

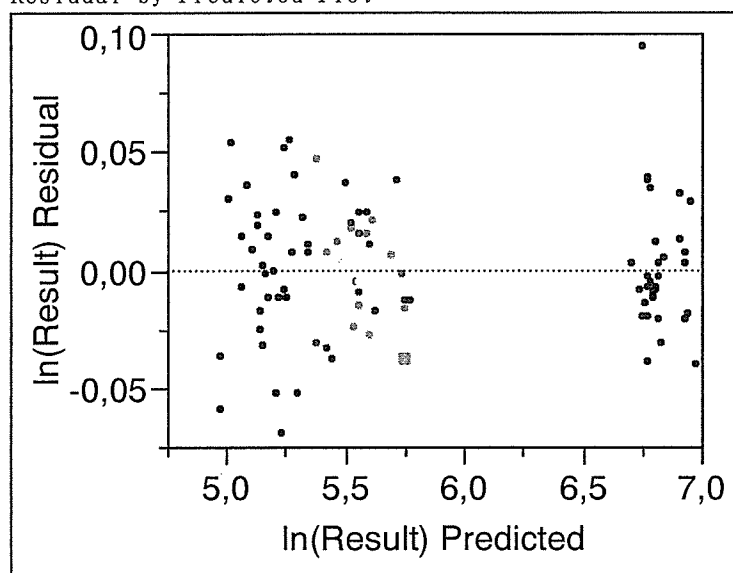
Response ln(Result)

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



その結果、酵素サンプル No.、基質バッチ No.、そしてサンプル No. × 基質バッチ No. が 5% レベルで有意であることを示している。

これはそれぞれの酵素サンプルは異なった結果となり、これは基質のバッチに依存することを示している。また、基質バッチ間の相違は酵素サンプルによるものである。

### 5.2. 文献情報#1

基質の品質の影響について、次の文献に記述されている：

Determination of neutral lactase activity in industrial enzyme preparations by a colorimetric enzymatic method: collaborative study. (比色法による工業用酵素剤中の中性ラクターゼ活性の測定：共同研究) Engelen, A. J. & Randsdorp, P. H. G. *Journal of AOAC International* 82(1), 112-118 (1999).

この例では、ラクターゼ(3.2.1.23)活性測定に使用する基質(oNPG)の個々のバッチについて、使用の前にバリデーションが必要であることが示されている。

### 5.3. 文献情報#2

また、基質のバラツキの実例について次の文献に述べられている：

Genetic and environmental variation in the pentosan and  $\beta$ -glucan contents of barley, and their relation to malting quality. (大麦のペントサンと $\beta$ -グルカン含量における遺伝的、環境的なバラツキ、およびその麦芽品質との関係) Henry, R. J. *Journal of Cereal Science* 4, 269-277 (1986).

エンド-キシラナーゼの活性測定には天然物から抽出された高分子基質が必要である。この文献は大麦から抽出されるペントサンの品質には種々のファクターが影響するという実例が示されている。

---

## 6. 結論

統一測定法を設定することは、基質は試験室や時間に関わらず同じ反応性を示すことを暗示している。いかなる外部・内部バッチのバラツキも測定法の「不確実性の程度」を決めるときに考慮する必要がある。

前述の実験では、いくつかのケースで基質の基原とバッチが酵素活性測定値にかなりの影響を与えることを示している。

ある基質はその複雑な性質により、実際バッチ間に相当なバラツキを生じている。バッチ間のバラツキに起因する問題を低減するためにはバッチ当たり大量の基質の製造が必要とされる。これについては製造者の援助と協力を必要とする。多くの場合、これらの製造者は必要とされる大量のバッチを生産することができないことがある。

基質の基原とバッチの変更起因するバラツキを最小にし、定量化するために効果的な手段を設定する必要がある。この手順は、バリデートされた基質の使用のみが許可されるといったリリースシステムであることを確実にする必要がある。その手順はすべての基質について、及びある酵素メーカーについて必要であり、その要求は高度なものである。このような手順を開発し、モニタリングするときの困難さは、そこに必要な資源を考慮すると決して過小評価すべきでない。

方策を考えると、そのような手順を開発して、モニターすることにおける苦勞を過小評価すべきではない。

最後に、使用可能な基質を大きなバッチで製造するには定期的なモニタリングが必要とされる。既存の酵素で評価された基質は新規酵素の参入を排除することになるかもしれない。このことは、現在使用されている大量の基質を廃棄することになるかもしれないし、また、新しい酵素が市場に参入するときに変更するコストを生む原因になる。

