

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07519

研究課題名(和文) スギ樽から溶出するノルリグナン類の食品成分との反応生成物解明

研究課題名(英文) Elucidation of reaction products formed with food constituents and norlignans dissolving from sugi barrel for sake

研究代表者

河村 文郎 (Kawamura, Fumio)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80353655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本酒(樽酒)等の保存(エージング)におけるスギ材成分と食品(飲料)成分の共存による反応生成物を解明することを目的とした。スギ心材の代表的な抽出成分であるセキリン-C等のノルリグナン類と主な日本酒の成分7種を組み合わせ共存させた溶液を用いてエージングを行った。セキリン-Cとアミノ酸の一種であるL-アラニンとを組み合わせさせた溶液では、成分共存の影響が顕著であった。この溶液から生成物の分離・精製を行い、分析した結果、セキリン-Cの部分構造にL-アラニンが結合した物質を3種確認した。アミノ酸は日本酒の味に関わる成分であるため、樽酒のエージングにおけるセキリン-Cの味への影響が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wooden barrel sake (Taruzake) contains sugi heartwood constituents and constituents derived from Japanese sake. The objective of this study is the elucidation of reaction products caused by co-existence of sugi heartwood and sake constituents. Sequirin-C is a representative extractives of sugi heartwood. Aging experiment using some combination of sequirin-C and seven kinds of typical Japanese sake constituents were conducted. A solution with combination of sequirin-C and L-alanine showed remarkable influence of co-existence of both constituents. Several reaction products were separated and purified from this solution. As a result of instrumental analyses of these products, three products, which have partial structure of sequirin-C and linkage with L-alanine, were confirmed. Influence of sequirin-C on the flavor in the aging of wooden barrel sake was suggested, because amino acid is a constituent involved in the flavor of Japanese sake.

研究分野：森林資源を主な対象とした天然物化学

キーワード：スギ心材 ノルリグナン類 セキリン-C 食品成分 保存 エージング 生成物

1. 研究開始当初の背景

スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) は我が国の代表的な造林木であり、建築に広く利用される他、日本酒や焼酎の酒樽、さらに大型貯水槽などの食品(飲料)容器としても使用されている。スギ材を食品容器として利用する際、食品中へスギ材由来の成分が溶出して本来食品が有している健康促進機能(生物活性)を強化、あるいは新たな機能を発揮する可能性がある。スギ心材の抽出物ではノルリグナン類が高い組成を占め、これらの成分は有機溶媒や水によって材から容易に抽出され、機能性発現に寄与するものと予想される。

樽を用いた酒類等の食品中には、①材由来の成分、②食品(日本酒等)由来の成分、及び③材と食品由来の成分が熟成や保存の過程(エージング)で変化した物質、の3種が存在すると考えられる。①のスギ樽から日本酒中へ浸出する成分として *agatharesinol* 及び *sequirin-C* が報告されている(松永ら, 2004)。また、①と②の両方の可能性のある成分としてフルフラール類を挙げることができる。フルフラール類は、食品原料が変換されて焼酎や日本酒中に存在し、また、焼いたオーク材からも抽出される。さらに、フルフラール類は、食品の着色反応にも深く関与することが知られており、反応性に富む物質である。③のエージングについてのモデル実験として、Nonier ら(2007)はフルフラール類と②のワイン由来の成分であるカテキンとを 12%エタノール水溶液中で共存させて常温(20°C)放置し、カテキン2分子が1分子のフルフラールを介して結合した化合物を得ることに成功している。

申請者らは、スギ材を水やエタノールと水の混合溶媒で抽出して得た抽出物の成分分析を行い、いずれの溶媒を使用した場合もノルリグナン類の *agatharesinol* 及び *sequirin-C* が大量に含まれていることを確認した(河村ら, 2014)。また、これらのノルリグナン類は高い抗うつ作用を示した(河村ら, 未発表データ)。さらに、*agatharesinol* 及び *sequirin-C* を含有するスギ抽出物水溶液を4°Cで75日間保存した後、化学分析を行ったところ、両化合物の含有率が減少しており、特に *sequirin-C*

の減少が著しいことを明らかにした(河村ら, 未発表データ)。この結果から、*sequirin-C* や *agatharesinol* は比較的低温においても別の物質に変化することがうかがえる。樽に入れたまま出荷・販売される樽酒の賞味期限は1~3週間程度であり、通常常温保存される。また、ガラス瓶詰めの樽酒の場合もスギ樽の香り付けは常温で行われる。このように、樽酒にはアミノ酸やフルフラール類等の食品原料由来成分も共存し、常温で保存されるため、上述の予備実験の事例よりも、さらにノルリグナン類の変換反応が進行し易いと推定した。

2. 研究の目的

樽酒等のスギ材製容器を用いた飲料(食品)中には、ノルリグナン類等のスギ材由来の成分が溶出して存在しており、これらの成分は不安定であるため、飲料中に共存する食品成分と相互作用や反応を起こす可能性があると考えられる。

本研究では、スギ材製容器を用いて食品が保存(エージング)されるときの反応生成物の解明を行うことを目的とする。具体的には、食品由来の成分(アミノ酸類、フルフラール類、有機酸等)とスギ樽から酒類中へ浸出する成分である *sequirin-C* や *agatharesinol* (スギ心材主要ノルリグナン類)を共存させてエージングし、反応生成物を分離・精製し、機器分析等により構造決定してどのような変換反応が起こるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) スギ心材からのノルリグナン類の単離

天然乾燥したスギ心材(約70年生、三河産)を回転カンナ盤で切削し、小片(カンナ屑)を得た。小片をWileyミルで<2mmに粉碎した。得られたスギ心材粉末をアルコール抽出し、溶媒をエバポレーションにより溜去した。得られた抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによって *sequirin-C* 及び *agatharesinol* (図1)を分離、精製した。核磁気共鳴分光法(NMR)等の機器分析によってこれらの成分の化学構造を確認し、同定した。

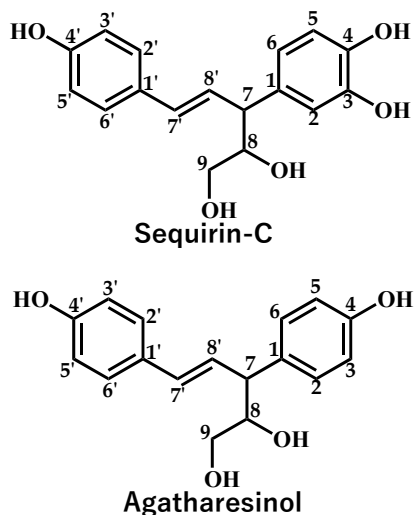


図1 スギ心材成分の化学構造

(2) エージング実験用試料溶液の調製

単離したノルリグナン類 (squirin-C, agatharesinol) と食品由来成分の市販標品 (L-malic acid, L-alanine, L-proline, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, ferulic acid) をそれぞれ 1 種類ずつ組み合わせ (12 通り)、15% エタノール水溶液に溶解させたモデル溶液を調製した。ノルリグナン類を溶解させた溶液をコントロール 1、食品由来成分のみを溶解させた溶液をコントロール 2 とした。5 mL のスクリー管を使用し、溶液の量は 2.5 mL、容器内での気相率は 50% とした。

(3) ノルリグナン類と食品由来の成分を共存させたエージング実験

ノルリグナン類と食品由来の成分を共存させた溶液、コントロール 1、及びコントロール 2 を暗所、静置、25°C で最大 128 日までエージングした (一部の試料のみ)。溶液を経時的に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析し、コントロールと比較して成分を共存させた溶液に特有なピークを確認した。

(4) 酸素濃度 (気相率) の影響

(2) の溶液について、体積を変えて容器に入れ、気相率 10, 50, 90% の試料溶液を調製した。(3) と同様の実験 (エージングは 32 日まで) を行い、気相率の影響を調べた。

(5) HPLC 分析において確認したピークの紫

外-可視分光 (UV-VIS) スペクトルの測定

HPLC 検出器の機能を用いて (3) で確認したピークの UV-VIS スペクトルを測定した。取り込み波長範囲は、200-900 nm とした。

(6) Alanine の L-体と D-体の違いによる squirin-C との反応生成物の比較

L-Alanine と D-alanine をそれぞれ個別に squirin-C と共存させた溶液を (2) と同様に調製し、(3) と同様の実験 (エージングは 32 日まで) を行い、L-体と D-体の違いによる結果を比較した。

(7) 反応生成物の単離・機器分析

(4) (気相率 90%) と同様に L-Alanine と squirin-C の試料溶液を 50 本調製した。エージングの条件は、暗所、静置、25°C、12 日間とした。

エージング後、50 本の試料溶液を併せ、エバポレーションにより濃縮し、分取 HPLC によって L-alanine を除去した。得られた溶液を濃縮し、分取 HPLC を行った。4 種の生成物を分取し、溶媒をエバポレーションにより除去し、乾固した。得られた生成物、L-alanine 及び squirin-C の CD₃OD 溶液を調製し、NMR スペクトル (¹H, ¹H-¹H COSY) を測定した。

4. 研究成果

(1) ノルリグナン類と食品由来の成分を共存させたエージングによる生成物

食品由来の成分のみの溶液 (コントロール 2) をエージングした結果、UV 検出による HPLC 分析ではピークが全く現れなかった。

squirin-C のみの溶液 (コントロール 1) 及び squirin-C と食品由来の成分を共存させた溶液では、非常に早く生成物のピークが生じ、2 日間のエージングで、多数のピークが確認された。squirin-C とアミノ酸 (L-alanine, L-proline) の組み合わせでは、コントロールと成分共存溶液との間に明確な差異が確認され、成分共存による特有の生成物が生じることがわかった。特に L-alanine 共存の影響が顕著であった (図 2)。一方、squirin-C と L-malic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, ferulic

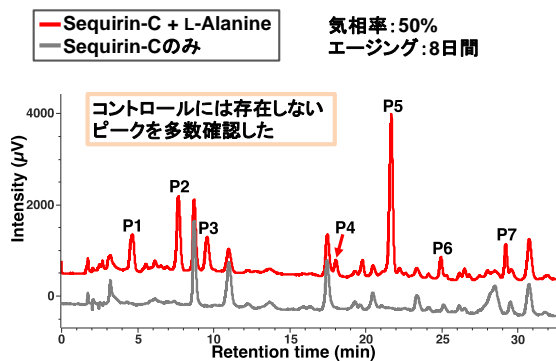


図2 Sequirin-C と L-alanine の共存による生成物の HPLC による確認

acid の各成分を共存させた溶液では、酸化生成物と予想されるピークは多数確認されたものの、コントロールと成分共存溶液との間に差異が確認されなかったため、スギ心材成分と食品成分の共存による影響は無いことが分かった。

Agatharesinol 及びその共存溶液では生成物のピークが生じる速度が遅く、また、コントロール 1 と成分共存溶液の間に差が見られなかった。

(2) 酸素濃度(気相率)の影響

Sequirin-C と L-alanine の共存によって生じた生成物のピークの保持時間を以下に示す: [生成物 No.(保持時間,min)], L-alanine (1.7), P1 (4.7), P2 (7.7), P3 (9.6), P4 (18.0), P5 (21.6), P6 (24.9), P7 (29.2), sequirin-C (38.4)。気相率 50%, エージング 8 日間での各生成物の相対生成量 (P5=100) は次の通りであった: P1 (28), P2 (52), P3 (25), P4 (11), P5 (100), P6 (10), P7 (19)。P2, P4, P5 及び sequirin-C の経時変化に対する気相率の影響を図 3 に示す。気相率が高くなる程、反応が速く進行することが分かった。従って、スギ心材成分と食品成分の共存による反応は、酸化反応が主体であると推定した。P5 は反応初期過程で先行して生成する最も生成量の多い物質であり、最高濃度に達した後の減少速度も早かった。生成量の少なかった P4 も P5 と同様の傾向を示し、減少速度は P5 よりもやや遅かった。P2 はこれらの生成物とは全く異なる挙動を示し、32 日目まで増加し続けた。また、データは示していないが、P1, P3, P6, P7 も P2 と同様の傾向を示した。

これらの生成物は比較的安定であると予想した。

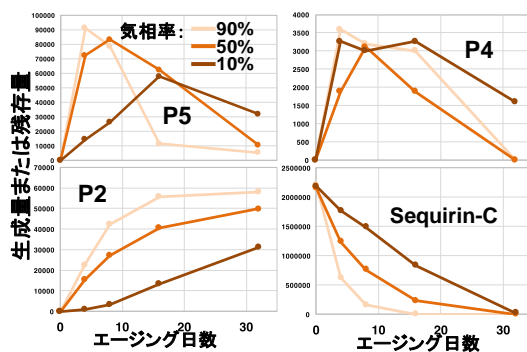


図3 反応挙動への気相率の影響

(3) HPLC 分析において確認したピークの UV-VIS スペクトル

生成物 P1-P7 の UV-VIS スペクトルを図 4 に示す。P6 のみ出発物質の sequirin-C と類似したスペクトルを示した。P1, P2, P3 及び P7 は極大吸収が sequirin-C よりも長波長側に移動した。結果(2)において、生成並びに減少の反応速度の速かった P5 及び P4 は、それぞれ P5 (260 nm, 348 nm), P4 (264 nm, 358 nm) に極大吸収を示した。これらは出発物質の sequirin-C (266 nm) の UV スペクトルとは大きく異なり、共役系の発達した構造が示唆された。

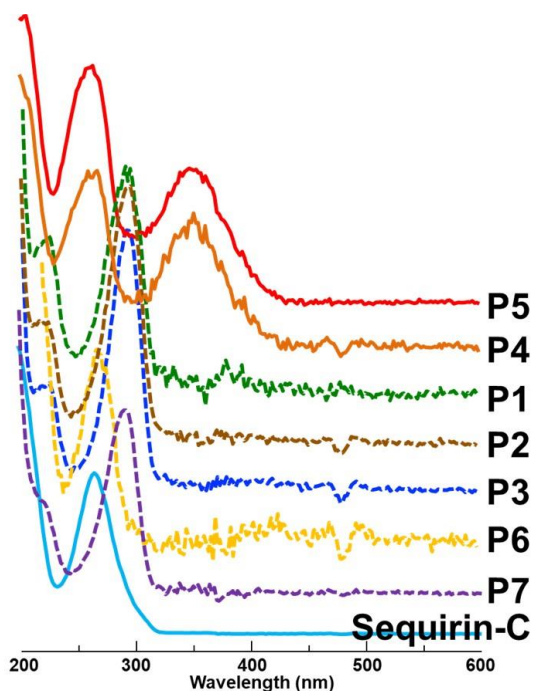


図4 生成物の UV-VIS スペクトル

(4) Alanine の L-体と D-体の違いによる sequirin-C との反応生成物の比較

日本酒には alanine の L-体と D-体の両方が含有されていることが知られている。Sequirin-C と alanine の L-体と D-体それぞれ個別に共存させ、8日間エージングを行った後、HPLC 分析した。結果を図5に示す。Sequirin-C と D-alanine を共存させた場合も多種多様な生成物のピークが確認された。その組成は L-体共存溶液のエージングの結果とは顕著に異なり、L-体共存溶液には全く存在しないピークも多数確認された。

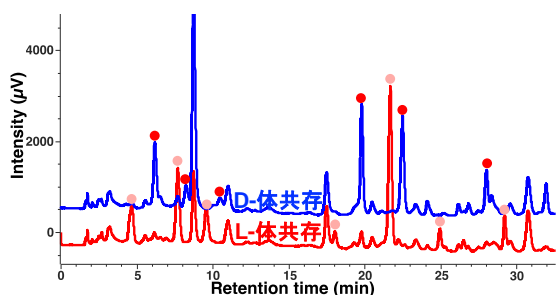


図5 sequirin-C と D-,L-Alanine の共存による生成物の比較

(5) 反応生成物の単離と化学構造推定

① P5 の分取

分取 HPLC を行い、P5 を含有する溶離液を分取した。分取直後にこの溶離液を HPLC 分析したところ、ほぼ単一のピークを示した。しかしながら、溶離液を乾固後、溶媒に再溶解させて HPLC 分析を行うと、P5 のピークは著しく減少し、多種多様なピーク(生成物)が生じた。これらの生成物の中には、エージングした溶液の HPLC 分析 [実験(3)]において確認された P1-P7 が全て存在し、P4 及び P2 の生成量が多く、P3, P6, P7 の生成は微量であった。また、P5 は一部出発物質である sequirin-C に戻っていることがわかった。P5 及び P4 は、350nm 付近に吸収極大を有する特徴的な UV-VIS スペクトルを示し、両者は非常に類似していた [実験(5)]。気相率 50%, 128 日後あるいは気相率 90%, 32 日後の溶液の HPLC では、P1, P2, P3, P6 及び P7 が主要なピークとして残存していたのに対し、P5 及び P4 は、著しく減少した。以上の結果から P5 及び P4 を P1, P2, P3, P6, P7 等の生成における中間体と推定した。

② P3, P1 及び P2 の単離、構造推定

分取 HPLC を行い、P3, P1 及び P2 を分取した。これらの内、最も純度を高くできた P3 からまず構造解析を行った。P3, sequirin-C 及び L-alanine の ¹H-NMR スペクトルを比較した結果、L-alanine [CH₃CH(NH₂)COOH] の CH₃(d)及び CH(dd)に対応したシグナルが、それぞれ P3 では、やや高磁場シフト、大きく低磁場シフトして現れた。なお、P3 の CH シグナルは非常にブロードになったため、CH-CH₃の相関は ¹H-¹H COSY のクロスピークで確認した。これらの解析結果から生成物 P3 には L-alanine が共有結合していると推定した。生成物 P3 と sequirin-C の ¹H-NMR スペクトルを比較した結果、P3 のスペクトルでは、カテコール核の消失、側鎖オレフィンの飽和、飽和脂肪族領域のシグナルの増加等が確認された。以上の結果から、P3 は、sequirin-C からカテコール核が外れ、側鎖が飽和し、側鎖部分に L-alanine が結合した物質であると推定した(図6)。P1 及び P2 の ¹H-NMR スペクトルは P3 と同様の特徴を有しており、類似した物質(ジアステレオマー等)と考えられた。

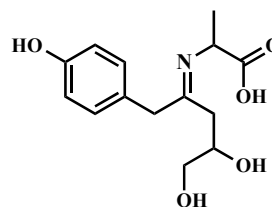


図6 生成物 P3 の推定構造式

③ 生成物の反応経路推定

①及び②の結果から P5 及び P4 を経由して P1, P2, P3, P6, P7 等が生成するエージング初期過程の経路を推定した(図7)。

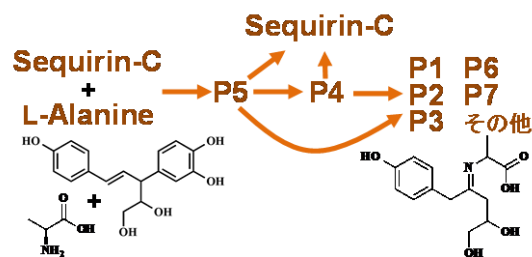


図7 推定したエージング初期過程の経路

(6) スギ樽由来成分と食品成分の共存による生成物の存在意義

本研究では、スギ樽由来成分と食品成分の共存による生成物を数種類単離し、化学構造を推定することができた。しかしながら、これらの物質はごく微量しか得られなかったため、薬理活性等の測定には至らなかった。また、この実験では、生成物を単離する必要があったため、スギ心材成分や食品成分を実際の樽酒における成分濃度よりも高くして実験を行った。一方、スギ樽由来成分と食品成分の濃度を実際の樽酒と同様に低くして実験を行うと、生成物の濃度は単離実験のときよりもさらに微量となったため、その機能性への寄与は低くなると推察した。他方、本研究では sequirin-C とアミノ酸との反応性が高いことが判明した。アミノ酸は日本酒の味に関わる成分であるため、sequirin-C がエージングにおいて樽酒の味に影響を及ぼす可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) 松永ら (2004) 樽酒の成分について(2). J. Brew. Soc. Japan, 99:585-590.
- 2) Marie-Françoise Nonier, M.-F. et al. (2007) A kinetic study of the reactions of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. J. Sci. Food Agric., 30:2081-2091.
- 3) 河村ら (2014) ラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞を用いたスギ心材抽出物の神経細胞保護効果の評価(II). 第 64 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p 190.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 河村文郎. スギ心材主要ノルリグナン類と食品成分の共存による生成物 (第 3 報). 第 68 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p.60, 2018 年.
- ② Kawamura, F. Interaction of sequirin-C with L- and D-isomers of alanine in ethanol wooden barrel sake. EuroFoodChem XIX conference, October 3-5, 2017, Budapest/ Hungary, p.182,

③ 河村文郎. スギ心材主要ノルリグナン類と食品成分の共存による生成物 (第 2 報). 第 67 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p.241, 2017 年.

④ Kawamura, F. The influence of coexistence of food constituents on the aging of major norlignans from the heart wood of *Cryptomeria japonica*. The XXVIIIth International Conference on Polyphenols, July 11-15, 2016, Vienna/Austria, p.394-395,

⑤ 河村文郎. スギ心材主要ノルリグナン類と食品成分の共存による生成物. 第 66 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p.225, 2016 年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河村 文郎 (KAWAMURA, Fumio)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・

森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号 : 8 0 3 5 3 6 5 5