

生酏, 乳酸菌添加生酏, 速醸酏造りの日本酒醸造工程中の D-アミノ酸の定量的解析

郷上佳孝¹⁾, 岡田かおり¹⁾, 森山昌和²⁾, 溝口晴彦²⁾, 老川典夫¹⁾
(¹⁾関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科*, ²⁾菊正宗酒造(株) 総合研究所**)

Quantitative analysis of D-amino acids in sake brewing processes of Kimoto, Kimoto adding starter lactic acid bacteria, and Sokujomoto

Yoshitaka GOGAMI¹⁾, Kaori OKADA¹⁾, Masakazu MORIYAMA²⁾, Haruhiko MIZOGUCHI²⁾, Tadao OIKAWA¹⁾

¹⁾Department of Life Science and Technology, Faculty of Chemistry, Material Bioengineering,
Kansai University, Suita Osaka 564-8680, Japan

²⁾General Research Laboratory, Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd., Kobe Hyogo 658-0046, Japan

Summary

We measured all of the D-amino acids in 37 samples taken in 3 kinds of sake brewing processes (Kimoto, Kimoto adding starter lactic acid bacteria, and Sokujomoto) and 4 samples of sake rice using high-performance liquid chromatography. We found that D-Asp, D-Glu, D-Ala, and D-Val were produced in all three sake brewing processes, but D-His, D-Arg, and D-Pro were detected only in Kimoto. D-Ile and D-Phe were detected only in Kimoto adding starter lactic acid bacteria. D-Leu was detected in Kimoto adding starter lactic acid bacteria and Sokujomoto but not in Kimoto. Most of these D-amino acid concentrations increased from Fukuremae to Modosi period. The D-amino acid concentrations observed were different in each brewing process, and the highest amount of D-Asp (32.1 μ M), D-Glu (25.3 μ M), and D-Ala (160.8 μ M) were contained in Kimoto at Jousou period. In contrast, sake rice contained D-Asp, D-Ala, D-Val, D-Glu, and D-Ser, but all of their concentrations were under 1 μ M. Lactic acid bacteria type culture strains (*Lacobacillus sakei* NBRC 15893 and *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102480) isolated from Kimoto produced D-amino acids (for *L. sakei*: D-Ala, D-Glu, and D-Asp; for *L. mesenteroides*: D-Ala, D-Glu, and D-Lys). We found that all of the gene products of the amino acid racemase homologue genes from *L. sakei* and *L. mesenteroides* showed alanine, glutamate, aspartate, lysine, or histidine racemase activity. Accordingly, Kimoto is one of effective methods to increase D-amino acid contents in sake. The D-amino acids in sake were produced by lactic acid bacteria in Kimoto, and the amino acid racemases of the lactic acid bacteria probably catalyze the synthesis of various D-amino acids in the organisms.

近年, ヒト等の哺乳動物の体内に遊離型 D-アミノ酸が存在し, さまざまな生理的機能を有することが明らかにされている。たとえば, D-アスパラギン酸は松果体実質細胞に存在し, メラトニン合成・分泌抑制^{1, 2)} や精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生の亢進などに関与し^{3, 4)}, D-セリンは哺乳類の脳内に存在し, 神経伝達に関与する N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のグリシン結合部位のコアゴニストとして機能することが明らかとなっている⁵⁾。また D-アラニン はラットの膵臓に存在し, 血糖値の制御⁶⁾ に関与することが推定されている。このような背景において, 食品中の D-アミノ酸の生成機構や機能が注

目されている。

先にわれわれは, 日本酒中にさまざまな D-アミノ酸が存在することを明らかにした⁷⁾。特に生酏(きもと)造りの日本酒中の D-アミノ酸濃度が高い傾向を見出し, それらの D-アミノ酸は日本酒の旨味や総合評価を高めることを明らかにした⁸⁾。本研究では, 生酏造り, 乳酸菌添加生酏造り, 速醸酏造りの日本酒醸造工程で採取されたサンプル中の D-アミノ酸含有量を高速液体クロマトグラフィーで定量するとともに, 生酏から単離された乳酸菌基準株 2 株の D-アミノ酸生産とゲノム上にコードされているアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の網羅的発現と酵素科学的

