

Megazyme

総澱粉量分析法

(AA/AMG法)

TOTAL STARCH

ASSAY PROCEDURE

(AMYLOGLUCOSIDASE /
 α -AMYLASE METHOD)

K-TSTA 08/19

K-TSTA-50A / -100A

(用手法 50 / 100 回分)

AOAC Method 996.11
AACC Method 76-13.01
(改良点を含む)

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

澱粉は人間の食事の中で主要なエネルギー源です。それは穀物、豆類、根菜類、果物など多くの主食に含まれています。パン、パスタ、朝食用シリアルなど良く使用される食品には澱粉が含まれています¹。澱粉はまた、多くの食品や飼料に著量含まれており、またそのままの状態か化学修飾された形で多くの産業用途があります。澱粉は、主として分岐をほとんど含まない直鎖構造の α -1,4 結合 D-グルカンであるアミロースと、 α -1,4 結合 D-グルカン鎖が高度に α -1,6 分岐した構造を有する枝分れ構造のアミロペクチンの2つの成分から構成されています。

類似した構造を有する多糖類としては、動物組織由来のグリコーゲン、植物由来のフィトグリコーゲンおよびカビ由来の各種 α -グルカンなどがあります。これらは全て、ヒトおよび動物の小腸内の消化酵素により加水分解されるので栄養学的に同等に機能します。この理由からアメリカ飼料管理職員協会(AAFCO)²の検査方法とサービス委員会は、産業界および研究者の協力のもと「食物澱粉」を、すなわち「糊化後、 α -1,4 または α -1,6 結合特異的な精製 α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼ(AMG)によりグルコースが放出される植物、動物および微生物由来のグルコースの α 結合からなる炭水化物。飼料中の濃度は α 結合型糖炭水化物をグルコースに酵素的に加水分解し、遊離したグルコースを測定することにより定量されます。この定義には、植物の澱粉、グリコーゲン、マルトデキストリン、およびマルトース/イソマルトースが含まれる」と定義しました³。

古くから澱粉の測定には様々な方法が用いられてきましたが、この数十年間では熱安定性 α -アミラーゼの存在下高温で澱粉を糊化することで多量の直鎖または分岐デキストリンにまで分解し、その後AMGでグルコースに定量的に加水分解する方法が採用されています⁴⁻¹¹。遊離グルコースはグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ(GOPOD)試薬、またはATPとNADP⁺の存在下、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼとヘキソキナーゼ系を用いて測定されます。澱粉測定におけるAMGと耐熱性 α -アミラーゼは、BaurとAlexanderにより報告され⁴、McClearyら¹⁰により合理化・統合されてAOAC/AACC/ICCの国際基準による研究機関の相互評価を受けました。これら一連の研究の結果、本法はAOAC法996.11、AACC国際法76-13.01およびICC法168として採用されました。

最近発表された動物用飼料およびペットフード中の澱粉測定法(AOAC法2014.10)^{3, 11}では、耐熱性 α -アミラーゼを用いて100°C、pH 5.0で1時間処理する方法を採用しています。著者はこの変更により、AOAC法996.11で得られた結果よりも澱粉値が高くなることを報告すると共に、これはAOAC法996.11および類似法で採用されているpH/温度条件ではマルトデキストリン中の還元末端D-グルコシル残基がD-フラクトースへ異性化するためであるとしています。著者はまた、GOPOD試薬¹²によるグルコース測定は直線性が低いことを報告しており、従来の澱粉定量法は全て「準経験的」なものであることを示唆しました。

Hallによる主張^{3, 11, 12}に基づき、我々は各工程を最初から見直して澱粉分析法を再評価することにしました。具体的には α -アミラーゼによる澱粉液化、AMGによるデキストリンおよびスクロースの加水分解、澱粉加水分解中のマルチュロースの生成、およびGOPOD試薬によるグルコースの測定条件について再評価しました¹³。一連の検討結果により前述のAOAC法996.11が動物飼料やペットフード(表3)、豆、穀物(表4)、朝食用シリアル(表5)、野菜(表6)を含む広範囲の製品中の総澱粉量を測定するための正確で信頼できる方法であることを示しました。またAOAC法996.11を僅かに変更(pH 5で安定に作用する耐熱性 α -アミラーゼを使用)する迅速総澱粉量測定法(RTS)という有効な変法を見出しました(図1)[手順(a)]。

RTS法では広範囲の食品、飼料、植物および穀物製品(天然または加工品)中の総澱粉量測定が可能です。ほとんどのサンプル(例えば、小麦粉)では耐熱性 α -アミラーゼの存在下、約100°Cで加熱することにより澱粉は完全に可溶化されます。一方、高濃度のレジスタントスターチ

を含有するサンプル(例えば、高アミローストウモロコシ澱粉)では、冷 1.7M NaOHまたは熱DM SOによる前処理溶解工程が必要です。可溶性澱粉またはマルトデキストリンのみを含むサンプルの場合、耐熱性 α -アミラーゼとの反応は不要です。

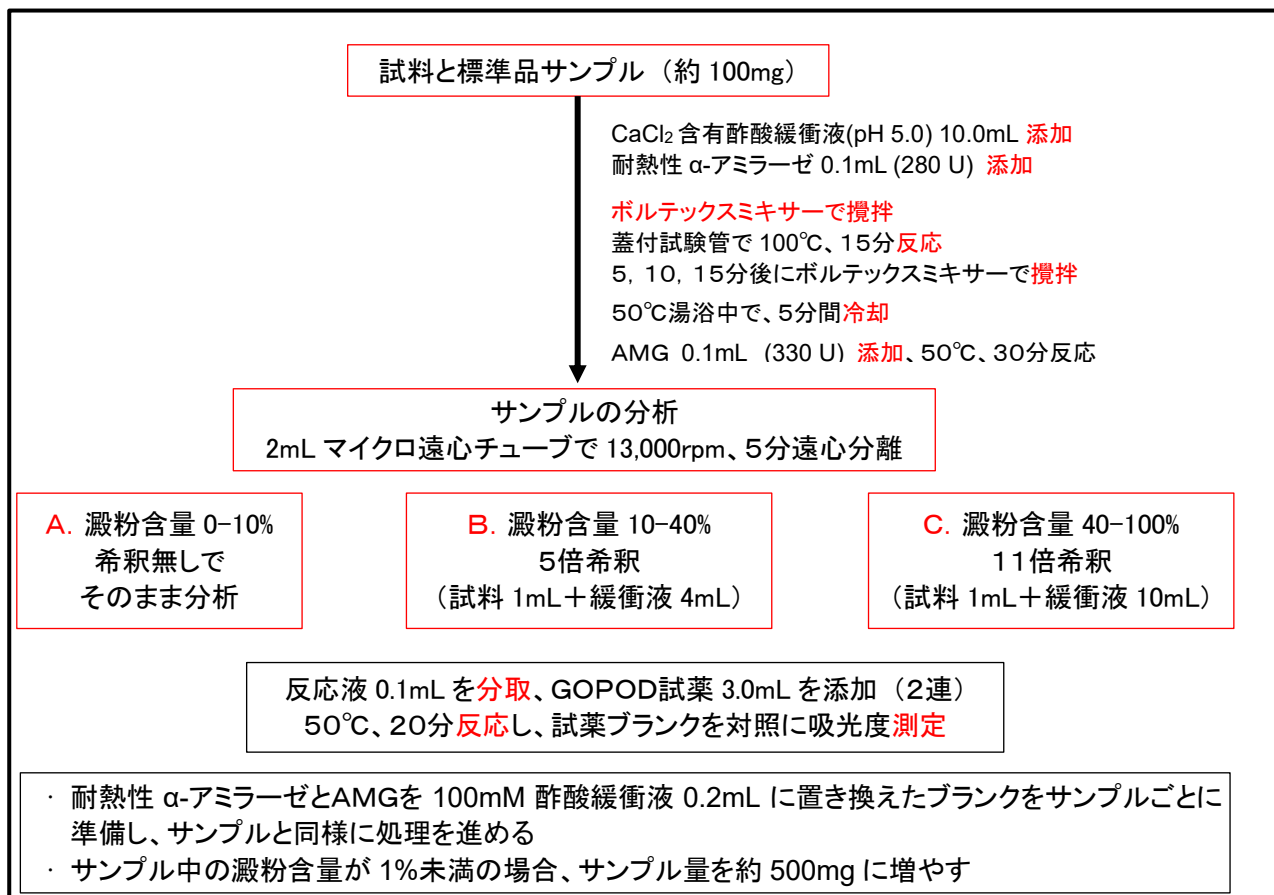
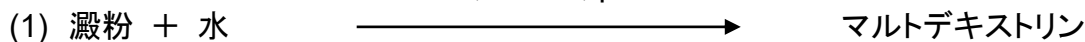


図1. 総澱粉量の測定 [手順(a)]

原理 - PRINCIPLE -

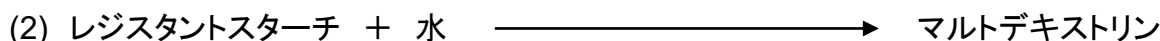
熱安定性 α -アミラーゼは澱粉を可溶性のマルトデキストリンに分解します(1)。

α -アミラーゼ, 100°C, pH 5.0 又は 7.0



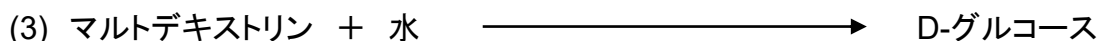
必要な場合、サンプル中のレジスタントスターチを冷 1.7M NaOH を加えて攪拌することで予備的に可溶化し、酢酸緩衝液で中和後、 α -アミラーゼで加水分解します(2)。
またDMSOを添加し 100°Cで煮沸する方法も効果的です。

NaOH 処理、中和 + α -アミラーゼ

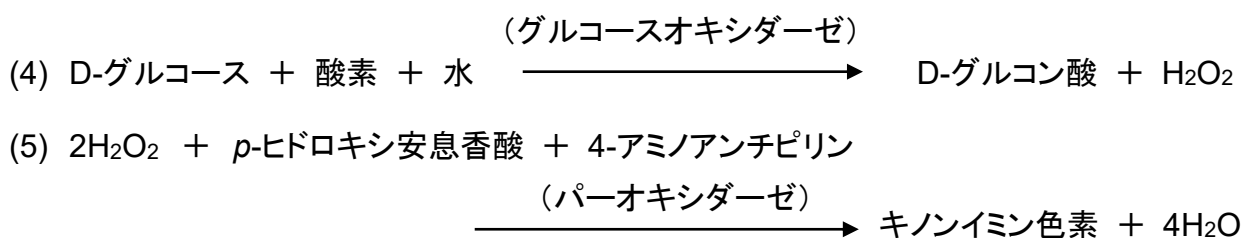


アミログルコシダーゼ (AMG) によりマルトデキストリンを D-グルコースに定量的に加水分解します(3)。

AMG



D-グルコースは D-グルコン酸に酸化され、同時に等モルの過酸化水素(H₂O₂)を遊離します。この過酸化水素をパーオキシダーゼを用いた発色反応によりキノイミン色素を生じます (4, 5)。



サンプル1本の分析は70分で完了します。2時間以内に20検体の分析が可能です。

特異性、感度、直線性と正確さ

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この分析法は α -グルカン(澱粉、グリコーゲン、フィトグリコーゲンおよび可溶性のマルトデキストリンを含む)に特異的です。

この分析法の最小吸光度差は 0.010 です。これは、推奨される全澱粉分析(RTS)法に従いサンプル 100mg および抽出液量 10.2mL を用いた場合、「有姿」で約 0.09g/100g の総澱粉量に相当します。検出限界は約 0.18g/100g の総澱粉量であり、これはサンプル 100mg、抽出液量 10.2mL の場合、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析法は分析当たり 4~100 μ g の D-グルコースの範囲で直線性があります。

阻害 - INTERFERENCE -

分析法で定められた時間(約20分)内に D-グルコースの定量反応が完了した場合は、一般に阻害が生じていないと結論づけることができます。

安全性 - SAFETY -

D-グルコース測定用試薬には、有害物質規制対象の有害物質は含まれません。一方、緩衝液濃縮物は防腐剤としてアジ化ナトリウム(0.09% w/v)を含有しています。すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。

キット - KITS -

50 並びに 100 検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

ボトル1: 耐熱性 α -アミラーゼ(メガザイム **E-BSTAA**、3,000 U*/mL, pH6.5, 40°C ; 2,500 U*/mL, pH5.0, 40°C)。*Ceralpha 単位
4°Cで4年以上、-10°C以下で10年以上安定です。
(K-TSTA-50A: 5mL、 K-TSTA-100A: 10mL)

ボトル2: アミログルコシダーゼ(メガザイム **E-AMGDF**、可溶性澱粉に対し 3,300 U/mL ; *p*-ニトロフェニル- β -マルトシド**に対し 200 U/mL) pH 4.5, 40°C。
4°Cで4年以上、-10°C以下で10年以上安定です。
(K-TSTA-50A: 5mL、 K-TSTA-100A: 10mL)

* α -アミラーゼ(**K-CERA**)、**アミログルコシダーゼ(**R-AMGR3**)の定量分析法を提供しております。日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

- ボトル3:** GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL、pH7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.09%w/v)含有。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル4:** GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼ+パーオキシダーゼおよび 4-アミノアンチピリン含有。凍結乾燥粉末品。-10°C以下で4年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準液(5mL、1.0mg/mL) 0.2%(w/v)安息香酸溶液。室温で密封条件下、5年以上安定です。
- ボトル6:** トウモロコシ澱粉標準品。澱粉含量はバイアルのラベルに記載されています。室温で密封条件下、5年以上安定です。

A. 試薬溶液／懸濁液の調製法

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。この溶液は粘性がありますので、ポジティブディスプレイメント方式ディスペンサー、例えば 5.0mL 容 Combitip®を付けた Eppendorf Multipette® を使用します(0.1mL 分注用)。4°Cで4年以上、-10°C以下で10年以上安定です。

NOTE: サンプルを AOAC 公式法 996.11(手順C)に従って分析する場合は、酵素を使用前にMOPS緩衝液(50mM、pH7.0; [B(e)])で30倍に希釈して下さい。

2. 付属のボトル2をそのまま使用して下さい。この溶液は粘性がありますのでポジティブディスプレイメント方式ディスペンサー、例えば 5.0mL 容 Combitip®を付けた Eppendorf Multipette®(0.1mL 分注用)を用いて下さい。4°Cで4年以上、-10°C以下で10年以上安定です。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物全量を蒸留水で 1L に希釈します。

NOTE:

1. 緩衝液濃度が高いため、保存中に塩の結晶が生じることがあります。この緩衝液を蒸留水で 1L に希釈する際には、結晶を完全に溶解して下さい。
2. この緩衝液には、0.09%(w/v)のアジ化ナトリウムが含まれています。これは有毒化学物質ですので、留意してお取り扱い下さい。

4. ボトル4の内容物を 20mL の溶液3に溶解し、これを残りの溶液3のボトルに全量に移します。このボトルをアルミニウム箔で覆い、試薬を遮光保管します。これがグルコース測定試薬(GOPOD試薬)です。2~5°Cで約3ヶ月、-10°C以下で12ヶ月以上安定です。凍結保存する場合は、1回の分析で使い切れる適量ずつ小分けにして保存して下さい。決して凍結／融解を繰り返さない下さい。試薬を新しく調製した際に、試薬が淡く黄色~ピンク色を呈していることがあります。着色は4°Cで2~3ヶ月保存している間にさらに強くなります。この試薬の吸光度は、蒸留水に対し 0.05 未満でなければなりません。それを上回る場合は新しい試薬をご用意下さい。
- 5, 6. 付属のボトル5と6をそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

B. 試薬 (提供外の試薬) - REAGENTS (NOT SUPPLIED) -

- a 酢酸緩衝液(100mM、pH5.0)、塩化カルシウム(5mM)含有。蒸留水 900mL に氷酢酸(1.05 g/mL) 5.8mL を加えます。1M(4g/100mL)水酸化ナトリウ

ム溶液を加えて pH を 5.0 に調整します(約 30mL 必要)。塩化カルシウム二水和物 0.74g を添加し溶解後、1L に定容します。4°Cで6ヶ月以上安定です。

b 酢酸ナトリウム緩衝液 (200mM、pH4.5)、塩化カルシウム(5mM)含有。

蒸留水 900mL に氷酢酸(1.05 g/mL) 11.6mL を加え、塩化カルシウム二水和物 0.74g を添加し溶解後、1M(4g/100mL)水酸化ナトリウムを用いて pH4.5 に調整(約 60mL 必要)後、蒸留水で 1L に定容します。4°Cで6ヶ月間以上安定です。

c 酢酸ナトリウム緩衝液 (600mM、pH3.8)、塩化カルシウム(5mM)含有。

蒸留水 1600mL に氷酢酸(1.05 g/mL) 69.6mL を加え、塩化カルシウム二水和物 1.48g を添加し溶解後、4M(16g/100mL)水酸化ナトリウムを用いて pH3.8 に調整します。蒸留水で 2L に定容します。室温で 12 ヶ月間以上安定です。

d 水酸化ナトリウム溶液 (1.7M)

蒸留水 900mL を攪拌し、NaOH 68g を注意しながら(必要なら防護メガネ等を着用)徐々に添加して溶解します。1L に定容後、密閉容器に保存します。室温で2年以上安定です。

e MOPS緩衝液(50mM、pH7.0) 塩化カルシウム(5mM)およびアジ化ナトリウム(0.02% w/v)含有。 オプション: AOAC公式法 996.11、手順(c)に基づきサンプルを分析する場合にのみ必要です。

MOPS 11.55g(ナトリウム塩、Sigma M9381 または同等品)を蒸留水 900mL に溶解し、1M HCl(10%v/v)で pH 7.0 に調整します(約 17mL 必要)。

塩化カルシウム二水和物 0.74g およびアジ化ナトリウム 0.2g を加えて溶解し、1L に定容します。4°Cで6ヶ月以上安定です。

CAUTION

pH 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。

f 約 50%、約 80%v/v エタノール

約 50%v/v エタノールは 95%v/v エタノール 500mL を蒸留水 500mL に加えます。

約 80%v/v エタノールは 95%v/v エタノール 800mL を蒸留水 200mL に加えます。

1 L メジウム瓶に保管して下さい。室温で4年以上安定です。

C. 必要な機器

- a 粉碎ミル— 12 枚歯のロータと 0.5mm の篩を備えた遠心分離式、または類似の装置
- b 卓上型遠心分離機— 101×65mm ポリエチレン試験管が使用可能なもの。
遠心力 3,250rcf (約 4,000rpm)相当。例 Sigma 社遠心機 4-15 No.10730
- c マイクロ遠心機— 13,000rpm 対応のもの
- d 分光光度計— 510nm に設定(光路 10mm)
- e 分析用天秤— 0.1mg までの精度があるもの
- f 恒温水槽— 50°C設定
- g 沸騰水浴— 試験管立付
- h マグネチックスターラー
- i マグネチックスターラーバー— PTFE製 12×6mm。一部に隆起があるもの
- j ボルテックスミキサー

- k マイクロピペッター—100 μ Lと1mL (例 Gilson Pipetman[®]).
- l 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 Combitip[®] (α -アミラーゼ/アミログルコシダーゼ溶液 0.1mL 分注用)
 - 25 mL Combitip[®] (0.5~2.5mL 分注用)
- m ディスペンサー—100mM 酢酸緩衝液(pH 5.0) 4mL、10mL 分注用
- n ディスポーザブルポリプロピレン試験管—13mL 容、101×16.5mm (例 Sarstedt #60.541.685)
- o ディスポーザブル 2.0mL ポリプロピレン製マイクロ遠心チューブ—(例 Sarstedt #72.691)
- p ガラス試験管—(16×120mm; 14mL 容)。
- q 消化反应用試験管—Corning[®]ネジロ試験管(16×120mm)。例 Fisher #14-933C
- r プラスチック製容器—試験管立てを入れ、氷水浴として使えるサイズのプラスチック製タッパー等(ページ13、図2参照)

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

- a GOPOD試薬の反応時間は重要ではないですが、少なくとも20分は必要です。また60分以内に分光光度計で測定して下さい(ページ15、図4参照)。
- b 各測定ごとに試薬ブランクおよびグルコース標準品(100 μ g、4連)測定を実施して下さい。グルコース—GOPOD標準曲線は極めて直線性に優れています(ページ15、図3)。
 - i. 試薬ブランクは蒸留水 0.1mL +GOPOD試薬 3.0mL から構成されています
 - ii. グルコース標準品はグルコース標準液(100 μ g/0.1mL)0.1mL + GOPOD試薬(3.0mL)から構成されています。ファクター「F」(10ページ)は、分析された D-グルコース量(100 μ g)を、D-グルコース発色による吸光度値で除算(例 100/1.038 = 96.386)により算出します。吸光度の値は測定ごとに変化します。
- c 各測定ごとに、澱粉標準品または既知の澱粉サンプルを同時に分析して下さい。
- d GOPOD試薬を作り変えた際は、グルコース標準 100 μ g の最大発色に至るまでの時間を確認する必要があります。これは通常約15分です。

E. サンプルの分析 (操作実施例):

(a) レジスタントスターチを含まない穀物および食品中の澱粉量測定 (推奨手順; 全て pH 5.0 反応)

迅速総澱粉量(RTS)測定法

1. 穀物、植物または食品を粉砕し、0.5mm の篩を通します。
2. 試料約 100mg をネジロ試験管(16×120mm) [C(q)]に2連で(1本はサンプルブランク用)精秤し、重量を記録しておきます。試験管を軽く叩きサンプルを試験管の底に落としておきます。
3. 両方の試験管に、ディスペンサー [C(m)]で 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、[B(a)]を 10mL 加えます。試験管をボルテックスミキサーで5秒間激しく攪拌します。
4. 一方の試験管(サンプル分析用)に、5mL 容チップを付けたポジティブディスプレイメント方式ピペット [C(l)]を用い、耐熱性 α -アミラーゼ原液 [A(l)] (**E-BSTAA**)を 0.1mL 加えます。

もう一方の試験管(サンプルブランク用)には 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) [B(a)]を 0.1mL 加えます。

5. 試験管を3秒間ボルテックス [C(j)] し、軽く蓋を閉めて直ちに沸騰水浴に入れ、同時にタイマーをスタートさせます。約2分後、蓋をしっかりと締めて、ボルテックスミキサーで試験管の内容物を激しく攪拌します。次に5分後と10分後にも5秒間ボルテックスし、再び沸騰水浴に戻す操作を繰り返します。
 α -アミラーゼの添加から15分後、沸騰水浴から試験管を取り出し、ボルテックスミキサーで5秒間激しく攪拌します。試験管を50°Cの水浴中に5分以上置き、温度を平衡化させます。
6. サンプル分析用試験管に 5mL 容チップを付けたポジティブディスプレイメント方式ピペット [C(l)]を用い、AMG原液 [A(2)] (**E-AMGDF**; 3,300 U/mL) 0.1mL を加え、3秒間攪拌します。もう一方のサンプルブランク用試験管には 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) [B(a)] 0.1mL を加えます。以後は攪拌せず、50°Cで30分間反応させます。
7. 反応槽から試験管を取り出し、10分以上放置して室温まで冷却します。試験管を数回反転させ、容器内側に付着した凝縮水を反応液と完全に混和します。
8. 各溶液(サンプルとサンプルブランク) 2.0mL をマイクロ遠心チューブに移し[C(o)]、チューブを 13,000rpm で5分間遠心します。(残りの反応液 8.2mL を保存しておきます。下記の Note 参照)。あらかじめ 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) [B(a)] 4mL を入れた 12×120mm 試験管に、ピペットでそれぞれの上清 1.0mL を正確に添加し混合します(5倍希釈)。
9. 各サンプルを 0.1mL ずつ2連で、16×120mm ガラス試験管[C(p)]の底部に正確に分取します。またサンプルブランクは 0.1mL ずつ 16×120mm ガラス試験管に分取します。
10. GOPOD試薬 3.0mL を添加して50°Cで20分間反応させ、試薬ブランクに対する510nm の吸光度を測定します。

サンプルと一緒に反応させます。

グルコース標準液: D-グルコース標準液(1.0mg/mL) 0.1ml+GOPOD試薬 3mL(4連)
試薬ブランク: 100mM 酢酸緩衝液(pH 5.0) [B(a)] 0.1mL+GOPOD試薬 3mL

11. 澱粉含量を算出します(ページ11、セクションFを参照)。

NOTE: この抽出法に準拠すると、最終抽出液量(EV)は 10.2mL となります。

NOTE:

1. サンプルのGOPOD吸光度が 0.100 未満の場合は、遠心上清を希釈せずにそのまま分析します(ステップ8)。吸光度の値が 1.20 より大きい場合は、遠心上清 1.0mL を 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) [B(a)] 10.0mL に加え攪拌し、0.1mL をGOPOD反応に用います。
澱粉含量1%(w/w)未満のサンプルの場合は、サンプル秤量を 500mg に増量し、遠心上清の原液を 0.1mL 分析に供します。希釈度(D) = 1、5または11。
2. 牧草やサイレージなどの繊維状試料を分析する場合は、NutriBullet PRO900 ブレンダー(または同等品)を使用してサンプルを粉砕し試料が均一になるまで約60秒攪拌します(**K-TSTA** のビデオを参照)。約 500mg の試料を精秤し分析します。例「a」に順じて反応させますが、耐熱性 α -アミラーゼ処理を100°Cで60分に延長します。AMG処理、室温冷却後、澱粉含量が約20~30%のサイレージ試料では 1mL を分取し蒸留水で20倍に希釈して良く混合した後、さらにその一部(約 2mL)を 13,000rpm で5分間遠心分離し、上清 0.1mL をGOPOD試薬で分析します(2連)。希釈度(D) = 20

(b) レジスタントスターチ含有サンプルの総澱粉量の測定
(RTS-NaOH 法—推奨)。

1. 試料約 100mg をネジロ試験管 (16×120mm) [C(q)] に2連で (1本はサンプルブランク用) 精秤し、重量を記録しておきます。
試験管を軽く叩きサンプルを試験管の底に落としておきます。
2. 80%v/v エタノール 0.2mL を加えてボルテックスミキサーで試験管を攪拌し、サンプルを完全に湿らせ、分散させます。
(この工程は澱粉含量の高い試料を完全溶解する場合、非常に重要です)。
3. 25mL 容チップを付けたポジティブディスプレイメント方式ピペット [C(l)] を使い、冷 1.7M 水酸化ナトリウム溶液 [B(d)] を 2mL 添加し、ボルテックスミキサーで試験管を15秒間攪拌します。試験管をマグネットスターラーの上の試験管立に入れ、15分間攪拌します (14ページ、図2)。反応中、2~3回取り出してボルテックスミキサーで断続的に激しく攪拌します。サンプルスラリーに塊がないことを確認して下さい。
4. ディスペンサー [C(m)] で酢酸緩衝液 (600mM, pH 3.8) [B(c)] を 8mL 加え、試験管をボルテックスミキサーで攪拌します。pH が約 5.0 であることを確認して下さい。
5. 一方の試験管 (サンプル分析用) に 5mL 容チップを付けたポジティブディスプレイメント方式ピペット [C(l)] を使い、耐熱性 α -アミラーゼ原液 [A(1)] (**E-BSTAA**) を直ちに 0.1mL 加えます。次に 5mL 容チップを付けたポジティブディスプレイメント方式ピペット [C(l)] を使い、AMG (3,300 U/mL) [A(2)] を 0.1mL 加えます。
もう一方の試験管 (サンプルブランク用) には 100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) [B(a)] を 0.2mL 加えます。両方の試験管に蓋をして3秒間ボルテックスします。
6. 試験管を50℃で30分間反応します。
7. 試験管を反応槽から取り出し、室温まで冷却します。試験管を数回反転させ、容器内側に付着した凝縮水を反応液と完全に混和します。
8. 手順(a)のステップ8 (7ページ参照) から進めます。
抽出液量 (EV)=10.4
希釈(D) = 1, 5 または 11

(c) レジスタントスターチ、D-グルコースとマルトデキストリンを含まない
穀物および食品中の澱粉量測定 (AOAC 公式法 996.11)

1. 穀物、植物または食品を粉砕し 0.5mm の篩を通します。
2. 粉砕試料約 100mg をコーニングネジロ試験管 (16×120mm) [C(q)] に精秤し、重量を記録しておきます。試験管を軽く叩きサンプルを試験管の底に落としておきます。
3. 水和エタノール (80%v/v) 0.2mL を加えて、サンプルを分散させます。
試験管をボルテックスミキサーで攪拌します。
4. 直ちに耐熱性 α -アミラーゼ (ボトル1 [A(1)] を 50mM MOPS 緩衝液、pH 7.0 [B(e)] により30倍希釈) 3mL を加えます。試験管を沸騰水浴中で6分間煮沸します
(均質性を維持するため、2, 4, 6分後に試験管を激しく攪拌します)。

5. 試験管を50℃の恒温槽に置き、200mM 酢酸緩衝液 (pH4.5) [B(b)] 4mL、続いてアミログルコシダーゼ 0.1mL (3300 U/mL) [A(2)]を加えます。
試験管をボルテックスミキサーで攪拌し、50℃で30分間反応させます。
6. 漏斗を使用して試験管の内容物を 100mL 容メスフラスコに移し、洗浄瓶で試験管の内容物を完全に回収します。酢酸緩衝液 (200mM、pH4.5) [B(b)]で定容し、内容物を十分に混合します。
7. 各溶液 2.0mL をマイクロ遠心チューブ [C(o)]に移し、13,000rpm で5分間遠心します。
8. 各上清を 0.1mL ずつ、2連で 16×120mm ガラス製試験管の底部に正確に分注します。
9. GOPOD試薬を 3.0mL 添加し、50℃で20分間反応させます。
試薬ブランクに対する 510 nm の吸光度を測定します。
10. 澱粉含有量を計算します (11ページのセクションFを参照)。
抽出液量 (EV)=100 (11ページの計算式を参照)
希釈(D) = 1

**(d) D-グルコースとマルトデキストリン非含有、レジスタントスターチ含有
サンプルの総澱粉量測定 (DMSO法-AOAC 公式法 996.11)**

1. 穀物、植物または食品を粉砕し 0.5mm の篩を通します。
2. 粉砕試料約 100mg をコーニングネジロ試験管 (16×120mm) [C(q)]に精秤し、重量を記録しておきます。試験管を軽く叩きサンプルを試験管の底に落としておきます。
3. 水和エタノール (80%v/v) 0.2mL を加えて、サンプルを分散させます。
試験管をボルテックスミキサーで攪拌します。
4. 直ちにジメチルスルホキシド (DMSO) 2mL を加え、試験管をボルテックスミキサーで攪拌します。激しく沸騰している沸騰水浴に試験管を入れ、5分後に取り出します。
5. 耐熱性 α -アミラーゼ [A(1)] (50mM MOPS緩衝液、pH 7.0 で30倍希釈) [B(e)] 3mL を沸騰水浴から取り出している間にすぐさま各試験管に添加し、ボルテックスミキサーで20秒間激しく混合します。直ちに沸騰水浴に戻して6分間煮沸し、2、4、6分後に激しくボルテックスミキサーで攪拌します (完全に均一にするため)。
6. 手順(c)のステップ5 (8ページ)から操作を続けます。
抽出液量 (EV)=100
希釈(D) = 1

(e) D-グルコースとマルトデキストリンを含有サンプルの澱粉量測定 (推奨法)

NOTE: 水和エタノール中のマルトデキストリンの溶解度は、マルトデキストリンのDP、最終エタノール濃度および溶液の温度により大きく変動します。

- アルコール洗浄により D-グルコースとマルトデキストリンを除去 -

1. 穀物、植物または食品を粉砕し 0.5mm の篩を通します。
2. ガラス遠沈管 (16×100mm; 14mm 容) [C(p)]に粉砕試料 (約 100mg) を精秤します。

3. 水和エタノール(80%v/v) 5.0mLを加えて、80～85℃で5分間加熱します。
ボルテックスミキサーで攪拌し、さらに水和エタノール(80%v/v) 5mLを加えます。
4. 卓上型遠心分離機[C(b)]で 3,250rcf(約 4,000rpm)、10分間遠心分離し、上清を廃棄します。
5. 沈殿を水和エタノール(80%v/v) 5mLに再懸濁し、ボルテックスミキサーで攪拌します。
さらに水和エタノール(80%v/v) 5mLを加え、反転して混和します。上記と同様に遠心分離し、上清を慎重に廃棄します。
6. 手順(c)のステップ4(8ページ)から操作を続けます。
サンプル中にレジスタントスターチが含まれている場合は手順(d)のステップ4(9ページ)から操作を続けます

抽出液量 (EV)=100

希釈(D) = 1

(f) 澱粉が溶液状または懸濁形態で存在する試料中の澱粉の定量

1. ボルテックスミキサーで攪拌、または転倒混和によりサンプルの内容物を完全に混合します。
必要によりサンプルを加熱またはホモジナイザーにより均質な懸濁化を図ります。
2. ポジティブディスプレイメント方式ディスペンサーを使用して、試料を 5mL ずつ2本のネジ口試験管(16×120mm) [C(q)]に直ちに分注します(サンプルとサンプルブランク)。
次に各試験管にディスペンサー[C(m)]で酢酸緩衝液(200 mM, pH 4.5) [B(b)]を 5mL 分注し、ボルテックスミキサーで5秒間激しく攪拌します。
3. サンプルおよびサンプルブランクを、手順(a)のステップ4(6ページ)に従って操作します。
4. 澱粉含有量を計算します(12ページのセクションF、液状品の記載を参照)。

サンプル液量 (DSV)= 10.2 mL

希釈(D) = 1, 5 または 11

サンプル容量(SV)= 5 mL

(g) 懸濁状態でレジスタントスターチを含有する試料の澱粉含有量の定量

1. ボルテックスミキサーで攪拌、または転倒混和によりサンプルの内容物を完全に混合します。
必要によりサンプルを加熱またはホモジナイザーにより均質化を図ります。
2. ポジティブディスプレイメント方式ディスペンサーを使用して、試料を 2mL ずつ2本のネジ口試験管(16×120mm) [C(q)]に直ちに分注します。次に各試験管にポジティブディスプレイメント方式ディスペンサー[C(d)]で 1.7M 水酸化ナトリウム溶液[B(d)]を 2mL 分注し、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌します。試験管をマグネットスターラーの上の試験管立に入れ、15分間攪拌します(ページ13、図2)。攪拌中2～3回、ボルテックスミキサーで試験管を断続的に激しく攪拌します。サンプルスラリーに塊がないことを確認して下さい。
3. サンプルおよびサンプルブランクを、手順(b)のステップ4(8ページ)に従って操作します。

サンプル液量 (DSV)= 12.2 mL

希釈(D) = 1, 5 または 11

サンプル容量(SV)= 2 mL

(h) 酵素耐性澱粉(レジスタントスターチ)の測定

レジスタントスターチは、メガザイムが提供するレジスタントスターチ分析キット(**K-RSTAR**)または迅速型レジスタントスターチ分析キット(**K-RAPRS**)を用いて正確に測定することができます。

K-RSTAR または **K-RAPRS** を用いて得られた結果は、*in vivo* 条件下の結果と良く一致しています¹⁴。レジスタントスターチ分析法(**K-RSTAR**)は、研究機関の相互評価(37 施設、16 試料)を得て AOAC インターナショナル(AOAC 公定法 2002.02)¹⁵および AACC インターナショナル 32-40.01 認証を得ております。

F. 計算式

1. 固形／粉末品

$$\begin{aligned}\text{澱粉\%} &= \Delta A \times F \times \frac{EV}{0.1} \times D \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times F \times EV \times \frac{D}{W} \times 0.90\end{aligned}$$

ここで:

- ΔA = 試薬ブランクに対する反応液の吸光度から、試薬ブランクに対するサンプルブランク吸光度を差し引いたもの (サンプルブランクを測定した場合)
- F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度}(\text{グルコース } 100\mu\text{g})}$ (吸光度を μg に換算するファクター)
- EV = サンプル抽出液量(手順(a)の場合は 10.2mL、手順(b)の場合は 10.4mL、手順(c) (d)の場合は 100mL)
- 0.1 = 分析に用いたサンプル液量
- D = サンプルの希釈率 (希釈無し、または5倍、11倍希釈)
[手順(a) NOTE と図1参照]
- 1/1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
- W = サンプル重量 (mg)
- 100/ W = 重量当たりの澱粉含量への換算ファクター
- 162/180 = グルコースのアンヒドログルコース(澱粉内の構造様式)換算

$$\begin{aligned}\text{澱粉\%w/w (乾燥当たり)} \\ = \text{澱粉\%w/w (有姿当たり)} \times \frac{100}{100 - \text{水分(\%w/w)}}\end{aligned}$$

2. 液状品 (mg/100mL)

$$\begin{aligned}\text{澱粉} &= \Delta A \times F \times \frac{DSV}{SV} \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D \\ &= \Delta A \times F \times DSV/SV \times 0.9 \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{澱粉 (g/100g サンプル)} \\ &= \text{mg/100mL} \times \frac{100}{\text{サンプル乾燥重量(mg/100mL)}}\end{aligned}$$

ここで:

- ΔA = 試薬ブランクに対する反応液の吸光度から試薬ブランクに対するサンプルブランク吸光度を差し引いたもの
- F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度(グルコース } 100\mu\text{g)}}$ (吸光度を μg に換算するファクター)
- DSV = 希釈されたサンプル容量
(すなわち、 α -アミラーゼとAMGに酢酸緩衝液を加えた後の液量)
- SV = 分析に用いた液量 (手順(f)では 5mL、手順(g)では 2mL)
- 100 = サンプル液量を 100mL に換算
- 0.1 = 分析に用いたサンプル容量
- 1/1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
- 162/180 = グルコースのアンヒドログルコース(澱粉内の構造様式)換算
- D = 反応液のさらなる希釈(必要な場合)

NOTE: 上記の計算式は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*™を使用することで簡単に計算できます。

表1. 総澱粉量測定法の分析機関相互の評価結果
[AOAC 公式法 996.11 法; 手順(c)(d)]¹⁰

試料	鶏飼料 ペレット	食パン	グリーン ピース	高アミロース トウモロコシ澱粉*	小麦粉末
水分%	11.4	10.7	12.4	13.4	12.8
分析機関数	32	32	31	25	31
外れ値	0	0	1 ^G	1 ^C	1 ^C
平均%	50.7	68.1	44.0	86.3	78.0
S _r	1.6	1.8	1.5	2.5	2.2
RSD _r	3.1	2.7	3.4	2.9	2.9
r	4.4	5.2	4.2	7.0	6.3
S _R	2.4	3.4	2.1	4.1	3.3
RSD _R	4.6	5.0	4.8	4.8	4.2
R	6.6	9.5	6.0	11.6	9.2
HORRAT	2.1	2.4	2.1	2.8	2.0
分析範囲	45.4-55.3	62.0-74.9	39.4-47.4	78.7-96.8	71.6-85.8

試料	小麦澱粉	オートブラン	スパゲティ	高アミロース トウモロコシ澱粉 (DMSO法)	小麦澱粉 (DMSO法)
水分%	12.3	8.8	11.8	13.4	12.3
分析機関数	26 ^a	31	31	31	31
外れ値	0	1 ^C	1 ^C	1 ^C	1 ^C
平均%	97.2	42.2	76.6	97.2	96.5
S _r	3.2	1.6	3.0	2.0	3.0
RSD _r	3.3	3.8	3.9	2.1	3.1
r	9.0	4.5	8.4	5.7	8.4
S _R	3.7	2.1	3.7	2.8	4.4
RSD _R	3.8	5.0	4.8	2.9	4.6
R	10.4	6.0	10.3	7.8	12.4
HORRAT	1.9	2.2	2.3	1.4	2.3
分析範囲	91.8-105.0	38.7-46.8	70.1-81.8	91.6-101.9	86.0-104.0

- 分析機関数 = 計算に使用した分析機関数
 外れ値 = 計算に含めなかった分析機関数 (C = コクラン、G = グラブス異常値)
 S_r = 再現性標準偏差
 RSD_r = 再現性相対標準偏差
 r = 再現性値 (2.8 × S_r)
 S_R = 再現性標準偏差
 RSD_R = 再現性相対標準偏差
 R = 再現性値 (2.8 × S_R)
 HORRAT = Horwitz 比、分析法の精度の指標、再現性試験の妥当性評価法。
 a = これらのサンプルではトラブルにより 26 セット分の結果しか得られなかった

表1には AOAC 法 996.11 に基づく分析機関相互評価の統計的解析結果が示されています。世界中の32の分析機関が参加し16試料(8つのブラインド試験)が分析されました。この結果を元に本法は AOAC、AACC、ICC の国際的な標準法として採用されました。



図2.

レジスタントスターチの1.7M NaOH 溶解操作のため、マグネチックスターラー上に配置した試験管ラック。

手順(b)に基づく

表2. 「精製」澱粉サンプル中の総澱粉の測定方法の比較¹³

澱粉の種類と品番	水分含量 % w/w	澱粉含量 ^a RTS 法; %w/w		澱粉含量 ^a NaOH-RTS 法; %w/w	
		有姿	乾燥重量 ^b	有姿	乾燥重量 ^b
		トウモロコシ澱粉; 高AMPシグマ S9679	10.9	88.38	99.2
馬鈴薯澱粉 -シグマ S4251	12.3	83.15	94.8	82.81	94.4
コメ澱粉 -シグマ S7260	11.6	85.33	96.5	87.28	98.7
小麦澱粉 -シグマ S512	12.9	87.05	99.9	88.78	101.9
Hi Maize 1043 -Batch 02161	10.0	60.08	66.8	87.23	96.9
コーンスターチ-シグマ S4126	11.4	85.95	97.0	87.86	99.2
ACS 可溶性澱粉 -#21101	12.8	86.34	99.0	85.57	98.1
Novelose 240 -天然高アミロース	11.3	64.37	72.5	87.01	98.1
Hi Maize (HAMS) -Batch CO-343	11.3	74.46	83.94	85.87	96.80
Novelose 330 -天然高アミロース	9.8	58.21	63.8	88.69	97.2
Hylon VII -#50904	10.7	73.45	82.25	86.51	96.9
アミロース(馬鈴薯) -シグマ A9262	10.5	63.78	71.2	88.90	99.3
Fibersol 2 -#112181A (松谷)	7.5	8.52	9.21	9.06	9.79
精製 Actistar (CereStar)	7.0	88.36	95.0	90.83	97.7
標準トウモロコシ澱粉 -#140801	13.7	85.97	99.6	87.17	101.0
Fiberite RW (糊化済リン酸架橋澱粉)	10.5	68.54	76.6	55.72	62.3
Fiberite RW (リン酸架橋澱粉)	9.9	69.85	77.5	67.59	75.0
未熟バナナ	9.1	63.00	69.3	63.35	69.7
高アミローストウモロコシ澱粉 -60107	11.2	59.87	67.4	85.61	96.4
化学的加工澱粉 -21101b	11.6	83.33	94.3	84.30	95.4

a 分析結果は2連の平均値

b 乾物当たり

表2に、各種「精製」澱粉サンプルをRTS手順並びにNaOH-RTS手順により総澱粉量を測定した比較結果を示した。ほとんどのサンプルで良く一致した値が得られたが、高アミロース澱粉含有サンプル(太字)では、NaOHによる前処理が必要であることが認められる。

表3. 再現性試験。

動物飼料およびペットフード中の総澱粉量はRTS法[手順(a)]により測定¹³

試料	総澱粉量、乾物 ^a 当たり%(w/w) 平均 ^b ±2SD, (CV ^c , %)				日差平均±2SD, (CV ^c , %)
	1日目	2日目	3日目	4日目	
雌鶏用ペレット	37±0.5	36.1±0.6	38±0.9	38.7±0	37.4±2.1 2.80
	0.65	0.82	1.17	0.00	
大豆ミール	7.5±0.3	7.5±0.1	7.9±0.7	7.7±0.5	7.6±0.5 3.01
	1.79	0.38	4.41	2.95	
アルファルファ	0.3±0	0.3±0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0 7.39
	6.73	2.32	8.32	11.22	
ウルサキンド馬飼料	14.3±0.4	13.7±0.6	13±1.2	13.9±0.8	13.7±1.2 4.33
	1.39	2.16	4.74	2.75	
フリーダム馬飼料	9±1.2	8.6±0.2	9.2±0.3	8.7±1.2	8.9±0.8 4.65
	6.93	1.32	1.46	6.72	
乳業用完全飼料	19.3±0	19.3±1.3	19.4±0.9	19.8±1.5	19.5±0.9 2.38
	0.11	3.40	2.44	3.68	
成犬用ドッグフード	40.6±0.6	40.7±0.4	41.4±0.8	41.1±0.7	40.9±0.8 1.04
	0.73	0.52	0.97	0.86	
トウモロコシサイレージ N16087	27.9±0.5	29.4±0.2	28.7±1.2	28.4±0.5	28.6±1.3 2.25
	0.94	0.41	2.10	0.82	
フレーク状トウモロコシ	74.9±2	75.6±1.8	76.8±2.8	76.9±1.7	76.1±2.4 1.58
	1.34	1.19	1.83	1.13	
湿式ドッグフード	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0	0.4±0	0.4±0.1 12.28
	12.12	11.16	0.00	1.79	
標準トウモロコシ澱粉	97.9±4.4	99.1±1.6	99.5±1.9	99.6±0.8	99.1±2.4 1.22
	2.27	0.83	0.94	0.43	

a 分析結果は乾物当たりの総澱粉量で表示

b 各試料は日ごとに2連で測定

c CV= 変動係数

表3に、一連の動物飼料およびペットフードについてのRTS法を用いた再現性データ[手順(a)]を示す。乾物当たりの澱粉含有量が0.3~99%w/wの範囲で非常に再現性のあるデータが各種のサンプルで得られた。この分析法はAOAC法 996.11と良く一致した澱粉含有量を得ることができ、かつ分析操作はより簡単である。

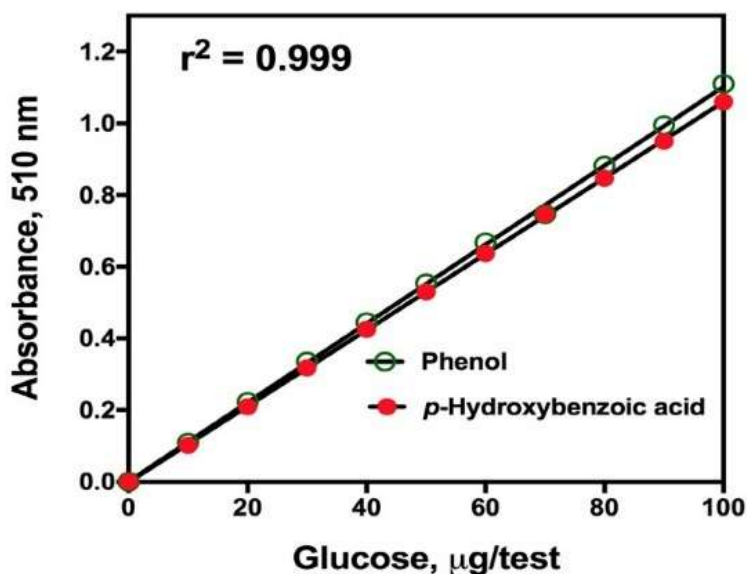


図3.

色原体としてフェノールまたはp-ヒドロキシ安息香酸を用いたGOPOD試薬によるグルコース測定の直線性。

標準曲線は原点と交差し、 r^2 値0.999で完全に直線性がある¹³

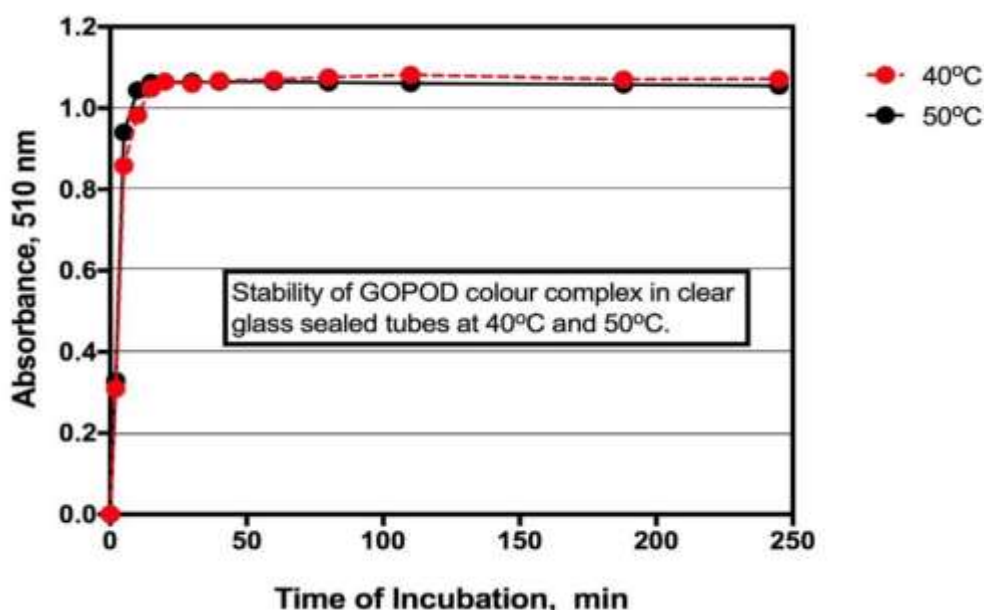


図4. グルコース 100 μ g とGOPOD試薬 3.0mL を40°Cまたは50°Cで反応させた時の呈色(および発色の安定性)¹³

図4から、GOPOD試薬とグルコースの呈色反応は15分で完了し、呈色は100分以上安定であることが認められた¹³。

表4. 穀物および豆類サンプル中のRTS法[手順(a)]およびNaOH-RTS法[手順(b)]による総澱粉含量¹³

澱粉試料	水分含量 % w/w	RTS法(手順a)による澱粉含量 ^a %w/w		NaOH-RTS法(手順b)による澱粉含量 ^a %w/w	
		有姿	乾物 ^b	有姿	乾物 ^b
白インゲン豆 (Natures Gold)	12.07	34.2	38.9	34.9	39.7
ライマメ (Natures Gold)	11.22	31.7	35.6	33.2	37.3
赤インゲン豆 (Natures Gold)	12.02	31.3	35.6	32.4	36.8
うずら豆 (Natures Gold)	12.09	32.2	36.6	35.3	40.1
インゲン豆 (Natures Gold)	13.40	33.4	38.6	34.5	39.8
大豆 (Natures Gold)	8.70	0.9	1.0	0.7	0.8
緑豆 (Natures Gold)	11.80	38.9	44.1	40.8	46.3
ヒヨコマメ (Natures Gold)	10.27	39.7	44.2	41.9	46.7
イエロープリットピー (Natures Gold)	12.36	44.7	51.0	46.6	53.2
黒目豆 (Natures Gold)	11.46	35.2	39.8	38.0	42.9
レンズ豆 (Natures Gold)	10.64	33.0	36.9	33.3	37.2
黒ペルーガレンズ豆 (Natures Gold)	12.12	36.2	41.1	36.3	41.2
キヌア (Natures Gold)	12.38	57.2	65.3	57.1	65.2
古代穀物 (Natures Gold)	12.67	59.8	68.5	59.2	67.8
焙煎ソバ (Natures Gold)	4.94	72.3	76.1	70.6	74.3
長粒玄米 (Natures Gold)	11.75	72.3	81.9	64.8	73.4
剥きオート麦 (Natures Gold)	10.82	61.6	69.1	60.2	67.5
粟 (Natures Gold)	11.28	68.5	77.2	61.5	69.3
小麦粒 (Natures Gold)	11.24	57.1	64.3	57.2	64.4
茶色亜麻仁 (フラックスシード)	4.38	1.0	1.0	0.4	0.4
標準トウモロコシ澱粉 (対照品)	13.7	87.0	100.8	87.9	101.9

a 分析結果は2連の平均値

b 乾物当たり

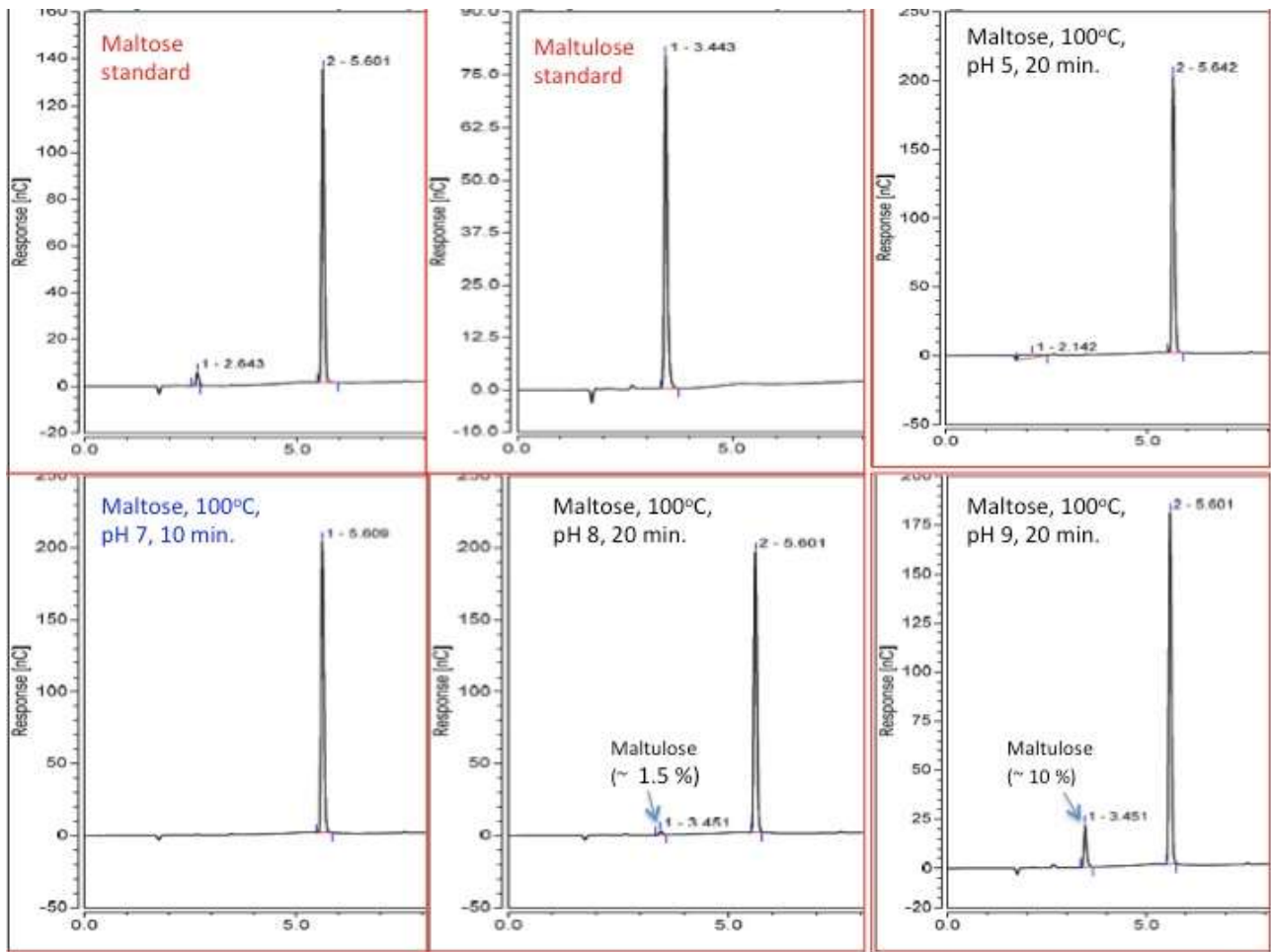


図5. マルトース標準品を 100°C、pH5~9 で 20 分加熱した場合のイオンクロマトグラフィー¹³。pH7 では AOAC 法 996.11 に合わせて 10 分間とした。

註> 100°Cで加熱では、pH8 未満ではマルトースからマルチュロースは生成しなかった。

表5. 各種朝食用シリアルのリチウム法[手順(a)]による総澱粉含量¹³

澱粉試料	水分含量 % w/w	遊離 グルコース % w/w	澱粉+遊離 グルコース (有姿) % w/w	澱粉(有姿) % w/w	澱粉(乾物) % w/w
ケロッグ® コーンフレーク	5.48	1.4	72.6	71.2	75.2
ケロッグ® スペシャルKオリジナル	3.69	0.5	64.5	64.0	66.5
ネスレ® Shreddies	4.04	1.0	56.7	55.7	58.1
ケロッグ® オールブランオリジナル	2.51	0.4	26.6	26.2	26.8
ケロッグ® フロスティアー	4.05	1.0	50.8	49.8	51.8
Weetabix®	6.09	0.3	62.0	61.7	65.6
マカロニ パスタ (Roma®)	8.57	0.04	69.1	69.1	75.5
標準トウモロコシ澱粉	13.7	0.03	85.5	85.5	99.0

a 分析値は2連の平均値

表6. 各種野菜のRTS法[手順(a)]による総澱粉含量¹³

試料	澱粉(乾物) % w/w	水分含量 % w/w	澱粉(材料重量 当たり) % w/w
サツマイモ	32.3	74.0	8.4
ジャガイモ(ルースター種)	67.4	77.3	15.3
カリフラワー	0.1	90.6	0.01
セロリ	0	95.0	0.0
ブロッコリー	0.1	88.5	0.01
マッシュルーム (<i>A. bisporus</i>)	0.5	91.6	0.04
赤タマネギ	0.6	87.7	0.07
ニンジン	1.6	92.5	0.12
ルタバガ	10.6	82.8	1.8
赤トウガラシ	0.5	89.7	0.05
完熟バナナ	18.9	74.1	4.9
完熟マンゴー	8.6	81.8	1.6

a 分析値は2連の平均値

G. 文献 - REFERENCES: -

1. Anon, (1987). Measurement of the starch content of commercial starches. *Starch*, **39**, 414-416.
2. AAFCO Discussions on starch definition, August, 2008.
https://www.aafco.org/.../9_mbh_notes_on_modified_starch_definition_0908.pdf
3. Hall, M. B. (2015). Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **98**, 397-409.
4. Baur, M. C. & Alexander, R. J. (1979). An enzymatic procedure for the determination of starch in cereal products. *Cereal Chem.*, **56**, 364-366.
5. Karkalis, J. (1985). An improved enzymic method for the determination of native and modified starch. *J. Sci. Fd. Agric.*, **36**, 1019-1027.
6. Knudson, K. E. B. (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Aim. Feed. Sci. Technol.*, **67**, 319-338.7. American Association of Cereal Chemists: "Approved Methods of the AACCC". Method 76-11, approved October 1976.
7. Theander, O. & Aman, P. (1979). Studies on dietary fibres. 1. Analysis and chemical characterisation of water-soluble and water-insoluble dietary fibres. *Swedish J. Agric. Res.*, **9**, 97-106.
8. Batey, I. L. (1982). Starch analysis using thermostable alpha-amylase. *Starch*, **34**, 125-128..

9. McCleary, B. V., Solah, V. & Gibson, T. S. (1994). Quantitative measurement of total starch in cereal flours and products. *J. Cereal Science*, **20**, 51-58.
10. McCleary, B. V., Gibson, T. S. & Mugford, D. C. (1997). Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase - α -amylase method: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, **80**, 571-579.
11. Hall, M. B. (2009). Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, **92**, 42-49.
12. Hall, M. B. & Keuler, N. S. (2009). Factors affecting accuracy and time requirements of a glucose oxidase-peroxidase assay for determination of glucose. *J. AOAC Int.*, **92**, 50-60.
13. McCleary, B. V. & Charmier, L. M. J. (2019). Measurement of starch: Critical evaluation of current methodology. *Starch*, **71**, 1800146.
14. McCleary, B. V. & Monaghan, D. A. (2002). Measurement of resistant starch. *J. AOAC Int.*, **85**, 665-675.
15. McCleary, B. V., McNally, M. & Rossiter, P. (2002). Measurement of resistant starch by enzymic digestion in starch samples and selected plant materials: Collaborative Study. *J. AOAC Int.*, **85**, 1103-1111..

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 : bj-megazyme@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