

尚、76品目の内下記5品目は、市場に流通していないとの理由で2005年2月25日に既存添加物名簿から削除された。

アクロモペプチダーゼ、エンドマルトヘキサオヒドロラーゼ、エンドマルトペンタオヒドロラーゼ、ニトリラーゼ、ノイラミニダーゼ

又、下記4品目は、第二次削除候補品目としてあがっている。

アガラーゼ、エラスターゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、ムラミダーゼ

酵素8品目の成分規格（案）

（1）目的

第7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既存添加物酵素は50品目で、自主規格未設定の16品目の内流通確認12品目を調査し、この内8品目について、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8品目は、FCC第5版及び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（9社参加）は、8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、[]内は第七部会に未参加の協力会社である。

- ① アクチニジン ナガセケムテックス(株) [アサヒフードアンドヘルスケア(株)]
- ② α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ ノボザイムズ ジャパン(株)
- ③ アントシアナーゼ ヤクルト薬品工業(株)、新日本化学工業(株)
- ④ イヌリナーゼ 合同酒精(株)、新日本化学工業(株)
- ⑤ α -グルコシルトランスフェラーゼ 三井製糖(株)、(株)林原、江崎グリコ(株)
- ⑥ ホスホジエステラーゼ 天野エンザイム(株)
- ⑦ ラクトパーオキシダーゼ 天野エンザイム(株) [日成共益等]
- ⑧ リポキシゲナーゼ ナガセケムテックス(株)

（3）成分規格・酵素活性測定法検討結果、概要、及び考察

＜検討結果＞

- ① 規格の記載方法は、食品添加物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。ただし、純度試験は、第8版食品添加物公定書 作業部会にて、鉛規格の国際的整合対応として「JECFA規格に対応でき、JECFA規格に鉛規格以外の規格がない場合においては、重金属規格を削除できる」こととされ、酵素は第8版の成分規格では重金属を除くことで進められたことから、自主規格においても重金属規格を削除した。
- 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・本質に準拠した。ただし、リストには糸状菌、細菌等の「培養液より得られた」と記載されているが、市販酵素剤には液体培養品と固体培養品があり、「培養液より」の表現では固体培養品は該当しなくなるので、自主規格では「培養物より」に統一して記載した。又、「基原・製法・本質」欄には製法が記載されているが、自主規格では省略した。
- ④ 酵素特性の項には、機能・本質を記載し、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、品目によっては複数のECナンバーを記載した。(アントシアナーゼ2種、 α -グルコシルトランスフェラーゼ8種)

- ⑤ 性状は、「酵素一般規格」の規格に準じ記載した。
- ⑥ 微生物限度試験については、規格項目は「酵素一般規格」同一とし、細菌数の限度値は、平成15年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査等食品添加物規格基準策定「食品用酵素剤の添加物指定に関する指針(案) 調査報告書」で10,000/g以下を提言したことから、測定結果に示す規格値は10,000/g以下に変更した。
- ⑦ 確認試験は、それぞれの活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示すこととした。ただし、アントシアナーゼは、酵素活性測定法で酵素活性を示す方法では一般的な β -グルコシダーゼや β -ガラクトシダーゼと識別できないので、赤色のアントシアン色素が退色することを確認する方法とした。又、 α -グルコシルトランスフェラーゼについては、酵素活性測定法で酵素活性を示す方法と、酵素活性測定法が特異的でない場合として基質、反応、及び生成物を特定できる6つの方法を設定した。
- ⑧ 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する必要があるため、 α -グルコシルトランスフェラーゼは9種類、イヌリナーゼは2種類の測定法を設定し、アントシアナーゼでは1つの測定法で2種の基質を選択できるようにした。又、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、種々の性質の異なる酵素にも対応できるようにした。
- ⑨ 酵素活性の規格値(含量規定)は、市販酵素剤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。
- ⑩ 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に適合し、成分規格(案)及び酵素活性測定法(案)の妥当性が検証された。

<各品目の確認試験、酵素活性測定法概要>

1) アクチニジン

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、酵素を基質乳製カゼインに作用させた後、トリクロロ酢酸を加え、未分解のたん白質を沈澱させ、ろ過して得られたろ液中の可溶化したカゼイン分解物中に含まれるチロジン、トリプトファン等の紫外部(275nm)における吸光度の増加を測定して求める方法である。尚、本測定法は、試料溶液調製法以外、パパイン活性測定法と同じである。

2) α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ

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 -アセト乳酸(エチル-2-アセトキシ-2-メチルラクタートアセタート)に作用させ、生成したアセトインを比色測定して求める方法である。尚、測定操作は自動分析装置(Cobas Fara Analyzer)を用いる方法で設定した。

3) アントシアナーゼ

確認試験は、クロマメあるいはリンゴ果皮から抽出したアントシアン色素がpH3.0で鮮やかな赤色を呈し、これにアントシアナーゼを作用させると退色することを利用した実用試験的な方法とした。

酵素活性測定法は、酵素を基質

p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド又は

p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドに作用させ、生成した

p-ニトロフェノールを比色測定して求める方法である。

4) イヌリナーゼ

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、第1法、第2法として、異なる基原の基質を用いること、又酵素作用で生成する還元糖の定量で異なる試薬を用いることから、2種類の方法を設定した。いずれも酵素を基質イヌリンに作用させ、生成した還元糖の還元力をDNS法で比色測定する方法で、第1法は基質としてチコリ由来のイヌリンを使用し、第2法は基質としてダリア由来のイヌリンを使用する方法である。

5) α -グルコシルトランスフェラーゼ

本酵素はグルコシル基、又はグルカン鎖を転移する転移反応を触媒する酵素で、ECナンバーにはEC2群(転移酵素)、EC5群(異性化酵素)の両方が含まれる。異性化酵素の番号(EC5群)が付いているものは分子内転移(異性化)を触媒する異性化酵素であるが、その中でも全てEC5.4群であり、構造異性化をもたらすターゼに属する。異性化反応のうち構造異性化反応は一般には転移反応に含まれるため本規格ではトランスフェラーゼの名称を用い、基質及び反応の形態から本酵素の範疇に含めた。(参考：東京化学同人「生化学辞典」第3版)

確認試験は、酵素の基原・性質により7種類の方法から選択して行うこととし、適切な確認試験方法を選択できるよう対応するECナンバーを付記した。第1法は、酵素活性測定法によりその基質、反応、及び生成物が特定される場合に該当し、第2法から第7法は、酵素活性測定法が特異的でない場合として、その基原・性質、ECナンバーからそれぞれ適切な条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、試料液は標準液のピークと同じ位置にピークを認めること、又は試料液及び比較液の対象生成物のピーク面積を測定するとき、試料液の生成物のピーク面積は比較液の生成物のピーク面積より大きいことを確認する方法である。

酵素活性測定法は、酵素の基原によりグルコシル基又はグルカン鎖を転移する基質又は反応生成物が異なるので、酵素の基原に合わせて第1法から第9法まで設定し、確認試験と同様適切な測定法を選択できるよう対応するECナンバーを付記した。

第1法は、酵素を無機リン酸存在下、基質可溶性澱粉に作用させ、転移反応を起こさせて、これによって生成した α -D-グルコース 1-リン酸を定量する方法である。

第2法は、酵素を無機リン酸存在下、基質ショ糖に作用させ、転移反応を起こさせて、これによって生成した α -D-グルコース 1-リン酸を定量する方法である。

第3法は、酵素を基質アミロースに作用させ、アミロース-ヨウ素複合体の吸光度低下を測定して求める方法である。

第4法は、酵素を基質のショ糖に作用させ、ショ糖の残存量を液体クロマトグラフィーにより測定して求める方法である。

第5法は、酵素を基質マルトペンタオースに作用させ、減少した還元力をソモギー・ネルソン変法により定量する方法である。

第6法は、酵素を基質トレハロースに作用させ、生成したマルトースの還元力をソモギー・ネルソン変法により定量する方法である。

第7法は、酵素を基質パノースに作用させ、転移反応を起こさせて、これによって遊離したグルコースをグルコースオキシダーゼ法により定量する方法である。

第8法は、酵素を基質マルトテトラオースに作用させ、転移反応を起こさせて、これによって遊離したマルトトリオースを液体クロマトグラフィーにより定量する方法である。

第9法は、酵素を基質マルトテトラオースに作用させ、転移反応を起こさせて、これによって遊離するマルトースを液体クロマトグラフィーにより定量する方法である。

6) ホスホジエステラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。当活性測定法は、基質としてアデノシン-3'-モ

ノホスフェートを用いるが、市販の *Penicillium citrinum* nuclease P1 (EC3.1.30.1 Endonuclease S1 (*Aspergillus*)) は、ジエステル及びモノエステル両方に対する活性があり、3'の位置のリン酸を切るモノエステラーゼ活性 (3'-phosphate を切り呈味性のある 5'-phosphonucleotide を生成する) で示しても当酵素の本質 あるいは品質を反映すること、又後述の活性測定法に示した理由から、当方法を検討・設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質アデノシン-3'-モノホスフェートに作用させ、生成するリン酸を過塩素酸酸性下リンモリブデン酸に変じ、それをアミドール試液によって還元し、生成するモリブデン青の青色を比色測定して求める方法である。尚、ホスホジエステラーゼの酵素活性測定法として、従来リボヌクレイン酸ナトリウムを基質としてホスホジエステラーゼ作用により生成する酸可溶性ヌクレオチドを紫外吸収で測定していたが、使用する国際規制物資酢酸ウラニルが国際的な諸般の事情により日本に入ってくるようになってしまったこと、又、他の方法として放射活性の増加を測定する方法もあるが一般の施設で難しいこと、及び上述の酵素の特性から、当酵素活性測定法を設定した。

7) ラクトパーオキシダーゼ

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、ABTS (2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸)の存在下で基質である過酸化水素に作用させ、生成した色素の呈する色調の増加量を波長 413nm で測定して求める方法である。

8) リポキシゲナーゼ

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、酵素を基質リノール酸に作用させた時 分子状酸素が導入され、その際生成するヒドロペルオキシド基の 234nm における吸光度の増加を測定して求める方法である。

<考察>

新規に酵素 8 品目の成分規格 (案)、酵素活性測定法 (案) を策定し、市販酵素剤を用いて測定、検討した結果、各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。尚、酵素活性測定法は、試験方法の原理によって評価結果は影響を受けること、基質が天然物である場合は その製法や精製度合により影響を受けること、又、緩衝液、反応 pH、反応温度・時間等の要素、条件によって影響を受けることから、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た更なる調査研究が必要であると考えられる。

尚、今年度の調査研究終了後の自主規格未作成品目は、第二次消除予定 4 品目を除くと、アミノペプチダーゼ、イソマルトデキストラナーゼ、トリアシルグリセロールリパーゼ、フィシンである。トリアシルグリセロールリパーゼは、「リパーゼ」に含まれ、他は 第七部会の調査では流通不明であることから、本年度の調査研究を以って新規の酵素自主規格の作成は終了する。

(4) 規格案

新規自主規格として策定した酵素 8 品目の成分規格 (案)、各酵素活性測定法 (案) は、別紙に示した。

以上

アクチニジン

Actinidin

定 義 本品は、マタタビ科キウイ (*Actinidia chinensis* PLANCH) の果肉より得られた、たん白質を分解する酵素である。乳糖，デキストリン，ブドウ糖，ショ糖又は還元パラチノースを含むことがある。

酵素特性 本品は、酵素活性発現のために、酵素分子中のシステインが不可欠な、システインプロテアーゼ（チオールプロテアーゼ）に分類されるプロテアーゼで、たん白質を加水分解し、ペプチドを生成する。

ECナンバー（参考）： EC3.4.22.14

性 状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状，又は無～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 酵素活性測定法のアクチニジン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 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10,000以下である。また，大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法のアクチニジン活性測定法により試験を行う。

アクチニジン活性測定法

ミルクカゼインを基質として酵素を作用させ、未消化のカゼインをトリクロロ酢酸溶液で沈澱させ、ろ過して得られたろ液中の可溶化したカゼイン分解物を 275nm における吸光度を測定して定量する方法である。

(1) 試料液

L-システイン塩酸塩一水和物 8.75g を水約 800ml に加えて溶かし、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2.23g を加えて溶解した後、1mol/L 水酸化ナトリウムで pH4.5 に調整し、水を加えて 1,000ml とし、希釈液とする。

操作法により試験するとき、275nm における吸光度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、本品に希釈液を加えて溶かし、氷水中に 1 時間放置した後、試料液とする。その濃度は通例 15~30 単位/ml である。

試料が溶解しにくい場合には、必要に応じて試料の分散液を氷水で冷却下に 10 分間超音波処理を行う。処理後も不溶物が存在する場合は、ろ紙ろ過あるいは遠心分離で清澄液を得て試料液とする。

(2) 基質溶液

カゼイン、乳製、酵素試験用約 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。その換算した乾燥物 1.20g に対応するカゼイン、乳製、酵素試験用を正確に量り、0.05mol/L リン酸二ナトリウム溶液 160ml を加え、水浴中で加温して溶かす。流水で冷却した後、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH8.0 に調整し、水を加えて正確に 200ml とする。用時調製する。

(3) 操作法

基質溶液 5 ml を正確に量り、試験管に入れ、37±0.5°C で 10 分間放置した後、試料液 1 ml を正確に加えて、直ちに振り混ぜる。この液を 37±0.5°C で正確に 10 分間反応させた後、0.11mol/L トリクロロ酢酸試液 5 ml を正確に加えて直ちに振り混ぜ、再び 37±0.5°C で 30 分間放置した後、定量分析用ろ紙（5 種 C）を用いてろ過する。最初の 3 ml を除いたろ液につき、水を対照とし、波長 275nm における吸光度 A_t を測定する。

別に、試験管に試料液 1 ml を正確に量り、0.11mol/L トリクロロ酢酸試液 5 ml を正確に加えて振り混ぜた後、更に基質溶液 5 ml を正確に加えてよく振り混ぜて、37±0.5°C で 30 分間放置し、以下同様に操作して、吸光度 A_b を測定する。

また、チロシン標準液につき、水を対照とし、波長 275nm における吸光度 A_s を測定する。更に、0.1mol/L 塩酸につき、水を対照とし、波長 275nm における吸光度 A_{s_0} を測定し、次式により酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間にチロシン 1 μ g に相当する吸光度の増加を与える酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_t - A_b)}{(A_s - A_{s_0})} \times 50 \times 11 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- A_t : 反応液の吸光度
- A_b : 対照液の吸光度
- A_s : チロシン標準液 (50 μ g/ml) の吸光度
- A_{s_0} : 0.1mol/L 塩酸の吸光度

- 50 : チロシン標準液のチロシン含量 ($50 \mu\text{g/ml}$)
11 : 反応液の総量 (11ml)
10 : 反応時間 (分)
W : 試料液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(3) 試薬・試液

1) 0.11mol/L トリクロロ酢酸試液

試薬特級トリクロロ酢酸 17.97g を正確に量り、水で溶かし、1,000ml とする。

2) カゼイン，乳製，酵素試験用

酵素試験用に特別に製したカゼイン，乳製を用いる。例えば，CALBIOCHEM 製，Casein, Bovine Milk, Carbohydrate and Fatty Acid Free, No. 218682) 又は同等品が使用できる。

3) チロシン標準液

食品添加物公定書 第7版 標準液 に記載のチロシン標準液を使用する。

アクチニジン測定結果

品名 アクチニジン-BOC（基原：キウイ由来）

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			8-28	9-14	10-6
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～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。	①	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		②	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		③	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに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
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 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	10,000/g 以下	①	300/g	200/g	300/g
		②	100/g	300/g	100/g
		③	200/g	200/g	100/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 (アクチニジン活性測定法)	単位/g	①	39,800	77,300	71,000
		②	38,900	75,700	68,800
		③	40,200	77,600	67,500
		④	39,000	74,000	65,200
		⑤	39,900	72,300	67,100
		⑥	39,500	73,400	67,500
	平均 (n=6)	39,600	75,100	67,900	
	標準偏差	517	2,162	1,932	
	CV (%)	1.3	2.9	2.8	
	最大値	40,200	77,600	71,000	
最小値	38,900	72,300	65,200		

* 確認試験の方法

アクチニジン活性測定法に準じた。

* 酵素活性測定法の条件

試料液：本品に活性測定法の試料液調製用の希釈液を加えて溶解し、調製した。

製造番号 8-28 (1→2,000)

製造番号 9-14 (1→4,000)

製造番号 10-6 (1→3,000)

α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ

α-Acetolactate Decarboxylase

α-アセトラクテートデカルボキシラーゼ

定義 本品は、細菌 (*Bacillus subtilis*, *Serratia*) の培養物より得られた、α-アセト乳酸のカルボキシル基を離脱する酵素である。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、α-アセト乳酸のカルボキシル基を離脱して、アセトインと二酸化炭素を生成する。

ECナンバー (参考): EC4.1.1.5 (α-Acetolactate decarboxylase)

性状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無～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 酵素活性測定法のα-アセトラクタートデカルボキシラ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 μg/g 以下 (2.0g, 第1法)

(2) ヒ素 As₂O₃ として 4.0 μg/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10,000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α-アセトラクタートデカルボキシラ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-アセトラクタートデカルボキシラーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ活性測定法

α -アセトラクタートデカルボキシラーゼを α -アセト乳酸に作用させるとアセトインが生成する。生成したアセトインはアルカリ性ナフトールとクレアチンの混合物と反応することにより赤色を呈する。本法はこの呈色反応を用い、反応産物の吸光度の経時変化を測定することにより α -アセトラクタートデカルボキシラーゼの活性を測定する方法である。

(1) 試料液

操作法により試験するとき、アセトイ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 0.05% Brij35 及び 0.6mol/L 塩化ナトリウムを含んだ 0.05mol/L MES 緩衝液 (pH6.0) を加えて溶かし試料液とする。その濃度は通例 0.025~0.075 単位/ml である。

(2) 基質溶液

50ml のフラスコに 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム 6ml と、エチルー 2-アセトキシ-2-メチルアセトアセタート溶液 0.1ml を加え、室温で 20 分間攪拌、さらに 0.05 mol/L MES 緩衝液 (pH 6.0) 44ml を加える。0.5mol/L 塩酸で pH 6.0 に調整し、0.05 mol/L MES 緩衝液 (pH 6.0) を加え 50ml とする。基質溶液は使用直前に調製する。

(3) アセトイン検量線

あらかじめ、アセトイン 0.1g 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, 4, 6 及び 8ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。この液 0.4ml ずつを正確に量り、試験管に入れ、発色液 4.6ml を加え、振り混ぜ、室温で正確に 40 分間放置し、波長 522nm における吸光度を測定する。横軸にアセトイン濃度、縦軸に吸光度をとり、アセトイン検量線を作成し、吸光度 1 に対するアセトイン濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求める。

(4) 発色液

ナフトール 5g 及びクレアチン 0.5g を 1mol/L 水酸化ナトリウム 500ml に溶かす。溶液は光から守り、使用直前に調製する。

(5) 操作法

試料液、MES 緩衝液、及び基質を 30°C で 10 分間暖める。試料液 0.2ml 及び 0.05 mol/L MES 緩衝液 (pH 6.0) 0.2ml をそれぞれ正確に量り、試験管に入れ、振り混ぜて、直ちに 30°C で正確に 20 分間に放置する。(酵素ブランク B1)

試料液 0.2ml 及び基質溶液 0.2ml をそれぞれ正確に量り試験管に入れ、振り混ぜて、直ちに 30°C で正確に 20 分間放置する。(酵素サンプル H1)

0.05M MES 緩衝液 0.2ml、0.05% Brij 及び 0.6M 塩化ナトリウムを含んだ 0.05M MES 緩衝液 0.2ml をそれぞれ正確に量り試験管に入れ、振り混ぜて、直ちに 30°C で正確に 20 分間放置する。(緩衝液ブランク B2)

0.05% Brij 及び 0.6M 塩化ナトリウムを含んだ 0.05M MES 緩衝液 0.2ml、基質溶液 0.2ml をそれぞれ正確に量り試験管に入れ、振り混ぜて、直ちに 30°C で正確に 20 分間放置する。(緩衝液サンプル H2)

各酵素サンプルに関して、B1, H1, B2, H2 という順番で調製する。20 分の反応時間後発色液 4.6ml を加え、室温で正確に 40 分間放置した後、波長 522nm 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、1分間に1 μ molのアセトインを生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{\Delta A \times F}{88.1} \times 5.0 \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

ΔA : (H1-B1)-(H2-B2)

F : 検量線から求めた吸光度1当たりのアセトイン濃度(μ g/ml)

88.1 : アセトインの分子量

5.0 : 反応液総量(ml)

20 : 反応時間(分)

0.2 : 試料液の液量(ml)

W : 試料液 1ml 中の試料の量(g 又は ml)

(6) 試薬・試液

1) MES(2[N-morpholino]ethanesulphonic acid)

たとえば, Sigma 社製試薬特級(製品番号 M3671)又は同等品が使用できる。

2) Brij 35

たとえば, Fluka 社製試薬特級(製品番号 16005)又は同等品が使用できる。

3) エチル-2-アセトキシ-2-メチルアセトアセタート Ethyl-2-acetoxy-2-methylacetoacetate

たとえば, Aldrich 社製試薬特級(製品番号 220396)又は同等品が使用できる。

4) ナフトール

たとえば, Sigma-Aldrich 社製試薬特級(製品番号 N1000)又は同等品が使用できる。

5) クレアチン

たとえば, Aldrich 製試薬特級(製品番号 291196)又は同等品が使用できる。

6) アセトイン Acetoin (dimer(acetyl-methylcarbinol; 3-hydroxy-2-butanon)),

たとえば, Fluka 社製試薬特級(製品番号 00540)又は同等品が使用できる。

7) 0.05 mol/L MES 0.05% Brij35, 0.6 mol/L NaCl 緩衝液

MES 48.80 g 及び塩化ナトリウム 175.32 g を正確に量り, 約 4.5L の水で溶かし, 15% Brij35 溶液 7.5 ml を加え, pH6.00 に調整し, 5L とする。

8) 15% Brij35 溶液

Brij35 15.0 g を量り, 水 70 ml を加えて, 60°C まで暖めて, 冷却後 100ml とする。

9) 0.05 mol/L MES 緩衝液

MES 9.76 g を量り, 水 900 ml を加えて溶かし, pH 6.0 に調整し, 1L とする。

α-アセトラクターデカルボキシラーゼ測定結果

品名 α-アセトラクターデカルボキシラーゼ (基原: 細菌 (Bacillus subtilis))

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			EAN00223	EAN00224	EAN00226
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。	①	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある
		②	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある
		③	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある	茶色の液体でわずかに特異なにおいがある
確認試験	α-アセトラクターデカルボキシラ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 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 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	10,000/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
		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	2200	2140	2230
		②	2240	2190	2140
		③	2230	2180	2180
		④	2180	2080	2110
		⑤	2190	2110	2130
		⑥	2210	2150	2210
	平均値(n=6) 単位/g	2208	2142	2167	
	標準偏差	23	42	48	
	CV(%)	1.04	1.96	2.2	
	最大値 単位/g	2240	2190	2230	
最小値 単位/g	2180	2080	2110		

アントシアナーゼ

Anthocyanase

定義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium decumbens*) の培養物から得られた、アントシアニ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、アントシアニン配糖体として存在しているアントシアニンをグルコース、又はガラクトースとアントシアニンに加水分解する酵素である。

EC番号 (参考): EC 3.2.1.21 β -Glucosidase

EC 3.2.1.23 β -Galactosidase

性状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無～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 クロマメ又はリンゴ果皮 30g に 1 mol/L 塩酸 10ml および水 200ml を加え、沸騰水浴中で 5 分間加温した後、ミキサーで粉砕してろ過する。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 3.0 に調整した液を基質溶液とする。本品の水溶液 1 ml をあらかじめ 40 \pm 0.5 $^{\circ}$ C に加温した基質溶液 5 ml に加えてよく振り混ぜ、40 \pm 0.5 $^{\circ}$ C で 30 分間加温する。その反応液の赤色は本品の水溶液の代わりに水 1 ml を加えた基質溶液の赤色より明らかに薄い。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 5.0 μ g/g 以下 (2.0g, 第 1 法)

(2) 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 10,000 以下である。また、大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法のアントシア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) はアントシアナーゼ (β -グルコシダーゼ, 又は β -ガラクトシダーゼ) の基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

アントシアナーゼ活性測定法

酵素を基質 ρ -ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド又は ρ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドに作用させ、生成した ρ -ニトロフェノールを比色測定して求める方法である。

(1) 試料液

操作法により試験するとき、 ρ -ニトロフェノール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液とする。その濃度は通例 0.01~0.03 単位/ml である。

(2) 基質溶液

ρ -ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド 0.172 g 又は ρ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド 0.172 g を正確に量り、0.05mol/L の酢酸緩衝液(pH4.0)を加えて溶かし正確に 100ml とする。用時調製する。

(3) ρ -ニトロフェノール検量線の作成

ρ -ニトロフェノール 0.139g を正確に量り、エタノール 5 ml を加えて溶かし、更に水を加えて正確に 500ml とする。この液 0.5, 1, 1.5 及び 2 ml を正確に量り、それぞれに 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 10ml を加えた後、更に水を加えて正確に 50ml とする。これらの ρ -ニトロフェノール標準溶液は 1 ml 中に ρ -ニトロフェノール 0.02, 0.04, 0.06 及び 0.08 μ mol を含む。これらの液につき、水を対照とし波長 405nm における吸光度を測定し、 ρ -ニトロフェノールの濃度(μ mol/ml)に対してプロットし、吸光度が 1 の時の ρ -ニトロフェノールの濃度 (μ mol/ml) を求める。

(4) 操作法

基質溶液 3.5ml を正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温した後、試料液 0.5ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 10 分間反応させた後、1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 1 ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。この液につき、水を対照とし、波長 405nm における吸光度 A_T を測定する。別に基質溶液 3.5ml を正確に量り、1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜ、次に試料液 0.5ml を正確に加えて振り混ぜる。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 μ mol の ρ -ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド又は ρ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを分解する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times F \times 5}{10 \times 0.5 \times W}$$

但し、

A_T	:	酵素反応液の吸光度
A_B	:	対照液の吸光度
F	:	吸光度が 1 の時の ρ -ニトロフェノールの濃度 (μ mol/ml)
5	:	最終液量 (ml)
10	:	反応時間 (分)
0.5	:	試料液の量 (ml)
W	:	試料液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) ρ -ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド

例えば Sigma 製 (製品番号 N-7006) 又は同等品が使用できる。

2) ρ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド

例えば Sigma 製 (製品番号 N1252) 又は同等品が使用できる。

3) ρ -ニトロフェノール

例えば Aldrich 製 (製品番号 24,132-6) 又は同等品が使用できる。

4) 0.05mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.0)

酢酸 3.0g を量り，水を加えて 800ml とした後， 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え pH4.0 に調整し，更に水を加えて 1,000ml とする。

5) 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液

無水炭酸ナトリウム 106g を量り，水を加えて 1,000ml とする。

アントシアナーゼ (β-グルコシダーゼ) 測定結果

品名 アントシアナーゼAC (基原: *Aspergillus niger* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			050711T3-15	050917T3-15	051027T3-15
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～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。	①	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		②	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		③	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なにおいがある
確認試験	クロマメ抽出液の赤色が退色する	①	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
		②	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
		③	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
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 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	10,000/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 (β-グルコシダーゼ活性測定法)	単位/g	①	417	445	415
		②	427	463	431
		③	423	458	428
		④	410	443	423
		⑤	421	435	438
		⑥	419	452	419
	平均 (n=6)	420	449	426	
	標準偏差	5.8	10.3	8.4	
	CV (%)	1.4	2.3	2.0	
最大値	427	463	438		
最小値	410	435	415		

* 確認試験の方法

アントシアナーゼ活性測定法 (β-グルコシダーゼ) に準じた。

* 酵素活性測定法の条件

試料液 : 本品に水を加えて溶解し、試料液とした。(1→31,250)

アントシアナーゼ (β-ガラクトシダーゼ) 測定結果

品名 アントシアナーゼ G L L (基原: *Aspergillus oryzae* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			050901T3-12	050930T3-12	051010T3-12
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～濃褐色の液状である。においはないか又は特異なおいがある。	①	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある
		②	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある
		③	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある	淡黄色の粉末で僅かに特異なおいがある
確認試験	リンゴ果皮抽出液の赤色が退色する	①	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
		②	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
		③	赤色が退色する	赤色が退色する	赤色が退色する
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 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	10,000/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 (β-ガラクトシダーゼ活性測定法)	単位/g	①	103,000	113,000	112,000
		②	118,000	121,000	115,000
		③	121,000	137,000	131,000
		④	116,000	119,000	130,000
		⑤	109,000	123,000	115,000
		⑥	108,000	123,000	127,000
	平均 (n=6)	112,500	122,667	121,667	
	標準偏差	6,892.0	7,941.5	8,571.3	
CV (%)	6.1	6.5	7.0		
最大値	121,000	137,000	131,000		
最小値	103,000	113,000	112,000		

* 確認試験の方法

アントシアナーゼ活性測定法 (β-ガラクトシダーゼ) に準じた。

* 酵素活性測定法の条件

試料液 : 本品に水を加えて溶解し、試料液とした。(1→7,500,000)

イヌリナーゼ

Inulinase

イヌラーゼ

定 義 本品は、糸状菌 (Aspergillus aculeatus, Aspergillus niger, Aspergillus phoenicis, Penicillium purpurogenum, Trichoderma) の培養物より得られた、イヌリン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、イヌリンを加水酸分解する。

ECナンバー (参考) : EC3.2.1.7 (Inulinase)

性 状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状，又は無～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 酵素活性測定法のイヌリ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) 鉛 Pbとして $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (2.0g, 第1法)

(2) 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10,000以下である。また，大腸菌は認めない。

酵素活性測定法 酵素活性測定法のイヌリ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，イヌリナーゼの基原，性質に応じて適切なものを選択する。

イヌリナーゼ活性測定法

第1法 (DNS-フェノール試薬法)

酵素を基質イヌリンに作用させ、生成した還元糖の還元力を DNS 法で比色測定する方法である。

(1) 試料液

操作法により試験するとき、還元力の増加が、試料濃度に比例する範囲の濃度になるように、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液とする。その濃度は通例 0.06～0.16 単位/ml である。

(2) 基質溶液

イヌリン 1.5g を正確に量り、0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)（又は適切な緩衝液）を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

(3) フルクトース検量線

あらかじめフルクトース約 1g を精密に量り、60℃、5 kPa 以下の減圧で 3 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 1.00g に対応するフルクトースを正確に量り、0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)（又は適切な緩衝液）を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この溶液 2 ml、3.5ml 及び 5 ml を正確に量り、0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)（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、フルクトースが 200、350 及び 500 μ g 含まれる。試験管にこのフルクトース標準液 0.4ml を正確に量り、3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 1.2ml を加えて振り混ぜる。試験管にガラスビーズで蓋をして、沸騰水浴中で 5 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.4ml を加え振り混ぜ、550nm における吸光度を測定する。横軸にフルクトース濃度、縦軸に吸光度をとり、フルクトース検量線を作成し、吸光度差 1 に対応するフルクトース濃度 (μ g/ml) を求める。

(4) 操作法

試験管に基質溶液 0.2ml を正確に量り、50±0.5℃で 5 分間放置した後、試料液 0.2ml 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、3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 1.2ml を加え、直ちに振り混ぜる。試験管にガラスビーズで蓋をして、沸騰水浴中で 5 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.4ml を加え振り混ぜ、550nm における吸光度を測定する (A_T)。

対照は、先に試験管に 3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 1.2ml を加え、次に基質溶液 0.2ml と試料液 0.2ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。試験管にガラスビーズで蓋をして、沸騰水浴中で 5 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.4ml を加え振り混ぜ、550nm における吸光度を測定する (A_B)。

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 のフルクトースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times 0.4 \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

但し、 A_T	: 反応液の吸光度
A_B	: 対照液の吸光度
F	: 検量線より求めた吸光度差 1 の時のフルクトース濃度 (μ g/ml)
0.4	: 基質溶液及び試料液の総液量 (ml)
180	: フルクトースの分子量
30	: 反応時間 (分)
0.2	: 試料液の液量 (ml)
W	: 試料液 1 ml の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) イヌリン

たとえば、シグマ社製（製品番号 I 2255：チコリ由来）又は同等品が使用できる。

2) 無水酢酸

(CH_3CO)₂O（市販試薬特級）

3) 0.1mol/L 酢酸緩衝液（pH5.0）

第1液：無水酢酸 1.39g に水を加えて 250ml とする。

第2液：酢酸ナトリウム 2.05g に水を加えて 250ml とする。

第1液に第2液を混和し、必要があれば、更にいずれかの液を加えて、pH5.0 に調整する。

4) D-(-)-フルクトース

たとえば、関東化学社製試薬特級（製品番号 16065-00）又は同等品が使用できる。

5) 3,5-ジニトロサリチル酸

(NO_2)₂C₆H₂(OH)COOH（市販試薬特級）

6) 3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液

第1液：3,5-ジニトロサリチル酸 44.0g を水に加えて 4,400ml とする。この液と酒石酸カリウムナトリウム 1,275g を、1,500ml の 1.125mol/L 水酸化ナトリウム溶液に加えよくかき混ぜる。

第2液：フェノール 45g を 110ml の 2.5mol/L 水酸化ナトリウム溶液に加えて溶かし、水を加えて 500ml とする。

第1液に第2液 345ml と炭酸ナトリウム 34.5g を加えて溶かし、2日間暗所にて保存後、アドバンテック社 No.2 の濾紙でろ過する。褐色瓶に入れ、密栓して暗所に室温で保存する。調製後、1年以内に使用する。

第2法（DNS-乳糖試薬法）

酵素を基質イヌリンに作用させ、生成した還元糖の還元力を DNS 法で比色測定する方法である。

(1) 試料液

操作法により試験するとき、還元力の増加が、試料濃度に比例する範囲の濃度になるように、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液とする。その濃度は通例 0.12~0.47 単位/ml である。

(2) 基質溶液

イヌリン 0.56g を正確に量り、水 70ml 中にかき混ぜながら徐々に加え、さらに沸騰水浴中で混ぜながら3分間加温して溶かす。1 mol/L 酢酸緩衝液（pH4.5）（又は適切な緩衝液）10ml を加え、水で正確に 100ml とする。

(3) フルクトース検量線

あらかじめフルクトース約 1g を精密に量り、60°C、5 kPa 以下の減圧で3時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 1.25g に対応するフルクトースを正確に量り、水を加えて溶かし正確に 50ml とする。この溶液 1、2 及び 3 ml を正確に量り、水を加えて正確に 50ml とする。それぞれの液 1 ml 中には、フルクトースが 500、1,000 及び 1,500 μg 含まれる。試験管にそれぞれの液 0.2ml を正確に量り、基質溶液 1.8ml 及び 3,5-ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4 ml を加えて振り混ぜる。試験管にガラス玉をのせて沸騰水浴中で 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。水を対照として 540nm における吸光度 A_1 、 A_2 及び A_3 を測定する。別に試験管に水 0.2ml を正確に量り、基質溶液 1.8ml 及び 3,5-ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4 ml を加えて振り混ぜる。試験管にガラス玉をのせて沸騰水浴中で 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。水を対照として 540nm における吸光度 A_0 を測定する。横軸にそれぞれの液のフルクトース濃度（μg/ml）を、縦軸に吸光度差（ A_1-A_0 、 A_2-A_0 及び A_3-A_0 ）をとり、検量線を作成し吸光度