

〔山梨大発研報告 15 1~8 1980〕

銅塩法によるワイン及びぶどう果汁中の  
ペプチドの簡易・微量定量\*

横塚 弘毅・相原 俊秀・榎田 忠衛

## Copper salt micromethod for the determination of peptides in juices and wines.\*

KOKI YOKOTSUKA, TOSHIHIDE AIHARA, and TADAE KUSHIDA

Peptides in fruit juices, vegetable juices, and wines were determined by a method including treatment with Dowex 50-X2(charcoal),  $\text{Cu}^{2+}$  chelation, and ion-exchange chromatography.

After removal of polyphenols and organic acids by treatment with Dowex 50-X2(charcoal), the sample was shaken at pH 8.0 with  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ . The copper salts formed were separated into an amino acid fraction and a peptide fraction by DEAE-Sephadex A-25 chromatography. The peptide fraction was collected and adjusted to pH 6.5. The absorbancy of the fraction was measured at 250 nm.

The determination was not affected by various juice or wine components including glucose, polyphenols, organic acids, metal salts, and ethanol. Sometimes, this method, however, could not be applied to the samples containing a large amount of acidic amino acids and very basic or aromatic peptides.

ワイン中のペプチドやタンパク質は、ワインの呈味、濁り、緩衝能などに深く関与しているが、それらの存在量は少ない。たとえば、甲州白ワイン1ℓ中には、アミノ酸が約1g存在するのに対し、ペプチドは約100mg、タンパク質は数mg存在している<sup>1,2)</sup>。筆者らは先に、ワインやジュース中のタンパク質を色素法を用いて微量定量する方法を報告したが<sup>3)</sup>、多量のアミノ酸と微量の低分子ペプチドが含まれる試料中のペプチドを簡便かつ微量で定量できる方法は知られていない。

Spies は、アミノ酸銅塩の紫外吸収極大が230nmにあることを利用し、ペプチド銅塩と同じ波長で測定してペプチドを定量する方法を報告したが<sup>4)</sup>、ペプチドと共にアミノ酸が存在したり、230nmに吸収がある物質が共存する試料には適用できない。アミノ酸銅塩

とペプチド銅塩の分離には、DEAE-cellulose<sup>5-8)</sup>、TEAE-cellulose<sup>5,6)</sup>、DEAE-Sephadex<sup>9)</sup>などを用いたカラムクロマトグラフィーが用いられているが、いづれもペプチドの分離、精製を目的としたものが多く、操作も複雑である。

本研究では、ワインやぶどう果汁中のアミノ酸とペプチドを銅塩とした後、イオン交換クロマトグラフィーで両者を分け、得られたペプチド溶出液を直接紫外吸収で測定して、微量かつ迅速にペプチドを定量することを試みた。

## 実験方法

**供試合成ペプチド** 標準ペプチド銅塩の調製には、株式会社ペプチド研究所製 Glu-Glu, Gly-Pro, Gly-Phe, Gly-Leu, Leu-Gly, Gly-Gly, His-Leu, Leu-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His 及びシグマ社製 Lys-Lys を用いた。

**供試ワイン** 各年度に山梨県あるいは当研究施設

\* 日本産ぶどうとワインの色調と呈味成分に関する化学的研究・第11報

Chemical studies on coloring and flavoring substances in Japanese grape and wines (XI).

育種試験地で収穫したぶどうを原料とし、付属試験工場を試醸した8種の白ワイン、4種の赤ワインを試料とした。

**供試果汁** 1978年、当育種試験地で収穫した6種のぶどうをガーゼに包んで圧搾し、得られた果汁を18,000rpm, 20min 遠心して得られた上清をぶどう果汁とした。また、市販のパナナ、なし、りんご及びみかんをワーリングブレンダーで処理し、18,000 rpm, 20 min 遠心して得られた上清も試料とした。

**供試野菜ジュース** 8種の野菜(ほうれん草、にんじん、じゃがいも、さつまいも、だいこん、きゅうり、たまねぎ、トマト)を包丁で細かく切り、適量の脱イオン水と共にワーリングブレンダーで処理し、ブフナー漏斗でろ過した。ロ液を18,000 rpm, 20 min 遠心し、得られた上清を野菜ジュースとした。

**アミノ酸と合成ペプチドの銅キレート化** アミノ酸銅塩およびペプチド銅塩の調製は、Tommel らの方法<sup>5)</sup>に準じて行った。アミノ酸あるいはペプチド3mgを0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.0)3mlに溶かし、希NaOHでpH8.0に調整した。これに塩基性炭酸銅  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  約5mgを加え、室温で30min 攪拌し銅キレート化後、3,500 rpm, 10 min 遠心して過剰の炭酸銅を除いた。

**各種ワインおよびジュース中のペプチドの銅キレート化** 試料3mgを希HClまたは希NaOHでpH3に調整後、Dowex 50-X2カラム(H型、0.7×9.0cm)に10ml/hrの流速でつけ、脱イオン水15mlで洗浄後、同量の30%ピリジン-4%酢酸でアミノ酸とペプチドを溶出した。溶出液は減圧下40℃で乾固し、0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.0)3mlに溶かし、前述の方法で銅キレート化した。赤ワインの場合には、1~2%となるように活性炭を加え、攪拌後ろ過し、ロ液を試料として上記の操作を行なった。

**DEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーによるアミノ酸銅塩とペプチド銅塩の分離** 0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(0.7×9.0cm)にアミノ酸銅塩とペプチド銅塩を含む試料をつけ、15mlの上記緩衝液で洗浄後、同量の0.5M NaClを含む0.05Mホウ酸緩衝液、pH8.0(以後、0.5M NaCl-pH8.0緩衝液とする)で溶出した溶出液を希HClまたは希NaOHでpH6.5に調整し、0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.0)で一定量とした後250nmの吸光度を測定し、Gly-Leu銅塩の検量線からペプチド量を算出した。

## 実験結果および考察

**合成ペプチド銅塩の分光学的性質** Table 1に10種のペプチド銅塩の0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.0)中の可視部及び紫外外部収極大を、Fig.1にGly-Leu銅塩の吸収スペクトルを示した。可視部ではペプチド銅塩の $\lambda_{\text{max}}$ は620nm付近に、紫外部では195nm付近に見られた。ワイン成分の影響が少ないペプチド銅塩の測定波長としては620nm付近が最適であるが、その吸光度は紫外部波長で測定した時の数十分の一であり(Fig.1)、微量定量を目的とするには不適當である。しかし、ワインの主成分であるフェノールカルボン酸やタンニンでは270~320nmに吸収を持ち<sup>10,11)</sup>、また190~220nmには有機酸に由来する吸収が存在する。そこで、これらの成分の影響が比較的少ない250nmを測定波長とした。

各ペプチド銅塩の250nmにおける吸光度とpHとの関係を示したのがFig.2である。ペプチド銅塩の吸光度はpH4~6で急激に増加し、またGly-Pro銅塩を除いた他のペプチド銅塩は、pH6~7.5で吸光度の増加はゆるやかであった。そこで、ペプチド銅塩溶液のpHを希HClでpH6.5とし250nmで測定することとした。しかし、各ペプチド銅塩の分子吸光係数 $\epsilon_{250}$ は非常に異なり、たとえば、Gly-Gly  $1.86 \times 10^3$ , Gly-Leu  $2.54 \times 10^3$ , Gly-Pro  $0.42 \times 10^3$ , Gly-Phe  $2.20 \times 10^3$ , Glu-Glu  $2.48 \times 10^3$ , His-Leu  $1.87 \times 10^3$ , Leu-Gly-Gly  $1.49 \times 10^3$ , Gly-Gly-His  $3.93 \times 10^3$ , であった。

Table 1. Wavelengths at maximum absorbancy of copper salts of dipeptides and tripeptides in 0.05 M potassium borate buffer, pH 8.0.

Peptides	Ultraviolet nm	Visible nm
Gly-Gly	198	635
Gly-Leu	193	627
Leu-Gly	193	640
Gly-Pro	198	660
Glu-Glu	191	632
His-Leu	196	614
Gly-Gly-Gly	196	614
Leu-Gly-Gly	194	557
Glu-Cyt-Gly*	192	620
Gly-Gly-His	197	524

\* Cyt : Cystine

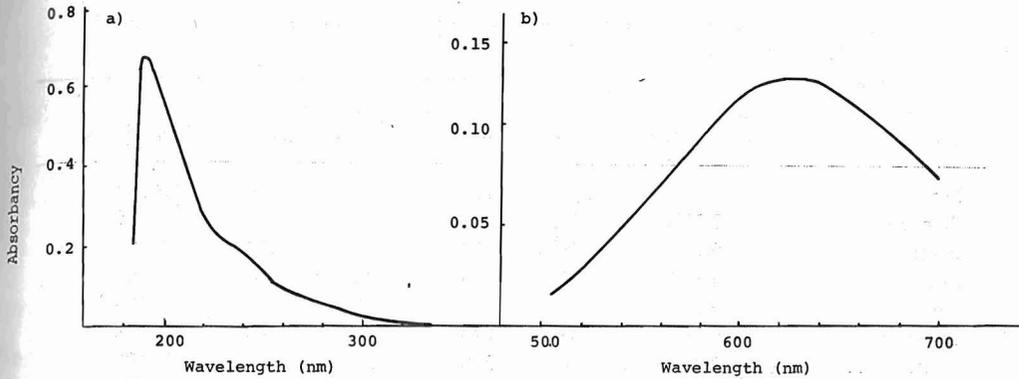


Fig. 1. Absorption spectra of copper salt of Gly-Leu in 0.05M potassium borate buffer, pH 8.0.

The concentration of the copper salt of Gly-Leu was 12.5  $\mu\text{g/ml}$  as Gly-Leu in a) and 250  $\mu\text{g}$  in b).

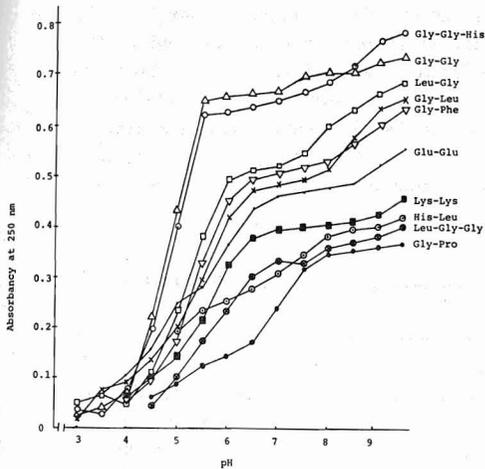


Fig. 2. Effect of pH on absorbance (at 250 nm) of copper salts of peptides.

After chelation, the solution of the copper salt of each peptide was adjusted to pH 3.0 - pH 9.5 with dilute NaOH or dilute HCl. The concentration of the copper salt of each peptide was 50  $\mu\text{g/ml}$  as free peptide.

**ペプチド銅塩形成に及ぼすワイン成分の影響** ペプチド銅塩形成に及ぼす主要なワイン成分の影響を調べた (Table 2). 各成分はワイン中に含まれる量に近い濃度で加えられている。グルコース、ペプチン、KCl, NaCl, 酢酸及びエタノールはほとんど影響しないが、カテキン、コーヒー酸、酒石酸及びリンゴ酸を添加した場合には一定の値が得られなかった。これは、

添加物質自体250 nmに吸収があったり、酒石酸、リンゴ酸は銅と複塩を形成するためと考えられ、これらの物質を何らかの手段で除いてから銅塩を形成させる必要がある。

**試料の前処理** ポリフェノール及び有機酸を除去するため、試料をDowex 50-X2で前処理後、銅キレート化を行なった結果をTable 3に示した。酒石酸、リンゴ酸、カテキンはDowex 50処理によって除去されたが、コーヒー酸はペプチドと挙動を共にした。しかし、コーヒー酸は後述したDEAE-Sephadex A-26クロマトグラフィーでアミノ酸銅塩とペプチド銅塩を分離する際、ペプチド区分には溶出せずゲルに吸着したまま残った。以上の結果から、白ワイン用ぶどう果汁や白ワインを試料とする場合には、Dowex 50を用いて前処理をすれば再現性の良い測定値が得られることが示唆された。

**DEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーにおけるアミノ酸銅塩とペプチド銅塩の挙動** Fig.3は、アミノ酸銅塩とペプチド銅塩の混合物のDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーにおける挙動を示している。Gluを除いた他のアミノ酸銅塩は、0.05Mホウ酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。塩基性ペプチド His-Leu銅塩はアミノ酸と分離して溶出したが、これより塩基性の強いペプチドはアミノ酸に近い位置に溶出されると考えられる。用いた合成ペプチドの中では最も酸性のGlu-Glu銅塩は、NaCl濃度0.3M程度で溶出していることから、0.5M NaCl-pH 8.0緩衝液で大部分のペプチド銅塩は溶出できると思われる。また、0.5M NaClを含む緩衝液のpHを6~8に変化させて用いたが、

Table 2. Effects of various wine components on the formation of copper salts of dipeptides and tripeptides.

Components added	Final concentration	Relative absorbance ( % )				
		Gly-Leu	Gly-Pro	Glu-Glu	His-Leu	Leu-Gly-Gly
None		100	100	100	100	100
Glucose	0.3 %	99	86	105	107	105
Pectin	0.1	78	110	102	112	99
KCl	0.2	91	95	103	112	104
NaCl	0.2	101	90	101	104	108
Catechin	0.01	148	373	94	188	108
Caffeic acid	0.01	96	240	133	235	106
Tartaric acid	1.0	81	-217	-63	-328	-268
Malic acid	1.0	-30	-235	-66	20	81
Acetic acid	1.0	102	113	102	84	99
Ethanol	13.0	98	84	100	109	108

Each peptide (1.5 $\mu$ moles) was dissolved in 3ml of 0.05 M potassium borate buffer (pH 8.0), containing each wine component at the same concentration indicated in this table. To the solution, an excess of  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$  was added. The mixture was mechanically stirred at room temperature for 30min and centrifuged at 3,000rpm for 10min. The supernatant was adjusted to pH 6.5 and its absorbancy was measured at 250nm.

Pectin was prepared from Kosu grapes according to a previous paper<sup>3)</sup>.

Table 3. Treatment of the sample solutions containing polyphenols and organic acids with Dowex 50-X2.

Components added	Final concentration	Relative absorbance ( % )				
		Gly-Leu	Gly-Pro	Glu-Glu	His-Leu	Leu-Gly-Gly
None		100	100	100	100	100
Tartaric acid	1.0	94	107	86	107	106
Malic acid	1.0	110	101	103	85	101
Catechin	0.01	101	114	75	109	101
Caffeic acid	0.01	160	194	124	173	111

The sample solutions were the same as in Table 2.

The sample solution (3ml) was applied to a small column of Dowex 50-X2 (0.7 $\times$ 9cm) at a flow rate of 10ml/min. The column was washed with 15ml of distilled water and peptides were eluted with 15ml of 40% pyridine-4% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 0.05M potassium borate buffer (pH 8.0). The  $\text{Cu}^{2+}$  chelation was carried out as shown in Table 2.

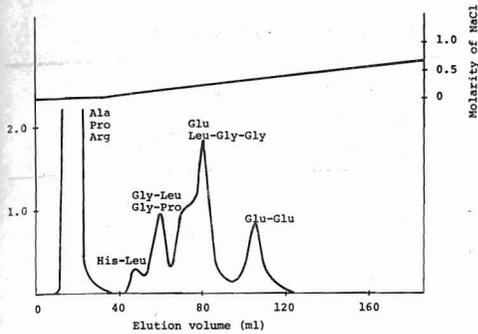


Fig. 3. Chromatographic behaviour of copper salts of amino acids and peptides on DEAE-Sephadex A-25.

Four amino acids and five peptides were dissolved, at a concentration of 0.5mg/ml, in 3ml of 0.05M potassium borate buffer, pH 8.0. The constituents in the solution were converted into the corresponding copper salts as described in the assay procedure. The solution of the copper salts was applied to a column of DEAE-Sephadex A-25 (1.6 × 7.5cm), equilibrated with 0.05M potassium borate buffer, pH 8.0, at a flow rate of 12.5ml/hr. The copper salts were eluted from the column at room temperature with the same buffer (30ml) and with linear gradient elution from the pH 8.0 buffer (120ml). The absorbancy of the eluate was read at 250 nm.

ペプチド銅塩の溶出位置にはほとんど変化が認められなかった。

銅塩法によるペプチド定量法の要約と信頼性

Fig. 4は、銅塩法によるペプチド定量の要約を示したものである。ペプチド量は、各種濃度のGly-Leu溶液を添した定量操作の全てを行って得られた測定値より成した検量線 (Fig.5)に基づいて算出した。

Table 4は、Gly-Leu溶液、甲州白ワイン、甲州ぶどう十及びこれらの混合物を試料とし、本方法によって得られた測定値を示したものである。Gly-Leu溶液、ワインあるいはぶどう果汁を試料とした時の各々の吸光度と、これらの混合物を試料とした時の吸光度を比べると、混合試料の吸光度は、ワインあるいはぶどう果汁の吸光度に、添加したGly-Leu量の吸光度をば加えた値となった。また本定量法とアミノ酸分析法で測定したワイン中のペプチド量は一致している。これ、250 nmで測定した吸光度がペプチド銅塩のみに

Fig. 4. Procedure for the determination of peptides in wines and juices by the copper salt micromethod.

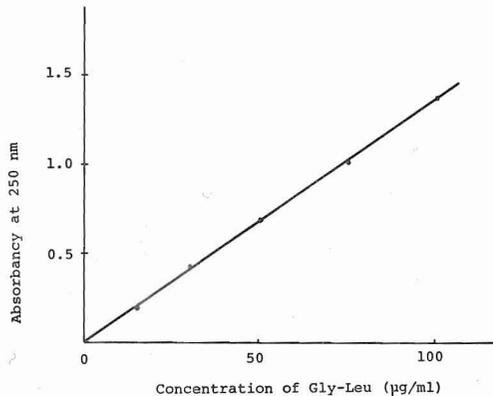
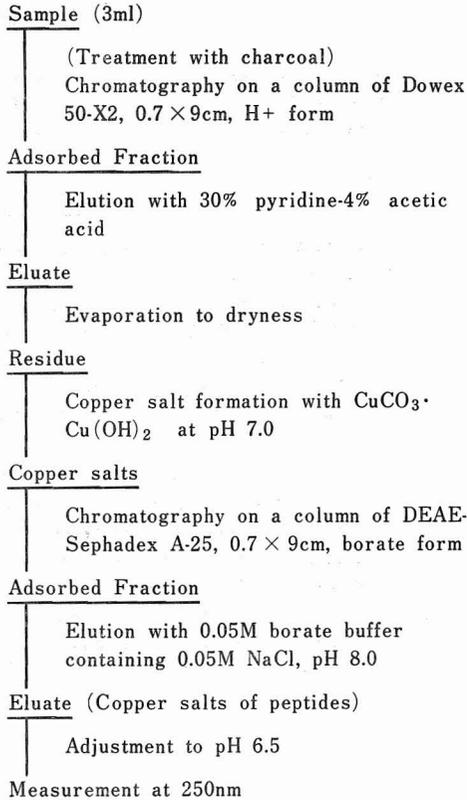


Fig. 5. Standard curve of copper salt of Gly-Leu.

Table 4. Determination of peptides in Koshu wine and Koshu grape juice.

Samples	Absorbancy at 250nm	Copper salt micromethod $\mu\text{g/ml}$	Amino acid analysis $\mu\text{g/ml}$
Gly-Leu (450 $\mu\text{g}$ )	0.938		
Wine (3ml)	0.813	65.0	67.2
Juice (3ml)	1.680		
Wine + Gly-Leu	1.695		
Juice + Gly-Leu	2.535		

- 1) Each sample (3ml) was treated with Dowex 50-X2 (Table 3) and the  $\text{Cu}^{2+}$  chelation was carried out as described in Table 2. The copper salts of amino acid and peptides were applied to a small column (0.7 $\times$ 9cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with 0.05M potassium borate buffer (pH 8.0). After elution with 15ml of the same buffer, the copper salts of peptides were eluted with 15ml of 0.05M potassium borate buffer (pH 8.0) containing 0.5M NaCl. The peptide fraction (15ml) was adjusted to pH 6.5 and the absorbancy was measured at 250nm.
- 2) A part of the peptide fraction (5ml) was extracted three times with an equal volume of 8-hydroxyquinoline in chloroform (6.5mg/ml). The aqueous fraction freed from  $\text{Cu}^{2+}$  ions was separated to dryness and the residue was hydrolyzed in 6N HCl in an evacuated, sealed tube at 105 $^{\circ}\text{C}$  for 24hr. The hydrolysate was evaporated under reduced pressure at 40 $^{\circ}\text{C}$ , dried over NaOH pellets and analyzed with a JEOL Model-6AH amino acid analyzer. The peptide content was estimated from the sum of all the amino acids found.

由来することを示している。これらのことから、白ワインや白ワイン醸造用ぶどう果汁中のペプチドは本定量法によって測定できることが明らかとなったが、赤ワインのごとく赤色系色素を多量に含む試料ではDowex 50処理によってアントシアニンを完全に除去できない。そこで、試料を活性炭処理しアントシアニンを除去してから本定量法を適用した。Fig.6はその結果を示している。活性炭量が増加すると吸光度は徐々に変化するが、その低下の度合は極めてゆるやかで、1~2%の活性炭添加が実用的と考えられる。白ワインでは活性炭処理の効果はほとんどなかった。

本定量法には本質的な3つの欠点がある。第1は、試料のDowex50処理による強酸性ペプチドの損失と樹脂からの不完全なペプチド回収、また活性炭処理による芳香性ペプチドの損失である。第2は、イオン交換ゲルクロマトグラフィーによるアミノ酸とペプチド区分との分離において、強塩基性ペプチドのアミノ酸区分への溶出と、酸性アミノ酸のペプチド区分への溶出である。第3は、ペプチドの種類によって $\epsilon_{250}$ が非常に異なり、検量線を作成する際に標準とするペプチド

の選択が難しいことである。しかし、この方法は、ペプチド量を純科学的な立場から極めて正確に測定することを目的としたものではない。最新の機器分析による厳密な測定値よりも、一般分析で得られた値がワインやぶどう果汁の品質を知る上でむしろ重要である場合が多いように、ペプチドのおよその量を簡便、迅速かつ微量に測定できることが本法の第1の目的であり、また利点でもある。

**各種ワイン及びジュース中のペプチド量** 甲州ワイン中のペプチド量は年度による差がほとんどなく1 $\ell$ 中に100mg程度であるのに対し、赤ワイン中のペプチド量は甲州ワインのその2~3倍である。ぶどう果汁中のペプチドは1 $\ell$ 中に200~300mg含まれ、ワインより多い。各種の果汁及び野菜ジュース中のペプチドを本定量法とアミノ酸分析法の両者で定量したところ、2つの測定値が一致したのは、バナナ、なし、にんじん、だいこん、きゅうり、トマトで、他のジュースではかなり違った値となった。これは、Gly-Leu銅塩の検量線を全ての試料に適用したこと、また、Dowex 50処理やDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーで

Table 5. Determination of peptides in wines, fruit juices, and vegetable juices.

Wines and juices	Copper salt micromethod	Amino acid analysis 1) + Dye method
<b>Wines</b>		
1974 Koshu	107 mg/l	
1975	100	
1976	92	
1977	98	
1975 Riesling	368	
1977	116	
1976 Chardonnay	192	
1975 Cavernet Sauvignon	226	
1977	180	
1975 Muscat Bailey A	305	
1977	351	
<b>Fruit juices</b>		
1978 Koshu	228	
Riesling	282	
Semillon	276	
Chardonnay	136	
Cavernet Sauvignon	296	
Muscat Bailey A	356	
Banana	615	635
Pear	491	336
Apple	327	170
Orange	665	924
<b>Vegetable juices</b>		
Spinach	643	1015
Carrot	831	794
Potato	1076	1768
Sweet potato	2050	2335
Radish	559	346
Pumpkin	547	780
Onion	1103	505
Tomato	905	1015

The juices were evaporated to dryness and the residues were hydrolyzed in 6 N HCl at 105°C for 24hr. The hydrolysates were analyzed with the amino acid analyzer as described in Table 4. The amino acids found (total amino acids) consist mainly of free amino acids and the amino acids derived from peptides and proteins. Therefore, the peptide contents were estimated by subtraction of the contents of free amino acids and proteins from the total amino acids.

The protein contents were determined according to the dye method reported previously<sup>3)</sup>.

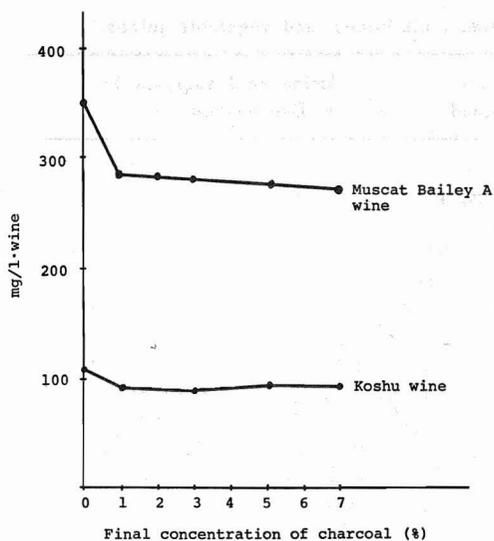


Fig. 6. Treatment of Koshu wine and Muscat Bailey A wine with charcoal.

Charcoal was added to Koshu white wine (1977) or Muscat Bailey A red wine (1977) at concentrations of 1 to 7%. The mixture was stirred and filtered through a Toyo No. 5 C paper. The peptide contents in the filtrates (3ml) were determined by the copper salt micromethod as described in Table 4.

除去できないポリフェノールや他の250 nmに吸収のある物質が存在したためと考えられる。

しかし、ペプチドのおよその量を迅速、簡便かつ少量の試料を用いだけで知ることができ、本定量法が食品学的、醸造学的に十分利用価値があると考えられる。

#### 要 約

果汁、野菜ジュースあるいはワイン中のペプチドをDowex 50-X2 (活性炭) 処理、銅キレート化及びイオン交換クロマトグラフィーを含む方法によって定量した。

Dowex 50-X2 (活性炭) の小カラムを用いて前処理した試料を、pH8.0で過剰の塩基性炭酸銅を加えて反応させ、生じたアミノ酸銅塩とペプチド銅塩をDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーで分離した。ペプチド銅塩を含む溶出液をpH6.5にした後、250nmの吸

光度を測定し、Gly-Leu銅塩の検量線からペプチド量を求めた。

本定量法は、糖、フェノールカルボン酸、タンニン、アントシアニン、有機酸、金属塩、アルコールなどのワインやぶどう果汁成分の影響は受けないが、酸性アミノ酸、強塩基性あるいは芳香性ペプチドを多量に含む試料には適用が難しい。

本研究は、木口隆生氏、大西由孝氏の協力に進められた。ここに深謝します。また本論文の一部は、日本農芸化学会昭和54年度大会(東京)で発表した。

#### 文 献

- 1) Yokotsuka, K., Aihara, T., Umehara, Y., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **53**, 631 (1975).
- 2) 横塚, 榑田 : 農化関東部会要旨集, P.27 (1978).
- 3) Yokotsuka, K., Kato, A., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **56**, 606 (1978).
- 4) Spies, J. R. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 65 (1952).
- 5) Tommel, D. K. J., Vliegthart, J. F. G., Penders, T. J., Arens, J. F. : *Biochem. J.*, **107**, 335 (1968).
- 6) Niederwieser, A., Curtius, H. CH. : *J. Chromatog.*, **51**, 491 (1970).
- 7) Tommel, D. K. J., Vliegthart, J. F. G., Penders, T. J., Arens, J. F. : *Biochem. J.*, **99**, 48P (1966).
- 8) Takita, T., Miyoshi, K., Kumada, K., Nishi, H. : *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 745 (1974).
- 9) Giliberti, P., Niederwieser, A. : *J. Chromatogr.*, **66**, 261 (1972).
- 10) Yokotsuka, K., Takahashi, Y., Yoshii, M., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **56**, 121 (1978).
- 11) Yokotsuka, K., Shinkai, S., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 101 (1980).