

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18705

研究課題名(和文) アミノ糖や構造的不安定性を有すオリゴ糖がメイラード反応に与える影響の網羅的解析

研究課題名(英文) Evaluation of thermal decomposition behavior of various oligosaccharides and amino sugars through browning reaction

研究代表者

知久 和寛 (Chiku, Kazuhiro)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：30711618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年の健康に対する関心の高まりにより、糖質の生体調節機能が注目されており、様々な機能性をもつ糖質が加熱加工食品中に用いられる機会が多くなってきている。本研究の目的は、近年機能性食品素材として注目されているアミノ糖やオリゴ糖が加熱工程により引き起こされるカラメル化反応やメイラード反応による影響を網羅的に解析していくことである。本研究では、糖質の構成や結合様式に依存した中性加熱条件下に引き起こされる多様な化学変換とその反応速度を測定した。

研究成果の概要(英文)：Oligosaccharides and amino sugars have great potential as functional food ingredients or additives. Along with recent development of the functional foods, the opportunities of addition of oligosaccharides and amino sugars to foods before heating will increase. Although the heating process can decrease the microbiological risk and improve the preservative quality and the digestibility, it sometimes causes decomposition of oligosaccharides and amino sugars with nonenzymatic "browning" such as caramelization and Maillard reaction.

The aim of this research is to propose kinetic models of decomposition reaction for amino sugars and oligosaccharides under the heat processing. We evaluate thermal decompositions of amino sugars and disaccharides composed of various kinds of sugar with various types of O-linkages under the neutral conditions.

研究分野：食品科学

キーワード：オリゴ糖 アミノ糖 メイラード 熱分解 加熱処理 ピーリング反応 異性化反応

1. 研究開始当初の背景

糖質は重合度の違いにより、単糖・オリゴ糖(重合度2以上)・多糖(重合度100以上)といった3つ分類に大きく分かれている。さらに単糖分子内にある水酸基の一部がアミノ基に置き替わったものはアミノ糖と呼ばれている。その代表例として、甲殻類の殻の構成多糖であるキチンの成分であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)があり、生体内に存在する糖タンパク質やムコ多糖(グルコサミノグリカン)中の構成糖としてもGlcNAcやN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)などのアミノ糖が含まれている。アミノ糖内部のアミノ基はほとんどの場合アセチル化されているが、アミノグリコシド系抗生物質などは無修飾な状態でアミノ基が存在している。

近年、日々の食生活の中で健康を維持し病気・疾病の改善を促す「医食同源」という考え方が消費者に浸透されつつあり、保健機能を伴った食品を摂取することについての関心が高まってきている。こういった背景から、食品中に含まれる糖質も、生命における主要な栄養源であるといった従来からある認識に加え、抗う蝕性、低エネルギー性、低血糖上昇性、整腸作用(腸内ビフィズス菌の増殖)、腸内菌叢の改善、便秘の改善、ミネラルの吸収促進などの種々の生体調節機能を有するといった認識が広まってきており、糖質を食品として摂取することや食品添加物として機能性食品の原料として用いられることが多くなっている。また機能性を有するもしくは機能性が期待される、多種多様な結合様式や構成糖を伴った糖質の酵素法を用いた調製技術も確立されつつある。

糖質の生体調節機能を重視した機能性食品の研究開発が積極的に進められている中で、加熱加工を経る食品に対して機能性をもつ糖質を添加する機会も増えてきている。糖質を含む食品の加熱処理は、食品の安全性・保存性・消化性を高める工程であるが、褐変化と呼ばれる非酵素的反応を引き起こし、糖質の分解を引き起こすことがある。褐変化反応のうち、糖のみで引き起こされる反応はカラメル化と呼ばれる。一方、糖とアミノ酸間で引き起こされる場合はメイラード反応と呼ばれている。これら反応は100℃以上の加熱で急速に反応が進行するが、糖の種類やpH条件によっては100℃以下の低温条件でも進行する。いずれの反応も食品に色や香りを生み出し味覚嗅覚応答や感覚に関する機能に影響を与えるが、糖質自体は分解・異性化・縮合などの化学変化を受ける。糖質の上述した保健機能には有効摂取量があり、場合によっては糖質の分解により期待した機能を適切に作用させることが出来なくなる可能性がある。そこで加熱条件下に引き起こされる糖質の構成

