

令和元年6月25日現在

機関番号：35305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25350111

研究課題名(和文)食物・食品の渋みの機構解析と評価

研究課題名(英文)Analysis and evaluation of the mechanism of astringency caused with foods

研究代表者

北畠 直文 (Kitabatake, Naofumi)

ノートルダム清心女子大学・人間生活学部・客員教授

研究者番号：30135610

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)：渋味は、苦味とともに食べ物や食品の“まずさ”や“雑味”の因子である。近年、唾液たんぱく質がタンニン酸等の渋味物質と複合体；不溶性凝集体を形成し、これが口腔内で生じ、渋味をもたらすという仮説が報告されている。そこで、唾液たんぱく質と渋味物質との相互作用、唾液・唾液たんぱく質の各成分の役割、渋味をもたらす不溶性凝集体の作用、唾液たんぱく質と渋味物質の凝集体の生理的意義、渋味抑制、渋味抑制物質の検討に焦点をあて、渋味と渋味閾値、渋味物質であるタンニン酸の細胞毒性と唾液による抑制効果、たんぱく質の渋味、茶の渋味に関する研究を行った。得られた結果は上記の仮説を支持し、さらに興味ある知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

おいしさの研究は多く目にするが、まずさを対象とする研究は少ない。食べ物・食品を渋い、不味いと感じるのは、生体にとって有益でない成分の取り込みを未然に防ぐ生体防御反応のひとつである。この感覚は基本的な生体反応であるにも関わらず、その機構が明確にされていない。この機構解析を通して、食品の味、とりわけ渋味に関する本質的な意義を見出すことを目指した。

渋味を対象としてまずさを捉えることによって、まずさの実体を示し、食品の品質に対する否定的な面に加え、有意義な生理学的意義を検討した。また、渋味抑制法の開発や渋味抑制物質を見出すための知見を得、食品製造ならびに食品加工に対して有益な情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Astringency, as well as bitterness, induces the unpleasant taste and flavor of foods, while in some foods astringency gives a favorable characteristics to some foods. Recently it has been suggested that the salivary proteins participated the induction of astringent sensation by the formation of the insoluble complex of salivary proteins with astringent compounds, e.g. tannic acid. In this study following subject were focused. i)induction of astringency and its threshold value, ii)cytotoxicity of tannic acid; one of the typical astringent compound, and the preventing effect of saliva against such toxicity, iii)induction of astringency by proteins, iv) astringency of tea. These studies gave the supporting result to the hypothesis of the role of saliva shown above and some information on the physiological significance of saliva.

研究分野：食品科学

キーワード：渋味 唾液 唾液たんぱく質 不快味

## 1. 研究開始当初の背景

渋味は、苦味とともに食べ物や食品の“まずさ”や雑味をもたらす因子であり、苦味が T2Rs を受容体とする化学感覚であるのに対して、渋味は、特定の受容体を介さず、渋味物質が直接口腔内上皮を刺激して、味を感じているとされている。近年、唾液たんぱく質がタンニン酸等の渋味物質と複合体を形成し、口腔内で生じた不溶性凝集体が渋味発現と関連することが示唆されている。しかし、その詳細は未だに不明である。以下の課題を通して、渋味発現の機構解明、すなわち、唾液たんぱく質と渋味物質との相互作用、渋味発現における唾液、唾液たんぱく質の各成分の役割、渋味をもたらす不溶性凝集体の作用、唾液たんぱく質と渋味物質の可溶性凝集体の意義、渋味抑制、渋味抑制物質の検討を行った。

研究の具体的内容は、以下の通りである。

- (1) 渋味と渋味閾値
- (2) 渋味物質であるタンニン酸の細胞毒性と唾液による抑制効果
- (3) たんぱく質の渋味
- (4) 茶の渋味

## 2. 研究の目的

(1) 渋味と渋味閾値 渋味は収斂味とも言い表され、不快味の代表的味刺激と言える。英語では、**puckering, shrinking, drawing, roughness, drying in the oral cavity or mouth** などとされ、口腔内においてざらざらした感覚、焼けるような感覚、縮むような感覚などの表現である。すなわち、渋味は極めて複雑な感覚であり、すべての人がこの言葉から同じ感覚を認識しているかどうかは判然としない。とりわけ、現代の日本人の若年者においては、これまで渋味をほとんど経験していないことから、渋味と苦味の差異を判別しがたい例もある。しかし、代表的な渋味物質であるタンニン酸の溶液の標準液を用いることにより、渋味の感覚を確認し、一定の渋味強度を評価することが可能となる。ヒトによる官能検査法を用いて、タンニン酸の渋味と渋味閾値を測定し、渋味発現における唾液たんぱく質の役割を明らかにすることを目的とした。

(2) 渋味物質であるタンニン酸の細胞毒性と唾液による抑制効果 ヒトを含め動物の多くは、植物に食を依存している。すなわち、従属栄養生物である。しかし、その頼りにしている植物は、熟した果実以外のほとんどの植物がタンニン類を含んでいる。進化の過程でこのタンニンの毒性との“戦い”が動物の生死を分けてきたと言っても過言ではない。唾液のプロリンリッチたんぱく質を獲得した動物は“戦い”に勝利することができ、植物を食して生命を繋いできた。タンニン酸と唾液たんぱく質との複合体形成は、これらのタンニン酸の様々な毒性軽減、除去の決め手となる反応である。タンニン酸の渋味発現機構とともに、タンニン酸の毒性について、主に細胞毒性に焦点を当てて検討し、唾液たんぱく質によるタンニン酸の毒性発現抑制効果について検討した。

(3) たんぱく質の渋味 牛乳乳清たんぱく質、及びそれを特定の条件下で加熱して得られた改質乳清たんぱく質は、食品素材として透明性維持など優れた加工機能特性を有する。しかし、この二種のたんぱく質は酸性条件下において官能検査を行った結果、渋味を呈することが報告されている。しかし、このように特定のたんぱく質が酸性条件下において、タンニンと同様渋味を呈する理由は明らかになっておらず、その渋味発現と機序について研究を行うこととした。すなわち、酸性条件下において渋味を呈するたんぱく質に着目し、官能試験を行い、凝集体や沈殿と渋味との関連性を明らかにすることを目的とした。

(4) 茶の渋味 茶の種類による渋みの違いを、茶抽出液に含まれる渋味成分の量、ならびに唾液たんぱく質との相互作用の観点から解析し、茶の渋みの特徴を明らかにすることを目的とした。また、口腔内における渋味物質による渋み発現機構、ならびに渋み制御について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 渋味と渋味閾値 タンニン酸 (Sigma) の水溶液を調製し、ヒトによる官能検査法によって渋味の閾値を測定した。渋味の評価は3点識別法を用いて、識別閾値を測定した。採唾器を用いて耳下腺、及び舌下腺・顎下腺からの唾液を回収し、実験に供した。唾液たんぱく質の分析は SDS 電気泳動によって行った。

(2) 渋味物質であるタンニン酸の細胞毒性と唾液による抑制効果 培養細胞を用いて、タンニン酸の細胞毒性とその細胞毒性に与える唾液たんぱく質の影響について検討した。用いた培養細胞は KB 細胞である。これに 2.0 および 4.0 mM のタンニン酸を添加した。また、0 から 0.5 mg/ml の濃度の耳下腺唾液たんぱく質を添加して、細胞の生存率を計測した。

(3) たんぱく質の渋味 大豆分離たんぱく質、牛乳乳清分離たんぱく質、オボアルブミンのそれぞれの溶液を pH 3.5 および pH7.0 に調整した。これらの溶液を、ヒトによる官能検査に供した。また、各 pH における濁度を測定し、沈殿形成能を評価した。

#### (4) 茶の渋味

緑茶、烏龍茶、紅茶は市販のものを用いた。緑茶、烏龍茶、紅茶 それぞれの茶葉 6.0 g に 450 mL の沸騰水を加え、3 分間加熱し、抽出液を得た。冷却後、 $-30^{\circ}\text{C}$  に保存し、実験時に融解して使用した。茶の渋味物質の定量は、タンニン酸 (Sigma-Aldrich) を標準物質として、フォーリン・デニス (Folin-Denis) 法によって行ない、茶抽出液の渋味濃度を、タンニン酸当量で算出した。唾液は採唾器を用いて採取し、主に耳下腺唾液を実験に用いた。採取した唾液は、メンブレンフィルター(0.45 $\mu\text{m}$ )でろ過を行ない、得られた濾液を $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存し、実験時に融解して使用した。渋味は官能検査法によって評価を行った。ゼラチンは、調製原

料、分解程度の異なる標品を入手し、実験に供した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 渋味と渋味閾値

①渋味の閾値は、**0.30 mg/mL (1 mM)** であった。ちなみに、**0.15 mg/mL** で何らかの味刺激を感じ、その**2倍**の濃度が渋味の閾値であった。

②採取した耳下腺唾液の一定量に、異なる濃度のタンニン酸を添加したところ、タンニン酸の濃度に依存して白濁し、沈殿の形成が観察された。沈殿を遠心操作で回収した後、**SDS 電気泳動**によって解析した。上清のたんぱく質分析も **SDS 電気泳動**で行った。タンニン酸濃度が上昇すると、上清画分に見られていた **37 kDa** の分子サイズのたんぱく質のバンドが著しく減退し、**0.20 mg/ml** の濃度でこのバンドは上清から消失した。一方、沈殿画分には **0.17 mg/ml** 以上の濃度のタンニン酸でこのバンドが現れ、タンニン酸濃度の上昇にともない、バンドの強度は増大した。とくに、タンニン酸の濃度が **0.23 mg/ml** 以上になると明瞭なバンドが観察された。文献によると、塩基性プロリンリッチたんぱく質 (**basic proline-rich protein; bPRP**) の分子サイズが **37 kDa** であり、このことからタンニン酸と反応して沈殿を形成しているのは **bPRP** であろうと判断した。タンニン酸は特異的に **bPRP** と反応していた。バンド強度とタンニン酸濃度の関係を調べると、**bPRP** のバンド強度は **0.20 mg/ml** 以上で上昇し、**0.26 mg/ml** で最高値を与えた。全唾液たんぱく質を用いた場合にも同様な結果が得られた。これらの知見は明らかに耳下腺唾液がタンニン酸の渋味発現に必須であり、耳下腺唾液のなかの **bPRP** がタンニン酸と不溶性の凝集物を形成し、それが渋味を発現していることを示すものであると結論した。

③ヒト官能試験においては上述のように **0.17** から **0.20 mg/ml** において味刺激を感じ、**0.27 mg/ml** 以上で渋味を感じた。この渋味の実験結果は、沈殿画分に現れる **bPRP** のバンドの強度と極めて良い対応を示している。このことから沈殿形成は渋味発生と強く関連していると考えられた。

④採唾器で採取した耳下腺唾液にタンニン酸を添加すると白濁が認められ沈殿が生じた。この沈殿形成をもたらすタンニン酸濃度は、渋味を感じるタンニン酸濃度に近いものであった。さらに、回収した沈殿画分を **SDS 電気泳動**で分析したところ、主要なたんぱく質は **bPRP** であった。

##### (2) 渋味物質であるタンニン酸の細胞毒性と唾液による抑制効果

**KB 細胞**に、**2.0 mM** 及び **4.0 mM** になるようにタンニン酸溶液を添加した場合、耳下腺唾液たんぱく質が存在しない場合、明らかに細胞毒性を示し、**10 分間**の曝露で著しい数の細胞が減少した。しかし、耳下腺唾液たんぱく質存在下においては、多くの細胞が生存していた。次に、タンニン酸で処理したのち、タンニン酸を除き、**48 時間 DMWM 培地**で培養を行い、細胞の生存率を計測した。タンニン酸濃度が **2.0 mM** と **4.0 mM** の場合、それぞれ細胞の生存率は

タンニン酸を添加しない対照と比べると 5%および 2%であり、細胞の大半が死滅していた。2.0 mM のタンニン酸添加の細胞に 0.1 mg/ml の耳下腺唾液たんぱく質を添加すると、若干の死滅防御効果が観察され、0.5 mg/ml においては細胞毒性が 60%にまで低減し、明らかに耳下腺唾液たんぱく質にはタンニン酸の細胞毒性を抑制する効果のあることが認められた。

### (3) たんぱく質の渋味

大豆分離たんぱく質、牛乳乳清分離たんぱく質、オボアルブミンのそれぞれの溶液を pH 3.5 および pH7.0 に調整した。pH7.0 のたんぱく質液には全く渋味は感じられないが、pH3.5 に調整したたんぱく質液の全てが渋味を呈した。pH 3.5 に調整した大豆分離たんぱく質、乳清分離たんぱく質、オボアルブミン溶液の渋味閾値は、それぞれ 0.83 mg/ml、4.0 mg/ml、12.5 mg/ml であり、pH 4.0 に調整した  $\beta$ -ラクトグロブリン溶液の渋味閾値は 4.1 mg/ml であった。 $\beta$ -ラクトグロブリン溶液の渋味強度は、たんぱく質濃度の上昇とともに増大した。これらのたんぱく質は酸性溶液の状態では渋味強度の増加を示した一方で、中性付近の pH 7.0 または pH 7.5 においては渋味を呈さない結果となった。これらのたんぱく質は pH3.5 において等電点沈殿を生じ、この沈殿形成が口腔内においても生じているため、この沈殿体が、タンニン酸と唾液たんぱく質との複合体形成による沈殿形成と同様に、渋味を惹起しているものと考えられた。

### (4) 茶の渋味

フォーリン・デニス法によって測定した緑茶、烏龍茶、紅茶抽出液のタンニン酸当量は、それぞれ 1.95 mg/mL、0.60 mg/mL、1.73 mg/mL であった。それぞれの茶抽出液の渋味物質（タンニン酸当量）を 0.60 mg/mL に調整した後、耳下腺唾液と茶抽出液を等量混合したところ、いずれの茶抽出液においても白濁が生じた。緑茶抽出液の閾値は、タンニン酸当量濃度で約 0.14 mg/mL にあり、タンニン酸とほぼ同様な傾向を示した。一方、紅茶の場合は、緑茶より低い濃度で渋みを呈し、紅茶の渋み物質は緑茶のものよりタンニン酸当量濃度の低濃度域で渋味を呈することがわかった。烏龍茶はほぼ紅茶と同様の渋味閾値を示したが、渋味の強度は紅茶より低い傾向を示した。つまり、同じタンニン酸当量濃度であっても、不発酵茶の緑茶、半発酵茶の烏龍茶、発酵茶の紅茶の順で、渋味が強くなることが示された。

茶と唾液の混合物を遠心処理（1,2000 x g、10 min）に供し、得られた上清と沈殿画分を SDS 電気泳動で解析した。SDS 電気泳動の結果、沈殿画分にプロリンリッチプロテインを含むいくつかの唾液たんぱく質が確認された。緑茶、烏龍茶、紅茶のいずれの場合も、35 kDa 付近の酸性プロリンリッチたんぱく質とヒスタチンと思われるたんぱく質が沈殿画分に観察された。緑茶、烏龍茶、紅茶による違いは若干認められたが、ほとんど同じだった。これらのことから、茶に含まれる各種のカテキン類やテアフラビンなどのポリフェノールは、唾液に含まれる一部のプロリンリッチたんぱく質とペプチドのヒスタチンと複合体を形成し不溶性の凝集体となり、沈殿になって渋みを惹き起こしていると考えられる。また、ゼラチンによる渋味の

抑制が観察され、その種類によって効果に違いが認められた。渋味の抑制効果を顕著に示した **High grade Gelatin Type AP** を用い、お茶に対する渋味抑制の効果を調べたところ、ゼラチンの添加によって明らかに渋味が抑制された。

ゼラチンの種類によって差はみられたものの、タンニン酸溶液にゼラチンを添加することによって、タンニン酸の渋味は抑制される。茶に対するゼラチンの渋味抑制の効果も確認され、タンニン酸溶液と同様の白濁が生じたことから、ゼラチン分子とタンニン酸が相互作用をして複合体を形成したためであると考えられた。

#### <引用文献>

- ① Lu Y., Bennick A., *Arch. Oral Biol.* **43**, 717 (1988).
- ② Lee C.A., Ismail B., Vickers Z.M., *J. Food Sci.*, **77**, C381 (2012).

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ①中西桃子、尾原成美、北畠直文、茶の渋味と渋味発現機構 一茶の渋味成分と唾液たんぱく質との相互作用、日本食品科学工学会、2014

[その他]

- ①北畠直文、「腸内細菌を取り巻く環境」、『食品技術ミニシンポジウム』2015年2月18日（岡山県食品新技術応用研究会第311回研修会）地域産業活性化推進対策費補助金に関する基金・地域技術起業化推進事業
- ②北畠直文、「Outline of the history and role of the functional foods in Japan」、第12回アジア栄養学会議、2015年5月15日
- ③北畠直文、「食品と発酵技術 微生物の関わらない食品の発酵加工」、日本農芸化学会 中四国支部創立15周年記念 第27回市民フォーラム、2015年8月26日
- ④北畠直文、「食べ物の味、匂い、食感」、吉備学会食農部会、2017年6月6日

#### 6. 研究組織

- (1) 研究分担者：なし
- (2) 研究協力者

研究協力者氏名：谷史人、梶田哲哉、塚副成、村上裕子、中西桃子、尾原成美、

ローマ字氏名：TANI Fumito、MASUDA Tetsuya、TUKAZOE Shigeru、MURAKAMI Hiroko、NAKANISHI Momoko、OBARA Narumi