

[連載講座]

ワイン中の単糖、オリゴ糖、および多糖成分 (II)

中西載慶 (東京農大・醸造)

前号 (Vol. 3, No. 1) では、ワイン中の単糖類を中心にまとめたので、今回は、オリゴ糖および多糖類について、その分離法、分析法、ワイン中の含量などについて簡単にまとめた。ワイン中のオリゴ糖や多糖類は、一般にワインのフレーバーとの直接的な関連性は低く、かなりマイナーな成分であることからこれまで、あまり多くの研究はなされていない。ただし、ペクチンについては、果汁の搾汁率、ワインの濁り、フレーバーなどと関連性があることから、これら糖類の中では比較的よく調べられている。一方最近、多糖類がワインの膜濾過 (Cross-flow microfiltration) に影響を与えるとの報告もあり、またオリゴ糖や多糖に生理機能のあることなども明らかにされつつある。このような観点から、ワイン中における、これら糖類の種類や含量などの分析も興味あるものと思われる。

(1) オリゴ糖類

ワイン中のオリゴ糖成分として、これまでにマルトース、イソマルトース、シュークロース、ラフィノース、ラクトース、トレハロース、セロビオース、メリビオース、スタキオースが、数種の外国産ワインにおいて検出されているが、その含量は非発酵性単糖類 (前号に述べた) よりさらに微量であるので明確に同定されているものは少ない。また、定性的な分析例は幾つかあるが、定量的な分析例は極めて少ない。2、3の研究報告の結果を以下にまとめた。アメリカ産ワイン^{1,6)}において、ラクトース、マルトース、シュークロースが、10~50 mg/l、フランス産ワイン^{1,7)}において、トレハロースが、0~600 mg/lの範囲で含まれていた等の報告もあるが、通常はその含量が、50 mg/l を越えることは稀で、ほとんどは 5mg/l 以下である。また著者らは、山梨大学発酵化学研究施設で試醸された8種の白ワインと2種の赤ワインより主要なオリゴ糖成分としてラミナリビオースとゲンチオビオースを単離・同定し、その含量はラミナリビオース 8~18 mg/l、ゲンチオビオース 10~24 mg/l の範囲にあることを報告した^{1,8)}。

ワインに存在すると報告されているオリゴ糖類のほとんどは、単糖類や多糖類 (後述する) と同様、ブドウ果汁より由来するが、トレハロース、ラミナリビオース、およびゲンチオビオースは酵母より由来する成分であると推

定される。オリゴ糖類は非発酵性の単糖類などと同様、主に熟成中のワインにおいて、ワインの褐変やマロラクチック発酵などに関係する可能性があるともいわれているが、それらに関する研究報告はほとんどない。

(2) オリゴ糖の分析法

前述のようにワイン中のオリゴ糖量は非常に少ないので、前処理なしに直接、定性、定量分析することは困難である。ワインの濃縮、炭末処理、イオン交換処理等の後に、ペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーにより定性分析した報告があるが（定量分析にあたっては、ペーパーあるいは薄層上のスポットをデンストメーターにより定量的に測定したり、相当するスポットからオリゴ糖成分を抽出後、通常の糖分析法により定量したりする方法）、実際には共存する他の糖類がオリゴ糖類よりかなり多いのでワイン中のオリゴ糖の分析としてはあまり適していない。最近、高感度の高速液体クロマトグラフィーの機器や糖分析用のカラムも市販されてはいるが、ワイン中のオリゴ糖に関していえば、上述のように共存糖類が多いことからこれらの機種を用いても、ワインの前処理なしにオリゴ糖成分を直接分析することは難しい。

そこで著者らは、濃縮したワインを、炭末カラムクロマトグラフィーにより、オリゴ糖類を単糖や多糖類と分画後、ペーパークロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーにより分析している。本方法はオリゴ糖の分画や単離には非常に有効であるが、炭末カラムクロマトグラフィーにおける糖の回収率の定量性にかけるのが難である。一応参考資料として、著者らの行った結果を紹介する（ワインに限らず、一般にオリゴ糖の分画、単離法として利用できる）。

まず、ワイン（赤、白）を濃縮後、蛋白質やフェノール化合物を除去したのち（硫安やTCA、あるいはワインの還元糖の測定法における前処理法；前号に記述、などにより除去できる）サンプルをカラムクロマトグラフィー用活性炭粉末を充填したカラムつけ、水およびアルコール溶液により糖成分を順次溶出させることが出来る。一般に水により単糖類が溶出し、ついでアルコール溶液によりオリゴ糖が溶出される。同一の構成糖よりなり重合度のみ異なるオリゴ糖の場合は、概ねアルコール濃度の増加にともない、重合度の低いオリゴ糖から重合度の高いオリゴ糖へと順次溶出されるが、糖の構造が異なる場合には溶出順序が異なる場合がある。

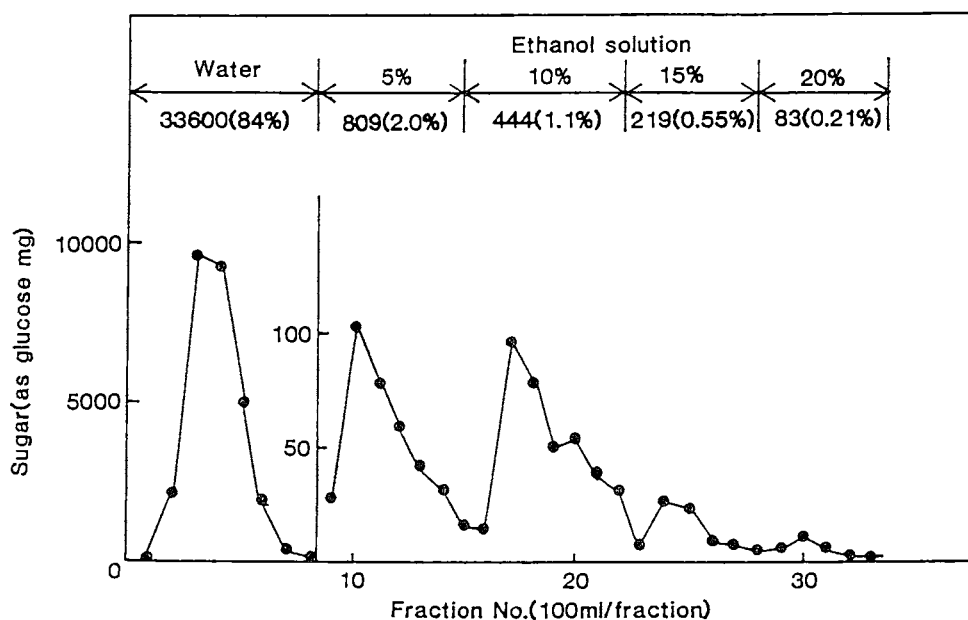
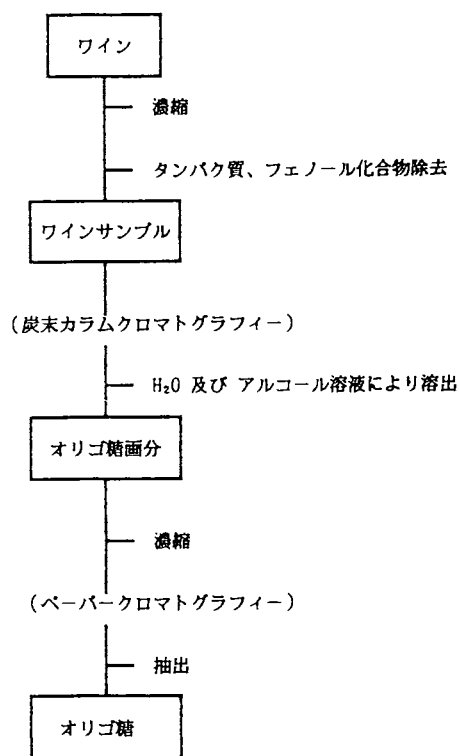
ワインからのオリゴ糖の分離の概略、炭末カラムクロマトグラフィーの糖溶出経過を以下に示した。各アルコール溶液で溶出された画分を用いれば、

ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、あるいは高速液体クロマトグラフィーなどにより、明確にオリゴ糖の検出が出来る。また、場合によっては、各オリゴ糖を単離することも可能である。

(2) 糖アルコール¹⁹⁾

前号で割愛したので、余白を利用して糖アルコールについて、少しまとめた。代表的な糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール、イノシトールが報告されている。ワイン中の含量は、ソルビトール 59~132mg、マンニトール 126~1376mg、イノシトール 200~700mgと報告されている。マンニトールがワイン中に多量検出された場合は乳酸菌が Stuck 発酵してフラクトースから生成することが知られている。

ワインからのオリゴ糖の分離



(3) 多糖類

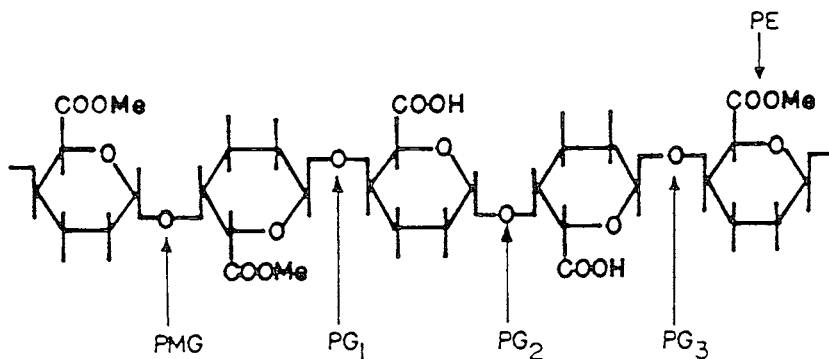
ワイン中の多糖類としては、これまでペクチン（ポリガラクトン酸）のような酸性多糖とマンナン、アラバン、ガラクトン、アラビノガラクトンのような中性多糖が報告されている。これらのうちマンナンは酵母より由来するといわれているが、その他はいずれも果汁中に存在しワインに移行する。特殊な例として貴腐ワイン中には、*Botrytis Cinerea* 由来のグルカンの存在も報告されている²⁰⁾。果汁あるいはワイン中の多糖類を直接正確に分析することはかなり難しいので、それらの種類や含量などに関する定量的なデータは比較的少ないが、既報の結果からみると、ワイン中の総量は、200～1000 mg/l程度と予想される。一般的に赤ワインの方が白ワインよりかなり高い値を示す。なお、量的にはペクチン、マンナン、およびアラビノガラクトン等が多く含まれているものと予想される。果汁中の多糖含量は、通常ワイン中よりかなり多く含まれているが、発酵中にアルコール等により一部が沈殿する。以下に量的に多く含まれているペクチン、マンナン、およびアラビノガラクトンについてまとめる。

（ペクチン） 多糖類の中では、上述のように最もワインの製造や品質に影響を及ぼす成分と考えられる²¹⁾。ペクチンは、ガラクトン酸が α -1,4結合して主鎖を形成し、そのカルボキシル基の一部がメチルエステル化しているが、その主鎖あるいは側鎖にラムノース、アラビノース、ガラクトースなどが結合しているといわれ、かなり複雑な構造である（ガラクトン酸を含有する多糖を酸性ペクチン多糖ともよび、これに共有結合して存在する多糖をもペクチン多糖とよぶ場合もある。それ故細胞壁に存在する、アラバン、ガラクトン、およびアラビノガラクトンのおおくは中性ペクチン多糖と定義されることもある）。

ブドウ果汁中に存在するペクチンのおおくはメチルエステル化されたペクチンであり、また分子量もかなり異なったものが混在している。ワイン中のメタノールは、メチルエステル化されているペクチンのメチル基の脱メチルにより生ずる。ブドウ中のペクチン含量は、ブドウ品種によりかなりことになっており、0.1～6 g/lの範囲とかなりの幅がある。このうちエステル化されているものは20～50%の範囲との報告もある¹⁹⁾。発酵中にこれらペクチンの30～90%は沈殿し、ワインにはその一部が移行するが、その量もブドウ品種や発酵条件の違いにより、かなり異なっている。また、ブドウマスト中にはそれほど高いレベルではないが、ペクチン分解酵素；ペクチンエステラーゼやポリガラクトナーゼ (endo and exo types) が存在し、ペクチンの一部を分解する。ワイン酵母は通常ペクチン分解酵素をあまり生産しない。し

かし、果汁の清澄化や、搾汁率向上のためにペクチナーゼ製剤を使用した場合にはワイン中のペクチン含量は、無使用に比べかなり少ない。

ワインのフレイバーとして、古くからペクチンはワインの柔らかさと芳醇さに関係するともいわれているが、それを示す明確なデータはないようである。



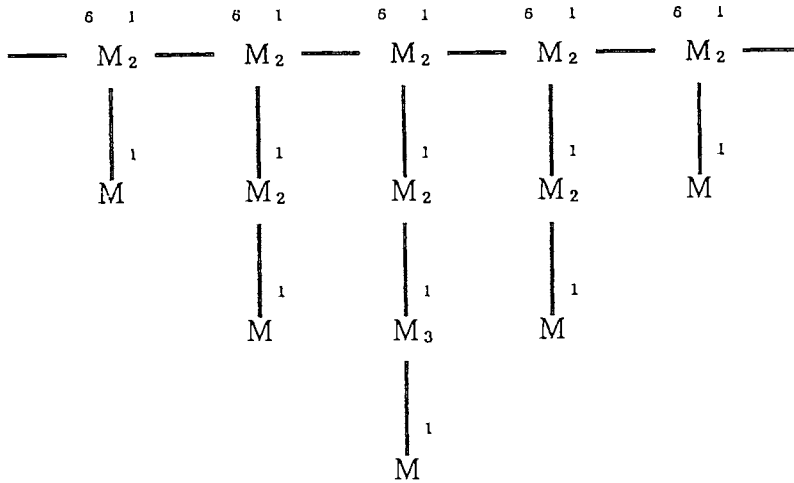
PE = Pectin esterase
 PMG = Polymethylgalacturonase
 Polygalacturonases (endo and exo)
 - PG₁ and PG₃ when acid and ester adjacent
 PG₂ when two acids adjacent

ペクチンの基本構造とペクチン分解酵素の作用部位

ブドウ果汁中のペクチンの分子量分布

Molecular weight	% of total
6,500- 10,000	7.0
10,000- 20,000	22.0
20,000- 30,000	15.0
30,000- 50,000	20.0
50,000-100,000	16.5
100,000-200,000	9.5
200,000-500,000	6.5
>500,000	3.5

(アラビノガラクトタンおよびマンナン) 最近、ワインの膜濾過の影響因子として、フランス産赤ワインよりアラビノガラクトタンが分離され、その構造などが報告されている²²⁾。その構造は、下図に示すように、ガラクトース



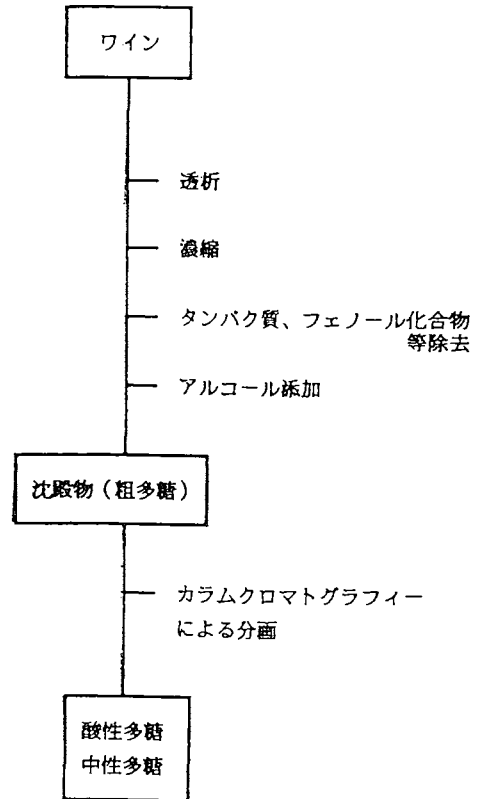
スイス産ロゼワインより分離されたマンナンの推定構造

M : Mannose (S. uvarum 酵母の細胞壁より分離されたマンナンとの比較検討より推定)

ワインからの多糖類の分離

(4) ワイン多糖の分離・分析法

ワインやブドウ果汁からの多糖類の分離においては、特に有効な分離法などは報告されていないが、一般に植物多糖の分離に準じて行なうことができる。ここでは、著者らの行なった簡便なワイン多糖の分離法についてまとめた。ワインを透析および濃縮により初発の1/20~1/25の容量としたのち、その4倍容量のアルコールを添加すれば(場合により少量の塩の存在下で)ワイン中のほとんどの多糖は白濁沈殿する(タンパクやフェノールを除去しない場合は褐色沈殿する)。この沈殿物を水で再溶解後、凍結乾燥することによりワイン粗多糖画分がえられる。このようにして得られた粗多糖画分中の糖含量は90%以上である。この粗多糖画分をカラムクロマトグラフィーにより、ペクチン画分と中性多糖画分に分離することは比較的容易であ



るが、マンナンやアラビノガラクトンのような中性多糖画分をさらに其々の糖成分に分離することはかなり面倒である。なお、この粗多糖中の構成糖の分析にあたっては、粗多糖を8%硫酸溶液にて100℃～110℃で2～3時間加水分解後、中和、誘導体の調製、GLCにより中性単糖として定量分析するのが便利である。もちろんHPLCでの測定も可能であるが、構成糖の同定をも目的とする場合には誘導体を調製する面倒さはあるもののGLCによる分析も便利である²³⁾。

ペクチンの定量法として、95%アルコールを添加し、ペクチンを沈殿させ濾別、洗浄後、水にとかしてアルカリでケン化して硫酸で逆滴定する方法、CaCl₂により沈殿させ、ペクチン酸石灰の重さを測る方法、カルバゾール・硫酸法により、ガラクツロン酸を測定する方法など種々報告されている¹⁹⁾

著者らは、もっとも簡便なワイン中の多糖含量の測定方法として、以下の方法を採用している²³⁾。

(1) 一定量のワインサンプルを十分に透析する (2) この透析内液中のペクチン含量はカルバゾール・硫酸法で測定し、ガラクツロン酸換算で表示し中性多糖含量は、フェノール・硫酸法で測定しグルコース換算で表示する。

(3) 透析内液量の増加分を補正して、ワイン1Lあたりに換算表示する。このようにして求めた多糖含量は、上記のごとく分離・分析した粗多糖含量とそれほど大きな違いはないので、ワイン中の多糖含量の概算値として利用できると思われる(ただし赤ワインの場合は若干異なる場合もある)。

以下に著者らが、山梨大学発酵化学研究施設にて試醸したワイン中の多糖含量を簡便法にて測定した結果を参考資料として紹介する。

甲州およびカベルネソービニオン種ブドウより、異なった製造法により得られたワイン中の多糖含量の分析から、果皮の多糖成分がかなりワインに移行することがわかる。

異なった製造法によるワイン中の多糖含量

糖量	'87甲州		'86カベルネ・ソービニオン	
	常法	スキンコンタクト	常法	ブラッシュ
フェノール硫酸法 (mg/l as glucose)	216	521	736	268
カルバゾール硫酸法 (mg/l as galacturonic acid)	51	484	246	114

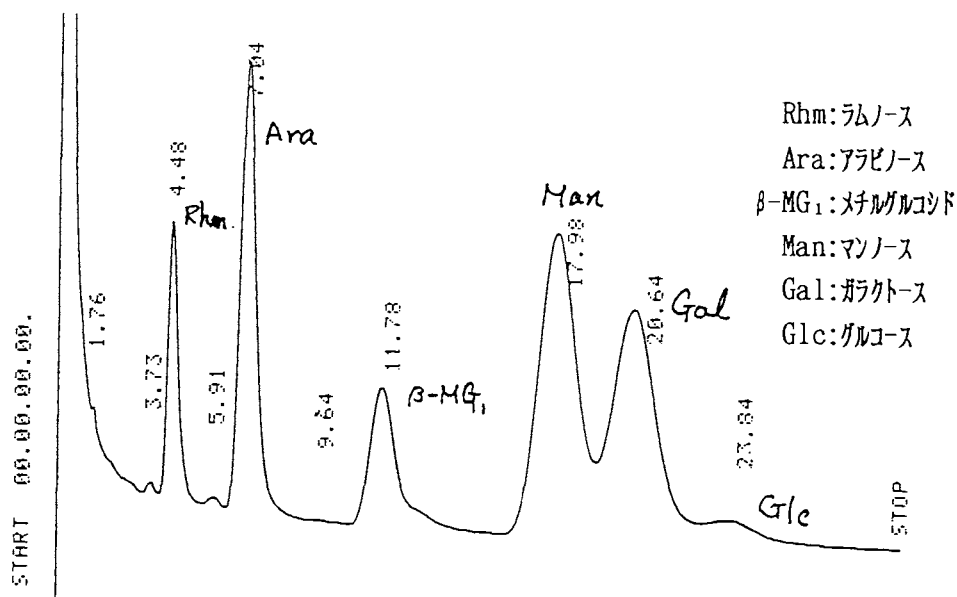
また、山梨大学発酵化学研究施設で過去10年間に試醸された、甲州、シャルドネ、リースリング等の白ワインにおける測定結果から、ワイン1 L当りペクチンはガラクトuron換算で100mg程度、中性多糖はグルコース換算で250~350mgであり、マスカットベリー A とカベルネソービニオン等の赤ワインでは、ペクチン200~400mg、中性多糖700~1000mgであった。

甲州ワインから分離した多糖画分中の構成糖を分析した結果を以下に示す。また、著者らのおこなったGLCによる糖分析の一例を以下にまとめた。これまでの検討から、アラビノース、ガラクトース、マンノース、およびガラクトuron酸量は、其々主にアラビノガラクタン、マンナン、およびペクチン量を反映するものと考えられる。なお酵母由来と推定されるマンナンの含量が高いことは興味がある。

(ガスクロマトラフィー; GLC によるワイン多糖の分析条件)

分析手順の一例

- (1) ワイン多糖 32mgを8mlの蒸留水に溶かす
- (2) 40%硫酸溶液 2mlを(1)に加えよく攪拌したのち、105℃、3時間オイルバス中で加水分解する。
- (3) (2)に水酸化バリウムを加えて pH6~7程度まで中和する。
- (4) 中和後、吸引濾過により濾液をとる。
- (5) (4)の濾液より一定量(この場合4ml)をとり、内部標準物質としてβ-メチルグルコシド溶液(1mg/ml)1mlを加える。
- (6) (5)の溶液に水素化ホウ素ナトリウム50mg(5の溶液中の糖量の2~3倍位加えるとよい)を加え、2~3時間室温で放置し、糖の還元を行なう。
- (7) 強酸性イオン交換樹脂を(6)に加え、pHが5~7になった時点で、濾紙により、イオン交換樹脂を除去し、濾液をとる。
- (8) この濾液をエバポレーターにて減圧濃縮、乾固する、メタノールを加え4回ほど同様の操作を繰り返す。
- (9) この乾固物にピリジン1mlと無水酢酸1mlを加え、25℃で1晩アセチル化する。
- (11) (9)を減圧乾固したのちジクロロメタンを2ml加えGLCにて分析する(カラム; 3% ECNSS-M Gas Chrom Q 1.5m, 195℃, FID) 其々の糖量は、別に内部標準物質と標準単糖とにより検量線を作成しておき、そのグラフより求める。



甲州ワインより分離した多糖成分中の構成中性単糖の分析1例

甲州ワインより分離した多糖成分中の構成糖 (%)

ラムノース	アラビノース	マンノース	ガラクトース	グルコース	ガラクトロン酸 ¹
6~9	17~20	35~45	25~32	3~7	20~30

中性単糖はGLCにて分析、ガラクトン酸はカルバゾール硫酸法にて測定

以上、ワイン中のオリゴ糖と多糖類についてまとめたが、これら成分とワインの品質との関係については、先にも述べたように、これまでどちらかと言えばマイナーな成分であったことから、あまり詳しい検討はなされていない。しかし、ワイン中の多糖類はワインの濁りやフレーバーに少なからず影響を与え、また製造法やブドウ品種により、その含量もかなりことなることから、今後も検討していく必要があろうと考えられる。

参考文献

- 1) 笠松: 醸協, 75, 631(1979).
- 2) EEC Regulation, No. 2133/74.
- 3) 大塚: 醸協, 68, 115(1973).
- 4) 大塚ら: 醸協, 80, 136(1985).
- 5) 荻野ら: 醸協, 80, 654(1985).
- 6) 乙黒ら: 醸協, 78, 284(1983).
- 7) 大塚ら: 醸協, 80, 867(1985).
- 8) 大塚ら: 醸協, 81, 113(1986).
- 9) 横塚ら: 山梨大学発研報告, 19, 39(1984).
- 10) 清水ら: 醸協, 81, 113(1986).
- 11) P. Esau et al: Am. J. Enol. Vitic., 15, 187(1964).
- 12) L. Usseglio-Tomasset et al: Vini Ital. 20, 27(1978).
- 13) F. Drawert et al: Z. Lebensm-Unters. Forsch, 162, 407(1976).
- 14) 醸造成分一覽: 日本醸造協会編, p284(1977).
- 15) M. A. Amerine et al: Methods for Analysis of Musts and Wines, p33 (1980).
- 16) P. Esau et al: Am. J. Enol. Vitic., 17, 265(1967).
- 17) M. A. Amerine et al: Methods for Analysis of Musts and Wines p41, (1980).
- 18) Nakanishi et al: J. Ferment. Bioeng., 67, 148(1989).
- 19) 醸造成分一覽: 日本醸造協会編, p285(1980).
- 20) D. Dubourdiou et al: Carbohydr. Res., 93, 294(1981).
- 21) J. M. Brillouet et al: Am. J. Enol. Vitic., 41, 29(1990).
- 22) J. C. Villettaz et al: Carbohydr. Res., 81, 341(1980).
- 23) 中西ら: 未発表