

## 〔研究報文〕

## 甲州ワインからの多糖類の分離とその性質

中西載慶<sup>1\*)</sup>・野崎一彦<sup>2)</sup>・徳田宏晴<sup>1)</sup>・横塚弘毅<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 東京農業大学短期大学部醸造学科 156 世田谷区桜ヶ丘1-1-1<sup>2)</sup> 山梨大学発酵化学研究施設 400 甲府市北新1-13-1

## 〔Research Note〕

## Isolation and Characterization of Polysaccharides from Koshu white Wines

Kotoyoshi NAKANISHI<sup>1\*)</sup>, Kazuhiko NOZAKI<sup>2)</sup>, Hiroharu TOKUDA<sup>1)</sup>  
and Koki YOKOTSUKA<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of Agriculture  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagayaku 156, Tokyo<sup>2)</sup> The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu  
400, Yamanashi.

The Concentration of polysaccharides in various Koshu wines made from 1975 to 1990 was examined. The concentrations of neutral polysaccharide and pectin in the white wines ranged from 200 to 300 mg/L (as glucose), and from 60 to 100 mg/L (as galacturonic acid), respectively. Polysaccharides were isolated from wines made from Koshu grapes by dialysis, salting-out (80 % saturation of ammonium sulfate) to remove proteins, and alcohol precipitation (80 % ethanol). The crude polysaccharides obtained as lyophilizates were analyzed for their composition by GLC of the alditol acetate derivatives of neutral sugars obtained after acid hydrolysis and the carbazol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method for uronic acid. About 70% of the total polysaccharides were neutral sugars which composed of mainly mannose, galactose and arabinose with minor quantities of rhamnose and glucose. The concentration of uronic acid was about 25 % of the total polysaccharides. These results suggest that arabinogalactan, mannan and pectin are major components of polysaccharides in Koshu wine.

\* Corresponding author

From the analyses of two polysaccharides fractions obtained from Koshu grapejuice and the resultant wine, it was suggested that mannan was released from yeast cells into the wine during the fermentation. In addition, a remarkable difference in the concentration of pectin between the two polysaccharides were observed. (Accepted for publication 4 March 1994)

**Key words:** Isolation of wine polysaccharides, Neutral polysaccharides in wines, Polysaccharides from Koshu wines, Polysaccharides from wines, Uronic acids in wines

ワイン中には種々の単糖、オリゴ糖および多糖などの存在が知られている。この中、グルコースとフラクトースはワインの甘味と密接に関係する成分としてよく調べられているが、オリゴ糖類や多糖類に関する報告は比較的少ない(1-5)。これまでの報告から、ワイン中のオリゴ糖類は極めて微量であるが多糖類はそれに比し量的にも多く含まれておりワイン中の糖成分としてさらに詳しい検討が必要と考えられる。

これまで、ワイン中の多糖類としてはペクチンのような酸性多糖と中性多糖の存在が知られ、ペクチンについては比較的多くの報告があるが、中性多糖類については極めて少なく、フランス産赤ワインからのアラビノガラクトンの分離(4)、スイス産ロゼワインからのマンナンの分離(5)等、幾つかの報告があるにすぎない。しかし、多糖類はワイン中にコロイドとして存在し、ワインの濁りと深く関係し、膜濾過によるワインの清澄化や安定化において阻害因子となることが知られ、また、ワイン中のペクチンは、柔らかさや芳醇さとも関係するとも言われている(1)。また、酵母細胞壁の不溶性多糖類の添加が、過度にデブルバージュした果汁におけるアルコール発酵の遅延や停止を防ぐ効果のあることなども報告されている(6,7)。一方、日本産ワインにおける多糖類の検討は、これまでほとんど行なわれていない。これらの点を考慮すれば、日本で製造されたワインにおける多糖の種類や含量などを調べることは興味あることと思われる。

そこで本報では、甲州ブドウより製造された白ワイン中の多糖含量および多糖の分離とその構成糖成分などを調べた。また、果汁中の多糖成分についても調べ、多糖類の果汁からワインへの移行についても若干の検討を行なったので報告する。

## 材料と方法

**ブドウ** 山梨大学発酵化学研究施設付属育種試験地で1990年10月に収穫された甲州種ブドウを用いた。また、このブドウよりのワインの試醸にあたっては、小型バスラン型プレスにより搾汁(搾汁率60%)した果汁(2.5L、清澄化処理はしていない)を用い3L容の細口ガラスビンにて、23° Brix になるよう補糖後、同果汁で前培養した酒母(*Saccharomyces cerevisiae* OC-2)を3%容量添加し、常法にしたがって25°Cで10日間発酵した。発酵終了後、遠心分離しその上清液より多糖分離を行なった。

**ワイン** 1975年から1990年に山梨大学発酵化学研究施設付属試験工場において同付属育種試験地で収穫された甲州種ブドウより、通常の方法により製造され、貯蔵されているワインを用いた。また、甲州ブドウより、1992年に製造された市販甲州ワイン5点を用

いた。

分析　ワイン中の多糖含量の測定にあたっては、試料ワイン50mlを脱イオン水にて、4℃で充分透析した。その内液を適当に希釈後、ペクチン量はカルバゾール・硫酸法(8)により測定しガラクトuron酸換算で表示し、中性多糖含量は、フェノール・硫酸法(9)により測定し、グルコース換算で表示した。タンパク質量は、プロテインアッセイキット(BIO-RAD社製)により、牛血清アルブミンをスタンダードとして測定した。総フェノール量はフォーリンシオカルト法(10)により測定し、没食子酸換算で表示した。

構成糖の分析　1) 多糖の加水分解　ワイン及び果汁より凍結乾燥物として分離された粗多糖(調整法は結果及び考察の項に記述する)32mgを8%硫酸溶液10mlに溶解後、100~105℃で3hr加水分解した分解液を水酸化バリウムにより中和後、東洋濾紙No.2で濾過した。

2) 糖誘導体の調製　上記で得られた濾液4mlに内部標準として濃度既知のメチル $\beta$ -グルコシド溶液1mlを加えた後、水素化ホウ素ナトリウムを50~60mg添加し、室温で3hr還元した。この溶液に強酸性イオン交換樹脂を加えpH5程度に調整後、濾過した。この濾液を減圧濃縮・乾固後、適当量のメタノールを加え溶解し、再度減圧濃縮・乾固した。この操作を数回繰り返した後、得られた乾固物にピリジンと無水酢酸を各々1ml加え25℃で1夜アセチル化した。

3) GLCの分析条件　島津GC-14Aを用い、ステンレスカラム:3%ECNSS-M(3.2mm $\phi$ x1.6m)、カラム温度:195℃、キャリアーガスには窒素を用い30ml/minの条件で行なった。また検出器にはFIDを用いた。

## 結果及び考察

### 1. ワイン中の多糖含量

1975年から1990年までの15年間に甲州ブドウより製造され、貯蔵されているワイン中の中性多糖及びペクチン含量を調べその結果をFig. 1に示した。中性多糖含量はグルコース換算でワイン1Lあたり200~300mg/L、ペクチン量はガラクトuron酸換算で60~100mg/Lの範囲にあり、製造年度により、特に顕著な差はなかった。ワイン中の多糖含量についての詳細な報告は少ないが、既報(11、12)の外国産ワインの値との比較においても、特に大きな差はなかった。一方、市販甲州ワイン5点については、中性多糖量は198~250mg/L、ペクチン量は50~60mg/Lであり、中性多糖含量は特に大きな差はなかったが、ペクチン含量は若干低い傾向にあった。市販ワイン中のペクチン量が比較的少ないのは、最近の白ワイン醸造においては、一般に原料果汁をペクチナーゼ処理するので、ワインへのペクチンの移行が少ないものと推定される。しかし、市販ワインについては、サンプル数が少ないので、今後さらに多試料のワインについて調べる必要がある。また、ワイン中の多糖含量は、ブドウの圧搾・搾汁方法やペクチナーゼ添加の有無、あるいは清澄化処理方法などと密接に関係すると思われるので、今後それらの検討は興味あるものと思われる。

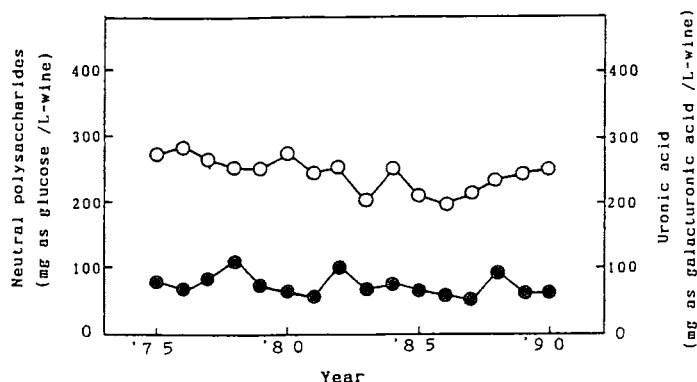


Fig. 1. Concentration of polysaccharides in Koshu white wines made from 1975 to 1990

Symbols: ○, Neutral polysaccharide; ●, Uronic acid

## 2. 多糖の分離

1988年及び1989年に製造された甲州ワインより多糖の分離を試みた。その概略をFig. 2に示した。ワイン各々12.6Lをロータリーエバポレーターで初発量の1/10程度まで減圧濃縮した後、この濃縮液を4℃の蒸留水中で充分透析した。次いで、透析内液をさらに前述のように濃縮した後、80%飽和硫酸アンモニウムを添加し、沈殿したタンパク質画分を遠心分離により除去した。この上清液を充分透析し、硫酸アンモニウムを除去した後、初発液量の1/25程度まで濃縮した。この濃縮液に終濃度1%となるように塩化ナトリウムを添加後、4倍容量のアルコールを添加し多糖画分を沈殿させた。こうして得られた沈殿物を蒸留水で溶解し充分透析後、凍結乾燥し得られた白色粉末を粗多糖画分とした。本方法により、1988および1989年の甲州ワインから、粗多糖画分として、それぞれ3141mgおよび2735mgが得られた。また、回収率はそれぞれ88%および82%であった。

Table 1. Composition of polysaccharides isolated from Koshu white wines.

Components	Concentration (%)	
	1988 Wine	1989 Wine
Neutral Sugars <sup>1)</sup>		
Rhamnose	5	3
Arabinose	13	18
Mannose	29	25
Galactose	21	28
Glucose	3	1
Uronic acid (as galacturonic acid) <sup>2)</sup>	26	21
Proteins (as bovine serum albumin) <sup>3)</sup>	0.5	0.7
Phenols (as gallic acid) <sup>4)</sup>	0.6	0.7
Others	1.9	2.6

1) Determined by GLC.

2) Determined by the Carbazol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

3) Determined by a BIO-RAD protein assay kit.

4) Determined by the Folin-Ciocalteu method.

## 3. 粗多糖の分析

上記で得られた粗多糖画分中の構成糖、タンパク質量、及びフェノール量を調べTable 1. に示した。2種のワインより得られた粗多糖の総含量（中性多糖+酸性多糖）はいずれも95%以上であることから、本方法はワインの多糖分離法として有効であると考えられる。

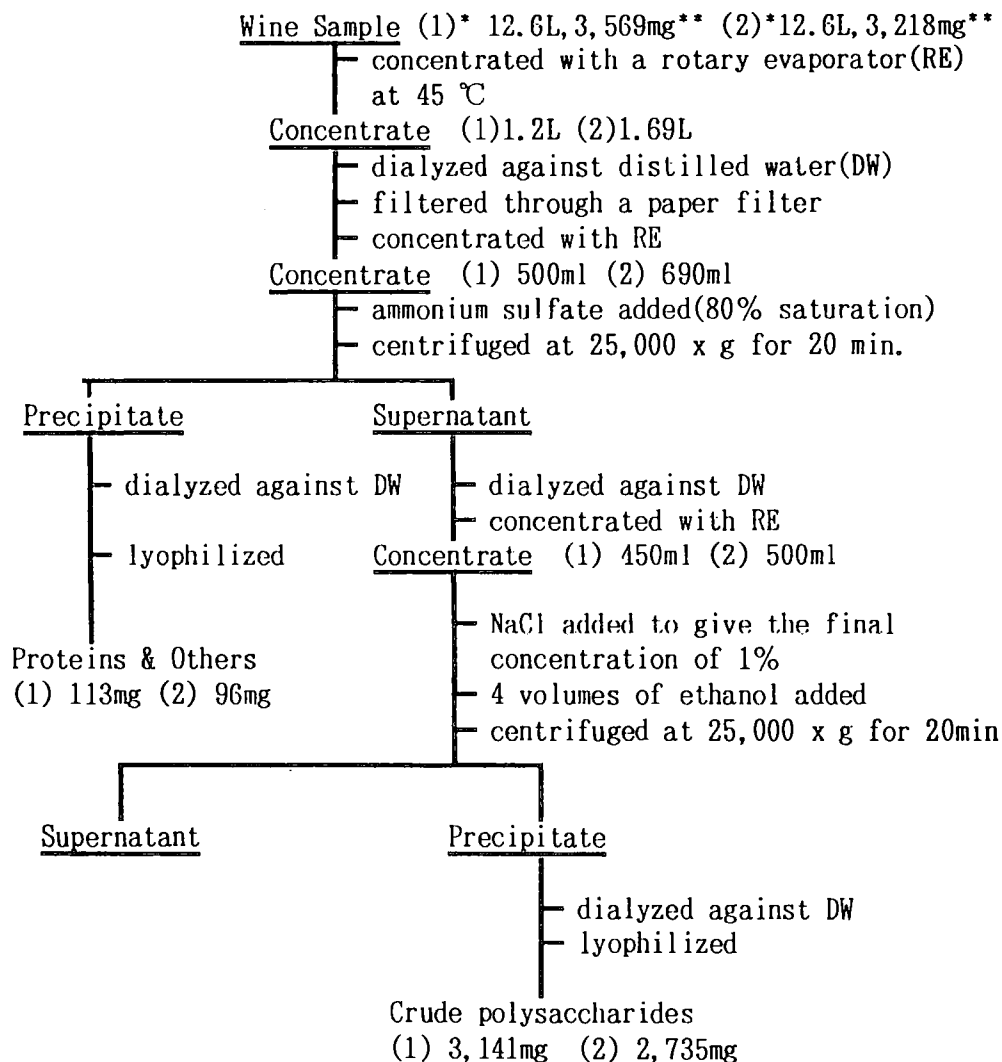


Fig. 2. Procedure for isolation of polysaccharides from Koshu white wines.

\*Koshu wines made in 1988 (1) and 1989 (2) were used for polysaccharides preparation.

\*\*The total polysaccharide contents were determined by the phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the carbazol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methods.

これら粗多糖画分中の構成単糖として、ラムノース、アラビノース、マンノース、ガラクトースおよびグルコースが検出された。このうち、マンノース、ガラクトース、およびアラビノース含量が高いことがわかった。白ワインより分離した多糖の構成糖成分についての報告はあまりないが、赤ワインより分離した多糖の構成糖において、上記糖成分の他フコースとキシロースが検出されたとの報告がある(11)。しかし、本報で分離された甲州ワインの多糖画分中には、定量可能な量のフコースとキシロースは検出されなかった。先にBrillouetらは、フランス産赤ワインよりアラビノガラクトタンを分離し、その構造を報告しており(4)、また、Villettazらは、スイス産ロゼワインより、マンナンを分離し、これらは酵母より由来すると報告している(5)。また、本報で分析されたアラビノースとガラクトースの量比は、アラビノガラクトタンの構造から推定した量比とよく符合していた。これらの報告を考慮すれば、本分析法により検出されたマンノースはマンナンより由来し、アラビノースとガラクトースはアラビノガラクトタンより由来しているものと予想される。また、ラムノースはペクチン分子の構成糖としてよく知られていることから、ペクチン由来と思われる。以上の結果より、甲州ワイン中には、マンナンやアラビノガラクトタンのような中性多糖とペクチンが主要な多糖成分として含まれているものと予想される。勿論本多糖画分より、それらの多糖成分を単離し詳細に検討する必要がある、それらについては現在検討中である。

#### 4. 果汁およびワイン中の多糖成分の比較

果汁よりワインへの多糖類の移行について調べるために、甲州ブドウ果汁より多糖類を分離するとともに、その果汁より製造されたワインからも同様に多糖類を分離しその構成糖について比較した。なお、多糖の分離法はすべて上記の方法と同様にして行った。その結果、果汁2Lから粗多糖648mg、ワイン2Lから410mgの粗多糖画分が得られた。なお、多糖(中性多糖+酸性多糖)の回収率は、ワインにおいては前記と同様約85%であったが、果汁では約70%であった。果汁1Lあたり324mg、ワイン1Lあたり205mgの粗多糖中の構成糖成分の分析結果をTable 2. に示した。果汁中ではペクチンが最も多く含まれており、約60%を占めていた。次いでアラビノガラクトタン由来と予想されるガラクトースとアラビノースが多く含まれていた。しかしマンノースはほとんど検出されなかった。一方、ワイン中のペクチン量は40mgで、全糖量の19%を占めていたが、果汁の場合におけるペクチン量は、185mgで全量の55%に相当していた。それ故、ペクチン量は、果汁とワインにおける多糖類の中で最も量的に異なることがわかった。これは、果汁のペクチンが、発酵に伴って生成したアルコールによってあるいは他のワイン成分と結合して不溶性となって沈殿したり、またペクチナーゼによる分解、あるいは澱引きによって除去されたためと考えられる。また、ガラクトースとアラビノース量は特に顕著な差はなかったこ

Table 2. Composition of polysaccharides isolated from Koshu grape juice in 1990 and the resultant wine.

Components	Sugar concentration	
	Juice mg/L(% of total)	Wine mg/L(% of total)
Crude Polysaccharides	338 (100)	207 (100)
Rhamnose	13 ( 4)	5 ( 3)
Arabinose	61 (18)	48 (23)
Mannose	0	45 (22)
Galactose	72 (21)	61 (29)
Glucose	5 ( 1)	2 ( 1)
Pectin (as galacturonic acid)	185 (55)	40 (19)
Others	2 ( 1)	6 ( 3)

とから、アラビノガラクトンのような中性多糖量のほとんどは、果汁からワインへそのまま移行するものと予想される。しかし、マンノースは、果汁では検出されなかったが、ワインでは総糖量の約20%を占めており、極めて興味ある結果が得られた。厳密には、これら多糖類よりマンナンを単離する必要があるが、恐らく酵母由来のマンナンが発酵中にワインに移行したものと推定される。果汁およびワインからの多糖成分の回収率が若干異なっているが、果汁及びワインの多糖類の中では、ペクチンとマンナンが最も大きく変動する成分であることが明らかとなった。また、マンナンが発酵中に酵母より由来するとすれば、ワイン中のマンナン含量に及ぼす発酵条件の影響について調べることは今後興味あることと思われる。

### 要 約

甲州ワイン中の多糖成分含量およびその構成糖成分などについて検討し以下の結果を得た。

- 1) 分析された甲州ワイン中の中性多糖含量は、200~300mg/L (グルコース換算) の範囲にあり、また、酸性多糖 (ペクチン) 含量は、60~100mg/L (ガラクトuron酸換算) の範囲にあり、製造年度により特に顕著な差はなかった。
- 2) 甲州ワインより多糖成分を分離し、その構成糖成分を分析した結果、主要な多糖成分は、ペクチン、マンナン、アラビノガラクトンと予想された。また、果汁およびワインより分離した多糖成分の比較から、果汁とそれより製造されたワイン中のペクチンおよびマンナン含量に大きな差異のあることが認められた。

## 文 献

1. Amerine, M.A., and C.S. Ough. *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley & Sons, Inc. New York p. 11–44 (1980).
2. Esau, P., and M.A. Amerine. Quantitative estimation of residual sugars in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **17**, 265–267 (1964).
3. Nakanishi, K., and K. Yokotsuka. Isolation of two glucodisaccharides from Japanese wines. *J. Ferment. Bioeng.*, **67** (3), 148–152 (1989).
4. Brillouet, J.M., C. Bosso, and M. Moutounet. Isolation, Purification, and Characterization of an arabinogalactan from a red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**(1), 29–36 (1990).
5. Villettaz, J.C., R. Amado, and H. Neukom. Comparative structural studies of the D-mannans from a rose wine and *Saccharomyces uvarum*. *Carbohydr. Res.*, **81**, 341–344 (1980).
6. Lafon-Laforgade, S., C. Geneix, and P. Ribereau-Gayon. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1246–1249 (1984).
7. Eeva Munoz., and W.M. Ingledew. Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: importance of the lipid component. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1560–1564 (1989).
8. 福井作蔵：還元糖の定量法, p. 55–59, 学会出版センター, 東京 (1982).
9. 福井作蔵：還元糖の定量法, p. 45–47, 学会出版センター, 東京 (1982).
10. Slinkard, K., and V.L. Singleton. Total phenol analysis automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 49–55 (1977).
11. Zinchnko, V.L., and F.L. Minchuk. Transformation of water-soluble polysaccharides during the fermentation of wine must in a continuous process. *Vinodel. Vinograd. SSSR.*, **8**, 16–20 (1976).
12. Brillouet, J.M., M. Moutounet, and J.L. Escudier. Fate of yeast and grape pectic polysaccharides of young red wine in the cross-flow microfiltration process. *Vitis*, **28**, 49–63 (1989).