

酒粕中のフェノール性抗酸化物質の分離と同定

江崎秀男*・森 久美子*・中村好志*

Separation and Identification of Phenolic Antioxidants in Sake Lees

Hideo ESAKI, Kumiko MORI and Yoshiyuki NAKAMURA

1. はじめに

生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルは、反応性が非常に高く、生体内たんぱく質や生体膜を構成する脂質を攻撃し、また DNA や RNA に傷害をひき起し、ひいては癌をはじめとする生活習慣病の発症や老化をもたらすこととなる¹⁾²⁾。

食品のもつ重要な生理機能の一つに、活性酸素やフリーラジカルを消去・捕捉する抗酸化作用がある。この抗酸化作用は、生体内における酸化ストレスを解消するのみならず、食品の酸化的劣化を防ぎ品質保持にも役立つ。食品中の抗酸化成分は多種多様であり、多くの食品素材に含まれているが、特に植物起源の素材には極めて広範囲に存在する。また、このような機能性成分は、米や麦などの穀類や大豆などの豆類を原料とする発酵・醸造食品を製造した場合の副産物（廃棄物）中に多量に含まれる場合もある³⁾⁴⁾。

酒粕は、清酒もろみの圧搾工程において副産物として産出される。この酒粕を酢酸発酵・熟成させて作られた粕酢（赤酢）は、にぎり寿し（江戸前寿し）の普及に貢献した。またこの酒粕は、栄養素に富んだ食品であり、ペプチドやアミノ酸などの旨み成分を含み、粕汁や粕漬けなどにも利用されてきた。近年、この酒粕を原料として新たな生理機能（脂質代謝改善作用、腸内フローラ改善作用、血圧低下作用、表皮角化細胞増殖作用、保湿作用など）を付与した機能性（食品）素材の開発が検討されている⁵⁻⁷⁾。

本研究では、酒粕のもつ抗酸化作用に着目し、活性成分を分離・精製するとともにその同定を行った。また、酒粕中の抗酸化物質を定量し、同時にその抗酸化活性を測定することにより、これらの物質の抗酸化的役割を評価することにした。

2. 実験方法

2.1 材料

本実験に使用した酒粕は、M社（愛知県）において清酒もろみを圧搾して得られたもの

* 生活科学部 管理栄養学科

であるが、圧搾後、使用時まで -30°C で保存した。卵黄レシチン (Lecithin, from Egg) は、和光純薬工業(株)の生化学用を使用した。AAPH (2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) は、和光一級を使用した。その他の試薬類は試薬特級を使用した。

2.2 リボソームを用いた抗酸化活性の測定

抗酸化活性の測定は、既報⁸⁾に従いリボソームを用いた試験法で行った。卵黄レシチン 100mg をナスフラスコに精秤し、クロロホルム 2mL に溶解した。その後、ロータリーエバポレーターを用いてこのナスフラスコ中の溶媒を留去し、レシチンの均一な薄膜をフラスコ内に作製した。ここに 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 10mL を加え、レシチンを膨化し、十分に攪拌した後、超音波洗浄器 (Branson model B-12) を用いて脂質を完全に分散させ、多重層のリボソーム MLV (Multilamellar Vesicle) を調製した。この MLV をテフロン瓶に入れ、窒素ガスで置換後、出力 180W で 20 分間の超音波処理 (Insonator model 200M, Kubota, Japan) を行うことにより、小さな一枚膜のリボソーム SUV (Small Unilamellar Vesicle) を調製した。

各試料溶液の抗酸化活性は、用時調製した新鮮な SUV 溶液を用いて測定した。試料溶液 100 μL に、SUV 溶液 100 μL および 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 700 μL を加えて十分に混合した後、ラジカル発生剤である 40mM AAPH 溶液 100 μL を添加して酸化反応を進行させた。37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間温置した後、1 % BHT 溶液 100 μL を加えて反応を停止させた。生成した TBA 陽性物質 (TBARS) 量は、この反応停止液に 0.375 % TBA / 15 % TCA 試薬 2.0mL を加え、沸騰水中で 15 分間加熱した後、遠心分離 (3,500rpm, 10 分間) を行い、得られた上清の吸光度 (ABS_{535nm}) を測定することにより求めた⁹⁾ (試料群)。

対照試験 (コントロール) としては、試料溶液の代わりに、試料を溶解した溶媒 100 μL を用いて同様の反応を行った (対照群)。また、AAPH による酸化反応前の TBARS 量を知るために、各試料群および対照群の反応において、AAPH 溶液の代わりに同量の蒸留水を加えた盲検試験も同時に行った。以上の試験結果より、試料を添加しない対照群で生成した真の TBA 値を 100 % とし、各試料添加時の酸化率 (%) を算出した (下式)。この酸化率が低い値を示す場合、各試料溶液が強い抗酸化力をもつことになる。

試料添加時の酸化率 (%)

$$= (\text{試料群の真の TBA 値} / \text{対照群の真の TBA 値}) \times 100$$

$$= \{ (\text{試料 ABS}_{535\text{nm}} \text{ 値} - \text{試料盲検 ABS}_{535\text{nm}} \text{ 値}) / (\text{対照 ABS}_{535\text{nm}} \text{ 値} - \text{対照盲検 ABS}_{535\text{nm}} \text{ 値}) \} \times 100$$

2.3 抗酸化物質の Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーによる分画

酒粕 1.8kg にメタノール 8.0L を加え、ミキサーで十分に均質化した後、室温で 16 時間抽出を行った。その後、この酒粕の 90 % メタノール抽出液の全量 (9.3L) を遠心分離 (9500rpm, 20 $^{\circ}\text{C}$, 15 分間) にかけて、上清を回収した。ここで得られた抽出液は、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮を行い、シラップ状とした (90 % MeOH 抽出物)。ここに、80 % メタノール 500mL を加えてシラップを溶解し、ガム状の不溶性物質を除去した。この溶液に Amberlite XAD-2 (合成吸着剤) 750mL を加え、再度ロータリーエバポ

レーターを用いて溶媒を完全に留去するとともに、酒粕抽出物を XAD-2 吸着剤の表面にコーティングした。ここで調製したコーティングサンプルは、あらかじめ 250mL の Amberlite XAD-2 を内径 6.0cm のガラスカラムに充填したものの上に重層した (60 i.d. × 360mm)。抗酸化物質の分画は、水-メタノール系の溶媒を用いて行った。まず、カラムを水 4.5L で洗浄した後、溶離液として 20% メタノール 3.0L, 40% メタノール 3.0L, 60% メタノール 3.0L, 80% メタノール 3.0L およびメタノール 3.0L を順次流し、各溶出画分 (20% MeOH 溶出画分, 40% MeOH 溶出画分, 60% MeOH 溶出画分, 80% MeOH 溶出画分および MeOH 溶出画分) を回収した。

2.4 Amberlite XAD-2 カラム分画物の収量および抗酸化活性の測定

Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーによって得られた各溶出画分の 1/60 量 (50mL) を減圧濃縮し、得られたシラップの収量を測定した。その後、シラップ濃度が 10mg/mL になるように 90% メタノールで溶解し、この溶液 100 μ L を用いて、XAD-2 カラム分画物の抗酸化活性をリボソーム試験法で測定した。

2.5 Amberlite XAD-2 カラム分画物中の抗酸化成分の検出 (TLC-大豆油スプレー法)

Amberlite XAD-2 カラム分画物 (シラップ濃度: 10mg/mL) の 5 μ L ずつを蛍光剤入りのシリカゲル 60 TLC プレート (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) にスポットし、トルエン:クロロホルム:アセトン混液 (8:5:7 v/v/v) で展開させた。展開後のプレートは、UV (254nm) 照射下でスポット物質の観察、スケッチおよび R_f 値の測定を行った。その後、4% 大豆油/ヘキササン溶液を噴霧し、暗所で UV (254nm) を連続的に照射した¹⁰⁾。照射時間の経過とともに、大豆油は酸化されて TLC プレートは全体に黒色化したが、抗酸化性を示すスポット物質が存在する場所では酸化反応は進行せず、スポット部分は白色の状態が維持された。また、この白色スポットが消失するまでの時間を測定することにより、各スポット物質の抗酸化力の評価を行った。

2.6 40% MeOH 溶出画分および 60% MeOH 溶出画分中の抗酸化物質の分離・精製

40% MeOH 溶出画分 2.3L を減圧濃縮し、シラップとした (658mg)。このシラップに 80% メタノール 5.5mL を加えて溶解後、この溶液を Sep-Pak Plus C-18 Cartridge (Waters) に注入し、通過液とともにメタノールでカートリッジを洗浄した洗液も回収した。この Sep-Pak 処理液を分取 HPLC (カラム; Develosil Lop-ODS (50 i.d. × 300mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD), 溶離液; 0.1% トリフルオロ酢酸/40% MeOH, 流速; 27mL/min, 検出波長; 254nm) に注入し、各ピーク画分を回収した。これらの画分の抗酸化性を TLC-大豆油スプレー法で調べ、活性を示すピーク画分はさらに分取 HPLC (カラム; Develosil Lop-10/30 (50 i.d. × 500mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD), 溶離液; 0.1% トリフルオロ酢酸/30% MeOH, 流速; 27mL/min, 検出波長; 254nm) を繰り返し、抗酸化物質の分離・精製を行った。

60% MeOH 溶出画分についても、同様に分取 HPLC (溶離液; 0.1% トリフルオロ酢酸/50% MeOH) を繰り返し、抗酸化物質の分離・精製を行った。

2.7 分離・精製した抗酸化物質の三次元 HPLC および TLC による同定

分取 HPLC によって分離・精製したピーク成分は、三次元 HPLC（ポンプ；LC-10AT, カラムオープン；CTO-10AC, フォトダイオードアレイ検出器；SPD-M10A）を用いて同定するとともに、その抗酸化性を TLC-大豆油スプレー法で確認した。標準物質として 9 種類のフェノール性物質（チロソール, *p*-ヒドロキシ安息香酸, *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド, バニリン酸, バニリン, クマリン酸, フェルラ酸, アニス酸, フェルラ酸エチル）を入手し、それぞれの物質について各濃度の標準溶液を調製し、その 15 μ L ずつを三次元 HPLC に注入した。各標準物質のピークの溶出時間, UV スペクトルを入手し、各試料のデータと比較検討するとともに、同時に、各ピーク面積値よりこれらの 9 種類のフェノール性物質の検量線を作成した。

HPLC の分析条件は、カラム；Develosil ODS-UG-5 (4.6 i.d. \times 250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度；35 $^{\circ}$ C, 溶離液；A；メタノール：水：トリフルオロ酢酸 (60：40：0.1), B；メタノール：水：トリフルオロ酢酸 (20：80：0.1) 【A：B = 0：100 (0 分 \rightarrow 10 分), A：B = (0：100 \rightarrow 100：0) (10 分 \rightarrow 70 分), A：B = 100：0 (70 分 \rightarrow 100 分), A：B = 0：100 (100 分 \rightarrow 120 分)], 流速；0.7mL/分, 注入量；15 μ L, 測定波長；200nm–380nm, 検出波長；254nm, 320nm とした。

2.8 酒粕中のフェノール性抗酸化物質の定量

A 社, B 社および C 社より入手した酒粕 5 種類（酒粕 A, 酒粕 B-1, 酒粕 B-2, 酒粕 B-3, 酒粕 C）中のフェノール性物質量を 2.7 の HPLC 条件で定量した。また、酒粕 B-3 については、原料蒸米および麴も同時に入手し、同様の分析を行った。

乳鉢で均質化した各試料 3.00g に、0.01% BHT (dibutylhydroxytoluene) および内部標準物質として 6ppmCP (Chloramphenicol) を含む酢酸エチル 20mL, 塩化ナトリウム 0.5g, 蒸留水 10mL を加え、室温、暗所で 3 時間振とう抽出を行った。遠心分離 (3,500rpm, 10 分間) により、酢酸エチル層を回収し、無水硫酸ナトリウムで脱水処理を行った後、その 10mL をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。得られたシラップにメタノール 1.0mL を加え、その 15 μ L を試料溶液として、三次元 HPLC 分析を行った。

また、本実験においては、同時に酒粕試料の代わりに、9 種類のフェノール性物質の混合液を用いて同様の抽出操作および HPLC 分析を行い、各フェノール性物質の回収率 (%) を算出した。

2.9 各種フェノール性物質の抗酸化活性の測定

チロソール, バニリン酸, クマリン酸, フェルラ酸およびフェルラ酸エチルの標準溶液を使用して、抗酸化活性を測定した。リポソームを用いた抗酸化活性の測定は 2.2 の方法で行った。また、ラジカル捕捉能試験として、DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) を用いて、常法に従い抗酸化活性の測定を行った¹¹⁾。

3. 結果および考察

3.1 酒粕中の抗酸化物質の Amberlite XAD-2カラムによる分画

酒粕中の抗酸化物質の抽出は、フェノール性物質が溶出しやすい条件、すなわち90%メタノール濃度で行った。1.8kgの酒粕より90%メタノール抽出液を調製し、これを合成吸着剤である Amberlite XAD-2に吸着させた後、メタノール濃度を20%ずつ順次上昇させたカラムクロマトグラフィーにより、抗酸化物質の溶出（分画）を行った。

各溶出画分（20% MeOH 溶出画分、40% MeOH 溶出画分、60% MeOH 溶出画分、80% MeOH 溶出画分および MeOH 溶出画分）3.0L 中の50mLを減圧濃縮し、得られたシラップ量を Table 1に示した。本実験では、酒粕抽出時のメタノール濃度を90%としたため、20% MeOH 溶出画分の収量は少なく、11.5mgであった。その後、溶離液のメタノール濃度の上昇にともない、各溶出画分の収量は増加し、40% MeOH 溶出画分で85.9mg、60% MeOH 溶出画分で15.7mg、80% MeOH 溶出画分で150mg および MeOH 溶出画分で564mg となった。

Table 1 Yield of Syrup Obtained from Each Eluate (50mL) Fractionated by Amberlite XAD-2 Column Chromatography

	20% MeOH Eluate	40% MeOH Eluate	60% MeOH Eluate	80% MeOH Eluate	MeOH Eluate
Yield (mg)	11.5	85.9	15.7	150	564

3.2 Amberlite XAD-2カラム各溶出画分の抗酸化活性

抗酸化力の評価は、生体膜モデルとしての一枚膜のリポソーム（SUV）を用いて行った。各溶出画分（50mL）より得られた濃縮物は、シラップ濃度を10mg/mLとした後、その100 μ Lを用いて抗酸化活性を測定した（Fig. 1）。

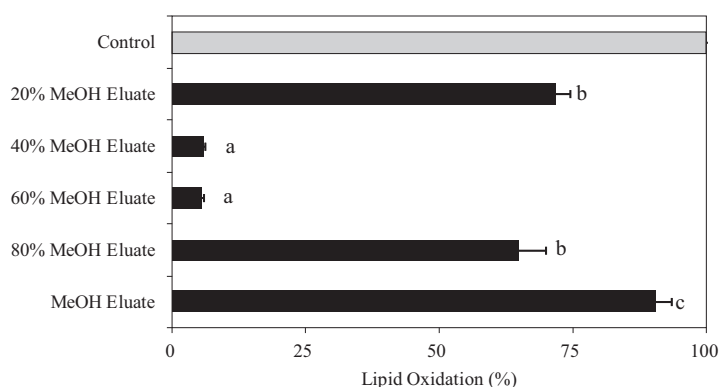


Fig. 1 Antioxidative Activity of Each Eluate Fractionated by Amberlite XAD-2 Column Chromatography

Each value in this figure is the mean \pm SD (n=3). The value for a control containing no added sample represents 100% lipid oxidation. Bars not sharing the same letters differ significantly ($P < 0.01$ by Tukey's test).

この図から明らかなように、40% MeOH 溶出画分および60% MeOH 溶出画分の酸化率は、それぞれ5.8%および5.6%となり、他の溶出画分より有意に ($P<0.01$) 強い抗酸化活性を示した。これに次いで、80% MeOH 溶出画分の酸化率は64.7%，また20% MeOH 溶出画分の酸化率は71.6%を示した。このなかで、80% MeOH 溶出画分の酸化率より、その抑制率を算出すると35.3%となり、この溶出画分はあまり強い抗酸化能を示さないことになる。しかし、この溶出画分のシラップ量は、40% MeOH 溶出画分の約1.7倍、60% MeOH 溶出画分の約9.6倍であることを考慮すると、この80% MeOH 溶出画分のもつ抗酸化能もかなり大きいことになる。

3.3 Amberlite XAD-2カラム各溶出画分中の抗酸化物質の検出

リポソームを用いた試験法において抗酸化活性が認められた Amberlite XAD-2カラム各溶出画分について、活性成分の探索を行った。抗酸化活性を測定した各試料溶液 (10mg/mL) および酒粕の90% MeOH 抽出物を用いて、TLC-大豆油スプレー法で抗酸化物質の検出を行った (Fig. 2)。カラム分画前の90% MeOH 抽出物において、Rf 値0.36に最も強い抗酸化性を示すスポットが検出された。それに次いで、Rf 値0.62に強いスポットが、また Rf 値0.42および Rf 値0.46に2つの抗酸化性スポットが検出された。

この90% MeOH 抽出物を、Amberlite XAD-2カラムクロマトグラフィーによって分画し

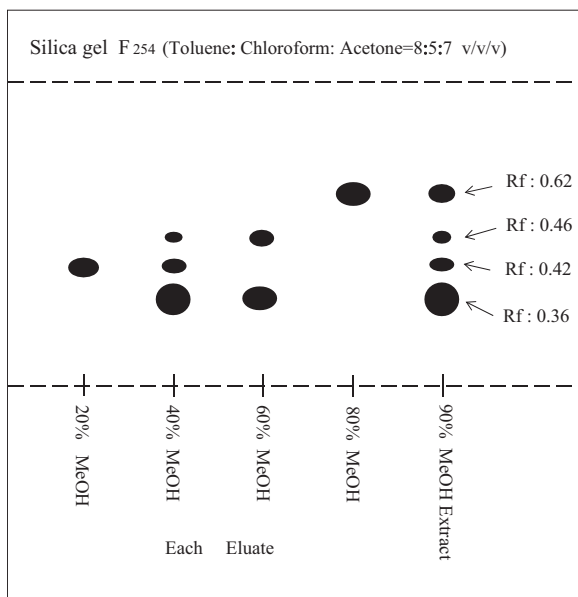


Fig. 2 Thin-layer Chromatogram of Antioxidative Spots in Each Eluate Fractionated by Amberlite XAD-2 Column Chromatography

Each eluate was developed with mobile phase toluene : chloroform : acetone (8:5:7 v/v/v), next sprayed with a tocopherol-stripped soybean oil solution of ca. 4% concentration in *n*-hexane, before being exposed to short-wave UV irradiation (254nm).

たが、20% MeOH 溶出画分には Rf 値0.42を示す抗酸化性スポットが検出された。また、リボソームを用いた試験法において強い抗酸化活性を示した40% MeOH 溶出画分および60% MeOH 溶出画分には、いくつかの抗酸化性スポットが検出された。40% MeOH 溶出画分には、Rf 値0.36および Rf 値0.42の主要スポットが、また60% MeOH 溶出画分には Rf 値0.36および Rf 値0.46のスポットが検出された。一方、80% MeOH 溶出画分には Rf 値0.62を示す抗酸化性スポットが検出された。

3.4 分取 HPLC による抗酸化物質の分離・精製

リボソーム試験において強い抗酸化活性を示し、またいくつかの抗酸化性スポットが混在した40% MeOH 溶出画分および60% MeOH 溶出画分については、逆相カラムを用いた分取 HPLC を繰り返して活性物質を分離・精製した。40% MeOH 溶出画分の Develosil Lop-ODS を用いた分取 HPLC（溶離液；0.1%トリフルオロ酢酸／40% MeOH）では、溶出時間9分、19分および36分に大きなピークが現れたので、これらのピーク画分をそれぞれ分取した（Aピーク、BピークおよびCピーク）。Bピークは、さらに分離能の高い Develosil ODS-10/30カラムを用いて分取 HPLC を繰り返し、抗酸化性を示す主要な2物質（B-1ピークおよびB-2ピーク）を分離した。

60% MeOH 溶出画分についても、Develosil Lop-ODS を用いた分取 HPLC（溶離液；0.1%トリフルオロ酢酸／50% MeOH）を行い、溶出時間23分に大きなピーク（Dピーク）を、また31分に小さなピーク（Eピーク）を得ることができた。

3.5 分離・精製した抗酸化物質の三次元 HPLC による同定

Amberlite XAD-2カラムによって分離した画分（20% MeOH 溶出画分および80% MeOH 溶出画分）および分取 HPLC によって分離・精製したピーク画分（B-1ピーク、B-2ピーク、Cピーク、DピークおよびEピーク）中の抗酸化物質は、TLC-大豆油スプレー法によってその抗酸化性を確認するとともに、フォトダイオードアレイ検出器を装備した三次元 HPLC を行うことにより、活性物質の同定を行った。穀類中に含まれるフェノール性物質¹²⁾を標準物質として、これらの三次元 HPLC 分析を行い、各物質のピーク溶出時間および紫外吸収（UV）スペクトルを、分離・精製した各試料より得られたものと比較検討した。また、試料中の一部の物質については、LC/MS 分析も行った。その結果、20% MeOH 溶出画分および80% MeOH 溶出画分中の主要な抗酸化物質として、それぞれチロソールおよびフェルラ酸エチルを同定した。また、B-1ピークはバニリン酸、B-2ピークはクマリン酸、CピークおよびDピークはフェルラ酸であることが分かった。Eピークの分子量は322であり、280nm および289nm に紫外吸収をもつ物質であるが、その化学構造については今後の課題である。

3.6 各種酒粕中のフェノール性抗酸化物質の同定と定量

A 社、B 社およびC 社より入手した酒粕5種類（酒粕A、酒粕B-1、酒粕B-2、酒粕B-3、酒粕C）を HPLC 分析したところ、いずれの酒粕においても、溶出時間10.7分に275nm に吸収極大をもつチロソール、溶出時間25.0分に309nm に吸収極大をもつクマリン酸、溶出時間28.8分に322nm に吸収極大をもつフェルラ酸、溶出時間52.7分に323nm

Table 2 Amount of Phenolic Antioxidants in Five Kinds of Sake Lees

	(μmol/kg of Sake Lees)				
	Tyrosol	Vanillic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Ethyl ferulate
Sake lees A	39.5	—	0.8	12.5	4.2
Sake lees B-1	49.8	—	1.3	29.5	10.0
Sake lees B-2	41.8	—	1.0	11.3	4.1
Sake lees B-3	31.0	—	0.5	9.1	2.2
Sake lees C	42.2	—	0.8	15.1	5.7

に吸収極大をもつフェルラ酸エチルが検出された。これらのフェノール性物質のピーク面積値を用いて、あらかじめ作成した各物質の検量線より、酒粕1.0kg中の物質質量 (mol) を算出し、その結果を Table 2 に示した。酒粕中に含まれるこれらのフェノール性抗酸化物質の量は、使用した酒米の種類や精米歩合、清酒の製造法（発酵に使用した微生物の種類や醸造の方法など）、酒粕の圧搾法などの差違による影響をうけると考えられるが、今回使用した5種類の酒粕においては、チロソールの含有量が最も多く、その値は約30～50μmolの範囲であった。次いで、フェルラ酸の含有量が多く、約10～30μmolであった。フェルラ酸エチルは、酒粕の種類によって、その含有量に大きな差があり、少ないもので約2μmol、多いものではその5倍に相当する量（10μmol）であった。

3.7 原料蒸米、米麴、酒粕中のフェノール性抗酸化物質量の比較

酒粕 B-3、この酒粕（清酒）の原料として使用した蒸米および米麴の HPLC 分析の結果を Fig. 3 に示した。蒸米においては、先に同定したフェノール性物質のいずれのピークも検出されなかった。しかし、蒸米を麴菌 (*Aspergillus oryzae*) で発酵させた米麴では、そのピークは小さいが、バニリン酸（溶出時間25.0分、吸収極大260nm）およびフェルラ酸（溶出時間28.8分）を検出することができた。酒粕 B-3では先にも記述したように、チロソール、クマリン酸、フェルラ酸およびフェルラ酸エチルが検出されたが、これらの物質は清酒の醸造過程で新たに生成されたものと考察される。今後、この醸造過程において経日的にサンプリングを行い、これらのフェノール性物質の変動を調べるとともに、その生成に関与する酵素類の活性変動を測定することにより生成メカニズムを明らかにする必要がある。

3.8 酒粕中に見出されたフェノール性物質の抗酸化性

酒粕中に見出されたチロソール、バニリン酸、クマリン酸、フェルラ酸およびフェルラ酸エチルのリボソームを用いた試験法における抗酸化性を Fig. 4 に示した。これらのフェノール性物質のなかで最も強い抗酸化活性を示したものは、フェルラ酸エチルであった。

この物質の10μM（モル濃度）における酸化抑制率は75%を示し、既知の抗酸化物質として知られている α -トコフェロール（酸化抑制率：40%）より有意に（ $P<0.01$ ）強い抗酸化活性を示した。また、フェルラ酸の酸化抑制率も64%を示し、クマリン酸、バニリン酸およびチロソールより、有意に（ $P<0.01$ ）強い抗酸化活性を示した。

酒粕中のフェノール性物質の抗酸化性は、DPPH を用いたラジカル捕捉能試験において

酒粕中のフェノール性抗酸化物質の分離と同定

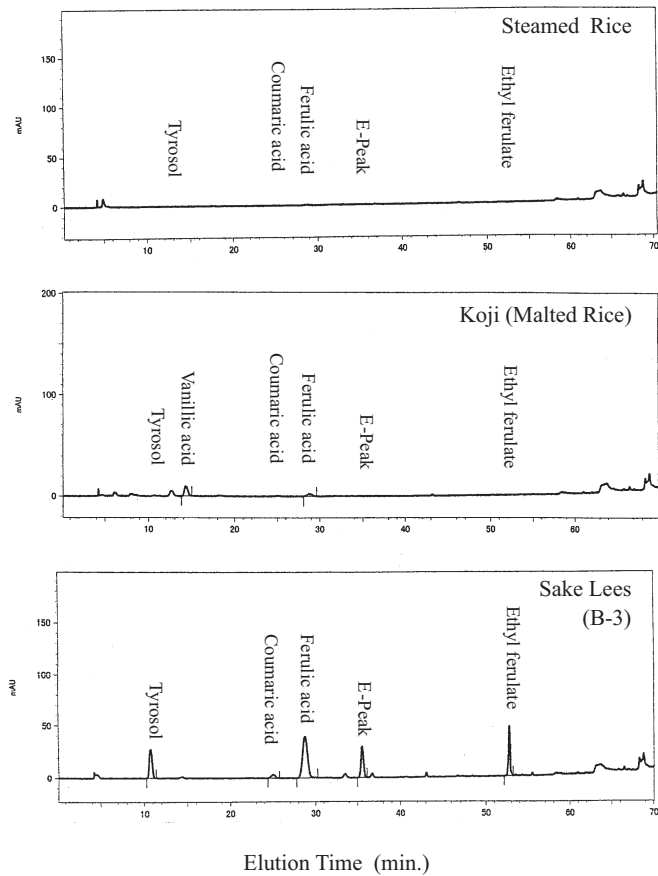


Fig. 3 HPLC Profiles of Phenolic Compounds in Steamed Rice, Koji and Sake Lees

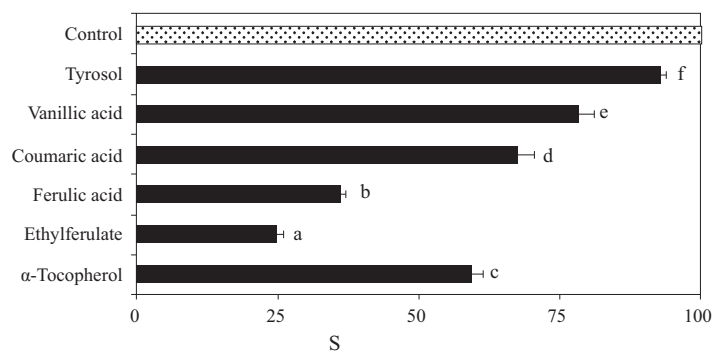


Fig. 4 Antioxidative Activity of Each Phenolic Compound Found in Sake Lees
Each value in this figure is the mean \pm SD (n=3). The value for a control containing no added sample represents 100% lipid oxidation. Bars not sharing the same letters differ significantly ($P < 0.01$ by Tukey's test).

も、ほぼ同様の結果を示した。50 μ Mにおけるフェルラ酸エチルおよびフェルラ酸のラジカル捕捉率は、それぞれ62%および55%を示し、バニリン酸（捕捉率：12%）、チロソール（捕捉率：8.2%）、クマリン酸（捕捉率：8.1%）より、有意に（ $P<0.01$ ）強いラジカル捕捉活性を示した。

4. ま と め

酒粕は清酒醸造時に産出する副産物である。清酒は、まず蒸米の一部に麹菌を接種した後、製麹工程により米麹を調製する。その後、この米麹に蒸米、水、酵母、乳酸を加えて発酵させ酒母を作る。この酒母に米麹、蒸米、水を3回に分けて添加し（三段仕込み）、発酵をさらに進める。米デンプンは麹菌の産生するアミラーゼによって糖化されるが、同時に低分子化された糖は酵母によりアルコールと二酸化炭素に変換され、もろみは熟成する（並行複発酵）。熟成もろみを圧搾して酒粕は回収されるが、このもろみが出来上がるまでには、約20日間の発酵日数が必要とされる。この間、もろみが酸化されず、香味や色沢の良好な清酒が製造されるには、抗酸化的な防御機構が存在すると考えられる。

太田ら¹³⁾は、清酒中の抗酸化物質としてフェルラ酸とチロソールを同定しているが、その他の物質、またこれらの含有量については不明である。酒粕は熟成もろみを圧搾したものであり、この中に含まれるフェルラ酸やチロソールの量は、清酒とは異なると考察される³⁾。

本研究においては、酒粕よりフェルラ酸およびチロソールを同定するとともに、その他の抗酸化物質としてクマリン酸およびフェルラ酸エチルを分離・精製し同定することができた。このフェルラ酸エチルは比較的極性が小さいため、清酒中よりも酒粕中に多く含まれていた（データは省略）。またこの抗酸化物質は、清酒や酒粕中に含まれる活性物質のなかで、最も強い抗酸化性を発揮した。これらの結果より、この酒粕のもつ抗酸化作用は、魚介類を粕漬けにした場合、魚介中の脂質の酸化を抑制し品質保持に寄与していると考えられる。また、酒粕を原料とした赤酢造りにおいても、粕中の抗酸化物質は風味の良好な食酢の醸造に大きく貢献してきたと推察される。今後は、これらの抗酸化物質が生体内においても抗酸化的に機能するかを検討する必要がある。

文 献

- 1) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真編集, 抗酸化物質, フリーラジカルと生体防御, 学会出版センター (1994).
- 2) 二木鋭雄, 吉川敏一, 大澤俊彦編集, 成人病予防食品の開発, シーエムシー, pp. 71-77 (1998).
- 3) 江崎秀男, 渡部綾子, 菱川進弘, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 醤油粕より調製したイソフラボン分画物の抗酸化素材としての有用性, 食科工, **51**, 47-53 (2004).
- 4) 栗木隆吉, 黒岩力也, 地域食品製造副産物を利用した高機能畜産物の生産技術の開発—地域食品製造副産物に含まれる機能性成分と飼料特性について—, 岡山総畜セ研報, 第15号, pp. 6-10 (2004).
- 5) <http://sakekasu-resistantprotein.com/>, <http://sakekasu-resistantprotein.com/seibun.html>

- 6) <http://www.nippon-shinyaku.co.jp/topics/ns2005/092805.html>
- 7) <http://www.hakutsuru.co.jp/corporate/news/2006/060425.shtml>
- 8) Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T., Antioxidant Activity and Isolation from Soybeans Fermented with *Aspergillus* spp. *J. Agri. Food Chem.*, **45**, 2020–2024 (1997).
- 9) Buege, J. A. and Aust, S. D., Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol.* **52**, 302–310 (1978).
- 10) Chang, W. H., Luu, H. X. and Cheng, A. C., A TLC-Fluorescent Method of Detecting and Evaluating Individual Antioxidative Components. *J. Food Sci.*, **48**, 658–659 (1983).
- 11) Yamaguchi T., Takamura H., Matoba, T. and Terao, J., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **62**, 1201–1204 (1998).
- 12) 木村進, 中村敏郎, 加藤博通編著, 食品の変色と化学, 光琳, pp. 8–15 (1995).
- 13) 太田剛雄, 高下秀春, 轟木康市, 岩野君夫, 大場俊輝, 清酒中に存在する抗酸化物質, 醸協, **87**, 922–926 (1992).