

[研 究 報 文]

ワインの清澄化処理中におけるタンパク質の挙動のゲル電気泳動分析

横塚弘毅¹・奥田 徹¹・福井正一^{1,2}・久本雅嗣¹・高柳 勉¹・木羽信敏³

¹山梨大学大学院医学工学総合研究部、ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

²現在：フジッコワイナリー株式会社 〒409-1313 甲州市勝沼町下岩崎 2770-1

³山梨大学大学院医学工学総合研究部、工学部応用化学科 〒400-8510 甲府市武田 4-4-37

Gel Electrophoresis Analysis of Behaviors of Soluble Proteins during Clarification of White and Red Wines

Koki YOKOTSUKA¹, Tohru OKUDA¹, Masakazu FUKUI^{1,2}, Masashi HISAMOTO¹,
Tsutomu TAKAYANAGI¹ and Nobutoshi KIBA³

¹Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering & The Institute of Enology and Viticulture,
University of Yamanashi, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

²Present address, Fujicco Winery Co., Ltd. Shimo-iwasaki, Katsunuma, Koshu, Yamanashi 409-3181, Japan

³Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering & The Faculty of Engineering,
University of Yamanashi, Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan

1. Two white wines (Semillon and Chardonnay) and one red wine (Muscat Bailey A) were clarified by racking with diatomaceous earth, fining with bentonite, PVPP, or activated carbon, cooling at -4°C for 7 days, or heating at 60°C for 30 minutes, and all the above treatments were followed by filtration. The wines were also subjected to successive and combined treatment that included racking with diatomaceous earth, fining with bentonite, heating, and cooling, and all those treatments were followed by filtration. Then, soluble proteins were isolated from the untreated and the clarified wines.

2. Compared with the soluble proteins in the original (untreated) wines, approximately 60 to 70% of soluble proteins disappeared by fining with bentonite or heating, and approximately 80 to 90% of the proteins were lost by clarification with the successive and combined treatment. Furthermore, appreciable quantities of soluble proteins were removed even by the other less severe clarification methods.

3. Soluble proteins were isolated from the untreated wines and the wines after the various treatments by ammonium sulfate precipitation (0.75 saturation), and were subjected to native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE or isoelectric focusing (IEF). Based on the protein band patterns and the relative proportions of individual bands on each gel, it was found that such properties as relative mobilities of protein bands on native-PAGE, molecular weights, and isoelectric points did not differ remarkably among the wines. As a whole, the number of protein bands and the properties of soluble proteins from the untreated wines greatly differed from those of soluble proteins from the wines after heating, treatment with bentonite, or the successive and combined treatment, but were similar to those of soluble proteins from the wines after the other treatments including treatment with diatomaceous earth, PVPP, or activated carbon, or cooling.

4. The amount of clarification agent and the treatment conditions should be strictly controlled in order not to excessively lose soluble proteins that give thickness to wine and reduce astringency and bitterness of tannins in wine, because an appreciable amount of soluble proteins was removed by injudicious clarification by racking and fining, even without fining agents.

Key words: clarification, electrophoresis, fining, protein, wine

緒言

タンパク質に由来する混濁（あるいは澱）は、ワイン、特に白ワインの商品価値を落とす。また澱からワインへ不快なフレーバーが移ったり、あるいは澱に含まれる成分を栄養源にした有害な微生物（産膜酵母や酢酸菌等）の繁殖が起こることから、通常、ワインを製造した翌年の夏までに種々の清澄化処理がなされている。一般にタンパク質除去を目的としたワインの清澄化は、ベントナイト処理、あるいは冷却・加熱処理等によってなされるが、これらの処理後でさえ比較的多量のタンパク質がワインに溶存した（3、4、7、8、9、10、12、13、14）。

ワインタンパク質は主としてプロテオグリカン（多くの糖鎖が結合した糖タンパク質）とグリコプロテイン（糖タンパク質）に分かれるが（6、11、12）、セミヨン白ワインとシャルドネ白ワインから硫酸塩析及びゲル濾過で分離したグリコプロテインを二次元ゲル電気泳動で分離すると、それぞれ数十のタンパク質スポットが見られたので、そのうちのいくつかのスポットのアミノ酸配列を決定したところ、オスモチン様タンパク質、タウマチチン様タンパク質、インベルターゼ、脂質輸送タンパク質、またこれらの加水分解物（ポリペプチド）等が含まれていた（3、9）。

今までは、タンパク質に起因するワインの混濁生成や混濁の除去法に関心が集まり、ワインの品質におけるタンパク質のポジティブな役割について十分認識されてこなかった。我々はタンパク質がワインの品質に及ぼす影響を検討した結果、プロシアニジンの苦渋味は溶存タンパク質によって緩和されることを明らかにした（2）。ワインの苦渋味の緩和にタンパク質が関与することは、安定に溶存するタンパク質をできるだけ除去せずにワインの清澄化を行えば、ワインの品質向上に寄与できると考えられた。そこで、本研究では、種々の澱引き・澱下げ処理によるタンパク質の挙動を明らかにし、タンパク質を中心としたワインの適切な清澄化法を確立することを目的とした。

材料と方法

1. ワイン

2003年秋に、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3種のブドウ（シャルドネ、セミヨン、マスカット・ベリーA）を用い、同センターワイン試験工場で常法に従い、白ワイン2点（シャルドネ及びセミヨン）と赤ワイン1点（マスカット・ベリーA）を製造した。製造したワインを8,000×gで連続遠心し、上清をSeitz濾過機で濾過した。濾液にメタ重亜硫酸カリウムを添加して遊離亜硫酸が40 mg/Lとなるように調整後、15°Cの地下セラーに一夜放置した。これらのワインを2-Lガラスビンに充填し、15°Cの地下セラーに保存した。

2. 清澄化処理

2-1 珪藻土処理：ワイン3Lをガラスビンに入れ、これに珪藻土（ラヂオライト、昭和化学工業、東京）を0.05%（終濃度、w/v）になるように添加し、マグネチック・スターラーで1時間室温で攪拌し一夜放置後、吸引濾過（Filter paper 5C、185 mm、Advantec、東京）した。さらにもう一回、前と同様に濾液を珪藻土処理した。

2-2 ベントナイト処理：珪藻土処理と同様な方法でベントナイト（ベンゲル、日本有機粘土、三重県）（終濃度0.05%、w/v）処理を2回行った。

2-3 PVPP処理：珪藻土処理と同様に、ポリビニルポリピロリドン（ナカライテスク株式会社、京都）（PVPP、終濃度0.002%、w/v）処理を2回行った。

2-4 活性炭処理：珪藻土処理と同様に、活性炭（ナカライテスク株式会社、京都）（終濃度0.002%、w/v）処理を2回行った。

2-5 冷却処理：ワイン3Lをガラスビンに入れ、-4°Cで1週間貯蔵後、吸引濾過した。

2-6 加熱処理：ワイン3Lをガラスビンに入れ、湯浴中60°Cで30分間加熱したのち、室温で放置して冷却後、吸引濾過した。

2-7 組合わせ清澄化処理：ワイン8Lをガラスビンに入れ、これに珪藻土（終濃度0.05%）を加えてマグネチック・スターラーで1時間室温でよく攪拌し6時間放置後、前と同様に吸引濾過した。この操作をもう一度行った。珪藻土処理したワインにベントナイト（終濃度0.05%、w/v）を加え同様に2回処理した。得られたワインを-4°Cで1週間貯蔵後濾過し、さらに60°Cで30分間加熱した後、室温で冷却した。

3. タンパク質の分離

ワイン1.5Lを約1/3量まで40°Cで減圧濃縮した。

濃縮されたワインに硫酸アンモニウム (75%飽和) を加え 4°C で 3 日間放置後、遠心分離 (4°C、15,000×g、15 分間) し、タンパク質沈殿を得た。得られた沈殿に 50 mL の脱イオン水を加え溶解した。この溶液を透析チューブに入れ、100 倍量の脱イオン水に対して 3 日間 4 回透析した。透析内液を凍結乾燥してタンパク質画分とした。

4. タンパク質の定量

ワイン 50 mL を透析チューブ (size 36/32、カットオフ分子量 14,000、Viskase Sales、沸騰脱イオン水中で処理) に入れ、1 日間流水 (水道水) 中で透析後、さらに 2 日間 100 倍量の脱イオン水に対して 3 回、4°C で透析を行った。透析内液中の窒素をマイクロケルダール法 (5) で定量後、得られた窒素量に 6.25 を乗じてタンパク質量とした。または、試料 (透析内液の凍結乾燥物、あるいは透析内液の一部を加水分解管に入れ、減圧乾固したもの) を 6N 塩酸 (定沸点) を用い、減圧密封試験管中で 110°C、24 時間加水分解後に見出された全アミノ酸の合計値をタンパク質量とした。マイクロケルダール法とアミノ酸分析法で得たタンパク質量はよく一致した (4)。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) および (Native) -PAGE はそれぞれ Laemmli (6) および Dunn (11) の方法に従った。分離ゲルのアクリルアミド濃度は 15% とし、ゲルの染色は CBB (クマーシー・ブリリアント・ブルー G-250) で行った。試料として 1 レーン当たり 15 µg のタンパク質を供した。また、分子量マーカーは LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences、NJ、USA) を使用した。染色したゲルを落射式蛍光読取装置 epi-Light UV FA500 (タイトック) と Plug-in Degitizer (カノープス) を用いて撮影し、保存した。

等電点電気泳動 (IEF) は、Ready Strip™ IPG Strip 11 cm, pH 3 - 6 (Bio-RAD、CA、USA) と Protean IEF Cell and ReadyPrep™ 2-D Starter Kit (Bio-RAD、CA、USA) を用いて行った。等電点マーカーは Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad pI Calibration Kit (pH 3-10) (Amersham Pharmacia Biotech Inc.、NJ、USA) を用いた (3、9)。

CBB あるいは IEF ゲル染色液で染色された各タンパク質バンドの強度は Bio-Rad ChemiDoc (Hercules、CA、USA) および Quantity One™ ソフトウェア・パッケージを用いて測定した。

Table 1 Effect of clarification on soluble protein contents in Semillon and Chardonnay white table wines and Muscat Bailey A red table wine.

Clarification operation	Semillon		Chardonnay		Muscat Bailey A	
	Mean (SD ^a) (mg/L)	Recovery (%)	Mean (SD) (mg/L)	Recovery (%)	Mean (SD) (mg/L)	Recovery (%)
No treatment	309 (6.8)	100	244 (13.7)	100	181 (1.7)	100
Diatomaceous earth ^b (0.05%, w/v, X2)	278 (0.4)	90	209 (12.7)	86	131 (3.6)	72
Bentonite ^b (0.05%, w/v, X2)	104 (17.3)	34	94 (0.8)	39	53 (14.1)	29
PVPP ^b (0.02%, w/v, X2)	242 (10.0)	78	191 (1.5)	78	139 (1.5)	77
Activated carbon ^b (0.02%, w/v, X2)	228 (38.3)	74	198 (16.6)	81	79 (1.3)	44
Cooling at -4°C for 7 days ^c	201 (12.3)	65	228 (1.2)	93	72 (1.6)	40
Heating at 60°C for 30 minutes ^c	68.7 (0.85)	22	66 (1.2)	27	54 (0.8)	30
Successive and combined treatment ^d	34.9 (0.07)	11	49 (0.6)	20	25 (0.8)	14

^a Standard deviation (n = 3).

^b Filtration through a filter paper 5C (185 cm, Advantec) was conducted after the treatment with diatomaceous earth, bentonite, PVPP, or activated carbon.

^c Filtration through a filter paper 5C (185 cm, Advantec) was conducted after cooling or heating.

^d Successive and combined treatment consisted of racking with diatomaceous earth, fining with bentonite, cooling, and heating. Filtration was conducted after each clarification operation.

結果と考察

清澄化および澱下げ処理によるタンパク質量の変化

澱下げは、ワインの外観(濁りや色)を改善し、オフ・フレーバーを除き、製造後数ヶ月あるいは数年経て顕在化するワインの欠点を予め除くことが目的である。一方、一般的にいえば、珪藻土添加の主たる目的は、濾過膜の目詰まりを防止して濾過をスムーズにし、また高価なフィルターパッドを長持ちさせることであり、澱下げ剤としては用いられない。しかし、澱下げや加熱、冷却後のワインを濾過する際、これをワインに添加後デプス型フィルターでの濾過は一般に行われているので、まず珪藻土添加の影響を調べた。Table 1 で明らかのように、2つの白ワインの場合、無処理ワインのタンパク質量の約 10%、赤ワインの場合、約 30%のタンパク質が珪藻土を用いた濾過によって失われた。タンパク質やポリフェノール(タンパク質はポリフェノールと結合しているので)に吸着能のある珪藻土中の不溶性不純物の存在、また濾過フィルターそのものへの吸着が起こることが推定された。

活性炭は、タンパク質を除去するための澱下げ剤ではないが、オフ・フレーバーや褐変またピンキングを減少させるためによく用いられ、また PVPP との組み合わせで使用される場合があるので、活性炭と PVPP が溶存タンパク質量に影響するか否かを調べた。その結果、PVPP は無処理ワインのタンパク質量の約 20%を除去し、活性炭は白ワインのタンパク質量の約 20~25%を、赤ワインのそれの約 55%を除いた。後に述べるように、3つのワインから得られたタンパク質の pI は 3.4 から 6.3 の範囲にあるので、ワインの pH で大部分のタンパク質は負に帯電し、正に帯電したベントナイトと凝集しやすく、ほとんどのタンパク質は沈殿除去されると予想された。しかし、本実験では3種のワインのベントナイト処理後でも、処理前のタンパク質量の 30~40%が溶存していた。

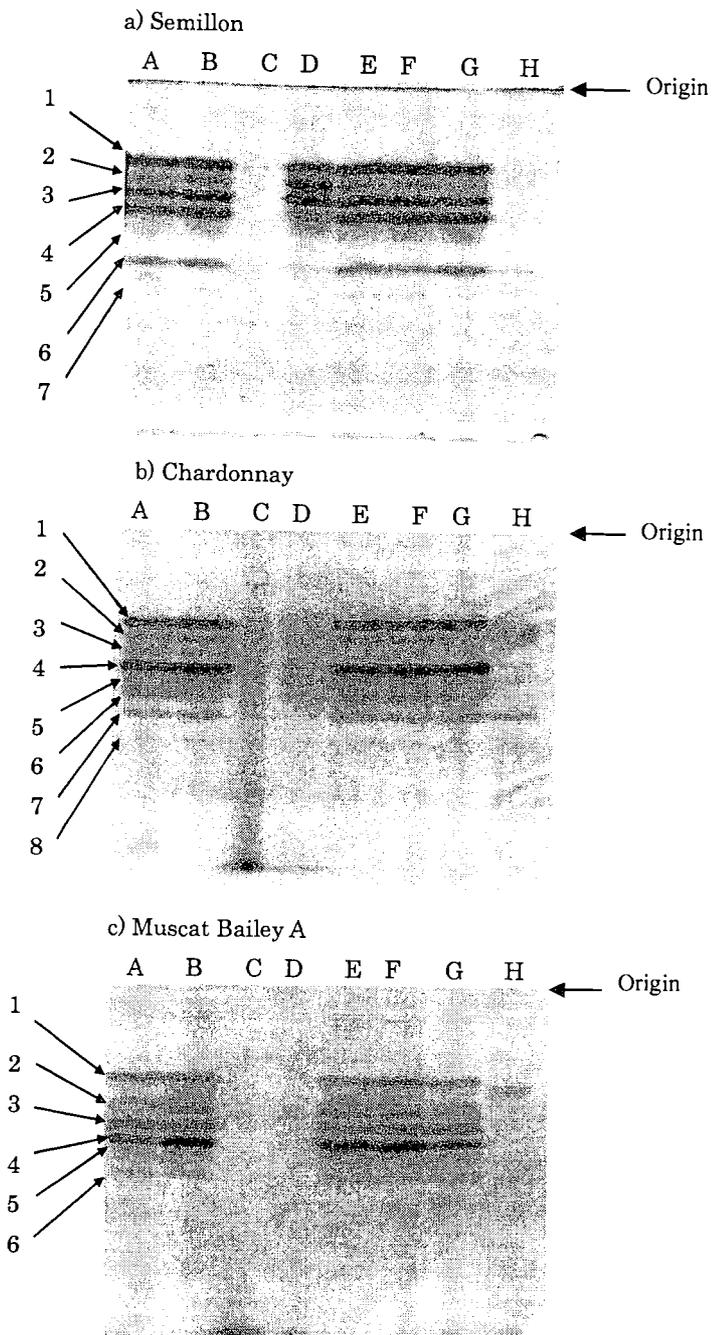


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation from two white wines (Semillon and Chardonnay) and one red wine (Muscat Bailey A) before and after various treatments for racking and fining. Lanes A to H visualized by CBB staining; bands designated by numbers 1 to 8. Lane A, untreated wine; lane B, racking with diatomaceous earth; lane C, successive and combined treatment of racking with diatomaceous earth, fining with bentonite, cooling, and heating; lane D, fining with bentonite; lane E, fining with PVPP; lane F, fining with activated carbon; lane G, cooling; and lane H, heating.

Table 2 Relative proportions of individual protein bands separated by PAGE of soluble proteins isolated by ammonium sulfate precipitation after clarification of Semillon white, Chardonnay white, or Muscat Bailey A red wines.

Protein fraction band	Relative mobility	(A) Original wine	(B) Racking with diatomaceous earth ^a	(C) Successive and combined treatment ^a	Relative proportions (%) of individual protein bands found				
					Fining with				
					(D) Bentonite ^a	(E) PVPP ^a	(F) Activated carbon ^a	(G) Cooling ^a	(H) Heating ^a
Semillon									
1	0.24	27.8	26.1	n.d. ^b	33.6	28.0	28.9	25.1	0
2	0.30	7.3	8.2	n.d.	21.4	8.1	7.2	5.8	15.6
3	0.34	19.8	18.9	n.d.	19.0	19.0	16.5	15.0	0
4	0.39	27.4	25.2	n.d.	16.3	25.4	26.1	27.4	29.0
5	0.45	f.b. ^c	26.0	n.d.	21.0	20.0	4.6	4.4	14.5
6	0.56	15.9	16.8	n.d.	5.4	15.1	3.4	18.6	43.2
7	0.63	1.9	22.0	n.d.	2.3	24.0	3.2	3.7	23.7
		100	100		100	100	100	100	100
Chardonnay									
1	0.28	23.6	26.4	n.d.	0	25.7	26.3	25.6	0
2	0.32	8.1	8.3	n.d.	46.1	8.5	10.3	4.3	60.5
3	0.36	4.0	3.5	n.d.	0	3.5	2.9	1.7	0
4	0.42	40.8	38.0	n.d.	15.5	37.6	32.6	42.0	3.4
5	0.44	5.5	5.4	n.d.	19.6	5.0	7.0	7.1	0
6	0.49	6.8	7.0	n.d.	18.8	7.9	11.2	6.4	0
7	0.55	9.8	8.4	n.d.	0	9.2	8.1	11.7	27.6
8	0.63	1.5	3.0	n.d.	0	2.7	1.7	1.1	8.4
		100	100		100	100	100	100	100
Muscat Bailey A									
1	0.27	20.4	16.0	n.d. ^b	n.d.	15.4	20.0	18.7	0
2	0.35	3.5	20.1	n.d.	n.d.	18.8	16.1	14.5	54.2
3	0.41	26.4	16.3	n.d.	n.d.	15.2	18.0	24.5	0
4	0.45	34.6	32.0	n.d.	n.d.	39.8	31.6	31.2	16.7
5	0.48	4.5	11.8	n.d.	n.d.	5.7	10.5	5.5	0
6	0.54	10.6	3.8	n.d.	n.d.	5.1	3.7	5.5	29.0
		100	100			100	100	100	100

^a See the footnotes in Table 1.

^b not detected.

^c faintish band.

冷却処理は主に酒石酸塩による混濁を除去するためになされるが、 -4°C で1週間の冷却によって、セミヨンワインのタンパク質の約35%、シャルドネワインのその約7%、マスカット・ベリーA赤ワインのその約60%が除去された。一方、並級ワインの微生物殺菌とタンパク質安定化のためによく用いられる加熱処理は、いずれのワインからも約70~80%のタンパク質を除去した。市販の並級ワインの多くは、珪藻土添加による濾過、ペントナイト処理、冷却処理、加熱処理を行った後に市販されるので、これらを組合わせたときのタンパク質量の変化を調べたところ、3種のワインともに80~90%のタンパク質が除去された。

清澄化処理中のタンパク質の挙動の Native-PAGE による分析

ワインおよび各種処理後のワインから硫酸塩析によって溶存タンパク質を分離し、これをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。Fig. 1は電気泳動図を、Table 2はゲル電気泳動で分離した各タンパク質バンドの相対濃度を示している。

セミヨン白ワインの場合、7つのバンドが認められた。組合わせ清澄化処理 (Fig. 1aのC) 後は全くバンドが認められず、また加熱 (Fig. 1aのH) 後には微かなバンド6が認められるだけであったが、他の処理後のバンド数は、無処理ワインと同じであった。マイクロゲル分析およびアミノ酸分析では試料中にタンパク質が存在するにもかかわらず、バンドが認められない理由は不明であるが、多量に結合した糖鎖あるいはタンニンなどの影響により、染色されないタンパク質が存在すると考えられた。これらの点は今後の解析が必要である。一方、無処理ワインの各バンドの相対濃度と冷却処理後のワインの各バンドの相対濃度は類似していた。

シャルドネ白ワインの場合、無処理ワインの泳動パターン (Fig. 1b中のA) と珪藻土処理 (B)、PVPPP処理 (E)、活性炭処理 (F)、あるいは冷却処理 (G) 後に得られたタンパク質の泳動パターンは類似し、各バンドの相対濃度もまた類似していた。

マスカット・ベリーA赤ワインの場合、無処理ワインの泳動パターン (Fig. 1cのA) と珪藻土処

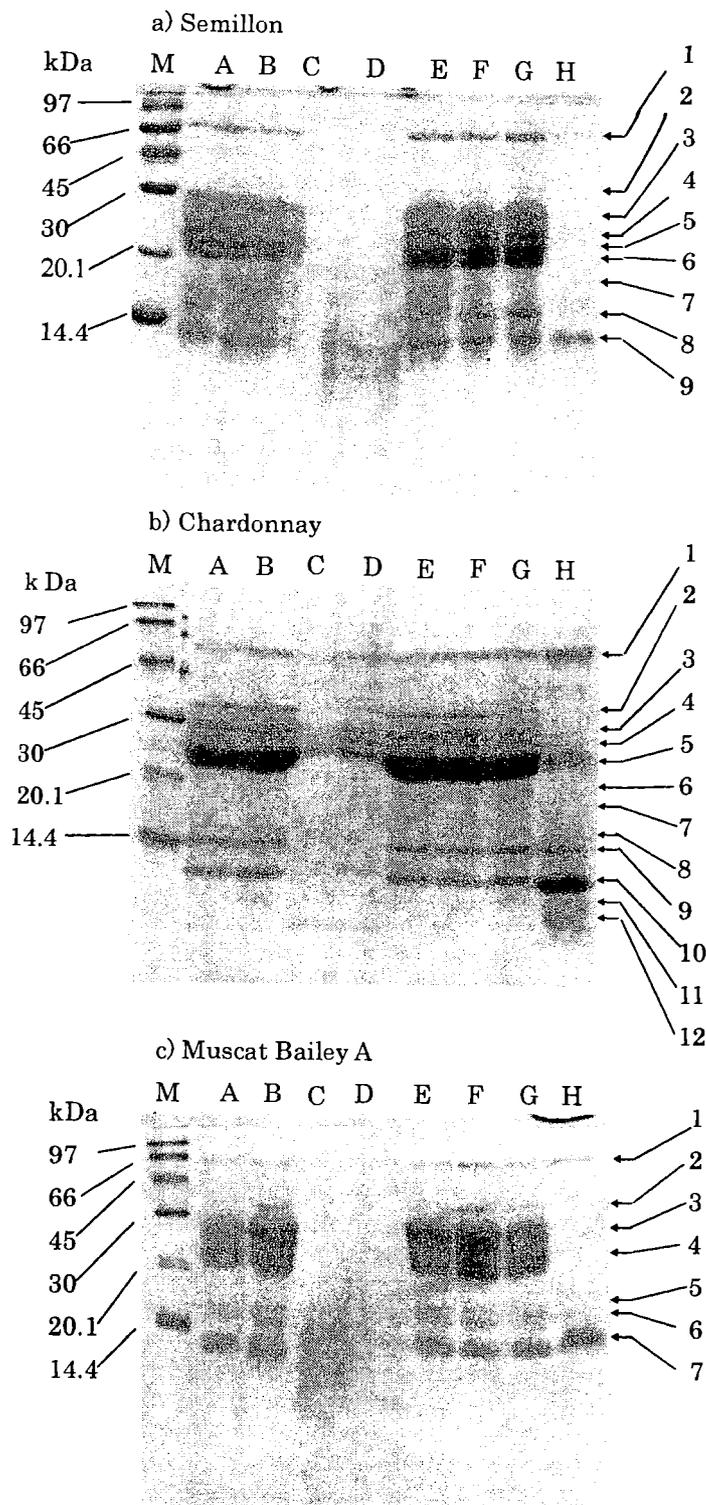


Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation from two white wines (Semillon and Chardonnay) and one red wine (Muscat Bailey A) before and after various treatments for racking and fining. Lanes A to H visualized by CBB staining; bands designated by numbers 1 to 12. Lane M, molecular weight marker, lanes A to H, see descriptions listed in Fig. 1.

Table 3 Relative proportions of individual protein bands separated by SDS-PAGE of soluble proteins isolated by ammonium sulfate precipitation after clarification of Semillon white, Chardonnay white and Muscat Bailey A red wines.

Protein fraction band	M.W. (kDa)	Relative proportions (%) of individual protein bands found							
		(A) Original wine	(B) Racking with diatomaceous earth ^a	(C) Successive and combined treatment ^a	Fining with				
					(D) Bentonite ^a	(E) PVPP ^a	(F) Activated carbon ^a	(G) Cooling ^a	(H) Heating ^a
Semillon									
1	66.0	5.3	5.3	n.d. ^b	n.d.	6.2	6.5	4.5	8.9
2	32.5	0.1	0.9	n.d.	n.d.	0.5	0.5	0.5	0
3	28.0	10.9	11.3	n.d.	n.d.	7.5	7.2	7.8	0
4	24.0	9.6	11.3	n.d.	n.d.	10.3	8.2	10.1	4.7
5	21.2	20.9	19.5	n.d.	n.d.	17.5	15.2	15.0	5.2
6	20.1	24.0	19.2	n.d.	n.d.	42.2	34.1	32.5	0
7	17.2	1.0	11.0	n.d.	n.d.	2.8	0.5	0.8	0
8	15.2	5.1	2.1	n.d.	n.d.	1.0	10.5	11.8	0
9	13.2	23.1	19.4	n.d.	n.d.	12.0	17.3	17.0	81.2
		100	100			100	100	100	100
Chardonnay									
1	58.0	4.2	6.2	8.4	18.4	5.7	5.2	6.2	17.2
2	34.0	3.5	4.0	0	6.9	5.0	5.3	1.1	0
3	28.9	6.8	5.7	5.5	10.4	6.2	4.2	2.2	2.4
4	26.0	3.2	2.9	7.6	8.7	3.3	2.6	3.3	2.7
5	22.4	54.9	48.9	63.8	43.8	50.3	55.2	54.8	23.2
6	19.0	0.2	1.1	0	0	2.3	0.2	0.5	0
7	17.0	0.8	0.6	0	0	2.0	0.2	0.9	0
8	15.1	0.8	0.8	0	0	0.7	0.3	0.5	0
9	14.3	12.3	10.2	6.1	4.7	10.6	11.5	12.4	12.6
10	13.0	12.0	15.5	8.6	7.1	13.9	15.2	18.1	36.3
11	12.2	0.7	2.2	0	0	0	0.1	0	3.0
12	10.2	0.6	1.9	0	0	0	0	0	2.6
		100	100	100	100	100	100	100	100
Muscat Bailey A									
1	60.0	2.6	2.8	n.d.	n.d.	3.7	7.2	3.9	9.5
2	34.8	1.3	1.6	n.d.	n.d.	0.4	5.0	1.2	0
3	25.1	12.3	36.8	n.d.	n.d.	41.2	37.1	19.5	8.8
4	20.7	41.2	18.8	n.d.	n.d.	24.0	28.1	46.3	0
5	16.0	0.8	0.8	n.d.	n.d.	2.6	0.9	1.5	0
6	14.9	3.2	3.3	n.d.	n.d.	7.6	3.3	2.3	3.5
7	13.0	38.6	35.9	n.d.	n.d.	20.3	18.4	25.3	78.2
		100	100			100	100	100	100

^a See the footnotes in Table 1.

^b not detected.

理 (B)、PVPP 処理 (E)、活性炭処理 (F)、あるいは冷却処理 (G) 後に得られたタンパク質の泳動パターンは類似し、各バンドの相対濃度もまた類似していた。組合わせ清澄化処理 (C) とベントナイト処理 (D) 後にはバンドは全く見えず、加熱 (H) 後にも 3 本の微かなバンドしか認められなかった。各バンドの相対的濃度は、処理法で若干の差はあるが、無処理ワイン (A)、珪藻土処理ワイン (B)、PVPP 処理ワイン (E)、活性炭処理ワイン (F)、冷却処理ワイン (G) の間で類似していた。

清澄化処理中のタンパク質の挙動の SDS-PAGE による分析

加熱・冷却および各種清澄化剤を用いた処理前後のワインタンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を行った (Fig. 2, Table 3)。

セミヨンワインには 13.2 kDa~66 kDa をもつ 9 つのバンドが見出された (Fig. 2a)。主なタンパク質バンドは、66.0 kDa、28.0 kDa、24 kDa、21.2 kDa、20.1 kDa、13.2 kDa の 6 つであった。組合わせ清澄化処理 (Fig. 2a の C) 後とベントナイト処理 (Fig. 2a の D) 後には明確なバンドが検出できず、また加熱後 (Fig. 2a の H) には 13.2 kDa の小さな分子量をもつタンパク質のみが残った。PVPP、活性炭および冷却処理後のタンパク質バンドパターンは、無処理ワイン (Fig. 2a の A) のタンパク質バンドパターンと類似していた。

シャルドネワインには、10.2 kDa~58.0 kDa の 12 のタンパク質バンドが見出され、13.0 kDa、14.3 kDa および 22.4 kDa の分子量をもつタンパク質が主要なバンドであった (Fig. 2b の a)。加熱処理 (H)、ベントナイト処理 (D)、および組合わせ清澄化処理 (C) 後のバンドパターンは類似し、これらの処理によっても 58 kDa、22.4 kDa、14.3 kDa、26.0 kDa、28.9 kDa および 13.0 kDa の 6 つのタンパク質バンドは消失しなかった。

マスカット・ベリー A ワインの場合、13.0 kDa~60.0 kDa の 7 つのタンパク質バンドが見出され、主要なバンドは 20.7 kDa と 13.0 kDa の分子量であった。ベントナイト処理後と組合わせ処理後のワインには明確なバンドがなかったが、加熱後ワインには 13.0 kDa、14.9 kDa、25.1 kDa および 60.0 kDa の 4 つのバンドが認められた。

以上の 3 種のワインのいずれの中にも、種々の清澄

化処理でも除去されない約 13 kDa、約 22~24 kDa および約 60 kDa のタンパク質が溶存することが分かった。

清澄化処理中のタンパク質の挙動の等電点電気泳動 (IEF) による分析

清澄化処理前後のワインの溶存タンパク質を IEF を用いて分析した (Fig. 3, Table 4)。セミヨンワインでは pI 3.4~pI 5.3 の 12 のタンパク質 (ポリペプチド) が認められた。いくつかのバンドで若干の差異はあるが、無処理ワイン (Fig. 3a の A) の溶存タンパク質のバンドパターンあるいは各相対バンド濃度は、珪藻土処理 (Fig. 3 の B)、ベントナイト処理 (D)、PVPP 処理 (E)、活性炭処理 (F)、冷却処理 (G) 後のワインのそれらと大きな差はなかった。また各処理を行った後にワインに溶存しているタンパク質に対応するバンドの相対濃度の間で大きな差はなかった。一方、組合わせ清澄化処理後 (C) と加熱後 (H) のワイン中のタンパク質の泳動パターンや各バンドの相対濃度は類似したが、無処理 (A) および他の処理後 (B、D、E、F、G) のそれらとかなり異なった。

シャルドネワインは pI 3.4~pI 5.9 の 12 のタンパク質を含んだ (Fig. 3b, Table 4)。組合わせ清澄化処理 (Fig. 3b の B) 後のワインには pI 4.1 と pI 5.9 の 2 つのバンドしか認められなかった。また、加熱 (Fig. 3b の H) 後のワインには pI 3.4、pI 3.8 および pI 4.1 の 3 本のバンドと pI 4.7 と pI 5.1 の計 5 本のバンドのみが、ベントナイト処理 (Fig. 3b の D) 後のワインには pI 4.1 と pI 5.3 の 2 本のバンドのみが見出された。清澄化処理によって溶存タンパク質量 (Table 1) およびバンド数ともに大きく減少した (Fig. 3)。

マスカット・ベリー A ワイン (Fig. 3c の A) は pI 3.4~pI 6.3 の 12 本のタンパク質バンドが見出された。組合わせ清澄化処理 (Fig. 3c の B) とベントナイト処理 (Fig. 3c の D) 後のワインを除いて、無処理ワインと他の処理後のワインの泳動パターンと各バンドの相対濃度は、多少の差異があるものの、類似していた。

このように、等電点電気泳動による分析では、加熱、ベントナイト処理及び組合わせ清澄化処理によって、ワインの溶存タンパク質は量的にも質的にも大きな変化を受けることが分かった。

近年の無濾過ワインの流行に見られるように、消費者はワインの外見よりも呈味の優れたものを選択する

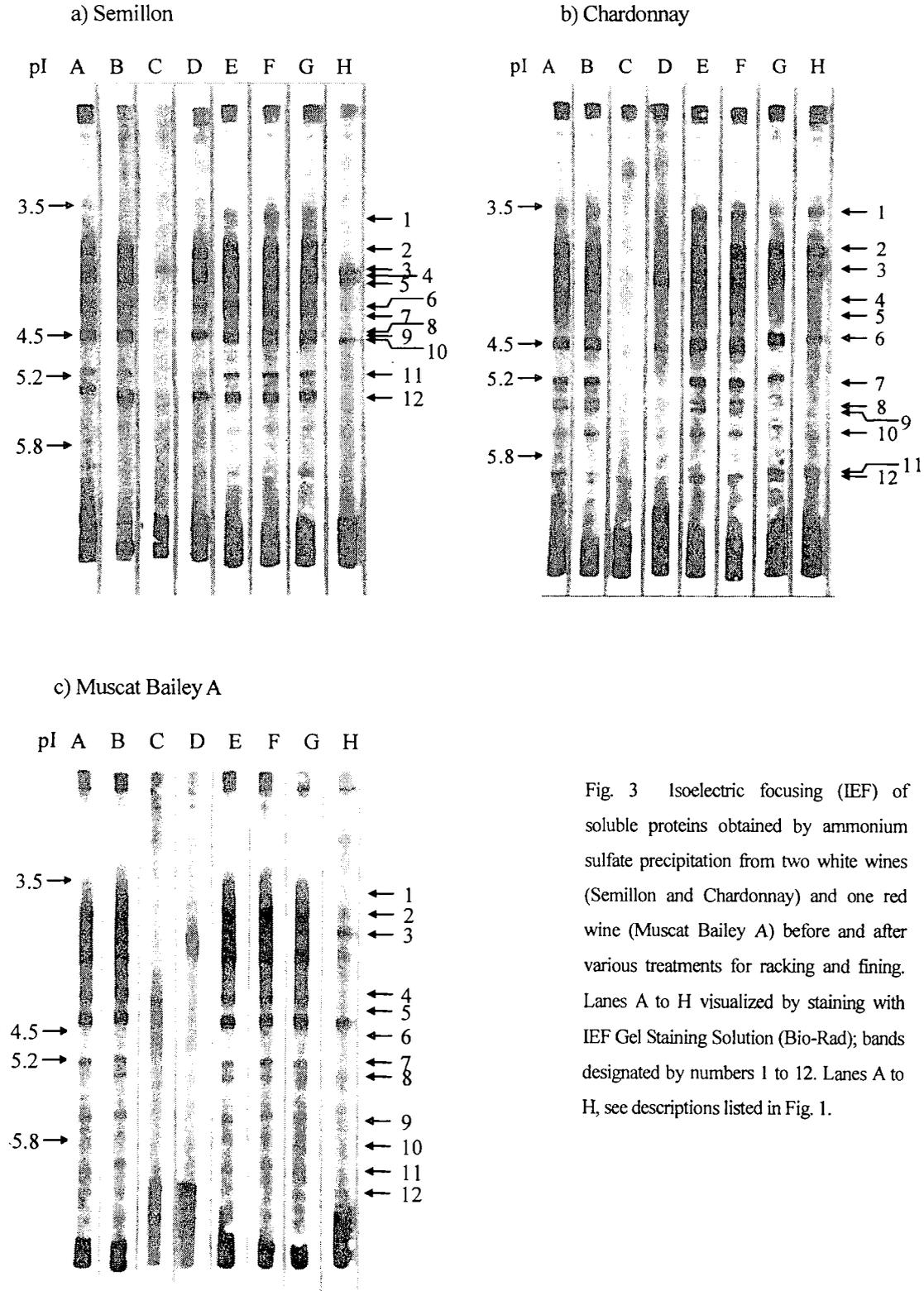


Fig. 3 Isoelectric focusing (IEF) of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation from two white wines (Semillon and Chardonnay) and one red wine (Muscat Bailey A) before and after various treatments for racking and fining. Lanes A to H visualized by staining with IEF Gel Staining Solution (Bio-Rad); bands designated by numbers 1 to 12. Lanes A to H, see descriptions listed in Fig. 1.

Table 4 Relative proportions of individual protein bands separated by IEF of soluble proteins isolated by ammonium sulfate precipitation after clarification of Semillon white, Chardonnay white and Muscat Bailey A red wines.

Protein fraction band	pI	Relative proportions (%) of individual protein bands found							
		(A) Original wine	(B) Racking with diatomaceous earth ^a	(C) Successive and combined treatment ^a	Fining with				
					(D) Bentonite ^a	(E) PVPP ^a	(F) Activated carbon ^a	(G) Cooling ^a	(H) Heating ^a
Semillon									
1	3.4	3.5	0	0	0	8.0	9.1	14.3	0
2	3.9	17.1	25.5	0	27.0	22.6	20.3	25.5	0
3	4.1	—	22.0	82.9	—	—	—	—	42.8
4	4.1	14.4	—	0	34.0	25.8	27.3	18.6	0
5	4.2	—	—	—	—	—	—	—	35.0
6	4.4	7.3	5.7	0	9.6	10.9	8.1	9.0	0
7	4.5	6.8	3.9	0	5.0	5.6	6.2	6.6	0
8	4.7	5.9	—	17.1	—	7.3	—	—	0
9	4.7	0	15.7	0	12.0	0	14.3	12.6	0
10	4.7	13.4	—	—	—	3.9	—	—	17.5
11	5.1	11.3	6.4	0	1.8	5.2	5.4	4.1	4.7
12	5.3	20.3	20.7	0	10.6	10.7	9.4	9.2	0
		100	100	100	100	100	100	100	100
Chardonnay									
1	3.4	8.9	8.3	0	0	17.1	13.8	7.4	24.7
2	3.8	7.7	11.2	0	0	17.6	17.7	15.4	33.2
3	4.1	9.3	12.2	43.3	55.3	10.4	9.6	16.3	20.9
4	4.4	5.2	4.2	0	0	0	0	0	0
5	4.5	7.2	7.1	0	0	6.8	0	0	0
6	4.7	17.6	14.1	0	26.5	12.9	13.1	20.7	17.0
7	5.1	12.6	12.4	0	9.4	10.3	15.4	19.3	4.3
8	5.3	4.1	6.0	0	8.8	5.0	6.4	6.6	0
9	5.3	7.0	6.9	0	0	4.6	8.8	0	0
10	5.6	9.5	8.4	0	0	7.3	7.2	0	0
11	5.9	10.8	4.3	56.7	0	7.9	8.1	9.1	0
12	6.0	0	4.9	0	0	0	0	5.1	0
		100	100	100	100	100	100	100	100
Muscat Bailey A									
1	3.4	6.1	0	0	0	6.2	0	0	0
2	3.7	14.7	13.1	0	0	11.6	23.5	16.8	12.1
3	3.9	4.2	13.6	0	0	0	0	0	23.4
4	4.1	11.8	7.6	0	100	11.6	9.4	10.7	10.1
5	4.5	12.3	12.2	0	0	12.4	11.8	10.7	0
6	4.7	18.3	19.2	100	0	19.2	16.5	20.5	30.0
7	5.0	11.5	9.2	0	0	10.8	10.5	8.4	0
8	5.2	0	7.7	0	0	7.3	7.0	7.9	7.3
9	5.6	3.9	7.2	0	0	6.6	6.6	5.1	7.1
10	5.8	3.9	5.0	0	0	4.6	6.0	3.5	0
11	6.1	8.2	5.2	0	0	5.6	8.6	9.4	0
12	6.3	5.1	0	0	0	4.1	0	7.0	10.1
		100	100	100	100	100	100	100	100

^a See the footnotes in Table 1.

ように変化しつつあると考えられる。従って、タンパク質による混濁を出さない程度で、今まで以上にワインの呈味を考慮した清澄化法を開発する必要がある。今回の実験により、ワイン中のタンパク質は清澄化処理により大きな影響を受け、処理方法の違いにより、タンパク質の種類や量が異なることを明らかになった。今後、ワインの呈味や安定性に対する各タンパク質の効果を詳細に検討したうえで、必要なタンパク質を残し、ワインの不安定化（混濁形成など）に關与するタンパク質だけを除去する清澄化法を検討する必要がある。

要 約

1. セミヨン白ワイン、シャルドネ白ワインおよびマスカット・ベリーA 赤ワインを珪藻土添加後の濾過、ベントナイト処理、PVPP 処理、活性炭処理、冷却処理、加熱処理、および珪藻土・ベントナイト・冷却・加熱の連続・組み合わせ処理を行い、処理前後のタンパク質量および溶存タンパク質の種類と性質を調べた。

2. ベントナイト処理と加熱によって約 60%~70% のタンパク質が消失し、また組み合わせ処理によって約 80~90% のタンパク質が消失したが、他の処理によってもかなり多量のタンパク質が失われた。

3. ゲル電気泳動パターンと各バンドの相対濃度の分析から、タンパク質の数と性質 (Native PAGE における相対移動度、分子量および等電点) は各ワイン間でそれほど大きな差はなかった。概して、無処理ワインのタンパク質の数と性質は、加熱、ベントナイト処理および組み合わせ清澄化処理後のワインのそれらと非常に異なったが、その他の処理 (珪藻土処理、PVPP 処理、活性炭処理および冷却処理) とはかなり類似していた。

4. タンパク質澱下剤を用いない処理でも、かなり多量のタンパク質が除去されるので、各処理に使用する澱下剤の量やその他の処理条件を厳密にコントロールし、苦渋味の緩和に影響するタンパク質を過剰に失わないようにすべきと思われた。

文 献

1. Dunn, M. J. Electrophoretic analysis methods. Oxford University Press, New York. 18-40 (1989).

2. Fukui, M., K. Yokotsuka, R. Ishii, R., 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).
3. 福井正一・奥田 徹・高柳 勉・横塚弘毅. セミヨン果汁及びワイン中に存在するタンパク質の性質. *日本醸造協会誌*. 98 (3): 1-7 (2003).
4. 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: 178-188 (2003).
5. Horowitz, W. (ed.). *Association of Official Analytical Chemists. A.O.A.C. Method 47.021.* Washington, DC. 12th ed.: 927-928 (1975).
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685 (1970).
7. 野崎一彦・斎藤直人・保坂 徹・横塚弘毅. マスカット・ベリーA 赤ワインの各製造段階での可溶性タンパク質の分離. *日本醸造協会誌* 90 (8): 646-653 (1995).
8. 奥田 徹・福井正一・高柳 勉・横塚弘毅. ワインのタンパク質および多糖含量に及ぼす加熱冷却とベントナイト処理の影響. *日本ブドウ・ワイン学会誌* 14 : 2-8 (2003).
9. Okuda, K., M. Fukui, T. Takayanagi and K. Yokotsuka. Characterization of major stable proteins or polypeptides in Chardonnay wine. *Food Sci. Technol. Res. (Tsukuba)* (2006 in press).
10. Yokotsuka, K., T. Ebihara and T. Sato. Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *J. Ferment. Bioeng.* 71 (4): 248-253 (1992).
11. 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).
12. Yokotsuka, K., K. Nozaki and T. Takayanagi. Characterization of soluble glycoproteins in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (4): 410-416 (1994).
13. 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 (1): 100-114 (1997).
14. Yokotsuka, K., M. Yoshii, T. Matsudo and T. Kushida.

Isolation and characterization of proteins in juices and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.* 55 (5): 510-515 (1976).