ブルースターチを基質としたアミラーゼ力の簡易 測定 (第1報) 基礎的検討

布川弥太郎・Marco Antonio・MENA MULLERID*

(国税庁醸造試験所)

昭和 47 年 10 月 18 日受理

- 1) 現場で迅速簡便にアミラーゼ力を測定する方法としてブルースターチ法を採用し種々検討を加えた。
- 2) 本法では適当に稀釈した酵素液 5 ml にブルー・スターチ錠剤 1 錠を添加, フラッシュミキサーで十分混和した後, 30°C に 30 分間静置加温し, 0.5 N NaOH 液 1.0 ml を加えて反応をとめ反応液を汙過する。汙液は酵素作用により可溶化した青色色素のため呈色するので, 620 m μ における吸光度を測定する。
- 3) α -アミラーゼ, 糖化型アミラーゼについて検討した結果, 反応時間, 酵素量に対して直線関係が成立した。
- 4) 最適基質濃度は 0.4 g であったが, 0.2 g の濃度でも直線関係が得られた。
- 5) α -アミラーゼの混在系にあっては, ブルー・スターチの可溶化は主として α -アミラーゼにより支配されることが知られた。
- 6) 米麴抽出液についても定量関係が成立し, ブルー・スターチ法による力価は, 常法により測定した α -アミラーゼ力と相関するようであった。

緒 言

清酒醸造において米麴の品質管理は重要であるにも拘らず, 測定法がやや複雑であるためアミラーゼの測定を行なっているところは少なく, 出麴時期などは主として官能的な判定に頼っているのが現状である。併し米麴の具備すべき主要因はアミラーゼ力であり, ややもすればその力価不足のため粕歩合の多いもろみになることがある。特に簡易製麴機の普及などで製麴法に改革がもたらされている今日, 出麴時期の判定, 工程管理などには迅速な力価測定法が要望されるものと考ええる。

戸塚ら¹⁾はこの事を指標として麴をミキサーにかけて短時間に酵素を抽出する方法を提唱しているが, 筆者ら²⁾が設定し, 国税庁所定分析法³⁾に採用されているアミラーゼ測定法自体が, 簡便とはいえ, 現場の見地からみれば尚繁雑の域を脱しない。

RINDERKNECHTら⁴⁾はでん粉に Remazolbrilliant Blue R を共軛させたものを調整, KLEIN ら⁵⁾は Cibachron Blue F 3 GA-amylose を調整, また CESKA ら⁶⁾は上と

同じ色素をでん粉分子に共軛させた後, 1,4-butandiol-glycidether により更に cross-linking させ 3 次元に交叉した不溶性の blue starch を調整してアミラーゼの基質に用いることを報告している。何れの場合もアミラーゼ源としては動物臓臓など医学的対照物を扱っているためこのブルー・スターチは醸造分野では余り知られていなかったが, 本邦においても既に臨床において体液アミラーゼ測定用試薬⁷⁾として「アミラーゼテスト」の名のもとに発売されている。

このアミラーゼテストはブルー・スターチに緩衝剤その他を加えて錠剤としたもので, 測定に当ってはその 1 錠 (0.2 g) を反応液に添加, 均一化するだけでよい。ブルー・スターチ自身は不溶性であるが, アミラーゼの作用を受けると可溶化され青色の溶液となるから, 一定条件で反応後の反応液を遠心分離するか濾過して上清をとりその色度を測ることによってアミラーゼ力の強弱が判定出来るという極めて便利なものである。

このブルー・スターチは米麴のみならず, もろみや生酒, 火入酒中のアミラーゼ力, 更にはすべての醸造物中のアミラーゼ力測定に応用出来得ると考え検討を進めて

* メキシコ交歓留学生

Fig. 1 Effect of substrate concentration

○: 0.5 ml of α -amylase solution (0.001%) was reacted to the substrate for 30 min
 △: 0.3 ml of glucamylase solution (0.05%) was reacted to the substrate for 30 min

Fig. 2 Reaction kinetics

0.5 ml of α -amylase solution (0.005%) was reacted to 0.2 g substrate (○)
 0.3 ml of glucamylase solution (0.05%) was reacted to 0.2 g substrate (△)

いるが、本報では基礎資料を得るための諸実験を行なったので報告する。

実験方法

1. 酵素剤

α -アミラーゼはタカジアスターゼA (三共), 糖化型アミラーゼはグルックS (天野製薬) を用いこれを適当に希釈して使用した。米麴からのアミラーゼ抽出は所定分析法⁹⁾によった。

2. 酵素反応

試験管に蒸溜水 5.0 ml をとり、これに酵素液の適量を加え予め 30°C に加温する。ブルー・スターチを添加後内容をフラッシュミキサーで激しく攪拌して錠剤の崩解分散をはかり以後は攪拌することなく 30°C で所定時間反応させる。

反応終了は 0.5 N NaOH 溶液 1.0 ml を加えフラッシュミキサーで混和して行なう。反応終了後反応混液を

Fig. 3 Effect of enzyme concentration

○: 0.01% α -amylase solution was reacted to 0.7 g substrate for 30 min
 △: 0.05% glucamylase solution was reacted to 0.2 g substrate for 30 min

Fig. 4 Effect of reaction temperature

0.5 ml of 0.005% α -amylase solution was reacted to 0.2 g substrate for 30 min

濾紙で濾過し濾液の呈色を(必要あれば希釈して) 620 mμ の吸光度によって求める。

また米麴酵素液については常法⁹⁾により α -アミラーゼおよび総合糖化力を測定した。

実験結果

1. 基質濃度の影響

0.001% の α -アミラーゼ液 0.5 ml を 30 分作用させた場合および 0.05% のグルックアミラーゼ液 0.3 ml を 30 分作用させた場合の作用曲線は第1図のとおりで、

基質濃度が 0.4~0.5 g/ml のところで極大に達した。併し錠剤 1 錠は 0.2 g であり、かなり高価なものであるため 0.5 g の使用は経済的に無理であろう。

2. 作用時間の影響

0.001% の α -アミラーゼ液 0.5 ml および 0.05% のグルックアミラーゼ液 0.3 ml を 0.2 g の基質に作用させた場合の結果を第2図に示したが、何れも反応時間と直線関係にあることが知られた。

3. 酵素濃度と関係

基質 0.2 g に 0.01% の α -アミラーゼ液を作用させた場合の結果を第3図に示した。O.D. が 1.0 ぐらいまで直線関係が成立した。

4. 反応温度との関係

0.05% α -アミラーゼ液 0.5 ml を 0.2 g の基質に作用させ、20, 25, 30, 35°C で 30 分作用させた場合の結果は第4図のとおりで温度が低ければ反応は弱くなるが、

Fig. 5 Effect of glucamylase on α -amylase activity

In all trials, concentration of α -amylase was 0.01%, 0.1 ml of enzyme mixture was reacted to 0.2 g substrate for 30 min

Fig. 6 Effect of α -amylase on glucamylase activity

0.1 ml of enzyme mixture was reacted to 0.2 g substrate for 30 min
In all cases, concentration of glucamylase was 0.06%

そう大きな違いは見られなかった。25°C と 35°C の間では殆んど違いは見られず、麴室の温度が 2~3°C 上下しても影響は殆んどないと見てよい。

5. α -アミラーゼと糖化型アミラーゼの相互関係

i) α -アミラーゼに対する糖化型アミラーゼの影響

1 ml の 0.1% α -アミラーゼ液に 0.1% グルック・アミラーゼ液を 0 から 8 ml まで加へ、水を加えて 10 ml に fill up した一連の酵素混合液を作り、その 0.1 ml を 0.2 g の基質に 30 分作用させた。従って α -アミラーゼの濃度は 0.01%, グルックアミラーゼの濃度は 0 から 0.08% となる。

結果は第5図に見るとおりで、グルックアミラーゼの存在はさほど影響がないようであった。

ii) 糖化型アミラーゼに対する α -アミラーゼの影響

今度は 12 ml のグルックアミラーゼ液 (0.1%) に α -アミラーゼ液 (0.1%) を 0 から 8 ml まで加え、水を加えて 20 ml に fill up した一連の酵素混液を作り、その 0.1 ml を 30 分作用させた。従ってグルックアミラーゼの濃度は 0.06%, α -アミラーゼの濃度は 0 から 0.04% となる。

結果は第6図のとおりで、 α -アミラーゼの影響が大きく現われていた。即わち α -アミラーゼと糖化型アミラーゼが混在している場合、ブルー・スターチの可溶化にあずかるのは主として α -アミラーゼのようであって、本測定法は主として α -アミラーゼ力を測るものと考えてよさそうであった。

6. 米麴抽出液についての検討

常法³⁾により抽出した米麴酵素液 0.1~0.5 ml を 0.2 g 基質に 30 分作用させた結果は第7図のとおりで、定量関係が成立つことが解った。

次に種々の米麴抽出液についてブルー・スターチ法による力価測定を行ない、これを常法により測定した α -アミラーゼ力、総合糖化力と比較した。結果は第1表に示してあるが、かなりのフレはあるとしてもブルー・スターチ法による力価は常法による α -アミラーゼ力価と相関しているように見受けられた。

考 察

現場的に多少精度は落ちてでも迅速にアミラーゼ力を測定する方法として、ブルー・スターチを基質にする方法を思いついたのであるが、本報で用いたブルー・スターチはでん粉を構成しているグルコース分子の C₆ の位置にトリアジンがところどころにくっついたものである。これが更に三次元的にクロスリンケージした不溶性の高

Fig. 7 Effect of enzyme concentration—Koji extract

○: Extract of Koji H was reacted to 0.2 g substrate for 30 min. Filtrates were diluted 2 times with water before O.D. measurement.
 △: Extract of Koji A, diluted to 5 times was reacted to 0.2 g substrate for 30 min.

分子であるが、これに α -アミラーゼ等が作用して α -1,4結合が切れると、青色色素のついたフラグメントが溶け出して来るという仕組みになっている。市販品は緩衝剤の入った0.2 gの錠剤となっており、測定にあたっては適当にうすめた酵素液にその1錠を添加、よくふりまぜた後、30°Cに20~30分静置加温するだけでよい。

基質が不溶性であるため、反応中は試験管の底に膨潤した基質が沈んでおり、反応は専らその周囲の酵素によって起るものと考えられる。従って反応がうまくいくかどうかと懸念されたが、検討した結果は、酵素量に対しても、反応時間に対しても直線関係が成立した。ただし反応の本質上或程度の実験値のフレはまぬがれず、厳密さを要求する測定にはもう少しきめの細かい工夫が必要であろう。

基質量も本来は0.4 g使用すべきであろうが、試薬が高価なため1錠(0.2 g) 或いはその半分量で測定を行わなければ不経済である。0.2 gの基質量でも直線関係が得られたので、その点は心配なさそうである。

Table 1 Comparison of amylase activities measured by the blue starch method and the conventional method

Koji	Blue starch method* (O.D. 620 m μ)	Conventional method	
		α -amylase activity (D ₃₀ ⁴⁰)	Saccharogenic activity
A	0.270	0.295	60
B	0.391	0.370	103
C	0.350	0.375	120
D	0.370	0.380	120
E	0.275	0.380	156
F	0.445	0.492	178
G	0.457	—	178

* Enzyme solution was diluted 5 times before the reaction
 Reaction time was 30 min at 30°C

ブルースターチに対し糖化型アミラーゼも勿論作用するが、その可溶性には α -アミラーゼの方が遙かに大きく寄与するので、両酵素の混存系では主として α -アミラーゼ力を測定しているものと考えて良い。米麴などでは普通両酵素がほぼ平行して生産されるし、米の溶けには α -アミラーゼが関与する^{2,8)}と考えられるので、このブルー・スターチ法で十分米麴の力価判定を行なうことが出来るであろう。

また反応温度を30°Cにしたのは実用的見地から麴室を利用することを考えたためであるが、30°C前後の温度の高低は余り酵素力価に影響してこない²⁾ので、麴室の温度が多少変わっても工程管理としてのアミラーゼ力測定は行えるものとする。

本報では主としてタカヂアスターゼA、グルックSといった酵素剤による検討結果を述べたが、米麴についてはまだ検討不十分な点もあり、更に詳細な検討を加えた後、次報において迅速アミラーゼ定量法などを報告するつもりである。

終りに貴重な試薬を分与下さいました生化学工業(株)に対して深謝致します。

文 献

- 戸塚 昭, 椎木敏, 塚田定清, 島田豊明, 志垣邦雄: 本誌 60, 893 (1965)
- 布川弥太郎, 西谷尚道, 荒木次夫: 本誌 55, 393(1960)
- 国税庁所定分析法注解 p.183(1967)
- H. RINDERKNECHT, P. WILDING & B. J. HAVERBACH: *Experimentia*, 23, 805(1967)
- B. KLEIN, J. A. FOREMAN & R. L. SEARCY: *Anal. Biochem.*, 31, 412(1969)
- M. CESKA, E. HULTMAN & B. G. A. INGELMAN: *Experimentia*, 25, 555(1969)
- 第一化学薬品(株), アミラーゼ研究会報告集(1970)
- 永谷正治, 水谷行夫, 難波康之祐: 日本醸工大会口演(1972, 11, 16)