

[研 究 報 文]

甲州ワイン中の β-ダマセノン生成促進のための果汁調整条件の影響と
実用規模醸造への応用小林弘憲¹・富永敬俊²・勝野泰朗³・安蔵光弘³・味村興成³・齋藤 浩³・
鈴木由美子¹・デュブルデュエ・デュニ²・金野知典¹¹メルシャン株式会社商品開発研究所 〒251-0057 藤沢市城南 4-9-1²ボルドー第二大学醸造学部 351, cours de la libération, 33405, Talence, Bordeaux³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

Effect of Processing Factors on β-Damascenone Content in Koshu Wine and Application to Wine Making

Hironori KOBAYASHI¹, Takatoshi TOMINAGA², Yasuaki KATSUNO³, Mitsuhiro ANZO³, Kousei AJIMURA³,
Hiroshi SAITO³, Yumiko SUZUKI¹, Denis DUBOURDIEU², and Tomonori KONNO¹¹Mercian Corporation, Jyonan, Fujisawa, Kanagawa 251-0057, Japan²Faculté d'Oenologie Université Victor Segalen Bordeaux 2, 351, cours de la libération, 33405, Talence, Bordeaux, France³Mercian Katsunuma Winery, Shimoiwasaki, Katsunuma, Koshu, Yamanashi 409-1313, Japan

β-Damascenone exists widely in flowers and fruits, and has an aroma similar to that of rose and cooked-apple volatiles. Together with such esters as isoamyl acetate, ethyl caproate, and hexyl acetate, β-damascenone contributes to the fruity aroma of wine. In this study, the effects of processing factors on β-damascenone content in Koshu grapes were investigated. Exposure of the grapes to oxygen, low pH, and high temperature during processing contributed to the liberation of β-damascenone from its precursors. The distribution ratio of β-damascenone in the juice and skin of Koshu grapes was 1:3. Skin contact during processing may therefore be an effective tool to increase β-damascenone content in the extracted juice. Using these processing modifications, Koshu wine having as high as seven times the β-damascenone content of commercial Koshu wines was produced.

Key words: aroma, β-damascenone, Koshu grape, Koshu wine, skin contact

緒 言

近年、甲州ワインにおける香りの研究は、甲州ブドウに隠された新たな香りのポテンシャル探索へと発展し、その研究過程において我々の研究グループはグレープフルーツ様のアロマを持つ硫黄化合物である 3-メルカプトヘキサノールを同定した (1、2、3)。これに合わせて揮発性フェノール化合物である 4-ヴィニルフェノールおよび 4-ヴィニルグアイヤコールが高濃度で存在することを確認し、その抑制の可能性について報告し

た (4)。さらに、甲州ワイン中からリンゴのコンポート等の香りを持つ β-ダマセノンの存在を確認した (5)。本化合物は、植物、果物などから幅広く同定されており、カロテノイド骨格をもつキサントフィル類のネオキササンチンが前駆物質の起点となり、酸化解裂、酸加水分解、(配糖体を形成したものに関しては酵素反応を含む) を経て生成されることが知られている (6)。ワインにおいてもソーテルヌ、ポート、赤ワイン用ブドウなどからの報告があり (7、8、9)、いくつかの脂肪酸エステルとともにフルーティーさの増強に効果的に作用する物質であると考えられることから、甲州果汁

2007 年 3 月 26 日受理

中の本化合物濃度の増強を目的として種々の果汁調整条件を検討した結果、いくつかの知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 供試ブドウおよびワイン

研究室における小規模試験には2004および2005年山梨県産甲州ブドウを用い、実用規模のワイン醸造試験はメルシャン（株）勝沼ワイナリーで醸造された2005年のワインを使用した（下記参照）。

2. β -ダマセノン生成因子の検討

1) 酸素およびアルコール発酵

2004年山梨県産の甲州ブドウ2kgを用い、搾汁率として果粒重量の60%を得た。その300mLを360mL容ワインボトルに充填し、20°C、48時間保存した後、 β -ダマセノン量を測定した。この対照として酸素の影響を確認するため、あらかじめ瓶内を炭酸ガスで置換したボトルに果汁を分注後、果汁中に炭酸ガスを吹き込みつつ密栓し20°C、48時間保存した後、 β -ダマセノンの定量を行った。また、果汁搾汁後直ちに-20°Cで冷凍保存し、48時間後に解凍した後、速やかに β -ダマセノン量を測定した。微生物の介在を阻止する目的ですべての系に（-20°Cの系は除外）アンピシリン（Sigma社製）、クロラムフェニコール（Sigma社製）をそれぞれ50 μ g/mLとなるように添加した（10）。果汁の段階において生成された β -ダマセノンに対してアルコール発酵による酵母の影響を確認するため、通常状態で48時間保存した果汁に市販ワイン酵母（VL1:Laffort社製）を300mg/Lになるように添加し、20°Cで発酵を行った後、得られたワインから β -ダマセノン量を測定した。

2) 温度およびpH

2005年山梨県産甲州ブドウ5kgから搾汁率として果粒重量の75%を得た後、得られた果汁を360mL容ワインボトルに300mLずつ6本に分注し、それぞれ0°C、10°C、20°C、30°C、40°C、50°Cで48時間保存し、 β -ダマセノン量を比較した。また、pHの差異による β -ダマセノン生成量についての影響を調べるため、得られた果汁（pH 3.2）に1NのNaOHおよび1NのHClを添加し、pH 2.4~4.2の間に調整後、360mL容ワインボトルに移し20°C、48時間保存した後、 β -ダマセノンの定量を行った。

3) 搾汁率

β -ダマセノンへの生成に及ぼす搾汁率の影響を調べる目的で2005年山梨県産の甲州ブドウ3kgから果粒重量の10%~80%までそれぞれ10%ごとの割合で搾汁した果汁を、360mL容ワインボトルに300mLずつ分取し、20°C、48時間保存後、 β -ダマセノンの定量を行った。

4) 亜硫酸

2005年山梨県産甲州ブドウ2kgから搾汁率として果粒重量の60%を得た後、1.5L容ワインボトルに移し、市販ワイン酵母VL1を300mg/Lになるように添加後、20°Cでアルコール発酵を行った。比重0.993以下を発酵の終了とし、得られたワインをそれぞれ360mL容ワインボトル4本に滓区分を除きながら300mLずつに分け、亜硫酸添加量として無添加、50mg/L、100mg/L、200mg/Lとなるように5%亜硫酸水を加えた。亜硫酸調整後20°C、48時間保存した後、 β -ダマセノンの定量を行った。

3. ブドウ各部位における β -ダマセノン生成量の測定

甲州ブドウ100gを果汁、果皮、種子の各部位にわけ、それぞれの重量を測定した後、30°C、48時間保存した。果皮、種子については、果汁中と同一条件にするため酒石酸でpH 3.5に調整したイオン交換水（重量に対し4倍量）中でホモジナイズし、30°C、48時間保存後、 β -ダマセノン量を測定した。なお、微生物の介在を防ぐため、これらいずれの試験区についてもアンピシリン、クロラムフェニコールを50 μ g/mLとなるように添加した。

4. 実用規模におけるワイン醸造

試験醸造1：2005年山梨県内収穫（9月19日）の甲州ブドウを、除梗・破碎時に30mg/Lの亜硫酸を加え果房重量の約50%をフリーラン果汁として得た。フリーラン区分を除いた後、残りの果汁および果皮区分につき、ペクチン質の分解による搾汁効率の向上を目的としてスクラーゼ（三共株式会社製）を容量に対して10mg/L添加し、バルーン式圧搾機内にて約30分間定期的に回転させながら短時間のスキンコンタクトを行った。その後、元の果房重量に対して約23%の圧搾果汁をプレス区分として得、12°C、16時間以上の清澄化を行った。得られたプレス果汁上清に市販ワイン酵母（VL1）を300mg/Lになるように添加し、温度20~22°Cの範囲でアルコール発酵を行った。比重0.993以

下になったことをアルコール発酵の終了とし、亜硫酸を加えた後、遊離型亜硫酸量を分析することで遊離型亜硫酸が 60 mg/L となるよう調整した。

試験醸造 2 : 2005 年山梨県内収穫 (9 月 24 日) の甲州ブドウについて、試験醸造 1 と同様の手法でフリーラン区分を除いた後、残りの果汁および果皮区分を 35°C まで加温し、試験醸造 1 と同様にスクラーゼの添加、短期間のスキンコンタクト、果汁の清澄化、アルコール発酵を行った。比重 0.993 以下になったことをアルコール発酵の終了とし、遊離型亜硫酸が 60 mg/L となるように亜硫酸を添加した。

5. β-ダマセノンの抽出および定量

100 mL 容分液ロートに果汁またはワイン 50 mL と 99.5%エタノールに溶解した 50 μL の 1-オクテン-3-オール (終濃度 1 mg/L) を内部標準物質として添加し、4 mL のジクロロメタンを加え 5 分間振動させ揮発成分を抽出した。ジクロロメタン層を集めた後、再度 2 mL のジクロロメタンを加え、計 2 回の抽出操作を行った。得られたジクロロメタン層を合わせた後、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。洗浄後のジクロロメタン層は、無水硫酸ナトリウム 2 g を加え水分除去を施し、窒素ガス気流下で約 300 μL まで濃縮し、その 2 μL 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 β-ダマセノン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、これを基に試料中の濃度を定量した。

6. 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 β-ダマセノン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、 $m/z=190$ で β-ダマセノンを、 $m/z=72$ で内部標準物質をそれぞれ検出した。

結果と考察

1. β-ダマセノン生成に及ぼす各種因子の影響

1) 酸素の影響および生成した β-ダマセノンの発酵中の安定性

20°C、48 時間保存した果汁中にはおよそ 2000 ng/L の β-ダマセノンが存在したが、炭酸ガスによる処理中、あるいは -20°C で保存した果汁中の β-ダマセノン量は 100~250 ng/L であったことから (Fig. 1)、従来の指摘どおり、ネオキシサンチンを起点する前駆体が酸素の介在により酸化分解を受けて、β-ダマセノンの果汁中の増加に繋がったと推察された (6)。またこのように一度果汁中に生成されたダマセノンはアルコール発酵により影響を受けることは少なく、ほぼその果汁中において一定濃度を維持した。

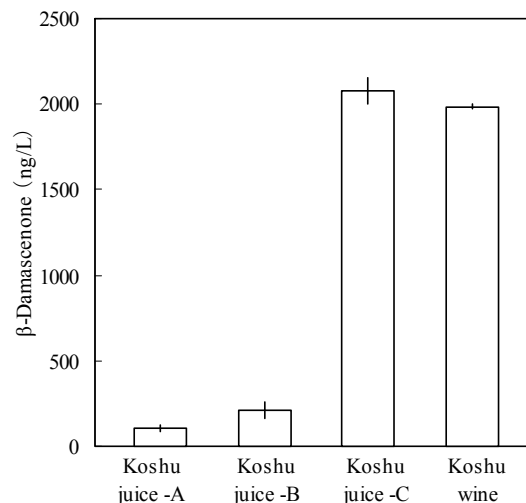


Fig. 1. Influence of oxygen and fermentation on β-damascenone content in Koshu juice and wine. Koshu juice-A, stored at -20°C; Koshu juice-B, stored at 20°C for 48 hrs under CO₂; Koshu juice-C, stored at 20°C for 48 hrs. Antibiotics (ampicillin and chloramphenicol) were added to all Koshu juice with no alcoholic fermentation (except Koshu wine).

2) 温度および pH の影響

搾汁後の果汁を各温度 (0~50°C) で保存した結果、温度の上昇に比例して β-ダマセノン含量の増加が確認された (Fig. 2)。温度上昇による前駆体からの β-ダマセノン濃度の増加はワイン中でも報告され (11, 12)、甲州果汁を用いた結果も同様であった。また温度の上昇は、前駆体からの酸化分解を促進していると思われる、加熱処理による紅茶における β-ダマセノン濃度の増加に関する研究結果とも一致している (13)。

pH の影響は、それが低くなるのに伴い β-ダマセノンへの生成量の増加が認められた (Fig. 3)。このことから、前駆体からの β-ダマセノン生成に酸加水分解反

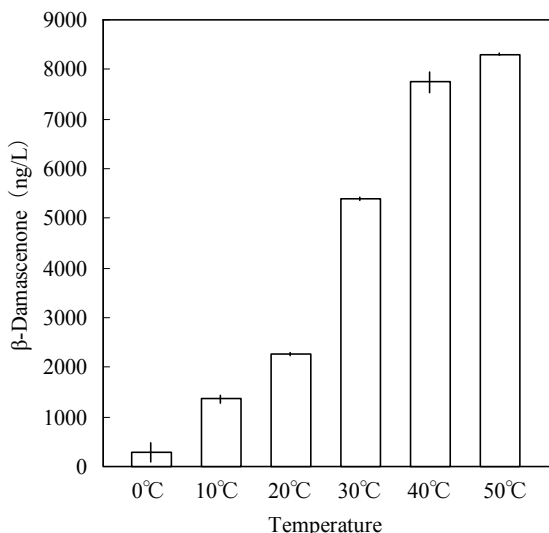


Fig. 2. Influence of storage temperature on beta-damascenone content in Koshu juice (after 48 hrs).

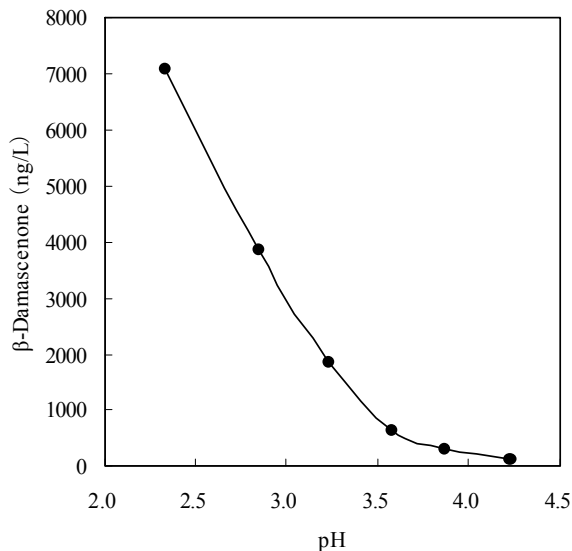


Fig. 3. Influence of pH on beta-damascenone content in Koshu juice (stored at 20°C for 48 hrs).

応が重要であると考えられた。

3) 搾汁率の影響

搾汁割合の影響を検討したところ、搾汁率の上昇に伴い beta-ダマセノン量の増加が認められた (Fig. 4)。即ち、ワイン醸造においてフリーラン区分 (搾汁率 50% 以下) の果汁と比較してプレス (搾汁率 50% 以上) 区分の果汁に beta-ダマセノン前駆体が多く含まれることを示しているものと思われた。

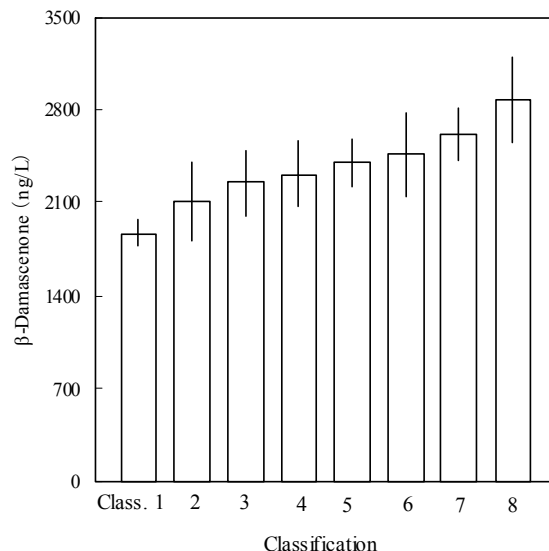


Fig. 4. Influence of pressure on beta-damascenone content in Koshu juice (stored at 20°C for 48 hrs). Class. No.: Fruit juice was squeezed until 80% in each 10% volume.

2. ブドウ各部位における beta-ダマセノン生成量の測定

2005 年山梨県産の甲州ブドウを果汁、果皮、種子に分け、それぞれの重量を測定し、30°C、48 時間の保存後に生成した beta-ダマセノン量を定量したところ果汁：果皮=約 1：3 (同一重量当たり、種子は不検出) の割合で含まれていた (Fig. 5)。ブドウ 1 粒あたりに

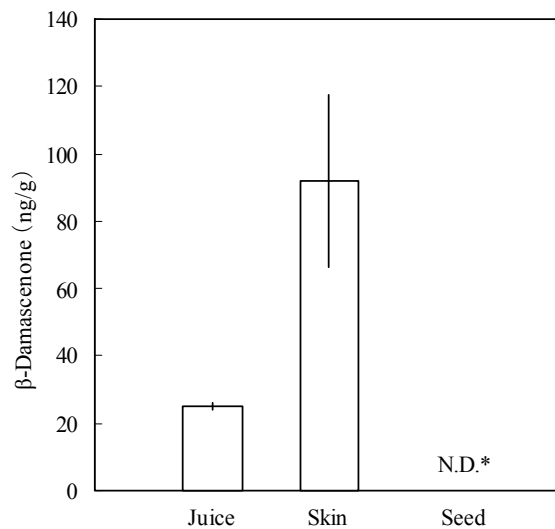


Fig. 5. Distribution of beta-damascenone in Koshu grapes (stored at 30°C for 48 hrs). *N.D.: Not detected

おける果汁、果皮の重量割合を考慮するとほぼ同程度のβ-ダマセノン生成量を示すことがわかった。このことから、果皮との接触をおこなうスキンコンタクト法がβ-ダマセノン高含有果汁を得るために重要な手段の1つとなることが示唆された。また、β-ダマセノン前駆体のブドウ果粒内分布は前項の搾汁率における定量結果をよく説明できるものと思われた。

3. β-ダマセノン含量に及ぼす亜硫酸の影響

生成したβ-ダマセノンのワイン中における亜硫酸の影響を確認したところ、亜硫酸の添加量が多くなるに伴い、保存期間中におけるβ-ダマセノン含量の減少が確認された (Fig. 6)。本来、β-ダマセノンは化学構

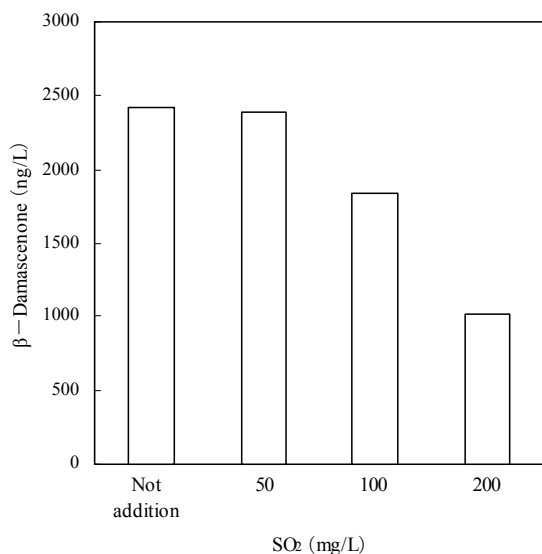


Fig. 6. Influence of sulfur dioxide addition on β-damascenone content in Koshu wine (stored at 20°C for 48 hrs).

造上ケトン類であることから亜硫酸と結合することが容易に予想された (14) が、50~100 mg/L の亜硫酸濃度までは大きな影響として確認されなかったため、通常ワイン醸造において亜硫酸の管理を適正の範囲内で行うことでワインを酸化から防ぎ、β-ダマセノンにも影響を与えないものと思われた。

4. β-ダマセノン含量の増強を目的としたワイン醸造

これまで得られた知見からβ-ダマセノンを高含有した果汁を得るための条件として、酸素の介在、低pH、果皮の利用、温度の上昇が必要と考えられた。これら条件を考慮し、pHの上昇を抑えるため収穫時期を9月の下旬に設定し、果皮の利用という観点からスキンコンタクト法を採用した試験醸造1のワインは、同じ

果汁のフリーラン区分で得られたワインと比較して約3倍、スキンコンタクト法を採用せず搾汁率60%以上

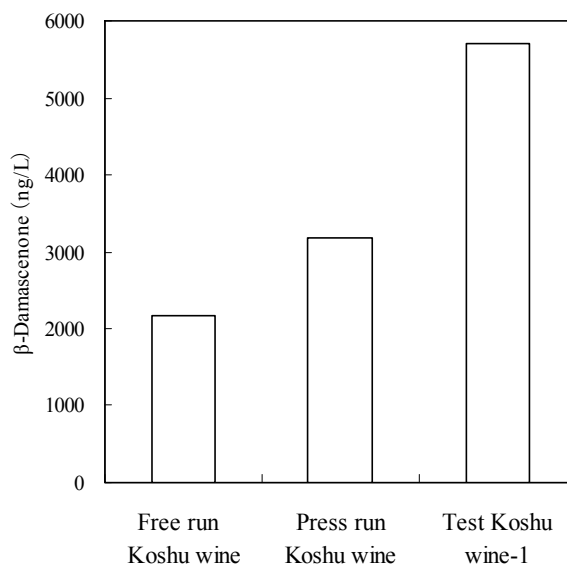


Fig. 7. β-Damascenone content in wines made from Koshu grapes by different methods (Harvest date: 19th September 2005). Free run Koshu wine: Made from free run juice; Press run Koshu wine: Made from press run juice; Test Koshu wine-1: Made from press run juice with skin contact (skin contact time: 30 min).

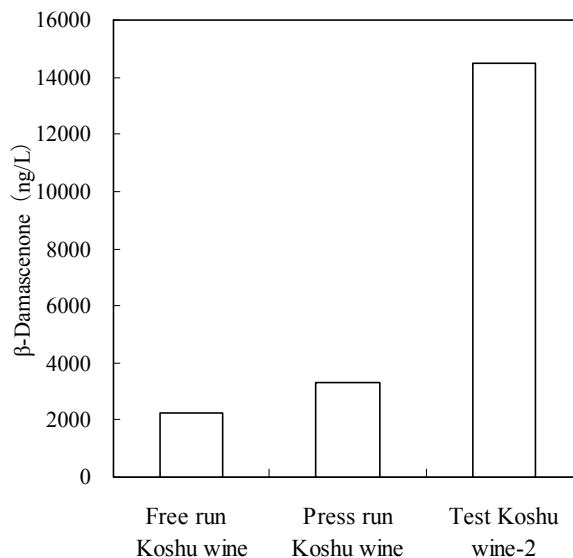


Fig. 8. β-Damascenone content in wines made from Koshu grapes by different methods (Winery scale, Harvest date: 24th September 2005). Test Koshu wine-2: Made from heated press run juice with skin contact (skin contact time: 30 min).

のプレス区分を用いた同様の果汁から得られたワインと比較して約2倍の β -ダマセノン含有していた (Fig. 7)。また、試験醸造1に加えスキンコンタクト中の果汁温度を35°Cまで上昇させた試験醸造2のワインは、同果汁のフリーラン区分で得られたワインと比較して約7倍、プレス区分から得られたワインと比較して約4.5倍の β -ダマセノン含有していた (Fig. 8)。これらの結果からスキンコンタクト法、さらには加温処理との併用は、 β -ダマセノン含量を増加させる有効な手段であると考えられた。

要 約

β -ダマセノンは、植物、果物などに幅広く存在し、その濃度に依存して「オールドローズ、リンゴのコンポート」などのニュアンスを持ち、ワイン中ではいくつかの脂肪酸エステルとともにフルーティーさに寄与する物質である。今回、 β -ダマセノンの貢献を生かした甲州ワイン醸造を目的にいくつかの試験を行った結果、 β -ダマセノンの生成に至るまでの経緯として酸素の介在、低pH、高い温度が重要な因子となることを明らかにした。また、甲州ブドウの各部位（果汁、果皮）における β -ダマセノン濃度を測定したところ、重量比としては果汁：果皮=1：3であった（種子は不検出）ことからスキンコンタクト法が果汁中の β -ダマセノン前駆体の抽出を促し、結果として β -ダマセノン濃度を増加させる方法の一つとして有効であることが示唆された。事実、これら知見に基づきスキンコンタクト法を用いた実用化規模の醸造を試みた結果、通常の甲州ワインと比較して最大7倍程度の β -ダマセノン濃度を含有する甲州ワインが得られた。

文 献

- 小林弘憲・富永敬俊・上野 昇・味村興成・有賀雄二・デュブルデュー・デュニ・大久保敏幸. 甲州ワインの品種香特定. J. ASEV. Jpn. 15: 109-110 (2004).
- 富永敬俊. エノロジカルナノテクノロジーが生んだ甲州きいろ香ワイン. Aroma Research 22 (6): 148-151 (2005).
- 小林弘憲・富永敬俊. 甲州ワインの新しい香り. バイオサイエンスとインダストリー 64 (4): 36-37 (2006).
- 小林弘憲・富永敬俊・勝野泰朗・安蔵光弘・味村興成・鈴木由美子・デュブルデュー・デュニ・大久保敏幸. 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. J. ASEV. Jpn. 17: 75-80 (2006).
- 勝野泰朗・富永敬俊・小林弘憲・安蔵光弘・味村興成・齋藤 浩・鈴木由美子・デュブルデュー・デュニ・金野知典. 甲州ブドウ及びワインにおけるノルイソプレノイド関連物質の挙動. J. ASEV. Jpn. 17: 137-138 (2006).
- Winterhalter, P. and R. L. Rouseff. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. ACS Symposium Series, Vol. 802. p. 241-254, ACS, Washington, D.C. (2002).
- Bailly, S., V. Jerkovic, J. M-Brynaert and S. Collin. Aroma extraction dilution analysis of sauternes wines. Key role of polyfunctional thiols. J. Agric. Food Chem. 54: 7227-7234 (2006).
- Mendes-Pinto, M. M., A. C. Ferreira, M. B. Oliveira and P. Guedes De Pinho. Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed- and normal-phase liquid chromatography: a quantitative analysis. J. Agric. Food Chem. 52: 3182-3188 (2004).
- Sefton, M. A. Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon. Aust. J. Grape Wine Res. 4: 30-38 (1998).
- 高鳥浩介. 抗菌剤の効力評価. p. 20-21. 西村民男監修. 誰でもわかる抗菌の基礎知識. テクノシステム. 東京 (1999).
- Skouroumounis, G. K. and M. A. Sefton. Acid catalyzed hydrolysis of alcohols and their β -D-glucopyranosides. J. Agric. Food Chem. 48: 2033-2039 (2000).
- Jarauta, I., J. Cacho and V. Ferreira. Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. J. Agric. Food Chem. 53: 4166-4177 (2005).
- Kumazawa, K. and H. Masuda. Change in the flavor of black tea drink during heat processing. J. Agric. Food Chem. 49: 3304-3309 (2001).
- Daniel, M. A., G. M. Elsey, D. L. Capone, M. V. Perkins and M. A. Sefton. The fate of damascenone in wine: the role of SO₂. J. Agric. Food Chem. 52: 8127-8131 (2004).