

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	センター長	玉 屋 圭
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	主任研究員	三 島 朋 子
食品開発支援センター	専門研究員	河 村 俊 哉

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。昨年度に、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確立した。今年度は、市販の醤油製品に含まれるDAを測定した。

1. 緒言

これまでに生体中のアミノ酸の大半は L-アミノ酸 (LA) であると考えられていたために、鏡像異性体である D 体は注目されて来なかった。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、DAを多く含む製品開発を行う。

今年度は、発酵食品である醤油に含まれるDAを昨年度に確立した蛍光HPLC分析法を用いて測定したので報告する。

2. 方法

2. 1 試薬

L-アスパラギン酸、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-セリン、L-アラニンはナカライテスク株式会社製を使用した。また、L-ロイシンはキシダ化学株式会社製、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-アラニン、D-ロイシンは東京化成工業株式会社製を用いた。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ー用を採用した。

2. 2 発酵食品に含まれる DA の分析

食品に含まれる DA を精度良く分析することを目的として、昨年度 HPLC 装置を用いる分析法を確立した。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である。

今年度は本法を用いて、県産の発酵食品に含まれる DA 量を測定した。今回は数種の発酵食品の中で、濃口醤油に含まれる DA の含量を検討したので報告する。

濃口醤油は県産の市販品 11 種を試料とした。製造方式として、本醸造 (6 品) 及び混合 (5 品) の 2 種

を採用した。測定の際には、醤油試料を 10 mM 塩酸を用いて 200～2500 倍に希釈した。

DA 及び LA の測定は以下に行った。

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、以下の条件^[9]により実施した。

流速 ; 0.8 mL/min

カラム ; Shim-pack VP-ODS (粒子径 5 mm, 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

なお、溶離液 (A) 並びに (B) のグラジエント条件を以下の表 1 に示す。

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 (B) の濃度 (%)
0	10
75	60
80	100
85	100
85.01	10
90	10

3. 結果

3. 1 醤油に含まれる DA 量

醤油に含まれる LA 及び DA 含量を蛍光 HPLC 分析法により測定した。特に、旨味、甘味、苦味などの味^[6]を有するアミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、アラニン、ロイシンの含量を検討した。

まず、本醸造醤油に含まれる LA 量を表 2 に示した。L-アスパラギン酸は 32.0～46.9 mM、L-グルタミン酸は 33.9～86.1 mM、L-セリンは 19.5～62.7 mM、L-アラ

ニンは 7.1～35.9 mM、L-ロイシンは 17.7～64.7 mM の範囲で含まれていた。竹田らは、未殺菌の生揚げ醤油の L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-セリン、L-アラニン、L-ロイシン濃度はそれぞれ 20 mM、40 mM、15 mM、20 mM、15 mM 程度と報告^[10]している。今回、蛍光 HPLC 法を用いて測定した値と大きな差異はなく、妥当な値であると判断された。

表 2 本醸造醤油に含まれる主要な LA の含量

本醸造 (mM)	L-アスパラギン酸	L-グルタミン酸	L-セリン	L-アラニン	L-ロイシン
No. 1	40.7	51.3	35.3	15.2	35.7
No. 2	45.3	33.9	19.5	7.1	17.7
No. 3	43.4	46.2	45.7	10.2	23.2
No. 4	46.9	78.6	62.7	35.9	64.7
No. 5	46.4	86.1	45.7	25.4	52.1
No. 6	32.0	41.8	34.9	18.3	39.7
平均	42.4	56.3	40.6	15.7	38.8

一方、本醸造醤油に含まれる DA 量については表 3 にまとめた。測定の結果、D-アスパラギン酸は 0.3 mM 以下、D-グルタミン酸は 0.1～0.6 mM、D-セリンは 0.3 mM 以下、D-アラニンは 0.3～0.7 mM、D-ロイシンは 0.1 mM 以下の濃度で含まれていることが判明した。生揚げ醤油の D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-アラニン、D-ロイシン濃度についてはそれぞれ 0.545～0.654 mM、0.230～0.259 mM、0.266～0.412 mM、2.468～3.368 mM、0.182～0.262 mM と報告^[10]されている。D-アラニン並びに D-ロイシンを除いては、今回の測定値とほぼ同等の値であった。本醸造醬

表 3 本醸造醤油に含まれる DA 含量

本醸造 (mM)	D-アスパラギン酸	D-グルタミン酸	D-セリン	D-アラニン	D-ロイシン
No. 1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1
No. 2	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0
No. 3	0.3	0.3	0.2	0.7	0.1
No. 4	0.3	0.6	0.3	0.4	0.0
No. 5	0.2	0.3	0.1	0.7	0.0
No. 6	0.0	0.1	0.1	0.3	0.0
平均	0.2	0.2	0.1	0.4	0.0

油の DA については、諸味発酵熟成工程、特に仕込み後 1～3 週に増加することが報告されている。ラセマーゼを有する乳酸菌などの発酵微生物が DA の増加に関与しているものと考えられた。

さらに、本醸造醤油と異なる方式で製造された混合醤油に含まれる LA 並びに DA の含量を測定した。醤油製造において、副原料として大豆タンパク質を塩酸で分解したアミノ酸液の使用が認められている。アミノ酸液を使用しない醤油を本醸造醤油と呼ぶのに対して、本醸造醤油の生揚げにアミノ酸液を加えたものを混合醤油と規定^[11]している。混合醤油に含まれるアミノ酸、特に DA について検討された例はほとんど見受けられないため、本研究では混合醤油での DA 含量を測定した。

表 4 に混合醤油に含まれる LA の含量を示した。L-アスパラギン酸は 48.9～72.0 mM、L-グルタミン酸は 45.5～136.2 mM、L-セリンは 23.5～47.2 mM、L-アラニンは 10.3～27.2 mM、L-ロイシンは 16.9～38.8 mM の範囲で含まれていた。また、混合醤油の LA 量の平均値 (L-アスパラギン酸; 56.2、L-グルタミン酸; 94.3、L-セリン; 36.0、L-アラニン; 20.3、L-ロイシン; 28.1 mM) を本醸造醤油の平均値 (L-アスパラギン酸; 42.4、L-グルタミン酸; 56.3、L-セリン; 40.6、L-アラニン; 15.7、L-ロイシン; 38.8 mM) と比較すると、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸について混合醤油で 1.3 倍以上高い値が認められたが、他のアミノ酸では大きな差異は認められなかった。

表 4 混合醤油に含まれる主要な LA の含量

混合 (mM)	L-アス パラギ ン酸	L-グル タミ ン酸	L-セリ ン	L-アラ ニン	L-ロイ シン
No. 1	72.0	73.3	29.3	15.0	20.3
No. 2	52.8	45.5	23.5	10.3	16.9
No. 3	54.1	136.2	39.9	25.9	29.4
No. 4	48.9	89.9	40.0	23.0	38.8
No. 5	53.2	126.6	47.2	27.2	35.2
平均	56.2	94.3	36.0	20.3	28.1

表 5 に混合醤油に含まれる DA 量を記載した。D-アスパラギン酸は 2.4～6.3 mM、D-グルタミン酸は 1.0～2.6 mM、D-セリン 0.5～1.0 mM、D-アラニンは 1.0～2.2 mM、D-ロイシンは 0.4～0.9 mM の範囲で含まれて

いた。表 2 の本醸造醤油の D-アミノ酸量の平均値 (D-アスパラギン酸; 0.2、D-グルタミン酸; 0.2、D-セリン; 0.1、D-アラニン; 0.4、D-ロイシン; 0.0 mM) と比較すると、混合醤油の DA 量 (D-アスパラギン酸; 4.4、D-グルタミン酸; 1.8、D-セリン; 0.7、D-アラニン; 1.3、D-ロイシン; 0.7 mM) は含量が 3 倍以上増加していることが明らかになった。

表 5 混合醤油に含まれる DA の含量

混合 (mM)	D-アス パラギ ン酸	D-グル タミ ン酸	D-セリ ン	D-アラ ニン	D-ロイ シン
No. 1	6.3	2.0	1.0	2.2	0.9
No. 2	3.8	1.0	0.6	1.0	0.4
No. 3	5.6	2.6	0.6	1.1	0.8
No. 4	2.4	1.2	0.5	1.2	0.4
No. 5	4.2	2.3	0.9	1.1	0.9
平均	4.4	1.8	0.7	1.3	0.7

混合醤油での DA 量が大幅に増加した要因としては、DA を含む副原料のアミノ酸液を添加した結果、DA の含量が増加した可能性が考えられた。塩酸による加水分解処理によりタンパク質から遊離したアミノ酸にラセミ化反応^[12]が起こることが知られている。混合醤油の製造に用いられたアミノ酸液でもラセミ化、すなわち L 体から D 体への変換が行われたと予想される。アミノ酸液を生揚げ醤油へ添加した結果、DA 含量が大きく増加したのと考えられた。

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。

食品に含まれる DA を精度良く分析することを目的

として、昨年度 HPLC 装置を用いる分析法を確立した。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である。

今年度は本法を用いて、県産の発酵食品に含まれる DA 量を測定した。今回は数種の発酵食品の中で、製造方式の異なる 2 種の濃口醤油（本醸造、混合）に含まれる DA の含量を検討した。

まず、本醸造醤油に含まれる DA 量については、D-アスパラギン酸は 0.3 mM 以下、D-グルタミン酸は 0.1～0.6 mM、D-セリンは 0.3 mM 以下、D-アラニン は 2.5～7.4 mM、D-ロイシンは 0.1 mM 以下の濃度で含まれていることが判明し、D-アラニンが最も高い濃度を有していた。

次いで、混合醤油に含まれる DA 量を検討した。D-アスパラギン酸は 2.4～6.3 mM、D-グルタミン酸は 1.0～2.6 mM、D-セリン 0.5～1.0 mM、D-アラニンは 10.1～21.6 mM、D-ロイシンは 0.4～0.9 mM の範囲で含まれていた。本醸造醤油の D-アミノ酸量の平均値と比較すると、混合醤油の DA 量は含量が 3 倍以上増加していることが明らかになった。混合醤油での DA 量が大きく増加した要因としては、DA を含む副原料のアミノ酸液を添加した結果、DA の含量が増加した可能性が考えられた。

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^[13]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, 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, 1-6 (2011).
- [3] Brückner H. , Hausch M. :Chromatographia, 28, 487-492 (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, 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, 62-66 (2012).
- [6] 真鍋久：美味技術学会誌, 19(1), 53-57 (2020).
- [7] 吉村徹：日本家政学会誌, 74(6), 346-351 (2023).
- [8] 牟田口祐太、大森勇門、大島敏久：化学と生物, 53(1), 18-26 (2015).
- [9] 玉屋 圭、河村俊哉、宮田裕次、三島朋子：長崎県工業技術センター報告, 53, 62-65 (2023).
- [10] 竹田悠見子、原 圭志、大橋ユキ、木田隆生、神山貴信、浦賀陽介、河盛幹雄：日本醸造協会誌, 116 (2), 125-131 (2021).
- [11] 館 博、宇都宮由佳、福留奈美：日本醸造協会誌, 115 (2), 75-84 (2020).
- [12] 宮本哲也、本間 浩：化学と生物, 56 (1), 18-25 (2018).
- [13] 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報告, 41, 1-5 (2011).