

学 位 論 文 要 旨

氏 名	リュウ ハニファ ヌルヤニ
題 目	インドネシアおよび日本の醤油における呈味成分の化学的、官能的研究 (Chemical and Sensorial Studies on Savory Fractions Obtained from Indonesian and Japanese Soy Sauces)

インドネシアの醤油は大豆を唯一の窒素源として製造される。本研究では *Aspergillus sojae* をスタータとして黄大豆を発酵して得られるモロミを試料とした。限外ろ過で段階的に得た 500 Da 以下の分子量画分をゲルろ過や逆相 HPLC などの各種クロマトグラフィーにより分画した。さらに化学分析、キャピラリー電気泳動、呈味試験により最も強いうま味画分を得た。その中でうま味を誘引、あるいは強める主要な成分を精製し、プロテインシーケンサー、ESI 質量分析計および ¹H-NMR により同定した。その結果、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-アラニンの他に、L-フェニルアラニン、L-チロシンのような遊離芳香族アミノ酸は閾値以下で食塩や遊離の酸性アミノ酸と共存する場合に、インドネシアの醤油のうま味発現に大きく寄与する成分であることが分かった。このことは一般に苦味を呈するアミノ酸に対する新しい知見である。

この新しい知見を官能的に証明するため、閾値 (5.0 mM) 以下の芳香族アミノ酸を含む L-グルタミン酸ナトリウム溶液 (MSG, 4.0 mM) のうま味を塩化ナトリウム (NaCl, 80 mM) の有無で評価した。L-Phe を 0.5~5.0 mM の濃度で加えることで、NaCl を含む MSG 溶液のうま味が著しく増大した。しかしながら、MSG のみ、あるいは NaCl のみの溶液では、閾値以下の L-Phe の添加によりそれぞれのうま味や塩味は強くならなかった。さらに閾値以下の 3 種類の濃度 (0, 0.5 mM, 1.5 mM) の L-Tyr を用いた実験でも L-Phe と同様の呈味作用を示した。以上のことから、醤油では閾値以下の芳香族アミノ酸が存在することによりうま味が強められることを解明した。

日本の典型的な 3 種類の醤油、濃口醤油、溜り醤油、白醤油は、主に製造に用いる大豆と小麦の組成の違いによって分類される。これら 3 種類の醤油の低分子量画分の官能的な特徴を評価し、比較するために、分子量 500 Da 以下の限外ろ過物のゲルろ過画分 (F-500) について化学的および官能的分析を行った。その結果、3 種類の醤油のすべての F-500 画分に塩味およびうま味の特徴を有することがわかった。さらにゲルろ過を行い、3 種類の醤油の呈味性の最も強い画分には閾値以上の濃度でナトリウム塩、遊離の L-グルタミン酸、一般的な他の遊離アミノ酸、特に甘味性アミノ酸が含まれることを確認した。また、主として食塩とフェニルアラニンを含み、遊離 L-グルタミン酸が比較的低い濃度の濃口醤油の画分では、遊離の L-グルタミン酸、食塩、フェニルアラニン間での相乗効果により強いうま味の増強が明らかになった。この事実は日本の醤油研究における初めての知見である。

一方、濃口および溜り醤油のいくつかのうま味画分にはペプチドが含まれていたことから、醤油の呈味へのペプチドの寄与を評価する研究をさらに行った。そこで、ペプチドの存在を確認するために、Sephadex G-10 と逆相 HPLC を用いた分画物を調製し、それらの官能評価 (呈味画分希釈分析法) およびアミノ酸分析を組み合わせで行った。その結果、グルタミン酸残基を有するペプチドはほとんどのペプチド画分に存在したが、それらのペプチドは醤油におけるうま味増強への寄与は極めて低かった。従来、ペプチドのうま味発現について、いろいろ議論がなされているが、本実験結果では、ペプチドのうま味としての役割はほとんど見られなかった。本研究で、未解決であった醤油のうま味発現に対するペプチドの寄与に関して議論することができた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Hanifah Nuryani Lioe
題 目	Chemical and Sensorial Studies on Savory Fractions Obtained from Indonesian and Japanese Soy Sauces (インドネシアおよび日本の醤油における呈味成分の化学的、官能的研究)

Indonesian soy sauce is made using only soybeans as the nitrogenous source. Moromi obtained from fermentation of yellow soybeans using *Aspergillus sojae* as the starter was investigated. The fraction with a molecular weight (MW) of less than 500 Da obtained by stepwise ultrafiltration was then fractionated by several chromatographic procedures. Several chemical analysis, CE profiles and taste profiles were performed to obtain the most intense umami fraction. The main components eliciting or enhancing the umami taste were purified and identified by protein sequencing, ESI-MS and ¹H-NMR at 400 MHz. Besides free L-glutamic acid, aspartic acid and alanine, free aromatic amino acids such as L-phenylalanine (L-Phe) and L-tyrosine (L-Tyr) give a key contribution in impressing savory or umami taste of Indonesian soy sauce, at their subthreshold concentrations and in the presence of salt and free acidic amino acids. This is reported as a new phenomenon of the so-called bitter amino acids.

To prove psychophysically the new phenomenon, the subthreshold aromatic amino acid effects (at concentrations below than 5.0 mM) are evaluated on the umami taste of monosodium L-glutamate in an aqueous solution (MSG, 4.0 mM), with or without sodium chloride (NaCl, 80 mM). L-Phe was found to significantly enhance the umami tastes of the MSG/NaCl mixtures when it was added in a concentration range of 0.5–5.0 mM ($P = 0.000$). However, neither the umami taste of MSG alone nor the salty taste of NaCl alone was intensified by the subthreshold L-Phe. In a further experiment, L-Tyr at the three subthreshold concentrations (0, 0.5, and 1.5 mM) studied was shown to have the same activity as L-Phe. Therefore, the phenomenon of umami or savory enhancement by subthreshold aromatic amino acids in the soy sauce system has been established.

Three typical forms of Japanese soy sauce (shoyu), koikuchi-shoyu, tamari-shoyu and shiro-shoyu, can be differentiated primarily due to their different compositions of soybeans and wheat used for their productions. To evaluate and compare the chemical characteristics of the low MW fractions of three types of shoyu with their sensory data, gel filtration fractions of ultrafiltration products with MW less than 500 Da (F-500) were subjected to chemical and sensory analyses. The results showed that salty and umami tastes were characterized in all three F-500 fractions of shoyu examined. After separation by gel filtration, it was found that the tastiest fractions of the three types of shoyu were identified as those containing sodium salt, free L-glutamic acid and most other free amino acids, especially sweet amino acids, at concentrations above their thresholds. In some umami fractions of koikuchi-shoyu and shiro-shoyu that predominantly contained salt and phenylalanine but had a relatively low free L-glutamic acid content, the synergistic effect among free L-glutamic acid, salt and phenylalanine to elicit an intense umami taste was obviously observed. This is the first report in a number of Japanese soy sauce researches.

The significance of peptide contribution on the umami taste of savory foods is often questioned by many researchers. Because peptides were also present in some umami fractions of koikuchi and tamari shoyu, further investigation to evaluate the precise contribution of peptides on the soy sauce tastes was conducted. To locate peptide fractions, several separation procedures using Sephadex G-10 and RP-HPLC linked to sensory evaluation (by taste dilution analysis) and amino acid analysis were performed. Peptides having glutamyl residue were present in most of peptide fractions, however they obviously showed very low contributions to the intense umami taste of the soy sauce fractions, and therefore, the peptide roles were considered as negligible.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Hanifah Nuryani Lioe
審査委員	主査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 琉球大学 助教授 和田 浩二
	副査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
審査協力者	
題 目	Chemical and Sensorial Studies on Savory Fractions Obtained from Indonesian and Japanese Soy Sauces (インドネシアおよび日本の醤油における呈味成分の化学的、官能的研究)
<p>醤油は独特の呈味を有する大豆発酵食品であり、日本、インドネシアおよびアジア諸国では日常の調理に欠くことの出来ない重要な調味料である。醤油の呈味に関する研究は日本で 1974 年頃まで行われていたが、その後の知見はほとんど得られていない。また、インドネシアの醤油の呈味に関する研究もきわめて少ない。本論文では、化学分析と官能検査の手法を駆使し、インドネシアの醤油と日本の醤油（濃口醤油、溜り醤油、白醤油）の呈味成分をそれぞれ明らかにし、その比較検討を行っている。</p> <p>本研究では、インドネシアの醤油の旨味成分を各種クロマトグラフィーにより精製を行った。精製物質はプロテインシーケンサー、ESI 質量分析計および $^1\text{H-NMR}$ により L-Phe と L-Tyr と同定された。L-Phe、L-Tyr 等の遊離芳香族アミノ酸が閾値以下で食塩や遊離の酸性アミノ酸と共存する場合に、インドネシアの醤油の旨味発現に大きく貢献することがわかった。この事実は芳香族アミノ酸の旨味発現への寄与に関する新しい知見である。</p>	

この現象を官能的に証明するために L-グルタミン酸ナトリウム溶液 (MSG, 4.0 mM) に NaCl (80 mM) 存在下で閾値 (0.5~5.0 mM) 以下の芳香族アミノ酸 (L-Phe または L-Tyr) を添加したところ、溶液の旨味は著しく増大した。しかしながら、MSG のみ、あるいは NaCl のみの溶液に同濃度の L-Phe または L-Tyr を添加しても溶液の旨味や塩味の増強にはほとんど影響を及ぼさなかった。以上のことから、醤油では閾値以下の芳香族アミノ酸が存在することにより旨味が増強されることが明らかとなった。

日本の醤油 (濃口醤油、溜り醤油、白醤油) の低分子量画分の官能的特徴を比較するために、分子量 500 以下の限外ろ過分画のゲルろ過を行い、各醤油の呈味性が最も強い画分について化学分析を行った。その結果、閾値以上の濃度で NaCl、遊離の L-Glu および甘味性アミノ酸が含まれることを確認した。また、濃口醤油では主として NaCl と L-Phe を含み、かつ L-Glu が比較的低濃度の画分においては、L-Glu、NaCl および L-Phe 間での相乗効果による旨味の卓越した増強作用を示すことが官能試験の結果から明らかとなった。この事実は日本の醤油研究における初めての知見である。

一方、濃口および溜り醤油のいくつかの旨味画分にはペプチドが含まれていたことから、呈味へのペプチドの寄与を評価する研究を行った。そこで、Sephadex G-10 と逆相 HPLC によりペプチド画分を調製し、それらの官能評価を行った。その結果、グルタミン酸残基を有するペプチドはほとんどの画分に存在したものの、旨味増強への寄与は低かった。従来、食品の旨味発現に関与するペプチドの役割について議論がなされているが、醤油の旨味に対するペプチドの貢献はほとんど見られなかった。

以上のように、本論文ではインドネシアの醤油および日本の醤油の呈味成分をそれぞれ明らかにしている。従来、苦味性アミノ酸として知られている芳香族アミノ酸が食塩と酸性アミノ酸の共存下で醤油の旨味を増強する現象を初めて見出し、モデル実験系で証明している。本論文は食品化学の分野に優れた新知見を提供するものである。審査委員会は全員一致で博士 (農学) の学位論文として十分な価値があると判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Hanifah Nuryani Lioe
審査委員	主査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 琉球大学 助教授 和田 浩二
	副査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月 6日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成18年1月6日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Hanifah Nuryani Lioe
<p>[質問 1]</p> <p>醤油の呈味成分を Sephadex G-10 のカラムを使って分画しているが、構成成分の溶出順序は必ずしも分子量に依存しているわけではない。Sephadex を用いたゲル濾過では化合物は主に分子量に依存して分離されるが、分子量以外に分離に及ぼす要因には何が考えられるか。</p> <p>[回答 1]</p> <p>ゲル濾過クロマトグラフィーの基本的な分離は分子量に依存しているのは事実です。しかしながら、充填剤はマトリクス構造をもつために分子との間に弱いながらも相互作用をもつことがあります。食品由来のポリフェノールなどの分離に応用されるのもこのような理由からです。したがって本研究でも分離される分子と充填剤との間に相互作用が起きることがあり、そのため溶出順序が必ずしも分子量に依存していないと考えられます。</p> <p>[質問 2]</p> <p>分子量 500 以下の画分のうま味の呈味性が最も強いという結果を示していますが、それ以外の画分の呈味性はどうか。</p> <p>[回答 2]</p> <p>分子量 500 以下の画分を得るために分子量 10000、3000、500 と段階的に限外ろ過を行っています。限外ろ過は 100%分子量にしたがって溶液を分画できるわけではありませんので、分子量 500 以上の画分に若干分子量 500 以下の成分も混入することになります。しかしながら、その中でも分子量 500 以下の画分に最も強いうま味が認められました。</p> <p>[質問 3]</p> <p>化学的な成分分析以外にスコアリングテストや TDA 法などの多くの官能評価法を用いていますが、パネリストの選択はどのようにして行いましたか。</p> <p>[回答 3]</p> <p>本研究では化学的データと官能的データを関係付けることが重要でした。したがって、パネリストの選択、訓練にも重点をおきました。まず複数回のトライアン</p>	

グルテストにより統計的に有意に識別能力をもつパネリストを選択しました。この時点で 25 人くらいから 10 人程度になり、その後約一週間の訓練を行い、官能試験を行いました。

[質問 4]

うま味成分の分離にゲル濾過カラムクロマトグラフィーの後に逆相系カラムを用いて分離したのは何故か？うま味成分はカラムのボイドボリューム画分で認められてはいるものの分離は不十分ではないのか？

[回答 4]

今回の HPLC での逆相カラムはペプチドと遊離アミノ酸の分離を主な目的として用いました。ボイドボリュームに該当するサブフラクション 1 では Glu や Ala などの遊離アミノ酸が溶出し、一方ペプチドはサブフラクション 2 以下で溶出しました。したがって、この分離操作によって目的は達成でき、ペプチドの呈味性についての寄与を明らかにすることができました。

[質問 5]

醤油のうまみとして、苦みのあるアミノ酸が閾値以下濃度で存在すると、うまみが増加するという、極めて興味ある発見について、化学的分析値のみで判断せず、実際に味わっての官能検討を行った結果の貴重な発見です。自分の五感を働かせる実験情報の収集は極めて大切で、今の学生にはかなり不足しているように感じますが、特にうまみなどの研究ではこのような実験態度は非常に重要です。この官能実験で確認していくという発想は、一連の実験を始める時から持っていたのでしょうか。あるいは何かの指摘の結果でしょうか。

[回答 5]

化学成分分析は客観的な指標を提示する上で重要であることはいうまでもありません。これに対し、人間の官能的な感覚は必ずしも化学的な量に一致するとはかぎりません。味や香りといった成分は微量でも人間の感覚に大きな影響を及ぼすことを考えていました。したがって、本研究では化学分析と官能的な分析の両面からアプローチすることが必要であると考えました。

[質問6]

L-Phe や L-Tyr 等の遊離芳香族アミノ酸は閾値以下で食塩や酸性アミノ酸の共存下で、うま味を増強しますが、トリプトファンではどうでしょうか？L-Trp で実験をされましたか。L-Trp に関する情報があれば教えてください。

[回答6]

本研究での醤油中には L-Trp はほとんど含まれていませんでした。したがって、醤油では L-Trp のうま味に対する影響がないことから実験は行っていません。ただし、本研究の結果から L-Trp も閾値以下の濃度で食塩や酸性アミノ酸と共存する場合はうま味を増強することが十分考えられます。