

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5632292号
(P5632292)

(45) 発行日 平成26年11月26日(2014.11.26)

(24) 登録日 平成26年10月17日(2014.10.17)

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 G 1/02	(2006.01)	C 1 2 G 1/02
C 1 2 P 7/06	(2006.01)	C 1 2 P 7/06
C 1 2 P 7/04	(2006.01)	C 1 2 P 7/04
C 1 2 P 11/00	(2006.01)	C 1 2 P 11/00

請求項の数 15 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2010-542837 (P2010-542837)	(73) 特許権者	000001915 メルシャン株式会社 東京都中野区中野4丁目10番2号
(86) (22) 出願日	平成21年12月4日(2009.12.4)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/006639	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(87) 国際公開番号	W02010/070838	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開日	平成22年6月24日(2010.6.24)	(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰
審査請求日	平成24年11月22日(2012.11.22)	(74) 代理人	100126099 弁理士 反町 洋
(31) 優先権主張番号	特願2008-322873 (P2008-322873)		
(32) 優先日	平成20年12月18日(2008.12.18)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-135657 (P2009-135657)		
(32) 優先日	平成21年6月5日(2009.6.5)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-175418 (P2009-175418)		
(32) 優先日	平成21年7月28日(2009.7.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインを含有する原料水溶液に乳酸菌及び酵母を接種して、3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコールを生成させることを含み、

前記原料水溶液は、ブドウ果皮抽出液の含有液であり、かつ前記原料水溶液は、Brix20%換算した場合、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン濃度が300nM~8000nMの範囲であり、かつS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システイン濃度が70nM~11100nMの範囲であり、

前記乳酸菌が、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオンをS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインに変換することができる乳酸菌であり、かつ、

前記原料水溶液に乳酸菌を接種した後0~6日発酵させた後に、前記水溶液に酵母を接種してアルコール発酵を行う、

3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液の製造方法。

【請求項2】

前記原料水溶液は、Brix20%換算した場合、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインの合計濃度が500nM~15500nMの範囲である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

前記ブドウ果皮抽出液は、

(1) ブドウ果皮を、ブドウ果皮の湿重量に対して0.5~3倍量の水に浸漬し、0~20 で0

.5～96時間保持し、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインを抽出する工程、及び

(2) ブドウ果皮浸漬液を固液分離し、ブドウ果皮を除去してブドウ果皮抽出液を取得する工程、を含む方法で調製されたものである、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記ブドウ果皮は、ソーヴィニヨン・ブラン種またはシャルドネ種のブドウの果皮である請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、3-メルカプトヘキシルアセテートをさらに含有することができ、3-メルカプトヘキサン-1-オールと3-メルカプトヘキシルアセテートの合計濃度である総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度は25～550nMの範囲である、請求項 1～4 のいずれかに記載の製造方法。

10

【請求項 6】

前記3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、3-メルカプトヘキシルアセテートを含有する、請求項 1～5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 7】

酵母接種前の乳酸菌による発酵期間が、1～5日間である請求項 1～6 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 8】

前記原料水溶液のpHが3～9の範囲であり、発酵温度が10～40 の範囲である請求項 1～7 のいずれかに記載の製造方法。

20

【請求項 9】

乳酸菌がラクトバチルス属に属する乳酸菌である請求項 1～8 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 10】

ラクトバチルス属に属する乳酸菌がラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ペントウサス(Lactobacillus pentosus)に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ヒルガルディイ(Lactobacillus hilgardii)に属する乳酸菌またはラクトバチルス・マリ(Lactobacillus mali)に属する乳酸菌である請求項 9 に記載の製造方法。

30

【請求項 11】

前記原料水溶液はBrix(%)が10～28%の範囲である、請求項 1～10 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 12】

3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、アルコール濃度が0.5～14%の範囲である請求項 1～11 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれかに記載の方法で、総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度が150nM以上である3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液を製造し、得られた3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液を飲料と混合して、3-メルカプトヘキサン-1-オール含有率を高めた飲料を得る、香りを改善した飲料の製造方法。

40

【請求項 14】

混合に用いられる飲料がワインである、請求項 13 に記載の製造方法。

【請求項 15】

3-メルカプトヘキサン-1-オール含有率を高めた飲料の総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度が1～150nMの範囲である、請求項 13 または 14 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2008年12月18日出願の日本特願2008 - 322873号、2009年6月5日出願の日本特

50

願2009 - 135657号及び2009年7月28日出願の日本特願2009 - 175418号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、ブドウ果皮抽出液を原料として用いた、優れた芳香性を有する3-メルカプトヘキサン-1-オール(以下3MHと略記することがある)を豊富に含有し、かつアルコールを含有する溶液の製造方法、さらに前記3MH及びアルコール含有液を用いた着香剤及び香りを改善した飲料の製造方法に関する。さらに本発明は、ブドウ果皮抽出液を原料として用いた果実酒の製造方法に関する。

【背景技術】

【0003】

3MHは、ソーヴィニヨン・ブラン種等のブドウから醸造されたワインに含有されることが報告されており、その分子構造内に-SH基を有するチオール化合物である。3MHの閾値は非常に低く(閾値60ng/L(0.45nM))、ワイン中に微量に存在するだけでグレープフルーツやパッションフルーツ等、ワインを含めたその他発酵飲料の品質に正に貢献するニュアンスを与える重要な成分である。

【0004】

3MHは、ブドウ果粒中でS-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン(以下、3MH-S-GSHと略記することがある)(非特許文献1参照)、及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システイン(以下3MH-S-Cysと略記することがある)という前駆体の形で存在する(非特許文献2参照)。一般に3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換は、ブドウが成熟するのに伴ってブドウ自身の持つ酵素によって起こることが知られている。これら3MH前駆体がアルコール発酵中に酵母により代謝され、ワイン中に3MHとして遊離される。この反応は酵母のもつ -リアーゼ活性を有する酵素等の働きによるものと考えられており、酵母の種類によってその力価が異なる。したがって、発酵原料中の3MH前駆体から3MHへの変換効率は、主に酵母の種類に依存する。

【0005】

また、遊離された3MHの一部は、酵母由来のアルコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素により酢酸エステル体である3-メルカプトヘキシルアセテート(以下、3MHAと略記することがある)となる。3-メルカプトヘキシルアセテートはパッションフルーツ、ツゲやエニシダのニュアンスを与え、閾値4ng/L(0.02nM)と3MHと同様に香りへの貢献度が高い物質である。一般に、遊離された3MHの量が増加すれば、3MHAの量も増加する。

【0006】

モデル培地を用いた試験において、酵母によってアルコール発酵中に起こる3MH-S-GSHから3MHへの変換率は3MH-S-Cysから3MHへの変換率と比較して1/30~1/20以下であることが報告されている(非特許文献3参照)。従って、酵母を用いた発酵では3MH-S-GSHから3MHへの変換効率は低く、3MH含有量を高めるためには発酵原料中の3MH-S-Cys量を増やすことが特に重要であると推察される。

【0007】

但し、近年3MH-S-GSHが直接酵母に取り込まれ、3MHに変換されているという学説も発表されており(非特許文献4参照)、酵母による3MH-S-Cysから3MHへの変換と3MH-S-GSHから3MHへの変換のどちらが、3MH前駆体から3MHに至る主要な経路であるかについて定説が確立されていないのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開平2 - 312581号公報

【特許文献2】特開2005 - 192562号公報

【非特許文献】

【0009】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4076-4079.

【非特許文献2】J. Agric. Food Chem. 1998b, 46, 52151-5219.

【非特許文献3】Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments 2006, pp222

【非特許文献4】J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9230-9235.

【非特許文献5】Yeast. 2007, 24(7), 561-574.

【非特許文献6】J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 1437-1444.

【非特許文献7】J. Chromatogr A 2008, 1183, 150-157.

【非特許文献8】J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 7251-7255.

【非特許文献9】Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments 2006, pp216-219 10

【非特許文献10】J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1044-1048.

【0010】

上記特許文献1, 2及び非特許文献1~10の全記載は、ここに特に開示として援用される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

このように3MHは、世界中で注目され、盛んに研究がなされている重要な香気成分であり、ワイン等の発酵飲料中の3MH含有量を高めるために様々な試みが為されている。 20

【0012】

例えば、酵母の種類に依存せず3MH-S-Cysから3MHへの変換効率を高める方法がオーストラリアのグループから報告されている(非特許文献5参照)。この方法は、大腸菌からシステイン-リアーゼ活性を有するトリプトファナーゼ遺伝子tnaAをクローン化し、これを導入することで遺伝子組換え酵母を作出し、この酵母を用いて発酵することでワイン中の3MH変換効率を驚異的に高めた、と報告されている。しかしながら、このような方法により得られた発酵飲料は、3MHを高濃度に含有しているものの、必ずしも好ましい発酵飲料とはいえない。何故なら、遺伝子組換え酵母の利用は食の安全性を確保する意味では依然危ぶまれ、消費者に不安を与える原因となる可能性があるからである。

【0013】 30

また、酵母以外の微生物を利用する3MHを高含有するワインの製造方法として、貴腐菌(*Botrytis cinerea*)を利用する方法がある。ブドウが貴腐菌に感染すると3MH-S-Cysの量が増加する(非特許文献6および7参照)。このことはワインにも反映され、貴腐菌に感染したブドウから醸造されるワインは、通常のワインに比べ3MH含有量も多いことが報告されている(非特許文献8参照)。しかしながら、ブドウを貴腐菌に感染させるには、湿度の高い朝と乾燥した日照のある午後という自然条件が必要であること、さらに果皮が薄めのブドウ品種であること等の条件が必要である。しかし、そのような自然条件を人為的にコントロールすることは困難であり、かつブドウ品種が制限されるという問題点があった。

【0014】 40

この他、ワイン醸造に用いられる酵母以外の微生物として、乳酸菌の使用が挙げられる。乳酸菌の使用目的は酸味の高い赤ワインや白ワインに多く含まれる強い酸味を呈するリンゴ酸を柔らかい酸味を呈する乳酸に変換し、酸味を低減させるためであった。こうした手法はマロラクティック発酵と呼ばれ、一般に、アルコール発酵終了後のワインにアルコール耐性の強い*Oenococcus oeni*等の乳酸菌を接種し、発酵が行われる。マロラクティック発酵では、乳酸菌により発酵原料中に含まれる有機酸のなかでリンゴ酸が優先的に乳酸に変換される。一方、通常の赤ワインや白ワインの原料となるブドウ果汁は、3MH前駆体の含有量が少ない。その上、上記のようにアルコール発酵後に乳酸菌を接種した場合、3MH前駆体のほとんどは発酵初期に酵母によって消費されてしまうので、アルコール発酵生成物中の3MH前駆体の含有量はさらに減少している。また、本発明者らの検討の結果によ 50

