

ブドウ成熟中のポリフェノールオキシダーゼの 経時的变化

中西 載慶・牧野 晋・横塚 弘毅

Changes in Polyphenol Oxidase Activity and Must Components during Fruit Maturation.

KOTOYOSHI NAKANISHI, SUSUMU MAKINO, and KOKI YOKOTSUKA

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

Abstract

Changes in Polyphenol oxidase (PPO) activity and other components of five grape varieties (Koshu, Chardonnay, Riesling, Muscat Bailey A, and Cabernet Sauvignon) were investigated during ripening period. The grape juices were separated into soluble and insoluble fractions by centrifugation, and their PPO activities were determined. The levels of total and insoluble PPO activities during the ripening period were independent of the changes in several components of juice analyzed. However, the change in soluble PPO activity of four grape varieties, all except Koshu grape, was closely related to their total acid and sugar contents. The results suggest that the measurement of soluble PPO activity in grape juices is useful in determining the best harvesting time for the grapes.

緒 言

一般にワインの品質は、原料ブドウの品質に大きく依存しており、ワインの香味や色調に関与するほとんどの成分は原料ブドウに由来し、これらが発酵中や熟成中に種々変化しワインの品質を主に決定している。それ故、高品質のワインを製造するためには最適の熟期（適熟期）でブドウを収穫することが必要であることはよく知られている。これまでヨーロッパやアメリカなどにおいては、ブドウの熟期と関係する種々の成分変化などに関し数多くの研究¹⁾がなされ、その適熟期の判定に糖一酸比や酒石酸一リンゴ酸比等^{2~4)}が有効な指標となることが報告されている。しかし、これらの指標（値）は良い土壌と気象条件の下で栽培され

たブドウで求められたものであり、我が国のように十分な糖度と酸度をもつブドウを生産できない地域においては、ほとんど適用できない不都合さが指摘されている。従って我が国の場合にはそれぞれの栽培地において、それぞれの品種ごとに数年に渡って、その栽培調査や成分分析を行い、それらの結果を集約し品種ごとに適熟期判定の一助として糖一酸比の値を算出している⁵⁾。しかし、これらの検討は地域、品種、気象条件などを考慮しつつ長期間を要することから、適熟期の判定にあたっては他の有効な指標の検索が望まれている。

一方、ブドウ果実中には種々の酵素が存在しているが、最近 Sapis ら⁶⁾、Wissemann ら⁷⁾および Kidron ら⁸⁾により、ブドウ果実の酸化・褐変反応に関与する

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) の活性はブドウの熟度と関係があるとの報告がなされた。そこで我々は、これらの報告に注目し、PPO 活性がブドウの適熟期の判定に利用しうるか否かについての検討を試みた。本報では、当研究施設育種試験地で栽培されているワイン用ブドウ5品種を対象とし、それらブドウの成熟中におけるPPO活性の消長を経時的に調べ、糖度、酸度、総フェノール量、総窒素量および総遊離アミノ酸量の変化と比較検討した結果について報告する。

実験方法

1. 材料およびPPOの調製

山梨大学附属発酵化学研究施設育種試験地で栽培されている甲州、シャルドネ、リースリング、マスカットベリーAおよびカベルネソービニオン種ブドウを用いた。各試験樹に対し平均的な果房40房を選定し、1985年8月～11月にかけてそれらの房より250～300gづつを経時的に採取した。採取した果粒は洗浄後皮を除き、二重のガーゼ中で手で圧搾・搾汁して果汁を得た。この果汁を全PPO画分とした。次いでその一部を15,000rpmで30分間遠心分離し、その上清を可溶性PPO画分とし、沈澱物は酢酸緩衝液又はMcIlvaineの緩衝液で洗浄後、その1gに対し同様の緩衝液を50ml加えPotter-Elvehjem型ガラスホモジナイザーで1～3分間ホモジナイズし、この懸濁液を不溶性PPO画分とした。なお全PPOおよび可溶性PPO画分は、0.1N NaOHでそれぞれの至適pHに調整した。

2. PPO活性測定法

PPO活性の測定にあたっては、ワールブルグ検圧計(大洋科学工業K.K. W-14型)を用いた。反応容器主室にPPO試料2mlを入れ、側室には基質として0.025Mカテキン水溶液0.5ml、副室には0.2mlの20% KOHを入れ、30°C、15分間予熱後基質をPPO試料液と混合し、30°Cで30分間反応させ、酸素吸収量を測定した。PPO活性は果汁100mlが30分間に吸収する酸素量($\mu\text{l O}_2$ uptake/30min, 100ml juice)として表示した。なお不溶性PPO画分の活性については果汁100ml中に存在する沈澱物量に相当するよう測定値を補正した。

3. 果汁成分の分析

果汁の糖度は屈折糖度計(Atago No.76090)で測定しBrix度として表示し、酸度は0.1N NaOH溶液を用い自動滴定装置(平沼K.K. COMTITE-8)で測定

し、酒石酸換算で表示した。総フェノール量はフェノール自動分析装置⁹⁾で測定し没食子酸換算で表示した。また総窒素量はケルダール法¹⁰⁾で測定し、総遊離アミノ酸量はアミノ酸自動分析装置を用いて測定した。

結果および考察

ブドウ採取期間中の気象条件 1985年8月～11月の間の気温および降水量を甲府気象台の気象月報により調べた結果をFig. 1に示す。最高気温が8月中旬から9月上旬にかけて平年より高い日があったが、総体的には気温・降水量ともほぼ平年並みであった。

果汁PPOの経時変化 ブドウを破碎・圧搾して得た果汁中のPPOの大部分は、不溶性の状態で見汁中に存在していることはよく知られている^{6-8,11-13)}。それ故PPOに関する報告の多くは、その不溶性画分(果汁沈澱物)に界面活性剤を添加しPPOを可溶化し、その可溶化されたPPOを対象としている^{11,12)}。一方横塚ら¹³⁾は、甲州ブドウマスト中のPPOの分布について調べ、PPO活性の大部分がマストの沈澱物中に存在していることから、その不溶性の状態でのPPO活性について検討している。そこで本報ではPPOに対する可溶化操作は行わずに、果汁中に可溶性の状態が存在するPPOと不溶性の状態が存在す

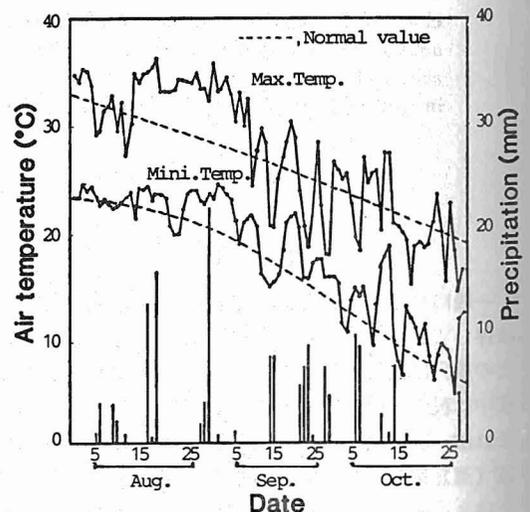


Fig. 1. Meteorological data for city of Kofu, Yamanashi Prefecture, from August through October in 1985.

All values of air temperature and precipitation were obtained from data of Kofu Meteorological Observatory.

る PPO および 全果汁中の PPO について、それぞれの活性を経時的に調べることとした。

まず各ブドウ品種において、全果汁、可溶性および不溶性画分の PPO 活性の至適 pH について検討した。甲州、シャルドネ、リースリング、マスカットベリー A および カベルネソービニヨンの全果汁画分の至適 pH はそれぞれ 6.5, 6.5, 5.0, 5.5 および 6.5 付近、可溶性画分のそれらは、4.5, 5.5, 5.0, 6.0 および 7.0 付近、不溶性画分のそれらは、6.0, 6.5, 5.0, 6.5 および 6.0 付近にあったことから、各品種の各画分の PPO 活性は上記の pH 値で測定した。Fig. 2 に白ワイン用品種の甲州、シャルドネ、リースリングブドウにおける 3 画分の PPO 活性の経時変化を示す。甲州においては、不溶性 PPO 活性が 11 月初旬以降わずかに増加傾向を示したが、全果汁および可溶性 PPO 活

性は、実験期間中いずれも大きな変化は観察されず、ほとんど一定値を示した。シャルドネおよびリースリングでは、可溶性および不溶性 PPO 活性の変化に類似性が認められた。即ち、可溶性 PPO 活性は実験開始時より徐々に低下する傾向が認められ、シャルドネでは 9 月初旬に、リースリングでは 10 月初旬に極めて低いレベルで一定値を示した。また不溶性 PPO 活性は、両品種とも多少増加する傾向が認められた。Fig. 3 に赤ワイン用品種のマスカットベリー A およびカベルネソービニヨンブドウの結果を示す。両品種とも可溶性の PPO 活性は経時的に低下傾向を示し、マスカットベリー A では 10 月中旬、カベルネソービニオンでは 9 月下旬に極めて低いレベルとなった。この傾向はシャルドネやリースリングの場合とよく類似していた。全果汁および不溶性 PPO 活性については、マス

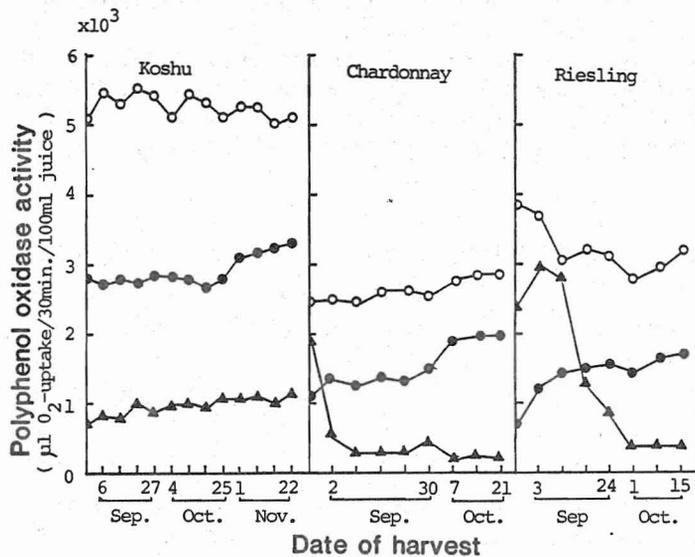


Fig. 2. Changes in polyphenol oxidase activity of Koshu, Chardonnay and Riesling grape juices during ripening.

After removal of skins, the berries were crushed by hand and filtered through two layers of gauze. The filtrate was adjusted to pH 6.5 (Koshu and Chardonnay) and pH 5.0 (Riesling) with 0.1 N NaOH and used as total polyphenol oxidase (PPO) fraction. The filtrate was centrifuged at 15000 rpm for 30 min at 4°C and the supernatant was adjusted to pH 4.5 (Koshu), pH 5.5 (Chardonnay) and pH 5.0 (Riesling) with 0.1 N NaOH. The precipitate was washed and suspended in 50 ml of McIlvaine buffer (Koshu; pH 6.0, Chardonnay; pH 6.5, and Riesling; pH 5.0), and the suspension was homogenized for 1-3 min in a Potter-Elvehjem homogenizer. The supernatant and homogenate were used as soluble and insoluble PPO fraction, respectively. Each PPO activity of three fractions was determined by the Warburg method described in the text.

○; total PPO activity, ●; insoluble PPO activity, ▲; soluble PPO activity,

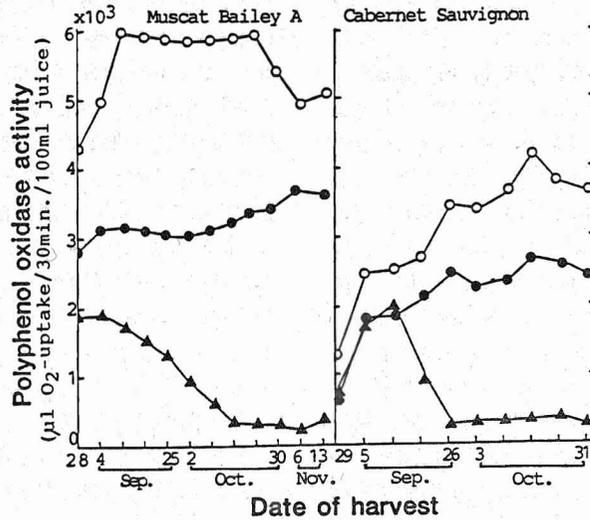


Fig. 3. Changes in polyphenol oxidase activity of Muscat Bailey A and Cabernet Sauvignon grape juices during ripening.

Experimental conditions were as in the footnote of Fig. 1, except that total, insoluble and soluble PPO fractions were adjusted to pH 5.5, 6.5, 6.0, (Muscat Bailey A) and pH 6.5, 6.5, 7.0 (Cabernet Sauvignon), respectively.

○; total PPO activity, ●; insoluble PPO activity, ▲; soluble PPO activity.

カットベリーAではいずれも顕著な変化は認められなかったが、カベルネソービニオンでは両活性とも増加する傾向が認められた。全果汁のPPO活性の増加傾向は、試験した品種の中でカベルネソービニオンにおいて特徴的であった。

上記5品種の各PPO活性において、全果汁のPPO活性は、カベルネソービニオン種を除き他の4品種では測定期間中あまり大きな変化はなく、ほぼ一定の活性レベルで推移した。不溶性PPO活性においては、いずれの品種においても程度の差は認められたもののわずかに増加する傾向が観察された。一方可溶性PPOの活性変化は、甲州を除く他の4品種でかなり類似した傾向を示し、最終的にいずれも極めて低い活性レベルで一定値を示した。尚、可溶性PPOと不溶性PPOの活性の和が全果汁のPPO活性の値と一致しなかったが、その原因については不明であり、今後詳しく検討する必要があると思われる。

ブドウ成熟中のPPO活性の変化については、すでにいくつかの報告があるが^{6-8,14,15}、それらによると果実中のPPO活性はブドウの成熟期間中大きく変動することが明らかにされている。しかし、その変化の

パターンは、それぞれの報告においてかなり異なっており、それがブドウ品種や栽培地の相違によるものか否かは明確でない。それ故ブドウの成熟とPPO活性の相関に対して満足のいく説明はなされていないが、いずれの報告においてもブドウが十分に成熟する時期(完熟期)においてのPPO活性は相対的にかなり低いレベルまで減少するという結果にはかなりの類似性が認められる。本報での結果においては、可溶性PPO画分の活性に多少の変動はみられたものの全体的な活性レベルには、それほど大きな変化はないように思われた。これらの点は上記報告とかなり異なっていたがその原因はブドウ品種や栽培地の相違、或いは上述したようにPPOサンプルの調製法の相違に起因しているかもしれない。本報において、不溶性PPOの可溶化を行なわなかったのは、本実験ではPPO活性がブドウの適熟期の判定に利用しうるか否についての検討をその目的としたことから、PPOの調製法はできるだけ簡単であることが望ましいと考えたからである。しかし、上記の各報告との比較検討のためには、今後それらの報告と同様の方法でPPO活性の経時的変化を調べる必要があり、またその検討は興味あることと

思われる。

PPO 活性と種々の果汁成分量の相関 PPO 活性の測定と同時に、同果汁中の糖度、酸度、総フェノール量、総窒素量および総遊離アミノ酸量について測定し3画分の PPO 活性とそれら成分量との相関性について調べた。Fig. 4 に3画分の PPO 活性と糖度との関係を示す。全果汁および不溶性 PPO 活性と糖度とは、

いずれの品種においても明確な相関性は認められなかった。しかし、可溶性 PPO 活性は 甲州種を除き他の4品種では糖度の増加に伴って減少する傾向が認められた。Fig. 5 に3画分の PPO 活性と酸度との関係を示す。糖度の場合と同様、全果汁および不溶性 PPO 活性と酸度とは相関性はなかったが、可溶性 PPO 活性については、甲州種以外の4品種では酸度の減少に

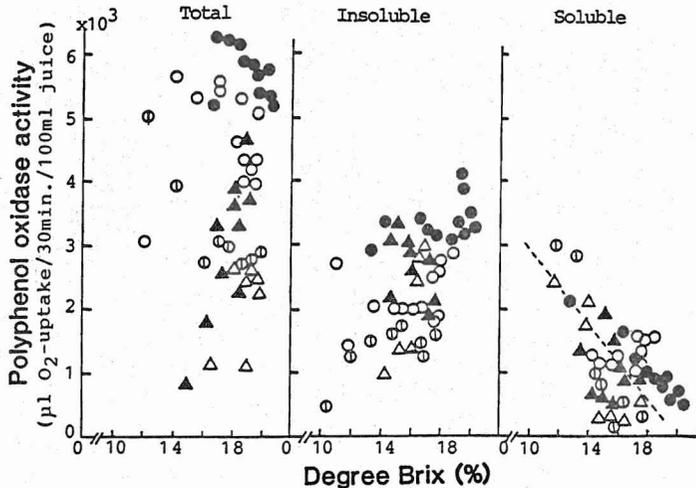


Fig. 4. Relationship between polyphenol oxidase activity and sugar content of five grape varieties during ripening.

○; Koshu, △; Chardonnay, ⊙; Riesling, ●; Muscat Bailey A, ▲; Cabernet Sauvignon.

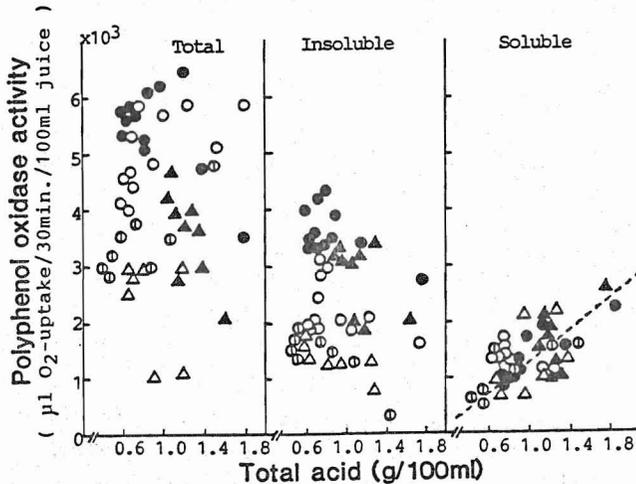


Fig. 5 Relationship between polyphenol oxidase activity and total acid content of five grape varieties during ripening.

○; Koshu, △; Chardonnay, ⊙; Riesling, ●; Muscat Bailey A, ▲; Cabernet Sauvignon.

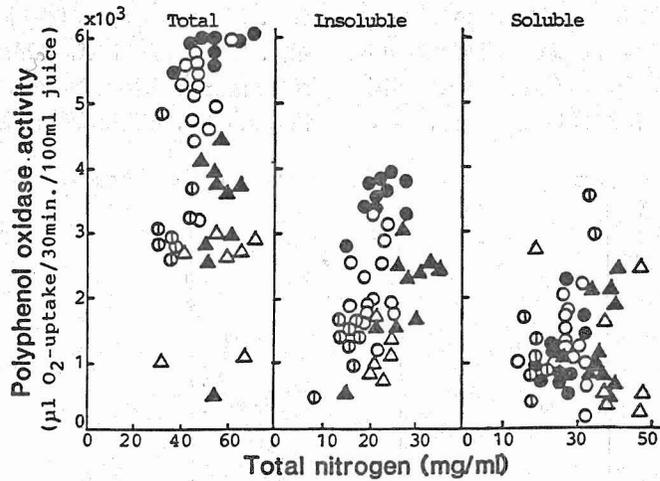


Fig. 6 Relationship between polyphenol oxidase activity and total nitrogen content of five grape varieties during ripening.
 ○; Koshu, △; Chardonnay, ⊙; Riesling,
 ●; Muscat Bailey A, ▲; Cabernet Sauvignon.

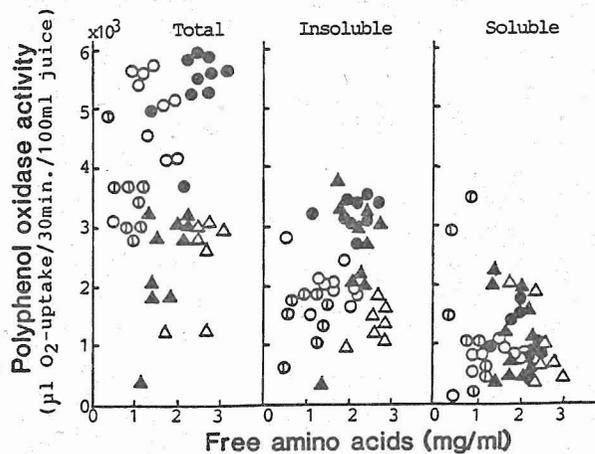


Fig. 7. Relationship between polyphenol oxidase activity and free amino acid content of five grape varieties during ripening.
 ○; Koshu, △; Chardonnay, ⊙; Riesling,
 ●; Muscat Bailey A, ▲; Cabernet Sauvignon.

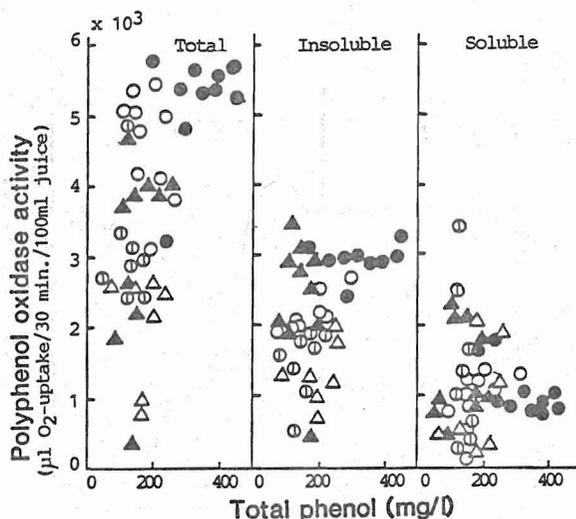


Fig. 8. Relationship between polyphenol oxidase activity and total phenol content of five grape varieties during ripening.

○ ; Koshu, △ ; Chardonnay, ⊙ ; Riesling,
● ; MuscatBailey A, ▲ ; Cabernet Sauvignon.

伴って活性も減少する傾向が認められた。総窒素量、総遊離アミノ酸量および総フェノール量と3画分のPPO活性との関係について調べた結果を、それぞれFig. 6, Fig. 7およびFig. 8に示す。これらの成分とPPO活性との関係においては、いずれの品種の場合も明確な相関性は認められなかった。なお、データは示さなかったが、総窒素量および総遊離アミノ酸量は試験したいずれの品種においても、成熟中徐々に増加する傾向が観察された。これらの結果は、さきにRichard¹⁰⁾らが数種のブドウについて調べた結果と類似していた。また総フェノール量については、品種によりその含量は異なっていたが、成熟期間中大きな変化は観察されず、ほとんど一定のレベルで推移した。さきにKimberly¹¹⁾は、総フェノール量とPPO活性とは直接的な関連性はないと報告しているが、本報の結果においても、それらの関連性は低いものと推察された。

上記の結果から、甲州種を除く他の4品種では可溶性PPO活性が糖度および酸度と関連性のあることが示唆された。果汁中の糖度と酸度は、ブドウの成熟の度合を判定するための最も重要な指標であることを考慮すれば、果汁中の可溶性PPO活性の変化はブドウの成熟経過と密接な関係にあるものと予想される。そこで、可溶性PPO活性と糖度および酸度の経時的変

化を4品種についてまとめた。その結果をFig. 9およびFig. 10に示す。可溶性PPO活性は、いずれの品種の場合も糖度の増加と酸度の減少に伴って低下傾向を示し、シャルドネでは9月中旬、リースリングでは10月初旬、マスカットベリーAでは10月中旬、カベルネソービニオンでは9月下旬に、それぞれ最低値を示し、以後一定レベルで推移した。この可溶性PPO活性が最低値を示した時期における糖度と酸度の値は、いずれの場合もブドウがかなり成熟した状態にあることを示している。一方山川⁹⁾は、本実験で用いた品種と同一のブドウ品種を当研究施設育種試験地において数年にわたり栽培し、それら品種の栽培特性を明らかにするとともに適熟期の目安として、糖-酸比がシャルドネ29、リースリング26、マスカットベリーA21、カベルネソービニオン18程度の値の時に適当であろうと報告している。そこで可溶性PPO活性が最低値を示す時期を仮にそれらブドウの適熟期とし、その時の糖-酸比をFig. 9およびFig. 10より求めたところ、シャルドネ29、リースリング23、マスカットベリーA29、カベルネソービニオン16の値となり、上述の結果とよく近似した値となった。勿論、糖-酸比の値は、栽培地域、天候、品種および収穫量の相違などにより異なることが知られ、また特に日本のような気象条件の下では、同一地域、同一品種においても収穫年

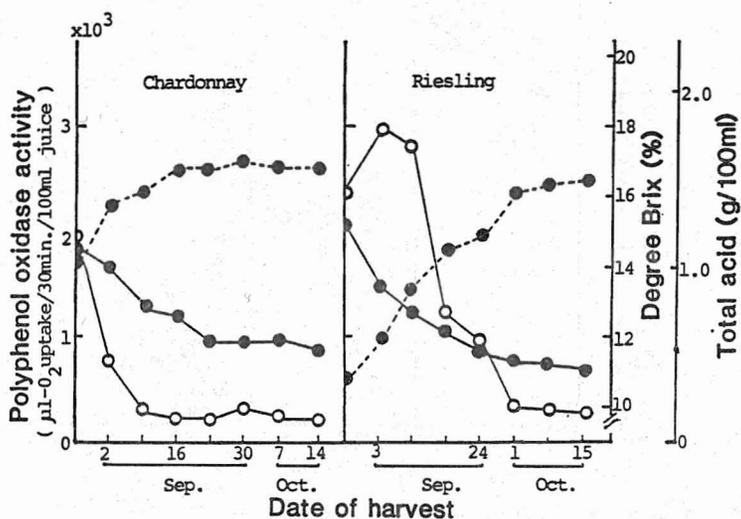


Fig. 9. Changes in soluble polyphenol oxidase activity, degree Brix, and total acid of Chardonnay and Riesling grape juices during ripening.

—○—; soluble PPO activity - - -●- - -; degree Brix
 —●—; total acid.

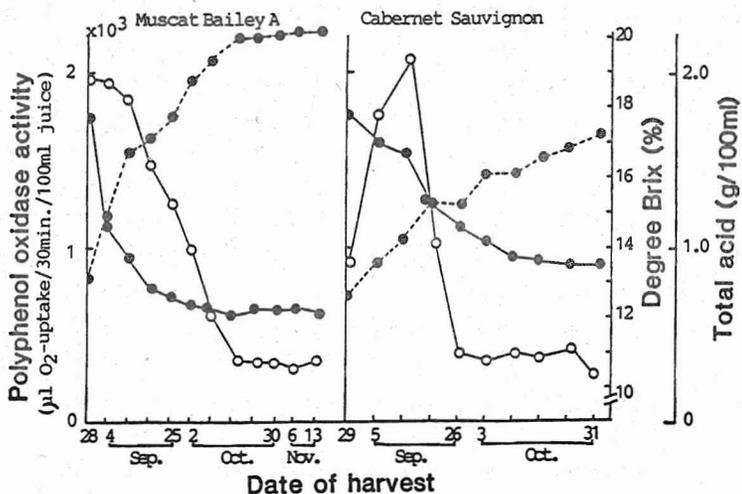


Fig. 10. Changes in soluble polyphenol oxidase activity, degree Brix, and total acid of Muscat Bailey A and Cabernet Sauvignon grape juices during ripening.

—○—; soluble PPO activity - - -●- - -; degree Brix
 —●—; total acid.

により、その値はかなり変動することがあるので厳密には、それらの値を比較・論議することはむずかしいが上述の結果は興味ある事実と思われる。また、この結果は、少なくとも、可溶性 PPO 活性が糖度や酸度と同様に、ブドウの適熟期を判定するための 1 つの指標として利用しうる可能性のあることを示しているものと考えられる。しかし、本結果は供試ブドウのサンプリング量が比較的少ないこと、および 1985 年度 1 年間の分析結果に基づいている点は注意すべきである。即ち同じブドウ園の同一のブドウ品種でも、土壌のタイプやこまかな気象条件の差などによって各ブドウ樹各ブドウ房毎に糖度や酸度、その他の成分量などが異なる場合のあることを考慮すれば、ブドウ果汁中の PPO 活性やその変化のパターンなども異なる可能性のあることも否定できない。それ故、本結論を明確なものとするためには、さらに数年にわたり種々のブドウ品種において多くの試験樹を対象とし検討を重ねる必要があるものと考えられる。

要 約

ブドウ果汁中に存在する PPO の活性がブドウの適熟期を判定するための指標として利用しうるか否かを明らかにするために、甲州、シャルドネ、リースリング、マスカットベリー A およびカベルネソービニオン種ブドウを対象とし、それらブドウの成熟中における PPO 活性を全 PPO、不溶性 PPO および可溶性 PPO の 3 つの画分においてそれぞれ経時的に調べ、以下の結果を得た。

1. 全果汁の PPO 活性は、カベルネソービニオン種では経時的に増加する傾向が認められたが、他の品種では顕著な変化はなく、ほぼ一定の活性レベルで推移した。不溶性 PPO 活性は、いずれの品種においても程度の差は認められたものの、わずかに増加する傾向が認められた。可溶性 PPO 活性の変化は、甲州種を除く他の品種でかなり類似した傾向を示し、ブドウの完熟期においては、いずれも極めて低い活性レベルで一定値を示した。

2. 3 画分の PPO 活性の経時的変化と果汁中の 2.3 の成分含量の経時的変化との相関性について調べた中では、可溶性 PPO 活性と糖度および酸度とに相関性が認められた。また可溶性 PPO 活性の経時的な減少傾向は、糖度の増加と酸度の減少経過とよく相関しており、ブドウが十分に成熟する時期においてはその活性は最低値を示すことがわかった。この結果は

ブドウ果汁中の可溶性 PPO 活性が、ブドウの適熟期の判定に利用しうる可能性のあることを示唆した。

本報告の概要はブドウ・ワイン学アメリカ学会日本部会 1986 年度大会（東京）において講演した。またブドウの採取にあたり助言・協力いただきました育種試験地・山川祥秀助教授に感謝致します。

文 献

- 1) Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., Webb, A. D.: *The Technology of Wine Making*, p.77, The AVI Publishing Company, Inc. (1980).
- 2) Amerine, M. A., Winkler, A. J.: *Proc. Amer. Sac. Hort. Sci.*, **38**, 379 (1941).
- 3) Kliewer, W. M., Howarth, L., Omori, M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **18**, 42 (1967).
- 4) Philip, T., Kuykendoll, J. R.: *J. Food. Sci.*, **38**, 874 (1973).
- 5) 山川, 守屋, 穴水: 山梨大学発研報告, **16**, 39 (1981).
- 6) Sapis, J. C., Macheix, J. J., Cordonnier, R. E.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 157 (1983).
- 7) Wissemann, K. W., Lee, C. Y.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **31**, 206 (1980).
- 8) Kidiron, M., Harel, E., Mayer, M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 30 (1978).
- 9) 横塚, 丹沢, 萩原, 二木, 加藤, 櫛田: 山梨大学発研報告, **18**, 37 (1983).
- 10) Amerine, M. A., Ough, C. S.: *Methods for Analysis of Musts and Wines*. (John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane and Toronto) (1980).
- 11) Kimberly, W. W., Lee, C. Y.: *J. Food Sci.*, **46**, 506 (1981).
- 12) 中村, 天野, 加賀美: 山梨大学発研報告, **16**, 15 (1981).
- 13) 横塚, 野崎, 櫛田: 山梨大学発研報告, **18**, 1 (1983).
- 14) Hrazdina, G., Farsons, G. F., Mattick, L. R.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **35**, 220 (1984).
- 15) 中村, 天野, 加賀美: 山梨大学発研報告, **19**, 7 (1984).
- 16) Richard, M. K., Leonard, R. M., Ross, H.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 102 (1978).

(1987. 9. 21 受理)