

酵素の既作成自主規格の見直し・改定に関する調査研究

研究者名・所属	脊黒 勝也	味の素(株)
	金谷 宗昭	エイチビィアイ(株)
	鷹羽 武史	江崎グリコ(株)
	田中 泰至	キッコーマン(株)
	志村 直己	キリンフードテック(株)
	濱口 和廣	合同酒精(株)
	加藤 容子	ジェネンコア協和(株)
	小西 哲哉	新日本化学工業(株)
	後藤 京二	大和化成(株)
	土屋 大輔	ダニスコジャパン(株)
	大脇 純	ナガセケムテックス(株)
	山本 健	日本食品化工(株)
	石橋 要	ノボザイムズ ジャパン(株)
	和泉 昇	(株)林原
	内田 典芳	三菱化学フーズ(株)
	酒井 和哉	名糖産業(株)
	金井 晴彦	ヤクルト薬品工業(株)
	林 真也	天野エンザイム(株)
	半谷 守弘	天野エンザイム(株)
	浅田 敏	天野エンザイム(株)

日本食品添加物協会 第七部会長

日本食品添加物協会・第七部会（酵素）第 4 版自主規格検討会は、既作成の自主規格の見直しと、第 4 版既存添加物自主規格（案）の作成について調査研究を行ったので、その概要を報告する。

（1）目的

第 3 版既存添加物自主規格収載の 16 品目、及び H.13～18 年度に検討した自主規格 45 品目の計 61 品目の成分規格及び酵素活性測定法、並びに酵素一般規格について見直し、第 4 版既存添加物自主規格に収載することと、流通実態調査で確認された基原の酵素の実測値データ補充（成分規格、及び酵素活性測定法の妥当性検証）を目的に検討した。

（2）検討方法

- ① 第 4 版既存添加物自主規格（案）の作成においては、書式、用語・字句は「第 4 版自主規格書式設定要領」、「第 3 版字句修正要領」に従い、内容については、平成 18 年度「既存添加物の規格化に関する調査研究」の「酵素の既作成自主規格の見直し・改定に関する調査研究」で報告した検討方法、検討結果に基づき見直し、試薬・試液については、酵素活性測定法と成分規格（確認試験法）から分離し、「C-2 試薬・試液等（酵素試験用）」にまとめた。尚、第 8 版食品添加物公定書の「試薬・試液」及び自主規格の「C-1 試薬・試液」に収載されているものは重複を省いた。

又、酵素一般規格は、第 3 版既存添加物自主規格の酵素一般規格を基本に、第 67 回 JECFA 会議で改正された「食品加工に使用される酵素製剤の一般規格及び考慮すべき事項」の考えを加味した。

② 流通実態調査で確認された酵素は、原則、実測データを取り、既存添加物名簿収載品目リストに記載のない基原の酵素についても実測データをとることとした。

既作成自主規格の見直し・検討では、更に新規測定法を作成するものや、未検証の基原の酵素について、データを取得した。

(3) 成分規格・酵素活性測定法の検討結果、概要、及び考察

<検討結果>

字句の見直しを除く検討結果の概要は、以下のとおりである。

酵素活性測定法の見直し	<ul style="list-style-type: none"> ・ セルラーゼ活性測定法に、第6法 CMC 振動粘度法を追加 ・ ヘミセルラーゼ活性測定法に、第4法ガラクトマンナン糖化力測定法-ニトロ試薬法を追加・挿入
成分規格と酵素活性測定法の妥当性検証（実測値データ補充）	<ul style="list-style-type: none"> ・ α-アミラーゼ（1製品） ・ グルカナーゼ（2製品） ・ セルラーゼ（1製品） ・ プロテアーゼ（1製品） ・ ペクチナーゼ（1製品） ・ ヘミセルラーゼ（3製品） ・ ホスホリパーゼ（1製品）

上記概要及び、第4版既存添加物自主規格作成にあたって検討した内容の詳細は下記のとおりである。

① 成分規格

- ・ 定義の項に示した基原は、既存添加物名簿収載品目リストに記載のない基原の酵素が流通しているものの、リスト収載通りとした。ただし、キシラナーゼの基原は、既存添加物名簿収載品目リストの記載が明らかに間違っているため、訂正して記載した。((誤) Trichoderma longibrachiatum reesei → (正) Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei)
- 又、基原の学名の後の人名は、第8版食品添加物公定書では、頭文字だけ大文字にして後は小文字とすることが決められたことから、これに従い修正した。(アクチニジン、カルボキシペプチダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -グルコシルトランスフェラーゼ、フィシン、ホスホリパーゼ、レンネット)
- ・ アクチニジンの英名は、リストの備考欄に記載されている Actinidine は正しくないため、Actinidin に訂正した。
- ・ 酵素特性の項には、参考として EC ナンバーを記載しているが、常用名を付記しているものは最新のものに見直した。
- ・ リパーゼの酵素特性は、第3版既存添加物自主規格では「油脂（トリアシルグリセロール）を加水分解して脂肪酸を生成する」と規定されていたが、ジアシルグリセロールやモノアシルグリセロールを加水分解するものもあるため、これらを追加・修正した。尚、モノアシルグリセロールに作用する酵素剤が市販されているため、その EC ナンバーも追加した。
- ・ 第4版既存添加物自主規格に関する意見募集において、グルコースオキシダーゼの酵素特性 (EC ナンバー) としてヘキソースオキシダーゼの EC ナンバー追加の要望が提出されたが、ヘキソースオキシダーゼはグルコースオキシダーゼの酵素特性を含む上位概念に相当するため、本意見の採用は見送った。詳細は以下のとおりである。

グルコースオキシダーゼの酵素特性は、「本品は、 β -D-グルコースを酸化して D-グルコノ- δ -ラク톤を生成する。EC ナンバー (参考): EC 1.1.3.4」と規定されている。EC 1.1.3.5 のヘキソースオキシダーゼもこの特性を持つ酵素であり、更に、ヘキソースオキシダーゼは、自主規格で定められている確認試験及び酵素活性測定法もグルコースオキシダーゼと同一である。又、ヘ

キソースオキシダーゼの基原である紅藻 Chondrus crispus はカラギーナンの原料として、及びアジアで長い食経験が知られており、JECFA 評価からもヘキソースオキシダーゼの安全性が確認されている（第 63 回 JECFA Chemical and Technical Assessment）ことから、プロテアーゼあるいはペクチナーゼなどの広範な酵素特性を含む品目が存在することを考慮すると、ヘキソースオキシダーゼもグルコースオキシダーゼの範疇に含めてもよいとも考えられる。しかしながら、グルコースオキシダーゼの特性の範囲を超えるものを追加することは不適切と判断された。

- ・ ホスホリパーゼ，レンネットの 2 品目のヒ素規格の測定条件として，第 3 版既存添加物自主規格の装置 B に加え，装置 C を加えた。2 品目以外では一般規格として適切かどうか未検討である為，不統一となっている。
- ・ 既作成の 61 品目の成分規格を見直し，別報で報告する新規フィシンと合わせ，合計 62 品目の成分規格を第 4 版既存添加物自主規格に収載する予定である。

② 酵素活性測定法

- ・ 測定法の原理がほぼ同じならば統合し，基質や生成物の定量の原理が異なれば新たに作成する方針で従来進めているが，本年度は，本件については検討しなかった。ただし，成分規格の酵素活性測定法の項で，反応温度，反応 pH，緩衝液の種類，試料の希釈液等の測定条件は，酵素の特性に応じて選択できるようにした。
- ・ 既作成 61 品目の酵素に対応する酵素活性測定法を見直して，第 4 版既存添加物自主規格に収載する。
- ・ セルラーゼ，ヘミセルラーゼに，新規の酵素活性測定法を追加した。セルラーゼは，第 6 法として CMC 振動粘度法を追加した。ヘミセルラーゼは，第 4 法としてガラクトマンナン糖化力測定法—ニトロ試薬法を追加した。これらの酵素活性測定法を，別紙として添付した。

<新規に作成した酵素活性測定法の概要>

1) セルラーゼ活性測定法

第 6 法として追加した CMC 振動粘度法は，セルラーゼを基質であるカルボキシメチルセルロース (CMC) と反応させると，基質の分解により粘度の低下が生じる。この粘度の低下はエンドグルカナーゼ活性に比例する。これを，振動粘度計を用いて測定することによりセルラーゼ活性を測定する方法である。

2) ヘミセルラーゼ活性測定法

第 4 法として追加したガラクトマンナン糖化力測定法—ニトロ試薬法は，酵素を基質アラビナンに作用させ，アラビノシド結合の切断に伴って増加する還元力を測定して活性を求める方法である。

③ 試薬・試液等

- ・ 試薬・試液では，第 3 版既存添加物自主規格に記載されているトランスグルタミナーゼの基質「ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン」の規格は，特殊な規格であった為，一般的な製品 Z-Gln-Gly の規格に変更した。又，「レンネット，定量用」に記載されている Rhizomucor pusillus の国際標準品は廃止された為，この標準品に関わる記載を削除，変更した。

④ 成分規格と酵素活性測定法の妥当性検証（実測値データ補充）

- ・ 主として，未検証の基原の酵素について，性状，確認試験，純度試験，微生物限度，酵素活性測定法を，原則 3 ロットの繰り返し試験を実施し，成分規格及び酵素活性測定法の妥当性を検証した。対象とした品目の α -アミラーゼ，グルカナーゼ（2 製品），セルラーゼ，プロテアーゼ，ペクチナーゼ，ヘミセルラーゼ（3 製品），ホスホリパーゼの検証データを別紙として添付した。

⑤ 酵素一般規格

- ・ 第4版既存添加物自主規格の酵素一般規格では、製剤に関する部分は削除した。
- ・ JECFAの酵素一般規格は、新規に開発された酵素の基準には適切と考えられたが、既存添加物に適用して良いか十分な検討はできなかったため、第3版既存添加物自主規格の酵素一般規格をベースとして改訂した。
- ・ 組換えDNA微生物については、食品安全委員会のガイドラインがあるため、基原微生物の一つとして使用できる表現とした。
- ・ JECFAの酵素一般規格に記載のあるアレルギー誘発性の評価については、含めなかった。

⑥ 流通が確認できた酵素と基原のデータ検証の状況

第4版既存添加物自主規格に記載する62品目の酵素について、流通が確認できた酵素の基原、主たるIUB No. (EC番号)と常用名、及び参考として第4版既存添加物自主規格に記載した各酵素の活性測定法の数や平成18年度に実施した流通実態調査で報告された流通酵素数、並びに、各基原酵素の成分規格、酵素活性測定法に対するデータ取得による検証の有無とその検証年度などについて、別紙「第4版既存添加物自主規格記載 酵素 一覧表」に示した。

<考察>

既存添加物酵素においては、酵素の名称と基原に関する問題、酵素活性規格値の設定の問題、酵素活性測定法の統一に関する問題など、種々の問題がある。これらの中で、第4版既存添加物自主規格に記載する酵素活性測定法や、今回新たに作成した酵素活性測定法の中には、十分な分析法バリデーションに関わる事項について、妥当性の検証が行えていないものもあるので、食品添加物公定書に記載するに当たっては、平成18年度の調査検討結果として示された「微生物由来酵素を食品添加物公定書に記載するに当たっての提案」を踏まえて、更なる調査研究が必要であると考えられる。

<添付資料>

1. 「第4版既存添加物自主規格記載 酵素 一覧表」
2. 「セルラーゼ活性測定法」
3. 「ヘミセルラーゼ活性測定法」
4. 成分規格と酵素活性測定法の妥当性検証データ
α-アミラーゼ (1製品)、グルカナーゼ (2製品)、セルラーゼ (1製品)、プロテアーゼ (1製品)、ペクチナーゼ (1製品)、ヘミセルラーゼ (3製品)、ホスホリパーゼ (1製品)

以上

第4版既存添加物自主規格収載 酵素 一覧表

既添 番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定 法の数	流通 報告数	データ 検証	検証 年度	備考
5	アガラーゼ	<i>Pseudomonas sp.</i>		3.2.1.81	β -agarase	1	2	○	18	
6	アクチニジン	キウイ		3.4.22.14	actinidain	1	1	○	17	
9	アシラーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>		3.5.1.14	aminoacylase	2	1	○	15	
10	アスコルビン酸オキシダーゼ	ウリ、ズッキーニ		1.10.3.3	L-ascorbate oxidase	1	2	○	14	
16	α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	4.1.1.5	acetolactate decarboxylase	1	1	○	17	
21	アミノペプチダーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.4.11.1	leucyl aminopeptidase	1	5	○	18	ペプチダーゼに含まれる。 未収載基原
22	α -アミラーゼ	<i>Arthrobacter ramosus</i>		3.2.1.141	4- α -D-((1 \rightarrow 4)- α -D-glucanol trehalose	5	1	○	18	
22	α -アミラーゼ	<i>Aspergillus aureus</i> \rightarrow <i>Aspergillus foetidus</i>		3.2.1.1	α -amylase		2	○	19	
22	α -アミラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.1	α -amylase		1	○	18	
22	α -アミラーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.2.1.1	α -amylase		8	○	12	
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		3.2.1.1	α -amylase		1	×		
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus licheniformis</i>		3.2.1.1	α -amylase		2	○	18	
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	α -amylase		5	○	18	
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		3.2.1.1	α -amylase		6	○	12	
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.1	α -amylase		1	×		
22	α -アミラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	3.2.1.1	α -amylase		1	○	12	
22	α -アミラーゼ	<i>Thermomonospora viridis</i> \rightarrow <i>Saccharomonospora viridis</i>		3.2.1.1	α -amylase		1	○	18	
22	α -アミラーゼ	麦芽エキス		3.2.1.1	α -amylase		1	×		
23	β -アミラーゼ	小麦		3.2.1.2	β -amylase	1	2	○	12	
23	β -アミラーゼ	大豆		3.2.1.2	β -amylase		2	○	18	
23	β -アミラーゼ	大麦		3.2.1.2	β -amylase		4	○	18	
32	アルギン酸リアーゼ	<i>Sphingobacterium multivorum</i>		4.2.2.3	poly (β -D-mannuronate) lyase 別名 Alginate lyase I	1	1	○	15	
35	アントシアナーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.21	β -glucosidase	1	1	○	17	
35	アントシアナーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.2.1.23	β -galactosidase		1	○	17	
36	イソアミラーゼ	<i>Flavobacterium odoratum</i> \rightarrow <i>Myroides odoratus</i>		3.2.1.68	isoamylase	2	1	○	18	
36	イソアミラーゼ	<i>Pseudomonas amyloclavata</i>		3.2.1.68	isoamylase		1	○	12	
42	イヌリナーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.7 3.2.1.80	inulinase fructan β -fructosidase	2	1	○	17	
42	イヌリナーゼ	<i>Penicillium purpurogenum</i>		3.2.1.7	inulinase		1	○	17	
46	インベルターゼ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		3.2.1.26	β -fructofuranosidase	2	1	○	13	
46	インベルターゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.26	β -fructofuranosidase		1	○	18	
51	ウレアーゼ	<i>Lactobacillus fermentum</i>		3.5.1.5	urease	1	2	○	14 18	
52	エキソマルトテトラオヒドロラーゼ	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		3.2.1.60	glucan 1,4- α -maltotetraohydrolase	1	2	○	15 18	
54	エステラーゼ	<i>Aspergillus japonicus</i>		3.1.1.xx	carboxylic ester hydrolases	1	1	○	15 18	
87	カタラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		1.11.1.6	catalase	2	2	○	18	
87	カタラーゼ	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> \rightarrow <i>Micrococcus luteus</i>		1.11.1.6	catalase		2	○	11	
87	カタラーゼ	ブタの肝臓		1.11.1.6	catalase		1	○	18	

