

# キチナーゼ活性測定法

## 第1法（エチレングリコールキチン法）

酵素を基質エチレングリコールキチンに作用させ、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 0.3~1.2 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

エチレングリコールキチン 0.50g を正確に量り、0.05mol/L リン酸緩衝液（pH7.0）（又は適切な緩衝液）を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

### (3) N-アセチルグルコサミン検量線

N-アセチルグルコサミン 1.00g を正確に量り、0.05mol/L リン酸緩衝液（pH7.0）（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 1ml, 2ml, 4ml, 6ml, 8ml 及び 10ml を正確に量り、0.05mol/L リン酸緩衝液（pH7.0）（又は適切な緩衝液）を加えて正確に 100ml とし、標準液とする。それぞれの標準液 1ml 中には、N-アセチルグルコサミンが 100, 200, 400, 600, 800 及び 1,000  $\mu$ g 含まれる。試験管に標準液 0.55ml を正確に量り、3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 1.65ml 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 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.8ml を加え振り混ぜ、550nm における吸光度を測定する。横軸に N-アセチルグルコサミン濃度、縦軸に吸光度をとり、N-アセチルグルコサミン検量線を作成する。

### (4) 操作法

試験管に基質溶液 0.5ml を正確に量り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間保温した後、試料液 0.05ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 2 時間反応させた後、3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 1.65ml 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 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.8ml 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-フェノール試液を加え、次に基質溶液 0.5ml と試料液 0.05ml 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 15 分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 8.8ml 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  $\mu$ mol の N-アセチルグルコサミンに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times 0.55 \times \frac{1}{221} \times \frac{1}{120} \times \frac{1}{0.05} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- $A_T$  : 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 N-アセチルグルコサミン濃度 ( $\mu$ g/ml)

0.55	: 基質溶液及び試料液の総液量 (ml)
221	: N-アセチルグルコサミンの分子量
120	: 反応時間 (分)
0.05	: 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) エチレングリコールキチン

たとえば、生化学工業社製（製品番号 400681）又は同等品が使用できる。

##### 2) 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 を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 4,400ml とする。この液と酒石酸カリウムナトリウム 1,275g を正確に量り、1.125mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1,500ml に加えよくかき混ぜる。

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

第1液に第2液 345ml と炭酸ナトリウム 34.5g を正確に量って、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 (p-ニトロフェニル法)

酵素を基質 p-ニトロフェニル N-アセチル-β-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-ニトロフェノールの増加が試料濃度に比例する範囲内の試験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 0.08~0.3 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

p-ニトロフェニル N-アセチル-β-D-グルコサミニド 0.017g を正確に量り、100ml の水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

### (3) p-ニトロフェノール検量線

p-ニトロフェノール 0.139g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 500ml とする。この液 6ml および 12ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 100ml とする。試験管にそれぞれの液 1.5ml、0.02mol/L リン酸一カリウム水溶液 0.4ml、水 0.1ml、5%トリクロロ酢酸溶液 0.1ml および 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 2.8ml を正確に量り振り混ぜる。このそれぞれの液は、1ml 中に p-ニトロフェノール 0.0368 μmol および 0.0736 μmol を含む。これらの液につき、水を対照として波長 400nm における吸光度 A1 および A2 を測定する。別に p-ニトロフェノール溶液の代わりに水を用い以下同様の操作をして吸光度 A0 を測定する。これより、横軸に p-ニトロフェノール濃度 (μmol/ml) をとり、縦軸に吸光度差 (A1-A0 および A2-A0) をプロットし、吸光度差が 1 の時の p-ニトロフェノール濃度 F (μmol/ml) を求める。

### (4) 操作法

試験管に基質溶液 1.5ml および 0.02mol/L リン酸一カリウム水溶液 0.4ml を正確に量り、37±0.5℃ で 5 分加温した後、試料溶液 0.1ml を正確に加えて振り混ぜる。37±0.5℃ で正確に 10 分間放置した

後、5%トリクロロ酢酸溶液 0.1ml を加えて振り混ぜ、さらに、0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 2.8ml を正確に量り振り混ぜ、水を対照として波長 400nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に、空試験として、試料溶液の代わりに水 0.1ml を用いて同様に操作を行い、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 p-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g または単位/ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times F \times 4.9}{10 \times 0.1 \times W}$$

ただし、

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 空試験の吸光度

F : 吸光度差が 1 の時の p-ニトロフェノール濃度 F ( $\mu\text{mol/ml}$ )

4.9 : 最終液量 (ml)

10 : 反応時間 (分)

0.1 : 試料溶液量 (ml) : 試料溶液量 (ml)

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

#### (5) 試薬・試液

1) p-ニトロフェニル N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニド

たとえば、シグマ製 (製造番号 N9376) または同等品が使用できる。

2) p-ニトロフェノール

たとえば、シグマ製 (製造番号 1048) または同等品が使用できる。

3) 0.02mol/L リン酸一カリウム水溶液

リン酸一カリウム 2.72g を水に溶かし 1000ml とする。

4) 5%トリクロロ酢酸溶液

トリクロロ酢酸 5g を水 95ml に溶かす。

5) 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)

第 1 液: リン酸一カリウム 27.2g を水に溶かし 1000ml とする。

第 2 液: リン酸二カリウム 34.8g を水に溶かし 1000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ、pH7.0 に調製する。

## キチナーゼ測定結果

品名 キトビアーゼ-BOC (基原: *Streptomyces* sp. 由来、同定中)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			CHI-1	CHI-2	CHI-3
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	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある
		②	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある
		③	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある	濃褐色の粉末で特異なおいがある
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/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 (β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ(キトビアーゼ)活性測定法)	単位/g	①	1.4	1.6	1.5
		②	1.4	1.6	1.4
		③	1.4	1.5	1.5
		④	1.4	1.6	1.5
		⑤	1.4	1.6	1.5
		⑥	1.3	1.5	1.5
	平均 (n=6)	1.4	1.6	1.5	
	標準偏差	0.04	0.05	0.04	
CV (%)	2.9	3.1	2.7		
最大値	1.4	1.6	1.5		
最小値	1.3	1.5	1.4		

\* 確認試験の方法

第2法 β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ(キトビアーゼ)活性測定法に準じた。

\* 酵素活性測定の条件

試料液 : β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ(キトビアーゼ)活性測定法で 0.08~0.3 単位/ml になるように本品に水を加えて溶解し、試料溶液とした。

## グルカナーゼ活性測定法

### 第1法（グルカン糖化力法）

$\beta$ -グルカンを基質として酵素を作用させ、生成した還元糖をソモギー・ネルソン法により比色定量して測定する方法である。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、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、本品に試料希釈溶液（又は、水、適切な緩衝液、塩類溶液）を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 0.0056~0.0287 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

$\beta$ -グルカン 1.0g を正確に量り、水約 60ml に懸濁し、沸騰水浴中で振り混ぜながら 5 分間加温溶解する。冷却後、1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 6.0)（又は適切な緩衝液）を 10ml 加え、更に水酸化ナトリウム試液を加えて pH 6.0（又は適切な pH）に調整し、水を加えて正確に 100 ml とする。用時調製する。

#### (3) ブドウ糖検量線の作成

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。その乾燥した乾燥物 0.900g に対応するブドウ糖を正確に量り、0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて溶かし、正確に 100ml (50  $\mu$ mol/ml) とする。更に、この溶液に 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を加え、0.25, 0.5, 0.75, 1.0 及び 1.25  $\mu$ mol/ml 濃度の標準溶液を調製する。それぞれの液 1 ml を正確に量り、ソモギー試液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、試験管にガラス玉を乗せ、沸騰水浴中で 30 分間加熱する。流水で冷却した後、ネルソン試液 1 ml を正確に加え、ゆるやかに振り混ぜて赤色の沈殿物を完全に溶かし、30 分間放置する。これらの液について、水を対照として、波長 520nm における吸光度を測定し、ブドウ糖量 ( $\mu$ mol) と吸光度の関係を表わす検量線を作成し、ブドウ糖 1  $\mu$ mol 当たりの吸光度  $\alpha$  を求める。

#### (4) 操作法

試料溶液 0.5 ml を正確に量り、40  $\pm$ 0.5℃にて 10 分間加温した後、あらかじめ 40  $\pm$ 0.5℃に保温した基質溶液 0.5ml を加え、直ちに振り混ぜ正確に 30 分間反応させる。次いで、ソモギー試液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、試験管にガラス玉を乗せ、沸騰水浴中で 30 分間加熱する（注 1）。その後、流水で冷却し、ネルソン試液 1 ml を正確に加え、ゆるやかに振り混ぜて赤色の沈殿物を完全に溶かし、30 分間放置する（注 2）。次いで、この液を試験管 (15mm  $\phi$   $\times$  105mm) に移し、3,000 回転/分、10 分間遠心分離する（注 3）。その上澄み液につき波長 520nm における吸光度 ( $A_T$ ) を測定する。

別に、空試験用として試験管 (15mm  $\phi$   $\times$  150mm) に試料溶液 0.5ml を正確に量り、ソモギー試液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、次に基質溶液 0.5ml を正確に加え振り混ぜ、以下同様に操作し吸光度 ( $A_B$ ) 得る。

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。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{A_T - A_B}{\alpha} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- $A_T$  : 試料試験の吸光度  
 $A_B$  : 対照の吸光度  
 $\alpha$  : ブドウ糖 1  $\mu\text{mol}$  当たりの吸光度  
 0.5 : 試料溶液量 (ml)  
 30 : 反応時間 (分)  
 $W$  : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(1) 試薬・試液

- 1)  $\beta$ -グルカン シグマ社製大麦由来  $\beta$ -グルカン又は同等品を用いる。
- 2) 牛血清アルブミン (BSA) 和光純薬工業製, 生化学用又は同等品を用いる。
- 3) アジ化ナトリウム 市販試薬特級
- 4) 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 6.0)

第1液: 酢酸 60g に水を加えて 1,000 ml とする。

第2液: 酢酸ナトリウム・3水和物 136 g を水に溶かして 1,000 ml とする。

第1液と第2液を混ぜ、pH 6.0 に調整する。

5) 試料希釈溶液

牛血清アルブミン (BSA) 0.1 g 及びアジ化ナトリウム 0.325 g を水 500 ml に溶かし、1 mol/l 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100ml および水を加えて正確に 1,000 ml とする。室温保存で1ヶ月を限度に使用する。

6) ソモギー試液

無水炭酸ナトリウム 24.0g, 酒石酸カリウムナトリウム 4水和物 12.0g を水約 200ml に溶かす (A液)。水約 200 ml に硫酸銅 (II) 5水和物 4.0g を溶かし、この溶液をA液に加え混ぜる。次いで炭酸水素ナトリウム 16.0g を加え溶かす (B液)。水 500ml に無水硫酸ナトリウム 180 g を加えて加熱溶解し、冷却後B液に加えて混合し、水を加えて 1,000 ml とする (C液)。C液に沸騰石を入れ 10 分間煮沸し、30℃で7日間放置する。その後、ろ紙(東洋濾紙(株)製 No. 2) を2枚重ねたもので濾過し、褐色瓶に入れて 30℃の暗所に保存し、3ヶ月を限度に使用する。

7) ネルソン試液

水約 800ml にモリブデン酸アンモニウム 4水和物 50.0g を加えて加熱溶解し、冷却後、硫酸 42ml を徐々に加えて混合する (N液)。次に、ひ酸二ナトリウム 7水和物 6.0g を水約 50ml に溶かし、その溶液をN液に加えて混合し、水を加えて 1,000 ml とする。37℃で24時間放置後、褐色瓶に入れる。室温保存で3ヶ月を限度に使用する。

(注1) 沸騰水浴中に試験管をつけても沸騰状態を維持できるように火力を強くする。必要であればパイプヒーターを併用する。また、沸騰水浴中につけてから最初の1~2分間は試験管を振

盪させる。振盪させずに 静置しておくで溶液中で温度境膜が生じ内部まで熱が伝わりにくくなる。そのため、 $2\text{Cu}^{2+} + \text{還元糖} \rightarrow \text{Cu}_2\text{O}$  反応が不十分となり正確な還元力が得られない。

(注2) ネルソン試液添加後、手で緩やかに混ぜる。激しく混ぜると  $\text{Cu}_2\text{O}$  が空気酸化する恐れがあるので、ブレンダーなどを用いることは避ける。また、 $\beta$ -グルカンの沈殿物は凝集しやすいので十分に混ぜる。

(注3) 遠心後、沈殿物にモリブデン（青色）色素がないことを確認する。もし、モリブデン色素があれば再試験を行う。

## 第2法（カードラン糖化力法）

カードランを基質として酵素を作用させ、生成した可溶性糖をフェノール硫酸法で比色定量して測定する方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、可溶性糖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 0.1mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）（又は水、適切な緩衝液、塩類溶液）を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 0.02~0.04 単位/ml である。調製後、30 分以内に試験を行う。

### (2) 基質溶液

カードラン約 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 2g に対応するカードランを正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、よく振り混ぜ均一な懸濁液とする。用時調製する。

### (3) ブドウ糖検量線の作成

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 0.901g に対応するブドウ糖を正確に量り、水に溶かし正確に 500ml とする。この液 1, 2, 3 及び 4 ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 100ml とする。それぞれの液 1 ml 中にはブドウ糖が 0.1, 0.2, 0.3 及び 0.4  $\mu\text{mol}$  含まれる。それぞれの液 1 ml を正確に量って試験管に入れ、5%フェノール試液 1 ml を正確に加え振り混ぜる。次に硫酸 5 ml を速やかに加え、激しくかき混ぜる。これらの液につき、水を対照として、波長 490nm における吸光度  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  及び  $A_4$  を測定する。

別に、ブドウ糖溶液に代えて水 1 ml を用いて同様に操作し、吸光度  $A_0$  を測定する。これより縦軸に吸光度差 ( $A_1 - A_0$ ,  $A_2 - A_0$ ,  $A_3 - A_0$ , 及び  $A_4 - A_0$ )、横軸にそれぞれの液 1 ml 中のブドウ糖量 ( $\mu\text{mol}$ ) をとり、検量線とする。吸光度差 0.500 に対応するブドウ糖量 ( $F \mu\text{mol}$ ) を求める。

### (4) 操作法

基質溶液をビーカーに移し、スターラーで攪拌しながら正確に 1 ml 量り、L 字管に入れる。更に、0.1mol/L リン酸塩緩衝液（pH 7.0）（又は適切な緩衝液）5 ml を正確に加え、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 3~5 分間放置した後、振とうしながら試料溶液 1 ml を正確に加える。この液を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で振とうしながら正確に 30 分間反応させたのち、振とうしながら 0.5mol/L 塩酸試液 1 ml を正確に加え、反応を止める。この液を 3,500 回転/分で 15 分間遠心分離し、

上澄液 1 ml を正確に量り採る。次いで、5 % フェノール試液 1 ml を正確に加え、更に硫酸 5 ml を速やかに加え、激しくかき混ぜる。この液につき、水を対照として、波長 490nm における吸光度を測定する ( $A_T$ )。

別に、試料溶液添加前に 0.5mol/L 塩酸試液 1 ml を正確に加えて、以下同様に操作を行い吸光度を測定する ( $A_B$ )。

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  $\mu$ mol のブドウ糖に相当する可溶性糖を遊離する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = (A_T - A_B) \times 2 \times F \times 8 \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- F : ブドウ糖検量線より求めた吸光度 0.500 のときのブドウ糖量 ( $\mu$ mol)  
W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

#### (5) 試薬・試液

1) カードラン 和光純薬工業製、生化学用又は同等品を用いる。

2) 5 % フェノール試液

フェノール 5.0g を水に溶かし 100ml とする。冷暗所に保存する。

3) 0.1mol/l リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)

第 1 液：無水リン酸一水素ナトリウム 14.2g を水に溶かし 1,000ml とする。

第 2 液：リン酸二水素ナトリウム 15.6g を水に溶かし 1,000ml とする。

第 1 液と第 2 液を混ぜ、pH 7.0 に調整する。

#### (6) 装置

振盪装置は、モノ式振とう機 (東京理化学機械製、スピード調節目盛 4)、モノシン II A バランス型 (大洋科学工業製、振とう目盛 2) 又は同等品を用いる。

### 第 3 法 (DNS 法)

$\beta$ -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-dinitrosalicylic acid (DNS) により比色定量して測定する方法である。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、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、本品に試料希釈溶液 (又は、水、適切な緩衝液、塩類溶液) を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 3.5~4.0 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

$\beta$ -グルカン 3.75g を正確に量り、水約 150ml に懸濁し、沸騰水浴中で振り混ぜながら 10 分間加温溶解する。冷却後、1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (又は適切な緩衝液) を 25ml 加え、更に水を加えて正確に 250ml とする。冷蔵庫保存で 2 週間を限度に使用する。

#### (3) ブドウ糖検量線の作成

無水ブドウ糖 0.1g を正確に量り、正確に 100ml (1.0 mg/ml) とする。この溶液に水を加え、0、



0.125, 0.25, 0.5, 0.75 mg/ml 濃度の標準溶液を調製する。各濃度の標準溶液 2ml を正確に量り、DNS 試薬 2ml を正確に加えてよく混和し、試験管に蓋をし、沸騰水浴中で 15 分間加熱する。その後、25℃ 水浴中で 10 分間冷却し、試験管の蓋を取り、水 10ml を加えて混和し、波長 540nm における吸光度を測定する。X軸にブドウ糖濃度、Y軸に吸光度をプロットし、検量線を作成し、グラフの傾き (m)、Y切片 (c) を求める。通常、 $m = 1.0$ 、 $c = -0.22$ 、相関係数は 0.999 となる。

(4) 操作法

基質溶液 1.75ml を試験管に正確に量り、 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  温浴中にて 5 分間加温した後、試料溶液 0.25ml を加えて直ちに混和し、正確に 10 分間、温浴中で反応させる。次いで、DNS 試薬 2ml を正確に加えてよく混和し、試験管に蓋をし、沸騰水浴中で 15 分間加熱する。その後、25℃ 水浴中で 10 分間冷却し、試験管の蓋を取り、水 10ml を加えて混和し、波長 540nm における吸光度 ( $A_T$ ) を測定する。

別に、対照試験として試験管に基質溶液 1.75ml を正確に量り、DNS 試薬 2ml を正確に加えてよく混和し、次に試料溶液 0.25ml を正確に加え直ちに混和し、試験管に蓋をし、以下同様に加熱、冷却、加水操作して吸光度 ( $A_B$ ) を得る。

酵素活性は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  に相当するブドウ糖量を生成する酵素量を 1 単位とする。

本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)

$$= \frac{(A_T - A_B) - c}{m} \times S \times \frac{1}{180.16} \times 1,000 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{W}$$

但し、

- $A_T$  : 試料試験の吸光度
- $A_B$  : 対照の吸光度
- $m$  : ブドウ糖検量線の傾き
- $c$  : ブドウ糖検量線の Y 切片
- $S$  : 反応溶液量 (2 ml)
- 180.16 : ブドウ糖分子量
- 1,000 :  $\mu\text{mol}$  への変換係数
- $V$  : 試料 (酵素) 溶液量 (0.25ml)
- $t$  : 反応時間 (10 分)
  
- $W$  : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1)  $\beta$ -グルカン      メガザイム社製大麦由来  $\beta$ -グルカン又は同等品を用いる。

2) 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

第 1 液: 氷酢酸 5.719ml に水を加えて 100ml とする。

第 2 液: 無水酢酸ナトリウム 8.203g を水に溶かして 100ml とする。

第 1 液 30ml と第 2 液 70ml を混ぜ、pH 5.0 に調整する。

3) DNS 試薬

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS ; シグマ社製又は同等品)20.0g を正確に量り, 水約 800ml に加温しながら懸濁する。また, 水酸化ナトリウム 32.0g を正確に量り, 水約 300ml に懸濁する。これを DNS 溶液に静かに加え, 約 50℃まで加温し (50℃を超えてはならない) , 溶液が透明になるまで懸濁する。そこに酒石酸カリウム 4 水和物 (シグマ社製又は同等品) 600g を混和しながら徐々に加え, 完全に溶解させる。溶液を室温まで放置し, 水を加えて 2,000ml とする。これを一晩放置し, フィルターろ過し, DNA 試薬とする。室温保存で 2 ヶ月を限度に使用する [I1]。

## グルカナーゼ測定結果

品名 マルチフェクト BGL (基原: *Trichoderma reesei* 由来)

規格項目	規 格	測定回数	ロット番号		
			301-05140-102	301-06016-013	3016304236
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 (グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法))	単位/g		4,405	4,500	4,380

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法第3法(DNS法)に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液: グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法)で0.20~0.25単位/mlになるように本品に試料希釈溶液を加えて溶解し、試料液とした。

基 質: β-グルカン(バイオコン製)を使用した。

反応 pH: pH 5.0

反応温度: 30℃

## グルカナーゼ測定結果

品名  $\beta$ -グルカナーゼ 750L

(基原: *Geosmithia emersonii* 由来)

規格項目	規 格	測定回数	ロット番号		
			1026355001	1027023001	1027038001
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 $\mu$ g/g 以下		5.0 $\mu$ g/g 以下	5.0 $\mu$ g/g 以下	5.0 $\mu$ g/g 以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 $\mu$ g/g 以下		3.0 $\mu$ g/g 以下	3.0 $\mu$ g/g 以下	3.0 $\mu$ g/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 (グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法))	単位/g		5,820	5,805	5,532

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法第3法(DNS法)に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液: グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法)で3.5~4.0単位/mlになるように本品に試料希釈溶液を加えて溶解し、試料液とした。

基 質: 大麦由来 $\beta$ -グルカン(メガザイム製)を使用した。

反応 pH: pH 5.0

反応温度: 50°C

## グルカナーゼ測定結果

品名  $\beta$ -グルカナーゼ 1000L

(基原：Geosmithia emersonii、Penicillium funiculosum 由来のグルカナーゼの混合品)

規格項目	規格	測定回数	ロット番号		
			401-05272-002	4016151001	4016279001
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  特異なにおいがある	褐色の液体  特異なにおいがある	褐色の液体  特異なにおいがある
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 $\mu\text{g/g}$ 以下		5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として 4.0 $\mu\text{g/g}$ 以下		3.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	3.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	3.0 $\mu\text{g/g}$ 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 (グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法))	単位/g		9,701	10,024	9,905

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法第3法(DNS法)に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液：グルカナーゼ活性測定法第3法(DNS法)で3.5～4.0単位/mlになるように本品に試料希釈溶液を加えて溶解し、試料液とした。

基質：大麦由来 $\beta$ -グルカン(メガザイム製)を使用した。

反応pH：pH 5.0

反応温度：50℃

## グルコアミラーゼ活性測定法

### 第1法（グルコースオキシダーゼーパーオキシダーゼー4-アミノアンチピリンを用いた酵素的な方法）

デンプンにグルコアミラーゼが作用するとき、グルコシド結合の切断に伴って生成するブドウ糖を、グルコースオキシダーゼーパーオキシダーゼー4-アミノアンチピリンを用いた酵素的な方法により測定する。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、ブドウ糖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、本品に水又は適切な緩衝液を加えて溶かし、試料溶液とする。

その濃度は、通例 0.3～3 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

可溶性デンプン、酵素試験用 2.0g を正確に量り、水 20ml を加え、よくかき混ぜながら約 40ml の沸騰水中に徐々に加え、沸騰し始めてから 1～2 分間煮沸した後、流水中で冷却する。次いで、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 1 ml と適切な緩衝液 0.2ml を各々正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した後、試料溶液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 20 分間放置した後、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。その後、30 分間放置したのち、1 mol/L 塩酸試液 0.1ml を加えて中和する。

別に、対照として基質溶液 1 ml、上記と同じ緩衝液等 0.2ml を各々正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した後、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液 0.1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。その後、試料溶液 0.1ml を正確に加え、以下同様に操作する。

上記、試料反応液及び対照液の生成ブドウ糖量を以下の方法で測定する。

ブドウ糖定量試液 6 ml、上記試料反応液 0.2ml を正確に量り混和し、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  にて正確に 40 分間放置する。この液を室温まで冷却後、2 時間以内に水を対象として波長 505nm における吸光度を測定する。(A<sub>1</sub>)

別に、試料反応液の代わりに対照液を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>2</sub>)

試料反応液の代わりにブドウ糖標準溶液を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>3</sub>)

試料反応液の代わりに水を用いて同様に操作し吸光度を測定する。(A<sub>4</sub>)

試料反応液のブドウ糖濃度及び生成ブドウ糖量は次式により求める。

$$\text{ブドウ糖濃度 (mg/ml)} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 0.5$$

$$\text{生成ブドウ糖量 (mg)} = \text{ブドウ糖濃度 (mg/ml)} \times 1.5\text{ml}$$

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 1 mg のブドウ糖を生成する酵素量を 1 単位とする。

本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)

$$= \text{生成ブドウ糖量 (mg)} \times \frac{60}{20 \times 0.1 \times W} = \text{生成ブドウ糖量 (mg)} \times \frac{30}{W}$$

ただし、W：試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

## 第2法 NADH 比色法

マルトースにグルコアミラーゼを作用させて生じる  $\alpha$ -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、生成する NADH を比色定量する。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、ブドウ糖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、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とする。

### (2) 基質溶液

マルトース 19.05g に適切な pH の 0.1mol/L 酢酸緩衝液を加えて溶かし正確に 1,000ml とする。用時調製する。

### (3) ブドウ糖標準溶液の調製

ブドウ糖を 105℃、6 時間乾燥後、その 0.65g を正確に量り、水又は適切な緩衝液で溶解し正確に 500ml とする。この液に水又は適切な緩衝液を加えて希釈し 1ml 中に 0, 65, 130, 195  $\mu$ g の各濃度のブドウ糖標準溶液を調製する。

### (4) 操作法

あらかじめ基質溶液 1ml を 25 $\pm$ 0.5℃で 15 分間加温し、この液に 25 $\pm$ 0.5℃に加温した試料溶液 1ml を正確に加え直ちに振り混ぜる。正確に 30 分間反応させた後、1.66mol/L トリス緩衝液 3ml を加える。この液を 0.3ml 正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 (グルコアミラーゼ活性測定用) 3ml と混合し、20 分間室温で放置後 340nm の吸光度を測定する。(A<sub>T</sub>)。別に対照として基質溶液 1ml に 1.66mol/L トリス緩衝液 3ml を加え混和しこれに 25 $\pm$ 0.5℃に加温した試料溶液 1ml を正確に加え直ちに振り混ぜる。この液を 0.3ml 正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 (グルコアミラーゼ活性測定用) 3ml と混和し、20 分間室温で放置後 340nm の吸光度を測定する。(A<sub>B</sub>)。

ブドウ糖検量線は、各濃度のブドウ糖標準溶液 0.3ml を正確に量り、あらかじめ 25 $\pm$ 0.5℃に加温したグルコースデヒドロゲナーゼ試液 (グルコアミラーゼ活性測定用) 3ml と混和し、20 分間放置後 340nm の吸光度を測定する。

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  $\mu$ mol のマルトースを分解する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 5}{A_G \times 180.2 \times 30 \times 2 \times W}$$

ただし、

- A<sub>T</sub> : 反応液の吸光度
- A<sub>B</sub> : 対照液の吸光度
- A<sub>G</sub> : ブドウ糖 1 μg/ml の吸光度 (検量線より算出)
- W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)
- 5 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml) に対する反応液の総液量 (ml)
- 180.2 : ブドウ糖の分子量
- 30 : 反応時間 (分)
- 2 : ブドウ糖 (μmol) からマルトース (μmol) への変換

**第3法 PNP-G 比色法** パラニトロフェニル α-D-グルコピラノシド (PNPG) にグルコアミラーゼを作用させて生じるパラニトロフェノール (PNP) を比色定量する。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、PNP 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、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 0.5~2.0 単位/g である。

(2) 基質溶液

PNPG 0.055g に適切な pH の 0.1mol/L 酢酸緩衝液を加えて溶かし正確に 500ml とする。用時調製する。

(3) 反応停止液の調製

ホウ酸ナトリウム 10 水和物 10.04g を正確に量り、水で溶解し正確に 500ml とする。

(4) グルコアミラーゼ検量線

グルコアミラーゼ標準を適量の水、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、0.6, 1.2, 1.8 単位/g の標準溶液を調製する。

(5) 操作法

適切な pH の 0.1mol/L 酢酸緩衝液 0.25ml に試料溶液 0.20ml を加え、30±0.5℃で5分間加温する。この液に基質溶液 0.5ml を正確に加え直ちに振り混ぜる。30±0.5℃で正確に10分間反応させた後、反応停止液 1.0ml を加え、400nm の吸光度 (A<sub>T</sub>) を測定する。別に対照として試料溶液の代わりに適切な pH の 0.1mol/L 酢酸緩衝 0.20ml を用い、同様に 400nm の吸光度 (A<sub>B</sub>) 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 PNP-G を分解する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 1.95 \times D}{A_S \times 10 \times 0.2}$$

ただし、

- A<sub>T</sub> : 反応液の吸光度
- A<sub>B</sub> : 対照液の吸光度



- $A_s$  : PNP 1  $\mu\text{mol/ml}$  の吸光度  
1.95 : 反応液量 (ml)  
0.2 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml)  
D : 希釈係数  
10 : 反応時間 (分)

(6) 試薬・試液

- 1) パラニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド (PNPG, 市販試薬)  
たとえばシグマ社製(製品番号 N1377-100MG)又は同等品が使用できる。

## グルコアミラーゼ測定結果

品名 オプチマックス 4060VHP

(基原：Aspergillus niger 由来)

規格項目	規格	測定回数	ロット番号		
			107-05168-002	107-05280-001	1077046001
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 特異なにおいがある	褐色の液体 特異なにおいがある	褐色の液体 特異なにおいがある
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 (グルコアミラーゼ活性測定法第3法 (PNPG法))	単位/g		272	278	291

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法 (PNPG 法) に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液：グルコアミラーゼ活性測定法第3法 (PNPG 法) で 0.5～2.0 単位/ml になるように本品に試料希釈溶液を加えて溶解し、試料液とした。

基質：パラニトロフェニル α-D-グルコピラノシド (PNPG) (シグマ製) を使用した。

反応 pH：pH 4.3

反応温度：30.0℃

## $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ

$\alpha$ -Glucosyltransferase

4- $\alpha$ -Glucanotransferase

6- $\alpha$ -Glucanotransferase

4- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼ

6- $\alpha$ -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、又はバレイシヨ (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、又はシヨ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、又はシヨ糖に作用し、グルコシル基、又はグルカン鎖を転移する。

ECナンバー (参考) : EC 2.4.1.1 Phosphorylase

(1,4- $\alpha$ -D-glucan:phosphate  $\alpha$ -D-glucosyltransferase)

EC 2.4.1.2 Dextrin Dextranase

EC 2.4.1.7 Sucrose phosphorylase

(sucrose:phosphate  $\alpha$ -D-glucosyltransferase)

EC 2.4.1.18 1,4- $\alpha$ -Glucan branching enzyme

EC 2.4.1.24 1,4- $\alpha$ -Glucan 6- $\alpha$ -glucosyltransferase

EC 2.4.1.25 4- $\alpha$ -Glucanotransferase

EC 5.4.99.11 Isomaltulose synthase (Sucrose glucosylmutase)

EC 5.4.99.15 (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan 1- $\alpha$ -glucosylmutase

EC 5.4.99.16 Maltose  $\alpha$ -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), (7), (8), 又は (9) の方法を選択して行う。

(1) 酵素活性測定法の  $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ活性測定法のいずれにより試験を行うとき、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。

ECナンバー : EC 5.4.99.15 (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan 1- $\alpha$ -glucosylmutase

**試料液** 酵素活性測定法の  $\alpha$ -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 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C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20 $\mu$ 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。

- (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。

ECナンバー：EC 5.4.99.16 Maltose  $\alpha$ -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 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C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 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C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20 $\mu$ 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。

- (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：EC 2.4.1.25 4- $\alpha$ -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 $\rightarrow$ 5）0.5mlに加えて混和し、35 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C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20 $\mu$ 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 示差屈折計

カラム充てん剤 9 $\sim$ 12 $\mu$ m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 $\sim$ 40cmのステンレス管

カラム温度 75 $\sim$ 85 $^{\circ}$ C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20 $\mu$ l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：EC 2.4.1.24 1,4- $\alpha$ -Glucan 6- $\alpha$ -glucosyltransferase