本みりんのラジカル消去活性と食品での抗酸化性

石崎俊行[※]・高倉 裕・吉浜義雄・平松順一・高橋康次郎・猪飼勝重^{*}

(宝酒造株式会社 ^{*}タカラバイオ株式会社)

平成 15 年 3 月 7 日受理

Radical Scavenging Activity of *Hon-mirin* and its Antioxidative Activity in a Food.

Toshiyuki ISHIZAKI, Yutaka TAKAKURA, Yoshio YOSHIHAMA,

Junichi HIRAMATSU, Kojiro TAKAHASHI, Katsushige IKAI^{*}

(Takara Shuzo Co., Ltd., Shijo-karasuma Higashiiru, Shimogyo-ku, Kyoto-shi 600-8688, Japan

^{*}Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu-shi, 520-2193, Japan)

Antioxidative activities of *hon-mirin* (traditional alcoholic seasoning) were evaluated by a radical-scavenging activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The activity of *hon-mirin* was superior to *mirin*-like seasoning (seasoning mainly made of starch syrup). The main radical-scavenging fraction was characterized as nitrogen containing compounds with a low molecular weight (< 1000 da). It was suggested that the active compounds are the early Maillard reaction products.

The antioxidative activity of *hon-mirin* was superior to *mirin*-like seasoning also in a food, *mirin-boshi*, which is dried sardine seasoned with *hon-mirin* or *mirin*-like seasoning.

Key words : ラジカル消去活性, 抗酸化性, 本みりん

緒 言

本みりんは、麴による多様な酵素反応や成分間の化学反応による甘味を主体とする多彩な呈味成分あるいはフレーバー及びそれらの前駆体を含んでいる。一方、麴を利用した食品は抗酸化性、抗変異原性などの様々な生理的機能を持つことが知られている¹⁾。特に醤油や味噌などの抗酸化性は詳細に検討され、メラノイジンや原料由来のフラボノイド等が活性物質であるとされている^{2,3)}。本みりんにおいてはその調理効果はよく調べられているが⁴⁾、それ以外の機能に関しては、リノール酸の酸化抑制を指標にしたモデル系において抗酸化性が示されている⁵⁾程度で十分には検討されていない。また、各種酒類のラジカル消去活性が石渡ら⁶⁾により詳細に調べられているが、本みりんについ

ては調べられていない。そこで、今回われわれは本みりんの抗酸化作用に着目して検討を行った。抗酸化性の評価方法には、酸化生成物に注目し過酸化物質価 (POV)、カルボニル価 (COV)、チオバルビツール酸価 (TBA) を測定する方法などがあるが、POV が最もよく用いられる。また、酸化と関連の深いラジカルに対する消去活性を測定し評価する方法もあり⁷⁾ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH と略) は、安定なラジカルモデル物質として最もよく使用されている⁸⁾。筆者らは本みりんの抗酸化性について DPPH ラジカル消去活性を指標として検討し、類似調味料であるみりん風調味料と比較して著しく高いラジカル消去活性を見出したのでその活性について検討した。一方、食品中での本みりんの抗酸化性に関しては、実際の食品中での効果を確認することが重要である。そこ

[※]現在の所属 宝酒造株式会社 技術・供給本部 SCM グループ 分析センター

で、本みりんを主要な調味料とするイワシのみりん干しにおいて、本みりんの抗酸化作用をPOVの測定によって評価した。

実験方法

1. 試薬

試薬類は特級試薬を用いた。

2. DPPH ラジカル消去活性の測定

定法を若干改変してDPPHラジカル消去活性を測定した⁹⁾。ただし、みりんのラジカル消去反応は、室温においては通常用いられる20分では完全には終了しない傾向があり、Kitagakiら¹⁰⁾が清酒において検討しているのと同様に、反応温度を50°Cとした。即ち、適当に希釈したサンプル800 μ l、0.5 M Tris緩衝液(pH 7.4) 200 μ l (最終濃度0.05 M) 及び500 μ M DPPH エタノール溶液1 mlを混合し、遮光した50°Cの恒温槽中で20分間反応させた後、517 nmの吸光度を測定した。本みりんにおいてもこの条件で反応後の吸光度はほぼ一定になっていた。サンプルの代わりに水を加えた対照の吸光度とから、以下の式によりラジカル消去率を求めた。さらにサンプル濃度とラジカル消去率をプロットしたグラフより、ラジカル消去率が50%となるときのサンプルの濃度、即ちIC₅₀を求め、ビタミンEの安定な同族体であるTroloxのIC₅₀と比較し、サンプル100 mlあたりのラジカル消去活性をTrolox 当量として示した。測定はすべて2回以上行い平均値を求めた。

