

[研 究 報 文]

1993年～2003年に製造したワイン貯蔵中のタンパク質の変化

横塚弘毅¹・福井正一^{1,2}・久本雅嗣¹・奥田 徹¹¹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 1-13-1²現在：フジッコワイナリー株式会社 〒409-3181 甲州市勝沼町下岩崎 2770-1

Changes in Proteins during Storage of Wines Produced from 1993 to 2003

Koki YOKOTSUKA¹, Masakazu FUKUI^{1,2}, Tohru OKUDA¹, and Masashi HISAMOTO¹¹Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering and The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan²Present address, Fujicco Winery Co., Ltd. Shimo-iwasaki, Katsunuma, Koshu, Yamanashi 409-3181, Japan

Two white table wines and one red wine were produced from Chardonnay, Semillon and Muscat Bailey A grapes over 11 years from 1993 to 2003 and stored at 15°C in a wine cellar. Proteins were obtained by vacuum concentration, ammonium sulfate precipitation (75% saturation), dialysis, and lyophilization. The protein concentration in Chardonnay wines became almost constant approximately 1.5 years after completion of fermentation, whereas that in Semillon wines became almost constant at approximately 4 years. In the white wines, Chardonnay wines, which had low protein concentration immediately after vinification, showed less turbidity than Semillon wines that had high protein concentration. On the other hand, Muscat Bailey A red wines, which contained large amounts of tannins, became stable approximately 1.5 years after completion of fermentation because of the removal of unstable proteins due to the formation of protein-tannin complexes. Semillon white, Chardonnay white and Muscat Bailey A red wines, which appeared to have reached a stable state due to the lack of turbidity, had average soluble protein concentrations of 72, 65, and 27 mg/L, respectively. Wine proteins were analyzed by native-PAGE, SDS-PAGE, and isoelectric focusing (IEF). There were minimal differences in the electrophoretic patterns of proteins among white wines produced from the same variety of grapes in different years. The molecular weights of proteins (including polypeptides) from two white wines made from Chardonnay and Semillon grapes ranged from 6 to 60 kDa, and 24 to 25 kDa proteins, which are the major components, accounted for approximately 60 to 80% of the total proteins. All of the proteins obtained from the three wines were separated in the range of pI 3.4 to 6.3. The isoelectric points of 60 to 70% of the proteins from white wines were in the range of 3.7 to 5.1. The three gel electrophoresis patterns of proteins from Muscat Bailey A wines gave no sharp or distinct bands. This may be due to the formation of soluble-protein-polysaccharide-tannin complexes.

Key words: aging, electrophoresis, protein, storage

結 言

ワインの熟成過程には2段階があり、第一段階は“成熟 (maturation)”、第二段階は“熟成 (aging)”と呼ばれる(16)。成熟段階は、アルコール発酵終了から瓶詰

めまでの数ヶ月～2年間を指す。この間、マロラクティック発酵や樽貯蔵が行われる場合があり、またしばしば澱引きや澱下げがなされる。澱引きや澱下げ中、ワインに空気が入るので、酸化反応が起こり、一方、瓶詰め後の熟成では、基本的に遊離酸素がない状態での反応が起こる。熟成によって、テーブルワインの外

2007年3月7日受理

観は、白ワインの場合、主に非フラボノイド型フェノールの酸化により黄色、琥珀色、茶色などに変わり、一方赤ワインではアントシアニンや他のフラボノイドの酸化、重合によってレンガ色、赤褐色へと変わる(1、11、15、17、18)。これらのポリフェノールの酸化・重合、それに続く不溶化と沈殿は、ワインの苦味や渋みを和らげる(7、14)。加えて、酒石の沈殿によって酸が減少し、また有機酸とアルコールとの反応により酸が減少するとともに、エステルが生成して“におい”の変化が起こり、若いワインの単純な果実香はより複雑かつ繊細なブーケとなる(10)。またシェリーやトカイ・アスのようなワインでは、アルデヒドやアセトールが増加し、酸化的フレーバーが発達する(12)。このような熟成中の酸、ポリフェノール、エステル類等の変化に対して、タンパク質がタンニンとの結合によって沈殿を生成すること以外、我々が調べた限り、ワインの貯蔵・熟成中のタンパク質の量的、質的变化は全く知られていない。

本研究では、1993年～2003年の11年間に製造されたマスカット・ベリーA赤ワインとセミヨンおよびシャルドネ白ワインを貯蔵中のワインタンパク質の変化について調べたので報告する

材料と方法

1. ワイン

山梨大学ワイン科学研究センター附属育種試験地で栽培したセミヨン、シャルドネおよびマスカット・ベリーAブドウを1993年～2003年の9月に収穫した。ブドウ果実の表皮に著しく農薬が残留する場合には、0.1%リンゴ酸および水道水で果実を洗浄後使用した。これらのブドウを用い、同センターワイン試験工場、1993年～2003年の11年間に、セミヨン白ワイン11点、シャルドネ白ワイン11点、及びマスカット・ベリーA赤ワイン11点を製造した。

赤ワイン製造の場合、収穫したブドウ果実(1ロット300kg)をローラータイプ除梗破砕機(MABILLE社製、タイプ46)で除梗・破砕し、得られた破砕物にメタ重亜硫酸カリウムを二酸化イオウにして50mg/Lの濃度に加えた後、ステンレススチール製タンク中、室温で一夜放置した。市販乾燥酵母(Uvafarm CM)を用いて、室温で発酵させ、発酵マストのアルコール濃度を経時的に測定した。アルコール濃度が7～8%にな

ったとき(酒母添加後約1週間)バスラン型圧搾機(3HLタイプ)で圧搾して液体マストを得た。このマストに、酒母添加前のマストの糖度に換算して23°Brixになるように上白糖を添加後、炭酸ガスの泡が認められなくなるまで発酵を続けた。発酵が終了してから1週間後にメタ重亜硫酸カリウムを二酸化イオウにして75mg/Lの濃度に添加して一夜放置した。次に、連続遠心機(H-600Sタイプ、国産遠心機株式会社)を用いて8,000×g、50L/hrでワインを連続遠心し、上清ワインをセルロースと珪藻土からなるノンアスベスト濾過板(厚さ2～4mm、大きさ200×200mm、NA-16タイプ、アドバンティック東洋株式会社)13枚を使用して濾過した。このワインにメタ重亜硫酸カリウムを加え、翌日に遊離亜硫酸濃度を測定して二酸化イオウにして30mg/Lに達しない場合には再びメタ重亜硫酸カリウムを添加して、上記の濃度範囲に遊離亜硫酸が存在するように調整した。発酵が終了してから約半年後(冬の寒さを利用した酒石の自然沈降後で、産膜酵母の発生前の時期を選択)、遊離亜硫酸濃度を10～20mg/Lになるように調整したワインを1.8L容ガラスボトルに詰め、王冠をし、横倒しにして、分析するまで15°Cの地下貯蔵庫に保管した。

白ワイン製造の場合、収穫したブドウ果実(1ロット300kg)をローラータイプ除梗破砕機(MABILLE社製、タイプ46)で除梗・破砕し、得られた破砕物をバスラン型圧搾機(3HLタイプ)で圧搾して液体マストを得た。このマストにメタ重亜硫酸カリウムを二酸化イオウにして50mg/Lの濃度に加えた後、ステンレススチール製タンク中、一夜放置した。市販乾燥酵母(Uvafarm CM)を添加して、15°Cで発酵させ、炭酸ガスの泡が認められなくなるまで発酵を続けた。発酵終了後の処理は赤ワイン製造の場合と同じである。

なお、毎年のお赤および白ワインの製造にあたって、ブドウの前処理、発酵条件、発酵後の処理はできるだけ同じになるようにし、ワインへのペントナイトやゼラチン添加などによる澱下げや木樽内貯蔵は行わなかった。

2. タンパク質の分離

ワイン1.5Lを40°Cで元の容量の約1/3までロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。濃縮物に硫酸アンモニウム(75%飽和)を加え4°Cで3日間放置後、遠心分離し(4°C、15,000×g、15分間)、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、タンパク質沈殿を溶解させた。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。

3. ワインのエタノールおよび遊離亜硫酸の分析

エタノールは、水素炎検出器が付いた島津 GC-14A ガスクロマトグラフで定量した。Sunpak-A (Thermon-1000) を充填したステンレススチールカラム (3 mm×2 m) を使い、インジェクターと検出器温度を 240°C とし、5 μL のワインを直接インジェクターに注入した。カラム温度は 6°C/分 で 100 から 160°C に上げ、それから 5 分間 160°C に保った。この方法で得たアルコール濃度は、ワインを 15°C にした後酒精度浮ひょうでその示度を読んだアルコール度数 (濃度) よりもいつも高かったが、統計学的に高い相関が認められた ($p < 0.001$)。ガスクロマトグラフィーで得たエタノール量を x 、浮ひょう法で得たエタノール量を y とすると、 $y = 1.055x - 1.451$ となった。そこで、ガスクロマトグラフィーで得た値を実験式に入れ、エタノール量 y を算出した。

ワインの遊離亜硫酸は、Burroughs and Sparks (2) の方法に従って、酸性にしたワインに室温で空気を吹き込み (通気)、この気流とともに気化した SO_2 を過酸化水素で酸化し、生成した H^+ を 0.01N NaOH で滴定することによって求めた。

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) を定沸点塩酸を使い、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) は、Laemmli (6) の方法に従い、6200 型ラビダス・ミニスラブゲル電気泳動槽 (120×100×1 mm、アトー株式会社) を使い、アクリルアミド濃度 15% の分離用ゲル中で行った (濃縮用ゲルのアクリルアミド濃度は 10%)。15 μg のタンパク質を含む 3 μL を泳動用試料液とした。マーカー色素、ブロムフェノールブルー (BPB) が分離ゲルの下端 1 cm に達するまで、ゲル当たり 18 mA の定電流で泳動した。

Native-PAGE は、SDS-PAGE と同じ電気泳動槽を用いて行った。分離用ゲルのアクリルアミド濃度は 10% とし、また SDS を添加しないことを除いて、SDS-PAGE と同じ条件で泳動した。

バンドの染色は CBB (クマーシー・ブリリアント・ブルー G-250) で行った。分子量マーカーは LMW Marker Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) 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 (タイテック) と Plug-in Degtizer (カノープス) を用いて撮影し、保存した。

等電点電気泳動は、バイオラッド社製、等電点電気泳動装置 (Protean IEF Cell) と Ready Strip™ IPG Strip pH 3-6 (11 cm) を用いて行った。8 M 尿素 10 mL、2% CHAPS、50 mM ジチオスレイトール、0.2% Bio-Lyte® 3/10 アンフォライト、BPB を含む ReadPrep® 再水和/試料-緩衝液中、0.5 mg/185 μL となるようにワインタンパク質を溶かし、遠心分離してその上清を試料液とした。等電点マーカーとして、Broad pI Kit (pH 3.5-9.3) (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用した。次に ReadyStrip™ IPG strip マニュアルに従って泳動を行った。

CBB あるいは IEF ゲル染色液で染色し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。

結果と考察

1. 製造年の異なるワインを分析する意義

ワインに溶存するタンパク質の熟成中の変化に関する研究を進めるにあたって、同じ製造年のワインを同じ条件で貯蔵し、以後毎年そのワインの分析を続ける方法と、異なった製造年のワインを同じ条件で貯蔵し、すべての試料ワインを同時に分析する方法が考え

られる。前者は同一ロットのワインから出発することに優れているが、長期にわたって同じ実験者が同一の測定機器や試薬を使って分析することは難しいので、毎年得られるデータを比較することに問題がある。また多くの製造年の同一ロット（分析に際してボトルを開栓する必要があるので、ワインに空気が入り、熟成状態が途切れるので、毎年同一ロットの別のボトルに貯蔵中のワインを分析するほうがよいと考えられる）のワイン中のタンパク質の変化を調べるには、毎年多くのワインを分析する必要がある。なぜならば、多くの製造年のワインを取り扱わなければ、製造年の相違、例えば各年の気候の違いによるブドウ樹で生成されるタンパク質の差異が考慮されないからである。一方、後者は分析の信頼性や毎年の栽培条件によるタンパク質の質的量的な差異は考慮されることに利点はあるが、同じロットの（同一試料の）ワインの経時変化

を調べることはできないので、製造年によってブドウの品質、つまりワイン成分が異なるために熟成の経過がワインによって違う懸念がある。このように、2つの方法のいずれにも利点と欠点があるが、実験計画の設定が容易で、かつワインのタンパク質濃度は非常に低く、また微量なタンパク質分析の困難さを考慮して分析上信頼がおける後者の方法を選択することとした。

2. 1993年～2003年に製造した3種ワインの溶存タンパク質量の貯蔵中の変化

1993年～2003年秋に発酵させたセミヨンおよびシャルドネ白ワイン並びにマスカット・ベリーA赤ワインの溶存タンパク質量を2003年12月～2004年1月に分析した。1993年産ワインは約10年間貯蔵され、一方2003年秋に製造されたワインは発酵後3～4ヶ月間経過したことになる。実験に用いたすべてのワイン

Table 1. Alcohol, free SO₂, and protein concentrations and pH of two white wines from Semillon and Chardonnay grapes and one red wine from Muscat Bailey A grapes produced in 1993 to 2003.

	Year produced										
	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994	1993
Semillon											
pH	3.2	3.0	—	3.0	3.0	2.7	3.1	3.3	3.4	3.5	3.1
Alcohol (% v/v)	11.2	12.3	—	11.9	12.0	11.7	13.6	12.2	12.7	12.2	12.3
Free SO ₂ (mg/L)	26	13	—	5	4	5	16	8	24	15	5
Protein in wine ^a	309 (4.8) ^b	172 (23.9)	—	131 (13.2)	62 (15.2)	51 (2.75)	71 (9.0)	58 (2.0)	72 (12.8)	105 (30.0)	85 (10.0)
Precipitate with (NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L) ^c	—	96	—	51	93	61	57	57	67	103	101
Protein in precipitate (mg/L) ^d	—	62	—	28	47	40	36	38	50	54	69
Chardonnay											
pH	3.3	3.5	3.3	3.4	3.2	3.2	3.5	3.3	3.3	3.5	3.5
Alcohol (% v/v)	11.3	12.9	13.4	13.5	12.4	12.8	13.6	13.6	12.8	13.0	11.8
Free SO ₂ (mg/L)	30	10	6	8	6	3	10	16	10	10	9
Protein in wine ^a	244 (9.7) ^a	94 (2.7)	66 (1.9)	72 (2.3)	74 (1.9)	80 (1.2)	54 (1.9)	46 (0.3)	46 (0.5)	52 (0.1)	61 (0.3)
Precipitate with (NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L) ^c	—	65	78	46	61	61	92	59	60	65	104
Protein in precipitate (mg/L) ^d	—	42	52	34	36	36	67	38	41	46	48
Muscat Bailey A											
pH	3.4	3.5	3.6	3.6	3.3	3.3	3.4	3.3	3.4	3.7	3.4
Alcohol (% v/v)	10.9	13.8	12.0	12.2	11.6	11.8	12.0	12.5	12.0	12.5	12.0
Free SO ₂ (mg/L)	21	8	3	4	6	3	5	3	6	6	3
Protein in wine ^a	181 (1.0) ^a	29 (0.4)	32 (0.4)	32 (0.5)	28 (0.2)	29 (<0.1)	24 (<0.1)	20 (0.2)	23 (0.1)	27 (0.3)	28 (0.1)
Precipitate with (NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L) ^c	—	288	473	277	292	479	633	593	250	294	347
Protein in precipitate (mg/L) ^d	—	26	31	28	37	29	31	18	14	16	25

^aProtein concentration in lyophilisate of the retentate after dialyzing wine against water.

^bStandard deviation.

^cPrecipitate (as lyophilisate) obtained by salting out one liter of wine with ammonium sulfate (0.75 sat.).

^dProtein concentration in lyophilisate of the retentate after dialyzing the precipitate against water, which was obtained by ammonium sulfate precipitation of one liter of wine.

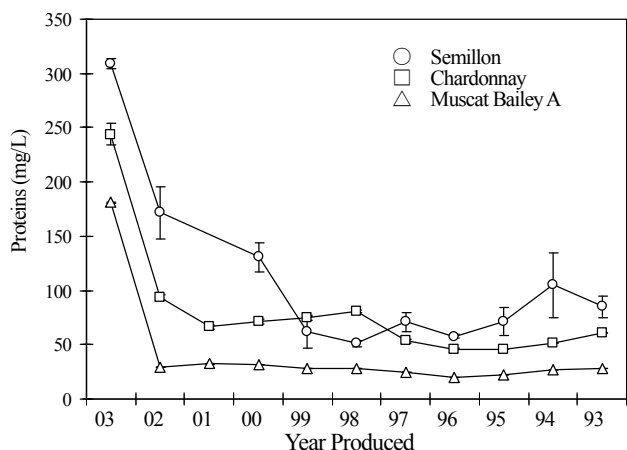


Fig. 1. Changes during storage of soluble protein concentrations in Semillon and Chardonnay white wines and Muscat Bailey A red wine produced in 1993 to 2003. Soluble protein concentrations in all the wines were determined between December, 2003 and January, 2004.

は、澱下げ処理を全く行っていない。各ワインのタンパク質濃度は Table 1 および Fig. 1 に示してある。極めて短期間貯蔵後に分析された 2003 年産白と赤ワインおよび 2002 年産白ワインは、十分に熟成が進んでおらず、タンパク質安定性の観点から見ると、不安定なワインであると思われる。しかし、タンパク質に結合可能な十分量の高分子タンニンが含まれる 2002 年産およびそれより前に製造されたマスカット・ベリーA 赤ワインは、発酵終了後 1 年半 (2002 年産) 以上を経過していることから、不安定なタンパク質はすでに除去されていると思われる。すなわち、シャルドネ白ワインとマスカット・ベリーA 赤ワインのタンパク質量は、発酵終了後 1 年半以上経つとほぼ一定量となり、1993 年～2001 年に製造したシャルドネワインのタンパク質量は平均 61.1 mg/L (標準偏差 12.76)、マスカット・ベリーA 赤ワインのそれは 27.1 mg/L (標準偏差 3.87) であった。これに対して、若いセミヨン白ワインに含まれるタンパク質量 (2000 年産、131 mg/L; 2002 年産、172 mg/L; 2003 年産 309 mg/L) は、シャルドネ白ワイン (2000 年産、72 mg/L; 2001 年産、66 mg/L; 2002 年産、94 mg/L; 2003 年産、244 mg/L) やマスカット・ベリーA 赤ワイン (2000～2002 年産、29～32 mg/L; 2003 年産、181 mg/L) のタンパク質量よりもずっと多かったが、1993～2001 年に製造したセミヨン白ワインは平均 79 mg/L のタンパク質を含んでいた。

Table 1 に示したように、いくつかのワインで 10 mg/L 以上の遊離亜硫酸が存在したが、大部分のワインは 10 mg/L 以下しか検出できなかった。用いたワイン

は遊離亜硫酸濃度が約 10～20 mg/L となるように瓶詰め直前にメタ亜硫酸カリウムを添加し、貯蔵した。ここで用いたワインのうち、1994 年～1998 年の 5 年間に製造したワインを製造年の翌年の 4 月～5 月に分析した結果はすでに報告した (18)。それによると、発酵後 4 か月を経過したセミヨン、シャルドネおよびマスカット・ベリーA ワインの遊離亜硫酸濃度は、それぞれ 6～44 mg/L (平均 29 mg/L)、4～62 mg/L (27 mg/L)、0～49 mg/L (48 mg/L)、一方、全フェノール濃度は、それぞれ 240～342 mg/L (平均 289 mg/L、うち 236 mg/L はフラボノイド)、224～328 mg/L (289 mg/L、うちフラボノイドは 291 mg/L)、1,620～2,912 mg/L (2,314 mg/L、うちフラボノイドは 1,793 mg/L) であった。瓶詰めしてから約 1 年後、ワインの溶存酸素が関与した酸化的重合によってフラボノイドの高分子化が進行し、生成した高分子タンニンとタンパク質との結合によりタンパク質-タンニン複合体の不溶化 (19、20) が起こった可能性があり、そのことによるタンパク質の減少が見られたのではないかと推定された。しかし、その後ボトル内で主としてポリフェノールにより酸素が消費され (13)、さらなるフラボノイドの酸化的重合、高分子化は起こらなかったため、タンパク質が安定的に存在し、タンパク質の量的変化が少なかったと思われる。

溶存タンパク質量がほぼ同じ値を示した 1993～1999 年製造のセミヨン白ワイン、1993～2002 年のシャルドネ白ワインおよびマスカット・ベリーA 赤ワインの平均タンパク質量はそれぞれ 72、65 および 27 mg/L であった。セミヨン、シャルドネ、マスカット・ベリーA ワイン 1 L からの硫酸塩析物重量の平均は、それぞれ 77、69 および 393 mg/L であり、それらに含まれるタンパク質量の平均は、それぞれ 48、44 および 26 mg/L であった。60%飽和-硫酸塩析によって、ワインに溶存するタンパク質の約 67% (セミヨン)、68% (シャルドネ) および 93% (マスカット・ベリーA) が回収できた。得られた硫酸塩析物のタンパク質の割合は、約 62% (セミヨン)、64% (シャルドネ) および 6.6% (マスカット・ベリーA) であった。すなわち、硫酸塩析物にはタンパク質以外のワイン成分が明らかに含まれた。Fukui and Yokotsuka (4) は、2000 年に製造したシャルドネワインから硫酸塩析によって調製したタンパク質画分 (凍結乾燥物) は、タンパク質 (約

73.2%)、酸性糖 (2.4%)、中性糖 (11.7%)、フェノール (4.7%)、水 (8.1%) (以上、計 100.1%) よりなり、一方同年産マスカット・ベリーA ワインより得られた硫酸塩析物は、それぞれタンパク質 (24.6%)、酸性糖

(19.5%)、中性糖 (51.4%)、フェノール (3.3%) および水 (1.3%) (以上、計 100.1%) であったことを報告した。タンパク質、中性糖、酸性糖およびポリフェノールを合計するとほぼ 100% になることから、硫酸塩析物の量的組成をこれらの 4 成分で説明できた。

これらのことから、本研究で硫酸塩析によって得られたタンパク質画分には、タンパク質以外に他の成分、たとえば中性多糖、酸性多糖、高分子タンニン等が混在するか、あるいはタンパク質-タンニン-糖の複合体が存在するかのいずれかであると思われる。中西ら (9) は、ワインを約 1/10 に濃縮後、透析し、透析内液に 80% 飽和になるように硫酸を加えてタンパク質を沈殿させ、遠心分離して除去し、次に上清に塩化ナトリウム (1%) とアルコール (4 倍量) を加えて多糖を分離した。すなわち、硫酸塩析では多糖は沈殿し難いので、前述した硫酸塩析物の糖は、タンパク質-タンニンと何らかの結合による複合体を形成していると思われる。マスカット・ベリーA 赤ワインの硫酸塩析物中に存在する多量の糖類は、醸し発酵により果皮 (また種子) から抽出されたことは明らかである。

3 Native-PAGE によるワイン貯蔵中のタンパク質の変化の検討

2003 年に製造したワインは非常に若く、ワイン成分学的に極めて不安定なので、実験操作中に種々の成分が反応し、成分組成の変化が激しいので、以下の 3 種のゲル電気泳動分析のための試料として、1993 年~2002 年に製造し、貯蔵後 1 年以上を経たワインから分離したタンパク質を用いた。

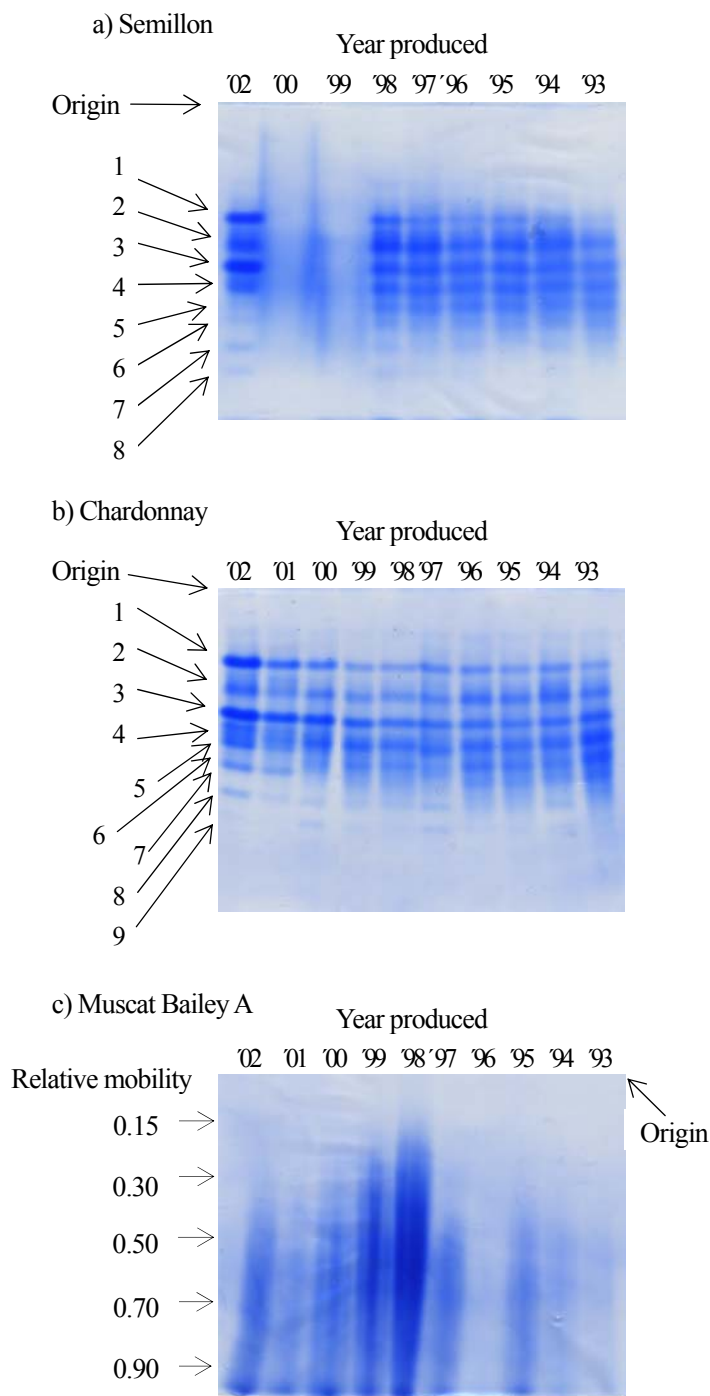


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation of two white (Semillon and Chardonnay) wines and one red (Muscat Bailey A) wine. Lanes (corresponding to nine protein samples isolated from wines produced in 1993 to 2002) were visualized by CBB staining, and bands were designated by numbers 1 to 8 in (a), and 1 to 9 in (b).

Fig. 2 に Native-PAGE の泳動図を Table 2 に泳動バンドの相対的移動度と CBB で染色された各バンドの相対濃度を示した。1999 年と 2000 年に製造したセミヨン白ワインから分離したタンパク質画分の泳動バンドは認められず、また 1993 年～2002 年に製造したすべてのマスカット・ベリーA 赤ワインから分離したタンパク質の場合には明確なバンドが見られず、一つの流れた形のバンドとなった。泳動に用いたタンパク質量

Table 2. Relative proportions of protein bands separated by native-PAGE of proteins from Semillon and Chardonnay white wines, obtained by ammonium sulfate precipitation.

Protein band	Relative mobility	Year produced									
		2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994	1993
Relative proportion (%) of protein band											
Semillon											
1	0.37	16	—	n.d. ^a	n.d.	9	8	7	7	5	4
2	0.44	26	—	n.d.	n.d.	25	25	25	26	25	22
3	0.52	18	—	n.d.	n.d.	21	18	18	18	18	17
4	0.58	20	—	n.d.	n.d.	15	17	19	22	16	20
5	0.64	9	—	n.d.	n.d.	14	15	15	12	17	17
6	0.69	5	—	n.d.	n.d.	9	9	10	7	11	12
7	0.77	4	—	n.d.	n.d.	4	7	6	9	8	8
8	0.87	2	—	n.d.	n.d.	3	0	0	0	0	0
		100				100	99	100	101	100	100
Chardonnay											
1	0.25	15	12	9	10	10	8	11	9	9	8
2	0.34	19	13	11	10	12	14	19	19	20	12
3	0.42	16	20	17	16	14	15	14	16	10	17
4	0.44	15	9	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0.48	19	21	32	25	26	30	23	20	26	23
6	0.53	13	20	15	18	15	19	14	13	16	19
7	0.60	0	0	5	10	12	5	13	15	11	16
8	0.67	3	5	5	5	5	4	4	6	5	6
9	0.74	1	0	6	5	5	4	3	3	3	0
		101	100	100	99	99	99	101	101	100	101

^a not detected.

Table 3. Relative proportions of protein bands separated by SDS-PAGE of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation after storage for a period of 1.5 to 11.5 years of Semillon and Chardonnay white wines produced in 1993 to 2002.

Protein band (kDa)	M.W.	Year produced									
		2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994	1993
Relative proportion (%) of protein band											
Semillon											
1	56	11	—	2	2	11	10	4	5	7	4
2	24	62	—	66	42	64	77	76	78	59	65
3	16	1	—	11	13	4	5	6	5	3	7
4	12	15	—	0	12	17	3	4	4	4	1
5	8.9	9	—	21	24	2	3	6	4	25	20
6	7.2	3	—	0	5	1	1	1	1	1	1
7	6.0	0	—	0	2	1	1	3	3	1	2
		101		100	100	100	100	100	100	100	100
Chardonnay											
1	62	2	4	3	4	4	2	1	1	3	5
2	39	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
3	25	652	88	83	84	70	78	71	80	83	81
4	21	1	1	0	0	6	1	1	8	0	0
5	16	8	0	5	3	0	2	3	3	0	1
6	12	1	3	1	1	5	2	4	5	8	7
7	9.4	18	3	6	7	13	15	18	2	5	6
8	8.0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
9	6.8	4	1	2	1	1	1	1	0	0	0
		101	100	100	100	101	101	100	100	100	101

は一定にしたので、不鮮明な泳動バンドしか得られなかったり、あるいはほとんどバンドが検出できなかった2つのセミヨン白ワインのタンパク質画分とマスカット・ベリーA赤ワインのすべての画分の場合は、タ

ンパク質以外の共存する（あるいは結合している）成分（酸性糖、中性糖、あるいはポリフェノール等）の影響によって CBB 染色が十分になされなかったと思われる。

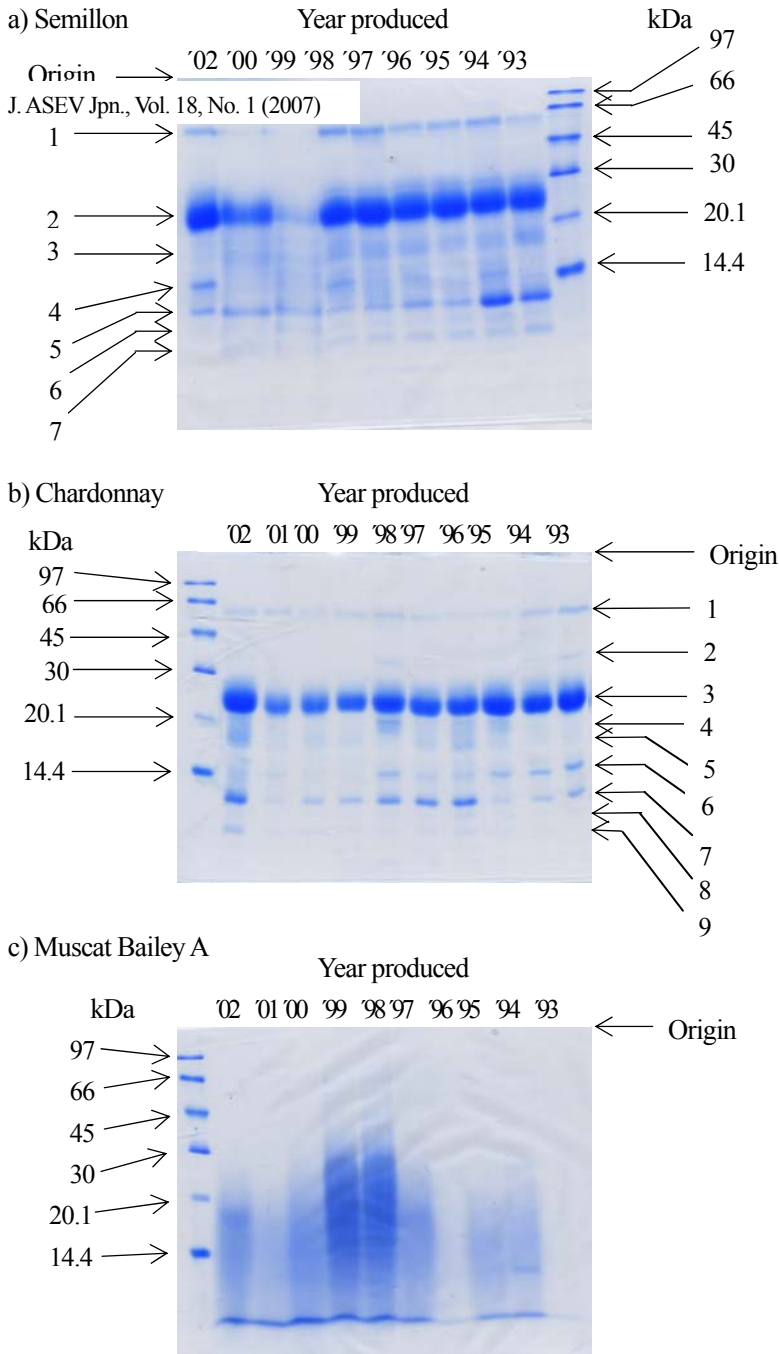


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation of two white (Semillon and Chardonnay) wines and one red (Muscat Bailey A) wine produced in 1993 to 2003. Lanes (corresponding to nine protein samples isolated from wines produced in 1993 to 2002) were visualized by CBB staining, and bands were designated by numbers 1 to 7 in (a), and 1 to 9 in (b).

1993～1998年および2002年に製造したセミヨン白ワインと1993～2002年に製造したシャルドネ白ワインは、それぞれ少なくとも9つおよび7つのタンパク質成分(バンド)を含んだ。そのうちの4～6つのバン

ド濃度割合は、全バンド濃度の10%を超えた。明確なバンドを示さなかった1999年と2000年および実験しなかった2001年以外のす、貯蔵中のワインタンパク質の挙動白ワイン(1993～1998年と2002年)から分離した画分の各タンパク質バンドの濃度割合は、各年の間でかなり類似していた。シャルドネワインの場合も同様で、2001年と2002年に製造した比較的若いワインからのタンパク質の泳動バンドの濃度割合と、1993年～2000年に製造したワインからのタンパク質の泳動バンドの濃度割合とは概して類似していた。以上の結果、製造年の異なるセミヨンおよびシャルドネ白ワイン、すなわち貯蔵期間の異なる白ワインから分離したタンパク質の泳動パターンおよび泳動バンドの濃度割合はかなり類似していることから、白ワインでは、貯蔵開始後1、2年間のいわゆる“成熟”期間を過ぎれば、貯蔵・熟成中にタンパク質の質的、量的な変化はほとんどないと思われる。

4. SDS-PAGEによるワイン貯蔵中のタンパク質の変化の検討

Native-PAGEの場合と同様に、マスカット・ベリーAワインから分離したタンパク質をSDS-PAGEで泳動したとき、明確なバンドは認められなかった(Fig. 3)。ゲル電気泳動では、グリコプロテインやリポプロテインの泳動バンドはいつでもシャープに分離するわけでもないことは一般に知られており、本実験でも、恐らくマスカット・ベリーA赤ワインのタンパク質は、大量の中性多糖や酸性多糖が結合し、またそれらにタンニンも結合しているためシャープなバンドとならなかったのではないかとと思われる。

セミヨン白ワインには少なくとも7種類の異なった分子量をもつタンパク質が含まれた。1999年を除く、1993～2002年に製造したセミヨン白ワインのタンパク質バンドの約60～80%(Table 3のバンド2)は24 kDaの分子量をもち、貯蔵年数の相違による

タンパク質バンドパターンや各バンドの濃度割合の大きな変化は認められなかった (1999 年産ワインの場合でも 24 kDa バンドは 42% を占めた)。また、少量では

あるが、分子量が 6.0 kDa~8.9 kDa のポ

リペプチドが含まれた。我々は、既に 1999 年産セミヨン白ワイン (本研究で用いた 1999 年産ワインとは別のロットであるが) から硫酸塩析によって得られたタンパク質のほとんどは 25 kDa~30 kDa であり、また 61 kDa および 57 kDa のタンパク質が認められたことを報告した (3)。前者にはオスモチン様タンパク質とタウマチン様タンパク質、また酵母由来タンパク質が含まれ、後者にはインベルターゼが含まれた (3)。福井ら (3) が報告した 25~30 kDa の分子量をもつタンパク質並びに 57 kDa あるいは 61 kDa のタンパク質は、それぞれ本論文の 24 kDa と 56 kDa のバンドに相当すると考えられる。

最近、我々は、山梨県で 1994、1997、2000、2001 および 2002 年に収穫されたシャルドネブドウから、山梨大学とフジッコワイナリーで白ワインを製造し、硫酸塩析、Sephadex G-100 クロマトグラフィー、2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (等電点ゲル電気泳動と SDS-PAGE) によってタンパク質を分離し、電気泳動ゲル上で 310 以上のタンパク質スポットを得た (9)。そのうちのいくつかの主要なスポットに含まれるタンパク質あるいはポリペプチドの構造決定を行った。その結果、インベルターゼ、オスモチン様タンパク質、タウマチン様タンパク質および脂質伝達タンパク質の構造と一致した (9)。これらのポリペプチドの kDa の多くは、本研究で得たタンパク質バンドの kDa と類似した。Table 3 に示すように、1993 年~2002 年に製造されたすべてのシャルドネ白ワインに全タンパク質

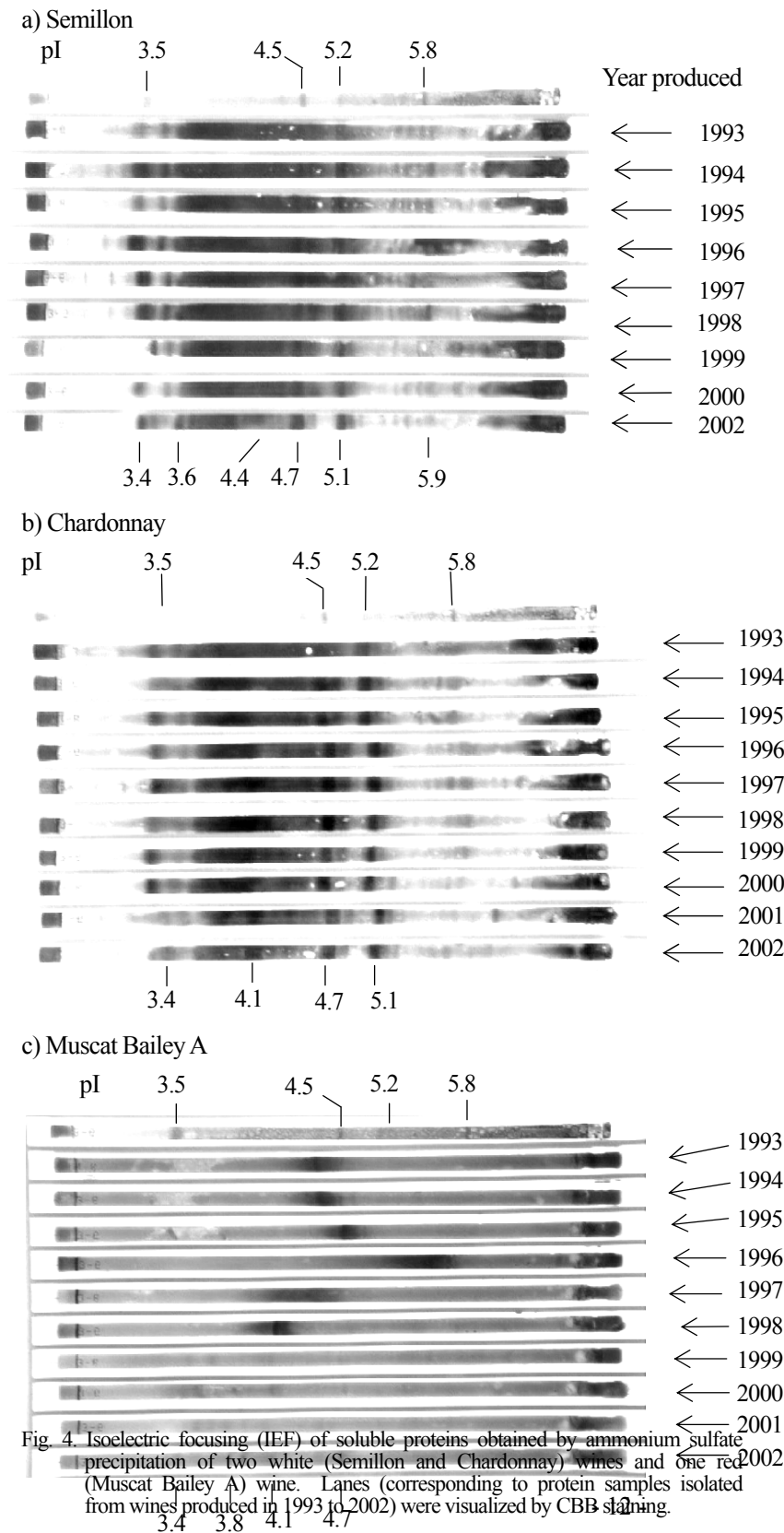


Fig. 4. Isoelectric focusing (IEF) of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation of two white (Semillon and Chardonnay) wines and one red (Muscat Bailey A) wine. Lanes (corresponding to protein samples isolated from wines produced in 1993 to 2002) were visualized by CBB staining.

の 65~84%を占める 25 kDa のタンパク質が含まれた。また 6.8~9.4 kDa の分子量をもつポリペプチドも認められた。その他のいくつかのバンドが存在したが、それらの量は少なかった。概して、貯蔵年数の相違によるタンパク質バンドパターンや各バンドの相対的割合の変化の度合いは少なかった。以上のことから、貯蔵中における白ワインタンパク質の分子量の変化は小さいと結論できた。

5. 等電点ゲル電気泳動 (IEF) によるワイン貯蔵中の

タンパク質の変化の検討

Fig. 4 と Table 4 は、それぞれセミヨン白ワインとシャルドネ白ワインに含まれるタンパク質の等電点 (pI) と各バンド濃度の相対割合を調べた結果である。等電点は 3.4~6.3 に分布し、そのうちの 44~63%は pI 3.7~5.0 をもった。次いで pI 3.4 および pI 5.1 をもつバインのタンパク質間の IEF パターンは非常に類似していた。

J. ASEV Jpn., Vol. 18, No. 1 (2007) インのタンパク質間の IEF パターンは非常に類似していた。

Table 4. Relative proportions of protein bands separated by IEF of soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation of two white wines from Semillon and Chardonnay grapes and one red wine from Muscat Bailey A grapes.

pI of protein band	Year produced									
	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994	1993
Relative proportion (%) of protein band										
Semillon										
3.4	5	—	5	3	6	6	7	4	6	4
3.6	8	—	3	3	3	3	3	3	4	4
3.7-5.0	59	—	59	56	52	51	57	58	52	63
5.1	10	—	11	12	12	12	13	14	9	9
5.4	1	—	1	1	2	3	2	1	4	2
5.5	1	—	1	1	2	2	1	3	3	2
5.6	1	—	2	1	2	2	2	4	3	2
5.7	—	—	2	5	6	3	3	3	2	3
5.8	1	—	4	—	—	—	7	4	4	3
5.9	—	—	—	1	5	7	—	1	3	3
6.0	1	—	3	7	4	6	5	2	3	2
6.2	1	—	1	4	—	—	—	1	2	—
6.3	12	—	9	7	8	5	—	3	5	4
	100	—	100	100	100	100	100	101	100	101
Chardonnay										
3.4	10	7	7	7	8	7	7	8	10	8
3.6	5	7	8	5	7	5	6	6	6	7
3.7-4.6	46	54	55	55	51	53	48	53	48	44
4.7-4.9	11	12	13	12	13	15	14	13	14	14
5.1	8	7	5	7	7	7	8	8	8	8
5.2	3	4	6	5	4	5	5	4	5	6
5.5	3	—	—	—	—	—	—	2	3	3
5.6	5	2	—	1	2	—	—	3	—	—
5.7	—	3	2	—	—	3	2	4	7	11
5.8	2	—	2	4	9	—	—	—	—	—
5.9	4	—	—	5	—	5	7	—	—	—
6.0	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
6.1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6.2	—	—	2	—	—	—	—	2	—	—
	100	100	100	101	101	100	99	101	101	101
Muscat Bailey A										
3.4	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3.5	—	—	22	21	—	—	—	—	—	—
3.6	10	14	13	—	—	—	—	—	—	—
3.7	11	16	27	36	—	—	—	—	—	—
3.8	10	22	13	—	—	—	—	—	—	—
3.9	10	11	15	—	—	—	—	—	—	—
4.1	23	18	—	29	—	—	—	—	—	—
4.2	—	—	—	—	(3.9-4.4) ^a	—	—	—	—	—
4.4	—	—	—	—	(4.1-4.7) ^b	—	—	—	—	—
4.5	13	19	—	—	—	—	—	—	(4.2-4.9) ^f	—
4.6	—	—	—	—	—	—	—	—	(4.3-4.9) ^e	—
4.7	14	—	10	14	—	—	—	—	(4.0-5.0) ^d	—
5.4	—	—	—	—	—	—	—	—	(4.6-5.8) ^c	—
	100	100	100	100	—	—	—	—	—	—

Proteins were observed as large band with pI ranges of approximately 3.9 to 4.4 (a), 4.1 to 4.7 (b), 4.6 to 5.8 (c), 4.0 to 5.0 (d), 4.3 to 4.9 (e), and 4.2 to 4.9 (f). See also Fig. 13c.

ク質画分の Native-PAGE と SDS-PAGE では (Fig. 2 と Fig. 3)、いずれの年に製造したワインから分離したタンパク質画分でもシャープなバンドに分かれなかったが、IEF では、1999～2002 年に製造し、まだ貯蔵期間が短いワインから得たタンパク質画分は明瞭なくつかのバンドに分かれた。しかし、他のワインタンパク質と同量を電気泳動したにもかかわらず、バンドは薄かった。多分、タンパク質に結合している多糖やタンニンのために CBB により十分な染色が行われなかったと考えられた。一方、1993～1998 年に製造し、5 年以上貯蔵したワインから分離したタンパク質は主として一つの塊となって泳動された。その泳動距離は一定せず、またある一定の傾向も示さなかった。これらのワインでは、多糖-タンニン-タンパク質複合体が形成されている可能性が高いと思われた。各赤ワインの醸し発酵時、種子や果皮から抽出された多糖やポリフェノールの量の差異や、熟成中のこれらの成分の部分的な加水分解や結合反応によって 3 成分の結合割合が異なるために、製造年の異なるワインからのタンパク質画分によって移動度が異なったのかもしれない。しかし、製造してから 4 年程度までのワインから分離したタンパク質ではシャープな分離が得られたので、3 成分の相互作用による複合体はかなりゆっくりした速度で形成されるのかもしれない。

要 約

- 1993～2003 年の 11 年間に製造したセミヨン白ワイン、シャルドネ白ワイン、マスカット・ベリーA 赤ワインを 15°C で地下セラーに貯蔵した。これらのワインを減圧濃縮し、硫酸塩析 (75%飽和)、透析、凍結乾燥してタンパク質画分を得た。
- シャルドネ白ワインのタンパク質濃度は、発酵終了後 1.5 年でほぼ一定となり、セミヨン白ワインのそれは 4 年後にほぼ一定となった。白ワインの場合、製造直後のタンパク質濃度が低いワイン (シャルドネ) の方が高いワイン (セミヨン) よりもタンパク質混濁の面で早く安定し、一方赤ワインの場合、含まれるタンニンとタンパク質との結合・沈殿によってタンパク質が除去されるので、発酵終了後 1.5 年でタンパク質安定の状態になった。タンパク質的に安定になったと思われるセミヨン白、シャルドネ白、マスカット・ベリーA 赤ワインの平均タンパク質濃度は、それぞれ 72、

65 および 27 mg/L であった。

- 各ワインから分離したタンパク質を SDS-PAGE と IEF 及び Native-PAGE を用いて分析した。同種の白ワインならば、製造年の相違による泳動パターンの大きな差異は認められなかった。2 種の白ワインから分離したタンパク質 (ポリペプチド) 分子量は 6 kDa～56 kDa に分布し、主成分である 24～25 kDa のタンパク質は全体の約 60～80% を占め、一方、等電点は、3 つのワインから分離したタンパク質のすべてが pI 3.4～6.3 の範囲に泳動されたが、白ワインタンパク質の 60～70% が pI 3.7～5.1 の範囲に入った。マスカット・ベリーA 赤ワインから分離したタンパク質の 3 種の電気泳動は、明確な泳動バンドを与えなかった。この不明瞭な泳動パターンは、赤ワインタンパク質が多糖やタンニンと複合体を形成しているために生じたと推定した。

文 献

- Amerine, M. A., R. E. Kunkee, C. S. Ough, V. L. Singleton, and A. D. Webb. *The Technology of Wine Making*. p. 453. AVI Publ. Co., Westport CT (1980).
- Burroughs, L. F. and A. H. Sparks. The determination of the free sulphur dioxide content of ciders. *Analyst*. 89:55-60 (1964).
- 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に存在するタンパク質の性質. *日本醸造協会誌*. 98:582-588 (2003).
- 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).
- Horowitz, W. (Ed.). *Association of Official Analytical Chemists*. 12th ed., pp. 927-928. Method 47.021. AOAC, Washington, DC (1975).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685 (1970).
- Malvezin, F. *Villissement des Vins et Spiritueux. Nouveau Traitement des Vins ou Pasteuroxyfrigorie*. Bordeaux, France: Feret et Fils (1903).
- 中西載慶・野崎一彦・徳田宏晴・横塚弘毅. 甲州ワインからの多糖類の分離とその性質. *日本ブド*

- ウ・ワイン学会誌. 5:19-26 (1994).
9. Okuda, T., M. Fukui, T. Takayanagi, and K. Yokotsuka. Characterization of major stable proteins in Chardonnay wine. *Food Sci. Technol. Res.* 12:131-136 (2006).
 10. Rapp, A. and M. Güntert. Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. In "The Shelf Life of Foods and Beverages . (G. Charalambous, ed.), pp. 141-167. Elsevier, Amsterdam (1986).
 11. Ribéreau-Gayon, P. Self-life of wine. In *Handbook of Food and Beverage Stability*. G. Charalambous, Ed., pp. 745-772. Academic Press, New York (1986).
 12. Schreier, P., F. Drawert, Z. Kerényl, and A. Junker. Gaschromatographisch -massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. VI. Aromastoffe in Tokajer Trocken-beerenauslese (Aszu)-Weinen a) Neutralstoffe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 161:249-258 (1976).
 13. Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am J. Enol. Vitic.* 38:69-77 (1987).
 14. Singleton, V. L. and C. S. Ough. Complexity of flavor and blending of wines. *J. Food Sci.* 27:189-196 (1962).
 15. Singleton, V. L., A. R. Trousdale, and J. Zaya. Oxidation of wines. I. Young white wines periodically exposed to air. *Am. J. Enol. Vitic.* 30:49-54 (1979).
 16. Somers, T. C. and E. Vérette. Phenolic composition of natural wine types. In *Wine Analysis, Modern Methods of Plant Analysis. New Series, Vol. 6*. H. F. Linskens and J. F. Jacjson (Ed.), pp. 219-257, Springer-Verlag, Berlin (1988).
 17. 横塚弘毅. カベルネ・ソービニヨン及びマスカット・ベリーA 赤ワインの熟成中における色調の変化 I. 色素パラメータのスペクトル分析. *日本醸造協会誌.* 90 : 222-229 (1995).
 18. 横塚弘毅. ワイン製造 (その7)、シリーズ、醸造の基礎技術. *日本醸造協会誌.* 95 : 318-327 (2000).
 19. Yokotsuka, K., K. Nozaki, and T. Kushida. Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannin. *J. Ferment. Technol.* 61:413-416 (1983).
 20. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: Turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:329-338 (1995).

貯蔵中のワインタンパク質の挙動

and blending of wines. *J. Food Sci.* 27:189-196 (1962).