

ブドウ果実の着色に関する研究

第1報 Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A 及び Red Millennium 種の果皮中の色素について

内藤 隆次 (園芸学研究室)

Ryuji NAITO

Studies on the Coloration of Grape Vine Fruits.

(1) Skin Pigments of Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A and Red Millennium.

I 緒 言

生食用ブドウの品質を決定する最も大きな要素が食味であることは云うまでもないが、外観、殊に着色の良否は商品としての果実の価値を大きく支配している。

本研究はブドウの栽培環境の各種要因と果実の着色との関係を追求する目的で始めたものであるが、我国の主要なブドウ品種の果皮中の色素についての報告が殆んど見当らぬので、先づその点を明らかにするために Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A 及び Red Millennium の4品種を取り上げ、その色素系について検討を加えた。

本研究を行うに当り終始懇切な御指導を載いた高馬教授、並びに実験に協力載いた研究室各位に対し深甚なる謝意を表する。

II 実験材料及び方法

上記4品種の完熟果の果皮を流水にて4、5分水洗した後、ガーゼ、濾紙で充分に水分を除去し実験に供した。

1) Carotinoid 及び Anthocyaninの定性

先づ之等4品種の果皮中の色素が Carotinoid 系に属するか Anthocyanin 系に属するかを知る為めの定性試験を林⁽³⁾(1954)の植物色素試験法に則り、下記の方法で行った。

a) 有機溶媒溶解性

水、アルコール類、エーテル、アセトン、ベンゼン、2硫化炭素に対する溶解性の難易。即 Anthocyanin は水、アルコール類に可溶でエーテル、アセトン、ベンゼン、二硫化炭素に不溶であり、Carotinoid はその逆の溶解性を示す。

b) Anthocyanin の呈色反応

1%メタノール性塩酸抽出液を0.1N NaOHで除々に中和する。Anthocyanin は酸性で赤、中性付近で紫、アルカリ性で青～緑の呈色反応を示す。

c) Carotinoid の呈色反応

エーテル抽出液からカラムクロマトグラフィーに依り Chlorophyll を除いた部分に就いて濃硫酸反応を調べた。Carotinoid が存在すれば暗青色～青紫色を呈し、これに水を加えると汚青色に変わる。又二硫化炭素抽出液に就いても同様の反応を試みた。

d) KUHN-BROCKMANN 法による Carotinoid の微量分析

果皮の減圧乾燥試料に就いて、同法により Lycopin, Carotin, Xanthophyl 類を分別した。

2) ペーパークロマトグラフィーによる Anthocyanin の定性

果皮の1%メタノール塩酸抽出物について、林⁽³⁾⁽⁴⁾(1952,1954)、遠藤⁽⁵⁾(1959)等の方法に準じてペーパークロマトグラフィーを行った。先づ果皮10g～15gに1%メタノール性塩酸40ccを加えて2時間冷蔵庫内(約8°C)で浸漬したのち濾過、濾液を減圧濃縮した後、約9倍容のエーテルを加えて色素を沈澱分離し、その分離した色素を再び少量の1%メタノール性塩酸にとかして展開用の試料とした。

東洋濾紙NO.50の40×40cm及び2×40cmの二通りを用い、下辺より6cmの部分に添着、添着後一昼夜風乾したのち、上昇法により展開した。展開溶媒はブタノール:36%塩酸:水(5:1:2)、ブタノール:氷醋酸:水(4:1:2, 4:1:5)及び80%蟻酸:36%塩酸:水(5:1:4)の4種類を用い展開時間はブタノール系で

10時間、蟻酸系で6時間半とした。展開時の温度はいづれも $25^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ とした。展開終了後直ちに風乾して各色帯の Rf 値、色調及び濃淡を記録した。

更に上記試料の一部よりアグルコン試料を調製し展開を行った。即ち試料2ccを1%塩酸10ccにとかし、等容の36%塩酸を加え直火で約3分間沸とうさせ、冷却後等容のイソアミールアルコール10ccを加えて強く振とうして静置するとアグルコンは上位のアルコール層に転溶する。このアルコール層を別の分液漏斗に移し、1%塩酸とベンゾール各20ccを加えて振とうするとアグルコンは水層に移る。この水層からアグルコンを少量のイソアミールアルコールで振り取って展開用の試料とした。濾紙、展着及び展開方法は上記と同様で展開溶媒は80%蟻酸:36%塩酸:水(5:1:4)、展開時間は6時間半。

展開温度並びに調査項目は上記と同様である。求めた Rf 値及び色調を、先に遠藤⁽²⁾(1959)が本実験と同一条件のもとで数種類の Anthocyanidin の純品で得た Rf 値及び色調と比較対照してアグルコンの同定を行った。更に翌年(1960年)同定の確実を期する為、Delaware, Campbell Early, Red Millennium の3品種のアグルコンと Cyanidin 及び Delfinidin の純品と同時展開を行った。

Ⅲ 実験結果

1) 果皮中の色素の Carotinoid 及び Anthocyanin に関する定性分析

Table I に示す如く、之等4品種のブドウの果皮中の赤色系の色素は水溶性、並びにアルコール可溶性でしか

Table 1. Qualitative analysis for carotinoid and anthocyanin in skin pigments. (Four varieties of Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A and Red Millennium are used as materials and following reactions from 1) to 6) are observed similarly in them.)

- 1) Pigments are soluble in water.
- 2) Pigments are easily extracted by cold methanolic hydrochloric acid and when ether is added to the extract, syrupy precipitation of red pigments occurs.
- 3) Extract with 1% methanolic hydrochloric acid is deep red and according as the extract is alkalinized gradually by dilute sodium hydroxide, it turned purple at neutral and greenish yellow at alkali.
- 4) Extract with ether from which chlorophyll has been separated assumes faint yellow and color reaction of carotinoid according to sulfuric acid method is not well defined.
- 5) Extract with carbon disulphide is faint greenish yellow and color reaction of carotinoid is not well defined.
- 6) Relative amounts of lycopin, carotin and xanthophyll separated by KUHN-BROCKMANN method are respectively very small.

もエーテルに不溶であること、及び1%メタノール性塩酸抽出液を稀アルカリで中和すると Anthocyanin 特有の呈色反応を示すこと等より、いづれも Anthocyanin 系の色素であることを確認した。エーテル抽出液から Chlorophyll を除いた部分には Carotinoid が溶存する筈であるが、その部分に対して行った Carotinoid の呈色反応は不明瞭であった。エーテルと同様 Carotinoid が抽出される二硫化炭素抽出液についても同様の結果が得られた。KUHN-BROCKMANN 法で調べた結果も Carotinoid は極めて微量にしか存在しないことを示

していた。

2) ペーパークロマトグラフィーによる Anthocyanin の定性試験

1%メタノール性塩酸抽出物について ペーパークロマトグラフィーを行った結果は Table 2 の如くである。

先づ Delaware ではブタノール-塩酸系、蟻酸-塩酸系で2種類、ブタノール-醋酸系で3種類の Anthocyanin を分離検出し得た。即ち少なくとも3種類の Anthocyanin が Delaware の果色の発現に関係している事を示して

Table 2. Rf values, color and relative amounts of the anthocyanins from the grape skins.

