

機関番号 : 13501

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21700739

研究課題名 (和文) メタボロミクスを基盤としたワインの品質評価技術の開発

研究課題名 (英文) Metabolomics for elucidation of wine evaluation

研究代表者

久本 雅嗣 (HISAMOTO MASASHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 00377590

研究成果の概要 (和文) :

赤ワインは熟成すると色が紫色から赤、レンガ色になり、味もスムーズでマイルドになる。瓶内での熟成による赤ワインの成分の変動を観測するため、製造直後の赤ワインとその1年後に超高速液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析装置で測定を行い、多変量解析を行った。その結果、ピラノアントシアニンやピラノアントシアニン重合体が熟成した赤ワインの熟成に貢献していることがわかった。

研究成果の概要 (英文) :

Applications of metabolomics techniques along with chemometrics provide an understanding in the relationship between metabolome of red wine and its quality. Ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOFMS) allowed a high-throughput analysis. Using this technique, a wide range of metabolites were investigated. A set of red wines during bottle storage was analyzed. Red wines with different storage time were discriminated through orthogonal partial least squares discriminate analysis (OPLS-DA). Furthermore, grape anthocyanins and pyranoanthocyanins detected in red wine were found to be significant markers to bottle aging.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野 : 総合領域

科研費の分科・細目 : 生活科学・食生活学

キーワード : ワイン

1. 研究開始当初の背景

ワインは多くのフェノール性化合物を含んでおり、色調、呈味などに影響を与える。赤ワインは熟成すると色が紫色から赤、そしてレンガ色になり、味もスムーズでマイルドになる。これはアントシアニンやプロアントシアニジンなどのポリフェノールの影響によるといわれている。特に、赤ワインの色調は“アントシアニンのコピグメンテーション”と、“アントシアニンと他の化合物の間で誘導体になり安定な色素体を形成”の2つのプロセスで安定化すると考えられている。しかしながらこの後者のプロセスにおいて、熟成中での安定な色素体の量や生成過程については不明なところが多い。

2. 研究の目的

メタボロミクス的手法を応用して、瓶内での熟成による赤ワインの成分の変動を観測するため、超高速液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析装置 (UPLC-TOFMS) と多変量解析を組み合わせた方法を用いて、赤ワインの熟成による成分の変化を測定した。

3. 研究の方法

- 熟成による赤ワインの瓶内での成分の変動を観測するため、2008年に山梨大学ワイン科学研究センターで製造したカベルネ・ソーヴィニヨン (CS) とマスカット・ベリーA (MBA) のワインを使用した。
- 分光光学的分析 [A420, A520, Wine Color in Acid (WCA), 色素重合体カラー (PPC), 色素パラメーター (Color Hue, Color Intensity), 全フェノール量, 全アントシアニン量] で測定
- それぞれの試料に内部標準として genistein を 2 mg/L になるように加え、0.20 μm の PTFE フィルターで通液し、以下の方法で製造直後とその1年後に同じ測定をした。

UPLC 条件

使用機器：ACQUITY UPLC®システム
カラム：ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm , 2.1×100 mm, Waters)
移動相：0.1%ギ酸水溶液-アセトニトリルグラジエント
流速：0.2 mL/min
注入量：2 μL
カラム温度：40°C
DAD 部：200-600 nm

TOFMS 条件

使用機器：Waters Micromass LCT Premier™ XE

イオン化：ESI Positive/Negative
検出レンジ： m/z 100-2000 with V-optics
キャピラリー電圧：2800 V/pos, 2800 V/neg
コーン電圧：60 V
スキャンタイム：0.2 sec
リファレンス：Leucine Enkephalin 25 fmol/mL

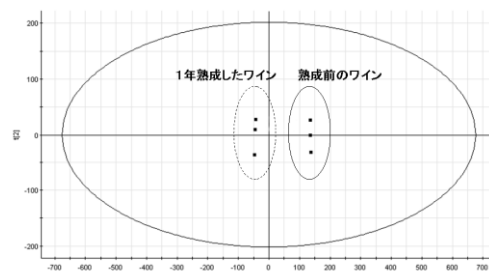
データ処理は MassLynx™ XS、統計処理は MarkerLynx™ XS (ともに Waters) を使用した。

4. 研究成果

熟成による赤ワインの瓶内での成分の変動を観測するため、2008年に製造したカベルネ・ソーヴィニヨンのワインを製造直後とその1年後に同じ方法で測定、比較した。

UPLC で高速分離し、TOFMS から高速フルスキャンで精密質量とフラグメントイオンが一斉に取得できるため、40分で赤ワイン中の10,000以上の化合物の組成式を推定した。

この膨大なデータから成分間の差異を見いだすため、検出ピークの精密質量と保持時間、並びに強度データをリスト化し、これを元に PCA (主成分分析) でスコアプロットしたものが図1である。この図から熟成前の状



