

D-AMINO ACID IN FOOD: OCCURRENCE, PRODUCTION MECHANISM, AND FUNCTION

Tadao Oikawa

Department of Life Science & Technology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,
Kansai University

3-3-35, Yamate-Cho, Suita-Shi, Osaka-Fu, 564-8680, Japan

oikawa@kansai-u.ac.jp

Fax: 06-6388-8609

Abstract

In general, enzymes are essential molecules for maintaining of life and are composed of various amino acids. The amino acids synthesized chemically contain both D- and L-amino acids, but enzymes contain exclusively L-amino acids in their peptide chains. This fact led to the origin of life, and many theories were mentioned but anyway both D- and L- amino acids co-existed at the beginning of the forming of the earth. Accordingly, D-amino acids exist more than 50 million years ago in nature, but the existence of D-amino acids have been ignored until the analytical methods for D-amino acids developed. Recently, much attention has been paid for the relationship between D-amino acid in food and their function in life.

In this work, I will describe D-amino acid in food, especially in sake, and discuss about occurrence, production mechanism, and function of D-amino acid in sake. I analyzed D- and L-amino acids contents of 141 kind of sake by combination of 3 different chiral derivatization methods for high-performance liquid chromatography. I analyzed the relationship between D- or L-amino acid content and taste of sake using principle component analysis. I found that D-amino acid content of sake increased when it was produced with Kimoto. The lactic acid bacteria contained Kimoto produced extracellularly D-alanine, D-aspartic acid, and D-glutamic acid. Principle component analysis revealed that D-alanine, D-aspartic acid, and D-glutamic acid in sake increased umami and total evaluation of sake. This new function of D-amino acid in food will make various functional foods and contribute to human health in daily life.

(Keywords)

D-Amino acid, Functional food, Sake, Amino acid racemase, Kimoto, Lactic acid bacteria, Principle component analysis

食品中の D-アミノ酸：存在、生成機構、機能

老川 典夫

関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科
〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35

FAX : 06-6388-8609

E-mail : oikawa@kansai-u.ac.jp

1. 緒論

生命の根幹を担う酵素は、一般にタンパク質から成り、そのタンパク質はアミノ酸で構成されている。アミノ酸は化学合成すると L 体と D 体が

等量生成するが、酵素タンパク質を構成するアミノ酸はすべて L 体である。生命誕生の起源にもつながるこの謎には、多くの学説が唱えられているが、いずれにしても地球創成期から宇宙には L 体と D 体のアミノ酸が存在していたことは明らかである[1]。したがって、人類が誕生したとされる約 500 万年以上前から自然界には D-アミノ酸が存在していたが、近年分析技術が進展するまでその存在は見過ごされてきた。特にヒトが摂取する食品中の D-アミノ酸は、生命現象との関連性から注目されている[2,3,4,5,6,7]。

本論文では、食品中の D-アミノ酸について、日本の伝統的発酵食品である日本酒を例にその存在、生成機構、機能について、著者の最近の研究成果をもとに論じる。まず 51 社の酒造会社の 141 種類の日本酒中に含まれる D-及 L-アミノ酸を定量し、各製品の D-及 L-アミノ酸濃度、生産地、日本酒度、アミノ酸度、原料米の精米歩合、アルコール度数、原料米の品種、醸造方法を検討する。これらのデータに基づき、日本酒中に含まれる D-及び L-アミノ酸の種類を特定するとともに、それぞれの含有濃度範囲を推定する。また、D-アミノ酸濃度の高い日本酒の D-アミノ酸濃度と生産地、日本酒度、アミノ酸度、原料米の精米歩合、アルコール度数、原料米の品種、醸造方法との間に関連性を見出す。また 51 社の酒造会社の 141 種類の開封直後の官能評価試験の結果を主成分分析で解析し、日本酒中の D-アミノ酸が日本酒の味や総合評価に及ぼす影響を解明する。さらに、生酏、速醸酏、乳酸菌添加生酏（簡易生酏）の 3 種類の日本酒醸造方法のさまざまな工程で採取した試料中に含まれる D-及び L-アミノ酸の定量分析や官能評価の低い日本酒への D-アミノ酸添加と官能評価試験を実施するとともに主成分分析で日本酒中の D-アミノ酸濃度と味の評価を解析し、醸造方法や醸造工程が日本酒中の D-アミノ酸含有量に及ぼす影響や日本酒中の D-アミノ酸が日本酒の味に及ぼす影響を解析し、D-アミノ酸濃度の高い、味や総合評価が優れた日本酒を製造する方法を、製品情報と製造方法及び工程の両面から解明することを目的とする。

2. 試料と分析

2.1 試料

分析には、51 都道府県の 141 の日本酒をランダムに購入し使用した。これらの日本酒の種別とその数は、大吟醸(9 製品)、純米大吟醸(14 製品)、吟醸(9 製品)、純米吟醸(42 製品)、特別本醸造 (2 製品)、特別純米酒 (9 製品)、本醸造 (15 製品) 純米酒 (35 製品)、普通酒 (6 製品) であった。

2.2 分析方法

日本酒中の D-及び L-アミノ酸の定量には、高

速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。また、D-及びL-アミノ酸の蛍光キラル誘導体化には、①OPA/NAC プレラベル法 (o-フタルアルデヒド/*N*-アセチル-L-システイン) [8]、②FLEC/AMAM プレラベル法 ((+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロホルメート/1-アミノアダマンタン) [9]、③OPA/NAC ポストラベル法[10]を併用することにより、システイン(システインはDL-システインとして定量)とグリシン(光学異性体がない)を除く全ての日本酒中のD-及びL-アミノ酸を定量した。D-及びL-アミノ酸は検量線法で定量した。①~③の蛍光キラル誘導体化法について、それぞれ検量線を作成することにより、蛍光キラル誘導体化法の違いによる蛍光強度の違いを除外した。①、②、③の蛍光キラル誘導体化法でのD-及びL-アミノ酸の測定可能な範囲は、それぞれ6 nM~20 μM、10 nM~20 μM、1.5 μMであった。また、D-アミノ酸の相対含有割合(%D)は、 $\%D = 100 \times A_D / (A_D + A_L)$ 、 A_D :D-アミノ酸のピーク面積、 A_L :L-アミノ酸のピーク面積で算出した。

3. 方法

3.1 日本酒中のD-及びL-アミノ酸の定量的解析
51社の酒造会社の141種類のすべての製品について、D-及びL-アミノ酸の分析と定量解析を行った。サンプルのアミノ酸分析は、プレラベル型 OPA-NAC キラル誘導体化法でアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アラニン、チロシン、トリプトファン、バリン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニンのD-及びL-体とグリシンを定量し、また本法では分離・定量が困難なアミノ酸のうち、システインは、DL体としてポストラベル型 OPA-NAC キラル誘導体化法で、さらに、メチオニン、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、リシン、ヒスチジン、プロリンについては、ADAME法を用いてそれぞれのアミノ酸のD-及びL-体を分離定量した。

3.2 日本酒中のD-及びL-アミノ酸の種類・含有量の系統的解析と官能評価分析

51社の酒造会社の141種類のすべての日本酒中に含まれるD-及びL-アミノ酸の種類・含有量の系統的解析と官能評価分析を行った。官能評価試験は、大阪国税局清酒鑑評会品質評価員1名に依頼し実施した。官能評価は、色沢(1.濁り(あり・なし)、2.色(無色・黄色・茶褐色)、香り(1.高低(高い・普通・低い)、2.酸臭(強い・弱い・なし)、3.炭臭(強い・弱い・なし)、4.甘臭(強い・弱い・なし)、5.特性(新酒臭・吟醸香・熟成香・個性的))、味(1.濃淡(旨味ある・濃醇・普通・淡麗)、2.苦み(苦みうく・強い・普通・弱い)、3.酸味(酸うく・強い・普通・弱い)、4.旨味(だれる・強い・普通・弱い)、5.甘味(だれる・甘うく・普通・弱い)、6.その他)、総合(1.調和(良好・普通・不調和)、2.熟度(熟成・普通・若い))について実施した。また、官能評価試験の結果は数値化し、主成分分析で解析した。さらに、開封後一定期間保存中のD-アミノ酸の増加に関与する微生物を特定するため、開

封後保存中にD-アミノ酸の増加が確認された12銘柄について、開封直後の日本酒中に含まれるD-及びL-アミノ酸の分析、定量解析と日本酒中に含まれる微生物の単離と同定を実施した。

3.3 日本酒へのDL-アラニン及びL-アラニン添加と官能評価試験

D-アミノ酸含有量が低くかつ官能評価試験の低い日本酒3製品に、DL-アラニン及びL-アラニンを終濃度がそれぞれ0, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200, 0.500, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 mM及び0, 0.005, 0.010, 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, 0.5000, 1.000, 2.500, 5.000 mMになるように添加し、官能評価試験を実施するとともに、D-及びL-アミノ酸濃度を定量した。また、主成分分析を行い、DL-アラニン濃度と味の評価を解析した。

3.4 生醗系日本酒醸造工程で採取された試料中のD-及びL-アミノ酸の分析と定量解析

酒造会社A社から提供された生醗系日本酒醸造工程で採取された試料中のD-及びL-アミノ酸の分析と定量解析を行った。A社は、D-アミノ酸濃度が高い仕込み方であることが明らかとなった生醗をその製造方法に用いている。A社の試料には、酒母、酒母もろみ、米麴(麴麴及び掛け麴)、原料米(兵系酒18号、五百万石、山田錦、日本晴)を用いた。仕込み方法は、生醗、簡易生醗、速醸醗の3種の異なる方法の試料を用いた。生醗、乳酸菌添加生醗(簡易生醗)、速醸醗の仕込み2日目、膨れ前、戻し、上槽の各工程でサンプリングした液体画分(39サンプル)と原料米(4サンプル)、米麴(2サンプル)の合計39サンプル中のD-及びL-アミノ酸含有量を定量した。玄米または米麴はミルで粉碎後、ふるいにかけて、米粉を緩衝液(pH 8)に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎後、遠心分離し、除タンパク処理後、中和し、遠心後の上清をフィルターろ過したものを分析試料とした。また液体画分は遠心分離し、除タンパク処理後、中和し、遠心後の上清をフィルターろ過したものを分析試料とした。

3.5 D-アミノ酸高生産生醗由来乳酸菌の選抜と試験醸造酒の作成

生醗由来乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 12株と生醗由来乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 16株は生醗系日本酒醸造会社A社から提供されたものを用いた。まず *L. sakei* 12株と *L. mesenteroides* 16株を、MRS培地(Glucose 18.5 g, Peptone 10 g, Meat extract 8 g, Yeast extract 4 g, Sodium acetate 3 g, K_2HPO_4 2 g, Ammonium citrate 2 g, Tween 80 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g, Deionized water 1 liter, pH 6.5)で、それぞれ30°Cで静置培養後、遠心分離を行いその上清を回収した。得られた培養液の上清にトリクロ酢酸を添加し除タンパク後、水酸化ナトリウムで中和し生じた沈殿を微量遠心機で沈殿除去後、その上清をアミノ酸分析用サンプルとした。得られたD-及びL-アミノ酸の分析結果に基づき、*L. sakei* 12株と *L. mesenteroides* 16株からD-アミノ酸高生産株を選抜した。選抜した *L. sakei* と *L. mesenteroides* を、米の酵素分解物を炭素源とする培地で、それぞれ30°Cで静置培養後、遠心分離を行いその上清を回収した。得られた培養液の上清にトリクロ酢酸

を添加し除タンパク後、水酸化ナトリウムで中和し生じた沈殿を微量遠心機で沈殿除去後、その上清をアミノ酸分析用サンプルとした。さらに米の酵素分解物を炭素源とする培地（米培地）で D-アミノ酸生産量の最も高い *L. sakei* 及び *L. mesenteroides* を選抜し、D-アミノ酸強化日本酒生産のための試験醸造を行った。試験醸造は①乳酸菌標準菌株を用いる乳酸菌添加生酏、②現在製造に用いられている乳酸菌添加生酏、③D-アミノ酸生産量の最も高い乳酸菌を用いる乳酸菌添加生酏、④速醸酏の4仕込みで行った。また得られら試験醸造酒の D-及び L-アミノ酸の定量と官能評価試験を実施した。

3.6 生酏由来乳酸菌の D-アミノ酸代謝関連酵素活性の探索と D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子のクローニング

生酏由来乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 のアラニンラセマーゼホモログ遺伝子(*alr*)、グルタミン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*murI*)、アスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*aspr*) と生酏由来乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides subsp. sake* NRRC 102480 の3つのアラニンラセマーゼホモログ遺伝子(*alr1*, *alr2*, *alr3*)と1つのグルタミン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*murI*) を、それぞれ発現ベクターに挿入し、大腸菌に形質転換した7つのクローン株を培養し、菌体を集菌した。これらの遺伝子産物は、精製が容易な His-タグ融合タンパク質として発現するよう発現ベクターを選択した。それぞれの菌体を、超音波破碎機により破碎後、遠心分離を行い、その上清を無細胞抽出液とした。得られたそれぞれの無細胞抽出液から、7種の遺伝子産物を精製した。精製には、GEヘルスケア・ジャパン(株)社製 AKTA purifier UPC 10 ベースシステムを用いた。

カラムには、His-タグ融合タンパク質と強い親和性を示す Ni-NTA アフィニティーカラムを用いた。得られた7つの精製酵素標品を用い、7つの遺伝子産物の酵素科学的特性（分子量、サブユニット構成、基質特異性、補酵素特異性、最適温度、最適 pH、熱安定性、pH 安定性、酵素反応速度論的パラメーター等）を解明した。

4. 結果と討論

4.1 日本酒中の D-及び L-アミノ酸の定量的解析

本研究により、日本酒中の D-アミノ酸の含有量は、製品によって大きく異なることが明らかとなった (Table 1, Table 2, Table 3)。51 社の酒造会社の 141 種類の日本酒に含まれている各 D-アミノ酸の割合は、D-アスパラギン酸(97.8%)、D-アラニン(96.4%)、D-アルギニン(82.9%)、D-プロリン(71.4%)、D-グルタミン酸(66.4%)、D-バリン(65.7%)、D-リシン(60.7%)、D-フェニルアラニン(59.9%)、D-イソロイシン(58.4%)、D-ヒスチジン(52.1%)、D-アスパラギン(51.4%)、D-チロシン(51.1%)、D-グルタミン(33.8%)、D-ロイシン(4.4%)、D-セリン(2.5%)、D-スレオニン(0%)、D-メチオニン(0%)、D-トリプトファン(0%)であることが明らかとなった。一方、51 社の酒造会社の 141 種類の日本酒に含まれている各 L-アミノ酸の割合は、L-アスパラギン酸(100%)、L-トレオニン(100%)、L-アラニン(100%)、L-メチオニン(100%)、L-アルギニン(100%)、L-ヒスチジン(100%)、L-アスパラギン(100%)、L-セリン(99.3%)、L-バリン(99.3%)、L-フェニルアラニン(99.3%)、L-プロリン(99.2%)、L-グルタミン(99.2%)、L-イソロイシン(97.8%)、L-リシン(97.1%)、L-ロイシン(88.3%)、L-チロシン(75.9%)、L-トリプトファン(0%)であることが明らかとなった。さらに、DL-システインとグリシンの含有割合は、それぞれ

Table 1. D- and L- amino acid concentration of thirty sakes with high amount of D-Asp, D-Glu, D-Thr, D-Ala, D-Ser, and D-Tyr.

産地	番号	Asp			Glu			Thr			Ala			Ser			Tyr		
		D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)
		(μM)			%			(μM)			%			(μM)			%		
千葉県	4401	18.1	695	2.5	132.0	771	14.6	ND	966	-	367.1	1228	23.0	11.6	874	1.3	31.4	504	5.9
富山県	2903	46.9	275	14.6	20.9	568	3.5	ND	165	-	524.3	1000	34.4	6.6	375	1.7	ND	186.4	-
三重県	0204	66.9	490	12.0	38.3	927	4.0	ND	907	-	315.1	1554	16.9	ND	763	-	1.4	510.3	0.3
石川県	3901	15.1	376	3.9	9.8	676	1.4	ND	604	-	171.8	1130	13.2	3.2	726	0.4	23.4	391.3	5.6
鳥取県	3303	6.8	650	1.0	11.4	715	1.6	ND	1011	-	78.2	1183	6.2	ND	828	-	17.5	454.4	3.7
大分県	3403	9.7	763	1.3	3.2	785	0.4	ND	453	-	7	1160	0.6	ND	784	-	ND	576.3	-
愛媛県	2105	11.8	373	3.1	0.6	660	0.1	ND	183	-	50.1	1112	4.3	2	425	0.5	2.5	270.1	0.9
和歌山県	4503	25.3	904	2.7	1.2	691	0.2	ND	321	-	5.2	1318	0.4	1.9	622	0.3	0.2	374	0.1
茨城県	0802	33.8	555	5.7	ND	1232	-	ND	906	-	179.0	1807	9.0	ND	775	-	ND	426.6	-
長崎県	3502	9.6	415	2.3	2.4	655	0.4	ND	302	-	6.8	1120	0.6	ND	663	-	12.4	466.2	2.6
岐阜県	1401	21.0	278	7.0	9.0	588	1.5	ND	405	-	133.6	1046	11.3	ND	493	-	9.5	302.2	3.0
大分県	3402	10	635	1.6	2.1	762	0.3	ND	375	-	43.3	1129	3.7	ND	731	-	9.9	479.4	2.0
和歌山県	4502	24.5	833	2.9	1.4	827	0.2	ND	498	-	1.8	1300	0.1	ND	835	-	2.7	560.4	0.5
愛媛県	2104	14.9	211	6.6	14.2	686	2.0	ND	184	-	65.4	673	8.9	ND	386	-	5.5	427.8	1.3
大阪府	4701	7.7	906	0.8	33.3	809	4.0	ND	895	-	83.8	1328	5.9	0.7	815	0.1	12.1	468.4	2.5
山梨県	2502	16.3	496	3.2	3.5	734	0.5	ND	702	-	55.4	1286	4.1	ND	680	-	ND	325.9	-
埼玉県	1303	9.4	619	1.5	11.7	736	1.6	ND	959	-	107.7	1452	6.9	ND	730	-	10.4	367	2.8
福島県	4901	61.8	779	7.4	56	642	8.0	ND	1017	-	5.2	534	1.0	9.3	843	1.1	15.3	341	4.3
青森県	2003	8.5	370	2.2	1.2	691	0.2	ND	321	-	5.2	1222	0.4	ND	390	-	23.2	374	5.8
鳥根県	2204	33	298	10.0	16	612	2.5	ND	183	-	7.8	1015	0.8	1	465	0.2	13	332.9	3.8
富山県	2905	4.2	178	2.3	3.1	395	0.8	ND	106	-	75.3	922	7.6	ND	253	-	ND	148.5	-
岡山県	1803	12.2	261	4.5	6.9	594	1.1	ND	148	-	66.4	1113	5.6	ND	371	-	8.3	301.4	2.7
大分県	3401	10.3	392	2.6	2.1	703	0.3	ND	321	-	44.2	1044	4.1	ND	690	-	9.1	482.4	1.9
山梨県	2503	14.9	512	2.8	4.4	773	0.6	ND	563	-	48.5	1287	3.6	ND	668	-	ND	323	-
大阪府	4702	8.3	750	1.1	4.1	806	0.5	ND	677	-	5.5	1302	0.4	3.8	798	0.5	27.4	477.6	5.4
鳥取県	1702	18.4	342	5.1	ND	650	-	ND	165	-	7.6	1043	0.7	ND	396	-	10.6	362.7	2.8
愛媛県	2102	15.2	229	6.2	5.1	530	1.0	ND	177	-	49.7	1012	4.7	ND	355	-	5.2	276.4	1.8
熊本県	3002	16.8	609	2.7	1.3	738	0.2	ND	500	-	6.7	1076	0.6	0.1	795	0.0	39.4	482.6	7.5
京都府	1501	10.9	381	2.8	5.4	798	0.7	ND	300	-	29.5	1022	2.8	ND	605	-	28.6	421.7	6.4
山梨県	2504	15.4	602	2.5	2.8	756	0.4	ND	415	-	51.7	1269	3.9	ND	655	-	6.2	351.7	1.7

Table 2. D- and L- amino acid concentration of thirty sakes with high amount of D-Tyr, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Phe, D-Arg, and D-His.

産地	番号	Val			Leu			Ile			Phe			Arg			His		
		D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)									
		(μM)			(μM)			(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
千葉県	4401	ND	340	-	ND	0.5	-	ND	660	-	ND	984	-	49.9	1877	2.6	ND	527	-
富山県	2903	3.1	13	19.3	ND	10	-	ND	80	-	ND	133	-	4.9	933	0.5	ND	216	-
三重県	0204	29.1	1099	2.6	ND	836	-	ND	209	-	ND	363	-	ND	156	-	ND	152	-
石川県	3901	ND	9	-	ND	ND	-	ND	220	-	ND	382	-	64.7	268	19.5	ND	431	-
鳥取県	3303	ND	21	-	ND	1045	-	ND	341	-	ND	581	-	133.1	862	13.4	ND	449	-
大分県	3403	68.4	874	7.3	ND	630	-	6.1	1067	0.6	39.1	545	6.7	17.2	1281	1.3	27.0	321	7.8
愛媛県	2105	19.1	422	4.3	ND	560	-	4.7	326	1.4	ND	218	-	56.9	1411	3.9	70.9	259	21.5
和歌山県	4503	50.2	590	7.8	ND	930	-	13.6	1289	1.0	60.9	803	7.0	51.9	1732	2.9	ND	384	-
茨城県	0802	ND	189	-	ND	1042	-	ND	196	-	ND	398	-	10.3	1636	0.6	ND	131	-
長崎県	3502	27.5	762	3.5	ND	936	-	7	700	1.0	43.5	393	10.0	107.1	1913	5.3	ND	320	-
岐阜県	1401	19.9	510	3.8	ND	600	-	3.2	250	1.3	13.3	208	6.0	ND	355	-	ND	220	-
大分県	3402	47.9	724	6.2	ND	718	-	5.5	676	0.8	42.9	445	8.8	23.3	1423	1.6	9.6	192	4.8
和歌山県	4502	55.8	659	7.8	ND	932	-	6.3	1292	0.5	63.9	745	7.9	39.3	1307	2.9	ND	384	-
愛媛県	2104	6.5	14	31.7	ND	ND	-	ND	133	-	ND	345	-	56.8	1851	3.0	20.9	427	4.7
大阪府	4701	ND	755	-	ND	624	-	8.3	832	1.0	19.9	500	3.8	11.5	1287	0.9	ND	438	-
山梨県	2502	21.2	501	4.1	ND	1071	-	6.3	488	1.3	14.6	303	4.6	43.9	1188	3.6	22.1	242	8.4
埼玉県	1303	22.3	802	2.7	ND	1141	-	7.1	529	1.3	8.2	304	2.6	ND	754	-	6.5	324	2.0
福島県	4901	0.5	28	1.8	ND	347	-	ND	618	-	ND	1028	-	12.5	762	1.6	8.4	903	0.9
青森県	2003	15.5	576	2.6	ND	376	-	7.3	462	1.6	30.4	282	9.7	52.8	1031	4.9	29.4	254	10.4
鳥根県	2204	13.7	460	2.9	ND	270	-	3.8	346	1.1	31.5	234	11.9	49.0	246	16.6	ND	87	-
富山県	2905	ND	24	-	ND	ND	-	ND	27	-	ND	111	-	21.8	801	2.6	ND	179	-
岡山県	1803	31.7	282	10.1	ND	1035	-	5.2	147	3.4	17.5	142	11.0	ND	619	-	12.8	218	5.6
大分県	3401	36.9	365	9.2	ND	747	-	5.6	239	2.3	38.9	403	8.8	ND	1086	-	4.2	158	2.6
山梨県	2503	23.7	491	4.6	ND	586	-	5.9	482	1.2	15.5	284	5.2	9.1	1216	0.7	33.9	263	11.4
大阪府	4702	ND	734	-	ND	604	-	10.4	802	1.3	27.7	520	5.1	48.9	1355	3.5	18.5	335	5.2
鳥取県	1702	27.3	426	6.0	ND	1154	-	5.5	341	1.6	39.1	229	14.6	37.3	229	14.0	6.3	177	3.4
愛媛県	2102	24.9	377	6.2	ND	803	-	2.5	297	0.8	25.8	177	12.7	29.3	675	4.2	ND	214	-
熊本県	3002	25	573	4.2	ND	223	-	8.7	793	1.1	48.6	532	8.4	ND	2059	-	ND	237	-
京都府	1501	21.4	582	3.5	ND	726	-	5.1	483	1.0	34.9	294	10.6	ND	633	-	ND	222	-
山梨県	2504	27.4	512	5.1	ND	790	-	3	489	0.6	15.4	296	4.9	5.6	1183	0.5	16.0	208	7.1

Table 3. D- and L- amino acid concentration of thirty sakes with high amount of D-Asn, D-Met, D-Lys, D-Gln, Gly, D-Pro, and DL-Cys.

産地	番号	Asn			Met			Lys			Gln			Gly		Pro			Cys	
		D-AA	L-AA	D/(D+L)	AA	D-AA	L-AA	D/(D+L)	DL-AA	DL-AA										
		(μM)			(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		(μM)			(μM)	
千葉県	4401	6.0	1298	0.5	ND	33	-	ND	410	-	ND	958	-	406	2.4	3808	0.1	157	-	
富山県	2903	5.9	275	2.1	ND	35	-	0.4	187	0.2	ND	10	-	308	ND	961	-	ND	-	
三重県	0204	ND	316	-	ND	57	-	0.8	366	0.2	ND	26	-	607	0.8	1292	0.1	75	-	
石川県	3901	5.2	1770	0.3	ND	28	-	0.6	445	0.1	0.8	69	1.1	332	1.1	1020	0.1	ND	-	
鳥取県	3303	7.4	663	1.1	ND	45	-	2.0	495	0.4	ND	42	-	358	0.2	1788	0.01	147	-	
大分県	3403	68.8	997	6.5	ND	199	-	1.9	518	0.4	3.0	93	3.1	496	0.3	1008	0.03	47	-	
愛媛県	2105	19.0	537	3.4	ND	33	-	0.7	312	0.2	5.2	338	1.5	436	ND	1175	-	180	-	
和歌山県	4503	4.5	192	2.3	ND	173	-	ND	416	-	15.4	588	2.6	465	4.3	1596	0.3	324	-	
茨城県	0802	2.8	536	0.5	ND	871	-	ND	670	-	ND	40	-	771	ND	1216	-	ND	-	
長崎県	3502	5.8	581	1.0	ND	51	-	1.0	518	0.2	ND	60	-	491	ND	1474	-	ND	-	
岐阜県	1401	ND	468	-	ND	51	-	2.8	267	1.0	ND	33	-	467	0.5	1084	0.05	ND	-	
大分県	3402	15.8	1069	1.5	ND	90	-	1.3	460	0.3	ND	109	-	451	0.3	1253	0.03	11	-	
和歌山県	4502	6.6	337	1.9	ND	173	-	ND	416	-	4.5	789	0.6	465	4.3	1507	0.3	112	-	
愛媛県	2104	2.7	701	0.4	ND	15	-	1.5	362	0.4	ND	527	-	325	0.6	1135	0.1	24	-	
大阪府	4701	3.9	204	1.9	ND	81	-	ND	528	-	7.2	176	3.9	514	0.5	1683	0.03	232	-	
山梨県	2502	4.2	455	0.9	ND	56	-	1.0	538	0.2	ND	94	-	488	ND	1328	-	19	-	
埼玉県	1303	ND	319	-	ND	29	-	4.9	421	1.2	ND	-3	-	344	0.3	1691	0.02	3	-	
福島県	4901	11.2	1592	0.7	ND	47	-	ND	559	-	ND	176	-	348	4.9	2001	0.2	58	-	
青森県	2003	ND	441	-	ND	23	-	2.1	416	0.5	4.0	358	1.1	455	3.0	1122	0.3	ND	-	
鳥根県	2204	7.5	762	1.0	ND	38	-	2.2	20	9.9	ND	106	-	339	0.7	1350	0.05	65	-	
富山県	2905	9.8	297	3.2	ND	40	-	1.4	165	0.9	ND	21	-	231	ND	608	-	ND	-	
岡山県	1803	8.8	530	1.6	ND	45	-	1.3	255	0.5	ND	58	-	298	ND	1240	-	ND	-	
大分県	3401	16.0	850	1.8	ND	89	-	1.2	518	0.2	ND	99	-	460	0.3	780	0.04	ND	-	
山梨県	2503	9.8	836	1.2	ND	36	-	1.5	508	0.3	ND	119	-	495	ND	1207	-	41	-	
大阪府	4702	ND	518	-	ND	77	-	4.2	577	0.7	1.6	361	0.4	492	2.0	1937	0.1	89	-	
鳥取県	1702	8.6	557	1.5	ND	36	-	ND	173	-	ND	188	-	432	0.3	1319	0.03	76	-	
愛媛県	2102	ND	555	-	ND	16	-	ND	224	-	ND	39	-	415	0.2	723	0.03	ND	-	
熊本県	3002	6.6	737	0.9	ND	171	-	ND	656	-	ND	703	-	483	3.5	1821	0.2	88	-	
京都府	1501	7.3	590	1.2	ND	27	-	2.7	344	0.8	6.1	189	3.1	460	2.4	1224	0.2	104	-	
山梨県	2504	4.7	589	0.8	ND	74	-	1.9	512	0.4	ND	210	-	486	ND	1046	-	30	-	

75.6%、100%であることが明らかとなった。得られたD-及びL-アミノ酸濃度のデータに基づき、アミノ酸濃度が高い日本酒とD-アミノ酸濃度が低い日本酒について、それぞれ種別、日本酒度、酸度、アミノ酸度、精米歩合、アルコール度数、原料米のデータを比較検討した。その結果、日本酒中のD-アミノ酸含有量と種別、日本酒度、酸度、アミノ酸度、原料米の精米歩合、アルコール度数、原料米の品種とは、明確な関連性はないことが明らかとなった。しかし、生酏、山麩、赤色酵母、海洋深層水、長期熟成で仕込まれている日本酒のD-アミノ酸濃度は、高い傾向が確認された(Table 4)。

4.2 日本酒中のD-及びL-アミノ酸の種類・含有量の系統的解析と官能評価分析

51社の酒造会社の141種類の開封直後の官能評価試験の結果を主成分分析で解析したところ、第1主成分に濃淡と調和が第2主成分に甘味と酸味・苦味が寄与する評価結果が得られ、今回解析した日本酒は様々な評価結果をもつことが明らかとなった。これら主成分得点とD-アミノ酸との関係を検討した結果、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、低濃度では、味や総合評価に影響を及ぼさないが、高濃度にこれらのD-アミノ酸を含む日本酒は、味や

Table 4. The basic properties of thirty sakes with high amount of D-amino acids.

産地	No.	特定名称区分	日本酒度	酸度	アミノ酸度	精米歩合(%)	アルコール度数(%)	原料米	特記
三重県	0204	純米吟醸	2	1.7	1.4	53	16以上17未満	三重山田錦	生酛
三重県	0208	純米吟醸	3	1.4	1.1	55	16以上17未満	三重山田錦	
茨城県	0801	純米吟醸	5	2.2		50	15以上16未満	日本晴(茨城)	長期熟成
茨城県	0802	特別本醸造	5	1.5		55	15.5	美山錦	
茨城県	0803	本醸造	3	1.4	1.4	70	15以上16未満		
福島県	0902	純米酒	4	1.5	1.2	66	15		生酛
宮崎県	1201	特別本醸造	6	1.2		60	16以上17未満	はなかがら	
埼玉県	1303	純米酒	6	1.6		55	15以上16未満	五百万石	
岐阜県	1401	純米吟醸	10	1.4	1.1	45	15以上16未満	美山錦	
岐阜県	1402	純米大吟醸	13	1.5	0.8	40	15以上16未満	山田錦	
京都府	1502	純米吟醸	8	1.8	1.5	60	15以上16未満	山田錦、日本晴	山麩
鳥取県	1702	純米吟醸	5	1.7	1.3	50	15以上16未満	山田錦・玉栄50%	
沖縄県	1902	本醸造	7.1	1.6	1.2	70	15以上16未満		
愛媛県	2104	純米酒	-61	2		65	9.5		赤色酵母
島根県	2204	純米吟醸	3	1.6		55	15以上16未満	山田錦	
福岡県	2401	特別純米	1	1.5		60	15以上16未満	山田錦	
富山県	2903	本醸造	5	1.3	1.2	55	15以上16未満	-	深層水仕込み
富山県	2904	純米酒	5	1.3	1.2	50	15以上16未満	-	深層水仕込み
大分県	3401	普通酒	-3	1.2		70	15以上16未満	-	
大分県	3402	純米酒	-2	1.4		60	15以上16未満	-	
富山県	3701	純米吟醸	4.5	1.4		50	15以上16未満	八反錦	滑川海洋深層水 9号系酵母
石川県	3901	本醸造	2	1.3		68	14以上15未満	石川県産五百万石	
高知県	4001		-22	1		70	18度以上19度未満	フクヒカリ	室戸海洋深層水
千葉県	4401	純米酒	-38	8	4.9	90-93	6-15	無農薬米(コシヒカリ等)	
和歌山県	4502	純米吟醸	0	1.5	2	麴米55 掛米60	18	備前雄町	9号系酵母
和歌山県	4503	純米吟醸	4	1.7	2.3	麴米55 掛米60	18	和歌山県産山田錦	9号系酵母
大阪府	4701	特別純米酒	8	2.1	1.3	70	18以上19未満	山田錦	生酒
福島県	4901	純米酒	-50	8	2.5	60	8.2	五百万石	桃色酵母
島根県	5101	普通酒	-13.5	2.3		70	14度以上15度未満		赤色酵母

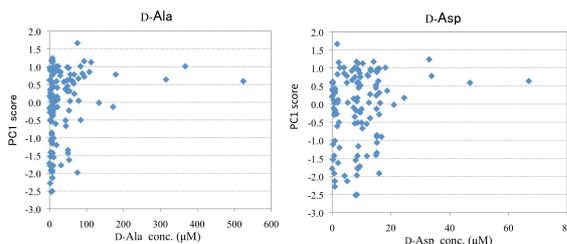


Figure 1. The effects of the D-Ala and D-Asp concentrations in 141 sakes on the PC1 score.

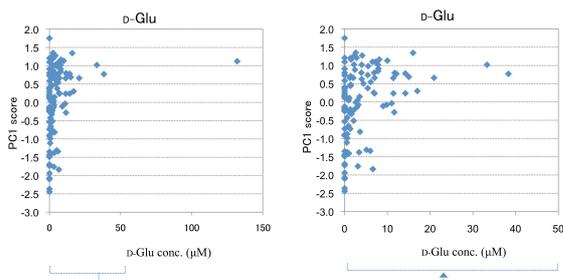


Figure 2. The effects of the D-Glu concentration in 141 sakes on the PC1 score.

総合評価が高いことが明らかとなった(Figure 1, Figure 2)。一方、日本酒中のL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸には、D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸のような日本酒の味や総合評価を高める効果がないことが明らかとなった。

4.3 日本酒へのDL-アラニン及びL-アラニン添加と官能評価試験

本研究により、日本酒にDL-アラニンを添加すると、L-アラニンよりも低濃度で官能評価試験の旨味が、増強されることが明らかとなった(Table

5)。また、日本酒にL-アラニンを添加すると、官能評価試験の旨味が増強されることが明らかとなった(Table 5)。このL-アラニンによる旨味の増強は、D-アラニンが共存すると、減少することが明らかとなった(Table 5)。また得られたデータを主成分分析で解析したところ、DL-アラニンは、L-アラニンより低濃度で第1主成分得点である濃淡を増加させることが明らかとなった(Table 5)。

4.4 生酛系日本酒醸造工程で採取された試料中のD-及びL-アミノ酸の分析と定量解析

本研究により、生酛、乳酸菌添加生酛は、日本酒中のD-アミノ酸濃度を増加させるのに有効な醸造方法であることが明らかとなった。まず各種原料米中のD-アミノ酸濃度を測定したところ、兵系酒18号には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、五百万石には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、山田錦にはD-アスパラギン酸、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-グルタミン酸が、日本晴にはD-アスパラギン酸、D-アラニン、D-セリン、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。D-セリンは山田錦と日本晴にのみ検出された。しかし、原料米中のD-アミノ酸の濃度は全て1 μM以下であり、日本酒中のD-アミノ酸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日目の試料中には、簡易生酛では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-フェニルアラニンが、速醸酛では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(Figure 3)。D-アラニン、D-イソロイシン、D-フェニルアラニンは簡易生酛の試料中には検出されたが速醸酛の試料中には検出されなかったことから、簡易生酛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

Table 5. Relationship between DL- and L- alanine added concentration to sake and sensory evaluation.

		4003							4504							2402								
添加Ala (μM)	味	総合							味	総合							味	総合						
		濃淡	苦味	酸味	旨味	甘味	熟度	調和		濃淡	苦味	酸味	旨味	甘味	熟度	調和		濃淡	苦味	酸味	旨味	甘味	熟度	調和
0		4.0	5.0	5.0	1.0	5.0	5.0	1.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	4.0	4.0	5.0	2.3	5.0	5.0	2.0		
L	5	4.0	6.0	5.0	1.0	3.7	5.0	1.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	4.0	4.0	5.0	2.3	5.0	5.0	2.0			
	10	7.3	6.0	5.0	3.0	5.0	5.0	1.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	4.0	6.0	5.0	2.3	5.0	5.0	1.7			
	25	7.7	6.0	6.0	3.0	5.0	5.0	1.0	4.0	6.0	5.0	5.0	5.0	2.0	6.0	8.0	6.0	3.7	3.7	5.0	1.0			
	50	7.7	7.0	7.0	5.7	3.7	5.0	0.7	7.3	6.0	5.0	7.0	5.0	1.7	8.0	8.0	6.0	5.0	3.7	5.0	1.0			
	100	7.3	8.0	7.0	6.3	3.7	5.0	0.7	7.7	7.0	6.0	7.0	5.0	1.3	9.3	8.0	7.0	5.7	3.7	5.0	0.7			
	250	7.3	8.0	7.0	6.3	3.7	5.0	0.7	9.0	8.0	7.0	5.0	5.0	1.0	9.7	8.0	8.0	6.7	3.7	5.0	0.0			
D	500	9.3	8.0	8.0	6.3	2.3	5.0	0.7	9.0	8.0	8.0	7.0	5.0	0.7	9.7	8.0	8.0	6.7	3.7	5.0	0.0			
	1000	9.0	8.0	8.0	7.0	2.3	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	5.0	0.3	9.7	8.0	8.0	6.7	3.7	5.0	0.0			
	2500	9.0	8.0	8.0	7.0	2.3	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	5.0	0.3	9.7	8.0	8.0	6.7	3.7	5.0	0.0			
	5000	9.0	8.0	8.0	7.0	2.3	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	5.0	0.0	9.7	8.0	8.0	6.7	3.7	5.0	0.0			
	L	10	5.3	6.0	6.0	4.3	3.7	5.0	1.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	6.0	5.0	6.0	3.7	3.7	5.0	1.7		
		20	7.0	6.0	6.0	6.3	5.0	5.0	1.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	8.0	5.0	7.0	3.7	3.7	5.0	1.3		
50		7.0	7.0	6.0	6.3	5.0	5.0	0.7	5.3	6.0	5.0	5.7	5.0	1.7	10.0	5.0	8.0	5.0	3.7	5.0	1.0			
100		9.3	7.0	8.0	6.3	5.0	5.0	0.7	7.0	7.0	7.0	6.3	5.0	0.7	10.0	7.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.7			
200		9.3	7.0	8.0	6.3	2.3	5.0	0.3	9.0	7.0	7.0	6.3	5.0	0.7	9.7	8.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.0			
500		9.3	7.0	8.0	6.3	3.7	5.0	0.7	9.0	7.0	8.0	7.0	5.0	0.7	9.7	8.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.0			
L	1000	9.0	8.0	8.0	6.3	2.3	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	5.0	0.0	9.7	8.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.0			
	2000	9.0	8.0	8.0	7.0	3.7	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	3.7	5.0	0.0	9.7	8.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.0		
	5000	9.0	8.0	8.0	7.0	2.3	5.0	0.3	9.0	8.0	8.0	7.0	3.7	5.0	0.0	9.7	8.0	8.0	5.7	3.7	5.0	0.0		
	10000	9.0	8.0	8.0	7.0	3.7	5.0	0.0	9.0	8.0	8.0	7.0	1.0	5.0	0.0	9.0	8.0	8.0	6.3	3.7	6.0	0.0		

れることが明らかとなった。膨れ前の試料中には、生酏では 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-バリンが、簡易生酏では 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(Figure 3)。D-セリンは生酏の試料中には検出されたが簡易生酏の試料中には検出されなかったことから、生酏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。戻しの試料中には、生酏では 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-バリンが、簡易生酏では 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、速醸酏では 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(Figure 3)。D-アスパラギン酸は生酏、簡易生酏の試料中には検出されたが速醸酏の試料中には検出されなかったことから、生酏、

簡易生酏の試料中に存在する乳酸菌によって D-アスパラギン酸が生産されることが明らかとなった。また D-セリンは生酏の試料中には検出されたが簡易生酏、速醸酏の試料中には検出されなかったことから、生酏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。上槽の試料中には、生酏では 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-バリンが、簡易生酏では 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、速醸酏では 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(Figure 3)。試料中の D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニンの濃度は、いずれも生酏が最も高いことが明らかとなった。以上の結果から、生酏、簡易生酏、速醸酏の醸造工程中には 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(Figure 3)。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、特に生酏、簡易生酏の醸造工程中の試料に 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。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、生酏、簡易生酏の醸造に関与する乳酸菌によって生産されることが明らかとなった。

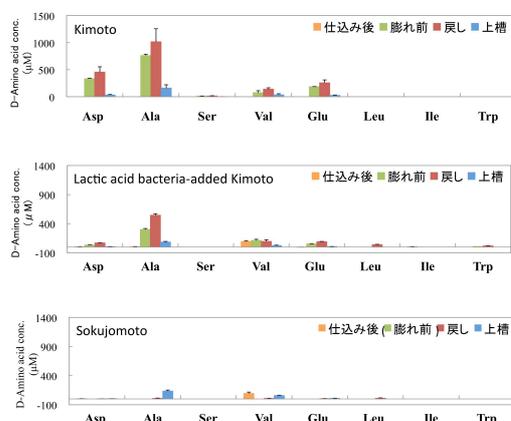


Figure 3. Comparison of D-amino acid concentrations in various brewing processes of Kimoto, Lactic acid bacteria added kimoto, and Sokujomoto.

4.5 D-アミノ酸高生産生酏由来乳酸菌の選抜と試験醸造酒の作成

MRS 培地で培養した結果、*L. sakei*, *L. mesenteroides* いずれの乳酸菌でも D-アミノ酸の生産総量やその構成比に違いがあることが明らかとなった。*L. sakei* 117 株が 12 株の *L. sakei* 中 MRS 培地を用いた場合には最も D-アミノ酸生産能が高いことが明らかとなった。また *L. mesenteroides* 103 株が 16 株の *L. mesenteroides* 中

MRS 培地を用いた場合には最も D-アミノ酸生産能が高いことが明らかとなった。さらに *L. sakei* 117 株と *L. mesenteroides* 103 株の米の酵素分解物を炭素源とする培地での D-アミノ酸能を検討したところ、*L. sakei* 117 株及び *L. mesenteroides* 103 株いずれも D-アミノ酸生産が確認されたが、MRS 培地での D-アミノ酸生産量とは違いがあることが明らかとなった。そこで D-アミノ酸生産能が高い *Lactobacillus sakei* 6 株と *Leuconostoc mesenteroides* 6 株の米の酵素分解物を炭素源とする培地での D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸の生産能を検討したところ、*L. sakei* 145 株が 6 株の *L. sakei* 中米の酵素分解物を炭素源とする培地を用いた場合には最も D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸生産能が高いことが明らかとなった。また *L. mesenteroides* 151 株が 6 株の *L. mesenteroides* 中米の酵素分解物を炭素源とする培地を用いた場合には最も D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸生産能が高いことが明らかとなった (Table 6)。そこで *L. sakei* 145 株と *L. mesenteroides* 151 株を用い、乳酸菌添加生酏で試験醸造を行っ

た。対照 3 仕込みを含め 01 : *L. sakei* 基準株と *L. mesenteroides* 基準株を用いたもの ; 02 : *L. sakei* 117 株と *L. mesenteroides* 103 株を用いたもの ; 03 : *L. sakei* 145 株と *L. mesenteroides* 151 株を用いたもの ; 04 : 速醸酏の 4 仕込みで行った。得られた 01~04 の 4 種の試験醸造酒中の D-及び L-アミノ酸含有量を定量したところ、乳酸菌添加生酏 01~03 中で、D-アミノ酸高生産乳酸菌 *L. sakei* 145 株と *L. mesenteroides* 151 株を用いた試験醸造酒 03 の D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-バリン、D-ロイシン濃度が最大となった (Table 7)。また試験醸造酒 01~04 の官能評価試験を行い、主成分分析で解析したところ、試験醸造酒 03 の濃淡を示す第 1 主成分得点が最も高く、前年度までに日本酒の味に寄与することを特定した D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸の強化が味に影響していることが明らかとなった。

4.6 生酏由来乳酸菌の D-アミノ酸代謝関連酵素活性の探索と D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子のクローニング

Table 6. D-Asp, D-Glu, and D-Ala concentration of various *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides*.

	Asp			Glu			Ala		
	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)	D-AA	L-AA	D/(D+L)
	(μM)	(μM)	%	(μM)	(μM)	%	(μM)	(μM)	%
Control	9.7	394.6	2.4	5.8	415.5	1.4	7.9	983.5	0.8
LT-13	9.2	378.2	2.4	8.4	428.9	1.9	50.6	1099.9	4.4
LK-117	29.8	361.0	7.6	24.1	855.0	2.7	276.8	1678.6	14.2
LK-133	28.0	312.0	8.2	24.5	824.1	2.9	234.7	1459.8	13.9
LK-135	27.8	356.3	7.2	28.3	950.0	2.9	384.4	1674.1	18.7
LK-145	47.7	460.0	9.4	34.0	1074.9	3.1	378.4	1683.5	18.4
LK-147	46.1	438.6	9.5	31.5	1087.2	2.8	369.5	1707.4	17.8
LT-38	1.7	727.1	0.2	1.7	252.2	0.7	6.4	1331.9	0.5
LK-16	6.1	393.7	1.5	37.6	442.5	7.8	118.0	954.7	11.0
LK-103	7.1	402.3	1.7	32.1	471.3	6.4	62.1	1045.6	5.6
LK-139	8.5	392.7	2.1	39.0	439.2	8.2	73.3	964.9	7.1
LK-151	8.1	376.6	2.1	52.7	412.1	11.3	80.0	908.9	8.1
LK-153	9.5	430.9	2.2	20.3	453.9	4.3	50.1	1053.8	4.5

Table 7. D- and L- amino acid concentrations of the sakes brewed with high amount of D-amino acid-producing *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides*.

番号	Asp		Glu		Ser		Thr		Ala		Tyr		Gly
	D-AA	L-AA	AA										
	(μM)												
01	0.2	243.5	8.3	633.1	0.1	407.3	N.D.	910.6	96.8	2027.8	0.4	316.5	1046.3
02	3.0	246.0	9.2	648.6	N.D.	400.2	N.D.	534.6	86.4	1973.0	0.3	313.0	1149.0
03	6.2	243.2	10.8	641.7	0.1	381.3	N.D.	337.8	93.2	1910.5	0.3	309.5	1096.1
04	8.0	239.6	6.8	680.2	0.2	367.4	N.D.	234.2	72.5	1932.3	0.3	318.3	958.7

番号	Val		Met		Trp		Phe		Ile		Leu	
	D-AA	L-AA										
	(μM)											
01	6.5	526.7	N.D.	25.5	N.D.	20.1	N.D.	252.1	N.D.	187.9	10.0	519.8
02	9.8	446.0	N.D.	25.9	N.D.	18.7	N.D.	250.0	N.D.	186.4	10.7	521.4
03	14.7	382.0	N.D.	21.4	N.D.	26.5	N.D.	242.1	N.D.	179.9	13.2	516.4
04	18.5	364.8	N.D.	20.7	N.D.	23.8	N.D.	253.1	N.D.	184.5	9.9	500.9

番号	His		Arg		Asn		Gln		Lys		Pro		Cys
	D-AA	L-AA	DL-AA										
	(μM)												
01	45.5	167.8	N.D.	2180.6	N.D.	294.3	N.D.	515.3	8.5	364.1	6.7	1288.5	182.3
02	44.9	129.3	N.D.	2343.4	N.D.	361.5	N.D.	573.1	0.8	177.4	8.2	1270.2	190.6
03	34.3	120.8	N.D.	2099.5	N.D.	335.1	N.D.	515.7	1.8	250.2	2.3	1204.7	177.2
04	69.9	217.6	N.D.	2352.7	N.D.	373.5	N.D.	581.5	2.4	159.1	5.6	666.5	124.7

生醗由来の乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 には、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をコードする *alr*, *murI*, *racD* の 3 遺伝子が、また生醗由来の乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 には、3 つのアラニンラセマーゼをコードする *alr1*, *alr2*, *alr3* とグルタミン酸ラセマーゼをコードする *murI* が存在することが明らかとなった。*L. sakei* NBRC 1589 のアラニンラセマーゼは、*Corynebacterium glutamicum* [11]、*Escherichia coli* [12] のアラニンラセマーゼとそれぞれ 33%、29% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 91 kDa で、ホモダイマー構造を有することが明らかとなった。ヒドロキシルアミンによる阻害や 420 nm 付近に吸収極大を有することから、本酵素は、ピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を補酵素とすることが明らかとなった。最適温度は 35°C、最適 pH は 10.5 であることが明らかとなった。本酵素は、アラニンだけでなくセリンも基質とすることが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。*L. sakei* NBRC 1589 のアスパラギン酸ラセマーゼは、*Lactobacillus brevis* [13]、*Lactobacillus casei* [13]、*Bifidobacterium bifidum* [14]、のアスパラギン酸ラセマーゼとそれぞれ 59%、53%、42% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 52 kDa で、ホモダイマー構造を有することが明らかとなった。最適温度は 45°C、最適 pH は 6.5 であることが明らかとなった。本酵素は、アスパラギン酸に高い特異性を有することが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。*L. sakei* NBRC 1589 のグルタミン酸ラセマーゼは、*Pediococcus pentosaceus* [15]、*Escherichia coli* [16] のグルタミン酸ラセマーゼとそれぞれ 54%、51%、49%、50%、29% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 35 kDa で、モノマー構造を有することが明らかとなった。最適温度は 37°C、最適 pH は 10 であることが明らかとなった。本酵素は、グルタミン酸に高い特異性を有することが明らかとなった。5,5'-ジチオビスなどの SH 阻害剤による阻害から、本酵素は SH 酵素であることが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。また *Leuconostoc mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 には、3 つのアラニンラセマーゼホモログ遺伝子(*alr1*, *alr2*, *alr3*)と 1 つのグルタミン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*murI*)が存在することが明らかとなった。これらの 4 遺伝子を、大腸菌で発現し各々の遺伝子産物を精製する方法を確立できた。

また *L. mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 の *alr1* はアラニンラセマーゼをコードしていることが明らかとなった。*Acetobacter acetii* [17]、*Corynebacterium glutamicum* [11]、*Geobacillus stearothermophilus* [18]、*Helicobacter pylori* [19] のアラニンラセマーゼとそれぞれ 33.3%、29.0%、38.0%、26.7% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 82 kDa で、ホモダイマー構造を有することが明らかとなった。ヒドロキシルアミンによる阻害や 420 nm 付近に吸収極大を有することから、本酵素は、ピリドキサル

5'-リン酸(PLP)を補酵素とすることが明らかとなった。最適温度は 15°C、最適 pH は 6.5 であることが明らかとなった。本酵素は、アラニンだけでなくセリンも基質とすることが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。*L. mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 の *alr2* はリシンラセマーゼをコードしていることが明らかとなった。*Acetobacter acetii* [17]、*Corynebacterium glutamicum* [11]、*Geobacillus stearothermophilus* [18]、*Helicobacter pylori* [19]、*Pseudomonas putida* [20] のアラニンラセマーゼとそれぞれ 23.0%、29.8%、39.7%、30.2%、24.9% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 89 kDa で、ホモダイマー構造を有することが明らかとなった。ヒドロキシルアミンによる阻害や 420 nm 付近に吸収極大を有することから、本酵素は、ピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を補酵素とすることが明らかとなった。最適温度は 25°C、最適 pH は 8.0 であることが明らかとなった。本酵素は、リシンの他、オルニチンやアルギニンにも作用することが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。*L. mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 の *alr3* はヒスチジンラセマーゼをコードしていることが明らかとなった。*Acetobacter acetii* [17]、*Corynebacterium glutamicum* [11]、*Geobacillus stearothermophilus* [18]、*Helicobacter pylori* [19]、*Pseudomonas putida* [20] のアラニンラセマーゼとそれぞれ 31.4%、29.8%、34.6%、25.1%、24.6% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 89 kDa で、ホモダイマー構造を有することが明らかとなった。ヒドロキシルアミンによる阻害や 420 nm 付近に吸収極大を有することから、本酵素は、ピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を補酵素とすることが明らかとなった。最適温度は 50°C、最適 pH は 9.5 であることが明らかとなった。本酵素は、ヒスチジンに高い特異性をもつことが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。ヒスチジンラセマーゼについてはこれまで全く報告がなく本酵素が最初の例であり新規酵素であることが明らかとなった。*L. mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 の *murI* はグルタミン酸ラセマーゼをコードしていることが明らかとなった。*Bacillus subtilis* [21]、*Mycobacterium tuberculosis* [22] のグルタミン酸ラセマーゼとそれぞれ 42.6%、36.9% の一次構造相同性を示すことが明らかとなった。分子質量は 42 kDa で、モノマー構造を有することが明らかとなった。本酵素は補酵素を要求しないことが明らかとなった。最適温度は 25°C、最適 pH は 7.5 であることが明らかとなった。本酵素は、グルタミン酸に高い特異性をもつことが明らかとなった。本酵素の K_{eq} は約 1 となり、アミノ酸ラセマーゼであることが明らかとなった。以上の結果、生醗由来の乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 の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をコードする *alr*, *murI*, *racD* の 3 遺伝子産物と生醗由来の乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides subsp.sake* NRRC 102480 の 3 つのアラニンラセマーゼをコードする *alr1*, *alr2*, *alr3* とグルタミン酸ラセ

Table 8. Enzymatic properties of various amino acid racemases from *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides*.

	<i>L. sakei</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Enzyme	AlaR	AlaR	GluR	GluR
Optimum temperature	35°C	15°C	37°C	25°C
Thermal stability	45°C	40°C	30°C	55°C
Optimum pH	10.5	6.5	10.5	7.5
pH stability	10.0	7.5	10.0	7.5
Substrate specificity	Ala, Ser	Ala, Ser	Glu	Glu
Coenzyme	PLP	PLP	None	None
Subunit structure	Homodimer	Homodimer	Monomer	Monomer

	<i>L. sakei</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Enzyme	AspR	LysR	HisR
Optimum temperature	45°C	25°C	50°C
Thermal stability	40°C	35°C	35°C
Optimum pH	6.5	8.0	9.5
pH stability	7.0-7.5	7.5-8.0	7.0
Substrate specificity	Asp	Lys, Arg, Orn	His
Coenzyme	None	PLP	PLP
Subunit structure	Homodimer	Homodimer	Homodimer

AlaR: alanine racemase, GluR: Glutamate racemase, AspR: Aspartate racemase, LysR: Lysine racemase, HisR: Histidine racemase

マーゼをコードする *murI* の遺伝子産物の酵素科学的性質が明らかとなった(Table 8)。

5. まとめ

ヒトが生命を維持していく為には、食品を摂取し食品から栄養素を体内に吸収し利用する必要がある。ヒトが持続的に食品を摂取するには、やはりその食品の味が大きな食品選択の要素となる。本研究で D-アミノ酸には L-アミノ酸にはない食品の味を向上させる特異な機能があることが明らかとなった。冒頭にも述べたように、D-及び L-アミノ酸のうちなぜ L-アミノ酸のみが生命の根幹を担う生体分子である酵素の構成要素となったのかは未だに解明されていないが、L-アミノ酸のみならず D-アミノ酸が L-アミノ酸にはない食品中での特異な呈味性という機能によってヒトの生命維持に直接あるいは間接的に関わる重要な機能を持つことは非常に興味深い。現在筆者は、さまざまな生産由来乳酸菌株から D-アミノ酸生成能が高い菌株を選抜し、これらの乳酸菌株を乳酸菌添加生産仕込みで使い、製品中の D-アミノ酸濃度を高めることにより味や総合評価のより優れた日本酒の生産を行うための試験醸造を行っている。また、D-アミノ酸生成能が高い生産由来乳酸菌は、日本酒以外の食品製造にも応用でき、これらの乳酸菌を用いる D-アミノ酸強化食品の開発も行っている。さらに、D L-アラニン (食品添加物グレード) は日本国内で入手が容易であり、また厚生労働省により食品添加物として認可されていることから、D L-アラニンを旨味や甘味を増強する調味料として用いた新たな食品の開発も行っていきたいと考えている。われわれが確立した日本酒中の D-及び L-アミノ酸の定量法は、日本酒以外の食品中の D-及び L-アミノ酸の定量分析にも応用可能であり、発酵食品を中心としたさまざまな食品中の D-及び L-アミノ酸の分析を行い、新たな D-アミノ酸高含有食品の探索もさらに行っていきたいと考えている。今後 D-アミノ酸によって機能が向上した食品が次々に開発、上市され、ヒトの生命維

持に貢献していくことが期待される。

謝辞

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構イノベーション創出基礎的研究推進事業 (平成 20 年度～平成 24 年度)、菊正宗酒造株式会社との共同研究 (平成 21 年度～平成 25 年度)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (平成 25 年度) により実施したものである。

References

- Fujii, N. D-Amino acids in living higher organisms, orig. Life Evol. Biosph. 32, 103-127 (2002).
- Brückner, H., Westhauser, T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants, Amino Acids. 24,43-55 (2003).
- Rubio-Barroso, S., Santos-Delgado, M.J., Martín-Olivara, C., Polo-Díez, L.M. Indirect chiral HPLC determination and fluorimetric detection of D-amino acids in milk and oyster samples. J. Dairy Sci. 89, 82-89 (2006).
- Brückner, H., Lüpke, M. Determination of amino acid enantiomers in orange juices by chiral phase capillary gas chromatography, Chromatographia 31, 123-128 (1991).
- Erbe, T., Brückner, H. J. Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture, J. Chromatography A, 881, 81-91 (2000).
- Ali, H.S., Pätzold, R., Brückner, H. Gas chromatographic determination of amino acid enantiomers in bottled and aged wines, Amino Acids, 38, 951-958 (2010).
- Pätzold, R., Brückner, H. Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell, Amino acids, 31, 63-72 (2006).
- Aswad, D.W. 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, 405-409 (1984).
- Einarsson, S., Josefsson, B., Möller, P., Sanchez, D. 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 (1987).
- Ishida, Y., Fujita, T., Asai, K. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography, J. chromatogr., 204, 143-148 (1981).
- Oikawa, T., Tauch, A., Schaffer, S., Fujioka, T. Expression of

- alr gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase, 125, 503-512 (2006).
12. Wu, D., Hu, Y., Zhang, L., Chen, J., Du, J., Ding, J., Jiang, H., Shen, X. Residue Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potentially in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: Enzymatic characterization with crystal structure analysis, *Protein Sci.*, 17, 1066-1076 (2008).
 13. Okada, H., Yohda, M., Giga-Hama, Y., Ueno, Y., Ohdo, S., Kumagai, H. Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, 1078, 377-382 (1991).
 14. Yamashita, T., Ashiuchi, M., Ohnishi, K., Kato, S., Nagata, S., Misono, H. Molecular identification of monomeric aspartate racemase from *Bifidobacterium bifidum*, *Eur. J. Biochem.*, 271, 4798-4803 (2004).
 15. Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., Soda, K. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus*, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2823-2830 (1986).
 16. Doublet, P., van Heijenoort, J., Mengin-Lecrux, D. Regulation of the glutamate racemase of *Escherichia coli* investigated by site-directed mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 43-49 (1996).
 17. Francois, J.A., Kappock, T.J., Alanine racemase from the acidophile *Acetobacter aceti*, *Protein Expr. Purif.*, 51, 39-48 (2007).
 18. Inagaki, K., Tanizawa, K., Badet, B., Walsh, C.T., Tanaka, H., Soda, K. Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization, *Biochemistry*, 25, 3268-3274 (1986).
 19. Saita, M., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Shinohara, T., Wakabayashi, S., Kurihara, T., Ishizuka, M., Nagata, Y. Alanine racemase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637: purification, characterization and gene cloning, *Life Sci.*, 80, 788-794 (2007).
 20. Liu, J.L., Liu, X.Q., Shi, Y.W. Expression, purification, and characterization of alanine racemase from *Pseudomonas putida* YZ-26, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 267-274 (2012).
 21. Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., Misono, H. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate, *J. Biochem.*, 123, 1156-1163 (1998).