

その乾燥物 1.000g 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 1,000ml とする。この液 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 及び 5ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 10ml とする。それぞれの液 1ml 中には、ブドウ糖が 0.1mg, 0.2mg, 0.3mg, 0.4mg 及び 0.5mg 含まれる。それぞれの液 1ml, 基質溶液 4ml 及びアルカリ性銅試液 2ml を正確に量り、25ml のメスフラスコに入れ、振り混ぜ、メスフラスコに栓を施し、水浴中で通例 30 分間加熱し、水冷後、ヒ素モリブデン酸試液 2ml を正確に加えてよく振り混ぜ、更に 0.5mol/l 水酸化ナトリウム試液 3ml を正確に加え、ふり混ぜて沈殿を溶かし、20 分間放置した後、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に 25ml とする。この液 1ml を正確に量り、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 9ml を正確に加えてよく振り混ぜる。この液につき波長 750nm における吸光度  $A_1, A_2, A_3, A_4$  及び  $A_5$  を測定する。別にブドウ糖溶液 1ml の代わりに水 1ml をとり、以下同様に操作して級光度  $A_0$  を測定する。これにより、縦軸に吸光度差 ( $A_1 - A_0, A_2 - A_0, A_3 - A_0, A_4 - A_0$  及び  $A_5 - A_0$ ) 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 4ml を正確に量り、25ml のメスフラスコに入れ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間放置した後、試料溶液 1ml を正確に量って加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 30 分間放置し、アルカリ性銅試液 2ml を正確に加えて振り混ぜ、メスフラスコに栓を施し、水浴中で通例 30 分間加熱する。水冷後、ヒ素モリブデン酸試液 2ml を正確に加えてよく振り混ぜ、更に 0.5mol/L 水酸化ナトリウム試液 3ml を正確に加え、ふり混ぜて沈殿を溶かし、20 分間放置した後、pH 4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に 25ml とする。この液 1ml を正確に量り、pH4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 9ml を正確に加え、よく振り混ぜる。この液につき波長 750nm における吸光度  $A_T$  を測定する。

別に試料溶液 1ml を正確に量り、25ml のメスフラスコに入れ、アルカリ性銅試液 2ml を正確に加えて振り混ぜ、次に、基質溶液 4ml を正確に量って加え、振り混ぜ、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 mg 数を  $G_T$  及び  $G_B$  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  $1 \mu\text{mol}$  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。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g)} = \frac{G_T - G_B}{30} \times \frac{1}{0.18} \times \frac{1}{W}$$

**第 3 法 (せんい素崩壊力測定法)** せんい素崩壊力測定法は、ろ紙にセルラーゼが作用するときろ紙が完全に崩壊するまでの時間を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、ろ紙の崩壊時間が 50~70 分の範囲内になるように、本品を適切な pH の 1 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液に溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例 2.8~4.0 単位/ml である。

## (2) 基質ろ紙

下記規格（参考値）のろ紙を光源を通して観察し、すきむらがなく、厚さが均一で異物のない箇所を1 cm×1 cmの大きさに切って用いる。なお、ろ紙の選択にあたっては下記規格を参考に従前と同等の分解力を表すものを選ぶ。

ろ紙の規格(参考値):紙厚 0.29~0.31mm, 重量 125~135g/m<sup>2</sup>, 破裂強度 1.2~1.8kg/cm<sup>2</sup>, ろ水時間 50~90 秒/100ml, 吸水高度 8~9 cm/10 分, 透気度 30~40 秒/cm<sup>2</sup>/100ml, 灰分 0.05%以下, α-繊維含量 98.5%以上。(市販ろ紙の例: アドバンテック東洋製 No.51A 又は No.51B)

## (3) 操作法

あらかじめ, Monod 式恒温振盪機の回転数を 65min<sup>-1</sup>, 振幅 6 cm, 水温 37±0.5℃に調節する。試料溶液 5 ml ずつを正確に量り, 5 本の L 型試験管に入れ, Monod 式恒温振盪機に取付け, 37±0.5℃で 5 分間放置した後, それぞれに基質ろ紙を 2 枚ずつ入れ, 直ちに振盪を開始する。適時にろ紙の崩壊状態を観察し, ろ紙が完全に崩壊して微細なせんいとなるまでの時間(分)を測定する。

上記の操作法の条件で試験するとき, 1 分間にろ紙を完全に崩壊する酵素量を 1,000 単位とし, 次式により算出する。

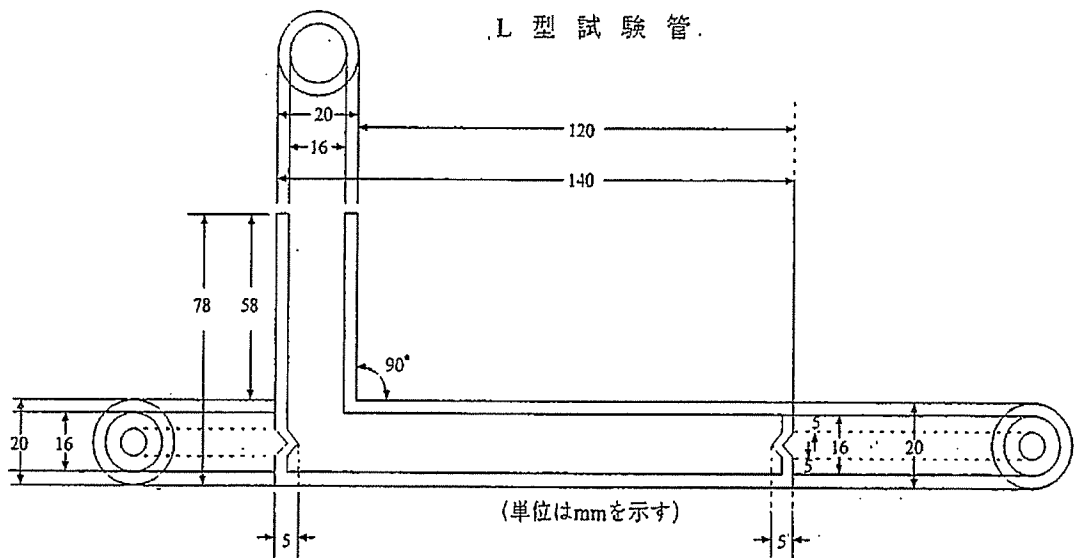
$$\text{本品中の酵素活性単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{1}{t \times W} \times 1,000$$

ただし,

t : ろ紙の崩壊時間(最長と最短を除く 3 本)の平均時間(分)

W : 試料溶液 5 ml 中の試料の量(g, ml)

## (4) 器具 L 型試験管



第4法（ろ紙分解力測定法-DNS-フェノール試薬法）      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。

(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の濃度になるように、本品に適量の水（又は適切な緩衝溶液、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 0.05~0.075 単位/ml である。

(2) 基質ろ紙

ワットマンろ紙 No. 1 の厚さが均一な部分から、約 1 × 6 cm のろ紙片を切り出す。このとき切り出したろ紙重量が 50 ± 1.5mg になるように、ろ紙短辺の長さを調整する。

(3) ブドウ糖検量線

あらかじめ、ブドウ糖約 1 g 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 1.0g に対応するブドウ糖を正確に量り、水で溶解し、正確に 200ml にする。その液から 2, 5 ml を正確に量り、それぞれ水で正確に 50ml にする。これらのブドウ糖標準液には 1 ml 中にブドウ糖 0.2, 0.5mg を含む。試験管にこのブドウ糖標準液 1.0ml を正確に量り、0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8) 0.5ml を加えた後、3, 5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて振り混ぜ、550nm における吸光度を測定する。横軸にブドウ糖濃度、縦軸に吸光度をとり、ブドウ糖検量線を作成し、吸光度差 1 に対応するブドウ糖濃度 ( $\mu$  g/ml) を求める。

(4) 操作法

試験管に 0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8) 1.0ml を量り、0.5ml の試料液を加え、攪拌する。基質ろ紙を加えて、試験管内で液中にろ紙が完全に沈むように、ボルテックスミキサーを用いてろ紙をコイル状にすばやく巻く。50℃ ± 0.5℃ で 60 分反応させた後、3, 5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、直ちに攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて攪拌し、550nm における吸光度を測定する ( $A_T$ )。このとき、吸光度が 0.15~0.25 の範囲になるようにする。

対照は、先に試験管に試料液 0.5ml と、3, 5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、次に 0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8) 1.0ml を正確に加え、直ちに攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて攪拌し、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 のブドウ糖に相当する還元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)

$$= (A_T - A_B) \times F \times 1.0 \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{W}$$

但し、 $A_T$             : 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 の時のブドウ糖濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
1.0	: 基質溶液及び試料液の総液量 (ml)
180	: ブドウ糖の分子量
60	: 反応時間 (分)
0.5	: 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) 0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8)

0.05mol/L クエン酸と 0.05mol/L クエン酸ナトリウムを混合して pH4.8 に調整する。

##### 2) 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)

##### 3) 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 (DNS) 44.0g を水に加えて 4,400ml とする。この液と酒石酸カリウムナトリウム 1,275g を、1,500ml の 1.125mol/L 水酸化ナトリウム溶液に加えよくかき混ぜる。

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

第 1 液に炭酸ナトリウム 34.5g を加えて溶かした後、第 2 液 345ml を加えて攪拌する。2 日間暗所にて保存後、アドバンテック社 No. 2 のろ紙でろ過する。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 5 法 (セルロース糖化力測定法-DNS-フェノール試薬法)** 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。

#### (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の濃度になるように、本品に適量の水 (又は適切な緩衝溶液、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 0.09~0.13 単位/ml である。

#### (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 1.0g 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、0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8) に溶解し、正確に 100ml にする。この溶液は用事調製する。

#### (3) ブドウ糖検量線

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 1.0g に対応するブドウ糖を正確に量り、水で溶解し、正確に 200ml にする。その液から 2, 5ml を正確に量り、それぞれ水で正確に 50ml にする。これらのブドウ糖標準

液には1 ml 中にブドウ糖 0.2, 0.5mg を含む。試験管にこのブドウ糖標準液 1.0ml を正確に量り、3, 5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて攪拌し、550nm における吸光度を測定する。横軸にブドウ糖濃度、縦軸に吸光度をとり、ブドウ糖検量線を作成し、吸光度差 1 に対応するブドウ糖濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を求める。

#### (4) 操作法

試験管に基質溶液 0.5ml と試料溶液 0.5ml を正確に量り、直ちに攪拌する。50℃ $\pm$ 0.5℃で正確に 30 分放置した後、3, 5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、直ちに攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて攪拌し、550nm における吸光度を測定する ( $A_T$ )。このとき、吸光度が 0.15~0.25 の範囲になるようにする。

対照は、先に試験管に試料液 0.5ml と 3,5-ジニトロサリチル酸-フェノール試液 3.0ml を加え、次に基質溶液 0.5ml を正確に加え、直ちに攪拌する。沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して室温まで冷やす。次に水 16ml を加えて攪拌し、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  $\mu\text{mol}$  のブドウ糖に相当する還元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)

$$= (A_T - A_B) \times F \times 1.0 \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{W}$$

但し、 $A_T$  : 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 の時のブドウ糖濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

1.0 : 基質溶液及び試料液の総液量 (ml)

180 : ブドウ糖の分子量

30 : 反応時間 (分)

0.5 : 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

##### 4) カルボキシメチルセルロースナトリウム

純正化学 1 級 (製品番号 2D4015) 又は同等品

##### 5) 0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8)

0.05mol/L クエン酸と 0.05mol/L クエン酸ナトリウムを混合して pH4.8 に調整する。

##### 6) 3,5-ジニトロサリチル酸

( $\text{NO}_2$ )<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OH)COOH (市販試薬特級)

##### 7) 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 (DNS) 44.0g を水に加えて 4,400ml とする。この液と酒石酸カリウムナトリウム 1,275g を、1,500ml の 1.125mol/L 水酸化ナトリウム溶液に加えよくかき混ぜる。

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

第1液に炭酸ナトリウム 34.5g を加えて溶かした後、第2液 345ml を加えて攪拌する。2日間暗所にて保存後、アドバンテック社 No. 2 のろ紙でろ過する。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。

## セルラーゼ測定結果

品名 GODO-TCF (基原: *Trichoderma reesei* 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号	
			#1801	
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おいがある。	①	褐色の液体でわずかに特異なおいがある	
		②	褐色の液体でわずかに特異なおいがある	
		③	褐色の液体でわずかに特異なおいがある	
確認試験	酵素活性を示す	①	酵素活性を示した	
		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 個/g 以下	①	10,000 個/g 以下	
		②	10,000 個/g 以下	
		③	10,000 個/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	単位/g		第4法	第5法
		①	111	2257
		②	107	2575
		③	100	2539
		④	105	2511
		⑤	116	2511
		⑥	114	2603
	平均値(n=6)	単位/g	109	2549
	標準偏差		6	36
	CV(%)		5.50	1.43
	最大値	単位/g	116	2603
最小値	単位/g	100	2511	

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法第4法および第5法を実施。

\* 酵素活性測定

酵素活性測定法第4法および第5法を実施。

#### 第4法

##### 試料溶液

GODO-TCF 0.5g を精密に採取し、0.05mol/L クエン酸緩衝液(pH4.8)で溶解し全量を正確に 50ml にした後、その溶液をさらに同緩衝液で正確に 20 倍希釈して試料溶液とした。

##### 基質ろ紙

ワットマンろ紙 No.1 を使用した。

#### 第5法

##### 試料溶液

GODO-TVF 0.5g を精密に採取し、0.05mol/L クエン酸緩衝液(pH4.8)で溶解し全量を正確に 50ml にした後、その溶液をさらに同緩衝液で正確に 240 倍希釈して試料溶液とした。

##### 基質溶液

カルボキシメチルセルロース 1g を精密に量り、105℃で3時間乾燥し、その減量を測定した。その換算した乾燥物 1.0g 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、0.05mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.8) に溶解し、正確に 100ml として基質溶液とした。

\*参考情報



## トランスグルコシダーゼ活性測定法

**第1法 (グルコースオキシダーゼ-パーオキシダーゼ-4-アミノアンチピリンを用いた酵素的方  
法)**  $\alpha$ -メチル-D-グルコシドを基質として酵素を作用させ、生成したブドウ糖をグルコースオ  
キシダーゼ、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン・フェノール試液を用いた酵素的方法  
により比色測定し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、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、本品に水又は冷水又は適切な緩衝液を加えて溶かし、試料液とする。その濃度は、通例、  
600~1300 単位/ml とする。

(2) 基質液

$\alpha$ -メチル-D-グルコシド 2.0g を正確に量り、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を 105℃で6時間乾燥し、その 1.000g を正確に量り、水を加えて溶か  
し、正確に 100ml とする。この液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml を正確に量り、それぞれに水を加え  
て正確に 100ml とする。これらのブドウ糖標準液は 1ml 中にブドウ糖 100, 200, 300, 400 及  
び 500  $\mu$ g を含む。各濃度のブドウ糖標準液 0.1ml を正確に量り、4-アミノアンチピリン・フ  
ェノール発色試液 3ml を正確に加え、よく振り混ぜ 40 $\pm$ 0.5℃で正確に 20 分間放置する。こ  
の液につき、水を対照として波長 500nm における吸光度  $E_s$  を測定する。

別に、ブドウ糖標準液の代わりに水 0.1ml を用い以下同様に操作して吸光度  $A_{s_0}$  を測定す  
る。縦軸に吸光度差 ( $A_s - A_{s_0}$ )、横軸にブドウ糖標準液のブドウ糖量を取り、検量線とする。

(4) 操作法

基質液 1ml 及び 0.02mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 1ml を正確に量り、40  
 $\pm$ 0.5℃で 10~15 分間放置した後、試料液 0.5ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  
40 $\pm$ 0.5℃で正確に 60 分間放置した後、沸騰水浴中で正確に 5 分間加熱し、流水中で冷却する。  
この液 0.1ml を正確に量り、4-アミノアンチピリン・フェノール発色試液 3ml を正確に加え、  
よく振り混ぜ 40 $\pm$ 0.5℃で正確に 20 分間放置する。この液につき、水を対照として波長 500nm  
における吸光度  $A_{6_0}$  を測定する。

別に、対照として 0.02mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 1ml と試料液 0.5ml を  
正確に量り、沸騰水浴中で正確に 5 分間加熱した後、流水中で冷却し、基質液 1ml 加え、以  
下同様に操作して吸光度  $A_0$  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、60 分間に 1  $\mu$ g のブドウ糖を生成す  
る酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = (A_{6_0} - A_0) \times G \times \frac{2.5}{0.1} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

- $A_{60}$  : 反応液の吸光度  
 $A_0$  : 対照液の吸光度  
 $G$  : 吸光度 1 のときのブドウ糖量 ( $\mu\text{g}$ )  
 $2.5$  : 反応系液量 (ml)  
 $0.1$  : 反応液量 (ml)  
 $0.5$  : 試料液量 (ml)  
 $W$  : 試料液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1)  $\alpha$ -メチル-D-グルコシド (市販試薬特級)

たとえば, 和光純薬工業社製又は同等品が使用できる。

2) ブドウ糖 (市販試薬特級)

たとえば, 片山化学工業社製又は同等品が使用できる。

3) 4-アミノアンチピリン・フェノール発色試液

グルコースオキシダーゼ 550 単位, パーオキシダーゼ 125 単位を量り, トリス・リン酸緩衝液 (pH7.2) 約 40ml に溶かし, これに 0.4w/v% 4-アミノアンチピリン試液 1ml と 5w/v% フェノール試液 1.4ml を加えた後トリス・リン酸緩衝液 (pH7.2) で 50mL とする。

グルコースオキシダーゼ: 天野エンザイム社製 GO “Amano” 2 又は同等品を使用する。

活性単位は, pH7.0, 37°Cにおいて, 1分間に  $1\mu\text{mol}$  のブドウ糖を酸化する酵素量を 1 単位とする。

パーオキシダーゼ: 天野エンザイム社製 PO “Amano” 2 又は同等品を使用する。活性

単位は, pH6.0, 20°Cにおいて, 20 秒間にピロガロールから プルプロガリン 1mg を生成する酵素量を 1 単位とする。

4) トリス・リン酸緩衝液 (pH7.2)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 36.3g, リン酸二水素ナトリウム 2 水和物 50.0g を水約 900ml に溶かし, 2mol/L 塩酸試液で pH7.20 に調整し, 水を加えて 1000ml とする。

5) 2mol/L 塩酸試液

塩酸 180ml に水を加え 1000ml とする。

6) 0.4w/v% 4-アミノアンチピリン試液

4-アミノアンチピリン 0.40g を水に溶かし 100ml とする。

7) 5w/v% フェノール試液

フェノール 5.0g を水に溶かし 100ml とする。

8) 0.02mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)

第 1 液: 酢酸ナトリウム 1.64g を水に溶かし 1000ml とする。第 2 液: 酢酸 1.20g に水を加え 1000ml とする。第 1 液と第 2 液を混ぜ, pH5.0 に調整する。その容量比は約 2 : 1 である。

**第2法（HPLC法）** 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により定量し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、トリサッカライドの生成量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、試料液とする。その濃度は、通例、200～1,000 単位/ml とする。

(2) 基質液

マルトース 5.00g を正確に量り、水又は適切な緩衝液を加えて正確に 25ml とする。

(3) 1 mg/ml ブドウ糖標準液

D-グルコース（無水）1.000g を正確に量り、0.005mol/L 硫酸を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、0.005mol/L 硫酸を加えて溶かし、正確に 100ml とする。

(4) 操作法

基質液 0.5ml を正確に量り、 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 10 分間保温した後、試料液 0.5ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 60 分間保温した後、沸騰水浴中で 10 分間加熱し、室温まで冷却する。ここに 0.0055mol/L 硫酸 9.0ml を正確に加え、穏やかに混合し、検液とする。

別に、基質液 0.5ml を正確に量り、 $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 60 分間保温した後、試料液 0.5ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を沸騰水浴中で 10 分間加熱し、室温まで冷却する。ここに 0.0055mol/L 硫酸 9.0ml を正確に加え、穏やかに混合し、対照液とする。

検液、対照液及びブドウ糖標準液それぞれ 10ml を  $0.45 \mu\text{m}$  のシリンジフィルター（ワットマン製又は同等品）でろ過し、バイオラッド製カチオンHガード付 HPX 87H 分析カラム（又は同等品）を用いたHPLCで各液中のブドウ糖、マルトース及びトリサッカライドを定量する。

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  $1 \mu\text{mol}$  のトリサッカライドを生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_{G3T} - A_{G3B}) \times 1,000 \times 2 \times 10 \times D}{A_{G1S} \times 504 \times 60 \times 1.30}$$

但し、

- $A_{G3T}$  : 検液のトリサッカライドのピーク面積
- $A_{G3B}$  : 対照液のトリサッカライドのピーク面積
- $A_{G1S}$  : 1 mg/ml ブドウ糖標準液のブドウ糖のピーク面積
- 1,000 : mg から g への変換係数
- 504 : トリサッカライドの分子量
- 2 : 試料液 1 ml への変換係数
- 10 : HPLC 希釈係数
- D : 試料液希釈係数
- 1.30 : 算出係数
- 60 : 反応時間 (分)

(5) 試薬・試液

1) マルトース 1 水和物 (市販試薬特級)

たとえば、シグマ製又は同等品が使用できる。6ヶ月毎に純度が99%以上あることをHPLCで確認する。

2) D-グルコース (無水) (市販試薬特級)

たとえば、シグマ製又は同等品が使用できる。

3) 0.005mol/L 硫酸

濃硫酸 2.05g をHPLCグレードの水 4.0L に加え、混合し、0.45 $\mu$ mフィルターでろ過後、15分間脱気する。

4) 0.0055mol/L 硫酸

濃硫酸 1.13g をHPLCグレードの水 2.0L に加え、混合する。

## トランスグルコシダーゼ測定結果

品名 トランスグルコシダーゼ L-500

(基原: *Aspergillus niger* 由来)

規格項目	規格	測定回数	ロット番号		
			1026342001	1027026001	1027044001
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 (トランスグルコシダーゼ活性測定法第2法(HPLC法))	単位/g		456	450	459

\* 確認試験の方法

酵素活性測定法 (HPLC 法) に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液: トランスグルコシダーゼ活性測定法第2法(HPLC法)で200~1,000単位/mlになるように本品に0.02mol/l酢酸緩衝液(pH 4.0)を加えて溶解し、試料液とした。

基質: マルトース1水和物(シグマ製)を使用した。

反応pH: pH 4.0

反応温度: 50℃

## プルラナーゼ活性測定法

**第1法（ソモギ・ネルソン変法）** プルランより生成した還元糖の還元力をソモギ・ネルソン変法で比色測定する方法である。

(1) 試料溶液の調製

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、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かす。その濃度は、通例 0.01~0.05 単位/ml である。

(2) 基質溶液の調製

プルラン 0.40g を量り、クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて溶かし、正確に 100ml 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、ブドウ糖を 105℃ で 6 時間乾燥し、その減量を測定する。その乾燥物 1.60g に相当するブドウ糖を正確に量り、クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて溶かし、正確に 200ml とする。この液にクエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて希釈し、1 ml 中に 16, 40, 80, 120 及び 160  $\mu$ g の各濃度のブドウ糖標準溶液を調製する。

(4) 操作法

基質溶液 1 ml を正確に量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に加温し、この液に  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に加温した試料溶液 1 ml を正確に加えて直ちに振り混ぜる。正確に 30 分間反応させた後、アルカリ性銅試液 2 ml を正確に加えて混和し、反応を停止する。試験管にガラス玉をのせ、沸騰水浴中で 20 分間加熱する。

冷却後、ヒ素モリブデン酸試薬 2 ml を正確に加え、赤色沈澱物を溶かした後、水 4 ml を正確に混合し、30 分間放置後、520nm で吸光度を測定する ( $A_T$ )。別に対照として試料溶液 1 ml を正確に量り、アルカリ性銅試液 2 ml を正確に加えて混和し、基質溶液 1 ml を正確に加えて、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 2 ml を正確に量り、アルカリ性銅試液 2 ml を正確に加え、以下同様の操作を行う。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。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 2}{W \times A_S \times 180 \times 30 \times 1}$$

ただし、

$A_T$ : 反応液の吸光度

$A_B$ : 対照液の吸光度

$A_S$ : ブドウ糖 1  $\mu$ g/ml の吸光度 (検量線より算出)

W: 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

- 2 : 反応液の総液量 (ml)  
180 : ブドウ糖の分子量  
30 : 反応時間 (分)  
1 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml)
- (4) 試薬・試液
- 1) プルラン  
本品は、分子量 50,000~100,000 の白色の粉末である。プルラナーゼにより加水分解され 94%以上のマルトトリオースを生ずる。  
たん白質 0.1%以下  
乾燥減量 7.0%以下  
灰分 0.1%以下  
たとえば、林原生物化学研究所社製（製品番号 PU101：分子量 5~10 万）又は同等品が使用できる
  - 2) クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0)  
クエン酸 10.5g を約 800ml の水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (4.3→100) で pH を 5.0 に調整する。水を加え正確に 1,000ml とする。
  - 3) アルカリ性銅試液  
硫酸銅 4.0g, 無水炭酸ナトリウム 24g, 炭酸水素ナトリウム 16g, 無水硫酸ナトリウム 180 及び酒石酸カリウムナトリウム 12g に水を加えて溶かし、900ml とする。この液を 10 分間煮沸した後、水を加えて 1,000ml とし、密栓して 1 週間放置した後、ガラスフィルター (G3) でろ過し、遮光して保存する。
  - 4) ヒ素モリブデン酸試液  
モリブデン酸アンモニウム 50g に水 900ml を加え、加温して溶かし、冷後、硫酸 42ml を正確に加え、更にヒ酸二ナトリウム溶液 (6.00→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。
  - 5) ヒ酸二ナトリウム  
 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (市販試薬特級)

**第2法 (レッドプルラン比色法)** 本測定法は、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、色素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 0.95~1.80 単位/ml である。

(2) 基質溶液

レッドプルラン 1.00g を 0.2mol/L 酢酸ナトリウム溶液 50ml に溶解し、基質溶液とする。

(3) 操作法

試料溶液 0.25ml を正確に量り、基質溶液 0.25ml 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、エタノール 1.0ml を正確に加えて振り混ぜ、室温に 5 分間放置し、遠心分離を行う。上清をとり、波長 520nm における吸光度  $A_T$  を測定する。対照として試料溶液の代わりに 0.2mol/L 酢酸ナトリウム溶液を用い、同様にして波長 510nm 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 分間に色素  $1.0 \mu\text{mol}$  の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 1.5 \times d}{A_S \times 0.25 \times 20}$$

ただし、

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 対照液の吸光度

$A_S$  : 色素  $1 \mu\text{mol/ml}$  の吸光度

1.5 : 反応液量 (ml)

0.25 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml)

d : 希釈係数

20 : 反応時間 (分)

#### (4) 試薬・試液

##### 1) 0.2mol/L 酢酸ナトリウム溶液

無水酢酸ナトリウム 16.406g を水に溶かし、酢酸を滴下し、pH5.0 に調整した後、水を加えて 1,000ml とする。

##### 2) レッドプルラン

メガザイム社製レッドプルラン (製品番号 S-RPUL) 又は同等品が使用できる。



## プルナーゼ測定結果

品名 オプチマックス 4060VHP

(基原 : Bacillus licheniformis 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 (プルナーゼ活性測定法第2法(レッドプルラン比色法))	単位/g		395	391	453

\* 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：プルナーゼ活性測定法第2法(レッドプルラン比色法)で0.95～1.80 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：レッドプルラン(メガザイム製)を使用した。

反応 pH：pH 5.0

反応温度：40℃

# プロテアーゼ活性測定法

**第1法 (カゼイン-フォリン法)** 本測定法は、カゼインにプロテアーゼが作用するとき、ペプチド結合の切断に伴って増加する酸可溶性低分子分解産物の量をフォリン反応で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、非タンパク性のフォリン試液呈色物質の増加が、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、15~30 単位/ml である。

(2) チロジン検量線

チロジン標準品を 105℃、3 時間乾燥し、その 0.050g を正確に量り、塩酸 (18→1,000) に溶かし、正確に 50ml とする (1 mg/ml)。この液 1 ml, 2 ml, 3 ml 及び 4 ml を正確に量り、それぞれに 塩酸 (18→1,000) を加え、正確に 100ml とする (10, 20, 30, 40 μg/ml)。それぞれの液 2 ml を正確に量り、炭酸ナトリウム溶液 (無水 58.29→1,000) 5 ml 及び薄めた フォリン試液 (1→3) 1 ml をそれぞれ正確に加え、直ちに振り混ぜ、37±0.5℃で 30 分間放置した後、これらの液につき、塩酸 (18→1,000) 2 ml を正確に量り、同様に操作して得た液を対照とし、波長 660nm における吸光度  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  及び  $A_4$  を測定する。縦軸に吸光度  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  及び  $A_4$  を、横軸にそれぞれの液 2 ml 中のチロジン量 (μg) をとり、検量線を作成する。吸光度差 1 に対応するチロジン量 (μg) を求める。

(3) 基質溶液

基質溶液 1 : カゼイン, 乳製, 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。その換算した乾燥物 1.20g に対応するカゼイン, 乳製, 酵素試験用を正確に量り, 乳酸溶液 (12.0g→1,000) 12ml 及び水 150ml を加え, 水浴中で加温して溶かす。流水で冷却した後, 塩酸 (90→1,000) 又は水酸化ナトリウム試液で所定の pH に調整し, 水を加えて正確に 200ml とする。用時調製する。

基質溶液 2 : カゼイン, 乳製, 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。その換算した乾燥物 1.20g に対応するカゼイン, 乳製, 酵素試験用を正確に量り, リン酸二ナトリウム溶液 (無水 7.098→1,000) 160ml を加え, 水浴中で加温して溶かす。流水で冷却した後, 塩酸 (90→1,000) 又は水酸化ナトリウム試液で所定の pH に調整し, 水を加えて正確に 200ml とする。用時調製する。

(4) 操作法

基質溶液 5 ml を正確に量り, 37±0.5℃で 10 分間加温した後, 試料溶液 1 ml を正確に加え, 直ちに振り混ぜる。この液を 37±0.5℃で正確に 10 分間放置した後, トリクロロ酢酸試液 A (0.44mol/l) (7.20→100) 又はトリクロロ酢酸試液 B (0.11mol/l) 5 ml を正確に加えて振り混ぜ, 再び 37±0.5℃で 30 分間放置し, ろ過する。初めのろ液 3 ml を除き, 次のろ液 2 ml を正確に量り, 炭酸ナトリウム溶液 (無水 58.29→1,000) 5 ml 及び薄めたフォリン試液 (1→3) 1 ml をそれぞれ正確に加え, よく振り混ぜ, 37±0.5℃で 30 分間放置する。この液につき, 水を対照とし, 波長 660nm 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, 上記で用いたトリクロロ酢酸試液 A (0.44mol/l) 又はトリクロロ酢酸試液 B (0.11mol/l) 5 ml を正確に加えて振り混ぜた後, 基質溶液 5 ml を正確に加え, 直ちに振り混ぜ, 37±0.5℃で 30 分間放置し, 以下同様に操作し, 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 分間にチロジン 1 μg に相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性単位 (単位/g 又は ml)} = (A_T - A_B) \times F \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

ただし,

F: チロジン検量線より求めた吸光度が1,000のときのチロジン量 ( $\mu\text{g}$ )

W: 試料溶液1ml中の試料の量 (g, ml)

**第2法 (ヘモグロビン法)** ヘモグロビン基質にプロテアーゼを作用させた後の未分解物をトリクロロ酢酸で沈殿させ、沈殿をろ過によって除去し、得られたろ液中の可溶化したヘモグロビン分解物を吸光度法により定量する方法である。活性は、チロジンを基準としたヘモグロビン単位 (HUT) で表わされる。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、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9~22単位/ml (吸光度差0.2~0.5の範囲) である。

(2) チロジン検量線

チロジン標準品を105℃、3時間乾燥し、その0.100gを正確に量り、塩酸(90→1,000, 100→1,000)60mlを加えて溶かし、水を加えて正確に1,000mlとする(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。この液25ml, 50ml及び75mlを量り、それぞれに塩酸(27→1,000, 20→1,000)を加え、正確に100mlとする(25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。これら4種類のチロジン標準溶液につき、塩酸(27→1,000, 20→1,000)を対照として波長275nmにおける吸光度を測定する。縦軸に吸光度を、横軸にチロジン量を取り検量線を作成する。原点を通る直線式から傾きを求める。この値に1.10を乗じてチロジンのファクター(F)とする。

(3) 基質溶液

ヘモグロビン4.0gを量り、100mlの水を加え10分間かき混ぜながら溶かす。溶解後、塩酸(27→1,000)を加えpH1.7に調整し、10分間かき混ぜた後、0.5mol/l酢酸ナトリウム試液を加えてpH4.7に調整する(又は、酸、アルカリ又は緩衝液を加えて、測定する酵素の至適pHに調整する)。この液に水を加えて正確に200mlとする。

(4) 操作法

共栓付き試験管(25×200mm)に基質溶液10mlを正確に量り、40±0.5℃で約5分間加温した後、試料溶液2mlを正確に加え、栓をして緩やかに30秒間混ぜる。この液を40±0.5℃で正確に30分間放置した後、14g/dlトリクロロ酢酸溶液(140→1,000)10mlを正確に加え、約40秒間よく振り混ぜる。この液を室温で60分間放置する。この間、10~12分の間隔でよく振り混ぜる操作を繰り返す。60分経過後、試験管を激しく振り混ぜ、ろ過する。ろ液のうち、最初の半量は同じろ紙で再ろ過する。

基質ブランクは以下のように操作する。

共栓付き試験管(25×200mm)に基質溶液10mlを正確に量り、40±0.5℃で約5分間加温した後、試料溶液の代わりに、試料の希釈に使用した水、緩衝液又は塩類溶液2mlを加え、以下前記試料溶液の場合と同様に操作する。

酵素ブランクは以下のように操作する。

共栓付き試験管(25×200mm)に基質溶液10mlを正確に量り、又別の試験管には約5mlの試料溶液を量る。それぞれの試験管を40±0.5℃で30分間放置した後、基質溶液の入った試験管に14g/dlトリクロロ酢酸溶液10mlを正確に加え、約40秒間よく振り混ぜる。この液に上記30分間予熱した試料溶液2mlを加え、再びよく振り混ぜる。以下試料溶液の場合と同様に操作する。

基質ブランクのろ液を対照として、層長10mm、波長275nmにおける試料のろ液の吸光度( $A_{30}$ )及び酵素ブランクのろ液の吸光度( $A_0$ )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1.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のチロジンに相当する加水分解物の増加をもたらす酵素量を1酵素活性単位(HUT)とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (HUT/g 又は ml)} = \frac{(A_{30} - A_0)}{F} \times \frac{1}{30} \times \frac{22}{W}$$

ただし、

F : チロジンのファクター

W : 試料溶液 2 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

**第3法 (アゾカゼイン法)** 本測定法は、アゾカゼインにプロテアーゼが作用して生じるアゾ色素の量を比色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、アゾ色素の増加が、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、0.10~0.35 単位/g である。

(2) 基質溶液

アゾカゼイン 0.5g を 0.05mol/L トリス緩衝液に溶解し、塩酸又は水酸化ナトリウム溶液で pH 7.5 に調整し、100ml とする。

(3) 操作法

試料溶液 0.2ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 2 分間加温した後、あらかじめ  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に保温した基質溶液 1 ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 5 分間放置した後、10% トリクロロ酢酸試液 0.2ml を正確に加えて振り混ぜ、室温に 5 分間放置し、14,000rpm で 5 分間遠心分離する。上清 1.0ml をとり、0.5mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.25ml を加え、波長 420nm における吸光度  $A_T$  を測定する。対照として試料溶液の代わりに 0.05mol/L トリス緩衝液を用い、同様にして波長 420nm 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 分間にアゾ色素  $1.0 \mu\text{mol}$  の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位とする。

$$\text{本品の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 1.25 \times 1.40 \times D}{A_S \times 0.2 \times 5}$$

ただし、

$A_T$  : 反応液の吸光度

$A_B$  : 対照液の吸光度

$A_S$  : アゾ色素  $1 \mu\text{mol/ml}$  の吸光度

1.25 : 測定液量 (ml)

1.40 : 反応液量 (ml)

1.0 : 測定に用いた反応液量 (ml)

0.2 : 反応に用いた試料溶液の液量 (ml)

D : 希釈係数

5 : 反応時間 (分)

**第4法 (ニトロアニリド法)** 本測定法は、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) にプロテアーゼが作用して生じる pNA の量を比色測定する方法である。

(1) 希釈溶液

ホウ酸ナトリウム 3.8g を水 0.8L に溶解する。そこに Tween 80 を 0.05ml 加え、pH を塩酸で 8.5 に調整し、全量を 1.0 L とする。これを  $0.2 \mu\text{m}$  のフィルターでろ過したものを希釈溶液とする。

(2) 試料溶液