

蕎麦焼酎香気成分の機能性

水光正仁、西山和夫、

榊原陽一（農学部）



要旨

本格焼酎は麴、酵母を用いた並行復発酵により得た醪を単式蒸留することで製造される日本古来の蒸留酒であり、発酵の課程で麴および酵母により生産される様々な代謝産物および原料由来の化合物を複雑に含有している。我々は本格焼酎として蕎麦焼酎の香気成分の網羅的な解析を行い、68種類の多様な化合物をガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析により同定した。さらに、これら68種類の香気成分に関して網羅的に機能性を検討した。機能性評価試験として、2種の抗変異原試験（Ames試験、Ames変法）および抗酸化試験（DPPH消去活性）の試験法により分析した。その結果、蕎麦焼酎をはじめとした本格焼酎の香気成分は抗変異原作用や抗酸化作用などの機能性を持つことが明らかとなった。

1. 緒言

本格焼酎は麴、酵母を用いた並行復発酵により得た醪を単式蒸留することで製造される日本古来の蒸留酒である。これまでは、主に南九州を中心に製造、消費される地方酒であった。しかしながら、近年の本格焼酎ブームで全国的なアルコール飲料として多くのファンを獲得するに至った。この焼酎ブームは、二日酔いしにくい等の消費者の健康志向に上手く乗った形で、従来のアルコール飲料とは異なり、本格焼酎の健康的なイメージが大きく貢献していると考えられる。現在、健康志向の高まりを受け食品の機能性について数多くの報告が見られる。アルコール飲料も例外ではなく、赤ワインのポリフェノールの機能性等様々な報告が見られるようになってきた。しかしながら、本格焼酎に関しては、蒸留酒であるため、圧搾工程で得られるワイン等より含有成分が少ないこと等の理由でその機能性に注目された研究はあまり報告されていない。そこで我々は蕎麦焼酎の揮発性成分を詳細に検討し、これら揮発性成分の抗変異原作用などの機能性を評価することで本格焼酎の機能性の開拓を試みた。

実験方法

I. 焼酎製造

一次仕込みは河内菌白麹 (*Aspergillus kawachii*) を用いた麦麹原料 800g、汲み水 960ml に協会焼酎酵母 2 号 (SH-2) を添加した。二次仕込みは蕎麦グリツ 1600g、汲み水 2880ml とした。発酵条件は一次 25°C、6 日間、二次 30°C、14 日間で行った。醪はロータリーエバポレーターで蒸留し、得られた焼酎を濃縮サンプルとした。以上のように本格焼酎製造は定法で行った。

II. 蕎麦焼酎揮発性成分の同定

アルコール濃度を 10% に希釈した蕎麦焼酎をポーラスポリマー樹脂に通し、ジエチルエーテルで揮発性成分を抽出したものを濃縮サンプルとした。このサンプルを窒素気流下で 500 μ l まで濃縮後 GC-FID (水素炎イオン化検出器)、GC/MS で同定分析した。GC 条件はキャリアガス圧 150kpa、カラム温度を 70°C から 240°C まで 3°C/min で昇温後 34 分間保持した。分離カラムは DB-WAXetr (60m \times 0.32mm i.d.、膜厚 0.25 μ m) を使用した。インジェクション、検出器の温度は 260°C、スプリット比は 10:1 で行った。また、GC/MS はインジェクション部をスプリットレスにした以外は全て同条件で実施した。

III. Ames 法による抗変異原性の検討

サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 株を用いた抗変異原試験を行った。間接変異原物質として Trp-P-1 (酢酸塩) をプレート 1 枚あたり 1.5ng 使用した。DMSO に溶解した試料 (揮発性成分)、ラット肝臓由来 S-9 に補酵素溶液を添加した S-9mix を滅菌小試験管で混合した。試料の終濃度は 1mM とした。ここに、前培養した TA98 菌株懸濁液を加え、37°C、20 分間振とうした。振とう後、小試験管にトップアガーを加え最少グルコース培地に重層した。シャーレは 37°C 48 時間暗所で倒置培養し生じたヒスチジン非要求性復帰変異コロニー数を計数した。抗変異原性 (%) は下式により求めた。陽性対照試験として直接変異原物質である 4-nitroquinoline-1-oxide を用いた場合は、S-9mix の代わりに滅菌水を用いた。また、抗変異原物質のコントロールとして、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) を終濃度 500 μ M で用いた。Trp-P-1 のみ添加した時のプレートコロニー数は 141 \pm 13 コロニーであった。

$$\text{抗変異原性 (\%)} = (1 - (A - B) / (C - B)) \times 100$$

A : 試料と Trp-P-1 添加時のコロニー数

B : 添加物無しのコロニー数 (自然復帰)

C : Trp-P-1 のみ添加時のコロニー数

IV. リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法

測定法は Glatt et al⁹⁾らの方法を改変して行った。まず、活性硫酸である 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を 16.7 μ M になるように Buffer B

(150mM KCl、15mM Na₂SO₄、15mM MgCl₂、10mM Phosphate Buffer、pH7.4) で調製した。次にヒト肝臓由来の dehydroepiandrosterone 硫酸転移酵素 (hDHEAST) の酵素液を 60 μg/ml になるように BufferC (150mM KCl、0.5mg/ml BSA、10mM Phosphate Buffer、pH7.4) で調製した。さらに前培養した TA98 菌株懸濁液を加えた。間接変異原物質として 9-hydroxymethylanthracene¹⁰⁾をプレートあたり 104.1ng 使用した。最後に、終濃度が 1mM になるよう DMSO に溶解した試料 (揮発性成分) を小試験管で混合した。以下、方法 3 と同様に行った。陽性対照試験および抗変異原性 (%) も方法 3 と同様の実施した。9-hydroxymethylanthracene のみ添加した時のプレートのコロニー数は 180±5 コロニーであった。

V. 1、1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性法

35%エタノールに溶解した各試料 2.1ml を 500mM Acetate Buffer (pH5.5) 300 μl、99.5%エタノール 300 μl、0.25mM DPPH エタノール溶液 300 μl とともに試験管に加えた後よく攪拌し、暗所で室温、1 時間反応させて、517nm での吸光度を測定した。試料の終濃度は 1mM とした。試料の代わりに 35%エタノールを対照として、下式のようにして求めた。また陽性対照試験として終濃度 2.5 μM EGCG を用いて行った。

$$\text{DPPH ラジカル消去率 (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A : ブランクの吸光度

B : 試料添加時の吸光度

2. 結果及び考察

本格焼酎由来の揮発性成分

単式蒸留により得られる本格焼酎は Figure 1 に示したように、非常に多様な成分からなりそれらが豊かな味と香りを生み出している。我々は、蕎麦焼酎の揮発性成分の網羅的な分析を行い、Table1 に示したように 68 種類の成分を同定、定量し報告した (参考文献)。その結果、本格焼酎の香気成分は、アルコール類の他に脂肪酸やそのエステル類など非常に多様な化合物が含まれていることが判明した。健康志向の消費者の支持もあって、本格焼酎は体によいと考えられているが、科学的な根拠に乏しく、それらを裏付ける研究報告もあまり知られていない。そこで、我々は蕎麦焼酎より同定した 68 種類の香気成分に関して網羅的にその機能性を検討した。今回注目した機能性は、抗変異原作用と抗酸化作用であり、それぞれ Ames 法およびリコンビナント硫酸転移酵素を用いた抗変異原試験と DPPH ラジカル消去活性法により検討した。

Ames 法による抗変異原性試験は、突然変異原性物質やガン原性物質としての可能性のある物質の第一次スクリーニング法として優れていることから、食品

peak no.	compound name	mg/l	peak no.	compounds name	mg/l
1	isopropyl alcohol*	0.02	35	n-octanol	0.02
2	ethyl alcohol	a)	36	isobutyric acid*	0.45
3	ethyl isobutyrate*	0.01	37	ethyl caprate	0.41
4	allyl formate*	0.01	38	1-nonanal	0.02
5	isobutyl acetate*	0.09	39	isovaleric acid	1.35
6	n-propyl alcohol	1.58	40	diethyl succinate	0.51
7	ethyl butyrate*	0.98	41	methionol	0.48
8	butyl acetate*	0.01	42	valeric acid	0.01
9	isobutyl alcohol	32.70	43	2-ethylbutyric acid*	0.01
10	isoamyl acetate	10.66	44	ethyl phenylacetate	0.05
11	1-butanol	0.62	45	nerol	0.01
12	1-ethoxy-2-propanol*	0.01	46	β -phenethyl acetate	5.77
13	3-methyl-1-butanol(I.A.OH)	551.83	47	caproic acid	0.37
14	ethyl caproate	0.61	48	2-methyl-hexanoic acid*	0.01
15	1-pentanol*	tr	49	benzyl alcohol	0.04
16	3-methyl-3-buten-1-ol*	0.02	50	phenethyl alcohol	103.32
17	3-hydroxy-2-butanone*	0.13	51	ethyl myristate	0.02
18	4-methyl-1-pentanol*	0.01	52	caprylic acid	0.30
19	2-heptanol	0.01	53	1-methyl-4-hydroxybenzen e	0.01
20	3-methyl-2-buten-1-ol*	0.03	54	ethyl cinnamate	0.05
21	3-methyl-1-pentanol	0.05	55	ethyl pentadecanoate	0.01
22	ethyl lactate	tr	56	ethyl palmitate	0.11
23	1-hexanol	0.07	57	capric acid	0.10
24	3-ethoxy-1-propanol*	0.03	58	trans,trans-farnesol	0.04
25	2-ethylhexyl acetate*	0.01	59	ethyl stearate	0.01
26	ethyl caprylate	1.20	60	ethyl oleate	0.12
27	1-octen-3-ol	0.02	61	ethyl linoleate	0.21
28	1-heptanol	0.07	62	ethyl nonadecanoate*	0.01
29	acetic acid	0.10	63	myristic acid	0.01
30	ethylhexanol	0.05	64	dibutyl phthalate	0.01
31	2-nonanol	nd	65	nerolidol(cis- & trans- mixture)	0.09
32	ethyl DL-3-hydroxybutyrate*	0.07	66	palmitic acid	0.03
33	ethyl n-nonanoate*	0.01	67	oleic acid	0.01
34	linalool	0.09	68	bis(2-methoxyethyl)phthala te*	0.02

nd : not detected, a) : Concentrations of ethanol was adjusted to 10% by material method.,
RI : retention index, tr : less than 0.01ppm, *:newly identified

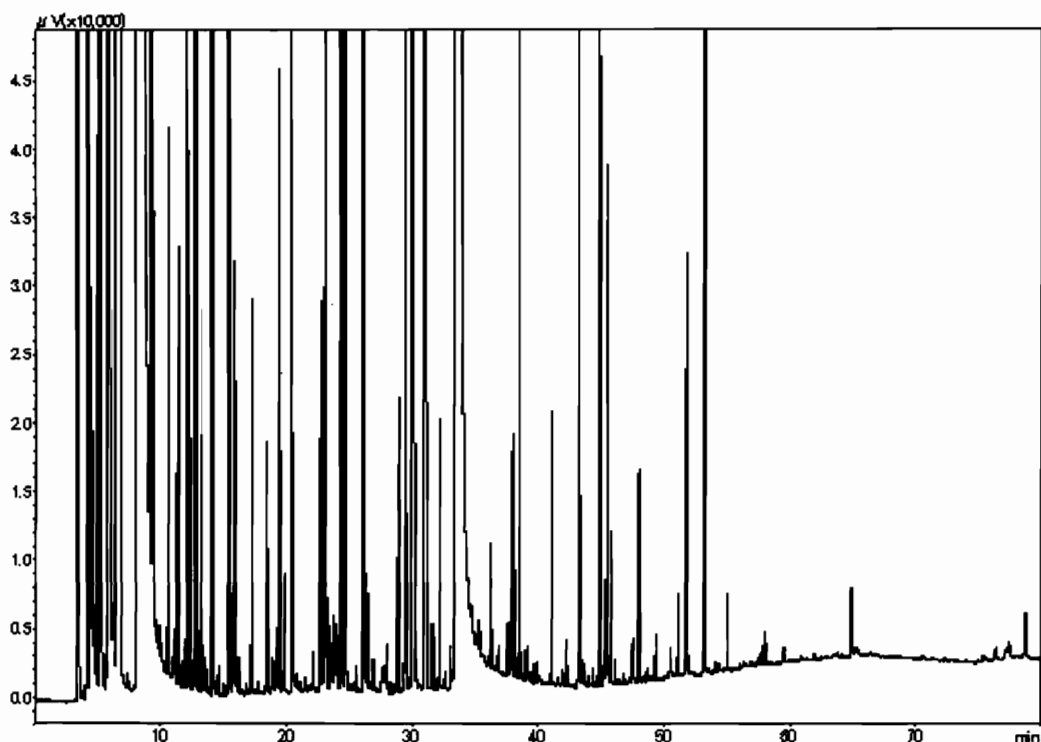


Figure 1 Chromatogram of concentrated Buckwheat Shochu by Solid phase extraction

Table 2 Antimutagenicity of volatile compounds from Buckwheat Shochu by Ames test and modified Ames test using sulfotransferase

No.	Compounds	Inhibition(%)		No.	Compounds	Inhibition(%)	
		A	B			A	B
3	ethyl isobutyrate	n.d.	34.7 ± 3.7	46	β -phenethyl acetate	34.1 ± 6.8	28.1 ± 2.6
4	allyl formate	n.d.	23.6 ± 5.2	47	caproic acid	n.d.	40.1 ± 1.7
5	isobutyl acetate	n.d.	14.0 ± 1.5	48	2-methyl-hexanoic acid	n.d.	28.6 ± 1.8
6	1-propanol	12 ± 4.3	15.8 ± 3.6	49	benzyl alcohol	14.7 ± 4.1	20.2 ± 4.7
10	isoamyl acetate	n.d.	31.0 ± 7.6	50	phenethyl alcohol	n.d.	28.3 ± 3.6
11	1-butanol	n.d.	28.6 ± 0.8	51	ethyl myristate	35.3 ± 3.1	n.d.
13	3-methyl-1-butanol(I.A.OH)	n.d.	39.4 ± 1.1	53	1-methyl-4-hydroxybenzene	30.9 ± 3.5	n.d.
19	2-heptanol	n.d.	30.5 ± 5.8	55	ethyl pentadecanoate	30.6 ± 0.2	n.d.
32	ethyl DL-3-hydroxybutyrate	36.5 ± 5.1	8.1 ± 1.2	60	ethyl oleate	31.9 ± 0.7	2.6 ± 0.8
33	ethyl n-nonanoate	33.3 ± 7.0	n.d.	61	ethyl linoleate	53.7 ± 0.5	n.d.
35	n-octanol	n.d.	25.4 ± 4.1	67	oleic acid	46.1 ± 0.4	n.d.
42	valeric acid	n.d.	20.7 ± 1.5		EGCG*)	76.2 ± 6.2	86.1 ± 3.0

A : Ames test. B : Modified Ames test using sulfotransferase. C : Final concentration of sample was 100 μ M. D : Final concentration of sample was 20 μ M. n.d. : not detected. - : Sample could not be dissolved in DMSO. Value showed means \pm S.D. (N = 3) *) : Final concentration of EGCG was 500 μ M.

科学の分野でも広く実施されている。S-9 を用いた Ames 法では、9 サンプルが 30%以上の抗変異原性を示した(Table 2)。その中で 7 サンプルがエステル化合物であり、さらに 6 サンプルがエチルエステル化合物であった。不飽和脂肪酸およびそのエチルエステル体である no.61/ethyl linoleate ($53.7 \pm 0.5\%$)、no.67/oleic acid ($46.1 \pm 0.4\%$) において 40%以上の抗変異原性が認められた。

リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法では、40%以上の抗変異原性が no.47/caproic acid ($40.1 \pm 1.7\%$) で認められた。また、20%以上の抗変異原性を示すサンプルは、従来の Ames 法で 9 サンプルであるのに対して、硫酸転移酵素を用いた Ames 変法では 14 サンプル確認された(Table 2)。特に no.46/ β -phenethyl acetate ($28.1 \pm 2.6\%$)、no.49/benzyl alcohol ($20.2 \pm 4.7\%$)、no.46/ β -phenylethyl isobutyrate ($37.6 \pm 6.3\%$)、no.50/phenethyl alcohol ($28.3 \pm 3.6\%$) 等のフェニル化合物で抗変異原性が多く認められた。従来の Ames 法では低沸点揮発性成分で活性が認められなかったのに対して、硫酸転移酵素を用いた Ames 変法では 20%以上の抗変異原性が 4 サンプル認められ、no.11/1-butanol ($28.6 \pm 0.8\%$)、no.13/3-methyl-1-butanol ($39.4 \pm 1.1\%$) のアルコール類で高い値を示した。

2 種類の抗変異原性試験でいずれも 20%以上の活性のある試料は no.46/ β -phenethyl acetate のみであった。(略) これは、間接変異原物質を直接変異原物質に代謝活性化する異化代謝経路が、S-9mix の酸化還元反応を利用している Ames 法に対して、硫酸転移酵素による極性の高い物質との硫酸抱合反応を利用した Ames 変法の違いによると推測される。このように 2 種の抗変異原試験を併用することで、反応機構の異なる抗変異原作用を検討することが可能となる。

DPPH ラジカル消去活性法

DPPH ラジカル消去活性法の結果を Table 3 に示した。No.53/1-methyl-4-hydroxybenzene ($74.4 \pm 0.9\%$) で高い抗酸化性が認められたが、フェニル化合物である benzyl alcohol、 β -phenylethylisobutyrate、phenethylalcohol、 β -phenethyl acetate、ethyl cinnamate において活性は見られなかった。アントシアニジンの B 環に水酸基が増えると抗酸化活性も高まることから、芳香環の水酸基すなわちフェノール基の存在が重要であると推測される。1-methyl-4-hydroxybenzene の活性は EGCG ($71.0 \pm 0.0\%$) と同程度であるが、測定に使用した濃度が 1-methyl-4-hydroxybenzene の 1mM に対して EGCG の $2.5 \mu\text{M}$ と 40 倍も高いことから、EGCG の抗酸化性には及ばない結果となった。

1-methyl-4-hydroxybenzene ($30.9 \pm 3.5\%$) は従来の Ames 法においても抗変異原活性が確認されたが、硫酸転移酵素を用いた Ames 変法において活性は認められなかった。また、今回の実験で抗変異原性試験および抗酸化性試験で共に活性のあるサンプルは認められなかった。

**Table 3 DPPH radical scavenging activity of volatile compounds
from Buckwheat Shochu**

No.	Compounds	Radical scavenging activity(%)
41	methionol	3.9 ± 1.3
48	2-methyl-hexanoic acid	3.4 ± 1.5
53	1-methyl-4-hydroxybenzene	74.4 ± 0.9
	EGCG*)	71.0 ± 0.0

n.d. : not detected

Value showed means ± S.D. (N = 3)

*) : Final concentration of EGCG was 2.5 μ M.

おわりに

本格焼酎の機能性成分については、血栓溶解活性の存在が報告されているがそれ以外にはほとんど報告されていない。今回、2通りの抗変異原性試験を実施したところ、従来の Ames 法では高沸点揮発性成分で多く活性が認められ、硫酸転位酵素を用いた Ames 変法では低沸点揮発性成分で多く活性が認められるという結果になった。また、甲類焼酎と本格焼酎の抗酸化性については僅かではあるが、本格焼酎の活性が高いことから本格焼酎は抗酸化活性などの機能性を有する可能性が考えられた（データ未掲載）。これらの結果より、本格焼酎は抗変異原作用や抗酸化作用をもつ多様な香気成分が含まれ、これらの作用が組み合わせることで相乗的に高い機能性を示す可能性が考えられた。現在、これらの香気成分の構造と機能との関係について詳細に検討を進めている。また、蕎麦以外に甘藷、麦、米などを原料とした本格焼酎に関しても分析を進め広く本格焼酎に秘められた機能性を明らかにしていきたいと考えている。