

酵素力価の電気化学的測定の検討*

佐藤稔英**、中山繁喜**、米倉裕一**、平野高広**、山口佑子**

酒造工程において重要な指標となる米麴の酵素力価について電気化学的測定を試みた。その結果、 α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼの活性測定においてそれぞれ0.0016~0.021、0.045~0.41Units/mLの範囲で直線的相関関係を示した。そこで、県内酒造メーカーで作製された米麴をサンプルとして活性測定を行ったところ、市販のキットでの測定結果と比較的良好な相関関係が得られた。

キーワード：麴、酵素活性、電気化学測定

Determination of Glucoamylase and α -Glucosidase Activity by Using Amperometric Detection

SATO Naruhide, NAKAYAMA Shigeki, YONEKURA Yuichi, HIRANO Takahiro, YAMAGUCHI Yuko

A biosensor system with amperometric detection was developed for the determination of glucoamylase and α -glucosidase activity. A linear relationship between steady-state current and concentration was found over a range of 0.0016~0.021 (α -glucosidase) and 0.045~0.41Units/mL (glucoamylase), respectively. Good comparative results were observed between glucoamylase and α -glucosidase activity contents in *koji* determined by the proposed system and by the commercially available kit.

key words : *koji*, enzyme activity, electrochemical measurement

1 緒 言

『一麴二酛三造り』と言われるように、酒造りの鍵を握るのが麴であり、その出来次第で酒質が左右するほど影響が大きい。そのため、酒造メーカーでは多くの場合、麴師に熟練の技術者を配置し酒質向上に努めている。しかし、酒造製造業会では早くから後継者育成の対策が強く叫ばれ続けながら、改善しないまま深刻な事態にある。これは麴造りにも同様であり、如何にして名杜氏、名麴師のノウハウを伝承していくか、が大きな課題となっている。特に酒造現場では米の硬さや蒸しの具合、麴の甘さなどを感覚で表すことが多く、具体的な数値で示すことが甚だ困難である。

一方、麴においては国税庁所定分析法¹⁾により「固体こうじの分析法」としてグルコアミラーゼの分析法を掲載している。また、「糖化力測定キット」もキッコーマン²⁾から販売されており、比較的数値化が可能である部分も多い。しかしながら、これらの分析方法は比色法であり、測定サンプルの濁りや着色の影響を除くための前処理が必要である。また、吸光光度計を持ち合わせていない酒造メーカーがほとんどで、分析は外注に頼っている。このため、麴力価を基に製麴工程を改善するには現場で容易に分析が可能な分析システムを構築することが不可欠である。

以上のことから、本研究では比較的低価格で装置を開発・販売できる電気化学的測定法に着目し、麴の酵素力価測定について検討した。さらに、最近発表された α -グルコシダーゼ活性測定²⁾についても同様に測定し、岩手県内で作られた麴を用いて市販のキット法との比較を行った結果について報告する。

2 方 法

2-1 酵素および試薬

グルコースオキシダーゼおよび α -グルコシダーゼは東洋紡績³⁾のものを用いた。ヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドは江崎グリコ⁴⁾から供与いただいたものをそのまま用いた。米麴は県内酒造メーカー6社から分析依頼のあったものをそのまま用いた。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま用いた。

2-2 電気化学測定

グラッシーカーボン電極(ϕ 2mm)の表面をアルミナ研磨し、透析膜で覆ってO-リングで固定したものを作用電極とした。測定は白金線を対極、銀/塩化銀電極を参照極とした三電極構成で測定を行った。測定液は0.01M 酢酸緩衝液

* 基盤的・先導的技術研究開発事業

** 食品醸造技術部

(pH5.0)に0.5%NaClを溶解したものをうい、電気化学測定はすべてピー・イー・エス(株)製 ALS703B でサイクリックボルタンメトリー以外の測定はマグネチックスターラーを用いて攪拌して行った。米麴サンプルは国税庁所定分析法の手順で調整し、キッコーマン(株)製糖化力分別定量キットおよび電気化学測定に用いた。

3 結果および考察

3-1 ヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドを用いた α -グルコシダーゼ活性の測定

α -グルコシダーゼによるヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドの分解反応をサイクリックボルタンメトリーにより検討した。2mMのヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドが緩衝液に存在した場合、約0.8Vvs.Ag/AgClの位置に酸化ピーク電流が見られる。この溶液に α -グルコシダーゼを40Units加え、5min攪拌後に行ったサイクリックボルタモグラムは図1中(B)のようになった。ヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドの酸化ピーク電流が消失し、p-ヒドロキノンの酸化ピーク電流および

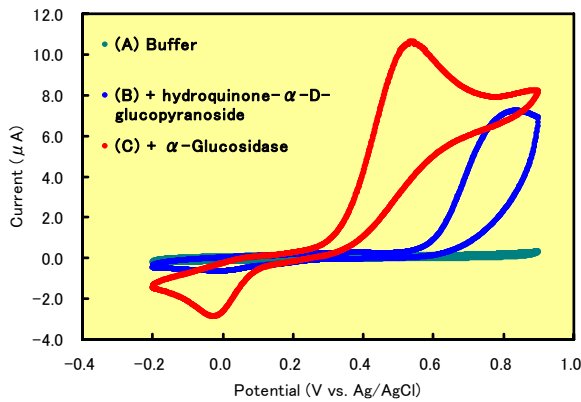


図1. α -Glucosidase の応答

その還元電流が得られた。これら結果は林ら²⁾が行った結果と同様であり、ヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドが α -グルコシダーゼの活性によりD-グルコースとp-ヒドロキノンに加水分解され、生成したp-ヒドロキノンが電極上で酸化されていることを示している。

次に電極電位を一定にして、生成される p-ヒドロキノンの測定電位を検討した。その結果、0.5Vvs.Ag/AgCl 以上の場合ヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドの酸化電流が測定に影響を及ぼすことがわかった。また、0.3Vvs.Ag/AgCl 以下の場合、p-ヒドロキノンの酸化電流値が低く、測定が困難になることが判明した。このため、以下の α -グルコシダーゼ活性測定では0.4Vvs.Ag/AgClの電位で行うこととした。

2mMのヒドロキノン- α -D-グルコピラノシドを緩衝液中に溶解し定電位において既知濃度の α -グルコシダーゼを作用させ、そのときに得られた1minの電流値変化量と α -グルコシダーゼ濃度との相関を示したのが図2(A)である。 α -グルコシダーゼは0.0016~0.021Units/mLの範囲で直線的相関関係を示し、決定係数は0.9781だった。

3-2 グルコアミラーゼの活性測定

グルコアミラーゼはデンプンの非還元末端をグルコース単位で切断する。よって、緩衝液中に可溶性デンプンと電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを溶解してグルコアミラーゼを反応させてD-グルコースを生成させ、グルコースオキシダーゼによってその生成量を測定することで活性測定を行った。グルコアミラーゼを反応系内に注入後、約1minで酸化電流値は増加し、添加後の時間と比例した。この電流増加の時間変化と既知濃度のグルコアミラーゼの濃度との相関を示したのが図2(B)である。この結果から、グルコアミラーゼは0.045~0.41Units/mLの範囲で直線的相関関係を

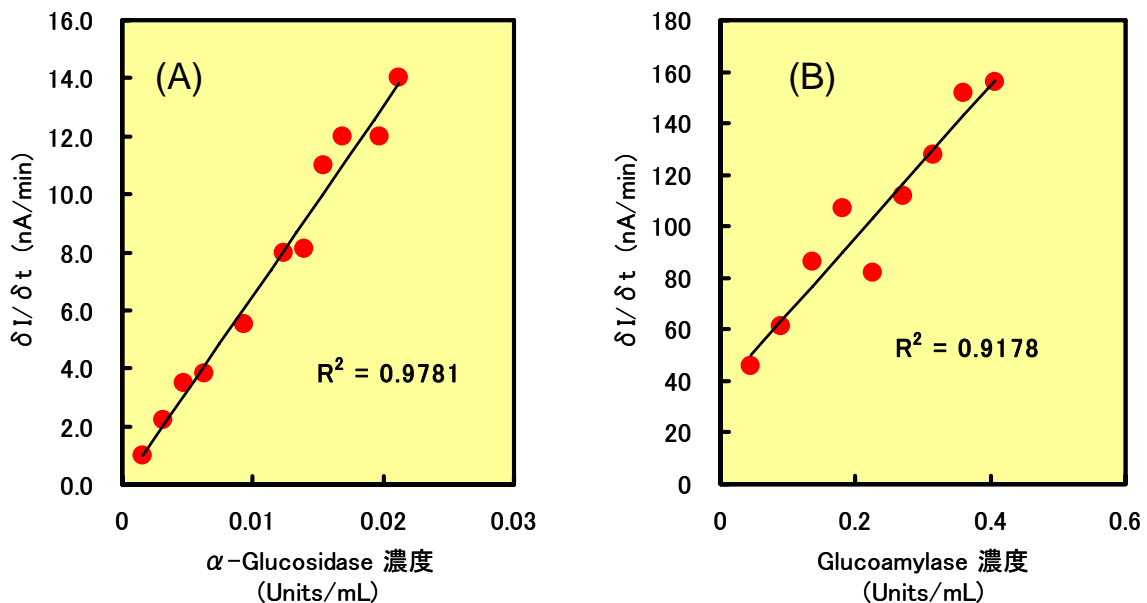


図2. α -Glucosidase および Glucoamylase の検量線

示し、その決定係数は0.9181 だった。

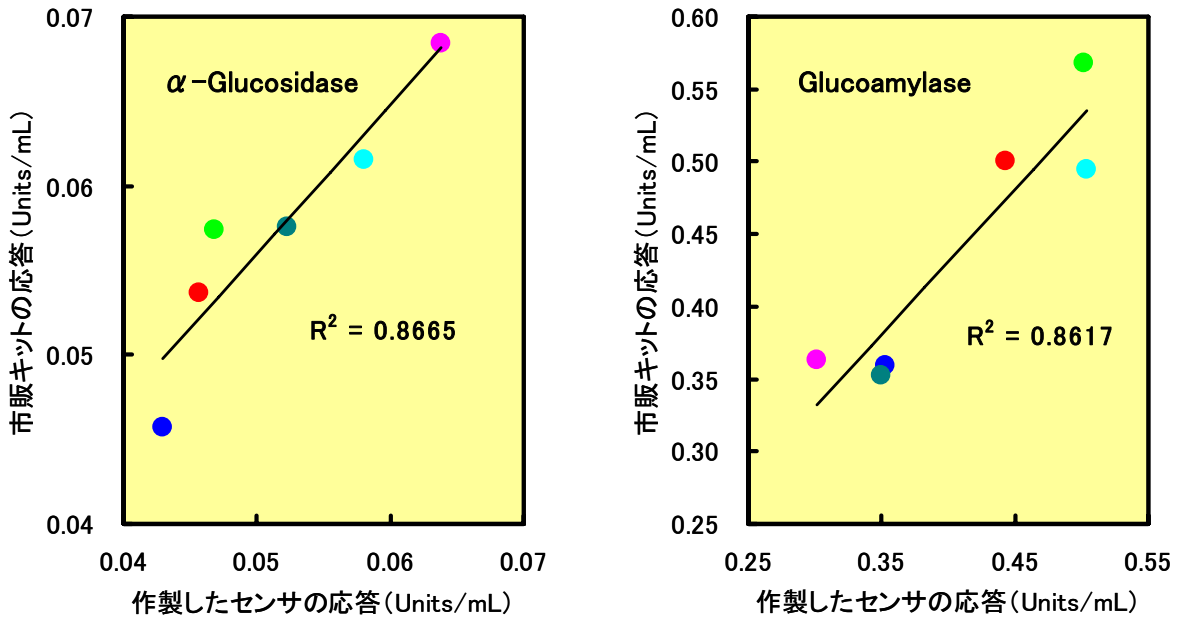


図 3. 米麴中の α -Glucosidase および Glucoamylase の活性測定

3-3 米麴をサンプルとした活性測定

上述した方法を用いて県内酒造メーカー7社で作製された米麴中のグルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼの活性測定を試みた。図3は市販キットとの相関図である。その結果、グルコアミラーゼ活性で決定係数0.8617、 α -グルコシダーゼで決定係数0.8665と比較的良好な相関関係が得られた。この結果から、米麴の酵素力価測定において電気化学的測定法は有効であることが示された。しかし、これら結果はある程度、温度の制御された環境下で行われた結果であり、冬場の酒蔵のような低温環境では測定誤差が大きくなるものと推定される。さらに、 α -グルコースが存在する場合、見かけ上の活性が阻害されることがすでに報告³⁾されており、これらの影響も含めて、今後検討していく予定である。

参考文献

- 1) 注解編集委員会:「第4回改正国税庁所定分析法注解」, 財団法人日本醸造協会(1993)
- 2) 林 達郎、加藤 睦美、三木 功次郎、木下 英明, 分析化学 55(12), 925 (2006)
- 3) Yuzuru Suzuki, Mari Shinji, Nobuyuki Eto, *Biochim. Biophys. Acta*, 787(3), 281 (1984)