カベルネ・ソービニヨン及びマスカット・ベリーA

赤ワインの熟成中における色調の変化

Ⅲ. 赤ワインの有機溶媒抽出による4つの色素画分の分別と得られた
画分の pH 変化及び亜硫酸に対する感受性

横 塚 弘 毅

<山梨大学発酵化学研究施設>

平成6年9月14日受理

Changes in Color during Aging of Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A Red Wines :

Ⅲ. Fractionation of Monomeric Anthocyanins and Oligomeric and Polymeric
Pigments from Young Red Wine by Extraction with Two Organic Solvents,
and Variability and Sensitivity of the Fractions to pH Changes
and Bleaching by Bisulfite

Koki YOKOTSUKA

(The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, 13-1
Kitashin-1-chome, Kofu, Yamanashi 400, Japan)

Muscat Bailey A red wine made in the usual manner in October, 1992 was analyzed between May and July, 1994. The young wine was successively extracted with isoamyl alcohol and *n*-butanol in order to fractionate red pigments of different molecular sizes. The *n*-butanol extract was further separated into two fractions by chromatography on Sephadex LH-20 with water and 50% ethanol. The three fractions and residual aqueous layer were spectrophotometrically analyzed. The isoamyl alcohol extract appeared to contain mainly monomeric anthocyanins, two fractions from the *n*-butanol extract oligomeric and/or polymeric anthocyanins, and aqueous layer polymeric pigments resistant to pH change and bleaching by bisulfite.

Key words : 赤ワイン・亜硫酸耐性色素・色素ポリマー

緒 言

SOMERS & EVANS^{1,2)}によれば、赤ワインの色調はアントシアニンモノマーと色素ポリマーとからなり、モノマーが重亜硫酸塩で退色するのに対して、アントシアニン(アントシアニン)がプロシアニンやその他のフラボノイドと結合することによって生じた色素ポリマー(polymeric pigments)^{3~6)}は全く影響を受けないと仮定し、ワインのpHで0.3%になるように重亜硫酸塩を添加した後に520nmの吸光度を測定して、これを色素ポリマーに由来するカラー(PPC)とした。彼らの結果では、pH<1以下において測定される全色素ポリ

マーの赤色の強度(PPCA)は、PPCを5/3倍したものである。しかし、筆者は前報^{7,8)}で、日本産ブドウから製造した17製造年のカベルネ・ソービニヨンや16製造年のマスカット・ベリーAワインのスペクトル分析や、イソアミルアルコールでワインより抽出分離した色素ポリマー画分の亜硫酸に対する感受性及びこの画分の薄層クロマトグラフィーによる分析から、ワイン中の色素ポリマーは、構造が類似した複数の色素オリゴマーあるいはポリマーよりなることを示唆した。ワインのアントシアニン色素や色素ポリマーをデキストランゲル、ポリアミドあるいはPVPPカラムクロマトグラフィーあるいは高速液体クロマトグラフィーによって分析した結

果、製造中や貯蔵中にワインの色素組成は非常に変化し、アントシアニンモノマーは色素オリゴマーやポリマーへ漸進的に変わり、これらの色素の亜硫酸に対する感受性も徐々に変化し、赤色色素の複雑性が増すことが示唆された⁹⁻¹⁵⁾。しかし、以上の研究の中では、色素オリゴマーやポリマーをワインより分離したり、またそれらの亜硫酸に対する感受性などを直接に調べていない。

これらのことから、本論文では、1) 亜硫酸によって脱色される色素は真にアントシアニンモノマーのみであるか否か、2) 色素ポリマー中には亜硫酸塩との反応性が異なる様々なポリマーが存在するのではないか、3) これらのポリマーカラーは pH 変化に応じて異なった変化をするのではないか、などについて研究することが重要であると考えた。そこで、製造後約1年半の非常に若く、色素組成の観点から不安定で、種々の色素オリゴマーやポリマーを含むと考えられる1992年産マスカット・ベリーA赤ワインから、溶媒抽出法で分子サイズの異なる色素ポリマーの分別を試み、分離された色素画分の pH や亜硫酸塩に対する感受性を調べて、色素ポリマーの不均一性を検討したので報告する。

実験方法

1. 赤ワインの製造

本研究では前報^{7,8)}の方法に従って、当研究施設有種試験地で1992年10月に収穫されたマスカット・ベリーAブドウを定法に従って製造した赤テーブルワインを用いた。発酵終了後1週間自然沈降させ、澱引きしたワインへ二酸化イオウにして75 mg/l となるようにピロ亜硫酸カリウムを加えた。一夜放置後、前報の通りワインをセルロースとケイソウ土からなるアスベスト板13枚を使って濾過し、1.8 l 容ガラスボトルに詰め、王冠をし、横に寝かせて15°Cの地下貯蔵庫に保存した。

2. フェノール分析

全フェノール及びフラボノイド型フェノールは、SINGLETON & ROSSI の方法¹⁶⁾並びに KRAMLING & SINGLETON の方法¹⁷⁾によって定量し、値は没食子酸換算で表わした。ワインや分離した赤色色素画分のスペクトル分析は SOMERS & EVANS の方法^{1,2)}及び筆者の前報⁷⁾によって行った。

3. 2種の有機溶媒を用いた抽出によるアントシアニンモノマー及び色素オリゴマーとポリマーの分別

1992年産マスカット・ベリーA赤ワイン50 ml を等量のイソアミルアルコール〔モデルワイン、すなわち重石酸カリウムで飽和した10%エタノール(pH 3.7)で飽和されている〕で抽出し、分離した水層に対して等量のイソアミルアルコールを加えて抽出する操作をさ

らに3回行った。イソアミルアルコール層(206 ml)をまとめてスクリュウキャップ付きガラス製試料瓶に入れ、ヘッドスペースを窒素置換後、キャップをして4°Cに保存した。水層へ等量のモデルワインで飽和したn-ブタノールを加えて、上と同様に5回抽出した。n-ブタノール層(248 ml)を合わせて上と同様に処理して保存した。残った水層(45 ml)もまた窒素置換して保存した。

イソアミルアルコール抽出液に等量のモデルワインと5倍量のベンゼンを加えてよく攪拌し、有機層と水層に分けた。有機層を再びモデルワインで抽出し、水層をまとめてロータリーエバポレーターを用いて35°Cで減圧乾固させ、これに試料ワインと同じ容量のモデルワインを加えて溶解させた。

n-ブタノール層へ等量のモデルワイン(pH 3.7)と3倍量のベンゼンを加えて攪拌後、静置し、有機層と水層に分けた。有機層を等量のモデルワインで再び抽出した。2回の水層を合わせ、35°Cで元の容量の約1/10へ減圧濃縮した。水で平衡化したSephadex LH-20 カラム(22×250 mm)に濃縮試料をつけ、水で溶出してくる画分と50%エタノールで溶出する画分に分けた。それぞれの画分を35°Cで減圧乾固し、モデルワインを加えて元のワイン量とした。

実験結果及び考察

実験に用いたマスカット・ベリーA赤ワインの一般成分組成並びにスペクトル分析した結果を前報^{7,8)}に示した。このワインは非常に若いので、製造後数年経ったワインや熟成したワインに比べて、赤色(A₅₂₀)に関する色素パラメータは高いが、その他の成分の分析値はマスカット・ベリーAワインとして典型的なものと認められた。

本研究を始めるにあたり、赤ワイン中には pH 変化や亜硫酸に対して感受性の違う数種の分子サイズの異なる色素ポリマーが存在するという仮定をたて、極性の異なる、水と容易に混和しない2つの有機溶媒を用いて、各画分の分別を試みた。

1992年産マスカット・ベリーA赤ワインをイソアミルアルコールとn-ブタノールで連続抽出し、それぞれの有機層と水層中の全フェノール量とフラボノイド型フェノール量を調べた。Table 1 はその結果を示したものである。ワインの全フェノールは1,046 mg/l で、その中の39.3%にあたる411 mg がフラボノイド型フェノールとして見いだされた。イソアミルアルコール抽出によってワイン中の全フェノールとフラボノイドのそれぞれ約54%と51%が抽出された。

Table 1 Concentrations of total and flavonoid phenols in the fractions extracted from 1992 Muscat Bailey A wine with isoamyl alcohol and *n*-butanol.

	Total phenols mg/ ℓ (%)	Flavonoid phenol mg/ ℓ (%)
Original wine	1046 (100)	411 (100)
Isoamyl alcohol extract ¹	569 (54.4) ³	210 (51.1) ³
<i>n</i> -Butanol extract ¹		
Water eluate ²	31 (3.0)	trace
50% ethanol eluate ²	104 (9.9)	62 (15.1)
Residual aqueous solution	169 (16.2)	83 (20.2)
Total	879 (83.5)	355 (86.4)

¹ The wine was successively extracted with isoamyl alcohol and *n*-butanol, which were saturated with aqueous 10% ethanol saturated with potassium bitartrate.

² The fraction extracted with *n*-butanol was applied to a Sephadex LH-20 column and eluted with water and then 50% ethanol.

³ The values in parentheses are the percentage concentrations of total phenols or flavonoid phenol of the original wine.

イソアミルアルコールで抽出後の水層を *n*-ブタノールで抽出し、これを 35°C で減圧乾固すると、理由は分からないが、試料の赤色が消失した。そこで、*n*-ブタノール抽出画分を約 1/10 に減圧濃縮後、Sephadex LH-20 カラムにつけ、水と 50% エタノールで順次溶出し、それぞれを減圧乾固した結果、両者とも赤色が消失したり、赤色強度が低下する現象は認められなかった。しかし、水で溶出した画分中の全フェノールは少なく、フラボノイドは全く存在しなかった。一方、50% エタノール溶出画分中の全フェノールの約 60% はフラボノイドであった。*n*-ブタノール抽出後の水層にはワインにもともと含まれていた全フェノールの約 16% のそれが残存し、その中の約 49% がフラボノイドであった。

HASLAMN¹⁸⁾ によれば、赤ワインの熟成中の最も基本的な化学変化は、酸触媒によるフラボノイド型フェノールの C-C 切断反応と結合（縮合）反応であり、その結果、ワインの色調は赤紫色、赤色～深紅色、赤褐色へと変化する。これはアントシアニンモノマーが酸化的に他のフラボノイドと結合し、より安定な色素になることを含む。すなわち、アントシアニンのヘテロサイクリック環の 4 位置のカルボニウムイオンとプロシアニジンやカテキンの求核性の 6-あるいは 8-位置との相互作用によって生成した色素オリゴマーやポリマーは、アントシアニンモノマーよりもずっと pH 変化や重亜硫酸塩の

影響を受けにくい。アントシアニンモノマーは亜硫酸の添加によって漂白され、また、酸性が強まるにつれて明るい赤色となり、フラビリウムカチオンの割合が増し、逆に pH が上昇するにつれて無色のカルビノールシュードベース、青色のキノイダルベース、ほぼ無色のカルコンに変わる。これに対して、前にも述べたが、色素ポリマーは pH の影響を受けにくく、またワインの pH で終濃度 0.3% になるように亜硫酸を添加しても脱色されず、これを pH<1 にするとワインの pH での A_{520} の 5/3 (1.67) 倍^{1,2,19)} あるいは前報の結果^{7,8)} では 1.37 または 1.42 倍になることが報告されている。そこで、若いワインから有機溶媒抽出によって分離された種々の色素画分に及ぼす重亜硫酸塩の添加及び pH 変化の影響を調べた。

まず、Table 1 で示した各色素画分のスペクトル分析を行った (Table 2)。pH 3.7 で A_{520} を測定した場合、イソアミルアルコールで抽出された画分の A_{520} は元のワインのその約 72% を占めた。次に *n*-ブタノールを用いたとき、元のワインの A_{520} の約 6% が抽出され、水層には約 11% のそれが残った。今までの 3 つの画分の A_{520} の合計は元のワインのその約 91% に相当した。この合計値は多数の溶媒抽出操作を行い、また、アントシアニンが酸化されやすいことを考慮すると満足のいくものであった。ワインの pH 3.7 での A_{520} が 2.475

Table 2 Effects of addition of SO₂ and acetaldehyde on the absorbances at 520 and 420 nm of 1992 Muscat Bailey A red wine and the four fractions obtained from the wine by extraction with two organic solvents and chromatography on Sephadex LH-20¹.

	Wine	Isoamyl alcohol extract	<i>n</i> -Butanol extract Water eluate	50% Ethanol eluate	Residual aqueous solution	Total
pH 4.1						
A ₅₂₀	1.551	0.979	0.007	0.121	0.264	1.360
A ₄₂₀	1.375	0.809	0.022	0.193	0.589	1.613
A ₅₂₀ (+SO ₂) ²	0.572	0.248	0.006	0.072	0.209	0.535
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO) ³	2.376	1.177	0.011	0.121	0.286	1.595
A ₅₂₀ (+SO ₂)/A ₅₂₀	0.37	0.25	1.00	0.60	0.79	
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)/A ₅₂₀	1.53	1.20	1.83	1.00	1.08	
pH 3.7						
A ₅₂₀	2.475	1.771	0.008	0.134	0.264	2.249
A ₄₂₀	1.564	0.974	0.022	0.193	0.591	1.780
A ₅₂₀ (+SO ₂)	0.620	0.259	0.006	0.074	0.209	0.548
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)	3.555	2.007	0.015	0.139	0.280	2.441
A ₅₂₀ (+SO ₂)/A ₅₂₀	0.25	0.15	0.75	0.55	0.79	
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)/A ₅₂₀	1.44	1.13	1.88	1.04	1.06	
pH 3.1						
A ₅₂₀	3.861	2.959	0.011	0.154	0.264	3.388
A ₄₂₀	1.848	1.221	0.022	0.193	0.594	1.780
A ₅₂₀ (+SO ₂)	0.693	0.275	0.006	0.077	0.209	0.567
A ₅₂₀ (CH ₃ CHO)	5.324	3.251	0.022	0.166	0.270	3.709
A ₅₂₀ (+SO ₂)/A ₅₂₀	0.18	0.09	0.55	0.50	0.79	
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)/A ₅₂₀	1.38	1.10	2.00	1.08	1.02	
pH 2.3						
A ₅₂₀	11.440	8.272	0.017	0.286	0.247	8.822
A ₄₂₀	3.443	2.244	0.023	0.215	0.545	3.027
A ₅₂₀ (+SO ₂)	0.880	0.358	0.006	0.088	0.176	0.628
A ₅₂₀ (CH ₃ CHO)	11.275	7.475	0.022	0.274	0.270	8.041
A ₅₂₀ (+SO ₂)/A ₅₂₀	0.08	0.04	0.35	0.31	0.71	
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)/A ₅₂₀	0.99	0.90	1.29	0.96	1.09	
pH 1.0						
A ₅₂₀	22.990	17.602	0.028	0.649	0.256	18.535
A ₄₂₀	5.522	3.667	0.022	0.275	0.539	4.503
A ₅₂₀ (+SO ₂)	7.414	4.879	0.006	0.231	0.187	5.303
A ₅₂₀ (CH ₃ CHO)	21.131	12.606	0.083	0.622	0.286	13.597
A ₅₂₀ (+SO ₂)/A ₅₂₀	0.32	0.28	0.21	0.36	0.73	
A ₅₂₀ (+CH ₃ CHO)/A ₅₂₀	0.92	0.72	2.96	0.96	1.12	

¹ Four pigment fractions were fractionated by extraction with organic solvents and Sephadex LH-20 chromatography. See Table 1.

² Absorbance at 520 nm (corresponding to polymeric pigments) of the wine containing 0.3% potassium metabisulfite.

³ Absorbance at 520 nm of the wine measured after removing SO₂ bound to pigments with excess acetaldehyde.

