

## アスパラギナーゼの規格基準改正に関する部会報告書（案）

今般の添加物としての規格基準の改正の検討については、事業者より規格基準の改正にかかる要請がなされたことに伴い、食品安全委員会において食品影響評価がなされたことを踏まえ、添加物部会において審議を行い、以下の報告を取りまとめるものである。

### 1. 品目名

和名：アスパラギナーゼ（*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたもの）

英名：Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus oryzae*

CAS 番号：9015-68-3

INS 番号：なし

EC 番号：EC 3.5.1.1

### 2. 構造式及び質量

構造式：アミノ酸配列（359 アミノ酸）は以下のとおり。

```
SPLLYPRATDSNVTYVFTNPGLNFTQMNTLPNVTIFATGGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAV  
PEMLNVANVAGVQVTNVGSPDITSDILLRLSKQINEVVCNDPTMAGAVVTHGTDLTLESAFFLDATVNCRK  
PVVIVGAMPSTAISADGPLNLLQSVTVAASPKARDRGALIVMNDRIVSAFYASKTNANTVDTFKAIEMGN  
LGEVVSINKPYFFYPVKPTGKTEVDIRNITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAGSGSGSVS  
TPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESSQIASGYLNPAKSRVLLGLLLAQGKSIEMRAVFER  
IGVA
```

質量：

アミノ酸配列から計算される質量は 37 kDa である。

### 3. 用途

製造用剤（食品加工の際のアクリルアミド生成抑制）

### 4. 概要及び諸外国での使用状況

#### （1）概要

アスパラギナーゼ（*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたもの）は、*A. oryzae*（こうじ菌）が本来有しているアスパラギナーゼ遺伝子を増幅して、アスパラギナーゼの生産性を向上させた菌より得られたものである。

アスパラギナーゼは、食品加工の際に生じるアクリルアミド<sup>1</sup>の生成の起因となるアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する作用を有する酵素であり、食品加工の際に生成するアクリルアミドを低減する目的で使用される。

JECFA では、平成 19（2007）年に、適正製造規範（GMP）に沿って適切に製造され、特定の目的（アクリルアミド生成の低減）で使用される場合、一日摂取許容量（ADI）は特定しない（not specified）と評価している。

我が国では、アスパラギナーゼは、製造用剤（食品加工の際のアクリルアミド生成抑制）の目的で平成 26 年に *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼが指定されている。

なお、本品目に関しては、平成 27 年 9 月に食品安全委員会より、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断されている。

#### （参考）アクリルアミドの主な生成経路

食品中のアクリルアミドの主要な生成経路は、アミノ酸の一種である遊離アスパラギンと還元糖に分類されているグルコース等によるアミノ・カルボニル反応であるとされている。グルコースやアスパラギンは、穀類、いも類及び野菜類等に豊富に含まれており、これらを原料にして、①揚げる、②焼く、③焙る等の高温での加熱（120℃以上）で加工した食品にアクリルアミドが含まれる。

---

<sup>1</sup> 国際がん研究機関（IARC：International Agency for Research on Cancer）による発がん性分類において、アクリルアミドは 2A（人に対しておそらく発がん性がある）に分類されている。国内では、食品安全委員会が自ら行う食品健康影響評価の案件として、加熱時に生じるアクリルアミドの食品健康影響評価を実施している。

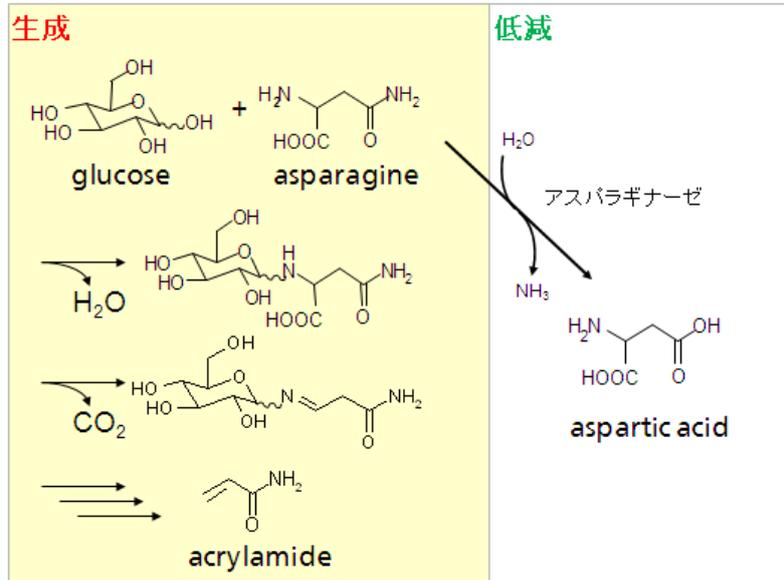


図 1 メイラード反応によるアクリルアミドの生成及び  
アスパラギナーゼによるアクリルアミドの生成の低減

## (2) 諸外国での使用状況等

コーデックス委員会では、加工助剤は食品添加物に分類されない<sup>2</sup>ため、コーデックス委員会食品添加物部会 (CCFA) が作成する添加物の使用基準 (食品添加物に関するコーデックス一般規格 (GSFA<sup>3</sup>)) に規格は設定されていない。

米国では、一般に安全と認められている (GRAS) 物質として認定されている。

欧州連合 (EU) では、デンマーク及びフランスでは、個別に認可されている。その他の国においては、現時点では、加工助剤としての酵素の使用に規制はない。

オーストラリア及びニュージーランドでは、2008 年に加工助剤としての使用が認められている。

<sup>2</sup> コーデックス委員会では、加工助剤は、「装置若しくは器具類を含まず、それ自体では食品の原材料として消費されることのない物質又は材料であって、処理若しくは加工過程において技術的な目的を達成すべく、原料、食品又はその原材料を加工する際に意図的に使用するものをいう。ただし、「加工助剤」を使用することで、意図的ではないが、その残渣又は派生物が最終製品中に存在することが回避できない場合がある。」と定義されている。

<sup>3</sup> コーデックスにおける食品添加物の最も基本的な規格。食品添加物の使用に関する一般原則 (食品添加物の安全性、使用の妥当性、適正製造規範 (GMP) の考え方等)、食品へのキャリーオーバー (食品の原材料の製造等に使用された食品添加物が食品中に存在すること) の考え方等の他、生鮮食品及び加工食品を階層的に分類した「食品分類システム」や、個別の食品添加物について、使用が認められている食品分類ごとに食品中の最大濃度を規定した「食品添加物条項」等から構成されている。

## 5. 食品添加物としての有効性

### (1) アスパラギナーゼの有効性

#### (i) アスパラギナーゼの機能

アスパラギナーゼは、アクリルアミドの生成の起因となるアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する作用を持つ。食品加工の際にアスパラギナーゼを添加することにより、アクリルアミドの生成が低減される。

#### (ii) ビスケット、ジンジャースナップ及びクラッカーに対する効果

アスパラギナーゼをビスケット、ジンジャースナップ及びクラッカーの原材料たる小麦粉に添加し、各食品を製造した場合のアクリルアミド含有量を測定し、アスパラギナーゼのアクリルアミドの低減効果を調べた。ビスケット、ジンジャースナップ及びクラッカーの原材料たる小麦粉の重量当たり、それぞれ、60～180、570～1430、145～715 ppm のアスパラギナーゼを添加したところ、アスパラギナーゼを添加していない対照群に比べて最大でそれぞれ 90、50、85%のアクリルアミドの低減効果が認められた（図2-1～図2-3）。

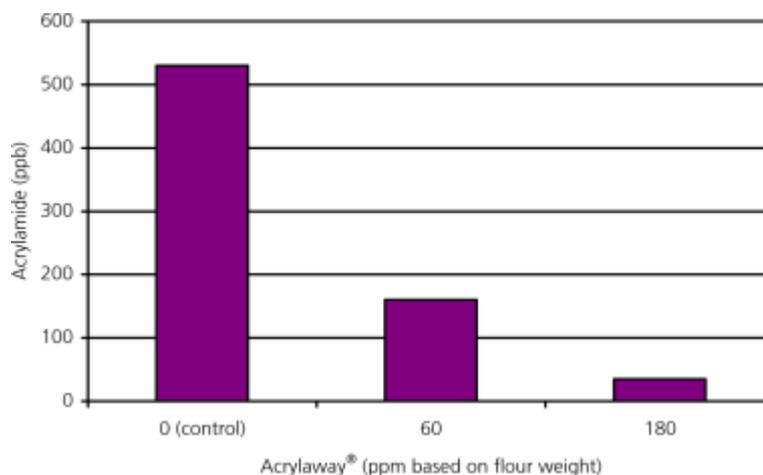


図 2-1 ビスケットにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果  
(Acrylaway®はアスパラギナーゼの商品名)

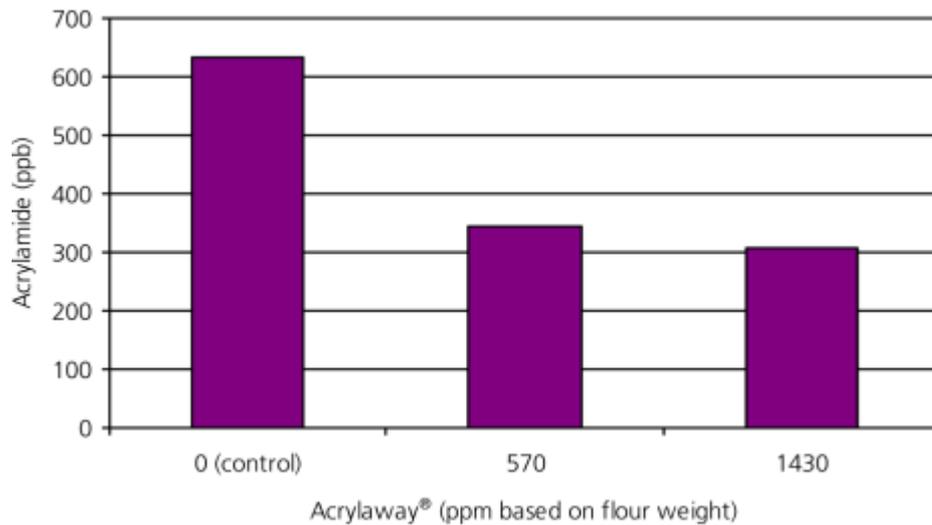


図 2-2 ジンジャースナップにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果

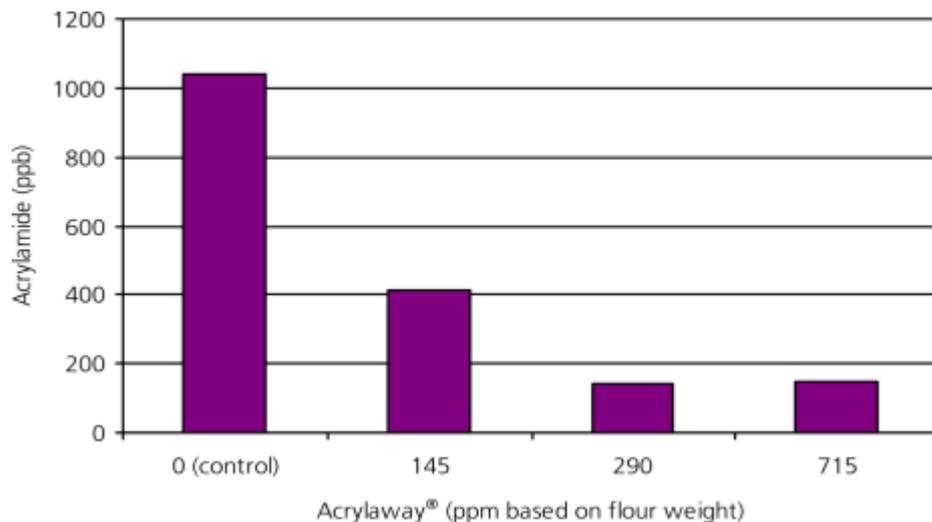


図 2-3 クラッカーにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果

(iii) コーデックス委員会におけるアクリルアミド生成の低減対策

コーデックス委員会では、行政、食品事業者等の関係者向けの手引きとして2009年に「食品中のアクリルアミド低減のための実施規範」を採択した。この規範には、大きく分けて以下の3つの有効な対策が示されている。

- ①適切な原材料の選択
- ②原材料の配合比率や組成の見直し
- ③調理加工条件、特に加熱条件の見直し

このうち、②の原材料の配合比率や組成の見直しの中で、アクリルアミド生成原因物質であるアスパラギンを酵素によって特異的に分解することが方法の1つと

して挙げられている。

## (2) 食品中での安定性

アスパラギナーゼの至適温度は、pH7において 50℃であり、80℃で失活する。実際の食品加工工程において、アスパラギナーゼで処理された食品はアクリルアミドが生成される 120℃以上の温度で加熱されるが、アスパラギナーゼは 120℃以上では失活する。

## (3) 食品中の栄養素に及ぼす影響

アスパラギナーゼは、食品中のアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに分解する。

## 6. 食品安全委員会における評価結果

食品添加物としての規格基準改正のため、食品安全基本法(平成 15 年法律第 48 号)第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、平成 26 年 10 月 17 日付け厚生労働省発食安 1017 第 1 号により、食品安全委員会に対して意見を求めたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価については、添加物専門調査会の議論を踏まえ、以下の評価結果が平成 27 年 12 月 8 日付け府食第 902 号で通知されている。

### 【食品健康影響評価 (添加物評価書抜粋)】

本委員会としては、本品目の製造を目的として適切に管理された本生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような病原性及び毒素産生性の懸念はないと判断した。

本委員会としては、本品目が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「酵素が消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかである場合」に該当すると判断したことから、本品目の毒性について、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性及びアレルギー性に係る試験成績を用いて評価を行うこととした。

本委員会としては、本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

本委員会としては、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

以上を踏まえ、本委員会としては、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算 : 880 mg TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 114  $\mu$ gTOS/kg 体重/日とを比較して得られる安全マージンが十分であること及び本品目が食経験のある基原微生物である *A. oryzae* を用いて生産されることを勘案して、本品目について、添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADI を特定する必要はないと判断

した。

## 7. 摂取量の推計

食品安全委員会の評価結果によると次のとおりである。

### 【一日摂取量の推計等（添加物評価書抜粋）】

#### 1. 国際機関等における推計

##### (1) JECFA における推計

上述（p11）の通り、JECFA は保守的な推定を行った場合の本品目の一日摂取量を 0.4 mgTOS/kg 体重/日としている。（参照 3、18）

#### 2. 我が国における推計

指定等要請者によれば、本品目は、小麦・加工品（パン類等）、その他の穀類・加工品、いも類、ケーキ・ペストリー類、ビスケット類、その他の菓子類（ポテトチップス等）、その他の調味料といった食品（群）に直接使用されるものであるとされている。

本委員会としては、本品目の一日摂取量について、指定等要請者の推計を基に、最大添加量について一部修正し、当該食品（群）又はそれらの原材料の全てに本品目が表 1 の最大添加量で添加され、全量そのまま最終食品に移行して、消費されたとした場合を想定し、平成 24 年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量を用いて、表 1 のとおり算出した。その結果、本委員会としては、本品目の一日摂取量を 6.26 mgTOS/人/日（114  $\mu$ gTOS/kg 体重/日）と判断した。なお、日本人の平均体重 55.1 kg を用いている。（参照 2、11、21）

表 1 本品目の推定一日摂取量

食品（群）	a 食品摂取量	b 本品目最大添加量	c 本品目一日摂取量 $a \times b / 1000000 \times 1000$	d 本品目由来 TOS 一日摂取量 $c \times 0.04$	e 本品目由来 TOS 一日摂取量 $d \times 1000 / 55.1$
	g/人/日	ppm <sup>*1</sup>	mg/人/日	mgTOS <sup>*2</sup> /人/日	$\mu$ gTOS/kg 体重/日
小麦・加工品（パン類等）	102.4	570 <sup>*3</sup>	58.37	2.335	42.38
その他の穀類・加工品	8.1	715 <sup>*4</sup>	5.79	0.232	4.20
いも類	54.3	715 <sup>*4</sup>	38.82	1.553	28.18

ケーキ・ペストリー類	7.1	715 <sup>*4</sup>	5.07	0.203	3.68
ビスケット類	1.9	570 <sup>*5</sup>	1.08	0.043	0.78
その他の菓子類 (ポテトチップス等)	6.2	715 <sup>*4</sup>	4.43	0.177	3.22
その他の調味料	59.9	715 <sup>*4</sup>	42.83	1.713	31.09
合計	239.9		124.2	6.26	114

\*1 最終製品の重量に対する数値

\*2 本品目のTOSを4%として算出

\*3 指定等要請者は小麦・加工品(パン類等)の本品目最大添加量を290 ppmとしているが、本委員会としては、中嶋(2009)(参照11)のクリスピーブレッドの値を用い、最大添加量を570 ppmと判断した。

\*4 アスパラギナーゼ添加量のデータがないため、本委員会としては、中嶋(2009)(参照11)の様々な食品の推奨添加量のうち最大添加量の値である715 ppmを用いて算出した。

\*5 指定等要請者はビスケット類の本品目最大添加量を290 ppmとしているが、本委員会としては、中嶋(2009)(参照11)のジンジャークッキーの値を用い、最大添加量を570 ppmと判断した。

