

要約

甲州ワインは他の白ワインと比較して多量のプロリン (約 500 mg/L) を含む。プロリンは中性付近で苦味や甘味を呈する。甲州ワインは、官能検査により淡麗・低酸味と指摘されることが多く、本ワインの酸味にプロリンが影響を与えている可能性が考えられた。本研究では、甲州ワインのプロリンを低減させる方法について検討した。

ワイン酵母 (5 株) のプロリン消費能力について調査した。プロリン (200 mg/L) を含む合成培地および甲州果汁培地 (プロリン: 632 mg/L) を用い、5 株を静置もしくは振盪培養した結果、各株のプロリン消費率は、いずれの培地および培養条件においても初発濃度の約 15 ~ 40% の間にあることがわかった。一方、酵母のプロリン資化代謝の第一段階酵素であるプロリンオキシダーゼ遺伝子 (PUT1) を導入した株を構築し、本株のプロリン消費能力についても調べた。結果、静置培養では、いずれも培地においても極端なプロリン消費は見られなかった。しかし、振盪培養では PUT1 株の細胞内プロリン濃度がコントロール株の約 20% まで低下していることがわかった。

甲州ワインおよびシャルドネワインに含まれるアミノ酸の比較

Table 1 Amino acid composition of Koshu wine. -Harvested in 1998-2006-

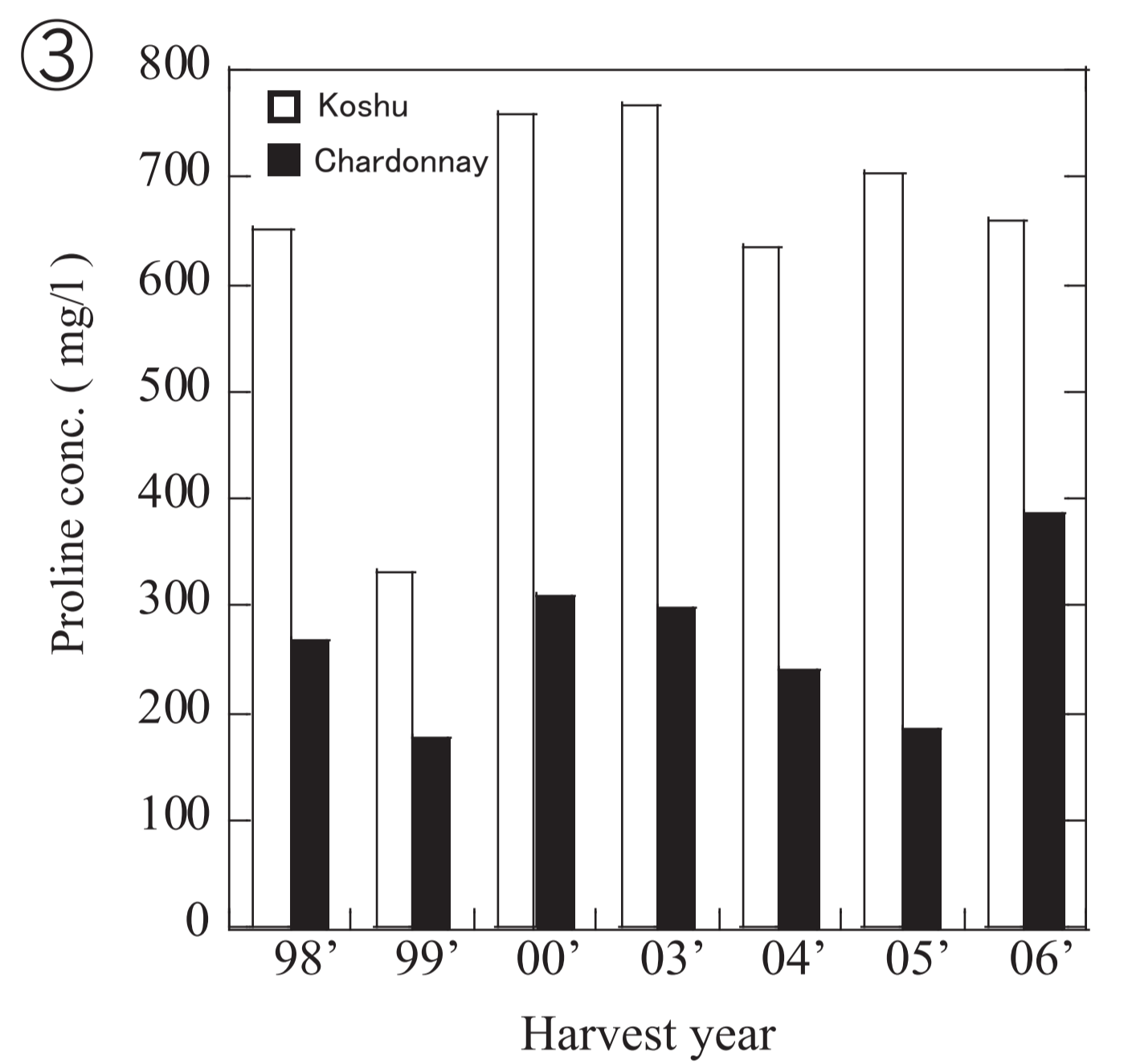
	1998	1999	2000	2003	2004	2005	2006	Average
Alanine	—	—	—	123.5	6.0	36.0	—	55.2
Arginine	48.0	39.8	23.2	38.1	19.2	38.8	25.4	33.2
Aspartic acid	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamic acid	64.7	—	41.2	—	—	—	—	52.9
Asparagine	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamine	75.8	62.7	23.9	164.3	111.8	122.1	72.6	90.4
Glycine	—	—	—	—	—	—	—	—
Histidine	—	—	—	59.4	55.2	71.8	—	62.1
Isoleucine	27.7	32.8	11.9	—	—	—	—	24.1
Leucine	—	—	28.1	18.0	35.9	—	—	27.3
Lysine	51.8	50.8	—	16.8	50.2	23.4	14.2	34.5
Methionine	31.2	59.9	—	215.8	—	42.2	59.3	81.7
Phenylalanine	24.8	49.7	32.3	—	42.0	25.6	—	34.9
Serine	—	—	—	—	—	—	—	—
Threonine	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	15.1	—	—	—	—	—	—	—
Tyrosine	—	—	—	—	—	—	—	—
Valine	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	339.0	295.6	160.6	636.0	320.2	359.9	171.5	—

Data indicated the concentrations of the amino acid (mg/l) in the wine. Means of triplic measurements within the experimental error, maximum = Not detected.

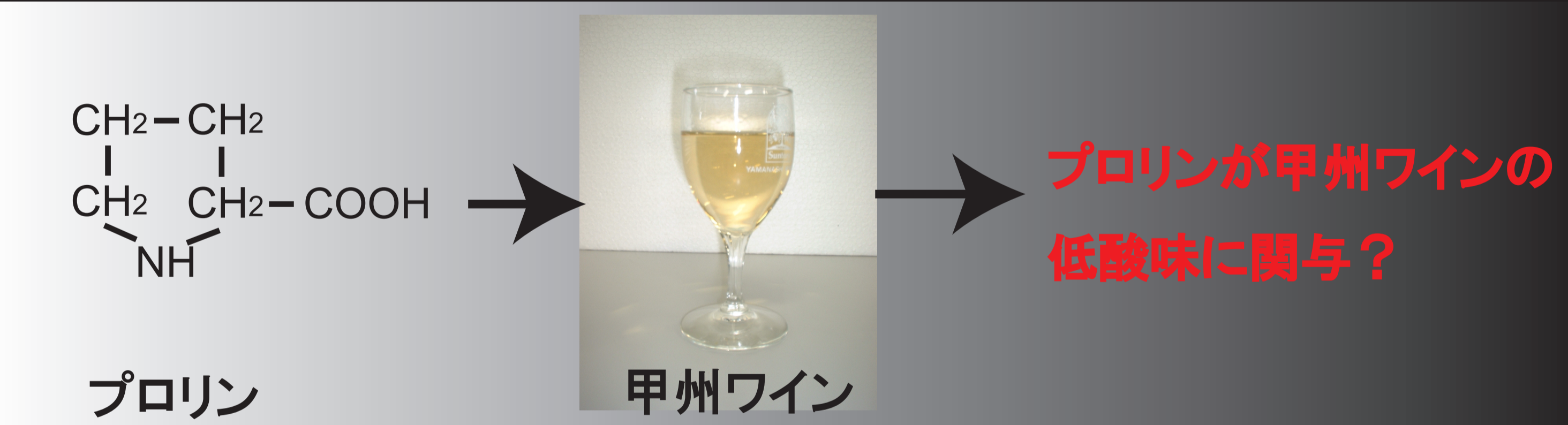
Table 2 Amino acid composition of Chardonnay wine. -Harvested in 1998-2006-

	1998	1999	2000	2003	2004	2005	2006	Average
Alanine	58.3	62.4	83.2	86.2	44.4	62.1	42.1	62.7
Arginine	56.4	86.3	109.6	97.4	79.2	100.3	44.6	82.0
Aspartic acid	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamic acid	—	—	—	73.7	—	—	—	—
Asparagine	—	182.3	—	—	—	—	—	136.7
Glutamine	—	—	—	—	65.8	82.3	—	74.0
Glycine	—	—	—	—	—	—	117.1	—
Histidine	—	—	—	23.0	65.0	128.0	65.0	70.3
Isoleucine	—	—	—	—	24.0	47.9	—	35.9
Leucine	—	—	—	—	30.9	19.0	27.3	23.8
Lysine	62.3	50.0	70.0	61.0	45.0	75.0	65.0	61.2
Methionine	—	—	—	—	—	—	32.8	—
Phenylalanine	—	—	—	—	—	—	—	—
Serine	—	—	—	—	—	—	—	—
Threonine	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	15.2	35.0	12.0	—	—	40.0	—	25.6
Tyrosine	—	—	—	—	—	—	—	—
Valine	—	—	—	36.9	—	—	—	—
Total	192.2	416.0	274.8	500.2	342.4	562.9	384.9	—