既添 番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定 法の数	流通 報告数	データ 検証	検証 年度	備考
96	α -ガラクトシダーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.22	α -galactosidase	2	2	○	13	
97	β -ガラクトシダーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.2.1.23	β -galactosidase	6	4	○	13	
97	β -ガラクトシダーゼ	<i>Bacillus circulans</i>		3.2.1.23	β -galactosidase		2	○	13	
97	β -ガラクトシダーゼ	<i>Kluyveromyces lactis</i>		3.2.1.23	β -galactosidase		4	○	13	
105	カルボキシペプチダーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.4.17.1 3.4.17.2	carboxypeptidase A carboxypeptidase B	1	1	○	16	
114	キシラナーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.8	endo-1,4- β -xylanase	2	3	○	14	
114	キシラナーゼ	<i>Aspergillus usamii</i> → <i>Aspergillus awamori</i>		3.2.1.8	endo-1,4- β -xylanase		1	○	18	未収載基原
114	キシラナーゼ	<i>Humicola insolens</i>		3.2.1.8	endo-1,4- β -xylanase		1	○	14	未収載基原
114	キシラナーゼ	<i>Trichoderma koningii</i> → <i>Trichoderma longibrachiatum</i>		3.2.1.8	endo-1,4- β -xylanase		1	○	14	菌株再同定の結果、菌名を変更
114	キシラナーゼ	<i>Trichoderma viride</i>		3.2.1.8	endo-1,4- β -xylanase		1	○	18	
117	キチナーゼ	<i>Aeromonas</i>		3.2.1.14	chitinase	2	1	○	16	
117	キチナーゼ	<i>Streptomyces</i>		3.2.1.52	β -L-N-acetylhexosaminidase		1	○	18	
119	キトサナーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.132	chitosanase	2	1	○	14	
119	キトサナーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		3.2.1.132	chitosanase		1	○	14	
142	グルカナナーゼ	<i>Arthrobacter luteus</i> → <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>		3.2.1.6	endo-1,3(4)- β -glucanase	3	2	○	13 19	
142	グルカナナーゼ	<i>Aspergillus aculeatus</i>		3.2.1.6	endo-1,3(5)- β -glucanase		1	×		
142	グルカナナーゼ	<i>Bacillus circulans</i> → <i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>		3.2.1.6	endo-1,3(6)- β -glucanase		1	○	18	未収載基原
142	グルカナナーゼ	<i>Pycnoporus cossineus</i>		3.2.1.6	endo-1,3(7)- β -glucanase		1	○	18 19	
142	グルカナナーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		3.2.1.6	endo-1,3(8)- β -glucanase		1	○	13	
142	グルカナナーゼ	<i>Humicola insolens</i>		3.2.1.6	endo-1,3(9)- β -glucanase		1	×		
142	グルカナナーゼ	<i>Geosmithia emersonii</i>		3.2.1.6	endo-1,3(10)- β -glucanase		1	○	18	未収載基原
142	グルカナナーゼ	<i>Trichoderma reesei</i>		3.2.1.6	endo-1,3(11)- β -glucanase		2	○	18	未収載基原
142	グルカナナーゼ	<i>Penicillium funiculosum</i>		3.2.1.6	endo-1,3(12)- β -glucanase		2	○	18	未収載基原
142	グルカナナーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		3.2.1.6	endo-1,3(13)- β -glucanase		1	×		未収載基原
144	グルコアミラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.3	glucan 1,4- α -glucosidase 別名 glucoamylase	3	8	○	12 18	
144	グルコアミラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus deramificans</i>	3.2.1.3	glucan 1,5- α -glucosidase 別名 glucoamylase		1	×		
144	グルコアミラーゼ	<i>Rhizopus delemar</i> → <i>Rhizopus oryzae</i>		3.2.1.3	glucan 1,6- α -glucosidase 別名 glucoamylase		5	○	12 18	未収載基原: <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus oryzae</i> → 収載基原
146	α -グルコシダーゼ	<i>Acremonium strictum</i>		3.2.1.20	α -glucosidase	1	2	○	14	
146	α -グルコシダーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.20	α -glucosidase		1	○	14	
147	β -グルコシダーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.21	β -glucosidase	2	3	○	13	
147	β -グルコシダーゼ	<i>Penicillium multicolor</i>		3.2.1.21 3.2.1.149	β -glucosidase β -primeverosidase		1	○	18	未収載基原 (β -ガラクトシダーゼの基原)
147	β -グルコシダーゼ	<i>Trichoderma reesei</i>		3.2.1.58	glucan 1,3- β -glucosidase		1	○	13	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Arthrobacter globiformis</i>		2.4.1.18	1,4- α -glucan branching enzyme	9	1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Arthrobacter ramosus</i>		5.4.99.15	(1→4)- α -D-glucan 1- α -D-glucosylmutase		1	○	17	

既添番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定法の数	流通報告数	データ検証	検証年度	備考
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Bacillus globisporus</i> → <i>Sporosarcina globispora</i>		2.4.1.24	1,4- α -glucan 6- α -glucosyltransferase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Bacillus globisporus</i> → <i>Sporosarcina globispora</i>		2.4.1.25	4- α -glucanotransferase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Bacillus stearothermophilus</i> → <i>Geobacillus stearothermophilus</i>		2.4.1.18	1,4- α -glucan branching enzyme		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Aquifex aeolicus</i>		2.4.1.18	1,4- α -glucan branching enzyme		2	○	18	未収載基原
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Acetobacter capsulatum</i> → <i>Gluconobacter oxydans</i>		2.4.1.2	dextrin dextranase		1	○	18	未収載基原
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Protaminobacter rubrum</i>		5.4.99.11	isomaltulose synthase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Pseudomonas mesoacidophila</i>		5.4.99.11	isomaltulose synthase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Streptococcus mutans</i>		2.4.1.7	sucrose phosphorylase		1	○	18	未収載基原
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Pseudomonas</i>		2.4.1.7	sucrose phosphorylase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Thermus aquaticus</i>		2.4.1.25	4- α -glucanotransferase		1	○	18	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	<i>Thermus aquaticus</i>		5.4.99.16	maltose α -D-glucosyltransferase		1	○	17	
148	α -グルコシルトランスフェラーゼ	パレイシヨ (<i>Solanum tuberosum</i> LINNE)		2.4.1.1	phosphorylase		1	○	17	
150	グルコースイソメラーゼ	<i>Streptomyces griseofuscus</i>		5.3.1.5	xylose isomerase	3	1	○	18	
150	グルコースイソメラーゼ	<i>Streptomyces murinus</i>		5.3.1.5	xylose isomerase		1	×		固定化酵素
150	グルコースイソメラーゼ	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	5.3.1.5	xylose isomerase		2	○	13 18	
151	グルコースオキシダーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		1.1.3.4	glucose oxidase	2	3	○	13	
151	グルコースオキシダーゼ	<i>Penicillium amagasakiense</i>		1.1.3.4	glucose oxidase		1	○	13	
152	グルタミナーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		3.5.1.2	glutaminase	2	3	○	12	
200	酸性ホスファターゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.1.3.2	acid phosphatase	1	1	○	14	
210	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. → <i>Paenibacillus campinasesis</i>		2.4.1.19	cyclomalto-dextrin glucanotransferase	4	1	○	18	
210	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. → <i>Bacillus clarkii</i>		2.4.1.19	cyclomalto-dextrin glucanotransferase		1	○	18	Bacillusは収載基原
210	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Bacillus macerans</i> → <i>Paenibacillus macerans</i>		2.4.1.19	cyclomalto-dextrin glucanotransferase		1	○	12	
210	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Bacillus</i> sp. → <i>Bacillus coagulans</i>		2.4.1.19	cyclomalto-dextrin glucanotransferase		1	○	18	
210	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Bacillus stearothermophilus</i> → <i>Geobacillus stearothermophilus</i>		2.4.1.19	cyclomalto-dextrin glucanotransferase		1	○	18	
244	セルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.4	cellulase	6	4	○	11	
244	セルラーゼ	<i>Trichoderma reesei</i>		3.2.1.4	cellulase		7	○	18 19	
244	セルラーゼ	<i>Trichoderma viride</i>		3.2.1.4	cellulase		2	○	11	
244	セルラーゼ	<i>Pycnoporous coccineus</i>		3.2.1.4	cellulase		1	○	18	
263	タンナーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.1.1.20	tannase	1	2	○	15	
275	5'-デアミナーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>		3.5.4.6	AMP deaminase	1	1	○	14	
275	5'-デアミナーゼ	<i>Streptomyces murinus</i>		3.5.4.6	AMP deaminase		1	○	18	未収載基原 (グルコースイソメラーゼの基原)
275	5'-デアミナーゼ	<i>Streptomyces aureus</i>		3.5.4.6	AMP deaminase		1	○	18	未収載基原
278	デキストラナーゼ	<i>Ghaetomium erraticum</i>		3.2.1.11	dextranase	2	1	○	15	

既添番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定法の数	流通報告数	データ検証	検証年度	備考
278	デキストラナーゼ	<i>Chaetomium gracile</i>		3. 2. 1. 11	dextranase		1	○	15	
298	トランスグルコシダーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3. 2. 1. 20 2. 4. 1. 24	α -glucosidase 1, 4- α -glucan 6- α -glucosyltransferase	2	2	○	14 18	
299	トランスグルタミナーゼ	<i>Streptovercillium mobaraense</i> → <i>Streptomyces mobaraensis</i>		2. 3. 2. 13	protein-glutamine γ -glutamyltransferase	1	2	○	12 18	
304	トレハロースホスホリラーゼ	<i>Plesiomonas</i>		2. 4. 1. 64	α , α -trehalose phosphorylase	1	1	○	16	
312	ナリンジナーゼ	<i>Penicillium decumbens</i>		3. 2. 1. 21 3. 2. 1. 40	β -glucosidase α -L-rhamnosidase	1	1	○	15	
327	パーオキシダーゼ	西洋ワサビ		1. 11. 1. 7	peroxidase	1	1	○	16	
337	パンクレアチン	ブタ膵臓		該当しない		備考	2	○	12	デンプン糖化力活性測定法、プロテアーゼ活性測定法 第1法、リパーゼ活性測定法 第1法
356	フィシン	クワ科ヒゴ (<i>Ficus glabrata</i> H. B. et K.)		3. 4. 22. 3	ficain	備考	1	○	19	食品添加物公定書のパパインの酵素活性測定法
357	フィターゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3. 1. 3. 8	3-phytase	1	2	○	13	
369	フルクトシルトランスフェラーゼ	<i>Arthrobacter</i> sp. → <i>Microbacterium lacticum</i>		3. 2. 1. 26	β -fructofuranosidase	1	1	○	15	
369	フルクトシルトランスフェラーゼ	<i>Bacillus macerans</i> → <i>Paenibacillus macerans</i>		3. 2. 1. 26	β -fructofuranosidase		1	○	18	
372	プルラナーゼ	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>		3. 2. 1. 41	pullulanase	2	1	○	12	
372	プルラナーゼ	<i>Bacillus brevis</i> → <i>Brevibacillus brevis</i>		3. 2. 1. 41	pullulanase		1	×		
372	プルラナーゼ	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	3. 2. 1. 41	pullulanase		1	○	18	
372	プルラナーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus deramificans</i>	3. 2. 1. 41	pullulanase		1	×		
372	プルラナーゼ	<i>Bacillus circulans</i>		3. 2. 1. 68 3. 2. 1. 41	isoamylase pullulanase		1	×		
372	プルラナーゼ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		3. 2. 1. 41	pullulanase		2	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases	4	1	○	11	
374	プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		5	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		6	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Aspergillus saitoi</i> → <i>Aspergillus phoenicis</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		2	○	19	
374	プロテアーゼ	<i>Aspergillus sojae</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		1	×		
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		3. 4. 24. 28	bacillolysin		2	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus clausii</i>		3. 4. 21. 62	subtilisin		2	○	18	未収載基原
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus licheniformis</i>		3. 4. 21. 62	subtilisin		4	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus stearothermophilus</i> → <i>Geobacillus stearothermophilus</i>		3. 4. 24. 28	Bacillolysin		2	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		3. 4. 21. 62 3. 4. 24. 28	subtilisin bacillolysin		5	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Bacillus</i> sp.		3. 4. 21. 62	Subtilisin		2	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Penicillium citrinum</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		1	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> → <i>Sphingomonas paucimobilis</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		1	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Pycnoporus coccineus</i>		3. 4. 23. 30	pycnopeptidase (別名 Pycnoporus coccineus aspartic proteinase)		1	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Rhizopus niveus</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		1	○	18	
374	プロテアーゼ	<i>Streptomyces aureus</i>		3. 4. 2x. xx	Endopeptidases		1	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Aspergillus aculeatus</i>		3. 2. 1. 15	polygalacturonase	7	1	×		

既添番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定法の数	流通報告数	データ検証	検証年度	備考
385	ペクチナーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.15 3.1.1.11	polygalacturonase pectinesterase		8	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Aspergillus pulverulentus</i>		3.2.1.15	polygalacturonase		1	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>		4.2.2.10	pectin lyase		2	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Rhizopus oryzae</i>		3.2.1.15	polygalacturonase		1	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Trichosporon penicillatum</i> → <i>Geotrichum klebahnii</i>		3.2.1.15	polygalacturonase		1	○	18	
385	ペクチナーゼ	<i>Aspergillus usamii</i>		3.2.1.15 3.1.1.11	polygalacturonase pectinesterase		1	○	19	
389	ヘスペリジナーゼ	<i>Penicillium decumbens</i>		3.2.1.40	α-L-rhamnosidase	1	1	○	15	
402	ペプチダーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.4.11.xx	aminopeptidase	4	3	○	14 18	
402	ペプチダーゼ	<i>Rhizopus oryzae</i>		3.4.11.xx	aminopeptidase		1	○	14	
402	ペプチダーゼ	<i>Streptomyces</i> sp.		3.4.11.xx	aminopeptidase		2	○	18	未収載基原
402	ペプチダーゼ	<i>Streptomyces</i> sp.		3.4.11.5	prolyl aminopeptidase		1	○	18	未収載基原
402	ペプチダーゼ	<i>Streptomyces</i> sp.		3.4.11.9	Xaa-Pro aminopeptidase		1	○	18	未収載基原
404	ヘミセルラーゼ	<i>Bacillus halodurans</i>		3.2.1.8	endo-1,4-β- xylanase	7	1	○	19	未収載基原
404	ヘミセルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.2.1.8 3.2.1.78	endo-1,4-β- xylanase mannan endo-1,4-β- mannosidase		3	○	11	
404	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma koningii</i> → <i>Trichoderma</i> <i>longibrachiatum</i>		3.2.1.8	endo-1,4-β- xylanase		1	○	11	
404	ヘミセルラーゼ	<i>Penicillium multicolor</i>		3.2.1.78	mannan endo-1,4-β- mannosidase		1	○	19	未収載基原 (β-ガラクトシダーゼの基原)
404	ヘミセルラーゼ	<i>Bacillus mannanilyticus</i>		3.2.1.78	mannan endo-1,4-β- mannosidase		1	○	19	未収載基原
404	ヘミセルラーゼ	<i>Pycnoporus coccineus</i>		3.2.1.8	endo-1,4-β- xylanase		1	○	18	
412	ホスホジエステラーゼ	<i>Penicillium citrinum</i>		3.1.30.1	<i>Aspergillus</i> nuclease S1	1	1	○	17	
412	ホスホジエステラーゼ	<i>Streptomyces aureus</i>		3.1.4.1	phosphodiesterase I		1	○	18	未収載基原
413	ホスホリパーゼ	<i>Actinomyces</i> sp. → <i>Kitasatospora</i> <i>paracochleata</i>		3.1.4.4	phospholipase D	3	1	○	13 18	
413	ホスホリパーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.1.1.32	phospholipaseA ₁		1	○	13	
413	ホスホリパーゼ	Porcine pancreatic glands (豚すい臓)		3.1.1.4	phospholipaseA ₂		1	○	18	
413	ホスホリパーゼ	<i>Streptomyces</i> <i>cinnamoneus</i>		3.1.4.4	phospholipase D		1	×		未収載基原
413	ホスホリパーゼ	<i>Streptomyces</i> <i>violaceoruber</i>	<i>Streptomyces</i> <i>cinnamoneus</i>	3.1.4.4	phospholipase D		1	○	18	未収載基原
413	ホスホリパーゼ	<i>Streptomyces</i> <i>violaceoruber</i>	<i>Streptomyces</i> <i>violaceoruber</i>	3.1.1.4	phospholipaseA ₂		1	○	18	未収載基原
413	ホスホリパーゼ	<i>Streptomyces</i> <i>violaceoruber</i>		3.1.1.4	PhospholipaseA ₂		1	○	19	未収載基原
417	ポリフェノールオキシダーゼ	<i>Trametes hirsuta</i>		1.10.3.2	laccase	2	1	○	14	
426	マルトースホスホリラーゼ	<i>Plesiomonas</i>		2.4.1.8	maltose phosphorylase	1	1	○	16	
427	マルトトリオヒドロラーゼ	<i>Microbacterium</i> <i>imperiale</i>		3.2.1.1	α-amylase	1	1	○	16	
437	ムラミダーゼ	<i>Streptomyces</i>		3.2.1.17	lysozyme 別名 muramidase	1	1	○	18	
460	ラクトパーオキシダーゼ	脱脂生乳		1.11.1.7	peroxidase	1	1	○	17	
469	リパーゼ	<i>Alcaligenes</i> sp. → <i>Pseudomonas</i> <i>pseudocaligenes</i>		3.1.1.3	triacylglycerol lipase	2	1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Aspergillus niger</i>		3.1.1.3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizomucor</i> <i>miehei</i>	3.1.1.3	triacylglycerol lipase		1	×		
469	リパーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i>	3.1.1.3	triacylglycerol lipase		1	○	12	
469	リパーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>		3.1.1.3	triacylglycerol lipase		1	×		

既添 番号	既存添加物名	基原 (ホスト)	基原 (ドナー)	IUB No. EC番号	常用名	活性測定 法の数	流通 報告数	データ 検証	検証 年度	備考
469	リパーゼ	<i>Candida rugosa</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Mucor javanicus</i> → <i>Mucor circinelloides</i> <i>f. circinelloides</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Penicillium camembertii</i>		3. 1. 1. 23	acylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Penicillium roquefortii</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Rhizopus delemar</i> → <i>Rhizopus oryzae</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Rhizopus japonicus</i> → <i>Rhizopus oryzae</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		2	○	12	
469	リパーゼ	<i>Rhizopus oryzae</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Rhizopus niveus</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	子牛舌下末		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Pseudomonas cepacia</i> → <i>Burkholderia cepacia</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Candida cylindracea</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
469	リパーゼ	<i>Alcaligenes sp.</i> → <i>Burkholderia stabilis</i>		3. 1. 1. 3	triacylglycerol lipase		1	○	18	
470	リポキシゲナーゼ	大豆		1. 13. 11. 12	lipooxygenase	1	1	○	17	
483	レンネット	<i>Rhizomucor miehei</i>		3. 4. 23. 23	mucorpepsin	1	1	○	18	
483	レンネット	<i>Mucor pusillus</i> → <i>Rhizomucor pusillus</i>		3. 4. 23. 23	mucorpepsin		1	○	12 18	
計	62		190			125	307			

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、1mol/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3ml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液は1ml中にブドウ糖0.10，0.20及び0.30mgを含む。

(4) 操作法

試料液1ml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1ml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4ml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、試料液1mlを正確に量り、試験管に入れ、DNS-乳糖試液又はDNS試液4mlを正確に加えて振り混ぜ、次に基質溶液1ml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液1mlを正確に量り、試験管に入れ、DNS-乳糖試液又はDNA試液4mlを正確に加えて振り混ぜ、次に基質溶液1ml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 ($Y = a X$) 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 μg への換算

180 : ブドウ糖の分子量

10 : 反応時間 (分)

W : 試料液 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

あらかじめカルメロースナトリウム (第 2 法用) 約 1 g を精密に量り、105°C で 4 時間乾燥してその減量を測定する。その乾燥物 0.625g に対応するカルメ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 (1 mol/L) 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°C で 6 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 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml 及び 5 ml を正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 10 ml とする。それぞれの液 1 ml 中には、ブドウ糖が 0.0001g, 0.0002g, 0.0003g, 0.0004g 及び 0.0005g 含まれる。それぞれの液 1 ml, 基質溶液 4 ml 及びアルカリ性銅試液 2 ml を正確に量り、25 ml 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 2 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、更に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム試液 3 ml 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 (1 mol/L) を加えて正確に 25 ml とする。この液 1 ml を正確に量り、pH 4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (1 mol/L) 9 ml を正確に加えてよく振り混ぜる。この液につき波長 750 nm 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 1 ml の代わりに水 1 ml 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 4 ml を正確に量り、25 ml 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、試料液 1 ml 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 2 ml 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 2 ml を正確に加えてよく振り混ぜ、更に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム試液 3 ml 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 (1 mol/L) を加えて正確に 25 ml とする。この液 1 ml を正確に量り、pH 4.5 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (1 mol/L) 9 ml を正確に加え、よく振り混ぜる。この液につき波長 750 nm における吸光度 A_T を測定する。

別に試料液 1 ml を正確に量り、25 ml のメスフラスコに入れ、アルカリ性銅試液 2 ml を正確に加えて振り混ぜ、次に、基質溶液 4 ml 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/m²，破裂強度 1.2～1.8kg/cm²，ろ水時間 50～90 秒/100ml，吸水高度 8～9 cm/10 分，透気度 30～40 秒/cm²/100ml，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⁻¹，振幅 6 cm，水温 37±0.5℃に調節する。試料液 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。

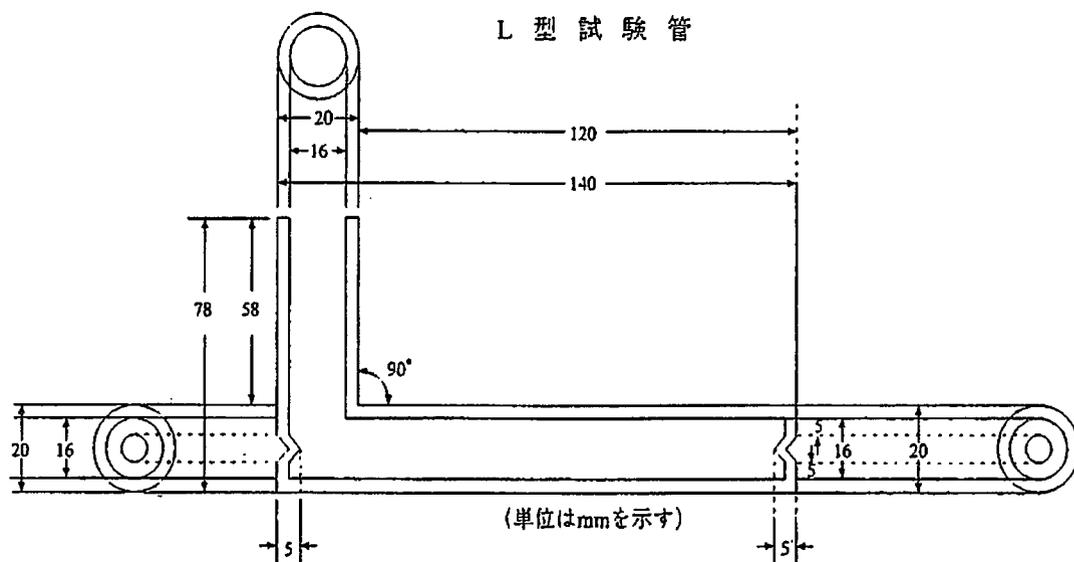
$$\text{本品中の酵素活性単位（単位/g 又は ml）} = \frac{1}{t \times W} \times 1,000$$

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 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 1ml 中にブドウ糖 0.0002, 0.0005g 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 (μg/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、ポ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 μmol 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)

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

ただし、 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 (μg/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)

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 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。この溶液は用時調製する。

(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 0.0002, 0.0005g 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 (μg/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℃±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 μmol 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)

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

ただし、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 (μg/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)

第6法 (CMC振動粘度法) セルラーゼを基質であるカルボキシメチルセルロース (CMC) と反応させると基質の分解により粘度の低下が生じる。粘度の低下度はサンプル内在性のグルカナーゼ活性に比例する。本法は、振動粘度計を用いて粘度低下を測定することによりセルラーゼの活性を測定する方法である。

(1) 試料液

測定結果の値が標準サンプルにおける 0.270 単位/ml ~0.772 単位/ml の間の値であれば、粘度低下度が試料濃度に比例する。そこで、0.54 単位/ml 程度になるように、本品に 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) を加えて溶かし、試料液とする。

(2) 基質溶液

1,000 ml のフラスコに約 700ml の 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) を加えて 85°C に温める。攪拌しながら少しずつ CMC を 35 g 加えていく。85°C で 30 分間攪拌し、その後、冷えるまで攪拌しつづける。0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) を加え 950 ml とした後、2 mol/L 塩酸試液あるいは 1.0 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 6.00 ± 0.05 に調整し最後に 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) で 1,000ml にメスアップしながら完全に混ぜ合わせる。溶液は透明であること、また、使用前には泡が入っていないことを確認する。5°C で 3 日間保存が可能であり、pH は使用前に再度調整する。

(3) 検量線

1.027g のセルラーゼ標準品を量り取り、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶かし、正確に 50ml にメスアップする。その後 15 分間攪拌する。溶かした標準サンプル溶液 0.050, 0.071, 0.100, 0.125, 0.142 及び 0.800ml をそれぞれ正確に量り、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) を加えて正確に 1.000ml とする。この液 0.125ml を正確に量り、試験管に入れ、0.375ml の 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) を加え、さらに、事前に 25°C に温めておいた 4.0ml の基質溶液

を加え、攪拌器で25-30秒間攪拌し、その後、40℃の恒温槽で30分間放置する。試験管をMIVI(ミビ)オンライン粘度計(ソフレーザー社製)のサンプル立てにセットし、振動しているスピンドルが試験管の中央に位置させた状態で20秒間経過させた時点での測定値を読み取る。セルラーゼ標準品の単位液量あたりの活性単位(単位/ml)を求め、グラフのX軸にとる。Y軸には測定値(mV)をとり、セルラーゼ標準品の測定結果をプロットし、検量線を作成する。

(4) 操作法

0.125mlの試料を試験管に入れ、0.375mlの0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH6.0)加える。さらに、事前に25℃に温めておいた4.0mlの基質溶液を加え、攪拌器で25-30秒間攪拌し、その後、40℃の恒温槽で30分間放置する。試験管をMIVI(ミビ)オンライン粘度計(ソフレーザー社製)のサンプル立てにセットし、振動しているスピンドルが試験管の中央に位置させた状態で20秒間経過させた時点での測定値(mV)を読み取る。試料の活性単位は以下の計算式より得られる。測定限界として、0.27単位/ml以上の活性単位が必要である。

本品中の試料の活性単位(単位/g) = $C \times 0.125 \times D / W$ (単位/g)

C : 検量線から読み取った希釈試料の活性単位(単位/ml)

0.125 : 試料液の液量(ml)

D : 試料液が希釈済みである場合の希釈率(倍)

W : 試料液1mlあたりの試料の重量(g)

ヘミセルラーゼ活性測定法

第1法（キシラン糖化力測定法-銅試薬法） 酵素を基質キシランに作用させ、グルコシド結合の切断に伴って増加する還元力を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、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、緩衝液又は塩類溶液を加えて溶かし、試料液とする。その濃度は、通例 0.6~1.2 単位/ml である。

(2) 基質溶液

あらかじめ、キシラン（第1法用）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 0.500g に対応するキシランを正確に量り、約 30ml の水を加え、かき混ぜながら加熱し、沸騰し始めから3分間煮沸する。冷後、水を加えて正確に 50ml とする。

(3) キシロース検量線

あらかじめ、キシロース約 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 0.125g に対応するキシロースを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする (1.25mg/ml)。この液 2ml, 3ml, 4ml, 5ml 及び 6ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする (0.00010, 0.00015, 0.00020, 0.00025, 0.00030 g/4ml)。この液 4ml ずつを 50ml ネスラー管に正確に量り、基質溶液 1ml 及びソモギー試液、酵素試験用 2ml を加えよく振り混ぜ、栓をし、沸騰水浴中で正確に 20 分間加熱した後、直ちに冷却する。冷後、ヒ素モリブデン酸試液 1ml を加え、亜酸化銅の赤色沈澱が完全に溶けるまでよく振り混ぜた後、室温で約 20 分間放置し、水 17ml を加えて正確に全量 25ml とし、よく振り混ぜる。この液を 15ml 遠沈管に約 8ml 量り、冷却遠心機で遠心分離 (3,000 回転/分, 25℃, 10 分間) した後、波長 500nm における吸光度 A_{51} を測定する。

別に、水 4ml と基質溶液 1ml にソモギー試液、酵素試験用 2ml を加え、振り混ぜた後、以下同様に操作して吸光度 A_{50} を測定する。用時調製する。

(4) 操作法

基質溶液 1ml と 0.1mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (至適 pH) 3ml を量り、 $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 10~15 分間放置した後、試料液 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 30 分間放置した後、ソモギー試液、酵素試験用 2ml を加えて振り混ぜ、栓をし、沸騰水浴中で正確に 20 分間加熱し、直ちに冷却する。冷後、ヒ素モリブデン酸試液 1ml を加え、亜酸化銅の赤色沈澱が完全に溶けるまでよく振り混ぜ、室温で約 20 分間放置し、水 17ml を加えて、全量を 25ml とし、よく振り混ぜる。この液を 15ml 遠沈管に約 8ml 量り、冷却遠心機で遠心分離 (3,000min, 25℃, 10 分間) した後、波長 500nm における吸光度 A_{30} を測定する。

別に、基質溶液 1ml と 0.1mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (至適 pH) 3ml にソモギー試液、酵素試験用 2ml を加え、振り混ぜた後、試料液 1ml を加えたものを以下同様に操

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、1 分間に 1mg のキシロースに相当する還元糖の増加をもたらす酵素量を 100 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = X \times \frac{1}{30} \times 100 \times \frac{1}{W}$$

ただし、

X : 生成キシロース量 (mg) で、 $(A_{30} - A_0)$ 値とキシロース検量線から求める。

$$X = [(A_{30} - A_0)] - b / a$$

1/30 : 1 分間当たりへの換算係数

100 : 100 単位

a : キシロース検量線の傾き

b : キシロース検量線の切片

W : 試料液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

第 2 法 (キシラン糖化力測定法-ニトロ試薬法) 酵素を基質キシランに作用させ、グルコシド結合の切断に伴って増加する還元力を測定して求める方法である。

(1) 試料液

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 1 ~ 2 単位/ml になるように調製し、試料液とする。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、キシラン (第 2 法用) 約 1g を精密に量り、105°C 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 に対応するキシランを正確に量り、0.2mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) (又は適切な緩衝液) 100ml を加え、30 分間かき混ぜてけん濁液とし、更にかき混ぜながら 60°C で 1 時間加温した後、室温まで冷す。pH4.5 ± 0.05 (又は適切な pH) であることを確認する。用時調製する。

(3) キシロース検量線

あらかじめ、キシロース約 1g を精密に量り、105°C 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 2.50g に対応するキシロースを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 2, 4 及び 6 ml を正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 50ml とする。これらのキシロース標準溶液は 0.1ml 中にキシロース 0.00010, 0.00020, 及び 0.00030g を含む。それぞれのキシロース標準溶液 0.1ml を正確に量り、試験管に入れ、ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4 ml を加えて振り混ぜ、次に基質溶液 1.9ml を加えよく振り混ぜる。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す。この液を遠心分離 (3,000 回転/分, 10 分間) した後、水を対照とし、波長 540nm における吸光度 A_s を測定する。

別に、水 0.1ml を量り、試験管に入れ、ジニトロサリチル酸-乳糖試液 4 ml を加えて振