

近年、わが国で栽培・収穫したブドウから国内で製造した**純粋な国産ワイン**が、世界の著名なワインコンペティションで金銀賞を受賞することも珍しくなくなった。これは、ブドウ栽培家やワインメーカーがブドウとワインの品質向上に不断の努力をしたことが主たる要因であることは無論であるが、これに加えて関係する研究教育機関および学術団体の存在もまた見逃せない。国内には、本学会の機関紙である「日本ブドウ・ワイン学会誌」をはじめ、いくつかの関連する学会誌が存在するが、わが国の研究者による多くの優れた研究論文が、国外の学術誌に外国語で公表され、本学会員でさえそれらの存在を見逃しがちである。日本国民の外国語能力が年々向上しているとはいうものの、外国語で書かれた論文を日本語論文と同様なスピードで理解することに困難を感じることもある。国外誌に外国語で発表された本学会員の論文を日本語の総説あるいは解説記事として紹介することは、わが国のブドウ学、ワイン学ばかりでなく、産業界の発展に寄与することが大きいと考えられる。2004年11月勝沼町“ぶどうの丘”で開催された本学会誌編集委員会は、欧米等の学術誌に既に公表された本学会員の論文を著者に依頼し、解説あるいは総説として掲載することを決定した。下記は、新企画最初の総説である。

## 【 総 説 】

### タンパク質系澱下げ剤によるワイン清澄化の化学的並びに理論的考察

横塚弘毅

山梨大学 〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

### Chemical and Theoretical Aspects of Clarification of Wines by Protein Fining Agents

Koki YOKOTSUKA

University of Yamanashi, 1-13-1 Kitashin, Kofu, 400-0005, Japan

この総説は、カリフォルニア大学の V. L. Singleton 名誉教授と筆者が 1987 年と 1995 年に *American Journal of Enology and Viticulture* に発表した「ワインフェノールとゼラチンあるいは関連したペプチドとの間の相互作用に関する研究」を解説したものである。

Koki Yokotsuka and Vernon L. Singleton: Interactive Precipitation between Graded Peptides from Gelatin and Specific Grape Tannin Fractions in Wine-like Model Solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (3): 199-206 (1987)

Koki Yokotsuka and Vernon L. Singleton: Interactive Precipitation between Phenolic Fractions and Peptides in Wine-like Model Solutions: Turbidity, Particle Size, and Residual Contents as Influenced by pH, Temperature and Peptide Concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 6 (3): 329-338 (1995)

## ワインを安定化するため、澱下げは赤ワインでも白ワインでも必要である

タンパク質系澱下げ剤を用いたワインの清澄化は、ワインより過剰なポリフェノール(タンニン)を除き、渋みを減少させ、味を滑らかにし、タンニン味を低下させるためになされる(1)。これらは主として、醸し発酵中に果皮や種子から多量のポリフェノールが抽出された赤ワインに適用されるが、わが国では白ワインでさえ、しばしばポリフェノールが過剰に含まれる場合がある。すなわち、わが国の多くの地域では、ブドウの収穫期に雨が多く、ブドウ樹は土中の水分を多量に吸収し、果実を膨潤させ、果皮を柔らかにする。柔らかい果実を除梗破砕後に強く圧搾すると、果皮から果汁に多量のポリフェノールが移行する。また、果汁の収量を上げるため、ブドウ破砕物を強く圧搾したり、あるいは梗(茎)を混ぜて圧搾したり、あるいは長時間何回も圧搾操作を繰り返したりした場合にも果皮や種子から果汁に多量のポリフェノールが抽出される。このような果汁から製造された白ワインは多量のポリフェノールを含み、不快な苦渋味をもつ。ポリフェノールに起因するワインの不安定化を除くため、しばしばタンパク質系澱下げ剤による清澄化がなされる。

## 澱下げの対象となるポリフェノールは、フラバノール三量体(プロシアニジンC)以上の大きさである

ワインのポリフェノールとしてフラボノイド型(フラボノイド骨格をもつ)フェノールと非フラボノイド型フェノールが存在する。非フラボノイド型フェノールは、ブドウ果実由来のフェノール酸、特にシナム酸の誘導体(ヒドロキシシナム酸塩)がほとんどである。これに加えて、安息香酸およびその誘導体、発酵中に生じるチロソールがワインに存在し、またワインを樽発酵や樽貯蔵すればオークの木樽から抽出されるフェノールが存在する。しかし、これらの非フラボノイド型フェノールは、ワインの清澄化や安定化の直接の対象にならないので、以下にフラボノイド型フェノールについて述べる。但し、非フラボノイド型フェノールでも、酸化によってキノンを生成し(2,3)、これらが重合してワインの変色を起こす場合にはPVP(ポリビニルピロリドン)あるいはPVPP(ポリビニルポリピロリドン)あるいは活性炭等によって変色したポリフェノールを除去する必要があるが、タンパク

質系澱下げ剤による処理の対象になることは少ないので、本編では解説しない。

ブドウやワインのフラボノイド型フェノールには、フラバノール(カテキン、フラバン-3-オール)、フラバン-3,4-ジオール、アントシアノーゲン、プロシアニジン、縮合型タンニンがある。ブドウのフラバン-3-オールとして(+)-カテキンと(-)-エピカテキンが含まれ、これらに少量の(+)-ガロカテキン、(-)-エピガロカテキン、エピカテキンとエピガロカテキンの3-ガレートがあるが、ワインには(+)-カテキンと(-)-エピカテキンが主に含まれる。これらのグリコシドは見出されていない。

ロイコアントシアニンモノマー(配糖体でないのでロイコアントシアニジンと呼ぶ方が分かりやすい)はブドウやワインには見出されていないので、アントシアノーゲン(アントシアニジンに容易に転換する)は、ダイマーあるいはそれ以上大きなフラボラン(縮合型タンニン)として存在する。ロイコアントシアニジン(無色)はフラバン-3,4-ジオールで、塩酸とともに加熱すると、3,4位で脱水が起こり、3-ケトフラバンを中間体としてアントシアニジンに酸化され、赤色を呈する。アントシアノーゲン(プロアントシアニジン、プロシアニジンとも呼ばれる)を塩酸処理して生じるアントシアニジンの名をとってそれぞれ(アントシアノーゲンがエピカテキンユニットからできていれば)ロイコシアニジン、(ガロカテキンユニットならば)ロイコデルフィニジンと呼ばれる。

フラバン-3,4-ジオールの4位の炭素とこれとは別のフラボノイドの電子に富む6位または8位の炭素との間で共有結合が起こり、二量体(ダイマー、プロシアニジンB)ができる。プロシアニジンという言葉はダイマー(フラバン2分子)と多分トリマー(フラバン3分子)のために、フラボランは3~10個のフラバン分子よりなる化合物に使われる。プロシアニジン(あるいはフラボラン)の4位の炭素に水酸基があれば、縮合反応が続き、3~4あるいはそれ以上のオリゴマー~ポリマーができる。フラバン-3,4-ジオールにカテキンが結合すれば、このダイマーの4位には反応性はなく、安定する。このようなフラボランは、通常エピカテキンユニットからなる。カテキン、フラバン-3-オール、フラボノール、タンニンは相互に反応し、より大きな分子量のタンニンとなる。タンニンは分子量約

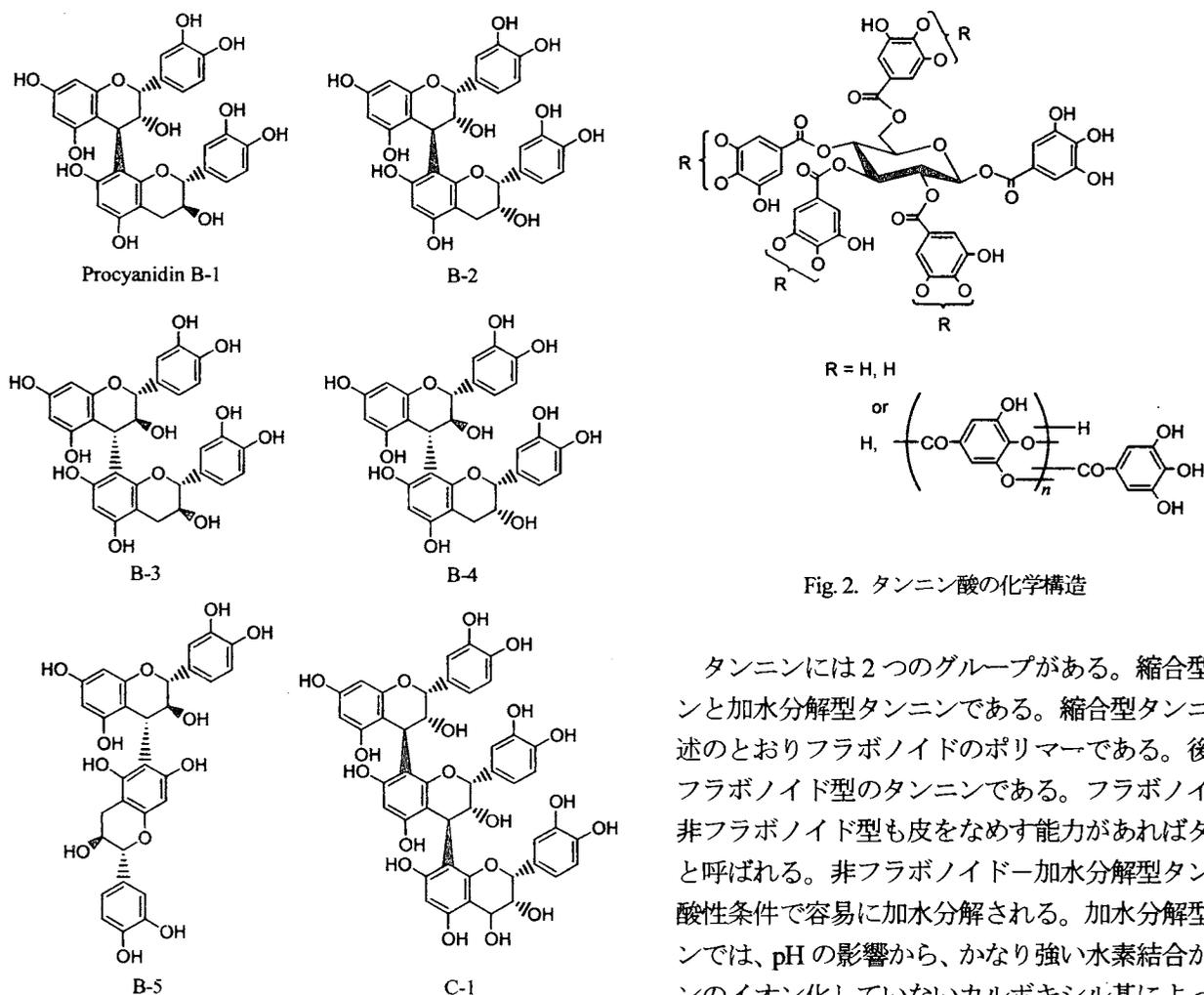


Fig. 2. タンニン酸の化学構造

Fig. 1. プロシアニジン B, C の化学構造

500~6,000 の、渋みがあり、蛋白質を沈殿させる高分子フェノールである。タンニンという言葉は、ある特定の共通した母核をもつ物質に対する化学的な呼び名ではない。もともとは、皮をなめして革にする性質をもった植物成分で、渋みがあり、比較的高分子の物質の名称として用いられていた。現在、タンニンという呼び名は、渋みのない低分子ポリフェノールも含めて、広く植物の褐変の原因となるポリフェノール成分の総称として用いられている。カテキン（またエピカテキン）の B 環は隣接した二つのヒドロキシル基をもち、酵素酸化されてキノンになる。このキノンの 6 位と第二のカテキンキノンの A 環の 6 位または 8 位の炭素が結合し、二量体（ダイマー）が形成される。このような縮合が続くと黄色から次第に褐色へと変色する。

タンニンには 2 つのグループがある。縮合型タンニンと加水分解型タンニンである。縮合型タンニンは前述のとおりフラボノイドのポリマーである。後者は非フラボノイド型のタンニンである。フラボノイド型も非フラボノイド型も皮をなめす能力があればタンニンと呼ばれる。非フラボノイド加水分解型タンニンは酸性条件で容易に加水分解される。加水分解型タンニンでは、pH の影響から、かなり強い水素結合がタンニンのイオン化していないカルボキシル基によって形成され、イオン化していないフェノール性水酸基は弱い水素結合を形成する。加水分解型タンニンは、通常の方法で製造されたワインには見出されない。このタンニンはオークの樽で長期間貯蔵されたり、オークチップを浸漬したワインに見出される。加水分解型タンニンは、ガロタンニン (gallotannin) とエラジタンニン (ellagitannin) がある。加水分解によって多価アルコールのほかエラグ酸を生じるタイプのタンニンがエラジタンニンである。ガロタンニンは鉍酸あるいはタンナーゼで加水分解すると、多価アルコールと没食子酸を生じる。代表的なガロタンニンはタンニン酸である。五倍子あるいは没食子から得られる。

ワインに存在するフラボノイド型フェノール（単にフラボノイドと書くときもある）は、最小のカテキン（またはエピカテキン、分子量 290）モノマー、その 2、3 個の重合体であるプロシアニジン B、C からエピカテキンユニット 10 個前後（約分子量 3,000）までの縮

合型タンニンが溶存している。フラボノイドの一種であるアントシアニンがカテキン、プロシアニジン、あるいはフラボランなどと縮合したタンニンも見られる。タンニンの重合度（縮合度）は果汁タンパク質と結合（親和性）し、混濁・沈殿を形成する能力と非常に関連する(4)。したがって、ある程度の分子量(500~1,000)をもつポリフェノールが、タンパク質系澱下剤によって不溶性複合体を形成させ沈殿として除去するために必要で、これに該当するのは、プロシアニジンB、Cあるいはフラボノイドオリゴマー以上の分子量をもつタンニンである。

#### 澱下剤の対象になるタンニンは果皮と種子に由来する

ブドウは梗、果皮、種子、果汁に分けられる。このうち、ポリフェノールは、梗、果皮、種子に多く含まれるが、梗をワイン醸造に利用することはまれであるので、梗由来のポリフェノールは本編の対象から除く。ブドウ(房)1kgにつき、種子は約20g、果皮約200g、残りの約780gはパルプである(山梨大学ブドウ育種試験地で収穫した赤白ブドウそれぞれ4品種の平均値、梗を除いて計算)(5)。パルプを圧搾すると、果汁とその残渣(固形物)に分かれる。赤ブドウのほうが白ブドウよりも約1.4倍多くのポリフェノールを含む。ポリフェノールはブドウ1kgあたり、白ブドウでは種子に2.6g、果皮には0.9g。赤ブドウでは種子に3.6g、果皮に1.4g含まれた。果汁にはわずかなポリフェノールしか含まれず、およそ0.3gであり、ほとんどはカftarリック酸(コーヒー酸と酒石酸のエステル)などの非フラボノイド型フェノールで、フラボノイドはブドウの破碎と圧搾のとき、種子や果皮から溶出したものである。種子の重量はわずか2%でしかないが、ブドウ全体(梗を除く)の約70%のポリフェノールが種子に存在する。一方、果皮には約25%、果汁には約5%のポリフェノールが存在する。果皮にはフラボノイドも非フラボノイド型フェノールも含まれ、ポリフェノールの種類も多い。これに対して種子はフラバノール(カテキンはフラバン-3-オール)、プロシアニジン、フラボランが含まれる。種子(粉末)を50%エタノール水溶液で浸漬することによって、これらの混合物が容易に高収量で分離される。本研究では、種子(風乾物1kg)から分離された抽出物が全フェノール画分(凍結乾燥物87g、フェノール441mg/g凍結乾燥物)用

として用いられた。

全フェノール画分から、珪藻土カラムクロマトグラフィーによって、カテキン(+エピカテキン)、プロシアニジンB(ダイマー)、エピカテキンユニット数個の重合体であるタンニンオリゴマー(トリマー、テトラマー、多分ペンタマー)、及びタンニンポリマーが分離された。このクロマトグラフィーでは、固定相として水、移動層としてエチルエーテル、酢酸エチル、1-ブタノール、および50%エタノールが用いられ、順次溶出して上記のフェノール画分が得られた。クロマトグラフィーで全フェノールの回収率は95%と極めて高収量であった。

#### タンパク質系澱下剤にはゼラチン、カゼイン、アイシングラス、オボアルブミンがある

タンパク質系澱下剤として、ゼラチン、カゼイン(ミルクプロテイン)、アイシングラス(魚の浮き袋からとれるゼラチン)、オボアルブミン(卵白に含まれるアルブミン)が用いられる。カゼインは、過剰なポリフェノールを含む白ワインの褐色の除去や色の安定化に用いられる。アイシングラスは、主として白ワインに対して用いられるが、ゼラチンに比べて縮合型タンニンに対する親和性は低い。オボアルブミンは主に赤ワインの清澄化に用いられるが、タンニンに対する親和性はゼラチンより低い。ゼラチンもまた赤ワインに対して使うのが一般的である。赤ワインは十分なタンニンを含むので、澱下剤のみが添加される。しかし、白ワインはポリフェノール含量が低いので、澱下剤の添加により過剰に清澄化され、色調が劣化したり、味が薄くなりあるいはコクがなくなり、また澱下剤(結合するタンニンが十分でない)自身はワインに残り、後に濁りを発生する原因になることさえある。それゆえ、シリカゲルやタンニン酸を澱下剤とともに添加し、過剰な澱下剤も同時に除去するのが普通である(ワインよりタンニンを除去することを目的とするとき、まずタンパク質系澱下剤を添加し、次にシリカゲルあるいはタンニン酸を添加する)。プレス白ワイン(ブドウ破碎物を圧搾すると、まずフリーラン果汁と呼ばれる質の良い果汁が約50%得られ、次に高い圧力で圧搾してプレス果汁が得られ、後者はブレンド用または低級ワインとして利用される)(4)。また、長期のスキンコンタクトを経た白ワインは、十分なタ

ンニンを含むので、澱下げ剤のみの添加でよい。ゼラチンによるワインの清澄化は、タンニンとゼラチンとの間の相互作用の結果、不溶性の複合体が生じることに基づいている。

カゼインやオボアルブミン（ウシ血清アルブミンもまた）に比して、ゼラチンのタンニンに対する親和性は非常に高い。これはゼラチンの構造や性質、特にアミノ酸組成と配列に起因している。なぜゼラチンを用いた清澄化は、タンニンに起因するワインの混濁や色調の劣化を防止するのか。なぜワインから効果的にタンニンを除去できるのか。その理由を以下に詳述する。

### ゼラチンはコラーゲンより分離されるポリペプチドである

ゼラチンはコラーゲンより熱水処理によって得られるタンパク質で、動物の皮、腱、骨中の主要な構造タンパク質である。市販ゼラチンは、骨か、子牛の皮か豚の皮の屑から、冷水での洗浄、石灰水に浸漬、酸性化、恒温水処理、濾過、濃縮、凝結、乾燥などを経てつくられる。このタンパク質は、使用する原料、抽出条件（酸処理で得られた酸性法ゼラチンとアルカリ処理で得られたアルカリ法ゼラチンがあり、前者の pH は約 4.7~5.0、後者は 8.0 である。）などによって性質が変わり、液状、粉体、粒状、シート状で供給される。アルカリ法ゼラチンの用途は写真感光材料をはじめヨーグルト、テーブルゼリー、ババロアなどの食用、ハードカプセル、ソフトカプセル、錠剤などの医薬用、あるいは接着剤などの工業用として極めて広範囲にわたる。酸性法ゼラチンはその色合いやアルカリ法ゼラチンとは異なる食感などから、ハードカプセルなどの医薬用、グミキャンディ、ソフトキャンディ、マッシュマロなどの食用に用いられている。酸性法ゼラチンはアミノ酸組成など本質的にはアルカリ法ゼラチンと異なるところは無いが、等電点が高いこと、また同じゼリー強度のアルカリ法ゼラチンに比べて一般に粘度が低くて取扱いが容易であるという特徴がある。

ゼラチンは冷水に不溶であるが、水を容易に吸収し、膨潤する。水中ではゼラチン重量の 5~9 倍の水を吸収する。水中に分散されたとき、ゼラチン溶液は高粘度となり、ゾルを形成する。ゼラチンゾルの粘性はゼラチン濃度が増すにしたがって双曲線様に増加する。これに対して、アルブミン溶液の粘性はずっと低く、ゼ

ラチンより使いやすい。粘性はゼラチンの分子量が高いほど大きいので、タンニンに対して同じ親和性を示すならば、分子量が小さなゼラチンのほうが使いやすく、ゼラチンの分子量とワインタンニンに対する親和性（清澄化力）との関連を調べる必要があった。

### ゼラチンペプチドとはゼラチンを加水分解して得られる

ゼラチンを酵素や酸で加水分解して得られる低分子ゼラチンは加水分解ゼラチン（あるいはゼラチンペプチド）と呼ばれ、調味料などの食品用、健康食品や体質改善の医薬用、シャンプーなどの化粧品用、精練などの工業用などに広く用いられている。本研究で用いたゼラチンペプチドは(株)ニッピより供給されたもので、いずれの製品も水による希釈ないし溶解が容易である。全ゼラチン（加水分解前のゼラチンを全ゼラチンと表す。）は平均分子量約 70,000 であり、これを酸加水分解して平均分子量約 10,000 のゼラチンペプチド（10,000-MW ペプチドと表す）、並びに酵素分解して平均分子量約 5,000 と 2,000 のペプチド（5,000-MW ペプチドと 2,000-MW ペプチドと表す）が得られた。これらのペプチドは多分散（各ペプチド画分は異なる大きさの分子単位からなる）であり、得られた分子量は数平均分子量と重量平均分子量として表されたものである。したがって、本研究の目的の一つであるゼラチン（ペプチド）の分子量と清澄化力（タンニンに対する親和性）を調べるためには、ゼラチンペプチドの分子量分布ができるだけ小さくなるように精製する必要がある。そこで、セルロース透析チューブ（1,000-MW、3,500-MW、5,000-MW、8,000-MW、10,000-MW、15,000-MW カットオフ）を用いた水に対する繰返し透析と Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィーによる精製がなされた。市販の 10,000-MW ペプチドを 8,000-MW カットオフ透析膜で透析し、膜内に残ったペプチドを 15,000-MW カットオフ透析膜で透析し、膜の外に出たペプチドを集めた。同様に、5,000-MW 画分を得るため、市販の 5,000-MW ペプチドを 8,000-MW カットオフ透析膜を通過し、3,500-MW カットオフ透析膜で保持されたペプチドを集めた。2,000-MW 画分に関して、3,500-MW カットオフ透析膜を通過し、1,000-MW カットオフ透析膜によって保持されたペプチドを集めた。これらのペプチドと全ゼラチンを

Sephadex G-100 カラムに供し、さらに精製するとともに、ピークの形と溶出位置から純度をチェック後、精製ゼラチン及び精製ゼラチンペプチドとした。なお、カラムは、添加したゼラチンやペプチドのゲル化を避け、粘度を最小にするためにクロマト中 40℃に保温した。

### タンパク質系澱下剤とタンニンとの4つの結合機構が推定される

タンパク質系澱下剤とタンニンとの間の結合には4つの機構が推定される。タンパク質系澱下剤に対する加水分解型タンニンと縮合型タンニンとの間の親和性に関する大きな相違は見つかっていない。タンパク質とタンニン間の結合機構として考えられるのは、共有結合、イオン結合、水素結合、あるいは疎水結合である。共有結合は、タンニンのキノイド型酸化生成物上でタンパク質のリジン残基の側鎖の求核的攻撃から生じる。リジンのカチオン性のアミド側鎖 ( $pK_{a3}=10.53$ ) とフェノレートアニオンとの間のイオン結合はフェノールの OH グループの  $pK_a$  (9~11) より大きな pH でのみ起こる。水素結合は、タンパク質のアミドカルボニルとフェノールの水酸基との間に形成される。

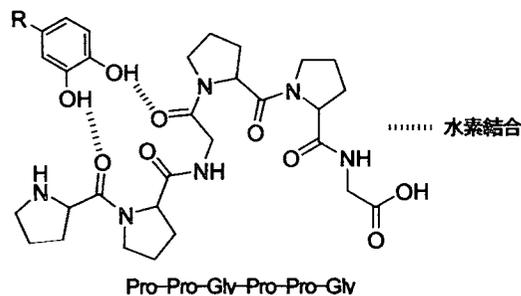


Fig. 3. ゼラチンペプチドとフェノールの結合様式

この結合は pH に依存し、フェノールの  $pK_a$  より小さな pH で生じる。タンニンの芳香核部分はフェニルアラニンのようなアミノ酸の非極性側鎖と疎水的に結合するであろう。疎水結合は pH に依存しない。これに対して縮合型タンニンによるタンパク質の沈殿は pH 依存性である。

ゼラチン-フェノール相互作用は 10%エタノール-酒石酸水溶液 (pH 3) 中で研究できる

ワインにゼラチンとタンニンを添加して、それらの相互作用を研究することが望ましいが、ワイン中には様々な成分が溶存し、系が極めて複雑なので、本研究ではモデルワイン (様溶液) 中でのタンパク質とゼラチンの相互作用を単純化して検討した。用いたモデルワインは、2 g の酒石酸を含む 0~24%エタノール水溶液 (v/v) を希 KOH 溶液で pH 2.5~4.0 に調整して作成した。タンニンポリマーは 50%エタノールに溶解し、ダイマー画分とカテキン画分はモデルワインに溶かした。ゼラチン及びゼラチンペプチドは水に溶かした。スクリーキャップ付き試験管 (16×100 cm) 中、種々の濃度のフェノール溶液 0.5 mL とゼラチン溶液 0.5 mL を混合し、モデルワイン 4 mL (計 5 mL) を加えてテスト溶液とした。糖とイオン強度の影響を調べるために、グルコース (終濃度 2~30%, w/v) と KCl (0.02~0.10 M) をモデルワインに添加した。試験管のヘッドスペースを窒素ガスで置換し、4℃、15℃、あるいは 25℃で4時間16日間放置後、生じた混濁の度合い (濁度) を濁度計で測定し、また混濁物の粒子サイズ (粒度) を遠心式粒子サイズ分布分析計で測定した。次にテスト溶液を濾過後、濾液中に溶存 (残存) しているフェノールとタンパク質 (ペプチド) 量を測定した。

### ワインボトルのヘッドスペースの空気は、ワインの短期間貯蔵中、フェノールの酸化重合に影響しない

モデルワイン中で全ゼラチン (あるいは3種のゼラチンペプチドのいずれか一つ) と3つのフェノール画分のいずれか一つを混合し、ヘッドスペースを窒素ガスで置換したものとし、15℃、2週間保存後、残存フェノール量を測定した。ヘッドスペースを窒素ガスで置換してもしなくても残存フェノール量に差異はなかった。市販ワインの場合、ワインのボトリング時にヘッドスペースは窒素ガスで置換される。ヘッドスペースの空気によってワインフェノールが酸化され、高分子タンニンが生成し、それ自身が不溶化したり、あるいは高分子タンニンとタンパク質とが結合して不溶性複合体をつくるからである。もともとテスト溶液中に溶存している空気 (酸素) によるフェノールの酸化重合が原因で不溶性タンニンの生成は起こるが、2週間の貯蔵中にヘッドスペース中の空気による酸化に起因する不溶性タンニンの生成は見られなかった。ゆえに、以下の実験では、テスト溶液の窒素ガス置換は

行わなかった。

### 糖とカリウムはゼラチン（ペプチド）とタンニンの結合に影響しないが、エタノールは不溶性複合体を可溶化する

ワインの糖濃度は、ドライワインの1%以下から貴腐ワインの数十%まで様々である。そこで、ゼラチン（ペプチド）とタンニンの結合に及ぼす糖（グルコース）の影響を調べた。調べた糖濃度は、0、2、10、15、20、25、30%である。テスト溶液を15°C、1週間保存した結果、濾過後の残存フェノール量は糖濃度に全く影響されなかった。糖はタンニン-タンパク質の結合に影響しない。

ワイン中で最も多量に含まれる金属イオンはカリウムである。ナトリウムはその数分の一に過ぎず、他の金属イオン濃度はさらに低い。そこで、KCl（終濃度0、0.02 M、0.04 M、0.06 M、0.08 M、0.10 M）を用いてタンパク質-タンニン複合体形成に及ぼす金属イオンの影響を調べた。ゼラチン（ペプチド）が存在しないフェノール単独の場合、KClを増すと残存フェノール量が15~30%減少した。これはKCl濃度の増加によってフェノールの沈殿が生成されるためであった。しかし、フェノールとゼラチンの両方が存在すると、KCl添加の影響は認められなかった。フェノールのみを含む溶液中での顕著なKCl添加効果の理由は分からなかった。

ゼラチン-タンニン複合体形成に最も影響したのはエタノールであった。エタノール濃度を増すと（0、4.8、9.5、14.3、19.0、23.8%、v/v）、残存フェノール量が増加し、フェノールの保持効果が顕著に現れた。この効果は、フェノール（全フェノール、ダイマー、タンニンポリマー）やゼラチン（無添加、ゼラチン、10,000-MW、5,000-MW、2,000-MW ペプチド）の種類によらない。タンニンポリマー（高分子タンニン）濃度が235 mg/Lで、色々な濃度のエタノールを含むモデルワインに溶かし、1週間、15°Cで保存したとき、エタノールを全く含まない場合約80%のタンニンが沈殿（約20%が残存）となるが、エタノール濃度を増加させると徐々に沈殿する割合が減り、エタノール濃度24%では全く沈殿しなかった（エタノール濃度14.3%でタンニン約25%が沈殿）。このエタノール添加効果は、タンニンと同時にゼラチン（及びペプチド）を添加しても変わらず、エタノールが全く含まれないとき約80%のフェノ

ールが沈殿するが、23.8%エタノールが存在すると約50%のタンニンが残存した（エタノール濃度14.3%でタンニン約35%が残存）。これらの結果は、エタノールは、高分子タンニンの不溶化を妨げるばかりか、ゼラチン-タンニン複合体の可溶化に役立っていることを示唆する。さらにタンパク質量/フェノール量の比が小さい（フェノール量のほうがかなり多いとき）場合、沈殿量は少ないことが推定される。したがって、ゼラチン（ペプチド）による過剰タンニンの除去を行う際、エタノール濃度に応じて添加するゼラチン量、あるいは処理条件（温度と時間）を設定する必要がある。

### 低温貯蔵はゼラチン（ペプチド）-タンニン複合体沈殿の形成を促す

テスト溶液の濁度（不溶性酸化重合体あるいはタンニン-タンパク質複合体形成による濁り）は、貯蔵温度を低くすると増加した。25°Cでの濁度を100とすると、15°Cでは110、4°Cでは138となり、低温、特に4°Cで多くの濁りが生成された。粒子サイズは、低い温度で小さく、25°Cでのサイズを100とすると、15°Cでは78、4°Cでは91となった。フェノールとゼラチン（ペプチド）の種々の組み合わせ実験を行ったが、濁度と粒子サイズに関する温度の影響は類似していた。4°C、15°Cおよび25°Cで、タンニンポリマー〔タンニンオリゴマー、あるいはフラバノール（カテキン）ダイマー（二量体）〕とゼラチン（ペプチド）との混合で形成される濁りの粒子サイズの（3つの温度で得られた値の）平均値は、それぞれ4.7、2.5、あるいは1.5 μmとなり、大きなタンニン分子（分子という表現は必ずしも適当でないが）のほうが、大きなサイズの濁りを形成した。

### pH効果—高いpHほど濁りが出やすい。ゼラチンとタンニンは水素結合によって複合体を形成する—

ゼラチン（ペプチド）が存在しない、フェノールのみが溶存するテスト溶液（完全に除タンパクされたワインに相当）では、pHを変えても新たに濁りは形成されない。酸性でフェノールはほとんどイオン化しないからである。フェノールとタンパク質を含むテスト溶液〔ゼラチン（ペプチド）-フェノール混合物〕のpHを2.5から4.5まで変化させ、生じる濁りを測定した結果、pHを2.5から約3.2まで上げると、濁りが急速に

増加したが、それ以上高い pH では濁りの度合いに変化はなかった。これらの結果から、低い pH ではフェノールがプロトン化（フェノレートアニオンがない）するほど、水に溶けにくくなり、タンパク質-フェノール結合が多くなることが分かった。プロシアニジン（カテキンやエピカテキン）タイプの縮合型タンニンでは、フェノール基の pKa 値以下では電荷をもつグループはなく、高い pH でのみフェノール性水酸基の解離によって荷電する。フェノレートイオンは、タンパク質と水素結合すべきプロトンをもたない。一方、低い pH で、タンパク質〔ゼラチン（ペプチド）〕は第4級窒素カチオンを増加させ、それら自身さらに強い水素結合供与体を求めるようになる。以上のことから、ワイン中でフェノールとゼラチン（ペプチド）とがイオン結合によって複合体を生成する可能性は低い。

KCl 添加によるイオン強度を増加させても、フェノール-ゼラチン（ペプチド）複合体による濁り生成に影響しないことを前述した。一方、温度を低くすると、ゼラチン（ペプチド）-フェノール複合体生成による濁りは増加した。イオン強度と温度が増加するに伴って、疎水結合の強さは増加することが知られている。一方、その反対の性質は水素結合に基づいた相互作用である。以上の結果は、フェノール（フェノールのベンゼン核は疎水性）とゼラチン（ゼラチンのプロリンやグリシンは疎水性）の主たる相互作用は、疎水結合によるのではなく、水素結合によることを強く示唆する。

**多量のゼラチン（ペプチド）を添加しても完全なタンニン除去はできず、ゼラチンが残る弊害のほうが大きい**

カテキンやフラバノール（カテキン）二量体（ダイマー、プロシアニジン B）は、ワインの通常の物理的条件で（pH 3.0、15°C）で、等重量のフェノールとゼラチン（ペプチド）との混合によって不溶性複合体をほとんどつとくらない。一方、タンニンオリゴマー（三量体～五量体）やタンニンポリマー（五量体～十二量体）は、ゼラチンあるいはゼラチンペプチド（2,000-MW、5,000-MW、10,000-MW）添加によって効率よく除去できる。タンニンに対する4種のゼラチン（ペプチド）の親和性はほとんど変わらない。しかし、同じゼラチン（ペプチド）に対して、タンニンポリマーのほうが

タンニンオリゴマーよりも約1.25倍多く不溶性複合体（沈殿）形成した。添加するゼラチン（ペプチド）量を増すと、より多くのタンニンを沈殿させることができた。添加ゼラチン量が 25 mg/L から 100 mg/L までは溶存しているタンニン（初発濃度 150 mg/L）量は直線的に減少し（つまり沈殿として除去される）、100 mg/L 以上の添加で除去率は下がった。つまり、フェノール濃度とゼラチン（ペプチド）濃度がほぼ同じとき、最も効率よい沈殿が得られ、フェノールよりもゼラチン（ペプチド）濃度をかなり高くしてもわずかな沈殿の増加しか得られなかった。つまり、最大沈殿量を得るため、溶存フェノール量に対する最適な添加ゼラチン量が存在することになる。

**ワインからタンパク質を除去する最も効果的な添加剤はベントナイトである。**

0.01%ベントナイトで2回処理後、80°C、6時間の加熱処理及び4°C、17時間の冷却処理後でさえ、22.4 mg/L（甲州 36 点、シャルドネ 30 点、セミヨン 30 点、マスカット・ベリー A36 点、カベルネ・ソービニオン 32 点、リースリング 10 点、計 174 点の平均値）の溶存タンパク質が確認された。非沈殿性溶存タンパク質は（市販のワインと試験ワインの両方）赤ワインと白ワインの区別なく数十 mg/L 存在する（7, 8）。一方、85 点の国産赤ワインの全フェノール（含まれるすべての種類のフェノールのこと）量は平均 1,338 mg/L であり、それらのうちの約 1,000 mg/L はフラボノイド型タンニンであることから、タンパク質に比べて多量に存在するタンニンによって不溶性複合体をつくらないタンパク質が存在することは明らかである。逆の立場で言えば、多量のゼラチンを添加しても除去できないタンニンが存在する。その中には、溶存性のタンニン-タンパク質複合体が存在しているのであろう。

**ゼラチン添加後1日間で大部分のゼラチン-タンニン複合体は生成される**

タンニンポリマーとゼラチン（ペプチド）を混合すると、はじめの1日で大部分の濁り（不溶性ゼラチン-タンニン複合体）が形成され、以後の濁りの増加はわずかである。テスト溶液中に溶存したまま残存したタンニンとゼラチンの両者は濁りの生成の度合いにほぼ比例して減少した。ゼラチン処理によるタンニン除

去は、ゼラチン添加して1日間放置後に生じた沈殿を除くことが効率的で、それ以後長く貯蔵しても澱下げ効果は小さいことは考慮する必要がある。

#### 小さいゼラチンペプチドが最も効率的なタンニン除去剤である

本研究では、全ゼラチン (70,000-MW、約 636 アミノ酸残基)、大きな (ポリ) ペプチド (10,000-MW、約 91 残基)、中程度の大きさの (ポリ) ペプチド (5,000-MW、約 45 残基)、小さな (ポリ) ペプチド (2,000-MW、約 18 残基) がタンニン除去剤として用いられた。いずれのタンニン画分に対しても、大きな全ゼラチンが最も効果的であったわけではなく、小さなポリペプチドでも全ゼラチンに匹敵するタンニン除去効果があった。一定量のタンニンポリマーとゼラチン (ペプチド) とを混合したとき、ゼラチン (ペプチド) の添加量を増すと、両者の混合比が 1:1 までは、溶存タンニン量が直線的に減少するが、それ以上多くのゼラチン (ペプチド) を添加しても、添加量に相応するタンニン減少量は得られなかった。カテキン (分子量 290)、フラバノールダイマー (分子量 580) はゼラチン (ペプチド) をほとんど沈殿させない。一方、タンニンポリマーは、いずれのゼラチン (ペプチド) 画分を添加しても沈殿を生じるが、この混合物にカテキンやフラバノールダイマーを同時に添加すると、タンニンポリマーの沈殿量を減少させた。つまり、ゼラチン (ペプチド) はカテキン、フラバノールダイマー、タンニンオリゴマー、ポリマーのすべてのフェノール画分と結合し、タンニンポリマーの沈殿形成を抑制した。このカテキンやフラバノールダイマーの効果は、タンニンポリマーとゼラチン (ペプチド) の混合後 1 週間以内に小さなフェノール画分を添加したときには見られるが、それ以降に添加しても全く効果はなかった。

前述のように、ゼラチン (ペプチド) の添加だけでは沈殿させることができないタンニンが残る。この理由の一つは、実験に用いたタンニンの組成 (ワイン中でも類似の組成と思われる) にある。カテキン以外のフェノール成分、フラバノール二量体 (ダイマー)、タンニンオリゴマーやポリマーは種子から分離された。ブドウ果実の組織の中で、種子重量は最小であるにもかかわらず (12 ブドウ品種の果実の平均種子重量は全

果実重量の約 2.4%)、種子には最も多量のタンパク質を含む (1 kg の果実に含まれる種子に平均 832 mg のタンパク質が存在する: 832 mg/種子/kg・果実と表現する) (5)。全果実に占める果皮の重量百分率 (%) は 11.4%、タンパク質は 413 mg/果皮/kg・果実; 果汁の重量%は 83.2%、タンパク質は 57 mg/果汁/kg・果実) である。種子から分離した全フェノールには平均 101 mg/g (凍結乾燥物) のタンパク質が含まれる。この全フェノールを珪藻土カラムクロマトグラフィーで分別して得られるタンニンオリゴマーとタンニンポリマーはそれぞれ 85 mg/g と 146 mg/g のタンパク質が含まれた。これらのタンパク質がフェノールの抽出中および分別中にフェノールと結合したのか、あるいは種子中で元々結合していたのかは分からないが、用いたフェノール画分には結合したタンパク質が存在し、その分ゼラチン (ペプチド) との結合部位が少なくなっていることは明らかである。このようなタンパク質-フェノール複合体の中には溶存性のものが存在し、大きなゼラチンは溶存性複合体のフェノール部分に近づくことができず、一方、小さなペプチドは結合できるのかもしれない。いずれにしても、可溶性のタンパク質-フェノール複合体の中には、多量のゼラチン (ペプチド) の添加によってさえ除去できないものがあるのかも知れない。

#### ゼラチンと類似の構造をもつ合成ペプチドはタンニンの良い沈殿剤になる

タンニンを除くためには、平均分子量約 70,000 の大きなゼラチンではなく、平均分子量約 2,000 の小さなゼラチンペプチドでも十分に効果的であった。しかし、ある一定範囲の分子量をもつゼラチンペプチドを得るには、ゼラチンの分解と加水分解されたペプチドの分別を必要とし、それにはかなりのコストと時間がかかる。そこで、類似の構造をもつ合成ペプチドを試用した。用いた合成ペプチドは (Pro-Pro-Gly)<sub>5</sub>、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>、(Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> である。それぞれの分子量は、1274、2528、1354 である。一方、赤ワインから分離したフェノールの中で、ワイン様モデル溶液中に可溶であるが、非透析性のタンニンポリマーは蒸気圧降下法で測定したところ、平均分子量約 3,500 であった。これは平均 12 量体 (カテキン単量体の分子量 290 の倍数として) のポリマーである。フラバノール

(カテキン) 二量体 (ダイマー) の分子量は 580、タンニンオリゴマーのそれは約 1,500 であった。

これら 3 つの合成ペプチドは、4 種のゼラチン (ペプチド) と同等の濁りを生成するが、沈殿の分離後、溶存して残ったフェノールとペプチド量は 30~40% も少なく (同じ添加量でゼラチンおよびゼラチンペプチドより合成ペプチドのほうがより多くのタンニンを沈殿でき、また残存するペプチドが少ない)、非常に優れた沈殿作用を示した。特に、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> をタンニン量/ペプチド量を 1:1 に添加したとき、溶存するフェノールの約 65% を除去できるが、このときに残存するペプチドはほとんどなく、添加したペプチドはほぼ完全に沈殿となり、また濁りの粒子サイズは平均 3.1 μm と小さく優れた沈殿剤となり得ることが分かった。

合成ペプチドと同時に、可溶性 PVP (ポリビニルポリピロリドン) と不溶性 PVPP を用いてタンニン除去実験を行ったが、ゼラチン (ペプチド) や合成ペプチドと同程度の添加効果しか得られなかった。

**ペプチドとタンニンは水素結合により重なり合うように結合している—ゼラチン中のグリシンの配列順序がタンニンとの親和性のキーになっている—**

ゼラチン (ペプチド) は比較的薄く、ねじれた糸のようであり、一方、タンニンは太く、棒のようである。小さなペプチドはタンニンに巻きつき密着して結合しているのであろう。恐らく、全ゼラチン (分子量約 70,000) は 1 分子以上のフェノールと結合し (フェノール/ペプチドの比 0.32-0.53)、分子量 10,000 と分子量 5,000 のゼラチンペプチドも同様であるかもしれない。もしも、フェノールを結合したゼラチン (ペプチド) 同士がフェノール間で架橋しないならば、分子量 2,000 のゼラチンペプチドや合成ペプチド 1 分子は (分子という言葉は必ずしも正確でないが)、タンニンオリゴマーあるいはタンニンポリマー 1 分子を結合しているように思える。

ワインのように種々のフェノールが含まれる系では、沈殿現象は、まずタンパク質系沈殿剤 [ゼラチン (ペプチド)] と大きなタンニンポリマーとの結合から始まる (各種ポリフェノールの沈殿の経時変化を観察すると)。そしてより小さなタンニンとの結合へと続くであろう。全ゼラチン分子に複数のタンニンが結合することによって相対的に大きなサイズの濁りの塊が作られ

ていくのであろう。沈殿物 (不溶性タンニン—ペプチド複合体) 中のフェノール/ペプチドの量比は、タンニンポリマー (分子量約 3,500) と (Pro-Pro-Gly)<sub>5</sub> の組合せで 1.10、タンニンポリマーと (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> の組合せで 0.77 であった。タンニンポリマーの分子量が約 3,500 であり、その分子量に最も近い分子量の (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> が最適の沈殿剤であることを考えると、両者は重なり合って結合しているように思える。

しかし、タンニンに対する親和性は、タンパク質 (ペプチド) の分子量というよりもアミノ酸組成や構造のほうがさらに重要であった。それは次の事実より明らかになった。分子量約 1,500 のポリプロリン (<sup>1</sup>Pro-<sup>2</sup>Pro—<sup>15</sup>Pro-<sup>16</sup>Pro、プロリン残基 16 個のポリペプチド) および分子量約 2,500 の (Pro-Gly-Pro)<sub>10</sub> はタンニンに対する親和性は低い。ポリプロリンはグリシンを含まず、一方、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> と (Pro-Gly-Pro)<sub>10</sub> との差異はグリシンの位置が前者では第 3 番目、後者では第 2 番目である。別の言い方をすれば、グリシンが第 1 か第 3 番目に存在することがタンニンに対する親和性にとって極めて重要である。(Pro-X-Gly)<sub>y</sub> ペプチドの X はプロリンでもヒドロキシプロリンでもよいが、グリシンの位置は非常に重要なのである。分子量 1,274 の (Pro-Pro-Gly)<sub>5</sub> あるいは (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> は、分子量 1,354 の (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> あるいは分子量約 70,000 の全ゼラチンと同じ重量あるいはそれ以上のフェノールを結合している。このグリシンはゼラチン (ペプチド) 分子が回転し、ねじれることを可能にし、恐らくタンニンと効率よく水素結合する構造をつくるのに役立っているのであろう。グリシンはまたプロリンと同様にペプチドの疎水性に寄与し、タンニンの疎水性のベンゼン核との間で疎水結合を形成し、一層強いタンニン—ペプチド相互作用を行っているのではなかろうか。

**(Pro-Pro-Gly)<sub>y</sub> ペプチドは最良の濁下げ剤と結論できる**

苦味、渋み、あるいは不快な味をもつフェノールをワインより選択的に完全に除去することを目的として、タンパク質系濁下げ剤を用いて清澄化するためには、酸性 pH、低温でワインを処理し、できるだけ小さな沈殿の塊を迅速に形成させるべきである。タンニンポリマーと同程度の比較的 low 分子量のゼラチンペプチドあるいはゼラチンと類似のアミノ酸配列の繰り返し構造を

もつ合成ペプチドが効果的かつ選択的にワインよりタンニン除去する。このようなタンパク質系沈殿剤はタンニンと小さな塊の澱をつくるので、最小のワインの損失で澱下げを可能にする。

### 文 献

1. Fukui, M., K. Yokotsuka, R. Ishii, M. O'Mahony, and B. Rousseau. Investigation of potential taste reduction of catechin and grape seed dimeric phenols in water by wine proteins. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 355-361 (2002).
2. Yokotsuka, K., T. Shimizu, and T. Kushida. Polyphenoloxidase from six mature grape varieties and their activities towards various phenols. *J. Ferment. Bioeng.* 71 (3): 156-162 (1991).
3. Yokotsuka, K., S. Makino, and V. L. Singleton. Polyphenol oxidase from grapes: Precipitation, re-solubilization and characterization. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (4): 293-302 (1988).
4. Yokotsuka, K., K. Nozaki, and T. Kushida. Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannins. *J. Ferment. Technol.* 61: 413-416 (1983) .
5. Yokotsuka, K. and M. Fukui. Changes in nitrogen compounds in berries of six grape cultivars during ripening over two years. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (1): 69-77 (2002).
6. Yokotsuka, K. Effect of press design and pressing pressures on grape juice components. *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1): 15-21 (1990).
7. Fukui, M. and K. Yokotsuka. Content and origin of protein in white and red wines: Changes during fermentation and maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (3): 178-188 (2003).
8. Yokotsuka, K., and V. L. Singleton. Glycoproteins: Characterization in a hybrid grape variety (Muscat Bailey A), juice, fermenting must and resultant red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 100-114 (1997).