

[研究報文]

6品種のブドウ果実成熟中のペプチド量の変化

福井正一・奥田 徹・高柳 勉・横塚弘毅

山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新1丁目13-1

Changes in Amount of Peptide in Juice, Skins and Seeds of Six Grape Cultivars
during Ripening

Masakazu Fukui, Tohru Okuda, Tsutomu Takayanagi and Koki Yokotsuka

The Institute of Enology and Viticulture, Kofu, Yamanashi 400-0005

Changes in the amounts of peptides in the berries (juice, skins and seeds) of six grape cultivars were examined during ripening in 1994 and 1995. Peptides were extracted effectively from the skins and seeds at pH 12 with water. The amount of peptides present in juice (the average amount for the six cultivars was 0.118 mg/L between 16 and 20°Brix) was lower than that of free amino acids (0.869 mg/L), but the amounts of peptides extracted from skins and seeds (6.46 mg/g seeds; 1.28 mg/g skins) were higher than those of free amino acids (0.356 mg/g seeds; 0.138 mg/g skins). The amounts of peptides in the juice and skin extracts of the six cultivars increased slightly or hardly changed during ripening, while peptides in the seed extracts slightly decreased or hardly changed. The presence of peptides extracted from seeds and/or skins may not be able to be ignored in terms of the flavor or taste of wines produced *via* skin contact or by fermenting on the skins (and seeds).

緒 論

ブドウの窒素化合物には、アンモニア、アミノ酸、ペプチド、タンパク質などが含まれる。ワイン発酵中、ワイン酵母の代謝にとって最も容易に利用できる窒素化合物はアンモニアと遊離アミノ酸（主に α -アミノ酸）であり、また遊離アミノ酸は高級アルコールの生成に欠かせない前駆体である。それゆえ、ブドウ成熟中の遊離アミノ酸量の変化に関する研究は多いが、日本におけるワイン用ブドウの成熟中の遊離アミノ酸量の変化に関する研究はそれほど多くない。タンパク質はワインの混濁を引き起こすことから、種々のブドウ品種の成熟中のタンパク質量の変化に関心がもたれるようになってきた（5）。これに対して、ペプチドは、ブドウやワインの品質との関連が不明であり、またペプチダーゼが発酵中のマストに存在せず、ゆえに果汁のペプチドがアミノ酸に分解され、それらが酵母の代謝に利用されないことから、我々のいくつかの報告以外に、ブドウペプチドに関する研究は見当たらない（5、6）。我々は、甲州白ワインより16のペプチドを分離精製し、それらの構造決定を行った結果（7）、呈味を有す

るいくつかのペプチドが存在することを明らかにした。また、ワインからアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示す6種類のペプチドを分離し、その構造を決定した（3）。しかし、このようなペプチドがブドウ生育中に存在するのか、あるいは発酵中に生成するのかは明らかでない。そこで、本論文では、6品種ブドウ果実を用いて、窒素化合物の中で果汁中に溶存しているペプチド量、並びに種子及び果皮から抽出可能なペプチド量の成熟中の変化を調べた。

材料と方法

ブドウ：山梨大学ワイン科学研究センター附属育種試験地で収穫したシャルドネ、セミヨン、リースリング、甲州、カベルネ・ソービニオン、マスカット・ベリーAの6品種ブドウを用いた。1994及び1995両年の8月初めから10月中旬まで10日おきに各ブドウ樹より10果房（34～151果粒/房）を収穫した。収穫した果房は、0.5%リンゴ酸、水道水、脱イオン水の順に洗浄後、ティッシュペーパーで水滴を拭いた。この果房から300果粒をとり、氷水中で果皮と種子をパルプから分けた。同じロットの300顆粒を2枚のガーゼにくるみ、手動プレスを用いて圧搾し、果汁を得た。果汁（圧搾直後に重亜硫酸カリウムを

