

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26282016

研究課題名(和文) 褐変反応生成物の分子的研究 新たな低分子色素ならびに前駆体の同定と褐変機構の提唱

研究課題名(英文) Molecular study on products of browning reaction

研究代表者

村田 容常 (Masatsune, Murata)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：60210051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：褐変反応は、食品の加工、調理、貯蔵中に普遍的に起こる反応であるが、その反応生成物についての化学的解明は進んでいない。ここでは、褐変反応を分子レベルで明らかにするために、メイラード反応による新規な低分子色素を同定し、また新たな前駆体を同定することにした。その結果、キシロース・リシン系メイラード反応の主要中間体として4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(4-HMF)を同定した。本物質を加熱しその反応生成物を解析し、メチルグルオキサールやジアセチルなどのジカルボニル化合物を同定した。また、システインとグルコースのメイラード反応系から新規化合物(ピロロチアゾレートと命名)を単離同定した。

研究成果の概要(英文)：The browning reaction ubiquitously occurs during processing, cooking, and storage of food. But chemical structure of products is still unclear. Here we tried to clarify products of the browning reaction at the molecular level by finding novel low-molecular-weight pigments and an intermediate compound. As a result, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMF) was identified as a major intermediate compound in xylose-lysine. We further showed that dicarbonyl compounds such as methyl glyoxal and diacetyl were formed from HMF. We then isolated and identified a novel low-molecular-weight yellow pigment in a cysteine-glucose system, which has a pyrrolothiazole ring and named as pyrrolothiazolate.

研究分野：食品加工貯蔵学

キーワード：メイラード反応 褐変 黄色色素 システイン ジカルボニル トレオニン セリン

1. 研究開始当初の背景

褐変反応は、食品の加工、調理、貯蔵中に普遍的に起こる反応で、食品の品質に大きく影響する。しかし、褐変生成物メラノイジンは不均一高分子であるため、原理的に化学的な構造が決定できず、そのため多くの研究者が研究を避け研究の進捗が進んでいない。しかし、褐変現象は食生活上大変重要で、消費者の食行動に大きな影響を与えていることは言うまでもない。加熱調理したもの、長期貯蔵したもの、熟成過程を経たものは必ず褐変反応を起こしている。一方、近年我々は、弱酸性の酢酸緩衝液中のリシン・キシロース系メイラード反応において、新たな黄色色素ジピロロン類を同定し、それが溶液全体の色度の約30%を占めることを明らかにした。これはメラノイジンのみを考えていた従来の褐変機構からは全く異なるものであった。また、実際の食品として醤油を用い、低分子色素を探索した結果、含硫揮発成分と知られているチオフェノンを同定した

2. 研究の目的

このような流れの中でメイラード反応の化学を考えると、低分子色素化合物の分子レベルでの構造解析のような基礎データをさらに充実させる必要がある。本研究の目的は、褐変反応を分子レベルで解明するため、モデル系や食品より新規な低分子色素化合物を単離・構造解析するとともに、未知の褐変物質前駆体を同定し新たな褐変機構を提唱し褐変色素の分子構造や形成過程を推定することである。ここでは、キシロース・リシン系の反応溶液を用いて、反応中間体を同定し、その化合物と褐変の関係を明らかにすること、また、含硫色素としてチオフェノンを同定したことより、システイン由来の色素を見出し、その化学構造ならびに性状を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) キシロースとリシンを含むリン酸緩衝液 (pH 7) を 100°C で加熱した。この溶液を、ダイオードアレイ検出器 (DAD) を装着した HPLC (DAD-HPLC) で分析し、UV 吸収を示す主要反応中間体を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル溶液を濃縮中に結晶化したため、NMR、MS、X 線などの機器分析に供し、本物質を同定した。また、本物質の溶液を加熱し、その褐変度を評価するとともに、加熱中に生成してくるジカルボニル化合物を、ジアミノベンゼンでトラップし、DAD-HPLC ならびに LC-MS で分析した。また、生成したポリマーは DAD を装着した GPC-HPLC で分析した。

(2) L-システイン、L-リシン及びグルコースを含むモデルメイラード反応系を 120°C、3 時間加熱した。この反応液を酢酸エチルで洗浄後 pH を 2 以下にし、色素を酢酸エチルで抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフ

イー (溶離液; ジクロロメタン: 酢酸 = 20 : 1) ならびに逆相系カラムを用いた分取 HPLC (溶離液; 0.1% 酢酸水溶液) により色素 (ピロロチアゾレート) を単離・精製した。NMR、MS、X 線結晶解析などの各種機器分析により構造決定した。また、色素希釈法により色素寄与率を評価した。

(3) D-システイン、L-リシン及びグルコースを含むモデルメイラード反応系から、DAD-HPLC 上ピロロチアゾレートと同一の挙動を示す化合物をピロロチアゾレートと同様の方法で単離し、CD スペクトルを測定した。また 1-¹³C-D-グルコースを用いた反応溶液からピロロチアゾレートを精製し、¹³C-NMR 分析に供し、どの部分に ¹³C が取り込まれたかを調べた。また、ピロロチアゾレートの抗酸化活性 (DPPH ラジカルスカベンジャー活性、リノール酸酸化阻害活性、SOD 様活性) を評価した。

(4) L-システイン、L-トレオニン及びグルコースもしくは L-システイン、L-セリン及びグルコースを含むモデルメイラード反応系を 120°C で加熱した。この反応液を酢酸エチルで洗浄後 pH を 2 以下にし、色素を酢酸エチルで抽出し、DAD-HPLC 分析に供し、ピロロチアゾレート用の UV-Vis スペクトルを示すピークを探索した。同様の抽出液を多量調製し、DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーならびに逆相系カラムを用いた分取 HPLC (メタノール: 酢酸: 水系) により色素 (ピロロチアゾレート A 及び B) を単離・精製した。NMR や MS などの各種機器分析により構造を決定した。

4. 研究成果

(1) キシロースとリジンのメイラード反応溶液中に、280 nm に極大吸収を示す主要ピークを、DAD-HPLC で見いだした。このピークを単離し、機器分析により 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(HMFO; 図 1) と同定した。

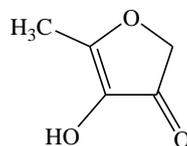


図 1 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(HMFO)

このピークは 280nm におけるクロマトグラムの 60-80% を占め、200 mg/100 ml のキシロースから約 20 mg/100 ml の HMFO が生成した。HMFO はアラビノースやリボースからも生成し、リボースが最も良い基質であった。リジン存在下および非存在下で、加熱により HMFO は分解重合し、無色や有色のポ

リマーを形成した。ジアセチルやメチルグリオキサールが HMFO の主要分解ジカルボニルであり、これらのジカルボニル化合物がポリマーになると考えられた (図 2)。

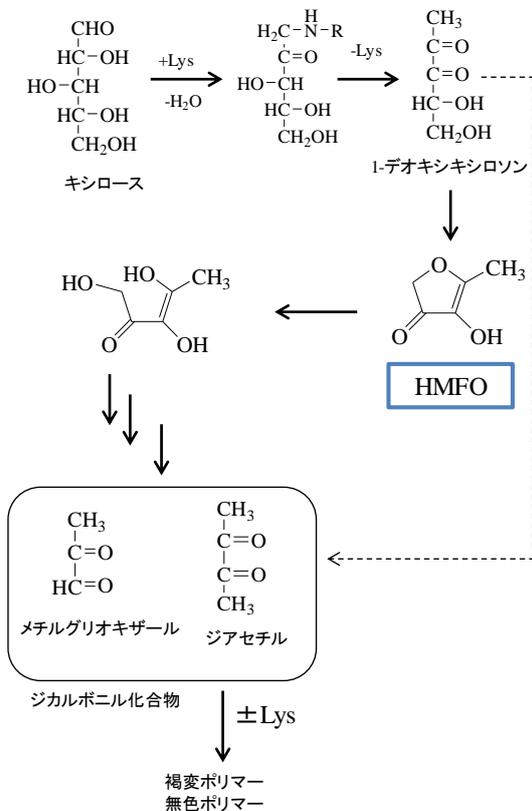


図 2 キシロース・リシン系メイラード反応における 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フランソソ (HMFO) の形成と褐変に対する役割

(2) L-システイン、L-リジン及びグルコースを含むモデルメイラード反応系から新規な黄色色素を、各種クロマトグラフィーを用い単離し、機器分析によりその構造を決定した。本色素はカルボン酸を有するジヒドロピロロチアゾール環を有する新規化合物であり、ピロロチアゾレートと命名した (図 3)。本化合物は酸性ないし中性下で、300 および 360 nm に極大吸収を示し、アルカリ性では 320 ならびに 400 nm に極大吸収を示した。ピロロチアゾレートは、システインとグルコースのモデル系での主要な低分子メイラード色素であり、その生成はリジンの添加により増大した。100 mM システイン、200 mM リジン及び 300 mM グルコースを含む酢酸バッファーないしリン酸バッファーを 110°C、2 時間加熱すると、1~2 mg/mL のピロロチアゾレートが生成した。モデル溶液での色素寄与率は約 0.8%であった。

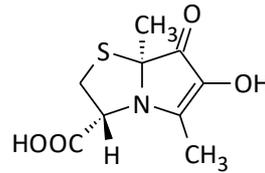


図 3 ピロロチアゾレート

(3) ピロロチアゾレート生成の反応溶液中の L-システインを D-システインに変え、色素を単離した結果、CD スペクトルがピロロチアゾレートと対称な形を示し、NMR などの機器分析データがピロロチアゾレートと一致する化合物を単離し、D-システインからはピロロチアゾレートのエナンチオマーが形成されることを示した。また、グルコースのラベル体を用いた実験では、グルコースの 1 位がピロロチアゾレートの二つのメチル基に取り込まれた。ピロロチアゾレートは 1-デオキシグルコソソ経路で形成され、1-デオキシグルコソソの脱水物とシステインのチオール基ならびにアミノ基と縮合し、更に脱水環化することでピロロチアゾレートが形成されると考えられた。ピロロチアゾレートは抗酸化性、ラジカルスカベンジャー活性を示した。

(3) システインとグルコースとのメイラード反応により生成するピロロチアゾレートは、色素団としてピロロチアゾール骨格を有している。ピロロチアゾレートの反応機構を考慮し、システインをスレオニンやセリンに変えることで、グルコース存在下、ピロロチアゾレート骨格を有するメイラード色素が形成されるかどうかを DAD-HPLC を用いて調べた。その結果、ピロロチアゾレートに類似した UV-Vis スペクトルを示す化合物が検出された。そこで、それらを各種クロマトグラフィーで単離し、その構造を機器分析により決定した。その結果、ピロロチアゾール骨格を有する二つの新規黄色色素 ピロロチアゾレート A 及び B をスレオニン-グルコース反応溶液ならびにセリン-グルコース反応溶液からそれぞれ単離し、その化学構造を明らかにした (図 4)。

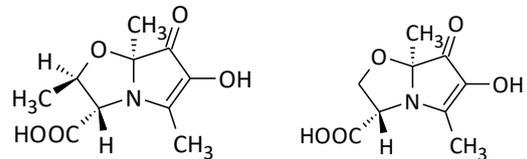


図 4 ピロロチアゾレート A (左) 及び B (右)

両色素は、酸性及び中性では 300 と 360 nm に極大吸収を示し、アルカリ性では 320 と 390nm に極大吸収を示した。構造的にはピロロチアゾレートの S が O に置換した類縁体であった。ピロロチアゾレート A 及

びBのモデル溶液における色素寄与率は1~2%程度であった。

また、その生成経路をピロロチアゾレートと比較して考えると、トレオニンとセリンのアミノ基が1-デオキシグルコソン由来のカルボニル化合物と縮合しピロロオキサゾール骨格を形成すると考えられた。ピロロチアゾレートとピロロチアゾレートの生成経路の概略を図5に示した。

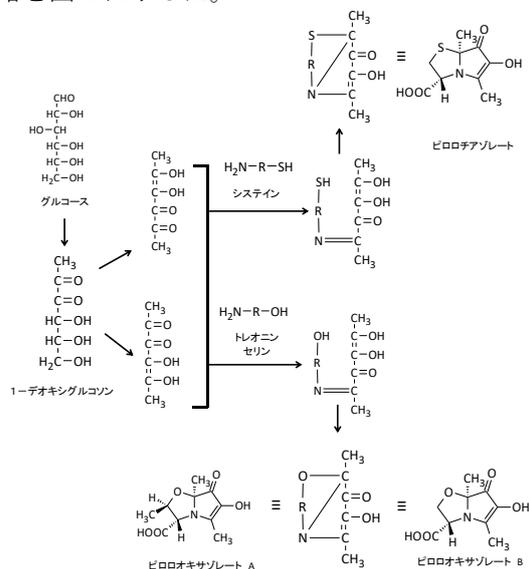


図5 ピロロチアゾレートとピロロチアゾレートの予想生成経路

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 6件)

- ① Yoko Mikami, Miki Nakamura, Shinji Yamada, and Masatsune Murata: 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMFO) contributes to browning in xylose-lysine Maillard reaction system, *Food Science and Technology Research*, 査読有、**23**, 283-289 (2017). DOI: 10.3136/fstr.23.283
- ② Asuka Igoshi, Yui Sato, Kumi Kameyama, and Masatsune Murata: Galactose is the limiting factor for the browning or discoloration of cheese during storage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 査読有、**63**, 412-418 (2017).
- ③ Kyoko Noda and Masatsune Murata: Two novel pyrrolooxazole pigments formed by the Maillard reaction between glucose and threonine or serine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、**81**(2), 267-274 (2017). DOI:10.1080/09168451.2016.1240607
- ④ Kyoko Noda, Naoko Terasawa, and

Masatsune Murata: Formation scheme and antioxidant activity of a novel Maillard pigment, pyrrolothiazolone, formed from cysteine and glucose. *Food & Function*, 査読有、**7** (6), 2551-2556 (2016). DOI: 10.1039/c5fo01625h

- ⑤ Yoko Mikami and Masatsune Murata: Effects of sugar and buffer types, and pH on formation of Maillard pigments in the lysine model system. *Food Science and Technology Research*, 査読有、**21** (6), 813-819 (2015). DOI: 10.3136/fstr.21.813
- ⑥ Kyoko Noda, Shinji Yamada, and Masatsune Murata: Isolation, identification, and formation conditions of a novel Maillard yellowish pigment, pyrrolothiazolone. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、**79** (8), 1350-1355 (2015). DOI: 10.1080/09168451.2015.1018127

[学会発表] (計 15件)

- ① 野田響子、寺沢なお子、島村裕子、村田容堂：ピロロチアゾール系メイラード色素の生物活性と食品中の分布、2017年度日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都女子大学、京都
- ② 中村美月、村田容堂：ペントース系メイラード反応の褐変における4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンの役割、2017年度日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都女子大学、京都
- ③ 野田響子、山田眞二、寺沢なお子、島村裕子、村田容堂：ピロロチアゾールならびにピロロオキサゾール構造を有する新規、メイラード黄色色素について—単離、構造決定、性状および生成機構—、第26回日本メイラード学会、2016年11月11日、つくば国際会議場、つくば
- ④ 中村美月、見上葉子、村田容堂：ペントース系メイラード反応におけるジカルボニル化合物の消長、第26回日本メイラード学会、2016年11月11日、つくば国際会議場、つくば
- ⑤ 井越明日香、佐藤由衣、亀山久美、村田容堂：チーズの貯蔵褐変とメイラード反応、2016年度日本農芸化学会大会、2016年3月29日、札幌コンベンションセンター、札幌
- ⑥ 野田響子、村田容堂：スレオニン・グルコースならびにセリン・グルコース系メイラード反応で形成される新規ピロロオキサゾール色素について、2016年度日本農芸化学会大会、2016年3月29日、札幌コンベンションセンター、札幌
- ⑦ 野田響子、山田眞二、寺沢なお子、村田容堂：新規色素メイラードピロロチアゾレートについて：単離、同定、性質及び生成経路、2015年度日本農芸化学会関東支部

大会、2015年9月26日、お茶の水女子大学、東京

- ⑧ 井越明日香、佐藤由衣、亀山久美、村田容常：チーズの貯蔵褐変の要因解析 2015年度日本農芸化学会関東支部大会、2015年9月26日、お茶の水女子大学、東京
- ⑨ Masatsune Murata, Shinji Yamada, and Yoko Mikami. Proposal of a browning mechanism via 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMF0) in xylose-lysine Maillard reaction system. 12th International Symposium on the Maillard reaction 2015. Sep. 1-4, 2015, University of Tokyo, Tokyo.
- ⑩ Yui Sato, Kumi Kameyama, Asuka Igoshi, Masatsune Murata. Browning of cheese during storage happens by the Maillard reaction. 12th International Symposium on the Maillard reaction 2015. Sep. 1-4, 2015, University of Tokyo, Tokyo.
- ⑪ Kyoko Noda, Shinji Yamada, Naoko Terasawa, and Masatsune Murata. Novel yellowish Maillard pigment, pyrrolothiazolate, formed from cysteine and glucose. 12th International Symposium on the Maillard reaction 2015. Sep. 1-4, 2015, University of Tokyo, Tokyo.
- ⑫ 野田響子、山田眞二、村田容常：システイン・グルコース系メイラード反応溶液からの新規色素ピロロチアゾレート (pyrrolothiazolate) の単離、同定と生成条件について、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学、岡山
- ⑬ 見上葉子、山田眞二、村田容常：キシロース・リジン系メイラード反応における 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン経路の褐変機構の提唱、2015 年 3 月 28 日、岡山大学、岡山
- ⑭ 見上葉子、山田眞二、村田容常：キシロース-リジン系メイラード反応により形成される主要反応生成物としての 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone の同定と褐変との関連について、第 24 回日本メイラード学会、2014 年 11 月 7 日、熊本国際交流会館、熊本
- ⑮ 見上葉子、山田眞二、村田容常：キシロース-リジン系メイラード反応により形成される主要反応生成物の同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 容常 (MURATA, Masatsune)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：60210051

(2) 研究分担者

寺沢 なお子 (TERASAWA, Naoko)

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：00227513

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし