

## *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産された プシコースエピメラーゼの食品添加物の指定に関する部会報告書 (案)

今般の添加物としての新規指定及び規格基準の設定の検討については、事業者より指定等の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健康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 : *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ

英名 : Psicose Epimerase expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP)

CAS 番号 : 1618683-38-7

EC 番号 : 未登録

### 2. 成分

*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ (以下、本要請品目) の有効成分はホモテトラマーの酵素であり、サブユニットは32kDa、アミノ酸配列から予想される等電点は4.86であるとされている。サブユニットのアミノ酸残基数は289であり、その配列は以下に示すとおりであるとされている。

```

1 MKIGCHGLVW TGHFDAEGIR YSVQKTREAG FDLVEFPLMD PFSFDVQTAK
51 SALAEHGLAA SASLGLSDAT DVSSDPVAVV KAGEELNRA VDVLAELGAT
101 DFCGVIYSAM KKYMEPATAA GLANSKAAVG RVADRASDLG INVSLEVVNR
151 YETNVLNTGR QALAYLEELN RPNLGIHLDT YHMNIEESDM FSPILD TAEA
201 LRYVHIGESH RGYLGTGSVD FDTFFKALGR IGYDGPVVF E SFSSSVVAPD
251 LSRMLGIWRN LWADNEELGA HANAFIRDKL TAIKTIELH

```

### 3. 用途

製造用剤 (フルクトースを異性化してプシコースに変換する酵素)

### 4. 概要及び諸外国での使用状況等

#### (1) 概要

本要請品目は、*Arthrobacter globiformis* から得られたプシコースエピメラーゼ遺伝子を大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 W3110株) に導入することにより得られる

酵素であり、フルクトースをプシコースに異性化する酵素である。

本要請品目によって得られるプシコースはフルクトースに類似の味質や物性を備え、エネルギー値はほぼゼロであり、食後の血糖上昇抑制作用を示す食品とされている。

## (2) 諸外国での使用状況等

コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準（GSFA）では、加工助剤（酵素を含む）は対象とされておらず、FAO/WHO食品添加物専門家会議（JECFA）において、本要請品目の評価は行われていない。

米国において、本要請品目は、2016年にFDAからGRAS物質としての届出に異議がない旨の回答が出されている。

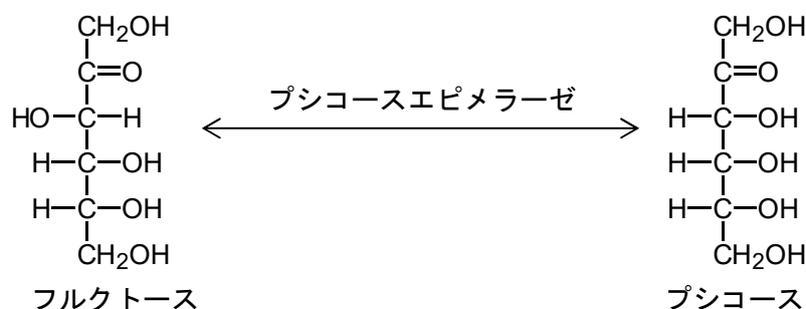
欧州連合（EU）（フランス及びデンマークを除く。）では、加工助剤として用いる酵素に対して2018年9月時点で規制がないため、本要請品目は法令上使用可能であるが、使用実績はないとされている。フランス及びデンマークでは、酵素に関する独自の規制が実施されており、流通には認可を必要としているが、本要請品目は認可されておらず、使用実績はない。欧州食品安全機関（EFSA）において、本要請品目の評価は行われていない。

オーストラリア・ニュージーランドでは、食品用酵素は加工助剤として規制されており、流通には認可を必要としているが、本要請品目は認可されておらず、使用実績はない。オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において、本要請品目の評価は行われていない。

## 5. 食品添加物としての有効性

### (1) プシコースエピメラーゼの機能

本要請品目は、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素であり、プシコースを生産する目的で使用される。



## (2) プシコースエピメラーゼの反応性

本要請品目の有効性について確認実験が行われており、試験結果の概要は以下のとおり。

50%フルクトース水溶液24.0g（固形分12.0g）に、本要請品目（粉末製品）を0（対照）、960、2400及び7200単位加えて混和し、50℃で1時間反応を行った。その結果、表1のように、12.0gのフルクトースから最大で2.74gのプシコースの生成が確認された。

表1 酵素単位と生成プシコース量

酵素単位 （単位）	反応液1g当りの プシコースの 重量（g）	反応液の重量 （g）	生成プシコース量 （g）
0	0.00	24.0	0.00
960	0.07	24.2	1.70
2400	0.10	24.5	2.38
7200	0.11	25.5	2.74

## (3) 食品中の安定性

本要請品目はプシコースの生産に使用する酵素であり、プシコースの生産過程中、イオン交換樹脂を用いた脱塩工程及び活性炭を用いた脱色工程によってプシコースから十分に除去されるため、本要請品目がプシコース中に残存する可能性は極めて低く、食品中で活性を示すことは想定されないとしている。

本要請品目を用いて生産された結晶プシコース中のタンパク質量について、改良デュマ法による分析を行った結果、結晶プシコース中に含まれるタンパク質量は0.1g/100g未満<sup>1</sup>であったとされている。

## (4) 食品中の栄養成分に対する影響

本要請品目はプシコースから十分に除去されるため、食品中の栄養素に影響を及ぼすことは想定されないとしている。

## 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指定及び規格基準設定のため、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30年10月10日付け厚生労働省発生食1010第3号により食品安全委員会に対して意見を求めた。*Escherichia coli*

<sup>1</sup> 日本食品標準成分表 2015年版（七訂）において、タンパク質の最小表示の位は少数第1位とされている。

K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラ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31年3月26日付け府食第167号により通知されている。

#### 【食品健康影響評価】

本委員会としては、本品目の組換えDNA技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、評価基準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した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された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安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

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、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

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NOAEL2.0% (TOS換算で雄：1.02gTOS<sup>2</sup>/kg体重/日、雌：1.12gTOS/kg体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 (国民全体で0.332mg TOS/kg体重/日、小児で0.918mg TOS/kg体重/日) とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、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、本要請品目の摂取量は、表2のとおりである。

---

<sup>2</sup> TOS：総有機固形物 (Total Organic Solids)

表2 本要請品目の推定一日摂取量

由来となる食品群			国民全体			小児		
			ブシコー スの一日 摂取量 (g/人/ 日)	本要請品 目の一日 摂取量 (mg TOS/人/ 日)	本要請品 目の一日 摂取量 (体重あ たり、mg TOS/kg 体 重/日)	ブシコー スの一日 摂取量 (g/人/ 日)	本要請品 目の一日 摂取量 (mg TOS/人/ 日)	本要請品 目の一日 摂取量 (体重あ たり、mg TOS/kg 体 重/日)
穀類	小麦・ 加工 品	パン類 (菓子 パンを 除く)	1.69	1.52	0.028	1.21	1.09	0.066
		菓子パ ン類	0.24	0.22	0.004	0.24	0.21	0.013
砂糖・甘味料類			0.65	0.58	0.011	0.36	0.32	0.020
野菜類	野菜ジュース		0.43	0.38	0.007	0.35	0.31	0.019
果実類	ジャム		0.13	0.12	0.002	0.10	0.09	0.005
	果汁・果汁飲料		0.37	0.34	0.006	0.90	0.81	0.049
魚介類	魚介 加工 品	魚介(佃 煮)	0.10	0.09	0.002	0	0	0
乳類	牛乳・ 乳製 品	発酵乳・ 乳酸菌 飲料	1.92	1.73	0.031	2.04	1.83	0.111
		その他 の乳製 品	0.42	0.38	0.007	0.89	0.80	0.049
菓子類	和菓子類		0.52	0.47	0.008	0.38	0.34	0.020
	ケーキ・ペスト リー類		0.35	0.31	0.006	0.29	0.26	0.016
	ビスケット類		0.10	0.09	0.002	0.17	0.15	0.009
	キャンディー類		0.15	0.13	0.002	0.75	0.67	0.041
	その他の菓子類		0.66	0.59	0.011	1.24	1.12	0.068

由来となる食品群			国民全体			小児		
			プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)
嗜好飲料類	その他の嗜好飲料	コーヒー・ココア	4.67	4.20	0.076	0.06	0.05	0.003
		その他の嗜好飲料	4.71	4.24	0.077	5.92	5.32	0.323
調味料・辛料類	調味料	その他の調味料	3.23	2.90	0.053	1.96	1.76	0.107
合計			20.34	18.29	0.332	16.84	15.15	0.918

注) 国民平均 (1歳以上) 及び小児 (1~6歳) の体重は 55.1 kg 及び 16.5 kg として算出。

## 7. 新規指定について

プシコースエピメラゼについては、食品安全委員会における食品健康影響評価を踏まえ、食品衛生法 (昭和22年法律第233号) 第10条の規定に基づく添加物として指定することは差し支えない。なお、指定の名称は「プシコースエピメラゼ」とし、成分規格において基原を特定することが適当である。

## 8. 規格基準の設定について

同法第11条第1項の規定に基づく規格基準については、次のとおりとすることが適当である。

### (1) 使用基準について

*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラゼについては、①消化管内で容易に分解され、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 を特定する必要がないこ

と等を踏まえて、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

成分規格を別紙1のとおり設定することが適当である（設定根拠は別紙2、JECFA規格等との対比表は別紙3のとおり。）。

(参考)

これまでの経緯

平成30年	10月10日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長宛てに 食品添加物の指定に係る食品健康影響評価を依頼
平成30年	10月16日	第716回食品安全委員会（要請事項説明）
平成30年	11月12日	第169回添加物専門調査会
平成31年	1月15日	第726回食品安全委員会（報告）
平成31年	1月16日	食品安全委員会における国民からの意見募集 （～平成31年2月14日）
平成31年	3月20日	添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ 報告
平成31年	3月26日	第736回食品安全委員会（報告） 食品安全委員会より食品健康影響評価の結果の通知
令和元年	7月26日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
令和元年	7月29日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

●薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

氏名	所属
石見 佳子	東京農業大学総合研究所教授
小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部長
工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部長
笹本 剛生	東京都健康安全研究センター食品化学部長
佐藤 恭子 ○	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第二室長
瀧本 秀美	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所栄養疫学・食育研究部長
戸塚 ゆ加里	国立研究開発法人国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 ユニット長
中島 春紫	明治大学農学部農芸化学科教授
原 俊太郎	昭和大学薬学部教授
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部長
三浦 進司	静岡県立大学食品栄養科学部教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部薬学科教授

※部会長

成分規格 (案)

プシコースエピメラーゼ

Psicose Epimerase

Allulose Epimerase

アルロースエピメラーゼ

[1618683-38-7]

**定 義** 本品は、細菌 (*Arthrobacter globiformis* に限る。) が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 W3110 株に限る。) の培養物から得られた、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素である。食品 (賦形、粉末化、希釈、安定化、保存又は力価調整の目的に限る。) 又は添加物 (賦形、粉末化、希釈、安定化、保存、pH 調整又は力価調整の目的に限る。) を含むことがある。

**酵素活性** 本品は、1 g 当たり 230 単位以上の酵素活性を有する。

**性 状** 本品は、淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末である。

**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  $5 \mu\text{g}/\text{g}$  以下 (0.80 g、第1法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フ  
レーム方式)

ただし、検液の調製において、残留物が硝酸 (1→100) 5 mL に溶けない場合には、  
第3法により操作する。

(2) ヒ素 As として  $3 \mu\text{g}/\text{g}$  以下 (0.50 g、第5法、標準色 ヒ素標準液 3.0mL、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、生菌数は 50000 以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。ただし、生菌数試験の試料液は第3法、大腸菌試験及びサルモネラ試験の前培養液は、それぞれ第3法及び第2法により調製する。

**酵素活性測定法** (i) 基質溶液 D (+) -プシコース 0.18 g を量り、水を加えて溶かし、  
更に水を加えて正確に 5 mL とする。用時調製する。

(ii) 試料液 本品約 1.0 g を精密に量り、1 mL 中に 4～10 単位を含むように、希釈液を加えて溶かして一定容量とし、試料液とする。ただし、希釈液は pH8.0 のリン酸緩衝液 ( $0.05\text{mol}/\text{L}$ ) と塩化マグネシウム試液 ( $1\text{mol}/\text{L}$ ) を 199 : 1 の割合で混和した液を用いる。

(iii) D (-) -フルクトース標準液 D (-) -フルクトース約 0.27 g を精密に量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする。標準原液を水で 1.5 倍、3 倍、5 倍及び 15 倍に正確に希釈し、1 mL 中に D (-) -フルクトース ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 180.16$ )

10 $\mu$ mol、5 $\mu$ mol、3 $\mu$ mol 及び 1 $\mu$ mol を含む 4 濃度の液を調製し、D (-) -フルクトース標準液とする。

- (iv) 操作法 試料液 0.100mL を試験管に入れ、試料液の調製に用いた希釈液 0.400mL を加えて混和し、蓋をして 50 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で 5 分間加温する。次に、この試験管に基質溶液 0.500mL を加えて混和し、50 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C で正確に 10 分間反応させた後、水浴中で 2 分間加熱する。冷後、この液に、あらかじめろ紙で付着水を除いた強酸性陽イオン交換樹脂約 100mg 及び弱塩基性陰イオン交換樹脂（遊離型）約 100mg を加えて 15 分間振とうし、メンブランフィルター（孔径 0.2 $\mu$ m）でろ過し、検液とする。ただし、強酸性陽イオン交換樹脂は、C 試薬・試液等、1. 試薬・試液、強酸性陽イオン交換樹脂の項に従い水洗したものを用いる。別に、試料液の代わりに希釈液 0.100mL を試験管に入れ、以下検液の調製と同様に操作し、対照液とする。検液、対照液及び 4 濃度の D (-) -フルクトース標準液をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ正確に量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの D (-) -フルクトース標準液のピーク面積と濃度 ( $\mu$ mol/mL) から検量線を作成する。次に検液及び対照液の D (-) -フルクトースのピーク面積を測定し、検量線から検液及び対照液中の D (-) -フルクトースの濃度 ( $\mu$ mol/mL) をそれぞれ求め、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 D (-) -フルクトース 1 $\mu$ mol を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{(C_T - C_B) \times V_T}{M}$$

ただし、 $C_T$  : 検液中の D (-) -フルクトースの濃度 ( $\mu$ mol/mL)

$C_B$  : 対照液中の D (-) -フルクトースの濃度 ( $\mu$ mol/mL)

$V_T$  : 調製した試料液の容量 (mL)

M : 試料の採取量 (g)

#### 操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 約 9 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用陽イオン交換樹脂 (Ca 型)

カラム管 内径 8 mm、長さ 30cm のステンレス管

カラム温度 80 $^{\circ}$ C

移動相 水

流量 0.4mL/分

#### 試薬・試液等

##### 1. 試薬・試液

**塩化マグネシウム試液 (1 mol/L)** 塩化マグネシウム六水和物 203 g を量り、水を加え

て溶かし、1000mL とする。

**D (+) -D-グルコース**  $C_6H_{12}O_6$  [551-68-8]

本品は、白〜ごく薄い黄色の結晶性の粉末又は粉末である。

比旋光度  $[\alpha]_D^{20} = +2.0 \sim +6.0^\circ$  (0.1 g、水、10mL)

純度試験 類縁物質 本品 20mg を水 2mL に溶かし、検液とする。検液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 50mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピーク以外のピークの合計面積は、比較液の主ピークの面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 3 倍までとする。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 5~10 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用アミノプロピル基化学結合型シリカゲル

カラム管 内径 3~8 mm、長さ 15~30cm のステンレス管

カラム温度 35~40 $^\circ$ C の一定温度

移動相 アセトニトリル/水混液 (7 : 3)

流量 D (+) -D-グルコースの保持時間が 6~9 分になるように調整する。

**D (-) -D-フルクトース**  $C_6H_{12}O_6$  [57-48-7]

本品は、無〜白色の結晶又は粉末である。

比旋光度  $[\alpha]_D^{20} = -90.0 \sim -94.0^\circ$  本品約 4 g を精密に量り、アンモニア試液

0.2mL 及び水 80mL を加えて溶かし、30 分間放置した後、水を加えて正確に 100mL とし、旋光度を測定する。

純度試験 (1) 溶状 澄明 (1.0 g、水 20mL)

(2) 乾燥減量 2.0% 以下 (減圧、18 時間)

(3) 類縁物質 本品 20mg を水 2mL に溶かし、検液とする。検液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 50mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピーク以外のピークの合計面積は、比較液の主ピークの面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 3 倍までとする。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 5~10 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用アミノプロピル基化学結合型シリカゲル

カラム管 内径 3~8 mm、長さ 15~30cm のステンレス管

カラム温度 35～40℃の一定温度

移動相 アセトニトリル／水混液（7：3）

流量 D（－）ーフルクトースの保持時間が4～7分になるように調整する。

(別紙2)

## プシコースエピメラーゼ成分規格設定の根拠 (案)

プシコースエピメラーゼの成分規格は、米国の GRAS Notice (No. 624) (GRAS 規格) の D-allulose 3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30 expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 及び第9版食品添加物公定書 (公定書) の他の酵素品目の成分規格を参照し設定した。

### 名称

GRAS 規格の名称を参照し、和名は「プシコースエピメラーゼ」、英名は「Psicose Epimerase」とした。また、和名別名として「アルロースエピメラーゼ」、英名別名として「Allulose Epimerase」を加えた。

### CAS 登録番号

CAS 登録番号は、GRAS 規格に記載はないが、D-Psicose 3-epimerase の CAS 登録番号である 1618683-38-7 とした。

### 定義

公定書の他の酵素品目の定義の記載を参照し、本品目の基原及び本質として「細菌 (*Arthrobacter globiformis* に限る。) が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 W3110 株に限る。) の培養物から得られた、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素である。」とし、含まれる可能性のある食品又は添加物についても示した。

### 酵素活性

酵素活性は、GRAS 規格では「1g 当たり 500 単位以上」であるが、GRAS 規格申請以降に、より安定性の高い製品としたため、製品の実態に合わせて「本品は、1g 当たり 230 単位以上の酵素活性を有する。」とした。

### 性状

性状は、GRAS 規格では「液体又は粉末である。」と設定しており、製品の色についての記載も加え、「本品は、淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末である。」とした。

### 確認試験

公定書の他の酵素品目の確認試験に倣い、「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

公定書の他の酵素品目の純度試験に準じて、鉛とヒ素の項目を設定した。

##### (1) 鉛

GRAS 規格では、 $5\mu\text{g}/\text{g}$  以下と設定されており、公定書の他の酵素品目の鉛の項においても、 $5\mu\text{g}/\text{g}$  以下と設定されていることから、本規格案では、「鉛 Pb として  $5\mu\text{g}/\text{g}$  以下 (0.80 g、第 1 法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フレイム方式)」とし、他の酵素品目の記載と同様に、製品の溶解が困難な場合を想定し、ただし書きを記載した。

##### (2) ヒ素

GRAS 規格では、ヒ素は設定されていないが、公定書の他の酵素品目の純度試験に準じ、ヒ素の項として「As として  $3\mu\text{g}/\text{g}$  以下 (0.50 g、第 5 法、標準色 ヒ素標準液 3.0mL、装置 B)」とした。

#### 微生物限度

GRAS 規格では、大腸菌群、大腸菌及びサルモネラが設定されているが、公定書の他の酵素品目の微生物限度試験に準じて、生菌数、大腸菌及びサルモネラを設定した。また、微生物限度値及び試料液や前培養液の調製法も公定書の他の酵素品目に準じて設定した。

#### 酵素活性測定法

本規格案の酵素活性測定法は、GRAS 規格と同じ原理によるものであり、本品を D (+) - プシコースに作用させ、生成する D (-) - フルクトースを液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、酵素活性単位として求める方法である。活性の正確な評価のため、本品が最も高い基質特異性を示す D (+) - プシコースを基質とし、また、公定書既収載のグルコースイソメラーゼの活性試験法第 2 法と同様に、酵素反応で増加する D (-) - フルクトース量を液体クロマトグラフィーにより測定し、1 分間に  $1\mu\text{mol}$  の D (-) - フルクトースを増加させる酵素量を 1 単位として活性を算出するものである。

なお、酵素活性測定法の計算式は、下記の A/B に基づき設定した。

$$\begin{aligned} A &= \text{反応で 1 分間に生じた D (-) - フルクトース} (\mu\text{mol}) \\ &= (C_T - C_B) (\mu\text{mol}/\text{mL}) \times 1.000 (\text{mL}) (=0.100+0.400+0.500) / 10 (\text{分}) \end{aligned}$$

$$B = \text{反応に用いた酵素} (\text{g}) = M (\text{g}) \times 0.100 (\text{mL}) / V_T (\text{mL})$$

酵素活性 (単位/g)

$$= A/B = 1 \text{ 分間に生じた D (-) - フルクトース} (\mu\text{mol}) / \text{用いた酵素の量} (\text{g})$$

ただし、 $C_T$  : 検液中の D (-) - フルクトースの濃度 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )

$C_B$  : 対照液中の D (-) - フルクトースの濃度 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )

$V_T$  : 調製した試料液の容量 (mL)

$M$  : 試料の採取量 (g)

#### 試薬・試液

成分規格の酵素活性測定法で用いるD (+) -ブシコース及びD (-) -フルクトースについて、試薬規格を新たに設定した。

プシコースエピメラーゼの規格対比表

	本規格(案)	米国、GRAS Notice (No. 624)
名称(英名)	プシコースエピメラーゼ Psicose Epimerase (別名 Allulose Epimerase、 アルロースエピメラーゼ)	D-allulose 3-epimerase from <i>Arthrobacter globiformis</i> M30 expressed in <i>Escherichia coli</i> K-12 W3110
定義	本品は、細菌( <i>Arthrobacter globiformis</i> に限る。)が本来有するプシコースエピメ ラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> K-12 W3110 株に限 る。)の培養物から得られた、フルクトー スとプシコースを相互に異性化する酵素で ある。食品を含むことがある。	—
酵素活性	1 g 当たり 230 単位以上	1 g 当たり 500 単位以上
性状	淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末	液体又は粉末
確認試験	酵素活性を示す。	—
純度試験		
鉛	5 µg/g 以下	5 µg/g 以下
ヒ素	3 µg/g 以下	—
微生物限度		
生菌数	1 g につき 50000 以下	—
大腸菌群	—	1 g につき 10000 以下
大腸菌	認めない(第3法)	認めない
サルモネラ	認めない(第2法)	認めない
酵素活性測定法	HPLC	HPLC