

[Research Note]

蒜山産ヤマブドウ果汁及びワインの全フェノール含量とラジカル消去活性

植木啓司¹・今井 孝¹・岡本五郎²・平野 健²¹岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530 岡山市津島中3-1-1²岡山大学大学農学部 〒700-8530 岡山市津島中1-1-1Total Polyphenol Level and Anti-oxidative Activity in Juice and Wine from *Vitis Coignetiae* Pulliat Grapes Grown in Hiruzen Highlands¹Keiji UEKI, ¹Takashi IMAI, ²Goro OKAMOTO, and ²Ken HIRANO¹Graduate School of Natural Science, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama, 700-8530, Japan²Faculty of Agriculture, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama, 700-8530, Japan

Total polyphenol levels and free radical scavenging activities were compared among berry juices and wines produced from *Vitis coignetiae* and cv. Cabernet Sauvignon grapes. Total polyphenol level and free radical scavenging activity were the highest in juice from *V. coignetiae* berries harvested at the fully ripe stage in Hiruzen vineyards. In wines, prepared under the same conditions in Hiruzen Winery, both the total polyphenol level and the free radical scavenging activity were higher in the wine made from *V. coignetiae* berries than in that from Cabernet Sauvignon berries. However, no consistent difference was found among commercially available *V. coignetiae* and Cabernet Sauvignon wines including imported ones.

Key words: *Vitis coignetiae*, juice, wine, polyphenol, anti-oxidative activity

緒言

岡山県の最北端に位置する蒜山高原には、ヤマブドウ樹 (*Vitis coignetiae* Pulliat) が自生しており、地元では古くからヤマブドウの果汁やその酒を飲むと健康に良いと言われ、愛飲する習慣があった。1978年から同地区内の川上村ではヤマブドウを馴化して栽培に移し、1980年からはひるぜんワイン(有)工場において、ワイン及びブドウ液、濃縮果汁などを商業的に生産してきた。2002年度の生産量は約45 tに達し、それらの製品は地域特産物として販売されている。著者ら(11, 15, 16)は、これまでに、ヤマブドウ果実の成熟特性を調査し、完熟すれば糖度(可溶性固形物含量)は20° Brix程度に達するが、酒石酸含量は1.5% 近くあって、pHが3以下と低いこと、総アミノ酸含量は2~5 mmol L⁻¹で、多くの栽培品種よりも著しく低いことを報告した。一方、果汁や果皮に含まれるアントシアニンの量は、一般的な赤ワイン用品種 (*V. vinifera*) よりも数倍程度高く(11, 15)、その赤色素の光安定性は他の植物由来の色素に比べて非常に高いことも明らかとなっている(13)。また、Igarashiら(5)は、ヤマブドウから抽出される

色素には高い抗酸化能が含まれていることを報告している。

近年、日本で赤ワインの消費が急増加した一つの理由は、赤ワインに含まれるポリフェノール類が動脈硬化や血流低下を防止するなど、人体に対する「機能性」が認められたことにあると考えられている(3, 4)。したがって、ヤマブドウ果実がこれらの物質をどの程度の濃度で含むか、産地によってその濃度は異なるのか、さらには、ヤマブドウから製造されたワインは、一般的な赤ワインと比べてそれらの含量や抗酸化活性がどうであるかなどを明確にすることは、地域特産物としてのヤマブドウ生産をさらに発展するための根拠として重要である。

そこで、川上村及び岡山市内で収穫されたヤマブドウ及びカベルネ・ソービニオン果実から製造された果汁とワイン、岡山県内外で商業的に製造されたヤマブドウワイン、市販の輸入ワインに含まれるポリフェノール、抗酸化能を比較した。

材料と方法

1. 供試材料と果汁、ワインの調製

2002年に、岡山県真庭郡川上村明連地区内のひる

2003年8月12日受理

ぜんワイン（有）ヤマブドウ試験圃場で栽培されているヤマブドウの成木（15～20年生、自根；水平棚仕立て）から、2002年9月20日、10月2日、10月14日に果実約1500 kgを収穫し、200 kgごとに分けて釜で加熱し、80℃で5分間保った後、ブドウ搾汁機（BUCHER, RPF15）で搾汁した（搾汁率：60%）。この果汁の1部を360 mL瓶に詰め、本実験に供した。

岡山大学農学部（岡山市津島）内の実験圃場で栽培中のヤマブドウ6樹（5～8年生、自根；水平棚仕立て）及びカベルネ・ソービニオン15樹（8年生、SO4台；垣根仕立て）から、果汁の可溶性固形物含量（TSS）が18 Brix以上に達した時期（ヤマブドウ：9月3日、カベルネ・ソービニオン：9月25日）に果実を採取した。その内から、1 kgの果粒を200 gずつに分け、2重ガーゼに包んで手で絞り、果汁を得た（搾汁率：40%）。また、別の1 kgはピーカー内で80℃まで加熱して、5分間保った後、同様に手で果汁を絞りとった。これらの果汁は、下記のポリフェノール及び抗酸化活性の分析まで、5℃で保蔵した。

2002年の9～11月に、上記の各種果実を原料として、ひるぜんワイン（有）でワインを製造した。上記の方法で機械搾汁した後、比重換算糖度が24度になるように結晶ブドウ糖で補糖、EC1118（LALVIN）酵母を添加した。醸し発酵は20～25℃で5日間または7日間行った。

2. 全フェノール、抗酸化能の測定

2003年4月に、上記の果汁とワイン、及び市販されているヤマブドウワイン（山形県及び岩手県産）、輸入カベルネ・ソービニオンワイン（チリ及びカリフォルニア産）について、以下の分析を行った。

全ポリフェノール含量の測定には、果汁、ワインとも直接測定が可能なポリフェノール測定器（TOYOBO, PA-20）によった。この装置は、ポリフェノールを含む試料溶液にパーオキシダーゼを加えて酸化し、発生するH₂O₂をメディエータ型過酸化水素センサーによって還元電流を測定、カテキン標準液による2点校正によって算出するものである。試料の果汁及びワインを、1～4倍に希釈し、カテキン換算で200～700 ppmになるように調整して、室温（約20℃）で測定した。分析は3回反復した。

抗酸化活性の測定は、須田（14）が示した分光光

度計によるDPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）ラジカル消去能の測定法によった。試料の果汁、ワインを凍結乾燥した後、粉末にした。200 μMのDPPH 300 μL（50% EtOH 溶液）に、200 mM MES buffer（pH 6.0）と蒸留水それぞれ150 μLを加え、さらに50 μM MES buffer（pH 6.0、50% EtOH溶液）300 μLを加えた。これに、数段階の濃度で50% エタノールに溶解した試料液300 μLを加え、攪拌して室温（25℃）に静置、20分間後に700 nmにおける吸光度を測定した。試料を添加しない場合の吸光度を100%とし、吸光度が50%に低下する試料濃度を求め、試料1 Lに含まれるDPPH 50%消去能（ユニット数）を算出した。この実験を2回行い、各試料についてほぼ同じユニット数が得られることを確かめた。

結果と考察

1. 果汁に含まれる全フェノール含量とラジカル消去活性

蒜山及び岡山大学で生産されたヤマブドウとカベルネ・ソービニオンの果汁に含まれる全フェノール含量はFig. 1のとおりである。まず、果汁について比較すると、岡山大学の試験圃場内で収穫されたヤマブドウとカベルネ・ソービニオン果実から、室温で搾汁した果汁の全フェノール含量は、ヤマブドウの方が約7倍高かった。ひるぜんワイン（有）における搾汁方式に準じて、80℃処理を行ってから搾汁すると、全フェノール含量はヤマブドウで約3倍、カベルネ・ソービニオンでは約6倍に増加した。これは、加熱処理によって果皮細胞や種子の表面構造が破壊され、フェノール物質の抽出効率が高まったためと思われる。しかし、いずれの搾汁方法によっても、ヤマブドウは代表的赤ワイン品種であるカベルネ・ソービニオンよりも、はるかに多量のフェノール物質が含まれていることは明らかである。一方、蒜山で収穫・調製（80℃処理）されたヤマブドウ果汁は、同じ条件で調製された岡山大学産ヤマブドウ果汁の2～3倍の高いポリフェノールが検出された。その理由は明らかではないが、両地区で果実の発育・成熟期間中、最も大きく異なる条件は、気温と雨量、日照時間である。岡山市でヤマブドウ果実が成熟する7、8月の平均気温は、26.9、28.4℃であり、雨量は134.8、73.0 mm、日照時間は173、231 hrである（8）。

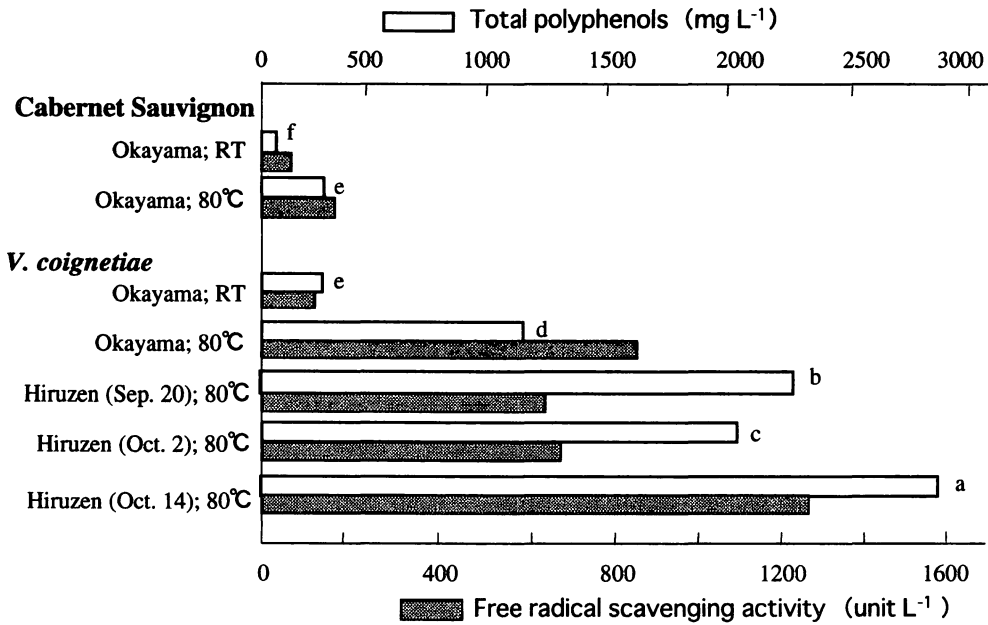


Fig. 1 Total polyphenol level (□) and free radical scavenging activity (■) of Cabernet Sauvignon and *Vitis coignetiae* grapes harvested in Okayama and Hiruzen. Berries were heated at 80 °C for 5 min or not heated (RT) before squeezing juice. Bars with different letters differ significantly by the DMRT test ($p < 0.05$, $n=3$).

これに対して、蒜山での成熟期である8, 9月の平均気温は23.9, 19.1℃、雨量は118.8, 236.5 mm、日照時間は156, 107 hrである(岡山県高冷地農業技術センター測定)。すなわち、蒜山では、成熟期の気温が岡山市よりも3~9℃低く、雨量は約40%多く、日照時間は35%短い。これらのどの条件が果汁に含まれるフェノール含量に影響を及ぼしているかは明確ではない。しかし、蒜山で収穫されたヤマブドウ果実の着色は、岡山産果実よりもはるかに高いこと、一般的に果実の着色は、成熟期の多日照と低温で促進されること(7)から、蒜山では成熟期が冷涼であることが、ヤマブドウ果実の高いフェノール含量をもたらしていると推察される。

3回に分けた収穫時期の中で、10月中旬に収穫された果実から得られた果汁は全フェノール濃度が最も高かった。この時期は、著者らが過去に行った調査から、TSS含量がほぼ20 Brixに達する時期であり(11, 15)、ヤマブドウ果実の完熟期にあたる。高いフェノール含量を持つヤマブドウジュースあるいはワイン原料としてのマストを得るには、果実の完熟を待って収穫すべきである。

なお、一定のヤマブドウ果汁について、本実験で用いたポリフェノール測定器(TOYOBO, PA-20)による値と、一般的に行われるフォーリンチオカルト

法による定量値を比較したところ、前者が2721.5 ppmであったのに対し、後者の場合は2876.8 ppm(それぞれ3回反復の平均、いずれもカテキン換算値)であった。すなわち、フォーリンチオカルト法によるよりも約5%低い値が示されたが、この差が本実験の全体的な傾向に影響するものではないと考えられる。

果汁のDPPHラジカル消去能による抗酸化活性についてみると、岡山大学で収穫されたヤマブドウとカベルネ・ソービニヨンの果実を室温で搾汁すると、ヤマブドウ果汁はカベルネ・ソービニヨン果汁よりも約2倍高い活性を示した。一方、80℃処理を行ってから搾汁した場合は、その活性はヤマブドウで約6.6倍、カベルネ・ソービニヨンでは2.6倍に高まった。すなわち、加熱搾汁したヤマブドウ果汁のラジカル消去能は、同じ方法で調製したカベルネ・ソービニヨン果汁の5.6倍高い結果となった。蒜山産ヤマブドウ果汁も加熱処理されているが、そのラジカル消去能は完熟期に収穫した場合に最も高い値を示し、岡山大学産の果汁の活性の約1.5倍であった。

このような品種や産地、搾汁法による抗酸化能の相違は、概ね果汁中の全フェノール含量の傾向と一致するものである。一般的に、果汁のDPPHラジカル消去能は、主としてポリフェノール物質の存在によ

ると考えられている (1, 3, 6, 9) から、ヤマブドウ果汁はカベルネ・ソービニオン果汁よりも、暖地産果実よりも冷涼な場所で栽培されたものの方が、そして、搾汁前に加熱処理をした方が、果汁の抗酸化能が高いことは、いずれも確実であろう。しかし、本実験で行ったDPPHラジカル消去能によるこの抗酸化活性はin vitroでの化学反応に過ぎず、人体内で有害とされるフリーラジカルを除去する能力の高さを意味するとは言い難い。しかし、体内で有害となる低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化抑制能力として、DPPH消去能を手がかりとして評価する研究は広く行われている (2, 3, 12)。

ヤマブドウ果汁は、健康飲料としての期待も大きく、国内のヤマブドウ全生産量の約27%が、ジュースとして消費されている (10)。その場合、ヤマブドウ果汁が高い抗酸化活性を有することを科学的に示すことは、消費者の需要を拡大するのに有効な要素であろう。冷涼な地域で栽培することが、健康食品として一層高い機能性を持つことが証明されたことの意義は大きいと思われる。

2. ワインに含まれる全フェノール含量とラジカル消去能

2002年に、蒜山圃場と岡山大学実験圃場で収穫されたカベルネ・ソービニオン果実から製造されたワ

イン、蒜山で9月25日及び10月1日に収穫されたヤマブドウ果実を原料として、同じ条件で試験醸造されたワイン、さらに市販されている蒜山、山形、岩手産のヤマブドウワインと市販の外国産カベルネ・ソービニオンワインについて、全フェノール含量とラジカル消去性を調査した結果がFig. 2、Fig. 3である。

カベルネ・ソービニオンワインの全フェノール含量は、岡山大学産果実よりも蒜山産果実を原料としたワインの方がやや高かった。これに比べて、蒜山で栽培されたヤマブドウ果実から製造されたワインは、全フェノール含量が明らかに高く、約2500 mg L⁻¹の濃度であった。また、ひるぜんワイン (有) で2000, 2001, 2002年に商品として製造されたヤマブドウワインは、いずれも2000 mg L⁻¹前後であった。一方、山形、岩手で製造されたヤマブドウワインのポリフェノール含量は、それぞれ約2200 mgL⁻¹、1500 mgL⁻¹で、両者の濃度はかなり相違した。また、チリ産及びカリフォルニア産のカベルネ・ソービニオンワインでは、それぞれ約2200 mg L⁻¹、1500 mg L⁻¹であった。このように、ワインに製造された場合のフェノール含量は、ヤマブドウワインとカベルネ・ソービニオンワインでそれほど大きな差がなくなり、市販のワインとしても、両品種によって著しい差は見られなかった。これらのワインのDPPH消去能を比較すると、

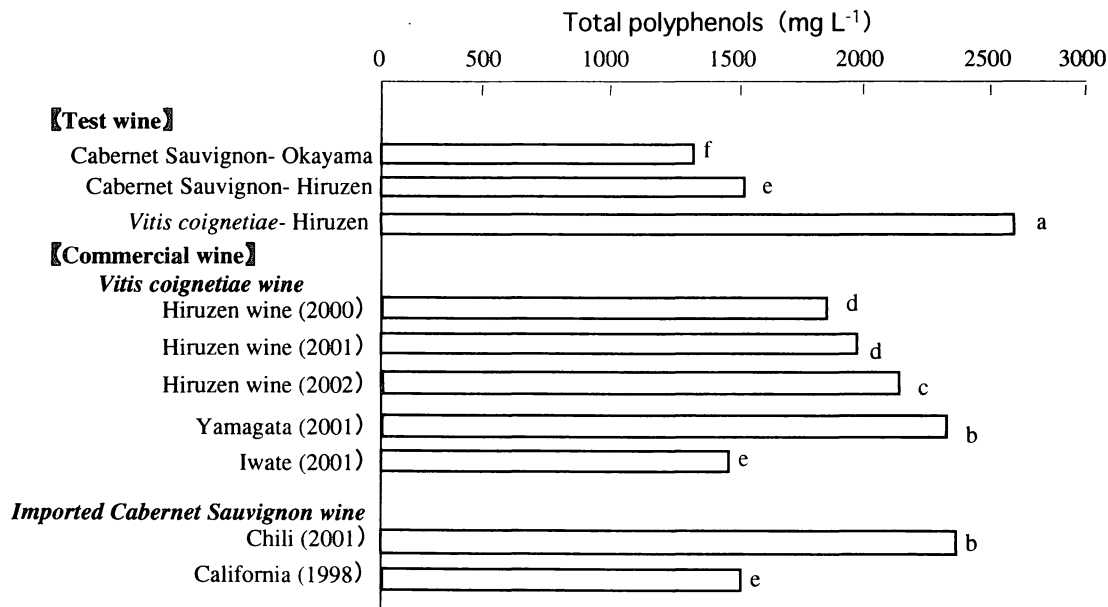


Fig. 2 Total polyphenol levels in Cabernet Sauvignon and *Vitis coignetiae* wines. Test wines were prepared from berries harvested in Okayama and Hiruzen vineyards in 2001. Bars with different letters differ significantly by the DMRT test ($p < 0.05$, $n=3$).

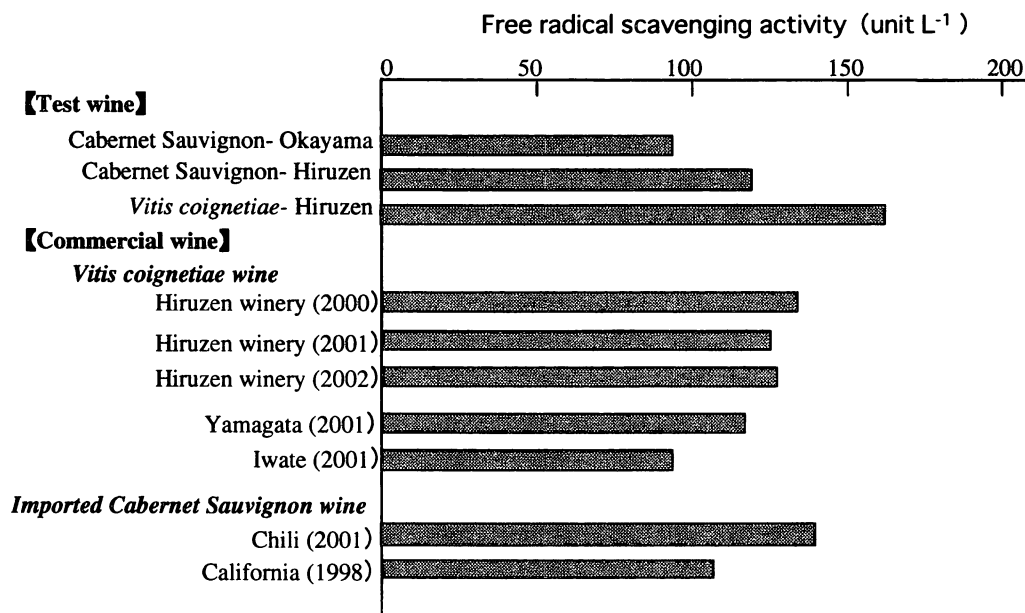


Fig. 3 Free radical scavenging activity of various types of *Vitis coignetiae* and Cabernet Sauvignon wines. Test wines were prepared from berries produced in Okayama and Hiruzen vineyards in 2001.

チリ産カベルネワインを除けば、全体にヤマブドウワインの方がカベルネワインよりも高い抗酸化活性を示したが、著しい差ではなかった。

まとめ

本実験で調査した範囲内では、ヤマブドウ果実を果汁として用いる場合、カベルネ・ソービニオンに比べると、全フェノール含量が明らかに高く、ラジカル消去能も高い傾向が認められる。一方、ヤマブドウを原料として製造されたワインも、同じ条件で製造したカベルネ・ソービニオンワインに比べれば、全フェノール含量、ラジカル消去能が高い傾向であったが、市販ワインも含めて比較すれば、あまり顕著な差ではない。したがって、健康飲料としてのヤマブドウの特性を強調するのであれば、ジュースとしての利用や、種々の食品に添加するための果汁としての利用が適当であろう。

引用文献

- Amous, A., D. P. Makris and P. Kefalas. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 5736-5742 (2001).
- Bandniene, D. and M. Murkovic. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol* 214: 143-147 (2002).
- Franke, E. N., J. Kanner, J. B. German, E. Parks and J. E. Kinsella. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *THE LANCET* 341: 454-457 (1993).
- 萩原健一. 最近のワイン消費動向とワイン造り. *J. ASEV Jpn.* 10: 36-40 (1999).
- Igarashi, K., K. Tanaka, M. Makino, and T. Yasui. Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild grapes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36:852-856 (1989).
- Kanner, J., E. Frankel, R. Granit, B. German and J. Kinsella. Natural antioxidants in grape and wines. *J. Agric. Food. Chem.* 42: 64-69 (1994).
- 小林 章. 果樹環境論, p. 64-69, 105-125 (1975).
- 国立天文台編. 理科年表. p. 198-213. 丸善 (1997).
- Landrault, N., P. Poucheret, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros and P. Teissedre. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 3341-3348 (2001).
- 望岡亮介. ヤマブドウ, 栽培の基礎「果樹編 第7巻. 特産果樹」p. 1-17, 農文協 (1999).

11. Okamoto, G., K. Ueki, T. Ichi, J. Aoki, M. Fujiwara and K. Hirano. Juice constituents and skin pigments in *Vitis coignetiae* Pulliat grapevines. *Vitis* 41: 161-162 (2002).
12. Sanchez-Moreno, C., J. A Larrauri and F. Saura-Calixto. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1301-1304 (1999)
13. 新保国之・市 隆人・植木啓司・岡本五郎. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) 色素の化学構造および熱・光安定性. 日本農芸化学会2002年度大会講演要旨集, p. 239 (2002).
14. 須田邦夫. 3-3-9 抗酸化機能 1. 分光光度計によるDPPHラジカル消去能の測定, 「篠原和毅ら編; 食品機能研究法」 p. 218-220 (2000).
15. 植木啓司・青木秀之・岡本五郎・平野 健. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) 果実の成熟に及ぼす葉数の影響と果汁の成分的特徴. *J. ASEV Jpn.* 12: 58-65 (2001).
16. 植木啓司・今井 孝・岡本五郎・平野 健. 蒜山で栽培されるヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) の樹による果皮中のアントシアニン組成の比較. *J. ASEV Jpn.* 13: 123-127 (2002).