

ワイン製造におけるアントシアニン及びその重合体の酵素的酸化機構に関する研究
(2002年日本ブドウ・ワイン学会論文賞受賞)

横塚弘毅

山梨大学大学院医学工学総合研究部・ワイン科学研究センター
〒400-0005 山梨県甲府市北新1丁目13-1

**Enological Studies on Enzymatic Oxidation and Degradation of Anthocyanins
and Oligomeric and Polymeric Pigments in Red Winemaking
from Grapes Grown in Japan**

Koki Yokotsuka

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering & The Institute of Enology and Viticulture,
University of Yamanashi, 13-1 Kitashin-1-chome, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan.

Abstract

The compositions of and changes in anthocyanins, red pigment oligomers, and polymers of grape skins and red wines during ripening, contacting between juice and skin (also seeds) after crushing of grapes, fermenting on skins, and storing or aging of finished wine were investigated for several red grape cultivars grown in Japan. In particular, the enzymatic and chemical properties of polyphenoloxidase from grape juices, its substrate specificity, and enzymatic decolorization of anthocyanins and oligomeric and polymeric pigments and decolorization mechanisms were analyzed and are discussed.

緒 論

筆者がワイン研究を開始した1970年当時、わが国のワイン消費量はわずか約6千kLであった。欧米でいわゆる「フレンチ・パラドックス」がマス・メディアによって報じられた1994年頃のわが国のワイン消費量は約12万kL、赤ワインブームが最盛を迎えた1998年のそれは約38万kLにも達した。このような過去30年のワイン消費量の拡大は、国民所得の増大、食生活の欧米化、海外旅行ブーム、大阪万国博覧会や東京オリンピックなどの国際的行事の開催に加えて、ワイン、特に赤ワインがもつ機能性と日本国民の健康志向がフィットしたことも一因であろう。一般にワイン先進国では白ワインよりも赤ワインの消費が多く、一方日本のようなワイン途上国ではやや甘口の白ワインのほうが好まれるという消費パターンは、1990年代後半のワインブームによって覆された。

従来、わが国のワイン研究は、ワイン酵母や白ワイン成分の研究が中心で、赤ワインの色調を構成するアントシアニンやその重合体に関する研究はほとんどなされていなかった。筆者は、1980～1981年、文部

省在外研究員としてカリフォルニア大学デイビス校ブドウ・ワイン学科のV. L. Singleton教授のもとで、主として果汁中の無色ポリフェノールの研究に取り組み、ワインポリフェノールの基礎を学んだ。帰国後、同教授のアドバイスを受けながら、「ブドウの赤色素に由来する色調と苦渋味の研究」、「ワインの溶存タンパク質の構造と機能に関する研究」、「バイオリクター及び抗酵母性物質によるワイン発酵の制御に関する研究」などを行った[7, 16, 19-23]。これらの3つの研究テーマは相互に関連しているが、本稿は、主として1997年2001年の5年間にAm. J. Enol. Vitic.と日本ブドウ・ワイン学会誌に掲載された筆者と共同研究者による「国産赤ブドウと赤ワインの色素に関する研究」をまとめたものである。

国産ブドウとワインのフェノール含量

Table 1は、国産白ワイン83点と国産赤ワイン52点のフェノール含量を示したものである[8]。全フェノール含量の平均は、白ワインで333 mg/L、赤ワインで1323 mg/Lであった。全フェノールは、果皮や種子由来のフラボノイドと果汁由来の非フラボノイド型フェノールによって構成されるが、白ワインでも赤ワインでも、非フラボノイド含量は約200 mg/L

Acknowledgements

I am grateful to Dr. Vernon L. Singleton, Professor Emeritus of The University of California, Davis for his helpful advice and valuable suggestions.

で、フェノール含量で見ると、国産ワインは外国産ワインの全フェノール含量と大きな差異はなかった。

2000年に山梨県で収穫された16品種の赤ブドウと白ブドウの各組織の重量と全フェノール含量を調べた (Table 2) [3]。赤ブドウでも白ブドウでも、種子と果皮の重量は生食用ブドウよりもワイン用ブドウのほうが大きく、逆に果汁量は生食用ブドウのほうが多かった。種子や果皮中の全フェノールはワイン用ブドウにより多く存在した。8品種のワイン用ブドウ顆粒 (grape berry) 1 kgあたりの種子及び果皮の平均重量はそれぞれ約3.5%と15%であったが、全フェノール量はそれぞれ約64%と32%であった。果汁の全フェノール含量は110 mg/kg 顆粒 (顆粒全体の全フェノールの約3.8%) と少ないのに比べて、ブドウ顆粒に存在するほとんどのフェノールは種子や

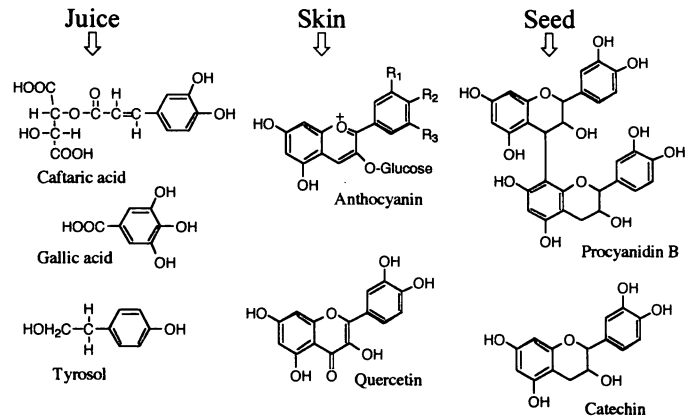


Figure 1 Some major phenolic compounds in juice, skin, and seed.

果皮に含まれていることから、ワインブーム、すなわちポリフェノール人気の対象となったワインは醸し発酵を経て造られる赤ワインであることが理解できる。

Table 3に、1992～1995年のカベルネ・ソービニョンブドウのパルプ、果皮、種子の重量、全フェノール及び種子と果皮から抽出可能なフェノール量を示した [11, 14]。各ブドウ組織の重量の割合は、パルプが83%、果皮が10.5%、種子はわずか2.8%であっ

Table 1 Mean phenol content of table wines made from grapes grown in Japan⁽⁶⁾.

	Total Phenols	Flavonoid Phenols (mg/L)	Non-Flavonoid Phenols
White wines (n = 83)	333	129	204
Red wines (n = 52)	1323	1000	223

Table 2 Mean total phenol content of wine and table grapes in the 2000 growing season in Japan⁽³⁾.

	Wine grapes			Table grapes		
	Seeds	Skins	Pulp	Seeds	Skin	Pulp
Red grapes						
Weight (g/kg berries)	38.5 ^a	148	757	14.7 ^c	89.5	842
Total phenols (g GAE/kg berries)	1.837	1.179	0.132	1.668	0.707	0.155
White grapes						
Weight (g/kg berries)	32.8 ^b	149	724	12.2 ^d	71.3	855
Total phenols (g GAE/kg berries)	1.887	0.711	0.087	1.337	0.369	0.174

^a Cabernet Sauvignon, Muscat Bailey A, Merlot, and Shiraz.

^b Chardonnay, Pinot gris, Riesling, and Koshu.

^c Benizuiho (Golden Muscat × Kuroshio), Kaiji, Pione, and Kyoho.

^d Rosaki, Rosario Bianco (Rosaki × Muscat of Alexandria), Neo Muscat, and Muscat of Alexandria.

Table 3 Phenolic contents of Cabernet Sauvignon grapes harvested in 1992, 1993, 1994, and 1995 in Yamanashi, Japan^(11,14).

Tissue ^a	Weight (g/kg berries)	Total phenols	Flavonoids	Extractable phenols ^b	
				Total phenols	Flavonoids
(mg GAE/kg berries)					
Pulp	830	309	138		
Skin	105	1443	613	419	402
Seed	28	3571	3460	634	622

^a Grapes were harvested at 20 Brix.

^b Phenols were extracted at 25°C for five days.

Table 4 Composition of anthocyanins extracted from berry skins of four grape cultivars^(14-15,25).

	Merlot	Cabernet Sauvignon	Muscat Berry A	Kosho
	(mg/kg)			
Total red pigments	1150	596	710	4.4
Total anthocyanins	1060	412	599	
	(% of total)			
Delphinidin-3-glucoside	12.2	16.0	3.8	
Cyanidin-3-glucoside	4.8	7.4		< 20
Petunidin-3-glucoside	9.0	8.4	6.4	
Peonidin-3-glucoside	11.4	11.7	12.2	46
Peonidin-3,5-diglucoside			9.1	
Malvidin-3-glucoside	30.2	29.8	43.1	29
Malvidin-3-gulcoside acylated with acetic acid	12.4	14.2		
Malvidin-3-glucoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid	8.8	3.7	10.0	
Malvidin-3,5-diglucoside			8.0	
Malvidin-3,5-diglucoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid			7.4	

たが、全フェノールは、パルプ（果汁と压榨後の固形物）に 309 mg/kg、果皮に 1443 mg、種子に 3575 mg が含まれ、パルプに約 5 %、果皮に 25%、種子に 70% のフェノールが存在した。しかし、これらのすべてのフェノールがワインの色や味に利用できるわけではない。モデルワイン（10% アルコール、pH 3.0）を用いて 25℃、5 日間抽出の結果、果皮からは約 30 %、種子からは約 18% のフェノールがワインに移行した。果皮や種子から移行したフェノールの 96~98 % はフラボノイド型フェノールであった。

赤ワインのフェノールは、木樽から抽出されるフェノールと発酵中にチロシンから生じるチロソールを除けば、果汁、果皮あるいは種子に由来する [10]。果汁由来の主なフェノールとして、酒石酸とコーヒー酸のエステルであるカフタリック酸、また安息香酸誘導体である没食子酸がある。没食子酸は遊離で存在す

る量は非常に少ないが、フェノール複合体の加水分解によって若干の没食子酸が生じる。果皮には、ケルセチンや赤色色素アントシアニンが含まれるが、通常これらは配糖体として存在する。種子抽出物のほとんどはプロシアニジンとして存在し、遊離のカテキンやエピカテキンはわずかしか見出されない。赤色のアントシアニンと黄色のフラボノイド以外のブドウフェノールは本来無色であるが、無色フェノールが酸化されれば黄色、黄色、茶色、褐色になり、白ワインの色調を形成する [12, 24]。

赤ブドウと赤ワインのアントシアニン

赤ワインに存在するアントシアニンの一般式と 5 種のアグリコン（アントシアニンの糖部分を除いたアントシアニジン）の構造を Figure 2 に示す。アントシアニンは 3,5,7-トリヒドロキシ-2-フェニルベンゾピリリウムを基本骨格とし、2 個のベンゾール核をそれぞれ A 環、B 環と呼ぶ。B 環における置換基、水酸基、メトキシル基の数と位置によってアントシアニジンの種類（構造）は決まる。B 環に 1 つの水酸基がついたペラルゴニジンはブドウに見出されていない。B 環に 2 つの水酸基がついたシアニジン、その 1 つの水酸基がメチル化されたペオニジン、3 つの水酸基のついたデルフィニジン、その 1 つの水酸基がメチル化されたペツニジン、2 つがメチル化されたマルビジンがある。ペーパークロマトグラム上の色調で、シアニジン、ペオニジン、マルビジンは赤あるいは紅色系、デルフィニジンとペツニジンは赤紫色である。アントシアニジンの A 環と B 環は 3 個の炭素鎖を介して γ -ピロン環をつくって結合しているが、この C 環の酸化状態で種々のフラボノイド骨格が区別される。C 環の 3 位の炭素についた水酸基はグルコシル化されている (3-glucoside)。ヨーロッパ系ブドウは、3-glucoside のアントシアニンのみをもつ。3-Glucoside に加えて A 環の 5 位の炭素の水酸基にもう 1 つのグルコースがついた 3,5-diglucoside のアントシアニンはアメリカ系ブドウに含まれる。

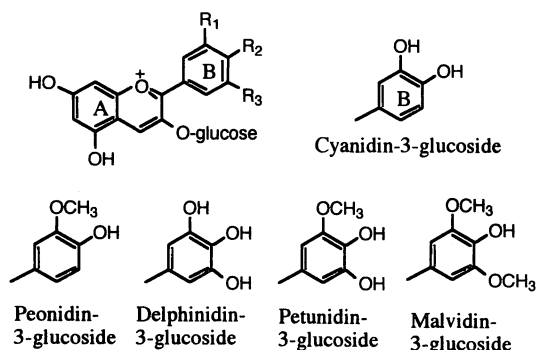


Figure 2 Anthocyanins of *Vitis vinifera* grapes.

日本で栽培されているヨーロッパ系赤ブドウ2品種、メルローとカベルネ・ソービニオン、ピンク果皮系の甲州、アメリカ系品種のベイリーと東洋系ヨーロッパ品種のマスカット・ハンブルグとの交配種であるマスカット・ベリーA、計4品種ブドウの果皮から抽出したアントシアニンの組成を調べた[14, 15, 25]。全色素含量で比較すると(Table 4), 1 kgのブドウあたり最も多くの赤色素を含むブドウは、メルロー、次にマスカット・ベリーA、次いでカベルネ・ソービニオンであった。甲州ブドウの場合、1 kgから4.4 mgの全色素が抽出された。同じヨーロッパ系ブドウのメルローとカベルネ・ソービニオンのアントシアニン組成は非常に類似していた。最も多量に存在するアントシアニンは、malvidin-3-glucosideで全アントシアニン量の約30%を占め、酢酸あるいはp-クマール酸でアシル化されたmalvidin-3-glucosideは約20%であり、全マルビジン誘導体の割合は約50%となった。ヨーロッパ系赤ブドウのアントシアニンは、ピノ・ノールなど1, 2のブドウを除いて、3位の炭素の水酸基に結合したグルコースがアシル化されている。一方、アメリカ系のマスカット・ベリーAには、anthocyanidin-3-glucosideの他に、malvidin-3,5-diglucosideとそれがp-クマール酸でアシル化されたアントシアニンを含んだ。甲州ブドウ果皮には、cyanidin-, peonidin-及びmalvidin-3-gulucosideが含まれたが、3,5-diglucosideは見出されなかったため、甲州はアメリカ系ブドウではなく、またpeonidin-3-glucosideの一部はフマル酸でアシル化されていたので、ヨーロッパ系ブドウのアントシアニン組成と異なり、アメリカ系やヨーロッパ系とは異なる系統のブドウであろう[15]。

ブドウ成熟中の赤色素とポリフェノールオキシダーゼ活性

マスカット・ベリーA (MBA) とカベルネ・ソービニオン (CS) ブドウの成熟に伴う果皮の全赤色素量と果汁のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性の変化を調べた (Figure 3)。MBAブドウの場合 15 Brix まで、CSブドウの

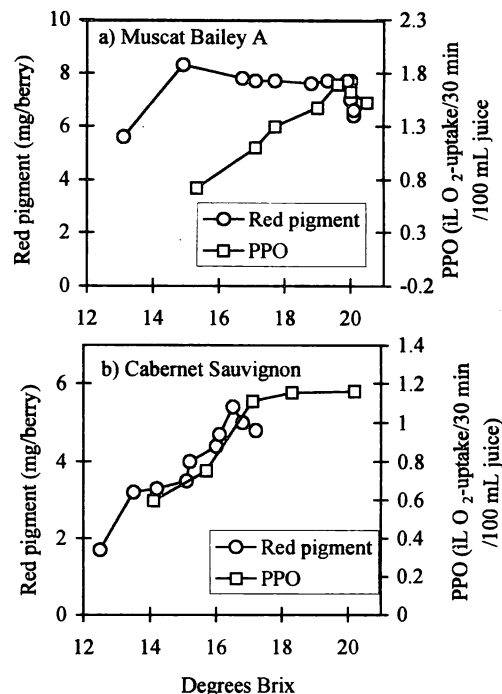


Figure 3 Changes in total pigments and polyphenol oxidase activity during ripening of Muscat Bailey A and Cabernet Sauvignon grapes⁽⁴⁾.

場合約 17 Brix まで、糖度が上昇するとともに、全色素量が増加し、それ以上の糖度ではほぼ一定の全色素量となった[14]。カテキンを基質とし、ワールブルグ検圧計を用いて酸素吸収量を測定した結果、ブドウ果汁はかなり強いPPO活性を含んだ。PPO活性もまた糖度の上昇に伴って増加したが、18 Brix以上ではほぼ同じ活性を示した。

甲州、シャルドネ、リースリングの白系ブドウ、カ

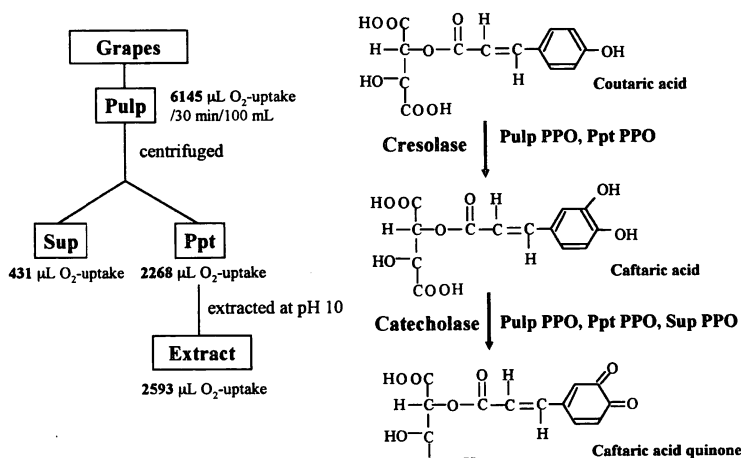


Figure 4 Preparation of polyphenol oxidase from grapes and oxidation of coumaric and catearic acids to catearic acid quinone^(2,12).

ベルネ・ソービニオン、
ピノ・ノール、コン
コードの赤系ブドウ、
計6品種の果汁のPPO
活性を比較した結果、
PPOの基質特異性や活
性に大きな差はなく、
各ブドウ果汁の褐変の
度合いの差異は、マス

Table 5 Characterization of polyphenoloxidase from Muscat Bailey A grape juice^(2,12,24-25).

Chemical and physical properties

Molecular weight: 40 to 42 kDa
N-terminal region: APIQAPDISK?GTA?VP

Enzymatic properties

Substrate specificity: caftaric acid > caffeic acid > catechol < epicatechin, catechin
< protocatechuic acid > pyrogallol > *p*-cresol > *p*-coumaric acid > gallic acid
Optimum pH: 5.8
Optimum temperature: 30°C
pH stability: stable between 3 and 11 (at 30°C for 1 hr)
Temperature stability: stable between 0 and 60°C (at pH 5.8 for 1 hr)
Inhibitors: KCN > sodium azide > SO₂ > NaCl > thiourea > ammonium sulfate

トに含まれるフェノール組成と還元性物質(グルタチオンなど)の種類と量によることが分かった[24]。ブドウを除梗・破碎し、果皮と種子を除いたパルプのPPO活性を、カテキンを基質としてワールブルグ検圧計を用いて酸素吸収量として測定した(Figure 4)。その結果、パルプ100 mLあたり、30分間に6145 μLの酸素吸収があった。これを遠心分離してPPO活性を測定した結果、上清に431 μL、沈殿に2268 μLの酸素吸収があった[2, 12]。さらに沈殿をpH 10の水で抽出した結果、抽出物に2593 μLの酸素吸収があった。すなわち、PPOのほとんどは、果汁に溶存せず、高分子フェノールと水素結合によって複合体を形成し、不溶物として存在した[12]。したがって、ブドウ破碎物から沈殿(PPO酵素)を迅速に除去すれば、果汁の酸化を防止できることが分かった。

ブドウには2種類のPPO活性、カテコラーゼとクレゾラーゼ活性がある(Figure 4)。これら2種類のPPO活性は別々の酵素ではなくて、酵素の立体構造が破壊されるために、クレゾラーゼ活性が失活したと考えられている[5]。PPOは通常フェノール・ベンゼン環の隣接した炭素に結合した2つの水酸基を酸化してo-キノンにするが、ブドウ果汁には1つの水酸基しかもたないモノフェノール、たとえばクエタリック酸が存在する。クレゾラーゼはクエタリック酸を酸化してジフェノールであるカフタリック酸にする。クレゾラーゼの立体構造は壊れやすく、分離精製の過程で通常失われる。一方、ジフェノールを相当するキノンに酸化するカテコラーゼは非常に強く、かなり厳しい条件で精製しても容易に失活しない。MBA果汁から分離したカテコラーゼは、分子量40,000～42,000でN-末端アミノ酸配列は、Ala-Pro-Ile-

Gln-Ala-Pro-Asp-Ile-Ser-Lys-?-Gly-Thr-Ala-?-Val-Pro-であり、これはトムソン・シードレスのもつPPOの一次構造と一致した[2]。

PPOで酸化されやすいフェノールの順序は、カフタリック酸>コーヒー酸>カテコール>エピカテキン、カテキン>プロトカテキュ酸(安息香酸誘導体)>ピロガロール>*p*-クレゾール>*p*-クマール酸>没食子酸となり、明らかにモノフェノールよりもジフェノールに対して高い活性をもった[2, 12]。pH 3から11の広い範囲で活性をもち、至適pHは5.8であり、ブドウ果汁のpH(pH 3～4)で十分活性をもつ。この酵素は、シアンカリウムで活性を失う典型的な銅酵素である。フラボノイドポリマーの水酸基と

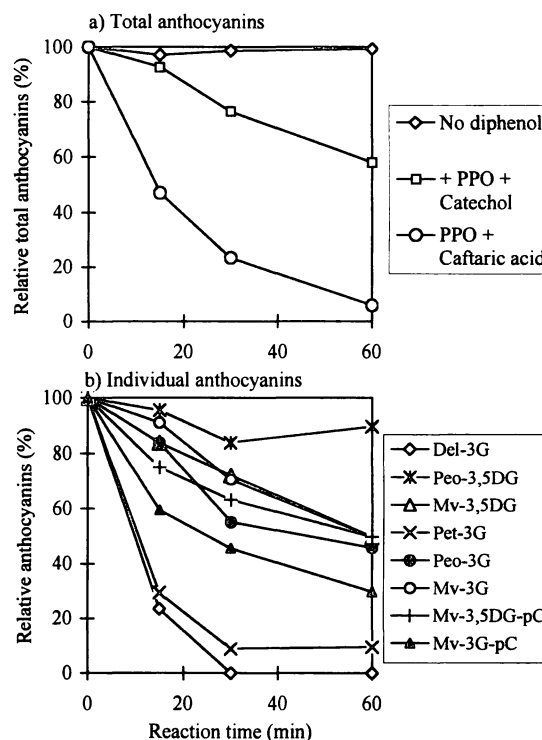


Figure 5 Degradation of MBA anthocyanins in the presence of PPO and catechol or caftaric acid⁽²⁵⁾.

PPOのペプチド結合のカルボニル酸素が結合し不溶性沈殿(澱)となるが、pH 10で水素結合が切れて、酵素は再び可溶化した[12]。

アントシアニンの酵素的脱色

CSあるいはMBAブドウ果皮から分離した全赤色素をpH 3.7 (MBA果汁のpH)の緩衝液に溶かし、さらに無色のジフェノールであるカフタリック酸あるいはカテコールを加えた。これにブドウの果汁沈殿からpH 10で水抽出した粗PPO酵素液を加えて25℃で60分間反応した。本実験は、PPO酵素自体の研究を

目的しておらず、アントシアニンやその重合体の酸化の程度と機構がテーマであるので、精製酵素を用いず、最も活性の強い不溶性PPOを用いた。反応後、HPLCで各アントシアニンを分析を行い、赤色脱色量を測定した[25]。CSブドウにはanthocyanidin-3,5-diglucosideは存在せず、anthocyanidin-3-glucosidesのみを含むが、一方MBA色素はanthocyanidin-3-glucosidesとanthocyanidin-3,5-diglucosidesの両者を含むので、ここではMBA色素を用いた実験結果のみを示した(Figure 5)。しかし、CSとMBAブドウ果皮から抽出した全色素を用いた実験結果は基本的に同じであった。

アントシアニンの酵素的酸化には3つの機構が推定された[6, 25]。第一は、酵素がアントシアニンを直接に酸化するケースである。MBAブドウ果皮の全色素に酵素のみを添加して反応を行った結果、60分間の反応中、色素には全く変化はなかった(Figure 5a)。前述のように、アントシアニンはフラビリウムカチオンとカルピノール・シュードベースの平衡状態で存在する。この結果からフラビリウムカチオンはPPOによって直接に酸化されてアントシアニンキノンに変化することはないことが分かった(Figure 6-1)。また、無色のカルピノール・シュードベースが酸化され、アントシアニンキノンが生成しても、フラビリウムカチオンとシュードベースは平衡状態にあるので、酸化されれば赤色カチオンが減少するはずである。しかし、全アントシアニン量の変化はなかった。結局、第一の反応機構はないと結論付けた(Figure 6-1)。

次に、全アントシアニンにカテコールあるいはカフタリック酸を加え、さらにPPOを加えて反応を行った結果、赤色アントシアニン量は急激に減少した(Figure 5a)。最も多量に減少したアントシアニンはB環に3つの水酸基があるdelphinidin-3-glucosideであり、次に、3つの水酸基のうちのひとつがメチル化されたpetunidin-3-glucosideが急速に脱色された。この反応は、次のように解釈できる。まずカテコールあるいはカフタリック酸が酵素酸化されて相当するo-キノンになる。生じたo-キノンによってデルフィニジンあるいはペツニジンをアグリコンとするアン

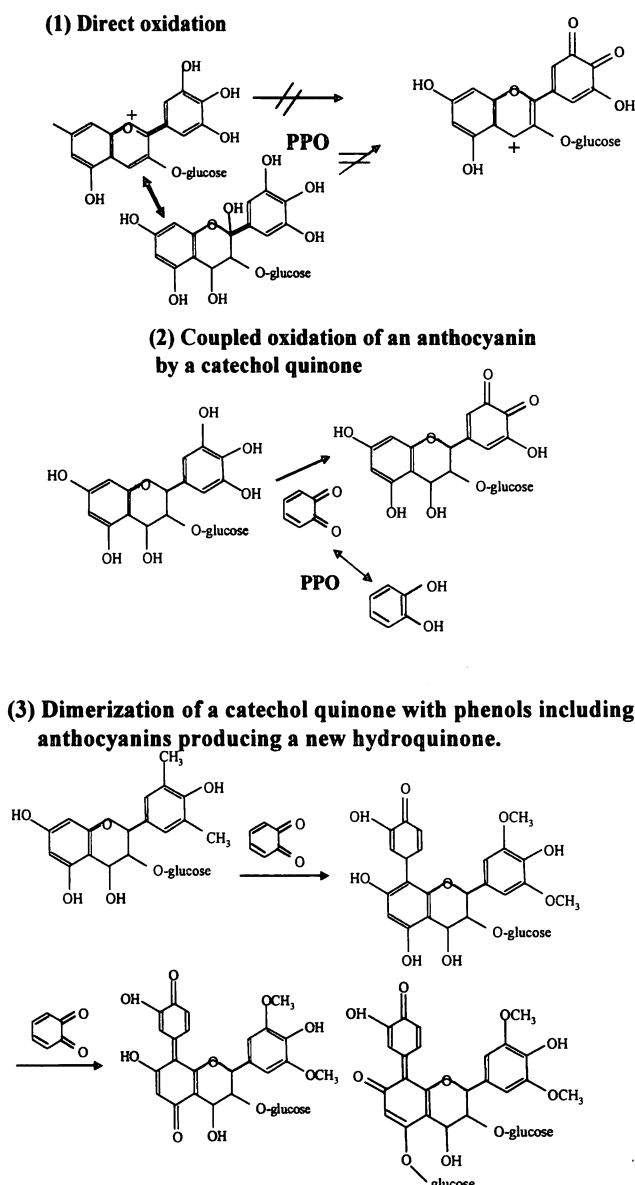


Figure 6 Three expected mechanisms for enzymatic decolorization of anthocyanins with polyphenoloxidase^(6,25).

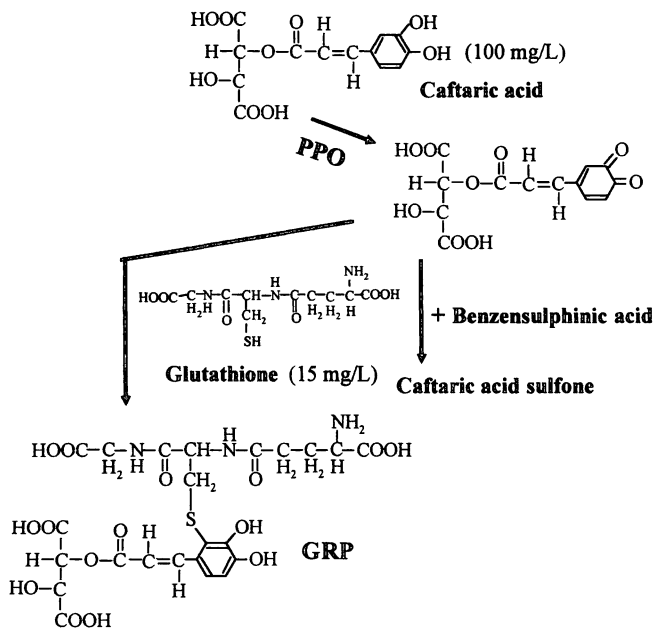


Figure 7 Prevention of decolorization reaction of anthocyanins by addition of benzenesulphonic acid or partial suppression by glutathione⁽²⁵⁾.

トシアニンのB環の隣接した2つの水酸基が共役酸化されてアントシアニンキノンになり、*o*-キノンはもとのフェノール(カテコールやカフタリック酸)に戻る反応である (Figure 6-2)。

B環に隣接した2つの水酸基をもたないpeonidin-3-glucosideやmalvidin-3-glucosideの酵素反応後の変化をHPLCで調べた結果、2つのアントシアニンともに減少した。さらにそれらが*p*-クマール酸でアシル化されたアントシアニンも減少した。しかし、これらの赤色色素の脱色は前述の共役酸化では説明できない。なぜならば、B環に隣接した2つの水酸基をもたないからである。これらのアントシアニンは、B環が酸化されるのではなくて、カフタリック酸やカテコールから生じたキノンが、アントシアニンの8位に結合し、さらにもう1分子のキノンによってさらに酸化されると推定した (Figure 6-3)。しかし、3,5-diglucosideは、5位のグルコースの立体障害のためにFigure 6-3のような構造はとれず、恐らく7位の炭素とこれに結合した酸素間が二重結合になると思われる[6,25]。

上では、アントシアニンの脱色はカテコールやカフタリック酸の酵素酸化によって生成した*o*-キノンによって生じると推定した。そこで、*o*-キノンが生成したという直接的な証拠を得る必要がある。キノンはベンゼンスルフィン酸によって捕捉され、フェノール・スルフィン酸になるので、ジフェノールが酵素酸化されてキノンを生じるならば*o*-キノンをベンゼンスルフィン酸添加によって消去できるはずである (Figure 7)。カフタリック酸の場合、カフタリック酸キノンが生成されればベンゼンスルフィン酸によってカフタリック酸スルフィン酸になる。Figure 8で、色素にPPOとカフタリック酸を加えて反応すると、カフタリック酸から酵素的に生成した*o*-キノンが色素を脱色した (Figure 8a), さらにベンゼンスルフィン酸(ナトリウム)を添加すると、*o*-キノンはベンゼンスルフィン酸によってトラップされるので、脱色は起こらなかった。カフタリック酸が時間とともに消失するとともにカフタリック酸スルフィン酸が生成された。

また、ベンゼンスルフィン酸の代わりにグルタチオンを添加すれば2-S-グルタチオニルカフタリック

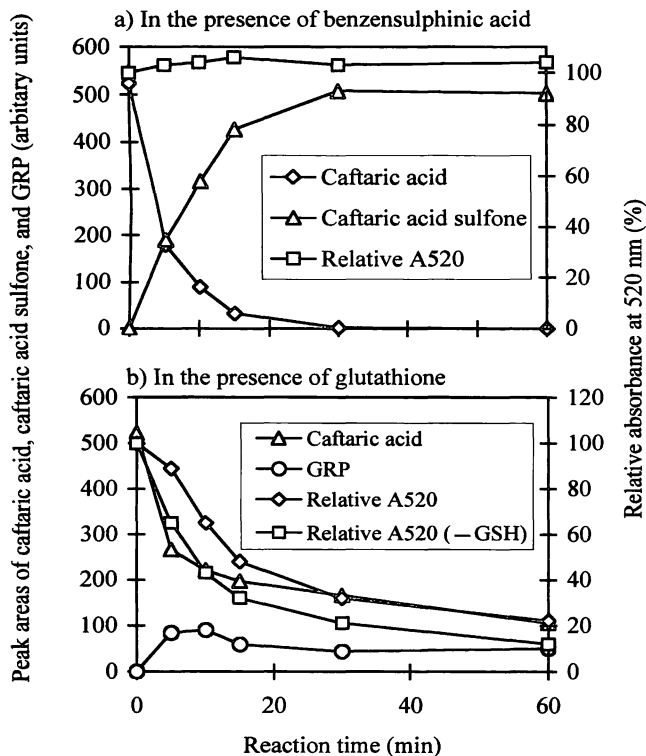


Figure 8 Decolorization of MBA pigment by quinone formed by PPO oxidation of caftaric acid in the presence of benzenesulphonic acid (a) or glutathione (b)⁽²⁵⁾.

酸, つまり grape reaction product (GRP) になることが知られている。MBA果汁中のグルタチオン (GSH) 含量を測定した結果, 果汁 1 L中に 15 mg の GSH を含んだ [4]。それゆえ, 色素に PPO, カフタリック酸, さらにグルタチオンを添加して実験した。GSHの有無にかかわらず 520 nmの減少が起こったが, 反応開始時にGSHが存在したときのほうが減少は少なかった (Figure 8b)。それは, 生成されたo-キノンがGSHと反応したためである。生成したGRP量は反応中に消失したカフタリック酸量と同じでなかった。一部のキノンがGSHと反応し, 残りのキノンが色素を脱色した。

以上の結果, 次のことが分かった。

1) p-クマール酸やクエタリック酸のようなモノフェノールは, ブドウのクレゾラーゼ活性によってまずジフェノールになり, またカテキン, コーヒー酸あるいはカフタリック酸のようなジフェノールは直ちにカテコラーゼによってキノンになる。これらのキノンは, アントシアニンのB環を共役酸化したり, あるいはA環の6位または8位の炭素と結合してダイマーをつかって赤色を失う。2) アシル化されたアントシアニンはより速く脱色される。3) アントシアニン-3-モノグルコシドよりも3,5-ジグルコシドのほうが安定である。よって一般に, CS赤ワインよりもMBA赤ワインの色調のほうが安定であるかもしれない。4) デルフィニジンやシアニジンのようなB環の水酸基がメチル化されていないアグリコンよりも, ペツニジン, ペオニジン, マルピジンのようなメチルされているアグリコンをもつアントシアニンのほうが安定である。5) モノグルコシドと比較すると, デルフィニジン>ペツニジン>シアニジン>ペオニジン>マルピジンの順に酸化されやすい。

