

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5195751号

(P5195751)

(45) 発行日 平成25年5月15日 (2013.5.15)

(24) 登録日 平成25年2月15日 (2013.2.15)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 L 1/22 (2006.01)	A 2 3 L 1/22 E
C O 7 K 5/072 (2006.01)	C O 7 K 5/072
C O 7 K 5/093 (2006.01)	C O 7 K 5/093 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 6 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2009-514105 (P2009-514105)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成20年5月1日 (2008.5.1)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/058326		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02008/139946	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開日	平成20年11月20日 (2008.11.20)		弁理士 川口 嘉之
審査請求日	平成23年2月21日 (2011.2.21)	(74) 代理人	100090516
(31) 優先権主張番号	特願2007-123771 (P2007-123771)		弁理士 松倉 秀実
(32) 優先日	平成19年5月8日 (2007.5.8)	(74) 代理人	100089244
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甘味料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

甘味物質と、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物とを含む甘味料であって、前記化合物が、 γ -Glu-X-Gly (XはCys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-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、 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)、からなる群から選択される1種または2種以上のアミノ酸又はペプチドである、甘味料。

【請求項 2】

前記XがVal、Cys(SNO)、Cys(S-allyl)、Gly、Cys(S-Me)、Abu、t-Leu、Cle、Aib、PenまたはSerであり、前記YがGly、Val、Glu、Lys、Phe、Ser、Pro、Arg、Asp、Met、Thr、His、Orn、Asn、Cys、Gln、GlyAまたはLacAである、請求項1に記載の甘味料。

【請求項 3】

前記化合物が、 γ -Glu-VaI-Gly、及び γ -Glu-Abu-Glyから選択される、請求項1又は2に記載の甘味料。

【請求項4】

甘味物質が、アスパルテーム、スクラロース、アセスルファムK、ネオテーム、N-[N-[3-(3-ヒドロキシ-4-メトキシフェニル)プロピル]- α -アスパルチル]-L-フェニルアラニン 1-メチルエステル、サッカリン、ステビア、グリチルリチン、ソーマチン、モナティン及びモネリンからなる群から選択される1種又は2種以上である、請求項1～3のいずれか一項に記載の甘味料。

【請求項5】

甘味物質のボディー感を改善するために甘味物質に添加される添加剤であって、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤。

10

【請求項6】

甘味物質の苦味を改善するために甘味物質に添加される添加剤であって、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、甘味料、及び、甘味料の成分として用いられる甘味物質のボディー感を改善し、甘味物質特有の苦味の改善をするために用いられる添加剤に関する。

【背景技術】

20

【0002】

近年、高甘味度甘味料 (high sweetness sweetener) は、その高い甘味倍率から甘味料としてダイエット食品を始め幅広い食品分野にて活用が進んできている。特に消費量の多い飲料・菓子分野では、カロリーオフやノンカロリーのいわゆる低カロリータイプ、ノンシュガータイプとして各種高甘味度甘味料が使用されてきている。その中でも代表的に使用される高甘味度甘味料としては、アスパルテーム (APM)、スクラロース、アセスルファムK (Ace-K)、ネオテーム、N-[N-[3-(3-ヒドロキシ-4-メトキシフェニル)プロピル]- α -アスパルチル]-L-フェニルアラニン 1-メチルエステル (以下「ANS9801」と略す)、サッカリン、ステビア、グリチルリチン、ソーマチン、モネリンなどが挙げられる。

【0003】

30

しかしながら、消費者は一般的に、これまで食品に使用されてきた砂糖、果糖ブドウ糖液糖 (glucose fructose syrup) 等の甘味に長年慣れ親しんでおり、上記のような高甘味度甘味料の甘味の質に関しては好まれない場合が多い。例えば、APMは、フレーバーエンハンス効果や共存物質の苦味、エグ味 (astringency) 低減などの利用効果がある反面、後甘味の強さ (後味の甘味の強さ) や熱耐性などの保存安定性が問題点として挙げられる。スクラロースは高い安定性を有するが、フレーバーの抑制や後味の甘味のしつこさなどが問題点として挙げられる。Ace-Kは高い安定性を有するものの、中味から後甘味のしつこさ (後味にかけてのしつこい甘味) と特に苦味やエグ味が強い為、他の高甘味度甘味料との組合せで使用されることが多い。

【0004】

40

これまで、上記の高甘味度甘味料の甘味質を改良する技術としては、これらの高甘味度甘味料同士を併用することが知られている (特許文献1)。また、これらの高甘味度甘味料と、他の甘味料、例えばトレハロースやエリスリトール (特許文献2)、もしくは α -グルコシル化ステビア抽出物 (特許文献3) との併用、あるいは食物繊維 (特許文献4) との併用が報告されている。しかしながら、砂糖や果糖ブドウ糖液糖の甘味質に慣れ親しんだ消費者の嗜好を満足するには至っていないのが現状である。

【0005】

ところで、カルシウム受容体は、カルシウムセンシング受容体 (Calcium Sensing Receptor: CaSR) とも呼ばれ、7回膜貫通型受容体 (G蛋白質結合型受容体; GPCR) のクラスCに分類されるアミノ酸1078個からなる受容体である。このカルシウム受容体は、1

50

993年に遺伝子のクローニングが報告され（非特許文献1）、カルシウム等で活性化されると細胞内カルシウム上昇等を介して様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。ヒトカルシウム受容体の遺伝子配列はGenBank Accession No NM_000388として登録されており、動物間でよく保存されている。

【0006】

上記カルシウム受容体は、生体内機能に促進的にはたらく場合もあれば、抑制的にはたらく場合もある。このため、現在、神経疾患、肝臓疾患、循環器疾患、消化器疾患、その他の疾患において、カルシウム受容体に対する活性化作用を利用した治療薬と抑制剤作用を利用した治療薬が病態に応じて使い分けられている。例えば、カルシウム受容体は、副甲状腺において血中カルシウム濃度の上昇を感知し、副甲状腺ホルモン（PTH）の分泌を抑制し、血中カルシウム濃度を是正する働きを有する。従って、カルシウム受容体活性化剤は血中カルシウム濃度を低下させる効果が期待される。実際に、カルシウム受容体活性化剤を血液透析患者の続発性副甲状腺機能亢進症の治療に用いたとき、カルシウム濃度やリン濃度は上昇させずにPTH濃度を低下させることが明らかになっている。

【0007】

カルシウム受容体の機能解析は、主としてカルシウムホメオスタシスに関して行われてきたため、今日までの応用研究もカルシウム調節に関わる骨代謝性疾患が中心であった。しかし、遺伝子発現解析などの結果から、カルシウム受容体が副甲状腺や腎臓以外の生体内に広く分布していることが明らかになり（非特許文献2、3）、様々な生体機能、疾患病因に関わっている可能性が提起された。例えば、カルシウム受容体が、肝臓、心臓、肺、消化管、リンパ球、脾臓、の機能に関わることが推測されている。本発明者もラットの各組織から抽出したRNAを材料とした、RT-PCRによる解析から、生体内において広範囲の組織に発現していることを確認した。上記観点から、現在、カルシウム受容体の活性化剤や阻害剤の応用価値が急速に高まっている。

【0008】

また、カルシウム受容体活性化剤としてはカルシウムの他に、ガドリニウムなどのカチオン、ポリアルギニンなどの塩基性ペプチド、スperlミンなどのポリアミン、フェニアラニンなどのアミノ酸、などが報告されている（非特許文献4）。

非特許文献5には、低分子ペプチドであるグルタチオン（ γ -Glu-Cys-Gly）がCaSR活性化剤であることが報告されているが、CaSRが味覚受容に関わっている可能性については全く言及されていない。

【0009】

しかしながら、特定の構造を持ったアミノ酸又はペプチドがカルシウム受容体活性化剤として有用であることは知られていない。また、アスパルテームのように甘味を呈するペプチド誘導体が知られているが、カルシウム受容体活性化作用を有するアミノ酸又はペプチドが、甘味物質の甘味の質を改善し得ることは知られていない。尚、ANS9801については、特許文献5に、ネオテームについては特許文献6に記載されている。

【特許文献1】特開2005-304440

【特許文献2】特開2002-51723

【特許文献3】特開2002-34501

【特許文献4】特開2004-41118

【特許文献5】米国特許第6548096号

【特許文献6】国際公開第WO/39979号

【非特許文献1】Nature, 1993, Vol.366(6455), p.575-580

【非特許文献2】J. Endocrinol., 2000, Vol.165(2), p.173-177

【非特許文献3】Eur. J. Pharmacol., 2002, Vol.447(2-3), p.271-278

【非特許文献4】Cell Calcium, 2004, Vol.35(3), p.209-216

【非特許文献5】J. Biol. Chem., 2006, Vol.281(13), p.8864-8870

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0010】

本発明は、1)甘味の質、特にボディー感や苦味が改善された甘味料を提供すること、取り分け、甘味の質、特にボディー感や苦味が改善された高甘味度甘味料を提供すること、及び2)甘味料の成分として用いられる甘味物質のボディー感の改善や、甘味物質特有の苦味の改善に用いられる添加剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、カルシウム受容体の活性化剤を探索する過程で、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物として各種アミノ酸及びペプチドを見出し、それらが高甘味度甘味料の甘味の質を改善することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1)甘味物質と、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物とを含む甘味料。

(2)前記化合物が、 γ -Glu-X-Gly(Xは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-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)、からなる群から選択される1種または2種以上のアミノ酸またはペプチドである、(1)に記載の甘味料。

20

(3)前記XがCys(SNO)、Cys(S-allyl)、Gly、Cys(S-Me)、Abu、tLeu、Cle、Alb、PenまたはSerであり、前記YがGly、Val、Glu、Lys、Phe、Ser、Pro、Arg、Asp、Met、Thr、His、Orn、Asn、Cys、Gln、GlyAまたはLacAである、(2)に記載の甘味料。

(4)前記アミノ酸又はペプチドが、 γ -Glu-Val-Gly、及び γ -Glu-Abu-Glyから選択される、(2)又は(3)に記載の甘味料。

(5)甘味物質が、アスパルテーム、スクラロース、アセスルファムK、ネオテーム、AN S9801、サッカリン、ステビア、グリチルリチン、ソーマチン、モナティン及びモネリンからなる群から選択される1種又は2種以上である、(1)~(4)のいずれかに記載の甘味料。

30

(6)甘味物質のボディー感を改善するために甘味物質に添加される添加剤であって、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤。

(7)甘味物質の苦味を改善するために甘味物質に添加される添加剤であって、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】カルシウム受容体に対するカルシウムの作用を示す図。アフリカツメガエル卵母細胞にヒトのカルシウム受容体cRNAをマイクロインジェクションした。任意の濃度の塩化カルシウム溶液を添加した時に、流れる細胞内応答電流値を記録した。細胞内電流の最大値を応答電流値とした。コントロールとして、蒸留水をマイクロインジェクションした卵母細胞では応答しないことを確認した。

40

【図2】カルシウム受容体に対するL型アミノ酸の作用を示す図。アフリカツメガエル卵母細胞にヒトのカルシウム受容体cRNAをマイクロインジェクションした。10mMのL型アミノ酸溶液を添加した時に、流れる細胞内応答電流値を記録した。細胞内電流の最大値を応答電流値とした。コントロールとして、蒸留水をマイクロインジェクションした卵母細胞では応答しないことを確認した。

【図3】カルシウム受容体に対するD型アミノ酸の作用を示す図。アフリカツメガエル

50

卵母細胞にヒトのカルシウム受容体 cRNA をマイクロインジェクションした。10 mM の D 型アミノ酸溶液を添加した時に、流れる細胞内応答電流値を記録した。細胞内電流の最大値を応答電流値とした。コントロールとして、蒸留水をマイクロインジェクションした卵母細胞では応答しないことを確認した。

【図 4】カルシウム受容体に対するペプチドの作用を示す図。アフリカツメガエル卵母細胞にヒトのカルシウム受容体 cRNA をマイクロインジェクションした。任意の濃度のペプチド溶液を添加した時に、流れる細胞内応答電流値を記録した。細胞内電流の最大値を応答電流値とした。コントロールとして、蒸留水をマイクロインジェクションした卵母細胞では応答しないことを確認した。

【図 5】甘味物質のボディー感の強弱を示す概念図。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、甘味物質と、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物、好ましくはアミノ酸又はペプチドとを含む甘味料である。また、本発明の他の形態は、甘味物質のボディー感や苦味を改善するために甘味物質に添加される添加剤であって、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤である。さらに、本発明の他の形態は、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物を含む添加剤が添加されてなる甘味料である。

【0014】

まず、カルシウム受容体活性化作用を有するアミノ酸又はペプチドについて説明する。

20

本発明者らは、カルシウム受容体活性化作用を有するアミノ酸又はペプチドが、食品にコク味 (kokumi) を付与し得ることを見出している。そして、このようなアミノ酸又はペプチドが、甘味物質のボディー感 (body taste) や苦味 (bitterness) を改善することができるを見出した。尚、前記「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) では表せない味を意味し、基本味だけではなく、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。

【0015】

一方、本発明において甘味物質の「ボディー感」とは、甘味物質を喫食したときに、先味から中味を中心としたまとまり、濃厚感 (richness) を持つことをいう。ボディー感の改善とは、ボディー感が強化されることをいう。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 (aftertaste) という。これらは相対的な概念であるが、典型的には、先味、中味及び後味は、それぞれ喫食後 0 から 2 秒まで、3 秒から 4 秒まで、及び 5 秒以降に感じる呈味である。図 5 に、ボディー感について、縦軸に呈味の強さ、横軸に喫食後時間を示した概念図を示す。ただし、同図は概念図であって、絶対的な数値を示すものではない。

30

【0016】

本明細書中において「カルシウム受容体」とは、カルシウムセンシング受容体もしくは Calcium Sensing Receptor (CaSR) と呼ばれる、7 回膜貫通型受容体のクラス C に属するものを指す。本明細書中において「カルシウム受容体活性化剤」とは、上記カルシウム受容体に結合し、カルシウム受容体を活性化するものをいう。また、本明細書中において「カルシウム受容体を活性化する」とは、カルシウム受容体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、カルシウム受容体がこのシグナルを伝達することを「カルシウム受容体活性」という。

40

本明細書中において各アミノ酸及び各ペプチドを構成するアミノ酸は、特に断わらない限りいずれも L 体である。

【0017】

< 1 > カルシウム受容体活性化作用を有する化合物

50

カルシウム受容体活性化作用を有する化合物は、甘味物質の甘味の質を改善する効果を有する限り、アミノ酸、ペプチドもしくはこれらの誘導体や、各種低分子化合物であってもよい。また、新規な化合物であって、スクリーニングにより得られるものであってもよい。例えば、カルシウム受容体と被検物質とを反応させ、カルシウム受容体活性を検出することにより取得することができる。このようにして得られる化合物について、甘味物質、取り分け高甘味度甘味物質の甘味の質を改善する効果を有することを確認することが好ましい。

【0018】

以下に、カルシウム受容体活性化作用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。

10

1) カルシウム受容体活性を測定するためのカルシウム受容体活性測定系に被検物質を添加して、カルシウム受容体活性を測定する。

2) 被験物質を添加したときのカルシウム受容体活性と、被験物質を添加しなかったときのカルシウム受容体活性を比較する。

3) 被験物質を添加したときに高いカルシウム受容体刺激活性を示す被験物質を選択する。

【0019】

カルシウム受容体活性の測定は、例えば、カルシウム受容体を発現する細胞を用いた測定系を用いて行われる。上記細胞はカルシウム受容体を内在的に発現している細胞であっても、外来のカルシウム受容体遺伝子が導入された組み換え細胞であってもよい。上記カルシウム受容体活性測定系は上記カルシウム受容体を発現する細胞に、カルシウム受容体に特異的な細胞外リガンド（活性化剤）を加えたときに、活性化剤とカルシウム受容体との結合（反応）を検出することができるか、又は、活性化剤とカルシウム受容体との結合（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、特に制限なく使用することができる。被検物質との反応によりカルシウム受容体活性が検出された場合、当該被検物質はカルシウム受容体刺激活性を有し、甘味物質の甘味の質を改善し得る物質であることが判別される。

20

【0020】

一方、甘味物質の甘味の質を改善する効果は、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。また、被験物質として用いるアミノ酸及びペプチドは特に制限はないが、ペプチドとしては2～10のアミノ酸残基からなるペプチド又はその誘導体が好ましく、2又は3個のアミノ酸残基からなるペプチド又はその誘導体がより好ましい。また、ペプチドのN末端側のアミノ酸残基は、 γ -グルタミン酸であることが好ましい。

30

【0021】

上記カルシウム受容体は、その由来は特に制限されず、上記ヒトのカルシウム受容体のみならず、マウス、ラット、イヌなど含めた動物由来のカルシウム受容体が挙げられる。

【0022】

上述の如く、カルシウム受容体活性は、カルシウム受容体又はその断片を発現した生きた細胞、カルシウム受容体又はその断片を発現した細胞膜、カルシウム受容体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出来る。

40

以下に生きた細胞を用いた一例を示すが、この一例に限定されるものではない。

【0023】

カルシウム受容体は、アフリカツメガエル卵母細胞やハムスタ-卵巣細胞やヒト胎児腎臓細胞等の培養細胞で発現させる。これは外来遺伝子を保持するプラスミドにカルシウム受容体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。

【0024】

カルシウム受容体の発現は、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。5mM程度の濃度のカルシウムに対して、細胞内電流が見られた卵母細胞もしくは

50

は蛍光指示試薬の蛍光が見ら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、ペプチド等の被験物質を $1 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ 程度に調製し、卵母細胞もしくは培養細胞に添加することで、上記ペプチド等の被験物質のカルシウム受容体活性を測定する。

【 0 0 2 5 】

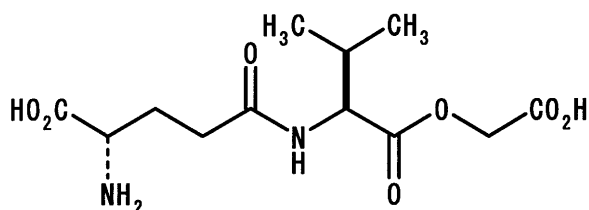
本発明において使用される化合物（以下、「本発明の化合物」と記載することがある）は、カルシウム受容体活性化作用を有する各種アミノ酸、ペプチド、もしくはこれらの誘導体、または各種低分子化合物が挙げられる（以下、単に「アミノ酸」「ペプチド」というときは、それぞれアミノ酸およびアミノ酸誘導体、ペプチドおよびペプチド誘導体のいずれをも含有する意味に用いられる場合もある）。本発明において使用されるカルシウム受容体活性化作用を有するアミノ酸又はペプチドは、甘味物質とともに喫食したときに、甘味物質のボディークセップ及び／又は苦味を改善する効果を有するアミノ酸又はペプチドであればよい。このようなアミノ酸又はペプチドとしては、例えば、 γ -Glu-X-Gly（Xは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-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)（以下、本発明のペプチド等ともいう）が挙げられる。本発明においては、これらのペプチド等は1種を用いてよく、これらの2種以上を併用してもよい。

【 0 0 2 6 】

また、ペプチドは、 γ -Glu-X-OC(H)(Z)CO₂Hの構造を有するペプチド誘導体であってもよい。ここに、式中Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表し、ZはH（水素原子）又はCH₃（メチル基）を表す。また、前記式 γ -Glu-Val-Yにおいて、YがGlyAまたはLacAである化合物であってもよい。具体例としては、 γ -Glu-Val-GlyA、 γ -Glu-tLeu-GlyA、 γ -Glu-Abu-GlyA、 γ -Glu-Val-LacA、 γ -Glu-tLeu-LacA、 γ -Glu-Abu-LacA等が好適に挙げられる。なお、GlyAとは、グリコール酸を表し、LacAとは、乳酸を表す。乳酸はS体とR体のいずれでも良いが、好ましくはS体である。これらの化合物の構造式を以下に記す。

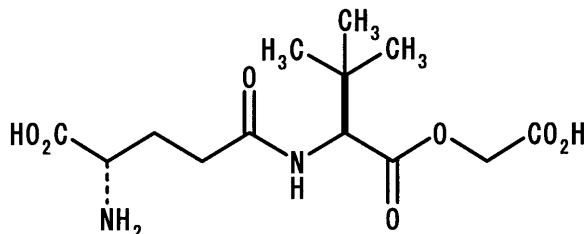
【 0 0 2 7 】

【化1】



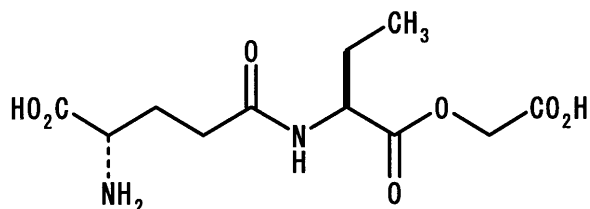
【 0 0 2 8 】

【化2】



【 0 0 2 9 】

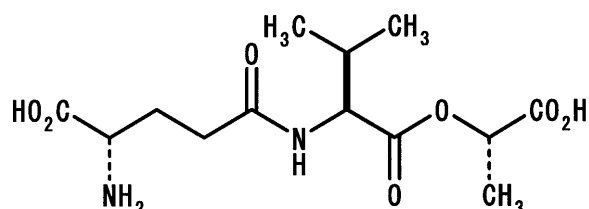
【化 3】



【 0 0 3 0 】

10

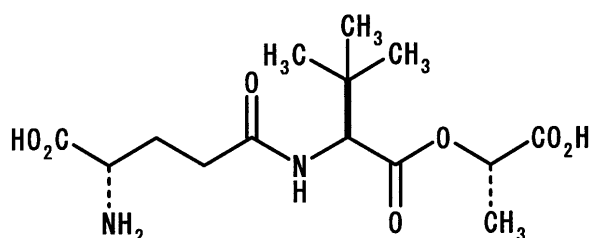
【化 4】



【 0 0 3 1 】

20

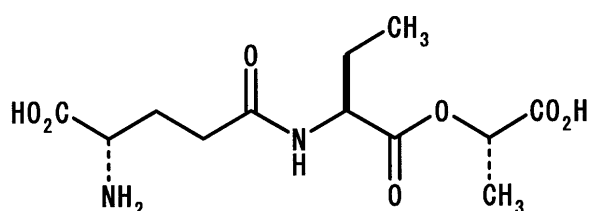
【化 5】



【 0 0 3 2 】

30

【化 6】



【 0 0 3 3 】

ここで、アミノ酸とは、Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Pro, Hyp, t-Leuなどの中性アミノ酸、Asp, Gluなどの酸性アミノ酸、Lys, Arg, Hisなどの塩基性アミノ酸、Phe, Tyr, Trpなど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、タウリンなども含有する。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-ペニシルアミンなどの非天然（非タンパク質構成）アミノ酸であっても良い。尚、ペプチド γ -Glu-X-Glyにおいて、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。

40

【 0 0 3 4 】

本明細書においてアミノ基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

50

(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	10
(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 : アスパラギン	
(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	20
(22) S a r : サルコシン	
(23) C i t : シトルリン	
(24) N - V a l : ノルバリン	
(25) N - L e u : 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)	30
(32) P e n : L - ペニシラミン (penicillamine)	

【 0 0 3 5 】

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など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、スルフォニル基や各種保護基などが挙げられ、例えば、A r g (N O₂) : N - γ - ニトロアルギニン、C y s (S N O) : S - ニトロシステイン、C y s (S - M e) : S - メチルシステイン、C y s (S - a l l y l) : S - アリルシステイン、V a l - N H₂ :
 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)
 などが含まれる。

【 0 0 3 6 】

尚、本明細書において、 γ - G l u - C y s (S N O) - 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 - M e) (O) 式中の (O) はスルフォキシド構造であることを意味する。 γ - G l u の (γ) とは、グルタミン酸の γ 位のカルボキシ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。

【 0 0 3 7 】

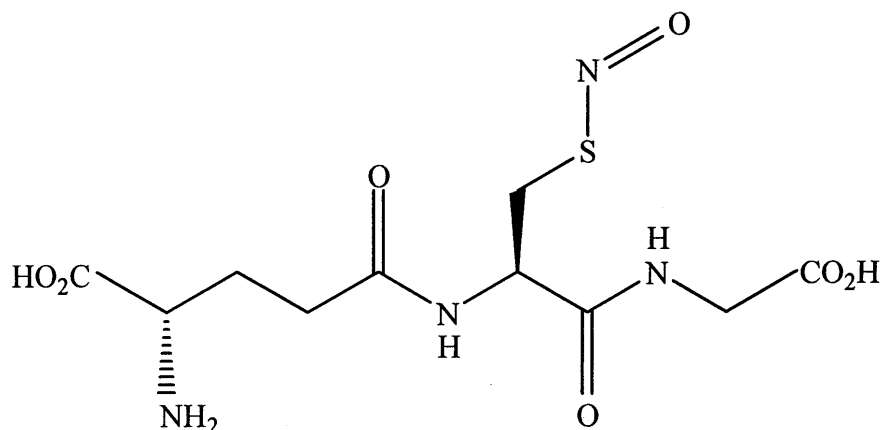
10

20

30

40

【化 7】



10

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

【 0 0 3 8 】

γ -Glu-X-Gly (Xは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-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)は、甘味物質のボディー感や苦味を改善する。

20

従って、 γ -Glu-X-Gly (Xは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-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) (以下、本発明に用いられるペプチド又はアミノ酸ともいう)は、甘味物質のボディー感や苦味を改善するために甘味物質に添加される添加剤として用いることができる。

30

【 0 0 3 9 】

本発明に用いられる化合物は単独で用いてもよく、また任意の2種又は3種以上を混合して用いることもできる。これらの中でも、 γ -Glu-X-Gly (XはCys(SNO)、Cys(S-allyl)、Gly、Cys(S-Me)、Abu、t-Leu、Cle、Aib、PenまたはSerである)、又は γ -Glu-Val-Y (YはGly、Val、Glu、Lys、Phe、Ser、Pro、Arg、Asp、Met、Thr、His、Orn、Asn、Cys、Gln、GlyAまたはLacAである)の構造式を有する化合物が好ましい。

これらの化合物のうち、中でも好ましい化合物は、 γ -Glu-Val-Gly、及び γ -Glu-Abu-Glyである。

【 0 0 4 0 】

40

上記本発明に用いられる化合物は、市販されているものであれば、市販品を用いることが可能である。また、ペプチドの場合は、(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。本発明において用いられるペプチドは、含まれるアミノ酸の残基数が2～3残基と比較的短いので、化学的に合成する方法が簡便である。化学的に合成する場合は、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、およびそれに続くペプチド精製はこの技術分野に

50

においてよく知られたものである。

【 0 0 4 1 】

また、本発明において用いられるペプチドを、酵素的な反応により生産することも出来る。例えば、国際公開パンフレットW O 2 0 0 4 / 0 1 1 6 5 3 号に記載の方法を用いることが出来る。即ち、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、アミノ基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せしめ、生成したジペプチド又はトリペプチドを精製することによっても生産することもできる。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。

10

尚、上述した様な酵素的な方法や化学的合成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、酵母エキス等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てもかまわない。

また、単離して用いる必要はなく、本発明のペプチドを多く含んでいる画分を用いてもかまわない。

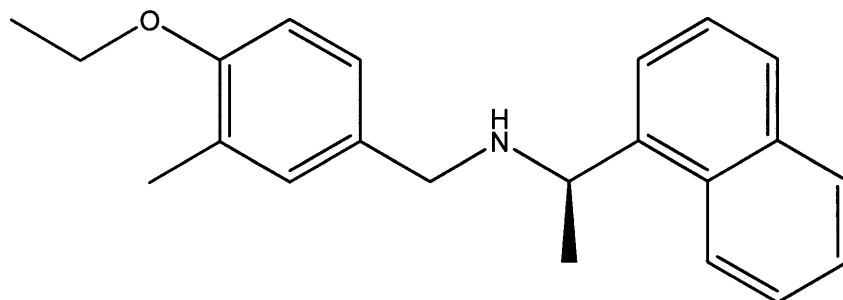
【 0 0 4 2 】

本発明において用いられる低分子化合物としてはシナカルセット（(R)-N-(3-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)プロピル)-1-(1-ナフチル)エチルアミン）及びその類縁化合物が挙げられる。シナカルセットの類縁化合物としては、下記化学式（1）で示される化合物（(R)-N-[(4-エトキシ-3-メチルフェニル)メチル]-1-(1-ナフチル)エチルアミン）または化学式（2）で示される化合物（(R)-N-(3-フェニルプロプ-2-エニル)-1-(3-メトキシフェニル)エチルアミン）等が挙げられる。これらの化合物は、例えば、米国特許第6211244号公報に記載されるような公知の方法により合成することができる。また、市販品を用いることもできる。

20

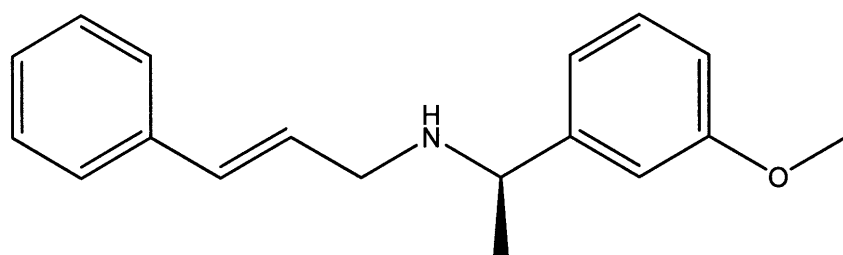
【 0 0 4 3 】

【 化 8 】



(1)

30



(2)

40

【 0 0 4 4 】

本発明において用いられる化合物は塩の形態をも包含する。本発明のペプチド及びアミノ酸が塩の形態を成し得る場合、その塩は薬理的に許容されるものであればよく、例えば、式中のカルボキシル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

50

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。式中に塩基性基が存在する場合の塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸などの無機酸との塩、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。

【0045】

10

< 2 > 本発明の添加剤及び甘味料

本発明に用いられる化合物、好ましくはペプチド及びアミノ酸は、甘味物質のボディー感を改善するために甘味物質に添加される添加剤として用いることができる。また、本発明に用いられるペプチド及びアミノ酸は、甘味物質の苦味を改善するために甘味物質に添加される添加剤として用いることができる。

前記化合物は、1種のみでもよく、2種以上の混合物であってもよい。また、本発明に用いられる化合物は、甘味物質と混合することにより、甘味料を構成することができる。

【0046】

本発明の添加剤は、例えば、上記本発明に用いられる化合物から選ばれる1種または2種以上のみで構成されていても良く、さらに、甘味料の甘味の質を改善する作用を有する他の化合物や各種添加物等を任意に添加され、構成されることも可能である。

20

【0047】

甘味物質に添加する添加剤の量は、甘味物質の甘味の質、特にボディー感を改善し得る量であれば特に制限されないが、具体的には例えば、高甘味度甘味料当たり本発明の化合物の量は、0.000001重量%~99.9999重量%、好ましくは0.00001重量%~99.999重量%、より好ましくは0.0001重量%~99.99重量%程度である。

尚、上記記載は高甘味度甘味料当たりの配合比率であるが、食品又は飲料中の本発明の化合物の使用量としては、1重量ppb~99.9重量%であり、好ましくは10重量ppb~10重量%、より好ましくは1重量ppm~1重量%程度である。

【0048】

30

本発明の甘味料は、甘味物質と、本発明に用いられる化合物とを含む。前記化合物は、1種のみでもよく、2種以上の混合物であってもよい。

甘味物質としては、高甘味度甘味料が好ましく、具体的には例えば、アスパルテーム、スクラロース、アセスルファムK、ネオテーム、ANS9801、サッカリン、ステビア、グリチルリチン、ソーマチン、モナティン、モネリンなどが挙げられる。これらの中では、アスパルテーム、スクラロース、アセスルファムKが好ましい。

甘味物質は、1種のみでもよく、2種以上の混合物であってもよい。複数の甘味物質を混合することにより、それぞれの甘味物質のボディー感を改善することができることが知られている。そのような場合であっても、本発明に用いられるペプチド又はアミノ酸を併用することによって、一層ボディー感を改善することができる。甘味物質の好ましい組合せとしては、アスパルテーム、スクラロース及びアセスルファムKから任意に選ばれる2種、又はこれら3種の組合せが挙げられる。

40

尚、好ましい組合せの例としては、アスパルテームと本発明において効果の高いと思われるγGlu-Val-Glyとの組合せが挙げられる。具体的には、重量比率で、アスパルテーム100重量部当たり0.1~500重量部となるように配合すればよい。勿論、これは配合例の1例に過ぎず、この比率にこだわる必要はない。

本発明の甘味料は、さらに、ショ糖、ブドウ糖、果糖や糖アルコール類(エリスリトール、マルチトール等)などの一般的な甘味料と混合されてもよいことは言うまでもない。本発明の甘味料の形態としては、粉末、顆粒、液体など、物性に制限はない。

【実施例】

50

【 0 0 4 9 】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【 0 0 5 0 】

〔参考例 1〕カルシウム受容体遺伝子 (c R N A) の調製

カルシウム受容体の遺伝子の調製は以下に行った。NCBIに登録されたDNA配列 (カルシウム受容体: NM_000388) 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 1)、及びリバースプライマー (配列番号 2)) を合成した。

【 0 0 5 1 】

ヒト腎臓由来の c D N A (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 で3分の後、94 で30秒、55 で30秒、72 で2分を35回繰り返した後、72 で7分反応させた。PCRによって増幅がなされたか否かをアガロ - 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検出した。同時に電気泳動したサイズ既知のDNAマ - カ - 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 - p B R 3 2 2 を制限酵素E c o R V (Takara社製) によって切断した。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DH5α株を形質転換し、PCR増幅産物がクロ - 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た。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鋳型とし、c R N A作製キット (Ambion社) を用いてカルシウム受容体遺伝子のc R N Aを作製した。

【 0 0 5 2 】

〔参考例 2〕各種試料の調製

L型アミノ酸試料として、各々特級グレードのアラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、オルニチン、タウリン (上記、味の素株式会社)、ヒドロキシプロリン (ナカライテスク株式会社) の23種類を用いた。D - C y sおよびD - T r p (ナカライテスク株式会社) 及び塩化カルシウムは特級グレードのものを用いた。

【 0 0 5 3 】

また、ペプチド試料として、γ - G l u - C y s - G l y (シグマアルドリッチジャパン株式会社)、γ - G l u - C y s (S N O) - G l y (株式会社同仁化学研究所)、γ - G l u - A l a (B a c h e m F e i n c h e m i k a l i e n A G)、γ - G l u - G l y (B a c h e m F e i n c h e m i k a l i e n A G)、γ - G l u - C y s (シグマアルドリッチジャパン株式会社)、γ - G l u - M e t (B a c h e m F e i n c h e m i k a l i e n A G)、γ - G l u - A b u - G l y (A b u : α - アミノ酪酸、B a c h e m F e i n c h e m i k a l i e n A G)、γ - G l u - T h r (国産化学株式会社)、γ - G l u - V a l (国産化学株式会社)、γ - G l u - L e u (受託合成品)、γ - G l u - I l e (受託合成品)、γ - G l u - O r n (国産化学株式会社)、A s p - G l y (受託合成品)、C y s - G l y (受託合成品)、C y s - M e t (受託合成品)、G l u - C y s (受託合成品)、G l y - C y s (受託合成品)、L e u - A s p (受託合成品)、γ - G l u - V a l - V a l (受託合成品)、γ - G l u - V a l - G l u (受託合成品)、γ - G l u - V a l - L y s (受託合成品)、γ - G l u - γ - G l u - V a l (受託合成品)、γ - G l u - G l y - G l y (受託合成品)、γ - G l u - V a l - P h e (受託合成品)、γ - G l u - V a l - S e r (受託合成品)、γ - G l u - V a l - P r o (受託合成品)、γ - G l u - V a l - A r g (受託合成品)、γ - G l u - V a l - A s p (受託合成品)、γ - G l u - V a l - M e t (受託合成品)、γ - G l u - V a l - T h r (受託合成品)、γ - G l u - V a l - H i s (受託合成品)、γ - G l u - V a l - A s n (受託合成品)、γ - G l u - V a

l - G l n (受託合成品)、γ - G l u - V a l - C y s (受託合成品)、γ - G l u - V a l - O r n (受託合成品)、γ - G l u - S e r - G l y (受託合成品)を用いた。グルタミン、システインは用事調製し、他の試料は調製後、- 20 に保存した。ペプチドは純度90%以上のものを用いた。γ - G l u - C y sのみ純度80%以上のものを用いた。

【0054】

各試料を溶解した後、pHが酸性、アルカリ性のものについては、NaOH、HClを用いて中性前後に調整した。アミノ酸、ペプチドの溶解液、アフリカツメガエル卵母細胞の調製用の溶液、卵母細胞の培養用の溶液は、以下の組成のものを使用した。96mM NaCl、2mM KCl、1mM MgCl₂、1.8mM CaCl₂、5mM Hepes、pH7.2。

【0055】

〔参考例3〕γ - G l u - V a l - G l yの合成

Boc - V a l - O H (8.69 g, 40.0 mmol)とGly - OBzl・HCl (8.07 g, 40.0 mmol)を塩化メチレン(100 ml)に溶解し、溶液を0 に保った。トリエチルアミン(6.13 ml, 44.0 mmol)、HOBT (1 - H y d r o x y b e n z o t r i a z o l e, 6.74 g, 44.0 mmol)及びWSC・HCl (1 - E t h y l - 3 - (3 - d i m e t h y l a m i n o p r o p y l) c a r b o d i i m i d e H y d r o c h l o r i d e, 8.44 g, 44.0 mmol)を溶液に加え、室温で一夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチル(200 ml)に溶解した。溶液を水(50 ml)、5%クエン酸水溶液(50 ml x 2回)、飽和食塩水(50 ml)、5%炭酸水素ナトリウム水溶液(50 ml x 2回)、飽和食塩水(50 ml)で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾過して除き、濾液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル - n - ヘキサンから再結晶してBoc - V a l - G l y - O B z l (13.2 g, 36.2 mmol)を白色結晶として得た。

【0056】

Boc - V a l - G l y - O B z l (5.47 g, 15.0 mmol)を4N - HCl / ジオキサン溶液(40 ml)に加え、室温で50分攪拌した。ジオキサンを減圧濃縮で除き、残渣にn - ヘキサン(30 ml)を加え減圧濃縮した。この操作を3回繰り返し、H - V a l - G l y - O B z l ・ HClを定量的に得た。

上記H - V a l - G l y - O B z l ・ HCl及びZ - G l u - O B z l (5.57 g, 15.0 mmol)を塩化メチレン(50 ml)に溶解し、溶液を0 に保った。トリエチルアミン(2.30 ml, 16.5 mmol)、HOBT (1 - H y d r o x y b e n z o t r i a z o l e, 2.53 g, 16.5 mmol)及びWSC・HCl (1 - E t h y l - 3 - (3 - d i m e t h y l a m i n o p r o p y l) c a r b o d i i m i d e H y d r o c h l o r i d e, 3.16 g, 16.5 mmol)を溶液に加え、室温で二夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を加熱した酢酸エチル(1500 ml)に溶解した。溶液を水(200 ml)、5%クエン酸水溶液(200 ml x 2回)、飽和食塩水(150 ml)、5%炭酸水素ナトリウム水溶液(200 ml x 2回)、飽和食塩水(150 ml)で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾過して除き、濾液を減圧濃縮した。析出した結晶を濾取、減圧乾燥してZ - G l u (V a l - G l y - O B z l) - O B z l (6.51 g, 10.5 mmol)を白色結晶として得た。

【0057】

上記Z - G l u (V a l - G l y - O B z l) - O B z l (6.20 g, 10.03 mmol)をエタノール(200 ml)に懸濁し、10%パラジウム炭素(1.50 g)を加え、水素雰囲気下に55 で5時間還元反応を行った。この間、全量で100 mlの水を徐々に加えた。触媒を桐山ロートで濾過して除き、濾液を半分に減圧濃縮した。反応液を更にメンブランフィルターで濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣を少量の

水に溶かした後にエタノールを加えて結晶を析出させ、結晶を濾過して集め減圧乾燥して γ -Glu-Val-Gly の白色粉末 (2.85 g, 9.40 mmol) を得た。

【0058】

ESI-MS: $(M+H)^+ = 304.1$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 0.87 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.99 - 2.09 (3H, m), 2.38 - 2.51 (2H, m), 3.72 (1H, t, $J = 6.35$ Hz), 3.86 (1H, d, $J = 17.8$ Hz), 3.80 (1H, d, $J = 17.8$ Hz), 4.07 (1H, d, $J = 6.8$ Hz).

10

【0059】

〔参考例4〕 γ -Glu-Cys(S-Me)-Gly の合成 [Cys(S-Me):S-メチルシステイン]

還元型グルタチオン (15.0 g, 48.8 mmol) を水 (45 ml) に加え、窒素を吹き込みながら水酸化ナトリウム (4.52 g, 2.2 当量, 107 mmol) を少しずつ加えた。ヨウ化メチル (4.56 ml, 1.5 当量, 73 mmol) を加え、密栓して室温で2時間攪拌した。濃塩酸で反応液のpHを2~3に調整し、エタノール (150 ml) を加え冷蔵庫に一夜保存した。油状物が分離したので、上澄みを除いた。残った油状物を水に溶かしエタノールを徐々に加えると、一部結晶を伴う油状物が析出したので再度上澄みを除いた。残渣を水 (300 ml) に溶解し、イオン交換樹脂 (Dowex 1-acetate, 400 ml) を充填したカラムに吸着させ、水洗した後に1N-酢酸水溶液で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、水-エタノールから再沈殿させ、 γ -Glu-Cys(S-Me)-Gly の白色粉末 (5.08 g, 15.8 mmol) を得た。

20

【0060】

FAB-MS: $(M+H)^+ = 322$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 2.14 (3H, s), 2.15 - 2.22 (2H, m), 2.50 - 2.58 (2H, m), 2.86 (1H, dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 14.0$ Hz), 3.03 (1H, dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 14.0$ Hz), 3.84 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 3.99 (2H, s), 4.59 (1H, dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz).

30

【0061】

〔参考例5〕その他ペプチドの合成

γ -Glu-Met(O)、 γ -Glu-Val-NH₂、 γ -Glu-Val-ol、 γ -Glu-Ser、 γ -Glu-Tau、 γ -Glu-Cys(S-Me)(O)、 γ -Glu-t-Leu、 γ -Glu-Cys(S-allyl)-Gly、 γ -Glu-Cys(S-Me) は参考例3および参考例4に準じて合成した。

【0062】

〔参考例6〕カルシウム受容体の活性化作用の評価

カルシウム受容体の活性化作用の評価には、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたCa濃度イオン依存性Clイオン電流測定法を用いた。カルシウム受容体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に、各活性化剤を添加すると、細胞内のCaイオンが増加する。次にCa濃度イオン依存性Clチャネルが開き、イオン電流として細胞内電流値が変化する。この細胞内電流値の変化を測定することで、カルシウム受容体の活性化作用の有無を知り得ることができる。

40

【0063】

具体的には、アフリカツメガエル腹部を切開し、卵塊を取り出した後、1%コラゲナーゼ溶液により20分で2時間処理することで個々の卵母細胞を得た。1個あたりの卵母細胞

50

胞に、マイクロガラスキャピラリーを用いて50 nlの1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 受容体cRNAもしくは50 nlの滅菌水を導入し、18 で2～3日培養した。培養時には、参考例2で示した溶液に2 mMピルビン酸と10 U/mlペニシリンと10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを加えたものを使用した。培養後、cRNAを注入した卵母細胞もしくは滅菌水を注入した卵母細胞に対し、試験溶液を添加した。電気生理学的測定は、増幅器GeneClamp 500 (Axon社製) および記録用ソフトAxoScope 9.0 (Axon社製) を用いて行った。卵母細胞を2電極膜電位固定法により-70 mVに膜電位固定し、Ca濃度イオン依存性Clイオンを介した細胞内電流を測定した。細胞内電流の最大値を応答電流値とした。

【0064】

10

〔参考例7〕カルシウム受容体に対するカルシウムの活性化作用の評価

参考例6に記載した方法を用い、カルシウム受容体に対するカルシウムの活性化作用を評価した。すなわち、カルシウム受容体のcRNAもしくは滅菌水を注入した卵母細胞を調製し、2電極膜電位固定法により-70 mVに膜電位固定した。膜電位固定された卵母細胞に、カルシウム(2 mM、5 mM、10 mM、20 mM)を添加し、Ca濃度イオン依存性Cl応答電流を測定した。結果は図1に示した。この結果より、卵母細胞に注入したカルシウム受容体のcRNAが機能的に発現していることが確認された。また、水を注入した卵母細胞は、高い濃度のカルシウムにも反応していないことから、卵母細胞自身にはカルシウム受容体が発現していないことが確認された。

【0065】

20

〔参考例8〕カルシウム受容体に対するL型アミノ酸の活性化作用の評価

参考例6に記載した方法を用い、カルシウム受容体に対するL型アミノ酸の活性化作用を評価した。すなわち、カルシウム受容体のcRNAもしくは滅菌水を注入した卵母細胞を調製し、2電極膜電位固定法により-70 mVに膜電位固定した。膜電位固定された卵母細胞に、アラニン(10 mM)、アルギニン(10 mM)、アスパラギン(10 mM)、アスパラギン酸(10 mM)、システイン(10 mM)、グルタミン(10 mM)、グルタミン酸(10 mM)、グリシン(10 mM)、ヒスチジン(10 mM)、イソロイシン(10 mM)、ロイシン(10 mM)、リジン(10 mM)、メチオニン(10 mM)、フェニルアラニン(10 mM)、プロリン(10 mM)、セリン(10 mM)、トレオニン(10 mM)、トリプトファン(10 mM)、チロシン(10 mM)、バリン(10 mM)、オルニチン(10 mM)、タウリン(10 mM)、又はヒドロキシプロリン(10 mM)を添加し、Ca濃度イオン依存性Cl応答電流を測定した。結果は図2に示した。この結果より、システイン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンがカルシウム受容体に対する明瞭な活性化作用を有することが示された。なお、上記アミノ酸についてはProc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25; 97(9): 4814-9で活性化作用が報告されている。

30

【0066】

〔参考例9〕カルシウム受容体に対するD-システインの活性化作用の評価

参考例6に記載した方法を用い、カルシウム受容体に対するD-システインの活性化作用を評価した。すなわち、カルシウム受容体のcRNAもしくは滅菌水を注入した卵母細胞を調製し、2電極膜電位固定法により-70 mVに膜電位固定した。膜電位固定された卵母細胞に、D-システイン(10 mM)、L-システイン(10 mM)、D-トリプトファン(10 mM)又はL-トリプトファン(10 mM)を添加し、Ca濃度イオン依存性Cl応答電流を測定した。結果は図3に示した。この結果より、D-システインがカルシウム受容体に対する明瞭な活性化作用を有することが示された。

40

【0067】

〔参考例10〕カルシウム受容体に対するペプチドの活性化作用の評価

参考例6に記載した方法を用い、カルシウム受容体に対するペプチドの活性化作用を評価した。すなわち、カルシウム受容体のcRNAもしくは滅菌水を注入した卵母細胞を調製し、2電極膜電位固定法により-70 mVに膜電位固定した。膜電位固定された卵母細胞

50

胞に、 γ -Glu-Cys-Gly (50 μ M)、 γ -Glu-Cys(SNO)-Gly (50 μ M)、 γ -Glu-Ala (50 μ M)、 γ -Glu-Gly (500 μ M)、 γ -Glu-Cys (50 μ M)、 γ -Glu-Met (500 μ M)、 γ -Glu-Thr (50 μ M)、 γ -Glu-Val (50 μ M)、 γ -Glu-Orn (500 μ M)、Asp-Gly (1 mM)、Cys-Gly (1 mM)、Cys-Met (1 mM)、Glu-Cys (50 μ M)、Gly-Cys (500 μ M)、Leu-Asp (1 mM) を添加し、Ca 濃度イオン依存性 Cl 応答電流を測定した。結果は図 4 に示した。この結果より、上記ペプチドは、カルシウム受容体に対する活性化作用を有することが示された。

【0068】

10

〔参考例 11〕カルシウム受容体に対するペプチドの活性化作用の評価

参考例 10 と同様に、カルシウム受容体に対するペプチドの活性化作用を評価した。膜に電位固定された卵母細胞に、表 1 の各ペプチドについて、1000 μ M、300 μ M、100 μ M、30 μ M、10 μ M、3 μ M、1 μ M、0.3 μ M、0.1 μ M を添加し、Ca 濃度イオン依存性 Cl 応答電流を測定した。電流が検出された最低濃度を表 1 に活性として示した。この結果より、これら 32 種類のペプチドは、カルシウム受容体に対する活性化作用を有することが明らかとなった。

【0069】

【表 1】

表 1

番号	ペプチド	活性
1	γ -Glu-Met(O)	1000 μ M
2	γ -Glu-Val-Val	1000 μ M
3	γ -Glu-Val-Glu	1000 μ M
4	γ -Glu-Val-Lys	1000 μ M
5	γ -Glu-Val-Arg	1000 μ M
6	γ -Glu-Val-Asp	1000 μ M
7	γ -Glu-Val-Met	1000 μ M
8	γ -Glu-Val-Thr	1000 μ M
9	γ -Glu- γ -Glu-Val	1000 μ M
10	γ -Glu-Val-NH ₂	1000 μ M
11	γ -Glu-Val-ol	1000 μ M
12	γ -Glu-Ser	300 μ M
13	γ -Glu-Tau	300 μ M
14	γ -Glu-Cys(S-Me)(O)	300 μ M
15	γ -Glu-Val-His	100 μ M
16	γ -Glu-Val-Orn	100 μ M
17	γ -Glu-Leu	100 μ M
18	γ -Glu-Ile	100 μ M
19	γ -Glu-t-Leu	100 μ M
20	γ -Glu-Cys(S-allyl)-Gly	100 μ M
21	γ -Glu-Val-Asn	30 μ M
22	γ -Glu-Gly-Gly	30 μ M
23	γ -Glu-Val-Phe	30 μ M
24	γ -Glu-Val-Ser	30 μ M
25	γ -Glu-Val-Pro	30 μ M
26	γ -Glu-Ser-Gly	30 μ M
27	γ -Glu-Cys(S-Me)	30 μ M
28	γ -Glu-Val-Cys	10 μ M
29	γ -Glu-Val-Gln	10 μ M
30	γ -Glu-Abu-Gly	3 μ M
31	γ -Glu-Cys(S-Me)-Gly	3 μ M
32	γ -Glu-Val-Gly	0.1 μ M

【 0 0 7 0 】

〔参考例 1 2〕本発明に用いられるペプチド及びアミノ酸のコク味付与活性

カルシウム受容体活性化作用が見出された、 γ -Glu-X-Gly (X はCys(SNO)、Cys(S-allyl)、Gly、Cys(S-Me)、AbuまたはSerである)、 γ -Glu-Val-Y (YはGly、Val、Glu、Lys、Phe、Ser、Pro、Arg、Asp、Met、Thr、His、Orn、Asn、CysまたはGlnである)、 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

10

20

30

40

50

-Me) (0)、 γ -Glu-Leu、 γ -Glu-Ile、 γ -Glu-t-Leuおよび γ -Glu-Cys (S-Me)、の中から代表例を選んで、官能評価試験によりコク味付与活性の有無を調べた。

【0071】

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)、塩化カルシウム (1 mM) を含有する蒸留水に、試料としてアリイン (alliin: S-allyl-cysteine sulfoxide、コク味付与活性のコントロール)、 γ -Glu-Cys-Gly、 γ -Glu-Cys、 γ -Glu-Ala、又は γ -Glu-Valをそれぞれ0.2 g/dlで混合した場合の、コク味付与活性の有無を判定した。なお試料溶解後に酸性を呈したサンプルについては、NaOHでpH 6.8 ~ 7.2 に合わせてから使用した。結果を表2に示した。

10

【0072】

【表2】

表2 カルシウム受容体促進剤のコク味付与活性

カルシウム受容体促進剤	コク味付与活性
γ Glu-Cys-Gly	+
γ Glu-Cys	+
γ Glu-Ala	+
γ Glu-Val	+

20

【0073】

〔参考例13〕本発明に用いられるペプチドのコク味付与活性

カルシウム受容体活性化作用が見出されたペプチド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 γ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン)、 γ -Glu-Ala、 γ -Glu-Met、又は γ -Glu-Valをそれぞれ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。なお試料溶解後に酸性を呈したサンプルについては、NaOHでpH 6.8 ~ 7.2 に合わせて使用した。尚、グルタチオンは、食品にコク味を付与し得ることが知られているため、比較対照として用いた。官能評点について、コントロール：0点、グルタチオン添加：3点として、n = 3で実施し、結果を表3に示した。尚、「先中味」とは、先味と中味を合わせたものである。

30

【0074】

【表3】

表3

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	0.1	3.0	3.0	厚み、ひろがり、持続性が強くなる。
γ Glu-Ala	0.1	0.5	0.2	効果は弱い、わずかに厚みが強くなる。
γ Glu-Met	0.1	1.5	0.4	やや厚み、ひろがりが強くなる。
γ Glu-Val	0.1	3.0	1.0	先中味中心に厚み、ひろがりが強くなる。

40

【0075】

〔参考例14〕本発明に用いられるペプチドのコク味付与活性

50

カルシウム受容体活性化作用が見出されたペプチド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 γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）、 γ -Glu-Cys、 γ -Glu-Val、又は γ -Glu-Val-Gly をそれぞれ 0.1 g / dl、必要に応じて 0.01 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。なお試料溶解後に酸性を呈したサンプルについては、NaOH で pH 6.8 ~ 7.2 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、グルタチオン添加：3 点として、n = 5 で実施し、結果を表 4 に示した。

【0076】

【表 4】

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	0.1	3.0	3.0	厚み、ひろがり、持続性が強くなる。
γ Glu-Cys	0.1	2.0	2.0	γ Glu-Cys-Gly に比し、やや弱いが同等の効果である。
γ Glu-Val	0.1	3.0	1.0	先中味中心に厚み、ひろがりが強くなる。
γ Glu-Val-Gly	0.1	*	*	*
γ Glu-Val-Gly	0.01	3.0	3.0	厚み、持続性を中心に強くなる。味全体が強まる。

*測定不能：コク味付与活性が強すぎ官能評価にて測定不能であった。

【0077】

〔参考例 15〕本発明に用いられるペプチドのコク味付与活性

カルシウム受容体活性化作用が見出されたペプチド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。

【0078】

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 γ -Glu-Cys-Gly（グルタチオン）、 γ -Glu-Abu-Gly、又は γ -Glu-Val-Gly をそれぞれ 0.1 g / dl、もしくは 0.01 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。なお試料溶解後に酸性を呈したサンプルについては、NaOH で pH 6.8 ~ 7.2 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、グルタチオン添加：3 点として、n = 12 で実施し、結果を表 5 に示した。

【0079】

【表 5】

表 5

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	0.1	3.0	3.0	厚み、ひろがり、持続性が強くなる。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	3.0	2.0	先中味中心に厚み、ひろがりが強くなる。
γ Glu-Val-Gly	0.01	3.0	3.0	厚み、持続性を中心に強くなる。味全体が強まる。

【0080】

〔実施例 1〕本発明に用いられる化合物の甘味に対する活性（I）

カルシウム受容体活性化作用、及びコク味付与活性が見出されたペプチドについて、定量的な官能評価試験により、代表的な高甘味度甘味料に対する活性（ボディー感改善、苦味改善）を調べた。

【0081】

定量的官能評価試験は以下のように実施した。各甘味料の標準液として、以下のものを用いた。以下の各標準液は、甘味度がほぼ同じ程度となる濃度として調整されている。

- i) ショ糖 (5 g / d l)
- ii) APM (0 . 0 2 5 g / d l)
- iii) スクラロース (0 . 0 0 8 g / d l)
- iv) Ace-K (0 . 0 2 5 g / d l)

尚、各高甘味度甘味料に対するペプチド類の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

【 0 0 8 2 】

各甘味料を含有する蒸留水に、試料として γ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン)、 γ -Glu-Val-Gly 又は γ -Glu-Abu-Gly、をそれぞれ 0 . 0 0 0 1 ~ 1 g / d l となるように混合した場合の、それぞれ甘味に対するボディー感改善と苦味改善の程度を測定した。

なお試料溶解後に試料無添加標準液に対し酸性を呈したサンプルについては、NaOH で標準液の pH に対し $pH \pm 0.2$ の幅に合わせて使用した。

【 0 0 8 3 】

ボディー感改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、グルタチオン及び / 又は本発明のペプチドを添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い: - 2 点、やや弱い: - 1 点、やや強い: 1 点、強い: 2 点として、 $n = 12$ で実施した。0 点より高ければ、ボディー感改善効果があることを意味する。

一方、苦味の改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、グルタチオン及び / 又は本発明のペプチドを添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い: - 2 点、やや弱い: - 1 点、やや強い: 1 点、強い: 2 点として、 $n = 12$ で実施した。0 点より低ければ、苦味改善効果があることを意味する。

評価の結果、上記添加濃度で幅広く活性を示したが、代表的な濃度での結果を表 6 ~ 8 に示した。表 6、7、8 に示した結果から分かるように、本発明のペプチド類はグルタチオンより低濃度で、ボディー感向上効果が認められた。また、本発明のペプチドには苦味改善効果が認められた。総じてペプチド類の添加によるボディー感向上、苦味の低減によりショ糖に近い甘味質を感じる。

【 0 0 8 4 】

【表 6】

表 6

試料 ii) APM	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	-0.5	全体的な甘味が強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.5	-0.2	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.5	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.7	-0.1	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.5	-0.1	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

【 0 0 8 5 】

【表 7】

表 7

試料 iii) スクラロース	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	0	中味にひろがりある甘味強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.1	先味と後味の突出した甘味をまとめる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.2	先味と後味の突出した甘味をまとめる。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.5	-0.1	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.0	-0.1	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

【表 8】

表 8

試料 iv) Ace-K	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディ感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	-0.6	中味から後味の甘味強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.6	中味にひろがりある甘味強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.2	-1.2	中味にひろがりある甘味強まる。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.5	-0.6	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.1	-1.2	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

10

【 0 0 8 7 】

〔実施例 2〕本発明に用いられる化合物の甘味に対する活性 (II)

カルシウム受容体活性化作用、及びコク味付与活性が見出されたペプチドについて、定量的な官能評価試験により高甘味度甘味料の代表的な組み合わせ配合品に対する効果 (ボディ感改善、苦味改善) を調べた。

【 0 0 8 8 】

定量的官能評価試験は以下のように実施した。各甘味料の組合せ標準液として、以下のものを用いた。以下の各標準液は、甘味度がほぼ同じ程度となる濃度として調整されている。

20

i) ショ糖 (5 g / d l)

ii) APM (0.02 g / d l) + Ace-K (0.005 g / d l) [甘味度比として APM : Ace-K = 8 : 2]

iii) スクラロース (0.0058 g / d l) + Ace-K (0.0075 g / d l) [甘味度比としてスクラロース : Ace-K = 7 : 3]

iv) APM (0.0125 g / d l) + スクラロース (0.0042 g / d l) [甘味度比として APM : スクラロース = 1 : 1]

v) APM (0.0125 g / d l) + スクラロース (0.0021 g / d l) + Ace-K (0.0063 g / d l) [甘味度比として APM : スクラロース : Ace-K = 2 : 1 : 1]

尚、各高甘味度甘味料に対するペプチド類の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

30

【 0 0 8 9 】

上記の各甘味料を含有する蒸留水に、試料として γ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン)、 γ -Glu-Val-Gly 又は γ -Glu-Abu-Gly をそれぞれ 0.0001 ~ 1 g / d l にて混合した場合の、それぞれ甘味に対するボディ感改善及び苦味改善の程度を測定した。各高甘味度甘味料に対するペプチド類の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

なお試料溶解後に、試料無添加標準液に比べて酸性を呈したサンプルについては、NaOH で標準液の pH に対し pH $\pm$ 0.2 の幅に合わせて使用した。

【 0 0 9 0 】

ボディ感改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、グルタチオン及び / 又は本発明のペプチドを添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い : -2 点、やや弱い : -1 点、やや強い : 1 点、強い : 2 点として、n = 12 で実施した。0 点より高ければ、ボディ感改善効果があることを意味する。

40

一方、苦味の改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、グルタチオン及び / 又は本発明のペプチドを添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い : -2 点、やや弱い : -1 点、やや強い : 1 点、強い : 2 点として、n = 12 で実施した。0 点より低ければ、苦味改善効果があることを意味する。

評価の結果、上記添加濃度で幅広く活性を示したが、代表的な濃度での結果を表 9 ~ 12 に示した。表 9 ~ 12 に示した結果から分かるように、本発明のペプチド類はグルタチオンより低濃度で、ボディ感向上効果が認められた。また、本発明のペプチドには苦味

50

改善効果も認められた。総じてペプチド類の添加によるボディー感向上、苦味の低減によりシヨ糖に近い甘味質を感じる。

【 0 0 9 1 】

【表 9】

表 9

試料ii) APM : Ace-K = 8 : 2	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	-0.3	全体的な甘味が強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.3	中味にひろがりある甘味強まる。後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.6	-0.3	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.3	-0.7	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

10

【 0 0 9 2 】

【表 10】

表 10

試料iii) スクラース : Ace-K = 7 : 3	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	-0.3	中味の甘味が強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.3	全体的にまとめる。しつこさ抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	全体的にまとめる。しつこさ抑えてキレがよい。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.5	-0.3	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.1	-0.7	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

20

【 0 0 9 3 】

【表 11】

表 11

試料iv) APM : スクラース = 1 : 1	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.0	-0.3	中味の甘味が強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.2	全体的にまとまりしっかりした味となる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.4	全体的にまとまりしっかりした味となる。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.6	-0.1	まとまりあり。先味中味の甘味が強まる。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.3	-0.1	まとまりあり。先味中味の甘味が強まる。

30

【 0 0 9 4 】

40

【表 1 2】

表 1 2

試料(v) APM :スクラロース: Ace-K=2 : 1 : 1	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディーク感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Cys-Gly	0.05	1.2	-0.3	全体的な甘味が強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.3	全体的にまとめる。しつこさ抑えて後味のキレをよくする。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	全体的にまとめる。しつこさ抑えて後味のキレをよくする。
γ Glu-Abu-Gly	0.001	0.6	-0.4	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。
γ Glu-Abu-Gly	0.01	1.3	-0.8	先味中味の甘味が強まる。後に残る甘味抑える。

10

〔実施例 3〕本発明に用いられる化合物の甘味に対する活性 (III)

カルシウム受容体活性化作用、及びコク味付与活性が見出されたペプチド、及びカルシウム受容体活性化作用を有することが知られているシナカルセット (Cinacalcet) について、定量的な官能評価試験により、代表的な高甘味度甘味料に対する活性 (ボディーク感改善、苦味改善) を調べた。

【0095】

定量的官能評価試験は以下のように実施した。各甘味料の標準液として、以下のものを用いた。以下の各標準液は、甘味度がほぼ同じ程度となる濃度として調整されている。

20

i) ショ糖 (5 g / d l)

ii) APM (0.025 g / d l)

iii) スクラロース (0.008 g / d l)

iv) Ace-K (0.025 g / d l)

尚、各高甘味度甘味料に対する試料の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

【0096】

各甘味料を含有する蒸留水に、試料として γ - G l u - V a l - G l y 又はシナカルセットをそれぞれ 0.0001 ~ 1 g / d l となるように混合した場合の、それぞれ甘味に対するボディーク感改善と苦味改善の程度を測定した。

30

なお試料溶解後に試料無添加標準液に対し酸性を呈したサンプルについては、NaOH で標準液の pH に対し $pH \pm 0.2$ の幅に合わせて使用した。

【0097】

ボディーク感改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い: -2 点、やや弱い: -1 点、やや強い: 1 点、強い: 2 点として、 $n = 12$ で実施した。0 点より高ければ、ボディーク感改善効果があることを意味する。

一方、苦味の改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い: -2 点、やや弱い: -1 点、やや強い: 1 点、強い: 2 点として、 $n = 12$ で実施した。0 点より低ければ、苦味改善効果があることを意味する。

40

評価の結果、上記添加濃度で幅広く活性を示したが、代表的な濃度での結果を表 13 ~ 15 に示した。表 13 ~ 15 に示した結果から分かるように、γ - G l u - V a l - G l y 及びシナカルセットは、同程度の濃度で、ボディーク感向上効果が認められた。また、本発明の試料には苦味改善効果が認められた。総じて試料の添加によるボディーク感向上、苦味の低減によりショ糖に近い甘味質を感じる。

【0098】

【表 1 3】

表 1 3

試料 ii) APM	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ホテター感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.5	-0.2	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.5	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
シナルセット	0.0001	0.8	-0.2	後に残る甘味を抑える。中～後味のひろがりあり。
シナルセット	0.001	1.5	-0.5	後に残る甘味を抑える。中～後味のひろがりあり。

【 0 0 9 9 】

10

【表 1 4】

表 1 4

試料 iii) スクラロス	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ホテター感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.1	先味と後味の突出した甘味をまとめる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.2	先味と後味の突出した甘味をまとめる。
シナルセット	0.0001	0.5	-0.1	先味と後味の突出した甘味をまとめる。
シナルセット	0.001	1.1	-0.2	先味と後味の突出した甘味をまとめる。

20

【 0 1 0 0 】

【表 1 5】

表 1 5

試料 iv) Ace-K	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ホテター感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.6	中味にひろがりある甘味強まる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.2	-1.2	中味にひろがりある甘味強まる。
シナルセット	0.0001	0.6	-0.2	中～後味のひろがりある甘味強まる。
シナルセット	0.001	1.1	-0.3	中～後味のひろがりある甘味強まる。

30

【 0 1 0 1 】

〔実施例 4〕本発明に用いられる化合物の甘味に対する活性 (IV)

カルシウム受容体活性化作用、及びコク味付与活性が見出されたペプチド、及びカルシウム受容体活性化作用を有することが知られているシナルセット (Cinacalcet) について、定量的な官能評価試験により高甘味度甘味料の代表的な組み合わせ配合品に対する効果 (ホテター感改善、苦味改善) を調べた。

【 0 1 0 2 】

定量的官能評価試験は以下のように実施した。各甘味料の組合せ標準液として、以下のものを用いた。以下の各標準液は、甘味度がほぼ同じ程度となる濃度として調整されている。

40

i) ショ糖 (5 g / d l)

ii) APM (0.02 g / d l) + Ace-K (0.005 g / d l) [甘味度比として APM : Ace-K = 8 : 2]

iii) スクラロス (0.0058 g / d l) + Ace-K (0.0075 g / d l) [甘味度比として スクラロス : Ace-K = 7 : 3]

iv) APM (0.0125 g / d l) + スクラロス (0.0042 g / d l) [甘味度比として APM : スクラロス = 1 : 1]

v) APM (0.0125 g / d l) + スクラロス (0.0021 g / d l) + Ace-K

50

(0.0063 g / dl) [甘味度比としてAPM :スクラロース : Ace-K = 2 : 1 : 1]

尚、各高甘味度甘味料に対するペプチド類の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

【0103】

上記の各甘味料を含有する蒸留水に、試料として γ -Glu-Val-Gly又はシナカルセットをそれぞれ0.0001~1 g / dlにて混合した場合の、それぞれ甘味に対するボディー感改善及び苦味改善の程度を測定した。各高甘味度甘味料に対する試料の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

なお試料溶解後に、試料無添加標準液に比べて酸性を呈したサンプルについては、NaOHで標準液のpHに対し $pH \pm 0.2$ の幅に合わせて使用した。

【0104】

ボディー感改善についての官能評価は、コントロール(蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの)を0点として、コントロールを基準に、弱い:-2点、やや弱い:-1点、やや強い:1点、強い:2点として、n=12で実施した。0点より高ければ、ボディー感改善効果があることを意味する。

一方、苦味の改善についての官能評価は、コントロール(蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの)を0点として、コントロールを基準に、弱い:-2点、やや弱い:-1点、やや強い:1点、強い:2点として、n=12で実施した。0点より低ければ、苦味改善効果があることを意味する。

評価の結果、上記添加濃度で幅広く活性を示したが、代表的な濃度での結果を表16~19に示した。表16~19に示した結果から分かるように、 γ -Glu-Val-Gly及びシナカルセットは、同程度の濃度で、ボディー感向上効果が認められた。また、本発明の試料には苦味改善効果も認められた。総じて試料の添加によるボディー感向上、苦味の低減によりショ糖に近い甘味質を感じる。

【0105】

【表16】

表16

試料ii) APM : Ace-K = 8 : 2	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.3	中味にひろがりある甘味強まる。後に残る甘味を抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	後に残る甘味を抑えてキレがよい。
シカルセット	0.0001	0.5	-0.1	中〜後味のひろがりある甘味強まる。
シカルセット	0.001	1.1	-0.3	中〜後味のひろがりある甘味強まる。

【0106】

【表17】

表17

試料iii) スクラロース : Ace-K = 7 : 3	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディー感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.7	-0.3	全体的にまとめる。しつこさ抑えてキレがよい。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	全体的にまとめる。しつこさ抑えてキレがよい。
シカルセット	0.0001	0.8	-0.1	中〜後味の厚み、ひろがりある甘味強まる。
シカルセット	0.001	1.5	-0.3	中〜後味の厚み、ひろがりある甘味強まる。

【0107】

【表 18】

表 18

試料iv) APM : スクロース = 1 : 1	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディ感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.2	全体的にまとまりしっかりした味となる。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.4	全体的にまとまりしっかりした味となる。
シナカルセット	0.0001	0.5	-0.2	中味の厚み、ひろがりある甘味強まる。
シナカルセット	0.001	1.1	-0.2	中味の厚み、ひろがりある甘味強まる。

10

【0108】

【表 19】

表 19

試料v) APM : スクロース: Ac e-K=2 : 1 : 1	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディ感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.6	-0.3	全体的にまとめる。しつこさ抑えて後味のキレをよくする。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.3	-0.7	全体的にまとめる。しつこさ抑えて後味のキレをよくする。
シナカルセット	0.0001	0.5	-0.2	中～後味のまとまり、濃厚感あり。
シナカルセット	0.001	1.1	-0.4	中～後味のまとまり、濃厚感あり。

20

【実施例 5】本発明に用いられる化合物の高甘味度甘味料使用ドリンクヨーグルトにおける活性

カルシウム受容体活性化作用、及びコク味付与活性が見出されたペプチド、及びカルシウム受容体活性化作用を有することが知られているシナカルセット (Cinacalcet) について、定量的な官能評価試験により、代表的な高甘味度甘味料使用ドリンクヨーグルトにおける活性 (ボディ感改善、苦味改善) を調べた。

【0109】

30

定量的官能評価試験は以下のように実施した。各甘味料のドリンクヨーグルト標準液として、以下のものを用いた。以下の各標準液は、甘味度がほぼ同じ程度となる濃度として調整されている。

i) ショ糖 (5 g / d l)

ii) APM (0.025 g / d l)

尚、各高甘味度甘味料に対する試料の添加効果は、ショ糖を参照して評価した。

【0110】

各甘味料を含有するドリンクヨーグルトに、試料として γ - G l u - V a l - G l y 又はシナカルセットをそれぞれ 0.0001 ~ 1 g / d l となるように混合した場合の、それぞれ甘味に対するボディ感改善と苦味改善の程度を測定した。

40

なお試料溶解後に試料無添加標準液に対し酸性を呈したサンプルについては、NaOH で標準液の pH に対し pH ± 0.2 の幅に合わせて使用した。

【0111】

ボディ感改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い : - 2 点、やや弱い : - 1 点、やや強い : 1 点、強い : 2 点として、n = 12 で実施した。0 点より高ければ、ボディ感改善効果があることを意味する。

一方、苦味の改善についての官能評価は、コントロール (蒸留水のみ添加し、試料を添加していないもの) を 0 点として、コントロールを基準に、弱い : - 2 点、やや弱い : - 1 点、やや強い : 1 点、強い : 2 点として、n = 12 で実施した。0 点より低ければ、苦

50

味改善効果があることを意味する。

評価の結果、上記添加濃度で幅広く活性を示したが、代表的な濃度での結果を表20に示した。表20に示した結果から分かるように、 γ -Glu-Val-Gly及びシナカルセットは、同程度の濃度で、ボディ感向上効果が認められた。また、本発明の試料には苦味改善効果が認められた。総じて試料の添加によるボディ感向上、苦味の低減によりショ糖に近い甘味質を感じる。

【0112】

【表20】

表20

試料 ii)APM	濃度 (g/dl)	呈味		評価コメント
		ボディ感	苦味	
コントロール	—	0	0	—
γ Glu-Val-Gly	0.0001	0.5	-0.2	後に残る甘味を抑える。
γ Glu-Val-Gly	0.001	1.4	-0.5	中味のひろがりあり。後に残る甘味を抑える。
シナカルセット	0.0001	0.5	-0.2	後に残る甘味を抑える。
シナカルセット	0.001	1.6	-0.1	厚みあり。後に残る甘味を抑える。

10

【産業上の利用可能性】

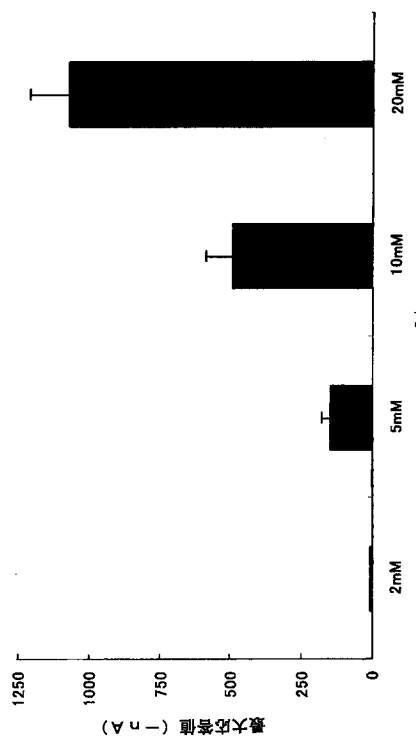
【0113】

甘味料、特に、アスパルテーム等の高甘味度甘味料に、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物、好ましくはアミノ酸又はペプチドとを組み合わせることで、アスパルテーム等の高甘味度甘味料のボディ感や苦味が改善される。このように、甘味のボディ感や苦味が改善された本発明の甘味料は飲料、氷菓等をはじめとして食品全般に広く利用できる。

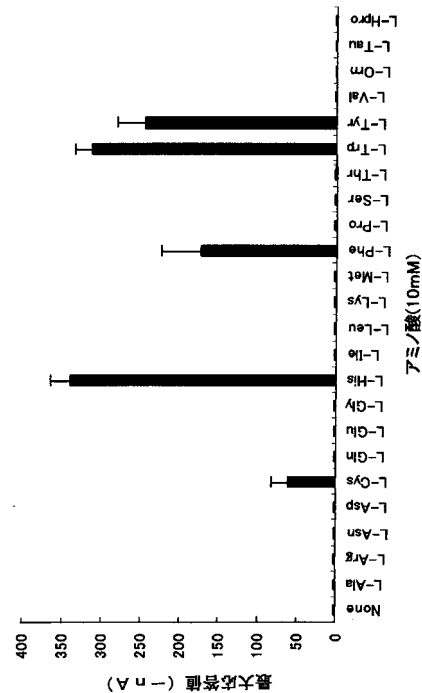
20

また、カルシウム受容体活性化作用を有する化合物は甘味料、特に、高甘味度甘味料のボディ感、苦味を改善できる添加剤として広く利用され得る。

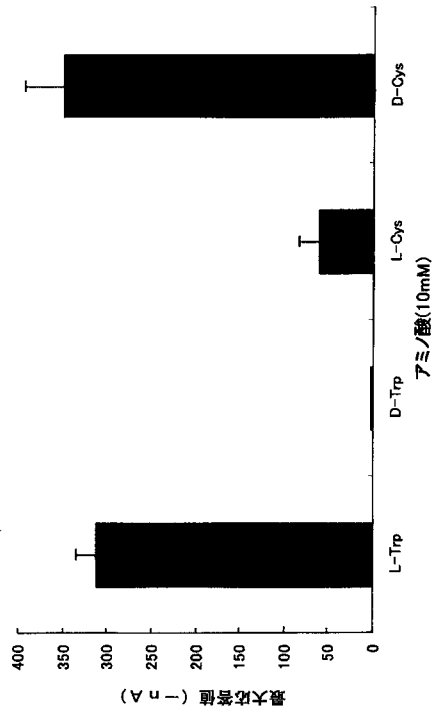
【図1】



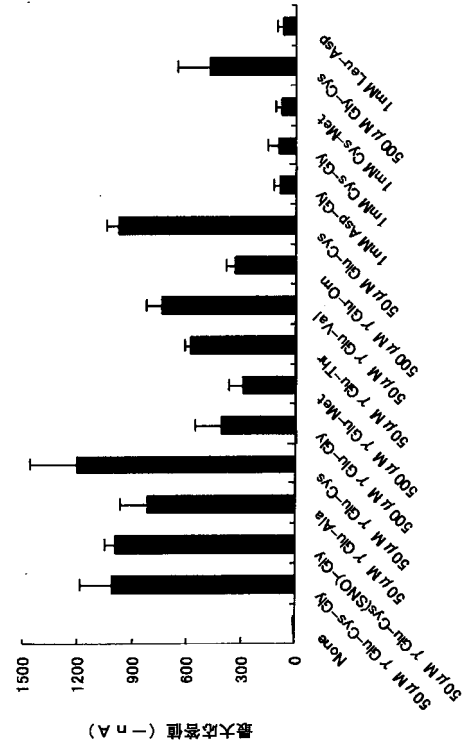
【図2】



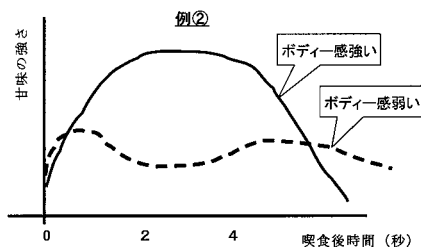
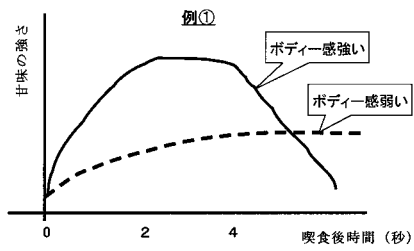
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0005195751000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 長崎 浩明
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
- (72)発明者 宮村 直宏
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
- (72)発明者 江藤 譲
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
- (72)発明者 脊黒 勝也
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 6 2 6 2 8 (WO , A 1)
特開 2 0 0 5 - 0 4 0 0 4 7 (JP , A)
国際公開第 2 0 0 6 / 0 4 1 6 6 8 (WO , A 1)
特開 2 0 0 3 - 2 7 4 8 9 6 (JP , A)
国際公開第 2 0 0 7 / 0 5 5 3 8 8 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 0 7 / 0 5 5 3 9 3 (WO , A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A23L 1/22-1/237, 1/24
C07K 5/00-5/12