

# Megazyme

---

## α-アミラーゼ分析法

(CERALPHA 法)

植物及び微生物 α-アミラーゼ測定用

## ALPHA-AMYLASE

ASSAY PROCEDURE

(CERALPHA METHOD)

K-CERA 06/18

K-CERA

(用手法 100/200 回分)

AOAC Method 2002.01

AACC Method 22-02.01

ICC Standard No. 303

**日本バイオコン株式会社**

## はじめに - INTRODUCTION -

微生物由来の $\alpha$ -アミラーゼは穀物製品やその処理において澱粉加工に広く用いられています。穀物や穀物製品中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼのレベルはこれら産業開発に大きな影響を与えます。製パンにおいて、 $\alpha$ -アミラーゼのレベルは酵母によって吸収・利用可能な糖類にまで分解する程度に十分でなければなりません。多すぎるとパンのクラム(内層)がべたついたり製造上の支障が生じるような過度の澱粉分解を引き起こしたりするなどの問題を生じます。醸造では麦芽の $\alpha$ -アミラーゼのレベルは品質の鍵となる重要な要素です。 $\alpha$ -アミラーゼはサイレージ添加剤にも使用され、澱粉分解を促進しバクテリアの生育に必要な発酵性の糖を供給します。バクテリア、カビ及び穀物 $\alpha$ -アミラーゼはアミラーゼ HR 試薬で測定できますが、分析条件(特に pH)は酵素によって適切に修正する必要があります。アミラーゼ HR 試薬は $\alpha$ -アミラーゼに特異的です。この基質は $\beta$ -アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼなどのエキソ型の酵素によって分解されることはありません。

## 原理 - PRINCIPLE -

アミラーゼ HR 試薬を採用した $\alpha$ -アミラーゼ Ceralpha 分析法は、過剰量の耐熱性 $\alpha$ -グルコシダーゼ存在下、ブロック修飾したオリゴ糖基質 *p*-ニトロフェニル-マルトヘプタオシド(BPNPG7)が採用されています(非還元末端が保護されているためにエキソ型酵素の分解を受けません)。

エンド型の $\alpha$ -アミラーゼがこのオリゴ糖基質を加水分解すると、 $\alpha$ -アミラーゼがこのオリゴ糖基質を加水分解すると *p*-ニトロフェニルマルトオリゴ糖が生じ、さらに補助酵素の $\alpha$ -グルコシダーゼがグルコースと *p*-ニトロフェノールに瞬時に分解します。反応模式図をスキーム1(13ページ)に示し、分析直線性を図1(7ページ)に示しました。

基本的に穀粉抽出物や培養液を基質混合物を定められた条件下で反応させた後、弱アルカリ溶液を加えて反応を停止させ(発色)、400 nm での吸光度を測定します(以前は 410 nm を用いていましたが吸光度のピークは 400 nm でした)(ページ8、図4参照)。この測定値はサンプル中の $\alpha$ -アミラーゼ活性に比例します。

Amylase HR 試薬は穀物、カビ、バクテリアの $\alpha$ -アミラーゼを定量的に測定できます。本来の Ceralpha 試薬に採用されていたアミログルコシダーゼ、酵母の $\alpha$ -グルコシダーゼを耐熱性 $\alpha$ -グルコシダーゼに代替したことで、幅広い pH 域(5.2~7.0)、温度帯(~60°C)での分析を可能にしています。この新しい試薬を用いた場合、穀物 $\alpha$ -アミラーゼ活性の最適 pH は 5.2~5.4 です(ページ12、図7参照)。また、Amylase HR 試薬を用い、この pH で穀物 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した値は、旧 Ceralpha 試薬(アミログルコシダーゼと $\alpha$ -グルコシダーゼを含む)を用い pH 5.2 で測定した値と一致します。ブロック型 *p*-ニトロフェニル-マルトヘプタオシドを基質に用いた混合試薬はカビ、穀物、バクテリア $\alpha$ -アミラーゼに拘わらずお使い戴くことができます。

## 正確さ - ACCURACY -

標準誤差5%未満が容易に達成できます。

## キット - KITS -

キットには 100/200 回分析可能な、以下のものが入っています。

1. 分析法マニュアル
2. 基質 BPNPG7 と 耐熱性 $\alpha$ -グルコシダーゼの凍結乾燥品
3. 濃縮 抽出用緩衝液
4. 濃縮 反応停止試薬
5. 麦芽粉末標準品

## 特異性 - SPECIFICITY -

本分析法は  $\alpha$ -アミラーゼに極めて特異的です。

表1. 小麦  $\alpha$ -アミラーゼ測定における Ceralpha 法の再現性<sup>a</sup>

試料	1日目		2日目		3日目		4日目		平均
A	0.365	0.390	0.365	0.354	0.384	0.379	0.385	0.398	0.378
B	0.486	0.534	0.463	0.502	0.502	0.507	0.514	0.486	0.499
C	0.255	0.259	0.27	0.286	0.265	0.287	0.264	0.284	0.271
D	0.142	0.146	0.143	0.150	0.142	0.137	0.135	0.153	0.143
標準誤差 <sup>b</sup>	0.0134		0.0134		0.0134		0.0134		0.0067

a 4試料につき、各2連で4日間分析（吸光度 400nm）

b 各サンプル平均についての分散の推定値に基づいて算出。

一点測定の標準偏差（日差偏差）= 0.0189 cv% = 4.05

### 基質（1バイアル当たり）

ブロック型 *p*-ニトロフェニル-マルトヘプタオシド（BPMPG7, 54.5 mg）  
耐熱性  $\alpha$ -グルコシダーゼ（125 U, pH 6.0）

全量を 10mL の蒸留水に溶かし、2~3mL ずつに小分けにし冷凍保存します。  
0~5°Cで保管した場合、基質は1週間安定です。一方冷凍状態では1年以上の保存が可能です。

### 麦芽粉末標準品

$\alpha$ -アミラーゼ活性標準品の麦芽粉末（瓶のラベルに表示）。少なくとも1つの小麦粉や麦芽粉を二次標準粉末として標準化されることをお奨めます。

### 溶液

#### (1) 濃縮緩衝液：（緩衝液A）

（1M リンゴ酸ナトリウム、1M 塩化ナトリウム、40mM 塩化カルシウム、0.1%アジ化ナトリウム）

使用前に 50mL の全内容物（結晶性沈殿物が生成している場合がありますが、それを含め）を蒸留水で 1,000mL に希釈します。pH は 5.4 であることを確認、必要により調整して下さい。  
0~5°Cで1年間安定しています。

#### (2) 濃縮 反応停止試薬 [20%(w/v) リン酸三ナトリウム溶液、pH~11]

全量(25mL)を蒸留水で 500mL に希釈します。室温で3ヶ月安定です。

### 追加抽出液の調製

#### A. 緩衝液A（穀物、カビ $\alpha$ -アミラーゼ用）

リンゴ酸 (Sigma M0875 または同等品; 1M)	134.1 g /L
水酸化ナトリウム	70.0 g
塩化ナトリウム (1M)	58.5 g
塩化カルシウム二水和物 (40mM)	5.9 g
アジ化ナトリウム (Sigma S2002 または同等品; 0.1%)	1.0 g

リンゴ酸、塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを 800mL の蒸留水に加え、室温まで冷却し、塩化カルシウムを加えます。水酸化ナトリウム(4M)または塩酸(4M)を滴下して pH を 5.4 に調整します。その後アジ化ナトリウムを加え、1Lに定容します。室温で保管して下さい。

使用時、この濃縮緩衝液 50mL を蒸留水で1Lに希釈して下さい。

## B. 緩衝液B (*Bacillus* sp.. $\alpha$ -アミラーゼ用)

マレイン酸 (Sigma M0375 または同等品; 0.1 M)	23.2 g /2 L
塩化ナトリウム	11.6 g
塩化カルシウム二水和物 (2mM)	0.6 g
アジ化ナトリウム (Sigma S2002 または同等品; 0.1%)	0.2 g

マレイン酸、塩化ナトリウムを 1600mL の蒸留水に溶解させた後、塩化カルシウムを加えます。4 M NaOH(160 g/L)を滴下して pH を 6.5 に調整後、アジ化ナトリウムを加え、2Lに定容します。室温で保管して下さい。

この緩衝液は希釈せずにそのままご使用下さい。ある種の微生物  $\alpha$ -アミラーゼは希釈時に失活するものがありますが、この場合は緩衝液にBSA (0.5mg/mL)を加えて下さい。

### CAUTION

1. pH 5.4 または pH 6.5 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. 粉末リンゴ酸とマレイン酸は刺激性がありますので、取扱いには留意願います。

## 追加停止液 - 1% w/v リン酸3ナトリウム, pH 11.0 -

無水リン酸3ナトリウム 10g を蒸留水 1L に溶解し、pH を約 11.0 に調整します。室温で少なくとも3ヶ月安定です。

## 装置 (推奨):

1. ガラス試験管 (12mL 容および 20mL 容)
2. ポリプロピレンチューブ (13mL 容)
3. ピペッター (例; Gilson Pipetman®) 基質 0.1mL 分注、酵素抽出物 0.2mL 分注用
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペット、例 Eppendorf Multipette®
  - 5 mL コンビチップ® (濃縮酵素液 0.5mL 分注用)
  - 25mL コンビチップ® (希釈液分注用)
5. 上皿天秤
6. 分光光度計 400nm に調整
7. ボルテックスミキサー (オプション)
8. 40°C に設定した恒温水槽
9. 実験室用タイマー (ストップウォッチ)
10. 卓上遠心機またはワットマン GF/A ガラス繊維濾紙 (9cm 径)。

## 標準品ならびに諸注意 - CONTROLS AND PRECAUTIONS -

1.  $\alpha$ -アミラーゼは、あらゆる体液中に高レベルで存在する酵素です。従って基質溶液の取り扱いや分注の際には使い捨て手袋を使用することを推奨します。
2. Ceralpha 試薬を溶解するための水は高純度かつ低汚染であることが不可欠です。作りたての蒸留水が得られない場合は、必ず蒸留水を加熱して沸騰させ、使用前に30°C以下に冷却してから使用して下さい。洗浄瓶中には藻類が生育しており、そのような水で溶解した試薬の安定性を著しく損なうのに十分な  $\alpha$ -アミラーゼが産生されている可能性に留意して下さい。

3. 凍結乾燥基質は室温で極めて安定です。また溶解時は使用中は 0～5℃で保管し、使用後は-10℃以下で保存する必要があります。1回の分析本数が限られている場合、基質を 2～3mL ずつ小分けにして凍結保存することが推奨されます。
4. 基質を 0～5℃で保存する場合、ブランクの吸光度値は5日間で 0.03 から 0.05 程度増加しますが、これは基質の性能自体には影響しません。但し分析ごとにブランク値を測定する必要があります。またブランク吸光度値が 0.50 と高くても、分析の信頼性または精度には影響しません。
5. 使用する分光光度計は、1%(w/v)のリン酸三ナトリウムに溶解した *p*-ニトロフェノール標準液( $\epsilon_{\text{mM}} = 18.1$ )で標準化すべきです。*p*-ニトロフェノール溶液(10mM)は試薬メーカー様から購入可能です(Sigma N7660 など)。この溶液の一定量を1%(w/v)のリン酸三ナトリウムで 200 倍に希釈した場合、400nm で 0.905 の吸光度が得られるはずです。
6. 分析法はキット同梱の麦芽粉末標準品で標準化する必要があります。標準品の活性は、バイアルラベルに表示されています。なお小麦粉末標準品はご希望により提供可能です。
7. 抽出時間は小麦粉末でも麦芽粉末でも15～20分とする必要があります。

**NOTE :**

各分析ごとに反応ブランク測定の実施が推奨されます。反応ブランクは、0.2mL の基質溶液に 3.0mL の停止試薬を完全に混合した後、0.2mL の酵素サンプルを添加して調製します。

**有用なヒント :**

1. 分析の吸光度値が 1.20 より大きい場合、酵素抽出液を適切な緩衝液で希釈し、再分析する必要があります。
2. セミマイクロ分光光度計キュベットを使用し、試薬を全て半量にすることにより、1キット当たりの検体数を2倍にすることができます。

## 酵素の抽出 - ENZYME EXTRACTION -

### A. 小麦粉末、大麦粉末

1. 小麦、大麦、その他の穀物 10～50g を粉砕(例 Fritsch centrifugal mill 等)し、0.5mm 目の篩を通します。
2. 粉末サンプル 3.0g を精秤し、50mL 容メスフラスコに入れます。
3. 各フラスコに抽出緩衝液(pH 5.4) 20mL を加え、内容物を強く攪拌します。
4. 40℃で15～20分間、時折攪拌しながら酵素の抽出を行ないます。
5. 抽出液を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過するか、1,000 *g* で10分間遠心分離します。分析は2時間以内に行ないます。

**NOTE :**

小麦粉標準品は非常に均一性が高い粉末です。従いまして、少ないサンプル量で抽出可能です(例 1.0g/6.0mL 緩衝液)。但し計算式には補正が必要です。

### B. 麦芽粉末

1. 約 20g の麦芽を粉砕し、0.5mm 目のふるいを通します。



2. 粉碎した麦芽粉末 0.5g を精秤し、100mL 容メスフラスコに入れます。
3. メスフラスコに、0.02%塩化カルシウム、0.02%アジ化ナトリウムを含む1%塩化ナトリウム溶液を加え、定容します。
4. 酵素を時折攪拌しながら15～20分間室温で抽出します。
5. 溶液を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過するか、1,000 g で10分間遠心分離します。
6. 濾液 0.5mL を 9.5mL の抽出緩衝液で希釈します。分析は2時間以内に行ないます。

## C. 微生物製剤

### 液状品

1. ポジティブディスプレイメント方式ディスペンサー等を使用し、液状品酵素製剤 1mL を 49mL の緩衝液A(pH 5.4)またはB(pH 6.5)に加え、良く攪拌します。  
この溶液を抽出液原液とします。
2. 抽出液原液 1.0mL に緩衝液(AまたはB)9.0mL を加えて10倍に希釈して良く攪拌します。この工程を分析に適した濃度になるまで繰り返します。  
例えば、市販の産業用酵素 (Kerry 社製、アイルランド) の細菌  $\alpha$ -アミラーゼの場合は抽出液原液を約 4,000 倍に希釈します。

### 粉末品

1. 酵素粉末製剤 1g を精秤し、緩衝液A(pH 5.4)またはB(pH 6.5)50mL を加え、懸濁液を15分間、または酵素が完全に分散・溶解するまで静かに攪拌します。
2. 抽出液を遠沈(1,000 g、10分間)または9cm径 Whatman No.1 濾紙濾過により清澄化します。この溶液を抽出液原液とします。
3. 抽出液原液 1mL に抽出・希釈緩衝液 9.0mL を加えて10倍に希釈します。この工程を分析に適した濃度になるまで繰り返します。

#### NOTE :

粉末酵素製剤の希釈にはメガザイム社では定容法が採用されていません。ブックレット記載情報もこの方法に基づいておりますので原文通りの記載としております。

## 分析方法 - ASSAY PROCEDURE -

### A. 小麦/大麦粉末

1. アミラーゼ HR 試薬溶液を 0.2mL ずつ試験管に分注し、40℃で5分間予熱します。
2. 穀物抽出液を40℃で5分間予熱します。
3. アミラーゼ HR 試薬溶液 0.2mL が入った試験管に、穀物抽出液 0.2mL を試験管底部に添加します。抽出液添加から正確に20分間、40℃で反応します。
4. 20分後、停止試薬 3.0mL を加え、良く攪拌します。
5. 400nm の吸光度を蒸留水に対し読み取ります。

### B. 麦芽・微生物製剤

1. アミラーゼ HR 試薬溶液を 0.2mL ずつ試験管に分注し、40℃で5分間予熱します。
2. 麦芽または酵素抽出液を40℃で5分間予熱します。

3. アミラーゼ HR 試薬溶液 0.2mL が入った試験管に、麦芽または酵素抽出液 0.2mL を試験管底部に添加します。抽出液添加から正確に10分間、40°Cで反応します
4. 10分後、停止試薬 3.0mL を加え、良く攪拌します。
5. 400nm の吸光度を蒸留水に対し読み取ります。

### 活性算出 - CALCULATION OF ACTIVITY -

熱安定性  $\alpha$ -グルコシダーゼ存在下、定義された条件下で基質 BPNPG7 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。

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

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 (麦芽または微生物調製品抽出物) = 20 分 (小麦または大麦抽出物)
反応液量	= 3.4 mL
酵素液量	= 0.2 mL
$\epsilon$ mM	= 18.1 (上記測定条件下における <i>p</i> -ニトロフェノールの分子吸光係数)
抽出液量(酵素量)	= 20mL / 3g (小麦または大麦) = 100mL / 0.5g (麦芽) = 50mL / 1g または 1mL (微生物製剤)
希釈	= 希釈原液の希釈倍率 (麦芽抽出物の場合 20 倍)

#### A. 小麦/大麦粉末

Ceralpha 単位 (CU) / (粉末 g 当たり)

$$= \frac{\Delta E_{400}}{20} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{20}{3.0}$$

$$= \Delta E_{400} \times 0.313$$

#### B. 麦芽

Ceralpha 単位 (CU) / (粉末 g 当たり)

$$= \frac{\Delta E_{400}}{10} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{100}{0.5} \times 20$$

$$= \Delta E_{400} \times 376$$

#### C. 微生物製剤

Ceralpha 単位 (CU) / (製剤 mL または g 当たり)

$$= \frac{\Delta E_{400}}{10} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{50}{1.0} \times \text{希釈倍率}$$

$$= \Delta E_{400} \times 4.7 \times \text{希釈倍率}$$

## 付録 - APPENDIX -

### A. Ceralpha 分析法の酵素濃度と反応時間の直線性

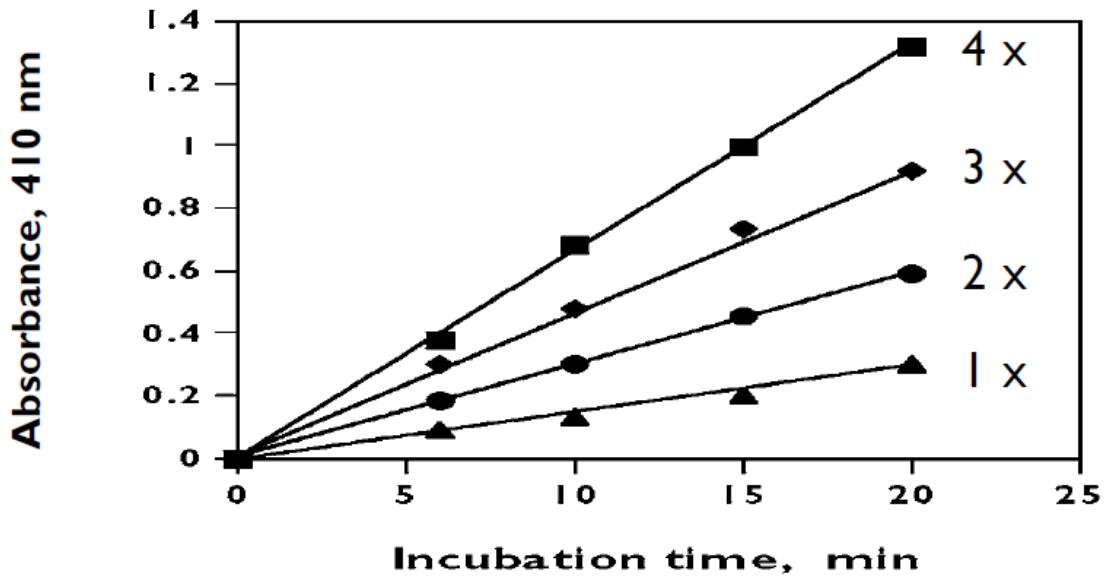


図1. 麦芽  $\alpha$ アミラーゼによる Ceralpha 分析の直線性

酵素濃度を4段階(1x、2x、3x および 4x)でリンゴ酸緩衝液(pH 5.4)中で行った。リン酸三ナトリウム(3.0mL、1%w/v)の添加により、反応を一定時間に終了させた。

### B. 試薬中 $\alpha$ -グルコシダーゼ濃度が $\alpha$ アミラーゼ測定値に及ぼす影響

図2の結果から、試薬中の  $\alpha$ -グルコシダーゼ濃度は 12 U/ml で充分であることが分かる。

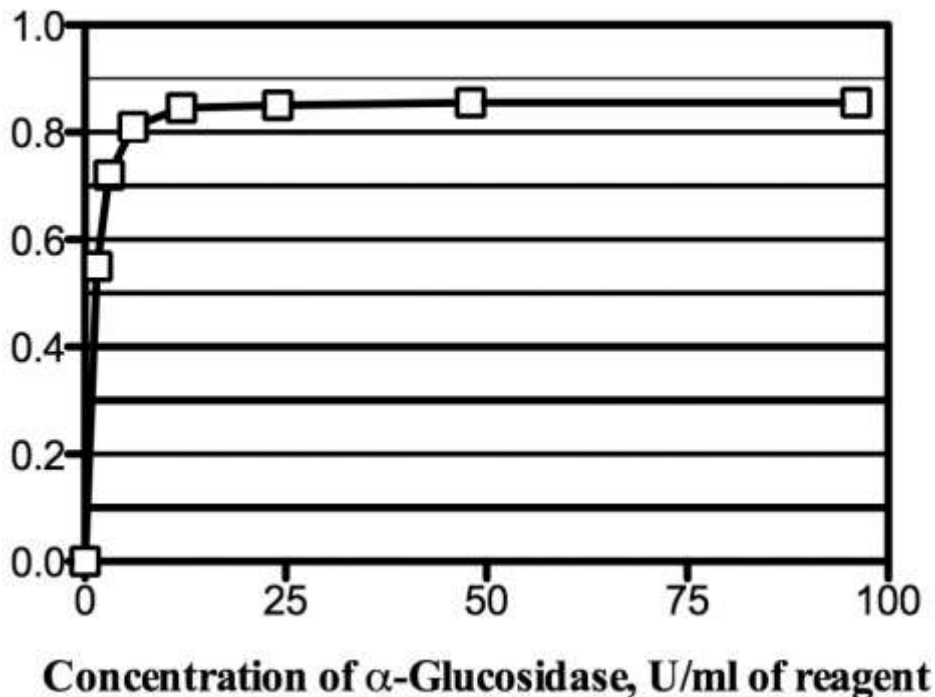


図2. 試薬中の  $\alpha$ -グルコシダーゼ濃度が吸光度に及ぼす影響



### C. 試薬の60°Cでの安定性

試薬溶液を60°Cで0～20分間加温処理後、これらの溶液を用いてカビ  $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定(40°C)し、試薬溶液の安定性を検討した。図3の結果から、試薬は60°Cで非常に安定であることが認められた。なお20分間の加温後のブランク吸光度値の増加は 0.01 未満であり、活性値の低下は未加熱試薬に比して3%未満であった。

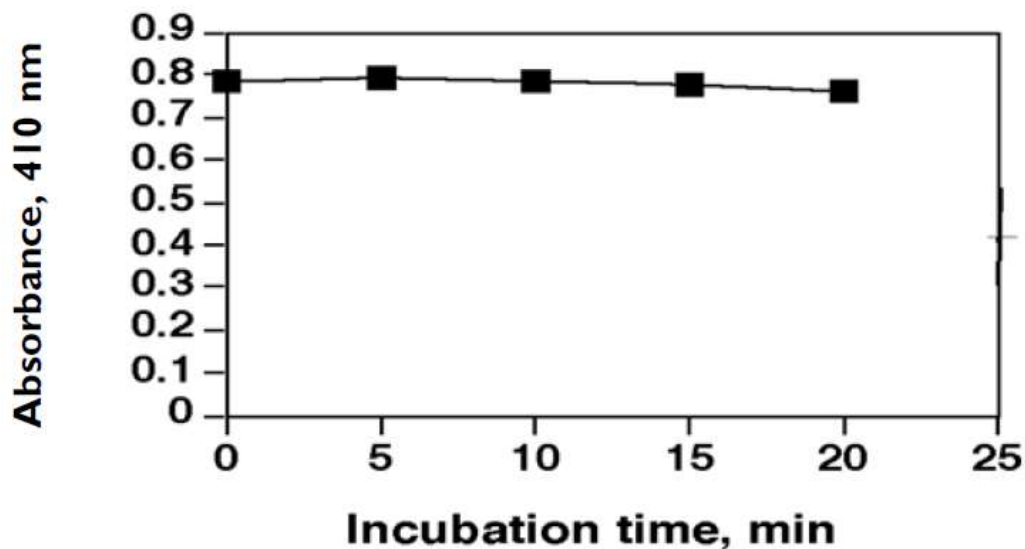


図3. Amylase HR 試薬の熱安定性

試薬溶液を60°Cで0～20分間加温後室温に戻し、カビ  $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した(40°C)

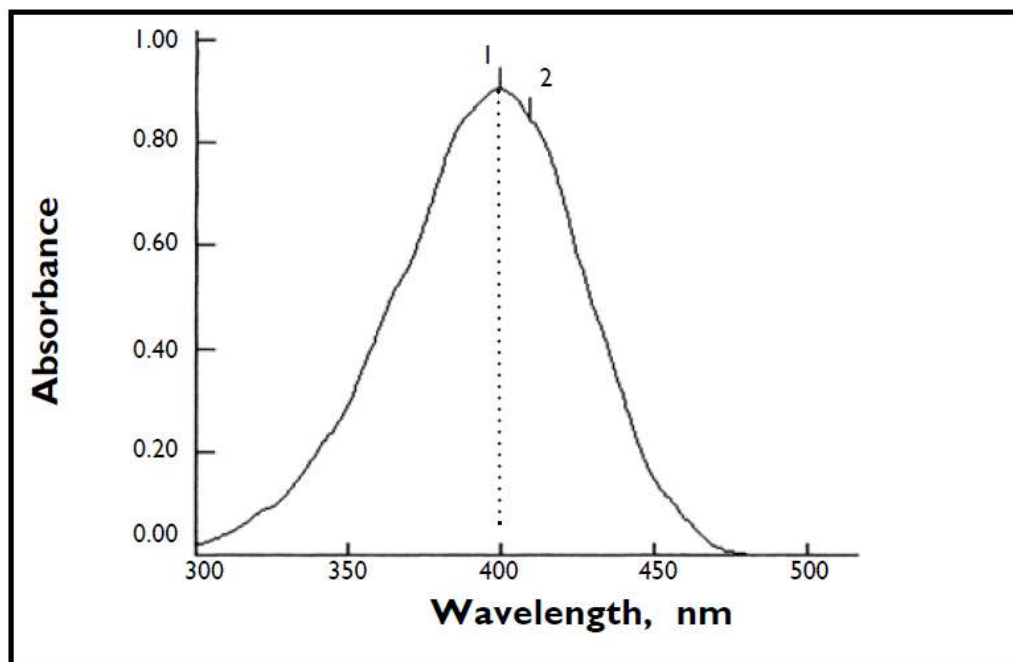


図4. 1%リン酸3ナトリウム(pH 11.0)中の *p*-ニトロフェノール吸収曲線

## D. Ceralpha 単位の澱粉基質を用いた国際単位への換算 - CONVERSION OF Ceralpha Units(CU) TO INTERNATIONAL UNITS(IU) ON STARCH SUBSTRATE -

*Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* 及び大麦麦芽由来精製  $\alpha$ -アミラーゼの、アミラーゼ HR 試薬と国際単位であるACS可溶性澱粉加水分解活性 (1%w/v; Nelson-Somogyi 還元糖法)との換算係数は以下の通りです。

**A.niger** (ともに pH5.4 反応)  
澱粉を用いた国際単位 =  $0.94 \times$  Ceralpha 単位

**B.subtilis** (ともに pH6.5 反応)  
澱粉を用いた国際単位 =  $4.6 \times$  Ceralpha 単位

大麦麦芽 (ともに pH5.4 反応)  
澱粉を用いた国際単位 =  $4.1 \times$  Ceralpha 単位

一定の pH、温度条件下、1分間当り1マイクロモルのグルコースに相当する還元糖量を遊離する酵素量を1国際単位(IU)と定義します

## E. 小麦・カビ $\alpha$ アミラーゼ活性測定における Ceralpha 法と Farrand 法の比較

Farrand 法では基質に  $\beta$ -限界デキストリンを使用し、澱粉分解による澱粉ヨウ素反応の呈色の減少により測定しています。この測定法は穀類試料の場合、穀粉抽出物由来の  $\beta$ -アミラーゼ過剰量存在下で実施されます。カビ試料の場合、精製された  $\beta$ -アミラーゼの添加が必要です。Farrand 法は一般的に英国内で使用され、Rank Hovis 社から供給される  $\beta$ -限度デキストリン製剤が使用されていました。精製  $\beta$ -限度デキストリン(マルトース除去)は、現在ではメガザイム社から入手可能です。

標準 Farrand 法では、抽出液には緩衝液が使用されず、抽出物の pH であるおよそ 5.8 で実施していました。分析機関相互の相関性試験の結果を Campden-Chorleywood 食品研究協会が調整した結果、小麦粉  $\alpha$ アミラーゼの Farrand 法と Ceralpha 法の相関性は次のようになりました。

$$\text{Farrand 単位} = \text{Ceralpha 単位} \times 57 - 1.9$$

小麦粉  $\alpha$ -アミラーゼの相関性については以前に McCleary と Sheehan により同様な報告 (1987)がなされています。すなわち:

$$\text{Farrand 単位} = \text{Ceralpha 単位} \times 57.1$$

カビ由来酵素の場合、関係式は McCleary らにより以下のように報告されています。:

$$\text{Farrand 単位} = \text{Ceralpha 単位} \times 69$$

カビ  $\alpha$ -アミラーゼを添加した小麦粉中の  $\alpha$ -アミラーゼの測定は、2種の酵素が混在することにより複雑になっています。一方(小麦由来)は低レベルで、もう一方(カビ由来)はその数千倍もの高レベルの活性を有するからです。これら成分が均質に混合されていないことによる誤差を最小限に抑えるために、サンプルの秤量を多くして(約 6g / 40mL)、多重に分析する必要があります。

## F. $\alpha$ -アミラーゼ分析における Ceralpha 法(CU)と、ASBC 法(DU)、AACCC 法 22-01(SKBB 単位)との比較

AACCC 法 22-01(SKBB 単位)は、AACCC / ASBC によって供給される「特別な」lintner 澱粉から調製された  $\beta$ -限界デキストリンを使用します。この方法は、30°Cで  $\beta$ -限界デキストリンに  $\alpha$ -アミラーゼを作用させた時に、ヨウ素反応による呈色が特定の色を示すまでの時間を測定します。

ASBC/ EBC/ 国際法 (Dextrinising 単位、DU)は、AACCC 法 22-01 と基質および酵素濃度を同じにして、活性単位も同様に計算します。但し分析は20°Cで実施しますので、同じ麦芽試料の DU 値は、その SKBB 値の約半分となります。

麦芽粉末の  $\alpha$ -アミラーゼ活性分析における Ceralpha 単位(CU)と AACCC 法 22-01(SKBB 単位)との相関を図5に、ASBC(国際)法(DU)との相関を図6に示しました。

麦芽サンプル7点をそれぞれの分析法で2連分析しました。

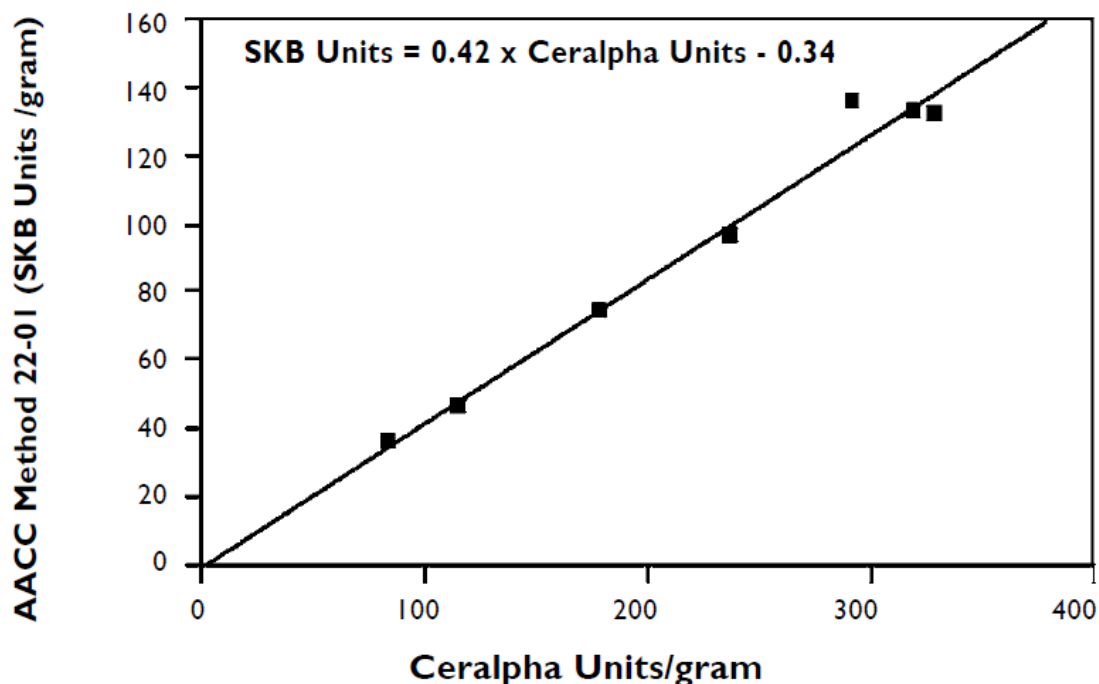


図5. 麦芽粉末  $\alpha$ -アミラーゼ分析における AACCC 法 22-01(SKBB 単位)と Ceralpha 法との相関

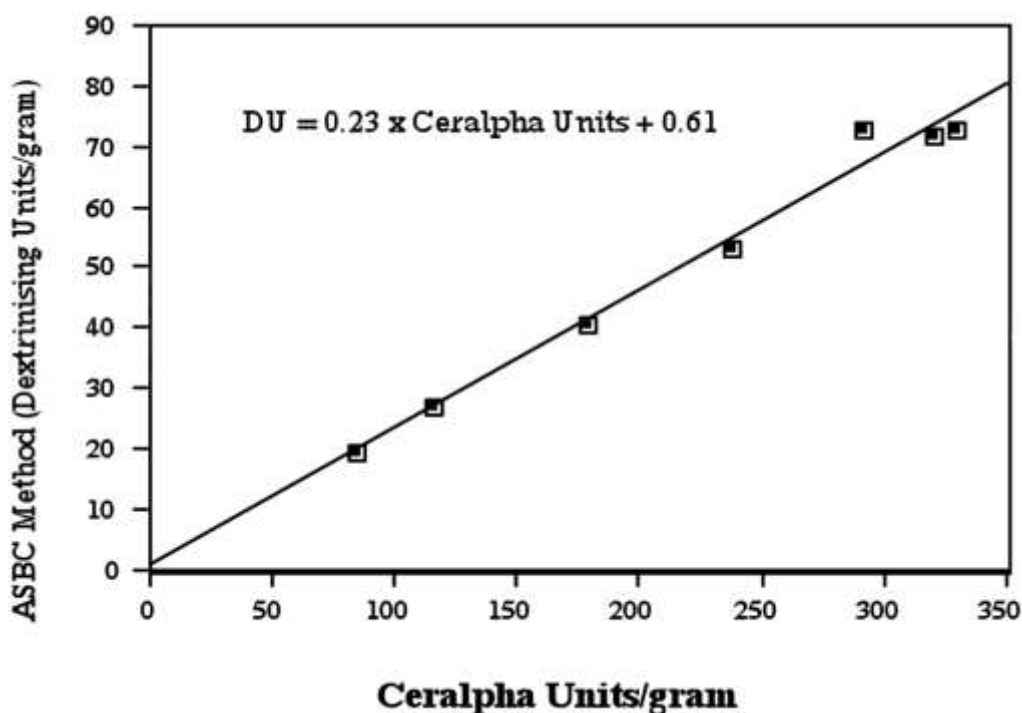


図6. 麦芽粉末  $\alpha$ アミラーゼ分析における ASBC (国際) 法と Ceralpha 法 (CU) の相関

麦芽、カビ、バクテリア  $\alpha$ アミラーゼの SKB 単位から Ceralpha 単位への換算:

麦芽:

$$\text{SKB 単位} = 0.42 \times \text{Ceralpha 単位 (CU)} - 0.34$$

(SKB 法は pH 4.7、Ceralpha 法は pH 5.4 で測定)

カビ:

$$\text{SKB 単位} = 0.60 \times \text{Ceralpha 単位 (CU)}$$

(SKB 法、Ceralpha 法ともに pH 5.4 で測定)

バクテリア:

$$\text{SKB 単位} = 1.8 \times \text{Ceralpha 単位 (CU)}$$

(SKB 法、Ceralpha 法ともに pH 6.5 で測定)

## G. 穀物、カビ、細菌 $\alpha$ -アミラーゼの pH 依存性

小麦麦芽、大麦麦芽、カビ (*A. niger*) およびバクテリア (*B. subtilis*) 由来  $\alpha$ -アミラーゼの pH 依存性をアミラーゼ HR 試薬を採用した Ceralpha 法により測定しました。10mM 塩化カルシウム共存下、穀類およびカビ  $\alpha$ -アミラーゼについてはリンゴ酸およびマレイン酸緩衝液 (100mM、pH5.0~6.4) を用い、細菌  $\alpha$ -アミラーゼではマレイン酸および Bis-Tris プロパン緩衝液 (pH5.6~9.0) を用いて測定しました。精製小麦麦芽およびカビ  $\alpha$ -アミラーゼの pH 依存性を図7に示しました。なお大麦麦芽  $\alpha$ -アミラーゼは小麦麦芽と一致した結果を示しました (データ非開示)。

枯草菌  $\alpha$ -アミラーゼの pH 依存性を図8に示しました。

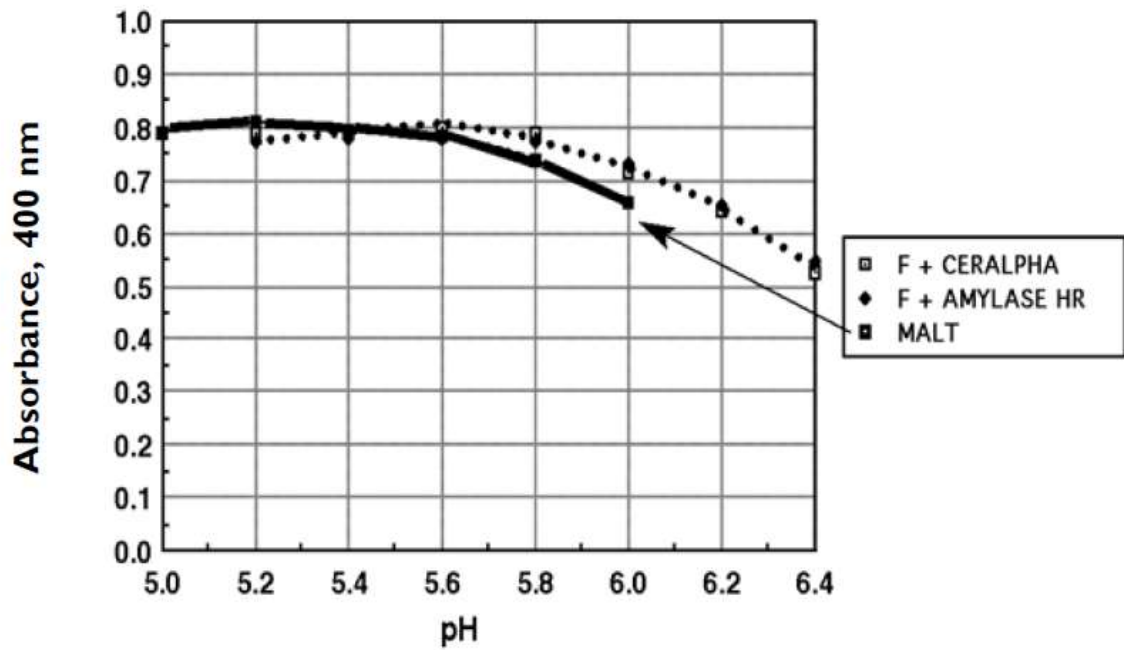


図7. カビおよび小麦麦芽  $\alpha$ アミラーゼの pH 依存性

カビ  $\alpha$ -アミラーゼについては Amylase HR 試薬並びにオリジナルの Ceralpha 試薬(アミログルコシダーゼと酵母  $\alpha$ -グルコシダーゼ含有)の双方で測定を行った。双方の pH 依存性曲線は完全に一致した。

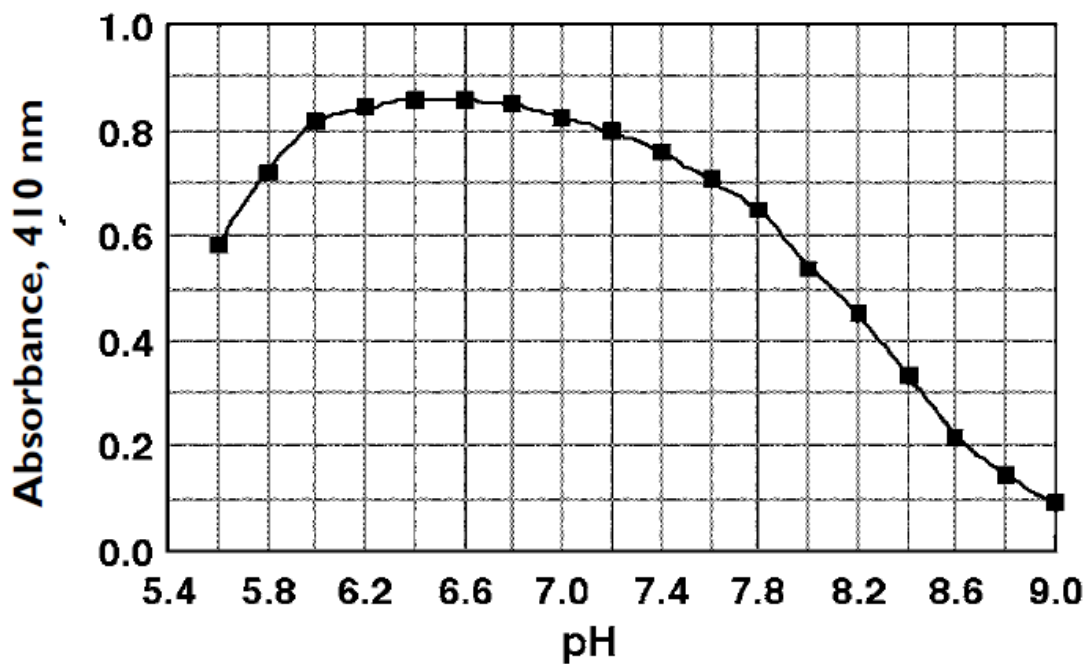
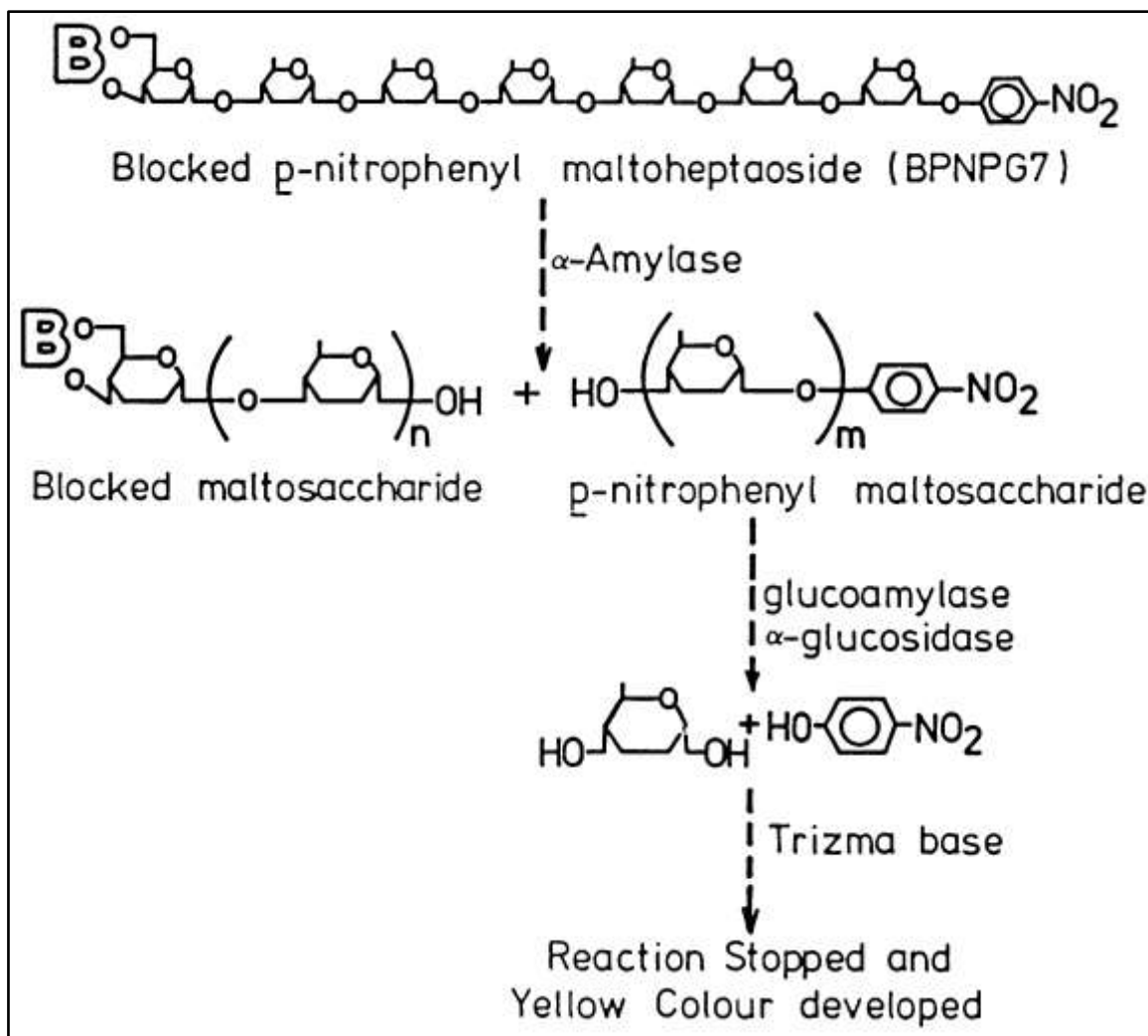


図8. *B. subtilis*  $\alpha$ アミラーゼの pH 依存性



### スキーム1. $\alpha$ アミラーゼ Ceralpha 測定法の概念図

$\alpha$ -アミラーゼは、ブロック化 *p*-ニトロフェニルマルトオリゴ糖基質(BPNPG7)の内部結合を直ちに切断し、遊離した *p*-ニトロフェニルマルトオリゴ糖生成物は、試薬中に過剰量存在する熱安定性  $\alpha$ -グルコシダーゼにより瞬時にグルコースおよび *p*-ニトロフェノールに分解されます。停止試薬のリン酸三ナトリウム(pH~11.0)の添加によりフェノレートイオンの黄色い呈色が生じます。

-----

1. McCleary, B. V. & Sheehan, H. (1987). Measurement of Cereal  $\alpha$ -Amylase: A New Assay Procedure. *Journal of Cereal Science*, **6**, 237-251.
2. Sheehan, H. & McCleary, B. V. (1988). A New Procedure for the Measurement of Fungal and Bacterial  $\alpha$ -Amylase. *Biotechnology Techniques*, **2**, 289-292.
3. McCleary, B. V., McNally, M., Monaghan, D. & Mugford, D. C. (2002). Measurement of  $\alpha$ -amylase activity in white wheat flour, milled malt, and microbial enzyme preparations using the Ceralpha Assay collaborative study. *Journal of AOAC International*, **85**, 1096-1102.



---

# 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