

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450175

研究課題名(和文) 赤ワインのアントシアニン抽出に対するブドウ果皮のマトリクス効果

研究課題名(英文) Matrix effect of grape skin on extraction of anthocyanins

研究代表者

奥田 徹 (OKUDA, Tohru)

山梨大学・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：赤ワインの色は、消費者の購買意欲に直結する重要な指標である。色素として重要なアントシアニンは赤ワイン製造中に、果皮からワインに抽出されるが、製造中に濃度が減少する。この原因はいくつか考えられ、例えば水和による分解、亜硫酸による脱色、果皮への吸着などがある。本研究では果皮への吸着について、その条件などを検討した。果皮へのアントシアニンの吸着は、アルコール濃度により阻害された。pHの影響を調べたところ、pH3.2付近で最も吸着率が高くなった。一方、アントシアニンの安定性に寄与するタンニンはpH3.2で極小となり、果汁のpHが果皮のアントシアニン吸着に大きな影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：Red color of wine is very important parameter for consumers. Anthocyanins as pigment are extracted from skin of grape into wine. But the concentrations of anthocyanins are reduced during vinification. Some parameters are affect this reduction fo anthocyanin contents, such as hydration with water, decolorization by sulfite, and adsorption toward skin. In this study, we focused the adsorption properties of grape skin. Anthocyanins adsorption was inhibited by increasing concentration of ethanol in medium. Adsorption of anthocyanins was maximal at pH 3.2, and it was declined other pH. Tannin, which stabilize anthocyanin during vinification, adsorption property was in inverse manner. These result may important for making hight qulality red wines.

研究分野：食品分析学

キーワード：ワイン アントシアニン 色調 タンニン

### 1. 研究開始当初の背景

ワインはブドウを発酵させただけの単純なアルコール飲料である。一方で、原料の価格に対して、最も付加価値が高められる6次産業のモデルであり、環太平洋パートナーシップ問題を抱える日本の農業において、品質の根本的な向上が期待されている。

消費者は色の濃いワインは品質が高いワインであると考え、実際、色の濃さと品質の高さに相関があることが統計的にも示されている。そして赤色を形成するアントシアニン類はブドウの果皮に存在し、ワイン製造時(醸し発酵中)にワインへ抽出される。ワインのアントシアニン量を高くするため、以下の方法が考えられてきた。

- ・抽出時間の延長(Extended Maceration)
- ・発酵温度を高くする(Thermo Vinification)

- ・ペクチナーゼ酵素によって果皮細胞壁を溶解し抽出率を上げる

また、攪拌効率の良い醸し発酵法(回転タンクの使用など)も数多く開発されている。しかし、これらの方法はほとんど効果が無いが、逆にアントシアニンの濃度を下げることが報告されている。

一般にアントシアニン濃度は発酵開始後4日程度で、最大になるが、その後、減少し、ワインの色も退色する。また、ワイン中のポリフェノールの半分以上を占めるProanthocyanidin(通称タンニン)は、酸化反応によってアントシアニンと結合し、「T-A複合体」を形成することが知られている。我々のFPLC-MSを利用した分析結果もこれらの理論を支持する。したがって、アントシアニン濃度が減少する理由は、醸し発酵中の攪拌により、ワインが酸化し、ポリフェノール類であるアントシアニンが高分子化し「沈殿」すると言われていた。しかし、沈殿物のポリフェノール量を測定したが、その量は少なく、また、変化も少なかった。従って、沈殿物中にT-A複合体が多く含まれているとは考えにくく、アントシアニン類の減少理由を合理的に説明できない。

一方、筆者らはタンニンの研究を行ってきた。タンニンは、発酵初期には、ワインに抽出されるが、発酵後6日目程度から急速に濃度が減少することを突き止めた。減少する理由は、発酵中に共存する果皮細胞壁多糖(果皮マトリクス)への吸着だと考えた。そこで果皮への吸着が行われる前に果皮を除去(早期圧搾)したところ、タンニンの減少が阻害された。

早期圧搾したワインでは、前述のアントシアニン類の退色も抑えられ、図2のような濃いワインが製造され(従来法の2倍の濃さ)官能的にも優れていることが分かった。

これらのことから、ブドウ果皮からワインへのアントシアニンの抽出は、単純な拡散率や溶解だけでなく、果皮マトリクスなどへの吸着が重要であり、この条件を明らかにする

ことが重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

赤ワイン製造時のポリフェノールの抽出機構を総合的に明らかにするため、果皮のマトリクス効果について調べることを目的とする。特に、不溶性のマトリクスへのアントシアニンやタンニンの吸着条件などをモデル実験、醸造実験からあきらかにする。

### 3. 研究の方法

(1)ブドウ果皮の不溶性マトリクスの精製  
予め-20℃で保存してあったマスカット・ベリーAから果皮を得た。まず果皮のフェノール化合物を取り除くために70%(v/v)アセトン水溶液でフェノール化合物の抽出を行った。その後ホモジナイズし、さらにフェノール化合物やその他の成分を取り除くため複数回洗浄(水、フェノール、エタノール、アセトン)を行った。最後に凍結乾燥をし、粉末状の果皮不溶性マトリクスを得た。

(2)ブドウ果皮ポリフェノールの抽出及び分画精製

(1)で抽出したフェノール化合物を使用し、ポリフェノールの分画精製を行った。分画には担体にToyopearl HW40-Fを、移動相にはアントシアニンを溶出するのに50%(v/v)酸性メタノール水溶液、タンニンを溶出するのに70%(v/v)アセトン水溶液を使用した。その後、各画分の溶媒を減圧蒸発させ、凍結乾燥の後、アントシアニンおよびタンニンの粉末を得た。

(3)ブドウ果皮ポリフェノールの不溶性マトリクスへの吸着モデル実験

(1)(2)で得られた果皮の不溶性マトリクス5mgとポリフェノール類1mgをそれぞれモデルワイン溶液中で1時間32℃で反応させた。モデルワインはアルコール濃度やpHを変化させたものを使用し、ポリフェノール類の果皮不溶性マトリクスへの吸着条件を調べた。アントシアニンはHPLCで分析し、タンニンはフォーリンシオカルト法とBSA沈殿法で分析した。

(4)醸造時におけるブドウ果皮中及びワイン中のポリフェノール量の変化

マスカット・ベリーAを用いて小規模醸造試験を実施した。製法は一般的な赤ワインの醸造法で行った。また、発酵中の果皮及び果汁を、醸造開始から7日目までは毎日、7~14日目までは隔日サンプリングした。(3)と同様、果皮中のアントシアニン類はHPLC分析で行い、タンニンの分析はフォーリンシオカルト法とBSA沈殿法で分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) モデル系実験によるポリフェノール吸着率の変化

アントシアニン類の吸着率の変化を図1と図2に示した。図1では全アントシアニンの吸着率の変化を示した。吸着時の条件に関係なく、平均約15~20%のアントシアニンが果皮不溶性マトリクスに吸着した。また、pH 3.0の時に最も吸着率が高く25%であった。図2ではマスカット・ベリーAワインに多く含まれ、かつ極性の異なる二種のアントシアニンの吸着率を示した。どの条件下でも極性の低い Malvidin-3-(6-p-coumaroyl)-glc(trans) において吸着率が高く、また、アルコールの非存在時においては約60%吸着した。タンニンの吸着率の変化を図3に示した。吸着時の条件に関係なく、全フェノール量で平均約30%、BSA 結合性タンニンで約30~40%吸着した。pH 4.2では約80%のBSA 結合性タンニンが吸着したが、一方pH 3.2では約20%だった。この実験によって、果皮不溶性マトリクスにポリフェノール類が吸着することが示され、また、特定のpHで吸着率が顕著に変化することがわかった。また、アルコール濃度が低い状態では、アントシアニン、タンニン共に容易に吸着が起こることが示唆された。

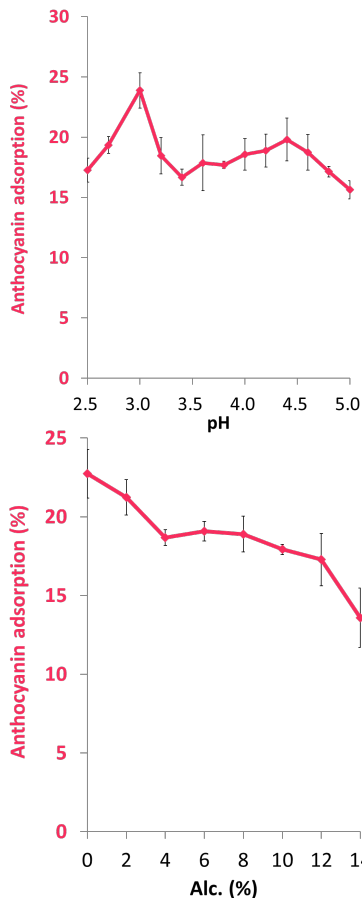


図1 全アントシアニンの吸着率の変化 (上: pH変化、下: アルコール濃度変化)

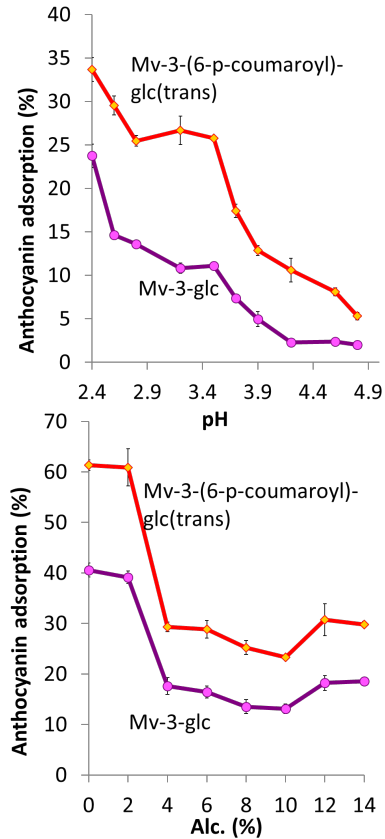


図2 Malvidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside (trans)と Malvidin-3-glc の吸着率の変化(上: pH変化、下: アルコール濃度変化)

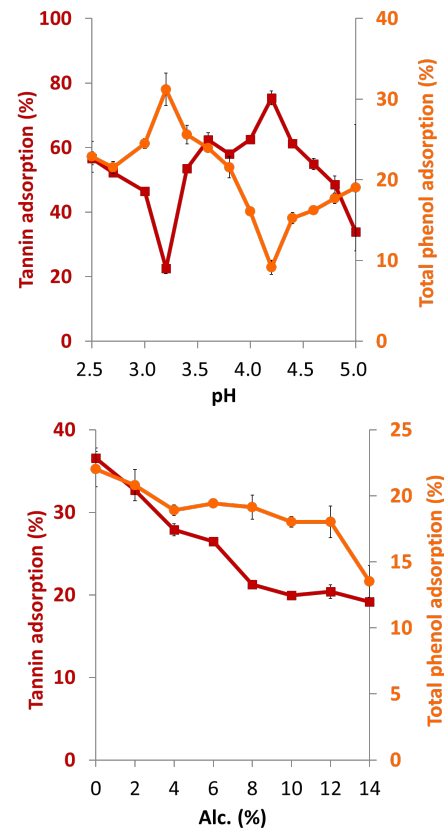


図3 全フェノール及び BSA 結合性タンニンの吸着率の変化(上: pH変化、下: アルコール濃度変化)

#### 4-2. 醸造時における果皮中及びワイン中のポリフェノール量の変化

醸造時の果皮中のアントシアニン量の変化を図4に示した。全てのアントシアニン類は発酵が進むにつれてワイン中に抽出されていった。しかし発酵6日目でアントシアニン類の抽出は止まった。また、果皮中およびワイン中のBSA結合性タンニン量を図5に示した。果皮中のBSA結合性タンニン量はアルコール発酵でほとんど全て抽出された。しかし、ワイン中のBSA結合性タンニン量は、発酵開始から4日目までは増加したがその後減少し続け、発酵後期にはほぼなくなった。これより、小規模醸造試験ではモデル系実験と同様の結果は得られなかったが、発酵中においてワイン中のタンニン量が減少していることから、さらなる検証を行う必要があると考えられた。

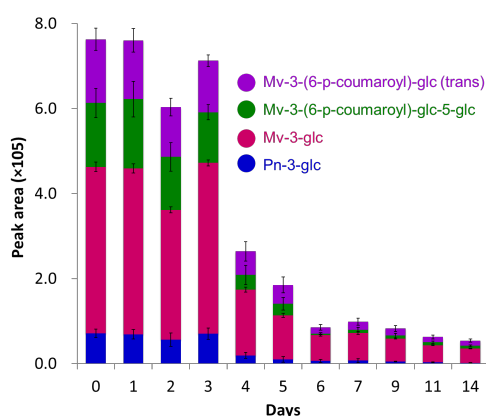


図4 アルコール発酵における果皮中の主要なアントシアニン類量の変化

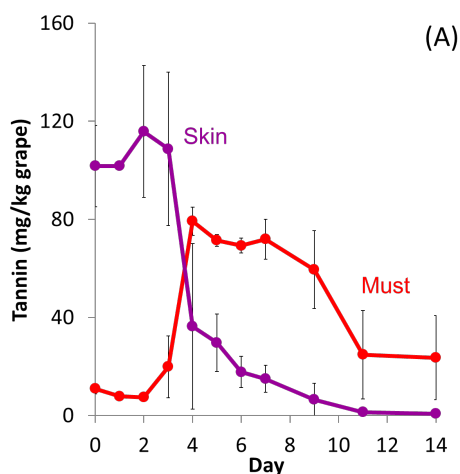


図5 アルコール発酵中における果皮およびワイン中のBSA結合性タンニン量の変化

#### 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 1件)

Tohru Okuda, Seiji Furuya, Eri Inoue, Yukinori Chikada, Marie Ichikawa, Fumie

Saito, and Masashi Hisamoto. Extraction of Proanthocyanidins during Fermentation of Muscat Bailey A and Cabernet Sauvignon Wines. J. ASEV Jpn. (査読有), 2014, 25(3), 90-96.

[学会発表](計 4件)

Eri Inoue, Haruka Kobayashi, Guangxian Liang, Fumie Saito, Masashi Hisamoto and Tohru Okuda\* Effects of must pH to red grape skin-tannin extraction. Am Soc Enol Vitic. 2016.6.28-30, National Conference, Monterey (CA)

井上絵梨, 斉藤史恵, 久本雅嗣, 奥田 徹, 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, 2015.11.7, 上越教育大 (新潟・上越)

Eri Inoue, Yukinori Chikada, Fumie Saito, Masashi Hisamoto and Tohru Okuda, Characteristic of polyphenol adsorption properties toward grape skin insoluble polysaccharides in Muscat Bailey A wine. Am. Soc. Enol. Vitic. 2015.6.16-18, National Conference, Seattle (WA)

井上絵梨, 斉藤史恵, 久本雅嗣, 奥田 徹. 不溶性多糖類による赤ワイン中のポリフェノールの吸着活性. 日本ブドウ・ワイン学会, 2014.8.18, 北海道大学 (北海道・札幌)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

奥田 徹 (OKUDA, Tohru)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 10252008