

アマライム法について

1.方法出典 Megazyme DIASTASE ACTIVITY(α -AMYLASE)IN HONEY T-AMZHY

2. 分析法の概要

Amylazyme 錠は、染色および架橋アミロース（デンプンの線分）を含有する。

Amylazyme 錠を緩衝液に添加すると急速に水和し、染色された架橋アミロースの粒子が緩衝液を吸収する。 α -アミラーゼの存在下で、基質は加水分解を行い可溶性の染色物が放出される。反応終了後、ろ過し、590nm で濾液の吸光度を測定する。濾液の吸光度は試料のジアスターゼ活性に正比例する。

3. 器具

- 1) ガラス試験管（丸底、容量約17 mL、16 × 120 mm）
- 2) 1mL 用マイクロピペット
- 3) ホールピペット
- 4) 電子天秤
- 5) 分光光度計(590nm)
- 6) 恒温水浴（40°C）
- 7) ボルテックスミキサー
- 8) ストップウォッチ

9) Whatman No.1 (9 cm) フィルター紙とフィルター漏斗

4.試薬

・ Amylzyme 錠(Megazyme 200 錠入り)

ロット番号が冊子の標準曲線に関連していることを確認する。室温で5年以上安定。

5.試液

・ 塩化カルシウム (5 mM) 含有マレイン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM、pH 5.6) :

蒸留水800mL にマレイン酸11.6g (Sigma cat. no. M-0375) と塩化カルシウム二水和物0.735 g (CaCl₂·2H₂O) (Sigma cat. no.C-5080) を加え、の水酸化ナトリウム溶液2M (8g/100mL) でpH を5.6 に調整。その後1L にメスアップする。4°Cで約2ヶ月間安定。

・ トリズマ塩基溶液

蒸留水900mL に2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール20g (Sigma cat. no. T-1503)を加え、溶解。pH を確認し、必要に応じて約8.5 に調整。その後蒸留水で1 L にメスアップする。室温で12ヶ月間安定。

6. 分析用蜂蜜サンプルの調製:

1) 蜂蜜の α -アミラーゼ活性は貯蔵時に変化する可能性があるため、試料は約5°Cで貯蔵しなければならない。

2) 100 mL ビーカーに蜂蜜2.00 g を秤量、マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.6)

100 mM 40 mLで溶解。50 mL にメスアップする。

7. 検査手順:

1) 試験管に1.0 mL の希釈された蜂蜜サンプルを入れ、40°Cで5 分間予備加温する。

ブランクはマレイン酸ナトリウム緩衝液を同量採取して加温しておく。

2) ピンセットを使用して、恒温槽から試験管を出さずにAmylazyme 錠を添加する。

このとき試験管をかき混ぜない。錠剤は急速に水分を含み、遊離液のほとんどを吸収する。

3) 試験管を40°Cで正確に10 分間加温する。

4) 恒温槽から出し、10 mL のトリズマ塩基溶液を加える。反応を終了し、ボルテックスキサーで試験管を力強く攪拌する。その後試験管は室温で放置する。

5) 約5 分後、再び試験管をかき混ぜて濾紙で内容物を濾過する。

6) 試料溶液の吸光度を反応ブランクに対して590nm で測定する。

※検査毎に1 つのブランクが必要であり、分光光度計をゼロにするために使用する。

8. ジアスターゼ数計算

試料の α -アミラーゼ活性 (蜂蜜1 グラムあたりのシェードまたはGothes 単位)

ジアスターゼ活性 (DN) (蜂蜜のシェード単位/グラム)

= $20.0 \times \Delta \text{Abs}$ (Amylazyme Lot 40101)

吸光度は 0.30 以上を有効とする。 __