

〔 J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 17 21~27 1982 〕

本邦産ワイン用赤色系交配ブドウの アントシアニン色素パターン

後藤 昭二・田中辰之助*・横塚 勇

Chromatographic Patterns of Anthocyanins in Japanese Hybrid Red Wine Grapes.

SHOJI GOTO, SHIN-NOSUKE TANAKA,* and ISAMI YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400.

Characterizations of the fractions of anthocyanins in nineteen hybrid red wine grape varieties were studied. The grapes used were 8 varieties of native Japanese red wine grapes, 3 varieties of European hybrid grapes, 3 varieties of American hybrid grapes, 2 varieties of Japanese wild grapes, and 2 varieties of rose wine grapes.

Red pigments, anthocyanins, isolated from the above grapes were analyzed by thin-layer chromatography. On the paper chromatography, no spot corresponding to anthocyanin-diglucoside was detected in the three European hybrid grape varieties (Cabernet Lion, Suntory Noir, and Hiro Hambergh). However, in the five American hybrid grape varieties (Black Queen, Muscat Bailey A, Bailey Alicante A, Cabernet Suntory, and Fuefuki) the diglucoside was detected. Chromatographic patterns of the two wild grape varieties produced in Tokachi and Yamanashi were similar to each other, but that of *V. amurensis* was slightly different from those of the above two grapes. No diglucoside was detected in Koshu grapes. In Koshu and Zenkoji grapes, chromatographic patterns were similar to each other.

赤色系ブドウの色素は多種類のアントシアニン色素からなるが、ブドウの種類によって含有する色素の組成が異なることが知られている。Ribereau-Gayon¹⁾は各種ブドウのアントシアニン色素の分布を研究し *V. vinifera* には monoglucoside のみで diglucoside は検出されず、*V. labrusca* とその雑種には diglucoside が含有することを特徴として上げた。このことは多

くの研究者の認めることでありワイン鑑別法の一つにも応用されている。わが国では近年、芥田ら²⁻⁹⁾によって巨峰ほか数種の食品加工用ブドウの色素の分析が報告され、また、最近高速液クロによる Cabernet Sauvignon (CS) の色素の分析が報告されている¹⁰⁾。著者らはわが国で醸造用として交配育成されてきた赤色系ブドウを中心に、その他ヨーロッパ系 (*V. vinifera*)、アメリカ系 (*V. labrusca* とその雑種)、山ブドウ、さらに紅色系の甲州や善光寺を供試し、薄層クロマ

*現在、岩崎醸造株式会社 (山梨県勝沼町下岩崎952)

Table 1. Grape varieties used and the parents in hybrid varieties.

Varieties (abbr.)	Parents or species	
	♀	♂
Cabernet Lion (CL)	KS (V) ^{a)}	x CSv (V)
Suntory Noir (SN)	KS (V)	x CSv (V)
Hiro Hambergh (HH)	KS (V)	x MH (V)
Cabernet Sauvignon (CSv)	(V)	
Muscat Hambergh (MH)	(V)	
Black Queen (BQ)	Bailey (AM) ^{b)}	x Golden Queen
Muscat Bailey A (MBA)	Bailey (AM)	x MH
Bailey Alicante A (BAA)	Bailey (AM)	x Alicante Bouchet
Cabernet Suntory (CSt)	BQ (H) ^{c)}	x CSv (V)
Concord (Cd)	(AM)	
Campbell Earley (CE)	Moore Earley (AM)	x (Belvidere x MH) (H)
Mills (M)	MH (V)	x Creveling (AM)
Fuefuki (F)	M (H)	x Angelo pirovana (V)
<i>V. amurensis</i> (A)	<i>V. amurensis</i>	
Wild grape 1 (WY-1)	from Yamanashi Prefecture	
Wild grape 2 (WT-2)	from Tokachi, Hokkaido	
Koshu (K)	(V)	
Zenkoji (Z)		
Koshu Sanjaku (KS)	(V)	

a) V : *V. vinifera* or European type, b) AM : American type, c) H : Hybrid.

トグラフィー(TLC)によるアントシアニン色素パターンを検討した, か簡単な一次元 TLC パターンから各ブドウの特徴を考察することが可能と思われたので, これらについて報告する.

実験方法

供試ブドウ わが国で育成された醸造用の赤色系8品種, ヨーロッパ系とアメリカ系の代表的な3品種, *V. amurensis*, 山梨県と北海道十勝産の山ブドウおよび甲州などの紅色系2品種, その他の計19品種を供試した. 品種名と交配種での母系, 父系などは Table 1 に一括して表示した.

アントシアニン色素の抽出, 精製 完熟した各ブドウの果皮を剥皮し果肉を水洗除去した後, 凍結乾燥した. この乾燥果皮4~5gを破砕し50mlの1% HCl-MeOHで抽出した. 抽出液を濾過し, 残渣は再び1% HCl-MeOHで抽出した. この操作を繰返し7回行ない色素を完全に抽出するようにした. 抽出液

はAmberlite IR 120に吸着, 脱イオン水, 次いで95% MeOHで洗浄した後, 1% HCl-MeOHで溶出, 精製した. これを減圧濃縮後, 少量の1% HCl-MeOHに再溶解して分析用試料とした. なお, 以上の操作は可及的N₂ガス気流中で行なった.

色素の定性分析 1) TLC とペーパークロマトグラフィー(PPC)におけるR_fと可視および紫外線(UV)下における色調・カルボキシメチルセルロース(CM)を担体としたTCLプレート(D=0.25mm)を用意しFHW(蟻酸:塩酸:水=5:2:3)とBAW(n-ブタノール:酢酸:水=4:1:5)を用いて二次元TLCを行ない暗所で風乾後, 各展開スポットのR_fを測定し, また可視とUV下における色調, 蛍光の有無を検した. 一方, 同様のTLCプレート10枚を用意して前記と同様に展開後, 各スポットの中心部をかき採り0.01% HCl-MeOHで抽出し減圧濃縮した. これらをBAW, AWH(酢酸:塩酸:水=15:3:82), 1% HClを展開剤としてPPCを行

Table 2. Rf, colors, and photometric data of pigments from Bailey Alicante A.

Spot No.	Rf values in			max in		AlCl ₃ shift (nm)	Colors in	
	BAW ¹⁾	AWH ²⁾	1% HCl ³⁾	HCl-MeOH			Visible	UV
q	0.34	0.42	0.15	524		0	dull red	fluoro red
p	0.27	0.41	0.12	300	535	0	redish purple	fluoro pink
o	0.23	0.31	0.05	534		+26	pale purple	fluoro orange
n	0.40	0.32	0.08	527		0	light red	orange
m	0.37	0.28	0.05	274	535	0	red	dull red
l	0.32	0.21	0.03	280	536	0	purple	dull purple
k	0.13	0.12	0.03	278	540	+8	pale purple	dull purple
j	0.38	0.21	0.04	538		0	red	orange
i	0.29	0.15	0.02	536		0	pale purple	pink
h	0.24	0.12	0.03	280	542	+10	red	red
g	0.21	0.20	0.04	276	543	+16	pink	dull purple
f	0.13	0.23	0.04	546		+36	purple	dull red
e	0.60	0.22	0.02	541		0	pink	light orange
d	0.49	0.13	0.03	544		0	pink	orange
c	0.52	0.23	0.04	541		0	pink	light pink
b	0.39	0.18	0.03	540		+8	pink	dull purple
a	0.32	0.20	0.03	548		+13	red	dull red

- 1) n-butanol:acetic acid:water=4:1:5,
- 2) acetic acid:HCl:water=15:3:82,
- 3) HCl:water=3:97

