

氏名	中島敬子
学位の種類	博士(学術)
学位記の番号	乙第65号
学位授与年月日	2015(平成27)年2月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	食品由来メイラード反応生成物の構造解析および反応機構の解析
論文審査委員	主査 本間 健 (人間発達学専攻 教授) 副査 新藤一敏 (生活環境学専攻 教授) 副査 藤井恵子 (生活環境学専攻 准教授) 副査 大塚 讓 (お茶の水女子大学名誉教授、戸板女子短期大学教授)

### 論文の内容の要旨

食品の貯蔵・加工・調理の過程において、食品の構成成分であるアミノ基とカルボニル基の間で非酵素的な反応が生じる。この反応は生化学者 L. C. Maillard により発見され、メイラード反応と呼ばれている。食品科学や食品産業の分野では、メイラード反応により味、色、香りおよび有害物質の生成や、食感の変化がもたらされることから、食品の品質向上・劣化の双方に関与する反応であるとみなしている。また、近年では抗酸化作用や血圧降下作用など保健的機能を有する反応であることが明らかになりつつある。

そこで、本研究は食品由来メイラード反応生成物の構造解析、および生成物の反応機構を解明することを目的として、3章で構成され、アミノ酸・ペプチド・タンパク質を用いたモデル実験(研究1、2)およびタンパク質源である肉や魚を用いた調理実験(研究3、4)を行った。

#### 第1章：アミノ酸、ペプチド、タンパク質とグルコース (Glc) のメイラード反応に及ぼす塩類の効果

##### 【研究1】

メイラード反応に影響を及ぼす因子としては、糖の還元能、pH、加熱温度、加熱時間、共存金属イオンなどがあげられ、メイラード反応におけるこれら因子の役割については多数報告されている。しかしながら、食品中に多く存在する食塩などの塩類の影響について調査した報告はほとんどない。日本では醤油や味噌など高濃度の塩類を含む食品が多いことから、塩類のメイラード反応に及ぼす影響を解明することが望まれる。そこで第1章では、数種のアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質を用いて、メイラード反応における塩類の濃度変化が及ぼす影響について検討を行った。アミノ酸の褐変度およびタンパク質の褐変度、重合度、リシン残存率の結果により、塩類のイオン強度の増加に伴いメイラード反応の進行が抑制されることが示唆された。塩類のイオン強度を調節することによってメイラード反応を制御することは、食品加工および栄養学上において極めて重要であると思われる。

## 第2章：Glc 修飾ペプチド LEKFD の修飾パターンおよびペプチド分解・架橋についての解析 [研究2]

近年、メイラード反応ペプチド(MRPs)が食品の品質に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかし、メイラード反応中におけるMRPsのペプチド分解や架橋についての研究はあまり行われていない。そこで第2章では、 $\beta$ -ラクトグロブリンの構造中に含まれるペプチド LEKFD を用いて、メイラード反応中における Glc 修飾パターンを解析するとともに、ペプチド分解および架橋の解明についても検討を行った。質量分析を行った結果、メイラード反応により Glc 修飾ペプチドのイミニウムイオン、ピリリウムまたはヒドロキシメチルフリリウムイウム等が生成した可能性が示唆された。分子軌道計算を行った結果、Glc 修飾ペプチドはペプチド結合の N 原子の部位で結合が切断される可能性が示唆された。フォトダイオードアレイ検出システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって分析した結果、加熱中においてMRPsのペプチド分解および架橋が生じる可能性が明らかとなった。本結果は、MRPsのペプチド分解や架橋について解明する上で極めて重要な情報であるといえる。

## 第3章：食肉製品の調理中に起こるメイラード反応の消長と安全性の検討 [研究3, 4]

食品の加工や調理の過程において、メイラード反応により様々な香気成分や色素、危害物質が生成される。したがって、調理条件とメイラード反応生成物の関係を明らかにすることは大変重要である。そこで第3章では、牛肉中メイラード反応生成物の生成に及ぼす調理法の影響について検討を行った。アマドリ転位生成物の生成はフライパン焼きと揚げでは急速に増加したがオープン加熱では始め緩やかに増加した。また、オープン加熱で調理した牛肉は他の2つの調理方法に比べて蛍光の増加速度が低かった。さらに、魚肉についても検討を行った結果、アマドリ転位生成物の生成は、揚げでは急速に増加したがフライパン焼きおよびオープン加熱では緩やかに増加した。また、オープン加熱で調理した魚肉は他の2つの調理方法に比べて蛍光の増加速度が低かった。危害物質である4(5)-メチルイミダゾール(4(5)-MI)は、加熱後14分以降の揚げおよび加熱後30分のフライパン焼きで、高い濃度の生成が確認された。加熱による牛肉および魚肉中のメイラード反応生成物の生成は、オープン加熱のほうが他の調理法よりも制御可能であることが示唆された。

以上3つの章からなる研究により、食品由来メイラード反応生成物の反応機構には塩類および調理法が強く関連し、危害物質の生成も調理法により制御可能であることを明らかにした。さらに、食品の加工・調理の過程で、MRPsのペプチド分解・架橋が生じる可能性が示され、新規の機能性ペプチドが見出されることが期待される。

## **Structure analyses of food-derived Maillard reaction products and clarification of the Maillard reaction mechanism.**

**Keiko Nakajima**

Maillard reaction products are widely used as functional substances that can be generated safely and efficiently and contribute to taste, aroma, color, texture and biological activity. Whereas, it is now known that various kinds of toxic substances are generated in food processing and cooking by the Maillard reaction. Therefore, the aim of studies is to the structure analyses of food-derived Maillard reaction products and clarification of the Maillard reaction mechanism. This report consists of three chapters that model experiments using amino acid, peptides and proteins [studies 1 and 2] and cooking experiments using meat and fish meat [studied 3 and 4].

### **Chapter 1 [study 1] :**

#### **Effect of salt concentration on the reaction rate of Glc with amino acids, peptides and proteins.**

It is well known that pH, reaction temperature, and reaction time influence the Maillard reaction. On the other hand, food contains various amounts of salt, and the traditional foods of Japan, such as soy paste and soy sauce, contain high concentrations of sodium chloride. There is a possibility that salt affect the reaction rate of the Maillard reaction. However, the effects of salt on the various amino acids, peptides, and proteins were not studied in detail. In study 1, we investigated the effects of salt concentration on the rates of the browning reaction of amino acid, peptides, and proteins. A high concentration of sodium chloride retarded the reaction rate of Glc with amino acids as measured with browning degree. On the other hand, a high concentration of sodium chloride retarded the reaction rate of Glc with proteins as measured with browning degree, polymerization degree or by the loss of Lys. It is hoped that the results of this study will be applied in the control of amino-carbonyl reaction rates in the food industry.

### **Chapter 2[study 2] :**

#### **Glycation pattern, thermal degradation and cross-linking of LEKFD modified with glucose.**

Maillard reaction peptides (MRPs) contribute to taste, aroma, color, texture and biological activity. However, peptide degradation or the cross-linking of MRPs in the Maillard reaction has not been investigated clearly. A peptide of LEKFD, a part of  $\beta$ -lactoglobulin, was heated with glucose and the reaction products were analyzed by MS, MS/MS and HPLC with gel-filtration column and DAD detector. In fractions, an imminium ion of LEK\*FD, a pyrylium ion or a hydroxymethyl furylium ion of LEK\*FD were detected by MS, MS/MS. Therefore, those products may be produced by the Maillard reaction. The molecular orbital of glycated LEKFD was calculated by MOPAC. These calculation

results suggest that glycated peptides may be degraded at their N atoms. HPLC with gel-filtration column showed cross-linking and degradation of peptides.

### **Chapter 3[study 3, 4] :**

#### **Morbidity and safety for the Maillard reaction occurred during cooking of meat products.**

During food processing and cooking, various flavor compounds, colored substances, and toxic substances are produced by the Maillard reaction. To investigate the relationship between Maillard reaction products and actual cooking conditions, we investigated the effects of seasonings and cooking conditions on the Maillard reaction of meat by measuring the content of furosine, fluorescent compounds, or 4(5)-methylimidazole [4(5)-MI]. The amount of amadori rearrangement product of seasoned and unseasoned meat increased rapidly when pan-broiled and fried but increased slowly during the initial stages of baking. On the other hand, the amount of amadori rearrangement product of seasoned and unseasoned fish meat increased rapidly when fried but increased slowly during the initial stages of pan-broiling and baking. The rate of increase in the fluorescence of baked meat and fish meat was lower than that of meat and fish meat subjected to other cooking methods. Both seasoned and unseasoned fish meat fried for longer than 14 min or pan-broiled for 30 min contained a high level of 4(5)-MI. Therefore, the formation of Maillard reaction products in meat was better controlled by baking in a gas oven than by cooking by other methods.

The present studies demonstrated that: (1) salt concentration and cooking conditions have a strong correlation with the reaction mechanism of food-derived Maillard reaction products, (2) baking does reduce the products of the Maillard reaction in meat and therefore seems to be the optimal cooking method in terms of both food quality and food safety, (3) it was found that both peptide degradation and peptide cross-linking occur in the Maillard reaction and therefore the Maillard reaction products with functional properties may be produced from glycated peptide.

#### 論文審査結果の要旨

食品の貯蔵・加工・調理の過程において、食品の構成成分であるアミノ基とカルボニル基の間で非酵素的な反応が生じる。この反応はメイラード反応と呼ばれ、味、色、香りおよび有害物質の生成や、食感の変化をもたらされることから、食品の品質向上・劣化の双方に関与する反応であるとみなしている。また、近年では抗酸化作用など保健的機能を有する反応であることが明らかになりつつある。

本研究は食品由来メイラード反応生成物の構造解析、および生成物の反応機構を解明することを目的として、3章で構成され、アミノ酸・ペプチド・タンパク質を用いたモデル実験（研究1、2）およびタンパク質源である肉や魚を用いた調理実験（研究3、4）を行っている。

## 第1章：アミノ酸、ペプチド、タンパク質とグルコース (Glc) のメイラード反応に及ぼす塩類の効果 [研究1]

日本では醤油や味噌など高濃度の食塩を含む食品が多いが、食塩などの塩類のメイラード反応に及ぼす影響について調査した報告はほとんどない。そこで第1章では、数種のアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質を用いて、メイラード反応における塩類の濃度変化が及ぼす影響について検討を行っている。その結果、食塩類がメイラード反応の後期過程を抑制することが初めて明らかとなった。一方、反応の初期段階のアマドリ転換反応は抑制しないことも初めて明らかとなっている。つまり、食塩類は、褐変の進行は抑えるが、栄養学的な劣化は抑制できないことが明らかとなった。

## 第2章：Glc 修飾ペプチド LEKFD の修飾パターンおよびペプチド分解・架橋についての解析 [研究2]

近年、メイラード反応ペプチド (MRPs) が食品の品質に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつあるが、MRPs のペプチド分解や架橋についての研究はあまり行われていない。そこで第2章では、 $\beta$ -ラクトグロブリンの構造中に含まれるペプチドを用いて、メイラード反応中における Glc 修飾パターンを解析すると共にペプチド分解および架橋の解明についても検討を行っている。質量分析およびゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った結果、メイラード反応により Glc 修飾ペプチドのイミニウムイオン等が生成した可能性が示唆され、ペプチド分解および架橋も生じる可能性が明らかとなった。また、分子軌道計算を行った結果、Glc 修飾ペプチドはペプチド結合の N 原子の部位で結合が切断される可能性が示唆された。

本章では MRPs の形成に関する基礎的な知見を提示している。このことは粉ミルク等の食品に係わる劣化反応に関する知見としてもとらえることができ、食品劣化に関する新しい知見も提示したとも評価できる。

## 第3章：食肉製品の調理中に起こるメイラード反応の消長と安全性の検討 [研究3, 4]

調理の過程において、メイラード反応により様々な香気成分や色素、有害物質が生成されることから、調理条件とメイラード反応生成物の関係を明らかにすることは大変重要である。そこで第3章では、食肉製品 (牛肉・魚肉) 中のメイラード反応生成物の生成に及ぼす調理法の影響について検討を行っている。アマドリ転位生成物の生成量は、揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の3種の調理法で明らかな差がみられなかった。また、オーブン加熱で調理した食肉製品は他の調理法に比べて蛍光物質の増加速度が低かった。有害物質である 4(5)-メチルイミダゾール (4(5)-MI) は、魚肉の揚げおよびフライパン焼きで、高い濃度の生成が確認された。以上の結果により、加熱による食肉製品中のメイラード反応生成物の生成は、オーブン加熱のほうが他の調理法よりも制御可能であることが示唆された。

本章は日常調理での有害物質の生成制御の可能性を初めて明らかとしており、調理科学的視点から見ても高く評価できる。

以上3つの章からなる研究により、食品由来メイラード反応生成物の反応機構には塩類および調理法が強く関連し、有害物質の生成も調理法により制御可能であることを明らかにした。今後の研究の発展として、食品の加工・調理の過程で、MRPs のペプチド分解・架橋が生じる可能性が示されたことより、新規の機能性ペプチドが見出されることも期待される。また、メイラード反応によって生じる有害物質は、4(5)-MI の他にもヘテロサイクリックアミンや AGEs など多数あるため、質量分析計を用いてそれら有害物質を簡便に分析する方法の検討も期待される。メイラード反応によって生じるペプチド分解・架橋につ

いても、さらなる詳細なメカニズムを解明することも期待される。

本論文は、食品科学の分野で重要であるにもかかわらず十分解明されていないメイラード反応をモデル系及び実際の調理条件で分析し、具体的に食品の加工、貯蔵、調理と関連付けて詳細に検討したもので、実際の生活で大きな意味のある科学的発見をもたらしており、その発想の独創性、方法論、分析手法等も的確であり、考察態度も適切で、高いレベルにあると考えられ、また、実際に一部は論文化して高いレベルの学会誌にも掲載されている。

以上より、審査委員会一同、学位（博士）にふさわしいものと考え、ここに推薦するものである。