Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 22 (6), 24-30, 2007

「ワイン造りはブドウ園から始まる」というのは、ワイン製造者達の間で広く支持されている「考え方」である。この考え方は、フランス語で「テロワール」と呼ばれる、ブドウが本来持っている特性、ひいてはそのブドウからできるワインの特性、というブドウ園のコンセプトを示している。数多くの素晴らしいワインが、素晴らしいブドウ園と関係していることは疑いようがない。それでは、酵母はどこに当てはまるのだろうか。

「ワイン酵母は忠実に、ブドウのマストをワインへと変換する」という認識は、過去数十年でその細部が変わってきた。これは、酵母の多くの役割を明らかにした科学と、様々な特性を示す菌株を幅広く選択することが可能になった結果である。例えば、殆どの酵母菌株が比較的類似した一般的な発酵香を生成するが、一部の菌株のみが、ソービニヨンブランの特性を示すシステイン抱合体を強力に分解する性質を持っている、すなわち選択された菌株のみがこの品種特性を高めることができることを意味する (Swiegers *et al.* 2006)。今日では、ワイン醸造家には発酵管理を通じて、ワインの品種特性を強化したり、さらに地域の特質を強く表現したりするための多くの選択肢がある。また、酵母はその環境に強く反応する。温度が発酵速度に影響を与えること、ブドウの固形分が酵母の生存率を高めること、および、

*Botrytis* 菌の影響を受けたマストのような高い浸透圧ストレスが、グリセロール生成を高めるだけでなく、揮発酸も高くすることはよく知られている。後者の例は、ストレスの多い（つまり高糖度）環境に適応する酵母の驚くべき能力が強く表現されている。しかし、これには風味にプラスにもマイナスにも影響しうる代謝の適応が伴う。

酵母が添加された時、その新しい環境を利用するために細胞が適応しなければならない様々なストレスにさらされる。ストレスとして知られているものには、浸透圧、酸化状態、亜硫酸の毒性、温度ショックがある（Bauer and Pretorius 2000）。栄養素は、最適濃度以下であっても以上であっても、ストレスや代謝反応を引き起こす可能性がある。最初の反応は、主要な栄養素が不足している時に酵母が増殖しないように保護すること、後者の反応は濃度が正常な範囲外の時に、潜在的な毒性に対応することを目的としている。この代謝反応には、たいてい生化学的な連鎖反応を伴い、栄養素の代謝が変化し、通常とは違う量の最終産物を酵母が分泌する場合もある（Albers *et al.* 1998）。官能的に特徴のある最終産物のいくつかは、ワインの風味特性に変化をもたらす可能性がある。H<sub>2</sub>S（硫化水素）の生成は、窒素の枯渇ストレスと関連する最もよく知られた例である。

ブドウ園の環境とブドウ栽培者による介入によって、ブドウ樹の生育、特にブドウ果実の成分組成が明らかに方向付けられる。ブドウ栽培者は仕様に合わせた果実を生産するため、長い優先事項リストのバランスを取ろうとするので、一旦果実が収穫されると修正できない性質に多くの注意が向けられるようだ。一方、酵母の栄養素はワイナリーで簡単に調整できると信じられているため、特に窒素量は発酵に最適ではない可能性がある。オーストラリアワインを製造するために、最大 500 トンのリン酸 2 アンモニウム（DAP）が毎年使用されていると推定されるが、これはワイン製造へ効果的に使用されているのだろうか？

発酵能とワインの成分組成とは対照的に、ブドウ園の窒素源管理の意味に関する我々の知識は、最近 Bell and Henschke（2005）によってレビューされた。本報告では、発酵中の窒素源が代謝の調節に果たす役割と、ワインの風味に与える可能性のあるいくつかの変化に焦点を当てていく。我々は最初に発酵に必要な窒素源を管理するのに最も優れた方法をまとめ、次いで、窒素源の影響を受ける主な風味の変化について述べる。最後に、我々は白および赤ワインの発酵中の窒素源とワインの風味の関連性を考える。

## 発酵中の窒素源を管理する現時点での最良の方法

ワイン醸造家の間で一般的に行われているのは、窒素濃度を測定せずに、酵母添加時に果汁またはマストへ標準的な DAP（リン酸 2 アンモニウム：100~300mg/L）を添加することである。本報告では、DAP の添加が香味に大きな影響をもたらすこと、さらには、初期の窒素濃度を測定することにより、適切な発酵速度が保持できるだけでなく、必要なワインの風味のプロフィールとスタイルを確実にするために DAP の添加量を調整することが可能となることを示す。この仕事は、まだシャルドネとシラーズを用いた研究に基づいた概念的な段階にあるが、ワイン醸造家がこれらの品種や他の品種で試してみる刺激になるはずである。

### 1.1 YAN（酵母資化性窒素）の測定

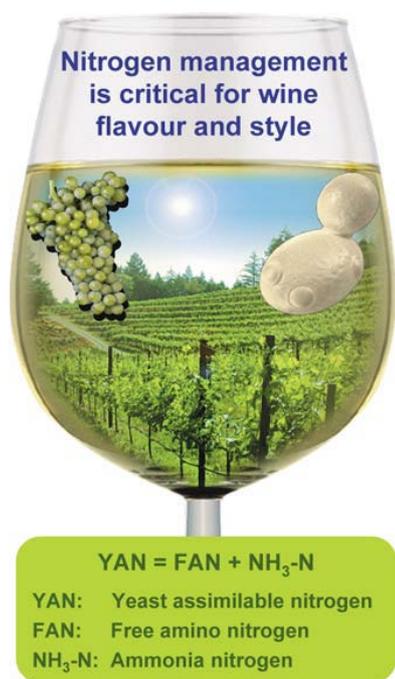
ブドウには様々な窒素化合物が含まれており、その中で最も重要なものは、一級アミノ酸（ $\alpha$ -アミノ酸）、アンモニウムイオンおよび小さなペプチドである。多くのブドウ品種中の主要な二級アミノ酸であるプロリンは、嫌気条件下では酵母に資化されない（Ingledew *et al.* 1987）。プロリンを除くこれらの窒素化合物は、一般に酵母資化性窒素（YAN）と呼ばれる。

アミノ酸は化学的に多様な分子なので、資化性窒素の最も簡便な測定法は、一般に遊離アミノ態窒素（FAN）と呼ばれる一級アミノ酸の遊離アミノ基（ $\alpha$ -アミノ基）の分析法と関係している。二級アミノ酸であるプロリンおよびタンパク質は、FAN の分析法から除外される。適用可能な化学的、酵素的および物理的方法（Shively and Henick-

Kling 2001; Bell and Henschke 2005; Filpe-Ribereiro and Mendes-Faia 2007) のうち、選択した方法は *o*-フタルジアルデヒド/*N*-アセチル-L-システイン (NOPA) 法である (Dukes and Butzke 1998) 。窒素を 82%含むアンモニアを測定するには、酵素法を追加する必要がある。これら 2 種類の窒素分の測定値を合計すると、YAN (図 1) が得られる。この分析手順は AWRI の分析サービス研究所

([http://www.awri.com.au/analytical\\_service/analyses/yeast\\_assimilable\\_nitrogen/](http://www.awri.com.au/analytical_service/analyses/yeast_assimilable_nitrogen/)) といった NATA (訳注: The National Association of Testing Authorities, オーストラリアの分析サービス機関等を認定する NPO 法人) 認定の研究室で用いられており、ワイン醸造期間中にタイムリーなサービスが提供される。

いわゆるホルモール滴定は YAN を測定するより簡便で迅速な分析法であるが (Shively and Henick-Kling 2001; Gump *et al.* 2002; Filipe-Ribereiro and Mendes-Faia 2005) , 毒性のある揮発性薬品であるホルムアルデヒドを使用するので、十分に訓練を積んだ分析者と適した実験室を必要とする。最も迅速な YAN 定量法は中赤外 (MIR) 分光分析法で、近年 AWRI によって開発された (Dambergs *et al.* 2005) 。YAN の測定は、理想的には、ブドウ園と発酵タンクの間で必然的に生じる減少による過大評価を避けるため、酵母添加時に果汁やマストのサンプルを採取する必要がある。さらに、ブドウ果汁はブドウの皮に含まれるアミノ酸の割合が高いため、果実中の総 YAN 量を過小評価する可能性がある。この点に関する詳細な議論は、Bell and Henschke (2005) のレビューを参照していただきたい。しかしながら、低 YAN に対する事前の注意は、ブドウ成熟期間中収穫の 1, 2 週間前にブドウ園でサンプリングすることで達成可能となる。



窒素管理はワインの風味とスタイルにとって重要である

$$YAN = FAN + NH_3-N$$

YAN : 酵母資化性窒素 (Yeast assimilable nitrogen)

FAN : 遊離アミノ態窒素 (Free amino nitrogen)

NH<sub>3</sub>-N : アンモニア態窒素 (Ammonia nitrogen)

図 1.

遊離アミノ態窒素とアンモニア態窒素の合計は、酵母資化性窒素分 (YAN) の推定として有用である

## 1.2 マストへ YAN を添加する

オーストラリアのブドウ果汁の YAN 含量はおおよそ 50~300mg/L の広い範囲でバラついており、その平均値は約 200 mg/L である。基準として、YAN が 400mg/L を超えた時に酵母の菌体量や発酵速度が最大になることが一般的に

認められているが、一方、150mg/L の YAN は移行領域を示し、それ以下では発酵停滞や発酵遅延の危険性が顕著に増加する (Henschke and Jiranek 1993; Blateyron *et al.* 2003) 。これらの基準確立の背景となった研究の多くが合成果汁あるいは過したブドウ果汁で実施されているので、この値は技術的には、高度に清澄化された嫌氣的な果汁発酵に対してのみ有効である。とはいえ、この基準は最悪のシナリオを示しており、他のタイプの発酵に対しても有効な手引きである。

一般に、辛口になるまで適切な発酵速度を維持するため、そのブドウ園に低 YAN による発酵の問題がこれまでにあったり、または窒素要求性が高い酵母を選択したりした時には、YAN が 150mg/L 未満の清澄化果汁は、少なくとも 150~200mg/L になるまで窒素を補わなければならない。ブリックスがより高い果汁に対しては、窒素補給は範囲の上限まで増やさなければならないが、一方、ブドウの固形分を含む果汁または通気された発酵では、低 YAN の問題を生じにくい (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000; Blateyron *et al.* 2003; Eglinton *et al.* 2005) 。本報告の後半で、果汁の YAN 含量と風味の因果関係を考察すると、ワイン醸造家のなかにはよりクリーンでフルーティーなスタイルを生み出すため、低 YAN 果汁に対して YAN が 250~300mg/L になるまで補うことを選択する人もいるだろう。

この目的のために、YAN を補うのに DAP (リン酸 2 アンモニウム) が広く用いられている。DAP は 21% の窒素を含み、便宜上、100mg の DAP は 20mg の YAN を含むと見なすことができる。一例として、YAN 濃度を 100mg/L から 200mg/L に増やすためには 500mg/L の DAP を添加する必要がある。この数字は大量の DAP 添加のように見えるが、最大発酵速度となる濃度に達するには、1.5g の DAP に相当する YAN が必要になるだろう。オーストラリアのワイン醸造家は、AWRI のウェブサイト で DAP の添加量を見積もる計算式にアクセスできる。(訳注：日本のワイナリーも免責事項に同意すれば使用できることを AWRI に確認済み)

[https://www.awri.com.au/industry\\_support/winemaking\\_resources/calculators/diammonium\\_phosphate/](https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/calculators/diammonium_phosphate/)

発酵助成剤として DAP を用いるデメリットの一つは、一部の果汁では酸性化が起こり、予想よりもワインの pH が低くなることである。酵母によってアンモニウムカチオンが利用されると、リン酸アニオンの顕著な割合が残り、初期 pH とマストの滴定酸度 (TA) 次第でより低い pH になる可能性がある。さらには、DAP の大量添加がワインの過剰なリン酸含量につながる可能性がある。実際には、DAP の最大添加量は、ワイン中に残っている可溶性リン酸塩の濃度によって制限され、これは P 400mg/L に設定されている (オーストラリア・ニュージーランド食品基準法 4.5.1) 。果汁/マストがリン酸塩を含んでいないと仮定すると、リン酸塩中のリンの濃度は最大 1.7g/L の DAP (360 mg/L の YAN に相当) に相当し、したがって実際にはより少量の DAP しか添加できない。

また、DAP の過剰使用は酢酸エステル類、特に酢酸エチルの過剰生成を促進する可能性があり、揮発酸 (VA) を感じさせ、品種の特性を抑制することになる。次節で議論するように、高濃度の YAN (450~500mg/L を超える) は多くの酵母菌株の酢酸エチル生成を促す可能性がある。

YAN 濃度が非常に低い果汁の場合、他の栄養源も同様に低い可能性があることを我々は観察してきた。このように、YAN が低く他の栄養源不足が疑われる場合、より複雑な形態の N とともにビタミン、脂質、ミネラルを含む市販の発酵助成剤の添加が役立つ可能性がある。実際、DAP 添加後に続く硫化水素の生成は一般的なビタミン不足を示唆しているが (Henschke 1996; Wang *et al.* 2003) 、他の原因もありうる。多くの酵母販売元は、一般的に不活性酵母から造られた発酵助成剤の使用を奨めている。

## YAN に対する酵母の一般的な代謝反応

酵母における糖代謝の主な役割は、エネルギーの生成と、細胞の全ての構成要素を組み立てるための炭素骨格を生み出すことである。これらの代謝活動は、ワインの香りや風味に関わるエステル、高級アルコールとポリオール、カルボニル、酸、チオールを含むいくつかの副産物をもたらす。タンパク質や核酸の合成のための窒素同化に関する代謝は、香りや風味に係る化合物の蓄積にも貢献する。窒素代謝は細胞増殖の中心的役割を果たすため、糖代謝や硫黄代謝などの他の代謝経路にも影響する。その結果、窒素分の多寡は多くの風味に関連する代謝物の生成にかなり影響を与える可能性がある。果汁やマストの窒素源の状態は、酵母増殖や糖の発酵に影響をおよぼすだけでなく、ワインの風味にも影響を与える。

### 2.1 主要な発酵産物

糖の主要な代謝物は、エタノールと二酸化炭素に加え、グリセロールやブタンジオールなどの多価アルコール、有機酸、特に酢酸やコハク酸、そして量は少ないがピルビン酸や $\alpha$ -ケトグルタル酸などのケト酸である。糖代謝で、これらの多くの一次代謝産物の生成は YAN によって調節されるが、変化の大きさは使用する酵母菌株に依存することが観察された。さらに、使用される窒素源、DAP かアミノ酸かも代謝物の生成に影響を与える (Alberts *et al.* 1996)。低 YAN の果汁は通常 DAP で補給されるため、本報告ではアンモニウムイオン濃度が酵母の代謝物生成に及ぼす影響についてのみ解説する。

エタノールは糖発酵の主要な産物である。しかし DAP の添加が酵母の増殖と発酵速度を向上させる一方で、最終的なエタノール収量に対する実質的な効果は、全くないかまたはほとんどない。理論的には、DAP で増殖した酵母はアミノ酸で増殖した酵母と比べて、細胞増殖のためにアミノ酸を合成することを余儀なくされる。このことがエタノール産生のために利用される糖分を減少させるが (Albers *et al.* 1996)、我々の実験ではエタノール収量にはわずしか影響しなかった。

ワインの組成と風味に重要なグリセロールと酢酸は、果汁の YAN 濃度に比較的強く左右される (Alberts *et al.* 1998; Torrea *et al.* 2005; Vilanova *et al.* 2007)。合成果汁や白ワインの発酵で見られる一般的な傾向を図 2 に要約した。グリセロールと酢酸の両方の生成は、使用する酵母菌株に強く依存する。例えば、酵母 *Vitilevure* M05 を用いた時、DAP を添加するとグリセロールの生成が増加するが、AWRI 796 の場合は逆である (Vilanova *et al.* 2007)。しかし、どちらの酵母も、中程度の YAN 濃度 (200~250 mg/L の範囲) で酢酸生成が最低になるが、YAN がより低濃度、もしくはより高濃度のときには、高濃度の酢酸が生成される。しかし、リンゴ酸の消費量は、酵母菌株に関係なく、DAP 濃度が増加するにつれて増える。逆に、菌株によっては DAP 添加量が増えるとコハク酸濃度が上がる可能性もある (Coulter *et al.* 2004)。一般に、YAN は風味に影響を与える可能性のある TA (滴定酸度) と、有機酸バランスに影響を与える可能性がある (Sowalsky and Noble 1998)。

発酵中の亜硫酸生成は、初期の YAN 濃度によっても促進されるが、これは酵母菌株に依存しているようである。合成培地や麦汁での試験研究で、低 YAN 培地では  $\text{SO}_2$  生成が低いが、初期の YAN 濃度が高いと増加することが示唆された (Duan *et al.* 2004; Osborne and Edwards 2006)。亜硫酸の生成は硫化水素の生成と対照的で、一般的に YAN が増えると増加する。マロラクティック発酵 (MLF) を阻害するリスクは高い YAN 添加にも関連して増加するが、この阻害は亜硫酸生成とは完全には相関していない (Osborne and Edwards 2006)。とはいえ、これらの現象についてより良い情報が得られるまでの間は、MLF が必要な場合、高 YAN 条件を避けることを考慮するほうがよいだろう。

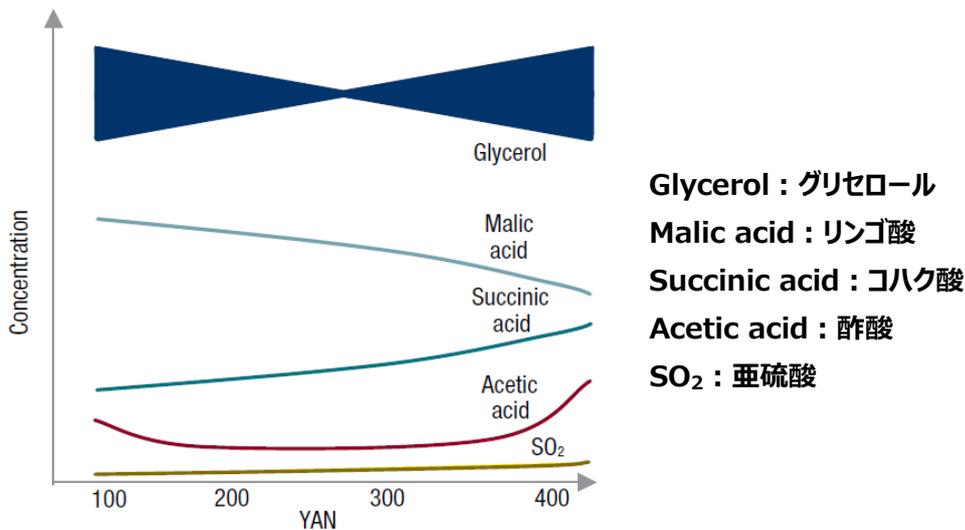
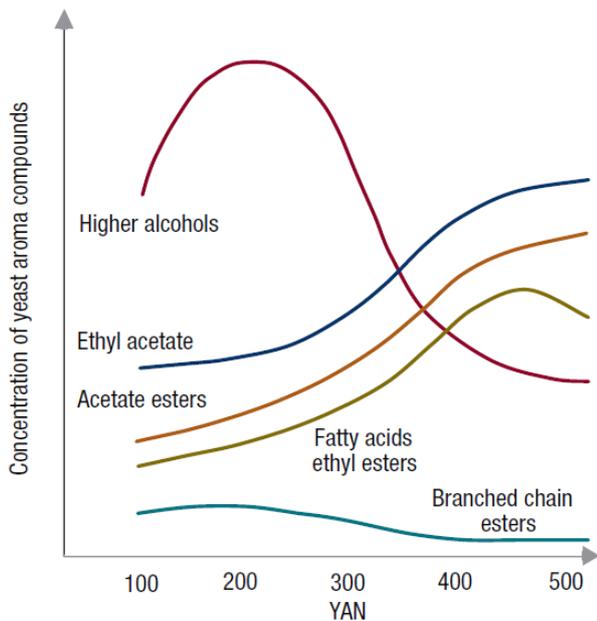


図 2. 酵母の窒化性窒素が糖発酵、および硫黄窒化による主要な代謝産物の生産、または利用に及ぼす影響

## 2.2 揮発性の香気化合物

果汁の窒素源組成により影響を受ける酵母のさまざまな代謝経路の中で、揮発性化合物の生成経路は、発酵由来の揮発性化合物がワインの香り特性に重要な役割を果たすため、特に重要である (Smyth *et al.* 2005) . いくつかの研究により、利用可能な全窒素量と、アミノ酸とアンモニアのバランスの両方が、発酵由来の各グループの揮発性化合物生成に大きな影響を与えることが示唆された。

実用的な観点から、果汁の窒素源の問題は、主として、窒素濃度が最適値よりも低く、発酵遅延または発酵停滞のリスクが高い果汁がよくみられることに関連している。この問題はワイナリーでは DAP の添加によって調整されることが多いため、この一般的なワイナリーでの対応がワインの揮発性成分に与える影響に関するいくつかの研究調査がある (Ayrappa 1971, Rapp and Versini 1999; Carrau 2003; Torrea and Henschke 2004; Hernandez-Orte *et al.* 2005, 2006; Vilanova *et al.* 2007) . 酵母菌株や発酵条件が様々なため、ワインの香りに与える DAP の添加効果に関する決定的な結論を、文献から推定することはやや困難である。ではあるものの、DAP 添加とワインの揮発性化合物との関係に関連するいくつかの一般的な傾向を図 3 に要約する。



Higher alcohols : 高級アルコール  
 Ethyl acetate : 酢酸エチル  
 Acetate esters : 酢酸エステル  
 Fatty acids ethyl esters : 脂肪酸エチルエステル  
 Branched chain esters : 分岐鎖脂肪酸エステル

図 3 .  
 初期 YAN 濃度と発酵後の揮発性化合物の関係

細胞内のアミノ酸の代謝に直接関与している高級アルコール類は、特徴的な挙動をする。すなわち、YAN 含量が非常に低い培地にアンモニウム塩を添加して全窒素源を増加させていくと、高級アルコールは初期には増加するが、YAN 濃度が 200~300mg/L でピークに達した後は減少する傾向がある。これらの変動には酵母菌株や発酵条件の違いを含む様々な要因が関与している。高級アルコール類はフーゼル油のような匂いに特徴づけられ、一般的に、ワインの発酵香の複雑さに寄与していると考えられている。しかし、非常に高濃度の高級アルコールが存在する場合は、フルーティな特徴をマスクすることが主な原因で、ワインの香りに悪影響を与える可能性がある。アンモニウム塩の補給によって高級アルコール生成が低下することにより、ワインの官能的品質を改善できるとの報告もある (Rapp and Versini 1991)。しかし図 3 からは、このアドバイスは、高級アルコールの生成パターンが減少する初期の YAN 濃度が 200mg/L 以上の場合を含むときのみ適用される可能性があるため、注意が必要である。

酢酸エチルを含む酢酸エステルだけでなく、脂肪酸エチルエステルの生成は、アルコール発酵前の果汁に DAP を添加すると一般的に増加する。脂肪酸のエチルエステルと酢酸エステルは、一般にワインのフルーティな特徴を示すため、このことはワインの風味に興味深い関係があると考えられる (Guth and Sies 2002)。しかし、酵母由来の主要な揮発性代謝物の一つである酢酸エチルが非常に高濃度で存在すると、マニキュア/溶剤や揮発酸のような用語で表現される好ましくない官能特性を与える可能性がある。分岐鎖脂肪酸エステルは、量的な観点からは発酵中にあまり多く生成されない。それらのワイン風味への寄与はこれから明らかにする必要があるが、これら化合物が、赤ワインの赤い果実の特徴に重要な寄与があるといった暫定的な証拠がある (Diaz-Maroto et al. 2005)。しかし、DAP の添加量が増えると、それらの濃度は減少するようである。

酵母由来の様々なグループの揮発性化合物が、DAP 添加に対して多様で異なる反応をするということは、揮発性化合物の各グループが異なる代謝経路に由来し、それぞれが DAP 添加に対して異なる反応をすることが原因である。ただし、実用的な観点から、ワインの官能特性を調節するための手段としての DAP 補給の潜在能力は、単に成分値に基づくだけで理解することはできない。図 3 に示す様々な揮発性物質または揮発性物質のグループは、非常に広い濃度範囲でワイン中に存在する。しかし、この図は、異なる化学物質間の実際の定量的関係を表すものではない。例えば、植物的な、フーゼル油のような匂いを特徴とする高級アルコールは、通常、果物のような匂いを特徴とする脂肪酸エチルエステルよりも最大 400 倍高い濃度になることがある。にもかかわらず、YAN 含有量の変動によってもたらさ

れる脂肪酸エチルエステルの比較的小さな濃度変動は、相対的に同じような変動が高級アルコールで起こる場合よりも、ワインの香りに影響を与える可能性が高い。これは、ある芳香化合物の濃度変化に伴う感じ方の変化が、他の要因はあるにせよ、その芳香化合物がある濃度で嗅覚刺激を生じさせる能力に依存しているからである。

この複雑な関係は、ある化合物の匂いを感じることができる最小濃度と定義される「閾値」の概念によって単純化されることが多く (Guth 1997) , これは匂い活性値 (OAV, odour active value, 訳注: 溶液中の濃度÷閾値) と呼ばれる。エステルなど、ワインのフルーティーな特徴に関連する発酵由来の揮発性化合物のいくつかは、非常に強力な匂い物質であり (つまり、閾値が非常に低い) , したがって、低濃度で存在する場合でも、特徴ある官能特性を与える。一方、高級アルコールのような化合物は、非常に高い匂い閾値を持っており、それゆえに、その濃度が非常に大きく変化する時のみ、ワインの特徴を変化させる可能性がある。図 3 に記載された化合物類に属するいくつかの揮発性化合物の OAV と DAP 補給の理論的關係を、図 4 に示す。この場合、DAP 添加によっておこる、酢酸エステルと脂肪酸エチルエステルの濃度変動 (酢酸イソアミルとオクタン酸エチルを、これら 2 つの化合物類の代表として示した) は、ワインの香気性に大きな影響を与える可能性があるが、アルコール (イソアミルアルコール) は量的には非常に多いが、影響はごく限られるだろう。OAV は、ある化合物がワインの全体的な香りに寄与する可能性を予測するだけであることを強調しておく必要があるが、図 4 に示された傾向は、DAP 添加に伴う組成変化のうち、どれがワインのアロマに大きな影響を与えるかをよく示している。

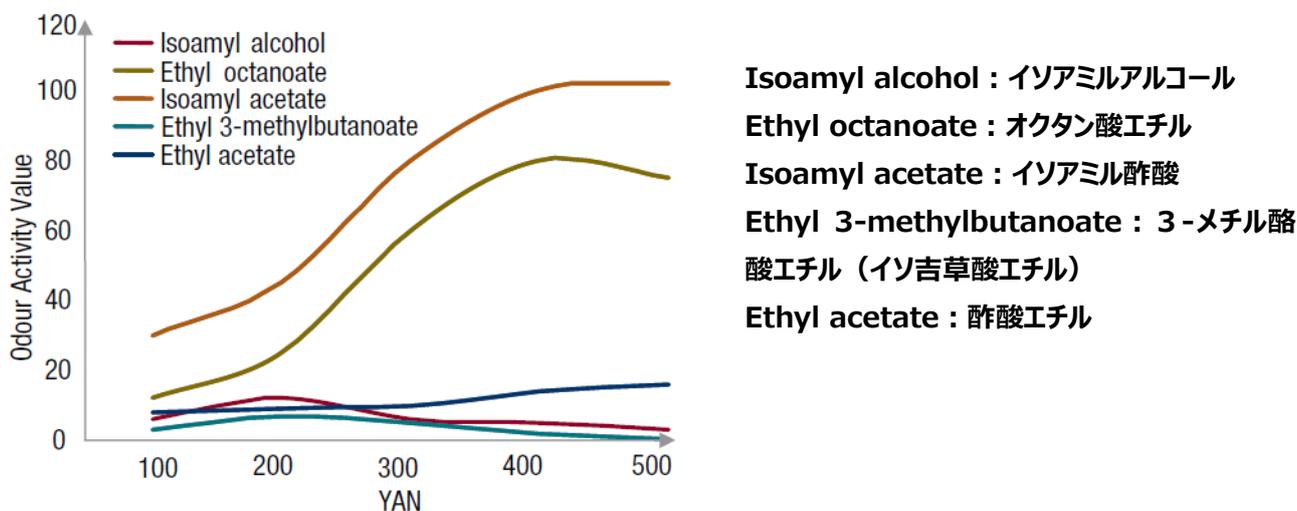


図 4. 発酵開始時の YAN 濃度と、酵母由来の芳香成分の匂い活性値 (OAV) との理論的關係

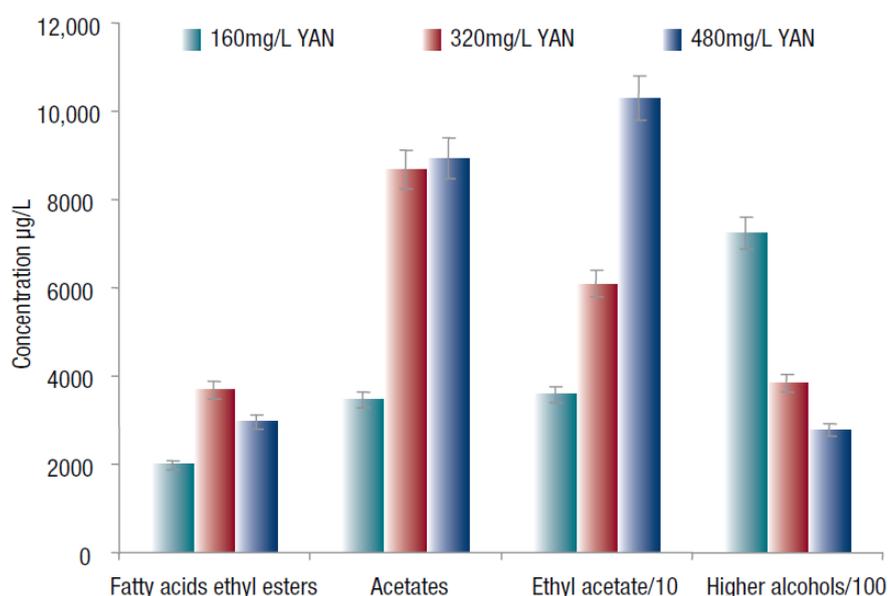
## ワイン発酵過程での窒素源の意味

### 3.1 白ワインの発酵に対する窒素源の影響

興味深いことに、AWRI で行った適量以下の YAN を含む果汁を使用した各種ワイン醸造試験の結果、通常のワイン醸造条件下で、DAP 添加がエステルの生成を調整できる非常に強力な手段であることが示された。エステルは、前述の議論のように、おそらく発酵中に生成される化合物のうち最も官能的に重要と思われるグループである。図 5 および図 6 に、様々な DAP 濃度で醸造されたシャルドネワイン中の揮発性化合物と官能プロファイルの変化を示す。図 3 で示された傾向とよく一致して、DAP はエステル生成にプラスの効果をもたらし、高級アルコールの生成を低下させた。

DAP を添加していない、または多く添加して造られたワインと比較して、果汁に適度な窒素源を添加して造られたワインの方が、パネリストによって高く評価された。この高評価は、より高い濃度の酢酸エステル、脂肪酸エチルエステル、および適度なレベルの酢酸エチルの組み合わせに原因があると思われ、酢酸エチルは、非常に高濃度で存在すると、望ましくない溶媒のような特徴を示す。低 YAN 果汁への DAP 添加はまた、多くのワイン酵母による H<sub>2</sub>S やメルカプタンの生成を抑制し、これが、この研究では定量化されていないが、適度な YAN 量のワインの高評価に貢献したことは疑いない。DAP 添加が 4 MMP, 3 MH, 3 MHA などのフルーティーなチオール類の生成に及ぼす影響は、今後解析する必要がある。

これらの結果は、組成分析結果からワインの香りを予測することが複雑であることを示している。また、不十分、もしくは過剰な DAP 添加がワインの香りにおよぼす悪い影響を避けるために、発酵前または発酵中に YAN を測定し、必要に応じて適切な量の DAP を添加することの重要性を示している。特に、過剰な酢酸エチルの生成リスクには注意する必要がある。というのも、他の酢酸エステルや脂肪酸エチルエステルが数か月のボトル貯蔵で大幅に減少する傾向があるのに対し、酢酸エチルはワインの熟成中は比較的安定だからである。



脂肪酸エチルエステル 酢酸エステル類 酢酸エチル/10 高級アルコール/100

図 5.

低 YAN (160 mg/L) シャルドネ果汁 (緑) に DAP を 2 段階の濃度で添加し、320 mg/L (赤) , 480 mg/L (青) にして得られたワインの揮発性化合物。発酵は酵母 *S. cerevisiae* AWRI 796 を使用し、18°Cで行った。

### 3.2 赤ワインの発酵に対する窒素源の影響

最近、AWRIの研究者は、シラーズのワインの揮発性成分に対するDAP添加の影響を調べた (Ugliano *et al.* 2007) . 赤ワインの製造に通常使用される条件 (すなわち、高めの温度、果帽管理操作中の発酵マストの通気、マセレーション中の果皮からのYANおよび他の栄養素の抽出) は、YAN濃度が適量以下の範囲に近づいた場合でも、発酵遅延または停止になりにくい状態にすると考えられている。それにもかかわらず、いくつかの研究結果から、

赤ブドウのYANレベルが最適値をはるかに下回る可能性があることが示された (Gockowiak and Henschke 1992; Butzke 1998; Nicolini *et al.* 2004; Ugliano and Henschke, 未公開データ) .

赤ワインの発酵中, YAN 欠乏が発酵に与える影響は穏やかであるようだが, それでも重要な芳香化合物の形成に悪影響を与える可能性がある. 低 YAN のシラーズのマスト (YAN 100mg/L) で *S. cerevisiae* AWRI 796 を使用して行われた実験結果から, DAP 添加が, 赤ワインでも揮発性組成を調節するための強力な手段であることが明らかとなった. これは, モデル基質および白ブドウ果汁を用いた発酵試験の傾向のいくつかを確認する結果であった. 図 7 に見られるように, DAP 添加は, 脂肪酸エチルエステルと, 酢酸エステルの生成量を増加させたが, 高級アルコールはほとんど影響を受けなかった.

また予備実験結果から, マストへの YAN 添加が赤ワインの色組成に影響を与える可能性があることが示された. 色の濃さと色相に関わる分析パラメーターが, DAP 添加によって変化することがわかった (Ugliano *et al.* 2007) . この効果の原因は, 現在 AWRI で調査中である. この効果は, ワインの色とフェノール組成を変化させる酵母のさまざまな代謝に起因すると思われる. これには, エタノール生産速度の違い, 酵母細胞壁へのアントシアニンの吸着 (Morata *et al.* 2003) , またはピルビン酸やアセトアルデヒドなど酵母由来の代謝物との反応によって生じる高分子色素の形成 (Romero and Bakker 1999) が含まれる.

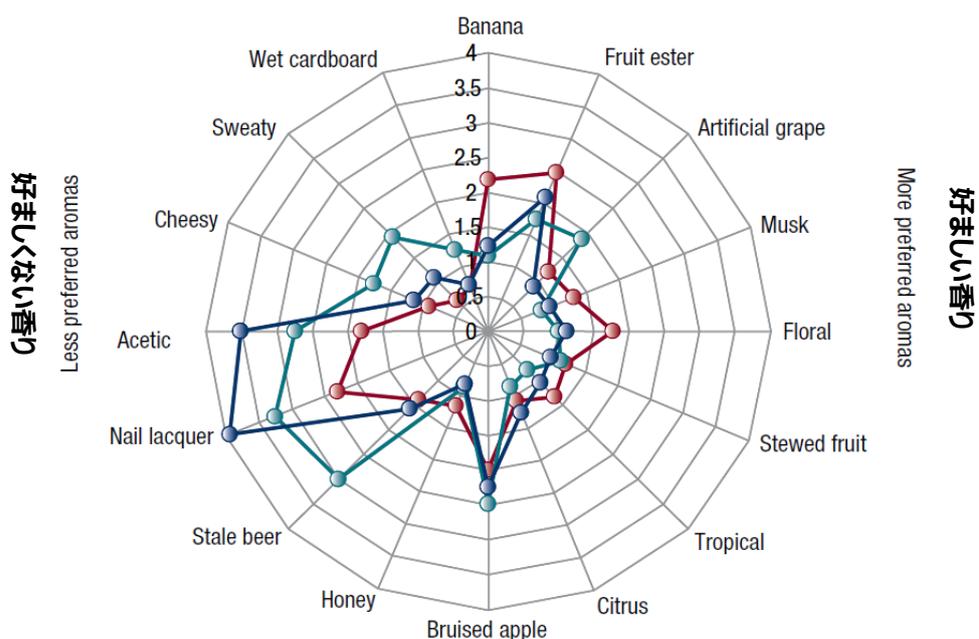


図 6.

低 YAN (160 mg/L) シャルドネ果汁 (緑線) に DAP を 2 段階の濃度で添加し, 320 mg /L (赤線) と 480 mg/L (青線) にして得られたワインの官能特性. 発酵は酵母 *S. cerevisiae* AWRI 796 を使用して, 18°Cで行った.

### 結論

本研究は, 酵母が資化可能な窒素濃度が, 酵母の良好な生育と発酵速度を確保するために重要なだけでなく, 糖発酵から生じる主要な代謝物の生産にも影響をおよぼす可能性があることを示している. エタノール濃度はほとんど影

響を受けないが、グリセロールや様々なカルボン酸の濃度はかなり変化する。これらの変化は、ワインの風味に影響を与える可能性がある。しかし最も重要なことは、YAN が揮発性代謝物のいくつか、特にバランスが取れている時にワインの香りにプラスに評価される酢酸エステルとエチルエステルの生成に、強く影響する可能性があるという知見である。高濃度ではマイナス評価になる可能性のある高級アルコールも、YAN によって調整できる。これらの様々な酵母代謝物は、赤ワインの発酵中でも異なることがわかり、これは、白ワインと同様に YAN が赤ワインの風味生成に影響を与える可能性があることを示唆している。我々の予備実験結果からは、ワインの色とフェノール類の組成も YAN の影響を受ける可能性があることが示唆された。

全体として、これらの結果は少なくともシャルドネの場合、ワインの風味とスタイルがブドウ果汁の初期 YAN 濃度によってかなり調整できることを示唆している。低 YAN レベルの果汁は、フルーティーな香りの少ない、より複雑なワイン造りに適しているが、一方、適度な YAN レベルではよりクリーンでフルーティーなワインになる。しかし、YAN レベルが高いと、過度にエステルの多いワインになる可能性がある。現在情報がないチオールを特徴とする品種を除いて、他の品種でも同様の効果が期待できる。マストの YAN とアミノ酸組成がワインの風味におよぼす影響をよりよく理解するために、さらにワインの官能評価の研究が必要である。

ブドウ園での窒素成分管理が、ワインの風味と品質に与える影響をより理解するため、ワイナリーでの窒素成分管理と比較しながら、赤ワインを用いた試験が進行中である。この研究によって、消費者の嗜好や他の目標に応じて、ワインのスタイルと品質を最適化するためのより良い情報が、ブドウ栽培家とワイン醸造家に提供されることが期待できる。

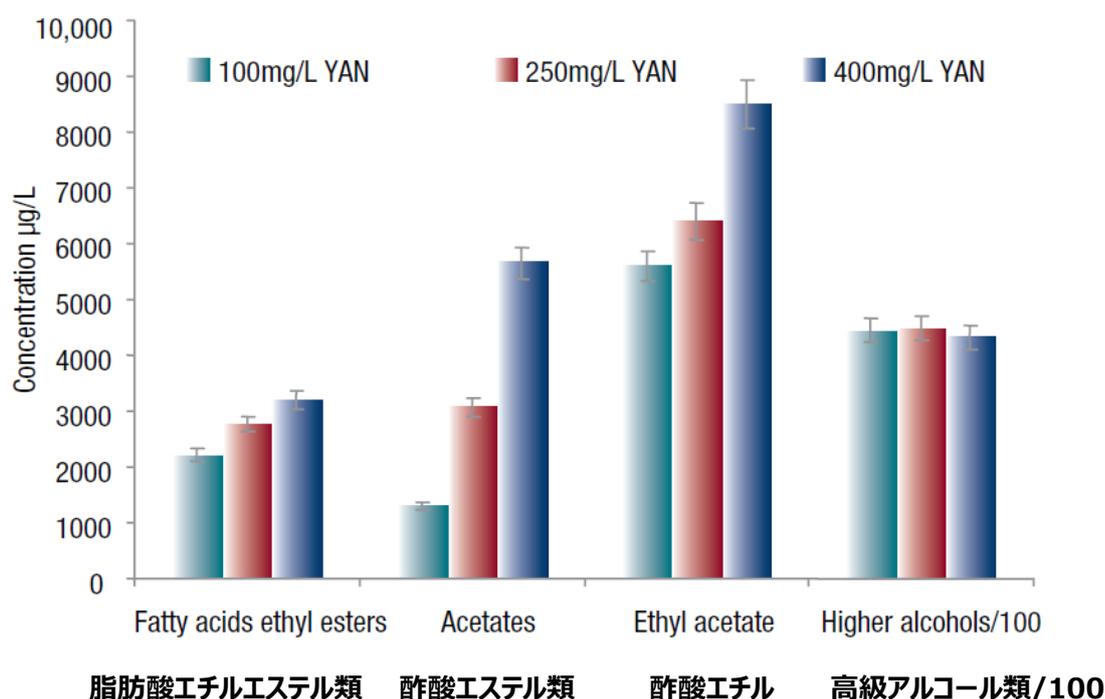


図 7.

低 YAN (100 mg/L) のシラーズのブドウに DAP を 2 段階の濃度で添加し、YAN を 250 mg/L と 400 mg/L にして得られたワインの揮発性化合物。発酵は酵母 *S. cerevisiae* AWRI 796 を使用して、22°C で行い 1 日に 3 回果帽の搾入れを行った。

## 謝辞

このプロジェクトを支援してくれた多くの同僚, 特に Tracey Siebert と Dimitra Capone による発酵揮発性物質の分析, Mariola Kwiatkowski と Meagan Mercurio によるフェノール化合物の分析; Kate Lattey, Belinda Bramley, Dr Leigh Francis による官能評価; 産業開発・支援および分析サービスチームのメンバーによる化学分析の支援, Dr Paul Chambers, Dr Cristian Valera とバイオサイエンスチームのメンバーによる多くの有益な議論に感謝する。ウルグアイの Francisco Carrau 教授, およびスペインの客員科学者である Dr Diego Torrea と Mar Vilanova は, このプロジェクトに重要な貢献をした。Boar's Rock ワイナリーの Mike Farmilo によるシラーズ発酵試験への多数の果汁サンプルの提供, 及びマストの寄付, Orlando Wines の Russell Johnstone と Inca Pearce, The Yalumba Wine Company の Louisa Rose と Simon Dillon による白ワイン果汁の提供に対して特に感謝する。窒素源管理に関する現在の研究業務には, Sally-Jean Bell 博士および Marcel Essling との協同研究も含まれる。Rae Blair には, 編集のサポートに感謝する。このプロジェクトは, オーストラリア政府からのマッチングファンドとともに, 投資機関 Grape and Wine research and Development Corporation を通じて, オーストラリアのブドウ栽培者とワイン醸造家によって支援されている。AWRI は Wine Innovation Cluster のメンバーである。

## 参考文献

- 1 Albers, E.; Larsson, C.; Liden, G.; Niklasson, C. & Gustafsson, L. (1996) Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 3187-3195.
- 2 Albers, E.; Lidén, G.; Larsson, C.; Gustafsson, L. (1998) Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Res. Develop. Microbiol.* 2: 253-279; 1998.
- 3 Äyräpää, T. (1971) Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *J. Inst. Brew.* 77: 266-276.
- 4 Bauer, F.F.; Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 27-51.
- 5 Bell, S.-J.; Henschke, P.A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 242-295.
- 6 Blateyron, L.; Ortiz-Julien, A; Sablayrolles, J.M. (2003) Stuck fermentations: oxygen and nitrogen requirements – importance of optimising their addition. *Aust. N.Z. Grapegrower Winemaker* 478: 73-79.
- 7 Butzke, C. (1998). Survey of Yeast Assimilable Nitrogen status in musts from California, Oregon, and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 220-224.
- 8 Carrau, F.M. (2003) Characterization of yeast in relation to the ability to utilize nitrogen – Studies of aroma compounds. PhD thesis, Universidad de la Republica, Uruguay.
- 9 Coulter, A.D.; Godden, P.W.; Pretorius, I.S. (2004) Succinic acid-how is it formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Aust. N.Z. Wine Ind. J.* 19: 16-20, 22-25.
- 10 Damberg, R.G.; Kambouris, B.; Cynkar, W.; Janik, L.J.; Cozzolino, D.; Henschke, P.A.; Gishen, M. (2005) A comparison of near infrared and mid-infrared spectroscopy for the

- analysis of yeast-assimilable nitrogen in grape juice. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Pretorius, I.S. (eds.) Proceedings of the twelfth Australian wine industry technical conference; 24-29 July 2004; Melbourne, Vic. Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide SA: 334.
- 11 Diaz-Maroto, M.C.; Schneider, R.; Baumes, R. (2005) Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *J. Agric Food Chem.*, 53, 3503-3509.
- 12 Duan, W.; Roddick, F.A.; Higgins, V.J.; Rogers, P.J. (2004) A parallel analysis of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> formation by brewing yeast in response to sulphur-containing amino acids and ammonium ions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 62: 35-41.
- 13 Dukes, B.C.; Butzke, C.E. (1998) Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 125-134.
- 14 Eglinton, J.; Siebert, T.; Kwaitkowski, M.; Francis, L.; Henschke P. (2005) Compositional and sensory implications of practical strategies for ensuring complete fermentation with non-conventional yeast. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Pretorius, I.S.(eds.) Proceedings of the twelfth Australian wine industry technical conference; 24-29 July 2004; Melbourne, Vic. Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide SA: 288.
- 15 Filipe-Ribeiro, L.; Mendes-Faia, A. (2007) Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chem.* 100: 1272-1277.
- 16 Gockowiak, H.; Henschke, P.A. (1992) Nitrogen composition of grape juice and implications for fermentation: results of a survey made in N-E Victoria. *Aust Grapegrower Winemaker* 340: 131, 133-138.
- 17 Gump, B.H.; Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Whiton, R.S. (2002) Comparison of analytical methods for prediction of pre-fermentation nutritional status of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 325-329.
- 18 Guth, H. (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wines varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45:3027-3032.
- 19 Guth, H.; Sies, A. (2002) Flavour of wines: Towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Høj, P.B. (eds.). Proceedings of the eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, 7-11 October 2001, Adelaide SA. Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide SA 128-139.
- 20 Henschke, P.A. (1996) Hydrogen sulphide production by yeast during fermentation. Proceedings Eleventh international oenological symposium, Sopron, Hungary (International Association for Winery Technology and Management: Breisach, Germany) pp. 83-102.
- 21 Henschke, P.A.; Jiranek, V. (1993) Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (ed.) (Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland) pp. 77-164.
- 22 Hernández-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J.; Ferreira V. (2005) Effect of the addition of

- ammonium and amino acids to must of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wines. *Food Chem.* 89: 163-174.
- 23 Hernández-Orte, P.; Bely, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. (2006) Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compounds production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust. J. Grape. Wine Res.* 12: 150-160.
- 24 Ingledew, W.M.; Magnus, C.A.; Sosulski, F.W. (1987) Influence of oxygen on proline utilization during wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 246-248.
- 25 Morata, A.; Gomez-Cordoves, M.C.; Suberviola, J.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J.A. (2003) Adsorption of anthocyanins by cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 4084-4088.
- 26 Nicolini, G.; Larcher, R.; Versini, G. (2004) Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effect of variety, ripening and vintage. *Vitis*, 43: 89-96.
- 27 Osborne, J.P.; Edwards, C.G. (2006) Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low- and high nitrogen conditions: a study in synthetic media. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12: 69-78.
- 28 Rapp, A.; Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. Davis USA: American Society for Enology and Viticulture, 156-164.
- 29 Ribéreau-Gayon, J.; Dubourdieu, D.; Donéche, B.; Lonvaud, A. (2000) *Handbook of Enology, Volume 1: The microbiology of wines and vinification*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK.: 454.
- 30 Romero C.; Bakker, J. (1999) Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3130-3139.
- 31 Shively, C.E.; Henick-Kling, T. (2001) Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 400-401.
- 32 Smyth, H., Cozzolino, D., Herderich, M.J., Sefton, M.A.; Francis, I.L. (2005) Relating volatile composition to wine aroma: identification of key aroma compounds in Australian white wines. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Pretorius, I.S. (eds.) *Proceedings of the Twelfth Australian Wine Industry Technical Conference, Melbourne, Vic, 24-29 July 2004*. Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide SA: 31-33.
- 33 Sowalsky, R.A.; Noble, A.C. (1998) Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chem. Senses* 23: 343-349.
- 34 Swiegers, J.H.; Francis, I.L.; Herderich, M.J.; Pretorius, I.S. (2006) Meeting consumer expectations through management in the vineyard and winery: the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Aust. N.Z. Wine Ind. J.* 21: 34-42.

- 35 Torrea, D.; Henschke P.A. (2004) Ammonium supplementation of grape juice – effect on the aroma profile of a Chardonnay wine. *Tech. Rev.* 150, 59-63.
- 36 Torrea, D.; Siebert, T.; Liebich, B.; Ancin, C.; Francis, L.; Henschke, P.A. (2005) Effect of ammonium supplementation of a Chardonnay must on wine aroma. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Pretorius, I.S. (eds.) *Proceedings of the Twelfth Australian Wine Industry Technical Conference, Melbourne, Vic, 24-29 July 2004.* Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide, SA: 293.
- 37 Ugliano, M.; Siebert, T.; Capone, D.; Mercurio, M.; Henschke, P.A. (2007) Colour, aroma and flavour compounds in Shiraz wine as affected by DAP addition before fermentation. Blair, R.J.; Williams, P.J.; Pretorius, I.S. (eds.) *Proceedings of the thirteenth Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, SA, 28 July-2 August 2007.* Australian Wine Industry Technical Conference Inc. Adelaide, SA: in press.
- 38 Vilanova, M.; Ugliano, M.; Siebert, T.; Pretorius, I.J.; Henschke, P.A. (2007) Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *App. Microbiol. Biotechnol.* 77: 145-157.
- 39 Wang, X.D.; Bohlscheid, J.C.; Edwards, C.G. (2003) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 94: 349-359.