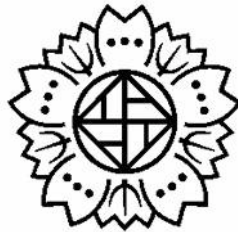


日本女子大学博士学位論文

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明

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

2015.3



中 島 敬 子

## 目 次

序 論 .....	1
第 1 章 アミノ酸、ペプチド、タンパク質とグルコースの メイラード反応に及ぼす塩類の効果 [研究 1] .....	4
1-1. 緒言 .....	4
1-2. 実験方法 .....	5
1-2-1. メイラード反応生成物の調製	
1-2-2. メイラード反応生成物の褐変度測定	
1-2-3. タンパク質重合度の測定	
1-2-4. タンパク質の Lys 残存率の測定	
1-2-5. タンパク質のアマドリ転位生成物の定量	
1-2-6. 統計解析	
1-3. 結果 .....	11
1-3-1. NaCl 添加アミノ酸試料の褐変度	
1-3-2. 無機塩類添加 Lys 試料の褐変度	
1-3-3. NaCl 添加ペプチド試料の褐変度	
1-3-4. NaCl 添加タンパク質試料の褐変度	
1-3-5. NaCl 添加タンパク質試料の重合	
1-3-6. NaCl 添加タンパク質試料の Lys 残存率	
1-3-7. NaCl 添加タンパク質試料のアマドリ転位生成物の生成	
1-4. 考察 .....	16
1-5. 要旨 .....	20
Figures .....	21
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] .....	31
2-1. 緒言 .....	31
2-2. 実験方法 .....	32
2-2-1. Glc 修飾ペプチド LEKFD (MRPs) の調製	
2-2-2. MRPs の m-アミノフェニルボロン酸によるアフィニティ ー・クロマトグラフィー	
2-2-3. MRPs の HPLC 分析	
2-2-4. MRPs の ESI-MS および ESI-MS/MS 分析	

2-2-5.	MRPs の MOPAC2006 による幾何学最適化	
2-2-6.	MRPs のフォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラムの連続測定	
2-3.	結果	36
2-3-1.	MRPs の m-アミノフェニルボロン酸カラムによる非吸着画分および吸着画分の HPLC クロマトグラム	
2-3-2.	HPLC による MRPs 分画の MS および MS/MS 分析	
2-3-3.	MRPs の半経験的分子軌道計算	
2-3-4.	MRPs のフォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラム	
2-4.	考察	39
2-5.	要旨	42
	Tables and Figures	43

### 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]	52
---------------------	----

#### 実際の調理に即した条件下における牛肉製品中の メイラード反応生成物の評価 [研究 3]

3-1.	緒言	54
3-2.	実験方法	54
3-2-1.	メイラード反応生成物の調製	
3-2-2.	糖類および NaCl 添加 Lys の褐変度測定	
3-2-3.	糖類および NaCl 添加 Lys のアマドリ転位生成物の定量	
3-2-4.	糖類および NaCl 添加牛肉（フライパン焼き）のアマドリ転位生成物の定量	
3-2-5.	上白糖および NaCl 添加牛肉（3 種の加熱法）のアマドリ転位生成物の定量	
3-2-6.	調味料無添加牛肉（3 種の加熱法）の蛍光強度測定	
3-2-7.	統計解析	
3-3.	結果	59
3-3-1.	糖類および NaCl 添加 Lys 試料の褐変度	
3-3-2.	糖類および NaCl 添加 Lys 試料のアマドリ転位生成物の生成	
3-3-3.	糖類および NaCl 添加牛肉試料（フライパン焼き）のアマドリ転位生成物の生成	

3-3-4.	上白糖および NaCl 添加牛肉試料（3 種の加熱法）のアマ ドリ転位生成物の生成	
3-3-5.	調味料無添加牛肉試料（3 種の加熱法）の蛍光物質の生成	
3-4.	考察	63
3-5.	要旨	67
	Tables and Figures	68

#### 実際の調理に即した条件下における魚肉製品中の

##### メイラード反応生成物の評価 [研究 4]

4-1.	緒言	78
4-2.	実験方法	78
4-2-1.	上白糖および NaCl 添加魚肉の調製（3 種の加熱法）	
4-2-2.	上白糖および NaCl 添加魚肉のアマドリ転位生成物の定量	
4-2-3.	上白糖および NaCl 添加魚肉の蛍光測定	
4-2-4.	上白糖および NaCl 添加魚肉の 4(5)-MI の定量	
4-2-5.	統計解析	
4-3.	結果	82
4-3-1.	上白糖および NaCl 添加魚肉の加熱による変化	
4-3-2.	上白糖および NaCl 添加魚肉試料（3 種の加熱法）のアマ ドリ転位生成物の生成	
4-3-3.	上白糖および NaCl 添加魚肉試料（3 種の加熱法）の蛍光 物質の生成	
4-3-4.	上白糖および NaCl 添加魚肉試料（3 種の加熱法）の 4(5)-MI の生成	
4-4.	考察	85
4-5.	要旨	90
	Tables and Figures	91
第 3 章	結語	98

総 括	99
-----	----

Summary	102
---------	-----

参 考 文 献	106
---------	-----

謝 辞	118
-----	-----



## 序 論

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 1912 年にフランスの生化学者 L. C. Maillard により発見され、メイラード反応（アミノ・カルボニル反応）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って味、色、香りの生成およびテクスチャー（食感）の変化がもたらされることから、食品の品質向上・品質劣化の双方に関与する反応であるとみなしている<sup>1)</sup>。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<sup>2-5)</sup>。

食品の貯蔵、加工、調理の際に生じるメイラード反応を制御することは、食品の品質維持・向上させるうえで重要である。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<sup>6-9)</sup>。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。高濃度の NaCl 添加が、メイラード反応によるアミノ酸の褐変を著しく阻害させることが報告されている<sup>10)</sup>。しかし、様々な種類の塩類によるアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質のメイラード反応に及ぼす影響については不明な点が多い。日本では味噌や醤油など高濃度の食塩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。

近年、メイラード反応したペプチド（Maillard reaction peptides : 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。なかでも風味に関する MRPs の研究は数多く行われている<sup>11-19)</sup>。例えば、大豆たんぱく質由来 MRPs がコンソメスープ中でこく味を増強させ、うま味を含む風味に対して

強い影響を与えることが報告されている<sup>11)</sup>。また、MRPsの抗酸化活性についても幾つか報告されている<sup>20, 21)</sup>。例えば、鶏タンパク質の加水分解物由来のMRPsは、還元力を有し貯蔵中のソーセージの脂質酸化を妨げることから、強い抗酸化活性を示すことが明らかとなっている<sup>20)</sup>。さらに、MRPsの香気成分についても注目され、グルタチオンおよびグリシン由来ペプチドから生成したMRPsや、リジン含有MRPであるピラジンが香気成分として報告されている<sup>22-24)</sup>。一方で、質量分析(Mass Spectrometry : MS)法によるMRPsの構造解析が多数行われ<sup>25-28)</sup>、分析のイオン源としてはエレクトロスプレーイオン化(Electrospray ionization : ESI)法やマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-assisted laser desorption ionization : MALDI)法などが用いられている<sup>26, 29-31)</sup>。さらに、質量分析計を直列に結合させたタンデム質量分析(MS/MS)法を用いることで、MRPsの詳細な構造情報を取得することが可能である<sup>26, 29, 31)</sup>。しかし、メイラード反応中に生じるMRPsのペプチド分解や架橋についての情報はほとんど得られていない。MRPsの有する機能を損なわずに維持するためには、MRPsのペプチド分解や架橋についての解明が望まれる。

また、食品の加工および調理の過程において、ヘテロサイクリックアミン(HCA)<sup>32, 33)</sup>やアクリルアミド<sup>34)</sup>、4(5)-メチルイミダゾール(4(5)-MI)<sup>35, 36)</sup>などの様々な発がん性を有する危害物質がメイラード反応により生成することが知られている。よって、食品の品質および安全を確保するためには、メイラード反応生成物の生成に及ぼす加工および調理条件の影響を解明することは極めて重要である。さらに、メイラード反応の後期段階では後期糖化生成物(Advanced glycation end products : AGEs)が生成する。生体内で生じるAGEsの場合、高血糖を伴う様々な疾病(例えば糖尿病、白内障、腎臓疾患、動脈硬化、神経変性疾患など)の進展に関与することが明らかとなっている<sup>37)</sup>。一方、食事性

AGEs は吸収されても大半が腎臓により速やかに排泄されるためヒトの健康に害を与える可能性は低いといった報告がある<sup>38)</sup>。しかし、食事性 AGEs の生体内における生理作用については詳細に解明されておらず、さらに、実際の加工・調理条件における食事性 AGEs の詳しい形成メカニズムも未だ明らかにされていない。

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、および生成物の形成に影響を及ぼす因子を解明することを目的として、3 章（研究 1～4）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[研究 1]：アミノ酸、ペプチド、タンパク質とグルコースのメイラード反応に及ぼす塩類の効果

第 2 章[研究 2]：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

第 3 章[研究 3、4]：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

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

## 1-1. 緒言

メイラード反応により食品の味、色、香りおよびテクスチャーの変化がもたらされることから<sup>1)</sup>、食品の品質維持・向上させるうえでメイラード反応に影響を及ぼす因子を制御することは、貯蔵、加工、調理の過程において極めて重要である。メイラード反応は、糖の還元能、pH、加熱温度、加熱時間、共存金属イオンなどによって影響を受けることが知られている<sup>6-9)</sup>。一方、食品中に多く存在する食塩などの塩類の影響については未だ解明されていない。メイラード反応によるアミノ酸の褐変は、金属イオン（特に  $\text{Fe}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$ ）の存在下で加速する傾向にあるが、高濃度の  $\text{NaCl}$  添加により著しく阻害されることが報告されている<sup>10)</sup>。しかし、様々な種類の塩類によるアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質のメイラード反応に及ぼす影響については不明な点が多い。日本の伝統的な食品に味噌および醤油があるが、これらの食品の発酵・熟成の工程において、メイラード反応が深く関与している<sup>39)</sup>。さらに、保水性を向上させるために一般的に味噌には食塩が12%前後、醤油には15%前後添加されている<sup>40)</sup>。また、メイラード反応が起こる際に、アミノ化合物はアニオンの形でカルボニル化合物と反応することが知られていることから<sup>41)</sup>、食品中の塩類から生じるイオンがメイラード反応に影響を及ぼす可能性があり、食品加工および栄養学上の観点より、その影響を解明することは重要である。

よって本研究では、メイラード反応における塩類が及ぼす影響について検討を行った。なお、アミノ化合物は数種のアミノ酸、ペプチド、タンパク質を用い、カルボニル化合物は代表的な還元糖であるグルコースを用いた。

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. メイラード反応生成物の調製

L(+)-リジン塩酸塩 (Lys)、グリシン (Gly)、グリシル・グリシン (Gly-Gly)、D-グルコース (Glc)、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> は関東化学 (株) から購入した。L-アラニン (Ala) は和光純薬工業 (株)、グリシル・グリシル・グリシン (Gly-Gly-Gly)、β-ラクトグロブリン (β-LG)、牛血清アルブミン (BSA) はシグマ アルドリッチ ジャパン (株)、DL-アラニル・DL-アラニン (Ala-Ala) は東京化成工業 (株) のものを使用した。

#### (a) NaCl 添加アミノ酸の糖化

アミノ酸は Lys、Gly、Ala を用いた。各種アミノ酸、Glc および NaCl は、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) により溶解した。0.2 M アミノ酸に 0.2 M Glc を加え、NaCl が 0、5、10% (w/v) の濃度になるように調製した。混合液 5.0 ml をスクリー管 (16 × 100 mm) に入れて栓をし、ヒートブロックを用いて 100 °C で 0、30、60、90、120 分間加熱した後、速やかに冷却した。

#### (b) 数種の無機塩類添加による Lys の糖化

アミノ酸は Lys を用い、無機塩類は NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた。また、Lys、Glc および無機塩類は数種のバッファーに溶解した。なお、バッファーは 0.1 M クエン酸バッファー (pH 4.5) および 0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0、7.5) を用いた。0.2 M Lys に 0.2 M Glc を加え、無機塩類のイオン強度が 0、0.8、1.6 になるように調製した。各々の混合液は前述と同様の方法で 0、120 分間加熱した後、速やかに冷却した。

#### (c) NaCl 添加ペプチドの糖化

ペプチドは Ala-Ala、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly を用いた。各種ペプチド、Glc

および NaCl は、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) により溶解した。0.2 M ペプチドに 0.2 M Glc を加え、NaCl が 0、5、10% (w/v) の濃度になるように調製した。混合液 5.0 ml をスクリー管 (16 × 100 mm) に入れて栓をし、ヒートブロックを用いて 100 °C で 0、30、60、90、120 分間加熱した後、速やかに冷却した。

#### **(d) NaCl 添加タンパク質の糖化**

タンパク質試料はβ-LG および BSA を用いた。各種タンパク質、Glc および NaCl は、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) により溶解した。0.1 mM タンパク質に 0.1 M Glc を加え、NaCl が 0、5、10% (w/v) の濃度になるように調製した。混合液 5.0 ml をスクリー管 (16 × 100 mm) に入れて栓をし、ヒートブロックを用いて 70 °C で 0、6、12、18、24 時間加熱した後、速やかに冷却し冷凍保存した。また、試料の一部は凍結乾燥して冷蔵保存した。アミノ酸およびペプチドの加熱温度が 100 °C であるのに対し、タンパク質の加熱温度をそれよりも低い温度 (70 °C) に設定した理由は、100 °C の加熱条件下ではタンパク質が熱変性により凝固してしまい、その後の分析に支障がでるからである。

### **1-2-2. メイラード反応生成物の褐変度測定**

UV-VIS 分光光度計 DU650 (ベックマン・コールター (株)) を用い、波長 470 nm における吸光度を測定することにより、試料の褐変度を測定した。タンパク質試料のみ、前処理として 0.2 μm 膜フィルターを用いて濾過した。

### **1-2-3. タンパク質重合度の測定**

タンパク質試料の重合度は、コンパクト PAGE システム AE-7300 (ATTO (株)) を用いたドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(SDS-PAGE) 法により測定された。凍結乾燥させたタンパク質試料 3.0 mg を超純水 1.0 ml に溶解し、SDS-PAGE 試料バッファーと混合して (1:1) 2 分間煮沸したものを電気泳動用試料とした。なお、バッファーには 0.5 M Tris-HCl バッファー (pH 6.8) 1.25 ml、グリセリン 1.0 g、ドデシル硫酸ナトリウム 0.2 g、2-メルカプトエタノール 1.0 ml、ブロムフェノールブルー (BPB) 10.0 mg を溶解した。 $\beta$ -LG 用の泳動ゲル (12.5% SDS) は、純水 1.5 ml、30% アクリルアミド保存液 3.75 ml、1.5 M Tris-HCl バッファー (pH 8.8) 3.75 ml、10% 過硫酸アンモニウム 80  $\mu$ l、N',N',N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 10  $\mu$ l を混合して作成した。BSA 用の泳動ゲル (7.5% SDS) は、純水 4.5 ml、30% アクリルアミド保存液 2.25 ml、1.5 M Tris-HCl バッファー (pH 8.8) 2.25 ml、10% 過硫酸アンモニウム 80  $\mu$ l、TEMED 10  $\mu$ l を混合して作成した。AE-7300 電気泳動装置 (出力モード Tris-gly/PAGE High、定電流 20.5 mA) により 45 分間泳動した後、Gel Code Blue Stain Reagent (Pierce) により染色し、純水により洗浄した。染色ゲルはデンストグラフ cool saver AE-6955 (ATTO (株)) を用いて解析を行い、各バンドの比率を測定した。

#### 1-2-4. タンパク質の Lys 残存率の測定

凍結乾燥させたタンパク質試料 2.5 mg を加水分解管に秤量し、6 N HCl で 110°C、24 時間の加水分解後、エバポレーターによって減圧下で HCl を除去した。これをクエン酸バッファー (pH 2.2) により希釈し、アミノ酸アナライザー-LCCS-905 (JASCO) を用いて Lys 量を測定した。NaCl 濃度 0 M、加熱時間 0 時間のタンパク質試料の Lys 量を 100% とし、他の試料の Lys 残存率を求めた。

アミノ酸アナライザーの分析条件は以下の通りである。アミノ酸混合標準液 H 型 (和光純薬工業 (株)) の 20 倍希釈をスタンダードとした。この際の希釈は

クエン酸バッファー（pH 2.2）を用いた。

分析装置：LC-905 型（日本分光 GULLIVER）

検出器：UV-970

検出波長：570 nm, 470 nm

カラム：AApak Na<sup>+</sup> (6.0 mm I.D×100 mm)

カラム温度：60℃

溶出条件：1st Buffer 0.2 N-Na<sup>+</sup>、pH 3.06

：2nd Buffer 0.2 N-Na<sup>+</sup>、pH 4.25

：3rd Buffer 0.2 N-Na<sup>+</sup>、pH 10.50

：4th Solution 0.2 M-NaOH

流速：0.6 ml/min.

ニンヒドリン反応液 A：Jas-Nin kit(A)

ニンヒドリン反応液 B：Jas-Nin kit(B)

反応液流速：0.5 ml/min

反応槽温度：120℃

## 1-2-5. タンパク質のアマドリ転位生成物の定量

Scheme 1-1 に示すように<sup>42)</sup>、主要なアマドリ転位生成物である ε-N-deoxy-fructosyl-lysine を酸加水分解することにより、35%の変化率でフロシンが生成されることが報告されている<sup>43)</sup>。したがって、フロシンを定量したのち 2.776 を乗じてアマドリ転位生成量に換算した。フロシンの定量法は Nicoletti 等の方法を改変して行った<sup>44)</sup>。凍結乾燥させたタンパク質試料をタンパク質含量が 25.0 mg 前後になるようにスクリー管（16 × 100 mm）に秤量した。粗タンパク質の定量はケルダール法を用いた。秤量した試料に 8 N HCl を 4.0 ml



加え、N<sub>2</sub>を2分間吹き付けて栓をし、110℃、23時間加水分解を行った。酸加水分解試料は0.2 μm 膜フィルターを用いて濾過した後、固相抽出を行った。固相抽出カートリッジ (Bond Elut-C18 100 mg 1 ml、Varian Associates) は、まずメタノール 1.0 ml、次に超純水 3.0 ml を用いてコンディショニングを行った。次に濾過後のタンパク質試料 0.5 ml をロードし、8 N HCl 0.5 ml で溶出した。その溶出液を HPLC 分析の試料として用いた。HPLC の分析条件は以下の通りである。

分析装置：HPLC-10Avp (島津製作所 (株))

カラム：Intersil Peptides C18 (4.6×250 mm、GL Science)

カラム温度：30℃

流速：1.0 ml/min

検出器：SPD-M10Avp ダイオードアレイ検出器 (島津製作所 (株))

検出波長：280 nm

溶出条件：A 液 (5 mM ヘプタスルホン酸/0.2%ギ酸/超純水)

B 液 (0.2%ギ酸/アセトニトリル)

A 液：B 液=80：20

サンプル注入量：20.0 μl

フロシン標準品 (Neosystem) は 8 N HCl を用いて 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μg/ml に希釈し、固相抽出を行った後に検量線を作成した ( $R^2=0.9998$ )。

## 1-2-6. 統計解析

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。すべての統計処理には Windows 版 Stat View (SAS Institute) による分散分析を用い、分析結果により事後検定 (post-hoc test) として Tukey-Kramer を行った。p<0.05 を統計学的有意水準

とした。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. NaCl 添加アミノ酸試料の褐変度

アミノ酸の種類および NaCl 濃度による褐変反応の影響を検討するため、Lys、Gly および Ala の 3 種類のアミノ酸を用いて、NaCl 濃度 0、5、10% (w/v) の条件における比較を行った。さらに、加熱時間による影響も検討するために 100℃で 0、30、60、90、120 分間加熱した試料を比較した。NaCl 添加アミノ酸試料の褐変度を Fig. 1-1 に示した。3 種類のアミノ酸は、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間に伴い褐変度が増加した。なかでも、Lys は特に褐変反応が速く、次いで Gly、Ala の順に反応性がみられた。NaCl 濃度における比較を行った結果、いずれのアミノ酸においても濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。

#### 1-3-2. 無機塩類添加 Lys 試料の褐変度

褐変反応における反応性が高い Lys をモデルとし、無機塩類の種類および塩類のイオン強度による褐変反応の影響を検討するため、NaCl、KCl および Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の 3 種類の塩類を用いて、イオン強度 0、0.8、1.6 の条件において比較した。さらに、pH による影響も検討するために pH 4.5、6.0、7.5 の 3 つの条件で比較した。一般的な食品として、多くの果物が pH 3~4、野菜が pH 4~6、肉・魚が pH 5~6、米・パンが pH 5~7、チーズが pH 6~7、水道水や牛乳が pH 7 程度であるため、本研究ではこれらの pH を参考にして pH 条件を設定した。試料はすべて 2 時間加熱した後に褐変度を測定した。無機塩類添加 Lys 試料の褐変度を Fig. 1-2 に示した。いずれの塩類においても pH 4.5 の条件下における加熱の場合、塩類濃度とは関係なく褐変度がほとんどみられなかった。また、すべての塩類において pH の値が高くなるほど有意に褐変の反応性が増す結

果となった。イオン強度による褐変反応の影響を比較した結果、褐変反応がみられる pH 6.0 および pH 7.5 の条件下では、いずれの塩類においてもイオン強度に依存して反応が抑制された。また、NaCl と KCl の抑制傾向は類似していたが、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>は他の塩類と比べて若干抑制傾向が緩やかな結果となった。

### 1-3-3. NaCl 添加ペプチド試料の褐変度

ペプチドの種類および NaCl 濃度による褐変反応の影響を検討するため、Ala-Ala、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly の 3 種類のペプチドを用いて、NaCl 濃度 0、5、10% (w/v) の条件において比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 100℃で 0、30、60、90、120 分間加熱した試料を比較した。NaCl 添加ペプチド試料の褐変度を Fig. 1-3 に示した。3 種類のペプチドは、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間に伴い褐変度が増加した。Gly-Gly および Gly-Gly-Gly における褐変度の増加は、ほぼ同様の傾向を示した。一方、Ala-Ala の褐変度は他の 2 種類のペプチドと比較して著しく褐変反応の反応性が低く、120 分間の加熱後においては他のペプチドの約 1/2 の褐変度しか示さなかった。NaCl 濃度における比較を行った結果、5% (w/v) NaCl 添加 Gly-Gly および Gly-Gly-Gly は 120 分間加熱した場合、僅かではあるが有意に他の NaCl 濃度よりも褐変反応が抑制された。しかし、いずれのペプチドにおいても NaCl 添加濃度と褐変度との間にほとんど関連性がみられなかった。

### 1-3-4. NaCl 添加タンパク質試料の褐変度

タンパク質の褐変反応における NaCl 濃度による影響を検討するため、乳清タンパク質の主な成分であるβ-LG および BSA をモデルとして用いた。特にβ-LG は、牛乳の加工過程において乳中のラクトースによりメイラード反応をおこす

ことが知られている<sup>45)</sup>。また、 $\beta$ -LG は乳中の主要なアレルゲンとして知られており<sup>46)</sup>、メイラード反応による低アレルゲン化も期待されることから、本研究において用いた。 $\text{NaCl}$  濃度 0、5、10% (w/v) の条件における褐変度を比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 70℃で 0、6、12、18、24 時間加熱した試料を比較した。 $\text{NaCl}$  添加 $\beta$ -LG の褐変度を Fig. 1-4A に示した。 $\text{NaCl}$  添加 BSA は加熱により沈殿物をともなう濁りがみられたため (Fig. 1-4B)、褐変度の測定を行わなかった。糖化 $\beta$ -LG は、いずれの  $\text{NaCl}$  濃度においても加熱時間に伴い褐変度が増加した。また、 $\text{NaCl}$  濃度 5% (w/v) および 10% (w/v) においては、加熱時間が長くなるほど褐変反応の抑制傾向がみられ、 $\text{NaCl}$  濃度が高くなるほどその抑制効果が顕著であった。

### 1-3-5. $\text{NaCl}$ 添加タンパク質試料の重合

メイラード反応の後期段階においては、タンパク質構造中に架橋の形成がみられるため、タンパク質の重合における  $\text{NaCl}$  濃度の影響を検討した。 $\beta$ -LG および BSA をモデルとして用い、 $\text{NaCl}$  濃度 0、5、10% (w/v) の条件における重合度を比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 70℃で 0、6、12、18、24 時間加熱した試料を比較した。 $\text{NaCl}$  添加 $\beta$ -LG の重合度を Fig. 1-5A に示し、 $\text{NaCl}$  添加 BSA の重合度を Fig. 1-5B に示した。両試料ともに、いずれの  $\text{NaCl}$  濃度においても加熱時間に伴い一量体が減少した。さらに、 $\text{NaCl}$  濃度が高くなるほど一量体の減少が緩やかになり、重合度が低下する傾向がみられた。これらの傾向が顕著に見られた $\beta$ -LG の電気泳動パターンを Fig. 1-6 に示した。

### 1-3-6. $\text{NaCl}$ 添加タンパク質試料の Lys 残存率

タンパク質構造中の Lys 残基をアミノ酸アナライザーにより測定した。Lys は必須アミノ酸のひとつであり、栄養的に重要なタンパク質であるが、メイラード反応によって損傷を受けやすく栄養価の低下が問題とされている。Glc による修飾反応は、タンパク質構造中の塩基性アミノ酸あるいは N 末端アミノ酸のアミノ基に Glc のカルボニル基が反応して引き起こされる。その中でも特に Lys 残基の  $\epsilon$ -アミノ基は Glc との反応性が高い。そこで、タンパク質中の Lys 残基の残存率を修飾の程度とみなした。 $\beta$ -LG および BSA をモデルとして用い、タンパク質の Glc 修飾における NaCl 濃度の影響を検討した。NaCl 濃度 0、5、10% (w/v) の条件における Lys 残存率を比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 70°C で 0、6、12、18、24 時間加熱した試料を比較した。NaCl 添加  $\beta$ -LG の Lys 残存率を Fig. 1-7A に示し、NaCl 添加 BSA の Lys 残存率を Fig. 1-7B に示した。両試料ともに、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間に伴い Lys 残存率の減少傾向がみられた。さらに、NaCl 濃度が高くなるほど Lys 残存率の減少が低下した。

### 1-3-7. NaCl 添加タンパク質試料のアマドリ転位生成物の生成

メイラード反応における中間体としてアマドリ転位生成物が形成されるため、これら生成物の形成における NaCl 濃度の影響を検討した。 $\beta$ -LG および BSA をモデルとして用い、NaCl 濃度 0、5、10% (w/v) の条件下におけるアマドリ転位生成物量を比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 70°C で 0、6、12、18、24 時間加熱した試料を比較した。フロシン標準品の HPLC クロマトグラムを Fig. 1-8A に示し、24 時間加熱した NaCl 無添加  $\beta$ -LG の HPLC クロマトグラムを Fig. 1-8B に示した。フロシン標準品の分析を行ったところ、9 分前後にフロシンが検出されたため、試料の分析においてもこの時間に検出さ

れたピークを各試料のフロシン成分とした。NaCl 添加 $\beta$ -LG のアマドリ転位生成物の量を Fig. 1-9A に示した。また、NaCl 添加 BSA のアマドリ転位生成物の量を Fig. 1-9B に示した。両試料ともに、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間に伴い生成量が増加した。しかし、NaCl 添加によるアマドリ転位生成物の減少傾向はみられなかった。

## 1-4. 考察

数種類のアミノ酸を用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、Lys の褐変反応は他のアミノ酸より反応性が高かった。Lys の  $pK_1=2.16$ 、 $pK_2=9.06$ 、 $pKR=10.54$ 、Gly の  $pK_1=2.35$ 、 $pK_2=9.78$ 、Ala の  $pK_1=2.35$ 、 $pK_2=9.87$  を比較すると、Lys における N 末端の  $pK$  値 (9.06) は、他のアミノ酸の N 末端  $pK$  値 (Gly 9.78、Ala 9.87) よりも極めて低い<sup>47, 48)</sup>。メイラード反応の初期段階では、アミノ酸のアミノ基と糖のカルボニル基が求核的反応をしてシッフ塩基を形成する<sup>49, 50)</sup>。したがって、求核性アミノ基を有する Lys は他のアミノ酸よりも速やかにメイラード反応が進み、褐変化したことがわかる。また、Ala の反応性が Gly よりも低値を示した理由としては、Ala の構造中にはメチル基があり Gly よりも複雑な立体配座を形成しているため、Glc との反応性が低かったことが考えられる。さらに、すべてのアミノ酸において NaCl 濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられ、褐変反応の抑制に塩類のイオン強度が影響している可能性が示唆された。メイラード反応において、アミノ化合物はアニオンの形でカルボニル化合物と反応することから<sup>51)</sup>、NaCl から生じるイオンがその反応の抑制に関与しているのではないかと推察された。次に、Lys をモデルとして無機塩類の種類、塩類のイオン強度および pH による褐変反応の影響を検討した。その結果、いずれの塩類においても pH 4.5 の条件下における加熱の場合、塩類濃度とは関係なく褐変度がほとんどみられなかった。一方、すべての塩類において pH 7.5 の条件下による褐変反応のほうが、他の pH 条件よりも反応性が高い結果となった。メイラード反応の中期段階から後期段階においては、pH が中性～塩基性の条件下でラジカル生成が促進され、さらには褐色色素の形成が促進される<sup>49)</sup>。このため、3 つの pH 条件のなかでもより塩基性に近い pH 7.5 における褐変度が顕著に高値を示



したことが考えられる。イオン強度による褐変反応の影響を比較した結果、もともと反応性が高い pH 6.0 および pH 7.5 の条件下では、いずれの塩類においてもイオン強度に依存して反応を抑制した。したがって、褐変反応の抑制に塩類のイオン強度が影響している可能性が示唆された。また、NaCl と KCl の抑制傾向は類似していたが、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> は他の塩類と比べて若干抑制傾向が緩やかな結果となった。したがって、反応の抑制にはイオン強度のみが関与しているのではなく、塩類の種類によっても変化することが推測される。

数種類のペプチドを用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、すべてのペプチドにおいて、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間にもない褐変度が増加した。Gly-Gly と Gly-Gly-Gly における褐変度の増加は、ほぼ同様の傾向を示した。一方、Ala-Ala の褐変度は他の 2 種類のペプチドと比較して著しく褐変反応の反応性が低く、120 分間の加熱後においては他のペプチドの約 1/2 の褐変度しか示さなかった。これは、ペプチドの解離定数  $pK_2$  値が関与している可能性が示唆された。メイラード反応において、アミノ化合物はアニオンの形で反応するため、 $pK_2$  値と褐変度との関係は反比例にあることがわかっている<sup>51)</sup>。Ala-Ala の解離定数は  $pK_2=8.42$  であり Gly-Gly は  $pK_2=8.25$ 、Gly-Gly-Gly は  $pK_2=7.91$  である<sup>52)</sup>。したがって、解離定数  $pK_2$  値が一番大きい Ala-Ala の褐変度が顕著に低くなったと考えられる。また、NaCl 濃度における比較を行った結果、いずれのペプチドにおいても、添加濃度と褐変度との間に関連性がみられなかった。ペプチドはアミノ酸と比較して水溶液中における  $pK_2$  値が低いことから<sup>47, 48, 52)</sup>、グルコースとの反応性が著しく早いために、アミノ酸における実験結果とは異なり、NaCl 添加による褐変反応の抑制がみられなかったと考えられる。

$\beta$ -LG を用いてタンパク質の褐変反応における NaCl 濃度および加熱時間による

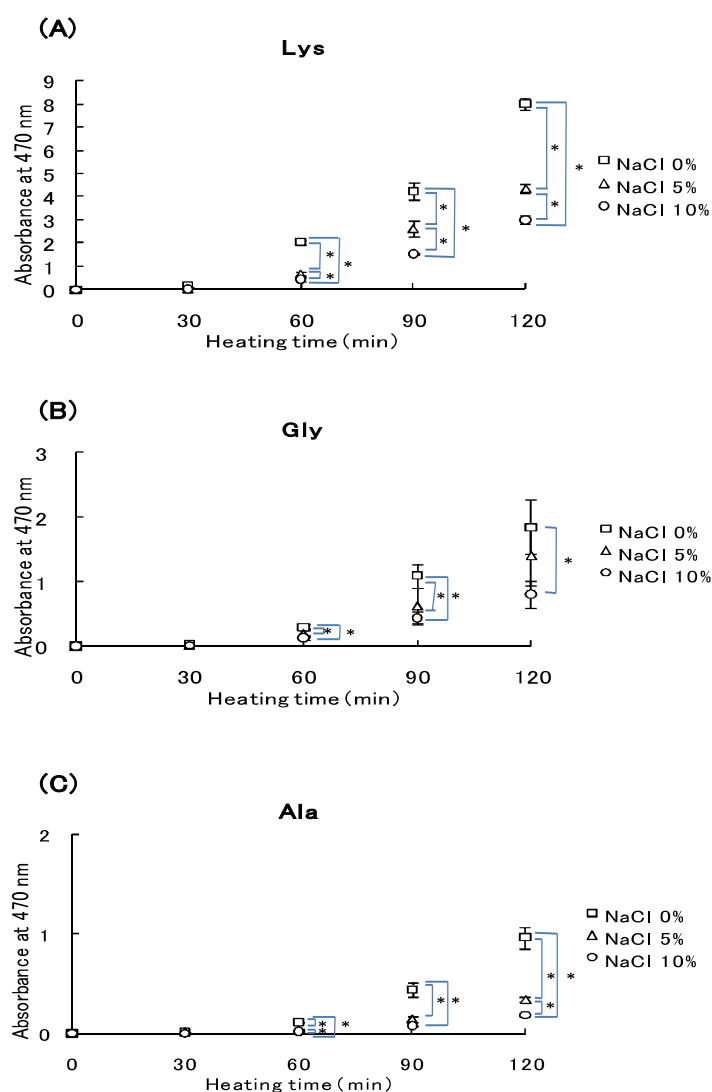
影響を検討した。その結果、NaCl 濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。次に、 $\beta$ -LG および BSA をモデルとして、タンパク質の重合度における NaCl 濃度および加熱時間による影響を検討した。その結果、NaCl 濃度が高くなるほど重合度が低下する傾向がみられ、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著であった。また、 $\beta$ -LG および BSA を用いて、タンパク質の Glc 修飾における NaCl 濃度および加熱時間による影響を検討した。その結果、NaCl 濃度が高くなるほど Lys 残存率の減少が低下し、加熱時間が長くなるほどその傾向がみられた。さらに、同タンパク質をモデルとして、アマドリ転位生成物の形成における NaCl 濃度および加熱時間による影響を検討した。その結果、いずれの加熱時間においてもアマドリ転位生成物の形成と NaCl 濃度との間に関連性がみられなかった。メイラード反応におけるタンパク質の褐変度、重合度、Lys 残存率の結果により、NaCl メイラード反応の進行を抑制することが明らかとなった。また、NaCl 濃度が高くなるほどその抑制効果が顕著となったことから、メイラード反応の抑制に NaCl のイオン強度が影響していることが示唆された。一方、アマドリ転位生成物の形成においては、NaCl 添加によるアマドリ転位生成物の形成の抑制効果がみられなかった。反応の初期段階に生じるアマドリ転位生成物は、加熱によって脱水反応を起こし、1,2-エミナールや 2,3-エンジオールといった中期段階生成物に変化しやすいため<sup>49, 50)</sup>、抑制効果が顕著にみられなかったと推察された。

メイラード反応の後期段階に生成される AGEs は、食品中および生体内において形成される<sup>53-56)</sup>。食事性 AGEs の生体内吸収後における生理作用については詳しく解明されていないが、生体内 AGEs が糖尿病合併症や老化を進展させることから、食品性 AGEs も同様に疾病の進展因子となる可能性がある。そのため、メイラード反応を制御し、AGEs の生成を抑制することが重要であると思

われる。また、食品の加工・貯蔵・調理の過程において、メイラード反応を制御することにより、褐色色素の生成を促進または抑制することが可能となる。したがって、塩類の種類を選択し、イオン強度や pH、加熱時間などを調節することにより、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の観点より極めて重要であるといえる。

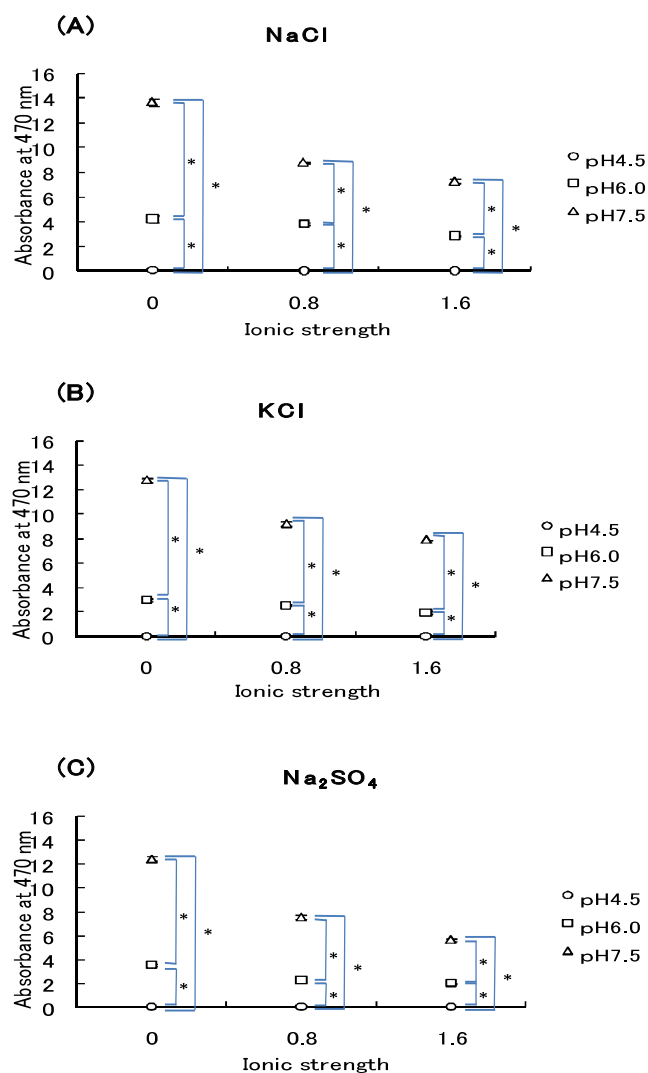
## 1-5. 要旨

食品の加工・貯蔵・調理の過程において、代表的な成分間反応のひとつであるメイラード反応は、食品の品質を変化させ、栄養生理的にも影響をもたらす。また、この反応は重金属イオンの存在によって促進される。日本において日常的に摂取されている味噌や醤油は、メイラード反応が生じて褐変した食品であり、食塩の含有量も高い。したがって、こうした塩濃度の高い食品の加工・調理において、塩類から生じるイオンがメイラード反応に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで、本研究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、Lys 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、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著となることが示唆された。塩類の種類を選択し、イオン強度や pH、加熱時間など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。



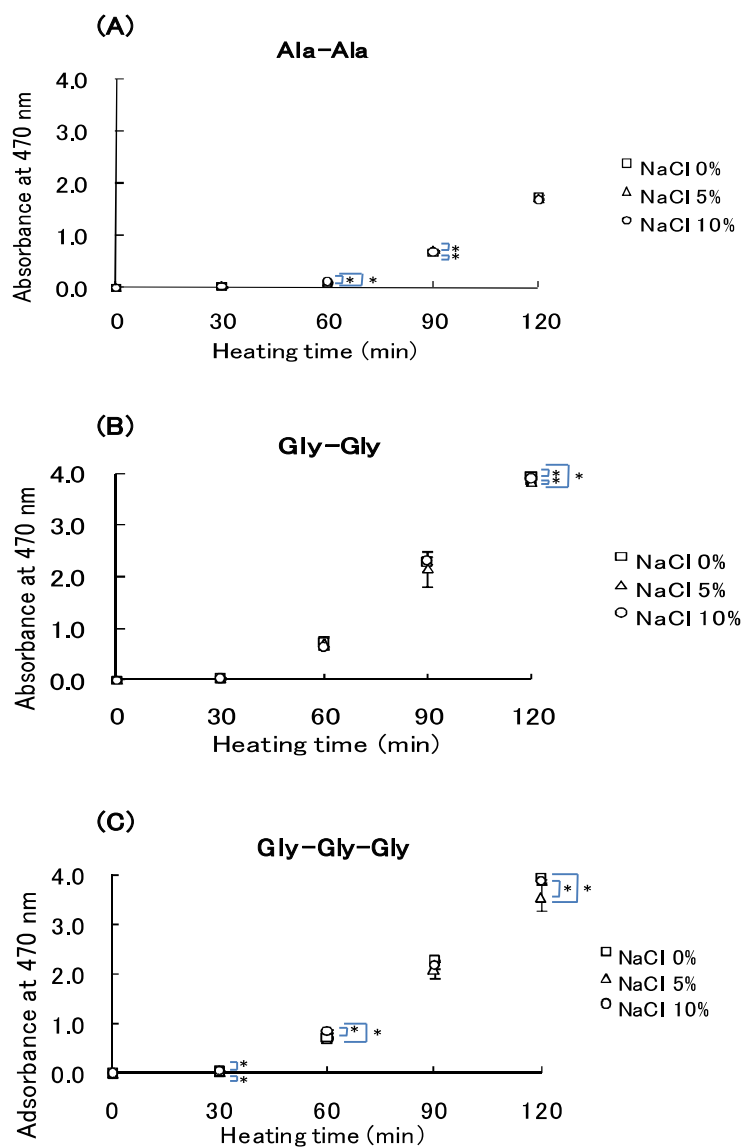
**Figure 1-1. NaCl concentrations in relation to degree of browning in the browning reaction between Glc and amino acids.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” The high browning samples were determined after dilution with water. Each value is the mean of five determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



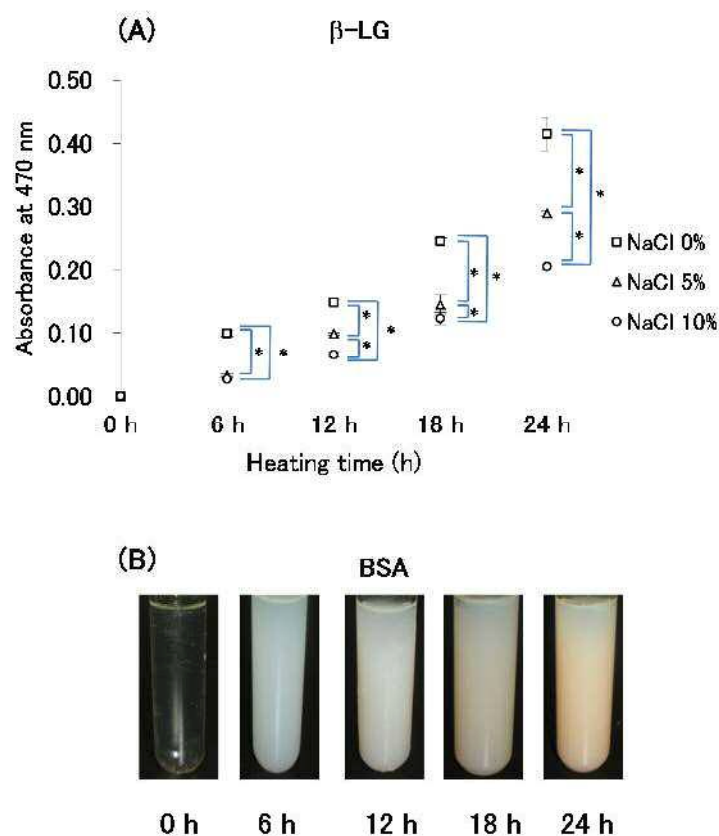
**Figure 1-2. Ionic strengths and pH in relation to degree of browning in the browning reaction between Glc and Lys due to the addition of NaCl, KCl, or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” The high browning samples were determined after dilution with water. Each value is the mean of five determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



**Figure 1-3. NaCl concentrations in relation to degree of browning in the browning reaction between Glc and peptides.**

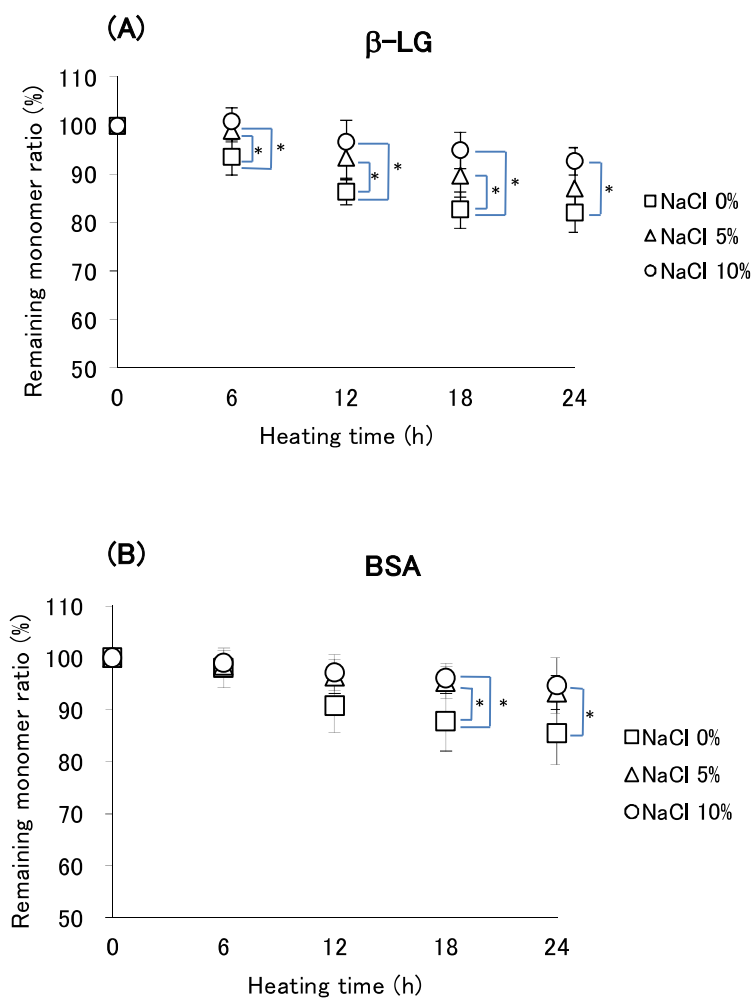
The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” The high browning samples were determined after dilution with water. Each value is the mean of five determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



**Figure 1-4.** NaCl concentrations in relation to degree of browning in the browning reaction between  $\beta$ -LG with Glc (top) measured with absorbance. The lower photograph is the reaction of BSA with Glc without absorbance data.

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” Each value is the mean of three determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.





**Figure 1-5. Effects of NaCl concentration on the polymerization of proteins in the reaction with Glc.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” Each value is the mean of three determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.

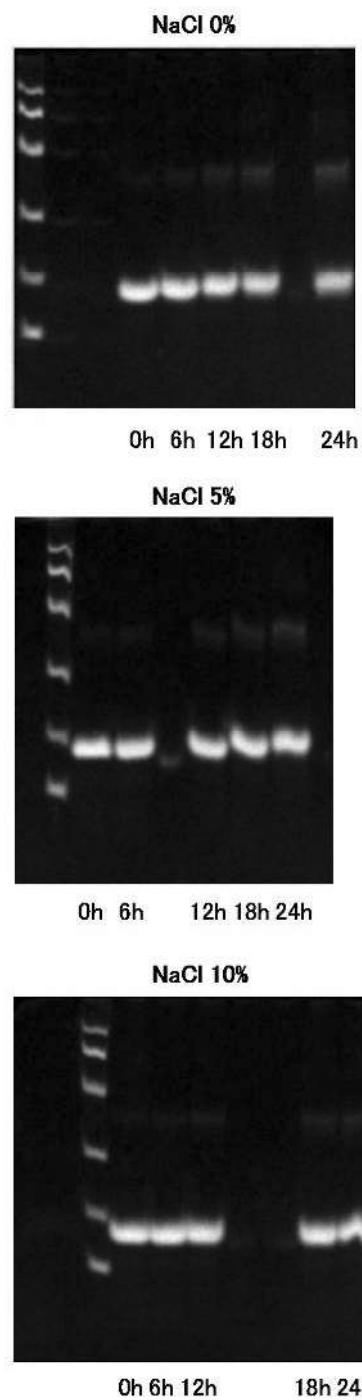
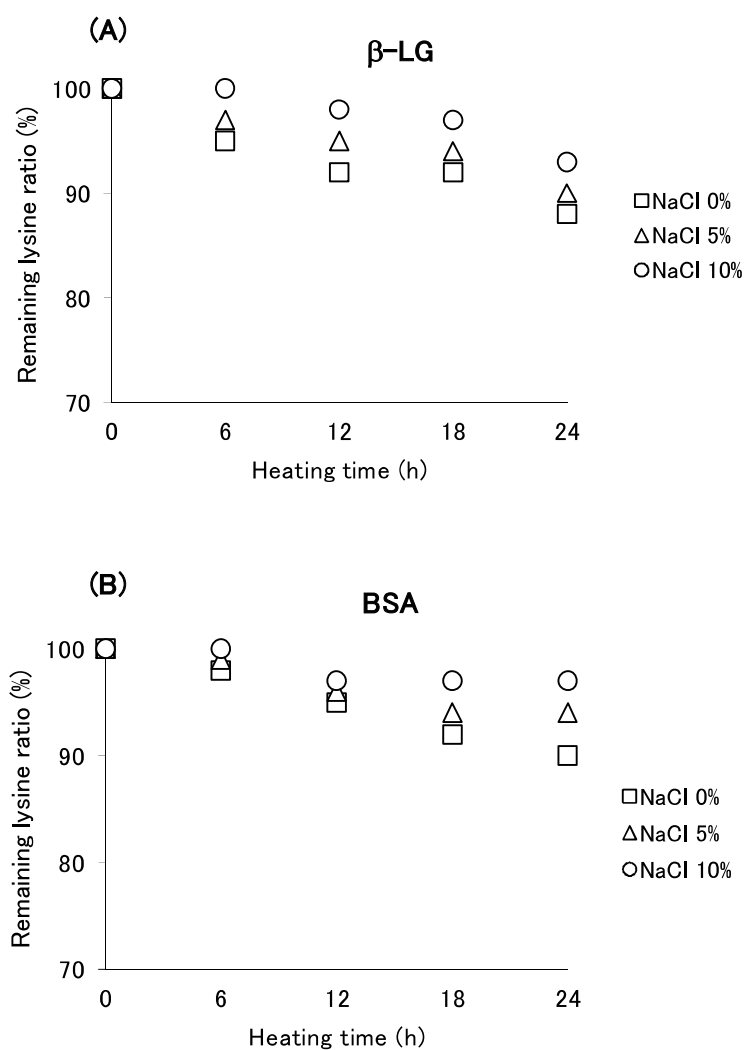


Figure 1-6. Effects of NaCl concentration on the polymerization of  $\beta$ -LG in the reaction with Glc, analyzed by SDS-PAGE.



**Figure 1-7. Effects of NaCl concentration on the remaining Lys ratio in the reaction between proteins and Glc.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” Each value is the mean of two samples.

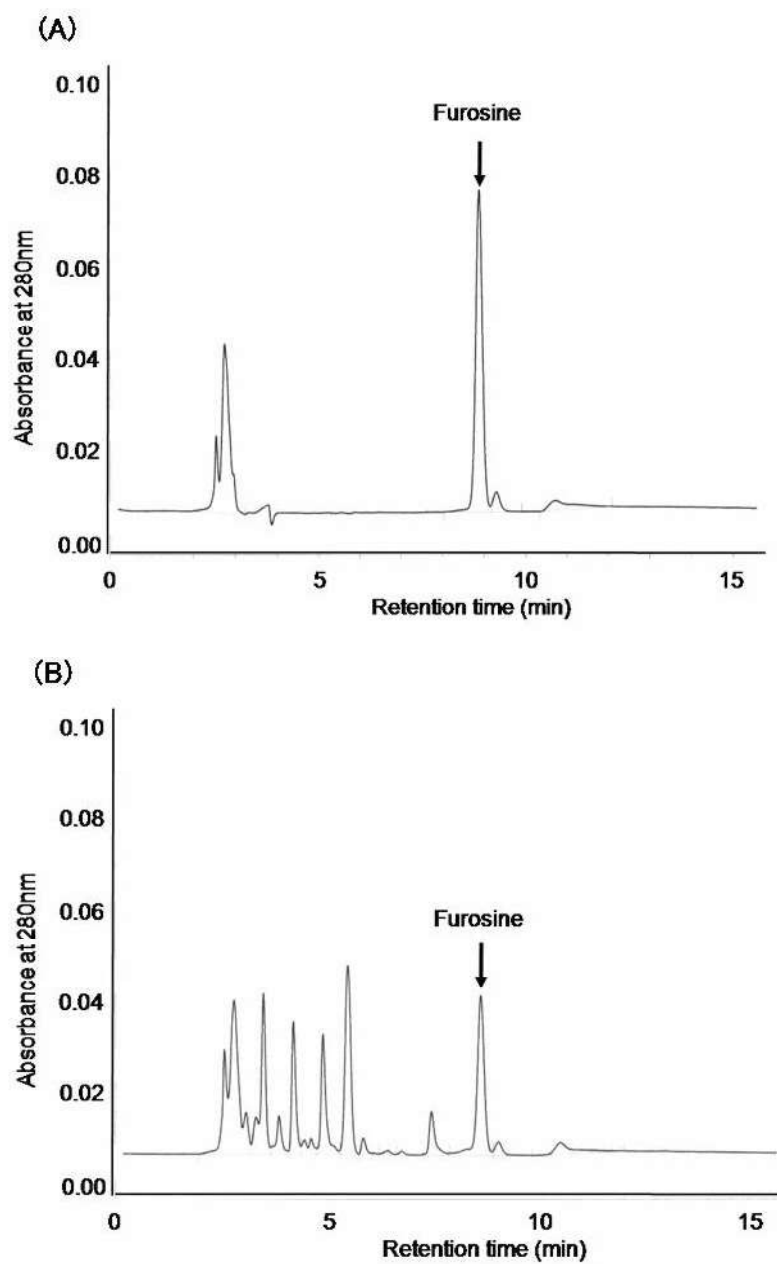
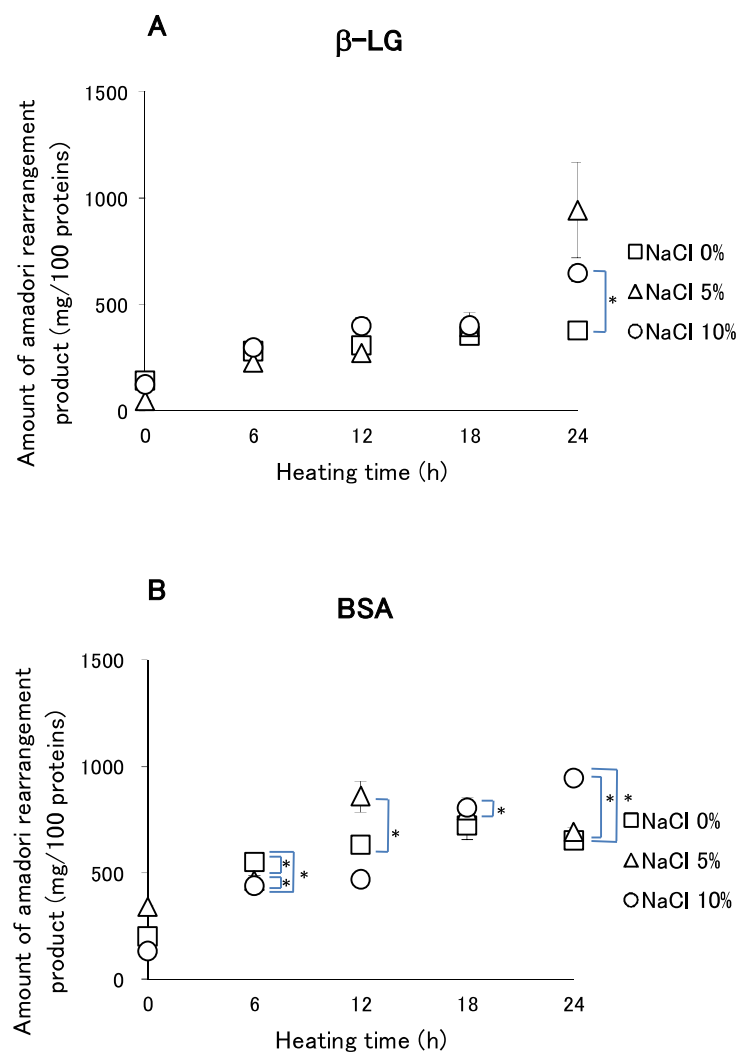
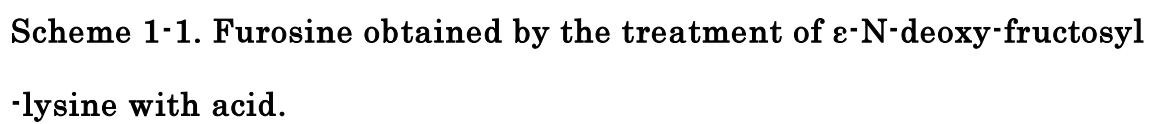


Figure 1-8. HPLC chromatogram of (A) furosine standard and (B) an acid hydrolysate of  $\beta$ -LG sample heated at 70°C for 24 h after solid-phase extraction.



**Figure 1-9. Effects of NaCl concentration on the amounts of amadori rearrangement product in the reaction between proteins and Glc.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods.” Each value is the mean of three determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



## 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]

### 2-1. 緒言

近年、メイラード反応によって修飾されたペプチド (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。なかでも、MRPs の風味に関する研究が数多く行われている<sup>11-19)</sup>。さらに、MRPs の抗酸化活性や香気成分についても幾つか報告されている<sup>20-24)</sup>。また、MS 法による MRPs の構造解析も多数行われ<sup>25-28)</sup>、分析のイオン源としては ESI 法や MALDI 法などが用いられている<sup>26, 29-31)</sup>。さらに、質量分析計を直列に結合させた MS/MS 法を用いることで、MRPs の詳細な構造情報を得ることが可能である<sup>26, 29, 31)</sup>。一方で、メイラード反応中に生じる MRPs のペプチド分解や架橋についての情報はほとんど得られていない。キシロース修飾大豆ペプチドの研究では、加熱によりペプチド分解およびペプチド架橋がともに観察されたが<sup>57)</sup>、ペプチド分解および架橋の詳細なメカニズムは未だ解明されていない。MRPs の有する機能を損なわずに維持するためには、MRPs のペプチド分解や架橋について、さらなる検討が必要とされている。

よって本研究では、乳清タンパク質の一種である  $\beta$ -LG の構造中に含まれるペプチド Leu-Glu-Lys-Phe-Asp (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。なお、LEKFD を用いた理由としては、速やかにメイラード反応が進む求核性アミノ基を有する Lys を含み、さらに、紫外部 260nm 付近に吸収スペクトルの極大値を有する Phe を含む特異的な構造である点が挙げられる。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. Glc 修飾ペプチド LEKFD (MRPs) の調製

$\beta$ -LG のアミノ酸配列の第 133 位・第 137 位に相当する LEKFD は、北海道システム・サイエンス (株) により合成されたものを購入した。また、Glc は関東化学 (株) から購入した。

ペプチドおよび Glc は 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.7) により溶解した。2 mM ペプチドに 4 mM Glc を加えた混合液 20.0 ml を 100 ml ナス型フラスコに入れ、フラスコに還流冷却器を取り付け、オイルバスにセットした。マグネティックスターラーで攪拌し、かつ還流しながら温度を 110 °C に保ち、24 時間加熱した。その後速やかに冷却し、凍結乾燥した後に冷蔵庫に保管した。凍結乾燥試料は、乾燥後も 2~3 週間でメイラード反応が若干進むことが報告されている<sup>58-60)</sup>。したがって、凍結乾燥 MRPs は機器分析のため 1 週間以内に使うこととした。

### 2-2-2. MRPs の m-アミノフェニルボロン酸によるアフィニティー・クロマトグラフィー

洗浄バッファー (250 mM 酢酸アンモニウムバッファー、50 mM  $\text{MgCl}_2$ 、pH 8.0) により懸濁した m-アミノフェニルボロン酸アガロース (シグマ アルドリッチ社) を 1ml ポリプロピレンカラム (85×7.5 mm ; Qiagen 社) に充填した。充填後、洗浄バッファーによりカラムを平衡化し、洗浄バッファーにより溶解した MRPs (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ペプチド) 1 ml を 4°C で注入した。1 時間後、室温で洗浄バッファー 10 ml によりカラムを洗浄し、カラム洗浄後の洗浄バッファーを遠心チューブに回収した。次に、カラムに吸着した MRPs を溶出バッファー (250 mM 酢酸溶液、pH 2.8) 5 ml により溶出し、遠心チューブに回収した。回収した溶



液は速やかに凍結乾燥した。

### 2-2-3. MRP<sub>s</sub> の HPLC 分析

凍結乾燥させた試料を超純水 500 ml により溶解し、HPLC 分析の試料として用いた。HPLC の分析条件は以下の通りである。

分析装置：HPLC-10Avp（島津製作所（株））

カラム：Intersil Peptides C18（4.6×250 mm、GL Science）

流速：1.0 ml/min

検出器：SPD-M10Avp ダイオードアレイ検出器（島津製作所（株））

検出波長：220 nm

溶出条件：A 液（0.1% TFA/超純水）

B 液（0.1% TFA/アセトニトリル）

グラジエント：0-40 分 A 液：100-70%、B 液：0-30%

サンプル注入量：20.0  $\mu$ l

主要な 10 ピーク（Fig. 2-1a のピーク 1-9 および Fig. 2-1b のピーク 9'）を MS 分析のために試験管で分取した。

### 2-2-4. MRP<sub>s</sub> の ESI-MS および ESI-MS/MS 分析

分析における最適な条件にするため、分取された各ピーク試料を 0.1%ギ酸含有アセトニトリル・水（50:50、v/v）により希釈した。その希釈液を Q TRAP MS（Applied Biosystems/ MDS Sciex）にインフュージョンで直接注入した（流速 5  $\mu$ l/min）。ESI 法を用いて、ポジティブモードで Enhanced MS スキャン（EMS）および Enhanced Product Ion スキャン（EPI）により測定を行った。

まず m/z 100-800 の間で EMS による測定を行い、分子量関連イオンの検出を

確認した。確認後、当該イオンについて CE を 35~50 に設定して m/z 50-800 の範囲で EPI による測定を行った。分析条件は以下の通りである。

装置：QTRAP<sup>TM</sup> 質量分析装置 (Applied Biosystems)

検出：EMS および EPI

イオン化法：ESI (Posi)

カーテンガス (CUR)：20.0 psi

イオンスプレー電圧 (IS)：5000.0 V

ターボガス温度 (TEM)：0℃

ネブライザーガス (GS1)：20.0 psi

ターボガス (GS2)：0 psi

## 2-2-5. MRP<sub>s</sub> の MOPAC2006 による幾何学最適化

分子軌道計算は、半経験的分子軌道計算がプログラムされた MOPAC2006 (バージョン 2.0.2、J. J. P. Stewart、富士通 (株)) を用いた。また、構造の最適化を行う Parametric Method Number 3 (PM3) パラメータは、京都大学コンピュータ・センターにあるパラメータを用いた。

## 2-2-6. MRP<sub>s</sub> のフォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラムの連続測定

MRP<sub>s</sub> のための分析条件は以下の通りである。

分析装置：DAD-HPLC (HPLC クロムマスター、日立ハイテク (株))

カラム：TSKgel G2500PWXL (7.8×300mm、東ソー (株))

流速：0.8 ml/min

検出波長：200-500 nm (所要時間 60 分)

溶出条件：0.1% TFA/超純水

サンプル注入量：10.0  $\mu$ l

## 2-3. 結果

### 2-3-1. MRPs の m-アミノフェニルボロン酸カラムによる非吸着画分および吸着画分の HPLC クロマトグラム

m-アミノフェニルボロン酸をベースにしたアフィニティー・クロマトグラフィーにより、MRPs の選択的抽出を試みた。さらに、m-アミノフェニルボロン酸カラムを用いて分画した非吸着画分と吸着画分を HPLC により分析し、クロマトグラムの比較を行った。非吸着画分のクロマトグラムを Fig. 2-1A に示し、吸着画分のクロマトグラムを Fig. 2-1B に示した。非吸着画分において、主要なピーク (Peak 1-9) が複数検出され、さらに小さなピークも多数検出された。一方、吸着画分における主要なピークは、50.8 分に検出されたピークのみであった。非吸着画分の Peak 9 と同じ保持時間であり、同一成分である可能性があることから Peak 9' とした。

### 2-3-2. HPLC による MRPs 分画の MS および MS/MS 分析

HPLC により分取した MRPs 分画 (Peak 1-9、9') を MS および MS/MS により分析し、構造解析を行った。各々の分画の MS 分析の結果は Fig. 2-2 に示した。本研究では  $m/z$  1600 まで分析を行ったが、すべてのスペクトルが  $m/z$  800 以下の範囲で検出されたため、Fig. 2-2 では  $m/z$  800 までのデータを示した。Peak 9 と Peak 9' は似通ったマススペクトルを示し、 $m/z$  759 で主要なシグナルが観測され、高いシグナル強度を示した。また、Peak 4 および Peak 5 の分画で観測された  $m/z$  663、および Peak 9 および Peak 9' の分画で観測された  $m/z$  759 の MS/MS 分析の結果は Fig. 2-3 に示した。さらに、MS および MS/MS による各々の分画の識別は Table 2-1 に示した。HPLC クロマトグラムにおいて主要なピークである Peak 3 のマススペクトルでは、イオン化した未修飾 LEKFD

として $[M+H]^+$  ( $m/z$  651) および $[M+2H]^{2+}$  (326  $m/z$ ) が観測された (Fig. 2-2、Table 2-1)。Peak 5 のマススペクトルにおいても同じシグナルイオンが確認され (Fig. 2-2、Table 2-1)、さらに、LEK\*FD のイミニウムイオン ( $-150$  u) に相当する $[M+H]^+$  ( $m/z$  663) も観測された (Fig. 2-2、Fig. 2-3A、Table 2-1、Scheme 2-1A)。また、LEK\*FD のイミニウムイオンに相当する $[M+H]^+$  ( $m/z$  663) は、Peak 4 のマススペクトルにおいても確認された (Fig. 2-2、Fig. 2-3A、Table 2-1、Scheme 2-1A)。Peak 9 および Peak 9' のマススペクトルでは、LEK\*FD のピリリウムまたはヒドロキシメチルフリリウムイオン (3 分子の水が脱水、 $-54$  u) に相当する $[M+H]^+$  ( $m/z$  759) が観測された (Fig. 2-2、Fig. 2-3B、Table 2-1、Scheme 2-1B)。また、Peak 1 のマススペクトルでは、EK および KFD に相当する $[M+H]^+$  ( $m/z$  276) および $[M+H]^+$  ( $m/z$  409) がそれぞれ観測された (Fig. 2-2、Table 2-1)。一方、 $m/z$  338 (Peak 7)、 $m/z$  520 (Peak 2)、 $m/z$  650 (Peak 7、8)、 $m/z$  673 (Peak 6)、 $m/z$  687 (Peak 7) および  $m/z$  763 (Peak 7) は、推定される配列を識別することができなかった。

### 2-3-3. MRPs の半経験的分子軌道計算

Lys 側鎖の $\epsilon$ -アミノ基に Glc が修飾しシッフ塩基を形成した LEKFD の分子軌道は MOPAC 2006 により計算し、PM3 を計算に用いて構造の最適化を行い、HOMO および LUMO で最適化された構造を表した (Fig. 2-4)。HOMO はシッフ塩基の N 原子に位置し、まず Glc とペプチドとの間で速やかな反応が生じることを示している。Fig. 2-5A は HOMO 1 および LUMO 1 を示し、Fig. 2-5B は HOMO 2 および LUMO 2 を示し、Fig. 2-5C は HOMO 3 を示した。HOMO 1 は Lys と Phe との間のペプチド結合の N 原子に位置していた。HOMO 2 もこの原子の辺りに位置し、LUMO 2 は Leu と Glu との間のペプチド結合の N 原子

に位置していた。HOMO 2 は Glu と Lys との間のペプチド結合の N 原子に位置し、HOMO 3 も同様のところに位置していた。

#### 2-3-4. MRP のフォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラム

フォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、未修飾ペプチドおよび Glc 修飾ペプチドのクロマトグラムを比較した。両ペプチドのプロット・クロマトグラムは、Fig. 2-6A および Fig. 2-7A に示した。また、波長 260 nm (Phe の吸収波長) で検出されたクロマトグラムは Fig. 2-6B および Fig. 2-7B に示し、波長 220 nm (ペプチド結合のカルボニル基の吸収波長) で検出されたクロマトグラムは Fig. 2-6C および Fig. 2-7C に示した。分析した結果、未修飾ペプチドは 18 分に検出された (Fig. 2-6B および C)。Glc 修飾ペプチドでは、LEKFD の分子量よりも低分子の化合物が少なくとも 7 個は検出された (Fig. 2-7A)。さらに、LEKFD の分子量よりも高分子の化合物も検出された (Fig. 2-7A および B)。プロット・クロマトグラムまたは 260 nm の波長において、低分子および高分子化合物の生成を確認することができたが、220nm の波長ではそれらを確認することがほとんどできなかった (Fig. 2-7C)。

## 2-4. 考察

m-アミノフェニルボロン酸カラムによる MRPs の選択的抽出を検討し、分画した非吸着画分と吸着画分の HPLC クロマトグラムを比較した。非吸着画分の Peak 9 は吸着画分の Peak 9' と同じ保持時間に検出されたことから、同一成分である可能性が示唆された。非吸着画分において複数のピークが検出されたことから、LEKFD はメイラード反応により Glc 修飾だけではなく、ペプチド分解および架橋をしている可能性が推察された。両画分において 10 分までに検出されたピークは、試料中に含まれるバッファの成分であると推測された。m-アミノフェニルボロン酸カラムにより、選択的に糖化ペプチドを濃縮することが可能である、といった報告が幾つかされている<sup>61, 62)</sup>。しかし Fig.2-1B で示すとおり、本研究では MRPs の選択的濃縮はほぼ認められなかった。Zhang 等により、非酵素的糖化リボヌクレアーゼ (RNase) および酵素的糖化タンパク質 ( $\alpha$ -1-アンチキモトリプシンおよび  $\alpha$ -2-hs 糖タンパク質) の m-アミノフェニルボロン酸カラムによる選択的吸着について、検討が行われた<sup>63)</sup>。その結果、非酵素的糖化 RNase はカラムに吸着したが、酵素的糖化タンパク質は吸着しなかった。理由として、カラム中のホウ酸塩がもつ陰イオンとタンパク質中の負電荷を帯びたシアル酸残基との間で静電反発が生じたのではないかと、彼らは推察した。したがって、本研究の結果も同様に、アミノ酸 (アスパラギン酸およびグルタミン酸) の酸性残基のカルボキシル末端領域とホウ酸塩の陰イオンとの間で生じた静電反発が、MRPs のカラム吸着を阻害した可能性が示唆された。

HPLC により分取した MRPs 分画を MS および MS/MS により分析し、構造解析を行った。Peak 4 および Peak 5 では、LEK\*FD のイミニウムイオン ( $\cdot$ 150 u) に相当する  $[M+H]^+$  ( $m/z$  663) が観測された。このマススペクトルの値は、イミニウムイオンの形成がアミノ化合物中の窒素における結合の  $\alpha$ -開裂により

生じることを示している。イミニウムイオンは、ガラクトシル化およびタガトシル化 $\beta$ -LG ペプチドの MS/MS 分析において観測された<sup>64)</sup>。その研究では、ヘキサペプチドあるいはそれよりも短いペプチドから成る短鎖の糖化ペプチドの MS/MS フラグメンテーションは、イミニウムイオンの形成に至らないか、あるいはフラグメンテーションが非常に弱かったことを報告した。また、ペプチドイオンはペプチド鎖長の減少に伴い直ちにプロトン移動反応性が増加するため、プロトンの移動が MS/MS の分析条件においてペプチドの解離に影響を及ぼす可能性があることを示唆した報告もある<sup>65)</sup>。一方、本研究の糖化ペントペプチド LEKFD においては、b-イオン、y-イオンおよび a-イオンにより特徴づけられた MS/MS スペクトルが、イミニウムイオンによって生じ、前述した研究報告とは一致しなかった。しかしながら、両研究において、ペプチドのイミニウムイオンのフラグメンテーションでは、b-イオンおよび y-イオンが生成されることが確認された。Peak 9 および Peak 9' のマススペクトルでは、 $[M+H]^+(m/z\ 759)$  が観測された。この値は、アマドリ修飾ペプチド LEK\*FD から 3 分子の水が脱水した ( $-54\ u$ ) ピリリウムイオンまたはヒドロキシメチルフリリウムイオンに相当し、b-イオン、y-イオンおよび a-イオンにより特徴づけられた MS/MS スペクトルが観測された。本研究で確認されたピリリウムイオンまたはヒドロキシメチルフリリウムイオンは、m-アミノフェニルボロン酸カラムによって精製されたものかもしれないが、一方で、MS/MS 分析におけるフラグメンテーションにより生成された可能性もある。糖化ペプチドの MS/MS スペクトルにおいて最も強いイオンは、糖部分の水分子の損失から生じ、オキシニウムイオンの形成をもたらすことが報告されている<sup>66-68)</sup>。しかし、本研究ではオキシニウムイオン（ピリリウムイオンまたはヒドロキシメチルフリリウムイオン）が MS 分析においても観測されたことから、メイラード反応によって生成されたイオンで



あることが示唆された。Peak 1 のマスペクトルでは、EK および KFD に相当する  $[M+H]^+$  ( $m/z$  276) および  $[M+H]^+$  ( $m/z$  409) が観測され、MS および MS/MS 分析によりペプチド分解の情報を得ることが可能であることが示唆された。

MRPs の半経験的分子軌道計算を行った結果、HOMO 1 および HOMO 2 が Lys と Phe との間のペプチド結合の N 原子に位置し、LUMO 2 が Leu と Glu との間のペプチド結合の N 原子に位置していた。したがって、Peak 1 において EK に相当する  $[M+H]^+$  ( $m/z$  276) が観測されたのは、これらの領域においてプロトンのような他原子が反応し、ペプチド結合の分解をもたらした可能性が考えられた。同様に、HOMO 2 および HOMO 3 が Glu と Lys との間のペプチド結合の N 原子に位置していたことから、この領域でペプチド結合の分解が生じたため、Peak 1 における KFD に相当する  $[M+H]^+$  ( $m/z$  409) が観測された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によるゲルろ過クロマトグラフィーにより MRPs を分析した結果、LEKFD の分子量よりも低分子および高分子の化合物が多数検出された。したがって、24 時間の加熱により MRPs の一部はペプチド分解あるいはペプチド架橋が生じたことが示唆された。また、それらの低分子および高分子化合物は、前述した MS および MS/MS 分析により観測された EK、KFD あるいは LEK\*FD のピリリウムイオンなどである可能性が示された。フォトダイオードアレイ検出器を用いたゲルろ過クロマトグラフィーは、MRPs のペプチド分解および架橋の推定において有用な情報を得るのに適した分析法であることが明らかとなった。今後は、MS および MS/MS 分析を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーにより検出された化合物の詳細な構造情報を取得していくことが必要である。

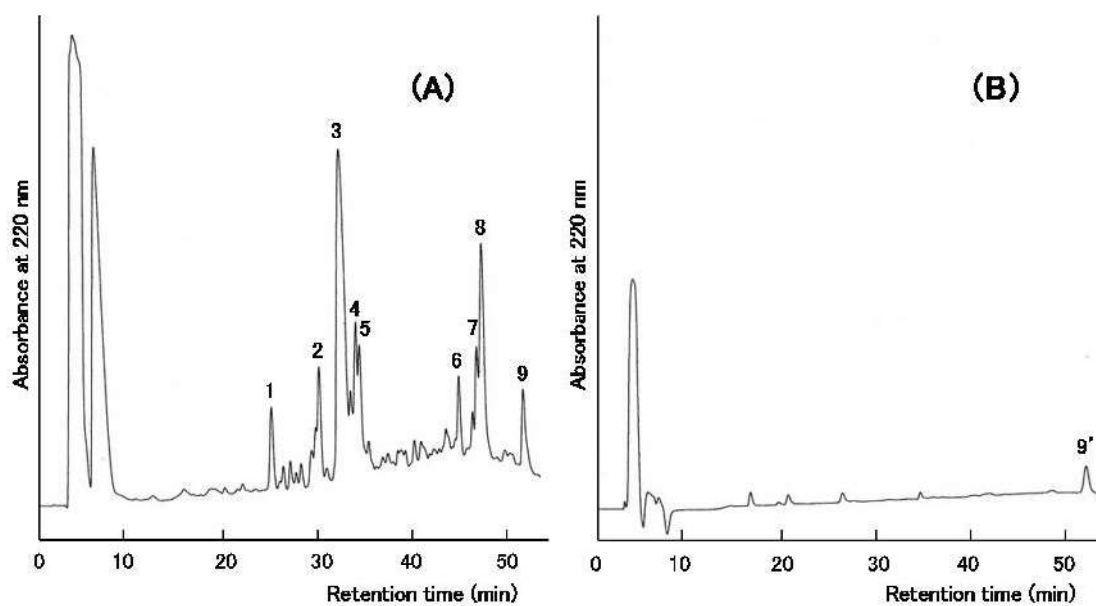
## 2-5. 要旨

近年、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。本研究では、乳清タンパク質の主な成分である $\beta$ -LG 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。m-アミノフェニルボロン酸カラムによる MRPs の選択的抽出の検討を試みたが、すべての Glc 修飾ペプチドを抽出することはできなかった。MS および MS/MS 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、Glc 修飾ペプチドのピリリウムまたはヒドロキシメチルピリリウムイウム、EK および KFD 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。本研究結果は、MRPs のペプチド分解や架橋について解明するうえで極めて重要な情報であるといえる。

**Table 2-1. MRPs derived from the glycated peptide LEKFD identified by ESI-MS and ESI-MS/MS.**

Peak number	R.T. (min)	Exp. Mass [M + H] <sup>+</sup> or [M + 2H] <sup>2+</sup>	Putative sequence	Charge state	Theor. mass [M + H] <sup>+</sup> or [M + 2H] <sup>2+</sup>	Losses of H <sub>2</sub> O	Loss of 150 u
Peak 1	24.4-25.4	276.1	EK	+1	276.3	-	-
		409.3	KFD	+1	409.5	-	-
Peak 2	29.6-30.3	520.5	-	-	-	-	-
Peak 3	31.1-32.9	326.4	LEKFD	+2	326.4	-	-
		651.2	LEKFD	+1	651.8	-	-
Peak 4	33.3-33.9	663.4	LEK*FD	+1	663.8	1	○
Peak 5	33.9-34.8	326.5	LEKFD	+2	326.4	-	-
		651.3	LEKFD	+1	651.8	-	-
		663.4	LEK*FD	+1	663.8	1	○
Peak 6	44.1-44.9	673.3	-	-	-	-	-
Peak 7	46.0-46.5	338.5	-	-	-	-	-
		650.4	-	-	-	-	-
		687.3	-	-	-	-	-
		763.3	-	-	-	-	-
Peak 8	46.5-48.0	650.6	-	-	-	-	-
Peak 9	50.8-52.3	759.5	LEK*FD	+1	759.8	4	-
Peak 9'	50.8-52.3	759.6	LEK*FD	+1	759.8	4	-

\* The putative glycated amino acid is indicated by an asterisk.



**Figure 2-1. HPLC chromatogram of (A) MRPs derived from the glycated peptide LEKFD not bound to the *m*-aminophenylboronic acid column, and (B) MRPs derived from the glycated peptide LEKFD bound to the *m*-aminophenylboronic acid column.**

Fractions of peaks 1-9, 9' were analyzed by ESI-MS, as described in Fig. 2.

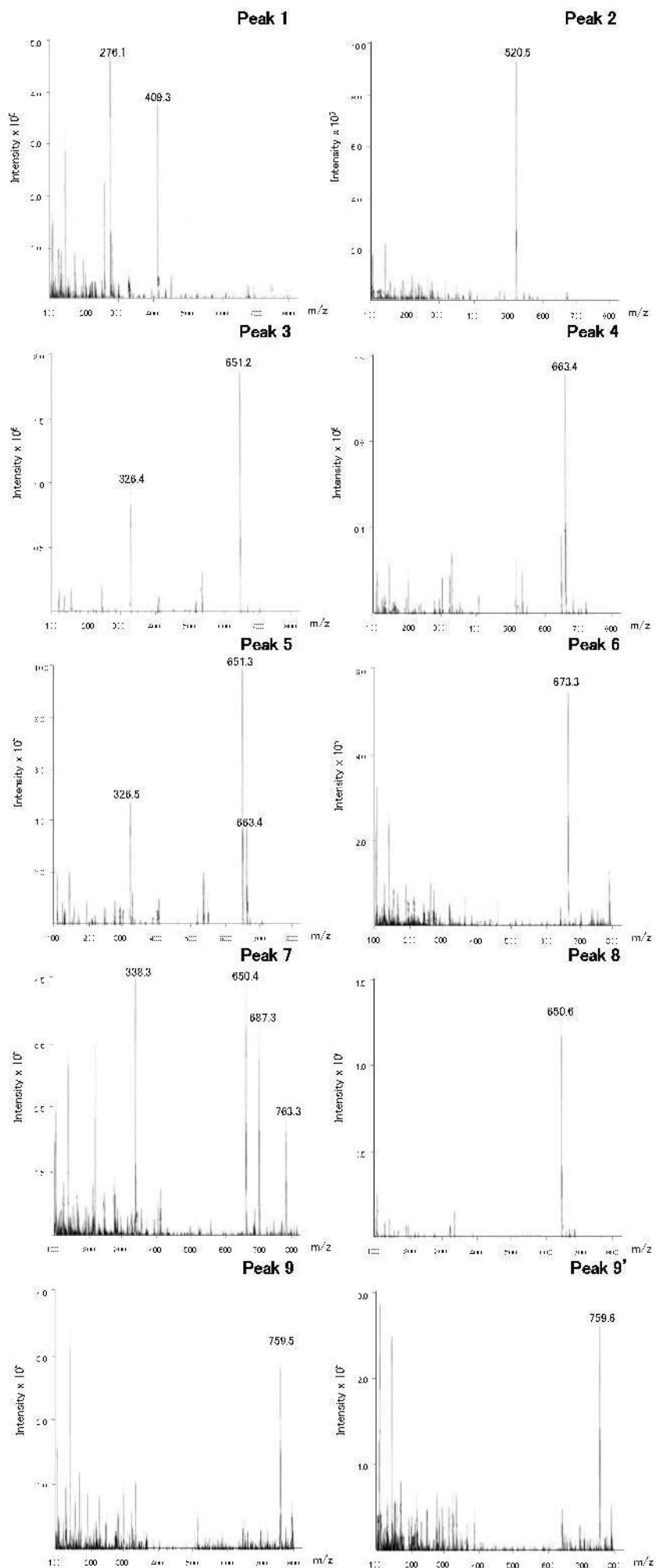
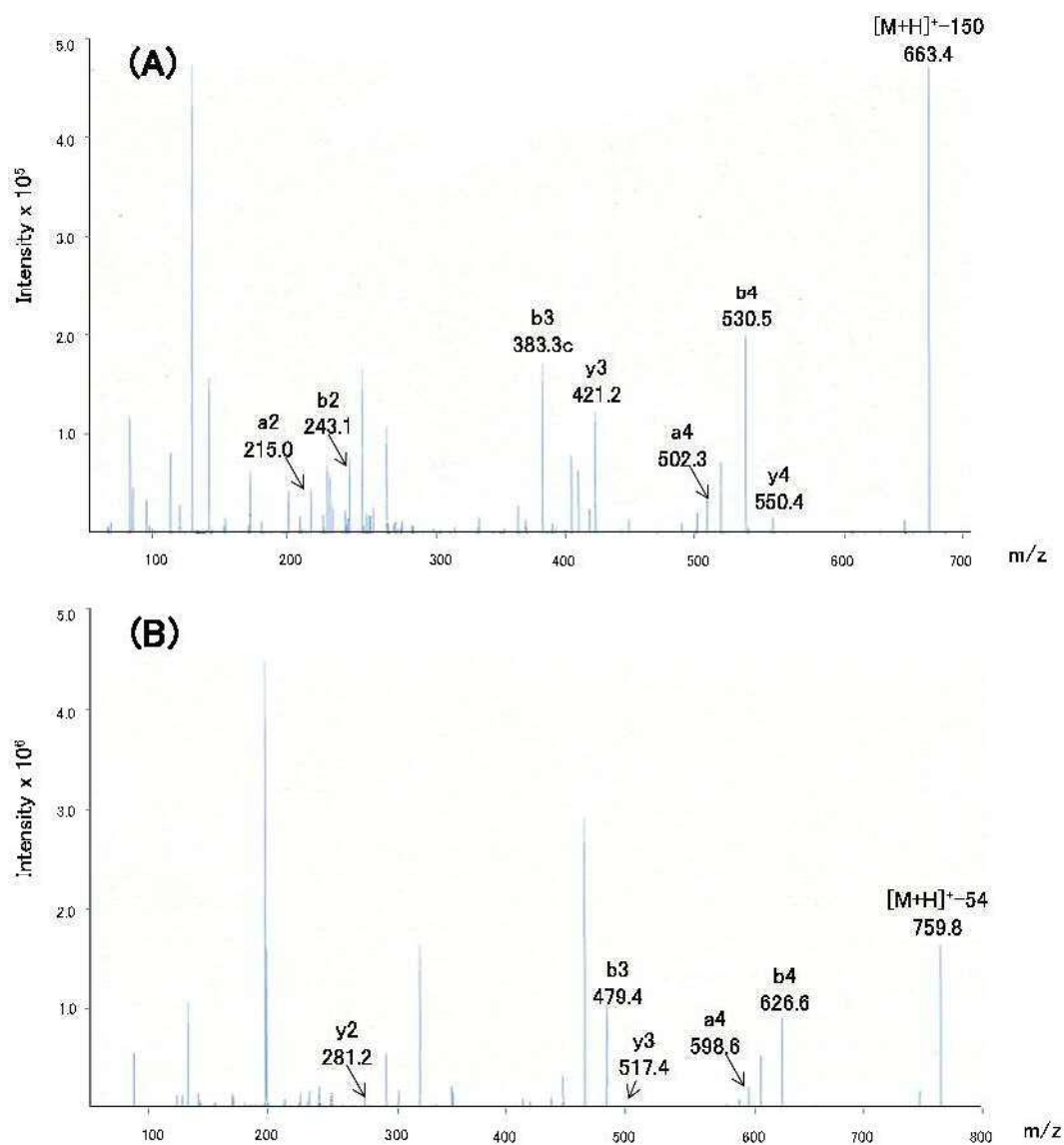


Figure 2-2. ESI-MS spectra of the fractions (peak 1-9, 9') from HPLC chromatography containing MRPs derived from the glycosylated peptide LEKFD.



**Figure 2-3.** ESI-MS/MS spectra of singly charged ions correspond to (A) an imminium ion of LEK\*FD, and (B) a pyrylium or hydroxymethyl furylium ion of LEK\*FD.

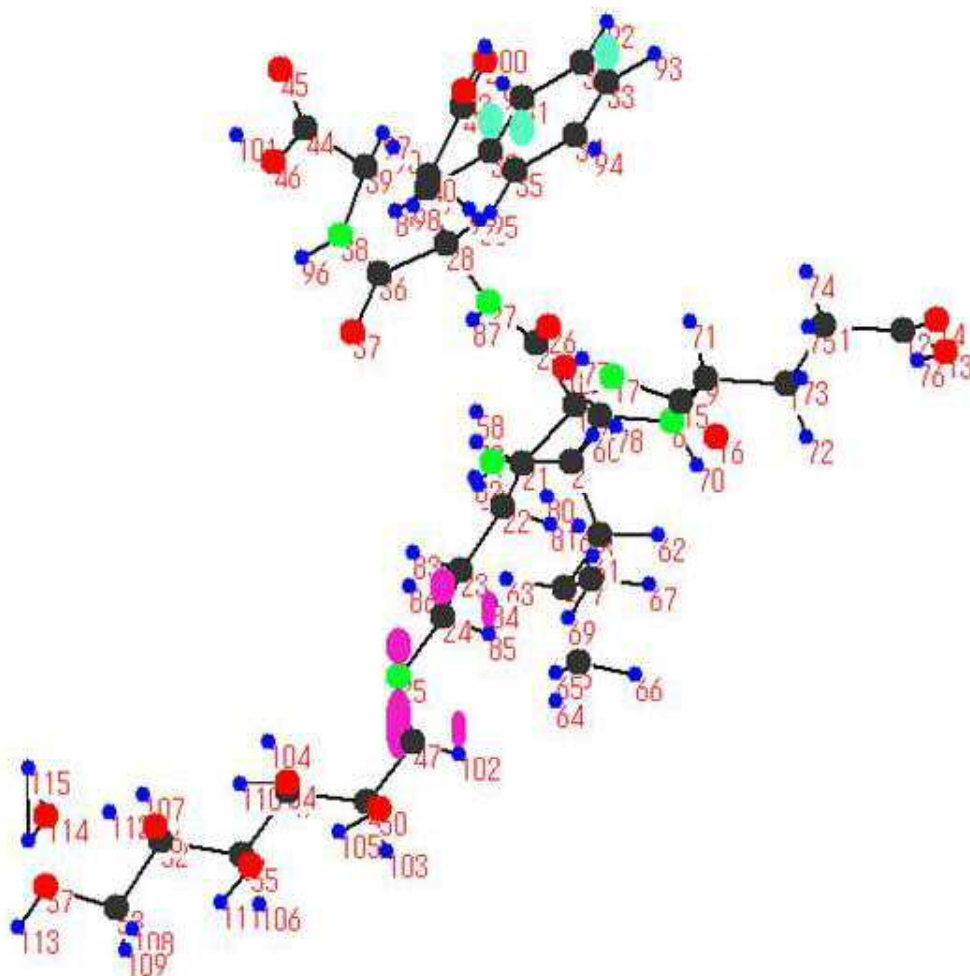
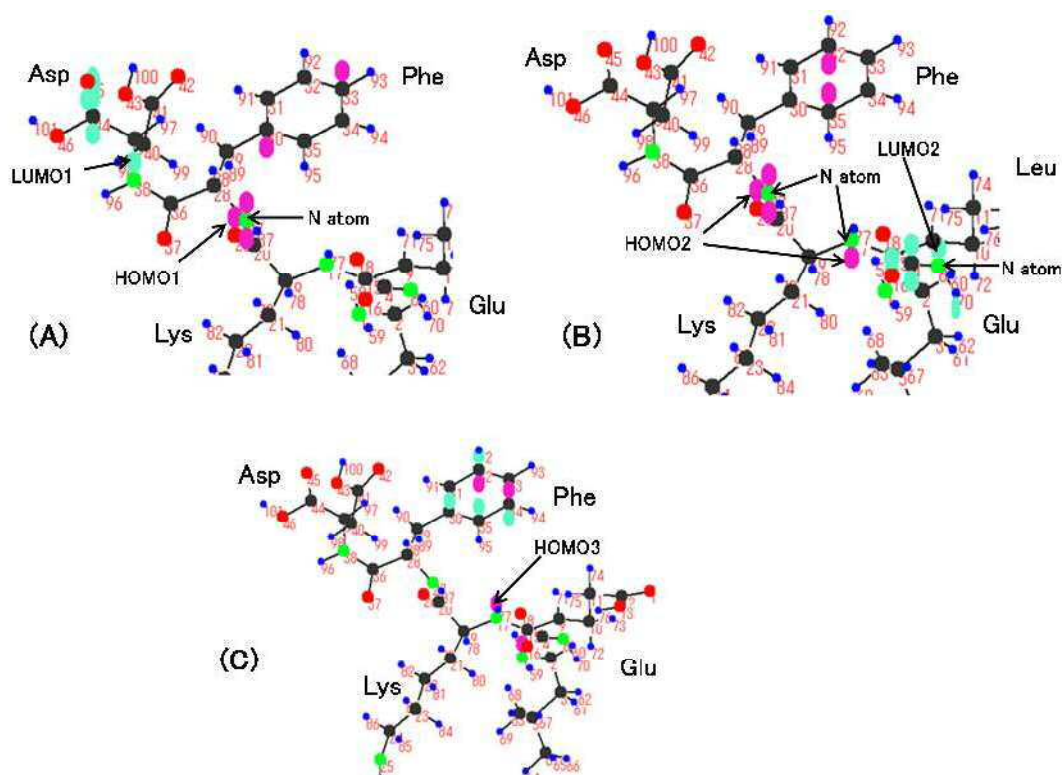


Figure 2-4. Optimized structure of the glycated peptide bound at the N atom of  $\epsilon$ -lysine with HOMO and LUMO. HOMO was located at the N atom of the Schiff base. Green indicates N atoms; red, O atoms; pink, HOMO; and sky blue, LUMO.

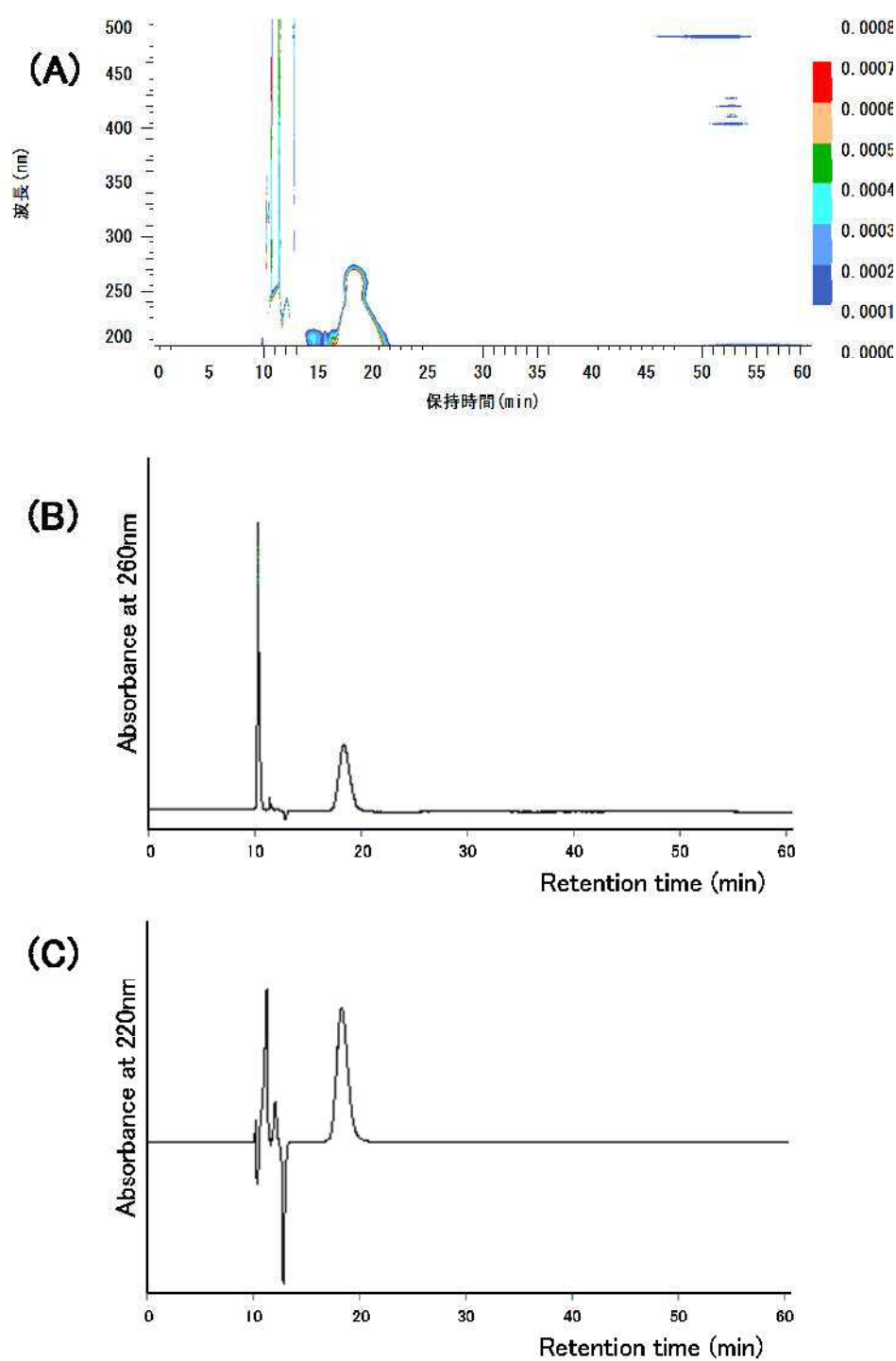


**Figure 2-5. Molecular orbitals around HOMO and LUMO.**

Green indicates N atoms; red, O atoms; pink, HOMO; and sky blue, LUMO.

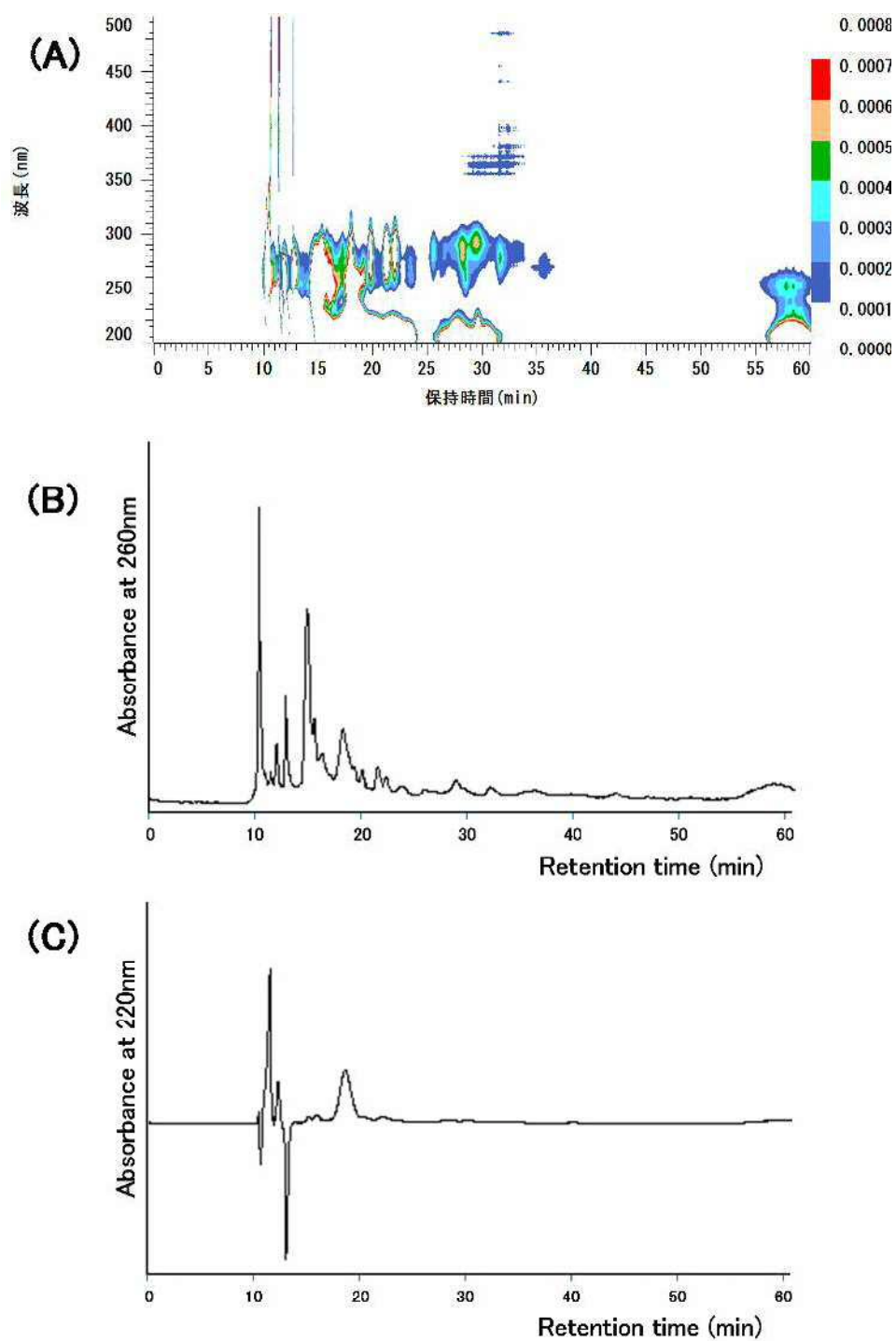
(A) HOMO 1 was located at the N atom of the peptide bond between lysine and phenylalanine. LUMO 1 was located at the N atom of the peptide bond between phenylalanine and aspartic acid. (B) HOMO 2 was located at the N atom of the peptide bond between lysine and phenylalanine, as well as at the N atom of the peptide bond between lysine and glutamic acid. LUMO 2 was located at the N atom of the peptide bond between leucine and glutamic acid. (C) HOMO 3 was also located at the N atom of the peptide bond between lysine and glutamic acid.





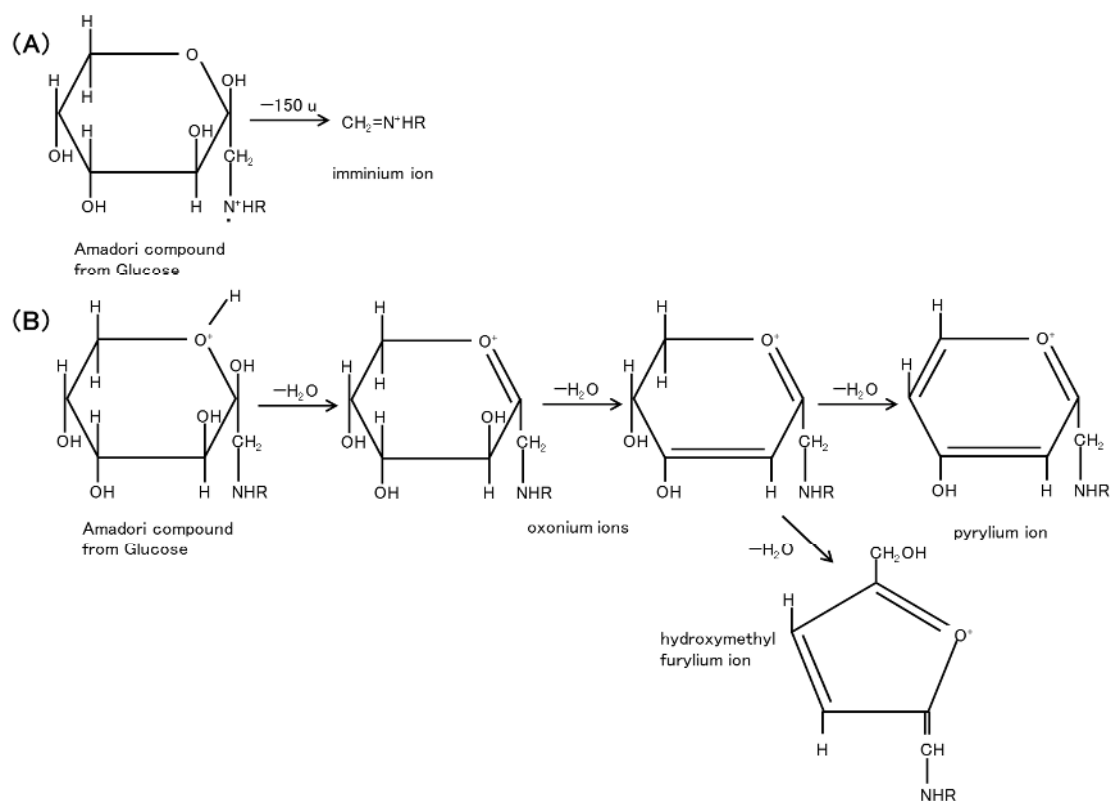
**Figure 2-6. Gel filtration HPLC of LEKFD detected by photodiode array.**

(A) Contour plot. (B) Absorbance at 260nm. (C) Absorbance at 220nm.



**Figure 2-7. Gel filtration HPLC of LEKFD heated at 110°C for 24 h detected by photodiode array.**

(A) Contour plot. (B) Absorbance at 260nm. (C) Absorbance at 220nm.



**Scheme 2-1. Proposed pathway of the glycated peptides to (A) the imminium ion ( $[\text{M}+\text{H}]^+-150$ ), (B) furylium ion ( $[\text{M}+\text{H}]^+-54$ ) and hydroxymethyl furylium ions ( $[\text{M}+\text{H}]^+-54$ ).**

### 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]

食品の加工および調理の過程において、メイラード反応により、味、色、香りの生成およびテクスチャー（食感）の変化がもたらされることが知られている<sup>1)</sup>。さらに、ヘテロサイクリックアミン（HCA）<sup>32, 33)</sup>やアクリルアミド<sup>34)</sup>、4(5)-メチルイミダゾール（4(5)-MI）<sup>35, 36)</sup>などの様々な発がん性を有する危害物質がメイラード反応により生成することが報告されている。したがって、食品の品質および安全を確保するためには、メイラード反応生成物の生成に及ぼす加工および調理条件の影響を解明することが極めて重要である。メイラード反応の中間体であるアマドリ転位生成物は酸加水分解することによりフロシンが生成されることから<sup>42)</sup>、フロシン生成量の測定に基づいて乳タンパク質の糖化の進行をモニターする方法が考案され<sup>69-72)</sup>、現在では穀類、パスタ、蜂蜜など他の製品にも適用されている<sup>73-77)</sup>。しかし、主要なタンパク質源である食肉製品のフロシン生成量の測定はほとんど行われていない。さらに、メイラード反応の後期段階において生成される AGEs（Advanced glycation end products）は、生体内で生じる場合、高血糖を伴う様々な疾病の進展に関与することが明らかとなっている<sup>37)</sup>。したがって、食事性 AGEs の生体内における影響についても着目され始めているが、食事性 AGEs の生理作用については詳細に解明されていない。また、実際の加工・調理条件における食事性 AGEs の詳しい形成メカニズムも、未だ明らかにされていない。

よって本章では、調味料添加の有無と調理法の違いによるメイラード反応に及ぼす影響について、食肉製品を用いたモデル実験をもとに検討を行った。

本章は研究3、4として2つの研究で構成されている。

研究 3：実際の調理に即した条件下における牛肉製品中のメイラード反応生成物の評価

研究 4：実際の調理に即した条件下における魚肉製品中のメイラード反応生成物の評価

## 実際の調理に即した条件下における牛肉製品中のメイラード反応生成物の評価 [研究 3]

### 3-1. 緒言

食品の加工および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ことが知られている<sup>71)</sup>。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。そこで本研究では、アマドリ転位生成物および蛍光物質の分析をもとに、牛肉製品における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。なお、蛍光物質については、ペントシジンやクロスリン、ピロピリジンなど、いくつかの AGEs が蛍光性を有することが報告されているため、蛍光物質の測定を行った<sup>78)</sup>。

### 3-2. 実験方法

#### 3-2-1. メイラード反応生成物の調製

Lys、Glc、NaCl は関東化学（株）から、スクロース（Suc）は和光純薬工業（株）から購入した。牛ひき肉（もも）は国産のものを使用した。

##### (a) 糖類および NaCl 添加 Lys の糖化

糖類は Suc または Glc を用いた。Lys、糖類および NaCl は、0.2 M リン酸バッファー（pH 6.0）により溶解した。各混合液の調整は Table 3-1 に示した。混合液 8.0 ml をスクリー管（16 × 100 mm）に入れて栓をし、ヒートブロックを用いて 100 °C で 0、30、60、90、120 分間加熱した。その後、速やかに冷却して冷凍保存した。

##### (b) 糖類および NaCl 添加牛肉の調製（フライパン焼き）

糖類は Suc または Glc を用いた。Table 3-2 に示すとおり、糖類および NaCl

を牛ひき肉に添加し、牛肉が 50 g になるようにハンバーグ状に形成した。試料は、テフロンのフライパンを用いてオイルを使用せずに 200℃で 0-60 分間加熱した。加熱中、均等に火が通るようにするため両面焼きを行った。フライパンの表面温度は、ミノルタスポットサーモメーター(HT-21、コニカミノルタ(株))により測定された。加熱後、速やかに冷却しホモジナイザー(日本精機(株))により超純水で均質化した。ペースト状の試料は凍結乾燥し冷凍保存した。

### **(c) アマドリ転位生成物定量用上白糖および NaCl 添加牛肉の調製(3 種の加熱法)**

牛ひき肉に 5.0% (w/w) 上白糖および 1.0% (w/w) NaCl を添加して、牛肉が 50 g になるようにハンバーグ状に形成し、調味料添加牛肉とした。添加した調味料の濃度は、家庭料理における調味の標準的な濃度に基づいた。一方、生の牛ひき肉を 50 g になるようにハンバーグ状に形成し、調味料無添加牛肉とした。各試料は、揚げ(140℃)、フライパン焼き(200℃)またはガスオーブン加熱(170℃)の 3 種の調理法により 0-30 分間加熱された。揚げ試料は 100%ピュアコーン油を用いて揚げ、油の表面温度はミノルタスポットサーモメーター(HT-21、コニカミノルタ(株))により測定された。フライパン焼き試料は、「第 3 章 3-2-1. (b)」の項と同様に加熱された。オーブン加熱試料は、オーブン(300 × 425 × 375 mm、GMO-S1300、ハーマン(株))の中央に置いて加熱された。各試料の内部温度は、熱電対式温度計測器(データコレクタ:AM-7002、熱電対プローブ:タイプ K、安立計器(株))により測定された。加熱後、各試料は速やかに冷却しホモジナイザー(日本精機(株))により超純水で均質化した。ペースト状の試料は凍結乾燥し冷凍保存した。

### **(d) 蛍光強度測定用調味料無添加牛肉の調製(3 種の加熱法)**

牛肉が 50 g になるようにハンバーグ状に形成した。各試料は、「第 3 章 3-2-1.

(c)」の項と同様に揚げ（140℃）、フライパン焼き（200℃）またはガスオーブン加熱（170℃）の3種の調理法により0-30分間加熱された。加熱後、各試料は速やかに冷却しホモジナイザー（日本精機（株））により超純水で均質化した。ペースト状の試料は凍結乾燥し冷凍保存した。凍結乾燥させた試料 600.0 mg を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1) により脱脂して風乾した。風乾した試料 150.0 mg を 0.01 M リン酸バッファー (pH 6.0) 8.0 ml により均質化し、遠心分離機により遠心 (3000 rpm、10 分) して、その上清を試料として用いた。

### 3-2-2. 糖類および NaCl 添加 Lys の褐変度測定

UV-VIS 分光光度計 DU650（ベックマン・コールター（株））を用い、波長 470 nm における吸光度を測定することにより、試料の褐変度を測定した。

### 3-2-3. 糖類および NaCl 添加 Lys のアマドリ転位生成物の定量

主要なアマドリ転位生成物である  $\epsilon$ -N-deoxy-fructosyl-lysine を酸加水分解することによりフロシンが生成される<sup>42)</sup>。したがって、フロシンを定量したのち 2.776 を乗じてアマドリ転位生成量に換算した。フロシンの定量法は Nicoletti 等の方法を改変して行った<sup>44)</sup>。凍結乾燥させた試料を Lys 含量が 90.0 mg になるようにスクリー管 (16 × 100 mm) に秤量し、8 N HCl を 8.0 ml 加えた後に  $\text{N}_2$  を 2 分間吹き付けて栓をし、110℃、23 時間加水分解を行った。酸加水分解試料は 0.2  $\mu\text{m}$  膜フィルターを用いて濾過した後、固相抽出を行った。固相抽出カートリッジ (Bond Elut-C18 100 mg 1 ml、Varian Associates) は、まずメタノール 1.0 ml、次に超純水 3.0 ml を用いてコンディショニングを行った。次に濾過後のタンパク質試料 0.5 ml をロードし、8 N HCl 0.5 ml で溶出した。その溶出液を HPLC 分析の試料として用いた。HPLC の分析条件は以下の通り



である。

分析装置：HPLC-10Avp（島津製作所（株））

カラム：Intersil Peptides C18（4.6×250 mm、GL Science）

カラム温度：30℃

流速：1.0 ml/min

検出器：SPD-M10Avp ダイオードアレイ検出器（島津製作所（株））

検出波長：280 nm

溶出条件：A 液（5 mM ヘプタスルホン酸/0.2%ギ酸/超純水）

B 液（0.2%ギ酸/アセトニトリル）

A 液：B 液＝80：20

サンプル注入量：20.0 μl

フロシン標準品（Neosystem）は 8 N HCl を用いて 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μg/ml に希釈し、固相抽出を行った後に検量線を作成した（ $R^2=0.9998$ ）。

#### **3-2-4. 糖類および NaCl 添加牛肉（フライパン焼き）のアマドリ転位生成物の定量**

凍結乾燥させた試料をタンパク質含量が 50.0 mg になるようにスクリー管（16×100 mm）に秤量した。粗タンパク質の定量はケルダール法を用いた。酸加水分解、固相抽出および HPLC 分析は「第 3 章 3-2-3.」の項に従って行った。

#### **3-2-5. 上白糖および NaCl 添加牛肉（3 種の加熱法）のアマドリ転位生成物の定量**

凍結乾燥させた試料をタンパク質含量が 50.0 mg になるようにスクリー管（16×100 mm）に秤量した。粗タンパク質の定量はケルダール法を用いた。酸

加水分解、固相抽出および HPLC 分析は「第 3 章 3-2-3.」の項に従って行った。

### 3-2-6. 調味料無添加牛肉（3 種の加熱法）の蛍光強度測定

蛍光強度測定には、分光蛍光光度計 RF-1500（島津製作所（株））を用いた。まず 370/440 nm（Ex./Em.）の波長により蛍光強度の測定を行った。さらに、励起波長および蛍光波長の最適化を検討するため、Ex. を 340 nm に固定して Em. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行い、次に、極大波長がみられた Em. 425 nm で波長を固定して Ex. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行った。調味料無添加牛肉試料は、Lowry 法によりタンパク質濃度 5.0 mg/ml になるように調製し、さらに 10-35 倍希釈したのち測定を行った。

### 3-2-7. 統計解析

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。すべての統計処理には Windows 版 Stat View（SAS Institute）による分散分析を用い、分析結果により事後検定（post-hoc test）として Tukey-Kramer を行った。p<0.05 を統計学的有意水準とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 糖類および NaCl 添加 Lys 試料の褐変度

褐変反応における糖類（Suc または Glc）および NaCl 添加の影響を検討するため、Lys をモデルとして用いて検討した。さらに、加熱時間による影響も検討するため、100 °C で 0、30、60、90、120 分間加熱した試料を比較した。糖類および NaCl 添加 Lys 試料の褐変度を Fig. 3-1 に示した。Suc を用いて糖化した結果、褐変度が非常に低値を示し、NaCl 添加による影響を確認することができなかった。一方、Glu を用いて糖化した結果、褐変度は加熱時間に伴い増加した。また、120 分間加熱した場合、1.0% (w/v) NaCl 添加により褐変度が有意に抑制された。

#### 3-3-2. 糖類および NaCl 添加 Lys 試料のアマドリ転位生成物の生成

アマドリ転位生成物の形成における糖類（Suc または Glc）および NaCl 添加の影響を検討するため、Lys をモデルとして用いて検討した。さらに、加熱時間による影響も検討するため、100 °C で 0、30、60、90、120 分間加熱した試料を比較した。糖類および NaCl 添加 Lys 試料のアマドリ転位生成物量を Fig. 3-2 に示した。Suc を用いて糖化した結果、生成量が非常に低値を示し、NaCl 添加による影響を確認することができなかった。一方、Glc を用いて糖化した結果、加熱 60 分後に生成量の増大がピークに達した後、減少した。さらに、60 分間加熱した場合のみアマドリ転位生成物の生成が、1.0% (w/v) NaCl 添加により有意に抑制された。

#### 3-3-3. 糖類および NaCl 添加牛肉試料（フライパン焼き）のアマドリ転位生成物の生成

アマドリ転位生成物の形成における糖類（Suc または Glc）および NaCl 添加の影響を検討するため、牛肉をモデルとして用いて検討した。さらに、加熱時間による影響も検討するため、200 °C で 0-60 分間加熱した試料を比較した。糖類および NaCl 添加牛肉試料のアマドリ転位生成物量を Fig. 3-3 に示した。調味料無添加試料および NaCl のみで調味した試料において、アマドリ転位生成物が加熱によりわずかに増加した。また、Suc で調味し加熱した場合も、生成量が低値を示し、NaCl 添加による影響を確認することができなかった。一方、Glc で調味し加熱した場合、Glc 添加濃度が高いほどアマドリ転位生成物量が高くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。さらに 5.0% (w/w) Glu 添加試料では、1.0% (w/w) NaCl 添加により有意に生成量が抑制された。

#### 3-3-4. 上白糖および NaCl 添加牛肉試料（3 種の加熱法）のアマドリ転位生成物の生成

アマドリ転位生成物の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加（5.0% (w/w) 上白糖、1.0% (w/w) NaCl）および無添加牛肉試料を各々フライパン焼き、オーブン加熱、揚げの 3 種の加熱法で 0-30 分間調理し、各試料の内部温度（Fig. 3-4）およびアマドリ転位生成物量（Fig. 3-5）を測定した。試料の内部温度は、揚げおよびフライパン焼きが最初の 5-10 分ほどで急激に温度が上昇したのに対し、オーブン加熱は 30 分かけて緩やかに温度が上昇した。すべての試料において 100°C 以上に内部温度が上がることはなかった。また、調味料添加の有無による差異はほとんどみられなかった。アマドリ転位生成物量は、揚げおよびフライパン焼きの加熱法において加熱後 10 分までに増大したが、10 分後以降では生成量の増加がみられなかった。一方、オーブン加熱では加熱後 15 分までは増加しなかったが、15 分過ぎに直線的に増加した。調味

料添加の有無による差異は、揚げおよびオーブン加熱による 30 分間加熱のみ、アマドリ転位生成物の生成が調味料添加により有意に増加した。しかしながら、各調理条件におけるアマドリ転位生成物量の差はほとんどみられなかった。アマドリ転位生成物の最大生成量は、各調理法ともにおよそ 160mg/100g protein であった。

### 3-3-5. 調味料無添加牛肉試料（3 種の加熱法）の蛍光物質の生成

メイラード物質由来蛍光物質の生成における調理条件による影響を検討するため、調味料無添加牛肉試料を各々フライパン焼き、オーブン加熱、揚げの 3 種の加熱法で 0-30 分間調理し、各試料の蛍光強度を測定した (Fig. 3-6、3-7、3-8)。まず、370/440 nm (Ex./Em.) の波長により蛍光強度測定を行った (Fig. 3-6)。その結果、各調理条件における牛肉試料中の蛍光強度は、加熱時間に伴い増加した。また、3 種の加熱法のなかで特にフライパン焼きの増加速度が速く、次いで揚げ、オーブン加熱の順であった。さらに、オーブン加熱の増加速度は他の 2 種の調理条件と比較して顕著に遅く、蛍光物質の生成が有意に抑制された。牛肉試料における励起波長および蛍光波長の最適化を検討した結果、333/425 nm (Ex./Em.) で最も感度よく測定することが可能であった。フライパン焼きの牛肉試料は、Em. を 425 nm に固定し励起波長を 220-900 nm でスキャンした結果、Ex. 333 nm にて極大ピークがみられ、未加熱の牛肉試料にはこのような極大ピークはみられなかった (Fig. 3-7)。また、揚げおよびオーブン加熱の牛肉試料においても同様の結果が得られた (データ省略)。333/425 nm (Ex./Em.) により蛍光強度を測定した結果、370/440 nm (Ex./Em.) の測定と同様に、各調理条件における牛肉試料中の蛍光強度は、加熱時間に伴い増加した (Fig. 3-8)。また、3 種の加熱法のなかでオーブン加熱が最も蛍光強度の増加

速度が緩やかであった。さらに、他の 2 種の調理条件と比較してオーブン加熱は顕著に蛍光物質の生成が抑制された。370/440 nm (Ex./Em.) の波長による測定と比較して唯一違う点は約 300 倍感度が良かった。

### 3-4. 考察

褐変反応およびアマドリ転位生成物の形成における糖類 (Suc または Glc) および NaCl 添加の影響を検討するため、Lys をモデルとして用いて検討した。その結果、非還元糖である Suc は還元糖の Glc に比べて反応性が低いため、褐変度およびアマドリ転位生成物量ともに非常に低値を示した。また、NaCl 添加による影響を判別することができなかった。比較のために用いた Glc では、褐変度は加熱時間に伴い増加し、120 分間加熱では 1% (w/v) NaCl 添加により有意に抑制された。「第 1 章 1-3-1.」においても NaCl 添加 Lys 試料の褐変度を検討したが、それよりもさらに NaCl 濃度が低い場合でも褐変度が抑制されることが明らかとなった。一方、アマドリ転位生成物量は、加熱 60 分後に増大がピークになったのを境に減少し、加熱 60 分後のみで NaCl 添加による生成抑制が確認された。メイラード反応の初期段階に生じるアマドリ転位生成物は、加熱によって脱水反応を起こし、1,2-エミナールや 2,3-エンジオールといった中期段階生成物に変化しやすいため<sup>49, 50)</sup>、このような結果になったことが推察された。実際の調味では Glc ではなく Suc を用いることから、褐変度、アマドリ転位生成物量は、メイラード反応の進行を評価する上で適切でない可能性が考えられた。

牛肉試料を用いて、アマドリ転位生成物の形成における糖類 (Suc または Glc) および NaCl 添加の影響を検討した結果、調味料無添加試料、および NaCl のみで調味した試料において、アマドリ転位生成物が加熱によりわずかに増加した。これは、牛肉の中に元来 Glc が含まれていたためであると推察された。Suc で調味し加熱した試料も同様に、アマドリ転位生成物の生成が少なく、NaCl 添加による影響を判別することができなかった。一方、メイラード反応において反応性が高い Glc で調味した場合、Glc 添加量および加熱時間に伴いアマドリ転位生成物の生成が増加した。しかし、5.0% (w/w) Glu 添加試料では 1.0% (w/w)

NaCl 添加により生成が抑制され、Lys を用いたモデル系と同様の結果が得られた。実際の調味では Suc を用いるため、牛肉試料のフライパン焼きにおいては、Suc および NaCl による調味は、アマドリ転位生成物の生成にあまり影響しないことが示唆された。

アマドリ転位生成物の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加および無添加牛肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の加熱法で調理し、各試料の内部温度およびアマドリ転位生成物量を測定した。アマドリ転位生成物量については、フライパン焼きと揚げの加熱法において、加熱後 10 分までに増大したが、それ以降は増加しなかった。それに対して、オーブン加熱では加熱後 15 分までは増加しなかったが、15 分過ぎに直線的に増加した。その理由のひとつとして、オーブン加熱では他の 2 種の調理条件と比較して、加熱初期の試料内部の温度上昇が緩やかであったことが考えられた。また、3 種の調理法では加熱による伝導方式がそれぞれ異なるため、それらの影響によりアマドリ転位生成物量に差異が生じた可能性も考えられた。フライパン焼きは、高温に熱されたフライパンに接した牛肉試料の表面でアマドリ転位生成物が急激に増加し、その後、伝導熱により試料内部で緩やかにアマドリ転位生成物が増加したことが推察された。一方、ガスオーブンは強制対流式であるため、空気の対流による伝熱が主流となる。したがって、牛肉試料の温度が空気の対流により緩やかに上昇し、それに伴いアマドリ転位生成物量も緩やかに上昇したと考えられた。揚げの場合では、同じ対流でも油の対流であるため、ガスオーブンよりも熱伝導率が高く、さらに、表面での水蒸気の発生により油の対流を強制的に引き起こすため、急激にアマドリ転位生成物が増加したことが推察された。オーブン加熱と揚げの加熱法においては、アマドリ転位生成物量は調味した試料の方が有意に多かった。しかしながら、各調理条件における



生成量の差はほとんどみられなかった。したがって、これら 3 種の調理条件における調味によるアマドリ転位生成物の形成への影響は少ないことが示唆された。

メイラード物質由来蛍光物質の生成における調理条件による影響を検討するため、調味料無添加牛肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の加熱法で調理し、各試料の蛍光強度を測定した。一般にメイラード反応由来の蛍光物質の測定には、励起波長 (Ex.) 340-370 nm、発光波長 (Em.) 420-470 nm がよく用いられている<sup>79)</sup>。また、*in vivo*における蛍光物質測定には、370/440 nm (Ex./Em.) や 350/450 nm (Ex./Em.) が用いられている<sup>80, 81)</sup>。したがって、まずメイラード反応由来蛍光物質の測定において、一般的な 370/440 nm (Ex./Em.) を用いて測定を行った。さらに、励起波長および発光波長の最適化を検討するため、Ex.を 340 nm に固定して Em. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行い、次に、極大波長がみられた Em. 425 nm で波長を固定して Ex. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行った。その結果、牛肉試料の蛍光強度は 333/425 nm (Ex./Em.)で最も感度よく測定できることが明らかとなり、一般的に用いられている 370/440 nm (Ex./Em.) の測定と比べて約 300 倍感度が良かった。各調理条件における牛肉試料中の蛍光強度は加熱時間に伴い増加しており、本測定法が加熱牛肉のメイラード反応の進行を反映する指標として有効であることが示唆された。また、オーブン加熱で調理した牛肉は他の 2 種の調理条件と比べて蛍光の増加速度が最も緩やかであった。したがって、加熱による牛肉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された。Ahmed 等によると、メイラード反応生成物の検出には LC/MS/MS 法が最もよい方法であると報告している<sup>77)</sup>。しかし、この方法はすべてのメイラード反応生成物を同定することができないため、確

立された方法とはいえない。したがって、我々は“全 AGE 蛍光強度”を測定することが、食品中の AGE 形成を明らかにするためには有効な手法ではないかと考えた。Leclère 等は、ミルクに類似したモデル系を用いて加熱によるリジン損傷について分析を行った<sup>82)</sup>。その結果、60-85℃の加熱処理をした場合、初期段階ではアマドリ転位生成物の分解物であるフロシンと後期メイラード反応生成物（Advanced Maillard product : AMP）の蛍光が同時に増加し、両指標ともリジン損傷を反映していることが明らかとなった。しかしその後、フロシンは定常の濃度状態に達し、AMP の蛍光のみ増加し続けリジン損傷との相関関係を示した。このことから、メイラード反応初期および後期においては、ミルクの加熱処理によるリジン損傷の指標として、AMP の蛍光が有効であると著者らは結論付けている。本研究においても、ミルク類似モデルの研究と同様の結果が得られたことから、蛍光測定が食品中におけるメイラード反応の進行を評価するのに効果的な指標であることが示唆された。

本研究では、アマドリ転位生成物および蛍光物質の生成を調べるため、モデル実験として牛肉試料の 30 分加熱や 60 分加熱を行った。実際の調理では食品の品質上 10-15 分の加熱が最も適した加熱時間であるが、食品の安全性においても有害なメイラード反応生成物の形成を減らすために、10-15 分の加熱が最適な加熱時間であることが明らかとなった。

### 3-5. 要旨

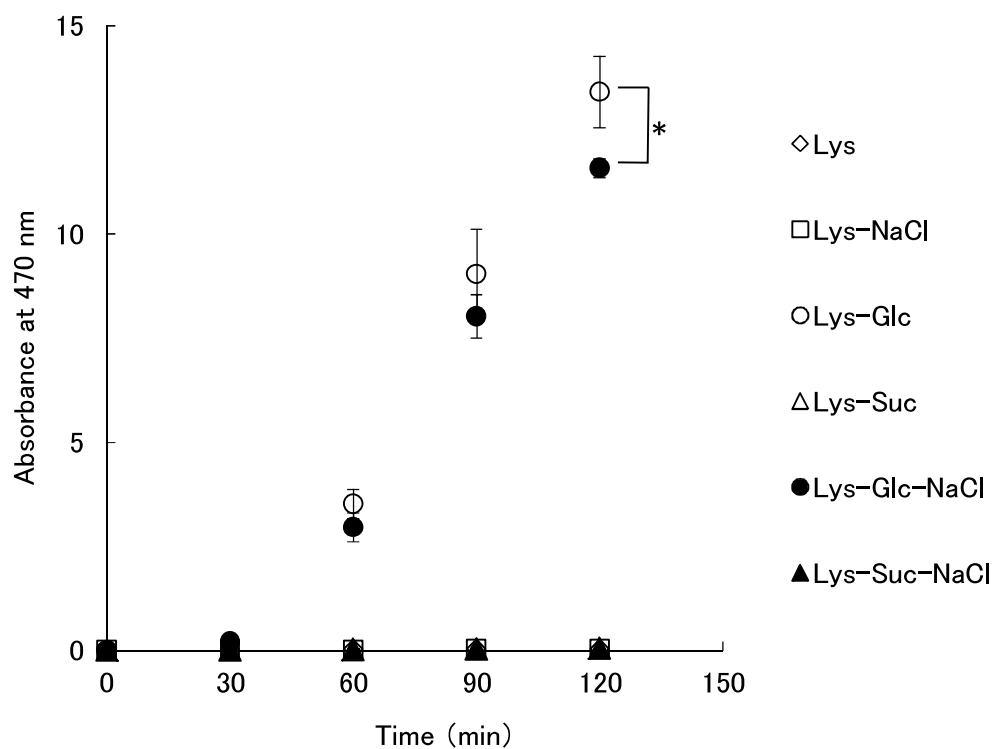
食品の加工や調理の過程において、メイラード反応により様々な香気成分や色素、危害物質が生成される。したがって、調理条件とメイラード反応生成物の関係を明らかにすることは大変重要である。そこで本研究では、アマドリ転位生成物と蛍光物質の生成をもとに、牛肉中メイラード反応生成物の生成に及ぼす調理法の影響について検討を行った。アマドリ転位生成物の生成はフライパン焼きと揚げでは急速に増加したがオーブン加熱では始め緩やかに増加した。加熱した牛肉の蛍光は 333/425 nm (Ex./Em.) に最大値を有し、牛肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブン加熱で調理した牛肉は他の 2 つの調理法に比べて蛍光の増加速度が緩やかであった。したがって、加熱による牛肉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。

**Table 3-1. Composition of meat samples containing L-Lys, saccharide and NaCl for the Maillard reaction**

Model name	L-Lys (M)	D-Glc (M)	Sucrose (M)	NaCl (%(w/v))
Lys	0.10	0.00	0.00	0.00
Lys-NaCl	0.10	0.00	0.00	1.00
Lys-Glc	0.10	0.15	0.00	0.00
Lys-Suc	0.10	0.00	0.15	0.00
Lys-Glc-NaCl	0.10	0.15	0.00	1.00
Lys-Suc-NaCl	0.10	0.00	0.15	1.00

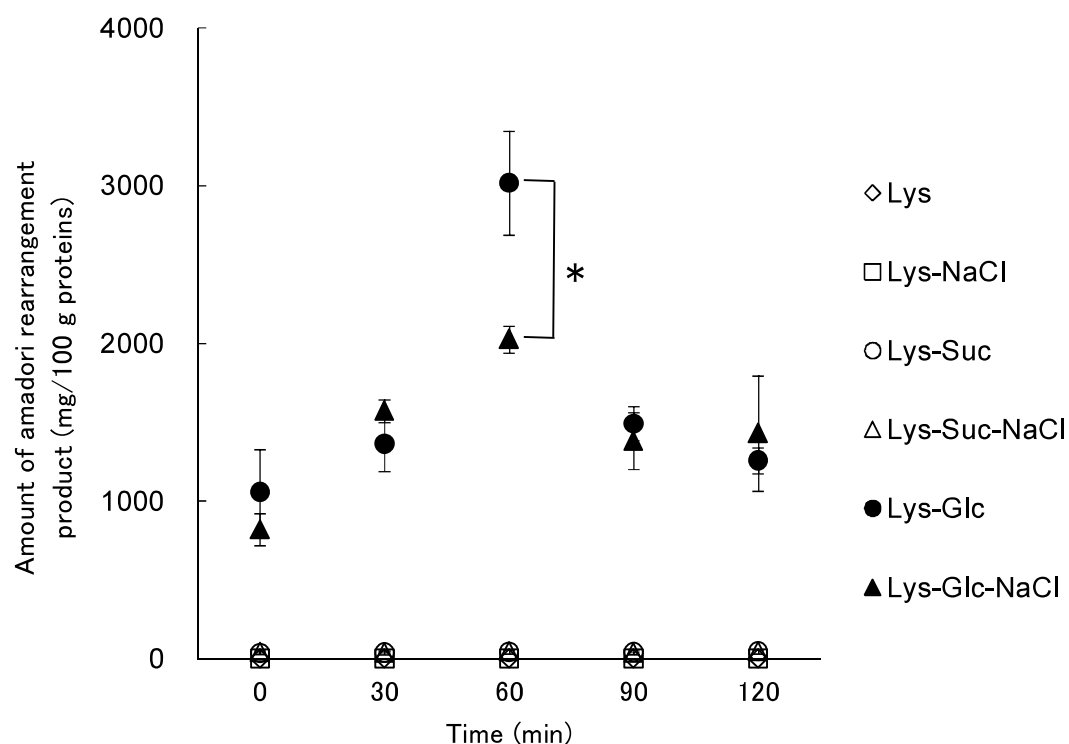
**Table 3-2. Composition of pan-broiled meat samples containing saccharide and NaCl**

Model name	D-Glc (%(w/w))	Sucrose (%(w/w))	NaCl (%(w/w))
Meat	0.0	0.0	0.0
Meat-NaCl	0.0	0.0	1.0
Meat-Glc 5.0%	5.0	0.0	0.0
Meat-Glc 2.5%	2.5	0.0	0.0
Meat-Suc 10.0%	0.0	10.0	0.0
Meat-Suc 5.0%	0.0	5.0	0.0
Meat-NaCl-Glc 5.0%	5.0	0.0	1.0
Meat-NaCl-Glc 2.5%	2.5	0.0	1.0
Meat-NaCl-Suc 10.0%	0.0	10.0	1.0
Meat-NaCl-Suc 5.0%	0.0	5.0	1.0



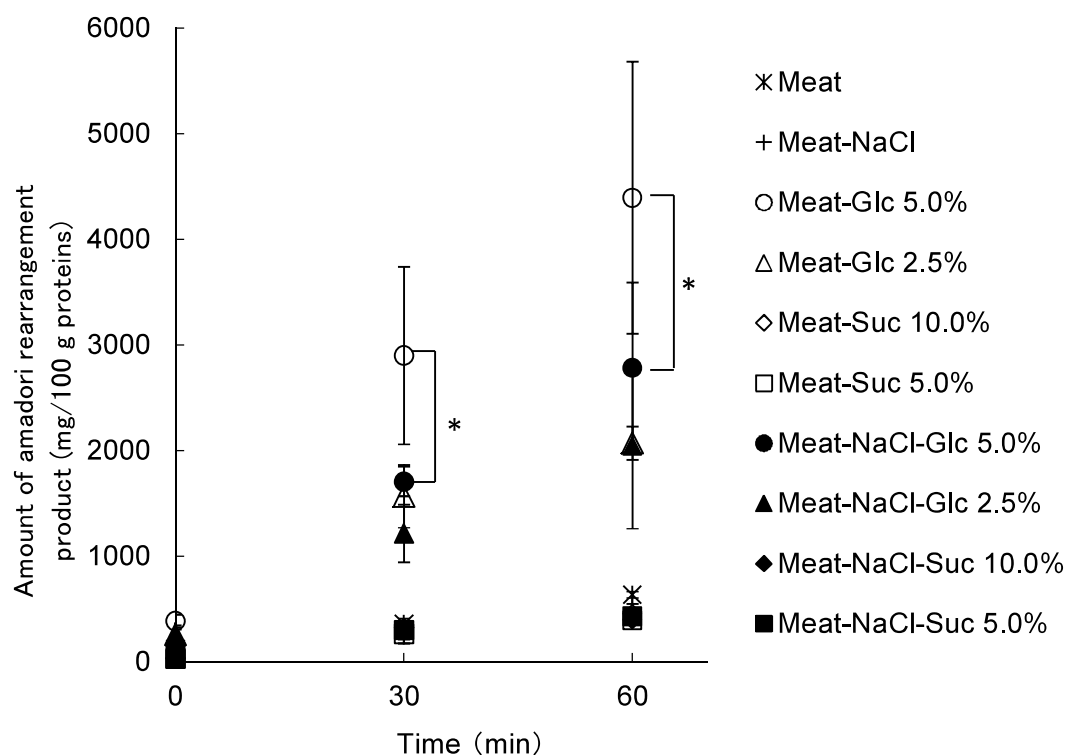
**Figure 3-1. Degree of browning of L-Lys samples containing saccharide and NaCl.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. Each value is the mean of 3 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



**Figure 3-2. Amounts of amadori rearrangement product in L-Lys samples containing saccharide and NaCl.**

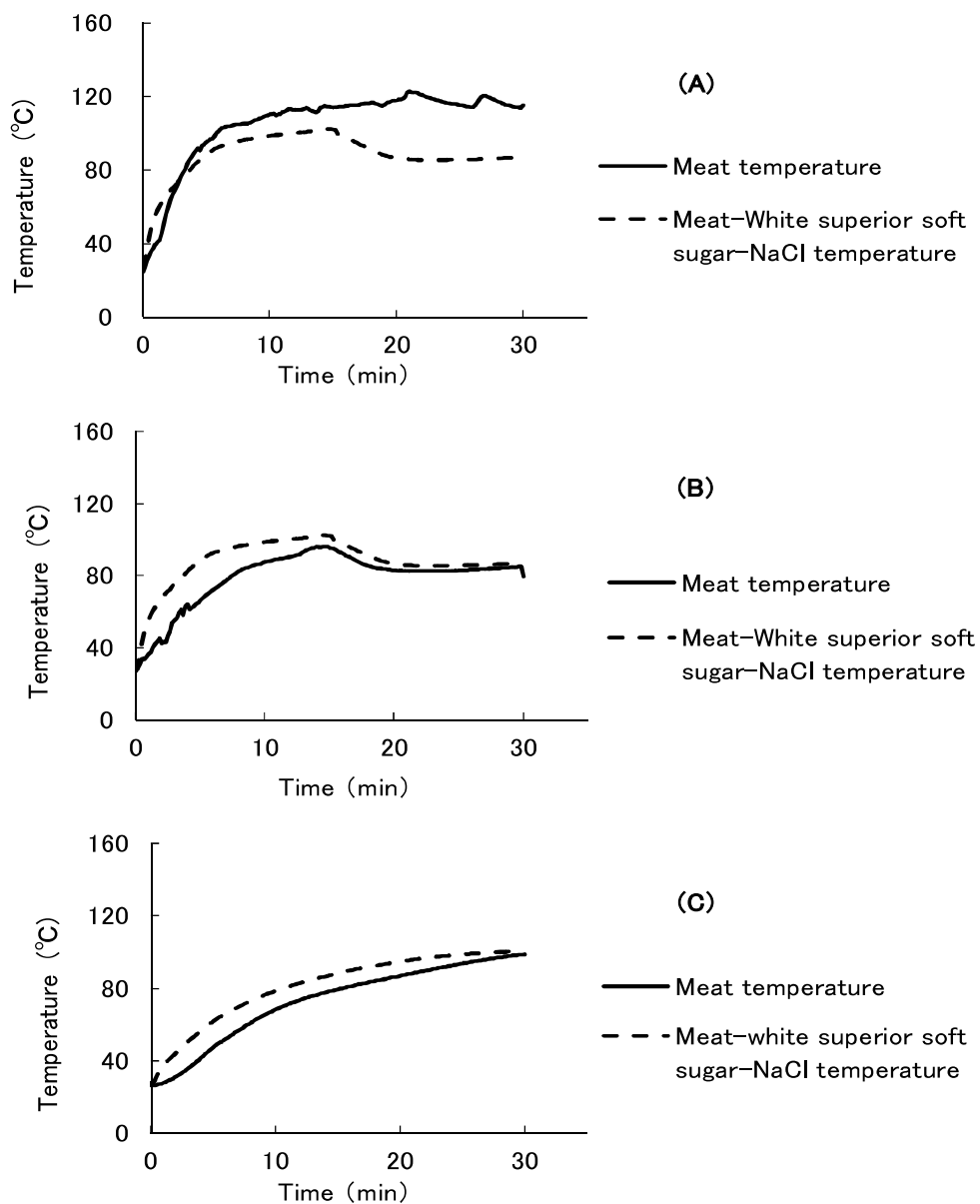
The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. Each value is the mean of 6 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.



**Figure 3-3. Amounts of amadori rearrangement product in pan-broiled (at 200°C) meat samples containing saccharide and NaCl.**

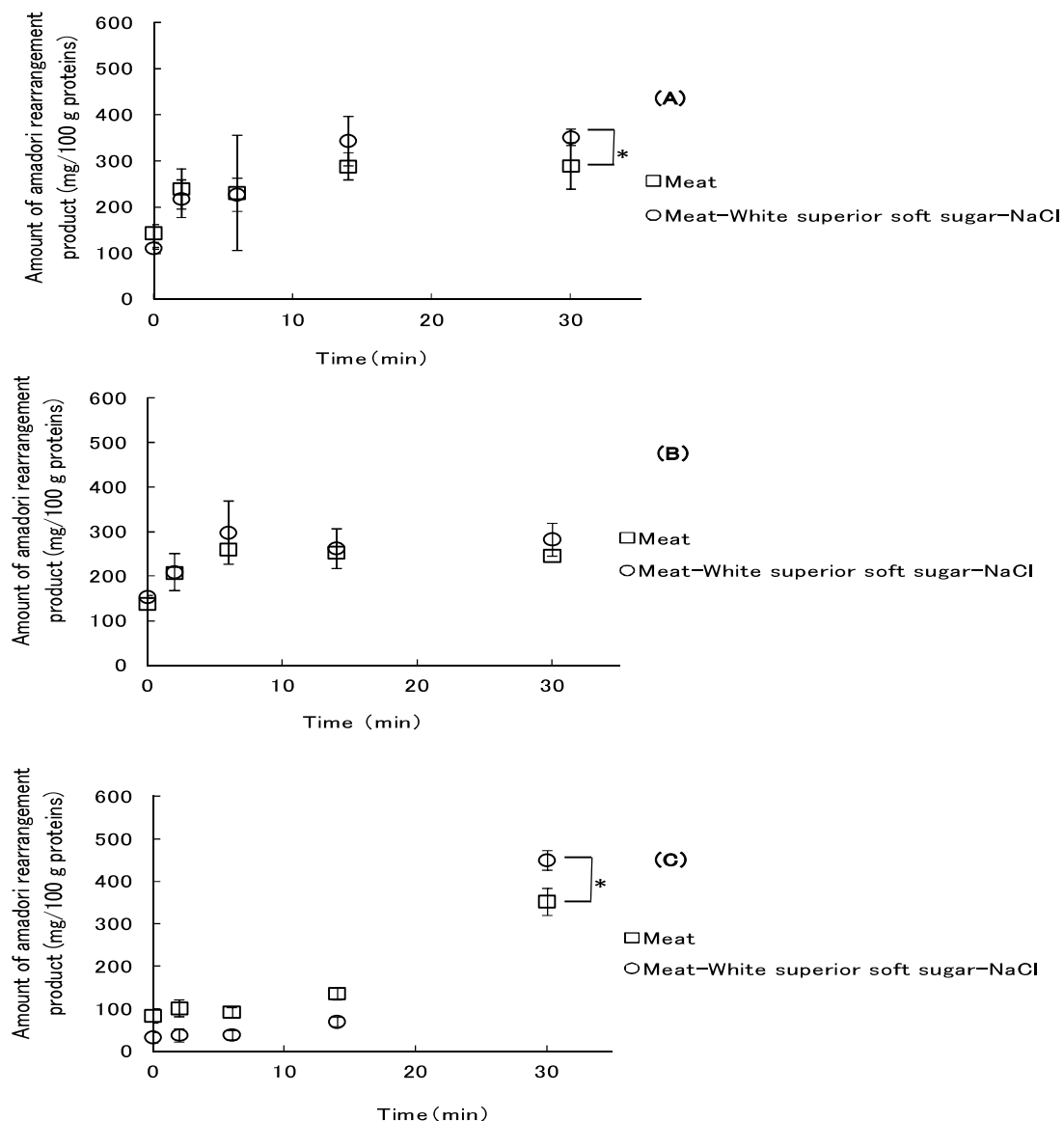
The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. The explanation of figure legends is shown in Table 3-2. Each value is the mean of 6 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test. The concentration of NaCl was 1.0%(w/w).





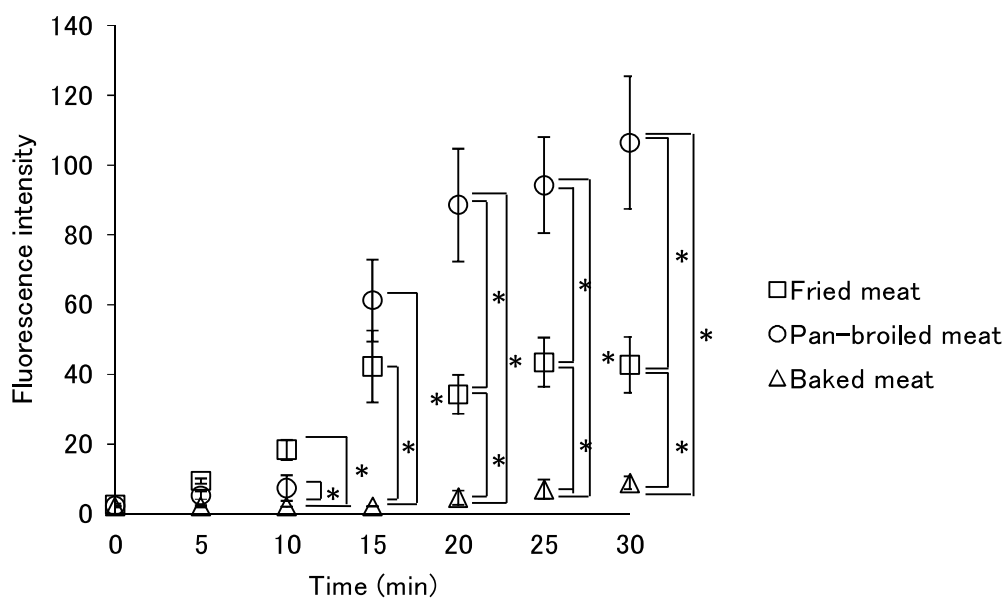
**Figure 3-4. Internal temperature of (A) fried, (B) pan-broiled, and (C) baked meat samples containing white superior soft sugar and NaCl.**

The values displayed are the mean of replicate measurements ( $n = 3$ ). Meat was seasoned with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl



**Figure 3-5. Amounts of furosine of (A) fried, (B) pan-broiled, and (C) baked meat samples containing white superior soft sugar and NaCl.**

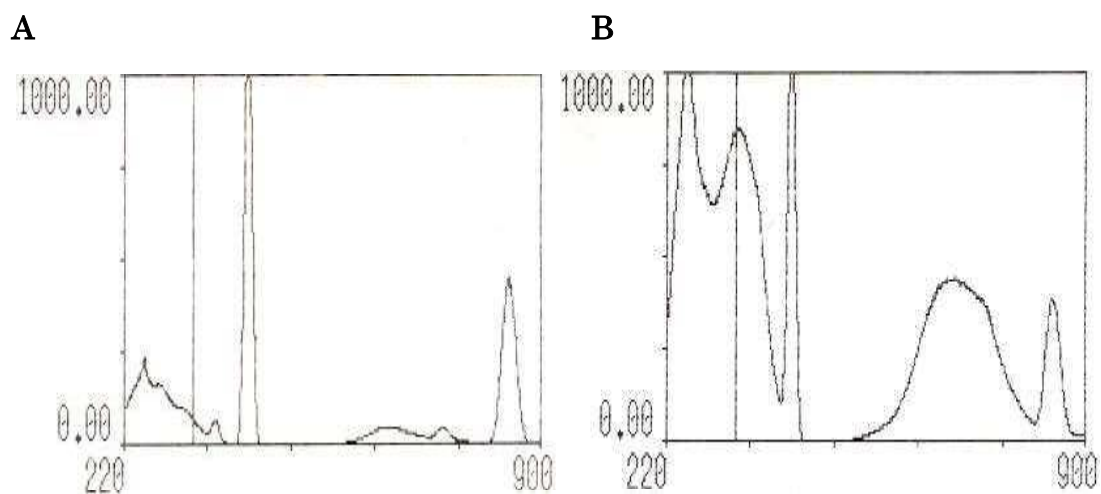
The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. Each value is the mean of 6 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test. Meat was added with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl.



**Figure 3-6. Comparison of fluorescence intensity of meat samples heated by three types of cooking methods.**

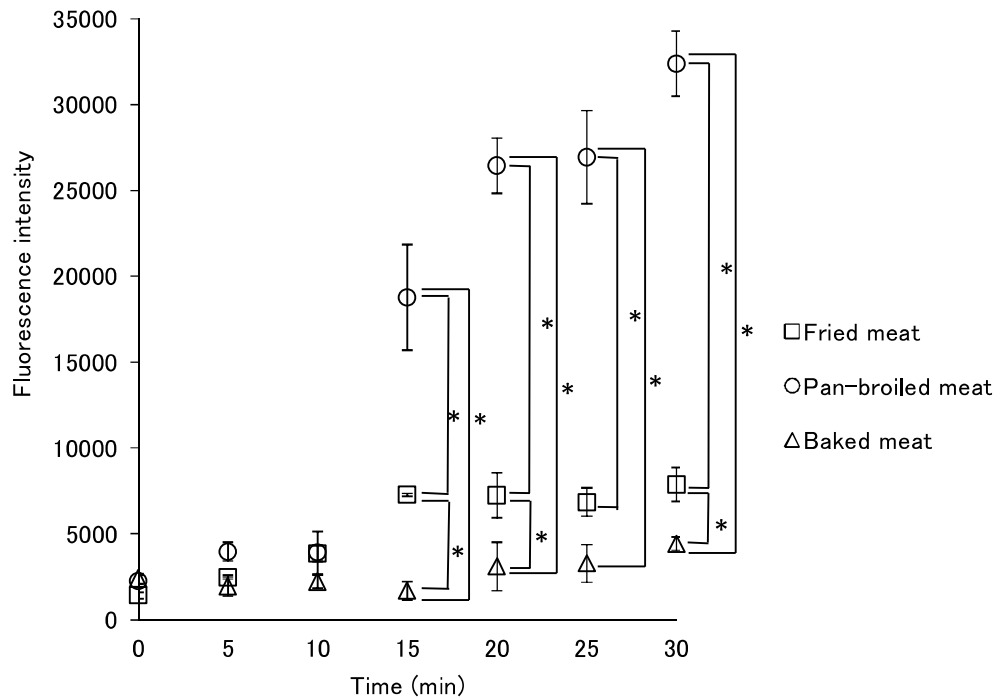
The reaction conditions are described in “Materials and Methods”.

Fluorescence was measured with 370/440 nm (exc./em.). Each value is the mean of 3 determinations. \*p < 0.05 by Tukey-Kramer post-hoc test.



**Figure 3-7. Fluorescence spectra of (A) raw and (B) pan-broiled meat samples cooked at 200 °C for 30 min.**

The emission wavelength was fixed at 425 nm, and excitation wavelength was scanned from 220 to 900 nm.



**Figure 3-8. Comparison of fluorescence intensity of meat samples heated by three types of cooking methods.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. Fluorescence was measured with 333/425 nm (exc./em.). Each value is the mean of 3 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.

## 実際の調理に即した条件下における魚肉製品中のメイラード反応生成物の評価 [研究 4]

### 4-1. 緒言

食品の加工および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<sup>1, 32-37)</sup>。したがって、調理条件とメイラード反応生成物の関係を解明することは大変重要である。そこで、アマドリ転位生成物および蛍光物質の分析を用いて、牛肉製品における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。その結果、オーブン加熱のほうが他の調理法よりもメイラード反応生成物の生成が制御可能であることが明らかとなった。したがって本研究では、他の食品においても同様の結果が得られるか不明なため、魚肉製品における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。牛肉製品による検討ではアマドリ転位生成物および蛍光物質の分析により評価を行ったが、本研究ではさらにメイラード反応により生成される発がん性 4(5)-MI<sup>35, 36)</sup>の分析によっても検討を行った。

### 4-2. 実験方法

#### 4-2-1. 上白糖および NaCl 添加魚肉の調製 (3 種の加熱法)

NaCl は関東化学 (株) から購入した。魚肉のすり身は生のマイワシ (千葉産) を使用した。魚肉のすり身に 5.0% (w/w) の上白糖および 1.0% (w/w) の NaCl を添加して、魚肉が 50 g になるようにハンバーグ状に形成し、調味料添加魚肉とした。添加した調味料の濃度は、家庭料理における調味の標準的な濃度に基づいた。一方、生の魚肉のすり身を 50 g になるようにハンバーグ状に形成し、調味料無添加魚肉とした。各試料は、「第 3 章 3-2-1. (c)」の項と同様に揚げ (140℃)、フライパン焼き (200℃) またはガスオーブン加熱 (170℃) の 3 種

の調理法により 0-30 分間加熱された。加熱後、各試料は速やかに冷却しホモジナイザー（日本精機（株））により超純水で均質化した。ペースト状の試料は凍結乾燥し冷凍保存した。

#### **4-2-2. 上白糖および NaCl 添加魚肉のアマドリ転位生成物の定量**

凍結乾燥させた試料をタンパク質含量が 50.0 mg になるようにスクリー管（16 × 100 mm）に秤量した。粗タンパク質の定量はケルダール法を用いた。酸加水分解、固相抽出および HPLC 分析は「第 3 章 3-2-3.」の項に従って行った。

#### **4-2-3. 上白糖および NaCl 添加魚肉の蛍光測定**

凍結乾燥させた試料 300.0 mg を CHCl<sub>3</sub>/ MeOH（2 : 1）により脱脂して風乾した。風乾した試料 75.0 mg を 0.01 M リン酸バッファー（pH 6.0）4.0 ml により均質化し、遠心分離機により遠心（3000 rpm、10 分）して、その上清を測定試料として用いた。Lowry 法によりタンパク質濃度 5.0 mg/ml になるように調製し、さらに 60 倍希釈したのち測定を行った。蛍光測定には、分光蛍光光度計 RF-1500（島津製作所（株））を用いた。測定方法は「第 3 章 3-2-4.」の項に従って行った。

#### **4-2-4. 上白糖および NaCl 添加魚肉の 4(5)-MI の定量**

凍結乾燥させた試料 300.0 mg を CHCl<sub>3</sub>/ MeOH（2 : 1）により脱脂して風乾した。風乾した試料 50.0 mg を超純水 5.0 ml により均質化し、遠心分離機により遠心（3000 rpm、10 分）した。その上清を 0.45 μm 膜フィルターを用いて濾過し、分析試料とした。QTRAP™ LC/MS/MS システム（Applied Biosystems）を用いて定量を行った。HPLC および MS/MS の分析条件は以下のとおりである。

### **HPLC 条件**

装置：1100 LC (Agilent Technologies)

カラム：Inertsil ODS-3 (High Pressure タイプ、GL Science)

(3  $\mu\text{m}$ 、150 $\times$ 2.1 mm I.D.)

カラム温度：20 $^{\circ}\text{C}$

流速：0.2 ml/min

溶出条件：A 液 (15 mmol/l アンモニア/超純水)

B 液 (15 mmol/l アンモニア/アセトニトリル)

グラジエント：0-4 分 A 液：B 液=98：2

4-13 分 A 液：98-60%、B 液：2-40%

13-20 分 A 液：B 液=60：40

20-35 分 A 液：B 液=98：2

サンプル注入量：5.0  $\mu\text{l}$

### **MS/MS 条件**

装置：QTRAP<sup>TM</sup> MS/MS (Applied Biosystems)

検出：多重反応モニタリング (MRM)

イオン化法：ESI (Posi)

カーテンガス (CUR)：30.0 psi

イオンスプレー電圧 (IS)：3500.0 V

ターボガス温度 (TEM)：500 $^{\circ}\text{C}$

ネブライザーガス (GS1)：50.0 psi

ターボガス (GS2)：70.0 psi

コリジョンガス (CAD)：4.0 psi

デュエルタイム：1000 msec/ MRM チャンネル



上白糖および NaCl 添加魚肉試料の検量線は、4(5)-MI 標準品（シグマ アルドリッチ ジャパン（株））を超純水により 0.001、0.002、0.003、0.005  $\mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈して作成した ( $R^2=0.9970$ )。4(5)-MI の添加回収試験は、4(5)-MI 添加濃度 0  $\mu\text{g/ml}$  および 0.5  $\mu\text{g/ml}$  の生の魚肉を用いて行った。その際の検量線は、4(5)-MI 標準品を超純水により 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈して作成した ( $R^2=0.9999$ )。添加回収試験用試料は、上白糖および NaCl 添加魚肉試料と同様に、脱脂して超純水で抽出され、QTRAP™ LC/MS/MS システムにより分析された。

#### 4-2-5. 統計解析

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。すべての統計処理には Windows 版 Stat View (SAS Institute) による分散分析を用い、分析結果により事後検定 (post-hoc test) として Tukey-Kramer を行った。p<0.05 を統計学的有意水準とした。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. 上白糖および NaCl 添加魚肉の加熱による変化

調味料添加（5.0%（w/w）上白糖、1.0%（w/w）NaCl）および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の3種の加熱法で0-30分間調理し、各試料の加熱による変化を比較した（Table 4-1）。調理加熱中において魚肉の表面は、揚げが著しく茶褐色に変化し、次にフライパン焼き、オーブン加熱の順で変化の度合いが高くなった。また、調味料を添加したほうが添加なしよりも魚肉の表面は褐色に変化しやすかった。その一方、魚肉の内部はどの試料においても灰色であった。

#### 4-3-2. 上白糖および NaCl 添加魚肉試料（3種の加熱法）のアマドリ転位生成物の生成

アマドリ転位生成物の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加（5.0%（w/w）上白糖、1.0%（w/w）NaCl）および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の3種の加熱法で0-30分間調理し、各試料の内部温度（Fig. 4-1）およびアマドリ転位生成物量（Fig. 4-2）を測定した。試料の内部温度は、揚げが最初の5分程度ですぐに100℃に達したのに対して、フライパン焼きとオーブン加熱は20分ほどかけて緩やかに温度が上昇し、最終的に約100℃程度に温度が達した。すべての試料において100℃以上に内部温度が上がることはなかった。また、調味料添加の有無による差異はみられなかった。アマドリ転位生成物量は、揚げでは加熱後6分過ぎに急速に増加した。一方、フライパン焼きおよびオーブン加熱では、加熱後14分までは増加しなかったが、14分過ぎ急速に増加した。また、調味料添加の有無による差異はみられなかった。アマドリ転位生成物の最大生成量は、各調理法ともに加熱30分後

に観察され、およそ 520-730mg/100g protein であった。

#### 4-3-3. 上白糖および NaCl 添加魚肉試料（3 種の加熱法）の蛍光物質の生成

メイラード物質由来蛍光物質の生成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加（5.0%（w/w）上白糖、1.0%（w/w）NaCl）および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の 3 種の加熱法で 0-30 分間調理し、各試料の蛍光強度を測定した（Fig. 4-3、Table 4-2）。励起波長および蛍光波長の最適化を検討するため、Ex.を 340 nm に固定して Em. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行い、次に、極大波長がみられた Em. 425 nm で波長を固定して Ex. 220-900 nm の範囲でスキャン測定を行った。調味料無添加の未加熱およびフライパン焼き魚肉試料の Ex.を比較した結果、Ex. 340 nm において加熱試料のピークが増大した（Fig. 4-3、添加試料はデータ省略）。また、揚げおよびオーブン加熱の魚肉試料においても同様の結果が得られた（データ省略）。340/425 nm（Ex./Em.）により蛍光強度を測定した結果、調味料添加および無添加ともに、各調理条件における魚肉試料中の蛍光強度は、揚げおよびフライパン焼きでは加熱時間に伴い増加したが、オーブン加熱ではほとんど増加しなかった（Table 4-2）。また、3 種の加熱法のなかでは揚げの増加速度が最も速く、次いでフライパン焼き、オーブン加熱の順であった。さらに、調味料添加試料を比較した結果、加熱後 14 分以降、オーブン加熱は他の 2 種の調理条件と比べて有意に蛍光強度の増加速度が抑制された。一方、調味料無添加試料を比較した結果、加熱後 30 分のみでオーブン加熱による同様な抑制がみられた。また、調味料添加および無添加の揚げ試料を比較した結果、加熱後 30 分のみで、顕著な蛍光物質の生成抑制が調味料無添加試料にみられた。

#### 4-3-4. 上白糖および NaCl 添加魚肉試料(3種の加熱法)の 4(5)-MI の生成

4(5)-MI の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加(5.0% (w/w) 上白糖、1.0% (w/w) NaCl) および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の 3 種の加熱法で 0-30 分間調理し、各試料の 4(5)-MI 生成量を測定した。4(5)-MI 標準品の LC-MS/MS クロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 4-4 に示した。MRM の  $m/z$  値 ( $Q1/Q3$ ) は 83.1 Da/56.0 Da であった。4(5)-MI の添加回収試験を行った結果、回収率は 8.9% (SD 5.7%) であった。揚げ、フライパン焼きおよびオーブン加熱試料における 4(5)-MI 生成量を Table 4-3 に示した。調味料添加および無添加の未加熱試料における 4(5)-MI レベルは、それぞれ 13.36-19.31  $\mu\text{g/g}$  および 12.03-20.33  $\mu\text{g/g}$  であり、加熱前にも魚肉中に 4(5)-MI は含まれていた。調味料添加および無添加の揚げ試料は、加熱時間に伴い 4(5)-MI が増加し、30 分後に生成量の増大がピークに達した。さらに、加熱 30 分後における揚げでは、調味料添加ほうが無添加よりも 4(5)-MI の生成量が有意に高値を示した。また、フライパン焼きでは加熱後 14 分までは増加しなかったが、14 分過ぎから 4(5)-MI の生成量が顕著に増加した。その一方、オーブン加熱では加熱に伴う 4(5)-MI の増加がみられなかった。

#### 4-4. 考察

アマドリ転位生成物の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の加熱法で調理し、各試料の内部温度およびアマドリ転位生成物量を測定した。アマドリ転位生成物量については、揚げの加熱法において、加熱後 6 分過ぎに急速に増加した。それに対して、フライパン焼きおよびオーブン加熱では、加熱後 14 分までは増加しなかったが、14 分過ぎに増加した。その理由のひとつとして、揚げでは他の 2 種の調理条件と比較し、加熱初期の試料内部の温度が急激に上昇したことが考えられた。また、3 種の調理法では加熱による伝導方式がそれぞれ異なるため、それらの影響によりアマドリ転位生成物量に差異が生じた可能性も考えられた。揚げの場合、油による対流であるため熱伝導率が高く、さらに、表面での水蒸気の発生により油の対流を強制的に引き起こすので急激にアマドリ転位生成物が増加したことが推察された。魚肉におけるアマドリ転位生成物の形成は、第 3 章[研究 3]にて報告した牛肉におけるアマドリ転位生成物の形成とは異なる結果となった。牛肉の場合、揚げおよびフライパン焼きはともに加熱の初期段階でアマドリ転位生成物量が増大した。また、牛肉におけるアマドリ転位生成物の形成は、魚肉と比較して増加がより緩やかであり、すべての調理条件においてアマドリ転位生成物量が 500 mg/100 g protein 以下であった。したがって、アマドリ転位生成物の形成が、加熱法だけではなく食品の種類によっても影響される可能性が明らかとなった。一方で、牛肉の場合と同様に、調味料添加の有無による差異はみられなかった。したがって、これら 3 種の調理条件における調味料によるアマドリ転位生成物の形成への影響は少ないことが示唆された。

メイラード物質由来蛍光物質の生成における調理条件による影響を検討する

ため、調味料添加および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の加熱法で調理し、各試料の蛍光強度を測定した。第 3 章[研究 3]では、調味料無添加牛肉試料における蛍光物質の生成について調査し、オーブン加熱で調理した牛肉は他の 2 種の調理条件と比べて蛍光の増加速度が最も緩やかであったことを報告した。本研究においても同様の結果が得られ、調味料無添加魚肉試料における蛍光物質の生成は、オーブン加熱で調理した魚肉中の蛍光物質が最も緩やかに増加した。しかしながら、魚肉試料における蛍光強度が揚げ>フライパン焼き>オーブン加熱の順であったのに対し、牛肉試料における蛍光強度はフライパン焼き>揚げ>オーブン加熱であった。これらの結果により、加熱法だけではなく食品の種類によっても、メイラード物質由来蛍光物質の生成は影響される可能性が示唆された。調味料添加魚肉試料における蛍光物質の生成は、加熱後 14 分および 30 分において、オーブン加熱は他の 2 種の調理条件と比べて有意に蛍光強度の増加速度が抑制された。また、調味料添加および無添加の揚げ試料を比較した結果、加熱後 30 分のみで、顕著な蛍光物質の生成抑制が調味料無添加試料にみられた。さらに、蛍光強度における内部温度の寄与については、内部温度の上昇速度が速やかであったのに対し、蛍光強度の増加速度は緩やかであったことから、内部温度による寄与は小さいことが明らかとなった。これらの結果により、メイラード物質由来蛍光物質の生成は、食品内部の温度上昇の影響を受けにくい、一方で、加熱法や加熱時間と同様に、調味の有無によっても蛍光強度の増加に影響を与える可能性が示された。また、調味料添加の有無にかかわらず、オーブン加熱で調理した魚肉は他の 2 種の調理条件と比べて蛍光の増加速度が最も緩やかであったことから、加熱による魚肉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された。一般にメイラード反応由来の蛍光物質の測

定には、励起波長 (Ex.) 340-370 nm、発光波長 (Em.) 420-470 nm がよく用いられ<sup>79)</sup>、in vivo における蛍光物質測定には、370/440 nm (Ex./Em.) や 350/450 nm (Ex./Em.) が用いられている<sup>80, 81)</sup>。しかし、本研究において測定波長の最適化を行った結果、魚肉試料の蛍光強度は 340/425 nm (Ex./Em.) で最も感度よく測定できることが明らかとなり、第 3 章[研究 3]にて報告した牛肉における波長と同様に、一般的に用いられている波長よりも低いことが明らかとなった。各調理条件における魚肉試料中の蛍光強度は加熱時間に伴い増加しており、本測定法が加熱魚肉のメイラード反応の進行を反映する指標として有効であることが示唆された。Leclère 等は、ミルクに類似したモデル系を用いて加熱によるリジン損傷について分析を行った<sup>82)</sup>。その結果、60-85℃の加熱処理をした場合、初期段階ではフロシンと AMP の蛍光が同時に増加し、両指標ともリジン損傷を反映していることが明らかとなった。その後、フロシンは定常の濃度状態に達し、AMP の蛍光のみ増加し続けリジン損傷との相関関係を示したことから、メイラード反応初期および後期においては、ミルクの加熱処理によるリジン損傷の指標として、AMP の蛍光が有効であると著者らは結論付けている。本研究においても、ミルク類似モデル実験および第 3 章[研究 3]の研究結果と同様の結果が得られたことから、蛍光測定が食品中におけるメイラード反応の進行を評価するのに効果的な指標であることが示唆された。

4(5)-MI の形成における調理条件による影響を検討するため、調味料添加および無添加魚肉試料を各々揚げ、フライパン焼き、オーブン加熱の加熱法で調理し、各試料の 4(5)-MI 生成量を測定した。その結果、調味料添加および無添加の未加熱試料における 4(5)-MI レベルは 13.36-20.33μg/g であり、加熱前にも魚肉中に 4(5)-MI は含まれていた。Samaha 等は、イワシ試料中のヒスタミン(1,4-メチルイミダゾール酢酸)含有量を測定し、新鮮イワシに 5%、塩漬イワシに

10%の高濃度なヒスタミンが検出されたことを報告した<sup>83)</sup>。ヒスタミンは、マグロ類、カツオ類、サバ類等の赤身魚に多く含まれる遊離ヒスチジンを原料とし、ヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌（ヒスタミン生成菌）によって生成される<sup>84)</sup>。したがって、本研究における未加熱のイワシ試料中の 4(5)-MI は、ヒスタミン由来メイラード反応生成物である可能性がある。4(5)-MI は、米国国家毒性プログラム（NTP）により 2007 年に癌を引き起こす化学物質と確認され、米国カリフォルニア州が 2011 年 1 月 7 日に「プロポジション 65」発ガン性物質リストに加えたため、現在、食品および飲料中の 4(5)-MI 量について、多くの研究者が関心を持っている。Hengel 等による調査では<sup>36)</sup>、ソース中の 4(5)-MI 量は、ウスターソース中で 0.027-3.4 µg/g、醤油中で 0.002-4.8 µg/g であった。一方、飲料中の 4(5)-MI 量はそれらと比較してかなり多く、コーラでは 0.17-613 µg/g、コーヒーでは 0.048-2.05 µg/g、ビールでは 0.017-28.03 µg/g であり、すべて規制値より超過した値であった。本研究では、調味料無添加の加熱後 14 分以降の揚げ試料および調味料添加の加熱後 6 分以降の揚げ試料における 4(5)-MI 量は、それぞれ 34.27-51.30 µg/g および 36.91-131.34 µg/g であった。また、調味料を添加した加熱後 30 分のフライパン焼き試料における 4(5)-MI 量は、約 50 µg/g であった。本結果は 4(5)-MI の添加回収試験における回収率が極めて低いため予備実験の値であるが、これらの値は規制値以上であるコーラの 4(5)-MI 量と同等の値であることから、ヒトは揚げおよびフライパン焼きの魚肉を摂取することでガンのリスクにさらされている可能性があることが示された。

Puangsoombat 等は、揚げた鶏肉の皮に含まれる MeIQx、DiMeIQx、PhIP（発がん性を有する HCA）のレベルが、肉中で検出した値より非常に高いことを報告した<sup>85)</sup>。その理由として、表面に存在する皮が肉のために絶縁層の働きをすることで、揚げている間の水分保持に役立ち、これにより HCA の形成を減少さ



























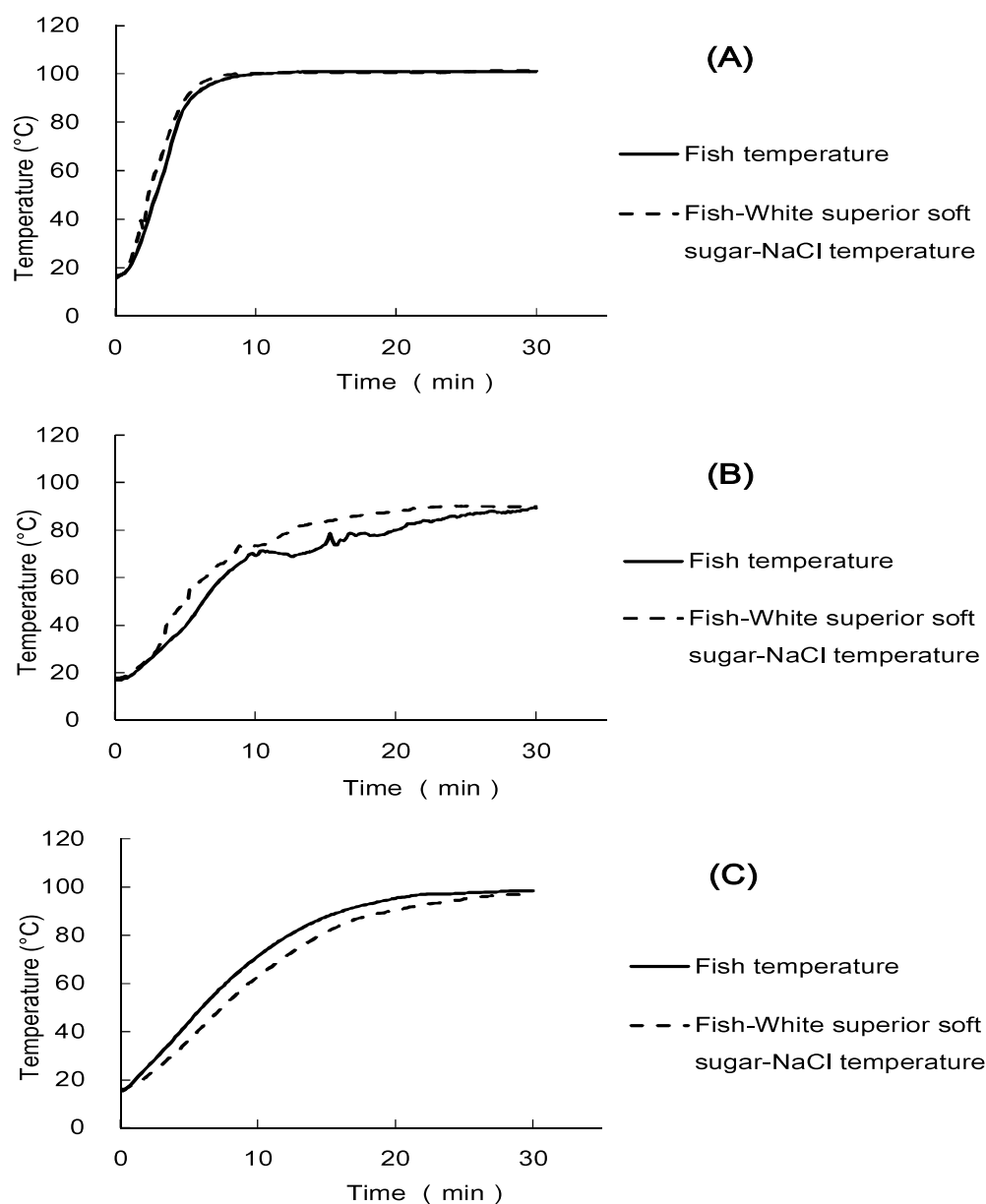
せた可能性がある、彼らは推察している。また同様の結果が、Solyakov 等によっても報告されている<sup>86)</sup>。したがって、食品の表面で水分保持をコントロールすることが HCA の形成を抑制するひとつの方法であることは明らかである。また Puangsombat 等は、揚げ時間が長くなると多くのタンパク質が変性し、肉表面のタンパク質から多量の水分が失われ、より多くの HCA 前駆体が HCA 形成のために表面へ移行する可能性を示唆している<sup>69)</sup>。本研究においても、魚肉の揚げ試料中で特にアマドリ転位生成物、蛍光物質および 4(5)-MI が検出されたのは、揚げによる加熱過程の中で水分の損失とともにこれらの前駆体が表面に移行し、食品表面でメイラード反応生成物が形成されたからかもしれない。調理加熱中において魚肉の表面は、揚げが著しく茶褐色に変化し、次にフライパン焼き、オーブン加熱の順で変化の度合いが高くなったが、その一方で、魚肉の内部はどの試料においても灰色であった。このことから、魚肉内部におけるイラード反応生成物の生成は表面よりも少ない可能性がある。したがって、今後は食品の表面と内部におけるメイラード反応生成物の生成量についても、比較検討が必要と考えている。

## 4-5. 要旨

メイラード反応は、食品の加工および調理の過程において、食品の品質向上、および劣化の双方に関与することが知られている。また、発がん性物質などの危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解明することは極めて重要である。そこで、本研究では、アマドリ転位生成物、蛍光物質および 4(5)-MI の生成をもとに、魚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揚げでは急速に増加したが、フライパン焼きおよびオーブン加熱では緩やかに増加した。加熱した魚肉の蛍光は 340/425 nm (Ex./Em.) で最も感度よく測定することができ、魚肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブン加熱で調理した魚肉は他の 2 つの調理法に比べて蛍光の増加速度が緩やかであった。さらに、魚肉中の 4(5)-MI は揚げおよびフライパン焼きで生成の増加が確認された。したがって、加熱による魚肉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。

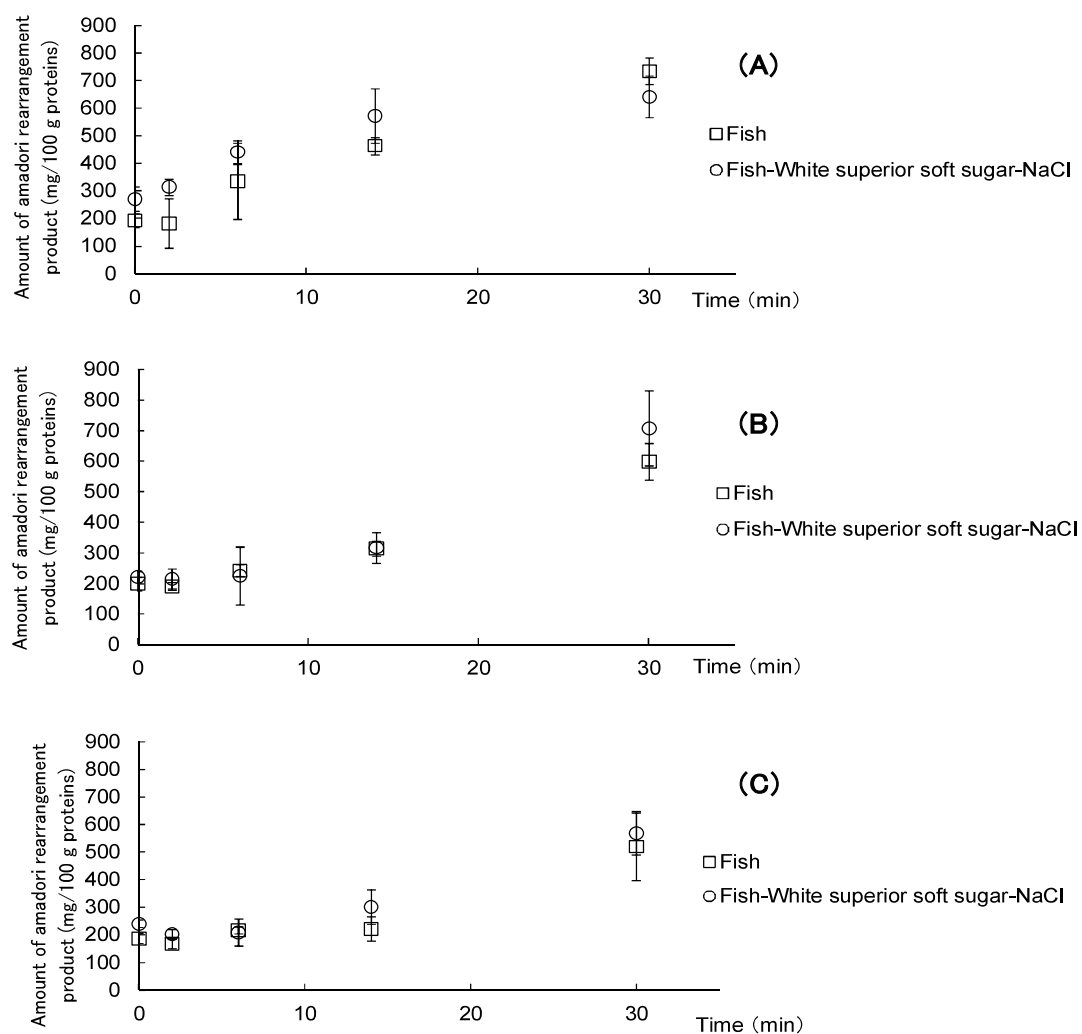
**Table 4-1. Changes in various seasoned and unseasoned fish meat samples with different cooking methods**

Cooking method	Seasoning	2 min	6 min	14 min	30 min
Fry (140 °C)	unseasoned				
	seasoned				
Pan-broil (200 °C)	unseasoned				
	seasoned				
Bake (170 °C)	unseasoned				
	seasoned				



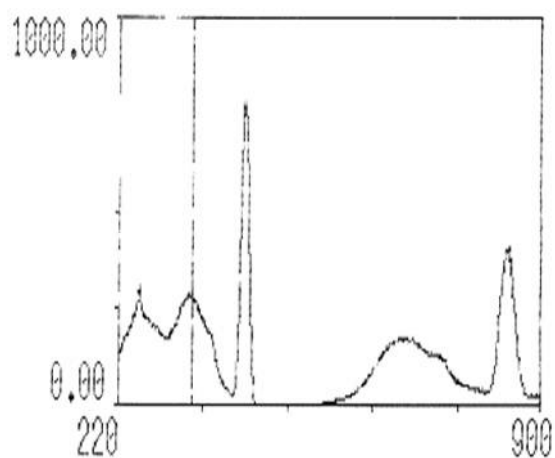
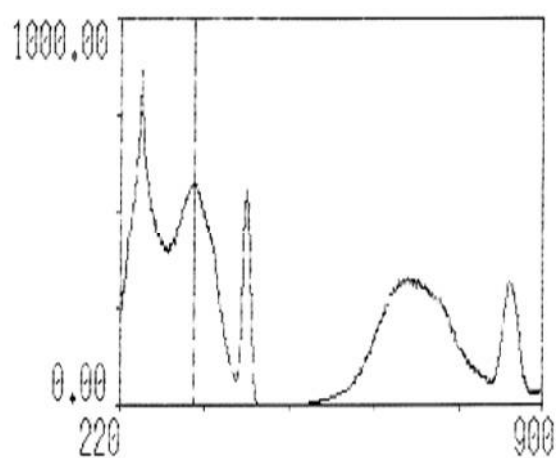
**Figure 4-1. Internal temperature of (A) fried, (B) pan-broiled, and (C) baked fish meat samples containing white superior soft sugar and NaCl.**

The values displayed are the mean of replicate measurements ( $n = 3$ ). Fish meat was seasoned with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl.



**Figure 4-2. Amounts of furosine of (A) fried, (B) pan-broiled, and (C) baked fish meat samples containing white superior soft sugar and NaCl.**

The reaction conditions are described in “Materials and Methods”. Each value is the mean of 6 determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test. Fish meat was added with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl.

**A****B**

**Figure 4-3. Fluorescence spectra of (A) raw and (B) pan-broiled fish meat samples cooked at 200 °C for 30 min.**

The emission wavelength was fixed at 425 nm, and excitation wavelength was scanned from 220 to 900 nm.

**Table 4-2. Fluorescence intensities of fried, pan-broiled, and baked fish meat samples**

Process	Fried fish meat (mg/100 g protein)	Pan-broiled fish meat (mg/100 g protein)	Baked fish meat (mg/100 g protein)
Heating 0 min			
Unseasoned	20124.8 ± 681.5efg	14295.8 ± 2850.9 h	16926.0 ± 3180.2fgh
Seasoned	15058.8 ± 4071.2 gh	14028.8 ± 1728.7 h	15791.9 ± 3965.0fgh
Heating 2 min			
Unseasoned	19999.9 ± 771.1efg	19159.7 ± 3000.6efgh	17148.7 ± 4494.6fgh
Seasoned	15104.9 ± 1825.4 gh	21580.1 ± 1423.9efg	18244.2 ± 2982.5fgh
Heating 6 min			
Unseasoned	18297.4 ± 1173.9fgh	22081.7 ± 1352.0efg	19482.1 ± 5411.1efgh
Seasoned	21108.5 ± 1015.7efg	22586.9 ± 3112.9def	19756.8 ± 954.5efg
Heating 14 min			
Unseasoned	23829.1 ± 1363.2de	20597.9 ± 652.2efg	18944.1 ± 1123.9efgh
Seasoned	29333.4 ± 4502.8cd	28461.6 ± 1955.4cd	18029.4 ± 752.6fgh
Heating 30 min			
Unseasoned	34986.6 ± 3489.0bc	30990.5 ± 2389.2bc	21748.8 ± 2888.7efg
Seasoned	44572.9 ± 4924.8a	36857.9 ± 3347.9ab	20484.0 ± 1923.5efg

Fluorescence was measured at 340/425 nm (exc./em.). Values are the mean ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer post-hoc test, p < 0.05). Fish meat was seasoned with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl.

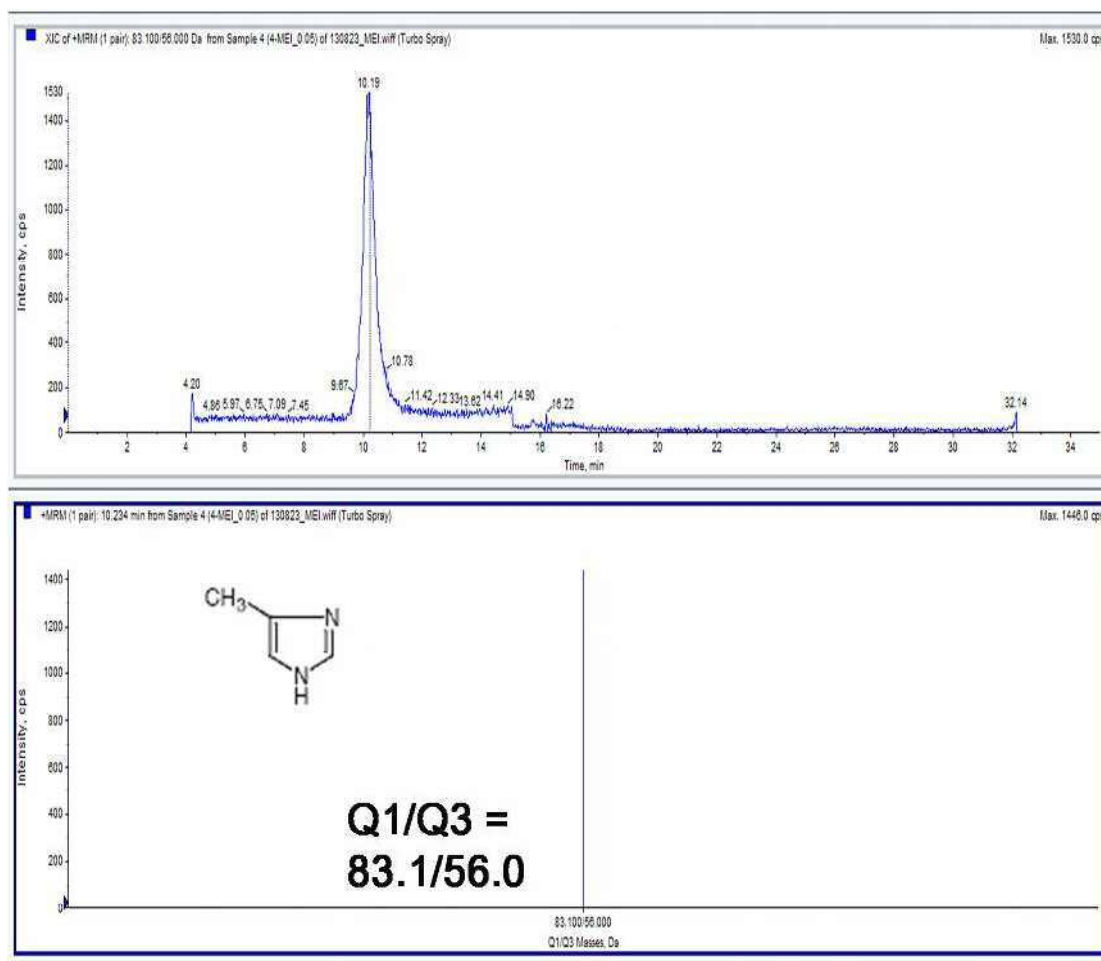


Figure 4-4. Positive-mode LC-MS/MS data for the 4(5)-MI standard



**Table 4-3. Amounts of 4(5)-MI detected in fried, pan-broiled, and baked fish meat samples.**

Seasoning	Fried fish meat (µg/g)	Pan-broiled fish meat (µg/g)	Baked fish meat (µg/g)
Heating 0 min			
Unseasoned	12.03 ± 4.90e	20.33 ± 2.20cde	17.07 ± 2.70de
Seasoned	13.36 ± 8.63de	19.31 ± 1.92cde	16.65 ± 3.81de
Heating 2 min			
Unseasoned	11.25 ± 1.58e	24.81 ± 4.45cd	14.85 ± 0.81e
Seasoned	17.79 ± 5.00de	29.35 ± 7.78cd	18.05 ± 5.25cde
Heating 6 min			
Unseasoned	18.18 ± 4.31cde	31.17 ± 4.84c	19.58 ± 6.66cde
Seasoned	36.91 ± 16.96bcde	26.33 ± 4.05cd	22.70 ± 3.37cd
Heating 14 min			
Unseasoned	34.27 ± 12.01bcde	23.38 ± 4.43cd	23.35 ± 0.76cd
Seasoned	58.88 ± 29.38bcde	24.84 ± 2.79cd	18.76 ± 6.66cde
Heating 30 min			
Unseasoned	51.30 ± 31.85bcde	52.79 ± 7.65b	21.66 ± 2.01cd
Seasoned	131.34 ± 17.24a	49.58 ± 2.69b	20.30 ± 2.08cde

Values are the mean ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer post-hoc test, p < 0.05). Fish meat was seasoned with 5.0%(w/w) white superior soft sugar and 1.0%(w/w) NaCl.

### 第 3 章 結語

本章では、調理条件とメイラード反応生成物の関係に着目し、牛肉製品 [研究 3] および魚肉製品 [研究 4] における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。

研究 3: 加熱調理された牛肉製品中のアマドリ転位生成物および蛍光物質の分析を行った。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ブン加熱では始め緩やかに増加した。加熱した牛肉製品の蛍光は 333/425 nm (Ex./Em.) に最大値を有し、牛肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブン加熱で調理した牛肉は他の 2 つの調理法に比べて蛍光の増加速度が緩やかであった。

研究 4: 加熱調理された魚肉製品中のアマドリ転位生成物、蛍光物質および 4(5)-MI の分析を行った。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ブン加熱では緩やかに増加した。加熱した魚肉の蛍光は 340/425 nm (Ex./Em.) で最も感度よく測定することができ、魚肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブン加熱で調理した魚肉は他の 2 つの調理法に比べて蛍光の増加速度が緩やかであった。さらに、魚肉中の 4(5)-MI は揚げおよびフライパン焼きで生成の増加が確認された。

以上の結果により、加熱による魚肉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。また、加熱法だけではなく食品の種類によっても、アマドリ転位生成物およびメイラード由来蛍光物質の形成が異なる可能性が示唆された。

## 総 括

貯蔵食品の貯蔵・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、香りおよび危害物質の生成や、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[研究 1]においては、メイラード反応に影響を及ぼす因子として、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、それらの役割については多数報告されているが、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。したがって、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、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著になることが示唆された。塩類の種類を選択し、イオン強度や加熱時間など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

と思われる。

第 2 章 [研究 2] においては、MRPs が近年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が、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ため、 $\beta$ -LG 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。ESI-MS および ESI-MS/MS 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、Glc 修飾ペプチドのピリリウムまたはヒドロキシメチルフリリウムイウム、EK および KFD 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、Lys 側鎖の $\epsilon$ -アミノ基に Glc が修飾しシッフ塩基を形成した修飾ペプチドは、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 [研究 3, 4] においては、食品の加工や調理の過程で、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が、調理条件とメイラード反応生成物の関係は未だ明らかになっていないため、牛肉製品および魚肉製品における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。牛肉について検討を行った結果、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ブン加熱では始め緩やかに増加した。加熱した牛肉の蛍光は 333/425 nm (Ex./Em.) に最大値を有し、牛肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブ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ブン加熱では緩やかに増加した。加熱した魚肉の蛍光は 340/425 nm (Ex./Em.) で最も感度よく測定することができ、魚肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。また、オーブ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。

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、特にオーブン加熱は危害物質の生成も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。

## **Summary**

### **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 sodium or chloride ions 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 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  $\beta$ -LG, was heated with glucose and the reaction products were analyzed by ESI-MS, ESI-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, KFD and EK were detected by

ESI-MS, ESI-MS/MS. Therefore, those products may be produced by the Maillard reaction. The molecular orbital of glycated LEKFD at the lysine epsilon amino residue with Schiff base form 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. The fluorescence of cooked meat exhibited a maximum at 333/425 nm (Ex./Em.) and was a useful indicator of the Maillard reaction in meat. The rate of increase in the fluorescence of baked meat was lower than that of meat subjected to other cooking methods. 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 fluorescence of cooked fish meat exhibited a maximum at 340/425 nm (Ex./Em.) and was a useful indicator of the Maillard reaction in fish meat. The rate of increase in the fluorescence of baked fish meat was lower than that of 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.

## 参 考 文 献

- 1) Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C., Dalgalarrrondo, M., Haertlé, T. (2006). Impact of Maillard type glycation on properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biotechnol. Adv.* 24(6), 629-632.
- 2) Jing, H., Melissa, Y., Wong, P. Y. Y., Kitts, D. D. (2011). Comparison of physicochemical and antioxidant properties of egg-white proteins and fructose and inulin Maillard reaction products. *Food Bioprocess Technol.* 4(8), 1489-1496.
- 3) Lertittikul, W., Benjakul, S., Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH. *Food Chem.* 100(2), 669-677.
- 4) Liu, P., Huang, M., Song, S., Hayat, K., Zhang, X., Xia, S., Jia, C. (2012). Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from Soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. *Food Bioprocess. Technol.* 5(5), 1775-1789.
- 5) Sun, Y., Hayakawa, S., Puangmanee, S., Izumori, K. (2006). Chemical properties and antioxidative activity of glycated  $\alpha$ -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food Chem.* 95(3), 509-517.
- 6) Pischetsrieder, M., Severin, T. (1995). "Chemical Markers for Processed and Stored Foods," eds. Lee, T.C., Kim, H.J., *American Chemical Society*, Washington DC, pp. 14-23.
- 7) Manini, P., d'Ischia, M., Prota, G. (2001). An unusual decarboxylative

- Maillard reaction between L-DOPA and D-glucose under biomimetic conditions: factors governing competition with Pictet-Spengler condensation. *J. Org. Chem.*, 66(15), 5048-5053.
- 8) Rizzi, G.P. (2004). Role of phosphate and carboxylate ions in maillard browning. *J. Agric. Food Chem.*, 52(4), 953-957.
- 9) Rizzi, G.P. (2008). Effects of cationic species on visual color formation in model Maillard reactions of pentose sugars and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 56(16), 7160-7164.
- 10) Kwak, E.J., Lim, S.I. (2004). The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids*, 27(1), 85-90.
- 11) Ogasawara, M., Katsumata, T., Egi, M. (2006a). Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide. *Food Chem*, 99(3), 600-604.
- 12) Katsumata, T., Nakakuki, H., Tokunaga, C., Fujii, N., Egi, M., Phan, T. H. Mummalaneni, S., DeSimone, J.A., Lyall, V. (2008). Effect of Maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). *Chem Senses*, 33(7), 665-680.
- 13) Zhang, Y. G., Chien, M. J., Ho, C.-T. (1988). Comparison of the volatile compounds obtained from thermal degradation of cysteine and glutathione in water. *J. Agric. Food Chem*, 36(5), 992-996.
- 14) Zhang, Y. G., Ho, C.-T. (1989). Volatile compounds formed from thermal interaction of 2,4-decadienal with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem*, 37(4), 1016-1020.

- 15) Zhang, Y. G., Ho, C.-T. (1991a). Comparison of the volatile compounds formed from the thermal reaction of glucose with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem*, 39(4), 760-763.
- 16) Zhang, Y. G., Ho, C. T. (1991b). Formation of meatlike aroma compounds from thermal reaction of inosine 5'-monophosphate with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem*, 39(6), 1145-1148.
- 17) Lu, C. Y., Hao, Z. G., Payne, R., Ho, C.-T. (2005). Effects of water content on volatile generation and peptide degradation in the Maillard reaction of glycine, diglycine, and triglycine. *J. Agric. Food Chem*, 53(16), 6443-6447.
- 18) Oh, Y.-C., Shu, C.-K., Ho, C.-T. (1991). Some volatile compounds formed from thermal interaction of glucose with glycine, diglycine, triglycine, and tetraglycine. *J. Agric. Food Chem*, 39(9), 1553-1554.
- 19) Van Lancker, F., Adams, A., De Kimpe, N. (2010). Formation of pyrazines in Maillard model systems of lysine-containing dipeptides. *J. Agric. Food Chem*, 58(4), 2470-2478.
- 20) Sun, W., Zhao, M., Cui, C., Zhao, Q., Yang, B. (2010). Effect of Maillard reaction products derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant, textural and sensory properties of Cantonese sausages. *Meat Sci*, 86(2), 276-282.
- 21) Liu, P., Huang, M., Song, S., Hayat, K., Zhang, X., Xia, S., Jia, C. (2012). Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from Soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. *Food Bioprocess. Techno*, 5(5), 1775-1789.

- 22) Zhang, Y.G., Ho, C.T. (1991b). Formation of meatlike aroma compounds from thermal reaction of inosine 5'-monophosphate with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem*, 39(6), 1145-1148.
- 23) Lu, C.Y., Hao, Z.G., Payne, R., Ho, C.T. (2005). Effects of water content on volatile generation and peptide degradation in the Maillard reaction of glycine, diglycine, and triglycine. *J. Agric. Food Chem*, 53(16), 6443-6447.
- 24) Van Lancker, F., Adams, A., De Kimpe, N. (2010). Formation of pyrazines in Maillard model systems of lysine-containing dipeptides. *J. Agric. Food Chem*, 58(4), 2470-2478.
- 25) Cucu, T., De Meulenaer, B., Kerkaert, B., Vandenberghe, I., Devreese, B. (2012). MALDI-based identification of whey protein derived tryptic marker peptides that resist protein glycation. *Food Res. Int*, 47(1), 23-30.
- 26) Lapolla, A., Fedele, D., Reitano, R., Arico, N. C., Seraglia, R., Traldi, P., Marotta, E., Tonani, R. (2004). Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 15(4), 496-509.
- 27) Meltretter, J., Seeber, S., Humeny, A., Becker, C. M., Pischetsrieder, M. (2007). Site-specific formation of Maillard, oxidation, and condensation products from whey proteins during reaction with lactose. *J. Agric. Food Chem*, 55(15), 6096-6103.
- 28) Mennella, C., Visciano, M., Napolitano, A., Del Castillo, M. D., Fogliano, V. (2006). Glycation of lysine-containing dipeptides. *J. Pept. Sci*, 12(4),

291-296.

- 29) Frolov, A., Hoffmann, P., Hoffmann, R. (2006). Fragmentation behavior of glycated peptides derived from D-glucose, D-fructose and D-ribose in tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 41(11), 1459-1469.
- 30) Moreno, F. J., Quintanilla-López, J. E., Lebrón-Aguilar, R., Olano, A., Sanz, M. L. (2008). Mass spectrometric characterization of glycated  $\beta$ -lactoglobulin peptides derived from galacto- oligosaccharides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 19(7), 927-937.
- 31) Zhang, Q., Frolov, A., Tang, N., Hoffmann, R., van de Goor, T., Metz, T. O., et al. (2007). Application of electron transfer dissociation mass spectrometry in analyses of non-enzymatically glycated peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21(5), 661-666.
- 32) Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.*, 95(4), 290-299.
- 33) Turesky, R.J. (2007). Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol Lett.*, 168(3), 219-227.
- 34) Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.*, 419 (6906), 448-449.
- 35) Moon, J.K., Shibamoto, T. (2011). Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in maillard reaction systems. *J. Agric. Food Chem.*, 59(2), 615-618.

- 36) Hengel, M., Shibamoto, T. (2013). Carcinogenic 4(5)- methylimidazole found in beverages, sauces, and caramel colors: chemical properties, analysis, and biological activities. *J. Agric. Food Chem.*, 61(4), 780-789.
- 37) Baynes, J. W. (2001). The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp. Gerontol*, 36(9), 1527-1537.
- 38) Ames, J. M. (2007). Evidence against dietary advanced glycation endproducts being a risk to human health. *Mol. Nutr. Food Res*, 51(9), 1085-1090.
- 39) 五明紀春. (1999). 大豆成分の生理機能研究 3 大豆発酵食品の機能性研究 動向 味噌・醤油の褐色色素の生理機能. *食品と開発*, 34(7), p. 12-14.
- 40) 実教出版編集部. (2013). オールガイド食品成分表 2014. p. 276-277., p. 280-281.
- 41) 並木満夫. (2011). 「化学と生物」とフリーラジカル. *化学と生物*, 49(10), 721-729.
- 42) Faist, V., Müller, C., Drusch, S., Erbersdobler, H. F. (2001). Selective fortification of lysinoalanine, fructoselysine and N epsilon-carboxymethyllysine in case in model systems. *Nahrung*, 45(3), 218-221.
- 43) Molnár-Perl, I., Pintér-Szakács, M., Wittmann, R., Reutter, M., Eichner, K. (1986). Optimum yield of pyridosine and furosine originating from Maillard reactions monitored by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, 361, 311-320.
- 44) Nicoletti, I., Cogliandro, E., Corradini, C., Corradini, D., Pizzoferrato, L. (2000). Determination of furosine in hydrolyzate of processed milk by HPLC using a narrow bore column and diode-array detector. *J. Liq.*

- Chromatogr. Rel. Technol.*, 23(5), 717-726.
- 45) Thomas, M. E. C., Scher, J., Desobry-Banon, S., Desobry, S. (2004). Milk Powders Ageing: Effect on physical and functional properties. *Rev. Food Sci. Nutr.*, 44(5), 297-322.
  - 46) Savilahti, E., Kuitunen, M. J. (1992). Allergenicity of cow milk proteins. *Pediatr.*, 121(5 Pt 2), S12-20.
  - 47) Donald, V., Judith, G.V., Charlotte, W.P. (1999). "Fundamentals of Biochemistry," Jon Wiley & Sons, Inc.
  - 48) Endrickson, J.B., Cram, D.J., Hammond, G.S. (1970). "Organic chemistry, 3rd Ed.," McGraw-Hill, Tokyo, p. 37.
  - 49) Hodge, J.E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model system. *J. Agric. Food Chem.*, 1(15), 928-943.
  - 50) Hodge, J.E. (1967). "Chemistry and Physiology of Flavors," eds. Schultz, H. W., Day, E.A., Libbey, L.N. *Avi Publishing*, p. 474.
  - 51) Chuyen, N.V., Kurata, T., Hujimaki, M. (1972). Studies on the strecker degradation of alanine with glyoxal. *Agric. Biol. Chem.*, 36(7), 1199-1207
  - 52) Jencks, W.P., Regenstein, J. (1975). "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology," 3rd edition, ed. Fasman, G.D., *CRC Press*, Ohio, pp. 305-352.
  - 53) 八木橋操六. (2004). 臨床医のための糖尿病病理. 診断と治療社
  - 54) Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., Vlassara, H., (2005). Diet-driven Advanced Glycation End products are major Contribution to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann NY Acad sci*, 1043, 461-466.



- 55) Cai, W., Gao, Q.D., Zhu, L., Peppas, M., He, C., Vlassara, H. (2002). Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med.*, 8(7), 337-346.
- 56) Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B.S., Uribarri, J., Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, 104(8), 1287-1291.
- 57) Lan, X.H., Liu, P., Xia, S.Q., Jia, C.S., Mukunzi, D., Zhang, X.M., Xiaa, W., Tianb, H., Xiao, Z. (2010). Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chem*, 120(4), 967-972.
- 58) Babiker, E., Hiroyuki, A., Matsudomi, N., Iwata, H., Ogawa, T., Bando, N., Kato, A. (1998). Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. *J. Agric. Food Chem*, 46(2), 866-871.
- 59) Nakamura, S., Kato, A. (2000). Multi-functional biopolymer prepared by covalent attachment of galactomannan to egg-white proteins through naturally occurring Maillard reaction. *Nahrung*, 44(3), 201-206.
- 60) Song, Y., Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A., Kato, A. (2002). Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food. Res. Int.*, 35(5), 459-466
- 61) Arena, S., Renzone, G., Novi, G., Paffetti, A., Bernardini, G., Santucci, A., Scaloni, A. (2010). Modern proteomic methodologies for the characterization of lactosylation protein targets in milk. *Proteomics*,

- 10(19), 3414-3434.
- 62) Frolov, A., Hoffmann, R. (2008). Analysis of amadori peptides enriched by boronic acid affinity chromatography. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1126(1), 253-256.
  - 63) Zhang, Q., Tang, N., Brock, J. W., Mottaz, H. M., Ames, J. M., Baynes, J. W., Smith, R.D., Metz, T.O. (2007). Enrichment and analysis of nonenzymatically glycated peptides: boronate affinity chromatography coupled with electron-transfer dissociation mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 6(6), 2323-2330.
  - 64) Corzo-Martínez, M., Lebrón-Aguilar, R., Villamiel, M., Quintanilla-López, J. E., Moreno, F. J. (2009). Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the characterization of galactosylated and tagatosylated beta-lactoglobulin peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A.*, 1216(43), 7205-7212.
  - 65) Pallante, G. A., Cassady, C. J. (2002). Effects of peptide chain length on the gas-phase proton transfer properties of doubly-protonated ions from bradykinin and its N-terminal fragment peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, 219(1), 115-131.
  - 66) Yaylayan, V., Sporns, P. (1987). Novel mechanisms for the decomposition of 1-(amino acid)-1-deoxy-D-fructoses (Amadori compounds): A mass spectrometric approach. *Food Chem.*, 26(4), 283-305.
  - 67) Jerić, I., Versluis, C., Horvat, S., Heck, A. J. (2002). Tracing glycoprotein structures: electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sugar-peptide adducts. *J. Mass Spectrom.*, 37(8), 803-811.

- 68) Horvat, S., Jakas, A. (2004). Peptide and amino acid glycation: new insights into the Maillard reaction. *J. Pept. Sci.*, 10(3), 119-137.
- 69) Bosch, L., Alegri, A., Farre, R., Clemente, G. (2008). Effect of storage conditions on furosine formation in milk-cereal based baby foods. *Food Chem.*, 107(4), 1681-1686.
- 70) Erbersdobler, H.F., Dehn-Müller, B., Nangpal, A., Reuter, H. (1987). Determination of furosine in heated milk as a measure of heat intensity during processing. *J. Dairy Res.*, 54, 147-151.
- 71) Tokusoglu, O., Akalin, A.S., Unal, K. (2006). Rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine ( $\epsilon$ -N-2-furoylmethyl-L-lysine) in yogurt and cheese marketed in Turkey. *J. Food Qual.*, 29(1), 38-46.
- 72) Villamiel, M., Arias, M., Corzo, N., Olano, A. (2000). Survey of the furosine content in cheeses marketed in Spain. *J. Food Prot.*, 63(7), 974-975.
- 73) Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. (2007). Lysine availability is diminished in commercial fibre enriched breakfast cereals. *Food Chem.*, 100(2), 725-731.
- 74) Erbersdobler, H.F., Hupe, A., (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z. Ernährungswissenschaft*, 30(1), 46-49.
- 75) Garcia-Banos, J.L., Corzo, N., Sanz, M.L., Olano, A. (2004). Maltulose and furosine as indicators of quality of pasta products. *Food Chem.*, 88(1), 35-38.

- 76) Pompei, C., Spagnolello, A. (1997). Furosine as an index of heat treatment intensity in meat products: Its application to cooked ham. *Meat Sci.*, 46(2), 139-146.
- 77) Sanz, M.L., Del Castillo, D.M., Corzo, N., Olano, A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.*, 51(15), 4278-4283.
- 78) Hayase, F. (2000). Recent development of 3-Deoxyosone related Maillard reaction products. *Food Sci. Technol. Res.*, 6(2), 79-86.
- 79) Matiacevich, S.B., Santagapita, P.R., Buera, M.P. (2005). Fluorescence from the maillard reaction and its potential applications in food science. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 45(6), 483-495.
- 80) Forbes, J.M., Yee, L.T., Thallas, V., Lassila, M., Candido, R., Jandeleit-Dahm, K.A., Thomas, M.C., Burns, W.C., Deemer, E.K., Thorpe, S.R., Cooper, M.E., Allen, T.J. (2004). Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*, 53(7), 1813-1823.
- 81) Ahmed, N., Thornally, P.J. (2007). Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes. Metab.*, 9(3), 233-245.
- 82) Leclère, J., Birlouez-Aragon, I. (2001). The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 49(10), 1682-1687.
- 83) Samaha, I.A., Elgazzar, M.M., El-Atabany, A.I. (1997). Histamine content in sardine and its products. *J. Egypt Public Health Assoc.*, 72(5-6),

471-478.

- 84) Choudhury, M., Sahu, M., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. (2008). Inhibition of actinomycetes to histamine producing bacteria associated with Indian mackerel fish. *J. Fish Aquat. Sci.*, 3(2), 126-136.
- 85) Puangsombat, K., Gadgil, P., Houser, T.A., Hunt, M.C., Smith, J.S. (2012). Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. *Meat Sci*, 90(3), 739-746.
- 86) Solyakov, A., Skog, K. (2002). Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. *Food Chem. Toxicol.*, 40(8), 1205-1211.

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、懇切丁寧な研究へのご指導と多大なるご教示を賜りました日本女子大学家政学部教授・グエン・ヴァン・チュエン先生に心より深く感謝申し上げます。また、本論文を作成するに当たり、ご指導とご助言を賜りました同教授・本間健先生、ならびにお茶の水女子大学教授・大塚譲先生、本論文を御高閲頂き貴重なご助言を賜りました新藤先生、藤井先生に深謝致します。

本研究の遂行や取りまとめにおいて、多くのご協力を頂いた中島克実氏、長束千春氏、會澤明子氏、中脇理絵氏、水出恵理氏をはじめとした日本女子大学 生活化学・食品機能科学研究室の皆様には深く感謝致します。

食品の温度測定についてご教示頂きましたお茶の水女子大学教授・香西みどり先生に深く感謝いたします。また、メイラード反応生成物の分析において、ご助言とご協力を頂きましたお茶の水女子大学 生活環境研究センターの能見祐理氏（現：新潟薬科大学）をはじめとしたセンターの皆様には御礼申し上げます。

最後に、長年の研究生活を支えてくれた夫と両親、心の支えとなった子供にこの場を借りて心より感謝の意を表します。