

$\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ(デキストリンデキストラナーゼ)  
確認試験クロマトグラム

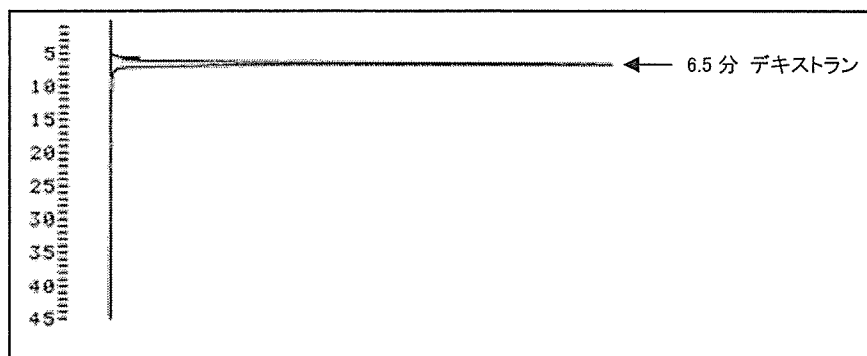


図1 標準液(デキストラン)

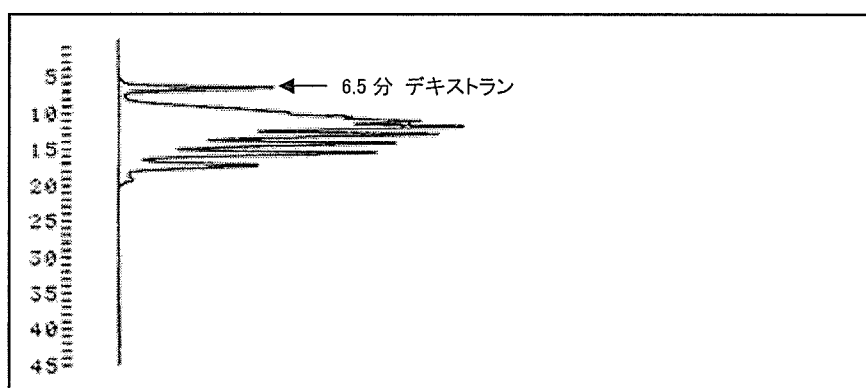


図2 比較液(ブランク液)

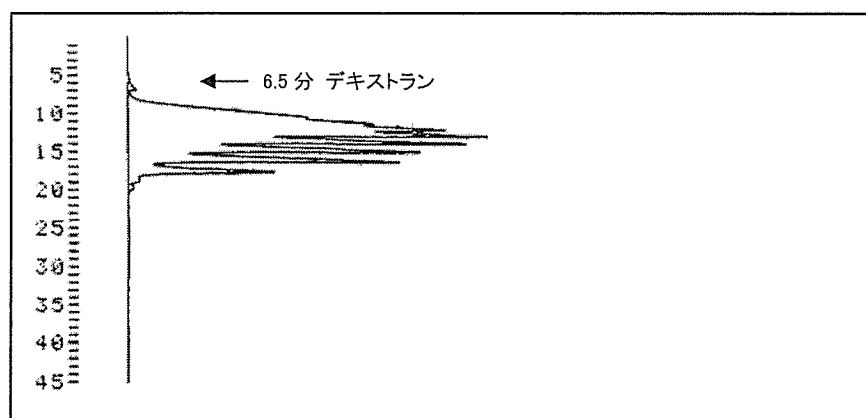


図3 試料液(デキストラナーゼ処理液)

## α-グルコシルトランスフェラーゼ測定結果

品名 DアミラーゼD (基原: *Gluconobacter oxydans* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			0001	0002	0003
性状	本品は白～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。においては、又は特異なおいがある。	①	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体で特異なおいがある
		②	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体で特異なおいがある
		③	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体で特異なおいがある	褐色の液体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	1,000/g 以下	1,000/g 以下	1,000/g 以下
		②	1,000/g 以下	1,000/g 以下	1,000/g 以下
		③	1,000/g 以下	1,000/g 以下	1,000/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	単位/ml	①	10.7	14.4	8.66
		②	9.31	14.1	8.91
		③	10.2	16.7	8.73
		④	9.11	17.1	8.80
		⑤	9.31	14.6	10.0
		⑥	9.19	13.8	8.59
	平均 (n=6)	9.62	15.1	8.95	
	標準偏差	0.64	1.4	0.53	
	CV (%)	6.7	9.3	5.9	
	最大値	10.7	17.1	10.0	
最小値	9.11	13.8	8.59		

※ 確認試験の方法

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8法に準じた。

※ 酵素活性測定法の条件

試料溶液: 本品に 0.05 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.2) を加えて正確に 400 倍希釈して試料溶液とした。

## グルコースイソメラーゼ活性測定法

### 第1法（システイン-カルバゾール-硫酸法）

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-カルバゾール-硫酸法で発色させ、吸光度を測定して求める。

#### (1) 試料溶液

本操作法により試験するとき、フラクトース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、0.02mol/L リン酸緩衝液(反応至適pH) (又は適切な緩衝液, 塩類溶液) に溶かし、又は懸濁し、試料溶液とする。その濃度は、通例1～2単位/mlである。

#### (2) 基質溶液

ブドウ糖 1.80g を正確に量り、0.2mol/L リン酸緩衝液(反応至適pH) 25ml 及び 0.1mol/L 硫酸マグネシウム溶液 (1.23→50) 5ml をそれぞれ正確に加えて溶かした後、更に水を加え正確に 50ml とする。

#### (3) 操作法

回線付き試験管(24mmφ, 50ml 容積)に基質溶液 1ml を正確に量り、70±0.5℃に保った恒温水槽で5分間加温する。試料溶液 1ml を正確に加えて振り混ぜた後、70±0.5℃で正確に 30分間反応させる。次いで、過塩素酸 (54ml→1,000) 2ml を正確に加えて反応を停止させ、水を加えて 50ml とし、これを検液とする。

検液 1ml を正確に量って試験管(24mmφ, 50ml 容積)に入れ、L-システイン塩酸塩溶液(0.15→10, 用時調製) 0.2ml を正確に加え、氷水中に浸す。氷水中に浸したまま、70%硫酸 6ml を正確に加え、よく振り混ぜる。氷水中で約5分間冷却した後、カルバゾールエタノール試液 0.2ml を正確に加え、よく振り混ぜる。次いで、60±0.5℃に保った恒温水槽に10分間正確に浸し、直ちに氷水中に2分間浸した後、室温に約5分間放置して室温と同じ温度にする。この液について、水を対照として波長 560nm における吸光度Aを測定する。

別に、対照として基質溶液 1ml に過塩素酸 (54ml→1,000) 2ml を加えてから試料溶液 1ml を加えた後、同様に操作して波長 560nm における吸光度Bを測定する。

又、水 1ml 及びフラクトース標準溶液(10μg/ml) 1ml を各々正確に試験管に量り、L-システイン塩酸塩溶液 (0.15→10, 用時調製) 0.2ml を正確に加え、以下同様に操作して波長 560nm における水の吸光度N及びフラクトース標準溶液の吸光度F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時間に1mgのブドウ糖をフラクトースに異性化させる酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A - B)}{(F - N)} \times 10 \times 50 \times 2 \times \frac{1}{1,000} \times \frac{1}{W}$$

但し、

A : 試料反応液の吸光度

B : ブランクの吸光度

F	: フラクトース標準溶液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の吸光度
N	: 水の吸光度
10	: フラクトース標準溶液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の吸光度を1 $\mu\text{g}$ へ変換する係数
50	: 反応停止後の総液量
2	: 30分反応を1時間への変換係数
1,000	: $\mu\text{g}$ からmgへの変換係数
W	: 試料溶液1ml中に含まれる試料の量(g又はml)

#### (4) 試薬・試液

- 1) カルバゾール JIS K8258
- 2) フラクトース 市販試薬特級
- 3) 0.2mol/L リン酸緩衝液(反応至適pH)
  - 第1液: リン酸一ナトリウム 31.2gを量り, 水を加えて溶かし1,000mlとする。
  - 第2液: リン酸第二ナトリウム 71.6g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, 反応至適pHに調整する。
- 4) 0.02mol/L リン酸緩衝液(反応至適pH)
  - 0.2mol/L リン酸緩衝液(反応至適pH)に水を加え, 10倍に希釈する。
- 5) 硫酸(精密分析用) ナカライテスク製精密分析用又は同等品を使用する。
- 6) 70%硫酸
  - 氷水中で冷却下, 水38mlに硫酸(精密分析用)90mlをかき混ぜながら徐々に加える。
- 7) カルバゾールエタノール試液(0.12W/V%)
  - カルバゾール12mgをエタノール(99.5)に溶かして10mlとする。用時調製する。
- 8) フラクトース標準溶液(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
  - フラクトースを真空乾燥し(65 $^{\circ}\text{C}$ , 減圧下, 5時間), デシケーター中で放冷した後, その50mgを正確に量り, 水に溶かし正確に100mlとする(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。この溶液2mlを正確に量り, 水を加えて正確に100mlとする。

#### 第2法(システイン-硫酸法)

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。

##### (1) 試料溶液

本操作法により試験するとき, フラクトース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, 0.05mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)(又は適切な緩衝液, 塩類溶液)に溶かし, 又は懸濁し, 試料溶液とする。その濃度は, 通例1~2単位/mlである。

##### (2) 基質溶液

ブドウ糖3.60gを正確に量り, 0.4mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)25ml及び0.1mol/L 硫酸マグネシウム溶液20mlをそれぞれ正確に加えて溶かした後, 更に水を加え正確に100mlとする。

### (3) 操作法

試験管(18mmφ)に基質溶液1mlと水0.8mlを正確に量り、試験管にガラスビーズで蓋をして、70±0.5℃に保った恒温水槽で5分間加温する。試料溶液0.2mlを正確に加えて振り混ぜた後、試験管にガラスビーズで蓋をして、70±0.5℃で正確に30分間反応させる。直ちに氷冷し、70%過塩素酸(45→1,000)4mlを正確に加えて反応を停止させ、さらに水4mlを加えて10mlとし、これを検液とする。

検液0.5mlと水0.5mlを正確に量って試験管(18mmφ)に入れ、氷水中で70%硫酸6mlを正確に加えてよく振り混ぜる。氷水中に浸しながらL-システイン塩酸塩溶液0.1mlを正確に加えてよく振り混ぜる。次いで、50±0.5℃に保った恒温水槽に10分間正確に浸し、氷冷後、水を対照として波長410nmにおける吸光度Aを測定する。

別に、対照として基質溶液1mlと水0.8mlに70%過塩素酸4mlを加えてから試料溶液0.2mlを加えた後、試験管にガラスビーズで蓋をして、70±0.5℃で正確に30分間反応させる。さらに水4mlを加えて10mlとする。これを検液とし、同様に操作して波長410nmにおける吸光度Bを測定する。

又、水0.5ml及びフラクトース標準溶液(100μg/ml)0.5mlを各々正確に試験管に量り、さらに水0.5mlを各々正確に加え、氷水中で70%硫酸6mlを正確に加えてよく振り混ぜる。氷水中に浸しながらL-システイン塩酸塩溶液0.1mlを正確に加えてよく振り混ぜる。次いで、50±0.5℃に保った恒温水槽に10分間正確に浸し、氷冷後、水を対照として波長410nmにおける水の吸光度N及びフラクトース標準溶液の吸光度F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時間に1mgのブドウ糖をフラクトースに異性化させる酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g又は単位/ml)} = \frac{(A - B)}{(F - N)} \times 50 \times 10 / 0.2 \times 2 \times \frac{1}{1,000} \times \frac{1}{W}$$

但し、

A	: 試料溶液の吸光度
B	: 対照の吸光度
F	: フラクトース標準溶液(100μg/ml)の吸光度
N	: 水の吸光度
100	: フラクトース標準溶液1ml中に含まれるフラクトース量(μg)
10	: 反応停止後の総液量(ml)
0.2	: 試料溶液量(ml)
2	: 30分反応を1時間への変換係数
1,000	: μgからmgへの変換係数
W	: 試料溶液1ml中に含まれる試料の量(g又はml)

### (4) 試薬・試液

- 1) ブドウ糖 市販試薬特級
- 2) フラクトース 市販試薬特級

3) 0.4mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)

第1液：リン酸二水素カリウム 54.4 g を量り，水を加えて溶かし 1,000ml とする。

第2液：リン酸水素二ナトリウム・12水和物 143.2 g 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) 0.1mol/L 硫酸マグネシウム溶液

硫酸マグネシウム・7水和物 12.3 g を量り，水を加えて溶かし 500ml とする。

5) 硫酸 市販試薬特級，96%。

6) 70%過塩素酸 市販試薬特級，70%

7) 70%硫酸

氷水中で冷却下，水 30ml に硫酸（特級）70ml をかき混ぜながら徐々に加える。

8) フラクトース標準溶液(100 μg/ml)

フラクトースを真空乾燥し（65℃，減圧下，5時間），デシケーター中で放冷した後，その1gを正確に量り，水に溶かし正確に100mlとする（10mg/ml）。この溶液1mlを正確に量り，水を加えて正確に100mlとする。

### 第3法（HPLC法）

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HPLCで測定して求める。

(1) 試料溶液

本操作法により試験するとき，フラクトース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，希釈液（又は適切な緩衝液，塩類溶液）に溶かし，試料溶液とする。その濃度は，通例2～20単位/mlである。

(2) 基質溶液

無水ブドウ糖 216.2g を正確に量り，希釈液又は適切な緩衝液，塩類溶液を加え正確に 500ml とする。

(3) グルコースイソメラーゼ標準液

グルコースイソメラーゼ標準（ジェネンコア製グルコースイソメラーゼ，3700 単位/g，又は同等品を用いる）を適量の希釈液（又は水，緩衝液，塩類溶液）を加えて溶かし，2，5，10，20 単位/g の標準液を調製する。

(4) 操作法

試験管(13mmφ×100mm)に基質溶液 1.0ml を正確に量り，60±0.5℃に保った恒温水槽で2分間加温する。試料溶液 0.25ml を正確に加えて振り混ぜた後，60±0.5℃で正確に 30 分間反応させる。次いで，塩酸（20ml→1,000）0.25ml を正確に加えて振り混ぜて反応を停止させ，室温まで冷却し，0.2 μm のフィルター（ワットマン製又は同等品）でろ過して HPLC バイアルにろ液を回収する。

バイオラッド製 HPX 87C カーボハイドレート分析カラム（又は同等品）を用いた HPLC でフラクトースを定量する。

別に対照として試料溶液に希釈液を用い，同様に操作してフラクトースを定量する。また、

試料溶液に各標準液を用い、同様に操作してフラクトースを定量し、対照との差をとり検量線を作成する。

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  $\mu$ mole のブドウ糖をフラクトースに異性化させる酵素量を1単位とする。

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

但し、

G : 試料溶液の活性 (U, 検量線より算出)

D : 希釈係数

#### (5) 試薬・試液

##### 1) 希釈液

マレイン酸 23.2g を水 800ml に溶解し、硫酸マグネシウム7水和物 4.9g, 0.1mol./L 塩化コバルト溶液 (23.8→1,000) 10ml を加え、完全に溶解する。水酸化ナトリウムで pH を 6.85 に調整し、水で 1,000ml とする。

グルコースイソメラーゼ測定結果

品名 GODO AGI-E (基原: Streptomyces griceofuscus 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			#17002	#18001	#18002
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	26,020	35,290	31,340
		②	25,940	34,680	31,410
		③	28,800	35,090	31,480
		④	29,030	35,020	31,840
		⑤	29,030	34,550	33,470
		⑥	29,720	35,290	32,620
	平均値(n=6)	単位/g	28,090	34,986	32,026
	標準偏差		1,663	310	851
	CV(%)		5.92	0.89	2.66
	最大値	単位/g	29,720	35,290	33,470
最小値	単位/g	25,940	34,550	31,340	

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法第2法を実施。



\* 酵素活性測定

酵素活性測定法第2法を実施。

試料溶液

GODO AGI-E 約1gを精密に採取し、0.05mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解し全量を正確に100mlにした後、その溶液をさらに同緩衝液で正確に200倍希釈して試料溶液とした。

基質溶液

0.4mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)及び0.1mol/L硫酸マグネシウム溶液を使用した。

\* 参考情報

## グルコースイソメラーゼ測定結果

品名 スペザイム Glpf

(基原 : *Streptomyces rubiginosus* 由来)

規格項目	規 格	測定回数	ロット番号		
			3026103008	3026204004	3027039002
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 (グルコースイソメラーゼ活性測定法第3法(HPLC法))	単位/g		3,730	3,740	3,370

\* 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：グルコースイソメラーゼ活性測定法第3法(HPLC法)で2～20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：無水ブドウ糖を使用した。

反応 pH：pH 6.85

反応温度：60℃

## シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法

**第1法（デンプンヨウ素発色法）** デンプンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが作用するとき、デンプンの直鎖成分（アミロース）の低分子化に伴うデンプンのヨウ素による呈色の減少を測定して求める。

### (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2～6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1mol/L水酸化ナトリウム試液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、測定する酵素に適したpHに調整するため、適切な緩衝液及び水を加えて正確に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、40±0.5℃で10分間加温した後、試料溶液1mlを正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を40±0.5℃で正確に10分間放置した後、この液1mlを正確に量り、塩酸（90→1,000，100→1,000）10mlに加え、直ちに振り混ぜる。次に、この液1mlを正確に量り、0.0004mol/Lヨウ素試液10ml中に正確に加え、振り混ぜた後、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、試料溶液の代わりに水を用いて同様に操作し、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分間にバレイショデンプンのヨウ素による呈色を1%減少させる酵素量を1単位とする。

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

ただし、

W： 試料溶液1ml中の試料の量（g 又は ml）

$A_B$ ： 対照液の吸光度

$A_T$ ： 検液の吸光度

100, 1/10： %及び反応時間の換算係数

**第2法（チルデンハドソン法）** デンプンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが作用するとき、シクロデキストリンの針状結晶が生じる時間を顕微鏡的に測定して求める。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、シクロデキストリンの針状結晶が生じる時間が10分前後

となるように、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 5～10 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℃で4時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 3.00g 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 70ml 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。次いで、測定する酵素に適した種類、pH の緩衝液又は塩類溶液 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

## (3) 操作法

基質溶液 6 ml を正確に量り、40±0.5℃で 10 分間加温した後、試料溶液 3 ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を 40±0.5℃に保ち、正確に 3 分後より 12 分後まで 1 分間隔で反応液 0.3ml を正確にとり、あらかじめヨウ素試液 0.1ml を正確に入れ、氷水中に置いた試験管に入れる。この液 10 μl をスライドグラスにとり、25±1℃にて乾燥する。スライドグラスを顕微鏡観察し（倍率 40 倍又は 100 倍）、針状結晶が生じた反応時間（t 分）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、30mg の可溶性デンプンを分解し、30 分間でシクロデキストリンの結晶を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{30}{t} \times 6 \times \frac{1}{3} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)
- t : 結晶を生成するまでの時間 (分)
- 30 : 単位換算係数 (30 分を 1 単位とする)
- 6 : 単位換算係数 (デンプン量 30mg/ml × 6 ml ÷ 30mg)
- 3 : 単位換算係数 (試料溶液 1 ml 当たり)

**第 3 法 (フェノールフタレイン法)** デンプンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが作用して β-シクロデキストリンが生成したとき、β-シクロデキストリンによるフェノールフタレインの 550 nm での吸光度の減少を測定して求める。

## (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、フェノールフタレインの吸光度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 0.03～0.1 単位/ml である。

## (2) 基質溶液

あらかじめ、可溶性デンプン 1g を精密に量り、水 50ml を加え、電子レンジで加熱して完全に溶解する。溶解後、測定する酵素に適した pH に調整するため、適切な緩衝液及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

## (3) 操作法

基質溶液 0.9ml 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、直ちに振り混ぜる。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 10 分間放置した後、0.04 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 2.5ml を添加し、直ちに振り混ぜる。次に、フェノールフタレイン試薬を 0.3ml 添加し、直ちに 550 nm の吸光度  $A_T$  を測定する。別に、基質溶液 0.9ml と 0.04 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 2.5ml をあらかじめ混合したものに試料溶液 0.1ml を添加したものを対照液として波長 550nm における吸光度  $A_B$  を測定する。0-0.1mg/ml の範囲で  $\beta$ -シクロデキストリンの検量線を作成し、その傾き  $S$  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 mg の  $\beta$ -シクロデキストリン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)

$$= \frac{A_B - A_T}{S} \times \frac{1}{0.1} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

$A_B$  : 対照液の吸光度

$A_T$  : 検液の吸光度

S : 検量線の傾き

1/0.1, 1/10 : 酵素試料の添加量及び反応時間の換算係数

**第 4 法 (プロモクレゾールグリーン法)** デンプンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが作用して  $\gamma$ -シクロデキストリンが生成したとき、 $\gamma$ -シクロデキストリンによるプロモクレゾールグリーンの 630 nm での吸光度の増加を測定して求める。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、プロモクレゾールグリーンの吸光度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、試料溶液とする。その濃度は、通例 0.1~0.3 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめ、可溶性デンプン 1.5g を精密に量り、水 50ml を加え、電子レンジで加熱して完全に溶解する。溶解後、測定する酵素に適した pH に調整するため、適切な緩衝液及び水を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

(3) 操作法

基質溶液 0.45ml 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 0.05ml 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 10 分間放置した後、0.05 N 塩酸水溶液 0.5ml を添加し、直ちに振り混ぜる。次に、プロモクレゾールグリーン試薬を 0.1ml 添加し、20 分間室温に静置する。これに発色緩衝液 2ml 加えて振り混ぜた後、630 nm の吸光度  $A_T$  を測定する。基質溶液 0.45ml と 0.05 N 塩酸水溶液 0.5ml をあらかじめ混合したものに試料溶液を添加したものを対照液として波長 630nm における吸光度  $A_B$  を測定する。

別に、0-0.2 mg/ml の範囲で $\gamma$ -シクロデキストリンの検量線を作成し、その傾きS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 $\gamma$ -シクロデキストリン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)

$$= \frac{A_T - A_B}{S} \times \frac{1}{1296} \times \frac{1}{0.05} \times \frac{1}{W} \times 1000 \times \frac{1}{10}$$

ただし、

W: 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

A<sub>B</sub>: 対照液の吸光度

A<sub>T</sub>: 検液の吸光度

S: 検量線の傾き

1/1296, 1/0.05, 1000, 1/10: mol, 酵素試料の添加量,  $\mu$ mol/ml 及び反応時間の換算係数

#### 試薬・試液

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 40.00g を量り、水を加えて 1,000ml とする。

0.04mol/L 水酸化ナトリウム溶液

1mol/L 水酸化ナトリウムに水を加えて 25 倍容量に薄める。

1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.2)

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 pH4.2 に調整する。

2% フェノールフタレイン溶液

フェノールフタレイン 2g を量り、99.5%エタノールを加えて 100ml とする。これを1ヶ月間室温にて密閉遮光保存する。

0.5 mol/L 炭酸ナトリウム溶液

炭酸ナトリウム 106g を量り、水を加えて 1,000ml とする。

フェノールフタレイン試薬 (用事調製)

2% フェノールフタレイン溶液 0.5ml と 0.5mol/L 炭酸ナトリウム溶液 0.5ml を量り、水を加えて 100ml とする。

ブロモクレゾールグリーン試薬

ブロモクレゾールグリーン 70mg を量り、20%エタノール溶液を加えて 20ml とする。これに超音波処理を 30 分間行い、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過をする。

発色緩衝液

クエン酸 1 水和物 6.30g を量り、1mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.2) を加えて 1,000ml とする。

可溶性デンプン, アミラーゼ定量用 (市販試薬)

たとえば，ナカライテスク社製（製品番号 32126-64）又は同等品が使用できる。

## シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ測定結果

品名 アルカリCDアミラーゼ (基原: *Paenibacillus campinasesis* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			2628153	3584172	2549476
性状	本品は白～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	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある
		②	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある
		③	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	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 (シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法第3法)	単位/ml	①	248	220	209
		②	241	223	214
		③	247	236	216
		④	244	237	219
		⑤	245	245	228
		⑥	248	245	228
	平均 (n=6)	246	234	219	
	標準偏差	2.5	9.7	7.0	
	CV (%)	1.02	4.14	3.21	
	最小値	241	220	209	

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法 第3法に準じた。

\* 酵素活性測定法の条件

試料溶液: 本品に 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.5) を加えて正確に 4,000 倍希釈して試料溶液とした。



## シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ測定結果

品名   ネオCDアミラーゼ   (基原: *Bacillus coagulans* 由来)

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			2635266	2542416	2428007
性状	本品は白～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	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある
		②	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある
		③	褐色の液体で特異なにおいがある	褐色の液体で特異なにおいがある	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 (シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法第3法)	単位/ml	①	26.5	34.6	32.2
		②	26.8	33.6	32.8
		③	28.0	33.7	32.1
		④	27.3	33.7	32.6
		⑤	27.1	34.0	32.0
		⑥	27.2	33.6	32.0
	平均 (n=6)	27.2	33.9	32.3	
	標準偏差	0.5	0.4	0.3	
	CV (%)	1.71	1.10	0.97	
最大値	28.0	34.6	32.8		
最小値	26.5	33.6	32.0		

＊ 確認試験の方法

酵素活性測定法のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法 第3法に準じた。

＊ 酵素活性測定法の条件

試料溶液：本品に 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.5) を加えて正確に 400 倍希釈して試料溶液とした。

## シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ測定結果

品名 CDアミラーゼG (基原: *Bacillus clarkii* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			021028	—	—
性状	本品は白～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	褐色の液体で特異なにおいがある	—	—
		②	褐色の液体で特異なにおいがある	—	—
		③	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	酵素活性を示した	—	—
		②	酵素活性を示した	—	—
		③	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	—	—
		②	5.0 μg/g 以下	—	—
		③	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	—	—
		②	4.0 μg/g 以下	—	—
		③	4.0 μg/g 以下	—	—
細菌数	10,000/g 以下	①	10,000/g 以下	—	—
		②	10,000/g 以下	—	—
		③	10,000/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 (シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法第4法)	単位/ml	①	9.90	—	—
		②	9.90	—	—
		③	9.94	—	—
		④	9.89	—	—
		⑤	9.53	—	—
		⑥	9.36	—	—
	平均 (n=6)		9.75	—	—
	標準偏差		0.2	—	—
	CV (%)		2.30	—	—
	最大値		9.94	—	—
最小値		9.36	—	—	

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ活性測定法 第4法に準じた。

\* 酵素活性測定法の条件

試料溶液: 本品に 25 mM グリシン-NaCl-NaOH 緩衝液 (pH 10) を加えて正確に 50 倍希釈して試料溶液とした。

## セルラーゼ活性測定法

第1法（セルロース糖化力測定法-DNS-乳糖試薬法） セルロース糖化力測定法は、酵素をカルボキシメチルセルロースに作用させる酵素反応と反応生成物である還元糖を定量する2段階からなる。還元糖の定量法としてニトロ試薬法（第1, 4, 5法）及び銅試薬法（第2法）の2種類がある。

### (1) 試料溶液

本品約 0.5g を精密に量り、水（又は適切な緩衝液、塩類溶液）を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液を、必要があれば遠心分離し、上澄液を水（又は適切な緩衝液、塩類溶液）で希釈して通例 0.06~0.18 単位/ml になるように調製し、試料溶液とする。通常、この範囲を含む3点以上の希釈段階をとり、グラフから吸光度差 0.250 となる試料濃度を求めて酵素活性値を求める。

### (2) 基質溶液

あらかじめ、カルボキシメチルセルロースナトリウム（第1法用）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 10.0g に対応するカルボキシメチルセルロースナトリウムを正確に量り、水 800ml にかき混ぜながら、徐々に加えて溶かす。この液に希酢酸 100ml を加え、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液で pH4.0 又は pH5.0 に調整し、水を加えて正確に 1,000ml とする。

### (3) ブドウ糖標準溶液

あらかじめ、ブドウ糖約 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 1.00g に対応するブドウ糖を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 200ml とする。この液の 1, 2, 及び 3 ml を正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 50ml とする。これらのブドウ糖標準溶液は 1 ml 中にブドウ糖 0.10, 0.20 及び 0.30mg を含む。

### (4) 操作法

試料溶液 1 ml を正確に量り、試験管に入れ、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温し、あらかじめ  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 5 分間加温した基質溶液 1 ml を正確に加え、直ちによく振り混ぜる。この液を  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間反応させた後、DNS（ジニトロサリチル酸）-乳糖試液又は DNS 試液 4 ml を正確に加えて振り混ぜる。次にガラスビーズで試験管にふたをして、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却する。この液につき、水を対照とし、波長 540nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に、試料溶液 1 ml を正確に量り、試験管に入れ、DNS-乳糖試液又は DNS 試液 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、次に基質溶液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、以下同様に操作して、吸光度  $A_B$  を測定する。

また、それぞれのブドウ糖標準溶液 1 ml を正確に量り、試験管に入れ、DNS-乳糖試液

又は DNA 試液 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、次に基質溶液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、以下同様に操作して、吸光度  $A_s$  を測定する。

更に、水 1 ml を正確に量り、試験管に入れ、DNS-乳糖試液又は DNA 試液 4 ml を正確に加えて振り混ぜ、次に基質溶液 1 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、以下同様に操作して、吸光度  $A_{s0}$  を測定する。

各ブドウ糖標準溶液 1 ml 中のブドウ糖量を X 軸にとり、それらに対応する吸光度から水の吸光度を差引いた値 ( $A_s - A_{s0}$ ) を Y 軸にとったブドウ糖検量線を引き、直線 ( $Y = aX$ ) の傾き  $a$  を求め、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 分間にブドウ糖  $1 \mu\text{mol}$  に相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_T - A_B) \times F \times \frac{1,000}{180} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 反応ブランク液の吸光度

$F$  :  $F = 1/a$ , ブドウ糖検量線より求めた吸光度差が 1 の時のブドウ糖量 (mg)

1,000 : mg から  $\mu\text{g}$  への換算

180 : ブドウ糖の分子量

10 : 反応時間 (分)

$W$  : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

## 第 2 法 (セルロース糖化力測定法-銅試薬法)

### (1) 試料溶液

操作法に従って試験するとき、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、本品に適量の水を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は、通例およそ 0.02~0.08 単位/ml である。試料が完全に溶けない場合には、時々かき混ぜながら 1 時間放置した後、遠心分離してその上澄液を試料溶液とする。必要ならば、水の代わりに適当な緩衝液を用いることができる。

### (2) 基質溶液

あらかじめカルボキシメチルセルロースナトリウム (第 2 法用) 約 1 g を精密に量り、105℃で 4 時間乾燥してその減量を測定する。その乾燥物 0.625g に対応するカルボキシメチルセルロースナトリウムを正確に量り、100ml の三角フラスコに入れ、水 50ml を加えて加温して溶かし、冷後、適切な pH の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とする。

### (3) ブドウ糖検量線の作成

あらかじめブドウ糖約 1 g を精密に量り、105℃で 6 時間乾燥し、その減量を測定する。