

助成番号 0746

にがり成分のメイラード反応に及ぼす影響と、その反応生成物の 抗酸化性に関する研究

久田 孝

石川県立大学生物資源環境学部

概要 近年、心疾患、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病の因子として、体内で過剰に生成される活性酸素の存在が知られており、この活性酸素を抑制する食品が注目されている。メイラード反応物質(MRP)は発がんとの関係が示唆される一方で、味噌や醤油のメラノイジンは活性酸素除去能を持つことや抗アレルギーに関連することも報告されている。嗜好性の面でも、メイラード反応を防がなければいけない場合(栄養の低下、色・匂いの劣化)と、積極的に利用する場合(カラメル、パンの焼き色・香りなど)の両面でその制御が重要となる。食塩の添加によりメイラード反応は抑制されることが知られているが、最近の研究では、ある濃度範囲のマグネシウムやカルシウムなどの金属イオンが存在することにより、メイラード反応が進むことも報告されている。

本研究においては、にがり、あるいはその成分を用いることによりメイラード反応にどのような影響を及ぼすのか、また高機能性のMRPを産生することへ繋げることも目的とし、グルコース+リジンのメイラード反応モデルに天然にがり製品を加え、メイラード反応度、およびその反応液の抗酸化活性(DPPHラジカル捕捉能および鉄還元能)を検討した。

0.5M グルコース + 0.5M リジン水溶液を99°Cで2h加熱するメイラード反応モデルに、天然にがり(8製品)を5~50%加えた場合、メイラード反応は促進される傾向であったが、その度合いは製品間で大きく異なり、2製品では顕著な褐変促進が認められたが、目視ではほとんど影響の認められない製品もあった。さらにメイラード反応を顕著に促進させた製品によって、その反応液のラジカル捕捉能が顕著に上昇し、鉄還元能でも同様の傾向が認められた。メイラード反応と各成分間の明確な相関性は得られなかったが、塩分濃度、NaイオンとMgイオンまたClイオンと硫酸イオンのバランス等が影響しているものと推測された。

今回の研究は通常の調理や食品加工、また生理的な濃度よりも高濃度での実験の結果ではあるが、にがり成分と長時間反応した場合には同様の結果が生じると推察される。また、にがりを使用して新たな機能性を持つメイラード反応物質を作成することも可能と考えられた。これらの点については今後、さらに研究を進める必要がある。

1. 研究目的

近年、心疾患、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病の因子として、体内で過剰に生成される活性酸素の存在が知られており、この活性酸素を抑制する食品が注目されている。我々も能登地域の食用海藻を中心に、抗酸化活性およびポリフェノール含量の検討を行ってきたが¹⁻³⁾、サンプル抽出を熱水あるいは熱エタノールで行った際に、褐変(メイラード反応)が起こり、その反応生成物(MRP)が抗酸

化性を持つ場合があることが示唆された⁴⁾。

MRPは発がんとの関係が示唆される一方で、味噌や醤油のメラノイジンは活性酸素除去能を持つことや抗アレルギーに関連することも報告されている^{5,6)}。嗜好性の面でも、メイラード反応を防がなければいけない場合(栄養の低下、色・匂いの劣化)と、積極的に利用する場合(カラメル、パンの焼き色・香りなど)の両面でその制御が重要となる。食塩の添加によりメイラード反応は抑制されることが知られて

いるが、最近の研究では、ある濃度範囲のマグネシウムやカルシウムなどの金属イオンが存在することにより、メイラード反応が進むことも報告されている^{6,7)}。

本研究においては、にがり、あるいはその成分を用いることによりメイラード反応にどのような影響を及ぼすのか、また高機能性のMRPを産生することへ繋げることも目的とし、グルコース+リジンのメイラード反応モデルに天然にがり製品、あるいはMgCl₂、MgSO₄などのにがり成分を加え、生成されるメイラード反応あるいはMRPの量およびその抗酸化特性を検討した。

2. 研究方法

2.1 にがり製品

天然にがり8製品を石川県内の小売店より購入した。にがり製品中の主要成分(Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, NH₄²⁺, Cl⁻, Br⁻ およびSO₄²⁻)は1,000から2,000倍の蒸留水で適宜希釈後、イオン分析機(PIA-1000, Shimadzu)で分析した。

2.2 メイラード反応モデル

D-グルコースおよびL-リジンを0.5 mol/Lずつ含む水溶液1 mLを99°Cのヒートブロックで2 h加熱し、急冷することを本実験のメイラード反応モデルとした。この反応モデルに5、15あるいは50%(v/v)のにがり製品、または0.2~2 Nとなるように塩類(NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgSO₄, (Na₄)₂SO₄)を加えてメイラード反応に及ぼす影響を観察した。また、既にメイラード反応を促進すると知られているリン酸塩の影響についても検討した。

2.3 可視・紫外光吸収スペクトル

反応終了後の溶液について色調を目視で観察後、可視・紫外光吸収スペクトルを分光光度計(U0080D, Hitachi)を用いて測定した。メイラード反応度の比較には、極大の認められた波長(可視光465 nm および紫外光285 nm)の吸光度を用いた。

2.4 DPPHラジカル捕捉能

DPPHラジカル捕捉能はBlois⁸⁾の方法を改変した方法³⁾で行った。即ち、メイラード反応溶液の2倍段階希釈液0.025 mLを96ウェルマイクロプレートに入れ、0.075 mLの蒸留水およびエタノール(EtOH) 0.1 mLを加え混合した。マイクロプレートリーダー(SH-1000Lab, コロナ電機)で517 nmの吸光度(Abs-blank)を測定後、1 mM DPPHラジカル/EtOHを0.025 mL加え、37°Cで30 minインキュベートし

た。インキュベート後、再度517 nmの吸光度(Abs)を測定し、吸光度の減少からDPPHラジカル捕捉能を次式により求めた。

DPPHラジカル捕捉能(%)

$$= (1 - (\text{Abs-sample} - \text{Abs-sample-blank}) / (\text{Abs-control} - \text{Abs-control-blank})) \times 100$$

また、各サンプルのラジカル捕捉能の強さは、ラジカルを50%消失させるサンプル濃度で比較した。

2.5 鉄還元能

鉄還元能はZhuら⁹⁾の方法を改変した方法³⁾で測定した。即ち、メイラード反応溶液の2倍段階希釈液0.025 mLを96ウェルマイクロプレートに入れ、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2)0.025 mL、および1%(w/v)フェリシアン化カリウム0.05 mLを加え混合した。37°Cで60 minインキュベート後、10%(w/v)トリクロル酢酸0.025 mL および蒸留水を加え、700 nmの吸光度(Abs-blank)を測定した。次いで、還元されて生成されたフェロシアン化カリウムを、0.1%(w/v) FeCl₃を0.025 mL加えて発色させた。各サンプルの鉄還元能の強さはFeCl₃発色による吸光度の上昇が1.0に達するサンプル濃度で比較した。

3 研究結果および考察

3.1 メイラード反応に及ぼすにがりの影響

0.5 Mグルコース+0.5 Mリジン水溶液を99°Cで2 h加熱したメイラード反応モデルの色調をFig. 1(Control)に示す。天然にがり(8製品)を5%以上加えた場合、メイラード反応は促進される傾向であったが、その度合いは製品間で大きく異なり、2製品では顕著な褐変促進が認められた(Fig. 1, Nigari-A)が、目視ではほとんど影響の認められない製品もあった(Fig. 1, Nigari-H)。

メイラード反応溶液の可視・紫外光吸収スペクトルと、にがりAおよびにがりHを加えたときの影響をFig. 2に示す。可視光では465 nmで、紫外光では285 nmに吸収極大が認められ、にがりAの影響は濃度依存的であった。にがりAを加えていないメイラード反応モデルの吸光度を1.0としたときの相対的な吸光度をTable 1に示す。

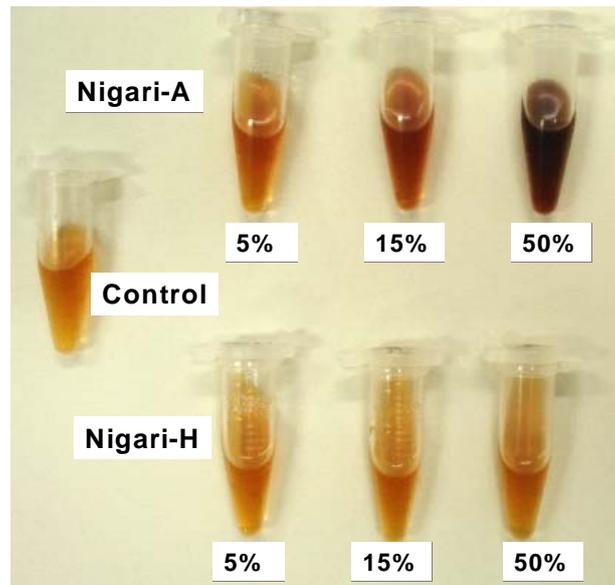


Fig. 1. Effect of seawater bitter (nigari) products on color of glucose/lysine Maillard reaction model

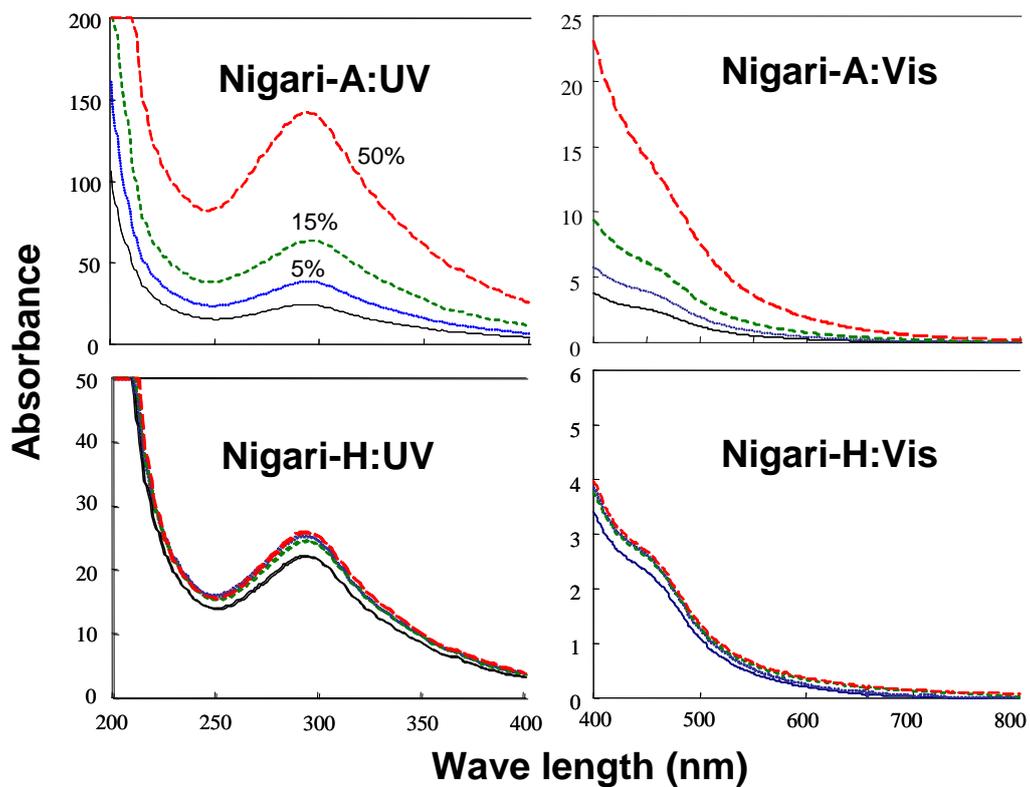


Fig. 2. Effect of seawater bitter (nigari) products on ultraviolet and visual absorbance spectre of glucose/lysine Maillard reaction model

Table 1. Effect of seawater bittern (nigari) products on browning and antioxidant activities of glucose/lysine Maillard reaction model

Products	%(v/v)	Relative absorbance*		Relative antioxidant activity**	
		285 nm	465 nm	DPPH·	Fe-reducing
A	5	1.65	1.46	1.49	1.33
	15	2.83	2.50	2.44	1.67
	50	6.09	5.29	5.65	1.82
B	5	1.61	1.75	1.39	1.28
	15	2.43	2.35	2.27	1.58
	50	5.30	5.25	5.00	2.05
C	5	1.32	1.31	1.26	1.05
	15	1.86	1.95	2.29	1.25
	50	3.86	3.62	4.95	1.90
D	5	1.52	1.65	1.39	1.37
	15	1.78	2.10	2.08	1.71
	50	3.43	3.50	3.57	1.86
E	5	1.33	1.50	1.32	1.03
	15	1.52	1.55	1.39	1.37
	50	2.39	2.30	2.50	1.71
F	5	1.18	1.10	1.19	1.18
	15	1.20	1.12	0.98	0.87
	50	1.64	1.67	1.67	1.11
G	5	1.74	1.19	1.13	1.25
	15	1.80	1.13	1.02	1.18
	50	1.48	1.02	0.98	1.11
H	5	1.74	1.14	0.89	0.87
	15	1.80	1.12	0.87	0.83
	50	1.48	1.17	1.02	0.95

Values are mean of triplicate measurement.

* Ratio of sample Abs./control Abs.

** Ratio of sample activity/control activity: The activities were from the concentration for 50% DPPH radical-scavenging or for the increased absorbance 1.0 in the Fe-reducing assay system

3. 2 メイラード反応溶液の抗酸化性に及ぼすにがりの影響

DPPH ラジカル捕捉能および鉄還元能の測定例を Fig. 3 に示す。

メイラード反応によって DPPH ラジカル捕捉能は上昇し、さらにメイラード反応を顕著に促進させた 2 製品 (Table 1, Fig. 4: Nigari-A, B) によって、5 から 6 倍もラジカル捕捉能が上昇した。また、明確なメイラード反応促進の認められなかった 2 製品 (Table 1, Fig. 4: Nigari-G, H) ではラジカル捕捉能の促進も認められなかった。鉄還元能でも同様の傾向が認められたが、にがり製品による促進は高いものでも 2 倍程度で、ラジカル捕捉能と比較して顕著ではなかった。

3. 3 にがり製品中の主要イオン組成

上記のようにメイラード反応およびその反応液の抗酸化活性に及ぼす天然にがりの影響は製品によって大きく異なった。その原因は塩分濃度および組成の違いによるものと考えられたため、各製品の主要イオン組成を分析した (Table 2)。メイラード反応およびラジカル捕捉能を最も促進させたにがり A および B では、Na イオン濃度が低く、Mg イオンが高い傾向であった。製品 C および D は硫酸イオン濃度が高い傾向であった。メイラード反応への影響が小さかったにがり F および H では塩分濃度が低かったが、同様に明確な促進作用の認められなかったにがり G では Na イオン濃度が最も高く、Cl イオン濃度も高かった。

メイラード反応と各成分間の明確な相関性は得られないが、総塩分濃度、Na イオンと Mg イオンまた Cl イオンと硫酸イオンのバランス等が影響しているものと推測される。

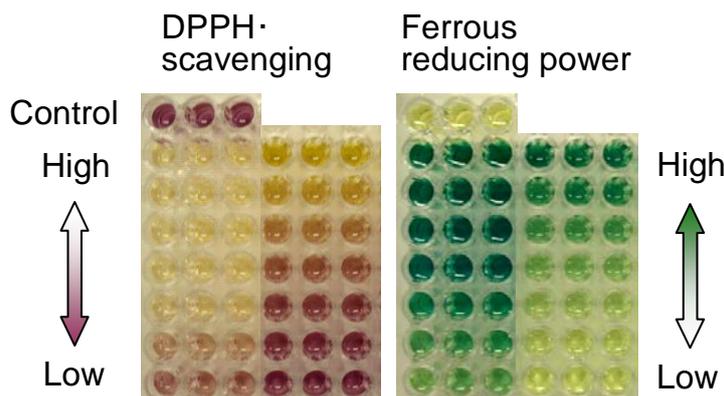


Fig. 3. Microplate colorimetric assay of DPPH radical scavenging capacity and ferrous reducing power

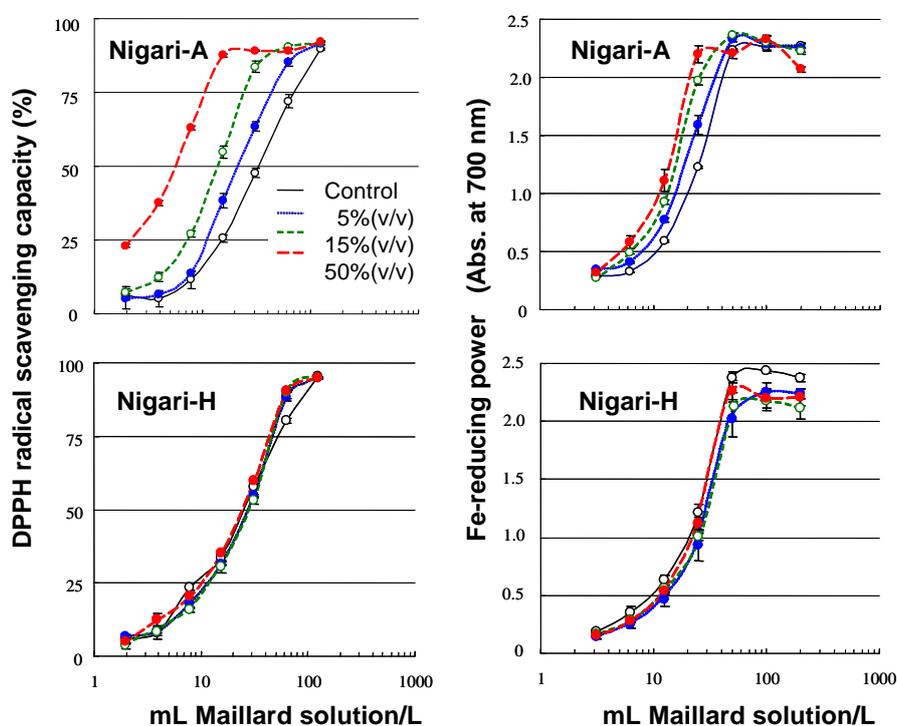


Fig. 4. Effect of seawater bitterm (nigari) products on antioxidant properties of glucose/lysine Maillard reaction model

Table 2. Major compounds (ions) in seawater bitterm products (mol/L)

Products	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	SO ₄ ²⁻
A	0.26	0.08	0.14	2.77	trace	0.01	6.15	0.07	0.25
B	0.37	0.26	0.23	3.41	trace	-	6.49	0.07	0.29
C	1.81	0.16	0.38	1.97	0.05	-	4.73	0.03	0.70
D	1.60	0.29	0.39	2.00	trace	trace	5.26	0.04	0.67
E	1.81	0.36	0.27	1.40	0.03	-	4.33	0.02	0.45
F	0.04	0.03	0.03	0.36	0.01	-	0.92	0.01	0.04
G	1.89	0.17	0.90	1.09	0.18	0.01	5.79	0.20	-
H	0.17	0.02	0.12	0.42	0.01	-	0.88	0.01	0.05

3.4 各種塩類のメイラード反応に及ぼす影響

塩化物塩を 0.2~2 N になるようにメイラード反応モデルに加えた場合、いずれの濃度でも明確な促進作用は認められなかった (Table 3)。特に MgCl_2 を多量に加えた場合、可視光の吸収は抑制された (Fig. 5)。

硫酸化物塩を加えた場合、メイラード反応の促進が認められ、特に Na_2SO_4 によって紫外線、可視光線の吸収が促進された。しかしながら Mg_2SO_4 の添加では可視光線の吸収の明確な促進は認められなかった。

近年、塩分濃度や陽イオンの存在によってメイラード反応が影響されることが報告されているが⁷⁾、本実験ではその種類や組成によって影響は様々であることが示された。

例えば陰イオンでも Cl イオンよりも SO_4 イオンの存在でメイラード反応が促進されることが示唆される。しかしながら、Table 1 および 2 で示されたにがり製品のメイラード反応の促進とイオン組成の結果と一致しない部分もある。陽イオン、陰イオンの組成、総塩分濃度、あるいはその他のマイナーな成分の組み合わせでメイラード反応に対する影響が異なってくると考えられるため、今後も検討が必要である。

リン酸塩はすでに知られているように、メイラード反応を顕著に促進した。リン酸結合部の高いエネルギーと関係しているものと考えられ、非常に興味深いのが、今回用いたにがり製品ではリン酸塩はほとんど検出限界以下であった。

Table 3. Effect of salts on browning and antioxidant activities of glucose/lysine Maillard reaction model

Salt	mol/L	Relative absorbance*		Relative antioxidant activity**	
		285 nm	465 nm	DPPH·	Fe-reducing
NaCl	0.2	1.18	1.12	1.36	1.13
	0.6	1.18	1.16	1.20	1.54
	2.0	1.26	1.07	1.15	1.05
MgCl_2	0.1	1.05	1.02	1.03	1.08
	0.3	1.08	1.00	0.97	1.05
	1.0	0.97	0.77	0.77	0.77
KCl	0.2	1.15	1.12	1.22	1.16
	0.6	1.18	1.16	1.13	1.29
	2.0	1.26	1.07	1.20	1.22
NH_4Cl	0.2	0.98	1.11	1.13	1.21
	0.6	1.06	1.31	1.05	1.14
	2.0	1.04	1.53	1.19	1.37
Na_2SO_4	0.1	1.38	1.35	1.25	1.38
	0.3	1.54	1.49	1.36	1.47
	1.0	2.08	2.09	1.88	1.29
MgSO_4	0.1	1.18	1.14	1.07	1.22
	0.3	1.41	1.30	1.11	1.10
	1.0	1.74	1.30	1.24	1.16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	1.25	1.33	1.19	1.46
	0.3	1.37	1.67	1.43	1.58
	1.0	1.60	2.06	1.79	1.64
NaH_2PO_4	0.1	2.69	3.75	2.19	2.73
	0.3	4.92	6.04	4.78	4.27
	1.0	8.27	10.21	8.96	6.72
KH_2PO_4	0.1	2.77	3.79	2.72	2.55
	0.3	4.62	5.63	4.30	3.94
	1.0	7.65	8.54	9.35	5.54

See footnotes of Table 1.

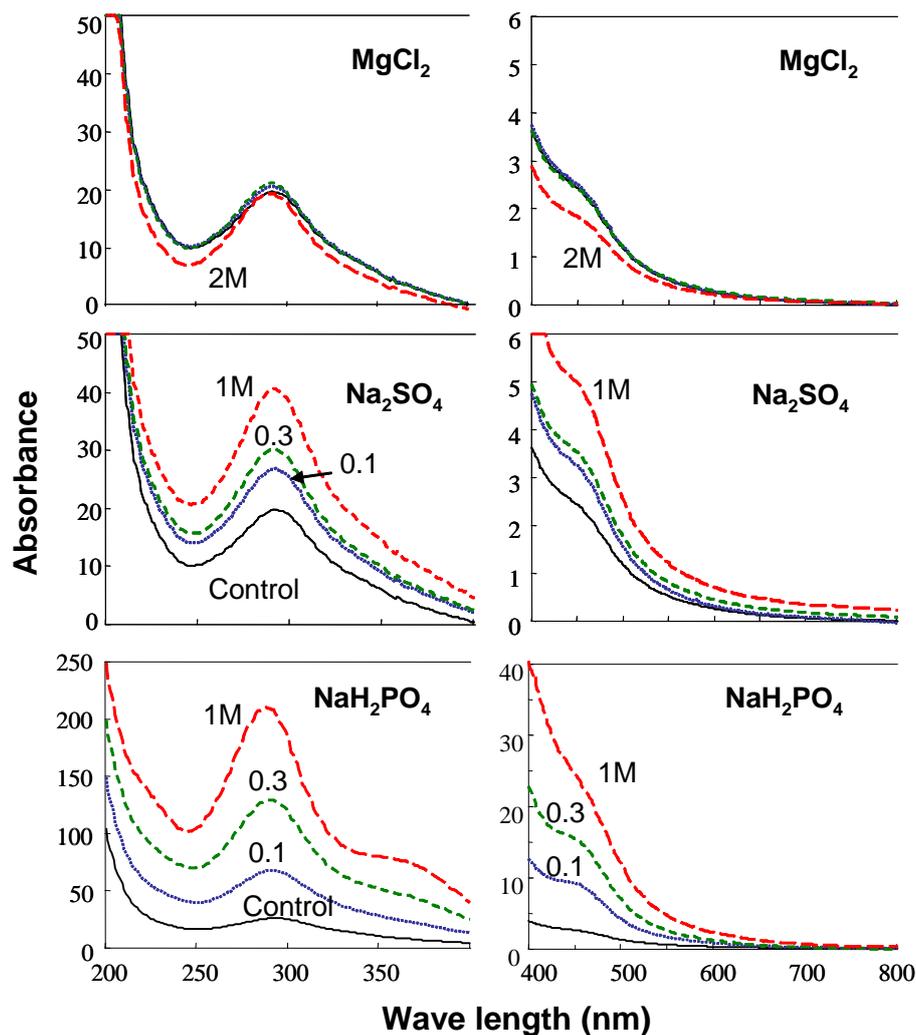


Fig. 5. Effect of salts on ultraviolet and visual absorbance spectre of glucose/lysine Maillard reaction model

3.5 メイラード反応溶液の抗酸化活性に及ぼす塩類の影響

メイラード反応液の DPPH ラジカル捕捉能に対する影響は、吸光度の変動と相関する傾向で、 MgCl_2 によって抑制され、 Na_2SO_4 によって促進された (Table 3)。リン酸塩による抗酸化性の促進も吸光度の上昇と相関していた。いずれの場合も、鉄還元能の促進は DPPH ラジカル捕捉能よりは小さかった。

3.6 経時的なメイラード反応に及ぼすにがり製品および塩類の影響

ここまでの実験で用いたメイラード反応モデルは 99°C 、2 h での吸光度と抗酸化活性を比較したが、反応 6 h までの

変動を Fig. 6 に示す。反応中の吸光度の上昇はほぼ直線的であった。DPPH ラジカル捕捉能の変動は吸光度と連動していたが、にがり製品 A および B (上の実験で顕著な促進作用を確認した 2 製品) では、塩類によるラジカル捕捉能の促進よりも顕著で、主要塩類以外にも抗酸化能を促進させる因子が存在する可能性がある。

以上のように高濃度のにがり成分の存在によってメイラード反応、およびその抗酸化活性が促進されることがあることが示された。これまで陽イオンや塩分がメイラード反応に影響することが報告されてきたが、陰イオンやその他の成分も関与していると考えられた。

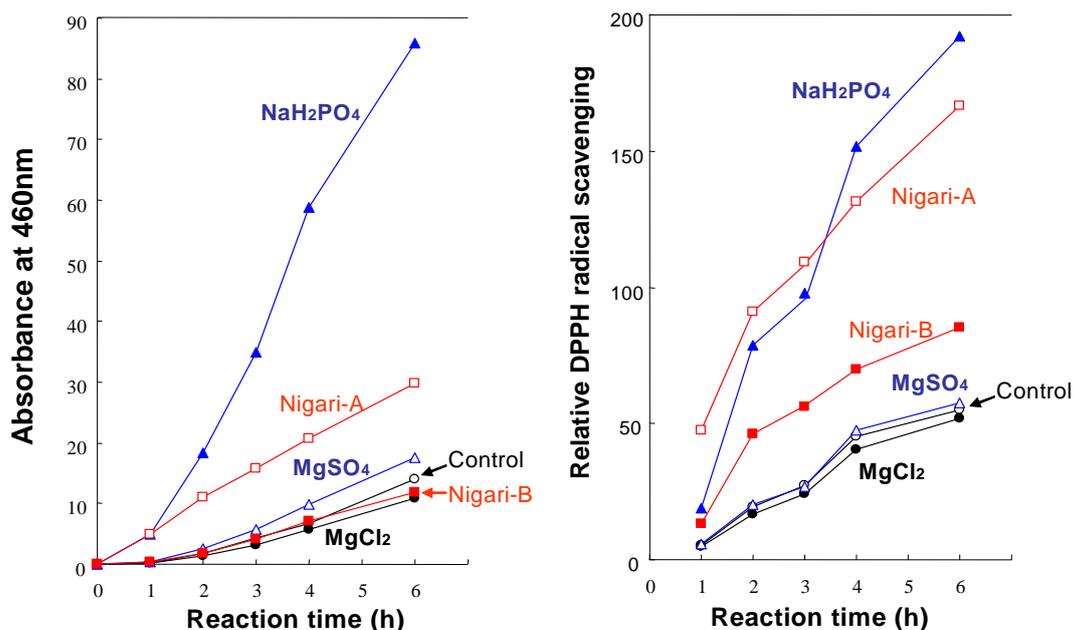


Fig. 6. Effects of nigari products (50%(v/v)) and salts (1 M) on kinetic changes of absorbance and DPPH radical scavenging capacity of glucose/lysine Maillard reaction model

4. 今後の課題

今回の研究は通常の調理や食品加工、また生理的な濃度よりも高濃度での実験の結果ではあるが、にがり成分と長時間反応した場合には同様の結果が生じると推察される。また、にがりを使用して新たな機能性を持つメイラード反応物資を作成することも可能と考えられた。これらの点については今後、さらに研究を進める必要がある。

本研究の遂行にご助成賜りました、財団法人ソルト・サイエンス研究財団に御礼申し上げます。

文献等

- 1) Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 625-633.
- 2) Kuda, T., Tsunekawa, M., Hishi, T., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chemistry* 89, 617-622.
- 3) Kuda, T., Kunii, T., Goto, H., Suzuki, T. & Yano, T. (2007). Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome*

products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chemistry* 103, 900-905.

- 4) Kuda, T., Hishi, T., & Maekawa, S. (2006). Antioxidant properties of dried product of 'haba-nori', an edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova. *Food Chemistry* 98, 545-550.
- 5) Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C.(2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal* 14, 421-427.
- 6) Gokmen, V., & Senyuva, H. Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations During the Maillard reaction. *Food Chemistry* 103, 196-203.
- 7) 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, 85-90.
- 8) Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1200.
- 9) Zhu, Q. T., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., & Keen, C. L. (2002). Antioxidant activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6929-6934.

No. 0746

Effects of Bittern on Maillard Reaction and Antioxidant Properties of the Maillard Reaction Product

Takashi Kuda

Ishikawa Prefectural University

Summary

To study the beneficial effects of seawater bittern products (nigari) on Maillard reaction and antioxidant properties of the Maillard reaction product (MRP), we used 0.5 M glucose / 0.5 M lysine Maillard reaction model that was incubated at 99 °C for 2 h.

By 5 - 50 % (v/v) of two nigari products, among the eight products, ultraviolet (UV) visual (Vis) ray absorbance was remarkably increased. The two nigari products also increased 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity and ferrous reducing power of the Maillard reaction model. Sodium sulfate and ammonium sulfate (1 mol/L) increased the absorbance and antioxidant activities. On the other hand, magnesium chloride (1 mol/L) decreased Vis ray absorbance and the antioxidant activities.

However, the major mineral content and composition in the nigari products were not correlated with the UV-Vis absorbance and the antioxidant activities in the model. Therefore we think that further study about the effect of minor compounds in nigari products on the Maillard reaction is necessary.