

ワイン中におけるエチルカルバメイトの生成と ワインの尿素及びアンモニア含量

渡辺 正平・飯野 修一・荻野 敏・富士縄昭平*

Formation of Ethylcarbamate in the Wines and Contents of Urea and Ammonia in Wines

Masahira WATANABE, Shuichi IINO, Satoshi OGINO and Shohei FUJINAWA*

要 約

モデルワイン及びワイン中に尿素からエチルカルバメイト (EC) の生成について検討すると共に、多試料のワインについて、尿素及びアンモニアの含量を測定した。

- 1) モデルワインに添加した尿素から加熱処理により、ECの増加は顕著に認められ、尿素含量が多いほど、処理時間の長いほど生成量は多かった。
- 2) 白及び赤ワインを同様に加熱処理した場合、ECは増加し、その含量は高 pH の赤ワインの方が低 pH の白ワインに比べ顕著に多いことが分かった。
- 3) 本邦産及び市販の計155点の種類別ワインの尿素及びアンモニア含量を測定した結果、尿素は最高値 8 ppm、1 ppm未満86点、1～3 ppm54点、3 ppm以上15点の分布を示し、そのうち 5 ppm以上のワインは 5 点にすぎず総体的に低含量であった。
一方、アンモニアは最高値17ppm、1 ppm未満39点、1～3 ppm57点、3～5 ppm27点及び 5 ppm以上32点の分布を示した。
- 4) 1973～1987年の醸造年度別ワイン17点の尿素含量は全て 2 ppm以下で、白ワイン11点の平均値1.1ppm及び赤ワイン 6 点の平均値1.3ppmであった。
一方、EC含量は白ワイン 4～17ppb (平均値8.5) に対して、赤ワイン 4～22ppb (10.1) で後者の方が若干高い値を示した。なお、EC含量に及ぼす貯蔵年数の影響は小さいものと思われた。
- 5) 酵母別試醸ワイン中の尿素及びアンモニア両含量は低く、ワイン酵母、清酒酵母及び焼酎酵母株との間に差異は認められなかった。

1. The amounts of ethylcarbamate (EC) formed from urea in the model and table wines were markedly influenced by the reaction temperature, time and the concentration of urea added. Especially, the amount of EC formed from urea in the table wines was larger at high pH than low pH.

2. White, red and rose Yamanashi table wines (155 samples) made from various grape varieties were analysed for urea and ammonia contents.

The distribution of the urea content of the samples was as follows; max. 8 ppm, below 1 ppm (86 samples), between 1 ppm and 3 ppm (54 samples) and above 3 ppm (15 samples). Only 5 samples contained 5 ppm or more urea.

The distribution of the ammonia content was as follows; max. 17 ppm, below 1 ppm (39 samples), between 1 ppm and 3 ppm (57 samples), between 3 ppm and 5 ppm (27 samples)

* 武田薬品工業(株)食品研究所

and above 5 ppm(32 samples).

3. Among the 11 white and 6 red wines of different vintage (1973-1987), urea was found in below 2 ppm. And also, the max., the min. and the average EC concentration were 4, 17 and 8.5 ppb in white table wines and 4, 22 and 10.1 ppb in red table wines respectively.
4. Among the 17 wines fermented by different yeast strains, urea and ammonia were found at levels of 1-2 ppm and 1 ppm, respectively. No correlation was observed between urea content and yeast strains.

1. 緒 言

数年前から清酒をはじめ、ワイン、ウイスキーなどの酒類にエチルカルバメイト (EC) が存在することが報告され、カナダでは1980年ワインに、1985年全酒類に対してEC含量が規制された。またアメリカでも業界の自主基準が設けられ規制されるようになった。

酒類中のECの生成に関しては、古く Lofroth¹⁾、Ough²⁾の報告があり、最近になって Oughらによりブドウ果汁発酵中におけるEC前駆体の生成³⁾、カルバミン化合物とエタノールの反応⁴⁾について報告されている。

我が国でも特に清酒やワインを中心に詳細な検討がなされ、分析法の開発や⁵⁾⁶⁾生成機構の解明⁷⁾⁸⁾が行われると共に、清酒中のEC含有量低減に向けて、醸造工程の見直し⁹⁾、その工程中の尿素及びその関連物質含有量の推移¹⁰⁾、ウレアーゼによる尿素的分解¹¹⁻¹⁶⁾及び尿素低生成能酵母¹⁶⁻¹⁸⁾などの対応策が進められている。

本報ではワイン中におけるECの生成について検討すると共に、多試料のワインについて尿素とアンモニア含量を測定したので、それらの結果を報告する。

2. 実験方法

2-1 供試ワイン

(1) 醸造年度別ワイン：当センター食品醸造部ワインセンターで常法¹⁹⁾により、1973年から1987年に醸造し、20℃以下のセラーで瓶貯蔵した白ワイン11点及び赤ワイン6点の計17点を供試した (Table 2, 4)。

(2) 本邦産及び市販ワイン：第19回山梨県ワイン鑑評会 (1989年6月9日実施) に48ワインメーカーから出品された白ワイン76点、赤ワイン26点及びロゼワイン6点の108点 (Table 3)、市販

ワイン審査会のため県内酒販店から買い上げた県内38ワインメーカー製の白ワイン28点、赤ワイン10点及びロゼワイン9点の47点 (Table 3) の合計155点を供試した。

(3) 酵母別試験ワイン：山梨大学発酵化学研究施設2菌株、国税庁醸造試験所1菌株、日本醸造協会2菌株、東京農業大学1菌株、東京大学応用微生物研究所1菌株の分譲7菌株と著者らの分離した10菌株の計17菌株 (Table 5) を用いて、1988年産の甲州種を原料として、常法により試験した酵母別ワインを供試した。

2-2 モデルワインの調製と加熱処理

0.01N酒石酸緩衝液 (pH2.5~4.0) にエタノールを12% (v/v) になるように調製したモデルワインに、尿素 (和光純薬工業製生化学用) を0.25~5.00ppm添加して試料とした。

これらの試料をそれぞれ沸騰湯煎上で8時間加熱処理した。

2-3 分析方法

(1) 尿素及びアンモニア：酵素法 [ベーリンガー・マンハイム山之内 (株) 製尿素/アンモニア定量用キット] により測定した。試料は全て孔径0.45 μm ミリポアフィルターで濾過後、赤ワインは活性炭で色素除去後測定に供した (検出限界1 ppm²⁰⁾)。

(2) エチルカルバメイト (EC)：モデルワイン中のECはガスクロマトグラフ (検出限界5 ppb²¹⁾) により、ワイン中のECは日本食品分析センターに依頼、GC-MSにより測定した (検出限界10ppb)。

3. 実験結果及び考察

3-1 ワイン中の尿素からECの生成

モデルワインに尿素を0.25~5.00ppm加え、加

熱処理後、生成したEC含量を調べた (Table 1)。

全試料区で加熱処理によりECの増加が顕著に認められ、尿素濃度が高いほど、処理時間の長いほどECの生成は多く、尿素含量とEC生成量との

間に密接な関係が見出された。またpHが高いほど、中性域になるほどEC生成量は多く、原⁷⁾のモデル酒で得られた結果とほぼ一致した (Table 1)。

Table 1. Effect of thermal treatment, pH, and amount of urea added on the formation of ethyl carbamate (EC) in model solution.

Model solution ¹⁾		EC (ppb) ²⁾ after treatment ³⁾ for			
Urea added (ppm)	pH	0	2	4 (hr)	8
0.25	2.50	<4)	-	-	<5
0.50		-	-	-	10
1.00		<5	10	25	45
5.00		<5	40	80	165
0.25	3.00	-	-	-	<5
0.50		-	-	-	20
1.00		<5	15	25	42
5.00		<5	60	80	170
0.25	3.50	-	-	-	<5
0.50		-	-	-	20
1.00		<5	10	20	50
5.00		<5	60	90	180
0.25	4.00	-	-	-	<5
0.50		-	-	-	20
1.00		<5	5	25	47
5.00		<5	50	110	185

1) Buffer solution of 0.01 N tartrate containing 12 % (v/v) of ethanol.

2) The lower limit of detection was 5 ppb.

3) The solution was kept on a boiling water bath for up to 8 hours.

4) - : not analyzed.

次に、前述の結果をワインで確かめるため、醸造年度の異なる本邦産の白ワイン (甲州種) 及び赤ワイン (マスカット・ベリーA種) を供試して、同様に試験した結果をTable 2に示した。沸騰湯煎上8時間の加熱処理によるEC生成量に及ぼす影響をみると、白及び赤ワインともECは増加し、モデルワインの場合と類似の傾向が認められ、その含量は高pHの赤ワインの方が低pHの白ワインに比較して顕著に多かった。白及び赤ワイン中の自然含有尿素量は2 ppm以下の低レベルであっ

たが、加熱処理により、白ワインでは10ppb以上、赤ワインには60ppb以上のECが生成されることが分かった。

しかし、ワインで得られた結果は、モデルワインの場合とかなり相違し、尿素含量とEC生成間に明瞭な関係は認められず、ECは尿素以外のものから生成されたものと考えられるが、その径路は明確でない。

上述の結果から、尿素がワイン中のEC前駆物質の主体であることを確かめることはできたが、

Table 2. Formation of ethyl carbamate(EC) in the wines during the treatment¹⁾ for 8 hours.

Wine	pH	Urea present (ppm)	EC present ²⁾ (ppb)	EC formed ³⁾ (ppb)
Koshu				
1976	3.07	<1	9*	22
1983	3.03	2	9*	13
Muscat Bailey A				
1977	3.74	1	16	60
1987	3.65	2	4*	106

- 1) See footnote of Table 1.
 2) The lower limit of detection was 10 ppb.
 3) Increase after treatment.
 * Values are only approximate.

それ以外のアルギニン²⁾やその他の前駆物質の存在^{7, 2)}も示唆されている。

て、その含量分布を調べた。

3-2 ワイン中の尿素及びアンモニア含量

前項の結果からワイン中のEC前駆物質の主体が尿素であることが分かったので、本項で原料別、製造メーカー別及び酵母別など種類別ワインの多試料について、尿素及びアンモニア含量を測定し

3-2-1 本邦産ワイン及び市販ワイン

供試した155点の種類別ワインについて、測定した尿素及びアンモニアの定量値分布を Table 3 に一括して表示した。

尿素含量の分布をみると全体的に低含量で、最高値は 8 ppm で、1 ppm 未満86点、1~2 ppm 26

Table 3. Range of urea and ammonia(NH₃) contents in a variety of wines.

Kind	Wine ¹⁾	Number of samples containing								Total	Highest conc.	
		Urea (ppm)				NH ₃ (ppm)					Urea	NH ₃
		<1	1-2	2-3	3<	<1	1-3	3-5	5<			
White	A	25	11	7	3	15	24	7	0	46	4	5
	B	14	7	5	4	3	16	3	8	30	8	13
	C	18	5	4	1	15	8	2	3	28	5	7
Red	A	5	0	6	0	0	3	6	2	11	3	9
	B	9	2	1	3	2	0	2	11	15	4	16
	C	6	1	1	2	0	1	3	6	10	8	12
Rose	A + B	4	0	2	0	2	3	1	0	6	3	4
	C	5	0	2	2	2	2	3	2	9	8	17
Total		86	26	28	15	39	57	27	32	155	-	-

1) A, B : Young and not young, i.e. stored for less than 6 months and over 1 year, respectively. C : Total wines of commercial origin.

点、2～3 ppm 28点、3 ppm以上15点で5 ppm以上のワインは5点にすぎず、供試ワインの70%以上が2 ppm未満で、清酒中の尿素含量20～50ppm²⁾に比べて1桁以上低い値を示した。

外国産市販ワイン67点の尿素定量値は、最高18 ppm、5 ppm以上のワイン7点と報告²⁾されているが、これらの値と比較すると本邦産ワインの定量値は総体的に低いことが分かった。

次に白及び赤ワインの新酒・古酒別を問わず尿素含量分布に差異を認めることはできず、貯蔵中の尿素含量の変動は少ないものと考えられる。

戸塚ら⁶⁾はワイン醸造工程における尿素的推移を調べ、果もろみ中の尿素含量のブドウ品種による差は少なく、貯蔵中の滓引きにより尿素含量を低減できると報告していることから、上述の結果が思惟される。

他方、供試ワイン155点のアンモニア定量値の分布は、最高値17ppm、1 ppm未満39点、1～3 ppm 57点、3～5 ppm 27点及び5 ppm以上のワイン32点であった。Mcwilliam ら²⁾はスティルワ

イン中のアンモニア含量を定量し、15.8～18.5ppmと報告している。この定量値と比較して、本邦産ワインのアンモニア定量値は顕著に低かった。

3-2-2 醸造年度別ワイン

1973年から1987年の間に当センター食品醸造部ワインセンターにおいて、甲州、セミヨン、マスカット・ベリーA及びカベルネ・ソービニヨンの4品種から試醸した瓶貯蔵中のワイン17点について、尿素、アンモニア及びEC含量を測定した(Table 4)。

尿素含量は全て2 ppm以下の低値で、白ワイン11点の平均値1.1ppm、赤ワイン6点の平均値1.3 ppmであった。

一方、アンモニア含量は白ワインの定量範囲1～5 ppm (平均値2.1ppm) に比較して、赤ワインでは2～8 ppm (平均値5.5ppm) で、後者の方が高い値を示した。

EC含量は白ワインの定量範囲4～17ppb (平均値8.5ppb) に対して、赤ワイン4～22ppb (平均

Table 4. Contents of ethyl carbamate(EC), urea and ammonia (NH₃) in wines of different vintage.

Kind	Wine ¹⁾	Year of vintage	Years old	pH	Urea (ppm)	NH ₃	EC ²⁾ (ppb)
White table	S	1973	15	3.41	1	4	11
	S	1975	13	3.33	<1	5	17
	K	1976	12	3.07	<1	2	9*
	K	1977	11	3.28	1	1	7*
	K	1978	10	3.62	1	3	11
	K	1979	9	3.27	1	2	4*
	K	1980	8	3.30	1	1	6*
	K	1982	6	3.31	1	2	4*
	K	1983	5	3.03	2	1	9*
	K	1985	3	3.18	1	1	7*
	K	1987	2	3.19	<1	1	8*
Average of 11 white wines			-	3.27	1.1	2.1	8.5
Red table	CS	1975	13	4.23	1	3	7*
	BA	1977	11	3.74	1	8	16
	BA	1979	9	3.69	1	8	22
	BA	1983	5	3.45	2	8	4*
	BA	1985	3	3.74	1	4	8*
	BA	1987	2	3.65	2	2	4*
Average of 6 red wines			-	3.75	1.3	5.5	10.1

1) S : Semillon. K : Koshu. CS : Cabernet sauvignon. BA : Muscat Bailey A.

2) The lower limit of detection was 10 ppb.

* : Values are only approximate.

値10.1ppb)で、後者の方が若干高い値を示した。

しかし、EC定量検出限界は10ppbなので、得られた値は極めて低含量であり、最近のアメリカにおけるテーブルワインの自主基準15~25ppb²⁾に近いものは17点のうち3点しかなかった。

上述の結果から尿素含量の低い本邦産ワインについては、ワイン中の尿素、アンモニア及びEC含量は貯蔵年数による影響を殆ど受けず、これら3成分の増加あるいは減少に及ぼす貯蔵年数の寄与は少ないものと考察され、前項の結果を裏付けている。

3-2-3 酵母別試醸ワイン

酒類中の尿素は、尿素サイクルによってアルギニンから主に酵母によって生成される最終代謝産物の一つであり¹⁾、これがEC前駆物質の主体であることを前述した。

ここでは現在、我が国で常用されている優良ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 及び

W-3 の2菌株を含む17菌株から試醸したワイン中に、どの程度の尿素及びアンモニア含量が生成されるかを調べた。

結果は Table 5 に示した如く、尿素含量は1~2 ppm及びアンモニアは全試料1 ppmで、ワイン酵母、清酒酵母及び焼酎酵母株との間に、尿素とアンモニア生成量の差異は認められず低含量であった。

Ough²⁾はワイン発酵における尿素集積を引き起こす要因として、使用酵母株の性質と原料果汁中の全アミノ酸含量を挙げているが、甲州種を原料としたワイン醸造の場合、EC前駆物質の生成量は少なく¹⁰⁾、現状では問題のないことが分かった。

なお、本報の一部は日本醸造学会に投稿中である。

終わりに本研究遂行にあたりワイン試料をご恵贈いただいた山梨県果実酒々造組合に深謝します。

Table 5. Amounts of urea and ammonia (NH₃) in the wines at the end of the fermentation.

Wine ¹⁾ No.	Strain No. ²⁾	Urea (ppm)	NH ₃	pH
1,2	RIFY YM-25, W-3	1	1	3.07, 3.25
3	IAM OC-2	1	1	3.19
4	BSJ K-7	1	1	3.26
5	BSJ K-901	2	1	3.25
6	GIB C-2	1	1	3.25
7	DBFA C2M1	1	1	3.10
8,9	YITC 8, 595	2	1	3.24, 3.17
10-17	YITC 17, 87-1, etc.	1	1	3.13-3.21

1) Wines obtained from a must of Koshu fermented with different strains of *Saccharomyces cerevisiae* at 15°C for 28-53 days.

2) RIFY: Research Institute of Fermentation, Yamanashi Univ.

IAM: Institute of Applied Microbiology, Univ. of Tokyo.

BSJ: The Brewing Society of Japan.

GIB: Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency, Tokyo.

DBFA: Department of Brewing & Fermentation, Tokyo Univ. of Agric.

YITC: The Yamanashi Industrial Technology Center, Kofu.

文 献

- 1) G. Lofroth and T. Gejvall : Science, **174**, 1248(1971)
- 2) C. S. Ough : J. Agric. Food chem., **24**, 323 (1976)
- 3) C. S. Ough, E. A. Crowell and L. A. Mooney : Am. J. Enol. Vitic., **39**, (3)243(1988)
- 4) C. S. Ough, E. A. Crowell and B. P. Gutlove : Am. J. Enol. Vitic., **39**, (3)239(1988)
- 5) 原 昌道、高橋康次郎、吉沢 淑 : 醸協、**83**, (1)64(1988)
- 6) 戸塚 昭、高橋利郎、北野一好 : 醸協、**83**, (6)420(1988)
- 7) 原 昌道、吉沢 淑、中村欽一 : 醸協、**83**, (1)57(1988)
- 8) 吉沢 淑、高橋康次郎 : 醸協、**83**, (1) 69 (1988)
- 9) 吉沢 淑、高橋康次郎、佐藤和夫 : 醸協、**83**, (1)136(1988)
- 10) 戸塚 昭、高橋利郎、北野一好 : 醸協、**83**, (6)424(1988)
- 11) 原 昌道、秋山裕一、野白喜久雄 : 特許公報, 昭和56-20830.
- 12) 吉沢 淑、高橋康次郎 : 醸協、**83**, (2) 142 (1988)
- 13) 戸田 準、富士縄昭平 : 酒研会報, No.28, P.23(1989)
- 14) 小林健文 : 酒研会報, No. 28, P. 37(1989)
- 15) C. S. Ough and G. Trioli : Am. J. Enol. Vitic., **39**, (4)303(1988)
- 16) 北本勝ひこ、小田佳緒子、五味勝也、高橋康次郎 : 日本醸造学会大会講演要旨集、P. 4 (1988)
- 17) 原 昌道、飯村 穰、五味勝也、吉沢 淑、中村欽一 : 醸協、**83**, (5)351(1988)
- 18) 田中準浩、永井英雄、中沢英五郎、三島秀夫、竹村成三 : 醸協、**84**, (6)413(1989)
- 19) 山梨県工業技術センター編 : 葡萄酒醸造法、第6版、P. 23 (1987)
- 20) Fujinawa, S. et al : J. Food Sci., 投稿中
- 21) Frank L. Joe, et al : J. Assoc. off. Anal. Chem., **60**, 509(1977)
- 22) F. F. Monteiro et al : Am. J. Enol. Vitic., **40**, 1(1989)
- 23) C. S. Ough : J. Agric. Food Chem., **24**, 323(1976)
- 24) 原 昌道、飯村 穰、五味勝也 : 私信
- 25) S. Fujinawa and G. Burns : Am. J. Enol. Vitic., 投稿中
- 26) D. J. Mcwilliam and C. S. Ough : Am. J. Enol. Vitic., **25**, 67(1974)
- 27) Food Chemical News, Jan. 11 ; Feb. 1 (1988)
- 28) C. S. Ough : At Symposium, Problem ethyl carbamate in alcoholic beverages, 14 Feb. Tokyo(1989)