国産赤ワイン用ブドウ及びワインのプロアントシアニジン組成とそのコントロール

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	小山,和哉
発行元	日本醸造協会
巻/号	114巻11号
掲載ページ	p. 673-680
発行年月	2019年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

国産赤ワイン用ブドウ及びワインのプロアントシアニジン組成とそのコントロール

縮合タンニンは加水分解によってアントシアニジン（アントシアニンから糖を除いた部分＿赤色の色素）を生じることからプロアントシアニジンと呼ばれ，ワインでは渋みを持ちボディー感に影響する大事な物質です。ワイン醸造者にとって，栽培条件や醸造条件によって，この組成がどのようになるかは，大きな関心事です。これまでの研究成果を解説していただきました。

小　山　和　哉

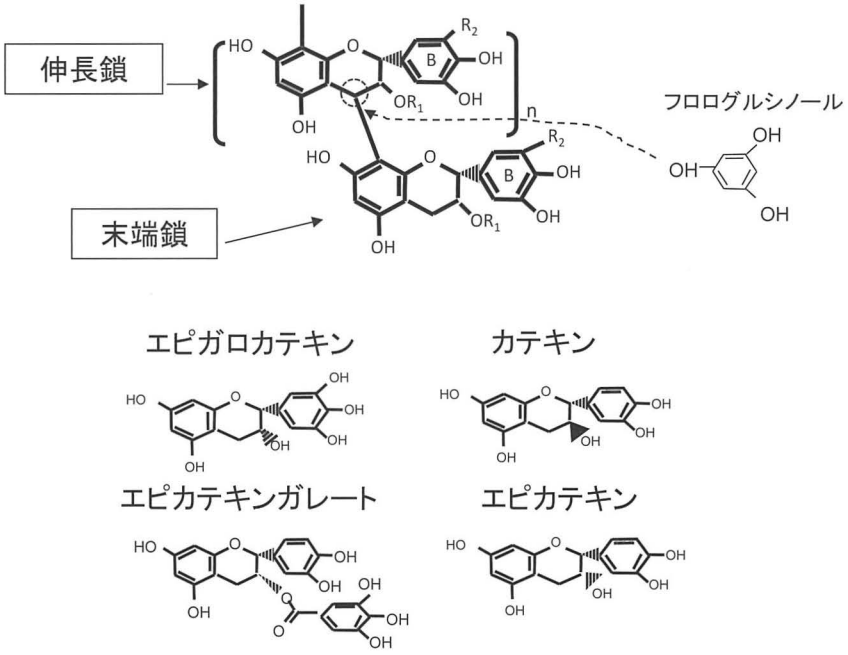
1. はじめに

赤ワイン用ブドウは多様なフェノール化合物と呼ばれる化合物を含有している。これらの化合物は，ワイン中に溶出し，ワインの色や呈味性に大きく寄与することから，醸造用ブドウの品質にとって重要な成分と考えられる[1]。また，抗酸化性，抗菌性，抗癌性など食品における機能性成分としても着目されている[2]。赤ワインにおいて特に顕著に含まれるフェノール化合物はフラボノイド型フェノールと呼ばれ，ブドウ果実の果皮や種子に主に含まれる。具体的には，色素であるアントシアニン，補助色素として色調や色の強度とも関連するフラボノール，渋みをもちワインのボディ感とも関連の深いプロアントシアニジンなどが含まれている。プロアントシアニジンは縮合型タンニンとも呼ばれ，ブドウ中では果皮及び種子の両者に含まれ，発酵中にワイン中に溶出する。カテキン類（ブドウでは主に4種類が知られている）が連なった基本構造をもっていると考えられるが，様々な組成や大きさをもつ高分子化合物からなる混合物である（第1図）。本稿では，赤ワイン醸造において特に重要であるプロアントシアニジンの組成解析方法，及びその方法を用いたブドウ果実やワイン中の組成，また，影響する栽培条件や醸造条件について解説する。

2. プロアントシアニジンの分析方法

プロアントシアニジンの測定は多くの方法が知られている。最も簡便には，吸光度計を用い280nmの吸光で測定されるが，測定値にはプロアントシアニジン以外の小分子のフェノール（アントシアニンを含む），タンパク質，DNA・RNAを含んでおり，特異的に測定しているとは言えない。一方，プロアントシアニジンに特異的に反応する発色物質を使用した方法（ヴァニリン法など），塩酸ブタノール法（酸熱分解し，生じた色をもつアントシアニジンを測定する方法），タンパク沈殿法（BSA法），多糖類（メチルセルロース）による沈殿法などが用いられている[3,4]。これらの方法によって比較的簡便にプロアントシアニジン含量が測定できるが，より詳細な解析を行うためには，クロマトグラフィーを用いた方法が必要となる。例えば，プロアントシアニジンの組成については，フロログルシノール存在下で酸熱分解し，各構成ユニット（ブドウでは主要なものとして4種類存在する）量をHPLC（高速液体クロマトグラフィー）にて測定することからも推定することができる（フロログルシノール分解法：第1図）[5]。フロログルシノールは分解時，伸張鎖の構成ユニットに付加されるのに対して末端鎖には付加されないことから，伸長鎖と末端鎖の構成ユニットを区別することができ，その比率からプロアントシアニジンの平均重合度などの情報も得られる。果皮と種子のプロアントシアニジンは，官能的な違いが経験的に知られているが，フロログルシノール分解法で測定される組成には大きな違いがみられ，果皮プロアントシアニジンは，種子プロアントシアニジンと比

Regulation of Proanthocyanidin Compositions in Domestic Red Wine Grape and Wine
Kazuya KOYAMA (*Analytical Research Division, National Research Institute of Brewing*)



第1図　ブドウ・ワイン中のプロアントシアニジンの構造と組成分析法(フロログルシノール分解法)

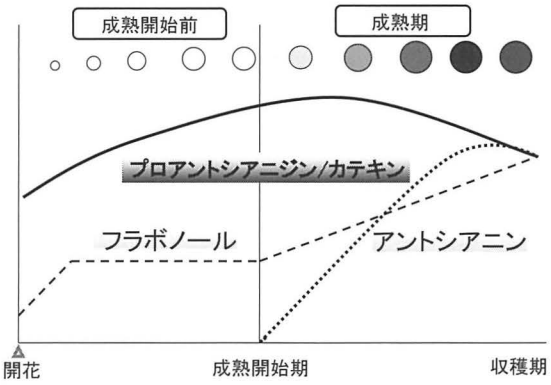
較して，構成ユニットにおけるエピガロカテキンの割合が顕著に高く，平均重合度が長いという特徴を一般的にもつ（第1表）。エピガロカテキンユニットは官能的ななめらかさと，平均重合度は渋みの強度と関連があるといわれるのに対して，エピカテキンガレートの割合が高いほど，肌理(きめ)の粗さ，苦みを感じる傾向があるといわれる[6]。

第1表　果皮由来，種子由来プロアントシアニジンの組成比較の例（カベルネ・ソーヴィニヨン）

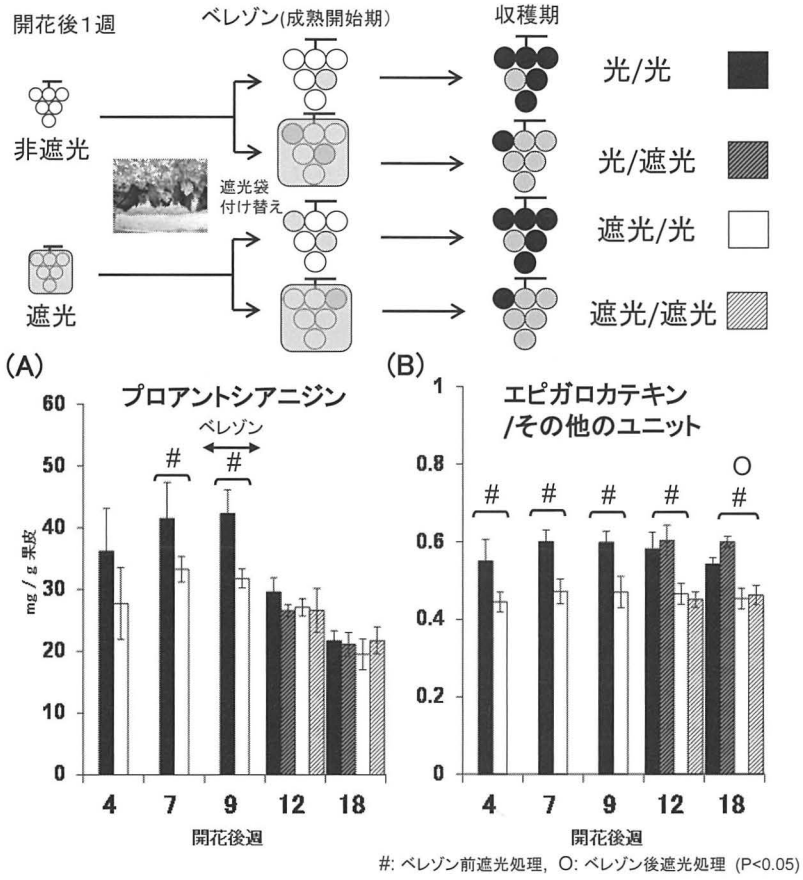
プロアントシアニジン組成	果皮	種子
エピガロカテキン割合（%）	38.2	N.D.
エピカテキンガレート割合（%）	1.6	16
平均重合度（伸長鎖／末端鎖）	18.1	7.5

3. 赤ワイン用ブドウ中のプロアントシアニジン組成へ及ぼす栽培条件の影響

ブドウ果実は，ベレゾンと呼ばれる時期を境として，それまでの成長器官から貯蔵器官となり成熟を始める。糖度が急速に増加するとともに，赤ブドウでは果皮にアントシアニンが生成し，着色が開始する。一方，プロアントシアニジンは，アントシアニンとは蓄積パターンが異なり，主に，結実してから成熟開始期まで（「成熟開始前」）に蓄積され，成熟開始期頃最大となり，その後減少する（第2図）。この減少は生成したプロアントシアニジンが酸化や局在の変化などにより溶出されにくくなるためと考えられている。醸造用ブドウには重要な成分であるが，アントシアニンと比較



第2図　ブドウ果皮でのフラボノイドの蓄積パターン



第3図 異なる時期の遮光処理が果皮プロアントシアニジンへ及ぼす影響[7*)]
(A)；プロアントシアニジン濃度,
(B)；プロアントシアニジン組成-エピガロカテキン / その他のユニット(モル比率)
(* 一部改変して引用)

して，生成に影響する栽培要因などについてこれまで詳しく調べられていなかった。

ブドウ生育期間の果房周囲の日照条件に着目し，異なる時期の果房への遮光処理（果実生育初期（成熟開始以前）及び／又は成熟期）が‘カベルネ・ソーヴィニヨン’果皮におけるプロアントシアニジン組成へ及ぼす影響について検討した[7)]。遮光処理は果実生育初期（着果期～成熟開始期）及び／又は成熟期に2重にした黒色寒冷紗の遮光袋を果房へとりつけることにより行ったが，この処理によって約90％の日照がカットされる条件であった（第3図上)。果実の生育初期の非遮光区では遮光区と比較して，果皮プロアントシアニジンの濃度は増加したが，両区のプロアントシアニジン濃度の成熟期の減少率は生育初期に非遮光であった果房においてより顕著であったため，生育初期の遮光処理は収穫期の果皮のプロアントシアニジン濃度には最終的に影響を及ぼさなかった（第3図A)。また，プロアントシアニジン含量への成熟期の日照の影響はみられなかった。一方，生育初期の遮光処理はプロアントシアニジンの組成の変化を誘導し，非遮光区の果実では果皮プロアントシアニジンの主な構成成分であるエピガロカテキンの割合や平均重合度の増加が収穫期までみられることがわかった（第3図B)。従って，プロアントシアニジンが生成する生育初期の果房への受光量は重要で，プロアントシアニジンの組成へ持続的なポジティブな影響をもたらすことがわかっ

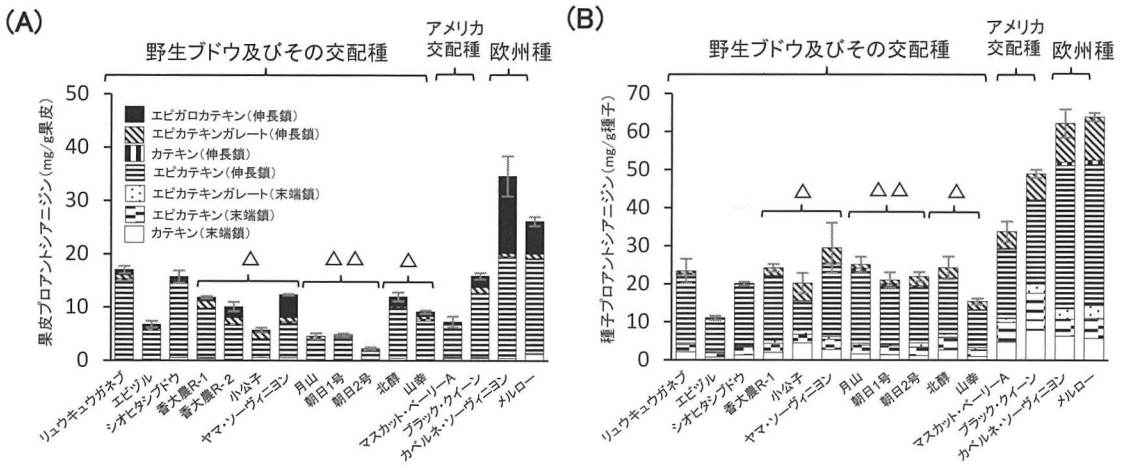
た。ダウニーら[8]は，果実中のプロアントシアニジン蓄積に影響を及ぼす環境要因を調査したところ，樹勢の違いによる影響が顕著にみられ，樹勢が弱い樹ほどプロアントシアニジンレベルは高まり，エピガロカテキンユニットの割合や平均重合度が増加すると報告している。私達の試験結果との類似性から，樹勢の違いに起因する樹冠内環境の変化（日照条件を含む）が間接的に影響している可能性が示唆された。

4. 赤ワインブドウ品種のプロアントシアニジン組成の特徴

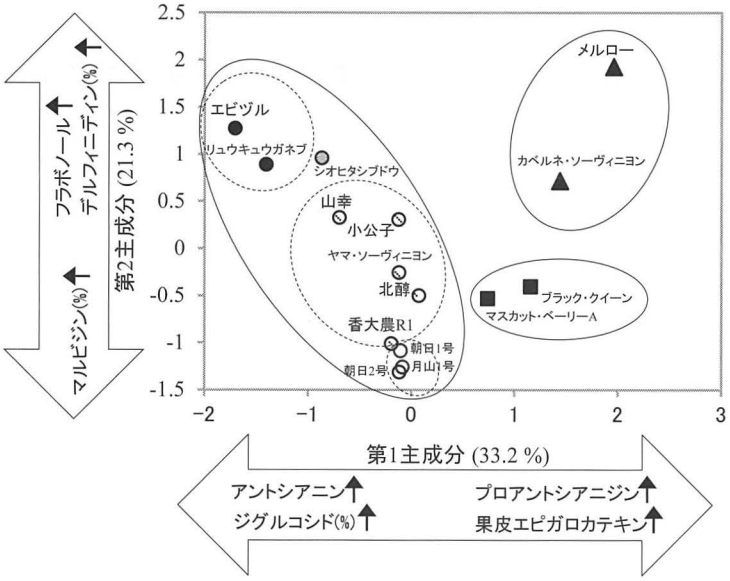
ブドウ果実中のポリフェノール組成へは環境要因の影響はある程度みられるが，品種間の遺伝的な違いによる影響がより大きいと言われており，組成の違いを利用した品種の判別や分類など検討されている[9,10]。国産赤ワイン品種のブドウの品質を調査するため，果実中のプロアントシアニジンを含めたポリフェノール組成に違いがみられるか調査を行った。代表的な欧州種2種及びアメリカ系交配種2種に加えて，日本在来野生ブドウであるヴィティス・フィシフォリア（リュウキュウガネブ，エビヅル），ヴィティス・コアニティ（ヤマブドウ），並びにこれらと欧州系品種などとの交配品種を含む計16品種の果実中のポリフェノール類のプロファイルの比較を行った[11]。検討した欧州系品種の果皮及び種子におけるプロアントシアニジン濃度はアメリカ系交配種，野生種及びその交配品種よりも顕著に高い傾向がみられた（第4図）。アメリカ系交配品種のブドウ及びワイン中では，一般的に，欧州種と比較してプロアントシアニジン含量が低いことが知られており[12]，これらの結果と矛盾しない結果であった。また，構成ユニット組成において，エピガロカテキンユニットの割合が欧州種において顕著に高い傾向がみられた。オーストラリアン・ワイン・リサーチ・インスティテュート（A.W.R.I.）による瓶詰め後4ヶ月以内の赤ワインの調査では，プロアントシアニジン中のエピガロカテキンユニット割合とワインの等級の間で正の相関がみられると報告されており[13]，この割合が高いことは，醸造用ブドウとしては好ましい性質であると考えられる。一方，その他のフェノール化合物については，野生ブドウ及びその交配品種では，これまで知られているように，果皮に多量かつ多様なアントシアニンを含有していた。さらに，一部の野生ブドウ及びその交配品種では，高い抗酸化性など機能性をもつことで知られるトランスリスベラトロールやミリセチン（フラボノール）を高含有するなどユニークなポリフェノール組成を持つものがあり，これらの性質は今後の育種においても有用な形質と考えられた。第5図では，各品種のポリフェノール成分の組成を比較するため，主成分解析をした結果である。野生種及びその交配品種，欧州系品種及びアメリカ系交配品種はそれぞれ特徴的なポリフェノール組成をもち，プロアントシアニジン関連成分（第1主成分の正方向）やフラボノール関連成分（第2主成分の正方向）が大きく影響していることがわかった。また，野生ブドウの交配種は，中間的な組成を示し，主成分スコアプロット上で親である野生ブドウと欧州系品種等との間にプロットされた。興味深いことに，‘ヤマブドウ’と欧州系品種‘カベルネ・ソーヴィニヨン’との交配品種‘ヤマ・ソーヴィニヨン’はプロアントシアニジンの含量や組成（エピガロカテキン割合）において，両親の中間的な値を示すことがわかった(第4図)。

5. 赤ワイン中のプロアントシアニジン組成へ及ぼす醸造条件の影響

赤ワインの醸造では，除梗・破砕後，果皮と種子を除かずにそのまま発酵を行う「醸し発酵」と呼ばれる工程において，ワインの色や呈味性に関わるフラボノイド化合物を果皮や種子からワインに溶出させる。アントシアニン，フラボノールは果皮より溶出されるのに対して，ワイン中のプロアントシアニジンは果皮と種子の両者より溶出するため，ワイン中のプロアントシアニジンは果皮由来のものと種子由来のものの混合物であるが，果皮と種子のプロアントシアニジンの組成は明確に識別可能である（第1表）。ある程度熟成したワインでは，プロアントシアニジンの分子内や分子間に複雑な結合が形成され，フロログルシノール分解法による分析が難しくなる。しかし，醸し発酵中で，果皮や種子が混在する状態（マスト）では，プロアントシアニジンの組成の解析より果皮及び種子からのそれぞれの抽出割合を推定することが可能である。例えば，エピガロカテキンユニットは果皮にのみ含まれるため，ブドウ果皮プロアントシアニジンのその割合とワイン中のそれを比較することによって，果皮由来プロアントシアニジンの割合が推定できる。同様に，エ



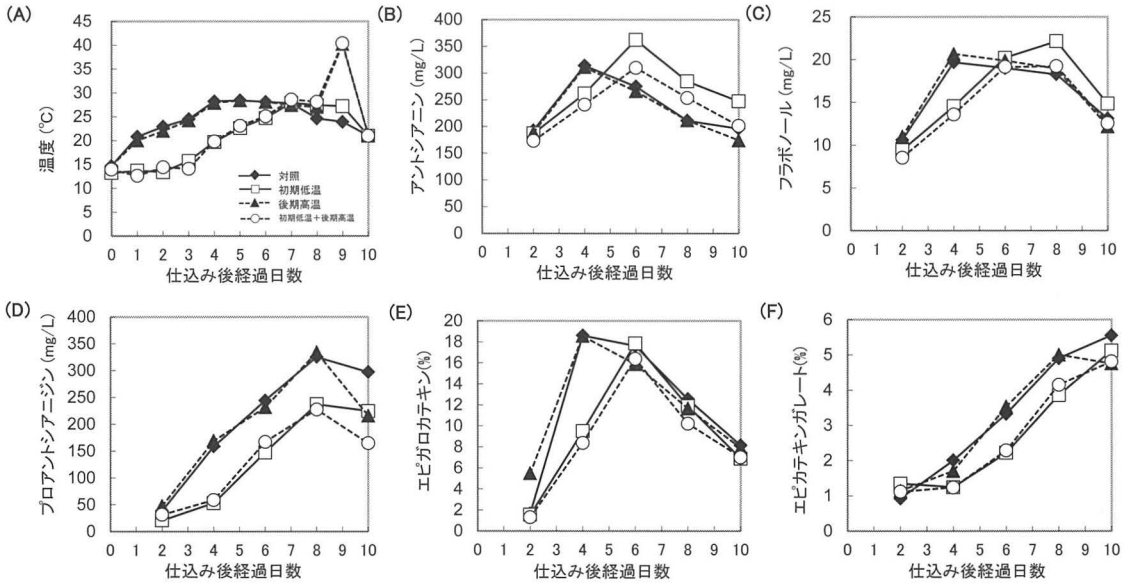
第4図　赤ワイン用品種の果皮及び種子プロアントシアニジンの特徴[11*)]
(A)；果皮プロアントシアニジン組成，(B)；種子プロアントシアニジン組成
△；野生ブドウ交配種，△△；ヤマブドウ
(* 一部改変して引用)



第5図　国産赤ワイン用ブドウ果実のフェノール化合物組成の特徴
○；野生ブドウ及びその交配種 {ヴィティス・フィシフォリア(黒丸)，ヴィティス・コアニティ(白丸)，交配品種(その他)}
△；欧州種(ヴィティス・ヴィニフェラ)
□；アメリカ系交配種(ヴィティス・ラブルスカーナ)

ピカテキンガレートはほとんど種子に含まれるため，この値から種子由来の抽出割合がわかる。

ブドウ中から赤ワインの品質に関連するフラボノイド類の溶出への醸造条件の影響について検討するために，‘カベルネ・ソーヴィニヨン’ブドウ 50kg を用いて醸造試験を行い，醸し発酵中の個々のフラボノイド



第6図　醸し発酵中におけるフェノール化合物抽出への発酵温度経過の影響[14*)]
(A)；醸し発酵温度経過, (B)；アントシアニン濃度, (C)；フラボノール濃度,
(D)；プロアントシアニジン濃度, (E)；エピガロカテキンの割合, (F)；エピカテキンガレートの割合
(* 一部改変して引用)

(アントシアニン，フラボノール，プロアントシアニジン）の溶出経過について検討を行った（第6図)[14)]。アントシアニンは醸し発酵初期に主に溶出し，ワインの色強度の増加がみられたが，発酵後半は酵母等への吸着などのためゆるやかに減少した（第6図B)。一方，プロアントシアニジンの溶出は醸し期間中に増加し，後半にも顕著に溶出することがわかった（第6図D)。また，詳細に果皮由来，種子由来のプロアントシアニジンの溶出パターンについて調べたところ，果皮由来であるエピガロカテキンユニットの割合は発酵初期に高くなり，その後減少したが，種子由来のエピカテキンガレートの割合は発酵期間が増加するにつれて徐々に増加し，発酵後半に顕著に高まることがわかった（第6図E，F)。したがって，発酵後半の総プロアントシアニジンの増加の多くは種子からのプロアントシアニジンの溶出によると考えられた。醸し期間が長ければプロアントシアニジンの総量は増えるが，種子由来のプロアントシアニジンが相対的に増加し，苦みなどが増える傾向があるとの報告もあり[15)]，ポジティブ面・ネガティブ面のバランスを官能評価にて判断する必要があると考えられる。

さらに，これらのフラボノイドの溶出への発酵温度経過（第6図A）の影響について調査を行うため，醸し発酵期間の温度経過（初期低温醸し及び／又は後期高温醸し）を変更し，醸造を行った。醸し発酵初期に2～3日間低温で温度を保つ「初期低温醸し」によって，果皮由来のアントシアニン，フラボノールの溶出が促進される（第6図B，C）のに対して，プロアントシアニジンの溶出は減少したが，これは，種子由来の苦みをもつ種子タンニン類の溶出の抑制によると考えられた（第6図D，F)。このように，初期低温醸しによってプロアントシアニジンの量だけでなく，質をコントロールできると考えられた。一方，発酵終了後にワインの温度を42℃まで一過的に上昇させる「後期高温醸し」では，揮発酸を増加させることなく，ポリフェノール類の溶出に正の効果があると報告がある[16)]が，予想に反して，プロアントシアニジンを含むすべてのフェノール化合物（没食子酸を除く）の減少がみられた（第6図B，C，D，F)。1つの理由としては，プロアントシアニジンなどフェノール化合物の酸化重合や果皮残渣等への吸着が促進されたことにより，これらが沈降したと考えられる。また，高分子

のプロアントシアニジンが優先的に減少したことから，高温下におけるプロアントシアニジンの分解の可能性等についても示唆され，今後の研究課題と考えられた。このように，醸造条件を変更することによってもプロアントシアニジンを含むフェノール化合物の抽出や消長をコントロールできることが示唆された。

6. おわりに

フロログルシノール分解法によるプロアントシアニジンの組成の解析によって，ブドウ中での蓄積の変化，各品種の果皮種子プロアントシアニジンの組成の違い，また，果皮や種子からワイン中への溶出パターンやその後の消長に関する多くの情報をえることができる。しかし，ブドウやワイン中におけるプロアントシアニジンの実際の構造は複雑であり，詳細は現在でも不明な点が多い[17]。フロログルシノール分解法における酸熱加水分解によって，分解できず測定できていないものが存在しており，一部の測定できたものの組成より全体を推定しているという点は課題と考えられる[18]。特に，熟成過程でアントシアニンとプロアントシアニジンは重合し新たな反応産物が生じるが，この生成物はフロログルシノール分解に抵抗性をもつといわれる。従って，ある程度熟成したワインでは同方法による分析が難しくなり，ワイン中での長期にわたるプロアントシアニジンの消長を明らかとするためには，今後のクロマトグラフィーを用いた分析方法の進展が必要であると思われる。

また，ワイン中でプロアントシアニジンは，コロイド粒子として他の高分子である多糖類やタンパク質などと会合して存在しており，これら他の高分子化合物もまたワイン中でのプロアントシアニジンの消長に影響するとともに，ワインの渋みや口内感へ影響していると考えられる[19]。井上らは，発酵中のマスカット・ベーリーAのワインでみられるプロアントシアニジンの減少には，不溶性の多糖類へのプロアントシアニジンの吸着が影響していることを明らかとした[20]。このように，プロアントシアニジンとこれらの高分子との相互作用，ワインの味わいとの関連を明らかとすることは，赤ワインの品質のコントロールのために避けては通れない道のように思われる。

〈独立行政法人酒類総合研究所〉

参考文献

1) V. Cheynier：*Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 223S-229S (2005).
2) RS. Jackson：Wine Science, Academic press (2000).
3) JF. Harbertson and S. Spayd：*Am. J. Enol. Vitic.* **57 (3)**, 280-288 (2006).
4) D. De Beer, JF. Harbertson, PA. Kilmartin, V. Roginsky, T. Barsukova, DO. Adams, and AL. Waterhouse：*Am. J. Enol. Vitic.* **55 (4)**, 389-400 (2004).
5) JA. Kennedy and GP. Jones：*J. Agric. Food Chem.* **49**, 1740-1746 (2001).
6) S. Vidal, L. Francis, S. Guyot, N. Marnet, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V. Cheynier, EJ. Waters：*J. Sci. Food Agric.* **83**, 564-573 (2003).
7) K. Koyama and N. Goto-Yamamoto：*J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **133 (6)**, 743-753 (2008).
8) M. Downey：FACT SHEET, GWRDC Innovators Network (2010).
9) A. Ortega-Regules, I. Romero-Cascales, JM. López-Roca, JM. Ros-García, and E. Gómez-Plaza：*J. Sci. Food Agric.* **86**, 1460-1467 (2006).
10) M. Figueiredo-González, M. Martínez-Carballo, B. Cancho-Grande, JL. Santiago, MC. Martínez, and J. Simal-Gándara：*Food Chem.* **130**, 9-19 (2012).
11) K. Koyama, H. Kamigakiuchi, K. Iwashita, R. Mochioka, and N. Goto-Yamamoto：*Phytochem.* **134**, 78-86 (2017).
12) L. Narduzzi, J. Stanstrup, and F. Mattivi：*J. Agric. Food Chem.* **63**, 6823-6834 (2015).
13) S. Kassara and JA. Kennedy：*J. Agric. Food Chem.* **59**, 8409-8412 (2011).
14) K. Koyama, N. Goto-Yamamoto, and K. Hashizume：*Biosci. Biotechnol., Biochem.* **71 (4)**, 958-965 (2007).
15) M. Gil, N. Kontoudakis, E. González, M. Esteruelas, F. Fort, JM. Canals, and F. Zamora：*J. Agric. Food Chem.*, **60**, 7988-8001 (2012).
16) V. Gerbaux, C. Briffox, and B. Vincent：*Rev. Fr. Oenol.* **201**, 16-21 (2003)
17) 小山和哉：生物工学会誌，87 (2), 88 (2009)
18) MA. Patricia and JA Kennedy：*J. Agric. Food Chem.* **55 (14)**, 5670-5680 (2007).

19) S. Vidal, L. Francis, L. Williams, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V. Cheynier, and E. Waters : *Food Chem.* **85**, 519-525 (2004).

20) E. Inoue, H. Kobayashi, F. Saito, M. Hisamoto, and T. Okuda : Am. Soc. Enol and Vitic., National Conference 2017.