

な多糖類が本品とキサントラン位であること、確認試験（2）についてはガラクトマンナンとのゲル化でそのキサントランガムとの区別ができることから2つの方法のセットの確認試験とした。なお改訂前の確認試験方法は（1）のみであった。

## 6. 結び

自主規格（案）を次に示す。

以上

## アグロバクテリウムスクシノグリカン

Agrobacterium Succinoglycan

スクシノグリカン

**定義** 本品は、アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) の培養液から得られた、スクシノグリカンを主成分とするものである。

**性状** 本品は、類白～類褐色の粉末でわずかに特異なにおいがある。

**確認試験** (1) 水 100ml に激しくかく拌しながら本品 0.3g を徐々に加え、80℃まで加熱するとき、粘稠な溶液となる。

(2) あらかじめ水 300ml を 80℃まで加熱し、500ml のビーカーの中でかくはん機により高速でかくはんしながら本品 1.5g およびカロブピンガム 1.5g の粉末を混合したものを添加する。80℃を保ちながら混合物を溶解させた後、10分間かくはんを続ける。かくはん後、室温になるまで2時間放置する。その後、4℃まで混合物を冷却するとき、弾力性のあるゲルが形成されない。

**純度試験** (1) 重金属 Pb として 20  $\mu$ g/g 以下 (1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) ヒ素  $As_2O_3$  として 4.0  $\mu$ g/g 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

**乾燥減量** 15.0%以下 (105℃, 3時間)

**強熱残分** 16.0%以下 (1g)

**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。

## 酵素の既作成自主規格の見直し・改訂に関する調査研究

研究者名・所属：香村 正徳	味の素(株)
金谷 宗昭	エイチビィアイ(株)
鷹羽 武史	江崎グリコ(株)
中森 薫	キッコーマン(株)
濱口 和廣	合同酒精(株)
内田 典芳	MFC ライフテック(株)
加藤 容子	ジェネンコア協和(株)
北原 昇吾	新日本化学工業(株)
小西 哲哉	新日本化学工業(株)
後藤 京二	大和化成(株)
古本 重廣	武田キリン食品(株)
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)
山本 健	日本食品化工(株)
ウ・ビ・ヒ モハト	ノボザイムズ ジャパン(株)
和泉 昇	(株)林原
諸橋 晴夫	名糖産業(株)
金井 晴彦	ヤクルト薬品工業(株)
林 真也	天野エンザイム(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）第 4 版自主規格検討会は、既作成の自主規格について見直し、改訂の調査研究を行ったので、その概要を報告する。

## （1）目的

第 3 版自主規格収載 16 品目、H.13～17 年度自主規格 42 品目の計 58 品目、及び酵素一般規格について見直し、第 4 版既存添加物自主規格に収載することを目的に検討した。

## （2）検討方法

- ① 既存添加物名簿収載品目リストにない基原の酵素も含め、流通実態調査で確認された酵素を基原毎に分類し、報告企業、IUB No.、推奨名等を記載した一覧表を作成し現状を把握した。
- ② それぞれの基原の酵素について、以前の自主規格作成時のデータ取得の有無を調査し、データの無いものについてはデータ取得を計画した。
- ③ 既作成測定法を用いるか、新規作成が必要かについても検討し、測定条件を変更したり新規に作成する酵素活性測定法については、測定データを収集し検証した。

尚、既作成自主規格測定法と基質や定量法の原理が異なるものについては、新たに適切な測定法を検討した。活性測定法は、定量の原理や基質が異なる場合は新規作成、原理等ほぼ同じであれば統合する方針で進めてきたが、各社データが既作成の自主規格測定法と反応温度、pH、緩衝液の種類、

酵素試料溶解液等の測定条件が異なっても、データに条件を明記することで それらを活用することとした。

- ④ これらの検討は、酵素毎に担当責任者を決め実施した。

### (3) 成分規格・酵素活性測定法検討結果、概要、及び考察

既作成自主規格の改訂においても、前述の新規自主規格（案）作成と同様、〈検討結果〉に記した事項を見直した。

#### 〈検討結果〉

- ① 基原の微生物分類名が変化しているものがあり、本年度の課題として「既存添加物酵素の名称、基原に関する調査報告」で検討した。リストの基原記載で、属のみ記載されたものがあるが、酵素を特定していくためには 少なくとも属と種を特定する必要があると考え、種まで調査した。
- ② 国の安全性評価が済んでいない GMO 酵素については、自主規格作成、測定データ収集の対象としていなかったが、安全性評価が済んだ流通実態のある酵素は、原則実測データを収集した。
- ③ 酵素の特性と規格定量法(評価方法)は 科学的にみて対応している必要がある為、 $\alpha$ -アミラーゼ剤がデンプン糖化力活性の規格で販売されることはあるものの、 $\alpha$ -アミラーゼ成分規格の酵素活性測定法にデンプン糖化力活性測定法は入れないこととした。
- ④ 成分規格で酵素活性測定法を規定する場合、その酵素活性測定法に何種類かの方法が設定されている時、特定の方法を指定する必要がない場合には第○法を削除し、単に「(酵素活性測定法の) ○○活性測定法により試験を行う」とした。
- ⑤ 成分規格で確認試験が複数ある場合、第 3 者がどの方法を選択したら良いか分かるようにして欲しいとの要望もあったが、酵素の基原によって適用できる確認試験が異なる場合があるので、そのようなときは該当事業者に確認していただくこととした。尚、成分規格では、確認試験が複数ある場合には、「(酵素活性測定法の) ○○活性測定法のいずれかにより試験を行う」と記載することとした。
- ⑥ 今までに作成した酵素活性測定法の反応温度の範囲指定は $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ としているが、レンネットの場合、国際的な標準試験法である原法「ISO15174:2002(E) IDF176:2002(E) (Milk and milk products – Microbial coagulants – Determination of total milk-clotting activity)」が $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で規定されているので、自主規格測定法も $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ とした。
- ⑦ 酵素活性測定法としてオートアナライザー法で運用している場合には、自主規格測定法では 一般にだれでも実施できる方法で示すように進めてきている。しかし、改めて一般にできる方法(用手法)として条件を設定することは、多大な検討を要する。今後 オートアナライザーによる方法は科学技術の進歩とともに増えてくると考えられるので、本件は、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」の中で考察した。
- ⑧ 酵素一般規格は、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」に基づき、改正した。定義の項において国際生化学分子生物学連合(IUBMB)の酵素の分類に関する記載及び酵素原体には基原の成分や発酵培養液残渣など製造工程に由来する物質を含むことがある旨の記載、微生物活性成分の項において酵素原体には 2 つ以上の異なる反応を触媒する酵素が含有されている旨の記載、その他の項において遺伝子組み換え微生物由来の酵素原体について考察しなければならない事項の記載等を追記した。純度試験については第 8 版食品添加物公定書の作成方針に基づき重金属の規格を削除した。
- ⑨ 調査した基原の酵素の中で、以前の自主規格作成時にデータが取得されていなかった基原酵素、測定条件を変更したり新規に作成した酵素活性測定法に対し、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法を、原則 3 ロットの繰り返し試験を実施し、成分規格（案）及び酵素活性測定

