



Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products

## 管理目的のための酵素の同一性及び活性測定に関する

### Amfep の見解及び提案

#### 1 背景

産業用酵素は食品用及び飼料用として使用されている。

食品用<sup>1</sup>及び飼料用<sup>2</sup>として使用が認められている酵素は EU 各国及び各共同体当局により以下のものが管理されている。

- 酵素剤中の酵素の同一性及びその活性（食品用及び飼料用）
- 飼料中の酵素活性（飼料用）<sup>3</sup>

#### 2 現在の状況

##### 2.1 規制の必要性

###### 食品

EU の食品酵素規則案は食品用酵素剤の規格が確立されることを見越している。この規格では、当局が表記されている酵素活性の存在を確認できるように酵素の同一性を分析する方法を要求している。

###### 飼料

飼料添加物に関する規則 Regulation (EC) 1831/2003 は、事前混合飼料 (premixture) 及び飼料中の飼料添加物の存在及びその量が検証できることを要求している。さらに、添加物そのものが管理可能でなければならない。したがって、酵素が関わる限り、酵素添加物、事前混合飼料及び飼料中における酵素活性の同一性及び量を分析する方法が必要とされる。

##### 2.2 同一性分析法

現在、市販酵素剤中の主要酵素活性の同一性を分析する方法としては多くの方法がある。これらの同一性分析法はまだ分析法がない場合には新たに開発される。しかしながら、同一性分析法は本質的には定性分析法である。

<sup>1</sup> (食品酵素の定義は) 現在は各国の規定に従い、将来は提案されている EU 食品酵素規則に従う。

<sup>2</sup> (飼料酵素の定義は) 規則 (EC) 1831/2003 に従う。

<sup>3</sup> 食品に使用されるほとんどの酵素は最終食品中で活性や機能を有しないので、食品中の酵素活性を測定する必要はない。

## 2.3 定量分析法

産業用酵素メーカーは各酵素剤の活性を測定するために、いわゆる“社内法”と呼ばれる方法を使用している。これらの方法は十分に有効性が評価されており、各メーカーの試験室における品質管理の目的には適している。しかし、非常に多くの測定法が存在するので、公的管理試験機関がそれらすべてを実施することは非常に困難である。

いくつかの特定のケースを除き、現在のところ管理当局が IUB 分類が与えられたいかなる酵素の活性でも定量可能な実用的な統一測定法は存在しない。

したがって、一般的に公的管理試験機関は酵素メーカーが表示したサンプル中に含まれる酵素活性を評価するための使い勝手のよい手段を持っていない。

## 3 進め方

Amfep は上記のように統一測定法の明確な規制の必要性を認めて、食品及び飼料分野における酵素を管理するために有効で実際的な解決策について当局との対話を始めたい。

対話の基礎として、統一可能性の範囲をこの文書の次の章で、統一に対する賛否両論とともに検討する。

## 4 可能な解決策

酵素剤及び決められたレベルの酵素活性を含有することが表示された原料の管理を容易にするために、以下に詳しく述べる様々な解決策を考えることができる。

### 4.1 酵素活性を正確に測定するための統一法

“統一測定法”が意味するところは、サンプル中に含まれる酵素活性の量を正確に測定できる方法のことである。ここで言うサンプルとは、酵素剤それ自体、あるいは酵素が意図的に加えられ一定レベルの酵素を含むと表記された全ての原料である。

そういった測定法であれば、どんな公的試験機関においても管理可能である。

これらの測定法は各々が酵素の生物学的起源と至適活性を示す条件がどんな場合であっても、同一 IUB に分類される酵素について使用できる方法でなければならない。

いくつかの統一測定法は既に実際に存在し使用されている。一例として、世界中のレンネットメーカーとチーズメーカーによって使用されているレンネット測定法が挙げられる。（注：この測定法がカバーするのはひとつの酵素、すなわちレンネットである）。他の例は、FEFANA<sup>4</sup>によって開発され、CEN とともに評価されたフィターゼ測定法がある。

### 4.2 酵素活性の同一性と半定量のための統一法

統一測定法は、ある場合には比較的容易に開発できるが、多くの場合は技術的なハードルの多さにより大変難しい（‘賛否両論’セクション参照）。

管理当局が彼らのタスクを実行するために考えられる他の可能性は、それほど精度を目的としない方法の開発である。しかし、その場合においても、サンプル中の酵素のタイプを検出し、酵素活性の合理的な推定値を提供する方法を開発しようとしている。

このような解決法は現在米国の FDA において、FCC 法を使用した試験サンプル中の酵素の存在を示す方法として使用されている。

当局がサンプル中の酵素の存在を確認することだけが必要である場合は、on/off 法（例えばストリップ法）を用いることもできる。

<sup>4</sup> FEFANA – EU Feed Additives and Premixtures Association

---

### 4.3 酵素メーカーへ分析作業の権限委託 / トレーサビリティ及び文書化

酵素メーカーは品質管理を目的として、自社酵素剤の活性測定のために効果的で、バリデートされた測定法を使用している。これらの測定法はほとんどの場合、製品ごとに特有な測定法である。例えば、2種類の異なったキシラナーゼを生産するメーカーは酵素ごとに異なった測定法を使用することがある。

