

学 位 論 文 題 名

醸造工程における果実酒中のアントシアニン色素の変化と 新規色素の生成メカニズムに関する研究

学位論文内容の要旨

果実酒は原料である果実由来の成分と、酵母や乳酸菌などの微生物による発酵や熟成などの醸造工程中に生成する成分を多く含んでおり、その中でもポリフェノール成分は果実酒において味、色調、香りおよび保存性などの酒質に大きく貢献し、非常に重要な成分群の一つである。さらに、最近では、赤ワインや緑茶に代表される食品中のポリフェノール成分が生体内において様々な生理機能性に関与することが報告され、非常に注目されている食品成分である。果実酒中のポリフェノール成分は果実由来のポリフェノール成分と、発酵や熟成などの醸造工程においてポリフェノール同士が直接または間接的に結合、多量体化し二次的に生成、変化した成分とが混在している。これまでは、果実酒中のポリフェノール成分を有効に分離する方法がないため果実由来のポリフェノール成分に関する検討がほとんどであり、二次的に生成する成分についての検討は十分に行われていない。

本論文では、リンゴを原料とする果実酒のロゼ・シードル中に生成する多量体化したアントシアニン類の生成メカニズムを検討することを目的に、まず、原料であるリンゴ中のポリフェノール成分、特に、プロシアニジン類を分離・精製し、構造解析を行った。次に、ロゼ・シードル中の多量体化したアントシアニン類の分析方法として新たにサイズ排除クロマトグラフィーを開発し、分子サイズ別の分離を可能とした。次に、LC/ESI-MS を用いてロゼ・シードルに生成したアントシアニン多量体の分子イオンピークを検出するとともに、モデル・シードルを調製し、その中に新たに生成したアントシアニンと一致することを確認した。さらに、このアントシアニンを分離・精製し、NMR による構造解析を行った。最後に、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF/MS）を用いて多量体化したアントシアニン類を分析し、その生成メカニズムの解明を試みた。

1. リンゴ中のポリフェノール成分の分析とプロシアニジン類の構造解析

リンゴ（*Starking Delicious* 種）中のポリフェノール成分を逆相系 HPLC で分析し、主要なポリフェノール成分として、フラバン-3-オール類であるカテキンやエピカテキン（EC）、アントシアニン類としてはシアニジン-3-ガラクトシド（Cy3g）、フェノールカルボン酸類のクロロゲン酸や 3'-*p*-クマロイルキナ酸、ジヒドロカルコン類のフロリジン、プロシアニジン類のプロシアニジン B1、プロシアニジン B2（PB2）、プロシアニジン C1 を検出した。また、新たにリンゴ中のプロシアニジン類として5種類の3量体成分と1種類の4量体成分を順相クロマトグラフィーおよび分取クロマトグラフィーによって分離・精製し、構造決定を行った。

2. 新サイズ排除クロマトグラフィー法による果汁およびロゼ・シードル中のアントシアニン類の分析

ポリフェノール成分の分析はフォーリンーチオカルト法やポーター法のような比色定量法や逆相系 HPLC による個別成分の分析法などがこれまで用いられてきた。また、逆相系 HPLC

を用いることにより一部のポリフェノール成分は詳細な解析が行えるようになってきた。しかし、プロシアニジン類のような高分子型のポリフェノール成分や醸造工程で果実酒中に生成する多量体化したアントシアニン類は、移動相と試料との相互作用や固定相と試料の親和性の差異に依存して溶出されるため、有効な方法が報告されていない。原料由来の成分と醸造工程で生成する二次的な成分とが混在する果実酒においては、より一層ポリフェノール成分の把握が困難であり、機能性研究における成分の構造と機能性の相関に関する研究を妨げている最大の要因である。

そこで、従来用いられてきたサイズ排除クロマトグラフィーにおいて移動相を 8 M 尿素 (pH2.0) とアセトンの混合液に変更することによりポリフェノール成分を分子量毎に分離することに成功した。また、本手法を用いることによりリンゴには観られない多量体化したアントシアニン類が醸造工程においてロゼ・シードル中に生成することが確認された。

3. モデル・シードルにおける多量体化したアントシアニン類の生成と構造解析

サイズ排除クロマトグラフィーで分画したロゼ・シードルの画分を LC/ESI-MS で分析したところアントシアニン類とフラバン-3-オール類がアセトアルデヒド由来のメチルメチン基を介して結合した分子に相当する m/z 765 を示す分子イオンピークと、アントシアニン類とプロシアニジン 2 量体がメチルメチン基を介して結合した分子に相当する m/z 1053 の分子イオンピークが検出された。そこで、醸造工程でのロゼ・シードル中のアントシアニン類の変化に関与する成分を検討する目的でモデル・シードルを調製し、保存期間中のアントシアニン類の変化を検討した。その結果、フラバン-3-オール類である EC やプロシアニジン類である PB2 と、アントシアニン類である Cy3g がアセトアルデヒドの共存する場合に新たなアントシアニン類が生成し、その成分はそれぞれ m/z 765 と 1053 の分子イオンピークを示すことが判明した。

そこで、アセトアルデヒドの共存する Cy3g と EC を含むモデル・シードルから 2 種類の新規アントシアニンを分離・精製し、NMR による構造解析の結果、両物質は Cy3g と EC がアセトアルデヒド由来のメチルメチン基を介して 8 位同士で結合していることが確認された。

4. MALDI-TOF/MS によるモデル・シードルおよびロゼ・シードル中の多量体化したアントシアニン類の分析

逆相系 HPLC や LC-ESI/MS 分析では、検出できない多量体化したアントシアニン類を MALDI-TOF/MS で分析した。モデル・シードルの分析の結果、Cy3g にメチルメチン基を介して EC や PB2 が多数結合した分子イオンピークが検出された。また、3 分子以上の Cy3g が結合している分子に相当する分子イオンピークは検出されなかった。以上の検討結果から、多量体化反応はアントシアニン類にメチルメチン基を介してフラバン-3-オール類やプロシアニジン類が 8 位または 6 位で結合し、フラバン-3-オール類やプロシアニジン類側へ連続的に伸張し、再度、アントシアニン類が結合することにより反応は停止すると考えられた。また、アントシアニン類の結合位置は 8 位だけであることが示唆された。

本論文では、果実酒としてロゼ・シードルにおける多量体化反応を検討したが、ブドウを原料とする赤ワインにおける多量体化したアントシアニン類の生成メカニズムも同様であると考えられるが、リンゴとは違いブドウは含有するアントシアニン類やプロシアニジン類の種類が多いこと、醸造方法もワインの産地により多様であることから生成する多量体化したアントシアニン類の解析はより困難であり、今後の課題であると考えられる。このように製造工程において微生物による発酵が関与している食品では、発酵中にポリフェノール成分の変化が起きていると考えられる。発酵食品の機能性研究においてはこの点を十分に考慮する必要がある、今回の研究はその一助になるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 端 潤
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 橋 床 泰 之

学 位 論 文 題 名

醸造工程における果実酒中のアントシアニン色素の変化と 新規色素の生成メカニズムに関する研究

果実酒中のポリフェノール成分は原料である果実由来の成分と、発酵や熟成などの醸造工程中にポリフェノール同士が直接または間接的に結合、多量体化し二次的に生成した成分とが混在しており、果実酒の味、色調、香りおよび保存性などの酒質に大きく貢献する。さらに、最近では、赤ワインや緑茶に代表される食品中のポリフェノール成分が生体内において様々な生理機能性に関与することが報告され、注目されている食品成分である。しかしながら、果実由来の成分と醸造工程に生成するポリフェノール成分を有効に分離する方法がないため果実由来のポリフェノール成分に関する検討がほとんどであった。

本研究の目的は、リンゴを原料とする果実酒のロゼ・シードル中に生成する多量体化したアントシアニン類の生成メカニズムを明らかにすることである。

1. リンゴ中のポリフェノール成分の分析とプロシアニジン類の構造解析

ロゼ・シードルの主原料である **Starking Delicious** 種のポリフェノール成分を逆相系 HPLC で分析し、主要なポリフェノール成分として、フラバン-3-オール類のカテキンやエピカテキン (EC)、アントシアニン類のシアニジン-3-ガラクトシド (Cy3g)、フェノールカルボン酸類のクロロゲン酸や 3'-p-クマロイルキナ酸、ジヒドロカルコン類のプロリジン、プロシアニジン類のプロシアニジン B1、プロシアニジン B2 (PB2)、プロシアニジン C1 を検出した。また、アントシアニン類の多量体化において重要な成分であるプロシアニジン類を新たにリンゴ中から順相クロマトグラフィーおよび分取クロマトグラフィーによって分離・精製し、NMR により構造を決定した。そのうち、5 種類の 3 量体成分と 1 種類の 4 量体成分ははじめてリンゴから確認された成分であった。

2. 新サイズ排除クロマトグラフィー法による果汁およびロゼ・シードル中のアントシアニン類の分析

従来ポリフェノール成分の分離に用いられてきたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の移動相をアセトンと 8 M 尿素 (pH 2.0) の混合液 (6:4) に変更することにより分子量毎

に分離することに成功した。また、本手法を用いることによりリングにはみられない多量体化したアントシアニン類が醸造工程においてロゼ・シードル中に生成し、時間の経過とともにアントシアニン多量体が増加することが確認された。

3. モデル・シードルにおける多量体化したアントシアニン類の生成と構造解析

新 SEC で分画したロゼ・シードルの画分を LC-ESI/MS で分析し、アントシアニン類とフラバン-3-オール類またはプロシアニジン 2 量体がアセトアルデヒド由来のエチリデン基を介して結合した分子に相当する m/z 765 および m/z 1053 の分子イオンが検出された。そこで、アントシアニン類と代表的なポリフェノール類を含むモデル・シードルを調製し、保存期間中のアントシアニン類の変化を検討した結果、EC や PB2 と Cy3g がアセトアルデヒドの共存する場合に新たなアントシアニン類が生成し、それぞれ m/z 765 と 1053 の分子イオンを示した。アセトアルデヒドの共存する Cy3g と EC を含むモデル・シードルから 2 種類の新規アントシアニン (EC-C1 および EC-C2) を分離・精製し、NMR による構造解析した結果、両物質は Cy3g と EC がアセトアルデヒド由来のエチリデン基を介して双方の 8 位同士で結合している構造異性体であった。

4. MALDI-TOF/MS によるモデル・シードルおよびロゼ・シードル中の多量体化したアントシアニン類の分析

逆相系 HPLC や LC-ESI/MS 分析では、検出できない多量体化したアントシアニン類を MALDI-TOF/MS で分析した。モデル・シードルの分析の結果、Cy3g ユニットにエチリデン基を介して EC ユニットや PB2 ユニットが多数結合した分子に相当するイオンが検出された。また、Cy3g ユニットが両端に結合した分子に相当するイオンも検出されたが、3 分子以上の Cy3g ユニットが結合している分子に相当する分子イオンは検出されなかった。以上のことから多量体化反応はアントシアニン類にエチリデン基を介してフラバン-3-オール類やプロシアニジン類が 8 位または 6 位で結合、連続的に伸張し、再度、アントシアニン類が結合することにより反応は停止すると考えられた。

本論文では、ロゼ・シードルにおける多量体化反応を検討したが、赤ワイン中でのアントシアニン類の多量体化のメカニズムも同様であると推定される。リングとブドウでは含有するアントシアニン類やプロシアニジン類の種類や含有量、産地により醸造方法も多様であることから多量体化したアントシアニン類の解析はさらに困難であり、今後の課題である。製造工程で微生物による発酵が関与する食品では、ポリフェノール成分の変化が起きていると推定される。発酵食品の機能性研究においてはこの点を考慮する必要がある、本研究はその一助になると考えられる。

よって審査員一同は、庄司俊彦が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。