

差1に対応するフルクトース濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求める。

(4) 操作法

試験管に基質溶液 1.8ml を正確に量り、 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ 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。 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に20分間放置した後、3,5-ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4ml を加えて直ちに振り混ぜる。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_T を測定する。別に試験管に試料液 0.2ml を正確に加え、 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ で5分間放置した後、3,5-ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4ml を加えて直ちに振り混ぜる。次に基質溶液 1.8ml 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_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 $1\ \mu\text{mol}$ 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。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times \frac{1}{180} \times F \times 0.2 \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

但し, A_T	: 反応液の吸光度
A_B	: 対照液の吸光度
180	: フルクトースの分子量
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 ($\mu\text{g/ml}$)
0.2	: 各フルクトース標準液の液量 (ml)
20	: 反応時間 (分)
0.2	: 試料液の液量 (ml)
W	: 試料液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) イヌリン

たとえば、和光純薬工業製 (製品番号 098-00321: ダリヤ由来) 又は同等品が使用できる。

2) 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5)

第1液: 酢酸 60g に水を加えて 1,000ml とする。

第2液: 酢酸ナトリウム 82g に水を加えて 1,000ml とする。

第1液に第2液を混和し、pH4.5 に調整する。

3) D-(-)-フルクトース

たとえば、和光純薬工業製 (製品番号 123-02762) 又は同等品が使用できる。

4) 3,5-ジニトロサリチル酸

$(\text{NO}_2)_2\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})\text{COOH}$ (市販試薬特級)

5) 3,5-ジニトロサリチル酸-乳糖試液

第1液: 3,5-ジニトロサリチル酸 10.0g を量り、水 400ml を加えてかき混ぜながら加温して懸濁し、この液に、水酸化ナトリウム溶液 (16→150) を徐々に加え、 50°C を超えないように注意してかき混ぜながら加温して溶かす。次に酒石酸カリウムナトリウム 300g を量り、徐々に加え、更に水を加えて液量を 950ml とし、 50°C を超えないように注意してかき混ぜながら加温して溶かす。次に室温まで冷し、水を加えて 1,000ml とし、必要ならばガラスフィルターでろ過する。褐色瓶に入れ、密栓して暗所に室温で保存する。調製後6ヶ月以内に使用する。

第2液: 乳糖-水和物 1.20g を量り、水を加えて溶かして 100ml とし、この液 1ml を量り、水を加えて 100ml とする。

第1液 150ml と第2液 50ml を混ぜ合わせる。用時調製する。

イヌリナーゼ測定結果

品名 GODO-INU （基原：Penicillium purpurogenum 由来）

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			#050706	#051117	#051118
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
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	10,000/g 以下	10,000/g 以下	10,000/g 以下
		②	10,000/g 以下	10,000/g 以下	10,000/g 以下
		③	10,000/g 以下	10,000/g 以下	10,000/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 (イヌリナーゼ活性測定法第 1 法)	単位/g	①	1,520	1,140	1,060
		②	1,510	1,180	1,070
		③	1,510	1,160	1,040
		④	1,530	1,200	1,070
		⑤	1,510	1,140	1,080
		⑥	1,530	1,140	1,100
	平均 (n=6)	1,518	1,160	1,070	
	標準偏差	10	25	20	
	CV (%)	0.7	2.2	1.9	
最大値	1,530	1,200	1,100		
最小値	1,510	1,140	1,040		

* 確認試験の方法

イヌリナーゼ活性測定法第 1 法に準じた。

* 酵素活性の測定法

試料溶液：本品に 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加えて希釈し，試料溶液とした。

(#050706：1 → 10,000、#051117：1 → 10,000、#051118：1 → 10,000)

イヌリナーゼ測定結果

品名 スミチーム I N U (基原: *Aspergillus niger* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号
			050128T3-13
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
		②	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
確認試験	酵素活性を示す	①	酵素活性を示す
		②	酵素活性を示す
		③	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
		②	5.0 μg/g 以下
		③	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
		②	4.0 μg/g 以下
		③	4.0 μg/g 以下
細菌数	10,000/g 以下	①	100/g 以下
		②	100/g 以下
		③	100/g 以下
大腸菌	認めない	①	認めない
		②	認めない
		③	認めない
酵素活性(イヌリナーゼ活性測定法第2法)	単位/g	①	9,060
		②	9,680
		③	9,530
		④	9,410
		⑤	9,190
		⑥	9,260
	平均 (n=6)		9,415
	標準偏差		245.8
	CV (%)		2.6
	最大値		9,680
最小値		9,060	

* 確認試験の方法

イヌリナーゼ活性測定法第2法に準じた。

* 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)

α-グルコシルトランスフェラーゼ

α-Glucosyltransferase
4-α-Glucanotransferase
6-α-Glucanotransferase
4-α-グルカノトランスフェラーゼ
6-α-グルカノトランスフェラーゼ

定義 本品は、細菌 (Agrobacterium radiobacter, Arthrobacter, Bacillus, Erwinia, Pimelobacter, Protaminobacter, Pseudomonas, Serratia, Thermus) の培養物、又はバレイショ (Solanum tuberosum LINNE) の塊茎より得られた、グルコシル基、又はグルカン鎖を転移する酵素である。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、アミロペクチン、アミロース、グルコオリゴ糖、又はショ糖に作用し、グルコシル基、又はグルカン鎖を転移する。

E C ナンバー (参考) : E C 2.4.1.1 Phosphorylase
(1,4-α-D-glucan:phosphate α-D-glucosyltransferase)
E C 2.4.1.7 Sucrose phosphorylase
(sucrose:phosphate α-D-glucosyltransferase)
E C 2.4.1.18 1,4-α-Glucan branching enzyme
E C 2.4.1.24 1,4-α-Glucan 6-α-glucosyltransferase
E C 2.4.1.25 4-α-Glucanotransferase
E C 5.4.99.11 Isomaltulose synthase (Sucrose glucosylmutase)
E C 5.4.99.15 (1→4)-α-D-glucan 1-α-glucosylmutase
E C 5.4.99.16 Maltose α-D-glucosyltransferase

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 酵素の基原、性質により(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、又は(7)の方法を選択して行う。

- (1) 酵素活性測定法のα-グルコシルトランスフェ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。
- (2) 本品は、次の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。

E C ナンバー : E C 5.4.99.15 (1→4)-α-D-glucan 1-α-glucosylmutase

試料液 酵素活性測定法のα-グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法 第5法に準じて操作した反応液を水浴中で10分間加熱した後、冷却する。この液1mlを量り、グルコアミラーゼ溶液1mlを加えて混和し、50±0.5℃で24時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

標準液 定量用トレハロース0.10gを正確に量り、水を加えて溶かし50mlとする。

操作法 試料液及び標準液をそれぞれ20μlずつ量り、自主規格「トレハロース」の定量法の操作条件を準用して液体クロマトグラフィーを行う。

- (3) 本品は、次の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。

E C ナンバー : E C 5.4.99.16 Maltose α-D-glucosyltransferase

試料液 本品の2単位に相当する量を量り、0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて正確に100mlとする。この液0.5mlをマルトース溶液0.5mlに加えて混和し、60±0.5℃で24時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱し、冷却した後、グルコアミラーゼ溶液1mlを加えて混和し、50±0.5℃で24時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

標準液 定量用トレハロース0.10gを量り、水を加えて溶かし20mlとする。

操作法 試料液及び標準液をそれぞれ20μlずつ量り、自主規格「トレハロース」の定量法の操作条件を準用して液体クロマトグラフィーを行う。

- (4) 本品は、次の条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、試料液は、標準液のピーク付近にピークを認める。

ECナンバー：EC2.4.1.25 4-α-Glucanotransferase

試料液 本品の200単位に相当する量を量り、0.05mol/L酢酸緩衝液(pH6.0)を用いて正確に100mlとする。この液0.5mlをパノース溶液(1→5)0.5mlに加えて混和し、35±0.5℃で30分間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

標準液 マルトペンタオース0.10gを量り、水を加えて溶かし50mlとする。

操作法 試料液及び標準液をそれぞれ20μlずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充てん剤 9~12μmの液体クロマトグラフィー用強酸性イオン交換樹脂

カラム管 内径10mm、長さ20~40cmのステンレス管

カラム温度 75~85℃の一定温度

移動相 水

流量 マルトペンタオースの保持時間が約41分になるよう調整する

カラムの選定 パノース0.10g及びマルトペンタオース0.10gを量り、水を加えて溶かし50mlとする。この液20μlにつき、上記の条件で操作するとき、マルトペンタオース、パノースの順に溶出し、その分離度が1.0以上のものを用いる。

- (5) 本品は、次の条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、試料液は、標準液のピーク付近にピークを認める。

ECナンバー：EC2.4.1.24 1,4-α-Glucan 6-α-glucosyltransferase

試料液 酵素活性測定法のα-グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法第8法に準じて操作した反応液を水浴中で10分間加熱する。冷却した後、β-アミラーゼ溶液1mlを加えて混和し、50±0.5℃で24時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

標準液 マルトペンタオース0.10gを量り、水を加えて溶かし50mlとする。

操作法 試料液及び標準液をそれぞれ20μlずつ量り、確認試験(4)の操作条件を準用して液体クロマトグラフィーを行う。

- (6) 本品は、次の条件で液体クロマトグラフィーを行い、試料液及び比較液のマルトースのピーク面積を測定するとき、試料液のマルトースのピーク面積は、比較液のマルトースのピーク面積より大きい。

ECナンバー：EC2.4.1.18 1,4-α-Glucan branching enzyme

試料液 酵素活性測定法のα-グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法第9法に準じて操作した反応液を水浴中で10分間加熱する。冷却した後、プルラナーゼ溶液1mlを加えて混和し、40±0.5℃で24時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理

(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

比較液 酵素活性測定法の α -グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法 第9法に準じて操作した反応液を水浴中で10分間加熱する。冷後、プルラーゼ溶液1mlを加えて混和し、直ちに、沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して比較液とする。必要ならば、前処理(除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

操作法 試料液及び比較液をそれぞれ20 μ lずつ量り、自主規格「トレハロース」の定量法の操作条件を準用して液体クロマトグラフィーを行う。

(7) 本品は、次の条件で液体クロマトグラフィーを行い、試料液および比較液に含まれる糖鎖のピークを測定するとき、試料液におけるマルトデカオースのピークは、比較液と比べ大きい。

マルトデカオースのピークは、マルトヘプタオースおよび短鎖アミロースを同条件で分析することにより同定する。

ECナンバー：EC2.4.1.18 1,4- α -Glucan branching enzyme

試料液 酵素活性測定法の α -グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法 第3法の500,000単位に相当する量を量り、0.01mol/Lリン酸緩衝液(pH7.5)を用いて正確に100mlとする。この液0.1mlをアミロース溶液0.1mlに加えて混和し、50 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cで16時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱し、冷却した後、プルラーゼ溶液0.2mlを加えて混和し、45 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cで30分作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して試料液とする。必要ならば、前処理(希釈、除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

比較液 酵素活性測定法の α -グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法 第3法の500,000単位に相当する量を量り、0.01mol/Lリン酸緩衝液(pH7.5)を用いて正確に100mlとする。この液0.1mlを基質アミロース溶液0.1mlに加えて混和し、50 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cで16時間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱し、冷却した後、0.02mol/L酢酸緩衝液(pH6.0)0.2mlを加えて混和し、45 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cで30分保持する。沸騰水浴中で10分間加熱した後、冷却して比較液とする。必要ならば、前処理(希釈、除タンパク、脱塩、ろ過等)を行う。

操作法 試料液及び標準液をそれぞれ25 μ lずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。

操作条件

検出器 パルスドアンペロメトリー検出器

カラム 日本ダイオネクス社 CarboPac PA-100

カラム温度 室温

移動相 0.15 mol/L水酸化ナトリウム溶液および1 mol/L酢酸ナトリウムを含む15 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用い、グルコースからマルトデカオースまでの直鎖糖が分離されるように、移動相中の酢酸ナトリウム濃度を変化させる。

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 α -グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法 第1法, 第2法, 第3法, 第4法, 第5法, 第6法, 第7法, 第8法, 又は第9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 -グルコシルトランスフェラーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

試薬・試液

グルコアミラーゼ溶液

グルコアミラーゼを 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) に溶かして、その 1ml 当りの活性を 1.0 単位とするよう調製する。

グルコアミラーゼ

自主規格「グルコアミラーゼ」。たとえば、生化学工業社製 (製品番号 A0448) 又は同等品が使用できる。

0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5)

1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) に水を加えて 10 倍容量に薄める。

1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5)

第 1 液：酢酸 60.0g を量り、水を加えて 1,000ml とする。

第 2 液：無水酢酸ナトリウム 82.03g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ pH4.5 に調整する。

0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)

0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) に水を加えて 25 倍容量に薄める。

0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)

第 1 液：リン酸一ナトリウム 78.0g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml とする。

第 2 液：リン酸二ナトリウム 179.07g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ pH7.0 に調整する。

マルトース溶液

マルトース、酵素試験用 2.105g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

マルトース、酵素試験用 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号 MA124) 又は同等品が使用できる。

マルトペンタオース $C_{30}H_{52}O_{26}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号 MA151) 又は同等品が使用できる。

パノース $C_{18}H_{32}O_{16}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号 IM231) 又は同等品が使用できる。

β -アミラーゼ溶液

β -アミラーゼを 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶かして、その 1ml 当りの活性 (デンプン糖化力) を 0.1 単位とするよう調製する。

β -アミラーゼ

自主規格「 β -アミラーゼ」。たとえば、東京化成社製 (製品番号 A0448) 又は同等品が使用できる。

0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)

1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) に水を加えて 10 倍容量に薄める。

1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)

第 1 液：酢酸 60.0g を量り、水を加えて 1,000ml とする。

第 2 液：無水酢酸ナトリウム 82.03g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ pH5.0 に調整する。

アミロース液

アミロース 1g を量り、ジメチルスルホキシドを加えて溶解し、10mL とする。さらに 20mL の 0.05mol/L リン酸緩衝液を加え、水を加えて 100ml とする。

アミロース

たとえば、シグマアルドリッチ社製の TypeIII Amylose (製品番号 A-0512) 又は同等品が使用できる。

マルトヘプタオース $C_{42}H_{72}O_{36}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号 MA171) 又は同等品が使用できる。

短鎖アミロース

たとえば、林原生物化学研究所社製 Amylose EX-I（製品番号 AM101）又は同等品が使用できる。

プルラナーゼ溶液

プルラナーゼを 0.1mol/L 酢酸緩衝液（pH6.0）に溶かして、その 1ml 当りの活性を 0.1 単位とするよう調製する。

プルラナーゼ

自主規格「プルラナーゼ」。たとえば、林原生物化学研究所社製（製品番号 EN201）又は同等品が使用できる。

0.1mol/L 酢酸緩衝液（pH6.0）

1mol/L 酢酸緩衝液（pH6.0）に水を加えて 10 倍容量に薄める。

1mol/L 酢酸緩衝液（pH6.0）

第 1 液：酢酸 60.0g を量り、水を加えて 1,000ml とする。

第 2 液：無水酢酸ナトリウム 82.03g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ pH6.0 に調整する。

α-D-グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法

第1法

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る。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。

ECナンバー：E C 2.4.1.1 Phosphorylase (1,4-α-D-glucan:phosphate α-D-glucosyltransferase)

(1) 試料液

操作法により試験するとき、生成したα-D-グルコース 1-リン酸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、本品に適量の0.02mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) (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液とする。その濃度は通例0.25~2.0単位/mlである。

(2) 基質液

可溶性澱粉5.000gを正確に量り、熱水を加えて溶かし、正確に100mlとする。

(3) グルコース-1-リン酸標準液の調製

α-D-グルコース 1-リン酸二ナトリウム1.000gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に100mlとする。

(4) グルコース-1-リン酸検量線の作成

試験管に水および20 μg/ml, 40 μg/ml, 60 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/mlに希釈したα-D-グルコース 1-リン酸標準液1.2mlを正確に量り、α-D-グルコース 1-リン酸定量試液0.6mlを正確に加えてよく混ぜる。30±0.5℃で30分間放置した後、340nmにおける吸光度を測定する。横軸にα-D-グルコース 1-リン酸濃度、縦軸に吸光度をとり、α-D-グルコース 1-リン酸検量線を作成する。この検量線から吸光度1あたりのα-D-グルコース 1-リン酸濃度 (μg/l)を求める。

(4) 操作法

試験管に基質液0.05mlと0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.04mlを正確に量りよく振り混ぜる。37±0.5℃で5分間放置した後、試料液0.01mlを正確に加えて混和し、37±0.5℃で正確に15分間作用させる。反応液を沸騰水浴中で5分間加熱した後、1.1mlの0.05mol/Lトリス緩衝液 (pH7.0)を正確に加えて混和した後、α-D-グルコース 1-リン酸定量試液0.6mlを正確に加えてよく振り混ぜる。30±0.5℃で30分間放置した後、340nmにおける吸光度(A_T)を測定する。

別に、試験管に基質液0.05mlと0.05mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.04mlを正確に量りよく振り混ぜる。37±0.5℃で5分間放置した後、試料液0.01mlを正確に加えて混和し、直ちに沸騰水浴中で5分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。以下同様に操作し340nm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 μmolのα-D-グルコース 1-リン酸を生成する酵素量を1単位とし、次式により決定される。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times \frac{1}{304.1} \times 1.2 \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{0.01} \times \frac{1}{W}$$

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1あたりのα-D-グルコース 1-リン酸濃度 (μg/ml)
304.1	: α-D-グルコース 1-リン酸の分子量
1.2	: 反応液の総液量 (ml)
15	: 反応時間 (分)
0.01	: 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) 可溶性澱粉 (soluble starch) (市販試薬)
たとえば, 和光純薬社製 (製品番号191-03985) 又は同等品が使用できる。
- 2) α -D-グルコース 1-リン酸二ナトリウム (市販試薬)
たとえば, 和光純薬社製 (製品番号075-04251) 又は同等品が使用できる。
- 3) 0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0)
第1液: リン酸水素二ナトリウム70.98gを量り, 水を加えて溶かし1,000mlとする。
第2液: リン酸二水素カリウム68.05gを量り, 水を加えて溶かし1,000mlとする。
第1液と第2液を混ぜpH7.0に調整する。
- 4) 0.05mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0)
0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) に水を加えて10倍容量に薄める。
- 5) 0.5mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH7.0)
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス) 121.14gを水600mlに溶解する。
塩酸でpH7.0に調整し, 水を加えて正確に1,000mlとする。
- 6) α -D-グルコース 1-リン酸定量試液
 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型199mg, 塩化マグネシウム六水和物 305mg, グルコース 1,6-ビスホスフェート 0.51mgを正確に量り, 水50mlと0.5mol/L トリス緩衝液 (pH7.0) 40mlを加えて混和する。ここにエチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸液1.5ml, ホスホグルコムターゼ液 0.3ml, グルコース 6-リン酸脱水素酵素液 0.4mlを添加したのち, 水を加え正確に100mlとする
- 7) β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (市販試薬)
たとえば, 和光純薬社製 (製品番号304-50441) 又は同等品が使用できる。
- 8) グルコース 1,6-ビスホスフェート (市販試薬)
たとえば, ロシュダイアグノスティックス社製 (製品番号127612) 又は同等品が使用できる。
- 9) エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸液 (市販試薬)
たとえば, 和光純薬社製の0.2mol/l EDTA (製品番号051-06995) 又は同等品が使用できる。
- 10) ホスホグルコムターゼ液 (市販試薬)
たとえば, ロシュダイアグノスティックス社製の2mg/mlホスホグルコムターゼ (製品番号108375) 又は同等品が使用できる。
- 11) グルコース 6-リン酸脱水素酵素液 (市販試薬)
たとえば, ロシュダイアグノスティックス社製の1000単位/ml グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (製品番号165875) 又は同等品が使用できる。

第2法

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る。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。

ECナンバー: EC2.4.1.7 Sucrose phosphorylase (sucrose:phosphate α -D-glucosyltransferase)

(1) 試料液

操作法により試験するとき, 生成した α -D-グルコース 1-リン酸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, 本品に適量の0.02mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) (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液とする。その濃度は通例0.25~2.0単位/mlである。

(2) 基質液

ショ糖2.000gを正確に量り, 水を加えて溶かし, 正確に100mlとする。

(3) グルコース-1-リン酸標準液の調製

α -D-グルコース 1-リン酸二ナトリウム1.000gを正確に量り, 水を加えて溶かし, 正確に100mlとする。

(4) グルコース-1-リン酸検量線の作成

試験管に水および20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した α -D-グルコース 1-リン酸標準液1.2mlを正確に量り, α -D-グルコース 1-リン酸定量試液0.6mlを正確に加えてよく混ぜる。30 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で30分間放置した後, 340nmにおける吸光度を測定する。横軸に α -D-グルコース 1-リン酸濃度, 縦軸に吸光度をとり, α -D-グルコース 1-リン酸検量線を作成する。この検量線から吸光度1あたりの α -D-グルコース 1-リン酸濃度 ($\mu\text{g/l}$) を求める。

(4) 操作法

試験管に基質液0.05mlと0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.04mlを正確に量りよく振り混ぜる。37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で5分間放置した後, 試料液0.01mlを正確に加えて混和し, 37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で正確に15分間作用させる。反応液を沸騰水浴中で5分間加熱した後, 1.1mlの0.05mol/Lトリス緩衝液 (pH7.0) を正確に加えて混和した後, α -D-グルコース 1-リン酸定量試液0.6mlを正確に加えてよく振り混ぜる。30 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で30分間放置した後, 340nmにおける吸光度(A_T)を測定する。

別に, 試験管に基質液0.05mlと0.05mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.04mlを正確に量りよく振り混ぜる。37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ で5分間放置した後, 試料液0.01mlを正確に加えて混和し, 直ちに沸騰水浴中で5分間加熱した後, 水浴中に移して室温まで冷却する。以下同様に操作し340nm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 μmol の α -D-グルコース 1-リン酸を生成する酵素量を1単位とし, 次式により決定される。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times \frac{1}{304.1} \times 1.2 \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{0.01} \times \frac{1}{W}$$

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1あたりの α -D-グルコース 1-リン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
304.1	: α -D-グルコース 1-リン酸の分子量
1.2	: 反応液の総液量 (ml)
15	: 反応時間 (分)
0.01	: 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) ショ糖 (市販試薬)

たとえば, 和光純薬社製 (製品番号192-00012) 又は同等品が使用できる。

2) α -D-グルコース 1-リン酸二ナトリウム (市販試薬)

たとえば, 和光純薬社製 (製品番号075-04251) 又は同等品が使用できる。

3) 0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0)

第1液: リン酸水素二ナトリウム70.98gを量り, 水を加えて溶かし1,000mlとする。

第2液: リン酸二水素カリウム68.05gを量り, 水を加えて溶かし1,000mlとする。

第1液と第2液を混ぜpH7.0に調整する。

4) 0.05mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0)

0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) に水を加えて10倍容量に薄める。

5) 0.5mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH7.0)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス) 121.14gを水600mlに溶解する。

塩酸でpH7.0に調整し, 水を加えて正確に1,000mlとする。

6) α -D-グルコース 1-リン酸定量試液

β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型199mg, 塩化マグネシウム六水和物 305mg, グル

コース 1,6-ビスホスフェート 0.51mgを正確に量り、水50mlと0.5mol/L トリス緩衝液 (pH7.0) 40mlを加えて混和する。ここにエチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸液1.5ml, ホスホグルコムターゼ液 0.3ml, グルコース 6-リン酸脱水素酵素液 0.4mlを添加したのち、水を加え正確に100mlとする

- 7) β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (市販試薬)
たとえば、和光純薬社製 (製品番号304-50441) 又は同等品が使用できる。
- 8) グルコース 1,6-ビスホスフェート (市販試薬)
たとえば、ロシュダイアグノスティックス社製 (製品番号127612) 又は同等品が使用できる。
- 9) エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸液 (市販試薬)
たとえば、和光純薬社製の0.2mol/l EDTA (製品番号051-06995) 又は同等品が使用できる。
- 10) ホスホグルコムターゼ液 (市販試薬)
たとえば、ロシュダイアグノスティックス社製の2mg/mlホスホグルコムターゼ (製品番号108375) 又は同等品が使用できる。
- 11) グルコース 6-リン酸脱水素酵素液 (市販試薬)
たとえば、ロシュダイアグノスティックス社製の1000単位/ml グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (製品番号165875) 又は同等品が使用できる。

第3法

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。

ECナンバー : EC 2.4.1.18 1,4- α -Glucan branching enzyme

(1) 試料液

操作法により試験するとき、アミロース-ヨウ素複合体の吸光度低下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液とする。その濃度は通例 15~30 単位/ml である。

(2) 基質溶液

アミロースストック溶液 1ml に、0.05mol/L リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)2ml を加えてよく混合し、水で 10ml にする。

(3) ヨウ素溶液

ヨウ素原液 0.5ml に、1mol/L 塩酸 2ml を加え、水で 260ml にする。

(4) 反応停止液

1mol/L 塩酸 2ml に水を加え、500ml にする。

(5) 操作法

基質溶液 0.1 ml を正確に量り、試験管に入れ、 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間放置した後、試料液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 10 分間放置した後、反応停止液 2ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。さらに、ヨウ素溶液 2ml を正確に加えて振り混ぜ、水を対照として波長 660nm における吸光度 A_T を測定する。別に基質溶液 0.1 ml を正確に量り、反応停止液 2ml 及び試料液 0.1ml を正確に加えて直ちに振り混ぜ、さらにヨウ素溶液 2ml を正確に加えて振り混ぜ、水を対照として波長 660nm 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 分間に吸光度を 0.05%低下させる酵素活性を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{A_B - A_T}{A_B} \times 100 \times \frac{1}{0.05} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- A_T : 酵素反応液の吸光度
 A_B : 対照液の吸光度
0.05 : 吸光度 0.05%
10 : 反応時間 (分)
W : 試料液 1 ml の試料の量 (g 又は ml)

(6) 試薬・試液

1) アミロースストック溶液

Sigma 製 TypeIII アミロース 1.2g に 100ml のジメチルスルホキシドを加えてよく混合し、70℃で 20 分加熱する。10000×g 10 分間遠心分離して、不溶物を除き、25℃で保管する。

2) 0.05mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5)

第 1 液：リン酸二水素カリウム 3.4g を量り、水を加えて溶かして 500ml とする。

第 2 液：リン酸水素二カリウム 13.06g を量り、水を加えて溶かして 1,500ml とする。

第 1 液と第 2 液を混ぜ、pH7.5 に調整する。

3) ヨウ素原液

26g のヨウ化カリウムを水に溶かし、2.6g の I_2 を加えて溶かし、水で 100ml にする。

第 4 法

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。

EC ナンバー：E C 5.4.99.11 Isomaltulose synthase (Sucrose glucosylmutase)

(1) 試料液

操作法により試験するとき、ショ糖の減少量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 0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) (又は水、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 50~100 単位/ml である。

(2) 基質溶液

ショ糖 8.56g を正確に量り、水を加えて溶かして、100ml とする。

(3) 操作法

基質溶液 4 ml を正確に量り、試験管に入れ、 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 15 分間加温し、この液に $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した試料液 1 ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で正確に 10, 20, 30 分間静置後、沸騰水中で 5 分間浸漬して、酵素を熱失活させた後、水浴中で室温まで冷却する。

液体クロマトグラフィーにより、反応溶液のショ糖の残存量を求める。液体クロマトグラフィーの分析条件として、次の 2 条件を例示する。

① アミノプロピル基化学結合型シリカカラム、分離溶媒としてアセトニトリル：水 (85 : 15)、流速 1ml/min、分析温度 20°C で、示差屈折計検出器を使用する。分析サンプルの注入量は $10 \sim 15 \mu\text{l}$ とし、修正面積百分率法で求めた糖組成から残存するショ糖、生成したパラチノース及びトレハロースの比率 (%) を求める。

② トリアコンチル基化学結合型シリカカラム、分離溶媒として水、流速 0.5ml/min、分析温度 50°C で、示差屈折計検出器を使用する。分析サンプルの注入量は $20 \sim 30 \mu\text{l}$ とし、修正面積百分率法で求めた糖組成から残存するショ糖、生成したパラチノース及びトレハロースの比率 (%) 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 $1 \mu\text{mol}$ のショ糖を転移させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = 0.25 \times 1000 \times \frac{4}{5} \times \frac{(100-A)}{100} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{W}$$

但し、

0.25 : 基質濃度 (mol/L)

A : 基質の残存率(%)

T : 反応時間(min)

W : 反応溶液 1ml 中の試料液の量 (g 又は ml)

(4) 試薬・試液

0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0)

第1液 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 31.20g を正確に量り、水に溶かして 1L とする。

第2液 : リン酸水素二ナトリウム十二水和物 71.64g を正確に量り、水に溶かして 1L とする。

第1液 43.85 ml と第2液 6.15ml に水を加え、100ml にする。

第5法

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。

E C ナンバー : E C 5.4.99.15 (1→4)-α-D-glucan 1-α-glucosylmutase

(1) 試料液

操作法により試験するとき、還元力の減少が、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0.01mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) (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液とする。その濃度は通例1.9単位/ml以下である。

(2) 基質溶液

あらかじめ、マルトペンタオースの水分を水分測定法 (0.1g, 直接滴定) で測定する。その換算した脱水物5.000gに対応する量のマルトペンタオースを正確に量り、300mlの水に溶解する。これに0.2mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) (又は適切なpH, 種類の緩衝液, 塩類溶液) 50ml及び水を加えて正確に500mlとする。

(3) マルトペンタオース標準液の調製

あらかじめ、マルトペンタオースの水分を水分測定法 (0.1g, 直接滴定) で測定する。その換算した脱水物5.000gに対応する量のマルトペンタオースを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に100mlとする。この液1mlを正確に量り、水を加えて正確に100mlとし、マルトペンタオース標準液とする。

(4) 操作法

50±0.5℃に加温した基質溶液5mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し、50±0.5℃で正確に60分間作用させる。反応液0.5mlを量り、あらかじめ用意した水5mlに直ちに加えて、直ちに沸騰水浴中で10分間加熱して反応を停止させる。この液0.5mlを量り、あらかじめ用意したソモギー銅試液2mlに加え、沸騰水浴中で10分間加熱する。冷却した後、ネルソン試液2mlを加え、よく混和し、30分間放置する。測定前に水5mlを正確に加え、波長520nmで吸光度A_Tを測定する。別に、50±0.5℃に加温した基質溶液5mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し、その0.5mlを直ちに量り、あらかじめ用意した水5mlに加えて、直ちに沸騰水浴中で10分間加熱して反応を停止させる。以下同様に操作し吸光度A₀を測定する。

また、マルトペンタオース標準液又は水0.5mlを正確に量り、あらかじめ用意したソモギー銅試液2mlに加え、以下同様に操作し吸光度A_S及びA_B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、操作法の条件で操作するとき、1分間に1μmolのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g又は単位/ml)} = \frac{(A_0 - A_T) \times 500 \times 5.2 \times 5.5}{(A_S - A_B) \times 828.72 \times 0.2 \times 0.5 \times 60 \times W}$$

ただし、

- A_T : 反応液の吸光度
- A_0 : 反応停止液の吸光度
- A_S : マルトペンタオース標準液の吸光度
- A_B : 水の吸光度
- 500 : マルトペンタオース標準液の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
- 828.72 : マルトペンタオースの分子量
- 5.2 : 反応液の総液量 (ml)
- 0.2 : 試料液の量 (ml)
- 5.5 : 反応停止液の総液量 (ml)
- 0.5 : 反応停止液の採取量 (ml)
- 60 : 反応時間 (分)
- W : 試料液1ml中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

- 1) マルトペンタオース $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26}$ (市販試薬)
たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号MA151) 又は同等品が使用できる。
- 2) 0.01mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)
0.2mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) に水を加えて20倍容量に薄める。
- 3) 0.2mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)
第1液: 酢酸12.2gを量り、水を加えて1,000mlとする。
第2液: 無水酢酸ナトリウム16.4gを量り、水を加えて溶かし1,000mlとする。第1液と第2液を混ぜpH6.0に調整する。
- 4) ソモギー銅試液
リン酸二ナトリウム71g及び酒石酸カリウムナトリウム40gに水650mlを加えて溶かし、水酸化ナトリウム試液100mlを加える。硫酸銅溶液 (1→10) 80mlをかき混ぜながら加えて加温した後、無水硫酸ナトリウム180g及び水を加えて1,000mlとする。2日間室温で放置した後、ろ紙 (No.2) でろ過し、遮光密栓して保存する。
- 5) ネルソン試液
モリブデン酸アンモニウム50gに水900mlを加えて、加温して溶かし、冷却した後、硫酸42gを正確に加え、さらにヒ酸二ナトリウム溶液 (6→50) 50mlを加えた後、水を加えて1,000mlとし、37°Cで一昼夜放置する。遮光密栓して保存する。

第6法

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。

E C ナンバー: E C 5.4.99.16 Maltose α -D-glucosyltransferase

(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内の濃度になるように、本品に適量の0.01mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) (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液とする。その濃度は通例0.05~0.2単位/mlである。

(2) 基質溶液

トレハロース，酵素試験用1.105gを正確に量り，0.05mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）を加えて溶かし，正確に100mlとする。

(3) マルトース標準液の調製

マルトース，酵素試験用2.105gを正確に量り，水を加えて溶かし，正確に100mlとする。この液1mlを正確に量り，水を加えて正確に100mlとし，マルトース標準液とする。

(4) 操作法

試験管に $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した基質溶液2mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し， $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に30分間作用させる。反応液1.0mlを量り，あらかじめ用意したソモギー銅試液2mlに加え，沸騰水浴中で10分間加熱する。冷却した後，ネルソン試液2mlを加え，よく混和し，30分間放置する。測定前に水5mlを正確に加え，波長520nmで吸光度 A_T を測定する。別に， $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した基質溶液2mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し，その1.0mlを直ちに量り，あらかじめ用意したソモギー銅試液2mlに加え，以下同様に操作し吸光度 A_0 を測定する。

また，マルトース標準液又は水1.0mlを正確に量り，あらかじめ用意したソモギー銅試液2mlに加え，以下同様に操作し吸光度 A_S 及び A_B 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，操作法の条件で操作するとき，1分間に $1 \mu\text{mol}$ のマルトースに相当する還元力を生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）} = \frac{(A_T - A_0) \times 200 \times 2.2}{(A_S - A_B) \times 342.30 \times 0.2 \times 30 \times W}$$

ただし，

- A_T : 反応液の吸光度
- A_0 : 反応停止液の吸光度
- A_S : マルトース標準液の吸光度
- A_B : 水の吸光度
- 200 : マルトース標準液の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
- 342.30 : マルトースの分子量
- 2.2 : 反応液の総液量 (ml)
- 0.2 : 試料液の量 (ml)
- 30 : 反応時間 (分)
- W : 試料液1ml中の試料の量 (g 又はml)

(5) 試薬・試液

- 1) トレハロース，酵素試験用 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （市販試薬）
たとえば，林原生物化学研究所社製（製品番号TH224）又は同等品が使用できる。
- 2) マルトース，酵素試験用 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ （市販試薬）
たとえば，林原生物化学研究所社製（製品番号MA124）又は同等品が使用できる。
- 3) 0.01mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）
0.5mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）に水を加えて50倍容量に薄める。
- 4) 0.05mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）
0.5mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）に水を加えて10倍容量に薄める。
- 5) 0.5mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）
第1液：リン酸一ナトリウム78.0gを量り，水を加えて溶かし1,000mlとする。
第2液：リン酸二ナトリウム179.07gを量り，水を加えて溶かし1,000mlとする。第1液と第2液を

混ぜpH7.0に調整する。

6) ソモギー銅試液

リン酸二ナトリウム71g及び酒石酸カリウムナトリウム40gに水650mlを加えて溶かし、水酸化ナトリウム試液100mlを加える。硫酸銅溶液（1→10）80mlをかき混ぜながら加えて加温した後、無水硫酸ナトリウム180g及び水を加えて1,000mlとする。2日間室温で放置した後、ろ紙（No.2）でろ過し、遮光密栓して保存する。

7) ネルソン試液

モリブデン酸アンモニウム50gに水900mlを加えて、加温して溶かし、冷却した後、硫酸42gを正確に加え、さらにヒ酸二ナトリウム溶液（6→50）50mlを加えた後、水を加えて1,000mlとし、37℃で一昼夜放置する。遮光密栓して保存する。

第7法

酵素を基質パノースに作用させ、転移反応を起こさせる。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。

ECナンバー：EC2.4.1.25 4- α -Glucanotransferase

(1) 試料液

操作法により試験するとき、生成したグルコース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、本品に適量の0.05mol/L酢酸緩衝液（pH6.0）（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液とする。その濃度は通例0.02～0.1単位/mlである。

(2) 基質溶液

あらかじめ、パノースの水分を水分測定法（0.1g、直接滴定）で測定する。その換算した脱水物1.000gに対応する量のパノースを正確に量り、0.05mol/L酢酸緩衝液（pH6.0）を加えて溶かし、正確に100mlとする。

(3) ブドウ糖標準液の調製

乾燥物換算した3.000gに対応する量のブドウ糖を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に100mlとする。この液1mlを正確に量り、水を加えて正確に200mlとし、ブドウ糖標準液とする。

(4) 操作法

35±0.5℃に加温した基質溶液2mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し、35±0.5℃で正確に30分間作用させる。反応液0.5mlを量り、沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。ブドウ糖定量試液2mlを正確に加えてよく振り混ぜ、37±0.5℃で10分間放置した後、505nmにおける吸光度 A_T を測定する。別に、35±0.5℃に加温した基質溶液2mlに試料液0.2mlを正確に加えて混和し、その0.5mlを直ちに量り、沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。ブドウ糖定量試液2mlを正確に加え、以下同様に操作し吸光度 A_0 を測定する。

また、ブドウ糖標準液又は水0.5mlを正確に量り、ブドウ糖定量試液2mlを加え、以下同様に操作し吸光度 A_S 及び A_B 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1 μ molのグルコースを生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）} = \frac{(A_T - A_0) \times 50 \times 2.2}{(A_S - A_B) \times 180.16 \times 0.2 \times 30 \times W}$$

ただし、

A_T : 反応液の吸光度

A_0 : 反応停止液の吸光度

- A_s : ブドウ糖標準液の吸光度
 A_B : 水の吸光度
 50 : ブドウ糖標準液の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
 180.16 : ブドウ糖の分子量
 2.2 : 反応液の総液量 (ml)
 0.2 : 試料液の量 (ml)
 30 : 反応時間 (分)
 W : 試料液1ml中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

12) パノース $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号IM231) 又は同等品が使用できる。

13) 0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)

1mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) に水を加えて20倍容量に薄める。

14) 1mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)

第1液: 酢酸60.0gを量り、水を加えて1,000mlとする。

第2液: 無水酢酸ナトリウム82.03gを量り、水を加えて溶かし1,000mlとする。

第1液と第2液を混ぜpH6.0に調整する。

15) ブドウ糖定量試液

グルコース測定用分析キットの発色試薬を使用する。発色剤1瓶 (150ml用) に5.3mmol/Lフェノールを含む0.06mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.1) 150mlを加え溶解する。溶解液はムタロターゼ (ブタ腎臓由来) 0.13単位/ml, グルコースオキシダーゼ (GOD) (*Penicillium*属由来) 9.0単位/ml, ペルオキシダーゼ (西洋ワサビ由来) 0.65単位/ml, 4-アミノアンチピリン0.50mmol/l, アスコルビン酸オキシダーゼ (カボチャ由来) 2.7単位/mlを含む。たとえば、和光純薬工業社製グルコースCII-テストワコー又は同等品が使用できる。

第8法

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る。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。

ECナンバー: EC2.4.1.24 1,4- α -Glucan 6- α -glucosyltransferase

(1) 試料液

操作法により試験するとき、生成したマルトトリオース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、本品に適量の0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) (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液とする。その濃度は通例0.01~0.05単位/mlである。

(2) 基質溶液

あらかじめ、マルトテトラオースの水分を水分測定法 (0.1g, 直接滴定) で測定する。その換算した脱水物2.000gに対応する量のマルトテトラオースを正確に量り、0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) を加えて溶かし、正確に100mlとする。

(3) マルトトリオース検量線

あらかじめ、マルトトリオースの水分を水分測定法 (0.1g, 直接滴定) で測定する。その換算した脱水物0.05gに対応する量のマルトトリオースを正確に量り、水を加えて溶かし正確に25mlとする。この液1, 2, 3, 及び4mlを正確に量り、それぞれに水を加えて正確に10mlとする。これらのマルトトリオース標準液は、1ml中にマルトトリオース200, 400, 600, 及び800 μg を含む。水及び各マルトトリオース標準液をそれぞれ20 μl ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、マルトトリオースのピーク面積を測定

する。縦軸にピーク面積を、横軸にマルトトリオース濃度 ($\mu\text{g/ml}$) をとり、検量線を作成する。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充てん剤 9~12 μm の液体クロマトグラフィー用強酸性イオン交換樹脂

カラム管 内径10mm, 長さ20~40cmのステンレス管

カラム温度 75~85°Cの一定温度

移動相 水

流量 マルトトリオースの保持時間が約50分になるよう調整する

カラムの選定 マルトトリオース0.10g及びマルトテトラオース0.10gを量り、水を加えて溶かし50mlとする。この液20 μl につき、上記の条件で操作するとき、マルトテトラオース、マルトトリオースの順に溶出し、その分離度が1.0以上のものを用いる。

(4) 操作法

35 \pm 0.5°Cに加温した基質溶液0.5mlに、試料液0.5mlを正確に加えて混和し、35 \pm 0.5°Cで正確に60分間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。必要ならば、前処理（除タンパク、脱塩、ろ過等）を行い、この液20 μl を量り、(3)の操作条件で液体クロマトグラフィーを行って、マルトトリオースのピーク面積を求め、検量線から反応液のマルトトリオース濃度 C_T を算出する。別に、35 \pm 0.5°Cに加温した基質溶液0.5mlに、試料液0.5mlを正確に加えて混和し、直ちに沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。以下、同様に操作し、検量線から反応停止液のマルトトリオース濃度 C_0 を算出し、次式により酵素活性を求める。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で操作するとき、1分間に1 μmol のマルトトリオースを生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g又は単位/ml)} = \frac{(C_T - C_0) \times 1.0}{504.44 \times 0.5 \times 60 \times W}$$

ただし、

C_T : 反応液のマルトトリオース濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_0 : 反応停止液のマルトトリオース濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

504.44 : マルトトリオースの分子量

1.0 : 反応液の総液量 (ml)

0.5 : 試料液の量 (ml)

60 : 反応時間 (分)

W : 試料液1ml中の試料の量 (g 又はml)

(5) 試薬・試液

1) マルトテトラオース $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号MA141) 又は同等品が使用できる。

2) マルトトリオース $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ (市販試薬)

たとえば、林原生物化学研究所社製 (製品番号MA131) 又は同等品が使用できる。

3) 0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)

1mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0) に水を加えて20倍容量に薄める。

4) 1mol/L酢酸緩衝液 (pH6.0)

第1液: 酢酸60.0gを量り、水を加えて1,000mlとする。

第2液: 無水酢酸ナトリウム82.03gを量り、水を加えて溶かし1,000mlとする。

第1液と第2液を混ぜpH6.0に調整する。

第9法

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る。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。

ECナンバー：EC 2.4.1.18 1,4- α -Glucan branching enzyme

(1) 試料液

操作法により試験するとき、生成したマルトース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、本品に適量の2mmol/L 塩化カルシウムを含む0.05mol/L酢酸緩衝液（pH6.0）（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液とする。その濃度は通例0.01~0.08単位/mlである。

(2) 基質溶液

あらかじめ、マルトテトラオースの水分を水分測定法（0.1g、直接滴定）で測定する。その換算した脱水物2.000gに対応する量のマルトテトラオースを正確に量り、2mmol/L塩化カルシウムを含む0.05mol/L酢酸緩衝液（pH6.0）を加えて溶かし、正確に100mlとする。

(3) マルトース検量線

あらかじめ、マルトースの水分を水分測定法（0.1g、直接滴定）で測定する。その換算した脱水物0.05gに対応する量のマルトースを正確に量り、水を加えて溶かし正確に25mlとする。この液1, 2, 3, 及び4mlを正確に量り、それぞれに水を加えて正確に10mlとする。これらのマルトース標準液は、1ml中にマルトース200, 400, 600, 及び800 μ gを含む。水及び各マルトース標準液をそれぞれ20 μ lずつ量り、自主規格「トレハロース」の定量法の操作条件を準用して液体クロマトグラフィーを行い、マルトースのピーク面積を測定する。縦軸にピーク面積を、横軸にマルトース濃度（ μ g/ml）をとり、検量線を作成する。

(4) 操作法

40 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cに加熱した基質溶液0.5mlに、試料液0.5mlを正確に加えて混和し、40 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cで正確に30分間作用させる。沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。必要ならば、前処理（除タンパク、脱塩、ろ過等）を行い、この液20 μ lを量り、(3)の操作条件で液体クロマトグラフィーを行って、マルトースのピーク面積を求め、検量線から反応液のマルトース濃度 C_T を算出する。別に、40 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cに加熱した基質溶液0.5mlに、試料液0.5mlを正確に加えて混和し、直ちに沸騰水浴中で10分間加熱した後、水浴中に移して室温まで冷却する。以下、同様に操作し、検量線から反応停止液のマルトース濃度 C_0 を算出し、次式により酵素活性を求める。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で操作するとき、1分間に1 μ molのマルトースを生成する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位（単位/g又は単位/ml）} = \frac{(C_T - C_0) \times 1.0}{342.30 \times 0.5 \times 30 \times W}$$

ただし、

- C_T : 反応液のマルトースの濃度（ μ g/ml）
- C_0 : 反応停止液のマルトースの濃度（ μ g/ml）
- 342.30 : マルトースの分子量
- 1.0 : 反応液の総液量（ml）
- 0.5 : 試料液の量（ml）
- 30 : 反応時間（分）
- W : 試料液1ml中の試料の量（g又はml）

(5) 試薬・試液

- 1) マルトテトラオース $C_{24}H_{42}O_{21}$ （市販試薬）

たとえば、林原生物化学研究所社製（製品番号MA-141）又は同等品が使用できる。