

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07812

研究課題名(和文)赤ワインのおいしさと関係するタンパク質非結合性タンニンの解析

研究課題名(英文) Analysis of BSA-non-precipitable tannin in red wine and its possible role on palatability

研究代表者

奥田 徹 (Tohru, OKUDA)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10252008

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)：赤ワインのタンニンは、渋みを決定する重要な要素である。渋みは口中で唾液タンパク質とタンニンが結合して不溶性の沈殿を生じることによるザラザラ感や、粘膜とタンニンの結合による引きつった感覚など、物理的的刺激によって知覚される。そこで、唾液タンパク質の代わりに構造が単一のタンパク質(牛血清アルブミン, BSA)を添加し、ワイン中のタンニンを定量する方法が開発され、広く用いられている。しかし、本研究によりタンパク質を入れても沈殿しないタンニンが多量に存在することが明らかになった。これらのタンニンは、口中でも沈殿せず、渋みを持たないタンニンであり、ワインの味わいに大きな影響を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質を添加しても沈殿を生じないワインタンニンの存在を明らかにした。このようなタンニンは渋みを持たないと思われる。一般に赤ワインは肉やチーズなど、タンパク質を豊富に含む食品との相性が良いとされている。赤ワインの口中での反応はよくわかっていないが、本研究はワインの食べ合わせや、品質にも直結する重要な発見である。タンパク質である牛血清アルブミンの添加によって沈殿しないBSA非沈殿性タンニンは、BSA沈殿性タンニンと同程度の濃度存在した。また、醸造試験の結果、BSA非沈殿性タンニンは醸造初期から存在し、ブドウ中に既に存在することも考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tannin is a one of the most important polyphenols in red wine because it evoke astringency sensation. This sensation is known to cause by the formation of insoluble complex with tannin and proteins in saliva. Using this unique character of tannin, a method was developed to measure the concentration of tannin in wine. In this method, bovine serum albumin (BSA) is added as protein to wine and measuring precipitated tannins. We firstly found that there were many tannins that has poor precipitate ability with BSA in red wine. The existence of this unprecipitable tannin with protein may have no astringent sensation, and will affect the taste of red wines.

研究分野：食品科学

キーワード：ワイン ポリフェノール タンニン 渋味

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 赤ワインにおけるタンニンの重要性

タンニンは高分子ポリフェノールで、赤ワインの収斂味(渋み)を決定する重要な成分である。タンニンはタンパク質と結合する性質を持ち、口中では「唾液タンパク質」と結合することで不溶化し、不溶化した化合物が収斂味を与えると考えられている。そこで、タンニンの測定は、唾液タンパク質の代わりに入手が容易な牛血清アルブミン(BSA)を添加してタンニンを沈殿させ(BSA結合性タンニン)、沈殿中のポリフェノール濃度を酸化鉄で発色させる方法(BSA沈殿法)で測定されている。Herbertsonは、世界の1325本の赤ワインのタンニンを調べ、タンニン濃度に品種差があること、同じ品種内でも32倍の差があること(全ポリフェノール濃度の差は2~3倍程度である)を明らかにした(Herbertson 2008)。研究代表者の試験でも、165種類の日本ワインを調べた結果、同様の知見を得た(Ichikawa 2011)。特に、我が国で最も多く作られているMuscat Bailey Aワインでは、タンニン濃度が極端に低く、その理由に興味を持たれた。Muscat Bailey Aは、我が国で最も多く作られている赤ワインであり、日本独自の品種でもあり、また、醤油が味付けのベースとなっている和食との相性も良いことが経験的に知られている。一般的にMuscat Bailey Aワインは酒質が軽いものが多く、Muscat Bailey Aワインにタンニンが少ないことと関係すると考えられた。

