

第五部会(酸化防止剤)既存添加物自主規格案検討結果報告書

日本食品添加物協会 第五部会

研究者所属:エーザイ株式会社

藤沢薬品工業株式会社

理研ビタミン株式会社

アサマ化成株式会社

築野食品工業株式会社

1. 目的

既存添加物「クローブ抽出物」及び「コメヌカ油抽出物」について、自主規格作成のため、含量、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量及び強熱残分について調査研究を行ってきたが、この結果に基づき規格(案)を策定し、その妥当性について調査研究を行う。

2. 検討内容及び方法

「クローブ抽出物」については、その主成分がオイゲノール等である。性状の異なる3ロットの試料についてオイゲノールの含量、性状、呈色反応及び極大吸収部測定による確認試験並びに重金属、鉛及びヒ素についての純度試験と評価を行った。第7版食品添加物公定書に「オイゲノール」が記載されていることから、本品のオイゲノール含量については「オイゲノール」の含量として示すこととした。また、「オイゲノール」の定量法は香料試験法中のフェノール類含量により定量されるが、本品においては不純物の存在があり、高速液体クロマトグラフィーによるオイゲノール($C_{10}H_{12}O_2$)の量を測定することとした。それぞれの規格項目について各ロット1回の試験であり測定のパラツキの評価ができないが今後の課題としたい。

「コメヌカ油抽出物」については、その有効成分がフェルラ酸である。3ロットの試料についてフェルラ酸含量、性状、重金属及びヒ素についての純度試験、乾燥減量及び強熱残分についての試験と評価を行った。確認試験については、本品の有効成分がフェルラ酸であることから、特に試験を行わず、第3版既存添加物自主規格「フェルラ酸」の確認試験試験法を準用することとした。第3版既存添加物自主規格「フェルラ酸」の定量法は水酸化ナトリウムによる中和滴定によるが、本品は不純物の影響が想定されるためにフェルラ酸の極大吸収部での吸光度測定によることとし、定量用フェルラ酸には既存添加物「フェルラ酸」を使用することとした。

3. 検討結果ならびに考察

別紙にそれぞれ個別の検討結果及びそれに基づく自主規格(案)を記載した。

(1)「クローブ抽出物」

第7版食品添加物公定書「オイゲノール」を定量用標準物質として使用した。「オイゲノール」の含量規格は「vol %」で示されるが、「オイゲノール」の比重と本品の比重とは必ずしも同等であるとはいえず、本品のオイゲノール含量は「オイゲノール」含量(重量)として示すこととした。

(2)「コメヌカ油抽出物」

試験例の乾燥減量値と規格(案)の乾燥減量値に差があるが、天然物であることから今後事例を重ねた上で必要であれば改定することとしたい。また、乾燥減量が低いことから含量について乾燥物換算とする必要性があるかの疑問はあるが上記の乾燥減量規格の設定及び既存添加物「フェルラ酸」規格においても乾燥物換算とされていることから暫定的に乾燥物換算としておき、今後の検討課題としたい。

以上

既存添加物「クローブ抽出物」自主規格案検討結果報告

日本食品添加物協会第五部会
研究者:アサマ化成株式会社

1. 目的

既存添加物「クローブ抽出物」について、自主規格作成のため、含量、性状、確認試験及び純度試験等について調査研究を行い、その結果を踏まえて規格(案)を策定し、その妥当性を確認した。

2. 検討内容及び方法

規格の策定に当たっては、下記の項目について試験及び評価を行なった。

- 1) 性状: 外観、におい
- 2) 確認試験
- 3) 純度試験: 重金属、鉛及びヒ素の限度
- 4) 定量法及び含量

3. 検討結果

1) 性状

ペースト(ロット1)、半流動体(ロット2)及び液体(ロット3)の3ロットの試料について官能評価を行った。全体的に褐色でクローブ特有のにおいを感じられた。

2) 確認試験

①確認試験(1) 呈色試験

規格案確認試験(1) に示す方法により、3ロットの試料について呈色色調を観察した。

3ロット共に青緑色に呈色した。呈色状態を写真1に示す。

本試験法策定に当たっては下記資料(オイゲノール)を参考にした。

- i) 生化学辞典: 今堀、山川監修、1994年第2版第5刷、(株)化学同人
- ii) 化学大辞典: 化学大辞典編集委員会編、昭和55年縮刷版第24版、共立出版(株)

②確認試験(2) 極大吸収部

規格案確認試験(2) に示す方法により、3ロットの試料について190nm～1,100nmの吸収スペクトルを測定した。3ロット共に282nm に極大吸収部を認めた。ロット1の吸収スペクトルを図1に示す。

3) 純度試験

規格案純度試験に示す方法により、3ロットの試料について重金属、鉛及びヒ素の限度試験を行った。結果を表1に示す。

表1 純度試験の結果

	重金属	鉛	ヒ素
ロット1	20 μ g/g以下	1 μ g/g以下	4.0 μ g/g以下
ロット2	20 μ g/g以下	1 μ g/g以下	4.0 μ g/g以下
ロット3	20 μ g/g以下	1 μ g/g以下	4.0 μ g/g以下

4) オイゲノール含量

規格案定量法に示す方法により、3ロットの試料についてオイゲノール含量を測定した。結果を表2に示す。

表2 含量試験の結果

	オイゲノール含量(%)
ロット1	45.1
ロット2	40.9
ロット3	33.7

4. 考察

- 1) 定量法に使用するオイゲノール(定量用)には食品添加物「オイゲノール」を使用する。「オイゲノール」の含量規格はvol %で示されるが、本品の性状にペースト状が含まれ、定量操作において容量での試料採取が困難であること、不純物量が多いことから必ずしも「オイゲノール」と同等の比重を示すとはいえないことを鑑み、含量は「オイゲノール」の重量含量とした。
- 2) 定量法における含量計算式の重量補正値を「オイゲノール」比重の規格値(1.065~1.071)の中央値(1.068)とした。それに伴う測定誤差は±0.28%と微々たるものであり、含量規格値への誤差幅は設定しないこととした。
- 3) 本試験においては各ロット共に1回の試験で、特に定量試験における測定のバラツキについての考察はできないが、含量規格の上限値が50%であることを考慮して本規格案を設定し、今後補充試験を実施し必要であれば修正を加えることとしたい。

以上

写真1：確認試験(1) 呈色状態

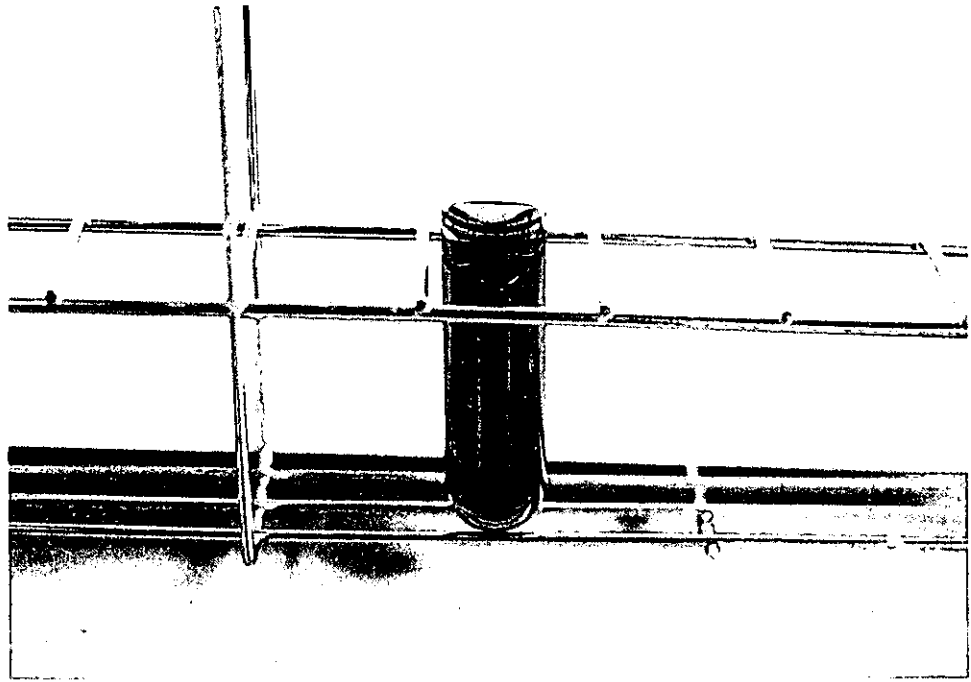
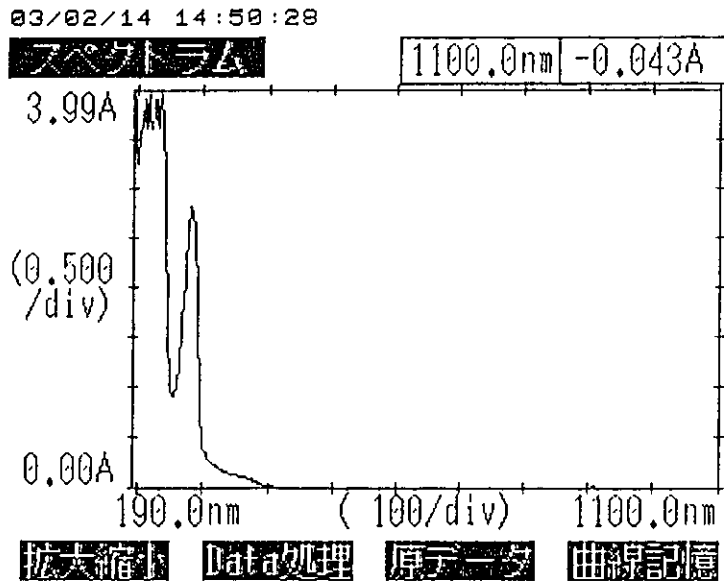


図1：確認試験(2) 吸収スペクトル (ロット1)



03/02/14 14:51:14

ピーク検出

横軸値	ABS	横軸値	ABS
1066.0	-0.011		
908.0	0.028		
810.0	-0.003		
666.0	0.002		
282.0	2.817		

グラフ

データ

処理

履歴

クローブ抽出物

Clove extract

チョウジ抽出物

定義 本品は、チョウジのつぼみ、葉又は花から得られた、オイゲノールを主成分とするものである。エタノールを含むことがある。

含量 本品は、「オイゲノール」20～50%を含む。

性状 本品は、褐色のペースト又は液体で、クローブ特有のにおいがある。

確認試験 (1) 本品0.02gにエタノール10mlを加えて溶かし、塩化第二鉄溶液（1→50）1～2滴を加えるとき、液は青緑色を呈する。

(2) 本品0.02gにエタノール10mlを加えて溶かし、この液1mlにエタノール9mlを加えて希釈した液は、波長280nm付近に極大吸収部がある。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして20 μ g/g以下（1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml）

(2) 鉛 Pbとして10 μ g/g以下（1.0g, 第1法）

(3) ヒ素 As₂O₃として4.0 μ g/g以下（0.50g, 第3法, 装置B）

定量法 本品約0.1gを精密に量り、80vol%メタノールを加えて溶かし正確に100mlとする。この液をメンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過し試料溶液とする。別に、「オイゲノール」0.1mlを精密に量り、80vol%メタノールを加えて溶かし正確に200mlにして標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液について、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、ピーク面積を求め、次式によりオイゲノール含量を求める。

操作方法

検出器 紫外外部吸収検出器（測定波長 280nm）

カラム充填剤 5 μ mの液体クロマトグラフィー用オクタデシル基結合シリカゲル

カラム管 内径4.6mm, 長さ150mmのステンレス管

カラム温度 30℃

移動相 メタノール/水混液（80:20）

流量 0.5ml/分

注入量 10 μ l

$$\text{オイゲノールの含量} = \frac{A_w}{A_s} \times \frac{C_s \times 1.068}{C_w} = \quad \times 100 \text{ (vol\%)}$$

A_w 試料溶液のオイゲノールのピーク面積

A_s 標準溶液のオイゲノールのピーク面積

C_w 試料の採取量 (g)

C_s オイゲノールの採取量 (ml)

既存添加物「コメヌカ油抽出物」自主規格案検討結果報告

日本食品添加物協会第五部会
研究者: 築野食品工業株式会社

1. 目的

既存添加物「コメヌカ抽出物」について、自主規格作成のため、含量、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分及び定量法等について調査研究を行い、その結果を踏まえて規格(案)を策定し、その妥当性を確認した。

2. 検討内容及び方法

規格の策定に当たっては、下記の項目について試験及び評価を行った。

- 1) 性状: 外観、におい
- 2) 確認試験
- 3) 純度試験: 重金属及びヒ素の限度
- 4) 乾燥減量
- 5) 強熱残分
- 6) 定量法及び含量

3. 検討結果

1) 性状

3ロットの試料について官能評価を行った。全体的に白色～淡黄褐色の粉末で、においはないかわずかに特異なにおいが感じられた。

2) 確認試験

本品の主成分はフェルラ酸であることから、特には検討せず、第3版既存添加物自主規格「フェルラ酸」の確認試験(1)、(2)及び(3)を準用することとした。

3) 純度試験

① 重金属

規格案に示す方法により、3ロットの試料について6回の繰返し試験を行った。
結果を表1に示す。

表1. 重金属測定結果(Pbとして $\mu\text{g/g}$)

試料ロット	繰 返 し					
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
F020809	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下
F020810	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下
F020811	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下	20以下

②ヒ素

規格案に示す方法により、3ロットの試料について6回の繰返し試験を行った。
結果を表2に示す。

表2. ヒ素測定結果(As_2O_3 として $\mu g/g$)

試料ロット	繰返し					
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
F020809	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下
F020810	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下
F020811	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下	2以下

4)乾燥減量

規格案に示す条件により、3ロットの試料について6回の繰返し試験を行った。
結果を表3に示す。

表3. 乾燥減量測定結果(%)

試料ロット	繰返し					
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
F020809	0.37	0.34	0.30	0.32	0.33	0.35
F020810	0.13	0.17	0.21	0.16	0.15	0.16
F020811	0.04	0.07	0.05	0.03	0.05	0.05

5)強熱残分

強熱残分試験法により、3ロットの試料について6回の繰返し試験を行った。
結果を表4に示す。

表4. 強熱残分測定結果(%)

試料ロット	繰返し					
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
F020809	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
F020810	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01
F020811	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01

6)含量

規格案に示す方法により、3ロットの試料について3回の繰返し試験を行った。
結果を表5に示す。

表5. 含量測定結果(%)

試料ロット	繰返し		
	1回目	2回目	3回目
F020809	65.9	66.2	66.5
F020810	68.3	67.6	67.1
F020811	69.1	68.6	69.5

4. 考察

- 1) 乾燥減量の測定結果は1.0 %以下であるが、天然物で不純物のバラツキの影響が考えられることから、規格値としては暫定的に5.0 %以下と設定したい。
- 2) 強熱残分の試験結果は0.1 %以下であるが、天然物であり不純物のバラツキの影響が考えられることから規格値としては暫定的に0.5 %以下と設定したい。
- 3) 含量については乾燥減量測定結果からは「乾燥したもの」とする必要はないとも考えられるが、乾燥減量規格を5.0 %と設定することから、乾燥物当たりの含量として設定したい。
- 4) 定量用のフェルラ酸は既存添加物「フェルラ酸」の乾燥物のフェルラ酸含量が98.0%以上であり、かつ、定量されることから、既存添加物「フェルラ酸」を使用することとしたい。

以上

コメヌカ油抽出物

Rice bran oil extract

コメヌカ油不けん化物

定義 本品は、米ぬか油から得られた、フェルラ酸を主成分とするものである。

含量 本品を乾燥したものは、フェルラ酸60%以上を含む。

性状 本品は、白色～淡黄褐色の粉末で、においはないかわずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品のメタノール溶液（1→100,000）は、波長234～238nm及び320～324nmに極大吸収部がある。

(2) 本品0.01gにエタノール製10%水酸化カリウム試液10mlを加え、加温して溶かすとき、液は黄色を呈する。

(3) 本品0.01gにアセトン2mlを加えて溶かし、塩化第二鉄のエタノール溶液（1→50）0.1mlを加えるとき、液は赤褐色を呈する。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして20 μ g/g以下（1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml）

(2) ヒ素 As₂O₃として2.0 μ g/g以下（1.0g, 第3法, 装置B）

乾燥減量 5.0%以下（105℃, 3時間）

強熱残分 0.50%以下（1.0g）

定量法 本品を乾燥物換算、約30mgを精密に量り、エタノール70mlを加え加温して溶かし、室温に冷却した後正確に100mlとする。この液2mlを正確に量り、エタノールを加えて正確に100mlとし試料溶液とする。

別に、既存添加物フェルラ酸を乾燥換算、約20mgを精密に量り、エタノールを加えて溶かし正確に100mlにして標準溶液とする。標準溶液の1, 2, 3, 4及び5mlを正確に量り、それぞれにエタノールを加えて正確に100mlとし、322nm付近における極大吸収部での吸光度を測定して検量線を作成する。

試料溶液の322nm付近における極大吸収部での吸光度を測定し、検量線より試料溶液中のフェルラ酸含量を求め、次式により試料のフェルラ酸含量を求める。

$$\text{フェルラ酸の含量} = \frac{\text{検量線より求めた試料溶液のフェルラ酸含量 (mg)} \times 50 \times 100}{\text{試料採取量 (mg)} \times (100 - \text{乾燥減量})} \quad (\%)$$

酵素 10 品目の新規自主規格（案）作成の調査研究

研究者名・所属：金谷 宗昭 エイチビィアイ(株)
 金井 晴彦 合同酒精(株)
 内田 典芳 三共(株)
 北原 昇吾 新日本化学工業(株)
 後藤 京二 大和化成(株)
 大脇 純 ナガセケムテックス(株)
 大門 浩作 ノボザイムズジャパン(株)
 半谷 守弘 天野エンザイム(株)
 浅田 敏 天野エンザイム(株)

日本食品添加物協会 第七部会長

日本食品添加物協会・第七部会・酵素自主規格検討会は、既存添加物酵素 10 品目について新規に自主規格設定のための研究を行ったので、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 76 品目が記載されている。規格の設定は、第七版食品添加物公定書には 4 品目、平成 14 年発行の第三版自主規格には 17 品目及び酵素一般規格が記載されている。平成 13 年度調査研究として新規に検討された 9 品目と、平成 14 年度調査研究として新規に検討した 10 品目を含む品目の状況は次の通りである。

第 7 版食品添加物公定書記載：パパイン、プロメライン、ペプシン、トリプシン

第 3 版自主規格記載： 酵素一般規格、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、カタラーゼ、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、セルラーゼ、トランスグルタミナーゼ、パンクレアチン、プルラナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、リゾチーム、レンネット

平成 13 年度新規検討品目： インベルターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルカナナーゼ、 β -グルコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルコースオキシダーゼ、フィターゼ、ホスホリパーゼ

平成 14 年度新規検討品目： アスコルビン酸オキシダーゼ、ウレアーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、 α -グルコシダーゼ、酸性ホスファターゼ、5'-デアミナーゼ、トランスグルコシダーゼ、ペプチダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ

1. 酵素 10 品目の成分規格（案）

(1) 目的

平成 13 年度の酵素 9 品目の新規自主規格作成の調査研究に引き続き、既存添加物酵素の規格設定を進めるため、第七版食品添加物公定書及び第三版自主規格に記載されていない新規 10 品目を選び、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法及び測定結果について調査研究を行い、この結果に基づき規格(案)を策定し、その妥当性について研究を行った。尚、本年度に検討した酵素 10 品目は、FCCIV 及び JECFA 規格には記載されていない。

(2) 検討方法

第七部会 自主規格検討会(8 社参加)は、10 品目の成分規格について品目毎に作成担当会社を決めた。作成担当会社は、下記の通りである。

- | | |
|---------------------|---------------|
| ① アスコルビン酸オキシダーゼ | ナガセケムテックス(株) |
| ② ウレアーゼ | ナガセケムテックス(株) |
| ③ キシラナーゼ | 新日本化学工業(株) |
| ④ キトサナーゼ | エイチビィアイ(株) |
| ⑤ α -グルコシダーゼ | 大和化成(株) |
| ⑥ 酸性ホスファターゼ | 新日本化学工業(株) |
| ⑦ 5'-デアミナーゼ | 天野エンザイム(株) |
| ⑧ トランスグルコシダーゼ | 天野エンザイム(株) |
| ⑨ ペプチダーゼ | ノボザイムズジャパン(株) |
| ⑩ ポリフェノールオキシダーゼ | 大和化成(株) |

(3) 検討結果並びに考察

検討結果は、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 第三版自主規格の「酵素一般規格」に従い、定義（基原・本質、賦形剤・希釈剤等）、酵素特性を記載し、性状、純度試験、微生物限度の規定、及び確認試験、酵素活性測定法を設定した。
- ③ 定義については、「既存添加物名簿収載品目リスト」の基原に準拠した。尚、製法は、「基原・製法・本質」欄に記載されているが、自主規格では省略した。
- ④ 酵素特性には、参考としてECナンバーを記載した。尚、既存添加物名簿に記載される酵素の名称は、特定の酵素を除き機能を表す名称であり、一般的に酵素は基原により基質特異性が異なるため、品目により複数のECナンバーを記載した。
- ⑤ 純度試験は、「酵素一般規格」の規格と同一とした。ただし、ポリフェノールオキシダーゼは、酵素たん白に銅を含み（約480 μ g/g）活性発現に銅を必要とする銅酵素であるため、重金属は純度試験として規定することは不適切で、酵素一般規格を適用しないこととした。
- ⑥ 微生物限度試験は、「酵素一般規格」の規格と同一とした。尚、ウレアーゼは、酒質保全剤としての醸造用資材規格の細菌数規格100,000/g以下に対し、厳しい規格となる。
- ⑦ 酵素活性測定法は、酵素の基原、性質により特性が異なるため、品目により複数の測定法を設定した。更に測定条件（反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等）を選択できることとし、種々性質の異なる酵素にも対応できるようにした。
- ⑧ 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、定めないこととした。
- ⑨ 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、各品目、3ロットの繰り返し試験を行った結果、測定値の全てが規格（案）に適合し、妥当性が検証された。尚、試験データは、全て市販の酵素剤により取得した。

各品目の規格案につき、確認試験、酵素活性測定法等の検討概要を次に示す。

1) アスコルビン酸オキシダーゼ

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L-アスコルビン酸に作用させ、減少したL-アスコルビン酸を吸光度変化で測定し定量する方法である。尚、操作法の中で、分光光度計の使用方法によって操作法を一部選択できるように、「必要に応じこの液に水3mlを加え振り混ぜる」を入れ、酵素活性の単位計算式も全液量(ml)を4.1（又は7.1）とした。

2) ウレアーゼ

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、酵素を基質尿素に作用させ、生成したアンモニアをニトロプルシッド反応で発色させ、吸光度を測定し定量する方法である。

3) キシラーナーゼ

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、1種類の測定法を設定し、他に第三版既存添加物自主規格に記載されているヘミセルラーゼ活性測定法第1法又は第2法によっても試験できるよう規格を設定した。キシラーナーゼ活性測定法は、酵素をレマゾールで染色したアラビノキシラン基質に作用させ、生成した基質分解物を比色測定して求める方法である。

4) キトサナーゼ

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、2種類の測定法を設定した。第1法は、酵素を合成基質であるp-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミドに作用させ、生成したp-ニトロフェノールを吸光度により測定する方法である。第2法は、酵素を基質キトサンに作用させ、キトサンの低分子化に伴い生成するアミノ糖（グルコサミン末端）を吸光度により測定する方法である。この方法は、グルコサミンの定量法である Rondle-Morgan 法^{*} に準じたもので、アミノ糖をアルカリ性下でアセチルアセトンと加熱縮合させたのち、塩酸酸性において、エールリッヒ試薬と反応させることにより呈色する赤紫色を測定する方法である。*）参考文献：キチン・キトサン研究会編、「キチン・キトサン実験マニュアル」、技報堂出版、P.135(1994)

5) α-グルコシダーゼ

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、1種類の測定法を設定した。この方法は、酵素を基質マルトースに作用させ、生成したブドウ糖をキットを用い測定する方法である。又、α-グルコシダーゼの中には糖転移作用の強いトランスグルコシダーゼがあり、8) トランスグルコシダーゼの活性測定法により試験を行うこともできるよう設定した。

6) 酸性ホスファターゼ

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p-ニトロフェニルリン酸に作用させ、生成したp-ニトロフェノールを発色させ、吸光度を測定し定量する方法である。

7) 5'-デアミナーゼ

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5'AMP-2Na(アデノシン5'-リン酸二ナトリウム)に作用させ、生成した5'IMP-Na(イノシン5'-リン酸ナトリウム)を吸光度を測定し定量する方法である。

8) トランスグルコシダーゼ

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α-メチル-D-グルコシドに作用させ、生成したブドウ糖をグルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンを用いた酵素的な方法により比色測定する方法である。

9) ペプチダーゼ

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、4種類の測定法を設定した。第1法は、酵素を基質GTG(L-グルタミル-L-チロシル-L-グルタミン酸)に作用させ、生成したL-グルタミン酸をo-フタル酸アルデヒド反応で比色測定して求める方法である。第2法は、酵素を基質L-ロイシル-ρ-ニトロアニリドに作用させ、生成したρ-ニトロアニリンを比色測定して求める方法である。第3法は、Leu-Gly-Gly(L-ロイシル-グ

リシル-グリシン) を基質として酵素を作用させ、生成するアミノ酸をニンヒドリンの呈色反応を利用して、波長 570nm における吸光度を測定して定量する方法である。第 4 法は、L-ロイシル-p-ニトロアニリドを基質として酵素を作用させ、生成する p-ニトロアニリンを p-(ジメチルアミノ)ケイ皮アルデヒド/エタノール試液で発色させ、波長 540nm における吸光度を測定して定量する方法である。

10) ポリフェノールオキシダーゼ

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、2 種類の測定法を設定した。第 1 法は、酵素を基質フェノール、4-アミノアンチピリンに作用させ、酸化縮合反応により生成するキノンイミン色素を比色定量して測定する方法である。第 2 法は、酵素を基質シリンガルダジン基質に有酸素下にて作用させ、生成するテトラメトキシ-アゾ-ビス-メチレン-キノンを比色定量して測定する方法である。

以上、新規に酵素 10 品目の成分規格(案)、酵素活性測定法(案)を策定した結果、各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。尚、各品目とも酵素の基原、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、単位定義も含め国際整合性を踏まえて、更なる調査研究が必要であると考えられる。

(4) 規格案

別紙に示す 10 品目の成分規格(案)、各酵素活性測定法(案)のとおり。

以上

アスコルビン酸オキシダーゼ

Ascorbate oxidase

定 義 本品は、ウリ、カボチャ、キャベツ、キュウリ若しくはホウレンソウより、又は糸状菌 (*Trichoderma lignorum*) 若しくは放線菌 (*Eupenicillium brefeldianum*) の培養物より得られた、L-アスコルビン酸を酸化する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、L-アスコルビン酸を酸化してデヒドロアスコルビン酸を生成する。

EC ナンバー : (参考) EC 1.10.3.3

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

確認試験 アスコルビン酸オキシダーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

純度試験 (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 Pbとして $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 一般試験法・酵素活性測定法中のアスコルビン酸オキシダ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) はアスコルビン酸オキシダーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

ウレアーゼ

Urease

定 義 本品は、乳酸菌(*Lactobacillus fermentum*) 又は細菌(*Arthrobacter*)の培養物より得られた、尿素を加水分解する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、尿素を加水分解して二酸化炭素とアンモニアを生成する。

EC ナンバー : (参考) EC 3.5.1.5

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。

確認試験 ウレアーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

純度試験 (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 Pbとして $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 一般試験法・酵素活性測定法中のウレア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)はウレアーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

キシラナーゼ

Xylanase

定 義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*) の培養物より得られた、キシランを分解する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、キシランを加水分解する。

ECナンバー (参考) : EC 3. 2. 1. 32 (Endo-1, 3- β -D-Xylanase)

EC 3. 2. 1. 8 (Endo-1, 4- β -D-Xylanase)

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 酵素活性測定法のキシラナーゼ活性測定法又は第三版自主規格に記載されているヘミセルラーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、キシラナーゼ活性測定法、又はヘミセルラーゼ活性測定法第1法又は第2法の酵素活性を示す。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして40 μ g/g以下 (0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして5.0 μ g/g以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As₂O₃として4.0 μ g/g以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法のキシラナーゼ活性測定法、又は第三版自主規格に記載されているヘミセルラーゼ活性測定法第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, 試料希釈液等) は、キシラナーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

キトサナーゼ

Chitosanase

定 義 本品は、細菌(Aeromonas, Bacillus),糸状菌(Aspergillus niger, Trichoderma reesei, Trichoderma viride, Verticillium)の培養物より得られた、キトサンを分解する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、キトサンを加水分解する。

ECナンバー (参考): EC 3. 2. 1. 132

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 キトサナ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。

純度試験 (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 Pbとして $5.0\mu\text{g/g}$ 以下(2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下(0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法のキトサナーゼ活性測定法 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, 試料希釈液等)は、キトサナーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

α-グルコシダーゼ

α-Glucosidase

定 義 本品は、糸状菌 (Absidia, Acremonium, Aspergillus) , 細菌 (Bacillus, Pseudomonas) 若しくは酵母(Saccharomyces)の培養物より得られた、α-D-グルコシド結合を加水分解する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、マルトースやオリゴ糖のα-D-グルコシド結合を切断し、同時に転移反応で非醗酵性の糖を生成する。本酵素の至的pHは起源により異なり、5～7である。

ECナンバー(参考) : EC 3.2.1.20 α-D-Glucosidase

EC 3.2.1.10 Oligo-1,6-Glucosidase

性 状 本品は、白～濃褐色の粉末又は無色～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 グルコシダーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして40μg/g以下(0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして5.0μg/g以下(2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As₂O₃として4.0μg/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 一般試験法・酵素活性測定法中のα-グルコシダーゼ活性測定法(マルトース分解法)、又はトランスグルコシダ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α-グルコシダーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

酸性ホスファターゼ

Acid phosphatase

定 義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) の培養物より得られた、種々のリン酸モノエステルを分解する酵素である。乳糖，デキストリン，ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

酵素特性 本品は、種々のリン酸モノエステルを加水分解する。

ECナンバー (参考) : EC3.1.3.2 (Acid phosphatase)

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 酸性ホスファターゼ活性測定法に準じて試験を行うとき，酵素活性を示す。

純度試験 (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 Pbとして $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき，本品1gにつき，細菌数は50,000以下である。また，大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法の酸性ホスファタ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，酸性ホスファターゼの基原，性質に応じて適切なものを選択する。