⑵　第２法

基質溶液の調製

フィチン酸ナトリウム0.8g（0.75～0.84g）を量り、pH5.5に調整した0.25mol/L酢酸塩酸緩衝液を加えて溶かし、塩酸でpHを5.5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100g（99.5～100.4g）を水800mLに溶かし、25％アンモニア水10mLを加えた後、水を加えて1,000mLとし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。バナジン酸アンモニウム2.35g（2.345～2.354g）に50℃に温めた水400mLを加えて溶かし、硝酸（１→３）20mLを加え、更に水を加えて1,000mLとし、バナジン酸アンモニウム試液とする。モリブデン酸アンモニウム試液１容量に、バナジン酸アンモニウム試液１容量及び硝酸（１→３）２容量を加え、混合する。反応停止発色液は、用時調製する。

操作法

試料溶液は、各条で規定する方法で調製する。基質溶液0.8mLをマイクロピペットを用いて量り、２mLのプラスチック製遠沈管に入れ、37±0.5℃に加温し、５分間放置する。この基質溶液に、別に、37±0.5℃に加温し５分間放置した試料溶液0.04mL及び各条に定める希釈液0.36mLをマイクロピペットを用いて加え、37±0.5℃に加温し、30分間放置する。その後、反応停止発色液0.8mLをマイクロピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で10分間放置する。さらに、毎分14,000回転で３分間遠心分離を行い、得られた上澄液につき、水を対照液として、波長415nmにおける吸光度OD_Tを測定する。別に、希釈液0.4mLを全量ピペット又はマイクロピペットを用いて量り、これに反応停止発色液0.8mLを加え、かき混ぜた後、基質溶液0.8mLを加え、10分間室温で放置する。以下同様の方法で操作して吸光度OD_Bを測定する。

$$1\text{g中のフィチン酸分解力単位} = (OD_T - OD_B) \times F \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W} \times Z$$

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

105℃で２時間乾燥させた後、デシケーターで保存したリン酸二水素カリウム0.682g（0.6815～0.6824g）を量り、希釈液を加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、更に希釈液を標線まで加えて100mLとする。この溶液３mL、６mL、12mL及び25mLを全量ピペットを用いて量り、それぞれ50mLの全量フラスコに入れ、それぞれに希釈液を標線まで加えて50mLとする。試料溶液と同様に操作法に従い、OD_{S1}、OD_{S2}、OD_{S3}及びOD_{S4}を測定する。リン酸イオン濃度を縦軸に、測定したOD_Bとの吸光度差（$OD_{S1}-OD_B$）、（$OD_{S2}-OD_B$）、（$OD_{S3}-OD_B$）及び（$OD_{S4}-OD_B$）を横軸にとり、検量線を作成する。

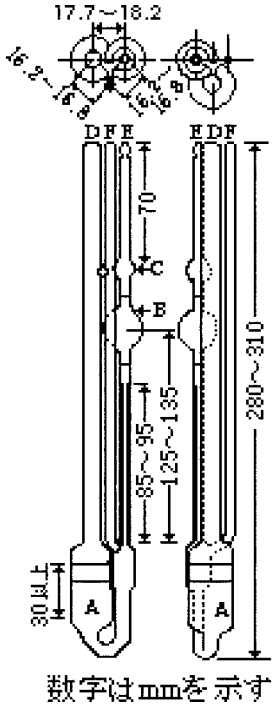
⑨　ペクチン液化力試験法

ペクチン液化力試験法は、ペクチンにペクチナーゼが作用するときに、ペクチンの全体的低分子化に伴って低下するペクチンの粘度により、飼料添加物中のペクチンの量を測定する方法であり、その単位は、ペクチン液化力単位で示す。

１ペクチン液化力単位は、ペクチナーゼが１％のペクチン溶液に37℃で10分間作用するとき、その粘度を半減させる酵素量に相当する。

装置

測定装置として図に示す粘度計を用いる。



基質溶液の調製

あらかじめペクチン約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2.0gに相当するペクチンを0.01gの桁まで量り、水50mLを加え、加温して溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、放冷した後、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当たりの濃度がそれぞれ約0.5ペクチン液化力単位、約1.0ペクチン液化力単位及び約2.0ペクチン液化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0.2mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、試料溶液A、B及びCとする。

基質溶液５mL及び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４mLを、粘度計の管Dから球Aに入れ、37±0.5℃の水浴中に10分間放置した後、試料溶液A１mLを加え、30秒以内によく振り混ぜ、37±0.5℃の水浴中に10分間放置する。粘度計の管Eから静かに吸引して液面を球Cの中心部まで引き上げた後、吸引を止め、30秒以内に重力により流下させ、液面が球Bの上の標線から下の標線まで流下するのに要する時間ta_1を測定する。別に、水５mL及び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４mLを、粘度計の管Dから球Aに入れ、37±0.5℃の水浴中に10分間放置した後、試料溶液A１mLを加え、30秒以内によく振り混ぜ、37±0.5℃の水浴中に正確に10分間放置する。以下同様の方法で粘度計を操作し、流下時間ta_2を測定し、T_A（ta_1-ta_2）を求める。次に、別に、試料溶液B及びCにつき、試料溶液Aと同様の方法で操作し、T_B（tb_1-tb_2）及びT_C（tc_1-tc_2）を求める。