魚介類におけるグルタチオンの分布と呈味効果

上田 要一, 日比野 岳, 香村 正徳

黒田 素央, 渡辺 勝子, 坂口 誠

(1997 年 10 月 7 日 受付)

Contents of Glutathione in Seafoods and Its Flavor Characteristics

Yoichi Ueda,*¹ Gaku Hibino,*¹ Masanori Kohmura,*¹
Motonaka Kuroda,*¹ Katsuko Watanabe,*² and Makoto Sakaguchi*¹

Contents of glutathione (GSH) in several fresh seafoods were determined by the HPLC method. GSH was detected in adductor muscle of scallop at a concentration of 29 mg/100 g and over the taste threshold of GSH (10 mg/100 ml). GSH content in salmon (9.2 mg/100 g) was near the threshold value. Other seafoods contained GSH in lower quantities. Contents of GSH disulfide (GSSG) in some seafoods were higher than those of GSH. The flavor character strengthened by GSSG was compared with that of GSH in the umami solution, showing that GSSG did not contribute to the flavors of foods so much as GSH.

The effects of adding GSH on the flavor of GSH-free synthetic scallop extract at a concentration of 29 mg/100 ml were examined by sensory evaluation. GSH increased the intensities of sweetness, umami, and some flavor characteristics, such as thickness, mouthfulness, and continuity, suggesting that GSH contributes to the flavor of scallop.

キーワード: グルタチオン, 魚介類, ホタテガイ, 風味, こく味, 閾値

グルタチオン (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) は微生物から高等動物まで広く分布するトリペプチドで, 近年その多彩な生理作用に注目され, 多くの研究が行われるようになった。その結果, GSH が健康維持, 老化抑制, 発癌物質の解毒などの効果を有することが明らかになりつつある。¹⁻³⁾

我々が日常摂取する食品にも, 当然 GSH は存在すると考えられるが, これまでの食品中の GSH の分析例は, 野菜や畜肉について数報見られる程度で,⁴⁻⁶⁾ 魚介類における分析例は少ない。また, GSH の食品の香味に及ぼす影響についての研究は極めて少なく, Ho⁷⁻¹⁰⁾ が, GSH の高温下での揮発性分解物や, グルコース, イノシン酸, 2,4-decadienal との反応により生成する揮発性成分を調べているに過ぎない。

著者ら¹¹⁾は, GSH の味について調べた結果, GSH は純水 100 ml 中 200 mg (0.2%) の濃度で酸味を呈するが, この濃度でも中性下ではすべての基本味 (甘味, 塩

味, 酸味, 苦味, うま味) を呈さないこと, またグルタミン酸とイノシン酸からなるうま味溶液や, 牛肉合成エキスにおいて, “あつみ”, “ひろがり”, “持続性” といった風味質を強めることを見出し, これらの風味質を “こく味” と定義した。また, うま味物質と共存すると, GSH の閾値が低下する現象を認めた。

これまでの美味魚介類の呈味成分に関する研究では, エキス成分中アミノ酸, 有機酸, 無機成分など, それ自身味を持つ低分子成分に主眼が置かれてきた。しかし, 味を持たない成分でも, ホタテガイ閉殻筋に多量に含まれるグリコーゲン, ホタテガイ合成エキスの味に濃厚感や天然感を与え, 味全体をまとめる働きがあることが示されている。^{1,2)} GSH もほとんど無味であるが, 魚介類に多量に含まれる場合には, それらの味に関与していることが考えられる。

一方, GSH は酸化されてグルタチオンジスルフィド (GSSG) に変化することがよく知られている。著者ら¹¹⁾

*¹ 味の素(株)食品総合研究所 (Food Research & Development Laboratories of Ajinomoto Co., Inc., Suzukicho, Kawasaki, Kawasaki, Kanagawa 210-8681, Japan).

*² 東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan).

も、GSH が食品の加熱調理条件下で、一部 GSSG に変化することを明らかにした。しかしながら、GSSG の呈味特性については未検討であった。

本研究はこのような背景のもとに、魚介類における GSH および GSSG の分布を明らかにするとともに、魚介類の風味に対する GSH と GSSG の関与を明らかにすることを目的とした。

実験方法

試料 エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* の生殖線は 1997 年 5 月に北海道の食料品店で新鮮なものを購入した。他の試料は 1997 年 5~7 月に神奈川県内の食料品店において購入した。マイワシ *Sardinops melanostictus*、マアジ *Trachurus japonicus* は全魚体のままで購入し、背側筋肉部を採取した。ギンザケ *Oncorhynchus kisutch*、メバチ *Thunnus obesus*、クロマグロ *Thunnus thynnus*、カツオ *Katsuwonus pelamis*、ブリ *Seriola quinqueradiata*、マサバ *Scomber japonicus*、ヒラメ *Paralichthys olivaceus*、スルメイカ *Todarodes pacificus*、アカイカ *Ommastrephes batrachi* は刺身用に調理されたものを用いた。ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* は殻付を入手し閉殻筋のみを、ホッコクアカエビ *Pandalus borealis*、ブラックタイガー *Penaeus monodon* は腹部筋肉を、アサリ *Ruditapes philippinarum* は軟体部全体を用いた。それぞれの試料を細切、均一化し、一部を分析に供した。

エキスの調製法 試料 10 g に 0.02 M EDTA 溶液 50 ml を加え、氷冷下、30 秒間ホモジナイザー中で磨砕した (6000 rpm)。磨砕液を遠心分離 (10000 rpm, 10 分間) し、抽出液と残渣を得た。残渣に 40 ml の上記 EDTA 溶液を加えて攪拌後、同様に遠心分離し、上清を合後 100 ml に定容した。本抽出液 7.2 ml に除蛋白剤として 50% メタリン酸水溶液 0.8 ml を加えて攪拌した後、ミリポアフィルター (0.45 μ) で濾過した。濾液 2.5 ml に 1 M 水酸化カリウム溶液を 1.2 ml 加えて中和した。本中和液を適宜 0.02 M EDTA 溶液で希釈して GSH および GSSG の分析に供した。

酵素還元法 GSSG を GSH として定量するため、グルタチオンレダクターゼ (Sigma 社製, EC 1.6.4.2) を用いて還元した。即ち、抽出液 0.5 ml に 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を 2.3 ml 加えて混合した。混合液に 1 mM NADPH 溶液 0.2 ml とグルタチオンレダクターゼ (200 U/ml) 0.1 ml を加えて混合し、25°C で 5 分間反応させた。次いで 50% メタリン酸溶液 0.4 ml を加えて酵素反応を止めた。10 分間放置後、1 M 水酸化カリウム 1.73 ml を加えて中和し、ミリポアフィルターで濾過した。濾液を HPLC に付し、得られた

総 GSH 量から、還元前の GSH 量の差し引いたものを GSSG 量とした。

HPLC 分析法 GSH は高橋ら¹³⁾の方法に準じ、ポストカラム法で分析した。送液ポンプには Jasco 880-PU を、カラムとしては Inertsil ODS-2 カラム (4.6×150 mm, ジーエルサイエンス社製) を用いた。移動相には 0.2% ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有 0.05 M リン酸溶液 (水酸化ナトリウムで pH 2.1 に調整) : メタノール (100 : 2) を用い、流速 1.0 ml/min で展開した。蛍光発色試薬として *N*-(9-acridinyl)maleimide (NAM, 同仁化学研究所製) を用いた。カラムからの溶出液に 0.15 M 水酸化カリウム溶液と 0.002% NAM を含むアセトニトリル溶液を、順次各 0.3 ml/min の流量で混合されるよう装置を設定した。反応は 50°C で行った。検出には Jasco 821-FP 型蛍光検出器を用い、励起波長 365 nm, 検出波長 435 nm とした。

GSSG の閾値測定法 うま味溶液として 0.05% グルタミン酸ナトリウム (MSG), および 0.05% イノシン酸ナトリウム (IMP) の共存する溶液を用いた。純水およびうま味溶液における GSSG の閾値の測定は、前報¹¹⁾における GSH の場合と同一の方法で行った。

GSSG と GSH の呈味効果の比較 上記うま味溶液に GSSG を 0.05%, 0.10%, 0.20% の 3 水準で添加した。3 水準濃度 (C_0) の溶液それぞれに対して以下の式で計算される濃度 (C) となるように、GSH をうま味溶液に加え、比較対照溶液群とした。

$$C = C_0 \times 1.2^n (n = 0, -1, -2, -3, -4, -5, -6)$$

3 濃度水準の GSSG 溶液につき、それぞれの GSH 対照溶液群と比較評価し、“こく味”の強度が同じになる水準を判定することにより、等価 GSH 濃度を算出した。官能試験は GSH の“こく味”について十分訓練した 5 名のパネルによるプロファイル法¹⁴⁾で行った。

合成エキスへの添加試験 ホタテガイの合成エキスとしては、すでに明らかにされている呈味有効成分からなる溶液を用いた。^{12,15)} この合成エキスを基準に、同合成エキスを 29 mg/100 ml の GSH を加えた溶液を、パネルを用いて官能評価した。評価方法は山口と君塚¹⁶⁾の方法に準じた。事前に研究担当者 3 名により試飲をして評価項目の検討を行い、香り、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の 6 項目に、あつみ、ひろがり、持続性を加えた合成 9 項目を選定した。パネルリストとして味の素研究所所員 28 名を用いた。パネルには、それぞれの項目に対して非常に弱い (-2), 弱い (-1), 同じ (0), 強い (+1), 非常に強い (+2) の五段階で評価させ、平均値と 95% 信頼限界を算出した。

結 果

GSH および GSSG の含量 GSH および GSSG の分析結果を Table 1 に示した。なお, 今回は同一種内でのバラツキは測定しなかった。

GSH は調べたすべての魚類に検出されたが, いずれも 10 mg (組織 100 g 中, 以下同様) 以下で, 魚類により含量が異なった。最も多かったのはギンザケで 9.22 mg 検出され, 次いでマアジ 6.51 mg, クロマグロ 5.46 mg の順であった。メバチ, ハマチでは 1 mg に満たなかった。

魚類以外では, ホタテガイ閉殻筋に圧倒的に多く, 29 mg 検出された。エゾバフンウ二生殖線, ホッコクアカエビにも比較的多く検出されたが, イカ類とアサリには検出されなかった。二枚貝であるホタテガイとアサリ, あるいはエビ類のホッコクアカエビとブラックタイガーの間に, 魚類の場合と同様, 同類内での GSH 含量の差異が認められた。多くの試料では, GSSG 含量は GSH のそれと比較して低い値であったが, メバチとカツオには GSH を上回る含量で検出された。その他ではエゾバフンウ二生殖線に 3 mg, マイワシおよびギンザケに少量認められた以外は, GSSG は検出されなかった。

GSSG の閾値, および GSSG と GSH の呈味効果の比較 GSSG の純水中およびうま味溶液における閾値を GSH の値¹¹⁾とともに Table 2 に示した。GSSG の閾値は, 純水中では 0.04% (40 mg/100 ml), うま味溶液中では 0.01% (10 mg/100 ml) となり, GSH と同値であった。GSSG も GSH と同様に, うま味溶液における閾値は, 純水における場合の 1/4 に低下した。

Table 3 に GSSG を添加したうま味溶液の“こく味”の強さを GSH のそれと比較した結果を示した。3 水準での比較結果から, GSSG の発現する“こく味”は GSH に比べて弱く, 効果は約 1/3 であることが分かった。

合成エキスへの GSH 添加試験結果 ホタテガイ閉殻筋に 29 mg と多量の GSH が検出されたので, GSH がホタテガイの味にどのような影響を与えるかを, すでに明らかにされている呈味有効成分¹²⁾からなる合成エキスをを用いて検討した。

ホタテガイ合成エキス¹²⁾と, 同合成エキス 100 ml に, 分析値に従って GSH を 29 mg 添加した溶液の, パネルによる比較評価結果を Fig. 1 に示した。GSH を添加することにより, “香り”, “塩味”, “酸味”, “苦味”は強められなかったが, “甘味”, “うま味”, “あつみ”, “ひろがり”, “持続性”が強められた。特に“あつみ”,

Table 1. GSH and GSSG contents in seafood

Samples	(mg/100 g)	
	GSH	GSSG*1
Fishes		
Bigeye tuna <i>Thunnus obesus</i>	0.81	3.75
Bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	5.46	nd*2
Skipjack tuna <i>Katsuwonus pelamis</i>	2.48	4.13
Chub mackerel <i>Scomber japonicus</i>	0.29	nd
Horse mackerel <i>Trachurus japonicus</i>	2.48	nd
Sardine <i>Sardinops melanostictus</i>	6.51	1.06
Yellow tail <i>Seriola quinqueradiata</i>	0.17	nd
Coho salmon <i>Onchorhynchus kisutch</i>	9.22	0.38
flatfish <i>Paralichthys olivaceus</i>	2.57	nd
Other seafoods		
Northern green sea urchin <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	7.36	3.24
Black tiger prawn <i>Penaeus mondon</i>	0.19	nd
Northern shrimp <i>Pandalus borealis</i>	4.45	nd
Neon flying squid <i>Ommastrephes batrami</i>	nd	nd
Japanese flying squid <i>Todarodes pacificus</i>	nd	nd
Short-neck clam <i>Ruditapes philippinarum</i>	nd	nd
Scallop <i>Patinopecten yessoensis</i>	29.05	nd

*1 Concentrations of GSSG were determined by the differences between the total amount of GSH+GSSG and the amount of GSH. The total amount of GSH+GSSG were determined after reduction with GSH reductase.

*2 Not detected.

Table 2. Threshold values of GSH and GSSG

Solution	Threshold (% w/v)	
	GSH ¹⁾	GSSG
Water	0.04	0.04
Umami solution*	0.01	0.01

* 0.05% monosodium glutamate+0.05% disodium inosinate.

Table 3. Equi-kokumi concentration of GSH to GSSG in Umami solution*¹

(% w/v)	
Concentration of GSSG	Equi-kokumi* ² concentration of GSH
0.05	0.016
0.10	0.033
0.20	0.067

¹ GSSG and GSH were dissolved in 0.05% monosodium inosinate+0.05% disodium inosinate.² Equality on the intensity of kokumi flavor (thickness, mouthfulness, and continuity).

“持続性”の両風味質が顕著に強められた。

考 察

今回分析した魚肉中のGSH含量はすべて10 mg以下であった。中添ら³⁾は各種魚類のGSHを普通筋、血合筋、肝臓別に分析し、魚種によるバラツキが大きいこと、ならびに普通筋では12 mg以下のものが多いことを明らかにしている。本研究の結果もこの報告とはほぼ一致している。

分析に供した魚介中、メバチやカツオではGSSGがGSHを上回る量で検出された。一般に、GSHは生体では還元型で存在することが知られている。¹⁾ GSSGがGSHを上回る量で検出された原因としては、漁獲時や流通時の生理的変化や、酸化によるものと考えられる。

ホタテガイ閉殻筋には、GSHが他の魚介類に比較して著量に検出された。他の二枚貝の閉殻筋中のGSH含量は不明であるが、閉殻筋におけるGSHの生理的役割との関連で興味深い。

ホタテガイ閉殻筋にGSHがその閾値以上の濃度で検出されたので、ホタテガイ合成エキスをGSHを添加し、味の変化を調べたところ、GSHは本合成エキスを、“甘味”、“うま味”、“あつみ”、“ひろがり”、“持続性”を付与することが示された。このことから、GSHはホ

Fig. 1. Effects of GSH on the flavor of synthetic extract of scallop.

The flavor of GSH-added synthetic scallop extract was evaluated by a five-point rating scale (-2~+2, very weak~very strong), compared with that of GSH-free extract. n=28. Each bar diagram includes a line indicating the 95% confidence level.

タテガイの味を構成する成分の一つであるといつて差しつかえないと思われる。著者ら¹¹⁾はすでに、牛肉合成エキスについて同様に検討し、GSHが“ひろがり”“持続性”、“肉様の味”を強めることを明らかにしている。しかし、牛肉合成エキスの場合、GSHは“甘味”や“うま味”に影響を与えなかった。ホタテガイ合成エキスにおいてそれらの味が強められた理由は不明であるが、合成エキスの構成成分やそれらの濃度の差異によるものではないかと思われる。

GSSGはGSHと同様、うま味溶液に“こく味”を付与するが、効果はGSHと比較して弱い。したがって、魚介類など食品におけるGSSGの風味への寄与は小さいと考えられる。

著者ら¹¹⁾はすでに、畜肉やワイン中にもGSHが多く含まれるとの結果を得ていることから、GSHは広範な食品に存在すると考えられる。GSHは前述したように、多様な生理活性を有し、¹⁻³⁾ また今回明らかにしたように、GSHとGSSGは効果の程度は異なるものの、食品のうま味や風味に影響を与える。食品中でのGSHや

³⁾ 中添純一、横山雅仁、良永知義、宇田川美穂：魚介類中のグルタチオンの分布と濃度。「平成3年度水産物健康性機能有効利用開発研究の成果の概要」(水産庁研究部研究課)。1991, pp. 187-195.

GSSG の含量に関する知見はまだ少ない。今後、食品中のそれらの含量や、加工時における変化などを広く調べる必要があると考えている。

文 献

- 1) 坂本幸哉, 谷口直之, 東 胤昭, 木村 光編: グルタチオン研究のエポック. 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 1353-1642 (1988).
- 2) D. J. Reed and P. W. Beatty: Biosynthesis and regulation of glutathione: Toxicological implications. *Rev. Biochem. Toxicol.*, **2**, 213-241 (1980).
- 3) P. He, S. Yamaoka-Koseki, and K. Yasumoto: Aged-related changes in glutathione concentration, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, and superoxide dismutase activities in senescence accelerated mice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1037-1040 (1994).
- 4) T. G. Wierzbicka, T. M. Hagen, and D. P. Jones: Glutathione in food. *J. Food Compos. Anal.*, **2**, 327-337 (1989).
- 5) 中川一夫, 池内真理, 次田陽子: 植物性食品素材中のグルタチオン含有量. 食衛誌, **27**, 425-427 (1986).
- 6) 橋本光冬, 岩附 聡, 桑田五郎, 今井正武: 食品に含まれるグルタチオンの HPLC による定量. 栄養・食糧学会誌, **45**, 363-365 (1992).
- 7) Y. Zhang, M. Chen, and C. T. Ho: Comparison of the volatile compounds obtained from thermal degradation of cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 992-996 (1998).
- 8) Y. Zhang and C. T. Ho: Comparison of the volatile compounds formed from the thermal reaction of glucose with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 760-763 (1991).
- 9) Y. Zhang and C. T. Ho: Volatile compounds formed from thermal interaction of 2, 4-decadienal with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1016-1020 (1989).
- 10) Y. Zhang and C. T. Ho: Formation of meatlike aroma compounds from thermal reaction of inosine 5'-monophosphate with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1145-1148 (1991).
- 11) Y. Ueda, M. Yonemitsu, T. Tsubuku, M. Sakaguchi, and R. Miyajima: Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1977-1980 (1997).
- 12) 渡辺勝子, 藍 恵玲, 山口勝己, 鴻巣章二: ホタテガイエキス成分の呈味上の役割. 食工誌, **37**, 439-445 (1990).
- 13) 高橋裕明, 吉田隆典, 目黒 熙: 高速液体クロマトグラフィーによるチオール化学物のポストカラムけい光分析法. 分析化学, **30**, 339-341 (1981).
- 14) 佐藤 信: 官能検査入門, 日科技連出版, 東京, 1978, pp. 48-49.
- 15) 鴻巣章二, 渡辺勝子, 郡山 剛, 白井隆明, 山口勝己: ホタテガイのエキス成分のオミッショントテストによる有効成分の同定. 食工誌, **35**, 252-258 (1988).
- 16) S. Yamaguchi and A. Kimizuka: Psychometric studies on the taste of monosodium glutamate, in "Glutamic acid: Advances in biochemistry and physiology" (ed. by L. J. Filer, Jr., S. Garatti, M. R. Kare, W. A. Reynolds, and R. J. Wurman), Raven Press, New York, 1979, pp. 35-54.