メラノイジンの食品栄養学的研究[†]

五 明 紀 春, 三 浦 理 代

女子栄養大学

Melanoidin in Foods: Chemical and Physiological Aspects

Toshiharu GOMYO, Masayo MIURA

Kagawa Nutrition College, Sakado 350-02

アミノ・カルボニル反応(Maillard 反応)は食品褐変をもたらす種々の反応のうちもっとも重要なものである。本反応は、最終的にメラニン様の褐色重合分子 Melanoidin (以下 Mel と略す) を生成・蓄積する。Maillard¹⁾ の D-glucose, lysine の系による研究に端を発し、基礎、応用の両面からアミノ・カルボニル反応に関する研究はおびただしい数に上る。Hodge²⁾, Reynolds³⁾, 加藤⁴⁾, Baltes⁵⁾ らによる総説がある。

実際の食品において、アミノ化合物としてアミノ酸、ペプチド、タンパク質が基質として重要であり、また、カルボニル化合物としては還元糖がおもなものである。食品によっては油脂の酸化生成物であるカルボニル類が問題となるであろう⁶⁾。

アミノ・カルボニル反応(アルドース/アミノ酸系)の進行はほぼつぎのようにまとめられる。

初期段階: Schiff 塩基, ついで aldosyl-amine (窒素配糖体) を経て Amadori 転位生成物 (1-amino-1-deoxy-2-ketose) となる。

中期段階: Amadori 転位生成物の分解による α -dicarbonyl 類 (reductones) の生成, Strecker 分解によるアミノ酸の分解, 各種複素環化合物の生成などがこの段階に相当する。食品の加熱香気(調理香)はこの段階で発生する。

終期段階: 中期段階までの種々の生成物が重合反応を起こし Mel を生成する。

ここでは、アミノ・カルボニル反応の最終段階で生成する Mel について、食品科学的、栄養学的立場からその生成機序、理化学的特性、生物作用について検討した結果を述べる。

1. Melanoidin の生成機序について

アミノ・カルボニル反応の着色機構すなわち Mel の生成段階については、依然として不明な点が多い。この点を明らかにする研究方法として、(1) Mel 自体の構造解析, (2) 重合開始種ならびに初期オリゴマーの検索, (3) 速度論的あるいは動力学的解析があげられよう。

Song ら⁷⁾は D-glucose/glycine 系の着色過程の動力学的研究に基づき、anionic な重合反応であるとし、主たる活性モノマーとして α , β -不飽和アルデヒドとアミノ酸の反応によるアルドイミン類を予想している。また、Suyama ら⁸⁾は crotonaldehyde/glycine 系でモノマーとして N-crotonylidene glycine と crotonaldehyde の縮合物をあげている。他方、DHA/ α -アミノ酸の系を用いた Kurata ら⁹⁾の赤色色素の構造解析、Hayashi ら¹⁰⁾の遊離基化合物の同定は、この系における重合初期オリゴマーの検索として位置づけることもできよう。

著者らは D-glucose/glycine 系, D-xylose/glycine 系について、その Mel 生成反応の速度論的解析を試み、二、三の知見を得た。また、D-xylose/glycine 系について、重合初期オリゴマーと目される青色色素を得たので、以下これらの点について述べることにする。

1) Melanoidine 生成反応の速度論的解析¹²⁾¹³⁾, aldose/glycine (1:1, mol/mol), NaHCO₃ 0.1 M のモデル系を用いた。この系においては反応初期に一定の誘導期を経て着色が始まるが Mel 収量で追跡するとこのような誘導期が認められなかった(図 1)。なお Mel 収量は、反応溶液中に Al(OH)₃ ゲルを形成させ、ゲルに吸着した物質の KMnO₄ 消費量をもって測定した。本法によれば、分子量 500~1,000 の画分のほぼ 90%, 1,000 以上の画分のほぼ 100% を回収できる。上に凸の収量曲線は、一般に反応初期に重合開始種の生成が大部分完了している迅速開始系の重合反応であることを示している¹⁴⁾¹⁵⁾。

平均 MW の対数は、反応時間とともにほぼ直線的に

[†] 本総説は、昭和 57 年度本学会奨励賞の受賞の対象となったものである。

図 1. Melanoidin 生成量の経時変化

図 2. Melanoidin の平均分子量の経時変化

増大した (図 2)。その勾配は温度に著しく依存しているが各直線のゼロ時間外挿値は1点に集中した。この値は、ほぼ 250 で Mel のモノマーの MW と見なすことができ、D-glucose と glycine の MW の和に匹敵する。なお、D-xylose の系についてもまったく同様の結果を得た。このように経時的に分子量が増大する重合反応は逐次重合系に属する¹⁴⁾¹⁵⁾。またその指数関数的増加は、ポリマー同士の結合が分子量増大に寄与していることを示している。

以上から、ポリマー鎖数 (Mel 分子数) は図 3 のように、一定時間後に極大に達し、再び減少することがわかった。すなわち、Mel 生成反応は活性種濃度の増減する非定常重合系に属する¹⁴⁾¹⁵⁾。一方ポリマー鎖数の極大値は、始発原料濃度に比例し、さらに極大値到達の所要時間は原料濃度にはば反比例した。

他方、Mel の生成速度に対する aldose, glycine の反応次数は無酸素条件下でいずれも一次であったことから、aldose/glycine 1:1 結合体の生成が律速段階であろうと推定された。これに対して、酸素の存在下では、

図 3. ポリマー鎖数 (Melanoidin 分子数) の経時変化

glycine に関して $1/2$ 次となり、glycine 1 分子が、実質的に 2 分子として重合に寄与していることが示唆された。

Mel 生成の活性化エネルギーは D-glucose/glycine 系で 11 kcal/mol、D-xylose/glycine 系では、高温領域において D-glucose の場合と同じであったが、低温領域においては 7.9 kcal/mol で Arrhenius plots は屈折した。D-xylose では、低温優先の反応と高温優先の反応が競争的に反応する機構であり、この点で D-glucose による重合とは異なっているようである。

2) D-xylose/glycine 系の褐変初期段階における青色色素の生成¹⁶⁾。D-xylose/glycine 系において、褐色化が始まる前段階において顕著な青変を引き起こす条件を見いだした。

すなわち、glycine に対して D-xylose を大過剰にし、微アルカリ性、窒素置換を行ない、室温以下で反応させると鮮明な青色色素を生成した。

青変時には反応液の吸収スペクトルは 627 nm に極大を示し、反応の進行とともに、 A_{627} が増大する一方、580 nm のショルダーが増大した。この間、反応液の色調は、淡黄色から青色を経て、濃青色に変わり、さらに暗青紫色から最終的に黒褐色になった (図 4)。

種々のアミノ酸と糖の混合水溶液を加熱すると、褐変に至る前段階で、反応溶液が特異な色調を経過することはしばしば観察されるところである。褐変初期におけるこれらの特異的な色調を有する生成物は重合反応の機構を解明するうえで有力な手がかりを与えるはずである。

D-xylose/glycine (1:1, mol/mol) で A_{627} の増加速度は極大となった。D-xylose の割合を増すと青変速度は低下するが、より鮮明な青色を呈した。逆に、glycine

図 4. D-xylose/glycine 系の可視部吸収スペクトルの経時変化

の割合を増大すると青変せずに速やかに褐変した。さらに青色反応溶液に glycine を添加していくと、やはり速やかに褐変し、青色物質は glycine により不安定化されるようであった。

また、青変最適 pH は 7.5 付近であり、pH 6 以下では緩慢に黄変後、褐変した。pH 9 以上では青変を経ずに速やかに褐変した。反応温度が高くなるにつれ、青変開始は早くなるが、青色持続時間は短縮し、褐変した。なお、反応液を経時的に採り、DE81 によって青色スポットを分離・抽出して定量した結果、反応時間とともに青色物質は蓄積するが、その後、減少することが判明した。青色物質は本反応系における褐色過程の中間体であることが推定された。

酸素の存在下では、鮮明な青変を経ず、緑変後、褐変した。暗所のほうが青変開始は早かった。

陰イオン種 (Na 塩) の影響も重要である。NaHCO₃ が鮮明な青変をもたらすのに反し、NaH₂PO₄、CH₃COONa、NaCl では青変せずに褐変した。さらに、親水性有機溶媒を加えると純水に比べ、青変開始が著しく早まり、青色も強くなった。アルコールについては、イソプロパノール>エタノール>メタノールの順で、極性の低いものほど青変を促進した。

青変した反応液について、DEAE-Sephadex で分画したところ、青色画分以外に黄色・赤色画分が得られた (図 5)。青色画分をさらに分画したところ、Blue 1, 2, 3 の三つの青色物質を得た。Bio-gel P2 の溶出パターンに基づき分子量を推定した結果、Blue 1 ca. 800, Blue 2 ca. 1,200, Blue 3 ca. 1,600 となり、また、黄色物質は ca. 400, 赤色物質は ca. 1,300 となった。

Blue 1, 2, 3 の吸収スペクトル、蛍光スペクトルは相互に類似し、構造上の近似性を予想させた。また、クロ

図 5. D-xylose/glycine 系青変溶液のクロマトグラム

DEAE-Sephadex A-25 (2×20cm), Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) により展開
---- NaCl 濃度

図 6. 青色色素と黄色色素の相関 (仮説スキーム)
() は推定分子量

マトグラフィー、吸収スペクトルから赤色物質は Blue 1 の酸化生成物に相当した。

黄色物質については、D-xylose/glycine 系の活性モノマー種と推定した (図 6)。その根拠として、(1) 青変直前に黄色物質が出現する、(2) 黄色物質単独で放置すると Blue 1 が出現し、その際、わずかに Blue 2, 3 も生成する、(3) Blue 1, 2, 3 は単独では比較的安定である、(4) 反応初期黄変段階で Blue 1 を添加すると無添加の場合に比べて Blue 2, 3 の生成が促進される、(5) 分子量推定値から、Blue 1, 2, 3 はそれぞれ黄色物質の約 2, 3, 4 倍に相当する、などがあげられる。なお、黄色物質はその分子量推定値から見て、D-xylose, glycine の骨格を 1:1 に含むものの二量体化したものであろうと考えているが、今後の検討を要する。

青色画分と黄色画分を混ぜると速やかに褐変すること、青変最適 pH と褐変のそれとが一致することなどから、現在、著者らは、青色物質は Mel 形成の主要経路に位置するオリゴマーと考えている。

2. Melanoidin の機能特性について

Mel に類似した一般吸収を有する褐色高分子化合物には種々のものがある。リグニン、タンニン色素、メラニン、リポフスチン、コールタール、腐植酸、酸化重合油、カラメルなどである。これらは、一般に poikilopolymer¹⁷⁾ とよばれ、分子量多分散であり、一義的にその構造を特定することができない。一見無秩序な有機化合物の集積体の観を呈する。これらの化合物が自然界の物質循環において、どのような意義を有するのか興味あるところである。

Mel は褐色の不定形粉末として得られるが、重合が進むにつれ樹脂状を呈し、不溶化する。重合度の低い水溶性 Mel をとくに premelanoidin として区別することもある。Mel の化学構造については、現在なお明確ではない。

以下、食品科学的見地から興味ある Mel 分子の機能について述べたい。

1) 光増感作用¹⁸⁾。一般に着色食品は、その色素による光増感作用のため劣化する可能性がある。そのためとくに遮光保存を要する食品は少なくない。

Mel によって着色した食品においてこのような劣化が起こりうるかどうか、アミノ酸を基質としてモデル実験を試みた。

表 1 にその成績を示す。Mel は D-glucose 2 M, glycine 2 M, NaHCO₃ 0.2 M 混合水溶液を 95°C, 15 時間加熱して調製した。E₄₇₀=1.0 となるように褐変溶液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解、これにアミノ酸を 0.01 M となるように溶解し、バイレックス試験管に注入し (内径 18 mm, 液高 8 cm), 25°C で通気しながら W ランプ (200 W, 反応液中心部とフィラメントの距離 15 cm) で照射した。照射 8 時間で、Trp, His, Cys, Met は約 50% 分解した。他のアミノ酸はこの実験条件下では安定であった。

表 1. 各種アミノ酸の Melanoidin による光増感分解

アミノ酸	残存率 (%)	アミノ酸	残存率 (%)	アミノ酸	残存率 (%)
Trp	55.4	Ser	106.5	Val	119.6
Lys	104.5	Glu	109.1	Met	43.9
His	54.7	Pro	—	Ile	112.9
NH ₃	125.3	CySH	—	Leu	110.3
Arg	111.2	Gly	114.5	Tyr	118.1
Asp	104.9	Ala	113.0	Phe	106.4
Thr	108.7	Cys	54.9		

通気下, 25°C, pH 7.0, W ランプにより光照射

さらに, His を基質として, 反応条件を詳しく検討した結果, 以下のことが明らかになった。

(1) Mel を Sephadex G-25 で分画し, 各画分を比較したところ, 蛍光強度のもっとも強い分子量 1,000 前後の画分の光増感力が最大であった。

(2) 相対量子収率は Mel が低濃度においては, 濃度によらずほぼ一定であったが, 一定濃度を超えると顕著な濃度消光を示した。

(3) 活性化エネルギーは約 1.3 kcal/mol で 4~40°C の範囲では, 反応速度の温度依存性はきわめて小さかった。

(4) His に関して一次反応で進行し, 速度定数 (25°C, pH 7.0) $3.6 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ であった。また頻度因子は 10^{-4} sec^{-1} できわめて小さく, Mel 分子の特異的作用点と His 分子との直接相互作用の結果, 反応の起こることが推定された。

(5) Mel 自体も光分解し, TLC で多数の蛍光性スポットが出現した。

なお, 無酸素条件下で, His の存在下, 光照射すると Mel の退色が起こった。現在著者らは, アルドイミン型の共役系が光励起し, 一種のピラジカルを生成し, His から H を引き抜きセミキノン型さらにはロイコ型に変換することにより退色するという仮説を立てている。また, このようにして生じた Mel 中の不対電子は, 空間的因子によって, 相対的に安定に保持されるのではないかと考えている。

2) 金属イオンとの相互作用¹⁹⁾。図 7 に濾紙電気泳動による Mel の移動速度と pH の関係を示してある。また図 8 は各種 Mel の溶解度の pH 依存性を示したものである。Mel は (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, NaCl などを加えていくと顕著に塩析され, また, 親水性有機溶媒の添加によって沈でんした。

以上, Mel の水溶液中での挙動から両性多価電解質としての性質を有することが予想された。一般にこのような性質をもつ高分子化合物は, 当然, 各種の金属イオンと結合する。Fe³⁺, Al³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ について Mel との相互作用を検討した。Mel は 2. 1) と同様に調製した。

これらの金属イオンの存在下で Mel は著しい凝固沈

図 7. Melanoidin の濾紙電気泳動に及ぼす pH の影響

図 8. Melanoidin の沈でん形成に及ぼす pH の影響

— Glycine, — L-valine, ---- L-glutamic acid, -.- L-arginine.

△ 24 hr, ○ 36 hr, ● 90 hr.

図 9. 各種金属による Melanoidin の凝固沈でん

● AlCl_3 , ○ FeCl_3 , ▲ CuSO_4 , △ ZnSO_4 , ■ CoCl_2 , □ MnCl_2 .

でんを起こした (図 9)。pH 3.8 において、沈でん形成に要する各金属イオンの臨界濃度を比較すると、 Fe^{3+} , Al^{3+} で約 10^{-4} M, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} で約 10^{-3} M であった。このような Mel の金属イオンに対する挙動は、負荷電親水性コロイドに通有のものである。また、凝固沈でんさせた後、EDTA を添加していくと、再溶解した。

Fe^{3+} , Cu^{2+} について、Mel の滴定曲線に及ぼす影響

図 10. Melanoidin の滴定曲線に及ぼす Fe^{3+} の影響

---- Mel, ● Fe^{3+} (10 μmoles), ○ Fe^{3+} (30 μmoles), ▲ Mel+ Fe^{3+} (10 μmoles), △ Mel+ Fe^{3+} (10 μmoles).

図 11. Melanoidin の滴定曲線に及ぼす Cu^{2+} の影響

---- Mel, ● Cu^{2+} (10 μmoles), ○ Cu^{2+} (30 μmoles), ▲ Mel+ Cu^{2+} (10 μmoles), △ Mel+ Cu^{2+} (30 μmoles).

を調べた (図 10, 11)。これから Fe^{3+} , Cu^{2+} は明らかに Mel と complex を形成していることがわかる。また、UV 差スペクトルからも complex 形成が確認された。さらに、これら両イオンについて、透析平衡法により Mel (平均分子量 10^5) との結合を定量的に解析したところ、表 2 の成績を得た。

表 2. Melanoidin と金属イオンとの結合

Melanoidin	25 mg	125 mg
Fe ³⁺	5.04×10^{-5} M	3.22×10^{-5} M
Cu ²⁺	6.49×10^{-5} M	2.38×10^{-5} M

一定量の Mel を 10^{-4} M FeCl₃ (0.1 M KCl) 50 ml に溶解し, 同じ FeCl₃ 溶液 200 ml に対して透析した後, 外液中の Fe³⁺, Cu²⁺ 濃度を測定した。

滴定曲線から, pH 2.5 から pH 11.0 までに Mel 10^5 g あたり H⁺ 約 500 g イオン解離した。元素組成から見て, この数はだいたい N 原子の数に匹敵した。酸性解離基のほとんどは, glycine の α -COOH に由来するものと考えた。なお, 酸性レダクトン含量は少なく, 滴定曲線に及ぼす寄与はごくわずかであると推定された。

Fe³⁺, Cu²⁺ と EDTA の間の安定定数 (log K) はそれぞれ, pH 3.8 において 15, 10 であった。Mel は EDTA に比べ, 両イオンときわめて強く結合していることになる。しかし, 一方, 結合数 (n) は Mel の解離基の数に比べかなり小さかった。これは金属イオンとの結合により, Mel 分子の空間構造が著しく変化し, 残余の解離基が空間的に遮蔽されたためと推定された。

このような金属イオンとの相互作用は Mel による金属イオンの強力な捕集効果を示しており, 食用油に対する Mel の抗酸化作用²⁰⁾の根拠たりうるものである。他方, 食物中の微量の金属の消化管内における吸収過程に対しても, Mel の影響は無視できないのではないかと推察された。

3) タンパク質との相互作用²¹⁾. 多価電解質高分子である Mel は適当な条件下では当然タンパク質と相互作用するはずである。このことは, 一般に食品のテクスチュアに一定の影響を与えると予想された。

大豆のようなタンパク含量の高い材料をしょうゆとともに加熱すると, テクスチュアの硬化が起こることはよく知られている²²⁾。著者らはこの現象はしょうゆ中の Mel とタンパク質の親水性コロイド同士の相互作用に起因するものと予想した。実際, 古くなって黒褐変したしょうゆは新しいものに比べ, 大豆のテクスチュアの硬化ははなはだしかった。

以下, D-glucose/glycine 系で調製した Mel を用い, Mel とタンパク質分子との相互作用についていくつかの知見を得た。

Mel とタンパク質の等電点にはさまれる pH 領域において, 顕著な沈でん形成が認められた (図 12)。また溶媒のイオン強度が増すにつれて, 沈でんは起こりにくくなった。

沈でん形成に極大を与える Mel/タンパク質の比率が

図 12. Melanoidin とタンパク質分子との相互作用に及ぼす pH の影響

● オブアルブミン, ○ リゾチーム, ▲ 血清アルブミン, ▲ ペプシン, ---- Mel の等電点

図 13. 溶液中のオブアルブミン濃度と沈でん物中のタンパク質/Mel モル比の関係

Mel: MW $10^4 \sim 5 \times 10^4$ 画分, pH 3.8, 室温

存在した。大過剰の Mel により沈でん物は可溶化した。また, Mel の MW が大きくなるにつれて沈でん形成に要する Mel の対タンパク質モル比は減少した。

Mel の対タンパク質モル比の増加に伴い, 沈でん物中のタンパク質/Mel のモル比は一定比率に収斂した (図 13)。また沈でん形成速度の Arrhenius plots から, 2 段階で沈でん形成が進行することが証明された。

Mel によるタンパク質の沈でん形成を図 14 のように模式化した。まず, 第 1 段階で Mel とタンパク質分子との静電的結合 ($E_a: 7$ kcal/mol) が起こり, これを一種のサブユニットとして, 第 2 段階では疎水的な結合 ($E_a: 0.6$ kcal/mol) により沈でんを形成すると考えられた。

これら一連の実験を通じて Mel は空間的に展開した分子形をもつものようであった。Motai²³⁾ は粘度特性の測定によって Mel 分子は symmetrically flexible な

Subunit	Molecular weight	Net charge	Aggregation
left	low	high	weak
right	high	low	strong

図 14. Melanoidin とタンパク質分子の相互作用
M: Mel, P: タンパク質, MmPn: サブユニット

図 15. Melanoidin とタンパク質分子間のサブユニットの形成

Left: Mel 過剰, Right: タンパク質過剰, M: Mel, P: タンパク質

鎖状高分子としている。これにに対して、一般にタンパク質分子は compact な分子形のものが多い。Mel とタンパク質の分子形の差異が図15で示されるように両者の相互作用を特徴づけている。

食品のテクスチュアに及ぼす効果のみならず、酵素分子と Mel の共存する系（たとえば消化管内）においても、このような相互作用は重要な意義をもつものと考えられる²⁴⁾。

3. Melanoidin の生物作用

一般に、食品成分間反応は、食品素材を「食物」に導く過程において不可避である。加工・調理操作は本質的にこれらの成分間反応の制御にかかわる技術であるといつて過言ではない。

成分間反応によって、食物の嗜好性はおおいに左右されるだけでなく、食物の安全性、栄養、生理面に及ぼす影響も見逃すことはできない。このような見地に立つて、著者らは、代表的な成分間反応であるアミノ・カルボニル反応の生物作用面での帰結を調べる目的で、まずその最終産物である Mel を用いた動物実験を行なった。

1) ラット腸内菌そうに及ぼす影響²⁵⁾。アミノ・カルボニル反応生成物の抗菌作用に関しいくつかの報告がある。Lankford ら²⁶⁾は高温滅菌培地では乳酸菌が生育しにくいことを観察し、滅菌時のアミノ・カルボニル反応

生成物の抗菌作用によるとした。Hanaoka²⁷⁾ はしょうゆ中の褐色色素による *Saccharomyces rouxii* var. *halomembrausis* の生育阻害を認め、また、桑原ら²⁸⁾は糖・アミノ酸褐変溶液がカビ、酵母、細菌などに幅広い抗菌スペクトルを有することを報告している。

他方、アミノ・カルボニル反応生成物が *Asp. awamori* var. *femeus*, *B. subtilis* に対し増菌作用を有するという報告もある²⁹⁾。しかし、いまのところ、増菌あるいは抗菌作用をもつ物質は分離・同定されていない。

かつて、著者らは Mel を唯一の炭素源として資化する土壌微生物を検索した経験をもつ。いくつかの土壌試料については Mel を退色させ、資化と思われる微生物の存在を認めたが、その菌株を純粋培養することはできなかった。

初体重 80 g のラットに対して 10% カゼイン飼料を制限食で与え、毎日、給餌直前に D-glucose/glycine 系により調製した Mel の 20% 生食溶液を 1 ml ずつ胃内強制投与し、70日間飼育後、消化管内容物の腸内菌そうを検索した。

消化管各部位別に、Enterococci, Staphylococci, Coliforms, Clostridia, Lactobacilli (好気性), Lactobacilli (嫌気性) の 6 種の菌群について、それらの生菌数を調べた結果は表 3 に示す。Lactobacilli (好気性, 嫌気性) についてのみ、Mel 投与によって生育が有意に促進された。ただし、盲腸、結・直腸においては好気性 Lactobacilli に対する増菌効果は認められなかった。

また、回腸部において、Mel 投与群では乳酸含量が高く、内容物の pH は対照群 8.1 ± 0.4 に対し、試験群 7.0 ± 0.5 と有意に低値となり、乳酸菌の増菌を支持する結果を得た。また腸内容物から釣菌した乳酸菌株 4 種について、*in vitro* で生育に及ぼす Mel の作用を調べたところ、増菌または抗菌作用を示し、結果は一定しなかった (表 4)。

Mel による Lactobacilli に対する *in vitro* における増菌作用の機構については今後さらに検討を要するところである。一方、Mel 溶液を強制投与した後、経時的に開腹し消化管内の Mel の物理的状態を調べたところ、消化管内 pH に照応して胃内で速やかに硬いゲルを形成し、十二指腸内でやや軟化し、回腸下部に至って流動化した。この際、回腸内溶液の pH は対照に比較して低く、Mel は乳酸菌群の生育に対して、より好適な環境を提供しているものと推定された。他方、Mel は消化管内を移送される間に、小腸粘膜に不可逆的に吸着した。2. 3) で述べたようなタンパク質と Mel との相互作用が、腸粘膜においても起こっているのではないかと考えられた。このような Mel の吸着は、乳酸菌群が棲息する腸粘膜の生理的状態を変化させ、乳酸菌群の生育に何らか

表 3. 腸管内容物中の各種菌群の生菌数に及ぼす Melanoidin の影響

Bacterial group	Ileum		Caecum		Colon-Rectum	
	Control	Test	Control	Test	Control	Test
Enterococci	4.9±1.3	5.2±1.0	6.7±0.5	6.6±0.5	7.0±0.4	6.6±0.4
Staphylococci	5.2±1.9	5.2±1.0	6.3±0.4	6.1±1.8	5.3±1.4	6.5±0.6
Califorms	4.8±1.6	5.6±0.6	6.7±0.9	6.5±1.1	6.2±0.7	6.1±1.0
Clostridia	6.7±0.9	7.4±0.4	7.4±0.6	8.0±0.3	7.2±0.9	7.6±0.9
Lactobacilli (aerobic)	5.8±0.4	7.0±0.6 ^{a)}	7.6±1.0	6.8±1.7	6.4±0.9	6.6±1.1
Lactobacilli (anaerobic)	4.5±0.4	5.8±1.0 ^{a)}	4.8±0.7	5.7±0.5 ^{a)}	4.5±0.7	5.7±0.4 ^{b)}

The values are Means±SD of logarithmic counts of viable cells per gram of the intestinal contents, N=8.

^{a)} Significantly different from control at $p=0.05$.

^{b)} Significantly different from control at $p=0.025$.

^{c)} Significantly different from control at $p=0.01$.

表 4. ラット腸内菌そうより分離した数種の乳酸菌株の生育に及ぼす Melanoidin の影響

Strains	Browning products added								
	The whole mix			Low molecular weight fraction (<500)			High molecular weight fraction (>500)		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
No. 1 aerobic	1.7	4.3	1.6	0.8	1.3	3.5	0.6	1.6	1.5
No. 2 aerobic	21.3	13.8	—	2.3	3.9	—	5.6	6.3	—
No. 3 anaerobic	0.1	0.6	0.5	0.2	0.5	0.3	0.1	0.3	0.4
No. 4 anaerobic	0.7	0.8	0.4	0.9	0.1	0.3	0.1	0.2	0.6
<i>L. lactis</i> L-3	1.8	1.7	1.6	2.1	1.7	1.5	3.2	2.6	2.2

The values are the ratios of the growth-rates to those without any browning product. a, b and c indicate the concentrations of browning products in culture media; a=0.5%, b=0.25%, c=0.125%.

の影響を及ぼしている可能性がある。

さらに Mel の乳酸菌群に対する増菌効果が動物の生理状態にどのような結果をもたらすのかは今後の検討課題であろう。

今回は腸内菌そうのうち、一部の菌群について調べただけであった。盲腸、結腸の内容物は対照と比べ著しく異なっていた。この部位に主として棲息する嫌気性菌群に対する Mel の影響について調べることは重要である。

2) 降コレステロール作用³⁰⁾³¹⁾。高コレステロール食飼育ラットの血液・肝臓中コレステロールレベルに対する水溶性難消化多糖類の抑制作用については、すでによく知られている²⁹⁾³⁰⁾。これらの多糖は、酸性領域においてゲルを形成する点で共通の物性をもつ。Mel は前述のように、胃の酸によって顕著なゲルを形成し、難消化性多糖と共通の生理作用を有することが期待された。

著者らは、高コレステロール食飼育ラットの飼料に Mel を添加したところ、血液・肝臓中のコレステロール

レベルの上昇を有意に抑制することを見いだした(表 5, 6)。

D-glucose/glycine 系で得た褐変溶液の酸沈で中性画分(高分子 Mel)を飼料に添加した。なお、この画分の Mel を限外濾過法で検定したところ、分子量 5,000 以上に相当することが認められた。

Fujimaki ら³²⁾によれば、D-glucose/glycine 系の褐変反応溶液の透析内液画分をラットに投与したところ、Mel の約 20% は体内に吸収したという。しかし、この場合、腸内菌そうによる Mel の分解が起こっていると推定している。体内に吸収されたこれらの分解産物が降コレステロール作用に寄与する可能性は否定しえないが、著者らは、現在、消化管内におけるコレステロール、胆汁酸の吸収過程で Mel が特異的な作用を及ぼしているものと考えている。

Mel 添加群では、糞中コレステロールの見掛けの回収率は、対照群と同じかやや低かった。中性ステロイド全

表 5. 高コレステロール食飼育ラットの血中コレステロール値に及ぼす Melanoidin の飼料添加の影響

	mg/dl of whole blood
Basal	47
Control	118
Test 1	94*
Test 2	79**

* and ** are significantly different from the control diet at $p=0.05$ and $p=0.01$, respectively.

Test 1 : Mel 2%, Test 2 : Mel 4%.

表 6. 高コレステロール食飼育ラットの肝臓中コレステロール値に及ぼす Melanoidin の飼料添加の影響

	mg/whole liver	mg/g of liver	mg/g of liver lipid
Basal	140	18.7	461
Control	243	30.0	603
Test 1	241	29.7	633
Test 2	127*	16.0*	348*

* is significantly different from the control diet at $p=0.05$.

Test 1 : Mel 2%, Test 2 : Mel 4%.

体の回収率についても同様の傾向を示した。また Mel によってコレステロールの腸内代謝産物であるコプロスタノールの生成が顕著に抑えられた点は注目される。コレステロールからコプロスタノールへの変換活性が低下したことは、腸内菌叢の何らかの変動を反映しているよう。

さらに、糞中への胆汁酸の排出量については、一次胆汁酸、二次胆汁酸のいずれでも、Mel 添加群と対照群の間では有意の差は認められなかった。

盲腸内容物について調べた結果も同様であった。これらの結果から、Mel による降コレステロール作用は、中性・酸性ステロイドの体外排出の促進によるものではないと結論された。

なお、Mel 添加群では、食物繊維を投与した場合と同様に盲腸の著しい肥大が観察され、盲腸内容物の水分量も対照群に比べ高かった。さらに糞重量も著しく増し、また、その水分量も対照群と比べて高かった。摂食量、成長速度、臓器所見については、Mel の影響は認められなかった。

Maillard 反応の世界に目を開かせていただき、終始ご指導をいただいた東京大学加藤博通教授、示唆に富む貴重な助言をいただいたお茶の水女子大学本間清一助教授、研究途上お励ましをいただいたお茶の水女子大学藤巻正生学長、国立栄養研究所宮崎基嘉基礎栄養部長に厚くお礼申し上げます。また、生物作用の研究に关しご協力をいただいた女子栄養大学桑原祥浩助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Maillard, L.C. : *C.R. Acad. Sci.*, **154**, 66 (1912)
- 2) Hodge, J.E. : *J. Agric. Food Chem.*, **1**, 928 (1953)
- 3) Reynolds, T.M. : *Adv. Food Res.*, **12**, 1 (1963); **14**, 167 (1965)
- 4) 加藤博通 : 食糧保蔵学(藤巻正生編), 164, (1980), 朝倉書店(東京)
- 5) Baltes, W. : *Ernähr. Umsch.*, **20**, 35 (1973)
- 6) Allen, J. St. A. and Ory, R.-L. : *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 141 (1975)
- 7) Song, P.S. and Chichester, C.O. : *J. Food Sci.*, **31**, 914 (1966)
- 8) Suyama, K., Tachibana, A. and Adachi, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 9 (1979)
- 9) Kurata, T. and Fujimaki, M. : *J. Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1471 (1973)
- 10) Kurata, T. and Fujimaki, M. : *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 676 (1973)
- 11) Hayashi, T., Manou, F., Namiki, M. and Tsuji, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 711 (1981)
- 12) 堀越理代, 五明紀春 : 日本農芸化学会昭和 51 年度大会講演要旨集, 208 (1976)
- 13) 堀越理代, 五明紀春 : 日本農芸化学会昭和 52 年度大会講演要旨集, 189 (1977)
- 14) Kagiya, T., Izu, M. and Fukui, K. : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 1045 (1967)
- 15) 鍵谷 勤, 伊津政寿 : 工化, **70**, 1841 (1967)
- 16) 三浦理代, 五明紀春 : 農化, **56**, 417 (1982)
- 17) Piattell, M. : *Tetrahedron*, **15**, 66 (1961); **18**, 941 (1962); **19**, 2061 (1963)
- 18) 五明紀春, 相原純子, 堀越理代 : 日本農芸化学会昭和 50 年度大会講演要旨集, 100 (1975)
- 19) Gomyo, T. and Horikoshi, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 33 (1976)
- 20) Kato, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 287 (1968)
- 21) Horikoshi, M. and Gomyo, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1531 (1976)
- 22) 中谷圭子, 松元文子, 桜井芳人 : 家政学雑誌, **25**, 195, ~201 (1974)
- 23) Motai, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1 (1976)
- 24) Lee, C.M., Chichester, C.O. and Lee, T.C. : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 775 (1972)
- 25) Horikoshi, M., Ohmura, M., Gomyo, T., Kuwabara, Y. and Ueda, S. : *Progress in Food and Nutrition Science*, Vol. 5, 223 (1981), Pergamon Press (UK)
- 26) Lankford, C.E., Ravel, J.M. and Ramsey, H.H. : *Appl. Microbiol.*, **5**, 65 (1957)
- 27) Hanaoka, Y. : *J. Ferment. Tech.*, **46**, 909 (1968)
- 28) 桑原総子, 清水 潮, 矢嶋瑞夫 : 農化, **46**, 89 (1972)
- 29) Kitada, M., Ueyama, H. and Fukimbara, T. :

- J. Ferment. Tech.*, **44**, 509 (1966)
- 30) 大村美奈子, 五明紀春: 第 33 回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 123 (1979)
- 31) 三浦理代, 五明紀春: 第 35 回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 52 (1981); 第 36 回 同, 44 (1982); 第 37 回 同, 118 (1983)
- 32) Fujimaki, M., Homma, S., Arakawa, N. and Inagaki, C.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 497 (1979)

(昭和 58 年 5 月 19 日受理)