*所在地: 〒564-8680 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 (関西大学)

**所在地: 〒658-0046 兵庫県神戸市東灘区御陰本町1丁目7番15号 (菊正宗総合研究所)

性質の解明を行い、日本酒中のD-アミノ酸の生成機構を明らかにすることを目的としている。

実験方法

1. 実験材料

菊正宗酒造株式会社の生酛造り、乳酸菌添加生酛造り、速醸酛造りの日本酒醸造工程（二日目、膨れ前、戻し、上槽）で採取した液体画分（33サンプル）と原料米（兵庫県産兵系酒18号、福井県産五百万石、兵庫県産山田錦、滋賀県産日本晴）4サンプルの合計37サンプルを分析試料として用いた。各日本酒醸造工程でのサンプルの採取時期をFig. 1に示した。

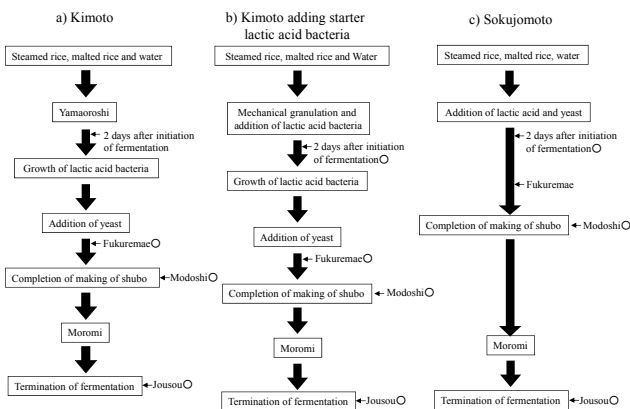


Fig. 1 Brewing process and sampling period
a) Kimoto brewing b) Kimoto adding starter lactic acid bacteria c) Sokujomoto Symbols: ○, Sampling period

2. 原料玄米の遊離D-アミノ酸の抽出

玄米10gを上皿天秤で量りとり、ミルで5分間粉碎した後、その米粉を250μmのふるいにかけた。ふるいを通じた米粉を15ml容のファルコンチューブ2本に0.5gずつ入れ、20mMクエン酸-リン酸緩衝液(pH 8.0)を4.5mlずつ加えて上下に激しく混合した後(0.1g-原料玄米/ml-緩衝液)、25℃で15分間超音波処理を2回行った。超音波処理後、13,000rpm(15,700×g)で15分間遠心分離し、その上清をそれぞれ分析試料として用いた。得られた2つの分析値の平均値と標準偏差(SD)を算出した。

3. 分析試料の除タンパク質

上記2で得られた上清にトリクロロ酢酸を添加し夾雑タンパク質を変性後、水酸化ナトリウムを加えて中和し、遠心分離後の上清のアミノ酸含有量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定し定量した。

4. 分析試料中のD-及びL-アミノ酸のキラル誘導化

分析試料中のD-及びL-アミノ酸は、OPA/NAC法またはFLEC/ADAM法でキラル誘導体化後、HPLCで分析した。サンプルの分析はそれぞれ2回ずつ行った。得られた2つの分析値の平均値と標準偏差(SD)を算出した。

OPA/NAC法

試料溶液60μlに1%四ホウ酸ナトリウム溶液40μlを加えた後、1%N-アセチル-L-システイン(NAC)、1.6%o-フタルアルデヒド(OPA)溶液をそれぞれ20μlずつ加え試料中のアミノ酸をキラル誘導化した。その反応液10μlをHPLCで分析した⁹⁾。

FLEC/ADAM法

試料溶液10μlに500mMホウ酸ナトリウム(pH 9.0)を10μl加えた後、1mM((+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロホルメート(FLEC)溶液を20μl添加し40℃でインキュベートした。30分後、40mM1-アミノアダマンタン(ADAM)溶液を25μl加え過剰のFLECを除去した。15分後、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を35μl添加し誘導体化反応を停止した。その反応液5μlをHPLCで分析した¹⁰⁾。

5. 生酛由来乳酸菌のD-アミノ酸生産

生酛由来の乳酸菌基準株である乳酸桿菌(*Lactobacillus sakei* NBRC 15893)及び乳酸球菌(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. sake NBRC 102480)を、MRS培地(200ml)を入れた三角フラスコ(500ml容)で振とう培養(100rpm)した。培養開始3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 39, 48, 69時間後、培養液(5ml)を無菌的に採取し、その遠心上清中のD-及びL-アミノ酸含有量をHPLCで測定し定量した。

6. 生酛由来乳酸菌のアミノ酸ラセマーゼホモログのクローニングと活性測定

生酛由来の乳酸菌基準株である乳酸桿菌(*L. sakei* NBRC 15893)及び乳酸球菌(*L. mesenteroides* subsp. sake NBRC 102480)のゲノム上にコードされているアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*Ls-aspr*, *Ls-murI*, *Ls-alsr*; *Lm-mur*, *Lm-alsr1*, *Lm-alsr2*, *Lm-alsr3*)をそれぞれポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅し、pET21bベクターにクローニングした。構築した7種のベクターをそれぞれ*Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換し各挿入遺伝子を発現後、得られた遺伝子産物をそれぞれNi-NTAカラムクロマトグラフィーで精製し酵素科学的性質を検討した。アミノ酸ラセマーゼ活性は、各種D-及びL-アミノ酸を基質として用い、30℃で酵素反応させた後、生成するエナンチオマーをHPLCで定量し測定した^{9, 10)}。酵素1Uは30℃で1分間に1μmolのエナンチオマーを生成する酵素量とした。

結果と考察

1. 原料玄米と醸造工程で採取したサンプル中のD-及びL-アミノ酸の含有量

まず各種原料玄米中のD-アミノ酸濃度を測定したとこ

ろ、すべての原料玄米中にはD-アスパラギン酸、D-アラニン、D-バリン、D-グルタミン酸がそれぞれ含まれていることが明らかとなった。しかしD-セリンは兵庫県産山田錦と滋賀県産日本晴にのみ含まれていた。これらの結果から、D-セリン濃度は原料玄米の産地や品種によって異なることが明らかとなった。また今回仕込みに用いた原料玄米中のD-アミノ酸の濃度はいずれも1 μ M以下であった。一般に日本酒醸造に用いられる精米歩合50-70%の原料米中にはD-アスパラギン酸およびD-バリンが0.1 μ M以下しか含まれていなかったこと¹¹⁾、今回仕込み時には精米原料米1 kgに水を1.3 ℓ を加えたこと(0.77 g-精米原料米/ml-水)を考慮すると、Fig. 2から日本酒原料米中のD-アミノ酸は、日本酒中のD-アミノ酸含有量にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。

仕込み後2日目のサンプル中には、乳酸菌添加生醗造りではD-アスパラギン酸、D-アラニン、D-バリン、D-イソロイシン、D-フェニルアラニン、D-プロリンが、速醸醗造りではD-アスパラギン酸、D-バリンがそれぞれ存在することが明らかとなった(Fig. 3)。D-アラニン、D-イソロイシン、D-フェニルアラニンは乳酸菌添加生醗造りのサンプル中には検出されたが速醸醗造りの試料中には検出されなかったことから、乳酸菌添加生醗中に存在する乳酸菌によってこれらのD-アミノ酸が生産されることが明らかとなった。

膨れ前のサンプル中には、生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-ヒスチジン、D-アルギニン、D-プロリンが、乳酸菌添加生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-バリン、D-プロリンがそれぞれ存在することが明らかとなった(Fig. 4)。D-セリンは生醗造りのサンプル中には検出されたが乳酸菌添加生醗造りのサンプル中には検出されなかったことから、生醗に存在する微生物によってD-セリンが生産されることが明らかとなった。

戻しのサンプル中には、生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-ヒスチジン、D-アルギニン、D-プロリンが、乳酸菌添加生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-バリン、D-ロイシンが、速醸醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-バリン、D-ロイシンがそれぞれ存在することが明らかとなった(Fig. 5)。またD-セリン、D-ヒスチジン、D-アルギニン、D-プロリンは生醗造りのサンプル中には検出されたが乳酸菌添加生醗造り、速醸醗造りのサンプル中には検出されなかったことから、生醗に存在する微生物によってD-セリン、D-ヒスチジン、D-アルギニン、D-プロリンが生産されることが明らかとなった。

上槽のサンプル中には、生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-プロリンが、乳酸菌添加生醗造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-バリンが、速醸醗

造りではD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-バリンがそれぞれ存在することが明らかとなった(Fig. 6)。サンプル中のD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニンの濃度は、いずれも生醗造りが最も高いことが明らかとなった。生醗造りでは*Lactobacillus sakei*の最大増殖量は約 1×10^9 cells/ml、*Leuconostoc mesenteroides*の最大増殖量は約 1×10^8 cells/ml、乳酸菌添加生醗造りでは*Lactobacillus sakei*の最大増殖量は約 4×10^8 cells/ml、*Leuconostoc mesenteroides*の最大増殖量は約 3×10^7 cells/mlであることから、これらのD-アミノ酸濃度の違いには、醗中の乳酸菌の影響が大きいことが明らかとなった。

またサンプル中のD-アラニンとD-バリンの濃度は、乳酸菌添加生醗造りより速醸醗造りの方が高いことが明らかとなった(Fig. 6)。これは速醸醗造りでは開放系の酒母には多量(約 1×10^5 cells/ml)の*Micrococcus*属等の好気性微生物が発生し死滅することが知られており、これらの微生物が生産するD-アミノ酸の影響であると考えられる。

以上の結果から、生醗造り、乳酸菌添加生醗造り、速醸醗造りの醸造工程中にはD-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸が存在し、D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸は乳酸菌の菌数が最大となる膨れ前から戻しにかけて増加することが明らかとなった(Fig. 4, Fig. 5)。また、これらのD-アミノ酸濃度は、醸造方法によって大きく異なり、特に生醗造り、乳酸菌添加生醗造りの醸造工程中のサンプル中にD-アミノ酸が多量に含まれていることが明らかとなった(Fig. 6, Fig. 7)。これらの結果から、日本酒中のD-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸は、生醗造り及び乳酸菌添加生醗造りの醸造に関与する乳酸菌によって主に生産されることが明らかとなった。

2. 生醗由来乳酸菌のD-アミノ酸生産

生醗由来の乳酸基準株である乳酸桿菌(*L. sakei* NBRC 15893)がD-アラニン、D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸を、乳酸球菌(*L. mesenteroides* subsp.sake NBRC 102480)がD-アラニン、D-グルタミン酸、D-リシンを培養液中に分泌生産することを見出した。D-アミノ酸生産量は、MRS培地で培養すると、*L. sakei* NBRC 15893では、D-アラニン(最大濃度1.2 mM; 培養時間39 h)、D-グルタミン酸(最大一定濃度0.87 mM; 培養時間48 h)、D-アスパラギン酸(最大一定濃度0.27 mM; 培養時間48 h)の順に、また*L. mesenteroides* subsp.sake NBRC 102480では、D-グルタミン酸(最大一定濃度0.47 mM; 培養時間69 h)、D-アラニン(最大濃度0.25 mM; 培養時間24 h)、D-リシン(最大一定濃度0.09 mM; 培養時間24 h)の順に高く、両微生物間でD-アミノ酸生産能が違うことが明らかとなった(Fig. 7)。

3. 生醗由来乳酸菌のアミノ酸ラセマーゼホモログの酵素科学的性質

生醗由来の乳酸菌基準株である乳酸桿菌 (*L. sakei* NBRC 15893) から、アラニンラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼのホモログ遺伝子 (*Ls-alsr*; *Ls-murI*; *Ls-aspr*) を、また乳酸球菌 (*L. mesenteroides* subsp. *sake* NBRC 102480) からグルタミン酸ラセマーゼ及び3種のアラニンラセマーゼホモログ遺伝子 (*Lm-mur*; *Lm-alsr1*; *Lm-alsr2*; *Lm-alsr3*) をクローニングし、大腸菌で発現することに成功した。また、*Ls-alsr*, *Ls-murI*, *Ls-aspr* の遺伝子産物を精製し、酵素活性を測定したところ、それぞれ、アラニンラセマーゼ (精製酵素の比活性: 7.4 U/mg), グルタミン酸ラセマーゼ (41.1 U/mg), アスパラギン酸ラセマーゼ (43.2 U/mg) 活性を示すことが明らかとなった。一方、*Lm-mur*, *Lm-alsr1*, *Lm-alsr2*,

Lm-alsr3 の遺伝子産物を精製し、酵素活性を測定したところ、それぞれグルタミン酸ラセマーゼ (精製酵素の比活性: 9.6 U/mg), アラニンラセマーゼ (27.1 U/mg), リシンラセマーゼ (16.2 U/mg), ヒスチジンラセマーゼ (12.7 U/mg) 活性を示すことが明らかとなった。これまでヒスチジンに特異的に作用するアミノ酸ラセマーゼの報告はなく、本酵素が最初の例である。また日本酒中にはD-ヒスチジンが存在していることから⁷⁾, 日本酒中のD-ヒスチジンは本酵素によって生成されていると考えられる。

以上の結果から、生醗造りは、日本酒中のD-アミノ酸濃度を増加させる醸造方法であり、日本酒中のD-アミノ酸の多くは生醗中に存在する乳酸菌によって生成することが明らかとなった。またこの乳酸菌によるD-アミノ酸の生成には、乳酸菌体内に存在するさまざまなアミノ酸ラセマーゼが関与すると思われる。

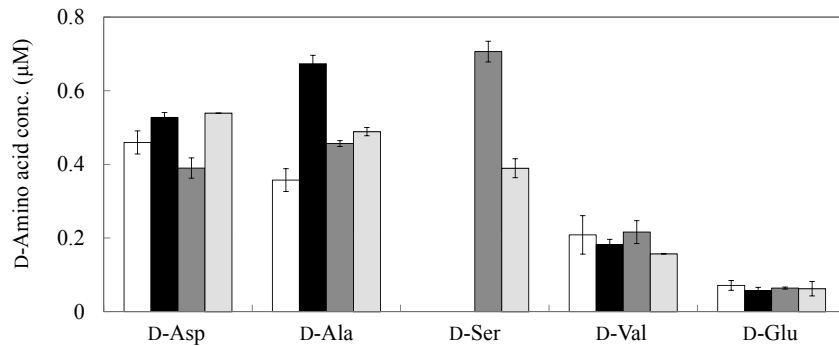


Fig. 2 D-amino acids contents in brown rice
Symbols: □, Hyoukeisake No.18; ■, Gohyakumangoku; ▒, Yamadanishiki; ◻, Nihonbare
Data were expressed as mean ±SD (n = 2).

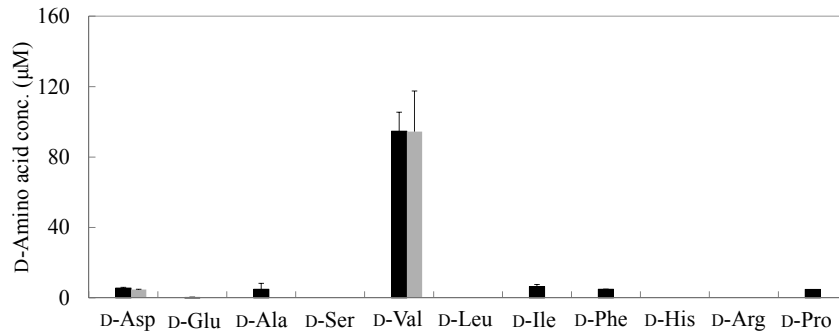


Fig. 3 Comparison of D-amino acid contents in brewing process (Second day)
Symbols: ■, Kimoto adding starter lactic acid bacteria; ▒, Sokujomoto
Data were expressed as mean ±SD (n = 2).

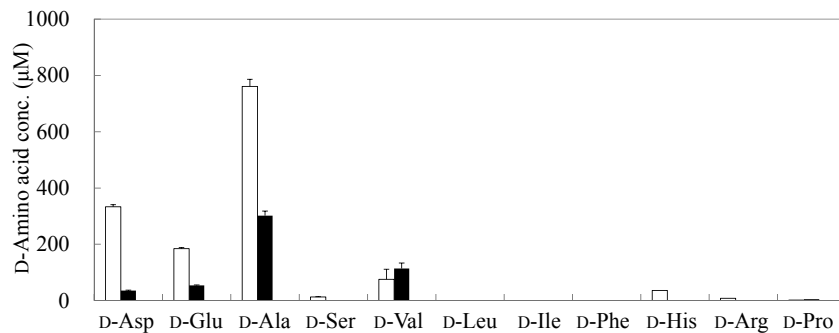


Fig. 4 Comparison of D-amino acid contents in brewing process (Fukuremae)
Symbols: □, Kimoto; ■, Kimoto adding starter lactic acid bacteria
Data were expressed as mean ±SD (n = 2).

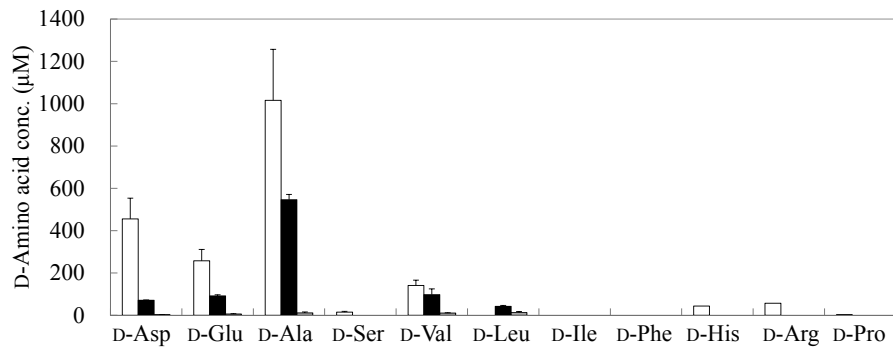


Fig. 5 Comparison of D-amino acid contents in brewing process (Modoshi)
 Symbols: □, Kimoto; ■, Kimoto adding starter lactic acid bacteria; ▒, Sokujomoto
 Data were expressed as mean \pm SD (n = 2).

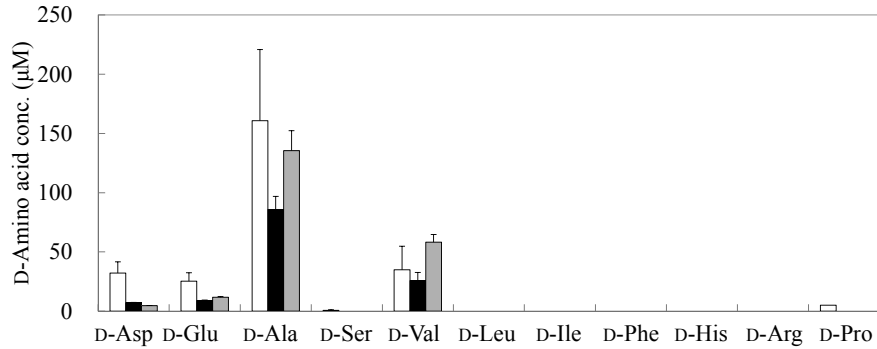


Fig. 6 Comparison of D-amino acid contents in brewing process (Jousou)
 Symbols: □, Kimoto; ■, Kimoto adding starter lactic acid bacteria; ▒, Sokujomoto
 Data were expressed as mean \pm SD (n = 2).

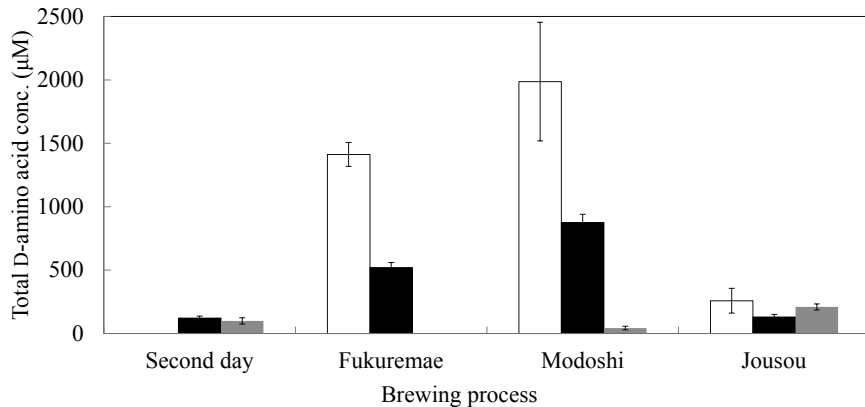


Fig. 7 Comparison of total D-amino acid contents in brewing process
 Symbols: □, Kimoto; ■, Kimoto adding starter lactic acid bacteria; ▒, Sokujomoto
 Data were expressed as mean \pm SD (n = 2).

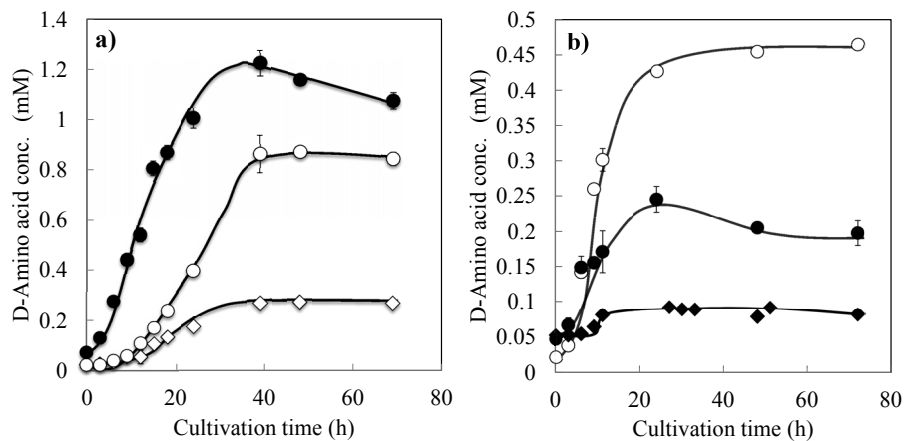


Fig. 8 D-Amino acid production of Kimoto lactic acid bacteria
 a) *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 Symbols: ●, D-Ala; ◇, D-Asp; ○, D-Glu
 b) *Leuconostoc mesenteroides* subs. *sake* NBRC 102480 Symbols: ●, D-Ala; ○, D-Glu; ◆, D-Lys
 Data were expressed as mean \pm SD (n = 2).

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) Takigawa Y, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Imai K (1998) D-Aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 641-647.
- 2) Ishio S, Yamada H, Hayashi M, Yatsushiro S, Noumi T, Yamaguchi A, Moriyama Y (1998) D-Aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Neurosci. Lett.* 249: 143-146.
- 3) Nagata Y, Homma H, Matsumoto M, Imai K (1999) Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by D-aspartate in rat Leydig cells. *FEBS Lett.* 454: 317-320.
- 4) Nagata Y, Homma H, Lee JA, Imai K (1999) D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Lett* 444:160-164.
- 5) De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14542-14547.
- 6) Morikawa A, Hamase K, Ohgusu T, Etoh S, Tanaka H, Koshiishi I, Shoyama Y, Zaitso K (2007) Immunohistochemical localization of D-alanine to β -cells in rat pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 872-876.
- 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) Okada K, Gogami Y, Oikawa T (2012) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids* DOI: 10.1007/s00726-012-1359-y.
- 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: 1191-1195.
- 11) 郷上佳孝, 保井美穂, 岡田おかり, 老川典夫 (2011) 日本酒原料米中の D-および L-アミノ酸含有量の地域差と局在性 *Trace Nutrients Research* 28: 1-9.