

## 5.2.1 (2) 醸造

### 【実験方法】

1. ブドウ果房を約 400 g 量り取り、除梗した後、果粒をよく水洗いする。
2. さらし布中で潰砕し、果汁を搾る。果汁の体積を測定後、500 ml 容コニカルフラスコに移し、アルミホイルでふたをする。
3. メタ重亜硫酸カリウム ( $K_2S_2O_5$ ) を果汁 100 ml あたり 15 mg ( $SO_2$  として約 100 ppm) 添加し、攪拌・溶解後、糖度及び pH の測定を行う。
4. ショ糖を加えて糖度 24% に調整する (補糖)。
5. 5.2.1. (1) で調製した酒母を全量移植する。
6. 18°C で 5 ~ 10 日間静置培養を行う。発酵中の様子を毎日観察・記録し、糖度と pH も毎日測定する。
7. 糖度 (3 ~ 5 度) や酸味、官能試験などにより発酵を終了する。
8. メタ重亜硫酸カリウムを 100 ml あたり 15 mg 添加する (あるいは添加しなくてもよい)。
9. 8,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清を得る。
10. 5.3.1. 酵素法によるアルコール濃度の簡略測定法に従い、アルコール濃度の測定を行う。
11. 4 ~ 10°C で 5 ~ 10 日間冷蔵保存する。
12. 5.3.2. 酵素法によるアルコール濃度の精密測定法に従い、アルコール濃度の正確な測定を行う。
13. 官能試験を行う。

### 参考文献

- (19) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 154  
(20) 京都大学農学部農芸化学科編 “農芸化学実験書” 第 2 巻、産業図書、1957、pp. 791

## 5.3. アルコール濃度の定量

### 5.3.1. 酵素法によるアルコール濃度の簡略測定法

alcohol dehydrogenase (ADH) と  $NAD^+$  の存在下で、発酵液中の alcohol を aldehyde に酸化する。ここに、PMS (phenazine methosulfate) を加えると、これが酸化によって生成した  $NADH$  により還元される。還元型 PMS を発色試薬 NTB (nitrotetrazorium blue) で酸化すると、液が青紫色に発色する。濃度既知の alcohol を幾種類か用いて同様の処理を施し、これらをスタンダードとして濃度未知の発酵液の液色と比較して濃度を予測する。

### 【測定原理】



### 【試薬】

以下の試薬を当番が調製する。

- |  |         |
|--|---------|
| (A) 1% (v/v) ethanol 水溶液                               | 1,000ml |
| (B) 100 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 (1% (w/v) Triton X-100 含有)    | 1,000ml |
| (C) 0.4% (w/v) $NAD^+$ 水溶液                             | 30ml    |
| (D) 10 units/ml ADH 溶液 (in 100 mM リン酸緩衝液 pH7.5)        | 30ml    |
| (E) 0.01% (w/v) PMS + 0.1% (w/v) NTB 水溶液 (アルミホイルで遮光する) | 30ml    |

### 【実験方法】

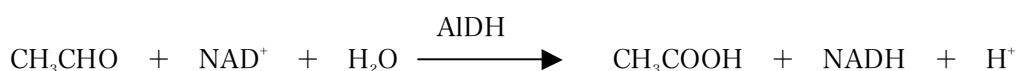
1. イノムアッセイ用マイクロプレート を 4 人に 1 枚用意する。
2. 試薬 (A) より調製した 0.1、0.05、0.02、0.01、0.005、0% (v/v) ethanol 標準液及び脱塩水で 100 倍と 1000 倍に希釈した発酵液 (ワイン・清酒) を 100  $\mu$ l ずつマイクロプレートの穴に入れる。
3. 標準液及び試料の入った各穴に、試薬 (B) 100  $\mu$ l、(C) 20  $\mu$ l、(D) 20  $\mu$ l を順に加え、軽く攪拌する。
4. 室温で約 5 分間放置する。
5. 試薬 (E) 20  $\mu$ l を加え、発色させる。
6. スタンダードの色の濃さと比較して、試料中のおおよその ethanol 濃度を推定する。

### 5.3.2. 酵素法によるアルコール濃度の精密測定法

清酒・ワイン中のアルコール濃度を、alcohol dehydrogenase (ADH)および aldehyde dehydrogenase (AIDH)を用いて酵素的に定量する。

#### 【測定原理】

試料中に含まれる ethanol を ADH および AIDH による酸化反応により下式に示すように acetic acid に完全に変換する。このとき、ethanol の 2 倍量の NADH が生成するので、NADH の濃度を分光学的に測定して ethanol の濃度を計算する。NADH は 340 nm において吸収があるのに対して NAD<sup>+</sup>は吸収がないことから、この波長における吸光度を測定することで測定が可能となる。



#### 【実験方法】

1. 試料を蒸留水で希釈し、エタノール濃度が 0.005~0.06 g/l の範囲になるように調整する（清酒・ワインの場合 10,000~30,000 倍が適当）。
2. 希釈試料 0.1 ml を吸光度測定用のセルに直接採取する。
3. F-キットエタノールの溶液 II（別途配布）を 3 ml 加え、混和する。
4. 室温にて約 3 分後、340 nm における吸光度 ( $E_1$ ) を測定する。
5. 同じセルに F-キットエタノールの溶液 III（別途配布）を 0.05 ml を加え、混和する。
6. 反応終了後（約 5~10 分、吸光度の増加がなくなったとき）、340 nm における吸光度 ( $E_2$ ) を測定する。
7. ブランクとして、2.~6.の操作を蒸留水 0.1 ml に対しても行い、 $E_1$  および  $E_2$  を測定する。

#### 【計算方法】

ethanol 濃度は、次式により求める。

$$\text{ethanol (g/l)} = \frac{V \times \text{MW}}{\varepsilon \times d \times v \times 2 \times 10,000} \times \Delta E \times \text{希釈率}$$

$$\Delta E = (E_2 - E_1) \text{ 試料} - (E_2 - E_1) \text{ ブランク}$$

V (反応液量) : 3.15 ml

MW (分子量) : 46.07

d (光路長) : 1 cm

$\varepsilon$  (吸光係数) : 6.3 ( $1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

v (検体量) : 0.10 ml

従って、

$$\text{ethanol (g/l)} = \frac{3.15 \times 46.07}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 2 \times 10,000} \times \Delta E \times \text{希釈率} = 0.1152 \times \Delta E \times \text{希釈率}$$