

操作法により試験するとき、pNA 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、本品に適量の希釈溶液、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、40～250 単位/g である。

(3) 基質溶液

AAApNA 0.03g を DMSO 1 ml に完全に溶解し、これを希釈溶液又は適当な緩衝液 15.0ml に溶解したものを基質溶液とする。

(4) 操作法

試料溶液 0.1ml を正確に量り、25℃で3分間加温した後、基質溶液 1ml を正確に加え、直ちに振り混ぜる。この液を 25℃で正確に 10 分間反応させた後、酢酸溶液 (20→100) 0.25ml を正確に加えて振り混ぜ、波長 405nm 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希釈溶液を用い、同様にして波長 405nm 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 pNA 1.0 μ mol の増加をもたらす酵素量を 1 酵素活性単位とする。

$$\text{本品の酵素活性の単位 (単位/g 又は ml)} = \frac{(A_T - A_B) \times 1.35 \times D}{A_S \times 0.1 \times 10}$$

ただし、

A_T : 反応液の吸光度

A_B : 対照液の吸光度

A_S : pNA 1.0 μ mol/ml の吸光度

1.35 : 反応液量 (ml)

0.1 : 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)

プロテアーゼ測定結果

品名 プロテックス 7L

(基原: Bacillus amyloliquefaciens 由来)

規格項目	規格	測定回数	ロット番号		
			4016275002	4016137001	4016340002
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	濃褐色の液体 特異なにおいが有る	濃褐色の液体 特異なにおいが有る	濃褐色の液体 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 ₂ O ₃ 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 (プロテアーゼ活性測定法第3法(アゾカゼイン法))	単位/g		1,625	1,670	1,633

* 確認試験の方法

プロテアーゼ活性測定法第3法(アゾカゼイン法)に準じた。

* 酵素活性測定法の測定条件

試料液: プロテアーゼ活性測定法第3法(アゾカゼイン法)で 0.10~0.35 単位/g 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: アゾカゼイン(フルカバイオケミカ製)を使用した。

反応 pH: pH 7.5

反応温度: 30℃

プロテアーゼ測定結果

品名 プロテックス 6L

(基原 : Bacillus licheniformis 由来)

規格項目	規 格	測定回数	ロット番号		
			3026224008	3026245005	3026253006
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	濃褐色の液体 特異なにおいが有る	濃褐色の液体 特異なにおいが有る	濃褐色の液体 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 ₂ O ₃ 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 (プロテアーゼ活性測定法第4法(ニトロアニリド法))	単位/g		619,000	598,000	605,000

* 確認試験の方法

プロテアーゼ活性測定法第4法(ニトロアニリド法)に準じた。

* 酵素活性測定法の測定条件

試料液：プロテアーゼ活性測定法第4法(ニトロアニリド法)で40～250単位/g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：AAApNA (スクシニルトリアラニンパラニトロアニリド、フルカバイオケミカ製)を使用した。

反応 pH：pH 8.5

反応温度：25℃

ペクチナーゼ活性測定法

第1法（ペクチン酸糖化力測定法） ペクチン酸（ポリガラクチュロン酸）にペクチナーゼが作用するとき、ペクチン酸が分解されて還元糖のガラクチュロン酸が生じ、生成した還元糖量を、アルカリ性下で過剰のヨウ素と反応させて残存するヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定することにより酵素活性を求める方法である。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、ガラクチュロン酸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、本品にクエン酸緩衝液（pH4.0）、酵素試験用（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 40～60 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめペクチン酸約 1g を精密に量り、105℃で 3 時間乾燥し、その減量を測定する。その換算した乾燥物 0.55g に対応するペクチン酸を正確に量り、クエン酸緩衝液（pH4.0）、酵素試験用 80ml を加えて溶かす。溶解後、クエン酸三ナトリウム溶液（29.4→100）または薄めた塩酸（9→100）を用いて pH4.0 に調整し、さらにクエン酸緩衝液（pH4.0）、酵素試験用を加えて正確に 100ml とする。

(3) 操作法

基質溶液 10ml を 100ml の共栓付き三角フラスコにとり、40±1℃で 5 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±1℃で正確に 30 分間放置した後、炭酸ナトリウム溶液（無水 106→1,000）3ml を加えて反応を停止する。次に 0.05 mol/L ヨウ素溶液 6ml を正確に加えてよく振り混ぜ、暗所に 30 分間放置する。これに 4 mol/L 硫酸 6ml を加え、デンプン試液を指示薬として 0.02 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する（Aml）。ただし滴定の終点は、滴定が終点近くなったときデンプン試液 1～2 滴を加え、生じた青色が脱色するときとする。

別に、空試験として、100ml の共栓付き三角フラスコに炭酸ナトリウム溶液（無水 106→1,000）3ml をとり、これに試料溶液 1ml を加えてよく振り混ぜる。次に基質溶液 10ml を加え、さらに 0.05 mol/L ヨウ素溶液 6ml を正確に加えてよく振り混ぜ、暗所に 30 分間放置した後、同様に滴定する（Bml）。

