バイオセンサーによるワイン中の
総亜硫酸の定量黒沢 尋・樋口直美・中村和夫・天野義文
(山梨大学工学部化学生物工学科)

平成3年8月28日受理

Determination of Total Sulfite in Wine
by a BiosensorHiroshi KUROSAWA, Naomi HIGUCHI,
Kazuo NAKAMURA and Yoshifumi AMANO
(Department of Applied Chemistry and
Biotechnology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, 4 Takeda,
Kofu, Yamanashi 400, Japan)

Total sulfite in various types of wines was determined by using a biosensor consisting of immobilized whole cells of *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814 (S3) and an oxygen electrode. For the determination of total sulfite, bound sulfite was previously decomposed into free form by heating at 85°C for 10 min under the acid condition of 0.5 N H₂SO₄. The biosensor could determine the total sulfite in white, red, rose and noble rot wines by the recovery at least 84%. The variance in the measurement of each sample was 5.0% on average. It was found that the biosensor method was applicable to the determination of total sulfite in wine. In the present situation, however, the accuracy was still not satisfactory for determining the total sulfite in orange wine and fortified wines such as sherry, port, and madeira.

Key words: バイオセンサー・ワイン・亜硫酸

緒言

ワインの製造(発酵, 熟成)においては, 発酵時の有害菌の増殖抑制及びワインの酸化褐変防止のために亜硫酸が使用され, 特に遊離型亜硫酸がこれらの目的を達成するために有効である。遊離型の亜硫酸はワイン中の成分と反応して徐々に効力のない結合型へと変化するので, ときどき補填する必要がある。しかし, 遊離型亜硫酸を維持するためとはいえ亜硫酸を過剰に添加すること

は食品衛生的に好ましくなく, その総量が規制されている。したがって, 遊離型と同時に結合型を含めた総亜硫酸量を把握することが品質管理上重要である。ワイン中の総亜硫酸の定量法には改良ランキン法が公定法として採用されているが^{1,2)}, 分析時間が長く, 測定操作に熟練を要することから, より簡便・迅速な定量法が望まれている。改良ランキン法にかわる亜硫酸の定量法として, これまでに Monier-Williams 法³⁾, ガスクロマト法⁴⁾, イオンクロマト法^{5,6)}等が報告されている。一方, NAKAMURA ら⁷⁾は *Thiobacillus thiooxidans* S3 の亜硫酸酸化能を利用した遊離型亜硫酸測定用バイオセンサーを開発し, ワイン中の遊離型亜硫酸の定量において良好な結果を得ている。同バイオセンサー法はワイン中に含まれる結合型亜硫酸を測定できないという問題点があったが, 川村ら⁸⁾は試料中の結合型亜硫酸を遊離型に分解する前処理法を確立し, バイオセンサーによる食品中の総亜硫酸の定量を可能にした。

本報では上記バイオセンサー法により種々のワイン中の総亜硫酸の定量を行い, 改良ランキン法の測定結果と比較するとともに, ワイン中の亜硫酸測定におけるバイオセンサーの適用限界と現状での問題点を明かにした。

実験方法

1. 結合型亜硫酸の遊離型化

ワイン中の結合型亜硫酸を硫酸酸性下で加熱することによって遊離型亜硫酸に分解した⁸⁾。ガラス製のバイアル瓶(10 ml 容)に試料と希硫酸をヘッドスペースを残さないように入れ密閉した。このときに試料を適宜希釈し, 含有する亜硫酸濃度をバイオセンサーの検量線の範囲内(0~5 µg/ml または 5~50 µg/ml)に調製すると同時に, 最終的に試料中に含まれる硫酸濃度が 0.5 N となるようにした。アルミブロックヒーターを用いて, 85°C で 10 分間加熱した(昇温に 3 分を要するため全処理時間は 13 分)。加熱処理後, 冷水中で室温まで冷却し, そのままバイオセンサーによる亜硫酸の測定に供した。

2. 亜硫酸の定量

(1) バイオセンサー法 亜硫酸測定用バイオセンサー(SO₂ METER, NA-S 011, 中基酢店(株))を用いた。Fig. 1 に測定装置の概略を示した。反応セルにセットされた微生物電極は, *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814 (S3) をアセチルセルロース膜で固定化した微生物膜と酸素電極で構成されている⁹⁾。この微生物電極はガス透過性膜を装着しており, 遊離型亜硫酸を選択的に検出できる。洗浄液(蒸留水)と試料液はペリスタポンプを用いて送液し, 液流は三方電磁弁により自動的に切り替えた。1 回の測定に必要な試料液量は 3 ml, 測定時間

は5分である。センサの校正は、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ または $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の SO_2 を含む亜硫酸水素ナトリウム溶液を標準試料として行った。亜硫酸標準試料は用事調製して用いた。標準試料を10回測定したときの測定値の変動率は、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の試料において1.5%、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の試料において1.9%であった。

(2) 改良ランキン法 国税庁所定分析法¹⁾の記載に従い、アルカリ滴定法にて試料中の総亜硫酸量を測定した。

3. 試料

市販されている各種のワインを購入し、使用した。試料は開封後、すみやかに各分析に供した。

結果および考察

赤・白ワイン、ロゼワイン及び貴腐ワイン中の総亜硫酸を測定した結果をTable 1に示した。ここでバイオセンサーによる総亜硫酸の回収率 (Recovery %) は、ランキン法で得られる測定値を100%としたときの比率を示すものである。Table 1から明らかなように、バイオセンサー法では、84%~101%の回収率でワイン中の総亜硫酸が測定可能であった。また、総亜硫酸量の規制上限に近い $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以上の亜硫酸を含む貴腐ワインについても、改良ランキン法と同等の回収率を得ることができた。個々の試料を5回測定したときの変動率は4.8~5.2%であり、標準試料の場合に較べて変動が大きくなった。これは、ワイン中に含まれるエタノールなどの揮発性成分が測定値の変動に影響したものと推察される。以上の結果より、バイオセンサー法は、改良ランキン法に較べて回収率が若干低くなる傾向があるものの、同法によりワイン中の総亜硫酸を平均5%の変動率で定量可能であることが示された。

次にフルーツワイン、酒精強化ワイン、混成ワインなどの特殊ワイン中の総亜硫酸をバイオセンサーで測定し、改良ランキン法の値と比較した。Table 2に示したようにバイオセンサー法は、ピーチワインおよびヴェル

モットについては比較的良好な回収率(90%以上)を示したが、オレンジワインと酒精強化ワインでは回収率は23~55%と著しく低くなった。これは特殊ワイン中に含まれる成分、とりわけガス透過性膜を通過可能な揮発性成分がバイオセンサーの測定を妨害したのが原因と考えられる。ピーチワイン、キーウィワイン、ヴェルモットは亜硫酸含有量が他のワインと較べて多く、試料の希釈倍率が大きくなったため妨害成分の影響が少なく、比較的良好な測定結果が得られたものと思われる。また結果は示していないが、炭酸ガスを含むワインについても測定を試みたが、炭酸ガスにより測定が妨害され、良好な定量性が得られなかった。

以上の結果よりバイオセンサー法をTable 2に示すような特殊ワインに応用する場合には、測定を妨害する要因を明らかにし、それらを除去するなどの前処理を施す必要があると思われる。

Fig. 1 Schematic diagram of the biosensor system.

Table 2 Determination of total sulfite in special types of wines by biosensor and modified Rankine method.

Sample		Found SO_2 ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery (%)
		Biosensor	Rankine	
Fruit wine	Peach	238.3	247.3	96
	Kiwi	78.1	97.7	80
	Orange	12.0	21.7	55
Fortified wine	Sherry	3.4	7.7	44
	Port	9.6	35.3	27
	Madeira	2.8	12.0	23
Flavored wine	Vermouth	75.7	80.6	94

Table 1 Determination of total sulfite in wine by biosensor and modified Rankine method.

Sample (wine)	Found SO_2 ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery (%)
	Biosensor	Rankine	
White (aged)	172.8	193.6	89
White (young)	100.8	116.6	86
Red (aged)	163.3	173.2	94
Red (young)	58.1	68.9	84
Rose	157.0	158.1	99
Noble rot	317.0	312.2	101

要 約

種々のワイン中に含まれる総亜硫酸を *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814 と酸素電極からなるバイオセンサーで測定した。バイオセンサー法は赤・白ワイン、ロゼワイン及び貴腐ワインに対して良好な定量性を示した。亜硫酸回収率は低くとも 84% 以上、変動率は平均 5.0% であった。これに対し、酒精強化ワインやオレンジワインなどの特殊なワインについては、現段階では良好な測定値が得られなかった。以上の結果より、結合型亜硫酸を予め遊離型に分解することによって、バイオセンサーによるワイン（ブドウを原料にしたもの）中の総亜硫酸の定量が可能となることが明らかになった。

文 献

- 1) 国税庁訓令：国税庁所定分析法，p. 27，国税庁（1991）
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，p. 473，金原出版（1990）
- 3) W. HORWITZ : *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, 10 th Ed., p. 466, The Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D. C. (1965)
- 4) T. HAMANO, Y. MITSUHASHI, Y. MATSUKI, M. IKUZAWA, K. FUJITA, T. IZUMI, T. ADACHI, H. NONOGI, T. FUKE, H. SUZUKI, M. TOYODA, Y. ITO and M. IWAIDA : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 168, 195 (1979)
- 5) H. KIM and Y. K. KIM : *J. Food Sci.*, 51, 1360 (1986)
- 6) T. HUANG, C. DUDA and P. T. KISSINGER : *Current Separations*, 8, 49 (1987)
- 7) K. NAKAMURA, Y. AMANO and O. NAKAYAMA : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 351 (1989)
- 8) 川村吉也, 佐藤 猛, 久保伸子, 赤野裕文, 黒沢 尋, 中村和夫, 天野義文, 伊藤菅志男, 藤巻正生 : 日食工誌, 39 (1992) (印刷中)
- 9) H. KUROSAWA, D. ROSADI, K. NAKAMURA and Y. AMANO : *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.*, 25, 15 (1990)