法（案）の妥当性を検証した。これらの検証データは、別紙として添付した。

#### <成分規格・酵素活性測定法を見直した品目、測定法の概要>

##### 1) $\alpha$ -アミラーゼ

新規流通品目が追加されたため、新規活性測定として第5法（BPNPG7比色法）を追加した。この測定法は、非還元末端をブロックしたパラニトロフェニルマルトヘプトシド（BPNPG7）を基質として酵素を作用させ、生成したパラニトロフェニルオリゴ糖をさらにグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼで分解し、遊離したパラニトロフェニルを比色測定する方法である。

##### 2) $\beta$ -アミラーゼ（デンプン糖化力）

第3版自主規格に記載したデンプン糖化力活性測定法は、デンプンに酵素を作用させたときに生成する還元力を銅試薬を用いる Fehling-Lehmann-Schoorl 法によりブドウ糖相当量として測定する方法である。多くの酵素においても同様であるが、流通している $\beta$ -アミラーゼには、測定原理が同じで、異なる試薬・試液を用いて酵素活性を測定しているものが存在する。酵素活性測定法の新規作成、統合を検討する中で、当デンプン糖化力においては、第3版自主規格に記載したデンプン糖化力活性測定法を銅試薬法1とし、生成する還元力を Somogyi 法を用いてブドウ糖相当量として酵素活性を測定する銅試薬法2、フェーリング液を還元する酵素量で酵素活性を測定する銅試薬法3として追加した。また、新規流通品目用に Food Chemical Codex 記載の方法である鉄試薬を用いて還元力を測定する鉄試薬法を新たに追加した。

##### 3) イソアミラーゼ

自主規格作成時にデータのなかった *Flavobacterium odoratum* 由来のイソアミラーゼ活性を測定するために、新規活性測定法（第2法）を追加した。この酵素活性測定法（ヨウ素呈色法—中性）は、酵素をデンプン（ワキシコーンスターチ）に作用させ、ヨウ素溶液による呈色反応を利用して、減少する枝分かれ構造を波長 610nm の吸光度を測定することにより酵素活性を求める方法である。

##### 4) インベルターゼ

自主規格作成時にデータのなかった *Aspergillus niger* 由来のインベルターゼ活性を測定するために、新規活性測定法を追加した。この酵素活性測定法は、酵素を基質ショ糖に作用させ、生成した還元糖の還元力を DNS 法により比色定量する方法である。

##### 5) キシラナーゼ

既存添加物名簿未記載基原である *Aspergillus awamori* 由来のキシラナーゼ活性を測定するために、新規活性測定法を追加した。この酵素活性測定法は、酵素を基質キシランに作用させ、生成した還元糖の還元力をソモギー変法により滴定して定量する方法である。

##### 6) キチナーゼ

キチナーゼの触媒反応は、キチン及びキトデキストリンの N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニド 1,4- $\beta$ -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を修正した。酵素特性の「本品はキチンを加水分解する」を、基質としてキチンに加え「キトデキストリン」も含むように「本品はキチン質を加水分解する」とし、EC ナンバー 3.2.1.52  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase を追記した。

酵素活性測定法では、従来のエチレングリコールキチン法に加え、新規に p-ニトロフェニル法（第2法）を追加した。この方法は、酵素を基質 p-ニトロフェニル N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドに作用させ、生成した p-ニトロフェノールを比色定量して求める測定法である。

##### 7) グルカナーゼ

新規流通品目が追加されたため、新規活性測定として第3法（DNS法）を追加した。この測定法は、 $\beta$ -グルカンを基質として酵素を作用させ、生成した還元糖を 3,5-ジニトロサリチル酸（DNS）によ

り比色定量して測定する方法である。

#### 8) グルコアミラーゼ

新規流通品目が追加されたため、新規活性測定として第3法（PNPG比色法）を追加した。この測定法は、パラニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド（PNPG）を基質として酵素を作用させ、生成したパラニトロフェノール（PNP）を比色定量する方法である。

#### 9) $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ

平成17年度に作成した  $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ自主規格では、ECナンバーの異なる8種の酵素を収載した。本年度調査では、 $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼに含まれる酵素を改めて調査し、成分規格と活性測定法を見直した。以下に調査の概要をまとめた。

