

市販測定キットを利用した清酒中の尿素の簡易定量分析

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	長井,隆 鈴木,利明 星野,敦 栗林,喬 原,崇 城,斗志夫
発行元	日本醸造協会
巻/号	115巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 109-114
発行年月	2020年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



J. Brew. Soc. Japan.

Vol.115, No. 2, p. 109 ~ 114 (2020)

市販測定キットを利用した清酒中の尿素の
簡易定量分析長井 隆^{1,2}・鈴木利明¹・星野 敦¹・栗林 喬³・
原 崇⁴・城斗志夫⁴(¹新潟銘醸株式会社, ²新潟大学院自然科学研究科,³新潟県醸造試験場, ⁴新潟大学農学部)

平成 31 年 4 月 10 日受理

The simple determination of urea in sake using
a commercial assay kit.Yutaka NAGAI^{1,2}, Toshiaki SUZUKI¹, Atsusi HOSHINO¹,
Takashi KURIBAYASHI³, Takashi HARA⁴, Toshio JOH⁴(¹Niigata Meijo Co., Ltd., 1-8-39 Toei, Ojiya, Niigata
947-0004, Japan, ²Graduate School of Science and Tech-
nology, and ⁴Agriculture, Niigata University, 2-8050
Ikarashi, Nishi-ku, Niigata, Niigata 950-2181, Japan,
³Niigata Prefectural Sake Research Institute, 2-5932-133
Suido-cho, Chuoh-ku, Niigata 951-8121, Japan)

Urea in sake was measured using the commercial measurement kit, DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Arbor Assays). The measurements taken correlated well with those taken by the conventional method, that is, diacetyl monoxime method ($r=0.9595$). The reaction was possible at room temperature, and the reaction time could be shortened by raising the reaction temperature. Furthermore, this assay allows instant determination of urea concentration in sake through visual inspection. These data show that this kit is very rapid, simple, and did not require expensive equipment. Hence, this method can be applied for risk management of ethyl carbamate in sake breweries.

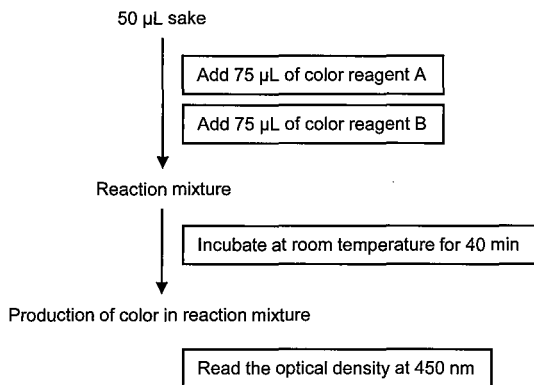
Key words : 清酒, 尿素, 簡易定量分析, Sake, Urea,
Simple determination

清酒を含む発酵食品に存在するカルバミン酸エチル (ECA) は、平成 19 年に国際がん研究機関 (IARC) において、グループ 2A (ヒトに対して、おそらく発がん性がある) に分類され、健康への影響が指摘されている¹⁾。そのため、清酒の安全性を担保するために清酒中の ECA 低減は必須である。既に、カナダやチエコといった国では、清酒中の ECA の濃度に規制値が設けられており²⁾、清酒の海外輸出においては ECA のリスクマネジメントは不可欠である。

