

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750025

研究課題名(和文) 匂い成分と呈味性ペプチドの相互作用による食品風味への影響に関する多面的解析

研究課題名(英文) Analysis for the effect of the interaction of odor components with taste-active peptides on flavor

研究代表者

大畑 素子 (Ohata, Motoko)

京都教育大学・教育学部・講師

研究者番号：60453510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホエイタンパク質を酵素分解した分解物には、消化吸収性の向上やアレルギー性の低減など様々な機能をもつものがあり、多くの食品に利用されている。しかし、苦みなどの不快味や不快な匂いによる嗜好性の低下が問題となっている。タイムやセイロン紅茶葉の揮発性画分は、ホエイタンパク質分解物の不快な風味を改善させる効果を有しており、その有効成分としてリナロールが特定された。リナロールは、検知閾値でホエイタンパク質分解物の不快な風味を有意に改善するが、ノーズクリップをして鼻腔に匂いが流入しない状態では風味への影響は見られなかった。このことから、リナロールの風味改善は味覚と嗅覚の相互作用によるものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Since whey protein hydrolysates (WPH) is a good source of bioactive peptides and results in improved human health, they are applied to various processed foods. However, in the production process of WPH, unpleasant flavor (mixture of taste and odor) is generated by hydrolyzation of whey protein or heat treatment with aims to deactivate protease and drying. Unpleasant flavor of WPH was improved by addition of the volatile fractions prepared from dried thyme leaves or Ceylon tea leaves to WPH solution. Linalool was detected with the highest FD-factor on both volatile fractions by aroma extract dilution analysis and this component was the most plausible causative agent among all potent odorants for the flavor improvement of WPH. While, the significant flavor improvement by linalool was not shown by the panelists with nose-clips, suggesting that the flavor improvement effect of linalool was interaction between olfactory perception and gustatory perception.

研究分野：食品科学

キーワード：におい成分 風味改善 ホエイタンパク質分解物

1. 研究開始当初の背景

人間が食品を摂取するとき、五感を大いに使いおいしさを感じている。特に匂いと味は、嗅細胞と味細胞を刺激する化学成分により得られる感覚であり、食品の嗜好性決定因子として極めて重要である。匂い成分と味成分はそれぞれが独立して細胞を刺激する一方、匂いと味は何らかの感覚的な相互作用により食品の全体的な風味を形成していることが知られている。

近年、ヒトの食品だけではなく、ペットの食品においても、嗜好性因子としての匂いの重要性が明らかになってきている。ネコを用いたキャットフードの嗜好性試験を実施し、高嗜好性(おいしい)キャットフードから単離・同定した数種の匂い成分を、低嗜好性(不味い)キャットフードに添加し、食いつきがいかに変化するか検証した実験では、匂い成分のみの添加で、低嗜好フードの嗜好性が回復するだけでなく、高嗜好フードの食いつきを顕著に上回る嗜好性の向上が確認されている。このことはすなわち、ある種の匂い成分は、単に、もともと存在する不味い匂いや味をマスキングするのではなく、味覚との相互作用により、不味さをおいしさに変える嗜好性向上機能を持つ可能性があるということを示唆している。しかし、あらゆる匂い成分がこのような効果を有するわけではなく、どのような匂い成分が、単独であるいは複数で、どう効果を発揮しているか、いまだ全貌は解明されていない。

他方、動物性タンパク質のプロテアーゼ分解物中には、多くの保健的機能性(抗酸化、抗疲労、抗アレルギー、抗高血圧等)を有するペプチドが存在していることから、加工食品への利用が増加しているものの、動物性タンパク質分解物中には呈味性を示すペプチド等も同時に存在するため、製品の嗜好性に大きな影響を与えている。特に、乳タンパク質由来の苦味ペプチドは、ごく少量であれば、乳加工食品の味に深みや厚みを与えるが、高嗜好を示す閾値を超えるととたんに嫌悪感を与え、えぐ味や渋味を助長させるという問題がある。乳タンパク質分解物は、アレルギー対応の乳幼児用粉ミルクの原料、あるいはアスリート用のサプリメントの原料でもあり、かねてより風味改善や嗜好性向上は重要な課題である。

2. 研究の目的

香辛料や、ハーブなどをはじめとする香草、香味野菜、果実類は、調理において風味を増強するのによく用いられている。乳加工食品の一種であるチーズを使った調理にも、特にそれがナチュラルチーズの場合、野菜類や香辛料、ハーブ類は欠かせないものとなっている。これは、乳タンパク質が分解されて生成した苦味ペプチドなどによる独特の風味をマスキングすること以外に、香辛料や香草等を加えることにより、さらにおいしくなるた

めであると考えられる。そこで本研究では、機器分析および官能評価によって、調理に用いられる香草や紅茶葉から不快味改善あるいは嗜好性向上の機能を持つ匂い成分を検索し、乳タンパク質の分解により生成した苦味などの不快味との相互作用による風味の変化を解析し、匂いの持つ新たな機能性を明らかにすることと、このような機能性を持つ匂い成分を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料および試薬

実験に用いた香草(すべて乾燥物)はレモンバーム、カルダモン、タイム、レモングラス、ローズマリーであり、すべて日本国内のローカルマーケットより購入した。実験に用いたセイロン紅茶葉も乾燥物であり日本国内のローカルマーケットより購入した。3,7-ジメチル-1,6-オクタジエン-3-オール(以下、リナロール)はシグマアルドリッチジャパン株式会社より購入した。

乳タンパク質分解物(Whey Protein Hydrolysates, WPH)は以下の通り調製した。原料となるホエイタンパク質を蒸留水に溶解し、pH8.5に調整後、55℃に加熱した。ここに酵素(エンド型プロテアーゼとエキソ型プロテアーゼ)を添加し反応させ、反応後、酵素を失活させた。その後噴霧乾燥させ、粉末化したものをWPHとした。

(2) 香草および紅茶葉からの揮発性画分の調製

香草および紅茶葉 5g から、市販飲料用軟水の熱湯 500mL で 10 分間熱水抽出し、コーヒーフィルターでろ過した。ろ液を 1L 容量の丸底フラスコに入れ、250℃に設定したマントルヒーターで 30 分間加熱し、蒸留を行った。得られた留出物を揮発性画分とした。蒸留装置の概要を図 1 に示した。

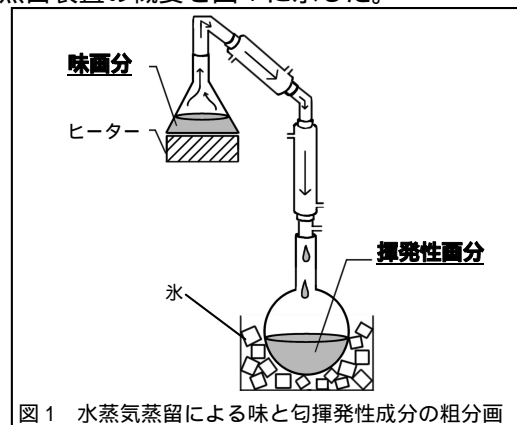


図 1 水蒸気蒸留による味と匂揮発性成分の粗分画

(3) Quantitative Descriptive Analysis (QDA)法を用いた官能評価

パネリストとして 21 - 24 歳の 9 名(男 3 名、女 6 名)を選出した。なお、T&T オルファクトメータの匂いを識別でき、WPH 水溶液を口に含んだ時に苦味および渋味を判別できることをパネリストの条件とした。

市販飲料用軟水を用いて、2.5%WPH 水溶液

を調製した。評価に先立ち、パネリスト個々に常温の2.5%WPH水溶液10mLを呈示し、WPH水溶液の風味を的確に表現できる用語を決定した。パネリストはWPH水溶液を口を含み、10秒間全口腔で味わった後吐き出した。パネリスト全員で数回のディスカッションによって、「苦い」「渋い」「まずい」「舌に長く残る」「軽い」「生臭い」の計6語を決定した。さらにパネリスト全員で評価用語に対する共通の認識と尺度合わせを行った。

官能評価に用いたサンプルは、市販飲料用軟水を5 μ L添加した10mLの2.5%WPHをコントロールとし、レモンバーム、カルダモン、タイム、レモングラス、ローズマリー、セイロン紅茶葉から得た揮発性画分をそれぞれ5 μ L添加した10mLの2.5%WPHを試験サンプルとした。予備実験により、いずれの揮発性画分においても5 μ Lの添加でレトロナーザルでの匂いの認知がないこと確認している。パネリストには、常温のサンプルを口を含み、10秒間全口腔で味わった後吐き出すように指示した。官能評価にはQDA法を用いた。各用語に対応する味および匂いの強度を、「感じられない」から「極めて強く感じる」までの7段階のカテゴリ尺度によって評価した。ひとつのサンプルにつき4回の官能評価を実施し、その平均を各パネリストにおける味および匂い強度とした。すべてのサンプルにおいて、全パネリストによる味および匂い強度の平均を算出し比較し、WPHの風味改善効果についてスクリーニングした。

(4) Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)法による寄与成分の検索と同定

香草および紅茶葉の留出物を用いたWPH風味改善のスクリーニングにより、改善効果を示した留出液中の香気寄与成分をAEDA法によって検索した。留出液を塩析し、ジエチルエーテルとペンタンを混合した溶媒を加え激しく攪拌し、有機層を回収した。数回この操作を繰り返し回収した有機層は、脱水後、常圧下で濃縮した、混合溶媒で段階的に5倍希釈しガスクロマトグラフィ匂い嗅ぎ(GC-0)分析に供した。香気寄与度を示すFlavor Dilution (FD)ファクターを求め、GC-MS分析によって化合物を同定した。

(5) リナロールの閾値測定およびリナロール添加によるWPH風味の官能評価

3点比較法を用いて、本研究におけるリナロールのレトロナーザルの閾値を測定した。リナロールを最終濃度で0.20, 0.14, 0.10, 0.06, 0.04, 0.02 μ g/mLとなるように2.5%WPHに添加した。一方でリナロール無添加のWPH(プラセボ)として、市販飲料用軟水を同量添加した。なお、WPHの最終濃度は2.5%となるように調製した。21-24歳の11名(男4名、女7名)をパネリストとした。10mLのサンプルをパネリストに同時に3つ呈示し、この3つのサンプルから異なるひとつを選出させた。パネリストには、自由な順序でそれぞ

れ口を含み、10秒間全口腔で味わった後吐き出すよう指示した。なお、すべての濃度はパネリストに対してランダムに呈示され、パネリストは各濃度合計2回ずつ評価した。有意に検知された最低濃度を検知閾値とし、その濃度をWPH風味の改善効果の検証に用いた。

さらに、QDA法でリナロールによるWPHの風味改善効果を検証した。最終濃度で検知閾値となるようにリナロールを添加した2.5%WPHを準備し、コントロールとしてリナロール添加の場合と同量の市販飲料用軟水を添加した2.5%WPHを準備した。10秒間全口腔で味わった後吐き出し評価をする「全口腔法」と、ノーズクリップをした状態で10秒間味わった後に吐き出し評価をする「ノーズクリップ法」の2方法で評価した。ひとつの方法につき4回官能評価を実施してその平均を各パネリストにおける味および匂い強度とした。全パネリストによる味および匂い強度の平均を算出し比較し、各評価用語において、コントロールとの強度の差を解析した。

4. 研究成果

(1) 香草および茶葉の揮発性画分を用いたWPH風味改善

2.5%WPH水溶液に香草あるいは紅茶葉の揮発性画分を添加した際の風味の変化を表1に示した。2.5%WPH水溶液に市販飲料用軟水5 μ Lを添加したコントロールにおいて、「まずい」の評価項目の強度が最も高く、次いで「舌に長く残る」「苦い」「生臭い」において高い強度を示した。一方、タイム、カルダモンおよびセイロン紅茶葉由来の揮発性画分の添加によって、「まずい」における強度が有意($p<0.05$, Tukey's multiple comparison test)に低くなることが判明した。また、「苦い」においてはセイロン紅茶葉由来の揮発性画分添加で、「生臭い」においてはタイム由来の揮発性画分添加で有意(いずれも $p<0.05$)に低くなった。いずれの揮発性画分においてもレトロナーザルで匂いが感知されない量を添加していることから、タイム、カルダモン、セイロン紅茶葉由来の揮発性画分の添加によるWPHの風味変化は、タイム、カルダモン、セイロン紅茶葉中の強い匂いによる単なるマスキングとは異なるものと考えられた。レトロナーザルの嗅覚と味覚との相互作用から風味が変化した可能性と、他方で揮発性画分中に存在する成分がWPH中の成分と何らかの反応を起こし、「苦い」「まずい」「生臭い」に寄与する成分が減少し全体の風味が変化した可能性が考えられた。そのなかでも特にタイムあるいはセイロン紅茶葉の揮発性画分は、少なくとも2つの評価項目について抑制作用があることが示された。そこで次に、タイムおよびセイロン紅茶葉の揮発性画分中の寄与成分を探索した。

表 1 WPH の評価項目に対する香草および紅茶葉揮発性画分添加による風味強度^a

WPHへの添加サンプル ^b	評価項目					
	苦い	渋い	まずい	舌に残る	軽い	生臭い
コントロール ^c	3.56±0.24	3.44±0.29	4.67±0.29	3.89±0.39	2.33±0.37	3.56±0.53
タイム揮発性画分	2.89±0.42	2.89±0.39	3.22±0.32*	2.33±0.37	2.11±0.51	1.44±0.41*
ローズマリー揮発性画分	2.89±0.48	3.00±0.55	4.11±0.51	3.44±0.58	2.33±0.60	2.44±0.44
レモンバーム揮発性画分	2.89±0.39	3.00±0.37	4.22±0.36	2.78±0.57	1.67±0.41	2.78±0.60
カルダモン揮発性画分	2.44±0.56	2.33±0.67	2.89±0.42*	2.44±0.47	2.44±0.41	1.67±0.62
レモングラス揮発性画分	4.00±0.33	3.89±0.26	4.00±0.24	3.00±0.44	2.33±0.60	1.67±0.50
セイロン紅茶葉揮発性画分	1.78±0.32*	2.56±0.44	2.89±0.35*	2.22±0.40	2.56±0.41	2.22±0.49

^a 平均値 ± 標準誤差 (n=9). ^b 2.5%WPH 溶液 10mL に対し各サンプル 4μL 添加. ^c コントロールとして市販飲料用軟水を 4μL 添加. ^d p<0.05.

(2) タイムおよびセイロン紅茶葉由来揮発性画分の香気寄与成分の検索

タイムおよびセイロン紅茶葉の揮発性画分 100mL から得られた香気濃縮物の収量は、それぞれ 171mg および 41mg であった。最も高い FD-ファクターを示したのは両試料共通してリナロールであり、タイムで⁵、セイロン紅茶葉で⁵であった(表 2)。タイムやセイロン紅茶葉に含まれる香気成分としてリナロールが存在すること、さらにそれぞれの食品香気に寄与することはすでに多くの研究で明らかになっており、本研究の結果からも確認することができた。両試料共通してリナロールが寄与成分であったことから、WPH の「苦い」「まずい」「生臭い」の抑制に対して、リナロールが関与した可能性が考えられた。

表 2 タイムおよびセイロン茶葉留出液の香気寄与成分

化合物	匂いの質 ^a	FDファクター ^b	
		タイム	セイロン紅茶葉
1,8-cineol	herbal	5 ³	- ^c
hexyl acetate	citrus	-	5 ⁰
(Z)-2-pentanol	citrus	-	5 ⁰
1-octen-3-ol	mushroom-like	5 ³	-
(E,E)-2,4-heptadienal	fatty, oily, nutty	-	5 ⁰
camphor	camphor-like, sandy	5 ⁰	-
linalool	cistus	5 ⁶	5 ²
alpha-terpineol	herbal, green	5 ⁴	5 ¹
borneol	herbal, citrus	5 ¹	-
alpha-citral	citrus, medical	-	5 ⁰
nerol	lemon-like	5 ⁰	-
benzenemethanol	citrus, black tea-like	5 ⁴	-
p-cymen-7-ol	thyme-like, citrus	5 ⁰	-
thymol	grassy, Chinese herb-like	5 ⁴	-
isothymol	thyme-like, grassy	5 ³	-

^aGC-0 分析による各化合物ピークの匂いの特徴. ^bAEDA 法を用いて決定した各化合物の Flavor Dilution ファクター. ^c未検出.

(3) 全口腔法およびノーズクリップ法によるリナロール添加 WPH の風味評価

共通寄与成分として同定されたリナロールの閾値を三点比較法で検索した結果を表 3 に示した。

2.5%WPH 水溶液にリナロールを最終濃度が 0.02, 0.04, 0.06, 0.1, 0.14, 0.2μg/mL になるように添加した際、リナロールの濃度が 0.04 から 0.2μg/mL までの添加で有意に判別できることが示されたことから、本研究でのレトロナザルにおけるリナロールの検知閾値(味や匂いなどの感覚が生じる最小濃度)は 0.04μg/mL であることが明らかとなっ

た。さらに、リナロールの添加によって、0.06 から 0.2μg/mL までの添加でいずれも「ユズ様」の匂い(口腔内全体で感知した風味)の認知があったが、0.04μg/mL 添加では識別はできるものの匂いの認知は確認されなかった。

表 3 三点比較法によるリナロールの検知閾値の検索

濃度(μg/mL) ^a	回答数 ^b	正解数 ^c	検定 ^d	リナロールの匂いの認知 ^e
0.02	22	11		-
0.04	22	16	***	-
0.06	22	15	***	+
0.10	22	16	***	+
0.14	22	18	***	+
0.20	22	19	***	+

^a リナロール添加濃度(最終濃度). ^b 11 人のパネリストの合計回答数. ^c 11 人のパネリストの合計正解数. ^d 片側検定による有意差検定. ^e 「ユズ様」の匂いの認知の有無. ^{*}: p<0.0001. ⁻: 匂いの認知無. ⁺: 匂いの認知有.

口腔内全体での匂いの認知がないにもかかわらずプラセボとリナロール添加試料が有意に識別されたことから、リナロールの特徴的な「ユズ様」の匂いによる WPH の不快な風味のマスキングではなく、何らかの作用でリナロールが WPH の風味変化に影響したためと考えられた。そこで、本研究におけるリナロールの検知閾値を 0.04μg/mL とし、2.5% WPH 水溶液に添加して、QDA 法を用いた官能評価によって全口腔法とノーズクリップ法(鼻腔に匂いが流入しない状態)でその風味の変化を詳細に比較検討した。

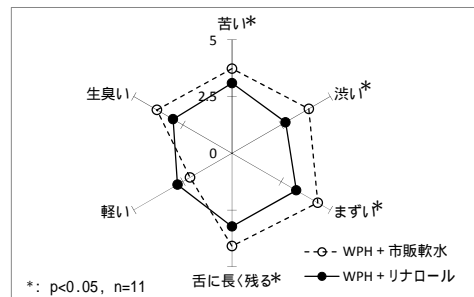


図 2-A 全口腔法による WPH の風味評価

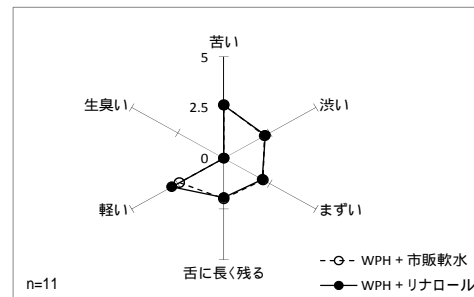


図 2-B ノーズクリップ法による WPH の風味評価

全口腔法による官能評価の結果を図 2-A に示した。検知閾値(最終濃度で 0.04μg/mL)となるようにリナロールを 2.5%WPH 水溶液 10mL に添加した試料と、コントロール(2.5% WPH 水溶液に蒸留水 2μL 添加した試料)を比較したところ、リナロール添加試料において、

「苦い」、「渋い」、「まずい」、「舌に長く残る」の評価項目で有意に減少することが示された。有意差はないが「生臭い」の評価項目においても弱くなる傾向が見られ、リナロールを検知閾値で添加することによる WPH の不快味改善が確認された。一方、ノーズクリップ法による官能評価の結果(図 2-B)、いずれの評価項目においても、コントロールとリナロール添加試料の間に有意な差はなかった。嗅覚における評価項目である「生臭い」では、いずれの試料においてもゼロであった。したがって、後鼻腔的にも匂いを感知しにくい状態では風味変化は起こらないことが明らかとなり、リナロールによる WPH の風味変化は、舌上でのリナロールの作用あるいは WPH とリナロールの反応による新しい化合物の生成ではなく、おそらく、味覚と嗅覚の相互作用によるものだと推察された。

以上をまとめると次の通りである。タイムやセイロン紅茶葉の揮発性画分は、ホエイタンパク質分解物の不快な風味を改善させる効果を有しており、その有効成分としてリナロールが特定された。リナロールは匂いの認知の無い検知閾値でホエイタンパク質分解物の不快な風味を有意に改善するが、ノーズクリップをして鼻腔に匂いが極力流入しない状態においては風味への影響は見られなかった。このことから、リナロールの風味改善は味覚と嗅覚の相互作用によるものであると考えられた。サプリメントなどの原料として広く利用されているホエイタンパク質分解物などの乳タンパク質分解物は、その風味改善はかねてからの課題であったが、タイムやセイロン紅茶葉、あるいは香料としてリナロールを添加することによって、不快味が軽減し、嗜好性も改善する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

ホエイタンパク質分解物からメイラード反応により生成する不快臭の抑制, 大畑素子, 中田創, 保坂茉里, 越智浩, 阿部文明, 有原圭三, 第 60 回香料・テルペンおよび精油科学に関する討論会講演要旨集, 123-125, 2016

Odor components generated by the production process of whey protein hydrolysates, Ohata M., Hosaka M., Nakada H., Ochi H., Abe F., Aeihara K. Abstract book of study on chemistry and biotechnology of functional foods and renewable natural resources, 1-0 01, 2015

[学会発表](計4件)

ホエイタンパク質分解物からメイラード反応により生成する不快臭の抑制, 大畑素子, 中田創, 保坂茉里, 越智浩, 阿部文明, 有原圭三, 第 60 回香料・テルペンおよび精油科学に関する討論会(東京農業大学) 2016年10月29日~31日

ホエイタンパク質分解物の製造過程において生成する香気成分, 保坂茉里, 大畑素子, 中田創, 越智浩, 阿部文明, 有原圭三, 日本食品科学工学会第 62 回大会(京都大学) 2015年8月27日~29日

Odor components generated by the production process of whey protein hydrolysates, Ohata M., Hosaka M., Nakada H., Ochi H., Abe F., Aeihara K. Study on chemistry and biotechnology of functional foods and renewable natural resources, 1st Bilateral Symposium (National University of Mongolia), 2015年7月9日~10日

乳清タンパク質分解物の特徴的な香気に寄与する成分の解明, 保坂茉里, 大畑素子, 中田創, 越智浩, 阿部文明, 有原圭三, 日本畜産学会第 119 回大会(宇都宮大学) 2015年3月28日~30日

6. 研究組織

(1)研究代表者

大畑 素子(OHATA MOTOKO)

京都教育大学・教育学部・講師

研究者番号: 60453510