$\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼはグルコシル基、又はグルカン鎖を転移する反応を触媒する酵素である。IUBMBは、 $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼのうち、転移反応が分子間で行われる酵素を EC2.4.1 群（EC2:Transferase → EC2.4:Glycosyltransferases → EC2.4.1:Hexosyltransferases）に、転移反応が分子内で行われ結果として構造異性化をもたらす酵素を EC5.4.99 群（EC5:Isomerases → EC5.4:Intramolecular Transferases → EC5.4.99:Transferring Other Groups）に分類している。さらに IUBMB は基質特異性や反応特異性の違いにより、本酵素をさらに細かく分類し、異なる EC ナンバーと名称を与えている。平成18年度自主規格では、平成17年度規格の8種の酵素に加え、昨年度は準備が間に合わなかった Dextrin dextranase (2.4.1.2)を新たに追加し、合計9種の酵素を  $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼとして収載した。下表は、これら9種の酵素の、ECナンバー、名称、酵素特性をまとめたものであるが、いずれの酵素も  $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼに属する酵素であると判断した。

EC ナンバー	Accepted name	Systematic name	基質と反応
2.4.1.1	Phosphorylase	1,4- $\alpha$ -D-glucan:phosphate $\alpha$ -D-glucosyltransferase	澱粉、澱粉分解物 グルコシル基転移
2.4.1.2	Dextrin dextranase	1,4- $\alpha$ -D-glucan:1,6- $\alpha$ -D-glucan 6- $\alpha$ -D-glucosyltransferase	澱粉、澱粉分解物 グルコシル基転移
2.4.1.7	Sucrose phosphorylase	Sucrose:phosphate $\alpha$ -D-glucosyltransferase	砂糖 グルコシル基転移
2.4.1.18	1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme	(1,4- $\alpha$ -D-glucan:1,4- $\alpha$ -D-glucan 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transferase)	澱粉、澱粉分解物 グルカン鎖転移
2.4.1.24	1,4- $\alpha$ -glucan 6- $\alpha$ -glucosyltransferase	(1,4- $\alpha$ -D-glucan:1,4- $\alpha$ -D-glucan (D-glucose) 6- $\alpha$ -D-glucosyltransferase)	澱粉、澱粉分解物 グルコシル基転移
2.4.1.25	4- $\alpha$ -glucanotransferase	(1,4- $\alpha$ -D-glucan:1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -D-glycosyltransferase)	澱粉、澱粉分解物 グルコシル基もしくは グルカン鎖転移
5.4.99.11	Isomaltulose synthase	Sucrose glucosylmutase	砂糖 グルコシル基転移
5.4.99.15	(1→4)- $\alpha$ -D-glucan 1- $\alpha$ -D-glucosylmutase	(1→4)- $\alpha$ -D-glucan 1- $\alpha$ -D-glucosylmutase	澱粉分解物 グルコシル基転移
5.4.99.16	Maltose $\alpha$ -D-glucosyltransferase	Maltose $\alpha$ -D-glucosylmutase	マルトース グルコシル基転移

自主規格の作成においては、下記の考え方で成分規格、酵素活性測定法を検討し作成した。

確認試験は、酵素の基原・性質により9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 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 9 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とした。このうち、第 9 法は Dextrin dextranase (EC 2.4.1.2) の確認試験として、第 8 法は起源の異なる 4- $\alpha$ -glucanotransferase (EC 2.4.1.25) にも対応可能な確認試験として、本年度新たに追加したものである。

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 EC ナンバーを付記した。その概要は、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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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。本年度、新たな活性測定法の追加は行っていないが、活性測定法第 3 法を適用できる酵素に 4- $\alpha$ -glucanotransferase (EC 2.4.1.25) を、第 8 法を適用できる酵素に Dextrin dextranase (EC 2.4.1.2) を追加した。

#### 10) グルコースイソメラーゼ

自主規格作成時にデータのなかった *Streptomyces griseofuscus* 由来のグルコースイソメラーゼ活性を測定するために、新規活性測定法（第 2 法と第 3 法）を追加した。第 2 法（システイン-硫酸法）は、ブドウ糖にグルコースイソメラーゼが作用するとき、生成したフラクトースをシステイン-硫酸法で発色させ、吸光度を測定して求める方法である。第 3 法（HPLC 法）は、酵素がブドウ糖に作用して生成したフラクトースを HPLC で定量する方法である。

#### 11) シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

本酵素は、デンプン、デキストリンそしてマルトオリゴ糖を基質として、加水分解反応、シクロデキストリン合成反応、カップリング反応、不均化反応を触媒する。これまでの活性測定は、デンプンの加水分解反応に基づき反応液中の還元力が増大するのを検出する方法（第 1 法）とシクロデキストリン合成反応に基づき生成したシクロデキストリンを結晶化させて検出する方法（第 2 法）が記載されている。このうち第 2 法は、得られる結晶が均一ではなく正確な酵素活性を求めることが困難である問題点があった。そこで、シクロデキストリン合成反応に基づく活性測定法として、pH 指示薬がシクロデキストリンに包接されることで極大吸収波長が変化することを利用し、生成するシクロデキストリンを定量する方法を用いて、酵素活性を測定する方法を新たに追加した。なお、酵素の特性で生成するシクロデキストリンの種類が異なるが、使用する pH 指示薬を  $\beta$ -シクロデキストリンの場合にはフェノールフタレインを（第 3 法）、 $\gamma$ -シクロデキストリンにはプロモクレゾールグリ

ーンを(第4法)用いることで、それぞれのシクロデキストリンを特異的に検出することが可能である。

#### 12) セルラーゼ

自主規格作成時にデータのなかった *Pycnoporou s coccineus* 由来のセルラーゼ活性を測定するために、新規活性測定法(第4法と第5法)を追加した。第4法(ろ紙分解力測定法-DNS-フェノール試薬法)は、ろ紙にセルラーゼが作用したときに生成する還元糖をDNS(ジニトロサリチル酸)-フェノール試薬により定量する方法である。第5法(セルロース糖化力測定法-DNS-フェノール試薬法)は、カルボキシメチルセルロースにセルラーゼが作用したときに生成する還元糖をDNS(ジニトロサリチル酸)-フェノール試薬により定量する方法である。

#### 13) トランスグルコシダーゼ

新規流通品目が追加されたため、新規活性測定として第2法(HPLC法)を追加した。この測定法は、マルトースを基質として酵素を作用させ、生成したトリサッカライドをHPLCにより定量する方法である。

#### 14) プルラーナーゼ

新規酵素活性測定法として第2法(レッドプルラン比色法)を追加した。この測定法は、合成基質レッドプルランに酵素が作用して生じる、エタノールに可溶性色素の量を比色定量する方法である。

#### 15) プロテアーゼ

新規流通品目が追加されたため、新規活性測定として第3法(アゾカゼイン法)及び第4法(ニトロアニリド法)を追加した。第3法は、アゾカゼインを基質として酵素を作用させ、生成するアゾ色素の量を比色測定する方法である。第4法は、パラニトロアニリド(pNA)を付加した合成ペプチド(スクシニルトリアラニンパラニトロアニリド:AAApNA)を基質として酵素を作用させ、生成するpNAの量を比色測定する方法である。

#### 16) ペクチナーゼ

新規酵素活性測定法として第5法、第6法、第7法を追加した。第5法は、酵素を基質ポリガラクトチュロン酸ナトリウムに作用させ、生成した不飽和ガラクトチュロン酸を波長235nmにおける比色測定により定量する方法である。第6法は、酵素をポリガラクトチュロン酸に作用させ、生成するガラクトチュロン酸残基の還元力をDNS(ジニトロサリチル酸)-フェノール試薬法により比色定量する方法である。また、第7法は、ペクチン溶液に酵素を一定時間作用させた後、ヨウ素滴定法により、ペクチンを分解して得られるガラクトツロン酸(ウロン酸)量を測定し、酵素活性を求める方法である。

#### 17) ホスホリパーゼ

新規酵素活性測定法として第3法(遊離脂肪酸滴定法)を追加した。この方法は、酵素反応により遊離した脂肪酸の量を滴定により求める方法である。

### <考察>

既存添加物酵素においては種々の問題があり、昨年度から実施している食品用酵素の流通実態調査からも検討課題として上がった既存添加物酵素の名称と基原に関する問題、自主規格作成における従来からの検討課題であった酵素活性規格の設定と酵素活性測定法の統一に関する問題を総合的に検討した。

酵素活性測定法の新規作成と統合を検討する中で、上述のデンプン糖化力のような酵素活性測定法自主規格案を作成したが、測定原理が同じでいくつもの方法・手順を設定したり、それぞれの酵素活性単位定義が異なっているのは、公定書法としては不適切と考えられる。新規作成と統合を進めるにあたっては、従来より既存添加物自主規格の酵素活性測定法作成の方針として、定量の原理や



基質が異なる場合は新規作成、原理がほぼ同じであれば統合することで進めてきており、酵素活性測定の場合においては、反応温度、pH、緩衝液の種類、酵素試料溶解液等を種々の性質の異なる酵素に対応できるようにしていること、及び、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」を考慮して検討する必要がある。

これらの問題点を含む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は、本年度の調査検討結果として示した「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」を踏まえた更なる調査研究が必要であると考えます。

#### (4) 規格案

見直した酵素一般規格（案：第 3 版自主規格との対比表）、改訂した酵素 2 品目（キチナーゼ、 $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ）の成分規格（案）、及び 新規方法を追加した 18 の酵素活性測定法（案）は、別紙に示した。

以上

## α-アミラーゼ活性測定法

第1法（ヨウ素-デンプン反応法） 酵素を基質デンプンの直鎖部分（アミロース）に作用させ、デンプンの低分子化に伴ってデンプンのヨウ素による青色呈色の減少を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、デンプンのヨウ素による呈色の減少が試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に適量の水、緩衝液又は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0.2~0.5単位/mlである。

### (2) 基質溶液

あらかじめ、バレイショデンプン約1gを精密に量り、105℃で2時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物1.000gに対応するバレイショデンプンを正確に量り、水20mlを加え、よくかき混ぜながら徐々に水酸化ナトリウム溶液（2→25）5mlを加えてのり状とする。次に、沸騰水浴中で混ぜながら3分間加熱した後、水25mlを加え、冷後、塩酸（18→100）を加えて正確にpH 7.0に調整する。次に適切な種類、pHの緩衝液10mlを加え、更に水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

### (3) 操作法

基質溶液10mlを正確に量り、37±0.5℃で10分間加温した後、試料溶液1mlを正確に加えて直ちに振り混ぜる。37±0.5℃で正確に10分間反応させた後、この液1mlを正確に量り、別に用意した0.1mol/L塩酸10mlに加えて直ちに振り混ぜる。次にこの液0.5mlを正確に量り、0.0002mol/Lヨウ素試液10mlを加えて直ちに振り混ぜた後、660nmにおける吸光度を測定する（ $A_T$ ）。別に試料溶液の代わりに水を用い、同様に操作し、吸光度を測定し（ $A_B$ ）、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分間にデンプンのヨウ素による青色を10%減少させる酵素量を1単位とする。

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

ただし、

$A_T$	: 反応液の吸光度
$A_B$	: 反応対照液の吸光度
100	: 百分率
10	: 単位量当たりの10%の減少度
10	: 反応時間（分）
W	: 試料溶液1ml中の試料の量（g又はml）

第2法（デンプン粘度低下力測定法） 酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴う粘度の低下を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、粘度の変化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、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、通例1単位/mlを中心に濃度が5%ずつ異なるように調製し、試料溶液とする。必要ならば加温抽出及びろ過する。

