

うま味の数値評価を志向した 食品中グルタミン酸の簡易分析デバイス

村居 景太¹, 古内 覚¹, 山口 浩輝², 高橋 一敏²

1 はじめに

食品のうま味は、酸味、甘味、塩味、苦味に続く5番目の基本味である。旧東京帝国大学の池田菊苗¹⁾は、コンブの出汁の美味がグルタミン酸塩に由来することを世界に先駆けて発見し、これをうま味と命名した。現在ではUmamiが国際的な学術用語として使用されている。うま味は食品の価値を構成する要素の一つであり、また、食味を損ねずに減塩が可能であることから、最近では健康志向の観点からも注目されている。

タンパク質構成アミノ酸の一種であるグルタミン酸(図1)およびその塩は、代表的なうま味成分の一つであり、様々な食品に含有されている。さらに、生理学的には神経伝達物質として作用するため、調理科学にとどまらずその機能解明について広く研究が進められている。

グルタミン酸をはじめとした食品中アミノ酸の定量方法として、ポストカラム誘導体化イオン交換クロマトグラフィー²⁾や液体クロマトグラフィー質量分析法³⁾が汎用されている。これらの方法は高精度な分析が可能であるが、^{きょうざつ}夾雑物を除去するための煩雑な前処理や高額かつ大型の分析装置が必須であり、アミノ酸測定への機会は現在のところ非常に限定的である。アミノ酸の簡易分析技術が確立できれば、分析設備が整備されていない環境においてもオンサイトで利用可能となり、アミノ酸研究に資するものと期待される。特に、うま味成分の一種であるグルタミン酸が簡易に測定できるようになれば、例えば食材の品質管理や食品開発工程への展開、調理工程の評価が日常的に実施可能となるため、産業上有用と考えられる。

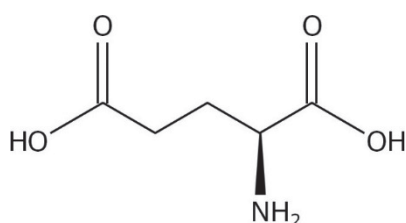


図1 L-グルタミン酸

以上を踏まえ、(株)共立理化学研究所と味の素(株)は、グルタミン酸を対象とした簡易分析技術の共同研究開発を進めており、数値評価デバイスの供給を通して「うま味の価値向上」を目標としている。今回、グルタミン酸に選択的な酵素反応を利用した比色分析法に基づく検査用デバイスを確立し、食品試料への応用を試みたので、本稿で紹介する。

2 アミノ酸分析に適した酵素の創出

酵素を用いたアミノ酸分析法として、酸化酵素や脱水素酵素を用いた比色法や電極法が広く知られている⁴⁾。目的のアミノ酸を簡便かつ迅速に定量するためには、安定性や活性、基質特異性に優れた酵素の取得が必要不可欠であるが、天然型の酵素は産業上要求される性能を十分に満たしていない。そこで、味の素(株)では、構造情報に基づくアミノ酸変異導入などを用いた酵素高機能化によって、実用性に優れた酵素を多数開発している⁵⁾⁶⁾。

酵素法によるグルタミン酸定量には、細菌(*Streptomyces* 属, X-119-6 株)由来のL-グルタミン酸酸化酵素(L-glutamate oxidase, LGOX)がこれまで広く用いられてきた⁷⁾。LGOX野生型は未成熟な状態で翻訳され、プロテアーゼ切断によって高性能な成熟型となることが報告されている⁸⁾。味の素(株)では、未成熟型のプロテアーゼ切断部位にアミノ酸残基を挿入することにより、成熟型と同等の活性を有する変異体の創出に成功した⁹⁾。このLGOX変異体はプロテアーゼ切断を不要とするため、高活性なLGOXを容易に調製することが可能である。

3 測定原理

本研究では、オンサイト分析に適した簡易分析技術として、発色試薬を用いる比色法を採用した。目的成分濃度に依存する直接的なシグナルが得られ、分析機器を一切用いない目視検出が可能であるため利便性が高い。小型の携帯型光度計を用いれば、現地での吸光光度定量も容易である。

今回、水系試料液中のグルタミン酸を測定するための比色法としてトリンダー法¹⁰⁾を採用し、主試薬である酵素には先述したLGOX変異体(味の素(株)製)を用い

た。この反応系では、グルタミン酸を基質として過酸化水素を生成させ、生じた過酸化水素によってペルオキシダーゼ触媒下で4-アミノアンチピリンとアニリン誘導体（新トリンダー試薬）とをカップリングさせ、有色のキノン色素を生成させる。本研究では、検体である食品に由来して黄色系統の夾雑物が混入する可能性が予想されたため、青色で視認性に優れた発色生成物（極大吸収波長：630 nm，モル吸光係数： 2.25×10^4 ）を生じるアニリン誘導体として *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethylaniline (MAOS)¹¹⁾ を使用した。

4 開発した比色分析デバイス

簡易分析技術の開発においては、方法の確立だけでなく、それをデバイスとして具現化するハード面の検討も重要である。実用に供するためには、感度や選択性が要求を満たすのに加え、操作性・可搬性・安全性・保存性・経済性などの諸課題に耐える必要がある。

本研究では、利便性を最優先に考慮し、発色に必要なすべての試薬を粉末状の混合試薬として調合し、柔軟性の高い半透明ポリエチレンチューブ（直径 10 mm）に封入した形状に加工した（図 2）。これは、(株)共立理化学研究所より市販されている簡易水質検査キット「パックテスト」の製造技術をそのまま利用したものである。チューブ端の融着部に挟み込まれた糸状の栓部材を引き抜いて外部との貫通穴を形成させ、スポイトのように試料水を吸入することで、そのまま目視定量のための比色管としても使用する¹²⁾。1 回分の測定に必要な粉末試薬があらかじめチューブ内に分包されており、1 本のチューブで採水容器、試薬保管容器、反応容器および比色管の役割が兼用されている。使用時に試料水を吸入して試薬と反応させるだけで直ちに目的成分濃度が判定できるため利便性が高い。また、粉末状の試薬は長期安定性に優れる特長を有する。

本研究では、主成分として LGOX 変異体、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、MAOS、pH 調整剤を含有する混合粉末試薬の組成および調合方法を検討

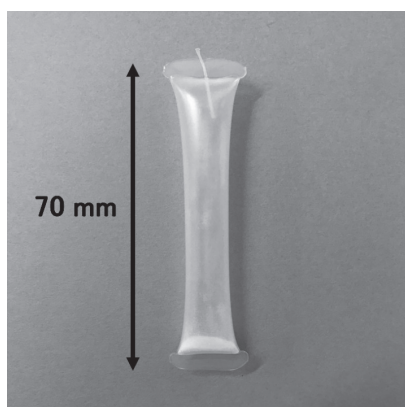


図 2 簡易分析デバイス「パックテスト」



図 3 操作方法

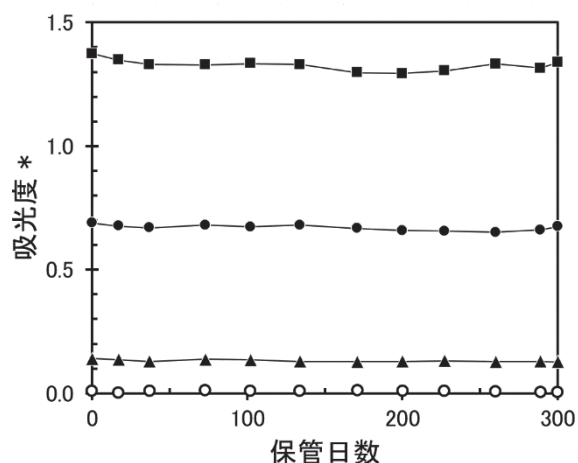


図 4 長期保存性

グルタミン酸標準液を測定，■：10 mg L⁻¹，●：5 mg L⁻¹，▲：1 mg L⁻¹，○：試薬ブランク。* 共立理化学研究所製 DPM-MTSP で測定，光路長：2 cm，測定波長：630 nm。

し、2 分間の反応時間で試料液 1.5 mL 中のグルタミン酸を選択的に定量できる条件を見いだした。確立したデバイスの操作方法を図 3 に示す。簡便な操作でグルタミン酸が定量可能であり、オンサイトでの利用も容易であった。検出方法として、目視比色法、携帯型光度計を用いる吸光光度法、スマートフォンを用いる画像解析法による 3 種類の技術を確認し、目的に応じて費用対効果が高い方法を選択可能とした。詳細は後述する。

粉末発色試薬を封入したチューブは、吸湿や酸化による変質を防止するために乾燥剤と共にアルミラミネート包装して保管した。図 4 に示すように、少なくとも 300 日間は常温下で品質が変化せず、冷蔵不要で長期間の保存に耐えることが分かった。

5 標準色列を用いる目視比色定量

発色試薬を封入したチューブに試料液を吸入すると、2 分間の反応時間でグルタミン酸濃度に依存した青色を示す明瞭な発色液が得られた。あらかじめ準備した標準色列（図 5）との目視比較により、グルタミン酸濃度の概略値が迅速に判定できた。目視比色による定量範囲は 1～50 mg L⁻¹ であった。試薬ブランクは無色透明であり、発色の視認性は良好であった。



図5 標準色列

6 携帯型光度計を用いる吸光度定量

目視比色法では分析機器を用いずに概略値が判定できる利点があるが、外光や個人差の影響を受けずにより定量性を高めるためには吸光度法の利用が適切である。本研究では、(株)共立理化学研究所より市販されている携帯型光度計「デジタルバックテスト」(図6)を用いて、得られた青色の発色液について吸光度定量を試みた。デジタルバックテストは、3種類の発光ダイオード(470 nm, 525 nm, 615 nm)を固定波長式の光源として搭載した乾電池駆動の携帯型光度計である。光路長2 cmのポリスチレン製専用セルを用いて、チューブ内の発色液を分取して吸光度を測定するものである。さらに検量線データを登録可能であり、吸光度から目的成分濃度を計算して測定値を画面表示する機能を有する。本研究では、615 nmの光源を用いて吸光度を測定した。デジタルバックテストによる定量範囲は $0.5 \sim 12.0 \text{ mg L}^{-1}$ であり、検量線の直線性は良好($R^2 > 0.999$)であった。



図6 携帯型光度計「デジタルバックテスト」

5 mg L^{-1} のグルタミン酸標準液を繰り返し測定した場合の変動係数は3%以内($n=5$)であった。

7 スマートフォンを用いる数値化ツール

吸光度法は目視比色法よりも定量性の高い測定値を得ることができるが、分析機器として光度計が必要であり測定コストが上昇する。簡易分析技術の普及を進めるためには、初期費用を含めたコストの低減も重要な課題である。

最近、世界的に普及しているスマートフォンのカメラ機能を利用した計測技術が注目されている。汎用品を分析機器として利用できるため、コストや利便性の点でメリットが大きい。(株)共立理化学研究所では、スマートフォンを用いたバックテスト濃度判定アプリ「スマートバックテスト」の配信を2020年4月より開始した。発色液をチューブごと撮影してカラー画像を取得し、画像解析により発色強度を読み取ることで濃度を算出する(図7)。本研究においても当該アプリの適用を試みた。グルタミン酸の定量範囲は $1.0 \sim 10.0 \text{ mg L}^{-1}$ であり、低コストでの機器分析が可能であった。



図7 数値化ツール「スマートバックテスト」

8 選択性および共存成分の影響

本デバイスの選択性は、使用したLGOX変異体の基質選択性に強く依存する。グルタミン酸以外の19種類のタンパク質構成アミノ酸について、グルタミン酸の定量に影響を及ぼさない共存許容濃度を調べた結果を表1に示す。アスパラギン酸、アラニン、グルタミンは高濃度で反応性を示しプラス誤差を与えたが、グルタミン酸と比較すると反応性は僅少で選択性は良好であった。一方で、還元性のアミノ酸であるシステインが共存すると、発色反応の中間生成物である過酸化水素を消費するためマイナス誤差を与えた。

同様に、試料液中に添加した各種成分について、グル

表 1 他のアミノ酸による影響

許容上限値 /mg L ⁻¹	共存アミノ酸
≥1000	アスパラギン, アルギニン, イソロイシン, グリシン, セリン, チロシン, トリプトファン, トレオニン, パリン, ヒスチジン, フェニルアラニン, プロリン, メチオニン, リシン, ロイシン
500	アラニン, グルタミン
100	アスパラギン酸
2	システイン

表 2 共存成分の影響

許容上限値 /mg L ⁻¹	共存成分
≥1000	B(Ⅲ), Cl ⁻ , F ⁻ , I ⁻ , K ⁺ , Mg(Ⅱ), Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SiO ₂ , SO ₄ ²⁻ , Zn(Ⅱ), ドデシル硫酸 Na, ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル, イノシン酸, グアニル酸, クエン酸, グルコース, 酒石酸, スクロース, デンプン
500	Ca(Ⅱ), NO ₂ ⁻ , コハク酸
200	Al(Ⅲ), フェノール
100	Cu(Ⅱ)
20	Fe(Ⅲ), Mn(Ⅱ), 塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム
5	Fe(Ⅱ)
1	アスコルビン酸
0.5	残留塩素, 没食子酸エチル
0.2	Ag(Ⅰ)

タミン酸の定量に影響を及ぼさない共存許容濃度を表 2 に示す。酸化剤や還元剤が共存すると mg L⁻¹ レベルの少量でも誤差を生じる傾向があった。食品試料に適用する場合は、特にアスコルビン酸の共存によるマイナス誤差の影響が想定されるため、青果物の抽出液を精度よく測定する場合などは前処理が必要である。

9 食品試料への適用

本デバイスの実用性を検証するため、食品試料中のグルタミン酸をデジタルバックテストで定量した。まず初めに、調理科学分野における教育課程で広く実施されている肉のかたさとスープの食味に関する実験¹³⁾に応用し、調理過程におけるグルタミン酸濃度変化の可視化を試みた。肉スープ加熱工程で経時的(15~120 分)にスープを採取し、水で 10 倍希釈後に定量した結果を表 3 に示す。肉スープの加熱工程でグルタミン酸が経時的に上昇しており、うま味の官能評価とも相関性が認められた。グルタミン酸濃度が上昇した理由として、加熱時間に応じた肉からのグルタミン酸の溶出やスープの蒸発

表 3 うま味の官能評価とグルタミン酸濃度の関係

加熱時間 /分	肉スープの におい ^{a)}	うま味 ^{a)}	グルタミン酸 濃度 ^{b)} /mg L ⁻¹
15	肉のにおい	非常に弱い	19
30	加熱肉のにおい	やや感じる	25
60	加熱肉のにおい	確かに感じる	37
90	ブイヨンのにおい	強く感じる	58
120	濃縮されたにおい	コクを感じる	92

a) 官能評価 (n=3)。b) 各試料原液中のグルタミン酸濃度を示す。デジタルバックテストで測定。

表 4 食品試料中のグルタミン酸濃度測定値

試料	デジタルバック テスト/g L ⁻¹	ポストカラム誘導体化イオン交換 クロマトグラフィー*/g L ⁻¹
出汁 A	26.2	24.8
出汁 B	10.8	10.4
日本酒 A	122.6×10 ⁻³	122.0×10 ⁻³
日本酒 B	90.5×10 ⁻³	90.0×10 ⁻³

各試料原液中のグルタミン酸濃度を示す。

*日立ハイテックスサイエンス製高速アミノ酸分析計 Amino SAAYA (LA8080) を使用。

による濃縮が起こっていると考えられる。このように、本デバイスをを用いれば、調理現場でグルタミン酸濃度を直ちに確認し、調理工程への反映が可能である。

次に、食品開発や品質管理への応用を想定して食品試料中のグルタミン酸濃度を定量した。市販されている液体の出汁 2 種類と日本酒 2 種類を水でそれぞれ 2000~8000 倍、20 倍となるように希釈後に定量した結果を表 4 に示す。ポストカラム誘導体化イオン交換クロマトグラフィーによる測定値とほぼ同等の値が迅速に得られた。また、試料希釈時に 3 mg L⁻¹ となるようにグルタミン酸標準液を添加した際の回収率は 100~110 % であった。

以上の結果から、開発したデバイスによって食品試料中のグルタミン酸濃度をオンサイトで簡便に測定することができ、官能評価を補完する客観的なうま味の指標を提供可能であることが検証できた。

10 まとめと展望

高機能な酵素の創出技術と簡易水質検査キットの製造技術を組み合わせ、食品中のうま味成分であるグルタミン酸を簡易に測定するための実用的な分析デバイスを開発した。うま味の簡易数値評価が可能であるため、調理科学実験における教材や、調味料や農作物の品質管理への利用が期待される。今後は開発したデバイスの普及を通してうま味の価値向上を進めていきたい。

また、本研究の応用可能性として、グルタミン酸以外の食味成分を対象とした簡易分析デバイスの開発に向け

た技術展開が期待される。

11 デバイスの入手方法

本稿で紹介したグルタミン酸の簡易分析デバイスの入手に関しては、下記窓口まで問い合わせいただきたい。

株式会社共立理化学研究所：

<https://kyoritsu-lab.co.jp/form-products>

謝辞 本共同研究開発の遂行にあたっては、令和元年度分析イノベーション交流会が発端となりました。当交流会の正副実行委員長である東京大学大学院総合文化研究科 豊田太郎准教授および東京薬科大学薬学部 東海林敦准教授に厚く御礼を申し上げます。食品試料への適用に関してご指導ご鞭撻賜りました、お茶の水女子大学サステナブル社会実装機構 SDGs 推進研究所 笠松千夏特任教授に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 池田菊苗：東京化学会誌, **30**, 820 (1909).
- 2) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore : *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 3) H. Miyano, A. Nakayama : *Chromatography*, **42**, 17 (2021).
- 4) Y. Asano : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 1 (2019).
- 5) H. Yamaguchi, M. Tatsumi, K. Takahashi, U. Tagami, M. Sugiki, T. Kashiwagi, M. Kameya, S. Okazaki, T. Mizukoshi, Y. Asano : *J. Biochem.*, **164**, 359 (2018).
- 6) M. Tatsumi, W. Hoshino, Y. Kodama, T. Ueatrongchit, K. Takahashi, H. Yamaguchi, U. Tagami, H. Miyano, Y. Asano, T. Mizukoshi : *Anal. Biochem.*, **587**, 1134 (2019).
- 7) W. Vahjen, J. Bradley, U. Bilitewski, R. D. Schmid : *Anal. Lett.*, **24**, 1445 (1991).
- 8) J. Arima, C. Sasaki, C. Sakaguchi, H. Mizuno, T. Tamura, A. Kashima, H. Kusakabe, S. Sugio, K. Inagaki : *FEBS J.*, **276**, 3894 (2009).
- 9) 味の素株式会社：高橋一敏，山口浩輝，田上宇乃：特開WO/2021/193598, “L-グルタミン酸オキシダーゼ変異体” (2021.03.23).
- 10) P. Trinder : *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 11) 溝口 誠，石山宗孝，志賀匡宣，佐々本一美：分析化学

(*Bunseki Kagaku*), **45**, 111 (1996).

- 12) 株式会社共立理化学研究所：岡内完治，瓦林孝夫，特許4125603, “簡易分析具及びその製造方法” (2008. 5. 16).
- 13) 今井悦子，柳沢幸江：“調理科学実験”，p.88-89 (2016), (アイ・ケイコーポレーション).



村居景太 (Keita MURAI)

株式会社共立理化学研究所開発部 (〒226-0006 神奈川県横浜市緑区白山 1-18-2 ジャーマンインダストリーパーク)。富山大学大学院理工学教育部修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》簡易水質検査器具の製品開発。《趣味》娘達の育児。
E-mail : murai-k@kyoritsu-lab.co.jp



古内 覚 (Satoru FURUUCHI)

株式会社共立理化学研究所開発部 (〒226-0006 神奈川県横浜市緑区白山 1-18-2 ジャーマンインダストリーパーク)。明治大学農学部卒。《現在の研究テーマ》簡易水質検査器具の製品開発。《趣味》釣り，サーフィン。
E-mail : furuuchi-s@kyoritsu-lab.co.jp



山口浩輝 (Hiroki YAMAGUCHI)

味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 (〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1)。九州大学大学院生物資源環境科学府修了。博士 (農学)。《現在の研究テーマ》X線結晶構造解析法やクライオ電子顕微鏡法を用いた産業タンパク質の構造解析と高機能化。《趣味》キャンプ，登山，クラブトビール巡り。
E-mail : hiroki.yamaguchi.wk7@asv.ajinomoto.com



高橋一敏 (Kazutoshi TAKAHASHI)

味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 (〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1)。東京大学大学院農学生命科学研究科修了。博士 (農学)。《現在の研究テーマ》X線結晶構造解析や計算科学を用いたタンパク質の解析と改良。《趣味》読書。
E-mail : kazutoshi.takahashi.pu7@asv.ajinomoto.com

株式会社共立理化学研究所ホームページ URL：

<https://kyoritsu-lab.co.jp/>

味の素株式会社ホームページ URL：

<https://www.ajinomoto.co.jp/>