

平成 13 年 2 月 16 日

自主規格改訂案「ロシン」

研究期間 平成 12 年 9 月 1 日～平成 13 年 1 月 31 日

研究報告者 荒川化学工業株式会社 富士工場 品質管理課

1. 目的

既存添加物リスト No487「ロシン」の自主規格案（平成 12 年作成）の改訂として、確認試験項目に赤外吸収スペクトルを追加し、純度試験項目の酸価の上限値を設定した。

2. 検討方法

1) 赤外吸収スペクトル

「食添 7」記載のフーリエ変換形赤外分光光度計を用い、臭化カリウム錠剤法にて試料調製し、参照スペクトル条件で測定。

2) 酸価

油脂類試験法中の酸価試験

3) 試料

中国より輸入したガムロジンを水蒸気蒸留処理した精製ロジン 3 点 (AWW12/11-3B、AWW10/9-3A、NWW10/9-3)

3. 検討結果

1) 赤外吸収スペクトル

上記条件により測定された 3 ロットの試料の赤外吸収スペクトルは、いずれも 1185cm^{-1} 、 1275cm^{-1} 、 1385cm^{-1} 、 1460cm^{-1} 、 1695cm^{-1} 、 2930cm^{-1} 、 3425cm^{-1} 付近に極大吸収を有する相似パターンを示している。（赤外吸収スペクトルチャート別添）

2) 酸価

酸価は 165～175 の範囲で大きなばらつきは認められない。従って上限値を 200 に設定することは問題無いと考えられる。

		AWW12/11-3B	AWW10/9-3A	NWW10/9-3
酸 価	1	173.3	170.4	169.9
	2	172.1	171.9	168.2
	3	173.6	171.2	169.0
	Ave	173.0	171.2	169.0

4. 結論（ロシン自主規格改訂案）

ロシン

Rosin

ロジン

定 義 マツ科マツ (*Pinus palustris* MILL.) の樹皮より分泌物を採取し、低沸点分を蒸留により除去、精製して得られたものである。成分はアビエチン酸である。

性 状 淡黄色～黄褐色でガラス様の透明な破碎しやすい塊で、特有の臭い（松脂臭）を有する。

確認試験 (1) 本品 0.1g に無水酢酸 10ml を加え、水浴中で加温して溶かし、冷後、硫酸 1 滴を加えるとき、液の色は紫赤色となり、ついで紫色に変わる。

(2) 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定し、本品のスペクトルを参照スペクトルと比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。

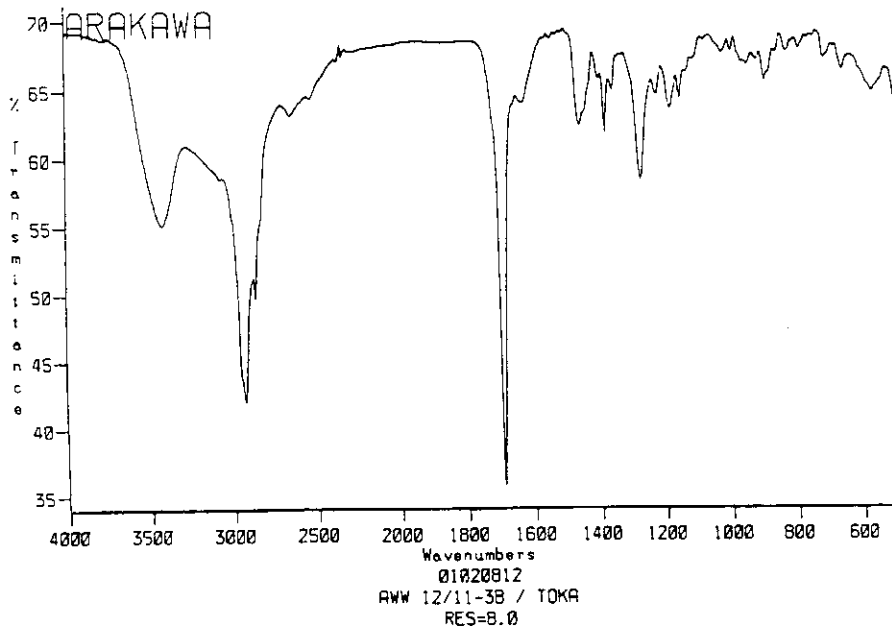
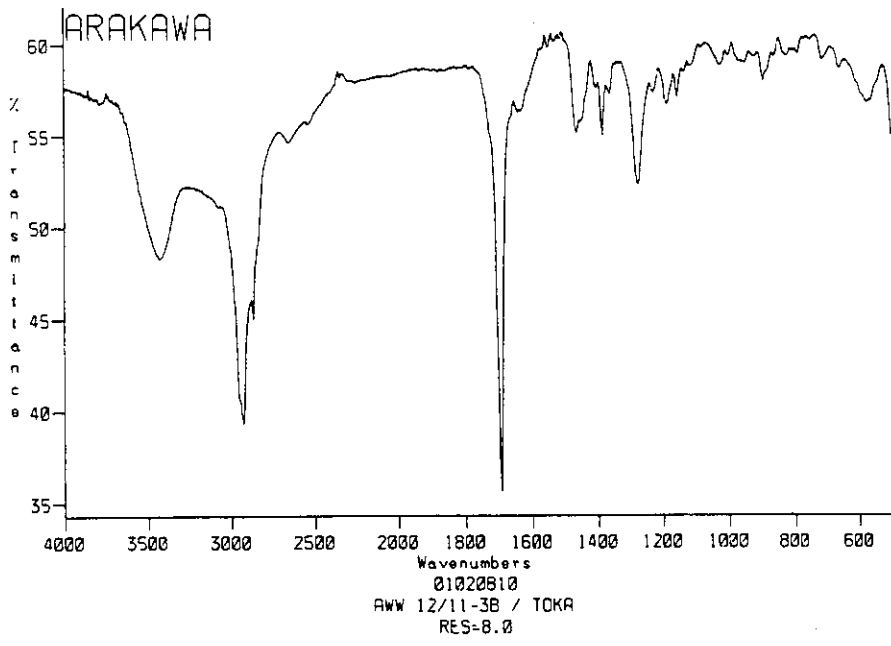
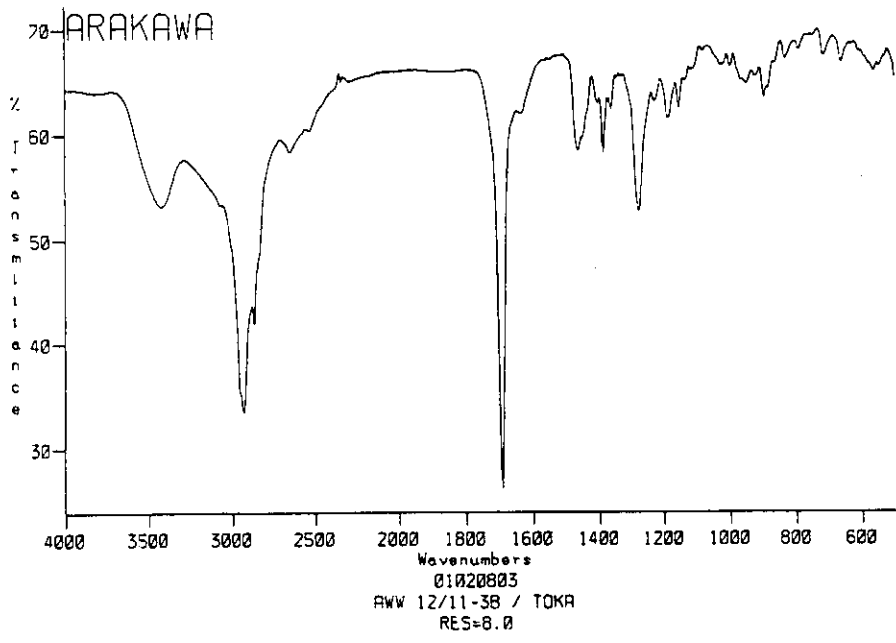
純度試験 (1) 酸価 150～200

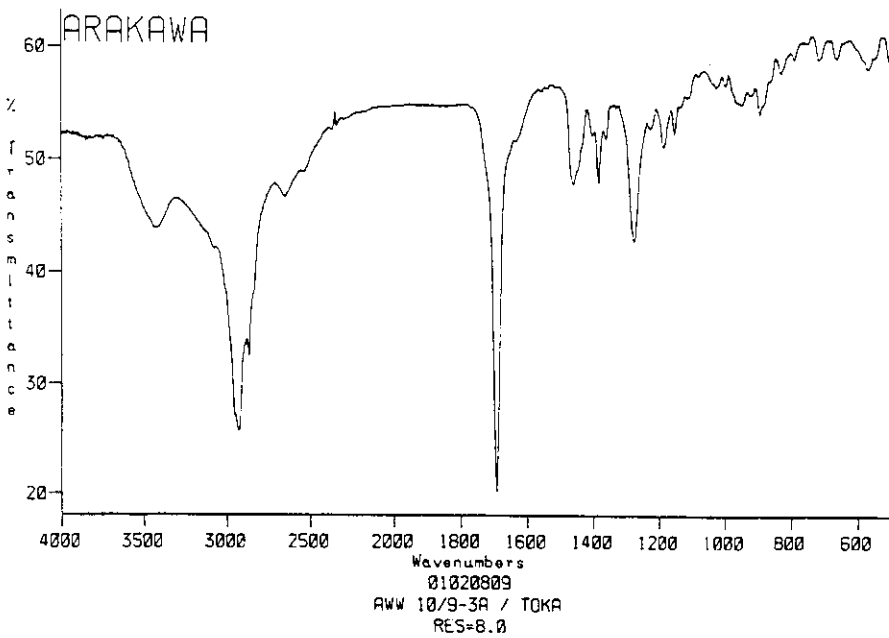
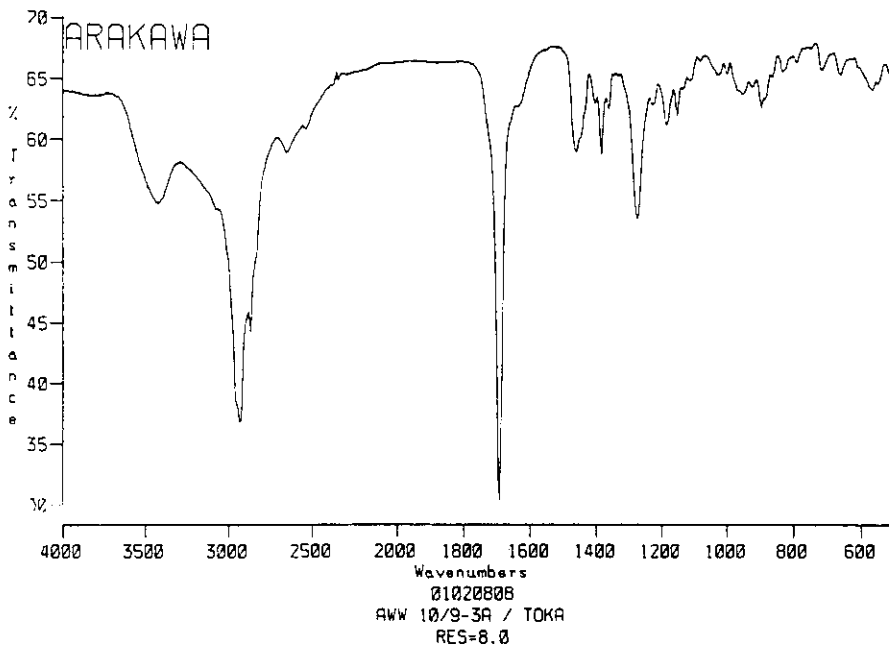
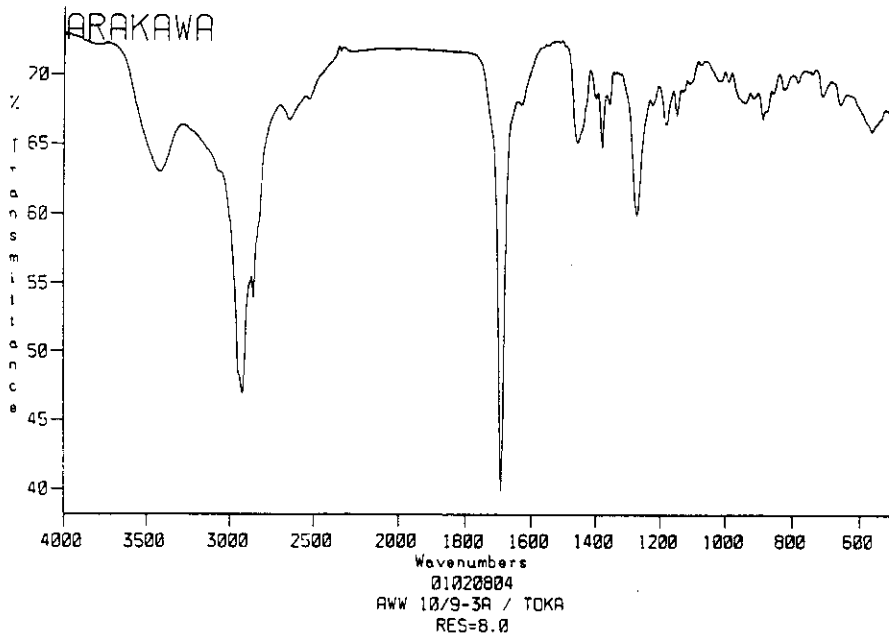
本品約 3g を精密に量り、トルエン／エタノール混液（2：1）50ml を量って加えて溶かし、検液とする。以下油脂類試験法中の酸価の試験を行う。

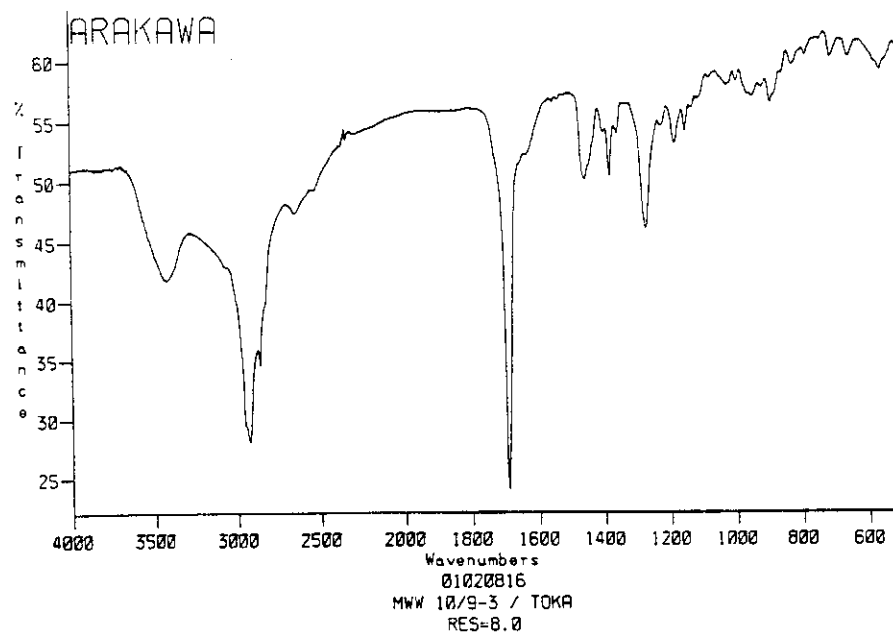
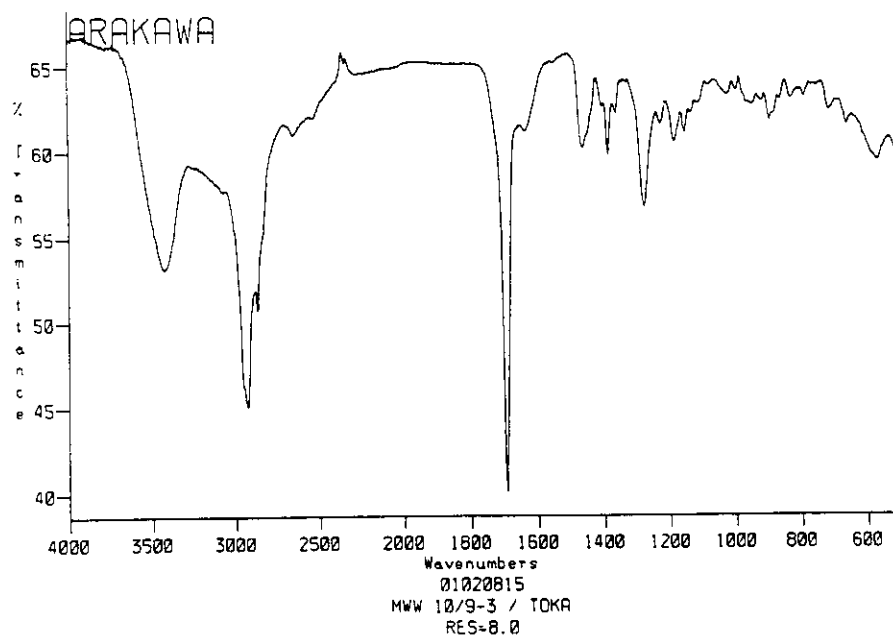
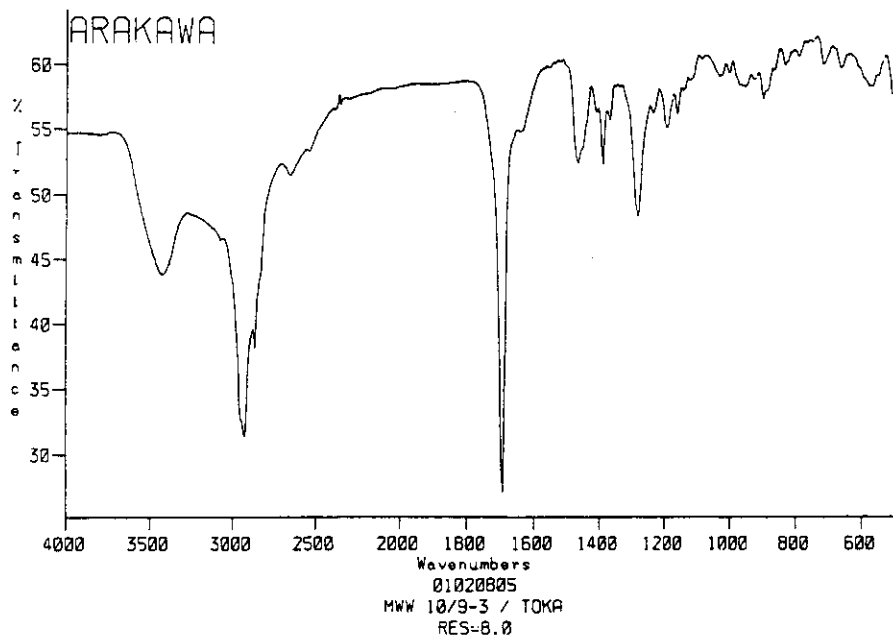
(2) 重金属 Pb として $40 \mu\text{g/g}$ 以下（0.5g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml）

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0 \mu\text{g/g}$ 以下（0.5g、第 3 法、装置 B）

強熱残分 0.10%以下（1.0g）







日添協・自主規格 12 品目改訂の調査研究

研究者名・所属：原田 努・ 味の素（株）
浅田 敏・ 天野エンザイム（株）
古部 健太郎・ エーザイ（株）
北原 昇吾・ 新日本化学工業（株）
二宮 誠・ 大和化成（株）
大脇 純・ ナガセ生化学工業(株)
安部 京子・ ノボ ザイムズジャパン(株)
齊藤 典行・ （株）林原
金谷 宗昭・ 阪急バイオインダストリー(株)
鈴木 里美・ 名糖産業（株）
長尾 一徳・ 日本食品添加物協会・第 7 部会長
田辺製薬（株）

日本食品添加物協会(日添協)・第 7 部会・酵素自主規格検討会は、第二版化学的合成品以外の食品添加物自主規格及び追補(自主規格)に記載されている既存添加物酵素「 α -アミラーゼ」、「 β -アミラーゼ」、「イソアミラーゼ」、「グルコアミラーゼ」、「グルタミナーゼ」、「シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」、「トランスグルタミナーゼ」、「パンクレアチン」、「プルナーゼ」、「リゾチーム」、「リパーゼ」、「レンネット」の 12 品目について、第 7 版食品添加物公定書の制定に伴い、改訂のための調査研究を行ったので、その概要を報告する。

既存添加物酵素は、「既存添加物名簿」には 76 品目が記載されている。規格の設定は、第 7 版食品添加物公定書には 4 品目、日添協・自主規格には 12 品目が記載されているが、今回、平成 12 年度調査研究として自主規格改訂の検討を行なった。尚、平成 11 年度調査研究では、酵素一般規格の作成、汎用されている酵素「カタラーゼ」、「セルラーゼ」、「プロテアーゼ」、「ペクチナーゼ」、「ヘミセルラーゼ」の 5 品目の成分規格(案)並びに酵素活性測定法(案)を作成している。

1. 酵素 12 品目の成分規格(案)

(1) 目的

第 2 版自主規格 12 品目の規格を、第 7 版食品添加物公定書(公定書)に準拠させるため、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法等について調査研究を行い、この結果に基づき改訂規格(案)を策定し、その妥当性について試験研究を行った。

(2) 検討方法

自主規格検討会(14 社参加)は、12 品目毎に作成担当会社を決めた。性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法について、第 2 版自主規格、国際規格、各社の試験方法を調査し、その

結果に基づき自主規格改訂（案）を策定し、その妥当性について試験を実施した。

作成担当会社は、下記の通りである。

- | | | |
|-------------------------|---|-----------------|
| ①α-アミラーゼ | : | 新日本化学工業（株） |
| ②β-アミラーゼ | : | 阪急バイオインダストリー（株） |
| ③イソアミラーゼ | : | （株）林原 |
| ④グルコアミラーゼ | : | ノボザイムズジャパン（株） |
| ⑤グルタミナーゼ | : | 大和化成（株） |
| ⑥シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ | : | 天野エンザイム（株） |
| ⑦トランスグルタミナーゼ | : | 味の素（株） |
| ⑧パンクレアチン | : | 天野エンザイム（株） |
| ⑨プルラナーゼ | : | ノボザイムズジャパン（株） |
| ⑩リゾチーム | : | エーザイ（株） |
| ⑪リパーゼ | : | ナガセ生化学工業（株） |
| ⑫レンネット | : | 名糖産業（株） |

（3） 検討結果並びに考察

検討結果の概要は、下記の通りである。

- ① 規格の記載方法は、公定書に準拠させた。
- ② 平成 11 年度に JECFA 規格を参考に「酵素一般規格」を設定したが、それを踏まえて、定義、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法につき準拠させた。
- ③ 定義については、基原は「既存添加物名簿」の定義に準拠したが、「酵素一般規格」により、原体、製剤両者に適用させた規格とした。尚、製法は、品目により不適切な記載を一部省略した。
- ④ 酵素特性を新たに設定し、参考として EC ナンバーを記載した。
- ⑤ 確認試験は、品目により、不適切な試験の削除、新しい特異的な確認試験や酵素活性の確認試験を設定した。
- ⑥ 純度試験は、公定書の規格と同一とした。
- ⑦ 微生物限度を新たに設定し、公定書の規格と同一とした。
- ⑧ 定量法は、酵素活性測定法と名称を改めた。酵素の性質は、基原、製法の違いにより大きく異なり、品目により測定法が複数設定されることで、最適な測定法が選択可能となった。さらに酵素の基原、性質により測定条件（反応 pH、緩衝液の種類、試料希釈液等）を選択してもよいとした。又、測定法は、一般試験法・酵素活性測定法にまとめて収載する。
- ⑨ 酵素活性の規格値（含量規定）は、市販酵素が種々の活性値に調製されているため、定めないとした。
- ⑩ 性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法につき、12 品目の各 3 ロットの繰り返し試験を行った結果、測定値の全てが改訂規格（案）に適合し、妥当性が検証された。尚、試験データは、全て酵素製剤により取得した。
- ⑪ 国際規格との比較については、日添協の調査研究「国際規格と自主規格対比表」を参照のこと。

各品目の改訂規格案につき、確認試験、酵素活性測定法等の検討概要を下記に示す。

(3) - 1. α -アミラーゼ

確認試験は、バイレシヨデンプンの粘度変化の確認を削除し、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、4つの測定法を設定した。第1法はヨウ素-デンプン反応法であり、酵素を基質デンプンに作用させ、デンプンの低分子化に伴うヨウ素の呈色減少を660nmの吸光度を測定する方法である。第2法はでんぷん粘度低下力測定法であり、酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴う粘度低下を標準のシリコーン油と比較測定する方法である。本測定法は、第13改正日本薬局方(日局)、一般試験法、24. 消化力試験法、(1) でんぷん消化力試験法、(ii) でんぷん糊精化力測定法並びに日本工業規格の工業用アミラーゼ(JIS K7001-1990)、7. 試験方法、7.1 液化力に準ずる方法である。第3法はSKB変法であり、酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴うヨウ素呈色の発色強度の低下と色調の変化を標準のカラーディスクと比較測定する方法である。本測定法は、JECFA規格の α -アミラーゼ活性測定方法と測定原理がほぼ同一である。第4法はNADH比色定量法であり、酵素を基質マルトトリオースに作用させ、生成した α -グルコースを β -グルコースに変換し、NADの存在下でグルコースデヒドロゲナーゼを作用させ、生成したNADHを340nmにおける吸光度から測定する方法である。

以上の4つの測定法は、 α -アミラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 2. β -アミラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質デンプンに作用させ、グルコシド結合の切断により生成した還元糖をチオ硫酸ナトリウム滴定で測定する方法である。本測定法は、日局の「でんぷん糖化力測定法」に準ずる方法である。尚、酵素の種類により、日局の基質バイレシヨデンプンで試験を行なった場合、チオ硫酸ナトリウム滴定の終点が不明瞭な場合があるため、基質2として「デンプン、溶性」を追加した。

この測定法は、でんぷん糖化力測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 3. イソアミラーゼ

確認試験は、酵素がデンプン(ワキシーコーンスターチ)を分解し、ヨウ素溶液との呈色の変化を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素が基質デンプンを加水分解し、ヨウ素溶液との呈色が赤紫色から青色へ変化する作用を利用し、610nmにおける吸光度から測定する方法である。

この測定法は、イソアミラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 4. グルコアミラーゼ

確認試験は、第2版自主規格の試験方法は改訂グルコアミラーゼ酵素活性測定法第1法と同一で、第2法と合わせて酵素活性を確認する2つの方法を設定した。

酵素活性測定法は、第2版自主規格の試験方法をでんぷん糖化力活性測定法として設定した。さら

に2つの測定法を設定した。第1法は国税庁所定分析法であり、酵素が基質デンプンを分解し、生成するブドウ糖にグルコースオキシダーゼーパーオキシダーゼー4-アミノアンチピリンを作用させ、505nmにおける吸光度から測定する方法である。第2法はNADH比色定量法であり、酵素が基質マルトースを分解し、NAD存在下でグルコースデヒドロゲナーゼを作用させ、生成するNADHを340nmにおける吸光度から測定する方法であり、市販酵素の酵素活性測定に広く採用されている。

第1法と第2法の測定法は、グルコアミラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 5. グルタミナーゼ

確認試験は、第2版自主規格の方法を設定すると共に、新たに酵素活性測定法第2法のL-グルタミン酸発色溶液にて赤色発色を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、第2版自主規格に収載されている2つの酵素活性測定方法を設定した。

第1法はL-グルタミン酸オキシダーゼ法であり、酵素を基質L-グルタミンに作用させ、生成したL-グルタミン酸を発色溶液にて青色に発色させ、600nmにおける吸光度を測定する方法である。

第2法はL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ法であり、酵素を基質L-グルタミンに作用させ、生成したL-グルタミン酸を発色溶液により赤色に発色させ、492nmにおける吸光度を測定する方法である。

これら2つの測定法は、グルタミナーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 6. シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

確認試験は、第2版自主規格の薄層クロマトグラフィーでの確認を変更してHPLC法を採用した。さらに酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、2つの酵素活性測定法を設定した。第1法は、第2版自主規格の測定法と同一で、酵素を基質バレイショデンプンに作用させ、デンプンのヨウ素呈色の減少を660nmにおける吸光度を測定する方法である。本測定法は、 α -アミラーゼ活性測定法の第1法と原理は同一である。第2法は新たに設定した方法で、酵素を基質デンプンに作用させ、シクロデキストリン結晶が生成する時間を顕微鏡観察により測定する方法である。

これら2つの測定法は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 7. トランスグルタミナーゼ

確認試験、酵素活性測定法は、第2版自主規格とほぼ同一である。

この測定法は、トランスグルタミナーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 8. パンクレアチン

確認試験は、第2版自主規格の(1)、(2)はパンクレアチンに特異な試験でないので、新たにでんぷん糖化力、プロテアーゼ力、脂肪消化力に特異的な確認試験を設定した。でんぷん糖化力は、酵素がバレイショデンプンに作用し、生成した還元糖をフェーリング液にて赤色沈殿を確認する方法、たん白消化力は、酵素がゼラチンに作用し、粘度低下を確認する方法、脂肪消化力は、酵素がオリーブ油に作用し、生成した脂肪酸によるpHの低下を指示薬で確認する方法である。

純度試験は、脂肪含量「0.060g以下」を「80mg以下」に変更した。その理由は、高活性のパンクレアチンについても適合させることを考慮した。

酵素活性測定法は、第2版自主規格は、たん白分解力、でんぷん分解力の2つの方法であったが、リパーゼ活性を追加した。又、測定方法の名称を変更し、たん白分解力はプロテアーゼ活性法に、でんぷん分解力はでんぷん糖化力活性にそれぞれ変更した。プロテアーゼ活性測定法、でんぷん糖化力測定法は、それぞれ第2版自主規格のたん白分解力測定法、でんぷん分解力測定法に同一である。尚、プロテアーゼ活性測定法、でんぷん糖化力測定法、並びに新しく設定したリパーゼ活性測定法は、日局パンクレアチンの活性測定法と同一である。

(3) - 9. プルラナーゼ

確認試験は、粘度低下を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、第2版自主規格の方法を設定したが、使用する試薬・試液につき、クエン酸緩衝液、ソモギ試薬、ネルソン試薬のそれぞれの調製方法を追加した。尚、ソモギ試薬、ネルソン試薬の調製方法は、日本工業規格のプルラナーゼ活性度測定法 JISK7001(JIS 糖化力法)に準じた。

この測定法は、プルラナーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 10. リゾチーム

確認試験は、吸収スペクトルを測定して確認する方法を設定した。尚、第2版自主規格の確認試験(1)は、酵素活性測定法と同一なため、削除した。

乾燥減量は、第2版自主規格の定量法に「乾燥減量を測定しておく」と記載されているが、測定条件が記載されていないので、試験項目を新たに設定した。

微生物限度は、リゾチームには静菌作用があり、試験方法の妥当性に検討を要するため、今回は設定しなかった。

酵素活性測定法は、第2版自主規格とほぼ同一の試験方法を設定した。

この測定法は、リゾチーム活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 11. リパーゼ

確認試験は、第2版自主規格の酵素にオリブ油乳化液に作用させ、遊離脂肪酸による pH 低下を pH 指示薬で観察する方法を設定した。

酵素活性測定法は、第2版自主規格に2つの測定法が収載されているが、定量法Ⅰは基質に乳化したオリブ油を使用しているのに対し、定量法Ⅱは乳化していないオリブ油を使用して特殊装置で反応させる方法である。定量法Ⅰ、Ⅱ共に同じオリブ油を基質に用い、乳化の有無の差があるが、定量法Ⅱについては、反応時に特殊装置が必要であることと、メーカーが採用していない等の理由により、削除した。定量法Ⅰを第1法とし、酵素が基質オリブ油に作用し、生成する脂肪酸を水酸化ナトリウム滴定で測定する方法である。本測定法は日局・一般試験法・24 消化力試験法(3)脂肪消化力試験法に準ずる方法である。又、新たに第2法として、酵素が基質トリブチリンに作用し、生じた酪酸を pH スタットにて測定する方法を設定した。

これら2つの測定法を、リパーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

(3) - 12. レンネット

確認試験は、レンネット活性、粉乳溶液の凝乳を確認する2つの試験方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素が基質脱脂粉乳に作用し、凝乳による微粒片が生じる時間を測定する方法である。酵素活性は、標準酵素に対する酵素量で測定される。本測定法は、国際酪農連盟の MICROBIAL COAGULANTS DETERMINATION OF TOTAL MILK CLOTTING ACTIVITY に準じる方法である。

この測定法は、レンネット活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

以上、酵素 12 品目の成分規格改訂（案）、一般試験法に収載する酵素活性測定法（案）を策定した結果、各品目共に試験方法の妥当性が検証された。

尚、各品目共に酵素の基原、性質により測定方法、測定条件が異なるため、公定書への収載の際には、国際的整合性を踏まえ、さらなる研究調査が必要であると考ええる。

(4) 規格案

別紙の 12 品目の各成分規格（案）、各酵素活性測定法（案）のとおり。

以上

平成12年度

第7部会 自主規格作成検討会メンバー会社 14社

- 味の素製薬株式会社
- 天野エンザイム株式会社
- エーザイ株式会社
- 三共株式会社
- 新日本化学工業株式会社
- 大和化成株式会社
- 田辺製薬株式会社
- 長瀬産業株式会社
- ナガセ生化学工業株式会社
- ノボザイムズジャパン株式会社
- 株式会社林原
- 阪急バイオインダストリー株式会社
- 名糖産業株式会社

以上

α-アミラーゼ（案）

α-Amylase

定 義 本品は糸状菌 (*Aspergillus aureus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*)、細菌 (*Alcaligenes latus*, *Arthrobacter*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Sulfolobus solfataricus*) 若しくは放線菌 (*Thermomonospora viridis*) の培養物より得られた、デンプンを分解する酵素である。

酵素特性 本品は、デンプン等のα-1,4-グルコシド結合を加水分解して低分子化する。
ECナンバー（参考）： EC 3.2.1.1

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 α-アミラーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、第1法、第2法、第3法又は第4法の酵素活性を示す。

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α-アミラーゼ活性測定法の第1法、第2法、第3法又は第4法により試験を行う。但し、測定条件（反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等）は、α-アミラーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

一般試験法 酵素活性測定法

α -アミラーゼ活性測定法（案）

第1法(ヨウ素-デンプン反応法)

酵素を基質デンプンの直鎖部分（アミロース）に作用させ、デンプンの低分子化に伴ってデンプンのヨウ素による青色呈色の減少を測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

本品に水又は緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、通例0.2~0.5単位/mlになるように調製し、試料溶液とする。

(2) 基質溶液

でんぷん消化力試験用バレイショデンプン試液を用いる。

(3) 操作法

基質溶液10ml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を正確に加えて直ちに振り混ぜる。 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に10分間反応させた後、この液1mlを正確に量り、別に用意した0.1mol/l塩酸10mlに加えて直ちに振り混ぜる。次にこの液0.5mlを正確に量り、0.0002mol/lヨウ素試液10mlを加えて直ちに振り混ぜた後、660nmで吸光度を測定する(A_r)。別に試料溶液の代わりに水を用い、同様に操作し、吸光度を測定し(A_B)、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分間にデンプンのヨウ素による青色を10%減少させる酵素量を1単位とする。

本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）

$$\begin{aligned} &= (A_B - A_r) / (A_B) \times 100 \times 1/10 \times 1/10 \times 1/W \\ &= (A_B - A_r) / (A_B) \times 1/W \end{aligned}$$

A_r : 反応液の吸光度

A_B : 反応対照液の吸光度

100 : 百分率

10 : 単体量当たりの10%の減少度

10 : 反応時間（分）

W : 試料溶液1ml中の試料の量（g又はml）

(4) 試薬・試液

1) でんぷん消化力試験用バレイショデンプン試液

あらかじめバレイショデンプン約1gを精密に量り、 105°C で2時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物1.000gに対応するバレイショデンプンを正確に量り、水20mlを加えてよく振り混ぜながら、徐々に水酸化ナトリウム溶液（2→25）5mlを加えて糊状にする。次に沸騰水浴中でよく振り混ぜながら3分間加熱した後、水25mlを加え、冷後、2mol/l塩酸試液で

pH7.0に調整する。次に適切な種類、pHの緩衝液又は塩類溶液10mlを加え、更に水を加えて正確に100mlにする。用時調製する。

2) バレイショデンプン

日本薬局方（第二部）バレイショデンプンを用いる。

3) 0.0002mol/lヨウ素試液

0.04mol/lヨウ素試液1mlを正確に量り、水を加えて正確に200mlとする。用時調製する。

4) 0.04mol/lヨウ素試液

ヨウ化カリウム5.00g及びヨウ素1.00gを水に溶かし、正確に100mlとする。

第2法(でんぷん粘度低下力測定法)

酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴う粘度の低下を測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

本品に適量の希釈液を加えて溶かし、通例1単位/mlを中心に濃度が5%ずつ異なるように調整し、試料溶液とする。必要ならば加温抽出及びろ過する。

(2) 基質溶液

バレイショデンプン10gを正確に量り、105℃で2時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物10.00gに対応するバレイショデンプンを正確に量り、酵素試験用pH6.0の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液又は適切な種類、pHの緩衝液又は塩類溶液10mlを正確に加え、水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

(3) シリコーン油封入試験管の調製

操作法に用いるものと同質・同型の試験管にシリコーン油11ml (10.6g) を正確に封入する。シリコーン油は25℃における粘度 $500 \pm 25 \text{mm}^2/\text{s}$ ($500 \pm 25 \text{cSt}$)、粘度温度係数 0.60 ± 0.02 のものを使用する。65℃における粘度は $250 \pm 20 \text{mm}^2/\text{s}$ ($250 \pm 20 \text{cSt}$)である。

(4) 操作法

試験管 (18 x 180 mm) に基質溶液10mlを正確に量り、試料溶液1mlを正確に加え、試験管にゴム栓をし、激しく振り、デンプンを均一に分散させた後、すばやく栓を取り、直ちに激しく振り混ぜながら沸騰水浴中で加熱し、デンプンが糊化したとき、直ちに $65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温槽に移す。正確に15分間反応させた後、同じ恒温槽にあらかじめ浸しておいた2本のシリコーン油封入試験管の間に反応液入り試験管をはさんで、3本の試験管をそろえて持ち、恒温槽から取り出し、下部を恒温槽の縁にかけながら、口部を水平から45度下方に速やかに傾けて、試験管内の流動性を観察し、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、シリコーン油と同じ速さで流動するときの酵素量を1単位とする。

本品中の酵素活性の単位 (単位/g又は単位/ml) = 試料溶液の希釈倍数

濃度が異なる一連の試料溶液について濃度の低い順に試験をするとき、ある試料溶液に対応する反応液がシリコーン油より遅く又は速く流動する場合、両試料溶液のちょうど中間の濃度の活性を1単位 (単位/ml) とする。

(5) 試薬・試液

1) バレイショデンプン

日本薬局方（第二部）バレイショデンプンを用いる。

2) 酵素試験用pH6.0の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液

酢酸ナトリウム27.2gを水900mlに溶かし、酢酸（1→100）を加えて、pH6.0に調整する。更に塩化カルシウム0.075g及び塩化ナトリウム0.6gを加えて溶かし、水を加えて1000mlとする。

3) シリコーン油

信越シリコーンKF96（物質名：ジメチルポリシロキサン、信越化学製）又は同等品を使用する。

第3法(SKB変法)

酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴うヨウ素呈色の発色強度の低下と色調の変化を測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

本品に水又は緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、通例0.1～0.125単位/mlになるように調製し、試料溶液とする。

(2) 基質溶液

あらかじめ可溶性デンプン約1gを正確に量り、105℃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2.00gに対応する可溶性デンプンを正確に量り、水20mlを加え、よくかき混ぜながら約50mlの沸騰水中に徐々に加え、絶えずかき混ぜながら沸騰を1～2分間持続した後、冷却する。次に2mol/lの酢酸緩衝液（pH4.6）5ml及び水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

(3) 操作法

平底試験管（30×120mm）に基質溶液10mlを正確に量り、30±0.5℃で15分間加温した後、あらかじめ30±0.5℃に加温した試料溶液5mlを正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を30±0.5℃に保ち、正確に19分間経過したときから20秒間隔で反応液1mlを正確にとり、あらかじめ30±0.5℃に加温したヨウ素希釈液5mlを入れた試験管（18×165mm）中に加え、振り混ぜる。直ちにヘリーゲコンパレーターの角形セルに液を移して、色調と濃度をカラーディスクと比較する。反応液の色がカラーディスクと同じになる時点を反応終点（Tmin）とし、反応終点となるまで反応液の測定をくり返す。具体的には、経時的に反応液をサンプリングして色の比較を行うとき、カラーディスクの色に対して、ある時点の色調は暗く、次の時点で明るくなる連続した2つの反応時間を記録し、その中間の時間を反応終点とするか、又はカラーディスクの色調と同等と判断された時点を反応終点とし、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、60分間に1gのデンプンを加水分解する酵素量を1単位とする。

本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）

$$= (0.02 \times 10) \times 60/T \times 1/5 \times 1/W = 2.4 / T \times 1/W$$

0.02 : 基質溶液のデンプン濃度（g/ml）

10 : 基質溶液の量（ml）

60 : 単位換算係数（60分）

- T : 酵素反応の反応終点 (min)
S : 酵素反応に使用する試料溶液の量 (ml)
W : 試料溶液1ml中の試料の量 (g又はml)

(4) 試薬・試液

1) 可溶性デンプン

可溶性デンプン (Merck製、製品番号 101252) 又は同等品を使用する。

2) ヨウ素希釈液

ヨウ化カリウム10gを約200mlの水に溶かし、ヨウ素原液1mlと水を加えて250mlとする。

3) ヨウ素原液

ヨウ素5.5gとヨウ化カリウム11gを約200mlの水に溶かし、更に水を加えて正確に250mlとする。
密栓した褐色ガラス瓶に入れ、冷蔵庫で保存する。

4) 2mol/l酢酸緩衝液 (pH4.6)

酢酸120mlに水約500mlを加えて混和する。1mol/l水酸化ナトリウム試液でpH4.6に調整し、水を加えて1000mlとする。

(5) ヘリーゲコンパレーター

Hellige pocket comparator with prism attachment (Orbeco Analytical Systems製、製品番号 605-AHT) 又は同等品を使用する。なお、付属品としてHellige daylight illuminator (Orbeco Analytical Systems製、製品番号 600-DA) 又は同等品を使用する。(写真添付)

(6) カラーディスク

Special Alpha-Amylase Color Disk (Orbeco Analytical Systems製、製品番号 620-S5) 又は同等品を使用する。

第4法(NADH比色法)

酵素を基質マルトトリオースに作用させ、生成した α -グルコースを β -グルコースに変換し、NADの存在下でグルコースデヒドロゲナーゼを作用させ、生成したNADHを比色測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

1mol/l塩化ナトリウム溶液10mlに水を加えて1000mlとし、希釈液とする。次に本品に希釈液を加えて溶かし、試料溶液とする。試料溶液の濃度がブドウ糖検量線の範囲内に入るように調製する。

(2) 基質溶液

マルトトリオース1000mgに0.1mol/lクエン酸緩衝液を加えて溶かし、正確に50mlとする。用時調製する。

(3) ブドウ糖標準液の調製

1. 600gのブドウ糖を水又は適切な緩衝液1000mlに溶解する。得られた溶液をさらに水又は適切な緩衝液で希釈し、1ml中に0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 μ gの各濃度のブドウ糖標準液を調製する。

(4) 操作法

あらかじめ基質溶液0.5mlを $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に加温し、この液に $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に加温した試料溶液0.5mlを正確に加えて直ちに振り混ぜる。 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で正確に30分間反応させた後、反応停止液1mlを正確に

加えてよく振り混ぜる。更にグルコースデヒドロゲナーゼ試液3mlを正確に加えてよく振り混ぜる。室温で正確に30分間放置後、340nmの吸光度を測定する(A_T)。別に対照として試料溶液に反応停止液を加えた後、基質溶液を加えて以下同様に操作を行う(A_B)。

ブドウ糖検量線は、各濃度のブドウ糖標準液2mlを正確に量り、グルコースデヒドロゲナーゼ試液3mlを正確に加えてよく振り混ぜる。室温で正確に30分間放置後、340nmの吸光度を測定し、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1 μ molのマルトトリオースを分解する酵素量を1単位とする。

本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）＝

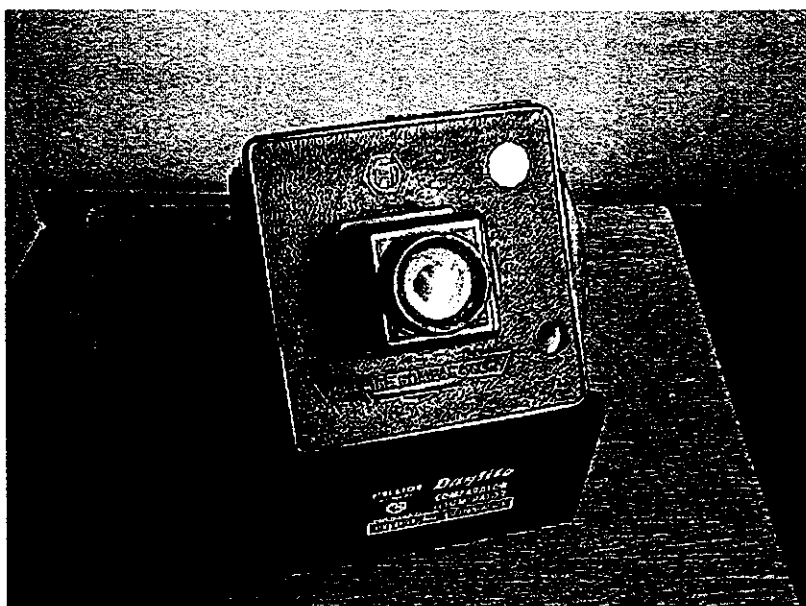
$$\frac{(A_T - A_B) \times 4}{A_G \times 30 \times 180.2 \times W} = \frac{(A_T - A_B) \times 4}{A_G \times 5406 \times W}$$

- A_T : 反応液の吸光度
 A_B : 対照液の吸光度
 A_G : ブドウ糖 1 μ g/mlの吸光度（検量線より算出）
180.2 : ブドウ糖の分子量
W : 試料溶液1 ml中の試料の量（g又はml）
4 : 反応に用いた試料の液量（ml）に対する検量線に用いたブドウ糖溶液の量の比
30 : 反応時間（分）

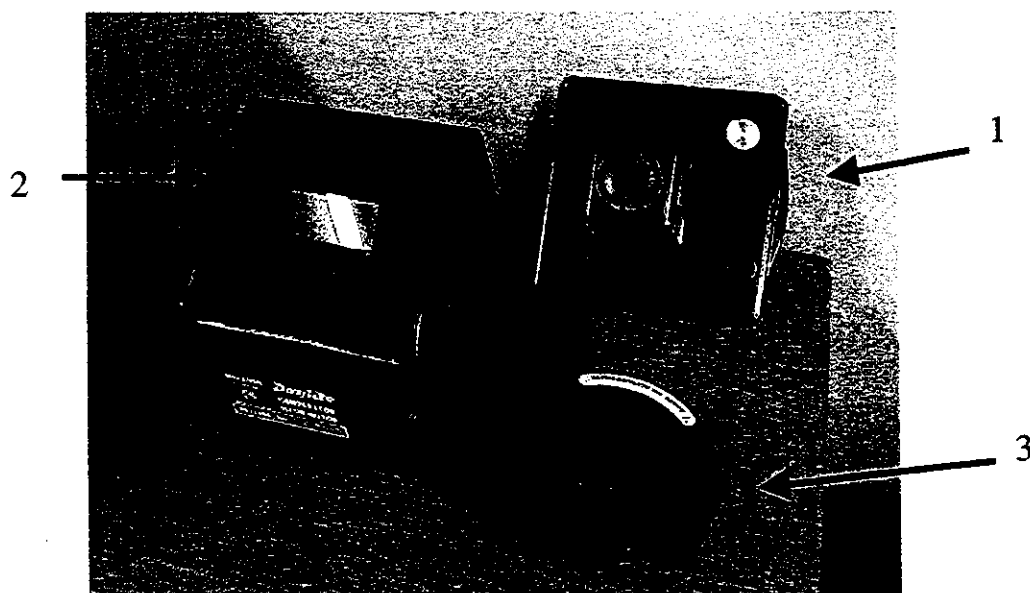
(5) 試薬・試液

- 1) マルトトリオース
マルトトリオース（Sigma製、製品番号M8378）又は同等品を使用する。
- 2) 0.1mol/lクエン酸緩衝液、pH5.0
クエン酸5.255gを約200mlの水に溶かし、5mol/l水酸化ナトリウム溶液でpHを5.0に調整する。水を加えて正確に250mlとする。用時調製する。
- 3) 1mol/l塩化ナトリウム溶液
塩化ナトリウム 29.22gに水を加えて溶かし、正確に500mlとする。
- 4) 反応停止液
1mol/l水酸化ナトリウム溶液30mlに水を加えて正確に500mlとする。
- 5) グルコースデヒドロゲナーゼ試液
NAD/ムタロターゼ1瓶（粉末）に専用のメルクオートGlucose緩衝液250mlを加えて溶かした後、Gluc-DH溶液1瓶2.5mlと混ぜ合わせる。用時調製する。
- 6) NAD/ムタロターゼ
メルクオートGlucose NAD/ムタロターゼ（Merck製 製品番号77003、粉末）又は同等品を使用する。
- 7) Gluc-DH溶液
メルクオートGlucose Gluc-DH溶液（Merck製 製品番号77004、2.5ml、褐色ビン入り）又は同等品を使用する。
- 8) メルクオートGlucose 専用緩衝液
メルクオートGlucose 緩衝液（Merck製 製品番号77005、1000ml）又は同等品を使用する。

α -アミラーゼ活性測定法（案）第3法のヘリーゲコンパレーター
ーおよびカラーディスクの装置説明



Hellige pocket comparator with prism attachment
(付属品 Hellige daylite illuminator)



1. Hellige pocket comparator with prism attachment
2. Hellige daylite illuminator
3. Special Alpha-Amylase Color Disk

α-アミラーゼ測定結果

品名 アミラーゼ AD「アマノ」1 (基原: *Bacillus subtilis* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			AY0850901	AY0852505	AY0952901
性状	白～濃褐色の粉末、若しくは粒、又は無色～濃褐色の液体、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。	①	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある
		②	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある
		③	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある	白色の粉末、特異なにおいがある
確認試験	第 1 法の酵素活性を示す	①	酵素活性を示す	酵素活性を示す	酵素活性を示す
		②	酵素活性を示す	酵素活性を示す	酵素活性を示す
		③	酵素活性を示す	酵素活性を示す	酵素活性を示す
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 ₂ O ₃ 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	737	746	825
		②	777	716	769
		③	723	739	786
		④	802	708	794
		⑤	740	762	761
		⑥	752	768	779
	平均 (n=6)	755	740	786	
	標準偏差	29.2	24.1	22.6	
	CV (%)	3.9	3.3	2.9	
	最大値	802	768	825	
最小値	723	708	761		

* 酵素活性の測定法 : 第 1 法

(1) 試料溶液 : 本品に水を加えて溶解し、試料溶液とした。(1→3000)