基質
基質の調製

## 7. 背景

基質の調整方法（たとえば、煮沸、乳化、静置時間、保存安定性）はそれぞれの酵素に異なった影響を与える。

統一測定法を設定するときは、バラツキの原因を最小にすることが大切である。高分子基質は、一般的に水の存在下での加熱によって分子構造が変化する。これによりこれら基質に作用する酵素に異なる影響を及ぼすことになる。

## 8. 実例

### 8.1. 試験室実験例 #1

#### 8.1.1. 目的

3種の $\alpha$ -アミラーゼ(3.2.1.1)の活性に及ぼすデンプン加熱時間の影響評価

#### 8.1.2. 酵素の基原

細菌とカビを基原とする微生物

#### 8.1.3. 実験方法

3種のアミラーゼ (A, B, C) と5種類のデンプン調製液 (基質調製 1-5) を反応した。

これらの基質調製液は次の表に示す方法で調製した。

基質調製液	調製方法
基質調製 1.	基質溶液を 90℃まで加熱、その後反応まで放置
基質調製 2.	基質溶液を 95℃まで加熱、その後反応まで放置
基質調製 3.	基質溶液を沸点まで加熱、そして 30 秒間煮沸、その後反応まで放置
基質調製 4.	基質溶液を沸点まで加熱、そして 5 分間煮沸、その後反応まで放置
基質調製 5.	基質溶液を沸点まで加熱、そして 10 分間煮沸、その後反応まで放置

各酵素は 8 回秤量し、それぞれの基質デンプン調製液を用いて測定した。

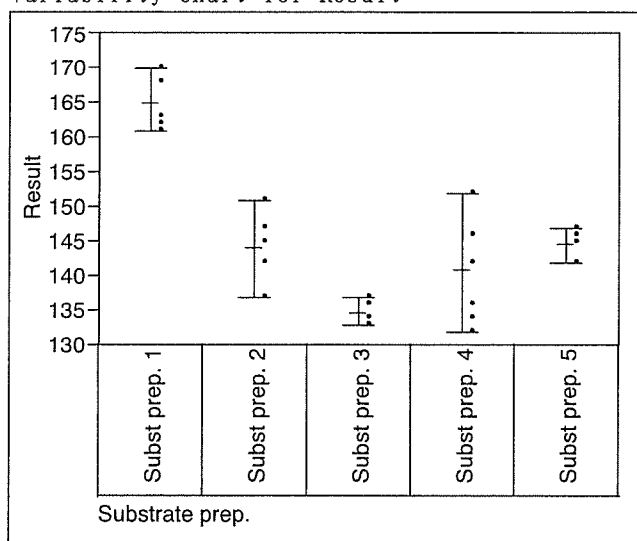
#### 8.1.4. 結果

結果は下記に図で示した：

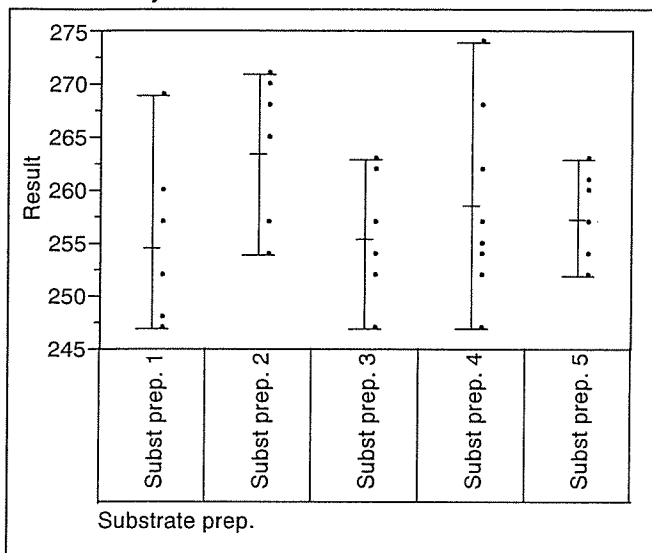
Sample: Amylase A

Variability Gage

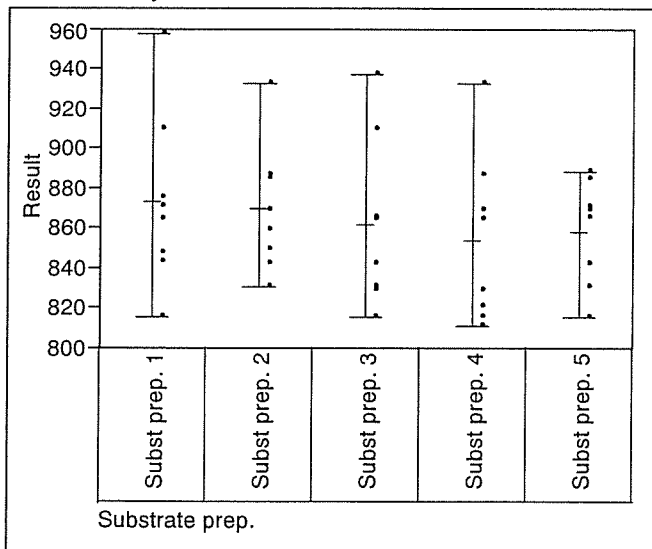
Variability Chart for Result



Sample: Amylase B  
 Variability Gage  
 Variability Chart for Result



Sample: Amylase C  
 Variability Gage  
 Variability Chart for Result



アミラーゼ A では基質調製液によって異なる平均値が得られた。アミラーゼ B と C では基質調製液の間に顕著な差は見られなかった。

すなわち、アミラーゼ A の場合は基質の調整方法（煮沸時間）に影響された。アミラーゼ B と C の場合には基質の煮沸時間による影響は見られなかった。

## 8.2. 試験室実験例 # 2

### 8.2.1. 目的

3種の $\alpha$ -アミラーゼ（3.2.1.1）の活性に及ぼすデンプン基質の放置時間の影響評価

### 8.2.2. 酵素の基原

細菌とカビを基原とする微生物

### 8.2.3. 実験方法

3種のアミラーゼ（A, B, C）と3つのデンプン基質調製液（基質調製1-3）を反応した。これらの基質は次の表に示す方法で調製した：

基質調製液	調製方法
基質調製1.	基質溶液を沸点まで加熱、そして30秒間煮沸、その後反応まで1時間放置
基質調製2.	基質溶液を沸点まで加熱、そして30秒間煮沸、その後反応まで24時間放置
基質調製3	基質溶液を沸点まで加熱、そして30秒間煮沸、その後反応まで48時間放置

