散乱光度法による α -アミラーゼ, 酸性 プロテアーゼ活性の簡易測定法

柳内敏靖・佐藤養一・井上佳彦・若井芳則

(黄桜酒造株式会社)

昭和 58 年 6 月 20 日受理

Determination of Enzyme Activity of α -Amylase and Acid Protease Using Light Scattering Method

Toshiyashu YANAGIUCHI, Yoichi SATO, Yoshihiko INOUE and Yoshinori WAKAI
(Kizakura Saké Brewing Co. Ltd., 223, Shioyamachi, Fushimi-ku Kyoto-shi)

緒 言

清酒醸造において、麴の有する各種酵素活性のバランスは、醪に大きな影響を及ぼす^{1,2)}。特に α -アミラーゼ (AAase), 酸性プロテアーゼ (APase) は、発酵および蒸米の溶解を支配しており、その活性を測定することは発酵管理の一端として有効な手段である。AAase, APase 活性は、国税庁所定分析法³⁾により一般に測定が行なわれているが、この方法は操作が煩雑であり、測定に多くの時間をとられる難点がある。

今回、高分子物質の分子量測定に用いられている光散乱現象^{4,5)}に着目し、高分子物質とみなされる基質が麴酵素によって分解され、散乱光が減少することを利用して、酵素活性を測定する方法を検討した。その結果所定分析法と同じ精度で測定し得ることを認めたので報告する。

実 験 方 法

1. 散乱光度計

サーチ社製散乱光度計を使用した。

第 1 図に原理を示した。散乱光を受光部で受け、その光電流を出力値として読んだ。

2. AAase 活性測定用試薬の調製

i) 基質 アミロペクチン (半井化学) 20 g を、Dimethyl sulfoxide に加熱溶解し 100 ml とした。

ii) 緩衝液 0.2 M リン酸緩衝液 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) pH 7.2

使用前に基質とその 10 倍量の緩衝液を混合し、

AAase 活性測定用試薬とした。

3. APase 活性測定用試薬の調製

i) 基質 カゼイン (メルク社) 1 g を、Dimethyl sulfoxide に加熱溶解し 100 ml とした。

ii) 緩衝液 0.15 M Na_2HPO_4 -クエン酸緩衝液 pH 3.0

使用前に基質とその 20 倍量の緩衝液を混合し、APase 活性測定用試薬とした。

4. AAase, APase 活性の測定法

測定用試薬 2 ml をキュベットにとり、20°C に予めインキュベートし検体を AAase の場合 50 μl , APase の場合 200 μl 加え、キュベットを転倒攪拌後、20°C で反応を行ない、90 秒間の散乱光量の減少を出力値として読んだ。

5. 試 料

岩野⁶⁾の方法に準じて、麴 20 g を 0.5% NaCl 溶液 (pH 5.0) 50 ml で抽出後、その 25 ml を蒸留水に対して透析したのち 50 ml に定容し抽出酵素液とした。またクラリン S を抽出酵素液に添加したものも試料として用い

第 1 図 散乱光度計の原理

た。

実験結果及び考察

1. 散乱光度法での AAase の反応系

第2図に AAase 反応中の散乱光量の減衰を示した。90 秒間の散乱光量の測定において，40 U/ml の酵素液の活性測定では直線的に減少がみられたが，110 U/ml，300 U/ml のように，酵素活性が高くなると，減少曲線がわん曲した。

一定時間（90 秒）の散乱光量の減少によって，活性を求めたが，高活性の領域では，希釈操作の必要なことが示唆された。

第2図 AAase 反応中の散乱光量の減少

第3図 各酵素濃度における AAase 活性

第4図 AAase 活性の散乱光度法と所定分析法との相関

第1表 散乱光度法と所定分析法による AAase 活性測定の再現性

項目	散乱光度法	所定分析法
平均	1,566.4 (-ΔmV)	73.9 (U/ml)
範囲	58.0	8
標準偏差	20.86	2.62
変動率(%)	1.3	3.5
測定回数	10	10

2. AAase 活性の測定

140 U/ml の酵素液について，酵素活性と酵素濃度との関係を第3図に示した。所定分析法では酵素活性と酵素濃度とは完全に比例関係にあるが，散乱光度法では，酵素活性の低い領域では，酵素活性と酵素濃度とは比例関係にあるが，高濃度（-ΔmV で 2,000 以上）になると比例関係からずれる。そのため散乱光度法での測定範囲を -ΔmV で 2,000 以下とし，その範囲で所定分析法と散乱光度法との相関を調べ，結果を第4図に示した。ここで，試料は麴の抽出酵素液を段階的に希釈したものを用いた。相関係数 $r=0.9892$ と高度（有意水準 1%）に有意であり，両法が比例関係にあることが認められた。この範囲であれば，散乱光度法は十分測定に適用できると考えられた。

両法の関係は次式により与えられる。

$$Y=19.0 X+157.0, X=0.053 Y-8.26$$

Y：散乱光度法（-ΔmV），X：所定分析法（U/ml）

通常，酒造において使用される麴の AAase 力価は，麴 1g 当り 870～1710 U であることが知られている⁶⁾。岩野らの抽出方法を用いれば，5 倍希釈の抽出酵素液が得られるので，さらに 5 倍程度希釈すれば散乱光度法での測定が可能となる。第1表には，同一の試料につき 10 回繰り返して分析を行った結果を示した。標準偏差，変動率ともに小さく，十分適用できると考えた。

3. 散乱光度法での APase 反応系

第5図に APase 反応中の散乱光量の減衰を示した。

1,300 U/ml の酵素液では直線的な散乱光量の減少がみられた。

AAase 同様 90 秒での散乱光量の減少によって活性を

第5図 APase 反応中の散乱光量の減少

第6図 各酵素濃度における APase 活性

第7図 APase 活性の散乱光度法と所定分析法との相関

第2表 散乱光度法と所定分析法による APase 活性測定の再現性

項目	散乱光度法		所定分析法
	麹 1	麹 2*	麹 1
平均	76.0 (-ΔmV)	257.0 (-ΔmV)	432.1 (U/ml)
範囲	10.0	30.0	38.0
標準偏差	5.16	9.49	12.04
変動率(%)	6.8	3.7	2.8
測定回数	10	10	10

* 麹 2: 麹の酵素抽出液に酵素剤 (クラリン S) を 1mg/ml 添加

もとめた。

4. APase 活性の測定

麹の抽出酵素液にクラリン S を添加したものを試料として、酵素活性と酵素濃度との関係を調べた結果を第6図に示した。所定分析法では Folin 反応の定量範囲が原

因で 1,000 U/ml を越えると比例関係からずれる。しかし散乱光度法では広範囲において比例関係が認められた。

そのため、所定分析法では 1,000 U/ml 以上のものは希釈操作することとし、麹の抽出酵素液及びクラリン S 添加液を試料として、所定分析法と散乱光度法との相関性を調べ第7図に示した。相関係数 $r=0.9734$ と高度 (有意水準 1%) に有意であり、両法が比例関係にあることが認められた。

両法の関係は次式により与えられる。

$$Y=0.11X+26, X=9.09Y-23.6$$

Y: 散乱光度法 (-ΔmV), X: 所定分析法 (U/ml)

通常、酒造において使用される麹の APase 力価は、麹 1g 当り 2,686~4,316 U であることが知られている⁶⁾。岩野らの抽出方法を用いれば、5 倍希釈の抽出酵素液が得られるので、両法とも直接測定することが可能である。第2表には、同一の試料につき 10 回繰り返して分析を行った結果を示した。標準偏差、変動率ともに小さく、十分適用可能である。

以上の実験結果より、本法は AAase, APase 活性の簡易測定法として有効であると考えた。

要 約

散乱光度法を用いた α-アミラーゼ、酸性プロテアーゼ活性の簡易測定法を検討した。試料には麹の抽出酵素液とこれに市販酵素剤を添加したものをを用いた。90 秒で測定が可能であり、得られた活性は国税庁所定分析法による活性と高度に有意な相関があった。

終りに、本稿の御校閲を頂きました大阪国税局鑑定官室長原昌道博士に深謝致します。また、御協力ならびに発表を許可下さいました黄桜酒造(株)松本社長、太田専務、石川生産管理部長、小西醸造部長に、散乱光度計を還配慮いただいたサーチ制御電機に感謝致します。

文 献

- 1) 布川弥太郎, 角谷貞夫: 醸協 73 (7) 567 (1978)
- 2) 布川弥太郎, 角谷貞夫: 醸協 73 (10) 785 (1978)
- 3) 第3回改正国税庁所定分析法注解 (1974)
- 4) P. Doty, R. F. Steiner: *J. Chem. Phys.*, 28 1211 (1950)
- 5) 和田昭允: 蛋白質・核酸・酵素 (生物化学実験法 II) 9 516 (1964)
- 6) 岩野君夫, 布川弥太郎: 醸協 73 (7) 555 (1978)