態のワインと1年間熟成したワインのグループに分けることが可能となった。

図1 PCAモデル: Score Plot

さらに、この2つのグループの分離に寄与している化合物を特定するために OPLS-DA (直交最小二乗法判別分析) による視覚化を行った。図2の S-Plot の両端は2つのグループ間の分離に最も寄与した重要な成分であることを示している。解析結果から、赤ワインの熟成に重要な成分の一部はアントシアニンやピラノアントシアニンであることが分かった。(Table 1)

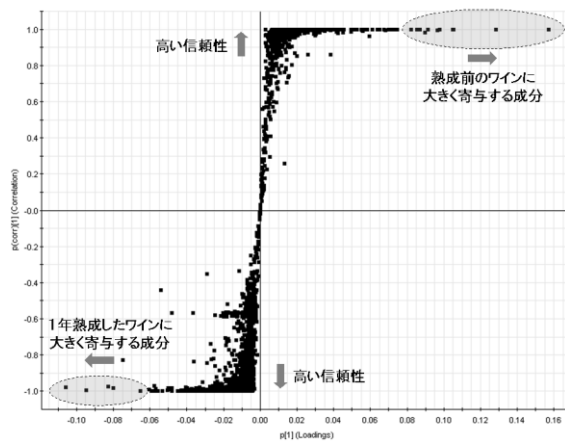


図2 OPLS-DAモデル: S-Plot

Table 1 UPLC-TOFMS から同定した赤ワインの熟成に関与する成分

No.	t R [min]	m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺	Experimental Fragment Ions	Formula	Compound
1	15.01	625.1794	625.1769	301.0761 463.1274	C28H33O16	Prn-3,5-diglc
2	15.05	655.1879	655.1874	331.0871 493.1395	C29H35O17	Mv-3,5-diglc
3	18.30	463.1256	463.1240	301.0768	C2H23O11	Prn-3-glc
4	19.20	493.1378	493.1346	331.0853	C3H25O12	Mv-3-glc
5	20.80	531.1196	531.1139	369.0636	C25H23O13	A-type vitisin of Prn-3-glc
6	21.56	561.1255	561.1244	399.0777	C26H25O14	Vitisin A
7	22.98	603.2546	603.1350	399.0745	C28H27O15	A-type vitisin of Mv-3-(6-acetyl)-glc
8	24.60	535.1451	535.1452	331.0856 493.1286	C29H33O16	Mv-3-(6-acetyl)-glc
9	24.98	809.2389	809.2293	331.0883	C40H41O18	Mv-3-glc-Catechin ethylbridge
10	25.22	801.2278	801.2242	331.0963 493.1363 639.1797	C38H41O19	Mv-3-(6-p-coumaroyl)-glc-5-glc
11	25.48	771.2159	771.2136	301.0756 463.1252 609.1602	C37H39O18	Prn-3-(6-p-coumaroyl)-glc-5-glc
12	27.07	707.1629	707.1612	399.0759 561.1466	C35H31O15	A-type vitisin of Mv-3-(6-p-coumaroyl)-glc
13	27.61	655.1879	655.1663	331.0790 493.1187	C32H31O15	Mv-3-(6-caffeoyl)-glc
14	29.28	639.1752	639.1714	331.0907 493.1494	C32H31O14	Mv-3-(6-p-coumaroyl)-glc
15	29.40	805.2021	805.1980	643.1479	C40H37O18	Mv-3-glc-4-vinylcatechin
16	30.16	625.1588	625.1557	463.1177	C31H29O14	Mv-3-glc-4-vinylcatechol
17	31.10	677.1998	677.1506	301.0557 463.1098	C34H29O15	Prn-(6-p-coumaroyl)-glc
18	31.20	805.2001	805.1980	643.1487	C40H37O18	Mv-3-glc-4-vinylcatechin
19	31.56	609.1619	609.1608	447.1124	C31H29O13	Mv-3-glc-4-vinylphenol
20	32.06	639.1708	639.1714	477.1246	C32H31O14	Mv-3-glc-4-vinylgualacol
21	32.83	651.1753	651.1714	447.1121	C33H31O14	Mv-3-(6-acetyl)-glc-4-vinylphenol
22	33.00	771.1920	771.1925	463.0834	C40H35O16	Mv-3-(6-p-coumaroyl)-glc-4-vinylcatechol
23	33.72	755.2006	755.1976	447.1132 609.2082	C40H35O15	Mv-3-(6-p-coumaroyl)-glc-4-vinylphenol

