

樽酒もしくは樽酒に含まれる成分の
機能性と食味に及ぼす影響に関する研究

高尾佳史

2016年

目次

	頁
序論	1
第1章 樽酒に含まれる成分の白癬菌 <i>T. rubrum</i> に対する抗菌性	4
第1節 諸言	4
第2節 実験方法	4
第1項 杉樽廃材からの杉樽精油の抽出	4
第2項 試験に供した精油と精油成分	5
第3項 使用菌株	5
第4項 <i>T. rubrum</i> 分生子懸濁液の調製	5
第5項 分生子に対する生育阻害活性の評価	5
第6項 菌糸に対する生育阻害活性の評価	6
第7項 DNA 代謝酵素阻害活性の評価	7
第8項 精油成分の分析	8
第3節 実験結果と考察	8
第1項 精油の <i>T. rubrum</i> に対する生育阻害活性	8
第2項 精油による <i>T. rubrum</i> の DNA ポリメラーゼ阻害活性	9
第3項 <i>T. rubrum</i> 菌糸に対する杉樽精油の生育阻害活性	10
第4項 精油による <i>S. epidermidis</i> に対する生育阻害活性	11
第5項 杉材から得られた精油の組成	13
第6項 杉樽精油から得られたセスキテルペン類の <i>T. rubrum</i> 生育阻害活性	13

	頁
第 7 項 杉樽精油から得られたセスキテルペン類の <i>T. rubrum</i> DNA 代謝酵素活性阻害	14
第 8 項 考察	15
第 4 節 要約	16
第 2 章 樽酒に含まれる成分の火落菌に対する抗菌性	17
第 1 節 諸言	17
第 2 節 実験方法	17
第 1 項 供試サンプル	17
第 2 項 樽酒中のフェルラ酸の同定	17
第 3 項 フェルラ酸の定量	18
第 4 項 杉材からのセスキテルペン類の分離精製	19
第 5 項 樽酒中のセスキテルペン類の分析・定量	19
第 6 項 ペーパーディスク法による抗火落菌試験	19
第 7 項 清酒中での抗火落菌試験	20
第 3 節 実験結果と考察	21
第 1 項 樽酒中のフェルラ酸の同定	21
第 2 項 樽貯蔵中の樽酒中フェルラ酸の増加	23
第 3 項 セスキテルペン類およびフェルラ酸の火落菌増殖抑制効果	25
第 4 項 考察	27
第 4 節 要約	28

	頁
第3章 樽酒が食品由来油脂に及ぼす影響	29
第1節 諸言	29
第2節 実験方法	30
第1項 供試サンプル	30
第2項 官能評価の方法	30
第3項 界面張力の測定方法	30
第3節 実験結果と考察	31
第1項 官能評価	31
第2項 清酒と油脂間の界面張力	32
第3項 杉樽由来成分と油間の界面張力	34
第4項 考察	35
第4節 要約	36
第4章 樽酒が食品の旨味に及ぼす影響	37
第1節 諸言	37
第2節 実験方法	38
第1項 供試サンプル	38
第2項 旨味後味の官能評価	38
第3項 味認識装置を用いた旨味後味の評価	38
第4項 味認識装置に供する食品サンプル液及び旨味サンプル液の調製	39
第5項 杉樽抽出物の調製	40
第6項 清酒濃縮液の調製	40
第7項 セスキテルペン類の分析・定量	40

	頁
第8項 総ポリフェノール量の測定	40
第9項 全糖量の測定	41
第3節 実験結果と考察	41
第1項 旨味後味の官能評価	41
第2項 味認識装置を用いた旨味の評価	42
第3項 旨味後味に関わる樽酒成分の推定	46
第4項 考察	50
第4節 要約	51
結論	52
参考文献	56
投稿論文目録	64
謝辞	67
要旨	68

目 録

	頁
第 1 章	
Fig. 1. 1 <i>In vitro</i> DNA polymerase inhibition assay scheme.	7
Fig. 1. 2 Inhibitory effects of essential oils on the activity of <i>T. rubrum</i> DNA polymerase. . .	10
Fig. 1. 3 Effects of immersion in essential oil of used cedar cask solution on the viability of <i>T. rubrum</i> mycelia.	11
Fig. 1. 4 <i>T. rubrum</i> MIC values of sesquiterpenoids from essential oil of used cedar cask. . .	14
第 2 章	
Fig. 2. 1 HPLC analysis of ferulic acid (including dihydroferulic acid) in sake.	22
Fig. 2. 2 Mass spectrum of ferulic acid in GC/MS analysis.	23
Fig. 2. 3 Time course of the ferulic acid (including dihydroferulic acid) content in <i>taru</i> - sake.	24
Fig. 2. 4 Growth inhibition effects of sesquiterpenoids and ferulic acid on <i>hiochi</i> bacteria (<i>L. fructivorans</i>) in sake (adjusted 10% ethanol concentration).	26
Fig. 2. 5 Growth inhibition effects of sesquiterpenoids and ferulic acid on <i>hiochi</i> bacteria (<i>L. hilgardii</i>) in sake (adjusted containing a final concentration of 10% ethanol). . .	27
第 3 章	
Fig. 3. 1 Measurement of perceived intensity of mayonnaise and greasy aftertaste after drinking sake.	32
Fig. 3. 2 Interfacial tension between cooking oils and sake.	33
Fig. 3. 3 Interfacial tension between refined fish oils and sake.	34

Fig. 3. 4	Interfacial tension between soybean oil and regular sake added with a <i>taru</i> -sake specific constituent.	35
-----------	---	----

第 4 章

Fig. 4. 1	Procedure of umami initial taste and aftertaste measuring by taste sensor.	39
Fig. 4. 2	Umami aftertaste in the broth of steamed clams using a sensory evaluation technique.	42
Fig. 4. 3	Quantitative evaluation of umami aftertaste using an artificial taste sensor.	44
Fig. 4. 4	Evaluation of aftertaste of umami- tasting solutions using a taste sensor.	46
Fig. 4. 5	The effect of cedar extract on aftertaste measurement of seasoning soy sauce using a taste sensor.	48
Fig. 4. 6	The effect of additive sake concentrate on aftertaste measurements of seasoning soy sauce using a taste sensor.	49

表目録

	頁
第 1 章	
Table 1. 1 <i>T. rubrum</i> MIC and MFC values of essential oils.	9
Table 1. 2 <i>S. epidermidis</i> MIC and MBC values of essential oils.	12
Table 1. 3 Sesquiterpenoids composition of essential oils extracted from Japanese cedar.	13
Table 1. 4 <i>T. rubrum</i> MIC values of sesquiterpenoids from essential oil of used cedar cask.	14
Table 1. 5 IC ₅₀ values of sesquiterpenoids from essential oil of used cedar cask against the activities of DNA metabolic enzymes from <i>T. rubrum</i>	15
第 2 章	
Table 2. 1 Antibacterial activity of sesquiterpenoids and ferulic acid against <i>hiochi</i> bacteria in paper disk agar plate method.	25
第 4 章	
Table 4. 1 Total sesquiterpenoid contents in <i>taru</i> -sake preparations.	47
Table 4. 2 Total polyphenol and total sugar contents in sake.	50

序論

樽酒とは清酒を杉 (*Cryptomeria japonica*) 製の樽に貯蔵する事により付与される杉のさわやかな香りを特徴とする酒である。木製の樽は世界中で液体の輸送や保存に使われてきた。欧米ではワインやウイスキーがそうであるように樽といえばオーク製であるが、日本では材料が豊富に得られることや比較的柔らかく加工が容易なことなどから杉製の樽が使用されてきた。江戸時代には、清酒製造が本格化した灘から一大消費地の江戸へ向けて樽に詰められた清酒が樽廻船により海路で運ばれた。文化・文政期にはその量は年間 60 万樽以上に上った (川崎, 1980; 日本海事史学会, 1972)。

現在では慶事の席などでの鏡開きくらいしか杉樽を見かけることはなくなったが、ガラスビンが普及し始める昭和の初期までは杉樽は清酒の輸送・保存容器として一般的に使用されており (今安, 1980)、このころまではほとんどの清酒が結果的に樽酒であった。このように、杉樽が容器として使用されたことによって生まれた樽酒であるが、日常生活から杉樽が姿を消した現在でも鏡開きで見られるほかに、一度杉樽に清酒を詰め、程よく香りがついたところでガラスビンなどに詰め替えたものが商品化されており、気軽に楽しむことができるようになっている。

樽酒の製造には杉樽が不可欠であるが、その材料として昔から奈良の吉野杉が香味や物理的特性 (酒の漏れにくさ) の面で適しているとされてきた (佐藤, 1922; 小穴, 1930)。杉樽を作る際には、杉の中心に近い赤味がかかった部分を板目 (年輪に沿った方向での切り出し方) に切ったものが用いられ、この材を用いた 20 枚程度の側板と円形の鏡を竹でできたタガで結わえることで、接着剤などを用いずとも水や酒を漏らさない樽が作られる。

樽酒には清酒に通常含まれる成分に加えて、セスキテルペン類、ジテルペン類、ノルリグナン類など杉樽由来の成分が多く含まれていることがわかっている (松永ら, 2002; 松永

ら, 2004; 松永ら, 2008)。また、これらの成分には様々な機能性があることが明らかになっており、セスキテルペン類の一種である δ -cadinene などには様々な微生物に対する抗菌性 (岡村ら, 2002) が、セスキテルペンアルコール類の一種であり、漢方薬の成分としても知られる β -eudesmol には胃潰瘍抑制効果 (Nogami *et al.*, 1986; Matsunaga *et al.*, 2000) や脂肪の蓄積を抑える効果 (光永ら, 2008; 光永, 2014)、冷受容チャネルである TRPA1 を活性化し、口腔内やのどに冷涼感を与える効果 (小原, 2012) が、セスキテルペンアルコール類の一種である torreyol にはリラックス効果 (坂巻ら, 2013) が、そのほかにもジテルペン類による火落菌に対する抗菌効果 (松永ら, 2008)、ノルリグナン類による抗酸化性や消臭活性 (松永ら, 2004) などが報告されている。

このように、樽酒には杉樽由来の多くの機能性成分が含まれているが、杉樽に清酒を貯蔵することで製造するため、杉材チップなどを用いる場合と比べると酒と杉材の接触面積が小さく、杉樽成分の抽出という意味では効率が悪い。そのためにほとんどの成分が杉樽に残ったままになっている。さらに、昔は使用後の杉樽が水をためるため、漬物や味噌の製造のためなど、様々な用途で再利用されていたが、現在では使用後の杉樽の利用価値はほとんどない。そのため、一度樽酒の製造に使用された杉樽はほとんどが廃棄されているが、環境保護などの観点からも何らかの形で有効利用されることが好ましい。そこで、杉樽廃材の有効活用を目指し、杉樽廃材から抽出された精油の白癬菌に対する抗菌性について検討した。また、清酒中で火落菌が繁殖することにより、貯蔵中や瓶詰め後に白濁や酸味が生じることがある。この現象は「火落ち」と呼ばれており、現在でも酒造業者を悩ませている。樽酒は一般的に通常の清酒に比べて火落ちしにくいと言われる (植田ら, 1988) が、これには上述のジテルペン類による抗菌効果が一定の寄与をしていると考えられる。しかし、樽酒中にはジテルペン類よりも多量のセスキテルペン類が含まれており、さらに上述の通りセスキテルペン類には様々な微生物に対する抗菌性が確認されているため、セスキテルペン類の火落菌に対する抗菌効果についての検討を行った。

一方、これまでに樽酒に含まれる成分の機能性については様々な効果が報告されてきた

ものの、食中酒である樽酒にとって重要な食品との相性についてはこれまで研究されてこなかった。また、アルコール飲料と食品の相性についての科学的な根拠に基づいた報告も少ない。樽酒はそのさわやかな香りのためか、一部でうなぎなどの油っこい食品にあうとされていることもあるため、樽酒と油脂を多く含む食品との間に何らかの関係がないか調べた。さらに、清酒と合わせることが多い和食にとって最も重要な要素の一つである、旨味に対して樽酒が与える影響についても検討を行った。

以上、本研究では樽酒や樽酒に含まれる成分の機能性を明らかにするとともに、これまで調べられてこなかった、樽酒と食品との食べ合わせについても科学的に評価することを目的とした。

第1章 樽酒に含まれる成分の白癬菌 *T. rubrum* に対する抗菌性

第1節 諸言

樽酒は杉樽に清酒を貯蔵することで製造される。そのため多くの杉樽が必要とされるが、現在では清酒貯蔵後の杉樽にはほとんど利用価値がなく、その多くが廃棄されている。しかし、杉樽廃材中にはセスキテルペン類、ジテルペン類、ノルリグナン類などの多くの成分が含まれており、これらは抗菌性、抗酸化性、消臭効果、リラックス効果など様々な機能性を持っていることが明らかになっている（松永ら, 2004; 松永ら, 2008; 坂巻ら, 2013）。さらに、清酒の樽貯蔵によって樽酒中に抽出される成分はほんの一部で、そのほとんどが杉樽廃材中に残存している。

一方、糸状菌の一種である白癬菌の感染により引き起こされる水虫は日本の全人口の 1/4 が感染しているとされており、多くの人を悩ませている（小笠原, 2003）。

そこで、本章では、現在ほとんどが廃棄されている樽酒製造後の杉樽廃材を有効利用するため、罹患者が多い水虫の治療への活用をめざし、杉樽抽出物の白癬菌に対する生育阻害活性について検討するとともに、そのメカニズムに関して検討を行った。

第2節 実験方法

1. 杉樽廃材からの杉樽精油の抽出

杉樽廃材を 5-10 mm 角のチップにし、水蒸気蒸留により抽出した。抽出は蒸留液が杉樽廃材の重量の 2 倍になるまで行い、その時の杉樽精油の収量は 0.1% (v/w) であった。

2. 試験に供した精油と精油成分

精油は全て木質部から抽出されたものを用いた。ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、ヒバ (*Thujopsis dolabrata*)、杉 (*Cryptomeria japonica*) の精油は (株) 生活の木で購入したものを使用した。 δ -cadinene (シグマアルドリッチ)、 β -eudesmol (和光純薬) は標準品を使用した。epicubenol は杉樽精油からメタノールを溶媒としてワコーゲル 50C18 (和光純薬) で粗精製し、さらに *n*-ヘキサンを溶媒としてワコーゲル C-300HG (和光純薬) で精製を行うことで得た。これらのセスキテルペン類の純度は 90%以上であった。

3. 使用菌株

水虫の原因菌として主要なものとしてされている、白癬菌 *Trichophyton rubrum* (NBRC5467)、代表的な表皮常在菌である表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (NBRC12993) を用いた。

4. *T. rubrum* 分生子懸濁液の調製

T. rubrum を 1/10 濃度の sabouraud dextrose 寒天培地上で 27 °C、1 週間以上培養し、分生子を形成させた。分生子は 0.1% Tween 80 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS + Tween 80, pH 7.0) に懸濁することで回収した。PBS + Tween 80 で洗浄後、菌糸断片を取り除くために滅菌ガーゼでろ過し、分生子懸濁液を得た。

5. 分生子に対する生育阻害活性の評価

微量液体希釈法により、96 穴ウェル上で最小生育阻害濃度 (MIC) を測定することで行った。精油もしくは杉樽精油成分が 2 倍希釈系列で 9.8- 10000 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) になるように調製した 0.1% Tween 80 含有 Mueller-Hinton 培地を各ウェルに加え、そこに最終濃度が 2.5×10^5 分生子/ml になるように *T. rubrum* 分生子懸濁液を加え、27 °C で 7 日間培養した。

プレートリーダー (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc.) で 630 nm の吸光度を測定し、吸光度が上昇していなかった (分生子を接種していないウェルと同じ吸光度を示した) ウェルのうち、最も低い成分濃度の値を MIC とした。

MIC 測定後に吸光度が上昇していなかったウェルから 100 μ l ずつを potato dextrose 寒天培地に塗布し、27 $^{\circ}$ C で 3 日間培養することで、最小殺真菌濃度 (MFC) を測定した。寒天培地上で菌糸の成長が見られなかったもののうち、最も低い成分濃度の値を MFC とした。

S. epidermidis の生育阻害活性も同様の方法で行ったが、MIC の評価は 30 $^{\circ}$ C、24 時間の培養で、最小殺菌濃度 (MBC) の評価は 30 $^{\circ}$ C、3 日間の培養で行った。

6. 菌糸に対する生育阻害活性の評価

杉樽精油の菌糸に対する生育阻害活性の評価は Inouye らの方法 (Inouye *et al.*, 2007) を参考にして行った。すなわち、直径 8 cm のシャーレに 15 ml の potato dextrose 培地 (寒天 3% 含有) を加えて固めたプレート上に分生子懸濁液 (1.0×10^7 分生子) を塗布し、27 $^{\circ}$ C、3 日間培養した。菌糸が生育したプレートからコルクボーラーで直径 7 mm の寒天ブロックを打ち抜いた。表面に菌糸が生育した寒天ブロックを 10 ml の 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) 含有滅菌水 (コントロール)、もしくは 1% DMSO 含有杉樽精油水溶液 (50、100 μ g/ml) に浸漬し、27、37、42 $^{\circ}$ C で 20 分間静置した。浸漬処理後、寒天ブロックを 10 ml 生理食塩水で洗浄し、ろ紙で余分な水分を除去し、菌糸が生育している面を上にして sabouraud dextrose 寒天培地上に置き、27 $^{\circ}$ C で 8 日間培養した。生育したコロニーの短径と長径をノギスで測定し、短径と長径を掛け合わせた値を算出した。寒天培地に生存している細胞の数を推定するため、プレートあたり 1.0×10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 分生子を塗布したプレートから寒天ブロックを打ち抜き、sabouraud dextrose 寒天培地上で上記と同様に培養し、分生子数と短径 \times 長径の値から検量線を作成した。これらの試験は 4 回ずつ行った。

7. DNA 代謝酵素阻害活性の評価

Potato dextrose 寒天培地に生育した *T. rubrum* の菌糸 5 mg を採取し、1 mM EDTA、5 mM 2-mercaptoethanol、15% glycerol、1 µg/ml leupeptin、100 µM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 含有 50 mM Tris- HCl 緩衝液 (pH 7.5) 2 ml で超音波処理を行った。遠心分離 (16,000 × g、10 min、4 °C) して得られた *T. rubrum* の酵素を含む上清を PC 緩衝液 (50 mM Tris- HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、5 mM 2- mercaptoethanol、15% glycerol) で希釈し、DNA 代謝酵素活性の評価に用いた。

DNA ポリメラーゼ、DNA トポイソメラーゼ II、IMP デヒドロゲナーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼの *in vitro* での活性評価は 37 °C の温度条件でこれまでの報告通りに行った (Fig. 1. 1) (水品ら, 1996; 水品ら, 1997; 水品ら, 1999; 水品ら, 2000; 水品ら, 2007)。酵素はそれぞれ 0.05 U 用いた。

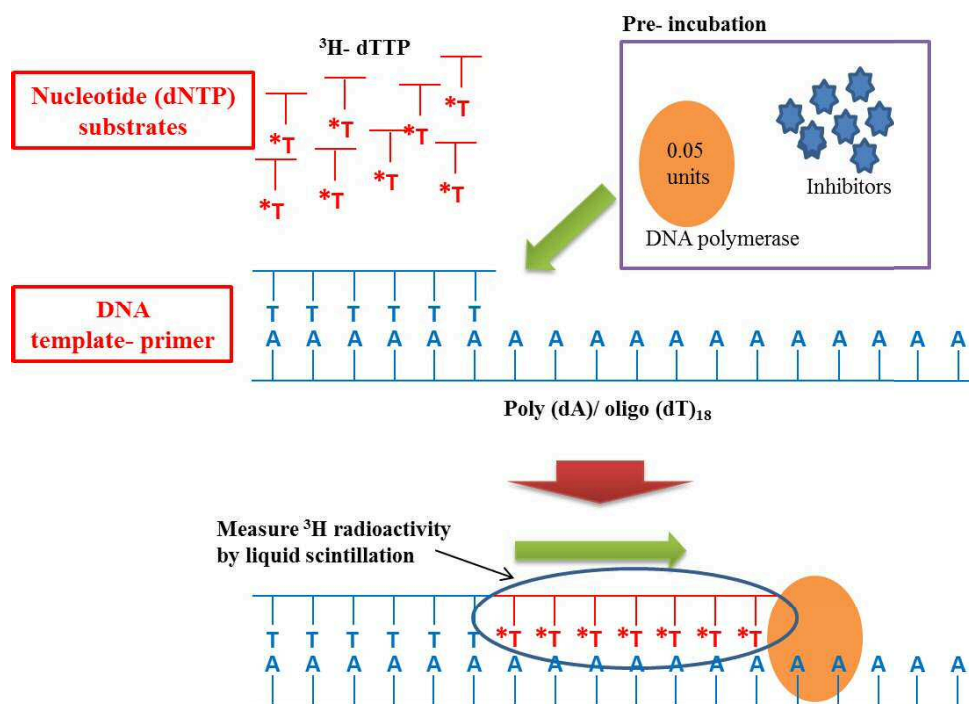


Fig. 1. 1 *In vitro* DNA polymerase inhibitor assay scheme.

In this study, we used essential oils extracted from Japanese woods as DNA polymerase inhibitor.

8. 精油成分の分析

精油サンプルは *n*-ヘキサンで 1000 倍希釈し、内部標準としてエタノールに溶解した *R*-(-)-carvone を用いた。分析は以下に示す条件で行った。

カラム : ULBON HR-SS-10 (信和化工, 0.25 mm × 50 m)

カラム温度 : 60 °C (1 min) → 5 °C/min → 220 °C (7 min)

カラム流量 : 2.0 ml/min He

注入口温度 : 220 °C

イオン源温度 : 230 °C

イオン化法 : 電子衝突イオン化法 (EI)

イオン化電圧 : 70 eV

第3節 実験結果と考察

1. 精油の *T. rubrum* に対する生育阻害活性

はじめに微量液体希釈法により、杉樽精油の *T. rubrum* に対する生育阻害活性を見た。その結果、MIC、MFC とともに 313 µg/ml となり、市販の杉 (*C. japonica*) の木部から得られた精油と同等の生育阻害活性が見られた (Table 1. 1)。今回試験した市販の3種の精油のなかではヒバ (*T. dolabrata*) の木部の精油で *T. rubrum* に対する最も強い生育阻害活性が認められ、その次に杉の木部の精油 (杉樽精油も含む)、最も弱かったのがヒノキ (*C. obtusa*) の木部の精油であった (Table 1. 1)。さらに、MFC/MIC 比率を見ると、ヒバ精油と杉精油 (杉樽精油を含む) では 1.0 に近かったため、これらの精油は殺真菌的に働いているものと考えられた。一方、ヒノキの精油では MFC/MIC 比率が 2.0 以上であり、静真菌的に働いていると考えられた。

Table 1.1 *T. rubrum* MIC and MFC values of essential oils.

The cedar cask oil was extracted from sake-cask by the steam distillation method, and the others were commercially available essential oils extracted from xylem by the same method.

MIC test : The microbroth dilution method was applied. Mueller Hinton broth containing 0.1% Tween 80 inoculated with microconidias in the micro plate was incubated at 27 °C for 7days followed by the measurement of absorbance at 630 nm.

MFC test : After the MIC tests, 100 µl broth were transported to a new potato dextrose agar plate and incubated at 27 °C for 3 days.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

essential oils	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)
Used cedar cask (Japanese cedar)	313	313
<i>Cryptomeria japonica</i> (Japanese cedar)	313	313
<i>Chamaecyparis obtuse</i> (Japanese cypress)	625- 1250	2500
<i>Thujopsis dolabrata</i> (False arborvitae)	78.1- 156	156

2. 精油による *T. rubrum* の DNA ポリメラーゼ活性阻害

次に精油の *T. rubrum* に対する生化学活性を *in vitro* で見たところ、杉樽精油 100 µg/ml で *T. rubrum* 菌糸から得られた DNA ポリメラーゼの活性を阻害し、50%阻害濃度 (IC₅₀) は 21 µg/ml であった (Fig. 1. 2)。また、市販精油のうち杉精油では杉樽精油と同等の阻害活性を示し、今回試験した精油のうちではヒバ精油の阻害活性が最も強く、次に杉精油で、ヒノキ精油が最も弱かった。精油による *T. rubrum* DNA ポリメラーゼ阻害活性は先述した *T. rubrum* 生育阻害活性試験の結果と阻害活性の強度が一致していた。これらの結果より、精油による *T. rubrum* の生育阻害は DNA ポリメラーゼ活性の阻害が主な原因になっていると考えられた。

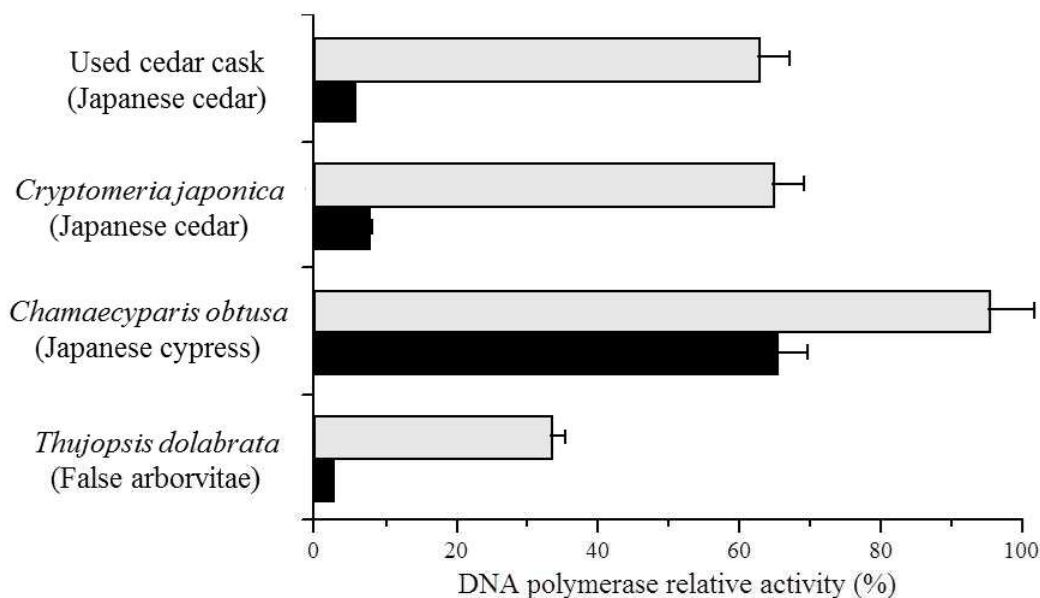


Fig. 1. 2 Inhibitory effects of essential oils on the activity of *T. rubrum* DNA polymerase.

DNA polymerase activity (0.05 units) in the absence of essential oil was taken as 100%, and relative activity is shown. Data are presented as the means \pm standard error (n=3).

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

3. *T. rubrum* 菌糸に対する杉樽精油の生育阻害活性

杉樽廃材の再利用の観点から、本研究では杉樽精油に焦点を置き、杉樽精油の *T. rubrum* 菌糸に対する生育阻害活性を調べた。Inouye らの方法 (Inouye *et al.*, 2007) を参考にし、*T. rubrum* 菌糸を生育させた寒天ブロックを杉樽精油溶液に浸した後も生育する菌糸細胞の数を測定したところ、50、100 $\mu\text{g/ml}$ の杉樽精油溶液中で 27、37、40 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間処理することで、生存細胞は顕著に減少した (Fig. 1. 3)。50 $\mu\text{g/ml}$ 杉樽精油中で 20 分間処理することで菌糸細胞の生存率は 27 $^{\circ}\text{C}$ で 5.2%、37 $^{\circ}\text{C}$ で 16.0%、42 $^{\circ}\text{C}$ で 10.4% と高い温度 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$) よりも低い温度 (27 $^{\circ}\text{C}$) で高い生育阻害活性が確認された。一方、抗真菌剤として水虫などの真菌症患者に処方されているイトラコナゾールを 8 $\mu\text{g/ml}$ 用いた場合には低い温度 (27 $^{\circ}\text{C}$) に比べて高い温度 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$) で高い生育阻害活性が確認された。

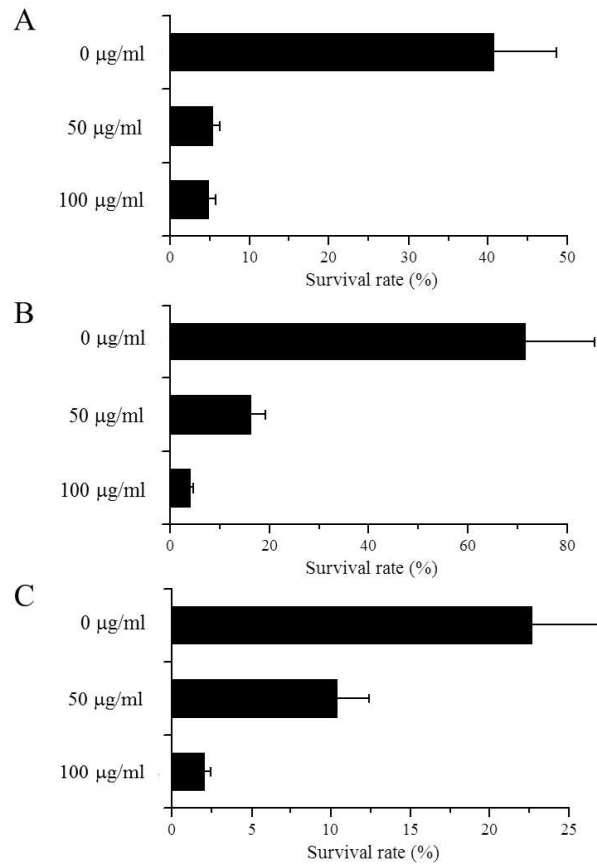


Fig. 1.3 Effects of immersion in essential oil of used cedar cask solution on the viability of *T. rubrum* mycelia.

Agar blocks implanted with *T. rubrum* were immersed in 1% DMSO solution containing 0, 50 or 100 µg/ml of essential oil extracted from used cedar cask for 20 min at (A) 27 °C, (B) 37 °C, (C) 42 °C. Surviving cells (%) = viable sells / initial inoculum × 100 ± standard error (n=4).

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

4. 精油による *S. epidermidis* に対する生育阻害活性

皮膚表面に存在する表皮常在菌は表皮を弱酸性にすることなどにより、外部からの病原菌の侵入や紫外線による害を防ぎ、皮膚の状態を正常に保つ役割を果たしている (Cogen *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2010)。そこで、精油が表皮常在菌に与える影響について調べるために、ヒト表皮常在菌の一種である *S. epidermidis* に対する各種精油の MIC、MBC 値を測定した。その結果、ヒバ精油は強い生育阻害活性 (MIC : 156-312 µg/ml、MBC : 5000 µg/ml) を見せ

たが、杉樽精油を含む他の精油では *S. epidermidis* の生育を阻害しなかった (Table 1. 2)。杉の葉の精油に多く含まれる α -pinene や sabinene などのモノテルペン類は口腔内細菌を代表とする様々な微生物に対して MIC 25- 500 $\mu\text{g/ml}$ の強い生育阻害活性があることが報告されている (Cha *et al.*, 2007) が、今回使用した杉精油もしくは杉樽精油は杉の心材から抽出した精油であり、モノテルペン類をほとんど含まないため (Cheng *et al.*, 2005)、*S. epidermidis* に対する阻害活性が見られなかったと考えられる。また、*S. epidermidis* の DNA ポリメラーゼに対する阻害活性においても、ヒバ精油では高い阻害活性が見られたが (IC_{50} : 60 $\mu\text{g/ml}$)、他の精油では阻害活性が見られなかった (IC_{50} : >1000 $\mu\text{g/ml}$)。これらの結果より、杉樽精油は *T. rubrum* に対する生育阻害活性は高いが、ヒト表皮の微生物叢を壊さないため、抗真菌治療に適している可能性が高い。

Table 1. 2 *S. epidermidis* MIC and MBC values of essential oils.
Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

essential oils	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
Used cedar cask (Japanese cedar)	> 10000	> 10000
<i>Cryptomeria japonica</i> (Japanese cedar)	> 10000	> 10000
<i>Chamaecyparis obtuse</i> (Japanese cypress)	> 10000	> 10000
<i>Thujopsis dolabrata</i> (False arborvitae)	156- 312	5000

5. 杉材から得られた精油の組成

杉樽精油および市販杉精油の GC/MS を用いた分析により、14 種のセスキテルペン類が確認された (Table 1.3)。杉樽精油に含まれるセスキテルペン類の総量は市販の杉精油と多少異なっていたが、 δ -cadinene、epicubenol の順で多く含まれているなど、組成は非常によく似たものであった。そのために、DNA ポリメラーゼ阻害試験においても、杉樽精油と市販杉精油は同等の阻害活性を示したと考えられた。

Table 1.3 Sesquiterpenoids composition of essential oils extracted from Japanese cedar.
Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

Compound	Essential oil of used cedar cask		Commercial essential oil (<i>C. japonica</i>)	
	$\mu\text{g/ml}$	%	$\mu\text{g/ml}$	%
α -cubebene	24.05	3.03	17.16	2.05
α -muurolene	73.85	9.29	65.74	8.51
δ -cadinene	206.13	25.94	190.98	22.84
gleenol	17.15	2.16	11.34	1.36
cubenol	50.07	6.30	38.68	4.63
epicubenol	91.81	11.55	71.14	7.86
elemol	22.99	2.89	56.35	6.74
T-cadinol	3.58	0.45	14.87	1.78
γ -eudesmol	12.98	1.63	18.00	2.15
torreyol	30.23	3.80	19.95	3.58
α -eudesmol	19.53	2.46	32.54	3.89
β -eudesmol	36.77	4.63	48.36	5.78
kongol	5.35	0.67	6.38	0.76
cryptomerione	19.69	2.48	39.70	4.75
Not identified but look identical to sesquiterpenes	180.50	22.72	195.11	23.32
total	794.68	100.00	826.30	100.00

6. 杉樽精油から得られたセスキテルペン類の *T. rubrum* 生育阻害活性

さらに、杉樽精油に含まれる主要な 3 種のセスキテルペン類、 δ -cadinene、epicubenol、 β -eudesmol (Fig. 1.4) の *T. rubrum* に対する生育阻害活性を測定した (Table 1.4)。その結果、杉樽精油の総セスキテルペンのうち 11.55% を占める epicubenol では MIC 値が 250- 500 $\mu\text{g/ml}$

と最も高い生育阻害活性が認められ、杉樽精油に最も多く含まれる δ -cadinene ではそれよりも弱く、 β -eudesmol が最も弱い生育阻害活性を示した。この試験で最も高い生育阻害活性を示した epicubenol に比べ、杉樽精油はさらに高い生育阻害活性 (MIC : 313 $\mu\text{g/ml}$) を示したことから、杉樽精油は複数の成分の相乗効果により *T. rubrum* の生育を阻害していると考えられた。

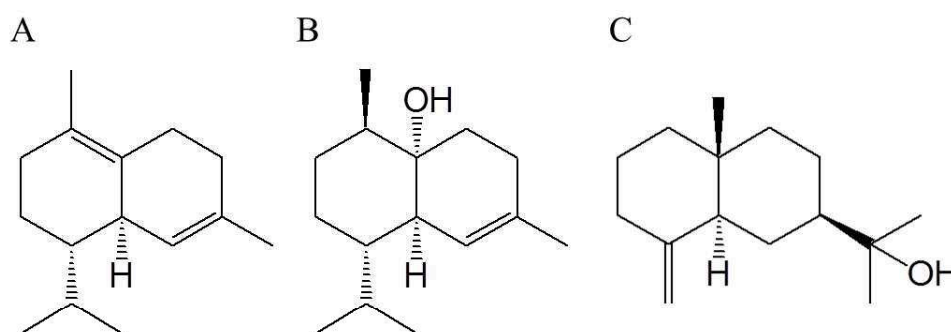


Fig. 1.4 Structures of the sesquiterpenoids present in essential oil of used cedar cask.

(A) δ -cadinene, (B) epicubenol and (C) β -eudesmol

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

Table 1.4 *T. rubrum* MIC values of sesquiterpenoids from essential oil of used cedar cask.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
δ -cadinene	500
epicubenol	250-500
β -eudesmol	1000

7. 杉樽精油から得られたセスキテルペン類の *T. rubrum* DNA 代謝酵素活性阻害

第1章3節6項の試験でも用いた3種の主要セスキテルペン類の *T. rubrum* DNA ポリメラーゼ阻害活性を調べたところ、 IC_{50} 値が epicubenol、 δ -cadinene、 β -eudesmol の順で高かった (Table 1.5)。この結果は第1章3節6項の生育阻害活性試験の結果と正に相関していた。

また、epicubenol と杉樽精油の *T. rubrum* DNA ポリメラーゼに対する IC₅₀ 値はそれぞれ 42、21 µg/ml となっており (Fig. 1. 2)、杉樽精油中で DNA ポリメラーゼ阻害に主要な役割を果たす物質の一つは epicubenol であると考えられる。一方、これらの成分は DNA トポイソメラーゼ II、IMP デヒドロゲナーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼといった *T. rubrum* から得られた DNA 代謝酵素に影響を与えなかった。

Table 1. 5 IC₅₀ values of sesquiterpenoids from essential oil of used cedar cask against the activities of DNA metabolic enzymes from *T. rubrum*.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012.

Enzyme	Compound (µg/ml)		
	δ-cadinene	epicubenol	β-eudesmol
DNA polymerase	90	42	185
DNA topoisomerase II	>1000	>1000	>1000
IMP dehydrogenase	>1000	>1000	>1000
Polynucleotide kinase	>1000	>1000	>1000
Deoxyribonuclease	>1000	>1000	>1000

8. 考察

杉樽廃材から抽出された精油には epicubenol や δ-cadinene などのセスキテルペン類が多く含まれており、これらは表皮常在菌に影響を与えることなく、皮膚病原真菌の生育を阻害することが明らかになった。このことから、杉樽廃材から抽出した杉樽精油は水虫に対する有効な治療薬となりうると考えられた。さらに、杉樽作成に使用される杉の心材からは辺材に比べて多量の精油が抽出され、この観点からも有効活用されることが望ましい。

また、この研究においては真菌抽出物中の DNA ポリメラーゼ活性を *in vitro* の系で測定する方法を採用した。この方法は 3 時間以内という短時間で完了することなどから、抗真菌剤のスクリーニングにおいて有効な手段になりうると考えられた。

第4節 要約

樽酒製造後に廃棄される杉樽廃材の有効活用のため、杉樽廃材から抽出した杉樽精油の水虫の主要な原因菌である *T. rubrum* に対する生育阻害活性について調べた。その結果、杉樽精油は *T. rubrum* に対して高い生育阻害活性を有するとともに、ヒト皮膚に常在し、皮膚の状態を正常に保つ役割を果たしている表皮常在菌として主要な *S. epidermidis* に対しては生育阻害活性を示さないことが明らかとなった。さらに、DNA ポリメラーゼなどの DNA 代謝酵素の活性阻害を調べることにより、今回明らかになった杉樽精油の *T. rubrum* に対する生育阻害活性は杉樽精油が *T. rubrum* の DNA ポリメラーゼを阻害することが主要な要因であると考えられた。

第2章 樽酒に含まれる成分の火落菌に対する抗菌性

第1節 諸言

清酒醸造は開放系で行われるため、様々な菌による影響を受けるが、清酒中に特異的に生育する火落菌の繁殖による、清酒の白濁や酸敗を引き起こす現象である「火落ち」は現在でも酒造業者を悩ませている。

一般に樽酒は通常の清酒に比べて火落ちしにくいと言われているが（植田ら, 1988）、これにはジテルペン類が寄与していることが明らかになっている（松永ら, 2008）。一方、樽酒中の主要テルペン類であるセスキテルペン類についても様々な微生物に対する抗菌性が報告されている（岡村ら, 2002）。

そこで、本章では、樽酒中に最も多く含まれるセスキテルペン類の火落菌に対する増殖抑制効果を検討した。また、これまで樽貯蔵による増加が確認されていなかった、清酒中のフェルラ酸についても分析を行った。

第2節 実験方法

1. 供試サンプル

当社本醸造原酒 72 L を吉野杉製の4斗樽に室温で2週間貯蔵したものを使用した。

2. 樽酒中のフェルラ酸の同定

試料 5 ml に酢酸エチル 1 ml を加えて激しく攪拌し、遠心分離後に酢酸エチル層を別の試

験管に取り、遠心エバポレーターで乾固した。残渣にピリジンを 20 μ l 加えて完全に溶解した後、トリメチルシリル (TMS) 化試薬 (BSTFA:TMCS = 99:1) 20 μ l を加えて TMS 化した。これを GC/MS (QP2010 plus、島津製作所) で以下に示す条件で分析を行った。

カラム : DB-1MSUI (Agilent, 30 m \times 0.25mm ϕ , 膜厚 0.25 μ m)

カラム温度 : 150 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (5 min)

カラム流量 : 2.0 ml/min He

注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C

イオン源温度 : 230 $^{\circ}$ C

イオン化法 : 電子衝突イオン化法 (EI)

イオン化電圧 : 70 eV

3. フェルラ酸の定量

フェルラ酸は HPLC (Agilent 1200 series) を用いて、以下に示す条件下で絶対検量線法により定量した。フェルラ酸とジヒドロフェルラ酸が混合したピークを測定し、フェルラ酸で作成した検量線を用いて、フェルラ酸とジヒドロフェルラ酸の総量をフェルラ酸当量として表した。

カラム : XDB-C18 (Agilent, 粒径 1.8 μ m, 4.6 \times 50 mm)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

溶離液 A : アセトニトリル

溶離液 B : 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

グラジエント A/B%(v/v) : 0-5 min (95/5%), 5-30 min (100/0% \rightarrow 70/30%), 30-40 min (100/0%)

検出波長 : 280 nm

4. 杉材からのセスキテルペン類の分離精製

吉野杉の樽材を破碎しておが粉を調製し水蒸気蒸留を行うことで、樽材から精油を得た。ワコーゲル 50C18（和光純薬）を充填したガラスカラム（EYELA、30 cm×2 cm）に、精油をアプライし、メタノールで溶出させることで粗精製を行った。本精製はワコーゲル C-300HG（和光純薬）を充填した同カラムに粗成生物を展開し、混合割合を変化させた *n*-ヘキサンと酢酸エチルの混合液（95:5 - 70:30）で溶出することで行った。各成分の同定はマススペクトルの比較により行った。

5. 樽酒中のセスキテルペン類の分析・定量

試料 3 ml に *n*-ヘキサン 150 μ l および 200 mg/L の *R*-(-)-カルボンを含むエタノール 20 μ l を加えて激しく混合し、遠心分離後の *n*-ヘキサン層を GC/MS に供した。分析は第 1 章 2 節 8 項に示した条件で行った。各セスキテルペン類の定量は内部標準法で行い、 β -eudesmol として表した。

6. ペーパーディスク法による抗火落菌試験

1) 使用菌株

真性火落菌として *Lactobacillus fructivorans* (ATCC8288), 火落性乳酸菌として *Lactobacillus hilgardii* (ATCC8290), *Lactobacillus paracasei* (JCM8130) を使用した。

2) 供試物質

epicubenol、cubenol、cryptomerione は方法 4 で精製したものを使用した。 δ -cadinene (Sigma Aldrich)、 β -eudesmol（和光純薬）およびフェルラ酸（和光純薬）は標準品を使用した。

3) ペーパーディスクの調製

オートクレーブ後さらに 135 $^{\circ}$ C で乾熱滅菌したペーパーディスク（ADVANTEC 厚手 8 mm）に、種々のセスキテルペン類を含む 40 mg/L エタノール溶液 20 μ l を滴下し、風乾し

た。ポジティブコントロールとして 1000 mg/L ゲンタマイシン硫酸塩水溶液を、ネガティブコントロールとしてエタノールをペーパーディスクにそれぞれ 20 μ l 滴下、乾燥させた。

4) 抗菌試験

供試菌を 10%エタノール含有 SI 液体培地 (松永ら, 2008) で前培養し、培養液 10 μ l を 10%エタノール含有 SI 寒天培地に埋包した。上述のペーパーディスクを培地上にのせ、ディスクをよく密着させた。プレートを上下逆向きにして密閉容器に入れ、30 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、ディスク周辺にできた阻止円を観察した。

7. 清酒中での抗火落菌試験

1) 使用菌株

Lactobacillus fructivorans (JCM1198)および独立行政法人酒類総合研究所より分譲を受けた *Lactobacillus hilgardii* (H-34)を使用した。

2) 供試物質

6 項で記載した物質のうち epicubenol、 δ -cadinene および β -eudesmol を共試した。

3) 使用清酒

当社本醸造酒の生原酒をエタノール濃度 10%に調製し、滅菌ろ過したものを使用した。

4) 菌数の測定

エタノール 6%含有 SI 寒天培地 (松永ら, 2008) に適宜希釈した菌体培養液を埋包し、30 $^{\circ}$ C で培養後、コロニー数を計測した。

5) 清酒での火落菌培養

火落菌をエタノール 10%含有 SI 液体培地（松永ら, 2008）で前々培養し、その 10 μ l を清酒 2 ml に接種し、前培養を行った。最大増殖量に達した前培養液中の菌数はバクテリア計算盤を用いて顕微鏡下で計測し、本培養液（エタノール 10%清酒）に 3.0×10^2 個/ml になるように接種した。培養は全て 30 $^{\circ}$ Cで行った。

第3節 実験結果と考察

1. 樽酒中のフェルラ酸の同定

樽酒中のフェルラ酸（ジヒドロフェルラ酸を含む）の存在を確かめるために、HPLC を用いて当社上撰樽酒の分析を行った。樽酒ではフェルラ酸に相当するリテンションタイムでピークが見られたのに対して、樽に貯蔵していない清酒ではピークが認められなかった (Fig. 2. 1)。また、フォトダイオードアレイ検出器において、樽酒のフェルラ酸に相当するピークの吸光スペクトルもフェルラ酸標品のものと類似していた。さらに、このピークがフェルラ酸であることを確認するために、この画分を分取し、TMS 化した後、GC/MS を用いて分析を行った。TMS 化物の GC/MS 分析においても、当該画分はフェルラ酸標品と同じ位置に溶出し、そのピークのマススペクトルもフェルラ酸とほぼ一致した (Fig. 2. 2)。このことから、樽酒はフェルラ酸を多く含むことが確認できた。

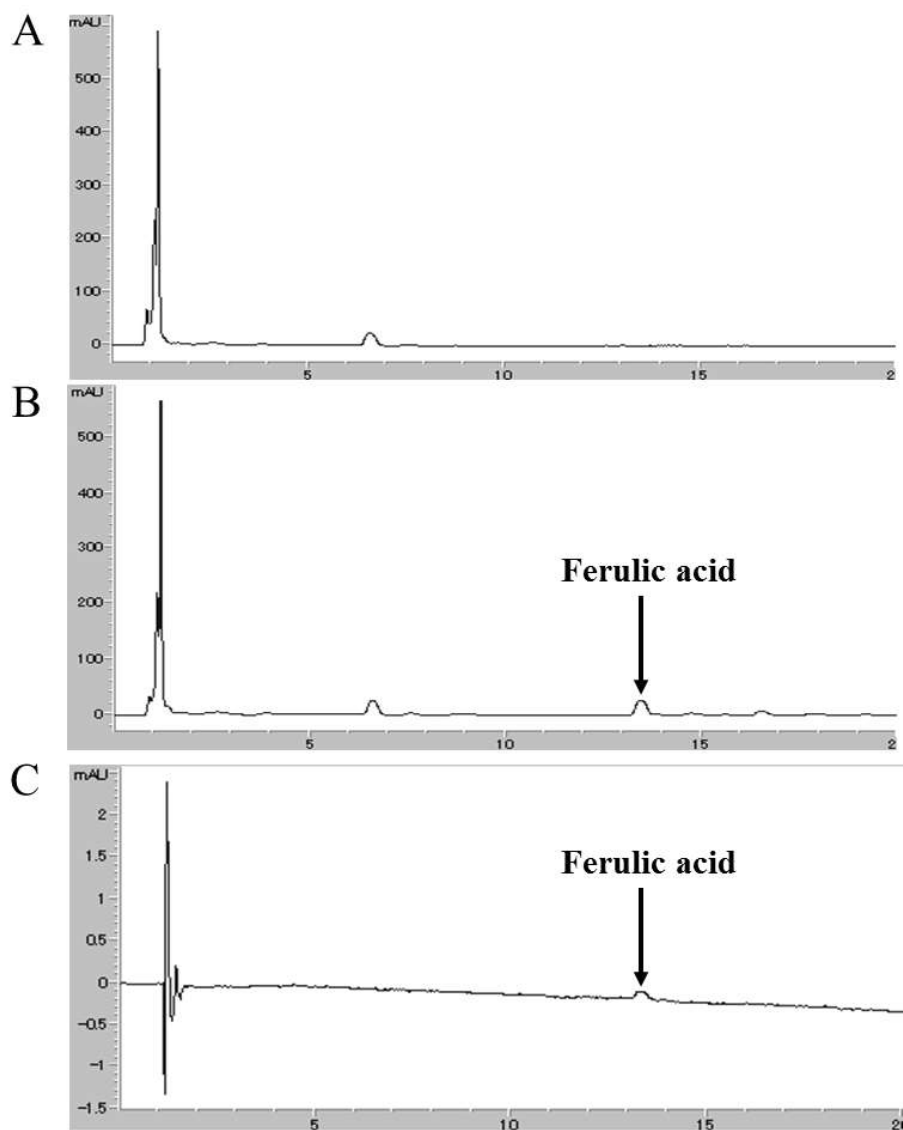


Fig. 2. 1 HPLC analysis of ferulic acid (including dihydroferulic acid) in sake. (A) Regular sake (not stored in a cedar cask). (B) *Taru*-sake (stored in a cedar cask). (C) Authentic preparation of ferulic acid
 Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

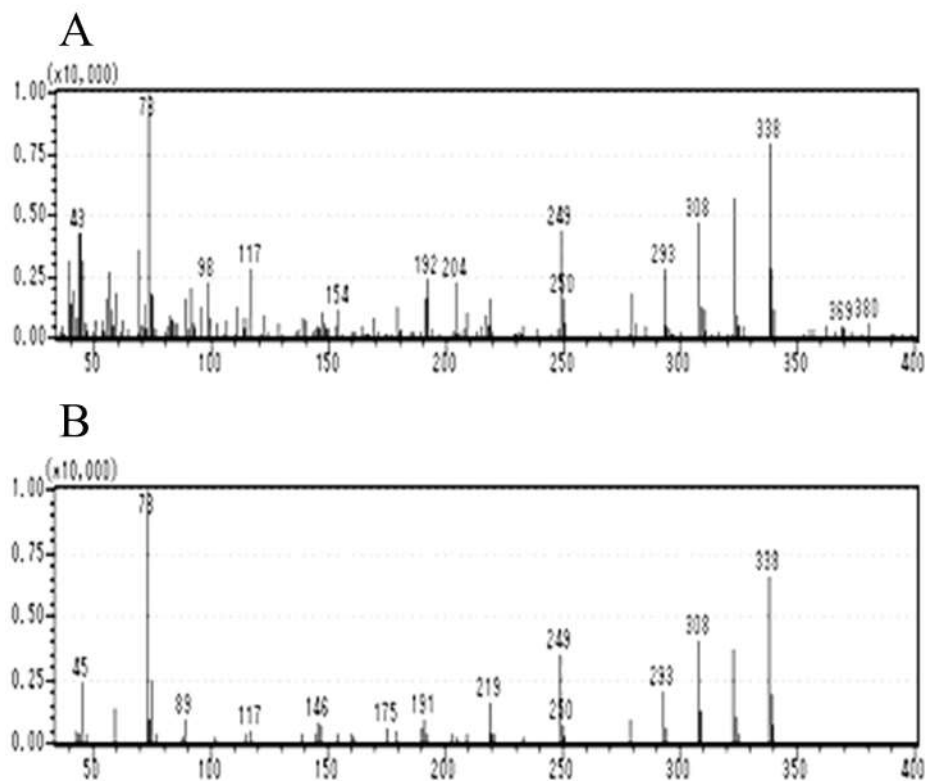


Fig. 2.2 Mass spectrum of ferulic acid in GC/MS analysis.

The fraction corresponding to the peak at 13.8 min in HPLC analysis of *taru*- sake (Fig. 2. 1) (A) and an authentic ferulic acid (B) were subjected to GC/MS analysis, following trimethylsilylation.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

2. 樽貯蔵中の樽酒中フェルラ酸の増加

通常、醸造された清酒中には米由来のフェルラ酸が存在する。しかし、活性炭ろ過により遊離のフェルラ酸のほとんどが吸着されてしまうため、清酒製品中には遊離フェルラ酸はほとんど存在しない（岡本ら, 2006）。

樽貯蔵中に清酒中のフェルラ酸が増加することを確認するために、当社上撰原酒 72 L を 4 斗樽に詰めて、室温で 2 週間貯蔵し、HPLC を用いてその間の樽酒中のフェルラ酸濃度の経時変化を分析した。その結果、樽貯蔵前の上撰原酒では検出されなかったフェルラ酸が

経時的に増加し、貯蔵 13 日目では、15 mg/L 以上に達することが分かった (Fig. 2. 3)。このことから、樽酒中のフェルラ酸は杉樽に由来していると考えられる。

木製の樽に貯蔵されるアルコール飲料として、代表的なものではウイスキーやワインがあげられるが、これらは一般的にオーク材の樽に貯蔵される。これまでに、ワイン中のオーク樽由来のフェルラ酸の存在は報告されている (M. del Alamo Sanza *et al.*, 2004) が、杉材の樽に貯蔵されたアルコール飲料中のフェルラ酸については報告されていない。杉材を超臨界水処理した際にフェルラ酸が抽出されることが報告されており (Saka S. *et al.*, 2006)、樽酒製造工程において、杉樽中に存在するフェルラ酸が清酒中に移行すると考えられる。

また、前述のように、活性炭ろ過をすることでほとんどの遊離フェルラ酸は吸着除去されてしまうため、通常、製品としての清酒中にはフェルラ酸はほとんど含まれていない。しかし、樽酒製造においては清酒を樽貯蔵後に活性炭ろ過しないため、最終製品としての樽酒中にもフェルラ酸が存在することが確認された。

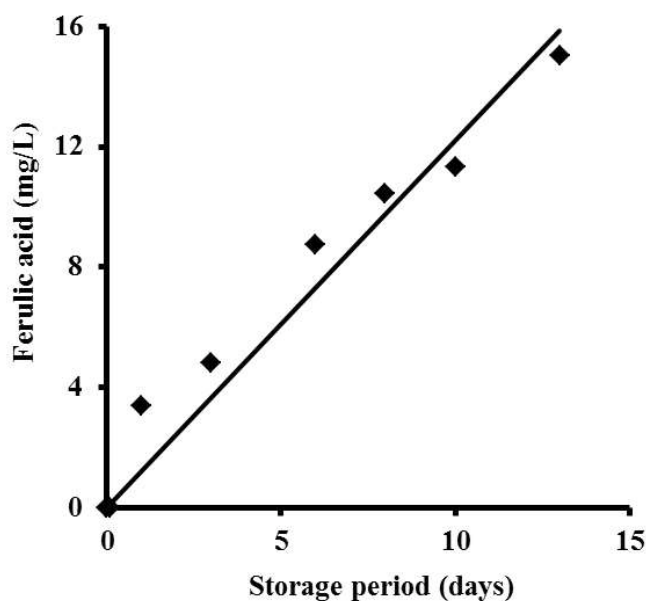


Fig. 2. 3 Time course of the ferulic acid (including dihydroferulic acid) content in taru-sake.

Sake was stored in a Japanese cedar cask at room temperature for 2 weeks. Ferulic acid content in sake was measured by HPLC.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

3. セスキテルペン類及びフェルラ酸の火落菌増殖抑制効果

火落菌に対して増殖抑制効果を示すセスキテルペン類のスクリーニングを目的として、ペーパーディスク法で抗火落菌試験を行った。セスキテルペン類のうち樽酒中の含量が多い δ -cadinene、epicubenol、cubenol、 β -eudesmol および cryptomerione、樽酒中に存在することが明らかになったフェルラ酸について、*L. fructivorans*、*L. hilgardii* および *L. paracasei* に対して試験を行った。その結果を Table 2.1 に示す。セスキテルペン類の中では epicubenol が最も増殖抑制効果が高く、次いで δ -cadinene の効果が高かった。これら 2 つの成分は今回試験に供した 3 種の火落菌全てにおいて阻止円が観察された。 β -eudesmol は *L. fructivorans* と *L. paracasei* では阻止円が観察されたが、*L. hilgardii* では観察されなかった。cubenol と cryptomerione は *L. paracasei* でのみ阻止円が観察された。一方、フェルラ酸は全ての菌において阻止円の形成が観察されなかった。

Table 2. 1 Antibacterial activity of sesquiterpenoids and ferulic acid against *hiochi* bacteria in paper disk agar plate method.

Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. hilgardii</i>
δ -cadinene	16.30 \pm 1.10	10.80 \pm 0.61	10.87 \pm 0.24
epicubenol	24.97 \pm 1.20	8.73 \pm 0.71	9.77 \pm 0.43
Sesquiterpenoids			
cubenol	19.20 \pm 0.80	n. d.	n. d.
β -eudesmol	15.97 \pm 2.92	10.93 \pm 1.44	n. d.
cryptomerione	10.53 \pm 1.15	n. d.	n. d.
Ferulic acid	n. d.	n. d.	n. d.
Control (gentamicine sulfate)	18.62 \pm 0.75	15.65 \pm 1.16	29.03 \pm 2.01

Antibacterial activity was evaluated as the diameter of growth inhibitory area. Each value is represented as the mean diameter \pm standard error (mm) (n = 8).

次に、ペーパーディスク法で増殖抑制効果が高かったセスキテルペン類である δ -cadinene、epicubenol、 β -eudesmol について、清酒中での *L. fructivorans* と *L. hilgardii* に対する増殖抑

制効果を調べた。また、フェルラ酸はペーパーディスク法では増殖抑制効果が低かったが、樽酒中での濃度がセスキテルペン類に比べて高いこと、一部の乳酸菌に対する抗菌効果が報告されている（山本, 2007）ことから、同様に清酒中での試験を行った。*L. fructivorans* に対する試験の結果を Fig. 2. 4 に示した。ペーパーディスク法で高い効果を示した δ -cadinene と epicubenol はこの試験でも最も効果が高く、2 mg/L でも 10 日目で CFU が 0 になっており、*L. fructivorans* はこの濃度では生育できないことが分かった。しかし、 β -eudesmol を添加した系では 10 mg/L で増殖抑制が見られたが、6 mg/L ではほとんど増殖が抑制されず、 δ -cadinene や epicubenol と比べると効果は低かった。一方、フェルラ酸では 100 mg/L 添加で増殖抑制効果が見られたが、セスキテルペン類と比べると、増殖抑制効果は非常に低かった。

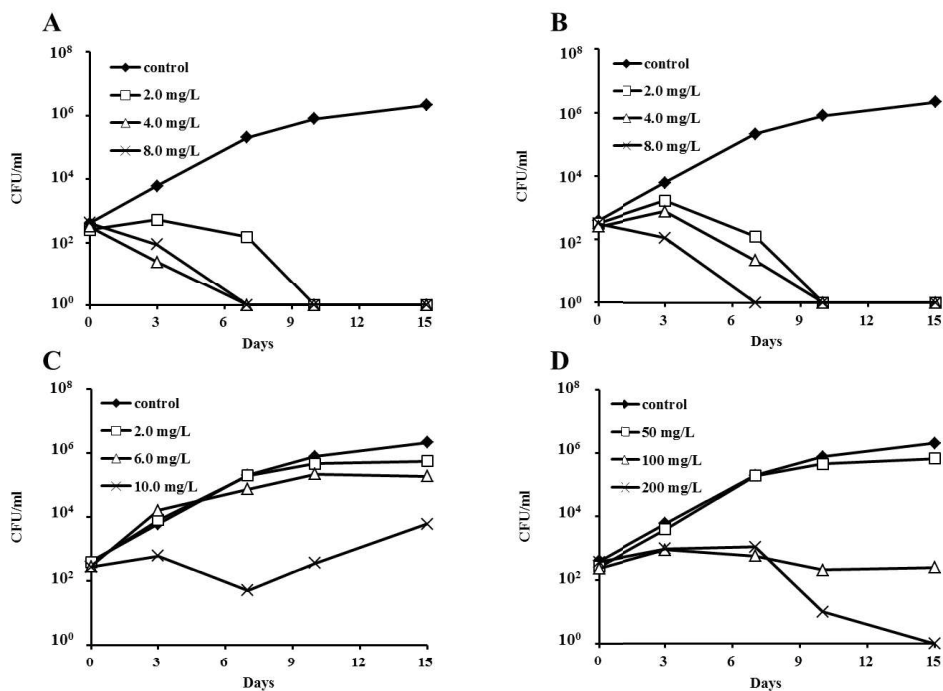


Fig. 2. 4 Growth inhibition effects of sesquiterpenoids and ferulic acid on *hiochi* bacteria (*L. fructivorans*) in sake (adjusted 10% ethanol concentration).

(A) δ -cadinene; (B) epicubenol; (C) β -eudesmol; (D) ferulic acid

Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

L. hilgardii に対する効果を調べた結果を Fig. 2. 5 に示した。*L. fructivorans* での結果と同様に、 δ -cadinene と epicubenol は抑制効果が高く、2 mg/L で増殖抑制効果が見られた。 β -eudesmol は *L. fructivorans* の場合と比べるとやや抑制効果が高い傾向が見られたが、 δ -cadinene および epicubenol と比べると効果は低かった。また、フェルラ酸は 50 mg/L で抑制効果が認められたが、*L. fructivorans* の場合と同様セスキテルペン類に比べて極めて効果が低かった。

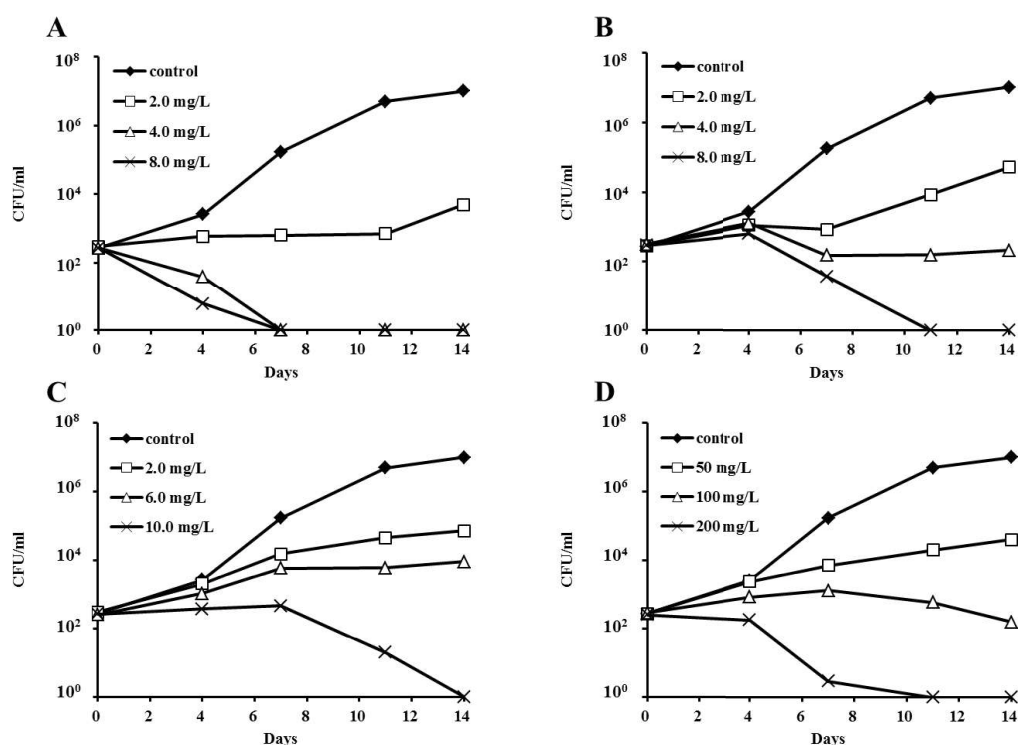


Fig. 2. 5 Growth inhibition effects of sesquiterpenoids and ferulic acid on *hiochi* bacteria (*L. hilgardii*) in sake (adjusted containing a final concentration of 10% ethanol). (A) δ -cadinene; (B) epicubenol; (C) β -eudesmol; (D) ferulic acid
Reprinted from Takao *et al.*, 2012 (in Japanese).

4. 考察

樽酒は樽貯蔵していない通常の清酒に比べて火落ちしにくいことが報告されている（植田ら, 1988）。樽酒中のジテルペン類が火落菌に対して増殖抑制効果を有すること（松永ら,

2008) が既に報告されているが、これに加えて樽酒中の主要テルペンである、セスキテルペン類にも抑制効果があることが明らかとなった。さらにセスキテルペン類に比べて効果は低いものの樽酒中のフェルラ酸も火落菌の増殖を抑制することが分かった。樽酒が火落ちにくいという現象はこれらの成分の複合的な効果の結果もたらされるものと考えられた。

第4節 要約

樽酒は杉樽に貯蔵することで製造されるため、杉樽由来成分が多く含まれている。これまでに樽酒には杉樽由来成分としてセスキテルペン類やジテルペン類などが含まれていることが分かっていたが、本研究で、杉樽貯蔵中にフェルラ酸が増加することが確かめられた。

一方、これまでに樽酒に含まれるジテルペン類の一部には、清酒中で増加し、清酒の劣化をまねくことで知られている火落菌に対する増殖抑制効果が確認されていた。樽酒中にジテルペン類よりも多く含まれているセスキテルペン類の火落菌に対する増殖抑制効果を調べたところ、 δ -cadinene、epicubanol で強い増殖抑制効果が確認された。さらに、本研究で樽酒中に存在することが確認されたフェルラ酸についても、上記のセスキテルペン類ほどではないものの、火落菌に対する増殖抑制効果を有することが確認された。

第3章 樽酒が食品由来油脂に及ぼす影響

第1節 諸言

これまでに樽酒中には杉樽由来のセスキテルペン類やジテルペン類などのテルペン類、ノルリグナン類、第2章でもふれたフェルラ酸など多くの成分が存在することが明らかになっている（松永ら, 2002; 松永ら, 2008; 松永ら, 2004; 高尾ら, 2012）。樽酒に含まれるこれらの成分のうち、ノルリグナン類には抗酸化活性や消臭活性（松永ら, 2004）が、セスキテルペン類の一種である β -eudesmol や elemol には抗潰瘍活性（Nogami M. *et al.*, 1986; Matsunaga T. *et al.*, 2000）が、 β -eudesmol には冷涼感受容チャネルである TRPA 1 を活性化し、のどに冷涼感を与える効果（小原ら, 2012）や経口投与することで精神的ストレス負荷時の交感神経の興奮を抑制する効果があることが報告されている（小原ら, 2013）。また、ジテルペン類の sandaracopimarinol や ferruginol、セスキテルペン類の δ -cadinene、epicubanol などには第1章と第2章でもふれたように、火落菌などに対する抗菌作用があることも明らかになっている（松永ら, 2008; 高尾ら, 2012; Takao Y. *et al.*, 2012）。このように樽酒中の成分の機能性についてはこれまで多くの報告があるが、これらの成分が樽酒の味わいや食品との相性に及ぼす影響についてはほとんど調べられていない。

飲料と食品の相性に関しては、ウーロン茶は一般的に他のお茶に比べて中華料理などの油っこい食品との相性が良いとされているが、最近その原因の一つは口腔内の油脂を洗い流す力が高さであることが報告されている（村ら, 2010; 木崎ら, 2011）。このように、植物原料由来成分であるポリフェノールなどを多く含有する飲料において口腔内油脂のウォッシュ効果が高いことから、杉樽由来成分を含有する樽酒にも同様の効果が期待できると考えられた。

そこで本章では、油脂を多く含む食品を食べた後の口腔内の感覚に樽酒が及ぼす影響について官能評価を行うとともに、樽酒と油脂の間の親和性を測定することにより、樽酒の口腔内ウォッシュ効果について検討した。

第2節 実験方法

1. 供試サンプル

本醸造原酒（対照酒）もしくは本醸造原酒を吉野杉製の木樽（72 L）に室温で7日間貯蔵した清酒（樽酒）をエタノール濃度 15%に調整して各種試験に供した。

2. 官能評価の方法

官能評価は16人のパネリストに対して飲料サンプルを提示する順番を替えて2回ずつ行った。油脂を多く含む食品としてマヨネーズを用い、飲料はミネラルウォーター、エタノール濃度 15%に調整した対照酒または樽酒を用いた。各サンプルはあらかじめ試験室内に一定時間置き、室温と同じになったことを確認して使用した。対照酒と樽酒の区別ができないように、アンバーグラスを用い、試験の間被験者にはノーズクリップを着用してもらった。被験者はマヨネーズ 1.5 g を摂取し、その30秒後に飲料 10 ml を10秒間かけて飲用し、30秒後に「マヨネーズの味」、「油が残っている感じ」の2つの口腔内感覚を5段階で評価した。

3. 界面張力の測定方法

界面張力は表面張力計（CBVP-A3、協和界面科学株式会社）を用いて、Wilhelmy plate 法（木崎ら, 2011; Ono N. *et al.*, 2009）で試験を行った。飲料サンプルにはエタノール濃度 10%に調整した対照酒と樽酒を用いた。また、樽酒成分の β -eudesmol（和光純薬工業株式会社）

およびフェルラ酸（和光純薬工業株式会社）は標準品を、epicubenol は第 2 章 2 節 4 項で示した方法で精製したものをそれぞれエタノールに溶解し、1 mg/L になるように対照酒に混合して試験に供した。油脂サンプルは市販のコーン油、大豆油、オリーブ油、精製魚油はそれぞれエイコサペンタエン酸（EPA）もしくはドコサヘキサエン酸（DHA）を多く含有する 2 種を用いた。

試験は 100 ml ビーカーに清酒もしくは樽酒成分を溶解させた対照酒を高さ 1 cm になるように加え、その上に油脂を高さ 1.5 cm になるように静かに積層した後、白金プレートが油液中に静かに沈めた。ビーカーをゆっくりと上に動かし、油液界面で白金プレート下端が液中に引き込まれる力を測定した。試験は 25 °C で行った。

第 3 節 実験結果と考察

1. 官能評価

樽酒が口腔内の感覚に与える影響を調べるために官能評価を行ったところ、「マヨネーズの味」、「油が残っている感じ」の両方の口腔内感覚について、ミネラルウォーターより対照酒、対照酒より樽酒で強度が低くなる傾向が見られた。さらに、「油が残っている感じ」ではミネラルウォーターと対照酒、樽酒の間に有意な差が見られた (Fig. 3. 1)。なお、試験後にアンバーグラスとノーズクリップを用いて 3 点識別法による官能評価を行い、対照酒と樽酒が区別できないことを確認した。

このようにヒトによる官能評価において、対照酒に比べて樽酒を飲用した後のほうが、マヨネーズによる口腔内における油分の感覚強度が低下する傾向が認められた。この結果は、口腔内の油脂の洗い流されやすさの差によって生じていると考えられた。

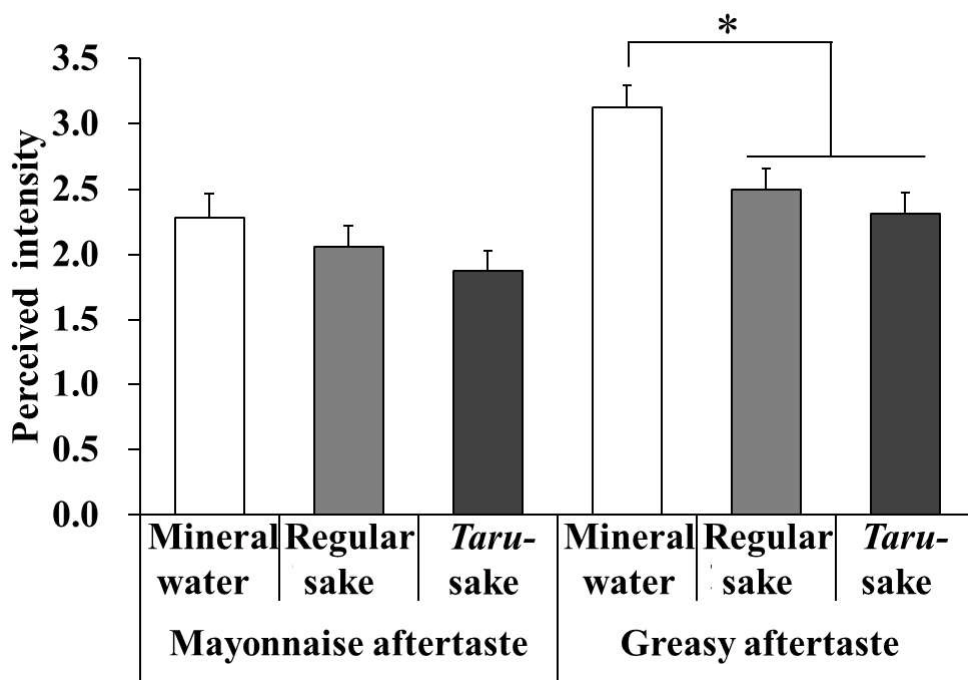


Fig. 3. 1 Measurement of perceived intensity of mayonnaise and greasy aftertaste after drinking sake.

n = 32, mean ± standard error, * $p < 0.05$

Reprinted from Takao *et al.*, 2014 (in Japanese).

2. 清酒と油脂間の界面張力

油脂の洗い流されやすさは物理的な力の他に、油脂との乳化しやすさが関係していると考えられる。そこで、様々な油脂に対する対照酒と樽酒の乳化能の違いについて調べることとした。

食用油とエタノール濃度 10%に調整した清酒の間の界面張力を Wilhelmy plate 法により測定したところ、今回使用したコーン油、大豆油、オリーブ油すべてにおいて、樽酒は対照酒より有意に低い値を示した (Fig. 3. 2)。しかし、オリーブ油を用いた場合、その差は小さかった。一般的にコーン油や大豆油はサラダ油と呼ばれるが、サラダ油は溶媒抽出後に多くの精製工程を経て製造されている (大沢, 1999; 加藤, 2001)。これに対して、オリーブ油はオリーブの実を圧搾後に静置分離、ろ過をしたものであり (加藤, 2001)、サラダ油に比

べて精製度が低い。そのためオリーブ油には不純物が多く、界面張力の差が小さくなってしまったと推察される。

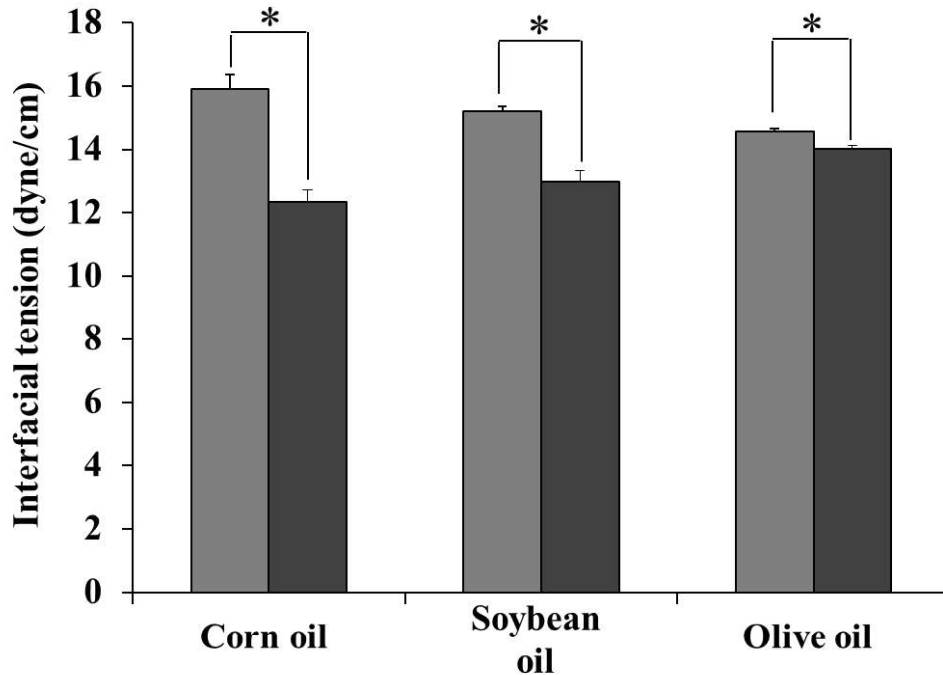


Fig. 3. 2 Interfacial tension between cooking oils and sake.

n = 10, mean \pm standard error, * $p < 0.05$ □: regular sake, ■: taru-sake

Reprinted from Takao *et al.*, 2014 (in Japanese).

対照酒に比べて樽酒は、食用油との間の界面張力が小さいことが明らかになったので、次に魚油を用いた試験を行った。精製度の低い魚油を用いると、オリーブ油での結果のように、明瞭な差が得られない可能性があると考えられたので、精製魚油を用いて試験を行った。その結果、食用油での結果と同様に、EPA、DHA をそれぞれ多く含む 2 種の精製魚油ともに、対照酒に比べて樽酒との間の界面張力が有意に低下していた (Fig. 3. 3)。

このように、食用油や精製魚油との界面張力は、樽酒のほうが対照酒より低くなることが明らかになった。界面張力が低いことは 2 つの物質の間の乳化が起りやすいことを示しており、油脂と緑茶、ウーロン茶などの中での乳化能力の差が報告されている (村ら, 2010;

木崎ら, 2011)。このことから、官能評価でマヨネーズによる口腔内の感覚強度が対照酒に比べて樽酒で低下していたのは、樽酒では油脂との界面張力が低く、油と乳化しやすいため、口腔内の油が洗い流されやすい状態になっていることが一つの原因として示唆された。

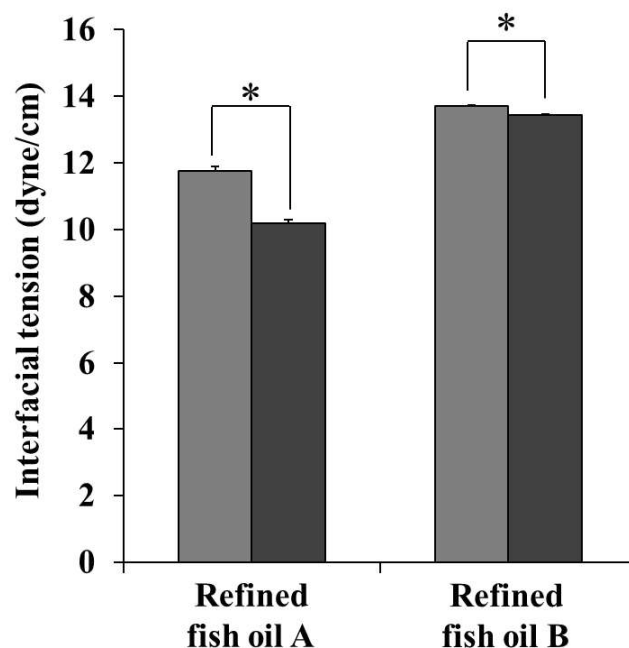


Fig. 3.3 Interfacial tension between refined fish oils and sake.

Refined fish oil A containing abundant EPA and B containing abundant DHA.

n = 10, mean ± standard error, * $p < 0.05$ ■ : regular sake, ■ : taru-sake

Reprinted from Takao *et al.*, 2014 (in Japanese).

3. 杉樽由来成分と油間の界面張力

樽酒には対照酒に含まれる成分に加えて、セスキテルペン類などの杉樽由来成分が含まれている。これらが樽酒と油脂の間の界面張力低下に関係していると考え、杉樽由来成分を用いて同様の試験を行った。樽酒に多く含まれるセスキテルペン類の epicubenol、 β -eudesmol とフェルラ酸をそれぞれエタノール濃度 10%に調整した対照酒に溶解させた後、大豆油との間の界面張力を測定した。しかしながら、これらの杉樽由来成分の添加によって、大豆油との間の界面張力の低下は観察されなかった (Fig. 3.4)。

樽酒中には杉樽由来成分として、今回試験に用いたセスキテルペン類やフェルラ酸以外にも、ジテルペン類やノルリグナン類も含まれていることが明らかになっている。樽酒と油脂間の界面張力の低下は樽酒中のジテルペン類やノルリグナン類など、セスキテルペン類やフェルラ酸以外の杉樽由来成分、もしくはこれら杉樽成分の相乗効果によって起こっているものと考えられる。

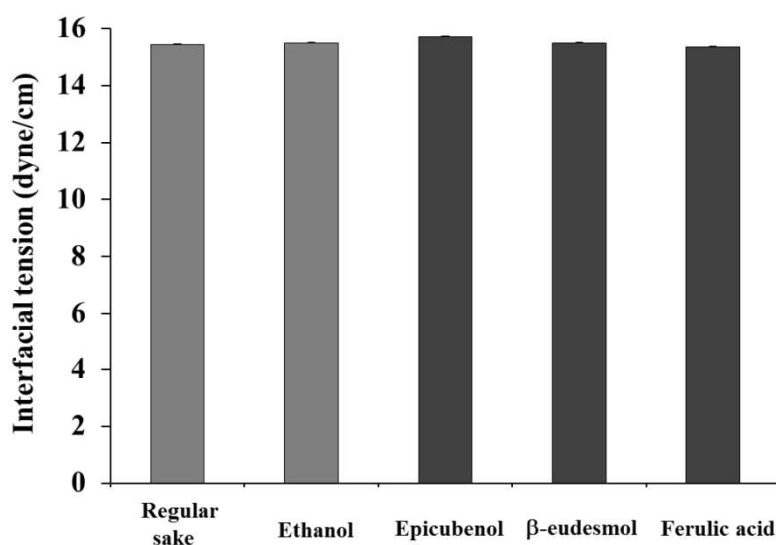


Fig. 3. 4 Interfacial tension between soybean oil and regular sake added with a *taru*-sake specific constituent.

Final concentration of each additional constituent is 1 mg/L.

n = 10, mean ± standard error

Reprinted from Takao *et al.*, 2014 (in Japanese).

4. 考察

本章では油脂との間の界面張力を低下させる樽酒中の成分を同定することはできなかった。木崎らの報告によると、ウーロン茶には油脂の乳化作用が認められるが、ウーロン茶中のカテキン (epigallocatechin, epigallocatechin gallate) については乳化に関係しておらず、ウーロン茶中の油脂の乳化に関与する成分は同定されていない (木崎ら, 2011)。また、佐藤らはアルカリ性電解水が油脂との間の乳化維持能が高いことを報告しているが、その機序

については明らかになっていない（佐藤ら, 2013）。このように、飲料による油脂の乳化作用について、いくつかの報告があるものの、寄与している成分や機序については解明されていない。これらを解明することは今後の課題であるが、界面活性作用のある杉樽由来のポリフェノール類などの関与が予想される。

第4節 要約

樽酒には杉樽由来成分が多く含まれていることが分かっているが、これらの成分が樽酒や樽酒と食品の食べ合わせに与える影響についてはこれまでに調べられてこなかった。

樽酒と油っこい食品の相性について調べるために、油脂を多く含む食品としてマヨネーズを用いて官能評価を行ったところ、マヨネーズ摂取後に対照酒を飲用した場合に比べて樽酒を飲用した場合には口腔内の油脂残存感が低下する傾向が見られた。この結果から、対照酒に比べて樽酒は油脂との親和性が高いために口腔内の油脂を洗い流しやすいと考えられた。Wilhelmy plate 法を用いて清酒と油脂の間の界面張力を調べたところ、様々な食用油、精製魚油との間で対照酒に比べて樽酒は界面張力が有意に低くなっており、樽酒は油脂との親和性が高いことが示された。これらの結果から、樽酒は油脂との親和性が高く、口腔内の油脂を洗い流されやすい形にするため、口腔内の油脂残存感を低下させ、油っこい食品をさっぱりと食べさせると考えられた。

第4章 樽酒が食品の旨味に及ぼす影響

第1節 諸言

アルコール飲料、特に一般的に食中酒といわれるものにとって、食品との相性は非常に重要なものである。食中酒の一種のワインでは食品との相性はマリアージュと言われ、一般的に赤ワインと肉料理、白ワインと魚料理などの相性が良いとされる。しかし、このようなアルコール飲料と食品の相性を科学的に示した報告は少なく、白ワインと魚介類を合わせたときに生臭みが出ることを示した報告が見られる程度であった (Fujita A. *et al.*, 2010; Tamura T. *et al.*, 2009)。

第3章では樽酒と油脂を多く含む食品の相性について検証したが、清酒と最もよく合わせられるのは、洋食や中華料理などと比べるとあまり油脂を多く用いない和食である。一方、和食の出汁を大事にする文化や、その出汁に用いられる昆布やカツオ節、シイタケなどの旨味成分がグルタミン酸ナトリウム (池田, 1909) やイノシン酸 (小玉, 1913)、グアニル酸 (国中, 1960) であることを発見したのがすべて日本人であることからわかるように、和食にとって最も重要な要素の一つは旨味であるといえる。

そこで本章では、樽酒と食品の相性について味覚の面からもアプローチするために、樽酒を様々な食品と同時に摂取した際の味覚への影響を調べた。官能評価に加えて近年味の客観的評価を得るツールとして利用され始めている味認識装置を用いて、樽詰めしていない清酒との比較を行い、その効果に寄与している成分の検討を行った。

第2節 実験方法

1. 供試サンプル

本醸造原酒（対照酒）、及び吉野杉製の木樽（72 L）に室温で3日間貯蔵した本醸造原酒（樽酒）を、それぞれエタノール濃度15%に調整して各種試験に供した。

2. 旨味後味の官能評価

食品サンプルとしてあさりの酒蒸しのスープ5 mlを摂取した5秒後に対照酒または樽酒を飲用し、清酒飲用後の旨味強度を1～5の5段階で評価し、0秒後の値を差し引くことにより5、10秒後の旨味強度を算出した。官能評価の際には、対照酒と樽酒の区別ができないように、アンバーグラスを用い、試験の間被験者にはノーズクリップを着用してもらった。

被験者は清酒の官能評価経験が豊富な当社研究所員6名で、5回の試験を行った。なお、あさりの酒蒸しのスープおよび各清酒サンプルはあらかじめ試験室内に一定時間置き、室温と同じになったことを確認してから試験に供した。

3. 味認識装置を用いた旨味後味の評価

旨味強度の測定には、味認識装置 SA-402B（株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー）を用いた。人工脂質膜型味覚センサーは旨味センサー（SB2AAE）のみを用い、基準液（30 mM KCl、0.3 mM 酒石酸）にセンサーを浸して膜電位 V_r を測定した後、食品サンプル液にセンサーを浸して膜電位 V_s を測定した。その後、センサーを清酒もしくは基準液で洗浄し、再び基準液中で膜電位 V_r' を測定した。旨味先味値 V_i は V_s から V_r を、旨味後味値 V_a は V_r' から V_r を差し引いた値とした（Fig. 4. 1）。試験は室温で行ったが、室温が20℃以下の時には味認識装置のサンプル保持部分に30℃の水を循環させた。

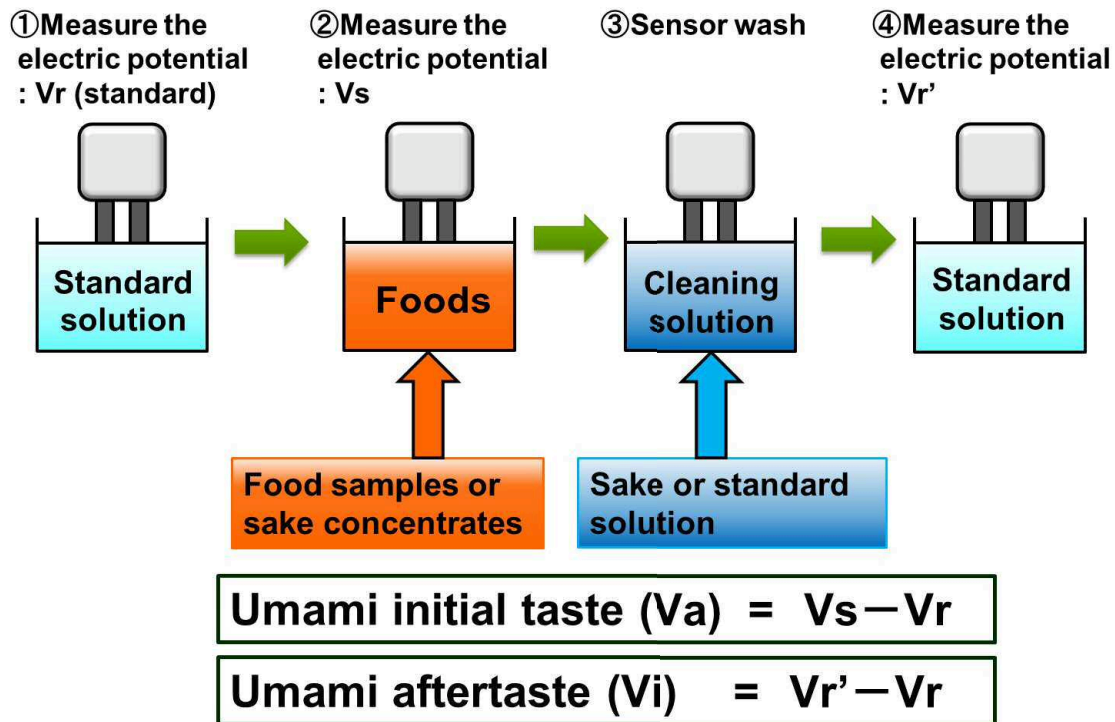


Fig. 4.1 Procedure of umami initial taste and aftertaste measuring by taste sensor.

After the standard electric potential measuring, umami sensor is soaked in food sample then it is soaked in cleaning solution, finally remaining aftertaste is measured in the standard solution. We set this procedure in the same way as we eat foods then drink sake.

4. 味認識装置に供する食品サンプル液及び旨味サンプル液の調整

そばつゆは 8 倍、あさりの酒蒸しのスープとしょうゆについては 10 倍に蒸留水で希釈して使用した。うなぎのかば焼き、まぐろ刺身、牛ステーキは同重量の蒸留水を加えてエクセルオートホモジェナイザーDX-8（日本精機製作所）を用いてホモジェナイズ（5000 rpm、1 分、室温）、遠心分離（10000 × g、10 min、4℃）、ろ紙（アドバンテック No. 5C）ろ過後、ろ液をまぐろ刺身はそのまま、うなぎのかば焼きと牛ステーキは蒸留水でそれぞれ 10 倍、4 倍に希釈して使用した。

旨味サンプル液として、グルタミン酸ナトリウム（和光純薬）、コハク酸二ナトリウム（和光純薬）、イノシン酸二ナトリウム（Sigma-Aldrich）、グアニル酸二ナトリウム（東京化成工

業) を 5.0 mM もしくは 2.5 mM になるように 1.0 mM KCl に溶解したものを使用した。

5. 杉樽抽出物の調製

エタノールまたは 20%エタノール 400 ml 中に 3 × 4 cm 角の杉樽断片 3 片を 30 °C、24 時間浸漬し、杉樽エタノール抽出物または杉樽 20%エタノール抽出物を調製した。これらの抽出物に蒸留水を加えてエタノール濃度 15%に調整して試験に供した。

沸騰水 400 ml 中に 3 × 4 cm 角の杉樽断片 3 片を浸漬し、30 °Cのインキュベーター中に 24 時間静置し、杉樽熱水抽出物を調製した。この抽出物に蒸留水とエタノールを加え、エタノール濃度、抽出物濃度ともに 15%に調整して試験に供した。

6. 清酒濃縮液の調製

清酒の揮発性画分の濃縮は栢原らの方法 (栢原ら, 1964) に準拠した。すなわち、清酒に等量のジエチルエーテル・ペンタン混合物 (2 : 1) を加えて 2 回抽出を行い、抽出液に蒸留水を加えてエタノールを除去後、35 °C常圧条件においてロータリーエバポレーターにより約 300 倍に濃縮した。また、ロータリーエバポレーターを用いて、60 °C、減圧条件において清酒を 10 倍に濃縮して、不揮発性画分とした。

7. セスキテルペン類の分析・定量

第 2 章 2 節 5 項に示した方法で行った。

8. 総ポリフェノール量の測定

Folin- Ciocalteu 法で測定した。すなわち、サンプル 1 ml に Folin- Ciocalteu 溶液 1 ml、10% 炭酸ナトリウム溶液 1 ml を加え、室温で 1 時間静置後、700 nm の吸光度を測定し、没食子酸として表した。

9. 全糖量の測定

フェノール硫酸法 (Dubois M. *et al.*, 1956) で測定した。すなわち、サンプル 1 ml に 5% フェノール水溶液 1 ml を加え、そこに濃硫酸 5 ml を加えて 490 nm の吸光度を測定し、グルコースとして表した。

第3節 実験結果と考察

1. 旨味後味の官能評価

あさりの酒蒸しのスープを飲んだ後に樽酒を飲んだ場合は、対照酒を飲んだ場合に比べて、5 秒後、10 秒後の旨味強度が有意に強くなっていた (Fig. 4. 2)。このことから、樽酒には杉樽に貯蔵していない対照酒より食品の旨味を増強し、旨味を感じる時間を長くする効果があると考えられた。

なお、あらかじめ 2 点識別法により、アンバーグラスとノーズクリップを用いた場合には、対照酒と樽酒が識別できないことを確認している。

コクの定義は定まっていないが、西村らによりコクの定義が提案されている (西村ら, 2012) ほか、伏木や宮村などによるコクについての報告がある (伏木, 2003; 宮村, 2007)。これらの報告によると、味に持続性があること、広がりがあることはコクにつながる。このことから、旨味後味が感じられる時間が長くなることは一般的にコクといえると考えられる。



Fig. 4. 2 Umami aftertaste in the broth of steamed clams using a sensory evaluation technique.

After tasting the broth followed by rinsing in the mouth with regular sake (◇) or taru-sake (■), the umami aftertaste of the broth was evaluated on scale of 1 to 5 in 0, 5, and 10 seconds. A student's t-test was used to determine any significant differences between zero time and 5/10 seconds after. n = 30, the bars indicate mean ± standard error, * $p < 0.05$

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

2. 味認識装置を用いた旨味の評価

1) 食品の旨味後味に及ぼす清酒の効果

近年、人間の味覚と同様の幅広い選択性を持つ味覚センサーが開発されている (Kobayashi Y. *et al.*, 2010)。これらの味覚センサーの説明として旨味センサーを例として挙げると、人間が様々な物質を旨味として感知するのと同様に、旨味センサーは特定の物質に対してのみ反応するのではなく、グルタミン酸ナトリウムにもイノシン酸ナトリウムにも反応するといったような広域選択性を持つ。このような特性を持つ味覚センサーは従来の人間を対象とした官能評価で問題となる、被験者の体調や嗜好による影響を受けないため、味の客観的評価を得るツールとして利用されており、緑茶の味の差 (Hayashi N. *et al.*, 2006; Hayashi N., *et al.*, 2008; Uchiyama Y. *et al.*, 2011)、薬品の苦み (Ishizaka T. *et al.*, 2007) の評価などの報

告がある。また、アルコール飲料と食品の相性についても味覚センサーを用いた報告 (Fujita A. *et al.*, 2010) がある。

このような特性を持つ味覚センサーを有する味認識装置を用い、あさりの酒蒸しのスープの旨味後味に及ぼす清酒の影響を評価したところ、基準液に比べて清酒でセンサーを洗浄することにより旨味後味値 (Va) が有意に強くなることがわかった (Fig. 4. 3A)。また、対照酒に比べて樽酒を用いたときにも、Va が有意に強くなっていた。次に、より単純な構成の出汁としてそばつゆを用いて同様の試験をおこなったところ、基準液、15%エタノール、対照酒、樽酒の順に、Va が有意に強くなることが示された (Fig. 4. 3B)。さらに食品をサンプルとして、まぐろの刺身とうなぎのかば焼きについても検討したところ同様の結果が得られ、対照酒に比べて樽酒でセンサーを洗浄すると、有意に Va が強くなることが確認できた (Fig. 4. 3 C, D)。

しかしながら、しょうゆ希釈液、および牛ステーキから調整したサンプルを用いた場合には、樽酒と対照酒の間に Va の差異が認められなかった (データ省略)。この結果については成分の組成比やサンプルの調整方法の影響とも考えられるが、今後の検討を要する。

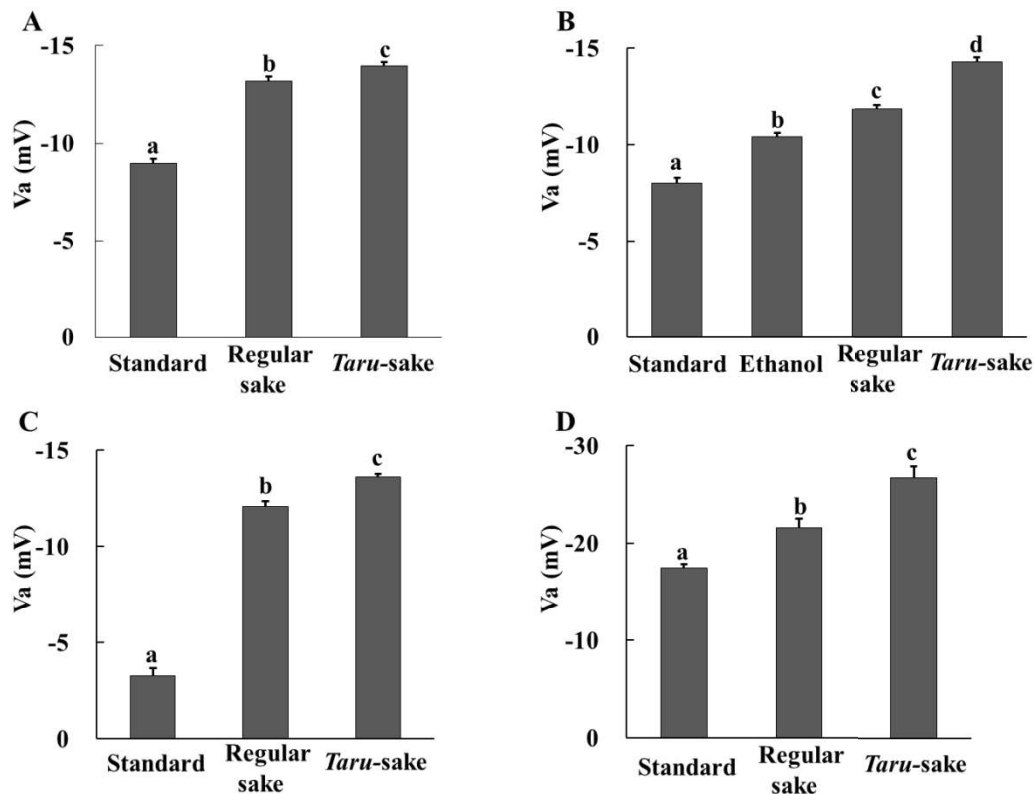


Fig. 4.3 Quantitative evaluation of umami aftertaste using an artificial taste sensor. Steamed clams (A), seasoning soy sauce (B), broiled eel (C), and raw tuna (D) were used for food samples, and regular sake or *taru*-sake was used as substitutes for the reference solution when rinsing a sensor for aftertaste (V_a) measurement. Bars not sharing a letter are significantly different according to the Tukey test ($*p < 0.05$). $n = 6$, and bars indicate mean \pm standard error. Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

Fig. 4.3の結果は官能評価の結果を支持すると考えられ、あさりの酒蒸しやそばつゆ、まぐろの刺身、うなぎのかば焼きなどの魚介類と樽酒を同時に摂取した場合、樽に貯蔵しない清酒に比べて食品の旨味後味が強くなる傾向が認められ、コクとして感じられるものと推察される。魚介類とワインを組み合わせた場合、苦味・えぐみや生臭いにおいが感じられることがあり、その原因がワイン中に含まれる亜硫酸や鉄イオンであることが報告されている (Fujita A. *et al.*, 2010; Tamura T. *et al.*, 2009)。清酒においてはそれらの原因物質が少ないため、魚介類との相性が良い上に樽酒では旨味後味を増強する効果も付加される。

2) 旨味物質の旨味後味に及ぼす清酒の効果

味認識装置を用い、食品と組み合わせて測定したとき、樽酒と対照酒の間で Va への効果に明瞭な差が認められない食品があることについて上述した。この理由として、樽酒の持つ効果が旨味物質の種類によって異なることが予想される。そこで、旨味物質として、グルタミン酸、グアニル酸、イノシン酸、コハク酸の各ナトリウム塩を食品サンプルの代わりに使用し、樽酒または対照酒と組み合わせたときの Va を測定した。その結果、グアニル酸をサンプルにした場合にのみ両者の有意差が認められた。他の旨味物質においては有意差が認められなかったものの、樽酒の方が Va が強まる傾向が見られた (Fig. 4. 4)。したがって、食品の旨味後味に対する樽酒の影響を単独の旨味物質に対する作用の違いのみで説明することは難しく、様々な成分が複合的に関与していると思われる。

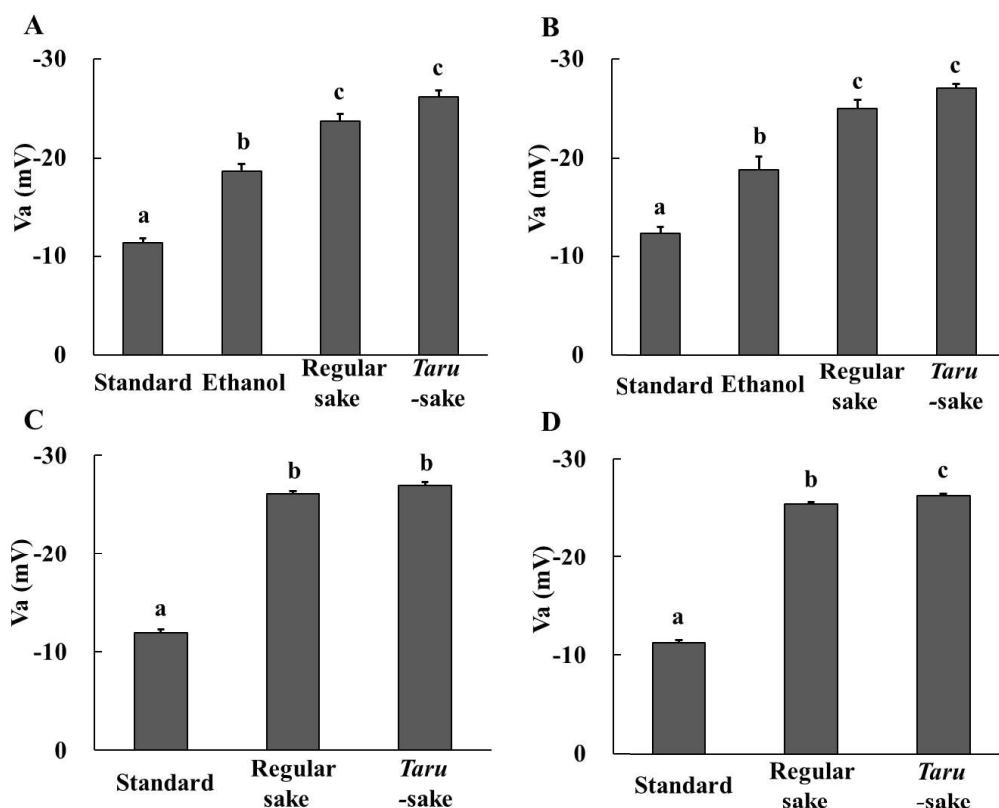


Fig. 4.4 Evaluation of aftertaste of umami- tasting solutions using a taste sensor.

5 mM monosodium glutamate (A), 5 mM disodium succinate (B), 2.5 mM disodium 5'-inosinate (C), and 2.5 mM disodium 5'-guaniate (D) were used for aftertaste (V_a) measurement, and 15% ethanol, regular sake, or *taru*-sake was served in place of the reference solution for rinsing a sensor. Bars not sharing a letter are significantly different according to the Tukey test ($*p < 0.05$). $n = 6$, and bars indicate mean \pm standard error.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

3. 旨味後味に関わる樽酒成分の推定

はじめに、樽の杉材から溶出した成分が旨味後味を増すことを確認する試験を行った。すなわち、樽酒の代わりとして 20%エタノールを用いた杉樽の抽出物を調製し、これをエタノール濃度 15%に希釈して供し、対照として 15%エタノール溶液を用いた。食品サンプルとして、Fig. 4.3において供試したそばつゆを用いて V_a の測定を行ったところ、エタノール溶液に比べて杉樽 20%エタノール抽出物では有意に V_a が強くなることを確認できた

(データ省略)。

次に、杉樽中のどのような成分に旨味後味を強くする効果があるかを見るため、杉樽エタノール抽出画分をエタノール濃度 15%に希釈したものと、杉樽熱水抽出画分にエタノールを加えてエタノール濃度 15%にしたものを用いて、試験を行った。調整した抽出液中のセスキテルペン類の総量を測定した結果を Table 4. 1 に示す。これらの抽出液を用いて、そばつゆの Va に対する効果を評価したところ、熱水抽出画分と対照の 15%エタノールの間に有意差が認められ (Fig. 4. 5)、杉樽由来で比較的極性が高い成分に効果があるものと推察された。

Table 4. 1 Total sesquiterpenoid contents in *taru*-sake preparations.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

	Total sesquiterpenoids (mg/L)
<i>Taru</i> - sake	1.975
Ether- pentane extract (300- fold conc.)*	1.182
Vacuum- concentrate (10- fold conc.)*	N. D.
Ethanol extract of cedar wood**	8.030
Hot water extract of cedar wood**	0.375

*Preparations for the experiment described in Fig. 4. 5

**Preparations for the experiment described in Fig. 4. 4

N. D. : Not detected

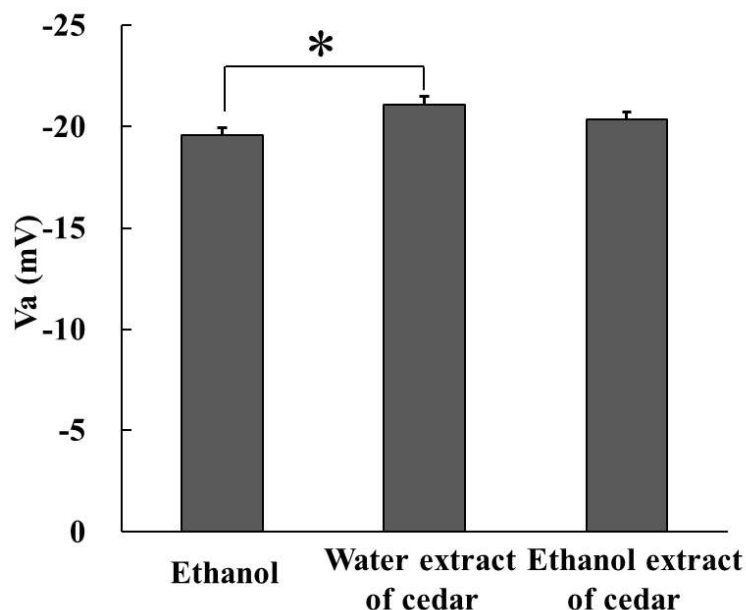


Fig. 4. 5 The effect of cedar extract on aftertaste measurement of seasoning soy sauce using a taste sensor.

Fifteen percent ethanol, hot water extract, and ethanol extract from cedar chips (Both final ethanol concentrations were adjusted to 15%) were used for rinsing a sensor as mentioned above. The asterisk shows a significant different according to the Tukey test ($*p < 0.05$). $n = 6$, and bars indicate mean \pm standard error.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

さらに、この成分が樽酒に多く含まれるテルペン類などの揮発しやすい成分かどうかを調べるため、樽酒と対照酒中の揮発性画分、及び不揮発性画分を調整して、これらをそばつゆに加えて食品サンプル液とし、後味を測定する前にセンサーを洗浄する洗浄液として基準液を用いて、旨味先味値 (V_i) と V_a の測定を行なった。調整したそれぞれの画分中のセスキテルペン類の総量を測定した結果を Table 1 に示した。杉樽に貯蔵していない対照酒からはセスキテルペン類は検出されないことを確認した。300 倍濃縮された揮発性画分はそばつゆに対して 0.083%、0.167%、0.33% (酒量にして 25%、50%、100%に相当) 添加した。10 倍濃縮された不揮発性画分は、これをそばつゆに対して 2.5%、5%、10% (酒量にして 25%、50%、100%に相当) 添加した。

樽酒及び対照酒の揮発性画分添加では、 V_i 、 V_a のいずれにおいても有意な差異は認めら

れなかった。他方、不揮発性画分の添加では、添加量に従って Vi の低下が見られた。これは不揮発性画分の添加によるそばつゆ中の旨味成分の希釈のためと考えられ、樽酒と対照酒の間に差異は認められなかった。しかしながら、Va については 5% 添加及び 10% 添加において、対照酒に比べて樽酒の Va が有意に強いことが確認でき、2.5% 添加でも樽酒の Va が強い傾向が見られた (Fig. 4. 6)。

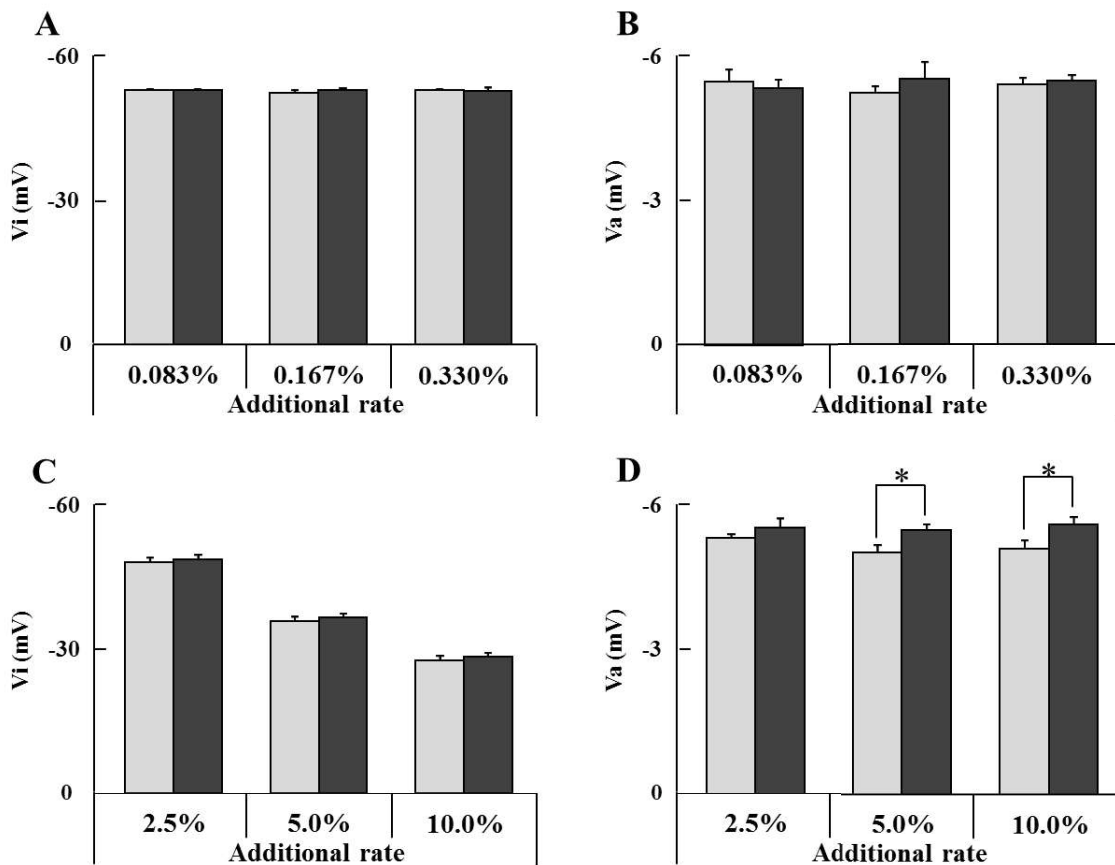


Fig. 4. 6 The effect of additive sake concentrate on aftertaste measurements of seasoning soy sauce using a taste sensor.

A volatile fraction (ether- pentane extract) of 300 times concentrated regular sake (□) and taru-sake (■) were added to seasoning soy sauce by 0.083%, 0.167% and 0.33%, and initial taste (Vi, A) and aftertaste (Va, B) of umami were measured according to the instruction of the taste sensors. A nonvolatile fraction (vacuum- concentrate) of 10 times concentrated regular sake (□) and taru-sake (■) were added to seasoning soy sauce by 2.5%, 5.0% and 10.0%, and Vi (C) and Va (D) were measured according to the instruction of the taste sensors. Bars indicate mean \pm standard error. $n = 6$, $*p < 0.05$.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

4. 考察

これまでの結果から、樽酒中の旨味後味を強くする成分は、杉材から抽出される比較的極性が高く、揮発しにくい成分であると考えられる。酒樽の杉材には心材付近の材が用いられることから、ポリフェノール類や細胞壁に由来する多糖類がより多く溶出すると考えられる。そこで、対照酒と樽酒に含まれるポリフェノールと全糖の濃度を測定したところ、対照酒に比べて樽酒ではポリフェノール濃度が 20%近く高かったが、全糖の濃度には差が見られなかった (Table 4. 2)。このことから、旨味後味を強くする樽酒中の成分は杉樽由来のポリフェノールもしくはその配糖体である可能性が考えられた。

他方、樽酒を減圧濃縮した不揮発画分を食品に添加すると、対照酒の不揮発性画分の場合と同様に希釈のために V_a が減少することから、その成分自体に旨味はなく、いわゆるコクを増す働きをすと思われ、今後詳細な検討が必要とされる。

Table 4. 2 Total polyphenol and total sugar contents in sake.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

	Total polyphenol (mg/L)	Total sugar (g/L)
Regular sake	62.9	43.4
<i>Taru-</i> sake	75.0	43.0

Concentration of total polyphenol was measured by the Folin Ciocalteu method and expressed as gallic acid equivalent. Concentration of total sugar was measured by the phenol-sulfuric method and expressed as glucose equivalent.

Reprinted from Takao *et al.*, 2015 (in Japanese).

第4節 要約

第3章では樽酒と油っこい食品との相性の良さを示した。しかし、清酒と最も多く合わせられるのは和食であり、和食にとって最も重要な要素の一つは旨味であると考えられるため、樽酒と旨味の関係について調べた。

官能評価の結果、旨味成分を多く含むあさりの酒蒸しのスープを摂取したのちに对照酒を飲用したときに比べて樽酒を飲用したときには、清酒飲用後5、10秒での旨味強度が有意に強くなっており、いわゆるコクを増す働きがあると考えられた。この効果についてより詳しく調べるために、味認識装置を用いた試験を行ったところ、あさりの酒蒸しに加えてそばつゆ、うなぎのかば焼き、まぐろの刺身でも樽酒で旨味後味が強くなる効果が確認された。一方、しょうゆや牛ステーキではこの効果は確認されなかったことから、樽酒による食品の旨味後味を強くする効果は魚介類由来の旨味に対するものであると考えられた。

樽酒の旨味後味増強効果に関与する食品中の成分について調べるために、グルタミン酸ナトリウムなどの旨味成分を用いて同様の試験を行ったが旨味成分間での差は見られず、関与する成分の特定には至らなかった。旨味後味増強効果に関与する樽酒中の成分について調べるために、杉樽抽出物や清酒濃縮物を用いた試験を行ったところ、比較的極性が高く、揮発しにくい成分の関与が明らかになり、杉樽由来のポリフェノール類などである可能性が考えられた。

結論

現在ではほとんどの清酒はステンレス製のタンクなどで製造され、その後の保存、輸送もステンレス製タンクやビン、パックなどで行われており、木製の容器が使用されることはほとんどない。しかし、昭和の初期に一升ビンが普及し始めるまではほとんどの清酒の輸送は杉樽で行われており、そのためほとんどの清酒は樽酒であった。現在では慶事の際の鏡開きなどでしか見ることがなくなった樽酒であるが、最近では一度杉樽に詰めて杉の香りを付加した清酒を詰めかえた、ビン詰め樽酒を見かけることも多くなっている。本研究ではこのような伝統的な側面を持つ樽酒に焦点を当て、その成分の有効活用と食味に及ぼす影響を調べることを目的とした。

樽酒製造に当たっては杉樽が不可欠であるが、材をチップなどに加工して使用するのに対して抽出効率が悪く、杉樽中のほとんどの香り成分が樽に残ったままになっている。一方で、衛生的で軽量のプラスチックやステンレス製の容器が利用できるようになった現在では、樽酒の製造に使用した後の杉樽に利用価値はほとんどなく、ビン詰め樽酒の製造に使用された杉樽のほとんどは廃棄されている。この杉樽廃材を有効活用することを目的として、杉樽廃材をチップにし、水蒸気蒸留をすることにより得られた精油の白癬菌 *T. rubrum* に対する生育阻害活性を調べたところ、分生子、菌糸の両方に対して高い生育阻害活性を有していることが明らかになった。これらの生育阻害活性は同じ木部から抽出され、幅広い微生物に対して高い抗菌性を示すことで知られるヒノキチオールを含むヒバ精油と比べると弱いものであったが、ヒバ精油と異なり、杉樽精油は皮膚の状態を正常に保つ働きを果たす皮膚常在菌として代表的な *S. epidermidis* に対して生育阻害活性を示さなかった。これらの結果から、杉樽廃材から抽出した杉樽精油は多くの国民が悩まされている水虫に対する有効な薬剤となりうると考えられた。また、DNA 代謝酵素阻害活性を調べることによ

り、杉樽精油の *T. rubrum* に対する生育阻害活性は主に DNA ポリメラーゼを阻害することによっていると考えられた。

(第1章)

清酒醸造において、清酒中に火落菌が繁殖することにより白濁や酸敗をまねく火落ちは現在でも酒造業者を悩ませる大きな問題である。一般に樽酒は火落ちしにくいと言われていたが、この原因の一つとして、樽酒中のジテルペン類の火落菌に対する増殖抑制効果が確認されている。樽酒中にはジテルペン類同様に杉樽由来でジテルペン類よりも多く含まれているセスキテルペン類の存在が知られている。そこで、樽酒に含まれるセスキテルペン類の火落菌に対する増殖抑制効果を確認したところ、 δ -cadinene、epicubenol に強い増殖抑制効果があることが明らかとなった。また、杉樽貯蔵中には高い抗酸化能を持つことで知られるフェルラ酸（ジヒドロフェルラ酸も含む）が増加することが明らかとなり、フェルラ酸にもセスキテルペン類ほどではないものの、火落菌に対する増殖抑制効果があることが確認された。これらの結果から、樽酒には杉樽由来のセスキテルペン類やジテルペン類など火落菌に対する増殖抑制効果を持つ成分が多く含まれているために火落ちしにくいと考えられた。

(第2章)

これまでの樽酒に関する研究で、樽酒中には通常の清酒には含まれない杉樽由来の様々な成分が存在し、それらには抗菌性や抗酸化性などの様々な機能性があることが明らかになっている。しかし、嗜好品であり、食中酒である清酒にとって最も重要な要素は美味しさであり、食品との相性である。樽酒はうなぎなどの油っこい食品との相性が良いと言われることがあるため、官能評価により油っこい食品と樽酒の関係を調べたところ、対照酒に比べて樽酒では口腔内に油が残っている感覚が低下する傾向が見られた。この結果から、樽酒は油脂との親和性が高いのではないかと考え、Wilhelmy plate 法により清酒と油脂との

間の界面張力を測定したところ、試験に供した4種の食用油と2種の精製魚油のすべてで対照酒に比べて樽酒との間の界面張力が低くなっており、樽酒は油脂との親和性が高いことが確認された。これらの結果より、樽酒は対照酒に比べて油脂との親和性が高いため、口腔内の油脂が洗い流されやすい状態になり、口腔内の感覚がリセットされやすくなる。これにより油っこい食品もさっぱりと食べやすくなるため、相性が良いと感じられるものと考えられた。本研究ではこれらの効果に係る樽酒中の成分を同定することができなかったが、樽酒同様に油脂を洗い流す効果が高いと報告されているウーロン茶やアルカリ性電解水においてもその機序については明らかになっておらず、今後の研究の進展が期待される。

(第3章)

第3章では樽酒と油脂を多く含有する食品の相性の良さを明らかにしたが、清酒と最もよく合わせられると考えられるのは和食で、和食にとって最も重要な要素の一つは旨味であると考えられる。そこで、樽酒と食品の旨味の関係について調べた。旨味を多く含む食品としてあさりの酒蒸しのスープを用いて官能評価を行ったところ、対照酒に比べて樽酒と合わせたときには旨味後味が有意に強くなることが分かった。この効果についてさらに詳しく解析するために、近年客観的な味の評価ツールとして使用され始めている味認識装置を用いた試験を行ったところ、あさりの酒蒸しのスープ、そばつゆ、うなぎのかば焼き、まぐろの刺身では対照酒に比べて樽酒を合わせたときに旨味後味が有意に強くなることが確認された。しかし、しょうゆや牛ステーキでは同様の効果は確認されず、樽酒による旨味後味増強効果は魚介類でのみ確認された。この効果に係る食品中の成分について調べるために、主要な旨味成分を食品の代わりに用いて同様の試験を行ったが、旨味成分間での顕著な差は見られなかった。さらに、この効果に係る樽酒中の成分について検討するために杉材抽出物や清酒濃縮物を用いた試験を行ったところ、比較的極性が高く、揮発しにくい成分の関与が示唆され、杉樽由来のポリフェノールなどが関与している可能性

が考えられた。

(第4章)

先にも述べたように、樽酒は杉樽が清酒の保存・輸送容器として適していたことから生まれたものであるが、本論文では、杉樽に含まれる成分には清酒を腐敗から守る効果や様々な食品をよりおいしく食べさせる効果があることが明らかになった。

参考文献

Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Moon SE, Kil BS, Yun SI, Lee KY and Song YH: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*, *Phytother. Res.*, **21**, (3) 295 (2007)

Cheng SS, Lin HY and Chang ST: Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*), *J Agric Food Chem* **53**, (3) 614 (2005)

Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, Torpey JW, Otto M, Nizet V, Judy E, Kim JE and Gallo RL: Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, (1), 192 (2010).

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, **28**, (3), 350 (1956)

Fujita A., Isogai A., Endo M., Utsunomiya H., Nakano S. and Iwata H.: Effects of sulfur dioxide on formation of fishy off-odor and undesirable taste in wine consumed with seafood, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, (7), 4414 (2010)

Hayashi N., Chen R., Ikezaki H., Yamaguchi S., Maruyama D., Yamaguchi Y., Ujihara T. and Kohata

K.: Techniques for universal evaluation of astringency of green tea infusion by the use of a taste sensor system., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 626 (2006)

Hayashi N., Chen R., Ikezaki H. and Ujihara T.: Evaluation of the umami taste intensity of green tea by a taste sensor, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, (16), 7384 (2008)

Inouye S., Uchida K., Nishiyama Y., Hasumi Y., Yamaguchi H and Abe S.: Combined effect of heat, essential oils and salt on the fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in foot bath, *Jpn. J. Med. Mycol.*, **48**, (1) 27 (2007)

Ishizaka T., Okada S., Takemoto E., Tokuyama E., Tsuji E., Mukai J. and Uchida T.: The suppression of enhanced bitterness intensity of macrolide dry syrup mixed with an acidic powder., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, (10), 1452 (2007)

Kobayashi Y., Habara M., Ikezaki H., Chen R., Naito Y. and Toko K.: Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectability to basic taste qualities and high correlation to sensory scores, *Sensors*, **10**, (4), 3411 (2010)

Lai Y, Cogen AL, Radek KA, Park HJ, MacLeod DT, Leichtle A, Ryan AF, Nardo AD and Gallo RL: Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, (9), 2211 (2010)

Matsunaga T., Hasegawa C., Kawasuji T., Suzuki H., Saito H., Sagioka T., Takahashi R., Tsukamoto H., Morikawa T. and Akiyama T.: Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, (5) 595 (2000)

M. del Alamo Sanza, I. Nevares Dominguez, L. M. Carcel Carcel and L. Navas Gracia: Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips, *Analytica Chimica Acta*, **513** (1), 229 (2004)

Mizushima Y., Tanaka N., Yagi H., Kurosawa T., Onoue M., Seto H., Horie T., Aoyagi N., Yamaoka M., Matsukage A., Yoshida S. and Sakaguchi K.: Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities in vitro, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1308**, (3), 256 (1996)

Mizushima Y., Yoshida S., Matsukage A. and Sakaguchi K.: The inhibitory action of fatty acids on DNA polymerase β , *Biochem. Biophys. Acta.*, **1336**, (3), 509 (1997)

Mizushima Y., Ohkubo T., Date T., Yamaguchi T., Saneyoshi M., Sugawara F. and Sakaguchi K.: Mode analysis of a fatty acid molecule binding to the N-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase β . A 1:1 complex and binding surface, *J. Biol. Chem.*, **274**, (36), 25599 (1999)

Mizushima Y., Iida A., Ohta K., Sugawara F. and Sakaguchi K.: Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase, *Biochem. J.*, **350**, (Pt 3), 757 (2000)

Mizushima Y., Dairaku I., Yanaka N., Takeuchi T., Ishimaru C., Sugawara F., Yoshida H. and Kato N.: Inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on IMP dehydrogenase, *Biochimie.*, **89**, (5), 581 (2007)

Nogami M., Moriura T., Kubo M. and Tani T.: Studies on the origin, processing and quality of crude drugs. II. Pharmacological evaluation of the Chinese crude drug "zhu" in experimental stomach ulcer.

(2). Inhibitory effect of extract of *Atractylodes lancea* on gastric secretion, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, (9), 3854 (1986)

Ono N., Kaneko T., Nishiguchi S., Shoji M.: Measurement of Temperature Dependence of Surface Tension of Alcohol Aqueous Solutions by Maximum Bubble Pressure Method, *J. of Thermal Sci. and Technol.*, **4**, (2), 284 (2009)

Saka S., Ehara K., Sakaguchi S. and Yoshida K.: Useful Products from Lignocellulosics by Supercritical Water Technologies, The 2nd Joint International Conference on “Sustainable Energy and Environment” (2006)

Takao Y., Kuriyama I., Yamada T., Mizoguchi H., Yoshida H. and Mizushima Y.: Antifungal properties of Japanese cedar essential oil from waste wood chips made from used sake barrels, *Mol. Med. Report*, **5**, 1163 (2012)

Tamura T., Taniguchi K., Suzuki Y., Okubo T., Takata R. and Konno T.: Iron is an essential cause of fishy aftertaste formation in wine and seafood pairing, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, (18), 8550 (2009)

Uchiyama Y., Yamashita M., Kato M., Suzuki T., Omori M. and Chen R.: Evaluation of the taste of tea with different degrees of fermentation using a taste sensing system., *Sensors and Materials*, **23**, (8), 501 (2011)

池田菊苗：新調味料に就きて，東京化学会誌，**30**，820 (1909)

今安聰：清酒の容器と酒質の変遷, 日本醸造協会誌, **75**, (4), 255 (1980)

植田典子、西村顕、松下寛、中沢英五郎、三島秀夫：樽材の火落菌増殖抑制効果, 日本醸造協会誌, **83**, (10), 713 (1988)

大澤俊彦：リグナン類の機能性 特にゴマリグナンを中心に, 日本油化学会誌, **48**, (10), 1041 (1999)

岡村大悟、鮫島正浩、谷田貝光克：樹木の精油成分とその抗菌活性, 木材保存, **28**, (6), 224 (2002)

岡本匡史、柿本尚宏、伊藤清：フェルラ酸高含有清酒の開発, 平成 18 年度日本醸造学会大会講演要旨集 (2006)

小笠原弓恵：白癬の頻度と患者意識, *Jpn. J. Mol. Mycol.*, **44**, 253 (2003)

小原一朗：ホップやユーカリに含まれる β -ユーデスマールによる冷受容チャネルの活性化, *Aroma Res.*, **13**, (3), 240 (2012)

小原一朗、北尾紗代子、岡田紘幸、小山田千秋、高橋千佳、真鍋簡利、形山幹生、永井克也： β -ユーデスマールの飲用による自律神経調節作用, 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会講演要旨集, 2101 (2013)

栢原健二、森俊朗、田口保、宮地昇：ウイスキー香気成分に関する研究：(第 3 報)ガスクロマトグラフによる分析法の研究：(その 3)エチルエーテル-n-ペンタン抽出による高沸成分の

濃縮について, 醗酵工学雑誌, **42**, (6), 375 (1964)

加藤保春: 油脂製造技術, オレオサイエンス, **1**, (7), 779 (2001)

川崎恒: 液体運搬用具、運搬方法, 日本醸造協会誌, **75**, (5), 381 (1980)

木崎諭希、村絵美、永井元、呉性姫、松宮健太郎、松村康生、林由佳子: 口腔内の油脂残存感低下に関わるウーロン茶の有効成分の検討, 日本味と匂学会誌, **18**, (3), 401 (2011)

国中明: 核酸関連化合物の呈味作用に関する研究, 日本農芸化学会誌, **34**, (6), 489 (1960)

小穴富司雄: 吉野秋田 杉材實地調査報告 (3) , 日本醸造協会誌, **25**, (3), 75 (1930)

小玉新太郎: イノシン酸の分離法に就て, 東京化学会誌, **34**, 751 (1913)

坂巻祥子、小藤田久義、菅原正和: スギ精油および精油成分の香気がヒトの脳波に及ぼす影響, *Aroma Res.*, **14**, (1), 64 (2013)

佐藤愛、金子裕司、形山幹生、小西豊: アルカリ水の口腔内油脂に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会講演要旨集, 1401 (2013)

佐藤壽衛: 酒の眞味に就て, 日本醸造協会誌, **17**, (9), 2 (1922)

高尾佳史、山田翼、古川恵司、溝口晴彦: 樽酒中の成分とその火落菌増殖抑制効果, 日本醸造協会誌, **107**, (11), 868 (2012)

高尾佳史、高橋俊成、溝口晴彦：樽酒中の成分が口腔内の食品由来油脂に及ぼす影響，日本醸造協会誌，**109**, (4), 305 (2014)

高尾佳史、高橋俊成、藤田晃子、松丸克己、溝口晴彦：樽酒中の成分が食品の旨味に及ぼす影響，日本醸造協会誌，**110**, (1), 48 (2015)

西村敏英、江草愛：食べ物の「こく」付与因子の分類と新規物質，日本味と匂学会誌，**19**, (2), 167 (2012)

日本海事史学会編：続海事史料叢書第2巻，成山堂書店（1972）

松永恒司、古川恵司、原昌道：樽酒の成分について，日本醸造協会誌，**97**, (7), 529 (2002)

松永恒司、高橋孝悦、古川恵司、原昌道：樽酒の成分について（2），日本醸造協会誌，**99**, (8), 585 (2004)

松永恒司、高橋孝悦、溝口晴彦：樽酒の成分について（3），日本醸造協会誌，**103**, (10), 779 (2008)

伏木亨：コクと日本酒，日本醸造協会誌，**98**, (6), 388 (2003)

光永徹、田丸貴絵：サイプレス（豪州ヒノキ）材精油による脂肪蓄積抑制効果，*Aroma Res.*，**9**, (2), 102 (2008)

光永徹：サイプレス材精油香気成分の肥満抑制食品フレーバーとしての可能性, 食品・食品添加物研究誌, **219**, (2), 126 (2014)

宮村直弘：食品の「コク味」とその活用, 日本醸造協会誌, **102**, (7), 520 (2007)

村絵美、永井元、松宮健太郎、松村康生、林由佳子：ウーロン茶の口腔内油脂浄化作用に関する研究, 日本味と匂学会誌, **17**, (3), 323 (2010)

山本正次：青果物/カット青果物の衛生管理法と微生物制御技術（8）化学的微生物制御技術天然系抗菌剤；フェルラ酸製剤, 防菌防黴誌, **35**, (5), 317 (2007)

投稿論文目録

基礎となる学術論文

第1章

題目：Antifungal properties of Japanese cedar essential oil from waste wood chips made from used sake barrels

著者名：Takao Y., Kuriyama I., Yamada T., Mizoguchi H., Yoshida H. and Mizushina Y.

学術雑誌名 巻・号・頁：Mol. Med. Reports, **5**, 1163-1168 (2012)

発表又は受理：2012年1月30日

発刊又は発刊予定年月：2012年5月

第2章

題目：樽酒中の成分とその火落ち菌増殖抑制効果

著者名：高尾佳史、山田翼、古川恵司、溝口晴彦

学術雑誌名 巻・号・頁：日本醸造協会誌, **107**, (11), 868-874 (2012)

発表又は受理：2012年3月30日

発刊又は発刊予定年月：2012年11月

第3章

題目：樽酒中の成分が口腔内の食品由来油脂に及ぼす影響

著者名：高尾佳史、高橋俊成、溝口晴彦

学術雑誌名 卷・号・頁：日本醸造協会誌, **109**, (4), 305-309 (2014)

発表又は受理：2013年10月2日

発刊又は発刊予定年月：2014年4月

第4章

題目：樽酒中の成分が食品の旨味に及ぼす影響

著者名：高尾佳史、高橋俊成、藤田晃子、松丸克己、溝口晴彦

学術雑誌名 卷・号・頁：日本醸造協会誌, **110**, (1), 48-55 (2015)

発表又は受理：2014年4月28日

発刊又は発刊予定年月：2015年1月

参考論文

題目：酒樽のスギ廃材から抽出した精油と芳香水の抗白癬菌活性

著者名：水品善之、高尾佳史、栗山磯子、山田翼、吉田弘美、溝口晴彦

学術雑誌名 卷・号・頁：バイオインダストリー, **29**, (9), 43-51 (2012)

発刊又は発刊予定年月：2012年9月

題目：樽酒の香り

著者名：高尾佳史

学術雑誌名 卷・号・頁：AROMA RESEARCH, **61**, 9-13 (2015)

発刊又は発刊予定年月：2015年2月

題目：樽酒が食品由来の油脂や旨味に及ぼす影響

著者名：高尾佳史

学術雑誌名 巻・号・頁：日本醸造協会誌, **110**, (6), 380-387 (2015)

発刊又は発刊予定年月：2015 年 6 月

題目：樽酒中の成分が食品由来の油脂や旨味に及ぼす影響

著者名：高尾佳史

学術雑誌名 巻・号・頁：化学工学, **79**, (7), 539-541 (2015)

発刊又は発刊予定年月：2015 年 6 月

題目：樽酒と食品の相性～樽酒中の成分が食品の油脂とうま味に及ぼす影響～

著者名：高尾佳史

学術雑誌名 巻・号・頁：バイオサイエンスとインダストリー, **73**, (6), 485-486 (2015)

発刊又は発刊予定年月：2015 年 11 月

謝辞

本論文をまとめるに当たりご懇篤なるご指導を賜りました恩師である山口大学大学院医学系研究科（農学系）教授 山田守先生に心からの感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、終始的確なご指導を頂きました菊正宗酒造株式会社総合研究所の前所長である溝口晴彦博士に深く感謝いたします。また、本研究を進めるに当たり温かい励ましや懇切なご指導を頂きました菊正宗酒造株式会社総合研究所 高橋俊成所長、生産管理グループ 山田翼課長、古川恵司博士、品質管理部 松永恒司課長に心より感謝いたします。本研究遂行にあたり惜しみないご協力を頂いた研究所員の皆様、製造部門の皆様にも心より感謝いたします。

さらに、本研究遂行に当たり深いご理解を示され、ご指導とご便宜をはかっていただきました菊正宗酒造株式会社 末野和男常務取締役、田中伸哉生産部長に厚く御礼申し上げます。

共同研究に当たり、懇切にご指導、ご助言いただいた神戸大学客員教授 水品善之先生、独立行政法人酒類総合研究所 松丸克己先生、藤田晃子先生に深謝いたします。

学位論文要旨

氏名 高尾佳史

題目 樽酒もしくは樽酒に含まれる成分の機能性と食味に及ぼす影響に関する研究

樽酒とは杉製の樽に貯蔵することで杉のさわやかな香りを付与した清酒である。樽酒は清酒の保存・輸送容器としての杉樽の必要性から生まれた。そのため、昭和のはじめごろに一升ビンが普及し始めるまではほとんどの清酒が樽酒であった。現在ではステンレスタンクやビンなどが普及し、容器としての杉樽の必要性はなくなったが、その特徴的な香りを手軽に楽しむためにビン詰め樽酒なども開発されている。本研究では樽酒や樽酒に含まれる成分の抗菌性と食味に及ぼす影響を調べた。

樽酒製造には杉樽が不可欠であるが、使用後の杉樽にはほとんどの香り成分が抽出されずに残っている。この杉樽廃材を有効活用するために水蒸気蒸留により杉樽精油を抽出し、水虫の主要な原因菌である白癬菌 *T. rubrum* に対する生育阻害活性を微量液体希釈法と寒天ディスクを用いた方法で見た。その結果、分生子、菌糸の両方に対して高い生育阻害活性を示すことが明らかとなった。杉樽精油の生育阻害活性は幅広い抗菌スペクトルと高い抗菌活性で知られるヒノキチオールを含むヒバ精油には及ばなかったものの、表皮に常在し、皮膚の状態を正常に保つ役割を担っている表皮常在菌 *S. epidermidis* に対して影響を及ぼさない点から、杉樽精油は *T. rubrum* に対する有効な抗菌薬となりうると考えられた。また、

杉樽精油が *T. rubrum* の DNA ポリメラーゼの働きを阻害する事により生育が阻害されていることが明らかになった。

清酒は様々な微生物の関与により製造されるが、野生酵母などの腐造につながる微生物の存在も知られている。火落菌もそのような微生物の一種で、清酒の白濁や酸敗を招く。樽酒は火落ちしにくいとされており、その原因の一つはジテルペン類の存在であることが分かっている。しかし、樽酒中には多量のセスキテルペン類の存在も確認されているため、それらの火落菌に対する効果を調べたところ、 δ -cadinene、epicubenol で強い増殖抑制効果が確認された。さらに、これまでに樽貯蔵中の増加が確認されていなかったフェルラ酸についてもセスキテルペン類ほどではないものの火落菌に対する増殖抑制効果を有することが確認された。

これまでに樽酒に含まれる成分の抗菌性や抗酸化性などの機能性については明らかにされてきたが、清酒にとって最も重要な要素であるおいしさや食品との食べ合わせについての科学的根拠に基づいた報告は見当たらない。樽酒はうなぎなどの油っこい食品と相性が良いとされることがあるので、油脂を多く含む食品とあわせて官能評価を行ったところ、対照酒に比べて樽酒をあわせた場合では口腔内の油脂残存感が低い傾向が見られた。この結果から、樽酒は油脂との親和性が高いために口腔内の油脂が洗い流されやすい状態になっているのではないかと考え、Wilhelmy plate 法により清酒と油脂の間の界面張力を測定した。その結果、試験に供した食用油 4 種、精製魚油 2 種全てとの間で対照酒に比べて樽酒では界面張力が有意に低く、樽酒は油脂との親和性が高いことが明らかとなった。これらの結果より、樽酒は油脂との間の親和性が高いために口腔内の油脂を洗い流しやすくし、油脂を多く含む食品をさっぱりと食べさせる効果があると考えられた。

樽酒と油脂との相性の良さが確認されたが、清酒は比較的油脂が少ない和食と

合わせられることが多い。一方、和食にとって最も重要な要素の一つは旨味であると考えられるため、樽酒と旨味の関係について調べることにした。旨味を多く含むあさりの酒蒸しのスープを摂取した後に清酒を飲用し、その後の旨味強度を評価する形で官能評価を行った結果、対照酒に比べて樽酒では清酒飲用後の旨味が有意に強くなっていた。この効果について詳細に調べるために味認識装置を用いた試験を行った。その結果、あさりの酒蒸しのスープに加えてそばつゆ、うなぎのかば焼き、まぐろの刺身でも対照酒に比べて樽酒を合わせたときには旨味後味が有意に強くなることが明らかになった。一方でしょうゆや牛ステーキではこのような効果は確認されず、樽酒の旨味後味増強効果は魚介類に対してのみ確認された。次に、旨味後味増強に関わる食品中の成分を明らかにするために、グルタミン酸ナトリウムなどの代表的な旨味成分を用いて同様の試験を行ったが、旨味成分間での差は見られなかった。さらに、旨味増強に関わる樽酒中の成分について調べるために杉材抽出物や清酒濃縮物を用いた試験を行ったところ、樽酒に含まれる比較的極性が高く、揮発しにくい成分が関与していることが明らかになり、杉樽由来のポリフェノールなどが関与している可能性が考えられた。