亜臨界・超臨界水による酒粕の処理および 可溶成分の生理機能

脇田義久[§]・原田 修・桑田 実・藤村 庄*・辻 啓介**

(兵庫県立工業技術センター・*近畿高エネルギー加工技術研究所・**兵庫県立大学環境人間学部)

平成 16 年 4 月 23 日受理

Sub- and Supercritical Water Treatment of Sake (Japanese Rice Wine) Cake and Physiological Functions of Soluble Components

Yoshihisa WAKITA, Osamu HARADA, Minoru KUWATA, Taira FUJIMURA* and Keisuke TSUJI**

(Hyogo Prefectural Institute of Technology, 3-1-12 Yukihiro, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan)

*The Advanced Materials Processing Institute Kinki Japan, 7-1-8 Doi-cho, Amagasaki 660-0087, Japan

**School of Humanities for Environmental Policy and Technology,

University of Hyogo, 1-1-12 Shinzaiki-Honcho, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan)

[§]連絡先 / Corresponding Author)

Sake (Japanese Rice Wine) cake was hydrolyzed in sub- (290°C or 320°C, 22 MPa) and supercritical (375°C, 22 MPa) water using a continuous flow-type reactor. The water-soluble component of sake cake increased in sub- and supercritical water during a short reaction time. Water-soluble components of sake cake and hydrolyzed sake cake were assayed for the inhibitory activities of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and the DPPH radical scavenging activities. It was observed that the ACE inhibitory activities and the DPPH radical scavenging activities of sub- and supercritical water treated samples were relatively strong compared with those of untreated samples. The activity of the supercritical water treated sample to inhibit 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethyl valeronitrile)-induced oxidation of human low-density lipoproteins (LDL) *in vitro* was investigated. An antioxidant activity for LDL was observed with the supercritical water treated sample.

Key words : 酒粕, 亜臨界・超臨界水処理, 生理活性

緒 言

食品副産物を有効利用することは、環境問題や収益の面において重要な問題である。清酒製造過程で派生する酒粕は飼料や肥料、あるいは粕漬け、甘酒の原料として用いられている。しかし、収益面を考えた場合、生活習慣病予防に関する生理活性等の新たな付加価値の付与による新規用途開発が求められている¹⁾。

近年、食生活の欧米化により、高血圧、高脂血症等の生活習慣病が問題となっており、これらの生活習慣病に罹っている場合は動脈硬化や脳梗塞を引き起こす可能性が高い²⁾。生活習慣病を予防、軽減する食品は機能性食品あるいは特定保健用食品として新しい市場を築いている。アンジオテンシン I 変換酵素 (Angiotensin I-converting enzyme : ACE) は不活性型のアンジオテンシン I (DRVYIHPFHL) に作用し、

C末端のジペプチド (HL) を切断することにより、活性型のアンジオテンシン II に変換する酵素であり、本酵素を阻害する物質は血圧上昇を抑制する効果が期待されている³⁾。また、動脈硬化では低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein cholesterol: LDL) の酸化が病気の初期段階に起こるが、抗酸化物質を含む食品を摂取することにより LDL の酸化を抑制し、動脈硬化の生成が抑えられると考えられている⁴⁾。

これまでに、食品副産物を含む低利用資源のタンパク質加水分解物の有する様々な生理活性が報告されている。例えば、牛乳カゼイン⁵⁾、ウシ皮膚ゼラチン⁶⁾、イワシ魚肉⁷⁾の分解物から ACE を阻害するペプチドが分離されており、一部は特定保健用食品に利用されている。また、タンパク質と糖の加熱処理によるアミノカルボニル (メイラード) 反応物中に ACE 阻害活性⁸⁾や抗酸化活性⁹⁾を有するものがあることが明らかになっており、メイラード反応物の生理機能についても関心が高まっている。

著者らはこれまで亜臨界および超臨界水を利用した食品副産物の加水分解と機能性に関する研究を行ってきた^{10,11)}。亜臨界水とは水の臨界点 (374°C, 22 MPa) 以下の、超臨界水は臨界点以上の高温高压状態の水を指す。この条件下では加水分解反応が触媒なしで短時間に起こることが知られている¹²⁾。また、高温処理であるため、タンパク質と炭水化物が含まれる食品副産物では加水分解と同時にメイラード反応も起こると考えられる。酒粕に亜臨界、超臨界水処理を行うことを考えた場合、麴の酵素で分解されない米由来タンパク質 PB 1、および酒粕中の酵母が破碎されることにより溶出したタンパク質がペプチドにまで分解することやタンパク質、ペプチドと糖の間でメイラード反応が起こることにより、ACE 阻害活性や抗酸化活性等の生理機能が付与されることが期待される。本研究では、酒粕を亜臨界および超臨界水処理し、その可溶性画分について ACE 阻害活性や抗酸化活性が強化できるかを検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

酒粕は大関株式会社から提供された。ACE (ウサギ肺由来) は SIGMA 社より、Hippuryl-His-Leu (HHL) は BACHEM 社より、Micro BCA Protein

Assay Kit は PIERCE 社より、2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4-dimethyl valeronitrile) (V 70), 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) およびその他の試薬は全て和光純薬工業 (株) よりそれぞれ購入した。

2. 酒粕の亜臨界・超臨界水処理

酒粕に蒸留水を加え、ミキサー (東芝ジュサーミキサー JC-V 70) で 5 分間攪拌して、10 wt% (酒粕の乾燥重量%) の酒粕スラリーを調製した。試料スラリーを高圧雰囲気下へ送液可能なスラリーポンプ、滞留時間が短い反応管、および未分解物等の固形物が含まれた溶液でも排出可能なコントロールバルブを備えた連続式の亜臨界・超臨界水処理装置 (Fig. 1) を用い、酒粕に亜臨界水あるいは超臨界水処理を施した。処理条件を Table 1 に示す。酒粕スラリーは予熱水と混合されて、最終的に 2.6 wt% になる。処理液は 14,000 rpm (日立高速冷却遠心機 CE 21 E, ロータ R 14 A 3) で 15 分間遠心を行い、上清を凍結乾燥した後、以後の試験に供試した。亜臨界および超臨界水処理による可溶成分量の変化は、各反応温度での処理液中の固形分と可溶成分の重量から算出した。加熱によるメイラード反応物の生成を把握するため、可溶性

Fig. 1 Schematic diagram of a continuous flow-type reactor: ① sake cake slurry, ② water, ③ pump for slurry, ④ pump for water, ⑤ electric furnace, ⑥ damper, ⑦ reactor (static mixer), ⑧ cooling water, ⑨ control valve, ⑩ actuator, ⑪ effluent.

Table 1 Conditions of sub- and supercritical water treatment

Run. No.	Reaction temp. (°C)	Density (ρ) (g/cm ³)	Residence time (τ) (sec)
1	290	0.7566	1.56
2	320	0.6972	1.44
3	375	0.2056	0.42

Volume of reaction tube (V), 3.1 ml

Total flow rate (F), 90 ml/min (Slurry pump ; 70 ml/3 min, Water pump ; 200 ml/3 min)

Pressure, 22 MPa

Residence time : $\tau = V/\rho/F$

分を 4 mg/ml になるように水で調整した後、メイラード反応物生成の指標となる 400~800 nm の吸光度を測定 (紫外可視分光光度計 V-550, 日本分光) した。また、可溶成分のタンパク質 (ペプチド, アミノ酸を含む) 含有量を推定するため、窒素量を Fisons Instruments (MA, USA) 社製元素分析装置 (Model EA-1108) を用いて測定した。

3. 可溶性画分の GPC 解析

可溶成分中のタンパク質の分子量分布はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により測定した。Waters 社 (MA, USA) 製 717 plus 型オートサンプラー, 600 型ポンプ, 2487 型 UV 検出器で構成される液体クロマトグラム装置にファルマシア製 Superdex 200 HR 10/30 (GPC 用カラム) を接続し, 0.2 N リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を 0.75 ml/min で送液して 210 nm の UV で検出した。

4. ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性試験は, HHL を基質に ACE により酵素反応させ, 生成した馬尿酸を定量することにより測定した¹³⁾。ACE を含む 125 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) を 50 μ l と試料 (0.5 M NaCl を含む上記緩衝液にけん濁したサンプル) 60 μ l を試験管に取り, 37°C で 3 分間予備加熱した後, 6.5 mM の HHL 溶液を 300 μ l 添加し, 1 時間酵素反応させた。1 M HCl を 200 μ l 加えて酵素反応を停止し, 酢酸エチルを 0.8 ml 加え, 遊離した馬尿酸を抽出した。抽出液 0.5 ml を遠心エバポレーターで蒸発乾固した後, それを蒸留水 0.5 ml に溶解して 228 nm で吸光度を測定し, ACE 活性に対する 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

5. DPPH ラジカル補足活性の測定

蒸留水で 20 mg/ml になるように調整した各処理物のラジカル補足活性を測定した。100 μ M の DPPH エタノール溶液 1 ml に各サンプルを 10 μ l 加え, 30 分間室温で反応させた後, 517 nm の吸光度を測定した。コントロールはサンプルを添加しないものとし, 抗酸化力 (%) は ((コントロール-サンプル)/コントロール) $\times$ 100 で求めた。抗酸化力の最も強いサンプルについては逆相カラム (μ Bondasphere C18, 19.0 $\times$ 250 mm, Waters 社) を用いた高速液体クロマトグラム (HPLC) 分取に供した。HPLC 分取には Waters 社製 717 plus 型オートサンプラー, 600 型ポンプ, 2487 型 UV 検出器で構成される液体クロマトグラム装置を用いて行った。20 mg/ml に調整したサンプル 100 μ l を注入し, 0.1% TFA 水溶液 (A) 系および 0.1% TFA 含有アセトニトリル (B) 系の移動相を流速流速 10 ml/min の二液グラジエント (0 $\rightarrow$ 1 分 : 0% B, 1 $\rightarrow$ 11 分 : 0 $\rightarrow$ 80% B, 11 $\rightarrow$ 12 分 : 80% B, 12 $\rightarrow$ 13 分 : 80 $\rightarrow$ 0% B) で送液し, 210 nm の UV 吸収で検出した。30 秒毎に試験管に分取した後, 遠心エバポレーターを用いて溶媒を除去した。そこに, 2 ml の 100 μ M DPPH を加え室温で 30 分間静置後, 517 nm の吸光度を測定し, 抗酸化力 (%) を求めた。

6. LDL の抗酸化活性

最も DPPH ラジカル補足活性の強いサンプルについて, LDL の抗酸化活性実験を行った。実験方法は既報¹⁴⁾に準じた。健康な人から採取した新鮮な血液を 3,000 rpm (多本架冷却遠心機 EX-125, ロータ 3815-10 P, トミー精工), 10 分間遠心することによ

り血漿を得た。KBr を用いて比重を 1.24 g/ml にした血漿を超遠心管に移し、上から PBS (Phosphate-buffered saline: 1.9 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.2) を重層した。100,000 rpm (日立分離用小形超遠心機 CS 150 GX, ロータ S-140 NT), 60 分間遠心することにより LDL 画分を採取した。LDL の蛋白量を Micro BCA Assay Kit を用いた BCA 法により測定し、その結果から 70 µg/ml となるように PBS を用いて LDL を希釈した。その 1 ml に対し 20 mg/ml となるように調整した処理サンプル溶液を 2 µl 添加した。その後 100 mM の V 70 溶液を 200 µM となるように加えて 37°C でインキュベートし、生成する共役ジエンを 234 nm で 3~5 分おきに測定した。コントロールにはサンプルを添加しないものを用いた。

実験結果

1. 亜臨界水・超臨界水処理による酒粕の可溶化

10wt% の酒粕スラリーを亜臨界・超臨界水処理した。いずれの反応温度でも未分解物が詰まることなく大気圧下へ反応液を排出することができた。可溶成分量と反応温度の関係を Fig. 2 に示す。反応温度が高くなるに従い可溶成分率は高くなり、超臨界水である反応温度 375°C では可溶成分率が 70% 以上になった。反応時間が 1 秒前後という短時間で触媒を加えること

Fig. 2 UV and VIS spectra of water soluble components of untreated and hydrolyzed sake cake

The spectrum (400~800 nm) of 4 mg/ml solution of the water soluble component was measured

なく、可溶成分量を増加させることができた。処理液を固液分離し、可溶性画分を得た後、400~800 nm での吸光度を測定したところ、未処理サンプルに比べ、処理サンプルでは検討した全ての波長域で吸光度が上昇した (Fig. 2)。窒素含有量は未処理サンプルで 5.924%, 290°C サンプルで 7.813%, 320°C サンプルで 8.918%, 375°C サンプルで 10.073% であった。

2. GPC 解析

可溶化成分のタンパク質の分子量分布を GPC により測定したところ、ペプチドと考えられる低分子領域にピークが検出された (Fig. 3)。

3. ACE 阻害活性

未処理酒粕および酒粕処理物の ACE 阻害活性 (IC₅₀) を Table 2 に示した。未処理の酒粕では IC₅₀ が 41.8 mg/ml であったのに対し、超臨界水処理である 375°C 処理では 4.1 mg/ml と未処理酒粕に比べ約 10 倍強い ACE 阻害活性を示した。

4. DPPH ラジカル補足活性

未処理ではラジカル補足活性が 1.0% とほとんど活性が認められなかったのに対し、処理サンプルでは活性が顕著であった (Table 2)。最も活性の強かった

Fig. 3 GPC curves of the water soluble components of untreated and hydrolyzed sake cake

Column, Pharmacia Superdex 200 HR 10/30; eluent, 200 mM sodium phosphate pH 6.8; flow rate, 0.75 ml/min; detector, UV (210 nm)

375°C処理物について、逆相カラムにより分画し、各画分についてラジカル補足活性を調べたところ、幅広い画分についてラジカル補足活性が確認された (Fig. 4)。

5. LDL の抗酸化能

今回最も抗酸化活性の強かった 375°C処理物について LDL の抗酸化試験を行ったところ、コントロールでは実験開始後約 60 分から酸化が開始されたのに対し、375°C処理物を添加した場合では酸化が抑制された (Fig. 5)。

考 察

亜臨界および超臨界水処理は触媒無しに加水分解反応が瞬時に起きることが知られている¹²⁾。今回、食品副産物のようなバイオマスの処理に適した連続式の処

理装置を用いて、酒粕に亜臨界あるいは超臨界水処理を施したところ、処理温度が高くなるにつれ、可溶成分量が上昇した。このように、酒粕においても、亜臨界、超臨界水を利用すれば水だけで加水分解が顕著に起こることが確認された。

可溶成分のタンパク質含有量を推定するために窒素分析を行ったところ、窒素分が未処理時に比べて処理温度依存的に上昇していた。このことから、酒粕に亜臨界および超臨界水処理することにより、米や酵母由来の不溶性タンパク質が可溶化したと考えられる。可溶化成分のタンパク質分子量分布を GPC により測定したところ、ペプチドと考えられる低分子領域にピークが検出され、可溶化したタンパク質の多くは瞬時にペプチド、アミノ酸にまで分解されることが示唆された。また、酒粕に含まれている炭水化物も同時に分解

Table 2 Water soluble components, IC_{50s} for ACE, and DPPH radical scavenging activities of sake cake and sub- and supercritical water treated sake cake

	untreated	290°C	320°C	375°C
Water soluble components (wt%)	36.2	46.9	69.6	73.6
IC ₅₀ for ACE (mg/ml)	41.8	5.9	4.5	4.1
DPPH radical scavenging activity (%)	1.0	20.8	33.1	64.1

Fig. 4 Chromatogram of the water soluble component of supercritical water treated sake cake and DPPH radical scavenging activities

The water soluble component of supercritical water treated sake cake was separated by HPLC on reversed-phase column (Waters μ Bondasphere C18 19.0×250 mm) and fractions at every 30 seconds were collected. The solvent of each fraction was removed by vacuum evaporation. The content was dissolved by 2 ml of 100 μ M DPPH

Fig. 5 Antioxidant activity of water soluble component of supercritical water treated sake cake for 2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4-dimethyl valeronitrile)-induced oxidation of human LDL

LDL (70 μ g protein/ml) was incubated with V-70 at 37°C in the presence of samples. $\blacktriangle$: Control, $\bigcirc$: 0.4 mg/ml Water soluble component of supercritical water treated sake cake

されて糖やオリゴ糖が生成していると思われる。

ここで、得られた可溶成分は処理温度が高くなるに従い褐色化していること、400~800 nm での吸光度が未処理サンプルに比べ上昇していることから、加水分解反応と同時に生成した糖とアミノ酸やペプチドによるメイラード反応が起こっていると考えられる。

ACE 阻害活性を検討したところ、未処理サンプルでは IC₅₀ が 41.8 mg/ml であったのに対し、処理サンプルでは処理温度依存的に IC₅₀ が減少しており、超臨界水処理である 375°C 処理では 4.1 mg/ml と約 10 倍強い ACE 阻害活性が確認された。酒粕を亜臨界あるいは超臨界水処理することにより ACE 阻害活性が上昇した。この理由として、酒粕中に含まれるタンパク質が加水分解により低分子化、可溶化し、ACE 阻害活性を有するペプチドが生成し、その結果 ACE 阻害活性が上昇したこと、さらに、加水分解反応と同時に引き起こるメイラード反応によりメラノイジンが生成し、それにより ACE 阻害活性が上昇したことが考えられる。

DPPH のラジカル補足活性を検討したところ、処理時サンプルについて顕著なラジカル補足活性が認め

られた。また、375°C 処理サンプルを逆相カラムにより分離し、各画分についてラジカル補足活性を調べた。この結果、幅広い画分についてラジカル補足活性が確認され、ラジカル補足活性を示す物質は単一成分でなく、多成分が関わっていることが示された。これまでメイラード反応産物であるメラノイジンにはラジカル補足活性のあることが報告されている⁹⁾。上述したように、メイラード反応が亜臨界、超臨界水処理時に起こることを観察した。このことからラジカル補足活性をもたらす物質はメイラード反応産物である可能性が高いことが示唆される。また、可溶成分の中には十数種類のアミノ酸、および分子量の異なるペプチドが含まれていることから数多くの構造の異なるメラノイジンが含まれていると思われる、このことは HPLC 画分に幅広くラジカル補足活性が認められたことを指示すると考えられる。

メイラード反応物においては、DPPH のラジカル補足活性と同様に LDL の抗酸化活性についてもこれまでに報告がなされている⁹⁾。今回、DPPH ラジカル補足活性の最も強かった 375°C 処理サンプルについて LDL の酸化開始剤に V 70 を用いた抗酸化試験を行ったところ、コントロールでは実験開始約 60 分から酸化が開始したのに対し、サンプルを添加した場合は測定時間内で酸化が認められなかった。このことから、動脈硬化の予防あるいは進展防止に酒粕処理物が効果を発揮することが期待される。

本研究では、酒粕を亜臨界あるいは超臨界水処理することにより加水分解し、可溶成分を増加させることができた。通常、タンパク質や炭水化物を加水分解するためには酵素や酸、アルカリを用いる必要があるが、本法では水のみで加水分解を行える利点がある。さらに本研究で用いた連続式の亜臨界・超臨界水処理装置は酒粕を連続的に処理できるため、バッチ処理で利用される大きな反応容器を必要とせず、コンパクトで操作が非常に簡便である利点もある。得られた可溶成分中には *in vitro* での ACE 阻害活性や抗酸化活性が確認され、いずれも未処理時に比べると活性が顕著に上昇していた。また、可溶成分には上記の生理活性に加え、アミノ酸や酵母由来の種々の成分が含まれている可能性があるため、調味料等への利用が期待される。このように酒粕に亜臨界、超臨界水処理を施すことは、酒粕の新規用途開発を考える上で有効な手段で

あると考えられる。

要 約

酒粕を亜臨界水処理（温度 290℃、320℃；圧力 22 MPa）および超臨界水（温度 375℃；圧力 22 MPa）し、得られた可溶性画分について生理機能を検討した。亜臨界、超臨界水処理により酒粕の可溶成分が増加し、その中でも超臨界水処理で最も可溶化率が高く、70%以上が可溶化した。処理物と未処理酒粕の可溶性画分の ACE 阻害活性と DPPH ラジカル補足活性を比較したところ、両者とも処理温度が高くなるに従い活性が強くなった。最もラジカル補足能が強かった 375℃処理サンプルについて酸化剤に V 70 を用いた LDL の抗酸化試験を行ったところ、コントロールでは実験開始約 60 分から酸化が開始したのに対し、サンプル添加した場合では酸化が認められなかった。

謝 辞

LDL の抗酸化試験を遂行するにあたり、貴重なご意見を賜りましたヤエガキ醸酵技研（株）の渡辺敏郎博士に深謝いたします。なお、本研究は平成 15 年度コンソーシアム事業（醸酵食品副産物からの機能性物質生産技術の開発）の委託を受けて実施したものである。ここに記して、近畿経済産業局ならびに（財）新産業創造研究機構（NIRO）に感謝いたします。

文 献

- 1) 芦田優子：醸造論文集，**54**，1-10（1999）
- 2) 上島弘嗣：日循協誌，**31**，231-237（1997）
- 3) M. A. ONDETTI and D. W. CUSHMAN：Ann.

- Rev. Biochem., **51**, 283-308（1982）
- 4) K. F. GAY：Bibllthca. Nutr. Dieta., **37**，53-91（1986）
- 5) S. MARUYAMA, K. NAKAGAMI, N. TOMIZUKA and H. SUZUKI：Agric. Biol. Chem., **49**，1405-1409（1985）
- 6) S. KIM, H. BYUN, P. PARK and S. FEREDON：J. Agric. Food Chem., **49**，2992-2997（2001）
- 7) T. MATSUI, H. MATSUFUJI, E. SEKI, K. OSAJIMA, M. NAKASHIMA and Y. OSAJIMA：Biosci. Biotech. Biochem., **57**，922-925（1993）
- 8) 岡本（貝沼）章子，松本英子，河村幸雄，小泉幸道，柳田藤治：醸協，**96**，199-206（2001）
- 9) R. DITTRICH, F. EL-MASSRY, K. KUNZ, F. RINALDI, C. C. PEICH, M. W. BECKMANN and M. PISCHETSRIEDER：J. Agric. Food Chem., **51**(13)，3900-3904（2003）
- 10) 原田 修，脇田義久，吉田和利，大橋智子，桑田 実，藤村 庄：食科工，**51**(3)，149-154（2004）
- 11) Y. WAKITA, O. HARADA, M. KUWATA, T. FUJIMURA, T. YAMADA, M. SUZUKI and K. TSUJI：Food Sci. Tech. Res., **10**，164-167（2004）
- 12) N. AKIYA and S. PHILLIP：Chem. Rev., **102**，2725-2750（2002）
- 13) D. W. CUSHMAN and H. S. CHEUNG：Biochem. Pharmacol., **20**，1637-1648（1971）
- 14) 近藤和雄，平野玲子：食品機能研究法（篠原和毅，鈴木建夫，上野川修一編），248-251，光琳，東京（2000）