であるのに対して、重亜硫酸塩を添加したときの A₅₂₀ は 0.620 となり、色素ポリマーの存在が考えられた。仮に、イソアミルアルコール層中のすべての色素がアントシアニンモノマーとしたら、重亜硫酸添加によってこの層のすべての色素が無色となるが、約 15% の A₅₂₀ 分 (0.259) は脱色されずに残った。これに対して、*n*-ブタノール抽出物や残った水層の A₅₂₀ の半分～大部分は重亜硫酸塩によって脱色されず、特に水層の赤色の約 80% が脱色されずに残った。従って、イソアミルアルコー

ル抽出層に比べて *n*-ブタノール層や水層中の色素は重亜硫酸塩で脱色されにくいオリゴマーやポリマーであると推定された。そこで、各色素画分の pH を 3.7 から種々の pH (4.1, 3.1, 2.3 あるいは 1.0) へ希塩酸あるいは希苛性ソーダ溶液で調整した後、A₅₂₀ を測定した。ワイン、イソアミルアルコール抽出物及び *n*-ブタノール抽出物の A₅₂₀ は、pH の低下に伴って徐々に高くなった。pH 3.7 で測定した A₅₂₀ に対する pH 1.0 での A₅₂₀ の比を比較すると、ワインの場合 9.29、イソアミ

Fig. 1 Effect of pH on the ratio of the absorbances at 520nm of 1992 Muscat Bailey A wine and four fractions fractionated by solvent extraction and Sephadex LH-20 chromatography from the wine with and without 0.3% sulfite. See Table 1 and 2.

ルアルコール抽出物の場合 9.94, *n*-ブタノール抽出物で Sephadex LH-20 から水で溶出する画分の場合 3.50, 50% エタノールで溶出する画分の場合 4.84 であった。予想通り, ワインよりもイソアミルアルコール抽出物 (アントシアニンモノマーを多く含むので) の比の方が大きかった。*n*-ブタノール抽出画分の 2 つのフラクションの同比はイソアミルアルコール抽出物のそれよりも小さく, 色素オリゴマーやポリマーの存在が推定された。一方, 有機溶媒抽出後に残った水層の同比は 0.97 で, pH を 1.0 から 4.1 まで変えても A_{520} はほとんど変化しなかった。各 pH でワイン及び色素抽出画分へ重亜硫酸塩添加を行い, 重亜硫酸塩添加前の A_{520} に対する添加後のその比を求めて図示したのが Fig. 1 である。この図はそれぞれの pH における各色素画分の重亜硫酸塩に対する感受性の相違を示したものである。最も重亜硫酸塩に感受性が高いのはイソアミルアルコール抽出画分で, この結果は遊離のアントシアニンモノマーが主体であると考えてきたことと矛盾しない。次に重亜硫酸塩に対して感受性が高いのは *n*-ブタノールで抽出され, Sephadex LH-20 カラムから 50% エタノール及び水で溶出されてくる画分であり, これらは恐らく色素オリゴマーであろう。最も重亜硫酸塩に対して感受性が低いのは有機溶媒で抽出されず, 水層に残った色素画分である。この画分の $A_{520}(+SO_2)/A_{520}$ 比は pH 2.3~4.1 の間ではほとんど変化せず, また重亜硫酸塩の添加によりどの pH でも一定の割合で吸光度が減少し, 恐らく色素ポ