(2) 赤ワイン醸造中のタンニンの抽出挙動

そこで、醸造中のタンニン濃度の推移を調べたところ、Cabernet Sauvignonでは、果汁にタンニンが抽出され、その後一定になったが、Muscat Bailey Aでは発酵4日目までは抽出されたが、突然、その濃度が減少し、ほぼ0となった(Ichikawa 2012)。タンニンはブドウの果皮および種子から抽出されるが、その分子量やポリフェノール組成は異なり、味も異なる。タンニン濃度減少の理由を調べるために、果皮や種子を除いた赤ワインを製造し、発酵中のタンニンの推移を調べたところ、Muscat Bailey Aでは、種子にタンニンが無いこと、果皮のタンニンは発酵数日まで抽出されるが、その後急激に減少すること、Cabernet Sauvignonでは、種子のタンニンが果皮タンニンの減少分を補完するかのように増加するが、Muscat Bailey Aでは種子タンニンが無いこと、果皮のタンニンが減少し、最終的にはタンニン濃度が0となること分かった(Okuda 2014)。

(3) タンニンの抽出機構

この現象が起こる理由として、タンニンは多糖類に結合する能力があり、赤ワイン製造中に、共存する果皮や種子など、不溶性の組織に再吸着する可能性が考えられた。研究代表者はその機構について研究を行ったが、確かに吸着力はあり、そのpH依存性やアルコール濃度に対する挙動などで興味深い発見がいくつかあった。しかし、定量的に考えると、果皮や種子への再吸着はタンニン濃度が急激に減少する主要な原因とは考えにくかった。一方、Kassara and Kennedyの研究では、ワインの値段ごとにタンニンを調べたところ、果皮のタンニンが多い、または果皮タンニンの割合が多いワインほど高級なワインであることが分かった(Kassara 2011)。従って、高品質の赤ワインを製造するためには果皮のタンニンをどうやって増やすかが課題であった。「おいしさ」に重要な果皮タンニンが、突然減少する理由の解明が急がれた。

また、本研究を開始する少し前に、ワイン中にはBSAと結合沈殿しないタンニンが多量に存在することが明らかになった。その量は、Cabernet SauvignonのワインでもBSAにより沈殿するタンニンと同量ほどであった。この結果は、世界的に使用されているタンニンの測定法の問題点を示すと同時に、「唾液」タンパク質と結合しない「渋くないタンニン」が存在することを示唆する重要な発見であった。

2. 研究の目的

本研究では(1) BSA非結合性のタンニンの存在を証明する、(2) BSA非結合性のタンニンの醸造中での挙動を明らかにする、(3) BSA結合性と非結合性のタンニンの違いを明らかにする、(4) 果皮タンニンを減少させない醸造法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BSA非結合性のタンニンの存在を証明

多くの日本ワインを集め、BSA非結合性のタンニンを定量する。従来のBSA沈殿法とFolin-Ciocalteu法を組み合わせ、さらにToyopearl HW-40による分画により、タンニンと低分子ポリフェノール類を分画することで、分析を可能とした。

(2) BSA非結合性のタンニンの醸造中での挙動解析

Muscat Bailey Aを醸造し、一次発酵(醸し期間)のBSA結合性および非結合性タンニンの経時変化を測定した。本実験には150 kgのMuscat Bailey A(19.37 Brix)を原料として用い、除梗後、SO₂を50 ppm/Kg grapeになるようにメタ重亜硫酸カリウムとして添加した。30 Lの果

汁をセニエとして除いたうえ、乾燥酵母として 15 g の市販 EC1118 酵母を膨潤後添加した。その後、1日2回のパンチダウンを行い、発酵後 22 Brix までショ糖で補糖した。パンチダウンの時に、溶液部分を 50 mL 程度サンプリングし、タンニンの分析に用いた。

(3) BSA 結合性と非結合性のタンニンの違いの解明

それぞれのタンニンを固相抽出等で回収し、タンニンの Fravan-3-ol 組成、結合した糖組成、アミノ酸組成を調べ、結合・非結合の違いの解明を試みた。

(4) 果皮タンニンを減少させない醸造法を提案

結合性に影響を与える成分の分析により、果皮タンニン濃度を制御する方法を提案した。

4 . 研究成果

(1) BSA 非結合性のタンニンの量

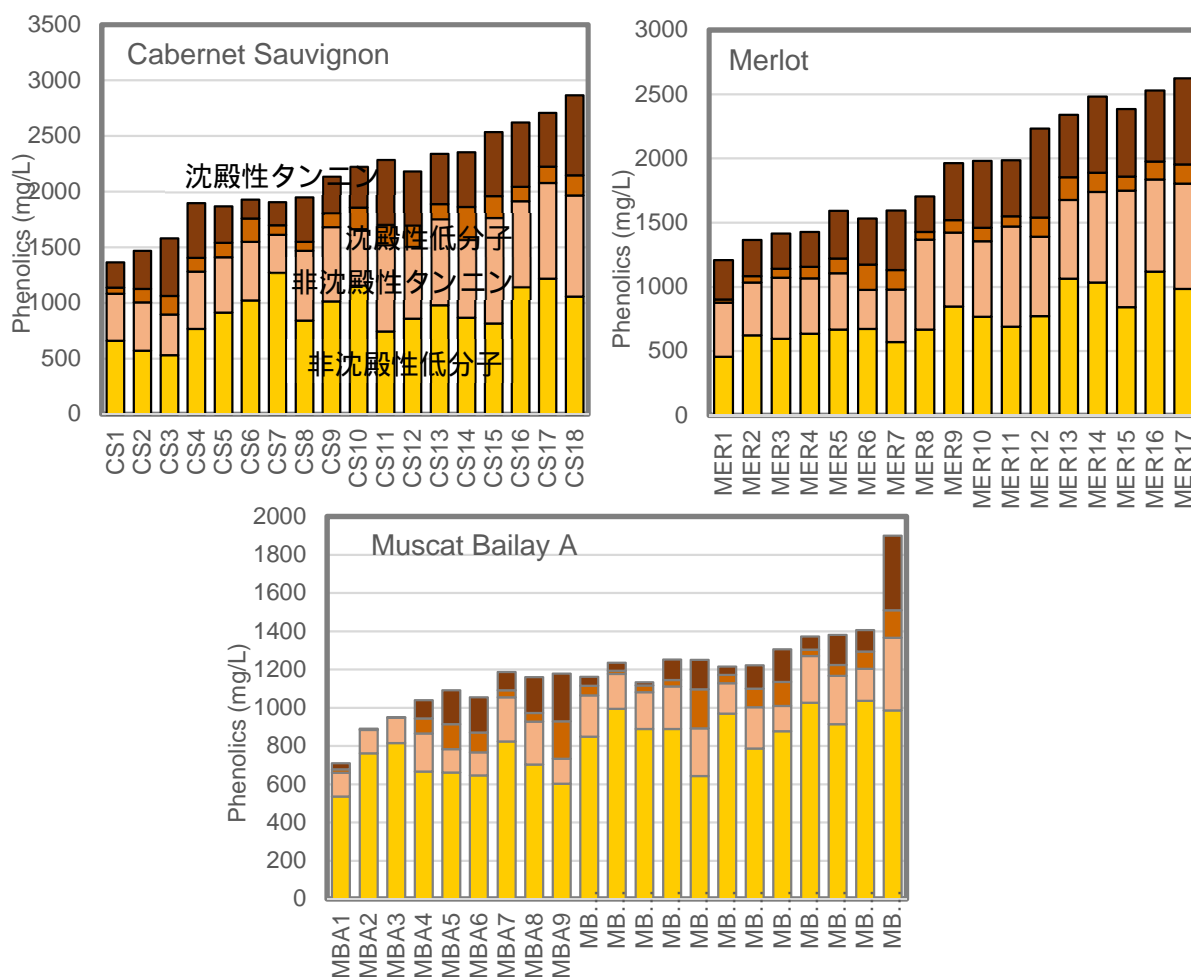


図 1 日本産赤ワイン中のポリフェノールの組成

図 1 には、日本産赤ワインのポリフェノールを沈殿性タンニン、沈殿性低分子ポリフェノール、非沈殿性タンニン、非沈殿性低分子ポリフェノールに分類した場合の濃度を、品種別に示した。ポリフェノール全体の平均濃度は Cabernet Sauvignon が高く、Merlot、Muscat Bailey A の順であった。3 品種とも非沈殿性低分子ポリフェノールの濃度は 600 ~ 1000 mg/L 程度であり、Cafaric acid や Coumaric acid など、果汁由来のものが多くと推測された。

一方、予想通り、非沈殿性タンニンも相当量検出された。本知見は世界で初めての知見であり、ワインの味に大きな意味を持つと考えられる。

(2) BSA 非結合性のタンニンの醸造中での挙動解析

上記で存在が明らかになった BSA 非沈殿性タンニンは、タンパク質との反応性が異なるため、味においては大きな意味を持つと思われる。しかし、化合物が原料ブドウ中に存在し、ワイン製造時に液体に溶出するのか、醸造中に、何らかの化合物と反応して生成するのかわかっていない。

そこで、この化合物のワイン醸造中の挙動について調べた。

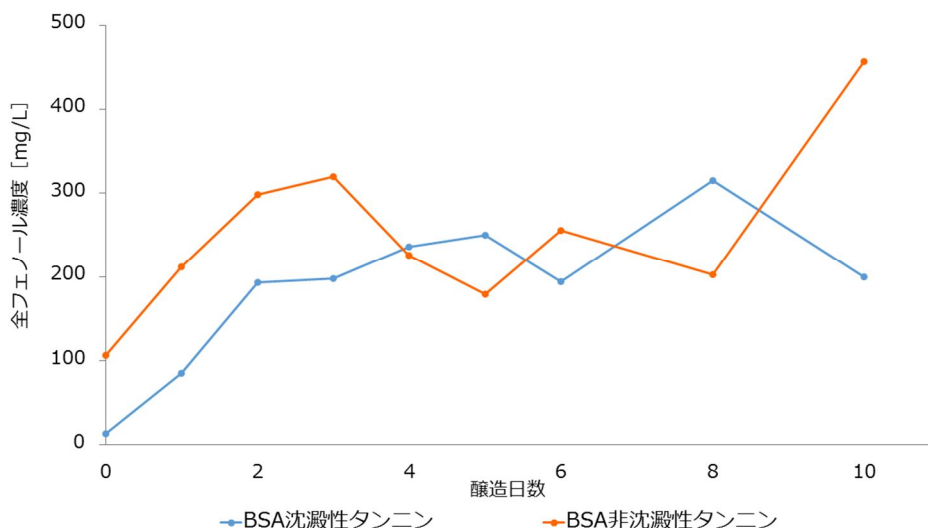


図2 Muscat Bailey A ワイン醸造中のタンニンの挙動

Muscat Bailey A ワインでは、醸造中に BSA 沈殿性タンニンが急激になくなることが報告されている (Ichikawa 2012)。しかし、本実験でこの現象は再現できなかった。BSA 沈殿性タンニンは、発酵初期は濃度が低いが、その後濃度が増加し 250 mg/L 程度で一定となった。これまでの報告で Muscat Bailey A のタンニンは 65 mg/L 程度であることが報告されているが (Ichikawa 2011)、今回の発酵試験では、これより明らかに高い値となった。この原因については現在不明である。

一方、BSA 非沈殿性のタンニンは初日から液体内に見出され、この化合物が反応によって生成したのではなく、ブドウ中に存在することが考えられた。その後 BSA 非沈殿性のタンニンの濃度は増加したが、3 日目以降は減少傾向が見られ、その後再度増加した。以上の結果から、BSA 非沈殿性のタンニンは比較的水溶性であり、醸造初期から抽出されることが考えられた。

