

アセト乳酸直接定量法の開発

～ アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼによるアセト乳酸の定量 ～

食品醸造室 三宅 幸一, 大垣 佳寛, 樋爪 紀子, 星野 徹也
バイオ応用室 前田 浩, 藤枝 正之
元キリンビール株式会社 井上 喬

Development of Direct Determination Method of α -Acetolactic Acid ～ Quantitative Assay of α -Acetolactic Acid with Reductoisomerase ～

Koichi MIYAKE, Yoshihiro OOGAKI, Tetuya HOSHINO, Hiroshi MAEDA and Noriko HIZUME
Masayuki FUJIEDA and Takashi INOUE¹⁾

¹⁾ former Kirin Brewery Company, Limited

酒類などのオフフレーバーであるジアセチルの発生を制御する目的で、その前駆体であるアセト乳酸の直接的な定量を試みた。反応に使用する酵素は、遺伝子工学的手法により作成した形質転換株により発現させた。清酒醪中のアセト乳酸を酵素反応により定量することが出来た。

1. はじめに

ジアセチルは清酒中の代表的なオフフレーバー物質でつわり香（火落ち香）の本体として知られており、吟醸酒や低アルコール清酒製造などのように醪の発酵が未熟になりやすい場合に多く生成することが知られている。

このジアセチルの発生の制御は杜氏達による経験と勘にたよった醪管理によって行われてきた。ジアセチルはアセト乳酸の酸化分解で生成し、清酒でジアセチルが生じるのは上槽後酵母と分離された後で、その時点で存在するアセト乳酸がジアセチル量に相関してくる。つわり香を抑えるためには上槽時のアセト乳酸の濃度を低くする必要があり、アセト乳酸濃度を知ることが清酒醸造の品質管理に重要となる。そこで本研究ではアセト乳酸を酵素を用いた測定系で直接的に定量することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 酵素の取得

アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼは、遺伝子工学的手法により作成した形質転換株 R I B 4 0 で発現させて精製した。

2.2 酵素反応の背景

アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼは酵母菌体内において分岐アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）の生合成経路（図1）に関与している。

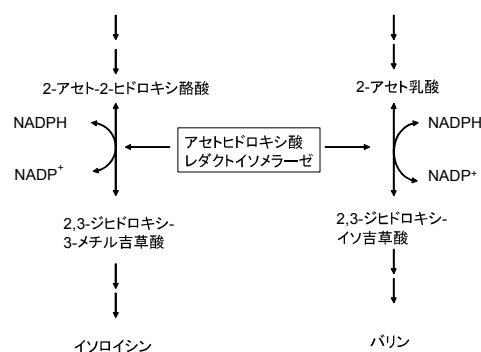


図1 酵素の関与する代謝経路

図1中のアセト乳酸、アセトヒドロキシ酪酸（以下2物質を総称してアセトヒドロキシ酸と記す）はアセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ、NADPHの存在下で代謝が進むが、この時340nmの吸光度の減少をとまなう。アセトヒドロキシ酸

量と NADPH の減少量が比例関係にあればアセトヒドロキシ酸を定量することが出来る。

2.3 酵素反応の条件

Arfin¹⁾の方法を応用して反応条件を検討した。

2.3.1 酵素活性へのpHの影響

BCPbuffer を使用して酵素活性の至適 pH を検討した。

2.3.2 酵素活性への温度の影響

pH の影響の結果より Tris-Hcl buffer にて pH 9 の条件で検討した。

3. 結果

3.1 酵素活性へのpHの影響

図2に示すごとく pH の安定性は6付近で高く、酵素活性の最も高いところは9であった。

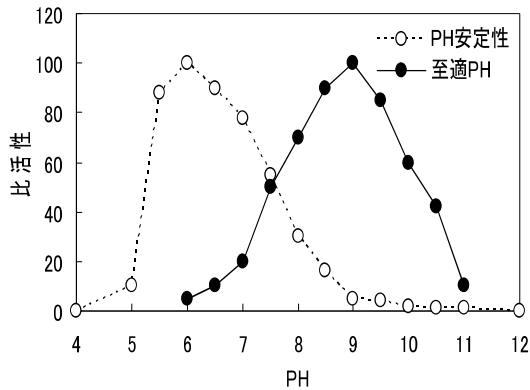


図2 酵素活性へのpHの影響

3.2 酵素活性への温度の影響

図3に示すごとく最高の酵素活性は 65 °C で得られた。37 °C 付近で最も安定していた。

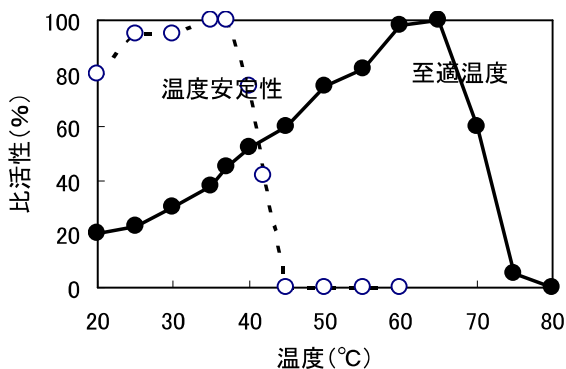


図3 酵素活性への温度の影響

3.3 酵素反応系の組成

酵素反応の諸条件を検討して組成を決定した。

(酵素反応系の組成と反応条件)

50mM Tris-Hcl 緩衝液 (pH 9.0)	830 μ L
10mM NADPH	10 μ L
1 M MgSO ₄	10 μ L
麴菌由来アセトヒドロキシ酸 レダクトイソメラーゼ	50 μ L
基質 (アセト乳酸溶液)	100 μ L
37 °C で 10 分間保温後の 340nm の吸光度減少値を測定	

酵素は遺伝子工学的手法により作成した形質転換株で発現させた。アセト乳酸は市販されているアセトキシエチルエステルを水酸化ナトリウムで加水分解して使用した。

3.4 酵素活性の検証

使用している酵素が図1に示した代謝経路を実際に触媒しているかどうかを検証した。基質として、アセト乳酸、アセトヒドロキシ酪酸、ジヒドロキシイソ吉草酸を使用して酵素を作用させた。図4に示すごとくアセトヒドロキシ酸は直線的にかつ両者平行して吸光度が減少した。またジヒドロキシイソ吉草酸は吸光度が変化しなかった。このことより実験に供した酵素は確実な活性を持つことが確認された。

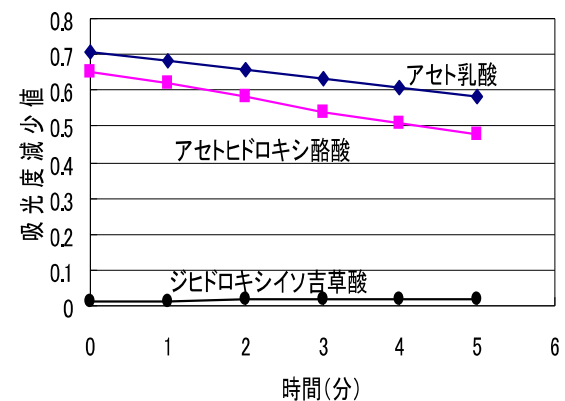


図4 各基質による酵素反応

3.5 アセト乳酸濃度と吸光度減少値

酵素反応基質液中に所定量のアセト乳酸を加えて酵素反応をおこない、吸光度の減少値との間に比例関係があるか検討した。図5に示すごとく、両者の間に比例関係が成立した。このことより、基質溶液中のアセト乳酸を定量することが出来ることが明らかとなった。

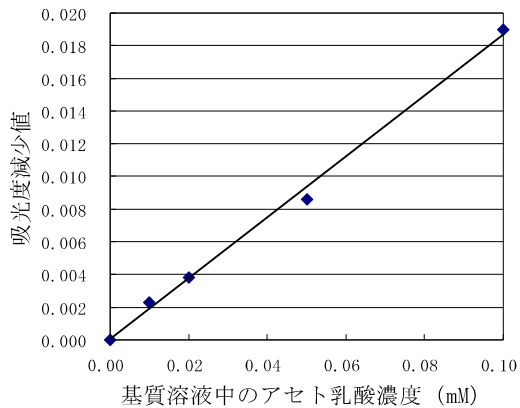


図5 基質溶液中のアセト乳酸濃度とNADPHの吸光度減少値

3.6 ジアセチル, アセトイン共存の影響

発酵食品において、ジアセチル, アセトインはアセト乳酸と共存することが多い。その測定への影響をしらべた。表1に示すごとく、共存の影響はなかった。

表1 アセト乳酸測定に対する, ジアセチル, アセトイン共存の影響

添加共存物質とその反応系中濃度	10分間の吸光度減少値
なし	0.001
アセト乳酸 0.001mM	0.002
アセト乳酸 0.01mM	0.019
アセト乳酸 0.001mM+ジアセチル 0.01mM+アセトイン 0.01mM	0.002
アセト乳酸 0.001mM+ジアセチル 0.1mM+アセトイン 0.1mM	0.001
アセト乳酸 0.01mM+ジアセチル 0.01mM+アセトイン 0.01mM	0.018
アセト乳酸 0.01mM+ジアセチル 0.1mM+アセトイン 0.1mM	0.019

3.7 清酒醪中に含まれるアセトヒドロキシ酸の定量

酒類の代表である清酒の製造工程中の半製品である清酒醪について、本酵素法によりアセト乳酸とアセトヒドロキシ酪酸（前述したごとく両者をアセトヒドロキシ酸と称する）の定量が可能であるか検討した。

清酒製造中の留添（とめぞえ）後2日目の醪を対象として、直ちに pH 7 に調整し低温下に保持して実験室に持ち帰り、遠心分離してその上清を採り、3.5と同一の酵素反応系を用いて測定をおこなった。醪試料中のアセト乳酸濃度がそれぞれ (0.1, 0.05, 0.02mM) となるようにアセト乳酸を添加した醪上清 100 μ l を用いて、標準添加法により定量分析を行った。

結果は図6に示すごとく醪中のアセトヒドロキシ酸の濃度は 0.05mM と算定された。

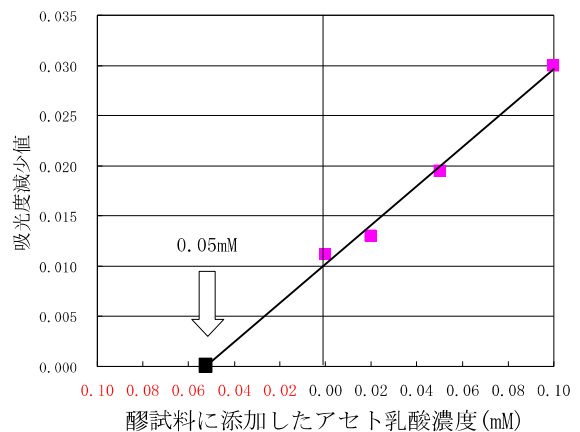


図6 標準添加法によるアセトヒドロキシ酸の定量

4. まとめ

清酒醪中のアセトヒドロキシ酸を、従来用いられてきた煩雑で不正確な方法によらずに本酵素法により簡便、正確に定量出来た。

参考文献

- 1) S.M.Arfin and H.E.Umberger : J.Biol.Chem, 244, 1118-1127(1969)