リマーだけが含まれていると考えられる。

さらに, ワインにアセトアルデヒドを添加して A_{520} を測定した結果, pH 3.7 で元のワインのその 1.44 倍に増加した。これは A_{520} の増加分だけの色素と亜硫酸がワイン中で結合し, 無色の複合体を形成していたためと推定できる。*n*-ブタノール抽出物を Sephadex LH-20 カラムにつけ, 水で溶出されてくる画分ではアセトアルデヒド添加の効果は大きく, アセトアルデヒド添加前後の A_{520} の比は 1.88 に達したが, 含まれるフェノール量が少なく, また A_{520} 値それ自体が小さいことから, この画分に対するアセトアルデヒド添加効果によって, ワインをアセトアルデヒド処理した前後の同比 1.44 のすべてを説明できない。一方, イソアミルアルコール抽出層, *n*-ブタノール抽出後に Sephadex LH-20 カラムにつけ, 50% エタノールで溶出した画分及び有機溶媒抽出後に残った水層中の色素はアセトアルデヒド処理前後で A_{520} が 1.04~1.13 倍にしか増えなかった。これは溶媒抽出中に色素と結合していた亜硫酸の脱離が起こり, アセトアルデヒド添加効果が少なくなったためかも知れない。

このように, 若い赤ワインには種々の度合に結合した色素オリゴマーあるいはポリマーが存在し, 重亜硫酸塩添加や pH 変化に対してその色調や吸収強度が複雑かつ様々に変わることが明らかとなった。一方, 熟成した赤ワインには, 若いワインとは違って, 複数種の色素オリゴマーやポリマーしか存在しないと考えられる。これらのことより, 赤ワインの酒質や色素の状態を調べるには, 赤ワインを上記の有機溶媒で抽出し, 得られた画分中に含まれるアントシアニンあるいは色素ポリマーの結合状態を初めに調べ, その後いくつかの吸収波長で吸光度を測定することによって, より確実なスペクトル分析をすることができると考えられる。

要 約

1992 年産マスカット・ベリーAワインをイソアミルアルコールと *n*-ブタノールで連続抽出した。*n*-ブタノール層はさらに Sephadex LH-20 クロマトグラフィーで 2 つの画分に分け, さらに残った水層も合わせて, 合計 4 画分の色素のスペクトル分析を行った。イソアミル層には主としてアントシアニンモノマーが含まれ, *n*-ブタノール層からの 2 画分には色素オリゴマー及びポリマーと思われる色素が, 水層には重亜硫酸塩添加にも pH 変化にも反応しない色素ポリマーと思われる色素が含まれていた。

謝 辞

本研究は, 当研究施設大学院生, 保坂徹君並びに中沢

和生君の助力の下に行われた。ここに深謝します。

文 献

- 1) T. C. SOMERS and M. E. EVANS : *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1369 (1974)
- 2) T. C. SOMERS and M. E. EVANS : *J. Sci. Food Agric.*, 28, 279 (1977)
- 3) P. RIBÉREAU-GAYON : *Vitis*, 12, 119 (1973)
- 4) C. F. TIMBERLAKE and P. BRIDLE : *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 97 (1976)
- 5) V. L. SINGLETON and J. F. GUYMON : *Am. J. Enol. Vitic.*, 14, 129 (1963)
- 6) V. L. SINGLETON, H. W. BERG and J. F. GUYMON : *Am. J. Enol. Vitic.*, 15, 75 (1964)
- 7) 横塚弘毅 : 醸協, 90, (3) 222 (1995)
- 8) 横塚弘毅 : 醸協, 90, (6) 485 (1995)
- 9) T. C. SOMERS : *Nature*, 209, 368 (1966)
- 10) P. RIBÉREAU-GAYON and Y. GLORIES : *C. R. Acad. Sci. Paris*, 273, 2369 (1971)
- 11) T. C. SOMERS : *Vitis*, 7, 303 (1968)
- 12) Y. GLORIES : *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 253 (1984)
- 13) J. BAKKER, N. W. PRESTON and C. F. TIMBERLAKE : *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 121 (1986)
- 14) J. BAKKER : *Vitis*, 25, 203 (1986)
- 15) J. BAKKER and C. F. TIMBERLAKE : *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 288 (1986)
- 16) V. L. SINGLETON and J. A. JR. ROSSI : *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144 (1965)
- 17) T. C. KRAMLING and V. L. SINGLETON : *Am. J. Enol. Vitic.*, 20, 86 (1969)
- 18) E. HASLAM : *Phytochemistry*, 19, 2577 (1980)
- 19) T. C. SOMERS : *Phytochemistry*, 10, 2175 (1971)