

県産地域資源に含まれるD-アミノ酸の解析と含有食品の開発

(特徴的な味を有するD-アミノ酸を活用した食品の付加価値向上)

食品開発支援センター	専門研究員	玉 屋 圭
食品開発支援センター	センター長	河 村 俊 哉
食品開発支援センター	専門研究員	宮 田 裕 次
食品開発支援センター	研 究 員	三 島 朋 子

近年の分析技術の進化に伴い、発酵食品にD-アミノ酸 (DA) が多く含まれていることが判明し、さらにはDAの有する甘味などの特徴的な味、美肌効果などの機能性について注目が集まっている。乳酸菌などの発酵微生物の一部はDAを生成する酵素を有していることから、DAを高生産する微生物を獲得出来れば、本成分を多く含有する高付加価値の食品を開発することが可能となる。そこで本研究では、センターが保有する乳酸菌などの微生物ライブラリーからDAを高生産する微生物を選抜し、得られた微生物株を用いてDAを多く含む製品開発を行う。まず、食品に含まれるDAを精度よく分析することを目的として、液体クロマトグラフ (HPLC) 装置を用いた分析法を検討したので報告する。

1. 緒言

これまでに生体中のアミノ酸の大半はL体であると考えられていたために、鏡像異性体であるD体は注目されなかった。しかしながら、近年は分析技術の進化に伴いDAの検出が可能となり、野菜及び果実^[1]、米^[2]などでその存在が確認されている。さらに発酵食品では、生鮮食品より高い濃度で存在することが示されており、チーズ^[3]、日本酒^[4]、黒酢^[5]などで含量が報告されている。

DAの味については、アラニン、セリン、フェニルアラニン、トリプトファンなど強い甘味を有するものが存在^[6]し、L体の味と異なることが大きな特徴である。また、DAの中には健康機能を有するものが見いだされており、特にD-アスパラギン酸は美肌効果を発揮^[7]することが明らかにされている。

発酵食品にDAが多く含まれる理由は、発酵に関与する微生物がL体をD体に変換する酵素^[8] (ラセマーゼ)を有しているからである。従って、DAを高生産する微生物を獲得できれば、本成分を多く含有する高付加価値の食品を開発することが可能となる。

そこで本研究では、センターが保有する乳酸菌などの微生物ライブラリーからDAを高生産する微生物を選抜し、得られた微生物株を用いてDAを多く含む製品開発を行う。

本研究では、まず食品に含まれるDAを精度よく分析することを目的として、HPLC装置を用いた分析法を検討したので報告する。

2. 方法

2. 1 試薬

L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、D-アスパラギン一水和物、酢酸、酢酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社製の試薬を用いた。L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-セリン、グリシン、L-アラニン、L-チロシン、L-メチオニン、L-イソロイシンはナカライテスク株式会社製を使用した。また、L-ヒスチジン、L-アルギニン、L-バリン、L-ロイシンはキシダ化学株式会社製、L-リジン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-グルタミン、D-ヒスチジン、D-スレオニン、D-アルギニン、D-アラニン、D-チロシン、D-メチオニン、D-バリン、D-トリプトファン、D-フェニルアラニン、D-ロイシン、D-リジンは東京化成工業株式会社製、D-イソロイシンは株式会社ペプチド研究所製を用いた。一方、誘導体化試薬であるo-フタルアルデヒド (OPA) は富士フィルム和光純薬株式会社製、N-イソブチリル-L-システイン (NIBC) はミリポアシグマ製を使用した。なお、これら試薬は全て特級のものを使用した。さらに、アセトニトリル及びメタノール (関東化学株式会社製) は高速液体クロマトグラフィ用を採用した。

2. 2 HPLCを用いたDA分析法の確立

食品に含まれるDAを精度よく分析することを目的として、HPLC装置を用いる分析法を検討した。

キラル構造を持つ誘導体化試薬であるNIBCの存在

下で、OPA を反応させることにより、L 体並びに D 体をジアステレオマー蛍光誘導体化し、逆相カラムを用いて分離した後に蛍光検出する手法を試みた。

まず、誘導体化試薬（OPA/NIBC）は以下のように調製した。OPA 試薬は、10 mg の OPA に 0.3 mL のエタノールを添加し溶解させた後、0.7 mL の 0.1 M ホウ酸緩衝液及び 4 mL の超純水を添加した。また、NIBC 試薬は、20 mg の NIBC に対して 10 mL の 0.1 M ホウ酸緩衝液を添加し溶解させて調製した。これら 2 種の試薬を同量ずつ混合させて OPA/NIBC 試薬とした。

試料の誘導体化は次のように行った。試料 1 mL に対して OPA/NIBC 試薬 4 mL を添加し、2 分間誘導体化反応を行い、蛍光-HPLC 装置に供した。

蛍光 HPLC の分析法は、これまでの DA 測定に関する報告^[9-10]をもとにした以下の条件により実施した。

装置；島津製作所製蛍光 HPLC システム

流速；0.8 mL/min

カラム；Shim-pack VP-ODS（粒子径 5 μ m, 内径 4.6 mm×長さ 150 mm）

カラム温度；35℃

溶離液；(A) 30 mM 酢酸ナトリウム（pH 6.0）

(B) メタノール/アセトニトリル（12:1）

蛍光検出；励起波長：230 nm, 蛍光波長：445 nm

誘導体化した L 体及び D 体を分離するために、溶離液 (A) 並びに (B) の組成を分析時間とともに変化させるグラジエント条件を検討した。

3. 結果

3. 1 L 体及び D 体の分析条件の確立

溶離液 (A) の 30 mM 酢酸ナトリウム並びに (B) のメタノール/アセトニトリル混液を表 1 のように変化させることにより、L 体及び D 体の分離を行った。

表 1 溶離液 (A) 並びに (B) のグラジエント条件

分析時間 (分)	溶離液 (A) 濃度 (%)	溶離液 (B) 濃度 (%)
0	90	10
75	40	60
80	0	100
85	0	100
85.01	90	10
90	90	10

その結果、図 1 に示したように、L 体と D 体の以下の 35 成分を分離することが出来た。図 1 のクロマトグラムに示された 1 から 35 のアミノ酸は以下のものである。

1：L-アスパラギン酸 2：D-アスパラギン酸 3：L-グルタミン酸 4：D-グルタミン酸 5：L-アスパラギン 6：D-アスパラギン 7：L-セリン 8：D-セリン 9：L-グルタミン 10：D-グルタミン 11：L-ヒスチジン 12：L-スレオニン 13：D-ヒスチジン 14：グリシン 15：D-スレオニン 16：L-アルギニン 17：D-アルギニン 18：L-アラニン 19：D-アラニン 20：L-チロシン 21：D-チロシン 22：L-バリン 23：L-メチオニン 24：L-トリプトファン 25：D-メチオニン 26：D-バリン 27：L-フェニルアラニン 28：D-トリプトファン 29：L-イソロイシン 30：D-フェニルアラニン 31：L-ロイシン 32：D-イソロイシン 33：D-ロイシン 34：L-リジン 35：D-バリン

次にアミノ酸試薬を用いて調製した 25 nmol/mL 濃度の溶液を誘導体化した後、5 回連続して蛍光 HPLC 装置に供し、再現性を検討した。表 2 には各アミノ酸の溶出時間を示した。

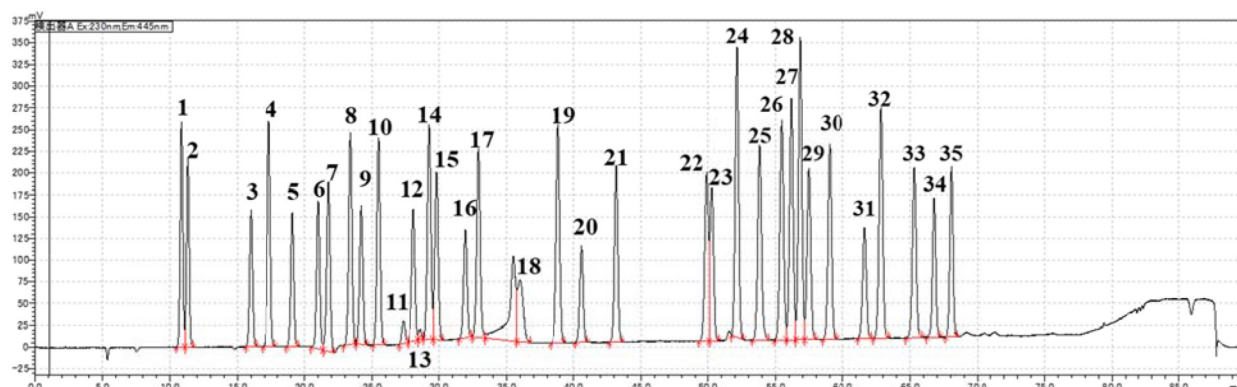


図 1 蛍光 HPLC 法を用いた L 体及び D 体のクロマトグラム

表2 25 nmol/mL 濃度のアミノ酸注入時（5回連続）
の溶出時間

アミノ酸	溶出時間（分）		
	平均	標準 偏差	変動 係数 (%)
1. L-アスパラギン酸	10.559	0.039	0.374
2. D-アスパラギン酸	11.024	0.027	0.249
3. L-グルタミン酸	15.793	0.047	0.299
4. D-グルタミン酸	17.152	0.035	0.202
5. L-アスパラギン	18.738	0.040	0.213
6. D-アスパラギン	20.706	0.029	0.140
7. L-セリン	21.483	0.045	0.211
8. D-セリン	23.152	0.035	0.152
9. L-グルタミン	23.987	0.044	0.183
10. D-グルタミン	25.302	0.034	0.133
11. L-ヒスチジン	27.281	0.035	0.127
12. L-スレオニン	28.103	0.054	0.193
13. D-ヒスチジン	28.633	0.025	0.089
14. グリシン	29.287	0.057	0.194
15. D-スレオニン	29.927	0.037	0.124
16. L-アルギニン	32.190	0.031	0.097
17. D-アルギニン	33.208	0.023	0.071
18. L-アラニン	35.867	0.063	0.175
19. D-アラニン	39.407	0.043	0.109
20. L-チロシン	41.280	0.055	0.134
21. D-チロシン	44.013	0.036	0.082
22. L-バリン	51.308	0.074	0.144
23. L-メチオニン	51.672	0.068	0.132
24. L-トリプトファン	53.659	0.063	0.117
25. D-メチオニン	55.411	0.050	0.091
26. D-バリン	57.159	0.049	0.085
27. L-フェニルアラニン	57.979	0.060	0.104
28. D-トリプトファン	58.633	0.048	0.082
29. L-イソロイシン	59.368	0.066	0.111
30. D-フェニルアラニン	60.978	0.049	0.080
31. L-ロイシン	63.848	0.069	0.107
32. D-イソロイシン	65.078	0.052	0.080
33. D-ロイシン	67.725	0.049	0.073
34. L-リジン	69.411	0.067	0.096
35. D-リジン	70.734	0.048	0.067

5回の繰り返し分析を行った際の保持時間の変動係数は各 DL アミノ酸で0.082～0.374%の範囲にあり、その平均は0.139%であった。

岩田^[10]は誘導体化試薬として NIBC、あるいは N-アセチル-L-システインと OPA とを組み合わせた手法を用いて、6回連続分析した際の溶出時間から算出した変動係数を0.01～0.35%と報告している。本研究で検討した結果とほぼ同等の数値であることから、本研究で検討した分析法は再現性のあるものと考えられた。

4. 結言

昨今の分析技術の進化に伴い、発酵食品に DA が多く含まれていることが明らかにされている。また、各種研究の進展により、DA の中には強い甘味を有する成分があること、DA が恒常性維持などの機能性を持つことが判明し、大きな注目が集まっている。

乳酸菌などの発酵微生物の一部は DA を生成する酵素を有していることから、DA を高生産する微生物を獲得できれば本成分を多く含有する食品を開発することが可能となる。

そこで本研究では、DA を高生産する微生物を選抜し、得られた微生物株を用いて DA を多く含む製品開発を行う。

本研究では、まず食品などの生物資源に含まれる DA を精度よく分析することを目的として、HPLC 装置を用いる分析法を検討した。キラル構造を持つ誘導体化試薬である NIBC の存在下で、OPA を反応させることにより、L 体並びに D 体をジアステレオマー蛍光誘導体化し、蛍光検出する手法の開発を試みた。本分析法を用いて、アミノ酸溶液の5回繰り返し分析を行い、溶出時間を検討したところ、変動係数が各 DL アミノ酸で0.082～0.374%の範囲にあることから、本分析法は再現性のあるものと判断された。

センターでは、これまでに長崎県特産物から乳酸菌約 600 株を分離^[11]してきた。さらに、これら菌株の有する特徴（有用成分生産能、抗菌性、抗酸化性など）をもとにしてライブラリー化している。

今後は、ライブラリーの乳酸菌が有する DA 生産能を本研究で確立した蛍光 HPLC 法を用いて測定することにより菌株の選抜を行い、DA を高度に含む発酵食品の開発につなげる。

参考文献

- [1] 郷上佳孝、伊藤克佳、老川典夫: Trace Nutrient Research, 23, pp.1-4, 2006.
- [2] 郷上佳孝、保井美保、岡田かおり、老川典夫: Trace Nutrient Research, 28, pp.1-6, 2011.
- [3] Brückner H. , Hausch M. :Chromatographia, 28, pp. 487-49, 1989.
- [4] 郷上佳孝、岡田かおり、森山昌和、伊藤克佳、老川典夫: Trace Nutrient Research, 29, pp.1-6, 2012.
- [5] 岡田かおり、郷上佳孝、竹下義隆、老川典夫: Trace Nutrient Research, 29, pp.62-66, 2012.
- [6] 真鍋久:美味技術学会誌、19(1), pp.53-57, 2020.
- [7] 吉村徹: 日本家政学会誌、74(6), pp. 346-351, 2023.
- [8] 牟田口祐太、大森勇門、大島敏久: 化学と生物、53(1), pp.18-26, 2015.
- [9] Inoue Y, Katsumata T, Watanabe H, Hayase F: Food Science and Technology Research, 22 (5), pp.679-686, 2016.
- [10] 岩田奈津紀: 島津製作所 Application News, No.L592, 2021-1,
https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17907/an_l592.pdf, (参照 2024-06-01)
- [11] 河村俊哉、晦日房和、玉屋 圭、松本周三:長崎県工業技術センター研究報告、No.41, pp.1-5, 2011.