

カタラーゼ測定結果

品名 レオネット

規格項目	規格	測定回数	製造番号					
			2907813		2956368		2935151	
性状	白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は無色～濃褐色の液体若しくはペーストである。においが無いか又は特異なにおいがある。	①	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	
		②	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	
		③	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	淡褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	
確認試験	過酸化水素試液に加えたとき、泡を生じる	①	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	
		②	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	
		③	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	泡を生じた	
重金属	Pbとして 40μg/g以下	①	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	
		②	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	
		③	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下	
鉛	Pbとして 10μg/g以下	①	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	
		②	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	
		③	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下	
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0μg/g以下	①	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	
		②	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	
		③	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	
細菌数	50,000/g以下	①	10/g以下	10/g	10/g	10/g	10/g以下	
		②						
		③						
大腸菌	認めない	①	認めない	認めない	認めない	認めない	認めない	
		②						
		③						
酵素活性	第1法 (吸光度法)		第1法	第2法	第1法	第2法	第1法	第2法
		①	72,936	57,653	70,184	56,318	72,885	60,842
		②	71,180	58,707	67,845	56,205	70,482	61,818
		③	71,187	59,099	64,979	57,201	71,944	59,534
		④	72,033	57,554	68,469	55,600	74,655	61,103
		⑤	69,861	58,699	65,694	56,296	70,262	58,489
	第2法 (滴定法)	⑥	75,847	57,081	66,789	54,995	75,626	57,226
		平均値(n=6) 単位/ml	72,174	58,132	67,327	56,103	72,642	59,835
		標準偏差	2,069	807	1,908	746	2,183	1,747
		CV(%)	2.9	1.4	2.8	1.3	3.0	2.9
最大値 単位/ml	75,847	59,099	70,184	57,201	75,626	61,818		
最小値 単位/ml	69,861	57,081	64,979	54,995	70,262	57,226		

\*確認試験の測定条件

レオネット 1.0g を 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0), 酵素活性測定用で溶かし、10ml とした。

\*酵素活性測定の測定条件

測定法 I 及び測定法 II 共に、試料溶液は 0.01mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0), 酵素活性測定用、基質溶液は 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0), 酵素活性測定用を使用した。

## セルラーゼ(案)

cellulase

**定 義** 本品は、糸状菌 (*Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Hemicola insolens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma insolens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*)、担子菌 (*Corticium*, *Irpex*, *Pycnoporus coccineus*)、放線菌 (*Actinomyces*, *Streptomyces*)、若しくは細菌 (*Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*) の培養物より得られたセルロース加水分解酵素である。

**酵素特性** 本品は、セルロースを加水分解する。

ECナンバー : EC 3.2.1.4

**性 状** 本品は白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は無色～濃褐色の液体若しくはペーストである。においはないか、又は特異なにおいがある。

**確認試験** 酵素の基原、性質により(1)又は(2)の方法を選択して行う。

(1)セルロース活性測定法に準じて試験を行うとき、第1法又は第2法の酵素活性を示す。

(2)カルボキシメチルセルロース1%溶液10mlを $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ にて10～15分保った後、試料溶液(セルロース糖化力測定法—銅試薬法で1～2単位/mlになるように試料を適量の水で溶かし試料溶液とする。)1mlを加えてよく混ぜ、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で20分間反応するとき基質溶液の粘度は低下する。

**純度試験** 酵素一般規格 純度試験(1)、(2)及び(3)を適用する。

**微生物限度** 酵素一般規格 微生物限度を適用する。

**酵素活性測定法** 一般試験法・酵素活性測定法中のセルラーゼ活性測定法の第1法又は第2法により試験を行う。測定条件(反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等)は、酵素の基原、性質に応じて適切なものを選択する。

\* 試薬・試液

1) カルボキシメチルセルロース1%溶液: セルラーゼ活性測定法を準用する。

一般試験法 酵素活性測定法

## セルラーゼ活性測定法 (案)

セルラーゼ活性測定法のセルロース糖化力測定法は、酵素をカルボキシメチルセルロースに作用させる酵素反応と反応生成物である還元糖の定量の 2 段階からなる。還元糖の定量はブドウ糖標準曲線との比較により求める。

### 第 1 法 (セルロース糖化力測定法—ニトロ試薬法)

#### (1) 試料溶液

試料約 0.5g を精密に量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液を、必要があれば遠心分離し、上澄液を水で希釈して 1ml 中に 0.06~0.18 単位含む液を調製する。通常、この範囲を含む 3 点以上の希釈段階をとり、グラフから吸光度差 0.250 となる試料濃度を求めて酵素活性値を求める。

#### (2) 基質溶液

カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 約 1g を精密に量り、105°C で 3 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 10.0g に対応する量を正確に量り、水 800ml を攪拌しながら、徐々に加えて溶かす。この液に希酢酸 100ml を加え、1mol/l 水酸化ナトリウム試液で pH4.0 又は pH5.0 に調整し、水を加えて正確に 1,000ml とする。

#### (3) ブドウ糖標準液

ブドウ糖約 1g を精密に量り、105°C で 3 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 1.00g に対応するブドウ糖を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 200ml とする。この液の 1、2、及び 3ml を正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 50ml とする。これらのブドウ糖標準液は 1ml 中にブドウ糖 0.10、0.20、及び 0.30mg を含む。

#### (4) 操作法

試料溶液 1ml を量り、試験管に入れ、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温し、予め  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した基質溶液 1ml を加え、直ちによく混合する。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間反応させた後、DNS-乳糖溶液 4ml を加え混合する。次にガラスビーズで試験管にふたをして、沸騰水浴中で 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷却する。この液につき、水を対照とし、波長 540nm における吸光度  $A_1$  を測定する。別に、試料溶液 1ml を量り、試験管に入れ、DNS-乳糖溶液 4ml を加え混合し、次に基質溶液 1ml を加えよく混合し、以下同様に操作して、吸光度  $A_2$  を測定する。また、それぞれのブドウ糖標準液 1ml を量り、

試験管に入れ、DNS-乳糖溶液 4ml を加え混合し、次に基質溶液 1ml を加えよく混合し、以下同様に操作して、吸光度  $A_5$  を測定する。更に、水 1ml を量り、試験管に入れ、DNS-乳糖溶液 4ml を加え混合し、次に基質溶液 1ml を加えよく混合し、以下同様に操作して、吸光度  $A_{50}$  を測定する。各ブドウ糖標準液 1ml 中のブドウ糖量を X 軸にとり、それらに対応する吸光度から水の吸光度を差引いた値 ( $A_5 - A_{50}$ ) を Y 軸にとったブドウ糖検量線を引き、直線 ( $Y = aX$ ) の傾き  $a$  を求め、次式により酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間にブドウ糖  $1\mu\text{mol}$  に相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とする。

本品中の酵素活性の単位 (単位/g) =  $(A_7 - A_5) \times F \times 1,000/180 \times 1/10 \times 1/C$   
ただし、

- $A_7$  : 反応液の吸光度
- $A_5$  : 反応ブランク液の吸光度
- F :  $F = 1/a$ , ブドウ糖検量線より求めた吸光度差が 1 の時のブドウ糖量(mg)
- 1,000 : mg から  $\mu\text{g}$  への換算
- 180 : ブドウ糖の分子量
- 10 : 反応時間 (分)
- C : 試料溶液の濃度(g/ml)

#### (5) 試薬・試液

1) カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC)

2) 1mol/l 水酸化ナトリウム試液

水酸化ナトリウム 4.3g を水にとかし 100 ml とする。

3) DNS 溶液

3,5-ジニトロサリチル酸 20.0g を量り、水 800ml を加えて攪拌しながら加温してけん濁し、この液に、水酸化ナトリウム液 (32.0g  $\rightarrow$  300ml) を徐々に加え、 $50^\circ\text{C}$  を越えないように注意して加温を続けながら溶かす。次に酒石酸カリウムナトリウム 600g を量り、徐々に加え、更に水を加えて液量を 1,900ml とし、 $50^\circ\text{C}$  を超えないように注意して加温と攪拌を続けながら溶かす。次に室温まで冷却し、水を加えて 2,000ml とし、必要ならばガラスフィルターでろ過する。褐色ビンに入れ、密栓して暗所に室温で保存する。(6ヶ月以内に使用する。)

4) 乳糖溶液

乳糖-水和物 1.20g を水に溶かして正確に 100ml とし、この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。

### 3) DNS-乳糖溶液

DNS 溶液の 150ml と乳糖溶液の 50ml を混合する。用時調製する。

## 第 2 法 (セルロース糖化力測定法-銅試薬法)

### (1) 試料溶液

操作法に従って試験するとき、還元力の増加が、試料濃度に比例する範囲内の試料濃度になるように、試料に適量の水を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は、通例およそ 0.02 ~ 0.08 単位/ml である。試料が完全に溶けない場合には、時々かき混ぜながら 1 時間放置した後、遠心分離してその上澄液を試料溶液とする。必要ならば、水の代わりに適当な緩衝液を用いることができる。

### (2) 基質溶液

あらかじめカルボキシメチルセルロースナトリウム (医薬品各条、第二部エーテル化度  $0.65 \pm 0.03$  のもの) 約 1 g を精密に量り、 $105^{\circ}\text{C}$  で 4 時間乾燥してその減量を測定する。その乾燥物 0.625g に対応するカルボキシメチルセルロースナトリウムを正確に量り、1000ml の三角フラスコに入れ、水 50ml を加えて加温して溶かし、冷後、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 10ml 及び水を加えて正確に 1000ml とする。

### (3) ブドウ糖検量線の作成

あらかじめブドウ糖約 1 g を精密に量り、 $105^{\circ}\text{C}$  で 6 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 1.000g に対応するブドウ糖を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 1000ml とする。この液 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 及び 5ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 10ml とする。それぞれの液 1ml 中には、ブドウ糖が 0.1mg, 0.2mg, 0.3mg, 0.4mg 及び 0.5mg 含まれる。それぞれ液 1.0ml、基質溶液 4.0ml 及びアルカリ性銅試液 2.0ml を正確に量り、25ml のメスフラスコに入れ、振り混ぜ、メスフラスコに栓を施し、水浴中で通例 30 分間加熱し、水冷後、ヒ素モリブデン酸試液 2.0ml を加えてよく振り混ぜ、更に 0.5N 水酸化ナトリウム試液 3.0ml を加え、ふり混ぜて沈殿を溶かし、20 分間放置した後、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に 25ml とする。この液 1ml を正確に量り、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 9.0ml を加えてよく振り混ぜる。この液につき波長 750nm における吸光度  $A_1, A_2, A_3, A_4$  及び  $A_5$  を測定する。別にブドウ糖溶液 1ml の代わりに水 1ml をとり、以下同様に操作して級光度  $A_0$  を測定する。これにより、縦軸に吸光度差 ( $A_1-A_0, A_2-A_0, A_3-A_0, A_4-A_0$  及び  $A_5-A_0$ ) を、横軸にブドウ糖量 (mg) をとり、検量線とする。

### (4) 操作法

基質溶液 4.0ml を量り、25ml のメスフラスコに入れ、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 10 分間放置した後、

試料溶液 1ml を正確に量って加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 30 分間放置し、アルカリ性銅試液 2.0ml を加えて振り混ぜ、メスフラスコに栓を施し、水浴中 1) で通例 30 分間加熱する。水冷後、ヒ素モリブデン酸試液 2.0ml を加えてよく振り混ぜ、更に 0.5N 水酸化ナトリウム試液 3.0ml を加え、ふり混ぜて沈殿を溶かし、20 分間放置した後、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に 25ml とする。この液 1ml を正確に量り、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 9.0ml を加え、よく振り混ぜる。この液につき波長 750nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に試料溶液 1ml を正確に量り、25ml のメスフラスコに入れ、アルカリ性銅試液 2.0ml を加えて振り混ぜ、次に、基質溶液 4.0ml を量って加え、振り混ぜ、以下同様に操作して吸光度  $A_B$  を測定する。 $A_T$  及び  $A_B$  にそれぞれ相当するブドウ糖量をブドウ糖検量線より求め、それぞれのブドウ糖 mg 数を  $G_T$  及び  $G_B$  とする。

測定条件下で反応初期の 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のブドウ糖に相当する還元力の増加をもたらす酵素量を 1 単位とする。次式により酵素活性を求める。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g)} = G_T - G_B/30 \times 1/0.18 \times 1/W$$

#### (5) 試薬・試液

##### 1) カルボキシメチルセルロースナトリウム

日本薬局方、医薬品各条、第二部エーテル化度  $0.65 \pm 0.03$  のもの

##### 2) 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (1 mol/l)

酢酸ナトリウム試液に希酢酸を加えて所定の pH に調整する。

##### 3) アルカリ性銅試液

硫酸銅 4.0g, 無水炭酸ナトリウム 24g, 炭酸水素ナトリウム溶かし、900ml とする。この液を 10 分間煮沸した後、水を加えて 1000ml とし、密栓して 1 週間放置したのち、ガラスフィルター (G3) でろ過し、遮光して保存する。

##### 4) ヒ酸二ナトリウム (特級) JIS K8764

##### 5) ヒ酸二ナトリウム試液

ヒ酸二ナトリウム 6.00g に水を加えて溶かし、50ml とする。

##### 6) ヒ素モリブデン酸試液

モリブデン酸アンモニウム 50g に水 900ml を加え、加温して溶かし、冷後、硫酸 42ml を正確に加え、更にヒ酸二ナトリウム試液 50ml を加えた後、水を加えて正確に 1000ml とし、 $37^\circ\text{C}$  で一昼夜放置する。

セルラーゼ測定結果

品名 スミチームC

Lot No. 981229-03、990527-03、991210-01

規格項目	規格	測定回数	Lot No.		
			981229-03	990527-03	991210-01
性状	白～褐色の粉末、粒、又は無色～濃褐色の液体、ペースト	3回	淡黄褐色～淡褐色の粉末	淡黄褐色～淡褐色の粉末	淡黄褐色～淡褐色の粉末
確認試験	確認試験(1)によりセルロース糖化力を示す。	①	糖化力を示す	糖化力を示す	糖化力を示す
		②	糖化力を示す	糖化力を示す	糖化力を示す
		③	糖化力を示す	糖化力を示す	糖化力を示す
重金属	Pbとして 40μg/g以下	①	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
		②	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
		③	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
鉛	Pbとして 10μg/g以下	①	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
		②	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
		③	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0μg/g以下	①	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
		②	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
		③	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
細菌数	50,000/g以下	①	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		②	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		③	100/g以下	100/g以下	100/g以下
大腸菌	1g中に認めない	①	認めない	認めない	認めない
		②	認めない	認めない	認めない
		③	認めない	認めない	認めない
酵素活性 第1法(セルロース糖化力測定法-ニコロ試薬法)	単位/g	①	1,110	1,130	1,110
		②	1,140	1,140	1,150
		③	1,040	1,150	1,120
		④	1,110	1,090	1,060
		⑤	1,040	1,060	1,140
		⑥	1,130	1,040	1,110
	平均(n=6)	1,095	1,102	1,115	
	標準偏差	44.2	45.4	31.5	
	CV(%)	4.0	4.1	2.8	
最大値	1,130	1,150	1,150		
最小値	1,040	1,040	1,060		



セルラーゼ測定結果

品名 セルラーゼ A「アマノ」  
Lot No. CX07507、CX10508、CX11510

規格項目	規格	測定回数	Lot No.		
			CX07507	CX10508	CX11510
性状	白～褐色の粉末、粒、又は無色～濃褐色の液体、ペースト	3回	淡黄褐色～淡褐色の粉末	淡黄褐色～淡褐色の粉末	淡黄褐色～淡褐色の粉末
確認試験	確認試験(2)により粘度が低下する。	①	粘度が低下する	粘度が低下する	粘度が低下する
		②	粘度が低下する	粘度が低下する	粘度が低下する
		③	粘度が低下する	粘度が低下する	粘度が低下する
重金属	Pbとして 40 $\mu$ g/g以下	①	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下
		②	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下
		③	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下	40 $\mu$ g/g以下
鉛	Pbとして 10 $\mu$ g/g以下	①	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下
		②	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下
		③	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下	10 $\mu$ g/g以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 $\mu$ g/g以下	①	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下
		②	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下
		③	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下	4.0 $\mu$ g/g以下
細菌数	50,000/g以下	①	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		②	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		③	100/g以下	100/g以下	100/g以下
大腸菌	認めない	①	認めない	認めない	認めない
		②	認めない	認めない	認めない
酵素活性 (第2法セルロース糖化力測定法-銅試薬法)	単位/g	①	1,390	1,400	1,390
		②	1,460	1,440	1,400
		③	1,360	1,380	1,390
		④	1,390	1,390	1,440
		⑤	1,350	1,300	1,400
		⑥	1,300	1,400	1,360
	平均(n=6)	1,375	1,385	1,397	
	標準偏差	53.2	46.4	25.8	
	CV(%)	3.9	3.4	1.9	
最大値	1,460	1,440	1,440		
最小値	1,300	1,300	1,360		

## プロテアーゼ (案)

### Protease

**定 義** 本品は、動物、魚類若しくは甲殻類の筋肉若しくは臓器より得られた、又は糸状菌 (*Aspergillus melleus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus sojae*, *Monascus pilosus*, *Monascus purpureus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Mucor rouxii*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium duponti*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*)、担子菌 (*Pycnoporus coccineus*)、放線菌 (*Streptomyces*)、細菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans* JA, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoproteolyticus*, *Pseudomonas paucimobilis*) 若しくは酵母 (*Saccharomyces*) の培養物より得られた、たん白質分解酵素である。

**酵素特性** 本品は、広い特異性で蛋白質を加水分解し、ペプチドなどを生成する。

EC ナンバー : EC 3.4.21 セリンエンドペプチダーゼ類 (Subtilisin, Oryzin 等)

EC 3.4.23 アスパラギンエンドペプチダーゼ類 (*Aspergillopepsin* I, *Rhizopuspepsin* 等)

EC 3.4.24 メタロエンドペプチダーゼ類 (*Thermolysin*, *Bacillolysin*, *Mycolysin*, *Deuterolysin*)

EC 3.4.99 反応機作未知のエンドペプチダーゼ類

**性 状** 本品は白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は無色～濃褐色の液体若しくはペーストである。においはないか、又は特異なにおいがある。

**確認試験** 酵素の基原、性質により (1)、(2) 又は (3) の方法を選択して行う。

(1) プロテアーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、第1法又は第2法の酵素活性を示す。

(2) 乳製カゼイン基質溶液 5ml に試料溶液 1ml (1,500～3,000 プロテアーゼ活性単位を含む) を加えてよく混和し、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応した後、トリクロロ酢酸試液 A (0.44mol/l) 5ml を加えて振り混ぜ反応を停止する。この時、発泡のおさまった反応液中に沈殿を生じない。

(3) 20%ゼラチン水溶液 10ml を  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  にて 10～15 分保った後、試料溶液 1ml (1,500～3,000 プロテアーゼ活性単位を含む) を加えてよく混和し、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 20 分間反応したとき、ゼ

ラチン水溶液の粘度は低下する。

**純度試験** 酵素一般規格 純度試験 (1)、(2) 及び (3) を適用する。

**微生物限度** 酵素一般規格 微生物限度を適用する。

**酵素活性測定法** 一般試験法・酵素活性測定法中のプロテアーゼ活性測定法の第 1 法又は第 2 法により試験を行う。但し、測定法及び測定条件 (反応 pH、緩衝液の種類、試料希釈用液等) は、プロテアーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

**\* 試薬・試液**

1) 乳製カゼイン基質溶液

プロテアーゼ活性測定法を準用する。

2) トリクロロ酢酸試液 A (0.44mol/l)

プロテアーゼ活性測定法を準用する。

3) 20%ゼラチン水溶液

ゼラチン 10g を水に静かに加熱しながら溶かし、50ml とする。必要ならばろ過する。用時調製する。

一般試験法 酵素活性測定法

## プロテアーゼ活性測定法 (案)

### 第 1 法 (カゼイン-フォリン法)

カゼインにプロテアーゼが作用するとき、ペプチド結合の切断に伴って増加する酸可溶性低分子分解産物の量をフォリン反応で比色測定して求める。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、非たん白性のフォリン試液呈色物質の増加が、試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、試料に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例、15~30 酵素活性単位/ml である。

#### (2) チロジン検量線

チロジン標準品を 105℃、3 時間乾燥し、その 0.050g を正確に量り、0.2mol/l 塩酸試液に溶かし、正確に 50ml とする (1mg/ml)。

この液 1ml、2ml、3ml 及び 4ml を正確に量り、それぞれに 0.2mol/l 塩酸試液を加え、正確に 100ml とする (10、20、30、40  $\mu$ g/ml)。

それぞれの液 2ml を正確に量り、0.55mol/l 炭酸ナトリウム試液 5ml 及び薄めた フォリン試液(1→3) 1ml をそれぞれ正確に加え、直ちに振り混ぜ、37± 0.5℃で 30 分間放置した後、これらの液につき、0.2mol/l 塩酸試液 2ml を正確に量り、同様に操作して得た液を対照とし、波長 660nm における吸光度  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  及び  $A_4$  を測定する。縦軸に吸光度  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  及び  $A_4$  を、横軸にそれぞれの液 2ml 中のチロジン量 ( $\mu$ g) をとり、検量線を作成する。吸光度差 1 に対するチロジン量 ( $\mu$ g) を求める。

#### (3) 基質溶液

基質溶液 1: 乳製カゼイン(MERCK 製 HAMMARSTEN No.2242 又は同等品)約 1g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 1.20g に対応する乳製カゼインを正確に量り、乳酸試液 12 ml 及び水 150ml を加え、水浴中で加温して溶かす。流水で冷却した後、1mol/l 塩酸試液又は水酸化ナトリウム試液で所定の pH に調整し、水を加えて正確に 200ml とする。用時調製する。

基質溶液 2 : 乳製カゼイン(MERCK 製 HAMMARSTEN No.2242 又は同等品)約 1g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 1.20g に対応する乳製カゼインを正確に量り、0.05mol/l リン酸二ナトリウム試液 160ml を加え、水浴中で加温して溶かす。流水で冷却した後、1mol/l 塩酸試液又は水酸化ナトリウム 試液で所定の pH に調整し、水を加えて正

確に 200ml とする。用時調製する。

#### (4) 操作法

基質溶液 5ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間加温した後、試料溶液 1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 10 分間放置した後、トリクロロ酢酸試液 A ( $0.44\text{mol/l}$ ) 又はトリクロロ酢酸試液 B ( $0.11\text{mol/l}$ ) 5ml を正確に加えて振り混ぜ、再び  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 30 分間放置し、ろ過する。初めのろ液 3ml を除き、次のろ液 2ml を正確に量り、 $0.55\text{mol/l}$  炭酸ナトリウム試液 5ml 及び薄めたフォリン試液(1→3)1ml をそれぞれ正確に加え、よく振り混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 30 分間放置する。この液につき、水を対照とし、波長 660nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に、試料溶液 1ml を正確に量り、上記で用いたトリクロロ酢酸試液 A ( $0.44\text{mol/l}$ ) 又はトリクロロ酢酸試液 B ( $0.11\text{mol/l}$ ) 5ml を正確に加えて振り混ぜた後、基質溶液 5ml を正確に加え、直ちに振り混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 30 分間放置し、以下同様に操作し、吸光度  $A_B$  を測定する。

上記の操作法の条件で試験するとき、1 分間にチロジン  $1\mu\text{g}$  に相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位とし、次式により算出する。

本品中の酵素活性単位 (単位/g 又は ml)

$$=(A_T - A_B) \times F \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし、 F : チロジン検量線より求めた吸光度が 1.000 のときのチロジン量 ( $\mu\text{g}$ )

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g、ml)

#### (5) 試薬・試液

1)  $0.2\text{mol/l}$  塩酸試液 :

塩酸 18ml に水を加えて 1000ml とする。

2)  $1\text{mol/l}$  塩酸試液 :

塩酸 90ml に水を加えて 1000ml とする。

3)  $6\text{mol/l}$  酢酸試液 :

酢酸 36g に水を加えて 1000ml とする。

4)  $1\text{mol/l}$  水酸化ナトリウム試液 :

水酸化ナトリウム 4.3g を水に溶かし、1000ml とする。

5)  $0.55\text{mol/l}$  炭酸ナトリウム試液 :

炭酸ナトリウム(無水) 58.29g を水に溶かし、1000ml とする。

6) トリクロロ酢酸試液 A ( $0.44\text{mol/l}$ ) :

トリクロロ 酢酸 7.20g を水に溶かし、100ml とする。

7) トリクロロ 酢酸試液 B (0.11mol/l) :

トリクロロ酢酸 1.80g 及び無水酢酸ナトリウム 1.80g に 6mol/l 酢酸試液 5.5ml 及び水を加えて溶かし、100ml とする。

8) 乳酸試液 :

乳酸 12.0g を水に溶かし 100ml とする。

9) 0.05mol/l リン酸二ナトリウム試液 :

リン酸二ナトリウム (無水) 7.098g を水に溶かし、1000ml とする。

10) フォリン試液 :

タングステン酸ナトリウム二水和物 20g、モリブデン酸ナトリウム二水和物 5g 及び水約 140ml を 300ml のフラスコに入れ、これに薄めたリン酸 (17→20) 10ml 及び塩酸 20ml を加え、すり合わせの還流冷却器を付け、10 時間穏やかに煮沸する。次に硫酸リチウム一水和物 30g 及び水 10ml を加え、更に臭素ごく少量を加えて濃緑色の液を黄色とし、冷却器を付けず 15 分間煮沸して過量の臭素を除く。冷後、水を加えて 200ml とし、ガラスろ過器でろ過し、塵が混入しないようにして保存する。この液を原液とし、使用するとき所定の濃度に水で薄める。

## 第 2 法 (ヘモグロビン法)

本測定は、ヘモグロビン基質にプロテアーゼを作用させた後の未分解物をトリクロロ酢酸で沈殿させ、沈殿をろ過によって除去し、得られたろ液中の可溶化したヘモグロビン分解物を吸光光度法により定量する。活性は、チロジンを基準としたヘモグロビン単位 (HUT: Hemoglobin Units on the Tyrosine basis) で表わされる。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、吸光度の増加が、試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、試料に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 9~22 酵素単位/ml (吸光度差 0.2~0.5 の範囲) である。

### (2) チロジン検量線

チロジン標準品を 105°C、3 時間乾燥し、その 0.100g を正確に量り、0.1mol/l 塩酸試液 60ml を加えて溶かし、水を加えて正確に 1000ml とする (100 $\mu$ g/ml)。この液 25ml、50ml 及び 75ml を量り、それぞれに 0.006mol/l 塩酸試液を加え、正確に 100ml とする (25、50、75 $\mu$ g/ml)。

これら 4 種類のチロジン標準液につき、0.006mol/l 塩酸試液を対照として波長 275nm における吸光度を測定する。

縦軸に吸光度を、横軸にチロジン量を取り検量線を作成する。原点を通る直線式から傾きを求める。この値に 1.10 を乗じてチロジンのファクター (F) とする。

### (3) 基質溶液

ヘモグロビン (シグマ、Cat No. H 2 6 2 5 又は同等品) 4.0g を量り、100ml の水を加え 10 分間かき混ぜながら溶かす。溶解後 0.3mol/l 塩酸試液を加え pH1.7 に調整し、10 分間かき混ぜた後、0.5mol/l 酢酸ナトリウム試液を加えて pH4.7 に調整する (又は、酸、アルカリ又は緩衝液を加えて、測定する酵素の至適 pH に調整する)。この液に水を加えて正確に 200ml とする。

### (4) 操作法

共栓付き試験管 (25×200mm) にヘモグロビン基質溶液 10ml を正確に量り、40±0.5℃で約 5 分間加温した後、試料溶液 2ml を正確に加え、栓をして緩やかに 30 秒間混ぜる。この液を 40±0.5℃で正確に 30 分間放置した後、14g/dl トリクロロ酢酸試液 10ml を正確に加え、約 40 秒間よく振り混ぜる。この液を室温で 60 分間放置する。この間、10~12 分の間隔でよく振り混ぜる操作を繰り返す。60 分経過後、試験管を激しく振り混ぜ、ろ過する。ろ液のうち、最初の半量は同じろ紙で再ろ過する。

基質ブランクは以下のように操作する。

共栓付き試験管 (25×200mm) にヘモグロビン基質溶液 10ml を正確に量り、40±0.5℃で約 5 分間加温した後、試料溶液の代わりに、試料の希釈に使用した水、緩衝液又は塩類溶液 2ml を加え、以下前記試料溶液の場合と同様に操作する。

酵素ブランクは以下のように操作する。

共栓付き試験管 (25×200mm) にヘモグロビン基質溶液 10ml を正確に量り、又別の試験管には約 5ml の試料溶液を量る。それぞれの試験管を 40±0.5℃で 30 分間放置した後、ヘモグロビン基質溶液の入った試験管に 14g/dL トリクロロ酢酸試液 10ml を正確に加え、約 40 秒間よく振り混ぜる。この液に上記 30 分間予熱した試料溶液 2ml を加え、再びよく振り混ぜる。以下試料溶液の場合と同様に操作する。

基質ブランクのろ液を対照として、層長 10mm、波長 275nm における試料のろ液の吸光度 ( $A_{30}$ ) 及び酵素ブランクのろ液の吸光度 ( $A_0$ ) を測定する。

上記の操作法の条件で試験するとき、1 分間に 1.10 $\mu$ g/ml のチロジン (0.006mol/l 塩酸試液中) に相当する加水分解物の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位 (HUT) とし、次式により算出する。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (HUT/g 又は ml)} = \frac{(A_{30} - A_0)}{F} \times \frac{1}{30} \times \frac{22}{W}$$

ただし、 F : チロジンのファクター

W : 試料溶液 2ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) 0.1mol/l 塩酸試液：

1mol/l 塩酸試液 100ml に水を加えて 1000ml とする。

2) 14g/dl トリクロロ酢酸試液：

トリクロロ酢酸 140g を水に溶かし、1000ml とする。



プロテアーゼ測定結果

品名 プロテアーゼ P「アマノ」3G

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			PRX07519PG	PRX09507PG	PRX10518PG
性 状	白～褐色の粉末、粒又は無色～濃褐色の液体、ペーストである。	①	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒
		②	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒
		③	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒	淡褐色～褐色の粒
確認試験	(1)第1法又は第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	①	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する
		②	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する
		③	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する	(1)第1法、第2法の酵素活性を示す (2)沈殿を生じない (3)粘度は低下する
重金属	Pbとして40μg/g以下	①	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
		②	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
		③	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
鉛	Pbとして10μg/g以下	①	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
		②	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
		③	10μg/g以下	10μg/g以下	10μg/g以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として4.0μg/g以下	①	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
		②	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
		③	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下	4.0μg/g以下
細菌数	50,000/g以下	①	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		②	100/g以下	100/g以下	100/g以下
		③	100/g以下	100/g以下	100/g以下
大腸菌	認めない	①	認めない	認めない	認めない
		②	認めない	認めない	認めない
		③	認めない	認めない	認めない
酵素活性 第1法	単位/g	①	376,000	373,000	370,000
		②	389,000	382,000	370,000
		③	382,000	387,000	374,000
		④	384,000	375,000	369,000
		⑤	388,000	377,000	369,000
		⑥	390,000	373,000	373,000
	平均 (n=6)	385,000	378,000	371,000	
	標準偏差	5,307	5,601	2,137	
	CV (%)	1.4	1.5	0.6	
最大値	390,000	387,000	374,000		
最小値	376,000	373,000	369,000		

品名 プロテアーゼ P「アマノ」3G

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			PRX07519PG	PRX09507PG	PRX10518PG
酵素活性 第 2 法	単位/g	①	95,500	90,400	90,100
		②	100,000	94,100	95,600
		③	99,700	94,800	94,900
		④	98,500	91,200	92,400
		⑤	94,700	91,100	93,700
		⑥	99,200	92,900	94,200
	平均 (n=6)		97,933	92,417	93,483
	標準偏差		2,267	1,790	1,983
	CV (%)		2.3	1.9	2.1
	最大値		100,000	94,800	95,600
最小値		94,700	90,400	90,100	

**\*確認試験の方法**

- (1) カゼイン法：試料を 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で溶かし (1→200) 試料溶液とした。
- (2) ゼラチン法：ゼラチンは DIFCO (Cat. No.0143-01) を使用した。試料溶液は、試料を 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で溶かした (1→200)。

**\*酵素活性の測定法：第 1 法 (カゼイン-フォリン法)**

- (1) 基質溶液の調製法：乾燥物 1.20g に対応する乳製カゼインを正確に量り、0.05mol/L リン酸一水素ナトリウム試液 160mL を加え、60~70°C で 15 分間加温溶解した。冷却後、1mol/L 水酸化ナトリウム試液を加えて pH8.00 に調整し、水を加えて正確に 200mL とした。
- (2) トトリクロロ酢酸試液：B (0.11mol/L) を使用した。
- (3) 試料溶液の調製：試料を 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で溶かした (1→ 15000)

**\*酵素活性の測定法：第 2 法 (ヘモグロビン法)**

- (1) 基質溶液の pH：pH 4.7
- (2) 試料溶液の調製：試料を酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) で溶かした (1→5000)

## 酵素一般規格（案）

日本食品添加物協会・第7部会

酵素一般規格は、酵素（原体及び製剤）の定義、酵素活性、基原・製法、賦形剤・希釈剤等について示し、食品添加物酵素の共通規格として性状、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法を規定する。但し、成分規格に定めるものは規定しない。

### 定義

食品添加物として用いられる酵素は、プロテアーゼ、アミラーゼなどのように通常、その酵素が働く基質に従って命名される。伝統的な名称、例えばペプシン、パパイン、レンネットなどの名称も用いられる。酵素の名称は、「既存添加物名簿」に記載されている。

酵素は、動物、植物あるいは微生物を基原として得られる。

酵素の活性成分は、生物学的に活性のあるたん白質で、特定の物質のみに作用する基質特異性を持ち、場合により金属、糖又は脂質を含むことがある。報告されている酵素の分子量は、約一万二千から数十万である。

市販されている酵素は、活性成分として単一又は複数の酵素活性成分を含み、酵素の安定化、保存又は活性調整等のため、賦形剤、希釈剤等を含む場合がある。

### 性状

白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無色～濃褐色の液状である。においはないか又は特異なにおいがある。

### 酵素特性

酵素活性の特性として、国際生化学連合（IUB）酵素委員会が系統的に分類したEC（Enzyme Commission）ナンバーを参考として記載する。

酵素活性は、個々の酵素の触媒する反応に従って測定し、通常単位重量（又は単位容量）当たりの活性単位数で表し、酵素活性単位の範囲と測定方法を明示する。

酵素活性の測定法は、一般試験法の「酵素活性測定法」に記載する。

## 基原・製法

酵素の基原は、「既存添加物名簿収載品目リスト」の「基原・製法・本質」欄に記載されている。

酵素の基原として使用される動物組織並びに植物原料は、当該酵素の通常の使用条件下で、最終加工食品中において健康に有害な残留成分を含んではならない。

酵素の基原として使用される微生物は、自然界に存在する菌株、又はこれらの育種によって得られた変異菌株、あるいは遺伝子組換え菌株である。これらの菌株は単離されており、酵素の基原として特定できるよう十分分類学的性質が明らかにされ、菌株由来のトキシンの産生が防止されていなければならない。又、菌株の培養に用いられる培地は、通常の使用条件下で最終加工食品中において健康に有害な残留成分を含んではならない。

酵素の製造管理及び品質管理は、「食品添加物の製造管理及び品質管理に関する自主基準」（食品添加物自主GMP）に準拠していなければならない。

## 賦形剤・希釈剤等

酵素の賦形剤・希釈剤等は、食品用途で使用されるもの又は食品添加物でなければならない。

## 純度試験

重金属、鉛、ヒ素の純度試験を行う。但し、特定酵素（例えばポリフェノールオキシダーゼなど）については適用しない。

- (1) 重金属 Pbとして  $40\mu\text{g/g}$  以下 (0.50g、第2法、比較液 鉛標準液 2.0ml)
- (2) 鉛  $10\mu\text{g/g}$  以下 (1.0g、第1法)
- (3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ として  $4.0\mu\text{g/g}$  以下 (0.50g、第3法、装置B)
- (4) その他必要に応じて個別の成分規格にて以下の事項を規定する。

### ① T.O.S (全有機物固形分%)

酵素と希釈剤やその他の添加物とを区別するため、T.O.Sを測定する。

$$\% \text{T.O.S} = 100 - (A + W + D)$$

A=灰分、W=水分、D=賦形剤・希釈剤等

### ② その他、製法上で規格設定が必要な純度試験

## 微生物限度

微生物限度試験法により試験を行う。

- (1) 酵素1gにつき、細菌数は50,000以下である。
- (2) 大腸菌は認めない。

酵素一般規格、酵素活性測定法(H12.2) .DOC