

水産食品の味に及ぼす遊離D型アミノ酸の影響

阿 部 宏 喜(共立女子大学家政学部教授)

タンパク質を構成するアミノ酸がすべてL型アミノ酸であることは周知の事実であるが、生理活性ペプチドの中にはD型アミノ酸を含むものもあることが知られ、また近年遊離のアミノ酸としてD-アスパラギン酸やD-アラニンがヒトも含めてさまざまな生物の中枢神経系や血液に見いだされている¹⁾。生物種あるいは組織によってはD型の比率がかなり高い場合もあり、生理学分野ではにわかにこれらD型アミノ酸が注目を浴び、それらの分布、代謝および生理的機能の研究が開始されている。しかしながら、これまで生理的機能に関してはほとんど明らかにされていない。医学的には最近アルツハイマー病患者の脳中に遊離D-アラニンとD-アスパラギン酸が存在し、これらが加齢により増加することが報告され²⁾、また歯のエナメル質³⁾にもD-アスパラギン酸が検出されるなど、まだ報告は少ないものの今後の研究が待たれている。

一方、食品化学的にはD型アミノ酸は一般にL型に比べて甘いアミノ酸が多く、グリシンを別としてL型ではアラニン、プロリン、セリンおよびスレオニンのみが甘味アミノ酸であることが知られているが、D型ではバリンを始めとするかなりのアミノ酸が甘味をもっている⁴⁾。しかしながら、これまではアミノ酸はすべてL型と考えて食品の味を考え、主要水産物に関しては合成エキスなども作成されており、D型アミノ酸は全く考慮されていなかった。水産食品特に水産無脊椎動物筋肉は特有の甘味をもつものが多く、アミノ酸はそれらの美味しさの主要な要素であることが知られているが、その味にD型アミノ酸が関与するかどうか

かは興味をもたれるところである。しかしながら、食品の味に対するD型アミノ酸の関与についてはこれまで検討は行われていない。

従来D型アミノ酸が省みられることが少なかった原因は、通常用いられているアミノ酸分析機ではLおよびD型の合計量が求められており、D型アミノ酸のみを特異的に定量することが難しかったことにあると考えられる。最近LおよびD型アミノ酸をガスクロマトグラフィおよび高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で分離定量する方法が幾つか報告され、分析機も市販されているが、水産動物エキスのようにタンパク質を構成しない遊離アミノ酸を多量に含む試料では、目的とするD型アミノ酸のピークにそのような他のアミノ酸のピークが重なり、正確な分離は不可能であった。

著者らはこれまで (+)-1-(9-fluorenyl)-ethyl-chloroformate (FLEC) で蛍光ラベルしたLおよびD型アミノ酸18種を、他の遊離アミノ酸と完全に分離してHPLCで分析する方法を確立した⁵⁾。そこで本研究ではまずこの方法を用いて、甲殻類、軟体類、および魚類諸組織におけるD型アミノ酸の分布を調べた。また、ケフサイソガニを淡水から海水に順応させ、順応過程におけるD型アミノ酸の変動を検討した。さらに、D-アラニンとL-アラニンの味質を官能検査により調べ、ホタテガイおよびズワイガニの合成エキスの内L-アラニンをD-アラニンに変えて官能検査を行い、味質の違いを明らかにした。

実験方法

1. 試料

試料は、甲殻類としてアメリカザリガニ (crayfish)

Procambarus clarkii, ミナミイセエビ (rock lobster) *Jasus* sp., スワイガニ (snow crab) *Chionoecetes opilio* および ケフサイソガニ (shore crab) *Hemigrapsus penicillatus*, 軟体類として ホタテガイ (scallop) *Patinopecten yessoensis*, 魚類として コイ (carp) *Cyprinus carpio* を使用した。いずれも生きたものを入手し、直ちに解剖して組織を取り出し、以後 -80°C に凍結貯蔵した。

2. 組織抽出液の調製

組織に10倍量の8%過塩素酸を加えてホモジナイズし、常法に従って過塩素酸抽出液を調製した。

3. 誘導体化

過塩素酸抽出液 $100\ \mu\text{l}$ に 0.3M ホウ酸緩衝液 ($\text{pH } 11.0$) $400\ \mu\text{l}$ を加え、これに FLEC のアセトン溶液 $500\ \mu\text{l}$ を添加して混合し、45秒間反応させたのち、未反応の FLEC を 2ml のペンタンで2回抽出除去した。得られた水層 $5\sim 10\ \mu\text{l}$ を HPLC にインジェクトした。

4. L-およびD-アミノ酸の分離定量

島津高速液体クロマトグラフ LC-6A を用い、カラムには Shimpack CLC-ODS ($4.6\times 250\text{mm}$) を使用した。溶離液にはイオンペア剤として 10mM テトラメチルアンモニウムを含む 15mM クエン酸緩衝液、アセトニトリル、およびテトラヒドロフランを用い、これらの組成の異なる3液グラジエントで溶出した。カラム温度は 55°C 、流速は $0.7\text{ml}/\text{min}$ とし、励起波長 260nm 、蛍光波長 310nm で蛍光検出した。

結果と考察

1. 高速液体クロマトグラフィによるL-およびD-アミノ酸の一斉分析

上記の方法を用いて HPLC による L-および D-アミノ酸の分離定量を試みたが、水産動物の組織抽出液中には種あるいは組織によりタウリン、 β -アラニン、ヒスチジン関連ジペプチド等のタンパク質を構成しない遊離アミノ酸および関連化

化合物が多く、それらがタンパク質構成アミノ酸と重なって溶出するため、すべての L-および D-アミノ酸の分離定量は困難であった。そこで Fig. 1 に示すように、3液グラジエントの溶離液の組成を変えて、3回の分析でタンパク質構成アミノ酸18種の分離定量を可能にした。なお、トリプトファン、チロシン、およびシステインは誘導体化されないため分析はできなかった。また、検出限界はいずれのアミノ酸でも 1pmol 程度であった。

2. 甲殻類、軟体類、および魚類諸組織におけるD型アミノ酸の分布

Table 3 に甲殻類諸組織における D 型アミノ酸の分布を示す。定量可能な18種の D 型アミノ酸中、種および組織によって2から7種類が検出されたが、ほとんどは $1\ \mu\text{mol}/\text{g}$ 以下であった。しかしながら、量的にはわずかも D-アスパラギン酸のように D 型の比率がきわめて高い場合も認められた。このアミノ酸はすでに哺乳類の脳中にも見いだされ、ニューロトランスミッターの可能性も指摘されている¹⁾。甲殻類でもミナミイセエビの神経系および眼球で高い値を示した。D-アルギニンは D-アラニンに次いで広い分布を示したが、含量は低く、総アルギニンに占める比率も低かった。一方、D-アラニンはすべての種および組織に高濃度に存在し、ミナミイセエビの心臓および肝臓、スワイガニの筋肉および神経系ではきわめて高い含量であった。さらに、総アラニンに占める D-アラニンの比率もかなり高いことが明らかである。主に食用とする筋肉でも D-アラニンの含量は高く、比率も $32\sim 45\%$ に達し、これらが甲殻類の味にどのように関与するかは興味もたれるところである。

次に、1種類ずつではあるが、軟体動物のホタテガイと魚類のコイの結果を Table 2 に示す。ホタテガイでは閉殻筋と心臓中の D-アラニン含量が高く、総アラニンに占める比率も高かった。

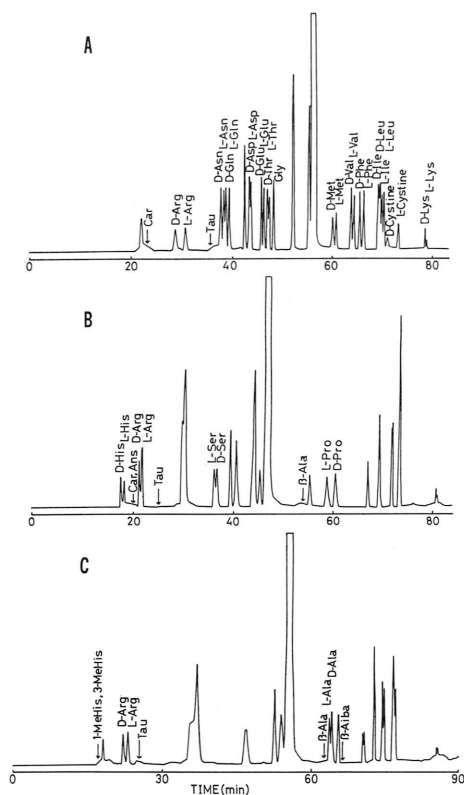


Fig. 1 Chromatograms of standard L- and D-amino acids derivatized with (+)-1-(9-fluorenyl)ethylchloroformate. HPLC conditions were as follows: chromatograph, Shimadzu LC-6A; column, Shimpack CLC-ODS (4.6 × 250mm); temperature, 55°C; flow rate, 0.7ml/min; detection, fluorescence ($\lambda_{ex}=260\text{nm}$, $\lambda_{em}=310\text{nm}$); mobile phase, 15mM citrate buffer containing 10mM tetramethylammonium, acetonitrile, and tetrahydrofuran. A, B, and C shows the chromatograms differed from the mobile phase compositions and gradient conditions. From A run, arginine (Arg), asparagine (Asn), glutamine (Gln), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), threonine (Thr), glycine (Gly), methionine (Met), valine (Val), phenylalanine (Phe), leucine (Leu), isoleucine (Ile), cystine, and lysine (Lys) were determined. From B run, histidine (His), serine (Ser), and proline (Pro) were determined. Alanine was determined from C run.

D-アルギニンは甲殻類と同様に含量は低いもののほとんどすべての組織に検出されたが、含量はわずかであった。D-アスパラギン酸は兩種ともにいくつかの組織に認められ、比率もホタテガイおよびコイの鰓およびコイの眼球では高かった。コイでは量的には少ないもののほとんどの組織に

D-ヒスチジンが認められ、総ヒスチジンに対する比率もきわめて高かった。しかしながら、筋肉には検出されなかった。コイは筋肉中に多量の遊離ヒスチジンを含むことが知られているが、この結果からそれらはすべてL型であることが確認された。一方、魚類筋肉にはD-アラニンは一切認

Table 1 Distribution of D-amino acids in the various tissues of crustaceans

Species	D-Ala	D-Arg	D-Asp	D-Glu	D-Ser	D-His	D-Phe	D-Pro
Crayfish (n=20)								
Muscle	3.22 (32.1)	0.032(0.07)		0.153(7.68)		0.323(6.7)		
Gill	1.14 (37.7)		0.066(12.5)			0.109(20.7)		
Heart	3.97 (29.8)	0.191(2.2)		0.063(1.08)				
Hepatopancreas	0.715(18.9)							
Nervous system	3.43 (35.3)	0.700(7.36)				0.231(26.0)		
Rock lobster (n=5)								
Muscle	6.07 (45.6)	0.144(0.88)	0.765(70.3)	0.054(1.55)	0.247(20.7)		0.010 (2.2)	
Gill	1.19 (37.2)	0.086(2.56)	0.583(52.2)	0.062(2.36)				
Heart	14.6 (60.1)	0.645(5.65)	0.701(52.8)	0.029(0.35)	0.020(0.90)			
Hepatopancreas	11.4 (11.4)	0.024(0.38)	+	0.009(0.20)	0.138(6.33)		0.083(5.15)	0.006(0.25)
Nervous system	3.83 (35.8)	0.211(4.03)	4.59 (49.4)	0.161(1.92)	0.103(11.1)		0.007(3.18)	
Eye	1.63 (30.3)	0.138(4.05)	0.864(51.3)	0.046(2.28)	0.017(2.87)			
Snow crab (n=3)								
Muscle	11.9 (44.4)	1.43 (4.00)					0.057(3.99)	0.120(0.64)
Gill	2.49 (24.9)	1.34 (13.7)					0.039(4.12)	
Heart	3.63 (27.3)	1.39 (6.3)					0.091(3.25)	
Hepatopancreas	6.92 (34.7)	1.20 (6.3)						0.030(0.56)
Nervous system	9.74 (33.9)	4.22 (19.6)						
Eye	3.13 (33.1)	0.472(3.5)	1.98 (55.3)					
Shore crab (n=20)								
Muscle	5.27 (37.2)	0.395(1.62)						
Gill	2.69 (30.8)	0.235(2.52)						
Heart	1.13 (11.3)	0.217(1.61)						
Hepatopancreas	4.53 (27.6)	0.65 (4.27)				0.050(22.0)		

In parentheses, percentage ratios of D-form to total (L+D) amino acid are shown.

+ : trace, blank column ; not found.

Table 2 Distribution of D-amino acids in the tissues of scallop and carp
($\mu\text{mol/g}$ wet wt.)

Specis	D-Ala	D-Arg	D-Asp	D-Asn	D-Gln	D-His	D-Lys
Scallop (n=5)							
Adductor muscle	4.02(50.8)	0.161(1.27)		0.114(0.95)			
Gill	0.04(1.26)	0.01 (0.93)	0.245(63.3)	0.044(0.47)	0.050(46.1)		
Heart	3.02(48.2)	0.11 (2.11)		0.057(1.50)			
Hepatopancreas	0.02(0.34)	0.199(14.3)	0.020(9.22)	0.160(1.38)			
Gonad		0.115(7.44)					
Mantle		1.03 (18.3)	0.083(2.68)				
Carp (n=1)							
Muscle		0.162(8.39)					
Gill		0.035(8.98)	0.470(41.7)	0.079(16.6)		0.021(41.7)	
Heart		0.015(0.91)				0.613(43.9)	
Brain		0.028(3.32)		0.014(8.28)		0.547(57.8)	
Medulla oblongata		0.024(2.61)	0.041(17.3)			0.696(57.9)	
Eye			0.103(47.0)			0.037(27.3)	0.049(45.0)

Percentage ratios of D-form to total (L+D) amino acid are shown in parentheses.

Blank column shows that D-form is not found.

められず、この点は無脊椎動物との関係に興味があ
もたれ、今後他の種についても検討する必要がある
ろう。これまで二枚貝には種により閉殻筋に多量
のD-アラニンが存在することが知られているが⁶⁾、
ホタテガイではこの含量はそう高くはなく、種に
よってかなり異なるものと考えられる。この点は
Table 1 に示した甲殻類でも同様で、これらの種
による差異がどのような原因によるものかは興味
がもたれる。

2. ケフサイソガニ海水順応中のD型アミノ酸 の変動

汽水域から海水域に生息するケフサイソガニを
河口で採取し、研究室の水槽中であらかじめ淡水
に順応させ、その後10日間かけて海水にまで順応
させ、順応過程におけるD型アミノ酸の変動を調
べた。結果を Fig. 2 に示す。順応過程で変化を示
したD-アミノ酸はD-アラニンのみであった。D-
アラニンは筋肉における変化が最も大きく、1/2
海水では淡水の3.7倍の含量にまで増加し、その
後は緩やかな増加であった。総アラニンに対する
比率も淡水の37.2%から海水の46.9%まで増大し
ている。また、心筋においても同様な変化を示し、
淡水に比べて1/2海水では6.7倍にまで増加したが、
その後の増加は緩やかであった。やはり総アラニ
ンに対する比率も11.3%から30.5%まで増大して
いる。一方、肝臓や鰓では増加はわずかであり、
むしろ1/2海水から海水への順応過程でやや増加
している。データは示さなかったが、イソガニの
海水順応により最も大きく増加したアミノ酸はL-
プロリンの14.3倍で、次いでL-グルタミンの4.3
倍、D-アラニンの3.9倍、L-アラニンの2.6倍な

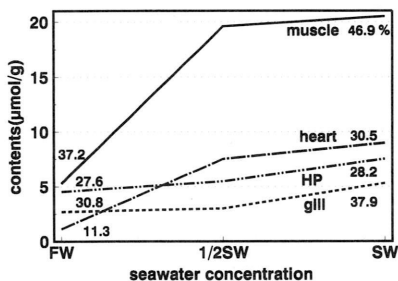


Fig. 2 Changes of D-alanine concentration in some tissues of shore crab *Hemigrapsus penicillatus* during seawater acclimation. HP; hepatopancreas. Values indicated in the figure were percentage ratio of D-alanine to total L- and D-alanine.

どが大きく増加したアミノ酸であった。海水順応時の含量ではグリシンの $27.6 \mu\text{mol/g}$ 、L-グルタミンの 24.7 、L-アラニンの 23.2 に次いでD-アラニン含量は高く、L-およびD-アラニンの合計値は $43.7 \mu\text{mol/g}$ と、すべての遊離アミノ酸中最も多かった。

このような結果から、少なくともイソガニの海水順応により筋肉中に蓄積された多量のD-アラニンはイソガニの浸透圧調節に関与するものであることは明らかである。著者らはすでにザリガニの海水順応に伴って非必須アミノ酸、特にグリシン、アラニン、プロリンなどの甘味を呈するアミノ酸が合計で約7倍に増加することを報告している⁷⁾。イソガニでも海水順応により増加したアラニンの約半分はD-アラニンであり、その浸透圧調節への寄与は大であると考えられる。

3. 水産物の味に対するD-アラニンの寄与

次に、上記試料動物の筋肉中に量的に最も多かったD-アラニンがそれらの筋肉の味に関与しているものか否かを官能検査により検討した。まず、L-およびD-アラニンの甘さの差異を検討した。両アラニンを 200mM の溶液とし、食物学科学学生43名をパネラーとして、3点識別試験法で試験を行ったところ、36名すなわち 83.7% が正解であった。このことからL-およびD-アラニンの甘さは有意に異なることがわかった。また、正解の36名中D-アラニンの方が甘いと回答した人数は25名であり、 0.1% 以下の危険率でD-アラニンの方が甘いことが判明した。

D-アラニンの方が甘いと回答したパネラーのうち21名を用いて、次に合成エキスの官能検査を行った。合成エキスとしてはすでに呈味有効成分が明らかになっているホタテガイとズワイガニ合成エキス⁸⁾を作成した。組成をTable 3に示す。合成エキス組成のうち、アラニンのみをL-あるいはD-アラニンのどちらかとし、3点識別試験

Table 3 Composition of taste-active components in the simple synthetic extracts of scallop and snow crab

Components	(mg/100ml/l)	
	Scallop	Snow crab
Glutamic acid	140	19
Glycine	1925	623
Alanine	256	187
Valine	8	30
Methionine	3	19
Arginine	323	579
Adenosine 5'-monophosphate	172	32
Inosine 5'-monophosphate	-	5
Guanosine 5'-monophosphate	-	4
Glycinebetaine	339	357
Na ⁺	73	191
K ⁺	218	197
Cl ⁻	95	336
PO ₄ ³⁻	213	217

法により、呈味試験を行った。パネラーの味覚疲労を避けるため、使用エキ스는Table 3に示した合成エキスの2倍希釈とし、また合成エキスのpHはホタテガイエキスでは 6.05 に、ズワイガニエキスでは 6.6 に、それぞれリン酸を用いて調整した。

まず、ホタテガイエキスの官能検査では、パネラー21名中正解者は13名で、正解率は 61.9% であった。このようにエキスの場合でもL-およびD-アラニンの間には 1% 以下の危険率で有意差が認められた。しかしながら、正解者の中でL-アラニンを用いた合成エキスの方が甘いと回答したパネラーが10名で、上記のアラニンだけの場合と逆の結果になった。これはTable 3に示したように、ホタテガイエキスは多量のグリシンを含み、アラニンは相対的に少ないためと、甘味の質が異なることによるものと考えられた。

そこで次に、グリシンが比較的に少ないズワイガニエキスをを用い、数人のパネラーによる風味側面法によりエキスの味の質的差異を検討した。その結果、D-アラニンを用いたズワイガニエキスは

L-アラニンを用いたそれに比べて①口に含んだ直後の甘味はうすい, ②後味に癖のない甘味が残る, ③塩味は弱い, ④味は濃厚ではなく, ⑤さらっとした舌触りである, ⑥口蓋に対する刺激が弱い, ⑦化学調味料様の味は弱い, などの明確な差異が認められた。すなわち, L-アラニンを用いて作成したズワイガニエキ스는刺激が強く, 口に含んだ後すぐに甘味を感じるが, D-アラニンの場合には口に含んだときにはさらっとしているが, 後味に甘味が残るようである。今回の合成エキ스는L-アラニンをすべてD-アラニンに置き換えて官能検査を行った極端な場合であるが, 以上の結果から, ズワイガニ筋肉中に多量に含有されているD-アラニンはその味に多大な影響を及ぼすものであることが明らかである。したがって, 今後D-アミノ酸の含量をも考慮して水産物の合成エキスを作成し, またエキスの味の検討にも少なくともD-アラニンの存在を考慮する必要があるものと考えられる。

水産物, 特にエビ・カニ類は日本人の好む豊かな風味をもつものが多く, また種によりその味はきわめて多様であるが, 以上の検討の結果から, エビ・カニ類には種によって筋肉中に多量のD-アラニンが含まれており, これが種特有の味をか

もし出すのに一役買っていることは明らかであった。今後多くの水産物について, D型アミノ酸と種特有な味との関連性を追求する必要がある。

本研究の遂行にあたり, 研究助成金を賜った(財)浦上食品・食文化振興財団に対して深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 長田洋子: 札幌医誌, 58, 271 (1989).
- 2) G. H. Fisher, A. D' Aniello, A. Vetere, L. Padula, G. P. Cusano, and E. H. Man: *Brain Res. Bull.*, **26**, 983 (1991).
- 3) P. M. Helfman and J. L. Bada: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2891 (1975).
- 4) 小俣 靖: “美味しさ”と味覚の科学, 1986, pp. 133-134, 日本工業新聞社, 東京.
- 5) E. Okuma and H. Abe: *J. Chromatogr.*, **660**, 243 (1994).
- 6) H. Felbeck and S. Wiley: *Comp. Biochem. Physiol.*, **87B**, 55 (1987).
- 7) E. Okuma and H. Abe: *Comp. Biochem. Physiol.*, **109A**, 191 (1994).
- 8) 山口勝巳・渡辺勝子: 魚介類のエキス成分(坂口守彦編), 1988, pp. 104-115, 恒星社厚生閣, 東京.

Effects of free D-amino acids on the taste of marine animal muscle

Hiroki Abe (Kyoritsu Women's University)

All free D-amino acids were determined on the various tissues of several crustaceans, scallop, and carp using a derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl) ethylchloroformate and high-performance liquid chromatography. Taste difference of L- and D-alanine was also evaluated by the sensory analyses, as well as the difference of the synthetic extracts of scallop and snow crab containing L- or D-alanine as a constituent.

Several D-amino acids were found in the tissues of all specimens examined and D-alanine was highest in the concentration. Crustacean muscle contained high D-alanine and the ratios of this amino acid to total alanine were as high as 32-45%.

During the seawater acclimation, only D-alanine increased in the tissues of shore crab *Hemigrapsus penicillatus*. In the muscle of seawater acclimated shore crab, D-alanine showed about 4-fold increase compared with that of freshwater acclimated one. The ratio of D-alanine to total alanine also increased from 37.2% to 46.9% during the seawater acclimation. Thus, D-alanine in the muscle of crustaceans was considered to be a osmo-regulator.

D-Alanine was evaluated to be sweeter than L-alanine by the sensory analyses. In case of the synthetic extracts, taste difference was also significant. The synthetic extract of snow crab containing D-alanine was evaluated to have refreshing taste just after tasted and sweet taste after that. These data indicate that D-amino acid, especially D-alanine, gives large effects on the taste of delicate sea-foods.