

甲州ワインの香気成分に関する研究

(2011年日本ブドウ・ワイン学会論文賞受賞)

小林弘憲

シャトー・メルシャン

〒409-1313 山梨県甲州市勝沼町下岩崎 1425-1

New Aroma of Koshu Wine

Hironori KOBAYASHI*

* Château Mercian, Mercian Corporation, Katsunuma, Koshu 409-1313, Japan

Koshu (*Vitis vinifera* cv.) is an indigenous grape cultivar that has been grown for more than a thousand years in Japan. In this research, we investigated the varietal aroma of Koshu wine and based on the results obtained, recommended viticultural practices and winemaking processes for aromatic Koshu wine. Many commercial Koshu wines have high 4-vinylphenol content, which is responsible for the phenol off-flavor. 2-Methoxy-4-vinylphenol, likened to smoky aroma, contributes to the varietal aroma of Koshu wine. In addition, β -damascenone, whose aroma is similar to apple compote, was detected. 3-Mercaptohexan-1-ol (3MH), which is responsible for aroma similar to grapefruit and passion fruit, was considered to contribute to Koshu wine aroma as well. From our research, we recommended rearranging yeast enzymatic activities and changing the harvest timing of Koshu grape to produce aromatic Koshu wine. Moreover, we analyzed the biosynthesis of *S*-(3-hexan-1-ol)-glutathione and *S*-(3-hexan-1-ol)-L-cysteine, which are the flavor precursors of 3MH in wines, in *V. vinifera* grapes exposed to various environmental stress conditions. The results suggest that environmental stress enhances the biosynthesis of the two flavor precursors in grapevine. Our findings are useful for the selection of suitable cultivation conditions and treatment methods for Koshu grape quality improvement. Further study of the crosstalk between Koshu physiology and enology may yield clues to partially explain ‘terroir’ of Koshu wines.

緒論

甲州 ‘*Vitis vinifera* cv. Koshu’ は、1000年以上の昔、シルクロードを渡り日本の地に根付いたとされる日本固有のブドウ品種であり (Fig. 1a)、生食および醸造用ブドウとして、その多くが山梨県全域で棚式栽培されている (Fig. 1b)。現在では、他の醸造用ブドウで用いられている垣根式での栽培方法の検討もなされている。一般に甲州ブドウは、その成熟に伴い、果皮が薄い紫色を呈することから白ブドウと黒ブドウの間であるグリ (Gri; フランス語で灰色という意味) ブドウと呼ばれ、独特の収斂味を有し、他の欧州系醸造用ブドウ品種 (例; シャルドネ、メルロー) と比較して果粒が2倍以上大きくなる。DNA多型解析による分類上の位

置づけでは、東洋系の *V. vinifera* に属するという結果 (Fig. 2) も得られている (Goto-Yamamoto *et al.* 2006)。



Fig 1 (a) Outer appearance of Japanese indigenous grape cultivar ‘Koshu.’, (b) Shelf-style cultivation (overhead trellis).

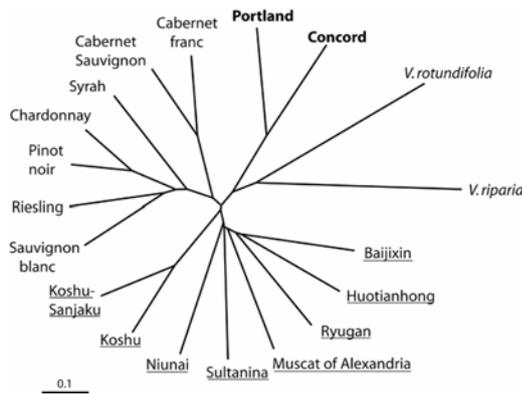


Fig 2. Figure adopted from Goto-Yamamoto et al. (2006).

UPGMA dendrogram based on the phenetic distances of the tested grape samples. Occidental and Oriental cultivars of *V. vinifera* are shown by Roman font and underlined Roman font, respectively. Bold font represents the cultivar of *V. labrusca*.

