

明 細 書

発明の名称： コク味付与剤

技術分野

- [0001] 本発明は、C a S Rアゴニスト活性を示すペプチドからなるコク味付与剤及び複合コク味付与剤に関する。又、本発明はC a S Rアゴニスト活性を示すペプチドを一定濃度以上含有する食品組成物に関する。

背景技術

- [0002] 近年、食生活の多様化等により味覚に対する消費者の要求が高まってきており、これに伴い、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味で表される5基本味だけでは表すことのできない、厚み・ひろがり・持続性・まとまりなど上記基本味の周辺の味をも増強した味覚である「コク味」を付与することのできる優れたコク味付与剤へのニーズが高まっている。

一方、カルシウムセンシング受容体（Calcium Sensing Receptor：C a S R）は、カルシウム受容体とも呼ばれるが、当該受容体シグナルは種々の生体内機能を調節し、C a S Rアゴニスト活性を有する物質はコク味付与剤として用いることができる（特許文献1および2、非特許文献3）。

- [0003] 上記の「コク味」には種々の呈味パターンが存在するが、中後味型であるコク味を付与することのできる、より高力価のコク味付与剤が求められている。またコク味を付与する物質は通常、食品等に用いられるため、安定性に優れることが求められる。

- [0004] 従って、C a S Rアゴニスト活性を有する多くのバリエーション化合物を探索し、より優れたコク味付与作用、特に先味型のコク味付与作用を有し、かつ安定性に優れ簡便かつ低コストで生産することが可能なコク味を付与するこのできる物質を見出し、該物質からなるコク味付与剤、及び該物質を他のC a S Rアゴニスト活性を有する物質と併用してなる複合コク味付与剤を提供することが求められている。

一方、 γ -グルタミンをN末端に有するいくつかの γ -グルタミルペプチ

ドについては、酵素活性の研究等において基質として合成された例は知られているが（特許文献3、非特許文献1、2）、 γ -Glu-Nva-Glyが食品用途に実際に用いられた例や天然に存在した例は知られていない。

また、前記特許文献1には、 γ -Glu-X-Gly（Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体）がCaSRアゴニスト活性を有する化合物であること等が記載されているが、 γ -Glu-Nva-Glyについては、実施例において実際に合成・評価された旨の記載はなく、具体的に開示されていない。尚、特許文献1及び2の内容は、本明細書の記載に含まれるものとする。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2007/055393号パンフレット
特許文献2：国際公開第2008/139945号パンフレット
特許文献3：国際公開第2007/066430号パンフレット

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Molecular Pharmacology (1982), 21(3), 629-36
非特許文献2：Biokhimiya (Moscow) (1972), 37(4), 757-61
非特許文献3：The Journal of Biological Chemistry, (2010), 285 (2), 1016-22

発明の概要

- [0007] 本発明は、CaSRアゴニスト活性を有する多くのバリエーション化合物を探索してより優れたコク味付与作用、特に中後味型で高力価のコク味付与作用を有し、かつ安定性に優れた、コク味を付与するこのできる物質を見出し、該物質からなるコク味付与剤、及び該物質を他のCaSRアゴニスト活性を有する物質と併用してなる複合コク味付与剤を提供することを課題とする。更に、一定濃度の該物質を含有する食品組成物を提供することを課題とする。
- [0008] 本発明者は、種々の化合物を探索した結果、驚くべきことに、 γ -Glu

—N v a—G l y（L— γ —グルタミル—L—ノルバリル—グリシン）が、高いC a S Rアゴニスト活性と極めて優れたコク味付与効果を有し、特にその呈味パターンが中後味型であるコク味を付与することができることを見出した。さらに、見出された γ —G l u—N v a—G l yが、同様のトリペプチドである γ —G l u—V a l—G l yと比較して10倍以上と、きわめて高力価であり、また安定性に優れ、かつより中後味が強いという好ましい呈味パターンを示すことを見出した。さらに、見出された γ —G l u—N v a—G l yが、単独で有用なコク味付与剤となりえることを見出した。また、 γ —G l u—N v a—G l yを添加することにより、コク味の増強した、好ましい食品組成物が得られることを見出した。さらに、該物質を他のC a S Rアゴニスト活性を有する物質と併用してなる複合コク味付与剤となりうることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は、 γ —G l u—N v a—G l yからなるコク味付与剤を提供する。

また、本発明は γ —G l u—N v a—G l yを含有する食品組成物をも提供する（以下、「本発明の食品組成物」ともいう。）。また、本発明は、（a） γ —G l u—N v a—G l yに、（b） γ —G l u—X—G l y（Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す、但しN v aを除く）、 γ —G l u—V a l—Y（Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す）、 γ —G l u—N v a、 γ —G l u—A b u、 γ —G l u—A l a、 γ —G l u—G l y、 γ —G l u—C y s、 γ —G l u—M e t、 γ —G l u—T h r、 γ —G l u—V a l、 γ —G l u—O r n、A s p—G l y、C y s—G l y、C y s—M e t、G l u—C y s、G l y—C y s、L e u—A s p、D—C y s、 γ —G l u—M e t（O）、 γ —G l u— γ —G l u—V a l、 γ —G l u—V a l—N H₂、 γ —G l u—V a l—o l、 γ —G l u—S e r、 γ —G l u—T a u、 γ —G l u—C y s（S—M e）（O）、 γ —G l u—L e u、 γ —G l u—I l e、 γ —G l u—t—L e uおよび γ —G l u—C y s（S—M e）からなる群より選択される1種又は2種以上のアミノ酸又はペ

プチド、を併用してなる複合コク味付与剤を提供する。

- [0010] 本発明によれば、極めて優れたコク味付与作用、特に呈味パターンが図1に示されるようなプロフィールを有するユニークな中後味型の極めて強力なコク味付与作用を有し、かつ安定性に優れ簡便かつ低コストで生産することが可能なコク味付与剤、及び複合コク味付与剤を提供することができる。又、本発明によれば、優れたコク味付与作用を有する物質を一定濃度含有する、優れた食品組成物を提供することができる。

本発明のコク味付与剤を用いると、低脂肪食品の呈味に脂肪様濃厚感及び滑らかさを付与できるので、脂肪含有食品中の脂肪の含有量を低下させても、元の食品と同様の濃厚感を保持でき、健康志向の高い食品にすることができる。このような食品としては、肉類含有食品や乳製品などがあげられる。特に、本発明のコク味付与剤を含有する食品を喫食すると、食べたとたんではなくて、その後に、脂肪様濃厚感及び滑らかさを感じることができるという利点がある。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1] 図1は、中後味型のコク味付与剤の味覚プロフィールを示す。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明で対象とする γ -Glu-Nva-Glyは3つのアミノ酸がペプチド結合してなるL- γ -グルタミル-L-ノルバリル-グリシン及び/又はその塩、特に可食性の塩が含まれる。

γ -Glu-Nva-Glyは優れたコク味付与効果を有するため、コク味付与剤として用いることができる。 γ -Glu-Nva-Glyは、コク味を付与する食品組成物の重量に対して、0.1ppb~99.9質量%、好ましくは1ppb~10質量%、より好ましくは0.01ppm~1質量%、含有するように添加して用いることができる。すなわち、本発明の別の態様は、 γ -Glu-Nva-Glyを含有する食品組成物、好ましくは、 γ -Glu-Nva-Glyを0.1ppb~99.9質量%含有する食品組成物に関する。より好ましくは、 γ -Glu-Nva-Glyを0.01

～50重量ppm含有する食品組成物に関する。

[0013] また、本発明のコク味付与剤、すなわち、 γ -Glu-Nva-Glyは、グルタミン酸ナトリウム（MSG）などのアミノ酸類、イノシン酸（IMP）などの核酸類、塩化ナトリウムなどの無機塩類、クエン酸などの有機酸類、種々の酵母エキスなどから選択される少なくとも1種の他の調味原料と組み合わせて用いることにより、他の調味原料を単独で用いる場合に比べて、よりコク味の増した、好ましい調味料を提供することができる。

[0014] 本発明において「コク味」とは、甘味（sweet taste）、塩味（salty taste）、酸味（sour taste）、苦味（bitter taste）、うま味（umami）で表される5基本味（five basic tastes）では表すことのできない味を意味し、基本味だけでなく、厚み（thickness）・ひろがり（growth（mouthfulness））・持続性（continuity）・まとまり（harmony）など基本味の周辺の味（marginal tastes）をも増強した味をいう。ここで、「コク味付与」とは、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味で表される5基本味の増強と、それに伴う厚み・ひろがり・まとまりなど基本味の周辺の味を付与することをいう。また、これを呈味増強作用と表現することもできる。したがって、本発明のコク味付与剤である γ -Glu-Nva-Glyは、呈味増強剤（Flavor Enhancer）と表現することもできる。本発明のコク味付与剤である γ -Glu-Nva-Glyは、甘味増強剤、塩味増強剤、酸味増強剤、苦味増強剤またはうま味増強剤として使用することができる。

また、味覚は喫食後の時間経過とともに変化するが、喫食直後から順に、先味（initial taste）、中味（middle taste）及び後味（after taste）と呼ぶ。これらは相対的な概念であるが、概して、先味、中味及び後味は、それぞれ喫食後0から2秒まで、2秒から5秒まで、及び5秒以降に感じる呈味である。また、0から5秒までを「先中味」といい、2秒以降約30秒前後までを「中後味」とする（図1参照）。3区分に分けた評価について、喫食者の評価への集中が困難なため、通常2区分に分けた評価を常用する。

コク味及び呈味パターンに対するCaSR活性を有する物質の効果は、ヒ

トによる味覚試験などの方法によって確認することができる。このようなヒトによる味覚官能試験としては、例えば本願明細書の実施例で示される試験が挙げられるが、これらに限定されない。

[0015] 本明細書において、「CaSR」とは、カルシウムセンシング受容体 (Calcium Sensing Receptor) を意味し、7回膜貫通型受容体のクラスCに属するものであり、カルシウム受容体とも呼ばれる。本明細書において「CaSRアゴニスト」とは、上記CaSRに結合し、CaSRを活性化する物質を意味する。また、本明細書において、「CaSRを活性化する」とは、CaSRにリガンドが結合し、グアニンヌクレオチド結合タンパク質を活性化して、シグナルを伝達することを意味する。また、CaSRに結合し、CaSRを活性化する性質を「CaSRアゴニスト活性」という。

[0016] CaSRアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする方法を具体的に示すが、これらのステップに限定されるものではない。

- 1) CaSR活性を測定するためのCaSR活性測定系に被検物質を添加して、CaSR活性を測定する。
- 2) 被検物質を添加したときのCaSR活性と、被検物質を添加しなかったときのCaSR活性を比較する。
- 3) 被検物質を添加したときにCaSRアゴニスト活性を示す被検物質を選択する。

[0017] CaSR活性の測定は、例えば、CaSRを発現する細胞を用いた測定系を用いて行うことができる。上記細胞は、CaSRを内在的に発現する細胞であっても、外来的にCaSR遺伝子を導入した組み換え細胞であってもよい。上記CaSR活性測定系は、上記CaSRを発現する細胞に、CaSRに特異的な細胞外リガンド（活性化物質）を加えたときに、活性化物質とCaSRとの結合（反応）を検出することができるか、又は、活性化物質とCaSRとの結合（反応）に応答して細胞内に検出可能なシグナルを伝達するものであれば、特に制限なく用いることができる。被検物質との反応によりCaSR活性が検出された場合、当該被検物質はCaSR刺激活性を有する

と判定される。

[0018] 上記CaSRとしては、GenBank Accession No. NM_000388で登録されているヒトCaSR遺伝子によってコードされるヒトCaSRが好ましく例示できる。尚、CaSRは、上記配列の遺伝子によってコードされるタンパク質に制限されず、CaSR機能を有するタンパク質をコードする限りにおいて、上記配列と60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有する遺伝子によってコードされるタンパク質であってもよい。なお、CaSR機能はこれらの遺伝子を細胞に発現させ、カルシウム添加時の電流の変化や細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定することによって調べることができる。

上記CaSRは、その由来は特に制限されず、上記ヒトのCaSRのみならず、マウス、ラット、イヌなどを含むあらゆる動物由来のCaSRが挙げられる。

[0019] 上述の如く、CaSR活性は、CaSR又はその断片を発現した生きた細胞、CaSR又はその断片を発現した細胞膜、CaSR又はその断片のタンパク質を含むインビトロの系などを利用して確認することができる。

以下に生きた細胞を用いた一例を示すが、これに限定されるものではない。

CaSRは、アフリカツメガエル卵母細胞やハムスター卵巢細胞やヒト胎児腎臓細胞等の培養細胞に発現させる。これは外来遺伝子を保持するプラスミドにCaSR遺伝子をクローニングしたものを、プラスミドの状態もしくはそれを鋳型にしたcRNAを導入することで可能となる。反応の検出には電気生理学的手法や細胞内カルシウム上昇の蛍光指示試薬を用いることができる。

CaSRの発現は、初めにカルシウムもしくは特異的活性化剤による応答で確認する。5 mM程度の濃度のカルシウムに対して、細胞内電流が観察された卵母細胞もしくは蛍光指示試薬の蛍光が観察された培養細胞を使用する。カルシウムの濃度を変えて濃度依存性を測定する。次に、被検物質を1 μ

M～1 mM程度に調製し、卵母細胞もしくは培養細胞に添加し、上記被検物質存在下でのCaSR活性を測定することで、上記被検物質のCaSRアゴニスト活性を測定する。

又、より具体的には、CaSRアゴニスト活性試験としては例えば本願明細書の試験例で示される試験が挙げられるが、これらに限定されない。

[0020] 本発明の複合コク味付与剤において γ -Glu-Nva-Glyと併用されるアミノ酸又はペプチドは、 γ -Glu-X-Gly (XはNva以外のアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 γ -Glu-Val-Y (Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 γ -Glu-Nva、 γ -Glu-Abu、 γ -Glu-Ala、 γ -Glu-Gly、 γ -Glu-Cys、 γ -Glu-Met、 γ -Glu-Thr、 γ -Glu-Val、 γ -Glu-Orn、Asp-Gly、Cys-Gly、Cys-Met、Glu-Cys、Gly-Cys、Leu-Asp、D-Cys、 γ -Glu-Met (O)、 γ -Glu- γ -Glu-Val、 γ -Glu-Val-NH₂、 γ -Glu-Val-ol、 γ -Glu-Ser、 γ -Glu-Tau、 γ -Glu-Cys (S-Me) (O)、 γ -Glu-Leu、 γ -Glu-Ile、 γ -Glu-t-Leuおよび γ -Glu-Cys (S-Me) からなる群より選択される1種又は2種以上のアミノ酸又はペプチドであるが、ここで、アミノ酸とは、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Pro、Hyp、t-Leu等の中性アミノ酸、Asp、Glu等の酸性アミノ酸、Lys、Arg、His等の塩基性アミノ酸、Phe、Tyr、Trp等の芳香族アミノ酸や、ホモセリン、シトルリン、オルニチン、 α -アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、タウリン等も含まれる。また、tert-ロイシン、シクロロイシン、 α -アミノイソブチル酸、L-ペニシラミン等の非天然（非タンパク質構成）アミノ酸であってもよい。尚、ペプチド γ -Glu-X-Glyにおいては、Xは上記のようなアミノ酸又はその誘導体のいずれでもよいが、Cys以外のアミノ酸又はその誘導体が好ましい。中でも、併用されるペプ

チドとしては、 γ -G l u - V a l - G l y、 γ -G l u - A b u - G l y、 γ -G l u - t L e u - G l y、 γ -G l u - N v aおよび γ -G l u - A b u等が好ましい。

特に、本発明のコク味付与剤は γ -G l u - N v a - G l yからなり、図1に示されるようなプロフィールを有するユニークな中後味型の優れたコク味付与作用を有するので、このようなプロフィールとは異なるプロフィールを有するペプチド、例えば、先味傾向の γ -G l u - A b u - G l y、 γ -G l u - A b uなどと組み合わせて用いるのが好ましい。

[0021] 本明細書において、アミノ酸残基の略号は以下のアミノ酸を意味する。

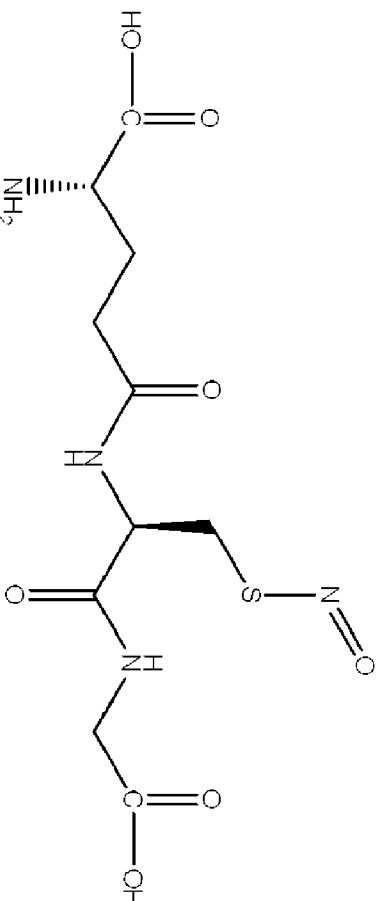
- (1) G l y : グリシン
- (2) A l a : アラニン
- (3) V a l : バリン
- (4) L e u : ロイシン
- (5) I l e : イソロイシン
- (6) M e t : メチオニン
- (7) P h e : フェニルアラニン
- (8) T y r : チロシン
- (9) T r p : トリプトファン
- (10) H i s : ヒスチジン
- (11) L y s : リジン
- (12) A r g : アルギニン
- (13) S e r : セリン
- (14) T h r : トレオニン
- (15) A s p : アスパラギン酸
- (16) G l u : グルタミン酸
- (17) A s n : アルパラギン
- (18) G l n : グルタミン
- (19) C y s : システイン

- (20) P r o : プロリン
- (21) O r n : オルニチン
- (22) S a r : サルコシン
- (23) C i t : シトルリン
- (24) N - V a l (又は、N v a) : ノルバリン (2-アミノ吉草酸)
- (25) N - L e u (又は、N l e) : ノルロイシン
- (26) A b u : α -アミノ酪酸
- (27) T a u : タウリン
- (28) H y p : ヒドロキシプロリン
- (29) t - L e u : t e r t - ロイシン
- (30) C l e : シクロロイシン
- (31) A i b : α -アミノイソブチル酸 (α -aminoisobutyric acid、2-メチルアラニン)
- (32) P e n : L-ペニシラミン (penicillamine)
- (33) a l l o - T h r : アロスレオニン
- (34) a l l o - I l e : アロイソロイシン

[0022] また、アミノ酸誘導体とは、上記アミノ酸の各種誘導体であって、例えば、特殊アミノ酸や非天然アミノ酸、アミノアルコール、或いは末端カルボニル基やアミノ基、システインのチオール基等のアミノ酸側鎖が各種置換基により置換したものが挙げられる。置換基としては、アルキル基、アシル基、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基、ニトロ基、スルホニル基や各種保護基等が挙げられ、例えば、A r g (NO₂) : N- γ -ニトロアルギニン、C y s (SNO) : S-ニトロシステイン、C y s (S-Me) : S-メチルシステイン、C y s (S-allyl) : S-アリルシステイン、V a l -NH₂ : バリンアミド、V a l -o l : バリノール (2-アミノ-3-メチル-1-ブタノール) 等が含まれる。尚、本明細書において、 γ -G l u -C y s (SNO) -G l y は下記の構造式を有するものであり、上記 γ -G l u -M e t (O) および γ -G l u -C y s (S-Me) (O) 式中の (O) はス

ルホキシド構造であることを意味する。γ-Gluの（γ）とは、グルタミン酸のγ位のカルボキシル基を介して他のアミノ酸が結合していることを意味する。

[化1]



S-ニトロソグルタチオン (S-Nitrosoglutathione (GSNO))

- [0023] 本発明のγ-Glu-Nva-Gly及びこれと併用されるアミノ酸又はペプチドは、市販されている場合には市販品を用いることもでき、その他、
- (1) 化学的に合成する方法、又は(2) 酵素的な反応により合成する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができるが、化学的な合成がより簡便である。本発明において用いられるγ-Glu-Nva-Glyは含まれるアミノ酸の残基数が3残基と短いので、化学的に合成する方法が比較的簡便であり、産業上有利である。また、本発明のγ-Glu-Nva-Gly及びこれと併用されるアミノ酸又はペプチドを化学的に合成する場合には、該オリゴペプチドをペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行うことができる。化学的に合成する方法としては、例えばペプチド固相合成法等が挙げられる。そのようにして合成したペプチドは通常的手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等によって精製することができる。このようなペプチド固相合成法、およびそれに続きペプチド精製はこの技術分野においてよく知られたものである。

- [0024] また、本発明において用いられるγ-Glu-Nva-Gly及びこれと

併用されるアミノ酸又はペプチドを酵素的な反応により生産する場合には、例えば、国際公開パンフレットWO 2004/011653号に記載の方法を用いてもよい。すなわち、一方のアミノ酸又はジペプチドのカルボキシル末端をエステル化又はアミド化したアミノ酸又はジペプチドと、アミノ酸がフリーの状態であるアミノ酸（例えば、カルボキシル基が保護されたアミノ酸）とを、ペプチド生成酵素の存在下において反応させ、生成したジペプチド又はトリペプチドを生成することによっても生産することが可能である。ペプチド生成酵素としては、ペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、又は該微生物の菌体処理物、又は該微生物に由来するペプチド生成酵素が挙げられる。尚、WO 2004/011653号に記載されている事項は、本明細書の記載に含まれるものとする。

さらに、上述したような酵素的な方法や化学的合成方法以外にも本発明において用いられるペプチドが、野菜や果物等の植物、酵母等の微生物、その他の天然物中に存在する場合がある。天然に存在する場合には、これらから抽出して用いることも可能である。

本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤は、そのまま、又は飲食品的に許容しうる担体や他の調味原料と混合して、調味料とすることができる。他の調味原料としては、例えば、香料、糖類、甘味料、食物繊維類、ビタミン類、グルタミン酸ナトリウム（MSG）などのアミノ酸類、イノシン酸（IMP）などの核酸類、塩化ナトリウムなどの無機塩類、クエン酸などの有機酸類が挙げられ、更には種々の酵母エキスも挙げられる。

[0025] 尚、本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤を含有する食品組成物として好ましい低脂肪食品は、元来脂肪を含む食品であり、特に、その脂肪含量が低減された食品である。ここで、「脂肪」とは「油脂」と同義であり、固形と液状の両方を含み、動物性脂肪及び植物性脂肪のいずれであってもよい。

このような低脂肪食品としては、牛乳、ヨーグルト、バター、クリーム等

の乳製品、マーガリン、コーヒー用ミルク、ソース、ルーなどの動物油脂及び/又は植物油脂含有食品、ドレッシング、マヨネーズなどの乳化食品等、調理済みの肉類を含む各種カレーやシチュー、肉エキスを含む各種スープなどがあげられる。又、調理済みの低脂肪牛肉からなるステーキや焼き肉類などや通常のフライ処理ではないベイクドスナックもあげられる。これらのうち、低脂肪食品としては、通常食品の脂肪含有量が1/2～1/3であるものが好ましい。

本発明のコク味付与剤を上記低脂肪食品に含有させることにより、これらの食品を喫食した時、最初ではなくてその次に、脂肪様濃厚感及び滑らかさを感じることができる。

なお、牛乳やヨーグルトに関しては、通常品が脂肪3～4%であるのに対し、ゼロ脂肪品（脂肪0.1%前後）も知られている。本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤はこれらゼロ脂肪品にも有効である。

[0026] また、本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤は、とりわけ、ポーク原料を含有する食品に添加することも好ましい。すなわち、本発明は、 γ -Glu-Nva-Glyとポーク原料とを含有する食品組成物も提供する。ポーク原料を含有する食品としては、特に制限はないが、例えば、ポークエキス、ソーセージ、即麺スープ等が挙げられる。ポーク原料の含有量に特に制限はないが、例えば、本発明の食品組成物において、0.005～80重量%程度であるものが挙げられる。

また、本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤は、ビーフ原料を含有する食品に添加することも好ましい。すなわち、本発明は、 γ -Glu-Nva-Glyとビーフ原料とを含有する食品組成物も提供する。ビーフ原料を含有する食品としては、特に制限はないが、例えば、ビーフエキス、コーンビーフ、ビーフ使用スープ、ビーフ使用ソース等が挙げられる。ビーフ原料の含有量に特に制限はないが、例えば食品組成物において、0.005～80重量%程度であるものが挙げられる。

[0027] 本発明において用いられる γ -Glu-Nva-Gly及び併用されるア

ミノ酸又はペプチドは塩の形態をも包含する。本発明の γ -Glu-Nva-Gly 及び併用されるアミノ酸又はペプチドが塩の形態を形成し得る場合、その塩は薬理的に許容される、可食性の塩であればよく、例えば、カルボキシ基等の酸性基に対しては、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸との塩を挙げることができる。また、塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩を挙げることができる。

[0028] 本発明のコク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤は、乾燥粉末、ペースト、溶液などの物性に制限なしにあらゆる形態で用いることができる。

本発明のコク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤は、食品、飲料、調味料等の各種飲食品に配合して用いることができる。

本発明のコク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤を食品、飲料、調味料等の各種飲食品に配合して用いる場合の最終的な γ -Glu-Nva-Gly の量及び併用されるアミノ酸又はペプチドの量は所望の効果が得られる量であれば特に制限されないが、 γ -Glu-Nva-Gly の量及び／又はアミノ酸若しくはペプチドの量として、食品、飲料あるいは調味料等の全質量を基準として、それぞれについて 0.1ppb～99.9重量%、好ましくは 1ppb～10重量%、より好ましくは 0.01ppm～1重量%程度である。

[0029] 本発明のコク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤が配合された食品、飲料、調味料等の各種飲食品には、飲食品的に許容しうるあらゆる固体又は液体の担体、適当な調味原料等をさらに配合させてもよい。

上記担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ゼラチン、アルブミン、アミノ酸、水、生理食塩水等が挙げられる。

上記の調味原料は、当業界で用いられるいずれの調味原料であってもよく特に制限されないが、より具体的には既に上述のものが挙げられる。

上記の担体、他の調味原料等はいずれもその含有量は特に制限されない。

上記調味原料のうち、酵母エキ스는、由来となる菌体・その培養条件・抽出処理方法のいずれも特に限定されず任意の酵母エキスをを用いることができ、更に加熱処理、酵素処理、濃縮、粉末化処理等が施されたものでも良い。

本発明は又、各種飲食品の製造中間品に、1質量ppb～99.9質量%含有させるように γ -Glu-Nva-Glyを添加することを特徴とする、各種飲食品の製造方法を提供する。ここで各種飲食品としては、低脂肪食品が好ましい。

[0030] 本発明は又、各種飲食品の製造中間品に、本発明の食品組成物を添加することを特徴とする、各種飲食品の製造方法を提供する。ここで各種飲食品としては、低脂肪食品が好ましい。

本発明のコク味付与剤を用いる製造中間品の製造方法については、 γ -Glu-Nva-Glyからなる呈味増強剤を飲食品原料（例えば、うま味原料、たん白加水分解物、畜肉エキス）に添加混合する工程、および、必要に応じて、得られる飲食品原料混合物をさらに調理する工程を含む、飲食品又は飲食品の製造中間品の製造方法が好ましい。

ここで、 γ -Glu-Nva-Glyからなる呈味増強剤を飲食品原料に添加混合する工程が、飲食品の製造中間品の γ -Glu-Nva-Gly濃

度を0.01～999900重量ppm、好ましくは、0.1～200000重量ppmとする工程を含むのが好ましい。

又、飲食品の製造中間品を別の飲食品原料（例えば、農産物、水産物、畜肉、乳製品、又は、それらの加工食品）に添加して、得られる飲食品の γ -Glu-Nva-Gly濃度を0.01～50重量ppm、好ましくは、0.05～20重量ppmとする工程をさらに含むのが好ましい。

又、 γ -Glu-Nva-Glyからなる呈味増強剤を飲食品原料に添加混合する工程が、飲食品の γ -Glu-Nva-Gly濃度を0.01～50重量ppm、好ましくは、0.05～20重量ppmとする工程を含むのが好ましい。

[0031] 上記の製造方法において、飲食品がポーク原料を含有する食品であるのが好ましい。この場合、0.01～50重量ppmの γ -Glu-Nva-Glyと、0.005～80重量%のポーク原料と、他の食品原料とを含有するのが好ましい。

上記の製造方法において、飲食品がビーフ原料を含有する食品であるのが好ましい。この場合、0.01～50重量ppmの γ -Glu-Nva-Glyと、0.005～80重量%のビーフ原料と、他の食品原料とを含有するのが好ましい。

又、本発明の対象食品としては、上記の食品に加えて、アイスクリーム、蜂蜜、マーマレード、およびイチゴジャムなどの甘味が主のデザート・菓子など食品（スイート系食品）や、チキンスープなどの塩味が主の加工食品・惣菜・スナックなど食品（セイボリー系食品）も好ましいものとしてあげられる。

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

実施例

[0032] （合成例1） γ -Glu-Nva-Gly（ γ -L-グルタミル-L-ノルバリル-グリシン）の合成

Boc-Nva (t-Butoxycarbonyl-L-norvaline、4.44 g、20.4 mmol) と Gly-OBzl · HCl (Glycine benzyl ester hydrochloride、4.12 g、20.4 mmol) を塩化メチレン (CH₂Cl₂、100 ml) に溶解した。反応液を 0 °C に保ち、トリエチルアミン (Et₃N、3.13 ml、1.1 当量、22.4 mmol)、HOBt · H₂O (1-Hydroxybenzotriazole hydrate、3.44 g、1.1 当量、22.4 mmol) 及び WSC · HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride、4.30 g、1.1 当量、22.4 mmol) を加えた。反応液の温度を徐々に昇温し、室温で一夜 (16 時間) 攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に酢酸エチル (150 ml) を加え、有機層を、水 (50 ml)、5 % クエン酸水溶液 (50 ml) で 2 回、飽和食塩水 (50 ml)、5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 ml) で 2 回及び飽和食塩水 (50 ml) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣に n-ヘキサンを加えると結晶化したので、結晶をろ過して集め、減圧乾燥して Boc-Nva-Gly-OBzl (6.88 g、18.9 mmol) を結晶として得た。

Boc-Nva-Gly-OBzl (6.88 g、18.9 mmol) に 4N HCl / ジオキサン溶液 (94.5 ml) を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧濃縮してジオキサンを除き、残渣に n-ヘキサン (30 ml) を加えて減圧濃縮する操作を 3 回繰り返して、定量的な収率で H-Nva-Gly-OBzlHCl を得た。

[0033] H-Nva-Gly-OBzlHCl を塩化メチレン (130 ml) に溶解し、反応液を 0 °C に保った。反応液に Z-Glu-OBzl (N-α-Carbobenzoxyl-L-glutamic acid α-benzyl ester、7.03 g、18.9 mmol)、トリエチルアミン (2.90 ml、1.1 当量、20.8 mmol)、HOBt · H₂O (3.20 g、1.1 当量、20.8 mmol) 及び WSC · HCl (3.98 g、1.1 当量、20.8 mmol) を加えた。反応液の温度を徐々に昇温し、室温で一夜 (16 時間) 攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に酢酸エチル (1000 ml) を加え、有機層を、水 (100 ml)、5 % クエン酸水溶液 (100 ml) で 2 回、飽和食塩水 (100 ml)、5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 ml) で 2 回及び飽和食塩水 (100 ml) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液を 50 °C に加熱した後に、硫酸マグネシウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮

した。結晶が出始めたところでn-ヘキサンを加えて十分結晶を析出させた。結晶をろ過して集め、減圧乾燥してZ-Glu(Nva-Gly-OBzl)-OBzl (10.16 g、16.4 mmol)を結晶として得た。

エタノール (250 ml) と水 (30 ml) の混合液にZ-Glu(Nva-Gly-OBzl)-OBzl (10.16 g、16.4 mmol)と5 %パラジウム炭素 (5 % palladium/carbon、1.20 g)を加え、50 °Cで一夜 (14時間)、水素雰囲気下で接触還元を行った。反応中、水 (100 ml) を少しずつ加えた。パラジウム炭素をろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣を少量の水とエタノールから再結晶してγ-Glu-Nva-Gly (4.59 g、15.1 mmol)を白色結晶として得た。その特性値を次に示す。

ESI-MS: (M+H)⁺ = 304.1

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.82 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.23-1.37 (2H, m), 1.55-1.75 (2H, m), 2.01-2.09 (2H, m), 2.38-2.48 (2H, m), 3.72 (1H, t, J=6.4Hz), 3.87 (1H, dd, J=17.8 and 20.9Hz), 4.21 (1H, dd, J=4.4 and 8.9 Hz)

[0034] (試験例1) CaSR発現プラスミドの調製

CaSR発現プラスミドの調製を以下のように行った。

NCBIに登録されたDNA配列 (CaSR (カルシウム受容体) : NM_00388、配列番号1、2)を元に、PCRに使う合成オリゴDNA (フォワードプライマー (配列番号3 : ACTAATACGACTCACTATAGGGACCATGGCATTTCATAGCTGCTGCTGG)、及びリバースプライマー (配列番号4 : TTATGAATTCACCTACGTTTTCTGT AACAG)を合成した。

ヒト腎臓由来のcDNA (Clontech社製)を材料として、前記プライマー、及びPfu Ultra DNA Polymerase (Stratagene社製)を用い、以下の条件でPCRを実施した。94 °Cで3分の後、94 °Cで30秒、55 °Cで30秒、72 °Cで2分を35回繰り返した後、72 °Cで7分反応させた。アガロース電気泳動を行い、DNA染色試薬で染色した後、紫外線照射によってPCRによって増幅がなされたか否かを検出した。又、同時に電気泳動したサイズ既知のDNAマーカーと比較することで、PCR産物の鎖長を確認した。

プラスミドベクター pBR322 を制限酵素 EcoRV (Takara社製) によって切断し、その切断部位に PCR によって増幅された遺伝子断片を Ligation kit (Promega社製) を用いて連結した。この反応溶液でエシェリヒア・コリ DH5 α 株を形質転換し、PCR 増幅産物がクローニングされたプラスミドを保持する形質転換体を選抜し、更に PCR 増幅産物を DNA 塩基配列解析によって確認した。

この組換えプラスミドを用いてヒト CaSR 発現プラスミド hCaSR/pcDNA3.1 を作製した。

[0035] (試験例 2) CaSR アゴニスト活性の評価

293E 細胞 (EBNA1 発現 HEK293 細胞、ATCC No. CRL-10852) を、200 μ g/ml の G418 (ジェネティシン) 存在下、10% のウシ胎児血清を含む DMEM/Ham's-F12 (3.15/ml Glucose 含有 Dulbecco's modified Eagle medium、ナカライテスク) にて培養した。3 $\times$ 10⁶ cells/10ml で F25 フラスコに撒き、CO₂ インキュベータ (5% CO₂、37°C) に 24 時間静置した後、トランスフェクション試薬 Eugene6 (Roche) にてヒト CaSR 発現プラスミド hCaSR/pcDNA3.1 をトランスフェクションした。CO₂ インキュベータに 6~7 時間置いた後、細胞を 10% ウシ胎児血清含有 DMEM/Ham's-F12 にて回収し、70,000 cells/well で poly-D-lysine coat 96 well plate (BD-Biocoat) に播種した。

CO₂ インキュベータにて 24 時間静置した後、この細胞を播種した 96 well plate から培地を除去し、Assay Buffer (146mM NaCl、5mM KCl、1mM MgSO₄、1mg/ml Glucose、20mM HEPES (pH 7.2)、0.75~1.25 mM CaCl₂) に溶解した Ca²⁺ 蛍光指示薬 Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) を 200 μ l/well 添加し、37°C で 1 時間、次いで室温で 10 分静置し指示薬を取り込ませた。

この 96 well plate に、0.1% BSA 含有 Assay Buffer に溶解した被験化合物を 50 μ l/well 添加し、FLEX Station (Molecular Devices) で 3 分間蛍光強度変化を測定した。

[0036] (EC₅₀ 算出法)

化合物添加前後の蛍光強度の最大値と最小値の差 (RFU (Max-Min)) を FLEX S

tationの自動計算にて求めた。化合物最大濃度添加時のRFU(Max-Min)を100%、被験化合物を含まない0.1%BSA含有Assay Bufferを使用時のRFU(Max-Min)を0%と定義した活性率を計算し、表計算ソフトXfitもしくはグラフパッドプリズムにてカーブフィッティングし、活性率50%時の化合物濃度であるEC₅₀値を求めた。結果を表1に示した。また、比較例として、同様に測定したトリペプチドのデータを表2、表3に示した。なお、表3に記載のデータは非特許文献3に掲載されている。

表 1

化合物	EC50, μ M
γ -Glu-Nva-Gly	0.055
γ -Glu-Val-Gly	0.075

[0037]

表 2

化合物	EC50, μ M
γ -Glu-Ala-Gly	0.016
γ -Glu-tLeu-Gly	0.09
γ -Glu-Thr-Gly	2.8

[0038]

表 3

化合物	EC50, μ M
γ -Glu-Val-Gly	0.039
γ -Glu-Abu-Gly	0.025
γ -Glu-Cys-Gly	0.7

この結果から、 γ -Glu-Nva-Glyは、他の γ -Glu-X-Gly型の構造を有するペプチドと同程度に高いCaSR活性を有することを予期せず見出した。

[0039] 実施例 1 コク味付与活性の評価

γ -Glu-Nva-Glyについて、定量的な官能評価試験によりコク味付与活性の強度を調べた。

定量的官能評価試験は以下のように実施した。グルタミン酸ナトリウム（0.05 g/dl）、イノシン酸ーリン酸（0.05 g/dl）、塩化ナト

リウム (0.5 g/dl) を含有する蒸留水に、試料として化合物類を 0.00001 ~ 0.1 g/dl にて混合した場合の、コク味付与活性の強度を測定した。試料溶解後、無添加コントロールに対し酸性を呈したサンプルについては、NaOH で無添加コントロールに対し pH ± 0.2 の幅に合わせて使用した。官能評点について、コントロール：0 点、強い：3 点、非常に強い：5 点とするとともに、尺度をより明確にするため、 γ -Glu-Cys-Gly の先中味、後味を各々 3.0 点とした。採点については、直線尺度法を用い、-5 ~ 0 ~ 5 点の位置を示した直線に対し、該当する採点を位置として記入する方法を用いた。また、食品の調味開発を累積で 1 年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Gly と γ -Glu-Val-Gly の力価の差が 10 倍前後と判定できる者（定期的に確認）をパネラーとした。評価は、n = 4 で実施した。尚、「先中味」とは、口含み後、0 ~ 5 秒の呈味、後味はそれ以降の呈味である。被検化合物は、上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、代表的な濃度の結果を表 4 に示した。

この結果、 γ -Glu-Nva-Gly 以外のトリペプチドについては、いずれも最大でグルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) の約 10 倍程度の活性であったが、驚くべきことに γ -Glu-Nva-Gly は、さらに高く、100 倍強の高活性を有することが示された。

[0040]

表 4

試料	濃度 (g/dl)	コク味の強さ		評価コメント
		先中味	後味	
コントロール	—	0	0	—
γ -Glu-Cys-Gly	0.01	3.0	3.0	濃厚感、厚み、持続性が強くなる。
γ -Glu-Val-Gly	0.001	2.5	3.0	まろやかさ、濃厚感、ひろがりを中心に強くなる。
	0.005	3.5	4.0	まろやかさ、濃厚感、ひろがりを中心に強くなる。
γ -Glu-Nva-Gly	0.00005	2.7	2.9	濃厚感、ひろがりの中後味中心に強くなる。
	0.0001	3.0	3.3	濃厚感、ひろがりの中後味中心に強くなる。
	0.001	4.0	4.0	全体的に厚みがつく。強すぎる。
γ -Glu-Abu-Gly	0.002	3.0	2.0	γ -Glu-Val-Glyより中盤の呈味が増強。
γ -Glu-Ala-Gly	0.001	3.3	2.3	先味の濃厚さ強いが、後味がぼける。
γ -Glu-Abu-GlyA	0.001	2.7	3.0	後味にわずかな収斂味がある。
γ -Glu-tLeu-Gly	0.001	2.5	3.0	後味のほうが強い傾向。やや収斂味が口に残る。

[0041] γ -Glu-Nva-Glyは γ -Glu-Cys-Glyに比較して約100倍、 γ -Glu-Val-Glyなどに比べて、コク味付与活性が少なくとも10倍程度高い。更に、 γ -Glu-Ala-Gly、 γ -Glu-Abu-Gly、 γ -Glu-tLeu-Glyのように、異味（後味の収斂味など）なく、 γ -Glu-Nva-Glyが優れていることが分かった。

[0042] 実施例2 コク味付与活性の評価

γ -Glu-Nva-Glyについて、中後味型を明確にするため別評価項目での定量的な官能評価試験によりコク味付与活性の強度を調べた。

定量的官能評価試験は以下のように実施した。中後味を分かり易くするため、評価液に関し、イノシン酸ーリン酸を使用せず、中後のうま味を低減した。すなわち、グルタミン酸ナトリウム（0.1 g/dl）、塩化ナトリウム（0.4 g/dl）を含有する蒸留水に、試料として化合物類を0.00001～0.1 g/dlにて混合した場合の、コク味付与活性の強度を測定した。試料溶解後に無添加コントロールに対し酸性を呈したサンプルにつ

いては、NaOHで無添加コントロールに対しpH±0.2の幅に合わせて使用した。官能評点について、コントロール：0点、強い：3点、非常に強い：5点とするとともに、尺度をより明確にするため、 γ -Glu-Cys-Glyの先、中後味を各々3.0点とした。採点については、直線尺度法を用い、-5～0～5点を示した直線に対し、該当する採点を位置として示す方法を用いた。また、食品の調味開発を累積で1年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Glyと γ -Glu-Val-Glyの力価の差が10倍前後と判定できる者（定期的に確認）をパネラーとした。評価は、n=4で実施した。尚、「先味」とは、口含み後、0～2秒の呈味、中後味はそれ以降の呈味である。被検化合物は、上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、代表的な濃度の結果を表5に示した。

この結果でも、 γ -Glu-Val-Glyは、グルタチオン（ γ -Glu-Cys-Gly）の約10倍程度の活性であったが、 γ -Glu-Nva-Glyは、さらに高く、100倍強の高活性を有することが示された。

[0043]

表5

試料	濃度 (g/dl)	コク味の強さ		評価コメント
		先味	中後味	
コントロール	—	0	0	—
γ -Glu-Cys-Gly	0.01	3	3	濃厚感、厚み、持続性が強くなる。
γ -Glu-Val-Gly	0.001	2	3	まろやかさ、濃厚感、ひろがりを中心に強くなる。
γ -Glu-Nva-Gly	0.00005	2	3	濃厚感、ひろがりの中後味中心に強くなる。
	0.0001	3	4	濃厚感、ひろがりの中後味中心に強くなる。

[0044] γ -Glu-Nva-Glyが優れたコク味付与活性を有し、その呈味パターンについて中後味の特徴を有し、異味（収斂味など）なく優れていることが分かった。また、 γ -Glu-Nva-Glyは γ -Glu-Cys-Glyに比較して約100倍、 γ -Glu-Val-Glyなどに比べて、コク味付与活性が少なくとも10倍程度高いため、きわめて低濃度での使用が可能である。したがって、より簡便かつ低コストでコク味付与剤を提供することを可能にし、産業上も非常に有利である。

[0045] 実施例 3 食品におけるコク味付与活性の評価

γ -Glu-Nva-Glyについて、実際、食品に用いた場合、高力価な γ -Glu-Val-Glyより、効果が極めて高いかどうかを官能評価試験により調べた。

官能評価試験は以下のように実施した。中後味が強いと考えられる食品として、甘味が主のデザート・菓子など食品（スイート系食品）の代表として、市販されているアイスクリーム、蜂蜜、マーマレード、およびイチゴジャムを使用した。塩味が主の加工食品・惣菜・スナックなど食品（セイボリー系食品）の代表として市販のチキンスープ、0.1重量%市販粉末コショウをマッシュポテトに加えたペースト、市販ねりショウガ、および2重量%バターをマッシュポテトに加えたペーストを使用した。比較する γ -Glu-Val-Glyの混合量について、効果が明白な0.002重量%とした。 γ -Glu-Nva-Glyについて、0.0000001~0.01重量%にて混合した場合の、呈味全体の増強（コク味付与活性の強度）を測定した。コントロールは無添加の食品である。官能評点について、小数点の差など小差を生まないようコントロール：±、やや強い：+、強い：++、非常に強い+++とした。+を1、++を2、+++を3とし、数値平均が2.2ならば2=++など、四捨五入した。また、食品の調味開発を累積で1年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Glyと γ -Glu-Val-Glyの力価の差が10倍前後と判定できる者（定期的に確認）をパネラーとした。評価は、n=4で実施した。 γ -Glu-Val-Glyについて、上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、明確に比較できる濃度の結果を表7と表8に示した。

この結果からも、グルタチオン（ γ -Glu-Cys-Gly）の約10倍程度のコク味付与活性である γ -Glu-Val-Glyに対し、 γ -Glu-Nva-Glyは、さらに5~13倍強と著しく高い活性を有することが示された。

[0046]

表 7

試料	濃度 (重量%)	呈味全体の増強			
		アイスクリーム	蜂蜜	マーマレード	イチゴジャム
γ -Glu-Val-Gly	0.002	+	+	+	+
γ -Glu-Nva-Gly	0.00015	+	±	±	±
	0.00028	++	±	±	±
	0.0004	+++	+	+	+

[0047]

表 8

試料	濃度 (重量%)	呈味全体の増強			
		チキンスープ	コショウペースト	ねりショウガ	バターペースト
γ -Glu-Val-Gly	0.002	+	+	+	+
γ -Glu-Nva-Gly	0.00015	+	+	±	±
	0.00028	++	++	+	+
	0.0004	+++	+++	++	++

[0048] γ -Glu-Nva-Glyについて、実際のセイボリー系からスイート系食品までの中後味が特徴的なすべての食品において、全体の呈味を上げる有望なコク味付与活性を有することが分かった。さらに γ -Glu-Nva-Glyは、実際の食品において、 γ -Glu-Val-Glyに比し、5～13倍強と著しく高いコク味付与活性を有することが示された。したがって、改善を行いたいが、品質安定性のため、これ以上原料を配合できない場合でも、 γ -Glu-Nva-Glyを用いることにより、極微量で品質改善が可能である。また、低コストでコク味付与剤を提供することが可能である。

[0049] 実施例 4 γ -Glu-Nva-Glyのポークエキスに与える効果

γ -Glu-Nva-Glyについて、コク味付与効果活性が γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）や γ -Glu-Val-Glyより喫食後、早い時間から強まることがわかった。よって、完全な中味型ではなくやや早く呈味が強まるポークエキスに対し、 γ -Glu-Nva-Glyが、 γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）や γ -Glu-Val-Glyより著しく効果的であることを官能評価試験により調べた。

官能評価試験は以下のように実施した。市販ポークエキス（固形分55.1重量%、塩分9.3重量%）を5.0重量%となるように熱水に溶解し、ポークエキス溶液を調製した。このポークエキス溶液に対し、試料として γ

γ -Glu-Nva-Gly、 γ -Glu-Cys-Gly、又は γ -Glu-Val-Glyを混合した。
 測定は2点識別試験法を用い、(1) γ -Glu-Nva-Gly 0.0003重量%と
 同等のコク味付与活性である γ -Glu-Cys-Gly 0.02重量%、(2) γ -Glu-
 Nva-Gly 0.0003重量%と同等量である γ -Glu-Val-Gly 0.0003
 重量%、(3) γ -Glu-Nva-Gly 0.0003重量%と同等のコク味付与活
 性である γ -Glu-Val-Gly 0.002重量%、を比較評価し、“ポークエキ
 スを呈味・風味のバランス変えず強め好ましい”方を判断させた。評価はN=
 9で実施した。 γ -Glu-Nva-Gly 0.0003重量%の方が“ポークエキ
 スを呈味・風味のバランスを変えず強め好ましい”と評価したパネル数を表9
 に示した。

この結果から(1)と(3)のように、同等のコク味力価でも、 γ -Glu-N
 va-Glyのほうが明らかに“ポークエキスを呈味・風味のバランスを変
 えずに強め好ましい”ことが示された。

[0050]

表 9

N = 9

試料	濃度 (重量%)	試料	濃度 (重量%)	γ -Glu-Nva-Glyの方が 、ポークエキスの呈味 ・風味のバランスを変 えずに強め好ましいと 評価したパネル数
(1) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Cys-Gly	0.02	8/9 ^{*)}
(2) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Val-Gly	0.0003	8/9 ^{*)}
(3) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Val-Gly	0.002	8/9 ^{*)}

^{*)}有意水準5%で γ -Glu-Nva-Glyの方が、ポークエキスを呈味・風味の balan
 スを変えずに強め好ましいと言える。

[0051] γ -Glu-Nva-Glyについて、同等コク味付与活性である濃度の γ -Glu-C
 ys-Glyや γ -Glu-Val-Glyよりも“ポークエキスを呈味・風味のベースの
 バランスを変えずに強め好ましくすること”という極めて特異的な効果を有
 することが分った。ポーク原料は世界的に広く、調味料・スープ・畜肉加工
 品・調理加工品・菓子・スナックなどに広く用いられている。従って、 γ -G

lu-Nva-Glyはより低コストおよび微量で、食品を改善することを可能とし、産業上も非常に有利である。

[0052] 実施例 5 γ -Glu-Nva-Glyのビーフエキスに与える効果

γ -Glu-Nva-Glyについて、コク味付与効果活性が γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）や γ -Glu-Val-Glyより喫食後、早い時間から強まることがわかった。よって、完全な中味型ではなくやや早く呈味が強まり後味まで続くビーフエキスに対し、 γ -Glu-Nva-Glyが、 γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）や γ -Glu-Val-Glyより著しく効果的であることを官能評価試験により調べた。

官能評価試験は以下のように実施した。市販ビーフエキス（固形分 6 1. 2 重量%、塩分 1 2. 2 重量%）を 3. 0 重量%となるように熱水に溶解し、ビーフエキス溶液を調製した。このビーフエキス溶液に対し、試料として γ -Glu-Nva-Gly、 γ -Glu-Cys-Gly、又は γ -Glu-Val-Glyを混合した。測定は 2 点識別試験法を用い、(1) γ -Glu-Nva-Gly 0. 0 0 0 3 重量%と同等のコク味付与活性である γ -Glu-Cys-Gly 0. 0 2 重量%、(2) γ -Glu-Nva-Gly 0. 0 0 0 3 重量%と同等量である γ -Glu-Val-Gly 0. 0 0 0 3 重量%、(3) γ -Glu-Nva-Gly 0. 0 0 0 3 重量%と同等のコク味付与活性である γ -Glu-Val-Gly 0. 0 0 2 重量%、を比較評価し、“ビーフエキスを呈味・風味のバランス変えず強め好ましい”方を判断させた。評価はN=9で実施した。 γ -Glu-Nva-Gly 0. 0 0 0 3 重量%の方が“ビーフエキスを呈味・風味のバランスを変えず強め好ましい”と評価したパネル数を表 1 0 に示した。

この結果から(1)と(3)のように、同等のコク味力価でも、 γ -Glu-Nva-Glyのほうが明らかに“ビーフエキスを呈味・風味のバランスを変えずに強め好ましい”ことが示された。

[0053]

表 1 0

N = 9

試料	濃度 (重量%)	試料	濃度 (重量%)	γ -Glu-Nva-Glyの方が、 ビーフエキスの呈味・風味の バランスを変えずに強め好まし いと評価したパネル 数
(1) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Cys-Gly	0.02	9/9 ^{*)}
(2) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Val-Gly	0.0003	8/9 ^{**)}
(3) γ -Glu-Nva-Gly	0.0003	γ -Glu-Val-Gly	0.002	8/9 ^{**)}

^{*)}有意水準 1 %で γ -Glu-Nva-Glyの方が、ビーフエキスを呈味・風味のバランスを変えずに強め好ましいと言える。

^{**)}有意水準 5 %で γ -Glu-Nva-Glyの方が、ビーフエキスを呈味・風味のバランスを変えずに強め好ましいと言える。

[0054] γ -Glu-Nva-Glyについて、同等コク味付与活性である濃度の γ -Glu-Cys-Glyや γ -Glu-Val-Glyよりも“ビーフエキスを呈味・風味のベースのバランスを変えずに強め好ましくすること”という極めて特異的な効果を有することが分った。ビーフ原料は世界的に広く、調味料・スープ・畜肉加工品・調理加工品・菓子・スナックなどに広く用いられている。従って、 γ -Glu-Nva-Glyはより低コストおよび微量で、食品を改善することを可能とし、産業上も非常に有利である。

請求の範囲

- [請求項1] γ -G l u-N v a-G l y からなるコク味付与剤。
- [請求項2] (a) γ -G l u-N v a-G l y に、
(b) γ -G l u-X-G l y (Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 γ -G l u-V a l-Y (Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 γ -G l u-N v a、 γ -G l u-A b u、 γ -G l u-A l a、 γ -G l u-G l y、 γ -G l u-C y s、 γ -G l u-M e t、 γ -G l u-T h r、 γ -G l u-V a l、 γ -G l u-O r n、A s p-G l y、C y s-G l y、C y s-M e t、G l u-C y s、G l y-C y s、L e u-A s p、D-C y s、 γ -G l u-M e t (O)、 γ -G l u- γ -G l u-V a l、 γ -G l u-V a l-N H₂、 γ -G l u-V a l-o l、 γ -G l u-S e r、 γ -G l u-T a u、 γ -G l u-C y s (S-M e) (O)、 γ -G l u-L e u、 γ -G l u-I l e、 γ -G l u-t-L e u および γ -G l u-C y s (S-M e) からなる群より選択される1種又は2種以上のアミノ酸又はペプチド、を併用してなる複合コク味付与剤。
- [請求項3] γ -G l u-N v a-G l y を0. 1 p p b ~ 99. 9 重量%含有する食品組成物。
- [請求項4] 0. 0 1 ~ 5 0 重量 p p m の γ -G l u-N v a-G l y と、0. 0 0 5 ~ 8 0 重量%のポーク原料と、他の食品原料とを含有する、請求項3記載の食品組成物。
- [請求項5] 0. 0 1 ~ 5 0 重量 p p m の γ -G l u-N v a-G l y と、0. 0 0 5 ~ 8 0 重量%のビーフ原料と、他の食品原料とを含有する、請求項3記載の食品組成物。
- [請求項6] γ -G l u-N v a-G l y からなる呈味増強剤を飲食品原料に添加混合する工程、および、必要に応じて、得られる飲食品原料混合物をさらに調理する工程を含む、飲食品又は飲食品の製造中間品の製造

方法。

- [請求項7] γ -Glu-Nva-Glyからなる呈味増強剤を飲食品原料に添加混合する工程が、飲食品の製造中間品の γ -Glu-Nva-Gly濃度を0.01~999,900重量ppmとする工程を含む、請求項6記載の飲食品又は飲食品原料の製造中間品の製造方法。
- [請求項8] 飲食品の製造中間品を別の飲食品原料に添加して、得られる飲食品の γ -Glu-Nva-Gly濃度を0.01~50重量ppmとする工程をさらに含む、請求項7記載の飲食品の製造方法。
- [請求項9] γ -Glu-Nva-Glyからなる呈味増強剤を飲食品原料に添加混合する工程が、飲食品の γ -Glu-Nva-Gly濃度を0.01~50重量ppmとする工程を含む、請求項7記載の飲食品の製造方法。
- [請求項10] 飲食品がポーク原料を含有する食品である、請求項6~9のいずれか1項に記載の飲食品の製造方法。
- [請求項11] 飲食品がビーフ原料を含有する食品である、請求項6~10のいずれか1項に記載の飲食品の製造方法。
- [請求項12] 請求項6~11のいずれかに記載の方法により得られる飲食品又は飲食品の製造中間品。
- [請求項13] γ -Glu-Nva-Glyを含有する組成物を飲食品に添加する工程を有する、飲食品の呈味増強方法。
- [請求項14] 呈味増強がコク味付与である、請求項13記載の方法。