1 g/L添加した) はプラスチック袋に入れ、 -20°C で保存した。種子と果皮は脱イオン水で洗い、水を切った後、ティッシュペーパーで水分を拭いた。果皮の窒素化合物は直ちに分析し、種子は貯蔵前に暗所、室温で風乾後、 4°C に貯蔵した。

果汁の窒素化合物の定量：果汁 5 mLを遠心分離 ($25,000 \times \text{g}$ 、20分間、 4°C) し、その上清をメンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$ 、アドバンティック) で濾過した。濾液中の遊離アミノ酸を日立アミノ酸分析機 (type L-8500A) を用いて分析し、検出された各アミノ酸の合計値を遊離アミノ酸量とした。上記の濾液を加水分解用試験管にとり、減圧乾固後、定沸点塩酸を加え、減圧下 110°C で24時間加水分解後、加水分解物のアミノ酸分析を行い、検出された各アミノ酸の合計値を総アミノ酸量とした。

果汁30 mLを遠心分離 ($25,000 \times \text{g}$ 、20分間、 4°C) し、その上清をメンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$ 、アドバンティック) で濾過した。この濾液を100倍量の水に対して 4°C で3回、3日間、セルロース膜 (cellulose tubing, 三光純薬) を用いて透析した。透析内液を上述のように酸加水分解後、アミノ酸分析し、検出された各アミノ酸の合計値をタンパク質量とした。

果汁ペプチド量は、総アミノ酸量から遊離アミノ酸量とタンパク質量を差し引いて算出した。

種子及び果皮からの窒素化合物の抽出と定量：我々は既に、種子及び果皮からの窒素化合物の抽出には、pH 12で水抽出する方法が最適であることを見出したので、本論文でも前報 (5) に従って窒素化合物の抽出を行った。

コーヒーミルを用いて粉碎した種子 3 gを30mLの水を入れた100mL容の三角フラスコに加えた。希水酸化ナトリウムあるいは希塩酸溶液を用いて、pH 12に再度調整後、 25°C で70往復/分で5時間振とう抽出した。抽出開始後2時間で振とう液のpHを12に調整し、振とうを続けた。抽出液を遠心分離 ($12,000 \times \text{g}$ 、20分間、 15°C) し、上述のように得られた沈殿をさらに2回抽出操作を行った。3回の抽出液を合わせてNo. 50C濾紙 (アドバンティック) を用いて濾過した。濾液をメンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$) で濾過し、これを種子抽出液とした。

果皮 (1品種につき10 g) をハサミで細かく刻み、

水に入れた後希水酸化ナトリウム溶液でpH 12とし、これをワーリングブレンダーを用いて15,000回転、1分間ホモジェナイズした。ホモジェネートのpHを再び12に調整後、ホモジェナイズした。ホモジェネートを $12,000 \times \text{g}$ 、20分間、 15°C で遠心した。上記の方法を用いて、得られた沈殿よりさらに2回抽出した。3回の抽出物 (約90mL) を集め、No. 50C濾紙 (アドバンティック) で濾過後、濾液をメンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$) で濾過し、得られた濾液を果皮抽出物として用いた。

種子あるいは果皮抽出物の遊離アミノ酸分析を行い、検出された各アミノ酸の合計値を遊離アミノ酸量とした。また、種子あるいは果皮抽出物を前述のように酸加水分解後アミノ酸分析し、見出された各アミノ酸の合計値を種子 (果皮) より抽出された総アミノ酸量とした。さらに、種子あるいは果皮抽出物を100倍量の水に対して 4°C で3回、3日間透析した。透析内液を酸加水分解し、アミノ酸分析分析後、検出された各アミノ酸の合計値を種子 (果皮) より抽出されたタンパク質量とした。

果汁ペプチド量は、総アミノ酸量から遊離アミノ酸量とタンパク質量を差し引いて算出した。

1995年産ブドウの果汁、種子及び果皮抽出物の総窒素量 (ケルダール窒素) は、マイクロケルダール法 (2) で測定した。「ケルダール窒素量 $\times 6.25$ 」の値をタンパク質量とした。