れば、全ての乳酸菌が3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換する能力を持っている訳ではない。そのため、乳酸菌が3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換する能力を持ったものであったとしても、乳酸菌による3MH-S-Cysの増大効果は実質的には得られず、3MH前駆体から3MHへの変換の改善効果も事実上は得られなかったものと本発明者らは考える。

【0015】

乳酸菌を含む酸生成菌を使用する発酵飲料の製造方法が知られている（特許文献1）。この方法は、(1)糖液、果汁、麦芽汁および穀類を原料とした糖化液を主としてなる発酵原料液を第一発酵帯域で酵母による発酵に付し、生成した発酵液を次いで第二発酵帯域で酸生成菌による発酵に付する方法、及び(2)第一発酵帯域を酸生成菌による発酵、第二発酵帯域を酵母による発酵とするものである。しかしながら、上記製造方法は、発酵飲料に酸味を付与することを課題としており、酸味の効いたビールや発泡酒を得ることを目的としている。従って、発酵原料に含まれる3MH前駆体濃度は、微小であり、さらに前述のマロラクティック発酵と同様に酵母を用いた発酵が乳酸菌による発酵に先行しており、3MH前駆体は、酵母を用いた発酵においてほとんど消費されてしまう可能性が高い。また、前述のように、全ての乳酸菌が3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換する能力を持っている訳ではない。乳酸菌が3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換する能力を持ったものであったとしても、乳酸菌を用いた発酵において、存在するとしても極微量である3MH前駆体よりも、乳酸菌の栄養分となるリンゴ酸等のその他の成分が豊富に含まれることから、3MH前駆体が3MHに変換されることは、事実上なかったものと考えられる。特許文献1には、特許文献1に記載の方法で得られた発酵飲料が、芳香が改善されたものであることは記載されておらず、従って、乳酸菌発酵による3MHの濃度増加はなかったものと本発明者らは考える。

【0016】

同じく乳酸菌を使用する発酵飲料の製造方法が知られている（特許文献2）。この方法は、果汁を約50及至約100%含む発酵原料を乳酸発酵させる第一発酵帯域と、生成した乳酸発酵液と、さらに糖化液とを含む発酵原料を酵母発酵させる第二発酵帯域を含む、乳酸発酵果汁含有の麦芽発酵飲料の製造方法である。特許文献2に記載の方法では乳酸発酵を第一に行い、次いで酵母発酵を行っている。また原料果汁としては、ブドウ果汁を例示している。しかし、一般にブドウ果汁の3MH前駆体含有量は極めて低い。従って、特許文献2には、ブドウ果汁を原料果汁として用いた発酵飲料の具体例が記載されているが、芳香が改善されたものであるとの記載はない。

【0017】

なお、ワイン中に含まれる3MH含有量の例として、例えば、アルザス地方の各ブドウから醸造されたワインにおいて
 ゲヴェルトトラミナー種では3MHが40～3300ng/L（0.30～24.58nM）、3MHAが0～6ng/L（0～0.03nM）、
 リースリング種では3MHが123～1234ng/L（0.92～9.19nM）、3MHAが0～15ng/L（0～0.09nM）、
 ミュスカ・ド・アルザス種では3MHが100～1800ng/L（0.74～13.40nM）、3MHAが0～1ng/L（0～0.01nM）、
 ピノ・グリ種では3MHが312～1042ng/L（2.32～7.76nM）、3MHAが0～51ng/L（0～0.29nM）、
 ピノ・ブラン種では3MHが88～248ng/L（0.66～1.85nM）、3MHAが0（0nM）、
 シルヴァナー種では3MHが59～554ng/L（0.44～4.13nM）、3MHAが0（0nM）、
 ソーテルヌ地区の各ブドウから醸造されたワインにおいて
 コロンバル種では3MHが400～1000ng/L（2.98～7.45nM）、3MHAが20～60ng/L（0.11～0.34nM）、
 貴腐菌（*Botrytis cinerea*）に感染したセミヨン種、いわゆる貴腐ワインでは、3MHが1000～6000ng/L（7.45～34.04nM）、3MHAが0（0nM）、
 南西地方のピレネー地区のプティ・マンサン種では、3MHが800～4500ng/L（5.96～33.52nM）、3MHAが0～100ng/L（0～0.57nM）含有していたという報告がある（非特許文献9参照

)。

【 0 0 1 8 】

そのほか、フランスのポルドー地方のソーヴィニヨン・ブランから醸造された1996年ヴィンテージのワインにおいて3MHが3736～12822ng/L (27.83～95.49nM)、3MHAが275～451ng/L (1.56～2.56nM)、サンセール地方のソーヴィニヨン・ブランから醸造された1996年ヴィンテージのワインにおいて3MHが1291～3415ng/L (9.62～25.44nM)、3MHAが212～777ng/L (1.20～4.41nM) 含有していたという報告がある(非特許文献10参照)。

【 0 0 1 9 】

上記のように、比較的高い濃度で3MHを含有するワインが得られたという報告はあるが、そのようなワインを得るのは非常に難しく、3MHの含有量が高く良好な芳香を有するワインを容易に製造することはできなかつた。そこで、3MHの含有量が高く良好な芳香を有するワインを容易に製造する方法の提供が望まれていた。さらに、3MH含有量が高く、ワインを含む種々の飲料や食品に3MHの香りを付加できる着香剤があれば、ワイン等の魅力をより高め、消費者の好みにあった飲料等を容易に提供できる可能性がある。しかし、これまで、そのような3MH含有量が高く、安全性にも優れた着香剤及び着香剤として使用できる材料は知られていなかった。

10

【 0 0 2 0 】

そこで本発明の第一の目的は、優れた芳香性を有する3MHを豊富に含有する、そのままワインとして用いることができ、あるいは着香剤としても用いることができるアルコール含有溶液とその製造方法を提供することである。さらに、本発明の第二の目的は、飲食品に優れた芳香性を付与することができる、3MHを豊富に含有するアルコール含有溶液を用いた着香剤及び香りを改善した飲料の製造方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、3-メルカプトヘキサン-1-オール香に優れた酒類の製造方法を提供することにある。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 1 】

本発明者らは、前記課題を解決するべく鋭意検討を重ねた。その結果、以下の知見を得、これらの知見に基づいて本発明を完成させた。

- (1) 特定の乳酸菌が3MH-S-GSHを3MH-S-Cysへ変換する能力を有していること、
- (2) 一定の発酵条件下で3MH前駆体を含有する原料を乳酸菌と酵母を用いて発酵させること、及び
- (3) 3MH前駆体を含有する原料として、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysからなる3MH前駆体を高濃度で含有するブドウ果皮抽出液を用いることで、
- (4) 3MH-S-GSHが3MH-S-Cysに効率よく変換されること、
- (5) さらにその結果、3MH-S-Cys含有量が増加するだけでなく、酵母の種類に依存せず3MH-S-Cysからの3MHへの変換効率が飛躍的に向上し、3MHを高濃度で含有するアルコール含有溶液(発酵液)を得ることができる。

30

【 0 0 2 2 】

さらに、こうして得られた3MHを高濃度で含有するアルコール含有溶液(発酵液)は、そのままワインとして用いることができること、あるいはその他の飲食品に添加あるいはブレンドすることで、その他飲料や食品の香味を調整することで3MH香に優れ、嗜好性の高い飲食品を提供できること、及び着香剤として使用できることを見出し、本発明を完成した。

40

【 0 0 2 3 】

すなわち、本発明は、以下の[1]～[23]に関する。

[1]

S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインを含有する原料水溶液に乳酸菌及び酵母を接種して、3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコールを生成させることを含み、前記原料水溶液は、ブドウ果皮抽出液の含有液であり、

50

前記乳酸菌が、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオンをS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインに変換することができる乳酸菌であり、かつ、

前記原料水溶液に乳酸菌を接種した後0~6日発酵させた後に、前記水溶液に酵母を接種してアルコール発酵を行う、

3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液の製造方法。

[2]

前記原料水溶液は、Brix20%換算した場合、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン濃度が300nM~8000nMの範囲であり、かつS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システイン濃度が70nM~11100nMの範囲である、[1]に記載の製造方法。

[3]

前記原料水溶液は、Brix20%換算した場合、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインの合計濃度が500nM~15500nMの範囲である、[1]または[2]に記載の製造方法。

[4]

前記ブドウ果皮抽出液は、

(1)ブドウ果皮を、ブドウ果皮の湿重量に対して0.5~3倍量の水に浸漬し、0~20 で0.5~96時間保持し、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインを抽出する工程、及び

(2)ブドウ果皮浸漬液を固液分離し、ブドウ果皮を除去してブドウ果皮抽出液を取得する工程、を含む方法で調製されたものである、[1]~[3]のいずれかに記載の製造方法。

[5]

前記ブドウ果皮は、ソーヴィニヨン・ブラン種またはシャルドネ種のブドウの果皮である[4]に記載の製造方法。

[6]

前記3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、3-メルカプトヘキシルアセテートをさらに含有することができ、3-メルカプトヘキサン-1-オールと3-メルカプトヘキシルアセテートの合計濃度である総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度は25~5500nMの範囲である、[1]~[5]のいずれかに記載の製造方法。

[7]

前記3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、3-メルカプトヘキシルアセテートを含有する、[1]~[6]のいずれかに記載の製造方法。

[8]

酵母接種前の乳酸菌による発酵期間が、1~5日間である[1]~[7]のいずれかに記載の製造方法。

[9]

前記原料水溶液のpHが3~9の範囲であり、発酵温度が10 ~40 の範囲である[1]~[8]のいずれかに記載の製造方法。

[10]

乳酸菌がラクトバチルス属に属する乳酸菌である[1]~[9]のいずれかに記載の製造方法。

[11]

ラクトバチルス属に属する乳酸菌がラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ペントウサス(Lactobacillus pentosus)に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ヒルガルディイ(Lactobacillus hilgardii)に属する乳酸菌またはラクトバチルス・マリ(Lactobacillus mali)に属する乳酸菌である[10]に記載の製造方法。

[12]

前記原料水溶液はBrix(%)が10~28%の範囲である、[1]~[11]のいずれかに記載の製造方法。

[13]

3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液は、アルコール濃度が0.5~14%の

10

20

30

40

50

範囲である[1]～[12]のいずれかに記載の製造方法。

[14]

[1]～[13]のいずれかに記載の方法で、総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度が150nM以上である3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液を製造し、得られた3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコール含有液を飲料と混合して、3-メルカプトヘキサン-1-オール含有率を高めた飲料を得る、香りを改善した飲料の製造方法。

[15]

混合に用いられる飲料がワインである、[14]に記載の製造方法。

[16]

3-メルカプトヘキサン-1-オール含有率を高めた飲料の総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度が1～150nMの範囲である、[14]または[15]に記載の製造方法。 10

[17]

3-メルカプトヘキサン-1-オール及びアルコールを含有する水溶液であって、前記水溶液は3-メルカプトヘキシルアセテートをさらに含有することができ、3-メルカプトヘキサン-1-オールと3-メルカプトヘキシルアセテートの合計濃度である総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度が150～5500nMの範囲である、着香剤。

[18]

3-メルカプトヘキシルアセテートを含有する、[17]に記載の着香剤。

[19]

前記水溶液がブドウ果皮抽出液の乳酸菌及び酵母発酵品である、[17]または[18]に記載の着香剤。 20

[20]

アルコール濃度が0.5～14%の範囲である[17]～[19]のいずれかに記載の着香剤。

[21]

飲食品の着香剤として用いられる[17]～[20]のいずれかに記載の着香剤。

[22]

飲食品がワインである、[21]に記載の着香剤。

[23]

飲食品が菓子、ケーキ、またはデザート類である、[21]に記載の着香剤。

[24]

ブドウ果皮抽出液またはブドウ果皮抽出液を含む果汁を酵母により発酵させることを含む、果実酒の製造方法。 30

[25]

前記ブドウ果皮抽出液は、

(1) ブドウ果皮を、ブドウ果皮の湿重量に対して0.5～3倍量の水に浸漬し、0～20℃で0.5～96時間保持し、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システインを抽出する工程、及び

(2) ブドウ果皮浸漬液を固液分離し、ブドウ果皮を除去してブドウ果皮抽出液を取得する工程、を含む方法で調製されたものである、[24]に記載の製造方法。 40

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、グレープフルーツやパッションフルーツのニュアンスを与える3MHの含有量が高く良好な芳香を有するワインを容易に提供することができる。さらに本発明によれば、3MH香を飲食品に付与できる着香剤として使用できる3MHを高濃度で含有するアルコール含有溶液(発酵液)を提供することもできる。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明について詳細に説明する。

[3MH及びアルコール含有液の製造方法]

本発明は、S-(3-ヘキサン-1-オール)グルタチオン(3MH-S-GSH)及びS-(3-ヘキサン-1-オール)-L-システイン(3MH-S-Cys)を含有する原料水溶液に乳酸菌及び酵母を接種して、3-メルカプトヘキサン-1-オール(3MH)及びアルコールを生成させることを含む方法である。本発明は以下の特徴を有する。

- (1)前記原料水溶液は、ブドウ果皮抽出液の含有液である。
- (2)前記乳酸菌が、3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換することができる乳酸菌である。
- (3)前記原料水溶液に乳酸菌を接種した後0~6日発酵させた後に、前記水溶液に酵母を接種してアルコール発酵を行う。
- (4)乳酸菌を用いた発酵及び酵母を用いたアルコール発酵によって、3MH及びアルコールを含有する溶液を得ることができる。

10

【0026】

<原料水溶液>

本発明の製造方法では、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysを含有する原料水溶液を用いる。以下、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysを3MH前駆体と呼ぶ。

【0027】

本発明における3MH前駆体を含有する原料水溶液としては、ブドウ果皮抽出液の含有液を用いる。ブドウ果皮抽出液は、3MH前駆体を高濃度で含有するものを調製できることから、本発明において高濃度の3MHを含有するアルコール含有発酵液を得るための原料として最適である。

【0028】

ブドウ果皮抽出液は、例えば、以下の工程(1)及び(2)を含む方法で調製することができる。

(1)ブドウ果皮を、ブドウ果皮の湿重量に対して、例えば、0.5~3倍量の水に浸漬し、0~20 で0.5~96時間保持し、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysを抽出する工程、

(2)ブドウ果皮浸漬液を固液分離に付し、ブドウ果皮を除去してブドウ果皮抽出液を取得する工程

【0029】

工程(1)

工程(1)では、ブドウ果皮を水に浸漬して、ブドウ果皮に含有される3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysを抽出する。抽出条件は、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの抽出効率を考慮して、適宜決定できる。例えば、ブドウ果皮を浸漬する水の量はブドウ果皮の湿重量に対して0.5~3倍量が適当である。3倍を超えると、3MH前駆体や糖分の濃度が薄くなり、そのままでは発酵原料として使用しにくくなるうえ、総ポリフェノール濃度が相対的に高まってしまう。0.5倍より少ないと、抽出や固液分離の操作性が悪くなる傾向がある。

20

30

【0030】

また抽出効率向上、固液分離の操作性向上を目的として、浸漬用の水にペクチナーゼ等の酵素活性を有する酵素剤を添加することもできる。酵素剤としては、市販品を用いることができ、例えば、スクラーゼ(三共(株)社製)、ペクチナーゼG、ペクチナーゼPL、ニューラーゼF、ペクチナーゼPL、ペクチナーゼG(以上天野エンザイム(株)社製)、LAFASE FRUIT、LAFAZYM PRESS(以上、LAFFORT社製)、SCOTTZYME BG、SCOTTZYME CINFREE、SCOTTZYME HC、SCOTTZYME KS、SCOTTZYME PEC5L(以上、SCOTT LABORATORIES社製)、LALLZYME EXV、LALLZYME EXV、LALLZYME BETA(以上、LALLEMAND社製)等を例示することができる。但し、これらに限定されるものではない。酵素の使用量は、酵素活性にもよるが、上記の浸漬条件では、例えば、10ppm~500ppmの範囲とすることができる。同様な目的で、ブドウ果皮を冷凍した後に水に浸漬することで3MH前駆体の抽出効率が増し、浸漬時間を短縮することができる。

40

【0031】

またブドウ果皮を浸漬し、3MH前駆体を抽出する温度は、0~20 が適当である。0 以上であれば3MH前駆体を効率的に抽出できるが、0 を下回ると浸漬中に凍結し、抽出や固液分離の操作性が悪くなる傾向がある。また、温度が20 を超えると呈味性や発酵特性の

50

点でマイナス要因となる総ポリフェノール量が相対的に多くなる傾向がある。また抽出時のpHは、特に調整する必要はない。pH2~11の範囲ではpHによる抽出効率の変動がほとんどないためである。総ポリフェノール量が多くなると、渋味や苦味等、呈味性の著しい悪化、発酵性の悪化がみられる。そのため、果皮抽出液中の総ポリフェノール濃度がBrix20%換算で6000ppm以下となるように抽出条件を決定することが好ましく、2000ppm以下に抑えられる条件とすることがより好ましく、600ppm以下に抑えられる条件とすることが最も好ましい。浸漬水の量、温度、攪拌速度等の条件にもよるが、抽出時間は0.5~96時間の範囲とすることができる。抽出された3MH前駆体の濃度を適宜測定し、その結果から抽出作業終了時間を決定できる。抽出作業終了時間は、例えば、測定された濃度がほぼ一定になった時点とすることができる。なお、本発明におけるBrix(%)とは屈折糖度計を用いて計測した可溶性固形分を表す数値であり、水溶液中の可溶性固形分を重量パーセント濃度で示したものである。また、Brix20%換算時の3-メルカプトヘキサン-1-オール前駆体濃度とは、水溶液中の3-メルカプトヘキサン-1-オール前駆体濃度を、同水溶液のBrix(%)を基準として、Brix20%に換算したときの3-メルカプトヘキサン-1-オール前駆体濃度を示す。

10

【0032】

工程(2)

工程(1)で抽出作業を終えたブドウ果皮浸漬物は固液分離に付される。固液分離は、例えば、圧搾機(メンブランプレス、バスケットプレス)、遠心分離、フィルタープレス等の固液分離装置を用いて行われ、残渣を分離して、清澄なブドウ果皮抽出液を取得することができる。得られたブドウ果皮抽出液は、そのまま本発明の製造方法の原料として用いることもできるが、所望により濃縮することもできる。

20

【0033】

ブドウ果皮抽出液を濃縮する場合には、蒸発濃縮(例えば、減圧蒸発濃縮等)、膜濃縮、冷凍濃縮等の公知の濃縮方法を適用することができる。蒸発濃縮であれば、循環式(液膜流下型)濃縮装置、ワンパス式(噴流薄膜型)濃縮装置、フラッシュエバポレーター等の通常の減圧蒸発濃縮装置等を用いることができる。減圧蒸発濃縮は、品温30~110、真空度0.04~0.4bar等の条件で実施できるが、ブドウ果皮抽出液に含まれる3MH前駆体の分解を防ぐために比較的低い温度、例えば品温40~100の条件が好ましい。膜処理であれば逆浸透膜を利用し、操作圧力60~150bar等の条件で、Brix10~68%程度まで濃縮することができる。

30

【0034】

本発明の製造方法に用いられるブドウ果皮抽出液は、固液分離により得られたブドウ果皮抽出液(非濃縮品)及びその後濃縮されたブドウ果皮抽出液(濃縮品)のいずれをも包含する。さらに、ブドウ果皮抽出液(濃縮品及び非濃縮品)は、必要に応じて清澄化、殺菌をしてもよく、それらの処理方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を適用すればよい。本発明におけるブドウ果皮抽出液は、これら清澄化、殺菌されたものも包含する。

【0035】

上記ブドウ果皮抽出液の調製で用いるブドウ果皮は、厳密な意味でのブドウ果実の果皮だけに限定されるものでなく、ブドウ果汁やワインの製造工程中で多量に排出されるブドウ果実の搾汁粕のようにブドウ種子、梗等を含んでいてもよい。通常のブドウ果汁やワインの製造工程中で得られるブドウ果皮の水分含量は、常圧加熱乾燥法で計測した場合、50%(w/w)~80%(w/w)である。酸化防止、微生物の繁殖防止のため、ブドウ果皮は搾汁後、比較的速やかに使用することが望ましい。但し、搾汁後、ブドウ果皮を所定の時間放置することでブドウ果皮中の3MH前駆体が増加する。そのため、所定時間放置後に水浸漬による抽出を行うことで3MH前駆体濃度が高くかつ総ポリフェノール濃度が低い抽出液が得られる。搾汁後、0.5~24時間放置後に水に浸漬することが好ましい。放置時間が24時間を超えると雑菌による汚染などが発生する可能性があるため望ましくない。搾汁後、水浸漬までの放置時間は、得られる抽出液の3MH前駆体濃度及び総ポリフェノール濃度を考慮すると1~4時間程度がより好ましい。尚、放置によるブドウ果皮中の3MH前駆体の増加は、ブ

40

50

ドウ果皮中の酵素による反応であり、冷凍処理や加熱処理などの酵素の失活を伴う操作、水浸漬による酵素及び基質の拡散を伴う操作で反応が停止すると推察され、また放置によるブドウ果皮抽出液中の総ポリフェノール濃度の低下は、ポリフェノール類が酸化重合することによって不溶化し、沈殿が生じるためと推察される。また、作業の都合上一定期間ブドウ果皮を保存する場合は、例えば冷凍での保存、保存料を使用することによって酸化防止、微生物の繁殖を抑制することが適当である。冷凍保存する場合には、上述の理由のため、冷凍保存する前に搾汁後のブドウ果皮を上述した範囲で所定の時間放置することが好ましい。

【 0 0 3 6 】

ブドウ果皮として用いることのできるブドウの品種は、特に制限はなく、甲州、巨峰、デラウエア、シャルドネ、ソーヴィニヨン・ブラン、ソーヴィニヨン・ヴェール、ソーヴィニヨン・グリ、リースリング、トンプソン・シードレス、セミヨン、ヴィオニエ、コロンパール、マスカット・オブ・アレキサンドリア、モスカテル・デ・アウストリア、モスカテル・ロサーダ、ピノ・ノワール、ピノ・グリ、ピノ・ブラン、カベルネ・ソーヴィニヨン、メルロー、シラー、マルベック、ペドロ・ヒメネス、トロンテス・リオハーノ、トロンテス・メンドシーノ、トロンテス・サンファニーノ、トロンテル、シュナン・ブラン、ユニ・ブラン、セレサ、クリオージャ、レッドグローブ等の多くの品種を使用することができる。但し、3MH前駆体を多く含む点においてソーヴィニヨン・ブラン種、シャルドネ種のブドウ果皮を用いることが好ましい。

【 0 0 3 7 】

上記方法で得られるブドウ果皮抽出液は、原料とするブドウ果皮の種類や抽出条件、さらには濃縮の有無や程度により、3MH前駆体の濃度は変化するが、Brix20%換算した場合、3MH-S-GSH濃度が300nM～8000nMの範囲であり、3MH-S-Cys濃度が70nM～11100nMの範囲であるものである。さらに、上記方法で得られるブドウ果皮抽出液は、Brix20%換算した場合、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が500nM～15500nMの範囲である。但し、3MH-S-GSH濃度、3MH-S-Cys濃度、両者の合計濃度は上記範囲より低いものも抽出や濃縮条件を変更することで、適宜調製することができる。

【 0 0 3 8 】

また、ブドウ果皮抽出液中の総ポリフェノール濃度は6000ppm以下、より好ましくは2000ppm以下、さらに好ましくは600ppm以下に抑えることが望ましい。前述のように、総ポリフェノール濃度が多くなると、渋みや苦味等、呈味性の著しい悪化、乳酸菌および酵母の発酵性の低下をもたらすことがあるためである。

【 0 0 3 9 】

なお、本明細書における総ポリフェノール濃度とは、SingletonとRossiらの方法 (Am. J. Agric. Enol. Vitic. 16: 144 (1965).) に従い、ガリック酸換算で算出した数値である。この方法は、ガリック酸に含まれる水酸基換算で定量を行うため、フラボノイド系のみならず、非フラボノイド系 (ヒドロキシシナム酸類等) も含めた全てのフェノール化合物が定量される。アルコール濃度(%v/v) は、国税庁所定分析法 (改正平成19年国税庁訓令第6号) p5 - 7、アルコール分の項に記載のガスクロマトグラフ分析法に基づいて測定した。滴定酸度 (mL) は、国税庁所定分析法 (改正平成19年国税庁訓令第6号) p28 - 29、総酸 (遊離酸) の項に記載の分析法に基づいて測定した。

【 0 0 4 0 】

なお、上記方法により得られるブドウ果皮抽出液は、3MH前駆体に加えて、酵母や乳酸菌の発酵あるいは増殖に必要なアミノ酸、糖、ミネラル等を含有する。

【 0 0 4 1 】

本発明においては、原料水溶液として、ブドウ果皮抽出液を含有する溶液を用いる。ブドウ果皮抽出液を含有する溶液は、例えば、ブドウ果皮抽出液を、単独で、あるいは適宜水等で希釈して用いることができ、あるいは、例えば公知の糖液、果汁、麦芽汁、穀類を原料とした糖化液と混合して、3MH前駆体濃度等を調整して使用してもよい。さらに、上記溶液に添加物を加えたものであることもできる。

【 0 0 4 2 】

発酵を助成促進する目的で、原料水溶液に酸類（例えば乳酸、リンゴ酸、酒石酸等）、塩類（例えば、食塩、リン酸水素カルシウム、リン酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸カルシウム、メタ重亜硫酸カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硝酸カリウム、硫酸アンモニウム等）、除酸剤（例えば、炭酸カルシウム、アンモニア等）、酵母発酵助成剤（不活性酵母、酵母エキス、酵母細胞壁、リン酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、チアミン塩酸塩、葉酸、パントテン酸カルシウム、ナイアシン、ビオチンの全部又は一部で構成されるもの）等の添加物を加えてもよい。

【 0 0 4 3 】

原料水溶液の3MH前駆体濃度は、目的とする3MH及びアルコール含有液の3MH濃度や発酵条件等を考慮して適宜決定できる。例えば、Brix20%換算した場合、3MH-S-GSH濃度は300nM以上の範囲であり、かつ3MH-S-Cys濃度が70nM以上の範囲であること、さらには3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が500nM以上の範囲であることが、3MH及びアルコール含有液の3MH濃度がより高濃度になるという観点からは適当である。

【 0 0 4 4 】

なお、前述のように3MHは、酵母由来のアルコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素により酢酸エステル体である3MHAに変換され得る。本発明の製造方法においても、酵母により製造される3MHは、発酵中にその一部が3MHAに変換される場合がある。一般に、3MH量が多いほど3MHAの量も増加する。また、酵母の種類によっても3MHAへの変換率は変化する。しかし、前述のように、3MHAは3MHと同様に香りへの貢献度が高い物質であり、本発明の製造方法においては、目的生成物である3MH及びアルコール含有液は、3MHAをさらに含有することができる。そして、本発明においては、3MH及びアルコール含有液は、3MHAをさらに含有するものも包含する。さらに、本願特許請求の範囲及び明細書においては、目的生成物である3MH及びアルコール含有液の3MH濃度と3MHA濃度の合計を総3-メルカプトヘキサン-1-オール濃度（以下、総3MH濃度と略記することがある）という。3MH濃度及び3MHA濃度は、T.Tominagaらの方法（J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1044-1048.本文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。）に従った分析法により測定できる。

【 0 0 4 5 】

具体的には、原料水溶液は、Brix20%換算した場合、3MH-S-GSH濃度が300nM～8000nMの範囲であり、かつ3MH-S-Cys濃度が70nM～11100nMの範囲であるものを用いることが好ましい。加えて、原料水溶液の3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が500nM～15500nMの範囲であるものを用いることが好ましい。3MH-S-GSH濃度、3MH-S-Cys濃度及び両者の合計濃度の各範囲の下限は、より高濃度の3MHを含有するアルコール含有液を得るという観点から設定される。また、3MH-S-GSH濃度、3MH-S-Cys濃度及び両者の合計濃度の各範囲の上限は、原料水溶液に含まれるブドウ果皮抽出液を調製する上で、実用上可能であるという観点から設定される。3MH-S-GSH濃度及び3MH-S-Cys濃度は、ブドウ果皮抽出液を単独で用いる場合には、ブドウ果皮抽出液の調製条件（例えば、抽出条件及び濃縮条件）を調整することで適宜変更できる。また、ブドウ果皮抽出液と他の溶液を混合する場合には、ブドウ果皮抽出液の3MH-S-GSH濃度及び3MH-S-Cys濃度並びに他の溶液との混合比により適宜決定できる。

【 0 0 4 6 】

原料水溶液は、3MH-S-GSH濃度が300nM～8000nMの範囲であることで、乳酸菌発酵により、3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに転換して、最終生成物であるアルコール含有発酵液中の3MH濃度をより高めることができる。さらに、3MH-S-Cys濃度が70nM～11100nMの範囲であることで、最終生成物であるアルコール含有発酵液として、高濃度の3MHを含有するアルコール含有発酵液を得ることができる。加えて、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が、500nM～15500nMの範囲であることで、高濃度の3MHを含有するアルコール含有発酵液を得ることができる。3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度の範囲の下限は、好ましくは1000nM、より好ましくは1500nM、さらに好ましくは2000nMである。3MH-S-GSH濃度と3MH-S-Cys濃度の比率に関わらず、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が高ければ高いほど、3MH濃度がより

10

20

30

40

50

高いアルコール含有発酵液を得ることができるからである。

【0047】

一方、原料水溶液の3MH前駆体濃度の上限は、実用的には、ブドウ果皮抽出液の3MH前駆体濃度に依存し、また、目的とする3MH及びアルコール含有液の3MH濃度に応じて適宜設定できる。より実用的な観点からは、原料水溶液の3MH-S-GSH濃度の上限は3000nM程度であり、3MH-S-Cys濃度の上限は5000nM程度であり、3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度の上限は8000nM程度である。但し、この範囲に限定される意図ではなく、ブドウ果皮抽出液の調製条件（例えば、抽出条件及び濃縮条件）を調整することで、より高濃度の3MH-S-GSH及び/又は3MH-S-Cysを含有するブドウ果皮抽出液を得ることは技術的には可能である。

【0048】

前記の範囲で3MH前駆体を含有する原料水溶液を用いることで、高濃度の3MHを含有する溶液（発酵液）を得ることができる。例えば、発酵条件により、総3MH濃度が25～5500nMの範囲である発酵液（3MH及びアルコール含有液）を得ることができる。このように高濃度で3MHを含有する溶液は、他の飲食品に少量または微量添加することで、飲食品の芳香を高めることができる。

【0049】

これとは別に、原料水溶液の3MH前駆体濃度は、例えば、Brix20%換算した場合、3MH-S-GSH濃度を300nM未満の範囲とし、かつ3MH-S-Cys濃度が70nM未満の範囲であること、さらには3MH-S-GSH及び3MH-S-Cysの合計濃度が500nM未満の範囲であることもできる。その場合には、発酵条件にもよるが、3MH及びアルコール含有液の総3MH濃度が比較的低濃度（例えば、1nM以上、25nM未満）になる。上記のように総3MH濃度が高濃度であるアルコール含有液は、後述するように他の飲料等とブレンドして用いることができるのに対して、総3MH濃度が比較的低濃度のアルコール含有液は、そのまま飲料として用いることができる。

【0050】

さらに、原料水溶液の可溶性固形分は、例えば、Brix（%）が10～28%の範囲であることができる。原料水溶液のBrix（%）の範囲は、目的とするアルコール濃度に応じて適宜決定される。また、原料水溶液のBrix（%）は、使用するブドウ果皮抽出液が有するBrix（%）及び混合または添加する果汁や添加物の種類により適宜調整できる。なお、アルコール濃度とBrix（%）との関係については後述する。

【0051】

<発酵条件>

発酵原料である原料水溶液の初発pHは、例えば、pH3～9の範囲が適当であり、好ましくはpH4～9、さらに好ましくはpH5～9の範囲が望ましい。pHが3を下回ると乳酸菌及び酵母の生育が極端に遅くなり、pHが9を超えるとでき上がった発酵飲料の色が濃くなりやすいうえ、異臭を伴う等、正常な品質が得られないことがあるためである。pH調整にはpH調整剤を用いることができ、pH調整剤は特に限定されず、公知のpH調整剤を使用することができる。例えば、pHを下げる目的では酒石酸やリンゴ酸等の有機酸類等を用いることができ、pHを上げる目的ではアンモニアや炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0052】

発酵温度は、乳酸菌および酵母の発酵あるいは増殖に適した温度であればよく、例えば、10～40の範囲が適当であり、好ましくは15～35の範囲、さらに好ましくは20～30の範囲が望ましい。発酵温度が10を下回ると乳酸菌の生育が極端に遅くなり、3MH-S-Cysに変換されずに残存する3MH-S-GSHが多くなり、その結果、酵母によって先行して消費される頻度が高まるからである。一方、発酵温度が40を超えると酵母の生育が悪くなるとともにでき上がった発酵飲料に加熱臭が生じ、品質が悪くなることがあるためである。発酵温度は、乳酸菌による発酵と酵母による発酵を同じ温度としても、あるいは異なる温度としてもよい。製造操作の容易さは、両者を同じ温度とする方が勝っている。しかし、乳酸菌による発酵は、乳酸菌の発酵と増殖により適した温度とし、酵母による発酵は酵母の発酵と増殖により適した温度とすることで、製造条件をより最適化することもできる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

酵母を接種する時期は、発酵原料の初発pH、発酵温度等の条件にもよるが、乳酸菌を接種後0～6日の範囲が適当であり、好ましくは1～5日の範囲、より好ましくは2～4日の範囲である。乳酸菌接種前に酵母を接種した場合、発酵原料中に含まれる3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに乳酸菌が変換するより先に酵母が3MH-S-GSHを消費してしまい、その結果、高濃度の3MHを得られなくなるという問題がある。また、乳酸菌接種後6日を超えると、その他の雑菌による発酵液の汚染のリスクが高まる傾向がある。

【 0 0 5 4 】

発酵期間は、乳酸菌や酵母の種類、pH、発酵温度、もしくは目標とするアルコール濃度等により適宜設定されるため、特に限定されないものの、例えば2日～20日間が好ましい。これより短期間で発酵が行われると十分に3MHが遊離されず、これより長時間で発酵が行われると発酵液中の3MHが酸化し、香りが失われる危険性が高まるためである。発酵期間は、より好ましくは4日～15日間である。さらに、発酵期間は、酵母を接種する時期と、酵母を接種後に必要な発酵期間も考慮して適宜決定できる。

【 0 0 5 5 】

本発明に用いる乳酸菌は、3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換することができる乳酸菌である。3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換することができる乳酸菌としては、例えば、*Lactobacillus*属乳酸菌（例えば、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*delbrueckii*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*、*Lactobacillus mali*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus kefirii*、*Lactobacillus fructosus*、*Lactobacillus acidipiscis*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus paracasei* subsp.*tolerans*、*Lactobacillus sakei* subsp.*sakei*等）、*Leuconostoc*属乳酸菌（例えば、*Leuconostoc mesenteroides*等）、*Pediococcus*属乳酸菌（例えば、*Pediococcus pentosaceus*等）が挙げられる。なかでもその変換能力の高い*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus mali*、*Lactobacillus hilgardii*を用いるのが好適である。接種する乳酸菌は1種類を単独で使用してもよいし、複数を混合して使用してもよい。乳酸菌は、例えば、約 $10^5 \sim 10^8$ cfu/mLの範囲で接種すればよい。なお、マロラクティック発酵に利用される*Oenococcus*属乳酸菌（例えば、*Oenococcus oeni*）は、3MH-S-GSHを3MH-S-Cysに変換する能力が非常に弱く、従って、3MHの変換率を高める効果はない。

【 0 0 5 6 】

本発明に用いることができる酵母は、一般に発酵飲料の製造に用いられる酵母であれば特に限定されないが、例えば*Saccharomyces*属酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces bayanus*等）が挙げられる。接種する酵母は1種類を単独で使用してもよいし、複数を混合して使用してもよい。また、*Saccharomyces*属酵母と共に*Kluyveromyces*属酵母（例えば、*Kluyveromyces thermotolerans*等）、*Torulasporea*属酵母（例えば、*Torulasporea delbrueckii*等）を混合して使用してもよい。酵母は、約 $10^5 \sim 10^8$ cfu/mLの範囲で接種すればよい。

【 0 0 5 7 】

得られる発酵液のアルコール濃度は特に限定されないが、0.5～14%程度が適当であり、より好ましくは5～12%程度である。発酵液として、目的とするアルコール濃度の発酵飲料を得るためには、原料水溶液中のBrix(%)が約10%～25%であることが望ましい。さらには発酵経過中のアルコール濃度を適宜測定し、目的とするアルコール濃度となった時点で発酵を止めることで所望のアルコール濃度の発酵液を得ることができる。発酵停止法は公知の方法を適用することができる。例えば、酵母や乳酸菌の生育を抑制するため、亜硫酸を50ppm～200ppm添加して、品温を下げ、上澄み液を濾過除菌（例えば、フィルター濾過、珪藻土濾過等）する方法、遠心分離機を用いて例えば約3500～12000rpm、約5分～4時間等の条件で遠心し、酵母及び乳酸菌を分離・除去する方法等が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

発酵終了後の3MH含有液は、ペクチン、タンパク質、金属等の混濁の原因となる成分を

10

20

30

40

50

除去する目的で、必要に応じ公知の清澄法を適用することができる。例えば、本発明の製造方法により得られる発酵液をそのまま飲料とする場合であって、この飲料が酒税法上の果実酒である場合には、ゼラチン、卵白、ペントナイト、ペクチナーゼ、二酸化珪素、ポリビニルポリピロリドン等を清澄剤として用いることができる。本発明の製造方法により得られる発酵液を着香剤として用いる場合にも、公知の清澄法を適用することができる。

【0059】

<生成物>

本発明の製造方法によれば、3MHを含有するアルコール含有発酵液を製造することができる。発酵液中の総3MH濃度は、原料中の3MH前駆体濃度、発酵条件等により適宜調整できるが、例えば、3MH前駆体合計濃度が500～15500nMの発酵原料を、本発明の一定の発酵条件下で乳酸菌と酵母で発酵させた場合、総3MH濃度が25～5500nMの範囲である3MH含有発酵液が得られる。上記3MH濃度の好ましい範囲は、用途により異なる。例えば、こうして得られた3MH含有発酵液のうち、総3MH濃度が比較的低濃度（例えば、25～150nMの範囲）の3MH含有発酵液はその他飲料とブレンドする等の調整することなしに3MH香に優れ、嗜好性の高い発酵飲料として利用できるほか、その他の飲料とブレンドするための原料としても利用できる。総3MH濃度が150nM以上である、極めて芳香性の高い発酵液は、着香剤等として使用できる。着香剤等として用いられる3MH含有発酵液の場合、総3MH濃度は、好ましくは200～4500nMの範囲、より好ましくは250～3500nMの範囲である。

【0060】

また、前述のように、3MH前駆体合計濃度が500nM未満の発酵原料を、本発明の一定の発酵条件下で乳酸菌と酵母で発酵させることで、総3MH濃度が1nM以上、25nM未満の範囲である3MH含有発酵液が得られる。この3MH含有発酵液も、その他飲料とブレンドする等の調整することなしに3MH香に優れ、嗜好性の高い発酵飲料として利用できる。

【0061】

[香りを改善した飲料の製造方法]

本発明は、上記本発明の方法で得られた総3MH濃度が25nM以上であるアルコール含有発酵液を飲料と混合して、3MH含有率を高めた飲料を得る、香りを改善した飲料の製造方法も包含する。ここで混合に用いられる飲料は、例えば、ワインであることができるが、ワイン以外の飲料であることもできる。3MH含有率を高め、香りを改善した飲料は、総3MH濃度が、例えば、1～150nMの範囲、好ましくは2～100nMの範囲に調整したものであることができる。

【0062】

[着香剤]

さらに本発明は、3MH及びアルコールを含有する水溶液であって、3MHAをさらに含むことができ、総3MH濃度が150～5500nMの範囲であるアルコール含有発酵液を用いた着香剤も包含する。本発明の着香剤は、3MHAをさらに含むものであることが好ましい。この着香剤は上記本発明の製造方法により製造できる。着香剤の総3MH濃度は、好ましくは200～4500nMの範囲、より好ましくは250～3500nMの範囲である。前記水溶液のアルコール濃度は例えば、0.5～14%の範囲であることができ、5～12%の範囲であることが、保存性や製造の容易さの観点から好ましい。なお、着香剤の3MH及びアルコールの含有量は、希釈または濃縮することで適宜調整することもできる。希釈には、水、アルコールまたはアルコール含有液等を用いることができる。

【0063】

上記本発明の着香剤は、総3MH濃度が高いことから、飲食品の着香剤として用いられる。用いられる飲食品としては、例えば、ワインを挙げるることができる。さらに着香剤が用いられる飲食品としては、菓子、ケーキ、またはデザート類等、ワインを原料の一部として用いる飲食品を挙げるることができる。また、本発明の着香剤は、天然原料を用い天然に存在する乳酸菌と酵母を用いて製造されるものであり、安全性に優れるという利点がある。

【0064】

10

20

30

40

50

< 酒類及びその製造方法 >

上記のようにして製造したブドウ果皮抽出液は、ブドウ果汁と混合して、酵母による通常のアルコール発酵に供し、3-メルカプトヘキサン-1-オール香に優れた果実酒を製造することができる。酵母の例としては、サッカロミセス属酵母（例えば、サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等）が挙げられる。また、サッカロミセス属酵母と共にクロイベロマイセス属酵母（例えば、クロイベロマイセス・サーモトラレンス(*Kluyveromyces thermotolerans*)等）、トルラスポラ属酵母（例えば、トルラスポラ・デルブレキ(*Torulasporea delbrueckii*)等）を混合して使用してもよい。

【0065】

発酵原料となるブドウ果皮抽出液とブドウ果汁の混合比は、特に制限されるものではないが、5：95～100：0の範囲が適当である。例えば、3-メルカプトヘキサン-1-オール前駆体を5000nM（およそ2000ppbに相当）含有する果皮抽出液の場合、ブドウ果皮抽出液とブドウ果汁の混合比を5：95で混合し、発酵することで3-メルカプトヘキサン-1-オール香が程よく発現した果実酒を得ることができ、ブドウ果皮抽出液のみで発酵させた3-メルカプトヘキサン-1-オール香が高度に発現した果実酒では、必要に応じて他の果実酒とブレンドし、香味を調整することができる。

【実施例】

【0066】

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0067】

本実施例において総3MH濃度(3MH濃度および3MHA濃度の合計)は、3MHおよび3MHAをT. Tom inagaraの方法(J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1044-1048.)に従った以下の分析法で測定し、これら2物質の濃度の和で示した。

【0068】

(分析法)

試料中の3MH(分子量134)および3MHA(分子量176)を、p-ヒドロキシ水銀安息香酸(p-hydroxymercuribenzoate)を用いた選択抽出を行った後、窒素気流下で濃縮した。内部標準は4-メトキシ-2-メチル-2-メルカプトブタン(4-methoxy-2-methyl-2-mercaptobutane)を用いた。このようにして濃縮した試料をGC/MSシステム(アジレントテクノロジー 6890N GCシステムおよび5973MSDシステム)に供試した。カラムはJ&W Scientific社製DB-XLB(50m×0.25μm×0.25μm)を使用し、GCサイクルは40分で5分保持した後、170℃まで4℃/分で、その後230℃まで8℃/分で上昇させ、最後に5分間維持することで1サイクルとした。各標品のマススペクトルをSCANモードで確認後、SIMモードに切り替え、3MH m/z 134、3MHA m/z 116で定量を行った。

【0069】

本発明の3MH前駆体は、前述のように3MH-S-GSH(分子量407)および3MH-S-Cys(分子量221)である。3MH前駆体の濃度は、これら2物質を以下の分析方法を用いて測定し、これら2物質の濃度の和で示したものである。

【0070】

(分析法)

試料を0.1%(v/v)蟻酸を含む10%(v/v)メタノール水溶液を用いて適当な倍率で希釈し、0.45μmのフィルターでろ過したものをLC/MS/MSシステムを用いて定量する。検量線を引くために用いた標品は3MH-S-GSHはC. P. des Gachons、T. Tominagaの方法(J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4076-4079.)に従い、また3MH-S-CysはC. Thibon、S. Shinkarukの方法(J. Chromatogr A 2008, 1183, 150-157.)に従い、有機合成することで得た。

【0071】

[使用機器]

3200 QTRAP LC/MC/MSシステム(アプライドバイオシステムズ社)

[LC/MS/MS条件]

10

20

30

40

50

インターフェース : Turbo V source

イオン化モード : ESI (positiveモード)

イオン源パラメーター : curtain gas 15psi、collision gas 3psi、ionspray voltage 5500V、temperature 700、ion source gas1 70psi、ion source gas2 70psi、interface heater ON

測定モード : MRMモード

選択イオン : 3MH-S-GSH m/z 408.2 162.1 (collision energy 27V)、3MH-S-Cys m/z 222.2 83.2 (collision energy 19V)

【 0 0 7 2 】

10

[LC条件]

カラム : アトランティス (Atlantis) T3、3 μm、2.1 × 150mm (ウォーターズ社)

カラム温度 : 40

注入量 : 10 μl

移動相 A : 0.1% (v/v) 蟻酸を含む水

移動相 B : 0.1% (v/v) 蟻酸を含むアセトニトリル

流速 : 0.2 mL/min

グラジエント : 移動相Aと移動相Bの混合率を移動相A : 移動相B = 90 : 10から移動相A : 移動相B = 0 : 100まで10分かけて上げ、その後移動相A : 移動相B = 90 : 10に戻し、5分間キープした。

20

【 0 0 7 3 】

実施例 1

MRS培地を用いた各種乳酸菌の3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力の評価(1)

Difco社製Lactobacilli MRS Brothを1Lのイオン交換水に55g混合し、オートクレーブにより滅菌することでMRS培地 (pH6.5) を作成し、クリーンベンチ内で有機合成によって得た3MH-S-GSHを1250nMとなるように溶解させ、次いで混合した。これを滅菌済15mLファルコンチューブに約10mLずつ分注した。そこに表1記載の各種乳酸菌を約 1.0×10^6 cfu / mL接種し、30℃で3日間静置培養した後、基質である3MH-S-GSHと生成物である3MH-S-Cysの濃度を上記分析方法で測定した。結果を表1に示す。

【 0 0 7 4 】

30

【表 1】

菌株名	菌種	3MH-S-GSH残存量 (nM)	3MH-S-Cys生成量 (nM)
Vegestart (クリスチャンハンセン社)	<i>Lactobacillus pentosus</i>	643.0	256.7
NBRC14712	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1121.5	56.5
Viniflora plantarum (クリスチャンハンセン社)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1101.9	55.1
NBRC14713	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1185.3	49.7
NBRC101975	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1158.3	45.0
NBRC101978	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1155.9	37.6
NBRC101977	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1158.3	37.4
KK (バイオテックジャパン社)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1133.8	25.7
NBRC14711	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1175.5	18.0
NBRC15891	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1205.0	11.7
NBRC101974	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1195.1	8.9
NK-2 (バイオテックジャパン社)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1229.5	6.7

40

【 0 0 7 5 】

結果、Lactobacillus属乳酸菌であるLactobacillus plantarum、Lactobacillus pentosus、Leuconostoc属乳酸菌であるLeuconostoc mesenteroides、Pediococcus属乳酸菌であるPediococcus pentosaceusで3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力を有していた。なかでもLactobacillus pentosus、Lactobacillus plantarumが高い変換能力を有していた。

【 0 0 7 6 】

実施例 2

MRS培地を用いた各種乳酸菌の3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力の評価 (2)

50

実施例1と同様にMRS培地 (pH6.5) を調整し、有機合成により調製した3MH-S-GSHを1000 nMとなるように溶解させ、次いで滅菌済15mLファルコンチューブに約10mLずつ分注した。これに表2記載の各種乳酸菌を約 1.0×10^6 cfu/mL接種し、30℃で3日間静置培養した後、基質である3MH-S-GSHと生成物である3MH-S-Cysの濃度を実施例1と同様の分析方法で測定した。結果を表2に示す。

【0077】

【表2】

菌名	菌種	3MH-S-GSH残存量 (nM)	3MH-S-Cys生成量 (nM)
NBRC3202	<i>Lactobacillus delbruekii subsp.delbrueckii</i>	835.0	77.0
NBRC13953	<i>Lactobacillus delbruekii subsp.bulgaricus</i>	780.2	64.1
NBRC102159	<i>Lactobacillus mali</i>	529.4	63.8
THT030702(THT社製)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	931.4	35.1
NBRC13951	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	973.9	14.0
NBRC14710	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	992.6	7.5
NBRC15886	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	946.9	5.2
NBRC15888	<i>Lactobacillus kefir</i>	947.7	2.6
NBRC3516	<i>Lactobacillus fructosus</i>	986.1	2.3
NBRC102164	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	983.7	2.1
NBRC15885	<i>Lactobacillus fermentum</i>	951.0	2.0
NBRC15906	<i>Lactobacillus paracasei subsp.tolerans</i>	988.6	1.4
NBRC15893	<i>Lactobacillus sakei subsp.sakei</i>	972.2	1.0

10

20

【0078】

結果、表2に記載の全てのLactobacillus属乳酸菌で3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力を有していた。なかでもLactobacillus delbruekii subsp.delbrueckii、Lactobacillus delbruekii subsp.bulgaricus、Lactobacillus mali、Lactobacillus plantarumが高い変換能力を有していた。

【0079】

実施例3

果皮抽出液を用いた各種乳酸菌の3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力の評価(1)

ブドウ(シャルドネ種)をメンブランプレス(プーハー・パスラン社製)で搾汁して得た水分含量66.8%のブドウ果皮を1ヶ月間冷凍保存した。冷凍状態のブドウ果皮1.5kgに対して、3.0kg(2倍量)の水を加え、20℃で24時間浸漬後、手動の圧搾式ジューサーで圧搾し、Brix5%のブドウ果皮抽出液を得た。得られたブドウ果皮抽出液にベントナイトを500ppm添加後30分攪拌し、5℃で24時間静置した。上澄みを珪藻土濾過した後、フラッシュエバポレーターにて品温60℃で減圧濃縮し、Brix50%まで濃縮した。ブドウ果皮抽出液の3MH前駆体濃度および総ポリフェノール濃度を測定し、Brix20%換算で算出したところ、ブドウ果皮抽出液中に含まれる3MH前駆体濃度9014.2nM(3MH-S-Cys:2895.8nM、3MH-S-GSH:6118.4nM)、総ポリフェノール濃度は1414ppmであった。

30

【0080】

このブドウ果皮抽出液をBrix20%に調整し、発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は9014.2nM(3MH-S-Cys:2895.8nM、3MH-S-GSH:6118.4nM)、総ポリフェノール濃度は1414ppmであった。これに発酵助成剤Fermaid K(Lallemand社)100mg/l、リン酸二水素アンモニウム1g/lを加え、100mLずつ180mL容のガラス容器に分注した。このとき、pHは4.4であった。表3記載の乳酸菌をそれぞれ約 1.0×10^7 cfu/mL添加し、20℃で2日間静置培養した。培養した後、基質である3MH-S-GSHと生成物である3MH-S-Cysの濃度を実施例1と同様の分析方法で測定した。また、3MH-S-Cys生成量は培養後の発酵液中の3MH-S-Cys濃度から培養前の発酵原料中の3MH-S-Cys濃度を引くことで求めた。結果を表3に示す。

40

【0081】

【表3】

菌名	菌種	3MH-S-GSH (nM)	3MH-S-Cys (nM)	3MH-S-Cys生成量 (nM)
NBRC101978	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1753.3	3764.6	868.8
Viniflora plantarum (クリスチャンハンセン社)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2765.5	3695.9	800.1
NBRC101977	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1744.2	3666.4	770.6

【0082】

結果、表3に記載の全ての*Lactobacillus plantarum*で3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力を有していた。

10

【0083】

実施例4

果皮抽出液を用いた各種乳酸菌の3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力の評価(2)

ブドウ(シャルドネ種)をメンブランプレス(ブーハー・パスラン社製)で搾汁して得た水分含量66.8%(w/w)のブドウ果皮を30~50日間冷凍保存した。冷凍状態のブドウ果皮8tに対して16t(2倍量)の水を加え、15~20℃でメンブランプレス(ブーハー・パスラン社製)内で回転させながら3時間浸漬した後、圧搾し、Brix4.6%のブドウ果皮抽出液を得た。得られたブドウ果皮抽出液に混濁成分の沈降促進のため、ポリビニルポリピロリドン(PVPP)1000ppmとベントナイト500ppm添加後30分攪拌し、5℃で24時間静置した。上澄みを遠心(4000rpm)し、95℃で加熱殺菌した後、真空薄膜式循環濃縮機にて品温30~40℃で減圧濃縮し、Brix50%まで濃縮した。ブドウ果皮抽出液の3MH前駆体濃度および総ポリフェノール濃度を測定し、Brix20%換算で算出したところ、ブドウ果皮抽出液中に含まれる3MH-S-GSHが1960.8nM(800ppb)(A)、3MH-S-Cysが5203.6nM(1150ppb)(B)であり、3MH前駆体濃度{(A)+(B)}は7164.4nM(1950ppb)、総ポリフェノール濃度は568ppmであった。

20

【0084】

このブドウ果皮抽出液をおよそBrix20%(pH4.2)に調整し、これを発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は7165nM(3MH-S-Cys:5204nM、3MH-S-GSH:1961nM)、総ポリフェノール濃度は568ppmであった。この発酵原料を300mLずつ360mL容のガラス容器に分注し、表4記載の乳酸菌を約 1.0×10^7 cfu/mL添加し、30℃で2日間静置培養した。培養した後、基質である3MH-S-GSHと生成物である3MH-S-Cysの濃度を実施例1におけると同様の分析方法で測定した。また、3MH-S-Cys生成量は培養後の発酵液中の3MH-S-Cys濃度から培養前の発酵原料中の3MH-S-Cys濃度を引くことで求めた。結果を表4に示す。

30

【0085】

【表4】

菌名	菌種	3MH-S-GSH (nM)	3MH-S-Cys (nM)	3MH-S-Cys生成量 (nM)
NBRC15886	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	298.2	6425.7	1221.7
THT030702(THT社製)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	21.7	6199.5	995.5
NBRC102159	<i>Lactobacillus mali</i>	259.0	5475.5	271.5
NBRC102164	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	1300.7	5385.0	181.0
NBRC3202	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp.delbrueckii</i>	1982.1	5294.5	90.5

40

【0086】

結果、表4に記載の全ての*Lactobacillus*属乳酸菌で3MH-S-GSHから3MH-S-Cysへの変換能力を有していた。なかでも*Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus mali*が高い変換能力を有していた。

【0087】

実施例5

ブドウ果皮抽出液(シャルドネ種)を発酵原料として用いた3MH高含有飲料の製造 - 乳

50

酸菌と酵母の最適接種時期の検討 -

実施例4と同様にブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液をおよそBrix22%(pH4.2)に調整し、これを発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は8028.1nM (3MH-S-Cys:6244.3nM、3MH-S-GSH:1784.8nM)、総ポリフェノール濃度は625ppmであった。

【0088】

この発酵原料各500mLを発酵温度20℃で酵母のみを接種する試験区(実施例5-6)、乳酸菌と酵母を同時に接種する試験区(実施例5-1)、乳酸菌接種1日後、酵母を接種する試験区(実施例5-2)、乳酸菌接種2日後、酵母を接種する試験区(実施例5-3)、乳酸菌接種4日後、酵母を接種する試験区(実施例5-4)、乳酸菌接種6日後、酵母を接種する試験区(実施例5-5)を設け、13日~15日間静置発酵させ、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれの発酵飲料を得た。このとき使用した乳酸菌(Lactobacillus plantarum: Viniflora plantarum(クリスチャンハンセン社製))は約7.0×10⁶cfu/mL、酵母(Saccharomyces cerevisiae: CY3079(Lallemand社製))を約1.0×10⁶cfu/mLをそれぞれ接種した。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した。結果を表5に示す。

10

【0089】

【表5】

	乳酸菌の接種時期	酵母の接種時期	初発pH	発酵温度(°C)	発酵期間(日)	アルコール濃度(%v/v)	3MH(nM)(A)	3MHA(nM)(B)	総3MH濃度(nM) [(A)+(B)]	3MH変換率(%mol/mol)
実施例5-6	不使用	発酵原料調整直後	4.2	20	13	10.5	84.7	1.3	85.9	1.07
実施例5-1	発酵原料調整直後	乳酸菌添加0日目	4.2	20	13	9.7	123.8	3.5	127.3	1.59
実施例5-2	発酵原料調整直後	乳酸菌添加1日目	4.2	20	13	10.2	186.0	4.3	190.3	2.37
実施例5-3	発酵原料調整直後	乳酸菌添加2日目	4.2	20	13	10.1	223.6	4.5	228.1	2.84
実施例5-4	発酵原料調整直後	乳酸菌添加4日目	4.2	20	13	9.7	344.0	4.6	348.6	4.34
実施例5-5	発酵原料調整直後	乳酸菌添加6日目	4.2	20	16	10.1	252.1	5.2	257.3	3.20

20

【0090】

表5に示したとおり、実施例5-6と比較して、実施例5-1~5-5では、総3MH濃度が高く、3MH変換率が向上していた。なかでも実施例5-3、5-4と5-5で3MH変換率が顕著に向上していた。

【0091】

実施例6

ブドウ果皮抽出液(シャルドネ種)を発酵原料として用いた3MH高含有飲料の製造-発酵温度依存性の検討-

実施例4と同様に、ブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液をおよそBrix22%(pH4.2)に調整し、これを発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は6216.5nM(3MH-S-Cys:4796.4nM、3MH-S-GSH:1420.1nM)、総ポリフェノール濃度は625ppmであった。この発酵原料各500mLを750mL容のガラス容器に分注し、10~40℃の各発酵温度で一方は酵母(Saccharomyces cerevisiae: CY3079(Lallemand社製))を約2.0×10⁶cfu/mL接種し、6~18日間発酵させ(実施例6-1a~4a)、他方は乳酸菌(Lactobacillus plantarum: Viniflora plantarum(クリスチャンハンセン社製))を6.0×10⁷cfu/mL接種し、2日後に酵母(Saccharomyces cerevisiae: CY3079(Lallemand社製))を約2.0×10⁶cfu/mL接種し、6~18日間静置発酵させ(実施例6-1b~4b)、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれ発酵飲料を得た。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した結果を表6に示す。

30

40

【0092】

【表 6】

	乳酸菌の 接種時期	酵母の 接種時期	初発pH	発酵温度 (°C)	発酵期間 (日)	アルコール 濃度 (%v/v)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総3MH濃度 (nM) [(A)+(B)]	3MH変換率 (%mol/mol)
実施例6-1a	不使用	発酵原料調整直後	4.2	10	19	10.8	96.7	0.7	97.4	1.57
実施例6-2a	不使用	発酵原料調整直後	4.2	20	10	11.5	227.2	6.8	234.0	3.76
実施例6-3a	不使用	発酵原料調整直後	4.2	30	6	11.1	205.3	6.1	211.4	3.40
実施例6-4a	不使用	発酵原料調整直後	4.2	40	5	7.3	89.0	0.9	89.9	1.45
実施例6-1b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	4.2	10	20	8.7	109.1	1.0	110.1	1.77
実施例6-2b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	4.2	20	12	10.7	435.5	21.6	457.1	7.35
実施例6-3b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	4.2	30	7	10.6	1291.0	40.9	1331.9	21.43
実施例6-4b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	4.2	40	7	8.9	149.0	2.7	151.6	2.44

【0093】

表6に示したとおり、各発酵温度において酵母のみで発酵させた発酵飲料と比較して、乳酸菌と酵母を用いて発酵させた発酵飲料は、3MH変換率が向上していた。なかでも実施例6-2b、6-3bで3MH変換率が顕著に向上していた。

10

【0094】

実施例7

ブドウ果皮抽出液(シャルドネ種)を発酵原料として用いた3MH高含有飲料の製造-pH依存性の検討-

実施例4と同様に、ブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液をおよそBrix20%に調整し、これを発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は5669.4nM(3MH-S-Cys:4416.3nM、3MH-S-GSH:1253.1nM)、総ポリフェノール濃度は568ppmであった。この発酵原料各500mLを水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いて初発pH3~9に調整した後、750mL容のガラス容器に分注し、発酵温度20℃で一方は酵母(*Saccharomyces cerevisiae*:CY3079(Lallemand社製))を約 2.0×10^6 cfu/mL接種し、6~18日間発酵させ(実施例7-1a~4a)、他方は乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*:Vinifloraplantarum(クリスチャンハンセン社製))を約 6.0×10^7 cfu/mL接種し、2日後に酵母(*Saccharomyces cerevisiae*:CY3079(Lallemand社製))を約 2.0×10^6 cfu/mL接種し、6~18日間静置発酵させ(実施例7-1b~4b)、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれの発酵飲料を得た。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した結果を表7に示す。

20

【0095】

【表7】

	乳酸菌の 接種時期	酵母の 接種時期	初発pH	発酵温度 (°C)	発酵期間 (日)	アルコール濃度 (%v/v)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総3MH濃度 (nM) [(A)+(B)]	3MH変換率 (%mol/mol)
実施例7-1a	不使用	発酵原料調整直後	3	20	10	10.6	169.9	3.4	173.3	3.06
実施例7-2a	不使用	発酵原料調整直後	5	20	10	10.2	162.0	4.2	166.2	2.93
実施例7-3a	不使用	発酵原料調整直後	7	20	10	10.7	135.5	2.7	138.2	2.44
実施例7-4a	不使用	発酵原料調整直後	9	20	10	10.4	127.0	2.5	129.5	2.28
実施例7-1b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	3	20	12	10.4	193.1	4.0	197.1	3.48
実施例7-2b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	5	20	12	9.8	765.1	19.3	784.4	13.84
実施例7-3b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	7	20	12	9.5	589.5	16.1	605.6	10.68
実施例7-4b	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	9	20	12	9.6	905.6	32.1	937.7	16.54

30

【0096】

表7に示したとおり、各初発pHにおいて酵母のみで発酵させた発酵飲料と比較して、乳酸菌と酵母を用いて発酵させた発酵飲料は、3MH変換率が向上していた。なかでも実施例7-2b、7-3b、7-4bで3MH変換率が顕著に向上していた。

40

【0097】

実施例8

ブドウ果皮抽出液(シャルドネ種)を発酵原料として用いた3MH高含有飲料の製造-Oenococcus Oeniとの比較-

実施例4と同様に、ブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液をおよそBrix22%(pH4.2)に調整し、これを発酵原料とした。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は5985.9nM(3MH-S-Cys:4909.9nM、3MH-S-GSH:1076.0nM)、総ポリフェノール濃度は625ppmであった。この発酵原料各500mLを750mL容のガラス容器に分注し、

50

発酵温度30℃で酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: CY3079 (Lallemand社製)) を約 2.0×10^6 cfu/mL接種したもの (実施例8-1)、乳酸菌 (*Oenococcus oeni*: MVP41 (Lallemand社製)) を約 1.0×10^7 cfu/mL接種し、2日後に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: CY3079 (Lallemand社製)) を約 2.0×10^6 cfu/mL接種したもの (実施例8-2)、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*: NBRC101978) を 1.0×10^7 cfu/mL接種し、2日後に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: CY3079 (Lallemand社製)) を約 2.0×10^6 cfu/mL接種したもの (実施例8-3) を用意し、それぞれ10日間静置発酵させ、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれ発酵飲料を得た。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した結果を表8に示す。

10

【0098】

【表8】

	乳酸菌の接種時期	酵母の接種時期	初発pH	発酵温度 (°C)	発酵期間 (日)	アルコール濃度 (%v/v)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総3MH濃度 (nM) [(A)+(B)]	3MH変換率 (%mol/mol)
実施例8-1	不使用	発酵原料調整直後	4.2	30	10	11.0	195.8	2.6	198.3	3.31
実施例8-2	発酵原料調整直後	乳酸菌添加0日目	4.2	30	10	10.9	174.5	2.6	177.1	2.96
実施例8-3	発酵原料調整直後	乳酸菌添加0日目	4.2	30	10	10.9	489.1	7.8	497.0	8.30

【0099】

表8に示したとおり、全ての実施例で高い総3MH濃度を示した。酵母のみで発酵させた発酵飲料と乳酸菌 (*Oenococcus oeni*) と酵母を用いて発酵させた発酵飲料は同程度の3MH変換率であった。それらと比較して、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) と酵母を用いて発酵させた発酵飲料の3MH変換率は向上していた。

20

【0100】

実施例9

ブドウ果皮抽出液 (シャルドネ種) を発酵原料として用いた3MH高含有飲料の製造 - ブドウ果皮抽出液の使用量の検討 -

実施例4と同様に、ブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液 (Brix50%) と含水結晶ぶどう糖 (日本食品化工社製) を混合したものを水で希釈し、表9記載の発酵原料を3種類調整した (実施例9-1~3)。

【0101】

【表9】

	ブドウ果皮抽出液 (Brix50%)使用量 (g/L)	含水結晶ぶどう糖使用量 (g/L)	Brix (%)	初発pH	総ポリフェノール量 (ppm)	3MH-S-Cys (nM) (a)	3MH-S-GSH (nM) (b)	3MH前駆体濃度 (nM) (a)+(b)
実施例9-1	113	159.3	20.2	4.7	179	1314.5	419.1	1733.6
実施例9-2	272	70.3	20.2	4.6	421	2895.9	997.5	3893.5
実施例9-3	453	0	22.2	4.5	715	4705.9	1691.2	6397.1

30

【0102】

この発酵原料各500mLを750mL容のガラス容器に分注し、発酵温度30℃でそれぞれ乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*: THT030702 (THT社製)) を約 1.0×10^6 cfu/mL接種し、2日後に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: VIN13 (Anchor社製)) を約 2.0×10^6 cfu/mL接種し、8日間静置発酵させ、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれ発酵飲料を得た。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した結果を表10に示す。

40

【0103】

【表10】

	乳酸菌の接種時期	酵母の接種時期	発酵温度 (°C)	発酵期間 (日)	アルコール濃度 (%v/v)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総3MH濃度 (nM) [(A)+(B)]	3MH変換率 (%mol/mol)
実施例9-1	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	30	8	10.8	417.6	2.7	420.3	24.2
実施例9-2	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	30	8	11.2	478.8	38.3	517.1	13.3
実施例9-3	発酵原料調整直後	乳酸菌接種2日目	30	8	10.5	602.0	93.7	695.8	10.9

【0104】

表10に示したように、ブドウ果皮抽出液の使用量を増やすことによって総3MH濃度は

50

増加した。一方でブドウ果皮抽出液の使用量を抑えることによって、3MH変換率が向上した。これは、相対的な総ポリフェノール量が減少したため、乳酸菌や酵母の3MH変換能力が向上したものと推察される。

【 0 1 0 5 】

実施例 1 0

総ポリフェノール濃度が3MH濃度に及ぼす影響調査

実施例 4 と同様に、ブドウ果皮を水で抽出し、濃縮することで得たブドウ果皮抽出液 (Brix50%) 150 g と含水結晶ぶどう糖 (日本食品化工社製) 45gを混合したものを水で希釈し、およそBrix22%の発酵原料を500mL (pH4.6) 調整した。このとき、発酵原料中に含まれる3MH前駆体濃度は4147.7 nM(3MH-S-Cys: 3054.3nM、3MH-S-GSH: 1093.4nM)、総ポリフェノール濃度は421ppmであった。この発酵原料を各100mLに対してそれぞれポリフェノールの1種であるガリック酸を加え、総ポリフェノール濃度を421、803、1222、2414、4851ppmにそれぞれ調整したのち、180mL容のガラス容器に移し、発酵温度30℃で乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*: THT030702(THT社製)) を約 1.0×10^6 cfu/mL接種し、2日後に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: VIN13 (Anchor社製)) を約 2.0×10^6 cfu/mL接種し、6日間静置発酵させ、その後遠心分離によって酵母あるいは乳酸菌を除去し、それぞれ発酵飲料を得た。得られた発酵飲料の3MHおよび3MHA濃度を測定した。また、発酵原料中に含まれていた3MH前駆体濃度に対する得られた発酵飲料中の総3MH濃度の割合を計算し、3MH変換率を算出した結果を表 1 1 に示す。

【 0 1 0 6 】

【表 1 1】

総ポリフェノール量 (ppm)	アルコール濃度 (%v/v)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総 3MH 濃度 (nM) {(A)+(B)}	3MH 変換率 (%mol/mol)
421	11.3	529.8	29	558.8	13.47
803	10.9	535.2	18.4	553.6	13.35
1222	11.3	493.2	19.9	513.1	12.37
2414	11.3	528.8	23.3	552.1	13.31
4851	11.7	75.9	3.1	79.1	1.91

【 0 1 0 7 】

参考例 1

モデル培地での3MH-S-GSHと3MH-S-Cysの酵母による変換効率の確認と比較 (両前駆体は有機合成で得たもの)

実験方法

1) 下記文献の方法で前駆体を有機合成した。

3MH-S-GSH : C. P. des Gachons、T. Tominagaらの方法 (J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4076-4079.)

3MH-S-Cys : C. Thibon、S. Shinkaruk らの方法 (J. Chromatogr A 2008, 1183, 150-157.)

2) 下記文献にあるモデル培地 (KP medium) を一部修正して用いた。

P.Marullo、M.Belyらの報告 (FEMS Yeast Res. 2006, 6, 268-279.)

3) 作成したモデル培地にクリーンベンチ内で有機合成した3MH-S-GSH、3MH-S-Cysをそれぞれ2000nMになるよう混合した。

4) これらに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: VL3 (Laffort社製)) を約 2.0×10^5 cfu/mL接種した。

5) 温度20℃、静置で9日間発酵させ、その後5℃で冷却し、酵母を沈降させた後、上澄み部分を採取し3MH含有量の分析を行った。

【 0 1 0 8 】

結果

表5に示すとおり、両前駆体ともに酵母によって3MHへ変換されることを確認するとともに3MH-S-Cysは3MH-S-GSHよりも効率的に酵母によって3MHへ変換されることを確認した(約8.3倍)。表12中の「3MH前駆体添加量」は、モデル培地への3MH前駆体添加量である。

【0109】

【表12】

	3MH前駆体 添加量 (nM)	初発 pH	発酵温度 (°C)	発酵期間 (日)	3MH (nM) (A)	3MHA (nM) (B)	総3MH濃度 (nM) {(A)+(B)}	3MH変換率 (%mol/mol)
3MH-S-GSH	2000	3.3	20	9	10.39	0.34	10.73	0.54
3MH-S-Cys	2000	3.3	20	9	87.51	1.83	89.34	4.47

10

【0110】

参考例2

表13に記載した各種果実を手動の圧搾式ジューサーで搾汁し、各種ブドウ果汁を得た。得られたブドウ果汁について、Brix(%)及び3MH前駆体量を測定した。

【0111】

【表13】

品種	Brix (%)	3MH-S-Cys (nM) (A)	3MH-S-GSH (nM) (B)	3MH前駆体量 (nM) {(A)+(B)}
ソーヴィニオン・ブラン	20.3	47.4	151.4	198.8
セミヨン	17.3	23.3	32.3	55.5
甲州	14.7	46.5	89.9	136.4
ヴィオニエ	22.7	21.8	28.4	50.2
シャルドネ	19.6	27.6	71.3	98.9
ピノ・ノワール	21.4	42.4	251.6	294.0
メルロー	19.1	34.8	143.5	178.3
カベルネ・ソーヴィニオン	17.7	29.4	214.7	244.2

20

30

【産業上の利用可能性】

【0112】

本発明は、ワイン等の発酵飲料の製造分野に有用である。

フロントページの続き

- (72)発明者 高瀬 秀樹
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 小林 弘憲
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 丹澤 史子
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 大橋 宏之
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 高田 良二
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 金野 知典
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内
- (72)発明者 大越 崇
東京都中央区京橋一丁目5番8号 メルシャン株式会社内

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 特開昭59-098672(JP,A)
国際公開第2007/095682(WO,A1)
特開2005-192562(JP,A)
特開平02-312581(JP,A)
特開2002-136259(JP,A)
特開2008-101097(JP,A)
PEYROT C et al., Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-g, J. Agric. Food Chem., 2002年, Vol.50, No.14, pp.4076-4079
MURAT ML et al., Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by, J. Agric. Food Chem., 2001年, Vol.49, No.11, pp.5412-5417
MAGGU M et al., Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must, J. Agric. Food Chem., 2007年, Vol.55, No.25, pp.10281-10288
SWIEGERS JH et al., The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine, Food Microbiol., 2009年 4月, Vol.26, No.2, pp.204-211, Epub. 2008.11.5
SUBILEAU M et al., New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon Blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2, J. Agric. Food Chem., 2008年10月 8日, Vol.56, No.19, pp.9230-9235
SARRAZIN E et al., Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytized sweet wines: identification and q, J. Agric. Food Chem., 2007年, Vol.55, No.4, pp.1437-1444
SWIEGERS JH et al., Engineering volatile thiol release in Saccharomyces cerevisiae for improved wine aroma, Yeast, 2007年, Vol.24, No.7, pp.561-574
小林弘憲ほか, 甲州ワインの新しい香り ブドウ「甲州」からのメッセージ, バイオサイエンスとインダストリー, 2006年 4月 1日, Vol.64, No.4, pp.226-227
小林弘憲ほか, 甲州きいろ香にみるワインの個性化醸造法, 生物工学, 2008年 7月25日, Vol.86, pp.366-367
岡野康弘ほか, ブドウ果皮残渣からの乳酸製造, 日本ブドウ・ワイン学会誌, 2006年11月25日, Vol.17, No.3, pp.145-146

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12G 1/02

C12P 7/04

C12P 7/06

C12P 11/00

A23L 1/212

CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JST7580(JDreamIII)

Food Science and Tech Abst(FSTA)(ProQuest Dialog)

Foodline Science(ProQuest Dialog)

Food Adlibra(Dialog)