### (2) 基質溶液

あらかじめ、バレイショデンプン約10gを精密に量り、105℃で2時間乾燥し、その減量を測定す

る。その乾燥物1.000gに対応するバレイショデンプンを正確に量り、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) , 酵素試験用又は適切な種類, pH の緩衝液又は塩類溶液10mlを正確に加え、水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

### (3) シリコン油封入試験管の調製

操作法に用いるものと同質・同型の試験管にシリコン油、酵素試験用11ml (10.6g) を正確に封入する。シリコン油は25℃における粘度 $500 \pm 25 \text{mm}^2/\text{s}$  ( $500 \pm 25 \text{cSt}$ ) , 粘度温度係数 $0.60 \pm 0.02$ のものを使用する。65℃における粘度は $250 \pm 20 \text{mm}^2/\text{s}$  ( $250 \pm 20 \text{cSt}$ ) である。

### (4) 操作法

試験管 (18×180mm) に基質溶液10mlを正確に量り、試料溶液 1 mlを正確に加え、試験管にゴム栓をし、激しく振り、デンプンを均一に分散させた後、すばやく栓を取り、直ちに激しく振り混ぜながら沸騰水浴中で加熱し、デンプンが糊化したとき、直ちに $65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温槽に移す。正確に15分間反応させた後、同じ恒温槽にあらかじめ浸しておいた2本のシリコン油封入試験管の間に反応液入り試験管をはさんで、3本の試験管をそろえて持ち、恒温槽から取り出し、下部を恒温槽の縁にかけながら、口部を水平から45度下方に速やかに傾けて、試験管内の流動性を観察し、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、シリコン油と同じ速さで流動するときの酵素量を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) = 試料溶液の希釈倍数

濃度が異なる一連の試料溶液について濃度の低い順に試験をするとき、ある試料溶液に対応する反応液がシリコン油より遅く、次に高い濃度の試料溶液に対応する反応液が速く流動する場合、両試料溶液のちょうど中間の濃度の活性を1単位 (単位/ml) とする。

**第3法 (SKB変法)** 酵素を基質デンプンに作用させ、低分子化に伴うヨウ素呈色の発色強度の低下と色調の変化を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、色の変化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、緩衝液又は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 $0.1 \sim 0.125$ 単位/mlである。

#### (2) 基質溶液

あらかじめ、可溶性デンプン、酵素試験用約1gを精密に量り、 $105^\circ\text{C}$ 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2.00gに対応する可溶性デンプン、酵素試験用を正確に量り、水20mlを加え、よくかき混ぜながら約50mlの沸騰水中に徐々に加え、絶えずかき混ぜながら沸騰を1~2分間持続した後、冷却する。次に2mol/Lの酢酸緩衝液 (pH 4.6) 5ml及び水を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

#### (3) 操作法

平底試験管 (30×120mm) に基質溶液10mlを正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で15分間加温した後、あらかじめ $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した試料溶液 5 mlを正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保ち、正確に19分間経過したときから20秒間隔で反応液 1 mlを正確にとり、あらかじめ $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温したヨウ素希釈液 5 mlを入れた試験管 (18×165mm) 中に加え、振り混ぜる。直ちにヘリーゲコンパレーターの角形セルに液を移して、色調と濃度をカラーディスクと比較する。反応液の色がカラーディスクと同じになる時点を反応終点 (T分) とし、反応終点となるまで反応液の測定をくり返す。具体的には、経時的に反応液をサンプリングして色の比較を行うとき、カラーディスクの色に対して、ある時点の色調は暗く、次の時点で明るくなる連続した2つの反応時間を記録し、その中間の時間を反応終点とするか、又はカラーディスクの色調と同等と判断さ

れた時点を反応終点とし、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、60分間に1gのデンプンを加水分解する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g又は単位/ml)} = 0.02 \times 10 \times \frac{60}{T} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- 0.02 : 基質溶液のデンプン濃度 (g/ml)
- 10 : 基質溶液の量 (ml)
- 60 : 単位換算係数 (60分)
- T : 酵素反応の反応終点 (分)
- 5 : 酵素反応に使用する試料溶液の量 (ml)
- W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g又はml)

**第4法 (NADH比色法)** 酵素を基質マルトトリオースに作用させ、生成した $\alpha$ -グルコースを $\beta$ -グルコースに変換し、NADの存在下でグルコースデヒドロゲナーゼを作用させ、生成したNADHを比色測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

あらかじめ、塩化ナトリウム溶液 (2.9→50) 10mlに水を加えて1,000mlとし、希釈液とする。

本品に希釈液を加えて溶かし、試料溶液とする。試料溶液の濃度は、生成ブドウ糖がブドウ糖検量線の範囲内に入るように調製する。

(2) 基質溶液

マルトトリオース 1gに0.1mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて溶かし、正確に50mlとする。用時調製する。

(3) ブドウ糖標準溶液の調製

あらかじめブドウ糖約 1gを精密に量り、105℃で6時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物1.600gに対応するブドウ糖を正確に量り、水又は適切な緩衝液を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。得られた溶液をさらに水又は適切な緩衝液で希釈し、1ml中に0, 16, 32, 48, 64, 80, 96  $\mu$ gの各濃度のブドウ糖標準溶液を調製する。

(4)  $\alpha$ -アミラーゼ検量線

$\alpha$ -アミラーゼ標準を適量の希釈液 (又は水、緩衝液、塩類溶液) を加えて溶かし、3.0, 6.0, 9.0 単位/gの標準溶液を調製する。

(5) 操作法

あらかじめ、基質溶液0.5mlを $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温し、この液に $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した試料溶液0.5mlを正確に加えて直ちに振り混ぜる。 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に30分間反応させた後、反応停止液 1mlを正確に加えてよく振り混ぜる。更にグルコースデヒドロゲナーゼ試液 ( $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用) 3mlを正確に加えてよく振り混ぜる。室温で正確に30分間放置後、340nmの吸光度を測定する ( $A_T$ )。別に対照として試料溶液に反応停止液を加えた後、基質溶液を加えて以下同様に操作を行う ( $A_B$ )。

ブドウ糖検量線は、各濃度のブドウ糖標準溶液 2mlを正確に量り、グルコースデヒドロゲナーゼ試液 ( $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用) 3mlを正確に加えてよく振り混ぜる。室温で正確に30分間放置後、340nmの吸光度を測定し、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  $\mu$ molのマルトトリオースを分解する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g又は単位/ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 4}{A_G \times 30 \times 180.2 \times W}$$

ただし、

- $A_T$  : 反応液の吸光度
- $A_B$  : 対照液の吸光度
- $A_G$  : ブドウ糖 1  $\mu$ g/mlの吸光度 (検量線より算出)
- 180.2 : ブドウ糖の分子量

- W : 試料溶液1 ml中の試料の量 (g又はml)  
 4 : 反応に用いた試料の液量 (ml) に対する検量線に用いたブドウ糖溶液の量の比  
 30 : 反応時間 (分)

(6) 試薬・試液

- 1) マルトトリオース (市販試薬)  
 たとえば和光純薬工業社製 (製品番号137-06541) 又は同等品でも使用できる。
- 2) グルコースデヒドロゲナーゼ (市販試薬, 生化学用)  
 たとえば和光純薬工業社製 (製品番号071-02411) 又は同等品でも使用できる。

**第5法 (BPNG7比色法)** 非還元末端をブロックしたパラニトロフェニルマルトヘプトシド (BPNG7) に酵素を作用させ、生じたパラニトロフェニルオリゴ糖をさらにグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼで分解し、遊離したパラニトロフェニルを比色測定して求める方法である。

(1) 試料溶液

あらかじめ、マレイン酸 6.7g, 塩化ナトリウム 2.92g, 塩化カルシウム 0.29gを水に溶解し、pHを5.6に調整後、正確に1,000mlとした0.05mol/Lマレイン酸溶液を調製する。次に、牛血清アルブミン (BSA) 1.0gに0.05mol/Lマレイン酸溶液を加えて100mlとし、希釈液とする。

操作法により試験するとき、パラニトロフェニルの増加が、試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に適量の希釈液 (又は水, 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2.3~11.0単位/gである。

(2) 基質溶液

基質バイアル1本につき、希釈液10mlを加え、完全に溶解させ、基質溶液とする。

(3)  $\alpha$ -アミラーゼ検量線

$\alpha$ -アミラーゼ標準を適量の希釈液 (又は水, 緩衝液, 塩類溶液) を加えて溶かし、3.0, 6.0, 9.0 単位/gの標準溶液を調製する。

(4) 操作法

試料溶液0.05mlを25℃で2分間加温した後、基質溶液0.40mlを加えて直ちに混合する。25℃で正確に5分間反応させた後、反応停止液0.5mlを正確に加えてよく振り混ぜ、410nmの吸光度を測定する ( $A_T$ )。別に対照として試料溶液に希釈液を用い、基質溶液を加えて以下同様に操作を行う ( $A_B$ )。

これらの値と、パラニトロフェニルの吸光係数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  $\mu$ molのBPNG7を分解する酵素量を1単位とする。

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

ただし、

- $A_T$  : 反応液の吸光度  
 $A_B$  : 対照液の吸光度  
 $A_S$  :  $\alpha$ -アミラーゼ標準1単位/gの吸光度の吸光度 (検量線より算出)  
 $D$  : 希釈係数

(5) 試薬・試液

- 1) Ceralpha Method Reagent基質バイアル (市販試薬)  
 メガザイムズ製 (製品番号K-cera) : パラニトロフェニルマルトヘプトシド (BPNG7) とグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを含む。
- 2) 反応停止液 : 0.2mol/Lホウ酸溶液  
 ホウ酸6.183gを正確に量り、水又を加えて溶かし、1mol/L水酸化ナトリウム水溶液でpHを10.2とし、さらに水を加えて500mlとする。反応停止として使用する。

## α-アミラーゼ測定結果

品名 SPEZYME FRED

(基原: *Bacillus licheniformis* 由来)

規格項目	規格	測定回数	ロット番号		
			1016194004	1016226901	1076228901
性状	白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は無～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回	褐色の液体 特異なにおいが有る	褐色の液体 特異なにおいが有る	褐色の液体 特異なにおいが有る
確認試験	酵素活性を示す		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		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		3.0 μg/g 以下	3.0 μg/g 以下	3.0 μg/g 以下
細菌数	10,000/g 以下		10,000/g 以下	10,000/g 以下	10,000/g 以下
大腸菌	認めない		認めない	認めない	認めない
酵素活性 (α-アミラーゼ 活性測定法第5法 (BPNG7 比色法))	単位/g		18,685	17,855	18,120

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液: α-アミラーゼ活性測定法第5法(BPNG7比色法)で2.3~11.0単位/gになるように本品に希釈液を加えて溶解し、試料液とした。

基質: Ceralpha Method Reagent 基質バイアル メガザイム製(製品番号 K-cera)を使用した。

反応 pH: pH5.6

反応温度: 25°C

## デンプン糖化力活性測定法

酵素を基質デンプンに作用させ、グルコシド結合の切断により生成した還元力を測定して求める方法である。

### (1) 試料溶液

試料溶液 1: 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、本品に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、必要があればろ過する。  
通例 1 ml 中に 0.4~0.8 単位を含む液を調製する。

試料溶液 2: 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、本品に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、必要があればろ過する。  
通例 1 ml 中に 1~3 単位を含む液を調製する。

試料溶液 3: 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、本品に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、必要があればろ過する。  
通例 1 ml 中に 0.2~20 単位を含む液を調製する。

試料溶液 4: 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、本品に適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、必要があればろ過する。  
通例 1 ml 中に 7.2~14.4 単位を含む液を調製する。

### (2) 基質溶液

基質溶液 1: あらかじめ、バレイショデンプン約 1 g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 1.000g に対応するバレイショデンプンを正確に量り、水 20ml を加え、よくかき混ぜながら徐々に水酸化ナトリウム溶液 (2→25) 5 ml を加えてのり状とする。次に、沸騰水浴中で混ぜながら 3 分間加熱した後、水 25ml を加え、冷後、塩酸 (18→100) を加えて正確に pH7.0 に調整する。次いで、測定する酵素に適した種類、pH の緩衝液 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

基質溶液 2: あらかじめ、可溶性デンプン、酵素試験用約 1 g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 1.000g に対応する可溶性デンプン、酵素試験用を正確に量り、少量の水に懸濁し、これを約 50ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 5 分間煮沸した後、流水中で冷却する。冷後、測定する酵素に適した種類、pH の緩衝液 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

基質溶液 3: あらかじめ、バレイショデンプン約 1 g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 2.4g に対応するバレイショデンプンを正確に量り、水 50ml を加え、よくかき混ぜながら徐々に水酸化ナトリウム溶液 (8.3→100) 10ml を加えてのり状とする。次に、沸騰水浴中で混ぜながら 5 分間加熱溶解する。冷後、塩酸 (18→100) を加えて正確に pH5.5 に調整する。次いで、測定する酵素に適した種類、pH の緩衝液 10ml 及び水を

加えて正確に 200ml とする。用時調製する。

基質溶液 4：あらかじめ、可溶性デンプン、酵素試験用約 1g を精密に量り、105℃で 2 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 20.0g に対応する可溶性デンプン、酵素試験用を正確に量り、少量の水に懸濁し、これを約 750ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 2 分間煮沸した後、流水中で冷却する。冷後、測定する酵素に適した種類、pH の緩衝液 20ml 及び水を加えて正確に 1,000ml とする。用時調製する。

基質溶液 5：あらかじめ、可溶性デンプン、酵素試験用約 1g を精密に量り、105℃で一晩乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 2.0g に対応する可溶性デンプン、酵素試験用を正確に量り、水約 60ml に懸濁し沸騰水中で完全に溶解させる。恒温槽で 20℃まで冷却させ、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝溶液 (1mol/L, pH4.6) を 2ml 添加し、水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

### (3) 操作法

#### (銅試薬法 1)

基質溶液 1 又は 2 を 10ml 正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間加温した後、試料溶液 1 を 1ml 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 10 分間放置した後、デンプン消化力試験用フェーリング試液のアルカリ性酒石酸塩液 2ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。次に、デンプン消化力試験用フェーリング試液の銅液 2ml を正確に加え、軽く振り混ぜた後、沸騰水浴中で正確に 15 分間加熱し、直ちに  $25^\circ\text{C}$  以下に冷却する。次に、濃ヨウ化カリウム溶液 (30+70, 用時調製) 2ml 及び薄めた硫酸 (1→6) 2ml を正確に加え、遊離したヨウ素を 0.05mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する (a ml)。ただし、滴定の終点は、滴定が終点近くなったとき、溶性デンプン試液 1～2 滴を加え、生じた青色が脱色するときとする。

別に、基質溶液 1 を用いた場合は、基質溶液の代わりに水 10ml を正確に量り、同様に操作して滴定する (b ml)。基質溶液 2 を用いた場合は、基質溶液 10ml を正確に量り、デンプン消化力試験用フェーリング試液のアルカリ性酒石酸塩液 2ml を正確に加えた後、試料溶液 1 を 1ml 正確に加え、以下同様に操作して滴定する (b ml)。

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 1mg のブドウ糖に相当する還元力の増加をもたらす酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (b - a) \times 1.6 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

(b - a) × 1.6 : ブドウ糖の量 (mg)

1.6 : 0.05mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 1ml は、1.6mg のブドウ糖に相当する。

10 : 反応時間 (分)

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)



(銅試薬法 2)

基質溶液 3 を 5 ml 標線付き (25ml) 試験管に正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間保温した後、同温に保温した試料溶液 2 を 1 ml 正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 20 分間反応させた後、沸騰水浴中に 10 分間浸漬して反応を停止させ、冷後、水で 25ml とする。(T)

別に空試験用として、試料溶液 2 を 1 ml 正確に標線付き (25ml) 試験管に量り、沸騰水浴中に 10 分間浸漬して失活させた後、冷後、基質溶液 3 を 5 ml 正確に加え、水で 25ml とする。

(B)

次に Somogyi 試薬を用いて、還元力を測定する。試験管 (30×190mm) 2 本に、上記の 25ml に定容した T 及び B をそれぞれ正確に 5 ml 量り、Somogyi 試薬 5 ml を加え、軽く振り混ぜる。試験管の口を中空ガラス球で被い、金属籠に入れ、沸騰水浴中に 30 分間浸漬する。別に、試験管 (30×190mm) 2 本に、ブドウ糖溶液 (1.0mg/5 ml) 及び水をそれぞれ正確に 5 ml を量り、同様に操作を行う。(G) 及び (C)

冷却後、2.5% ヨウ化カリウム溶液 2.0ml を加え、次に 1.5mol/L 硫酸 1.0ml を速やかに加えて混ぜ、約 1 分後、遊離したヨードを 0.005mol/L チオ硫酸ナトリウム試液で滴定する。(指示薬としてデンプン試液、溶性を用いる。)

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、10 分間に 1 mg のブドウ糖に相当する還元力の増加をもたらす酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(B-T)}{(C-G)} \times \frac{25}{5} \times \frac{10}{20} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- T : 反応液の滴定値
- B : 空試験の滴定値
- G : ブドウ糖溶液 (1.0mg/5 ml) の滴定値
- C : 水の滴定値
- 25 : 反応停止後の総容量
- 5 : 滴定に用いた液量
- 10 : 酵素活性単位の定義に 10 分間を使用
- 20 : 反応時間 (20 分)
- W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(銅試薬法 3)

基質溶液 5 を 40ml、100ml 容三角フラスコに入れ、 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で保温した後、試料溶液 4 を 0.4ml 正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 1 時間反応させた後、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 12ml 加え反応停止させ水で 80ml とする。

試験管内で、フェーリング溶液 5 ml に適量の反応液を加え混合し、沸騰水中で 2 分間加熱

する。メチレンブルー試液を5滴添加しさらに1分間加熱する。メチレンブルー試液の青色が消え、赤色になるそれぞれの反応液の量を滴定終点とする。

その酵素活性の単位は、基質溶液5を40ml用いて20℃で反応させた場合、60分間に5mlのフェーリング溶液を還元するに相当する還元糖の増加をもたらす酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{1}{X} \times \frac{40}{0.4} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

X : 5 ml のフェーリング溶液を還元した反応溶液の量 (ml)

40 : 基質溶液の量 (ml)

0.4 : 試料溶液の量 (ml)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

#### (鉄試薬法)

基質溶液4を200ml正確に量り、20℃±0.2℃で30分間加温した後、試料溶液3を10.0ml正確に加え、直ちに混和する。この液を20℃±0.2℃で正確に30分間放置した後、0.5mol/L水酸化ナトリウム溶液20mlを加え、さらに水を加えて全量を正確に250mlとし、よく混和する。この反応液5.0mlにフェリシアン化アルカリ溶液10.0mlを加え、軽く振り混ぜた後、沸騰水浴中で正確に20分間加熱し、直ちに25℃以下に冷却する。次にAPZ溶液25ml及び濃ヨウ化カリウム溶液2を1ml正確に加え、遊離したヨウ素を0.05mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(a ml)。

別に、0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液20mlに試料溶液1を10.0ml加え、よく混和した後、基質溶液4を200ml加え、さらに水を加えて全量を正確に250mlとし、よく混和し、以下同様に操作して滴定する(b ml)。

その酵素活性の単位は、基質溶液4を100ml用いて20℃で反応させた場合、60分間に5mlのデンプン消化力試験用フェーリング試液を還元するに相当する還元糖の増加をもたらす酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (b - a) \times 0.23 \times D$$

ただし、

0.23 : 係数

D : 希釈倍率

#### (4) 試薬・試液

##### 1) Somogyi 試薬

無水リン酸水素二ナトリウム 28.0g と (+) 酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 (ロッシェル塩) 40.0g を水 700ml に溶かし、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液 100ml を加え、10%硫酸銅 (II) 5 水和物溶液 80ml を加える。次に、硫酸ナトリウム、無水 180.0g を加えて溶解し、最後に 1/6 mol/L ヨウ素酸カリウム溶液 25ml を加え、水を加えて 1,000ml にする。

1～2日放置すると、不純物が沈殿するので、上澄み液を傾斜して濾紙（No. 2）でろ過する。遮光密栓して保存する。

1～2年安定であるが、冬季は硫酸ナトリウムが結晶する場合があるので、20～25℃で保存する。

2) 1/6 mol/L ヨウ素酸カリウム溶液

ヨウ素酸カリウム 3.57g を量り、水を加えて溶かし 100ml とする。遮光して保存する。

3) ブドウ糖溶液（1.0mg/5 ml）

無水結晶ブドウ糖 1.0g を正確に量り、水に溶かして正確に 100ml とする。この液 5 ml を正確に量り、水を加えて正確に 250ml とする。本液 1 ml は、ブドウ糖 0.2mg を含む。

4) フェリシアン化アルカリ溶液

フェリシアン化カリウム 16.5g 及び無水炭酸ナトリウム 22.0g を水に溶解し、1,000ml とする。

5) APZ 溶液

塩化カリウム 70g 及び硫酸亜鉛 7 水和物 20g を 700ml の水に溶解し、氷酢酸 200ml を加え、さらに水を加えて全量を 1,000ml とする。遮光して保存する。

6) 濃ヨウ化カリウム溶液 2

ヨウ化カリウム 50g を水に溶解し、100ml とする。ここに 50%水酸化ナトリウム溶液を 2 滴滴下し、よく混和する。

7) フェーリング溶液

フェーリング A 液

硫酸銅五水和物 69.3g を濃硫酸 0.5mL を含む水に溶かし、水で 1L とする。

フェーリング B 液

酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 346g と水酸化ナトリウム 100g を水 600ml に溶かし、水で 1L とする。

A 液と B 液を使用直前に等量混合して調製する。

## β - アミラーゼ測定結果

品名      GODO-GBA (基原：大麦麦芽由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			#631131	#641131	#650131
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	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある
		②	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある
		③	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわずかに特異なにおいがある	褐色の液体でわず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 <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	10,000 個/g 以下	①	10,000 個/g 以下	10,000 個/g 以下	10,000 個/g 以下
		②	10,000 個/g 以下	10,000 個/g 以下	10,000 個/g 以下
		③	10,000 個/g 以下	10,000 個/g 以下	10,000 個/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	2,201	2,201	2,126
		②	2,201	2,216	2,140
		③	2,216	2,232	2,140
		④	2,216	2,232	2,126
		⑤	2,216	2,232	2,111
		⑥	2,201	2,232	2,126
	平均値(n=6)	単位/g	2,209	2,224	2,128
	標準偏差		9	13	11
	CV(%)		0.39	0.59	0.51
	最大値	単位/g	2,216	2,232	2,140
最小値	単位/g	2,201	2,201	2,111	

\* 確認試験の方法

試料溶液 4、基質溶液 5、銅試薬法 3