

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25750024

研究課題名（和文）ワイン醸造における新規エステル生成経路の解明とその応用：フレーバー向上技術の開発

研究課題名（英文）Study of a new esterification mechanism of pectinase preparations in winemaking

研究代表者

斉藤 史恵 (SAITO, Fumie)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：00625254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：エステル化合物はフレーバーを形成する重要な要素である。本研究で、ペクチナーゼ製剤によるフェノール酸エチルエステル生成はシンナモイルエステラーゼによる逆反応である可能性が示された。生成したエステル化合物がフレーバーに影響するか検証する方法としては、味強度を経時的に測定するTI法が有用であると考えられた。醸造試験では、脱炭酸酵素を有する酵母を選択するとフェノール酸は優先的に揮発性フェノールに変換されてエチルエステル生成が妨げられると推測された。

研究成果の概要（英文）：Ester compounds are important compounds as wine flavor. In this study, the synthesis of phenolic acid ethyl esters (PEEs) may be catalyzed by cinnamoyl esterase in pectinase preparations. Time intensity methodology is useful for evaluation of wine flavor. The use of wine yeast strains having phenolic off-flavor (POF) activity caused the production of POF and decreased the production of PEEs.

研究分野：食品科学

キーワード：ワイン フレーバー 酵素製剤

### 1. 研究開始当初の背景

日本固有のブドウ品種“甲州”からつくられる甲州種ワインには独特の苦味が存在する。研究代表者は、この苦味成分を探索する過程で、苦味の強い甲州種ワインには *p*-Coumaric acid や Caffeic acid の「エチルエステル」が存在していることを明らかにした。これらフェノール酸エチルエステル (以下 PEE) は、ブドウ果汁中には見られず、また酵母添加のみの製造条件ではほとんど生成しなかった。しかし、果汁の清澄化に用いるペクチナーゼ製剤を添加した場合には PEE が多く生成することを見出した。ワインにおいてエステル化合物はフレーバーを形成する重要な要素である。例えば、有機酸のエチルエステル体はワインの香りに寄与する。この重要なエステル生成反応は、従来ワイン酵母や乳酸菌による酵素反応や酸触媒との長期的な熟成反応により生成すると考えられてきた。しかし、本研究で注目するペクチナーゼ製剤は *A. niger* 由来であり、酵母や乳酸菌とは基質特異性が異なる。従って、通常の発酵では生成しないエステル化合物がペクチナーゼ製剤の添加によってワイン中に生成されている可能性が考えられるが、生成物の特定やフレーバーに与える影響については不明である。

そこで、本研究ではペクチナーゼ製剤による新規エステル生成経路 (図 1) を解明し、生成されるエステル化合物がワインフレーバーに与える影響を明らかにする。この知見をもとに、本反応を利用したワインのフレーバーを向上させる新たな醸造技術開発へと展開することを目指した。

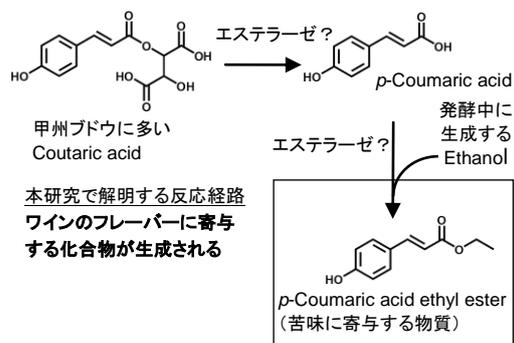


図 1 予想されるエステル化反応によるフレーバー成分の生成経路

### 2. 研究の目的

(1) 新規エステル生成経路の解明にむけた エチルエステル生成酵素の同定：本研究で着目するペクチナーゼ製剤は *A. niger* 由来の様々な酵素が含まれているため、エステル生成活性を有する酵素の分離と同定を試みる。

(2) エステル化合物がワインフレーバーに与える影響を評価するための 官能評価法の確立：官能評価の手法には採点法や記述法など様々なあるが、本課題では味強度の経時変化

を測定できる Time Intensity (TI) 法についてパネリストの訓練法や TI 法の有用性について検証する。

(3) 新たな醸造技術開発への展開をふまえた ワイン醸造試験の条件検討：ワイン醸造で用いる酵母の種類は数多くあり、ペクチナーゼ製剤と同様に様々な酵素を有している。そのため、エステル化反応の基質を奪い合うことが十分考えられる。そこで、小規模の醸造試験を行い、使用する酵母およびペクチナーゼ製剤の検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬

Caftaric acid および Coutaric acid は V. L. Singleton らの方法 (1978) を参照し、Diaion HP-20 および Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて甲州ワインより分離精製して得た。Caffeic acid および *p*-Coumaric acid は、東京化成工業株式会社の一級を使用した。Caffeic acid ethyl ester および *p*-Coumaric acid ethyl ester は J. C. Hufnagel らの方法 (2008) に従って合成して精製したものをを用いた。官能評価に用いる試薬は、すべて和光純薬株式会社の食品添加物グレードを使用し、その他の試薬は特級グレードを使用した。

#### (2) ペクチナーゼ製剤

ペクチナーゼ製剤は Lallemand 社製の 5 種類 (Lallzyme BETA, CUVÉE BLANC, EX-V, HC, OE) と Novozymes 社製の 5 種類 (Novarom Blanc, Ultrazym 100G, VinoClear Classic, Vinotaste Pro, Vinozym Process)、三菱ケミカルフーズ株式会社の 1 種類 (Sclase X) を使用した。

#### (3) 機器

##### ① 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

フェノール酸化合物の測定に、HPLC を使用した。HPLC 装置は Hitachi L-2000 system (株式会社日立ハイテクサイエンス) を用い、以下の条件でフェノール性化合物の検出を行った。

[HPLC 条件] カラム：Kinetex C18 (4.6 mm×75 mm, 3 μm; Phenomenex 社製)、カラム温度：40°C、流速：0.8 mL/min、検出波長：320 nm、移動相：(A 液) 0.4% リン酸溶液、(B 液) アセトニトリルをグラジエント溶出した。

##### ② ガスクロマトグラフィー (GC)

ペクチンメチルエステラーゼ (PME) 活性の測定に GC を用いた。GC 装置は Shimadzu GC-2014 デュアルパックドカラム (株式会社島津製作所製) を用い、以下の条件でメタノールの測定を行った。

[GC 条件] カラム：Peg 600 Chromosorb W 60/80 AW ガラスカラム (2.1 m, 3.2 mm ID)、キャリアガス：N<sub>2</sub>、キャリアガス流量：30

mL/min, FID 検出器温度 : 185°C, 注入部温度 : 185°C, カラム温度 : 110°C

(4) ペクチナーゼ製剤に含まれるエステル化反応を触媒する酵素の同定

①ペクチナーゼ製剤の分離・精製

ペクチナーゼ製剤の酵素分離は Kita らの方法 (1991) を参考にして行った。カラムは DEAE Sepharose fast flow (GE Healthcare 社製) を用いた。0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化させた DEAE Sepharose fast flow カラム (φ30×125 mm) に、ペクチナーゼ製剤 0.6 mg を 5 mL の緩衝液に溶解したものをアプライしてカラムに吸着させた。その後、同緩衝液 300 mL と 0.7 M 塩化ナトリウムを含んだ同緩衝液 300 mL とを塩濃度を上昇させながら溶出してタンパク質を分離した。これらの酵素分画作業は 4°C の低温室内で行った。

②酒石酸エステル加水分解活性

0.1 mM リン酸緩衝液 (pH 3.5~4.5) 525 μL に 0.2 mM Caftaric acid 225 μL, 120 mg/L ペクチナーゼ製剤溶液もしくは酵素分画液 250 μL を加え 30°C の湯浴で 1.5 時間インキュベーションしたのち 100°C で 5 分間おいて酵素失活をさせた。生成した Caffeic acid は HPLC で測定して、その生成量を活性とみなした。

③フェノール酸エチルエステル (PEE) 生成活性

Caffeic acid および *p*-Coumaric acid を 6.73 g/L になるようにエタノールに溶解させた。本溶液 0.48 mL に 0.05 M 酒石酸緩衝液 (pH 3.5~6.5) 4.32 mL, 75 g/L ペクチナーゼ製剤溶液もしくは酵素分画液 0.2 mL を加えて 30°C 湯浴で 24 時間インキュベーションさせた。100°C で 5 分間おいて酵素失活をさせたのち HPLC を用いて Caffeic acid ethyl ester および *p*-Coumaric acid ethyl ester を測定した。

④シンナモイルエステラーゼ (CE) 活性

0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0~6.5) にクロロゲン酸 0.5 水和物を加え 1.5 mM クロロゲン酸-酢酸緩衝液を調製した。この 1.5 mM クロロゲン酸-酢酸緩衝液 3.6 mL に 25 g/L ペクチナーゼ製剤もしくは酵素分画液 0.15 mL を添加し 30°C で 1.5 時間インキュベーションした。次に 100°C で 5 分間おいて酵素失活させた後、HPLC を用いて生成した caffeic acid の測定を行った。

⑤ペクチンメチルエステラーゼ (PME) 活性

0.2 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0~6.0) にペクチン(シトラス由来) を 0.5%w/v になるように調製した。このペクチン溶液 1100 μL に 60 g/L ペクチナーゼ製剤もしくは酵素分画液 100μL を添加して 30°C の湯浴で 1 時間インキュベーションした。その後、内部標準としてアセトンを 300 μL 加え、GC を用いてメタノールの測定を行った。

(5) 官能評価法の確立

官能評価を行うパネリストは男性 9 名・女性 4 名の合計 13 名で構成した。本研究課題では、ワインの味を定量的に判断する分析型官能評価を行う必要がある。初めにパネリストの訓練を行い、続いてワインの官能評価を実施した。また、当初は苦味の評価を行う予定であったが、一般的に苦味標準物質として用いられる硫酸キニーネとワインにおける苦味の味質が異なるという問題が生じた。そこで、味の判断が容易な酸味を用いて官能評価法の確立を行うこととした。訓練は次の 3 つのステップで行った。[ステップ 1] 3 点識別法を用いて、酸味の認識訓練を行った。具体的には、パネリストに 3.2 mM 酒石酸水溶液または 3.4 mM リンゴ酸水溶液を入れたグラスとミネラルウォーターを入れたグラスを提示し、酸味を識別できるか確認した。[ステップ 2] 順位法を用いて、酸味の強弱を判断する訓練を行った。具体的には、5 段階の濃度に調製した酒石酸水溶液 (0.32, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4 mM) とリンゴ酸水溶液 (0.34, 1.7, 3.4, 5.1, 6.8 mM) を提示し、濃度順に順位付けをさせる形をとった。[ステップ 3] 官能評価には味の強度を時間軸で測定する Time Intensity (TI) 法を採用した。TI 法を行うためのソフトウェアの設計は本研究代表者が行い、ソフトウェアの作製はアルストピア社 (岐阜) が行った。TI 法にて酸味試料を正しく知覚できた段階で訓練を終了した。各訓練における試料の提示はブラインドで行い、パネリストが複数回正解した時点で、次の訓練に移行するように指示した。

(6) ワイン醸造試験に向けた条件検討

甲州ブドウ 60 kg にピロ亜硫酸カリウム 150 mg/L を加えながら除梗破砕し、圧搾して果汁を約 32 L 得た。果汁を 4°C で一晚静置した後に上澄を分離して糖度 21°, 資化性窒素量 250 mg N/L になるように上白糖とリン酸二アンモニウムを加えて調整果汁を作製した。本果汁を 400 mL ずつ分注し、ワイン酵母 (最終濃度 150mg/L) およびペクチナーゼ製剤 (最終濃度 200mg/L) を添加して約 18°C で 14 日間インキュベーションした。ワイン酵母は揮発性フェノール生成能を基準に Uvaferm 228 (活性無し), EC1118 (中程度), Simi white (高い) の 3 種類を選定した。ペクチナーゼ製剤は PEE 生成能を基準に Novarom blanc (高い), BETA (中程度), Vino taste pro (低い) の 3 種類を選定した。また醸造試験の試料は表\*\*に示した 16 通りである。一定期間ごとに、試料を採取してアルコール度, Brix およびフェノール酸化合物の生成量を測定した。

