

(訳注及び免責事項) この記事は、下記のサイトから、AWRI の同意を得て翻訳したものです。

https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/amorphous_deposits/

翻訳には細心の注意を払っていますが、完全性及び正確性を保証するものではありません。

THE AUSTRALIAN WINE RESEARCH INSTITUTE > SERVICES TO INDUSTRY > WINEMAKING > INSTABILITIES, HAZES AND DEPOSITS > HAZES AND DEPOSITS > AMORPHOUS DEPOSITS

AMORPHOUS DEPOSITS

非晶質の沈殿

非晶質 (アモルファス) とは、大まかにいうと、拡大しても特定の形状や形態を持たない粒子を指す。ワインに含まれる一般的な非晶質沈殿は次のとおり。

- ・ タンパク質
- ・ 多糖類
 - ・ キャラメル
- ・ 赤色色素
- ・ ポリフェノール
- ・ 金属混濁
 - ・ 銅
 - ・ 鉄

これらの組合せ、例えばタンパク質とフェノール類、タンパク質と多糖類、多糖類とタンニンの複合体もある。顕微鏡観察のみで、非晶質の混濁や沈殿が何であるかを判断することはできない。非晶質沈殿を特定するためには、まずその溶解度をテストする。ここでは、次にどの試験を行うかを定めるのに役立つ、いくつかの簡単な溶解度試験を紹介する。

非晶質沈殿の溶解性試験

試薬:

1. 0.1M 水酸化ナトリウム
2. 塩酸 (約 10%) 濃塩酸 (約 32%) : 冷蒸留水=1:2 (訳注:発熱するため、冷水を攪拌しながら徐々に塩酸を加える。逆は危険)

3. 50% v/v エタノール

遠心分離した少量の沈殿物を用いて、水酸化ナトリウムおよび塩酸溶液への溶解性を調べる。典型的なタンパク質の沈殿と一部のフェノール性の混濁は水酸化ナトリウムに溶解する。塩酸への溶解は、金属混濁または着色物質を示唆する(Anon 1984)。50% エタノールへの溶解は、ポリフェノール(色素とタンニン)の存在を示す。

タンパク質

タンパク混濁は、ワインに含まれる熱に不安定なブドウタンパク質によって生じ、ワインの温度が上がると徐々に変性して沈殿したり、多糖類やポリフェノールとの不溶性複合体を形成したりする。

沈殿が 0.1 M 水酸化ナトリウムに溶ける場合は、タンパク混濁の可能性が高い。沈殿中のタンパク質を確認するために、次の試験を行う。

タンパク質のニグロシン試験

試薬:

1. 0.1 M 水酸化ナトリウム
2. 染色液 125 mg のニグロシン (BDH) を、メタノール 483 mL、氷酢酸 86 mL、および蒸留水 431 mL の混合液に溶解する。
3. 脱色液 メタノール 50 mL、酢酸 10 mL、蒸留水 50 mL を混合する。

沈殿物を 0.1 M 水酸化ナトリウム(約 1~2 mL)に溶解し、その 1~2 滴を濾紙に垂らす。ヘアドライヤーを使って液体を蒸発させ、さらに 1~2 滴を垂らし、再度蒸発させる。沈殿の量に応じて、必要な溶液の量は増減させる。濾紙を小さなペトリ皿に置き、ニグロシン染色液を注ぐ。約 15 分後に溶液を捨て(溶液は再利用可)、ろ紙がほぼ白くなるまで脱色液に浸す。タンパク質は青みがかった灰色に染色される(Anon. 1984)。

赤外分光法を使用して、タンパク混濁を同定することもできる。ワインの熱安定性を確保するため、適量のベントナイトで滓下げすることにより、タンパク混濁を防ぐことができる。ワインの熱安定性試験に関する情報は、Measuring heat stability of wine https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/laboratory_methods/chemical/heat_stab/ (訳注:まとめサイトに和訳掲載)、および Protein stability, Fact Sheet, <https://www.awri.com.au/wp-content/uploads/2020/03/protein-stability-fact-sheet.pdf> を参照。タンパク質が検出されたら、位相差顕微鏡で沈殿を観察し、明るく光沢のある球体が観察された場合は、銅が含まれていないか確認することが望ましい。(金属混濁の項目を参照)。銅が含まれる場合は、銅/タンパク混濁が示唆される。

多糖類

多糖類はブドウ（ペクチンなど）や灰色カビに由来するとともに、発酵中および滓との接触中の酵母、また一部の細菌にも由来する。多糖類はワインにコロイド状の混濁を形成し、清澄や濾過を困難にすることがある。多糖類はアルコール溶液と混合するとゼラチン状の凝集体を形成するため、以下の簡単な試験で混濁中に多糖類が存在するかどうかを確認できる。

多糖類のアルコール沈殿試験

ワイン 10 mL を試験管入れ、96% v/v エタノール 5 mL を加え、よく混合する。白いフィラメント（繊維状のもの）ができた場合は、多糖類の存在を示す。

フィラメントは形成されないが、混合時に曇りを生じる場合は、次のより高感度の試験が望ましい。

ワイン 10 mL を 96% v/v エタノール 10 mL と混合、30 分間放置した後、遠心分離し、上清を捨てる。沈殿を 2 mL の水に再溶解し、1 mL 96% v/v エタノールを加える。フィラメントの形成は多糖類を示す。

カラメル

不安定なカラメルは、ブランデーの不安定性の主な原因の 1 つであり、色の調整のためにカラメルが添加されたスピリッツやワイン（訳注：日本では果実酒にカラメル等の色素を加えると甘味果実酒となる。）でも生じる場合がある。カラメルは、パストリゼーションされた甘口ワインに沈殿を生じさせることがある。カラメル色素が不安定になり、混濁や沈殿につながる主な原因は次のとおり。

1. 間違った種類のカラメルの使用（ワインにはワイン用を、ブランデーにはスピリット用のカラメルを使用する）。
2. 古いカラメルの使用。カラメルを冷暗所で保存した場合、最長の保存期間は 1~2 年。
3. 異なるメーカーまたは種類のカラメルを混ぜたり、異なるカラメルで着色された製品をブレンドしたりすること。
4. ワインやブランデーの成分との反応：
 - ① タンパク質（タンパク質性滓下げ剤からの過剰なタンパク質を含む）
 - ② カルシウム
 - ③ 鉄
 - ④ タンニンと木材抽出物。

カラメルを含む沈殿は通常、茶色から黒色を示す。沈殿にカラメルが疑われる場合は、次の炭水化物(二糖類および多糖類)の試験が推奨される。

固形分中の炭水化物(二糖類および多糖類)の存在を調べるスポットテスト

試薬:

1. 10%アニリン溶液 (in 10% 酢酸)
2. リン酸

沈殿を小型るつぼに入れる。リン酸を 1 滴加え、酢酸アニリン試薬(試薬 1)で湿らせたディスク状の濾紙でるつぼを覆う。次に、小さな時計皿を重石として上に置く。

次に、るつぼを、飛び散らないように注意しながら、小さなブンゼンバーナーで約 30 秒間穏やかに加熱する。ピンク～赤色が現れ、その色合いは存在する炭水化物の量に依存する(色が濃いほど、存在する炭水化物の量が多い)。この色は 5 分ほどで消える。

ポジティブコントロールとネガティブコントロール(例:ショ糖と塩化ナトリウム)を検体と同時に試験し、加熱時間を一定にすることが推奨される。

この試験(Feigl (1956))は、二糖類および多糖類が分解されてフルフラールまたはその誘導体になり、アニリンアセテートによって赤色を示す「シッフ塩基」が形成されることに基づく。

赤色色素

特に赤ワインに含まれる非晶質の沈殿のほとんどは着色している。赤ワインの色は、アントシアニンとして知られるフラボノイドフェノール化合物の一種である。LA 試薬への溶解性に基づく赤色色素の簡便な試験を以下に示す。

LA 試薬への溶解性に基づいた赤色色素試験

試薬:

1. LA 試薬 25 mL の濃塩酸を 500 mL の n-ブタノールに加える。

約 2 mL の LA 試薬を試験管または遠心管内の少量の沈殿に加え、沸騰水中に約 15 分間置く。溶解性と暗赤色の生成は、赤色色素の存在を示す。

ポリフェノール

ワイン中のフェノール化合物は、時間の経過とともに他のフェノール化合物と結合し、重合する可能性があります。ポリマーがあるサイズ以上になると、ワインに溶けなくなり、沈殿する。4 単位を超える鎖長を持つポリマーはタンニンとして知られている。溶液中で、タ

ンニンとはタンパク質と相互作用し、沈殿する可能性がある。タンニンは次 2 つのカテゴリに分類される。

1. 加水分解性タンニン – 没食子酸/エラグ酸と糖のコポリマー
2. 縮合タンニン – 主に C-C 結合で縮合されたフラバノイドのポリマー

以下は、ポリフェノールと縮合タンニンの確認試験である。

ポリフェノールとタンニンの試験

沈殿を時計皿にのせ、蒸留水で 1:10 に希釈した Folin-Ciocalteu 試薬（化学メーカーから入手可能）を 1 滴加える。

フェノール性重合物は溶解または一部溶解し、溶液は灰青色から濃青色を示す。

縮合タンニンのシアニジン試験

試薬:

1. メタノール
2. 塩酸（約 32% v/v）

沈殿を約 1 mL のメタノールで 2 回洗浄する。遠心分離後、1 mL のメタノールと 1 mL の塩酸（約 32% v/v）を加え、80°C で 30 分間加熱する。ピンク～赤色を呈する場合は、縮合タンニンの存在を示す。タンニンが加水分解されてシアニジンが生成され、赤みがかつた色を示す (Porter et al. 1986)。

金属混濁

ワインの混濁を起こす可能性のある主な金属は銅と鉄、場合によってはアルミニウムである。他の金属（錫、鉛、銀など）もワインの混濁を起こす可能性があるが、これらの金属がワイン中に微量以上存在することはほとんどない。

これらのあまり一般的ではない金属の不安定性についての詳細は、次を参照。

https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/other_metals/

銅

銅混濁は、最も一般的な金属混濁である。これは主に、他の要因が存在する場合、低い濃度の銅で混濁が生じるためである。

ワイン中の銅の含有量は、より高濃度な場合もあるが、通常は約 0.3 mg/L 以下である（現在のオーストラリアの食品法では、「飲料およびその他の液体食品」の最大値は 5 mg/kg

と規定されている)。AWRI は以前、銅の不安定性を避けるための妥当な最大「安全レベル」を 0.5mg/L と示したが、この濃度未満でも不安定性が観察されている。安定性は銅濃度だけでなく、ワインの組成や保管条件等の条件にも依存する。

銅の不安定性、または銅混濁と呼ばれる現象は主に白ワインに見られ、瓶詰め後しばらくしてから発生する。混濁は最初は細かい曇りとして観察され、その後オフホワイトから中程度の茶色の沈殿を形成することがある。銅混濁は通常、位相差顕微鏡で観察すると非晶質の粒状に見える。

銅はブドウ樹の微量栄養素であり、特定の酸化酵素の成分として微量必要である。土壌からブドウの果実に取り込まれるレベルを超えてワイン中に含まれる場合は、おそらく次の原因による。

1. おそらく大部分の銅混濁の原因は、硫化臭軽減のための硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) の添加である。硫酸銅の偶発的または誤った計算による添加も非常に多い。AWRI のワイン製造計算ツールを使用すると、正確な添加であることを確認できる。
2. ボルドー液 (硫酸銅を含む) やオキシ塩化銅などの銅を含むブドウ用農薬の残留は、散布量が間違っていた場合や、出荷前の最終散布時期が守られなかった場合、果汁中の高い銅濃度の原因となる。ただし、銅は酵母の滓と結合して沈殿する傾向があり、発酵後の銅の濃度は通常約 1.0 mg/L まで低下する。
3. ワインと、銅または真鍮 (銅+亜鉛) や青銅 (銅+約 3 分の 1 の錫) などの銅合金の保護されていない表面との接触。硫化水素を硫化銅として沈殿させて除去する作用があることも、この種の素材がワイナリーで長い間使用され続けられてきた理由と考えられる。真鍮の部品は、ワインの鉛の汚染源としても認識されている。
4. 滓下げ剤 (硫酸銅以外) もワイン中の銅汚染の原因とされる。
5. 未洗浄のフィルターパッドは、鉄やカルシウムだけでなく、銅の供給源となる可能性がある。
6. 銅汚染のもう 1 つの原因として、銅管を通った熱水ですすいだフィルターパッドが考えられる。

銅混濁の生成と防止に関するさらに詳しい技術情報は次のサイトにある。

https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/copper_instability/

鉄

鉄混濁は、銅混濁よりもはるかに少ない。オーストラリアのワインには一般に約 0.5~5.0 mg/L の鉄が含まれており、多くの場合約 2.0 mg/L 未満である。ワイン中の鉄についてオーストラリア・ニュージーランド食品規格局が定めた制限はないが、銅と同様、混濁を避け

るために推奨される濃度範囲として、ほとんどの情報源は「最大安全レベル」は約 5~6 mg/L としている。また、鉄は 10 mg/L 以上含まれると金属的な味を与える可能性がある。

白ワインでは、鉄 (III) がリン酸アニオンと反応してリン酸第二鉄を形成し、これが沈殿して白い濁りや沈殿物を生じる。このため、ホワイトカッセ (白い混濁) と呼ばれることもある。したがって、不安定性を促進する他の条件も仮定すると、リン酸イオン濃度が高まると混濁の可能性を増大させると予想される。リン酸イオンの濃度を高める可能性が最も高いのは、リン酸二アンモニウム (DAP) の添加である。

赤ワインでは、鉄 (III) がタンニン酸イオンと反応して、青みがかった黒色のタンニン酸第二鉄の沈殿物を形成する。これは、ブルーカッセ (青い混濁) と呼ばれることがある。これは、スキンコンタクトで作られたワインや、強い圧搾を行ったワインなど、フルボディの白ワインでも発生することがある。(訳注: Fe^{3+} はタンニン酸イオン以外のフェノール化合物とも青色の混濁を生じる。pp.97, Handbook of Enology, vol. 2, ed. 2., Wiley, 2006)

ワインの鉄の由来は次のとおり。

1. 保護されていない軟鋼または鋳鉄の表面と果汁やワインの接触。エポキシ樹脂またはワックスでコーティングされた軟鋼タンクは毎年検査し、必要に応じて表面を再塗装する。
2. 滓下げ剤、特にベントナイトからのコンタミ。(AWRI は、2017 年 2 月と 2018 年 12 月に、ベントナイトからワインへの金属移行に関する 2 つのテクニカル レビュー記事を発表した。)
3. 未洗浄のフィルターパッドからの汚染

鉄の不安定性に関するより詳細な技術情報は、次のサイトを参照。

https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/iron_induced_instability/

混濁が銅または鉄に関連しているかどうかを判断するには、次の試験がある。

銅と鉄の存在確認試験

試験管に約 20 mL のワインを入れ、30% 過酸化水素を 5 滴加える。

混濁が消えた場合は、銅の存在が疑われる。ワインの濁りが強くなった場合は、鉄の存在が疑われる。

試験管にワイン約 20 mL を入れ、0.1% 亜硫酸ナトリウム溶液を数滴加える。

混濁が消えたら、鉄の存在が疑われる。すぐにワインの濁りが強くなった場合は、銅の存在が疑われる。

十分な沈殿が得られる場合は、簡便なフェロシアン化物/フェリシアン化物試験ができる。

金属のフェロシアン化物/フェリシアン化物試験

試薬:

1. 塩酸 (約 10%) 濃塩酸 (約 32%) : 冷水 = 1 : 2 (訳注: 発熱するため、冷水を攪拌しながら徐々に塩酸を加える。逆は危険)
2. フェロシアン化物/フェリシアン化物混合溶液 フェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムの各 5 g を蒸留水に溶解、混合し、蒸留水で 100 mL にする (取扱注意!!)。

少量の沈殿物を約 2 mL の 10% 塩酸に溶解し、フェロシアン化物/フェリシアン化物の混合溶液を数滴加える。青または緑の色は鉄の存在を、赤褐色は銅の存在を示す (白い沈殿は亜鉛の存在を示す)。

銅の存在を確認する試験

沈殿を数 mL の 25% 塩酸に溶解し、濃水酸化アンモニウムを一滴ずつ加える。青色は銅の存在を示す。

非晶質沈殿の溶解性試験に供したときに、沈殿が 10% 塩酸に可溶で、0.1 M 水酸化ナトリウムにもある程度可溶であれば、タンパク質も存在している可能性がある。タンパク質の存在は、ニグロシン試験で確認できる。沈殿に銅が含まれていることが示され、ニグロシン試験で陽性となった場合、その沈殿は銅/タンパク混濁である。

白い濁りまたは沈殿が白ワインから分離され、鉄が含まれていることが示された場合は、リン酸鉄である可能性が高い。

リン酸塩のモリブデン酸アンモニウム/ベンジジンテストは、Feigl (1958) Spot tests. In: Inorganic analysis 5th edition, pages 333-334 を参照。

青みがかった黒色の沈殿が赤ワインから分離され、鉄が含まれていることが示された場合は、おそらく鉄-タンニン複合体であると考えられる。ポリフェノールとタンニンの試験と縮合タンニンのシアニジン検査を組み合わせると、その複合体中にタンニンが含まれることが示される。

金属分析

金属を含有する沈殿が疑われる場合は、沈殿物を NaOH または HCl に溶解し、民間の

検査機関に金属分析を依頼するか、ワイン自体の金属含有量を分析してもらうこともできる。Affinity Labs（オーストラリアの分析機関）では、誘導結合プラズマ質量分析法を使用した金属分析ができる。