ないRfを測定した。2)吸収スペクトルの測定・前項で得た各色素試料を少量の0.01% HCl-メタノールに溶解し240-660mmでの吸収スペクトルを測定した(日立200-20型自記分光光度計)。また、AlCl₃添加による最大吸収のシフトの変化の有無を測定した。3)部分的酸加水分解・試料と同量の2nHClを加え90°Cで0-100分間加水分解し、各分解液をBHW-1(イソブタノール:塩酸:水=5:1:4)とBHW-2(イソブタノール:塩酸:水=1:2:6)を用いてPPCを行ない、スポット数とRfを測定し構成糖の分析を行なった。4)アグリコンの推定・上記の酸加水分解を完全に行なったものについてFHWとForestal(酢酸:塩酸:水=30:3:10)を用いてPPCを行ない、Rfおよび可視と紫外線下での色調からアグリコンの推定を行なった。なお、3)と4)の実験は多量の試料が得られた2試料(後述するスポットNo. mとp)について行なった。

TLC上の各スポットの組成比の測定 CMを担体としたTLCプレート(D=0.25mm)を用意して、

果皮から抽出、精製した色素試料の一次元TLC(展開剤FHW)を行ない、風乾後、クロマトスキャナー(島津CS200型)を用いて展開スポットの濃度を測定した。

結 果

Bailey Alicante A (BAA) の各色素の推定 供試各ブドウのTLCによる色素パターンを検討するのに先だって各スポットの色素成分を知るため、色素含量の多いBAAを用い含有アントシアニン各色素の同定を行なった。

色素試料は一次方向FHW、二次方向BAWを展開剤としてTLCを行なった。結果はFig. 1に示したように一次元展開ではNo.1-No.8の8個のスポットが明瞭に分離した。次いでBAWによる二次元展開ではa-gの17個のスポットが認められた。各スポットの可視およびUV下での色調、蛍光の有無、BAW, AWH, 1% HClを展開剤として行なったPPC上のRf, MeOH溶液中での最大吸収スペクトルとAlCl₃添加

Table 3. Consumption of each spot on two-dimensional TLC

Spot No.	Name of anthocyanin	
	I a)	II b)
8	q	Peonidin-3 5-diglucoside
	p	Malvidin-3 5-diglucoside
7	o	Petunidin-3 5-diglucoside
6	n	Peonidin-3-monoglucoside
	m	Malvidin-3-monoglucoside
	l	Malvidin-3-monoglucoside acylated with acetate
5	k	Delphinidin-3-monoglucoside acylated with p-coumarate
	j	Malvidin-3-monoglucoside acylated with p-coumarate
4	i	Delphinidin-3-monoglucoside
	g	Delphinidin-3-monoglucoside acylated with acetate
3	e	Peonidin-3-monoglucoside acylated with p-coumarate

a): one-dimensional by FHW,

b): two-dimensional by BAW

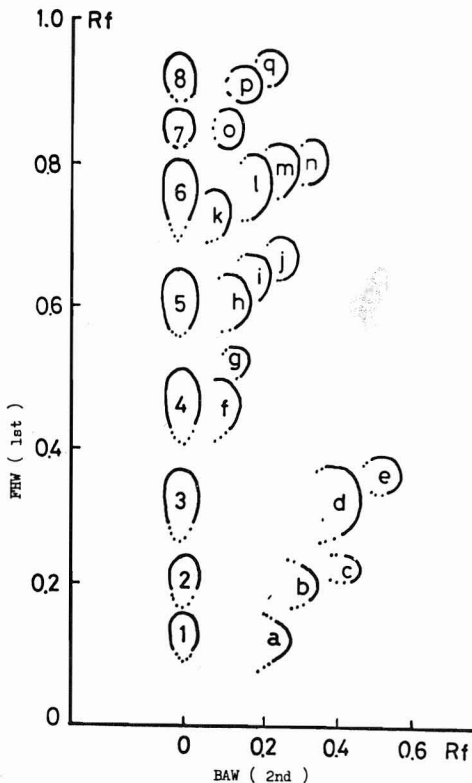


Fig. 1. Two-dimensional TLC of pigments from Bailey Alicante A.

FHW : Formic acid:conc.HCl:Water = 5:2:3

BAW : n-Butanol:Acetic acid:Water = 4:1:5

後のシフトの変化を一括してTable 2に表示した。なお、多量の試料が得られたスポットmとpについては酸加水分解物のPPCのR_fと分光光学的性質から構成糖としてグルコースを検出、またアグリコンはMalvidinと推定した。以上の結果をHarbane^{10,11)}およびWulf, Nagel¹²⁾の記載と比較しながら各スポットの推定を行なった。結果はTable 3に示したように17スポットのうちe, g, i~gの11個はMalvidin, Peonidin, Petunidin, Delphinidinのmono-, di-glucosideあるいは、これらのp-coumarate, acetateのacylateと推定された。しかし、a~d, hの6個のスポットは同定するには致らなかった。

なお、供試各ブドウの色素についても二次元TLCを行なったが、一般に再現性を欠き、各スポットの分離が必ずしも良好でなくデンストメトリーで組成比を測定することが困難であった。

以上の結果から一次元TLC上の8個のスポットに含まれる色素成分はFig. 2とTable. 3に示したようにNo. 8にはMalvidinとPeonidinの3·5-diglucoside, No. 7にはPetunidin-3·5-diglucosideを含み, No. 6~No. 3にはMalvidin, Peonidin, Delphinidinの3-monoglucosideとそのp-coumarate, acetateのacylateから成ることが推定された。これらのことは後記するようにブドウ品種と含有色素との関係の特性¹⁾からも推定される。このようなことから一次元TLC(展開剤FHW)上における色素パターンを検討することから各ブドウ品種の特徴を考察しうる可能性を

Table 4. Patterns of anthocyanins in each grape variety.
(ratio of each spot by densitometry, %)

Grape variety	Spot No. on one-dimensional TLC (FHW)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CL	3	3	4	4	8	78	0	0
SN	1	2	12	2	5	78	0	0
HH	1	9	13	2	19	56	0	0
CSv	3	6	29	3	4	55	0	0
MH	1	3	8	8	17	63	0	0
BQ	4	4	10	8	13	51	t	10
MBA	4	8	10	7	16	39	2	14
BAA	6	5	11	10	11	31	5	21
CSt	1	2	15	3	7	44	t	28
Cd	1	2	t	34	28	17	12	6
CE	2	0	0	8	10	23	38	19
M	6	10	11	7	19	35	5	7
F	2	12	5	7	41	20	9	4
A	0	0	1	2	2	24	10	61
WY-1	t	1	0	10	7	25	7	50
WT-2	1	t	0	16	10	16	9	48
K	0	2	0	10	35	53	0	0
Z	3	8	3	29	38	16	3	0
KS	0	0	13	0	87	0	0	0

The optical densities of the separated pigment spots were measured by reflectance densitometry at 520 nm with Dual wavelength TLC SCANNER, Shimadzu Model CS 200. Optical reference was at 700 nm and the instrument was operated with a 1.25 x 1.25 mm slit-width and a sensitivity range of x 20.

示すものと思われる。

供試ブドウ色素の一次元 TLC 上における組成比

供試ブドウの色素パターンを検討するため展開剤 FHW を用いて一次元 TLC を行なった後、各スポットの組成比をクロマトスキャナーを用いて測定した。供試19品種の組成比を Table 4 に一括して表示した。

母系、父系ともに *V. vinifera* に属するヨーロッパ系品種からの交配種 SL, SN, HH の3品種はヨーロッパ系の CSv や MH と同様にスポット No. 1~No. 6 を有したが、diglucoside からなる No. 7 と No. 8 のスポットは検出されなかった。このうち Malvidin-3-monoglucoside とその acylate, Peonidin-3-monoglucoside と Delphinidin-3-monoglucoside の acylate からなるスポット No. 6 の組成比が最も大きく 55~78

% であり、No. 1, No. 2, No. 4 の組成比は小さかった。しかし、組成比は品種によって少しずつ差がみられた。

母系、父系とも、あるいはどちらか一方の親にアメリカ系の品種をもつ交配種 BQ, MBA, BAA, CSt, F ではアメリカ系の Cd や CE, M と同様に No. 1 から No. 8 の各スポットが検出された。一般にスポット No. 6 の組成比が大きかった、が Cd で No. 4 と No. 5, CE では No. 7, F では No. 5 の組成比が大きく、また品種によって各スポットの組成比に差があった。スポット No. 7 と No. 8 が常に検出されたことは前記のヨーロッパ系品種との大きな相違点であった。なお、CE ではスポット No. 7 と No. 8 が検出されず、No. 7 が優勢スポットであることが一つの特徴であった。

山梨県産の山ブドウ WY-1 と北海道十勝産山ブドウ WT-2 とは殆んど同じパターンでスポット No.8 が優勢で No.3 を欠いていた。 *V. amurensis* も No.8 が優勢で山ブドウに類似したパターンであったが、No.3 を含有し、No.1 と No.2 が検出されないという相違がみられた。

紅色系の甲州種 (K) では No.2, No.4, No.5, No.6 の 4 スポットが検出され、そのうち No.6 と No.5 が優勢であった。他の紅色系ブドウ善光寺 (Z) では No.1 から No.7 までのスポットが検出され、そのうち No.5 と No.4 が優勢で、No.1, No.3, No.7 は微小スポットであった。わが国のブドウ交配において母系や父系としてよく使用されてきた甲州三尺 (KS) ではスポット No.5 と No.3 のみが検出された。

考 察

わが国で交配育成された赤色系ブドウ CL, SN, HH のように母系、父系ともヨーロッパ系なのは、ヨーロッパ系の CSv や MH と同様 diglucoside (スポット No.7, No.8) を欠く。他方、母系、父系の両方あるいはそのどちらかがアメリカ系である交配種、BQ, MBA, BAA, CSt, F ではアメリカ系の Cd, CE, M と同様に diglucoside が検出された。これらのことは Ribereau-Gayon¹⁾, van Buren, Bertino¹³⁾, Robinson, Weirs¹⁴⁾ によって指摘されているようにヨーロッパ系 (*V. vinifera*) とアメリカ系 (*V. labrusca* やその雑種) との相違点であり、また diglucosides の生成がアメリカ系品種の強い遺伝的形質によることを裏付けるものである。また、これらの結果は同時に本実験系、すなわち FHW による一次元 TLC の色素パターンからヨーロッパ系とアメリカ系との識別が可能であり、交配種における遺伝的特徴をある程度知りうることを示すものである。ただし、色素パターンの細部から母系、父系および交配種における遺伝的特徴を検討しようとしたが、交配系が同一な多くの交配種が得られなかったことや母系、父系の系統が必ずしも明確でないなどから個々の色素についての遺伝的考察は不可能であった。なお、笛吹 (F) について太田、芥田⁹⁾ は diglucosides を検出しておらず、これは笛吹が *V. vinifera* でバッククロスされているためとした。しかし、著者らは少量ながら母系である Mills (M) と同様 diglucosides を検出した。ただ、*V. vinifera* によるバッククロスによってアメリカ系の形質の弱まったものが得られることは

理論的にも期待されよう。

Akuta, Ohta⁸⁾ は色素パターンから北海道十勝産山ブドウが *V. amurensis* や *V. coagnitae* から異なるが、恐らく *V. amurensis* var. *glabrescans* Nakai であろうとした。葉、果実、種子の形状から *V. coagnitae* と推定した山梨県産ブドウ (WY-1) と著者らが入手した十勝産山ブドウ (WT-2) の色素パターンはほぼ同じであった。著者らが供試し *V. amurensis* (A) の色素パターンは山ブドウと類似しているが、A ではスポット No.1 と No.2 を欠き No.3 ~ No.5 の組成比が小さく、他方、山ブドウではスポット No.3 を欠き、微少な No.1 と No.2 が検出されるといった相違がみられるように、色素パターンからのみで山ブドウと *V. amurensis* との系統を論ずるのは危険と思われた。

甲州 (K) は芥田、太田⁷⁾ も報告しているように diglucosides を含まず既知のようにヨーロッパ系の品種であることが、本実験の結果からも推定できた。甲州と同系統といわれる善光寺 (Z) の由来、系統については茂木、上野¹⁵⁾ によって詳細に報告されているように、甲州とは多少来歴が異なるものであろうことが本実験の結果、すなわち、善光寺では甲州に含有しないスポット No.1, No.3, No.7 が微量ながら検出されたことから推定された。

要 旨

わが国で主にワイン用として交配育成されてきた赤色系ブドウ 8 品種のほかヨーロッパ系のアメリカ系、山ブドウ、*V. amurensis*、さらに紅色系の甲州や善光寺など 19 品種を供試して薄層クロマト (TLC) によるアントシアニン色素パターンから各ブドウの特徴を検討した。

母系、父系ともヨーロッパ系の交配種 Cabernet Lion, Suntory Noir, Hiro Hambergh には diglucoside 含有スポットが検出されなかった。母系、父系ともに、あるいはそのどちらかがアメリカ系の交配種、Black Queen, Muscat Bailey A, Bailey Alicante A, Cabernet Suntory, 笛吹には diglucoside が検出された。十勝産と山梨県産山ブドウの色素パターンは殆んど同じであった、が *V. amurensis* はこれらと多少異なるパターンであった。

紅色系の甲州は diglucoside が検出されなかった。が善光寺は甲州と多少異なる色素パターンであった。

本実験に供試したブドウの提供を載しました山梨県果樹試験場、北海道池田町ブドウ・ブドウ酒研究所、サントリー山梨ワイナリーおよび当研究施設育種試験地の各位に深謝します。また種々ご助言を賜りました当研究施設の横塚弘毅先生に感謝します。

文 献

- 1) Ribéreau-Gayon, P. : *Chemistry of wine making* (ed. Webb, A. D), American Chemical Society, Washington D. C., 1974, p. 50.
- 2) 芥田, 松富 : 食品工誌, **23**, 101, 108 (1976).
- 3) 太田, 芥田, 箴島 : 食品工誌, **24**, 150 (1977).
- 4) 松富, 山村, 小林, 太田, 芥田 : 食品工誌, **24**, 279 (1977).
- 5) 松富, 山村, 太田, 箴島, 芥田 : 食品工誌, **24**, 342 (1977).
- 6) 芥田, 太田, 箴島 : 食品工誌, **24**, 346 (1977).
- 7) 芥田, 太田, 箴島, 松富, 小林 : 食品工誌, **24**, 521 (1977).
- 8) Akuta, S., Ohta, H., Sakane, Y., Osajima, Y. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **24**, 643 (1977).
- 9) 太田, 芥田, 白石, 箴島 : 食品工誌, **25**, 421 (1978).
- 10) Harbone, J. B. : *J. Chromatogr.* **1**, 473 (1958).
- 11) Harbone, J. B. : *Biochem. J.*, **70**, 22 (1958).
- 12) Wulf, L. W., Nagel, C. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 42 (1978).
- 13) Van Buren, J. P., Bertino, J. J., Einset, J., Remaily, G. W., Robinson, W. B. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **21**, 117 (1970).
- 14) Robinson, W. B., Weirs, L. D., Bertino, J. J., Mattick, L. R. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **17**, 178, (1966).
- 15) 茂木, 上野, 木下 : 醸協誌, **73**, 608 (1978). (昭57. 8. 31受付)