Solvent ^{c)}	Spot No.	a) Delaware			b) Campbell Early		
		Rf	Color	Relative Amount	Rf	Color	Relative Amount
A	1	0.40	Purplish red	+	0.53	Red	+
	2	0.27	Purplish red	++++	0.47	Reddish Purple	++
	3				0.40	Red	++++
	4				0.36	Reddish purple	++++
	5				0.34	Red purple	++++
	6				0.20	Red	+
	7				0.16	Red purple	++
	8				0.09	Reddish purple	++
B	1	0.33	Purplish red	++	0.57	Red purple	+
	2	0.29	Purplish red	++++	0.46	Reddish purple	++++
	3	0.18	Purplish red	+	0.43	Red purple	++++
	4				0.37	Red purple	+++
	5				0.34	Reddish purple	++++
	6				0.27	Red purple	++
	7				0.25	Reddish purple	++
	8				0.17	Reddish purple	+
C	1	0.60	Purplish red	++	0.74	Purplish red	++
	2	0.51	Purplish red	++++	0.69	Purplish red	+++
	3				0.66	Purplish red	++++
	4				0.57	Red purple	+++
	5				0.47	Purplish red	++
	6				0.36	Red purple	++
Solvent ^{c)}	Spot No.	Muscat Bailey A			Red Millennium		
		Rf	Color	Relative Amount	Rf	Color	Relative Amount
A	1	0.54	Reddish purple	++	0.54	Yellowish red	+
	2	0.45	Purplish rep	++	0.29	Red	++++
	3	0.41	Red	+++	0.17	Red purple	++
	4	0.34	Reddish purple	++++			
	5	0.28	Red Purple	++++			
	6	0.21	Reddish purple	++++			
	7	0.17	Purplish red	++++			
	8						
B	1	0.45	Reddish purple	++++	0.47	Red purple	+
	2	0.39	Red purple	++++	0.39	Purplish red	++++
	3	0.36	Reddish purple	++++	0.33	Purplish red	+
	4	0.34	Purplish red	+++			
	5	0.28	Purplish red	++			
	6						
	7						
	8						

- a) Color is observed on the filter paper when air dried.
- b) Relative Amount : +=Trace, ++=Small, +++= Moderate, ++++=Large.
- c) Solvent : A n-Butanol : 36% hydrochloric acid : Water (5:1:2)
 B n-Butanol : Acetic acid : Water (4 : 1 : 2)
 C 80% formic acid : 36% hydrochloric acid : Water (5 : 1 : 4)

いる。Campbell Early ではブタノール-塩酸系、ブタノール-醋酸系で共に8種類、蟻酸-塩酸系で6種類を分離検出し得た。Muscat Bailey A ではブタノール-塩酸系で7種類、ブタノール-醋酸系で5種類が、更にRed Millennium ではブタノール-塩酸系、ブタノール

-醋酸系いづれに於ても3種類の Anthocyanin が検出された。之等の結果は Delaware, Red Millennium に較べ、Campbell Early, Muscat Bailey A の色素構成が著しく複雑なことを示している。更に Rf 値を比較検討すると、構成 Anthocyanin の数のみでなく、その種

類も品種間で異なることが分るが、これだけの資料では個々の Anthocyanin の同定は困難である。

3) ペーパークロマトグラフィーによる Anthocyanidin の定性試験

夫々の Anthocyanidin の Rf 値及び色調と遠藤⁽³⁾ (1959)

が同一条件で得た Anthocyanidin 純品の Rf 値及び色調を対比して表にしたのが Table 3. a) 次年度 Cyanidin 及び Delfinidin の純品と同時展開して得た結果が Table 3. b) である。Rf 値は僅かな条件の違いによって変動する可能性があることが認められているが、(佐竹1955)⁽⁴⁾ 両年度の結果、及び Cyanidin, Delfinidin の純品の Rf

Table 3. Rf values, relative amounts, and colors of the anthocyanidins from the grape skins compared with that of authentic anthocyanidins. (Solvent; 80% formic acid : 36% hydrochloric acid: Water (5 : 1 : 4). Temp. 25°C)

a) Results in 1959

Anthocyanidin	Rf of authentic Anthocyanidin *	Delaware		Campbell Early	
		Rf	Relative Amount	Rf	Relative Amount
Paeonidin	0.30	0.30	+		
Malvidin	0.27			0.27	+
?				0.24	++
Cyanidin	0.22	0.23	++++	0.21	++++
Petunidin	0.18			0.17	++
Delfinidin	0.12	0.12	++	0.12	++++
?				0.10	+

Anthocyanidin	Muscat Bailey A		Red Millennium		Color
	Rf	Relative Amount	Rf	Relative Amount	
Paeonidin	0.29	++++			Red
Malvidin	0.27	++++			Red
?					Purplish red
Cyanidin	0.21	++	0.21	++++	Red
Petunidin	0.16	++			Purplish red
Delfinidin					Purplish red
?	0.10	+			Purplish red

* T. ENDO (1959)

b) Results in 1960

Anthocyanidin	Rf of authentic Anthocyanidin	Delaware		Campdell Early		Red Millennium		Color
		Rf	Relative Amount	Rf	Relative Amount	Rf	Relative Amount	
		0.30	+					Red
				0.27	+			Red
Cyanidin	0.21	0.21	++++	0.21	++++	0.21	++++	Red
				0.17	+			Purplish red
Delfinidin	0.12	0.11	++	0.11	++++			Purplish red

値が遠藤 (1959) の結果とほぼ一致したことより、遠藤の結果と対比して Cyanidin, Delfinidin 以外の Anthocyanidin の同定を行って殆んど誤りはないと思はれる。

之等の結果より先づ Delaware の果皮中の Anthocyanin の Aglucon は Cyanidin, Delfinidin, Paeonidin の3種類と考えられ、そのうち Cyanidin の占める割合が最も多いことが分る。Campbell Early では Cyanidin, Delfinidin, Petunidin, Malvidin は明らかであるが、Rf 0.24及びRf 0.10は之に相当する純品の Rf値が見当らず不明である。次年度の展開ではその両者は検出出来なかった。それ等の Anthocyanidin のうち、Cyanidin 及び Delfinidin の量が多い。Muscat Bailey A では Paeonidin 及び Malvidin が最も多く、Cyanidin Petunidin がこれ等に次いでいる。Campbell Early の場合と同様 Rf 0.10 は不明である。Red Millennium では Cyanidin のみ検出され、之等4品種中で最も単純な Aglucon 構成を示した。

IV 考 察

ブドウの果皮中の色素に就いては、先づ WILLSTÄTTER 及び ZOLLINGER (1916) が Dark blue north Italian grape (*V. vinifera*) の主要色素が主として Oenin (Malvidin 3-glucoside) であることを確認したのに始まり、次いで ANDERSON (1923, 24) が Norton, Concord, Clinton 種などについて調べ、各種 Anthocyanin を識別した。更に LEVY (1931) は Fogruna 種について果皮色素の主要 Aglucon が Malvidin であり、Petunidin, Delfinidin も存在することを認めた。又 ANDERSON (1923, 24), LEVY (1931), BROWN (1940) 等の結果から Malvidin, Petunidin, Delfinidin の mono 或いは di-glucoside が多様に結合されて各種の品種の果皮色素を構成していることが明になった。(以上は BOCKIAN⁽⁴⁾ (1955) の報文より引用)

本邦では今井⁽⁶⁾ (未発表) が約90種の主として加工用ブドウの果皮色素の Aglucon に就いて分類を試みている。此の様にブドウの果皮の発現が主として Anthocyanin 色素によることは多くの品種に於て己に認められている。一方栽培の見地より土屋⁽⁶⁾ (1956) は我国で栽培されているブドウについて散光着色品種と直光着色品種に分類し、夫々良好な着色に対する光線の要求度にかなり相異のあることを認めている。又岸⁽⁶⁾ (1953) は人工的に果実の受光量を調節して同様な傾向を認めている。筆者はこれ等の着色に対する光線の要求度の相異は果皮の発現に関与する色素系の相異、特に Carotinoid 系の色素の関与の有無に依るのではないかと推定した。本実験に供

試した4種類のうち、Red Millennium は光線要求度の極めて高い赤色系品種であり、他の3種類はいづれも散光着色品種であるが Delaware は赤色系、Campbell Early, Muscat Bailey A はいづれも濃紫赤色 (所謂黒色) の果皮を呈する品種である。

然し乍ら本実験の結果から、之等4品種の果皮色素はいづれも明瞭な Anthocyanin の反応を示し、Carotinoid は果皮の発現に殆んど関係のないことが明になった。従って着色に対する光線要求度の品種間差異の原因は別な見地から検討する必要がある。

次にこれ等4種類のブドウの果皮中には多種多様な Anthocyanin が存在することが明となった。即ち Delaware, Red Millennium では夫々少くとも3種類、Campbell Early では8種類、Muscat Bailey A では7種類の Anthocyanin が識別された。今後更に個々の Anthocyanin を分別して、夫々に対し確実な同定を試みたいと考えている。

又果皮色素の Aglucon の同定を行った結果、Delaware では主として Cyanidin、それに Delfinidin 及び Paeonidin が含まれており、Red Millennium では Cyanidin 一種のみが検出された。Campbell Early では Cyanidin, Delfinidin, Petunidin, Malvidin が存在し、そのうち前2者が量的に多い。Campbell Early に就いては今井⁽⁶⁾ (未発表) の結果と全く一致した。Campbell Early における Rf 0.24 の色帯は恐らく Delfinidin 或いは Petunidin の未加水分解物と思はれ、Rf 0.10 は不純物に依る分離障害より生じた Delfinidin の色帯と思はれる。Muscat Bailey A では Paeonidin 及び Malvidin が最も多く、Cyanidin, Petunidin が之に次いでいる。

此の様に外観の色調の相似た Campbell Early と Muscat Bailey A の果皮色素の Aglucon 組成が著しく異なることは興味深い。又散光着色の Delaware と直光着色の Red Millennium の主要果皮色素がともに Cyanidin 誘導体であることは果皮発現機構の複雑さを示すものと考えられる。

以上の如く、本実験では此の4種類のブドウに就いて果皮の色素構成の概要を示したに過ぎず、今後更に検討する余地が大いにある。

V 摘 要

Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A, Red Millennium の4品種に就いて果皮の色素系を検討した。

1. 之等4品種の果皮色素は各種有機溶媒に対する溶

解性，呈色反応などよりいづれも Anthocyanin 色素であり，Carotinoid 色素は殆んど果色の発現には関係していないことを確認した。

2. ペーパークロマトグラフィー法によって分析した結果，Delaware, Red Millennium では少くとも3種類，Campbell Early では8種類，Muscat Bailey A では7種類の Anthocyanin が果皮中に存在することが認められた。

更に Delaware, Red Millennium では Cyanidin 誘導体が，Campbell Early では Cyanidin 及び Delphinidin 誘導体が，Muscat Bailey A では Paeonidin 及び Malvidin 誘導体が主要 Anthocyanin として識別された。

参 考 文 献

1. BOCKIAN, A. H., RICHARD E. KEPNER and A. DINSMOOR WEBB: *Agr. and Food Chem.* 3 (8), 695-699, 1955.
2. 遠藤徹：植物学雑誌 72, 10-19, 1959.
3. 林孝三：植物色素試験法, 1954.
4. 林孝三・阿部幸類：資源植物彙報 28, 1-11, 1952.
5. 今井貞三：東大農学部大学院業績（未発表）.
6. 岸光夫・雨宮毅：果樹試験研究年報 26, 1953.
7. 佐竹一夫：ペーパークロマトグラフィー, 1955.
8. 土屋長男：葡萄栽培新説, 1956.

Summary

The present paper describes the results of experimental work on the nature of skin pigments of Delaware, Campbell Early, Muscat Bailey A and Red Millennium which are main varieties of table grape vine in Japan.

In regard to the skin pigments, solubility for some organic solvents and specific color reactions of anthocyanin and carotinoid were examined. Results of these qualitative analyses showed that the skin colors of these varieties ranging from red to deep reddish purple are caused by anthocyanin, and carotinoid has scarcely any relation to the development of them.

Then skin pigments extracted by methanolic hydrochloric acid were separated by paper chromatography. Filter papers of Tōyō No. 50 were always employed and a mixture of butanol, hydrochloric acid and water (5 : 1 : 2) and a mixture of butanol, acetic acid and water (4 : 1 : 2) were used as developer for anthocyanin and a mixture of 80% formic acid, hydrochloric acid and water (5 : 1 : 4) was used for both anthocyanin and anthocyanidin.

From this study, it was found that at least three kinds of anthocyanins are present in the skin of Delaware and Red Millennium, eight in Campbell Early and seven in Muscat Bailey A. And also the results indicated that major anthocyanins of Delaware and Red Millennium are cyanidin derivatives, that of Campbell Early are cyanidin and delphinidin derivatives and that of Muscat of Bailey A are paeonidin and malvidin derivatives.