報 文

醤油中グルコースの自動定量法の改良とその
醸造解析への応用

神戸千幸*・牛島重臣*・内田金治*

An Improved Automated Method for the Measurement of D-Glucose
in Soy Sauce and Its Application to the Fermentation Control

Chiuyuki KANBE*, Shigeomi USHIJIMA* and Kinji UCHIDA*

* Central Research Laboratories, Kikkoman Corporation, Noda-shi, Chiba-ken, 278

An improved enzymatic method using 4-aminoantipyrine and *p*-hydroxybenzoic acid for the determination of D-glucose in soy sauce is described. The reagent 4-aminoantipyrine is not carcinogenic unlike the reagent *o*-dianisidine formerly used. In the procedure, D-glucose is oxidized by glucose oxidase to D-gluconic acid with the simultaneous production of hydrogen peroxide, which oxidatively couples with 4-aminoantipyrine and *p*-hydroxybenzoic acid in the presence of peroxidase to yield a quinoneimine dye with maximum absorption at 500 nm. The method requires no specific pretreatment of samples other than simple dilution. The calibration curve is linear to 100 mg/dl. Many substances that may be encountered in soy sauce do not interfere the quantitative reaction. An efficient automatic assay method was established by the use of this procedure with a new discrete-type auto-analyzer. In addition, the behavior of various neutral sugars in the soy sauce brewing process was traced using by ion-exchange liquid chromatography. A distinct decrease of glucose appeared at the same time when brewing microorganisms (*Pediococcus halophilus*, *Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis*) grew actively, though the changes of the other sugars were not so prominent. These results suggest that the determination of glucose, not of reducing sugars, has a more practical meaning in the control of fermentation during the process of soy sauce brewing.

(Received Mar. 27, 1981)

醤油中のグルコースは、主要呈味成分の一つとして重要であるばかりでなく、それを定量することは醤油醸造工程における乳酸菌、酵母などの微生物活動を間接的に知る上からも必要である。従来、醤油中の糖類の定量¹⁾には、アルデヒド基およびケト基の還元力を利用した BERTRAND 法²⁾、SOMOGI-NELSON 法³⁾ が用いられてきた。しかし、これらの方法は、定量に要する操作が繁雑で、測定に手間と時間がかかるばかりでなく、醤油中に含まれる糖類以外の還元物質の影響を受け易いなど難点が多い。そこで、その定量の能率化をはかるために、テクニ

コンオートアナライザーを用いる方法⁴⁾ も報告されている。

一方、著者らはグルコースオキシダーゼ (glucose oxidase, 以下 GOD と略記) とパーオキシダーゼ (peroxidase, 以下 POD と略記) を用いる醤油中グルコースの迅速定量法⁵⁾ を既に報告したが、最近、発色試薬オルソジアニジンの安全性が問題⁶⁾ となっている。そこで、これに代るより安全性の高いものとして、4-アミノアンチピリンとフェノール類との混合試薬を用いる発色系⁷⁾⁸⁾ を採用し、新たに開発されたディスクリット

* キッコーマン(株)中央研究所 (〒278 千葉県野田市野田 399)

式自動分析機を使用して、醤油中 D-グルコースの迅速自動測定を試みたところ良い結果を得た。また、醤油中の各種中性糖を全自動糖分析機を用いるイオン交換クロマト法により分離定量し、各糖の熟成期間中における挙動を追跡して、醸造過程におけるグルコース測定の意義についても検討を加えたので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

各種醤油は市販品を用い、諸味液汁については、濃口醤油の仕込経過を追って採取した。各試料は蒸留水で適宜希釈した。

2. 酵素法によるグルコースの自動定量

(1) 使用機種および試薬

- (i) ディスクリート式自動分析機：盛進製薬製ディスクリートアナライザー-S-120
- (ii) 比色計：島津ダブルビーム分光光度計 UV-200 S
- (iii) プリンター：パントスデジタルプリンター DP-60 D

GOD (Grade III, Cat. No. 105180, カビ由来), POD (Grade II, Cat. No. 128066, 西洋ワサビ由来) は、ベーリンガー・マンハイム山之内(株)より購入した。4-アミノアンチピリン、パラオキシ安息香酸ナトリウムおよび D-グルコースは東京化成工業(株)製、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムは和光純薬(株)製で、いずれも特級試薬を用いた。

(2) 操作条件

比色反応は TRINDER⁷⁾ の方法を用いた。試薬は以下のごとく調製した。

(i) 緩衝液：リン酸一ナトリウム 2 水塩 7.27g, リン酸二ナトリウム 12 水塩 27.77g, パラオキシ安息香酸ナトリウム 3.49g, 4-アミノアンチピリン 102mg, GOD 320mg, POD 50mg を 1000ml の脱イオン水に溶かし、pH 7.0 に調整した。

(ii) グルコース標準液：特級 D-グルコースを水で、0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml になるように希釈してスタンダードカーブ作成用に用いた。

自動分析は Fig. 1 に概略を示したような条件で行なった。通常 25~50 倍に蒸留水で希釈した醤油試料溶液 1.0ml を専用のサンプルカップに入れ、ディスクリートアナライザーのコンベヤーシステム上に並べた。サンプルカップ中の試料液 0.1ml と酵素入緩衝液 3.0ml とを自動サンプリングユニットにより、容量約 5ml の専

Fig. 1 Procedure of automated measurement of D-Glucose

- 1. 0.1 ml of diluted soy sauce from sample cup.
- 2. 3.0 ml of 0.12M phosphate buffer solution containing GOD and POD (pH 7.0).

用反応試験管に注入し、自動攪拌器で攪拌した。20 分間、37°C で反応させた後、サンプルトランスファーユニットにより減圧で反応液を比色計のフローセルに導入し、キノネミン色素生成による 500 nm の吸光度の増大を測定した。フローセルは光路長 5 mm のものを用いた。

醤油試料中のグルコース含量を求めるには、まず標準グルコースの測定値をプロットして検量線 (Fig. 2) を作成し、希釈試料の O.D. 測定値からグルコース量を求め、希釈率を乗じて算出した。醤油試料の分析に際しても、試料自体の 500 nm における吸収に基づくブランク値は、測定値に対する割合がきわめて小さく、補正する必要はほとんど認めなかった。この結果、本法においては、特に濃色の試料でない限り各試料毎のブランクを置く必要はなく大変能率的であった。

3. 液クロ法による中性糖の分析

(1) 使用機種および試薬

- i) 液体クロマトグラフィー：盛進製薬製全自動糖分

Fig. 2 Standard curve for D-Glucose in the automated measurement system

析機 S-550 (オートサンプラー付)

分離用樹脂: 三菱化成製強塩基性陰イオン交換樹脂
CA-06 S, (0.3φ×18 cm)

試料量: 80 μl

溶離液: ① 0.13M H₃BO₃ pH 7.0, ② 0.27M H₃BO₃
pH 9.1, ③ 0.35M H₃BO₃ pH 9.6

カラム温度: 60°C

検出温度: 120°C

検出方法: オルシン硫酸方式 (波長 425 nm)

流速: 分離用ポンプ 0.15 ml/min, 発色用ポンプ
0.55 ml/min

ii) 記録計: 日本電子科学製ユニコーダー U-225M

ホウ酸は和光純薬(株)製, オルシンはメルク社製でいずれも特級試薬を用いた。

結果と考察

1. 改良法の定量性の確認

グルコース定量の検量線 (Fig. 2) から明らかなように, 実験方法 2 の条件でグルコース量 1.0 mg/ml の範囲まで直線性が認められ, またその勾配は測定をくり返しても再現性が良好であった。

次いで, 従来法⁹⁾でグルコースを定量した醤油について本法での定量を行ない, その相関を調べた。Fig. 3 に相関図を示したが, 相関係数は 0.998 ($n=40$) で極めて高く, 本法が従来法の代りに使用できることがわかった。

また, 1.57 g/dl のグルコースを含む醤油 100 ml にグルコースを 0.5~2.0 g 添加し, その回収率を求めた

Fig. 3 Correlation between the amounts of D-Glucose in soy sauce measured by the improved 4-aminoantipyrin method and those by the ordinary o-dianisidine method

Fig. 4 Recovery of added D-Glucose from soy sauce

ところ, Fig. 4 に示したように回収率は 100.5% であり, この点からも定量性の良いことが示された。同一の醤油を繰り返し分析した時の再現性は変動係数 $cv=0.37\%$ と良好であった。このように誤差が少ない原因としては, ① 本法で設定した酵素反応条件がエンドポイントアッセイであること, ② 反応によって生成した色素の安定性が比較的高いこと, ③ 自動分析機を使用しているため, 温度, 時間, 試料採取量などの諸条件が非常に正確にコントロールされていること, 等が考えられる。

Fig. 5 には本法で使用する酵素反応のタイムコースを示した。反応は 20 分を過ぎると定常状態になるので, 実験方法 2. に記載したように反応時間は 20 分と定めた。

Table 1 は上記条件下で酵素反応と発色反応を行なわせた反応液を室温に放置した時の吸光度の変化を調べた

Fig. 5 Time course of enzyme reaction in D-Glucose determination

Glucose concentration was 0.8 mg/ml. Procedure of the assay system was the same as in Fig. 1.

Table 1 Decrease of optical density of quino-
neimine dye at room temperature

Time*	O.D. at 500 nm	Average of O.D.	Ratio
0 min	665,670	668	100**
15	669,670	670	100
30	661,658	660	98.8
45	651,651	651	97.5
60	653,655	654	97.9

* Time elapsed after the end of the reaction.

** Ratio of discoloration when O.D. at 0 min was shown as 100%.

ものである。この結果、反応によって生成した色素は時間経過に伴ない徐々に退色する傾向がみられたものの、反応後1時間以内ならば最大2.5%までの低下にとどまっていた。Fig. 5 および Table 1 の結果より、自動分析機を用いない手操作でグルコースの定量を行う場合には、37°C で20分以上の酵素反応を行なわせた後、1時間以内に吸光度を測定することが望ましいと思われる。

また、仕込初期の諸味生液汁には、著量のデンプンが含まれているが、本法に用いる GOD 標品にアミラーゼ、マルターゼなどの加水分解酵素が共存していると、デンプンのグルコースへの分解が同時に進行し、その結果、実際のグルコース値よりも高い値を与える可能性が考えられる。そこで、可溶性デンプン(メルク社製)を一昼夜透析して得た精製デンプンについて上記酵素反応を試みた。その結果、本法で用いた GOD にはアミラーゼ、マルターゼ等の共存活性はほとんどなく、デンプンのグルコースへの分解は事実上起きていないことがわかった。しかし、仕込初期の醤油諸味の液汁中には、醤油麹菌由来のグルコアミラーゼが存在することが当然考えられる。本法では、醤油試料は最終的に1,500倍程度に希釈されるため影響は少ないと思われるが、デンプンを多く含む試料の測定においては測定前に試料を熟あるいは酸処理して、試料中の多糖分解酵素群を失活させることも適宜必要と考えられる。さらに、反応中にカタラーゼが含まれていると、カタラーゼによる過酸化水素の分解が起こり、色素の生成を減じて呈色反応の直線性に影響することが予想されるが、生醤油においても市販醤油と同様に回収率が100%に近いこと、醤油試料は最終的に1,500倍程度に希釈されることなどにより、カタラーゼによる定量の妨害はなかったものと考えられる。

通常の分析においては、1試料あたり2回の測定を行ない、60試料/hrの醤油中グルコースの迅速定量が可能であった。

2. 仕込経過に伴う各糖の消長

次いで、ホウ酸バッファーを溶出液に用いるイオン交換クロマト法^{9)~11)}により醤油中の中性糖を分離定量し、仕込経過に伴う各糖の消長を追跡した。その代表的なクロマトグラムを Fig. 6 に示した。醤油中の中性糖は岡本¹²⁾らも報告しているように、グルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、マンノースが代表的なものであった。これらの糖の仕込経過に伴う変化を Fig. 7 に示した。図から明らかなように、いずれの単糖も仕込直後はまだ麹から液汁への溶出が十分でなく低い値を示しているが、その後、麹菌由来の各種糖質分解酵

Fig. 6 Typical chromatogram of neutral sugars in raw soy sauce by ion-exchange chromatography

Fig. 7 Changes of glucose, galactose, arabinose and xylose during fermenting of soy sauce mashes

Samples were collected successively from the same tank.

素群の働きにより溶出が加速され、仕込後 30 日目あたりに最大値を示した。仕込全期間を通じてみると、グルコースの変化が最も大きく、仕込直後は 28 mg/ml 程度であったものが 1 カ月後には 83 mg/ml まで増加した。この時点においては乳酸やアルコールの生成量はわずかなことより、上記の糖量は諸味中における原料持ち込みの糖量と考えてほぼ差しつかえないものと思われる。その後、30 日目から 100 日目にかけてグルコースは約 70 mg/ml 減少したが、特に 70 日目までの減少割合が大であった。100 日目以降は汲み出しまで大きな変化はなく、ほぼ一定の水準で推移した。一方、アラビノース、キシロースは 30 日目ですれぞれ 4.6, 3.0 mg/ml であったものが、100 日目になると 2.3, 1.2 mg/ml となり、グルコースが減少する時期と同時期に減少した。消費された絶対量ではアラビノース、キシロースとも約 2 mg/ml 程度で、グルコースに比べると 1/30 以下の量であった。また、ガラクトースはグルコースに次いで諸味中に多く含まれている糖であるが、Fig. 7 から明らかなように全仕込期間を通じてほとんど変化することなく推移した。このことは、今回の実験に供した諸味中の醤油乳酸菌および醤油酵母が、ガラクトースをほとんど代謝しなかったことを示唆している。

Fig. 8 には仕込経過中におけるグルコースの変化を乳酸、アルコール、pH の変化と対応させて示した。図から明らかなようにグルコースの減少時期と乳酸、アルコールの生成時期はほぼ一致しており、30~70 日にかけてみられたグルコースの急激な減少は諸味中の各種乳酸菌、酵母によってグルコースが消費され乳酸、アルコールなどが生成されたことを示している。

このように、醤油中のグルコースを定量することは、単に一呈味成分としてのグルコースの多少以外に、醤油諸味中で活躍する主要微生物の動態を知る上でも、極めて有効な手段の一つである。しかも、酵素を用いる分析法の最大の利点はその特異性が高いことにあり、したがって醤油のような複雑な混合成分系では酵素を用いる分析法が非常に有利である。一方、醤油の色についての研究も近年活発に行なわれており、色生成のメカニズムの主要反応として、糖とアミノ酸あるいはアミン類によるアミノカルボニル反応がよく知られているが、醤油中の単糖で量的に最も多いグルコースの褐変に及ぼす役割りは極めて大きいことも容易に考えられる。

以上のように、醤油中のグルコースを迅速、簡便かつ正確に定量することは醤油醸造において非常に意義あることと思われる。

Fig. 8 Relations between the production of lactic acid and alcohol and the consumption of glucose during fermenting of soy sauce mash

Samples were the same as in Fig. 7.

要 約

4-アミノアンチピリンを発色剤に用いた酵素法と自動分析機の組合せにより、醤油中 D-グルコースを迅速、正確に測定することができた。試料の前処理は必要なく、検量線は 100 mg/dl まで直線性が認められた。また、醤油醸造過程における各種中性糖の消長を追跡し、微生物管理および品質管理の面からグルコースを測定することの重要性を指摘した。

終りにのぞみ、御指導、御鞭撻を賜りました当研究所、井口信義所長、吉田文彦副所長、水沼武二博士に深謝致します。また、有益な御助言をいただきました盛進製菓(株)、小沢善徳博士に感謝致します。

文 献

- 1) 日本醤油技術会編：基準しょうゆ分析法，p. 10 (1966).
- 2) 京都大学農芸化学教室編：農芸化学実験書，p. 525 (1969).
- 3) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952).
- 4) 豊田雅美・矢崎英行：日本醤油研究所雑誌，1, 137 (1975).
- 5) 神戸千幸・小沢善徳・安田 敦・逆井利夫：調味科学，21, 27 (1974).

- 6) KINOSHITA, T., HIRAGA, Y., NAKAMURA, N., KITAJO, A., and IINUMA, F.: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 568 (1979).
- 7) TRINDER, P.: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 8) KABASAKALIAN, P., KALLINEY, S. and WESTCOTT, A.: *Clin. Chem.*, **20**, 470 (1974).
- 9) KESLER, R.B.: *Anal. Chem.*, **39**, 1416 (1967).
- 10) LEE, Y.C., MCKELVY, J.F. and LANG, D.: *Anal. Biochem.*, **27**, 567 (1969).
- 11) KENNEDY, J.F. and FOX, J.E.: *Carbohydr. Res.*, **54**, 13 (1977).
- 12) 岡本 武・竹上伊津子：調味科学 **18**, 342 (1971).
(昭和56年3月27日受理)

新 刊 紹 介

Nutrition and Food Science

Vol. 1 Food and Nutrition Policies and Programs

Vol. 2 Nutrition and Food Science and Technology

Vol. 3 Nutritional Biochemistry and Pathology

Walter SANTOS, Nabuco LOPES, J.J. BARBOSA,
Dagoberto CHAVES and José Carlos VALANTE 編

1978年8月にブラジルリオデジャネイロで開催された第11回国際栄養学会議 (XI ICN) のプロシーディングである。会議のシンポジウムのフルテキストが全て図表と参考文献とともに収録されている。従って全3巻とかなり大部となっている。この会議はブラジルで開催されたことから、発展途上国における栄養問題を中心テーマとして取り上げており、栄養知識の教育、政策にかなりの部分がさかされている。各巻の内容は次のとおりである。

Vol. 1—Food and nutrition policies and programs

- Planning and implementation of National Programs
- The role of International and Non-governmental Agencies
- The role of the Private Sector

—Program Evaluation and Nutritional Surveillance

—Nutrition Intervention Programs for Rural and Urban Areas

—Mass Feeding Programs

—Consumer Protection Programs

Vol. 2—Nutrition education and food science and technology

—Animal and Vegetable Resources For Human Feeding

—Food Science and Technology

—Research in Food and Nutrition

—Nutrition Education

Vol. 3—Biochemical and pathological nutrition

—Nutritional Biochemistry

—Pathological and Chemical Nutrition

—Nutrition, Growth and Human Development

A 5 版 Vol. 1, 808 頁, Vol. 2, 950 頁, Vol. 3, 815 頁

Plenum Press, New York, 227 West 17th Street, New York, N.Y. 10011, U.S.A.

Vol. 1, 75.00 ドル, Vol. 2, 79.50 ドル, Vol. 3, 69.50 ドル (米国外では 20% 高)