

## 111 固体こうじ

### 111-1 試料の採取

102-1 により、約 100 g を試料とする。

### 111-2 性 状

色相、破精込みの状態、香味、乾湿の程度等並びにスベリこうじ等の異常現象を調べる。

### 111-3 水 分

#### A) 減圧乾燥法

検体約 10 g をあらかじめひょう量したフタ付きひょう量器に精ひょうし、70～75℃で 6.7 kPa を超えない圧力の下で 1 時間真空乾燥する。デシケーター中で放冷後精ひょうし、次式によって水分を求める。

$$\text{水分 \% (w/w)} = (a-b)/a \times 100$$

ただし、a は乾燥前の検体重量、b は乾燥後の検体重量である。

#### B) 加熱乾燥法

検体約 10 g をあらかじめひょう量したアルミ製のフタ付きひょう量器に精ひょうし、105℃で 5 時間乾燥する。デシケーター中で放冷後精ひょうし、次式によって水分を求める。

$$\text{水分 \% (w/w)} = (a-b)/a \times 100$$

ただし、a は乾燥前の検体重量、b は乾燥後の検体重量である。

### 111-4 デンプン価

102-11 による。

### 111-5 $\alpha$ -アミラーゼ

#### A) 可溶性デンプン法

##### 111-5-1 試薬

0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

A 液 0.2 M 酢酸

氷酢酸 11.55 ml を水で 1 l にする。

B 液 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 27.21 g を水に溶かして 1 l とする。

A 液及び B 液を調製し、A 液 5.9 ml、B 液 14.1 ml の割合で混合する。pH が正確に 5.0 にならない場合は A 液又は B 液を用いて調整する。

塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 5 g を水に溶かし、これに 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 ml を加えて水で 1 l にする。

0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 50 ml を水で希釈し、1 l とした後、pH 5.0 に調整する。  
10%塩酸

水に濃塩酸 24 ml を攪拌しながら徐々に加え、100 ml にフィルアップする。

ヨウ素溶液

ヨウ素 0.0317 g にヨウ化カリウム 0.1 g、10%塩酸 50 ml を加え、水に溶かして 1 l とする。

デンプン溶液

可溶性デンプン 1 g を精ひょうしてとり、適当量の熱水を加えてよくかき混ぜ 1~2 分間沸騰させた後、0.01 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 20 ml を加えて pH 5.0 に調整し、更に水を加えて 100 ml とする。

#### 111-5-2 酵素液の調製

1) 静置抽出透析法

固体こうじ 10 g に塩化ナトリウム溶液 50 ml を加え、低温室(5℃以下)で一晩、又は室温(15~20℃)で 3 時間時々振り混ぜながら浸出した後ろ過する。そのろ液 10 ml を透析膜に入れ、0.01 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) に対して低温で一晩透析した後、水で 20 ml とし酵素液とする。

2) ホモジナイズ抽出法

固体こうじ 2 g に塩化ナトリウム溶液 10 ml を加え、ワーリングブレンダーにより、10,000 rpm 2 分間、ホモジナイズを行う。ホモジナイズ後、乾燥ろ紙でろ過するか遠心分離 15,000 rpm 3 分間の上清を得て静置抽出法に準じ透析及び液量調整を行い酵素液とする。

#### 111-5-3 試験操作

デンプン溶液 2 ml を試験管にとり、40℃で 5 分間予熱する。酵素液 0.1 ml を加えて反応を開始し、反応液中よりその 0.1 ml ずつをピペットで経時的(0.5 分あるいは 1 分おき)に、あらかじめヨウ素溶液 10 ml を入れた試験管にとり、よく混合し、生じた色を 25℃に保ちながら、光路長 10 mm の吸収セルを通して 670 nm で比色し、透過率 T%を測定する。

比色の際の対照液には、水 2 ml に酵素液 0.1 ml を混ぜたものから 0.1 ml を取り出し、10 ml のヨウ素溶液に加えたものを用いる。

これら一連の T%の値の中から 66%に相当する反応時間を見出してこれを t 分とする。

#### 111-5-4 活性の表示

$\alpha$ -アミラーゼ活性は、40℃で 30 分間に分解される 1%可溶性デンプン量(ml)として表示する。こうじ 1 g の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は次式によって求める。

$\alpha$ -アミラーゼ活性(単位/g こうじ)

$$= 2 \times (\text{デンプン溶液量}) \times 1/0.1 (\text{酵素量}) \times 30/t (\text{反応時間}) \times 100/10 (\text{抽出率})$$

(注) 1 この試験に使用する可溶性デンプンは、111-5-1 によりデンプン溶液を調製し、その 2 ml に水 0.1 ml を混合したものから 0.1 ml をとり、10 ml のヨウ素溶液に加え、生じた色を光路長 10 mm の吸収セルを通して 670 nm で比色し、透

過率 T%が 18~20 にならなければならない。

この条件に合わないデンプンの場合には、以下の換算式を用いる。反応時間を t 分間とし、反応前のヨウ素呈色を  $T_0\%$ 、反応後のヨウ素呈色を  $T_t\%$ としたとき

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性(単位/g こうじ)} = (T_t - T_0) / t \times 12.75 \times 100 / 10$$

2 酵素反応を 5 分間行った後の T%が 80 以上の場合は酵素液を適宜希釈する。

## B) 合成基質法 (清酒こうじ)

### 111-5-5 試薬

#### 塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

#### 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

##### A 液 (0.2 M 酢酸)

氷酢酸 11.55 ml に水を加えて 1 l とする。

##### B 液 (0.2 M 酢酸ナトリウム溶液)

酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 27.21 g を水に溶かして 1 l とする。

A 液及び B 液を調製し、A 液約 82 ml、B 液約 18 ml の割合に混合し、A 液又は B 液で、pH 4.0 に調整する。

#### 基質溶液

2-クロロ-4-ニトロフェニル 6<sup>5</sup>-アジド-6<sup>5</sup>-デオキシ- $\beta$ -マルトペンタオシド (以下 N3-G5- $\beta$ -CNP と略す、MW=1008.5) を 10 mM となるように、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解する。

#### 共役酵素液

調製された A 液約 0.9 ml、B 液約 4 ml の割合に混合し、塩化ナトリウム 0.117 g、塩化カルシウム 0.044 g を添加後、A 液又は B 液で pH 6.0 に調整し、100 ml にする。更に  $\beta$ -グルコシダーゼを 12 単位/ml 及びグルコアミラーゼを 80 単位/ml となるように加える。

#### 反応停止液

炭酸ナトリウム 10.6 g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (2 水塩) 7.44 g を水に溶かして 1 l とする。

### 111-5-6 酵素液の調製

#### 1) 静置抽出法

固体こうじ 10 g に塩化ナトリウム溶液 50 ml を加え、低温室 (5°C 以下) で一夜、又は室温 (15~20°C) で 3 時間時々振り混ぜながら浸出した後ろ過する。そのろ液を水で 50 倍に希釈し酵素液とする。

#### 2) ホモジナイズ抽出法

固体こうじ 2 g に塩化ナトリウム溶液 10 ml を加え、ワーリングブレンダーにより、10,000 rpm 2 分間、ホモジナイズを行う。ホモジナイズ後、No. 5C でろ過するか遠心分離 15,000 rpm 3 分間の上清を得て水で 50 倍に希釈し酵素液とする。

#### 111-5-7 試験操作

基質溶液 0.5 ml に共役酵素液 0.5 ml を添加し、37°C で 5 分間予熱加温する。これに酵素液 0.1 ml を加えて、37°C で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液 2.0 ml を添加する。これを吸収セルにいれ、400 nm の波長で吸光度を測定する。

ブランク値の測定は、基質溶液 0.5 ml に共役酵素液 0.5 ml を加えて 37°C で 15 分間加温後、反応停止液 2.0 ml を添加し、更に酵素液 0.1 ml を加える。この液の吸光度を上記と同様にして測定する。

#### 111-5-8 活性の表示

1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の N3-G5- $\beta$ -CNP のマルトペンタオースの  $\alpha$  1-4 結合をエンド型に加水分解する活性を 1 単位と定義する。

$\alpha$ -アミラーゼ活性(単位/ml)

$$= (\text{酵素液測定時の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}) \times 0.179 \times \text{酵素液の希釈率}$$

固体こうじの活性の表示

$\alpha$ -アミラーゼ活性(単位/g・固体こうじ)

$$= \alpha\text{-アミラーゼ活性(単位/ml)} \times \text{抽出} \cdot \text{希釈倍率}$$

#### 111-6 耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ

##### 111-6-1 試薬

0.2 M 酢酸緩衝液(pH 3.5)

A 液 0.2 M 酢酸

氷酢酸 11.55 ml を水で 1 l にする。

B 液 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 27.21 g を水に溶かして 1 l とする。

A 液及び B 液を調製し、A 液に B 液を少量ずつ攪拌しながら加え、pH メーターで pH が 3.5 になるように調整する。

デンプン溶液

可溶性デンプン 1 g を精ひょうしてとり、適当量の熱水を加えてよくかき混ぜ 1~2 分間沸騰させた後、0.2 M 酢酸緩衝液(pH 3.5) 20 ml を加えて pH 3.5 に調整し、更に水を加えて 100 ml とする。

0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)

111-5-1 による。

塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 5 g を水に溶かし、これに 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 500 ml を加えて水で 1 l にする。

ヨウ素溶液

111-5-1 による。

##### 111-6-2 酵素液の調製

1) 静置抽出法

111-5-2イ)による。ただし、塩化ナトリウム溶液は111-6-1のものを用いる。

ロ)ホモジナイズ抽出法

111-5-2ロ)による。ただし、塩化ナトリウム溶液は111-6-1のものを用いる。

111-6-3 試験操作

デンプン溶液 2 ml を試験管にとり、40℃で5分間予熱する。酵素液 0.1 ml を加えて反応を開始し、反応液中よりその 0.1 ml ずつをピペットで経時的(5分おき)に、あらかじめヨウ素溶液 10 ml を入れた試験管にとり、よく混合し、生じた色を 25℃に保ちながら、光路長 10 mm の吸収セルを通して 670 nm で比色し、透過率 T% を測定する。

比色の際の対照液には、水 2 ml に酵素液 0.1 ml を混ぜたものから 0.1 ml を取り出し、10 ml のヨウ素溶液に加えたものを用いる。

これら一連の T% の値の中から 66% に相当する反応時間を見出してこれを t 分とする。

(注) 反応時間は 30 分程度とする。

111-6-4 活性の表示

111-5-4 による。

こうじ 1 g の耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ活性は次式によって求める。

$\alpha$ -アミラーゼ活性(単位/g こうじ)

$$= 2 \times (\text{デンプン溶液量}) \times 1/0.1 (\text{酵素量}) \times 30/t (\text{反応時間}) \times 100/10 (\text{抽出率})$$

(注) 1 酵素反応を 30 分間行った後の T% が 80 以上の場合は酵素液を適宜希釈する。

2 酵素液は透析しないものを用いても良い。その場合は抽出率を 50/10 として計算する。

111-7  $\alpha$ -グルコシダーゼ

A) 4-ニトロフェニル  $\alpha$ -グルコシド法(清酒こうじ)

111-7-1 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

A 液 (0.1 M 酢酸)

氷酢酸 5.75 ml に水を加えて 1 l にする。

B 液 (0.1 M 酢酸ナトリウム溶液)

酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 13.6 g を水に溶かして 1 l とする。

A 液及び B 液を調製し、A 液約 82 ml、B 液約 18 ml の割合に混合し、A 液又は B 液で、pH 4.0 に調整する。

基質溶液

4-ニトロフェニル  $\alpha$ -グルコシド(以下、PNP-G と略す MW= 301.25)を 6 mM となるように、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解する。

反応停止液

炭酸ナトリウム 21.2 g を水に溶かして 1 l とする。(0.2 M 炭酸ナトリウム溶液)

#### 111-7-2 酵素液の調製

111-5-6 による。ただし、そのろ液又は上清は希釈せず酵素液とする。

#### 111-7-3 試験操作

基質溶液 2 ml を、37°C で 5 分間予熱加温する。これに酵素液 0.1 ml を加えて、37°C で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液 1.0 ml を添加する。反応終了液を吸収セルにいれ、400 nm の波長で吸光度を測定する。

次に、基質溶液 2 ml を 37°C で 15 分間加温後、反応停止液 1.0 ml を添加し、更に酵素液 0.1 ml を加え、試料ブランクの吸光度を上記と同様にして測定する。

#### 111-7-4 活性の表示

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、PNP-G から 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の PNP を遊離する活性を 1 単位とする。

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性(単位/ml)

$$= (\text{酵素液測定時の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}) \times 0.171 \times \text{酵素液の希釈率}$$

固体こうじの活性の表示

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性(単位/g・固体こうじ)

$$= \text{酵素液の} \alpha\text{-グルコシダーゼ活性(単位/ml)} \times \text{抽出率}$$

#### B) $\alpha$ -メチル-D-グルコシド法

##### 111-7-5 試薬

###### 塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

###### 4% $\alpha$ -メチル-D-グルコシド溶液

$\alpha$ -メチル-D-グルコシド(以下  $\alpha$ -MG と略す) 4 g を精ひょうし水に溶かして 100 ml とする。

###### 0.02 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)

111-5-1 の 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 10 ml に水を加えて 100 ml にする。pH が 5.0 にならない場合は 0.02 M の酢酸又は酢酸ナトリウム溶液を加えて調節する。

###### 1 N 水酸化ナトリウム溶液

5-12-1 による。

###### 1 N 塩酸

3-13-1 による。

###### ブドウ糖標準溶液

3-10-1 による。

###### ブドウ糖測定試薬

3-10-1 による。

#### 111-7-6 酵素液の調製

111-5-2 による。

#### 111-7-7 試験操作

4%  $\alpha$ -MG 溶液 0.5 ml を試験管にとり、0.02 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 0.5 ml を加えて

40°C、5 分間予熱後、酵素液 0.1 ml を加えて 2 時間反応させたのち、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml を加え反応を停止する。

反応停止後 30 分間放置し、1 N 塩酸溶液 0.1 ml を加えて中和し酵素反応液とする。この酵素反応液を冷水中で冷却したあと、冷却したブドウ糖測定試薬 5 ml を添加し、40°C で 20 分間反応させる。反応は沸とう水中に 5 分間浸して停止する。これを常温に戻した後、光路長 10 mm の吸収セルで 505 nm における吸光度を測定する。

次に酵素を加える前に 1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて、以下上記と同様の操作を行って試料ブランクの吸光度を求める。

別にブドウ糖標準溶液 (500~5000  $\mu$ g/ml) を用いて上記と同様に操作しブドウ糖濃度と吸光度との間で検量線を作成する。この検量線を用いて、反応液中のブドウ糖濃度 A ( $\mu$ g/ml) を求める。

#### 111-7-8 活性の表示

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性の単位は  $\alpha$ -MG から 40°C、60 分間に 1  $\mu$ g のブドウ糖を生成する活性を 1 単位とする。

固体こうじの活性は次式によって表示される。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシダーゼ活性(単位/g}\cdot\text{固体こうじ)} \\ & = A \times 60 / 120 (\text{反応時間}) \times 1 / 0.1 (\text{酵素液量}) \times 100 / 10 (\text{抽出率}) \end{aligned}$$

#### 111-8 グルコアミラーゼ(清酒こうじ)

##### 111-8-1 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

111-7-1 による。

基質溶液

4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-グルコピラノシド(以下、G2-PNP と略す、MW=463) を 10 mM となるように、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解する。

共役酵素液

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に  $\beta$ -グルコシダーゼを 28 単位/ml となるように加える。

反応停止液

111-7-1 による。

##### 111-8-2 酵素液の調製

111-5-6 による。ただし、ろ液又は上清を水で 2 倍に希釈し酵素液とする。

##### 111-8-3 試験操作

基質溶液 0.5 ml に共役酵素液 0.5 ml を添加し、37°C で 5 分間予備加温する。これに酵素液 0.1 ml を加えて、37°C で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液 2.0 ml を添加する。この停止させた反応液を吸収セルにいれ、400 nm の波長で吸光度を測定する。

ブランク値の測定は、基質溶液 0.5 ml に共役酵素液 0.5 ml を加えて 37℃で 15 分間加温後、反応停止液 2.0 ml を添加し、更に酵素液 0.1 ml を加える。この液の吸光度を上記と同様にして測定する。

#### 111-8-4 活性の表示

グルコアミラーゼ活性の表示

酵素液のグルコアミラーゼ活性(単位/ml)

$$= (5.85 \times (\text{検体の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}) \times 2 - 14.1 \times (\alpha\text{-グルコシダーゼ測定時の吸光度} - \alpha\text{-グルコシダーゼ測定時のブランクの吸光度})) / 34.22$$

固体こうじの活性の表示

グルコアミラーゼ活性 (単位/g・固体こうじ)

$$= \text{酵素液のグルコアミラーゼ活性 (単位/ml)} \times 10 (\text{抽出倍率})$$

(注)  $\alpha$ -グルコシダーゼ測定時の吸光度- $\alpha$ -グルコシダーゼ測定時のブランクの吸光度は 111-7-4 のものを使用する。

#### 111-9 糖化力

##### A) 可溶性デンプン法

###### 111-9-1 試薬

0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)

111-5-1 による。

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

(注) 黒こうじ系固体こうじの場合は、0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)500 ml を加える。

0.01 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)

111-5-1 による。

デンプン溶液

可溶性デンプン 2 g を精ひょうしてとり、適当量の熱水を加えてよくかき混ぜ 1~2 分間沸騰させた後、冷却して水を加え 100 ml とする。

1 N 水酸化ナトリウム溶液

5-12-1 による。

1 N 塩酸

3-13-1 による。

###### 111-9-2 酵素液の調製

111-5-2 による。

###### 111-9-3 試験操作

酵素反応

デンプン溶液 1 ml に 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)0.2 ml を加え、40℃で 5 分間予熱する。これに酵素液 0.1 ml を加え、40℃で 20 分間反応させ、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml を添加して反応を停止する。その後 30 分間放置し、1 N 塩酸溶液 0.1 ml



を加えて中和する。

別に対照として、デンプン溶液 1 ml に 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.2 ml を加え、40°C で 5 分間予熱し、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml を加えた後に酵素液 0.1 ml を添加し、以下上記と同様に操作する。

#### ブドウ糖の定量

反応液中に生成したブドウ糖量 ( $\mu\text{g}$ ) を 3-10 により測定する。

#### 111-9-4 糖化力の表示

糖化力は、可溶性デンプンから 40°C で 60 分間に 1 mg のブドウ糖を生成する活性を 1 単位として表示する。

こうじ 1 g の糖化力は次式によって求める。

糖化力 (単位/g こうじ) = 生成ブドウ糖量 ( $\mu\text{g}$ )  $\times$  60/20 (反応時間)  $\times$  1/0.1 (酵素量)  $\times$  100/10 (抽出率)

(注) 1  $\alpha$ -アミラーゼの影響を除くため、デンプンの分解率を 10% 以下 (生成ブドウ糖が約 2 mg 以下) とする。

2  $\alpha$ -アミラーゼ活性が 200 単位/ml 以下の酵素液を用いる。

#### B) 合成基質法 (清酒こうじ)

##### 111-9-5 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

111-7-1 による。

基質溶液

111-8-1 による。

共役酵素液

111-8-1 による。

反応停止液

111-7-1 による。

##### 111-9-6 酵素液の調製

111-8-2 による。

##### 111-9-7 試験操作

111-8-3 による。

##### 111-9-8 糖化力の表示

糖化力 (単位/g 固体こうじ) =  $(5.85 \times (\text{検体の吸光度} - \text{ブランクの吸光度})) \times 1.71$

#### 111-10 酸性プロテアーゼ

##### 111-10-1 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

マッキルベイン緩衝液(pH 3.0)

A液 (0.2 M リン酸二ナトリウム溶液)

リン酸二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71.63 g を水に溶かして 1 ℓ とする。

B液 (0.1 M クエン酸溶液)

クエン酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 21 g を水に溶かして 1 ℓ とする。

A液 4 ml、B液 16 ml の割合で混合すればほぼ所定の pH になる。pH が正確に 3.0 にならない場合は A 液又は B 液を用いて調整する。

カゼイン溶液

カゼイン 2 g をとり、10 倍に希釈した乳酸 5 ml を加え、更に水を約 50 ml 加えて完全に白濁状に溶解するまで金網上で加熱しながらかき混ぜる。

一度沸騰させてから冷却し、これにマッキルベイン緩衝液 (pH 3.0) 20 ml を加え、更に水を加えて全容を 100 ml とする。

0.4 M トリクロール酢酸溶液(TCA 溶液)

トリクロール酢酸 65.4 g を水に溶かして 1 ℓ とする。

フェノール試薬(フォリン・チオカルト試薬)

市販品を 5 倍に希釈して使用する。

0.4 M 炭酸ナトリウム溶液

炭酸ナトリウム 42.4 g を水に溶かして 1 ℓ とする。

チロシン標準溶液

L-チロシン(特級) 10.0 mg をとり、1 N 塩酸 1 ml を加えて全容を 100 ml とする。本試薬を必要に応じて希釈し、チロシン 20~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む標準溶液を作成する。

検量線の作成

各チロシン標準溶液 1 ml に炭酸ナトリウム溶液 5 ml とフェノール試薬 1 ml を加えて、40°C で 30 分間発色を行う。チロシンを含まない液を対照として光路長 10 mm の吸収セルで 660 nm における吸光度を測定し、検量線を作成する。

111-10-2 酵素液の調製

111-5-2 による。

111-10-3 試験操作

カゼイン溶液 1.5 ml にマッキルベイン緩衝液(pH 3.0) 1.0 ml を加え、40°C に予熱しておく。これに酵素液 0.5 ml を加え、40°C で 60 分間反応させた後、TCA 溶液 3 ml を加えて反応を停止させ沈殿をろ別する。

そのろ液 1 ml に炭酸ナトリウム溶液 5 ml とフェノール試薬 1 ml を加えて 40°C で 30 分間の発色を行い、660 nm を測定する。

別に対照として酵素液を TCA 溶液の添加直前に加えて、以下上記と同様の操作を行い吸光度を測定する。

試験液と対照液との吸光度の差 E を求める。

得られた E から検量線により生成チロシン量  $y$  ( $\mu\text{g}$ ) を求める。

(注) E が 0.3 以上になると酵素力と E とが直線関係より外れるので、E が 0.3 以下に

なるように酵素液を希釈する。

#### 111-10-4 活性の表示

酸性プロテアーゼ活性は、40℃で60分間に1 μgのチロシン相当量の呈色を示す活性を1単位とする。

こうじ1gの酸性プロテアーゼ活性は次式によって求められる。

酸性プロテアーゼ活性(単位/g こうじ)

$$=y \times (6/1) (\text{反応液量}) \times 1/0.5 (\text{酵素量}) \times 100/10 (\text{抽出率})$$

(注) 酵素液は透析しないものを用いても良い。その場合は抽出率を50/10として計算する。

#### 111-11 酸性カルボキシペプチダーゼ

##### A) グルタミル-チロシン法

###### 111-11-1 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1による。

4 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)

A液(4 M 酢酸)

氷酢酸 231 ml に水を加えて1 ℓとする。

B液(4 M 酢酸ナトリウム溶液)

酢酸ナトリウム(CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O) 544.3 g を水に溶かして1 ℓとする。

A液及びB液を混ぜてpH 5.5に調整する。

0.5 M 酢酸緩衝液(pH 3.0)

前記のA液、B液をそれぞれ8倍に希釈したものを混ぜて、pH 3.0に調整する。

0.5 mM カルボベンゾキシ-グルタミル-チロシン溶液

カルボベンゾキシ-グルタミル-チロシン(Cbz-Glu-Tyr MW=386.41) 45 mg にメチルアルコール 10 ml を加えて溶解し、更に水 170 ml と 0.5 M 酢酸緩衝液(pH 3.0) 20 ml を加える。

ニンヒドリン溶液

ニンヒドリン 2 g、ヒドリンダンチン 0.3 g をメチルセロソルブ(CH<sub>3</sub>·OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) 75 ml に完全に溶解する。次に4 M 酢酸緩衝液(pH 5.5) 25 ml を加えて濃赤色として使用する。保存は冷蔵庫で行い、退色したら使用しない。

チロシン標準溶液

111-10-1による。

###### 111-11-2 酵素液の調製

111-5-2による。

###### 111-11-3 試験操作

カルボベンゾキシ-グルタミル-チロシン溶液 1 ml を試験管にとり、30℃で5分間予熱後、酵素液 0.1 ml を加えて20分間反応させた後、ニンヒドリン溶液 0.5 ml を加え

反応を停止する。

次に沸騰水中で 15 分間加熱後、急冷し常温に戻して、60%(v/v)エチルアルコール 5 ml を加えて攪拌する。5 分間静置した後光路長 10 mm の吸収セルを通して 570 nm における吸光度を測定する。

別に、対照として酵素液をニンヒドリン溶液の添加直前に加え、以下上記と同様の操作を行い吸光度を測定する。試験液と対照液との吸光度の差 E を求める。検量線はチロシン標準溶液(0~50  $\mu$ g/ml) 1 ml に水 0.1 ml とニンヒドリン溶液 0.5 ml を加え、上記と同様の操作を行って作成する。

得られた E から検量線によりチロシン量 a ( $\mu$ g) を求める。

- (注) 1 沸騰水中での加熱はムラなく均一になるように行う。液の蒸発を防ぐため試験管の口にガラス玉を乗せる。
- 2 エチルアルコールを入れて攪拌すると気泡が発生するため静置する必要がある。
- 3 検量線は測定の都度作成することが望ましい。
- 4 吸光度が 0.4 を超える場合は、反応時間を短縮するか、酵素液を希釈して再分析する。

#### 111-11-4 活性の表示

酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、カルボベンゾキシ-グルタミル-チロシンから 30°C で 60 分間に 1  $\mu$ g のチロシンを遊離する活性を 1 単位とする。

こうじ 1 g の酸性カルボキシペプチダーゼ活性は次式によって求められる。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性(単位/g こうじ)

$$= a \times (60/20) (\text{反応時間}) \times 1/0.1 (\text{酵素量}) \times 100/10 (\text{抽出率})$$

#### B) チロシル-アラニン法(清酒こうじ)

##### 111-11-5 試薬

塩化ナトリウム溶液

111-5-1 による。

0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

A 液 (0.05 M 酢酸)

氷酢酸 2.88 ml に水を加えて 1 l とする。

B 液 (0.05 M 酢酸ナトリウム溶液)

酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 6.8 g を水に溶かして 1 l とする。

A 液及び B 液を調製し、A 液約 18 ml、B 液約 82 ml の割合に混合し、A 液又は B 液で、pH 4.0 に調整する。

基質溶液

カルボベンゾキシ-L-チロシル-L-アラニンを 2.0 mM、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型三水和物 ( $\text{NAD}^+ \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) を 2.0 mM となるように、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解する。

共役酵素液

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（以下、トリス） 6.05g を水に溶かし、塩酸で pH 8.5 に調整し、1 ℓ とする（50 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 8.5））。50 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 8.5）に、アラニンヒドロゲナーゼを 8 単位/ml となるように溶解する。

#### 反応停止液

トリス 60.5g を水に溶かし、塩酸で pH 9.0 に調整し、1 ℓ とする（500 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 9.0））。500 mM トリス-HCl 緩衝液（pH 9.0）に、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8（2-（2-メトキシ-4-ニトロフェニル）-3-（4-ニトロフェニル）-5-（2,4-ジスルフォニル）-2H-テトラゾリウム、ナトリウム塩、MW=600.47）を 82.5 μM となるように溶解する。

#### 定量用発色液

55.4 mg の 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメトサルフェイト（PMS）を水に溶かして 1 ℓ とする。

#### アラニン標準溶液

89.1 mg の L-アラニンを水に溶かして 1 ℓ とする。

#### 111-11-6 酵素液の調製

111-5-6 による。ただし、ろ液又は上清を水で 5 倍に希釈し酵素液とする。

#### 111-11-7 試験操作

基質溶液 1.0 ml を、37°C で 5 分間予熱加温する。これに酵素液 0.1 ml を加えて、37°C で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液 2.0 ml を添加する。

この反応終了液を、37°C、約 5 分間加温した後、共役酵素液 0.1 ml を加えて、37°C で 20 分間反応させた後、定量用発色液 0.1 ml を加え、更に 10 分間定量反応を続ける。

反応終了液を吸収セルにいれ、460 nm の波長で吸光度を測定する。

次に、基質溶液を 37°C で 15 分間加温後、反応停止液 2.0 ml を添加し、更に酵素液 0.1 ml を加える。以下は、上記と同様の操作を行い試料ブランクの吸光度を測定する。

標準値は、酵素液のかわりに標準溶液を同様に反応させて吸光度を測定する。

発色ブランク値は、酵素液のかわりに蒸留水を同様に反応させて吸光度を測定する。

#### 111-11-8 活性の表示

酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、カルボベンゾキシ-L-チロシル-L-アラニンから 1 分間に 1 μmol のアラニンを遊離する活性を 1 単位とする。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性（単位/ml）

$$= (\text{酵素液測定時の吸光度} - \text{試料ブランクの吸光度}) / (\text{標準溶液の吸光度} - \text{発色ブランクの吸光度}) \times 0.1 \times \text{酵素液の希釈率}$$

固体こうじの活性の表示

酸性カルボキシペプチダーゼ活性（単位/g・固体こうじ）

$$= \text{酸性カルボキシペプチダーゼ活性（単位/ml）} \times \text{抽出率}$$

#### 111-12 水浸出液の酸度

111-12-1 試薬

ブロムチモール・ブルー(B. T. B.)、ニュートラル・レッド(N. R.)混合指示薬

3-5-1による。

N/10 水酸化ナトリウム溶液

3-5-1による。

111-12-2 試験操作

こうじ 20 g に水 100 ml を加え室温にて時々振り混ぜながら 3 時間浸出し、そのろ液 10 ml をとり、3-5-2 によって酸度を求める。