ブドウ果汁の品質に関する研究

(第1報) 貯蔵中における濃縮ブドウ果汁 (キャンベル・アーリー)
の色調とアントシアニンの変化

太田英明*・箆島 豊*・沢村正義*・中村 浩**・芥田三郎*

Studies on Qualities of Grape Juice

Part I. Changes of color and anthocyanin in concentrated juice of
Campbell Early grapes during storage

HIDEAKI OHTA*, YUTAKA OSAJIMA*, MASAYOSHI SAWAMURA*,
HIROSHI NAKAMURA** and SABUROU AKUTA*

The changes of color and total anthocyanin in the concentrated juice of Campbell Early grapes which was stored at room temperature, 5°C and -30°C, were investigated for ten months.

Optical density of the juice (at 520 nm) and the total anthocyanin content decreased rapidly as follows: room temperature > 5°C > -30°C. At -30°C for ten months, the color density and the total anthocyanin content decreased to 78% and 58%, respectively. In six bands of anthocyanins on paper chromatogram, band 4 (3-monoglucosides of malvidin and peonidin) decreased to 4%, band 3 (peonidin-3,5-diglucoside and petunidin-3-monoglucoside) to 8% and band 2 (malvidin-3,5-diglucoside and delphinidin-3-monoglucoside) to 9%, at room temperature for ten months. From these evidence 3-monoglucosidic anthocyanidins seemed to decompose more easily than 3,5-diglucosides in the grape juice.

Crude anthocyanins prepared by basic lead acetate method were isolated by paper chromatography and characterized by spectroscopy, hydrolysis and chromatographic techniques. Nine anthocyanins were identified: 3-monoglucosides of malvidin, peonidin, petunidin and delphinidin, 3,5-diglucosides of malvidin, peonidin and delphinidin, and malvidin-3-monoglucoside and peonidin-3,5-diglucoside acylated with *p*-coumaric acid.

(Received Feb. 19, 1976)

ブドウは世界で最も多く生産されている果実であるが、近年わが国でもその生産は増加の一途にあり、これにともない加工食品(ワイン, ジュース, ジャムなど)の製造も盛んになってきている。一方、国産のブドウ果汁に関する研究は極めて少なく、加工、利用のネックとなっている。

ブドウ果汁の品質因子(色, 味, 香など)の中で、貯蔵中に劣化の最も目立つのは色調である。ブドウ独特の色は白色種を除き主にアントシアニン色素に依存してい

る。

著者らは本邦産果実のアントシアニン系色素に関する研究^{1,2)}の一環として各ブドウ品種の構成色素の調査を行うとともに、ブドウ加工食品の退色機構を解明し、さらには退色防止法の確立を目的として研究を進めてきた。

本報では、まず退色現象を明確に把握するため、二三の貯蔵条件を設定し、果汁色調とアントシアニン含量の変化を糖および酸の変化とともに調査した。また未だ構

* 九州大学農学部食品分析学教室 (〒812 福岡市東区箱崎)

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka.

** 山口大学農学部食品化学教室 (〒753 山口市吉田)

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi.

成色素が明らかにされていない供試ブドウ果汁(キャンベル・アーリー)のアントシアニン色素の同定を併せ行った。

実験材料および方法

1. 実験材料

山口県経済連山口工場で1972年10月に製造されたブドウ品種、キャンベル・アーリーの1/5濃縮果汁(原果汁)を200 ml容の瓶またはビニール袋に充填し、75°C、22分間殺菌したものを実験材料とした。この原果汁は、洗浄した果粒を潰砕後搾汁し、熱交換器(75°C、1分間)中を通して殺菌、ペクチナーゼ処理後、真空濃縮(25°C、20 mmHg)して得た。

2. 貯蔵方法

下記の各試験区とも各12本の瓶またはビニール袋を用いた。

室温区; 瓶詰めを室内散乱光下で貯蔵した。

低温区; 瓶詰めを冷蔵庫(0~5°C)の暗所に貯蔵した。

冷凍区; ビニール袋詰めを冷凍庫(-30°Cの暗所)に貯蔵した。

3. 測定項目

(1) 糖度, pH および滴定酸度

糖度; 糖用屈折計2号(30~66%)を用いて原果汁のまま測定し, Brix で表示した。

pH; 原果汁 5 ml を純水で5倍希釈し, 日立-堀場 H5 型 pH メーターを用いて測定した。

滴定酸度; 原果汁 5 ml に純水 20 ml を添加した希釈果汁液を中和するのに要した 0.1 N 水酸化ナトリウムの ml 数から酒石酸に換算して示した。

(2) 色調

原果汁を 0.1 M 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.0)で希釈し, その極大吸収波長 520 nm の吸光度を日立 Perkin-Elmer 139 分光光度計で測定し, 貯蔵開始時を 100% としてその後の変化を百分率で表わした。

(3) ペーパークロマトグラフ法(以下 PPC と略す)に用いた溶媒系

Table 1 に示す通りで, 以下その略号を使用する。

(4) 全アントシアニン

原果汁 5 ml を純水で5倍に希釈し, 飽和塩基性酢酸鉛を徐々に添加し, 色素を緑色の鉛塩として沈殿させた。0.5 N 水酸化ナトリウムで pH 7.0 に調節後, 4,000 rpm, 5分間遠心分離し上澄みを除去し, 純水次にメタノールで洗浄した後, 1% 塩酸-メタノール液で色素を抽出した。4,000 rpm, 10分間(0°C)遠心分離し鉛を塩化鉛の白色沈殿として除去した。上澄みを減圧濃縮(38°C, 炭酸ガス通気)し, 5倍量の無水エーテルを加え色素を沈殿させるとともにエーテル可溶物質を除去した。得られた沈殿物に 20 ml のメタノールを加え減圧濃縮乾固することによって粗色素(塩化物)を調製した。

全アントシアニンは, この粗色素を 0.01% 塩酸-メタノール液(pH 1.0 に調節)で 25 ml に定容し, その極大吸収波長 530 nm の吸光度を測定し貯蔵開始時を 100% としてその後の変化を百分率で表示した。

(5) バンド(以下 Bd) 別アントシアニン

試料中のアントシアニンは, 全アントシアニン液を減圧濃縮し, 東洋濾紙 No. 50 (20×20 cm) に帯状に塗布した後, iBAW を溶媒として展開, 分離させた。Bd 別アントシアニンは, 分離した各色素 Bd を 0.01% 塩酸

Table 1. Solvent systems for paper chromatography

Abbreviation	Composition	Proportion (v/v)	Layer	Solvent used for
BAW	<i>n</i> -Butanol:acetic acid:water	4:1:5	Upper	Anthocyanins Anthocyanidins Sugars Acyl groups
iBAW	Isobutanol:acetic acid:water	8:2:3	Miscible	Anthocyanins
HAW	Conc. hydrochloric acid:acetic acid:water	3:15:82	Miscible	Anthocyanins
1%HCl	Conc. hydrochloric acid:water	3:97	Miscible	Anthocyanins
Forestal	Acetic acid:water:conc. hydrochloric acid	30:10:3	Miscible	Anthocyanidins
FHW	Formic acid:conc. hydrochloric acid:water	5:2:3	Miscible	Anthocyanidins
BHW	<i>n</i> -Butanol:conc. hydrochloric acid:water	7:2:5	Upper	Anthocyanins
EAW	Ethyl acetate:acetic acid:water	3:1:3	Upper	Sugars
BPW	<i>n</i> -Butanol:pyridine:water	6:3:1	Miscible	Sugars
2%AcOH	Acetic acid:water	2:98	Miscible	Acyl groups
BenAW	Benzene:acetic acid:water	2:2:1	Upper	Acyl groups