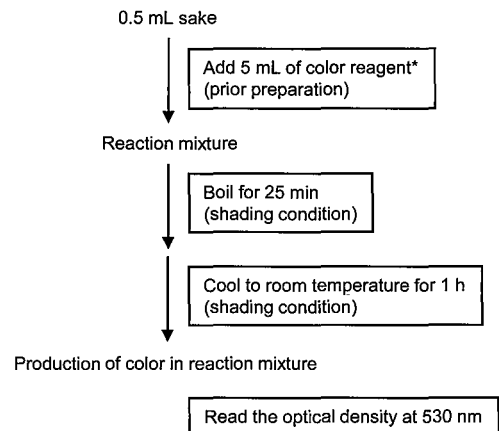
清酒の ECA は、酵母が生産する尿素とエタノールから化学的に生成され、火入れや貯蔵で増加し、清酒中の尿素濃度が高いほど ECA が生成されやすいことが知られている³⁾。現在まで、清酒中 ECA の効率的な除去方法は開発されていないため、ECA 生成反応の律速物質の尿素を低減し、生成を抑制することが一般的である。代表的な尿素低減方法としては、非尿素生産性酵母の使用^{4,5)}、製成酒のウレアーゼ処理⁶⁾、火入れ後の速やかな冷却³⁾、貯蔵温度の管理³⁾が報告されている。これらの方法を行った際は、その有効性の確認のため、清酒中の尿素を測定する必要がある。

尿素的な代表的な定量方法としては、尿素とジアセチルモノオキシムの呈色反応を比色するジアセチルモノオキシム法 (DAMO 法) や^{7,8)}、尿素とウレアーゼを反応させる酵素法⁹⁾が挙げられ、清酒中の尿素的な定量には、DAMO 法⁸⁾や酵素法に基づいた測定キット¹⁰⁻¹³⁾が広く用いられている。この 2 つの従来法のメリットは清酒中の尿素を正確に定量可能であることで、デメリットは分析操作が複雑であることと、高価な測定機器が必要なことである。DAMO 法のデメリットは、遮光条件での煮沸と冷却操作が必要であるため、操作が複雑である。さらに、測定試薬に強い特異臭があり、清酒製造工程での官能検査を妨げる恐れがある。酵素法および酵素法に基づいた測定キットのデメリットは、測定原理上、試料中のアンモニアの影響を受けるため、試料の前処理が必要であり、また測定試薬の調製と測定のための分析機器が必要となることである。これらのデメリットが要因となり、実際の酒造現場では清酒中の尿素的な測定はあまり行われていない。また過去には、吉沢と高橋が、当時 3 社から販売されていた酵素法に基づいた尿素測定キット 3 種類を用いて清酒中尿素的な測

DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit



Diacetyl monoxime method



*Color reagent - Dissolve 588 g of phosphoric acid, 60.2 mg of thiosemicarbazide, and 25.0 mg of ferric chloride and dilute to 1 L with water. Carefully add 200 mL of 0.6% (w/v) diacetyl monoxime aqueous solution.

Fig. 1 Summary procedure for determination of urea in sake. Left panel; DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit, Right panel; diacetyl monoxime method.

定値の比較を報告し良好な定量結果を示しているが¹⁴⁾、従来の報告で用いられてきた酵素法に基づいたキットに比べ、①操作が簡便で操作性に優れる、②分析時間が短縮できる、③清酒中のアンモニアの影響を受けない、④吸光度の測定により定量可能であるとともに、マイクロプレートリーダーなどの高価な装置を用いなくても目視による簡易判別が可能である、といった様々な優れたメリットを持つ生体試料分析用の尿素窒素キットが近年発売されている。

そこで本研究では、清酒中のカルバミン酸エチルのリスク管理として重要な指標となる尿素の分析方法について検討し、従来の報告で用いられてきた DAMO 法や酵素法に基づくキットに比べ優れた操作性等、様々なメリットを持つ生体試料分析用の尿素窒素分析キットを清酒中の尿素分析に適応したところ、定量性に優れていたとともに目視による簡易判別も可能であり、広く酒造現場で利用可能であると考えられることから報告する。

実験方法

1. 測定キット

清酒中の尿素の測定には、Arbor Assays 社製の

DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (以下、本キット) を用いた。なお、キット付属のマニュアルに、本キットは試料中のアンモニア含量が 81.9 mM 以下である場合、アンモニアの影響を受けず測定が可能であると書かれている。清酒のアンモニア含量は平均 1.2 mM と報告されているため¹⁵⁾、本キットを使用するに当たり、清酒の希釈やアンモニア除去等の前処理は行わず測定した。

2. 尿素の測定方法

本キットの具体的な測定方法については Fig. 1 (上部パネル) に示す。清酒 (測定試料) 50 μ L、本キットの呈色試薬 A、B 各 75 μ L を、96 ウェルマイクロプレート上で混和後、室温で 40 分間静置した。キット付属のマニュアルに記載されている測定方法では室温で 30 分間静置とされていたが、この条件では結果の判定が難しかったため、反応時間を延長した。反応後、マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。

なお、従来法として DAMO 法を採用し、具体的な測定方法については Fig. 1 (下部パネル) に示す。はじめに、A 試薬 (無機リン酸 588 g、チオセミカルバ

ジド 60.2 mg, 塩化第二鉄 25.0 mg, 以上を水 1 L で溶解したもの)と, B 試薬 (ジアセチルモノオキシム 6 g を水 1 L で溶解したもの)を, 5 対 1 の比率で混和し, 発色試薬を用事調製した。清酒 (測定試料) 0.5 mL と発色試薬 5.0 mL を混和, 遮光条件下で 25 分間煮沸後, 室温まで冷却し, 分光光度計で 530 nm における吸光度を測定した。

3. 尿素添加モデル清酒の調製

モデル清酒は島津らの報告と同様に調製した¹⁶⁾。15.5% (v/v) エタノール水溶液に乳酸 1.1 g/L, コハク酸 0.7 g/L, リンゴ酸 0.6 g/L, グルコース 2% (v/v) となるように溶解し, 15 度モデル清酒とした。また同様に, 20.5% (v/v) エタノール水溶液を用いて 20 度モデル清酒を調製した。

調製した 15 度と 20 度モデル清酒に尿素を 10, 20, 30, 40, 50 mg/L となるように溶解し, 各尿素添加モデル清酒を調製した。

4. 尿素測定への清酒成分の影響の検討

Fig. 1 (上部パネル) によって各尿素添加モデル清酒を発色させ, マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定し, 検量線を作成した。これらの測定は 3 回行い平均値を分析値とした。

5. 測定精度の検証と添加回収試験

15 度モデル清酒を Fig. 1 (上部パネル) によって 10 回繰り返し測定した場合の標準偏差を求めた。この標準偏差の 3 倍に相当する値に, 先に求めた 15 度の尿素添加モデル清酒の検量線の傾きを割った値を検出限界とし, 標準偏差の 10 倍に相当する値に, 同様に検量線の傾きを割った値を定量下限とした¹⁷⁾。

15 度の尿素添加モデル清酒 (尿素濃度 10 mg/L) を 10 回繰り返し測定した場合の標準偏差と平均値を求め, 標準偏差を平均値で割った値を変動係数とした¹⁸⁾。

15 度の尿素添加モデル清酒 (尿素濃度 20 mg/L) を 5 回繰り返し測定し, 実測値と理論値から回収率を求めた。

6. 清酒試料

測定試料としての清酒は, 古酒や長期貯蔵の表示がないものを購入した。国内産 33 点 (純米大吟醸 2 点,

大吟醸 1 点, 純米吟醸 13 点, 純米 7 点, 本醸造 2 点, 特定名称以外 8 点), アメリカ産 6 点 (純米吟醸 4 点, 純米 2 点), オーストラリア産純米吟醸 1 点, ベトナム産純米 1 点, ノルウェー産 2 点 (純米吟醸 1 点, 純米 1 点), 韓国産純米 2 点, カナダ産純米大吟醸 1 点の計 46 点である。

7. 清酒のウレアーゼ処理

清酒のウレアーゼ処理は, タケメイト-AU (麒麟協和フーズ株式会社) を使用し, 製品に添付された手順書に従い, 10 kL の清酒を処理した。すなわち, 100 g のタケメイト-AU を 10 kL の清酒に添加し, 4℃から 10℃で 10 日間貯蔵した。その後, 常法に従って, 酵素を添加した清酒のオリ下げおよびろ過を行い, ウレアーゼ処理清酒を得た。

実験結果および考察

1. 尿素測定への清酒成分の影響

本キットに対するエタノールや有機酸の影響を検討し, 清酒に適用できるかを調べるため, モデル清酒に所定の濃度で尿素を加えた各尿素添加モデル清酒を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。各尿素添加モデル清酒において, 10 mg/L から 50 mg/L の間で十分な直進性と, 高い相関性 (15 度モデル清酒 $R^2 = 0.9978$, 20 度モデル清酒 $R^2 = 0.9982$) が認められ, エタノールおよび有機酸の影響は見られなかった。よって, 本キットは, これらの物質の影響を受けることなく分析できることが確認できた。

2. 測定精度の検証と添加回収試験

次に 15 度モデル清酒を用いて, 本キットの検出限界と定量下限および変動係数を調べた。その結果, 検出限界 1.2 mg/L, 定量下限 3.9 mg/L, 変動係数 3.6% (10 mg, $n=10$) であり, 簡易定量分析法としては十分な値を示した。

また, 15 度の尿素添加モデル清酒 (尿素濃度 20 mg/L) を用いて, 回収率を測定したところ, 理論値に対する実測値が 99.6% ($n=5$) の回収率となり, 良好な回収結果を示した。

3. 従来法 (DAMO 法) との比較

市販清酒 46 点を用いて, DAMO 法の定量値と本

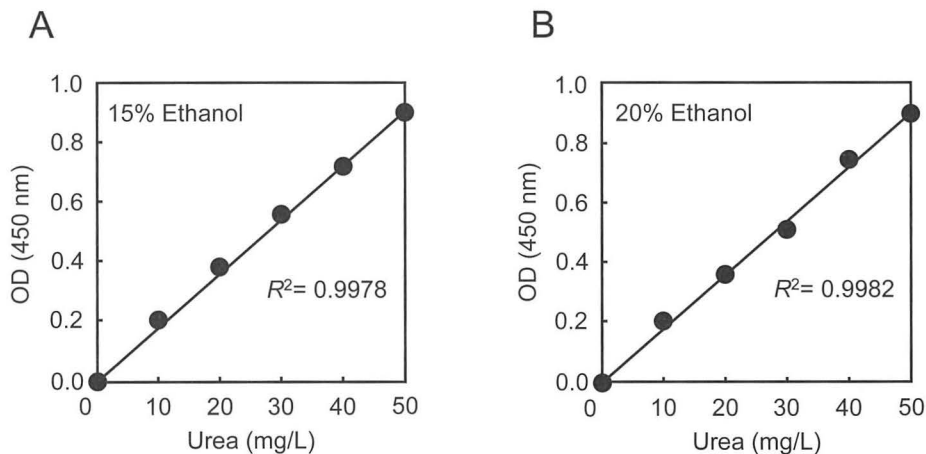


Fig. 2 Calibration curve for urea in model sake obtained using the DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit. A: model sake containing 15% ethanol; B: model sake containing 20% ethanol.

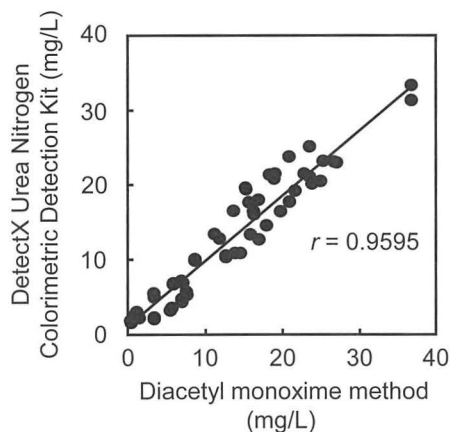


Fig. 3 Correlation between the urea concentrations in sake obtained from the DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit and diacetyl monoxime method ($n = 46$).

キットの定量値との比較を行った。その結果を Fig. 3 に示す。両者の間には良好な相関関係（相関係数 $r = 0.9595$ ）が認められたことから、本キットによる測定は、清酒中の尿素の簡易定量分析法として十分活用できることがわかった。

4. 目視による尿素量の簡易判定

ウレアーゼ処理前後の清酒を本キットで測定した。その結果を Fig. 4 に示す。処理前の清酒に比べ、ウレ

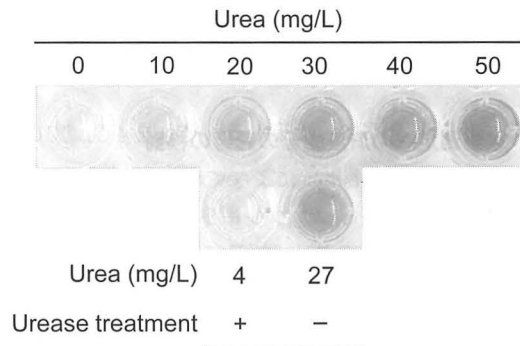


Fig. 4 Urea content in sake before/after urease treatment (upper row ; urea standard samples, lower row; sake with (+) and without (-) urease treatment).

アーゼ処理を施した清酒は、その尿素濃度に依存して明確な濃淡変化が観察され、ウレアーゼ処理の有無を明確に判別できた。さらに、標準試料と比較することで、目視により尿素濃度を簡易的に判定することができた。従って、本キットを用いることにより、清酒のウレアーゼ処理の成否を簡便に確認できることがわかった。

5. 反応時間と反応温度の検討

本キット付属の手順書では、測定試料と呈色試薬混和後の反応温度と反応時間を、室温で 30 分間と規定

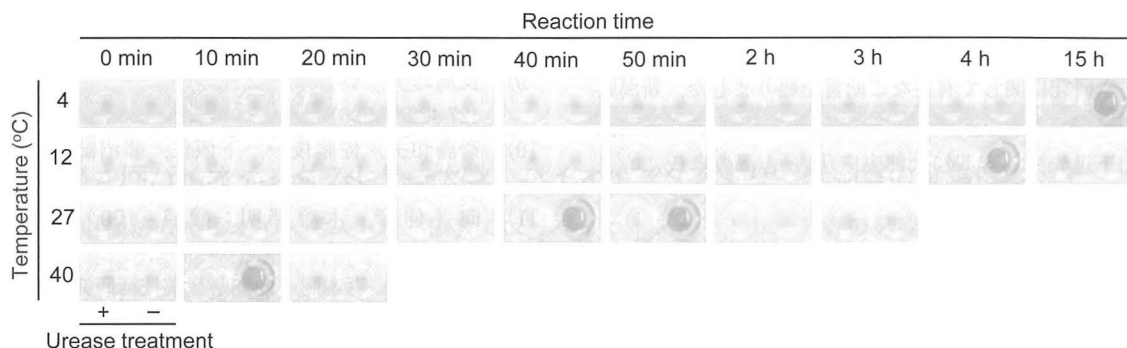


Fig. 5 Effect of reaction temperature and reaction time on the process of determination of urea in sake while using the DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit.

している。しかし、酒造現場の室温は、外気温に左右され、季節によって大きく変動する場合が多いことから、本キットの適用可能な反応温度と反応時間を検討した。

ウレアーゼ処理した清酒と、未処理の清酒に本キットの呈色試薬を添加した後、それぞれを4℃、12℃、27℃、40℃で反応させ経時的観察した。その結果をFig. 5に示す。40℃は10分間、27℃は40分間、12℃は4時間、4℃は15時間で、発色が確認できた。また、12℃、27℃、40℃で反応させた試料は、発色後に反応を継続させると退色した。これらの結果から、呈色に要する時間は異なるが、40℃から12℃の範囲で呈色することが確認できた。この方法を製造現場で使用する場合、室温が高い麹室等で反応させることにより、短時間で測定結果を得られ、また反応液を加温する設備がなくとも、反応時間を延長することによって分析が可能であると考えられる。しかし、呈色後放置することで退色するため、呈色による判定は、注意が必要である。

6. 本法の有効性

清酒中の尿素を定量し把握することは、ECAのリスク管理上不可欠であり、その定量には酵素法や酵素法に基づいた従来の測定キット、またDAMO法が用いられている。しかしながら、酵素法と従来の測定キットは試料の前処理や高価な分析機器を必要とし、DAMO法は遮光条件での煮沸および冷却操作と、測定試薬の用事調製が必要である。また、この2つの方

法は分析に1時間以上も要してしまう。本キットによる尿素定量は、これらの従来法とは異なり、試薬の調製や試料の前処理、煮沸といった煩雑な操作がない。また、Fig.1に示したようにDAMO法での分析は1時間以上要するが、本法では少量の清酒とキット付属の試薬を混和し、その反応液を室温に40分間静置するのみで分析が完了する。さらに、分析機器を必要とせず、目視による簡易判定も可能であることから、本キットは、清酒の製造現場における日常的な尿素の分析法として、非常に有効な方法であり、ECAのリスク管理に向けて、製造現場への普及が期待される。

要 約

DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Arbor Assays 社) を用いた清酒中の尿素定量について検討した。このキットは、清酒中に含まれるエタノールや有機酸の影響を受けずに尿素の定量が可能であり、測定精度も良好であった。市販清酒中の尿素を測定した結果、ジアセチルモノオキシム (DAMO) 法と比較して相関性のある結果が得られ、簡便かつ迅速な尿素の定量分析法として確立できた。さらに、本キットを用いて、ウレアーゼによる清酒の尿素低減処理の成否を、目視で確認できることがわかった。また、適切な反応時間の検討が必要だが、様々な温度で呈色することを確認した。これらの結果から、本キットによる分析は、清酒製造に適した尿素分析法であり、日常的な分析法として実用性の高い手法である。

謝 辞

本研究に関して有益なご助言を賜りました，新潟県酒造組合新潟清酒教育協会立新潟県清酒学校前校長山下進先生，吉澤仁太郎商店代表 吉澤義孝氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 国税庁：<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/anzen/joho/joho01.htm>
- 2) European Food Safety Authority：*The EFSA J.*, **551**, 1-44 (2007)
- 3) 吉沢淑，高橋康次郎：醸協，**83**，69-73 (1988)
- 4) 北本勝ひこ，宮崎佳緒子，山岡洋，五味勝也，熊谷知栄子：醸協，**87**，598-601 (1992)
- 5) 福田潔，北本勝ひこ，五味勝也，熊谷知栄子：醸協，**88**，633-638 (1993)
- 6) 吉沢淑，高橋康次郎：醸協，**83**，142-144 (1988)
- 7) J. J. Coulombe, L. Favreau：*Clin. Chem.*, **9**，102-108 (1963)
- 8) 蓮田寛和：醸協，**109**，576-581 (2014)
- 9) 長島珍男，呉月娥，釜谷美則：分析化学，**45**，427-429 (1996)
- 10) 斎藤和夫，佐藤俊一，下飯仁，蓼沼誠，吉沢淑：醸協，**83**，145-149 (1988)
- 11) 向井伸彦，木曾邦明：醸協，**100**，705-714 (2005)
- 12) 宮岡俊輔，森本聡：愛知県産業技術研究所報告，**49**，6-9 (2011)
- 13) 渡部貴志，高橋仁恵，増淵隆：群馬県立産業技術センター研究報告，平成28年度，11-14 (2016)
- 14) 吉沢淑，高橋康次郎：醸造試験所報告，別冊 (**159**)，34-37 (1987)
- 15) 財団法人 日本醸造協会：醸造物の成分，64-65 (1999)
- 16) 島津善美，藤原正雄，渡辺正澄，太田雄一郎：日本調理科学会誌，**42**，327-333 (2009)
- 17) 釜谷美則：ぶんせき，**4**，158-162 (2008)
- 18) 平井昭司：ぶんせき，**1**，2-9 (2010)