

## グルコアミラーゼ活性測定法（案）

### 第 1 法（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用いた酵素的な方法）

酵素が基質デンプンに作用させ、グルコシド結合の切断に伴って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反応させ、吸光度の測定から求める方法である。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、ブドウ糖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、水又は適切な緩衝液を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 0.3～3 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

可溶性デンプン 2.0g を正確に量り、水 20ml を加え、よくかき混ぜながら約 40ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 1～2 分間煮沸した後、流水中で冷却する。次いで、水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

#### (3) 操作法

基質溶液 1ml と適切な緩衝液 0.2ml を各々正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した後、試料溶液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 20 分間放置した後、1mol/l 水酸化ナトリウム試液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。その後、30 分間放置したのち、1mol/l 塩酸試液 0.1ml を加えて中和する。

別に、対照として基質溶液 1ml、上記と同じ緩衝液等 0.2ml を各々正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した後、1mol/l 水酸化ナトリウム試液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。その後、試料溶液 0.1ml を正確に加え、以下同様に操作する。

上記、試料反応液及び対照液の生成ブドウ糖量を以下の方法で測定する。

ブドウ糖定量試液 6ml、上記試料反応液 0.2ml を正確に量り混和し、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  にて正確に 40 分間放置する。この液を室温まで冷却後、2 時間以内に水を対象として波長 505nm における吸光度を測定する。

(A<sub>1</sub>)

別に、試料反応液の代わりに対照液を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>2</sub>)

試料反応液の代わりにブドウ糖標準液を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>3</sub>)

試料反応液の代わりに水を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>4</sub>)

試料反応液のブドウ糖濃度及び生成ブドウ糖量は次式により求める。

$$\text{ブドウ糖濃度 (mg/ml)} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 0.5$$
$$\text{生成ブドウ糖量 (mg)} = \text{ブドウ糖濃度 (mg/ml)} \times 1.5\text{ml}$$

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 1mg のブドウ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 又は単位/ml)

$$= \text{生成ブドウ糖量 (mg)} \times \frac{60}{20} \times \frac{1}{0.1} \times \frac{1}{W}$$

ただし、W：試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

\* 試薬・試液

(1) 可溶性デンプン

Starch soluble GR for analysis ISO (Marck 製、製品番号 101252) 又は同等品を使用する。

(2) ブドウ糖定量試液

色素溶液及び酵素溶液を等量混和する。

(3) 色素溶液

4-アミノアンチピリン 81mg、フェノール 500mg、トリトン X-100 100mg を量り、0.1mol/l トリス・リン酸緩衝液 (pH 7.3) に溶かし 200ml とする。

(4) 0.1mol/l トリス・リン酸緩衝液 (pH 7.3)

トリスヒドロキシルアミノメタン 12.11g を量り、水 900ml を加えて溶かし、リン酸で pH 7.3 に調整した後、水を加えて正確に 1000ml とする。

(5) 酵素溶液

グルコースオキシダーゼ 800 単位、パーオキシダーゼ 2000 単位を量り、0.1mol/l トリス・リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) に溶かし、正確に 200ml とする。

(6) ブドウ糖標準液

無水結晶ブドウ糖 0.5g 及び安息香酸 1g を精密に量り、水に溶かし 1000ml とする。

## 第2法 NADH 比色法

酵素を基質マルトースに作用させ、生成した $\alpha$ -グルコースを $\beta$ -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に作用させ、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

本品に水又は適切な緩衝液を加えて溶かし、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

マルトース 19.05g に 0.1mol/l の酢酸緩衝液を加えて溶かし正確に 1000ml とする。用時調製する。

### (3) ブドウ糖標準液の調製

ブドウ糖を 105℃、6 時間乾燥後、0.65g を精密に量り、水又は適切な緩衝液で溶解し正確に 500ml とする。この液に水又は適切な緩衝液を加えて希釈し 1ml 中に 0, 65, 130, 195 $\mu$ 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 1ml を 25 $\pm$ 0.5℃で 15 分間加温し、この液に 25 $\pm$ 0.5℃に加温した試料溶液 1ml を正確に加え直ちに振り混ぜる。正確に 30 分間反応させた後、1.66mol/l トリス緩衝液 3ml を加える。この液を 0.3ml 正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 3ml と混合し、20 分間室温で放置後 340nm の吸光度を測定する。(At)。別に対照として基質溶液 1ml に 1.66mol/l トリス緩衝液 3ml を加え混和し、これに 25 $\pm$ 0.5℃に加温した試料溶液 1ml を正確に加え直ちに振り混ぜる。この液を 0.3ml 正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 3ml と混和し、20 分間室温で放置後 340nm の吸光度を測定する。(Ab)。

ブドウ糖検量線は、各濃度のブドウ糖標準液 0.3ml を正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 3ml と混和し、20 分間放置後 340nm の吸光度を測定する。

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 $\mu$ mol のマルトースを分解する酵素量を 1 単位とする。

本品の酵素活性の単位（単位/g 又は単位/ml）＝

$$\frac{(At - Ab) \times 5}{As \times 180.2 \times 30 \times 2 \times W} = \frac{(At - Ab)}{As \times W \times 2162.4}$$

At：反応液の吸光度

Ab：対照液の吸光度

- As : ブドウ糖 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の吸光度 (検量線より算出)  
W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)  
5 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml) に対する反応液の総液量 (ml)  
180.2 : ブドウ糖の分子量  
30 : 反応時間 (分)  
2 : ブドウ糖 ( $\mu\text{mol}$ ) からマルトース ( $\mu\text{mol}$ ) への変換

(5) 試薬・試液

1) 0.1mol/l 酢酸緩衝液、pH4.3

酢酸ナトリウム・3水和物 4.10g と酢酸 4.00ml に水を加え正確に 1000ml とする。pH を  $4.30 \pm 0.03$  に調製する。

2) 1.66mol/l トリス緩衝液、pH7.6

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 201g と 5mol/l 塩酸 248ml に水を加え正確に 1000ml とする。pH を  $7.60 \pm 0.05$  に調製する。

3) マルトース

マルトース HHH (生化学工業製 製品番号 400514) または同等品を用いる。

4) 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) にメルクオート Glucose 専用緩衝液 500ml を加え溶かした後、Gluc-DH 溶液 1 瓶 2.5ml と混ぜ合わせる。用時調製する。

5) NAD/ムタロターゼ

メルクオート Glucose NAD/ムタロターゼ (粉末、専用緩衝液 25ml で溶かした場合、NAD として 3.7mmol/l。Merck 製 製品番号 77003) または同等品を用いる。

6) Gluc-DH 溶液

メルクオート Glucose Gluc-DH 溶液 (Merck 製 製品番号 77004 2.5ml、褐色ピン入り)

7) 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) または同等品を用いる。

グルコアミラーゼ測定結果

品名 グルクS (基原: *Rhizopus delemar* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			GSY0751206S	GSY0850808S	GSY1050210S
性状	白～褐色の粉末、粒、又は淡黄～濃褐色の液体である。においはないか又は特異なにおいがある。	①	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、特異なにおいがある
		②	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、特異なにおいがある
		③	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、特異なにおいがある	淡褐色の粉末、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 40 µg/g 以下	①	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
		②	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
		③	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
鉛	Pbとして 10 µg/g 以下	①	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
		②	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
		③	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 µg/g 以下	①	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下
		②	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下
		③	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/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  でんぷん糖化力測定法	単位/g	①	1980	1960	2040
		②	2000	2000	2040
		③	2000	1980	2050
		④	1960	1980	1990
		⑤	2000	2000	2010
		⑥	1980	2010	2030
	平均 (n=6)		1987	1988	2027
	標準偏差		16.3	18.4	22.5
	CV (%)		0.8	0.9	1.1
	最大値		2000	2010	2050
最小値		1960	1960	1990	

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			GSY0751206S	GSY0850808S	GSY1050210S
酵素活性 第1法	単位/g	①	113000	112000	115000
		②	109000	108000	110000
		③	111000	109000	115000
		④	109000	111000	112000
		⑤	107000	115000	114000
		⑥	112000	114000	111000
	平均 (n=6)	110200	111500	112800	
	標準偏差	2230	2740	2140	
	CV (%)	2.0	2.5	1.9	
	最小値	107000	108000	110000	

\* 酵素活性の測定法：でんぷん糖化力

- (1) 試料溶液：本品に水を加えて溶かし、試料溶液とした。(1→3000)
- (2) 基質溶液の調製法：あらかじめ、日本薬局方バレイショデンプン約 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、よく振り混ぜながら、徐々に 2 mol/l 水酸化ナトリウム試液 5ml を加えてのり状とする。次に沸騰水浴中で5分間加熱した後、水 25ml を加え、冷後、2 mol/l 塩酸試液で pH7.0±0.1 に調整する。これに pH4.5 の 1mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 10ml を加え、更に水を加えて正確に 100ml とした。(用時調製する)

\* 酵素活性の測定法：第1法

- (1) 試料溶液：本品に塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とした。(1→3000)
- (2) 塩類溶液：酢酸カルシウム  $[\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$  0.176g、酢酸ナトリウム  $(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$  2.722g、塩化ナトリウム 5.844g を水に溶かして 1000ml とし、10%酢酸を 10ml 加える。
- (3) 基質溶液の調製法：可溶性デンプン (Merck 製 Art.1252) 2.00g を量り、水 20ml を加え、よくかき混ぜながら約 40ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 1～2分間煮沸した後、流水中で冷却する。次いで、水を加えて正確に 100ml とした。(用時調製する)
- (4) 操作法：基質溶液 1 ml と、0.2mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0) 0.2ml を正確に量り、40±05℃で5分間加温した後、以降、第1法の操作手順に従い測定を行った。

グルコアミラーゼ測定結果

品名 AMG 300L (基原: *Aspergillus niger* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			AMN04305	AMN04312	AMN04316
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。においが無いか又は特異なにおいがある。	①	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある
		②	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある
		③	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある	淡褐色液状、 特異な臭いがある
確認試験	第2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 40 µg/ml 以下	①	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下
		②	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下
		③	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下	40 µg/ml 以下
鉛	Pbとして 10 µg/ml 以下	①	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下
		②	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下
		③	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下	10 µg/ml 以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 µg/ml 以下	①	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下
		②	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下
		③	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下	4.0 µg/ml 以下
細菌数	50,000/ml 以下	①	100/ml 以下	100/ml 以下	100/ml 以下
		②	100/ml 以下	100/ml 以下	100/ml 以下
		③	100/ml 以下	100/ml 以下	100/ml 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2法	単位/g	①	296	317	301
		②	301	317	297
		③	300	316	299
		④	295	318	302
		⑤	292	316	299
		⑥	291	314	297
	①	296	316	299	
	②	2.8	2.0	2.7	
	③	1.1	0.7	1.1	
	④	301	318	302	
	⑤	291	314	297	

\* 酵素活性の測定法：第2法

- (1) 試料溶液：本品に水を加えて溶かし、試料溶液とした。(1→6000)
- (2) 0.1mol/l 酢酸緩衝液 pH4.3の調製法：酢酸ナトリウム・3水和物 4.10g と氷酢酸 4.00ml に水を加え正確に 1000ml とし、pH を  $4.30 \pm 0.03$  に調製した。
- (3) 基質溶液の調製法：マルトースHHH (生化学工業製 製品番号 400514) 19.05g に 0.1mol/l 酢酸緩衝液を加えて溶かし、正確に 1000ml とした。用時調製した。
- (4) 反応停止液  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン 201g と 5mol/l 塩酸 248ml に水を加えて、正確に 1000ml とし、pH を  $7.60 \pm 0.05$  に調製した。
- (5) グルコースデヒドロナーゼ試液  
NAD/ムタロターゼ 1 瓶 (粉末) を専用のメルクオート Glucose 緩衝液 500ml に溶かした後、Glucose DH 溶液 1 瓶 2.5ml と混ぜ合わせた。用時調製した。
- (6) 操作法：第2法の操作手順に従い測定を行った。

## グルタミナーゼ (案)

### Glutaminase

**定 義** 本品は、糸状菌 (*Aspergillus*)、細菌 (*Bacillus subtilis*)、又は酵母 (*Candida*)の培養物から得られた、L-グルタミンを加水分解してL-グルタミン酸とアンモニアを生成する酵素である。

**酵素特性** 本品は、L-グルタミンに作用しアミド基を加水分解して、L-グルタミン酸とアンモニアを生成する。

ECナンバー (参考) : EC 3. 5. 1. 2

**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。においは無いか又は特異なにおいがある。

**確認試験** (1) 酵素活性測定法で用いる基質溶液1mlに本品の水溶液 (1→20) 1ml を加え、振り混ぜた後、40℃で10分間加温する。この反応液 1ml をL-グルタミン酸発色溶液3mlに加えて振り混ぜ、15～20℃で放置するとき、20分以内に酵素活性測定法第1法のL-グルタミン酸発色溶液の場合は青色、酵素活性測定法第2法のL-グルタミン酸発色溶液の場合は赤色を呈する。

(2) 酵素活性測定法で用いる基質溶液 2ml に本品の水溶液 (1→20) 1mlを加えて、40℃で20分間反応させた後、ネスラー試薬 0.5 ml を加えると、2分以内に赤褐色を呈する。

**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グルタミナ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、測定条件 (反応pH、緩衝液の種類、試料希釈用液等) は、酵素の基原、性質に応じて適切なものを選択する。又、グルタミナーゼ活性測定法として確立された他の酵素活性測定法を用いることも出来る。

一般試験法 酵素活性測定法

## グルタミナーゼ活性測定法 (案)

### 第1法 (L-グルタミン酸オキシダーゼ法)

酵素を基質L-グルタミンに作用させ、生成する L-グルタミン酸をL-グルタミン酸オキシダーゼにて発色させて測定する方法である。

#### (1) 試料溶液

本品を正確に量り、L-グルタミン酸の増加が試料濃度に比例する範囲内の試料濃度となるように試料希釈用液を加えて溶かす。試料溶液は、通例1ml中に 0.15~0.40 単位を含む。

#### (2) 基質溶液

L-グルタミン 2.00 g に水約 70 ml を加えて溶かし、1mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0) 10 ml (又は適切な緩衝液) を加え、水を加えて 100mlとする。用時調製する。

#### (3) 操作法

試験管に試料溶液 1 ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5$  °C の恒温水槽中で 5分間加温後、同温度にあらかじめ加温した基質溶液 1 ml を正確に加えて、直ちに振り混ぜる。 $37 \pm 0.5$  °Cで正確に 10 分間加温後、過塩素酸溶液(83→1000) 1 mlを正確に加えて振り混ぜ、ミキサーで攪拌し直ちに氷水中に1 分間以上放置する。この溶液に水酸化ナトリウム溶液(3→100) 1 ml を正確に加えて振り混ぜ反応液とする。

試料溶液 1 ml を正確に量り、過塩素酸溶液(83→1000) 1 mlを正確に加えて、 $37 \pm 0.5$  °C の恒温水槽中に5分間放置した後、基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜ直ちに氷水中に1分間以上放置する。この溶液に水酸化ナトリウム溶液(3→100) 1 ml を正確に加え振り混ぜて、反応対照液とする。

L-グルタミン酸発色溶液 3 ml を正確に分注した4本の試験管それぞれに、反応液、反応対照液、L-グルタミン酸標準液(100 $\mu$ g/ml)及び水を 200  $\mu$ l ずつ別々に正確に加え振り混ぜる。これらの液を 15~25 °Cで10 分間放置し発色させた後、波長600 nmにおける吸光度( $A_S$ 、 $A_{SB}$ 、 $A_R$ 、 $A_{RB}$ )を発色操作後 40 分以内に測定する。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  $\mu$ mol のL-グルタミン酸を生成させる酵素量を 1 単位とし、次式により酵素活性を求める。

本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)

$$=20 \times \frac{A_S - A_{SB}}{A_R - A_{RB}} \times \frac{4}{0.2} \times \frac{1}{147} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$
$$= \frac{A_S - A_{SB}}{A_R - A_{RB}} \times 0.2721 \times \frac{1}{W}$$

- 20 : L-グルタミン酸標準液200 $\mu$ l中のL-グルタミン酸の量 ( $\mu$ g)  
A<sub>S</sub> : 反応液の吸光度  
A<sub>SB</sub> : 反応対照液の吸光度  
A<sub>R</sub> : L-グルタミン酸標準液の吸光度  
A<sub>RB</sub> : 水の吸光度  
4 : 反応液の総液量 (ml)  
0.2 : 発色用検体の採取量 (ml)  
147 : L-グルタミン酸の分子量  
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) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(トリトンX-100)  
和光純薬製試薬(化学用)又は同等品を使用する。
- 2) 試料希釈用液  
pH6.0の1mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(または各酵素に適切な緩衝液)  
10ml及び10%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(トリトンX-100)溶液0.5mlに水を加えて1000mlとする。
- 3) 過塩素酸  
試薬特級(60%)
- 4) L-グルタミン  
試薬特級
- 5) L-グルタミン酸標準液  
L-グルタミン酸0.1gを正確に量り、水を加えて溶かし、pH6.0の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(又は各酵素に適切な緩衝液)10ml及び水を加えて正確に1000mlとする。用時調製する。
- 6) L-グルタミン酸発色溶液  
ヤマサ醤油製、ヤマサL-グルタミン酸測定キット、製品コード No.:7171、又は

同等品を使用する。

0.05mol グッズ緩衝液 (pH7.1) 100ml中にL-グルタミン酸オキシダーゼ35単位、パーオキシダーゼ 100 単位、4-アミノアンチピリン 80  $\mu$ mol 及び Nエチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン・ナトリウム塩 (DAOS; 発色試薬) 80  $\mu$ mol を溶かす。

・グッド緩衝液 (pH7.1)の試薬:

N-N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸;

ナカライテスク製試薬 (SPグレード品) 又は同等品を使用する。

・L-グルタミン酸オキシダーゼ;

ヤマサ醤油製試薬又は同等品を使用する。

L-グルタミン酸に対する反応速度を100%とすると、他のアミノ酸に対する反応速度は、0.5%以下である。

・パーオキシダーゼ;

TOYOBO製試薬 (グレードⅢ) 又は同等品を使用する。

比活性: 110 Purpurogallin 単位/mg 以上

・DAOS [N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン・ナトリウム塩];

同仁化学研究所試薬又は同等品を使用する。純度: 97.0%以上

・4-アミノアンチピリン

ナカライテスク製試薬又は同等品を使用する純度: 99.0%以上。

・L-グルタミン酸

シグマ試薬又は同等品を使用する。純度: 99.0%以上

## 第2法 (L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ法)

酵素を基質L-グルタミンに作用させ、生成する L-グルタミン酸をグルタミン酸デヒドロゲナーゼにより発色させて測定する方法である。

### (1) 試料溶液

本品を正確に量り、水を加えて溶かし、通例0.01~0.05 単位/mlになるように希釈する。

### (2) 基質溶液

L-グルタミン 625 mg を正確に量り、pH7.0 のリン酸緩衝液 (または適切な緩衝液) で溶解し正確に 100 ml とする。5~10 °Cに保存し3日以内に使用する。

### (3) 操作法

基質溶液 2 ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5$  °Cであらかじめ5分間加温後、試料溶液 0.5 ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。 $37 \pm 0.5$  °Cで正確に 60 分間反応させた後、沸騰水浴中で 5 分間加熱し反応を停止させる ( $A_{\gamma}$ )。反応の対照として同

一試料溶液を沸騰水浴中で 5 分間加熱失活させ、同様の操作を行なう ( $A_B$ )。

次にL-グルタミン酸発色溶液を用いてそれぞれの吸光度を測定する。分光光度計のキュベット 2本にL-グルタミン酸発色溶液 2.8ml ずつを正確に量り、上記反応液の $A_\gamma$ 及び $A_B$ から 0.2 ml を正確に量りこれに加えて、振り混ぜ、2分後に 492 nm で吸光度 $A_{\gamma-1}$ 及び $A_{B-1}$ を測定する。次いで 900 単位/mlのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) 溶液 0.03 ml を正確に加えて振り混ぜ、約 15 分後に492 nm で吸光度 $A_{\gamma-2}$ 及び $A_{B-2}$ をそれぞれ測定する。それぞれの吸光度の差について、( $A_{\gamma-2} - A_{\gamma-1}$ ) を $\Delta A_\gamma$ とし ( $A_{B-2} - A_{B-1}$ ) を $\Delta A_B$ とし、次式により酵素活性を求める。その酵素の活性単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に 1  $\mu$  mol のL-グルタミン酸を生成させる酵素量を 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)

$$\begin{aligned} &= (\Delta A_\gamma - \Delta A_B) \times 3.03 \times \frac{1}{19.9} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{2.5}{0.5} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{W} \\ &= (\Delta A_\gamma - \Delta A_B) \times 0.0634 \times \frac{1}{W} \end{aligned}$$

$\Delta A_\gamma$  : 反応液の吸光度差

$\Delta A_B$  : 反応対照液の吸光度差

3.03 : L-グルタミン酸測定時の総反応液量 (ml)

19.9 : 492nmにおけるホルマザンの吸光度係数 ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

0.2 : グルタミン酸測定用試料の量 (ml)

2.5 : 活性測定時の総反応液量 (ml)

0.5 : 試料溶液量 (ml)

60 : 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) L-グルタミン

試薬特級

##### 2) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (トリトンX-100)

和光純薬製試薬 (化学用) 又は同等品を使用する。

##### 3) L-グルタミン酸発色溶液

ロシュ・ダイアグノスティックス製、F-キット L-グルタミン酸、製品番号 139092、又は同等品を使用する。

0.4% ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (トリトンX-100) を含む pH 8.6 リン酸/トリエタノールアミン緩衝液で、0.1 単位/ml ジアホラーゼ、0.03 %  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド ( $\beta$ -NAD)、及び 0.1 % 2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2Hテトラゾリウムクロリド (INT) を含む溶液を調製する。

・ジアホラーゼ；

ロシュ・ダイアグノスティックス製試薬又は同等品を使用する。

グレード I、ブタ心筋起源、比活性:210単位以上 (基質は、lipoamide)

・ $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド ( $\beta$ -NAD)；

ロシュ・ダイアグノスティックス製試薬又は同等品を使用する。

グレード II、純度:95%

・2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2Hテトラゾリウムクロリド (INT)；

シグマ製試薬又は同等品を使用する。

#### 4) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) 溶液

ロシュ・ダイアグノスティックス製、F-キット L-グルタミン酸、製品番号 139092、又は同等品を使用する。

・グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH)；

ロシュ・ダイアグノスティックス製試薬又は同等品を使用する。

牛肝臓起源、比活性:120単位/mg 以上 (基質は、oxoglutarateと $\text{NH}_4^+$ )

グルタミナーゼ測定結果

品名 グルタミナーゼダイワC100S (基原: *Bacillus subtilis* 由来)

規格項目	規格	測定回数	Lot No.		
			P0KA173	P0KA174	P0KA175
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。	①	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。
		②	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。
		③	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。	淡褐色の粉末、特異なにおいがある。
確認試験	(1) 第1法又は第2法の酵素活性を示す (2) 反応液にネスラー試薬を加えると赤褐色を呈する	①	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した
		②	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した
		③	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した	(1)第1法の酵素活性を示した (2)赤褐色を呈した
重金属	Pb として 40 µg/g 以下	①	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
		②	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
		③	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下	40 µg/g 以下
鉛	Pb として 10 µg/g 以下	①	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
		②	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
		③	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下	10 µg/g 以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 µg/g 以下	①	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下
		②	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下
		③	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/g 以下	4.0 µg/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	112	114	115
		②	110	114	114
		③	111	112	113
		④	114	115	116
		⑤	113	114	115
		⑥	113	113	115
	平均 (n=6)	112	114	115	
	標準偏差	1.47	1.03	1.03	
	CV (%)	1.31	0.91	0.90	
	最大値	114	115	116	
最小値	110	112	113		

## 確認試験の方法

- (1) 酵素活性測定法で用いる L-グルタミン酸溶液 1ml に本品の水溶液 (1→20) 1ml を加え、よく振り混ぜた後、40℃で 10 分間加温する。この反応液 1ml を採り L-グルタミン酸発色溶液 3ml に加えて振り混ぜ、15～20℃で放置するとき、20 分以内に青色を呈する。
- (2) 酵素活性測定法で用いる L-グルタミン酸溶液 2ml に本品の水溶液 (1→20) 1ml を加え、40℃で 20 分間反応させた後、ネスラー試薬 0.5ml を加えると、2 分以内に赤褐色を呈する。

## 酵素活性の測定条件

### 1. 基質溶液の調製

- (1) 1 mol / l 酢酸

氷酢酸 60.1 g に水を加えて 1000ml とする。

- (2) 1mol / l 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム・3 水和物 136 g を水に溶かし、1000ml とする。

- (3) 1mol / l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)

1mol / l 酢酸ナトリウム溶液に 1 mol / l 酢酸を加えて pH6.0 に調節する。(混合比 約 95:5)

- (4) ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル [トリトン X-100]

10 g のトリトン X-100 に水約 70ml を加え、加温して溶かし、冷後、水を加えて 100ml とする。

- (5) L-グルタミン溶液

L-グルタミン 2.00 g に水約 70ml を加えて溶かし、1mol / l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 10ml を加え、水を加えて 100ml とする。用時調製する。

### 2. 試料希釈用液

試料希釈用液の調製には、pH6.0 の 1mol / l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 10ml 及び、10% ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル [トリトン X-100] 試液 0.5ml に水を加えて 1000ml にしたものを使用した。

## [参考情報]

品名 グルタミナーゼダイワ C100 S

酵素活性 110 単位/g (大和化成の細菌グルタミナーゼ活性度測定法)

本品の酵素活性の許容範囲 110 ± 9% 単位/g

グルタミンナーゼ測定結果

品名 グルタミンナーゼ 100FG (基原: *Bacillus subtilis* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			05000011	05000470	05000480
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。においては無いか又は特異なおいがある。	①	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある
		②	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある
		③	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある	黄褐色の微細粒でわずかに特異なおいがある
確認試験	グルタミン溶液との反応液に酵素活性測定法第2法のグルタミン酸発色液を加えると赤色を呈する。	①	赤色を呈した	赤色を呈した	赤色を呈した
		②	赤色を呈した	赤色を呈した	赤色を呈した
		③	赤色を呈した	赤色を呈した	赤色を呈した
重金属	Pbとして 40μg/g以下	①	40μg/g以下	40μg/g以下	40μg/g以下
		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	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個/g以下	①	100個/g以下	800個/g	900個/g
		②	100個/g以下	600個/g	700個/g
		③	100個/g以下	700個/g	600個/g
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2法	単位/g	①	106	108	106
		②	110	107	104
		③	106	103	102
		④	107	108	105
		⑤	108	107	106
		⑥	109	108	103
	①	108	107	105	
	②	1.58	1.76	1.52	
	③	1.5	1.6	1.4	
	④	110	108	106	
⑤	106	103	102		

\* 確認試験の方法

グルタミナーゼ 100FG 1.0g を水で溶解し、全量を 20ml にして試料溶液とした。

試料溶液 1ml と酵素活性測定で用いるグルタミン溶液 1ml を試験管に採り、40℃で 10 分間加温する。

その 1ml に酵素活性測定で用いる L-グルタミン酸発色液 3ml を加え、室温で放置したとき、20 分以内に赤色を呈する。

\* 酵素活性測定

測定法 2

試料溶液

グルタミナーゼ 100FG 約 1.0g を精密に採取し、水で溶解し全量を正確に 100ml にした後、その溶液 1.0ml をさらに水で正確に 30ml にして試料溶液とした。

緩衝溶液

pH7.0 0.1M リン酸塩緩衝液 (0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

[参考情報]

酵素活性の情報

製品のラベルには酵素活性の表示はしていない。

酵素活性の許容範囲

100 単位/g 以上

# シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (案)

Cyclodextrin glucanotransferase

**定 義** 本品は、細菌 (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*) の培養物より得られた、シクロデキストリンを生成する酵素である。

**酵素特性** 本品はでんぷんに作用し、でんぷんからシクロデキストリンを生成する。

EC ナンバー (参考) : EC 2.4.1.19

**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) 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) 本品は、次の操作法の条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、試料溶液のピークはシクロデキストリン標準液のピークの一つ以上と同じ位置に認める。

試料溶液：本品 (75～150 単位相当量) と 5% 可溶性でんぷん溶液 10ml を量り、 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  にて 30 分間放置する。次に、水浴中で 5 分間加熱後、冷却して試料溶液とする。必要ならば、メンブランフィルターでろ過する。

標準液： $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリンを乾燥し、それぞれ 0.50g を量り、水に溶かし 50ml とする。

操作法：試料溶液及び標準液 13 $\mu$ l を用い、 $\beta$ -シクロデキストリンの定量法の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。

**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・酵素活性測定法の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、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) 5%可溶性でんぷん溶液

可溶性でんぷん 5.00g を量り、少量の水に懸濁し、これを約 50ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 5 分間煮沸する。冷却後、0.1mol/l 塩酸試液又は、希水酸化ナトリウム試液を加え試験する酵素の至適 pH に調整し、さらに水を加えて正確に 100ml とする。

2) 可溶性でんぷん

乾燥減量 15%以下、強熱残分 0.6%以下、pH (2%) 4.5~7.5、還元性物質 (マルトースとして) 0.7%以下

3)  $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン

含量 97%以上 (乾燥後)