

[一般試験法 酵素活性測定法]

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 (案)

第 1 法 (でんぶん-ヨウ素発色法)

酵素を基質デンプンに作用させ、デンプンの直鎖成分 (アミロース) の低分子化に伴い、ヨウ素呈色の減少を測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、でんぶんのヨウ素による呈色の減少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 2~6 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめ、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、よくかき混ぜながら徐々に 1mol/l 水酸化ナトリウム試液 5ml を加えてのり状とする。次に、沸騰水浴中で混ぜながら 3 分間加熱した後、水 25ml を加え、冷後、測定する酵素に適した pH に調整するため、適切な緩衝液又は塩類溶液及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

(3) 操作法

基質溶液 10ml を正確に量り、40±0.5℃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 40±0.5℃で正確に 10 分間放置した後、この液 1ml を正確に量り、0.1mol/l 塩酸試液 10ml に加え、直ちに振り混ぜる。次に、この液 1ml を正確に量り、0.0004mol/l ヨウ素試液 10ml 中に正確に加え、振り混ぜた後、水を対照として波長 660nm における吸光度 A_T を測定する。

別に、試料溶液の代わりに水を用いて同様に操作し、吸光度 A_B 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 分間にバレイショデンプンのヨウ素による呈色を 1% 減少させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{A_B - A_T}{A_B} \times 100 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし、W：試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

A_B : 試料反応液の吸光度

A_γ : ブランクの吸光度

100、1/10 : %及び反応時間の換算係数

試薬・試液

1) 0.1mol/l 塩酸試液

塩酸 90ml に水を加えて 1000ml とし、更にこの液 100ml に水を加えて 1000ml とする。

2) 0.0004mol/l ヨウ素試液

0.08mol/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。

3) 0.08mol/l ヨウ素試液

ヨウ化カリウム 10.00g 及びヨウ素 1.00g を水に溶かし、正確に 100ml とする。遮光して保存する。

第2法(チルデンハドソン法)

酵素を基質デンプンに作用させ、シクロデキストリンの針状結晶が生成する時間を顕微鏡観察により測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、シクロデキストリンの針状結晶が生じる時間が10分前後となるように、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5~10単位/mlである。

(2) 基質溶液

あらかじめ、可溶性デンプン約1gを精密に量り、105℃で4時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物3.00gに対応する可溶性デンプンを正確に量り、少量の水に懸濁し、これを約70mlの沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから5分間煮沸した後、流水中で冷却する。次いで、測定する酵素に適した種類、pHの緩衝液又は塩類溶液10ml及び水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

(3) 操作法

基質溶液6mlを正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で10分間加温した後、試料溶液3mlを正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保ち、正確に3分後より12分後まで1分間隔で反応液0.3mlを正確にとり、あらかじめヨウ素試液0.1mlを正確に入れ、氷水中に置いた試験管に入れる。この液10 μl をスライドグラスにとり、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ にて乾燥する。スライドグラスを顕微鏡観察し(倍率40倍又は100倍)、針状結晶が生じた反応時間(t分)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、30mgの可溶性デンプンを分解し、30分

間でシクロデキストリンの結晶を生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{30}{t} \times 6 \times \frac{1}{3} \times \frac{1}{W}$$

ただし、 W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

t : 結晶を生成するまでの時間 (分)

30 : 単位換算係数 (30分を1単位とする)

6 : 単位換算係数 (デンプン量 30mg/ml × 6ml ÷ 30mg)

1/3 : 単位換算係数 (試料溶液 1ml 当たり)

試薬・試液

1) 可溶性デンプン (メルク製、製品番号 1.01252.) 又は同等品を使用する。

pH (2%水溶液) 4.5~7.5

還元性物質 (マルトースとして) 0.7%以下

強熱残分 0.6%以下

乾燥減量 (105℃、2時間) 15%以下

平成 12 年 12 月

天野エンザイム (株)

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ測定結果

品名 コンチザイム (基原: *Bacillus macerans* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			CGTRX07506L	CGTRX12509L	CGTRY0552401L
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。においはないか又は特異なにおいがある。	①	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある
		②	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある
		③	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある	淡褐色の液体、特異なにおいがある
確認試験 (1)	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
確認試験 (2)	標準液のピークの一つ以上と同じ位置に認める	①	同じ位置に認める	同じ位置に認める	同じ位置に認める
		②	同じ位置に認める	同じ位置に認める	同じ位置に認める
		③	同じ位置に認める	同じ位置に認める	同じ位置に認める
重金属	Pb として 40 μ g/ml 以下	①	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下
		②	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下
		③	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以下
鉛	Pb として 10 μ g/ml 以下	①	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下
		②	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下
		③	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以下
ヒ素	As ₂ O ₃ として 4.0 μ g/ml 以下	①	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下
		②	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下
		③	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下	4.0 μ g/ml 以下
細菌数	50,000/ml 以下	①	1000/ml 以下	1000/ml 以下	1000/ml 以下
		②	1000/ml 以下	1000/ml 以下	1000/ml 以下
		③	1000/ml 以下	1000/ml 以下	1000/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 1 法	単位/ml	①	625	670	642
		②	623	653	630
		③	652	633	615
		④	618	663	654
		⑤	648	655	629
		⑥	627	624	638
	平均 (n=6)		632	650	635
	標準偏差		14.2	17.7	13.3
	CV (%)		2.2	2.7	2.1
	最小値		618	624	615

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			CGTRX07506L	CGTRX12509L	CGTRY0552401L
酵素活性 第2法	単位/ml	①	860	860	750
		②	750	860	860
		③	860	750	750
		④	750	750	860
		⑤	750	750	860
		⑥	750	750	750
	平均 (n=6)		787	787	805
	標準偏差		57	57	60
	CV (%)		7.2	7.2	7.5
	最小値		750	750	750

***確認試験（2）の測定法**

確認試験（2）において、本品 150 単位を使用して実施した。

5%可溶性でんぷん溶液の pH は、1 回目 5.34、2 回目 4.74、3 回目 4.75 であった。

液体クロマトグラムを別紙添付する。

***酵素活性の測定法：第1法**

（1）試料溶液：本品に水を加えて試料溶液とした。（1→150）

（2）基質溶液の調製法：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、よくかき混ぜながら徐々に 1 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、希酢酸で pH5.50 に調整し、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2法**

（1）試料溶液：本品に水を加えて試料溶液とした。（1→100）

（2）基質溶液の調製法：あらかじめ、可溶性デンプン（メルク製、製品番号 1.01252.）約 1g を精密に量り、105°C で 4 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 3.00g に対応する可溶性デンプンを正確に量り、少量の水にけん濁し、これを約 70ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 5 分間煮沸した後、流水中で冷却する。次いで、1mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5) 10ml、及び水を加えて正確に 100ml とした。（用時調製する）

CLASS-LC10 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 検出器番号=2 ファイル名=07506L1.D01 00/11/30 10:37:34

サンプル名 : CGTRX07506L

ID : 1回目

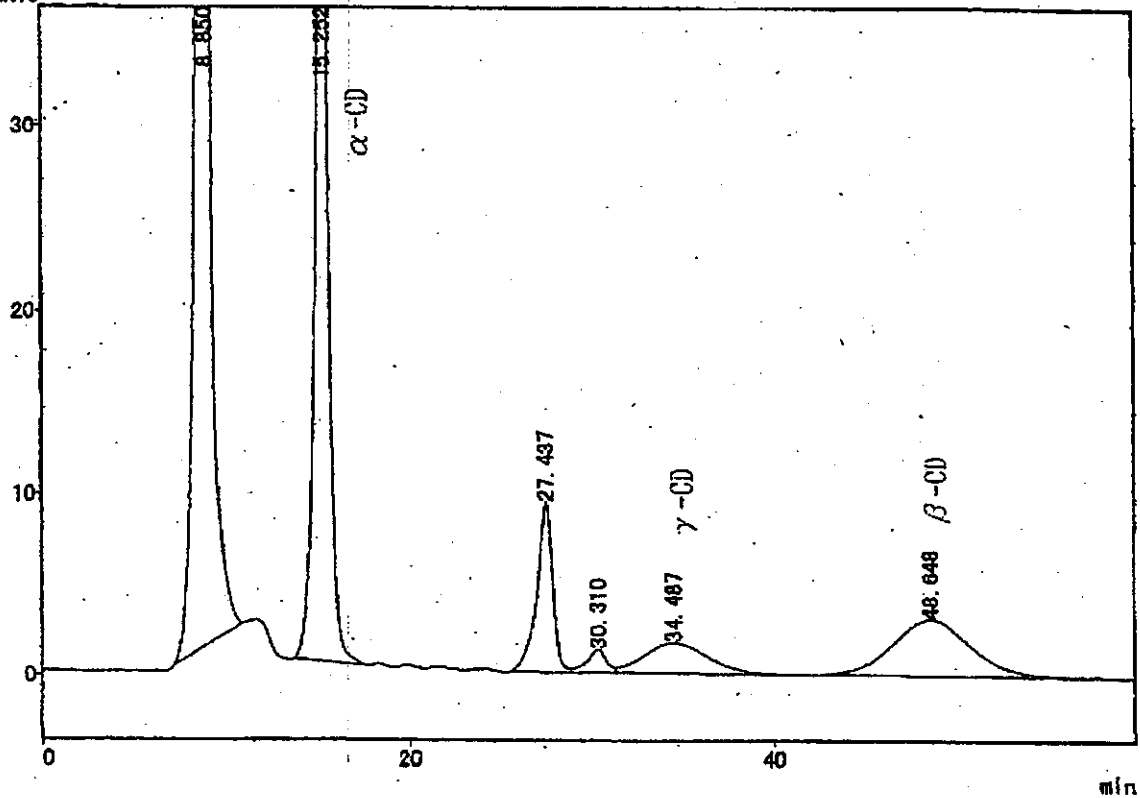
タイプ : 未知試料

検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T. Akao

メソッド名 : CGTR環化.MET

*** 追加データ *** ファイル名:07506L1.D01
uRIU



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.850	730753	24539			51.4639	
2	15.252	255624	5189			21.5006	
3	27.437	57610	942			4.8629	
4	30.310	9859	130	V		0.8282	
5	34.487	41873	171	V		3.5220	
6	48.648	92989	307			7.8213	

1188914

31278

100.0000

CLASS-LC10 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 検出器番号=3 ファイル名=12509L1.D01 00/11/30 11:38:38

サンプル名 : CGTRX12509L

ID : 1回目

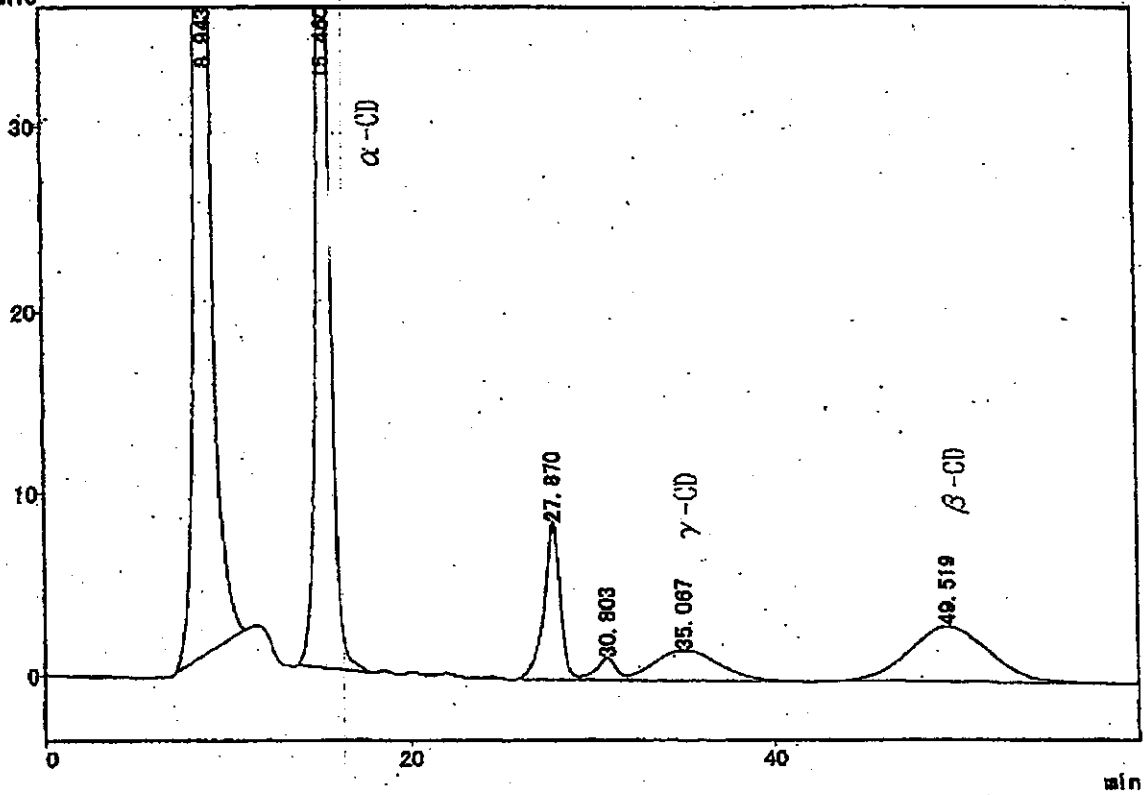
剤名 : 未知試料

検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T. Akao

メソッド名 : CGTR強化.MET

*** 加算データ *** ファイル名:12509L1.C01
LRIU



*** レポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.843	759565	25085			62.4551	
2	15.460	261066	5228			21.4661	
3	27.870	53493	660			4.3985	
4	30.803	9153	120	V		0.7526	
5	35.067	40992	166	V		3.3705	
6	49.519	91909	302			7.5572	

1216177 31771 100.0000

CLASS-LC10 Ver.=1.84 システム番号=1 Ch=1 検出器番号=4 データ=05524011.D01 00/11/30 12:39:42

サンプル : CGTRY0552401L

ID : 1回目

タイプ : 未知試料

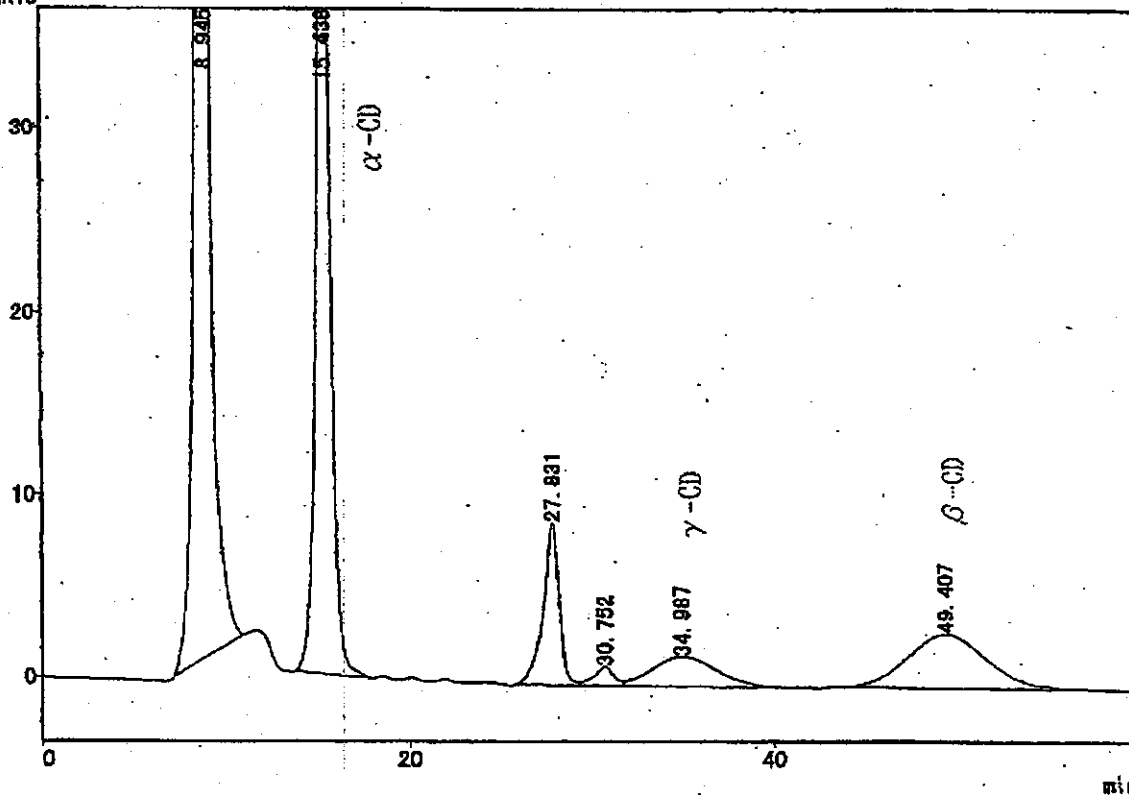
検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T. Akao

ファイル名 : CGTR環化.NET

*** 加算 *** ファイル名:05524011.D01

URIU



*** 検出器 ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.945	758449	25129			62.5467	
2	15.438	258458	5176			21.3704	
3	27.831	55284	881			4.5695	
4	30.752	8144	106	Y		0.8734	
5	34.987	40405	184	Y		3.3409	
6	49.407	90697	297			7.4992	

1209415

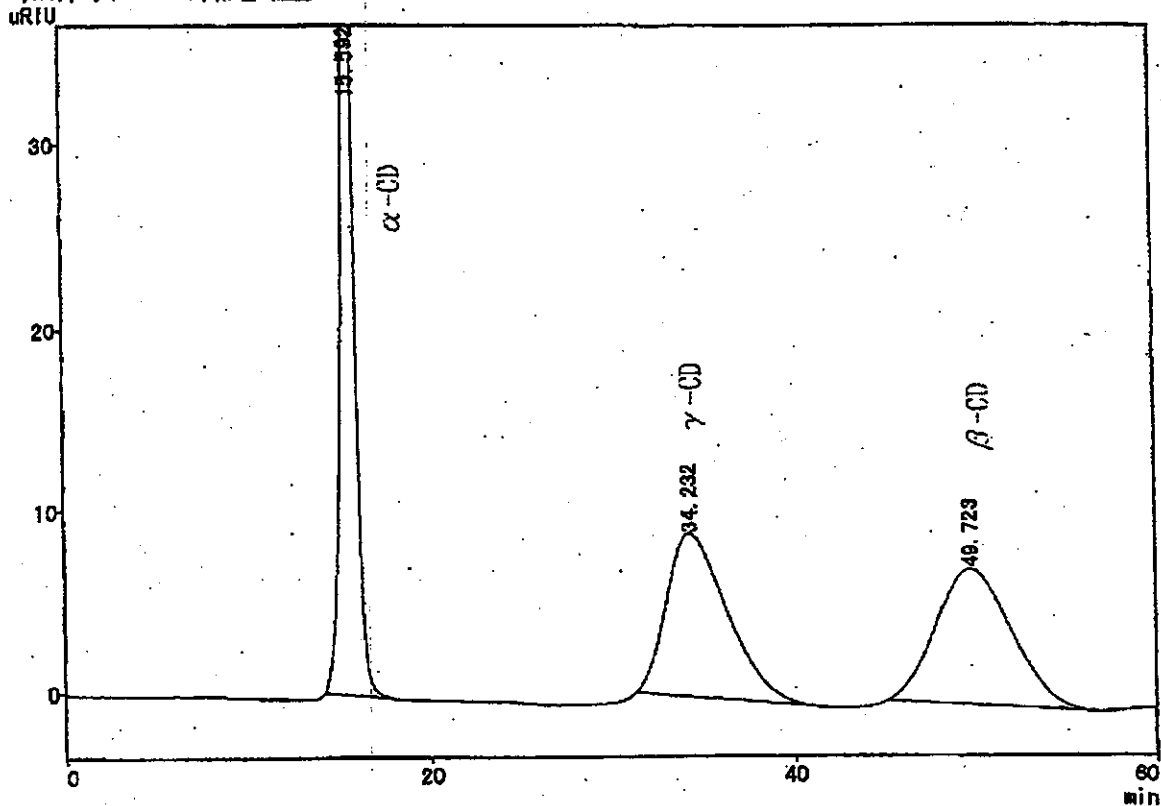
31782

100.0000

CLASS-LC10 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 検出器番号=1 データ=確認ST-2.D01 00/12/04 10:51:44

サンプル : ST
 ID : ST-2回目
 タイプ : 未知試料
 検出器 : RID-10A
 オペレータ名 : T. Akao
 サンプル名 : GGTR環化. MET

*** カロリグラム *** ファイル名: 確認ST-2.D01



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	15.592	239601	4939			38.0935	
2	34.232	209329	899			31.5333	
3	49.723	214904	745			32.3732	
		663834	6483			100.0000	

CLASS-L010 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 検体番号=2 T=07506L2.D01 00/12/04 11:58:44

サンプル : CGTRX07506L

ID : 2回目

タイプ : 未知試料

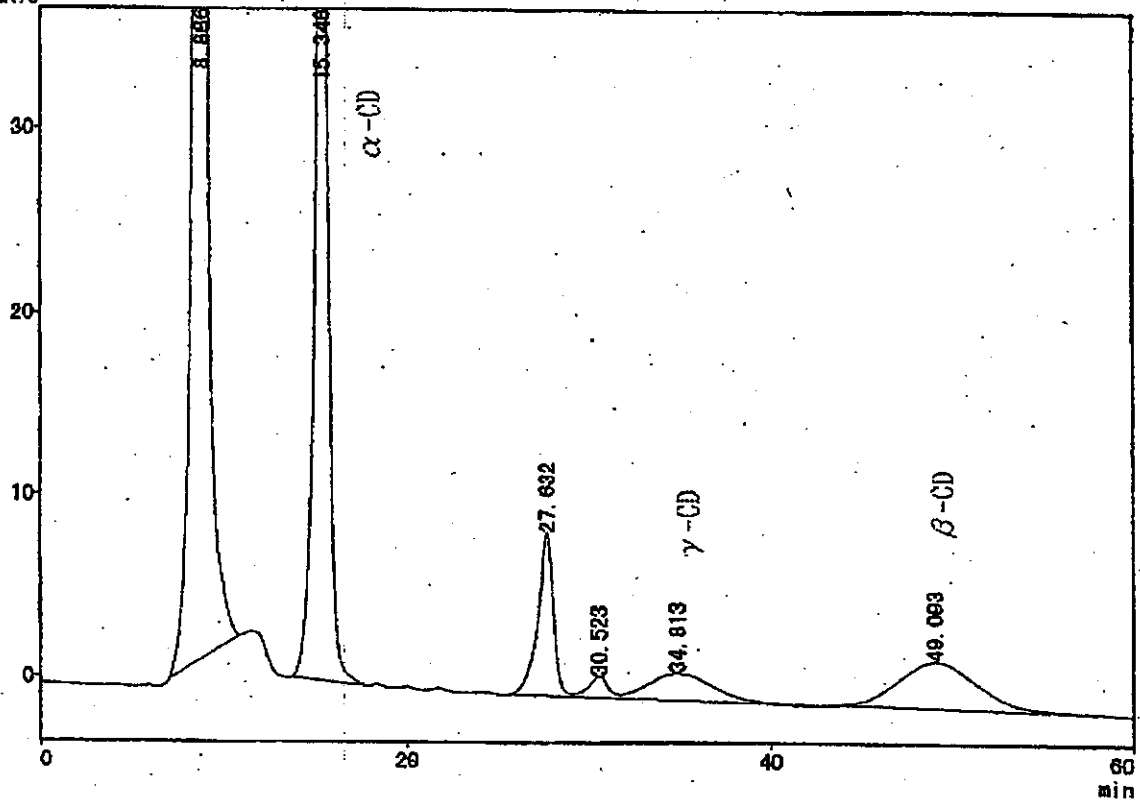
検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T.Akao

検体名 : CGTR還元.MET

*** カロリテック *** ファイル名:07506L2.C01

uRIU



*** レポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.886	781281	26480			64.9357	
2	15.348	250578	5051			20.5634	
3	27.632	54081	892			4.4381	
4	30.523	8610	119	V		0.7066	
5	34.813	38535	150	V		2.9982	
6	49.093	77476	258			6.3580	

1218581

32916

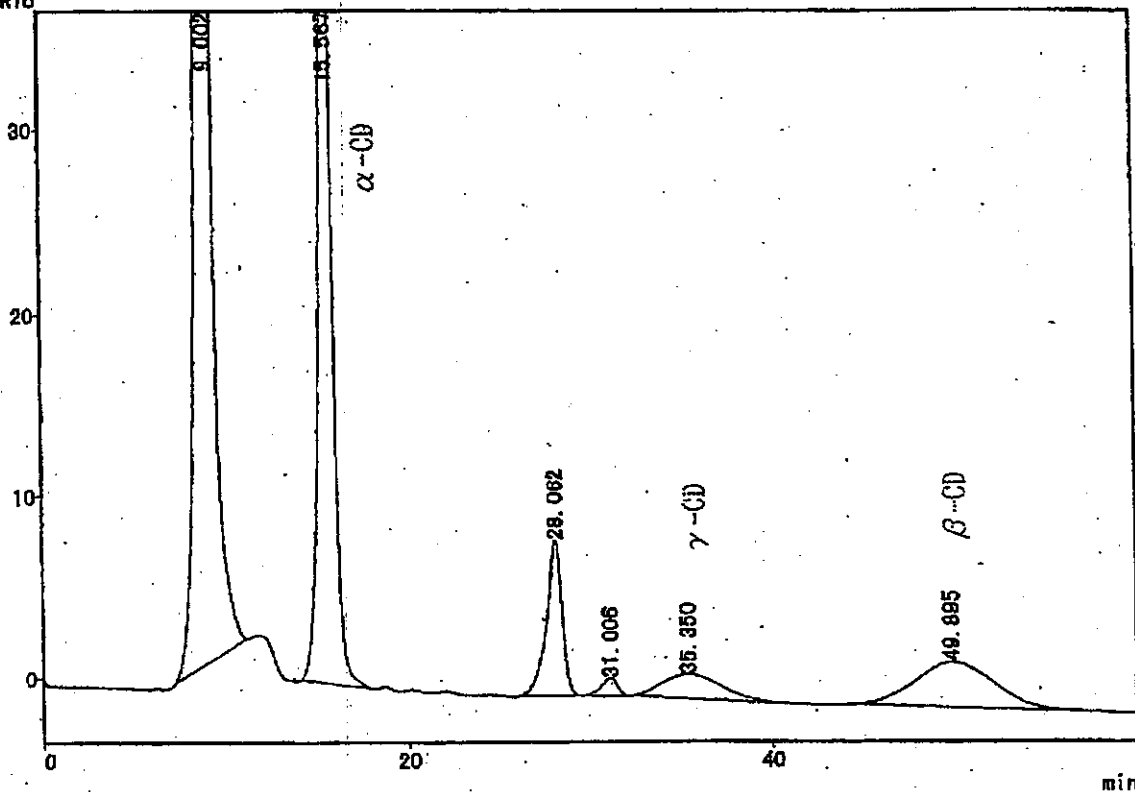
100.0000

CLASS-LC10 Ver.=1.64 システム番号=1 CH=1 レポート番号=3 データ=12509L2.D01 00/12/04 12:59:48

サンプル : CGTRX12509L
 ID : 2回目
 タイプ : 未知試料
 検出器 : RID-10A
 オペレータ名 : T. Akao
 サンプル名 : CGTR還元.MET

*** 加算プログラム *** ファイル名:12509L2.D01

URIU



*** レポート ***

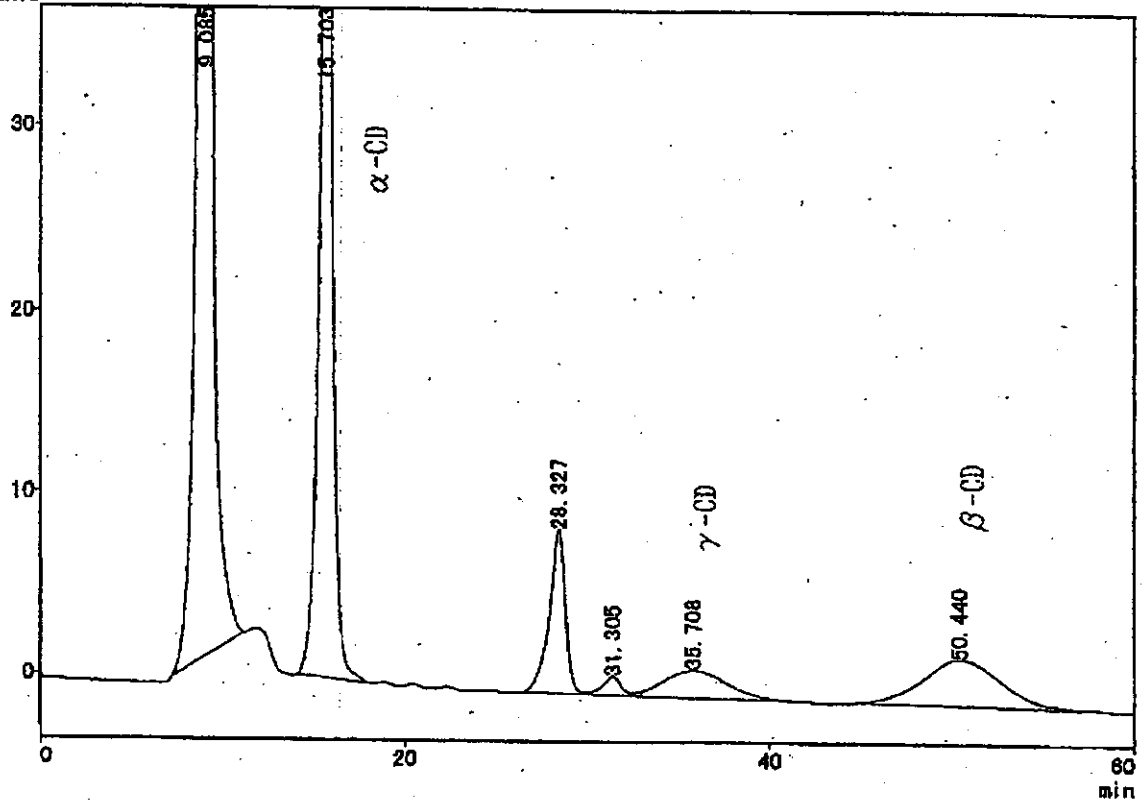
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	PK	IDNO	CONC	NAME
1	9.002	811126	26696			65.8746	
2	15.567	255867	5119			20.7800	
3	28.062	51805	858			4.2073	
4	31.006	8070	101	V		0.4929	
5	35.350	30978	136			2.5157	
6	49.895	75474	250			6.1295	

1231318 33160 100.0000

CLASS-LC10 Ver.=1.64 実行番号=1 Ch=1 ポート番号=4 データ=05524012.D01 00/12/04 14:00:52

サンプル : CGTRY0552401L
 ID : 2回目
 タイプ : 未知試料
 検出器 : RID-10A
 オペレーター名 : T. Akao
 サンプル名 : CGTR環化.NET

*** 知れぬ *** ファイル名:05524012.D01
 URIU



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	NK	IDNO	CONC	NAME
1	9.085	819562	26548			85.4870	
2	15.703	256470	6112			20.4932	
3	28.327	55458	895			4.4314	
4	31.305	7300	101	V		0.5633	
5	35.708	37063	150	V		2.9815	
6	50.440	75635	251			6.0438	

1251488

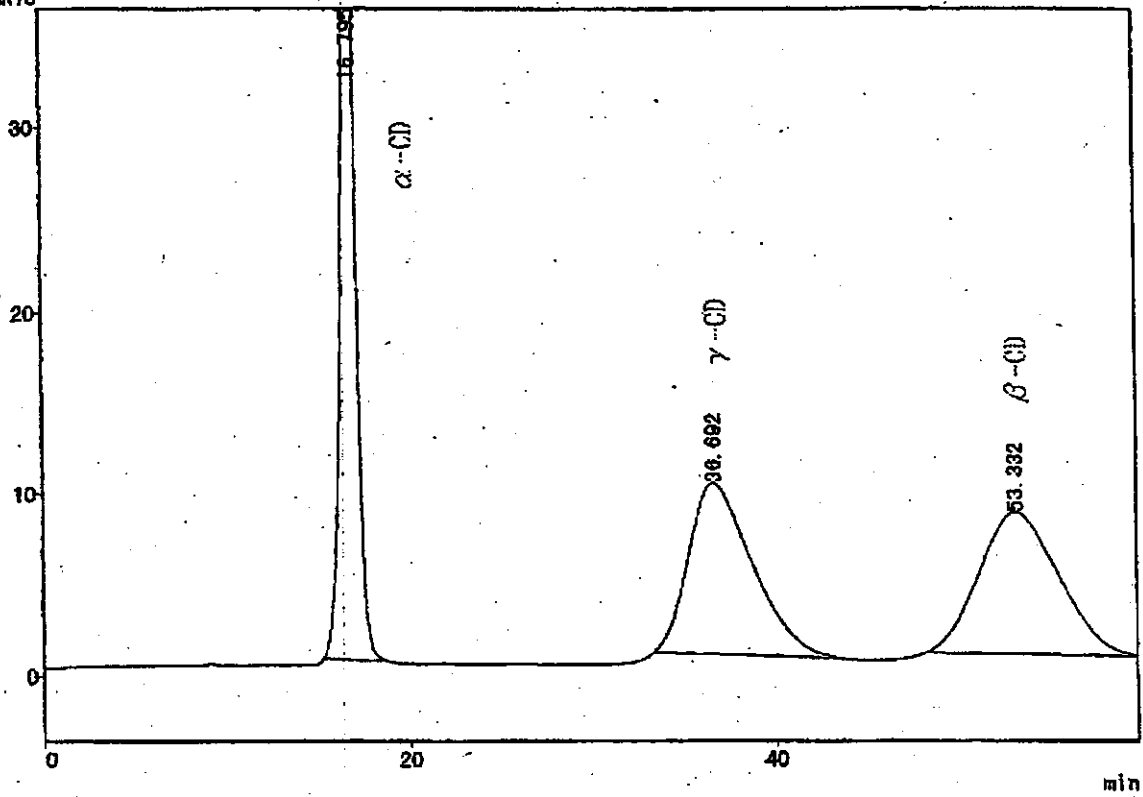
33056

100.0000

CLASS-LG10 Ver.=1.84 システム番号=1 Ch=1 検体番号=4 確認ST-3.D01 00/12/08 15:03:14

サンプル : ST
 ID : ST-3回目
 タイプ : 未知試料
 検出器 : RID-10A
 オペレーター名 : T. Akao
 サンプル名 : CGTR環化.MET

*** 加算結果 *** ファイル名:確認ST-3.001
 LRIU



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	16.795	256993	4978			35.6514	
2	36.692	227934	940			31.6201	
3	53.332	235924	781			32.7285	
		720851	6699			100.0000	

CLASS-LC10 Ver.=1.64 試料番号=1 Ch=1 検体番号=5 データ=07506L3.D01 00/12/08 16:07:36

サンプル : CGTRX07506L

ID : 3回目

タイプ : 未知試料

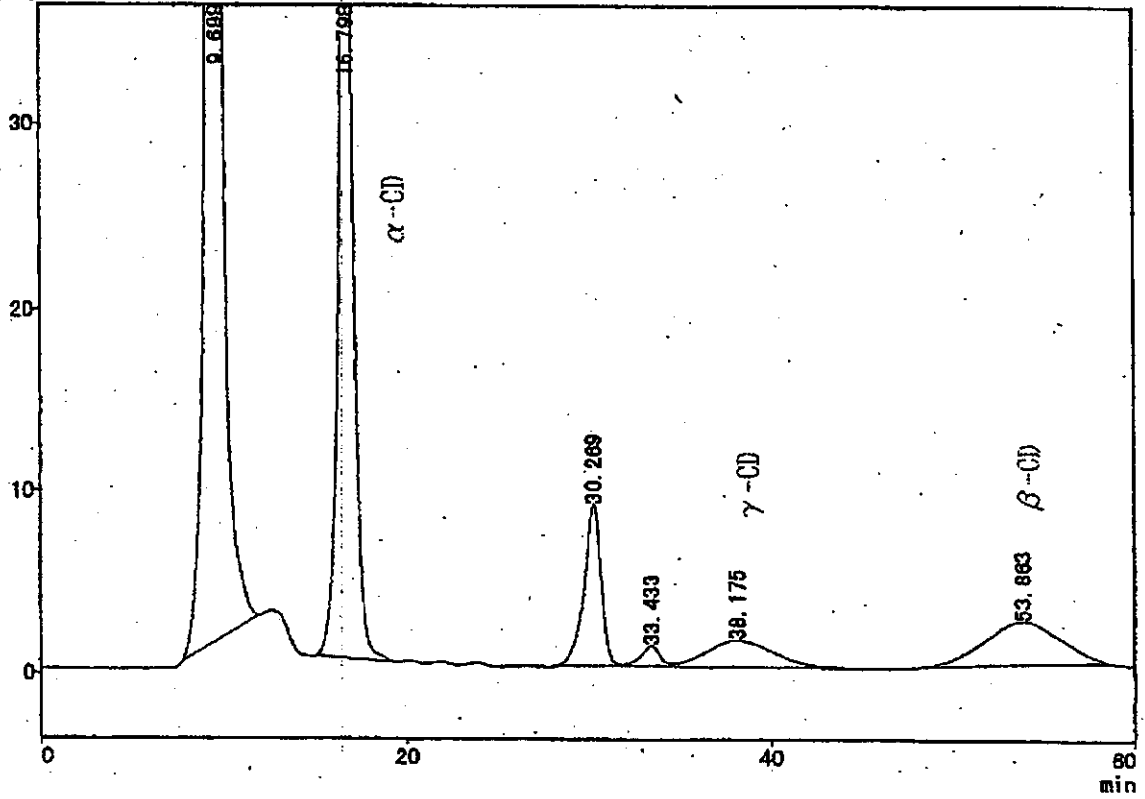
検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T.Akao

サンプル名 : OGTR環化.MET

*** 検出結果 *** ファイル名:07506L3.D01

URIU



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK	IDNO	CONO	NAME
1	9.699	860808	25884			65.9572	
2	16.798	269025	5118			20.6823	
3	30.269	57919	885			4.4379	
4	33.433	8548	113	V		0.8548	
5	38.175	37130	146	V		2.8450	
6	53.863	70771	241			5.4226	

1305100.

32387

100.0000

CLASS-LG10 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 検体番号=6 データ=12509L3.D01 00/12/06 17:08:40

サンプル : CGTRX12509L

ID : 3回目

タイプ : 未知試料

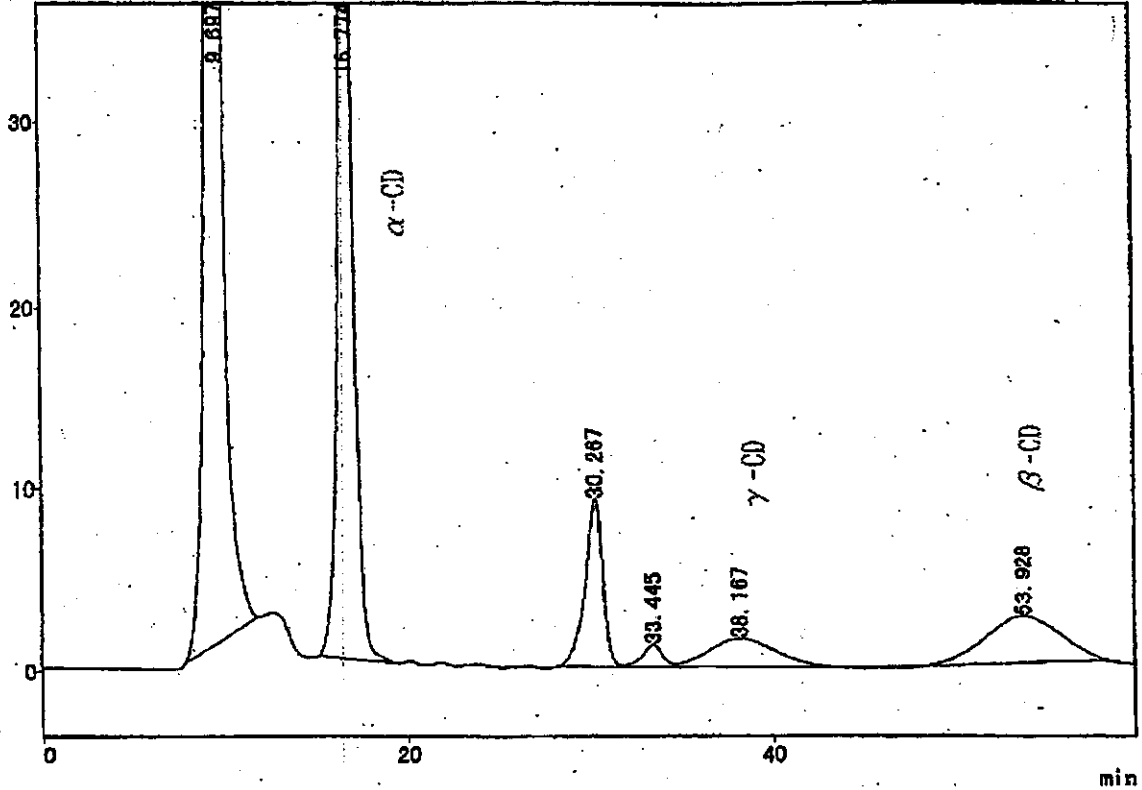
検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T. Akao

サンプル名 : CGTR環化.MET

*** 検出結果 *** ファイル名:12509L3.D01

URIU



*** 検出結果 ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	NK	IDNO	CONC	NAME
1	9.897	840279	25489			64.7089	
2	16.774	274828	5242			21.1642	
3	30.267	60352	920			4.8476	
4	33.445	8979	120	Y		0.8914	
5	38.167	39380	155	Y		3.0326	
6	53.928	74735	256			5.7553	

1298553

32193

100.0000

CLASS-L010 Ver.=1.64 システム番号=1 Ch=1 試料番号=777-05524013.001 00/12/06 18:09:44

サンプル : CGTRY0552401L

ID : 3回目

タイプ : 未知試料

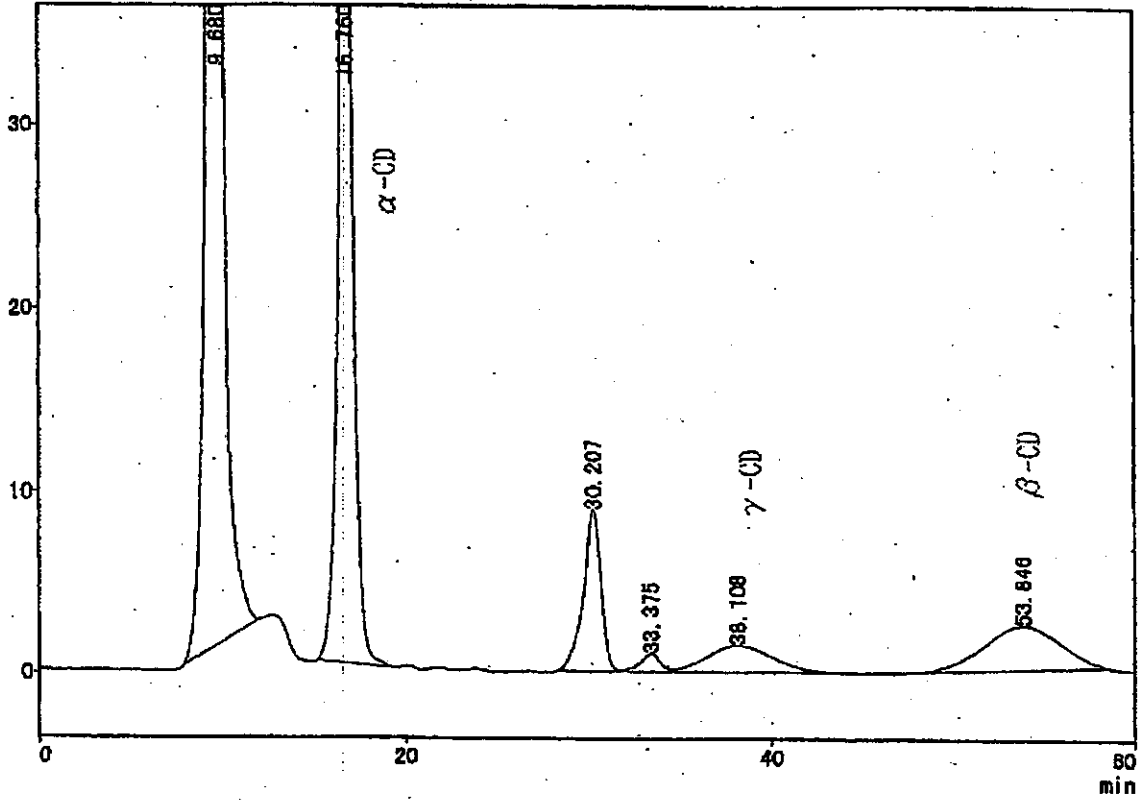
検出器 : RID-10A

オペレーター名 : T. Akao

サンプル名 : CGTR還元.MET

*** 加算結果 *** ファイル名:05524013.001

URIU



*** レポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	9.680	858645	25260			88.0401	
2	16.760	267789	5098			20.5962	
3	30.207	58534	892			4.5019	
4	33.375	7540	98	V		0.5799	
5	38.108	37403	147	V		2.8767	
6	53.846	70277	240			5.4051	

1300187

31733

100.0000

トランスグルタミナーゼ (案)

Transglutaminase

定義 本品は、動物の血液あるいは肝臓より抽出、又は放線菌 (*Streptomyces*、*Streptovercillium* 等)、細菌 (*Bacillus* 等) の培養物から得られた、アシル転移反応を触媒する酵素である。

酵素特性 本品は、たん白質又はペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、アミン化合物の第 1 級アミノ基やたん白質又はペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基をアシル受容体とするアシル転移反応を触媒する。

EC ナンバー (参考) : EC 2.3.2.13

性状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は淡黄～濃褐色の液体である。においはない。

確認試験 本品 40 単位相当量を量り、1.5mg の塩化カルシウムを含む 10% α -カゼイン溶液 2ml に加え、55℃で 1 時間反応させたとき、試料溶液の粘性が著しく増大するか、もしくはゲルを形成する。

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・酵素活性測定法のトランスグルタミナーゼ活性測定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、トランスグルタミナーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

*** 試葉・試液**

- (1) α -カゼイン：本品は、牛乳から精製したカゼインで、蛋白質含量が 70%以上で、電気泳動分析によるとき、その含量は 85%以上である。
- (2) 10% α -カゼイン溶液： α -カゼインを正確に 1g 量り、15mg の塩化カルシウムとともに水に溶かし、10ml とする。

一般試験法 酵素活性測定法

トランスグルタミナーゼ活性測定法 (案)

酵素の作用により、アシル転移反応から生じたヒドロキサム酸が鉄錯体を形成し、可視部に吸収を持つことを利用して、反応液の波長 525nm の吸光度を測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

本品 70~100 単位に相当する量を精密に量り、0.2mol/l トリス塩酸緩衝液 (pH6.0) または他の適切な緩衝液、塩類溶液に溶かし、正確に 50ml とし、試料溶液とする。

(2) 基質溶液

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシン 4.048g、塩酸ヒドロキシルアミン 2.780g、還元型グルタチオン 1.229g、及び塩化カルシウム 0.295g、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 9.688g を正確に量り、水を加えて溶かし、12mol/l 塩酸にて pH6.0 に調整した後、正確に 400ml とする。

(3) グルタモヒドロキサム酸検量線の作成

グルタモヒドロキサム酸 64.8mg を正確に量り、0.2mol/l トリス塩酸緩衝液 (pH6.0) または他の適切な緩衝液、塩類溶液 10ml を加えて溶かす。この液に pH6.0、0.2 mol/l トリス塩酸緩衝液を加え、1.2、1.5、2、4 及び 8 倍に希釈し、標準液とする。本標準液は、0.2ml 中にグルタモヒドロキサム酸としてそれぞれ、6.67、5.33、4.0、2.0、1.0 μ mol を含む。各標準液 0.2ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 1 分間加温する。これに予め同温度で 10 分間加温した基質溶液 2ml を正確に加えて直ちによく振り混ぜる。これを $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 10 分間放置した後、発色試液を正確に 2ml 加え直ちに振り混ぜ、水を対照として波長 525nm における吸光度を測定する。これより縦軸にグルタモヒドロキサム酸標準液各吸光度、横軸にグルタモヒドロキサム酸量 (μ mol) を用いて検量線を作成する。

(4) 操作法

試験管に試料溶液 0.2ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温槽で 1 分間加温する。これに予め同温度で 10 分間加温した基質溶液を正確に 2ml 加えて直ちによく振り混ぜて、反応を開始する。これを $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 10 分間反応させた後、発色試液を正確に 2ml 加えて直ちによく振り混ぜて、反応を停止させる。これを必要に応じて遠心分離 (3000 rpm \times 10 分間) した上澄み液を、水を対照として波長 525 nm における吸光度 A_1 を測定する。

別に試料溶液 0.2ml を正確に量り、発色試液 2ml を加えて $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 10 分間加温した後、基質溶液 2.0ml を正確に加える。必要に応じて遠心分離した上澄み液を、水を対照として波長 525nm における吸光度 A_2 を測定する。

吸光度 ($A_1 - A_2$) に相当するグルタモヒドロキサム酸量をグルタモヒドロキサム酸検量線より求め、そのグルタモヒドロキサム酸 μ mol 数を M_1 とし、次式により酵素活性を求める。

酵素活性の単位は、上記の操作法の条件で試験するとき、1 分間に 1μ mol のグルタモヒドロキサム酸を生成するのに必要な酵素量を 1 単位とする。

本品中の酵素活性の単位 (単位/g または単位/ml)

$$= \frac{M_1 \times 50 \times n}{0.2 \times 10 \times W}$$

$$= M_1 \times 25 \times n / W$$

ただし、 0.2 : 試料溶液量 (ml)
50 : 本品を溶解した容量 (ml)
10 : 反応時間 (min)
n : 試料液の希釈倍数
W : 試料溶液 1ml 中の試料の量(g または ml)

(5) 試薬・試液

1) ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリシン

本品は、白色の結晶または結晶性の粉末である。

含量 97.0%以上

融点 182.0~183.0℃

比旋光度 $[\alpha]_D^{22} = -2.7^\circ$

乾燥減量 0.14% (P₂O₅, 1.0g, 室温, 減圧, 16 時間)

定量法 本品約 200mg をとり, ジメチルフォルムアミドを加えて溶かして 10 ml とし, 検液とする。
検液 0.3~0.5 μl につき, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, ピーク面積を自動分析法により測定する。

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリシンの量 (%)

$$= \frac{\text{検液のベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリシンのピーク面積} \times 100}{\text{総ピーク面積}}$$

操作条件

検出器 紫外外部吸収検出器 (測定波長 210nm)

カラム 内径 3~6mm, 長さ 15~25cm のステンレス管

カラム充てん剤 5~10 μm の化学結合型オクタデシルシラン

カラム温度 室温 (一定)

移動相 0.01mol/l リン酸カリウム溶液/0.05mol/l 硫酸ナトリウム溶液/アセトニトリル混液(1:1:1)

流量 主ピークが約 12 分に現れるように調整する。

2) 還元型グルタチオン

本品は、白色の結晶または結晶性の粉末である。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -16 \sim -19^\circ$

本品約 1 g を精密に量り, 水を加えて正確に 100ml とし, 旋光度を測定する。

乾燥減量 0.5%以下 (P₂O₅, 1.0g, 室温, 減圧, 4 時間)

強熱残分 0.2%以下

3) グルタモヒドロキサム酸

SIGMA 製 (製品番号 G2253) 又は同等品を使用する。

4) 12 w/v %トリクロロ酢酸試液

1,000ml 中トリクロロ酢酸 120g を含む。

トリクロロ酢酸 24g を量り, 水を加えて溶かして 200ml とする。

5) 発色試液

塩化第二鉄 5.0g を量り, 0.1mol/l 塩酸を加えて溶かして 100ml とする。

この液と 3mol/l 塩酸及び 12w/v%トリクロロ酢酸溶液を (1:1:1) に混合する。

トランスグルタミナーゼ測定結果

品名 アクティバ(基原: *Streptovercillium*由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号			
			11110	20105	11202	
性状	淡黄褐色の粉末	①	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	
		②	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	
		③	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	淡黄褐色の粉末	
確認試験	粘度が上昇する	①	粘度が上昇する	粘度が上昇する	粘度が上昇する	
		②	粘度が上昇する	粘度が上昇する	粘度が上昇する	
		③	粘度が上昇する	粘度が上昇する	粘度が上昇する	
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 ₂ O ₃ 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	50,000g/g以下	①	100g/g以下	100g/g以下	100g/g以下	
		②	100g/g以下	100g/g以下	100g/g以下	
		③	100g/g以下	100g/g以下	100g/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		①		1,205	1,219	1,221
		②		1,206	1,181	1,200
		③		1,198	1,199	1,193
		④		1,195	1,189	1,200
		⑤		1,210	1,205	1,215
		⑥		1,206	1,200	1,195
		平均値(n=6) 単位/g		1,203	1,199	1,204
		標準偏差		6	13	11
		CV(%)		0.5	1.1	0.9
		最大値 単位/g		1,210	1,219	1,221
		最小値 単位/g		1,195	1,181	1,193

酵素活性の測定法

(1) 試料溶液: 本品70~100単位に相当する量を精密に量り、0.2mol/lトリス塩酸緩衝液(pH6.0)に溶かし、正確に50mlとし、試料溶液とした。

(2) 基質溶液の調製法: ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン4.048g、塩酸ヒドロキシルアミン2.780g、還元型グルタチオン1.229g、及び塩化カルシウム0.295g、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン9.688gを正確に量り、水を加えて溶かし、12mol/l塩酸にてpH6.0に調整した後、正確に400mlとした。