

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月23日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00811

研究課題名(和文) ワインに含まれる高分子色素重合体に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Studies on polymeric pigments in red wines

研究代表者

久本 雅嗣 (HISAMOTO, Masashi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：00377590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：赤ワインを熟成すると高分子色素重合体が徐々に占める割合が多くなり、赤ワインの色調や呈味に大きく影響を及ぼす。この高分子色素重合体について分子量構成比とその渋味について明らかにすることを目的とした。まず、高分子色素重合体の主となるプロアントシアニジン进行分析するため、反応性・再現性が高く、操作が簡便な分析方法を開発した。

赤ワインから分離した高分子色素重合体の構造と知覚(渋味)の関わりを調べた。その結果から高分子色素重合体とブドウ種子抽出物は組成や渋味の質が異なることが明らかになった。また、糖の種類によって渋味と渋味の質である心地よさに対して異なる印象を与える傾向があることが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子色素重合体の詳細な生成機構やその化学構造と渋味との相関、さらにその呈味の質の評価については未だ不明な点が多く、その生産技術も存在しない。本研究は赤ワイン由来の高分子色素体の分画と化学構造の解析方法と高分子色素重合体の渋味の評価と化学構造の関係について解明した。これにより、天然の食品から従来にはない食品の味に深みや奥行きを与える新しい呈味素材成分である「おいしい渋味成分」を開発し、食品に風味、コク、ボリューム感、濃厚感を付与することのできる高付加価値のある新たな食品素材技術の創出が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Proanthocyanidins are primarily responsible for the astringency of red wine, and their chemical structures play a vital role in red wine astringency quality. The two most common methods for proanthocyanidin analysis, thiolysis and phloroglucinolysis, have both strong and weak points. The purpose of this investigation was to develop a new method for proanthocyanidin analysis, which possesses the strong points of thiolysis and phloroglucinolysis, using 1-dodecanethiol. The polymeric pigments of red wine were fractionated by ultrafiltration and gel adsorption chromatography. The composition of the astringent tasting high-molecular weight polymers was analyzed by means of LC/MS and thiolysis reaction using 1-dodecanethiol. At the same concentration, high molecular pigmented fraction was perceived rather mellow, seed and skin monomeric and low molecular fraction was characterized slight astringent.

研究分野：食品化学

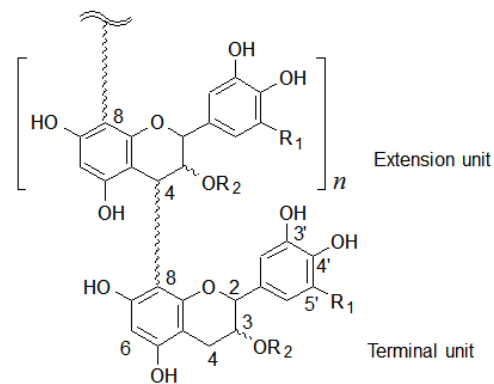
キーワード：ワイン タンニン アントシアニン プロアントシアニジン

1. 研究開始当初の背景

渋味は、味の五つの基本味(甘味・酸味・塩味・苦味・旨味)には含まれない呈味で、辛味と同様、触覚に近い感覚と考えられている。ブドウやカキに含まれる主要な渋味成分のプロアントシアニジン(縮合型タンニン)(図1)は、唾液タンパク質を変性・凝集させることから、口腔内の滑らかさが減少して機械的な摩擦が大きくなり、舌や口腔粘膜を変性させるために渋味(収斂味)を感じる。渋味は、一般に好まれない呈味であり、食品製造において渋味成分を除去もしくは他の成分を入れてマスキングするなど加工される場合が多い。しかしながら、「渋味」は、ワインの風味、奥深く複雑な味わいの深さを構成する重要な要素である。“おいしい渋味”が適度であり、他の呈味と調和し、味わいのある呈味を形成する。

赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出したアントシアニンに由来している。しかし、アントシアニンは不安定な化合物で、温度、酸素との接触、pH、亜硫酸、光など、様々な要因によって影響を受け、そのアントシアニンの組成、構造が変化することは以前から知られている。醸造後、数年経過するとアントシアニンはほとんど存在しなくなり、赤ワインの赤色は、ピラノアントシアニンや高分子色素重合体が主となる。これに伴い、赤ワインの色は赤紫色や赤色から澄んだルビー、ガーネット、レンガ色、赤褐色へと変化する(図2)

熟成が進んだ赤ワインでは高分子色素重合体の割合が高く、色調の保持としての機能以外に、高分子色素重合体は呈味を構成する重要な役割を担っていると示唆される。しかしながら、高分子色素重合体の詳細な生成機構やその化学構造と呈味との関連、さらにその呈味の質の評価については未だ不明な点が多い。