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 1μmol のガラクチュロン酸を生成する酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位（単位/g または単位/ml）} = (B - A) \times 513 \times \frac{2}{100} \times \frac{60}{30} \times \frac{1}{W}$$

ただし、

513： 1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 1 ml は 1 mg 当量のヨウ素に相当する。

1 mg 当量のヨウ素は 513 μmole のガラクチュロン酸に相当する。

W： 試料溶液 1 ml 中の試料の量（g 又は ml）

第2法（ペクチン粘度降下力測定法－1） 酵素を基質アップルペクチンに作用させ、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、粘度低下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、キャノンフェンスケ型粘度計（No.200）を使用する場合、通例8単位/mlである。又、キャピラリー粘度計（20ml容量、水の流下時間：20～25秒）を使用する場合は、試料を約100単位/mlに水で希釈した後、水で100%、75%、50%、25%に希釈し、試料溶液とする。必要があれば遠心分離して用いる。

(2) ペクチナーゼ標準溶液

キャノンフェンスケ型粘度計（No.200）を使用する場合

ペクチナーゼ、定量用（自主規格C-2-1：新日本化学工業社製のペクチナーゼ（12,000単位/g）を用いる）約1.1gを精密に量り、水を加えて溶かし、正確に100mlとする。この液3mlを正確に量り、水を加えて50mlとする。

キャピラリー粘度計（20ml容量、水の流下時間：20～25秒）を使用する場合

ペクチナーゼ、定量用（ダニスコ製ペクチナーゼ、100単位/g、又は同等品を用いる）を、水で100%、75%、50%、25%に希釈する。

(3) 基質溶液

あらかじめ、ペクチン（アップル）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1.45gに対応するペクチンを正確に量り、エタノール約2mlで湿潤した後、水70mlを加え、30分間かき混ぜて溶かした後、水を加えて正確に100mlとする。必要ならばろ過する。用時調製する。

(4) 操作法

キャノンフェンスケ型粘度計（No.200）を使用する場合

基質溶液10mlを平底試験管（30×130mm）に入れ、0.5mol/L酢酸緩衝液（pH4.0）1mlを加えて振り混ぜ、40±0.5℃で5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。このとき、反応時間測定用ストップウォッチー1をスタートする。この酵素反応液を、40±0.5℃で加温したキャノンフェンスケ型粘度計（No.200）に移す。反応開始2分後から6分後までの間、2分間隔で酵素反応液の流下時間 F_n を流下時間測定用ストップウォッチー2で測定する。このとき、それぞれの流下時間測定開始時間 t_n を反応時間測定用ストップウォッチー1から記録し、各流下時間測定時の反応時間 T_n を次式により求める。

$$T_n = t_n + F_n / 2$$

次に、基質溶液10mlを平底試験管（30×130mm）に入れ、0.5mol/L酢酸緩衝液（pH4.0）1mlを加えて振り混ぜ、40±0.5℃で5分間加温した後、ペクチナーゼ標準溶液1mlを正確に加え、直ちに振り混ぜる。このとき、反応時間測定用ストップウォッチー1をスタートする。この酵素反応液を、40±0.5℃で加温したキャノンフェンスケ型粘度計（No.200）に移す。反応開始2分後から6分後までの間、2分間隔で酵素反応液の流下時間 F_{sn} を流

下時間測定用ストップウォッチ-2で測定する。このとき、それぞれの流下時間測定開始時間 t_{s_n} を反応時間測定用ストップウォッチ-1から記録し、各流下時間測定時の反応時間 T_{s_n} を次式により求める。

$$T_{s_n} = t_{s_n} + F_{s_n} / 2$$

別に、基質溶液 10ml を平底試験管 (30×130mm) に入れ、0.5mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.0) 1ml を加えて振り混ぜ、40±0.5℃で5分間加温した後、水 1ml を加えてよく振り混ぜる。この基質ブランク液を、40±0.5℃で加温したキャノンフェンスケ型粘度計 (No.200) に移し、流下時間 F_0 を測定する。更に、水 12ml を別の平底試験管 (30×130mm) に入れ、40±0.5℃で5分間加温した後、40±0.5℃で加温したキャノンフェンスケ型粘度計 (No.200) に移して、水ブランク液の流下時間 F_∞ を測定し、粘度半減期の流下時間 $F_{1/2}$ を次式により求める。

$$F_{1/2} = (F_0 + F_\infty) / 2$$

グラフのX軸に試料溶液の反応時間 T_n をとり、Y軸にそれに対応する流下時間 F_n をとり、粘度半減期の流下時間 $F_{1/2}$ に対応する酵素反応時間 T をX軸から求める。別に、グラフのX軸にペクチナーゼ標準溶液の反応時間 T_{s_n} をとり、Y軸にそれに対応する流下時間 F_{s_n} をとり、粘度半減期の流下時間 $F_{1/2}$ に対応する酵素反応時間 T_s をX軸から求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、次式により求める。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は 単位/ml)} = S \times \frac{T_s \times W_s}{T \times W}$$

ただし、

S : ペクチナーゼ、定量用の酵素活性 (12,000 単位/g)

T_s : ペクチナーゼ標準溶液の反応時間 (秒)

W_s : ペクチナーゼ標準溶液 1ml 中のペクチナーゼ、定量用の量 (g)

T : 試料溶液の反応時間 (秒)

W : 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

キャピラリー粘度計 (20ml 容量、水の流下時間: 20~25 秒) を使用する場合

基質溶液 25ml を試験管にとり、希釈倍率 I (%) の試料溶液 1ml を加えて振り混ぜ、50±0.5℃で60分間反応させる。反応後、100℃で5分間滅菌処理後、25±0.2℃まで冷却し、ナイロン布でろ過する。これを 25±0.2℃で約30分間保温し、キャピラリー粘度計 (20ml 容量、水の流下時間: 20~25 秒) で流下時間 (秒, V_{T_1}) を測定する。希釈倍率 I (%) のペクチナーゼ標準溶液についても同様に操作し、流下時間 (V_{S_1}) を測定し、標準溶液の希釈倍率を横軸、 V_{S_1} を縦軸に検量線を作成する。ここで V_{T_1} から希釈倍率 I (%) の試料溶液の濃度 C_1 を求め、希釈倍率 I における比活性 (R_1) を求める。

$$R_1 = \frac{C_1}{I} \quad (\text{ただし、I は 100, 75, 50, 25 のいずれかである。})$$

この比活性 R_1 の平均値 (A) 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、次式により求める。

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

ただし、

- S : ペクチナーゼ、定量用の酵素活性 (100 単位/g)
- A : 比活性 R_1 の平均値
- D : 試料溶液の希釈係数

第3法 (ペクチン粘度降下力測定法-2) 基質レモンペクチン溶液にペクチナーゼが作用するとき、ペクチンが分解されてペクチン溶液の粘度が低下する。この粘度の低下を測定して酵素活性を求める方法である。

(1) 試料溶液の調製

操作法により試験するとき、基質ペクチン (レモン) 溶液の粘度低下が試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に適量の冷水 (又は適切な緩衝液、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 0.2 単位/ml 前後である。

(2) 基質溶液の調製

ペクチン (レモン) 0.950g を量り、あらかじめ 70~90℃ に加熱した水約 70ml 中に入れて溶かした後、冷却する。冷後、0.1mol/L クエン酸試液又はリン酸水素二ナトリウム試液 (無水 28.4→1,000) で pH3.50 (又は適切な pH) に調整し、マッキルバイン緩衝液 (pH3.5) (又は適切な緩衝液) 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とする。

(3) 操作法

基質溶液 (pH3.5) 6ml とマッキルバイン緩衝液 (pH3.5) 6ml を正確に量り、ウペローデ型粘度計の管 A から静かに入れ、40±0.5℃ の恒温水槽中に垂直に設置し、10~15 分間放置した後、試料溶液 2ml を正確に加える。加え終わったら直ちに管 C を指で閉じ、管 B より口で空気を吹き込み内容を混合する。管 C を指で閉じ、空気の泡が管 B 中に入らないようにして管 B から弱く吸引して液面を球 F の中心部まで吸い上げた後、吸引を止め、管 C の管口を開き、直ちに管 B の管口を閉じ、毛細管の最下端の試料溶液が流下したとき、管 B の管口を開き、液面が球 E の上の標線から下の標線まで流下するに要する時間 t_i 秒を測定する。この操作を 5 回繰り返す。

別に、基質溶液 (pH3.5) 6ml、マッキルバイン緩衝液 (pH3.5) 6ml 及び水 2ml を用いて同様に操作して流下時間 t_0 秒を測定する。

更に、水 14ml を用いて同様に操作して、流下時間 t_w 秒を測定する。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に粘度を 50% 低下させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{60}{V_{50}} \times \frac{1}{W}$$

$$\text{ただし、粘度低下率 (} V_{50} \text{)} = \frac{t_0 - t_i}{t_0 - t_w} \times 100$$

t_0 : 基質 6ml + 緩衝液 6ml + 水 2ml の流下時間 (秒)

t_i : 反応液の流下時間 (秒)

t_w : 水の流下時間 (秒)

60 : 単位換算係数 (1 分間=60 秒)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g, ml)

V_{50} : 粘度低下率 50% になる時間 $\left[T_i + \frac{t_i}{2} \right]$ 秒

T_i は、反応開始から i 回目の粘度測定開始までの経過時間

縦軸に粘度低下率, 横軸に時間 $\left[T_i + \frac{t_i}{2} \right]$ 秒

をとり, 曲線を描き, 粘度低下率 50% になる時間を読みとる。

粘度計 : 一般試験法, 粘度測定法に記載されている毛細管粘度計 (ウベローデ型粘度計) を用いる。毛細管内径: 0.56~0.60mm, 毛細管の長さ: 85~95mm, 動粘度の測定範囲: 2~10mm²/s, 球 B の容量: 4 ml, 粘度計の概略の定数: $K=0.01$

第 4 法 (ペクチンエステル分解力測定法) 基質ペクチン溶液にペクチナーゼが作用するとき, ペクチナーゼ中のペクチンエステラーゼの働きによりペクチン中のエステル基が遊離しペクチン酸が生ずる。生じたペクチン酸を一定時間アルカリ滴定し, アルカリの消費速度より初期反応速度を求める方法である。

(1) 試料溶液の調製

操作法により試験するとき, ペクチン酸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 0.0007~0.006 単位/ml である。

(2) 基質溶液の調製

エステル化ペクチン 5.0g を正確に量り, あらかじめ 40℃ に加温した水 800ml に混ぜながら徐々に加え懸濁した後, さらに混ぜながら加温し 60℃ 以下で十分溶かした後, 室温まで冷却する。塩化マグネシウム 2.03g を正確に加え, 水酸化ナトリウム試液で pH を 4.80 ± 0.04 にあわせた後, 水を加えて正確に 1000ml とする。

(3) 操作法

あらかじめ滴定用ビューレットに 0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液を入れた pH スタット反応装置につき, 反応槽を 30 ± 0.5℃ に調整し, 滴定終点の pH を 4.8 に設定する。基質溶液 20ml を正確に量り, 専用の容器に入れ, 30 ± 0.5℃ で少なくとも 3 分間加温した後, 溶液中に空気が入らないように調整して高速攪はんする。基質溶液を 0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 4.8 に調整した後, 試料溶液 1 ml を正確に量り, 基質溶液に加えて 0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液で自動滴定を行う。pH が 4.8 にて滴定値表示パネルの容量を 0 にリセットし, 同時に自動滴定を開始して正確に 2 分間滴定し, この時間の

0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液の滴定値を a ml とする。

別に対照として、試料溶液のかわりに水又は試料の希釈に使用したものと同一緩衝液 1 ml を用いて上記と同様に操作し、滴定値を b ml とする。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に 1 μ mol のカルボキシル基の増加をもたらす酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{a - b}{20 \times 2 \times W}$$

ただし、

a : 試料溶液の 2 分後の滴定値 (0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液, μ l)

b : 対照液の 2 分後の滴定値 (0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液, μ l)

20 : 1 μ mol のカルボキシル基に対応する 0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液の滴定量 (μ l)

2 : 反応時間 (分)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

第 5 法 (吸光度法)

酵素を基質ポリガラクトuron酸ナトリウムに作用させ、生成した不飽和ガラクトuron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。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、生成した不飽和ガラクトuron酸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 0.1mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8、0.5mmol/L 塩化カルシウムを含む)、(又は適切な緩衝液、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 0.01~0.8 単位/ml である。

(2) 基質溶液

ポリガラクトuron酸ナトリウム 0.444g を 0.2mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5、1mmol/L 塩化カルシウムを含む) 100ml と水約 75ml に加え、室温で 30 分間攪拌溶解する。その後 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C に加温し、2mol/L 塩酸を用いて pH7.8 に調整後、水で 200ml とする。用時調製する。

注) pH が下がりすぎた場合は、pH 調整して使用せずに調製をし直す。水酸化ナトリウム溶液での pH 調整を行ってはならない。

(3) 操作法

基質溶液 1.8ml を正確に量り、試験管に入れ、37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C の恒温水槽中に約 10 分間放置する。この試験管に、試料溶液 0.2ml を正確に加え、直ちに振り混ぜた後、恒温水槽中に放置する。試料溶液を加えてから、正確に 10 分後、0.05mol/L 塩酸溶液 2.0ml を素早く加え、直ちに恒温水槽より取り出して振り混ぜる。この液につき、水を対照とし、波長 235nm における吸光度 A_T を測定する。

別に空試験用として、基質溶液 1.8ml を正確に量り、試験管に入れ、上記の恒温水槽中に約 10 分間放置した後、0.05mol/L 塩酸溶液 2.0ml を加え、更にあらかじめ恒温 (37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C) にした試料溶液 0.2ml を正確に加えて、振り混ぜる。この液につき、水を対照とし、波長 235nm

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1分間に $1 \mu\text{mol}$ の不飽和ガラクチュロン酸を生成させる酵素量を1単位とし、次式により算出される。

本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)

$$= \frac{(A_T - A_B)}{\epsilon} \times 1,000 \times \frac{4.0}{0.2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

但し、

A_T : 反応液の吸光度

A_B : 空試験の吸光度

ϵ : 不飽和ガラクチュロン酸のモル吸光係数 $4,600/\text{M}\cdot\text{cm}$

1,000 : 不飽和ガラクチュロン酸 1mol/L を $1\mu\text{mol/ml}$ への変換係数

4.0 : 反応液総量 (4.0ml)

0.2 : 試料溶液の液量 (0.2ml)

10 : 反応時間 (10分)

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

第6法 (DNS-フェノール試薬法)

酵素をポリガラクチュロン酸に作用させ、生成するガラク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。

(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、本品に適量の酵素希釈液を加えて溶かし、試料液とする。その濃度は通例 $0.25\sim 0.70$ 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめポリガラクチュロン酸-K塩約 1g を精密に量り、 105°C で3時間乾燥し、その減量を測定しておく。次にポリガラクチュロン酸-K塩を乾物として 1.0g を正確に秤量する。少量の水に懸濁した後、沸騰した水を 50ml 程度添加し、攪拌する。軽く煮沸した後に水冷する。 0.2mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) を 100ml 添加し、正確に 200ml とする。

(3) ガラクチュロン酸検量線

ガラクチュロン酸 1水和物約 1g を精密に量り、水を加えて正確に 100ml とし原液とする。標準液原液 $3,7\text{ml}$ を正確に量り、それぞれ 0.08mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 100ml とする。これらのガラクチュロン酸標準液には 1ml 中にガラクチュロン酸 $0.3, 0.7\text{mg}$ を含む。試験管にこのガラクチュロン酸標準液 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 を加え攪拌し、沸騰水浴中で5分間加温した後、水浴中に移して常温まで冷却する。次に水 16ml を加えて攪拌し、 550nm における吸光度を測定する。横軸にガラクチュロン酸濃度、縦軸に吸光度をとり、ガラクチュロン酸検量線を作成し、吸光度差1に対応するガラクチュロン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求める。

なお検量線は分析ごとに作成する。

(4) 操作法

試験管に試料液 0.2ml と 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.3ml を正確に量り、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 2～3 分加温した後に基質溶液 0.5ml を正確に加え、直ちに攪拌する。 $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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、水浴中に移して常温まで冷却する。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)。

対照は試験管に水 0.2ml, 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.3ml, 基質溶液 0.5ml および 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、水浴中に移して常温まで冷却する。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)。

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 $1 \mu\text{mole}$ のガラクチュロン酸に相当する還元力を生じる酵素量を 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)

$$= (A_T - A_B) \times F \times 1.0 \times \frac{1}{212} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

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 の時のガラクチュロン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

1.0 : 基質溶液及び試料液の総液量 (ml)

212 : ガラクチュロン酸 1 水和物の分子量

30 : 反応時間 (分)

0.2 : 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) 0.2mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)

0.2mol/L 酢酸と 0.1mol/L 酢酸ナトリウムを混合して pH5.0 に調整する。

2) 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)

0.1mol/L 酢酸と 0.1mol/L 酢酸ナトリウムを混合して pH5.0 に調整する。

3) 0.08mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0)

0.08mol/L 酢酸と 0.08mol/L 酢酸ナトリウムを混合して pH5.0 に調整する。

4) 酵素希釈液

BSA (ウシ血清アルブミン, 和光純薬工業製又は同等品) 25mg に 0.2mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.0) 50ml, 水 450ml を加えて溶解する。

冷蔵庫に保存し 1 ヶ月以内に使用する。

5) ガラクチュロン酸

D-ガラクチュロン酸 (1 水和物) は SIGMA 社製 (製品番号 G-2125) 又は同等品が使用できる。

6) ポリガラクチュロン酸-K 塩

SIGMA 社製ポリガラクチュロン酸-K 塩（製品番号 P-7276）又は同等品が使用できる。
冷蔵庫に保存し 1 ヶ月以内に使用する。

7) 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）

8) 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 液に第 2 液 345ml と炭酸ナトリウム 34.5g を加えて溶かし、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 7 法（ペクチン酸糖化力測定法-2）

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。

(1) 試料溶液

本品約 0.5g を精密に量り、クエン酸緩衝液（pH4.0）を加えて溶かしたのち、0.01N チオ硫酸ナトリウム液の消費量(B-A)が 4.0~5.0ml となるように、クエン酸緩衝液(pH4.0)を加えて正確に一定量とし、試料溶液とする。

(2) 基質溶液

ペクチン 0.65g をスターラーでかき混ぜている 80ml のクエン酸緩衝液（pH4.0）中へ徐々に加えて溶かし、クエン酸二ナトリウム溶液（26.3→100）又は 1N 塩酸試液により pH を 4.0 に調整した後、クエン酸緩衝液（pH4.0）で 100ml とする。

(3) 操作法

基質溶液 10ml を正確に量り、100ml のヨウ素フラスコに入れ、 $40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の恒温水槽中で 5 分間予熱した後、試料溶液 1ml を正確に加えてよく振り混ぜ、直ちに同恒温水中で正確に 1 時間放置する。放置後直ちに 0.1N ヨウ素液の 1/2 倍量（通常 2.5ml）の炭酸ナトリウム試液を加えてよく振り混ぜ、更に 0.01N チオ硫酸ナトリウム液の滴定量 B が 25ml 以上となるように 0.1N ヨウ素液の一定量（通常 5ml）を正確に加えてよく振り混ぜる。加えた 0.1N ヨウ素液が 7ml 以下のときは 40 分間、7ml を越えるときは、1 時間暗所に放置した後、炭酸ナトリウム試液の 2 倍量（通常 5ml）の薄めた硫酸（12→100）を加えて良く振り混ぜ、直ちに 0.01N チオ硫酸ナトリウム液で滴定を行い、液が微黄色になったときデンプン試液 1ml を加え、青色が消えるまで滴定を続け、その量を Aml とする。

別に基質溶液 10ml を正確に量り、100ml のヨウ素フラスコに入れ、試料のときと同量

の炭酸ナトリウム試液を加えてよく振り混ぜる。更に試料のときと同量の 0.1N ヨウ素液を正確に加えて良く振り混ぜ、以下試料と同様に操作したときの 0.01N チオ硫酸ナトリウム液の量を Bml とし、次式により力価を算出する。

$$\text{ペクチナーゼ力価 (u/g)} = \{ (B - A) \times 2.3 \} \times 0.01 \times 513 \times \frac{1}{\text{試料溶液 1ml 中の試料の量 (g)}}$$

(4) 試薬・試液

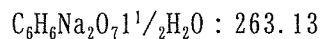
1) クエン酸緩衝液 (pH4.0)

0.1N 塩酸試液 45ml にクエン酸二ナトリウム溶液(26.3→1,000)55ml を徐々に加え、pH を 4.0 に調整する。

2) 0.01N チオ硫酸ナトリウム液

0.1N チオ硫酸ナトリウム液 20ml を正確に量り、新たに煮沸し、冷却した水を加えて正確に 200ml とする。用時調整

3) クエン酸二ナトリウム



無色～白色の結晶でにおいはない。

4) ペクチン

植物体の非木質化組織に特有の酸性多糖類のメチルエステル化したもので無色，無臭，無味の非晶質性物質。5℃以下で保存する。

ペクチナーゼ測定結果

品名 ペクチナーゼ XP-534 (基原 : Bacillus subtilis 由来)

規格項目	規 格	測定回数	製造番号		
			2642404	2649489	2677946
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においがある。	①	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		②	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある
		③	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある	淡褐色の粉末で僅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 ₂ O ₃ として 4.0 μg/g 以下	①	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
		②	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
		③	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
細菌数	10,000/g 以下	①	100/g 以下	100/g 以下	100/g 以下
		②	100/g 以下	100/g 以下	100/g 以下
		③	100/g 以下	100/g 以下	100/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 (ペクチナーゼ活性測定法第5法(吸光度法))	単位/g	①	6,980	6,640	6,770
		②	6,720	6,560	6,880
		③	7,040	6,770	6,620
		④	6,970	6,730	6,510
		⑤	6,580	7,030	6,510
		⑥	6,740	6,940	6,550
	平均 (n=6)	6,838	6,778	6,640	
	標準偏差	184	178	153	
	CV (%)	2.7	2.6	2.3	
	最大値	7,040	7,030	6,880	
最小値	6,580	6,560	6,510		

* 確認試験の方法

ペクチナーゼ活性測定法 第5法(吸光度法)にて実施

* 酵素活性測定の条件

試料液 : ペクチナーゼ活性測定法 第5法(吸光度法)で0.01～0.8単位/mlになるように本品に0.1mol/L トリス-塩酸緩衝液(pH7.8、0.5mol/L 塩化カルシウムを含む)を加えて溶解し(20,000倍)、試料溶液とした。

ペクチナーゼ測定結果

品名 Pectinase-GODO (基原: Geotrichum klebahnii 由来)

規格項目	規格	測定回数	製造番号		
			#1801L-1	#1801L-2	#1801L-3
性状	無色～黄色の液体である。においはないか又は特異なにおいがある。	①	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 特異なにおいがある
		②	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 特異なにおいがある
		③	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 特異なにおいがある	淡黄色の液体, 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 ₂ O ₃ として 4.0 μg/g 以下	①	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
		②	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
		③	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下	4.0 μg/g 以下
細菌数	10,000/g 以下	①	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 (ペクチナーゼ活性測定法第6法)	単位/g	①	11,763	11,429	12,068
		②	12,152	11,624	12,180
		③	11,818	11,874	12,152
		④	12,374	11,929	12,319
		⑤	12,346	11,651	12,263
		⑥	12,152	11,651	12,319
	平均 (n=6)	12,101	11,693	12,217	
	標準偏差	258	182	101	
	CV (%)	2.14	1.56	0.82	
	最大値	12,374	11,929	12,319	
最小値	11,763	11,429	12,068		

*** 確認試験の方法**

ペクチナーゼ活性測定法第6法に準じた。

*** 酵素活性の測定法**

試料溶液: 本品に 0.1mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて希釈し, 試料溶液とした。

(#1801L-1: 1 → 20,000、#1801L-2: 1 → 20,000、#1801L-3: 1 → 20,000)

ホスホリパーゼ活性測定法

第1法（遊離脂肪酸測定法）

大豆レシチンにホスホリパーゼを作用させ、加水分解により遊離した脂肪酸を比色測定して求める方法であり、本方法はホスホリパーゼA₁、ホスホリパーゼA₂及びホスホリパーゼBの活性測定に使用される。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき、脂肪酸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、本品に水（又は適切な緩衝液、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0.5～0.6単位/mlである。

(2) 基質溶液

レシチン1.0gを正確に量り、4%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(トリトンX-100)溶液(4→100)50mlに攪拌しながら、徐々に加えて溶かし、基質溶液とする。

(3) 操作法

試験管(15×105mm)に基質溶液0.5ml、0.2mol/L酢酸緩衝液(pH4.0)(又は適切な緩衝液)0.25ml及び0.1mol/L塩化カルシウム溶液(14.7→1,000)0.05mlを各々正確に入れ、37±0.5℃で約5分間予熱する。試料溶液0.1mlを正確に加えて、直ちに振り混ぜ、37±0.5℃で正確に10分間放置した後、1mol/L塩酸0.1mlを加えて混ぜる。この液0.03mlを別の試験管(15×105mm)に正確に量り、発色液3mlを正確に加えてよく混ぜ、覆いをして、37±0.1℃で10分間放置する。この液について、昼間であれば、ブラインドを降ろし、消灯した上で、水を対照として660nmにおける吸光度A_Tを測定する。

別に、試験管に基質溶液0.5ml、0.2mol/L酢酸緩衝液(pH4.0)0.25ml及び0.1mol/L塩化カルシウム溶液(14.7→1,000)0.05mlを正確に入れ、37±0.5℃で約5分間予熱する。1mol/L塩酸0.1mlを正確に加えてよく振り混ぜ、試料溶液0.1mlを正確に加えてよく混ぜた後、以下同様に操作して吸光度A_Bを測定する。

また、水0.03ml及びオレイン酸標準溶液(1μEq/ml)0.03mlを別々の試験管に正確に量り、発色液3mlを加えて振り混ぜる。以下同様に操作してA_S、A_{S0}を測定する。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験をするとき、1分間に1μmolの脂肪酸を遊離する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{A_T - A_B}{A_S - A_{S0}} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{0.1} \times \frac{1}{W}$$

但し、

A_T : 試料反応液の吸光度

A_B : 対照液の吸光度

A_S : オレイン酸標準溶液(1μEq/ml)の吸光度

A_{S0} : 水ブランクの吸光度

- 10 : 反応時間(分)
0.1 : 反応に使用した試料液量(ml)
W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(4) 試薬・試液

1) レシチン

SLP-ホワイト(ツルーレシチン工業製大豆レシチン), 又は同等品を用いる。

2) 0.2mol/L 酢酸塩緩衝液(pH4.0)

希酢酸に酢酸ナトリウム溶液(13.6→100)を加えて, pH4.0 に調整する。この液を水で5倍にうすめる。

3) 発色液

遊離脂肪酸定量試薬キット・デタミナーNEFA(協和メディクス製), 又は同等品をその処方にしたがって調製する。

4) オレイン酸標準溶液(1 μ Eq/ml)

遊離脂肪酸定量試薬キット・デタミナーNEFA(協和メディクス製)に付属のもの, 又は同等品を使用する。

第2法(遊離コリン測定法)

大豆レシチンにホスホリパーゼを作用させ, 加水分解により遊離したコリンを比色測定して求める方法であり, ホスホリパーゼDの活性測定に使用される。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき, 遊離するコリン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, 試料に適量の水(又は適切な緩衝液, 塩類溶液)を加えて溶かし, 試料溶液とする。その濃度は通例 0.1~0.2 単位/ml である。

(2) 基質溶液

レシチン 0.5g を正確に量り, 水 9.5ml を正確に加えて溶かし, 一晩放置する。

(3) 操作法

基質溶液 0.1ml, トリス・マレイン酸緩衝液(pH5.5)(又は適切な緩衝液) 0.1ml, 0.1mol/L 塩化カルシウム溶液(14.7→1,000) 0.05ml, 7.5%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル溶液(トリトンX-100, 7.5→100) 0.15ml をそれぞれ正確に量り, よく振り混ぜ, 37±0.5℃で5分間加温する。次いで, 試料溶液 0.1ml を正確に加え, 直ちに振り混ぜ, 37±0.5℃で正確に10分間放置した後, EDTA-トリス・塩酸試液 0.2ml を正確に加えて振り混ぜ, 直ちに沸騰水浴中で正確に5分間加熱する。冷後, 呈色試液(ホスホリパーゼ活性測定用) 4ml を正確に加え, よく振り混ぜ, 37±0.5℃で20分間放置する。この液につき, 水を対照とし, 波長 500nm における吸光度 A を測定する。

別に対照として, 試料溶液の代わりに水を用い, 同様に操作して吸光度 A_B を測定する。

また, 試料溶液の代わりに 1.43mmol/L 塩化コリン標準溶液 0.1ml を用い, 同様に操作して吸光度 A_S 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 μ mol のコリンを遊離

する酵素量を1単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{A - A_B}{A_S - A_B} \times \frac{1.43}{10} \times \frac{1}{W}$$

但し、

A	: 試料反応液の吸光度
A _B	: 対照液の吸光度
A _S	: 塩化コリン標準溶液の吸光度
1.43	: 塩化コリン標準溶液の濃度 (mmol/L)
10	: 反応時間 (分)
W	: 試料溶液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(4) 試薬・試液・標準溶液

1) レシチン

Epikuron 200 (Cargill BioActives 製大豆レシチン), 又は同等品を使用する。

2) トリス・マレイン酸緩衝液 (pH5.5)

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 1.21g 及びマレイン酸 1.16g を量り、水を加えて溶かし 100ml とする。この液 25ml をとり、水酸化ナトリウム溶液 (1→250) を加えて pH5.5 に調整し、更に水を加えて 100ml とする。

3) EDTA-トリス・塩酸試液

エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム 22.6g をトリス・塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶かし、1,000ml とする。

4) トリス・塩酸緩衝液 (pH8.0)

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 121.1g を量り、水 600ml を加えて溶かし、塩酸 (9→100) で pH8.0 に調整し、水を加えて 1,000ml とする。

5) コリンオキシダーゼ

Alcaligenes sp. 由来, 和光純薬製 製品番号 037-14401, 10 単位/mg 粉末以上, 又は同等品を使用する。

6) ペルオキシダーゼ

Horseradish 由来, 和光純薬製 製品番号 169-10791, 100 単位/mg 以上, 又は同等品を使用する。

7) HEPES 緩衝液 (pH7.4)

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-*N'*-2-エタンスルホン酸 11.9g を量り、水 600ml を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1→500) を加えて pH7.4 に調整した後、更に水を加えて 1,000ml とする。

8) 呈色試液, ホスホリパーゼ活性測定用

コリンオキシダーゼ 3 単位, ペルオキシダーゼ 6 単位, フェノール 0.001g, 4-アミノアンチピリン 0.0006g を HEPES 緩衝液 (pH7.4) 4ml に溶かす。

9) *N*-2-ヒドロキシエチルピペラジン-*N'*-2-エタンスルホン酸

SIGMA 製 (製品番号 H-3375), 又は同等品を使用する。

10) エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 4H_2O$ [エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム 4 水和物, 特級]

11) 1.43mmol/L 塩化コリン標準溶液

塩化コリン 0.2g を正確に量り, 水を加えて溶かして正確に 1,000ml とする。

第 3 法 (遊離脂肪酸滴定法)

大豆レシチンにホスホリパーゼを作用させ, 加水分解により遊離した脂肪酸を pH8.0 に保つために必要な 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量を測定して求める方法であり, 本方法はホスホリパーゼ A₂ の活性測定に使用される。

(1) 試料溶液

操作法により試験するとき, 滴定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 0.001mol/L 塩酸を加えて溶かし, 試料溶液とする。その濃度は, 通例約 1.0 単位/ml である。

(2) 基質溶液

レシチン 10.0g を正確に量り, 水 200ml, 0.32mol/L 塩化カルシウム溶液 (0.47→10) 10ml, 0.016mol/L デオキシコール酸ナトリウム溶液 (0.67→100) 100ml を加え, 完全に溶解させた後全量 500ml となるように水を加え, 基質溶液とする。

(3) 操作法

活性測定には自動滴定装置 (ダイアインスツルメンツ GT-100), 又は同等品を用いる。40±0.5℃で保温したビーカー内の基質溶液 25ml に対し試料溶液 2ml を添加し, 試料添加後 5 分間に滴定に要した 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量 V_T を測定する。

別に 40±0.5℃で保温したビーカー内の基質溶液 25ml に対し 0.001mol/L 塩酸 2ml を添加し, 添加後 5 分間に滴定に要した 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量 V_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をするとき, 1 分間に 1 μ mol の脂肪酸を遊離する酵素量を 1 単位とする。

$$\begin{aligned} \text{本品中の酵素活性の単位 (単位/ml)} &= 0.01 \times (V_T - V_B) \times 1,000 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{5} \times \text{希釈倍率} \end{aligned}$$

但し,

V_T : 試料反応液の滴定に要した 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量 (ml)

V_B : 対照反応液の滴定に要した 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量 (ml)

0.01 : 反応に使用した水酸化ナトリウム溶液の濃度 (mol/L)

1,000 : 1 mol から 1 μ mol へ変換する係数

2 : 試料溶液の量 (ml)

5 : 反応時間(分)

(4) 試薬・試液

1) レシチン

SIGMA 製 L-Phosphatidylcholine, Soybean type IV-S, 又は同等品を用いる。