

## 赤ワインのアルコール発酵と乳酸発酵過程でのリスベラトロール関連物質濃度の変化

柚木恵太, 安井美裕\*, 大西正男<sup>§</sup>

帯広畜産大学生物資源科学科  
\*池田町ブドウ・ブドウ酒研究所

Changes in Concentrations of Resveratrol and  
Its Related Compounds in Red Wine  
during Alcoholic and Malolactic Fermentation

Keita Yunoki, Yoshihiro Yasui\* and Masao Ohnishi<sup>§</sup>

Department of Bioresource Science, Obihiro University  
of Agriculture and Veterinary Medicine,  
Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555

\*Tokachi-Ikeda Research Institute for Viticulture  
and Enology, Hokkaido 083-0002

During alcoholic fermentation *trans*- and *cis*-resveratrol were rapidly extracted from grape skin along with the rise in the alcoholic concentration and reached equilibrium six days after the start of maceration. The increase of *trans*-resveratrol was shown to be ahead of that of the *cis* isomer, but the *trans* isomer decreased at the late stage. It was, therefore, assumed that *trans*-resveratrol would be converted to the *cis* isomer by the action of a possible yeast isomerase. In addition, on the process of malolactic fermentation resveratrol levels were found to increase accompanied by a decrease in piceid concentration. This means that the increase resulted from the hydrolysis of piceid by  $\beta$ -glucosidase activity produced by lactic acid bacteria involved in the malolactic fermentation.

(Received Sep. 30, 2003; Accepted Feb. 24, 2004)

「フレンチパラドックス」が発端となりワイン中の機能性成分が世界的に研究され、赤ワイン飲酒による健康上の有効性が認知されている<sup>1)~5)</sup>。赤ワインはポリフェノール(1~3g/l)を多く含む飲料で<sup>6)7)</sup>、果皮由来のアントシアニン類や種子由来のカテキン類、フラボノールなどがその多くを占める。ブドウの果皮に由来する成分であるリスベラトロール(3,5,4'-trihydroxystilbene)は、ppmレベルでしか含まれていないが、抗動脈硬化作用などを有する高機能性因子のひとつとして注目されてきた<sup>8)9)</sup>。ワイン中のリスベラトロールについては多くの研究がなされ、アルコール発酵過程でアルコールの生成に伴って果皮からワイン中に移行すること、ブドウ品種、栽培地域および製造方法などの違いによってその含量が大きく異なることが報告されている<sup>10)~14)</sup>。また、リスベラトロールがブドウ灰色カビ病

のファイトアレキシンの前駆体であるということから<sup>15)</sup>、先に著者らはリスベラトロール量とブドウ栽培地域の気象要因との関連性を検討した<sup>16)</sup>。

リスベラトロールにはシス異性体が存在し、その他に関連物質としてリスベラトロールのグルコース配糖体である2種のパイシードおよびB環のヒドロキシル基の数と配置が違うアストリンギニンが知られている<sup>17)~19)</sup>。それらは生体内でトランス-リスベラトロールと同等の生理活性を示すと推測されていたが、アストリンギニンはリスベラトロールよりも100倍以上高いスーパーオキシドアニオン消去活性を有することが報告されている<sup>20)</sup>。

著者らはアルコール発酵後と乳酸発酵(MLF)後のワインを比較すると、MLF後ではリスベラトロールが増加してパイシードが減少していることを見出した<sup>14)</sup>。本研究では、引き続いてワインのアルコール発酵過程でのリスベラトロール量の変動をトランスとシスの両異性体について調査した。さらに、MLF過程でのリスベラトロールとパイシードの経時的な変化についても検討した。MLFは、ブドウ由来の主要な有機酸であるリンゴ酸が乳酸菌の働きによって乳酸へ代謝される2次発酵で、特に酸度の高いブドウ品種や北海道のような冷涼な気象条件で造られるワインでは減酸とともに香味の改善につながる極めて重要なプロセスである。

### 1. 実験方法

#### (1) アルコール発酵

1995年に北海道池田町で栽培された赤ワイン用ブドウ品種である清見170kgを用いて試験用として仕込み、アルコール発酵を通常の赤ワイン製造法に従って13日間行った。アルコール発酵過程で経時的に試料(発酵物)を採取し、ろ過後にワインの温度、比重、アルコールおよび総酸を測定した<sup>21)</sup>。

#### (2) 乳酸発酵

1996年産清見種について、アルコール発酵後に2度の濃引きしたワインを100lタンクに移し、16~18°Cに管理されたワイン熟成室で乳酸菌(*Oenococcus oeni*, Lallemand社製)を添加してMLFを行った。なお、コントロールとして同じワイン3lを0.45 $\mu$ mフィルターでろ過し、嫌気チャンバー内で16~18°Cに保持した。乳酸発酵の進行程度はその都度、乳酸量を測定して判定した。また、リスベラトロールとパイシードの含量は後述する方法に従って試料の採取後に速やかに実施した。

#### (3) 乳酸量の測定

ワイン中の乳酸量は高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)で分析した。HPLCの分析条件は、以下の通りである。装置:日立製作所製L-6200, カラム:Shodex KC-811(昭和電工), カラムサイズ:8×300mm, 溶離液:3mM HClO<sub>4</sub>, 流速:0.75ml/min, カラム温度:60°C, 検出波長:440nm。

〒080-8555 北海道帯広市稲田町

\*〒083-0002 北海道中川郡池田町字清見83番地

<sup>§</sup>連絡先 (Corresponding author), mohnishi@obihiro.ac.jp

## (4) リスベラトロールの定量

ワイン中のリスベラトロールは、試料の採取後、直ちに固相抽出法を用いて抽出・分離された<sup>22)</sup>。まず、ワイン5 mlをそのままC<sub>18</sub>カートリッジ(ウオーターズ)に吸着させ、次いでリスベラトロールを酢酸エチル5 mlで2回抽出した。得られた抽出液を窒素気流下で濃縮乾固した後、クロロホルム-メタノール(2:1, v/v) 300 $\mu$ lに溶解してHPLC用試料とした。HPLCによるリスベラトロールの定量は、前報と同様に順相および逆相HPLCを組み合わせて行った<sup>14)16)</sup>。検量線は市販のリスベラトロール(トランス体)を用いて作成した。なお、リスベラトロールのシス体の分析値は、トランス体とシス体の280 nmでの分子吸光係数の違いを考慮して補正した<sup>23)</sup>。

## (5) パイシードの定量

ワイン5 mlを上記(4)項と同様のカートリッジに吸着させ、メタノール5 mlで2回溶出させてパイシードを含むフェノール画分を得た<sup>14)</sup>。それを市販の $\beta$ -グルコシダーゼで処理し、酵素処理前後での遊離のリスベラトロール量をHPLCで定量してパイシード量を求めた。なお、パイシードはリスベラトロール換算量として算出した。

## (6) ポリフェノールの定量

赤ワイン中のポリフェノールは、試料の採取後、直ちに没食子酸相当量としてFolin-Ciocalteu法により定量した<sup>24)</sup>。

## 2. 実験結果

(1) アルコール発酵過程におけるリスベラトロール異性体の変化

## i) 全リスベラトロール含量

アルコール発酵過程におけるリスベラトロール画分の逆相HPLCプロファイルをFig. 1に示す。リスベラトロール量は発酵4日目までに急激に増加し、その後にトランス体とシス体の割合に変化が見られた。

アルコール発酵0日目から13日目までの発酵液中のリ

スベラトロール量を測定した結果をTable 1に示す。発酵0日目の果汁の段階ではリスベラトロール量は少なく(0.5 mg/l)、2日目までは量的な変化はなかった。3日目以降にリスベラトロールは急激に増加して6日目でピーク(4.0 mg/l)に達し、その変動はエタノールの生成と連動していた。7日目以降では、緩やかに減少する傾向(4.0 mg/lから2.9 mg/l)が示された。

## ii) リスベラトロール異性体量の変化

アルコール発酵過程におけるトランス-およびシス-リスベラトロール含量の経時的変化をFig. 2に示す。トランス体はエタノール生成の初期段階の発酵4日目までにほぼ最大値(2.0 mg/l)に達しており、発酵3日目からのリスベラトロールの急激な増加はトランス体によるものであった。一方、シス体はエタノールの蓄積と連動して徐々に増加し、6日目で最大値(1.7 mg/l)となった。トランス体は7日目頃から徐々に減少(2.1 mg/lから1.4 mg/l)したが、シス体の含量はほぼ一定であった。両異性体の変化をtrans/cis比で見ると、発酵初期ではトランス体がシス体の3倍以上であったが、発酵後半ではその比は減少し、発酵13日目(0.9)ではシス体がトランス体を上回っていた。

## iii) 全フェノール量

発酵0日目の全フェノール含量は、アルコール発酵後のワインの半分程度(1.5 g/l)であった。フェノール成分はアルコールが生成する前から発酵日数の経過とともに増えて6日目でピーク(3.2 g/l)に達し、その後は変化が認められなかった。

(2) MLF過程におけるリスベラトロールとパイシードの含量変化

モデル乳酸発酵過程におけるリスベラトロールとパイシード量の経時的変化を調べた結果をFig. 3に示す。なお、乳酸発酵0日目でのリスベラトロールとパイシードの含量は、それぞれ1.4 mg/lおよび2.9 mg/lであった。リス

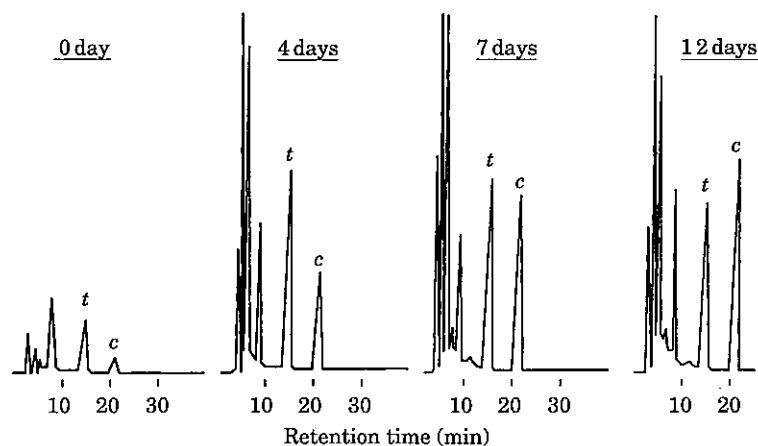


Fig. 1 Reversed phase HPLC profiles of resveratrol fractions in fermenting musts during alcoholic fermentation

*t* and *c* mean *trans* and *cis* isomers of resveratrol.

ベラトロールは乳酸が増加する前の発酵初期から増加し、2週目で乳酸発酵0日目の1.2倍に達した。パイシード量は、リスベラトロールの増加と相反して減少した。一方、MLFを行わなかったコントロールのワイン試料ではリスベラトロール量の変化は見られなかった。なお、乳酸発酵過程において、トランス-リスベラトロールとそのシス異性体の量比には変化が見られなかった(データ非記載)。

### 3. 考 察

リスベラトロールはワインポリフェノールの中では微量成分ではあるが、ワイン飲酒により生体内に取り込まれると血小板凝集抑制作用やガン予防作用を示し、また冠状動脈疾患の致死率を減少させる上でワイン中のリスベラトロールは有効であると考えられている<sup>25)26)</sup>。

これまでに、マストから製成酒までの過程でアルコールの生成に伴ってリスベラトロールが著増することは知られているが<sup>27)</sup>、今回、初めてアルコール発酵過程でのトラン

ス体とシス異性体の変動が検討された。リスベラトロールの総量は発酵6日目で最大値に達し、通常のもろみ発酵の期間(7日目)までに果皮からワイン中への移行は終了することが確認された。また、リスベラトロールのトランス体とシス体は共にアルコール生成とともに増加したが、シス体の割合は発酵の後半で上昇することが示された。このことから、果皮に含まれる主要なトランス体がまず発酵液中に移行し、それが恐らく酵母由来のイソメラーゼ作用によりシス体へと変換されるものと推測された。また、アルコール発酵7日目以降ではリスベラトロールの総量にはほとんど変化が見られなかったが、トランス体の緩やかな減少とシス体の微増が観察されたことから、酵母の増殖停止後にもイソメラーゼ活性が残存するものと考えられる。

以前に著者らは、ワイン中のリスベラトロールが乳酸発酵後に増加することを見出し、それは乳酸菌によるパイシードの加水分解によると推測した<sup>14)</sup>。本研究において、MLFを停止したワインではリスベラトロール量の変動が生じないことが確認された。また、MLF進行のシグナルである乳酸量が上昇する前からリスベラトロールの増加とパイシードの減少が観察された。したがって、乳酸菌が増殖するMLF誘導期に $\beta$ -グルコシダーゼ活性が上昇してくると推測される。パイシードと同様に、この時期に他のポリフェノール配糖体もアグリコンへと転換されると考えられるので、それに伴ってワインのラジカル消去活性が増強化されることが期待される<sup>28)</sup>。現在、ワイン製造過程におけるラジカル消去活性の変動について解析を行っており、その結果については次報に記載する予定である。

### 4. 要 約

ワイン中の機能性物質のひとつであるリスベラトロールとその関連物質について、ワインの発酵過程での含量変化を分析した。

(1) アルコール発酵3日目からのアルコール濃度の上昇

Table 1 Concentrations of alcohol, total resveratrol and total phenol in fermenting musts during alcoholic fermentation

Days	Alcohol (%)	Total resveratrol (mg/l)	Total phenol (g/l)
0	—*	0.5	1.5
1	—	0.4	2.0
2	—	0.5	2.2
3	1.5	0.9	2.5
4	6.5	2.7	2.8
5	7.3	3.1	3.1
6	—	4.0	3.2
7	10.0	3.6	3.0
9	10.0	3.5	3.2
12	—	3.1	3.3
13	10.1	2.9	3.2

\*Not analyzed.

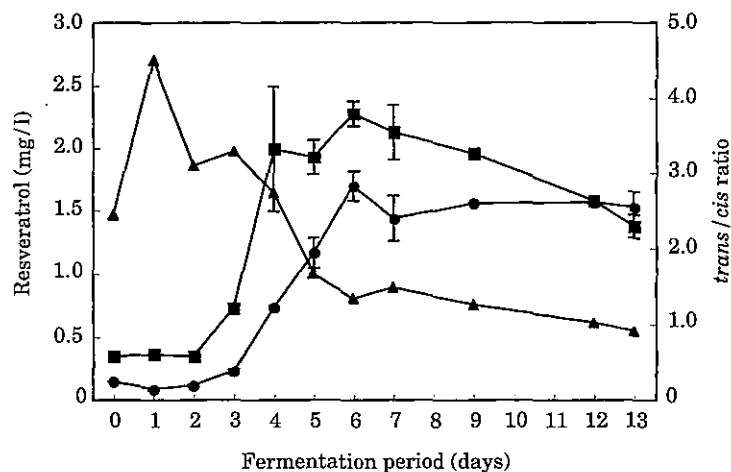


Fig. 2 Changes in contents of resveratrol isomers in fermenting musts during alcoholic fermentation

●, cis-resveratrol; ■, trans-resveratrol; ▲, trans/cis ratio.

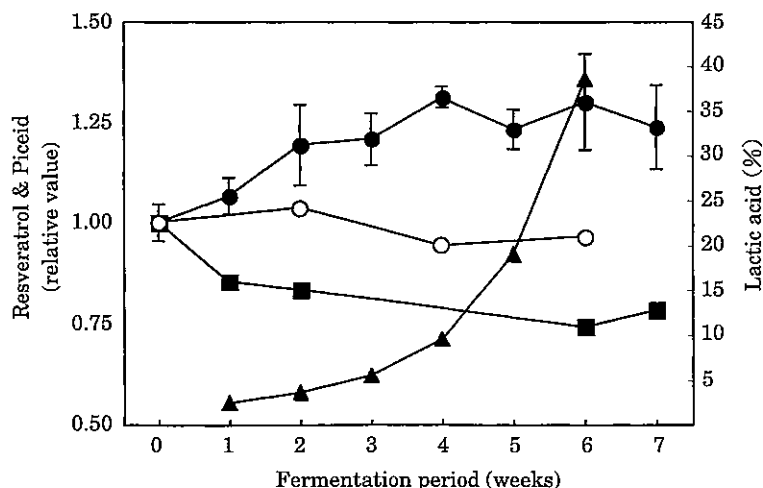


Fig. 3 Changes in relative contents of resveratrol and piceid during malolactic fermentation

Resveratrol and piceid contents in the samples were presented as values relative to those in the wine before malolactic fermentation.

●, resveratrol ; ■, piceid ; ▲, lactic acid ; ○, resveratrol in the control experiment in which malolactic fermentation was not taken place.

とともにリスベラトロールは果皮から抽出され、発酵6日目ではほぼ平衡に達した。その過程で、シス異性体の割合が増加し、発酵後半ではトランス体のみが減少していたことから、酵母由来のイソメラーゼ活性により発酵中にリスベラトロールの異性化が起きていることが示唆された。

(2) 乳酸発酵過程において、リスベラトロールの増加とバイシードの減少が観察され、果皮から移行したバイシードが乳酸菌由来の $\beta$ -グルコシダーゼ活性によって加水分解されてリスベラトロールに変換されるものと推測された。

## 文 献

- 1) Renaud, S. and De Lorgeril, M., Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1527 (1992).
- 2) Bisson, L.F., Butzke, C.E. and Ebeler, S.E., The role of moderate ethanol consumption in health and human nutrition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 449-462 (1995).
- 3) Sun, A.Y., Simonyi, A. and Sun, G.Y., The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad. Biol. Med.*, 32, 314-318 (2002).
- 4) Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, J.E., Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 64-69 (1994).
- 5) Simonetti, P., Pietta, P. and Testolin, G., Polyphenol contents and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1152-1155 (1997).
- 6) Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna, O., Brighenti, F. and Pietta, P., Polyphenol content and total antioxidant activity of *vini novelli* (young red wines). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 732-735 (2000).
- 7) Brenna, O.V. and Pagliarini, E., Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4841-4844 (2001).
- 8) Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E., Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454-456 (1993).
- 9) Bertelli, A.A.E., Giannesi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M. and Bertelli, A., Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue. React.*, 17, 1-3 (1995).
- 10) Goldberg, D.M., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Soleas, G. and Waterhouse, A.L., A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 159-165 (1995).
- 11) Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P. and Trollat, P., Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 1-4 (1995).
- 12) Ector, B.J., Magee, J.B., Hegwood, C.P. and Coign, M.J., Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 57-62 (1996).
- 13) Okuda, T. and Yokotsuka, K., *Trans*-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 93-99 (1996).
- 14) Yunoki, K., Yasui, Y., Naito, A., Kawaguchi, M. and Ohnishi, M., Comparative analysis of concentrations of *trans*- and *cis*-resveratrol in must and wine from eleven different grapevines grown in Hokkaido, northern Japan. *J. Oleo Sci.*, 50, 895-903 (2001).
- 15) Jeandet, P., Sbaghi, M. and Bessis, R., The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grapevine *in vitro* cultures, and its application to screening for grey mould resistance. *J. Wine Res.*, 3, 47-57 (1992).
- 16) 安井美裕, 柚木恵太, 内藤彰彦, 川口政憲, 大西正男, 赤ワイン中のリスベラトロール含量に及ぼす気象要因および熟成の影響, *食科工*, 49, 220-227 (2002).
- 17) Waterhouse, A.L. and Lamuela-Raventos, R.M., The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries.

- Phytochemistry*, 37, 571-573 (1994).
- 18) Goldberg, D.M., NG, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E. P. and Soleas, G., Resveratrol glucosides are important components of commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 415-420 (1996).
  - 19) Sato, M., Suzuki, Y., Okuda, T. and Yokotsuka, K., Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1800-1805 (1997).
  - 20) Hung, L.M., Su, M.J., Chu, W.K., Chiao, C.W., Chan, W.F. and Chen, J.K., The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br. J. Pharmacol.*, 135, 1627-1633 (2002).
  - 21) 国税庁所定分析法注解 第 4 回改正, (日本醸造協会, 東京), (1993).
  - 22) Mattivi, F., Solid phase extraction of *trans*-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 196, 522-525 (1993).
  - 23) Trela, B.C. and Waterhouse, A.L., Resveratrol : isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1253-1257 (1996).
  - 24) 横塚弘毅, 全フェノール, *ASEV Jpn. Rep.*, 1, 85 (1990).
  - 25) Jang, M., Cai, L., Udeani, G., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J. M., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220 (1997).
  - 26) Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N. and Raul, F., Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cells. *Cancer Lett.*, 158, 85-91 (2000).
  - 27) Pezet, R. and Cuenat, P., Resveratrol in wine : Extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Gamay grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 287-290 (1996).
  - 28) Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L. and Arnhold, J., Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.*, 395, 49-56 (2001).

(平成 15 年 9 月 30 日受付, 平成 16 年 2 月 24 日受理)