

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450184

研究課題名(和文) コク付与物質としてのメイラード反応生成物の解析

研究課題名(英文) Analysis of Maillard reaction products contributed to Koku taste

## 研究代表者

早瀬 文孝 (Hayase, Fumitaka)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：80105246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：メイラード反応最終生成物の褐色色素のメラノイジンは前駆体の青色、赤色などさまざまな「色素」から生成する。これらの色素には共通のピロロピロール構造を有している。本研究ではメイラード反応生成物が「コク」に対し、どのように関与するかを明らかにすることを目的としている。調味つゆのコク寄与成分について methional, L-Ethyl lactate, 4-Ethyl-2-methoxyphenol はつゆにおいてコク増強効果を有した。一方、モデルメラノイジンや八丁味噌に含まれるメラノイジンは、コク増強に寄与することが示された。メラノイジンのピロロピロール構造がコク増強効果を有すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed cooked flavor in seasoning soy sauce (SS) and found some odorants contributing to the Koku taste of SS by sensory evaluation. Methional, L-(-)-ethyl lactate, 4-ethyl-2-methoxyphenol were contributed to Koku taste. On the other hand, we proposed that yellow, blue, and red pigments involved in pyrrolopyrrole ring would be key intermediate in melanoidin formation from reducing sugar and amine reaction systems. Model melanoidins and melanoidins in soy bean paste called Hacho miso were contributed to Koku taste. Furthermore, we obtained anti-pyrrolopyrrole- antibody recognized model melanoidin and browned foods, indicating that pyrrolopyrrole structure contain in melanoidin molecules and the structure might be contributed to the enhance of Koku taste.

研究分野：農学

キーワード：メイラード反応 メラノイジン コク ピロロピロール

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食品のおいしさを引き出す「コク」、「コク味」が注目されるようになってきた。「コク」の定義は曖昧な面もあるが、味わいに「濃厚感、持続性、広がりが強められたときに感じる現象」とする研究者が多い。コク付与には加熱による反応、とくにメイラード反応により生成する成分の寄与が大きいと考えられるが、それら成分の実体や生成機構にはなお不明な点が多い。

最近、筆者らはメイラード反応で生成する褐色色素「メラノイジン」が、苦味抑制とともに、コク付与（旨味増強）作用を発揮することを見出した（2012年度農化会 2J15p18）。すなわちメラノイジンを含む調味液では味の「強さ」「持続性」が有意に増大することが官能評価により明らかとなった。このことから、加熱食品あるいは醤油・味噌等に見られる「コク味」の一部にはメラノイジンが関与していると考えられる。しかしながらその複雑性ゆえ、メラノイジンの構造および生成機構はほとんどわかっていない。

筆者らはメラノイジンの前駆体となる色素化合物の解析を進め、これまでにキシロース-グリシン由来メラノイジンの前駆体として新奇青色色素「Blue-M1」の構造を同定するとともに、これが重合してメラノイジンを形成することをはじめて明らかにした（Food Sci. Technol. Res., 6, 79-86, 2000; Biosci. Biotech. Biochem., 63, 1512-1514, 1999; 化学と生物, 50, 80-82, 2012）。さらに、Blue-M1 以外に黄色色素、赤色色素、高分子の青色色素などの「メラノイジン前駆体色素」についても構造を明らかにしている。また、グルコースとグリシンの反応系においても、特徴的なピロロピロール構造を有する青色色素 Blue-G1 を単離・同定している。これ

ら「前駆体色素」の構造は、メラノイジンの構造や生成機構を解明する上で重要な知見といえる。しかしながら、前駆体色素の生成機構や、色素が重合してメラノイジン生成に至る機構は明らかになっていない。

一方、筆者らは加熱食品である調味液（つゆ）においてもメイラード反応生成物がコクに寄与すると考えて解析を進め、つゆのコクに寄与する香気成分を最近明らかにした（食工誌, 60, 59-71, 2013）。解析の結果、ノーズクリップ装着により嗅覚を遮断すると官能評価結果に有意差がなくなることから、香気成分が「つゆのコク」に大きく関与することが示唆されている。

しかしながら、コクへの寄与度の高い香気成分のうち、未同定のものも多く認められており、その解明は十分であるとはいえないのが現状である。

## 2. 研究の目的

食品のコクを解明する上で、メイラード反応で生成するメラノイジンや香気成分の解析は重要な研究課題であるといえる。筆者らはメラノイジン前駆体色素の化学構造やつゆの香気分析に関して研究成果を挙げてきたが、メラノイジンに至る重合機構やコクへの寄与など解明すべき点が多く残されている。

本研究は（1）メラノイジン前駆体色素とメラノイジン生成機構、（2）つゆのコク付与揮発性成分の同定、（3）官能評価や細胞を用いたメイラード反応生成物のコク付与成分の官能特性、を明らかにすることを目指して計画されたものである。