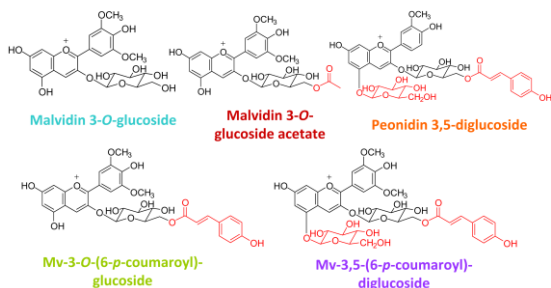


図3 熟成によって減少する主要化合物

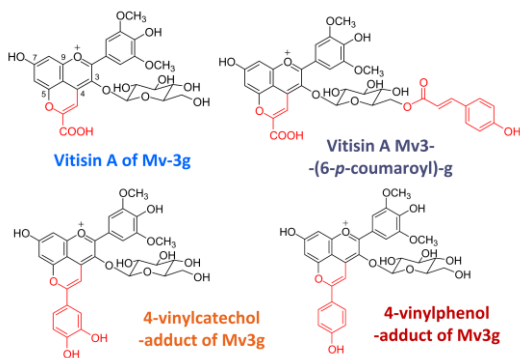


図4 熟成によって増加する主要化合物

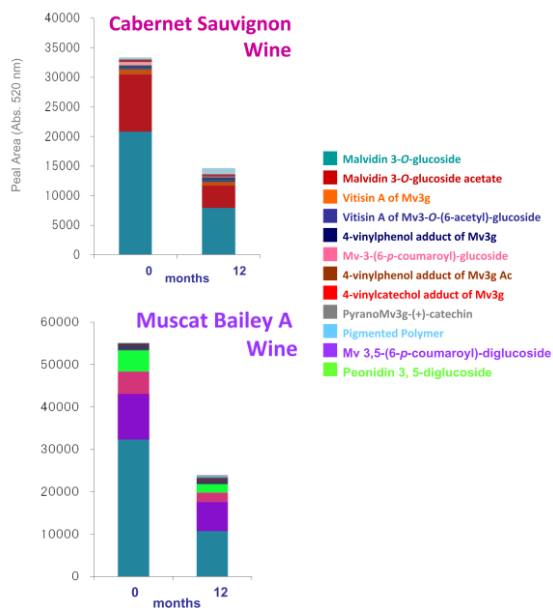


図5 熟成による成分の変化

図3, 4, 5は、カベルネ・ソーヴィニヨン (CS) とマスカット・ベリーA (MBA) アントシアニンやピラノアントシアニンの瓶内での1年間の増減やその主要成分の化学構造を示す。1年間の熟成で Malvidin 3-O-glucoside などの遊離アントシアニンは熟成期間が進むと極端に少なくなり、Vitisin A などのピラノアントシアニンは熟成によって増えることが分かった。また、熟成したワイン中では、遊離アントシアニンはほとんど見られないが、ピラノアントシアニンはわずかではあるが存在することが確認され、ピラノアントシアニンはワインの pH 下 (3.5-3.9) でも強く発色を示すため、赤ワインの色調の一部に寄与している事が考えられる。

以上より、赤ワインの熟成と共に増加するピラノアントシアニンは、ワインの品質評価の指標の1つになることが示唆された。同時に Pigmented Polymers の占める量が増えていくことが確認された。赤ワインの色を保つには、この高分子体の構造やその生成メカニズムを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 久本 雅嗣、市川 茉莉枝、依田 諭、小林 浩武、奥田 徹、オンライン DPPH-HPLC 法によるブドウ種子フェノール中の抗酸化化合物の探索、日本ブドウ・ワイン学会誌、査読付、Vol.22, No.1, 2011, 3-9.

- ② Keishi Narita, Masashi Hisamoto, Tohru Okuda and Sen Takeda., Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. PLoS ONE, 査読付, Vol.6, No.3, 2011, 1-10.
- ③ Masashi HISAMOTO, Hirokazu MUNEDA, Tohru OKUDA , Antioxidant Activity of Various Part of Koshu Grape, Journal of ASEV Japan, 査読付, Vol. 22, 2011, in press.
- ④ Masashi Hisamoto, Taiyo Furuya, Akiko Nakagawa, Fujitoshi Yanagida, Tohru Okuda and Michikatsu Sato, Phenolic off flavor characterization of commercially available wine yeasts and selection of the yeast for Koshu winemaking. Journal of ASEV Japan, 査読付, Vol.21, No.3, 2010, 112-117.

[学会発表] (計2件)

- ① 久本 雅嗣, 藤原 陽, 古屋 太陽, 奥田 徹, 赤ワインの熟成と成分のメタボローム解析, 第5回メタボロームシンポジウム, 2010年9月10日, 山形県鶴岡市
- ② 古屋 太陽, 久本 雅嗣, 勝亦 秀和, 杉山 啓介, 佐藤 充克, 奥田 徹, 生育中の甲州種ブドウに含まれるフェノール性化合物の変化, 日本ブドウ・ワイン学会, 2009年11月21日, 東広島市

[その他]

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Displnfo.Scholar/0/AB357CCA12C1C0CF.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久本 雅嗣 (HISAMOTO MASASHI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：00377590

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし