

Figure 1. Chemical structure and $^1\text{H-NMR}$ spectra of atractylon and crude drug extracts. (A) Chemical structure and (B) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of atractylon. A typical $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the methanol extract of (C) *Atractylodis Rhizoma* or (D) *Atractylodis Lanceae Rhizoma* are also shown.

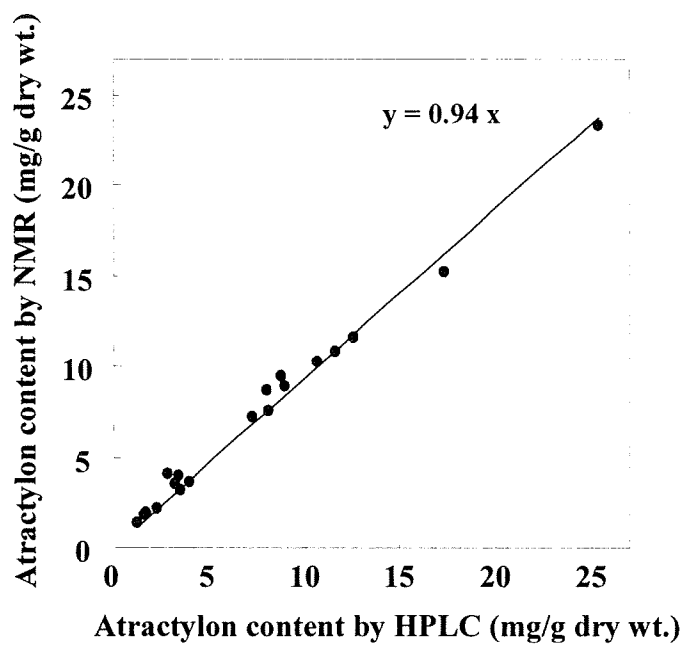


Figure 2 Relationship between atractylon content estimated by qHNMR and the content determined by HPLC.

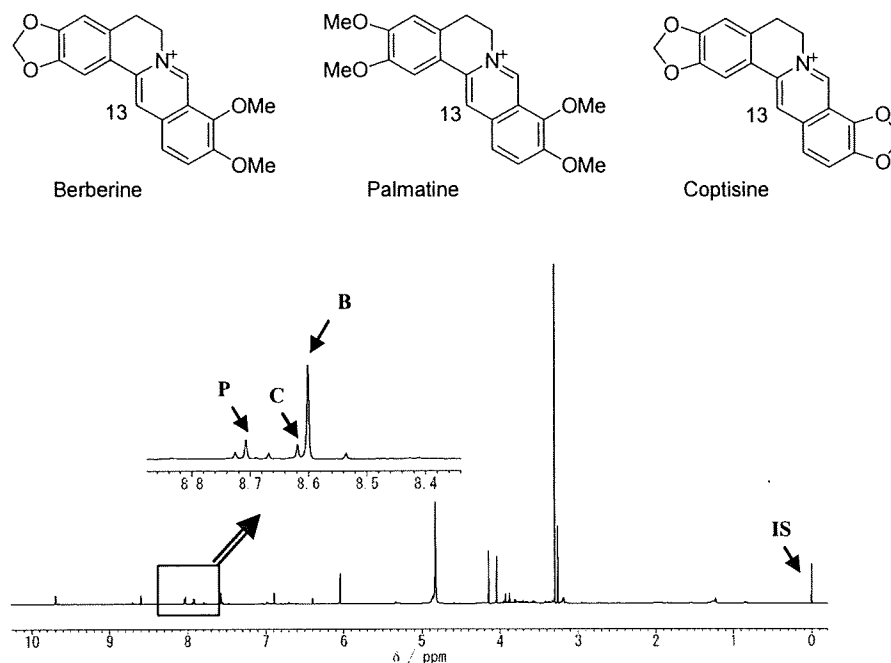


Figure 3 Chemical structures of protoberberine alkaloids and ¹H-NMR spectra of methanol extract of Coptidis Rhizoma extracts. Arrows indicate H-13 proton of each compound, B : berberine, C: coptisine, P: palmatine, IS: internal standard (HMD).

Table 1 Purities of the protoberberine alkaloid reagents estimated by qHNMR

Compound	Grade	Purity claimed by the manufacturer	Purity estimated by qHNMR (%)
Berberine chloride	Reagent grade	97	94.3
Berberine chloride	Reagent grade (for crude drug evaluation)	99.8	90.3
Berberine chloride	The Japanese Pharmacopoeia Reference Standard	90.6	90.4
Palmatine chloride	Reagent grade	97	81.8
Palmatine chloride	Reagent grade (for crude drug evaluation)	99.9	92.6
Coptisine chloride	Reagent grade (for crude drug evaluation)	One spot by TLC	90.9

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究

6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 21 年度分担研究報告書

既存添加物の成分と基原に関する研究

—既存添加物クワ抽出物の基原の解析—

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨

既存添加物製品の基原植物の確認は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物クワ抽出物は、天然由来の製造用剤であり、その基原はクワ科クワ (*Morus bombycis* Koidz.) の根茎の皮と記載されているが、既存添加物製品が実際にどのクワ品種の成分組成に一致または類似するのか確認されていなかった。本研究では、数種の国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物から抽出物を調製して成分組成を調べ、既存添加物クワ抽出物製品および生薬ソウハクヒ製品の成分組成と比較することにより基原植物の検討を行った。

A. 研究目的

既存添加物名簿には、天然植物由来の抽出物が多数収載されており、既存添加物名簿¹⁾の定義や既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質の項に、その基原植物が記載されている。しかしながら、既存添加物として提出される製品の中には、これらに記載の基原とは異なる植物種が原料と推定される製品もある。既存添加物において原料植物はその根幹となるものであり、種類が異なれば、その抽出物である製品の成分組成をはじめ、品質や有効性・安全性も異なる可能性がある。したがって、既存添加物製品の基原植物を確認することは、品質や安全性確保の上から極めて重要である。

既存添加物クワ抽出物は、天然由来の製造用剤である。その基原・製法・本質²⁾として、「クワ科クワ (*Morus bombycis* Koidz.) の根茎の皮より、水、温時エタノール、又は室温時～微温時アセトンで抽出して得られたものである。主成分はフラボノイド及びスチルベン誘導体等である。」と記載されている。一方、生薬ソウハクヒ（桑白皮）も同様にクワ根皮を基原

とするが、「本品はマグワ *Morus alba* Linné (*Moraceae*) の根皮である。」と定義³⁾され、既存添加物の基原とされるヤマグワ *M. bombycis* とは異なる植物種が記載されている。また、成分組成研究⁴⁾から中国市場ソウハクヒにはマグワ *M. alba* 以外にモウコグワ *M. mongolica*, やシマグワ *M. australis* が基原と推定される製品もあると報告されており（表 1）、さらにクワ品種は互いに交雑が可能である。したがって、既存添加物製品が実際にどのクワ品種の成分組成に一致または類似するのか確認しておく必要がある。

そこで本研究では、数種の国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物から抽出物を調製して成分組成を調べ、既存添加物クワ抽出物 3 製品および生薬ソウハクヒ 4 製品の成分組成と比較することにより基原植物の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

既存添加物クワ抽出物 (Mulberry bark extract) は日本食品添加物協会を通じ、3 製

品を入手した。生薬ソウハクヒは国内生薬企業4社市販の各1製品(計4製品,いずれも中国産)を購入した。

クワ栽培品種については,(独)農業生物資源研究所つくば,大わし地区,試験用桑園より,基原種の明らかな株の根を採取した(表2)。国内では,一般的にクワは台木への栽培品種の接ぎ木によって育成されており,台木は接ぎ木とは異なり品種の特定ができない。そこで,接ぎ木由来で栽培品種が明らかな根と,台木由来で栽培品種不明な根を別々に採取した。根は採取後水洗し,根皮を剥皮して乾燥し,凍結乾燥したものをシリカゲルとともに密封保存した。

B-2. 試料溶液の調製

既存添加物製品は,各試料1.0 mgを1 mLの50v/v%エタノール溶液に溶解し,30秒間の攪拌を2回行った。各溶液を10,000 rpmで2分遠心し,上清をLC/MS分析試料とした。

生薬製品およびクワ根皮乾燥品は,約1 cm x 5 mmの細片に切断した後,各試料0.5 gをスクリー栓付試験管に入れ,50 v/v%エタノール溶液3 mLを加えて密栓し,60°Cで3時間加温した。得られた溶液を,10,000 rpmで2分遠心し,上清を50 v/v%エタノール溶液で5倍希釈し,LC/MS分析試料とした。

B-3. LC/MS分析

装置:高速液体クロマトグラフ/質量分析計

(LC/MS): Waters社製 LC/MS system (Alliance 2695, 2996 photodiode array detector, Quattro Micro triple- quadrupole mass spectrometer)

LC条件: ODSカラム(2.1 mm i. d. x 150 mm, 3 μm), 流速0.3 mL/min, カラム温度30 °C, 移動相0.1%ギ酸/アセトニトリル, PDA検出器200-600 nm, 試料導入量10 μL

MS条件: ソース温度120 °C, 脱溶媒温度

350 °C, 脱溶媒ガス流量400 L/hr, Coneガス50 L/hr, キャピラリー電圧3.0 kV, Cone電圧10~60 V, Mode ESI neg./pos., Scan m/z 100-1000, SIR(表3)

B-4. 主成分分析

16種の主要ピーク(表3, 図1, 図2)のLC/MS(SIR測定)ピーク面積値を説明変数として,主成分分析を行った(図3)。

多変量解析ソフトにはJMP7を用いた。

本研究では成分組成の差の検出を目的としたため,試料の濃度や成分ごとのイオン化率の差の影響を除く目的で,各試料および各ピークの最大ピーク面積値が100となるよう補正した値を主成分分析に用いた。

C. 結果及び考察

C-1. 各種クワ由来試料の成分分析結果

同じ栽培品種および製品の種類ごとにクロマトグラムが類似したため,各々代表的な例を図1に示した。国内クワ品種標準植物の接ぎ木由来の根皮抽出物を調製してHPLCで比較したところ,*M. bombycis*(2栽培品種),*M. alba*(2栽培品種)では各品種毎に成分組成の特徴が認められた。

既存添加物製品の成分組成をこれらと比較したところ,既存添加物製品3種はほぼ類似した組成を示したが,既存添加物の基原とされるヤマグワ*M. bombycis*より,国内でマグワ*M. alba*とされている品種の根皮抽出物の組成に類似していた。

次に,生薬ソウハクヒ4製品(中国産)から調製した抽出物の成分組成を調べたところ, No. 3のみ他と少し異なる組成を示したものの,4製品はいずれも添加物製品では認められない共通成分(Peak 16)を含有し,かつ既存添加物製品とは異なる組成を示した。生薬ソウハクヒの基原は*M. alba*と定義されているが,国内で*M. alba*と考えられている栽培品種の根皮と生薬製品とは組成が異なっていた。

C-2. 主成分分析の結果

16種の主要ピークのLC/MS(SIR測定)ピーク面積値を用い、主成分分析を行った(図3)。国立衛研内クワ栽培品種の根皮抽出物の比較では、マグワ *M. alba* とその交雑種(*M. alba* × *M. latifolia*) とで明確な区別はできなかったものの、これら品種とヤマグワ *M. bombycis* との間では区別が可能であった。既存添加物製品は、ヤマグワよりマグワおよびその交雑種の検出位置に近かった。生薬製品は、国内クワ栽培品種の根皮抽出物および既存添加物製品とは検出位置が異なり、中でもHPLC分析で他製品とは異なる組成を示したNo. 3のみ、離れた位置に検出された。主成分分析により各試料の成分組成の差を明瞭に検出することができた。

D. 結論

既存添加物製品の基原植物の確認は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。そこで本研究では、数種の国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物から抽出物を調製して成分組成を調べ、既存添加物クワ抽出物3製品および生薬ソウハクヒ4製品の成分組成と比較することにより基原植物の検討を行った。その結果、既存添加物クワ抽出物製品の基原は、国内でマグワ *M. alba* とされている栽培品種またはその交雑種と推定された。しかしながら、中国産クワを原料とする生薬ソウハクヒ製品とは成分組成が異なったことから、今後さらにクワ品種の形態学的、遺伝学的および化学的な検討が必要だと考えられる。

E. 参考文献

1. 厚生省告示第210号“既存添加物名簿”平成8年4月16日(1996)
2. 厚生省生活衛生局長通知“別添1 既存添加物名簿収載品目リスト”(平成8年5月23日)。衛化第56号(1996)
3. 厚生省告示第285号“第十五改正日本薬局方”平成18年3月31日(2006)
4. Nunome, S., *et al*, Studies on the Quality of Mulberry Bark (1), Natural Medicines, 48, 71-74 (1994)

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 多田敦子, 石附京子, 小山朗夫, 深井俊夫, 秋山卓美, 山崎 壮, 河村葉子, 既存添加物クワ抽出物中の成分と基原の検討, 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 2009. 10 (函館)

表1 クワの品種

	和名	学名	備考
1	ヤマグワ	<i>Morus bombycis</i> Koidzu.	既存添加物クワ抽出物 産地: 日本原産品種。(2000年以上前に大陸から渡ってきた他の品種と、既に関連していると考えられる。国内雑種) 他、朝鮮、中国、サハリン。日本の養蚕。
2	マグワ、カラヤマグワ	<i>Morus alba</i> Linne	生薬 桑白皮(ソウハクヒ) ホワイトマルベリー(一般飲食物添加物・マルベリー色素、健康食品) 産地: 主に中国、朝鮮半島に自生または栽培、中国の養蚕。日本でも養蚕用としてよく利用される。
3	ログワ	<i>Morus latifolia</i> Poir.	産地: 中国、日本でも養蚕用としてよく栽培される。
4	モウコグワ	<i>Morus mongolica</i>	産地: 中国
5	シマグワ	<i>Morus australis</i> Poir.	産地: 九州以南、沖縄本島、南西諸島、台湾
6	オガサワラグワ	<i>Morus boninensis</i> Koidzu.	希少 産地: 小笠原諸島
8	クロミグワ	<i>Morus nigra</i> Linne	ブラックマルベリー(一般飲食物添加物・マルベリー色素、健康食品) 産地: 南西アジア
9	Red mulberry	<i>Morus rubra</i> L..	産地: 北米、カナダ など

表2 クワ栽培品種 採取試料

学名		No.	栽培品種名
<i>Morus bombycis</i> Koidzu.	ヤマグワ	1	剣持
		2	ゆきしのぎ
<i>Morus alba</i> Linne	マグワ、カラヤマグワ	1	一ノ瀬
		2	改良鼠返
<i>Morus alba</i> Linne x <i>Morus latifolia</i> Poir.	マグワ x ログワ	1	はやてさかり
		2	しんいちのせ



表3 各ピークのLC/MSによるSIR測定条件

Peak	RT(min)	ESI	m/z
1	5.5	+	569.1
2	8.1	+	451.1
3	11.6	+	245.2
4	17.4	+	327.1
5	21.5	+	627.1
6	23.8	+	693.2
7	26.4	+	761.3
8	30.4	+	421.2
9	14.4	-	241.0
10	22.0	+	560.9
11	25.2	-	693.1
12	31.7	+	437.1
13	6.0	-	353.0
14	8.5	-	579.3
15	22.3	+	563.0
16	28.7	-	295.2

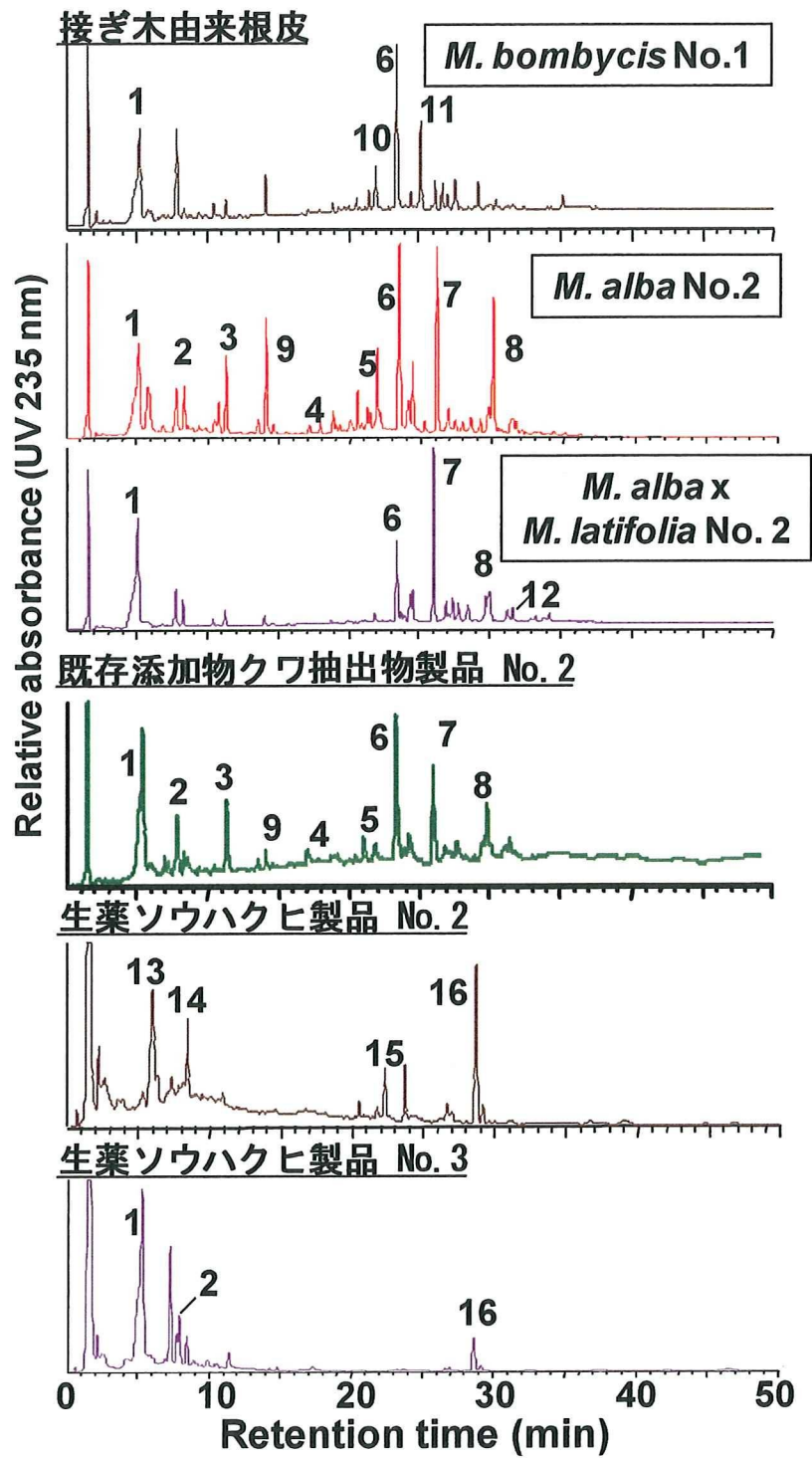


図1 HPLCによる成分組成の比較

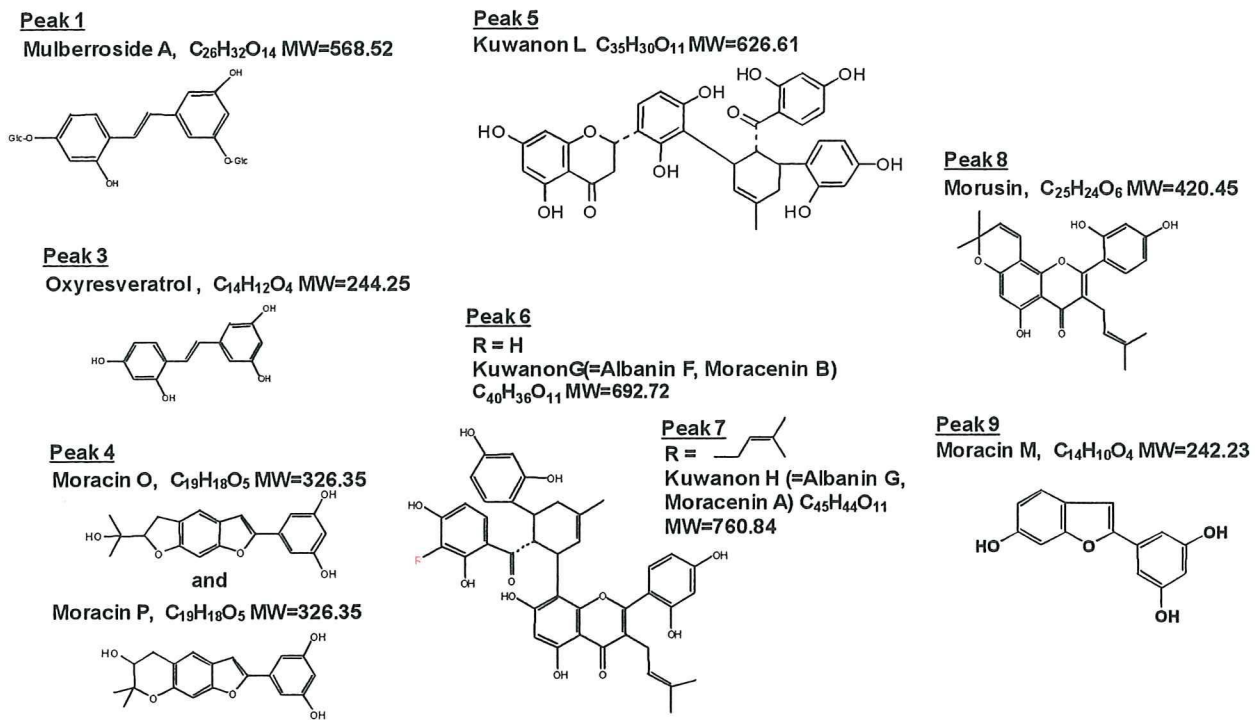


図2 クワ抽出物製品含有化合物

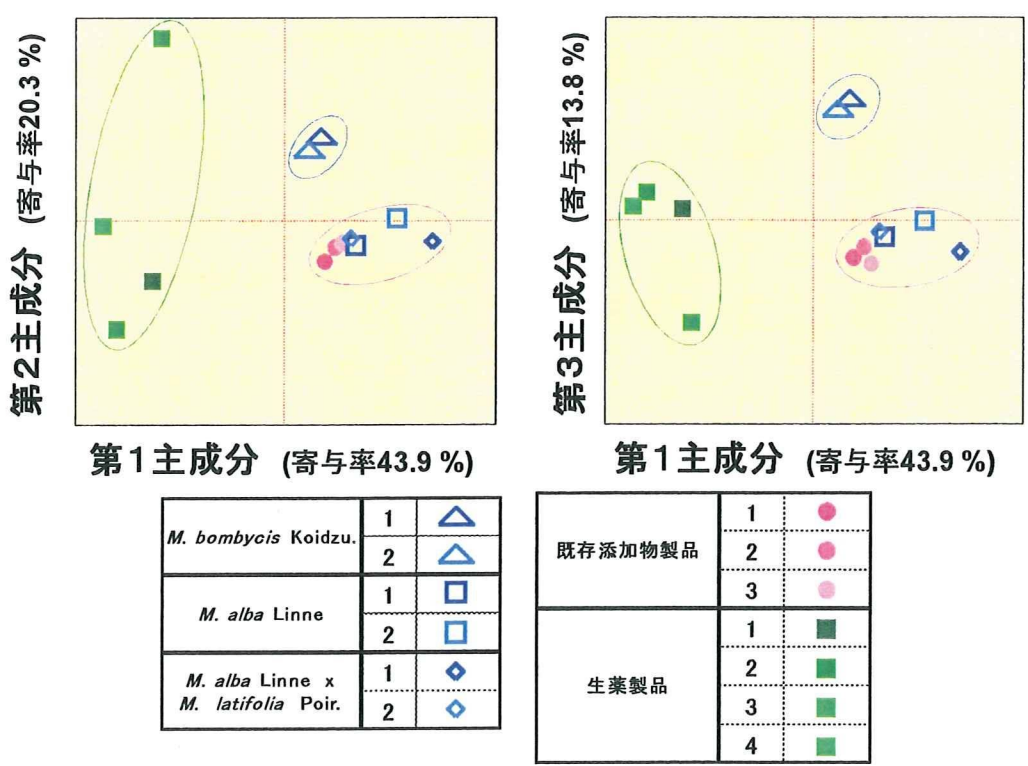


図3 主成分分析による成分組成の比較

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 21 年度分担研究報告書

食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

研究分担者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究要旨 日本では食品用酵素(すべて既存添加物)は、酵素機能を表し、酵素タンパク質(物質)を特定できる名称ではない。そのため、既存添加物名簿に含まれる酵素の多くで、一つの品目に異なる基原に由来する製品が含まれている。そこで、酵素製品に含まれるタンパク質を化学的に分析して基原生物種や菌種の確認ができれば、酵素の簡便な基原確認試験法として利用が期待できる。そこで、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼについて、日本国内で現在流通している製品を可能な限り網羅的に収集した。103 製品を試料として用い、SDS-PAGE により分析した。含有量の大きいタンパク質の分子量を求めたところ、多くの製品に関して基原によって特徴的なタンパク質分離パターンを示した。植物由来酵素では、種の確認が可能であった。細菌・真菌由来酵素では、菌種の確認が可能な例が多かったが、*Bacillus* 属のように属の確認しかできない例もあった。基原種と SDS-PAGE の分離パターンの関連に関する有用な情報が得られた。

A. 研究目的

既存添加物名簿¹⁾に含まれる酵素は2010年1月現在69品目であり、食品添加物公定書第8版²⁾には5品目が収載されている。既存添加物名簿における品目名はその添加物が持つ酵素活性に基づいた名前が付けられている。酵素の基原が指定されていないため、全く異なる生物種に由来する製品が一つの品目として収載されており、実際に多くの品目において基原の異なる様々な製品が流通している。同じ品目名でも基原によって酵素タンパク質は異なり、酵素特性も酵素活性測定法も異なることが、酵素の成分規格を作成することを困難にしており、酵素品目の多くが食品添加物公定書未収載である要因の一つにもなっている。また、微生物に由来する製品の場合、生物種としては同じであっても菌株が異なる製品も存在する。異なる生物種や株に由来す

る酵素製品は酵素特性が違う場合が多く、食品製造においては区別して用いられる場合が多い。

酵素製品の特性は基原に関する情報や酵素活性などにより判断されるが、化学的分析によっても確認できることが望ましい。分析対象物質としてまず考えられるのがタンパク質である。食品添加物として使用される酵素製品は、一般に酵素タンパク質だけを高度に精製したものではなく、酵素生産菌の培養液や原料生物から酵素タンパク質を含む画分を抽出したものか、もしくは簡単な分画のみを行って調製したものである。酵素製品には安定化などの目的のために、塩類や賦形剤として多糖類などが添加されている場合があるが、基原生物に由来しないタンパク質が安定化剤として添加されている可能性は極めて低い。したがって、製品のタンパク質組成は基原や

製法の違いを反映していると考えられる。

日本国内で現在流通する酵素製品含有タンパク質の多様性については、これまでに調査されていない。そこで、タンパク質の分子量による分離パターンを簡便に分析できる SDS-PAGE を使って市場の酵素製品を分析し、タンパク質分離パターンの特徴や差異からその多様性を検討した。また、基原生物種と分離パターンに齟齬がないか、また基原の判定法としての可能性についても検討した。

B. 研究方法

1. 試料

α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼの 8 品目について、日本国内で現在流通している製品を基原の情報とともに日本食品添加物協会を通じて入手した。内訳は α -アミラーゼ 8 基原 18 試料、 β -アミラーゼ 3 基原 6 試料、グルコアミラーゼ 3 基原 11 試料、カタラーゼ 3 基原 5 試料、 β -ガラクトシダーゼ 3 基原 8 試料、セルラーゼ 5 基原 12 試料、プロテアーゼ 16 基原 36 試料およびヘミセルラーゼ 3 基原 7 試料である。試料は個別の番号で呼ぶ。Table 1 に番号と基原情報を示した。なお、微生物の学名は現在の登録学名を使用した。既存添加物名簿収載品目リスト³⁾が作成された 1996 年以降に学名が変更されたものがある。そのようなものについては Table 1 に説明を付した。

2. タンパク質定量

染色液：Quick Start Bradford 1× Dye Reagent (BIO-RAD 製)

ウシ血清アルブミン (BSA) 標準液：Quick Start BSA Standard Set (1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25

and 0.125 mg/mL, BIO-RAD 製)

装置：吸光度計 V-650 (日本分光製)

BIO-RAD Quick Start Bradford Protein Assay のスタンダードアッセイ法により行った。すなわち、適切な濃度になるよう水に溶解した粉末試料または適切な濃度に水で希釈した液体試料を試験管に 20 μ L とり、1.0 mL の染色液を加え、室温で 5 分間以上置いた。ディスポーザブルキュベットに移し、595 nm における吸光度を測定した。同様に操作した BSA 標準液を用いて作成した検量線を用いて試料中のタンパク質量を計算した。

3. SDS-PAGE 分析

試料量：試料 1~37 は 1 レーンあたりタンパク質 2 μ g 相当量を、製品 38~103 は 1 レーンあたりタンパク質 3 μ g 相当量を載せた。製品 18 はこの他にタンパク質 71 μ g 相当量を載せる分析も行った。

分子量マーカー：Precision Plus Protein Standards-Unstained (BIO-RAD 製)

2×サンプルバッファー：62.5 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% Bromophenol Blue, 5% β -mercaptoethanol

装置：Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD 製)

電源：Power Supply (BIO-RAD 製)

ゲル：Ready Gel J, 10%, 12 well (BIO-RAD 製)

泳動バッファー：1× Tris/Glycine/SDS Buffer (25 mmol/L Tris, pH8.3, 192 mmol/L glycine, 1% SDS, BIO-RAD 製)

泳動条件：定電圧 (200 V), 40 分

クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液：Quick-CBB (和光純薬工業株式会社製)

試料溶液または希釈液 10 μ L を 2×サンプル

バッファー10 μ L と混合し、100°C で5分間加熱した。10 μ L をゲルに載せ、上記の条件で電気泳動し、CBB 染色を行った。

C. 結果と考察

既存添加物名簿に記載されている酵素8品目について、市場に流通する103試料を入手した。今回入手できた酵素製品の基原は多くが微生物であったが、これらの製品は液状や粉末状のものがありまた、製造方法や精製度が異なることからタンパク質含量も様々と考えられた。そこで、SDS-PAGEにおける分析タンパク質量をそろえて、分離パターンを比較しやすくするため、まず各製品のタンパク質量をBradford法により測定した。これをもとに同一ゲルで分析する試料中のタンパク質量がほぼ同じになるように調整してSDS-PAGEを行い、CBB染色によりタンパク質のバンドを検出した。ゲル濃度は普遍的である10%にした。分子量マーカーを用いて作成した標準曲線に基づいて、検出されたバンドの泳動度から推定分子量を求めた。通常は1レーンあたりタンパク質2 μ g または3 μ g 相当量の試料を載せたが、弱いバンドを観察するために、ゲルへの試料添加量を増やした分析も行った。

Figs. 1-12 にタンパク質分離パターン、Table 1 に主なタンパク質の推定分子量を示した。ただし、同一品目の基原で、パターンが一致した製品は一つに記載した。これらの結果をもとに、タンパク質分離パターンの特徴、製品間の差異、共通性と多様性の程度を検討し、基原の判定法に応用できるかどうか考察した。さらに、タンパク質のアミノ酸配列データベースであるSwiss-Protに登録されている配列との関係を考察した。下記に品目毎に述べる。

1. α -アミラーゼ (Figs. 1 and 2)

Aspergillus 属由来の製品1~7は3つのパターンに分けられた。*Aspergillus foetidus* 由来の製品1および*Aspergillus niger* および*Aspergillus oryzae* に由来する製品8は、推定分子量87 kDaと50 kDaの強いバンドが見られた。*Aspergillus niger* 由来の製品2は、64 kDaの強いバンドが見られた。*Aspergillus oryzae* 由来の製品3~7は、50 kDaの強いバンドが見られた。Swiss-Protには*A. oryzae* の α -アミラーゼとして理論的な分子量がともに52 kDaのP0C1B3とP0C1B4が登録されており、この50 kDaのバンドとの関連に興味を持たれる。

Bacillus 属由来とされる製品9~17はほぼ類似したパターンが見られた。すなわち、54 kDaに強いバンドが見られた。他の製品との区別に利用可能な大きな特徴である。Swiss-Protには*B. amiloliquefaciens* 由来の α -アミラーゼとして理論的な分子量が58 kDaの配列P00692が、そして*B. liqueniformis* の α -アミラーゼとして理論的な分子量が58 kDaの配列P06278が登録されている。*Bacillus* 属由来製品の特徴である54 kDaの強いバンドとの関連が興味深い。ただし、製品間の差異が弱いバンドの有無や分子量の差として見られ、3つのパターンに分けることができた。*Bacillus amiloliquefaciens* 由来の製品9には24 kDaのやや強いバンドが見られ、*Bacillus liqueniformis* 由来の製品10~13と*Bacillus subtilis* 由来の製品16は43 kDaの弱いバンドが見られたのに対し、*B. subtilis* 由来の製品14、15および17には確認できるバンドがなかった。

Saccharomonospora virides 由来の製品18に

は 20 kDa 以上のバンドが見られなかった。データは示していないが、71 μ g の試料を分析すると、32 kDa および 28 kDa のバンドが見られた。

以上のように、 α -アミラーゼのタンパク質分離パターンは 7 通りに分かれた。基原情報が異なる製品を分けて考えると 9 パターンである。同じ α -アミラーゼの製品でもタンパク質の組成がさまざまであることを実際に流通している製品を用いて明らかにすることができた。

SDS-PAGE の基原の判定法としての応用についても考察した。*Aspergillus* 属由来の製品については、製品 2 の分離パターンまたは製品 3~7 の分離パターンを示す試料については基原同定が可能と考えられる他、製品 1 および 8 のパターンであっても *Aspergillus* 属であることは判定できる。*Bacillus* 属由来の製品は特徴的な 54 kDa のバンドがあるため、属のレベルでの判定は可能である。*Bacillus* 属は同属内の菌が分類学上近縁であるとされており、*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* とは近縁であることが報告されている⁴⁾。それらに含まれる α -アミラーゼの分子量が類似していることはあり得るので、*Bacillus* 属内の同属異種の菌株由来の酵素を SDS-PAGE で相互区別することは困難であると予想される。

2. β -アミラーゼ (Fig. 3)

収集した製品はいずれも植物由来のものである。コムギ (*Triticum aestivum*) 由来の製品 19 および 24 は似たパターンを示した。推定分子量 55 kDa および 38 kDa の強いバンドが見られ、特に 55 kDa のバンドが強い。製品 24 はこの 2 本の他に 42 kDa のバンドも比較的強く、さらに 25

kDa にも弱いバンドが見られた。ダイズ (*Glycine max*) 由来の製品 20 および 21 では、いずれも 54 kDa と 29 kDa の強いバンドが見られた。オオムギ (*Hordeum vulgare*) 由来の製品 22 および 23 もよく似ており、54 kDa および 36 kDa の強いバンドが見られ、この 2 本のバンドの強さが同程度であった。製品 22 には 31 kDa のバンドも見られた。

Swiss-Prot にはコムギの β -アミラーゼとして理論的な分子量が 57 kDa の配列 P93954、ダイズ由来として 56 kDa の P10538、オオムギ由来として 60 kDa の P16098 が登録されている。近い位置にバンドがあるため、関連に興味を持たれる。

以上のように、 β -アミラーゼは基原の違いと一致する 3 グループに分かれた。したがって、SDS-PAGE を基原の判定法として利用できる可能性がある。ただし、弱いバンドに着目すると 5 パターンに分かれた。製品 19 と 24 の差や製品 22 と 23 の違いは栽培時の環境や製造方法により生じている可能性が推測される。

3. カタラーゼ (Fig. 4)

A. niger 由来の製品 25~27 には、それぞれ推定分子量 80 kDa, 75 kDa, 91 kDa の強いバンドが見られ、互いに異なるパターンを示した。*Micrococcus luteus* 由来の製品 28 には、57 kDa の強いバンドが見られた。ブタ (*Sus scrofa*) の肝臓由来の製品 29 には、66 kDa, 57 kDa に強いバンドが見られた。

Swiss-Prot には *A. niger* のカタラーゼとして理論的な分子量が 84 kDa の A2Q7T1 と 80 kDa の配列 P55303 が登録されており、推定分子量が近いバンドとの関連が予想される。また、*M. luteus* のカタラーゼとして分子量が 57 kDa の配列 P29422 が、ブタのカタラーゼとし

て分子量が 60 kDa の配列 P62839 が登録されている。これらも SDS-PAGE で見られたバンドの推定分子量と近い。

カタラーゼの 5 製品はすべて異なるパターンに分かれた。同じ *A. niger* でも 3 パターンを示し、多様性が大きいことが判明した。また、異なる基原で同じパターンを示すものはなく、SDS-PAGE はカタラーゼの基原の判定法として有望である。

4. β -ガラクトシダーゼ (Fig. 5)

A. oryzae 由来の製品には 2 種類のパターンが見られた。製品 30 および 31 には、推定分子量 91 kDa, 60 kDa および 53 kDa のバンドが見られ、91 kDa が最も強かった。一方、同じ *A. oryzae* 由来の製品 32 には、69 kDa および 53 kDa の 2 本の強いバンドが見られた。

Bacillus circulans 由来の製品 33 は、138 kDa, 108 kDa, 98 kDa および 83 kDa の 4 本の強いバンドが確認できた。

Kluyveromyces lactis 由来の 4 つの製品はバンドの推定分子量は共通しているが、それらの強さの異なる 3 つのパターンを示した。製品 34 は、93 kDa, 81 kDa, 48 kDa および 34 kDa のバンドが全て同程度の強さで認められた。製品 35 は製品 34 で見られた 4 本のバンドに加えて 69 kDa のバンドが見られ、93 kDa のバンドは他の 4 本のバンドより弱かった。製品 36 および 37 は 93 kDa の強いバンドが見られた。81 kDa, 69 kDa および 48 kDa のバンドは弱く、34 kDa のバンドは確認することができなかった。

このように β -ガラクトシダーゼ製品は 6 つのパターンを示し、提供された基原情報の種類以上の多様性があることがわかった。同じ基原で異なるパターンを示す製品があった

が、異なる基原で同じパターンを示す製品はなかったため、基原の判定法としての SDS-PAGE の可能性に期待が持てる。

5. グルコアミラーゼ (Fig. 6)

A. niger 由来の製品には 2 種類のタンパク質分離パターンが見られた。1 つは製品 38~41 に認められ、推定分子量 100 kDa, 75 kDa および 64 kDa のバンドが見られ、100 kDa のバンドが最も強かった。もう 1 つは同じ *A. niger* 由来の製品 42 で、64 kDa に強いバンドが見られた。Swiss-Prot には *A. niger* のグルコアミラーゼとして理論的な分子量が 66 kDa の配列 P69328 が登録されており、強弱の差はあってもすべての製品に見られた 64 kDa のバンドと関連している可能性がある。

Rhizopus oryzae 由来の製品 43 および 44, そして *Rhizopus sp.* 由来とされている製品 45~48 はすべて類似のパターンを示した。69 kDa, 62 kDa, 51 kDa および 40 kDa のバンドが見られ、69 kDa のバンドが最も強かった。*R. oryzae* 由来で分子量が 62 kDa, 52 kDa および 48 kDa の 3 種類のグルコアミラーゼをコードする P07683 が登録されている。弱いバンドで推定分子量に近いものがあり、興味深い。

以上のようにグルコアミラーゼは 3 つの分離パターンを示した。*A. niger* 由来の製品のうち製品 42 だけは強いバンドの分子量が、*Rhizopus* 属由来の製品 43~48 の強いバンドの分子量と近かったが、製品 42 も *Rhizopus* 属由来の製品とを並べて電気泳動することで異なる泳動パターンであることを確認できる。

R. oryzae 由来の製品と *Rhizopus sp.* 由来とされている製品はすべて同じパターンを示した。製品 45~48 の菌種の同定に興味を持たれるが、現在得られている情報だけでも、*A.*

niger は種として, *Rhizopus* 属は属として SDS-PAGE による基原判定が可能と考えられる。

6. セルラーゼ (Fig. 7)

A. niger 由来のセルラーゼには 2 種類のタンパク質分離パターンが見られた。1 つは製品 49 および 50 に見られ, 推定分子量 57 kDa, 40 kDa, 37 kDa および 25 kDa のバンドが観察された。もう 1 つのパターンを示したのは製品 51 であり, 57 kDa, 50 kDa, 42 kDa, 26 kDa および 18 kDa のバンドが見られ, 57 kDa のバンドが最も強かった。

Pycnoporus coccineus 由来の製品 52 は, 30 kDa, 27 kDa, 23 kDa および 18 kDa の 4 本の強いバンドが見られ, 30 kDa のバンドが最も強かった。

Trichoderma 属由来の製品はいずれも 60 kDa 付近の 2 本の強いバンドが特徴的である。大きく 2 つのグループに分けることができる。1 つは 61 kDa と 55 kDa の強いバンドが見られるグループで, 製品 54, 56, 59 および 60 である。これらは, 細かく見ると弱いバンドの違いでさらに 3 つのパターンに分類できる。*Trichoderma longibrachiatum* 由来の製品 54 と *Trichoderma reesei* 由来の製品 56 には 61 kDa と 55 kDa のバンドのみが観察された。*Trichoderma viride* 由来の製品 59 には 50 kDa および 16 kDa のバンドが見られ, 製品 60 には, 29 kDa, 23 kDa および 16 kDa のバンドが見られた。もう 1 つのグループは, 58 kDa と 54 kDa の強い 2 本のバンドが見られたグループで, 製品 53, 55, 57 および 58 である。これらは, 細かく見ると弱いバンドの違いでさらに 4 つのパターンに分類できる。*T. longibrachiatum* 由来の製品 53 は他に 16 kDa

のバンドが見られた。*T. reesei* 由来の製品 55 は 58 kDa および 54 kDa 以外にバンドが認められなかった。同じ *T. reesei* 由来の製品 57 は他に 23 kDa および 16 kDa のバンドが見られた。製品 58 は 23 kDa のバンドが見られた。

以上のように, セルラーゼ製品は 5 グループまたは 10 パターンに分かれた。基原の種類以上の多様性がある。

Trichoderma 属由来の製品は種名とは関係なく 2 グループに分かれていたものの, 属と泳動パターンとの関係は明白であり, セルラーゼについては属のレベルでの基原判定が可能である。ただし, 製品 51 と *Trichoderma* 属由来の製品とはよく似ており, 基原の判定法として使用するには標品が必要であろう。

7. プロテアーゼ (Figs. 8–11)

Aspergillus 属由来の製品は下記のように 4 つのグループまたは 6 つのパターンに分けることができた。*Aspergillus melleus* 由来の製品 61 および 62 には, 29 kDa に強いバンドが見られ, 32 kDa, 27 kDa および 19 kDa に弱いバンドが観察された。*A. niger* 由来の製品 63～65 には, 40 kDa に強いバンドが見られた。*Aspergillus phoenicis* 由来の製品 74 も同じパターンである。*A. oryzae* 由来の 66～70, 72 および 73 と *Aspergillus* sp. 由来とされる製品 75 は, 31 kDa, 22 kDa および 20 kDa のバンドが共通に見られる似たパターンを示した。製品 67, 68 および 70 と *Aspergillus* sp. 由来の製品 75 は上述の 3 本以外に強いバンドがなく, 製品 66, 72 および 73 には 47 kDa のバンドがあり, 製品 69 には 44 kDa のバンドが認められた。同じ *A. oryzae* 由来でも製品 71 だけは異なるパターンを示した。47 kDa および 26 kDa にバンドが見られた。

Bacillus 属由来の製品は大きく 5 つのグループに分けることができた。まず, *B. amyloliquefaciens* 由来の製品 76 および 78, *B. subtilis* 由来の製品 85 および 86 は 54 kDa の強いバンドが認められた, このグループの中でも弱いバンドに差異があった。33 kDa, 27 kDa および 18 kDa のバンドのいずれかが見られ, 製品 76 および 78 では 27 kDa のバンドが, *B. subtilis* 由来の製品 85 では 27 kDa および 18 kDa のバンドが, 製品 86 では 33 kDa, 27 kDa および 18 kDa のバンドが見られた。次に, *Bacillus* sp.由来の製品 83 と *B. subtilis* 由来の製品 87 および 88 が同じパターンを示し, 27 kDa, 24 kDa および 18 kDa のバンドが観察された。次に, *B. licheniformis* 由来の製品 77 および 82, *Bacillus* sp. 由来の製品 84 はいずれも 28 kDa のバンドのみが見られた。4 番目のパターンを示したのは *Bacillus clausii* 由来の製品 79 であり, 26 kDa にバンドが見られた。最後に, *B. licheniformis* 由来の製品 80 および 81 には, 27 kDa および 22 kDa にバンドが見られた。このように, グループ内での差異も考慮すると 7 パターンであった。

製品 89~96 は基原の違いとタンパク質分離パターンの違いが一致している。*Geobacillus stearothermophilus* 由来の製品 89 および 90 には, 31 kDa に強いバンドが見られ, *Penicillium citrinum* 由来の製品 91 には, 30 kDa および 20 kDa にバンドが見られた。*P. coccineus* 由来の製品 92 には, 32 kDa, 27 kDa, 23 kDa および 18 kDa にバンドが見られ, 32 kDa が最も強かった。同一基原のセルラーゼである製品 52 と同じパターンであった。*Rhizopus niveus* 由来の製品 93 および 94 には, 67 kDa の強いバンドと 44 kDa の弱いバンドが見られた。*Sphingomonas paucimobilis* 由来

の製品 95 には, 18 kDa にバンドがあり, *Streptomyces aureus* 由来の製品 96 には, 40 kDa および 27 kDa にバンドが見られた。

以上をまとめると, プロテアーゼは 15 グループに分けられ, さらに 19 パターンに分かれた。多様性が非常に大きい。プロテアーゼは総称であるため, この中には様々な酵素活性を示す酵素が含まれる。そのため, 酵素タンパク質としてまったく異なる様々なものが存在していると推測された。SDS-PAGE の結果でもまったく異なる様々な泳動パターンを示した。プロテアーゼについて SDS-PAGE の基原判定法としての可能性を考察するには, 酵素反応特性ごとに細分類したうえで泳動パターンと基原菌種との関連を考察することが必要と考えられるが, プロテアーゼ製品の酵素特性情報が十分に得られなかったので, 今回はプロテアーゼ製品全体で泳動パターンと基原菌種との関連を考察した。*Aspergillus* 属, *Bacillus* 属については難しいが, 製品 76, 78, 85 および 86 に見られた 54 kDa の強いバンドを持つ試料が *Bacillus* 属であることの確認は可能である。*G. stearothermophilus* 由来の 2 製品, *P. citrinum* 由来の製品, *P. coccineus* 由来の製品, *R. niveus* 由来の製品および *S. aureus* 由来の製品はいずれも特徴的なバンドがある。

P. coccineus 由来のプロテアーゼ製品 92 は同じ *P. coccineus* 由来のセルラーゼである製品 52 およびヘミセルラーゼである製品 100 と同じパターンである。同一の基原から得られた粗酵素液を高度な精製を行わずに複数の品目の製品として利用している可能性がある。

8. ヘミセルラーゼ (Fig. 12)

A. niger 由来の製品 97 および 98 には, 推定分子量 40 kDa のバンドが見られた。*A. niger*

由来の製品でも製品 99 には 59 kDa のバンドが見られ、製品 103 には、27 kDa および 22 kDa のバンドが見られた。 *P. coccineus* 由来の製品 100 には 32 kDa, 27 kDa, 23 kDa および 18 kDa のバンドが見られた。同一基原のセルラーゼである製品 52 およびプロテアーゼである製品 92 と同じパターンである。 *T. longibrachiatum* 由来の製品 101 には 16 kDa の強いバンドと 63 kDa の弱いバンドが見られた。同じ基原の製品 102 には 53 kDa および 43 kDa の強いバンドが見られた。

製品 97 と 98 が同じパターンを示したほかはすべての製品が異なるタンパク質分離パターンであり、6 パターンである。4 種類ある基原の差異以上の多様性がある。いずれも特徴的なパターンであり、基原の判定法として SDS-PAGE を使用できる可能性がある。

A. niger 由来の製品 97 および 98 は同じ基原に由来するプロテアーゼと同じパターンを示した。プロテアーゼの項で述べた *P. coccineus* 由来の製品と同様に、同一の基原から得られた粗酵素液を高度な精製を行わずに複数の品目の製品として利用している可能性がある。

D. まとめ

既存添加物名簿に記載される 8 品目の酵素について、国内で流通しているほぼすべてにあたる 103 試料を入手し、SDS-PAGE によりタンパク質分離パターンを分析した。その結果、同一品目であっても基原の生物種が異なると分離パターンは大きく異なり、製品の多様性が非常に大きいことが確認された。既存添加物における酵素の分類がその活性により行われているという特殊性が改めて示されたと言える。今回の分離パターンでは基原の違いだけでは説明できない

差異も見られたが、抽出や精製方法、特異的な酵素特性などとの関連が推測される。また、SDS-PAGE による酵素タンパク質の分離パターンにより、基原や製造法などに由来する製品間の差異を簡便に確認できたことから、製品の品質管理にも有用と考えられる。

E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第 120 号“既存添加物名簿”平成 8 年 4 月 16 日(1996).
- 2) 厚生労働省“第 8 版食品添加物公定書”(2007).
- 3) 厚生省生活衛生局長通知衛化第 56 号“既存添加物名簿収載品目リスト”平成 8 年 5 月 23 日 (1996)
- 4) Goto, K., Omura, T., Hara, Y., : Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **46**, 1-8 (2000).

F. 研究発表

1. 論文発表

秋山卓美、佐々木亮、山崎壮、棚元憲一、山形一雄、河村葉子. SDS-PAGE による既存タンパク質酵素のタンパク質分離パターン. 日本食品科学学会誌、2010 印刷中

2. 学会発表

- (1) Akiyama, T., Sasaki, R., Yamagata, K., Tanamoto, K., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Identification of origins of food manufacturing enzymes. The 123rd AOAC Annual Meetings & Exposition
- (2) 秋山卓美, 佐々木亮, 山形一雄, 棚元憲一, 山崎壮, 河村葉子, 既存添加物酵素の製

品間差異と基原. 日本食品衛生学会第 98 回学
術講演会.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし.

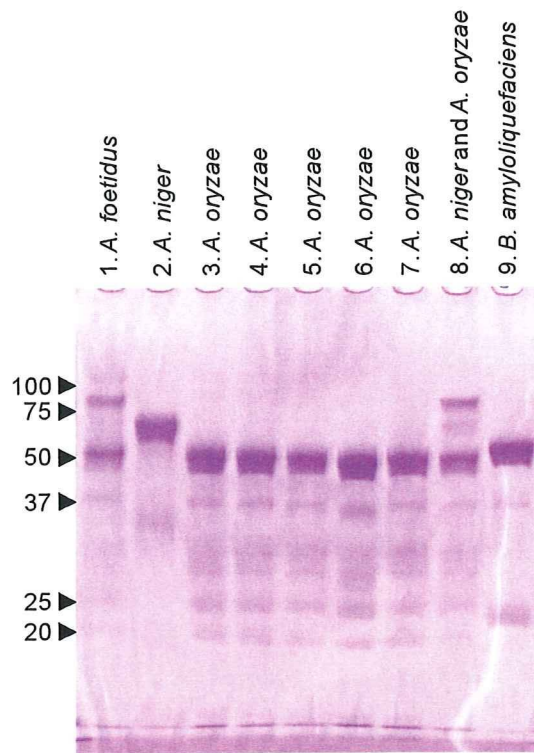


Fig. 1. SDS-PAGE of α -amylase products 1-9.

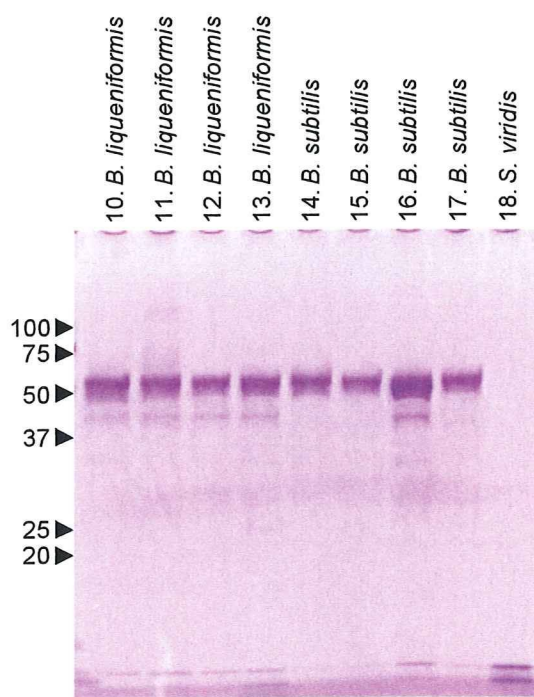


Fig. 2. SDS-PAGE of α -amylase products 10-18.