

[連載講座]

やさしい有機酸分析(2)

キッコーマン(株)酒類事業本部
流山工場研究課 兼 研究本部
島津善美

前報で述べたように、ワインをはじめ、ビール、清酒、老酒等の醸造酒及びその他食品群において、酸味を与える主要有機酸成分として、L-リンゴ酸、L-酒石酸、クエン酸、乳酸(D,L)、酢酸、コハク酸等があげられる。

上記主要有機酸成分の定量方法として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が、極めて有用な分析方法であることを既報で述べた。しかしながら、HPLCによる分析方法は、分析操作が比較的煩雑で熟練を要する、測定機器が高価である、光学異性体を分別定量できない、多数試料の同一成分を簡便かつ迅速に定量することが困難であるなどの難点がある。このようなHPLC法に対し、酵素法による分析は、

- (1) 試料の前処理は、希釈程度でほとんど必要としない。
- (2) 分析精度が高い。
- (3) 分光光度計のほかは、高価な機器を必要としない。
- (4) 測定試薬は、無害で水溶性か、低塩濃度のものに限られる。有機溶媒を使用しない。
- (5) 基質特異性が高く、光学異性体も定量できる。
- (6) 分析操作が簡便である。
- (7) 多数試料を短時間で分析できる。
- (8) 分析試料が微量ですむ。

等多くの利点がある。

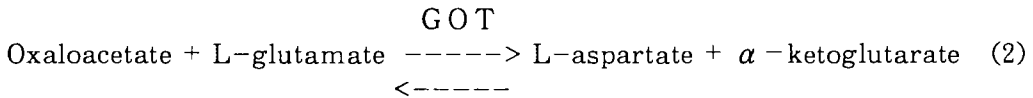
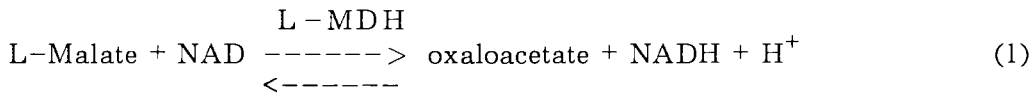
本稿では、酵素法によるワイン等酒類中のリンゴ酸(D, L)、L-酒石酸、乳酸(D, L)の定量方法について、簡単に解説する。

1. 酵素法によるL-リンゴ酸の定量

ワインおよび清酒中のL-リンゴ酸の酵素法による定量は、原らの報告がある。以下に酵素を用いるL-リンゴ酸の定量法について述べる。

1.1. 反応原理

本方法は、次の2組の酵素反応からなる。



(1) 式の反応において、L-リンゴ酸はL-リンゴ酸脱水素酵素(MDH:EC.1.1.1.37)の存在によりオキザロ酢酸に酸化される。上記反応によって、酸化型補酵素NADは還元型補酵素NADHに還元される。この(1)式の平衡は、リンゴ酸側に傾いているゆえ、オキザロ酢酸を除くことによって、反応が右側に傾くことが可能となる。

(2) 式の反応では、生成オキザロ酢酸はL-グルタミン酸(オキザロ酢酸トランスアミナーゼ) Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT)の反応でL-アスパラギン酸に変換される。それゆえ(2)式の平衡は、右側に傾く。(1)式の反応によって生成したNADHの増加を340nmにおける吸光度測定によりL-リンゴ酸を定量する。

1.2. 試薬

(イ) グリシルグリシン緩衝液

グリシルグリシン 2.36 g とL-グルタミン酸 0.44 g を 25 ml の脱イオン水に溶解し、10N-NaOH で pH 10 に調整し全容を30 ml とする。

(ロ) β-ニコチン酸アミドアデニンヌクレオチド酸化型 (NAD, 市販品) 溶液

NAD 210 mg を6 ml の脱イオン水に溶解する。これを4°Cで保存する。

(ハ) GOT溶液

GOT 10 mg をpH 6.0 の3.2M 硫酸アンモニウム水溶液 1 ml に懸濁した酵素液(市販品)を4°Cに貯蔵しておき、使用時上記3.2M硫酸アンモニウム溶液(pH 6.0)で5倍に希釈する。

(ニ) リンゴ酸脱水素酵素液

MDH 10 mg を1.0 ml 50%グリセリン水(pH 7.0)に溶解した酵素液(市販品)を4°Cに貯蔵しておき、使用時に上記グリセリン水で倍に希釈する。

1.3. 試験操作

グリシルグリシン緩衝液1 ml と酸化型NAD 0.2 ml、脱イオン水0.9 ml を分光光度計

用10 mmガラスセルに取り、GOT溶液 0.01 mlと検体 0.1 mlを加えて直ちに 340 nmの吸光度 (OD_{340}°)を測定する (E_1)。MDH液 0.01 mlを加え、25°Cで10分間放置後、再び OD_{340}° を測定する (E_2)。別に検体のかわりに水 0.1 mlを加えた空試験を行い、 OD_{340}° を測定してそれぞれ E_{1b} 、 E_{2b} とする。

1.4. 計算

L-リンゴ酸濃度 (mg/ml)

$$\begin{aligned} &= \{(V \times MW) / (\epsilon \times d \times v \times 1,000)\} \times \Delta E \\ &= \{(2.22 \times 134.09) / (6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1,000)\} \times \Delta E \\ &= 0.473 \times \Delta E \end{aligned}$$

$$\Delta E = \Delta E_s - \Delta E_b, \quad \Delta E_s = E_2 - E_1, \quad \Delta E_b = E_{2b} - E_{1b}$$

V : 最終試験溶液量 (ml)

MW : リンゴ酸の分子量

ϵ : 還元型NADHのモル吸光係数 340 nmのとき 6.3 ($l \times \text{mmo}l^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

v : 検体量 (ml)

d : 光路長 (cm)

1.5. 測定上の留意点

定量範囲は 20 ~ 350 mg/l で、L-リンゴ酸濃度が 20 mg/l 以下の検体を定量する場合、検体量を水の代わりに多く使用する。L-リンゴ酸が 350 mg/l 以上の検体は、適宜水で希釈して定量範囲内に入るように試験操作をする。濃色系ジュースなどの検体の場合、検体 10 ml 当たりポリビニルポリピロリドン 0.1 g を混ぜて脱色後試料とする。

1.6. 酵素法の定量精度

上記のMDHを用いた酵素法の定量精度を確認するため、白ワイン (1982年甲州) を用いてまずL-リンゴ酸の添加回収率を求めた。その結果を表1に示す。

表1. 酵素法によるリンゴ酸定量の回収率

L-リンゴ酸添加量 (mg/l)	測定値 (mg/l)	回収量 (mg/l)	回収率 (%)
0	2,950	—	—
100	3,052	102	102.0
1,000	3,975	1,025	102.5

試料：白ワイン (1982年甲州)、測定値は、同一試料につき2回測定した平均値。

更に、ドイツ産モーゼルワイン（1985 Piesporter Michelsberg Sp tlese）を用いてL-リンゴ酸の繰り返し分析を行い定量精度を調べた。同一試料に対する10回の繰り返し分析の結果、L-リンゴ酸含量は、5.20, 5.22, 5.21, 5.23, 5.25, 5.20, 5.22, 5.21, 5.23, 5.25 (g/l) となった。平均値：5.22 (g/l)、標準偏差：0.014 (g/l)、変動係数：0.28 %で、本酵素法による定量精度が非常に高いことが確認された。

本原理に基づく食品分析酵素法試薬として、L-リンゴ酸測定キットがベーリンガー・マンハイム山之内（株）より市販されている。

2. L-リンゴ酸の酵素法による自動定量

酵素法による食品のL-リンゴ酸の定量は、通常用手法で行われるが、多数試料を分析したい場合、一連の分析操作を自動化することによって、分析時間の短縮と分析能率向上が達成される。ここでは、著者が試みた Discrete 式自動分析機を用いたリンゴ酸の自動分析法の一例を示す。

2.1. 自動分析システム

L-リンゴ酸の自動分析の実験には、エバンス式オートケミスト171-S型を主体として組み立てた自動分析機を用いた。自動分析機の構成概略を図1に示す。

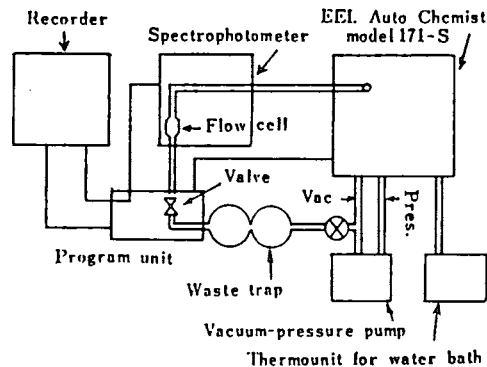


図1 自動分析機の構成概略図

本L-リンゴ酸自動定量法として改変した点につき記述する。酵素反応後の反応液は、比色計のフローセルにオートタップを用いて減圧方式により送液した。このフローセルは、Pye Unicum 製光路長5mmオートタップ用を使用した。このセルは共洗いが良く行われ、比色の際の各サンプル同士の相互汚染は、本定量法においては、ほとんど問題はなかった。比色計は、島津製作所製ダブルビームUV200を用いた。本比色計はloglinear変換がなされておりOD値の読みとりが容易である。本比色反応は、L-リンゴ酸脱水素酵素法による。測定用試薬は以下のごとく調製した。

A液：緩衝液（0.4Mヒドラジン、1Mグリシン、pH 9.5）

グリシン7.5g、硫酸ヒドラジン5.2g、EDTA $\text{Na}_2\text{H}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g を約40ml

の脱イオン水に溶解し、2N-NaOH で pH 9.5 に調整後全容 100ml とした。この緩衝液は、4℃で約 1 週間保存できた。

B液：酵素液

L-リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)(ペーリンガー・マンハイム山之内 Cat.No.127248) を上記の硫酸ヒドラジンだけを除いた緩衝液 A 液で 4 倍に希釈したものを酵素液として使用した。この酵素入り緩衝液は、必要量を分析当日に調製し、自動分析中もこの B 液を入れた容器を氷冷しつつ酵素の失活を防止した。

C液：β-NAD液

β-NAD 177mg を脱イオン水 100ml に溶解した。これは 4℃で約 1 週間保存できた。

L-リンゴ酸標準液

特級 L-リンゴ酸を水で希釈して標準液とし、標準曲線作成用に使用した。

2.2. 自動分析操作

試料溶液 (適宜水で希釈したもの) 約 0.3ml を用手操作でオートケミスト専用のサンプルカップに入れ、オートケミストのコンベアシステム上に並べた。試薬溶液 A 2.0ml とサンプルカップ中の試料液 0.1ml とをオートケミストのサンプラーユニットを用い容量 5ml の専用反応試験管に自動注入し、さらに 15 分後、ディスペンサースターラーユニットで試薬溶液 C 1.5ml を加え、30 分間反応後比色計のフローセルにサンプルトランスファーユニットよりオートタップを用いて反応液を導入し、340nm (タングステンランプ使用) で比色した。この操作により、340nm における試料液自体の吸収補正のためのブランク値を測定した。

全試料のブランク値の測定終了後、上記専用反応試験管にあらかじめエペンドルフで酵素入り緩衝液 B 液を 50 μl ずつ分注しておき、試薬溶液 A 液 2.0ml とサンプルカップ中の試料液 0.1ml とを自動分注して、同上の操作を行い L-リンゴ酸の定量を行った。すなわち L-リンゴ酸脱水素酵素反応で生成した NADH による 340nm の吸光度増大を測定し、L-リンゴ酸を定量した。反応温度はすべて 37℃ とし、攪拌用スターラーを使用した。

酵素法による自動定量法の測定フローを図 2 に示す。

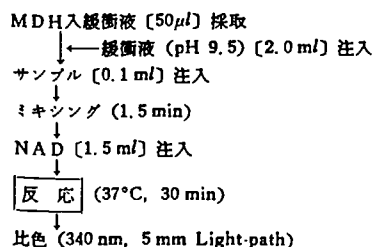


図 2 酵素法による L-リンゴ酸の自動定量条件

市販品のロットにより酵素力価がやや異なるので、その力価を検定するため、同様にオートケミストを用いて分析した。適宜希釈した (通常 50 倍 ~ 100 倍) 酵素液 50 μl を反応試験管に加え、約 3 分後に 0.1 % L-リンゴ酸 0.1ml と試験液 A 0.2ml を加え、1.5 分後 C 液を加えてから 4 分後に 340nm

で比色した。0.1%リンゴ酸にかえて水を用いて測定した値をブランクとして ΔOD を求めた。力価の計算は酵素量を横軸に取り縦軸に ΔOD をとり、そのプロットが直線範囲にあるところの勾配を使って計算した。1ユニット=1 $\Delta OD/min / \mu l$ 酵素液とすると通常0.05ユニット程度であった。

試料中のL-リンゴ酸含量を求めるには次の方式に従って計算した。

OD値 a : 試料または希釈試料を試薬液A+試薬液B(酵素液)で測定した値

OD値 b : 同上試料液を試薬液Bを使用して測定した値

OD値 c : 標準L-リンゴ酸を試薬液A+試薬液Bで測定した値

OD値 d : 試料は水で試薬液A+試薬液Bを使用して測定した値

まず(OD値 c - OD値 d)をプロットしてL-リンゴ酸標準曲線(図3)を作成した。標準曲線の直線性は広い範囲で良好であることが確認された。上記標準曲線にサンプルの計算値(OD値 a - OD値 b)を当てて、試料の希釈率を乗じてL-リンゴ酸含量を求めた。通常ワインの場合、白ワインは5倍希釈、赤ワインは原液のまま測定した。

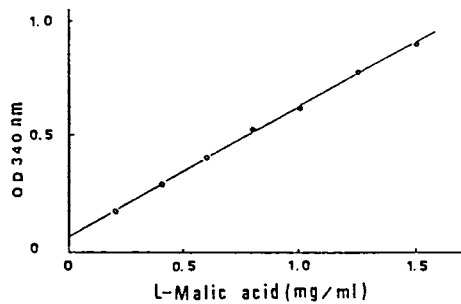


図3 酵素自動定量法によるL-リンゴ酸の標準曲線

ワイン試料の分析においては、OD値 bはワイン間で大きな差はないので各試料1回測定で十分だった。したがって本法によればOD値 aの2回測定ならびにOD値 bの1回測定の計3回測定で約40検体のL-リンゴ酸の定量が1時間で可能である。またワイン試料にL-リンゴ酸の既知量を添加してL-リンゴ酸の回収率を求めたところ、回収率は97.6%であり定量精度も高いことが示された。

以上のように、Discrete式自動分析機を用いた自動分析法により食品中のL-リンゴ酸が、従来の用手法分析に比較して迅速かつ簡便に高精度に定量できることが分かった。

本自動分析法によるL-リンゴ酸の定量結果は白ワイン：1970甲州が1.65 (g/l)、赤ワイン：1969カベルネ・ソーヴィニオンが0.35 (g/l)であった。

3. 酵素法によるL-酒石酸の定量

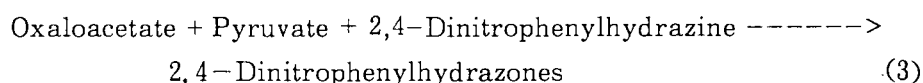
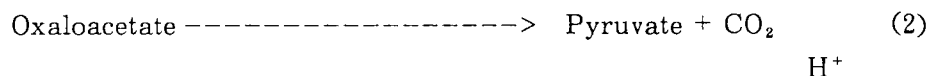
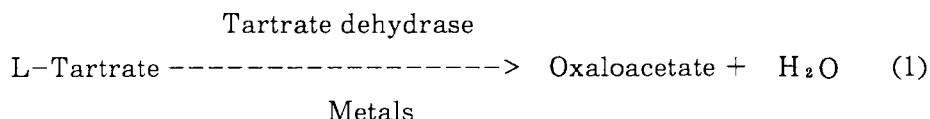
酒石酸は、3種類の立体異性体すなわちL(+型)、D(-型)、メゾ型が存在するが、天然ぶどう果汁中に含まれる酒石酸は、L(+型)である。

食品中のL-酒石酸の定量は、現在ルーチン分析できる標準的なL-酒石酸測定用酵素

剤が市販されていないので一般に比色法およびカルボン酸分析計などが用いられている。

酵素法による食品中のL-酒石酸定量法としては、Pseudomonas putida 起源のL-Tartrate dehydrogenase (EC 4.2.1.32) を用いる分析法がある。

3.1. 反応原理



反応(1)は、定量的に進む。2価の金属イオンの存在下でオキザロ酢酸は、一部分ピルビン酸に脱炭酸される(2)。両方のオキソ酸は、2,4-Dinitrophenylhydrazonesを生成する(3)。これらの誘導体は、アルカリ溶液中で褐色を示し、540(546)nmにて測定できる。この色度は、生成オキソ酸濃度に直線的に比例する。この酵素反応は、pH 8~9の嫌気条件下で最も良く進行する。両オキソ酸のモル吸光係数は、上述の条件下で同じである。本酵素は、酸素に敏感である。Tartrate dehydraseの粗酵素液標品によって、本反応は満足に行われる。

3.2. 分析法

本反応は測定用キュベットを用い、表2に示すように調製して行う。

表2. 酵素法によるL-酒石酸定量法の測定条件

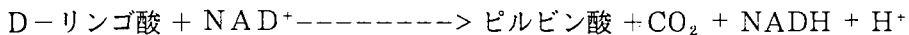
操作	容量
1 試料	0.3 ml
Tris buffer (pH 8.5)	0.1 ml
2 Herium ガスで 4 分間充填	
3 L-Tartrate dehydrase 液	0.1 ml
4 混合密栓、25℃、5分反応	
5 2,4-Dinitrophenylhdrazine	0.5 ml
6 約20分静置	
7 2.5N NaOH	4.0 ml
8 比色(波長 540 nm、光路長 1 cm、5分以内)	

4. 酵素法によるD, L-リンゴ酸の分別定量

平成元年の酒税法改定に伴い、ワイン醸造の製造工程中に限定して、リンゴ酸添加が許されるようになった。ここで使用されるリンゴ酸としては、コスト面及び食品添加物である点などから、D, L-リンゴ酸が対象となる。L-リンゴ酸とD-リンゴ酸の光学異性体を分別定量する簡便な分析方法は、見当たらないので、著者らは、カルボン酸分析計を用いたLC法(D, L-リンゴ酸)と酵素法(L-リンゴ酸)を組み合わせる方法を試みた。最近、D-リンゴ酸が直接測定できる酵素法キットの製品化が検討されたので、著者らはワイン中のD-リンゴ酸の分析に早速応用し、良好な定量性を確認した。

4.1. 定量原理

D-MDH



ここで生成するNADHの量は、D-MDH (D-malate dehydrogenase) により分解されるD-リンゴ酸の量と当量であるので、NADHの吸収(340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm)を測定することで、D-リンゴ酸が定量できる。

4.2. サンプルの前処理

ベーリンガー社のマニュアルに基づくCa(OH)₂法を改良して、NaOH中和法を用いた。すなわち、ワイン10 mlをN/3 NaOHでpH 7~8に調整し、赤ワインについてはPVPPを10 mg添加し攪拌した。これを水で20 mlに定容し濾液を供試した。

4.3. D-リンゴ酸の回収率

水溶液でのD-リンゴ酸は、0.02~0.60 g/l (キュベット当たり2~60 μg)の範囲内で良好な直線性が得られた。さらに、D-リンゴ酸を含まない白ワイン及び赤ワインにD-リンゴ酸とDL-リンゴ酸を添加して回収率を求めた。

適性サンプル量は、定量的には、白ワインで0.5 ml (0.1 g/l)、赤ワインで0.2 ml (0.2 g/l)であった。定性的には、白ワインで1 ml (0.02 g/l)、赤ワインで1 ml (0.1 g/l)であり、現実的使用量と予想されるDL-リンゴ酸0.5 g/l以上程度で十分鋭敏である。

4.4. 酵素法と従来法(組み合わせ法)との比較

白及びロゼワインを用いて、D-リンゴ酸含量について、酵素法と著者らの既法組み合わせ法(カルボン酸分析計とL-リンゴ酸酵素定量法)の比較を行った。結果を表3に示す。酵素法により、直接定量したD-リンゴ酸の回収率は、ほぼ安定した96~111%の間にあり、またL-リンゴ酸の酵素法による回収率も良好であった。

表3 Comparison between conventional and enzymatic methods for D-malic acid determination in a white and a rose wine.

Sample	Enzymatic method		Conventional method				(1)-(2)	
	D-MA (g/l)	RC(%)	(1) LC method		(2) Enzymatic method		D-MA (g/l)	RC(%)
			D+L-MA (g/l)	RC(%)	L-MA (g/l)	RC(%)		
White (control)	—	—	0.88	—	1.01	—	—	—
White+0.5 g/l D-MA	0.556	111	1.33	96	1.02	—	0.31	62
White+0.5 g/l DL-MA	0.244	98	1.32	96	1.25	99	0.07	28
White+1.0 g/l DL-MA	0.545	109	1.72	91	1.50	99	0.22	44
White+2.0 g/l DL-MA	0.957	96	2.46	85	1.98	99	0.48	48
Rose (control)	—	—	1.69	—	1.59	—	0.10	—
Rose+0.5 g/l D-MA	0.532	106	2.02	92	1.58	—	0.44	88
Rose+0.5 g/l DL-MA	0.265	106	2.10	96	1.86	101	0.24	96
Rose+1.0 g/l DL-MA	0.543	109	2.45	91	2.10	100	0.35	70

Abbreviations ; RC : Recovery, MA : Malic acid. White : Grape variety *Koshu* white wine, vintage 1990. Rose : Rose wine made from grape variety *Koshu* and *Muscat Balley A*.

以上、D-リンゴ酸酵素定量法により、DL-リンゴ酸を添加したワイン中のD-リンゴ酸を簡便かつ精度良く迅速分析できることを認めた。

5. 発泡性ワイン中のD,L-乳酸の分別定量

マロラクチック発酵 (MLF) は、ワインに酸味のみならず香気の改善をもたらす効果があるので、特に赤ワインの品質上重要な意義を持っている。酵母によるアルコール発酵後さらに二次アルコール発酵過程を経て製造される発泡性ワインにおいてもMLFが生起されることが示唆された。

5.1. D, L-乳酸の分別定量法

L-乳酸は、EEL自動分析機モデル17/S (エバンスエレクトロセレンウム社、England) を用いる酵素法により測定した。D-乳酸はカルボン酸分析計で求めた総乳酸量 (D-乳酸 + L-乳酸) からL-乳酸を差し引いて算出した。

5.2. 市販発泡性ワインのD, L-乳酸

表4に市販発泡性ワイン (9点) の有機酸含量を示す。乳酸が著しく多く、リンゴ酸は 0.55 g/l と少ないことが認められた。発泡性ワイン中の著量の乳酸生成は、MLFに起因していることが分かった。シャンパンとゼクトの乳酸含量は大きな差異を認めたが、これはそれぞれの原料に使用されたベースワインの品質及び二次発酵形式・熟成期間などの差異によるものと思われる。

L (+) 乳酸含量の総乳酸含量に対する割合を算出したところ、平均値は 76.3% (68.9~82.1%) で、総乳酸含量の大部分は L (+) 異性体であることが認められた。この結果から、発泡性ワインの醸造において、一次発酵または二次発酵過程に、MLFが生起していることが示唆される。

表4 Contents of various organic acids in commercial sparkling wines.

Sample	No.	Contents (g/l)									L/TL ^a (%)	TL/M ^b
		Lactic acid			Malic acid	Tartaric acid	Succinic acid	Acetic acid	Citric acid			
		total	L(+)	D(-)								
Sekt	1	2.51	1.73	0.78	2.00	2.83	0.40	0.38	0.13	68.9	2.78	
	2	3.18	2.25	0.93	0.60	2.15	0.42	0.36	0.08	70.8	11.67	
	3	2.51	1.97	0.54	1.23	5.36	0.45	0.45	0.14	78.5	4.51	
Champagne	1	4.54	3.42	1.12	0.21	4.38	0.33	0.74	0.16	75.3	46.87	
	2	4.55	3.51	1.04	0.15	5.03	0.28	0.74	0.39	77.1	68.31	
	3	4.02	3.02	1.00	0.11	4.16	0.35	0.49	0.03	75.1	82.95	
	4	3.97	3.08	0.89	0.13	3.94	0.32	0.50	0.07	77.6	65.62	
	5	6.08	4.97	1.11	0.21	4.42	0.20	0.51	0.12	81.7	62.76	
Asti Spumante	1	2.52	2.07	0.45	0.28	1.74	0.21	0.23	0.29	82.1	19.85	
Average		3.76	2.89	0.88	0.55	3.78	0.33	0.49	0.15	76.3	40.76	

^a L/TL: percent of L(+)-lactic acid content to total lactic acid content.

^b TL/M: mole ratio of total lactic acid to malic acid.

6. 参考文献

- 1) 原昌道・戸塚昭・高橋保雄・讃岐仁史：醸協、Vol. **73**, 744 (1978)
- 2) 島津善美：酵素による食品分析法、p. 56、食品化学新聞社 (1989)
- 3) 島津善美：フードケミカル、Vol. **7**, 95 (1987)
- 4) 竹内潔・島津善美：醸協、Vol. **87** (12), 927 (1992)
- 5) Shimazu, Y. and Watanabe, M : J. Ferment. Technol., Vol. **57**(6), 512(1979)