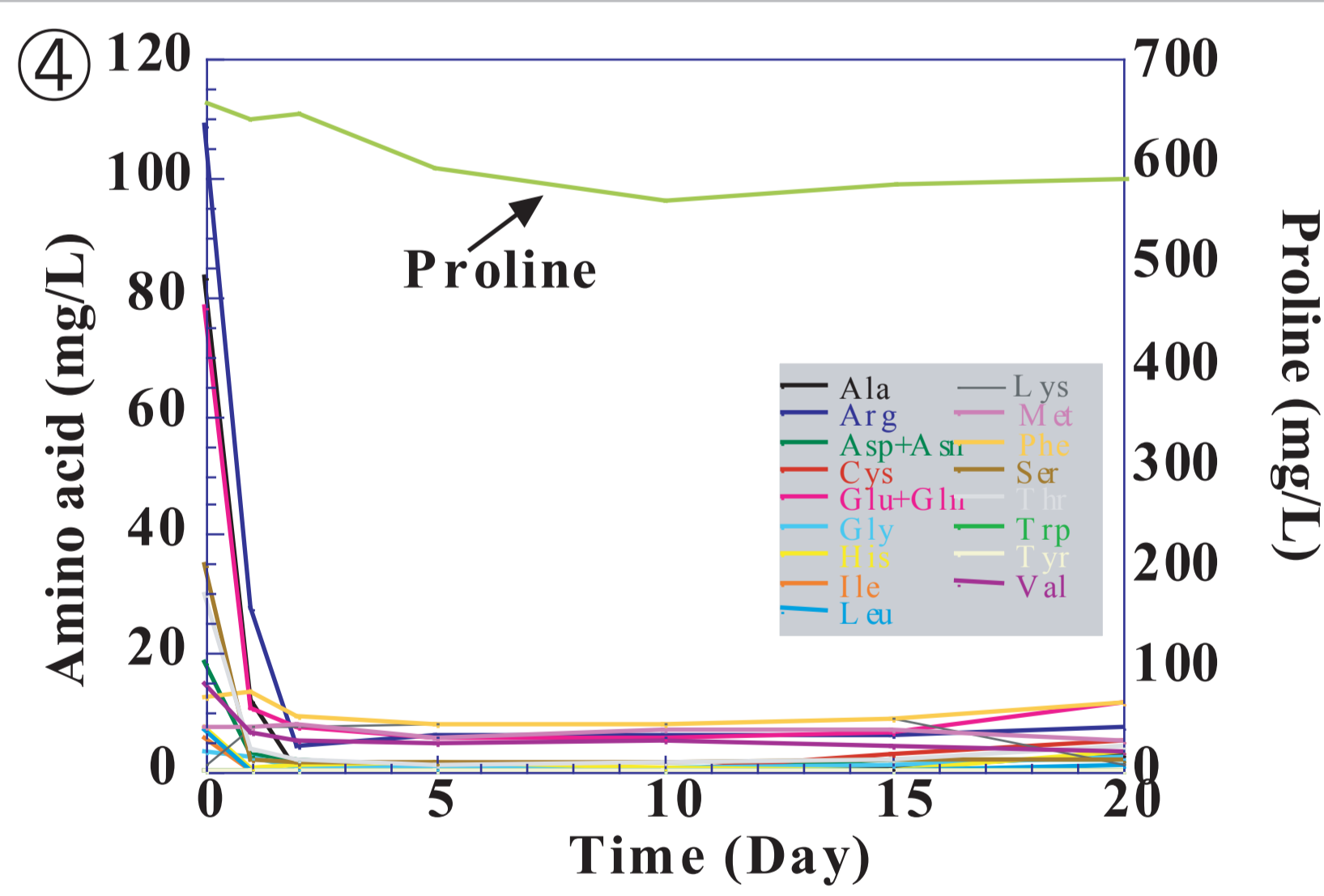
Data indicated the concentrations of the amino acid (mg/l) in the wine. Means of triplic measurements within the experimental error maximum = Not detected.



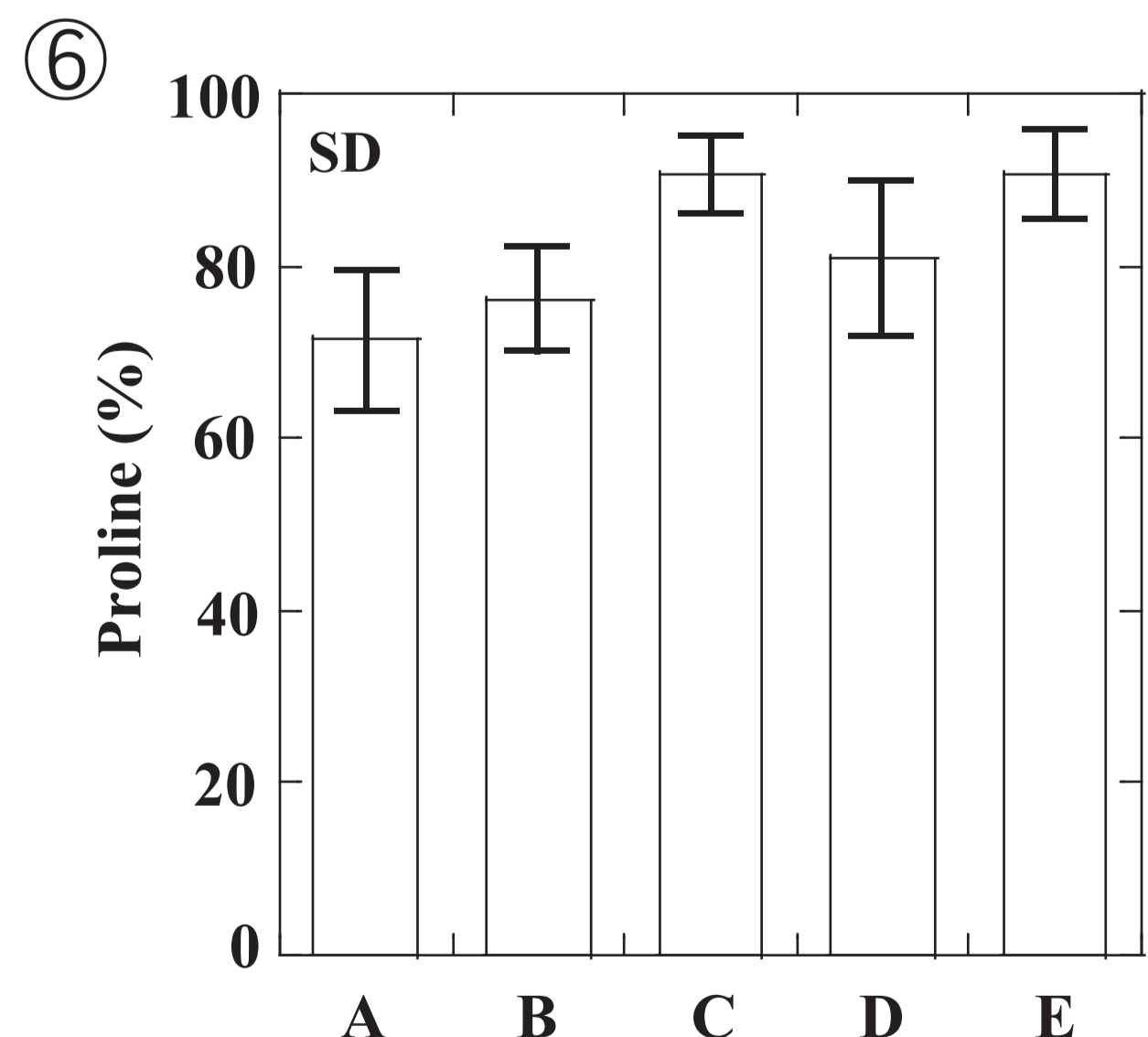
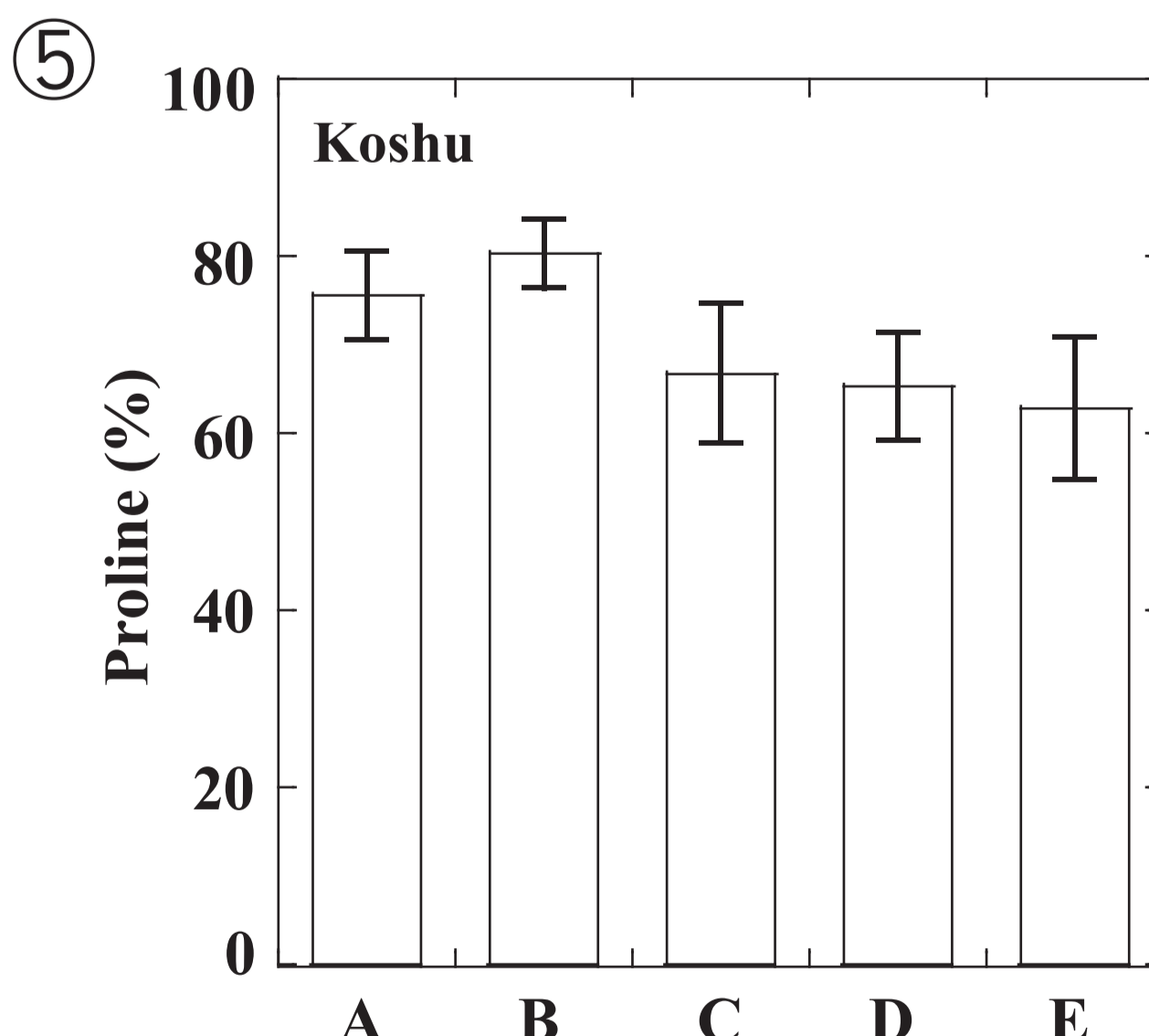
山梨大学ワイン科学研究センターにて、1998-2006年に試験醸造された甲州ワインおよびシャルドネワインのアミノ酸濃度を調査し、両ワインのアミノ酸組成の違いについて比較した。その結果、甲州ワインにはグルタミンが、シャルドネワインにはアラニンが特徴的に含まれている点で異なった (①、②)。また、甲州ワインはシャルドネワインに比べ約2倍のプロリンを含んでいることがわかった (③)。



なぜ、プロリンが多く含まれるのか？ ~ワイン発酵過程でのアミノ酸濃度の変化~



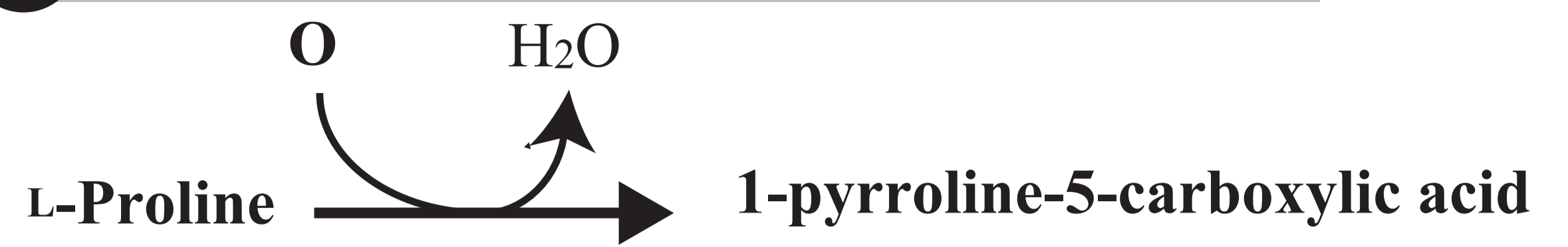
甲州ブドウ果汁に含まれるアミノ酸の多くは、発酵開始直後から酵母によりほとんど消費される。しかし、プロリンは、他のアミノ酸と異なり、ほとんどが発酵終了まで残存した (④)。



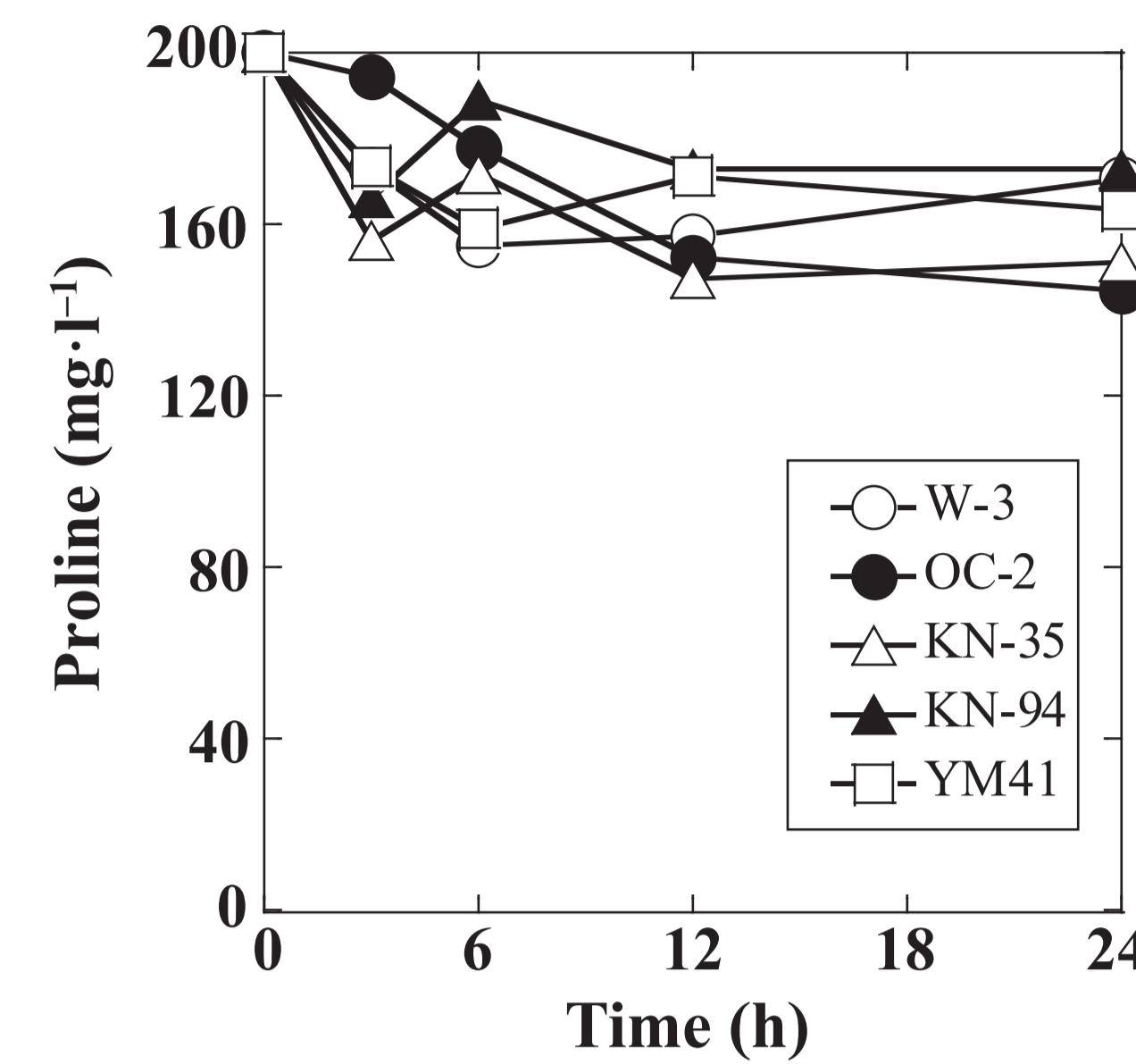
Saccharomyces cerevisiae W-3 (A), *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 (B), *Saccharomyces cerevisiae* KN-35 (C), *Saccharomyces cerevisiae* KN-94 (D), *Saccharomyces cerevisiae* YM41 (E)

異なる酵母株 (5 株) を用いて甲州果汁培地 (pH 3.2, 糖 20%, プロリン 632 mg/L) を発酵 (16°C, 14 日間) させた場合、初発プロリン濃度の約 20 ~ 40% が減少した (⑤)。同様に、SD 合成培地では、約 15 ~ 30% が減少した (⑥)。これらのデータから、1) 甲州ブドウ果汁に含まれるプロリンは、発酵過程で酵母によりほとんど消費されない為、結果的に甲州ワインは多くのプロリンを含む。2) ワイン酵母株によってプロリン消費率は異なるものの、いずれの培地においても初発濃度の約 15 ~ 40% の間にあることがわかった。

酵母は発酵中、果汁中のプロリンを利用できない？



プロリン代謝の律速酵素であるプロリンオキシダーゼは酸素を基質に用いる。ワイン発酵中の低酸素状態が原因？



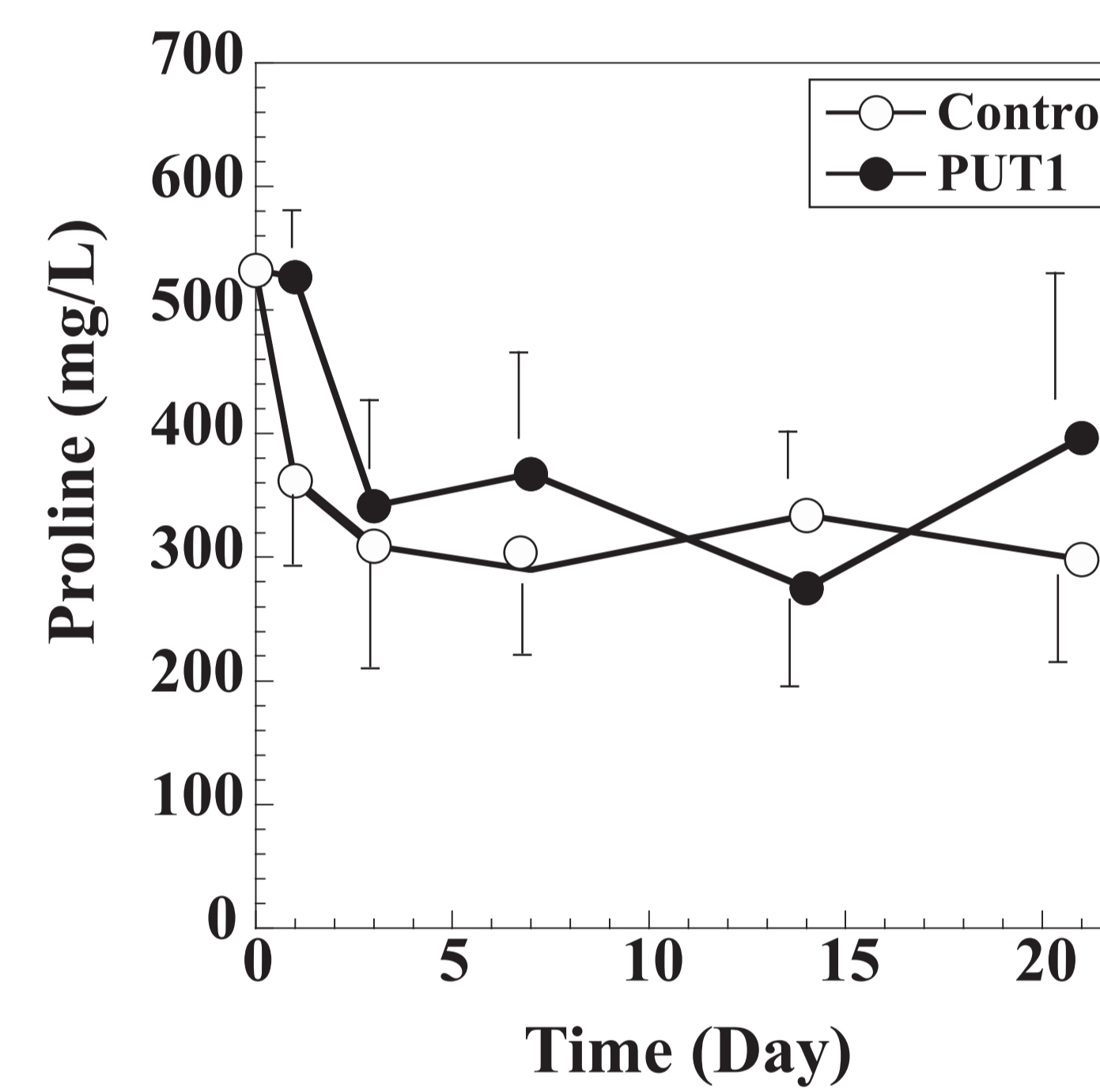
SD 合成培地 (プロリン 200mg/L) にワイン酵母 (5 株) を接種し、好氣的培養 (振盪培養) を行った。結果、プロリンは発酵させた場合とほぼ同様の減少率を示した。つまり、酸素供給しただけでは、酵母のプロリン消費は増大しない。

PUT1 遺伝子産物の発現が酵母のプロリン消費の鍵？

PUT1 株を用いたプロリン低減化の試み

プロリンオキシダーゼ遺伝子 (PUT1) を過剰発現させた株 (PUT1 株) を用いることにより、培地中のプロリン量を減少させることができるか検証した。

PUT1 株: 多コピーベクター pRS416 のマルチクロニングサイトへ PUT1 遺伝子 (*S. cerevisiae* OC-2 株由来) を導入したプラスミドを作成し、これを *S. cerevisiae* DBY746 株 (*MAT* α: *trp1*⁻²⁸⁹, *his3*Δ¹, *leu2*³⁻¹¹², *ura3*⁻⁵²) へ形質転換した株を構築した。



SD 合成培地 (プロリン 500mg/L) に PUT1 株を接種し、発酵させた。結果、PUT1 株のプロリン消費は、コントロール株と同等であることがわかり、プロリンは発酵させた場合とほぼ同様の減少率を示した。つまり、PUT1 遺伝子を過剰発現させただけでは、酵母のプロリン消費は増大しない。

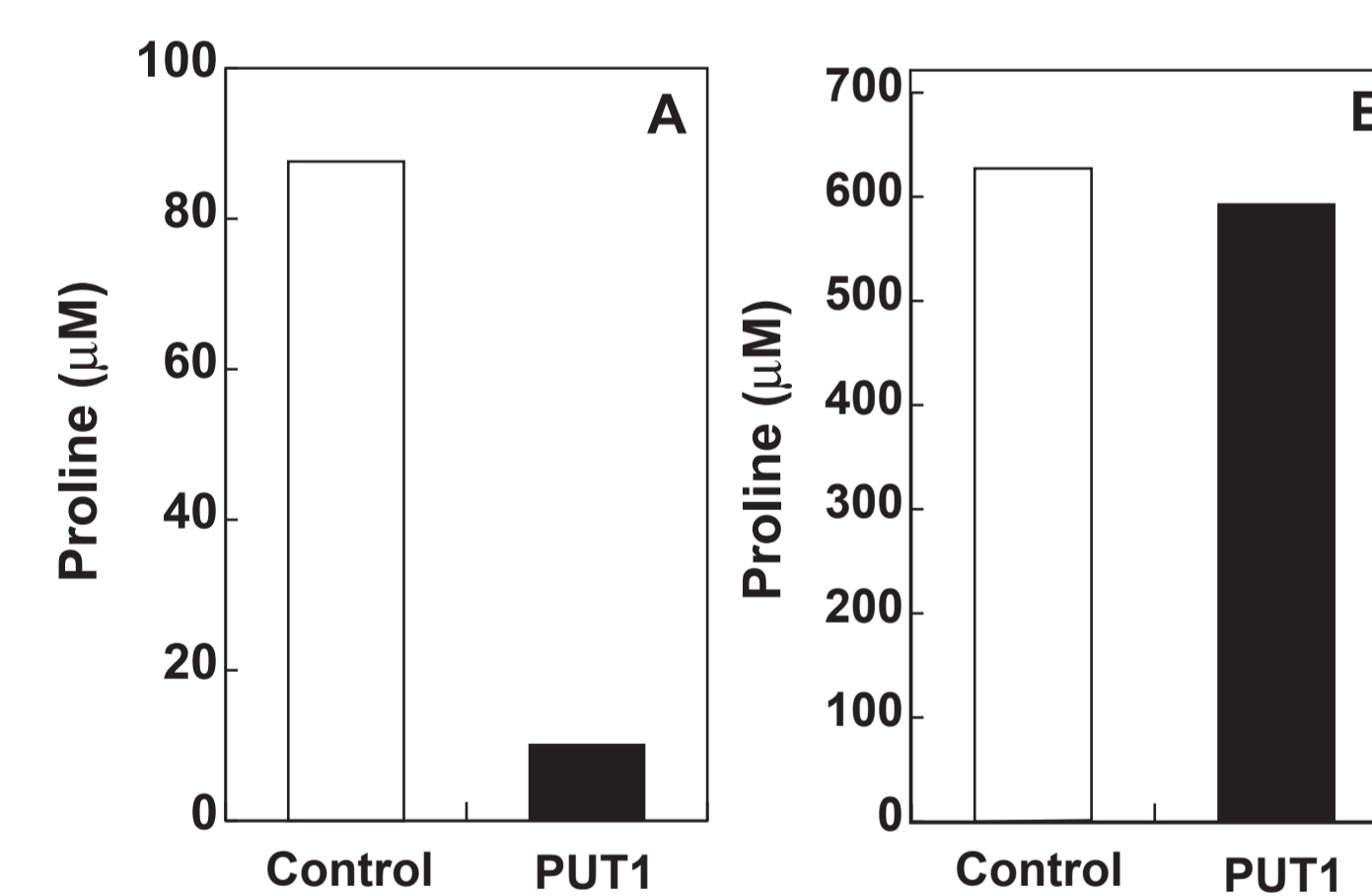


Figure Intracellular proline concentration in PUT1 gene transformant. Cells were grown on SD medium (2% glucose; 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid; 0.01% histidine, leucine, tryptophan; 0.1% proline) at 26 ° C for 24h. Panel A : Reciprocal shaking cultivation. Panel B : Anaerobic fermentation (20 day).

SD 合成培地 (プロリン 860μM) に PUT1 株を接種し、振盪培養 (パネル A) および発酵 (パネル B) させ、酵母細胞内のプロリン濃度を測定した。結果、PUT1 株の細胞内プロリン濃度は、発酵させた場合、コントロール株と差が見られなかったが、振盪培養させた場合は、20%まで低下した。

今後の展開

- 甲州ワインに含まれるプロリンの低減化できる条件 (酵母株および培養条件) の検討。
- PUT1 株を用いて発酵させ、微量の酸素を供給するシステムの構築
- PUT3 遺伝子 (プロリンパーミアラーゼ) の共発現系の構築

参考文献

- Palma, S.F. *et al.* (1992) *Amino Acids*, 3, 303-309 (アミノ酸分析方法)
- Ascorbic acid content in grapes grown in Japan and its change during wine fermentation and storage. Takeo Miki, Yuhsuke Iwata and Takashi Shinohara. *J.ASEV jpn. impress* (2008)
- Characteristics of amino acid compositions of koshu and chardonnay wines. Takeo Miki, Takashi Shinohara, *J. Brew. Soc. Japan*, 103(12) impress (2008)
- Potential of yeasts isolated from botrytized grape to be new wine yeast. Takeo Miki, Yoshiaki Ito, Kazumasa Kuroha, Shingo Izawa, Takashi Shinohara, *Food Sci. Technol. Res.* 14(4), 345-350, (2008)
- Formation of the cytoplasmic P-bodies in sake yeast during Japanese sake brewing and wine making. Shingo. Izawa, Keiko Kita, Kayo Ikeda, Takeo Miki, and Yoshiharu Inoue, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 70417- 70418 (2007)