色素オリゴマーとポリマーの色調と酵素酸化

赤ワインの赤色は, ブドウの果皮からワインに移行したアントシアニンを起源とするが, アントシアニンがそのモノマーのままの状態でも長くワインに存在するわけではない。通常, 熟成したワインではアントシアニンは他のポリフェノールと重合体をつかって存

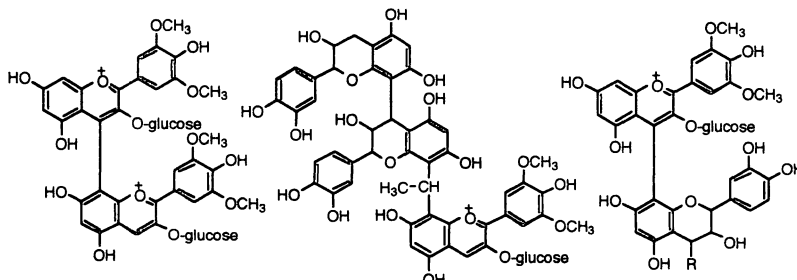


Figure 9 Possible structures of oligomeric pigments.

在する。たとえば, アントシアニンの4位の炭素と他のアントシアニンの8位の炭素が重合し, アントシアニンダイマーをつくる (Figure 9)。あるいはプロシアニジンBの8位の炭素にアルデヒドから生成したカルボニウムイオンが付加し, これとアントシアニンの8位の炭素が結合した重合体が存在する。アントシアニンの4位の炭素とカテキンあるいはプロシアニジンの8位の炭素が結合した重合体も存在するかもしれない。これらの3つの重合体のB環はいずれも共鳴構造を維持し, 赤色の色調を保つと推定し, 実験を行った。

重合した色素研究の第一歩は色素重合体の赤ワイ

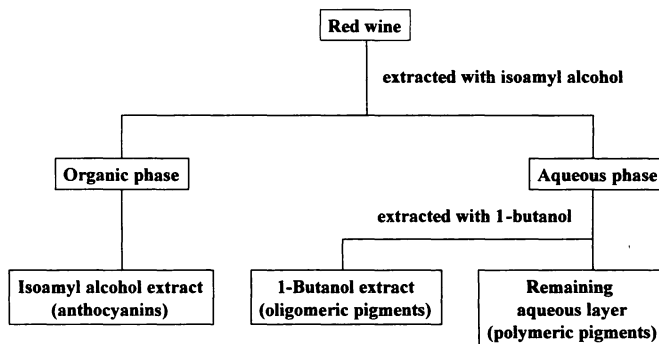


Figure 10 Flow chart of procedures for fractionating three pigment fractions from red wine⁽²⁶⁾.

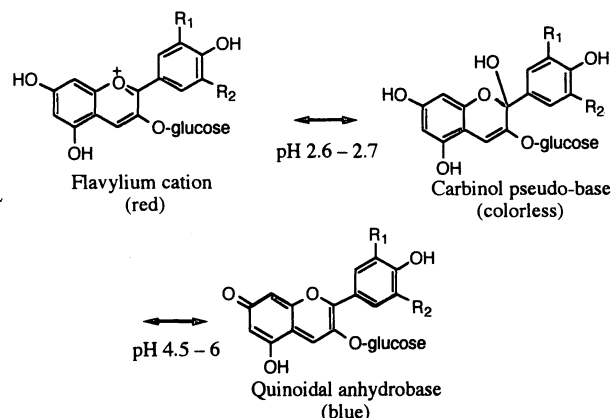


Figure 11 Anthocyanin equilibria.

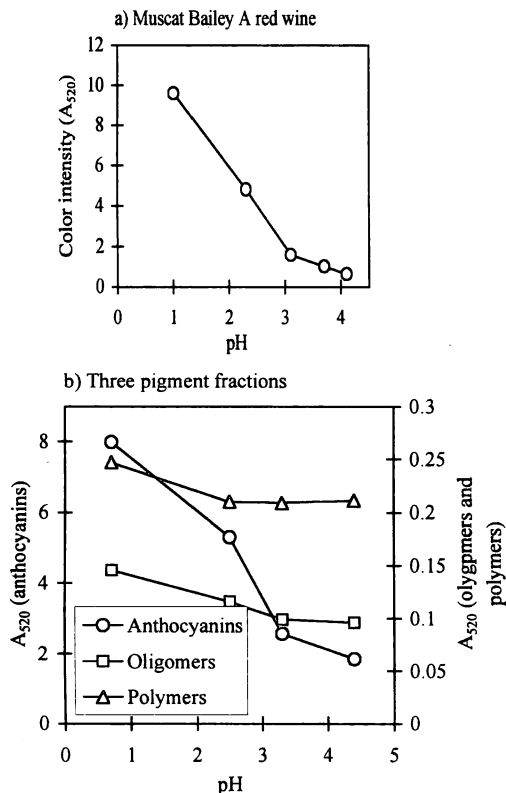


Figure 12 Effect of pH on absorbances at 520 nm of Muscat Bailey A (a) and three pigment fractions fractionated from the wine (b)^(13,17,26).

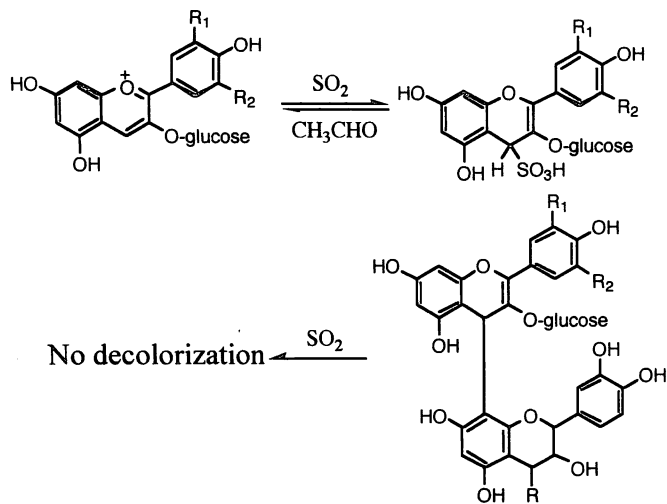


Figure 13 Effects of SO₂ and/or acetaldehyde on decolorization of anthocyanins.

ンからの分別である (Figure 10)。そこで、赤ワインをイソアミルアルコールで抽出し、有機相 (アントシアニンモノマー) と水相に分けた。水相をさらにブタノール-1で抽出し、有機相 (色素オリゴマー) と水相 (色素ポリマー) に分けた [26]。各画分の性質は、HPLC と薄層クロマトグラフィーでの挙動、SO₂ や

pH に対する感受性によって調べた。

pH 3.7 の MBA 赤ワイン (520 nm で測定したときの吸光度は 1.03) を希塩酸と希苛性ソーダ溶液で pH 1 ~ 4 に調整し、520 nm の吸光度の変化を調べた (Figure 12a) [13, 17]。pH 4.1 のときの吸光度は 0.65 と非常に低くなった。逆に pH 3.1 では 1.6 と高くなった。さらに pH を下げると赤色強度 (吸光度) は直線的に高くなった。MBA 果皮から分離した全色素画分の pKa を調べると約 2.6 にあり、一方、CS の全色素の pKa は 2.7 であった (Figure 11)。すなわち、赤色のフラビリウム・カチオンと無色のカルビノール・シュードベースが pH 2.7 付近で半分ずつ存在し、一方 pH 3.7 では存在するアントシアニンの数%しかイオン化していないと考えられた。

溶媒抽出によって MBA 赤ワインより分別したアントシアニンモノマー、オリゴマー、ポリマーの 3 画分の赤色強度に及ぼす pH の影響を調べた (Figure 12b) [26]。pH を高くするとアントシアニン画分の赤色強度は減少した。これに対して、色素オリゴマーやポリマーの赤色強度は pH の変動に伴ってほとんど変化しなかった。すなわち、アントシアニンが他のフェノールと結合することによって、色素オリゴマーやポリマーの赤色は pH の変化に対して安定化した。同様に、3 つの色素画分の亜硫酸に対する感受性を調べた (Figure 14)。アントシアニンモノマーは 50 mg/L までの SO₂ の添加で直線的に赤色強度を低下させた。一方、色素オリゴマーやポリマーは SO₂ の添加によって赤色強度が変らなかった。つまり、アントシアニン

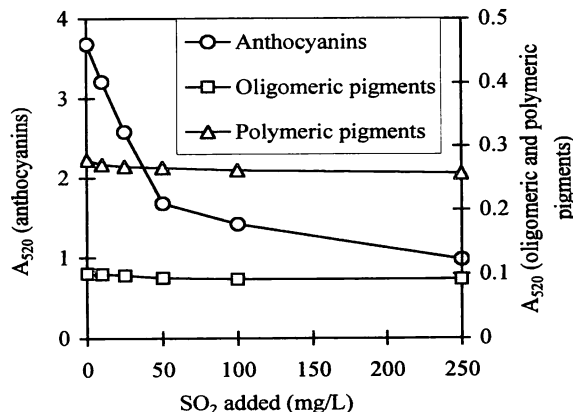


Figure 14 Effect of SO₂ on decolorization of three wine pigment fractions⁽²⁶⁾.

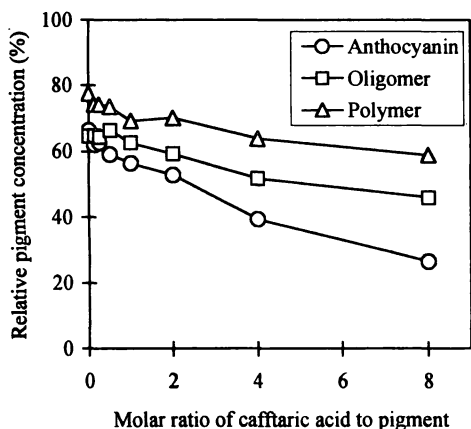


Figure 15 Effect of ratio of caffeic acid concentration to total pigment concentration on decolorization of three wine pigment fractions⁽²⁶⁾.

は重合体になることによって非常に安定になることが分かった。Figure 13に示したように、SO₂はアントシアニンの4位の炭素に付加し、無色となる。しかし、アントシアニンの4位の炭素に別のフェノールが結合していると、SO₂は4位に付加できない。このような化学的に安定な色素重合体の存在こそ、赤ワインが長期の貯蔵に耐える理由かもしれない。

先に、アントシアニンがPPO酸化によってジフェノールから生成したo-キノンによって酸化脱色されることを示したが、マスト中にはアントシアニンだけでなく色素オリゴマーやポリマーもまた存在するので、これらの重合体が酵素酸化されるのか否かを検討した [26]。赤色色素を pH 3.3 の酒石酸溶液に溶解し、これにPPO酵素とカftarリック酸を添加した。色素量に対するカftarリック酸量の比は 0 ~ 8 であった。カftarリック酸を添加しないときにも色素の脱色が生じた (Figure 15)。これは、ワインより分離した各色素画分中、かなり多量のカftarリック酸、カテキンなどのジフェノールが存在しているので、これらが酵素酸化されてo-キノンが生成されたためであった。Figure 15で、カftarリック酸量を増加していくと脱色の割合が増えた。3画分とも酵素によって脱色されたが、最も脱色されやすいのはアントシアニンモノマー (脱色率約 60%)、次にオリゴマー (約 50%)、そしてポリマー (約 35%) の順であった。

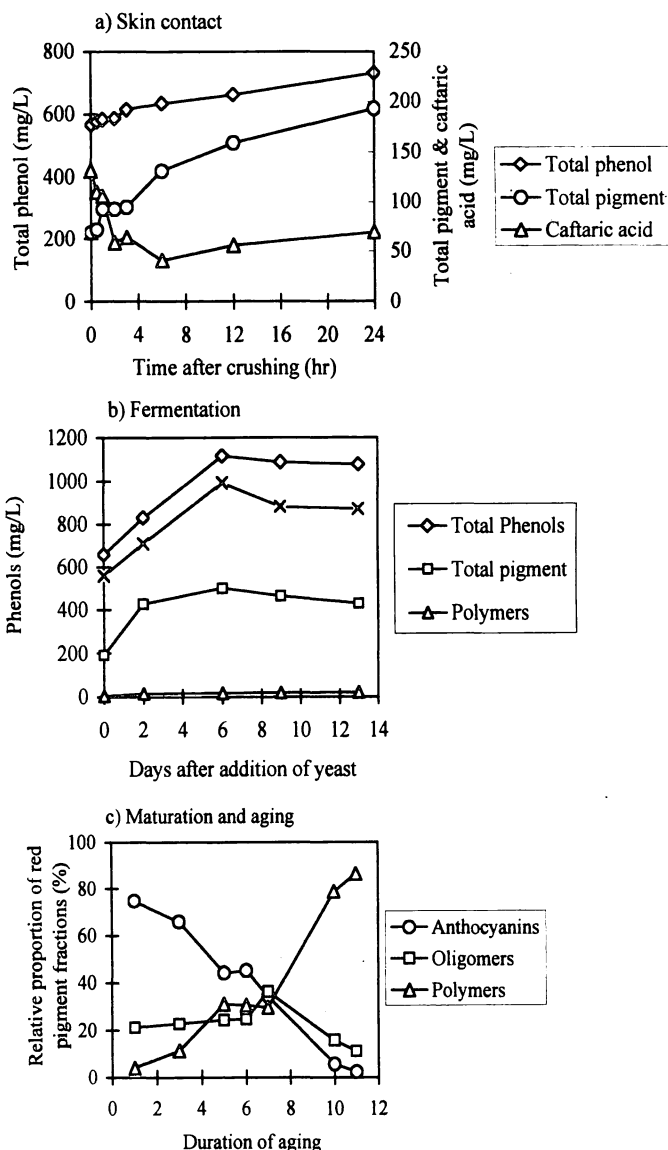


Figure 16 Changes in total phenols, total pigment, caftaric acid, and three pigment fractions during must preparation, red wine fermentation, and aging of finished wine^(1,9,17-18,25).

MBAブドウマストのスキン・コンタクト中、赤ワインの発酵中及び熟成中の色素画分の変化

MBAマストの調製、発酵、製造したワインの熟成中の赤色色素の動向を調べた。MBAブドウを破碎すると、果皮の色素が果汁にすぐに溶出した (Figure 16a)。果汁のみの全フェノール量は通常約 200 mg/L であるが、MBAマストは破碎直後ですら 560 mg/L の全フェノールを含んだ [25]。この中には、約 130 mg/L のカftarリック酸と約 70 mg/L の赤色色素が含まれた。24時間のスキン・コンタクト中に全フェノールは約 160 mg/L 増加した。そのうち、約 60

mg/Lはアントシアニンの増加によった。増加した残りの100 mg/Lは果皮や種子からのフラボノイドと非フラボノイドフェノールであった。破碎直後の果汁のカftarリック酸量は130 mg/Lであったが、それは酵素酸化されてカftarリック酸キノンになり、著しく減少した。しかし、この減少に上回る量のカftarリック酸が、果皮より果汁へ移行したので、破碎後5時間以後カftarリック酸は増加したと考えられる。生成したカftarリック酸キノンは、アントシアニンを急速に酸化し、脱色を始めると思われた。

Figure 16bに、MBAブドウマストの発酵中の種々のフェノールの変化を示した[17]。醸し発酵は6日間とした。全フェノールは醸し発酵中増加したが、増加したほとんどのフェノールはフラボノイド型フェノールであった。しかし、赤色色素量の増加とフラボノイド量の増加とは相関しなかった。すなわち、フラボノイド量は増えても赤色色素量は増加しなかった。これはメルローブドウを用いた醸し発酵でも認められた[18]。発酵中のマストの赤色色素のほとんどはアントシアニンで色素重合体量はわずかであった。

発酵直後の若いMBA赤ワインの色調のほとんどはアントシアニンに由来した。この赤ワインを貯蔵し、貯蔵中の色素変化を調べた[1, 9]。赤ワインを製造後1年目の赤ワインの約80%はアントシアニン、約20%はオリゴマーで、ポリマーはほとんどなかった。しかし、貯蔵年数を重ねると、アントシアニンモノマーは直線的に減少し、代わりに、色素オリゴマーとポリマーが生成された(Figure 16c)。貯蔵11年目には約90%はポリマーになり、アントシアニンはほとんど見出されず、またオリゴマーも約10%しか残っていなかった。すなわち、貯蔵・熟成すると赤ワインの色素は化学的に安定な重合体に変化した。

要 約

赤ブドウ成熟中、赤ブドウ破碎後のスキンコンタクト中、マスト発酵中、並びに赤ワインの貯蔵・熟成中のアントシアニン及び色素オリゴマー及びポリマーの変化を調べた。特に、ブドウ果汁のポリフェノールオキシダーゼの酵素的及び化学的性質、基質特異性、アントシアニン及び色素重合体の酵素的脱色やその

機構を分析し、論議した。

文 献

1. Okuda, T., T. Takayanagi, M. Sato, and K. Yokotsuka. Changes in radical scavenging activity of Japanese Cabernet Sauvignon red wines during aging. *J. Wine Res. (London)*. 13 (2), 93-100 (2002).
2. Okuda, T., A. G. Pue, K. Fujiyama, and K. Yokotsuka. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Muscat Bailey A grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(2):137-143 (1999).
3. 奥田 徹, 横塚弘毅 (未公表).
4. Okuda, T. and K. Yokotsuka. Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(3): 264-270 (1999).
5. Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38 (1): 69-77 (1987).
6. Singleton, V. L. Personal communication.
7. Yajima, M. and K. Yokotsuka. Volatile compounds formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (3): 210-218 (2001).
8. 横塚弘毅: ワインの味とにおい(1), 調理科学会誌. 22 (1): 29-36 (1989).
9. 横塚弘毅: カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA赤ワインの熟成中における色調の変化. 日本醸造協会誌 90 (3): 222-229 (1995); (6): 485-491 (1995); 日本醸造協会誌 90 (7): 560-565 (1995).
10. 横塚弘毅, 第8章 フェノール化合物, 醸造物の成分. 日本醸造協会(東京), pp. 327-342 (1999).
11. Yokotsuka, K. and M. Fukui. Changes in nitrogen compounds in berries of six grape cultivars during ripening over two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 69-77 (2002).
12. Yokotsuka, K., S. Makino and V. L. Singleton. Polyphenol oxidase from grapes: Precipitation, resolubilization, and characterization. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39 (4): 293-302 (1988).
13. 横塚弘毅, 松土俊秀, 奥田 徹, 高柳 勉. ハンディー酸度計を用いたブドウ果汁とワイン酸度の簡易測定とその信頼性. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 11 (1): 22-25 (2000).
14. Yokotsuka, K., A. Nagao, K. Nakazawa, and M. Sato. Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil

- over two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50: 1-12 (1999).
15. Yokotsuka, K., N. Nishino, and V. L. Singleton. Unusual Koshu grape skin anthocyanins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39 (4): 288-292 (1988).
 16. Yokotsuka, K., K. Nozaki, and T. Takayanagi. Characterization of soluble glycoproteins in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45 (4): 410-416 (1994).
 17. 横塚弘毅, 奥田 徹, 佐藤充克. 種々の pH をもつマスカット・ベリーAブドウマストから製造した赤ワイン新酒の色調と色素パラメータ. *日本ブドウ・ワイン学会誌*. 9 (1): 2-12 (1998).
 18. Yokotsuka, K., M. Sato, N. Ueno, and V. L. Singleton. Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *J. Wine Res.*, (London) 11 (1): 7-18 (2000).
 19. Yokotsuka, K., M. Yajima, and V. L. Singleton. Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (4): 471-481 (1997).
 20. Yokotsuka, K., Takayanagi, T., Okuda, T., and Yajima, M.: Production of sweet table wine by termination of alcohol fermentation using an antimicrobial substance from paprika seed. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54 (2): 112-118 (2003).
 21. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46 (3): 329-338 (1995).
 22. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Grape seed nitrogenous components and possible contribution to wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47 (3): 1-11 (1996).
 23. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Glycoproteins: characterization in a hybrid grape variety (Muscat Bailey A) juice, fermenting must, and resultant red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (1): 100-114 (1997).
 24. Yokotsuka, K., T. Shimizu, and T. Shimizu. Polypehnoloxidase from six mature grape varieties and their activities towards various phenols. *J. Ferment. Bioeng.*, 71 (3): 156-162 (1991).
 25. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton: Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48: 13-25 (1997).
 26. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Effects of seed tannin on enzymatic decolorization of wine pigments in the presence of oxidizable phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52 (2): 93-100 (2001).
-