

## 日本酒中の D-アミノ酸の定量と生成機構の解析

岡田 かおり, 郷上 佳孝, 老川 典夫

(関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科\*)

## The Quantitative Analysis and Studies on Biosynthesis of D-Amino Acid in Sake

Kaori OKADA, Yoshitaka GOGAMI and Tadao OIKAWA

Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials, and Bioengineering,

Kansai University, Suita Osaka 564-8680, Japan

## Summary

We detected the D-amino acids forms of Ala, Asn, Asp, Arg, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Ser, Tyr, Val, Phe, and Pro in 141 bottles of sakes using HPLC. We used three individual derivatization methods of HPLC: precolumn & postcolumn methods of *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-L-cysteine and (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate/1-aminoadamantane method. The D-amino acid content of the sakes was increased by using deep-sea water “*Kaiyoushinousui*”, “*Kimoto yeast starter*”, “*Yamahaimoto*”, and the long aging process “*Choukijukusei*”. After three months storage at 25°C, the sakes that were brewed with the adenine auxotroph of sake yeast (“*Sekishoku seishu kobo*”, *Saccharomyces cerevisiae*) without pasteurization (“*Hiire*”) contained large amount of D-Ala, D-Asp, and D-Glu.

D-アミノ酸は、かつて非天然型とみなされ、生体内で重要な生理機能を持たないと考えられてきた。しかし近年、ヒトを含む哺乳動物の特定の部位に高濃度の遊離型 D-アミノ酸が存在することが報告され<sup>1-3)</sup>、それらの由来や生理機能に関心が寄せられている。先にわれわれは、本誌でさまざまな野菜や果物などの食品中に各種 D-アミノ酸が含まれていることを報告した<sup>4-8)</sup>。本研究では、種々の日本酒中の D-アミノ酸を定量し、原料米、産地、仕込み方、種別などの違いが、日本酒中の D-アミノ酸含有量に及ぼす影響を解析することを目的としている。

酒を開封後3か月間、25°Cで保存したものについても同様に分析した。

## 2. 分析に用いた日本酒

分析には47都道府県51社の酒造会社からランダムに購入した141種類の日本酒を用いた。またそれらの日本酒の種別ごとの本数は、大吟醸9本、純米大吟醸14本、吟醸9本、純米吟醸42本、特別本醸造2本、特別純米酒9本、本醸造15本、純米酒35本、普通酒6本であった。

## 結果と考察

47都道府県51社の酒造会社の141種類の日本酒を分析した結果、141種類の日本酒のうち、80%以上の製品には D-Asp, D-Ala, D-Arg が含まれていた。また、D-Pro, D-Glu, D-Val, D-Lys, D-Phe, D-Ile は約70%, D-His, D-Asn, D-Tyr は約50%, D-Gln は33.8%, D-Leu は4.4%, D-Ser は2.5%の日本酒にそれぞれ含まれていた。D-アミノ酸含有量の高い日本酒上位20種類と下位20種類について、原料米、産地、仕込み方、種別等の特徴を Table 1 及び Table 2 に示した。生醸造りのもや長期熟成のものに D-アミノ酸含有量が高い傾向が見られた (Table 3)。また、海洋深層水仕込みのものにも D-アミノ酸含有量が高いものがあつた (Table 4)。しかし、日本酒度、酸度、アミノ

## 実験方法

## 1. 日本酒中の D-及び L-アミノ酸の高速液体クロマトグラフィによる測定

日本酒中の D-及び L-アミノ酸の定量は、各分析試料を 50 mM 酢酸ナトリウム溶液で希釈後、含有アミノ酸を *o*-フタルアルデヒド (OPA) と *N*-アセチル-L-システイン (NAC)<sup>9)</sup> または (+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロフォルメート (FLEC)/1-アミノアダマンタン (ADAM)<sup>10)</sup> と反応させ、蛍光キラル誘導体にして高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で実施した。測定は少なくとも3回行い、各アミノ酸について作成した検量線からそれぞれの D-及び L-アミノ酸濃度を算出した。また、分析に用いた日本

\*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

酸度, アルコール度数及び原料米の品種や産地と日本酒中の D-アミノ酸含有量との関連性は認められなかった。これらのことから, 日本酒中に含まれる D-アミノ酸含有量には仕込み方の違いが影響することが示唆された。さらに, 開封から3ヶ月後の日本酒の中には, D-Ala, D-Asp, D-Glu の含有量が増加するものがあることが明らかとなった。D-アミノ酸含有量が増加した日本酒のうち, 増加量の多い日本酒の上位20種類を Table 5 に示した。D-アミノ酸含有量が増加した日本酒には, にごり酒や発泡にごり酒が多く含まれていた。特に, 赤色清酒酵母を用いたものではその増加量が多くなっていた。赤色清酒酵母を用いた日本酒では, その特有の色を出すためにもろみを弱く搾ったにごり酒として製造されており, 製品中に残存している微生物やその酵素が D-アミノ酸含有量に影響を及ぼしていると考えられる。

本研究の結果から, 日本酒中の D-アミノ酸含有量には日本酒の仕込み方が深く関わっていることが示唆された。しかし, 生酛造り等の D-アミノ酸含有量が高い傾向にある仕込み方で製造した日本酒でも D-アミノ酸含有量が低い日本酒もあったことから, 酒造会社ごとの製造方法や醸造に参与する微生物の種類の違いが日本酒中の D-アミノ酸含有量に影響していると考えられる。今後さらに D-アミノ酸の生理機能の解明が進み, 日本酒を原料とする食品中の D-アミノ酸含有量を高めた機能性食品の開発への応用が期待される。

**Table 1** The basic properties of the twenty sakes with the highest amount of D-amino acids

Rank	Area of production	No.	Specific class	Rice species	SMV value "Nihonsyudo"	Acidity "Sando"	Amino acid value "Aminosando"	Polishing ratio (%) "Seimaibuai"	Alcohol content (%)	Remark
1	Chiba	4401	"Junmai"	"Koshihikari"	-38	8	4.9	90-93	6-15	"Kimoto yeast starter"
2	Toyama	2903	"Honjozo"	-	5	1.3	1.2	55	15-16	Deep-sea water
3	Mie	0204	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	2	1.7	1.4	53	16-17	"Kimoto yeast starter"
4	Ishikawa	3901	"Honjozo"	"Gohaykumangoku"	2	1.3	-	68	14-15	Deep-sea water
5	Tottori	3303	"Junmai"	"Yamadanishiki"	6.5	2.3	-	60	16.2	"Kimoto yeast starter"
6	Oita	3403	"Honjozo"	-	-1	1.2	-	65	15-16	-
7	Ehime	2105	"Junmai Ginjo"	"Shizukuhime"	4.5	1.9	-	60	15-16	-
8	Wakayama	4503	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	4	1.7	2.3	55-60	18	"Kyoukai Kobo(No. 9)"
9	Ibaraki	0802	"Special Honjozo"	"Miyamanishiki"	5	1.5	-	55	15.5	"Choukijukusei"
10	Nagasaki	3502	"Junmai"	-	0	1.3	1.2	60	15-16	Subsoil water in Saga
11	Gifu	1401	"Junmai Ginjo"	"Miyamanishiki"	10	1.4	1.1	45	15-16	"Choukijukusei"
12	Oita	3402	"Junmai"	-	-2	1.4	-	60	15-16	-
13	Wakayama	4502	"Junmai Ginjo"	"Eizenomachi"	0	1.5	2	55-60	18	"Kyoukai Kobo(No. 9)"
14	Ehime	2104	"Junmai Ginjo"	-	-61	2	-	65	9.5	"Sekishoku Seishu Kobo"
15	Osaka	4701	"Special Junmai"	"Yamadanishiki"	8	2.1	1.3	70	18-19	"Kimoto yeast starter"
16	Yamanashi	2502	"Junmai"	"Cyokuei"	5	1.7	-	60	15-16	-
17	Saitama	1303	"Junmai"	"Gohyakumangoku"	6	1.6	-	55	15-16	"Choukijukusei"
18	Fukushima	4901	"Junmai"	"Gohyakumangoku"	-50	8	2.5	60	8.2	"Sekishoku Seishu Kobo"
19	Aomori	2003	"Special Junmai"	"Hanafubuki"	3	1.5	-	55	15-16	-
20	Shimane	2204	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	3	1.6	-	55	15-16	"Yamahaimoto"

**Table 2** The basic properties of the twenty sakes with the lowest amount of D-amino acids

Rank	Area of production	No.	Specific class	Rice species	SMV value "Nihonsyudo"	Acidity "Sando"	Amino acid value "Aminosando"	Polishing ratio (%) "Seimaibuai"	Alcohol content (%)	Remark
121	Ibaraki	4101	"Junmai"	"Hitachinishiki"	4	1.4	1.2	60	15-16	Subsoil water in Tsukuba
123	Hokkaido	0701	"Daiginjo"	"Ginpu"	5	1.2	1.1	40	15-16	-
124	Mie	0207	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	3	1.4	1.1	55	16-17	-
125	Tochigi	4301	"Junmai Ginjo"	"Wakamizu"	4	1.4	0.9	55	16-17	-
126	Tottori	3302	"Junmai"	"Gouriki"	9.5	2.1	1.3	80	N.D.	-
127	Tokyo	1102	"Junmai Ginjo"	"Gohyakumangoku" "Miyamanishiki"	1	1.6-1.8	1.2-1.4	55	15-16	-
128	Siga	0501	"Junmai Daiginjo"	"Yamadanishiki"	5	1.4	1	50	16-17	"Sekishoku Seishu Kobo"
129	Nagano	0303	"Ginjo"	"Miyamanishiki", 80% "Hitogokochi"	-2	1.6	1.1	55	18	"Kyoukai Kobo (No. 7)"
130	Gifu	1402	"Junmai Daiginjo"	"Yamadanishiki"	13	1.5	0.8	40	15-16	-
131	Fukushima	0901	"Junmai Daiginjo"		2	1.3	1.1	50	15	"Kimoto yeast starter"
132	Tochigi	4302	"Daiginjo"	"Yamadanishiki"	3	1.3	0.8	35	17-18	-
133	Hiroshima	0603	"Futuu"	"Hattannishiki"	1.5	1.2	1.2	-	15-16	Barreled sake
134	Mie	0202	"Daiginjo"	-	3	1.2	0.9	40	16-17	-
135	Hiroshima	0602	"Ginjo"	-	2	1.3	1.2	60	15-16	-
136	Hiroshima	0601	"Daiginjo"	"Yamadanishiki", "Sennbonnishiki"	3.5	1.2	1	38	16-17	-
137	Hyogo	0101	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki" "Nihonbare"	4.5	1.5	1.2	60	16	-
138	Ibaragi	0803	"Honjozo"	-	3	1.4	1.4	70	15-16	-
139	Siga	0503	"Junmai"	Ancient black rice	5	1.4	1.1	70	15-16	-
140	Saitama	1301	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	6	1.6	-	50	16-17	"Kyoukai Kobo (No. 7)"
141	Hiroshima	0604	"Honjozo"	"Hattannishiki"	3	1.3	1.2	69	14-15	"Namasake"

**Table 3** Amino acid content of various in sakes brewed with "Kimoto yeast starter", "Yamahaimoto", and "Chokizyukusei"

No.	4401			0204			3303			4701			2204			0802			1401			1303		
	AA	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D		
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$			
Asp	695	18.1	2.5	490	66.9	12.0	650	6.8	1.0	906	7.7	0.8	298	33	10.0	555	33.8	5.74	278	21	7.02	619	9.4	1.50
Glu	771	132.0	14.6	927	38.3	4.0	715	11.4	1.6	809	33.3	4.0	612	16	2.5	1232	ND	-	588	9	1.51	736	11.7	1.56
Asn	1298	6.0	0.5	316	ND	-	663	7.4	1.1	204	3.9	1.9	762	7.5	1.0	536	2.8	0.52	468	ND	-	319	ND	-
Ser	1228	11.6	0.9	1554	ND	-	1183	ND	-	815	0.7	0.1	465	1	0.2	775	ND	-	493	ND	-	730	ND	-
Gln	958	ND	-	26	ND	-	42	ND	-	176	7.2	3.9	106	ND	-	40	ND	-	33	ND	-	-3	ND	-
Thr	966	ND	-	907	ND	-	1011	ND	-	895	ND	-	183	ND	-	906	ND	-	405	ND	-	959	ND	-
Gly	406	-	-	607	-	-	358	-	-	514	0.0	339	-	-	771	-	-	467	-	-	344	-	-	-
His	527	ND	-	152	ND	-	449	ND	-	438	ND	-	87	ND	-	131	ND	-	220	ND	-	324	6.5	1.95
Ala	1228	367.1	23.0	1554	315.1	16.9	1183	78.2	6.2	1328	83.8	5.9	1015	7.8	0.8	1807	179	9.01	1046	133.6	11.33	1452	107.7	6.91
Arg	1877	49.9	2.6	156	ND	-	862	133.1	13.4	1287	11.5	0.9	246	49.0	16.6	1636	10.3	0.63	355	ND	-	754	ND	-
Tyr	504	31.4	5.9	510.3	1.4	0.3	454.4	17.5	3.7	468.4	12.1	2.5	332.9	13	3.8	426.6	ND	-	302.2	9.5	3.05	367	10.4	2.76
Val	340	ND	-	1099	29.1	2.6	21	ND	-	755	ND	-	460	13.7	2.9	189	ND	-	510	19.9	3.76	802	22.3	2.71
Met	33	ND	-	57	ND	-	45	ND	-	81	ND	-	38	ND	-	871	ND	-	51	ND	-	29	ND	-
Trp	134.5	ND	-	90.7	ND	-	12.3	ND	-	75.3	ND	-	34.5	ND	-	41.4	ND	-	55.4	ND	-	19.3	ND	-
Phe	984	ND	-	363	ND	-	581	ND	-	500	19.9	3.8	234	31.5	11.9	398	ND	-	208	13.3	6.01	304	8.2	2.63
Ile	660	ND	-	209	ND	-	341	ND	-	832	8.3	1.0	346	3.8	1.1	196	ND	-	250	3.2	1.26	529	7.1	1.32
Leu	0.5	ND	-	836	ND	-	1045	ND	-	624	ND	-	270	ND	-	1042	ND	-	600	ND	-	1141	15.5	1.34
Lys	410	ND	-	366	0.8	0.2	495	2.0	0.4	ND	528	-	20	2.2	9.9	670	ND	-	267	2.8	1.04	421	4.9	1.16
Cys	157	-	-	75	-	-	147	-	-	1683	-	1350	-	ND	-	ND	-	-	ND	-	-	3	-	-
Pro	3808	2.4	0.06	1292	0.8	0.06	1788	0.2	0.01	232	-	-	65	-	-	1216	ND	-	1084	0.5	0.05	1691	0.3	0.02

**Table 4** Amino acid content of various sakes brewed with deep-sea water

No.	2903			2905			3801			3901			4002			4001			
	AA	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D	L-AA	D-AA	% D
		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	
Asp	275	46.9	14.6	178	4.2	2.3	116	1.7	1.4	376	15.1	3.9	195	2.3	1.2	196	2.2	1.1	
Glu	568	20.9	3.5	395	3.1	0.8	231	ND	-	676	9.8	1.4	466	1.6	0.3	549	2.6	0.5	
Asn	275	5.9	2.1	297	9.8	3.2	293	ND	-	1770	5.2	0.3	386	3.5	0.9	457	6.5	1.4	
Ser	375	6.6	1.7	253	ND	-	235	ND	-	726	3.2	0.4	622	0.7	0.1	560	6.9	1.2	
Gln	10	ND	-	21	ND	-	11	0.7	5.9	69	0.8	1.1	161	4.4	2.7	308	ND	-	
Thr	165	ND	-	106	ND	-	533	ND	-	604	ND	-	353	ND	-	831	ND	-	
Gly	308	-	-	231	-	-	250		0.0	332		0.0	253		0.0	140		-	
His	216	ND	-	179	ND	-	221	ND	-	431	ND	-	177	7.2	3.9	223	ND	-	
Ala	1000	524.3	34.4	922	75.3	7.6	780	75.3	8.8	1130	171.8	13.2	1048	84.3	7.4	1122	93.5	7.7	
Arg	933	4.9	0.5	801	21.8	2.6	743	16.9	2.2	268	64.7	19.5	724	24.7	3.3	894	10.2	1.1	
Tyr	186.4	54.9	22.8	148.5	59.1	28.5	127.1	35.5	21.8	391.3	23.4	5.6	132.4	106.8	44.6	177.5	44.3	20.0	
Val	13	3.1	19.3	24	ND	-	20	ND	-	9	ND	-	25	ND	-	55	ND	-	
Met	35	ND	-	40	ND	-	28	ND	-	28	ND	-	7	ND	-	23	ND	-	
Trp	32.1	ND	-	16.9	ND	-	17.9	ND	-	15.9	ND	-	35.1	ND	-	55.1	ND	-	
Phe	133	ND	-	111	ND	-	77	ND	-	382	ND	-	114	ND	-	166	ND	-	
Ile	80	ND	-	27	ND	-	13	ND	-	220	ND	-	38	ND	-	32	ND	-	
Leu	10	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	
Lys	187	0.4	0.2	165	1.4	0.9	11	ND	-	445	0.6	0.1	41	ND	-	9	1.0	10.0	
Cys	ND	-	-	ND	-	-	ND		-	ND		-	18		-	26		-	
Pro	961	ND	-	608	ND	-	660	ND	-	1020	1.1	0.1	709	ND	-	871	ND	-	

**Table 5** Basic properties of the twenty sakes that contained the highest amounts of D-amino acids after three months storage at 25°C

Rank	Area of production	No.	Specific class	Rice species	SMV value "Nihonsyudo"	Acidity "Sando"	Amino acid value "Aminosando"	Polishing ratio (%) "Seimaibuai"	Alcohol content (%)	Remark
1	Ehime	2104	"Junmai"	-	-61	2	-	65	9.5	"Sekishoku Seishu Kobo"
2	Shimane	5101	"Futuu"	-	-13.5	2.3	-	70	14-15	"Sekishoku Seishu Kobo"
3	Yamaguchi	1002	"Junmai Ginjo"	"Yamadanishiki"	6	1.2	-	50	15-16	
4	Okayama	5001	"Junmai"	"Akebono"	-50	3.2	1.4	65	13	"Okayama Hakutou Kobo" "Sekishoku Seishu Kobo"
5	Wakayama	4501	"Junmai Ginjo"	-	-3	1.4	1.4	55	19	-
6	Toyama	2904	"Junmai"	-	5	1.3	1.2	50	15-16	-
7	Fukushima	4901	"Junmai"	"Gohyakumangoku"	-50	8	2.5	60	8.2	"Sekishoku Seishu Kobo"
8	Wakayama	4502	"Junmai Ginjo"	"Bizenomachi"	0	1.5	2	55,60	18	"Kyoukai Kobo(No. 9)"
9	Shimane	2201	"Junmai Daiginjo"	"Yamadanishiki"	4	1.6	-	45	16-17	-
10	Shizuoka	4602	"Junmai Ginjo"	"Homarefuji"	2	1.3	-	55	16-17	-
11	Gifu	1403	"Junmai Daiginjo"	"Miyamanishiki"	11	-	-	45	15-16	-
12	Tochigi	4301	"Junmai Ginjo"	"Wakamizu"	4	1.4	0.9	55	16-17	-
13	Kanagawa	2302	"Junmai"	"Yamadanishiki"	16	2.14	-	70	19-20	-
14	Hyogo	0105	"Honjozo"	-	3.5	1.4	-	70	15	-
15	Nagano	0303	"Ginjo"	"Miyamanishiki" 80% "Hitogokochi" 20%	-2	1.6	1.1	55	18	-
16	Hyogo	0103	"Futuu"	-	1	1	0.8	78	12.5	-
17	Nagano	3501	"Honjozo"	-	1	2.1	1.4	60	14	-
18	Chiba	4401	"Junmai"	Organic rice	-38	8	4.9	90-93	6-15	-
19	Tokushima	3203	"Ginjo"	-	5	1.7	-	58	18.5	-
20	Tochigi	4303	"Junmai Ginjo"	"Bizenomachi"	4	1.4	0.9	50	16-17	-

## 謝 辞

本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

## 参考文献

- 1) Long Z, Lee JA, Okamoto T, Nimura N, Imai K, Homma H (2000) D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH<sub>3</sub>). *Biochem Biophys Res Commun* 276:1143-1147
- 2) Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci* 102:5606-5611
- 3) Morikawa A, Hamase K, Ohgusu T, Etoh S, Tanaka H, Koshiishi I, Shoyama Y, Zaito K (2007) Immunohistochemical localization of D-alanine to beta-cells in rat pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 355:872-826
- 4) 老川典夫, 山田高史, 杉原裕貴, 宮田智子, 吉田宗弘, 左右田健次 (2003) 食品中の D-アミノ酸: 定量的解析と微量栄養素としての可能性. *微量栄養素研究* 20:121-124
- 5) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫 (2006) 野菜および果物中の D-アミノ酸の定量と植物における D-アミノ酸の生合成機構. *微量栄養素研究* 23:1-4
- 6) 老川典夫 (2008) 高等植物及び食品中の D-アミノ酸とその代謝関連酵素. *生化学* 第80巻 第4号: pp. 300-307
- 7) 老川典夫 (2009) 食品中の D-アミノ酸 —おいしさとの関連と食品産業への応用—. *バイオインダストリー* Vol. 27 No. 1: 44-48
- 8) 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(3):380-387.
- 9) Aswad DW (1984) Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of *o*-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 137(2):405-409.
- 10) Einarsson S, Josefsson B, Möller 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(8):1191-1195.