

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350093

研究課題名(和文) 赤ワイン由来成分ピラノアントシアニンに関する基盤的研究

研究課題名(英文) Characterization of pyranoanthocyanin in red wine

## 研究代表者

久本 雅嗣 (HISAMOTO, Masashi)

山梨大学・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出されるアントシアニンに由来する。ワインの熟成が進むにつれてブドウ由来のアントシアニンは減少し、醸造後数年経過するとほとんどなく、色調も熟成によって赤色から赤褐色へと変化する。それに伴い、赤ワイン中に新たに「ピラノアントシアニン」と呼ばれる赤色化合物を形成する。本研究では合成したピラノアントシアニンの耐熱・耐光性及び酸化抑制活性を行った結果、ピラノアントシアニンは、主要なブドウ由来のアントシアニン(M3G)より色調安定性が高いことから、今までにない新しい特徴を持つ化合物であり、食品をはじめ他の産業への展開が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anthocyanins are the major components responsible for the color of young wines. However, they are relatively unstable and tend to form anthocyanin derivatives during maturation and aging. Some of the anthocyanin derivatives are more stable than anthocyanins themselves, in particular pyranoanthocyanins. In this study, Malvidin 3-O- $\beta$ -glucoside pyruvate (Vitisin A) and Malvidin 3-O-glucoside-4-vinylphenol were synthesized. In addition, all isolated compounds were examined for the color characteristics, stability in relation to pH changes. To better understand the chemical and sensory characterization of polymeric pigments of aged red wines, polymeric pigments were isolated from Cabernet Sauvignon wines. The molecular weight of these pigments were determined on gel permeation chromatography. Compositional characterization, purity and sensory evaluation of polymeric pigments were performed by liquid chromatography/mass spectrometry and sensory analysis, respectively.

研究分野：食品化学

キーワード：ワイン アントシアニン ピラノアントシアニン 高分子色素重合体

### 1. 研究開始当初の背景

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、熟成中にワインの色調は紫色や輝きのある赤色から澄んだルビー、ガーネット、レンガ色、マホガニー色へと変化する。この色調の変化は、若い赤ワインの色調の主体である Malvidin-3-O-glucoside (図1) やそのアシル体など、ブドウ果皮由来のアントシアニンが、熟成中に温度や空気との接触の程度、pH、亜硫酸、他の成分などによって影響を受け、その色素組成が変化することは知られている。

ピラノアントシアニンは、赤ワインに含まれる赤色素体の主成分の一つで、赤ワインの発酵及び熟成工程中にアントシアニンの4位と5位の間でピラン環を形成し、赤ワインの色調を安定化している(図2)。しかしながら、ピラノアントシアニンの詳細な生成メカニズムやその機能的な特徴は、未だ明らかにされていない。上記の

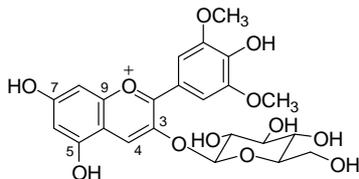


図1 ブドウ由来のアントシアニン (Malvidin 3-O-glucoside)

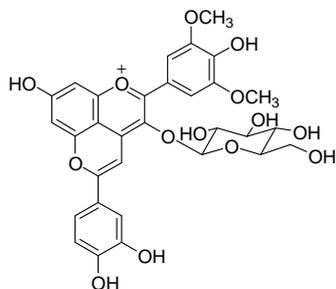


図2 ピラノアントシアニン @ (Malvidin 3-O-glucoside-4-vinylcatechol)

学術的背景およびこれまでの研究成果を元に、本研究はピラノアントシアニンのまだ解明されていない基礎的研究を完成し、ピラノアントシアニンを利用した新しい食品添加物や創薬・医療への応用に展開するための基盤となる研究を行う。

### 2. 研究の目的

赤ワインの熟成中に生成するピラノアントシアニンの化学構造・機能・生成メカニズムを明らかにし、未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、ピラノアントシアニンを実用へと展開するための研究基盤を確立する。さらに、熟成中の赤ワイン中ではピラノアントシアニンの生成とともに、高分子色素重合体の赤色素成分の中で徐々に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。しかしながら高分子色素重合体の化学構造と呈味の関係、さらにその呈味の質の評価については不明な点が多い。そこで高分子色素重合体について、分子量とその呈味について明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ピラノアントシアニンの化学合成・化学

### 構造の決定の確立

Malvidin 3-O-glucoside (M3G) を用いて、赤ワイン中に含まれる2つのピラノアントシアニン ( Malvidin 3-O-glucoside pyruvate ( Vitisin A ) )、Malvidin 3-O-glucoside vinylguaiacol ( M3G-4VG ) ) の化学合成を行った(図3)。Vitisin Aは、pH 0.5の水溶液に市販のM3Gとピルビン酸Na(モル比1:50)を添加し、35°Cのインキュベーター中で10日間反応させた。また、M3G-4VGは、pH 0.5、10%EtOH水溶液中にM3Gと4-vinylguaiacol(モル比1:20)を添加し、35°Cのインキュベーター中で3週間反応させた。反応溶液はUPLC-DAD-TOFMS分析で確認を行った。分取HPLCでそれぞれの化合物を単離し、NMRと精密質量分析より構造解析の同定を行った。

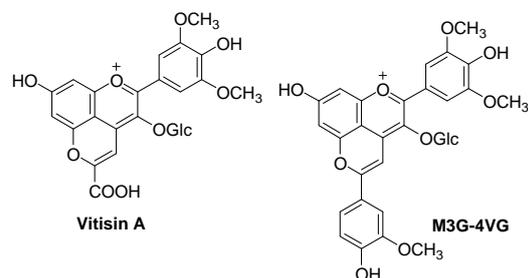


図3 化学合成を行ったピラノアントシアニン

(2) ピラノアントシアニンの耐光性・耐熱性の評価

2つのピラノアントシアニン(Vitisin A, M3G-4VG)に対して、耐熱性試験は50°Cで、耐光性試験は色比較・検査用D65蛍光ランプを用い、色調の評価は、Lab色空間(CIELAB, L\*a\*b\*)で行った。

(3) ピラノアントシアニンの酸化抑制能の評価

2つのピラノアントシアニン(Vitisin A, M3G-4VG)の酸化抑制活性は、DPPHラジカル捕捉活性で評価を行った。

(4) 発酵中のピラノアントシアニンの生成機構の解析及び高産生条件の確立

Vitisin AはM3Gとピルビン酸による反応で生成することから、ピルビン酸を多く産生する酵母を用いることでVitisin Aの形成を促進できることが推測される。そこで赤ワイン醸造に用いられている7種類の市販酵母の中からピルビン酸高産生酵母の選抜を行った。

(5) 赤ワインに含まれる高分子色素重合体の呈味

赤ワインは、山梨大学ワイン科学研究センターで製造し、15°Cで1.8Lのガラス瓶中に保存しているCabernet Sauvignon(CS)のワインを試験試料とした。高分子色素重合体は、2000年から2010年に製造したワインを各種クロマトグラフィーで分離し、高分子色素重

合体を得た。

分画した高分子色素重合体の分子量の測定方法は、GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）分析を行った。カラムは PLgel（5 μm, 100 Å, 300×7.5 mm, Agilent 社）を 2 本直列に接続して使用した。流速 0.25 mL/min, カラム温度 60°Cで行い、検出器には示唆屈折計を用いた。分子量の異なるポリエチレングリコールの  $t_R$  と分子量から検量線を作成し、高分子色素重合体の分子量を算出した。また、ワインの熟成による高分子色素重合体の分子量及びその呈味の変化を調べるため、各 CS ワインについて、2012 年に分画した高分子色素重合体（2012）と、その 2 年後の今回再度分画した高分子色素重合体（2014）の変化について調べた。

さらに、得られた高分子色素重合体の味覚への影響を調べるために、味認識装置 TS-5000Z（インテリジェントセンサーテクノロジー社製）を用いた測定と、熟練のパネラーによる複数の高分子色素重合体の渋味の強弱と渋味の質の評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ピラノアントシアニンの精製・化学構造の決定・合成方法の確立

ブドウ由来アントシアニンの M3G とピルビン酸 Na を反応させた試験試料は定期的に採取し、UPLC-DAD-TOFMS で分析した。反応 10 日後のクロマトグラムの結果を図 4 に示す。それぞれのピークは質量分析（ESI-TOFMS positive mode）の結果それぞれ M3G と Vitisin A (Mw 561) であると推定した（図 5）。

