酵素法によるワイン中の

D-リンゴ酸の定量

竹内 潔・島津善美*

(マンズワイン<株>,*キッコーマン<株>)

平成4年2月1日受理

Enzymatic Determination of D-Malate
in Wines

Kiyoshi TAKEUCHI and Yoshimi SHIMAZU*

(Mann's Wine Co., Ltd., 400, Yama, Katsunuma-cho, Yamanashi 409-13. *Kikkoman corporation Product Development Dept., 399, Noda, Noda-shi, Chiba 278)

D-Malate in wines was determined using newly developed enzymatic methods. Sample-neutralization method with NaOH, improved by the authors, gave better and satisfying recoveries, compared with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -neutralization used in the original method. Determination limit was considered to be 20-25 $\mu\text{g}/\text{cuvett}$, which corresponds to 0.1 g/l of white wine or 0.2 g/l of red wine, and the limit of qualitative detection was about 10 $\mu\text{g}/\text{cuvett}$. The result of comparison between the proposed method and the conventional method, i.e., combination of LC-method and the enzymatic L-malate determination, showed that the enzymatic D-malate determination method was very accurate, rapid and useful to detect the possible usage of DL-malate as acid additives in wines.

Key words : D-リンゴ酸・ワイン・酵素法分析——

緒言

平成元年の酒税法改訂に伴いワイン醸造の製造工程中に限定してリンゴ酸添加が許可されるようになった¹⁻³⁾。ここで使用されるリンゴ酸としてはコスト面及び食品添加物である点などからは DL-リンゴ酸が対象となる。従来、ワイン中のリンゴ酸の分別定量は島津が LC 法と酵素法を組み合わせで算出する方法で試みている³⁾。最近 BEUTLE らにより D-リンゴ酸を直接定量できる酵素法分析キットの製品化が検討された⁴⁾。著者らはこの分析キットの試作品ならびに本生産品を用いてワイン中の D-リンゴ酸の定量を試み、良好な定量性を確認したので

以下報告する。

実験方法

1. 定量原理

ここで生成する NADH の量は分解される D-リンゴ酸の量と等量であるので、NADH の吸収 (340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm) を測定することで D-リンゴ酸が定量できる⁴⁾。

2. 試薬

試薬はベーリンガー・マンハイム社より提供していた食品成分分析用キット (F-キット) の試作品ならびに発売後は本生産品を用いた。試薬の調製はメーカー指示通りに行った⁶⁾。

3. サンプルの前処理⁶⁾

今回 2 つのサンプル前処理方法を用いて測定した。

操作法 1 : $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和法 (Boehringer 社のマニュアルに基づく方法)

ワイン 25 ml に $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末 125 mg 及びエタノール 5 ml を加え 2 分間攪拌する。その後 1N KOH で pH 7~8 に調整し水で 50 ml に定容し、濾液を測定に供した。赤ワインの場合濾液 10 ml に PVPP (Polyvinylpyrrolidone) 2 mg を添加、攪拌しその濾液を供試した。

操作法 2 : NaOH 中和法 (著者による改良法)

ワイン 10 ml を N/3 NaOH で pH 7~8 に調整し、赤ワインについては PVPP を 10 mg 添加し攪拌した。これを水で 20 ml に定容し濾液を供試した。

4. 測定方法

吸光度の測定は日立製分光光度計 100-20 型で光路長 10 mm のセルを用いて行った。測定方法及び計算方法はメーカーマニュアルに基づいて行った。

5. 従来法によるリンゴ酸の分別定量

L-リンゴ酸はベーリンガー・マンハイム社製 F-キットにより^{5,7)}、D, L-リンゴ酸の総量は東京理化学機械製カルボン酸分析計 S-700 を用いて島津らの EDC 法⁸⁾により定量した。

実験結果及び考察

1. D-リンゴ酸水溶液における回収率の確認

D-リンゴ酸標準液を 0.01~0.60 g/l の濃度になるように希釈し、試料量 0.1 ml で回収率を確認した結果を Table 1 に示した。この結果から水溶液中では D-リンゴ

Table 1 Recoveries of D-malic acid in aqueous solution.

D-Malic acid (g/l) (μg/cuvett)	ΔE	D-Malic acid found (g/l)	Recovery (%)
0.01 1	0.011	0.0069	69
0.02 2	0.031	0.0195	98
0.05 5	0.081	0.0509	102
0.10 10	0.157	0.0986	99
0.30 30	0.476	0.2989	100
0.60 60	0.959	0.6022	100

Sample volume : 0.1 ml

酸濃度 0.02~0.60 g/l (キューベットあたり 2~60 μg) の範囲で良好な回収率が得られた。E₁ が低ければかなり ΔE が高くても定量可能であることが確認された。

2. ワインに添加した D-リンゴ酸の回収率

D-リンゴ酸を含まない白ワイン及び赤ワインに D-リンゴ酸及び DL-リンゴ酸を添加し Ca(OH)₂ 中和法 (操作法 1) 及び NaOH 中和法 (操作法 2) によりサンプル前処理を行って回収率を求めた結果を Table 2 に示した。キューベットあたり 20 μg 程度、すなわち白ワインでは 0.1 g/l, 赤ワインでは 0.2 g/l 程度から良好な回収

率が得られた。定量性の良さ、操作の簡便性の点から NaOH 中和法が Ca(OH)₂ 中和法に比べて有利であることが分かった。また NaOH 中和法で定量性が良くなる濃度、すなわち 20~25 μg/cuvett での適正サンプル量は白ワインで 0.5 ml (0.1 g/l), 赤ワインで 0.2 ml (0.2 g/l) であった。定量限界はこの程度の濃度にあると思われる。定性的には 10 μg/cuvett, すなわち白ワインで 0.02 g/l, 赤ワインで 0.1 g/l, サンプル量は各 1.0 ml, 酸の添加 0.2 ml で判定可能であると考えられた。実際 DL-リンゴによる効果を期待する場合、0.5 g/l (D-リンゴ酸として 0.25 g/l) 以上が現実的使用量と思われるので前述の定量限界で充分鋭敏であると考えられた。

Ca(OH)₂ 中和法に比べて NaOH 中和法がより良い回収率を示したが、これは Ca(OH)₂ 中和法では D-リンゴ酸の一部が Ca-malate tartarate のような塩として沈殿することにより回収率が低下するのではないかと推察されたがこのことは沈殿を回収、溶解して D-リンゴ酸を定量することで確認された。

3. 亜硫酸の影響

試験的に亜硫酸を添加せずに醸造した甲州種の白ワイ

Table 2 Recoveries of D-malic acid in a white and a red wine.

Sample	Volume D-MA (ml) (μg/cuvett)		(1) Neutralization with Ca(OH) ₂			(2) Neutralization with NaOH		
			ΔE	D-MA found (g/l)	Recovery (%)	ΔE	D-MA found (g/l)	Recovery (%)
White (control)	1.0	0	0.018	(0.0023)	—	0.034	(0.0043)	—
White+0.02 g/l D-MA	1.0	10	0.090	0.0116	58	0.192	0.0241	121
White+0.05 g/l D-MA	0.5	12.5	0.149	0.0374	75	0.304	0.0764	153
White+0.1 g/l D-MA	0.5	25	0.290	0.0728	73	0.404	0.102	102
White+0.2 g/l DL-MA	0.4	20	—	—	—	0.319	0.100	100
White+0.2 g/l D-MA	0.2	20	0.236	0.148	74	0.320	0.201	101
White+0.5 g/l D-MA	0.2	50	0.608	0.382	76	0.777	0.488	98
White+0.1 g/l DL-MA	0.2	50	0.632	0.397	79	0.787	0.494	99
Red (control)	0.2	0	0.014	(0.0001)	—	0.052	(0.0131)	—
Red+0.04 g/l D-MA	0.2	4	0.059	0.037	93	0.074	0.0465	116
Red+0.1 g/l D-MA	0.2	10	0.150	0.0942	94	0.177	0.111	111
Red+0.2 g/l D-MA	0.2	20	0.290	0.182	91	0.326	0.205	102
Red+0.4 g/l DL-MA	0.2	20	0.286	0.180	90	0.337	0.212	106
Red+1.0 g/l DL-MA	0.2	50	—	—	—	0.780	0.490	98

Samples were neutralized with Ca(OH)₂ and NaOH, respectively, and diluted to 1/2

Abbreviations ; MA : Malic acid. White : Grape variety *Koshu* white wine, vintage 1990. Red : Grape variety Muscat Bailey A red wine, vintage 1990.

Table 3 Influence of SO₂ on the enzymatic determination of D-malic acid.

Sample	free/total SO ₂ (ppm)	Volume (ml)	D-MA (μg/cuvett)	ΔE	D-MA found (g/l)	Recovery (%)
White (control)	3/ 29	0.2	50	0.787	0.494	100
White+100 ppm SO ₂	69/131	0.2	50	0.774	0.486	98
White+300 ppm SO ₂	252/325	0.2	50	0.796	0.500	101

White : *Koshu* white wine, vinified without SO₂-addition

Sample wine, containing 1.0 g/l DL-malic acid added, was neutralized with NaOH and diluted to 1/2.

Table 4 Comparison between conventional and enzymatic methods for D-malic acid determination in a white and a rose wine.

Sample	Enzymatic method		Conventional method				(1)-(2)	
			(1) LC method		(2) Enzymatic method		D-MA (g/l)	RC(%)
	D-MA (g/l)	RC(%)	D+L-MA (g/l)	RC(%)	L-MA (g/l)	RC(%)		
White (control)	—	—	0.88	—	1.01	—	—	—
White+0.5 g/l D-MA	0.556	111	1.33	96	1.02	—	0.31	62
White+0.5 g/l DL-MA	0.244	98	1.32	96	1.25	99	0.07	28
White+1.0 g/l DL-MA	0.545	109	1.72	91	1.50	99	0.22	44
White+2.0 g/l DL-MA	0.957	96	2.46	85	1.98	99	0.48	48
Rose (control)	—	—	1.69	—	1.59	—	0.10	—
Rose+0.5 g/l D-MA	0.532	106	2.02	92	1.58	—	0.44	88
Rose+0.5 g/l DL-MA	0.265	106	2.10	96	1.86	101	0.24	96
Rose+1.0 g/l DL-MA	0.543	109	2.45	91	2.10	100	0.35	70

Abbreviations ; RC : Recovery, MA : Malic acid. White : Grape variety *Koshu* white wine, vintage 1990. Rose : Rose wine made from grape variety *Koshu* and Muscat Balley A.

ンに 1.0 g/l の DL-リンゴ酸を添加したものさらに 100 ppm および 300 ppm の SO_2 を添加し、亜硫酸無添加の区分と共に D-リンゴ酸を定量した結果を Table 3 に示した。遊離亜硫酸及び総亜硫酸による影響は実用濃度範囲では認められなかった。

4. 従来法との比較

Table 4 に同一ワインを著者らの既法⁵⁾、すなわちカルボン酸分析計による D+L-リンゴ酸の総和量定量と酵素法による L-リンゴ酸の定量を組み合わせる算出した D-リンゴ酸量及び酵素法による D-リンゴ酸の直接定量値を比較して示した。酵素法により直接定量した D-リンゴ酸の回収率はほぼ安定して 96~111% の間にあり、また L-リンゴ酸の酵素法による回収率も良好であった (99~101%)。一方、カルボン酸分析計と L-リンゴ酸の酵素法による定量値を組み合わせる場合には回収率が不安定であった。これは二つの異なる原理に基づく分析法同志の組み合わせ計算で求めるため誤差が大きくなってしまったためと考えられた。

要 約

新しく開発された D-リンゴ酸の酵素法分析キットを用いてワイン中の D-リンゴ酸の直接定量を試みた。サンプル前処理法としてはメーカーマニュアルに基づく $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和法では十分な回収率が得られなかったのに対し著者らの改良した NaOH 中和法で良好な回収率が得られた。定量限界はキューベットあたり 20~25 μg と考えられた。これに相当するワイン中の D-リンゴ酸濃度は白ワインで 0.1 g/l (サンプル量 0.5 ml) 赤ワイン

で 0.2 g/l (サンプル量 0.2 ml, 各 2 倍希釈) であり実用上十分に鋭敏な定量法であることを認めた。定性的には 10 $\mu\text{g}/\text{cuvett}$ で確実に判定可能であった。LC 法による D, L-リンゴ酸総量から酵素法による L-リンゴ酸量を差し引いて求める従来法との比較も行い、本法が DL-リンゴ酸の添加の有無の定性確認及び添加された量の算出に役立つことが確かめられた。さらに精度及び迅速性、簡便性、確実性、分析コスト等の面において優れていることが示された。

本実験にあたって D-リンゴ酸分析キットの試作品をご提供いただいたペーリンガー・マンハイム・山之内(株)ならびに御助言いただいた国税庁醸造試験所戸塚昭室長に深く感謝致します。

文 献

- 1) 島津善美, 渡辺正澄, 篠原 隆, 岡村成通: 特許第 932791, 昭和 53-12596
- 2) 渡辺正平: 「改訂酒税法と技術的対応」第 5 回ワインセミナーテキスト, p. 141 (1989)
- 3) 島津善美: ワイン学, p. 120, 産調出版 (1991)
- 4) H. O. BEUTLER, B. WURST: *Dtsch. Lebensm.-Rdsch.* 86, (12), 386-389 (1990)
- 5) 島津善美: フードケミカル, 7, 95 (1987)
- 6) Boehringer Mannheim 社 F-キット No. 1215558 取扱説明書
- 7) Boehringer Mannheim 社 F-キット No. 1139068 取扱説明書
- 8) 島津善美, 渡辺正澄: 醸協 76, (6) 418 (1981)
- 9) G. WÜRDIG, R. WOLLER: *Chemie des Weines*, p. 138, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1989)