ブドウ酒醸造における結合型亜硫酸形成
のバイオセンサによる動的測定黒澤 尋・今野由信・中村和夫・天野義文
(山梨大学工学部化学生物工学科)

平成7年5月29日受理

Kinetic Analysis of the Formation of
Bound Sulfite in Wine MakingHiroshi KUROSAWA, Yoshinobu KONNO,
Kazuo NAKAMURA and Yoshifumi AMANO
(Department of Applied Chemistry and
Biotechnology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Takeda
4-3-11, Kofu 400)

The change of sulfite from free (f-SO₂) to bound form (b-SO₂) in 0.1 M tartrate buffer (pH 3.4), which was used as model grape juice, was dynamically measured with a biosensor containing immobilized cells of *Thiobacillus thiooxidans*. By the use of a gas-permeable polytetrafluoroethylene (PTFE) tube, gaseous f-SO₂ was selectively separated from the sample solution and continuously determined with the biosensor. Kinetic analysis was done by applying Michaelis-Menten type equation to the measured data. Among the SO₂ acceptors such as acetaldehyde (AcH), pyruvic acid (PA), and α -ketoglutaric acid (KGA), which are typically found in wine, AcH more rapidly combined with f-SO₂ than the others. The saturation constants (K_m) of SO₂ acceptors were AcH 3.2 mM, PA 3.2 mM, and KGA 6.2 mM, respectively. This indicated that KGA had a lower affinity for f-SO₂ than the others.

Key words: バイオセンサ・ワイン・亜硫酸

緒言

ワインの醸造において亜硫酸は酸化防止、漂白、有害菌の増殖抑制、清澄の保持、ブドウ果皮からの赤色素の溶出等の目的で使用されている¹⁾。また、亜硫酸はワインの香気成分の生成に影響を及ぼすことが知られている^{2,3)}。亜硫酸が持つこれらの作用が効果的に発揮されるには、亜硫酸は遊離型亜硫酸 (f-SO₂) の状態で適量存

在する必要がある。しかし、亜硫酸は f-SO₂ から結合型亜硫酸 (b-SO₂) へと移行しやすく、それに伴い亜硫酸の効力も低下することが知られている。

b-SO₂ には、AcH を主とするアルデヒド類と結合して比較的安定して存在するものと、ピルビン酸 (PA) や α -ケトグルタル酸 (KGA) などのケト酸及び糖類と結合した不安定状態のものがある⁴⁾。後者の f-SO₂ は温度や pH の影響を受けて、遊離状態と結合状態の間を可逆的に変化するとされている⁵⁾。これまでに亜硫酸の有効利用のために、ワイン中の成分と亜硫酸の結合力 (結合率) に関する研究が種々行われている⁶⁻⁸⁾。しかし、亜硫酸の測定は改良ランキン法⁹⁾によって行われているために、b-SO₂ の形成に伴う f-SO₂ 濃度の経時的減少を連続的に測定することは困難であった。そのためブドウ果汁あるいはワイン中の亜硫酸の消長は、これまで断片的にとらえられてきたにすぎない。

本研究では、遊離型亜硫酸が結合型亜硫酸へ移行する過程を動的に解析することを目的として、はじめにバイオセンサ法による遊離型亜硫酸の連続的測定法を確立した。次にバイオセンサ法により、遊離型亜硫酸がアルデヒドやケト酸に代表される亜硫酸受容体と結合して減少する経過を測定し、結合型亜硫酸の形成に関する速度論的考察を行った。

実験方法

1. 測定原理

亜硫酸測定のためのバイオセンサは、硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814 と酸素電極からなっている。*T. thiooxidans* は酸素消費を伴い亜硫酸を硫酸にまで酸化する^{10,11)}。よって、亜硫酸が酸化されるとき酸素濃度の変化を酸素電極によって測定すれば、電極の電流値変化より亜硫酸濃度を求めることができる¹²⁾。*T. thiooxidans* は遊離型、結合型いずれの形態の亜硫酸も酸化できるが、低 pH 域において遊離型亜硫酸だけがガス状に変化することに注目し、遊離型亜硫酸をガス透過性膜にて選択的に分離して測定した。

2. バイオセンサによる遊離型亜硫酸の測定装置

亜硫酸測定用バイオセンサは、NAKAMURA 他¹²⁾の方法に従い作製した。ただし、電極先端に装着した微生物膜はプラスチック製のリングで固定した。遊離型亜硫酸の測定は Fig. 1 に示した測定装置を用いて行った。ガラス攪拌槽にモデルブドウ果汁として 0.1 M 酒石酸緩衝液 (pH 3.4) を 500 ml 入れ、ここにさまざまな濃度の亜硫酸を添加したものを試料液とした。pH 3.4 の水溶液中では遊離型亜硫酸は解離平衡により、全遊離型亜硫酸の約 5% がガス (SO₂) として存在している。この

SO₂ ガスを分離するために、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブ (長さ 1 m, 内径 2 mm, 外径 3 mm, 孔径 1 μm, 住友電工社製) を攪拌槽内に布設した。キャリア溶液 (0.1 M クエン酸 Na-NaOH 緩衝液, pH 5.5) をペリスタポンプによって 6 ml/min の流速で供給し, PTFE チューブ内を通過させた。このとき, 試料液中に含まれる SO₂ などのガス成分は, PTFE チューブ膜面を透過してキャリア溶液に吸収される。ガス成分を含んだキャリア溶液を 2 つに分岐させ, 一方をバイオセンサが挿入されたフローセルに, 他方を比較電極 (加熱失活させた微生物膜を装着した酸素電極) を挿入したフローセルに導いた。いずれのフローセルも恒温水を通じて 30°C に制御した。バイオセンサと比較電極の応答をそれぞれ記録計 (理化電器, R-62) にてチャート紙に記録した。バイオセンサの応答値から比較電極の応答値を差し引き, SO₂ ガス以外のガス成分による影響を相殺した。

3. 結合型亜硫酸形成経過の測定

攪拌槽内に 500 ml の 0.1 M 酒石酸緩衝液 (pH 3.4) を満たした。ここに遊離型亜硫酸濃度 (f-SO₂) で 60 ppm になるように NaHSO₃ を添加した。バイオセンサによる測定値が 60 ppm で一定になったことを確認した後, 攪拌槽に亜硫酸受容体を添加して f-SO₂ 濃度の変化を測定した。

4. 試薬

標準の亜硫酸として亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO₃) を使用した。SO₂ として 1,000 ppm を含むように NaHSO₃ を蒸留水に溶解し, 標準亜硫酸原液とした。標準亜硫酸原液は用事調整した。

ブドウ果汁に含まれる成分のうち, 遊離型亜硫酸 (f-SO₂) と結合して結合型亜硫酸 (b-SO₂) を形成する物質としてアセトアルデヒド, ビルビン酸ナトリウム, α-ケトグルタル酸を選択し, 亜硫酸受容体として使用した。

結果及び考察

1. 亜硫酸に対するバイオセンサの応答

先に示した攪拌槽に 0.1 M 酒石酸緩衝液 (pH 3.4)

Fig. 1 Experimental apparatus for the continuous measurement of f-SO₂.

Fig. 2 Response curves of the biosensor to various concentrations of f-SO₂.

Fig. 3 Time courses of the decrease of f-SO₂ concentration by adding various SO₂ acceptors.

を満たし, センサ出力のベースラインを得た。ここに種々の濃度の標準亜硫酸を添加し, 電流値の経時変化を測定した。Fig. 2 に示されるように, 亜硫酸添加後, 約 2 分経過したところで電流値が減少し始め, 10~20 分後に定常値が得られた。センサの応答遅れは, 攪拌槽を通過したキャリア溶液がフローセルに達するのに要する時間と考えられる。電流値減少の絶対値と亜硫酸濃度との間には, 亜硫酸濃度が 0~60 ppm の範囲で比例関係がみられた。このことから, 本バイオセンサにより槽内の亜硫酸濃度を測定できることが明らかになった。

2. 結合型亜硫酸形成の動的測定

60 ppm の亜硫酸を含む 0.1 M 酒石酸緩衝液に種々の亜硫酸受容体を 2.5 mM となるように加え, その後の遊離型亜硫酸濃度の経時変化を測定した。

Fig. 3 に示されるように, 同濃度の亜硫酸受容体を添加した場合は, アセトアルデヒド (AcH) を添加したときに遊離型亜硫酸の減少速度が最も速く, 次いでビルビン酸 (PA), α-ケトグルタル酸 (KGA) の順となった。遊離型亜硫酸の減少量は AcH を添加したときが最も大きく, 97% の亜硫酸が結合型亜硫酸となった。PA では 79%, KGA では 71% の結合型亜硫酸を形成した。

Fig. 4 Effect of the concentration of SO₂ acceptors on the decrease rate of f-SO₂ concentration.

Symbols: ●; acetaldehyde, ▲; pyruvic acid, ■; α-ketoglutaric acid.

RANKINE と POCOCK⁷⁾ は、これら3つの亜硫酸受容体と亜硫酸の結合率は、AcH:PA:KGA=100%:66%:47% であると報告している。吉沢と大塚⁸⁾は、AcH:PA:KGA の結合率が水においては 100%:80%:70% であり、ワインにおいては 73%:66%:55% であることを報告している。さらに乙黒と渡辺⁹⁾は、モデルワインにおける結合率が AcH:PA:KGA=81%:66%:47% であると報告している。実験方法が異なることから、これらの結果を直接比較することはできないが、いずれも AcH, PA, KGA の順で亜硫酸との結合率が高いことを示しており、この傾向は本報の結果とも一致する。

3. 結合型亜硫酸形成速度に及ぼす亜硫酸受容体濃度の影響

添加する亜硫酸受容体の濃度を種々変化させたときの結合型亜硫酸形成の速度を求めた。

Fig. 4 に示したように、AcH, PA, KGA のいずれの亜硫酸受容体を添加した場合でも、受容体の濃度が高くなるに従って亜硫酸の減少速度が高くなり、やがて最大値に漸近した。この反応を酵素反応におけるミカエリス・メンテンの式に当てはめ、Woelf plot により解析した。その結果、亜硫酸濃度を 60 ppm (一定) とした場合の最大亜硫酸減少速度は、AcH 6.2 mmol/l·min, PA 3.7 mmol/l·min, KGA 3.8 mmol/l·min と算出された。亜硫酸の減少速度は、キャリアー溶液の流速や亜硫酸ガス及び酸素の膜透過速度によっても影響を受けると考えられる。したがって、ここで求めた亜硫酸の減少速度は撹拌槽内の亜硫酸濃度の変化を直接反映したものではなく、相対的な値であると考えられる。亜硫酸と受容体との飽和定数 (Km) は、AcH 3.2 mM, PA 3.2 mM, KGA 6.2 mM であった。亜硫酸の減少速度は相対的な値と考えられるが、飽和定数は亜硫酸の減少速度が絶対値か相対値かによって影響を受けないので、それらは結

合の親和性を直接反映していると考えられる。

以上の結果より、検討した受容体の中では AcH が最も速く結合型亜硫酸を形成することが明らかとなった。また、KGA の Km 値は他の2倍の大きさがあることから、AcH や PA に比べて亜硫酸との親和性が低いことがわかった。

要 約

疎水性でガス透過性を有するポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブにより試料中の SO₂ ガスを分離することによって、バイオセンサによる遊離型亜硫酸の選択的かつ連続的な測定が可能となった。これにより試料中の遊離型亜硫酸濃度の経時変化をチャート上に記録できるようになり、これを基にして遊離型亜硫酸から結合型亜硫酸への形態変化を動的に解析した。

代表的な亜硫酸受容体であるアセトアルデヒド (AcH)、ピルビン酸 (PA)、α-ケトグルタル酸 (KGA) の中では、AcH が最も速やかに亜硫酸と結合することがわかった。結合型亜硫酸の形成反応をミカエリス・メンテンの式に当てはめ、Woelf plot による解析を行ったところ、亜硫酸と亜硫酸受容体の飽和定数 (Km) は、AcH 3.2 mM, PA 3.2 mM, KGA 6.2 mM となり、KGA が他と比べて亜硫酸との親和性が低いことが明らかとなった。

文 献

- 1) ワイン学編集委員会編：ワイン学，p. 84-85，産調出版 (1991)
- 2) T. SHINOHARA, Y. SHIMAZU, and M. WATANABE: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2569-2577 (1979)
- 3) 篠原 隆，渡辺正澄：農化，**52**, 309-316 (1978)
- 4) 渡辺正平，飯野修一：醸協，**82** (7), 505-510 (1987)
- 5) J. F. SCHOPFER, J. AERNY: *Bulletin de L'O. I. V.*, **652-653**, 515-542 (1985)
- 6) 吉沢 淑，大塚謙一：醸協，**66** (6), 616-619 (1971)
- 7) B. C. RANKINE and K. F. POCOCC: *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 104-109 (1969)
- 8) 乙黒親男，渡辺正平：醸協，**73** (12), 962-967 (1978)
- 9) 国税庁訓令：国税庁所定分析法，p. 27-37，国税庁 (1991)
- 10) J. T. PRONK, R. MEULENBERG, W. HAZEU, P. BOS and J. G. KUENEN: *FEMS Microbiol. Reviews*, **75**, 293-306 (1990)
- 11) K. NAKAMURA, S. KURIBAYASHI, H. KUROSAWA and Y. AMANO: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 261-263 (1992)
- 12) K. NAKAMURA, Y. AMANO and O. NAKAYAMA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 351-354 (1989)