(3) BSA 沈殿性と非沈殿性のタンニンの違いの解明

BSA 沈殿性のタンニンと非沈殿性タンニンの違いについて検討した。上記の実験の結果、非沈殿性タンニンの方が水溶性が高いことが示唆された。従って、タンニンの性質を考えると、多糖類やタンパク質が結合していることが考えられた。また、タンニンを構成するフェノール化合物が異なることも考えられた。多糖類については、フェノール硫酸法、ヒドロキシジフェニル法で、中性糖、酸性糖の定量を行ったが、再現性が低く、明確な結果が得られなかった。そこで、ABEE 誘導体化法を用いた、糖組成の解析を試みているが、HPLC の分離が悪く、現在、方法の改良中である。また、フロログルシノール誘導体化法でタンニンの組成の解析を試みたが、加水分解率が低く、実験データとしての信頼性を欠くと考えられた。ワイン中のタンニン解析において、加水分解率が低いことは広く世界的に報告されており、現時点で、タンニンの組成解析を行う良い方法がないことから、今後の解析に期待する。さらに、タンパク質の違いを SDS-PAGE 法で解析した。その結果、BSA 沈殿性と非沈殿性のタンニンに含まれるタンパク質にいくつか異なるバンドが検出された。しかし、多量の BSA を添加した実験であるため、共存する BSA のためバンドが見にくいこと、また、添加した BSA はある程度精製した試薬 (フラクション) であるが、共存する他のタンパク質が存在し、バンドの確認を困難とした。このため、BSA 沈殿性と非沈殿性のタンニンの違いの解明については、現在引き続き解析している。

(4) 総括

タンニンの収斂味は、赤ワインの非常に重要な指標であり、その質がワインの品質を決定する。タンニンはタンパク質や多糖類と結合する性質があることは広く知られており、ワインを飲んだ場合、唾液のタンパク質や口中の粘膜と反応し、収斂味を呈することも知られている。このことから、BSA 沈殿性タンニンが収斂味と大きな関係を持つことは報告されている。一方で、BSA 沈殿性タンニンの濃度は、ワイン間で大きく異なり、ワインの品質に大きな影響を与えていることが示唆されてきた。一方、本実験で扱った BSA 非沈殿性のタンニンは、これまで報告が無く、ワインの味にどのような影響を与えるのかに興味を持たれた。これまで、赤ワイン中のタンニンは全フェノール化合物濃度 (1~3 g/L) の半分程度と言われてきたが、その半分が非沈殿性タン

ニンによって構成されていることは重要な発見である。今後、赤ワインのおいしさにおける BSA 非沈殿性タンニンの役割が解明されることが期待される。

参考文献

J. F. Herbertson et al., Variability of Tannin Concentration in Red Wines., *Am. J. Enol. Vitic.*, 59, 210-214 (2008)

M. Ichikawa et al., Concentrations of BSA-Binding Proanthocyanidins in Red Wines Produced in Japan., *Food Sci. Technol. Res.*, 17, 335-339 (2011)

S. Kassara and J. Kennedy, Relationship between Red Wine Grade and Phenolics. 2. Tannin Composition and Size., *J. Agric. Food Chem.*, 59, 15, 8409–8412 (2011)

M. Ichikawa et al., Effect of Cap Management Technique on the Concentration of Proanthocyanidins in Muscat Bailey A Wine. *Food Sci. Technol. Res.*, 18, 201-207 (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Eri Inoue, Haruka Kobayashi, Riku Hoshino, Fumie Saito, Masashi Hisamoto, and Tohru Okuda
2. 発表標題 Adsorption potential of grape insoluble polysaccharides to red wine phenolics
3. 学会等名 American Society for Enology and Viticulture (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tohru OKUDA, Guangxian LIANG, Masaru GOZU, Fumie SAITO-WATANABE, Masashi HISAMOTO
2. 発表標題 Understanding composition of white wine lees during vinification
3. 学会等名 American Society for Enology and Viticulture (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----