清酒の製造工程における

DPPH 消去能の推移

北垣 浩志

(大阪国税局鑑定官室)

(現所属：独立行政法人酒類総合研究所)

平成 15 年 3 月 19 日受理

Transition of the DPPH-scavenging ability
of sake during brewing

Hiroshi KITAGAKI

(Office of Brewing Technology,

Osaka Regional Taxation Bureau)

1-5-63, Otemae, Tyuou-ku, Osaka City,

Osaka, 540-0008, Japan

To control the DPPH-scavenging ability of sake, its activity during brewing was investigated. Results showed that the DPPH-scavenging ability of koji rapidly increases 40 hours after the start of koji-making. This ability of sake mainly consists of a DPPH-scavenging ability which is directly produced by koji and one which koji first produces and then is potentiated during moromi. The DPPH-scavenging ability of sake was decreased to 50% by treatment with active carbon.

Key words：フリーラジカル消去能

緒 言

フリーラジカルは DNA、タンパク質、脂質等の酸化障害を引き起こし、様々な疾病の原因となることが

知られている。フリーラジカル消去能を持つ食品は体内のフリーラジカルを消去する働きを持ち、各種疾患の防止に役立つことが近年報告されていることから、著者らが前報においてフリーラジカルである 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) を消去する清酒の能力について調べたところ、清酒は 100 ml 当たりアスコルビン酸 2.0 mg, 3-t-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA) 6.9 mg に相当する DPPH 消去能を持つことが明らかとなった。清酒のフリーラジカル消去能をコントロールするためにはフリーラジカル消去能が清酒のどの製造工程で発現するかを調べる必要があるが、これまでそのような報告はされていない。

そこで本論文では、清酒の製造工程における DPPH 消去能の推移を調べ、DPPH 消去能が清酒のどの製造工程で発現するかを調べることにした。

実 験 方 法

1. 清酒の DPPH 消去能の測定

前報¹⁾に従った。

2. 麴の DPPH 消去能の測定

採取した麴の重さを測定し、その 2 倍の重さの蒸留水を加えて浸漬した。一定時間ごとに試料の入った試験管を振り、均一化を図った。試料の上清の DPPH 消去能を経時的に測定した。米は精米 40% の山田錦を、種麴には今野もやし (株式会社今野商店) を用いた。

3. もろみの発酵

もろみの発酵は、Table の仕込配合により 15°C において行った。麴を含まない仕込みの場合は、まずスピターゼ (長瀬産業株式会社) により 55°C で 12 時間糖化した後に酵母を添加し、発酵を行った。酵母は麴エキスで通気培養したものを 0.7 ml 加えた。

4. もろみの DPPH 消去能の測定

もろみを 5 krpm で 10 分間遠心し、その上清 50 μ l

Table Amounts of rice, koji and water in making the model moromi

	Rice, yeast and koji	Rice and koji	Rice and yeast	Rice
Rice(yamada-nishiki 55%)	13 g	13 g	20 g	20 g
Dried koji	7 g	7 g	—	—
Water	45 ml	45 ml	45 ml	45 ml
Kyokai-7	+	—	+	—
Spitase	—	—	0.1 g	0.1 g

Fig. 1 Solubilization of the DPPH-scavenging ability of koji

Two volumes of water were added to koji, incubated for various times, and the DPPH-scavenging ability of the supernatant was analyzed.

のDPPH 消去能を測定し、528 nm における吸光度として表した。

5. 活性炭処理

さまざまな量の活性炭（武田薬品工業株式会社製、「特性白鷺」）を市販本醸造酒に加えて 30°C で 30 分間置き、その上清 50 μ l の DPPH 消去能を測定し、528 nm における吸光度として表した。

結果及び考察

1. 麴からの DPPH 消去能の浸出条件の検討

麴の DPPH 消去能を定量的に測定するために、麴からの DPPH 消去能の浸出条件について検討した。麴をその重さの 2 倍の蒸留水にさまざまな時間浸漬し、その上清の DPPH 消去能を測定することで、麴からの DPPH 消去能の浸出時間を調べた。その結果、DPPH 消去能は麴から蒸留水に時間依存的に浸出していくが (Fig. 1)、その浸出はほぼ 24 時間で飽和することがわかった。そこで、以後、麴を 2 倍量の蒸留水に 24 時間浸漬してから DPPH 消去能を測定することとした。

なお、エタノール濃度は麴からの DPPH 消去能の浸出に有意には影響を及ぼさなかった。

2. 製麴工程における DPPH 消去能の推移

麴の DPPH 消去能の定量的な測定方法を設定したので、実際の酒造工場での製麴工程における DPPH 消

去能の推移を調べた。麴を製麴開始後一定時間ごとにサンプリングし、上記の条件で麴 1 g 当たりの DPPH 消去能を測定した。その結果、麴の DPPH 消去能は製麴開始 40 時間後に急増することが明らかとなった (Fig. 2)。

3. もろみにおける DPPH 消去能の推移

次にもろみにおける DPPH 消去能の発現要因について調べた。もろみは米や麴由来の物質、酵母など複雑な反応系から成り立っており、DPPH 消去能の発現に関与する要因は非常に多いと考えられる。従って、そのままもろみの DPPH 消去能を測定しても要因が多すぎて解析が難しい。そこで、DPPH 消去能の発現に関与する要因を明らかにするために、米や麴、酵母の有無で 4 種類のモデルもろみを用意し (Table)、それぞれについて小仕込を行って DPPH 消去能の変化を調べた。その際、もろみ初期での測定を可能にするために、汲水の割合を通常の仕込よりも多くした。このようにして発酵させたもろみを一定期間ごとに採取して遠心し、上清の DPPH 消去能を測定した。その結果、米だけのもろみ及び米と酵母を含むもろみの DPPH 消去能は小さく、その大きさはもろみ期間中変わらなかった。このことは米から抽出される DPPH 消去能、あるいは米の成分から酵母が生産する DPPH 消去能はあまり大きくないことを示している。一方、米

Fig. 2 Transition of the DPPH-scavenging ability of koji during koji-making

Koji was sampled during koji-making at certain intervals, immersed in water for 24 hours, and the DPPH-scavenging ability of the supernatant was analyzed.

Fig. 3 Transition of the DPPH-scavenging ability of model moromi

Moromi was made as shown in Table, sampled at certain intervals, centrifuged, and the DPPH-scavenging ability of the supernatant was analyzed. ▲ indicates the DPPH-scavenging ability of moromi with koji, yeast and rice, ■ indicates that with koji and rice, ◆ indicates that with rice and yeast, ◆ indicates that with rice alone.

と麴を含むもろみの DPPH 消去能は比較的大きな値を示したが、その大きさはもろみ期間中変わらなかった。しかし、米と麴と酵母を含むもろみではもろみ初期から DPPH 消去能が高く、かつその DPPH 消去能

がもろみ期間中 10 日以上に渡って増加していた (Fig. 3)。このことは、麴が生産した前駆体をもろみにおいて酵母が DPPH 消去能のより高い物質に変換していることを示唆していると考えられる。これらの結果が

Fig. 4 Effect of the treatment of active carbon on the DPPH-scavenging ability of sake.

Various amounts of active carbon were added to sake, incubated at 30°C for 30 min, and the DPPH-scavenging ability of the supernatant was analyzed.

ら、各画分の清酒のDPPH消去能への寄与の割合を計算したところ、米から抽出される画分の寄与が13.1%、麴が直接生産するDPPH消去能の寄与が32.1%、麴が生産した物質のDPPH消去能がもろみにおいて増加する分の寄与が47.7%、酵母が米の成分から生産する画分の寄与が7.2%であり、麴がDPPH消去能を直接生産する画分と、麴が生産し、もろみにおいてDPPH消去能が増加する画分が最終的な清酒のDPPH消去能に主に寄与していることがわかった。

4. 活性炭処理のDPPH消去能に対する影響

活性炭処理が清酒のDPPH消去能に及ぼす影響について調べた。その結果、清酒を活性炭で処理すると、清酒のDPPH消去能は約半分までに減少するが、活性炭使用量約1000 g/klでほぼ飽和することが明らかとなった (Fig. 4)。このことは、活性炭で清酒を処理するとDPPH消去能を約半分取り去ってしまうことを示しており、清酒に含まれるDPPH消去能物質は活性炭に吸着されてしまうものと、吸着されないものに分かれることが示唆される。

これまで清酒の製造工程をDPPH消去能という切り口で調べた報告はなかった。今回、清酒のDPPH消

去能の定量的な測定方法を設定し、清酒の製造工程におけるDPPH消去能の推移を調べることで、清酒のDPPH消去能の発現の推移が明らかになった。すなわち、清酒のDPPH消去能は、麴が生産し直接DPPH消去能を発揮する分と、麴が生産し、もろみにおいてDPPH消去能が増強する分があるが、活性炭処理により減少する、ということが明らかになった。

食品のフリーラジカル消去能に期待されることは機能性の他に、保存性の向上がある。すなわち、食品のフリーラジカル消去能は、保存中に食品中で発生したフリーラジカルを消去することによって、香味安定性を増強することが知られている^{3,4)}。そこで、市販されている清酒を購入してDPPH消去能と香味安定性を測定し、DPPH消去能の大きい清酒の香味安定性は大きいかわかったが、有意な結果は得られなかった。DPPH消去能の大きい清酒は麴由来の成分が多い傾向にあり、もともと味が濃く老ねやすい酒質であるため、DPPH消去能と香味安定性の間に有意な結果が得られなかったと考えられた。そこで次に、酒質が同じでDPPH消去能が異なる清酒で香味安定性を比較した。すなわち、ひとつの清酒に外部からさまざまなフリーラジカル消

去物質を添加して人為的に DPPH 消去能を増大させ、香味安定性を比較した。しかし、フリーラジカル消去物質を添加することにより発生する異味や異臭の影響が大きく、香味安定性の変化を測定することができなかった。今後、清酒の DPPH 消去能の解析結果を香味安定性を増大させる技術に活用していくためには、この問題を解決する必要があると考えられる。

前報までの結果^{1,2)}と合わせると、清酒の製造・貯蔵工程において、DPPH 消去能は製麹工程で増加し、もろみにおいてさらに、増強されるが、活性炭処理と貯蔵によって減少することが明らかとなった。本研究は DPPH 消去能という現象面だけを解析したもので、その発現のメカニズムや DPPH 消去能に寄与する物質を明らかにしたものではない。これまで清酒中に含まれることが報告されている抗酸化性物質としてはフェルラ酸などがある⁵⁾が、本方法で測定した DPPH 消去能の推移がフェルラ酸などの挙動とどのように関係しているのか、今後、清酒中に含まれる物質の研究などを通じて明らかになってくると期待される。

要 約

清酒の DPPH 消去能をコントロールするための情報とするため、清酒の製造工程における DPPH 消去能の推移を調べた。その結果、製麹工程においては製麹時間 40 時間後に単位重量当たりの DPPH 消去能が急増すること、清酒の DPPH 消去能には、麹が直接生産する DPPH 消去能と、麹が生産した物質の DPPH 消去能がもろみにおいて増加する分が主に寄与していること、活性炭処理によって単位容量当たりの DPPH 消去能は約半分にまで減少することが明らかとなった。

文 献

- 1) H. Kitagaki and M. Tsugawa : *J. Bioscience. Biotechnol.*, **87**, 3, 328-332 (1999)
- 2) 北垣浩志, 岩槻安浩, 津川光昭 : *醸協*, **94**, (6), 502-506 (1999)
- 3) M. Uchida and M. Ono : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **54**, 198-204 (1996)
- 4) M. Uchida, S. Suga and M. Ono : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **54**, 205-211 (1996)
- 5) 太田剛雄, 高下秀春, 轟木康市, 岩野君夫, 大場俊輝 : *醸協*, **87** (12), 922-926 (1992)