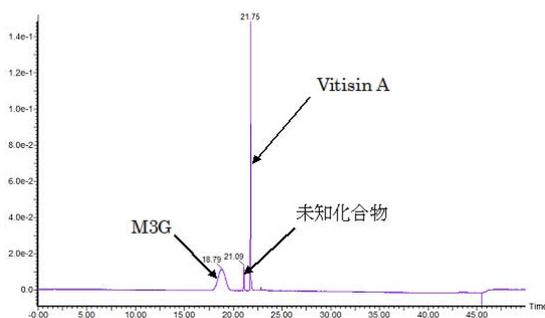


図4 M3Gとピルビン酸の反応物のクロマトグラム

同様に M3G と 4VG を反応させた試料を 3 週間後に UPLC-DAD-TOFMS で分析した。その結果、新たに M3G-4VG であると考えられた。次にこれらの化合物を分取 HPLC で単離し、NMR ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC, HMBC) で化学構造の決定を行った。その結果、それぞれ Vitisin A、M3G-4VG であると同定した。

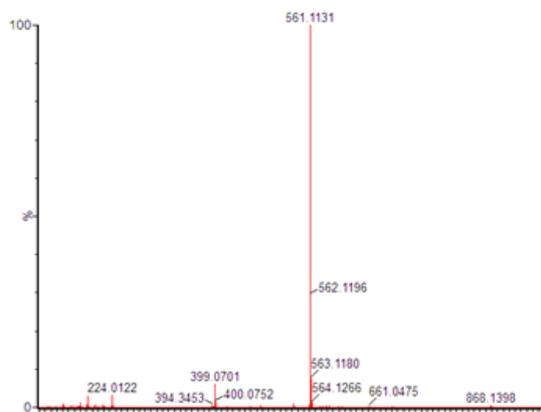


図5 Vitisin AのMSスペクトル

##### (2) ピラノアントシアニンの耐光性・耐熱性の評価

赤ワイン中に含まれるピラノアントシアニン（Malvidin 3-O-glucoside pyruvate (Vitisin A)）と Malvidin 3-O-glucoside vinylguaiacol (M3G-4VG) 及び、対照として果皮ブドウ由来アントシアニンの 1 つである Malvidin 3-O-glucoside (M3G) を用いて、耐光性・耐熱性の評価を行った。化合物の耐熱性試験は 50°Cで行った。耐光性試験は色比較・検査用 D65 蛍光ランプを用い、インキュベーター中で行い、温度は 15°C に設定した。各試料の光の照度が約 6000 lx になるようにした。それぞれの試験の評価は、Lab 色空間 (CIELAB,  $L^*a^*b^*$ ) で行った。Lab 色空間は、 $a^*$ を横軸にとり、値が大きければ赤色であり、低ければ緑色になる。 $b^*$ は縦軸にとり、値が大きければ黄色になり低ければ青色になる。 $L^*$ は明度を示す。数値が高ければ明るく、低ければ暗い。原点は無色透明を指す（図 7, 8）

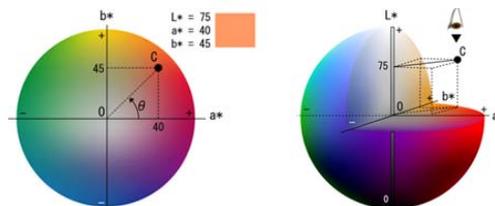


図7 色差計の評価 (CIELAB,  $L^*a^*b^*$ )

$a^*$ : 値が正に高ければ高いほど赤色を示す。  
 $b^*$ : 値が正に高ければ黄色を示し、負に高ければ青色を示す  
 $L^*$ : 明度(数値が大きくなるほど色が透明になる)  
 $\Delta E^*(ab)$ : 数値が大きければ色調に変化があったことを示す

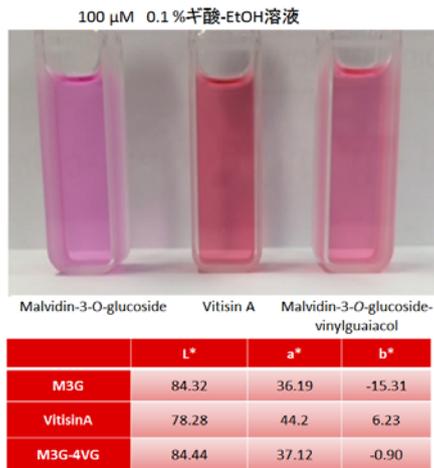


図8 各化合物の色調とL\*a\*b\*

M3G及びM3Gより得られた2つのピラノアントシアニンを含む3つの化合物について耐光性を比較した結果、M3Gはa\*値が最も減少、L\*値が増加したのに対し、Vitisin Aはa\*値の減少、L\*値の増加が最も緩やかであった(図9)。耐熱性において、M3G-4VGは、色調にほとんど変化がなく、M3GとVitisin Aはa\*値とL\*値が類似した推移で変化した(図10)。

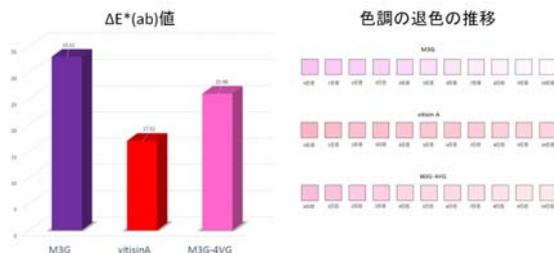


図9 蛍光照射後のピラノアントシアニンの色調の推移

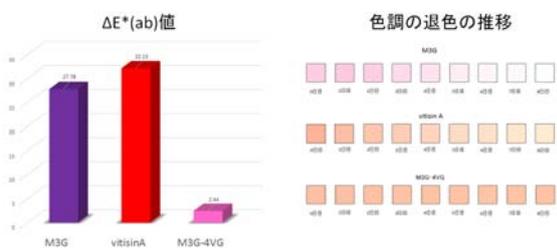


図10 熱処理後のピラノアントシアニンの色調の推移

各pHにおける保存安定性試験を行った結果、M3GはpH4付近で退色するのに対し、Vitisin A、M3G-4VGはpH4においてもほとんど色差に影響がなかった(データは示さず)。以上より、従来のアントシアニン系色素は、光・熱に対し不安定であるため、食品への用途が限定されているが、今回評価を行ったピラノアントシアニンは、主要なブドウ由来の

アントシアニン(M3G)より色調安定性が高いことから、今までにない新しい特徴を持つ化合物であり、食品をはじめ他の産業への展開が可能と考えられる。

### (3) ピラノアントシアニンの酸化抑制能の評価

ピラノアントシアニンの酸化抑制能の評価はDPPHラジカル捕捉活性で評価を行った。DPPHは比較的安定な有機ラジカルであり、溶液中では紫色を呈している。この溶液中に抗酸化物質(RH)を加えると、DPPHラジカルは抗酸化物質から水素を引き抜いて還元され、ラジカルではなくなり溶液の色が紫色から透明になる。その結果、Vitisin Aの活性が最も高く、次いで、M3G、M3G-4VGであった(図11)。

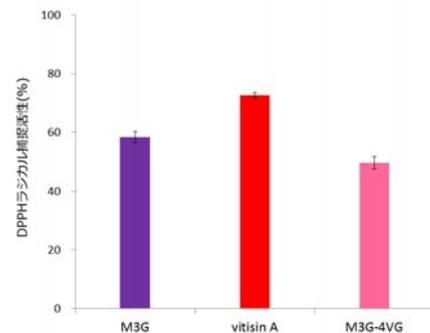


図11 ピラノアントシアニンのDPPH捕捉活性 (M3G Vitisin A, M3G-4VGは各50 μM、100 μM DPPH-EtOH溶液で反応)

### (4) 発酵中のピラノアントシアニンの生成機構の解析及び高産生条件の確立

各酵母7種(BM45, BRL97, EC1118, PRIMEUR, RC212, Rhône2226, Rhône2323)を加水活性化したのちに、YPD培地に接種したサンプルを20°Cの恒温培養器に置き、12時間毎に4日間測定を行った。図12は3日経過後のピルビン酸量を示す。BM45とRhône2226はピルビン酸濃度が高いのに対し、EC1118やPRIMEUR、RC212のピルビン酸濃度は低かった。ピルビン酸濃度が高い2種の中でもRhône2226は、BM45に比べ安定的にピルビン酸を産生し続けた。

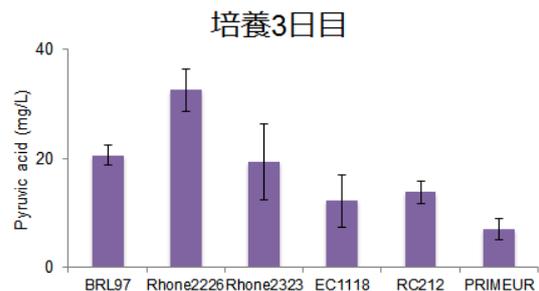


図12 市販酵母によるピルビン酸生成量

また、Cabernet Sauvignon ブドウ果汁中におけるピルビン酸量も同様の傾向が認められた。

#### (5) 赤ワインに含まれる高分子色素重合体の呈味

赤ワインは、山梨大学ワイン科学研究センターで製造し、15℃で1.8 Lのガラス瓶中に保存している Cabernet Sauvignon (CS) のワインを試験試料とした。高分子色素重合体は、赤色素成分として他のブドウ由来のアントシアニンやピラノアントシアニンとワイン中で混ざった状態で存在している。そこで、高分子色素重合体は、2000年、2005年及び2009年に製造した3種類のワインを各種クロマトグラフィーで分離し、高分子色素重合体を得た(図13)。右の写真に示すように、モノマー画分の色素は、鮮やかな赤色を呈しているのに対し、ポリマー画分はレンガ色を呈した。ポリマー画分(高分子色素重合体)の精製を確認するために、UPLCで分析した結果、良好に精製できた(図14)。

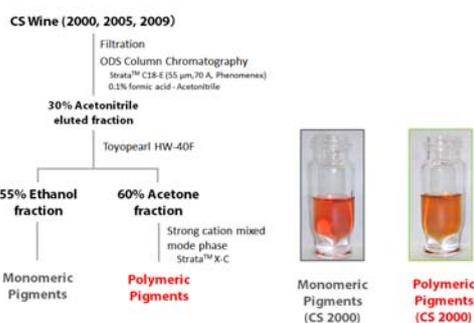


図13 赤ワインから高分子色素重合体の分画

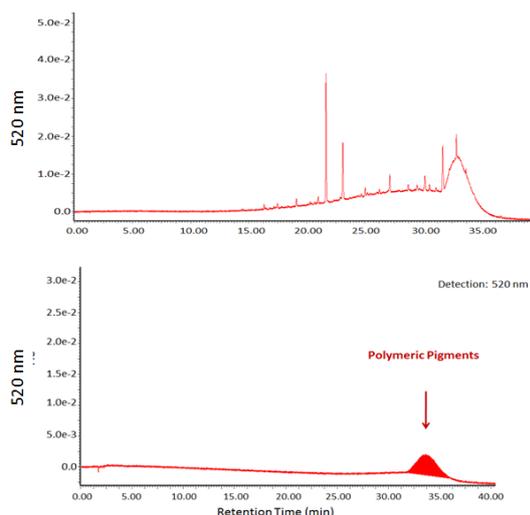


図14 CSワインから分画した高分子色素重合体のUPLCクロマトグラム(上:分画前、下:分画後)

分画した高分子色素重合体の分子量の測定は、GPC(ゲル浸透クロマトグラフィー)分析でおこなった。カラムは、PLgel(5µm, 100Å, 300×7.5mm, Agilent社)を2本直列に接続し

て使用した。流速0.25 mL/min, カラム温度60℃で行い、検出器には示唆屈折計を用いた。標準品であるポリエチレングリコールの $t_R$ と分子量から検量線を作成し、高分子色素重合体の分子量を算出した。今回、ワインの熟成による高分子色素重合体の分子量及びその呈味の変化を調べるため、各CSワインについて、2012年に分画した高分子色素重合体(2012)と、その2年後の今回再度分画した高分子色素重合体(2014)の変化を調べた。その結果を図15に示す。

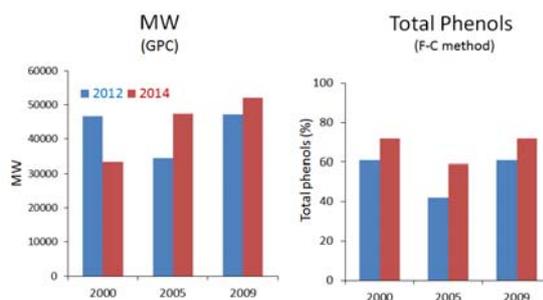


図15 各CSワインから分画した高分子色素重合体(2012年に分画、2014年に分画)の分子量(左)とそのポリフェノール量の割合(右)

左図は各高分子色素重合体の分子量、右図に各高分子色素重合体に占めるポリフェノールの割合を示す。ポリフェノール量はフォーリンシオカルト法(F-C法)より算出した。分子量はCS2000年のワインを除き、2年後には分子量は増加し、それに伴いポリフェノールが占める割合も増加していることが認められた。

次に、得られた高分子色素重合体の味覚への影響を調べるために、味認識装置を用いた測定とヒトによる官能評価を行った。味認識装置は現在保有しているTS-5000Z(インテリジェントセンサーテクノロジー社製)を使用した。高分子色素重合体の測定では、13%エタノール溶液を基準とし、(+)-Catechin-13%エタノール溶液及び2000年、2005年及び2009年に製造したCSワインから分画した高分子色素重合体-13%エタノール溶液を使用した。図16(左)は渋味(先味)の結果を示す。同重量濃度において、いずれの高分子色素重合体も(+)-Catechinより強い渋味(先味)を示した。特に、比較的製造年が新しいCS2005とCS2009は熟成により渋味が強くなった。これらの結果より、分画した年で渋味の強度が変化するもの、ほとんど変化しないものが認められた。

熟練のパネラー9名による渋味の質のブラインド評価を図16(右)に示す。(+)-Catechinについて最初は苦味を感じ、後にざらつきのある収斂味として多くのパネラーが指摘した。一方、CS2000のいずれの高分子色素重合体も「まろやか」、「余韻が残り柔らかい渋味」などのコメントが得られた。それに対しCS2005とCS2009の分画物は、味認識装置

による渋味（先味）の強度と比例し、強い渋味として評価したが、渋味の質については異なるコメントが得られた。現在、製造年並びに分子量と渋味（先味）の強度の関係について検討中である。

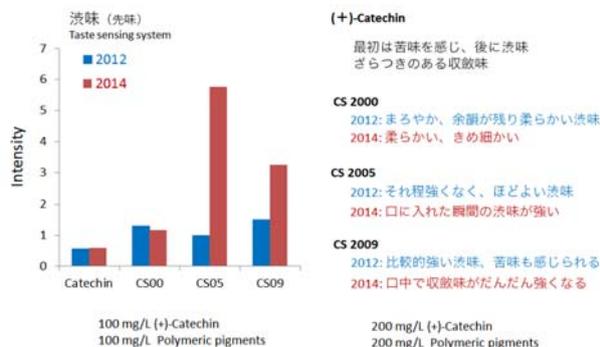


図 16 各 CS ワインから分画した高分子色素重合体の渋味（先味）（左）と熟練のパネラーによる高分子色素重合体の渋味の質の評価（右）

## 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）

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 小金澤あづみ, 久本雅嗣, 鈴木淳平, 斉藤史恵, 奥田 徹, 赤ワインに含まれる高分子化合物赤ワインに含まれる高分子化合物, 日本ブドウ・ワイン学会, 2015 年 11 月 7 日, 上越教育大学 (新潟県・上越市)
- ② 井上絵梨, 近田有哉法, 小林春香, 梁 光織, 斉藤史恵, 久本雅嗣, 奥田 徹, 赤ワイン醸造におけるポリフェノールの抽出挙動, 日本ブドウ・ワイン学会, 2015 年 11 月 7 日, 上越教育大学 (新潟県・上越市)
- ③ 久本雅嗣, 鈴木淳平, 斉藤史恵, 奥田 徹, 赤ワインに含まれる高分子色素重合体の呈味, 日本農芸化学会 2015 年度岡山大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)
- ④ 田村彰吾, 久本雅嗣, 鈴木淳平, 斉藤史恵, 奥田 徹, 赤ワイン由来成分ピラノアントシアニンの色調安定性, 日本栄養・食糧学会関東支部第 93 回シンポジウム及び日本食品科学工学会平成 26 年度関東支部合同大会, 2014 年 3 月 1 日, 東京農業大学 (東京都・世田谷区)
- ⑤ 田村彰吾, 久本雅嗣, 鈴木淳平, 斉藤史恵, 奥田 徹, 赤ワイン由来成分ピラノアントシアニンの機能性, 日本食品化学学会, 2013 年 8 月 30 日, 日本食品化学学会第 19 回総会・学術大会, 金城学院大学 (愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_DisInfo.Scholar/0/AB357CCA12C1C0CF.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisInfo.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 総合研究部 准教授

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