

(5) 試薬・試液

1)  $\alpha$ -メチル-D-グルコシド (市販試薬特級)

たとえば、和光純薬工業社製又は同等品が使用できる。

2) ブドウ糖 (市販試薬特級)

たとえば、片山化学工業社製又は同等品が使用できる。

3) 4-アミノアンチピリン・フェノール発色試液

グルコースオキシダーゼ 550 単位，パーオキシダーゼ 125 単位を量り，トリス・リン酸緩衝液(pH7.2) 約 40ml に溶かし，これに 0.4w/v% 4-アミノアンチピリン試液 1ml と 5w/v% フェノール試液 1.4ml を加えた後トリス・リン酸緩衝液(pH7.2)で 50mL とする。

グルコースオキシダーゼ：天野エンザイム社製 GO “Amano” 2 又は同等品を使用する。活性単位は、pH7.0, 37°Cにおいて、1 分間に 1  $\mu$ mol のブドウ糖を酸化する酵素量を 1 単位とする。

パーオキシダーゼ：天野エンザイム社製 PO “Amano” 2 又は同等品を使用する。活性単位は、pH6.0, 20°Cにおいて、20 秒間にピロガロールからプルプロガリン 1 mg を生成する酵素量を 1 単位とする。

4) トリスリン酸緩衝液(pH7.2)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 36.3g, リン酸二水素ナトリウム二水和物 50.0g を水約 900ml に溶かし，2mol/l 塩酸試液で pH7.20 に調整し，水を加えて 1000ml とする。

5) 2mol/l 塩酸試液

塩酸 180ml に水を加え 1000ml とする。

6) 0.4w/v% 4-アミノアンチピリン試液

4-アミノアンチピリン 0.40g を水に溶かし 100ml とする。

7) 5w/v% フェノール試液

フェノール 5.0g を水に溶かし 100ml とする。

8) 0.02mol/l 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)

第 1 液：酢酸ナトリウム 1.64g を水に溶かし 1000ml とする。第 2 液：酢酸 1.20g に水を加え 1000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ，pH5.0 に調整する。その容量比は約 2 : 1 である。

# ペプチダーゼ活性測定法

## 第1法 (GTG法)

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。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、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になるように、本品に適量の0.2 mol/l 酢酸緩衝液 (pH4.0) (又は適切なpH, 種類の緩衝液, 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0.08~0.2 単位/mlである。

### (2) 基質溶液

L-グルタミル-L-チロシル-L-グルタミン酸 0.055 g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 50ml とする。

### (3) L-グルタミン酸検量線

あらかじめ、L-グルタミン酸約1gを精密に量り、105℃で3時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物3.68gに対応するL-グルタミン酸を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。この液2ml, 4ml及び6mlをそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に50mlとする。これらのL-グルタミン酸標準液は1ml中にL-グルタミン酸1, 2及び3 μmolを含む。これらの液0.1mlずつを別の試験管に正確に量り、o-フタル酸アルデヒド試液3mlを加えよく振り混ぜた後、室温で約5分間放置し、水を対照として波長340nmにおける吸光度A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>及びA<sub>3</sub>を測定する。

別に、水0.1mlにo-フタル酸アルデヒド試液3mlを加えよく振り混ぜた後、以下同様に操作して吸光度A<sub>0</sub>を測定する。これより、縦軸に吸光度差(A<sub>1</sub>-A<sub>0</sub>, A<sub>2</sub>-A<sub>0</sub>およびA<sub>3</sub>-A<sub>0</sub>)、横軸にL-グルタミン酸濃度(μmol/ml)をとり、検量線とする。

### (4) 操作法

基質溶液1mlを正確に量り、37±0.5℃で5分間加温した後、試料溶液0.2mlを正確に加え直ちに振り混ぜる。試験管にふたをして37±0.5℃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、直ちに冷却する。冷後、この液0.1mlを別の試験管に正確に量り、o-フタル酸アルデヒド試液3mlを加えよく振り混ぜた後、室温で約5分間放置し、水を対照として波長340nmにおける吸光度A<sub>T</sub>を測定する。

別に、基質溶液1mlを正確に量り、37±0.5℃で5分間加温した後、試料溶液0.2mlを正確に加えて振り混ぜ、試験管にふたをして直ちに沸騰水浴中で正確に5分間加熱し、冷却する。冷後、この液0.1mlを別の試験管に正確に量り、o-フタル酸アルデヒド試液3mlを加えよく振り混ぜた後、以下同様に操作して吸光度A<sub>B</sub>を測定する。A<sub>T</sub>及びA<sub>B</sub>にそれぞれ相当するL-グルタミン酸濃度をL-グルタミン検量線より求め、それぞれのL-グルタミン酸濃度(μmol/ml)をG<sub>T</sub>及びG<sub>B</sub>とする。

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1μmolのL-グルタミン酸に相当するアミノ酸を生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (G_T - G_B) \times \frac{1.2}{0.2} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- G<sub>T</sub>-G<sub>B</sub> : 生成L-グルタミン酸濃度 (μmol/ml)
- 0.2 : 反応に使用する試料溶液の量 (ml)
- 1.2 : 酵素反応液の液量 (ml)
- 60 : 反応時間 (分)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) L-グルタミン-L-チロシル-L-グルタミン酸

たとえば, Bachem 製 (製品番号 H-3225) 又は同等品が使用できる。

2) 0.2 mol/l 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

酢酸 12.0g に水を加えて 800ml とした後, 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 (40→1,000) を加えて pH 4.0 に調整し, 更に水を加えて 1,000ml とする。

2) 0.1mol/l 四ホウ酸ナトリウム試液

38.1g の四ホウ酸ナトリウム 10 水塩 (市販試薬特級) を水に溶かして 1000ml とする。

3) 20% ドデシル硫酸ナトリウム試液

200g のドデシル硫酸ナトリウム (市販試薬特級) を加温しながら水に溶かして 1000ml とする。

4) 2-メルカプトエタノール (市販試薬特級)

たとえば, 和光純薬工業製 (製品番号 137-06862) 又は同等品が使用できる。

5) o-フタル酸アルデヒド試液

0.04g の o-フタル酸アルデヒド (市販試薬特級) を正確に量り, エタノールを 1 ml 加えて溶かす。

0.1mol/l の四ホウ酸ナトリウム試液 25ml, 20% のドデシル硫酸ナトリウム試液 2.5ml 及び 2-メルカプトエタノール 0.1ml を加え, 水を加えて 50ml とする。

**第 2 法 (LNA 法-1)**

酵素を基質 L-ロイシル-p-ニトロアニリドに作用させ, 生成した p-ニトロアニリンを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, p-ニトロアニリン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 pH, 種類の緩衝液, 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 0.16~0.4 単位/ml である。

(2) 基質溶液

L-ロイシル-p-ニトロアニリド 0.059 g を正確に量り, 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0) (又は 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH 8.0) 等の適切な pH, 種類緩衝液, 塩類溶液) を加えて溶かし, 正確に 200ml とする。

(3) p-ニトロアニリン検量線

あらかじめ, p-ニトロアニリン約 1 g を精密に量り, 105°C で 3 時間乾燥し, その減量を測定する。その換算した乾燥物 0.1g に対応する p-ニトロアニリンを正確に量り, 水を加えて溶かし, 正確に 500ml とする。この液 2 ml 及び 4 ml をそれぞれ正確に量り, 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0) (又は 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH 8.0) 等の適切な pH, 種類緩衝液, 塩類溶液) を加えて正確に 100ml とする。これらの p-ニトロアニリン標準液は 1 ml 中に p-ニトロアニリン 0.029 及び 0.058  $\mu$  mol を含む。これらの液につき, 水を対照として波長 405nm における吸光度  $A_1$  及び  $A_2$  を測定する。

別に, 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0) (又は 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH 8.0) 等の適切な pH, 種類緩衝液, 塩類溶液) の吸光度  $A_0$  を測定する。これより, 縦軸に吸光度差 ( $A_1-A_0$  及び  $A_2-A_0$ ), 横軸に p-ニトロアニリン濃度 ( $\mu$  mol/ml) をとり, 検量線とする。

(4) 操作法

基質溶液 4 ml を正確に量り, 40±0.5°C で 5 分間加温した後, 試料溶液 0.1ml を正確に加えて振り混ぜる。この液を 40±0.5°C で正確に 5 分間放置した後, 水を対照として波長 405nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に、基質溶液 4 ml を正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間放置した後、水 0.1 ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。以下同様に操作して吸光度  $A_B$  を測定する。 $A_T$  及び  $A_B$  にそれぞれ相当する p-ニトロアニリン濃度を p-ニトロアニリン検量線より求め、それぞれの p-ニトロアニリン濃度 ( $\mu\text{mol/ml}$ ) を  $N_T$  及び  $N_B$  とする。

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  $1 \mu\text{mol}$  の p-ニトロアニリンを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (N_T - A_B) \times \frac{4.1}{0.1} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- $N_T - N_B$  : 生成 p-ニトロアニリン濃度 ( $\mu\text{mol/ml}$ )  
0.1 : 反応に使用する試料溶液の量 (ml)  
4.1 : 最終液量 (ml)  
5 : 反応時間 (分)  
W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

#### (5) 試薬・試液

1) L-ロイシル-p-ニトロアニリド塩酸塩 (市販試薬生化学用)

たとえば、和光純薬工業製 (製品番号 124-02253) 又は同等品が使用できる。

2) p-ニトロアニリン (市販試薬特級)

たとえば、和光純薬工業製 (製品番号 147-01542) 又は同等品が使用できる。

3) 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0)

第 1 液: リン酸一カリウム 6.81 g を水に溶かして 1,000 ml とする。

第 2 液: リン酸二ナトリウム 12 水塩 17.6 g を水に溶かして 1,000 ml とする。

第 1 液と第 2 液を混ぜ、pH4.0 に調整する。

4) 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH8.0)

第 1 液: トリス 121 g に脱塩水 (Milli-Q 水) を加え、1000 ml とする。

第 2 液: 2M 塩酸

第 1 液 100 ml に第 2 液 32 ml を加え、脱塩水を加えて 1000 ml とする。適宜水酸化ナトリウム溶液または塩酸にて、pH を 8.0 に調整する。

### 第 3 法 (LGG 法)

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 570 nm における吸光度を測定して定量する方法である。

(1) 試料溶液

操作法に従って試験するとき、アミノ酸の増加が、試料濃度に比例する範囲内の試料濃度になるように、本品に適切な緩衝液を加えて溶かし試料溶液とする。通例、吸光度差が 0.1~0.3 とする。

(2) 基質溶液

Leu-Gly-Gly (L-ロイシル-グリシル-グリシン) 30.66 mg を正確に量り、0.05mol/l リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液 (pH7.0) を加えて溶かし、正確に 50 ml とする。用時、この液を 0.05mol/l

リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)で10倍にうすめて使用する。

### (3) L-ロイシン検量線の作成

L-ロイシン 131.2 mgを正確に量り、0.05mol/l リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)を加えて溶かし、正確に100mlとする。この液1ml, 2ml, 3ml, 4ml 及び5mlを正確に量り、それぞれに0.05mol/l リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)を加えて正確に100mlとする。それぞれの液1ml中には、L-ロイシンが0.1  $\mu$ mol, 0.2  $\mu$ mol, 0.3  $\mu$ mol, 0.4  $\mu$ mol 及び0.5  $\mu$ mol 含まれる。共栓付き試験管にそれぞれの液1ml, 水0.1ml 及びニンヒドリン溶液2ml, 塩化スズ(II)溶液0.1mlを正確に量り、振り混ぜた後、試験管に栓を施し、沸騰水浴中で正確に20分間加熱し、流水中で10~30分間冷却する。冷後、1-プロパノール/水混液(1:1)10mlを正確に加え振り混ぜる。振り混ぜた後5分以上30分以内に水を対照として波長570nmにおける吸光度 $A_1, A_2, A_3, A_4$ 及び $A_5$ を測定する。別にL-ロイシン溶液の代わりに0.05mol/l リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)を用い以下同様の操作をして吸光度 $A_0$ を測定する。これより、縦軸に吸光度差( $A_1 - A_0, A_2 - A_0, A_3 - A_0, A_4 - A_0$  及び  $A_5 - A_0$ )を、横軸にそれぞれの液1ml中のL-ロイシン量( $\mu$ mol)をとり検量線とする。吸光度差1に対するL-ロイシン量( $\mu$ mol)Fを求める。

### (4) 操作法

共栓付き試験管に基質溶液1mlを正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に60分間放置し、直ちに沸騰水浴中で正確に5分間加熱し、流水中で冷却する。冷後、ニンヒドリン溶液2ml, 塩化スズ(II)溶液0.1mlを正確に加え、振り混ぜた後、試験管に栓を施し、沸騰水浴中で正確に20分間加熱し、流水中で10~30分間冷却する。冷後、1-プロパノール/水混液(1:1)10mlを正確に加え振り混ぜる。振り混ぜた後5分以上30分以内に水を対照として波長570nmにおける吸光度 $A_T$ を測定する。別に、共栓付き試験管に試料溶液0.1mlを正確に量り、沸騰水浴中で5分間加熱した後、流水中で冷却し、基質溶液1mlを正確に加えたものにつき、以下同様に操作して水を対照として波長570nmにおける吸光度 $A_B$ 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1  $\mu$ molのL-ロイシンに相当するニンヒドリン呈色の増加をもたらす酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g, 単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times (1/0.1) \times (1/60) \times \frac{1}{W}$$

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 対照液の吸光度

F : 吸光度差1に対するL-ロイシン量( $\mu$ mol)

0.1 : 試料溶液量(ml)

60 : 反応時間

W : 試料溶液1ml中の試料の量(g)

### (5) 試薬・試液

#### 1) L-ロイシル-グリシル-グリシン

たとえば、ペプチド研究所製 又は同等品が使用できる。

#### 2) 0.05mol/l リン酸一カリウム・リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)

第1液: リン酸一カリウム 6.80g を水に溶かし1,000mlとする。第2液: リン酸二カリウム 8.71g を水に溶かし1,000mlとする。第1液と第2液を混ぜ、pH7.0に調整する。その容量比は約5:4である。

#### 3) L-ロイシン (市販試薬特級)

たとえば、和光純薬工業製 又は同等品が使用できる。

#### 4) ニンヒドリン溶液

ニンヒドリン1.00g にエチレングリコールモノメチルエーテル 25ml を加えて溶かし、クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 25ml を加えて混合する。

5) 塩化スズ(II)溶液

塩化スズ(II)二水和物 0.1g にクエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 6.2ml を加えて溶かす。

6) 1-プロパノール/水混液(1:1)

1-プロパノール 500ml と水 500ml を混合する。

#### 第4法(LNA法-2)

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。

(1) 試料溶液

操作法に従って試験するとき、p-ニトロアニリンの増加が、試料濃度に比例する範囲内の試料濃度になるように、本品に適切な緩衝液を加えて溶かし試料溶液とする。通例、吸光度差が 0.1~0.5 とする。

(2) 基質溶液

L-ロイシル-p-ニトロアニリド・塩酸塩 71.92 mg を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。

(3) p-ニトロアニリン検量線の作成

p-ニトロアニリン 138.1 mg を正確に量り、0.7%塩酸/エタノール試液を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 及び 5ml を正確に量り、それぞれに 0.7%塩酸/エタノール試液を加えて正確に 100ml とする。それぞれの液 1ml 中には、p-ニトロアニリンが 0.1  $\mu$ mol, 0.2  $\mu$ mol, 0.3  $\mu$ mol, 0.4  $\mu$ mol 及び 0.5  $\mu$ mol 含まれる。試験管にそれぞれの液 2ml, 水 1ml 及び 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH7.0) 1ml, 0.06%p-(ジメチルアミノ)ケイ皮アルデヒド/エタノール試液 2ml を正確に量り、振り混ぜる。この液を 25 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で 10 分間放置した後、水を対照として波長 540nm における吸光度  $A_1, A_2, A_3, A_4$  及び  $A_5$  を測定する。別に p-ニトロアニリン溶液の代わりに 0.7%塩酸/エタノール試液 2ml を用い以下同様の操作をして吸光度  $A_0$  を測定する。これより、縦軸に吸光度差 ( $A_1 - A_0, A_2 - A_0, A_3 - A_0, A_4 - A_0$  及び  $A_5 - A_0$ ) を、横軸にそれぞれの液 2ml 中の p-ニトロアニリン量 ( $\mu$ mol) をとり検量線とする。吸光度差 1 に対する p-ニトロアニリン量 ( $\mu$ mol)  $F$  を求める。

(4) 操作法

試験管に基質溶液 0.8ml 及び 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH7.0) 1ml を正確に量り、37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ 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 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で正確に 60 分間放置する。放置後、0.7%塩酸/エタノール試液 2 ml を正確に加え直ちに振り混ぜ、0.06%p-(ジメチルアミノ)ケイ皮アルデヒド/エタノール試液 2ml を正確に加え振り混ぜる。この液を 25 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で 10 分間放置した後、水を対照として波長 540nm における吸光度  $A_T$  を測定する。別に試験管に試料溶液 0.2ml と 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH7.0) 1ml 及び 0.7%塩酸/エタノール試液 2 ml を正確に加え振り混ぜる。さらに基質溶液 0.8ml を正確に加え、以下同様に操作して吸光度  $A_B$  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 1  $\mu$ mol の p-ニトロアニリンを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g, 単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times (1/0.2) \times (1/60) \times \frac{1}{W}$$

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 対照液の吸光度

$F$  : 吸光度差 1 に対する p-ニトロアニリン量 ( $\mu$ mol)

- 0.2 : 試料溶液量(ml)  
60 : 反応時間  
W : 試料溶液 1ml 中の試料の量(g)

(5) 試薬・試液

- 1) L-ロイシル-p-ニトロアニリド・塩酸塩(市販試薬生化学用)

たとえば、和光純薬工業製 又は同等品が使用できる。

- 2) p-ニトロアニリン(市販試薬特級)

たとえば、和光純薬工業製 又は同等品が使用できる。

- 3) 0.1mol/l トリス緩衝液(pH7.0)

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1g を量り、水 800ml を加えて溶かし、1 mol/l 塩酸試液(90ml→1000) で pH を 7.00 に調整した後、水を加えて正確に 1,000ml とする。

- 4) 0.7%塩酸/エタノール試液

エタノール(99.5) 300ml に 塩酸 5.8ml を加え、混合する。

- 5) 0.06%p-(ジメチルアミノ)ケイ皮アルデヒド/エタノール試液

p-(ジメチルアミノ)ケイ皮アルデヒド(たとえば 和光純薬工業製 又は同等品が使用できる。) 60mg に エタノール(99.5)を加えて溶かし、正確に 100ml とする。用時調製する。

# ポリフェノールオキシダーゼ活性測定法

## 第1法 (P-4AA法)

酵素を4-アミノアンチピリン (P-4AA) とフェノールに作用させ、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。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、キノンイミン色素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、本品に試料希釈溶液 (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 12 ~ 30 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

フェノール 23.5 g を正確に量り、水に溶かし、1,000 ml とする。ガラス容器に遮光して 30 °C で保存する。(注 1)

4-アミノアンチピリン 1.83 g を水に溶かし、1,000 ml とする。ガラス容器に遮光して 30 °C で保存する。(注 1)

### (3) 装置及び器具

- 1) 恒温水槽 (30 ± 0.5 °C)
- 2) 恒温セルホルダー付分光光度計 (例えば島津 UV-160A 等)
- 3) 分注器 (0.5 ml を量れるもの; ピペットマン等)

### (4) 操作法

250 mmol/l フェノール溶液 1 ml、9 mmol/l 4-アミノアンチピリン溶液 1 ml、1 mol/l 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.5 ml をガラスセル (光路長 1 cm) に入れて混合し、(注 3) パラフィルムでふたをして 30 ± 0.5 °C に設定したセルホルダー中で 10 分間予熱する(注 4)。これに、あらかじめ 30 ± 0.5 °C で予熱した酵素溶液 0.5 ml を分注器で加え(注 5)、数回吸引・排出を繰り返し混合する。反応開始 (酵素溶液を添加した時点) 10 秒後から 40 秒後までの 30 秒間における 505 nm の吸光度変化を求める。

室温で 1 時間放置後、測定に供する。(注 2)

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験し、1 分間に吸光度が 0.1 増加するとき、反応液 1 ml 中に含まれる酵素量を 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)

$$= \frac{\Delta OD \times 2}{0.1} \times 3 \times \frac{1}{0.5} \times D = \Delta OD \times 120 \times D$$

$\Delta OD$  : 505 nm における 30 秒間の吸光度変化

D : 試料溶液の希釈倍数



## (5) 試薬・試液

- 1) 250 mmol/L フェノール溶液
- 2) 9 mmol/L 4-アミノアンチピリン溶液
- 3) 1 mol/L 酢酸  
酢酸 60g に水を加えて 1,000 mL とする。
- 4) 1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液  
酢酸ナトリウム三水和物 136g を水に溶かし、1,000 mL とする。
- 5) 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5)  
1 mol/L 酢酸に 1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液を加えて pH を 4.5 に調整する。  
30 °C で保存する。〔混合比 約 57.5 : 42.5〕
- 6) 20 mmol/L ホウ酸溶液  
ホウ酸 1.24 g を水に溶かし、1,000 mL とする。
- 7) 20 mmol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液  
四ホウ酸ナトリウム十水和物 7.63 g を水に溶かし、1,000 mL とする。
- 8) 20 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.0)  
20 mmol/L ホウ酸溶液と 20 mmol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液を加えて pH を 8.0 に調整する。〔混合比 約 94 : 6〕

---

### 注

- (注 1) 調製後 30 °C で 24 時間放置後に使用する。有効期間は調製後 2 週間とする。
- (注 2) 30 秒間あたりの吸光度変化は 0.10 ~ 0.25 の範囲に入るように、酵素溶液を調製する。
- (注 3) プラスチック製のセル (特に新しいもの) は酵素が吸着されるので不適當である。
- (注 4) 試薬はあらかじめ所定の割合に混合したものをを用いてもよい。  
ただし、その場合は試薬混合後、1 時間以内に測定する。
- (注 5) ピペットマン等を使用し、液量、液温の誤差を少なくする為、数回吸引・排出後、採取する。
- (注 6) 試薬(1)~(4)に用いる水は イオンクロマトグラフィー用精製水を使用する。

## 第2法 (LAMU法)

シリングアルダジン基質に有酸素下にて酵素を作用させ、生成されたテトラメトキシ-アゾ-ビス-メチレン-キノンを 530nm にて定量する方法である。

### (1) 試料溶液

操作方法に従って試験するとき、生成されたテトラメトキシ-アゾ-ビス-メチレン-キノンが、試料濃度に比例する範囲内の試料濃度になるように、試料に適量の希釈液 (PEG6000 50g/L、又は適切な希釈液) を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は通常 0.05~0.3 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

10ml メスフラスコを水で洗浄する。さらにエタノールで洗浄する。0.56mM シリングアルダジン 4.40ml に水を加え、10ml とする。

### (3) 酵素活性標準曲線

LAMU 標準酵素 (Novozymes A/S、例: LAMU 標準酵素 61-1100、定格活性 276 単位/g) を希釈液 (PEG6000 50g/L) で希釈し酵素溶液とする。その際、酵素溶液中の酵素活性が 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 および 0.30 単位になるよう調製する。吸光度測定用セルに基質溶液を 240  $\mu$ l 加え 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で保温する。これに希釈した酵素溶液を 80  $\mu$ l 加えると同時にあらかじめ 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C にて保温されていた pH7.50 緩衝液を 3.20ml 加え混合する。吸光度計にセルをセットし、530nm にて 60 秒後、120 秒後の吸光度を測定する。120 秒後の測定値から 60 秒後の測定値を差し引いた数値を吸光度の増加とする。横軸に酵素活性 (LAMU/ml)、縦軸に吸光度の増加をとり、酵素活性標準曲線とする。

### (4) 操作法

吸光度測定用セルに基質溶液を 240  $\mu$ l 加え 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で保温する。これに試料溶液を 80  $\mu$ l 加えると同時にあらかじめ 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C にて保温されていた pH7.50 緩衝液を 3.20ml 加え混合する。吸光度計にセルをセットし、530nm にて 60 秒後、120 秒後の吸光度を測定する。120 秒後の測定値から 60 秒後の測定値を差し引いた数値を吸光度の増加とする。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、次式により求める。

試料中の酵素活性の単位 (AMU/g 又は ml) = A / W

但し、A = 標準曲線から読み取った酵素活性 (LAMU/ml)

W = 試料溶液 1ml 中の試料量 (g)

### (5) 試薬・試液

#### 1) pH7.50 緩衝液

第一液: リンゴ酸 (37%品、例: Merck 800380) 23.2 g に水を加え、全量を 200ml とする。(遮光ビンにて室温で 1 ヶ月保存可)

第二液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（例：Sigma T-1387）

121.1g に水を加え、全量を 1000ml とする。（室温にて 1 ヶ月保存可）

第三液：Triton X-100（例：Sigma T-9284）25.0g に水を加え 250ml とする。

（1～10℃で 1 ヶ月間保存可）

第二液 25.0ml に水を 700ml 加え、さらに第一液を 10ml、第三液を 5ml 加える。

pH を  $7.50 \pm 0.05$  に Cl イオンを含まない酸で調整し、水を加え 1000ml とする。毎

回、新鮮なものを調製する。

2) 希釈液（PEG6000 50g/L）

PEG6000（例：Merck 807491）250.0g に水を加え 5000ml とする。

毎回、新鮮なものを調製する。

3) 0.56mM シリンガルダジン

50ml 遮光メスフラスコを水で洗浄する。さらにエタノールで洗浄する。

シリンガルダジン（例：Sigma S-7896）10.0mg にエタノールを加え 50ml とする。

スターラーにて 3 時間激しく攪拌し、完全に溶解させる。（1～10℃で 5 日間保存可）

4) LAMU 標準酵素 61-1100（定格活性 276 単位/g、Novozyme A/S）

アスコルビン酸オキシダーゼ測定結果

品名 ASO-10 (ウリ)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			2249339	2256392	2270503
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。においが無いか又は特異なにおいがある。	①	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある
		②	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある
		③	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに特異なにおいがある	淡黄白色の粉末でわずかに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より酵素活性を示す。	①	酵素活性を示した。	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		②	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		③	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
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	5 µg/g以下	①	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 µg/g以下
		②	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 µg/g以下
		③	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 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	300/g	1000/g
		②	100/g	700/g	600/g
		③	300/g	700/g	700/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	単位/g	①	1,090	1,140	1,180
		②	1,120	1,180	1,190
		③	1,140	1,210	1,220
		④	1,210	1,200	1,190
		⑤	1,160	1,190	1,190
		⑥	1,160	1,190	1,190
	①	1,147	1,185	1,193	
	標準偏差	41	24	14	
	CV(%)	3.6	2.0	1.1	
①	1,210	1,210	1,220		
②	1,090	1,140	1,180		

\*確認試験の方法

酵素活性測定を実施

\*酵素活性測定

試料溶液

ASO-10 約1gを精密に採取し、酵素希釈液(0.05%BSAを含む10mMリン酸二ナトリウム試液)で溶解し全量を正確に100mlにした後、その溶液をさらに同酵素希釈液で正確に40倍希釈して試料溶液とした。

ウレアーゼ測定結果

品名 ナガブシン (Lactobacillus fermentum)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			15130010	15130020	2263441
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。においが無いか又は特異なおいがある。	①	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある
		②	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある
		③	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある	淡黄白色の微細粒でわずかに特異なおいがある
確認試験	ウレアーゼ活性測定法により酵素活性を示す。	①	酵素活性を示した。	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		②	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		③	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
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	5 µg/g以下	①	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 µg/g以下
		②	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 µg/g以下
		③	5 µg/g以下	5 µg/g以下	5 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	単位/g	①	3,120	2,760	2,670
		②	3,100	2,740	2,590
		③	3,160	2,750	2,590
		④	3,280	2,760	2,540
		⑤	3,170	2,720	2,510
		⑥	3,170	2,630	2,560
	平均値(n=6)	単位/g	3,167	2,727	2,577
	標準偏差		63	50	55
	CV(%)		2.0	1.8	2.1
最大値	単位/g	3,280	2,760	2,670	
最小値	単位/g	3,100	2,630	2,510	

\*確認試験の方法

酵素活性測定を実施

\*酵素活性測定

試料溶液

ナガブシン 約1gを精密に採取し、水で溶解し全量を正確に100mlにした後、その溶液をさらに水で正確に80倍希釈して試料溶液とした。

キシラナーゼ測定結果

品名 ペントパン 500BG (基原: *Humicola insolens* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			CN100819	CN100821	CN100822
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	3回	淡褐色の顆粒  特異なにおいがある	淡褐色の顆粒  特異なにおいがある	淡褐色の顆粒  特異なにおいがある
確認試験	酵素活性を示す	①	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		②	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		③	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
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 5.0 μg/g 以下	①	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下
		②	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下
		③	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 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	50,000/g 以下	50,000/g 以下	50,000/g 以下
		②	50,000/g 以下	50,000/g 以下	50,000/g 以下
		③	50,000/g 以下	50,000/g 以下	50,000/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 (キシラナーゼ測定法)	単位/g	①	3,310	2,710	2,960
		②	3,130	2,720	3,060
		③	2,910	2,770	2,980
		④	2,785	3,120	3,070
		⑤	2,950	2,900	3,130
		⑥	2,860	3,110	3,030
	平均 (n=6)	2,991	2,888	3,038	
	標準偏差	194	188	62	
	CV (%)	6.5	6.5	2.1	
	最大値	3,310	3,120	3,130	
最小値	2,785	2,710	2,960		

\* 確認試験の方法  
キシラナーゼ活性測定法に準じた。

\* 酵素活性の測定法  
試料溶液: 0.1mol/l リン酸緩衝液 (pH6.0) に本品を加えて溶かし試料溶液とした。  
(1→5,000)



キシラーゼ測定結果

品名 ヘミセルラーゼ「アマノ」90G (基原: Aspergillus niger 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			CX09519G	CX09520G	CX09521G
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	3回	淡褐色の粒  においはない	淡褐色の粒  においはない	淡褐色の粒  においはない
確認試験	酵素活性を示す	①	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		②	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		③	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
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	Pbとして 5.0μg/g以下	①	5.0μg/g以下	5.0μg/g以下	5.0μg/g以下
		②	5.0μg/g以下	5.0μg/g以下	5.0μg/g以下
		③	5.0μg/g以下	5.0μg/g以下	5.0μg/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/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 (ヘミセルラーゼ活性測定法第1法)	単位/g	①	99,500	100,000	99,800
		②	103,000	104,000	105,000
		③	98,000	99,500	97,700
		④	101,000	101,000	101,000
		⑤	98,500	97,300	98,000
		⑥	96,100	97,000	98,800
	平均(n=6)	99,400	99,800	100,000	
	標準偏差	2,416	2,581	2,711	
	CV(%)	2.4	2.6	2.7	
	最大値	103,000	104,000	105,000	
最小値	96,100	97,000	97,700		

\* 確認試験の方法

ヘミセルラーゼ活性測定法 第1法に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料溶液: 0.6~1.2 単位/ml になるように本品に水を加えて溶解し、試料溶液とした。(1→100000)

基質: キシラン Fluka, Cat No. 95590 を使用した。

キシラナーゼ測定結果

品名 スミチームX（基原：Trichoderma koningii 由来）

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			980317-05	980908-04	990525-04
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	酵素活性を示す	①	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		②	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
		③	酵素活性を示した	酵素活性を示した	酵素活性を示した
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 5.0 μg/g 以下	①	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下
		②	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下
		③	5.0 μg/g 以下	5.0 μg/g 以下	5.0 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 (ヘミセルラーゼ 活性測定法第2 法)	単位/g	①	50,100	52,100	51,800
		②	50,600	51,800	54,700
		③	50,900	54,400	54,300
		④	51,300	51,500	52,800
		⑤	51,000	51,400	51,300
		⑥	52,100	53,400	52,000
	平均 (n=6)	51,000	52,400	52,800	
	標準偏差	675	1204	1396	
	CV (%)	1.3	2.3	2.6	
最大値	52,100	54,400	54,700		
最小値	50,100	51,400	51,300		

\* 確認試験の方法

ヘミセルラーゼ活性測定法第2法に準じた。

\* 酵素活性の測定法

試料溶液：本品に水を加えて溶解し，試料溶液とした。（1 → 50,000）

キトサナーゼ測定結果 - 1

品名		(基原 : <i>Aspergillus niger</i> 由来)			
セルロシン CAC		製造番号			
試験項目	規格	測定回数	9W09B	OY15D	2O17S
性状	白～濃褐色の粉末、粒、又は無色～濃褐色の液体、ペーストにおいはないか又は特異なおいがある	①	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある
		②	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある
		③	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある	淡褐色の粉末で特異なおいがある
確認試験	第 1 法又は第 2 法の酵素活性を示す	①	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した
		②	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した
		③	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した	第 1 法の酵素活性を示した
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 5.0 µg/g 以下	①	5.0 µg/g 以下	5.0 µg/g 以下	5.0 µg/g 以下
		②	5.0 µg/g 以下	5.0 µg/g 以下	5.0 µg/g 以下
		③	5.0 µg/g 以下	5.0 µg/g 以下	5.0 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	10/g 以下	10/g 以下	10/g 以下
		②	10/g 以下	10/g 以下	10/g 以下
		③	10/g 以下	10/g 以下	10/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	196	205	208
		②	203	202	195
		③	205	213	203
		④	207	206	207
		⑤	211	196	207
		⑥	198	198	195
	平均 (n = 6)		203	203	202
	標準偏差		5.4	6.2	6.2
	CV (%)		2.7	3.0	3.1
	最大値		211	213	208
最小値		196	196	195	

\* 確認試験の方法

キトサナーゼ活性測定法第1法に準じた。

\* 酵素活性測定方法の条件

試料溶液：クエン酸緩衝液（pH4.5）に本品を加えて溶かし試料溶液とした。（1→5,000）

その他の条件はキトサナーゼ活性測定法第1法に準じた。