## 3. 研究の方法

（1）キシロースとグリシンの反応系において、主要青色色素Blue-M1の前駆体や新奇青

色色素を単離・精製し構造解析を行った。

一方、青色色素を単独でインキュベートすると褐変することを確認している。そこで色素の重合によりメラノイジンが生成する機構を解明するために、青色色素の変化と生成する高分子化合物の同定を各種MS、NMRにて分析した。

(2)市販つゆの成分をSDE法により捕集し、GC、GC-MS、臭い嗅ぎGCで同定、定量し、FD factorを求めた。次にカツオを使用して調製した「コントロールつゆ(CT)」とそれにコク付与した「コンブ増量つゆ(KT)」を調製し、同様に香気成分を分析した。これによりつゆの香気特性に寄与度の高い成分を特定した。

(3)つゆのコクには香気成分が大きく寄与している。そこで上記(2)で同定した香気成分を添加・増量したときの官能評価を行った。これら解析により、コク付与に関わる香気成分を明らかにした。

(4)筆者らはメラノイジンの苦味の抑制について明らかにしている。それ以外の基本五味、コクについて官能評価を行い、メラノイジンの呈味特性について検討した。影響の認められた物質についてはBIACOREを用いて呈味物質との相互作用を調べた。具体的にはメラノイジンをリガンドとしてセンサーチップに固定化し、アナライトとして各呈味物質をセンサーチップ上に流し、相互作用を検討する。呈味物質にはMSG、NaCl、スクロース、硫酸キニーネ、カフェイン、グルタチオン等を用いた。

(5)キシロース-グリシン反応系より精製したピロロピロールアルデヒド(PPA)を化学的にBSAにカップリングさせたもの(PPA-BSA)をハプテンとして用いて抗PPA抗体の作製を行う。PPA特異的抗体を調製し、タンパク質中のPPA含量の定量法、つゆなどの褐色食品中のメラノイジンの存在について検討を加えた。

(6)官能評価によりPPAやBSA-PPAのコク付

与作用を解析する。ブイヨンにPPAあるいはBSA-PPAを加え、(3)と同様に官能評価を行った。

(7)八丁味噌のメラノイジンについて、(3)と同様に官能評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)調味液のコク寄与成分

調味つゆのコク(厚み、持続性)寄与成分について揮発性成分を解明し、コク寄与の高い3種の成分について添加試験を行った結果、L-(-)- Ethyl lactate, 4-Ethyl-2-methoxyphenolはつゆにおいて2,5-Dimethylpyrazineと同等のコク増強効果を有した。

##### (2)メラノイジンの呈味に及ぼす影響

グルコース-各種アミノ酸系(グリシン、グルタミン酸Naあるいはアスパラギン酸Na)で調製したメラノイジン(MEL)は、苦味抑制、うま味およびコク味増強に寄与することが官能評価によって示された。

BIACOREを用いた相互作用解析による結果から苦味の抑制機構にMELと苦味物質との相互作用が一部関与している可能性が示唆された。また、MELとうま味物質は結合を示さないことからMELは受容体に関与し、うま味を増強させる可能性が示唆された。官能評価および培養細胞評価系による検討から、MELが及ぼすコク味受容機構にカルシウム感受受容体(CaSR)が関与している可能性が示唆された。

##### (3)メラノイジンの生成機構

メラノイジンの生成機構を調べるために、glycine-D-xylose系で生成する主要な青色色素Blue-M1の生成機構について2種の前駆体を推定した。これら前駆体は265nmに極大吸収を有するが常温で保存すると速やかに青変し、Blue-M1を生成する。またBlue-M1を単独でインキュベートすると褐色化が起こるが、この褐色化機構についてBlue-M1が分解し重合することを明らかにした。

さらに、glycine-D-xylose系で生成する

新奇青色色素Blue-M10を単離・生成し、構造解析を行った。Blue-M10は主要な青色色素であるBlue-M1の側鎖からC2H3(OH)が脱離したピロロピロール構造を有し、Blue-M1の還流によってBlue-M10が生成する結果より、Blue-M1の側鎖が開裂し、Blue-M10が生成すると示唆された。

#### (4) 八丁味噌のメラノイジンのコク寄与成分

八丁味噌中のMELがコクに与える影響について検討を加えた。八丁味噌の水溶性画分を限界濾過により3-5 kDa、5-10 kDa、10 kDa以上の3つの画分に分けた。その結果、八丁味噌のコクに3-5 kDa 水溶性画分(HM-LMW)と5-10 kDa 水溶性画分(HM-MMW)が寄与することが示された。HM-LMWとHM-MMWはタンパク質分解酵素により低分子化する物質がほとんど含まれていなかったことから、主成分はMELであることを確認した。

#### (5) 抗ピロロピロール抗体の作成

D-Xylose (0.8 M)と6-Aminohexanoic acid (0.2 M)をインキュベートし、黄色色素PPA-AH1を各種クロマトグラフィーにより単離・精製した。PPA-AH1をハプテンとしてキャリアタンパク質のKLHに結合させることで抗原とし、BALB/c 系雌マウスに免疫した。免疫したマウスから血清を採取して抗血清を得た。得られた抗血清で競合ELISAを行った。ELISAによる結果より、免疫したマウスから得た抗血清は7週目以降から顕著な抗体価の上昇を示した。また、競合剤として、PPA-AH1生成時に用いる化合物、ピロール化合物、ピロロピロール化合物を用いた競合ELISAの結果、抗血清がピロロピロール構造特異的抗体であることを確認した。競合剤としてモデル系メラノイジン、タンパク質サンプル、みそサンプルを用いた競合ELISAの結果、抗血清はそれぞれのサンプルを認識した。この結果より、メラノイジン中、みそサンプル中においてピロロピロール構造の存在が示唆された。

#### (6) 青色色素のコク寄与

メラノイジン前駆体の青色色素画分(BF)

のうま味溶液におけるコク増強効果を官能評価したところ、持続性の増強効果が認められた。

以上の結果より、メラノイジンは基本骨格としてピロロピロール構造を有し、この構造がコク増強効果を有することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1) 金子成延、渡辺寛人、早瀬文孝ら、大麦の炊飯香気の特徴に寄与する成分、日本食品科学工学会誌、60(8), 439-442 (2013).

DOI: <http://doi.org/10.3136/nskkk.60.439>

2) 渡辺寛人、早瀬文孝、つゆの香気成分とコク寄与成分、日本醸造協会誌、109(3), 161-167 (2014).

<http://www.jozo.or.jp/newstopics/%e6%97%a5%e6%9c%ac%e9%86%b8%e9%80%a0%e5%8d%94%e4%bc%9a%e8%aa%8c%e7%ac%ac109%e5%b7%bb3%e5%8f%b7%e3%81%8c%e7%99%ba%e5%88%8a%e3%81%95%e3%82%8c%e3%81%be%e3%81%97%e3%81%9f>

3) 早瀬文孝、渡辺寛人、呈味に關与する香気成分、香料、263, 61-66 (2014).

<http://n-koryokyokai.com/1ran.html>

4) 早瀬文孝、味噌メラノイジンの生成機構に関する化学的解析、中央味噌研究所研究報告、36, 78-83 (2015).

[http://www.miso.jp/chumiken\\_hokoku.html](http://www.miso.jp/chumiken_hokoku.html)

〔学会発表〕(計10件)

1) 高井良輔、渡辺寛人、早瀬文孝ら、D-キシロース - グリシン系メイラード反応により生成するピロロピロール化合物の抗酸化性、2014年度日本農芸化学会、2014年3月28日、明治大学

2) 加藤祥恵、渡辺寛人、早瀬文孝ら、調味液のコクに寄与する香気成分の解析、2014年度日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学

3) 青木真洋、渡辺寛人、早瀬文孝ら、メイラード反応により生成する色素のピロロピロール構造特異的抗体の作製、2014年度日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学

4) 伊藤恵介、渡辺寛人、早瀬文孝、D-キシロース-グリシン系メイラード反応で生成する青色色素の生成機構について、2014年度日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学

5) 加藤祥恵、渡辺寛人、早瀬文孝ら、調味液の加熱香気成分とコク寄与成分の解析、日本メイラード学会、2014年11月7日、熊本市

6) 加藤祥恵、渡辺寛人、早瀬文孝ら、味噌メラノイジンのコクへの寄与、2014年度日本農芸化学会、2015年3月28日、岡山大学

7) 泉雄斗、渡辺寛人、早瀬文孝、D-キシロース-グリシン系メイラード反応により生成する新奇青色色素化合物の同定、2014年度日本農芸化学会、2015年3月28日、岡山大学

8) 井上裕、渡辺寛人、早瀬文孝ら、味噌の加熱香気成分とコク寄与成分の解析、日本食品科学工学会、2015年8月29日、京都大学

9) F.Hayase, H.Watanabe et al., The formation and browning mechanisms of blue pigments, melanoidin intermediat, 12th International Symposium on the Maillard Reaction 2015, 2015年9月4日, Yokyo, japan

10) 泉雄斗、渡辺寛人、早瀬文孝ら、D-キシロース-グリシン系メイラード反応へのジカルボニル化合物による影響、2015年度日本農

芸化学会、2016年3月28日、札幌

〔図書〕(計3件)

1) 早瀬文孝、渡辺寛人、メディカルレビュー社、アンチエイジングのための100の質問、2014、p.34-35.

2) 早瀬文孝、渡辺寛人、シーエムシー出版、メイラード反応の化学(メイラード反応の機構・制御利用)、2016、p.6-15.

3) 渡辺寛人、早瀬文孝、シーエムシー出版、メイラード反応と色調(メイラード反応の機構・制御・利用)、2016、p.6-15.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~maillard/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 文孝 (HAYASE FUMITAKA)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：80105246

(2) 研究分担者

渡辺 寛人 (WATANABE HIROHITO)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：20270859

(3) 連携研究者

なし