

# 5'-デアミナーゼ

5'-Deaminase

**定 義** 本品は、糸状菌 (*Aspergillus melleus*, *Aspergillus oryzae*)の培養物より得られた、5'-アデニル酸を脱アミノ化して5'-イノシン酸を生成する酵素である。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、5'-アデニル酸を脱アミノ化して5'-イノシン酸を生成する。

ECナンバー (参考) : EC 3.5.4.6 (AMP deaminase)

**性 状** 本品は、白～褐色の粉末、又は無色～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** 酵素活性測定法の5'-デアミナ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  $\text{As}_2\text{O}_3$ 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5'-デア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5'-デアミナーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

# トランスグルコシダーゼ

Transglucosidase

**定義** 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus usami*), 細菌 (*Sulfolobus solfataricus*) の培養物より得られた、オリゴ糖に糖を転移して非発酵性の糖にする転移酵素である。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 $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を切り、同時にグルコシド基を転移する。

ECナンバー (参考): EC 3.2.1.20 ( $\alpha$ -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～濃褐色の液体である。

**確認試験** 酵素活性測定法のトランス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40 $\mu$ 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 $\mu$ g/g以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0 $\mu$ 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) はトランス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。

# ペプチダーゼ

Peptidase

**定 義** 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*) 若しくは細菌 (*Bacillus*, *Lactococcus lactis*) の培養液より得られたもので、タンパク質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、タンパク質およびペプチドを分解し、アミノ酸などを生成する。

EC ナンバー : (参考) EC3.4.11.1 Aminopeptidase (cytosol)  
EC3.4.11.2 Aminopeptidase (microsomal)  
EC3.4.11.3 Cystyl aminopeptidase  
EC3.4.11.4 Tripeptide aminopeptidase  
EC3.4.11.5 Proline iminopeptidase  
EC3.4.11.6 Arginine aminopeptidase  
EC3.4.11.7 Asparatate aminopeptidase

**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** 酵素活性測定法のペプチ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  $\text{As}_2\text{O}_3$ 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** 酵素活性測定法中のペプチダーゼ活性測定法第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) はペプチダーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

# ポリフェノールオキシダーゼ

Polyphenol oxidase

**定義** 本品は、糸状菌 (*Alternaria*, *Aspergillus niger*, *Cochlosphaera*)、担子菌 (*Cyathus*, *Polyporus cinereus*, *Pycnoporus coccineus*, *Polyporus versicolor*, *Trametes*) の培養物より得られた、ポリフェノールの水酸基を酸化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、銅を含む酵素で、ポリフェノールの水酸基を酸化分解してキノンとなり、メラニンを生成する。

ECナンバー (参考) : EC 1.10.3.1 Polyphenol oxidase  
EC 1.10.3.2 Laccase

**性状** 本品は、白～淡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** ポリフェノール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) 鉛 Pbとして $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (2.0g, 第1法)

(2) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ 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ポリフェノールオキシダーゼ活性測定法第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) はポリフェノール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。

注) ポリフェノールオキシダーゼは、酵素蛋白に銅イオンが結合しており (約 $480 \mu\text{g/g}$  ラッカーゼダイワY120)、これを酵素蛋白から除去すると活性が発現しない。

従って、ポリフェノールオキシダーゼに限っては、重金属の含有量が、酵素一般規格 ( $40 \mu\text{g/g}$ 以下) に適合しない。

## アスコルビン酸オキシダーゼ活性測定法

アスコルビン酸オキシダーゼはL-アスコルビン酸をデヒドロアスコルビン酸に酸化する。減少したL-アスコルビン酸を波長 245nm の吸光度の変化で測定し、定量する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、L-アスコルビン酸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、本品に酵素希釈液(又は適切な緩衝液、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 0.08~0.35 単位/ml の範囲である。

### (2) 基質溶液

L-アスコルビン酸 0.088g を量り、0.001mol/l 塩酸試液(0.001mol/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む)を加えて溶かし、50ml とする。(10mmol/l L-アスコルビン酸溶液)

この液を 0.2mol/l リン酸二水素カリウム試液(0.001mol/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む)で 10 倍に希釈して基質溶液とする。用時調製する。

### (3) 操作法

試験管に基質溶液 0.5ml 及び 0.01mol/l リン酸二ナトリウム試液 0.5ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間放置した後、試料溶液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 5 分間放置した後、0.2mol/l 塩酸試液 3 ml を正確に加え振り混ぜて反応を停止する。必要に応じこの液に水 3 ml を加え振り混ぜる。この液について水を対照として波長 245nm における吸光度を測定する。

( $A_5$ )

別に、基質溶液 0.5ml 及び 0.01mol/l リン酸二ナトリウム試液 0.5ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間放置した後、0.2mol/l 塩酸試液 3 ml を正確に加え振り混ぜた後、試料溶液 0.1ml を正確に加え以下同様に操作し、吸光度を測定する。(  $A_0$  )

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  $1 \mu\text{mol}$  の L-アスコルビン酸を酸化する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_0 - A_5) \times 4.1 \text{ (又は 7.1)}}{10.0 \times 5 \times 0.1 \times W}$$

$A_0$  : 対照液の吸光度

$A_5$  : 反応液の吸光度

4.1 (又は 7.1) : 全液量 (ml)

10.0 : アスコルビン酸の上記測定条件下でのミリモル分子吸光係数 ( $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$ )

5 : 反応時間 (分)

0.1 : 試料溶液量 (ml)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

### (4) 試薬・試液

#### 1) 酵素希釈液 (0.05% BSA を含む 10mM リン酸二ナトリウム試液)

リン酸二ナトリウム、無水 1.42g と BSA(牛血清アルブミン)0.5g を水に溶かして 1,000ml とする。

#### 2) BSA(牛血清アルブミン)

市販試薬 アルブミン、ウシ血清製、Fraction V

たとえば、和光純薬工業製(製品番号 013-07492) 又は同等品が使用できる。

- 3) L-アスコルビン酸  
市販試薬特級
- 4) 0.001mol/l 塩酸試液(0.001mol/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む)  
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(市販試薬特級)58.5mg を量り、0.01mol/l 塩酸 20ml を加えて溶かし、水を加えて 200ml とする。
- 5) 0.2mol/l リン酸二水素カリウム試液(0.001mol/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む)  
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(市販試薬特級)58.5mg 及びリン酸二水素カリウム(市販試薬特級)5.44g を水に溶かし、200ml とする。
- 6) 0.01mol/l リン酸二ナトリウム試液  
リン酸二ナトリウム、無水 284mg を水に溶かし、200ml とする。

## ウレアーゼ活性測定法

尿素を基質としてウレアーゼを作用させると、尿素は加水分解され二酸化炭素とアンモニアを生成する。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、波長 640nm の吸光度を測定して定量する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、アンモニアの生成が試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に水(又は適切な緩衝液、塩類溶液)を加えて溶かし、試料溶液とする。(試料が不溶性の場合は良く振り混ぜた分散液を直ちに採取する。) その濃度は、通例 0.2~1.0 単位/ml の範囲である。

### (2) 基質溶液

尿素 0.60g を水に溶かして 100ml とする。用時調製する。

### (3) 操作法

試験管に試料溶液 0.5ml 及び 0.1mol/l 酢酸緩衝液 2.5ml を正確に量り、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 5 分間放置した後、予め  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で加温した基質溶液 1.0ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で正確に 30 分間放置した後、10%トリクロロ酢酸溶液 4 ml を正確に加え振り混ぜて反応を停止する。(酵素反応液)

別に、試料溶液 0.5ml 及び 0.1mol/l 酢酸緩衝液 2.5ml を正確に量り、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 35 分間放置した後、10%トリクロロ酢酸溶液 4 ml を正確に加えて振り混ぜた液に、基質溶液 1.0ml を正確に加える。(対照液)

酵素反応液及び対照液を各々 2 ml 正確に採り、それぞれに水を加えて正確に 20ml とし、希釈液とする。(試料が不溶性の場合は、酵素反応液及び対照液を遠心分離(5,000rpm 以上、5 分間)した後、上澄液 2 ml で希釈液を調製する。)

酵素反応液と対照液の各希釈液 4 ml を正確に採り、発色液 A 2 ml を正確に加え静かに混和し、次いで発色液 B 2 ml を正確に加え混和後  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させ発色させる。この液につき、水を対照とし、波長 640nm における吸光度を測定する。

別に、硫酸アンモニウム標準液(0~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を正確に 2 ml、10%トリクロロ酢酸溶液 1 ml、0.1mol/l 酢酸緩衝液 0.625ml を採り、水を加えて正確に 20ml とした液について、上記希釈液と同様の操作で吸光度を測定し、検量線を作成する。

検量線から酵素反応液のアンモニア濃度を求める。

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  $\mu\text{mol}$  のアンモニアを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{A \times 8.0}{17.03 \times 30 \times 0.5 \times W}$$

A	: 検量曲線より求めた酵素反応液中のアンモニア濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
8.0	: 全液量 (ml)
17.03	: アンモニアの分子量
30	: 反応時間 (分)
0.5	: 試料溶液量 (ml)
W	: 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(4) 試薬・試液

1) 0.1mol/l 酢酸緩衝液

酢酸 6.01g、エタノール、無水 200ml を水に溶かし、1,000ml とする。(A液)

酢酸ナトリウム三水和物 13.61g、エタノール、無水 200ml を水に溶かし、1,000ml とする。(B液)

A液とB液を混合してpH4.0に調整する。

2) 10%トリクロロ酢酸溶液

トリクロロ酢酸 50g を水に溶かし、500ml とする。

3) 発色液A

フェノール 5g、ニトロプルシッドナトリウム 25mg を水に溶かし、500ml とする。冷暗所に保存する。

4) 発色液B

水酸化ナトリウム 5.0g 及び次亜塩素酸ナトリウム溶液(市販試薬、有効塩素濃度約5%)7.5ml を水に溶かし、500ml とする。用時調製する。

5) 硫酸アンモニウム標準液

硫酸アンモニウム 200mg を正確に採り、水に溶かして 200ml とする。(1 mg/ml)

この液を用いて、硫酸アンモニウム 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の液を調製する。(アンモニアとして、0, 5.2, 10.3, 15.5, 20.6, 25.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )



## キシラナーゼ活性測定法

レマゾールで染色した小麦アラビノキシラン基質に酵素を作用させ、転換されていない基質をエタノールで沈殿させ、沈殿しなかったレマゾール染色基質の分解生成物による上澄みの青色を比色定量する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、分解生成物による上澄みの青色の増加が、試料濃度に比例する範囲内の試料濃度になるように、本品に適量の水（又は適切な緩衝液、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 0.4～1.4 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

アゾー小麦アラビノキシラン 0.50g を正確に量り、0.1mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）（又は適切な緩衝液）を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

### (3) 酵素活性標準曲線

4,000 単位相当の FXU 標準酵素を正確に量り、0.1mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）（又は適切な緩衝液）を加えて溶かし、正確に 200ml とする。この溶液 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml 及び 7 ml を正確に量り、0.1mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）（又は適切な緩衝液）を加えて正確に 100ml とする。それぞれの液 1 ml 中には、酵素活性が 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 及び 1.4 単位含まれる。試験管にこの酵素溶液 0.1ml を正確に量り、50±0.5℃で 10 分間放置した後、基質溶液 0.9ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。50±0.5℃で正確に 30 分間放置した後、停止液 5 ml を加え、直ちに振り混ぜる。30 分間放置した後、4,000rpm で 15 分間遠心分離し、20 分以内に上澄みの 585nm における吸光度を測定する。横軸に酵素活性（単位/ml）、縦軸に吸光度をとり、酵素活性標準曲線とする。

### (4) 操作法

試験管に試料溶液 0.1ml を正確に量り、50±0.5℃で 10 分間放置した後、基質溶液 0.9ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。50±0.5℃で正確に 30 分間放置した後、停止液 5 ml を加え、直ちに振り混ぜる。30 分間放置した後、反応液を 4,000rpm で 15 分間遠心分離し、20 分以内に上澄みの 585nm における吸光度を測定する。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、次式により決定される。

$$\text{本品中の酵素活性の単位（単位/g 又は単位/ml）} = \frac{C}{W}$$

但し、C : 標準曲線から読み取った酵素活性（単位/ml）

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量（g 又は ml）

### (5) 試薬・試液

#### 1) 0.1mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）

リン酸二水素ナトリウム一水和物 12.1g 及びリン酸水素二ナトリウム二水和物 2.19g を水約 900ml に溶かし、水酸化ナトリウム溶液または塩酸で pH 6.0 に調整し、更に水を加え全量を 1,000ml とする。

#### 2) アゾー小麦アラビノキシラン

たとえば、Megazyme 製（製品番号 S-AWAXP）又は同等品が使用できる。

#### 3) FXU 標準酵素、定量用

Novozymes A/S 製（約 3,500 単位/g）を用いる。

#### 4) 停止液

2 mol/l 塩酸 7 ml にエタノール、無水を加え、全量を 1,000ml とする。

# キトサナーゼ活性測定法

## 第1法

酵素を基質 p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミニドに作用させ、生成する p-ニトロフェノールの量を測定する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、生成する p-ニトロフェノール量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1.5~2.5単位/mlである。

### (2) 基質溶液

p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミニド137mgを正確に量り、クエン酸緩衝液 (pH4.5) を加えて溶かし、正確に100mlとする。用時調製する。

### (3) p-ニトロフェノール標準液の調製

p-ニトロフェノール125mgを正確に量り、クエン酸緩衝液 (pH4.5) を加えて溶かし正確に1000mlとする。この液をさらにクエン酸緩衝液 (pH4.5) で希釈し、1 ml中に12.5、25、37.5、50、62.5 μgの各濃度の p-ニトロフェノール標準液を調製する。

### (4) p-ニトロフェノール検量線の作成

各濃度の p-ニトロフェノール標準液0.4mlを正確に量り、Sørensen緩衝液3 mlを加え、よく振り混ぜた後、波長400nmにおける吸光度を測定する。対照としてクエン酸緩衝液(pH4.5)0.4mlを正確に量り、以下同様に操作し吸光度を測定する (A<sub>0</sub>)。

縦軸に吸光度差、横軸に p-ニトロフェノール量 (μg) をとり、検量線とする。

### (5) 操作法

基質溶液0.2mlを正確に量り、40±0.5℃で5分間加温した後、あらかじめ40±0.5℃に加温した試料溶液0.2ml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、Sørensen緩衝液3 mlを正確に加えて、振り混ぜ、反応を停止し、波長400nmにおける吸光度 (A<sub>T</sub>) を測定する。

別に試料溶液0.2mlを正確に量り、Sørensen緩衝液3 mlを正確に加えて振り混ぜた後、基質溶液0.2mlを正確に加え、直ちに振り混ぜ、以下同様に操作する (A<sub>B</sub>)。

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 μmolの p-ニトロフェノール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)

$$=(A_T - A_B) \times F \times \frac{1}{139.11} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

A<sub>T</sub> : 反応液の吸光度

A<sub>B</sub> : 対照液の吸光度

F : 吸光度差が 1.000に相当する p-ニトロフェノール量 (μg、検量線より算出)

139.11 : p-ニトロフェノールの分子量

0.2 : 試料溶液量

10 : 反応時間

W : 試料溶液 1 ml中の試料の量 (g又はml)

(6) 試薬・試液

- 1) p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミニド  
例えばSigma製 (製品番号 N9376) 又は同等品が使用できる。
- 2) クエン酸緩衝液 (pH4.5)  
第1液: クエン酸21.0gに水を加えて溶かし、1000mlとする。  
第2液: リン酸二ナトリウム71.6gに水を加えて溶かし、1000mlとする。  
第1液と第2液を混和し、両液を用いてpH4.5に調整する。
- 3) p-ニトロフェノール (市販試薬特級)  
例えば和光純薬工業製 (製品番号 143-02242) 又は同等品が使用できる。
- 4) 0.2mol/l ホウ酸ナトリウム溶液  
ホウ酸ナトリウム76.274gに水を加えて溶かし、1000mlとする。
- 5) 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液  
水酸化ナトリウム4.0gに水を加えて溶かし、1000mlとする。
- 6) Sørensen緩衝液  
0.2mol/l ホウ酸ナトリウム溶液に0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えてpH9.8に調整する。

## 第2法

酵素を基質キトサンに作用させ、キトサンの低分子化にともない生成するアミノ糖の量を測定する方法である。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、生成するアミノ糖量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0.03~0.05単位/mlである。

(2) 基質溶液

キトサン0.5gを正確に量り、攪拌している0.75mol/l 酢酸90mlに加えて溶かし、10mol/l 水酸化ナトリウム溶液でpH5.6に調整し、水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

(3) グルコサミン塩酸塩標準液の調製

グルコサミン塩酸塩200mgを正確に量り、水を加えて溶かし正確に1000mlとする。この液をさらに水で希釈し、1 ml中に5、10、15、20 μgの各濃度のグルコサミン塩酸塩標準液を調製する。

(4) グルコサミン塩酸塩検量線の作成

各濃度のグルコサミン塩酸塩標準液1 mlを正確に量り、アセチルアセトン試薬1 mlを加え、ガラス球或いはアルミホイルで試験管の口を塞ぎ、100℃で20分間加熱する。冷却後、エタノール3 mlおよびエールリッヒ試薬1 mlを添加し、65~70℃で10分間加熱する。

冷却後、3000rpmで10分間遠心分離し、その上清について530nmにおける吸光度を測定する。

対照として水1 mlを正確に量り、以下同様に操作し、吸光度を測定する ( $A_0$ )。

縦軸に吸光度差、横軸にグルコサミン塩酸塩量 (μg) をとり、検量線とする。

### (5) 操作法

基質溶液0.5mlを硬質ガラス製遠沈管(16.5×105mm)に正確に量りとり、40±0.5℃で5分間加温した後、あらかじめ40±0.5℃で10分間加温した試料溶液0.5ml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、アセチルアセトン試薬1mlを正確に加えて、軽く振り混ぜ、遠沈管の口にアルミホイルで栓を施し、沸騰水浴中で20分間加熱し、直ちに流水で室温程度にまで冷却する。

次にエタノール3mlを正確に加えてよく振り混ぜ、さらにエールリッヒ試薬1mlを正確に加えてよく振り混ぜ、直ちに67±2℃の水浴中に正確に10分間放置した後、直ちに流水で室温程度まで冷却する。

これを3000rpm、10分間遠心分離して、その上清区分について波長530nmにおける吸光度(A<sub>T</sub>)を測定する。別に対照として基質溶液にアセチルアセトン試薬を加えた後、試料溶液を加えて以下同様に操作を行う(A<sub>B</sub>)。

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 μmolのグルコサミン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)

$$= (A_T - A_B) \times F \times \frac{1}{215.64} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

A<sub>T</sub> : 反応液の吸光度

A<sub>B</sub> : 対照液の吸光度

F : 吸光度差が1.000に相当するグルコサミン塩酸塩量(μg、検量線より算出)

215.64 : グルコサミン塩酸塩の分子量

0.5 : 試料溶液量

10 : 反応時間

W : 試料溶液1ml中の試料の量(g又はml)

### (6) 試薬・試液

#### 1) キトサン

例えばSigma製(製品番号C3646)又は同等品が使用できる。

#### 2) 0.75mol/l 酢酸溶液

酢酸、希75mlを量り、水を加えて100mlとする。

#### 3) 10mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム40gに水を加えて溶かし、100mlとする。

#### 4) グルコサミン塩酸塩

例えばSigma製(製品番号G4875)又は同等品が使用できる。

#### 5) アセチルアセトン試薬

アセチルアセトン1mlを0.5mol/l炭酸ナトリウム50mlに添加し、よく振り混ぜる。用時調製する。

#### 6) アセチルアセトン(市販試薬特級)

例えば和光純薬工業製(製品番号013-00493)又は同等品が使用できる。

#### 7) 0.5mol/l炭酸ナトリウム溶液

炭酸ナトリウム、無水26.5gを水に溶かして500mlとする。

- 8) エールリッヒ試薬  
p-ジメチルアミノベンズアルデヒド0.8gをエタノール30mlに溶かし、次いで濃塩酸30mlを加え、直ちに冷却する。用時調製する。
- 9) p-ジメチルアミノベンズアルデヒド（市販試薬特級）  
例えば和光純薬工業製（製品番号 047-18042）又は同等品が使用できる。

## $\alpha$ -グルコシダーゼ 活性測定法

### マルトース分解方法

酵素をマルトースに作用させ、 $\alpha$ -1,4 グルコシド結合の切断に伴って遊離するグルコースを測定する方法である。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、測定時の吸光度差が 0.3 ~ 0.5 の範囲に入るように試料希釈液（又は水、適切な緩衝液、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 0.012 ~ 0.020 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

結晶マルトース・一水和物 2.1 g を正確に量り、水を加え攪拌溶解し、0.5mol/l リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.65) 10 ml 及び水を加えて 100 ml とする。用時製する。

#### (3) ブドウ糖検量線の作成

市販のグルコース C-II テスト ワコーに梱包されているブドウ糖標準液 II (2 mg/ml) を、用時水で 200 倍(0.01 mg/ml)と 100 倍(0.02 mg/ml)に正確に薄め、この希釈液 4ml と発色液 1ml を正確に量って、よく混ぜ、37~40°C の恒温水槽に 25 分間放置した後、水を対照として波長 505nm における吸光度 ( $E_{ST}$ ) を測定する。

別に、ぶどう糖標準液の代わりに水を用い、以下同様に操作して吸光度 ( $E_{SB}$ ) を測定し、 $\Delta E$  ( $E_{ST} - E_{SB}$ ) とブドウ糖含有量の関係から検量線を作成する。用時検量線を作成する。

#### (4) 操作法

基質溶液 1 ml を正確に量り、37±0.5 °C で 5 分間放置した後、あらかじめ 37±0.5 °C に保温した基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜる。この液を 37±0.5 °C で正確に 10 分間放置した後、0.5 mol/l 塩酸 1 ml を正確に加えて、直ちに振り混ぜる。この液を室温で放置する。

別に対照として、基質溶液 1 ml を正確に量り、37±0.5 °C で 5 分間放置した後、0.5 mol/l 塩酸 1 ml を正確に加えて振り混ぜ、この液を 37±0.5 °C で正確に 10 分間放置した後、あらかじめ 37±0.5 °C に保温した試料溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜる。

それぞれに 0.5 mol/l 水酸化ナトリウム 1 ml を正確に加え、振り混ぜ、各反応液について直ちにブドウ糖含有量 (mg/ml) を測定する。

ブドウ糖量の測定は、グルコース C-II テスト ワコーを用い、その発色試液 4ml を正確に量り、反応液 1 ml を正確に加えて、よく混ぜ、37~40°C の恒温水槽に 20 分間放置した後、波長 505nm における吸光度 ( $E_T$ ) を測定する。

別に、反応液の代わりに水を用い、以下同様に操作して吸光度 ( $E_B$ ) を測定する。

あらかじめブドウ糖標準液を用いて作成した検量線から、上記操作で測定された吸光度に対するブドウ糖含量  $G_T$  および  $G_B$  (mg/ml) をそれぞれ求める。

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 2  $\mu$ mol のグルコースを生成する酵素量を 1 単位とする。

次式により試料溶液のマルトース分解力を算出する。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{G_T - G_S}{0.18} \times 4 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

$G_T$  : 反応液(試験)のグルコース濃度 ( mg/ml )

$G_B$  : 反応液(対照)のグルコース濃度 ( mg/ml )

0.18 : 1  $\mu$ mol に対応するグルコース量 ( mg )

4 : 反応液量 ( ml )

2 : 1単位の酵素が 1 分間に生成するグルコース量 (  $\mu$ mol )

10 : 反応時間 ( 分 )

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 ( g )

#### (5) 試薬・試液

##### 1) 0.5 mol/l リン酸二水素ナトリウム溶液

リン酸二水素ナトリウム 60 g を水に溶かし 1,000 ml とする。

##### 2) 0.5 mol/l リン酸水素二ナトリウム溶液

リン酸水素二ナトリウム・12水和物 179 g を約 900 ml の水に加温して溶かし、1,000 ml とする。

##### 3) 0.5 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 6.6 )

0.5 mol/l リン酸水素二ナトリウム溶液に 0.5 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液を加えて pH を 6.6 に調整する。25 °C で保存する。(混合比は約 54 : 46)

##### 4) 希釈用液 ( 50 m mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 7.00 ) )

0.5 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 6.6 ) 100 ml に水を加えて 1,000 ml とする。pH が 7.00  $\pm$  0.05 であることを確認する。用時調製する。

##### 5) 0.5 mol/l 塩酸

塩酸 42 ml に水を加えて 1,000 ml とする。

##### 6) 0.5 mol/l 水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウム 20.0 g を水に溶かし、1,000 ml とする。

##### 7) 発色試薬

グルコース C-Ⅱ テスト ワコーを用いる。発色剤 1びんを同キット付属の緩衝液 1びんに溶かす。(添付の説明書に従い調製し、保存すること。)

## 酸性ホスファターゼ活性測定法

基質とする  $p$ -ニトロフェニルリン酸に酵素を作用させ、酵素作用によって  $p$ -ニトロフェノールを生成する。 $p$ -ニトロフェノールをアルカリ性溶液中で黄色に発色させ、波長 440nm における吸光度を測定し、定量する。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、 $p$ -ニトロフェノール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、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。その濃度は、通例 1.25~6.25 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

$p$ -ニトロフェニルリン酸二ナトリウム・六水和物 186 mg を正確に量り、0.05mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。用時調製する。

### (3) $p$ -ニトロフェノール検量線の作成

$p$ -ニトロフェノール 0.0334g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 1,000ml とする (標準原液)。この液 25ml, 50ml, 100ml を正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 150 ml とし標準溶液とする。これらの  $p$ -ニトロフェノール標準溶液及び標準原液は 1 ml 中に  $p$ -ニトロフェノール 0.04, 0.08, 0.16 及び 0.24  $\mu$ mol を含む。各濃度の  $p$ -ニトロフェノール標準溶液及び標準原液 4 ml を正確に量り、0.05mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5) 0.2ml を加え、更に水酸化ナトリウム試液 1 ml を正確に加え振り混ぜる。この液につき、水を対照として波長 440nm における吸光度  $A_s$  を測定する。

別に、標準溶液の代わりに水を用いて以下同様に操作し、吸光度  $A_b$  を測定する。

縦軸に吸光度差 ( $A_s - A_b$ )、横軸にそれぞれの液 4 ml 中の  $p$ -ニトロフェノール量 ( $\mu$ mol) をプロットし、吸光係数 ( $\epsilon$ ) を求める。

$$\epsilon = (A_s - A_b) / (p\text{-ニトロフェノール濃度}(\mu\text{mol/ml}) \times 4)$$

吸光係数は通常 1.20 である。

### (4) 操作法

基質溶液 4 ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間放置した後、試料溶液 0.2ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 20 分間放置した後、水酸化ナトリウム試液 1 ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液につき、水を対照として波長 440nm における吸光度  $A_{20}$  を測定する。

別に、対照として基質溶液 4 ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 20 分間放置した後、水酸化ナトリウム試液 1 ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。その後、試料溶液 0.2ml を正確に加え、以下同様に操作し吸光度  $A_b$  を測定する。反応停止後 30 分以内に吸光度を測定する。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、60 分間に 1  $\mu$ mol の  $p$ -ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_{20} - A_b)}{\epsilon} \times \frac{60}{20} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

$A_{20}$  : 酵素反応液の吸光度

$A_b$  : 対照液の吸光度

$\epsilon$  :  $p$ -ニトロフェノール吸光係数

20 : 反応時間(分)

0.2 : 反応系試料溶液の添加量(ml)

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)



(5) 試薬・試液

- 1)  $p$ -ニトロフェニルリン酸ニナトリウム・六水和物（市販試薬特級）

たとえば，和光純薬工業製（製品番号 149-02342）又は同等品が使用できる。

- 2)  $p$ -ニトロフェノール（市販試薬特級）

たとえば，和光純薬工業製（製品番号 143-02242）又は同等品が使用できる。

## 5'-デアミナーゼ活性測定法

5'AMP-2Na(アデノシン 5'-リン酸二ナトリウム)を基質として酵素を作用させ、酵素作用によって5'IMP-Na(イノシン 5'-リン酸ナトリウム)を生成する。5'AMP-2Naと5'IMP-Naの吸光波長の違いの最も大きい波長 265nm における吸光度を測定し定量する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、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。その濃度は、通例 5 ~30 単位/ $\mu$ l である。

### (2) 基質溶液

あらかじめ、5'AMP-2Na(アデノシン 5'-リン酸二ナトリウム)を 105°C、4 時間乾燥し、乾燥減量を求め、乾燥物として 330.2 mg を正確に量り、約 25ml の水を加え溶かし、0.1mol/l 塩酸試液又は希水酸化ナトリウム試液で pH5.6 に調整し、水を加えて正確に 100ml とする。用時この液と 1/15mol/l リン酸緩衝液(pH5.6)を 1 : 2 の割合で混ぜて使用する。

### (3) 操作法

基質溶液 3ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 5 分間放置した後、試料溶液 1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 15 分間放置した後、過塩素酸試液(10 $\rightarrow$ 300)4ml を正確に加え、振り混ぜる。この液 2ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、水を対照として波長 265nm における吸光度を測定する。(A<sub>1</sub>)

別に、基質溶液 3ml 及び過塩素酸試液(10 $\rightarrow$ 300)4ml を正確に量り、振り混ぜた後、試料溶液 1ml を加え振り混ぜる。この液 2ml を正確に量り、以下同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>2</sub>)

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、60 分間に吸光度差が 0.001 減少するとき、10 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/mg又は単位/}\mu\text{l)} = (A_2 - A_1) \times \frac{10}{0.001} \times \frac{8}{2} \times \frac{60}{15} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{W}$$

A<sub>2</sub> : 対照液の吸光度

A<sub>1</sub> : 反応液の吸光度

10 / 0.001 : 単位換算係数(吸光度差 0.001 のとき 10 単位)

8/2 : 単位換算係数(反応系 8ml から 2ml 採取)

60/15 : 単位換算係数(反応時間 60 分当たり)

1000 : 単位換算係数

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(4) 試薬・試液

1) 5'AMP-2Na(アデノシン 5'-リン酸二ナトリウム)  $C_{10}H_{12}N_5O_7P \cdot Na_2$  (市販試薬)

たとえば、ヤマサ醤油社製又は同等品が使用できる。

2) 0.1mol/l 塩酸試液

塩酸 9.0ml に水を加え 1000ml とする。

3) 希水酸化ナトリウム試液

水酸化ナトリウム 4.3g を水に溶かし 1000ml とする。

4) 過塩素酸試液(10→300)

過塩素酸 10ml に水を加え 300ml とする。

5) 1/15mol/l リン酸塩緩衝液(pH5.6)

第1液：リン酸二水素カリウム 9.07g を水に溶かし 1000ml とする。第2液：無水リン酸水素二ナトリウム 9.46g を水に溶かし 1000ml とする。第1液と第2液を混ぜ pH5.60 に調整する。その容量比は約 14 : 1 である。

## トランスグルコシダーゼ活性測定法

$\alpha$ -メチル-D-グルコシドを基質として酵素を作用させ、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・フェノール試液を用いた酵素的方法により比色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、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、本品に水又は冷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、600~1300 単位/ml とする。

### (2) 基質溶液

$\alpha$ -メチル-D-グルコシド 2.0g を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。

### (3) ブドウ糖検量線の作成

あらかじめブドウ糖を 105°C で 6 時間乾燥し、その 1.000g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 100ml とする。これらのブドウ糖標準溶液は 1ml 中にブドウ糖 100, 200, 300, 400 及び 500  $\mu$ g を含む。各濃度のブドウ糖標準溶液 0.1ml を正確に量り、4-アミノアンチピリン・フェノール発色試液 3ml を正確に加え、よく振り混ぜ 40 $\pm$ 0.5°C で正確に 20 分間放置する。この液につき、水を対照として波長 500nm における吸光度  $E_s$  を測定する。

別に、ブドウ糖標準溶液の代わりに水 0.1ml を用い以下同様に操作して吸光度  $E_{s_0}$  を測定する。

縦軸に吸光度差 ( $E_s - E_{s_0}$ )、横軸にブドウ糖標準溶液のブドウ糖量を取り、検量線とする。

### (4) 操作法

基質溶液 1 ml 及び 0.02mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)1ml を正確に量り、40 $\pm$ 0.5°C で 10~15 分間放置した後、試料溶液 0.5ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を 40 $\pm$ 0.5°C で正確に 60 分間放置した後、沸騰水浴中で正確に 5 分間加熱し、流水中で冷却する。この液 0.1ml を正確に量り、4-アミノアンチピリン・フェノール発色試液 3ml を正確に加え、よく振り混ぜ 40 $\pm$ 0.5°C で正確に 20 分間放置する。この液につき、水を対照として波長 500nm における吸光度  $E_{6_0}$  を測定する。

別に、対照として 0.02mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)1ml と試料溶液 0.5ml を正確に量り、沸騰水浴中で正確に 5 分間加熱した後、流水中で冷却し、基質溶液 1 ml 加え、以下同様に操作して吸光度  $E_0$  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、60 分間に 1  $\mu$ g 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) =

$$(E_{6_0} - E_0) \times G \times \frac{2.5}{0.1} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{W}$$

$E_{6_0}$  : 反応液の吸光度

$E_0$  : 対照液の吸光度

G : 吸光度 1 のときのブドウ糖量 ( $\mu$ g)

2.5 : 反応系液量 (ml)

0.1 : 反応液量 (ml)

0.5 : 試料溶液量 (ml)

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)