

柿ワインの亜硫酸分析

立本 行江^{*1)}， 都築 正男^{*1)}

Analysis of Sulfur Dioxide in Persimmon Wine

TATSUMOTO Yukie ^{*1)}， TSUDUKI Masao ^{*1)}

産官学共同研究で進める県産富有柿を用いた柿ワインについて、保管に必要な亜硫酸の追加添加量を把握するため、瓶充填前の柿ワインに濃度を変えて亜硫酸を添加し、遊離型亜硫酸の残存量の推移を確認した。

亜硫酸 200 mg/kg 以上の添加で、抗酸化や抗菌のために必要な遊離型亜硫酸量を約 1 か月間確認し、その後は結合型亜硫酸が時間経過で減少していくことが判明した。柿ワインの亜硫酸測定は含有成分等の影響で誤差が生じることから、ランキン法¹⁾での測定が必須であり、必要に応じ製造工程中の含量把握を行うことが求められる。

1. 緒言

平成 28 年 9 月に奈良県と近畿大学で包括連携協定を結び、「県産農・畜・水産物のブランド化」の取り組みを実施している。柿は全国第 2 位の生産量を誇るものの生食用販売に向かないものの多くは干し柿などの加工食品に利用されるのみであった。そのためその有効活用を目的に、若い世代の好みを取り入れた新たな付加価値を有する県産オリジナル柿ワインの研究開発事業が進められた。大学が柿ワインの製造研究を行い、酒類販売業者が A ワイナリーに製造を委託した。

通例ワインの製造において、亜硫酸は、酸化による品質劣化の回避や有害な微生物を抑制し、汚染を防ぐ目的に使用される食品添加物である。亜硫酸は製造工程の原料調整時に使用され、瓶充填前に遊離型亜硫酸が 20～40 mg/kg になるように添加調製される。^{2,3)}

A ワイナリーで柿ワイン製造時に亜硫酸を添加し、ろ過・搾汁後、瓶充填前に自動分析滴定装置（以下、リッパ一法¹⁾）で亜硫酸を測定したところ、添加量より多い遊離型亜硫酸値を示したことから、当センターへ通気・蒸留滴定法（以下、ランキン法¹⁾）による測定依頼があった。ランキン法で分析したところ遊離型亜硫酸は検出されず結合型亜硫酸のみ測定された。比較として当センターにおいてもリッパ一法で測定を行うと、遊離型亜硫酸と総亜硫酸が高値を示したことから、ランキン法とリッパ一法に相関性はないことが確認された。

A ワイナリーはこの結果からさらなる検証を行うため、充填前の柿ワインに (A) 20 mg/kg と (B) 40 mg/kg を添加

した検体を作成し、再度検査を依頼した。その結果、添加した次の日の検査結果は、(A)、(B) とも遊離型亜硫酸は検出されないことから、柿ワインへ 40 mg/kg までの追加亜硫酸量では十分な遊離型亜硫酸が確認できないことが判明した。過去に柿ワインの貯蔵試験で亜硫酸の検証を行った報告⁴⁾では遊離型亜硫酸は 6 か月間確認できたが、今回は短期間で確認ができない状態になった。ブドウワインの亜硫酸分析報告は多いが、柿ワインの亜硫酸分析報告はほとんどない。今回、柿ワインの保管に必要な亜硫酸の追加添加量を把握するため、濃度を変えて亜硫酸を添加し、遊離型亜硫酸の残存量の推移を検証したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

奈良県産富有柿（冷凍）を用いて、2021 年 11 月の製造中に 200 mg/kg 亜硫酸を添加し（図 1 ①）、瓶充填前の 2022 年 1 月に (A) 20 mg/kg、(B) 40 mg/kg の亜硫酸を追加添加（図 1 ②）した柿ワインを使用した。

(A)、(B) とも外観は薄いオレンジ色でやや酸味のあるワイン臭であった。成分値は表 1 のとおり。

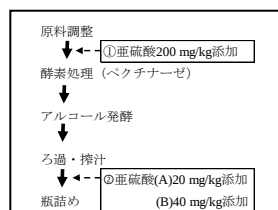


図 1 柿ワイン製造工程



図 2 柿ワイン

^{*1)} バイオ・食品グループ

表 1 供試柿ワインの成分

mg/kg	pH	酸度	アルコール %	Brix %	可溶性ポリフェノール mg/100mL
(A) 20	3.69	12	10.9	6.7	69.0
(B) 40	3.83	11.6	11	6.7	74.8

2.2 試薬

ピロ亜硫酸カリウム（キンダ化学株）、ペクチン（ナカライテスク社）、タンニン酸（富士フィルム和光純薬株）は食品添加物、30%過酸化水素水、リン酸は試薬特級を使用した。

2.3 分析方法

亜硫酸は酒類総合研究所標準分析法、通気・蒸留滴定法（ランキン法）及びワイン用亜硫酸測定器 HI84500（リッパー法）（ハンナ・インスツルメンツ社製）で測定した。色調は SYNERGY HTX（Bio Tek 社製）で吸光度を測定。pH はガラス電極 pH メータ HS-30S（東亜電波工業株製）、Brix はデジタル糖度計 PR-100（ATAGO 社製）、アルコール度は簡易アルコール分析器 AL-2 型アルコメイト（理研計器社製）、タンニンは酒石酸鉄比色法¹⁾及び可溶性ポリフェノールはフォーリン・デニス法で測定した。

2.4 亜硫酸添加条件

以下の条件で遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸の経時変化をランキン法で測定した。なお、温度による遊離型亜硫酸濃度の測定値の違い⁵⁾が発生しないよう、測定時の温度は 15℃～17℃とした。

- また、過去の報告⁴⁾を参考に 430nm の色調と pH, Brix, 可溶性ポリフェノールを測定した。
- (1) (A) 20 mg/kg, (B) 40 mg/kg 亜硫酸添加柿ワインに、それぞれ 100 mg/kg, 200 mg/kg の亜硫酸を添加。(表 2)
 - (2) 亜硫酸添加 4 時間後、1 日後、3 日後、1 週間毎（4 週間まで）、1 か月毎（3 か月まで）測定。
 - (3) 貯蔵条件は 5℃
 - (4) 貯蔵容器は、製品と同じ透明瓶を使用し金属栓で密封。
 - (5) 亜硫酸添加直後の比較として、(A)20 mg/kg に高濃度になる亜硫酸 350 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg を添加し 1 日後、1 か月後を測定。

表 2 亜硫酸添加条件

製造工程添加		(単位 mg/kg)
①原料調整	②瓶詰め前	亜硫酸添加
200	(A) 20	100
		200
	(B) 40	100
		200

2.5 柿成分による亜硫酸への影響

柿ワインの原料である富有柿の含有成分の影響を調べるため、富有柿に特徴的な成分であるペクチン、タンニンを用いて亜硫酸への影響を確認した。

(1) ペクチン（多糖類）

富有柿の可溶性ペクチン量である 243 mg/100 g⁶⁾の水溶液に亜硫酸を 100 mg/kg, 200 mg/kg 添加し、1 日後の遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸を測定した。

(2) タンニン

柿ワイン (A) 20 mg/kg (B) 40 mg/kg のタンニン量を酒石酸鉄比色法で測定した。また、富有柿（成熟 11 月頃）の可溶性タンニン濃度 0.1 %⁷⁾とした水溶液に亜硫酸を 100 mg/kg, 200 mg/kg, 添加し、1 日後の遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸を測定した。

3. 結果と考察

3.1 亜硫酸添加直後の変化

(独) 酒類総合研究所からの情報より、ワインに亜硫酸を添加後、2～4 時間で遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸になるとのことから、添加 4 時間後（表 3）と、1 日後の亜硫酸濃度を示す（表 4）。

4 時間後には遊離型亜硫酸は、添加した 100 mg/kg の約 16～25 %、200 mg/kg の約 25 %の濃度となった。結合型亜硫酸は添加前に含まれる濃度を除外して考えると 100 mg/kg の 38～45 %、200 mg/kg で 27～38 %の濃度となった。

添加量のすべてが遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸にはならず、さらに遊離型亜硫酸は結合型亜硫酸より濃度が少なくなり、添加後すぐに柿ワイン中の成分の影響で減少することが考えられた。

白ワインに発酵前に 200 mg/kg 添加し、残存する遊離型亜硫酸量は添加後 18 時間後でも、約 40 %残存する²⁾報告があるが、柿ワインではそれより早い時間で低い濃度になった。

1 日経過後の結果（表 4）から、遊離型亜硫酸が添加 4 時間後より更に減少したため、柿ワインは遊離型亜硫酸の減少速度が速いことが示された。この結果より遊離型亜硫酸を 20～40 mg/kg になるように添加調製するためには、200 mg/kg の添加が必要と考えられた。

3.2 亜硫酸添加量の色調変化

亜硫酸添加によるワインの色調変化について、200 mg/kg までの添加では影響は見られなかったが、高濃度の 350

mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg で、やや淡色化し変化が見られた。(表4)

表3 亜硫酸添加4時間後の亜硫酸濃度

(単位 mg/kg)			
	添加濃度	遊離型亜硫酸	結合型亜硫酸
(A)20mg/kg	添加前	0	41.1
	100mg/kg	15.8	86.9
	200mg/kg	48.2	94.1
	添加前	0	61.7
(B)40mg/kg	100mg/kg	27.7	99.6
	200mg/kg	56.9	138.3

表4 亜硫酸添加1日後の亜硫酸濃度と色調変化

	添加濃度	遊離型亜硫酸 mg/kg	結合型亜硫酸 mg/kg	430nmO.D.
(A)20mg/kg	添加前	0	41.1	0.20
	100mg/kg	19.8	86.9	0.199
	200mg/kg	35.6	120.9	0.212
	350mg/kg	90.1	204.7	0.196
	500mg/kg	96.4	211.8	0.201
	1000mg/kg	248.2	345.4	0.194
(B)40mg/kg	添加前	0	61.7	0.196
	100mg/kg	14.2	111.5	0.216
	200mg/kg	36.4	137.5	0.217

3.3 貯蔵中の経時変化

貯蔵中の亜硫酸、色調等の変化を表5、図3～5に示す。

(1) 亜硫酸

全ての添加条件で遊離型亜硫酸は保管時間とともに減少し、(A)、(B)とも100 mg/kg 添加では1か月で遊離型亜硫酸を確認できなくなった。200 mg/kg 添加では添加後1日で、添加4時間後の濃度の(A)は73%、

(B)は64%まで減少した。その後横ばいで徐々に減少し、1か月経過以降も遊離型亜硫酸は10 mg/kg 以上を維持していたが3か月経過で確認ができなくなった。

一方、結合型亜硫酸は100 mg/kg, 200 mg/kg の添加では、添加後1週間は減少傾向が見られたが、2週目から3週目にかけ徐々に増加に転じ、1か月経過以降、再び減少する傾向が見られた。

今回の結果から、亜硫酸を200 mg/kg 追加添加し、次の日には瓶充填を行うことで、ワイン関連微生物に対して抗菌活性を示す十分な遊離型亜硫酸濃度を1か月以上得ることができると考えられた。

ただし、酸化防止等のために必要な濃度の遊離型亜硫酸を維持することは重要であるが、一方で高すぎる遊離型亜硫酸は、ワイン飲用時に独特の刺激臭として認識されるため、官能面からの考慮が必要であること³⁾と、食品衛生法上の規制値 350 mg/kg⁸⁾を踏まえて亜硫酸を添加する必要があるため、必要に応じた工程の検査を行うことが奨められる。

表5 貯蔵中の亜硫酸の経時変化
(上表 遊離型亜硫酸 下表 結合型亜硫酸)

(単位 mg/kg)						
遊離型亜硫酸				(B)40		
添加濃度	添加前	100	200	添加前	100	200
4時間	0.0	15.8	48.2	0.0	27.7	56.9
1日	0.0	19.8	35.6	0.0	14.2	36.4
3日	0.0	11.9	19.0	0.0	12.6	30.0
1週	0.0	7.1	19.0	0.0	11.1	28.5
2週	0.0	5.5	15.0	0.0	14.2	28.5
3週	0.0	3.2	17.4	0.0	14.2	26.9
1か月	0.0	0.0	15.8	0.0	0.0	23.7
2か月	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3か月	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(単位 mg/kg)						
結合型亜硫酸				(B)40		
添加濃度	添加前	100	200	添加前	100	200
4時間	41.1	86.9	94.1	61.7	99.6	138.3
1日	41.1	86.9	120.9	61.7	111.5	137.5
3日	39.5	59.3	95.6	61.7	99.6	140.7
1週	33.2	64.8	92.5	58.5	94.1	141.5
2週	37.1	88.5	126.5	38.7	101.2	147.0
3週	31.6	85.4	128.0	44.3	113.8	153.3
1か月	27.1	58.5	118.6	39.5	94.8	142.3
2か月	7.9	49.0	50.6	15.8	79.0	121.7
3か月	0.0	39.5	44.3	7.9	71.1	118.6

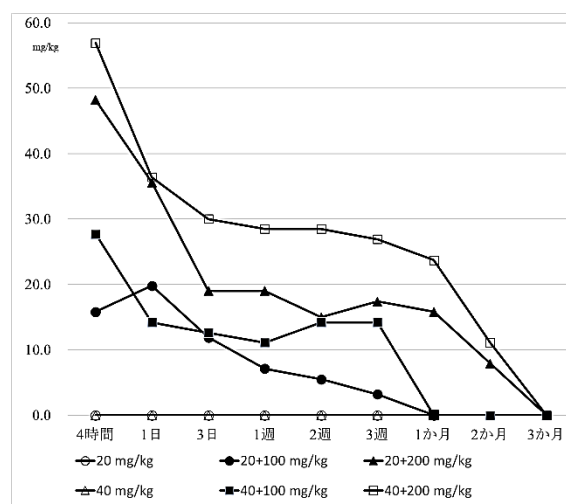


図3 遊離型亜硫酸の経時変化

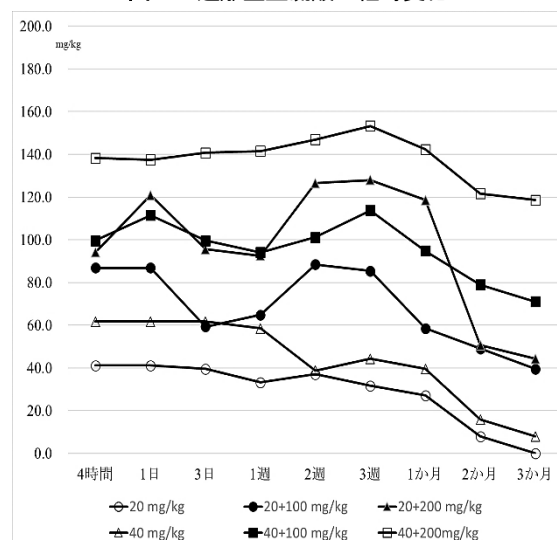


図4 結合型亜硫酸の経時変化

(2) 色調, Brix, pH, 可溶性ポリフェノール

柿ワインの色調変化については、若干程度の差はあるものの同じような動向を示した。430 nm O.D. 値を比較した場合、亜硫酸の添加濃度にかかわらず2週間目で濃化が進みさらに、1 か月以降で更に濃化が進んだ(図 5)。既報³⁾では3~6 か月間で急激な濃化が進むとあったが、今回の柿ワインではそれよりも早く着色が進む結果となった。また、100 mg/kg 添加では2週間目の濃化が顕著に進んだが、200 mg/kg では3 か月にわたり緩やかに濃化が進んだ。

果汁の酸化はポリフェノールオキシダーゼの酵素反応で起こるためワインの酸化よりずっと速く進むが、亜硫酸はポリフェノールオキシダーゼ活性を阻害する作用があるため、果汁の酸化を防ぐことができる。表 4 で過剰な亜硫酸を添加した検体の着色が低いのはその理由と考えられる。

糖分 (Brix) と pH については、添加後1日と1か月後を比較したところ、添加濃度にかかわらず変化はなかった。可溶性ポリフェノールは100 mg/kg の添加で、1 か月後に減少傾向が見られたが200 mg/kg 以上の添加では増加傾向が見られ、亜硫酸添加濃度が増加すると、可溶性ポリフェノールの増加が示された(表 6)。

以上の結果から糖と pH は亜硫酸の増減に影響がないと考えられ、可溶性ポリフェノールの成分が亜硫酸に影響すると考えられた。

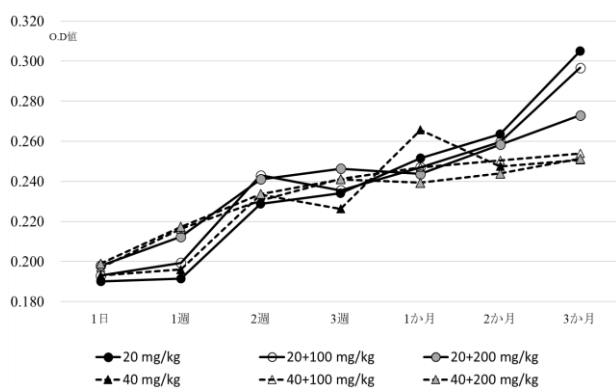


図 5 430 nm O.D. 色調の経時変化

3.4 ペクチン, タンニンの影響

(1) ペクチン

富有柿に含まれるペクチン濃度の水溶液に亜硫酸を添加し、ランキン法で測定した。結果を表 7 に示す。

添加量の半分が遊離型亜硫酸となり、結合型亜硫酸はほぼ検出されなかった。ペクチンは遊離型亜硫酸に影響せず、結合型亜硫酸になるのを阻害することが明らかになった。

表 7 ペクチン水溶液の亜硫酸濃度

添加濃度	(単位 mg/kg)	
	遊離型亜硫酸	結合型亜硫酸
100	52.2	1.6
200	129.6	3.2

(2) タンニン

タンニン酸 0.1% 水溶液に、亜硫酸を添加し、ランキン法で測定した。結果を表 8 に示す。

添加量の 8 割が遊離型亜硫酸となり結合型亜硫酸は検出されなかった。

タンニンは結合型亜硫酸となると考えられるが²⁾、富有柿に含有するタンニン量は、結合型亜硫酸として、検出が判断できないほど含有量が少ないと考えられた。

表 8 タンニン水溶液の亜硫酸濃度

添加濃度	(単位 mg/kg)	
	遊離型亜硫酸	結合型亜硫酸
100	83.8	0.0
200	172.3	0.0

柿ワイン中のタンニン含有を確認するため、酒石酸鉄比色法で (A), (B) を測定したところ、タンニン量を測定できなかったことから、柿ワイン中にタンニンが含有されないことが考えられた。一方、可溶性ポリフェノールをフォーリン・デニス法で測定した結果(表 1), (A) は 69.0 mg/100 g, (B) は 74.8 mg/100 g であることから、タンニン以外の可溶性ポリフェノールが多く含まれることが確認できたことから、ポリフェノール類が亜硫酸が減少する要因の一つと考えられた。

表 6 亜硫酸添加1日後と1か月後の亜硫酸濃度, Brix, pH, 可溶性ポリフェノール含有量

		遊離型亜硫酸 mg/kg		結合型亜硫酸 mg/kg		Brix %		pH		可溶性ポリフェノール mg/kg	
添加濃度 mg/kg		1日後	1か月後	1日後	1か月後	1日後	1か月後	1日後	1か月後	1日後	1か月後
(A)20 mg/kg	添加前	0.0	0.0	41.1	27.1	6.7	6.6	3.69	3.68	69.0	67.7
	100	19.8	0.0	86.9	58.5	6.7	6.6	3.66	3.65	66.4	57.9
	200	35.6	15.8	120.9	118.6	6.6	6.6	3.67	3.65	63.7	66.0
	350	90.1	31.6	204.7	123.3	6.6	6.6	3.68	3.70	51.4	62.1
	500	96.4	44.3	211.8	167.6	6.6	6.6	3.67	3.69	52.4	56.1
	1000	248.2	56.9	345.4	221.3	6.4	6.5	3.7	3.69	48.5	54.0

3.5 亜硫酸測定方法の違い

柿ワインのランキン法とリップー法の測定結果を、表 9 に示す。

結果より、リップー法では遊離型亜硫酸、結合型亜硫酸ともランキン法より含有量が高い値となった。また測定によっては定量上限以上の測定値になる場合があった。リップー法は反応液を強酸性にしてフェノール化合物による還元を抑制しているが、タンニンなどのフェノール化合物を多く含むものは、抑制は完全ではなく測定値が高く測定される報告⁹⁾のとおり結果となった。

また、リップー法の分析機器は、ブドウワインの亜硫酸測定分析専用であり、それ以外の果実酒やタンニン、ビタミンCを多く含む場合は測定値に誤差が出ると使用上の注意に記載されているものの、実際にはブドウ以外の果実酒にも使用されている。しかし、柿ワインなどブドウ以外の果実酒の場合は、原料果実成分の影響を踏まえ、ランキン法での確認が重要であることが示された。

表 9 ランキン法及びリップー法の亜硫酸測定結果

添加濃度 mg/kg	ランキン法		リップー法	
	遊離型亜硫酸	結合型亜硫酸	遊離型亜硫酸	結合型亜硫酸
添加前	0.0	7.9	72.0	14.0
(A) 20	0.0	41.1	90.0	45.0
(B) 40	0.0	61.7	94.0	86.0

今回の検証ではペクチン、タンニンによる影響はないことが判明したものの、甘柿には他にも縮合型タンニンであるロイコシアニジンが多く⁷⁾柿ワインの中に含まれる、タンパク質、アントシアニンを含む色素やポリフェノールなど様々な成分が亜硫酸の遊離型、結合型に影響していると考えられ、引き続き、柿ワインのより良い製造検証を進める際に、影響成分の特定や亜硫酸含量の検討が必要と考える。

4. 結言

本研究での主な結果は次のとおりである。

- (1) 県産富有柿を用いた柿ワインの製造で、瓶充填前に亜硫酸を追加する場合、遊離型亜硫酸を 20～40 mg/kg の濃度で保存維持するには、200 mg/kg 以上追加が必要であることが判明した。
- (2) 色調は、亜硫酸濃度が異なっても 200 mg/kg 添加までは同様の増加傾向を示し、2 週間経過後から着色が徐々に進んだ。
- (3) 遊離型亜硫酸が減少する理由の一つとして、柿ワイン中のペクチンやタンニンではなく、可溶性のポリフェノール類など、他の成分による影響が想定された。

- (4) 柿ワインの亜硫酸測定は含有成分等の影響で誤差が大きく生じるため、ランキン法での測定が必須であり、必要に応じ製造工程中の含量把握が求められる。

謝辞

本研究にあたり、検体を提供いただいた関係各位に感謝いたします。

参考文献

- 1) 酒類総合研究所標準分析法註解，標準分析法註解編集委員会編，公益財団法人日本醸造協会 95-102, 2017
- 2) Yair Margalit, Ph. D. ワイン製造の基本 小規模ワイナリーのための製造技術，独立行政法人酒類総合研究所，2021
- 3) 新ワイン学，株式会社ガイアブックス，2020
- 4) 川西祐成，山中信介，松澤一幸，柿を原料とした果実酒の製造に関する研究（第3報）-柿ワインの貯蔵試験-，奈良県工業試験場研究報告，No.13, 21-23, 1987
- 5) 後藤奈美，上用みどり，沼田美子代，神本真紀，小山和哉，ワインの亜硫酸分析 遊離型亜硫酸分析に及ぼす温度の影響並びにリップー法における検体の希釈の影響，日本ブドウ・ワイン学会誌，Vol26(3), 127-132, 2015
- 6) 石丸恵，茶珍和雄，和田安規，上田悦範，平核無と富有カキ果実のペクチン質およびヘミセルロースの変化と軟化との関係，日本食品保蔵科学会誌，Vol28 (3), 119-125, 2002
- 7) 稲荷妙子，友枝幹夫，柿の脱渋に関する一考察（第2報）タンニンの不溶化及びそれに関与する酵素活性の変動，日本家政学会誌，Vol43(4), 271-276, 1992
- 8) 食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年厚生省告示第 370 号
- 9) 後藤奈美，ワイン醸造の基礎 - 亜硫酸の話 -，Sake Utsuwa Research/08V，きた産業株式会社