

樽酒の成分と生理活性への貯蔵期間の影響

折原佑輔・*和気洋子†・宇都宮 仁†・青島 均

(山口大学 理学部, †独立行政法人酒類総合研究所, *現キリンビール株式会社)

平成 17 年 11 月 2 日受理

Components of *Taru-Sake* and Their Physiological Activity

Yusuke ORIHARA, Hiroko WAKE, Hitoshi UTSUNOMIYA and Hitoshi AOSHIMA

(Department of Physics, Biology and Informatics, Faculty of Science, Yamaguchi University,
1677-1, Yoshida, Yamaguchi 753-8512,

†National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashihiroshima 739-0046)

Esters, higher alcohols and sesquiterpenoids in *Taru-Sake* (*sake* stored in a cedar cask) stored in *Akamidaru* and *Kotsukidaru* for various length of time were analyzed by gas chromatography. Glucose and the absorbance at 490 nm were also analyzed. The storage of *sake* in a cedar cask increased the sesquiterpenoids and the absorbance at 490 nm, but esters, higher alcohols, and glucose were not affected by the storage. *Sake* caused the response of GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes, suggesting the presence of GABA in the *sake*. However, the extract of cask stored *sake* with pentane did not potentiate the GABA_A receptor response, though that of whiskey did. The storage of *sake* in a cedar cask increased the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and the total polyphenol.

Key words : 樽酒, γ -アミノ酪酸, 抗酸化

緒 言

清酒は米から醸造したお酒で、日本において古くから主要なお酒として愛飲されてきた。清酒を杉材でできた樽に入れ、一定期間貯蔵して香りやわずかな色をつけたものは樽酒として販売されている。樽酒にはセスキテルペン類に由来する特有の香りがあり、着色も生じることが報告されている^{1,2)}。これらの成分のうち Cedrol は、自律神経系への作用による鎮静³⁾、睡眠改善^{4,5)}、また Eudesmol は胃酸抑制⁶⁾ などさまざまな健康増進作用があるのではないかと報告されている。

一方、ウイスキーは蒸留後榿樽に貯蔵して熟成させる。蒸留直後に無色透明で香りも刺激が強いものが熟成と共に琥珀色でまろやかな香りを持つようになる。

この過程で芳香成分やポリフェノール類の増加がウイスキーに起こり、 γ -アミノ酪酸（以下 GABA と略）の受容体のひとつである GABA_A 受容体に対する応答の昂進⁷⁾や抗酸化活性の増加⁸⁾が見られた。GABA_A 受容体は抑制性のイオンチャンネル型受容体で、この受容体応答が活性化されると、抗不安、リラックス効果を引き起こすため、酔い心地や健康への良い効果が予想される。

今回、赤味樽 (*Akamidaru* ; 杉の中心部の赤い部分を使用) および甲付樽 (*Kotsukidaru* ; 杉の表皮に近い白い部分と赤い中心部の境目周辺部を使用) に清酒を貯蔵した際の低沸点香氣成分、セスキテルペン類、着色度 (490 nm の吸光度) 等の変化を貯蔵日数を変えて測定した。次に樽酒においてもウイスキーと同様 GABA_A 受容体応答の昂進や抗酸化活性の増加が起

るか検討した。また、樽酒や樽に貯蔵しない清酒（以下未処理清酒という）による GABA_A 受容体への効果を測定した。

実験方法

1. 樽酒の調製及び成分分析

杉樽は、飼肥杉を用いた甲付と赤味の2種類の一斗樽（18 l 容）を有限会社庄司製樽所より購入した。清酒は、酒類総合研究所製 14 酒造年度産本醸造酒を使用し、その一般成分は、アルコール 15.5%，日本酒度 5.8，酸度 1.3，アミノ酸度 1.1，グルコース 21 g/l，着色度（490 nm）0.005 であった。

杉樽は、あらかじめ、40°C の湯 2 l で洗浄後 71~72°C の湯を 5 時間詰め、湯を抜いて水洗後、水を入れて 1 晩放置した。翌日水を抜いて、清酒 18 l を入れ、15°C に貯蔵し、2 日後、7 日後に 1.8 l ずつサンプリングし、残りを 14 日後にサンプリングした。

着色度は、松永らの報告¹⁾により 490 nm における吸光度として、2, 7, 14 日のサンプルを用い測定した。

グルコースは、アークレイ社 GA-1150 全自動グルコース測定装置を用い、2, 7, 14 日のサンプルを用い測定した。

GABA は、日本電子 JLC-500/V 全自動アミノ酸分析機を用いて測定した。

酢酸エチル、酢酸イソアミル、n-プロパノール、イソブチルアルコール、イソアミルアルコール、カプロン酸エチル（以下低沸点香氣成分）は、ヘッドスペースガスクロ法⁹⁾により 2, 7, 14 日目のサンプルについて測定した。

杉樽成分については、2, 7, 14 日のサンプルを用い、以下の方法で分析を行った。

2. 杉樽成分の分析

(1) サンプルからの杉樽成分の抽出

サンプルからの杉樽成分の抽出は、松永らの報告¹⁾を参考に、サンプル 3 ml を茶褐色の共栓付 10 ml 遠心沈殿管にとり、内部標準 0.02% L-カルボン・エタノール溶液 20 μ l と抽出溶媒 n-ヘキサン 500 μ l を加え、密閉しボルテックスで 5 分間攪拌した。その後 3000 rpm 10 分間遠心分離して溶媒層を取り、無水硫酸ナトリウムで脱水後、GC-MS 分析に供した。

(2) GC-MS 分析条件

HP 6890 Series GC System および HP 6890 Series Mass Selective Detector を用い以下の条件で分析を行った。定量は、スキャンモードにおける対内部標準ピーク面積比から Cedrol (μ g/l) として計算した。

カラム : DB-WAX 60 m \times 250 μ m, 0.25 μ m
カラム温度 : 初期温度 60°C 1 分間保持, 昇温速度 5°C/min で 220°C まで昇温し, 10 分間保持した。

カラム流量 : 1.5 ml/min 定流量モード

注入口 : 温度 230°C, パルスドスプリットレスモード, パルス圧 345 kPa, パルス時間 0.7 分

注入量 : 1.0 μ l

3. GABA_A 受容体応答の測定

GABA_A 受容体応答の測定は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞に cRNA を注入して、 α_1 , β_1 サブユニットから構成された GABA_A 受容体を発現させ、試料 (GABA, 樽酒及び未処理清酒, GABA+ペンタン抽出成分) による卵母細胞の電位変化をボルテジクランプ法により測定する方法で行った。

アフリカツメガエルは浜松生物教材から購入し、Kusano 等の方法¹⁰⁾で調整した。cRNA は Eric A. Barnard 教授 (Department of Pharmacology, University of Cambridge, UK) から供与された cDNA を鋳型として RNA ポリメラーゼにより合成した。cRNA を卵母細胞に注入し、ストレプトマイシン (50 mg/l) とペニシリン (25 mg/l) を含む Barth 液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.33 mM Ca (NO₃)₂ and 0.41 mM CaCl₂ in 5 mM Tris at pH 7.6) 中に 19°C で保存した。2 日~7 日後測定を行った。

測定はカエルリンガー液 (115 mM NaCl, 1 mM KCl and 1.8 mM CaCl₂ in 5 mM Tris at pH 7.2) 中で行い、試料液はカエルリンガー溶液として所定の濃度になるよう調整した。測定用セルに卵母細胞をセットし、カエルリンガー液、試料液を切り替えながら、電位変化をボルテジクランプ法 (Dagan 社製増幅器) により測定し、AD Instruments 社のデータ記録装置 (PowerLab/2 SP) により記録した。

樽酒及び未処理清酒からのペンタン抽出は次のように行った。200 ml の試料に 100 ml のペンタンを加え

て分液漏斗中で激しく混合し、二層に分かれた後にペンタン層を取り出した。エバポレーターでペンタンを除去した後に、抽出成分を200 μ lのエタノールに溶かし、冷蔵庫に保存して測定に用いた。

4. 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル補足活性, 総ポリフェノール, 過酸化水素の測定

DPPH ラジカルの捕捉活性は次のように測定した。0.5ml 0.5M 酢酸緩衝液 (pH 5.5), 1ml 0.2mM DPPH エタノール液, 0.375ml 試料 (樽酒及び未処理清酒), 1.125ml 50%エタノール水溶液を混合し, 30分後に517nmの吸光度を測定した。コントロールは, 樽酒等の代わりに15%エタノール水溶液を加えた。DPPH ラジカルの捕捉活性は, $100(C-S)/C$ (但し, Cはコントロールの吸光度, Sは試料の吸光度とする) として計算した。

総ポリフェノール量は, Folin-Ciocalteu 法により次のように測定した。1ml 蒸留水で5倍希釈した試料 (樽酒及び未処理清酒), 1ml Folin-Ciocalteu 溶液 (片山化学工業, 大阪), 1ml 炭酸ナトリウム水溶液 (0.1g/ml) を混合し, 1時間後に700nmの吸光度を測定した。試料の代わりに, Gallic acid 水溶液についても, 同様に測定し, 総ポリフェノール量は Gallic acid の濃度として表した。

過酸化水素量は, FOX 法により次のように測定した。溶液1 (4.4mM 2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT)メタノール液) と溶液2 (1mM Xylenol orange, 2.56mM Ammonium ferrous sul-

fate and 250mM H₂SO₄水溶液) を9対1の割合で混合し, FOX 溶液を調製した。3ml FOX 溶液と0.1mlの試料 (樽酒及び未処理清酒) あるいは基準とする過酸化水素液を混合し, 1時間後に遠心し, 560nmの吸光度を測定した。基準の過酸化水素液の吸光度を基に, 試料の酸化水素濃度を決定した。

実験結果

1. 低沸点香気成分, 着色度, グルコース及び杉樽成分の測定

Table 1に杉の赤味樽および甲付樽に清酒を貯蔵した際の, 低沸点香気成分, 着色度, グルコースを示した。着色度はほんのわずかであったが, 貯蔵日数と共に増加した。見た目にも樽酒はわずかに黄色に着色した。甲付樽に保存した時のほうが赤味樽に保存した場合に比べて着色度は大きかった。グルコースはウイスキーの貯蔵中に増加する¹¹⁾が, 樽酒では変化がなかった。低沸点香気成分は, カプロン酸エチルの減少以外に有意な変化は見られなかった。

Fig. 1に樽酒に含まれる杉樽由来セスキテルペンおよびそのアルコールの分析例を示した。 δ -Cadinene, Cubenol, epi-Cubenol, Cedrol, γ -Eudesmol, τ -Muurolol, δ -Cadinol (Torreyol), α -Eudesmol, β -Eudesmolについては, マスフラグメント及びリテンションインデックスから推定した。なお樽貯蔵しない清酒にはこれらの成分はほとんど検出されなかった。Table 2に貯蔵日数ごとの分析値をまとめた。いずれも日数と共に増加した。2日間では, セスキテルペン

Table 1 Colors and contents of esters, higher alcohols, and glucose in the *Taru-Sake* among storage periods.

	Non-treated		<i>Akamidaru</i>			<i>Kotsukidaru</i>		
		2 days	7 days	14 days	2 days	7 days	14 days	
Absorbance at 490 nm	0.005	0.006	0.010	0.011	0.008	0.010	0.014	
Glucose(g/100 ml)	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	
Ethyl acetate(mg/l)	38	38	38	36	37	38	39	
n-Propanol(mg/l)	57	56	54	50	55	55	53	
Isobutanol(mg/l)	45	44	42	40	43	44	42	
Isoamyl acetate(mg/l)	0.9	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
Isoamyl alcohol(mg/l)	123	121	117	118	118	119	123	
Ethyl caproate(mg/l)	0.4	0.2	0.1	0.2	trace	trace	trace	

Akamidaru indicates the sake stored in an *Akamidaru* (a type of cedar cask)

Kotsukidaru indicates the sake stored in a *Kotsukidaru* (another type of cedar cask)

Non-treated indicates the sake was not stored in a cedar cask.

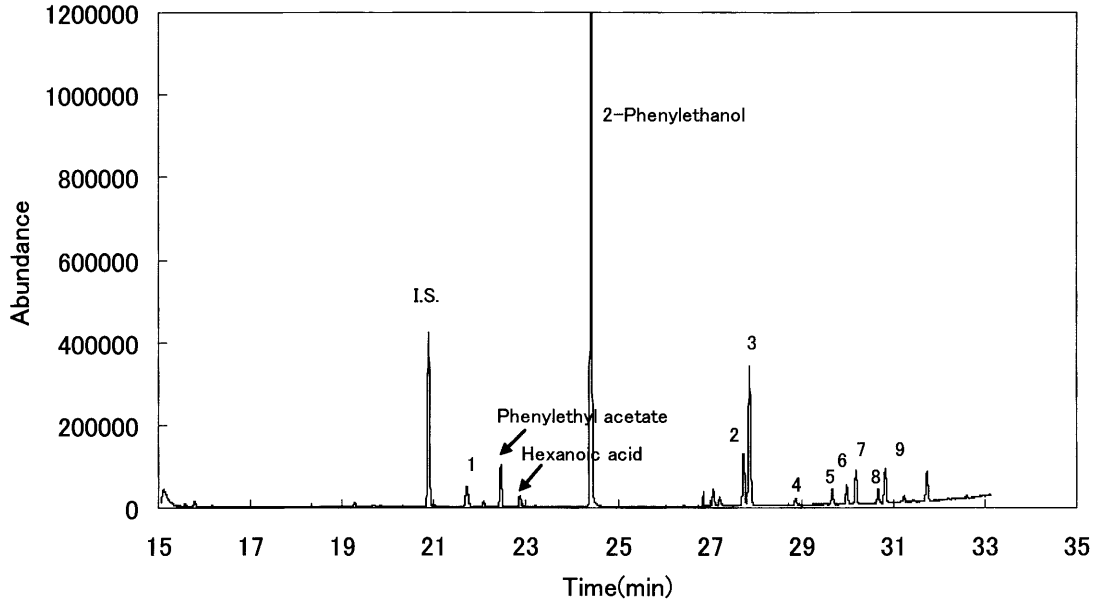


Fig. 1 The total ion chromatogram of an extract of *Taru-Sake* (*Kotsukidaru*, 14 days)
Peak No. 1 δ -Cadinene, 2 Cubenol, 3 epi-Cubenol, 4 Cedrol, 5 γ -Eudesmol, 6 τ -Muurolol, 7 δ -Cadinol (Torreyol), 8 α -Eudesmol, 9 β -Eudesmol, I.S. L-Carvone

Table 2 Contents of sesquiterpenes and sesquiterpene alcohols in the *Taru-Sake* among storage periods.

Compounds	(μg/l)					
	<i>Akamidaru</i>			<i>Kotsukidaru</i>		
	2 days	7 days	14 days	2 days	7 days	14 days
δ -Cadinene	15	35	44	135	157	213
Cubenol	107	362	387	213	304	392
epi-Cubenol	296	1141	1193	553	825	1121
Cedrol	10	33	47	28	31	52
γ -Eudesmol	11	64	61	65	77	109
τ -Muurolol	35	136	144	75	112	130
δ -Cadinol	64	261	266	124	178	231
α -Eudesmol	10	38	39	63	75	104
β -Eudesmol	40	150	154	172	204	279
Total	588	2220	2336	1428	1964	2632

類含量は甲付樽が赤味樽より多かった。特にカディネン類、オイデスマール類は甲付樽が赤味樽に比べて含有量が大きくなった。しかし14日後におけるその他の物質及び総セスキテルペン類含量では赤味樽との大きな差は見られなかった。

2. GABA_A 受容体への効果

Fig. 2 a に示すように清酒自身も GABA 様活性を引き起こした。しかしこの応答は甲付樽及び赤味樽に保存しても増加しなかった。なお、Fig. 2 a には甲付樽のデータのみを示し、未処理清酒及び赤味樽は同じであるため省略した。1% (v/v) 清酒の応答は 10

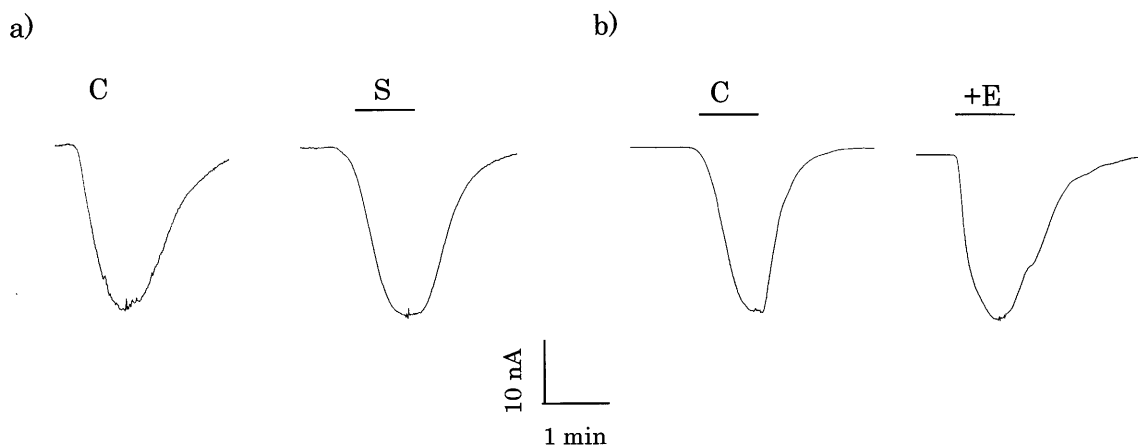


Fig. 2 a) GABA_A receptor response elicited by the sake.

GABA_A receptors were expressed in *Xenopus* oocytes by injecting cRNAs of the α_1 and β_1 subunits of the bovine receptors. All traces were obtained with a voltage clamp at -40 mV. The inward current is shown as a downward curve. C : 10 μ M GABA, S : 1% (v/v) *Taru-Sake* (*Kotsukidaru*, 14 days)

b) Effect of a pentane extract of *Taru-Sake* on GABA_A receptor response.

C : 10 μ M GABA + 0.05% (v/v) ethanol, +E : 10 μ M GABA + 0.05% (v/v) the extract of *Taru-Sake*.

μ M GABA の応答とほぼ等しいことから、応答を GABA そのものによるものと仮定すると清酒に含まれる GABA の量は 1mM と推定された。一方、全自動アミノ酸分析機にて測定された GABA の量は、0.18mM であった。また cRNA を注入していない卵母細胞は、清酒による応答を示さなかった。

増加が測定されたセスキテルペンアルコールは、今までの研究¹²⁾ から GABA_A 受容体への作用が予測される。そこで樽酒のアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた GABA_A 受容体への作用を検討することにした。清酒は GABA 様活性を示すため、ウイスキーの場合のように受容体応答への影響を直接測定することはできない。そこで清酒をペンタンにより抽出して芳香成分を取り出した。この抽出成分の GABA_A 受容体応答への効果を検討するため、10 μ M の GABA 及びエタノールを 0.05% となるよう加えた溶液を対照として、10 μ M の GABA 及びペンタン抽出成分を 0.05% となるよう加えた溶液の応答を測定した (Fig. 2 b)。しかし有意な応答の昂進は見られなかった (Fig. 3)。

3. DPPH ラジカル補足活性, 総ポリフェノール, 過酸化水素の測定

樽酒の DPPH ラジカル補足活性および総ポリフェノール量を Table 3 に示した。また過酸化水素がポリフェノールから生成することが報告¹³⁾ されているため、過酸化水素量を FOX 法により測定し Table 3 に示した。DPPH ラジカル補足活性および総ポリフェノール量は貯蔵日数と共に有意に増加し相関関係 (赤味樽 $r=0.97$, 甲付樽 $r=0.99$) が見られた。過酸化水素量も増加傾向を示したが、有意なものではなかった。

考 察

清酒にはセスキテルペンやそのアルコールは含まれていないが、杉樽に保存すると日数と共に増加した。甲付樽に保存した時のほうが赤味樽に保存した場合に比べてセスキテルペン類が早く抽出され、成分増加量が大きいものが見られた。これは杉の中心部は古く、テルペン量が少ないのに対して、木の周辺部は比較的新しく特定のテルペン成分量が豊富なためかもしれない。

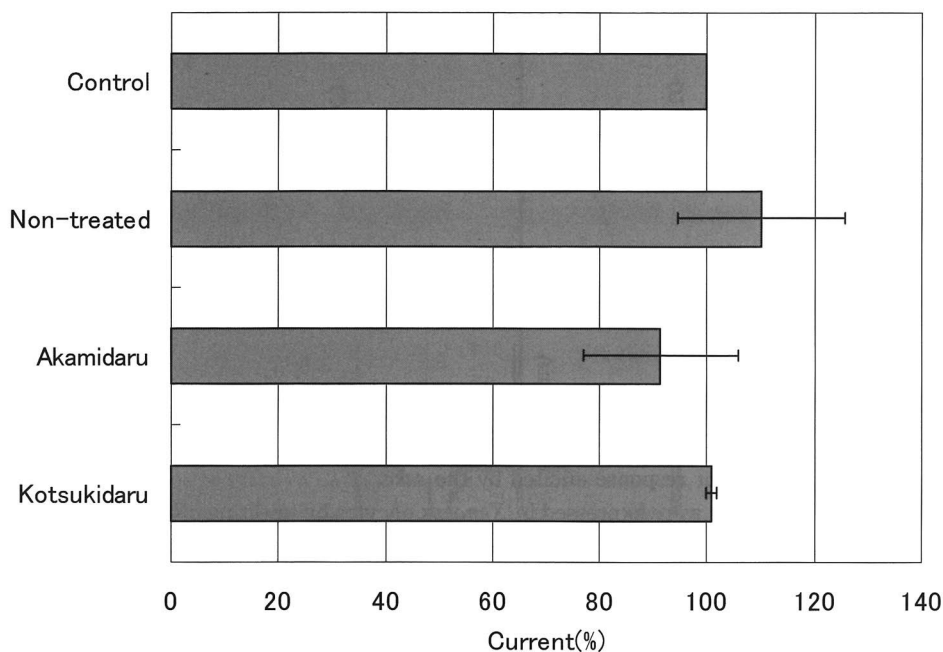


Fig. 3 Effect of a pentane extract of *Taru-Sake* on GABA_A receptor response.

The response elicited by 10 μ M GABA without any extract was taken to be 100%. The concentrations of the extracts of *Sake* (*Taru-Sake* and Non-treated) were 0.05% (v/v).
Control : 10 μ M GABA + 0.05% (v/v) ethanol

Table 3 DPPH radical scavenging activities, total polyphenol concentrations, and hydrogen peroxide (H₂O₂) concentrations in *Taru-Sake*.

	Scavenging activity (%)	Total polyphenol (mM)	H ₂ O ₂ (μ M)
Non-treated	23.3 \pm 1.9	0.744 \pm 0.006	9.28 \pm 0.75
<i>Akamidaru</i>			
2 days	26.0 \pm 2.3	0.749 \pm 0.007	9.54 \pm 0.65
7 days	46.8 \pm 3.2	0.789 \pm 0.006	9.01 \pm 0.38
14 days	44.4 \pm 0.9	0.801 \pm 0.007	11.7 \pm 1.4
<i>Kotsukidaru</i>			
2 days	29.7 \pm 2.5	0.764 \pm 0.004	12.7 \pm 1.1
7 days	39.8 \pm 1.9	0.786 \pm 0.004	12.0 \pm 1.1
14 days	46.1 \pm 3.0	0.811 \pm 0.008	10.6 \pm 2.1

Concentration of total polyphenol was expressed as mM garlic acid equivalent.

ウイスキーは榿樽で熟成することにより、GABA_A受容体応答の有意な昇進が見られた。樽酒の場合はGABAを含むため、樽酒を直接GABA溶液に添加して効果を見ることはできない。そこでペンタン抽出成分を添加して応答への効果を測定したが、有意な効果

は見られなかった。ウイスキーの場合には、貯蔵中のエタノール濃度も高く無色から琥珀色に変わるまで数年から数十年熟成させる。しかし樽酒の場合は、エタノール濃度も低く長くて数週間貯蔵するだけで、ほんのわずかに着色するだけである。木材成分の清酒への移

動量はウイスキーに比べるとずっと少なく成分構成も異なると思われる。そのため GABA_A 受容体応答に、有意に作用する程の効果は持たなかったと推定される。しかし、樫と杉という木材の種類の違いも関係しているかもしれない。樽酒の場合、健康増進効果が見られるとすれば GABA_A 受容体を通した直接的効果は弱く、嗅覚系を通した効果が主と思われる。

ウイスキーには GABA が含まれていないのに対して、醸造酒の清酒には 0.18 mM の GABA が含まれていた。しかし GABA_A 受容体応答では応答から推定して約 1 mM の GABA 相当の応答があった。これは清酒のなかに、GABA 以外に活性を引き起こす物質が存在するのか、あるいはペンタン抽出されない応答を昇進させる物質が含まれている可能性が考えられ、今後の検討課題である。GABA を豊富に含む食品は血管に作用して、高血圧を抑制する効果があると報告されている^{14,15)}。従って清酒は GABA を含む点で蒸留酒より健康に良いと言えるかもしれない。

ウイスキーの熟成過程で、抗酸化活性の一つの指標である DPPH ラジカル捕捉活性が増加した。樽酒においても総ポリフェノール量が増加すると共に DPPH ラジカル捕捉活性が増加し、両者に相関が見られた。樽貯蔵によってポリフェノールが約 1 割増加すると DPPH ラジカル捕捉活性は約 2 倍になることから、清酒にすでに含まれているポリフェノールに比べて、杉材に含まれるポリフェノールの抗酸化活性は高いものと推定される。すでにノルリグナン類の Agatharesinol, Sequirin-C や Sugiresinol が樽酒から同定・定量されている。また、樽酒にこれらの成分が含まれることにより、抗酸化活性だけでなく、消臭活性が増加することも報告されている¹⁶⁾。

一方、茶など嗜好飲料に含まれるポリフェノールは過酸化水素を生成することが報告されている¹³⁾。そこで樽酒において生成する過酸化水素量を測定した。しかし有意な増加は見られず、過酸化水素による細胞毒性はないものと考えられる。

要 約

1) 赤味樽および甲付樽に清酒を、0, 2, 7, 14 日間貯蔵し、グルコース、着色度、低沸点香気成分及び杉樽由来成分セスキテルペン類香気成分量を測定した。

- 2) グルコース、低沸点香気成分は、樽貯蔵しても増加しなかった。着色度とセスキテルペン類は貯蔵日数と共に増加した。セスキテルペン類は甲付樽の方が早く抽出され、カディネン、オイデスマールは甲付樽に保存した方が赤味樽に保存したものに比べて含有量が大きかった。
- 3) アフリカツメガエル卵母細胞に GABA_A 受容体を発現させて、清酒の効果を検討した。清酒は応答を引き起こし GABA 様活性を示した。また、この応答は清酒中の GABA 含有量に対して大きかった。しかし、この応答は樽貯蔵しても増加しなかった。
- 4) 樽酒をペンタン抽出して芳香成分の GABA_A 受容体応答への影響を測定したが、有意な効果は見られなかった。
- 5) 樽貯蔵により、総ポリフェノール量及び DPPH ラジカル捕捉活性は相関して増加した。しかし、過酸化水素の有意な増加は見られなかった。

文 献

- 1) 松永恒司, 古川恵司, 原 昌道: 醸協, **97**, 529 (2002)
- 2) 松永恒司: 醸協, **97**, 744 (2002)
- 3) 永嶋義直, 水戸部裕之, 左達秀敏, 鈴木めぐみ, 矢田幸博, 鈴木敏幸, 大石幸子: 日本薬理学雑誌, **124**, 5012 (2004)
- 4) 山本由華吏, 白川修一郎, 永嶋義直, 大須弘之, 東條 聡, 鈴木めぐみ, 矢田幸博, 鈴木敏幸: 日本生理人類学会誌, **8**, 69 (2003)
- 5) 永嶋義直: 香料, **222**, 113 (2004)
- 6) NOGAMI M, MORIURA T, KUBO M, TANI T: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3854 (1986)
- 7) KODA H, HOSSAIN SJ, KISO Y, AOSHIMA H: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5238 (2003)
- 8) AOSHIMA H, TSUNOUE H, KODA H, KISO Y: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5240 (2004)
- 9) 中野成美, 宇都宮仁, 磯谷敦子, 高橋利郎: 酒類総合研究所報告, **177**, 1 (2005)
- 10) KUSANO K, MILEDI R: *J. Physiol.*, **328**, 143 (1982)
- 11) LEE K-Y M, PATERSON A, PIGGOTT JR: *J. Inst. Brewing*, **107**, 287 (2001)
- 12) HUANG SH, DUKE RK, CHEBIB M, SASAKI K, WADA K, JOHNSTON GA.: *Eur. J. Pharmacol.*,

- 464, 1 (2003)
- 13) AKAGAWA M, SHIGEMITSU T, SUYAMA K :
Biosci. Biotechnol. Biochem., **67**, 2632-2640 (2003).
- 14) 梶本修身, 平田 洋, 西村 明:健康・栄養食品研究, **6**, 51-64 (2003)
- 15) 風見大司, 小倉長尾, 福地敏彦, 辻 啓介, 穴
沢麻梨, 前田浩明:日本食品科学工学会誌, **49**,
409-415 (2002)
- 16) 松永恒司, 高橋孝悦, 古川恵司, 原 昌道:醸
協 (平成15年度日本醸造学会大会要旨
集), **98**, 677 (2003)
-