

酵母による鉄含有物質の生合成に関する研究

(第1報) ブドウ酒発酵中における鉄の消長

四條 徳 崇, 田中健太郎

(昭和40年10月20日受理)

Studies on Biosynthesis of Iron-Containing Substances by Yeasts.

Part 1. The Fate of Iron during Fermentation of Grape Musts.

By Noritaka SHIJO and Kentaro TANAKA

The fate of soluble iron in the fermenting musts of the white wine prepared from a grape of Delaware variety and of the red wine prepared from a grape of Mills variety, in which were added $^{59}\text{Fe}-\text{FeSO}_4$ (as Ferrous ion), $^{59}\text{Fe}-\text{FeCl}_3$ (as Ferric ion) and both $^{59}\text{Fe}-\text{FeCl}_3$ and amino acids, have been investigated by determining radioactivity of ^{59}Fe for 30 days after start of fermentation.

It was supposed that inorganic iron in the musts was incorporated into the yeast cells during the fermentation and then excreted into the musts as soluble organic iron compounds.

This process was notably observed for 10 days after start of fermentation but was hardly observed on and after 15 days.

The effects of varieties of added amino acid on the amounts of soluble iron in the wine were not recognized.

The concentration of the soluble iron in the red wine was about two times high in the white wine.

緒 言

ブドウ果汁およびブドウ酒中に溶存する微量金属は、或る一定量まではブドウ酒発酵に必要な成分であるとされているが、過剰の金属特に銅 (0.5 mg/l 以上)¹⁾ および鉄 ($6 \sim 30 \text{ mg/l}$) が存在していると、ブドウ果汁では香味が劣り、ブドウ酒では混濁を生ずるなどその品質に悪い影響をおよぼすと言われている。このためにブドウ酒および果汁中の銅および鉄の分析^{3~8)}、過剰のこれら金属の除去方法^{9~13)}、および両金属に起因すると思われる混濁^{14~19)} などその含量とブドウ酒の品質についての研究報告はしばしばみられる。

一方ブドウ酒発酵中における銅および鉄の役割について、AMERINE²⁰⁾ らはブドウ果汁

に無機の銅および鉄を種々の割合で添加し発酵させた場合、酵母によりその大部分が菌体内に固定されると報告し、又 KOLTA²¹⁾ はブドウ酒中の酒石酸、クエン酸等の有機酸が鉄と錯塩を作り混濁の防止に役立っていると報告している。しかしブドウ果汁中に存在する銅および鉄がブドウ酒発酵を経てブドウ酒中に化学的に如何なる状態で存在するか、又酵母の活性にどのような影響をおよぼすかについての報告は少ない。

私らは先づ金属として鉄を選び、果汁に加えられた無機性鉄がどのような経過をへてブドウ酒中に溶存しているか、その化学的構造、生理活性の有無ならびにこれが酵母の活性にどのように影響するかなどについて検討する目的で研究に着手した。

本報においては鉄-59を Tracer として白 (Delaware)、赤 (Mills) 両種の果汁を原料として2 俵の鉄、3 俵の鉄および3 俵の鉄とアミノ酸を添加してブドウ酒発酵を行ない、発酵中の鉄の動向を添加物の影響を含めて追跡し、或る程度の結果を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 原料ブドウおよび果汁の処理方法

原料ブドウは1962年度 Delaware および Mills を使用し、いずれも除梗破碎機にかけ破碎し、Delaware はそのまま自然流出液を取り、果汁にメタカリ ($K_2S_2O_5$) を SO_2 として 100 ppm 加え、 $15^\circ C$ に1 夜放置した後、上澄液を取り、さらに連続遠心分離器にかけて滓を除いた後、糖度24%になるように補糖した。Mills は破碎後、色調を出すため $60^\circ C$ 、10分間加熱し、冷却後圧搾器により圧搾した果汁を Delaware と同様に処理し、滓を除いた後24%になるように補糖してそれぞれの果汁とした。果汁はメタカリ添加後、いずれも上記の操作を行い、かつ48時間経過しているため、その還元性は殆んど認められない。

2. 添加物の調製

i) $^{59}Fe + FeCl_3$ 溶液 ; ^{59}Fe 0.6mc に蒸留水 50 ml を加え ^{59}Fe 液を作る。これより 40 ml を取り、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 13.1g ($Fe=1880$ mg) を溶かし、蒸留水を加え 100 ml とした。このものは $Fe^{+3}=27$ mg/ml であり、 $^{59}Fe=4.8$ $\mu c/ml$ である。

ii) $^{59}Fe + FeSO_4$ 溶液 ; ^{59}Fe 溶液 10 ml に $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.004 g ($Fe=675$ mg) を溶解し、全量を蒸留水にて 25 ml とした。これは $Fe^{+2}=27$ mg/ml、 $^{59}Fe=4.8$ $\mu c/ml$ である。

iii) アミノ酸 ; 特級アミノ酸の結晶をそのまま、それぞれの割合に応じて添加した。(TABLE I)

3. 仕 込 方 法

i) Delaware ; 果汁 21 l に酒母 (ブドウ酒酵母 OC-2) を 1% になるように加え、2 l 瓶に 1.5 l とり D-0 (対照) 区分とし、残り 19.5 l を 1.5 l づつ 2 l 瓶に分注し D-13 まで作る。その内 D-2、D-4 には $^{59}Fe + FeSO_4$ 溶液をそれぞれに 3.0 ml、4.5 ml を加え、 Fe^{+2} 量として 54 mg/l、81 mg/l とし、D-1、D-3 には $^{59}Fe + FeCl_3$ 溶液をそれぞれ 3.0 ml、4.5 ml を加え、 Fe^{+3} 量として 54 mg/l、81 mg/l とする。他の 9 区分には $^{59}Fe + FeCl_3$ 溶液を 3.0 ml 宛加え、 Fe^{+3} 量として 54 mg/l とし、更に D-5 から D-12 までには各種アミノ酸を $Fe : Amino\ Acid = 1 : 1$ 分子量の割合で添加し、D-13 には発酵を行なわせないた

め, 99%アルコールをアルコール濃度15%になるように添加し無発酵区分とする, それぞれを攪拌均一化した後発酵栓を付けて, 室温にて発酵させた。(TABLE I)

ii) Mills ; 果汁 13.5 l に酒母 (ブドウ酒発酵母 OC-2) を 1% になるように加え, Delaware と同様 M-0 より M-8 まで調製した。(TABLE I)

TABLE I
発酵果汁の調製 Preparation of the Musts

区分 Sign	果汁 (l) Juice	添加量 Amount Added (mg/l)		
		Fe ⁺³ a)	Fe ⁺² b)	Amino acid
<i>Delaware variety</i>				
D-0	1.5	—	—	—
D-1	1.5	54	—	—
D-2	1.5	—	54	—
D-3	1.5	81	—	—
D-4	1.5	—	81	—
D-5	1.5	54	—	Proline 115
D-6	1.5	54	—	Phenylalanine 165
D-7	1.5	54	—	Leucine 131
D-8	1.5	54	—	Cystine 121
D-9	1.5	54	—	Glycine 75
D-10	1.5	54	—	Tyrosine 181
D-11	1.5	54	—	Asparagine 133
D-12	1.5	54	—	Threonine 119
D-13	1.5	54	—	Alcohol
<i>Mills variety</i>				
M-0	1.5	—	—	—
M-1	1.5	54	—	—
M-2	1.5	81	—	—
M-3	1.5	54	—	Proline 115
M-4	1.5	54	—	Phenylalanine 165
M-5	1.5	54	—	Leucine 131
M-6	1.5	54	—	Cystine 121
M-7	1.5	54	—	Glutamic acid 147
M-8	1.5	54	—	Alcohol

a) FeCl₃ · 6H₂O was used

b) FeSO₄ · 7H₂O was used

4. 放射能測定法

各区分につき発酵中の果汁を毎日よく攪拌均一化して, その中より 5 ml を取り, 10,000 r. p. m., 10 分間遠心分離し, 可溶部 (ブドウ酒) より 2 ml を取り, Aloka DC-6 ウェル型シンチレーションカウンタにより放射能を測定した。

結果および考察

1. 3 価の鉄添加量の影響

Delaware の D-1 ($\text{Fe}^{+3}\dots 54 \text{ mg/l}$) と D-3 ($\text{Fe}^{+3}\dots 81 \text{ mg/l}$) の可溶部では、その鉄含量の消長は添加量の多少にかかわらず同じような経過をたどっている。即ち仕込み2日目頃までは急激に減少するが、主発酵の始まる3日目頃より鉄含量は急に増加し、5～6日目頃で鉄含量は最高となり、以後11日目頃までは若干の増減を示しながら後発酵に移り、12日目頃よりその含量ははっきり減少を始め、D-1では20日目頃まで、D-3では30日目頃までつづいているが、いずれの場合にも最終的には含量はほぼ等しくなっている。(Fig. 1)

Mills の M-1 ($\text{Fe}^{+3}\dots 54 \text{ mg/l}$) と M-2 ($\text{Fe}^{+3}\dots 81 \text{ mg/l}$) の可溶部では、D-1 および D-3 のように著しい変化はなく、仕込み後2日目頃まで減少し、以後は徐々に増加し発酵の盛な時期に可溶性鉄は最高となり、以後は徐々に減少しているが、発酵終了時における鉄含量は Delaware の場合に比べて添加量の相異による違いがあらわれている。又同じ添加量ならば Delaware よりも可溶性鉄含量は多い。(Fig. 1)

又ブドウ果汁にアルコールを加えた無発酵区の D-13 および M-8 は 4日目頃までは鉄含量は著しく減少するが、以後は緩慢となり、6日目頃よりほぼ一定となる。(Fig. 1)

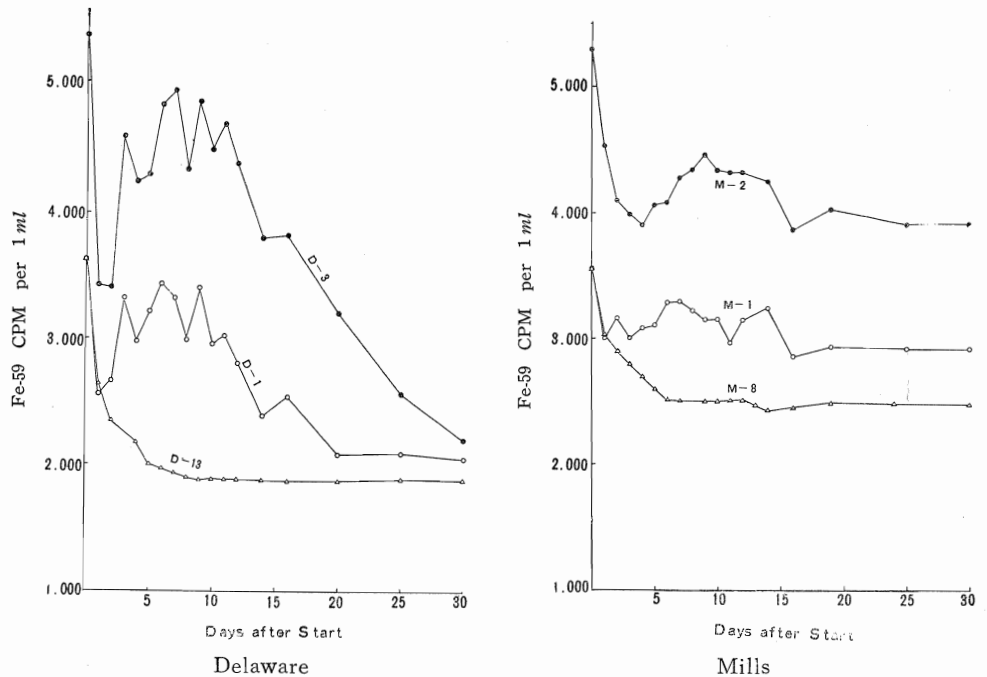


Fig. 1. Changes in the amount of soluble Fe^{+3} in the musts during fermentation. For the must No. see TABLE I

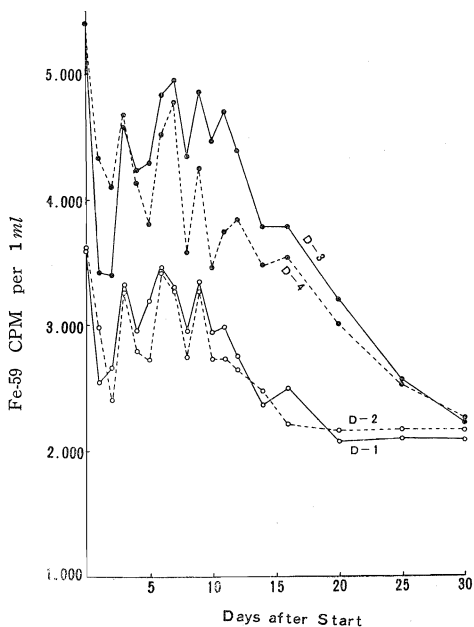
このことを比較検討すると、添加した無機鉄は発酵の初期においては、ブドウ果汁に含まれている酸その他の成分と結合して不溶物を生ずると共に、酵母が菌体内に鉄を取込むため可溶性鉄量は急激に減少する。発酵が盛んになる6日目頃より酵母は取込んだ鉄

を可溶性鉄として菌体外に排出するため、ブドウ酒中の鉄含量は増加するが、又一方この時期には鉄の取込みも行なわれているのでこの増減の変化を繰返し、発酵が緩慢になるにしたがって可溶性鉄の変化はなくなり、15日以後は殆んど一定している。Mills と Delaware では可溶性鉄の量に違いがあるのは果汁成分の相異、酵母の発育状態などが考えられるが今後なお詳しく検討するつもりである。

2. 2価と3価の鉄の相違

D-1, D-2, D-3 および D-4 について、それぞれ 2 価および 3 価の鉄を添加した場合の発酵中の可溶部の鉄の変化を追跡したところ、2 価と 3 価の鉄ではほとんど同じような経過を示し、著しい差異は認められなかった。(Fig. 2)

Fig. 2. Changes in the amount of soluble Fe^{+3} and Fe^{+2} in the musts during fermentation. For the must No. see TABLE I



3. アミノ酸添加による可溶性鉄含量への影響

前述のように 2 価と 3 価の鉄による酵母の取込みの違いはみられなかったので、3 価の鉄を使用し TABLE I に示すように、各種アミノ酸を添加して、アミノ酸の種類による鉄含量への影響をしらべた結果、Delaware ではアミノ酸を添加しても、可溶性鉄含量への影響はみられなかったが、Mills では 3 価の鉄を加えた場合と比較して発酵中ではその消長に変化がある場合も認められたが、15日以後のブドウ酒中の可溶性鉄含量についてはほとんど影響はみられなかった。(Fig. 3, Fig. 4)

要 旨

Delaware および Mills の果汁に、 FeSO_4 (Fe^{+2} として)、 FeCl_3 (Fe^{+3} として) および FeCl_3 とアミノ酸を添加し、放射性鉄-59 を tracer としてブドウ酒発酵を行ない、発酵開始より約30日間もろみ中の可溶性鉄の消長を測定した。

2 価、3 価の如何にかかわらず無機の鉄はいずれも酵母によりその菌体内に取込まれ、可溶性鉄として再びもろみ中に排出される。この経過は仕込後10日頃まで最も盛んで、15日以後はほとんど変化していない、このためブドウ酒中の鉄成分は無機性の鉄とは違った鉄含有物質が相当量溶存しているものと思われる。

Delaware 果汁を原料とした場合よりも、Mills の方がブドウ酒中の可溶性鉄は約 2 倍

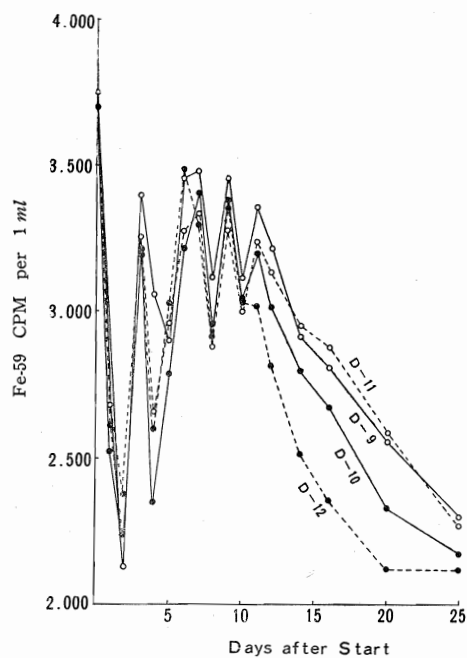
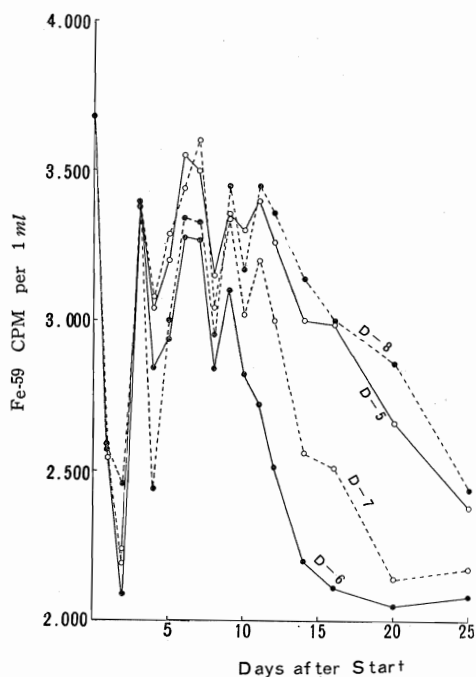


Fig. 3. Effects of varieties of added amino acid on the amounts of soluble Fe^{+3} in the Delaware musts during fermentation. For the must No. see TABLE I

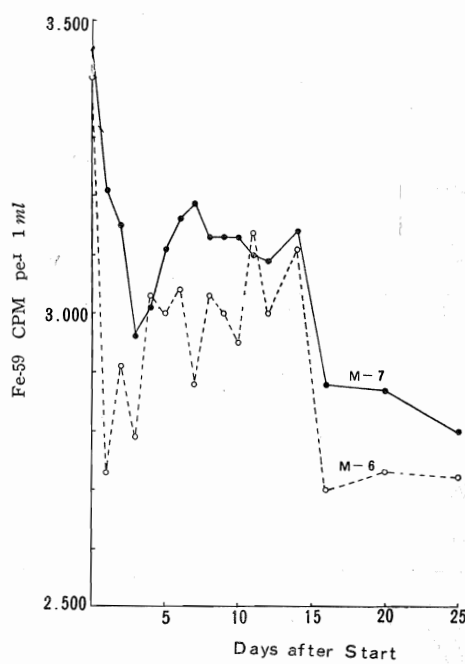
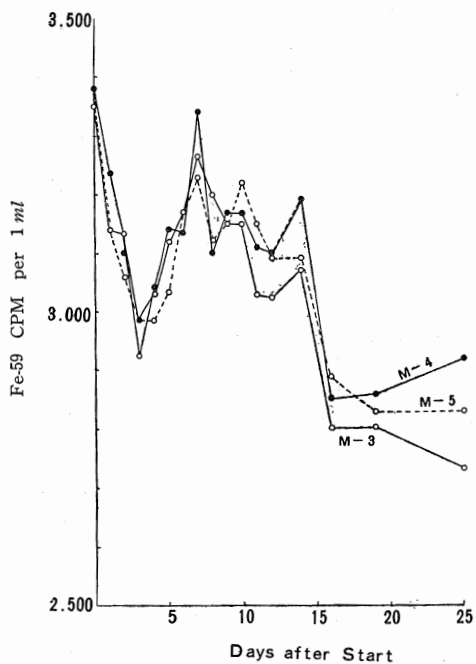


Fig. 4. Effects of varieties of added amino acid on the amounts of soluble Fe^{+3} in the Mills musts during fermentation. For the must No. see TABLE I

多く又アミノ酸添加による影響はいずれもほとんどみられなかった。

終りに臨み実験に協力して戴いた両角劔喜, 飯沼静子および雨宮昭郎の諸氏に感謝致します。

文 献

- 1) BONASTRE, J. : Le Ferrocyanure ferigu, Echangeur de Cation lourde. *Ind. alim. agr.*, **73**, 21 (1956)
- 2) FORMCHON, J. C. M. : Oenology course for winemakers. Lecture 1. Senior course, *Wine Stability. Aust. wine Brew. and Spirit. Rev.*, **79** (7), 56 (1961)
- 3) NITAGLIANO, M. : The Mineral Constituents of Wine. II. Iron. *Ann. Spor. agr.*, (N. S.), **10**, 659 (1956)
- 4) 早川善之助 : 県産ブドウ酒中の銅含量, 山梨県立医学研究所報, **2**, 261 (1965)
- 5) BOUKAROV, P. S. et al. : Dasage der métaur louda dans le vin par polarographic. *Vinod, Vinog.*, **21**, (7) 32 (1961)
- 6) LYALIKOU, Yu, S. et al. : A rapid method for determination of iron and aluminium in Wine. *Sadovodstvo Vinog. Vinod. Moldavü*, **16**(8), 45(1961). *Ref. C. A.*, **56**, 1840 (1962)
- 7) MARGHERI, G. et M. RIGATTI : Les substances Minérales des Vines de le province de Trente, *Riv. Vitic. Enol.*, **17** (10), 405 (1964)
- 8) HENNI, K. und A. LAY. : Kolormetrische Bestimmung von Kuppferiu in Wine mit Oxalsäure-bis- (Cyclohexylidenhydroxid) "Cuprizon". *Weinb. Keller*, **11**, 585 (1964)
- 9) GERUTTL, G. & L. CERTTEL : Employing ion-exchange resins in winemaking. *Riv. vitticolt, l enol.*, **8**, 119 (1955)
- 10) CAPT, E. : Sur le deferrisation der Vins par les sels de l' acide phytigue. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **47**, 431 (1956)
- 11) DEIBNER, L. et P. BÉNARD : Emploi der alginates pour la deferrisation des Vins. *Ann. tech. agr.*, l' I. N. R. A., **7**, 103 (1958)
- 12) EKSTER. Ya. E. et L. Ya. EKSTER : Sur la teneur en fer dans les Vine traites par la bentonite la sous-bentonite. *Bull. P O. I. V.*, **36** (394), 1477 (1963)
- 13) ANTONIANI, C. et A. D. GHETTA : Les problemes relatifs a la demétallisation des Vins et l'emploi du ferrocyanure de potassium. *Riv. Vitic. Enol.*, **11**, 407 (1963)
- 14) AERNE, M. A. & M. A. JOSLYN : The behavior of wines sus eptible to clouding by iron casse and capper casse. *Table Wine*. 232 (1951)
- 15) KEAM, C. E. and Gy. L. MARSH : Investigation of Capper Complexes causing Cloudiness in Wines. *Food Res.*, **21**, 441 (1956)
- 16) ROCQUES. M. J. : La stobilisation der Vins. *Le Moniter Vinicole*, Fev. 1957 : *Rev. Vinicole*, No, 64, 16 (1956)
- 17) COLAGRANDE, O. : Neue Gesichtchtspunkte über dée Bildung der Kupfer-

- trubungen bei Weiben Flaschenweinen. *Riv. Viticolte enol.*, **11**, 187 (1958)
- 18) BERG, H. W. and C. S. OUGH : The effects of Sorbitol on Wine. *W & V.* **43**, 27 (1962)
- 19) RENTSCHEER, H. : Metalltrubungen von Weinen und ihre Behandlung. *D. W. Z.*, **100**, 526 (1964)
- 20) THOUKIO, G. and M. A. AMERINE : The Fate of Copper and Iron during Fermentation Grape Musts. *Am. J. Enol.*, **7**, 45 (1956)
- 21) KOLTA, R. and E. ZUKAL : Complex Fermentation between Iron and Organic acid. *Hung. tech. Abstr.*, **8**, 92 (1956)