Flavan 3-ols	Configuration	R ₁	R ₂
(+)-Catechin (C)	2R, 3S	H	H
(-)-Epicatechin (EC)	2R, 3R	H	H
Epigallocatechin (EGC)	2R, 3R	OH	H
Epicatechin gallate (ECg)	2R, 3R	H	Galloyl

図1 ブドウに含まれるプロアントシアニジンの化学構造

2. 研究の目的

赤ワインの渋味(収斂作用)の主成分は、ブドウの種子や果皮由来のプロアントシアニジンである。その化学構造は、カテキン、エピカテキンなどのフラバン-3-オール(カテキン類)が重合した構造を基本骨格とし、様々な修飾や変換を受けて多岐にわたっている。特に、色調の保持としての機能以外に、高分子色素重合体は呈味の深みや複雑さ・良質の渋味を与え、おいしさを構成する重要な役割を担っている。そのプロアントシアニジンは高分子であるため、そのままの状態では化学

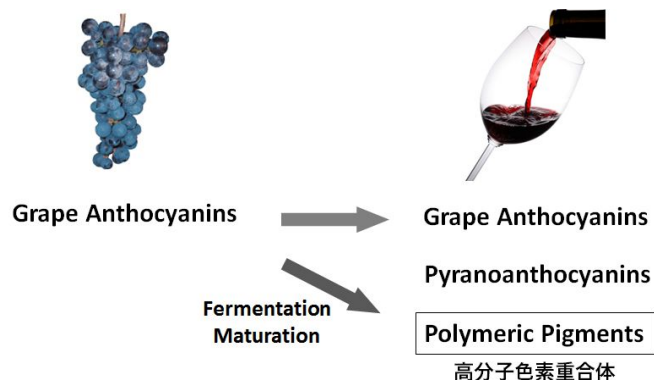


図2 ブドウ・ワイン中におけるアントシアニンの変化

構造を分析することは難しい。そのため、加水分解により低分子化し、求核剤で誘導体化後、HPLC分析を行う方法がある。現在、求核剤として一般的に用いられているのは、フロログルシノールとベンジルメルカプタンである。これら求核剤を用いた分析方法であるフロログルシノールを用いたフロログルシノリシス（Phloroglucinolysis）とベンジルメルカプタンを用いたチオリシス（Thiolysis）は、その反応性、再現性の良さから使用されている。この2つの方法には、それぞれ長所、短所がある。ベンジルメルカプタンを用いたチオリシスはフロログルシノリシスと比較し、分解生成物の収量が多い反面、ベンジルメルカプタンは催涙性の強い刺激臭のため、「公害対策基本法」において公害とされ、「悪臭防止法」によりその使用が規制されている。一方、フロログルシノリシスは、無臭で取り扱いが簡便であるが、チオリシスと比較すると分解物の収量が少ないことが問題である。

以上よりまず上記の2つの方法の長所を併せ持ち、反応性、再現性が良く、環境に負担のない「1-ドデカンチオールを用いたプロアントシアニジン分析方法」を開発した。以下では、1-ドデカンチオールを用いたプロアントシアニジン組成分析法をOdorless thiolysisと記載する。

一方、赤ワインの熟成期間、アントシアニン類と縮合型タンニンの両方で化学変化を起こし、より安定な高分子色素重合体を形成する。熟成期間を経るにつれて赤ワイン中の赤色色素成分の中で徐々に高分子色素重合体が占める割合が多くなり、赤ワインの色調に大きく影響を及ぼしている。また、縮合型タンニンにおいては、C4-C8とC4-C6との間のフラバン結合を介して連結された高分子のFlavan-3-olsであり、それらの構成単位は主にカテキン・エピカテキン・エピカテキンガレート・エピガロカテキンである。ワインタンニンの渋味は、唾液タンパク質との疎水性相互作用や水素結合、タンパク質との凝集・沈澱によるタンニンとの相互作用によるものと考えられている。赤ワイン中のタンニンの平均重合度（mDP）は、モノマーごとに異なる。モデル溶液中では、モノマーは渋味よりも苦味があると認識されるが、mDPが増加するにつれて渋味も増す。平均重合度に加えて、タンニンのサブユニット構成比は渋味を決定する重要な変数であると考えられる。しかし、上記のようにプロアントシアニジンに関する報告は見られるが、化学構造が複雑で且つ分子量が大きい赤ワインの高分子色素重合体の研究に関する報告はほとんどない。さらにその呈味の質の評価については未だ不明な点が多い。そこで本研究課題で新たに開発した1-ドデカンチオールを用いたOdorless thiolysisでプロアントシアニジン組成を分析し、ワインから分離した高分子色素重合体の構造と知覚（渋味）の関わりを調べた。

3．研究の方法

(1) Odorless thiolysis

本研究で開発した方法（Odorless thiolysis）では、1.00 g/L プロアントシアニジン-メタノール溶液 0.50 mL に1-ドデカンチオール 25.0 μ L と 12 M 塩酸 5.0 μ L を添加し、55 に設定したウォーターバスで 40 分間反応させた。フロログルシノリシスと濃度を合わせるためにメタノールで 1 mL までメスアップし、0.45 μ m の PTFE フィルターに通し、LCMS 分析に供した。プロアントシアニジン試料にプロシアニジン B2、ブドウ種子エキス、ブドウ果皮およびカシスを用いた。ブドウ果皮とカシスは、カラムクロマトグラフィーを用いた方法および水性緩衝液を用いた方法の2通りでプロアントシアニジンの精製を行い、組成分析を行った。

(2) 高分子色素重合体の構造と渋味の関係

赤ワインをToyopearl HW-40Fに供し、66%アセトン水溶液で高分子色素重合体を溶出し、高分子色素重合体画分を得た。この画分を限外ろ過で分子量ごとに分画し、乾燥粉末後、SEC（サイ

ズ排除クロマトグラフィー)を使用して分子量を求めた。さらに各フラクションのflavan-3-ols組成や糖組成を求め、官能評価を行った。

4. 研究成果

(1) Odorless thiolysis

1-ドデカンチオールによって生じるカテキン類誘導体について、その化学構造とモル吸光係数を明らかにするため、5.00 gのカベルネ・ソービニヨンの種子抽出物と1-ドデカンチオールを用いたチオリシスを行った後、分取HPLCにより3つの誘導体を得た。NMR分析の結果、化合物1((-)-Epicatechin-4 β -dodecanethioether)、化合物2((+)-Catechin-4 α -dodecanethioether)、化合物3((-)-Epicatechin-3-O-gallate-4 β -dodecanethioether)と決定し、モル吸光係数を算出した。

上記で分取した誘導体を用いて、1-ドデカンチオールを用いたチオリシスを行った結果、ブドウ種子由来プロアントシアニジンについて、現在広く使われているフロログルシノリシスと比較し、高い収率が得られた。試料によってOdorless thiolysisとフロログルシノリシスの分析結果に差が生じた。Odorless thiolysisは、ブドウ果皮プロアントシアニジンの分析において、フロログルシノリシスの117~125%の反応生成物収量が得られた。平均重合度は3.10~5.70の差があった。加水分解率は5.90~17.2%の差があった。また、ブドウ種子エキスにおいて、組成比および平均重合度で有意差が認められた。それに対し、カシスプロアントシアニジンにおいては、平均重合度、加水分解率および反応生成物収量に差は見られなかった。新しく開発したOdorless thiolysisは、本研究でのほとんどの試料の組成分析において、フロログルシノリシスと同等もしくはそれ以上の加水分解率および反応生成物収量を示した。

本研究の結果より、1-ドデカンチオールを用いた方法の利点として、フロログルシノリシスよりも使用する薬品の数が少なく、反応時間も短い点、従来のチオリシスの欠点であった強悪臭を生じず、取り扱いやすい点が挙げられる。以上のようなことから、1-ドデカンチオールを用いた分析方法は新しいプロアントシアニジン分析方法として有効であることが示唆された。

(2) 高分子色素重合体の構造と渋味の関係

赤ワインをToyopearl HW-40Fに供し、66%アセトン水溶液で高分子色素重合体を溶出し、高分子色素重合体画分を得た。この画分を限外ろ過で分子量ごとに分画し、乾燥粉末後、SEC(サイズ排除クロマトグラフィー)を使用して分子量を求めた。さらに各フラクションのflavan-3-ols組成や糖組成を求めた。さらに官能評価を行った。

各フラクションの色調から、色を持つ高分子色素重合体であることを確認した。またSECの分子量分布の測定により、各フラクションが分画できたことが判明した。各フラクションのフェノール性化合物と糖組成より、各フラクションの70から80%がフェノール性化合物で、20から30%が糖類で構成していた。各フラクションとブドウ種子抽出物についてFlavan-3-olsの組成分析を行ったところ、平均重合度(mDP)がFr. 3はFr. 1とFr. 2と比較して小さいことが明らかになった。

プロデルフィニジン比についてもFr. 3はFr. 1とFr. 2と比較して小さいことが明らかになった。糖組成においては、他のフラクションと比較してFr. 1のみアラビノースが多く含まれ、ラムノースが少ないことが示唆された。また、官能評価について渋味強度に有意な差は見られなかったが、渋味の質に関してはFr. 1は収斂性が弱く・心地よいという渋味品質の評価を得た。Fr. 2は収斂性がある・ざらざら感・心地よいという渋味品質の評価を得た。Fr. 3は収斂性がある・ざらざらし

ているという評価を得た。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

日本食品科学工学会平成 29 年度関東支部大会

赤ワイン中の高分子色素重合体の化学構造と呈味

小金澤あづみ、久本雅嗣，鈴木友佳里，斉藤史恵，奥田 徹
山梨大学ワイン科学研究センター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等