## 8. 規格基準の改正について

食品衛生法(昭和22年法律第233号)法第11条第1項の規定に基づく規格基準については、次のとおり改正することが適当である。

### (1) 使用基準について

アスパラギナーゼは使用基準が設定されていない。*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を用いて生産されたアスパラギナーゼについては、*Aspergillus niger* ASP-72株を用いて生産されたアスパラギナーゼと同様、①消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかであるため、ヒトが摂取する際の安全性の懸念は低いこと、②食品安全委員会の評価結果において、ADIを特定する必要はないこと等を踏まえて、本規格基準の改正においても使用基準を設定しないこととするのが適当である。

### (2) 成分規格について

別紙1のとおり改正することが適当である(設定根拠は別紙2、JECFA規格との対比表は別紙3のとおり)。

## 成分規格 (案)

## アスパラギナーゼ

## Asparaginase

定 義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger* 及び *Aspergillus oryzae*に限る。) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. niger* ASP-72 株及び *A. oryzae* NZYM-SP 株に限る。) より得られた、アスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。本品には、アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来) 及びアスパラギナーゼ (*A. oryzae* NZYM-SP 株由来) がある。グリセリン、デキストリン、マルトデキストリン、食塩又は小麦粉を含むことがある。

アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来)

酵素活性 本品は、1 g あるいは 1 ml 当たり 2,375 単位以上の酵素活性を有する。

性 状 本品は、黄～褐色の澄明な液体又はごくうすい灰色若しくはごくうすい黄色を帯びた白色の顆粒である。

確認試験 本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 5.0 $\mu$ g/g 以下

本品 0.8 g を量り、白金製、石英製若しくは磁製のるつぼ又は石英製のビーカーに入れる。硫酸 (1→4) を加えて試料全体を潤した後、徐々に温度を上げ、試料が炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱する。必要があれば硫酸 (1→4) を更に加え、試料がほとんど炭化するまで加熱する。なお、液体試料及び炭化しにくい試料の場合には、硫酸 (1→4) の代わりに硫酸を用いてもよい。試料が炭化した後、必要があれば容器に緩くふたをして電気炉に入れ、徐々に温度を上げて 450～600℃で強熱して灰化する。炭化物が残る場合は、必要があればガラス棒で炭化物を砕き、硫酸 (1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸 (1→4) 10 ml を入れ、水浴上で加熱して蒸発乾固する。残留物に少量の硝酸 (1→100) を加え、加温して溶かし、冷後、更に硝酸 (1→100) を加えて正確に 10 ml とし、検液とする。なお、500℃以下で灰化操作を行う場合には、耐熱ガラス製のビーカーを使用することができる。別に、鉛標準原液 1 ml を正確に量り、水を加えて正確に 100 ml とする。この液 4 ml を正確に量り、硝酸 (1→100) を加えて正確に 10 ml とし、比較液とする。検液及び比較液につき、鉛試験法第 1 法により試験を行う。

(2) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 4.0 $\mu$ g/g 以下 (0.50 g, 第 3 法, 装置 B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1 g につき、細菌数は 50,000 以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。なお、サルモネラの

試験は、「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。

## 酵素活性測定法

### (1) 基質溶液

L-アスパラギン 1 水和物 1.50 g を量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加え、かくはんして完全に溶かした後、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 100ml とする。用時調製する。

### (2) 試料溶液

本品約 2.5 g を精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 20 ml を加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 25ml とする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で希釈して、1 ml 中に 6 単位を含む液を調製し、試料溶液とする。

### (3) 比較原液

4,000 単位に対応する量の酵素活性測定用アスパラギナーゼを量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 20ml を加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 25ml とする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で希釈して、1 ml 中に 6 単位を含む液を調製し、比較原液とする。

### (4) 硫酸アンモニウム標準液

硫酸アンモニウム約 3.9 g を精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 40ml を加えて 15 分間かくはんする。更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて 50ml とし、標準原液とする。標準原液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で 4 倍、6 倍、10 倍、30 倍及び 60 倍に希釈し、硫酸アンモニウム標準液とする。

### (5) 操作法

2 本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、37°C で 10 分間加温する。1 本の試験管に試料溶液 0.100ml を、もう 1 本の試験管に比較原液 0.100ml を加えて混和する。これらの試験管を 37°C で正確に 30 分間加温した後、トリクロロ酢酸溶液 (1 → 4) 0.400ml を加えて混和し、更に水 2.5ml を加えて混和する。2 本の試験管からそれぞれ 0.100ml を量り、水 4.0ml に加え、塩基性フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、アスパラギナーゼ活性試験用次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液 0.850ml を加えて 37°C で 10 分間放置した液を検液及び比較液とする。検液及び比較液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度  $A_T$  及び  $A_C$  を測定する。また、別の 2 本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、それぞれにトリクロロ酢酸溶液 (1 → 4) 0.400ml を加えて混和し、試料溶液又は比較原液 0.100ml を加えて混和し、37°C で 30 分間加温した後、水 2.5ml を加えて混和する。これらの液それぞれ 0.100ml を量り、水 4.0ml に加え、塩基性フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、アスパラギナーゼ活性試験用次亜塩素酸ナトリウム・

水酸化ナトリウム試液 0.850ml を加えて 37℃で 10 分間放置した液をそれぞれ検液の対照液及び比較液の対照液とする。対照液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度  $A_{BT}$  及び  $A_{BC}$  を測定する。別に、基質溶液 2.0ml ずつを量り、5 本の試験管に入れ、37℃で 10 分間加温し、試料溶液の代わりに、それぞれの試験管に異なる濃度の硫酸アンモニウム標準液 0.100ml ずつを加えて、以下検液の調製と同様に操作して得られた液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度を測定する。硫酸アンモニウム標準液の硫酸アンモニウムの濃度と得られた吸光度により検量線を作成し、その傾きを  $a$  (ml/mg) とする。次式により、酵素活性測定用アスパラギナーゼの酵素活性を求め、酵素活性が表示量の 91~109% のとき、試料の酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、L-アスパラギンから、1 分間にアンモニア 1  $\mu\text{mol}$  を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{A \times D_f \times 25 \times 2 \times 10^3}{a \times W \times 132.14 \times 30}$$

ただし、 $A$  : 検液又は比較液の吸光度 ( $A_T$  又は  $A_C$ ) から対照液の吸光度 ( $A_{BT}$  又は  $A_{BC}$ ) を引いた値

$D_f$  : 試料溶液又は比較原液の希釈係数

$W$  : 試料又は酵素活性測定用アスパラギナーゼの採取量 (g)

アスパラギナーゼ (*A. oryzae* NZYM-SP 株由来)

酵素活性 本品は、1 g あるいは 1 ml 当たり 3,500 単位以上の酵素活性を有する。

性状 本品は、淡褐色の液体又は白~灰白色の顆粒である。

確認試験 本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 5.0  $\mu\text{g/g}$  以下

本品 0.8 g を量り、以下「アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来)」の純度試験(1)を準用する。

(2) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$  として 4.0  $\mu\text{g/g}$  以下 (0.50 g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1 g につき、細菌数は 50,000 以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。なお、サルモネラの試験は、「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。

酵素活性測定法

(1) 基質溶液

L-アスパラギン 1 水和物 0.25g を量り、MOPS 緩衝液 (0.1mol/L, pH7.0) 15ml を加え、かくはんして完全に溶かした後、遮光し、A液とする。 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム水和物 (還元型) 0.011g, 2-ケト

グルタル酸二ナトリウム 0.063g 及び 1,680 単位以上に対応する量の L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (ウシ肝臓由来) を量り, A液に加えてかくはんして溶かし, MOPS 緩衝液 (0.1mol/L, pH7.0) を加えて正確に 25ml とする。用時調製する。

#### (2) 試料溶液

本品約 1.0g を精密に量り, 酢酸緩衝液 (0.1mol/L, pH5.0, ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を加えて溶かし, 正確に 100ml とする。この溶液を酢酸緩衝液 (0.1mol/L, pH5.0, ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) で希釈して, 1ml 中に約 0.6 単位を含む溶液を調製し, 試料溶液とする。

#### (3) 標準原液

775 単位に対応する量の酵素活性測定用アスパラギナーゼ (*A. oryzae* 由来) を量り, 酢酸緩衝液 (0.1mol/L, pH5.0, ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を加えて溶かし, 正確に 100ml とする。この液を酢酸緩衝液 (0.1mol/L, pH5.0, ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を用いて 8, 10, 15, 20 及び 30 倍に希釈して, 1ml 中に 0.9688, 0.7750, 0.5167, 0.3875 及び 0.2583 単位を含む 5 つの液を調製し, 標準原液とする。

#### (4) 操作法

試験管に基質溶液 4.6ml を正確に量り, 37.0±0.5℃で 8 分間加温した後, 試料溶液 0.4ml を正確に加えてかくはんし, 37.0±0.5℃で 90 秒間加温した液を検液とする。検液につき, 水を対照として, 波長 340nm における吸光度 A を測定する。別に, 基質溶液 4.6ml ずつを正確に量り, 5 本の試験管に入れ, 37.0±0.5℃で 8 分間加温し, 試料溶液の代わりに, それぞれの試験管に異なる濃度の標準原液 0.4ml ずつを加えて, 以下検液の調製と同様に操作し, 標準液とする。標準液につき, 水を対照として, 波長 340nm における吸光度を測定する。得られた吸光度と標準原液 1ml 中の酵素活性 (単位/ml) から検量線を作成する。試料溶液中の酵素活性 U (単位/ml) を検量線から求め, 次式により, 試料の酵素活性を求める。その酵素活性の単位は, 操作法の条件で試験するとき, 1 分間にアンモニア 1µmol を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{U \times D \times 100}{\text{試料の採取量 (g)}}$$

ただし, U : 試料溶液中の酵素活性 (単位/ml)

D : 試料溶液の希釈係数

試薬・試液 (案)

アスパラギナーゼ (*A. oryzae* 由来), 酵素活性測定用 本品は, 糸状菌 (*Aspergillus*

*oryzae*に限る。)が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. oryzae* NZYM-SP 株に限る。)より得られた、淡褐色の液体又は白～灰白色の顆粒である。本品は、既知の酵素活性を有する。本品の1単位は、L-アスパラギンを基質として、pH7.0、37°Cにおいて1分間に1 μmol のアンモニアを遊離する酵素量とする。

3- (*N*-モルホリノ) プロパンスルホン酸  $C_7H_{15}NO_4S$  本品は、白色の結晶性粉末で、水に溶解やすく、エタノール (99.5) にほとんど溶けない。  
融点 275~280°C

ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル  $(C_2H_4O)_n C_{12}H_{26}O$  日本薬局方ラウロマクロゴールを用いる。

ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル試液 ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル 15g に水を加えて 100ml とする。

$\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム水和物 (還元型)  $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$  本品は、白～淡黄色の粉末で、水に溶ける。

2-ケトグルタル酸二ナトリウム  $C_5H_4Na_2O_5$  本品は、白色の粉末で、水に溶ける。

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (ウシ肝臓由来) 本品は、ウシの肝臓から得られた、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼである。本品は、既知の酵素活性を有する。本品の1単位は、2-ケトグルタル酸を基質として、pH7.3、25°Cにおいて1分間に1 μmol のL-グルタミン酸を遊離する酵素量とする。

酵素活性測定用アスパラギナーゼ (*A. oryzae* 由来) アスパラギナーゼ (*A. oryzae* 由来)、酵素活性測定用を見よ。

酢酸緩衝液 (0.1mol/L, pH5.0, ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) 酢酸緩衝液 (1mol/L, pH5.0) 500ml に水 3,500ml を加え、さらにポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル試液 7.5ml を加える。適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液で pH5.0 に調整し、水を加えて正確に 5 L とする。

酢酸緩衝液 (1mol/L, pH5.0) 酢酸ナトリウム三水和物 88.8g を水 1,800ml に溶かし、酢酸で pH5.0 に調整し、水を加えて正確に 2,000ml とする。

**MOPS 緩衝液 (0.1mol/L, pH7.0)** 3 – (*N*-モルホリノ) プロパンスルホン酸 21g  
を量り, 水 900ml を加えて溶かし, 適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液で pH7.0  
に調整し, 水を加えて正確に 1,000ml とする。

アスパラギナーゼ (*A. oryzae* NZYM-SP株由来) の規格設定の根拠

アスパラギナーゼは、JECFA Combined Compendium of Food Additive Specifications (JECFA規格) には、ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* EXPRESSED IN *A. NIGER* と ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* EXPRESSED IN *A. ORYZAE* という2つの規格が設定されている。*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ (アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72株由来)) については、平成26年11月に指定されており、今回、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を用いて生産されたアスパラギナーゼについて指定要請があったことから、JECFA規格の ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* EXPRESSED IN *A. ORYZAE*, アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72株由来) の成分規格及び指定要請書の成分規格案 (以下「指定要請規格案」という。) を参考に成分規格案を設定した。なお、成分規格案は、最終的にアスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72株由来) の成分規格と合わせてまとめた。

**定義**

アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来) では、基原及び本質並びに賦形剤等の添加される可能性のある化合物を規定していることから、本規格案では、JECFA 規格及び指定要請書の記載を参考に、基原及び本質を、「本品は、糸状菌 (*Aspergillus oryzae* に限る) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. oryzae* NZYM-SP 株に限る) より得られた、アスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。」とし、含まれる可能性のある化合物は、アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来) の記載に、要請のあったデキストリンと食塩を加え、「グリセリン、デキストリン、マルトデキストリン、食塩又は小麦粉を含むことがある。」とした。

**酵素活性**

JECFA 規格には規格値は設定されていないが、アスパラギナーゼ (*A. niger* ASP-72 株由来) の記載方法に合わせて酵素活性を設定することとし、「酵素活性 本品は、1 g あるいは1 ml 当たり 3,500 単位以上の酵素活性を有する。」とした。

**性状**

JECFA 規格では、「淡褐色の液体である。」、指定要請規格案では、「淡褐色液状 (液状品)、白色～灰白色顆粒 (顆粒品)。」としている。本規格案は、「本品は、淡褐色の液体又は白～灰白色の顆粒である。」とした。

**確認試験**

JECFA 規格及び指定要請規格案では、いずれも酵素 (アスパラギナーゼ) 活性を示すとしていることから、本規格案では、「本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。」とした。

**純度試験及び微生物限度**

JECFAの酵素一般規格では、鉛 (5mg/kg以下)、微生物限度 (サルモネラ: 不検出/25g 試料、大

腸菌群：30/g以下，大腸菌：不検出/25 g）及び抗菌物質活性（微生物由来の製剤に活性がないこと）を規定しているが，アスパラギナーゼ（*A. niger* ASP-72株由来）では，鉛（Pbとして5.0μg/g以下），ヒ素（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0μg/g以下），微生物限度（細菌数は50,000/g以下，大腸菌，サルモネラは認めない）を規定していることから，本規格案では，純度試験は，鉛（Pbとして5.0μg/g以下），ヒ素（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0μg/g以下）を規定し，微生物限度は，「微生物限度試験法により試験を行うとき，本品1 gにつき，細菌数は50,000以下である。また，大腸菌及びサルモネラは認めない。なお，サルモネラの試験は，「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。」を規定した。

#### 酵素活性測定法

JECFA規格及び指定要請規格案では，アスパラギナーゼによるL-アスパラギンの分解によって生じるアンモニアにα-ケトグルタル酸を結合させ，L-グルタミン酸を生成させる際に消費されるNADH（NADに変換されるNADH）を測定する方法により酵素活性を求めていることから，本規格案でもこれを採用した。

アスパラギナーゼ(*A. oryzae* NZYM-SP株由来)の規格対比表

	本規格案	JECFA	
定義	本品は、糸状菌( <i>Aspergillus oryzae</i> に限る)が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌( <i>A. oryzae</i> NZYM-SP株に限る)より得られた、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。グリセリン、デキストリン、マルトデキストリン、食塩又は小麦粉を含むことがある。	(起源)アスパラギナーゼは、 <i>Aspergillus oryzae</i> に由来したアスパラギナーゼ遺伝子を含む <i>Aspergillus oryzae</i> の遺伝子組換え菌株の流加法(fed-batch)の液体培養によって生産される。酵素はバイオマスを除くためにろ過によって発酵培養液から分離され、限外濾過又は蒸発によって濃縮される。酵素濃縮物は細菌ろ過され、次いで、食品グレードの化合物を使用して調合され、要求された活性に、規格化される。	
酵素活性	本品は、1gあるいは1ml当たり3,500単位以上の酵素活性を有する。	—	
性状	本品は、淡褐色の液体又は白～灰白色の顆粒である。	淡褐色の液体である。	
確認試験	酵素活性を示す	アスパラギナーゼ活性を示す	
純度試験			
鉛	Pbとして5.0 $\mu$ g/g以下	Pbとして5.0mg/kg以下*	
ヒ素	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として4.0 $\mu$ g/g以下	—	
抗菌活性	設定しない	微生物由来の製剤に活性がない*	
微生物限度	細菌数	50,000以下	—
	大腸菌	認めない	不検出/25 g *
	サルモネラ	認めない	不検出/25 g *
	総大腸菌群	設定しない	30以下/g *
酵素活性測定法	NADHの定量(340nm) (アスパラギナーゼによるL-アスパラギンの分解によって生じるアンモニアに $\alpha$ -ケトグルタル酸を反応させてL-グルタミン酸を生じる際に消費されるNADHを測定)	NADHの定量(340nm) (アスパラギナーゼによるL-アスパラギンの分解によって生じるアンモニアに $\alpha$ -ケトグルタル酸を反応させてL-グルタミン酸を生じる際に消費されるNADHを測定)	

\*General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing