

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12326

研究課題名(和文)ポリフェノールが作る還元的環境で食肉の新鮮色が維持できるか

研究課題名(英文) Can the reducing environment produced by polyphenols maintain the bright red color of fresh meats?

研究代表者

増田 俊哉 (MASUDA, Toshiya)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授

研究者番号：10219339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノールを用いて食肉の新鮮色が維持できるかを検討した。食肉の色はミオグロビンの状態によることから、ミオグロビンに対するポリフェノールの効果から検証した。多くのポリフェノールは鮮赤色のオキシミオグロビンの褐変化を促進した。一方で、ケルセチンなどのポリフェノールは、褐色ミオグロビンを鮮赤色へ変換した。機構解析の結果、ポリフェノールキノンのプロオキシダント効果を除くためにシステインを共存させたところ、高還元性のポリフェノールに強力な鮮赤色化効果を発見した。この効果はシステインをポリフェノールに導入したのものにも見られた。さらに、実際の食肉として、変色が速いカツオ肉を用いても検討した。

研究成果の概要(英文)：Reserving effect on the bright red color of fresh meats by polyphenols has been investigated. Meat color variety depends on the redox stages of myoglobin. Therefore, the effect of polyphenols on the red color of oxymyoglobin was examined. Most polyphenols promoted the oxidation of oxymyoglobin. On the other hand, the same polyphenols including quercetin converted metmyoglobin to oxymyoglobin. The mechanism of the reaction revealed that the prooxidant activity was resulted from the reaction with the formed quinones. To reduce the effect, addition of cysteine was examined. Polyphenols in the presence of cysteine afforded good results to convert metmyoglobin to oxymyoglobin. Cysteinylated polyphenols also showed sufficient results. In addition to these investigations, the effect of polyphenols and cysteine (NAC) on fresh meats was also examined using red meats of Skipjack tuna, the red color of which was well-known to change quickly.

研究分野：食品機能化学

キーワード：meat color polyphenols cysteine myoglobin

1. 研究開始当初の背景

消費者は、食肉の新鮮さをその鮮赤色で判断している。この鮮赤色は、食肉中の色素タンパク質・ミオグロビンの2価鉄イオンに酸素が配位した鮮赤色のオキシミオグロビンによるものである。なお、このミオグロビンは安定ではなく、徐々に鉄が3価に酸化され、褐色のメトミオグロビンとなり、商品価値の低下および、食肉の酸化的劣化を誘発する。従って、食肉製造から消費の間に、オキシミオグロビンが示す赤色状態を保持することは重要な課題である。最近では、流通経路の複雑化に加え、変色劣化の速い魚肉の取り扱いも多くなり、本問題の解決に繋がる研究の必要性は増している。

一方、植物には多様なフェノール成分が含まれ、それらは高い抗酸化性と還元性を有する機能性成分・ポリフェノールとして着目されている。しかしポリフェノールは高い還元反応性ゆえに物質としては不安定性で、その利用には注意が必要であり、根拠に乏しい“いわゆる健康食品”などへの応用にとどまっているのが実状である。活性なポリフェノールを利用するには、基礎研究から実用化にわたって、その化学的性質に関する高度な知識と技術が必要である。

このようなポリフェノールの高い還元および抗酸化反応性がコントロールでき、また、その機能を積極的に用いることで、生鮮食品、特に食肉の流通、品質管理上、重篤な問題となる新鮮色の変色の制御を可能にすることができれば、食品科学の発展に寄与し、またその成果の食肉関係の産業への展開にも繋がる事が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景を踏まえ、食肉の変色を制御できる能力を有する強い還元性ならびに抗酸化性を持つポリフェノールを選抜し、食肉色素であるミオグロビンの変色制

御能を検討し、さらに実際の食肉において、その能力を確認することで、その新鮮さの保持を達成することを目的とする。具体的には、
1) ポリフェノールによる褐色のメトミオグロビンの還元機構、鮮赤色のオキシミオグロビンに対する抗酸化的保持機構を、ポリフェノールとミオグロビンとの酸化還元反応物に基づいて解析する。

2) 解明した反応機構に基づき、有効なポリフェノールを選抜し、その能力を引き出すことで、新しい食肉変色制御法の確立を目指す。これにより、食肉の有効利用を促進するとともに、安価で安全性の高い食用植物成分・ポリフェノールの利用促進にも寄与する。

3. 研究の方法

(1) 研究材料およびその調製

ポリフェノールは、以下のものを入手して、本研究に用いた。 gentisic acid, protocatechuic acid, quercetin, caffeic acid, hydroxytyrosol, myricetin, morin, kaempferol, catechin, rosmarinic acid, chlorogenic acid, nordihydroguaiaretic acid, dihydrocaffeic acid, Taxifolin。

オキシミオグロビン (MbO_2) は、ウマ心筋由来のミオグロビンから以下の様に作成した。市販のミオグロビンを 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し (20 mg in 2 mL), 50 μ L の $Na_2S_2O_4$ (0.23 mol/L) 緩衝液を 25 °C で加えた。反応液を Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィー (10 cm \times 1.6 cm i.d.) に供し、鮮赤色の MbO_2 分画を収集した。なお、 MbO_2 の濃度は分光光度計で 582 nm の吸光度から $\epsilon_{582\text{ nm}} = 15,100$ として算出した。

メトミオグロビン (MetMb) は、上記調製により得た MbO_2 緩衝液溶液 (120 μ mol/L) 3 mL に Potassium hexacyanoferrate (III) (2 mg) を加え、30 秒穏やかに攪拌し、それを Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 ultrafiltration membrane カートリッジに移し、4 °C、14,000 g 6 分間の遠心ろ過を 3 回繰り返すことにより脱塩して調製した。

(2) ポリフェノールによる MetMb の還元および MbO_2 の酸化効果の測定

マイクロプレートの各ウェルに、50 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH 7.4, 140 μ L), 120 μ mol L^{-1} MetMb または、 MbO_2 のリン酸緩衝液溶液 (150 μ L), ポリフェノールまたはアスコルビン酸の DMSO 溶液 (10 μ L) を順に加えた。プレートを 37 °C にてインキュベートし、1 時間間隔で、500, 582 nm の吸光度を測定した。また、反応開始と反応終了時には、可

視光領域の吸光スペクトル (450–650 nm) 測定した。各ウェル中の MbO₂ と MetMb の濃度は、60 μmol L⁻¹ の純粋な MbO₂ または MetMb の測定スペクトルから得られた計算式 MbO₂ (μmol L⁻¹) = (89.7 × A₅₈₂) - (32.9 × A₅₀₀)、(なお A₅₀₀ と A₅₈₂ は 500 nm および 582 nm の吸光度) から算出した。また、ミオグロビン間の酸化還元変換の効率は、MetMb または MbO₂ 初期の初期濃度と生成または残存 MbO₂ 濃度の比を百分率で表した。

(3) MetMb 還元時にケルセチンから生成する物質の分析

上記条件にて、ケルセチンを添加した MetMb 溶液から、1 時間ごとに 5 μL の溶液を採取し、HPLC 分析した。また各物質ピークの MS データは、LC-MS で測定した。

生成物 I, II, III は、ケルセチン (50 mg) のアセトニトリル (50 mL) および水 (50 mL) 溶液に 90 mg の FeCl₃·6H₂O を加え、37 °C で 1 ~ 2 時間撹拌したものを Chelex100 (10 g) に通し、濃縮後分取 HPLC より精製し NMR および MS 測定により化学構造を同定した。

(4) MetMb 還元時に、システイン共存カフェ酸から生成する物質の分析とシステイン、シスチンの定量

システイン共存下でのカフェ酸による MetMb 還元 MbO₂ 化反応における生成物の分析は以下の様に行った。反応条件: 10 μL of カフェ酸の DMSO 溶液 (18 mmol/L), 40 μL のシステイン水溶液 (4.5 mmol/L), 120 μL の MetMb 緩衝溶液を 150 μL のリン酸緩衝液 (50 mmol/L, pH 7.4) の入ったマイクロプレートウェルに順に加え、撹拌後、37 °C でインキュベートした。1 時間ごとに、5 μL の溶液を採取し、その成分を HPLC 分析に供した。(検出したカフェ酸およびカフェ酸からの生成物は、基準物質で別途作成した検量線を用いて定量した。また、生成物ピーク 1, 2 の MS データは、さらに 5 μL の溶液を 2 時間後に採取し、以下の要件で LC-MS 分析することにより取得した。システインの定量は、改良 Ellman 法を用いて行った。

シスチンの定量は、Mizuta and Sakai の方法に準じて、誘導した N, N-ジベンゾイルシスチンを HPLC 分析することにより行った。

(5) システイン共存下での各種ポリフェノール反応物の調製

各種ポリフェノールのメタノール溶液 (18 mmol/L, 1 mL) に、システイン水溶液 (18 mmol/L, 1 mL), ペルオキシダーゼ水溶液 (60 μmol/L, 20 μL), 過酸化水素水溶液 (400 mmol/L, 30 μL) 順に加え、その後水で 4 mL とした。その反応液を 25 °C で 8 分程度反応させ、これをシステイン共存下でのポリフェノール反応物とした。(4.5 mmol/L based on starting polyphenol concentration). なお、システインを加えずに同様に反応させたものを


コントロール反応物とした。MetMb 還元アッセイに供した。

(6) NAC 置換ヒドロキシチロゾールの調製
ヒドロキシチロゾール (400 mg), N-アセチルシステインメチルエステル (NACMe) (551 mg) のアセトニトリル溶液 (250 mL) に 23 °C にて DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (2.1 g) の粉末を撹拌しながら加えた。溶液を減圧かで濃縮し、少量の酢酸エチル-アセトン (6:1) に懸濁してろ過した。ろ液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル-アセトン (6:1) から同 (4:1)) で生成し、モノ NACMe-ヒドロキシチロゾール (SP10) およびジ NACMe-ヒドロキシチロゾール (SP11) をそれぞれ 21% (176 mg) と 15% (188 mg) の収率で得た。90 mg の SP11 と NAC (40 mg) のアセトン溶液 (50 mL) に DPPH (140 mg) を撹拌しながら加え、数分後、溶媒を減圧下で濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル-アセトン (1:2)) で精製し、トリ NACMe-ヒドロキシチロゾール (SP12) を 50% (60 mg) の収率で得た。

(8) カツオ赤肉変色抑制効果の測定

Bao らの方法に準じ、ヒドロキシチロゾールと N-アセチルシステイン (NAC) を用いて行った。漁獲、処理後 -40 °C の低温保存のカツオフィレ肉を入手し、解凍のち、ミキサ-セミンチとした。その 4 g に 500 ppm の検定サンプルを 0.05 mL の水に溶かしてよく混ぜ、直径 3 cm のプラスチックシャーレに広げ、ジップロックに入れて、乾燥を防ぎ、冷蔵保存した。1 日ごとに、肉表面の、LED ライト (6000 K) 下でデジタルカメラ撮影し、得られた JPEG ファイルを ImageJ にて RGB 分解し、その強度 (256 ステップ) を求めた。なお、赤色強度比 (r) と緑色強度比 (g) を以下の式にて求めた。r = R/(R+B+G) × 100, g = G/(R+G+B) × 100。また、同時に肉より pH 7.4 緩衝液にてミグロビンを抽出し、吸収スペクトル (400–700 nm) を測定し、524 nm のイソベスティックポイント補正を行ったのち、MbO₂ 量を 541 nm の補正吸光度にて MetMb 量を 498 nm の補正吸光度にて評価した。

4. 研究成果

(1) ポリフェノールによる MbO₂ 酸化促進効果
ポリフェノールによる鮮赤色の保護効果を期待し、新鮮肉の鮮赤色素である MbO₂ に各種のポリフェノールを添加し、MbO₂ の変化を測定した結果を  1 に示した。その結果、いずれのポリフェノールも MbO₂ を保持することはなかった。特に、強い抗酸化性が期待できるポリフェノールほど MbO₂ の変化を促

進する傾向にあった。強い抗酸化性物質は、その対象との関係で、酸化促進、すなわちプロオキシダントとして働くことが知られている。本結果もそれを示唆するものであり、ポリフェノールにより、食肉の変色を制御するためには、抗酸化ポリフェノールの有するプロオキシダント性の制御の必要性が考えられた。

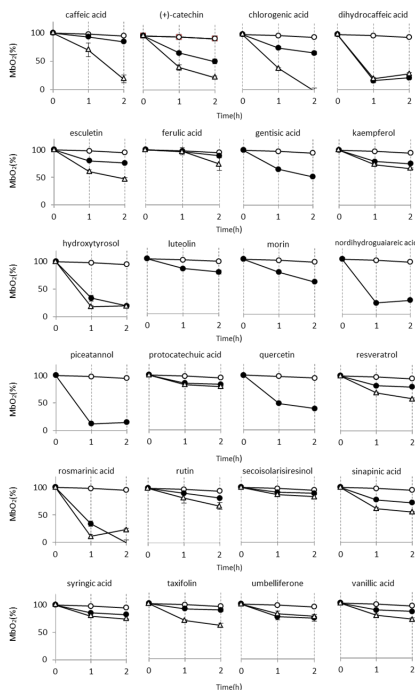


図1 MbO₂に対するポリフェノールの効果

(2)ポリフェノールによる MetMb 還元効果とケルセチンによる還元機構

一部のポリフェノールは、抗酸化性のみならず、強い還元性も有する。褐変化した食肉色素である MetMb を還元でき（実際は還元後酸素の配位後）MbO₂ とすることができれば、食肉の鮮赤色化に繋がる。そこで、調製した MetMb 溶液にポリフェノールを添加した結果を図2に示した。

その結果、多くのポリフェノールに MetMb 還元能が認められたが、その効率は高くなか

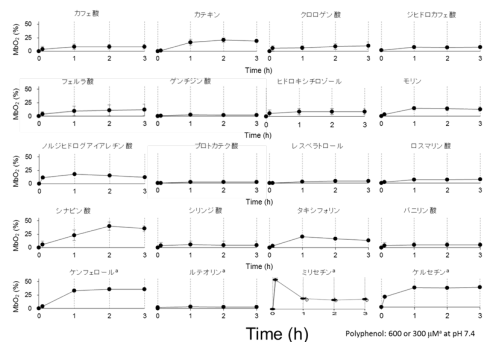


図2 MetMb に対するポリフェノールの効果

った。しかし、その中でも、ケルセチン、ケンフェロールの効率は高い方であり、さらにこの2物質はフラボノールに属するという共通項があることから、ケルセチンを用いてさらなる検討を行った。ケルセチンによる MetMb 還元過程において3種の物質(I, II, III)の生成を確認した。経時的な分析から、ケルセチンからまず生成物Iができ、その後安定なIIおよびIIIになると考えられた(図3)。ポリフェノールが MbO₂ に対してプロオキシダント的作用を示すのは、生じる求電子性キノン誘導体であると考えられる。一方、ケルセチンから生成した3種の化合物は、ケルセチンキノンが加水分解して生じたものと考えられ、この分解反応が進行することにより、

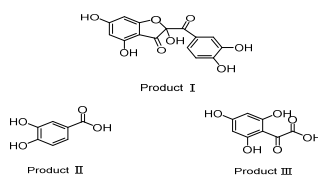


図3 MetMb 還元反応によるケルセチンからの生成物

ケルセチンなどのフラボノールには、MetMb 還元鮮赤色化作用が認められたものと考えられた。

(3)システイン共存下でのポリフェノールによる MetMb 還元効果

ポリフェノールの MetMb 還元を効率的に行うには、還元によって生じるポリフェノールキノンを取り除く必要がある。ところで、

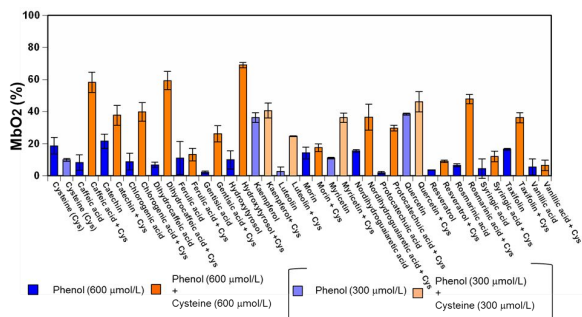


図4 システイン共存下でのポリフェノールによる MetMb 還元能

キノン性物質の求電子性は高く、システインなどの求核性 SH 基と非常に速く反応することが知られている。そこで、システインの存在下で、各種ポリフェノールの MetMb 還元 MbO₂ 化能を測定した結果を **図4** に示した。予想どおり、本条件により、還元性の強いポリフェノールによる MetMb 還元 MbO₂ 化が効率よく達成された。

(4)システイン化ポリフェノールによる MetMb 還元 MbO₂ 維持効果

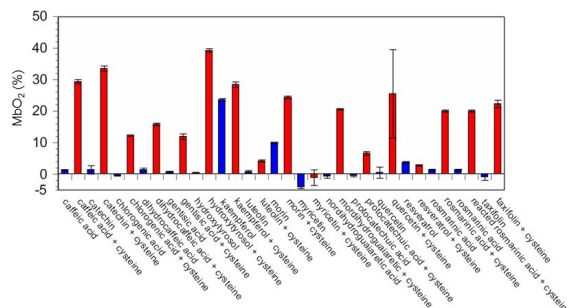


図5 システイン化ポリフェノール生成物による MetMb 還元能

MetMb 還元系において発生する S-システイン化ポリフェノールが実際に有効であれば、あらかじめシステインを導入しておいたポリフェノールに効果的な MetMb 還元 MbO₂ 維持効果が期待できる。 **図5** は、ペルオキシダーゼ触媒により各種ポリフェノールにシステインを導入した反応生成物の MetMb 還

元能を調べたものである。このうち最も効果の高かったヒドロキシチロゾールに着目して、多システイン置換体を調製し、MetMb 還元 MbO₂ 保持効果を検討した。なお、3 置換体の調製のために、システインとして、N-アセチルシステインメチルエステルを用いた。その結果を **図6** 及び **7** に示した。

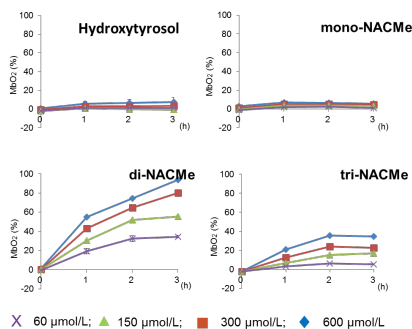


図6 NAC-ヒドロキシチロゾールによる MetMb 還元能

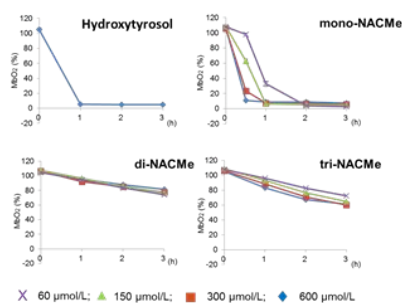


図7 NAC-ヒドロキシチロゾールによる MbO₂ 維持能

図6 からわかるように、何も置換しないヒドロキシチロゾールの MetMb 還元能は見かけ上見られず、 **図7** からわかるように、MbO₂ の酸化促進能に由来することが示唆された。その一方で、NAC 置換したヒドロキシチロゾールについては、2 NAC 置換および 3 置換ヒドロキシチロゾールに MetMb 還元能が観察され、それらには MbO₂ 酸化促進能は見られず、システイン置換、特に 2 置換ヒドロキシチロゾールに食肉鮮赤色の維持能が期待された。

(5)カツオ新鮮肉での検討

効果的な MetMb 還元 MbO₂ 維持効果が観察されたポリフェノール・ヒドロキシチロゾールを用いて、実際の食肉の新鮮色に対する効果

を検証した。用いた食肉としてカツオ肉を採択した。魚肉は、刺身などで食されることから新鮮度の指標としてその鮮やかな色調は重要である。その一方で、畜肉と比べ、その中でもとりわけ、カツオ肉の変色は速いと

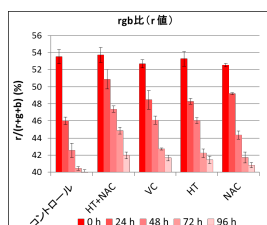


図8 カツオ肉の赤色強度の変化 (サンプル 500 ppm, HT:ヒドロキシチロゾール; VC: アスコルビン酸)

され、その制御が可能であれば、他の食肉の変色防止が容易に可能になると考えたからである。図8にヒドロキシチロゾール、ヒドロキシチロゾール+NAC, NAC ならびに対象として、食肉変色抑制能が認められているアスコルビン酸をそれぞれ 500 ppm 添加したときの赤色比率を示した。残念ながら、いずれも変色を完全には抑制できなかったが、ヒドロキシチロゾール+NAC はアスコルビン酸よりも効果的な赤色の保持能を示した。なお、試験管内の反応と異なり、ヒドロキシチロゾール自体も、弱いながらも保持能を示すことがわかった。魚肉には、酸化に感受性の高い多価不飽和脂質が多く含まれていることが知られている。脂質の酸化生成物がミオグロビンの状態に影響を与えるとの報告もあり、さらなる解析が必要と考えられる。しかしながら、ポリフェノール+システインの鮮赤色保持効果が実際の食肉にも認められたため、挑戦的萌芽の研究としては一定の成果が得られたと考えている。今後、基盤研究により、より深く研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1) Sari Honda, Yukari Miura, Toshiya Masuda, Akiko, Masuda: Effective Conversion of

Metmyoglobin to Oxymyoglobin by Cysteine-Substituted Polyphenols, (査読あり) *J. Agric. Food Chem.* 2016, Vol. 64, pp. 806-811.

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05511

2) 本田沙理, 増田俊哉: ポリフェノール, 化学反応を基盤とする機能性物質, 抗酸化反応から成分間反応まで, (依頼, 査読なし) *化学と生物* 2015, Vol. 53, pp. 442 - 448.

doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.53.442

3) 本田沙理, 増田晃子, 増田俊哉: ポリフェノールによる食肉色素ミオグロビンの鮮色の制御(査読なし) *New Food Industry*, 2015, Vol. 57, pp. 29-34

〔学会発表〕(計3件)

1)ポリフェノールおよびシステイン類によるカツオ肉の鮮赤色の維持研究, 富重蓮華, 本田沙理, 増田俊哉, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2017 年 3 月 19 日, 京都女子大学 (京都府京都市)

2)ポリフェノールの反応性に基づく食品機能の解明, 増田俊哉(招待講演)「バイオマテリアルインターフェース先端マテリアルの創製」第7回シンポジウム, 2017 年 2 月 10 日, あべのメディカス(大阪府大阪市)

3)システイン置換ポリフェノールによるメトミオグロビンのオキシ化と維持研究, 本田沙理, 三浦ゆかり, 増田俊哉, 増田晃子, 2015 年度日本農芸化学中四国・西日本支部合同大会, 2015 年 9 月 18 日, 愛媛大学(愛媛県松山市)

〔その他〕

ホームページ <https://foodchem-ocu.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 俊哉 (MASUDA, Toshiya)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授

研究者番号: 10219339