

{J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 29, 23~28 1994}

微生物センサによるワイン中の揮発酸度の評価

天野義文¹、中村和夫¹、黒沢 尋¹、柳田藤寿²、篠原 隆²
(山梨大学工学部化学生物工学科¹、山梨大学工学部発酵化学研究施設²)

A Microbial Sensor for Estimation of Volatile Acidity in Wine

YOSHIFUMI AMANO¹, KAZUO NAKAMURA¹, HIROSHI KUROSAWA¹,
FUJITOSHI YANAGIDA² and TAKASHI SHINOHARA²

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Faculty of Engineering, Yamanashi University, Takeda, Kofu 400, Japan¹
Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kitashin, Kofu 400, Japan²*

Abstract

A microbial sensor was built to determine volatile acidity of wine. This microbial sensor consisted of immobilized *Pseudomonas alcaligenes*, an oxygen electrode, and a gas-permeable Teflon membrane. *P. alcaligenes*, which was isolated from winery soil, assimilated major organic acids in wine. Although this microbe oxidized nonvolatile organic acids such as tartaric acid, malic acid, citric acid, succinic acid, and pyruvic acid, these nonvolatile acids did not pass through the gas-permeable membrane. Thus, the microbial sensor selectively responded to the membrane-permeable volatile acids. Sugars and ethanol did not disturb the measurement. A steady state current was attained within 6 to 10 minutes, and the decrease in current was linearly related to the concentration of sodium acetate below 80 mg/l. The volatile acidity determined with the sensor was 1.5–1.6 times greater than that measured by the conventional A.O.A.C. method, and was proportional to the conventional method. The reproducibility of the sensor method was also sufficient for the measurement (relative standard deviation, 1.65%), thus the sensor method is very useful for the estimation of volatile acidity of wine. With this sensor, the time and the sample volume needed for one measurement were remarkably low: 15 minutes and 0.3 ml, respectively.

緒 論

ワイン中に含まれる有機酸は水蒸気蒸留で気化する揮発酸と、気化しない不揮発酸に大別され、その組成およびバランスはワインの品質に大きく影響している。ワインに最も多く含まれている揮発酸は酢酸であり、発酵によりつくられる。正常な発酵の場合に生成する酢酸は0.30g/l以下であるが¹⁾、野生酵母や酢酸菌に汚染されると酢酸量が増加する。通常揮発酸は果もろみの発酵が順調に行われな

い増加するので、欧米諸国では揮発酸の許容量が定められている²⁾。このことから、ワインの揮発酸度を測定することはワインの品質管理において重要である。

これまでワインの酸度測定にはA.O.A.C.による公定分析法³⁾が用いられてきているが、この方法は測定操作が煩雑であり、測定に要する時間も長い。一般にバイオセンサによる分析法は、迅速であること、選択性が高いこと、必要とする試料量が少

ないなどの利点を有するため、近年、多くのバイオセンサが食品分析のために開発されている^{4, 5, 6)}。本研究ではワイン中の揮発酸を測定することを目的とし、新たに分離した有機酸酸化性菌を用いてバイオセンサ(微生物センサ)を構築した。

実験方法

1. 供試菌

ワイン醸造工場内の土壌から分離した有機酸酸化性細菌(No.412株)を用いた。

2. 培地

有機酸酸化性菌の分離は、酒石酸アンモニウム 1.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、寒天1.5%を含む培地(pH=7.0)を用いて行った⁷⁾。各成分は水道水に溶解した。この分離用培地及び肉汁寒天培地(肉エキス1%、ペプトン1%、NaCl 0.5%、pH=7.0)を用いて、分離菌の同定を行った。

菌体の増殖用培地として、酒石酸ナトリウム二水塩1.186%、 NH_4Cl 0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.04%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%からなる液体培地(pH=7.0)を用いた。

3. 微生物センサの作製

細菌(No.412株)を増殖用培地で培養し、遠心分離により集菌した。さらに2回の洗浄・遠心分離を行った後、細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液(50~100 μ l)をアセチルセルロース膜(ミリポア社製、HAWP02500、孔径0.45 μ m)でサンドウィッチ固定し、微生物膜とした。この微生物膜を活性化するために、増殖用培地で培養した(48時間、30 $^{\circ}$ C)。培養後の微生物膜に含まれる細菌数はおよそ 4.2×10^6 cells/membraneであった。活性化した微生物膜を酸素電極(電気化学計器、Bio-sensor kit type BSK-1)の先端に装着し、微生物センサを構築した。本微生物センサは、分離した細菌が酢酸などの有機酸を酸化する際に消費する酸素量を、酸素電極で測定することを基本原理としている。酸素電極により検出される電流値の変化と試料濃度の間に直線関係が得られれば、電流値の変化から試料濃度を求めることができる。

微生物センサを揮発酸の測定に用いるときは、電極先端をガス透過性のテフロン膜で被い、さらにその内側には微生物膜が浸る程度に0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0)を満たした。ガス透過性膜はガス状で存在する揮発酸を選択的に通過させるため、センサは揮発酸に対して選択的に応答する。ただし、ワイン及びマスト中に含まれる種々の物質に対する微生物センサの応答性を検討するときは、ガス透過性膜

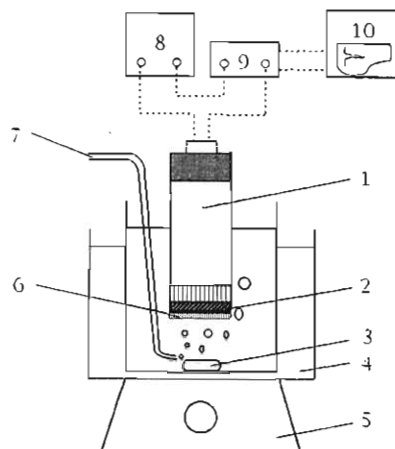


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus. 1, oxygen electrode; 2, microbial membrane; 3, magnetic bar; 4, water bath; 5, magnetic stirrer; 6, gas-permeable membrane; 7, air flow (500ml/min); 8, constant voltage source; 9, galvanometer; 10, recorder.

を装着しない状態で用いた。

測定は微生物センサをバッチ式の測定装置(Fig. 1)に組み込んで行った。試料は0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解、または希釈した後、必要に応じて H_2SO_4 または $NaOH$ を添加して、試料液のpHを7.0または3.0に調整した。容量30mlの容器に試料10mlを入れ、数分間通気し、ベースの電流値が安定したところで測定を開始した。電流値の減少をレコーダーで記録し、電流値が定常となったところを測定値とした。定常電流値は6~10分で得られた。測定温度は特に断らない限り30 $^{\circ}$ Cとした。

4. 供試料

実試料として、市販の白、赤ワインを各2種類用いた。

5. 分析方法

微生物センサの測定値と比較するために、A.O.A.C.の公定分析法³⁾に従い、蒸留法で揮発酸度を測定した。また、酢酸濃度については酵素法(Boehringer Mannheim F-kit)により測定し、他の測定値と比較した。

実験結果および考察

1. 菌の同定

Table 1. Oxidation by *Pseudomonas alcaligenes* of some compounds usually found in must and wine.

Compound	Current decrease (μA)	Compound not oxidized
Sodium tartrate	0.080	Sodium formate
Sodium malate	0.024	$\underline{D}(+)$ -Glucose, $\underline{D}(-)$ -Fructose, Arabinose, Sucrose, Maltose, Galactose, Mannitol, Sorbitol, Inositol
Sodium citrate	0.175	Ethanol, Glycerol, Isobutyl alcohol, Isoamyl alcohol
Sodium acetate	0.025	Acetaldehyde
Sodium succinate	0.250	Isoamyl acetate, Ethyl acetate, Proline, Glutamic acid, α -Ketoglutarate
Sodium lactate	0.180	Caffeic acid, Syringic acid, $\underline{D}(+)$ -Catechin
Sodium pyruvate	0.120	Potassium metabisulfite
Arginine	0.080	

The measurements were made at 30°C and pH7.0 with concentration of the compounds set at 1.74×10^{-4} M.

分離菌 (No.412株) の同定は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1⁸⁾ を基準として行った。No.412株は好気性のグラム陰性菌であり、胞子を形成しない短桿菌である。単一の極鞭毛を有し、運動性がある。細胞径は0.8-1.0 μm 、細胞長は1.5-3.0 μm であった。分離培地上で形成されたコロニーは波形の縁を持つ円形をしており、表面は粗く、ややもりあがっていた。色はにごった薄茶色であった。No.412株は4°Cの低温下では生育せず、蛍光色素とレクチナーゼを生産しなかったが、カタラーゼ、オキシダーゼおよびウレアーゼを生産した。ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積、細胞外PHBの加水分解、デンプンの加水分解及びゼラチンの液化はいずれも行われなかった。酢酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸の資化性を有していた。しかし、グルコース、フルクトース、サッカロース、グリセロールおよびエタノールは資化しなかった。アルギニン脱炭酸酵素の活性を有しているが、リジンとオルニチンの脱炭酸酵素の活性は見られなかった。分離菌の化学分類学的性質は、キノンがQ-9、菌体脂肪酸組成がC_{16:0}、C_{16:1}、C_{18:1}、3-OH_{10:0}、3-OH_{12:0}、DNAの塩基組成 (G+C含量) が62-63mol%であった。以上の結果より、分離菌 (No.412株) を *Pseudomonas alcaligenes* と同定した。

2. 有機酸に対する微生物センサの応答性

分類の結果より *P. alcaligenes* が有機酸に対して資化性を示すことが明らかとなった。ここでは、*P. alcaligenes* を利用した微生物センサが、ワイン中に含まれる主要な成分に対してどのような応答性 (電流値の変化) を示すのかを検討した。各成分の濃度が0.174mMとなるように0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した試料を、ガス透過性膜を装着しない微生物センサを用いて測定した。

Table 1に示したように、微生物センサはエタノールをはじめとするアルコール類、グルコース、

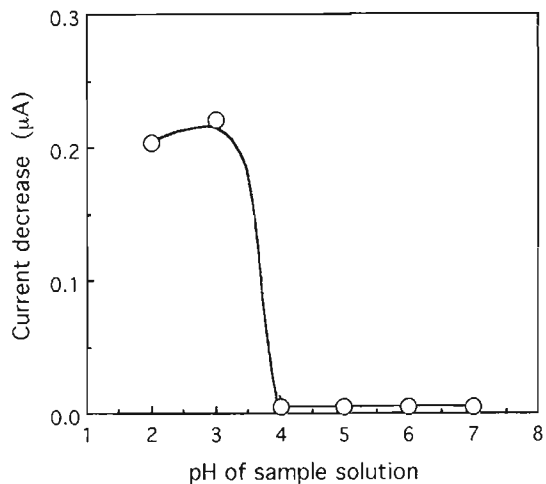


Fig. 2. Effect of pH of sample solution on microbial sensor response.

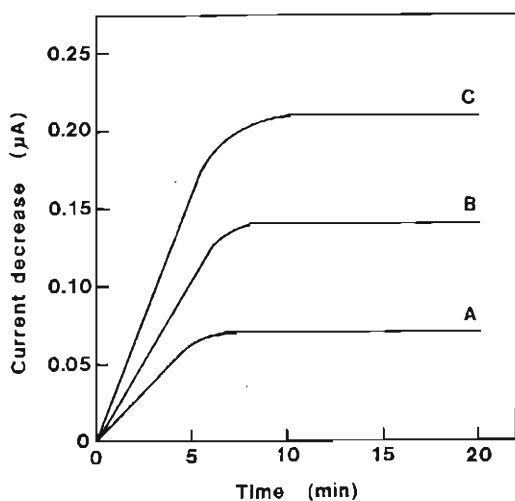


Fig. 3. Response curves of microbial sensor for sodium acetate. Sodium acetate concentrations: A, 25mg/l; B, 50mg/l; C, 75mg/l.

フルクトースなどの糖類、エステル類、フェノール類、アセトアルデヒド、及び酸化防止剤として添加されている亜硫酸に対しては全く応答しなかった。また、検討した有機酸のうち、蟻酸と α -ケトグルタル酸には全く応答しなかった。これに対し、ワイン中の主要な有機酸である酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、酢酸、コハク酸、乳酸、ピルビン酸及びアミノ酸の一つであるアルギニンに対しては良好な応答性が得られた。

以上の結果より、*P. alcaligenes*がワイン中の多量成分であるアルコール類や糖類を酸化せず、主として有機酸を酸化することが明らかになった。このとき、酸素消費を伴うことが、酸素電極の応答より確認された。このことから、測定の基本原理にもとづき微生物センサを構築できることが示唆された。しかし、*P. alcaligenes*が揮発酸以外の有機酸及び一部のアミノ酸をも資化することから、微生物センサにガス透過性膜を装着し、揮発酸を選択的に分離する必要があることがわかった。

4. 揮発酸に対する微生物センサの応答に及ぼすpHの影響

ワイン中の主要な揮発酸である酢酸を標準試料として以下の実験を行った⁹⁾。酢酸の溶液中での存在形態はpHの影響を受け、低pHになるほどイオンとして存在する酢酸が減り、ガス状(揮発性)の酢酸が増大する。種々のpHにおける酢酸の状態変化

は、Henderson-Hasselbalchの式($\text{pH} = \text{pK}_a + \log[\text{CH}_3\text{COO}^-]/[\text{CH}_3\text{COOH}]$)¹⁰⁾に酢酸の解離定数($\text{pK}_a = 4.74$)を代入し、求めることができる。通常のワインのpHである3.5において、酢酸はその90%がガス状態で存在することが式より計算できる。このように酢酸の気化状態がpHによって異なることから、ガス透過性膜を装着した微生物センサの感度は、試料液のpHに大きく影響されると考えられる。酢酸ナトリウム溶液のpHを2.0~7.0に調整し、センサの感度を試験したところ、溶液のpHが2.0とpH3.0の時に顕著な応答が得られた(Fig. 2)。よって、以後の測定試料のpHはすべて0.05M硫酸溶液を用いて3.0に調整した。

5. 揮発酸度測定の検量線

25, 50, 及び75mg/lの酢酸ナトリウム溶液(pH 3.0)に微生物センサを浸し、電流値の経時変化を追跡した。Fig. 3に示されるように電流値は徐々に低下し、測定を開始して6~10分後に定常状態に達した。酢酸ナトリウム濃度が0~100mg/lの試料液について同様の測定を行い、酢酸ナトリウム濃度と定常状態における電流減少値をプロットすると、酢酸ナトリウム濃度が80mg/l以下の範囲で直線関係が得られた(Fig. 4)。酢酸ナトリウムの濃度は、酢酸と酢酸ナトリウムの分子量比0.732を乗ずることによって、酢酸濃度に容易に変換することができる。以上の結果より、本微生物センサにより酢酸に代表される揮発酸度の測定が可能であることが示唆された。

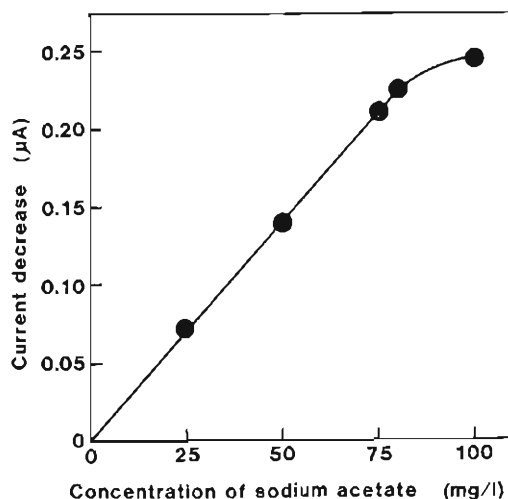


Fig. 4. Calibration curve for volatile acidity based on sodium acetate.

6. ワインの揮発酸度測定

微生物センサを用い、数種の市販ワインの揮発酸度を測定し、蒸留法及び酵素法の結果と比較した (Fig.5)。揮発酸度は酢酸換算値で表した。白ワインA (セミヨンと甲州のブレンド) において、蒸留による測定値は0.346g/lであったのに対し、センサ法では0.526g/lとなり、蒸留法よりも約1.5倍高くなった。酵素法で求めた酢酸濃度は0.136g/lで、蒸留法の約40%あった。白ワインB (甲州とデラウェアのブレンド) においても同様の傾向が認められ、各方法で得られた分析値を比較すると、酵素法:蒸留法:センサ法=0.4~0.5:1.0:1.5~1.6となることがわかった。赤ワインC (マスカット・ベリーA) 及び赤ワインD (マスカット・ベリーAとコンコードのブレンド) の場合は、分析法による値の比率は、酵素法:蒸留法:センサ法=0.5~0.6:1.0:1.5~1.6となった。ワイン中には主体となる酢酸以外にも、蟻酸、イソブチル酸、プロピオン酸等の揮発酸が含まれており、蒸留法ではこれらすべての揮発酸が検出され酢酸濃度に換算される。このため蒸留法の分析値は、純粋に酢酸濃度だ

けを測定する酵素法の分析値よりも大きくなったと考えられる。センサ法もガス透過性膜を透過する揮発酸に反応することから、酵素法に比べて高い分析値が得られたと考えられる。さらに、亜硫酸や二酸化炭素などのガス成分によって酸素分圧が低下し、測定誤差を生じた可能性も考えられる。しかし、ワインの種類に関わりなく、センサ法の分析値は蒸留法で得られる値の1.5~1.6倍で感度が高く、常に安定しており、比例性もあることから、微生物センサによりワイン中の揮発酸度を相対的に評価することが可能であると思われる。

微生物センサによる測定では、必要試料量がワイン原液で0.3ml、測定時間が1試料当たり約15分であることから、蒸留法にくらべて簡便・迅速であることが示された。また、同一の試料を10回測定したときの相対標準偏差は、センサ法1.65%、蒸留法1.96%であり、センサ法は優れた再現性を示した。

以上の結果、この微生物センサは蒸留法に代わる揮発酸度測定法として、ワインの品質管理に応用できるものと考えられる。

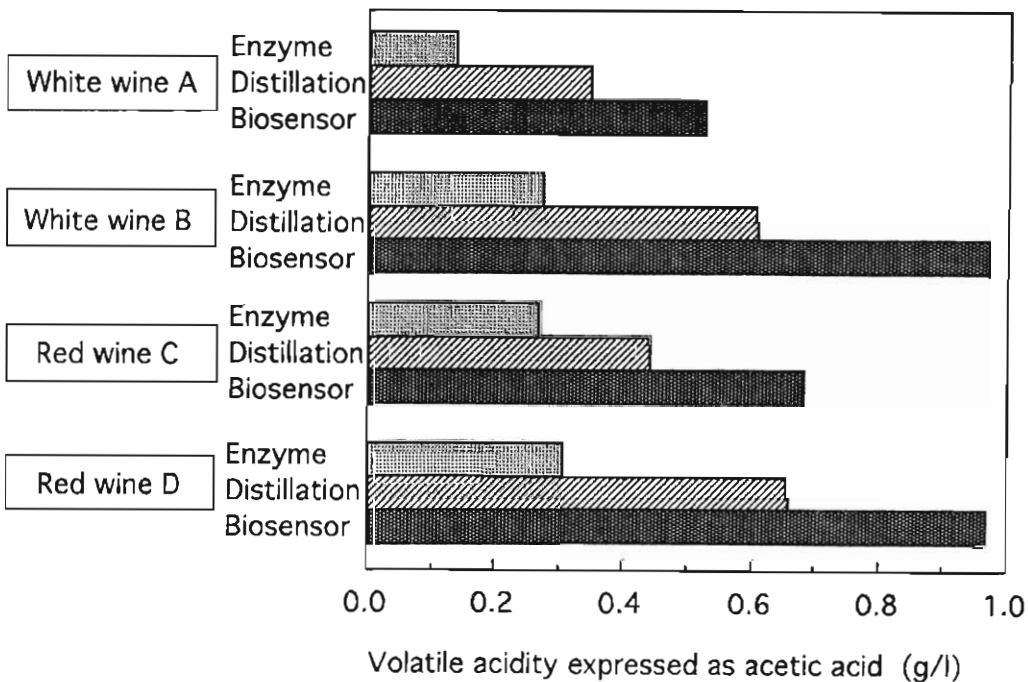


Fig. 5. Comparison of the results of volatile acid analysis in wine samples by the three methods.

要 約

ワイン中の揮発酸度を測定する微生物センサを製作した。この微生物センサは、アセチルセルロース膜で固定化した *Pseudomonas alcaligenes* と酸素電極及びガス透過性膜からなっている。*P. alcaligenes* はワイナリーの土壌から分離した菌で、ワイン中に含まれる主な有機酸を資化する。*P. alcaligenes* は酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸等の揮発酸以外の有機酸に対しても資化性を示したが、ガス透過性膜により揮発酸だけが分離されるため、微生物センサは揮発酸に対して選択的な応答性を示した。糖およびエタノールは、微生物センサの応答に影響を及ぼさなかった。測定系において微生物センサの定常電流値は6~10分で得られた。揮発酸の標準物質である酢酸ナトリウム濃度と電流減少値の間には、80mg/l以下の範囲で直線関係が得られた。センサで測定したワインの揮発酸度は、醸造分析法(A.O.A.C.法)である蒸留法に比べて1.5~1.6倍大きくなったが、微生物センサの測定値は蒸留法の値に比例していた。また、測定の再現性も高いことから(相対標準偏差1.65%)、本微生物センサによりワインの揮発酸度が相対的に評価できることが明らかとなった。さらに、1回の測定に必要な時間は約15分、試料量はワイン原液で0.3mlであり、蒸留法に比べて迅速かつ経済的な測定が可能であった。

文 献

- (1) Amerine, M.A., Ough, C.S.: *Methods for Analysis of Musts and Wines*, pp.48-50,

- John Wiley & Sons, New York (1980).
 (2) Amerine, M.A., Berg, H.W., Cruess, W.V.: *The Technology of Wine Making*, 3rd. ed., pp.577-599, The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut (1972).
 (3) Chichilo, P., Clifford, P.A., Reynolds, H.: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists* 10th ed., ed. W. Horwitz, p.174, Assoc. Off. Agric. Chemists, Washington (1965).
 (4) Nakamura, K., Amano, Y., Nakayama, O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 351-354 (1989).
 (5) Mason, M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 173-175 (1983).
 (6) Matsumoto, K., Naotsuka, M., Shirasaka, Y., Nomura, T., Osajima, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2749-2753 (1982).
 (7) Nomura, M., Sakaguchi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1, 77-98 (1955).
 (8) Palleroni, N.J.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1*, eds. N.R. Krieg, J. H. Holt, pp.141-183, Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
 (9) 大塚謙一編著:新版醸造成分一覽 pp.298-305, 日本醸造協会 (1977).
 (10) Conn, E.E., Stumpf, P.K., Bruening, G., Doi, R.H.: *Outline of Biochemistry*, 5th. ed., pp.15-20, John Wiley & Sons, New York (1987).