

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05874

研究課題名（和文）赤ワインの非酵素的酸化による色調の安定化と渋味の変化の解明

研究課題名（英文）Evaluation of pigments and astringent taste by non-enzymatic oxidation in red wine

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：赤ワインの赤色はブドウ果皮に含まれるアントシアニンに由来している。アントシアニンは不安定な化合物であり、pHや亜硫酸などの影響によって色調が変化する。本課題において、アントシアニンは、ブドウ果汁中の主要な有機酸である酒石酸から生成されるグリオキシル酸と非酵素的酸化下で架橋反応を起こし、アントシアニン誘導体を形成した。さらに、アセトアルデヒド及びグリオキシル酸との架橋反応によって生じるアントシアニン誘導体はアントシアニン溶液に比べて亜硫酸及び熱への耐性があり、着色形態で安定化していることが明らかとなった。さらに、ワインの試験醸造において、これらの色素が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに実際の醸造現場ではワインの赤色の色素を安定化させるためにそれぞれの醸造工程でいろいろな取り組みがされ、経験的に理解されつつも、ワイン醸造全体を通してそのメカニズムは不明であった。これらを解決するために本課題では生産方法に着目し、特に、アルコール発酵前の色素の安定化、ワインのアルコール発酵中の色素の安定化、ワインの熟成中の色素の安定化についてモデル系ならびにワイン醸造で評価を行った。これらの結果から品質の安定化および製造の手法を実際にワイン醸造で実証し、産業界のニーズに応えることができるものであると考える。

研究成果の概要（英文）：The red color of red wine is derived from anthocyanins contained in grape skins. Anthocyanins are unstable compounds, and their color is affected by pH and SO₂. In this subject, anthocyanins cross-linked with glyoxylate, which is formed from tartaric acid, a major organic acid in grape juice, under non-enzymatic oxidation to form anthocyanin derivatives. Furthermore, the anthocyanin derivatives produced by the cross-linking reaction with acetaldehyde and glyoxylic acid were more resistant to SO₂ and heat than free anthocyanins and were stabilized in the colored form. Furthermore, these pigments were formed during winemaking.

研究分野：食品化学

キーワード：ワイン アントシアニン

1. 研究開始当初の背景

ワイン製造において、品質を左右する最も重要な要素の一つとして、ブドウの品質が挙げられる。近年、日本でも高品質なワインが多く製造され、その価値が世界的に高まってきている。しかし、日本の気候はワイン用ブドウ栽培に適していない地域が多く、高温多湿な気候、夜温の高さがその例である。近年は温暖化の影響で夜温の高温化が顕著で、日中との寒暖差が小さくなり、特にブドウの着色不良（アントシアニンの蓄積）の問題は国内だけでなく、銘醸地のヨーロッパでも同様の現象が報告されており、赤ワインを製造する上で非常に大きな問題になっている。この課題を解決するための方策として赤ワイン醸造の工程で赤ワインの色素の安定化・増強する取り組みが多く生産者で行われているが、これらの多くは細かな工程についての色素安定化に関する議論が多く、醸造全体を通して最終的に赤ワインのアントシアニン由来色素は安定化や色調が濃くなったのか？さらにその原因は何か？という問いに対して明確に説明できる回答はほとんどない。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起因するようになる。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。特に、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相関については未だ不明な点が多い。

ワイン用ブドウ品種に存在するアントシアニンはマルビジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、およびシアニジンの誘導体であり、3位にグルコースを持つ。特に Malvidin-3-O-glucoside (以降 Mv3g) はブドウの主要なアントシアニンである。

単量体のアントシアニンは、pH に大きく依存し、その平衡状態によりいくつかの形態として存在し、その相対的な割合は溶液の色に大きく影響する。pH が 1~2 では、フラビリウムカチオンとして存在し、強い赤色を呈する。フラビリウムカチオンは正に帯電しているため強い求電子性を持ち、その C2 および C4 位は求核剤と反応しやすく、フラビリウム形態の赤色が失われ、無色のヘミアセタールとなる。溶液の pH が上昇すると、フラビリウムカチオンは水と反応してヘミアセタールの割合が多くなる。pH が 3.6 の場合、フラビリウムカチオンの存在割合は少なくなっており、ヘミアセタールの割合が多くなっている [1]。さらに、抗酸化作用や抗菌作用を目的として添加される亜硫酸によってもアントシアニンは無色化し [2]、非常に不安定である。

一方でアントシアニンは他の化合物と相互作用することで安定性が向上し、減色を防ぐことができる。特に赤ワインにおいては、この相互作用により生じる pigment によって色調が決定するため、重要な役割を果たしていると考えられている [3]。アントシアニンとフェノール化合物との非共有相互作用で生じる Copigmented Anthocyanin はアントシアニンを水の求核攻撃から保護し、色を安定させる [4]。共有相互作用である Polymeric pigment や Pyranoanthocyanin は熟成したワインの色の大部分を担っており、長期間の貯蔵でも分解されにくい [5, 6]。Polymeric pigment についてこれまでに多くの研究が行われてきたが、赤ワインに含まれるフェノール化合物の複雑さから、非常に多様な Polymeric pigment がワイン中では検出されている [5]。この重合化反応には求核-求電子反応によって直接アントシアニンと Flavan-3-ol のカテキン類、プロアントシアニジンが結合するものと、架橋構造を形成して重合化するものがある [7, 8]。架橋構造はワインや果汁中に存在するアルデヒド類が Flavan-3-ol と結合し、更に別の Flavan-3-ol やアントシアニンと結合することで形成される。また、この架橋構造を持つ pigment は紫の色相を持ち、アントシアニンと比べて pH 変化に対しても安定で、亜硫酸による影響を受けにくいと報告がされている [9, 10]。アルデヒド架橋反応で代表的なものはアセトアルデヒドを介した反応である。

アセトアルデヒドはワイン中に含まれるエタノールの酸化や *Saccharomyces cerevisiae* の酵母により生成される [11, 12]。このアセトアルデヒドはアントシアニンと反応することでアルデヒド架橋アントシアニン二量体を形成する [13]。さらに、このアセトアルデヒド架橋反応で生成する誘導体は Polymeric pigment になる初期の誘導体であると考えられており、二量体は反応が進むにつれてさらに重合化していく。ブドウ果汁中において主要な有機酸である酒石酸は、水溶液中において遷移金属の存在下で容易に分解される。その分解経路の一つであるフェントン反応によって、グリオキシル酸が生成する [14]。このグリオキシル酸はアルデヒド基を持ち、反応性が高い [15]。さらに、アセトアルデヒド以外のワイン中に含まれるアルデヒド類でも同様に架橋構造が形成されることが示されていることから [16]、グリオキシル酸架橋反応によりグリオキシル酸架橋アントシアニン二量体が生成する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、赤ワインの醸造中で起こるとされる非酸化反応で生成する色素安定化とその要因を明らかにし、未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、実用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

アントシアニンがアセトアルデヒドのような発酵中に生成するエタノール由来のプロトン化したカルボニル化合物と反応して安定なアントシアニン誘導体を形成するだけでなく、ブドウの破碎直後の浸漬状態やアルコール発酵がほとんど起こっていないマセレーション初期の段階の実験を実施した。具体的にはブドウ果汁の中での反応系（モデルブドウ果汁）を作成し、アントシアニンと酒石酸から生成するアントシアニン誘導体の同定とその特徴について検討した。さらに、アセトアルデヒド及びグリオキシル酸との架橋反応によって生じるアントシアニン誘導体の色の評価と生成されたアントシアニン誘導体の安定性の評価を行なった。色の評価はCIELAB、UV-VIS スペクトルによって測定した。色の安定性の評価は、生成したアントシアニン誘導体、アルデヒド無添加物溶液に亜硫酸添加、耐熱性の試験を行なった。

また、実際にワインの醸造で高分子色素形成やタンニンの評価を行なった。日本で最も多く栽培されている黒ブドウであるマスカット・ベリーA (MBA) [*Vitis labruscana* (Bailey) x *V. vinifera* (Muscat Hamburg)] を用いて、アルコール発酵前及びアルコール発酵後に pH を調整したワインを調整し、アントシアニン組成や高分子色素重合体の変化を評価した。

4. 研究成果

ブドウ由来のアントシアニン抽出溶液にアセトアルデヒドを添加すると、色調が変化し、新たな化合物が生成していることが示唆された。アセトアルデヒドを添加するとどの pH の条件でも同様に暗色化が見られアセトアルデヒド無添加物溶液に比べ、高い pH 条件下でも色の安定性があることがわかった。また、グリオキシル酸を添加するとどの pH の条件でも色調の変化が見られた。pH が高くなるにつれ、より濃色化が見られ pH 4.0 の条件下の方がより反応性が高いことがわかった (図 1, 2)。また、アセトアルデヒド誘導体溶液、グリオキシル酸誘導体溶液はアセトアルデヒド無添加物溶液、グリオキシル酸無添加物溶液に比べて亜硫酸による耐性があることが明らかになった。さらに、アセトアルデヒド誘導体溶液、グリオキシル酸誘導体溶液はグリオキシル酸無添加物溶液に比べ、熱による耐性があることが明らかになった。

黒ブドウであるマスカット・ベリーA (MBA) を用いて、アルコール発酵前及びアルコール発酵後に pH を調整したワインを調整し、アントシアニン組成や高分子色素重合体の変化を評価した。マストの段階で pH 調整 (3.0-4.2) を行った場合、アントシアニン量は pH 3.0 が最も高く、その他の pH では差は認められなかった。高分子色素重合体量はアルコール発酵中においてワインの pH が高いほど多く、ワイン製造 12 ヶ月後も同様の傾向であった。高 pH で作成したワインでアルコール発酵終了後に pH を下げたワインは Color Hue が減少した。アルコール発酵終了後に MBA ワインを低い pH に調整しても、高分子色素重合体の量が保持された。よって、アルコール発酵中の高い pH は高分子色素重合体を増加させ、ワインの色の安定化に寄与した。アルコール発酵中のマストおよびアルコール終了後の pH 調整のタイミングは、アントシアニン及びアントシアニン重合体の生成に大きく影響することが認められた。また、アルコール発酵中の醸しの期間の長さは、アントシアニン濃度、色調、高分子色素、BSA 反応性タンニン量に違いが認められた。

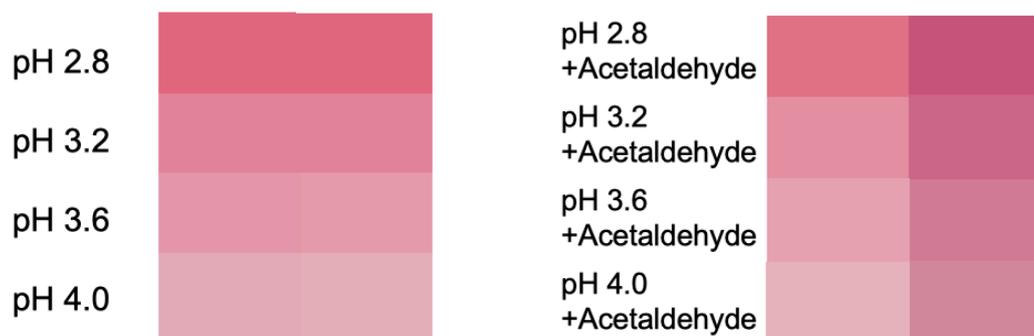


図1 CIELABによるアルデヒド無添加物溶液 (Control) およびアセトアルデヒド添加溶液の色の変化

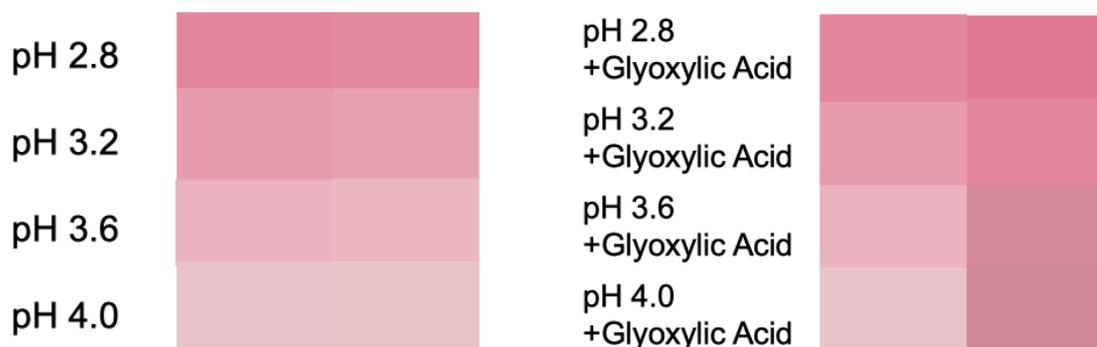


図2 CIELABによるグリオキシル酸無添加物溶液 (Control) およびアセトアルデヒド添加溶液の色の変化

参考文献

1. Forino, M., et al., *The malvidin-3-O-glucoside chemical behavior in the wine pH range*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019.
2. Timberlake, C. and P. Bridle, *Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins II.—Reactions with sulphur dioxide*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1967. **18**(10): p. 479-485.
3. Liu, Y., et al., *Reaction kinetics of the acetaldehyde-mediated condensation between (-)-epicatechin and anthocyanins and their effects on the color in model wine solutions*. Food Chemistry, 2019. **283**: p. 315-323.
4. Boulton, R., *The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review*. American Journal of Enology and Viticulture, 2001. **52**(2): p. 67-87.
5. Alcalde-Eon, C., et al., *Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**(1-2): p. 238-254.
6. Zimman, A. and A.L. Waterhouse, *Incorporation of malvidin-3-glucoside into high molecular weight polyphenols during fermentation and wine aging*. American Journal of Enology and Viticulture, 2004. **55**(2): p. 139-146.
7. Remy, S., et al., *First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(6): p. 745-751.
8. Es-Safi, N.-E. and V. Cheyrier, *Flavanols and anthocyanins as potent compounds in the formation of new pigments during storage and aging of red wine*. 2004, ACS Publications.
9. Escribano-Bailón, T., et al., *Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin*. Journal of Agricultural

- and Food Chemistry, 2001. **49**(3): p. 1213-1217.
10. Bakker, J. and C.F. Timberlake, *Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(1): p. 35-43.
 11. Romano, P., et al., *Acetaldehyde production in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts*. FEMS Microbiology Letters, 1994. **118**(3): p. 213-218.
 12. Singleton, V. and T. Kramlinga, *Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
 13. Atanasova, V., et al., *Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**(35): p. 6151-6153.
 14. Fenton, H.J.H., *LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1894. **65**: p. 899-910.
 15. Drinkine, J., Y. Glories, and C. Saucier, *(+)-Catechin– aldehyde condensations: Competition between acetaldehyde and glyoxylic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(19): p. 7552-7558.
 16. Pissarra, J., et al., *Structural Characterization of New Malvidin 3-Glucoside– Catechin Aryl/Alkyl-Linked Pigments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(17): p. 5519-5526.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 明石直輝・深澤京香・渡辺（斉藤）史恵・奥田 徹・久本雅嗣
2. 発表標題 ブドウ果汁中の酸化反応で形成する新規アントシアニン誘導体
3. 学会等名 日本ブドウ・ワイン学会（ASEV JAPAN）2020 名古屋大会（オンライン）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------