

# Megazyme

---

## β-アミラーゼ分析法 (BETAMYL-3<sup>®</sup> 法)

### **BETA-AMYLASE**

ASSAY PROCEDURE  
(BETAMYL-3<sup>®</sup> METHOD)

K-BETA3 05/18

K-BETA3  
(用手法 100 / 200 回分)

**日本バイオコン株式会社**

## はじめに INTRODUCTION:

$\beta$ -アミラーゼは、穀物の発芽や麦芽化中に澱粉の代謝可能または発酵可能な糖への完全な分解において中心的な役割を果たします。また高マルトースシロップの製造において、澱粉枝切酵素との併用で多くの用途が見出されています。 $\beta$ -アミラーゼは通常、澱粉を基質として非特異的な還元糖分析法により測定されます。いくつかの方法において、 $\alpha$ -アミラーゼは低 pH 処理によって最初に不活性化されます。

Mathewson および Seabourn<sup>1</sup>により、Calbiochem Pantrak<sup>®</sup>血清  $\alpha$ -アミラーゼ試薬が穀物  $\alpha$ -アミラーゼの存在下でも  $\beta$ -アミラーゼを測定するために使用できることを発見したことにより、 $\beta$ -アミラーゼ測定法は大きく進化しました。Pantrak 試薬は、*p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトペンタオシド (PNPG5) と *p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトヘキサオシド (PNPG6) の混合物から構成されています。これらの基質は  $\beta$ -アミラーゼによって迅速に加水分解されますが、基質サブサイト結合要件を満たすため、ある程度の鎖長の必要な穀物  $\alpha$ -アミラーゼでもゆっくりとですが切断されることが分かりました。この状況を元にメガザイムは PNPG5 および  $\alpha$ -グルコシダーゼの組合せで特異性を付与した製品 Betamyl<sup>®</sup> ( $\beta$ -アミラーゼ分析試薬)を開発致しました<sup>2</sup>。この試薬は現在では補助酵素を  $\beta$ -グルコシダーゼに変更し、より特異性が高く、より安定性の高い  $\beta$ -アミラーゼ分析試薬 Betamyl-3<sup>®</sup>にリニューアルされました。

メガザイム社 Betamyl-3<sup>®</sup>、 $\beta$ -アミラーゼ試験試薬は、高純度  $\beta$ -グルコシダーゼと *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトトリオシド (PNP  $\beta$ -G3) を使用しています。使用される  $\beta$ -グルコシダーゼ量は、最大感度を示す量が添加されています。基質である PNP  $\beta$ -G3 が  $\beta$ -アミラーゼによりマルトースと *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコースへの加水分解されると、*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコースは試薬中に含まれる  $\beta$ -グルコシダーゼにより直ちに D-グルコースおよび *p*-ニトロフェノールに分解されます(スキーム1)。従って *p*-ニトロフェノールの遊離速度は、 $\beta$ -アミラーゼによるマルトースの遊離速度に正比例します。アルカリ性の反応停止液の添加でフェノラートイオンの黄色の呈色が生じます。

PNP  $\beta$ -G3 と  $\beta$ -グルコシダーゼの混合物には、効果の高い安定剤を含有しています。4°C または 20°C で保存したときの Betamyl-3<sup>®</sup> 基質溶液のブランク吸光度増加は、Betamyl<sup>®</sup> 試薬のものより極めて僅かになりました。

## 正確さ – ACCURACY -

標準誤差5%未満が容易に達成できます。

## 特異性 – SPECIFICITY -

この測定法は  $\beta$ -アミラーゼに対して極めて特異性が高いです。基質は  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびアミログルコシダーゼによっても加水分解されますので注意が必要です。

## キット内容 – KITS -

100/200 回分析用キットを提供しています。キットには以下のものが含まれます。

**ボトル1:(2本)** 各バイアルには、*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトトリオシド (PNP  $\beta$ -G3) と  $\beta$ -グルコシダーゼ (50U) および安定剤を含有しています。  
-10°C以下で4年以上安定です。

**ボトル2:** トリス塩酸緩衝液 (25mL, 1M, pH8.0)、EDTA二ナトリウム (20mM) およびアジ化ナトリウム (0.02% w/v) を含有。4°C でおよそ4年間安定です。

**ボトル3:** MES緩衝液(48mL、1M、pH6.2)およびEDTA二ナトリウム(20mM)、BSA 10mg/mL およびアジ化ナトリウム(0.09%w/v)を含有します。4°Cでおよそ4年間安定です。

**ボトル4:** システイン塩酸塩(16g)。室温で4年以上安定です。

**ボトル5:**  $\beta$ -アミラーゼ活性の麦芽標準品 (活性はボトルラベルに記載)。室温で4年以上安定です。

## 試薬溶液／懸濁液の調製

### -PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS-

1. ボトル1の内容物を 10mL の沸騰後冷却した蒸留水に溶解します(沸騰は微生物汚染の低減と、脱気による試薬の安定性の向上が目的です)。これを **Betamyl-3<sup>®</sup> 基質溶液**と称します。適切な容量に分けてポリプロピレンチューブに-10°C以下で保存して下さい。試薬は使用するまで氷上で待機させて下さい。必要になるまで**2本目のボトルを溶解しないで**下さい。-10°C以下で2年以上安定です。
2. **抽出緩衝液A** : ボトル2の内容物 2.5mL を取り、蒸留水で 50mL に希釈します。使用前に 0.88g のシステイン塩酸塩(ボトル4; **G-LCYST200**; 最終濃度約 100mM)を添加し、4M NaOH で pH 8.0 に調整します。4°Cで8時間安定です。
3. **希釈／分析緩衝液B**: ボトル3の全内容を蒸留水で 500mL に希釈します。4°Cでおよそ1年安定です。
4. 付属のボトル4をそのまま使用して下さい。室温で4年以上安定です。
5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。室温で4年以上安定です。

### 追加抽出緩衝液の調製 - PREPARATION OF ADDITIONAL EXTRACTION BUFFER -

#### 0.05M トリス-塩酸緩衝液; 1mM EDTA含有

6.06g のトリス緩衝液(**B-TRIS500**)および 0.37g の EDTA 二ナトリウム(Sigma E4884 または同等品)を 700mL の蒸留水に溶解します。溶解後、1M HCl で pH 8.0 に調整後、1Lに定容します。4°Cでおよそ3ヶ月安定です。

使用直前に、1.75g のシステイン塩酸塩(**G-LCYST200**)を 100mL の上記緩衝液に添加し、4M NaOH で pH 8.0 に調整します(システインの終濃度約 100mM)。4°Cで8時間安定です。

緩衝液を使用する直前に、システインを緩衝液Aに添加します(pH調整が必要です)。システインは未発芽の穀粒に存在する「不溶性」 $\beta$ アミラーゼを抽出するために必要とされています。この緩衝液は、Erdal(1993)<sup>3</sup>および Santos and Riis(1996)<sup>4</sup>による研究に基づいて、当初の推奨値から変更されています。  
システインを添加しないで抽出された酵素は、「可溶性」 $\beta$ アミラーゼと呼ばれています。一方、システイン添加にて抽出されたものは「総」 $\beta$ アミラーゼと呼ばれます。

## 追加希釈／分析緩衝液の調製

### - PREPARATION OF ADDITIONAL DILUTION/ASSAY BUFFER -

#### 0.1M MES緩衝液; 1mM EDTA、1 mg/mL BSA、0.02%アジ化ナトリウム含有

700mL の蒸留水に 21.3g のMES一水和物(**B-MES500**)および 0.37g のEDTA二ナトリウム(Sigma E4884 または同等品)を溶解する。4M(16g/100mL)の水酸化ナトリウムで pH 6.2 に調整し、1Lに定容します。BSA(Sigma A2153 または同等品) 1.0g と防腐剤としてアジ化ナトリウム 0.2g を加えます。4°Cで2年以上安定です。

## CAUTION

1. pH 6.2 に調整するまでアジ化ナトリウムを緩衝液に添加しないでください。  
酸性溶液にアジ化ナトリウムを加えると、有毒なガスが放出されることがあります。
2. 防腐剤としてアジ化ナトリウムを添加せずに希釈緩衝液を調製する場合は、用事調製して下さい。

## 反応停止液 – STOPPING REAGENT –

### 1% (w/v) トリス緩衝液 (pH 8.5)

トリス緩衝液(**B-TRIS500**) 10g を 900mL の蒸留水に溶解する。pH 8.5 に調整し、1Lに定容します。室温で1年間安定です。

## 装置 – EQUIPMENT –

1. 使い捨ての 13mL 容ポリプロピレン試験管。例 Sarstedt 60.541.685 PP
2. 使い捨ての 1.5mL ポリプロピレン微量遠心管。例 Sarstedt 72.692
3. 使い捨てプラスチックマイクロキュベット(光路1cm、1.5mL)。例 Plastibrand® 7591 15
4. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman® (100 $\mu$ L および 200 $\mu$ L)。
5. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipipette®
  - 5.0mL Combitip® (基質溶液 0.2mL 分注用)
  - 25 mL Combitip® (抽出緩衝液と停止液 3.0mL 分注用)
6. 分析用天秤
7. 分光光度計を 400nm に設定
8. ボルテックスミキサー
9. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
10. 卓上型遠心分離機または Whatman GF/A グラスファイバー濾紙
11. マイクロ遠心分離機(13,000rpm; 15,000 $\times g$  対応)。例 Eppendorf 54XX
12. 実験室ミル(篩サイズ 0.2mm 設定)。例 Buhler Miag ディスクミル DLFU:0.2mm。0.5mm 篩付 Frisch Pulverisette 14®, または Tecator Cyclotec® Mill。

## 標準品と諸注意 – CONTROLS AND PRECAUTIONS –

1.  $\beta$ -アミラーゼは低タンパク質濃度で高度に希釈された場合、極めて不安定です。従って追加希釈/分析緩衝液が記載の通り正確に調製されること、特にウシ血清アルブミン(BSA)を所要量含有することが不可欠です。
2. 分析ごとに試薬ブランク値を測定する必要があります。試薬ブランクは予め加温により平衡化した **Betamyl-3®** 基質溶液 0.2mL に停止試薬 3.0mL を加えた後、麦芽エキスの希釈液 0.2mL を加えます。1回の分析に試薬ブランク1本で十分です。
3. 試薬ブランク吸光度値が 0.3 を超える場合、その **Betamyl-3®** 基質は廃棄しなければなりません。
4. 分析吸光度値が 1.8 を超える場合、酵素抽出物を緩衝液Bで希釈し、再分析する必要があります。その後、計算式は希釈度で補正します。

5. PNP  $\beta$ -G3 は穀物  $\alpha$ -アミラーゼによる切断には非常に抵抗性がありますが、ある種の  $\alpha$ -アミラーゼ、特に真菌由来の酵素には分解できるものがありますのでご留意下さい。

このように本分析法は一定レベルの真菌  $\alpha$ -アミラーゼ活性を含む物質、例えばカビ由来  $\alpha$ -アミラーゼ添加小麦粉では  $\beta$ -アミラーゼを特異的に測定することはできません。また本基質は  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびアミログルコシダーゼによって急速に加水分解されます。

#### 有用なヒント：

1. 基質は凍結状態で保存し、使用時解凍後は氷冷保管して下さい。  
供給時の凍結乾燥粉末では基質混合物は $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で4年間以上安定です。
2. キットごとの分析回数は、使用する全試薬の容量を半分にし、分光光度計のセミマイクロセルを使用することによって2倍に増やすことができます。但し最終反応混合物中の基質濃度は変更しないで下さい。

## 分析手順： - ASSAY PROCEDURE -

### 酵素抽出：

1. 麦芽または大麦を適切な実験室ミルで 0.5mm スクリーンに通します。
2. 13mL 容量ポリプロピレン試験管に小麦粉 0.5g を精秤し、抽出緩衝液 5.0mL を加えます。
3. ボルテックスミキサーで時折激しく攪拌しながら(1時間に5回以上)、室温で1時間酵素を抽出させます。または試験管を転倒型攪拌機に入れ、転倒させながら攪拌を1時間行います。
4. 酵素調製物の一定量をワットマン GF/A ガラス繊維濾紙を通して濾過させるか、卓上またはマイクロ遠心機で最低  $2,000 \times g$  で10分間遠心分離します。
5. 濾液 0.2mL を希釈／反应用緩衝液B 4.0mL に加え、混合して  $\beta$ -アミラーゼ活性の検定に使用します。

#### NOTE：

同じ抽出物中で  $\alpha$ -アミラーゼ量を分析する場合は、Ceralpha 法では次のように実行します。

1. Ceralpha 緩衝液A(Ceralpha ブックレット **K-CERA** の3ページに記載) 3mL に希釈麦芽または大麦抽出物 0.2mL(上記の Betamyl-3<sup>®</sup>分析で使用したもの)を添加
2.  $\alpha$ -アミラーゼ分析を行なう(本書の6ページ)。

### $\beta$ -アミラーゼ分析

1. 希釈した麦芽抽出物の 0.2mL を 13mL 容ポリプロピレン試験管の底に直接分注し、 $40^{\circ}\text{C}$  で約5分予備加温します。
2. Betamyl-3<sup>®</sup> 基質溶液を $40^{\circ}\text{C}$ で約5分間予備加温します。
3. 希釈した麦芽エキスを含む各試験管に Betamyl-3<sup>®</sup> 基質溶液 0.2mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、添加してから正確に10分間、 $40^{\circ}\text{C}$ で反応します。
4. 10分後、停止試薬 3.0mL を加え、攪拌します。
5. 反応液と試薬ブランクの吸光度を蒸留水に対して 400 nm で測定します。



## 活性算出 - CALCULATION OF ACTIVITY -

### 小麦中のβアミラーゼ活性

熱安定性β-グルコシダーゼ存在下、定義された条件下で基質 PNPβ-G3 より1分間に1マイクロモルの *p*-ニトロフェノールを遊離するのに必要な酵素量を1単位と定義し、これを **Betamyl-3®**単位と称します。

$$= \frac{\Delta E_{400}}{\text{反応時間}} \times \frac{\text{反応液量}}{\text{酵素液量}} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{mM}}} \times \frac{\text{抽出液量}}{\text{酵素量}} \times \text{希釈倍率}$$

$$= \frac{\Delta E_{400}}{10} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{50}{0.5} \times 21$$
$$= \Delta E_{400} \times 19.72$$

ここで:

|                        |   |                                      |
|------------------------|---|--------------------------------------|
| $\Delta E_{400}$       | = | 吸光度(反応液) - 吸光度(ブランク)                 |
| 反応時間                   | = | 10 分                                 |
| 反応液量                   | = | 3.4 mL (1.7mL) <small>半量系</small>    |
| 酵素液量                   | = | 0.2 mL (0.1mL)                       |
| $\epsilon_{\text{mM}}$ | = | 18.1 (上記測定条件下における 4-ニトロフェノールの分子吸光係数) |
| 抽出液量(酵素量)              | = | 0.5g の麦芽に対し 5mL                      |
| 希釈                     | = | 0.2mL を 4.2mL に希釈 (21 倍)             |

### 麦芽エキス中のαアミラーゼ活性測定

(註> Ceralpha 法の詳細と試薬の調製は **K-CERA** ブックレット参照のこと)

1. 適切に希釈した麦芽エキスの 0.2mL (5ページの注記を参照) を 13mL 容ポリプロピレン試験管の底に直接分注し、40°C で約5分間予備加温します。
2. **アミラーゼ HR 試薬®** を40°C で約5分間予備加温します。
3. 希釈した麦芽エキスを含む各試験管に 0.2mL の**アミラーゼ HR 試薬®** を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、添加から正確に10分間、40°C で反応させます。
4. 10分後、停止試薬 3.0mL を加え、攪拌します。
5. 反応液と試薬ブランクの吸光度を蒸留水に対して 400 nm で測定します。

### 活性算出

熱安定性α-グルコシダーゼ存在下、定義された条件下で基質 PNPβ-G3 より1分間に1マイクロモルの *p*-ニトロフェノールを遊離するのに必要な酵素量を1単位と定義し、これを **Ceralpha®**単位と称します。

$$= \frac{\Delta E_{400}}{\text{反応時間}} \times \frac{\text{反応液量}}{\text{酵素液量}} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{mM}}} \times \frac{\text{抽出液量}}{\text{酵素量}} \times \text{希釈倍率}$$

$$= \frac{\Delta E_{400}}{10} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{5}{0.5} \times 336$$
$$= \Delta E_{400} \times 315.6$$

## ここで:

|                  |   |   |
|------------------|---|---|
| $\Delta E_{400}$ | = | 吸光度(反応液) - 吸光度(ブランク)                                      |
| 反応時間             | = | 10 分  |
| 反応液量             | = | 3.4 mL (1.7mL) <small>半量系</small>                         |
| 酵素液量             | = | 0.2 mL (0.1mL)  |
| $\epsilon_{mM}$  | = | 18.1 (上記測定条件下における 4-ニトロフェノールの分子吸光係数)                      |
| 抽出液量(酵素量)        | = | 0.5g の麦芽に対し 5mL   |
| 希釈               | = | 0.2mL を 4.2mL に希釈 (21 倍)、<br>さらに 0.2mL を 3.2mL に希釈 (16 倍) |
|                  | = | 21 × 16 = 336 倍   |

## 分析系に対する $\alpha$ -アミラーゼ干渉度合の測定並びに許容度

穀物の  $\alpha$ -アミラーゼが Betamyl-3<sup>®</sup>基質を分解する速度は  $\beta$ -アミラーゼの1%以下です。

## Betamyl(PNPG5 基準)および Betamyl-3<sup>®</sup>(PNP $\beta$ -G3)の両基質に対する 大麦麦芽 $\beta$ -アミラーゼ活性単位の比較

活性比: Betamyl<sup>®</sup>基質 / Betamyl-3<sup>®</sup>基質 = 58.6

## Betamyl-3<sup>®</sup>活性と、澱粉を基質とした国際単位との換算係数

精製  $\beta$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼ非含有) の Betamyl-3<sup>®</sup>活性を、可溶性澱粉(Nelson/Somogyi 還元糖法)に対する活性と比較し、換算係数を得ました。大麦、小麦、大豆、サツマイモおよび *Bacillus cereus* 由来の  $\beta$ -アミラーゼについて測定した結果は以下の通りです。

表 1

| $\beta$ アミラーゼの起源       | 澱粉 / Betamyl-3 <sup>®</sup> 活性比 |
|------------------------|---------------------------------|
| 麦芽(大麦)                 | 39.7                            |
| 大麦                     | 40.1                            |
| 小麦                     | 20.3                            |
| 大豆                     | 21.2                            |
| サツマイモ                  | 193.9                           |
| <i>Bacillus cereus</i> | 352.2                           |

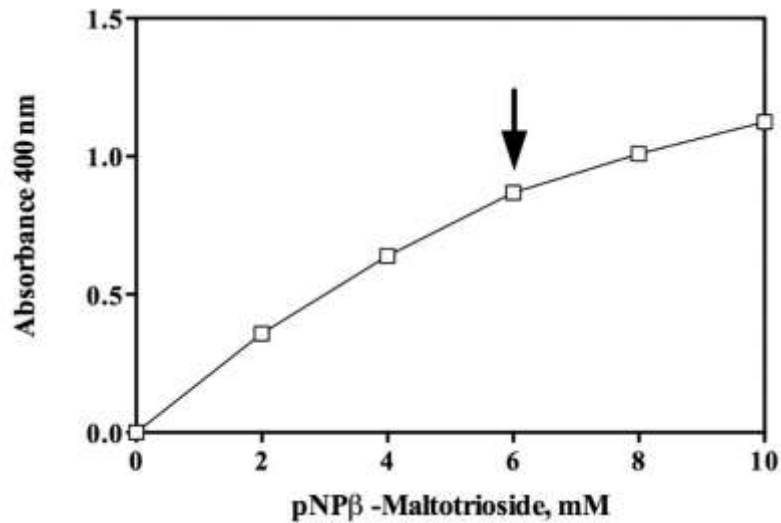


図1. 精製大麦βアミラーゼによる PNP β-G3 加水分解速度に及ぼす基質濃度の影響  
 矢印は、Betamyl-3<sup>®</sup>試薬混合物中の最終濃度を示す。

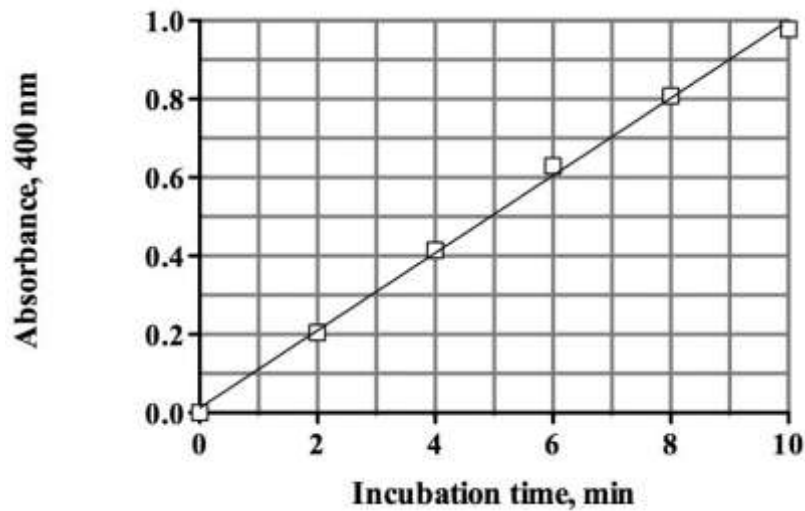


図2. 精製大麦βアミラーゼによる PNP β-G3 (Betamyl-3<sup>®</sup>試薬) 加水分解の経時変化

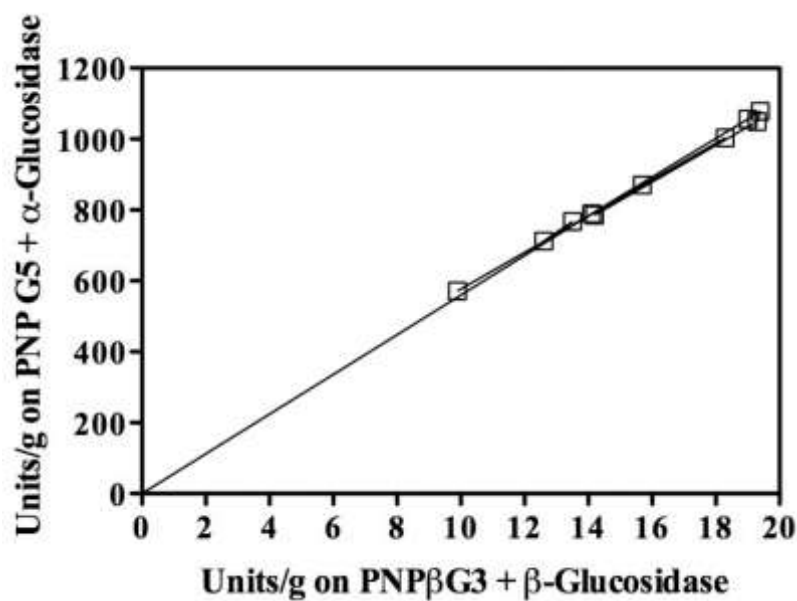


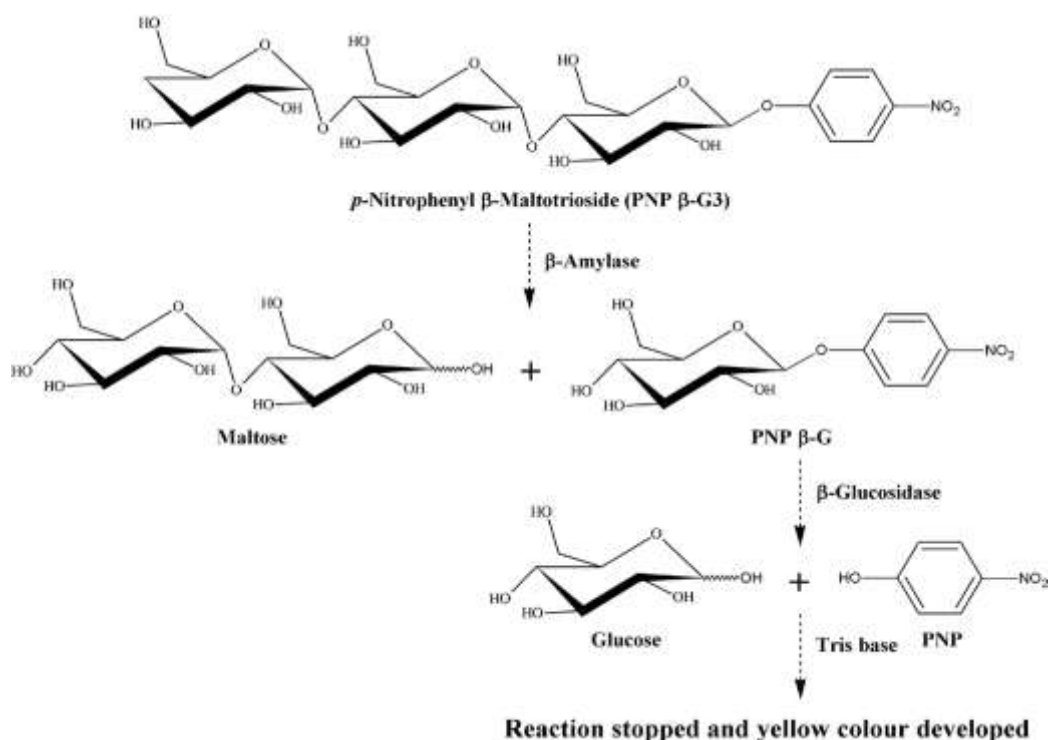
図3. Betamyl<sup>®</sup>基質 (PNPG) と Betamyl-3<sup>®</sup>基質 (PNP β-G3) による麦芽試料10点中のβアミラーゼの活性の比較  
 Betamyl<sup>®</sup> 活性単位 = 58.6 × Betamyl-3<sup>®</sup>活性単位



表2. 各種麦芽サンプル10点中の $\alpha$ アミラーゼ(Ceralpha)、 $\beta$ アミラーゼ(Betamyl-3<sup>®</sup>)および糖化力の比較

| 試料  | Ceralpha (U/g) | Betamyl-3 (U/g) | 糖化力 (EBC)WK (Units/100 g) | DP (°IoB) (Units/100g) |
|-----|----------------|-----------------|---------------------------|------------------------|
| A1  | 157.8          | 13.1            | 243                       | 67.3                   |
| A2  | 153.7          | 13.8            | 239                       | 66.2                   |
| A3  | 218.1          | 14.8            | 242                       | 67                     |
| A4  | 258.8          | 16.4            | 212                       | 59.2                   |
| A5  | 294.8          | 15              | 218                       | 60.8                   |
| A6  | 324.1          | 16.2            | 251                       | 69.4                   |
| A7  | 334.5          | 17.4            | 242                       | 67                     |
| A8  | 268.6          | 10.5            | 226                       | 62.9                   |
| A9  | 241.1          | 15.7            | 253                       | 69.9                   |
| A10 | 187.8          | 15.1            | 229                       | 63.6                   |
| B1  | 172            | 13.9            | 220                       | 61.3                   |
| B2  | 186.8          | 17.7            | 228                       | 63.4                   |
| B3  | 183            | 17.9            | 220                       | 61.3                   |
| B4  | 174.2          | 17.4            | 233                       | 64.7                   |
| B5  | 202.9          | 12.8            | 229                       | 63.6                   |
| B6  | 192.5          | 16.8            | 253                       | 69.9                   |
| B7  | 353.5          | 9.6             | 217                       | 60.5                   |
| B8  | 167.3          | 14.4            | 230                       | 63.9                   |
| B9  | 263.5          | 11.8            | 207                       | 57.9                   |
| B10 | 278.7          | 13.1            | 233                       | 64.7                   |

糖化力は Analytica-EBC 法 4.12(麦芽の消化力)を、  
 DP(°IoB)は  $DP(°IoB) = [DP(WK) + 16] / 3.85$  の計算式から算出。  
 この結果から、DP と  $\beta$ -アミラーゼまたは  $\alpha$ -アミラーゼ活性との間に相関はない。



### スキーム1. Betamyl-3<sup>®</sup> $\beta$ アミラーゼ分析手順の理論的根拠

PNP  $\beta$ -G3 が  $\beta$ -アミラーゼによりマルトースおよび PNP  $\beta$ -G に切断されると、PNP  $\beta$ -G は試薬混合物の補助酵素である過剰量の  $\beta$ -グルコシダーゼによって *p*-ニトロフェノールおよびグルコースに迅速に切断される。

## 文献

1. Mathewson, P. R. & Seabourn, B. W. (1983). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **31**, 1322-1326.
2. McCleary, B. V. & Codd, R. (1989). *Journal of Cereal Science*, **9**, 17-33.
3. Erdal, K., Jensen, M. O., Kristensen, M., Krogh, J. J., Riis, P. & Vaag, P., E. B. C. *Proceedings of the 24th European Brewery Convention Congress*, Oslo, 1993, 147.
4. Santos, M. M. & Riis, P. (1996). *Journal of the Institute of Brewing*, **102**, 271-275.

---

# 日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル  
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

**TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)**

**E-mail : info@biocon.co.jp**

**Homepage : http://www.biocon.co.jp**

---

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません