舌上での油滴拡散ダイナミクスが第六の味覚 「コク味」に与える影響の解明

国立研究開発法人海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター 岡田 賢

1. 研究の目的と背景

味覚とは、舌状の味覚受容体に対して特定の化学物質群 が結合することによる刺激に由来する感覚である.人間の 味覚には、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味という基本五 味があることが知られている。これらの味覚は、糖、ナト リウムイオン,カルボン酸,アルカロイド等,グルタミン 酸等のアミノ酸という化学物質群が刺激物質となり、舌表 面の乳頭と呼ばれる凹凸上にある,対応する味覚受容体に 検知されることで生じるものである.一方,辛味や渋みの ように、一般に味と思われているそれ以外の感覚は、痛覚 や組織収れん作用を検知しているのであり、対応する味覚 受容体がないことから味ではないと考えられている. とこ ろで、舌表面に存在する受容体の中には、上に挙げた化学 物質群以外を検知するものもあることが近年の研究で明ら かにされつつある。その一例として、コク味と呼ばれる、 脂肪酸の味を検知する受容体が発見されており、味覚試験 の結果からこれが第六の味覚ではないかという仮説が生じ ている.1,2)

喫食時に味覚を感じるのは味覚物質が舌上に吸着するた めである.しかしながら、味を感じるまでにかかる時間や 味の残り具合、すなわち味覚物質の吸着ダイナミクスは、 物質の形態により大きく異なる. 例えば、米などの固体物 を直接舌表面に当てた場合に比べて、スープのように味覚 物質が液体中に溶解している食物のほうが味覚を直ちに感 知することは日常的に経験するところである.これは、味 覚物質は検知できる形で味覚受容体に到達する必要があ り、固体物質はまず水に溶解する必要があるからである。 また基本五味の元となる化学物質の大多数は数 Å 程度の 大きさを持つ水溶性の小分子であるため、水溶液とした場 合には味覚物質が分子レベルで水中に溶解しており、刺激 物質が拡散し味覚受容体に吸着する一連の過程が容易にか つ短時間で起こるからである.液体の対流を考えない単純 な系では、味覚物質の受容体への拡散が重要なパラメータ となる.分子の拡散しやすさは拡散係数Dを用いて評価 することができ、これは分子半径r、媒質の粘度n、ボル ツマン定数 k, 温度 T を用いて $D=kT/6\pi\eta r$ と与えられる. そのため、分子が小さく、粘度が低く、かつ温度が高い場 合に分子拡散は加速される.一方,脂肪酸は水への溶解度 が低いために分子レベルでは溶解しておらず、エマルショ ンと呼ばれる数十 nm ~数百ミクロンの粒子として分散し ている. 粒径が百倍以上に増大するため、水中での拡散速

度は百倍以上遅くなる. さらには, 受容体が存在する舌表 面は細胞が露出しているが, 細胞表面は脂質二重膜からな るため, 油脂に対して親和性がある. そのため, 味覚物質 の脱吸着も起こりにくいと考えられる. 以上の考察から, コク味の特性として, 他の味覚と比較して知覚まで時間が かかり, かつ後味として残りやすいという特性が示唆され る.

味覚物質が舌表面に吸着する過程をより詳細に考察する と、まず味覚物質が舌表面付近に拡散し、その後分子間相 互作用により受容体に吸着するという過程を経る。分子間 相互作用の中でも長距離で作用するものが静電相互作用で ある。すなわち、吸着面と粒子が双方とも負に帯電してい る場合は吸着が起きにくく、逆に表面電化の符号が逆ない し、どちらかの電荷が0である場合には粒子が吸着しやす い。この表面電位は、ゼータ電位をパラメータとして議論 することができる。すなわち、コク味においては油粒子お よび舌表面のゼータ電位のゼータ電位の大小が味覚感知ダ イナミクスに影響を及ぼすと示唆される。また、舌表面に ある味覚受容体への粒子拡散では、舌の表面形状も重要と なる。以上を鑑み、筆者は脂肪酸エマルションの組成、粒 径、ゼータ電位の相関を見出し、これが舌上での油滴拡散・ 付着ダイナミクスに与える影響について検討した。

2. 研究の方法

2.1 試料

本研究で使用した脂肪酸および卵黄レシチンは全て東京 化成工業より、それ以外の試薬は全て和光純薬より購入し た.水は Milli-Q Advantage (Millipore) にて精製された ものを用いた.舌のモデルとして用いた牛タン(常陸牛) および豚タンの皮(いずれも冷凍)は、ケミテックを通 して購入した.酸化インジウムスズ被覆ガラス(ITO)は GEOMATECより購入した.

2.2 エマルション作製

110 mL ネジロバイアルに水 49.9 g に対し脂肪酸 0.1 g を加え,超高速ホモジナイザー(T 25 digital ULTRA-TURRAX, IKA)を用いて 10-25 krpm で 3-10 分間処理 し,エマルションを得た.油脂が常温で固体の場合のみ, 70-75℃に加熱した水浴中にバイアルを浸して処理を行 なった.連続相は、リン酸ナトリウム緩衝液(pH7),酒 石酸緩衝液(pH4.5),ホウ酸緩衝液(pH9)の 10 mM 水 溶液を用事調製して用いた.

2.3 物性評価

2.3.1. 粒径およびゼータ電位

粒径は FPAR-100AS(大塚電子)により 25℃で三回測 定し, CONTIN アルゴリズムにより 1-4000 nm の範囲で 粒度分布解析を行ない,キュムラント解析により平均粒径 および多分散指標を得た. ゼータ電位は FDLS-Z1000(大 塚電子)により濃厚系セルを用いて測定した. 溶液の pH は LAQUAtwin pH-22B(堀場製作所)により測定した. 舌表面のゼータ電位は,約 37 × 16 × 5 mm に切断した舌 サンプルを平板用セルユニットに装着し,10 mM 塩化ナ トリウム水溶液に懸濁させたモニター粒子を用いて測定し た.

2.3.2. 電子顕微鏡

走 査 電 子 顕 微 鏡 (SEM) 観 察 は, Quanta 450 FEG (ThermoFisher)を用い,着地電圧 1 kV,チャンバー圧 <10⁻³ Pa で行なった.SEM 観察試料は UV/オゾン処理 (3分間,ASM401N,あすみ技研)した ITO (5 mm 角) 上に試料を 5 μ L 塗布し,10 秒後に余分な液を濾紙で吸い 取った後にデシケータ中で減圧乾燥して調製した.舌表面 の SEM 像は,Helios G4 UX (ThermoFisher)に冷却ス テージとして PP3010T (Quorum)を取り付けたものを用 い,着地電圧 1 kV で撮影した.SEM 観察試料は約 5 mm 角に切断したものを ϕ 10 mm × 10 mm のアルミ試料台上 にドータイトで固定し,これをスラッシュ窒素に浸漬して 瞬間的に凍結することで調製したものを,SEM チャンバー 前室に真空搬送し,-80℃で3分間表面自由水を昇華させ た後に約-150℃で観察した.

2.3.3. 粉末 X 線回折

粉末 X 線回折 (XRD) は、X'Pert-Pro MPD (PANalytical) を用い、Cu K α 線 (1.5406/1.5442 Å) にて測定した.標 準試料は 75°C に加熱したガラスセル (ϕ 5 mm × 0.3 mm) 上に載せて融解させた後常温にて凝固させた.エマルショ ン試料は、常温にて減圧濃縮ないし窒素吹付けにより脱水 して得られた固体をガラスセル上に載せた.

3. 研究内容

本研究ではまず,幅広い粒径を持つ脂肪酸エマルション を調製し,粒径とゼータ電位の相関を評価する.また,牛 や豚の舌表面のゼータ電位および表面テクスチャも測定 し,エマルションのゼータ電位と粒径から吸着ダイナミク スについて議論する.

4. 研究の実施経過

食品油脂は複数種の脂肪酸の混合物であるが、その中で もオレイン酸は全ての食用油脂に含まれている.また、実 際の食品は味付けのために食塩などが添加されているた め、電解質水溶液と見なすことができる.そのため、本研 究ではまず、リン酸バッファ中のオレイン酸エマルショ ンをモデルとして実験条件を決定した.オレイン酸濃度 を1-10 wt%の間で変化させたが、ゼータ電位は -90 mV 付近でほとんど変化しなかった(Table 1, entry 1-4).こ のため、以降の検討はオレイン酸濃度を 2% で固定して行 なった.この条件下で超高速ホモジナイザーの回転数を 変化させることで粒径を変化させた場合、ゼータ電位の 絶対値は平均粒径の減少とともに微増する傾向にあった (Table 1, entry 3, 5-7).なお、さらに粒径の小さいエマ ルションを作成するために超臨界水を用いた乳化³⁾も検討 したものの、350℃以上の高温条件ではオレイン酸の二重 結合部位に酸化が見られたため、本検討からは除外した.

ゼータ電位の pH 依存性を,各種バッファ溶液中で乳化 することにより検討した(Table 1, entry 8-10). その結 果,酸性条件下ではゼータ電位が -31 mV と増加したが, 中性ないし弱塩基性条件ではゼータ電位が -70 mV 以下 となった. 直鎖カルボン酸の pKa が 4.8-5.0 であるので,⁴⁰ ゼータ電位の上昇は脂肪酸の電離が抑制されたことに起因 する.以上の結果から,オレイン酸エマルションは表面に 露出しているカルボキシアニオンにより安定化されている こと,10 μm 以下程度の粒径においてはゼータ電位と粒径 には顕著な相関がないことが示された.

 Table 1. Properties of oleic acid emulsions in water.

) to the bills of a	1-1-1-1-1-		tot data in	de al list the test	
entry	油脂濃度	緩衝液	рН	粒径 /nm	多分散指標	セータ電位/mV
1	1%	リン酸	7.24	972 ± 11	0.336 ± 0.006	-93.39
2	2%		7.09	586 ± 32	0.237 ± 0.009	-86.30
3	5%		7.21	671 ± 28	0.228 ± 0.010	-87.78
4	10%		7.06	676 ± 9	0.240 ± 0.010	-90.36
5	2%	リン酸	7.19	15036 ± 6888	1.711 ± 0.613	-85.55
6			7.13	1931 ± 770	0.718 ± 0.261	-83.43
3			7.09	586 ± 32	0.237 ± 0.009	-86.30
7			7.12	470 ± 25	0.231 ± 0.025	-88.41
8	2%	酒石酸	4.50	527 ± 19	0.237 ± 0.013	-31.06
9		リン酸	7.03	523 ± 49	0.211 ± 0.033	-84.83
10		ホウ酸	8.82	449 ± 14	0.253 ± 0.011	-71.30

次に、脂肪酸の種類を変えて同様の実験を行なった.リ ノレン酸のような不飽和脂肪酸では、得られたエマルショ ンの粒径はオレイン酸の場合とほぼ同様であり、ゼータ電 位と粒径に有意な相関は見られなかった(Table 2, entry 1-3).一方、ステアリン酸やパルミチン酸といった飽和 脂肪酸の場合は、エマルションの粒径がオレイン酸の場合 よりも増加し、また粒径が小さくなるに従ってゼータ電位 が増加する傾向が見られた(Table 2, entry 4-9).この傾 向は炭素鎖が長いステアリン酸でより顕著であった.こ れら飽和脂肪酸エマルションは冷却後1時間程度放置す ることでエマルション液表面に視認できる粒径の固体粒 子を生じた(Figure 1 左).ステアリン酸ナノ粒子の形状

を SEM で観察した所,厚さ 100-200 nm,直径 1-3 µm の 板状粒子および直径 100-900 nm 程度の球状粒子が観察さ れた (Figure 1a). このことから, 常温で固体となる飽和 脂肪酸では、まず球状のエマルションが生じ、これが冷却 される過程で脂肪酸の結晶化、粒子の変形と合一が起こっ たと考えらる. また, 特に炭素数の短いラウリン酸乳化物 では溶液全体の流動性が下がるように全体的に固体粒子 が生じたが(**Figure 1 右**), SEM 像では球状粒子とともに シート状固体がネットワークを形成している様子が確認さ れた (Figure 1b). ラウリン酸は融点が 43.2℃と低く,ス テアリン酸よりも結晶化にかかる時間が長いため、部分的 に結晶化しシート状に変形した粒子同士が合一したものと 考えられる.また、粉末X線結晶構造解析において、脂 肪酸ナノ粒子からの反射ピーク位置や本数がバルク結晶の ものと異なっていたことから、ナノエマルションからの結 晶化において結晶構造が変化している可能性が示唆される (Figure 3). さらに, ステアリン酸エマルションを75℃か ら徐々に冷却しながらゼータ電位を測定したところ、電場 応答する成分に加えて電場応答が殆どないゼータ電位がほ ぼ0となる成分が見られた. ゼータ電位がほぼ0となる成 分は、冷却により結晶化が起き、電極やセル表面に固着し たステアリン酸粒子によるものと考えられる.

 Table 2.
 Properties of 2 wt% fatty acid emulsions/ particle dispersions in water.

	F				
entry	油脂	pН	粒径 /nm	多分散指標	ゼータ電位/mV
1	リノレン酸	7.60	1013 ± 73	0.340 ± 0.021	-65.61
2		7.56	877 ± 56	0.260 ± 0.013	-86.71
3		7.53	627 ± 9	0.223 ± 0.017	-88.33
4	ステアリン酸	7.27	9915 ± 429	0.370 ± 0.048	-73.63
5		7.30	5653 ± 1771	0.279 ± 0.075	-64.42
6		7.27	748 ± 57	0.249 ± 0.036	-59.87
7	パルミチン酸	7.69	3903 ± 183	1.022 ± 0.031	-74.90
8		7.87	1457 ± 96	0.438 ± 0.040	-70.28
9		7.71	999 ± 17	0.202 ± 0.024	-67.74



Figure 1. Optical image of stearic acid nanoparticle dispersion (left) and lauric acid sol (right) at room temperature.



Figure 2. SEM images of solidified fatty acid particles. (a) Stearic acid (Table 2, entry 5), (b) lauric acid.



Figure 3. Powder XRD of stearic acid and its emulsion (Table 2, entry 5).

実際に食品で用いられている油脂は複数の脂肪酸からな る混合物であるため、ごま油、オリーブ油、ラードの成分 をオレイン酸と直鎖脂肪酸の混合物として模した油脂を 用いて同様に乳化を行なった(Table 3). これら疑似油脂 混合物は、オリーブ油模擬のみ常温で液体であった.本実 験は超高速ホモジナイザーの回転数を変化させることで行 なったが、いずれの条件においても粒径は0.5-1 µmのも のが得られた.また、ゼータ電位も -90 mV 前後となり、 オレイン酸エマルションで得られた結果に近いものとなっ た.また、得られたエマルションを1日放置しても固体の 析出は顕著には見られなかった.このことから、油滴表面 物性は混合脂肪酸エマルション中に含まれる不飽和脂肪酸 に強く影響されることが示された.

Table 3. Properties of mixed fatty acid emulsions in water.

ontra	4115	ъЦ	粉体 /mm	タム歩世博	ゼータ雪位/mV
entry	1四7月	pm	和1主 /1111	多力取1时示	ビーク 电位/III V
1	ごま油模倣油脂混合物	7.10	972 ± 11	0.336 ± 0.006	-93.39
2	オレイン酸 50/ラウリル酸 50	7.03	671 ± 28	0.228 ± 0.010	-87.78
3		6.99	676 ± 9	0.240 ± 0.010	-90.36
4	オリーブ油模倣油脂混合物	6.98	653 ± 46	0.284 ± 0.026	-92.37
5	オレイン酸 85/ステアリン酸 15	6.94	626 ± 9	0.263 ± 0.025	-91.28
6		6.93	556 ± 12	0.232 ± 0.018	-87.63
7	ラード模倣油脂混合物	6.98	726 ± 42	0.242 ± 0.033	-91.62
8	オレイン酸 85/ステアリン酸 35	6.93	726 ± 24	0.258 ± 0.024	-81.71
9		6.93	635 ± 22	0.229 ± 0.009	-89.55

さらに,加水分解前のリン脂質のモデルとして卵黄レシ チンの乳化およびゼータ電位測定も同様の条件で行なった (Table 4). その結果, 粒径が 400 nm から 200 nm へと減 少するに従い, ゼータ電位も -22 mV から -16 mV へと減 少した. 本実験において, ゼータ電位の増加と pH の増加 に相関があるように見えるが, レシチン末端は四級アンモ ニウムカチオンおよびリン酸モノエステルからなり負電 荷には pKa は 6-7 であるリン酸部位のみが関与するため, 本結果は粒径が減少するとゼータ電位が増加することを示 している.

Table 4. Properties of lecithin emulsions in water.

entry	pН	粒径 /nm	多分散指標	ゼータ電位/mV
1	7.13	396 ± 33	0.191 ± 0.068	-22.45
2	7.23	236 ± 1	0.238 ± 0.009	-18.48
3	7.28	199 ± 2	0.191 ± 0.018	-16.24

脂肪酸油滴吸着の対象となる舌表面のゼータ電位を、牛 タンおよび豚タン皮をモデルとして測定したところ、+1.2 ~-1.4 mV となった. この結果は、細胞膜モデルである リン脂質二重膜ベシクル^{5.6)} や微生物⁷⁾ のゼータ電位がほ ぼ0 mV であることと一致している. また, 舌の表面テ クスチャを SEM で観察したところ、牛タン表面は太さ 400 µm 程度の毛状組織が生えておりサブミリスケールの 凹凸に富む構造である一方,豚タン表面は0.4-1 µmの乳 頭状構造が密になった構造を取ることが分かった(Figure 4). 人間の舌表面は豚タンにより近いことから、豚タンを モデル物質として用いることが有効であると考えられる. ところで、卵黄レシチンエマルションも細胞膜と同様にリ ン脂質からなるが、エマルションとベシクルではゼータ電 位が大きく異なる. このことは、表層下部でのレシチン分 子の配向が、二重膜とエマルションで異なっていることを 示唆している.



Figure 4. SEM images of tongue surface. (a) Cow, (b) pig.

5. 研究から得た結論・考察

本研究では,脂肪酸固体粒子分散系および卵黄レシチン エマルションにおいて,粒径の減少に伴いゼータ電位が増 加した一方,液体として分散しているオレイン酸エマル ションではゼータ電位は粒径に依存しなかった.このこと は,分散質の凝集構造と関連付けて説明できる.例えば, ステアリン酸は常温で固体となるが、その結晶構造はカル ボキシ基同士で分子間水素結合を形成した二量体が平行に 整列し、カルボキシ基とアルキル基がそれぞれカラム状に ドメイン形成したものとなる.^{8.9)}この構造では、親水基が 露出した結晶面と、疎水基が露出した結晶面の両方が生じ る.結晶が板状でかつ水に分散していることを考えると、 面積の大きな面にカルボキシ基が露出していると考えられ る.粒径が減少すると、カルボキシ基露出面の面積は疎水 基が露出した側面の面積に比べて著しく減少するため、粒 子表面における親水基の割合が減少する。これが粒径の減 少とともにゼータ電位が減少する原因と考えられる.レシ チンのような層状構造を取りやすい固体粒子も同様と考え られる.一方、オレイン酸のような液滴の場合は表面構造 が流動的なため構造異方性がなく、ゼータ電位に大きな影 響が生じないと考えられる.

タン皮をモデルとしたゼータ電位測定では、舌表面はほ ぼ電気的に中性であることが分かった。すなわち、舌細胞 表面の吸着において、油脂は電気的反発を受けることなく 舌表面に吸着できることが示唆された。また、冷却過程で ゼータ電位測定の電場に応答しないような粒子が生じたこ とから、脂肪酸エマルションが舌表面で冷却される際にも 同様に、舌表面に油脂被膜が生じることが示唆される。こ の現象は具体的には、温度がやや下がった炒めものを喫食 した際に舌に脂が付着し味がマスキングされることや、冷 えた料理表面に滑らかな油脂被膜が生じることと関連付け られる。なお、固着したステアリン酸はエタノール溶液で 容易に洗浄できたことからも、油料理喫食時にアルコール 飲料を提供することは合理的であることが示唆される。

以上をまとめると、本研究からは、脂肪酸エマルション の表面電位は直鎖脂肪酸が固化した際に粒径依存するこ と、舌表面は電気的にほぼ中性であるために静電反発は大 きくないことの二点が明らかになった.

6.残された問題、今後の課題

本研究においては、油滴拡散ダイナミクスに対し、ゼー タ電位と粒径の関係に焦点を当てて研究を行なった.その 際に、舌表面に常に分泌されている粘液との相互作用や、 舌の微細構造への吸着などを無視して系を単純化したが、 これらの実際の味覚において重要なパラメータたり得る. 上記問題は、粘液そのものの組成や電位、舌表面の微小空 間における接触角などから明らかにすることができ、味覚 と粒径との相関をより詳細に調査するためには、複数人に よる味覚試験も今後の検討課題となる.

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって,(公財)東洋食品研究所 から多大なるご支援を戴きました.関係者の皆様に感謝致 します.

References

- C. A. Running, B. A. Craig, R. D. Mattes, *Chem. Senses* 2015, 40, 507.
- 2) M. Y. Pepino, L. Love-Gregory, S. Klein, N. A. Abumrad, *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 561.
- 3) S. Deguchi, N. Ifuku, Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 6409.
- 4) Dissociation constants of organic acids and bases. In CRC Handbook of chemistry and physics, 98th ed.; J. R. Rumble Ed.; Taylor & Francis: New York, 2018; pp 5-87-5-96.
- 5) R. Tunuguntla, M. Bangar, K. Kim, P. Stroeve, C. M. Ajo-Franklin, A. Noy, *Biophys. J.* 2013, 105, 1388.
- 6) A. C. Blakeston, A. M. Alswieleh, G. R. Heath, J S. Roth, P. Bao, N. Cheng, S. P. Armes, G. J. Leggett, R. J. Bushby, S. D. Evans, *Langmuir* 2015, *31*, 3668.
- 7) H. Morisaki, S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, K. Kogure, *Microbiology*, 1999, 145, 2797.
- 8) M.Goto, E.Asada, Bull. Chem. Soc. J. 1978, 51, 2456.
- 9) E. Moreno-Calvo, G. Gbabode, R. Cordobilla, T. Calvet, M. A. Cuevas-Diarte, P. Negrier, D. Mondieig, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 13141.