-メタノール液で溶出し、原果汁 5 ml 中に存在する量に換算して E_{580nm} 値で表示した。

以上の項目を2カ月毎に測定した。

4. 各アントシアニンの同定

(1) 分離および精製

すべて PPC によった。

各色素の分離は、東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) に粗色素を帯状に塗布し、溶媒 iBAW を用いて行った。各色素は、分離した色素バンドを 0.01% 塩酸-メタノール液で溶出し、減圧濃縮後東洋濾紙 No. 50 (20×20 cm) を用い、溶媒 HAW, iBAW, 1% HCl の順で PPC を行い精製した。各精製色素の R_f 値の測定には、Whatman No. 1 (20×30 cm) を用いた。

(2) 各アントシアニンの同定法

分光分析、部分的酸加水分解など既報¹⁾に準じて行った。

実験結果および考察

1. 貯蔵中の変化

(1) 糖度, pH および滴定酸度

糖度 56%, pH 3.0, 滴定酸度 3.2~3.3% であり、貯蔵期間を通じてほとんど変化はなく、果汁の味の指標である糖酸比 (Brix/酒石酸) は 17.3 であった。

(2) 色調および全アントシアニンの変化

色調および全アントシアニンの変化を Fig. 1 に示した。貯蔵開始とともに各区とも色調は劣化し始めるが、全アントシアニンの減少度は色調の劣化割合よりも大き

Fig. 1. Changes of color and total anthocyanin in the concentrated juice of Champbell Early grapes under three conditions
—○—; stored at -30°C, —△—; stored at 5°C,
—×—; stored at room temperature.

い。各試験区では室温区で最も大きく減少しており、その割合は貯蔵初期に顕著である。6カ月以降は褐変が目立ち著しく商品価値を減じた。また冷凍区においてすら10カ月後には、色調が78%, 全アントシアニンは58%まで減少した。このように色調の劣化が全アントシアニンの減少より小さいのは、果汁中に存在するアントシアニンの分解物やタンニンなどのフェノール物質の着色の結果によると推定される。

(3) Bd 別アントシアニンの変化

粗色素液は溶媒 iBAW による PPC によって、Fig. 2 のように6コの Bd に分離した。このバンド別アントシアニンの変化を Fig. 3 に示した。

Fig. 2. Paper chromatogram of anthocyanins in the grape juice with iBAW

Fig. 3. Changes of each banded anthocyanin content in 5 ml of the grape juice during storage
—○—; Band 4, —●—; Band 3, —○—; Band 2,
—△—; Band 5, —▲—; Band 1, —×—; Band 6.

最も量的に多い Bd 4 は、室温区で貯蔵期間の増加にともない大幅に減少した。低温区、冷凍区でも同様に経時的に減少するが、減少割合は冷凍区で最も小さかった。この Bd 4 は Table 4 に示すように Malvidin-3-monoglucoside (Mv-3G と略す。他のアントシアニンの略号は Table 4 の通り) と Pn-3G に相当する。

一方少量色素の中、Bd 3 (Pn-3,5DG と Pt-3G)、Bd 2 (Mv-3G と Dl-3G) および Bd 5 (Pn-3,5DG-Cm) は、Bd 4 と類似した経時変化を示した。また Bd 1 (Dl-3,5DG) と Bd 6 (Mv-3G-Cm) は、室温貯蔵区では急速に減少したが、低温区、とくに冷凍区ではあまり減少しなかった。

最も色素分解の著しい室温区で、主要色素バンド (Bd 2, 3, 4) の色素残存率を各 Bd の貯蔵開始時の E_{680nm} を 100% として百分率で表示すると、10 カ月後には Bd 4 (Mv-3G と Pn-3G) は 4%、Bd 3 (Pn-3,5DG と Pt-3G) は 8%、Bd 2 (Mv-3,5DG と Dl-3G) は 9% であった。

ワイン中では、3,5-diglucoside (以下 3,5DG と略す)

Fig. 4. Two-dimensional chromatogram of anthocyanins in the grape juice

の色素が 3-monoglucoside (以下 3G と略す) の色素より分解が速いと報告⁹⁾されているが、本実験から明らかにブドウ果汁ではむしろ 3G 色素の分解速度の方が大きかった。この 3G 色素 (Bd 4) は、Fig. 3 に示したように量的に最も多いため果汁の色調劣化に大きく関与していると考えられる。

2. 各アントシアニンの同定

(1) 二次元ペーパークロマトグラム

二次元 PPC の結果を Fig. 4 に示した。溶媒 iBAW を用いて 6 コに分離した色素のうち、Bd 2, 3, 4 は溶媒 HAW で各々 2 コに分離したので原点に近い方から Bd 2-1, 2-2, …… と命名した。

また各アントシアニンの R_f 値と色調を Table 2 に示す。

(2) 部分的酸加水分解

阿部ら⁴⁾の方法に準拠し、1N 塩酸を用いて行った。

東洋濾紙 No. 50 (20×20 cm) の溶媒 HAW を用いた結果を Fig. 5 に示した。

その結果、Bd 2-1, 3-1, 4-1 および 4-2 は、アグリコンと原色素との 2 コに分離し、結合糖分子が 1 つであると判明した。Bd 2-2, 3-2 は 4 コのスポットに分離したので結合糖分子が 2 つであると推定した。Bd 1 は 3 コに分離したが、上方のスポットは蛍光を有しないので、中間のスポットは 3G と 5-monoglucoside とが重なったものと考えられた。この Bd 1 を溶媒 BHW を用いて展開すると 4 コに分離することから糖分子 2 コをもつ 3,5DG であると推定した。Bd 5, 6 はアシル基を有するため、Bd 5 は 5 コに Bd 6 は 3 コに分離した。

(3) アグリコンおよび糖

各色素の 90 分間加水分解液のイソアミルアルコール抽出部を展開し、 R_f 値と色調を Harborne^{5,6)} および

Table 2. Comparison of R_f values and color of individual anthocyanins in the grape juice

Anthocyanins (Band)	R_f values ($\times 100$)				Visible color*	Color under U.V.
	iBAW	BAW	1% HCl	HAW		
1	9	16	8	34	Grayish purple	Dark blue purple
2-1	19	25	4	18	Light bluish gray	Blue purple
2-2	20	29	11	42	Dull red purple	Fluorescent purple
3-1	25	34	4	22	Pale purple	Light bluish purple
3-2	26	35	15	44	Pale red purple	Fluorescent purple
4-1	35	38	5	28	Dull red purple	Dull purple
4-2	38	39	9	33	Dull red purple	Dull red purple
5	42	41	11	41	Purplish pink	Fluorescent pink
6	52	69	3	24	Pale red purple	Light purple

*These were classified with "Guide to color standard", Nippon Shikisai Kenkyusho (1951)⁹⁾

ALBACH⁷⁾らの数値と比較した結果, Bd 1 および 2-1 を Delphinidin (BAW; 0.46, FHW; 0.15, Forestal; 0.33), Bd 2-2, 4-1 および 6 を Malvidin (BAW; 0.58, FHW; 0.25, Forestal; 0.59), Bd 3-2, 4-2 および 5 を Peonidin (BAW; 0.69, FHW; 0.33, Forestal; 0.64), Bd 3-1 を Petundin (BAW; 0.54, FHW; 0.22, Forestal; 0.47) と推定した。

水層部を溶媒 BAW, BPW, EAW を用いて展開し, 風乾後アニリン水素フタル酸を噴霧, 105°C 5 分間発色させたところ糖としてグルコースのみが検出された。

Fig. 5. Paper chromatograms of partial acid hydrolysis products of anthocyanins in the grape juice with HAW

(4) 吸収スペクトルおよびアシル基

吸収スペクトルの結果を Table 3 に示す。

305~330 nm にピーク⁸⁾が存在する Bd 5 および 6 の加水分解液のエーテル抽出部を溶媒 BAW, BenAW, 2% AcOH を用いて展開し, 風乾後 Diazotied *p*-nitro-aniline 試薬で発色させ, R_f 値と色調を測定した結果, R_f は BAW; 0.91, BenAW; 0.68, 2% AcOH; 0.44, 色調はオレンジであり *p*-クマル酸の標品と完全に一致した。

以上の実験結果から供試ブドウ果汁 (キャンベル・アーリー) に含まれるアントシアニン色素を Table 4 のように同定した。

要 約

濃縮ブドウ果汁 (キャンベル・アーリー品種) を 3 区に分けて貯蔵し, 色調とアントシアニン含量の変化を調べるとともに, 9 種のアントシアニンを同定した。

(1) 糖度, pH, 滴定酸度は貯蔵期間を通じてほとんど変化しなかった。

(2) 原果汁の色調とアントシアニン色素ともに貯蔵初期に大きく減少した。減少率は室温区で最も大きく, 冷

Table 3. The absorption spectra of anthocyanins in the grape juice

Band	λ_{max} in 0.01% HCl-MeOH (nm)			$E_{440nm}/E_{vis,max}$ (%)	Sift with $AlCl_3$
1	280		532	13	+
2-1	275		535	20	+
2-2	280		530	12	-
3-1	278		534	19	+
3-2	285		522	13	-
4-1	287		535	27	-
4-2	280		523	20	-
5	285	308	526	11	-
6	280	308	537	18	-

Table 4. Identification of anthocyanins in the concentrated juice of Campbell Early grapes

1	Delphinidin-3,5-diglucoside	(D1-3,5DG)
2-1	Delphinidin-3-monoglucoside	(D1-3G)
2-2	Malvidin-3,5-diglucoside	(Mv-3,5DG)
3-1	Petundin-3-monoglucoside	(Pt-3G)
3-2	Peonidin-3,5-diglucoside	(Pn-3,5DG)
4-1	Malvidin-3-monoglucoside	(Mv-3G)
4-2	Peonidin-3-monoglucoside	(Pn-3G)
5	Peonidin-3,5-diglucoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid (Pn-3, 5DG-Cm)	
6	Malvidin-3-monoglucoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid (Mv-3G-Cm)	

凍区ですら貯蔵10ヵ月後では、色調は78%, 全アントシアニン58%に減少した。

(3) 塩基性酢酸鉛法によって調製した粗アントシアニンをペーパークロマトグラフィーにより分離精製した。各精製画分をペーパークロマトグラムの R_f 値と色調、吸収スペクトル、部分的酸加水分解法などにより検討した結果、アントシアニン9種を同定した。

(4) 主要色素は、Malvidin-3-monoglucosideとPeonidin-3-monoglucosideであり、次いでMalvidin-3,5-diglucoside, Delphinidin-3,5-diglucoside, Peonidin-3,5-diglucosideであった。

(5) バンド別アントシアニンの変化で、Band 4に属するMalvidin-3-monoglucosideとPeonidin-3-monoglucosideの減少率が大いことから3-monoglucosideの色素分解の方が3,5-diglucosideの分解より速いと推定された。

終わりに供試材料を提供して頂いた山口県経済連山口工場に感謝を表します。

本報告の要は昭和49年4月23日、日本食品工業学会大会に発表した。

文 献

- 1) 芥田三郎・松富直利: 食品工誌, 23 101(1976).
- 2) 芥田三郎・松富直利: 食品工誌, 23 108(1976).
- 3) ROBINSON, W. B., WEIRS, L. D., BERTNO, J. J. and MATTICK, L. R.: *Amer. J. Enol. Vit.*, 17, 178 (1966).
- 4) ABE, Y. and HAYASHI, K.: *Bot. Mag. Tokyo*, 69, 822 (1956).
- 5) HARBORNE, J. B.: *J. Chromatogr.*, 1, 473 (1958).
- 6) HARBORNE, J. B.: "Comparative Biochemistry of the Flavonoids," Academic Press Inc., London & N. Y., p. 7 (1967).
- 7) ALBACH, R. F., KEPNER, R. E. and WEBB, A. D.: *J. Food Sci.*, 28, 55 (1963).
- 8) HARBORNE, J. B.: *Biochem. J.* 70, 22 (1958).
- 9) 日本色彩研究所: 色の標準, (日本色彩社)(1951).
(昭和51年2月19日受理)