

クワイの呈味成分について

(その3) 苦味成分の分離と性状

山沢和子、加藤宏治、上野良光

緒 言

著者らは、前報¹⁾においてクワイの苦味発現物質が脂質の一種であることを各種の定性反応から推定した。

そこで、本研究ではクワイ脂質から苦味成分を分離し、その性状について検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

前報¹⁾と同様に愛知県で収穫した1983年産白クワイ(3kg)を凍結乾燥し、得られた乾燥粉末(720g)を実験材料として用いた。

2. 脂質の抽出

クワイ乾燥粉末よりFolch法²⁾に準じて脂質を抽出した。すなわち、クワイ乾燥粉末720gとクロロホルム—メタノール(1:1、v/v)混液2ℓを5ℓ容三角フラスコに入れ、4℃で24時間保ったのち吸引濾過した。残渣について同様の操作を4回繰り返した後、濾液を合し200mlに減圧濃縮した。濃縮液をクロロホルム—メタノール(1:1、v/v)混液1ℓ、塩化カリウム(2M)500ml、水500mlとともに5ℓ容分液ロートに入れよく混和した後、下層のクロロホルム層を分取した。この操作を3回繰り返して非脂質成分を濃縮液から除去した。さらに、クロロホルム層は無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し総脂質を得た。

3. 総脂質の分画

クワイ乾燥粉末より抽出したクワイ総脂質はケイ酸カラムクロマトグラフィー³⁻⁴⁾によって分画した。すなわち、ガラスカラム(∅4.5×45cm)に120℃で24時間活性化したシリカゲル(ワコーゲル、C-200)150gをクロロホルムに懸濁してつめ、これに少量のクロロホルムに溶解したクワイ総脂質8gを吸着させた後、クロロホルム1,800ml、アセトン2,400ml、メタノール750mlで順次溶出した。この操作で、クロロホルム溶出画分より中性脂質、アセトン溶出画分より糖脂質およびメタノール溶出画分よりリン脂質をそれぞれ得た。

4. 中性脂質の分画

クワイの苦味は主に中性脂質画分で認められた。そこで、クワイ総脂質より分画した中性脂質画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィー(以後、TLCと略す)とシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。

① シリカゲルTLCによる分離

シリカゲルTLCプレートは市販品(メルク社製 Kieselgel 60F²⁵⁴または、和光純薬工業KK製シリカゲル70プレート)を用いた。展開溶媒にヘキササン—エチルエーテル—酢酸(80:30:1または、80:20:1、v/v)⁵⁻⁶⁾を用いて展開し50%硫酸を噴霧したのち加熱して化合物を検出した。また、TLCで検出された各化合物は、TLCアルミプレートを用いて分取した。すなわち、クロロホルムに溶解した中性脂質をアルミプレート(15×20cm)上にバンド状に塗布し、前述の溶媒で展開した。TLC上の各化合物の

位置は、アルミプレートの両端の1 cmを切りとって50%硫酸で発色させて確認した。分離した各化合物は、TLCアルミプレートからかきとり、クロロホルム-メタノール(1:1、v/v)100mlにてシリカゲルから抽出した。

② シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離

ガラスカラム(φ2.0×33cm)にシリカゲル(ワコーゲル、C-200)20gをヘキサンに懸濁してつめ、これに少量のヘキサンに溶解した中性脂質画分0.5gを吸着させた後、ヘキサン220ml、ヘキサン-エチルエーテル(95:5、v/v)100ml、同(90:10、v/v)100ml、同(80:20、v/v)100ml、同(70:30、v/v)100ml、同(50:50、v/v)100mlおよびメタノール100mlで順次溶出させた。⁷⁻⁸⁾ 溶出液は、10gずつフラクションコレクターで分取した。脂質の溶出状態は各フラクションをTLCで分析して確認した。苦味を有する画分は、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ガラスカラム(φ1.2×30cm)にシリカゲル(ワコーゲル、C-200)5gをクロロホルムに懸濁してつめたもの〕で分離精製した。溶出はクロロホルムで行ない、5gずつ分取し、溶出状態をTLCで確認した。

5. 苦味成分の安定性

シリカゲルTLCで分離精製した苦味成分(苦味A、BおよびC)は、25℃(大気中および減圧下)、4℃(大気中)、-30℃(大気中)の各条件で保存し、温度および酸素に対する苦味の安定性を調べた。すなわち、各苦味成分を一定量(苦味Aは0.6mg、苦味Bは0.3mg、苦味Cは1mg)ずつフタ付きサンプルビンに入れ、前述の各条件で保存した。試料は1週間ごとに苦味試験をし、苦味の消長を調べた。

6. 苦味試験

化合物の苦味の有無は、6名のパネラーによる味覚試験によって判断した。すなわち、それぞれの実験で得た試料をクロロホルムにとかしその一定量を径7cmの時計皿に入れ溶媒を完全に除去したのち、パネラーに苦味の有無の回答

を求めた。

実験結果および考察

1. 脂質の分画と苦味

前報¹⁾において、クワイの苦味が一種の脂質に起因していることを推定した。そこで、まずクワイ乾燥粉末からFolch法²⁾で総脂質を抽出した。その結果、総脂質はクワイ乾燥粉末720gから8.28g(生クワイに対して0.28%に相当)得られ、この画分に苦味が確認された。

次に、総脂質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで中性脂質、糖脂質およびリン脂質に分画した。分画した各脂質の含量ならびに苦味試験の結果を表1に示した。この結果、クワイ

表1 クワイ総脂質中の各脂質種の含量とその苦味

	含 量 (%)	苦 味
中 性 脂 質	38.3	+
糖 脂 質	23.9	±
リ ン 脂 質	38.9	-

+ 苦味あり
± 苦味痕跡
- 苦味なし

総脂質(8.3g)の組成は、中性脂質38%、糖脂質24%、リン脂質39%であった。得られたそれぞれの脂質50mgを用いて苦味試験を行なったところ、苦味は中性脂質に強く認められ、またわずかではあるが糖脂質にも認められた。以上の結果より、クワイの苦味の主たる成分は、中性脂質画分に存在していることが明らかとなった。一般に、中性脂質画分には脂肪酸・グリセリド・テルペン・ステロール・炭化水素・色素などが含まれる。これらの物質のうち、現在までに苦味が認められているものとしては、テルペンに属するリモノイド⁹⁾、ククルピタシン¹⁰⁾およびフムロン¹¹⁾、ステロールに属するサルササポゲニン¹²⁾、脂肪酸メテルエステルの誘導体¹³⁾、モノグリセリドのモノラウリン¹⁴⁾などが報告されている。そこで、クワイ中性脂質画分より苦味成分の分離を以下行なうこととした。

2. 中性脂質の分画と苦味

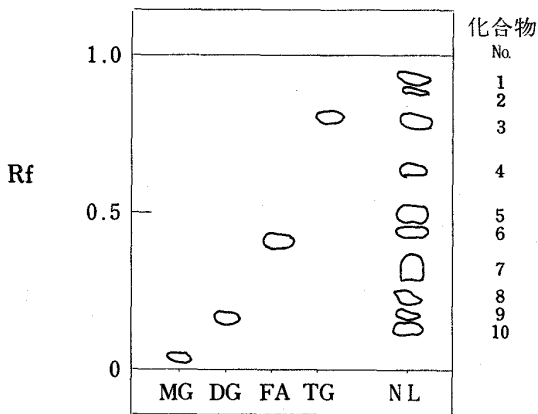


図1 クワイ中性脂質の薄層クロマトグラム

薄層…シリカゲル (Kiesergel, 60F₂₅₄)

展開溶媒…ヘキサン：エチルエーテル：

酢酸 (80：30：1、v/v)

発色剤…50%硫酸

MG…モノグリセリド TG…トリグリセリド

DG…ジグリセリド NL…中性脂質

FA…遊離脂肪酸

図1にクワイ中性脂質画分をシリカゲルTLCで分析した結果を示した。標準物質は大豆油から調製したトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドおよび遊離脂肪酸を用いた。TLC分析により、クワイ中性脂質画分は10個の化合物を与えた。そのうち、No.3およびNo.10の化合物は、標準物質のトリグリセリドおよびジグリセリドとそれぞれ対応した。TLC上の各化合物は、苦味の有無を検索するためアルミプレートを使用したTLCで分取した。得られた各化合物(5mg)について苦味試験を行ない、苦

表2 クワイ中性脂質中の苦味成分とその含量・苦味発現量および寄与度

化合物 No.	苦味	中性脂質に対する含量(%) ^{a)}	苦味を認める最低量 (mg) ^{b)}	寄与度 ^(a/b)
1	—			
2	—			
3(苦味A)	+	9.7	0.7	14
4	—			
5	—			
6(苦味B)	+	8.3	0.1	83
7	—			
8	—			
9	—			
10(苦味C)	+	9.3	0.4	23

+ 苦味あり

— 苦味なし

味を呈した成分については中性脂質に占める割合を求めた(表2)。表2に示したようにTLCで分離した10個の化合物のうちNo.3、No.6およびNo.10(以後、苦味A、BおよびCと記す)に苦味が認められた。クワイ中性脂質に占める苦味A、BおよびCの割合は、それぞれ9.7、8.3および9.3%であった。また、図1および表2の結果より、苦味を呈した3化合物のうち、苦味Aはトリグリセリド、苦味Cはジグリセリドに相当する化合物と考えられたが、苦味Bは図1における標準物質とは異なる化合物であった。

後述するように、苦味Bは他の2苦味成分(苦味AおよびC)に比べ著しく強い苦味を有していた。そこで、クワイ中性脂質画分より苦味

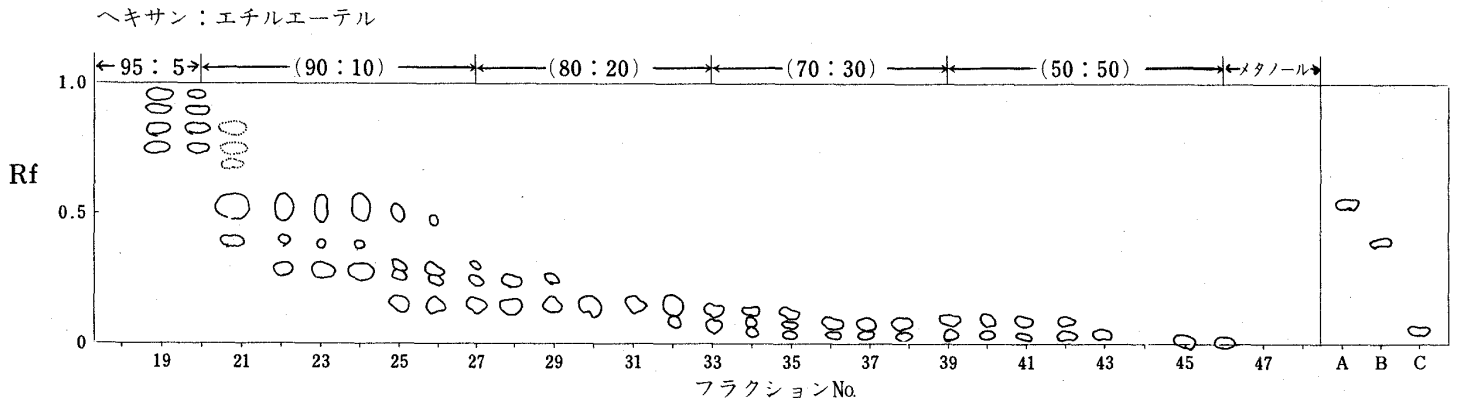


図2 シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画したクワイ中性脂質の溶出状態および苦味成分の薄層クロマトグラム

薄層…シリカゲル (シリカゲル70プレート)

展開溶媒…ヘキサン：エチルエーテル：酢酸 (80：20：1、v/v)

発色剤…50%硫酸

A…苦味A

B…苦味B

C…苦味C

Bを単離することとした。最初に、ヘキサン-エチルエーテルの溶媒系を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離を試みた(図2)。苦味Bは、苦味Aおよびその他の化合物とともにフラクションNo.21~24に溶出したが、分離は不十分であった。そこで、苦味Bの溶出画分を

さらにクロロホルムを溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離した(図3)。図3に示したように、苦味BはフラクションNo.12~25に溶出し、混在していた他の2化合物から分離することができた。

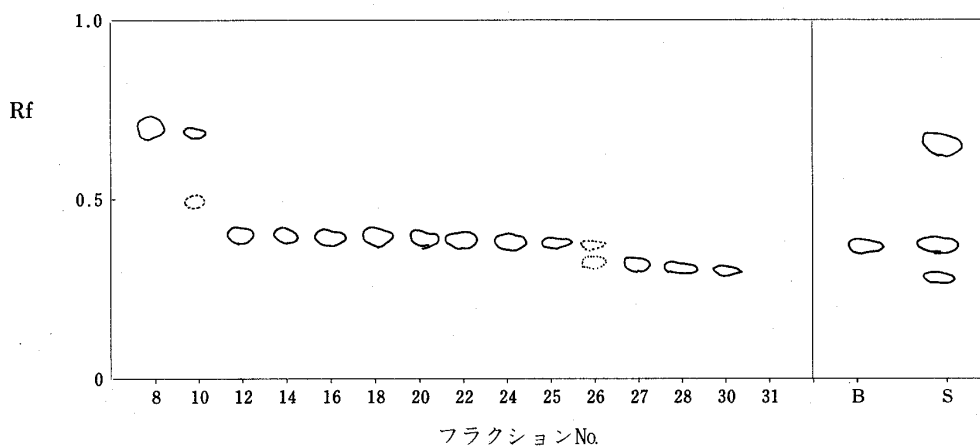


図3 苦味B溶出画分の再シリカゲルカラムクロマトグラフィーでの溶出状態および苦味Bの薄層クロマトグラム

薄 層…シリカゲル(シリカゲル70プレート)
 展開溶媒…ヘキサン:エチルエーテル:酢酸(80:20:1、v/v)
 発色剤…50%硫酸
 B……苦味成分B
 S……再カラムクロマトグラフィーに供した試料
 (苦味B溶出画分)

3. 苦味成分の性状

シリカゲルTLCで分離した苦味A、BおよびCについて苦味を感じる最低の量を求めた(表2)。この結果、苦味Bは苦味AおよびCと比較すると強い苦味(苦味Aの7倍、苦味Cの4倍の苦味)を有していた。また、クワイ中性脂質画分中の苦味A、BおよびCの含量をそれぞれの化合物の苦味を感じる最低量で除した値を苦味に対する寄与度¹⁵⁾として求めた(表2)。その結果、苦味Aの寄与度は14、苦味Bは83、苦味Cは23とそれぞれ算出された。これらの値はクワイの苦味に対して苦味Bの貢献度が最も大きいことを示しているため、苦味Bがクワイの主たる化合物であると考えた。なお、本実験で行なった苦味発現最低量の算出方法は、現在一般に行なわれている水溶性物質の閾値算出方法¹⁶⁾とは異なっている。しかし、脂溶性物質についての正確な閾値算出方法が現在定まっていない

表3 苦味成分の温度および酸素安定性

温 度	空気の 有無	苦味 成分	保存期間(週)			
			1	2	3	4
25℃	有	A	-			
		B	-			
		C	-			
	無	A	+	+	-	
		B	+	+	-	
		C	+	+	-	
4℃	有	A	+	+	+	+
		B	+	+	+	+
		C	+	+	+	+
-30℃	有	A	+	+	+	+
		B	+	+	+	+
		C	+	+	+	+
			+	苦味あり		
			-	苦味なし		

ので、本実験で行なった苦味発現最低量の算出方法を苦味の強さを示す一指標として用いた。

次に、苦味A、BおよびCについて温度および酸素に対する苦味の安定性を調べた(表3)。苦味A、BおよびCともに、大気中・25℃の保存では1週間後、減圧下・25℃の保存では3週間後にそれぞれ苦味が消失した。しかし、各成分とも4℃の保存では1ヶ月後、-30℃の保存では6ヶ月後においても苦味が保持されていた。従って、クワイより単離した苦味成分は、温度および酸素の影響を強く受ける化合物であることが示された。

要 約

クワイ脂質から苦味成分を分離し、その性状について検討した。

- ① クワイの総脂質は生クワイの0.28%を占め総脂質中の中性脂質、糖脂質およびリン脂質の組成は38:24:39であった。このうち、中性脂質画分で強い苦味が認められた。
- ② 中性脂質画分からの苦味成分の分離法としては、展開溶媒にヘキサン-エチルエーテル-酢酸の溶媒系を用いるシリカゲル薄層クロマトグラフィーが有効であった。
- ③ クワイの中性脂質は、シリカゲル薄層クロマトグラフィーで10個の化合物に分離された。そのうち3化合物(苦味A、BおよびC)に苦味が認められ、最も苦味の強かった苦味Bがクワイの主たる苦味成分と考えられた。さらに、苦味Bは、本実験で用いた標品(トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドおよび遊離脂肪酸)とは異なる化合物であった。
- ④ シリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離した苦味A、BおよびCは、温度および酸素の影響を強く受け、大気中・25℃の保存で1週間後にすでに苦味を消失していた。

本実験を行なうにあたり、終始御懇篤な御助力を頂いた岐阜大学農学部農芸化学科山内 亮

先生に深く感謝致します。

(家政学科・食物栄養)

(共同研究/岐阜大学農学部農芸化学科)

加藤宏治・上野良光

参考文献

- 1) 山沢和子：東海女子短期大学紀要第11号、p.73 (1985)
- 2) J. Folch, I. Ascoli, M. Lee, J. A. Meath, F. N. Lebaron : J. Biol. Chem., 191, 833 (1951)
- 3) 山川民夫他：脂質研究法、東京化学同人、p.108 (1975)
- 4) 藤野安彦：脂質分析法入門、学会出版センター、p.69 (1978)
- 5) 山川民夫他：脂質研究法、東京化学同人、p.137 (1975)
- 6) 藤野安彦：脂質分析法入門、学会出版センター、p.101 (1978)
- 7) 藤野安彦：脂質分析法入門、学会出版センター、p.71 (1978)
- 8) E.J. Barron and D.J. Hanahan : J.Biol. Chem., 231, 493 (1958)
- 9) D.L. Dreyer : Fortsch. Chem. Org. Nat., 26, 190 (1968)
- 10) T.Shimamoto, J.Sugayama : J.Sci. Res. Inst., 45, 139(1951)
- 11) 黒岩芳明：化学と生物, 4, 439 (1966)
- 12) 坂村貞雄他：日本食品工業学会誌, 14, 491(1967)
- 13) C. D. Evans, E. N. Frankel, P. M. Cooney, H. A. Moser : J.Am. Oil Chemists' Soc., 37, 452(1960)
- 14) 薄木理一郎、金田尚志：油化学、19, 617 (1970)
- 15) 菊地武昭、和田 俊、鈴木平光：栄養と食糧、29 147 (1976)
- 16) 日本化学会：味とにおいの化学(化学総説No.14)、学会出版センター、p.130 (1976)