④　繊維糖化力試験法

繊維糖化力試験法は、カルボキシメチルセルロースナトリウムにセルラーゼが作用するときに、加水分解に伴って増加する還元力により、飼料添加物中のセルラーゼの量を測定する方法であり、その単位は、繊維糖化力単位で示す。

１繊維糖化力単位は、セルラーゼがカルボキシメチルセルロースナトリウムに37℃で作用するとき、反応初期の１分間に１μmolのブドウ糖に相当する還元力の増加をもたらす酵素量に相当する。

基質溶液の調製

あらかじめカルボキシメチルセルロースナトリウム約１gを0.001gの桁まで量り、その数値を記録し、105℃で４時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物0.625gに相当するカルボキシメチルセルロースナトリウムを0.001gの桁まで量り、水50mLにかき混ぜながら少量ずつ加えた後、60～70℃でときどきかき混ぜながら20分間加温して溶かし、放冷した後、100mLの全量フラスコに移し、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液10mLを加え、更に水を標線まで加えて100mLとする。

操作法

試験を行うために必要な量の試料を有効数字３桁まで量り、その数値を記録し、１mL当たりの濃度が、0.02～0.08繊維糖化力単位となるように水又は試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.1mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、試料溶液とする。試料が完全に溶けない場合には、ときどきかき混ぜながら１時間放置した後、遠心分離し、その上澄液を試料溶液とする。基質溶液４mLを全量ピペットを用いて量り、25mLの全量フラスコに入れ、37±0.5℃で10分間放置した後、全量ピペットを用いて試料溶液１mLを加え、30秒以内に振り混ぜ、37±0.5℃で正確に30分間放置する。次に、アルカリ性銅試液Ｂ２mLを加え、振り混ぜ、全量フラスコに栓をし、水浴中で30分間加熱し、水冷する。さらに、ヒ素モリブデン酸試液２mLを加え、よく振り混ぜ、0.5mol/L水酸化ナトリウム試液３mLを加え、振り混ぜて沈殿を溶かし、20分間放置した後、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を標線まで加えて25mLとする。この溶液１mLを全量ピペットを用いて量り、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液９mLを加え、よく振り混ぜ、波長750nmにおける吸光度A_Tを測定する。別に、試料溶液１mLを全量ピペットを用いて量り、25mLの全量フラスコに入れ、アルカリ性銅試液Ｂ２mLを加え、振り混ぜ、全量ピペットを用いて基質溶液４mLを加え、振り混ぜ、全量フラスコに栓をし、水浴中で30分間加熱し、水冷する。以下同様の方法で操作し、吸光度A_T'を測定する。A_T及びA_T'に対応するブドウ糖の量（mg）を検量線から求め、それぞれG_T及びG_T'とする。

$$1\,g中の繊維糖化力単位=\frac{G_T-G_T'}{30}\times\frac{1}{0.18}\times\frac{1}{W}$$

W：試料溶液１mL中の試料の量（g）

検量線の作成

あらかじめブドウ糖約１gを0.01gの桁まで量り、その数値を記録し、105℃で６時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物１gに相当するブドウ糖を0.01gの桁まで量り、水を加えて溶かし、1,000mLの全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて1,000mLとする。この溶液１mL、２mL、３mL、４mL及び５mLを全量ピペットを用いて量り、10mLの全量フラスコに入れ、それぞれに水を標線まで加えて10mLとする。それぞれの溶液１mL、基質溶液４mL及びアルカリ性銅試液Ｂ２mLを全量ピペットを用いて量り、25mLの全量フラスコに入れ、振り混ぜ、全量フラスコに栓をし、水浴中で30分間加熱する。水冷後、ヒ素モリブデン酸試液２mLを加え、よく振り混ぜ、さらに、0.5mol/L水酸化ナトリウム試液３mLを加え、振り混ぜて沈殿を溶かし、20分間放置した後、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を標線まで加えてそれぞれ25mLとする。これらの溶液１mLを全量ピペットを用いて量り、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液９mLを加え、よく振り混ぜる。これらの溶液につき、波長750nmにおける吸光度A_1、A_2、A_3、A_4及びA_5を測定する。別に、水１mL、基質溶液４mL及びアルカリ性銅試液Ｂ２mLを全量ピペットを用いて量り、以下同様の方法で操作し、吸光度A_0を測定する。吸光度差（A_1-A_0）、（A_2-A_0）、（A_3-A_0）、（A_4-A_0）及び（A_5-A_0）を縦軸に、ブドウ糖の量（mg）を横軸にとり、検量線を作成する。

⑤　繊維崩壊力試験法

繊維崩壊力試験法は、ろ紙にセルラーゼが作用するときに、ろ紙が崩壊する時間により、飼料添加物中のセルラーゼの量を測定する方法であり、その単位は、繊維崩壊力単位で示す。

1,000繊維崩壊力単位は、セルラーゼがろ紙に37℃で作用するとき、１分間に１cm×１cmの大きさの酵素定量用ろ紙２枚を完全に崩壊する酵素量に相当する。

基質の調製

酵素定量用ろ紙（紙厚0.29～0.31mm、質量125～135g/m^2、α繊維含量98.5%以上、灰分量0.05%以下、ろ水時間50～90秒/100mL、破裂強度1.2～1.8kg/cm^2、吸水高度８～９cm/10分、透気度30～40秒/cm^2/100mLのものをいう。）を光源を通して観察し、すきむらがなく、厚さが均一で異物のない個所を１cm×１cmの大きさに切る。

操作法

試験を行うために必要な量の試料を有効数字３桁まで量り、その数値を記録し、１mL当たりの濃度が2.8～4.0繊維崩壊力単位となるように、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した１mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、試料溶液とする。試料が完全に溶けない場合には、ときどきかき混ぜながら１時間放置した後、遠心分離し、その上澄液を試料溶液とする。試料溶液５mLずつを全量ピペットを用いて量り、５本のＬ字型試験管に入れ、37±0.5℃で５分間放置した後、それぞれに基質を２枚ずつ入れ、毎分65回転、振幅60mm及び温度37±0.5℃で30秒以内に振とうする。適時、ろ紙の崩壊状態を観察し、ろ紙が完全に崩壊して微細な繊維となるまでの時間（分）を測定する。

$$1\,g中の繊維崩壊力単位=\frac{1}{T\times W}\times 1{,}000$$

T：ろ紙が完全に崩壊するまでの時間（最短と最長のものを除く。）の平均時間（分）

W：試料溶液５mL中の試料の量（g）

L字型試験管

