J. Brew. Soc. Japan.
Vol. 82, No. 10, p. 709~711 (1987)

清酒醸造用糖化酵素剤の α -アミラーゼ 力価測定法

吉田 清・稲橋正明・村上英也
(（財）日本醸造協会)

昭和 61 年 12 月 11 日受理

The Assay Method for α -Amylase activity in saccharifying enzymes

Kiyoshi YOSHIDA, masaaki INAHASHI
and Hideya MURAKAMI

(Brewing Society of Japan, 2-6-30
Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

The determination of α -amylase activity of saccharifying enzyme preparations on the market was investigated.

Even if the origin of starch as substrate, and saccharifying enzyme preparations were different, the what formula gave good approximations with the value of the official method of Tax Agency, Japan.

Key words: 清酒・ α -アミラーゼ・力価測定

緒 言

米麴及び醸造用糖化酵素剤の α -アミラーゼ力価測定方法について、国税庁所定分析法¹⁾では基質デンプンの 1% 溶液の酵素反応前のヨウ素呈色度 $T_{0\%}^{40}$ の値 ($T_0\%$) が 18~20% の範囲でなければならないと規定されている。しかしながら、最近ではこの範囲内にあるデンプンの入手が極めて困難であるため、同一米麴や酵素剤の力価を測定しても用いるデンプンによって、力価に著しい違いが生じることが多く、その解決策が望まれていた。そこで椎木ら²⁾は清酒用米麴の α -アミラーゼ力の測定について $T_0\%$ の違いによる測定値のバラツキが少なく、しかも現行の所定法の測定値に近似する簡便な方法（以下「換算法」と略す）を提唱した。そこで種々の起原からなり、又米麴に比べ単位重量当りの酵素活性が高い市販醸造用糖化酵素剤の α -アミラーゼ力価測定にこの換算法を適用できるか否かを検討した。

実 験 方 法

1. 基質デンプン

第 1 表に示したようなメルク社製のロットの異なる可

溶性デンプン 5 種類を用いた。

2. 供試糖化酵素剤の種類

第 3 表に示したような *Rhizopus* 起原 3 点（供試酵素剤 No. 1~3）、*Rhizopus* 起原と *Aspergillus oryzae* 起原の混合酵素 4 点（供試酵素剤 No. 4~7）、*Rhizopus* と *Bacillus subtilis* 起原の混合酵素 2 点（供試酵素剤 No. 8~9）、*A. oryzae* と *Endomyces* 起原の混合酵素 1 点（供試酵素剤 No. 10）、*Rhizopus* と *B. subtilis* 及び *A. oryzae* の 3 起原の混合酵素 1 点（供試酵素剤 No. 11）、*B. subtilis* 起原 1 点（供試酵素剤 No. 12）の 4 起原 6 種類計 12 点の市販醸造用糖化酵素剤を試料とした。

3. α -アミラーゼ力価の測定法

国税庁所定分析法¹⁾の方法（以下所定法と呼ぶ）に準じて測定した。すなわち、 $T_0\%$ が 11.5, 15.9, 20.0, 27.7, 29.5% のメルク社製デンプンを用いて、上記の市販醸造用糖化酵素剤 12 点の力価を求めた。又 $T_0\%$ が 20% の基質デンプンを用いた力価を標準力価とした。次に同じ測定値を用いて（2）式の換算式を用いる椎木らの方法²⁾によって力価を求め、 $T_0\%$ の異なる各々の基質デンプンを用いた時の力価と比較した。なお、所定法では酵素反応前の $T_0\%$ が 18~20% のデンプン溶液を用いて、反応液の透過率 $T\%$ が 66 に相当する反応時間 t 分を求め（1）式を使っている。

$$D_{30'}^{40} = \frac{600}{t} \quad (1)$$

一方、椎木ら²⁾の力価算出法では

$$D_{30'}^{40} = \frac{T_t - T_0}{t} \times 12.75 \quad (2)$$

ここで T_t : t 分間反応した時の透過率 $T\%$, T_0 : 酵素反応前の $T\%$, 12.75: 換算係数

実験結果及び考察

第 1 表には、本試験に供したメルク社製市販デンプンのロット毎の $T_0\%$ を示した。市販デンプンの $T_0\%$ がロットによって異なり、その結果 α -アミラーゼ力価の測定値に大きなバラツキが生じることにはすでに知られている。著者ら³⁾はデンプンのアミロース含量が 20% になるように、標準アミロースを添加して α -アミラーゼ

第 1 表 ロットの異なる基質デンプンの $T_0\%$

供試デンプン No. 1)	Lot. No.	$T_0\%$ 2)
1	3656336	11.5
2	5272172	15.9
3	7021223	20.0
4	6372057	27.7
5	3630674	29.5

1) メルク社製デンプン

2) $T_0\%$ は酵素反応前の基質デンプンの透過率を示す。

力価を測定する方法を提唱したが、これはアミロースの溶解、調製等に手間を要する難点があった。椎木²⁾は所定法の分析操作を何ら変えることなく換算式を用いることにより $T_0\%$ が 10~30 の範囲のデンプンで、酵素反応液の透過率 ($T\%$) が 40~75% の範囲であればバラツキの少ない方法を発表した。この方法は *A. oryzae* を起原とする清酒用米麴の酵素反応時間と反応液の透過率 ($T\%$) が比例関係にあり、一定の直線性を示すものと仮定している。清酒用市販糖化酵素剤は、製造メーカーにより酵素剤の起原が異なり、難波⁴⁾はヨード反応が酵素の起原により異なり、標準曲線が変わってくると報告している。したがって米麴について換算式を用いた椎木²⁾の方法が市販醸造用糖化酵素剤に採用可能か否かを調べる必要があり、以下の検討を行った。

第2表には供試酵母 No. 1 について、 T_0 が異なる3種類のデンプンについてそれぞれの反応時間毎の酵素反応液の透過率 ($T\%$) と、所定法及び換算法によって求めた力価の一例を示した。標準力価である 78,600 U/g に対し、所定法では T_0 が 15.9% のデンプンで 71,800 U/g, 27.7% のデンプンで 91,100 U/g で、それぞれの誤差は 8.7%, 15.8% であったが、換算法で求めるとそれぞれ 76,600 U/g, 74,100 U/g であり、誤差はそれぞれ 2.5%, 5.7% となり標準力価との差は非常に

第2表 デンプンの $T_0\%$ が異なる各反応時間毎の酵素反応液の $T\%$ と換算後の力価 (供試酵素剤 No. 1 の場合)

デンプンの 百分値 ($T_0\%$)	酵素反応時 間 (分)	酵素反応液の $T\%$	所定法で求め た力価(U/g)	換算後の力価 (U/g)
15.5	6	52.5	71,800	77,800
	8	64.0		76,700
	10	75.0		75,400
	12	83.1		71,400
	14	88.3		65,900
			$T\%$ が 40~75 の平均力価	76,600
		標準力価との差	8.7%	2.5%
20.0	6	56.5	78,600	77,600
	8	68.1		76,700
	10	79.9		76,400
	12	85.5		69,600
	14	90.2		63,900
			$T\%$ が 40~75 の平均力価	77,200
		標準力価との差	—	1.8%
27.7	6	62.7	91,100	74,400
	8	74.0		73,800
	10	82.9		70,400
	12	88.9		65,000
	14	93.0		59,500
			$T\%$ が 40~75 の平均力価	74,100
		標準力価との差	15.8	5.7%

$T_0\%$: 酵素反応前の基質デンプンの透過率

小さくなった。なお、換算法では椎木²⁾の方法にしたがい酵素反応液の $T\%$ が 40~75% の範囲の測定値を用いている。

第3表に種々の起原より製造した 12 点の酵素剤につ

第3表 $T_0\%$ の異なる基質デンプンと起原別市販醸造用糖化酵素剤の α -アミラーゼ力価との関係 (その1)

供試 酵素剤 No.	起 源	基質デンプン T ₀ %			標準力価に対する誤差 (%)			
		A. 15.9	B. 20.0	C. 27.7				
1	Rhizopus	① 76,600	77,200	74,100	2.5	1.8	5.9	
		② 71,800	78,600	91,100	8.7		13.7	
		③ 76,600	78,400	74,400	2.5	0.3	5.3	
2		① 46,000	48,200	45,800	3.8	0.8	4.2	
		② 43,600	47,800	55,300	8.8		15.7	
		③ 47,500	48,800	46,200	0.6	2.1	3.3	
3		① 45,600	44,100	41,000	1.3	2.0	8.9	
		② 40,600	45,000	52,000	9.8		15.6	
		③ 45,900	45,000	42,900	2.0	0	4.7	
4		① 373,200	367,500	364,400	4.4	5.8	6.7	
		② 360,000	390,200	448,800	7.7		15.0	
		③ 386,300	381,100	367,200	1.0	2.3	5.9	
5	Rhizopus Aspergillus oryzae	① 367,800	377,300	376,800	0.1	2.7	2.6	
		② 352,900	367,300	456,400	3.9		24.3	
		③ 389,800	382,500	392,700	6.1	4.1	6.8	
6		① 68,100	68,300	64,900	2.1	2.4	2.7	
		② 64,300	66,700	76,200	3.6		14.2	
		③ 70,400	69,700	64,500	5.5	4.5	3.3	
7		① 119,200	116,400	108,700	2.1	0.3	6.9	
		② 107,900	116,700	128,600	7.5		10.2	
		③ 117,300	116,900	108,900	0.5	0.2	6.7	
8	Rhizopus Bacillus subtillis	① 182,800	185,400	204,000	8.0	6.7	2.7	
		② 161,000	198,700	248,900	19.0		25.3	
		③ 190,800	199,300	210,000	4.0	0.3	5.9	
9		① 84,400	80,900	88,400	1.5	5.6	3.2	
		② 75,900	85,700	105,400	11.4		23.0	
		③ 91,300	83,600	88,800	6.5	2.5	3.6	
10		Aspergillus oryzae Endomycetes	① 86,600	83,000	81,000	3.2	7.3	9.5
			② 82,200	89,500	97,400	8.2		8.8
			③ 87,800	87,300	82,400	1.9	2.5	7.9
11	Rhizopus Bacillus subtillis Aspergillus oryzae	① 63,900	68,300	75,600	7.9	1.6	8.9	
		② 60,100	69,400	90,700	13.4		30.7	
		③ 65,400	69,800	74,600	5.8	0.6	7.5	
12	Bacillus subtillis	① 97,700	98,800	102,400	6.8	5.7	2.3	
		② 90,100	104,800	124,300	14.0		18.6	
		③ 99,900	104,700	105,400	4.7	0.1	0.6	
					3.6	3.6	5.4	
単位: U/g					平均値	9.7	17.9	
						3.4	1.6	5.1

$T_0\%$: 酵素反応前の基質デンプンの透過率

基質デンプン A, B, C における力価測定値の上段①の値は換算法で求めた平均値。

中段②の値は所定法による測定値。下段③の値は反応液の透過率 $T_0\%$ が 66 に最も近い数値を換算法で求めた値。

標準力価との誤差: 所定法の $T_0\%$ が 18~20 ときの基質デンプンに該当する B の②の測定値に対しての誤差。

太字は標準力価

いて $T_0\%$ の異なる 3 種のデンプンを用いた時の α -アミラーゼ力価測定値と所定法により求めた標準力価との比較を示した。上段④の値は椎木ら²⁾の換算式を用いて求めた力価の平均値であり、中段⑤の値は現行の所定法により求めた力価である。下段⑥は酵素反応液の透過率 ($T\%$) が 66 に最も近い測定値を換算式で求めた値である。その結果、 T_0 が 27.7% のデンプンを用いて所定法で求めた場合、供試酵素剤 No. 11 のように表中太字で標準力価に比べ 30.7% 高い値もあり、 $T_0\%$ の異なるデンプン A, C での全供試酵素剤の平均誤差はそれぞれ 9.7% 及び 17.9% であった。それに対し、換算法では供試酵素剤 No. 5 のように T_0 が 15.9% 及び 27.7% のときの標準力価に対する誤差は 0.1% 及び 2.6% と非常に小さく、又全供試酵素剤の平均誤差もそれぞれ 3.6% 及び 5.4% に縮小した。又 $T\%$ が 66 に最も近い測定値を用いると更に誤差は縮小し、3.4% 及び 5.1% となり標準力価に最も近い値となった。

第 4 表では更に T_0 の低いデンプン及び逆に高いデンプンを用いて、3 種の酵素剤について検討した結果を示した。所定法で測定した場合 T_0 の差が大きいため、測定値のバラツキが第 3 表より一層大きくなり、標準力価に比べその誤差は 23.9~37.9% であるのに対し、換算法では基質デンプンの T_0 が 11.5, 20.0, 29.5% における平均誤差はそれぞれ 3.6, 1.1, 9.1% となり、表中太字で示した標準力価に対し誤差は非常に小さくなった。以上のように換算式を用いた α -アミラーゼ力価測定法は、基質デンプンの $T_0\%$ や酵素剤の起原が異なっても

第 4 表 $T_0\%$ の異なる基質デンプンと起原別市販醸造用糖化酵素剤の α -アミラーゼ力価との関係 (その 2)

供試 酵素剤 No.	基 質 デ ン プ ン $T_0\%$			標準力価との誤差 (%)		
	A. 11.5	B. 20.0	C. 29.5			
8	④ 180,300	199,300	215,300	9.2	0.3	8.3
	⑤ 148,000	198,700	261,500	25.5		33.1
10	④ 88,200	87,300	81,100	1.5	5.2	9.4
	⑤ 77,500	89,500	106,000	13.4		18.4
11	④ 64,900	69,800	76,000	0	0.6	9.5
	⑥ 46,700	69,400	112,500	32.7		62.1
単位: U/g				3.6	1.1	9.1
平 均 値				23.9		37.9

上段④の数値は換算法で求めた力価測定値

下段⑤の数値は所定法に従って求めた力価測定値

太字は標準力価

力価測定値に大きなバラツキがなく、しかも現行の所定法に近似する値が得られた。

終りに終始御指導頂いた国税庁醸造試験所、椎木敏室長に深謝致します。

文 献

- 1) 村上英也監修；第三回改正国税庁所定分析法注解、日本醸造協会、(1974)
- 2) 梅木 敏，三上重明，植木俊博，島田豊明；醸協，80，(12) 879 (1985)
- 3) 吉田 清，服部裕子，村上英也；醸協，76，(12) 856 (1981)
- 4) 難波康之祐，水谷行夫；醸協，69，(9) 606 (1974)