⑦　でんぷん糖化力試験法

でんぷん糖化力試験法は、デンプンにアミ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、飼料添加物中のアミラーゼの量を測定する方法であり、その単位は、でんぷん糖化力単位で示す。

１でんぷん糖化力単位は、アミラーゼがバレイショデンプンに37℃で作用するとき、反応初期の１分間に１mg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

あらかじめバレイショデンプン約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１gに相当するバレイショデンプンを0.01gの桁まで量り、三角フラスコに入れ、水20mLを加え、よく振り混ぜながら徐々に２mol/L水酸化ナトリウム試液５mLを加えてのり状とし、水浴中で振り混ぜながら３分間加熱した後、水25mLを加え、放冷した後、２mol/L塩酸試液で正確に中和し、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、100mLの全量フラスコに入れ、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0.4～0.8でんぷん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乳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10mLを全量ピペットを用いて量り、直径30mmの試験管に入れ、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10分間放置する。次に、フェーリング試液のアルカリ性酒石酸塩液２mLを加え、30秒以内に振り混ぜ、さらに、全量ピペットを用いてフェーリング試液の銅液２mLを加え、軽く振り混ぜた後、試験管の口に漏斗をのせ、水浴中で正確に15分間加熱し、30秒以内に流水で25℃以下に冷却する。さらに、濃ヨウ化カリウム試液２mL及び硫酸（１→６）２mLを加え、遊離したヨウ素を30秒以内に0.05mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する（指示薬　溶性デンプン試液１～２滴）。この場合において、滴定の終点は、溶液の青色が消えたときとし、その滴定量をAmLとする。別に、基質溶液10mLの代わりに水10mLを量り、以下同様の方法で操作し、その滴定量をBmLとする。

$$1\,g中のでんぷん糖化力単位＝（B－A）\times1.6\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{W}$$

W：試料溶液１mL中の試料の量（g）

⑧　フィチン酸分解力試験法

フィチン酸分解力試験法は、フィチン酸にフィターゼが作用するときに、加水分解により生成されるリン酸イオンの量により、飼料添加物中のフィターゼの量を測定する方法であり、その単位は、フィチン酸分解力単位で示す。

１フィチン酸分解力単位は、フィターゼがフィチン酸に37℃で作用するとき、反応初期の１分間に１μmolのリン酸を遊離させる酵素量に相当する。

(i)　第１法

基質溶液の調製

あらかじめフィチン酸ナトリウムをデシケーター（シリカゲル）中で24時間以上乾燥し、その0.271g（0.2705～0.2714g）を量り、試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.2mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液約50mLを加えて溶かし、0.2mol/L酢酸試液を加えてpH5.5に調整した後、100mLの全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて100mLとする。

反応停止発色液の調製

モリブデン酸アンモニウム1.236g（1.2355～1.2364g）に水を加えて溶かし、100mLとし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。モリブデン酸アンモニウム試液１容量に、2.5mol/L硫酸試液１容量及びアセトン２容量を加え、よく振り混ぜ、30秒以内に氷中で冷却する。反応停止発色液は、用時調製する。

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0.04～0.06フィチン酸分解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0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、必要ならばろ過し、試料溶液とする。基質溶液0.5mLを全量ピペットを用いて量り、10mLの丸底遠沈管又は試験管に入れ、37±0.5℃に加温する。この基質溶液に、別に、全量ピペットを用いて37±0.5℃に加温した試料溶液0.5mL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。その後、全量ピペットを用いて氷中で冷却した反応停止発色液２mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて１mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、５分以内に水を対照液として波長380nmにおける吸光度OD_Tを測定する。別に、試料溶液0.5mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて氷中で冷却した反応停止発色液２mLを加え、よくかき混ぜた後、全量ピペットを用いて基質溶液0.5mLを加え、よくかき混ぜ、全量ピペットを用いて１mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、更によくかき混ぜる。以下同様の方法で操作して吸光度OD_{TB}を測定する。

$$1\,g中のフィチン酸分解力単位＝（OD_T－OD_{TB}）\times F\times2\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{W}\times Z$$

F：検量線から求めた吸光度差１に対応するリン酸イオン濃度（μmol/mL）

W：試料採取量（g）

Z：希釈倍率

検量線の作成

リン酸二水素カリウムをデシケーター（シリカゲル）中で24時間以上乾燥し、その0.680g（0.6795～0.6804g）を量り、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及び４mLを全量ピペットを用いて量り、50mLの全量フラスコに入れ、それぞれに水を標線まで加えて50mLとする。それぞれの溶液１mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて氷中で冷却した反応停止発色液２mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて１mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、水を対照液として波長380nmにおける吸光度OD_{S1}、OD_{S2}、OD_{S3}及びOD_{S4}を測定する。別に、水１mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて氷中で冷却した反応停止発色液２mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて１mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、水を対照液として波長380nmにおける吸光度OD_{SB}を測定する。リン酸イオン濃度を縦軸に、吸光度差（$OD_{S1}－OD_{SB}$）、（$OD_{S2}－OD_{SB}$）、（$OD_{S3}－OD_{SB}$）及び（$OD_{S4}－OD_{SB}$）を横軸にとり、検量線を作成する。