

正誤表

平成18年度 既存添加物の成分と品質評価に関する研究
「既存添加物の規格化に関する調査研究」

	誤	正
本文5ページの別紙	道 津 信 夫	伊 藤 秀 行
別紙資料目次(本文6ページ)	2-3.増粘安定剤(1品目)	2-3.増粘安定剤(2品目)

研究報告書
既存添加物の成分と品質評価に関する研究

—既存添加物の規格化に関する調査研究—

研究者 高橋 仁一

所属 日本食品添加物協会

役職 常務理事

[はじめに]

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収録した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物450品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度には、第8版食品添加物公定書への収録候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。

本年度は、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直し改定を行った。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格(案)を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格(案)を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

なお、これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

2. 研究結果の概要

2-1. 検討対象品目

本年度は以下の品目について、「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第三版既存添加物自主規格として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した

自主規格案の内容についての見直し」を行った。なお、必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性に関しても評価・検討した。

また、「酵素についての流通実態に関する調査」についても併せて実施した。

(1)平成18年度 新規規格作成検討(4品目)

本年度新規作成検討品目は次のとおりである。

用途名(検討品目数)	自主規格作成検討品目
着色料・製造用剤(1品目)	金
酵素(3品目)	アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ

(2)既設定規格の見直し(30品目)

本年度は、「第三版 既存添加物 自主規格」(平成14年11月刊行)掲載品目及び自主規格案策定済品目全般について見直しを行った。見直しの結果、改定の必要とされた30品目については、その妥当性を評価・検討した。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次表のとおりである。

用途名(品目数)	検討項目	見直しの概要
甘味料(1品目)	ブラジル甘草抽出物	質量分析計検出器による液体クロマトグラフィーによる定量法について検討を行った。
着色料(9品目)	カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ペカンナッツ色素、チコリ色素	褐色(フラボノイド)系着色料の識別のための試験法の調査を実施し、確認試験方法への利用について検討を行った。
増粘安定剤 (2品目)	ウエランガム アグロバクテリウムスクシノグリカン	確認試験の改良について検討を行った。
酵素(18品目)	α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、インベルターゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ、グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシルトランスフェラーゼ、グルコースイソメラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、セルラーゼ、トランスグルコシダーゼ、プルラナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ホスホリパーゼ	酵素活性測定法の追加検討を行った。 キチナーゼと α -グルコシルトランスフェラーゼについては、成分規格の見直しと酵素活性測定法の追加検討を行った。
	酵素一般規格	JECFA 規格改定に基づく改正検討を行った。

(3)既存添加物酵素の流通実態に関する調査

本年度は、次の3項目について、既存添加物酵素の流通実態に関する調査を行った。調査の概要は、次表のとおりである。

調査対象	調査項目	調査研究の概要
酵素全般	既存添加物酵素の名称、基原に関する調査	既存添加物酵素の名称、基原に関する調査を行い、結果のまとめを行った。
	酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査	酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査を行い、結果のまとめを行った。
	微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案の検討	微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案の検討を行った。

3. 研究結果の概要

3-1. 新規規格作成検討

(1) 着色料(1品目)

本年度は、金について検討した。定義、含量、性状、確認試験、純度試験及び定量法について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。規格案の策定に当たっては、医薬品添加物規格、EU規格及び医薬部外品原料規格を参照した。

(2) 酵素(3品目)

本年度は、アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼの3品目を選定し検討した。なお、これら3品目は、JECFA規格及びFCCには収載されていない。

それぞれの品目について、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、この結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。

規格の記載方法は第8版食品添加物公定書(案)に準拠したが、第三版既存添加物自主規格の「酵素一般規格」に従って定義及び酵素特性を記載し、参考としてECナンバーを記載した。

確認試験については「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」とこととした。また、純度試験については「酵素一般規格(改定案)」に基づいて設定することとした。さらに、微生物限度試験については、「酵素一般規格(改定案)」に基づいて設定することとした。

3-2. 既策定規格の見直し

(1) 甘味料(1品目)

ブラジル甘草抽出物について質量分析計を検出器とする高速液体クロマトグラフィーによる定量法の検討を行った。この方法は、検体のラベル化の必要がなく、4種のペリアンドリンを個別に、かつ高感度に検出できることが確認された。

(2) 着色料(9品目)

褐色(フラボノイド)系着色料9品目の識別のための試験法の調査を実施し、確認試験方法への応用の可否について検討を行った。ペカンナッツ色素とチコリ色素は自主規格3版の検討時にバニリン硫酸法を取り入れ、さらに Folin-CIOCALTE'S 法などを利用すれば他の茶系色素との区別が可能と考えられた。5-ヒドロキシメチルフルフラール検出法と4-メチルイミダゾール検出法を組み合わせることにより、カラメル色素(I, III, IV)と他の褐色フラボノイド系着色料との区別が可能であることが示唆された。

(3)増粘安定剤(2品目)

ウェランガムについては、特徴をより明確に区別するため、確認試験の全面的見直しを行った。

アグロバクテリウムスクシノグリカンについては、類似の物性を持つキサンタンガムとの区別を明確にするための確認試験を追加した。

(4)酵素(18品目)

α -アミラーゼ等17品目について、酵素活性測定法の追加を行った。

これらのうち、キチナーゼについては、キチン及びキトデキストリンのN-アセチル- β -D-グルコサミニド 1,4- β -結合をランダムに加水分解するので、その内容を反映するように成分規格案を改定した。また、酵素活性測定法については、p-ニトロフェニル法(第2法)を追加した。 α -グルコシルトランスフェラーゼについては、包含される酵素を改めて調査し、成分規格案を改定し、酵素活性測定法を追加した。

酵素一般規格については、第67回 JECFA 会議で改正された「食品加工に使用される酵素製剤の一般規格及び考慮すべき事項」に基づく改定検討を行い、規格案を作成した。

3-3. 既存添加物酵素の流通実態に関する調査

既存添加物酵素の流通実態に関する調査を行った。調査するなかで、現在の既存添加物制度との比較検討を行い、そこから見えてくる問題点を検討した。そのうえで、将来微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案を示した。

4. 自主規格委員会メンバー

別紙のとおり。

5. 考察

本年度は4品目の新規自主規格策定検討及び30品目の既設定規格・規格案の見直しを行った。また、既存添加物酵素の流通実態に関する調査を行い将来微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案を示した。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。

今後は、新規規格策定を継続するとともに、規格策定の可否についても見極めていく。また、本年度中にも第8版食品添加物公定書の公示が予定されていることから、自主規格内容の全面見直しを行い、来年度策定を目標に第4版既存添加物自主規格の作成作業を進めて行く所存である。

本年度自主規格策定或いは見直し作業に関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生を始めとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

以上

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	高橋 仁一	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	黄海 三雄	オルガノ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	相田 忠	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅田 敏	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間 保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田 実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田 裕次	東和化成工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野 茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	柏木 哲	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤 昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香田 隆敏	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅井 以和夫	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	太田 弥穂	三共ライフテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	滝口 俊男	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	道津 信夫	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	所 一彦	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	古本 重廣	武田キリン食品株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	宮野 信雄	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大和谷 和彦	大日本住友製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本 隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	吉武 繁廣	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	山田 隆	日本食品添加物協会

— 別紙資料目次 —

1. 新規規格作成検討品目	
1-1. 着色料(1品目)	1
1-2. 酵素(3品目)	5
2. 既策定規格の見直し品目	
2-1. 甘味料(1品目)	20
2-2. 着色料(9品目)	29
2-3. 増粘安定剤(1品目)	49
2-4. 酵素(18品目)	56
(1)成分規格見直し・酵素活性測定法追加品目	
α -アミラーゼ	63
キシラナーゼ	87
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	144
トランスグルコシダーゼ	162
プルラナーゼ	167
(2)追加検証データ取得品目	
α -アミラーゼ	195
カタラーゼ	209
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	224
5'-デアミナーゼ	230
フルクトシルトランスフェラーゼ	233
リパーゼ	282
(3)酵素一般規格	310
3. 既存添加物酵素の流通実態に関する調査研究	315
3-1. 別表-1:酵素流通実態調査リスト	325
3-2. 別表-2:既存添加物酵素収載品目リストの基原と流通実態の比較	334
3-3. 別表-3:既存添加物酵素の基原名と各菌株寄託機関における名称 の比較調査-細菌類(放線菌類)	342
3-4. 別表-4:既存添加物酵素の基原名と各菌株寄託機関における名 称の比較調査-糸状菌類(酵母を含む)	344
3-5. Amfep関連資料	346

研究年月日： 2006年4月～2007年3月5日

研究者名：日本食品添加物協会 第二部会

天然色素三色会(会長ヤエガキ醗酵技研株式会社)

株式会社ツキオカ 堀金箔株式会社

既存添加物 着色料・製造用剤「金」の自主規格設定

1. 目的： 「既存添加物名簿」に記載されている着色料「金」の規格設定を行う。
2. 自主規格： 添付資料1
3. 既存添加物 着色料・製造用剤「金」の自主規格設定の説明

名称 厚生省告示第百二十号（平成八年四月十六日）「既存添加物名簿」又は「一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用される品目リスト」記載の名称を用いる。英名及び別名のあるものについては記載。

定義 公定書第8版に準じ定義を設定。厚生省告示第百二十号（平成八年四月十六日）既存添加物名簿記載の定義を用いる。

含量 食品添加物用途として販売されている現状を調査し95%以上と設定した。

性状 市場流通している原体の性状を調査し決定。公定書第8版に準じにの表現を統一した。

確認試験

(1)及び(2)は、金特有の性質を利用し確認試験とした。

純度試験

(1)ヒ素の規格においては、医薬品添加物規格(2003)に準じ設定した。

(2)金箔においては純度により銀・銅の含有があるが、食品添加物用途については銅を含まないものが流通している。医薬品添加物規格においても銅塩の純度規格があったが食品添加物規格においては銅として設定した。銅の純度試験規格設定に当たっては、平成18年9月12日に公示された消除予定添加物名簿に「銅」が記載されていることも考慮した。

定量法

医薬品添加物規格(2003) 金箔を参照し設定した。

4. 改訂規格の妥当性確認

各項目の分析事例 別紙添付

5. 国際規格状況 INS No.175 Gold(Metallic)はあるが、JECFA規格はない。EU規格がある。

6. 考察

金においては、金属としての流通が主であり食品及び食品添加物用途は限られている。食品添加物としての使用は金を加工した金箔としての流通が主流である。

規格化については、医薬品添加物規格(2003) 金箔を参考にしたが、流通実態から、金属としての工業用のものが食品添加物に混入しないように含量及び銅規格を変更設定した。

以上

添付資料 1

金

Gold

金箔

Au

原子量 196.97

定義 本品は、金 (^{197}Au) である。銀を含むことがある。

含量 本品は金 (Au) 95%以上を含む。

性状 本品は金色の柔らかい粉末、薄片又は塊で、におい及び味がない。

確認試験 (1) 本品は塩酸、硝酸、硫酸に溶けず王水に溶ける。

(2) 本品 0.01 g をとり、硝酸/塩酸/水混液 (1 : 4 : 5) 5 ml を加え加熱して溶解する。冷却後、塩酸 2 ml を加え水浴上で加熱濃縮する。この操作を 4 回繰り返して硝酸を除去した後、水 20 ml を加える。次いで水酸化ナトリウム試液を加えて弱酸性とした後、p-ジメチルアミノベンジリデンロダニン/エタノール混液 (1 : 3000) 1 ml を加えるとき、液は赤紫を呈する。

純度試験 (1) ヒ素 As_2O_3 として $5.0 \mu\text{g/g}$ 以下

本品 0.40 g 量り、王水 5 ml を加え、白煙が発生するまで加熱する。冷却後、注意しながら水を加えて 5 ml とし検液とする。装置 B を用いる。

(2) 銅 Cu として $50 \mu\text{g/g}$ 以下

本品約 0.2 g を精密に量り金が溶けるまで王水を加え加熱して溶かす。塩化銀の沈殿物が生成したら完全に溶けるまで塩酸を加える。冷後、塩酸を加えて正確に 10 ml とし、検液とする。別に原子吸光光度用銅標準原液 5 ml を正確に量り、水を加えて正確に 50 ml とし標準液とする。さらに、1 ml, 2 ml, 3 ml 及び 4 ml をそれぞれ正確に量り塩酸を加え正確に 100 ml とし、標準液とする。検液及び標準液につき次の条件で原子吸光光度法より試験を行い標準液の吸光度から得た検量線を用いて検液中の銅の量を求める。

使用ガス：可燃性ガス アセチレン

支燃性ガス 空気

ランプ：銅中空陰極ランプ

波長：324.8 nm

定量法 本品約 0.025 g を精密に量り王水 2 ml を加え加熱して溶かし、冷後、水を加えて正確に 200 ml とする。この液 2 ml を量り水を加えて正確に 25 ml とし検液とする。別に原子吸光光度用金標準原液 5 ml, 10 ml, 及び 15 ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 25 ml とし標準液とする。検液及び標準液につき次の条件で原子吸光光度法より試験を行い標準液の吸光度から得た検量線を用いて検液の含量を求め、含量を求める。

使用ガス：可燃性ガス アセチレン

支燃性ガス 空気

ランプ：金中空陰極ランプ

波長：242.8 nm

試薬試液の項

p-ジメチルアミノベンジリデンロダニン $C_{12}H_{12}N_2OS_2$ (特級 K8495)

金標準原液 Au:1,000mg/L 原子吸光用標準溶液

銅標準原液 Cu:1,000mg/L 原子吸光用標準溶液

金箔 (Gold Leaf)

性状 金色の柔らかい粉末又は薄片 (約 2 μ) で無味無臭

ロット	1 回	2 回	3 回
241218 (i)	適	適	適
180119	適	適	適
180128	適	適	適

確認試験

	ロット	1 回	2 回	3 回
①王水溶解性	241218 (i)	適	適	適
	180119	適	適	適
	180128	適	適	適
②呈色反応	241218 (i)	適	適	適
	180119	適	適	適
	180128	適	適	適

《純度試験》

	ロット	検査結果	
		1 回	2 回
①ヒ素	241218 (i)	1 回	5 μg/g以下
		2 回	5 μg/g以下
		3 回	5 μg/g以下
	180119	1 回	5 μg/g以下
		2 回	5 μg/g以下
		3 回	5 μg/g以下
	180128	1 回	5 μg/g以下
		2 回	5 μg/g以下
		3 回	5 μg/g以下
②銅	241218 (i)	1 回	50 μg/g以下 (実測値18 μg/g)
		2 回	50 μg/g以下 (実測値20 μg/g)
		3 回	50 μg/g以下 (実測値18 μg/g)
	180119	1 回	50 μg/g以下 (実測値7 μg/g)
		2 回	50 μg/g以下 (実測値7 μg/g)
		3 回	50 μg/g以下 (実測値8 μg/g)
	180128	1 回	50 μg/g以下
		2 回	50 μg/g以下
		3 回	50 μg/g以下

*) 180128の銅の分析結果は、50 μg/g以下での分析の為、実測値はありません。

《含量》

	ロット	検査結果		
			Au	Ag
含有量	241218 (i)	1 回	95.0%	4.97%
		2 回	95.0%	4.97%
		3 回	95.4%	4.94%
	180119	1 回	99.2%	
		2 回	99.7%	
		3 回	99.1%	
	180128	1 回	99.4%	
		2 回	99.8%	
		3 回	99.8%	

*) 241218(i)は、金と銀の合金のため、銀の分析値も記載 (Ag: 原子吸光光度法にて測定)

株式会社ツキオカ・堀金箔粉株式会社

酵素 3 品目の新規自主規格（案）作成の調査研究

研究者名・所属：土屋 大輔 ダニスコジャパン(株)
大脇 純 ナガセケムテックス(株)
半谷 守弘 天野エンザイム(株)
浅田 敏 天野エンザイム(株)

日本食品添加物協会 第七部会長

日本食品添加物協会・第七部会・酵素自主規格検討会は、既存添加物酵素 3 品目について 新規に自主規格設定のための研究を行ったので、その概要を報告する。

既存添加物酵素は、「既存添加物名簿」から平成 17 年 2 月 25 日通知により 5 品目が削除され、71 品目が収載されている。これまでに設定された規格としては、第 7 版食品添加物公定書に 4 品目、平成 14 年発行の第三版自主規格に 17 品目及び酵素一般規格が収載されている。尚、第三版自主規格に収載されているリゾチームは、第 8 版食品添加物公定書に収載される。

平成 13 年度から 17 年度の調査研究として検討された 42 品目は、次の通りである。

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

第三版自主規格収載： 酵素一般規格， α -アミラーゼ， β -アミラーゼ，イソアミラーゼ，カタラーゼ，グルコアミラーゼ，グルタミナーゼ，シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ，セルラーゼ，トランスグルタミナーゼ，パンクレアチン，プルラナーゼ，プロテアーゼ，ペクチナーゼ，ヘミセルラーゼ，リゾチーム（第 8 版食品添加物公定書収載予定），リパーゼ，レンネット

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

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

平成 15 年度新規検討品目： アシラーゼ，アルギン酸リアーゼ，エキソマルトテトラオヒドロラーゼ，エステラーゼ，タンナーゼ，デキストラナーゼ，ナリンジナーゼ，フルクトシルトランスフェラーゼ，ヘスペリジナーゼ

平成 16 年度新規検討品目： カルボキシペプチダーゼ，キチナーゼ，トレハロースホスホリラーゼ，パーオキシダーゼ，マルトースホスホリラーゼ，マルトトリオヒドロラーゼ

平成 17 年度新規検討品目： アクチニジン， α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ，アントシアナーゼ，イヌリナーゼ， α -グルコシルトランスフェラーゼ，ホスホジエステラーゼ，ラクトパーオキシダーゼ，リボキシゲナーゼ

尚、当初「既存添加物名簿」に収載された 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 2 品目は、第二次消除候補品目としてあがっている。

エラスターゼ，スーパーオキシドジスムターゼ

定する必要がある。逆にアミノペプチダーゼについては、ペプチダーゼ活性測定法で評価できる為その1つを活性測定法として設定した。又、測定条件を選択できることとし、従来の記載に反応温度も加え「反応温度、反応 pH、緩衝液の種類、試料希釈液等」として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（含量規格）は、微生物由来酵素は基原が多種多様である為、既存添加物名簿で示される同じ名称の酵素でも 基原毎に生成される酵素の性質が異なり、一定の規格値を設定することは困難であることから、定めないこととした。
- ⑩ 自主規格書式、用語・字句の修正は、第4版自主規格書式設定要領、第3版字句修正要領に従った。
- ⑪ 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。（検証データは、別紙として添付した。）

<各品目の確認試験、酵素活性測定法概要>

1) アガラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法と、寒天溶液に酵素液を加え放置すると寒天の粘性またはゲルの強度が低下することを確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質寒天（溶液）に作用させ、ガラクトシド結合の加水分解により生成した還元力を、ブドウ糖検量線を用いて求める方法である。

2) アミノペプチダーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、ペプチダーゼ活性測定法の第2法 LNA 法-1 をアミノペプチダーゼ活性測定法とした。この方法は、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。

3) ムラミダーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を *Bacillus subtilis* K168 株の分散・懸濁液に作用させ、吸光度（濁度）の減少を測定して溶菌酵素活性を求める方法である。

<考察>

新規に酵素3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、食品添加物公定書に収載するには、単位定義も含め国際整合性を踏まえた調査研究が必要であり、又、本年度の課題として検討した「酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査報告」及び「微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案」を踏まえた更なる調査研究が必要であると考えられる。

(4) 規格案

新規自主規格として策定した酵素3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

アガラーゼ

Agarase

定義 本品は、担子菌 (Coliulus) 又は細菌 (Bacillus, Pseudomonas) の培養物より水で抽出して得られた、寒天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、寒天中の D-ガラクトース残基と 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基間の β -1,4 ガラクトシド結合または β -1,3 ガラクトシド結合を加水分解して、主としてネオアガロヘキサオース、ネオアガロテトラオース、ネオアガロピオースまたはアガロヘキサオース、アガロテトラオース、アガロピオースが生成する。

ECナンバー (参考) : EC3.2.1.81

性状 本品は、無～濃褐色の液体または粉末である。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) 又は (2) の方法を選択して行う。

- (1) 酵素活性測定法のアガ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 1g 又は 1ml を量り、水を加えて 1ml 中におよそ 1 単位 (1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のブドウ糖に相当する還元力を生成する酵素活性を 1 単位とする) を含む液を調製する。 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ に保温したこの液 1ml を量り、あらかじめ沸騰水浴中で加熱し完全溶解させ $45 \pm 1^\circ\text{C}$ に加温した 1 w/v% 寒天試液 10ml に加え、 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ で 30 分間放置するとき、常温時の液の粘性またはゲルの強度は低下する。

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ガラーゼ活性測定法により試験を行う。ただし、測定条件 (反応温度、反応 pH、緩衝液の種類、試料希釈液等) は、アガラーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

アガラーゼ活性測定法

酵素を基質寒天（溶液）に作用させ、ガラクトシド結合の加水分解により生成した還元力を、ブドウ糖検量線を用い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、還元力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、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし試料液とする。その濃度は、通例 0.1~0.4 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめ 80℃、5 時間減圧乾燥した寒天 1.0g を正確に量り、リン酸緩衝液（pH7.0, 0.01mol/L）約 70ml に沸騰浴水中又は電子レンジで加熱し完全溶解させた後、45±1℃で保温する。この寒天溶液を 45±1℃に保温したリン酸緩衝液（pH7.0, 0.01mol/L）を加えて 100ml とする。これを基質溶液として、使用するまで 45±1℃にて保温する。

(3) ブドウ糖検量線

あらかじめ 80±1℃、5 時間減圧乾燥したブドウ糖 1.000g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする（10mg/ml）。この液 1 ml, 2 ml 及び 4 ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする（0.1, 0.2, 0.4mg/ml）。この液 0.5ml を正確に試験管に入れ、DNS 試液 1.5ml を正確に加えて振り混ぜて、沸騰浴水中に 5 分間保持した後、流水中にて 10 分間冷却する。この液に水 5 ml を正確に加えて振り混ぜ、波長 540nm における吸光度 A_1 , A_2 及び A_3 を測定する。

別に、水 0.5ml を正確に試験管に入れ、DNS 試液 1.5ml を正確に加えて振り混ぜて、沸騰浴水中に 5 分間保持した後、流水中にて 10 分間冷却する。この液に水 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、波長 540nm における吸光度 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 及び A_3-A_0 ）を、横軸にブドウ糖量（mg）をとり、検量線とする。

(4) 操作法

基質溶液 0.25ml を正確に量り試験管に入れ、45±0.5℃に保持する。これにあらかじめ 45±0.5℃に保温した試料液 0.25ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。この液を 45±0.5℃で正確に 10 分間放置した後、DNS 試液 1.5ml を正確に加えて直ちに振り混ぜ酵素反応を停止させる。これを沸騰浴水中に 5 分間保持した後、流水中にて 10 分間冷却する。この液に水 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、遠心分離（3,000rpm, 10 分間, 室温）してゲルを沈殿させる。この上清の波長 540nm における吸光度 A_T を測定する。

別に、あらかじめ 45±0.5℃に保温した試料液 0.25ml, DNS 試液 1.5ml, 基質溶液 0.25ml をあらかじめ 45±0.5℃に保温した試験管に順次入れ、振り混ぜる。これを沸騰浴水中に 5 分間保持した後、流水中にて 10 分間冷却する。この液に水 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、遠心分離（3,000rpm, 10 分間, 室温）してゲルを沈殿させる。この上清の波長 540nm における吸光度 A_S を測定する。

A_T 及び A_S の還元力に相当するブドウ糖量をブドウ糖検量線より求め、それぞれのブドウ糖量 (mg) を G_T 及び G_S 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 $1 \mu\text{mol}$ のブドウ糖に相当する還元力を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/ml 又は単位/g)} = (G_T - G_S) \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{0.18} \times \frac{0.5}{0.25} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- G_T : ブドウ糖検量線より求めた試料反応液のブドウ糖量 (mg)
 G_S : ブドウ糖検量線より求めた対照液のブドウ糖量 (mg)
10 : 反応時間 (分)
0.18 : ブドウ糖 $1 \mu\text{mol}$ (mg)
0.5 : 酵素反応液量 (ml)
0.25 : 試料液量 (ml)
W : 試料液 1ml 中の試料の量 (ml 又は g)

(5) 試薬・試液

1) DNS 試薬 :

3,5-ジニトロサリチル酸	10.6g
水酸化ナトリウム	19.8g
ロッシェル塩	306g
フェノール	7.6g
ピロ亜硫酸ナトリウム	8.3g
水	1416ml

水 1416ml に、まず 3,5-ジニトロサリチル酸と水酸化ナトリウムを入れ、攪拌して溶解させる。次にロッシェル塩とピロ亜硫酸ナトリウムを入れ、攪拌して溶解させる。次にあらかじめ 50°C に保温して溶解させたフェノールを入れ、20-30 分間攪拌し、完全溶解させる。これをろ紙にてろ過し、遮光にて 1 日放置して使用する。使用時に沈殿が生じている場合、ろ紙にてろ過して用いる。

2) リン酸塩緩衝液 (pH7.0, 0.01mol/L)

第 1 液 : リン酸二ナトリウム 3.58g を水に溶かし 1,000ml とする。

第 2 液 : リン酸二水素カリウム 1.36g 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 3 : 2 である。

アガラーゼ測定結果

品名 アガラーゼ (基原 : *Pseudomonas* sp. (同定中))

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			6 0 1 1 3	6 0 2 2 8	6 0 3 2 2
性状	無～濃褐色の液体または粉末である。においはないか、又は特異なにおいがある。	①	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で特異なにおいがある
		②	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で特異なにおいがある
		③	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で特異なにおいがある	淡褐色の液体で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	30/g	420/g	440/g
		②	30/g	350/g	440/g
		③	60/g	430/g	420/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 (アガラーゼ活性測定法)	単位/mL	①	10.67	33.71	24.78
		②	10.83	32.59	25.92
		③	11.27	33.06	23.18
		④	10.97	31.88	23.36
		⑤	11.20	31.13	24.98
		⑥	10.30	32.84	25.13
	平均 (n=6)		10.87	32.54	24.56
	標準偏差		0.36	0.91	1.07
	CV (%)		3.3	2.8	4.4
	最大値		11.27	33.71	23.18
最小値		10.30	31.13	25.92	

* 確認試験の方法

アガラーゼ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 60113 (1→30)

製造番号 60228 (1→100)

製造番号 60322 (1→80)

アミノペプチダーゼ

Aminopeptidase

定義 本品は、細菌 (*Aeromonas caviae*、*Lactobacillus casei*、*Lactococcus lactis*) の培養物より得られたもので、タンパク質およびペプチド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
EC3.4.11.6 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 酵素活性測定法のアミノ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)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 酵素活性測定法中のアミノペプチダーゼ活性測定法により試験を行う。但し、測定条件(反応温度、反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等)はアミノ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。

アミノペプチダーゼ活性測定法

LNA 法—1 (ペプチダーゼ活性測定法 第2法)

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0.059gを正確に量り、0.05mol/lリン酸緩衝液(pH7.0)(又は0.1mol/lトリス緩衝液(pH8.0)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2ml及び4mlをそれぞれ正確に量り、0.05mol/lリン酸緩衝液(pH7.0)(又は0.1mol/lトリス緩衝液(pH8.0)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1ml中にp-ニトロアニリン0.029及び0.058 μ 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(pH7.0)(又は0.1mol/lトリス緩衝液(pH8.0)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(μ mol/ml)をとり、検量線とする。

(4) 操作法

基質溶液4mlを正確に量り、 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ 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4mlを正確に量り、 $40\pm 0.5^\circ\text{C}$ で5分間放置した後、水0.1ml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(μ 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 μ 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 (μ 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)