

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02368

研究課題名(和文)ポリフェノールの焙煎化学 フェノール酸の高温反応生成物の化学的特徴と機能

研究課題名(英文)Roasting Chemistry of Polyphenols - Chemical Characteristics and Functions of High Temperature Reaction Products of Phenolic Acids

研究代表者

増田 俊哉 (Masuda, Toshiya)

大阪公立大学・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食材から食物に至る調理・加工操作で、機能性が生じるかについて研究を進めた。調理加工法として焙煎を想定し、食材成分として穀物に多いポリフェノールのフェノール酸を対象にした。焙煎温度である200℃付近の高温加熱条件で、上記のフェノール酸は、多様な物質に変化し、機能として、痛風の軽減に資するキサンチンオキシダーゼ阻害作用(XOI)の発現または増強を認めた。なお、カフェ酸からはフェニルインダン系の物質、フェルラ酸およびシナピン酸からは、1,3-ジフェニルブタン系の物質が生成した。個々のXOI測定より、カフェ酸はフェニルインダン化、フェルラ酸は、より高い重合化により、XOI活性が増強することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食材を人が実際に食する食物とするために必須な調理・加工操作は古来より、様々な新技術が開発されてきているが、現代人の食による健康維持の期待には対応していなかった。本研究により、植物食品に広く存在するフェノール酸に高温の焙煎加工を行うことにより、有用な食品機能を発生させることができる一例を示すことができた。現段階では、実際の食材を用いた検討はなし得ていないが、本研究をさらに発展させることにより、確かな食材から調理加工という操作により、健康に資する食品の創製に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We studied whether cooking and processing operations from food ingredients to food products produce functional properties. Roasting was assumed as the cooking and processing method, and phenolic acids, which are polyphenols abundant in grains, were targeted as food ingredients. Under high-temperature heating conditions around 200 °C, the roasting temperature, the above phenolic acids were transformed into various substances, and as a function, the xanthine oxidase inhibitory activity (XOI), which contributes to the reduction of gout, was expressed or enhanced. Caffeic acid produced phenylindane-type substances, and ferulic acid and sinapic acid produced 1,3-diphenylbutane-type substances. The XOI measurements of the identified compounds showed that the phenylindanation of caffeic acid and the higher polymerization of ferulic acid enhanced the XOI activity.

研究分野：食品機能化学

キーワード：焙煎反応 高温加熱 ポリフェノール フェノール酸 機能発現 キサンチンオキシダーゼ阻害

1. 研究開始当初の背景

人は食材そのものを食するのではなく食物を食する。人が摂取する食物は、食材に、加工や調理操作を施したものである。その過程で、食材成分から、人の食欲を増進する色、味、香などの二次機能成分が発生する。ところで、現代は、食品に健康機能(三次機能)を期待する時代である。現在では、食品の健康機能とその機能発現物質に関する多くの研究が国内外でなされ、特定保健用食品や機能性表示食品が作られるなど、食による健康維持の社会的ニーズは非常に高い。しかしながら、これまでの研究で解明されてきた食品機能性成分は、食材から特定されてきたものがほとんどである。そして、人が実食する食物(調理加工済みの食品)の成分の機能については、それほど知られていない。さらに、食物中の機能性物質が食材の成分をどこまで反映しているも不明であった。機能性成分が、食材の調理・加工過程で、新たに生成することはないのであるか。食品の二次機能成分のように、三次機能性成分も調理・加工の過程において生成しても良いはずである。さらに、様々な食材から、機能を有する食物を創り出す有用な手段に、調理・加工操作がならないか。これらの解決を試みる研究が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は、食材から食物にする際に必須な工程の調理・加工操作で、人が実際食する食物に機能性(三次機能)を付与することができるかと言う命題に対し、食材成分から発生し、食物に蓄積する機能性物質を化学的に明確にしながら研究を進める。方法として、対象物質の分析検出、精製と単離という物質科学的アプローチを用い、物質の化学構造に基づくエビデンスを取得することを目的とした。

食材の調理・加工操作の中でも、加熱は最も基本的なものであり、加熱調理法には、焼・揚・炒・煮・蒸・煎などの方法が知られているが、本研究では、特に「煎」に着目した。煎る調理、すなわち焙煎(焙焼)は、食材を200 近い高温で加熱する方法で、特に穀類や豆類によく利用され、香ばしい匂いや色を発生させる。食材成分の多くは、焙煎のような高温条件では安定ではなく、複雑な化学反応をおこす。たとえば、糖やアミノ酸では、連続する脱水や縮合による複雑な反応によるキャラメル化やメイラード反応を誘導することがよく知られている。高い機能性を有する食材ポリフェノールも、200 近い高温条件下では、安定ではなく、結果として、キャラメル化やメイラード反応とは異なる、様々な反応がおきると考えられる。しかし、これらの反応の生成物の化学的なキャラクタリゼーションはそれほど進んでいない。また、機能もほとんど調べられていない。

本研究では、対象ポリフェノールとして、特にフェノール酸類に焦点を絞り、焙煎加工を想定した高温反応による物質の変化と機能の発現に関する有用かつ確実な結果を得ることを目的に行った。なお、フェノール酸には、カフェ酸以外にフェルラ酸やシナピン酸などが知られている。これらは、穀類系食材に存在し、かつポリフェノールとしての基本的な化学構造と反応性を備えており、多様な食材ポリフェノールの高温調理加工反応に関わる広範な基礎・応用研究への展開に繋がる基本的なポリフェノール系の物質である。

3. 研究の方法

(1) フェノール酸の高温反応(焙煎反応)

穀類に多く含まれるフェノール酸(フェルラ酸、シナピン酸、カフェ酸)を、焙煎のモデル反応として、130 から300 まで高温加熱反応を行った。なお反応は、食品の焙煎モデルとして、pH を弱酸性(溶液にしてpH 6)に固定したリン酸緩衝塩担持法を用い、加熱は300 まで加熱可能なメタルブロックヒータを用いた。

(2) 焙煎反応のモニタリング

各温度と各時間によるフェノール酸の減少と反応生成物の蓄積を、経時的な HPLC 分析にて測定した。焙煎反応物をメタノールで抽出し、ODS カラムを用いた H₂O-CH₃CN 系によるグラジエントモードにおける総成分分析および、抽出物をアセチル化の後、GPC カラムを用いた分子量サイズ分析を行った。

(3) 焙煎反応生成物(混合物)の機能測定

各フェノール酸焙煎反応生成物(抽出物)の機能として、キサンチンオキシダーゼ阻害能と DPPH ラジカル消去能を測定し、評価した。なお、キサンチンオキシダーゼは、核酸代謝経路の律速酵素であり、生体内でアデノシンからの代謝物であるキサンチンを酸化して、尿酸にする酵素である。ヒトは尿酸をそれ以上分解できないため、尿酸を尿として排出する。この尿酸の溶解度は非常に低く、また結晶性が高いため、血中尿酸濃度が7 mg/dL になると針状結晶を形成し炎症を引きおこす、いわゆる痛風を発症する。現在、痛風は食生活由来の生活習慣病とされており、ヒトの QOL 低下をもたらす疾病である。キサンチンオキシダーゼの阻害は、直接的に痛風の予防につながり、また、酸化酵素でもあるため、その阻害は酸化ストレスの元である活性酸素の発生低減にも繋がり、本研究の機能検証対象としては価値のあるものと考えた。

(4) 焙煎反応生成物の構成物質の生成・単離・構造決定

3種のフェノール酸を大量に(20 100g)リン酸混合塩(Na₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 6 相当)に担持し、熱伝導性のよいステンレス反応容器にいれ、シリコンオイルバスにて140、170、200、

0.5-1.5h加熱した。反応生成物をメタノールで直接、または、リン酸塩を水で溶解した後、酢酸エチルで液液分配することにより抽出した。その抽出物を、次に Amberlite XAD-7 を用いたカラムクロマトグラフィー法(メタノール-水系)にて分画した。各分画の構成成分を HPLC 分析し、その結果に基づいて、ODS カラムを用いた分取 HPLC、セファデックス LH-20 を用いたゲル濾過、シリカゲルを用いた TLC 等を組み合わせて、主要な成分を精製単離した。その結果、カフェ酸焙煎反応物から 18 種、フェルラ酸焙煎反応物からは 7 種、シナピン酸焙煎反応物からは、7 種の物質の単離を行い、それらの化学構造の解析を行った。構造解析は、DART または ESI-TOFMS による分子式の決定から開始し、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^1H -COSY、HMQC、HMBC、NOESY または NOEDIF の NMR 分光法を用い、そのデータを取得し、解析することにより行った。

(5) 焙煎反応生成物の機能評価

キサンチンオキシダーゼ阻害活性

各焙煎反応生成物のうち、機能測定に供与できる量が確保でき、かつ化学構造が確定したものに付いて、キサンチンオキシダーゼ阻害活性を測定した。測定供試濃度は 200 $\mu\text{mol/L}$ とし、阻害率を求めた。なお、コントロール物質として、痛風市販薬であるアルプリノール 0.5 $\mu\text{mol/L}$ と、それぞれの原料フェノール酸の阻害率を同時に求めた。

その他の機能

その他の機能として、抗酸化機能関連活性の評価として、DPPH ラジカルの消去能を測定した。また、脂質消化酵素であるリパーゼの阻害能も測定した。

4. 研究成果

(1) はじめに

焙煎による調理加工は食材を 200 近い高温で加熱する方法で香ばしい匂いや色を発生させる。そのような焙煎調理加工を行う食材としては、コーヒー豆などの嗜好飲料の原材料以外には穀類が多い。そこで、本研究が対象にするポリフェノールとしては、穀類に多く存在するフェノール酸を選択した。フェノール酸は、植物体内では主要生合成経路であるシキミ酸経路によって合成されるフェニルアラニンから PAL によってアミノ化され、C6C3 の炭素骨格とベンゼン環上のフェノール基が形成されて蓄積する。このフェノール酸生合成経路から、フラボノイドなどのポリフェノールが生合成され、また、フェノール酸自体も、糖質やアミノ酸などと縮合することにより複合型ポリフェノールとなるなど、ポリフェノールの基本的物質である。なお、カフェ酸は、ベンゼン環の 3,4 位に 2 つのフェノール性水酸基を持つポリフェノールであるが、フェルラ酸は、その一つがメトキシ基となり、シナピン酸は、そのフェルラ酸にもう一つメトキシ基が増えたもので、厳密にはポリフェノールの定義からは外れるが、ポリフェノール同様の機能を有することから、ポリフェノール系の物質とされている。

(2) カフェ酸の焙煎反応

カフェ酸を焙煎のモデル条件として、水溶液にすると pH6 に相当するリン酸塩混合物に担持し、130 から 290 まで高温加熱反応を行った。その反応生成物を抽出し、生成物のキサンチンオキシダーゼ阻害活性 (XOI) 測定の結果を、**図 1** に示した。また、PDA 検出逆相 HPLC 法にて全成分を分析した結果 (A) と GPC による分子量の分布を測定した結果 (B) を **図 2** に示した。その結果、カフェ酸の焙煎反応物及び XOI 活性には、温度依存性が見られ、170 加熱において、最大活性を示した。なお、原料のカフェ酸はこの条件ではどの加熱生成物より弱い活性であった。通常の焙煎は 200 付近であることを考えると、カフェ酸を含む穀物の焙煎によって、XOI 機能の発現が十分に期待できる。170 加熱においては、HPLC 分析により、また原料のカフェ酸が残存しており、かつカフェ酸より疎水性の多くの物質が生成していることがわかった。GPC 分析の結果からは、それらの生成物はカフェ酸のオリゴマーであろうと予想できた。続いて、生成物がどのようなものを、単離、構造解析することにより解明を試みた。なお、温度による反応生成物の化学構造の違いを確認するため、生成物調製反応は、140 と 170 の 2 種で行った。その結果、単離ができ、かつ構造決定ができたもの 18 種の構造式を **図 3** に掲載した。得られたカフェ酸の焙煎反応生成物は、主にフェニルインダン骨格を有するものが多かった。なお、140 ~ 170 の加熱条件では、カフェ酸のカルボン酸が残存したフェニルインダンが生成するのに対し、170 ~ 200 では、フェニルインダンからカテコール部分が脱離した構造の物が生成する特徴が見られた。

(3) フェルラ酸とシナピン酸の焙煎反応

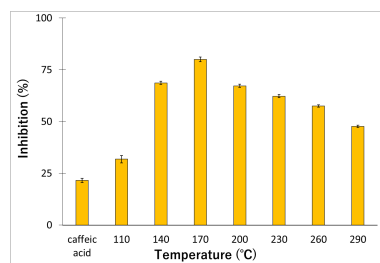


図 1

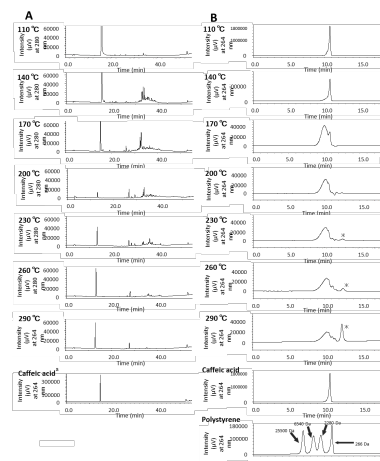


図 2

フェルラ酸とシナピン酸についても、カフェ酸の反応と同じ方法で、焙煎反応を行った。なお、反応温度は、カフェ酸において最も XOI の高かった 170 条件を用いた。フェルラ酸及びシナピン酸自体、200 $\mu\text{mol/L}$ の条件では XOI 活性を示さなかったが、焙煎反応生成物には、活性が

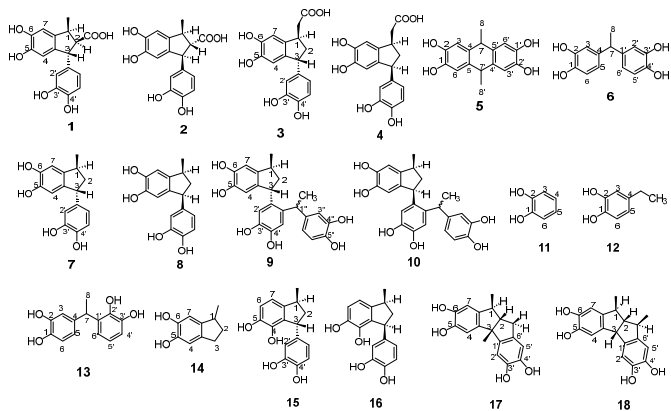


図3

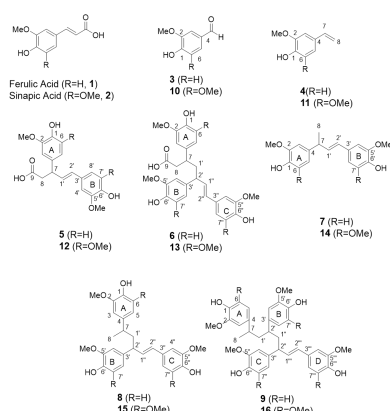


図4

見られた。ただし、カフェ酸由来のもの比べると、その活性は弱く、その順位はカフェ酸由来 > フェルラ酸由来 > シナピン酸由来であった。次にフェルラ酸及びシナピン酸からの各焙煎反応生成物の単離と構造決定を行った。その結果として、単離構造決定に成功した物質の構造式を図4に示した。それらの構造式から、フェルラ酸とシナピン酸由来の焙煎反応物は類似しており、カフェ酸からはフェニルインダン型の物質が生成したが、フェルラ酸とシナピン酸からは、直線型に重合したオリゴマーが生成することが判明した。今回焙煎反応によって生成した物質の生成中間体は、加熱脱炭酸反応で生じるそれぞれのビニルフェノールであることが考えられ、それが重合していくが、カフェ酸の場合は、ベンゼン環の求核反応性が高く、環化反応が進みフェニルインダン型の生成物が生じた。一方、フェルラ酸およびシナピン酸は、フェノール性水酸基がメチル化されているため、反応性が低く、ビニル基のみの反応が進んだと考えられた。

(4) 焙煎反応物の機能

カフェ酸、フェルラ酸、シナピン酸の焙煎反応生成物の XOI 活性 (物質濃度 200 $\mu\text{mol/L}$) を測定した。その結果を図5及び図6に示した。なお、化合物番号は、図3と図5、図4と図6を一致させている。

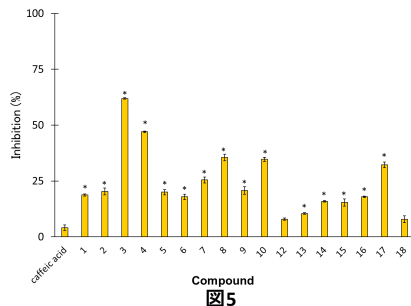


図5

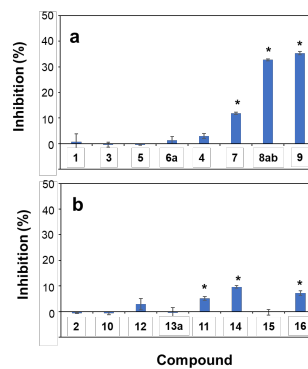


図6

結果から、カフェ酸の反応生成物において、その化学構造と XOI を考察すると、カフェ酸 ビニルカテコール型のオリゴマーの方が、ビニルカテコール - カテコール型のオリゴマーの方より活性が強い傾向にあった。カフェ酸 ビニルカテコール型のオリゴマーは、200 の様な反応温度が高くなると生成が少なくなるため、XOI が最も強く認められた 170 反応のカフェ酸焙煎物の機能は、このカフェ酸 ビニルカテコール型のオリゴマーに由来すると考えられた。一方、フェルラ酸、シナピン酸の焙煎反応で生じたオリゴマーの XOI は、カフェ酸由来の生成物にくらべて XOI は弱いものであった。なお、フェルラ酸からの反応生成物に関しては、重合化度が高くなるほど XOI 活性が高いが、シナピン酸からの生成物にはそのような傾向がないことがわかった。以上により、カフェ酸およびフェルラ酸を多く含む食材については、170 付近まで焙煎することにより XOI 機能の上昇が期待でき、その結果、生活習慣病の痛風の軽減効果も期待できると考えられた。

その他の機能として、抗酸化機能に関連するラジカル消去活性をフェルラ酸及びシナピン酸焙煎反応生成物について測定した。その結果、フェルラ酸からの生成物の活性増強はあまり認められず、シナピン酸からの生成物には、増強効果が認められた。抗酸化性等の酸化ストレス軽減機能は、痛風を含む各種生活習慣病の発症抑制や軽減に寄与すると考えられており、シナピン酸の焙煎反応物も、二次的に機能する可能性も期待できる。さらに、化学構造の特定に至っていないが、フェルラ酸等から多く生じる高分子褐変物質 (メラノポリフェノールと命名) の機能として、膵リパーゼの阻害機能を確認した。食品の加熱加工において生じる褐変 (黒色) 物質としては、メラノイジンやカラメルが知られている。なお、本研究によって、ポリフェノールも加熱褐変物質を生じ、かつ機能が期待できることが判明した。その詳細な説明は、今後の課題となった。

(5) その他の焙煎という化学反応によって生じる機能性成分の同定

フェノール酸を対象にした上記研究以外に、本研究期間中に、本研究の大きな目的に合致した焙煎反応とポリフェノールの機能に関する研究も遂行し、その成果を学術誌で報告した。(5参照)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishida Takumi, Funakoshi Yurie, Fukuyama Yuya, Honda Sari, Masuda Toshiya, Oyama Yasuo	4. 巻 43
2. 論文標題 Conflicting actions of 4-vinylcatechol in rat lymphocytes under oxidative stress induced by hydrogen peroxide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 347 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01480545.2018.1492604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Doi Sayaka, Kawamura Mina, Oyama Keisuke, Akamatsu Tetsuya, Mizobuchi Mizuki, Oyama Yasuo, Masuda Toshiya, Kamemura Norio	4. 巻 15
2. 論文標題 Bioactivity of alginetin, a caramelization product of pectin: Cytometric analysis of rat thymic lymphocytes using fluorescent probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0241290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shindo Yukino, Taniguchi Asuka, Masuda Akiko, Masuda Toshiya	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification of the roasting reaction products of ferulic and sinapic acids and their xanthine oxidase inhibitory activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Doi Sayaka, Shindo Yukino, Masuda Akiko, Oyama Yasuo, Masuda Toshiya	4. 巻 85
2. 論文標題 Identification of a polyphenol and its antioxidant properties from the roasting reaction of alginic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 957 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新道雪乃, 唐津明日香, 増田俊哉
2. 発表標題 フェルラ酸の焙煎反応物の化学構造
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新道雪乃, 谷口明日香, 増田俊哉
2. 発表標題 フェノール酸焙煎反応物の化学構造・キサントニンオキシダーゼ阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	増田 晃子 (Masuda Akiko) (80631720)	四国大学・管理栄養士養成課程・准教授 (36101)	
研究協力者	小山 保夫 (Oyama Yasuo) (80214229)	徳島大学・生物資源産業学部・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------