このように、生食および醸造用ブドウとして日本古来の伝統的な地位を確保している甲州ブドウではあるが、生食用としては人々の嗜好の変化にあわせた新しい交配種の創出により、またワイン醸造用としてはシユール・リー、冷凍濃縮、スキンコンタクト、樽発酵などの様々な技術を駆使した甲州ワインが存在しているものの、欧州系醸造用ブドウ品種から得られるワインや輸入ワインの影響により、今日その栽培面積および生産量の減少という問題に直面している。これらのことから、甲州ブドウが持つ品種特徴を今まで以上に引き出す栽培および醸造方法の確立は急務といえる。本稿は、甲州ワインの更なる品質向上を目的に、甲州ワインに関する香气成分に焦点を当て、甲州ブドウ由来の様々な香りの研究をまとめたものである。

甲州ワインからの香り探索

近年、分析機器の進歩と共に、個々のブドウ品種が持つそれら香りの特徴を物質レベルで解明しようとする研究が盛んに行われ、例えばソーヴィニヨン・ブランワインからは、品種特徴香を担うであろう特徴的なチオール化合物が数種類同定されている (Tominaga *et al.* 1998)。そこで筆者らは、甲州ワインに含まれる多くの香りを様々な抽出方法 (抽出溶媒の種類変更、極性の違いを利用したアロマの分画および特定化合物に

焦点を当てた選択抽出方法など) の組み合わせにより分離し、繰り返し、匂いかぎ分析を行った。その結果、数種の脂肪酸エステル類に加え、揮発性フェノール化合物である 4-ヴィニルフェノール (4VP)、2-メトキシ-4-ヴィニルフェノール (=4-ヴィニルグアイヤコール, 4VG)、C13-ノルイソプレノイド骨格を有する β -ダマセノンおよびチオール化合物の一つである 3-メルカプトヘキサノール (3MH) などの強い貢献が示唆された (Table 1) (小林ら, 2004)。これら化合物は、果実に含まれる個々の前駆物質を出発点としてアルコール発酵を通じ、揮発成分としてワイン中に放出されることから、ターゲット物質に合わせた新たな栽培および醸造方法の構築が、甲州ワインの新たな可能性を切り開くと考えられた。

Table 1. Identification of volatile compounds from Koshu wine

Compound	Threshold	Odor description
4VP	85 $\mu\text{g/L}$	Pharmacy
4VG	32 $\mu\text{g/L}$	Smoky
β -damascenone	50 ng/L	Apple compote
3MH	60 ng/L	Grapefruit
3MHA	4 ng/L	Passion fruit

甲州ワインにおける揮発性フェノール化合物

揮発性フェノール化合物である 4VP および 4VG は、薬品臭 (フェノール臭) および燻製香としてそれぞれ認識され、特に 4VP が高濃度で存在した場合、白ワインのフェノール臭の要因とされている (Chatonnet *et al.* 1993)。筆者らは、匂いかぎ分析により明らかとなった 4VP の存在を様々な市販甲州ワインについて調べた結果、分析当時、多くの甲州ワインから高濃度で検出された。このことから、甲州ワインに含まれるいくつかのアロマは、4VP などによる香りのマスキング作用により醸造されたワインにまで十分に反映されていないことが示唆された。4VP および 4VG は、*p*-クマル酸、フェルラ酸をそれぞれ前駆物質として酵母の脱炭酸酵素により生成される (Fig. 3)。

そこで、これら物質の抑制に向け、成熟ステージの異なる甲州ブドウを用い、4VP および 4VG の生成量および酵母の酵素活性の量的な違いを小規模発酵試験

により明らかとした (小林ら. 2006)。甲州ワインにおける 4VP および 4VG 生成量は、ブドウが成熟するにつれ増加し、市販酵母の酵素活性の違いにより変動することが示唆された (Fig. 4) ことから、収穫タイミングの再考および収穫期後半のブドウを用いる場合には、Polyphenol Off Flavor-酵母 (市販ワイン酵母のパフレットには、4VP および 4VG の生成に関して Polyphenol Off Flavor +、-などの標記がされている場合が多い) の使用が、甲州ワインのフェノール臭低減に寄与するものと考えられた。

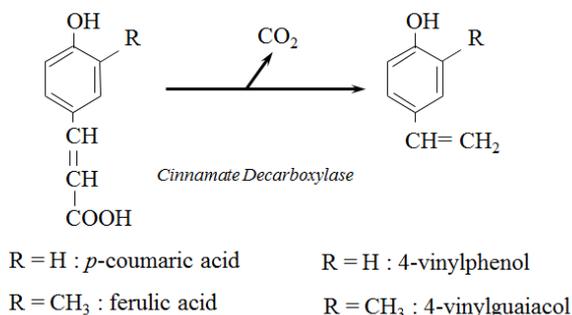


Fig.3 Synthetic pathway of volatile phenols.

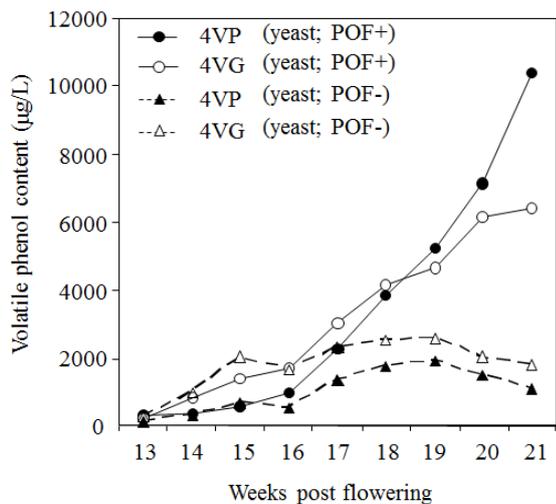


Fig.4 Monitoring of volatile phenol contents in Koshu wines made from Koshu grapes harvested at different stages of grape maturity (Laboratory Scale). VL3 and VL1 were used as POF + and POF - yeast, respectively.

さらに甲州ブドウは、他の醸造用白ワインと比較して *p*-クマル酸、フェルラ酸の前駆体であるシナミル酸酒石酸エステル類 (カフタリック酸、クータリック酸など) を多く含む (Yokotsuka *et al.* 1993)。またフラ

ボノール関連物質も他のブドウ品種と比較して高含有 (Kobayashi *et al.* 2011) であることから、これらフェノール化合物が甲州ブドウの有する独特な苦味の要因を担っている可能性が高い。現在、甲州ワインに含まれる苦味化合物の官能特性およびヒドロキシシナミル酸エチルエステルの生成機構に関する研究も進んでいる (斉藤ら. 2012)。今後、甲州ブドウの持つ特徴的な苦味のメカニズムの解明が期待される。

甲州ワインにおけるノルイソプレノイド化合物

「ブルガリアン (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、植物、果物などに幅広く存在するβ-ダマセノン、いくつかの脂肪酸エステルとともにワインのフルーティーさに寄与する物質であり、カロテノイド骨格をもつキサントフィル類のネオキサントニンが前駆物質の起点となり、酸化開裂、酸加水分解、(配糖体を形成したのものに関しては酵素反応を含む) などの複雑な経路を経て生成される (Fig. 5) ことが知られている (Skouroumounis *et al.* 2001)。

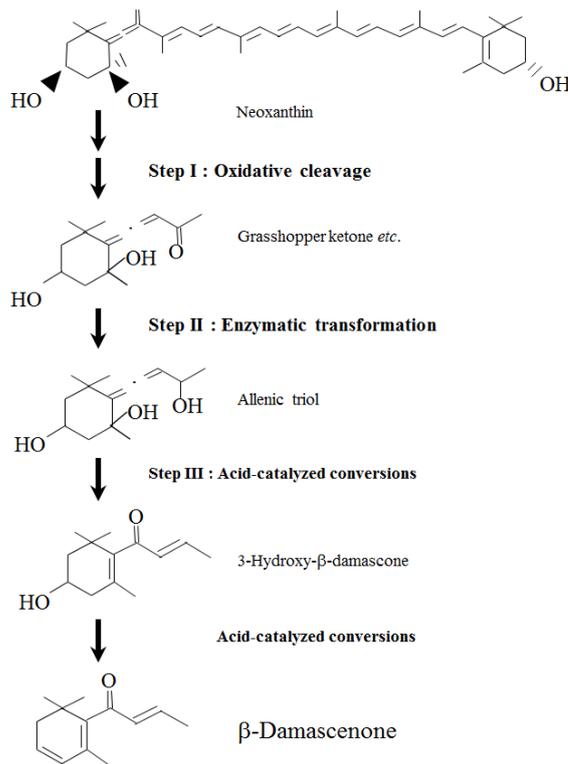


Fig.5 Proposed pathway leading to β-damascenone from neoxanthin.

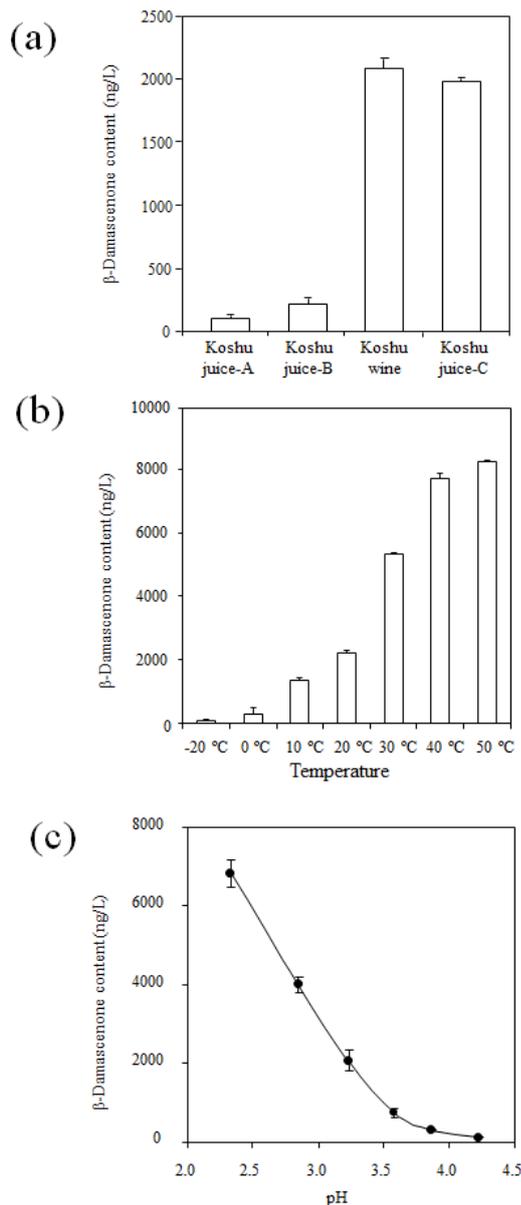


Fig.6 (a) Influence of oxygen and fermentation on β -damascenone content in Koshu juice and wine. Koshu juice-A: stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; Koshu juice-B: stored at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs under CO_2 ; Koshu juice-C: stored at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs. Antibiotics (ampicillin and chloramphenicol) were added to all the Koshu juices to avoid alcoholic fermentation (except Koshu wine). (b) Influence of storage temperature on β -damascenone content in Koshu juice (after 48 hrs). (c) Influence of pH on β -damascenone content in Koshu juice (stored at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs).