また、酵素メーカーは顧客のために日常的に分析を行っている。

したがって、管理当局に代わって、各酵素メーカーがそれぞれの自社製品を含む試験サンプルの分析を実施することが可能である。この場合、当然ながら十分に確立され、監査可能な品質標準に従って分析が実施されていなければならない。

当局は、ある酵素剤がそのメーカーがクレームした性質、活性の酵素を含むという事実を、酵素メーカーの施設において、文書記録に基づいて管理することができる。

また、酵素が添加された原料の中に表示された活性が存在することを管理したい人もいる可能性がある。（例えば飼料）

## 5 賛否両論

### 5.1 酵素活性を正確に測定するための統一測定法

詳細な解説及び実例は補遺 2 を参照のこと。

#### 賛成意見

統一測定法を確立することにより、管理当局は試験サンプルの酵素活性を管理目的のために測定できるようになる。

すでに自社製品の適切な測定法を確立している酵素メーカーにとって利点はない。

#### 反対意見

##### 商業上

統一測定法の確立は、この測定法によって得られた酵素活性レベルに基づいて、酵素の応用場面における有効性を比較しようと試みている団体を勇気づけることになる。このような比較は、酵素ユーザを惑わせ、誤ったデータに基づいた競争を助長することになる。

##### 技術上

基質、試験サンプルの特性、多くの場合において標準酵素に依存しなければならないこと、酵素剤の複雑さ、分析パラメータなどの要因により、大多数の場合において信頼性のある統一測定法を設定することは非常に難しい。

特に、下記の場合、大変大きな技術的問題となる。

- 基質が高分子の場合、及び
- 複数の酵素が測定で得られた酵素活性に寄与している場合

このような統一測定法は、市場に現れた新しい酵素がその方法では種々の生化学的根拠を分析評価できないとなると、“統一測定法”であるという性格を失うことになりかねない。

##### 實際上

標準酵素と標準基質及び換算係数の維持、管理試験室における統一試験法の定期的なリングテスト、統一試験法の頑健性の不足は、もし技術的なハードルが克服できたとしても、それら統一試験法を実行することを困難にするであろう。

---

## 5.2 酵素活性の同一性、半定量のための統一測定法

### 賛成意見

このような測定法は管理当局にとって比較的容易に設定し、実施できる。

このような半定量法は統一測定法より頑健である。すなわち、多くの場合、新しい酵素は既存の半定量法でカバーされる。

半定量法は商業上の問題や酵素ユーザーをミスリードするリスクを生じないであろう。

### 反対意見

半定量法は与えられたサンプルの酵素活性を正確に測定することはできない。

On/off 法は定義された酵素活性量に対しては全く不正確である。又、これらの方法は非特異的である。

## 5.3 酵素メーカーへ分析作業の権限委託 / トレーサビリティ及び文書化

### 賛成意見

各酵素メーカーの測定法はそれぞれの酵素製品によく適合している。したがって、それらは管理のためには適した方法である。

この解決策は、当局の管理コストとシステムの複雑さを軽減する。即ち、当局レベルで測定法を設定し維持する必要がなく、試験作業と機器に費やす資源が少なくなる。

開発や試験作業を必要としないので、トレーサビリティの解決は簡単である。したがって、管理当局と酵素メーカーの両方にとって費用効率がよい。

### 反対意見

ある当局は、十分に確立され、監査可能な品質標準の枠組みをもってしても、酵素メーカーのこのようなタスクの遂行を信じないかもしれない。

文書化と監査は、分析を実施することと必ずしも同じではない。このことが当局から信用に対する疑念を生むことになる。

## 6 補遺

補遺 I: 統一測定法を設定するときに注意する事

補遺 II: 統一測定法のためのパラメータ



Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products

**Amfep's comments and proposals on:**  
**Determination of enzyme activity for control purposes**

**Annex 1: facts to be taken into account when setting up harmonised methods**

## **1 Commercial**

- Should 'harmonised' methods be established, customers and some authorities will try to use the activity determination results to predict and compare the performance of the enzyme preparations in their applications. Experience shows that such attempts are deemed to fail. The performance of a given enzyme is indeed linked to the dose used. However, different enzymes perform differently when equal activity levels (according to a given method) are used. This is due to the complexity of enzyme preparations and of the substrates they act upon in their actual applications. This is also due to the fact that enzymes may be used in conditions (pH, temperature) different from the ones selected for the method.
- This trend in comparing the enzyme performance based on activity units would likely induce some enzyme manufacturers and distributors to try and compete based on the amount of activity printed on the label – instead of competing on actual performance and cost in the application.

## **2 Technical**

### **2.1 Substrate**

- Substrates (especially those of macromolecular nature) are variable in quality, type and supply.
- A given enzyme may act on a variety of possible substrates. The choice of the substrate for the harmonised method will have different influence on different enzymes.

- 
- The way the substrate is prepared (e.g. boiling, emulsifying, resting time, storage stability) will have different influence on different enzymes.

## **2.2 Assay method**

- The principle of the method (e.g. viscosity measurement, reducing sugars, etc.) influences the amount of activity which will be measured. This influence varies according to the enzyme preparation under consideration and may have no relation to the effect in the application.

## **2.3 Matrix effects**

- If the test sample contains the enzyme embedded into a complex matrix, the sample preparation procedure must ensure that the enzyme will actually be extracted from various matrices.
- The test sample (e.g. a compound feedingstuff) may itself contain significant amounts of the type of enzyme activity to be determined – thereby influencing the result of the determination. This influence will be different on different enzymes, and therefore blank test samples (no added enzymes) must be supplied.
- The test sample may contain inhibitors or activators which have varying effects on different enzymes.

## **2.4 Enzyme standards**

- In a number of cases (macromolecular substrates, enzyme preparations in which more than one enzyme contributes to the measured activity, activity measurements in complex matrices), the activity measurement cannot be absolute. It must then be related to a reference enzyme standard.
- Overall, an enzyme standard will be necessary when there is a matrix effect, and/or when the substrate is not chemically well defined or varies from batch to batch.
- Whenever an enzyme standard is necessary, it must come from the same source as the enzyme in the commercial product. This is because the use of enzyme standards can compensate for the substrate and assay condition variations within one enzyme, but not across different enzymes covered by a harmonised method.

## **2.5 More than one enzyme activity in the sample**

- Commercial enzyme preparations typically contain more than one enzyme activity. The non-standardised activities may significantly influence the result of the determination. This influence will vary according to the enzyme preparation under consideration – thereby compromising the harmonisation of the method.
- The test sample (e.g. a compound feedingstuff) may have been supplemented by the same type of enzyme activity from different commercial enzyme preparations. This makes it impossible to determine separately which amount of activity comes from which commercial enzyme preparation. Also, the interferences between the enzymes will in a number of cases cause a bias in the determination.

## **2.6 Assay conditions**

- The pH and temperature chosen for a harmonised method will not be the optimal ones for all enzymes to be assayed. A small pH or temperature variation will create a very significant error in the determination, especially when the set point is situated on a steep part of the pH or temperature curve.

- The sensitivity of various enzymes to factors such as ionic strength, incubation time, nature of the incubation buffer is variable.
- The presence and concentration of inhibitors or activators (e.g. metal ions) in the reaction mixture will have different effects on various enzymes.
- The optimal enzyme/substrate ratio is different for each enzyme.

### **2.7 Activity units**

- Depending on the assay principle and the substrate, the expression of the result in IU (nkatal) may not be possible (e.g. viscosity-based methods).

## **3 Practical**

- The development of new enzymes outside the boundaries (assay conditions, activity and specificity pattern, reaction kinetics) of a harmonised method would invalidate the 'harmonised' character of this method.
- Conversion factors will be necessary in order for the control laboratories to relate the results of the controls to the activity claimed on the labels, since the enzyme manufacturers will typically continue using analytical methods which are best suited to their own products (assay conditions, substrate, etc.).
- Conversion factors will also be necessary whenever the substrate is a macromolecule and is not available in a standard form: if enzyme standards are not used, each new substrate batch will have to be validated and re-qualified across the whole analytical network.
- When enzyme standards are used, the control laboratory will have to know exactly which standard applies to the sample to be assayed. This is even more of a problem when several enzymes of the same type are present in the sample.
- Establishment and maintenance of methods: implementation of methods across laboratories, regular ring-testing for each harmonised method, would be necessary and require many resources.



Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products

## 管理目的のための酵素活性の測定に関する

### Amfep の意見及び提案

#### 補遺 1：統一測定法を設定するときに注意する事

## 1 商業上

- 統一測定法が確立されると、顧客や一部の当局は、酵素活性の測定結果を酵素の応用における酵素剤の性能の予測及び比較をするために使用することは確かである。経験上、そのような試みは失敗に終わると思われる。実際には、既知酵素の性能は使用量によって決まる。しかし、酵素が異なれば同じ酵素活性レベル(所定の方法に従って測定して)を使用しても異なる性能を示す。これは、酵素剤及び実際応用する際の基質の複雑さに起因する。また、これは酵素の測定法で選択された条件(pH, 温度)と異なる条件で使用されているかもしれないといった事実の為でもある。
- 酵素の性能を活性単位に基づいて比較する動きは、酵素のメーカー及び販売者が、酵素応用時の実際の性能やコストで競争するのではなく、ラベルに印刷された酵素活性数値に基づく競争に向かわせる可能性がある。

## 2 技術上

### 2.1 基質

- 基質(特に高分子性質のものは)、品質、タイプ及び供給面で変動しやすい
- 既知の酵素は、さまざまな可能性のある基質に作用することができる。選択した統一測定法の基質は酵素が違えば異なる影響を及ぼす。
- 基質の調製方法(例えば、煮沸、乳化、静止時間、保存安定性)は酵素が違えば異なる影響を及ぼす。

### 2.2 活性測定法

- 測定原理(例えば、粘度測定、還元糖等)は測定する酵素活性数値に影響を与える。この影響は検討している酵素剤によって変わり、酵素の応用における効果とは関連無いことがある。

### 2.3 マトリックスの影響

- 試験サンプルが複雑なマトリックスの中に酵素を含んでいる場合、サンプル調製手順はさまざまなマトリックスから酵素が本当に抽出される事が確実な方法でなければならない。



- 試験サンプル(例えば、混合飼料)は、それ自身が測定しなければならない非常に多くの種類の酵素を含んでいる可能性があり、そのため測定結果に影響がでる。この影響は酵素毎に異なるので、酵素を加えていないブランク試験サンプルの入手が必要となる。
- 試験サンプルは阻害剤あるいは活性化剤を含む可能性があり、これらは酵素によりさまざまな影響を与える。

#### 標準酵素

- 高分子基質、複数の酵素が測定する活性に寄与する酵素剤、及び複雑なマトリックス中の酵素活性のような場合には、活性測定は絶対値を表すものではない。つまり、得られた活性は参照した標準酵素との関連を示すだけである。
- 概して、マトリックスの影響があるとき、及び/又は基質が化学的に良く判明してない時、バッチ毎に基質が変動する場合には、標準酵素が必要となる。
- 標準酵素が必要な場合、標準酵素は市販品の酵素と同じ供給源からのものでなければならない。なぜならば、標準酵素の使用はその一つの酵素に関する基質や測定条件の変動を補正できても、統一測定法がカバーする異種酵素をまたがっては補正できないからである。

### 2.5 複数の酵素活性を持つサンプル

- 市販の酵素剤は通常複数の酵素活性を含んでいる。そのなかの規格化されていない活性が測定結果に重大な影響を与えることがある。この影響は検討する酵素剤によって異なり、その結果、測定法の統一化を危うくする。
- 混合飼料のような試験サンプルは、異なる市販酵素剤に由来する同様タイプの酵素活性が加えられていることがある。この場合、どの活性量がどの市販酵素製剤に由来するかを別々に測定することは不可能である。また、酵素間同士の干渉が活性測定にかたよりを引き起こすことになる。

### 2.6 測定条件

- 統一測定法で選択した pH 及び温度は、測定する全ての酵素に対し最適であるとは言えない。わずかな pH あるいは温度の違いが測定に非常に大きな誤りを引き起こす。それは特に設定ポイントが pH または温度曲線の勾配が急な位置にあるときに顕著である。
- 種々酵素のイオン強度、インキュベーション時間、インキュベーション緩衝液の種類などの因子に対する感度は一定ではない。
- 反応液中の阻害剤、あるいは活性化剤(例えば、金属イオン)の存在及び濃度は、酵素によって異なる影響を受ける。
- 酵素によって最適の酵素/基質の比率は異なっている。

### 2.7 活性単位

- 活性測定の原理及び基質によっては IU (nkatal)による結果の表示ができないことがある。(例えば、粘度を基にした測定法)

## 3 実践上

- 統一測定法の限界(測定条件、活性及び特異性パターン、反応動力学)を超える新規酵素の開発は、この方法の“統一された”性格の効力を無くしてしまう。
- 酵素メーカーは、一般的に自社製品に最適な分析方法(測定条件、基質等)を使用し続けるので、管理試験機関がラベルに表示された活性と検査機関の結果を関連付ける為に換算係数が必要になる。

- 
- 換算係数は、基質が高分子であったり標準品として入手できなかつたりした時にも必要になる。もし標準酵素を使用しない場合には、基質ロットが新しくなる度にバリデートしなければならず、また全分析ネットワークにまたがって再度検証しなければならない。
  - 標準酵素を使用する場合には、管理試験機関は検査サンプルに対してどの標準酵素を適用するのかを正確に知らなければならない。このことは、そのサンプル中にいくつかの同じタイプの酵素が存在している時、一層問題となる。
  - 統一測定法の確立と維持に関わる各々の統一測定法の試験機関をまたがる実施、定期的な ring-test は多くの資源(資力)が必要であり又要求される。



Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products

**Amfep's comments and proposals on:**  
**Determination of enzyme activity for control purposes**

**Annex 2: Parameters for a harmonised method of analysis**

<b>Assay conditions</b>
<b>Reaction pH</b>

## 1. Background

It is commonly seen that enzymes belonging to the same EC class but obtained from different biological sources typically exhibit different reaction pH optima.

It is commonly seen that modifications in the primary structure (amino-acid sequence) of a given enzyme significantly change its optimum reaction pH.

Given the pH profiles of known enzymes belonging to the group to be covered by the harmonised method, how to choose a reaction pH for a harmonised method?

How to deal with enzymes not known / not yet characterised?

## 2. Illustration

### 2.1. From laboratory experiment #1

#### 2.1.1. Purpose

Establish the pH profiles of 3 enzymes belonging to the EC 3.2.1.8 (endo-1,4- $\beta$ -xylanase) class.

#### 2.1.2. Enzyme sources

Microorganisms from bacterial and fungal origins.

#### 2.1.3. Experimental setup

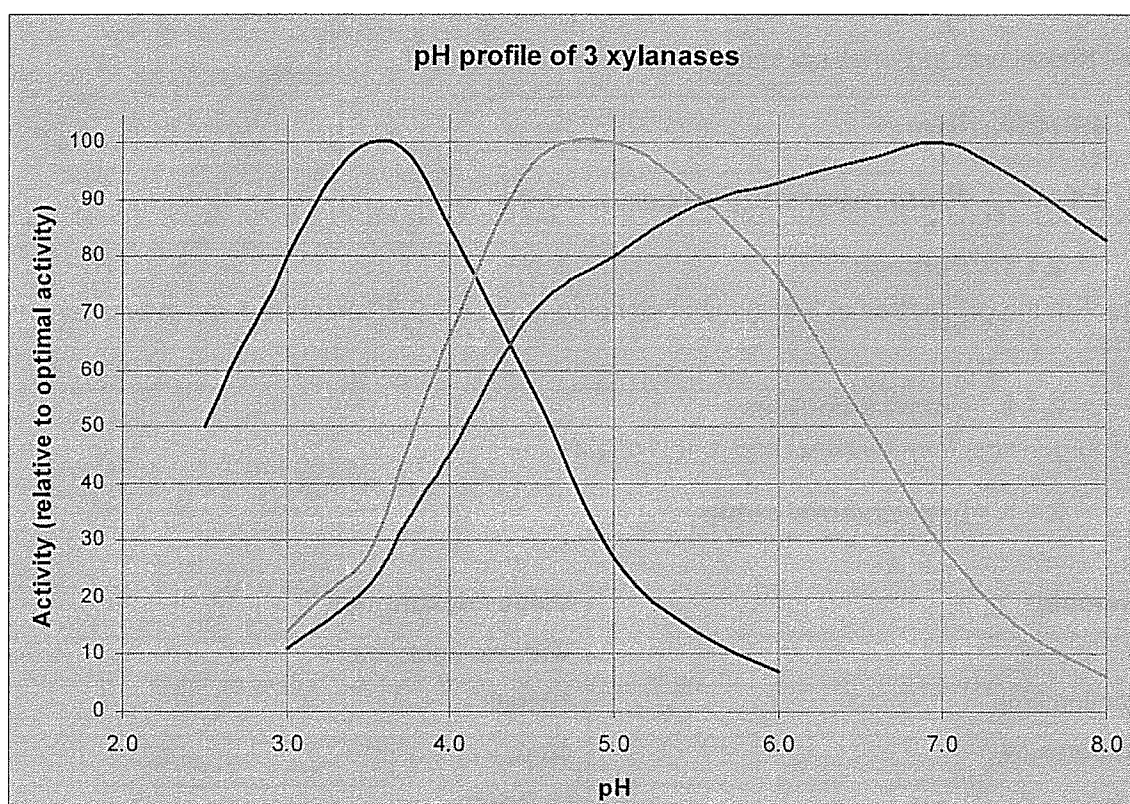
Parameter	Value / description
pH	Variable parameter
Reaction time	10 min
Temperature	40°C
Buffer	Mcllvaine
Substrate	Megazyme xylatabs (wheat based)

#### 2.1.4. Results

Expressed for each enzyme relatively to the maximum activity.

pH	Xylanase		
	#1	#2	#3
2.5	50		
2.7	63		
2.9	73		
3	80	14	11

3.25	93	21	16
3.5	100	28	22
3.75	98	47	34
4	85	66	45
4.5	57	96	70
5	27	100	80
5.5	14	91	89
6	7	76	93
6.5		52	97
7		29	100
7.5		14	93
8		6	83



### 2.1.5. Discussion

The 3 enzymes under consideration exhibit significantly different pH profiles, with optima ranging from 3.5 to 7.0.

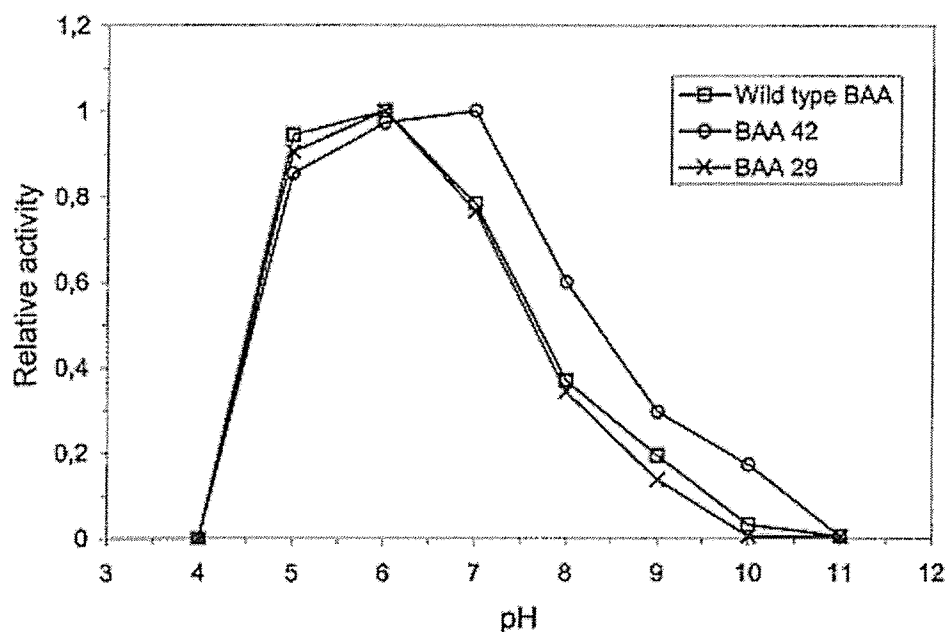
Two of the three enzymes under consideration have steep pH curves. This means that a small experimental pH error / deviation in the reaction medium will lead to a significant variation in the activity measurement.

## 2.2. From literature source #1

**Directed evolution of a bacterial  $\alpha$ -amylase: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity.** Cornelius Bessler, Jutta Schmitt, Karl-Heinz Maurer, Rolf D. Schmid. *Protein Science* 12, 2141–2149 (2003).

Enzyme class under consideration:  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1).

Experimental findings as shown in Fig. below:



**Figure 6.** pH activity profiles. Activity measurement was carried out using the following 50-mM buffers: pH 4–6 acetate, pH 7–8 Tris/HCl, pH 9–10 glycine NaOH, pH 11 carbonate. (squares) WT, (circles) BAA 29, (x) BAA 42. The relative activity is the ratio of the catalytic activity at a certain pH and the maximum activity of each enzyme.

Conclusion: modifying an enzyme protein by protein engineering may induce significant pH profile changes.

### 2.3. From literature source #2

**A Novel, High Performance Enzyme for Starch Liquefaction. Discovery And Optimization Of A Low pH, Thermostable  $\alpha$ -Amylase.** Toby H. Richardson, Xuqiu Tan, Gerhard Frey, Walter Callen, Mark Cabell, David Lam, John Macomber, Jay M. Short, Dan E. Robertson, Carl Miller. *The Journal of Biological Chemistry* 277(29), 26501–26507 (2002).

Enzyme class under consideration:  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1).

Experimental findings as shown in Fig. below:

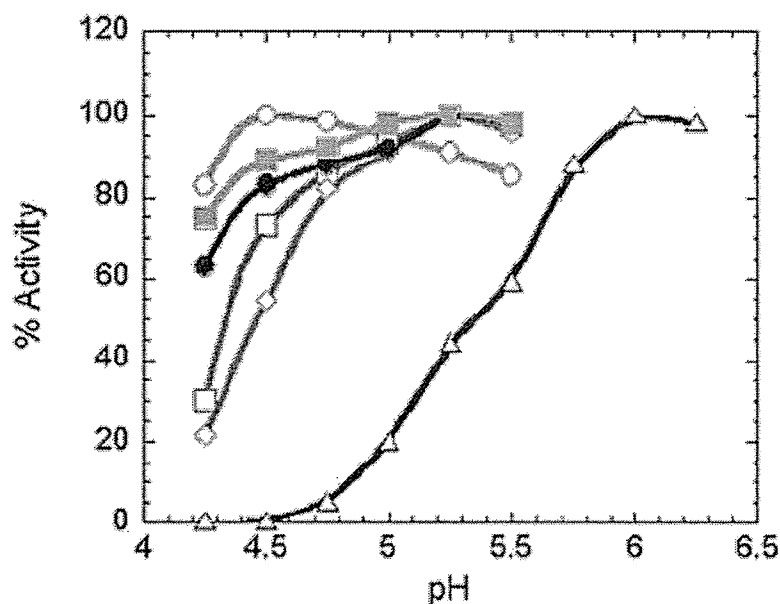


FIG. 2. Determination of  $\alpha$ -amylase pH optima. The pH optima of wild-type and reassembled  $\alpha$ -amylases were measured under typical industrial liquefaction conditions: 32% w/w starch slurry, 5 min treatment at 105 °C followed by 90 min at 95 °C. The dosage of amylase needed to achieve a target DE of 12 at the optimum for each  $\alpha$ -amylase was determined. The same dosage was then used in liquefaction experiments at the remaining pH values, and the response was measured. The percentage of the maximal response at each pH is given as follows:  $\Delta$ , *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase;  $\diamond$ , BD5031;  $\square$ , BD5064;  $\bullet$ , BD5088;  $\circ$ , BD5063;  $\blacksquare$ , BD5096.

Conclusion: modifying an enzyme protein by protein engineering may induce significant pH profile changes.

### 3. Conclusion

Setting up a harmonised method of analysis implies the choice of a reaction pH which is suitable for all enzymes covered by the method.

The above experimental findings show that pH profiles and optima vary significantly across:

- enzymes from different biological sources.
- "wild-type" enzymes and protein engineered enzymes belonging to the same EC/IUB class.

In particular:

- pH optima may differ of more than 3 pH units.
- pH profiles may exhibit very steep slopes.

In practice, the pH chosen for a harmonised method will not be the optimal pH for all enzymes to be assayed. A small pH variation during the assay may create a very significant error in the determination, especially when the set point is situated on a steep part of the pH or temperature curve.

---

<b>Substrate</b>
<b>Substrate batch to batch variability</b>

## 4. Background

Substrates (especially those of macromolecular nature) are variable in quality, type and supply.

A harmonised method requires that the substrate behaves the same way in all laboratories using the method.

If the enzyme reaction rate varies according to the substrate batch, or substrate supplier, one then needs to ensure that all laboratories use the same substrate batch, and when this batch is nearing exhaustion, to re-standardise all laboratories with the new batch.

## 5. Illustration

### 5.1. *From laboratory experiment #1*

#### 5.1.1. Purpose

Assess the influence of starch supplier and batch on the activity of 3  $\alpha$ -amylases (3.2.1.1).

#### 5.1.2. Enzyme sources

Microorganisms from bacterial and fungal origins.

#### 5.1.3. Experimental setup

Three amylases (A, B, C) were incubated with 4 different starch batches (Batch 1-4). Batch 1 and 2 were supplied by Supplier 1 and batch 3 of 4 from supplier 2 and 3 respectively. The activities were measured according to the method EB-SM-0009.02 version 1 (amylase A and B at pH 5.6 and amylase C at pH 4.7). Eight weighings of each product were measured with each batch of starch.

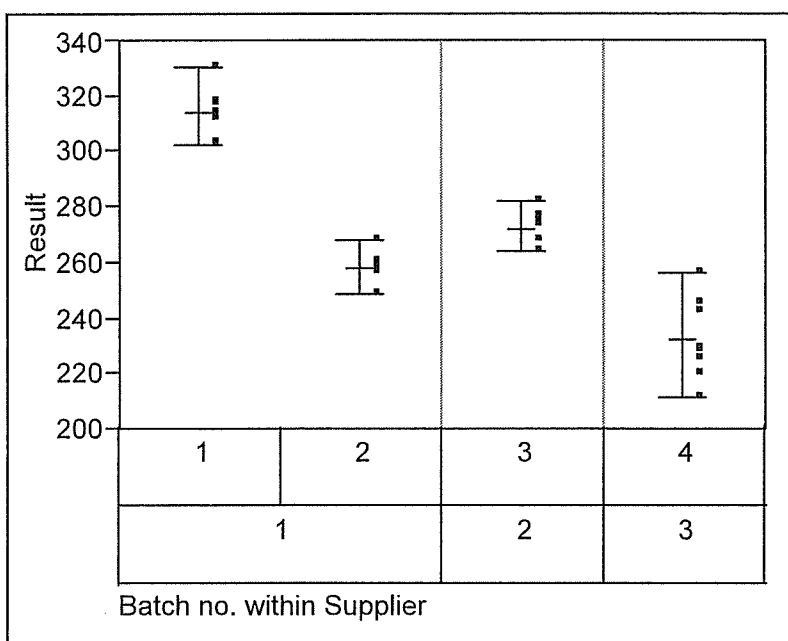
#### 5.1.4. Results

Sample: Amylase A

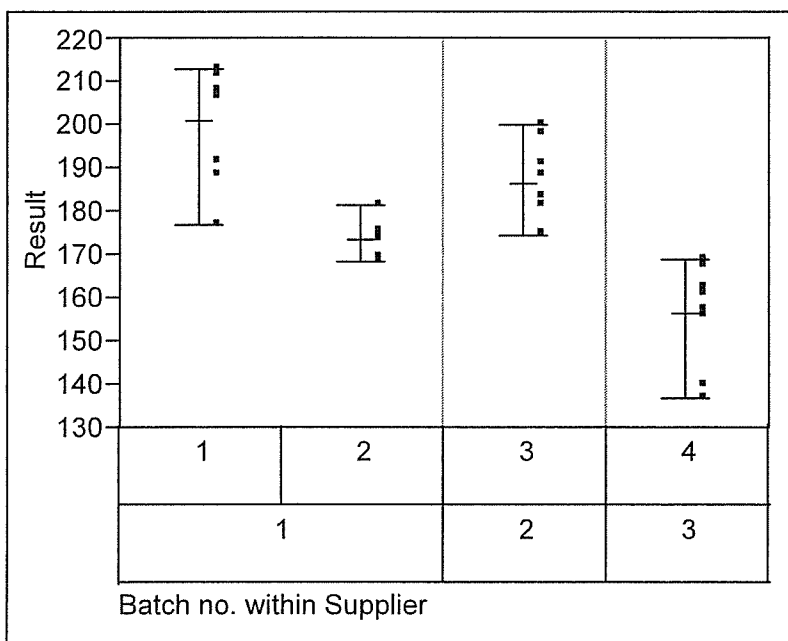
Variability Gage

Variability Chart for Result

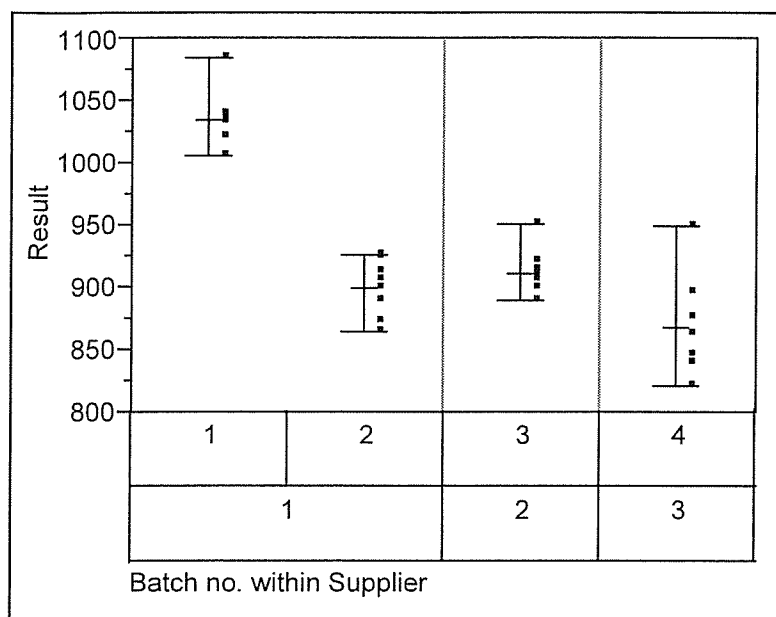




Sample: Amylase B  
 Variability Gage  
 Variability Chart for Result



Sample: Amylase C  
 Variability Gage  
 Variability Chart for Result



### 5.1.5. Discussion

It is seen that different batches of starch leads to different mean values and different variations. The pattern is different from product to product. For Amylase C, substrate batch 2 and 3 leads to almost the same mean values. This is considered to be by coincidence as it is different substrates and different suppliers.

It was tested if substrate batch was significant by test of the following model in SASjmp.

$\ln(\text{Result}) = \mu + \text{sample no.} + \text{batch no.} + \text{weighing} + \text{sample no.} * \text{batch no.} + \text{batch no.} * \text{weighing} + \text{sample no.} * \text{weighing}$ , Result was set to continuous, the rest to nominal.

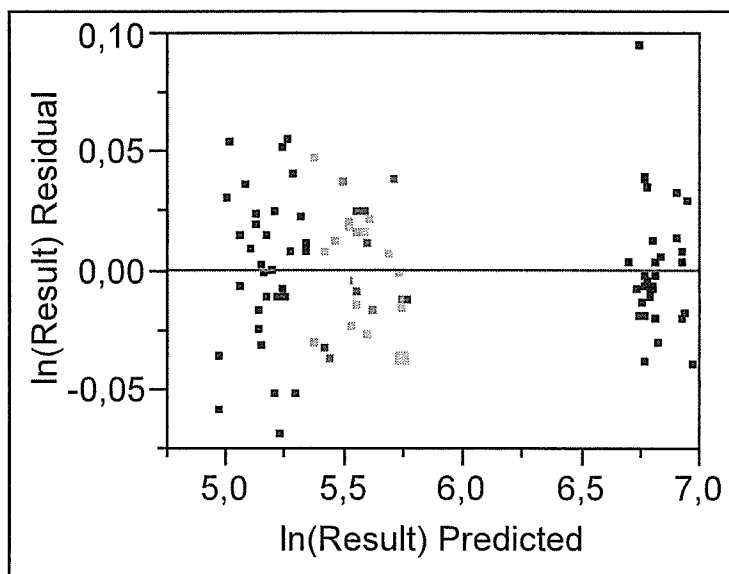
#### Response $\ln(\text{Result})$

##### Whole Model

##### Effect Tests

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Sample no.	2	2	47,186768	13421,63	<,0001
Batch no.	3	3	0,740912	140,4948	<,0001
Weighing	7	7	0,024093	1,9580	0,0842
Sample no.*Batch no.	6	6	0,053768	5,0978	0,0005
Batch no.*Weighing	21	21	0,032753	0,8872	0,6062
Sample no.*Weighing	14	14	0,034018	1,3823	0,2043

Residual by Predicted Plot



The test shows that sample no., batch no. and sample no\*batch no. is significant (5% level). Which means that each of the samples gives different results and this depends on the substrate batch. Also the difference from batch to batch depends on the sample.

### 5.2. From literature source #1

The influence of substrate quality can also be seen in the following paper:

**Determination of neutral lactase activity in industrial enzyme preparations by a colorimetric enzymatic method: collaborative study.** Engelen, A.J. & Randsdorp, P.H.G. *Journal of AOAC International* 82(1), 112-118 (1999).

In this example it is shown that the individual batches of the substrate (oNPG) used for the determination of lactase (3.2.1.23) needs to be validated before use.

### 5.3. From literature source #2

An illustration of substrate variability can also be seen in the following paper:

**Genetic and environmental variation in the pentosan and  $\beta$ -glucan contents of barley, and their relation to malting quality.** Henry, R.J. *Journal of Cereal Science* 4, 269-277 (1986).

Endo-xylanases need to be assayed on macromolecular substrates extracted from natural sources. This article illustrates the fact that many factors influence the quality of pentosans that can be extracted from these sources.

## 6. Conclusion

Setting up a harmonised method of analysis implies that the substrate gives a uniform response across laboratories and over time. Any inter or intra batch variation will need to be taken into account when determining the "level of uncertainty" for the procedure.

The experiments above show that the origin and batch have in some cases a considerable influence on the measured enzyme activity.

The complex nature of some substrates does indeed cause considerable variability between batches. To reduce problems caused by batch to batch variation large batch quantities of substrate will need to be produced. This will necessitate the assistance and compliance of the manufacturers. In many cases these manufacturers may not be able to produce the bulk batches necessary.

To minimise and quantify variation caused by changes in substrate origin and batch an effective procedure must be put in place. This procedure must ensure that a positive release system only allows the use of validated substrate. The procedures will be necessary for all substrates and for some enzyme manufacturers the requirements will be high. The difficulty in developing and monitoring such procedures should not be underestimated when considering resources.

Finally, the creation of large batches of acceptable substrate will require regular monitoring. This substrate, while validated for existing enzymes, may preclude the entry of new entrant enzymes. This may result in the "write-off" of large quantities of the "current" substrate and will result in further costs when new enzymes enter the market.