

[参考情報]

酵素活性	1150 単位/g
本品の酵素活性の許容範囲	1150±150 単位/g

パンクレアチン（案）

Pancreatin

定 義 本品は動物の膵臓より得られた、たん白質、デンプン及び脂肪を分解する酵素である。

酵素特性 本品はたん白質を加水分解しペプチドなどを生成する。また、デンプン及び脂肪を加水分解する作用を有する。

性 状 本品は、白～淡黄色の粉末で、特異なおいがある。

確認試験 (1) でんぷん糖化力 あらかじめ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ に加温した1%バレイショデンプン溶液10ml中に本品のでんぷん糖化力活性200～1,000単位相当量を加えてよく振り混ぜ、同温度で10分間放置したのち、でんぷん消化力試験用フェーリング試液のアルカリ性酒石酸塩液2ml及び銅液2mlを加え、加熱するとき赤色沈殿を生ずる。

(2) プロテアーゼ力 あらかじめ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ に加温したゼラチン溶液10ml中に本品のプロテアーゼ活性2,000～10,000単位相当量を加えてよく振り混ぜ、同温度で10分間放置するとき、内容液の粘度は減少する。

(3) 脂肪消化力 あらかじめ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ に加温したオリブ油乳化液5ml及び0.1mol/lリン酸塩緩衝液（pH7.0）4mlの混合液中に本品のリパーゼ活性50～200単位相当量を加えてよく振り混ぜ、同温度で20分間放置した後、アセトン・エタノール混液（1：1）20ml及びプロモクレゾールパープル試液5滴を加えて振り混ぜるとき内容液は黄色～黄緑色を呈する。

純度試験 (1) 変敗 本品は不快な又は変敗したにおい及び味がない。

(2) 脂肪 本品1.0gにエーテル20mlを加え、時々振り混ぜ30分間抽出した後、ろ過し、エーテル10mlで洗い、ろ液及び洗液を合わせ、エーテルを蒸発し、残留物を 105° で2時間乾燥するとき、その量は80mg以下である。

(3) 重金属、鉛、ヒ素 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・酵素活性測定法のでんぷん糖化力活性測定法、プロテアーゼ活性測定法 第1法、及びリパーゼ活性測定法 第1法により試験を行う。

ただし、でんぷん糖化力活性測定において、基質は基質溶液 1、緩衝液はパンクレアチン用リン酸塩緩衝液 10ml を用い、試料溶液の調製には氷冷した水を用いる。また、プロテアーゼ活性測定においては、第1法 基質溶液 2 を用い、pHは8.5に調整、沈殿試液はトリクロロ酢酸試液 B を用いる。試料溶液の調製には氷冷した水を用いる。リパーゼ活性測定においては、第1法 乳化液のポリビニルアルコールとしてポリビニルアルコール I 18g 及びポリビニルアルコール II 2g を用い、試料溶液の調製には氷冷した水を用い、操作法の緩衝液としてリン酸塩緩衝液（pH8.0）を用いる。

* 試薬・試液

1) 1%バレイショデンプン溶液

でんぷん糖化力活性測定法の基質溶液を用いる。ただし、緩衝液はパンクレアチン用リン酸塩緩衝液 10ml を用いる。

- 2) パンクレアチン用リン酸塩緩衝液
無水リン酸一水素ナトリウム 3.3g、リン酸二水素カリウム 1.4g 及び塩化ナトリウム 0.33g
を水に溶かし、100ml とする。
- 3) ゼラチン溶液
ゼラチン（日局）2g に水 10ml を加え、加温して溶かす。
- 4) オリーブ油乳化液
リパーゼ活性測定法第1法で用いる基質溶液を使用する。
- 5) 0.1mol/l リン酸塩緩衝液（pH7.0）
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 17.9g を水に溶かし 500ml とした液に、リン酸二水素カリウム 6.8g を水に溶かし 500ml とした液を加え pH7.0 に調整する。その容量は約 2 : 1 である。
- 6) ブロモクレゾールパープル試液
ブロモクレゾールパープル 0.05g をエタノール（95）100ml に溶かし、必要ならばろ過する。
- 7) リン酸塩緩衝液（pH8.0）
0.2mol/l リン酸二水素カリウム試液 50ml に 0.2mol/l 水酸化ナトリウム試液 46.1ml 及び水を加えて 200ml とする。
- 8) 0.2mol/l リン酸二水素カリウム試液
リン酸二水素カリウム、pH 測定用 27.22g を水に溶かし 1000ml とする。
- 9) 0.2mol/l 水酸化ナトリウム試液
水酸化ナトリウム 8.0g に新たに煮沸して冷却した水を加えて溶かし 1000ml とする。用時調製する。

パンクレアチン測定結果

品名 パンクレアチン F (基原: プタ豚臓由来)

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			PY0951103	PY0952604	PY0952701
性状	白～淡黄色の粉末で、特異なおいがある。	①	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある
		②	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある
		③	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある	淡黄色の粉末、特異なおいがある
確認試験	(1) でんぷん糖化力 (2) 7°077-セカ (3) 脂肪消化力	①	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する
		②	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する
		③	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する	(1) 赤色沈殿を生じる (2) 粘度が減少する (3) 黄緑色を呈する
変敗	不快な又は変敗したにおい及び味がない	①	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない
		②	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない
		③	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない	不快、変敗したにおい及び味がない
脂肪	80mg 以下	①	4.1mg	1.1mg	1.8mg
		②	2.4mg	0.8mg	0.7mg
		③	1.7mg	0.7mg	0.8mg
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	200/g	100/g 以下	100/g 以下
		②	240/g	100/g 以下	100/g 以下
		③	150/g	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

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			PY0951103	PY0952604	PY0952701
でんぷん糖化力	単位/g	①	3830	3940	3920
		②	3840	3860	3910
		③	3830	3780	3840
		④	3790	3900	3910
		⑤	3750	3710	3860
		⑥	3860	3830	3730
	平均 (n=6)		3817	3837	3862
	標準偏差		39.8	83.1	72.0
	CV (%)		1.0	2.2	1.9
	最大値		3860	3940	3920
最小値		3750	3710	3730	
プロテアーゼ活性	単位/g	①	38600	37500	39500
		②	37400	34100	36500
		③	38400	34300	36200
		④	39000	36700	38900
		⑤	38600	36100	37600
		⑥	38900	35800	38200
	平均 (n=6)		38480	35750	37820
	標準偏差		574	1335	1308
	CV (%)		1.5	3.7	3.5
	最大値		39000	37500	39500
最小値		37400	34100	36200	
リパーゼ活性	単位/g	①	1500	1260	1300
		②	1500	1220	1250
		③	1570	1200	1230
		④	1490	1260	1290
		⑤	1560	1300	1280
		⑥	1530	1250	1220
	平均 (n=6)		1525	1248	1262
	標準偏差		34	35	33
	CV (%)		2.2	2.8	2.6
	最大値		1570	1300	1300
最小値		1490	1200	1220	

試料溶液の調製法

でんぷん糖化力	0.1g→1000ml
プロテアーゼ活性	0.1g→200ml
リパーゼ活性	0.1g→100ml

プルラナーゼ(案)

Pullulanase

定 義 本品は細菌 (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Sulfolobus solfataricus*) の培養物から得られた、プルランを分解する酵素である。

酵素特性 本品は、プルラン、アミロペクチン、グリコーゲンなどの α -1, 6-グルコシド結合を加水分解し、プルランからはマルトトリオースを、その他からはアミロース様直鎖多糖類を生成する。

EC ナンバー(参考) : EC 3. 2. 1. 41

性 状 本品は、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。

確認試験 本品約 40 単位の水溶液 1ml をプルラン水溶液 (1→10) 5ml に加え混合し、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 1 時間反応させたとき、溶液の粘度は低くなる。

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ルラ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、試料の希釈液等）はプルラナーゼの基原、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

プルラナーゼ活性測定法（案）

ソモギ・ネルソン変法

酵素を基質プルランに作用させ、生成した還元糖の還元力をソモギ・ネルソン変法で比色測定して求める方法である。

(1) 酵素溶液の調製

操作法により試験するとき、還元力の増加が、酵素濃度に比例する範囲の濃度になるように適量の pH5.0 のクエン酸緩衝液（又は適切な pH、種類の緩衝液または塩類溶液）を加えて溶かす。その濃度は、通例 0.01～0.05 単位/ml である。

(2) 基質溶液の調製

プルラン 0.40g を量り、pH5.0 のクエン酸緩衝液（又は適切な pH、種類の緩衝液または塩類溶液）を加えて溶かし、正確に 100ml 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℃ で 6 時間乾燥し、得た無水物 1.60g を精密に量り、pH5.0 のクエン酸緩衝液（又は適切な pH、種類の緩衝液または塩類溶液）を加えて溶かし、正確に 200ml とする。この液に pH5.0 のクエン酸緩衝液（又は適切な pH、種類の緩衝液または塩類溶液）を加えて希釈し、1ml 中に 16, 40, 80, 120 及び 160 μ g の各濃度のブドウ糖標準液を調製する。

(4) 操作法

基質溶液 1ml を正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温し、この液に $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した酵素溶液 1ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。正確に 30 分間反応させた後、アルカリ性銅試液 2ml を正確に加えて混和し、反応を停止する。試験管にガラス玉をのせ、沸騰水浴中で 20 分間加熱する。

冷却後、ヒ素モリブデン酸アンモニウム試薬 2ml を正確に加え、赤色沈澱物を溶かした後、水 4ml を正確に混合し、30 分間放置後、520nm で吸光度を測定する (A1)。別に対照として酵素溶液 1ml を正確に量り、アルカリ性銅試液 2ml を正確に加えて混和し、基質溶液 1ml を正確に加えて、同様に操作を行う (Ab)。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、アルカリ性銅試液 2ml を正確に加えて、以下同様の操作を行う。

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 のブドウ糖に相当する還元力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）

$$= (At - Ab) \times 2 \times \frac{1}{W \times As \times 180 \times 30 \times 1.0}$$

$$= (At - Ab) \times \frac{1}{W \times As \times 2700}$$

At : 反応液の吸光度

Ab : 対照液の吸光度

As : ブドウ糖 1 μ g/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）

2 : 反応液の総液量（ml）

180 : ブドウ糖の分子量

30 : 反応時間（分）

1.0 : 反応に用いた試料溶液の液量（ml）

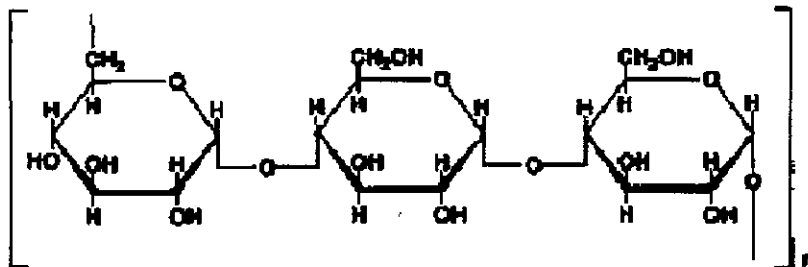
試薬・試液

1) プルラン

林原生物化学研究所製 製品番号 PU101（分子量 5～10万）又は同等品を使用する。

PU101 規格

構造式



分子量：50,000～100,000

乾燥減量：7.0%以下

灰分：0.1%以下

蛋白：0.1%以下

特性：プルラナーゼにより加水分解され 94%以上のマルトトリオースを生ずる。

外観：白い粉末状

2) クエン酸緩衝液、pH5.0

クエン酸 52.54 g を約 4000ml の水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.00 に調整する。水を加え正確に 5000ml とする。

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 16g、無水硫酸ナトリウム 180g 及び酒石酸カリウムナトリウム 12g に水を加えて溶かし、900ml とする。この液を 10 分間煮沸したのち、水を加えて 1000ml とし、遮光密せんして 1 週間放置したのち、ろ紙(No. 2)を 2 枚重ねて 2 回ろ過する。遮光密栓保存する。

4) ヒ酸二ナトリウム

和光純薬製、製品番号 191-01202 又は同等品を用いる。

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) ヒ素モリブデン酸アンモニウム試液

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 を加えたのち、水を加えて正確に 1000ml とし、37℃で一昼夜放置する。

平成 13 年 2 月
ノボザイムズ ジャパン (株)

プルラナーゼ測定結果

品名 Promozyme 400L (基原: *Bacillus acidopullulyticus* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			AGN 03050	AGN 03052	AGN 03053
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。においがいいか又は特異なにおいがある。	①	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある
		②	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある
		③	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある	淡色～濃褐色液状、特異な臭いがある
確認試験	プルラナーゼ活性測定法により酵素活性を示す	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
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
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
細菌数	50,000/g 以下	①	200/g 以下	200/g 以下	1000/g 以下
大腸菌	認めない	①	認めない	認めない	認めない
酵素活性	単位/g	①	375	354	338
		②	405	328	345
		③	418	302	387
		④	393	344	367
		⑤	402	356	360
		⑥	423	326	334
	平均値(n=6)		403	335	355
	標準偏差		17.5	20.5	20.2
	CV(%)		4.35	6.12	5.69
	最大値		423	356	387
最小値		375	302	334	

* 確認試験：本品を水で希釈し（1→10）約 40 単位の水溶液を得た。これを 1ml をプルラン水溶液（1→10）5ml に加え混合し、40±0.5℃で1時間反応させた。別に対照として水 1ml をプルラン水溶液（1→10）に加えたものを同様の条件で反応させた。反応終了後、粘度計（東京計器、E形粘度計）で測定した。プルラン水溶液を加えたサンプルは対照液より粘度が低下していた。

* 酵素活性測定法：プルラーゼ活性測定法

- (1) 試料溶液：本品に pH5.0 のクエン酸緩衝液を加えて溶かし試料溶液とした（1→20000）
- (2) 0.1mol/l クエン酸緩衝液、pH5.0
クエン酸 52.54g を約 4000ml の水に溶解し、5.0mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.0 に調製した後水を加えて正確に 5000ml とした。用時調製した。
- (3) 基質溶液の調製法：プルラン（生化学工業製 製品番号 902101）0.40g を量り、pH5.0 のクエン酸緩衝液で溶解し正確に 100ml とした。用時調製した。
- (4) アルカリ性銅試液
リン酸水素二ナトリウム 35.1g と酒石酸カリウムナトリウム 4 水和物 40.0g を 500ml の水に溶かし、1mol 水酸化ナトリウム溶液 120g を加えた。この液に硫酸銅 5 水和物 8.0g を加え無水硫酸ナトリウム 180g を加えて溶かし、水で希釈し 1000ml とした。
- (5) ヒ酸二ナトリウム試液：ヒ酸二ナトリウム（和光純薬製 製品番号 191-01202）6g を 50ml の水に溶かした。
- (6) ヒ素モリブデン酸アンモニウム試液
モリブデン酸アンモニウム 4 水和物 50g を 900ml の水に希釈し、攪はんしながら硫酸 42ml を加えた。さらにヒ酸二ナトリウム試液 50ml を加え褐色ビンに入れ、室温 37℃で 48 時間放置後、沈殿のないことを確認しその後は室温で保管した。
- (7) 操作法：プルラーゼ活性測定法の操作手順に従い測定を行った。

[参考資料]

プルラーゼ測定結果につき、純度試験、微生物限度は、各ロット共に 1 回のみの測定なので、参考として同一ロットのノボ社の試験結果を示す。

試料：プルラーゼ市販品（商品名 プロモザイム 400L）

ノボ社試験結果

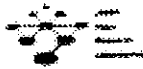
規格項目	規格	測定方法	ロット番号		
			AGN 03050	AGN 03052	AGN 03053
重金属	Pb として 40 μg/ml 以下	ノボ社法	< 30 ppm	< 30 ppm	< 30 ppm
鉛	Pb として 10 μg/ml 以下	ノボ社法	< 5 ppm	< 5 ppm	< 5 ppm
ヒ素	As ₂ O ₃ として 4.0 μg/ml 以下	ノボ社法	< 3 ppm	< 3 ppm	< 3 ppm
細菌数	50,000/mL 以下	ノボ社法	< 200	< 200	< 1000
大腸菌	認めない	ノボ社法	認めない	認めない	認めない

食品、添加物等の規格基準に基づく測定法による確認

試料：プルラーゼ市販品（商品名プロモザイム 400L）、ロット番号 AGN 03052

試験結果：別紙

別紙



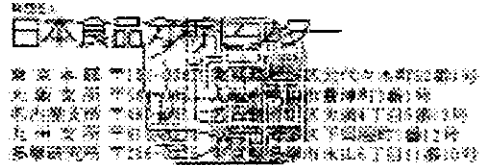
分析試験成績書

第188132841-001号
平成18年02月27日

依頼者 フロモイムズ ジャパン株式会社

検体名 Promocryme 400L

依頼事項 Batch No.
A09D8082



平成18年02月27日付の依頼書に基づき提出された検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

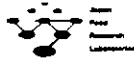
分析試験項目	結果	検出限界値	分析方法
重金属			依頼者指定の方法
試験1:鉛	限度内		
試験2:銅	限度内		
試験3:亜鉛	限度内		
カドミウム			依頼者指定の方法
試験1:鉛	限度内		
試験2:銅	限度内		
試験3:亜鉛	限度内		
ヒ素			依頼者指定の方法
試験1:鉛	限度内		
試験2:銅	限度内		
試験3:亜鉛	限度内		

- 注1. 食品、添加物等の規格基準（昭和54年厚生省令第219号）の規格値に準じて試験した。
測定条件：試料採取量、0.5g；検体抽出液量及び検体の調整、0.5g；検体濃縮率、0.5g
- 注2. 食品、添加物等の規格基準（昭和54年厚生省令第219号）の規格値に準じて試験した。検体濃縮率、0.5g；検体濃縮率、0.5g
測定条件：試料採取量、0.5g；検体抽出液量、0.5g
- 注3. 食品、添加物等の規格基準（昭和54年厚生省令第219号）の規格値に準じて試験した。
測定条件：試料採取量、0.5g；検体抽出液量、0.5g；検体濃縮率、0.5g

以上

本試験報告を他社に提供すること等（本報告）の一部承認を要する場合があります。

日本食品分析センター



分析試験成績書

第100122941-003号
平成13年02月26日

依頼者 ノボザイムズ ジャパン株式会社

検体名 Promozyme 400L

付記事項 Batch No.
AGN03052

〒151-0052 東京都千代田区千代田2-2-1
〒564-0021 大阪府大阪市東淀川区東中津3-1-1
〒460-0001 名古屋市中区大須4丁目5番13号
〒812-0022 福岡市博多区下呉服町1番12号
〒206-0005 東京都多摩市永山6丁目11番10号

平成13年01月25日当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

分析試験項目	結果	検出限界	注	分析方法
微生物限度 細菌数				
試験1回目	300以下/m1		1	依頼者指定の方法
試験2回目	300以下/m1		2	依頼者指定の方法
試験3回目	300以下/m1		2	依頼者指定の方法

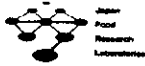
注1. 食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の第2添加物の8の33.微生物限度試験法（カンテン平板混濁法）に準じて試験した。なお、培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験は、試験報告書第100122941-002号で実施した。

注2. 食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の第2添加物の8の33.微生物限度試験法（カンテン平板混濁法）に準じて試験した。なお、培地の性能は良好であった。また、発育阻止物質の確認試験は、試験報告書第100122941-002号で実施した。

以上

本成績書を他に掲載するときは当センターの承認を受けて下さい。

日本食品分析センター



培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

- 1 依頼者
ノボザイムズ ジャパン株式会社
- 2 検体
Promozyme 400L (Batch No. AGN03052)
- 3 試験概要

食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)の第2添加物の一般試験法「微生物限度試験法」に準拠し、検体について生菌数試験(細菌)及び大腸菌試験を実施するための培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験を行った。試験条件を表-1及び2に示した。

表-1 試験条件(細菌数試験)

試験菌株	<i>Escherichia coli</i> IFO 3972(ATCC 8739) <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134(ATCC 6633)* <i>Staphylococcus aureus</i> IFO 13276(ATCC 6538)	
試料10倍希釈液の調製	検体採取量	10 ml
	希釈液	ペプトン食塩緩衝液
	希釈液量	90 ml
試料液の希釈	100及び1,000倍	
分注量	試料液1 ml	
試験方法	カンテン平板混釈法	
培地	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天	
培養条件	30~35℃, 5日間	

* 孢子液を用いた。

表-2 試験条件(大腸菌試験)

試験菌株	<i>Escherichia coli</i> IFO 3972(ATCC 8739)
検体採取量	10 ml
増菌培地	乳糖ブイヨン
増菌培地量	90 ml
試験方法	増菌培養法
分離培地	マッコンキー寒天
培養条件	増菌培地: 30~35℃, 3日間 分離培地: 30~35℃, 18~24時間

4 試験結果

1) 細菌数試験

試験結果を表-3に示した。本試験条件においては試料(10倍希釈液1 ml)による発育阻止は認められないと判定された。なお、培地の性能は良好であった。

表-3 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験結果(細菌数試験)

試験菌株	出現集落数			
	試料の 非存在下	試料(試料液1 ml)の存在下		
		試料液の希釈倍率		
		10倍	100倍	1,000倍
<i>Escherichia coli</i> IFO 3972	132	110	131	121
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	73	94	81	77
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 13276	116	114	128	111

2) 大腸菌試験

検体10 mlに90 mlの増菌培地を加えて混合し、増菌培養法により試験した結果を表-4に示した。菌液のみを接種して培養したときに試験菌の十分な生育が認められ、培地の性能は良好と判定された。しかし、試料(検体10 ml)の存在下では発育阻止が認められた。

表-4 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験結果(大腸菌試験)

試験菌株	分離平板上での試験菌の生育	
	試料の非存在下	試料(検体10 ml)の存在下
<i>Escherichia coli</i> IFO 3972	+	-

+ : 試験菌の生育を認める

- : 試験菌の生育を認めず

以 上

リゾチーム（案）

Lysozyme

定 義 本品は、卵白より、アルカリ性水溶液及び食塩水で処理し、樹脂精製して得られたもの、又は樹脂処理若しくは加塩処理した後、カラム精製若しくは再結晶により得られたもので、細菌の細胞壁物質を溶菌する酵素である。

酵素特性 本品は、細菌細胞壁のムコ多糖などに存在する *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミン間の β -1,4 結合を加水分解する。

ECナンバー（参考）： EC 3. 2. 1. 17

性 状 本品は、白色の粉末で、においはない。

確認試験 本品（約 1 mg（力価）/mg）を酢酸塩緩衝液（pH5.4）に溶かした液（1→10,000）につき、吸収スペクトルを測定するとき、波長 279～281nm に吸収の極大を示す。

純度試験 (1) 溶状 本品の水溶液（1→100）5ml に必要であれば希塩酸を加えて pH3.0 に調整するとき、波長 660nm での透過率は、80.0% 以上である。

(2) 重金属 酵素一般規格 純度試験（1）を適用する。

(3) 鉛 酵素一般規格 純度試験（2）を適用する。

(4) ヒ素 酵素一般規格 純度試験（3）を適用する。

(5) 塩化物 塩素（Cl）として 4.5% 以下

本品約 0.5g を精密に量り、水 50ml を加えて溶かす。この液に 10% クロム酸カリウム溶液を 0.1ml 加え、淡赤褐色を呈するまで 0.1mol/l 硝酸銀溶液で滴定する。

乾燥減量 6.0% 以下（1 g、シリカゲル、減圧、2 時間）

酵素活性測定法 一般試験法・酵素活性測定法のリゾチーム活性測定法により試験を行なう。

* 試薬・試液

1) 酢酸塩緩衝液（pH5.4）

酢酸 5.78ml に水を加えて 1,000ml とした液 176 ml に、無水酢酸ナトリウム 8.2g に水を加えて 1,000ml とした液 824 ml を加える。必要ならば、更にいずれかの液を加えて pH5.4 に調整する。

リゾチーム活性測定法（案）

(1) 試料溶液

あらかじめ本品約 1g を精密に量り、シリカゲルを乾燥剤としたデジケーターに入れ、減圧下で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物約 50mg（力価）に対応する量を精密に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 100ml とする。この液 2ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 100ml とし、さらに、この液 2ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 50ml とする。

(2) 標準溶液

あらかじめリゾチーム標準品約 1g を精密に量り、シリカゲルを乾燥剤としたデジケーターに入れ、減圧下で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物約 50mg（力価）に対応する量を精密に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 100ml とする。この液 2ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 100ml とし、さらに、この液 2ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えて正確に 50ml とする。

(3) 基質溶液

Micrococcus luteus の乾燥菌体適量にリン酸塩緩衝液（pH6.2）を加えてホモミキサー或はホモジナイザーで懸濁した後、波長 640nm における透過率が 10% になるように、基質又はリン酸塩緩衝液（pH6.2）を加え調整する。但し、基質のロットが変わったときは、毎回標準品について検量線を作成し直線部分の最適濃度を使用する。通例、濃度範囲 0.2~0.6 μ g（力価）/ml で直線部分を認める。

(4) 操作法

基質溶液 3ml ずつを正確に量り、3 本の試験管に入れ、35℃で 3 分間加温する。別に標準溶液、試料溶液及びリン酸塩緩衝液（pH6.2）を 35℃で 3 分間加温し、その 3ml ずつを正確に量り、それぞれを基質溶液の試験管に加え、35℃で 10 \pm 0.1 分間反応した後、直ちに水を対照として波長 640nm でそれぞれの吸光度 A_3 、 A_T 及び A_0 を測定する。試験を 3 回繰返し、その平均値から次式により計算する。その酵素活性は、操作法の条件で試験するとき、リゾチーム標準品に対する酵素量を求める。

本品中の酵素活性の単位 [mg（力価）/mg]（乾燥物）

$$=S/B \times (A_0 - A_T) / (A_0 - A_S)$$

ただし、S：標準品の量（乾燥物）[mg（力価）]

B：本品の量（乾燥物）(mg)

A_0 ：リン酸塩緩衝液（pH6.2）を基質溶液に加えて反応後の吸光度

A_T ：試料溶液を基質溶液に加えて反応後の吸光度

A_S ：標準溶液を基質溶液に加えて反応後の吸光度

(5) 試薬・試液

1) リン酸塩緩衝液 (pH6.2) :

リン酸二水素カリウム 9.08g に水を加えて溶かし、1,000ml とした液 800l mに、無水リン酸水素二ナトリウム 9.46g に水を加えて溶かし 1,000ml とした液 200ml を加える。必要ならば、更にいずれかの液を加えて pH6.2 に調整する。

2) リゾチーム標準品 :

国立医薬品食品衛生研究所「リゾチーム標準品」を用いる。

その酵素活性は、約 1 mg(力価) / mg である。

3) *Micrococcus luteus* の乾燥菌体 :

Factor 1.00 以上。

Micrococcus luteus (生化学工業(株)製、Code No. 450971) または同等品を使用する。

尚、基質溶液に用いる本乾燥菌体の採取量は、通例、乾燥菌体 0.05g にリン酸塩緩衝液 (pH6.2) 60ml を加えて調製する。

平成12年12月
エーザイ(株)

リゾチーム測定結果

品名 リゾチーム(卵白) (基原:卵白由来)

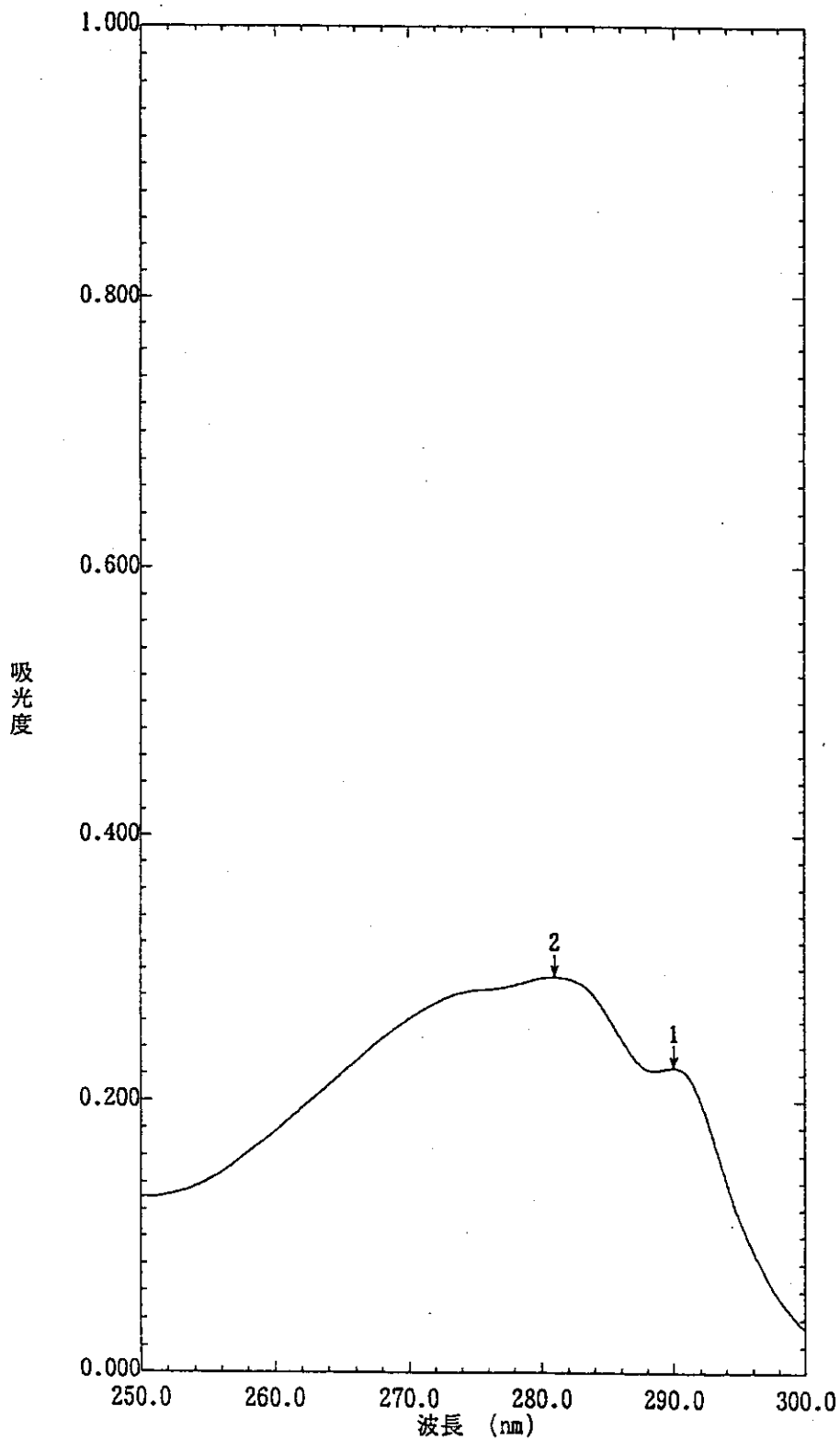
試験項目	規格	測定回数	製品ロット		
			90090102	90090103	90090605
性状	白色の粉末でにおいはない	①	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない
		②	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない
		③	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない	白色の粉末で、においはない
確認試験	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	①	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す
		②	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す
		③	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す	波長279nm~281nmに吸収の極大を示す
溶状	波長660nmで透過率80.0%以上	①	99.8	99.8	99.1
		②	99.7	99.7	99.3
		③	99.8	99.5	99.9
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
塩化物	塩素(Cl)として4.5%以下	①	2.3	2.3	3.4
		②	2.3	2.3	3.5
		③	2.3	2.3	3.6
乾燥減量	6.0%以下	①	3.5	3.3	1.9
		②	3.5	3.3	1.5
		③	3.5	3.3	1.9
酵素活性	mg(力価)/mg 小数点以下第4位は切り捨て	①	0.968	0.942	0.957
		②	0.967	0.961	0.985
		③	0.966	0.947	0.839
		④	0.951	0.987	0.979
		⑤	0.905	0.914	1.026
		⑥	0.976	0.866	1.041
		平均(n=6)	0.9555	0.9362	0.9712
		標準偏差	0.0260	0.0419	0.0718
		CV(%)	2.72	4.47	7.40
		最大値	0.976	0.987	1.041
		最小値	0.905	0.866	0.839

【参考:pH測定値】

[pH試験の方法]

本品0.3gを水20mlに溶かした液につき、pHを測定する。

試験項目	測定回数	製品ロット	90090102	90090103	90090605
pH	①	/	7.3	7.3	7.3
	②		7.3	7.3	7.3
	③		7.3	7.3	7.3



ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	290.05	0.2250
2	281.00	0.2943

ファイル名 NZ (確認試験)
90090102-1

作成: 16:30 00/10/17
データ: オリジナル

10/17 堀

検査責任者 上林 (上林)

測光値: 吸光度
スキャン速度: 高速
スリット幅: 1.0
サンプリングピッチ: 0.05