甲州ブドウにおいても酸素の介在、高温処理、低 pH が β -ダマセノンの生成にとって有効な因子であった (Fig. 6a, b, and c)。また、甲州ブドウ各器官における β -ダマセノン量は、重量比として果汁：果皮=1：3 で

あり (種子は検出されず)、果汁の压榨率が進むにつれ、より多くの β -ダマセノンとその果汁中に含有していた (Fig. 7a and b)。これらの知見を基に、プレス果汁およびスキンコンタクト法を採用し、赤ワイン醸造並みに発酵温度を高く設定した実用化規模のワイン醸造を試みた結果、通常の甲州ワインと比較して最大7倍程度の β -ダマセノン濃度を高含有する甲州ワインが得られた (小林ら, 2007)。

その香りの効果的なリリースにスキンコンタクト法など果皮を用いる甲州ワイン醸造は、甲州ブドウの有する特徴的な苦味成分も併せて抽出する可能性が高いことから、ターゲット化合物に焦点を合わせると共に最終のワインのスタイルを考慮したワイン醸造が重要となる。

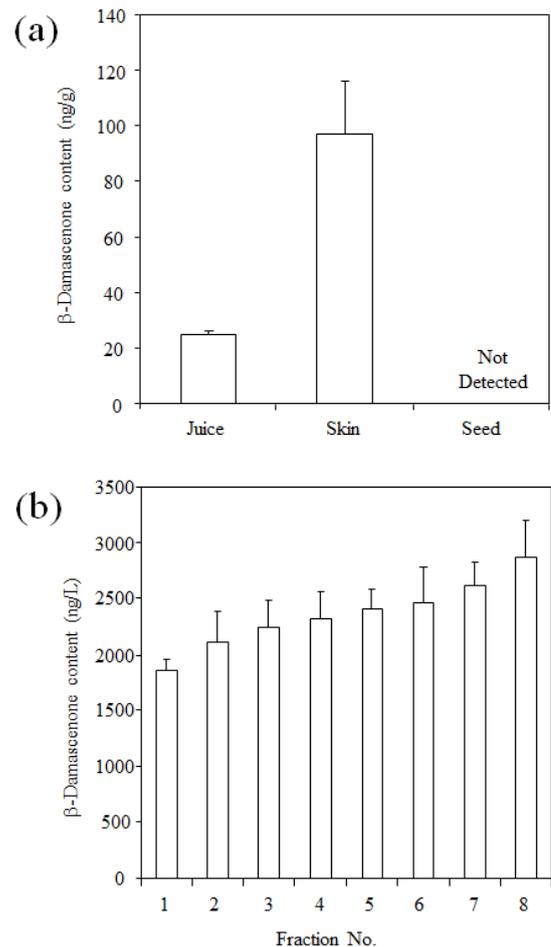


Fig. 7 (a) Distribution of β -damascenone in Koshu grape (stored at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs). (b) Influence of pressure on β -damascenone content in Koshu juice (stored at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs). Fraction No.: Fruit juice from 10% to 80% squeezed at intervals 10% volume.

甲州ワインにおけるチオール化合物

ソーヴィニオン・ブランワインにおけるチオール化合物 (Tominaga *et al.* 1998a) およびソーヴィニオン・ブランブドウからそれらチオール化合物前駆体の発見 (Tominaga *et al.* 1998b) は、個々のブドウ品種の持つ特徴を解明した画期的な研究であり、現在、その成果が実醸造に応用されている。匂いかぎ分析の結果、それらチオール化合物の中で 3MH および 3-メルカプトヘキシルアセテート (3MHA) が、甲州ワインからも同定された (小林ら. 2004)。3MH および 3MHA は、それぞれグレープフルーツ、パッションフルーツなど柑橘系アロマとして認識されている。ブドウ果粒におけるこれら香りの生成メカニズムは、グルタチオン抱合体 (Peyrot des Gachons *et al.* 2002) が前駆体として形成され、システニルグリシン抱合体 (Capone *et al.* 2011) およびシステイン抱合体 (Tominaga *et al.* 1998b) を経て、最終的に酵母により香り (3MH) へと変換され、ワイン中へリリースされる (Fig. 8)。そこで、これらチオール化合物に焦点を当て、甲州ワインへの増強方法を検討した。

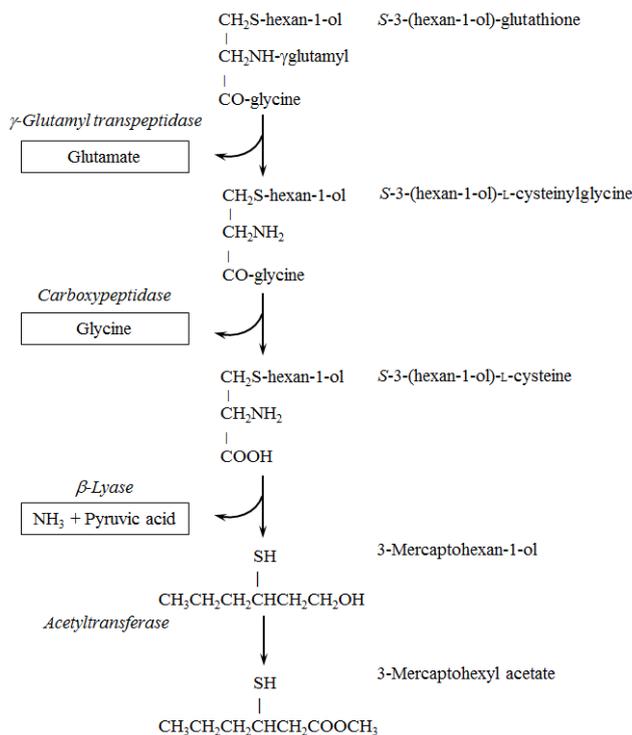


Fig. 8 Synthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate.

まず、一般に SH 基を含むチオール化合物は、重金属類との反応性に富み、その特徴的な香りを速やかに消失することから、ブドウ防除剤として広く用いられるボルドー液 (硫酸銅と石灰の混合液) の使用時期および頻度の見直しを行い、収穫期のブドウに出来る限り銅が残存しないよう努めた。また、前駆体含有量は、生育ステージに大きく左右される (Kobayashi *et al.* 2010a) ことが示唆されたため、甲州ブドウに含まれる前駆体含有量を経時的にモニタリングし、その挙動から収穫のタイミングを決定した (Fig. 9a and b)。

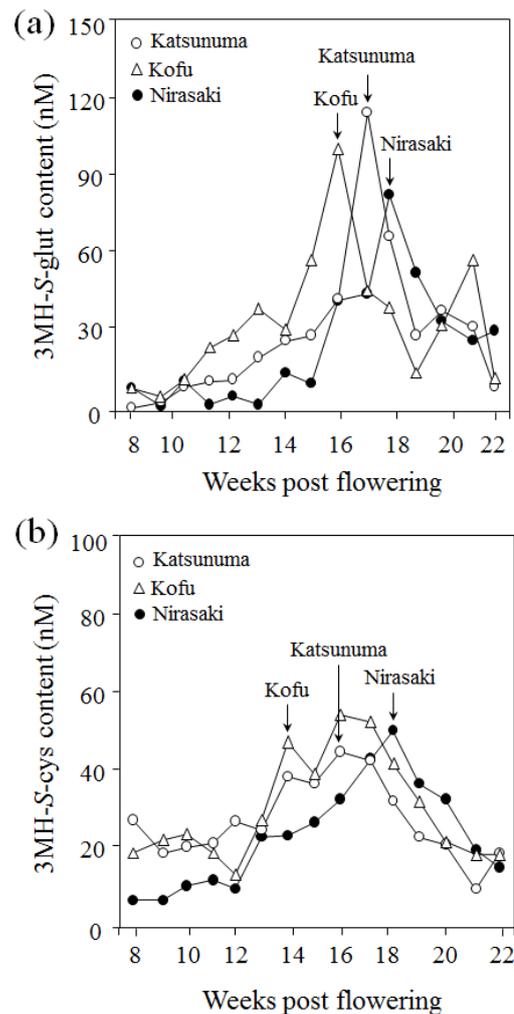


Fig. 9 (a) Monitoring of S-glutathionyl conjugate (3MH-S-glut) content in Koshu grape juice from the three vineyards during development. Arrows indicate peaks of 3MH-S-glut content for each vineyard. (b) Monitoring of S-glutathionyl conjugate (3MH-S-cys) content in Koshu grape juice from the three vineyards during development. Arrows indicate peaks of 3MH-S-cys content for each vineyard.

さらに、酵母 (Murat *et al.* 2001) および発酵方法 (Masneuf-Pomarède *et al.* 2006) などの影響も受けることから、甲州ブドウを用いた小規模発酵試験を行い、香りの発現に効果的な酵母および推奨される発酵条件を設定した。このような栽培および醸造の取り組みにより、従来の甲州ワインと比較して 5 倍以上 3MH を高含有する甲州ワインを得た。

筆者らは、近年の研究においてブドウ果粒内における前駆体 3MH 含有量は、低温、高温、紫外線、微生物による刺激などの環境ストレスに応答すること (Kobayashi *et al.* 2011b)、また 1 日の中で変動すること (Kobayashi *et al.* 2012) を見出した。事実、*Botrytis cinerea* に感染したブドウからは高濃度の前駆体 (Thibon *et al.* 2009) が、またワインからは高濃度の 3MH (Sarrazin *et al.* 2007) がそれぞれ定量されている。さらに、ヘキサナールおよびグルタチオンからグルタチオン抱合体が合成されることもブドウ細胞を用いて明らかとされている (Thibon *et al.* 2011)。植物生理学の視点から前駆体 3MH の存在意義を考察すると、前駆体 3MH は、栽培環境などに由来する各種ストレスに対し、ブドウ自身を保護する (解毒する) ために生成された物質であるとも考えられる (Fig. 10)。

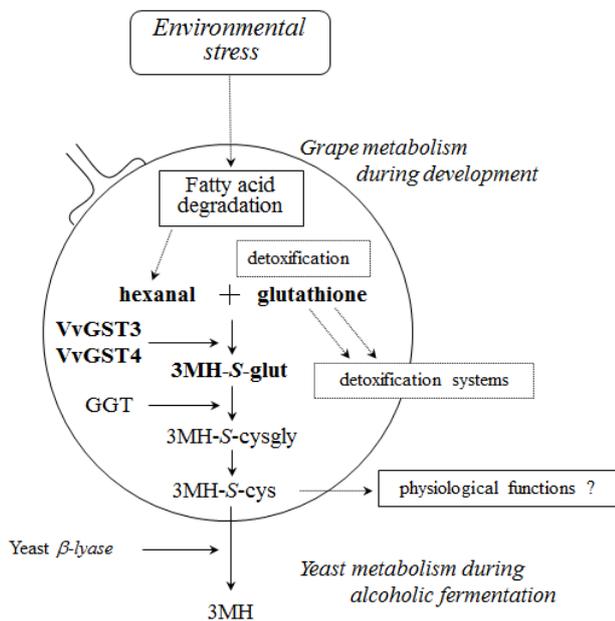


Fig. 10 Hypothetical pathway for the biosynthesis of 3MH-S-glut and 3MH-S-cys in grapevine exposed to environmental stress conditions.

まとめ

以上述べてきたように、甲州ブドウに隠された潜在的な香りの特性を最大限に引き出すためのブドウ栽培および効果的に発現させるためのワイン醸造に関する研究の結果、現在、いくつかの新しいスタイルの甲州ワイン醸造に至っている。今後、甲州ブドウの‘テロワール’ (産地が形成するブドウの特徴) について、今まで以上に科学的な解明が進み、日本が有する特徴的な気候を反映した甲州ワインが数多く創造されることを期待する。

謝辞

本研究は、旧ボルドー第2大学醸造学部 (現 Institut de Sciences de la Vigne et du Vin) デュブルデュー研究室・故富永敬俊博士、東京工科大学応用生物学部・高柳勉教授、山梨大学ワイン科学研究センター・鈴木俊二准教授ならびにメルシャン株式会社商品開発研究所、シャトー・メルシャンの皆様にご指導・ご協力いただき行われたものであり、ここに厚く感謝の意を申し上げます。

文献

- Capone, D. L., K. H. Pardon, A. G. Cordente, and D. W. Jeffery. 2011. Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11204-11210.
- Chatonnet, P., D. Dubourdiou, J. Noel, and V. Lavigne. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* 62, 191-202.
- Goto-Yamamoto, N., H. Mouri, M. Azumi, and K. J. Edwards. 2006. Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 105-108.
- 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・デウニ, 大久保敏幸. 2004. 甲州ワインの品種香特定. *日本ブドウ・ワイン学会誌.* 15, 109-110.
- 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・デウニ, 金野知典. 2006.

- 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. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 17, 75-80.
- 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, デュブルデュエ・デウニ, 金野知典. 2007. 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. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 18, 22-27.
- Kobayashi, H., H. Takase, K. Kaneko, F. Tanzawa, R. Takata, S. Suzuki, and T. Konno. 2010. Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 176-185.
- Kobayashi, H., Y. Suzuki, K. Ajimura, T. Konno, S. Suzuki, and H. Saito. 2011a. Characterization of phenolic compounds biosynthesized in pink-colored skin of Japanese indigenous *Vitis vinifera* cv. Koshu grape. *Plant Biotech. Rep.* 5, 79-88.
- Kobayashi, H., H. Takase, Y. Suzuki, F. Tanzawa, R. Takata, K. Fujita, M. Kohno, M. Mochizuki, S. Suzuki, and T. Konno. 2011b. Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *J. Exp. Bot.* 62, 1325-1336.
- Kobayashi, H., S. Matsuyama, H. Takase, K. Sasaki, S. Suzuki, R. Takata, and H. Saito, 2012. Impact of harvest timing on the concentration of 3-mercaptohexan-1-ol precursors in *Vitis vinifera* berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 544-548.
- Skouroumounis, G. K. and M. A. Sefton. (ed. Winterhalter, P. and R. L. Rouseff.) 2001. Occurrence in grapes and wine in *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, p. 241-299, The American Chemical Society.
- Masneuf-Pomarède, I., C. Mansour, M. L. Marat, T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2006. Influence of fermentation temperature on volatile thiol concentrations in Sauvignon blanc wine. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 385-390.
- Murat, M. L., I. Masneuf, P. Darriet, V. Lavigne, T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2001. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 136-139.
- Peyrot des Gachons, C., T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2002. Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4076-4079.
- 斉藤史恵, 山本祐梨子, 久本雅嗣, 奥田徹. 2012. 甲州種ワインに含まれるヒドロキシシシナム酸エチルエステルの生成機構. 日本農芸化学会大会要旨. 講演番号 3A12a01.
- Sarrazin, E., S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, E. Frrot, and D. Dubourdieu. 2007. Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytised sweet wines: Identification and quantification of new sulfanyl alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1437-1444.
- Thibon, C., D. Dubourdieu, P. Darriet, and T. Tominaga. 2009. Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chem.* 114, 1359-1364.
- Thibon, C., S. Cluzet, J. M. Mérillon, P. Darriet, and D. Dubourdieu. 2011. 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1344-1351.
- Tominaga, T., A. Furrer, R. Henry, and D. Dubourdieu. 1998a. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragrance J.* 13, 159-162.
- Tominaga, T., A. Furrer, R. Henry, and D. Dubourdieu. 1998a. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragrance J.* 13, 159-162.
- Tominaga, T., C. Peyrot des Gachons, and D. Dubourdieu. 1998b. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215-5219.
- Yokotsuka, K., T. Shimizu, and T. Seki. 1993. Chemical characterization of wine grapes grown in Japan. *J. Inst. Enol. Vitic.* 28, 23-35.