4. 研究成果

(1) ペクチナーゼ製剤の PEE 生成活性  
市販ペクチナーゼ製剤の PEE 生成活性は Novarom Blanc が最も高かった。本ペクチナ

一ゼ製剤は *A. niger* 由来の酵素が混在する製剤であるため、いずれの酵素がエステル生成に関与しているか明らかにすることを次の目的とした。

(2) ペクチナーゼ製剤 (Novarom Blanc) の酵素活性と pH の影響

酒石酸エステルの加水分解および PEE 生成はエステル加水分解酵素 (エステラーゼ) による正反応と逆反応によるものではないかと推測し、ペクチナーゼ製剤に存在が報告されている CE および PME の測定を行った。酒石酸エステル加水分解活性、PEE 生成活性、CE 活性および PME 活性が最も高くなった pH はそれぞれ 4.0, 4.5, 6.0, 5.0 付近であったため、以降の活性測定はこれら pH にて行った。

(3) ペクチナーゼ製剤 (Novarom Blanc) の分離精製および酵素活性の測定

酒石酸エステルの加水分解および PEE 生成反応を触媒する酵素を同定するため、ペクチナーゼ製剤の分画を行った。得られたフラクションを 280 nm で測定してタンパク質の溶出を確認した。図 2 に示したように、複数のピークが確認され、ペクチナーゼ製剤のタンパク質分離を行うことができた。次に、得られた画分の酵素活性を測定した。酒石酸エステル加水分解および CE 活性はほぼ同じタンパク質溶出画分 (フラクション No.20~30) に認められた (図 2)。

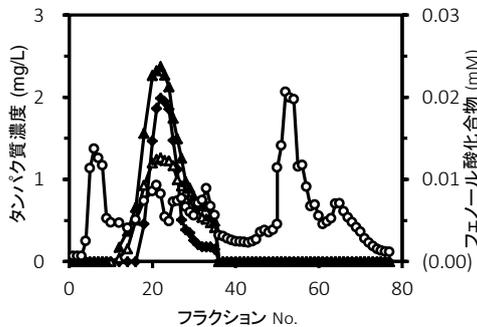


図 2 各フラクションの酒石酸エステル加水分解活性 (△) と CE 活性 (◇)

○: タンパク質, △: Caffeic acid, ▲: *p*-Coumaric acid, ◆: Caffeic acid (CE 活性)

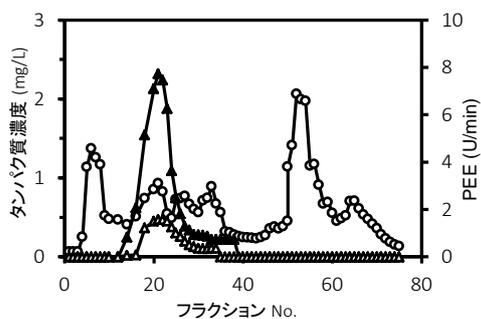


図 3 各フラクションの PEE 生成活性

○: タンパク質, △: Caffeic acid ethyl ester, ▲: *p*-Coumaric acid ethyl ester

また、PEE 生成活性もほぼ同じフラクションに認められた (図 3)。一方で PME 活性はフラクション No.50 以降に認められた (図 4)。これらの結果から、酒石酸エステル加水分解および PEE 生成活性は CE の正反応および逆反応によるものと推測される。引き続き、活性のみられた画分を再精製するとともに電気泳動などにより酵素の同定を行う予定である。

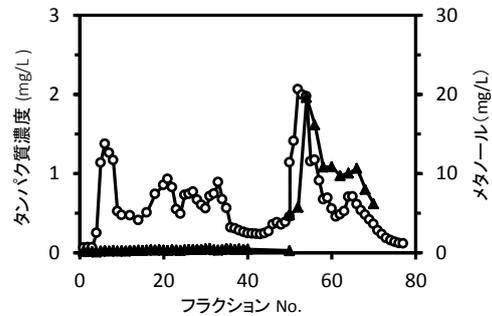


図 4 各フラクションの PME 活性

○: タンパク質, ▲: マタノール

(4) 官能評価法の確立

パネリストの訓練と TI 法の有用性について検証した。訓練を終えたパネルは、比較的再現性のよい TI 曲線を描くことができた。しかしながら、日ごとの誤差も見受けられた。パネリストが疲労せずに連続評価できる試料数は 8 つであった。そこで官能評価は、試料 8 種類を 1 セットとし複数日実施するように設計した。また、TI 曲線を見ると味強度が最大になるまでにかかる時間がパネル間で異なった (図 5)。このことは、一定時間後に味を点数化させる採点法では、正確な強度がみれていない可能性を示唆している。この点に関しては TI 法の方が有用性が高いと判断した。

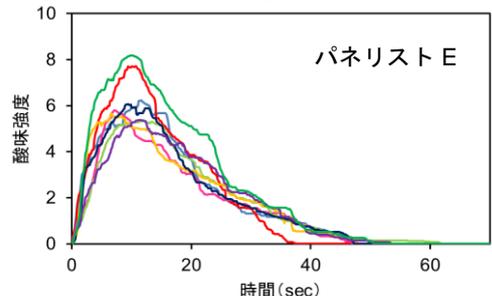
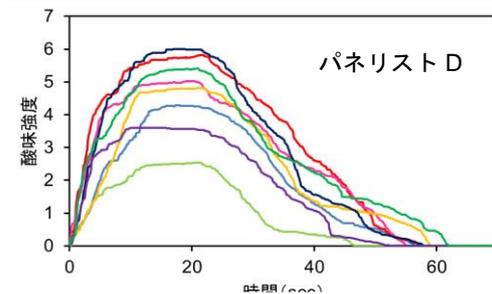


図 5 ワインの酸味強度における TI 曲線

(5) ワイン醸造試験に向けた条件検討

甲州ブドウを用いて醸造試験の条件検討を行った。アルコール発酵終了までの日数は、3種の酵母のうちEC1118が6日と最も早く、その他の2種は10~14日を要した。図6, 7, 8に *p*-Coumaric acid と *p*-Coumaric acid ethyl ester の変化を示した。甲州果汁由来の Coumaric acid が加水分解されて生成する *p*-Coumaric acid 量はペクチナーゼ製剤 Novarom blanc を添加した場合に、最も高かった。しかしながら、Simi white 発酵区では発酵4日目から急激に *p*-Coumaric acid 量が減少した(図8)。*p*-Coumaric acid ethyl ester 生成量は、Novarom blanc 添加区のみ認められたが、Simi white 発酵区では認められなかった。Simi white は *p*-Coumaric acid から揮発性フェノールである 4-vinyl phenol を生成する脱炭酸酵素を有することが報告されている(久本ら, 2010)。このことから Coumaric acid の加水分解から生成した *p*-Coumaric acid はエステル化反応を生じる前にワイン酵母由来の脱炭酸酵素によって 4-vinyl phenol に変換されたと推定される。以上を踏まえると、エステル化反応を優位にするためには Uvaferm228 のような脱炭酸酵素を有さないワイン酵母を選択する必要があることが示された。

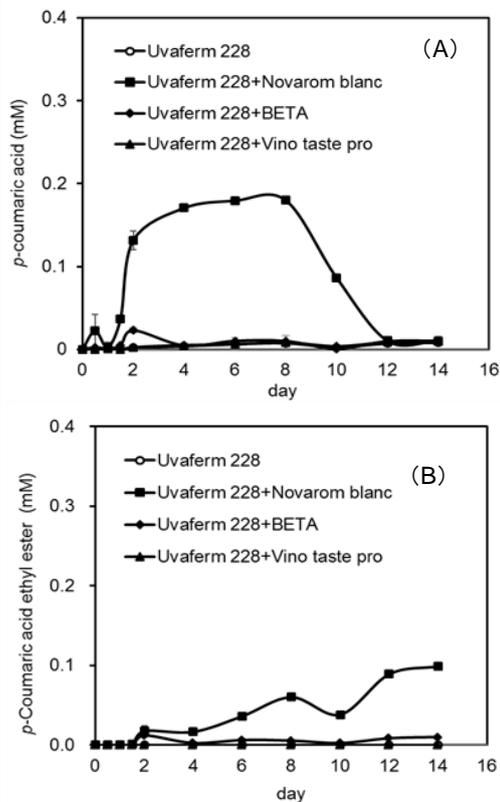


図6 酵母 (Uvaferm 228) とペクチナーゼ製剤を用いた際の PEE 生成量の変化

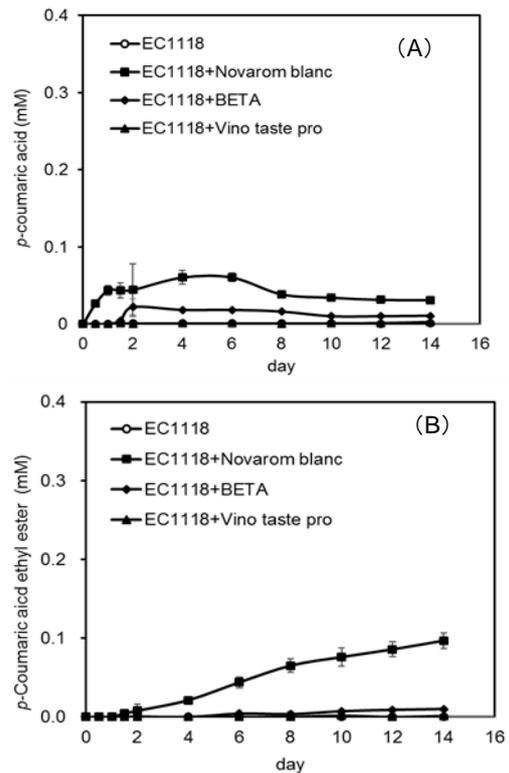


図7 酵母 (EC1118) とペクチナーゼ製剤を用いた際の PEE 生成量の変化

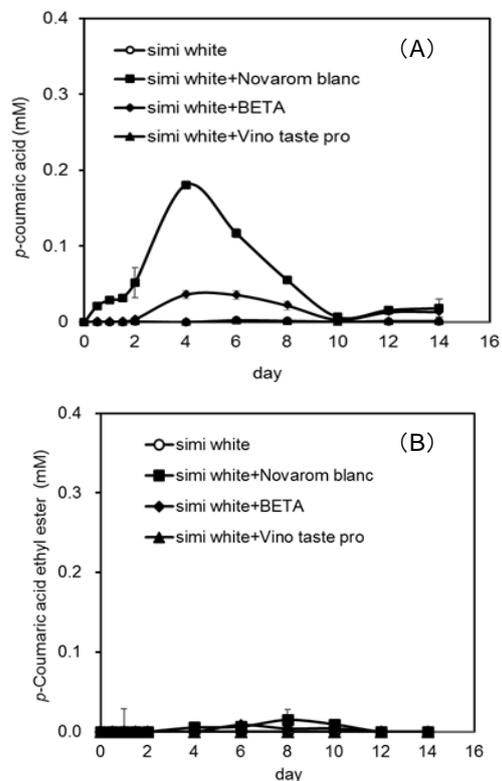


図8 酵母 (simi white) とペクチナーゼ製剤を用いた際の PEE 生成量の変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 下村豪志, 新海有貴, 斉藤史恵, 久本雅嗣, 奥田徹, 白ワインの緩衝能における有機酸の影響, 日本食品科学工学会, 2016年8月27日, 名城大学(愛知県・名古屋市)
- ② 林周美, 斉藤史恵, 久本雅嗣, 奥田徹, ワイン中のヒドロキシシナム酸におけるペクチナーゼ製剤の影響, 日本ブドウ・ワイン学会, 2014年8月18日, 北海道大学(北海道・札幌市)
- ③ Fumie SAITO, Megumi HAYASHI, Yuriko YAMAMOTO, Masashi HISAMOTO, Tohru OKUDA, Pectinase-catalyzed esterification of cinnamic acids with ethanol during winemaking, American Society for Enology and Viticulture, 2014年6月25日, Hyatt Regency Austin (Texas, USA)
- ④ 斉藤史恵, 林周美, 久本雅嗣, 奥田徹, 甲州種ワイン醸造におけるヒドロキシシナム酸エチルエステルの生成と呈味に与える影響, 日本農芸化学会, 2014年3月29日, 明治大学(神奈川県・川崎市)
- ⑤ 斉藤史恵, 山本祐梨子, 久本雅嗣, 奥田徹, 甲州種ワインに含まれるヒドロキシシナム酸エチルエステルの生成機構, 日本農芸化学会, 2013年3月26日, 東北大学(宮城県・仙台市)

[その他]

ホームページ等

- ① 山梨大学研究者総覧  
[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_DisplInfo.Scholar/0/0E8ECBF25FE69BE0.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplInfo.Scholar/0/0E8ECBF25FE69BE0.html)
- ② ワイン科学研究センター機能成分学研究部門  
<http://www.wine.yamanashi.ac.jp/biofunctional/biofunctional.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 史恵 (SAITO, Fumie)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 00625254

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし