

## [研究報文]

### セミヨン果汁へのペクチナーゼ添加がワインの多糖成分に与える影響

高柳 勉・奥田 徹・松土俊秀・横塚弘毅

山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新1丁目13-1

Effect of Addition of Pectinase to Semillon Juice on Polysaccharides in Resulting Wine  
Tutomu TAKAYANAGI, Tohru OKUDA, Toshihide MATSUDO, and Koki YOKOTSUKA  
The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University  
1-13-1 Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

Polysaccharide fractions were separated from Semillon grape juice and wine by dialysis and precipitation with four volumes of ethanol. The amounts of lyophilizates of polysaccharide fractions obtained from 1 L juice and 1 L wine were  $644 \pm 45$  mg and  $595 \pm 30$  mg, respectively, compared with  $394 \pm 20$  mg and  $347 \pm 13$  mg in the cases of juice to which pectinase was added and wine made from that juice. HPLC analysis of the acid-hydrolyzates showed that the major components of the polysaccharide fraction from juice were galacturonic acid, arabinose and galactose, while in the polysaccharide fraction from wine they were mannose, galacturonic acid, arabinose and galactose. The contents of galacturonic acid and arabinose in wine were decreased and the mannose content was increased by adding pectinase. Gel filtration analysis of the polysaccharide fractions from juice and wine showed two polysaccharide peaks (114 kDa and 43 kDa) in each case. When pectinase was added, the two peaks in the juice polysaccharide fraction decreased, whereas the 114 kDa peak in the wine polysaccharide increased. Therefore, the 114 kDa peak in the polysaccharide fraction from wine produced using juice with added pectinase was thought to be due to polysaccharides of yeast.

#### 緒言

ブドウ果汁に最も多く含まれている糖質はグルコースとフルクトースであり、これらヘキソースはワイン発酵によってエタノールに変換される。グルコースとフルクトースは強い甘味を持ち、発酵終了後のワインにこれらが残存するとワインの味、特に甘味に大きな影響を与える。ブドウ果汁中の糖成分として、グルコースとフルクトース以外にも多糖、オリゴ糖などがある(1、4、8、13)。これら糖質は、ワイン発酵において酵母に資化されないため、その多くがワインに残存すると考えられる。しかし、これら分子量の大きな糖質は量的に少なく、直接的な呈味も小さいことから、ワイン成分としてあまり注目されてこなかった。ブドウ果汁に含まれる高分子多糖のペクチンなどは、ワイン製造過程において濾過を困難にする濁りの成分となることから、除去すべき不要な物質と考えられてきた。しかし、近年、ワイン中の糖質、特に多糖の機能についての研究が進み、ワインに溶解している多糖に重要な働きがあ

ること、すなわち、ワイン加熱時に発生する濁りを防ぐ機能(11、12)やワインの味をまろやかにする効果(10)があることが明らかになってきた。

我々は、成熟期ブドウ果実に含まれる多糖成分の変化を分析し、ベレゾーン以降の果肉においてポリガラクトン酸を主成分とする可溶性の酸性多糖が急激に増加し、その分子量は43kDaであることを明らかにした(9)。この結果に基づき、本研究では、果汁中の可溶性多糖がワイン製造過程においてどのように変化し、ワインへ移行するかを検討した。特に、白ワイン製造において果汁の清澄化を目的として行われるペクチナーゼの添加がワイン中の可溶性多糖の量や組成にどのように影響するかに着目した。ペクチナーゼはポリガラクトナーゼを主成分とする酵素製剤で、これを添加することにより果汁の多糖成分は大きく変化すると推測される。

#### 材料と方法

##### 1. 供試料

山梨大学ワイン科学研究センター育種試験地において栽培されているセミヨンブドウ (*Vitis vinifera*)

2002年4月9日受理

を用いた。

## 2. セミヨン果汁の調製とペクチナーゼ処理

セミヨン果実を除梗・破碎後、バスラン型圧搾機で圧搾し、果汁（糖度19.0°Brix、滴定酸度 0.71%）を得た。得られた果汁にメタ重亜硫酸カリウムを100ppm濃度になるように加え、よく混合した。この果汁を4L取り、ペクチナーゼ（スクラーゼN、三共）を200 mg/L濃度になるように加えた。ペクチナーゼ添加および非添加の果汁を15℃で一夜放置した後に濾紙（アドバンテックNo.131）で濾過し、以後の分析およびワイン製造に用いた。

## 3. セミヨンワインの製造

ペクチナーゼ添加果汁2L、非添加果汁2Lをそれぞれガロン瓶に取り、23°Brixまで補糖後、酒母を添加し（*Saccharomyces cerevisiae*, Uvaferm CM）、15℃で発酵を行った。比重が0.996（アルコール12.5%）になった時点でメタ重亜硫酸カリウムを150 mg/L濃度になるように加えて発酵を止めた。このワインを0.8 μmのメンブレンフィルターで濾過後、1.8 L容のビンに詰め、15℃で保存した。

## 4. 多糖画分の抽出

果汁またはワイン100 mLを透析膜（三光純薬32/36）に入れ、脱イオン水に対して、4℃にて2日間透析した。透析後、遠心分離（7,500 g、10分間）し、得られた上清100 mLに95%エタノールを400 mL加え、攪拌後、生じた沈殿を遠心分離（27,000 g、10分間）により回収した。この沈殿に80%エタノールを約20 mL加え、5分間攪拌し、遠心分離して沈殿を回収した。この操作を3回繰り返した。この沈殿物に水を約20 mL加え、ワーリングブレンダーでホモジナイズ（15,000回転、3分間）した後に、遠心分離（27,000 g、10分間）して沈殿と上清に分離した。この操作を5回繰り返した。この5回分の上清を集めて透析膜に入れ、脱イオン水20 Lに対して4℃、2日間透析後、透析内液を凍結乾燥し、多糖画分を得た。

## 5. 多糖画分の糖組成および分子量の分析

多糖画分の糖組成は、酸加水分解とHPLCにより分析した。すなわち、多糖画分1 mgを蓋付き試験管に取り、90%ギ酸1 mLを加え、混合し、ヘッドスペースを窒素ガスで置換後に密閉した。この試験管をヒーティングブロック（TA-2H、タイテック）

で100℃、1時間加熱した。試験管から反応液を取りだし、ナス型フラスコに入れ、メタノール2 mLを加え、ロータリーエバポレーターにより減圧乾固した。これに2.5 M トリフルオロ酢酸を1 mLを加え、よく混合した。この液を新しい蓋付き試験管に移し、ヘッドスペースを窒素ガスで置換して密閉した後にアルミブロックで120℃、1.25時間加熱した。試験管から反応液を取りだし、ナス型フラスコに入れ、メタノール2 mLを加え、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。さらに、メタノール0.5 mLを加え、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。この操作を3回繰り返した。このナス型フラスコに蒸留水を0.5 mL加え、よく混合した後、エッペンドルフチューブに移し、遠心エバポレーター（VC-360、タイテック）で減圧乾固した。この乾固物を蒸留水50 μLに溶解し、0.45 μmのメンブレンフィルターで濾過し、CarboPac PA-1（4×250 nm、Dionex）カラムを装着したHPLCシステムを用いて糖組成を分析した。分離溶媒として0.01M NaOH（流速0.8 mL/min）、ポストカラムの添加溶媒として0.5M NaOH（流速0.4 mL/min）を用い、溶出される単糖をPAD検出器により検出した（ $E_1 = 0.05V$ ,  $t_1 = 360ms$ ;  $E_2 = 0.80V$ ,  $t_2 = 120ms$ ;  $E_3 = -0.6V$ ,  $t_3 = 420ms$ ）（2）。標準物質としてフコース、ラムノース、アラビノース、グルコサミン、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノースを用い、試料で得られたピークの溶出位置と面積から単糖を同定し、定量した。

多糖画分の分子量をゲル濾過カラム（ウルトラハイドロゲル250、4×250 mm、Waters）を装着したHPLCシステムにより測定した。分離溶媒として0.2 M NaCl（流速0.3 mL/min）を用い、溶出した糖質をRI検出器（L-3300、日立）およびUV検出器（210 nm、L-4200H、日立）により検出した。ポリエチレングリコール（分子量400、1,000、4,000、20,000、70,000、和光純薬）を用いて分子量の検量線を作成し、試料の分子量を算出した。

## 結果と考察

### 1. セミヨン果汁およびワインから分離した多糖画分の組成と分子量

ブドウ果汁およびワインに溶解している多糖画分

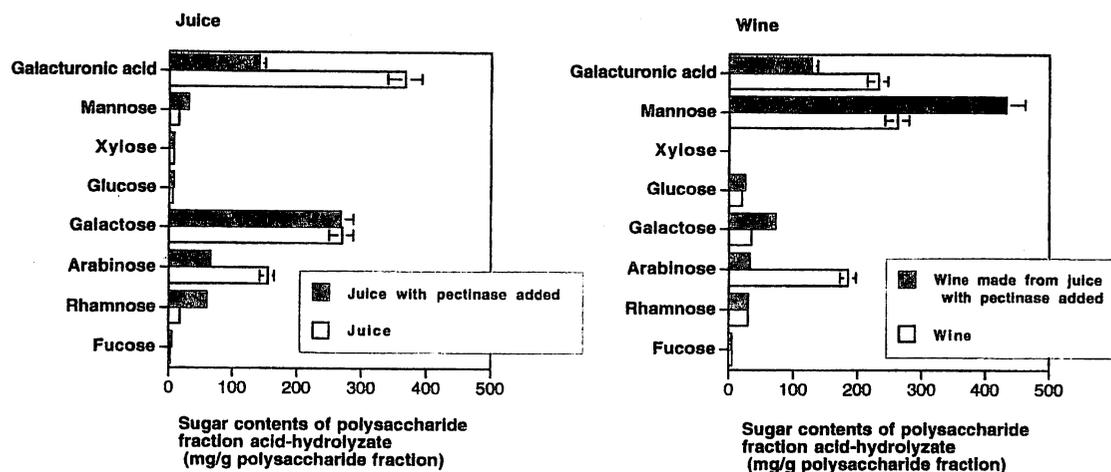


Fig. 1. Sugar composition of acid-hydrolyzate of polysaccharide fractions from Semillon juice, wine, juice with pectinase added, and wine made from juice with pectinase added.

Error bars represent SE ( $n = 2$ ).

を透析と80%エタノール沈澱を順次行うことにより分離した。セミヨン果汁およびワイン1Lから、それぞれ $644 \pm 45$  mgおよび $595 \pm 30$  mgの多糖画分（凍結乾燥物）を得た。得られた多糖画分の糖組成を酸加水分解とHPLCにより分析した結果、セミヨン果汁の多糖画分に最も多く含まれる糖成分はガラクトン酸で、多糖画分1g中 $366 \pm 26$  mgであった

(Fig. 1)。次いでガラクトース、アラビノースの順に多く、この3種類の糖の合計量は、検出された糖成分の合計量の94.6%に達した。これら3種類の単糖は、成熟したブドウ果実から抽出されるペクチンの主要な構成糖である（5、7、9）ことから、果汁中の多糖画分のほとんどが果実の細胞外マトリックスに存在するペクチンであると考えられる。

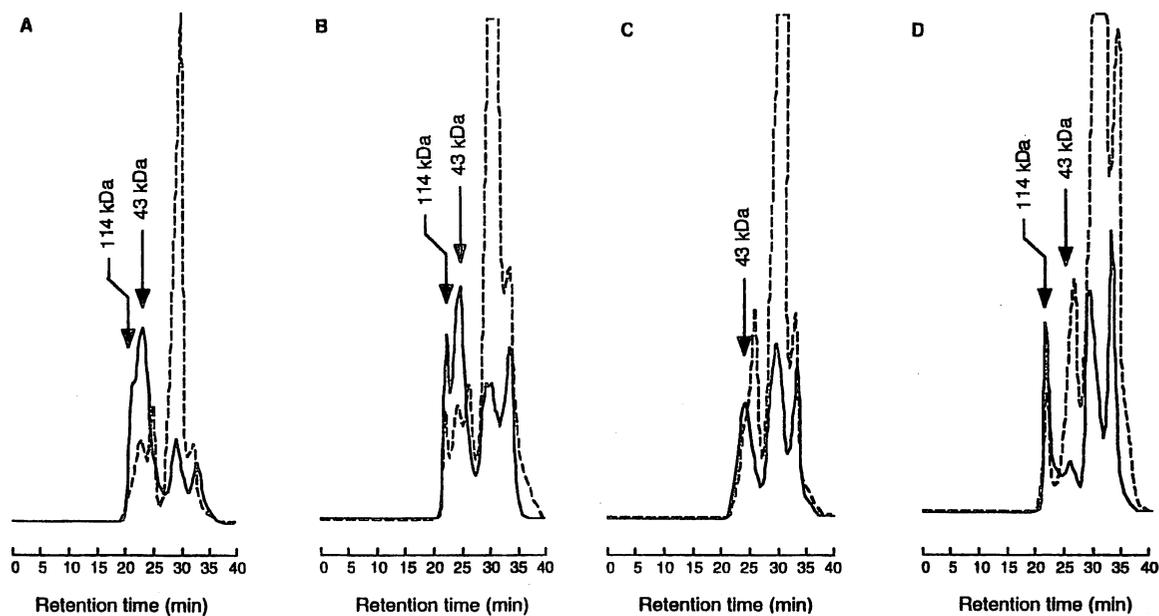


Fig. 2. Gel-filtration HPLC of polysaccharide fractions from Semillon juice (A), wine (B), juice with pectinase added (C), and wine made from juice with pectinase added (D). Unbroken and dashed lines indicate the differential refractive index and absorbance at 210 nm, respectively.

セミヨンワインに含まれる多糖の総量は $595 \pm 30$  mg/Lで果汁の多糖総量 ( $644 \pm 45$  mg/L) より僅かに減少していた。しかし、その単糖組成をワインと果汁で比較すると、ワインから分離した多糖のマンノース量が果汁のそれに比べて顕著に大きくなっていった (Fig. 1)。すなわち、セミヨンブドウ果汁の多糖画分に含まれるマンノースの比率は1.8%であったのに対して、セミヨンワインのマンノースの比率は34.3%と増加した。マンノースは、酵母細胞壁のプロテオグリカンの構成糖であることから (3)、ワイン発酵中に酵母細胞壁からプロテオグリカンが溶出したものと考えられる。多糖画分の総量として大きな変化は見られないことから、果汁に含まれていた多糖の一部が発酵中に分解、沈澱形成などにより減少し、酵母の由来のマンノースを多く含む多糖が増加したと推測される。

セミヨン果汁およびワインから分離した多糖画分の分子量をゲル濾過により分析した。示差屈折検出器 (RI) により検出した果汁の溶出パターンでは、114 kDaと43 kDa (ポリエチレングリコールを標準物質として、溶出時間から算出) に主要なピークが見られた (Fig. 2)。紫外波長 (210 nm) の吸収パターンでは、溶出時間28分付近に最大のピークが見られた。210 nmにおける吸収は、アミノ酸のフェニル基やアミノ酸と酸性糖のカルボニル基に由来するものと考えられる。したがって、28分のピークはタンパク質やペプチド由来のピークである可能性が高い。28分付近のピークは、ポリエチレングリコールを標準物質として分子量を算出すると数千程度であるが、おそらくは、タンパク質分子がコンパクトな立体構造を取っているために、直鎖状のポリエチレングリコールを標準物質とした場合、真の分子量よりも小さく算出されていると考えられる。セミヨンワインのHPLCパターンでは、果汁と同様に114 kDaと43 kDaの両方にRIのピークが見られた (Fig. 2)。

## 2. 果汁およびワインの多糖類に及ぼすペクチナーゼの影響

ペクチナーゼを添加したセミヨン果汁1Lから $394 \pm 20$  mgの多糖画分 (凍結乾燥物) を得た。さらに、この果汁から製造したセミヨンワイン1Lか

らは $347 \pm 13$  mgの多糖画分 (凍結乾燥物) を得た。ペクチナーゼを添加していないセミヨン果汁とその果汁から製造したワインの多糖画分量は、それぞれ $644 \pm 45$  mgと $595 \pm 30$  mgであることから、果汁とワインの両方において、ペクチナーゼ添加が溶解している多糖量を減少させたと考えられる。ペクチナーゼは、果汁の清澄化に広く利用されている酵素製剤で、その主成分はポリガラクトuron酸を加水分解するポリガラクトuronナーゼである。従って、ペクチナーゼが、果汁のにごりの原因となる不溶性の酸性多糖を加水分解すると同時に、溶解している酸性多糖も加水分解し、低分子化しているものと推測される。

ペクチナーゼを添加したセミヨン果汁の多糖画分の糖組成をペクチナーゼ非添加の果汁の糖組成と比較すると、ペクチナーゼ添加果汁中のガラクトuron酸とアラビノースの含有量が低くなった (Fig. 1)。これは、ペクチナーゼによりガラクトuron酸とアラビノースを構成糖とするペクチンの加水分解が進んだことに起因すると考えられる (6)。ペクチナーゼ添加果汁と非添加の果汁から製造したワインで糖組成を比較すると、ペクチナーゼの添加によりガラクトuron酸とアラビノースの含有量が低下し、マンノースの含有量が増加した。ペクチナーゼによりガラクトuron酸とアラビノースの含量が低下したことにより、発酵中に増加したマンノースの含量が相対的に高くなったと考えられる (Fig. 1)。

セミヨン果汁およびワインから分離した多糖画分のゲル濾過分析の結果は、主要な二つのピーク (114 kDaと43 kDa) を示した。ペクチナーゼを添加した果汁をゲル濾過分析したところ、114 kDaのピークは消失し、43 kDaのピークは非添加の果汁に比べて減少した (Fig. 2)。ペクチナーゼにより、これら多糖が分解され、低分子化したものと考えられる。ペクチナーゼを添加した果汁から製造したワインにおいては、114 kDaのピークが顕著に増加した (Fig. 2)。ペクチナーゼの作用により、114 kDaのピークは果汁の段階で消失していることから、ワインにおける114 kDaのピークは発酵中に新たに出現したと考えられる。ワインから分離した多糖画分の糖組成においてマンノースが増加していることから、酵母細胞壁より溶出した多糖 (プロテオグリカン)

に由来するピークであると推測される。

多糖類がワインの品質に与える影響については、ほとんど明らかになっていないが、最近、幾つかの実験結果が報告されている。すなわち、Watersらはワインのマンノプロテイン (12) やアラビノガラクトタン-タンパク質複合体 (11) がワイン加熱時に発生するタンパク質の濁りを防ぐ機能を持つことを報告している。また、Llauberesは、シュルリーがワイン中の多糖量を増加させ、ワインのタンニンと多糖成分が複合体を形成することによって、タンニンの収斂性が低下する (10) ことを報告している。本研究において、セミヨン果汁にペクチナーゼを添加すると、果汁由来の43 kDaの多糖成分は著しく減少し、酵母の細胞壁由来と考えられる114 kDaの多糖成分の比率が高くなることが明らかになった。今後、ペクチナーゼ添加による可溶性多糖の総量の減少や酵母細胞壁多糖の増加がワインの濁りの形成や官能特性にどのように影響するかを研究することにより、ワインに溶存している多糖の役割を明らかにするための重要な手がかりが得られるものと期待される。

### 要 約

セミヨン果汁およびワインに溶解している多糖画分を透析と80%エタノール沈澱を順次行うことにより分離した。セミヨン果汁およびワイン1 Lから、それぞれ644±45 mgおよび595±30 mgの多糖画分の凍結乾燥物を得た。ペクチナーゼを添加したセミヨン果汁1 Lからは394±20 mgの多糖画分、さらに、この果汁から製造したセミヨンワイン1 Lから347±13 mgの多糖画分が得られた。ペクチナーゼ添加果汁と非添加の果汁から製造したワインの多糖画分の糖組成を比較すると、ペクチナーゼの添加によりガラクトン酸とアラビノースの含有量が低下し、マンノースの含有量が増加した。セミヨン果汁およびワインから分離した多糖画分のゲル濾過分析により、多糖由来と考えられる二つのピーク (114 kDaと43 kDa) が確認された。ペクチナーゼを添加した果汁をゲル濾過分析したところ、114 kDaのピークが消失し、43 kDaのピークが減少した。ペクチナーゼによりこれら多糖が分解され、低分子化したと考えられる。ペクチナーゼを添加した果汁から製

造したワインにおいては、114 kDaのピークが顕著に増加した。発酵中に出現したこの114 kDaのピークは、酵母細胞壁より溶出した多糖に由来するピークであると推測される。

### 文 献

1. Brillouet, J. M. A study of pectic polysaccharides in musts from various mature grapes grown in the Peach Rouge experimental vineyards. *Biochimie* 69:713-721 (1987).
2. Hardy, M. R., R. R. Townsend, and Y. C. Lee. Mono-saccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* 170:54-62 (1988).
3. Klis, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10:851-869 (1994).
4. Nakanishi, K., and K. Yokotsuka. Isolation of two glucodisaccharides from Japanese wines. *J. Ferment. Bioeng.* 67:148-152 (1989).
5. Saulnier, L., and J. M. Brillouet. Structural studies of pectic substance from the pulp of grape berries. *Carbohydr. Res.* 182 (1988).
6. Saulnier, L., and J. F. Thibault. Enzymic degradation of isolated pectic substances and cell wall from pulp of grape berries. *Carbohydr. Polym.* 7:345-360 (1987).
7. Saulnier, L., and J. F. Thibault. Extraction and characterization of pectic substances from pulp of grape berries. *Carbohydr. Polym.* 7:329-343 (1987).
8. Silacci, M. W., and J. C. Morrison. Changes in pectin content of Cabernet Sauvignon grape berries during maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:111-115 (1990).
9. 高柳勉、奥田徹、横塚弘毅、ブドウ果実成熟中の可溶性多糖の変化、山梨大学発酵研究所報告 31:9-13 (1996).
10. 棚橋博史、ワイン中の多糖類の起源とその役割、日本醸造協会誌 89:524-529 (1994).
11. Waters, E. J., P. Pellerin, and J. M. Brillouet. A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Biosci. Biotech.*

Biochem. 58:43-48(1994).

12. Waters, E. J., W. Wallace, M. E. Tate, and P. J. Williams. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. J. Agric. Food Chem. 41:724-730(1993).
13. Yokotsuka, K., K. Ito, K. Nozaki, and T. Kushida. Koshu grape pectins: Isolation, chemical composition, and precipitation. J. Inst. Enol. Vitic. Yamashiro Univ. 17:59-63(1982).