

総説特集：「減塩食品の開発とうま味」

天然素材による塩味感受性の変化

神田 祐輔

(MCフードスペシャリティーズ株式会社・研究開発統括本部 基盤研究センター)

発酵・熟成食品は人類の文化と共に発展してきた伝統的な食品である。そのような食品群は食物保存の意味合いも強いいため、一般に塩濃度が高く、塩辛いイメージを持つものが多く存在する。一方で、その塩分量は長期の発酵・熟成過程でも大きな変化はないに関わらず、発酵・熟成を経ることにより塩味を強く感じさせるものや、逆に塩味のカドがとれてまろやかに感じさせるものがある。そのような味質への修飾効果を発揮する成分として、メイラードペプチドやD-アミノ酸が、塩味を含む味覚への修飾作用を持つことがわかってきたので、その検討内容について紹介する。

キーワード：塩味、発酵熟成食品、メイラードペプチド、TRPチャネル、D-アミノ酸、

はじめに

伝統的な発酵・熟成食品は一般に保存食としての意義も大きいいため塩濃度が高く、塩辛いイメージを持つ食品が多く存在する。例えば、醤油、味噌、チーズ等があげられる。これらは製造工程の中で長期の発酵・熟成過程を必要とするが、その発酵・熟成前後に塩分量の大きな変化はない。しかしながらこのような食品の中には、その発酵・熟成過程を経ることにより塩味を強く感じられる場合や、逆に塩味のカドがとれてまろやかに感じられる場合があることが知られている。例えば、チーズは食塩含量が平均的には2%程度であり、その食塩含量の割に塩味を強く感じられる食品と言われている。また、味噌汁と同じ食塩濃度の塩水は塩辛いだけで多くの人はおいしいと感じないだろうが、味噌汁であればトゲトゲしい塩味を感じることなく、その風味を楽しむことができる。したがって、チーズや味噌の中に塩味を強く感じさせる成分や、カドをとってまろやかに仕上げる成分が含まれていると考えられる。我々は

このような塩味への修飾効果を示す成分が発酵・熟成過程に生成されるのではないかと考え、その解析を行ってきた。

1. 発酵熟成中の成分変化について

前述のように、発酵・熟成過程において塩分量は変化しない。さらに一例として熟成を特徴とする味噌である信州味噌の分析例を図1に示す。熟成期間

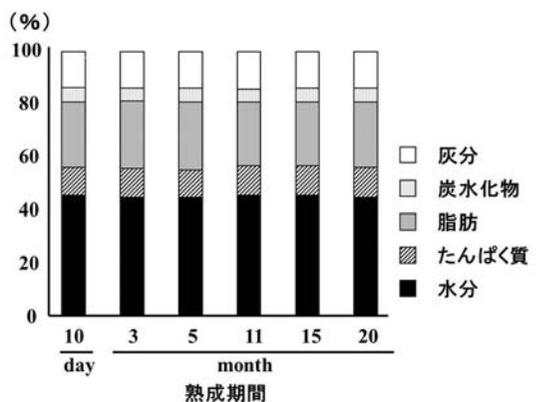


図1 信州味噌の熟成期間毎の一般成分の変化

Some natural products modulates salt sensitivity

Yusuke Kanda: Advanced Research and Technology Center, Research and Development Division, MC Food Specialties Co., Ltd., 4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0398 Japan

Tel : 029-888-8039, Fax : 029-888-3324, E-mail : Yusuke_Kanda@mc-foodspecialties.com

神田 祐輔

毎の一般成分含量を示しており、炭水化物・タンパク質・脂肪・灰分・水分の割合は熟成期間が10日から20ヶ月の間でほとんど変化がない。このような一般成分という大きな括りでの成分変化では目的の成分は見えてこなかった。発酵・熟成食品には、その製造過程において微生物的な働きはもとよりメイラード反応等の非酵素的な反応も加わり、無数の成分が存在すると思われる。そこで、より詳細な成分の解析を行ったところ、発酵・熟成の進行と共に増加し、呈味に関与している二つの成分を見出した。

一つがメイラードペプチド (MRPs) である。発酵熟成を経て確認される変化の一つに褐変がある。この褐変が起こるメカニズムの一つがメイラード反応と呼ばれる非酵素的な反応であると言われて¹⁾。メイラード反応は、アミノカルボニル反応とも呼ばれ、低分子の糖や脂肪酸、その他のカルボニル化合物がアミノ基と結合することから始まる一連の非酵素的な化学反応の総称である²⁾。一般に発酵・熟成の初期には脂質や高分子のタンパク質・糖鎖等が豊富に含まれている。それが微生物・酵素・熱などの働きによって分解され、低分子の糖・脂肪酸・アミノ酸・ペプチド等が切り出されてくる。したがってメイラード反応の基質が、発酵熟成が進むにつれて増えてくる。そうしてできた基質がメイラード反応を起こし褐変が進んでいく。メイラード反応生成物の中でも、分解されたペプチドに糖や脂肪酸その他のカルボニル化合物が付加したものを弊社ではメイラードペプチド (MRPs) と呼んでいる。そして、そのうち分子量が1000から5000のものに特に強い呈味への修飾作用があることを見出している^{3,4)}。

もう一つがD-アミノ酸である。発酵熟成食品中には生鮮品と比較して多くのD-アミノ酸が含まれているという報告が複数なされている。例えば、様々なお酢のうち、長期熟成を行うものや乳酸発酵を特徴としたものに特に多くD-アミノ酸が含まれているという報告がある⁵⁾。そこで、熟成工程の進行によるD-アミノ酸含量の確認を行った(図2)。熟成期間の異なる味噌のD-アミノ酸含量を測定したところ、L体の含有量には大きな変化がない一方で、D体は熟成1年と比較して熟成3年の味噌ではおよそ2.5倍量に増加していた。L体と比較して絶対量が少ないことに注意が必要なものの、熟成による相

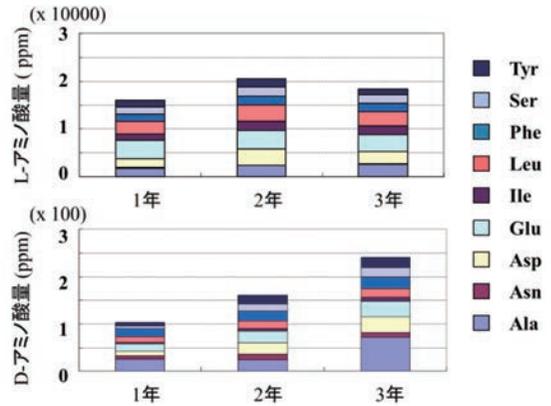


図2 市販味噌の熟成期間毎のD-アミノ酸量の変化

対的な変化は大きいことがわかった。

以上のように、それ自体は多量に存在するものではないが、熟成前後に相対的な変化の大きい成分としてMRPsとD-アミノ酸を見出した。次項より、その呈味の修飾効果の検討結果についてそれぞれ紹介する。

2. MRPsの塩味修飾作用

MRPsの塩味修飾効果について検討するためにモデルMRPsの調製を行った。文献3の方法に従い、大豆由来タンパク質の酵素分解、限外濾過、糖とのメイラード反応により熟成工程を再現した1000-5000DaのMRPsを調製し、以後の試験に用いた。

まず、キシロースとペプチドを反応させ調製したMRPs (Xyl-MRPs) を食塩溶液に添加し、それをラットに与えた時の鼓索神経応答を測定した(図3)。食塩に対するラットの鼓索神経応答はXyl-MRPs0.5%添加までは増大し、それ以上の濃度添加

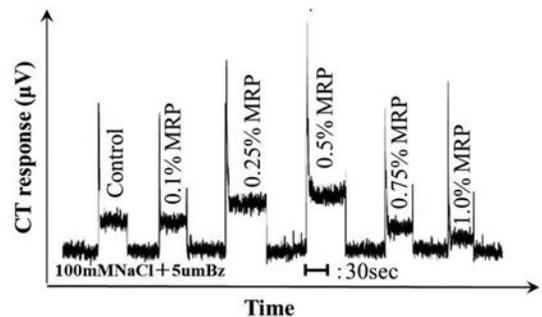


図3 NaCl溶液に対するラットの鼓索神経応答

天然素材による塩味感受性の変化

では逆に抑制された。したがって、ある濃度域ではMRPsがラットの塩味応答シグナルを増強させた。続いて、ヒトの官能においても塩味の修飾が感じられるか確かめるために、同様のXyl-MRPsを添加した塩化ナトリウム溶液のプロビット法による等価食塩濃度解析を行った(図4)。その結果、神経応答のシグナルと同様に、Xyl-MRPs添加によってある濃度までは濃度依存的に塩味感受性強度が増加し、それ以上の濃度添加によって抑制されることが確認された。以上よりXyl-MRPsがNaCl溶液の感受性を増加させることを電気生理学的、官能的に確認した。

次に、MRPsの修飾構造の差異によって塩味修飾能力が変化するか確認するために、種々の糖(GlcNH₂:グルコサミン、GalA:ガラクトロン酸、Fru:フルクトース、Glc:グルコース)と反応させたメイラードペプチドを用いてラットの鼓索神経応答を観察した(図5)。その結果、いずれのMRPsもXyl-MRPsと同様に増強効果と抑制効果を示した

が、効果のある濃度域や応答強度は反応した糖の種類によって異なっていた。したがって、本試験に供したMRPsはいずれも塩味の感受性に影響を与え得るが、ペプチドと反応させる糖の種類によって効果が異なると考えられる。さらに重要なことに未反応のペプチドは神経応答に影響を与えず、塩味の修飾効果には糖とペプチドのメイラード反応が重要であることが示された。

最後に、MRPsの塩味修飾効果の作用機序についての確認を行った。食塩の感受性に重要なイオンチャンネルとして、上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)やパニロイド受容体(TRPV1)のバリエーションであるTRPV1tが知られている^{6,7)}。そこでMRPsの作用する塩味感受の経路について検討した。ENaCの阻害剤であるベンザミル(Bz)、TRPV1tの阻害剤であるSB-366791(SB)をそれぞれ用いて、チャンネル阻害下での鼓索神経応答を測定した(図6)。ENaC阻害下では、これまでのように添加濃度依存的に応答

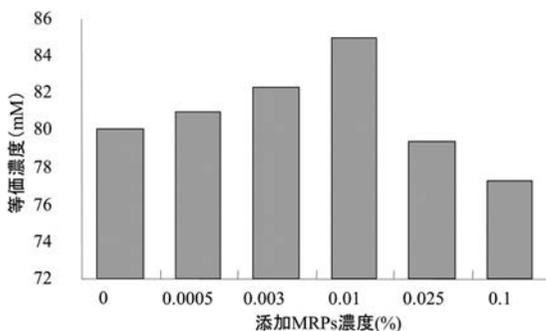


図4 ヒト官能試験によるMRPsによる塩味感受強度の変化: 80 mM NaCl溶液にMRPsを添加した際の等価食塩濃度

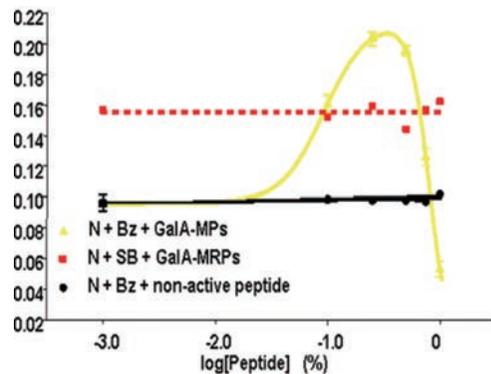


図6 ENaC、TRPV1t阻害剤を用いた神経応答曲線

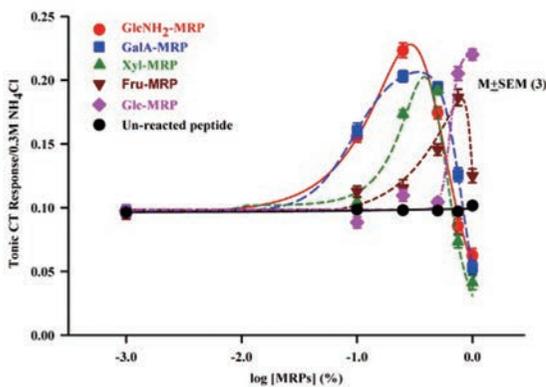


図5 各種MRPsによる塩味神経応答の変化曲線

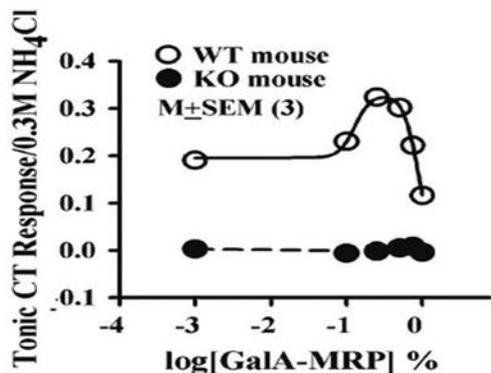


図7 TRPV1 KOマウスを用いたMRPsの鼓索神経応答の変化

神田 祐輔

曲線が変化した。一方で、TRPV1t 阻害下ではMRPs 添加による神経応答の変化が見られなかった。さらに、TRPV1 のノックアウト (KO) マウスを用いて鼓索神経応答を観察した (図7)。野生型 (WT) マウスではこれまで同様に神経応答が観察できたのに対して KO マウスではMRPs 添加による応答は消失した。以上の結果から、MRPs が示す塩味修飾効果はENaC ではなくTRPV1t を介した塩味修飾効果であることが示唆された。

3. D-アミノ酸の塩味カド抑制効果

アミノ酸は、不斉炭素を持つためD体とL体の鏡像異性体が存在するが、生体中のアミノ酸即ち食品中のアミノ酸のほとんどはL体で構成されている。立体配置が異なると、当然のことながら受容体との相互作用も異なるため、D体かL体かによって同じアミノ酸であっても呈味性が異なる事が知られている^{8,9)}。とはいえ、D体はL体と比較すると極微量成分ということもあり、食品においてはあまり注目されてこなかった成分と言える。しかしながら、分析技術の向上により様々な食品においてその存在が確認されており、味噌・醤油・バルサミコ酢などの発酵・熟成食品^{10,11,12)} で近年多く報告がなされている。そこで、これらD-アミノ酸の呈味への効果の検証を行った。

図2に示す様に発酵・熟成によってD-アミノ酸が増加する傾向にある。図2の熟成味噌を用いて、熟成期間の違いによる味噌の呈味変化の推移を図8に、この熟成味噌の分析値の一部を表9に示す。うま味、甘味、酸味では熟成期間によりその強さに有意な変化が見られた。塩味に関しては、有意差は得られなかったが、熟成期間の違いによって塩味の感じ方が変化する傾向が見られた。うま味の増強はタンパク質やペプチドの分解に伴うグルタミン酸を始めとした遊離アミノ酸の増加が一部影響していることが考えられる。また、甘味の低減と酸味の増強には、微生物の作用やメイラード反応等による糖の消費・分解やそれに伴う有機酸の増加が関与していることが推測される¹³⁾。一方で塩味に関しては、表9のように熟成期間毎に食塩量の変化がないにも関わらず、塩味の感じ方が変化する傾向が見られた。したがって熟成により変化する食塩以外の成分が塩味の感じ方に影響を与える可能性が考えられた。

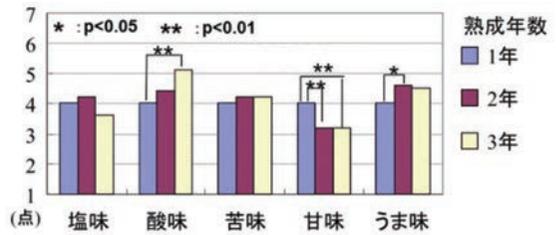


図8 熟成期間の異なる味噌の基本味の強さ (熟成1年を4点とした7点評価法)

	1年	2年	3年
食塩 (%)	13.6	13.6	14.0
固形分 (%)	44.6	44.1	43.9
D-Ala (ppm)	26	23	71
D-Asp (ppm)	11	24	34
D-Glu (ppm)	15	24	32

表9 熟成期間の異なる味噌の分析値

そこで、このような熟成中の呈味変化に対してD-アミノ酸が関与しているか確認するために、各種呈味溶液へのD-アミノ酸添加効果をTime-Intensity法を用いたヒト官能評価によって呈味の強度と持続時間の変化を評価した (図10)。15種類のD-アミノ酸を用いたところ、食塩溶液に対して、D-グルタミン酸添加に最も大きな影響が見られた。D-グルタミン酸は塩味の持続時間にはほとんど影響を与えずに塩味の強度を低下させた。さらにL体の添加と比較したところ、その効果はD体の方が強い傾向が見られた。また、クエン酸溶液を用いて酸味に対しても同様の試験を行ったところ、アスパラギン酸が特に酸味の強度を抑制し、その効果はD体に強く

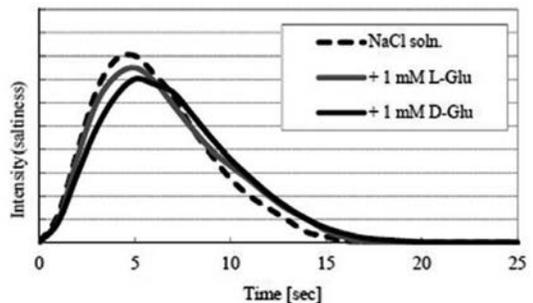


図10 塩味に対するD-アミノ酸の添加効果

天然素材による塩味感受性の変化

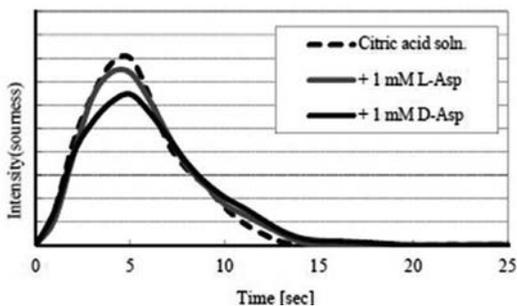


図 11 酸味に対する D-アミノ酸の添加効果

見られた (図 11)。以上のように D-アミノ酸の中には呈味の感じ方に影響を与えるものがあり、塩味・酸味に対しては強度を低下させることがわかった。しかしながら D-アミノ酸による塩味・酸味抑制の生理学的な作用機序は不明のままである。

4. 食品系への応用

最後に、以上のような MRP_s・D-アミノ酸の味覚修飾効果が食品系への添加においても得られるかどうか検討した。

モデル食品系として各種畜肉ブロスを用いたヒトの官能評価を行った。MRP_s 無添加の時の塩味を 4 点として MRP_s を添加した際の塩味の強さを官能により評価したところ、MRP_s 添加による塩味の濃度依存的な増強・抑制が見られた (図 12)。したがって、MRP_s は食塩溶液だけでなく実際の食品中においてもその塩味増強作用が期待できることがわかった。

また、酢・醤油に対してそれぞれ D-アミノ酸を添加し、塩カド・酢カドの強弱を 7 点評価法で評価した (図 13)。醤油に対しては、用いた D-アミノ酸の中でグルタミンを除いて有意に塩カドを抑制することが示された。また、酢カドに対しても多くの D-アミノ酸がカド抑制効果を示した。したがって D-アミノ酸のいくつかは塩味・酸味の強度を低下することによってその食品をまろやかに感じさせる効果を持つことが示唆された。

以上のように、MRP_s・D-アミノ酸の塩味修飾作用は我々が普段食するような食品系においても有効で、減塩時の塩味増強や、塩カド抑制等に利用することが可能となる。

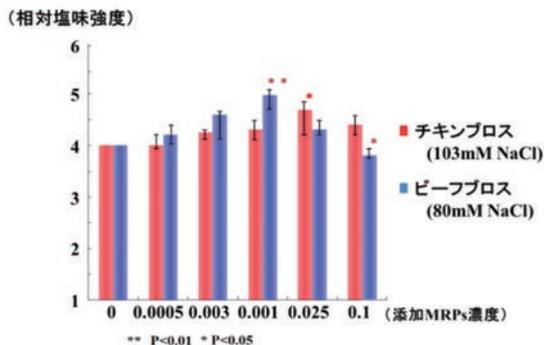


図 12 畜肉エキスへの MRP_s 添加効果

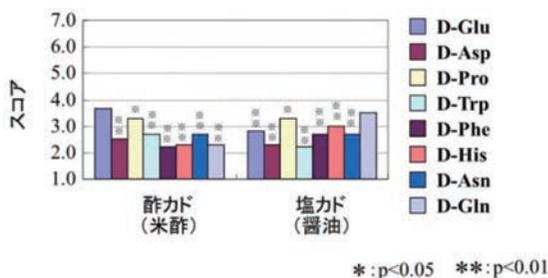


図 13 食品への D-アミノ酸添加効果

おわりに

食品においてメイラード反応が進むと非常に多くの反応産物が生成される。その中で、ピラジン類やフラノン類、メラノイジン等、食品の香り形成や色調形成に重要な化合物の生成が多く報告されている^{1,2)}。今回はメイラード反応物の中から分子量 1000~5000 の MRP_s が無味無臭にも関わらず呈味修飾作用を有することを紹介した。特に塩味に対しては TRPV1t を介した作用であることを示唆し、また MRP_s の修飾構造の差異によっても効果を調整しうることが明らかになった。

また、舌に強く感じる塩味や酸味を塩カド・酢カド等と一般に呼ぶが、このようなカドをみりんや味噌等の発酵・熟成食品で抑制できることはよく知られている¹⁴⁾。今回の D-アミノ酸の検討結果から、発酵・熟成食品によるカド抑制効果の一部に D-アミノ酸の塩味・酸味強度抑制効果が関与している可能性が考えられた。さらに、D-アミノ酸はその味覚閾値以下でその抑制効果を有した。

以上のように発酵・熟成を特徴とする伝統食品に着目して種々の解析を行ってきた結果、MRP_s・D-

神田 祐輔

アミノ酸に塩味をはじめとする様々な味覚修飾効果があることが明らかになってきた。さらに興味深いことに、それ自身は呈味を示さない（濃度域）にも関わらず、味覚修飾効果を発揮した。

発酵熟成を特徴とした伝統食品は郷土料理等を含めると世界中に数えきれないほど存在する。その中に未だに光の当たっていない有用成分や味覚修飾メカニズムのヒントが隠れているかもしれない。

文 献

- 1) Rannou C, Laroque D, Renault E, Prost C and Serot T: Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the reaction in foods. *Food Res Int* 90, 154-176 (2016)
- 2) van Boekel MA: Formation of flavor compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol Adv* 24, 230-233 (2006)
- 3) Ogasawara M, Katsumata T and Egi M: Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000-5000 Da peptides. *Food Chem* 99, 600-604 (2006)
- 4) Katsumata T, Nakakuki H, Tokunaga C, Fujii N, Egi M, Phan THT, Mummalaneni S, DeSimone JA and Lyall V: Effect of maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). *Chem Senses* 33, 665-680 (2008)
- 5) Mutaguchi Y, Ohmori T, Akano H, Doi K and Ohshima T: Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus* 2, 691 (2013)
- 6) Frank ME, Contreras RJ and Hettinger TP: Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. *J Neurophysiol* 50, 941-960 (1983)
- 7) Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan THT, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW and Desimone JA: The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J Physiol* 558, 147-159 (2004)
- 8) Schiffman SS, Sennewald K and Gagnon J: Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L-amino acids. *Physiol Behav* 27, 51-59 (1981)
- 9) Bassoli A, Borgonovo G, Caremoli F and Mancuso G: The taste of D- and L-amino acids: In vitro binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3). *Food Chem* 150, 27-33 (2014)
- 10) Brückner H and Hausch M: Gas Chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia* 28, 487-492 (1989)
- 11) Erbe T and Brückner H: Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography - selected ion monitoring mass spectrometry. *Z Lebensm Unters F A* 207, 400-409 (1998)
- 12) Mori M, Ito Y and Nagasawa T: Content of free D-Ala and D-Glu in traditional Asian fermented seasonings. *J Nutr Sci Vitaminol* 56, 428-435 (2010)
- 13) Shu CK: Pyrazine formation from amino acids and reducing sugars - a pathway other than Strecker degradation. *J Agri Food Chem* 46, 1129-1131 (1998)
- 14) 福井裕, 石田丈博, 西村敏英, 松田秀喜: 本みりんの塩味・酸味抑制効果における官能評価と味覚センサーの分析結果との相関性, 日本調理学会誌 39, 49-56 (2006)

<著者紹介>

神田 祐輔 (かんだ ゆうすけ)

2014年 筑波大学生命環境学群生物学類 卒業

2016年 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物資源科学専攻修士課程 修了

2016年 MC フードスペシャリティーズ株式会社 製品開発研究所

2017年 MC フードスペシャリティーズ株式会社 基盤研究センター

