大豆種子の成熟過程における脂質とトコフェロール 組成の変動について*

吉田 弘美, 梶本 五郎
(神戸学院大学栄養学部)

昭和 47 年 2 月 16 日 受 理

Changes in the Fatty Acid and the Tocopherol Compositions of Soybean Seed during Ripening (Studies on the Productions of the Lipids and the Tocopherols in Seed during Ripening Part I)

By Hiromi YOSHIDA and Gorō KAJIMOTO
College of Nutrition, University of Kobe Gakuin

Changes in the fatty acid and the tocopherol compositions of soybean seed during ripening were studied. The seed after flowering was collected at intervals (20, 30, 40, 60 and 80 days). The contents of lipid and tocopherol were determined.

Fatty acid compositions of lipid were analyzed by gas-liquid chromatography and each tocopherol separated by thin-layer chromatography was determined with spectrophotometric method at 534 m μ by bathophenanthroline-FeCl₃-orthophosphoric acid procedure. Total tocopherols showed a markedly rapid increase until 40 days and from 60 to 80 days.

The main fatty acid compositions of total lipid were 14:0, 18:1, 18:2 and 18:3. The percentages of 14:0, 16:0, 18:0 and 18:3 decreased while those of 18:1 and 18:2 increased during ripening. The main compositions of tocopherol were γ - and δ -tocopherol, but α -tocopherol showed a marked increase after 40 days of ripening.

(Received February 16, 1972)

緒 言

植物脂質や食品中のトコフェロール (Toc.) に関する報告は比較的多く⁽¹⁻⁴⁾, また種子の発芽⁽⁵⁾ならびに成熟過程における脂質と構成脂肪酸の変動については, 2, 3 の植物について研究されている⁽⁶⁾. しかし, 種子の未熟時から完熟時にいたるまでに, Toc. の生成と脂質および構成脂肪酸の変動に関する研究は少なく, Green ら⁽⁷⁾ はコムギ, エンドウなどを発芽させた場合に, 発芽の時間経過とともに α -Toc. 含量は増加するが, 他の Toc. は対応量だけ減少すると報告している.

Grams と Blessin ら⁽⁸⁾ は完熟トウモロコシについて,

* 種子の成熟過程における脂質とトコフェロールの生成について (第 1 報).

総 Toc. の 70~80% までがハイにあり, しかも α -Toc. の 94~96% までがハイに集中していると報告している程度で, ことに脂質と Toc. の生成との関連において検討されているものは, ほとんどみない. Toc. の生理作用と酸化防止作用は広く知られているが, 植物体における機能については, 不明な点が多い. そこで著者らは, 種子の成熟過程における脂質と Toc. の生成について研究する一環として, まず油脂原料の代表的なもので, Toc. 含量も比較的多い大豆種子について, 種子の未熟時から完熟時にいたるまでの Toc. の生成量と脂質量, および構成脂肪酸の変動について調べた.

実 験 方 法

1. 試料 前年度収穫の大豆種子 (品種, 玉錦) を

Table I. Seeding and Picking of Soybean Seed

Date of seeding	5/28					
Date of picking	7/2	22	8/1	11	31	9/1
Days after flowering	0	20	30	40	60	80

Table I の条件で栽培し、種子の採取は開花後 20, 30, 40, 60, 80 日目の合計 5 回に分け、それぞれの採取時は、できるだけ生育度の均一な種子を選び出した。

それぞれの種子 20~50g (湿重量) を常法により磨砕し、約 5 倍量のクロロホルム・メタノール (2/1, v/v) 混液で数回に分けて抽出を繰り返し、抽出液はすべて合わせ、吸引濾過し、ガラスフィルター上の残渣は少量の同溶媒で数回洗浄し、濾液はすべて合わせ、Folch 法⁽⁹⁾に準じて水洗後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧濃縮して溶媒を留去し、総脂質とした。これらのヨウ素価、酸価は日本油化学協会制定基準油脂分析法⁽¹⁰⁾によった。なお、ソックスレー抽出装置で同溶媒を使用し、20 時間連続抽出した場合と、上記の抽出法とで比較した総脂質量において、ほとんど差異は認められなかった。

2. 試料のケン化と不ケン化物の分離 各採取種子から調製した総脂質を、100 ml 容褐色三角フラスコに 1g 前後を精秤し、津郷らの方法⁽¹¹⁾に準じ、5% (w/v) ピロガロールアルコール溶液を 5 ml 加えて、温水につけて完全に溶解させ、60% (w/w) 苛性カリ水溶液を 1 ml 加えて還流冷却器を取りつけ、煮沸水につけてときどき振とうさせながら、20 分間ケン化した。ケン化後、室温まで冷却してから、蒸留水 25 ml でフラスコを洗浄しながら、内容物を 300 ml 容褐色分液漏斗に移す。過酸化物を除去した精製エーテル 40 ml で、フラスコを洗って分液漏斗に移し、強く 3 分間振り、水層とエーテル層が完全に分離してから、水層を別の分液漏斗に移し、エーテル層は蒸留水 20 ml を加えて水洗し、水層は先の水層に合一した。合一した水層はさらにエーテル 40 ml で 2 回抽出を繰り返し、分離したエーテル層は 1 回目のものと合一した。蒸留水で中性になるまで水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ガラスフィルターを使用し、吸引濾過して減圧下でエーテルを留去し、以下の Toc. 分離用試料とした。

水層と水洗液は、すべて合一して希塩酸で微酸性とし、100 ml のエーテルで 3 回抽出を繰り返し、脂肪酸をエーテル層に完全に移行させた。エーテル層は蒸留水

で中性になるまで水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ガラスフィルターで濾過し、減圧下でエーテルを留去して脂肪酸を得た。

3. 不ケン化物から各 Toc. の分離定量 エーテルを留去した不ケン化物に、ベンゼン 1 ml を加えて完全に溶解し、あらかじめ *n*-ヘキサン中に懸垂させながら作製した活性アルミナカラム (内径 1 cm, 高さ 10 cm) に、定量的に負荷した。

n-ヘキサン、*n*-ヘキサン・ベンゼン (20/80, v/v)、*n*-ヘキサン・ベンゼン (50/50, v/v)、ベンゼン、メタノールの順で、それぞれ 50 ml を用いて順次展開し、得られたそれぞれの溶出物について、減圧下で溶媒を留去し、それぞれについて Pennock の方法⁽¹²⁾により、薄層クロマトグラフィー (TLC) を実施した。TLC 用シリカゲル G (Kieselgel G メルク社製) で、厚さ 250 μ のプレート (20×20 cm) を作製し、1 夜放置後、電気定温乾燥器で 110°C、2 時間加熱乾燥した。

それぞれの溶出物を原点から 1.5 cm の位置にスポットし、ベンゼン・メタノール (98/2, v/v) の混合溶媒で 15 cm 展開し、エメリー・エンゲル試薬を噴霧し、同時に展開した標準の各 Toc. の *R_f* 値から、試料中の各 Toc. を同定した。さらに、Toc. 以外の物質の混入を知る目的で、濃硫酸を噴霧し、110°C で 1 時間加熱灰化した。それらの結果は Fig. 1 で、なお Toc. 以外に他の物質が含まれていた。

そこで、Toc. のみを分離するため、各 Toc. が濃縮されている *n*-ヘキサン・ベンゼン (20/80, v/v)、*n*-ヘキサン・ベンゼン (50/50, v/v) とベンゼン溶出物を合わせ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。すなわち、あらかじめ 110°C の電気定温乾燥器で 3 時間加熱乾燥したシリカゲル (クロマト用ワコーゲル Q-22) 10 g に、*n*-ヘキサンを加えてかくはんし、気ホウの混じらない均一な懸濁液にして、カラム (内径 1 cm, 長さ 30 cm) に注入した。*n*-ヘキサン 30 ml でカラムを洗浄後、Toc. 濃縮物にベンゼン 1 ml を加えて完全に溶解し、先のカラムに定量的に負荷した。

n-ヘキサン、ベンゼン、メタノールの順で、それぞれ 50 ml を用いて順次展開し、減圧下で溶媒を留去し、TLC を実施した。その結果、ベンゼン溶出物にのみ Toc. が検出された。各 Toc. を単離し、エタノール抽出物について、バソフェナントロリン法⁽¹¹⁾により比色定量した。

なお、検量曲線は Fig. 2 に示した。各 Toc. の補正係

Fig. 1. Thin-layer Chromatograms of Unsaponifiable Matter Separated by Column Chromatography.

Solvent system: benzene-methanol (98/2), detection methods: A and B, Emmerie-Engel reagent spray. C and D, sulfuric acid spray followed by heating after Emmerie-Engel reagent. S: standard mixtures of α , β , γ , δ -Toc. 1~5: fractions eluted from activated alumina column chromatography. 1: *n*-hexane, 2: *n*-hexane-benzene (20/80), 3: *n*-hexane-benzene (50/50), 4: benzene, 5: methanol, 6: rechromatography of 2~4 fractions on silicic acid column to separate tocopherol mixtures.

数は α -Toc., γ -Toc., δ -Toc. はそれぞれ 47.2, 38.7, 36.7 であり, クロマト間の TLC による標準物質の回収率は, 5 回の繰り返し実験より平均 92% であったので, これを基準として各 Toc. 量を算出した.

4. ガスクロマトグラフィー ケン化処理して得た脂肪酸は, Stoffel らの方法⁽¹³⁾ に準じてメチルエステルとし, 柳本製作所製昇温ガスクロマトグラフィー G 8 型を使用し, U 字型ステンレス製 3mm ϕ ×3m のカラムに polyethylene glycol succinate 15% on 60~80 mesh Diasolid S を充てん剤としてつめ, カラム温度 190°C, キャリヤーガス He (約 20 ml/min), 熱伝導型検出器の条件で測定した. 各ピーク面積は半値幅法により, 面積比から組成百分率を算出した.

実験結果

1. 種子の成熟度と脂質量

種子の成熟度は, 開花後 20, 30, 40, 60, 80 日目のものを採取し, 100

Fig. 2. Calibration Curves of α , γ and δ -Tocopherols.

—○— α -Toc., —△— γ -Toc.,
—□— δ -Toc.

粒の種子について, その形状, 湿重量を測定し, 1 粒平均として示した. 脂質量は, 乾燥種子に対する割合で示した. それらの結果は, Table II のとおりである.

開花後, 種子は次第に成熟し, 40 日目に形状, 重量ならびに脂質量とも最大となり, その後ほとんど一定であった. 遊離酸は成熟が進むにつれて急減し, ヨウ素価はこれに対して次第に増加することから, 不飽和脂肪酸の生成が著しいことがわかる.

2. 総脂質の脂肪酸組成の変動

ケン化物を脂肪酸メチルエステル誘導体としてガスクロマトグラフィーにかけ, 開花後の総脂質の脂肪酸の変動を調べた結果は, Table III である.

成熟が進むにつれて, C_{12} , C_{14} は減少し, 60 日目以後はほとんど消失した. C_{16} は 20 日目から次第に減少した. 40 日目以後は一定になり, 総脂質を構成する脂肪酸

Table II. Changes of Form, Lipid Contents and their Properties of Soybean Seed during Ripening

Form	Days after flowering				
	20	30	40	60	80
Long length (mm)	7.9	11.5	14.5	9.6	8.5
Short length (mm)	5.3	7.8	8.9	7.7	7.2
Width (mm)	2.2	4.5	6.2	6.0	5.7
Weight (g)*	0.04	0.19	0.37	0.26	0.24
Lipid contents (%)**	7.0	14.9	20.8	17.2	17.5
Iodine value	112.6	115.3	121.9	123.8	142.3
Acid value	35.3	3.2	2.8	2.1	1.6

* wet weight per one seed, ** % of dry weight.

Table III. Fatty Acid Compositions of Total Lipid of Soybean Seed during Ripening

Fatty acid	Days after flowering				
	20	30	40	60	80
	%	%	%	%	%
12:0	0.2	0.1	tr	tr	tr
14:0	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1
16:0	28.2	20.8	15.7	15.0	14.0
18:0	6.0	4.9	3.7	3.3	3.6
18:1	15.6	21.3	28.6	24.4	24.6
18:2	37.7	43.3	45.5	50.6	51.6
18:3	11.9	9.4	6.4	6.6	6.1
20:0	tr	tr	tr	tr	tr
Saturated	34.8	26.0	19.5	18.4	17.7
Unsaturated	65.2	74.0	80.5	81.6	82.3

tr : trace.

の約15%を占めた。 C_{18} , $C_{18:3}$ は20日目から次第に減少し, 80日目には20日目の約半量に減少した。これに対して, $C_{18:1}$ は開花後40日目に最大になり, 総脂肪酸の約29%を占め, その後はほとんど変動しない。 $C_{18:2}$ は成熟が進むにつれて急増し, 80日目には全構成脂肪酸の約52%に達した。

3. 各 Toc. の生成

種子の成熟時の各 Toc. の生成量は, Fig. 3 に示した。各 Toc. ならびに総 Toc. 量は, 比色定量により抽出総脂質 1g に対する μg 単位で示した。

総 Toc. 量は今回, α , γ , δ -Toc. の総合計量としてあらわした。このことは, 種子の成熟が最大に達する40

Fig. 3. Changes in Tocopherol Content of Oil Soybean Seed during Ripening.

—x— total Toc., —o— α -Toc.,
—Δ— γ -Toc., —□— δ -Toc.

日目以後の不ケン化物中に, R_f 値が 0.96 と 0.98 にエメリー・エンゲル試薬に陽性のスポットが微量検出された。これらの陽性物質は, Whittle ら⁽¹⁴⁾および Kováts⁽¹⁵⁾などが報告している Toc. 類似物質と考えられる。従って厳密には, これらの物質も総 Toc. 量として算出しなければならない。詳細な点については, 今回検討しなかった。総 Toc. 量は開花後20日目に, すでに $114\mu\text{g}$ 生成されていた。種子の成熟が最大に達する40日目まで急増し, 20日目の約6倍量 ($654.6\mu\text{g}$) にあたる。その後40日目から60日目にかけて, わずかに増加した。60日目から80日目にかけて, 再びかなりの生成が認められ, 最終的には20日目の約9倍量 ($983.1\mu\text{g}$) になった。

一方, 各 Toc. の生成量は開花後20日目に α -Toc., γ -Toc., δ -Toc. は, それぞれ $2.4\mu\text{g}$, $98.9\mu\text{g}$, $13.5\mu\text{g}$ であり, その割合は 2:86:12 であって, 圧倒的に γ -Toc. の占める割合が多い。その後 γ -Toc., δ -Toc. は, 成熟が進むにつれて急増し, これに対して α -Toc. は, 80日目には $101.5\mu\text{g}$ となり, 20日目の約50倍量に達し, 他の各 Toc. に比べて増加率が著しく多い。

考 察

大豆種子成熟過程の脂質と, Toc. の生成量について調べた。成熟が急激に進む開花後40日目まで, 脂質ならびに総 Toc. 量も急増した。その後, 脂質はほぼ一定量になるのに対して, Toc. は増加した。種子成熟過程における脂質組成変動の一般的傾向としては, 成熟初期では複合脂質がその主体であるが, 種子の急速な充実期にはいと, トリグリセリドの絶対量と比率が増大し, 複合脂質や遊離酸の比率は急減する。

Table II で, 成熟過程において抽出総脂質の酸価が急減し, ヨウ素価が増加すること, また平山ら⁽⁶⁾は薄層クロマトグラフィーで, 40日目以後からトリグリセリド成分が90%以上検出され, しかも構成脂肪酸中で $C_{18:2}$ が約50%以上を占めると報告している。著者らも, 同じような結果を得た。従って, Toc. が種子中の植物生理と貯蔵脂質の酸化防止に, なんらかの作用があるのかも知れない。

種子の成熟過程において, 総 Toc. が一般に増加することは, Giovannini ら⁽¹⁶⁾によっても報告されている。Toc. 生合成に対する各 Toc. の変化の意味は, まだよくわかっていないが, Green ら⁽⁷⁾はコムギとエンドウ苗について研究した結果, α -Toc. は他の Toc. から生成

されると推論している。開花後 40 日目から 80 日目にかけて, γ -Toc. や δ -Toc. よりも α -Toc. の増加率が多く, この期間中での $C_{18:2}$ の増加も多い。しかし, 植物種子中における不飽和脂肪酸と Toc. および, これらの各 Toc. の生成意義とその機能については今後の課題にしたい。

要 約

大豆種子成熟過程における脂質, ならびに Toc. の量的, 組成的变化について調べた。開花後, 成熟中の種子を 5 回に分けて採取した。

種子の成熟が最大に達する 40 日目に, 脂質量も最大に達し, その後一定になった。総不飽和脂肪酸含量も同じような傾向を示し, 40 日目には全脂肪酸の約 80% になった。これに対して, 総 Toc. 量は 20 日目から 40 日目, 60 日目から 80 日目の 2 回にわたって著しく増加した。各 Toc. のうち, γ -Toc., δ -Toc. は著しく増加したが, この時期に α -Toc. はわずかに増加しただけである。 δ -Toc. は, 40 日目から 60 日目にかけて生成量は少なく, γ -Toc., α -Toc. は同時期においても比較的増加した。各 Toc. のうちで, α -Toc. の増加率が最も多いことがわかった。

終りに臨み, トコフェロールを提供していただいたエーザイ株式会社に厚くお礼申し上げます。

(1) R. L. Hoffman, H. A. Moser, C. D. Evans and

- J. C. Cowan : *J. Am. Oil. Chemist's Soc.*, **39**, 323 (1962).
- (2) M. K. Rao, S. V. Rao and K. T. Achaya : *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 121 (1965).
- (3) H. T. Slover, L. M. Shelley and T. L. Burks : *J. Am. Oil. Chemist's Soc.*, **44**, 161 (1967); **46**, 417 (1969).
- (4) 稲垣長典, 五十嵐脩, 荒川信彦, 太田登茂江 : 農化, **42**, 731 (1968).
- (5) B. E. Brown, E. M. Meade and J. R. Butterfield : *J. Am. Oil. Chemist's Soc.*, **39**, 327 (1962).
- (6) O. Hirayama and K. Hujii : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1 (1965).
- (7) J. Green : *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 801 (1958).
- (8) G. W. Grams, C. W. Blessin and C. E. Inglett : *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **47**, 337 (1970).
- (9) J. Folch, A. M. Lees, J. M. Meath and F. N. Le Baron : *J. Biol. Chem.*, **191**, 833 (1951).
- (10) 日本油化学協会編 : 油脂分析試験法, 理化書院, 1956, p. 106.
- (11) 津郷友吉, 山内邦男, 菅野長右衛門 : 農化, **42**, 367 (1968).
- (12) J. F. Pennock, F. W. Hemming and J. D. Kerr : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 542 (1964).
- (13) W. Stoffel, F. Chu and E. H. Ahrens : *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959).
- (14) K. J. Whittle and J. F. Pennock : *Analyst*, **92**, 423 (1967).
- (15) L. T. Kováts and E. B. Kransner : *Die Nahrung*, **11**, 671 (1967).
- (16) E. Giovannini and G. Condorelli : *Ric. Sci.*, **78**, 1863 (1958).