

麴のグルコアミラーゼ力価簡易測定*

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。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、グルコアミラーゼの活性測定において 44.7~265.2Units/g の範囲で直線的相関関係を示した。

キーワード：麴、酵素活性、電気化学測定

Electrochemical Biosensor for Glucoamylase Activity 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 activity. A linear relationship between steady-state current and concentration was found over a range of 44.7~265.2Units/g. Good comparative results were observed between glucoamylase 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

『一麴二酏三造り』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(株)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、我々は²⁾昨年度、電気化学測定法を利用した酵素力価測定法を提案した。本年度は酒造現場においていち早く把握しておきたいグルコアミラーゼ活性に着目し、より高感度化、試料調整の短時間化を行うため検討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は東洋紡績(株)のものを用いた。米麴は県内酒造メーカー9社から分析依頼のあった35試料をそのまま用いた。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

金電極(φ2mm)の表面を、0.2M 硫酸を用いてサイクリックボルタンメトリーを行って研磨し、システアミン、

* 基盤的・先導的技術研究開発事業

** 食品醸造技術部

1%グルタルアルデヒドにより電極表面上にグルコースオキシダーゼを共有結合法により固定化したものを作用極として用いた。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(pH5.0)に0.5%NaClを溶解したものをを用い、電気化学測定はすべてビー・イー・エス(株)製 ALS703B でクロノアンペロメトリーにより測定した。米麴サンプルは国税庁所定分析法の手順で調整したものを対照として、1g 麴をフードプロセッサで2分間粉碎し、酢酸緩衝液で5分間振とう抽出したものを電気化学測定用サンプルとした。市販キットの対照はキッコーマン(株)製糖化力分別定量キットを用いた。

3 結果および考察

3-1 ファラデー電流域の計測

クロノアンペロメトリーは図1に示されるように、外部電圧を電極に印加して電解によって流れる電流を測定する方法である。電極表面上での電子移動反応が十分に速い場合、電極表面での化学反応は拡散律速とみなし、電流 $I(t)$ の時間変化は下式のようなコッレル式に従うことになる。

$$I(t) = \frac{nFACo}{\pi D o t}$$

ここで n 、 F 、 A 、 Co^* 、 Do はそれぞれ、反応電子数、ファラデー定数、電極面積、反応対象物のバルク濃度およびその拡散係数である。つまり、拡散律速に達した測定の場合、電流値の逆数は時間の平方根に比例するようになる。しかし、反応初期には電極表面上の電気二重層形成までの間、バックグラウンドとして非ファラデー電流が計測される。通常、充電電流は数秒で消失するが、本検討では電極表面上に巨大タンパクを固定化していることから、バックグラウンドノイズとして計測されることが予測された。そこで、非ファラデー電流の消失時間をコッレルプロットから計測した。その結果を図2に示す。その結果、測定後20sで充電電流は消失し、概ね25s後には律速となった。このため、以下の電流値の計測は25sの値を用いた。

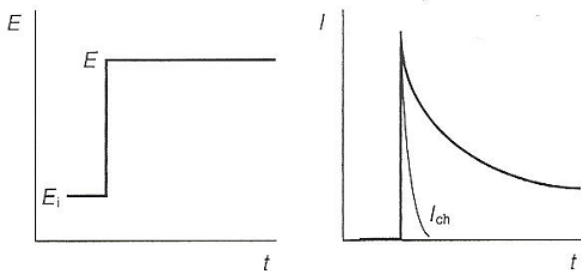


図1 クロノアンペロメトリーの原理

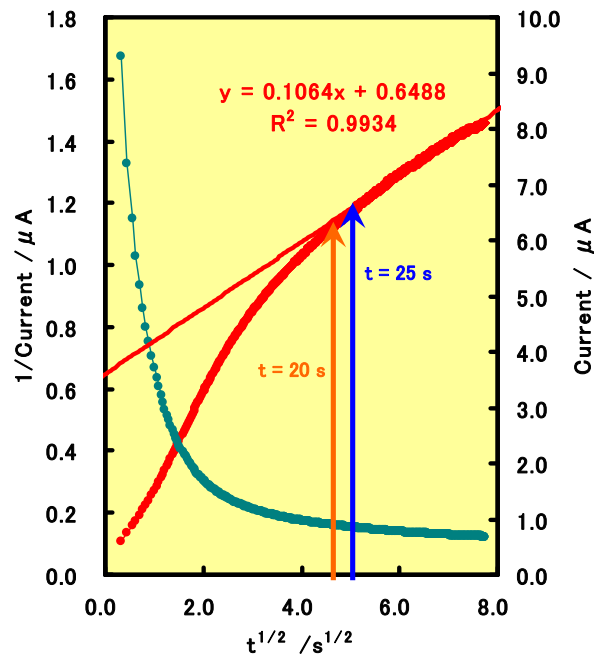


図2 コッレルプロット

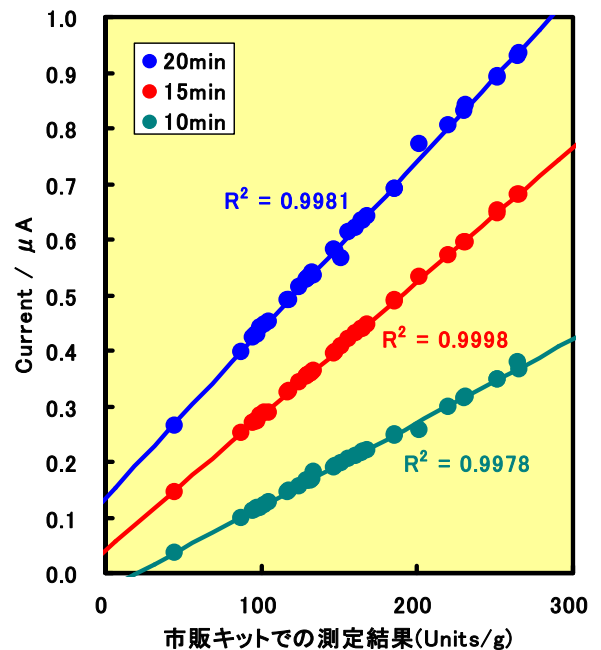


図3 応答値と市販キット結果との関係

3-2 米麴をサンプルとした活性測定

グルコアミラーゼは前報²⁾の通り、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した。県内酒造メーカー9社で作製さ

れた米麴中のグルコアミラーゼの活性を電気化学測定法と市販キットでの結果の関係を表したのが図 3 である。反応時間を 10 分～20 分とすると、応答電流値に差はあるものの、いずれの時間においてもグルコアミラーゼ活性 44.7～265.2Units/g の範囲で良好な相関関係を示した。

3-3 市販バイオセンサを用いた測定

一般に販売されているバイオセンサで最も需要が高いのが血糖値測定用バイオセンサである。各社様々な測定方法があるが、基本的にはグルコースオキシダーゼと血中グルコースとの反応を利用したものである。このことから、麴のグルコアミラーゼ活性測定に応用が可能であるかを検討した。用いたサンプルは市販キットにより 97.6、167.8、185.5Units/g と求められた麴である。市販のバイオセンサとして(株)タニタ製の尿糖計(UG-201)を用いた。また、グルコースの測定は(株)アイアンドティー製全自動糖分析装置(GA05)を用いた。

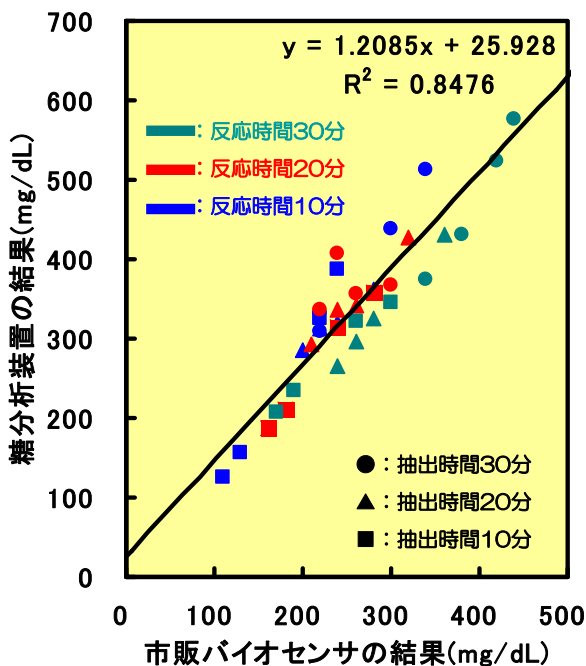


図 4 市販バイオセンサと糖分析装置の
応答値の関係

2%可溶性デンプン溶液 2mL に麴抽出液を 0.1mL 添加し、反応時間 10 分ごとの応答値を測定した結果を図 4 に示す。その結果、市販のバイオセンサの場合、糖分析装置と比較して応答値が低く検出されるものの、抽出時間に関わらず比較的高い相関が得られた。このことから所定分析法に記載の下式から概ねのグルコアミラーゼ活性を求めることが出来る。

酵素活性(Units/g)

$$= (\text{反応前グルコース量}(\text{mg/dL}) - \text{反応後グルコース量}(\text{mg/dL})) \times 60 / \text{反応時間}(\text{分}) \times 2 / 0.1 \times 5 / 100$$

$$= \text{生成グルコース量}(\text{mg/dL}) \times 60 / \text{反応時間}(\text{分})$$

市販のバイオセンサは試料中のグルコース量に応じて分解能が変化する。米麴のグルコース量は概ね 2～4%であるため、本方法で抽出すると、初期グルコース量は 100～200mg/dL 程度となる。本研究で用いたバイオセンサは 200～500mg/dL の範囲で分解能が 20mg/dL となることから反応時間は概ね 30 分程度は必要であると思われる。

4 結 言

電気化学測定法を利用したグルコアミラーゼの簡便・迅速な測定法を検討した。

その結果、作製した酵素電極および市販バイオセンサを用いたいずれの方法でも、市販キットとの相関が確認された。所定分析法での測定の場合、吸光光度計を用いた光学的検出を行うため、試料に着色や濁りなどがあるときには測定値に大きく影響を及ぼす。そのため、試料調整は米麴から酵素を抽出した後、透析やろ過、遠心分離などの作業が求められる。

一方で電気化学測定の場合、酵素反応物を電極上で酸化、還元反応させ、そのときの電子移動量を計測するため試料の濁り、着色の影響がない。このことから、麴から酵素を抽出する際に高速抽出を可能とし、その後の操作もないまま測定が可能である。吸光光度計が無い場合や緊急的な分析などには有効であると思われる。

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) 佐藤稔英、中山繁喜、米倉裕一、平野高広、山口佑子：酵素力価の電気化学的測定の検討，岩手県工業技術センター研究報告，16，113 (2009)