

ダイズの脂質を起点とした苦味抑制物質の探索と その作用メカニズムの解明

朝倉富子*

東京大学大学院農学生命科学研究科日清食品寄付講座

Analysis of Bitterness-Suppressing Mechanism by Fatty Acid and the its Application

Tomiko ASAKURA*

Taste Science, Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural
and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Soy-bean is an important lipid and protein source. Soy-bean is known to contain about 20% lipid and few free fatty acids. Free fatty acids were identified in a natural white cheese mold as bitterness-suppressing compounds. In this study the binding potential between oleic acid and the bitter compounds was estimated by isothermal titration calorimetry (ITC). These results suggest that oleic acid suppressed bitterness by interaction with the bitter compounds. We analyzed the bitterness-suppressing mechanism by fatty acid using ITC on bitter substance, mainly quinine. These results indicated that the structure of bitter compounds had two common parts, similarly that of fatty acids had another two common parts. The common part of bitter compounds showed that the first was a nitrogen atom and the second was an aromatic ring. The fatty acid's parts showed that the first was carboxylic acid and the second was an alkyl chain. We estimated that the first interaction between the nitrogen atom in the bitter compound and the carboxylic acid in the fatty acid, and the second interaction between the aromatic ring and the alkyl chain caused the changes in the conformation of the bitter compound and the bitter activity decreased. We expect that fatty acid can be used a food additive and also is produced in foods fermented by microorganisms, such as miso. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 46-51, 2014.

Key words : quinine, fatty acid, oleic acid, bitter substance, bitter taste

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

ダイズは5大穀物の一つであり豊富な栄養成分を含むことから世界中で栽培されている。ダイズはたん白質と脂質で60%以上を占めるが、約20%を占める脂質のほとんどが油脂であるグリセリドで構成されている。ダイズ由来の油脂、いわゆる大豆油、の脂肪酸組成は多い順にリノール酸、オレイン酸、パルミチン酸であり特にリノール酸が約50%を占める点が大豆油の特徴といえる。しかし、油脂中の脂肪酸の多くはトリグリセロール・エステルでの形で存在するため、遊離脂肪酸の割合は少なく、0–3%と報告されている^{1–3)}。

発酵食品は微生物を利用して素材の風味・保存性・テクスチャーなどを改良した加工食品であるが、微生物や酵素の作用により素材の化学組成が変化しているとも考えられる。しかし、大豆を原料とした発酵食品は味噌・醤油・納豆等様々なものが利用されているが、これらの加工食品の化学組成がどのように変化するかに関する研究はそれほど多くないのが現状である。例えばダイズには油脂が多く含まれるため遊離脂肪酸が増加した食品は遊離脂肪酸特有の機能が期待できる。

我々は、すでにある種のナチュラルチーズには苦味抑制活性が認められることを見出し、チーズに含まれる苦味抑制成分をエタノール抽出・シリカゲルカラムにより精製を行い、NMRを用いて構造決定を行うことで活性成分が遊離脂肪酸であることを見出した⁴⁾。チーズの遊離脂肪酸は主にカビなどの発酵過程により生成してくるものと推定しているが、味噌や納豆等でも相当量が含有することが期待できる。これを裏付けるように、木内ら¹⁾は、原料大豆ではほとんど遊離脂肪酸が検出されないが味噌では、脂質画分中に18–34%の遊離脂肪酸が認められたと報告している。

本研究では各種脂肪酸と苦味物質の相互作用メカニズムを解析することによって苦味物質の抑制メカニズムの分子機構の一端を明らかにした。

方 法

1) ヒト官能試験

苦味物質として0.22 mMキニーネ塩酸塩、1.5 mMプロメタジン塩酸塩、50 mMカフェイン、脂肪酸として0.5 mMオレイン酸ナトリウムを用い、脂肪酸の有無のみ異なる試料溶液A、B二液間における二点比較による官能試験を行った。得られた結果は片側二項検定により危険率0.05でデータ解析を行った。

2) 等温カロリメトリー (ITC) を用いた相互作用測定

試料はサンプル側シリンジ側共に5 mMリン酸緩衝

液を含む溶液として調製した。苦味物質としては2.2 mMキニーネ、1.5 mMプロメタジン、2.2 mMまたは50 mMカフェイン、または1.5 mM各種苦味物質溶液をシリンジ側の溶液とし、脂肪酸としては0.5 mMオレイン酸ナトリウムまたは0.5 mM各種脂肪酸ナトリウムをサンプルセル側の溶液として用いた。装置はMicroCal iTC₂₀₀ (GEヘルスケア)、解析はOrigin 7.0を使用した。

結 果

1) ヒト官能試験

脂肪酸による苦味抑制がどのような苦味物質に対して有効かを調べるために、キニーネ、プロメタジンおよびカフェインに対するオレイン酸の苦味抑制効果についてヒトを用いた官能試験を行った。二点比較法の結果、キニーネ (n=20) およびプロメタジン (n=6) の苦味に関してはオレイン酸によりそれぞれ有意に苦味が抑制 (p=0.0059, 0.0156) されたが、カフェイン (n=10) の苦味は抑制されず、むしろ脂肪酸を添加した方が苦いという傾向がみられた (p=0.0547)。

2) ITCを用いた相互作用測定

オレイン酸と、キニーネ、プロメタジンおよびカフェイン間の相互作用についてITCを用いて測定した。結果をFig. 1に示す。オレイン酸をキニーネおよびプロメタジンに対して滴定したところ、両者とも発熱反応が観測された。しかし、オレイン酸をカフェインに滴定したところ、熱変化は検出されなかった。以上より、官能試験でオレイン酸により苦味が抑制される物質は、ITCでも相互作用が確認された。すなわち、オレイン酸の苦味抑制活性は、苦味物質との直接的な相互作用が関係することが示された。

3) 広範な苦味物質によるオレイン酸との相互作用測定

どのような苦味物質がオレイン酸と相互作用するかを網羅的に調べるために24種類の苦味物質 (Table 1) を用いてオレイン酸との相互作用測定を行った。苦味物質の濃度は1.5 mMとし、0.5 mMのオレイン酸を滴定する形で測定した。相互作用を示した苦味物質の構造をFig. 2に示す。24化合物中、キニーネ、プロメタジン、プルシン、プロプラノロール、ヨヒンビンの6化合物ではオレイン酸との相互作用が確認されたが、他の18種類の苦味物質では相互作用はみられなかった。これら6化合物のオレイン酸との結合定数を

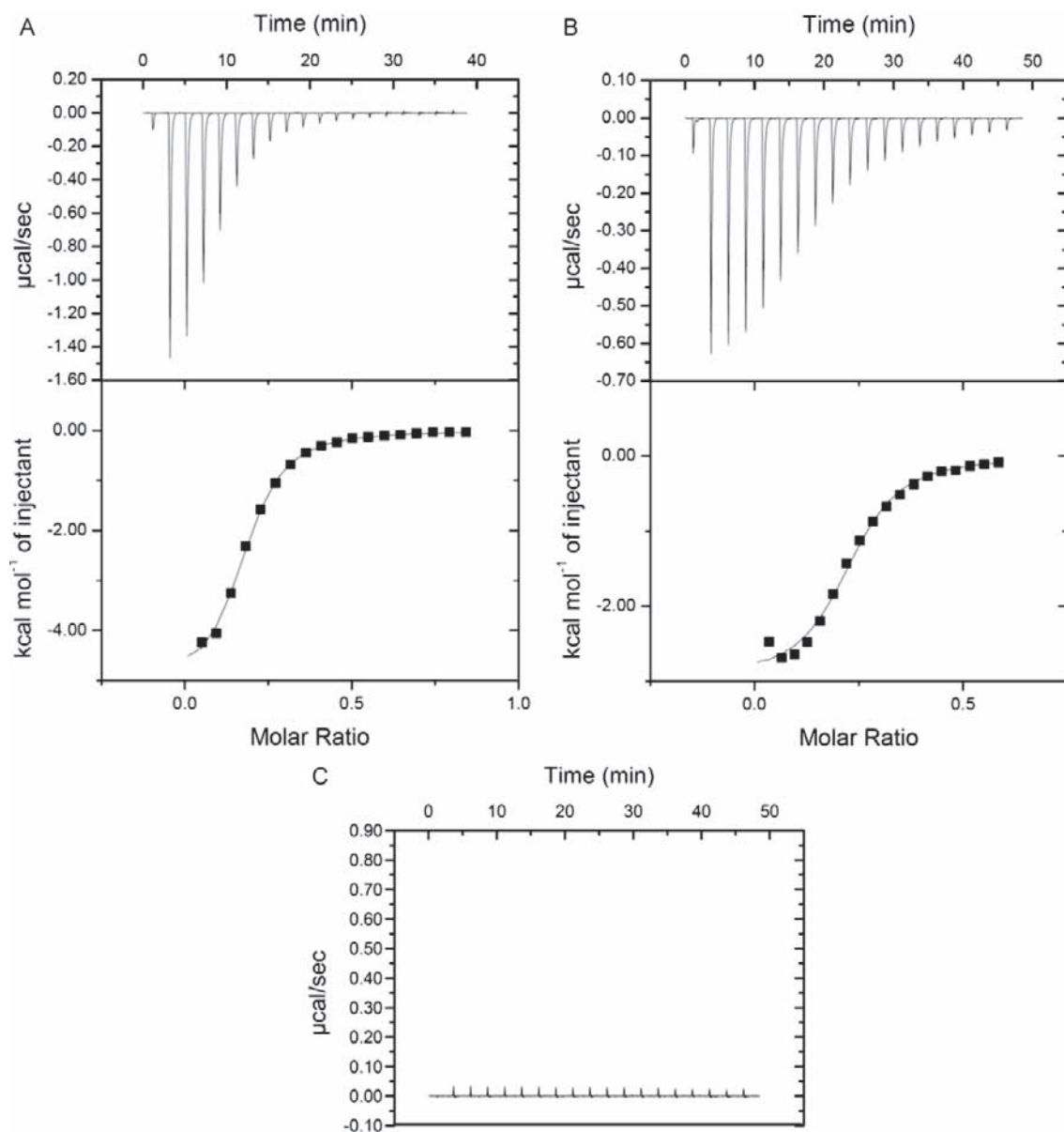


Fig. 1. Interactions between bitter substances and oleic acid using isothermal titration calorimetry (ITC). A) quinine, B) promethazine, C) caffeine. Titration curves (A, B, C) and fitting curves (A, B) are shown.

Table 2に示す。この中でキニーネが最も結合定数が大きく、プルシンおよびヨヒンビンが他の苦味物質に比べて結合定数が小さかった。

4) 鎖長および不飽和度の異なる脂肪酸とキニーネの相互作用

脂肪酸の鎖長および不飽和度の違いが苦味物質との相互作用にどのように影響するかを明らかにするために、ITCを用いて炭素数10-20の各種脂肪酸とキニー

ネとの相互作用を測定した。なお、炭素数14以上の飽和脂肪酸は水に溶解させることができずデータは得られなかった。相互作用の得られた脂肪酸の結合定数をTable 3に示す。測定の結果、鎖長12以上の脂肪酸ではキニーネとの相互作用が検出されたが、鎖長10のデカン酸では検出されなかった。また、測定した脂肪酸の中で鎖長18のオレイン酸が最も結合定数が大きく、鎖長14以下のミリストレン酸 (14:1) およびラウリン酸 (12:0) の10倍程度であった。鎖長18の脂肪酸

Table 1. Bitter substances used for ITC

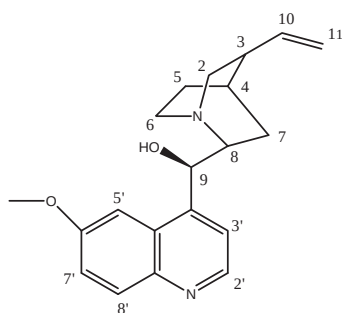
No	Substance name
1	Sodium thiocyanate
2	Taurine
3	N-phenylthiourea
4	Acesulfame K
5	Saccharine sodium dihydrate
6	Antipyrine
7	Caffeine
8	Methyltryptophan
9	(+/-)-propranolol hydrochloride
10	Promethazine hydrochloride
11	Salicine
12	Chloramphenicol
13	Berberine hydrochloride
14	Thiamine hydrochloride
15	Yohimbine hydrochloride
16	Quinine hydrochloride
17	Brucine dihydrate
18	Colchicine
19	Aloin, crude
20	Amygdalin
21	Sodium cromolyn
22	Limonin from citrus seeds
23	Naringin
24	Ouabain octahydrate

Table 2. Association constant (K) of bitter substances which interact with oleic acid

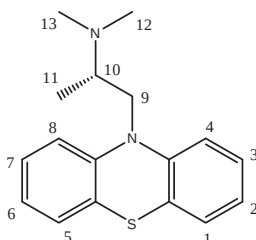
No	Substance	K ($\times 10^4 \text{M}^{-1}$)
1	Propranolol	8.4 ± 0.7
2	Yohimbine	2.1 ± 0.1
3	Berbeline	6.8 ± 0.4
4	Brucine	1.6 ± 0.2
5	Promethazine	9.2 ± 0.2
6	Quinine	12.9 ± 1.1

Table 3. Association constant (K) of fatty acids which interact with quinine

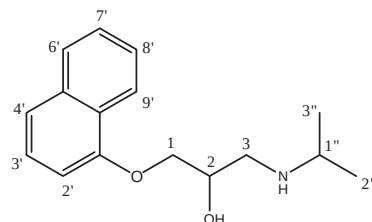
No	Fatty acid	Carbon number and unsaturated value	K ($\times 10^3 \text{M}^{-1}$)
1	Lauric acid	12:0	7 ± 0.8
2	Myristoleic acid	14:1	17 ± 1
3	Palmitoleic acid	16:1	118 ± 3
4	Oleic acid	18:1	129 ± 11
5	Linoleic acid	18:2	111 ± 1
6	Linolenic acid	18:3	91 ± 2
7	Arachidonic acid	20:4	62 ± 1



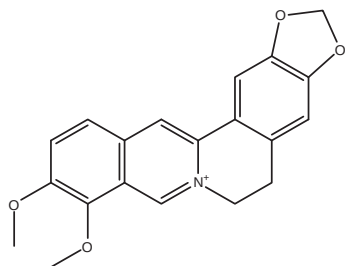
a) quinine



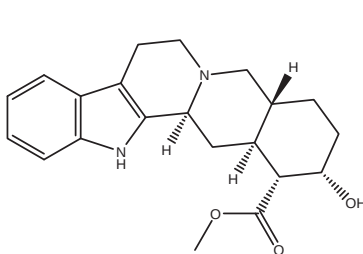
b) promethazine



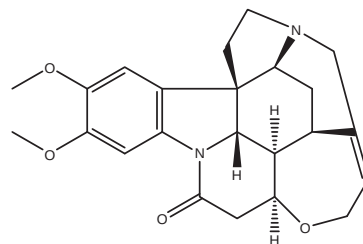
c) propranolol



d) berberine



e) yohimbine



f) brucine

Fig. 2. Structures of bitter substances which interact with oleic acid

を用いて不飽和度の違いについて比較したところ、不飽和度の違いはそれほど結合定数の違いに影響を与えなかった。しかしオレイン酸（鎖長18）のグリセロールモノエステルであるオレイン酸モノグリでは相互作用を検出できなかった。この結果から、脂肪酸のカルボキシル基が苦味物質との相互作用に重要な役割を持っていることが明らかとなった。

考 察

本論文ではITCを用いて様々な苦味物質と脂肪酸の間の相互作用を測定したITCは苦味物質と脂肪酸との相互作用を微量な熱量変化という形で検出する装置である。しかし、今回の実験で、カフェインなど使用した苦味物質の半数以上ではITCによる相互作用が検出されなかった。例えばカフェインでは官能試験による苦味抑制も認められなかった。このことは、脂肪酸の苦味抑制は特定の苦味物質との物質間の相互作用によることを示している。

脂肪酸と相互作用がみられた苦味物質（Table 1）は24物質中6種類（キニーネ、プロメタジン、プルシン、ベルベリン、プロプラノロール、ヨヒンビン）であるが、これらの苦味物質と脂肪酸には、共通する構造上の特徴がそれぞれ2点存在する。まず、脂肪酸に関しては、1) 分子内に一定鎖長以上のアルキル基をもつ、2) 負の電荷を持ちうるカルボン酸、である。つまり、1) に関しては、デカン酸（C10）では相互作用がみられないにも関わらず、ラウリン酸（C12）で相互作用が検出されたこと、2) に関してはオレイン酸モノグリセリドで相互作用がみられなかったこと、から示されている。

苦味物質に関しては、1) アルキル基と相互作用を起こすための芳香族環、2) 正の電荷を持ちうる分子内の窒素原子、の存在である。これらは、脂肪酸のカ

ルボン酸と相互作用するために正に荷電可能な窒素原子が必要であり、続いて疎水相互作用を起こすために脂肪酸のアルキル基と苦味物質の芳香族環が必要となると考えられる。以上の相互作用により、苦味物質の立体構造が変化し、苦味物質の苦味が低下すると考えられる。すなわち、今回の脂肪酸による苦味抑制は、電荷による相互作用と疎水相互作用の2種類の相互作用が必須であり、逆にこれらの2つ構造上の特徴を持つ苦味物質は脂肪酸と相互作用することで苦味が抑制されると推定できる。

キニーネに関しては、構造変化についてNMRから傍証が得られている。NOE(核オーバーハウザー効果)差スペクトルを用いた構造解析により、DMSO中でのキニーネ単独の立体構造として、キヌクリジン環とキノリン環のヒンジ部にある水酸基が回りの窒素原子や芳香族プロトンと相互作用することで交換しづらい構造を推定している。次に、脂肪酸とキニーネが等モル共存する状態ではキヌクリジン環の窒素原子と脂肪酸のカルボン酸が相互作用することでキニーネの水酸基との相互作用が消失し構造が変化すると推定される⁵⁾。

以上より本研究により、脂肪酸は芳香族環および分子内に窒素原子を持つ苦味物質と相互作用することで苦味を低下させると考えられる。発酵食品、特に味噌中には微生物の作用で生成した遊離脂肪酸が多く含まれ、これらの構造を持つ苦味物質を少量含む具剤、例えば山菜やキノコ等を使用しても苦味をあまり感じさせず素材の風味を引き出しておいしく食することが可能と思われる。このような事実は経験的には古くから知られているが、遊離脂肪酸の効果として科学的に証明した例は見当たらない。今後はキニーネや関連の苦味物質での構造変化や水溶液中での構造変化に関する情報を集め脂肪酸による苦味抑制のメカニズムを総合的に解明してゆく予定である。

要 約

脂肪酸の苦味抑制作用は、苦味物質と直接相互作用し、苦味の発現を抑えている可能性が示された。相互作用には脂肪酸の鎖長およびカルボキシル基、苦味物質の芳香族環構造が関与していることが示唆された。以上の結果から、脂肪酸によって苦味が抑制される苦味物質を構造から予測することが可能となり、新たな苦味抑制物質の分子基盤の確立につながることが期待される。

文 献

- 1) 木内 幹, 鈴木 紀, 太田輝夫, 佐藤恵美子, 海老根英雄 (1978): 遊離脂肪酸を資化する耐塩性味噌酵母の分離. 日本食品工業学会誌, **25**, 508-514.
- 2) Kan Kiuchi, Teruo Ohta and Hideo Ebine (1975): Changes in Lipid Components of *Miso-dama Koji*. *J Ferment Technol*, **53**, 869-874.
- 3) 山下 昭 (1976): とうふの製造過程における脂質成分の変動について. 帯广大谷短期大学紀要, **13**, A1-A8.
- 4) Homma R, Yamashita H, Funaki J, Ueda R, Sakurai T, Ishimaru Y, Abe K and Asakura T (2012): Identification of bitterness-masking compounds from cheese. *J Agric Food Chem*, **60**, 4492-4499.
- 5) Yamashita H, Oogi K, Kasahara Y, Ishimaru Y, Abe K and Asakura T. (2014): 投稿中