

5 資 審 第 42 号
令和5年10月25日

農林水産大臣 宮下 一郎 殿

農業資材審議会長 君嶋 祐子

飼料添加物の製造の方法等の基準及び成分の規格の改正に係る諮問について
(答申)

令和5年2月6日付け4消安第5743号をもって諮問のあった標記の件について、下記
のとおり答申する。

記

遺伝子組換え技術によって得られた *Trichoderma reesei* から産生されるキシラナーゼを飼料添加物として製造等することができるよう、法第3条第1項の規定に基づき定められたキシラナーゼの製造の方法等の基準及び成分の規格について、当該キシラナーゼの基準及び成分の規格を追加する別紙の改正を行うことは適当と認める。

キシラナーゼについて、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）において次の事項を基準及び成分の規格として定めること（下線部が改正部分）。

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
飼料一般の製造方法の基準

キシラナーゼ（その2）は、豚、鶏、うずらを対象とする飼料（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

ア 製造用原体

(イ) 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30,000キシラン糖化力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、茶褐色の液体で、特異な臭いを有する。
- ② 本品の水溶液（1→100）のpHは、3.5～4.5である。
- ③ 本品は、pH6.0～6.5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、重金属試験法第2法により試料溶液を調製し、鉛標準液5.0mLを用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くてはならない(50μg/g以下)。
- ② ヒ素 キシラナーゼ（その1）製造用原体の純度試験②を準用する。
- ③ 抗菌活性 キシラナーゼ（その1）製造用原体の純度試験③を準用する。

強熱残分 10.0%以下（1.0g）

酵素力試験 キシラン糖化力試験法第2法により試験を行う。

試料溶液の調製 キシラナーゼ約7,500キシラン糖化力単位を含む本品を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、25mL全量フラスコに入れ、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）を標線まで加

えて 25mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.2～0.4 の範囲になるように同緩衝液で正確に希釈し、試料溶液とする。

(i) 製造の方法の基準

Trichoderma reesei に属する菌株を宿主としたキシラナ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、さらに遠心分離してからその上清をろ過し、菌体を除去して製造すること。

(ii) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(iii) 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）

(1) 成分規格

本品は、キシラナーゼ（その 2）製造用原体にソルビトール、安息香酸ナトリウム及び水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、表示キシラン糖化力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験 キシラン糖化力試験法第 2 法により試験を行う。

試料溶液の調製 キシラナーゼ（その 2）製造用原体の酵素力試験を準用する。

(2) 保存の方法の基準

キシラナーゼ（その 2）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(3) 表示の基準

キシラナーゼ（その 2）製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤（その 2）

(7) 成分規格

本品は、キシラナーゼ（その２）製造用原体に、賦形物質を混和した粉末である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示キシラン糖化力単位の85～170%を含む。

酵素力試験 キシラン糖化力試験法第２法により試験を行う。

試料溶液の調製 キシラナーゼ約 9,300 キシラン糖化力単位を含む本品を有効数字３桁まで量り、その数値を記録し、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）を加えて溶かし、室温で 20 分間攪拌した後、50mL 全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて 50mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.2～0.4 の範囲になるように同緩衝液で正確に希釈し、試料溶液とする。

(4) 保存の方法の基準

キシラナーゼ（その２）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(7) 表示の基準

キシラナーゼ（その２）製造用原体の表示の基準を準用する。

3. 飼料添加物一般の試験法

(14)酵素力試験法

① キシラン糖化力試験法

（ii）第２法

基質溶液の調製

キシラン 1.00 g（0.95～1.04g）を量り、60℃のクエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）80mL を加えて攪拌しながら徐々に加えた後、沸点まで熱して溶解し、攪拌しながら室温になるまで徐々に温度を下げる。その後 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。

保管する場合は-20℃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。基質溶液 1.8mL をマイクロピペットを用いて量り、試験管に入れ、50℃の水浴中に 5 分間放置した後、マイクロピペットを用いて試料溶液 0.2mL を加え、

よく振り混ぜ、50℃の水浴中で正確に5分間加熱する。水浴から試験管を取り出し、3,5-ジニトロサリチル酸試液 3.0mLを加え、よく振り混ぜた後、試験管を100℃の水浴中で正確に5分間加熱し、その後21℃の水浴中で5分間冷却し、試験反応液とする。この溶液につき、波長 540nm における吸光度 A_T を測定する。

別に、基質溶液 1.8mL をマイクロピペットを用いて量り、試験管に入れ、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）0.2mLを加え、よく振り混ぜた後、3,5-ジニトロサリチル酸試液 3.0mLを加え、以下試験反応液の調製と同様に操作して得た溶液を試験対照液とし、波長 540nm における吸光度 A_B を測定する。

$$\text{1g 中のキシラン糖化力単位} = \frac{(A_T - A_B) \times F \times V \times Z \times 0.299}{W \times 3}$$

F：検量線から求めた吸光度差 1 に対応するキシロース濃度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）

V：試料溶液の定容量（mL）

W：試料採取量（g）

Z：希釈倍率

検量線の作成

デシケーター（シリカゲル）中で24時間以上乾燥したキシロース 150mg を 0.1mg の桁まで量り、その数値を記録し、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）を加えて溶かし、100mL の全量フラスコに入れ、さらにクエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）を標線まで加えて、100mL とし、標準原液とする。この標準原液 1 mL は、キシロース（ $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ）10 μmol を含む。

標準原液の一定量を試験管に入れ、標準液 S1 とする。別に、標準原液の一定量をそれぞれ試験管に入れ、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.05mol/L、pH5.3）で正確に2倍、3倍、5倍希釈し、標準液 S2、S3、S4 を調製する。基質溶液 1.8mL をマイクロピペットを用いて量り、試験管に入れ、マイクロピペットを用いて各標準液 0.2mL をそれぞれ加え、さらに全量ピペットを用いて 3,5-ジニトロサリチル酸試液 3mL を加え、よく振り混ぜた後、100℃の水浴中で正確に5分

間加熱した後、21℃の水浴中で5分間冷却する。これらの溶液につき、波長 540nm における吸光度 A_{S1} 、 A_{S2} 、 A_{S3} 及び A_{S4} を測定する。

別に、基質溶液 1.8mL をマイクロピペットを用いて量り、試験管に入れ、マイクロピペットを用いてクエン酸ナトリウム緩衝液 (0.05mol/L、pH5.3) 0.2mL をマイクロピペットを用いて加え、さらに全量ピペットを用いて 3,5-ジニトロサリチル酸試液 3 mL を加え、以下同様の方法で操作し、吸光度 A_{S0} を測定する。

吸光度差($A_{S1}-A_{S0}$)、($A_{S2}-A_{S0}$)、($A_{S3}-A_{S0}$)、($A_{S4}-A_{S0}$)を縦軸に、キシロース濃度 ($\mu\text{mol/mL}$) を横軸にとり、検量線を作成する。

4. 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法の規定

(2) 試薬・試液

クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2)

(略)

クエン酸ナトリウム緩衝液 (0.05mol/L、pH5.3)

クエン酸 10.5g (10.45~10.54g) に水 800mL を加えて溶かし、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH5.3 に調整した後、水を加えて 1000mL とする。