

食品中の塩味修飾物質の単離と構造解析

吉村 悦郎, 鈴木 道生, 井村 祐己

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 塩味は Na^+ イオン濃度だけで定まるものではなく、食品中の成分によって増強あるいは抑制される。その機構のひとつの仮説として、食品中の成分が Na^+ と相互作用することにより、 Na^+ の活量が低下することが考えられる。

本研究は ^{23}Na -NMR を利用して、塩味を制御する食品中の成分の分析を行うことを試みた。 Na^+ のアコイオンは配位原子による電場の対象性が高く、核四極子による緩和が遅いためにシャープな信号を与える。一方、 Na^+ イオンに水分子以外の配位子が結合すると、電場の対象性が低下して緩和が速くなり、ブロードな信号となる。また、電場の対象性が高い場合にも、溶液の粘性が高いと Na^+ イオンの回転相関時間 (τ_c) が大きくなりブロードな信号を与える。この変化を利用してフリーの Na^+ イオン量を評価した。塩味を制御する成分を含む食品として醤油を選択した。官能試験を行った結果、醤油の塩味は実際に含まれる NaCl の濃度よりも薄く知覚されることが明らかになった。すなわち、醤油は塩味を制御する成分を含んでいることが示唆された。

醤油の ^{23}Na -NMR を測定した結果、 NaCl 溶液と比較してシグナルの半値幅が約3倍に広がっている事が明らかになった。このことから、醤油中には Na^+ と相互作用することで活量を低下させる物質が含まれている事が示唆された。醤油を溶媒分画し、得られた画分の ^{23}Na -NMR を測定することでこの物質の探索を行った。その結果、酸性、塩基性の両条件にて水溶性となる画分の ^{23}Na -NMR シグナルが広がっていた。この画分に含まれ、醤油に高濃度に存在する物質としてアミノ酸を考えた。しかし、アミノ酸溶液の ^{23}Na -NMR シグナルは醤油のようには広がらなかった。

^{23}Na -NMR シグナルが広がった別の要因として、溶液の粘性が NaCl 溶液と醤油で異なっている可能性を考えた。グリセロールを NaCl 溶液に添加して粘性を変化させたところ、30~35%のグリセロールを含む溶液にて醤油と同程度の半値幅のシグナルが得られた。すなわち、醤油で起きた ^{23}Na -NMR シグナルの広がり、粘性によってもたらされる範囲内であることが分かった。 ^{17}O -NMR を測定した所、醤油のシグナルは NaCl 溶液よりも2倍以上広がっており、 ^{23}Na -NMR シグナルの広がり、溶液の粘性によるものである可能性が考えられた。

その一方で、 ^{35}Cl -NMR を測定したところ、醤油のシグナルは NaCl 溶液の17倍に広がっていた。この広がり方は粘性によるものと比較して大きく、醤油には Cl^- と結合することで活量を低下させる物質が含まれている可能性が示唆された。塩味を知覚するには Cl^- も必要であることから、醤油の塩味抑制は Cl^- の活量を低下させることで起こっている可能性が示唆された。

1. 研究目的

塩味は五つの基本味のひとつと考えられている。塩味には嗜好性があり、食においしさを与える一方で、過剰摂取による健康被害も知られている。したがって、おいしさを損なわずに食塩摂取量を減らす試みが必要といえる。

塩味は、味細胞にある上皮性ナトリウムチャンネルを Na^+

イオンが通過することで生じる。塩味は、 Na^+ イオンとともに共存する化学物質により増強される場合もあり、逆に遮蔽される場合もある。この塩味修飾の分子機構は複雑でその詳細は解明されていない。この研究において障害になるのが、フリーの Na^+ イオン濃度が明確でない点があげられる。すなわち、塩味修飾物質は、味細胞に直接作用す

る場合と Na^+ イオンと結合してそのイオンとしての濃度(活量)を変化させる場合の二通りの過程があるが、この区別が明確にされていない。一方、酢酸ナトリウムが塩味を呈さないことから、塩化物イオンも塩味の発現にかかわっていることは明白である。

醤油などの塩分を多く含む食品中で Na^+ イオンは何らかの物質と結合を形成しており、活量が低下している可能性が考えられる。本研究では、醤油における実際の Na の活量を ^{23}Na -NMR で測定し、実際の塩濃度との差異を明確にするとともに、このように Na^+ イオンの活量を変化させている物質の同定を試みた。

2. 実験方法

2.1 食品成分の塩味官能検査

塩味に対して一定の感受性を有する被験者 12 名を用いて、塩化ナトリウム水溶液と醤油の希釈液における塩味の官能試験を行った。被験者は以下の方法により塩味感受性に対するトレーニングを行った。0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00% (w/v)の5つの濃度の塩化ナトリウム溶液を用意し、それらをランダムに並び変えた後に A, B, C, D, E とラベル付けを行った。溶液を口に含んで塩味を覚え、水で口をすすいだ後に別の溶液を口に含み、2サンプル間で塩味の大小の比較を行った。この操作を5サンプルに対して行

い、濃度順に序列付けを行った。この序列付けが成功した後に、醤油希釈液の評価を行った。醤油希釈液と上述の塩化ナトリウム水溶液希釈系列を同様に比較し、最も近い濃度を選ぶことで醤油の塩味を評価した。

2.2 ^{23}Na -NMR による Na^+ イオンの存在形態の評価

^{23}Na -NMR シグナルの半値幅を測定することによりフリーの Na^+ イオンの存在形態を評価した。すなわち、 Na^+ のアクセシビリティは配位原子による電場の対象性が高く、核四極子による緩和が遅いためシャープな信号を与える。一方、 Na^+ イオンに水分子以外の配位子が結合すると、電場の対象性が低下して緩和が速くなり、ブロードな信号となる。また、電場の対象性が高い場合でも、溶液の粘性が高いと Na^+ イオンの回転相関時間(τ_c)が大きくなりブロードな信号を与える。本研究では、醤油に含まれる Na^+ イオンと Cl^- イオンの存在形態を明らかにするために、それぞれ ^{23}Na -NMR と ^{35}Cl -NMR の測定を行った。なお、溶液の粘性の指標とするために、水分子の ^{17}O -NMR の測定を行った。

2.3 溶媒分画による醤油中の Na 結合物質の探索

醤油中の Na 結合物質を探索するため、醤油成分を溶媒分画した。有機溶媒としてヘキサン:酢酸エチルを 1:1 で混合した溶媒を用い、Fig. 1 のフローチャートに従って pH を変化させながら有機相と水相をそれぞれ分離した。

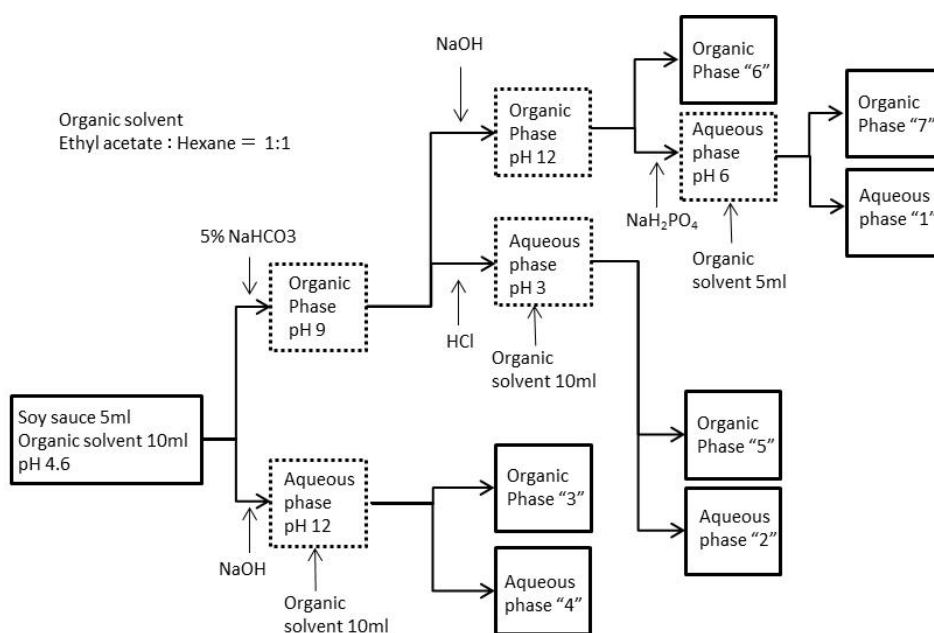


Fig. 1. Flowchart of solvent fractionation. Soy sauce was extracted with organic solvent (Ethyl acetate: Hexane = 1:1). The pH was modified with NaOH, NaHCO_3 , HCl and NaH_2PO_4 . Fraction 1 to 7 were obtained.

その後有機相は風乾させ、水に再溶解させ終濃度 3 M となるよう NaCl を添加し、NMR 測定を行った。水相には直接 NaCl を添加し、NMR 測定を行った。

3. 実験結果

3.1 塩味官能検査

NaCl 濃度を 0.90% (w/v) に調製した醤油希釈液の塩味を評価した結果、検量線下限である 0.80% NaCl 水溶液よりも低い塩味と判定された。NaCl 濃度を 1.04% にした醤油希釈液を評価した結果のヒストグラムは Fig. 2 に示す通りである。同等の塩味と評価された食塩水の濃度の最頻値は 0.85% であり、算術平均は 0.88% となった。この結果から、醤油の塩味は NaCl 溶液よりも薄く感じられることが明らかになった。

3.2 ^{23}Na -NMR の半値幅による解析

1 mM NaCl 水溶液、ウシ血清アルブミン (BSA, 0.047 mM) を添加した NaCl 水溶液、ヘモグロビン (Hb, 0.1 mM) を添加した 1 mM NaCl 水溶液、陽イオン交換樹脂 (Chelex, BioRad) で処理をした BSA を添加した 1 mM NaCl 水溶液、Chelex 処理をした Hb を添加した NaCl 水溶液の ^{23}Na -NMR シグナルの半値幅を Fig. 3 に示す。シグナルの半値幅はそれぞれ 7.016, 6.903, 9.538, 7.940, 14.047 Hz であった。BSA, Hb 溶液では Chelex 処理の有無により ^{23}Na シグナルの半値幅が大きく変化していた。これは BSA や Hb がはじめ Ca^{2+} や Fe^{3+} などの陽イオンと強固に結合していたため、 Na^+ がタンパクと結合できず、多くがフリーの状態が存在していたからと考えられる。Chelex によりタンパクから陽イオンを除去すると、 Na^+ がタンパクと結合できるようになり、半値幅が広がったと考えられる。したがって、 ^{23}Na -NMR シグナルは溶液中の結合物質との相互作用により半値幅が広がる事が明らかとなり、フリーの Na^+ イオン量および Na^+ イオンの結合状況の評価の指標として利用できる可能性が示唆された。

3.0 M の NaCl 水溶液および醤油原液 (NaCl 濃度 2.7 M) の ^{23}Na -NMR 結果を Fig. 4 に示す。スペクトルの半値幅はそれぞれ 9.923, 26.857 Hz であり、醤油の ^{23}Na シグナルは約 3 倍スペクトル幅が広がっていた。このことから、醤油中に Na^+ と結合している物質が存在している可能性が考えられた。この原因となる物質を調べるため醤油に対して溶媒分画を行い、成分を分離した。

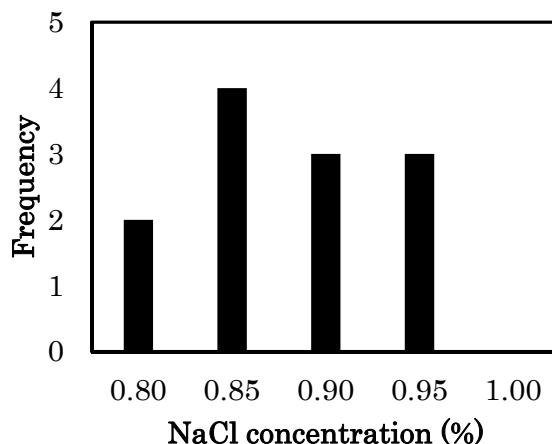


Fig. 2. Histogram of organoleptic examination score. Diluted soy sauce including 1.04% NaCl was tasted and compared with NaCl solution.

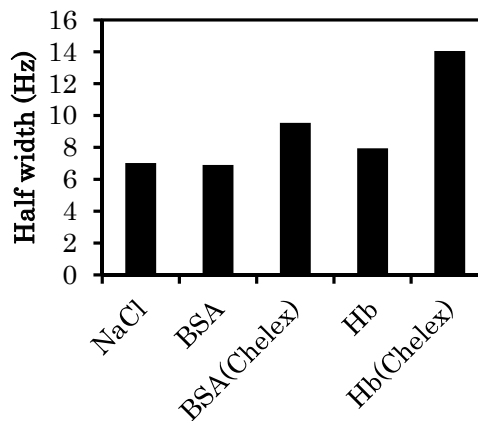


Fig. 3. Half width of ^{23}Na -NMR signal. 1mM NaCl solution and 1mM NaCl solution including BSA or Hb with or without Chelex treatment were measured.

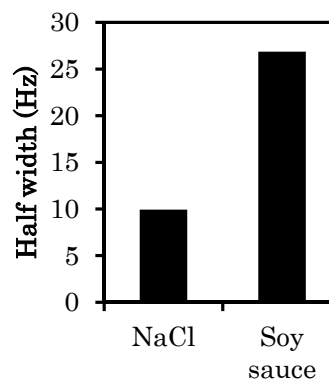


Fig. 4. Half width of ^{23}Na -NMR signal. 3 M NaCl solution and Soy sauce (2.7 M NaCl) were measured.

Fig. 5 に示すとおり、画分 1~7 で、半値幅の広がりが見られたのは画分 4 であった。この画分は、酸性・塩基性のいずれにおいても水相に分布する成分が含まれる画分であり、極めて水溶性の高い低分子や双性イオンなどが含まれる。半値幅の広がり、醤油に含まれる成分と Na⁺との相互作用によりもたらされているのであれば、その成分は醤油中に多量に含まれていると考えられる。なぜならば、醤油中には Na⁺が多量に存在しているため、Na⁺結合性の成分がわずかであれば結合状態の Na⁺の割合が少なく、フリーの Na⁺によるシグナルの影響が大勢を占めることになると考えられるからである。醤油に多量に含まれ、画分 4 に分布する物質として、アミノ酸が考えられた。そこで、20 種類のアミノ酸溶液へ終濃度 3 M となるよう NaCl を加え、同様の NMR 測定を行った。結果を Fig. 6 に示す。半値幅が大きく変化しているものは見られなかった。すなわち、醤油の Na シグナル半値幅の増加は、アミノ酸によりもたらされているのではない事が示唆された。

アミノ酸の中でも、酸性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸は負電荷を有し、Na⁺との相互作用を起こしやすいと考えられる。また、醤油中のグルタミン酸、アスパラギン酸の濃度はそれぞれ 80 mM, 50 mM であり、アミノ酸の中でも比較的高濃度に含まれている。この濃度の溶液を用いても、Na シグナル半値幅は増加しなかった (data not shown)。醤油に含まれる物質で、酸性アミノ酸以上に Na⁺に対する親和性を有し、かつ多量に含まれるものはやや考えにくい。醤油における ²³Na-NMR シグナル半値幅の広がり、Na⁺結合性物質とは違う機構で引き起こされている可能性を考えた。

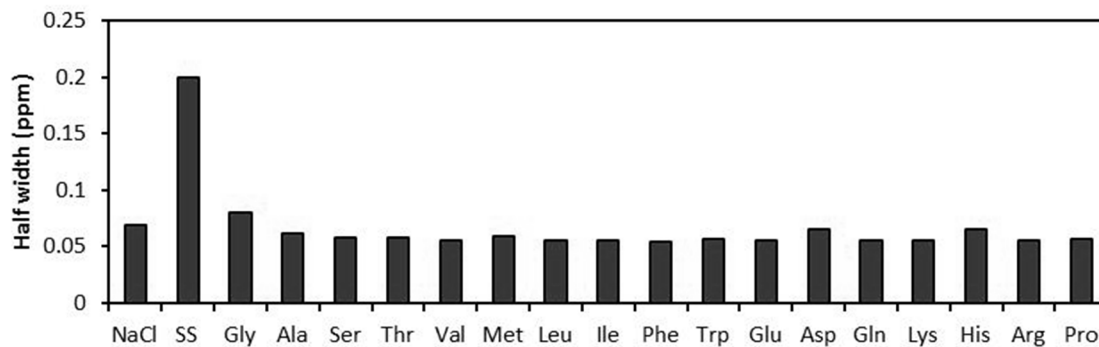


Fig. 6. Half width of ²³Na-NMR signal. The concentration of amino acid was 30 mM. The half width of NaCl solution and neat soy sauce (shown as SS) were also shown.

3.3 NMR を利用した溶液の粘性の評価

緩和時間の短縮を引き起こす別の要因として、溶液の粘性が考えられる。粘性により醤油と同程度の半値幅を示す溶液を作製し、粘度を評価することとした。粘性の増加させる方法として、グリセロールの添加を行った。グリセロールを 20, 25, 30, 35% (v/v) 含む NaCl 溶液を作製し、²³Na-NMR の測定を行った。結果を Fig. 7 に示す。グリセロールを 30~35% 含む溶液において、醤油と同程度の半値幅となった。すなわち、醤油における Na シグナルの広がり、粘性によってもたらされる範囲にあることが分かった。

また、これらの溶液の ¹⁷O-NMR を測定した。3 M NaCl 溶液と醤油の ¹⁷O シグナルの半値幅はそれぞれ 109, 231 Hz

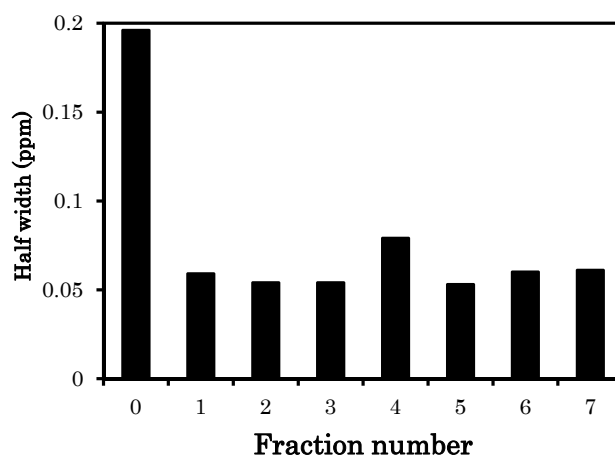


Fig. 5. Half width of ²³Na-NMR signal. 7 fractions shown in Fig. 1 and neat soy sauce (shown as 0) were measured.

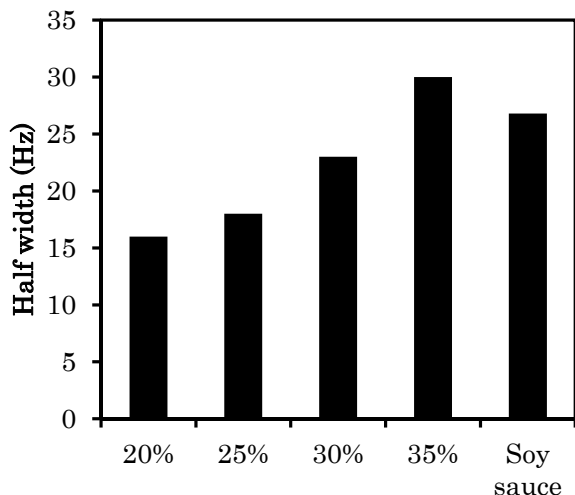


Fig.7. Half width of ²³Na-NMR signal. The viscosity of the solution was modified with glycerol (20, 25, 30, 35%, v/v). Half width was broadened as viscosity increased.

であった。醤油では ¹⁷O シグナルも ²³Na と同様に広がっていることが確認された。これらの溶液の ¹⁷O シグナルはほとんどが H₂O に由来するものと考えられる。H₂O は溶液中でほとんど交換などが生じないと考えられるため、¹⁷O シグナルは溶液の粘性を反映したピークを与えるものと考えられる。すなわち、醤油溶液におけるシグナルの広がりには粘性によるものである可能性が示唆された。

3. 4 ³⁵Cl-NMR の半値幅による解析

3 M NaCl 溶液、醤油の ³⁵Cl-NMR シグナルの半値幅を **Fig.8** に示す。半値幅はそれぞれ、12, 208Hz であった。醤油の ³⁵Cl のシグナルは NaCl 溶液のものと比較して 17 倍に広がっており、¹⁷O や ²³Na の広がり方と比較しても大きく広がっていた。すなわち、Cl⁻ は粘性以外の理由によってもシグナルの広がりを示しており、醤油内に含まれる物質と相互作用している可能性が示唆された。

4. 考 察

官能試験の結果から、醤油の塩味は NaCl 溶液よりも薄く感じられることが明らかになった。すなわち以下のような可能性が考えられた。ひとつは醤油に Na⁺ 結合物質もしくは Cl⁻ 結合物質が含まれており、フリーのイオンが減少している可能性である。もう一つは醤油中の成分が味細胞に作用して塩味の感受性を減弱させている可能性である。本研究では NMR による検出が容易な Na⁺ に焦点をあて、

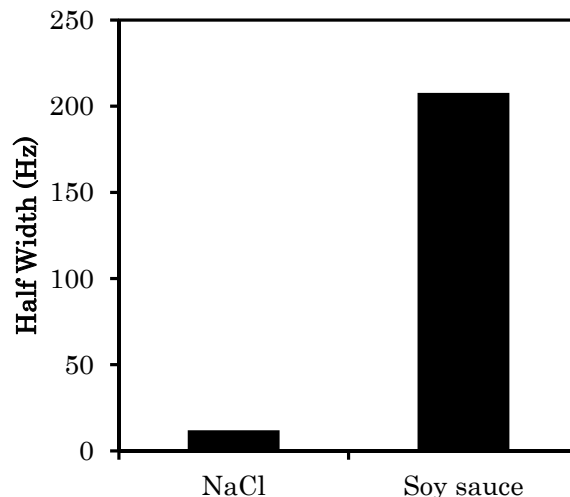


Fig.8. Half width of ³⁵Cl-NMR signal. The width of soy sauce was 17 times as wide as that of NaCl solution.

結合物質の探索を試みた。

Na⁺ との結合能が知られている BSA や Hb を用い、²³Na-NMR で Na⁺-結合物質の相互作用を検出できることを確かめた。Chelex 処理の有無により半値幅に差が生じたことは、結合物質の Na⁺ への結合能を正しく検出できている証拠と考えられた。そこで本法を用いて醤油サンプルの測定を行ったところ、半値幅の広がりを検出することができ、醤油に Na⁺ 結合物質が含まれていると考えられた。この物質を同定しようと分析を行った。しかし結合物質と思われる物質を特定するには至らず、半値幅の広がりが別の原因によるものではないかと考えた。半値幅は T2 緩和時間により決定されるものであり、緩和時間が短くなる要因として溶液の粘性が考えられる。30~35% のグリセロール添加により醤油の ²³Na-NMR シグナルと同程度まで半値幅が広がったこと、および NaCl 水溶液と醤油において ²³Na-NMR シグナルと ¹⁷O-NMR シグナルが同様の挙動を示したことから、²³Na-NMR シグナルの半値幅の広がりは粘性によってもたらされた事が示唆された。その一方で、³⁵Cl-NMR シグナルの広がりは、醤油で NaCl 溶液の 17 倍であり、²³Na や ¹⁷O の広がり方よりも大きい。すなわち Cl⁻ は醤油中に含まれる結合物質と相互作用している可能性が示唆された。この相互作用により醤油中の Cl⁻ の活量が低下し、醤油の塩味が抑制されている可能性が考えられる。

5. 謝 辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の援助によって実施した結果である。謹んで感謝申し上げます。

Purification and Structural Elucidation of Salty-Taste-Modifying Substances in Food

Etsuro Yoshimura, Michio Suzuki, Yuuki Imura

The University of Tokyo

Summary

Salty taste is promoted or inhibited by food constituents. One possible mechanism is that some food constituents interact with Na^+ and reduce the activity of ion. In this study, we tried to analyze the salty-taste-controlling food constituents using ^{23}Na -NMR. The Na^+ activity was evaluated by half width of the signal. An organoleptic examination revealed that the salty taste of soy sauce was weakened compared to its NaCl concentration. This result suggests that there should be salty-taste-inhibiting food constituents in soy sauce. The ^{23}Na -NMR signal of soy sauce was 3 times as wide as that of NaCl solution. This result suggests that there should be some substances interacting with Na^+ in soy sauce. The substances were searched for through solvent fractionation. However, no candidate was detected. Therefore, we considered the signal broadening in ^{23}Na -NMR was brought by viscosity of the solution, not by food constituents. Glycerol was added to NaCl solution to modify the viscosity. The ^{23}Na -NMR signal of NaCl solution with 30% glycerol had almost same half width as that of soy sauce. ^{17}O -NMR was measured to evaluate the viscosity of the solution. The signal of soy sauce was more than twice as wide as that of NaCl solution. These results suggest that the ^{23}Na -NMR signal broadening of soy sauce should be because of the viscosity of the solution. On the other hand, ^{35}Cl -NMR signal of soy sauce was 17 times as wide as that of NaCl solution. This broadening was significant because it was larger than that brought by viscosity. This result indicates that there should be some substances interacting with Cl^- in soy sauce. Such substance might decrease the activity of Cl^- . Cl^- is also important to perceive salty taste, because sodium acetate has no salty taste. From this research, it is suggested that there should be no sodium-binding substances but chloride-binding substances in soy sauce, which inhibit the salty taste.