⑥　たん白消化力試験法

たん白消化力試験法は、カゼインにプロテアーゼが作用するときに、加水分解に伴って増加する酸可溶性分解産物の量により、飼料添加物中のプロテアーゼの量を測定する方法であり、その単位は、たん白消化力単位で示す。

１たん白消化力単位は、プロテアーゼが乳製カゼインに37℃で作用するとき、反応初期の１分間に１μgのチロシンに相当する非たん白性のフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量に相当する。

(i)　第１法

基質溶液の調製

あらかじめ乳製カゼイン約１gを0.01gの桁まで量り、その数値を記録し、105℃で２時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物1.20gに相当する乳製カゼインを0.01gの桁まで量り、0.05mol/Lリン酸一水素ナトリウム試液160mLを加え、水浴中で加温して溶かす。この溶液を流水で冷却した後、１mol/L塩酸試液又は１mol/L水酸化ナトリウム試液を加えて試料の最大酵素活性を示すpHに調整した後、200mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200mL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10～30たん白消化力単位となるように、水又は0.02mol/Lリン酸塩緩衝液を加えて溶かし、試料溶液とする。必要ならば、ろ過又は遠心分離を行う。基質溶液５mLを全量ピペットを用いて量り、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10分間放置する。次に、トリクロル酢酸試液B５mLを加え、振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置する。さらに、この溶液をろ過して沈殿物を完全に除去した後、ろ液２mLを全量ピペットを用いて量り、0.55mol/L炭酸ナトリウム試液５mL及びフォリン試液（１→３）１mLを加え、よく振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置した後、この溶液につき、波長660nm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、トリクロル酢酸試液B５mLを加え、振り混ぜ、基質溶液５mLを正確に加え、37±0.5℃で30分間放置する。以下同様の方法で操作し、吸光度A_T'を測定する。

$$1\,g中のたん白消化力単位=(A_T-A_T')\times F\times\frac{11}{2}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{W}$$

F：検量線から求めた吸光度差１に対応するチロシンの量（μg）

W：試料溶液１mL中の試料の量（g）

検量線の作成

チロシン標準品を105℃で３時間乾燥し、その0.500g（0.4995～0.5004g）を量り、0.2mol/L塩酸試液を加えて溶かし、500mLの全量フラスコに入れ、更に0.2mol/L塩酸試液を標線まで加えて500mLとする。この溶液１mL、２mL、３mL及び４mLを全量ピペットを用いて量り、それぞれ100mLの全量フラスコに入れ、それぞれに0.2mol/L塩酸試液を標線まで加えて100mLとする。それぞれの溶液２mLを全量ピペットを用いて量り、0.55mol/L炭酸ナトリウム試液５mL及びフォリン試液（１→３）１mLをそれぞれ加え、37±0.5℃で30分間放置した後、これらの溶液につき、波長660nmにおける吸光度A_1、A_2、A_3及びA_4を測定する。別に、0.2mol/L塩酸試液２mL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）及び（A_4-A_0）を縦軸に、チロシンの量（μg）を横軸にとり、検量線を作成する。

(ii)　第２法

基質溶液の調製

あらかじめ乳製カゼイン約１gを0.01gの桁まで量り、その数値を記録し、105℃で２時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物1.20gに相当する乳製カゼインを0.01gの桁まで量り、１mol/L乳酸試液16mL及び水146mLを加え、水浴中で加温して溶かす。この溶液を流水で冷却した後、１mol/L塩酸試液又は１mol/L水酸化ナトリウム試液を加えて試料の最大酵素活性を示すpHに調整した後、200mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200mL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10～30たん白消化力単位となるように水、0.1mol/L乳酸塩緩衝液、酢酸塩酸緩衝液又は0.01mol/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。必要ならば、ろ過又は遠心分離を行う。基質溶液５mLを全量ピペットを用いて量り、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10分間放置する。次に、トリクロル酢酸試液A５mLを加え、振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置する。さらに、この溶液をろ過して沈殿物を完全に除去した後、ろ液２mLを全量ピペットを用いて量り、0.55mol/L炭酸ナトリウム試液５mL及びフォリン試液（１→３）１mLを加え、よく振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置した後、この溶液につき、波長660nm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、トリクロル酢酸試液A５mLを加え、振り混ぜ、全量ピペットを用いて基質溶液５mLを加え、37±0.5℃で30分間放置する。以下同様の方法で操作し、吸光度A_T'を測定する。

$$1\,g中のたん白消化力単位=(A_T-A_T')\times F\times\frac{11}{2}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{W}$$

F：検量線から求めた吸光度差１に対応するチロシンの量（μg）

W：試料溶液１mL中の試料の量（g）

検量線の作成

(i)の検量線の作成を準用する。

(iii)　第３法

基質溶液の調製

(i)の基質溶液の調製を準用する。

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10～30たん白消化力単位となるように水を加えて溶かし、試料溶液とする。必要ならば、ろ過又は遠心分離を行う。基質溶液５mLを全量ピペットを用いて量り、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10分間放置する。次に、トリクロル酢酸試液A５mLを加え、振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置する。さらに、この溶液をろ過して沈殿物を完全に除去した後、ろ液２mLを全量ピペットを用いて量り、0.55mol/L炭酸ナトリウム試液５mL及びフォリン試液（１→３）１mLを加え、よく振り混ぜ、37±0.5℃で30分間放置した後、この溶液につき、波長660nm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、トリクロル酢酸試液A５mLを加え、振り混ぜ、全量ピペットを用いて基質溶液５mLを加え、37±0.5℃で30分間放置する。以下同様の方法で操作し、吸光度A_T'を測定する。

$$1\,g中のたん白消化力単位=(A_T-A_T')\times F\times\frac{11}{2}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{W}$$

F：検量線から求めた吸光度差１に対応するチロシンの量（μg）

W：試料溶液１mL中の試料の量（g）

検量線の作成

(i)の検量線の作成を準用する。