

〔山梨大発研報告 15 15~22 1980〕

## 限外濾過法による白ワインの褐変防止

天野義文, 中村和夫, 小室寿輝\*,  
桐林信二, 加賀美元男

## The control of browning of white table wine by ultrafiltration.

YOSHIFUMI AMANO, KAZUO NAKAMURA, TOSHITERU KOMURO,  
SHINJI KIRIBAYASHI and MOTOO KAGAMI

It was confirmed that ultrafiltration increased the resistance to browning of white table wine. The following points were clarified.

1. A wine's resistance to oxidative browning could not be determined merely by the total polyphenol content of the wine. The measurement of "browning capacity" by a modified Singleton method proved to be useful in comparing wines capacity to brown even if the components or vintage years of tested wines were different from each other. By this method, it was significantly increased, judging from the browning rate, absorbance at 420 nm, and spectrum pattern of the wine.
2. By ultrafiltration, the oxygen uptake rate of a wine was reduced to 57% to 66% of the control. Polyphenols and nitrogenous compounds were also partially removed from the wine by ultrafiltration.
3. Wine's buffering capacity for the change in the redox potential was reduced by ultrafiltration.
4. The flow rate of ultrafiltration was changed by adjusting the applied pressure. When the high pressure ( $3 \text{ kg/cm}^2$ ) was applied, the flow rate was high initially but reduced rapidly during the ultrafiltration. A significant increase in the flow rate occurred when the ultrafiltering temperature was elevated.

白ワインの褐変防止に関して数多くの研究がなされてきた。それらは亜硫酸等の還元性物質を添加する褐変防止法とフェノール性化合物の除去による方法とに別される。篠原ら<sup>1)</sup>は原料果汁を限外濾過処理して高分子ポリフェノール等を除去すれば色調安定性に富み品質優良なワインが得られることを認めている。また、清酒では限外濾過処理により白ボケの発生が防止

され清澄度の高い酒が得られるという報告<sup>2~4)</sup>がある。

本研究では白ワインを限外濾過処理することにより、褐変に対する安定性がきわめて良くなることを確認したので報告する。

## 供試料および実験方法

**試料ワイン** Table 1に示した6種の白ワインを試料として用いた。本研究は1977年度に実施したので、

A, Bは古酒, C~Fは1977年産の新酒である。各ワインの製造上の特徴を以下に述べる。A, D, E, Fはプレス搾汁液(搾汁率80%)より製造されたワインでポリフェノール含量の高いことが特徴である。また, A, Eは供試料の中では亜硫酸含量が多く、遊離、結合亜硫酸をそれぞれ 20, 300 mg/l 程度含んでいる。D, Fには遊離亜硫酸はほとんどなく結合亜硫酸量もA, Eより少ない。Cはフリーランの果汁より製造されたワインでポリフェノール, 全窒素含量が少なく, 全亜硫酸も結合型を17 mg/l 含有するのみである。Bはフリーランの果汁より製造されたワインの滓(主に酵母を含む)を15°Cで一年間貯蔵した後、遠心分離(10,000 rpm, 15 min, 4°C)して得た上清で, 全窒素含量が多く亜硫酸を含まないことが特徴である。

**限外濾過** 東洋濾紙KK製UHP-43型限外濾過装置を使用し窒素ガスで加圧することにより濾過した。通常は4°Cの温度下で操作した。

**Browning Capacity の測定** Singleton<sup>5)</sup>の方法を若干変更し以下のようにして行った。試料ワイン100mlに対して1gのベントナイト(豊順工業KK製)を用意し, ワインの一部を用いてベントナイトを十分湿潤させた後, 200ml容三角フラスコに洗いこむ。三角フラスコのヘッドスペースを窒素ガスで置換してからゴム栓で密封し時々振りまぜながら室温で2時間放置する。次に遠心分離機(6,000 rpm, 15 min)でベントナイトを除き, さらに東洋濾紙No.5Cで濾過して残存する濁りを除去する。このようにして調製した試料ワインを試験管(18×165mm)に7mlずつ分注する。分注した試験管を2グループに分け, 1つのグループの試験管のヘッドスペースを酸素ガスで, 他のグループについては窒素ガスで置換した後, ゴム栓をし, さらにその上をビニールテープでしっかり巻いてガス漏れしないように密封する。これらの試験管を恒温槽(60°C)に入れ褐変を進行させる。ヘッドスペースを酸素及び窒素で置換してある試験管を各1本ずつ経時的に取り出し, その吸収スペクトルを測定する。褐変度の評価は420nmの吸光度変化を指標とし, 60°Cでの加温を開始してより3日目から10日目までの直線的な吸光度増加の傾き, 並びに10日目の吸光度の大小によって判定する。窒素ガス置換してある試料の吸光度の増加は非酸化的褐変を示すから, 酸化的褐変のみについて言及するときは窒素ガス置換した試料の吸光度を酸素ガス置換した試料の吸光度から差し引いた値を用いればよい。

以上の操作において, ベントナイト処理がワイン分および褐変に及ぼす影響を検討したところ, ワインの全ポリフェノール含量は変化しなかったが, 全窒素は18%減少し, 鉄イオンは2.9 mg/l 増加した。銅イオンおよび還元糖量は変化しなかった。また, 褐変したワインの特徴を示す445nm付近の吸収極大値はベントナイト量10,000 mg/l 以上の使用によりやや減少する傾向を示したが, 420nmを指標とする吸光度変化はベントナイト処理の影響をほとんど受けなかった。従ってベントナイト使用量が10,000 mg/l 以下ならばワインの褐変性に影響を及ぼさないことがわかった。

**酸化還元電位の測定と滴定** 100ml容ビーカーに試料ワイン40mlをとり恒温槽内で25°Cに保持して, 白電極を装着したpH計(電気化学計器KK製, MC3型)により酸化還元電位を測定した。滴定曲線はN/100 I<sub>2</sub> 溶液を1mlずつ試料ワインに加えよく混してから白金電極を挿入し指針が定定するまで5分待った後直を読み, その値を滴定量に対して点綴し成した。

**その他の測定方法** 酸素消費速度はワールブマンメーターにより, 吸収スペクトルは日立自記式光度計323型により測定した。全ポリフェノール, 窒素等の一般分析は“Wine and Must Analysis”に従って行った。

## 実験結果および考察

**Browning Capacity 法によるワインの褐変性の値** Singleton<sup>5)</sup>はBrowning Capacity法(BC法と称す)を用いて420nmの吸光度増加を測定すれば, その大小から試料ワインが褐変しやすいかを判定出来ると述べている。ここではその方法に基づいて試料ワインのBCを測定し, 各試料ワインの特性を評価した。成分的特徴が異なる4種類の白ワインを試料として用い, BC法による褐変の経過をFigに示した。4種の試料のすべてについて, 褐変速度試験開始日後2, 3日目までは一定でなく変化したが, 2, 3日目以降の褐変速度は一定となり, その速度はヘッドスペースを酸素ガス置換した試料の方が窒素ガス置換の試料よりも大きく, その速度差は試料により異なっていた。これらの試料の3日目より10日目までの吸光度増加の傾きおよび褐変操作開始前の吸光度値をTable 2に示した。試料Aはデラウ種を原料ぶどうとした古酒であるが, 褐変速度は小

Table 1. Analysis of the wines used in the experiment.

Sample	A	B	C	D	E	F
Variety	D <sup>1)</sup>	K <sup>2)</sup>	K	K	D	K
Year <sup>3)</sup>	'75	'76	'77	'77	'77	'77
Ethanol (v/v)%	12.9	14.2	11.3	11.9	14.0	13.8
Reducing sugar <sup>4)</sup> (g/l)	3.17	1.10	2.49	2.41	7.94	8.18
Total acid <sup>5)</sup> (g/l)	8.7	9.2	6.3	6.4	8.0	5.1
Total polyphenol <sup>6)</sup> (mg/l)	390	350	184	542	840	475
Sulfur dioxide (mg/l)						
Free	17	0	0	4	23	0
Fixed	324	0	17	50	286	193
Total nitrogen (mg/l)	302	804	71	109	366	252
Fe (mg/l)	8.7	2.8	6.2	8.4	6.0	5.3
Cu (mg/l)	2.7	3.1	0.5	0.1	0.6	0.1
pH	3.5	3.9	3.6	3.5	3.5	3.4

- 1) Delaware. 2) Koshu. 3) Vintage year. 4) As glucose. 5) As tartaric acid.  
6) As gallic acid.

Table 2. Browning capacity of four wine samples.

Sample <sup>2)</sup>	Absorbance at 420 nm		Browning rate (OD/day) <sup>1)</sup>		Oxidative browning rate
	(days)		Gas phase		
	0	10 <sup>3)</sup>	O <sub>2</sub> (1)	N <sub>2</sub> (2)	(1) - (2)
A	0.187	0.618	0.036	0.029	0.007
B	0.087	0.782	0.056	0.035	0.021
C	0.100	0.808	0.061	0.036	0.025
D	0.142	1.990	0.220	0.130	0.090

- 1) The increase in absorbance at 420 nm during 3 to 10 days was used to determine the browning rate.  
2) Wine samples A, B, C, and D are those shown in Table 1.  
3) The absorbance value was measured of the sample with oxygen in the gas phase.

く10日目のOD<sub>420</sub>も小さい値で4種の試料中では褐変に対する安定性が最もすぐれていた。B, C, Dはいずれも甲州種ぶどうを原料とするワインで亜硫酸はほとんど含有せずその含量にも大差はないが、ポリフェノール量と窒素量に大きな差がある。BはCと比較しポリフェノール含有量が約2倍であるのにもかかわらず、褐変性にはそのような大きい違いは認められなかった。また、B, CはAよりポリフェノール含量が低いにもかかわらず褐変速度、OD<sub>420</sub>はAより高い値を示した。Dはプレス搾汁液より製造された新酒でポリフェノール含量が多い、この試料Dは酸化、非酸化的

褐変の速度が他の3試料と比較して極端に大きく褐変し易い試料で、褐変期間10日目のOD<sub>420</sub>は開始時の値の10倍以上となった。この場合、窒素ガス置換した試料の褐変速度も相当大きかったことより判断して、新酒の褐変防止にはワインをガス状酸素から遮断するだけでなく亜硫酸の添加等により還元状態に保つことの必要性が示された。4種の試料の褐変性を比較してみると古酒(A, B)は比較的褐変し難いのにに対し新酒は褐変し易く、その速度および着色度共に大きいことがわかった。また、全ポリフェノール含有量の多いワインは褐変し易い傾向をもつが、その含量が多いとい

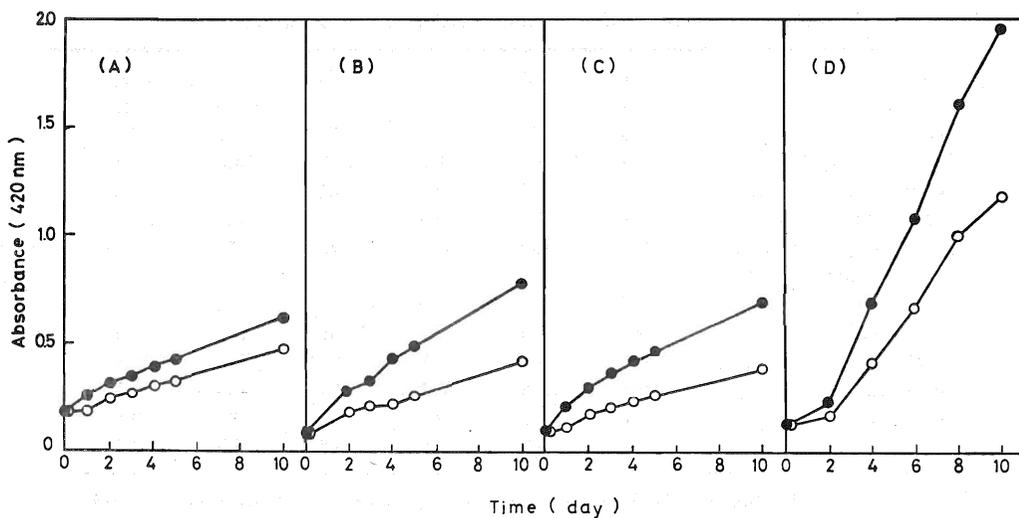


Fig. 1. Browning of four different wines with time.

Wine samples A, B, C, and D are those shown in Table 1. The gas phase in the flask : ●, oxygen ; ○, nitrogen.

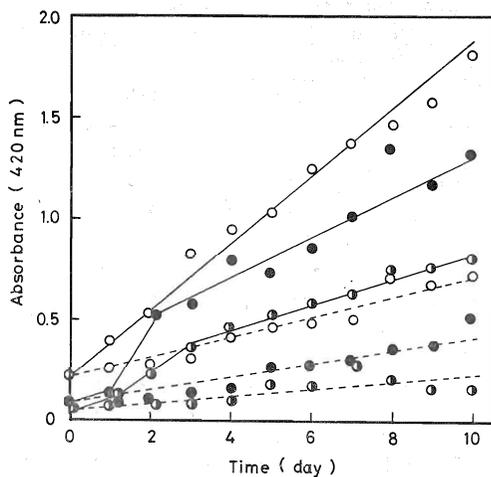


Fig. 2. The effect of ultrafiltration on the increase in browning.

The experiments were carried out at 60°C with the wine sample F. ○, Control ; ●, Filtrate through a membrane UK-50 (molecular weight 50,000); ◐, Filtrate through a membrane UP-20 (molecular weight 20,000). Gas phase : O<sub>2</sub>(—) ; N<sub>2</sub>(.....)

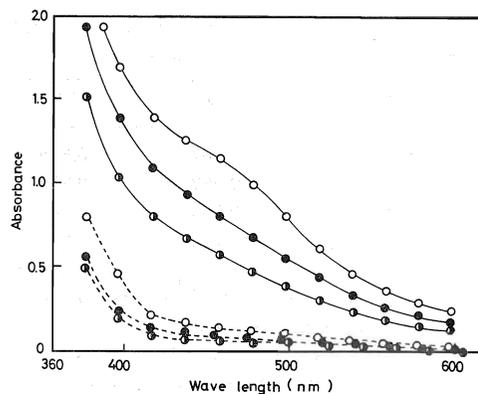


Fig. 3. Effect of ultrafiltration on absorption spectra (wine sample F).

The dotted lines refer to the absorption spectra of the wine before storage test. The solid lines refer to the absorption spectra of the wine kept at 60°C for four days in an oxygen gas atmosphere. ○, Control ; ●, UK-50 filtrate ; ◐, UP-20 filtrate.

Table 3. The effect of ultrafiltration on browning capacity.

Sample	Absorbance at 420 nm <sup>1)</sup>	Browning rate (OD <sub>420</sub> /day)		Oxidative browning rate
		Gas phase		
		O <sub>2</sub> (1)	N <sub>2</sub> (2)	(1) - (2)
E Control	1.83	0.151	0.087	0.064
UK-50 filtrate	1.25	0.082	0.038	0.044
UP-20 filtrate	1.01	0.059	0.028	0.031
F Control	1.80	0.159	0.051	0.108
UK-50 filtrate	1.32	0.108	0.033	0.075
UP-20 filtrate	0.80	0.060	0.017	0.043

1) The values were measured after ten days of the sample with oxygen in the gas phase.

Table 4. Effect of various treatments on browning of wine sample F.

Treatment	Absorbance at 420 nm		Browning rate (OD <sub>420</sub> /day)		Oxidative browning rate
	days		Gas phase		
	0	10	O <sub>2</sub> (1)	N <sub>2</sub> (2)	(1) - (2)
Control	0.142	1.99	0.220	0.130	0.090
Ultrafiltration (UP-20)	0.024	0.323	0.065	0.055	0.010
Nylon-6 <sup>1)</sup>	0.102	1.49	0.160	0.123	0.037
Seitz filter <sup>2)</sup>	0.096	2.12	0.233	0.125	0.108
Centrifugation					
10,000xg	0.138	1.90	0.203	0.133	0.070
50,000xg	0.138	1.92	0.208	0.125	0.083
100,000xg	0.144	1.96	0.210	0.147	0.063

- 1) 0.2g of nylon-6 powder was added to 100ml of a wine sample and stirred for two hours by a magnetic stirrer in a nitrogen gas atmosphere. The powder suspension was filtered and the browning capacity was measured of the filtrate.
- 2) The wine sample was filtered through a Seitz filter before measuring of browning capacity

うだけでは褐変し易いか否かを判定出来ないことがわかる。その理由はポリフェノールと称されているもの全てが褐変に関与するわけではなくフェノール化合物の中の特定成分の多少が褐変と関係するからである。従って、ワインの褐変に対する安定性をあらかじめ知るためには全ポリフェノール量を求めるばかりでなく、BCを測定することが有効であることがわかる。

**限外濾過処理による褐変防止** 限外濾過処理を行うことによりワインの褐変性がどのように変化するかをBC法により検討した。試料ワインとしてE, Fを使用し、分画分子量20,000および50,000の膜を用いて限外濾過した。その結果、限外濾過処理したワインはコントロールワインと比較し、酸化褐変の速度が低下することがわかった (Fig. 2)。E, Fは新酒である

**Table 5.** The rate of oxygen uptake of ultrafiltered wine. The rate was measured by the Warburg manometric technique in an oxygen gas atmosphere at 30°C.

Two ml of wine sample was placed in the main compartment of a Warburg flask and 0.2 ml of 20% KOH in the center well.

Sample	Oxygen uptake rate ( $\mu\text{l O}_2/\text{ml-wine/hr}$ )		
	Control <sup>1)</sup>	Ultrafiltered wine	
		UK-50 (M. W. 50,000)	UP-20 (M. W. 20,000)
E	6.10	3.85	3.45
F	6.20	4.10	3.85

1) Unfiltered wine.

**Table 6.** Effect of ultrafiltration on the contents of total polyphenol and nitrogen.

Sample	Total polyphenol <sup>1)</sup> (mg/l)	Total nitrogen (mg/l)
E Control	840	366
UK-50 filtrate	757	340
UP-20 filtrate	706	315
F Control	475	252
UK-50 filtrate	375	222
UP-20 filtrate	329	158

1) As gallic acid.

上にポリフェノール含量は多く、遊離亜硫酸が少ないので、限外濾過処理を行わないコントロールワインは著しく褐変した。しかし、限外濾過処理を行ったところ、その酸化褐変速度はコントロールワインの速度を100%とすると、分画分子量50,000の処理で約70%に低下し、20,000の処理を行った場合には40~48%とコントロールワインが示す褐変速度の半分以下に低下することがわかった (Table 3)。限外濾過処理を行った後に酸素ガス下で褐変させた (60°C, 4日間) 試料ワインFの可視部吸収スペクトルをFig. 3に示した。限外濾過処理酒のスペクトルパターンおよび吸光度値は無処理のコントロールワインのそれと大差がなかった。しかし、これらの試料を酸素ガス下で60°C, 4日間保温したところ、コントロールが著しく褐変したの

に比較し、処理酒の着色度は弱く、限外濾過処理はワインの褐変防止にきわめて有効であることが示された。特にコントロールワインの吸収スペクトルは450nm付近にショルダーを有し、褐変したワインに特徴的なスペクトルパターンを示したのに対し、限外濾過処理したワインの場合にはそのようなショルダーがみられなかった。

限外濾過処理による褐変防止効果をナイロン粉末処理等、他のワイン処理法による効果と比較検討した (Table 4)。ザイツ濾過および遠心分離法は褐変防止に有効ではなかった。ナイロン粉末処理は褐変防止に有効であることが既に報告<sup>8-10)</sup>されているが、その処理効果をBC法によって評価したところ、処理酒の酸化褐変速度はコントロールが示す速度の $\frac{1}{2}$ 以下に低下

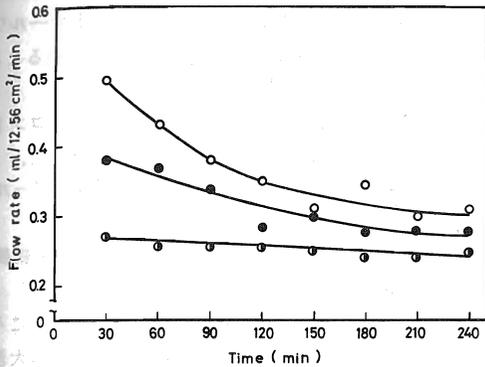


Fig. 4. Effect of ultrafiltration on the redox titration curve (wine sample D).  
○, Control ; ●, UP-20 filtrate ; ◐, SO added to 100 mg/l ; ◑, SO<sub>2</sub> added to 50 mg/l ; ×, The wine was kept for six days at 60°C in an oxygen gas atmosphere before titration.

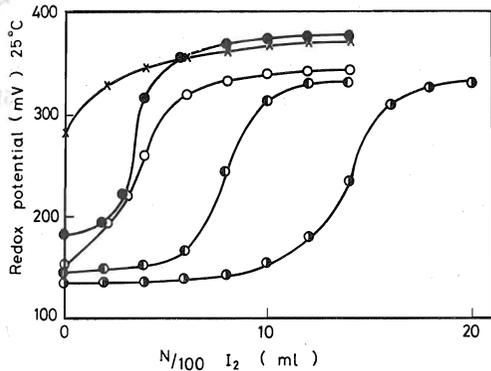


Fig. 5. Effect of pressure on the flow rate of ultrafiltering (wine sample F).  
A membrane type UK-50 (M.W. 50,000) was used for the ultrafiltration. Pressure applied : ○, 3 kg/cm<sup>2</sup> ; ●, 2 kg/cm<sup>2</sup> ; ◐, 1 kg/cm<sup>2</sup>.

し、また10日目のOD<sub>420</sub>もコントロールと比較し低い値を示していた。一方、限外濾過処理を行った場合には処理酒の酸化褐変速度がコントロールの速度の1/9にまで低下し、その速度低下は試験した処理法による影響の中で最も大きかった。

#### ワインの酸素消費速度に対する限外濾過処理の影響

試料ワインとして、E、Fを使用した、分画分子

量20,000および50,000の膜を使用し、4°C、窒素ガス圧4〔kg/cm<sup>2</sup>〕により限外濾過処理したワインを酸素消費速度測定用試料とした。コントロールとして限外濾過処理しないワインの酸素消費速度も測定した。その結果、E、F共に限外濾過処理したワインはコントロールワインと比較し酸素消費速度が低下した(Tale 5)。その速度はコントロールの速度を100%とすると分画分子量50,000および20,000の処理により、それぞれ63~66%、57~62%に低下した。

**限外濾過処理によるワイン中のポリフェノールおよび窒素量の変化** ワインを限外濾過処理したところ、その分画分子量に応じ全ポリフェノールおよび全窒素含量は低下し、この操作によりポリフェノールおよび窒素化合物の一部が除去されていることがわかった(Table 6)。また限外濾過したとき膜上に残った物質を集め、それを濃縮したのち酸加水分解、80%エタノール抽出、酢酸エチル抽出を分けて得られたそれぞれの試料をペーパークロマトグラフィーで展開したところ、フェリシアン化カリ-鉄ミョーバン溶液の噴霧により青色を呈するスポットが認められ、限外濾過処理によりフェノール化合物の一部が膜上にトラップされることを確認した。

**酸化還元電位の変化** 限外濾過処理したワインの性質変化を酸化還元電位の立場から検討した。試料Dを用いて酸化還元電位を測定した後、引き続きN/100 I<sub>2</sub>溶液により酸化還元滴定を25°Cで行った。コントロールワインの酸化還元電位は154 mVで平均的<sup>11)</sup>な値を示した。亜硫酸を50および100 mg/l添加した場合、ワインの電位は8および18 mV低下しただけであったが、酸化に対してはその添加量に応じ緩衝力の増加していることがわかる(Fig 4)。限外濾過(M.W. 20,000)したワインの酸化還元電位は186 mVでコントロールワインより高い値であった。I<sub>2</sub>溶液による滴定曲線では滴定数3 mlと4 mlの間で酸化還元電位に電位差跳躍があり、コントロールワインの滴定曲線と比較し緩衝力の低下が認められた。また、最終的に到達した電位はコントロールワインの到達電位より高く、コントロールワインを酸素ガス下で加熱褐変(60°C、6日間)させた試料の到達電位とほぼ同じ値を示した。ワイン中の緩衝能物質としてポリフェノール化合物が報告<sup>12)</sup>されていることから、限外濾過処理によるポリフェノール量の減少が緩衝力の低下と関係しているものと考えられる。

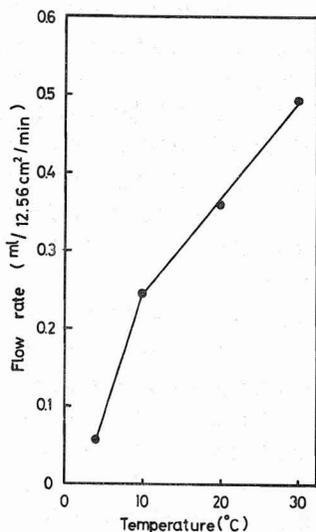


Fig. 6. Effect of temperature on the flow rate of ultrafiltering (wine sample F).

Filtration was carried at the pressure of 3 kg/cm<sup>2</sup> for four hours using a UK-50 (M.W. 50,000) membrane.

**限外濾過速度に対する濾過条件の影響** Fig. 5に濾過速度の経時変化を、圧力をパラメーターとして示した。高い圧力で操作すれば初期の濾過速度は大きい。一方、低い圧力で濾過した場合は濾過速度は遅いが、経時的な速度低下は少なかった。次に操作圧力を一定(3 kg/cm<sup>2</sup>)として濾過温度の影響を検討したところ、10°Cにおける濾過速度は4°Cの場合の4.3倍と著しく増加したが(Fig. 6)、10°C以上では温度に比例し、温度が1°C上るごとに0.0009 [ml/cm<sup>2</sup>/min]の割合で濾過速度が増加した。

#### 要 約

白ワインを限外濾過処理して褐変を防止する方法を検討し次の結果を得た。

1. ワインの褐変に対する安定性を全ポリフェノール含量だけから判定することは出来ないが、Browning Capacity 法を用いて褐変安定度を数値で表わせば、成分や製造年度の異なるワインであっても相互の褐変安定度の比較が容易に行えることを示した。

2. 限外濾過処理したワインの褐変安定性をBC法に

より評価したところ、褐変速度、OD、スペクトルパターンから判断して、処理酒はコントロールワインと比較し、褐変安定性が非常に増していることがわかった。

- 限外濾過処理したワインの酸素消費速度はコントロールワインが示す速度の57~66%に低下した。
- 限外濾過処理によってワイン中のポリフェノール窒素含量が減少した。
- 限度濾過処理によってワインの酸化に対する緩容量が低下した。
- 限外濾過処理の濾過条件について検討したところ、高い圧力で操作した場合には初期の濾過速度は大きい。経時的な速度低下が著しいこと、また、濾過するときの温度が高い程濾過速度の大きいことがわかった。

#### 文 献

- 篠原：公開特許公報，52-24396，515(1977)。
- 今井，遠藤，川端，藤井，今野：醸協誌，72，(1977)。
- 佐藤，大場，高橋，梅原：醸工，55，84(1977)。
- 大場，高橋，早川，難波，佐藤：醸協誌，73，9(1978)。
- Singleton, V. L., Kramling, T. E.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 157 (1976)。
- Amerine, M. A., Ough, C. S.: *Wine and Must Analysis*, John Wiley & Sons, New York (1974)。
- Rossi, J. A., JR., Singleton, V. L.: *Am. Enol. Vitic.*, 17, 231 (1966)。
- De Villiers, J. P.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 12, 25 (1961)。
- 渡辺，加々美，倉田，風間：山梨県食品工業研究所研究報告，2，33 (1969)。
- 天野，松野，加賀美：山梨大学醸酵研報告，1，15 (1970)。
- 加々美：醸協誌，57，559 (1962)。
- 大塚，戸塚，野津，荻野，伊藤，飯村：醸協誌，71，398 (1976)。