ラジカル消去率 (%)

$$= ([\text{対照の OD}_{517}] - [\text{サンプルの OD}_{517}]) / [\text{対照の OD}_{517}] \times 100$$

3. 本みりんのラジカル消去活性成分の分画

ゲルろ過液体クロマトグラフィーにより抗酸化成分の分子量分布を測定し、さらにイオン交換液体クロマトグラフィーにより分画を試みた。

ゲルろ過は、内径1.6 cmのガラスカラムにトヨパール HW-40 S を約60 ml 充填したものをを用い、移動相には0.05 M Tris緩衝液(pH 7.4) を約0.5 ml/minの流速で流した。カラム分画後フラクションコレクターにより2.5 ml/tube で分取した。

本カラムでのブルーデキストランによって求めた排除体積(V₀)は約21 mlであった。また、低分子ペプチド標品(KVLAGM=560 da) 及びインスリン

(5800 da)について溶出体積を測定した結果、それぞれ40 ml 及び27 mlであった。各画分は希釈せず等量の500 μ M DPPH エタノール溶液と混合しラジカル消去率を測定した。移動相をブランクとした。

本みりんの抗酸化成分のバッチ法による分画は次のように行った¹¹⁾。すなわち本みりん1000 mlをキレート樹脂(ダイヤイオンCR-11 (H⁺型)、三菱化成) 50 mlをつめたガラスカラムに通液し、吸着画分を500 mlの1 N HClで溶出した(金属画分M)。この通液をさらに陽イオン交換樹脂(IR-120 B(H⁺型)、アンバーライト) 100 mlを詰めたカラムに通液し、吸着画分を1000 mlの2 N NH₄OHで溶出した(窒素画分R)。この通液をさらに陰イオン交換樹脂(IR-45 (OH⁻型)、アンバーライト) 100 mlを詰めたカラムに通液し、吸着画分を1000 mlの2 N NH₄OHで溶出した(酸画分A)。以上の溶出画分はいずれも水酸化ナトリウムまたは塩酸の水溶液によりpHを元の本みりんと同じ6.0とした後減圧濃縮し、それぞれ100 ml (14%エタノール) に調製した。陰イオン交換樹脂の通液(中性画分N)は多量の糖を含むためpH調整後の濃縮は700 mlまでとした。

4. 本みりんの試醸及び保存試験

掛け米は市販の糯米(羽二重もち)、麴米は粳米(日本晴)をそれぞれ90%精白したものをを用いて、定法に従い本みりんを製造した。麴は蒸した粳米と市販の種麴を用いて作製した。本みりんの試醸は掛け米1940 g、麴米270 g、67.5% (V/V) エタノール0.71 及び水0.561を混合し30°Cで27日間糖化・熟成を行った。糖化・熟成後は得られたもろみを布袋に入れ、小型圧搾機(徳島精工株式会社)で圧搾し上槽液を得た。得られた上槽液はさらにガラス繊維フィルター(GA-100, ポアサイズ1 μ m, アドバンテック)でろ過し清澄化後、貯蔵・熟成試験に供した。

貯蔵・熟成試験は本みりんをガラス瓶に詰め密栓して15°C、25°C及び30°Cで暗所において6ヶ月保存した。

5. みりん干しの作製

みりん干しは笠原らの方法¹²⁾に従って作製した。即ち、新鮮なマイワシから頭部、内臓、背骨を除去して、約20時間、冷蔵庫内で調味液に浸漬した後、25°C~30°Cで、重量で生の状態の約60%となるまで約24時間送風乾燥した。調味液は、本みりんまたは

みりん風調味料を15%食塩水と等量（V：V）混合したものを魚の生重量の3倍～4倍量使用した。みりん干しはナイロン袋にいれ密閉せずに冷蔵保存した。

6. 過酸化価値（POV）の測定

POVの測定はTakagiらの方法¹³⁾を若干改変して行った。即ち、みりん干しの腹部を帯状に約2gサンプリングし、ハサミで細切したものに1.5mlの水、5mlのメタノール（0.04%ブチルヒドロキシアニソール含有）、2.5mlのクロロホルムを加え、ホモジナイザー（SMT製HF93）を用いて8000回転で2分間磨砕した。磨砕物に2.5mlの水、2.5mlのクロロホルム、及び10mlのヘキサンを順に加え混合したのち、遠心処理（2000rpm、5分）した。上層から適量の試料を2つ採取し、一方は試験管に取り油量の測定に供し、一方は25ml容のメスフラスコに取りPOVの測定に供した。油量の測定は窒素を吹き付けて溶媒を飛ばし残った油の重量を秤量した。POVの測定は採取した上層にサンプルとの合計が5mlとなるようにクロロホルムを加え、さらに10ml氷酢酸及び1mlの50%ヨウ化カリウム水溶液を加えて速やかに気相を窒素置換してから密封し、5分間暗所に静置した。静置後2%酢酸カドミウム水溶液で25mlまでフィルアップし、40℃の水浴に1分間つけ2層に分離した後

の上層をとり、410nmの吸光度を測定した。サンプルを加えない対照についても同様に測定を行い、以下の式によりPOVを算出した。測定は3回以上行いt-検定により有意差を検定した。

POV (meq/kg) =

$$\{([\text{サンプルの OD}_{410}] - [\text{対照の OD}_{410}]) \times 60.14 + 0.69\} \div (0.008 \times [\text{油重 (mg)}])$$

実験結果と考察

1. 本みりん及びそのほかの食品等のDPPHラジカル消去活性

今回DPPHラジカル消去活性の測定は反応温度を50℃としたため、この温度で本みりん及びみりん風調味料のラジカル消去活性は共に室温より高まった。一方、対照として用いたTroloxではIC₅₀が室温では75.8μMに対して50℃で79.0μMとラジカル消去活性に大きな変化はなく、DPPHとの反応における定量的関係は変わらず、反応速度が大きくなったものと考えられた。この条件における代表的な本みりん及びみりん風調味料の測定結果をFig. 1に示した。本みりんA及び麴米にも糯米を用いた純もち米タイプの本みりんBのラジカル消去活性はTrolox当量として118μmol/100ml及び184μmol/100mlで、みりん

Fig. 1 Radical-scavenging activities of *hon-mirin* and *mirin*-like seasoning

The radical-scavenging activity was plotted against the concentration of the seasoning.

Table 1 Radical-scavenging activities of fermented foods, *hon-mirin* and *mirin*-like seasoning

	IC 50 (%)	Trolox equivalence ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$)
Vinegar (Rice vinegar)	25.1	31
Sake E (<i>Hon-Jozo</i>)	33.8	23
Sake F (<i>Jun-mai</i>)	18.3	43
<i>Mirin</i> -like seasoning C	30.5	26
<i>Mirin</i> -like seasoning D	43.3	18
<i>Hon-mirin</i> A (<i>Issyu</i>)	6.7	118
<i>Hon-mirin</i> G (<i>Issyu</i>)	14.3	55
<i>Hon-mirin</i> H (<i>Issyu</i>)	10.0	79
<i>Hon-mirin</i> I (<i>Issyu</i>)	10.9	72
<i>Hon-mirin</i> B (<i>Issyu, Jun-mai</i>)	4.3	184
<i>Hon-mirin</i> J (<i>Issyu, Jun-mai</i>)	3.4	235
<i>Hon-mirin</i> K (<i>Issyu, Jun-mai</i>)	2.4	332
<i>Hon-mirin</i> L (<i>Nisyu</i>)	8.3	95
<i>Hon-mirin</i> M (<i>Nisyu</i>)	11.6	68
<i>Hon-mirin</i> N (<i>Nisyu</i>)	10.1	78

風調味料C及びDにおいては $26\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ 及び $18\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ であり4倍以上の差がみられた。次に、各種本みりん及びその他の食品等のラジカル消去活性をTable 1に示した。本測定条件において酢では $31\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ 、清酒で $23\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ （本醸造タイプ）ないし $43\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ （純米タイプ）であり、本みりんは比較的強いラジカル消去活性を持つことが確認された。また、本みりんの品種間の違いでは、純米タイプB, J, Kで比較的高い値がみられた。なお、使用するアルコールが甲類焼酎である一種みりんグループ（A, G, H, I）と乙類焼酎を使用する二種みりんグループ（L, M, N）の間で顕著な差は見られなかった。

2. ラジカル消去活性物質の性質の検討

本みりんに比較的強いラジカル消去活性が確認されたため、ラジカル消去物質の分子量分布をゲルろ過液体クロマトグラフにより検討しFig. 2に示した。サンプルとしてはラジカル消去活性の比較的高かった本

みりんBを2ml用いた。その結果、主なラジカル消去活性は分子量1000以下の比較的低分子の画分に多く含まれていた。次にキレート樹脂、陽イオン交換樹脂、及び陰イオン交換樹脂により順次分画し、金属画分M、窒素画分R、酸画分A、及び中性画分Nについてラジカル消去活性を測定した結果をTable 2に示した。ラジカル消去活性は画分Rに49%と最も多く分布し、ついで画分M（26%）及び画分N（24%）にも活性がみられ、画分Aにはみられなかった。

そこで、上記の各画分に含まれる既知成分のうちラジカル消去活性に関与する可能性のある成分について、ラジカル消去活性を測定し結果をTable 3に示した。画分Rに含まれるアミノ酸の中では微量に含まれるシステインに IC_{50} で $59.2\mu\text{M}$ とTrolox（ $\text{IC}_{50}=79.0\mu\text{M}$ ）と同程度の強いラジカル消去活性が、またトリプトファンに 4.4 mM の弱いラジカル消去活性があった他は顕著なラジカル消去活性は認められなかった。システインについてはみりん中の含有量が10

Fig. 2 Fractionation of the radical-scavenging activities of *hon-mirin* B by gel filtration chromatography

Fraction volume was 2.5 ml. The radical-scavenging activity of each fraction was plotted.

Table 2 Fractionation of radical - scavenging activities of *hon-mirin* A by liquid chromatography

	IC 50(%)	Trolox equivalence ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$)	Ratio (%)
Fraction M	41.1	19.2	26
Fraction R	21.7	36.4	49
Fraction A	ND	ND	0
Fraction N	43.9	18.0	24
Total		73.6	100

ND : Not detected

μM 程度であるから、Trolox 当量としては $1.3\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$ 以下となり、全ラジカル消去活性（本みりん B で $184\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ）への寄与は 1% 以下と考えられた。同様にトリプトファンについてもラジカル消去活性への寄与は低い。また、本みりん中の主要なフェノール化合物で画分 A または N に存在すると考えられるフェルラ酸について、本みりんをアルカリ加水分解し結合型を含めた総フェルラ酸含量を HPLC により測定したところ¹⁴⁾、 $17.5\ \mu\text{M}$ でありラジカル消去活性に占める割合は 2% 以下と考えられた。本みりんにはグルコースが約 40% 含まれているが（画分 N）、グルコースには DPPH に対するラジカル

消去活性はなかった。また画分 M は金属イオンを含む画分であるが、この画分についてはラジカル消去活性に関与する因子は明らかではない。以上のように調べた既知物質の本みりんラジカル消去活性に占める割合は 3% 程度と低かった。

これまでの結果をまとめると、本みりんの主要なラジカル消去活性は上で検討した物質以外の窒素画分 R に含まれる物質であり、ゲルろ過の結果から低分子成分であることが示唆される。窒素画分 R は遊離アミノ酸以外にペプチドと、アミノ酸あるいはペプチドが糖とアミノカルボニル反応を起こして生成するメイラード反応化合物を含んでいると考えられ、これらの遊離アミノ酸以外の窒素を含む低分子成分がラジカル消去活性の主体であると推定された。

3. 本みりん製造中のラジカル消去活性

前章ではラジカル消去物質の同定に至らなかったため、製造工程中のラジカル消去活性を調べ、本みりんのラジカル消去物質に関する洞察を得ることとした。

試醸した本みりんを用いて貯蔵・熟成中のラジカル消去活性及び 430 nm における着色度の変化を測定し Fig. 3 に示した。ラジカル消去活性は、 15°C で熟成させた場合にはほとんど上昇しないが、 25°C 及び 30°C では活性が上昇し、特に 1~3 ヶ月目にかけて上昇が著しく、その後はややなだらかに上昇する傾向が見られた。一方、熟成中に特に高温で着色は進んだが、その進行は 1~3 ヶ月までは緩やかで、その後は急速に

Table 3 Radical-scavenging activities of known constituent in *hon-mirin* B

Fraction	Constituent	Concentration (mM)	IC 50 (mM)	Activity*	Fraction	Constituent	Concentration (mM)	IC 50 (mM)	Activity*
M	Asp	2.49	>10	0	M	Ile	0.93	>10	0
	Thr	0.89	>10	0		Leu	2.17	>10	0
	Ser	1.75	>10	0		Tyr	0.99	>10	0
	Asn	0.00	>10	0		Phe	0.90	>10	0
	Glu	2.94	>10	0		Trp	0.09	4.4	0.2
	Gln	0.33	>10	0		Lys	0.66	>10	0
	Gly	1.71	>10	0		His	0.15	>10	0
	Ala	2.57	>10	0		Arg	0.98	>10	0
	Val	1.68	>10	0		Pro	0.96	>10	0
	Cys	0.01	0.0592	1.3	A or N	Ferulic acid	0.02	0.0742	1.8
	Met	0.47	>10	0				total	3.3
	Cysthi	0.29	>10	0					*Trolox equivalence, $\mu\text{mol}/100\text{ml}$

Fig. 3 Changes in radical-scavenging activity (Trolox equivalence) and optical density at 430 nm during the maturation of *hon-mirin*

進行する傾向が見られた。

ラジカル消去活性は貯蔵・熟成温度が高いほど上昇しやすいことと、糖化・熟成中に遊離全窒素成分や遊離アミノ酸の生成はほぼ終了していることから、メイラード反応がラジカル消去活性の上昇に関与していることが推察された。

メイラード反応物が抗酸化活性やラジカル消去活性を持つことはよく知られている²⁾。また、製造工程中に糖とアミノ酸などの窒素化合物がメイラード反応を起こす本みりんについてもその抗酸化活性がモデル系においてすでに報告されている⁵⁾。メイラード反応物の抗酸化性に関しては、初期反応物に活性が高いとする報告と¹⁵⁾、最終生成物である着色物質のメラノイジンに活性が高いとする報告とがある²⁾。本研究において分子量 1000 以下の比較的低分子の画分にラジカル消去活性が強いことと、着色より前にラジカル消去活性の上昇が起こることが明らかとなり、本みりんに関しては初期中間体がラジカル消去活性に重要な役割を担っていることが示唆された。本みりんのメイラード反応物に関してはこれまで十分に検討されていないため、今後検討が必要であると考えられる。

4. 過酸化脂質生成抑制効果

本みりんに強い抗酸化性が見られたことから、その効果をイワシの脂質酸化の抑制という観点から調べ、みりん風調味料と比較して Fig. 4 に示した。本みりんを用いた調味液に浸漬した場合の POV は浸漬前の

Fig. 4 Changes in POV during the cold storage of *mirin-boshi*

POV of mirin-boshi made of hon-mirin or mirin-like seasoning was plotted against the cold storage period.

Vertical bar indicates the standard error of each point (n=3~7).

28 meq/kg が浸漬乾燥後に 83 meq/kg となったのに対して、みりん風調味料を用いた調味液に浸漬した場合は浸漬乾燥後の POV が 169 meq/kg と高くなった。その後も 18 日目に差がなくなるまで本みりんでき低く推移し、浸漬乾燥直後及び 12 日目には 5% の危険率で有意差が認められた。一般にみりん干しの賞味期間は 10 日から 2 週間程度であり、その期間内は本みりん使用のみりん干しで過酸化価の上昇が抑えられることが示された。

本みりんの効果としてはこれまで、甘みをつけ、照りや焼き色を付与するという効果、食品への調味液の浸透性の調節、テクスチャーの調節などの効果が知られているが⁴⁾、食品の酸化を防ぐという栄養成分の保護的な効果は報告されていない。今回みりん干しにおいて、冷蔵保存中の脂質の酸化が、みりん風調味料を使用した場合より抑えられることが認められ、本みりんの抗酸化性が実際に食品の品質を保持する意義が確認された。なお、みりん干しの調味液浸漬時に、みりん風調味料を使用した場合は調味液に濁りが生じるが、本みりんを使用した場合は清澄であり、魚体成分の漏出が抑えられていることも認められた。またデータは示していないが、本みりんのラジカル消去活性は 100°C、30 分の加熱では減少せず、加熱を伴う調理食品においても本みりんの抗酸化性が有効であろうと考えられる。

本みりん中の窒素画分 R からの抗酸化活性物質の同定に関しては現在検討中であり¹⁶⁾、別途詳細に報告する予定である。

要 約

醸造調味料である本みりんの抗酸化性を検討する目的で 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) に対するラジカル消去活性を検討した。その結果、本みりんは類似調味料であるみりん風調味料と比較して強いラジカル消去活性をもつことが示された。本活性をゲルろ過及び各種樹脂処理等により分画した結果、分子量 1000 以下の窒素成分を含む画分が活性の主体であり、熟成初期に生成するメイラード反応の初期生成物であることが推察された。さらに実際の食品中での抗酸化作用を検討し、みりん干しにおいてみりん風調味料よりも強い過酸化価 (POV) 上昇抑制効果が認められた。

謝 辞

本論文をまとめるにあたって懇切なご助言をいただいた奈良女子大学 的場輝佳教授に深謝いたします。本研究を進めるにあたり終始ご助言をいただきました宝酒造(株) 小川慶次博士並びに浅野忠男博士に深謝いたします。

参考文献

- 1) 大下克典：醸協，**85**(11)，762-770 (1990)
- 2) 早瀬文孝：醸協，**88**(6)，421-425 (1993)
- 3) 林田安生，西村賢了，J. コリン スローター：醸協，**93**(10)，841-843(1998)
- 4) 河辺達也，森田日出男：醸協，**93**(11)，863-869 (1998)
- 5) 猪飼重勝，高嶋和美，佐川裕章，大屋敷春夫，加藤郁之進：特許公開 2001-231536
- 6) 石渡仁子，高村仁知，的場輝佳：調理科学，**34**，407-417 (2001)
- 7) 過酸化脂質・フリーラジカル実験法：学会出版センター p 15 (1995)
- 8) M. B. Arnao，： *Trends Food Sci. Tech.*， **11**， 419-421 (2000)
- 9) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba, J. Terao，： *Biosci. Biotechnol. Biochem.*， **62**， 1201-1204 (1998)
- 10) H. Kitagaki, M. Tsugawa，： *J. Biosci. Bioeng.*， **87**， 328-332 (1999)
- 11) 佐藤信，中村欣一，蓼沼誠，高橋康次郎：醸協，**66**(6)，605-610 (1971)
- 12) 笠原香代子，板谷真由美，西堀幸吉：日水誌，**55**， 715-719 (1989)
- 13) Takagi, T., Mitsuno, Y., Masumura, M.： *Lipids*， **13**， 147-151 (1978)
- 14) 西澤千恵子，太田剛雄，江頭祐嘉合，真田宏夫：日食工誌，**45**， 499-503 (1998)
- 15) Murakami, M., Shigeeda, A., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T.： *J. Food Sci.*， **67**， 93-96 (2002)
- 16) 石崎俊行，吉浜義雄，平松順一，猪飼勝重：2002 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p 109