

研究論文

市販ピルビン酸分析キットの清酒製造工程への適用

三井俊*1、伊藤彰敏*1、近藤徹弥*1、亀井佑香*1、伊東寛明*1、澤田雅彦*2、
鈴木耕平*2、石原博通*2

Application of Commercial Pyruvic Acid Analysis Kit to Sake Brewing Process

Shun MITSUI*1, Akitoshi ITO*1, Tetsuya KONDO*1, Yuka KAMEI*1, Hiroaki ITO*1,
Masahiko SAWADA*2, Kohei SUZUKI*2 and Hiromichi ISHIHARA*2

Food Research Center*1 BIOCON (JAPAN) LTD*2

食品用の市販ピルビン酸分析キットの清酒製造管理への利用を検討した。清酒醪及び清酒を対象として、測定可能な濃度範囲、繰り返し精度を検証すると共に、キット法と HPLC 法による定量値を比較した。その結果、5~450 mg/L の濃度範囲で、試料を希釈することなく、ピルビン酸を定量することができた。また、100 mg/L のピルビン酸を添加した清酒試料を用いて、繰り返し 5 回定量した結果、変動係数は 2.0% だった。さらに、キット法と HPLC 法でそれぞれ得られた定量値は 10~450 mg/L の濃度範囲で良く一致していた。本ピルビン酸分析キットは、清酒醪及び清酒におけるピルビン酸の迅速・高精度な定量に利用できることがわかった。

1. はじめに

清酒製造工程における醪の上槽のタイミングは、醪のアルコール分、日本酒度等の成分値を指標として、その推移から総合的に判断される。指標となる成分値の一つにピルビン酸濃度がある。酵母は醪中のブドウ糖からピルビン酸を経由してアルコールを生成する。醪後期にピルビン酸濃度は減少していくが^{1),2)}、上槽時に残存しているピルビン酸濃度が高いと(100 mg/L が目安)、アセトアルデヒド、ジアセチル等のオフフレーバー生成の可能性が高まり、酒質が低下する恐れがある^{3),4)}。このため、清酒醪中のピルビン酸濃度を正確に測定し、把握することが品質管理上重要となる。

従来、多くの清酒メーカーでは、醪のピルビン酸濃度の判定に、試験紙タイプのピルビン酸測定スティックを用いてきた⁵⁾。このスティックでは、分光光度計を必要とせず、試験紙の色の違いによりピルビン酸濃度を判定することができるため、長らく製造現場では重宝されてきたが、現在は販売されていない。このスティック同様に、肉眼で清酒醪中のピルビン酸濃度を判定することができるピルビン酸簡易測定キットが販売されている⁶⁾。これはカルボニル化合物定量のための 3-DG(3-デオキシグルコソン)法⁷⁾に基づく発色をピルビン酸濃度の推定に利用したものであり、25~35℃の環境下、約 1 時間でおおよそのピルビン酸濃度を分析することができる。

一方、乳酸脱水素酵素を用いた食品用ピルビン酸分析

キットが市販されている⁸⁾。乳酸脱水素酵素は、ピルビン酸を乳酸に還元すると同時に、NADH を NAD⁺に酸化化する。この酵素反応はピルビン酸に特異的であり、NAD⁺の増加に伴う吸光度の減少の割合はピルビン酸の濃度に比例する。本キットは、この原理を利用しており、比較的簡便かつ短時間でピルビン酸を定量することができる。本キットの清酒製造への適用は、清酒の品質管理上、非常に有用であると期待されるが、清酒への適用を詳細に検証した報告はなく、清酒醪及び清酒に含まれるピルビン酸の定量に本キットが適用可能かどうかについては検討されていない。そこで本研究では、本ピルビン酸分析キットの清酒醪及び清酒への利用を検討した。

2. 実験方法

2.1 供試清酒醪及び清酒

供試清酒醪は食品工業技術センター試験醸造醪 2 本及び愛知県内の清酒メーカーで製造された清酒醪 1 本を用いた。醪を遠心分離し、その上清液のろ液(アルコール分 2~17%)を用いた。

供試清酒は令和 2 年愛知県清酒きき酒研究会出品酒 27 点(アルコール分 16~18.5%)及び市販酒 2 点(アルコール分 7~8%)を用いた。

2.2 ピルビン酸の定量法

2.2.1 キット法

メガザイム社製ピルビン酸分析キット(日本バイオコ

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 日本バイオコン(株)

ン(株)販売)を用いた。還元型 NADH の存在下、D-乳酸デヒドロゲナーゼ(D-LDH)は、ピルビン酸を D-乳酸と NAD⁺に変換する(図 1)。この反応で生じる NAD⁺量はピルビン酸量と化学量論的に同一であり、NADH 量は 340 nm の吸光度減少により測定できる。

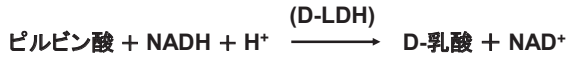


図 1 キット法の測定原理

試料系列は以下の様に行った。石英セルに試料 0.1 mL、蒸留水 2.5 mL、NADH 溶液 0.2 mL を取り混和後、室温(約 25°C)で約 2 分間静置した。静置後、340 nm の吸光度(A_{1s})を測定した。これに D-LDH 溶液 0.02 mL を添加し攪拌後、室温(約 25°C)で約 3 分間静置し、反応させた。反応後、340 nm の吸光度(A_{2s})を測定した。ブランク系列は、石英セルに蒸留水 2.6 mL、NADH 溶液 0.2 mL を取り混和後、試料系列と同様の手順で行い、吸光度 A_{1B} 及び A_{2B} を求めた。A_{1s} - A_{2s} = ΔA_s、A_{1B} - A_{2B} = ΔA_B、ΔA_s - ΔA_B = ΔA とし、ピルビン酸濃度 (mg/L) = ΔA × 394.2(係数の算出はキット付属の手順書⁸⁾を参考)として算出した。

2.2.2 HPLC 法

有機酸分析システム((株)島津製作所)を用い、以下の条件にて分析した。

カラム: Shim-Pack SCR102H(2 本連結)

検出器: 電気伝導度検出器

移動相: 4 mM *p*-トルエンスルホン酸

緩衝相: 4 mM *p*-トルエンスルホン酸(100 mM

EDTA、20 mM Bis-Tris 含有)

流速 : 移動相、緩衝相ともに 0.8 mL/min

3. 実験結果及び考察

3.1 測定可能な濃度範囲及び検出限界

ピルビン酸を 5~450 mg/L 含む 17%エタノール溶液を調製し(5~100 mg/L の標準液はキット付属のピルビン酸標準溶液、200~450 mg/L の標準液はピルビン酸リチウムを用いて調製)、キット法にて定量した結果を図 2 に示す。5~450 mg/L の範囲で高い直線性(R²=0.9980)が得られた。一般的な清酒醪や製品に含まれるピルビン酸濃度はおおよそ 0~400 mg/L であるので^{2),7)}、本キットでは、試料を希釈することなく測定できると考えられた。また、キット法によるピルビン酸の検出下限濃度は、推定下限濃度を 5.0 mg/L と設定し、ピルビン酸を 5.0 mg/L 含む 17%エタノール溶液について繰り返し 5 回測定した結果から、1.8 mg/L と求められた。

3.2 繰り返し再現性及び添加回収試験

清酒試料(HPLC 法でピルビン酸濃度 51.0 mg/L)に

100 mg/L のピルビン酸を添加した試料を用いて、キット法にて、繰り返し 5 回測定して回収率及び繰り返し精度を求めた。その結果、回収率は 95~101%であり、繰り返し測定における変動係数は 2.0%と良好な値となった。また、同じ清酒試料にピルビン酸を 20~200 mg/L 添加した試料を用いて、ピルビン酸を定量したところ図 3 に示すように良好な直線関係が得られ、回収率は 101~111%であった。これらより、キット法は清酒醪及び清酒中のピルビン酸の分析に問題なく使用できると考えられた。

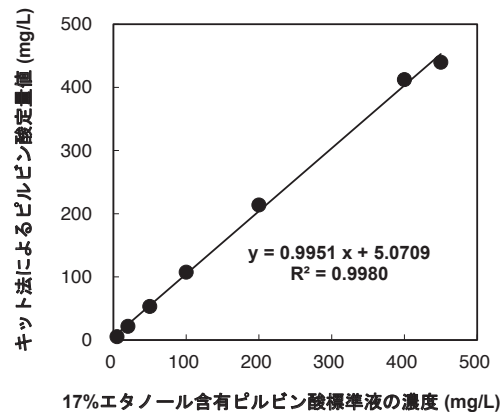


図 2 キット法の適用濃度範囲

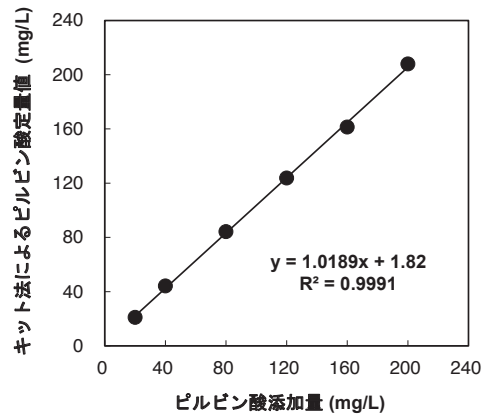


図 3 キット法における添加回収試験

3.3 反応温度及び反応時間の検討

キット付属の手順書では、D-LDH 溶液添加後の反応温度を約 25°C、反応時間を約 3 分と設定しているが、反応時間の短縮等、作業性を考慮し、最適温度、最適時間を再検証した。ピルビン酸濃度既知の清酒醪試料(HPLC 法でピルビン酸濃度 121.4 mg/L)を用い、反応温度、あるいは反応時間の一方を固定し、反応温度は 5、10、15、20、25、30、40、50°C、反応時間は 0.5、1、2、3、5、10、15、30、60 分と変化させてピルビン酸

を定量した(N=3)。その結果、いずれの条件下でもピルビン酸定量値はほぼ一定となった(データは省略)。これより、反応温度は5~50℃、反応時間は0.5~60分の間であれば、温度や時間の厳密な管理が不要であり、簡便に分析できることがわかった。

3.4 清酒醪中のピルビン酸濃度の定量

ピルビン酸経過の異なる食品工業技術センター試験醸造醪2本(醪①:カプロン酸エチル高生成酵母の醪、醪②:伝統型酵母の醪)及び愛知県内清酒メーカー製造の醪1本(醪③:カプロン酸エチル高生成酵母の醪)にキット法及びHPLC法を適用した。

醪①~③について、醪経過の指標となるBMD(醪日数にボーメ度を乗じた値)とピルビン酸濃度(HPLC法によ

る定量値)の関係及びキット法とHPLC法のピルビン酸定量値を比較した結果を示す(図4~9)。

3本の醪の結果より、およそ10~450 mg/Lの範囲でキット法とHPLC法のピルビン酸定量値は良く一致していた。今回の分析では、醪初期から末期までの幅広い試料を用いており、アルコール分(2~17%)を含めた醪に含まれる他の成分値は様々である。よって、キット法はアルコール分を含めた一般的な醪成分に影響されず、清酒醪のピルビン酸の定量に問題なく使用できることが確認できた。また、伊藤らは、清酒醪中のピルビン酸とBMDは相似した経過をたどると報告しているが²⁾、今回分析した醪でも同様の傾向が見られた。

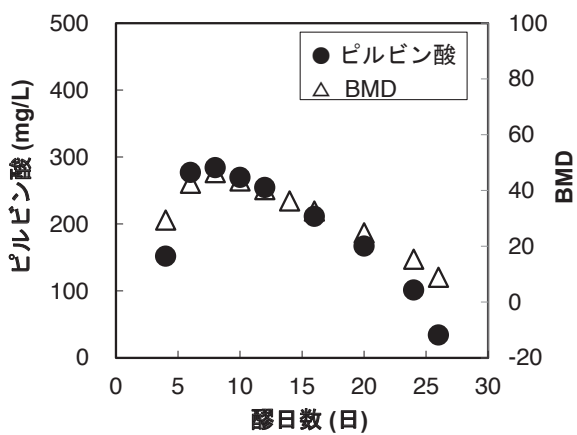


図4 ピルビン酸とBMDの関係(醪①)

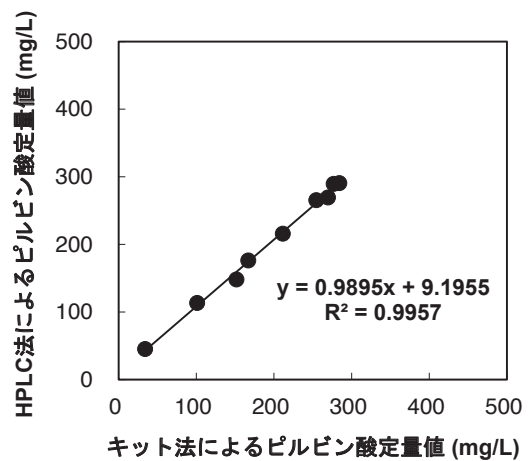


図5 キット法とHPLC法の定量値(醪①)

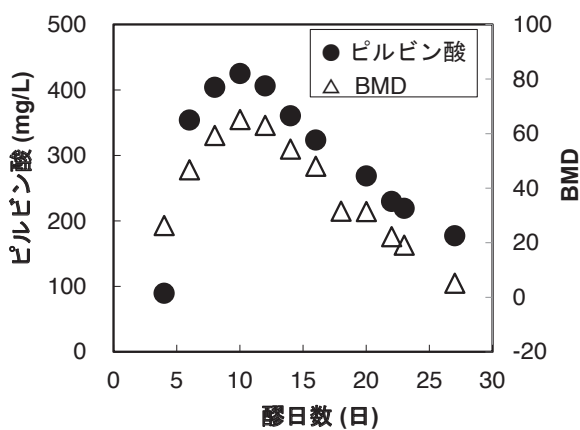


図6 ピルビン酸とBMDの関係(醪②)

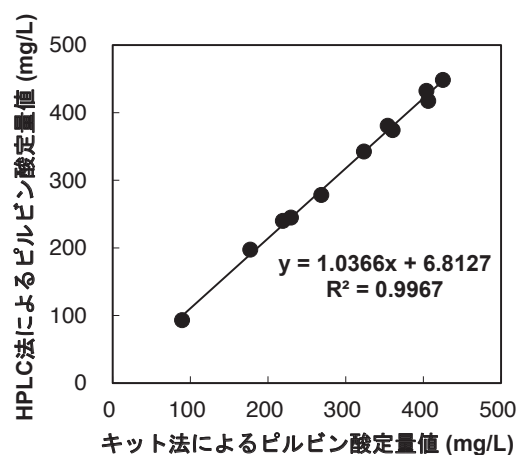


図7 キット法とHPLC法の定量値(醪②)

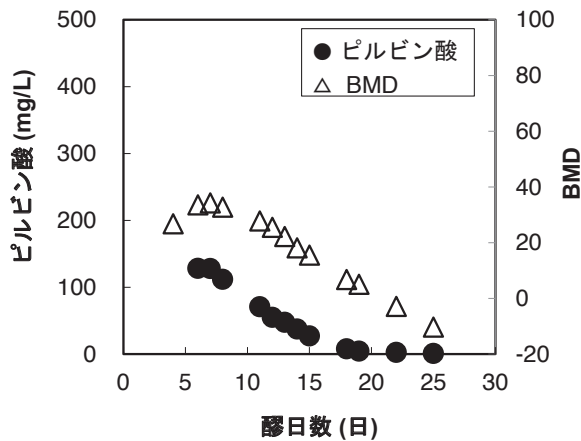


図8 ピルビン酸とBMDの関係(醪③)

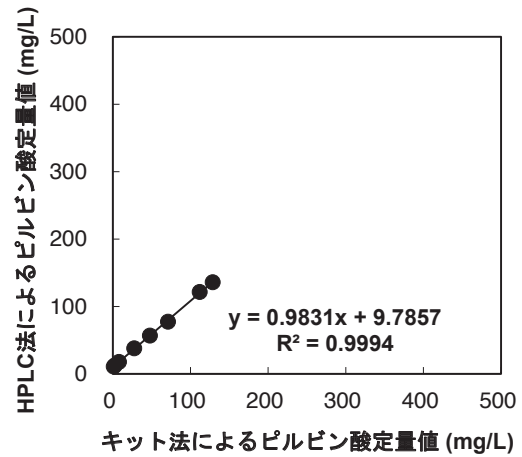


図9 キット法とHPLC法の定量値(醪③)

3.5 清酒中のピルビン酸濃度の定量

令和2年愛知県清酒きき酒研究会出品酒27点及び市販酒2点に、キット法とHPLC法を適用し、ピルビン酸定量値を比較した。結果を図10に示す。キット法によるピルビン酸定量値は、およそ10~300 mg/Lの範囲でHPLC法によるピルビン酸定量値と良く一致していた。これより、キット法は清酒中のピルビン酸の定量にも問題なく使用できることが確認できた。

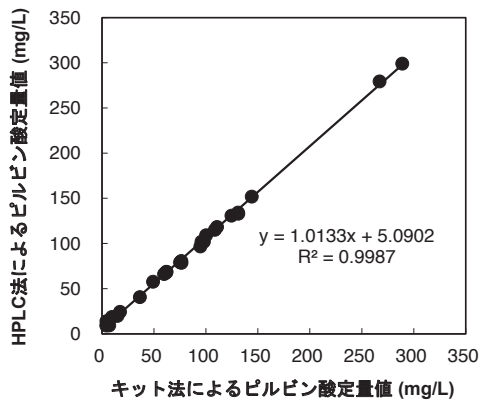


図10 清酒中のピルビン酸定量におけるキット法とHPLC法の比較

4. 結び

本研究では、乳酸脱水素酵素系の食品用ピルビン酸分析キット(メガザイム社製、日本バイオコン(株)販売)を用いた清酒醪及び清酒中のピルビン酸の定量を検討した。結果は、以下のとおりである。

- (1) 測定可能な濃度範囲、再現性、回収率を検討した結果、今回検証したキット法は、一般的な清酒醪及び清酒に十分適用できるものと考えられた。
- (2) 清酒醪試料を対象に、キット法とHPLC法を比較したところ、両法での定量値はおよそ10~450 mg/Lの

濃度範囲で良く一致していた。

- (3) 清酒試料を対象とした場合においても、キット法とHPLC法の定量値はおよそ10~300 mg/Lの濃度範囲で良く一致していた。
- (4) キット法は、少量の試料とキット付属の試薬を混和し、厳密な温度管理も必要なく、数分間で分析が完了する。分光光度計は必要となるものの、簡便・迅速且つ高精度なピルビン酸分析法であり、清酒製造管理に非常に有効と考えられた。

文献

- 1) 吉沢淑, 高橋康次郎, 平田勤, 曾我浩: 日本醸造協会誌, **80**, 569(1985)
- 2) 伊藤和樹, 佐藤時習, 兎森忠道, 渡辺誠衛, 田口隆信: 日本醸造協会誌, **102**, 309(2007)
- 3) 土肥和夫, 宮内俊一, 川本雅之: 醗酵工学会誌, **52**, 416(1974)
- 4) 平田みよ, 元村沙織, 佐々木真, 堀江健太, 大場孝宏, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志: 日本醸造協会誌, **106**, 323(2011)
- 5) 月桂冠株式会社: ピルビン測定スティック, <https://www.gekkeikan.co.jp/RD/sake/sake06/>, (2021/5/31)
- 6) 新洋技研工業株式会社: ピルビン酸簡易測定キット, <https://www.shinyo.co.jp/product/chemical>, (2021/5/31)
- 7) 西田淑男, 久野敦史, 幅靖志, 深谷伊和男: 日本醸造協会誌: **94**, 416(1999)
- 8) 日本バイオコン株式会社: ピルビン酸(塩)分析法, [http://www.biocon.co.jp/products/pdf/K-PYRUV%20\(1020\)%20.pdf](http://www.biocon.co.jp/products/pdf/K-PYRUV%20(1020)%20.pdf), (2021/5/31)