

[連載講座]

やさしい有機酸分析 (1)

キッコーマン株式会社酒類事業本部

流山工場 研究課兼研究本部

島津 善美

ワインをはじめ、ビール・清酒・老酒などの醸造酒は、用いられる原料、発酵法などの違いにより、それぞれ特有な香味（フレーバー）を持っている。とりわけ、ワインは他の酒類に比較して、酸味が際だって複雑な特徴を有している。そしてワイン中の有機酸は、糖類やエチルアルコールと並ぶ基本的な味覚成分であり、ワインフレーバーを左右する重要な役割を果たしている。それ故、ワインの製造上、原料ブドウ・ワイン発酵管理及び製品管理の全般において有機酸を適切に制御することは、極めて大切な管理項目である。

ワインの有機酸成分に関して、ブドウ品種の栽培、酵母・乳酸菌などの有機酸代謝及び有機酸分析方法等、これまでに数多くの研究成果が報告されている。

本稿では、ワインの有機酸に焦点を当て、著者らの開発したワインの有機酸分析方法を中心に酵素分析方法も触れて、概要を3回に分け紹介したい。

1. ワイン中の主要有機酸成分

ワインに存在する主要有機酸としては、原料ブドウ果実にもともと含まれる主成分の酒石酸、リンゴ酸、クエン酸は発酵後にワイン中に移行する一方、酵母のアルコール発酵と乳酸菌のマロラクティック発酵（MLF）によって、乳酸、コハク酸、酢酸、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸等の諸成分が生成される。

貴腐菌（キフキン）が付着した貴腐ブドウを原料にして作られる貴腐ワインには、上記の通常のワイン成分に加えて、グルコン酸、ガラクチュロン酸、グルキユロン酸等が生産される。表-1にワイン中の主要な有機酸成分の含有量と成因を示す。

2. 総酸及び揮発酸の分析方法

ワインの総酸（滴定酸度）及び揮発酸の分析方法について、すでに横塚弘毅先生が連載講座（1990年Vol. 1）¹⁾に推奨方法を紹介されているので御参照いただきたい。

3. 主要有機酸成分の分析方法

ワイン中の個々の有機酸成分を分析する手段には、様々な方法が開発され、実用化されている。ガスクロマトグラフィー（GC）の他、薄層クロマトグラフィー、イオン交換樹脂法、シリカゲルクロマトグラフィー法、および酵素法などは広く用いられているが、多数の天然試料の全有機酸成分を簡便にかつ特異的に精度よく定量するには、困難な場合が

Table 1.

ワインの主要有機酸成分

| 有機酸成分名 | 分子量 | 含有量 (per l) | 主要成因 |
|----------------------------------|-----|--------------|--------------|
| 酒石酸 (L-Tartaric acid) | 150 | 1 - 5 g | 果汁 |
| リンゴ酸 (L-Malic acid) | 134 | Tr. - 8 g | 果汁 |
| クエン酸 (Citric acid) | 192 | Tr. - 1 g | 果汁 |
| 乳酸 (L, D-Lactic acid) | 90 | Tr. - 5 g | 醱酵, MLF |
| 酢酸 (Acetic acid) | 60 | Tr. - 1 g | 醱酵, MLF, 貴腐果 |
| コハク酸 (Succinic acid) | 118 | Tr. - 1.5 g | 醱酵 |
| ピルビン酸 (Pyruvic acid) | 88 | Tr. - 400 mg | 醱酵 |
| α-ケトグルタル酸 (α-keto glutaric acid) | 146 | Tr. - 100 mg | 醱酵 |
| 酪酸 (Butyric acid) | 88 | Tr. | 細菌汚染 |
| シュウ酸 (Oxalic acid) | 126 | Tr. - 100 mg | 果汁 |
| キナ酸 (Quinic acid) | 192 | Tr. | 果汁 |
| ガラクトuron酸 (Galacturonic acid) | 194 | Tr. - 2 g | ベクチナーゼ, 貴腐果 |
| グルクロン酸 (Glucuronic acid) | 194 | Tr. - 2 g | 貴腐果 |
| グルコン酸 (Gluconic acid) | 196 | Tr. - 3 g | 貴腐果 |

Tr. : Trace

多い。一方、液体クロマトグラフィー (LC) は、食品中の水溶性の有機酸成分を分析する方法として、非常に適している²⁾。

LC法による有機酸を分離・検出する方法について、数社から有機酸分析計が市販されているが、それぞれ分析システムに特徴を持っている。その代表的な検出方法には、有機酸が酸性であることを利用して、pH指示薬を呈色させる方法 (昭和電工、日本分光) またはカルボキシル基が負に荷電することを利用して、電気化学検出器で測定する方法 (島津製作所、Dionex) およびポストカラム誘導化法を採用し、カルボン酸のみを発色させる方法のカルボン酸分析計 (東京理化工械) 等がある。上述の主要カルボン酸分析計には、各々の性能に一長一短がある。ここでは、以下にカルボン酸のみを検出分析するシステムを組み込んだカルボン酸分析計 (当初、盛進製菓が販売、現在は東京理化工械が改良機器を販売) を紹介する。このシステムはカルボン酸の分離が極めて良く、カルボン酸のみが発色されるため他の夾雑物の影響を受けにくいメリットがある。この分離・検出システムを組み込んだ分析システムを、著者らは初めてワインの有機酸分析に応用した³⁾。

食品中の全有機酸成分を特異的にかつ高精度に定量する分析手段として、検出系にDCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド) 試薬3) を用いるDCC法および更に改良のEDC {1-メチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドハイクロライド} 法4) が開発された。著者らはこのEDC法をLCのポストラベル系に応用したカルボン酸分析計を用いて、ブドウ果汁およびワイン有機酸成分の分離定量について検討を行った⁴⁾。このカルボン酸分析計のフローダイヤグラムを Fig. 1 に示す。

P-1は分離用ポンプで、溶離液は0.01M KH_2PO_4 を含む0.2N HCl水溶液である。試料は付属小型冷蔵庫に内蔵したオートサンプラー S-36 (36試料保持) を用いて添加した。サンプラー容量は、100 μl である。分離用樹脂は、強塩基性陰イオン交換樹脂 (Diaion CK8S、粒径11 μm 、三菱化成 (株)) を用いた。カラム温度は40°Cである。P-2は4%ピリジンと0.15 M EDC/エタノール溶液の送液ポンプである。P-3ポ

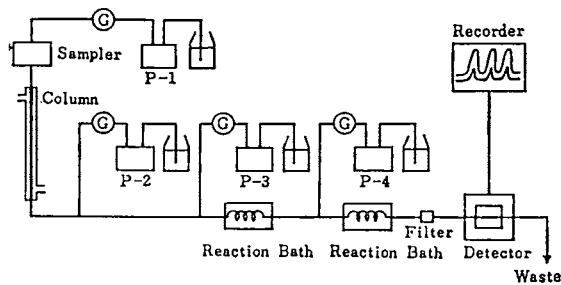


Fig.1. Flow diagram of the system for carboxylic acid chromatography.

- P-1: Eluent pump 1; 0.2 N HCl+0.01 M KH_2PO_4
(flow-rate, 0.13 ml/min)
- P-2: Reagent pump 2; 4%(v/v) pyridine/Et-OH+
0.15 M EDC (flow-rate, 0.25 ml/min)
- P-3: Reagent pump 3; 0.2 N HCl+0.01 M ONPH
(flow-rate, 0.25 ml/min)
- P-4: Reagent pump 4; 1 M NaOH (flow-rate, 0.25 ml/
min)

ンプにより、0.1 M ONPH の0.2 N HCl 溶液を送液し、混合液は反応槽を用いて40°Cで約4分間反応させて、ヒドラジンを生成させた。更にP-4ポンプで、1M NaOHを添加し、再び反応槽を用いて100°Cで約6分間加温、ヒドラジンを発色後冷却し、比色計で530 nmの吸収を比色、記録した。

10種類の標準有機酸混合液のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。本分離型カルボン酸分析計の場合、分析時間は約2時間必要である。また本法の検出限界は約0.5 nmol である。最近、高分離型と同時に高速分析(約30分分析)を可能にした高速型の2モード装着の新カルボン酸分析計(S-3000)が東京理化学器械(株)より市販されている。

上述の両モードで分析された白ワイン(マンズワイン:ハイベスト)の有機酸クロマトグラムを Fig. 3 (高分離型モード)、Fig. 4 (高速型モード) に示す。白ワインの分析結

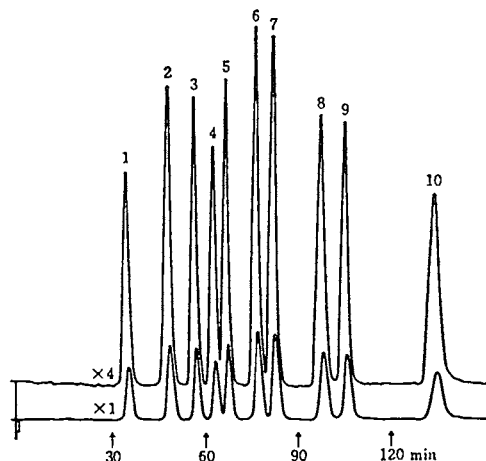


Fig.2. Typical chromatogram of organic acids in a standard mixture.

- Resin; Dialon CA-08 S. Sample size; 100 μl .
- Peaks: 1, Glutamic acid(0.06 mg/ml); 2, Galacturonic acid(0.06 mg/ml); 3, Pyroglutamic acid(0.07 mg/ml); 4, Lactic acid(0.015 mg/ml); 5, Acetic acid(0.014 mg/ml); 6, Tartaric acid(0.025 mg/ml); 7, Mallic acid(0.025 mg/ml); 8, Citric acid(0.030 mg/ml); 9, Succinic acid(0.020 mg/ml); 10, α -Ketoglutaric acid(0.050 mg/ml)

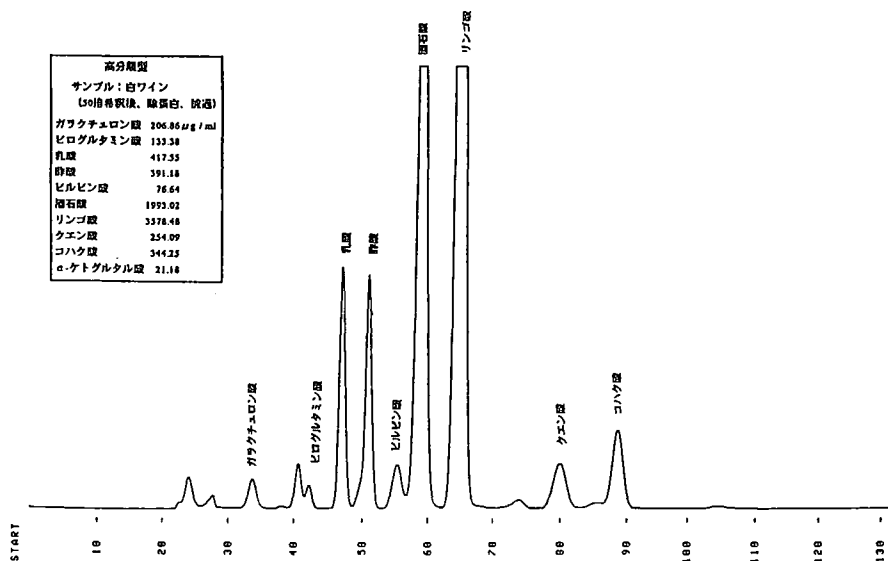


Fig. 3 白ワインの有機酸クロマトグラム (高分離型モード)

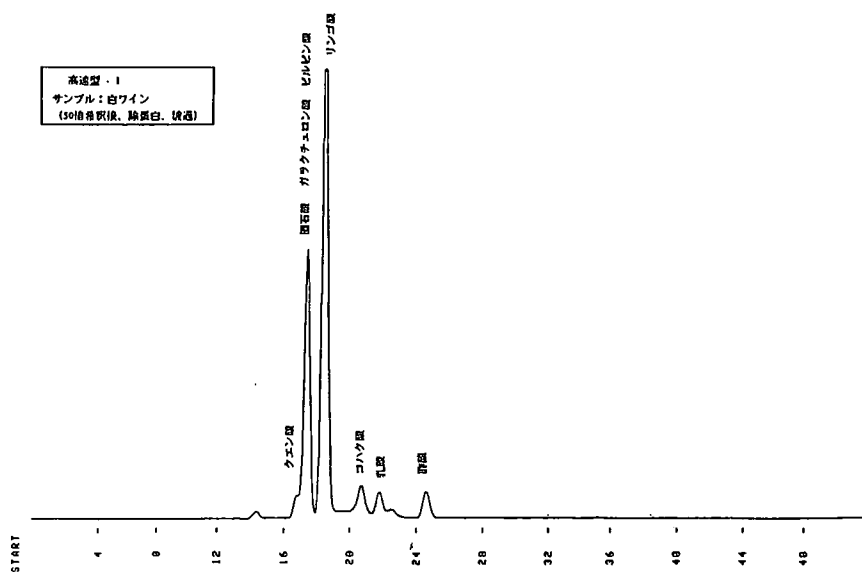


Fig. 4 白ワインの有機酸クロマトグラム (高速型モード)

果から、ガラクチュロン酸、ピログルタミン酸、乳酸、酢酸、ピルビン酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸と4つ以上の未知ピークが認められた。また上記の標準有機酸試薬の添加回収率の試験で、各成分の定量性が良いことを確認した¹⁾。

著者らが分離型カルボン酸分析計S700を用いて分析したブドウ果汁および主要テーブルワインの有機酸分析結果をTable 2とTable 3に示す。ブドウ果汁(4品種)には、酒石酸、リンゴ酸の他に少量のクエン酸とガラクチュロン酸が認められた。善光寺種、

Table 2. Contents of organic acids in grape musts determined by EDC method

| Variety | Tartaric acid (g/l) | Malic acid (g/l) | Citric acid (g/l) | Galacturonic acid (g/l) | M/T ^{a)} |
|--------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Koshu ^{a)} | 4.30 | 1.88 | 0.25 | 0.06 | 0.44 |
| Zenkoji ^{b)} | 4.15 | 6.50 | 0.31 | 0.08 | 1.57 |
| Riesling ^{c)} | 3.92 | 4.15 | 0.21 | 0.25 | 1.06 |
| Chardonnay ^{d)} | 3.43 | 6.25 | 0.28 | 0.18 | 1.82 |

a), c) and d): Koshu, Riesling and Chardonnay varieties were harvested in Yamanashi Prefecture in 1980.

b): Zenkoji variety was harvested at Komoro in Nagano Prefecture in 1980.

e): M/T; Proportion of content of malic acid to tartaric acid.

Table 3. Contents of organic acids in commercial table wines determined by EDC method (g/l)

| Sample ^{a)} No. | Tartaric acid | Malic acid | Succinic acid | Acetic acid | Lactic acid | Citric acid | Galacturonic acid |
|-----------------------------|---------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 1.65 | 1.56 | 0.29 | 0.12 | 0.63 | 0.16 | 0.25 |
| 2 | 2.18 | 1.35 | 0.45 | 0.34 | 1.39 | 0.15 | 0.25 |
| 3 | 1.57 | 5.19 | 0.96 | 0.35 | 1.44 | 0.29 | 0.36 |
| 4 | 2.10 | 1.53 | 0.58 | 0.24 | 0.31 | 0.21 | 0.13 |
| 5 | 1.73 | 2.63 | 0.39 | 0.27 | 0.55 | 0.21 | 0.27 |
| 6 | 1.11 | 0.08 | 0.78 | 0.85 | 2.41 | 0.04 | 1.21 |
| 7 | 1.40 | 0.25 | 0.61 | 0.48 | 2.29 | 0.14 | 0.92 |
| 8 | 1.93 | 0.42 | 0.64 | 0.49 | 1.60 | 0.13 | 0.81 |
| 9 | 1.38 | 2.63 | 0.49 | 0.42 | 0.61 | 0.22 | 0.33 |
| 10 | 1.45 | 2.66 | 0.74 | 0.94 | 0.53 | 0.67 | 0.22 |
| 11 | 1.11 | 5.43 | 0.42 | 0.12 | 0.20 | 0.19 | 0.21 |
| 12 | 1.91 | 3.56 | 0.34 | 0.15 | 0.98 | 0.19 | 0.22 |
| 13 | 2.25 | 0.20 | 0.44 | 0.83 | 5.49 | 0.11 | 0.30 |
| 14 | 1.49 | 0.27 | 0.61 | 0.20 | 5.15 | 0.11 | 0.33 |

a) Sample No.1~5: Japanese white table wines, No.6~8: Japanese red table wines, No.9: Japanese noble wine (1978), No.10: Japanese noble wine (1976), No.11, 12: German white wines (1977, Kabinett), No.13, 14: Erench white wines (1977, Chablis).

シャルドネ種およびリースリング種は、M/T（リンゴ酸/酒石酸）比が1.0より高く、リンゴ酸が酒石酸より多量含有されていることが分かった。一方、テーブルワインには酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、酢酸、乳酸、クエン酸およびガラクチュロン酸が認められた。赤ワインは、白ワインよりも乳酸、酢酸およびガラクチュロン酸が多く含まれていた。著量の乳酸の生成と酢酸の増加は、乳酸菌のMLFにより、ガラクチュロン酸の生成はブドウ果汁中のペクチン質の分解に起因している。またMLF完了のワインにクエン酸含量が比較的少ないのは、乳酸菌の分解に因るものである。以上の如く高分離型EDC法カルボン酸分析計によりブドウ果汁およびワイン中の有機酸が短時間内に簡便にかつ精度良く分析定量できることを明らかにした。

著者らは上述のカルボン酸分析計を応用して日本産および外国産のブドウ果汁・高級ワイン類の計2,500点以上の有機酸分析をこれまでに試みた。これによって高級ワインの有機酸成分組成のパターンは、ワインタイプによってそれぞれ明瞭な特徴があることを明確にした^{5, 6)}。

参考文献

- 1) 横塚弘毅: ASEV Jpn. Rep., Vol.1, p.65 (1990)
- 2) 鈴木義仁、小泉均: ASEV Jpn. Rep., Vol.4, p.18 (1993)
- 3) Y.Shimazu, M.Watanabe: Die Wein-Wiss., Vol.31, p.45 (1975)
- 4) 島津善美、渡辺正澄: 醸協, Vol.76, p.418 (1981)
- 5) 島津善美: ぶんせき, No.4, p.286 (1983)
- 6) 島津善美、上原三喜夫、岡村成通、渡辺正澄: 醸協, Vol.77, p.628 (1982)