

発酵食品および熟成食品の味質に及ぼす D-アミノ酸の影響についての考察

井上 裕, 岡部 唯, 鈴木 理恵, 尾中 孝, 木田 隆生

(MC フードスペシャリティーズ株式会社食品開発研究所*)

Effect of D-Amino Acids as Taste Modifiers in Fermented Foods

Yutaka INOUE, Yui OKABE, Rie SUZUKI, Takashi ONAKA, and Takao KIDA
Food Research & Development Laboratory, MC Food Specialties Inc.,

Summary

The aim of this study was to investigate the influence of D-amino acids (D-AAAs) on the food flavor profile of fermented foods. First, the content of fifteen D-AAAs in eight soy sauces, eight soybean pastes and eight cheeses were analyzed by the HPLC method using derivatization reagents. Ten D-AAAs in the soy sauces, ten D-AAAs in the soybean pastes and twelve D-AAAs in the cheeses were detected, and the minimum value of total D-AA concentration among the all foods was 1.3 mM. Second, two sensory evaluations by the Constant stimuli method and the Time-Intensity method were conducted to evaluate the influence of the D-amino acids at 1 mM concentrations on the profile of the five basic tastes (sourness, bitterness, saltiness, sweetness, and umami). Five basic taste solutions (0.025% citric acid, 0.075% caffeine, 1% NaCl, 4% sucrose, and 0.5% MSG) were prepared, to which were added 1 mM D-AA. From the results of the sensory evaluations, we found that D-Asp significantly suppressed sourness and bitterness, and that D-Pro strengthened continuity, sweetness, and umami compared with L-enantiomer. These results suggest that D-AAAs play crucial roles in the fundamental tastes of fermented foods.

D-アミノ酸は、L-アミノ酸の鏡像異性体であるが、生体中のアミノ酸の大半がL-アミノ酸であるため、これまであまり着目されてこなかった。しかしながら、近年分析技術の発展に伴い、低濃度のD-アミノ酸の検出が可能となり、キュウリやかぼちゃなどの野菜類¹⁾、リンゴやバナナなどの果実類¹⁾、牛乳²⁾や米³⁾など様々な食品でその存在が確認されている。このようにD-アミノ酸は生鮮食品中に存在が認められている。また、発酵食品、熟成食品においては生鮮食品よりも高い濃度でD-アミノ酸の検出が報告されている。例えば、エメンタルチーズではD-アラニン、D-グルタミン(酸)(各31.5 mg/100 g (3.53 mM), 31.9 mg/100 g (2.17 mM [グルタミン酸換算]))⁴⁾、発酵黒豆ではD-アラニン、D-アスパラギン(酸)(各75.5 mg/100 g (8.47 mM), 65.5 mg/100 g (4.92 mM [アスパラギン酸換算]))が検出され⁴⁾、25年熟成させたバルサミコ酢においてはD-プロリンが191.9 mg/l (1.67 mM) 検出されている⁵⁾。その他、ヨーグルト⁴⁾、赤ワイン^{4,5)}、ビール⁴⁾、黒酢⁶⁾、日本酒⁷⁾などの発酵食品、熟成食品でもD-アミノ酸の存在が報告されている。

これらの発酵食品、熟成食品にD-アミノ酸が多い要因として乳酸菌等の微生物の関与が報告されている⁸⁾。微生物

の持つラセマーゼにより食品中に存在しているL-アミノ酸がD体に変換され、D-アミノ酸含量が高い食品に変化していくものと考えられる。このように特定の微生物の関与がD-アミノ酸含量に影響を与えるため、バルサミコ酢⁵⁾や黒酢⁶⁾などにおいてL-アミノ酸含量とD-アミノ酸含量が必ずしも相関しないことが確認されている。

一方で、D-アミノ酸の味質に関しては、Shiffmanらが閾値について、詳しく報告している⁹⁾。pH無調整の系において、D-セリンが最も閾値が高く(64.8 mM)、次いでD-プロリン(60.4 mM)、D-スレオニン(33.7 mM)、D-イソロイシン(12.5 mM)、D-アラニン(11.2 mM)と続いている。また、河合らは閾値以上の各D-アミノ酸の味質について報告しており、例えば閾値以上の濃度域においてD-セリン、D-スレオニン、D-アラニンは甘味を呈し、D-プロリンは甘味と苦味を呈すると報告している¹⁰⁾。

このようにD-アミノ酸単独の味質に関する報告がある一方、2013年に老川らは141種類の日本酒の官能評価結果と各D-アミノ酸含量の主成分解析により、微量のD-アラニン、D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸が日本酒の味質に影響を与えている可能性を報告している¹¹⁾。

しかしながら、この老川らの日本酒に関する報告以外に、

*所在地：茨城県稲敷郡阿見町阿見4041 (〒300-0398)

食品中に存在している濃度のD-アミノ酸が味質に与える影響について調べた報告はない。

そこで我々はD-アミノ酸が食品の味質に与える影響について考察することを目的とし、本研究を行った。はじめに味質修飾効果を確認するための試験濃度を決定するため、D-アミノ酸の存在が報告されている醤油、味噌、チーズについて複数の市販品を分析し、その含有量の実態を調べた。次に基本味溶液を用いた官能評価試験により、食品中に存在している濃度のD-アミノ酸が基本味に与える影響について明らかにし、発酵食品、熟成食品の味質に及ぼすD-アミノ酸の影響について考察した。

実験方法

1. 実験材料

D-アミノ酸含有量を分析する試料として醤油、味噌、チーズを選択した。醤油は原材料に脱脂加工大豆、小麦、食塩、アルコールのみを使用している市販の国産濃口醤油を、味噌は原材料に大豆、米、食塩のみを使用している市販の国産米味噌を、チーズは原材料に生乳と食塩のみを使用している市販のオランダ産ゴーダチーズを各8種類ずつ用いた。

また5基本味の試料溶液には、無水クエン酸、無水カフェイン、塩化ナトリウム (NaCl)、スクロース、L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 (MSG) を用い、添加効果の評価にはL-アスパラギン酸、D-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、D-グルタミン酸、L-プロリン、D-プロリンを用いた。

2. 食品中のD-アミノ酸の分析

HPLC システムに Agilent1100 シリーズを用い、Brückner ら¹²⁾ および Einarsson ら¹³⁾ の測定法に準じ、醤油、味噌、チーズ中の15種類のD-アミノ酸 (アラニン (図表中表記, Ala), アルギニン (Arg), アスパラギン (Asn), アスパラギン酸 (Asp), グルタミン (Gln), グルタミン酸 (Glu), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), リジン (Lys), フェニルアラニン (Phe), セリン (Ser), バリン (Val), スレオニン (Thr), チロシン (Tyr), プロリン (Pro)) を OPA 法または FLEC 法で測定した。

(1) OPA 法

2%スルホサリチル酸に適量混合し一晩静置した試料 (チーズはフードカッターによる粉碎品を使用) の100 mM ホウ酸希釈液 (pH 9.5) 900 μ L と、誘導体化試薬である *o*-フタルアルデヒド 2 mg と N-イソブチル-L-システイン 3 mg を溶解したメタノール 100 μ L を室温で2分間混合し反応させ測定試料とした。カラムには Inertsil[®] ODS-4 (4.6 ϕ \times 250 mm, GLサイエンス) を、移動相には酢酸により pH 6 に調整した 30 mM 酢酸ナトリウム溶液 [A 液] とメタノールとアセトニトリルの 12:1 混合溶液 [B 液] を用い、A 液 + B 液 75 min (直

線濃度勾配で 99.5:0.5 \rightarrow 40:60) \rightarrow A 液 + B 液 5 min (直線濃度勾配で 40:60 \rightarrow 0:100) \rightarrow B 液 10 min の条件で溶出した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 0.8 ml/min とし、励起波長 230 nm、蛍光波長 445 nm で検出した。

(2) FLEC 法

(1) と同様に前処理を行った 100 mM ホウ酸希釈液 (pH 9.5) 200 μ L と、誘導体化試薬である (+)-クロロギ酸 1-(9-フルオレニル) エチルアセトン溶液 200 μ L を 40 $^{\circ}$ C で 30 分間混合し反応させた後、40 mM アマタジン塩酸塩水溶液 250 μ L と室温にて 10 分間混合し反応させ、最後に A 液 350 μ L と混合したものを測定試料とした。カラムおよび移動相には (1) と同じものを用い、A 液 + B 液 40 min (47.5:52.5) \rightarrow A 液 + B 液 5 min (直線濃度勾配で 47.5:52.5 \rightarrow 0:100) \rightarrow B 液 10 min の条件で溶出した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 0.7 ml/min とし、励起波長 263 nm、蛍光波長 313 nm で検出した。

3. 官能評価

(1) パネルの選定

官能評価は、調味料の評価経験を1年以上積んだ社内分析専門パネルに対し5味識別テスト¹⁴⁾および濃度差識別テスト¹⁴⁾を実施し合格した者をパネルとして選定した(20~40代の男性8名、女性5名)。ヘルシンキ宣言に則り、パネルには事前に研究内容について十分に説明し、試験に対する同意を確認した。なお本研究はコンプライアンス要件を含め、社内関係部署で稟議の上、承認を得た上で適切に履行した。

(2) 恒常刺激法¹⁵⁾

D-アミノ酸が酸味、苦味、塩味に及ぼす効果の評価は、恒常刺激法¹⁵⁾による官能評価を行い、プロビット分析¹⁶⁾による解析から等価濃度 (PSE: Point of Subjective Equality) を算出した。評価するD-アミノ酸の濃度は、食品中のD-アミノ酸含有量の分析結果から1 mM と設定した。たとえば酸味溶液の場合、0.025%無水クエン酸溶液を基準として等比で差をつけた酸味強度の異なる5種類の無水クエン酸標準溶液 (0.019%, 0.021%, 0.023%, 0.025%, 0.028%) を作成し、0.025%無水クエン酸溶液に1 mM になるようにD-アスパラギン酸を添加した試験溶液と各標準溶液をパネルに比較させ、酸味を強く感じる溶液を選ばせた。パネルには標準溶液および試験溶液に関する情報は非開示の上、試験を実施した。プロビット分析には解析ソフト SPSS17.0 を用い、パネルの50%が酸味を強く感じた標準溶液の濃度を1 mM のD-アスパラギン酸を添加した0.025%無水クエン酸溶液の等価濃度とした。同様に苦味溶液では、0.075%無水カフェイン溶液を基準とした際の1 mM のD-アスパラギン酸の添加効果を、塩味溶液では、1% NaCl 溶液を基準とした際の1 mM のD-グルタミン酸の添加効果を評価した。各試験ともに比較のためにL-アミノ酸を用いて、同様の評価を実施した。各試験の評価は、選定された13名のパネルから試験毎に無作

為に8名ずつ選び（男性5名，女性3名），当該8名が日にちを変え2回ずつ実施した。

(3) Time Intensity 法

D-アミノ酸が各基本味に及ぼす効果の評価として，西村らの官能評価法¹⁷⁾に準じ，Compusense five Jを用いて，Time Intensity Curveを測定した。すなわちパネルに20 mlの検液を一度に口に含ませ5秒間口に含んだ後，全て吐き出させ，口に含んでから特定の呈味が消えるまでの呈味強度の変化をPC画面上のカーソルを動かして測定した。検液には酸味溶液（0.025%無水クエン酸溶液），苦味溶液（0.075%無水カフェイン溶液），塩味溶液（1% NaCl溶液），甘味溶液（4%スクロース溶液），うま味溶液（0.5% MSG溶液）を基準溶液として用い，酸味および苦味は基準溶液に1 mMのD-アスパラギン酸を，塩味は基準溶液に1 mMのD-グルタミン酸を，甘味およびうま味は基準溶液に1 mMのD-プロリンを添加し，評価した。各試験の評価は，選定された13名のパネルから試験毎に無作為に5名ずつ選び（男性3名，女性2名），当該5名が日にちを変え2回ずつ実施した。比較のためにL-アミノ酸を用いて同様の評価を実施した。

実験結果

1. 発酵食品・熟成食品中のD-アミノ酸含有量

醤油，味噌，チーズについてD-アミノ酸含有量を測定し，食品毎に各アミノ酸の平均値，標準偏差，最大値，最小値を算出した（Table 1）。測定した24品目全てにおいてD-アミノ酸が検出され，食品別では醤油からD-イソロイシン，D-フェニルアラニン，D-スレオニン，D-チロシン，D-プロリンを除く10種類のD-アミノ酸，味噌からD-アルギニン，D-グルタミン，D-リジン，D-スレオニン，D-プロリンを除く10種類のD-アミノ酸，チーズからD-フェニルアラニン，D-スレオニン，D-チロシンを除く12種類のD-アミノ酸が検出された。15種

類のD-アミノ酸の総含有量は醤油が3.2 mM-7.2 mM，味噌が1.3 mM-2.7 mM，チーズが2.4 mM-32.5 mMであり，各食品ともに含有量の平均値はD-アラニン，D-グルタミン酸，D-アスパラギン酸が高い結果となった。

2. 5基本味溶液の味質に及ぼすD-アミノ酸の影響

分析した食品の中でD-アミノ酸の総含有量が最も低かった食品試料は米味噌のうちの1つで，1.3 mMであった。そこで本研究では今回測定した食品試料におけるD-アミノ酸の味質への影響を確認するため，1 mMのD-アミノ酸が各基本味溶液の味質に与える影響を検証することとした。

(1) 酸味

今回測定した15種類のD-アミノ酸について，含量が1 mMになるようにD-アミノ酸を添加した酸味溶液（0.025%無水クエン酸溶液）を用意し，添加前との味質の変化を評価した。その結果，15種類のD-アミノ酸の中でD-アスパラギン酸を添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで酸味溶液に，D-アスパラギン酸およびL-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度とTime Intensity Curveを評価した（Table 2 (a), Fig. 1）。D-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度は0.0213%となり，

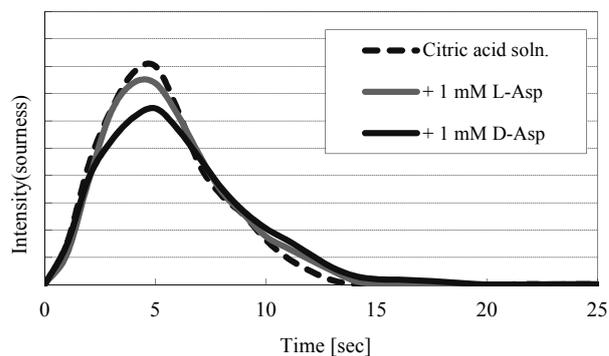


Fig. 1 Comparison of Time Intensity curves Sourness (citric acid solution by the addition of Asp)

Table 1 D-amino acid concentration in soy sauces, soybean pastes, and cheeses

| Sample | Number of samples | Value | D-amino acid concentration (mM) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------------|-------|---------------------------------|------|------|-----|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | | Ala | Arg | Asn | Asp | Gln | Glu | Ile | Leu | Lys | Phe | Ser | Val | Thr | Tyr | Pro | Total |
| Soy sauce | 8 | Ave. | 1.6 | 0.3 | 0.0 | 0.9 | 0.4 | 1.0 | — | 0.1 | 0.3 | — | 0.1 | 0.1 | — | — | — | 4.9 |
| | | SD | 0.7 | 0.2 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | — | 0.1 | 0.2 | — | 0.1 | 0.2 | — | — | — | 1.3 |
| | | Max. | 2.5 | 0.7 | 0.1 | 1.4 | 0.9 | 1.4 | n.d. | 0.3 | 0.5 | n.d. | 0.3 | 0.5 | n.d. | n.d. | n.d. | 7.2 |
| | | Min. | 0.7 | n.d. | n.d. | 0.5 | n.d. | 0.7 | n.d. |
| Soybean paste | 8 | Ave. | 0.7 | — | 0.1 | 0.2 | — | 0.2 | 0.1 | 0.1 | — | 0.1 | 0.1 | 0.0 | — | 0.1 | — | 1.7 |
| | | SD | 0.6 | — | 0.0 | 0.0 | — | 0.0 | 0.0 | 0.0 | — | 0.0 | 0.0 | 0.1 | — | 0.0 | — | 0.6 |
| | | Max. | 1.8 | n.d. | 0.1 | 0.3 | n.d. | 0.2 | 0.1 | 0.2 | n.d. | 0.2 | 0.2 | 0.1 | n.d. | 0.2 | n.d. | 2.7 |
| | | Min. | 0.1 | n.d. | 0.0 | 0.2 | n.d. | 0.2 | 0.0 | 0.1 | n.d. | 0.1 | 0.1 | n.d. | n.d. | 0.1 | n.d. | 1.3 |
| Cheese | 8 | Ave. | 5.8 | 0.4 | 0.0 | 4.4 | 0.0 | 4.8 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | — | 0.2 | 0.1 | — | — | 0.3 | 15.8 |
| | | SD | 3.7 | 0.3 | 0.1 | 3.1 | 0.0 | 3.2 | 0.1 | 0.1 | 0.5 | — | 0.3 | 0.1 | — | — | 0.3 | 10.8 |
| | | Max. | 12.6 | 1.0 | 0.2 | 9.8 | 0.1 | 9.8 | 0.2 | 0.4 | 1.1 | n.d. | 0.7 | 0.3 | n.d. | n.d. | 1.0 | 32.5 |
| | | Min. | 0.9 | 0.1 | n.d. | 0.1 | n.d. | 0.2 | n.d. | 2.4 |

n.d. : not detected
— : not applicable

95%信頼限界範囲が0.0207～0.0219%であることから酸味を抑制する作用が認められた。またL-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度は0.0227%であり、95%信頼限界範囲が0.0222～0.0233%であることから、D-アスパラギン酸を添加した際の酸味抑制作用のほうが大きいたことが示された。またTime Intensity CurveではD-アスパラギン酸およびL-アスパラギン酸の添加により、無添加時よりも酸味の最大強度（ピークの高さ）が抑制され、D-アスパラギン酸添加時のほうがL-アスパラギン酸の添加時よりも酸味の最大強度が抑制されることが認められた。

(2) 苦味

苦味溶液（0.075%無水カフェイン溶液）を用意し、酸味溶液と同様15種類のD-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-アスパラギン酸を添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで苦味溶液に、D-アスパラギン酸およびL-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度とTime Intensity Curveを評価した（Table 2 (b), Fig. 2）。D-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度は0.0635%となり、95%信頼限界範囲が0.0618～0.0652%であることから苦味を抑制する作用が認められた。またL-アスパラギン酸を添加した際の等価濃度は0.0686%であり、95%信頼限界範囲が0.0668～0.0709%であることから、D-アスパラギン酸を添加した際の苦味抑制作用のほうが大きいたことが示された。またTime Intensity CurveではD-アスパラギン酸およびL-アスパラギン酸の添加により、無添加時よりも苦味の最大強度が抑制され、D-アスパラギン酸添加時のほうがL-アスパラギン酸添加時よりも苦味の最大強度が抑制されることが認められた。

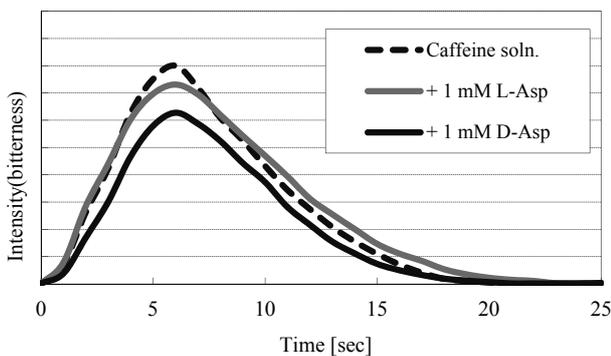


Fig. 2 Comparison of Time Intensity curves Bitterness (caffeine solution by the addition of Asp)

(3) 塩味

塩味溶液（1% NaCl 溶液）を用意し、酸味溶液と同様15種類のD-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-グルタミン酸を添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで塩味溶液に、D-グルタミン酸およびL-グルタミン酸を添加した際の等価濃度とTime Intensity Curveを評価した（Table 2 (c), Fig. 3）。D-グルタミン酸を添加した際の等価濃度は0.940%となり、95%信頼限界範囲が0.929～0.953%であることから塩味を抑制する

作用が認められた。またL-グルタミン酸を添加した際の等価濃度は0.955%であり、95%信頼限界範囲が0.943～0.971%であることから、D-グルタミン酸添加時とL-グルタミン酸添加時の等価濃度には有意な差は認められなかった。またTime Intensity CurveではD-グルタミン酸およびL-グルタミン酸の添加により、無添加時よりも塩味の最大強度が抑制され、D-グルタミン酸添加時のほうがL-グルタミン酸添加時よりもやや塩味の最大強度が抑制される傾向が認められた。

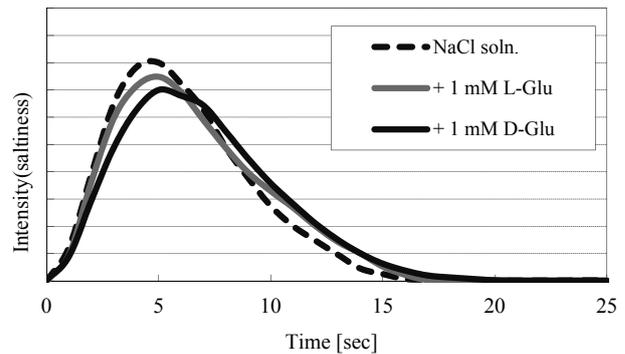


Fig. 3 Comparison of Time Intensity curves Saltiness (NaCl solution by the addition of Glu)

(4) 甘味

甘味溶液（4%スクロース溶液）を用意し、酸味溶液と同様15種類のD-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-プロリンを添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで甘味溶液に、D-プロリンおよびL-プロリンを添加した際のTime Intensity Curveを評価したところ、L-プロリン添加時には無添加時と大きな違いは見られなかったが、D-プロリンの添加により最大強度以降の甘味の低下が緩やかとなる傾向が認められ、甘味の持続時間が長くなることが確認された（Fig. 4）。

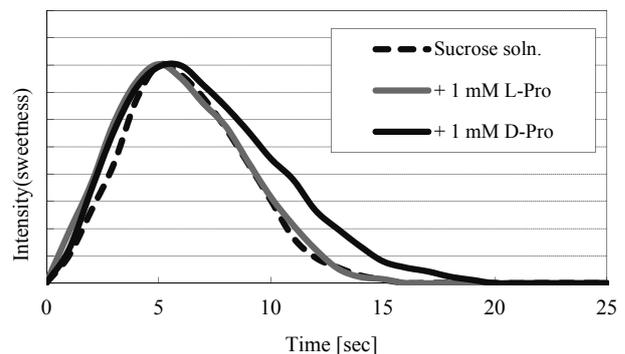


Fig. 4 Comparison of Time Intensity curves Sweetness (sucrose solution by the addition of Pro)

Table 2 Comparison of PSE concentration

(a) Citric acid solution by the addition of Asp (sourness)

| Sample [A] | Conc. of pure citric acid sample [B] (%) | The number of total test (n) | The number of test [B > A] (r) | r/n (%) | regression line ¹⁾ | PSE(%) | Confidence interval (%) |
|---|--|------------------------------|--------------------------------|---------|-------------------------------|--------|-------------------------|
| Citric acid soln.(0.025%) + 1 mM D-Asp | 0.019 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 975X - 20.7$ | 0.0213 | 0.0207-0.0219 |
| | 0.021 | 16 | 7 | 43.8 | | | |
| | 0.023 | 16 | 15 | 93.8 | | | |
| | 0.025 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 0.028 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| Citric acid soln.(0.025%) + 1 mM L-Asp | 0.019 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 975X - 22.2$ | 0.0227 | 0.0222-0.0233 |
| | 0.021 | 16 | 1 | 6.3 | | | |
| | 0.023 | 16 | 9 | 56.3 | | | |
| | 0.025 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 0.028 | 16 | 16 | 100.0 | | | |

(b) Caffeine solution by the addition of Asp (bitterness)

| Sample [A] | Conc. of pure caffeine sample [B] (%) | The number of total test (n) | The number of test [B > A] (r) | r/n (%) | regression line ²⁾ | PSE (%) | Confidence interval (%) |
|--|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------|
| Caffeine soln.(0.075%) + 1 mM D-Asp | 0.056 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 352X - 22.4$ | 0.0635 | 0.0618-0.0652 |
| | 0.062 | 16 | 5 | 31.3 | | | |
| | 0.068 | 16 | 15 | 93.8 | | | |
| | 0.075 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 0.083 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| Caffeine soln.(0.075%) + 1 mM L-Asp | 0.056 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 292X - 20.1$ | 0.0686 | 0.0668-0.0709 |
| | 0.062 | 16 | 1 | 6.3 | | | |
| | 0.068 | 16 | 5 | 31.3 | | | |
| | 0.075 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 0.083 | 16 | 16 | 100.0 | | | |

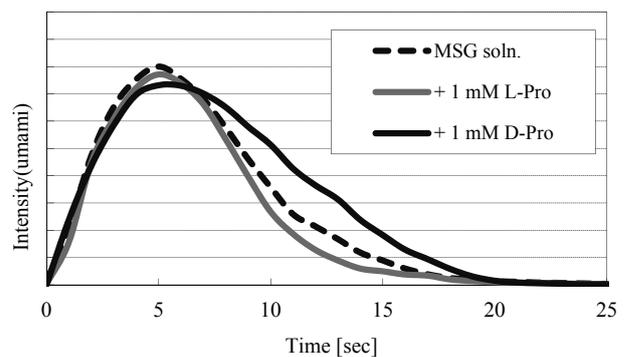
(c) NaCl solution by the addition of Glu (saltiness)

| Sample [A] | Conc. of pure NaCl sample [B] (%) | The number of total test (n) | The number of test [B > A] (r) | r/n (%) | regression line ³⁾ | PSE (%) | Confidence interval(%) |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------|-------------------------------|---------|------------------------|
| NaCl soln.(1%) + 1 mM D-Glu | 0.86 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 51.4X - 48.3$ | 0.940 | 0.929-0.953 |
| | 0.91 | 16 | 1 | 6.3 | | | |
| | 0.95 | 16 | 11 | 68.8 | | | |
| | 1.00 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 1.05 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| NaCl soln.(1%) + 1 mM L-Glu | 0.86 | 16 | 0 | 0.0 | $Y = 42.5X - 40.7$ | 0.955 | 0.943-0.971 |
| | 0.91 | 16 | 1 | 6.3 | | | |
| | 0.95 | 16 | 5 | 31.3 | | | |
| | 1.00 | 16 | 16 | 100.0 | | | |
| | 1.05 | 16 | 16 | 100.0 | | | |

¹⁾Y = Probit, X = Conc. of pure citric acid sample (%)²⁾Y = Probit, X = Conc. of pure caffeine sample (%)³⁾Y = Probit, X = Conc. of pure NaCl sample (%)

(5) うま味

うま味溶液 (0.5% MSG 溶液) を用意し、酸味溶液と同様 15 種類の D- アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D- プロリンを添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこでうま味溶液に、D- プロリンおよび L- プロリンを添加した際の Time Intensity Curve を評価したところ、D- プロリンの添加により最大強度以降のうま味の低下が緩やかとなる傾向が認められた (Fig. 5)。

**Fig. 5** Comparison of Time Intensity curves
Umami (MSG solution by the addition of Pro)

考 察

醤油や味噌中のD-アミノ酸についてはMoriらがD-アラニン、D-グルタミン酸の存在を報告している¹⁸⁾。その他のD-アミノ酸については、分析の報告がないため、本研究により新たに醤油、味噌中にD-アラニン、D-グルタミン酸以外の多種類のD-アミノ酸が存在していることが確認された。醤油、味噌およびチーズにおいて様々なD-アミノ酸が含まれる主な要因は発酵工程や熟成工程中に働く微生物のラセマーゼによる影響と考えられ、またアミノ酸種の違いは個々に有するラセマーゼの基質特異性によるものと思われる。一例として醤油、味噌、チーズは共通してL-スレオニンが存在するにもかかわらずD-スレオニンが検出されていない。過去の報告でもD-スレオニンの分析を実施している赤ワイン⁵⁾、バルサミコ酢⁵⁾、黒酢⁶⁾、日本酒⁷⁾においてD-スレオニンは検出されておらず、発酵や熟成工程においてスレオニンをラセミ化するラセマーゼの関与が低いことが推測される。

続いて醤油、味噌、チーズ中のD-アミノ酸の分析結果より、1 mMにおけるD-アミノ酸が基本味の味質に及ぼす影響を評価した。その結果、1 mMのD-アスパラギン酸が酸味と苦味に、D-グルタミン酸が塩味に、D-プロリンが甘味とうま味に対し味質修飾効果を有することが確認された。酸味溶液および苦味溶液におけるD-アスパラギン酸添加時とL-アスパラギン酸添加時の等価濃度の差異は0.0014%と0.0051%であり、それぞれ基準溶液の濃度差を下回ったが(酸味溶液(クエン酸溶液):0.002~0.003%, 苦味溶液(カフェイン溶液):0.006~0.008%), 専門パネルにより各添加区の味質強度の差が認識される程度の違いが見られた。またプロリン添加時のTime Intensity Curveより、D-プロリンにおいて確認された甘味およびうま味の持続は、最大強度(ピークの高さ)への影響が小さいことから、D-プロリンの添加にはスクロースやMSGの濃度を上げた場合の味の変化とは異なる効果があることが示唆された。

また老川らは¹¹⁾、141種類の日本酒の官能評価結果と各D-アミノ酸含量の主成分解析により、D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸の含量が日本酒のstrong tasteに影響を与えると報告している。また日本酒へのL-アラニンとDL-アラニンの添加試験より、L-アラニンよりもD-アラニンにうま味を向上させる効果があると述べている。本研究の基本味溶液における官能評価と老川らの日本酒における官能評価は評価対象が異なるため単純に比較はできないが、味質に対してD-アスパラギン酸およびD-グルタミン酸が各L体のアミノ酸と異なる影響を与える結果が得られた点では、本研究は老川らの研究結果を支持する結果となっている。一方で食品中に存在する濃度におけるD-プロリンの味質修飾効果に関する報告はこれまでになく、本研究が初めてである。Shiffmanらの報告ではD-プロリンの閾値は60.4 mMであることか

ら⁹⁾、今回確認されたD-プロリンの味質修飾効果は閾下での効果を示唆した。

今回測定した24種類の食品試料は全てD-アミノ酸の総含有量が1 mMを超えており、またD-アスパラギン酸の含有量が1 mMを超えている試料が10種(醤油3種、チーズ7種)、D-グルタミン酸の含有量が1 mMを超えている試料が12種(醤油6種、チーズ6種)、D-プロリンの含有量が1 mMを超えている試料が1種(チーズ)であった。今回分析した醤油、味噌、チーズ以外にも、発酵黒豆⁴⁾やバルサミコ酢⁵⁾など様々な発酵食品、熟成食品で1 mMを超えるD-アミノ酸が検出されている。食品の発酵工程、熟成工程中では微生物や酵素による生化学的反応やメイラード反応などの化学的反応によりペプチド^{19,20)}やメイラードペプチド^{21,22)}が生成し味質に影響を与えていることなどが知られてきたが、本研究によりこれらの食品成分と同様に、D-アミノ酸も幅広く発酵食品、熟成食品の味質に影響している可能性が示された。

本研究では一成分ごとのD-アミノ酸の味質修飾効果を評価したが、味質修飾効果を有するD-アミノ酸は食品中に複数存在すると複合的に味質に作用することを確認している²³⁾。一例として、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-プロリンおよびD-アラニンを添加したそばつゆは、添加してしないそばつゆや各L体を添加したそばつゆよりも、一体感のあるまろやかな味わいになることを確認している。食品の発酵工程や熟成工程は食品・食材のおいしさを高め、食の豊かさを生み出すために非常に重要な工程であり、本研究によりこれらの工程中に生成するD-アミノ酸の味質への関与が示唆されたことから、今後、複合的な作用も含めD-アミノ酸の味質修飾の作用機序について研究を進めていきたい。

参考文献

- 1) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫(2006) 野菜および果物中のD-アミノ酸の定量分析と植物におけるD-アミノ酸の生成機構. Trace Nutrients Research 23:1-4.
- 2) Palla G, Marchelli R, Dossena A, Casnati G(1989) Occurrence of D-amino acids in food. Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. J Chromatogr 475:45-53.
- 3) Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T(2009) Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. Phytochemistry 70:380-387.
- 4) Brückner H, Hausch M(1989) Gas Chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. Chromatographia 28:487-492.

- 5) Erbe T, Brückner H(1998) Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography – selected ion monitoring mass spectrometry. *Z Lebensm Unters F A* 207: 400-409.
- 6) 岡田かおり, 郷上佳孝, 竹下義隆, 老川典夫 (2011) 黒酢及び米酢中の D- 及び L- アミノ酸の定量的解析 *Trace Nutrients Research* 29 : 62-66.
- 7) Gogami Y, Okada K, Oikawa T(2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake. *J Chromatogr B* 879: 3259-3267.
- 8) 郷上佳孝, 岡田かおり, 森山昌和, 溝口晴彦, 老川典夫 (2012) 生酛, 乳酸菌添加生酛, 速醸酛造りの日本酒醸造工程中の D- アミノ酸の定量的解析. *Trace Nutrients Research* 29 : 1-6.
- 9) Schiffman S, Sennewald K, Gagnon J(1981) Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L- amino acids. *Physiol behav* 27: 51-59.
- 10) Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Okiyama A, Ninomiya Y(2012) Gustatory sensation of L-and D-amino acids in humans. *Amino Acids* 43: 2349-2358.
- 11) Okada K, Gogami Y, Oikawa T(2013) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids* 44: 489-498.
- 12) Brückner H, Haasmann S, Langer M, Westhauser T, Wittner R(1994) Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde and chiral thiols: Applications with reference to biosciences. *J chromatogr A* 666: 259-273.
- 13) Einarsson S, Josefsson B, Moeller P, Sanchez D(1987) Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. *Anal chem* 59: 1191-1195.
- 14) 日本官能評価学会 (1999) 官能評価士テキスト, 建帛社, 東京 : pp.52-53.
- 15) 小林紀子, 上村美也子, 山根嶽雄 (1974) 新甘味料アスパルテームについて. *昭和女子大学近代文化研究所学苑* 418 : 8-21.
- 16) 古川秀子 (2000) おいしさを測る 食品官能検査の実際, 幸書房, 東京 : pp.69-71.
- 17) 石井克枝, 西村敏英, 畑江敬子, 島田淳子 (1994) 小麦グルテンの酵素水解ペプチドの基本味に及ぼす影響. *日本家政学会誌* 45 : 797-801.
- 18) Mori M, Ito Y, Nagasawa T(2010) Content of free D-Ala and D-Glu in traditional Asian fermented seasonings. *J Nutr Sci Vitaminol* 56:428-435.
- 19) 岩澤秀樹, 平田明弘, 木村貞司, 山内邦男 (1996) カマンベールチーズ熟成中におけるタンパク質分解. *日本食品科学工学会誌* 43 : 703-711.
- 20) 西村敏英 (2003) 食品の呈味形成におけるペプチドの働き. *日本調理科学会誌* 36 : 52-62.
- 21) 斉藤知明 (2004) 食品のこくとこく味. *日本味と匂い学会誌* 11 : 165-174.
- 22) Ogasawara M, Yamada Y, Egi M(2006) Taste enhancer from the long-term ripening of miso (soybean paste). *Food Chem* 99:736-741.
- 23) 井上裕, 竹中実里, 田嶋靖子 (2013) D- アミノ酸に着目した「こく味調味料 PD-400, MD-400」のご紹介. *月刊フードケミカル* 341 : 18-21.