

ぶどうマスト中のポリフェノールオキシダーゼ活性

横塚 弘毅・野崎 一彦・櫛田 忠衛

Polyphenoloxidase Activity in Koshu Grape Must

KOKI YOKOTSUKA, KAZUHIKO NOZAKI, and TADAE KUSHIDA

Laboratory of Wine Chemistry, The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400.

Koshu grapes were stemmed, crushed, and pressed. The must obtained was filtered through wire netting or cotton gauzes, or centrifuged at 2,000 rpm for 30 min or at 8,000 rpm for 30 min in order to get the musts with various degrees of cloudiness. The polyphenoloxidase (PPO) activity increased as the degrees of cloudiness of the musts increased. The activity in the musts was mostly present in insoluble colloidal particles and precipitates.

PPO was isolated from the must precipitate by extraction with various buffers with or without detergents, and the extracts were used for assays of the activity and stability of PPO, and the effect of SO₂ on PPO activity. The activity was the highest at pH 5-6 and 35°C, and stable at pH 4-7 and below 40°C. Addition of 50 ppm of SO₂ to the must resulted in complete loss of the activity.

緒 論

ぶどうマストにはタンナーゼ、ペクチナーゼ、インベルターゼなどと共にポリフェノールオキシダーゼ (PPO) のような酸化酵素が含まれ、マストの品質に多大の影響を与えている。ぶどうを強く圧搾すると果皮中のPPOがマストに移行し、圧搾の度合(搾汁率)とマストの品質との間には特に関係があることが知られている。¹⁻⁴⁾ 通常、SO₂はフェノールの酸化を防ぎ

バクテリアの繁殖を抑制したり、発酵を停止するために添加すると共に、マスト中の PPO 活性を低下あるいは失活させる目的にも用いられている。⁵⁻⁷⁾

我々がかねてより日本の代表的白ワイン用品種である甲州ぶどうを原料としていろいろな方法でワインを製造してきた。従来の我々の方法では、甲州ぶどうを破碎圧搾して得たマスト(搾汁率60~65%)に、50 ppmのSO₂を加えて1夜放置後、酒母を加えて発酵させてきたが、圧搾法や搾汁率によって、マストの状態特に滓の量が異なり、添加する糖、酒母、SO₂などの量を一定とすることができず、また発酵後の滓の量もまちまちであった。このため数年前より、連続遠心機を利用して圧搾直後のマストの沈殿除去や発酵後の新酒

Chemical Studies on Coloring and Flavoring Substances in Japanese Grapes and Wines (XX).

の滓引等を行って、マストやワインの量的、質的な安定化や品質向上のための研究に着手した。

遠心力で除去されたマストからの沈殿は、タンニンなどのフェノール成分、マスト成分と金属イオンとの複合体、タンパク質-タンニン複合体が大部分と考えられ、これらの中にはPPOとの複合体も存在するものと推定される。

ここでは、ワイン仕込時におけるPPOの影響を、マスト中におけるPPOの分布、PPO活性の強さ、SO₂による活性の抑制等を醸造化学的に研究したので報告する。

実験方法

甲州ぶどうマスト 本研究施設で1982年に栽培した甲州ぶどうを用いた。ぶどう698kgを除梗破碎し、バスラントタイプの圧搾機で搾汁してマスト419lを得た。マストは、連続遠心機(国産H-600S型)を用い、15,000rpmで遠心分離を行ったが、1hにつき、50lの清澄なマストが得られるようにペリスタポンプを用いて圧搾直後に得られるマストを遠心ロータに流入させた。この遠心操作により、清澄なマスト400lと沈殿7.23kgが得られた。マストには直ちにSO₂50ppmとなるようにメタ重亜硫酸カリを添加し酒母を加えて発酵させ、沈殿は凍結保存した。

ポリフェノールオキシダーゼ活性 連続遠心機でマストより得た沈殿1gづつをいろいろな緩衝液に懸濁し、Potter-Elvehjem型のテフロンホモジナイザーで5分間すりつぶし均一なホモジネイトとし、これをPPO活性試験用試料とした。

PPO活性は、大缶製作所製円槽型ワールブルグ検圧計で測定した。反応容器主室にPPO試料液2mlを入れ、側室に基質として10⁻²Mカテキン水溶液0.5ml、副室に口紙片(2cm×1.8cm)に0.2mlの20% KOHをしみ込ませたものを置いた。反応容器は温度平衡のために30°Cで15min空振り後、すぐに混合して30°Cで30min反応させ、ガス圧の測定を開始した。以下の図中の値は酸素吸収量で示した。

タンパク質量 凍結保存した沈殿を前に述べた方法で水に懸濁した。このホモジネイト40mlを透析チューブに入れ、5lの水に対して3回、3日間透析した透析内液(不溶性の沈殿物を含む)に同量の濃塩酸を加え、110°C、24h加水分解した。加水分解液の一定量を採り、HClを除去後、アミノ酸自動分析機でアミノ酸分析し、見出されたアミノ酸の合計値からタンパク質量を算出した。

マスト中のタンパク質量は、前に報告した過塩素酸

一色素法⁸⁾で行った。

結果及び考察

甲州ぶどう果粒25個を2枚のガーゼにくるみ、手で圧力を加えてしぼり、いろいろな搾汁率のマストを得た。搾汁率は、用いた果粒の重量に対する得られたマストの容量の百分率で示されている。Fig. 1は、搾汁率とPPO活性との関連を調べたものである。PPO活性は搾汁率63%の時に最も高く、搾汁率がこれ以上高くなると減少した。搾汁率を高くすると果皮からフェノール成分が多量に溶出することは良く知られているが、これらのフェノールがPPOと結合し活性を低下させているのかも知れない。

Fig. 2は、マストの濁りとPPO活性との関係を示したものである。4種の濁りの試料は搾汁率60%のマストを家庭用金網を通したもので、2枚のガーゼで濾過したもの、8,000rpm、30minあるいは2,000rpm、30min遠心したものである。これらの試料の濁度をUT-11型コロナ濁度計を用いて測定すると共に、PPO活性を調べた。試料の濁度が高い程高いPPO活性が見られた。Schanderlは、濁ったマストを用いた方が清澄化したマストを用いるよりも発酵速度が早いことを示したが⁹⁾、PPO活性もまたマストの濁りと密接に関係し、大部分のPPOはマスト中に溶解して存在しているのではなく、不溶性の粒子や沈殿として存在していることが示された。

そこで、マストを遠心して得られた沈殿をいろいろなpHの緩衝液に懸濁して、懸濁液中のPPO活性を測定した。Fig. 3に示したように、PPO活性の至適pHは5~6にあり、またpH4~7で安定であった。マストのpHである付近では、至適pHでの活性の約1/2しか示さず、更にPPO活性はこのpHでは不安定であった。

至適温度及び温度安定性を調べた結果(Fig. 4)、このPPO活性は35°C付近で最も高く、我々が甲州マストの発酵を行っている15~25°Cの温度でPPOは安定であった。

今まで述べてきたように、マスト中の不溶性の粒子あるいは沈殿に高い活性を持つPPOが存在することが明らかとなったので、マストの滓よりPPOを界面活性剤を用いて抽出し、PPO活性が存在することを再確認することを試みた。連続遠心機で集めたマストの滓の凍結物1gを各種の界面活性剤1%を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、テフロンホモジナイザーで処理した。ホモジネイトは、18,000rpm、30min遠心し、得られた上清約40mlを50mMリン酸

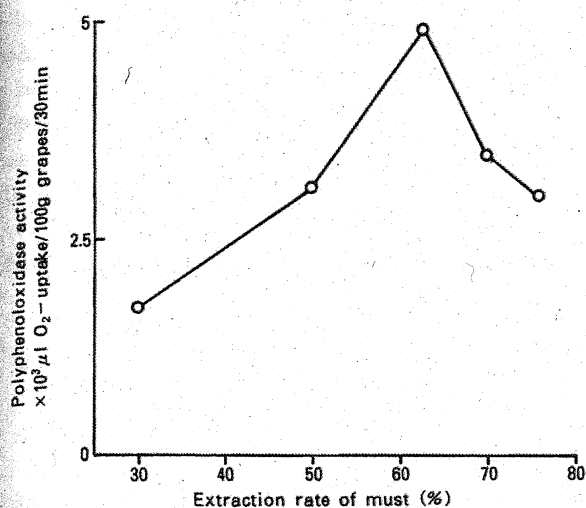


Fig. 1. Polyphenoloxidase activity of Koshu grape must.

Koshu grape berries were placed in a bag made of two layers of gauzes and squeezed. Various amounts of musts were obtained from the berries of 100 g each under different hand pressures. The extraction rate of each must is defined as follows:

$$\frac{\text{volume of must extracted (ml)}}{\text{weight of berries used (100 g)}} \times 100(\%)$$

Two ml of each must was placed in the main compartment of the Warburg flask and 0.5 ml of 10^{-2} M catechin solution was placed in the side arm. After 15-min equilibration at 30°C, the catechin solution was tipped to the main compartment. The readings were taken at 5-min intervals for 90 min. The oxygen uptake increased with time until 60 min, but thereafter hardly increased. For comparison of polyphenoloxidase activities of various must samples, therefore, the amounts of oxygen taken up for 30 min were determined.

緩衝液 (PH 7.0) 5l に対し, 3回, 3日間透析し, 透析内液中のタンパク質量及び PPO 活性を調べた。この結果, 凍結沈殿 1 g より Triton ×100 を含むリン酸緩衝液で 3.2 mg, Tween 20 を含む緩衝液で 3.1

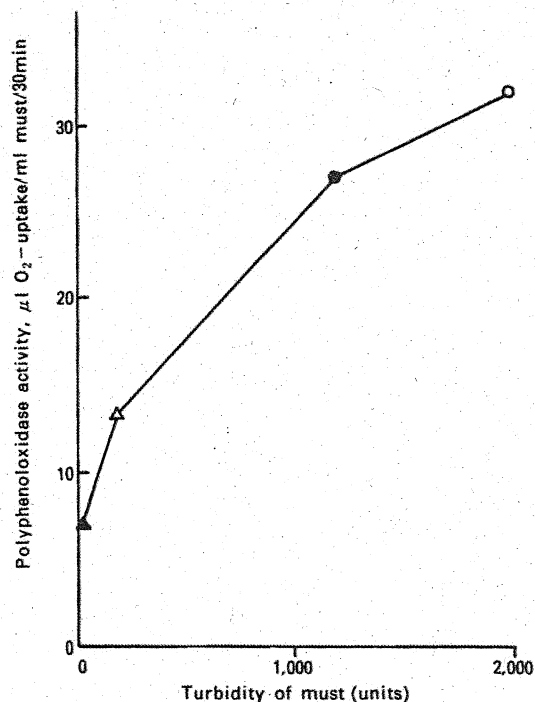


Fig. 2. Polyphenoloxidase activity of the musts with various degrees of turbidity.

Koshu grapes (698 kg) were crushed with a Garolla crusher and pressed with a Vasilin-type press. The extraction rate of the must (419 l, see Fig. 1) obtained was 60%. The must was filtered through wire netting (○) or two layers of gauzes (●), or centrifuged at 2,000 rpm for 30 min (△) or at 8,000 rpm for 30 min (▲).

The original must (naturally cloudy must) and the four clarified musts were used for determination of polyphenoloxidase activity. The assay procedure of polyphenoloxidase activity is described in Fig. 1. The activity and turbidity of the original must were the same as those of the must obtained by filtration through wire netting. After the musts had been diluted with water, turbidity of the diluted musts were measured with a Corana, model UTIL, turbidimeter. One unit of turbidity is defined as the turbidity caused by 1 ppm of Kaolin (Wako).

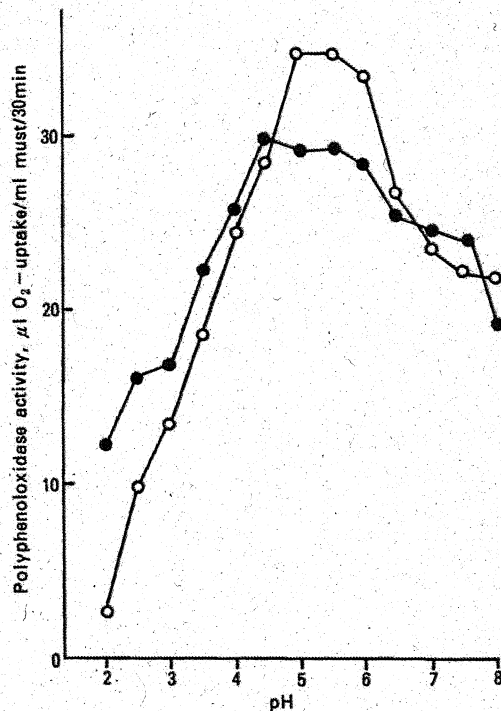


Fig. 3. Effect of pH on the activity (-○-○-) and stability (-●-●-) of the must polyphenoloxidase.

The must obtained in Fig. 2 was introduced into the top of the rotar of a Kokusan continuous centrifuge (type H 600-S) at the flow rate of 50 l/h with the aid of a rotary peristaltic pump, and centrifuged at 15,000 rpm at room temperature. The precipitate (6.9 kg) and clarified must (382 l) were separated from 400 l of the must. The precipitate was stored at -20°C.

For the activity of polyphenoloxidase, the precipitate (1 g) was homogenized in 50 ml of hydrochloric acid-potassium chloride buffer (pH 2.0)¹⁰⁾, citrate-phosphate beffer (pH 3-7)¹¹⁾ or phosphate buffer (pH 8)^{12,13)} with a Potter-Elvehjem homogenizer, and the homogenate was again adjusted to the corresponding pH.

For the stability of polyphenoloxidase, the precipitate (1 g) was homogenized in 50 ml of 0.02 M tartrate buffer (pH 5.0) with a Potter-Elvehjem homoge-

nizer, and the homogenate (20 ml) was adjusted to pHs from 2 to 8 with dilute HCl or KOH. Each homogenate was allowed to stand at 30°C for 60 min and then adjusted to pH 5.0. The homogenate was brought up to a volume of 50 ml with 1/10 M tartrate buffer (pH 5.0) and the remaining activity was determined by the assay procedure in Fig. 1.

mg, Tween 80を含む緩衝液で 3.5 mg, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む緩衝液では 6.4 mg, リン酸緩衝液のみでは 1.1 mg のタンパク質が可溶化した。沈殿 1 g 中には, 21.8 mg のタンパク質が含まれていた。S DS を用いれば約 30% のタンパク質が可溶化できるが, SDS 抽出物の PPO 活性は低く, 他の非イオン性界面活性剤で抽出したものの PPO 活性は, 界面活性剤を含まない抽出液のそれと同じ位であった。これらのことから, マストの滓に PPO が含まれていることが確認された。

このようにマスト中には多量の PPO が含まれ, フェノール類を酸化してマストを褐変させると考えられるが, マストに添加された SO₂ は, 酵素的に生じた酸化物である o-キノン, アルデヒドなどと結合して褐変を間接的に防止し, 一方直接的には PPO 自身に SO₂ が作用してマストの劣化を防止していることが報告されている⁵⁻⁷⁾。Fig. 6 は PPO 活性に及ぼす SO₂ の影響を示したものである。凍結沈殿物を pH 5.0 の緩衝液にテフロンホモジナイザーを用いて懸濁し, この懸濁液に SO₂ を添加して, PPO 活性を測定した。その結果, 50 ppm の SO₂ が存在すれば, ほぼ完全に活性はなくなった。従って, ぶどうを破碎圧搾後, 直ちに 50 ppm の SO₂ を添加すれば, PPO によるフェノール類の酸化に基づくマストの褐変は防止できることが分った。

以上のことから, マスト中の PPO の大部分は不溶性の粒子や滓に存在し, その活性は強いが 50 ppm の SO₂ がマストに存在すれば PPO による酸化褐変はなく, また遠心分離によってマストを清澄化すれば, ほとんどの PPO 活性を沈殿として除去できることが明らかとなった。

要 約

甲州ぶどうを破碎, 圧搾して得たマストを金網あるいはガーゼでろ過したり, 2,000 rpm あるいは 8,000 で 30 min 遠心して濁度の異なる 4 種のマストをつくり,

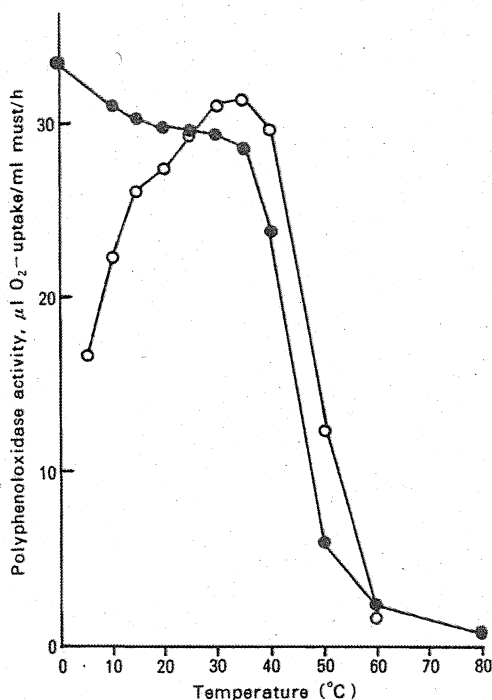


Fig. 4. Effect of temperature on the activity (-○-○-) and stability (-●-●-) of the must polyphenoloxidase.

The frozen precipitate (1 g, see Fig. 3) was homogenized in 50 ml of 0.02 M tartrate buffer (pH 5.0) with a Potter-Elvehjem homogenizer. The pH of the homogenate was 3.2, hence the homogenate was adjusted to pH 5.0 with dilute KOH.

For the heat stability of polyphenoloxidase, the homogenate was pre-incubated for 60 min at various temperatures and the remaining activity was determined according to the assay procedure in Fig. 1.

これらのPPO活性を調べた。マストの濁りの度合が上がると共にPPO活性も高くなり、マスト中のほとんどのPPO活性は、不溶性のコロイド粒子や沈殿に存在した。PPO活性はpH 5~6, 35°Cで最も高く、またpH 4~7, 40°C以下で安定で、甲州マストのpHや仕込温度で強いPPO活性が認められたが、50 ppmのSO₂をマストに添加するとこの活性は完全に失われ、PPOによるマストやワインの酸化褐変は実際上問題とならない。

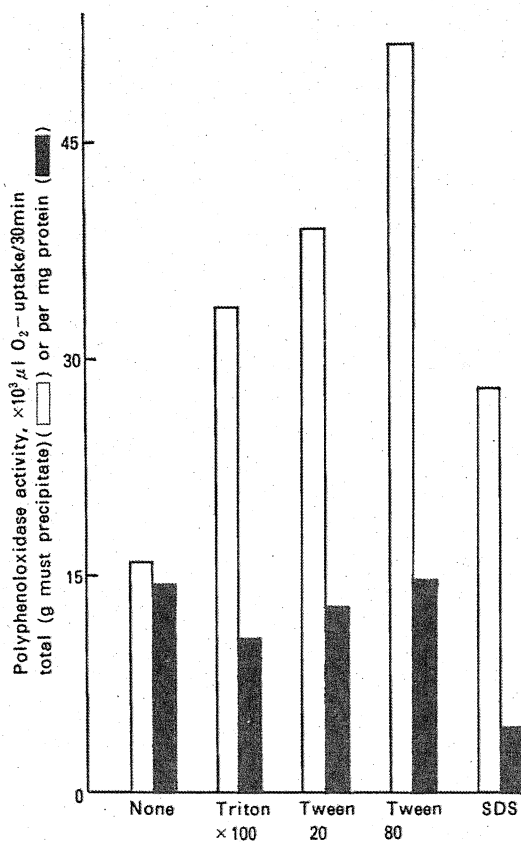


Fig. 5. Polyphenoloxidase activity of fractions extracted from the must precipitate with various detergents.

The must precipitate (1 g) was homogenized in 40 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) or the buffer containing 1% Triton X-100, Tween 20, Tween 80, or sodium dodecyl sulfate (SDS) with a Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate was centrifuged at 18,000 rpm for 30 min and the supernatant was dialyzed three times for 3 days against 5 l of the pH 7.0 buffer. The protein contents and polyphenoloxidase activity of the dialysates were examined.

The precipitate (1 g) was placed in a test tube, and to this, 0.8 ml of concentrated HCl and 2 ml of constant-boiling HCl were added to give a final concentration of 6 N HCl, because the dry weight of 1 g of the precipitate was 0.2 g. Each

of the extracts with or without the four detergents was placed in a test tube and evaporated to dryness, and to this, 2 ml of constant-boiling HCl was added. The tubes were evacuated, sealed, and heated at 110°C for 24 h. The hydrolysates were subjected to amino acid analysis. The protein contents were estimated from the sum of all amino acids found. The total protein content of 1 g of the precipitate was 21.8 mg. The Triton X-100 extract, Tween 20 extract, Tween 80 extract, SDS extract, and the extract without detergent contained 3.2mg, 3.1mg, 3.5mg, 6.4 mg, and 1.1 mg/g precipitate, respectively.

Polyphenoloxidase activity was assayed according to the method in Fig. 1. The total polyphenoloxidase activity was calculated as follows: (polyphenoloxidase activity, $\mu\text{l O}_2$ -uptake/mg protein/30 min) \times (total protein content of each extract, mg).

文 献

- 1) Ivanov, T.P. : *Ann. Technol. Agr.*, 16, 35 (1967).
- 2) Ivanov, T.P. : *Ann. Technol. Agr.*, 16, 81 (1967).
- 3) Cassignard, R. : *Vignes et Vins, numéro spécial*, p13 (1966).
- 4) Cassignard, R. : *Vignes et Vins, numéro spécial*, p24 (1966).
- 5) Diemair, W., Koch, J., Hess, D. : *Lebensm.-Untersuch-Forsch.*, 113, 381 (1960).
- 6) Embs, R. J., Markakis, P. : *J. Food Sci.*, 30, 753 (1965).
- 7) Markakis, P., Embs, R. J. : *J. Food Sci.*, 31, 807 (1966).
- 8) Yokotsuka, K., Kato, A., Kushida T. : *J. Ferment. Technol.*, 56, 606 (1978).
- 9) Schanderl, H : *Die Mikrobiologie des Mostes und Weins*, 2nd Ed., Eugen Ulmer, Stuttgart (1959).
- 10) Clark, W. M., Lubs, H. A. *J. Bacteriol.*, 2, 1 (1917).
- 11) McIlvaine, T. C. : *J. Biol. Chem.*, 49, 183 (1921).
- 12) Sørensen, S. P. L. : *Biochem. Z.*, 21, 131 (1909).
- 13) Sørensen, S. P. L. : *Biochem. Z.*, 22, 352 (1909).

(昭和58・8・31 受付)

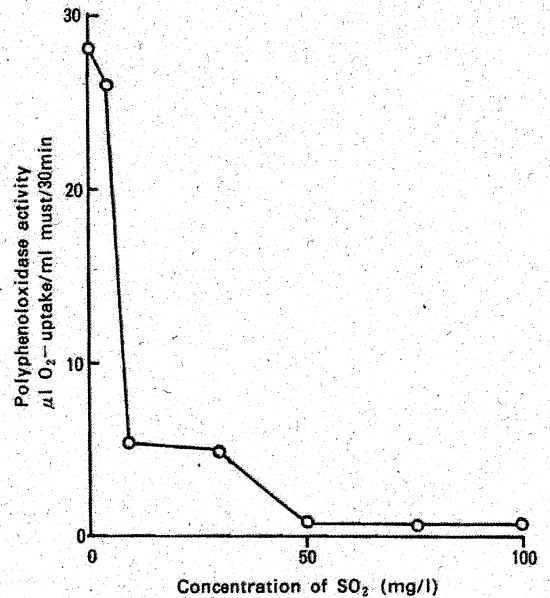


Fig. 6. Effect of SO₂ concentration on the activity of the must polyphenoloxidase.

The must precipitate was homogenized in 0.1 M tartrate buffer (pH 5.0) with a Potter-Elvehjem homogenizer. In the assay procedure in Fig. 1, 2 ml of the homogenate was placed in the main compartment of the Warburg flask and 0.5 ml of the solution containing 10⁻² M catechin and various concentrations of SO₂ was placed in the side arm. The final concentration of SO₂ was from 5 ppm to 100 ppm in the total volume of 2.5 ml. SO₂ was added as potassium metabisulfate.