１．飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の製造の方法の基準

フィターゼ（その２の（６））は、豚、鶏、うずら、魚類及び甲殻類を対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

２．各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

フィターゼ（その２の（６））

ア　製造用原体

(ｱ) 成分規格

酵素力単位　本品は、酵素力試験を行うとき、１g 中に 200,000 フィチン酸分解力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

①　本品は、黄色～褐色の粉末又は粒子である。

②　本品の水溶液又は水懸濁液（１→100）の pH は、4.0～5.0 である。

③　本品は、pH2.5～5.0 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

①　鉛　本品 1.0g（0.95～1.04g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第１法）により鉛の試験を行うとき、その量は、５μg/g 以下でなければならない。

②　ヒ素　フィターゼ（その１）製造用原体の純度試験②を準用する。

③　抗菌活性　フィターゼ（その１）製造用原体の純度試験③を準用する。

乾燥減量　12.0％以下（１g，105℃，３時間）

強熱残分　25.0％以下（0.5g）

酵素力試験　フィチン酸分解力試験法第３法により試験を行う。

試料溶液の調製　本品 2.00g（1.995～2.004g）を 100mL の全量フラスコに量り、その数値を記録し、0.2mol/L クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）を標線まで加えて 100mL とする。この液を室温で１時間撹拌した後、3,400×g で 10 分間遠心分離を行い、その上澄液を試料原液とする。この原液適量を全量ピペットを用いて量り、１mL 当たりの濃度が 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え、試料溶液とする。

(ｲ) 製造の方法の基準

Komagataella pastoris に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養し、培養を終了した後、培養物をろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液を噴霧乾燥することにより製造すること。

(ｳ) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(ｴ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数点以下第１位まで）を記載すること。

イ　製剤（その１　液状）

(ｱ) 成分規格

本品は、フィターゼ（その２の（６））製造用原体にショ糖水溶液を混和した水溶性液状物である。

酵素力単位　本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験　フィチン酸分解力試験法第３法により試験を行う。

試料溶液の調製　本品５mL を全量ピペットを用いて量り、50mL の全量フラスコに入れ、0.2mol/L クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）を標線まで加えて 50mL とし、試料原液とする。この原液適量を全量ピペットを用いて量り、１mL 当たりの濃度が 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え、試料溶液とする。

(ｲ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その２の（６））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ｳ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数点以下第１位まで）を記載すること。

ウ　製剤（その２）

(ｱ) 成分規格

本品は、フィターゼ（その２の（６））製造用原体に、小麦粉を加え、α-デンプ

ンの水溶液を混和して造粒した後乾燥し、必要に応じて、賦形物質を混和した小片、粉末又は粒子である。

酵素力単位　本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験　フィチン酸分解力試験法第３法により試験を行う。

試料溶液の調製　フィターゼ（その２の（６））製造用原体の酵素力試験を準用する。

(ｲ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その２の（６））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ｳ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数点以下第１位まで）を記載すること。

３．飼料添加物一般の試験法

酵素力試験法

フィチン酸分解力試験法　第３法

基質溶液の調製

あらかじめフィチン酸ナトリウムをデシケーター（シリカゲル）中で 24 時間以上乾燥し、その 1.0g（0.95～1.04g）を量り、0.2mol/L クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）（クエン酸ナトリウム 58.82g（58.815～58.824g）に水を加えて 1000mL とし、また、クエン酸 42.02g（42.015～42.024g）に水を加えて 1000mL とし、これら２つの溶液を pH5.5 となるように混合して調製）65mL を加えて溶かし、0.2mol/L クエン酸試液（クエン酸 4.2g（4.15～4.24g）に水を加えて溶かし、100mL にして調製）で pH を 5.5 に調整した後、100mL の全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて 100mL とする。

発色液の調製

硫酸 60mL を水 1,000mL 中にかき混ぜながら徐々に加えた後、放冷し、１mol/L 硫酸試液を調製する。モリブデン酸アンモニウム 2.5g（2.49～2.54g）に水を加えて溶かし、100mL とし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。アスコルビン酸 10g（9.9～10.4g）に水を加えて溶かし、100mL とし、アスコルビン酸試液を調製する。１mol/L 硫酸試液３容量にモリブデン酸アンモニウム試液１容量及びアスコルビン酸試液１容量を加え、混合する。発色液は、用時調製する。

反応停止液の調製

トリクロル酢酸 150g（145～154g）に水を加えて溶かし、1,000mL とする。

操作法

試料溶液は、各条で規定する方法で調製する。試料溶液 0.5mL をマイクロピペットを用いて量り、12×150mm の試験管に入れ、37±0.5℃に加温し、５分間放置する。この試料溶液に基質溶液 0.5mL をマイクロピペットを用いて加え、30 秒以内に混合し、37±0.5℃で正確に 15 分間放置する。その後、反応停止液 1.0mL をマイクロピペットを用いて加え、混合し、試料反応液とする。別に試験溶液 0.5mL をマイクロピペットを用いて 12×150mm の試験管に入れ、37±0.5℃に加温し、５分間放置する。この試料溶液に反応停止液 1.0mL をマイクロピペットを用いて加えた後、基質溶液 0.5mL をマイクロピペットを用いて加え、混合し、試料対照液とする。

水 1.8mL をマイクロピペットを用いて量り、別の 12×150mm の試験管に入れ、試料反応液 0.2mL をマイクロピペットを用いて加え混合する。この溶液に発色液 2.0mL をマイクロピペットを用いて加え混合し、50±0.5℃で 15 分間放置した後、室温まで放冷する。また、水 2.0mL をマイクロピペットを用いて 12×150mm の試験管に入れ、発色液 2.0mL をマイクロピペットを用いて加え、混

合し、同様に操作したものを対照液として、波長 820nm における吸光度 OD_T を測定する。別に、試料対照液について、試料反応液と同様に操作し、吸光度 OD_B を測定する。

$$1\text{g 又は mL 中のフィチン酸分解力単位} = (OD_T - OD_B) \times F \times 40 \times \frac{1}{15} \times Z \times \frac{1}{W}$$

F：検量線から求めた吸光度差１に対応するリン酸イオン濃度（μmol/mL）
W：試料採取量（g 又は mL）
Z：希釈倍率

検量線の作成

105℃で２時間乾燥させた後、デシケーターで保存したリン酸二水素カリウム 0.612g（0.6115～0.6124g）を量り、水を加えて溶かし、500mL の全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて 500mL とする。この溶液２mL を全量ピペットを用いて量り、200mL の全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて 200mL とし、標準液Ｓ１とする。標準液 S_1 を順次水で正確に２倍、４倍、８倍及び 16 倍に希釈し、それぞれ標準液 S_2、S_3、S_4 及び S_5 とする。各標準液 2.0mL をマイクロピペットを用いて 12×150mm の試験管に入れ、発色液 2.0mL をマイクロピペットを用いて加え 30 秒以内に混合し、50±0.5℃で 15 分間放置した後、室温まで放冷する。試料溶液と同様に操作法に従い、OD_{S1}、OD_{S2}、OD_{S3}、OD_{S4} 及び OD_{S5} を測定する。リン酸イオン濃度を縦軸に、測定した OD_B との吸光度差（$OD_{S1}-OD_B$）、（$OD_{S2}-OD_B$）、（$OD_{S3}-OD_B$）、（$OD_{S4}-OD_B$）及び（$OD_{S5}-OD_B$）を横軸にとり、検量線を作成する。