Vitis vinifera 品種でバッククロスされた Y系ブドウ3系統のアントシアニン色素†

太田英明*・芥田三郎*・白石真一**・箴島 豊*

Anthocyanin Pigments of Three Y-Grape Strains Backcrossed by *Vitis vinifera* Varieties

HIDEAKI OHTA*, SABURO AKUTA*, SHIN-ICHI SHIRAISHI**
and YUTAKA OSAJIMA*

The anthocyanins isolated from three Y-grape strains, Y-3784, Y-4689 and Y-4708 (Fuefuki) by column chromatography on polyvinylpyrrolidone, were identified with chromatographic techniques, hydrolysis methods and spectrometry.

(1) The total anthocyanin contents were very small, such as Y-3784; 4.7, Y-4689; 5.3 and Y-4708; 2.1 mg/g in dried skins, respectively.

(2) The three grape strains contained 3-monoglucosides of malvidin and peonidin, and these monoglucosides acylated with *p*-coumaric acid.

(3) This results showed that 3-monoglucoside pigments are only contained in these strains backcrossed by *Vitis vinifera* in twice to hybrids (American species × *V. vinifera*).

(Received Nov. 22, 1977)

著者らは、これまでわが国産の主要栽培ブドウ品種を色、その他の特徴で分類するとともに、それぞれの構成アントシアニン系色素（以下色素と略す）の分離・同定に関する研究を行なって来た¹⁻⁷⁾。

本実験で取り上げたブドウの系統は、山梨果樹試験場で育成されたものの中で、福岡県園芸試験場において生食用および施設栽培に適当な品種の選抜ならびに九州地区での適応性の検討がなされている系統の一部である。これらは果皮中の色素含量が低く、淡紫色を帯び、果粒の外観ならびに性状が *Vitis vinifera* に類似している。

供試したブドウ3系統の交配親品種は下記の通りで、このうち、Y-4708は笛吹という名称登録がされている。

Y-3784 = Muscat Bailey B × Chasselas Rose
Fontainebleau

Y-4689 および Y-4708 = Mills × Angelo Pirovano

したがって、3系統ともに *V. vinifera* の遺伝形質は7/8前後である。

色素分析の結果、3,5 DG 色素を有する米欧雑種に *V. vinifera* を2代にわたってバッククロスしたこれらY系ブドウには、3 MG 色素のみしか認められないという興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

供試材料はすべて福岡県園芸試験場で1976年に収穫

† 本邦産果実のアントシアニン色素に関する研究（第8報）（前報，文献7）参照）
Studies on Anthocyanin Pigments in Fruits Harvested in Japan. Part 8.

* 九州大学農学部食糧化学工学科（〒812 福岡市東区箱崎）
Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Fukuoka.

** 福岡県園芸試験場（〒815 福岡市南区柏石）
Fukuoka Horticulture Experiment Station, Fukuoka.

された Y-3784, Y-4689 および Y-4708 の生果粒重, 3.8, 1.3 および 24.6 Kg から既報¹⁾の方法にしたがい, それぞれ 13.9, 15.4 および 91.0 g の乾燥果皮を調製した。

2. 色素の抽出

Y-3784, Y-4689 および Y-4708 ブドウの色素は既報¹⁾と同じく乾燥果皮から冷 0.1%塩酸-メタノール液で抽出した。

3. クロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィー (PPC): 東洋濾紙 No. 50 を用いて, アグリコンおよび糖の同定の際に使用した。

薄層クロマトグラフィー (TLC): Avicel SF セルロースを吸着剤として, ガラスプレート (20×20cm) に厚

さ 300 μ になるように作成した。色素の2次元クロマトグラフィーおよび有機酸の同定に用いた。

カラムクロマトグラフィー: 色素の分離・精製に使用した。吸着剤として用いた不溶性ポリビニルピロリドン (PVP) は, 市販品 (東京化成製) を HRAZDINA⁸⁾の方法にしたがい, 脱イオン水に懸濁させ 15 分後に上澄み液を除去する操作を繰り返して (20 回) 調製した。この PVP をカラム管 ($\phi 2 \times 40$ cm) に充填し, 粗色素液を流下させることによって色素を吸着させた。一旦, 脱イオン水で洗浄後, 0.1%塩酸-80%エタノール液で展開・溶出した。溶出液は 3 ml 宛フラクションコレクターで分離し, E_{680nm} 値で測定した。

4. 分光学的方法

紫外および可視吸収スペクトル: 個別色素およびそれらのアグリコンを 0.01%塩酸-メタノール液に溶解して日立 124 型自記分光光度計によって測定した。

赤外線吸収 (IR) スペクトル: 個別色素のアグリコンを KBr 錠剤法により Beckman IR 20 型赤外分光光度計を用いて測定した。

5. 個別色素の同定および相対含量比の測定

測色, R_f 値, 部分的酸加水分解法, 有機酸の検出などの同定法および個別色素の相対含量比の測定はすべて既報¹⁻⁷⁾に準拠した。

Fig. 1. Two-dimensional thin layer chromatograms of anthocyanins from Y-3784, Y-4689 and Y-4708 (Fuefuki) grapes

iBAW: isobutanol-acetic acid-water (8:2:3, v/v).

AHW: acetic acid-conc. HCl-water (15:3:82, v/v).

Fig. 2. Column chromatogram (A) on polyvinylpyrrolidone of anthocyanins from Y-4689 grapes and paper chromatogram (B) of four pigment fraction

Column: $\phi 2 \times 40$ cm, flow rate: 2 ml/min, elution solvent: 0.1% HCl-80% ethanol.

実験結果および考察

1. 2 次元 TLC

Y-3784, Y-4689 および Y-4708 ブドウの粗色素液を 1 次元方向に iBAW (イソブタノール-酢酸-水, 8:2:3 v/v), 2 次元方向に AHW (酢酸-塩酸-水, 15:3:82 v/v) を用いて行なった TLC の結果を Fig. 1 に示した。iBAW で展開した場合の上昇順位により下方から統一番号をつけた。

図から明らかなように, Y-3784 および Y-4689 では No. 1, 2, 3 および 4 個の色素が存在し, Y-4708 では更に少ない No. 1 および 2 の 2 個の色素のみが認められた。

以上 4 個の色素は蛍光を有しないことから 3 MG 色素であり, モリブデン試薬⁵⁾の散布によっても深色しないことから B 環に隣接し

た水酸基を有しない malvidin (Mv) および Peonidin (Pn) 系色素と推定された。

2. PVP カラムクロマトグラフィーによる個別色素の分離

Y-3784, Y-4689 および Y-4708 の各粗色素液について行なった。Y-4689 粗色素の溶出パターンを Fig. 2-A に示した。

図から明らかなように粗色素は4つのピークを示した。3 ml 宛分画した各分画は溶媒 BHW (n-ブタノール-塩酸-水, 7:2:5 v/v) を用いて TLC を行なった。その結果, 単一スポットを与えた各色素分画を Fr. 1, 2, 3 および 4 として Fig. 2-A の上方に併せて記載した。これら TLC 的に純粋な Fr. 1, 2, 3 および 4 を溶媒 iBAW で展開した PPC の結果を Fig. 2-B に示した。

Fig. 2-B の各色素の性質 (R_f 値, 色調, 螢光, モリブデン試薬との反応) から Fr. 1, 2, 3 および 4 は, それぞれ Fig. 1 の色素 No. 1, 2, 3 および 4 と一致した。

HRAZDINA⁸⁾は, 1 l 中に 1 N 塩酸 1 ml を含む 30% エタノール溶液を用いて PVP カラムクロマトグラフィーを2回繰り返すことによって 3, 5 DG 色素が分離できることを報告しているが, 著者らは溶出液の条件を修正することによって 3 MG 色素が分離できることを認めた。これらカラムクロマトグラフ法の条件については別に報告する。

3. 個別色素の R_f 値, 色調および分光学的性質

前項の各精製色素を濃縮乾固した後, 改めて 0.01% 塩酸-メタノール液に溶解し, その R_f 値, 色調ならびに分光学的性質を測定した結果を Table 1 に示した。

既報¹⁻⁷⁾との比較から, No. 1 および 2 は, それぞれ Mv-3 MG および Pn-3 MG と推定された。No. 3 および 4 は近紫外部 (310 nm 前後) にピークを有することからアシル化色素と推定された⁹⁾。

4. 部分的酸加水分解

常法にしたがい部分的酸加水分解を行なった結果, No.

1 および 2 は2個のスポットに分離したので結合糖が1個である 3 MG 色素, No. 3 および 4 は3個に分離したので 3 MG のアシル化色素と推定された。

5. アグリコンの同定

(1) R_f 値, 色調および吸収極大波長 (λ_{max})

個別色素の酸加水分解液からイソアミルアルコールで抽出したアグリコンについて R_f 値, 色調ならびに 0.01% 塩酸-メタノール溶液の λ_{max} は以下のものであった。

No. 1 および 3: Forestal (酢酸-塩酸-水, 30:3:10 v/v); 0.61, FHW (ギ酸-塩酸-水, 5:2:3 v/v); 0.27, red purple, 543 nm, No. 2 および 4: Forestal; 0.69, FHW, 0.38, pink, 532 nm。

(2) IR スペクトル

R_f 値, 色調の完全に一致した各アグリコン (イソアミルアルコール部) No. 1 と 3, No. 2 と 4 を合わせ, 濃縮乾固した後, 少量の0.1% 塩酸-メタノール溶液に溶解し, 過剰の無水エチルエーテルを加えてアグリコンを沈殿させた。沈殿したアグリコンは濾別して集め, 一昼夜真空デシケーター中で乾燥させて IR スペクトルを測定した。

また対照品として用いた Mv および Pn は, ベーリ・アリカント A から調製した Mv-3, 5 DG および Pn-3, 5 DG の各 30 mg を 6 N 塩酸に溶解, 試験管に封入後, 沸騰水中で 30 分間加水分解を行なって沈殿物を濾集し, 1 N 塩酸から再結して得た。IR スペクトルの測定結果を Fig. 3 に示した。

図から明瞭なように, 1350~900 cm^{-1} の指紋領域において No. 1 と 3 のアグリコンのスペクトルは Mv のそれと, また No. 2 と 4 からアグリコンのスペクトルは Pn のそれと完全に一致した。各アグリコンともピリウム環の —C=O^+ —伸縮振動に起因する特徴的な吸収が 1630 cm^{-1} に出現した。

以上の結果から, No. 1 および 3 のアグリコンは Mv,

Table 1. Chromatographic and Spectral Properties of Anthocyanins from Y-strain Grapes

Pigment No.	$R_f \times 100$ in solvents (23°C)				λ_{max} (nm) in 0.01% HCl-MeOH			$E_{440}/E_{vis. max}$	Visible color
	(1)	(2)	(3)	(4)					
1	38	29	28	06	279		535	20	Red purple
2	39	31	32	08	280		523	28	Light red
3	48	51	21	03	282	308	538	20	Light red purple
4	52	60	22	04	282	310	530	20	Purplish pink

Solvents: (1) iBAW (see Fig. 1), (2) BAW (n-butanol-acetic acid-water, 4:1:5, v/v, upper phase), (3) AHW (see Fig. 1), (4) 1% HCl.

Fig. 3. IR-spectra of malvidin and peonidin, and four aglycones from anthocyanins of Y-strain grapes (KBr disk).

Malvidin and peonidin were prepared by hydrolysis (6N HCl for 30 min) of 3,5-diglucosides of malvidin and peonidin from Bailey Alicante A grapes.

No. 2 および 4 のアグリコンは Pn と同定した。

6. アシル基および糖

アシル化色素と推定された No. 3 および 4 の酸加水分解のエーテル抽出部を 2 種の溶媒を用いて TLC を行ない風乾後, DPNA 試薬¹⁰⁾で発色させ, R_f 値と色調を測定した。またエーテル抽出部を減圧濃縮乾固後, メタノールに溶解して紫外スペクトルを測定した。その結果, R_f 値は 0.42 (2%酢酸), 0.65 (ベンゼン-酢酸-水, 2:2:1, v/v, upper phase), スポットの発色はオレンジ色, $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 311 nm で *p*-クマル酸の標品と完全に一致した。

糖分子としてはグルコースのみが検出された。

7. 結論

Y-4689 の精製色素の 0.1%塩酸-メタノール溶液における $\lambda_{\max}$ は 530 nm であったので, 既報^{1,2)}にしたがって検量線を作成した。その結果を Fig. 4 に示した。また Y 系統の 3 種のブドウ色素の同定結果ならびに Fig. 4 から求めた色素含量を Table 2 に示した。

表から明らかなように, これら 3 系統のブドウは色素含量が少なく 2~5 mg/g 乾燥果皮であった。1976 年は夏季天候の不順のため特に少量であったと思われる。また青色味を増す delphinidin および petunidin 系色素ならびに Flame Tokay や Red Malaga¹¹⁾のような赤色ブドウに多い cyanidin 系色素は認められず malvidin と peonidin の 3 MG 色素のみ存在した。

Y-4689 および Y-4708 の交配親品種は Mills×Angelo Pirovano={*V. vinifera*×(*V. labrusca*×*V. vini-*

fera)}×*V. vinifera* であり, Y-3784 のそれは Muscat Bailey B×Chasselas Rose Fontainebleau = {(*V. lincecumii*×*V. labrusca*×*V. vinifera*)×*V. vinifera*}×*V. vinifera* である。

すなわち, これら Y 系の 3 種のブドウは, 米国系雑種に 2 度 *V. vinifera* をバッククロスしたことにより米国種の遺伝形質が減少している。

このため 3,5 DG 色素は発現せずに, *V. vinifera* の特徴である 3 MG 色素のみしか認められなかったものと推定される。このことは甲州ブドウの結果⁶⁾と相俟って, ブドウおよびその加工食品の品質評価のみならず育種学的にも利用価値のある知見であろう。著者らはこれらのデータに基き, 今後, さらに研究を続ける予定である。

Fig. 4. Calibration curve of total anthocyanins of Y-4689 grapes in 0.1% HCl-methanol solution at 530 nm

Table 2. Identification and Contents of Anthocyanins from Skins of Y-strain Grapes

Pigment No.	Anthocyanin	Estimated ratio (%)		
		Y-3784	Y-4689	Y-4708
1	Malvidin-3-monoglucoside	51	43	70
2	Peonidin-3-monoglucoside	32	34	21
3	Malvidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)-monoglucoside	10	15	—
4	Peonidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)-monoglucoside	7	8	—
Content of total anthocyanins (mg/g in dried skins)		4.7	5.3	2.1

要 約

山梨県果樹試験場で育成された 3 種類の Y 系統ブドウのアントシアニン色素をカラムクロマトグラフィーで分離し、各色素を測色, *R_f* 値, 分光学的方法および加水分解法などによって同定した。

(1) これら淡紫色ブドウの色素含量は極めて小さく, Y-3784 : 4.7, Y-4689 : 5.3 および Y-4708 : 2.1 mg/g 乾燥果皮であった。

(2) Delphinidin および petunidin 系色素がなく, malvidin および peonidin の 3-monoglucoside とそれらに *p*-クマル酸のアシル化した色素のみが認められた。

(3) これらの系統のように, 米欧雑種に 2 度 *V. vinifera* をバッククロスしたブドウには, 雑種特有の 3,5-diglucoside 色素の発現は認められず, すべて 3-monoglucoside 色素とそのアシル化色素から成ることが判明した。

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) 松富直利・山村益士・小林邦彦・太田英明・芥田三郎: 食品工誌, **24**, 279 (1977).
- 4) 松富直利・山村益士・太田英明・箴島 豊・芥田三郎: 食品工誌, **24**, 342 (1977).
- 5) 芥田三郎・太田英明・箴島 豊: 食品工誌, **24**, 346, (1977).
- 6) 芥田三郎・太田英明・箴島 豊・松富直利・小林邦彦: 食品工誌, **24**, 521 (1977).
- 7) SABURO, A., OHTA, H., SAKANE, Y. and OSAJIMA, Y.: *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, **24**, 631 (1978).
- 8) HRAZDINA, G.: *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 243 (1970).
- 9) HARBORNE, J. B.: *Biochem. J.*, **70**, 22 (1958).
- 10) CHEN, L. F. and LUH, B. S.: *J. Food Sci.*, **32**, 67 (19767).
- 11) AKIYOSHI, M., WEBB, A. D. and KEPNER, R. E.: *J. Food Sci.*, **28**, 177 (1963).

(昭和 52 年 11 月 22 日受理)