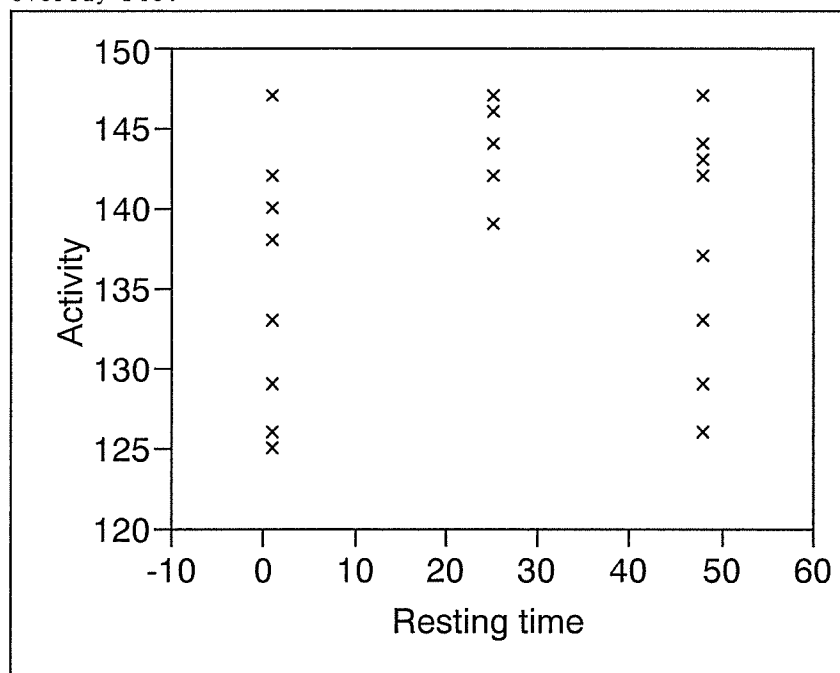
各酵素は10回秤量し、それぞれの基質デンプン調製液を用いて測定した。

### 8.2.4. 結果

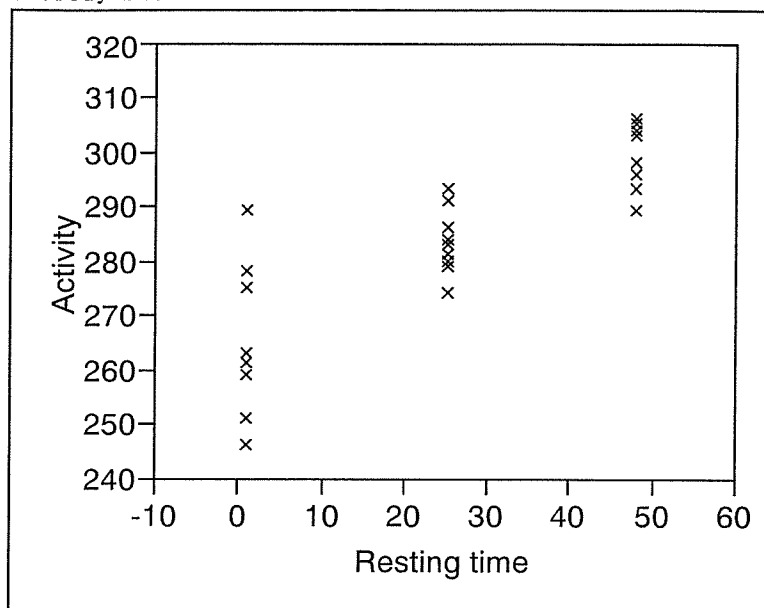
結果は下記に図で示した：

Product: Amylase A

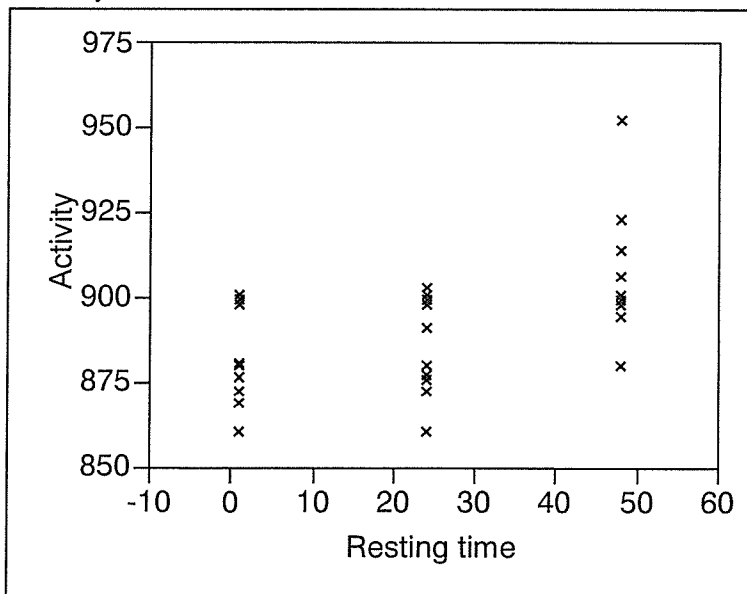
Overlay Plot



Product: Amylase B  
 Overlay Plot



Product: Amylase C  
 Overlay Plot



アミラーゼAでは3種の基質調製方法に対してほぼ同様の平均値を示した。しかし、測定値のバラツキは基質2の場合と基質1、3の場合では異なっていた。アミラーゼBとCでは放置時間の延長にしたがって活性値が上昇する傾向にあった。

基質ブランクが1、24、48時間の放置時間と関係するかテストしたが、8時間以降は関係なかった。したがって、アミラーゼA、B、Cは基質の放置時間に対して異なった活性パターンを示す。

## 9. 結論

$\alpha$ -アミラーゼの例では、ある場合には基質の調整方法によって分析結果に明らかな影響を与えることが示された。

---

分析条件
イオン、緩衝液

## 10. 背景

反応液中の阻害物質や活性化物質（例えば金属イオン）の存在や濃度は種々の酵素に対して、異なった影響を及ぼす。

統一測定法は種々異なる酵素に適用されるが、酵素の特定の活性化物質や阻害物質に対する感度は酵素の基原によって異なる。そこで、緩衝液の選択の他に、反応条件はこれらの影響を無視できる条件である必要がある。

## 11. 実例

### 11.1. 文献情報#1

Properties of lactase produced by *Candida pseudotropicalis*. (*Candida pseudotropicalis* 由来ラクターゼの性質) Castillo F.J. & Moreno, B. *Journal of Dairy Science* 66(8), 1616-1621 (1983).

検討された酵素: ラクターゼ(3.2.1.23).

下の図はラクターゼ活性に対する  $Mg^{2+}$  と  $Mn^{2+}$  イオンによる活性化効果を示している:

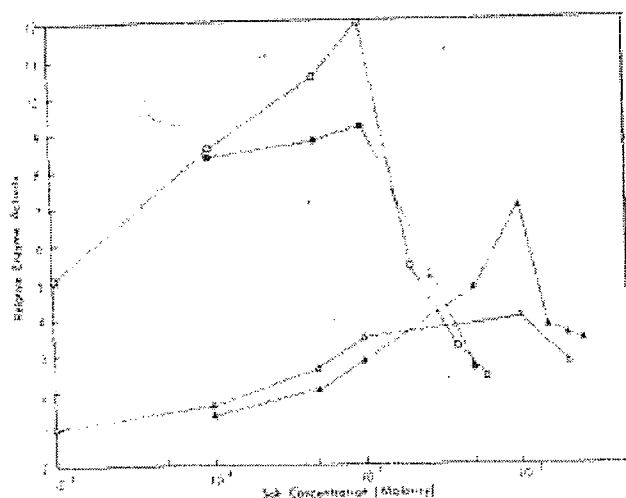


Figure 3. Activation of lactase activity by  $Mn^{++}$  and  $Mg^{++}$  salts. The enzyme was dialyzed against distilled water for 24 h and the salts added at the concentrations shown. The relative enzyme activity shown corresponds to the ratio: activity in the presence/absence of added salt.  $MnCl_2$  (○),  $MnSO_4$  (●),  $MgCl_2$  (△),  $MgSO_4$  (▲).

下の図はラクターゼ活性に対するいくつかのイオンの阻害効果を示している。

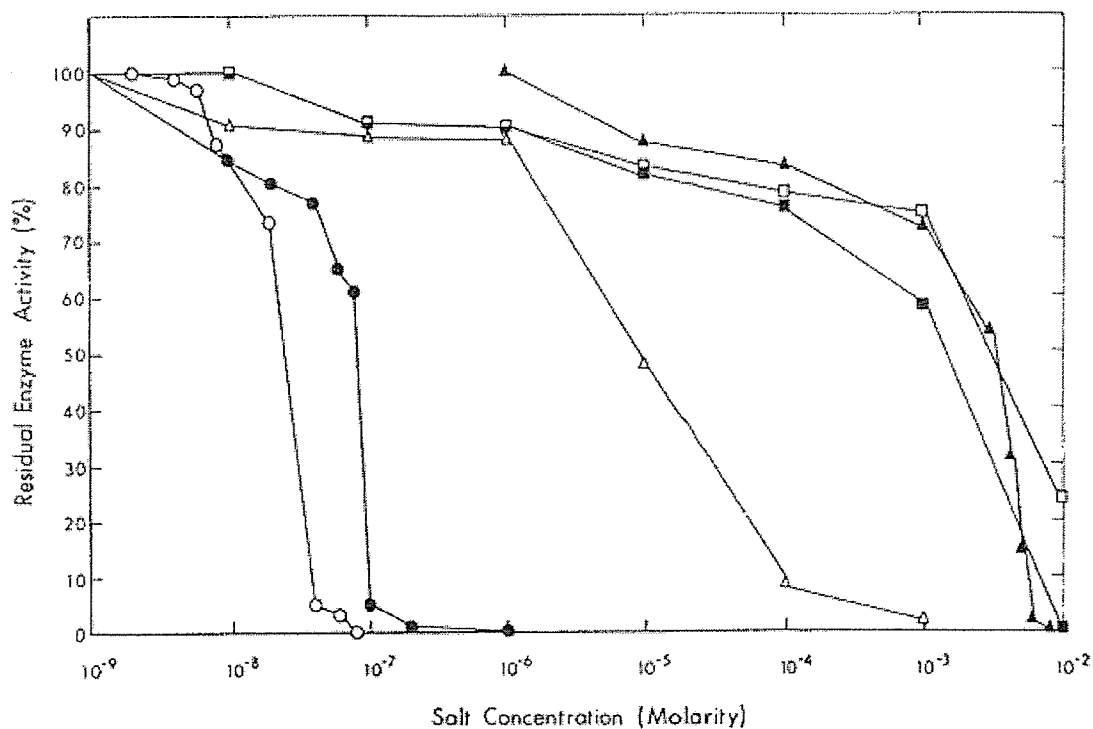


Figure 4. Inactivation of lactase activity by different cations. HgCl<sub>2</sub> (○), AgNO<sub>3</sub> (■), CuSO<sub>4</sub> (△), ZnCl<sub>2</sub> (▲), CaCl<sub>2</sub> (□), CdCl<sub>2</sub> (●).

### 11.2. 文献情報#2

Inhibition of potato phenol oxidase by anions and activity in various carboxylate buffers (pH 4.8) at constant ionic strength. (ポテトフェノール・オキシダーゼの陰イオンによる阻害と一定のイオン強度の種々カルボン酸塩緩衝液 (pH4.8) 中での活性) Malkin, B.D, Thickman, K.R., Markworth, C.J., Wilcox, D.E. & Kull, F.J. *J. Enzyme Inhibition* 16, 135-145 (2002).

この論文ではフェノールオキシダーゼに対する種々のイオンと緩衝液の影響が示されている。

## 12. 結論

分析条件、特に活性化あるいは阻害イオンの濃度と緩衝液の種類は酵素活性が大きく変化しないような範囲に設定しなければならない。



基質
基質の性質

### 13. 背景

既知の酵素はさまざまな基質に作用する。従って、統一測定法のために選択した基質は酵素によって異なった影響を及ぼす。

統一測定法ではすべての酵素が十分な反応性を示す基質を使用すべきである。

### 14. 実例

#### 14.1. 試験室実験例 #1

##### 14.1.1. 目的

数種のキシラナーゼ(3.2.1.8)の活性に対する基質の影響についての調査

##### 14.1.2. 酵素の基原

細菌とカビを基原とする微生物

##### 14.1.3. 実験方法

パラメーター	値/説明
PH	5.0
反応時間	10 分
温度	40°C
緩衝液	マッキルペイン
基質	可変パラメーター

#### 使用基質

- 小麦-アラビノキシラン(wheat AX)
- カバノキ-アラビノキシラン(birch AX)
- ライ麦-アラビノキシラン(rye AX)
- 不溶性-アラビノキシラン(WIP)
- 可溶性-アラビノキシラン(WSP)

#### 分析法の原則

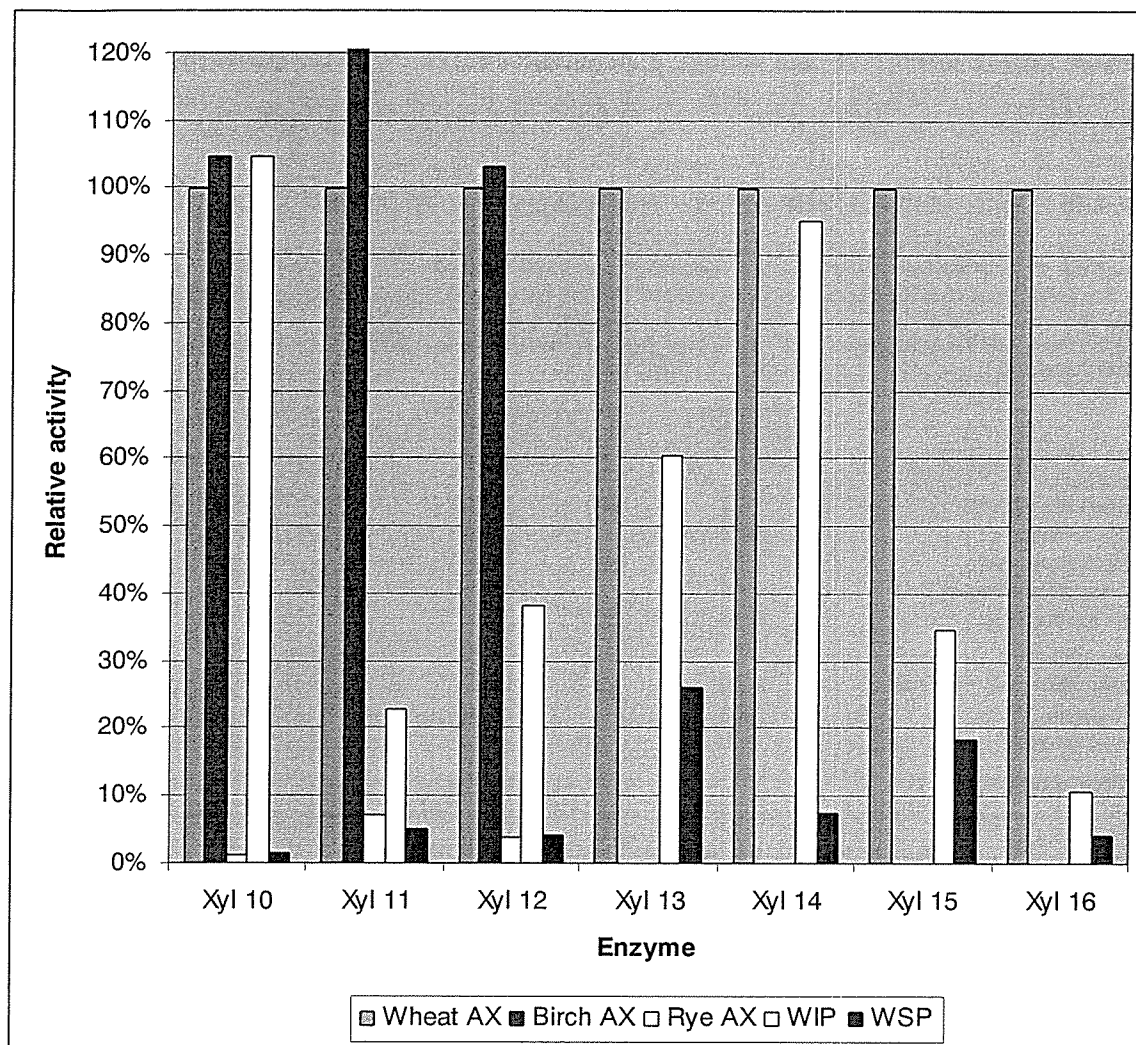
- WIP 活性は標準酵素に対する試料酵素 g 当たりの可溶化したキシラン重量で測定した
- 比色法による活性 (タブレット法以外) は、遊離キシロース  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  酵素試料で測定した
- 比色法 (タブレット法) では標準酵素に対する相関で活性を測定した

##### 14.1.4. 結果

下記の表は7種類のキシラナーゼについて小麦アラビノキシラン基質に対する相対活性値を示している。

相対活性 (wheat AX tabs の結果に対する相対値)					
	Wheat AX	Birch AX	Rye AX	WIP	WSP
Xyl 10	100%	105%	1%	105%	1%
Xyl 11	100%	198%	7%	23%	5%
Xyl 12	100%	103%	4%	38%	4%
Xyl 13	100%	-	-	60%	26%
Xyl 14	100%	-	-	95%	7%
Xyl 15	100%	-	-	35%	18%
Xyl 16	100%	-	-	11%	4%

下記の図は同じ結果をグラフで示した。



結論：アラビノキシラン基質の基原は7種のキシラーナーゼに対し重要で差別的な影響を及ぼすことが明白である。

## 14.2. 文献情報#1

Methods for lipase detection and assay: a critical review. (リパーゼの検出と分析法: 批評) Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. & Verger, R. *Eur. J. Lipid C. Technol.* 133-153 (2000).

次の表は2種の異なった基質に対するリパーゼ活性の反応性の違いについて示している。

**Tab. 1.** Initial rates of hydrolysis of tributyrin emulsions and resorufin ester by various pure proteins. Tributyrin assay conditions: with all the proteins assayed except RGL, the buffer used was 1 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. With RGL, the buffer used was 50 mM acetate (pH 6), 150 mM NaCl, 2 mM NaTDC, 1.5 μM BSA. Resorufin assay conditions (in the absence of *Thesit*<sup>TM</sup>): 10 μl of a lipase sample were added to 90 μl of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M (pH 6.8) and 7 μl of resorufin ester stock solution in dioxane (1 mg · ml<sup>-1</sup>). With RGL, the buffer used was 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8), 150 mM NaCl, 0.05% Triton X100.

Protein	Tributyrin (IU · mg <sup>-1</sup> )	Resorufin ester (IU · mg <sup>-1</sup> )	Tributyrin/Resorufin ester ratio
<b>Fungal lipases</b>			
<i>Candida antarctica</i> lipase B	184	0.2	1022
<i>Candida rugosa</i> lipase	1037	214	4.8
<i>Fusarium solani</i> cutinase	3180	32	99
<i>Pseudomonas glumae</i> lipase	3000	401	7.5
<i>Rhizomucor miehei</i> lipase	8240	450	18.3
<b>Mammalian lipases</b>			
Human pancreatic lipase + Colipase	8000	1000	9
Lipoprotein lipase	250	8	31.2
Rabbit gastric lipase	800	3	267
<b>Non enzymatic proteins</b>			
Hemoglobin	0	0.7	0
Bovine serum albumin	0	0	-

## 15. 結論

統一測定法設定の際に、対象の酵素が選択された基質に確実に反応するかどうかを調査する必要がある。

---

マトリックス効果
----------

テストサンプル中の阻害物質
---------------

## 16. 背景

テストサンプルは種々の酵素に異なった作用を及ぼす阻害物質や活性化物質を含んでいることがある。

## 17. 実例

### 17.1. 試験室実験例 # 1

#### 17.1.1. 目的)

種々キシラナーゼに対する小麦キシラナーゼ阻害物質の影響調査

#### 17.1.2. 酵素の基原

細菌とカビを基原とする微生物

#### 17.1.3. 実験方法

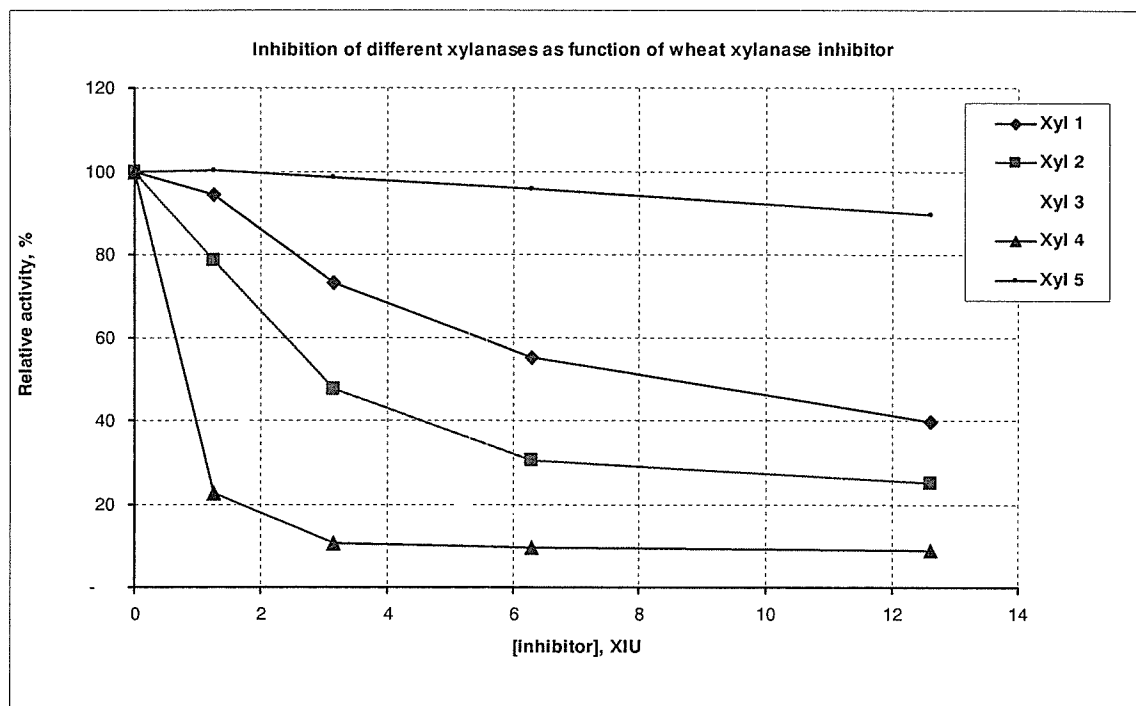
パラメーター	値/説明
PH	5.0
反応時間	10 分
温度	40°C
緩衝液	マッキルベイン
基質	Megazyme xylatabs (wheat based)

#### 17.1.4. 結果)

数種の阻害物質濃度（キシラナーゼ阻害単位：XIU で表現される）を 5 種のキシラナーゼで試験した。相対活性を下記に示した。

[阻害物質] XIU	Xyl 1	Xyl 2	Xyl 3	Xyl 4	Xyl 5
0	100	100	100	100	100
1.26	94	79	45	23	100
3.15	73	48	24	11	99
6.3	55	31	17	9	96
12.6	40	25	14	9	90

グラフで示す:



#### 17.1.5. 考察

この結果から、小麦中の阻害剤の存在に対して、それぞれのキシラナーゼが異なる反応性を示すことが明白である。

## 18. 結論

複雑な組成物質中の酵素活性測定のために統一法を設定するとき、組成物中の阻害または活性化物質の存在の影響を調査し、異なる酵素に大きく異なった機作で影響するかどうか検討する必要がある。

さらに、植物由来の複合組成物中のこのような阻害物質の量は栽培品種、収穫条件、気候、産地（その他要素を含めて）によって変動する。例えば下記の文献に見られる：

Variations in the levels of different xylanase inhibitors in grain and flour of 20 French wheat cultivars. (20種のフランス小麦品種の穀粒と小麦粉中の異なるキシラナーゼ阻害物質の含量変動) Bonnin, E., Daviet, S., Gebruers, K., Delcour, J.A., Goldson, A., Juge, N. & Saulnier, L. *Journal of cereal Science* 41, 375-379 (2005).