システインとポリフェノールの協働による食肉新鮮色の維持研究

増　田　晃　子
四国大学生活科科学部管理栄養士課程　講師
（現 四国大学生活科科学部管理栄養士課程　准教授）

緒　　言

グローバリゼーションの流れから、食品も国境を越えて流通している。鮮度が問題となる生鮮食品も例外ではなく、生鮮食品を新鮮なまま流通させるための品質管理技術の重要性は増しているといえる。食肉は世界共通の生鮮食品であり、その鮮度は消費者によって色の鮮やかさで判断され、変色は食肉成分の酸敗開始を意味する[1)]。食肉の新鮮さを示す鮮赤色は、食肉中の色素タンパク質・ミオグロビンの2価鉄イオンに酸素が配位したオキシミオグロビンによる。ミオグロビンはそれほど安定ではなく、徐々に鉄が3価に酸化され、褐色のメトミオグロビンとなり、商品価値と品質を低下させる。したがって食肉製造から消費の間に、オキシミオグロビンが示す赤色状態を保持することは食品科学上重要な課題である。最近では、流通経路の複雑化に加え、変色劣化の速い魚肉の取り扱いも多くなり、本問題の解決に繋がる研究の必要性は増している。

一方、植物には多様なフェノール成分が含まれ、それらは高い抗酸化性と還元性を有する機能性成分・ポリフェノールとして着目されている。しかしポリフェノールは高い還元反応性ゆえに物質としては不安定性で、その利用には注意が必要である。高い還元力を示すポリフェノールは褐色のメトミオグロビンの3価の鉄を2価に還元する能力がある。しかし、その反応によって生じたポリフェノールの酸化物は、鮮赤色のオキシミオグロビンの酸化を促進してしまう、いわゆるプロオキシダント効果が生じ、結局ポリフェノール単独では、オキシミオグロビンの維持は困難で、食肉の鮮赤色を保つことはできないことが知られている[2)]。

そこで、本研究では、ポリフェノールによるミオグロビンの還元鮮赤色維持を目指して、ミオグロビンに対するポリフェノールのプロオキシダント作用を詳細に解明し、その知見に基づき、高い求核性置換基のチオール基を有するアミノ酸であるシステインにより制御することを試み、ミオグロビンの鮮赤色を反映した食肉の新鮮色の維持技術の確立を目的とした研究を行った。

実験方法

MetMbからのMbO_2生成および維持実験

マイクロプレートのウェルに、試験サンプル（ポリフェノール）のDMSO溶液，MetMb緩衝溶液、システインの水溶液、およびリン酸緩衝液（pH 7.4）を入れ、マイクロプレートリーダー内にて、37℃で2時間インキュベートし、500 nmおよび582 nmの吸光度を経時的に測定した。各ウェルのMbO_2とMetMb濃度は、MbO_2（μmol/L）＝（89.7×A582）－（32.9×A500）式、およびMetMb（μmol/L）＝60－MbO_2（μmol/L）式から算出し，機能はMbO_2生成率として表した。

HPLCおよびLC-MSによるMetMb還元反応におけるカフェ酸の経時的分析

カフェ酸DMSO溶液とシステイン水溶液を用い、その他の実験条件は上記と同様にマイクロプレートリーダー中、37℃でインキュベートした。1時間間隔で反応液を以下の条件で分析した。：カラム、コスモシル5C18-AR-II（4.6 mm×250 mm、5 μm）；流速，1.0 mL/min; 溶媒A, 1%酢酸水；溶媒B,アセトニトリル；グラジエント条件：100%まで5～100%直線勾配の溶媒B（40分間）。検出；280 nm。反応混合物中のカフェ酸およびその誘導体の濃度は絶対検量線法を用いて計算した。$LC\text{-}MS^E$分析により各生成物を推定した。

MetMb還元反応におけるシステインおよびシスチンの定量分析

反応中のシステインの定量は改良エルマン法を用いて行った。1時間間隔で上記反応液から20 μLを取り、リン酸緩衝液（pH 7.4）、蒸留水、および5,5′-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）溶液を添加し23℃で5分間撹拌し

た後、この溶液10 μLのHPLC分析を行い生成した2-nitoro-5-hydrosulfulylbenzoic acidを以下の条件で定量した。：カラム，コスモシル3C18-EB（3.0 mm×150 mm, 3 μm）。流速0.3 mL/min。溶媒A，0.1％リン酸水溶液；溶媒B，アセトニトリル；グラジエント条件：0～100％（30 min）; 10.5分の保持時間ピークを330 nmで検出。システインの定量はMizutaの方法に従い、追加の反応液20 μLに塩化ベンゾイルCH_3CN溶液、およびトリエチルアミンCH_3CN溶液を0℃で攪拌しながら加えた。1時間後、反応混合物の10 μLを以下の条件でHPLCにより分析した。カラム：コスモシル5C18-AR-II（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流速0.5 mL /min。溶媒A, 0.1％トリフルオロ酢酸水；溶媒B,アセトニトリル；グラジエント条件：溶媒B10～100％（50分）；検出，254 nm。

結果と考察

これまでの研究において、MbO_2に添加したポリフェノールがMbO_2のメト化を促進することがわかっている。フラボノールに属するケルセチンは、メト化率が完全ではなく70％程度のMbO_2生成能であった。この理由を解析したところ、フラボノールはポリフェノールが酸化されることによって生じるキノン性物質が比較的速く消失し、結果として、MbO_2酸化促進能を示さなくなることが判明した[3)]。その消失反応の鍵となるのは、不安定中間体への水の求核付加であるため、その反応をより速く進めることができれば、効率的にMbO_2酸化促進を阻止できると考えた。ところでチオール基は硫黄原子の性質から、水酸基と比べて遥かに求核性が高い。そこでチオール基を有する食品成分であるシステインを用いて、ポリフェノールによるMetMbの還元とMbO_2の酸化防止を同時に達成できるかを検討した。図1にシステイン存在および非存在下での各種ポリフェノール（600または300 μmol/L）によるMetMb還元MbO_2化能を測定した結果を示した。図1のデータから、多くのポリフェノールは、単独で十分なMetMb還元活性を示すことはなかった。しかしながらシステインを共存させた系では、顕著な還元活性を示すポリフェノールが存在することがわかった。またシステイン自体のMetMb還元活性は非常に弱いものであったので、この還元性はシステインの効果が単純に合わさったものではない。なお、システインの共存下で顕著に還元能を示したポリフェノールはカフェ酸、ジヒドロカフェ酸、ヒドロキシチロソールであった。これらの物質は共通のカテコール構造を有し、強い還元性を示しながらオルトキノン体に容易に変化する抗酸化性の強いポリフェノールとして知られている。このオルトキノン構造の求電子性がMbO_2を不安定化する可能性があるが、そこにシステインが存在すると求核性のチオール基がすばやくキノンに付加することでMbO_2の不安定性を誘発しない物質になると考えられる。この想定機構を実証するために、カフェ酸を用いてさらなる検討を加えた。

図2に、マイクロプレートの各ウェルで、カフェ酸お

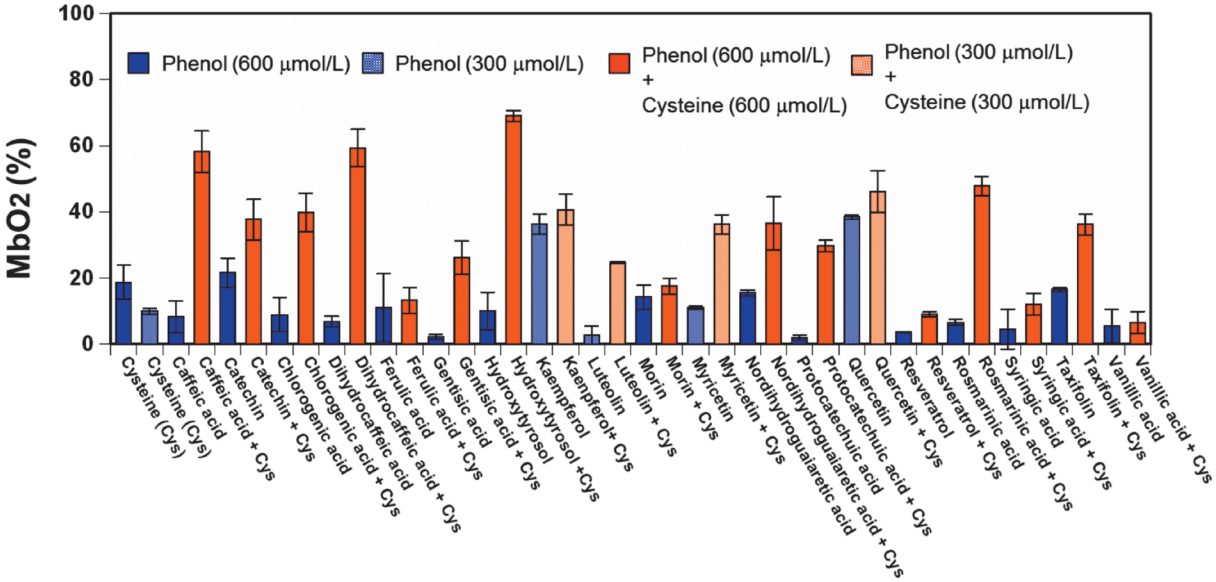

図1　システイン共存下におけるポリフェノールのメトミオグロビン還元能

Mean±SD、n=3

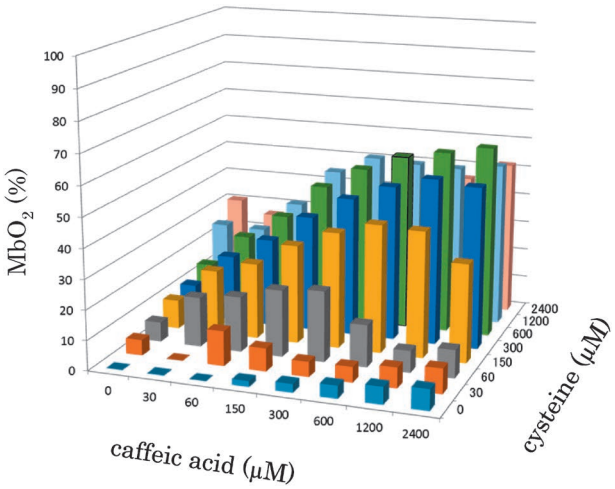

図2　システイン共存下におけるカフェ酸のメトミオグロビン還元能

0～2400 μMのマトリックスデータ、測定2回の平均値。

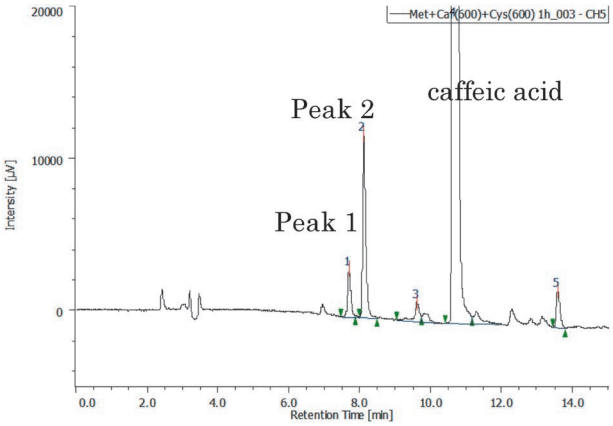

図3　HPLCプロファイル

システイン共存下でカフェ酸によるメトオグロビン還元反応を2時間行い、反応生成物をHPLCで分析した。

よびシステインとも濃度を変化させてMetMb還元反応を行い、プレートリーダーで吸光度を同時に読み取る方法で測定したMetMbの還元能のマトリックスデータを示した。得られたデータから、純粋なカフェ酸およびシステインは、2400 μmol/Lまでの間、濃度依存的に活性を示すが、その効率は高くないことがわかった。一方、カフェ酸とシステインの混合系は、顕著な還元活性を示した。カフェ酸とシステイン共存下でのそれぞれの最適濃度を見積もると、カフェ酸では、600～2400 μmol/Lに対し、システインでは、600 μmol/Lであることがわかった。一般的に活性物質は濃度依存的に効果が高くなると考えられる。しかし、カフェ酸が共存する本実験においては、システインが濃度依存的でなく、結果として、カフェ酸およびシステインがいずれもMetMbの濃度60 μmol/Lの10倍である、600 μmol/Lが最適であった。

次に、MetMb還元反応時に生成するカフェ酸およびシステイン由来の生成物の分析を行った。最適条件であるシステインとカフェ酸（各600 μmol/L）の存在下でMetMbの還元反応を行い、その生成物をHPLC分析した。図3に2時間反応後のHPLCプロファイルを示した。その結果、原料のカフェ酸以外に、7.6および8.1分の保持時間を有する二つの生成物ピークを検出した。これらピークの化合物をLC-MS分析し、ピーク1は*m/z*：298.0384 [M－H]⁻、ピーク2は*m/z*：298.0400 [M－H]⁻の分子関連イオンが検出され、そのマスユニットの値から、両化合物の分子式が$C_{12}H_{13}NO_6S$であることが判明

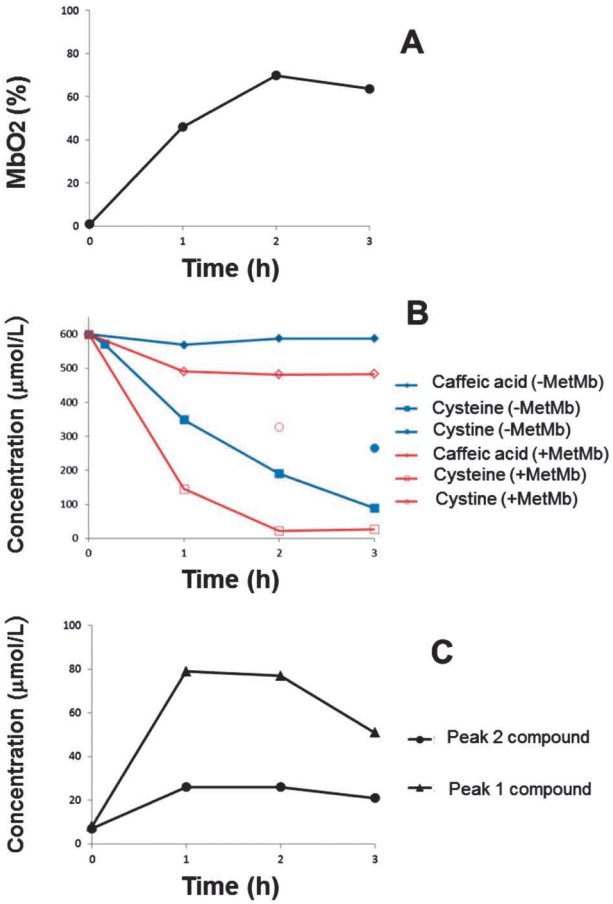

図4　システイン共存下でのカフェ酸のメトミオグロビン還元反応の経時的分析

A;オキシミオグロビン生成率。B；カフェ酸とシステインの残存量、およびシスチン生成量（シスチンは2または3時間後のみ測定）。C; 反応生成物量（図3のピーク1、ピーク2について）A～Cのデータとも測定2回の平均値。

した。この分子式から2つの生成物がカフェ酸とシステインの等モルカップリング生成物であることを示唆された。

図4には、MetMb還元によるMbO_2生成反応におけるカフェ酸、システイン、および2つの生成物とシステインから生成する可能性のあるシスチンの濃度を経時的に測定した結果を示した。図のAに示すように、MetMbは2時間で還元されてMbO_2を生成し、その後一時間ほぼ保持された。一方、図のBに示した様に、カフェ酸は、MetMb非存在下の実験と比べて、2時間の間に明らかに減少することが判明した。しかし、その減少量は100 μmol/L程度にとどまった。一方、システインに関しては反応時間に伴い減少することがわかり、その減少速度はMetMb非存在下の条件よりも遥かに速く、2時間でほぼなくなることがわかった。システインの減少に伴う生成物は酸化物のシスチンと予想されたことから、システイン消滅時のシスチンの定量を行い、主な生成物をシスチンと確認した。反応開始後1時間で合わせて100 μmol/L程度のカフェ酸システイン付加物が生成し、その後1時間維持された後減少を示した（図4C）。以上の経時的分析結果から、カフェ酸はMetMbを効果的に還元しMbO_2とすることができ、その際発生するカフェ酸キノンがMbO_2を不安定化する前にシステインと反応することでカフェ酸システイン付加物に変化し、その物質が存在する限りMbO_2の酸化的褐変化（メト化）を起こさず、鮮赤色が維持されることがわかった。なお、本研究成果を含む一連の研究については、一部公表、報告した[4)]。

要　約

ポリフェノールは抗酸化性を示すことが知られているが、食肉色素のミオグロビンに対しては酸化を促進し、メト化し褐色化させることが報告されている。

本研究により、システインをポリフェノールと共存させると、ミオグロビンの酸化的褐色化が防止できることがわかった。反応生成物からこれらの機構を検討したところ、ポリフェノール単独では、抗酸化性を示す際に生成するキノン体がミオグロビンの酸化的褐色化を促進するが、求核性の高いチオール基を有するシステインの存在下では、システインがポリフェノールと反応するため、キノン体による食肉色素のメト化が回避されると考えられた。

すなわち、食品成分であるポリフェノールとシステインの協働により褐色の食肉の色が還元されて鮮赤色とすることができ、またその色が維持されることを明らかにした。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より助成金を賜りました。ここに記して、関係各位に厚く御礼申し上げます。

文　献

1） A. R. Mancini, C. M. Hunt: *Meat Sci.*, **71**, 100–121, 2005.
2） T. Masuda, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 1097–1104, 2013.
3） M. Inai, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 893–901, 2014.
4） 本田沙理ほか：*New Food Industry*, **57**, 29–34, 2015.