糖や結合様式に依存した化学変換を予測することやその反応を制御する技術を確立することが、食品科学の分野で重要視されている。

2. 研究の目的

申請者らはアミノ糖や一部の構造を伴ったオリゴ糖が、グリコシド結合が比較的安定であると考えられている中性付近での加温にも関わらず、構造変換を受けて分解され褐変化を引き起こす現象を見出している。本研究の目的は、近年機能性食品素材として注目されているアミノ糖やオリゴ糖が加熱工程により引き起こされるカラメル化反応やメイラード反応による影響を網羅的に解析していくことである。本研究では、糖質の構成糖や結合様式に依存した中性加温条件下に引き起こされる化学変換について、系統的にかつ化学反応速度論的に解析を行った。

3. 研究の方法

・使用した糖試薬

D-グルコース(Glc)、D-フルクトース(Fru)、D-マンノース(Man)、N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)、D-グルコサミン(GlcN)、トレハロース(Tre)、コージビオース(Koj)、ニゲロース(Nig)、マルトース(Mal)、イソマルトース(Iso)、スクロース(Suc)、ツラノース(Tur)、マルツロース(Malt)、パラチノース(Pal)、ソホロース(Sop)、ラミナリビオース(Lam)、セロビオース(Cel)、ゲンチビオース(Gen)、ラクトース(Lac)、N-アセチルラクトサミン、ラクツロース(Lact)を使用した。二糖類のそれぞれの構造の違いを表1に示す。

表1. 実験に用いた二糖類の化学構造

名称	略号	化学構造
トレハロース	Tre	D-Glc- α -(1 \leftrightarrow 1)- α -D-Glc
コージビオース	Koj	D-Glc- α -(1 \rightarrow 2)-D-Glc
ニゲロース	Nig	D-Glc- α -(1 \rightarrow 3)-D-Glc
マルトース	Mal	D-Glc- α -(1 \rightarrow 4)-D-Glc
イソマルトース	Iso	D-Glc- α -(1 \rightarrow 6)-D-Glc
スクロース	Suc	D-Glc- α -(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fru
ツラノース	Tur	D-Glc- α -(1 \rightarrow 3)-D-Fru
マルツロース	Malt	D-Glc- α -(1 \rightarrow 4)-D-Fru
パラチノース	Pal	D-Glc- α -(1 \rightarrow 6)-D-Fru
ソホロース	Sop	D-Glc- β -(1 \rightarrow 2)-D-Glc
ラミナリビオース	Lam	D-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-D-Glc
セロビオース	Cel	D-Glc- β -(1 \rightarrow 4)-D-Glc
ゲンチビオース	Gen	D-Glc- β -(1 \rightarrow 6)-D-Glc
ラクトース	Lac	D-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-D-Glc
N-アセチルラクトサミン	LacNAc	D-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc
ラクツロース	Lact	D-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-D-Fru

・反応条件

50 mM の上述した糖試薬を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に溶解させた。その溶液を 0~720 分間加熱した。反応溶液中に残存する糖試薬の濃度や反応生成物の濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

・HPLC 分析

HPLC 分析は、昭和電工製の Shodex HILICpak VG-50 カラムを用い、75 %もしくは 80 %アセトニトリルを溶媒として用いることで分析した。検出器としては、示唆屈折計 RefractoMax 521 (ERC 製)、UV/VIS 検出器 SSC-5410 (センシユー科学製)、および質量分析装置 API 2000 LC/MS/MS (AB SCIEX 製) をもちいた。質量分析は、エレクトロスプレー法によるイオン化ののち、選択イオン検出 (SIM) モードで分析した。Glc、Fru、Man は 179 (-)、二糖類は 341 (-) を対象とし、アミノ糖である GlcNAc は 220 (-)、GlcNAc の分解産物である GlcNAc 1 脱水物は 202 (-)、GlcN は 180 (+)、GlcN の分解産物であるジヒドロフルクトサジンは 323(+)、フルクトサジンは 321 (+)、デヒドロフルクトサジンは 305 (+) を対象とした。

・反応生成物の構造解析

反応生成物を上述した HPLC 分析条件で単離した。化合物の分子量は AB SCIEX 製の質量分析装置 API 2000 LC/MS/MS を用いて測定した。化学構造は、反応生成物を凍結乾燥後、重水に溶解させ、ブルカーバイオスピン製の核磁気共鳴装置 Bruker Advance 800 spectrometer もしくは Bruker Advance 600 spectrometer を用いて分析した。なお、化学シフト値の補正には *t*-ブチルアルコール (δ_H 1.23 と δ_C 31.2) を用いた。

・糖質の化学変換速度の算出

添加した糖質の分解速度の定数 (k_{sub}) とその反応生成物の生成速度の定数 (k_{pro}) は、以下の式 (1) と (2) を元に解析ソフト Origin を用いて非線形回帰分析でフィッティングさせることにより算出した。

$$\begin{aligned} [\text{基質濃度}]_t &= \\ [\text{基質濃度}]_0 \times \exp(-k_{sub} \times t) \dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [\text{反応生成物濃度}]_t &= \\ [\text{基質濃度}]_0 \times [1 - \exp(-k_{pro} \times t)] \dots (2) \end{aligned}$$

なお、 $[\text{基質濃度}]_0$ は初期基質濃度、 $[\text{基質濃度}]_t$ は t 分後の基質濃度、 $[\text{反応生成物濃度}]_t$ は t 分後の反応生成物の濃度、 t は加熱時間を示す。

また、反応生成物としてグルコースが見られた場合は、和光製のグルコース CII テストワコーを用いて定量した。

活性化エネルギー値はアレニウス式 (3) に当てはめることにより算出した。

$$\ln k = \ln A - E_a / R \times T \dots (3)$$

なお、 A は頻度因子、 R は気体定数、 T は加熱温度を示す。

・糖の分解速度の温度依存性

糖の分解速度の温度依存性は、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 下で 70~95 °C で加熱することにより測定した。

・糖の分解速度の pH 依存性

pH 依存性は 100 mM に調製した以下の緩衝液下に 50 mM 糖溶液を溶解させることにより算出した。各緩衝液は、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0~8.5)、HEPES—NaOH 緩衝液 (pH 7.5~8.5)、トリシン—NaOH 緩衝液 (pH 8.0~9.0)、トリス—NaOH 緩衝液 (pH 8.5~9.0)、ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5~9.5)、グリシン—NaOH 緩衝液 (pH 9.0~10.5)、CHES—NaOH 緩衝液 (pH 9.0~10.0)、炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0~11.0) を常温で pH を調整し、作成した。また、これら緩衝液を 90 °C に加熱した時の pH の実測値を、pH メーターを用いて測定した。

・アミノ酸が共存した際の影響

50 mM 糖溶液 (ラクトースとラクツロース) と 50 mM のアミノ酸溶液 (システイン、リジン、アルギニン) になるように 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中に溶解させた。その溶液を 0~720 分間加熱した。反応溶液中に残存する糖試薬の濃度や反応生成物の濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

4. 研究成果

・アミノ糖の熱分解反応の LCMS 分析

ヒトミルクオリゴ糖の構成二糖として知られるラクト-N-ビオース I (LNB, Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc) は、グリコシド結合が一般的に安定と考えられている中性条件下での加温にも関わらずピーリング (β 脱離) 反応により分解され、茶褐色の反応溶液となることが分かっている。例えば、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 下で 90 °C にて加温した時に半減期は 8.1 分であり、その分解産物としてガラクトース分子と GlcNAc 1 脱水物が生成されることが知られている。この反応はピーリン

グ反応と呼ばれる 3 位にグルコシド結合を持つ二糖類に特徴的な反応であるが、アミノ単糖である GlcNAc でも反応速度は遅い（半減期は 433 分）ものの同様の反応が LCMS 分析で確認された。他の単糖類である Glc、Man、Fru は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 下で 90°C にて加温した時、Glc⇌Fru⇌Man 間の変換反応を起こした。これは主にアルカリ条件下で見られるケト-エノール互変異性が中性・加温条件下で見られたと考えられる。GlcNAc は 2 位にアセトアミド基が存在するためケトース体が形成できず、その結果として 2,3-不飽和体が形成し、その際に 3 位の水酸基が脱離したと考えられる。

GlcN は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 下で 90°C にて加温した時、半減期 10 分にて速やかに分解された。反応生成物として、GlcN 2 分子間でアミノカルボニル反応 (2 分子間メイラード反応) したジヒドロフルクトサジン、フルクトサジン、デオキシフルクトサジンに相当する分子関連イオンが LCMS 上で観察された。加熱時間を変えて経時的に GlcN の熱分解反応をモニタリングした結果、ジヒドロフルクトサジンに相当する分子関連イオンは反応初期に見られ、熱処理時間経過とともに減少していった。フルクトサジンに相当する分子関連イオンはジヒドロフルクトサジンに相当する分子関連イオンの減少と共に生成され、また並行して反応速度は遅いもののデヒドロフルクトサジンに相当する分子関連イオンもいくらか観察された。以上の結果より、GlcN の分解メカニズムは、図 1 であると考えられた。反応液中の pH が上昇するにつれた GlcN の分解速度は上昇したが、平衡に達する濃度も上昇する傾向が見られた。すなわち、初期に起こるジヒドロフルクトサジンの生成反応は可逆的であること、その後のフルクトサジンの生成反応は酸性側で主に進行すると考えられた。

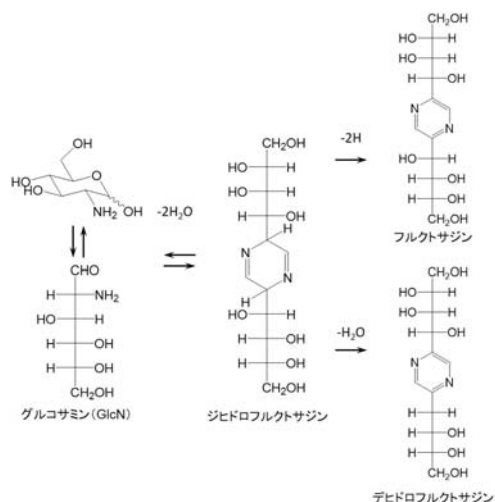


図 1 Glc の熱分解反応の推定メカニズム

・種々の結合様式を伴った二糖類の熱分解反応の解析

各種結合様式を伴った二糖類 (表 1 参照) の中性加温条件 (pH 7.5, 90°C) 下での分解特性を調べた結果、3 位の水酸基に結合をもつアルドースが一般的に分解をされやすいことが分かった。3 位の水酸基に結合をもつアルドース類であるニゲロースとラミナリビオースの分解反応の半減期は約 2 時間程度であった。ニゲロースおよびラミナリビオースの熱分解における経時変化を調べたところ、初期基質の減少量とグルコースの生成量がほぼ等モルであったことから、LNB と同様にピーリング (β 脱離) 反応により還元末端側のグルコース残基が欠落することが示唆された。

さらに 4 位の水酸基に結合をもつアルドースであるマルトース、セロビオース、ラクツロースの分解特性について調べた。先に見られたような脱離反応による分解は反応初期において確認されず、還元末端側のグルコース残基がフルクトース残基へと変換される異性化反応が見られた。マルトースもしくはラクツロースを初期基質とした場合は、それぞれマルツロースもしくはラクツロースを生成した。これは塩基を触媒とした条件で見られるアルドース-ケトース間の相互異性化 (ロブリー・ド・ブリュイン=ファン・エッケンシュタイン転位反応) が、中性加温条件下でも見られたと考えられる。さらにマルツロースもしくはラクツロースを初期基質とした場合の分解特性を調べた結果、初期基質の減少量に伴って非還元末端側のグルコース残基 (マルツロースの場合) もしくはガラクトース残基 (ラクツロースの場合) がほぼ等モルで生成してきたことから、LNB と似たメカニズムにより還元末端側のフルクトース残基が欠落していることが予想された。マルツロースとラクツロースのような還元末端側がケトース残基である場合、4 位に存在するグルコシド結合はケトン基に対して β 位に存在することになる。したがって、4 位の水酸基に結合をもつアルドースについても、還元末端がケトースに変換されたのちにピーリング (β 脱離) 反応によるグルコシド結合の開裂が起こると考えられた。マルツロースとラクツロースの分解反応の半減期はそれぞれ 173 分と 230 分と算出された。

6 位の水酸基に結合をもつアルドースであるイソマルトースやゲンチビオースの半減期は約 5 時間と算出された。イソマルトースを初期基質とした場合、4 位の水酸基に結合をもつアルドースと同様にアルドース-ケトース間の異性化反応を起こし、パラチノースを生成した。さらにパラチノースを初期基質とした分解特性を調べた結果、還元末端側のケ

トース残基がアルドース残基へと変換され異性化していく反応が主に観察されたが、グルコース残基の遊離も見られたため、β 脱離反応とは別のメカニズムによりグルコシド結合の開裂が起こっていると考えられた。

2 位の水酸基に結合をもつアルドースであるコージピオースとソホロースを初期基質とした場合、アルドース—アルドース間の異性化反応を起こし、それぞれ α-グルコピラノシル-(1→2)-マンノースと β-グルコピラノシル-(1→2)-マンノースを生成した。なおグルコースの遊離は中性加温条件下で 12 時間加熱しても確認されず、反応溶液も透明のままであった。

さらに非還元性二糖であるトレハロースやスクロース、メチルグルコシド、ソルビトールなどは、中性加温条件下で 12 時間加熱しても全く変化が確認されなかった。

以上の結果より、中性加温条件下において各種結合様式を伴ったアルドースやケトースが起こしうる化学変換反応をまとめると図 2 のようになった。

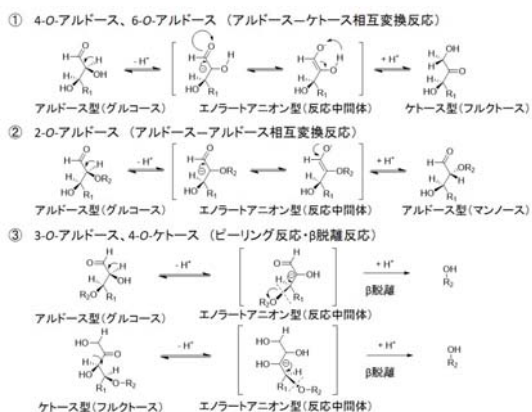


図 2. 各種二糖類の中性・加温条件下の反応

非還元性二糖、グルコシド、糖アルコール類など、水溶液中で鎖状構造としてアルデヒド基やケト基を形成しない糖質はいずれも反応性が見られなかった。したがって、初期基質となる糖質が水溶液中でアルデヒド基やケト基を含む鎖状構造を形成できることが、これら反応が進行する上で重要であると考えられる。またいずれの反応も pH が高くなるほど反応速度が上昇したことから、塩基によるアルデヒド基やケト基の α 位に存在する水素の脱離 (α 水素脱離) を経たエノラートアニオンの共鳴による様々な分子種の形成が反応の律速となっていると思われる。その後、二重結合の形成位置により以下のような様々な反応が起こったと考えられる。4 位あるいは 6 位の水酸基に結合をもつアルドース (4-O-アルドースと 6-O-アルドース) はアルドース—ケトース相互変換反応により 4-O-ケトースと

6-O-ケトースを生成した (図 3 ①)。2 位の水酸基に結合をもつアルドース (2-O-アルドース) は、非還元糖を除くと最も安定であり、グリコシド結合がほぼ開裂される事無くアルドース—アルドース間相互変換反応を引き起こした (図 3 ②)。ピーリング (β 脱離) 反応による非還元末端側の糖残基の遊離が確認されたのは 3 位の水酸基に結合をもつアルドース (3-O-アルドース) と 4 位の水酸基に結合をもつケトース (4-O-ケトース) であった (図 3 ③)。特に、3-O-アルドースについては還元末端側の糖残基がケトース型を形成できない 2-デオキシグルコースもしくは GlcNAc であった場合より熱に対して不安定になることが分かった。6 位の水酸基に結合をもつケトースについても非還元末端側の糖残基の遊離が確認されたことから β 脱離反応以外のメカニズムによる分解が起こっていると思われる。還元末端側の糖残基の遊離が確認された反応では、いずれの場合も茶褐色の反応溶液が得られた。また、いずれも反応も溶液中の pH 条件を弱酸側へ移行するか、加熱温度を低くするか、加熱時間を短くするかの操作をすることで反応の進行を大きく抑えることが可能であった。

・アミノ酸共存下におけるラクトースとラクツロースの分解反応の影響

50 mM ラクトースあるいはラクツロースを含む溶液に 50 mM アミノ酸を添加し、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 下で 90°C 加熱した場合、反応液が褐色に呈色した (図 3)。

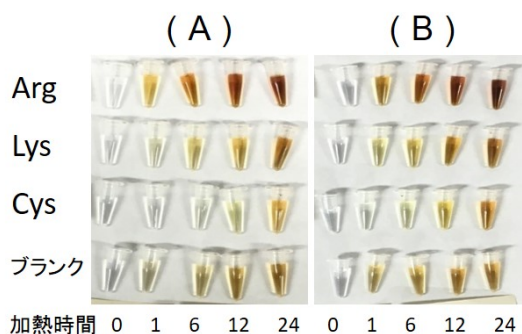


図 3. 各種アミノ酸共存下におけるラクトース (A) とラクツロース (B) の呈色試験
縦軸は添加したアミノ酸の種類、横軸の数値は加熱時間 (h) を表す。

アルギニンやリジンを追加した反応系はブランクと比べて濃い褐変化を引き起こした。これはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸を加えることで反応液の pH が塩基性側に傾いたため、ブランクと比べてラクトースの異性化反応やラクツロースの分解反応が効

率的に進行したと考えられる。また、システインを添加した試料が強い呈色を示さなかったのは、システインは重合化しシスチンになる際に水素イオンを遊離するため、反応液のpHが低下した可能性がある。

これらラクトースやラクツロースのカラメル化やメイラード反応による反応生成物の推移をLC-MS法、蛍光指紋法、紫外可視分光法を用いて分析した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① 知久和寛、中性加温条件下に起こるオリゴ糖とアミノ糖の分解特性の評価、*アグリバイオ*、1(4)、p. 94-99、2017 (査読なし)

②

[学会発表] (計 5件)

- ① 知久和寛、細沼亜里沙、小野裕嗣、北岡本光、吉田充、「コージビオースとソホロースの中性加温条件下におけるエピメリ化」、*日本応用糖質学会平成29年度大会(第66回)*、日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)、2017年9月6~8日(口頭発表兼ポスター発表)

- ② 和田真海、厚地春伽、細沼亜里沙、小野裕嗣、吉田充、知久和寛、「オリゴ糖の中性・加温条件下でのピーリング反応による分解機構の解析」、*第3回 Symposium for Women Researcher(第8回 SSH女子交流会)*、東京都立戸山高等学校(東京都新宿区)、2016年11月6日(ポスター発表)

- ③ 澤田真未、細沼亜里沙、田端彩菜、番美咲希、桑原志帆、知久和寛、吉田充、鈴木彌生子、「洗米、炊飯による米の軽元素安定同位体比の変動の解析」、*第3回 Symposium for Women Researcher(第8回 SSH女子交流会)*、東京都立戸山高等学校(東京都新宿区)、2016年11月6日(ポスター発表)

- ④ 細沼亜里沙、番美咲希、桑原志帆、澤田真未、田端彩菜、知久和寛、吉田充、鈴木彌生子、「産地判別をめざしたアジア各国産の精白米の軽元素安定同位体比の分析」、*第3回 Symposium for Women Researcher(第8回 SSH女子交流会)*、東京都立戸山高等学校(東京都新宿区)、2016年11月6日

- ⑤ 知久和寛、和田真海、厚地春伽、細沼亜里沙、小野裕嗣、吉田充、「二糖類の中性・加温条件下でのピーリング反応による分解機構の解析」、*日本農芸化学会 関東支部大会 2016年度支部大会*、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)、2016年10月15日(ポスター発表)

[図書] (計 1件)

- ① 吉田充、知久和寛 (分担執筆)、「NMRによる糖鎖の構造解析」、pp. 53-59、弘前大学出、『植物細胞壁実験法』、ISBN:978-4-907192-21-1

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

該当なし

○取得状況 (計 0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

知久 和寛 (CHIKU, Kazuhiro)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号: 30711618

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし