

ムラミダーゼの基準及び規格（案）

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

ムラミダーゼは、ブロイラーを対象とする飼料（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. 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

飼料一般の表示の基準（下線部が改正箇所）

飼料添加物名	名称
L-アスコルビン酸 (略)	ビタミン C (略)
<u>ムラミダーゼ</u> (略)	<u>ペプチドグリカン分解酵素</u> (略)
リン酸二水素ナトリウム（結晶）	リン酸二水素ナトリウム

3. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

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、1 g 中に 30,000 ペプチドグリカン分解力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、淡褐色～濃褐色の液体である。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液（1→100）の pH は、3.0～5.0 である。
- ③ 本品は、pH4.0～7.5 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 0.5 g (0.45～0.54 g) 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、20 µg/g 以下でなければならない。
- ② ヒ素 本品 1.0 g (0.95～1.04 g) を量り、ヒ素試験法第 3 法により試料溶液を調製し、装置 A を用いる方法によりヒ素の試験を行うとき、吸収液の色は、標準色より濃くてはならない（2 µg/g 以下）。
- ③ 抗菌活性 本品 1 g (0.5～1.4 g) を量り、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Escherichia coli* ATCC 27166 について抗菌活性試験法により試験を行うとき、抗菌活性を示してはならない。

強熱残分 5.0%以下 (1 g)

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 製造の方法の基準

*Trichoderma reesei*に属する菌株を宿主としたムラミダ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、又は水で抽出した後ろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液を濃縮して製造すること。

(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)

(ア) 成分規格

本品は、ムラミダーゼ製造用原体に、必要に応じて硫酸ナトリウムを加え、さらに、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、表示ペプチドグリカン分解力単位の 85~170%を含む。

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

ムラミダーゼ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

ムラミダーゼ製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤 (その 2 液状)

(ア) 成分規格

本品は、ムラミダーゼ製造用原体にソルビトール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、表示ペプチドグリカン分解力単位の 85~170%を含む。

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

ムラミダーゼ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

ムラミダーゼ製造用原体の表示の基準を準用する。

4. 飼料添加物一般の試験法

(14) 酵素力試験

ペプチドグリカン分解力試験法

ペプチドグリカン分解力試験法は、蛍光標識ペプチドグリカンにムラミダーゼが作用するときに、加水分解に伴って増加する蛍光強度により、飼料添加物中のムラミダーゼの量を測定する方法であり、その単位は、ペプチドグリカン分解力単位で示す。

1 ペプチドグリカン分解力単位は、ムラミダーゼがフルオレセイン標識ペプチドグリカンに pH6.0、30°C で作用するとき、1 分間に 0.06 nmol のフルオレセインイソチオシアナート（アイソマーI）に相当する蛍光強度を増加させる酵素量に相当する。

希釈液

リン酸一水素ナトリウム・二水和物 22.5 g (22.45~22.54 g) 及びクエン酸 7.74 g (7.735~7.744 g) を量り、1 L の全量フラスコに入れ、800 mL の水を加え、溶解するまで攪拌した後、トリトン X-100 試液 1 mL を加え、0.05 mol/L 水酸化ナトリウム試液又は 0.1 mol/L 塩酸試液を用いて pH を 5.9~6.1 に調整する。更に水を標線まで加える。

基質溶液の調製

0.5 mg/mL フルオレセイン標識ペプチドグリカン試液 100 µL に 1,900 µL の希釈液を加え混合する。用時調製する。

操作法

試験を行うために必要な量の試料を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、1 mL 当たりの濃度が 0.01~0.03 ペプチドグリカン分解力単位となるように希釈液を加え、45~90 分間かき混ぜて得られた液を試料溶液とする。

標準液 A~G 及び試料溶液を 50 µL ずつマイクロプレート（黒色）に分注し、使用しない隣接ウェルには希釈液を 100 µL 分注する。標準液 A~G 及び試料溶液の入ったウェルに基質溶液を速やかに 50 µL ずつ分注し、直ちに励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm 及び温度 30°C に設定した蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、測定間隔 1 分で 30 分間測定する。

$$1 \text{ g 中のペプチドグリカン分解力単位} = \frac{F \times V \times Z}{W}$$

F：検量線から求めたペプチドグリカン分解力単位

V：調製した試料溶液量

Z：試料溶液の希釈倍率

W：試料採取量 (g)

検量線の作成

70,000 ペプチドグリカン分解力単位に相当するムラミダーゼを量り、適量の希釈液を加え、45~90 分間よくかき混ぜて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更に希釈液を標線まで加えて 100 mL とする。この液 50 µL を 100 mL の全量フラスコにとり、希釈液を標線まで加えて 100 mL とし、標準原液とする。この液を下表に従い、希釈液にて希釈し、標準液 A~G とする。

標準液	希釈倍率	標準原液量 (μL)	希釈液量 (μL)	ペプチドグリカン分 解力単位/mL
A	40 倍	30	1,170	0.0088
B	30 倍	40	1,160	0.012
C	24 倍	50	1,150	0.015
D	20 倍	60	1,140	0.018
E	15 倍	80	1,120	0.023
F	12 倍	100	1,100	0.029
G	10 倍	120	1,080	0.035

標準液 A~G の 0~30 分までの測定値から 1 分間あたりのそれぞれの蛍光強度増加量（傾き）を算出する。算出した傾きを縦軸に、各標準液の 1mL 中のペプチドグリカン分解力単位を横軸にとり、検量線を作成する。

5. 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析法標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

試薬・試液

トリトン X-100 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ [オクチルフェノールエトキシレート]

トリトン X-100 試液 トリトン X-100 25 g (24.5~25.4 g) に水を加えて溶かし 250 mL とする。

フルオレセインイソチオシアナート（アイソマー I） $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$ 黄橙色の粉末である。

フルオレセイン標識ペプチドグリカン試液、0.5 mg/mL *Micrococcus lysodeikticus* 由来のペプチドグリカンを以下の操作により蛍光物質であるフルオレセインイソチオシアナート（アイソマー I）で標識したもの。

ペプチドグリカン 100 mg (99.5~100.4 mg) を量り、炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.3) 35 mL を加え、よく振り混ぜて懸濁液とする。この懸濁液をフルオレセインイソチオシアナート（アイソマー I）800 mg (799.5~800.4 mg) に加え、更に懸濁液の入っていた容器を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.3) 10 mL で洗浄した後、フルオレセインイソチオシアナート（アイソマー I）に加える。毎分 700 回転、37°C で 4 時間振り混ぜた後、1,500 × g で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。次に、この残留物に炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.3) 35 mL を加えてよく振り混ぜた後、1,500 × g で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に 1 回繰り返す。次に、この残留物に水 35 mL を加えてよく振り混ぜた後、1,500 × g で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に 1 回繰り返す。次に、この残留物にアセトン 35 mL を加えてよく振り混ぜた後、1,500 × g で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に 1 回繰り返す。さら

に、この残留物にエタノール 35 mL を加えてよく振り混ぜた後、 $1,500 \times g$ で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に 1 回繰り返した後、凍結乾燥し、 -20°C で保存する。

ペプチドグリカン 細菌などの細胞壁に存在する多糖類である。ただし、*Micrococcus lysodeikticus* 由来のものを用いる。

炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.3) 炭酸水素ナトリウム 21.0 g (20.95~21.04 g) に水を加えて溶かし、1 mol/L 塩酸試液で pH9.3 に調整した後、更に水を加えて 500 mL とする。

リン酸一水素ナトリウム・二水和物 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$