統計分析：エクセル統計を用いて統計分析 (分散分析とt検定) を行った。有意水準は $p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$ とした。最小有意差検定は分散分析あるいはt検定の結果に基づいて行った。

結果及び考察

本研究に用いた6品種ブドウの果粒、種子、果皮、圧搾パルプの重量、果汁液量、果汁の糖度 (可溶性固形物量、 $^{\circ}\text{Brix}$)、pH及び酸度の成熟中の変化並びにタンパク質量及びそれらの成熟中の変化はすでに報告した (5)。本論文では、ブドウ成熟中の遊離アミノ酸量の変化と対照させて、ペプチド量の変化を調べた。1994年と1995年産のブドウを試料として用いたが、ブドウ栽培用積算温度は、Amerine and Winklerの報告 (1) に従って、4月1日から10月31日までの毎日の平均気温 ($^{\circ}\text{F}$) から 50°F を差し引

いた値を加算して求めた。すなわち、栽培地である甲府の積算温度と同じ期間の降雨量は、1994年の場合4656 degree daysと624mmであり、1995年の場合4245 degree daysと674mmであった。6つのブドウ品種すべてにおいて、ベレゾン後、糖度は上昇し、酸度は減少した。果汁の糖度で判断すると、各ブドウは1995年よりも積算温度がより高い1994年のほうが早く熟した。しかし、1994年と1995年の成熟期における果汁の糖度とpHの増加カーブ並びに酸度の減少カーブの間に有意の差はなかった(5)。

ブドウやワイン中のペプチドに関する研究が進展しなかった理由の一つは、ペプチドがワインやブドウに少量しか存在せず、またペプチドのみを容易に分離する手段がないためと考えられる。先に、我々は銅塩法によるワインペプチドの分別法を報告したが、銅塩法でペプチドを分離する場合、まず試料中のペプチドを銅キレート化し、次いでイオン交換樹脂でアミノ酸銅塩とペプチド銅塩を分離せねばならず、少量の試料を多数処理することはできない(6)。そこで、本論文では、同じ試料を3つにわけ、第1の試料は、そのままアミノ酸分析して遊離アミノ酸量を測定し、第2の試料は酸加水分解後にアミノ酸分析を行い全アミノ酸量とし、第3の試料は透析して遊離アミノ酸とペプチドを除き、透析内液を酸加水分解してアミノ酸分析し、検出された全アミノ酸の合計量をタンパク質量とした。ペプチド量は、全アミノ酸量から、タンパク質量と遊離アミノ酸量を差し引いて求めた。既報で述べた平均ペプチド量とその標準偏差から推定できるように、本法ではペプチドを直接に定量していないので、正確さには欠けるが、多数の微量試料を迅速に分析するには適していると考えられた。

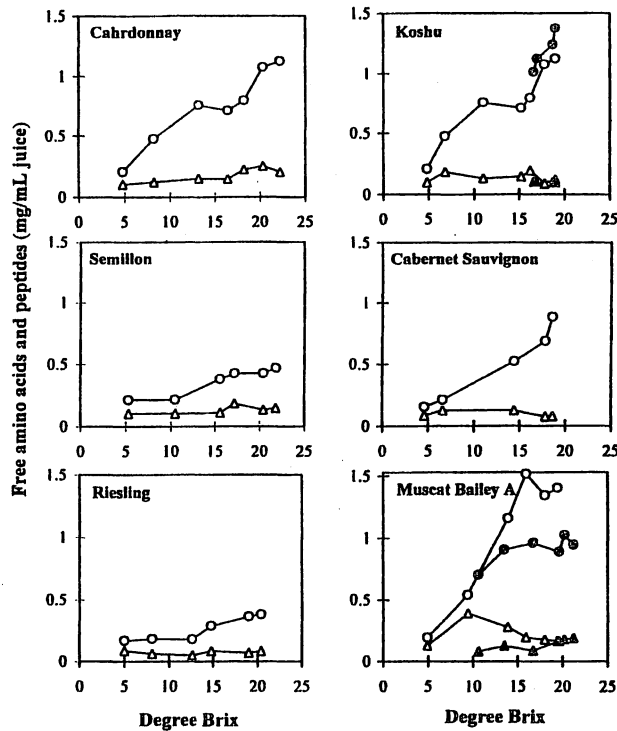


Fig. 1. Changes in free amino acids and peptides soluble in juice during ripening of six grape varieties in 1994 and 1995. Symbols: ○, free amino acids, △, peptides in 1995; ●, free amino acids, ▲, peptides in 1994.

遊離アミノ酸やペプチドの量的変化 (y軸) を図 (Fig. 1 ~ Fig. 3) に示すとき、日付 (x軸) に対して遊離アミノ酸やペプチド量をプロットすると、年によってブドウの生育速度が異なり、1994年と1995年の窒素化合物の量的変化を同じ図中で比較できないので、x軸は°Brixとした。Fig. 1は、1994年の成熟期の甲州及びマスカット・ベリーA並びに1995年成熟期における6品種ブドウ果汁の遊離アミノ酸及びペプチド量の変化を示したものである。6品種全てにおいて、ペプチド量よりも遊離アミノ酸量が非常に高かった。甲州とマスカット・ベリーAブドウ果汁のペプチド量は1994年と1995年の間で差異はなかった。遊離アミノ酸量は、糖度の上昇に伴って顕著に上昇したが、ペプチド量はやや増加あるいはほとんど変化しなかった。各ブドウの成熟中、15°Brix以上の果汁中の遊離アミノ酸とペプチド量を比較した。日本で育成されたブドウであるマスカット・ベリーA及び甲州ブドウの遊離アミノ酸量は、シャルドネを除いた他のヨーロッパ系3品種の果汁

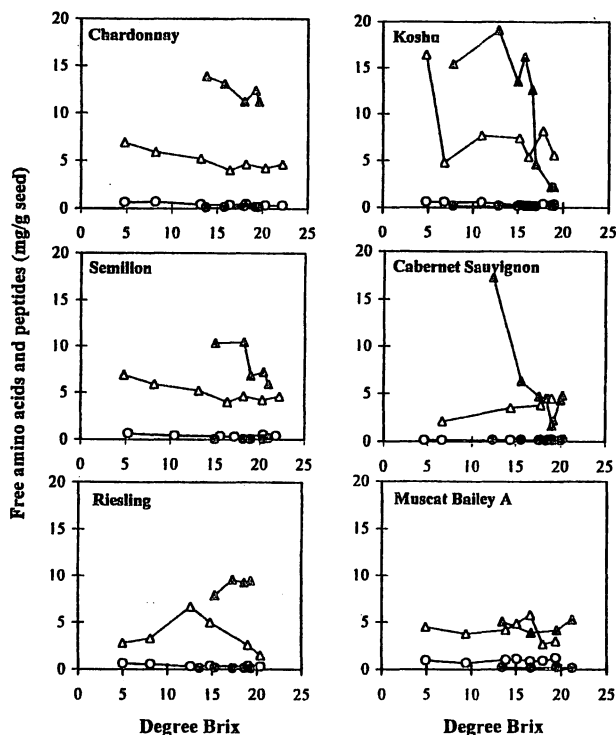


Fig. 2. Changes in free amino acids and peptides extracted from seeds during ripening of six grape varieties in 1994 and 1995. Symbols: ○, free amino acids, △, peptides in 1995; ●, free amino acids, ▲, peptides in 1994.

の遊離アミノ酸量よりも多かった ($p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$)。1994と1995両年において、カベルネ・ソービニヨンとリースリングブドウの果汁のペプチド量は他の品種のそれよりも少ない傾向が認められた ($p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$)。

果汁では、遊離アミノ酸量のほうがペプチド量よりも非常に多かった。一方、種子から抽出される遊離アミノ酸とペプチド量を比較すると、いずれの品種でもペプチド量のほうが多かった (Fig. 2)。約17 °Brix以下では、マスカット・ベリーAブドウを除いた他の5品種の種子抽出物中には1995年よりも1994年産のほうがより多いペプチドが

含まれていたが ($p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$)。遊離アミノ酸量は年による差はなかった。ブドウ品種によって変化の程度は違うが、ペプチド量は成熟の進行とともに低下するかあるいはほとんど変わらなかった。

Fig. 3に示したように、カベルネ・ソービニヨンブドウを除いて、ブドウの成熟に伴い、1995年のブドウ果皮より抽出されたペプチド量は増加したが、1994年のそれは20°Brix近くまで成熟すると、ほぼ一定になるか、あるいは減少する傾向が認められた。果皮より抽出されたペプチド量は1994年よりも1995年のほうが多く存在する傾向が示された。種子のペプチド量は

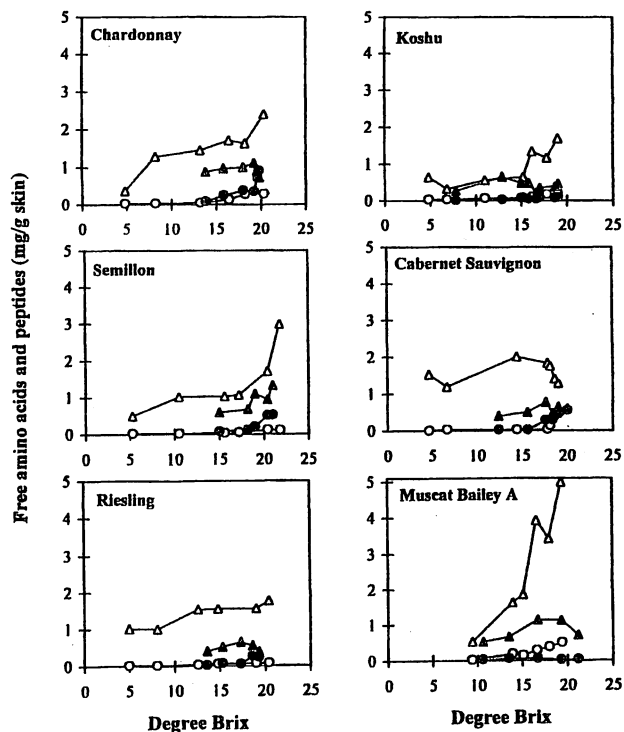


Fig. 3. Changes in free amino acids and peptides extracted from skins during ripening of six grape varieties in 1994 and 1995. Symbols: ○, free amino acids, △, peptides in 1995; ●, free amino acids, ▲, peptides in 1994.

Table 1. Average contents of soluble solids ($^{\circ}$ Brix), free amino acids, and peptides present in soluble form in juices or extracted from skins and seeds of berries of six grape varieties harvested between 16 and 20 $^{\circ}$ Brix during 1994 and 1995 seasons.

	$^{\circ}$ Brix	Free amino acids (mg/mL juice; mg/g seeds or skins)	Peptides ¹
Juice ² (mg/mL)	17.1	0.869 (78.1) ³	0.118 (10.6)
Skins ² (mg/g)		0.138 (2.7)	1.28 (25.3)
Seeds ² (mg/g)		0.356 (0.9)	6.46 (15.7)
Juice (mg/kg berries)		393.0	53.4
Skins (mg/kg berries)		15.7	145.4
Seeds (mg/kg berries)		8.6	156.3

¹ (Peptides) = (total amino acids: all amino acids found in the hydrolysates of the juices, and the extracts from seeds or skins) - (amino acids constituting proteins) - (free amino acids).

² The average weights of juice, skins, and seeds from 1 kg berries of six grape varieties were 526.6 g (491.1 mL), 104.8 g, and 23.3 g, respectively.

³ Values in parentheses are % (by weight) of the total amino acids found.

1994年のほうが多い傾向を示し、果皮と種子で異なる結果となった。種子ほどではないが、果皮の場合にも、抽出可能な遊離アミノ酸量はペプチド量よりも低かった。いずれの品種でも遊離アミノ酸量は、成熟が進むにつれてわずかに増加した。

ブドウ品種、収穫年、施肥法などによってブドウの窒素化合物量は違うので、6品種の平均値で論じたほうが窒素化合物の全体像を知るためには、醸造者にとって便利なきがある。そこで、わが国のワイン用ブドウの多くが16~20 $^{\circ}$ Brixの間で収穫されることを考慮して、Fig. 1~Fig. 3で16~20 $^{\circ}$ Brixの範囲にある6品種ブドウの遊離アミノ酸及びペプチド量の平均値をTable 1に示した。果汁には主に遊離アミノ酸が含まれるのに対して、果皮と種子からの抽出物には、遊離アミノ酸よりもペプチドのほうが多いことが分かった。また果実1kgあたりの遊離アミノ酸及びペプチド量でも同様なことが認められた。よって、白ブドウをスキンコンタクトしたり、あるいは赤ブドウを醸し発酵すれば、果汁に含まれる以上のペプチド量が果皮や種子より抽出される可能性がある。これらのペプチドのワインの風味に果たす役割の解明をすることは重要であり、そのためには本研究で用いた方法よりもさらに簡便・迅速・正確なブドウあるいはワインペプチドの定量法の開発が望まれる。

要 約

1994年と1995年のワイン用6品種ブドウの成熟中

のペプチド量の変化を調べた。果汁にはペプチド(16~20 $^{\circ}$ Brix、6品種平均、0.118mg/L)よりも遊離アミノ酸(0.869mg/L)のほうが多く含まれるが、種子や果皮から抽出されるペプチド量(種子、6.46mg/g; 果皮、1.28mg/g)は遊離アミノ酸(種子、0.356mg/g; 果皮、0.138mg/g)よりも多かった。果汁と果皮のペプチド量は成熟中やや増加するか、あるいはほとんど変化しなかった。これに対して種子ペプチド量は成熟中やや低下するか、あるいはほとんど変化しなかった。果汁に含まれるペプチド量よりも種子や果皮から抽出されるペプチド量のほうが多いので、スキンコンタクトや醸し発酵で製造されるワインの呈味において、種子あるいは果皮のペプチドの存在は無視できないと考えられる。

引用文献

1. Amerine, M A. and A. J. Winkler: Composition and quality of musts and wines of California grapes. Hilgardia, 15:493-675, 1944.
2. Horowitz, W. (ed.): A.O.A.C., 12th ed., pp. 927-928. Method 47.021. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1975.
3. Takayanagi, T. and Yokotsuka, K.: Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. Am. J. Enol. Vitic., 50:65-68, 1999.
4. Yokotsuka, K., T. Aihara, Y. Umehara, and T. Kushida: Free amino acids and peptides in

- musts and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.*, 53:631-635, 1975;
5. Yokotsuka, K. and M. Fukui: Amount of protein and amino acid composition in juice, skins, and seeds of six cultivars of grape: Changes during ripening over two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2002, 印刷中.
 6. 横塚弘毅、松土俊秀、櫛田忠衛：山梨大学発酵研究所報告、銅塩法によるワイン及びブドウ果汁中のペプチドの簡易・微量定量、15：1-8、1980.
 7. Yokotsuka, K., Y. Umehara, T. Aihara, and T. Kushida: Isolation and structural analysis of peptides in Koshu white wine. *J. Ferment. Technol.* 53:620-625, 1975.