

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 22 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

－ 既存添加物トウガラシ水性抽出物の品質・基原に関する成分の分析 －

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

既存添加物製品に含有される成分の確認は、基原の推定や品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物トウガラシ水性抽出物の品質・基原に関する成分を明らかにすることを目的とし、LC-RID による分析を行った。また、LC-MS を用いてトウガラシ水性抽出物の含有成分を分離・分析する方法を明らかにした。この方法を用い、既存添加物製品として提供されたトウガラシ水性抽出物 3 製品を分析したところ、成分含量に多少の違いは見られたものの、成分組成はほぼ同じであった。既報のトウガラシ由来抗菌活性成分と推定されるピークを含有することが確認され、また、既報との成分検出パターン類似から、今回分析した製品の基原が、既報の基原と同様であることも示唆された。本研究により、既存添加物トウガラシ水性抽出物の規格法を検討する上で、有用な基礎的データが得られた。

A. 研究目的

既存添加物トウガラシ水性抽出物（英名：Capsicum water-soluble extract）は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている製造用剤の 1 つで、その定義は、「トウガラシの果実から抽出して得られた、水溶性物質を主成分とするものをいう。」と記載されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、「ナス科トウガラシ（*Capsicum annuum* LINNE）の果実より、室温時含水エタノールで抽出したもので、タンパク質、ペプチド、ビタミン C を含む。」と記載されている。

トウガラシ水性抽出物は、酵母に対する抗菌作用³⁾があるため日持向上剤として利用され

ており、抗菌活性成分の 1 つは、(25*R*)-3β-[[4-*O*-[2-*O*-β-D-glucopyranosyl]-3-*O*-(3-*O*-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-β-D-galactopyranosyl]oxy]-5α-spirostan-2α-ol (Fig. 1, 以下ギトゲニン配糖体 A と略す。) であることが報告³⁾されている。また、本研究班における昨年度の分担研究報告⁴⁾においても、酵母 *Candida albicans* に対し明確な抗菌作用を示すことが報告された。

本研究は、既存添加物トウガラシ水性抽出物の成分確認と、その分析法の確立を目的として行った。

B. 研究方法

B-1. 試料および試薬

既存添加物トウガラシ水性抽出物3製品 (Capsicum water-soluble extract, 1社のロットのみ異なる製品A~C), およびギトゲニン配糖体A (Fig.1) 標品 (添加物企業精製品) は, 日本食品添加物協会を通じて入手した.

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいはHPLC用を使用した. 移動相用のエタノールには, 試薬特級エタノール (99.5) (和光純薬工業 (株)) を使用した.

B-2. 装置

各種分析データ取得には, 次の機器を用いた.

LC-MS: Waters社製 LC/MS system (Alliance 2695, 2996 photodiode array detector, Miceomass ZQ single quadrupole mass spectrometer)

LCからの流路を分岐させ, 示差屈折率検出器 (Waters社製 2414 refractive index detector (RID)) にも接続し, 検出を行った.

B-3. 試料の調製

ギトゲニン配糖体A標品は, 1 mg/mlとなるよう70%(v/v)エタノール水溶液で調製した. 既存添加物トウガラシ水性抽出物製品は, 含有成分のMSスペクトル測定用として460 mg/ml, ピーク分析用として20 mg/ml, となるようそれぞれ70%(v/v)エタノール水溶液で調製し, 0.45 μ m フィルターでろ過した.

B-4. 分析条件

LC条件: カラム, SunFire C18 (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μ m, Waters); 流速, 1 mL/min; カラム温度, 45 $^{\circ}$ C; 移動相, ①50%(v/v)エタノール水溶液, ②50%(v/v)メタノール水溶液, ③70%(v/v)メタノール水溶液; 試

料導入量, 50 μ L

MS条件: ソース温度, 120 $^{\circ}$ C; 脱溶媒温度, 350 $^{\circ}$ C; 脱溶媒ガス流量, 400 L/h; コーンガス, 50 L/h; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 10, 30, 60 V; スキャン範囲, ESI neg./pos. m/z 100~1600

RID条件: 示差屈折計温度, 35 $^{\circ}$ C; 感度 128

C. 結果及び考察

C-1. トウガラシ水性抽出物含有成分の分析法の検討

既報³⁾に記載のあった移動相, ①50%(v/v)エタノール水溶液に代えて, メタノールを使用した移動相, ②50%(v/v)メタノール水溶液および③70%(v/v)メタノール水溶液でトウガラシ水性抽出物含有成分の分析が可能かどうか検討したところ (Fig. 2), ③70%(v/v)メタノール水溶液でほぼ同様の分離が可能であったが, ピーク形状等が改善されるというような結果は得られなかった. MSスペクトル値から, ピーク6と7の溶出順が逆転していることが示唆され, 同定の際には注意が必要であると考えられた. 移動相については①50%(v/v)エタノール溶液のままで良いと考えられた.

次に, ギトゲニン配糖体A標品および既存添加物製品を用いてLC-MSによる成分分析方法を検討し, 分析条件に示す方法により, 添加物製品含有成分の分離・分析が可能であることを明らかにした. ギトゲニン配糖体A標品をLC-RIDおよびLC-MSで分析した結果 (Fig. 3), ギトゲニン配糖体Aは, 保持時間17.5分に溶出され, MSのESI pos./neg.およびコーン電圧を変化させて検出したところ, ESI neg.60 Vにおいて検出感度が最も良好であった (Fig. 4). また, ESI neg./pos.のいずれのコーン電圧においても, 分子量関連イオンのみが検出され, ギトゲニン由来と思われるフラグメントは認められなかった. カラムにLuna C18 (4.6 mm

i.d.×250 mm, 5 μm, Phenomenex)を用いたところ、ピーク相互の分離は良くなる傾向が認められたが、ギトゲニン配糖体 A の保持時間は、28 分付近と遅くなった。

その他、LC-RID 分析においてインジェクション濃度および量について検討したところ、40 mg/mL, 50uL の場合と 200 mg/mL, 10uL の場合とで RID ピーク面積値に有意な差は特に認められなかった。

また、分析試料のろ過操作の影響を確認したところ、ギトゲニン配糖体 A 標品はろ過の有無により RID ピーク面積値の変化は認められなかった。添加物製品の分析試料では、茶色に濃く着色しており、LC インジェクション直後の溶出成分が多く、ろ過を行わないとインジェクション部分につまりが生じる可能性が推定されたことから、メンブレンフィルターによるろ過が必要であると考えられた。

C-2. トウガラシ水性抽出物含有成分の分析

既存添加物 3 製品を LC-RID で分析した際のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。製品毎に含有成分濃度に差が認められたが、成分相互の組成に大きな差は認められず、ロットによる大きな差異は無いことが確認された。

既報³⁾では、抗菌活性を有するピークとして peak 1~10 が報告されている。本研究における既存添加物製品の分析でも 10 種のピークが検出された。LC-MS による分析方法を検討し、既存添加物製品と唯一標品があるギトゲニン配糖体 A (既報³⁾における peak 4)とで、保持時間および MS スペクトルを比較したところ、本研究で認められたピーク 3 がギトゲニン配糖体 A であると推定された。既報³⁾で認められた直前のピークは、LC-MS における m/z 917 の検出により、ピーク 3 の立ち上がり部分の保持時間に溶出されていることが示唆された。また、本研究では、既報³⁾では明確に確認されな

かったピーク 8 も、ピーク 6 および 7 と同程度のレベルで検出された。LC-MS により各ピークの MS スペクトルを確認した結果、ESI neg. でピーク 1 は m/z 1240, ピーク 2 は m/z 1078, ピーク 3 は m/z 1242, ピーク 4 は m/z 1080, ピーク 5 は m/z 918, ピーク 6 は m/z 1226, ピーク 7 は m/z 1196, ピーク 8 は m/z 1224, ピーク 9 は m/z 1226, ピーク 10 は m/z 1064 の分子イオンピークを示した。トウガラシ由来サポニンの糖鎖を外した研究で、gitogenin と tigogenin が確認されている⁵⁾ため、ピーク 3, 4, 5 は gitogenin に糖がそれぞれ 5, 4 および 3 個結合したサポニン、ピーク 9, 10 は titogenin に糖がそれぞれ 5 および 4 個結合したサポニンと推測される。Gitogenin に糖が 5, 4 および 3 個結合したサポニンは、*Capsicum frutescens* に存在することが確認されている⁶⁾。

D. 結論

既存添加物製品に含有される成分の確認は、基原の推定や品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物トウガラシ水性抽出物の品質・基原に関与する成分を明らかにすることを目的とし、LC-RID による分析を行った。また、LC-MS を用いてトウガラシ水性抽出物の含有成分を分離・分析する方法を明らかにした。この方法を用い、既存添加物製品として提供されたトウガラシ水性抽出物 3 製品を分析したところ、成分含量に多少の違いは見られたものの、成分組成はほぼ同じであった。既報のトウガラシ由来抗菌活性成分と推定されるピークを含有することが確認され、また、既報との成分検出パターン類似から、今回分析した製品の基原が、既報の基原と同様であることも示唆された。本研究により、既存添加物トウガラシ水性抽出物の規格法を検討する上で、有用な基礎的データが得られた。

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. M. Yajima, T. Takayanagi, I. Matsuo, K. Yokotsuka, Isolation and structure of antimicrobial substances from paprika seeds, *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 99-101 (2000)
4. 堀江正一, 小林晴美, 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究, 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 (2010)
5. S. Yahara, T. Ura, C. Sakamoto, T. Nohara, Steroidal glycosides from *Capsicum annum*, *Phytochemistry* **37**, 831-835 (1994)
6. A. J. De Lucca, S. Boue, M. S. Palmgren, K. Maskos, T. E. Cleveland, Fungicidal properties of two saponins from *Capsicum frutescens* and the relationship of structure and fungicidal activity, *Can. J. Microbiol.* **52**, 336-342 (2006)

F. 研究発表

1. 論文発表

石附京子、多田敦子、杉本直樹、松本清、受田浩之、松藤 寛、山崎 壮、河村葉子. 既存添加物ドクダミ抽出物の品質評価. *日本食品化学学会誌*, **17(3)**, 192-197 (2010).

2. 学会発表

なし

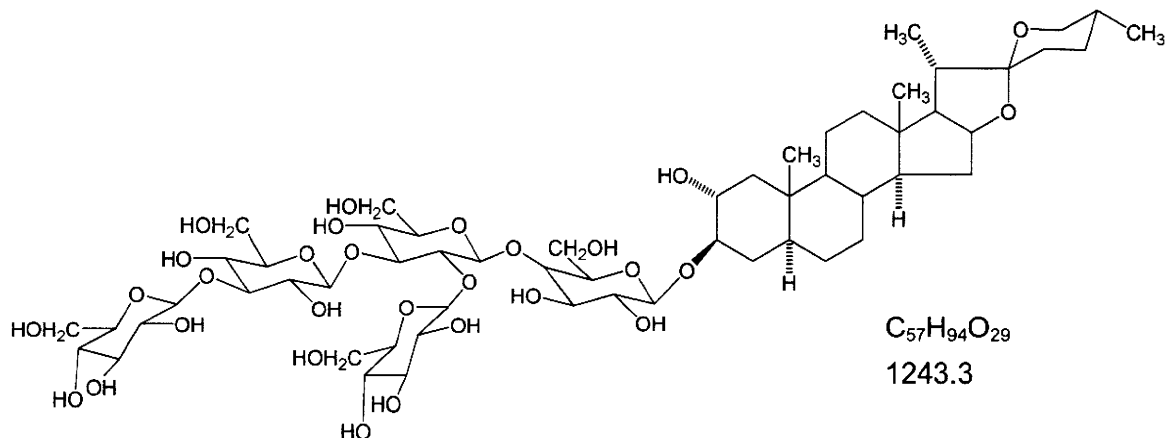


Fig. 1 (25*R*)-3β-[[4-*O*-[2-*O*-β-D-Glucopyranosyl]-3-*O*-(3-*O*-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-β-D-galactopyranosyl]oxy]-5α-spirostan-2α-ol (ギトゲニン配糖体A)

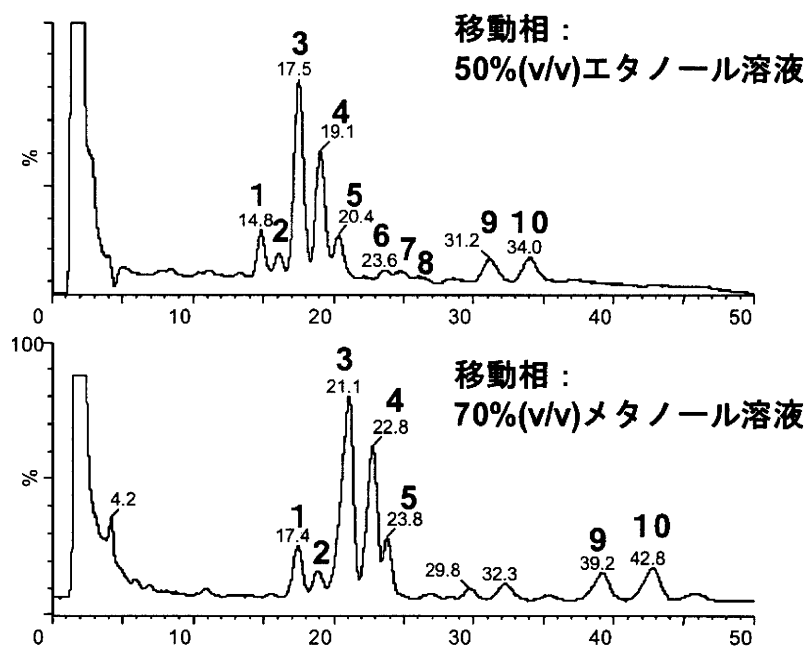


Fig. 2 LC-RID でのトウガラシ水性抽出物分析における移動相の検討

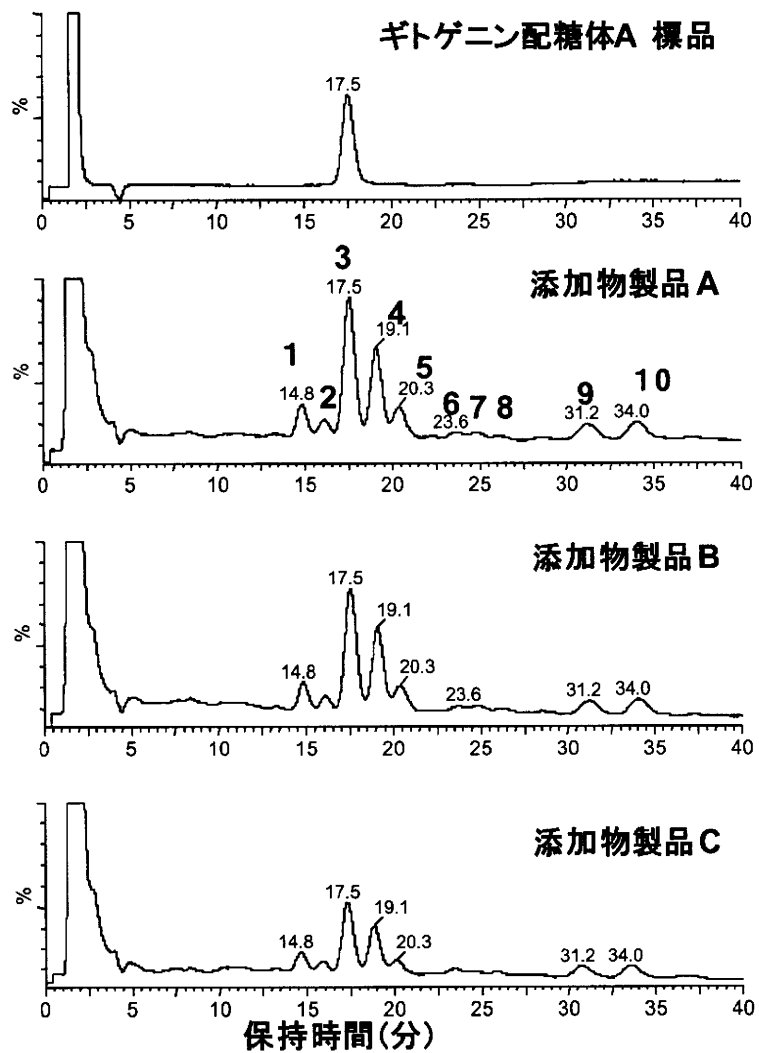


Fig. 3 LC-RID によるギトゲニン配糖体 A 標品および既存添加物トウガラシ水性抽出物 3 製品の分析結果

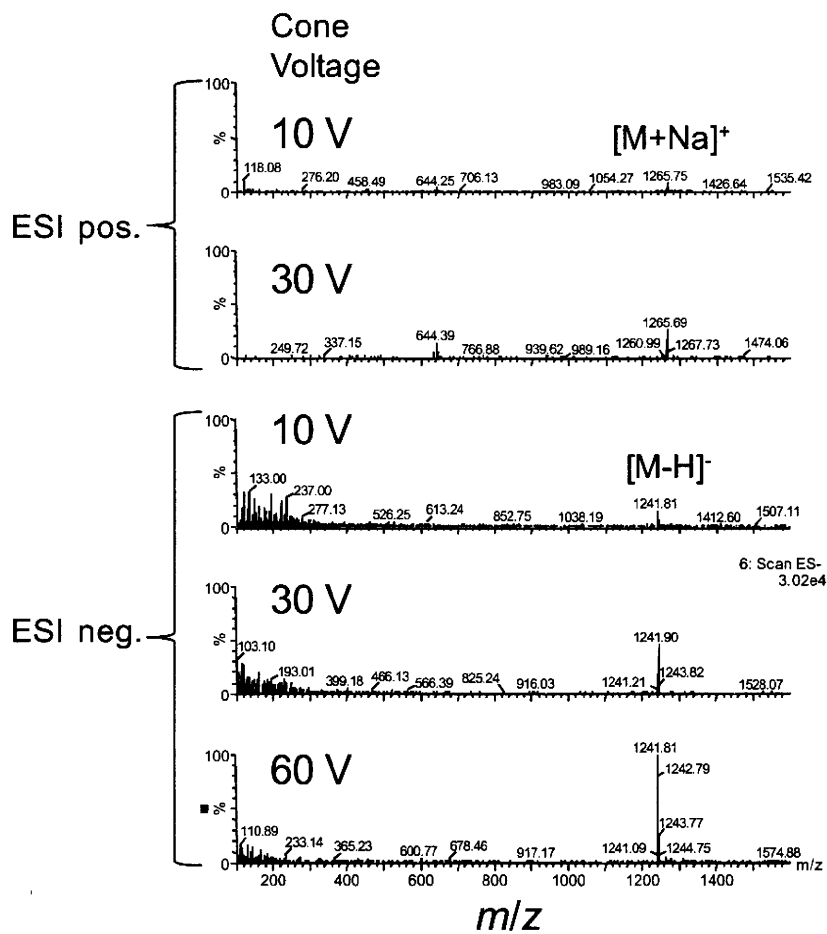


Fig. 4 LC-MSによるギトゲニン配糖体A標品のMSスペクトル

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 22 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

分担研究者 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、昨年度に日本国内で現在流通している製品を SDS-PAGE により分析したところ、有効な手段であることが示されたが、区別が難しい試料もあった。そこで、試料をタンパク質分解酵素で消化し、生成するペプチドを HPLC で分析することで識別できないか検討した。α-アミラーゼについて、5 種類のタンパク質分解酵素で消化を行い、反応液を逆相 HPLC で分離したところ、trypsin で分解した場合と endoproteinase Lys-C で分解した場合に分解産物であるペプチドのピークが確認された。Trypsin 分解では、*Bacillus* 属由来とされ、SDS-PAGE 上で区別できないメインバンドを持つ 9 製品を明確に 3 つのグループに分けることができ、さらに SDS-PAGE の情報と併用することで 4 つのグループに分類することができた。また、Lys-C による分解を施したところ、*A. oryzae* 由来とされ、SDS-PAGE では区別できなかった 5 製品を 2 つのグループに分けることが可能であった。

A. 研究目的

既存添加物名簿¹⁾に含まれる酵素の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、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。

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。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かった。そこで、昨年度の本研究において、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。その結果、有効な手段であることが示されたが、区別が難しい試料もあった。

α -アミラーゼについても、市場に流通する 18 試料について SDS-PAGE による区別を試みた。Figs. 1-2 には昨年度報告した SDS-PAGE におけるタンパク質分離パターンを示した。18 試料が 7 つのパターンに分かれたが、メインバンドの泳動度が近く、識別が容易とは言えなかった。そこで、タンパク質分解酵素で消化し、生成するペプチドを HPLC で分析することで識別できないか検討した。

B. 研究方法

1. 試料

日本国内で現在流通している α -アミラーゼの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。8 基原 18 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²⁾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. タンパク質分解酵素

ロシュ・ダイアグノスティックス製のタンパク質分解酵素を購入して使用した。

- (1) Trypsin sequencing grade from bovine pancreas
- (2) Endoproteinase Lys-C sequencing grade from *Lysobacter enzymogenes*
- (3) Chymotrypsin sequencing grade from bovine pancreas
- (4) Endoproteinase Arg-C sequencing grade from *Clostridium histolyticum*

(5) Endoproteinase Glu-C sequencing grade from *Staphylococcus aureus* V 8

3. タンパク質分解反応

昨年度測定したタンパク質濃度に基づき、反応溶液内のタンパク質濃度が等しくなるように試料量を調整した。いずれのタンパク質分解酵素についても反応液量は 50 μ L とした。

(1) Trypsin

緩衝液: 0.1 mol/L Tris-HCl pH8.5

試料タンパク質量: 0.2 mg

Trypsin 量: 10 μ g

温度及び時間: 37°C, 4 時間

(2) Lys-C

緩衝液: 40 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 1 mmol/L EDTA

試料タンパク質量: 10 μ g

Lys-C 量: 0.5 μ g

温度及び時間: 37°C, 4 時間

(3) Chymotrypsin

緩衝液: 0.1 mol/L Tris-HCl pH7.8, 10 mmol/L CaCl₂

試料タンパク質量: 0.1 mg

Chymotrypsin 量: 2 μ g

温度及び時間: 25°C, 14 時間

(4) Arg-C

緩衝液: 0.1 mol/L Tris-HCl pH7.8, 10 mmol/L CaCl₂

試料タンパク質量: 0.1 mg

Chymotrypsin 量: 0.5 μ g

温度及び時間: 37°C, 12 時間

(5) Glu-C

緩衝液: 25 mmol/L (NH₄)₂CO₃-HCl pH7.8

試料タンパク質量: 0.1 mg

Chymotrypsin 量: 1 μ g

温度及び時間: 25°C, 14 時間

4. UPLC

反応溶液を Milli Q 水で 4 倍に希釈し、10 μ L を下記の条件の UPLC に供した。

Instrument: UPLC system (Waters)

Column: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. \times 100 mm, Waters) and VanGuard Pre-column (2.1 mm i.d. \times 5 mm, Waters)

Column Temperature: 30°C

Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid

Solvent B: acetonitrile

Gradient: 0–30 min = 5–75% B \rightarrow 30–33 min = 75% B \rightarrow 33–38 min = 5% B

Flow rate: 0.4 mL/min

C. 結果

タンパク質分解酵素として、市販製品が入手できる trypsin, endoproteinase Lys-C (以下 Lys-C), chymotrypsin, endoproteinase Arg-C (以下 Arg-C), endoproteinase Glu-C (protease V 8, 以下 Glu-C) を用いることとした。

タンパク質分解酵素それぞれについて最適条件で反応を行い、試料タンパク質は昨年度測定したタンパク質濃度に基づき、反応溶液内のタンパク質濃度が等しくなるように調整した。18 試料のすべてを同時に反応させ、水で 4 倍に希釈して UPLC に供した。

タンパク質分解酵素を入れずにインキュベートしたものをコントロールとし、まずコントロールと比較してクロマトグラムに変化があるかどうかを観察した。変化があるものについては試料同士の比較を行い、グループ分けを行った。

1. trypsin (Figs. 3–8)

Figs. 3–5 にタンパク質分解酵素を用いないコントロールのクロマトグラムを、Figs. 6–8 に trypsin 処理した試料のクロマトグラムを示した。Aspergillus 属由来とされている製品では A. niger 由来の製品 2 のみがコントロールとの

差が確認された。6.7, 8.0, 11.3, 14.9 min に大きなピークがあり、他にも多くのピークが観察された。他の製品はコントロールとの差が確認できなかった。Bacillus 属由来とされている製品では、元のタンパク質と思われるピークが小さくなり、コントロールにないピークが観察された。製品 9, 14, 15, 17 には 12.3, 16.9 min にピークがあった。また、10, 11, 13, 16 には 13.7, 16.7 min にピークが見られた。製品 12 で見られたピークは 14.2, 17.1 min であった。Saccharomonospora viridis 由来とされている製品 18 はコントロールとの差が確認できなかった。

2. Lys-C (Figs. 3–5, 9–11)

Figs. 9–11 に Lys-C 処理した試料のクロマトグラムを示した。Aspergillus 属由来とされている製品はいずれも Figs. 3–5 に示したコントロールとの差が確認できた。元のタンパク質と思われるピークが顕著に小さくなった。A. foetidus 由来の製品 1 と A. niger and A. oryzae 由来の 8 が同じパターンを示した。11.7, 12.9, 13.2 min にピークが見られた。A. niger 由来の製品 2 は trypsin で消化した場合と同様に多くのピークが見られ、大きいピークとしては 7.9, 10.6, 13.3, 13.9, 15.3 min のものが挙げられる。これらのピークは trypsin 処理した場合は異なっている。A. oryzae 由来とされている製品のうち、製品 3, 4, 5, 7 は 8.2, 10.0, 11.4 min にピークが見られる同じパターンを示したが、製品 6 は製品 1 および 8 と酷似したパターンを示した。Bacillus 属由来の製品のうち、製品 12 は 14.2 と 17.2 min に、16 は 13.7 と 16.7 min にコントロールにはないピークを示した。製品 12 と 16 のいずれも trypsin 処理した場合と同じピークを含んでいるのは興味深い。一方、9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 はコントロールとの差が見られなかった。製品 18 は Lys-C でもコントロールとの

差が確認できなかった。

3. Chymotrypsin, Arg-C, Glu-C

Chymotrypsin, Arg-C, Glu-Cによる処理では、いずれの試料もコントロールとの差を示さなかった。 α -アミラーゼの分解には向かないことがわかった。

D. 考察

(1) SDS-PAGE 上のメインバンドのグループ分けへの応用

クロマトグラム上でコントロールにはないピークのうち大きいものは、SDS-PAGE でメインバンドになっているタンパク質が消化されたものである可能性が高いと考えられる。したがって、SDS-PAGE では泳動度が近いために区別できなかったメインバンドの区別とグループ分けに、これらのピークの保持時間の違いを利用することを検討した。

A. oryzae 由来とされている 3, 4, 5, 6, 7 のメインバンドは 50 kDa であり、また、製品 1 と 8 にも 50 kDa の強いバンドがあり、これらのバンドは泳動度からは区別できないが、Lys-C による 6 の分解産物のクロマトグラムが他の 4 つの *A. oryzae* 由来製品と全く異なるパターンを示し、むしろ 1 および 8 と酷似していたことから、3, 4, 5, 7 と 1, 6, 8 の 2 グループに分けることができると考えられる。

Bacillus 属由来とされる製品 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 のメインバンドはいずれも 54 kDa で SDS-PAGE では区別できないが、trypsin 処理した試料のクロマトグラムから、3 つのグループに分かれた。

(2) SDS-PAGE とペプチド分析を組み合わせた異同識別

昨年度の研究において、SDS-PAGE での 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。今回の研究では、SDS-PAGE から得られる情報とペプチド分析から得られる情報を組み合わせて、9 通りのグループに分けることができた。

I: 1 および 8

II: 2

III: 3, 4, 5, 7

IV: 6

V: 9

VI: 10, 11, 13, 16

VII: 12

VIII: 14, 15, 17

IX: 18

である。10, 11, 13, 16 と 14, 15, 17 は SDS-PAGE だけでも弱いバンドの有無により区別できたが、タンパク質分解酵素処理によって、より明確に区別できることがわかった。

基原の判定法としての応用についても考察する。本研究によって新たに区別できたのは製造メーカーによる基原情報が同じものであり、基原の判定法としては SDS-PAGE 以上の情報を得ることはできなかった。しかし、同一基原であるが菌株が異なる製品の識別に応用できる可能性が示されたと言える。また、*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³⁾。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ったが、ペプチド分析により菌株の異なる酵素の識別に有用な情報が得られる可能性が示唆された。

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)
- 3) 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

- 1) 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. 日本食品化学学会誌 17(2), 88-95 (2010)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

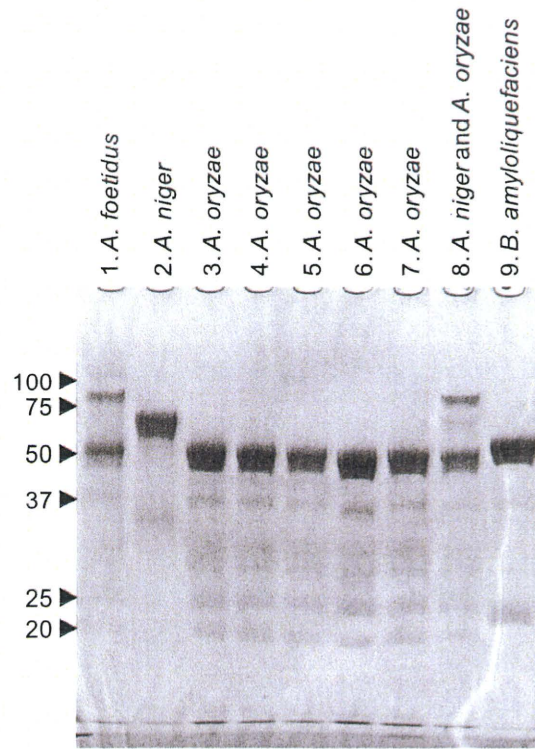


Fig. 1. SDS-PAGE of α -amylase products 1-9.

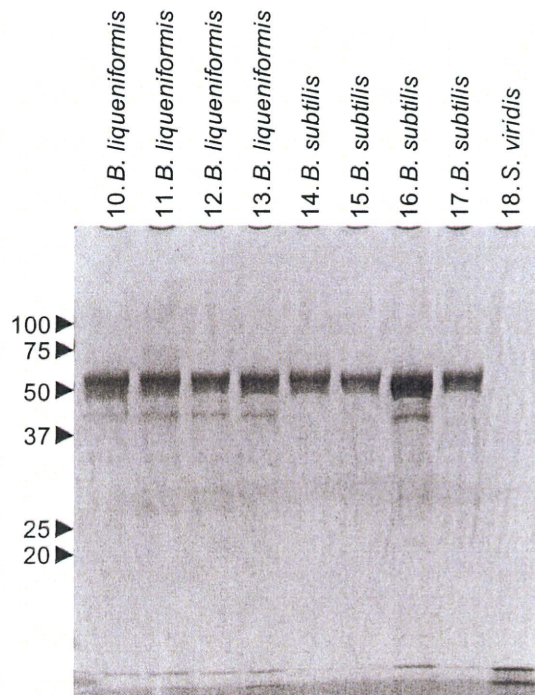


Fig. 2. SDS-PAGE of α -amylase products 10-18.

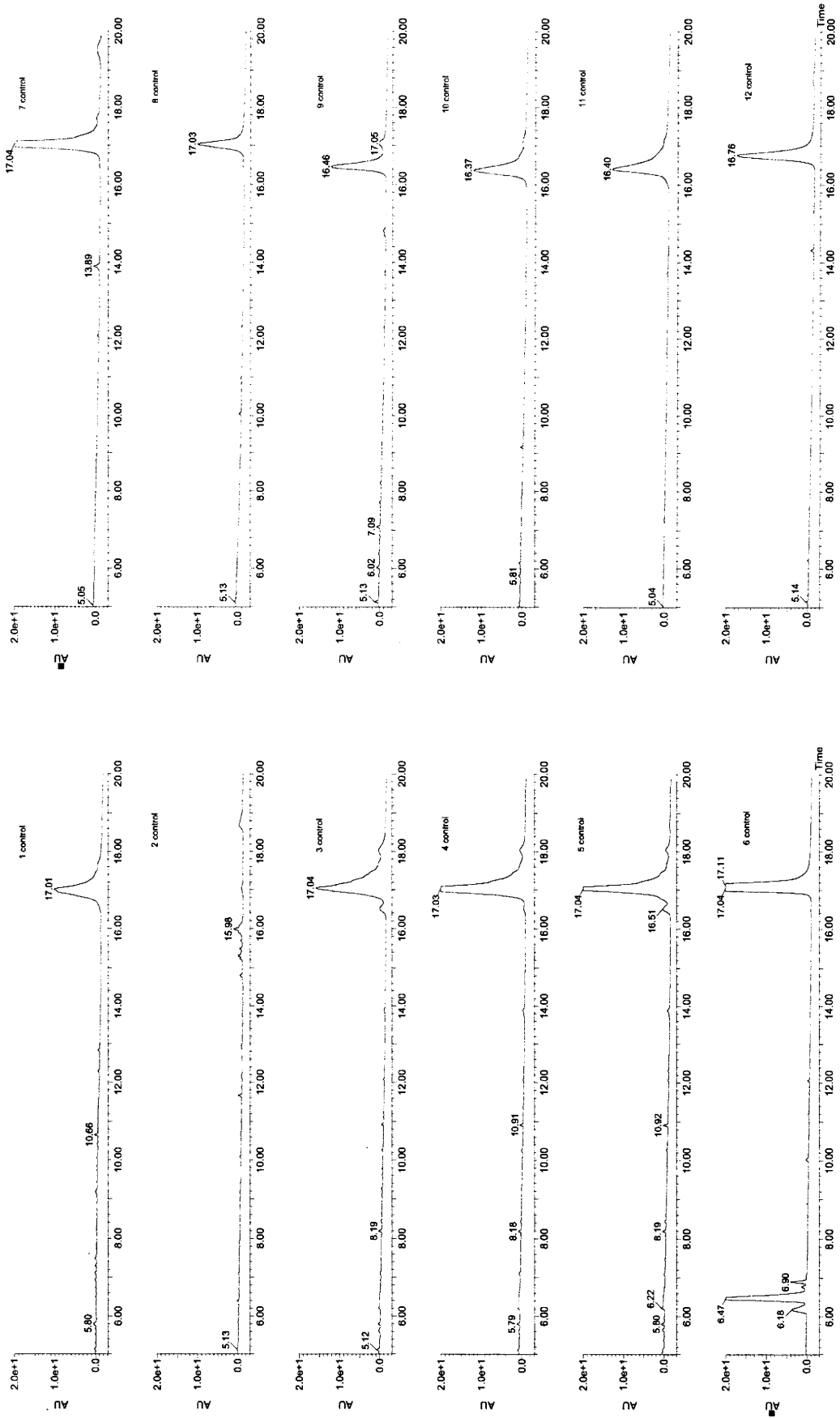


Fig. 3. HPLC chromatograms of the samples 1–6 without proteinase digestion.

Fig. 4. HPLC chromatograms of the samples 7–12 without proteinase digestion.

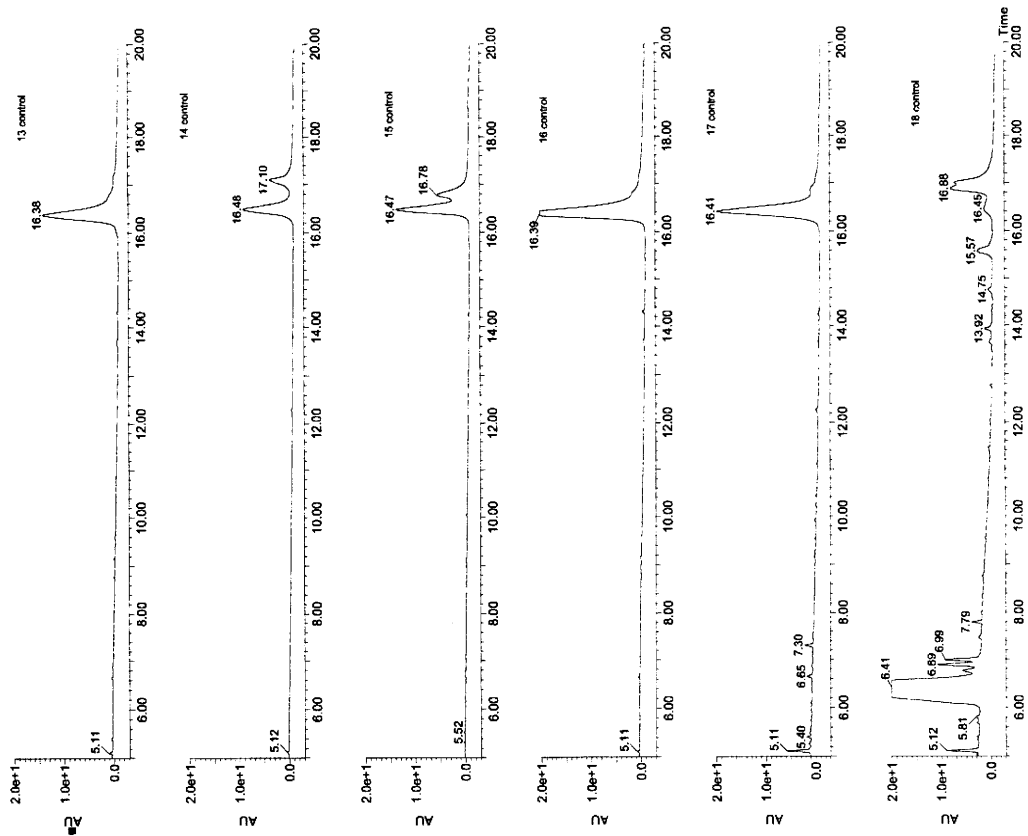


Fig. 5. HPLC chromatograms of the samples 13–18 without proteinase digestion.

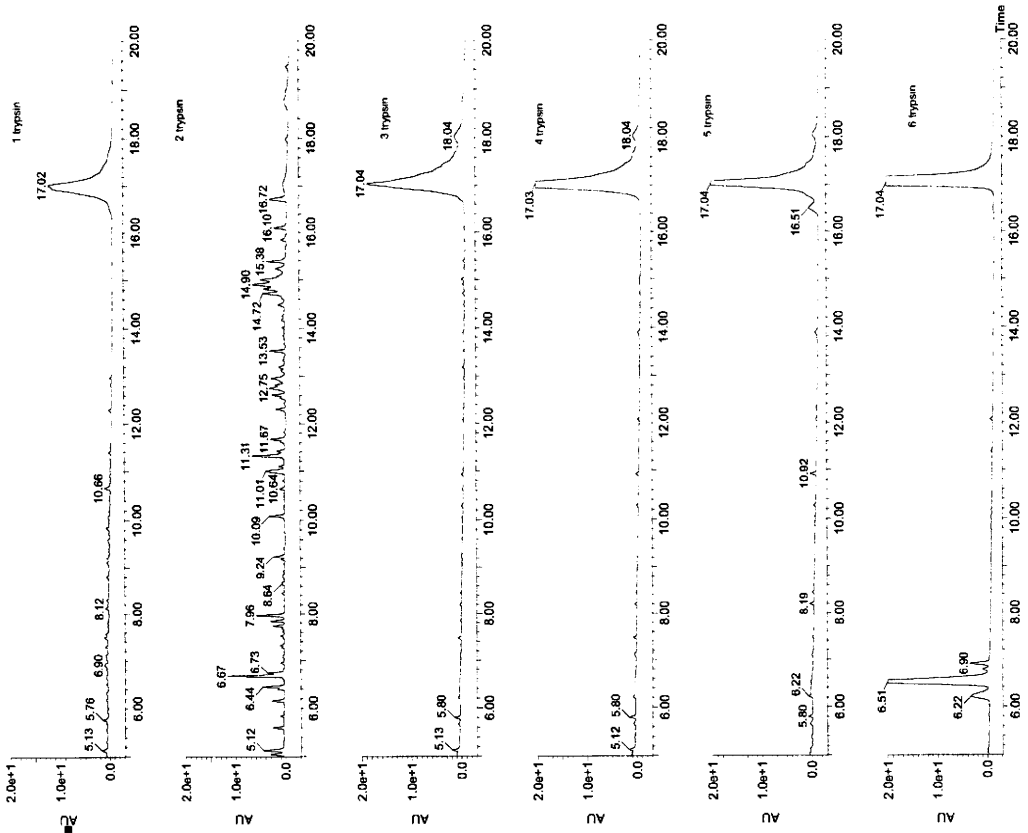


Fig. 6. HPLC chromatograms of the samples 1–6 after trypsin digestion.

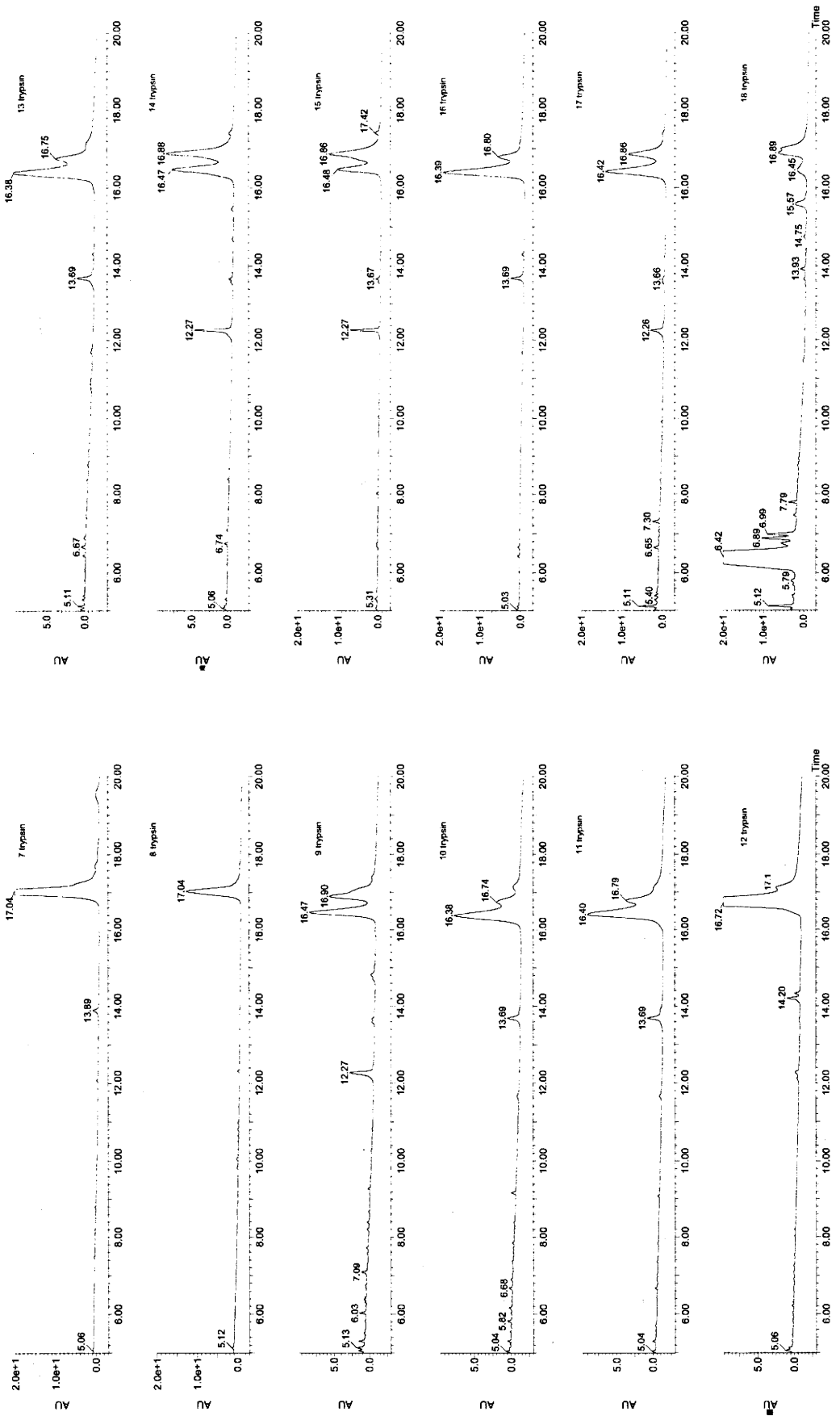


Fig. 7. HPLC chromatograms of the samples 7–12 after trypsin digestion.

Fig. 8. HPLC chromatograms of the samples 13–18 after trypsin digestion.

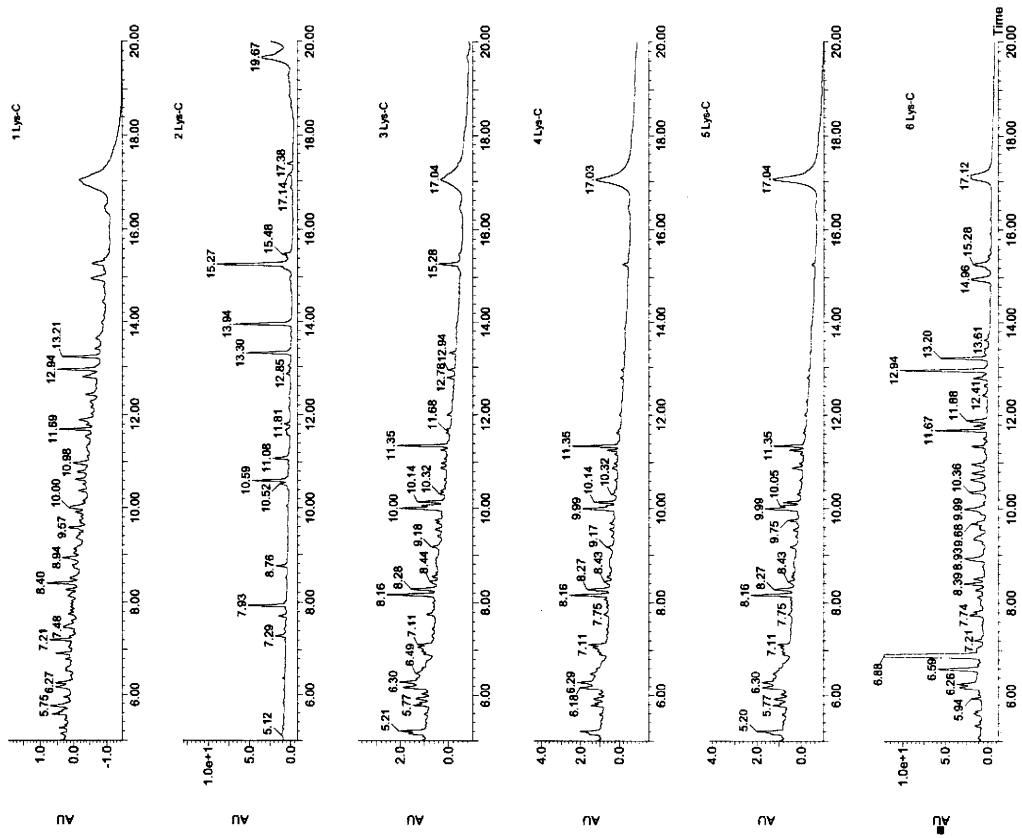


Fig. 9. HPLC chromatograms of the samples 1-6 after endoproteinase Lys-C digestion.

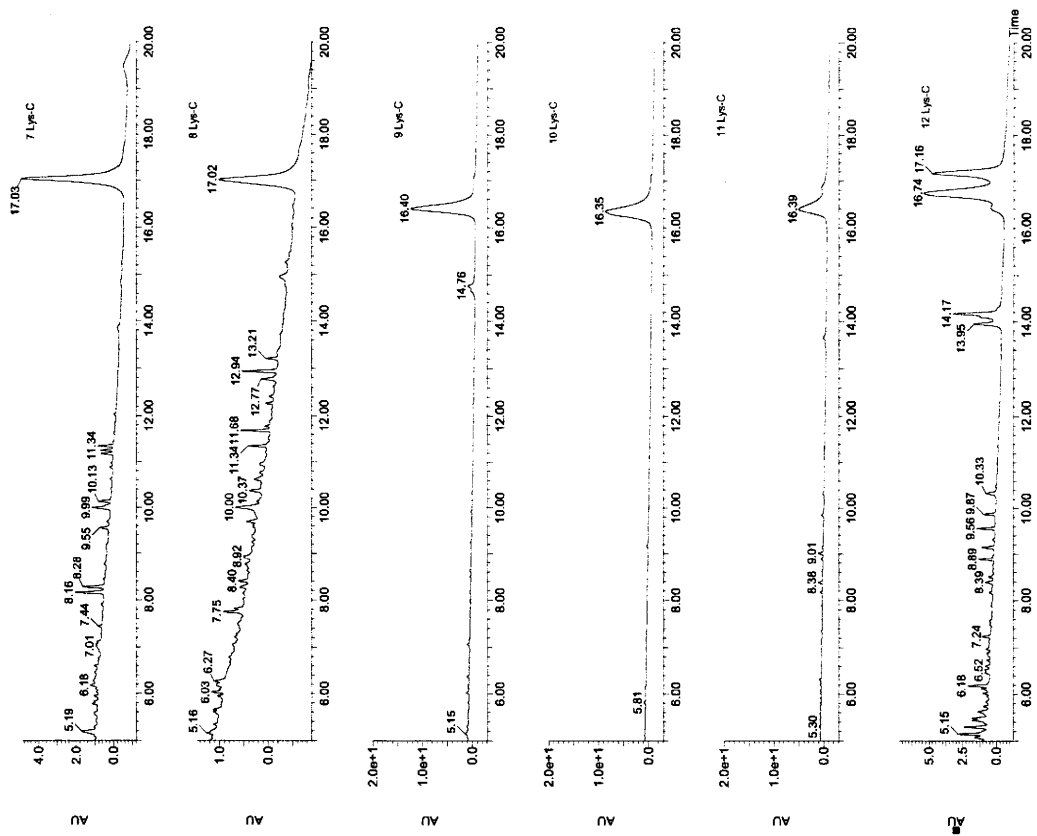


Fig. 10. HPLC chromatograms of the samples 7-12 after endoproteinase Lys-C digestion.

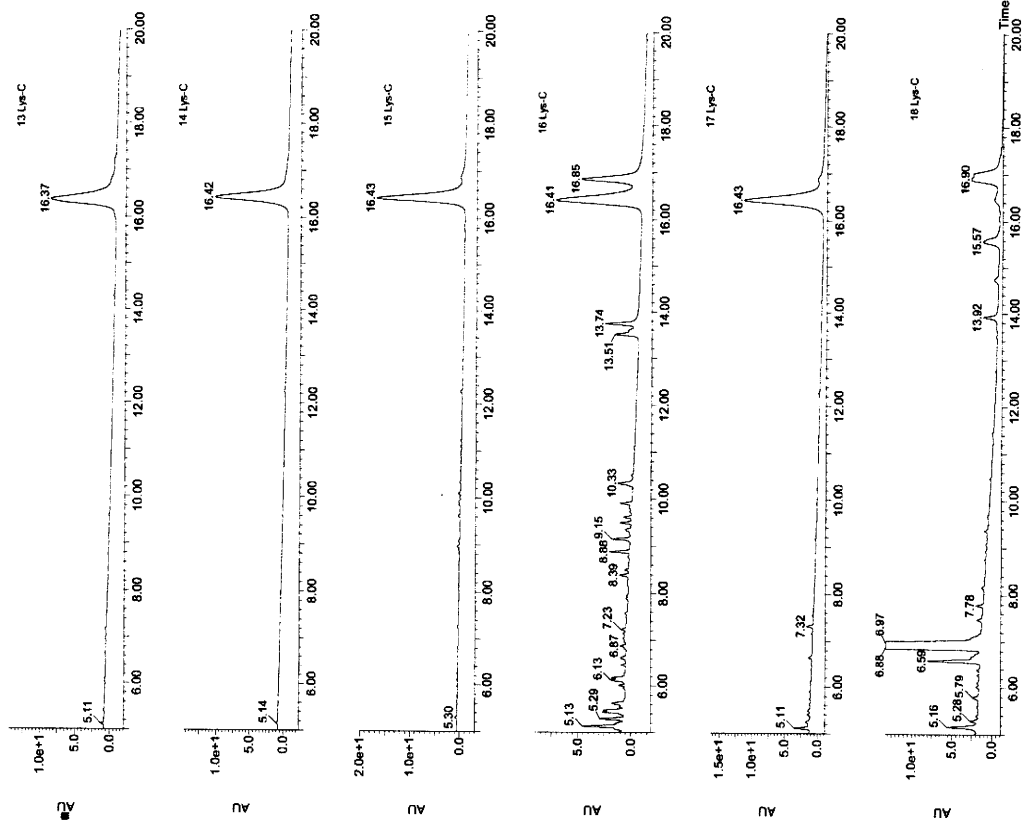


Fig. 11. HPLC chromatograms of the samples 13-18 after endoproteinase Lys-C digestion.

Table 1. Digestion-based classification of α -amylase products.

Provided information		Results and grouping					
Origin ^{*1}	Sample number ^{*2}	SDS-PAGE		Trypsin		Lys-C	
		Pattern ^{*3}	Molecular weights of major proteins (kDa)	Pattern ^{*3}	Retention time of major peaks (min)		Pattern ^{*3}
<i>Aspergillus foetidus</i> ^{*4} <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	1	a	87, 50	NO ^{*6}	NO	l	11.7, 12.9, 13.2
	2	b	64	h	6.7, 8.0, 11.3, 14.9	m	7.9, 10.6, 13.3, 13.9, 15.3
	3, 4, 5, 7	c	50	NO	NO	n	8.2, 10.0, 11.4
<i>Aspergillus niger</i> and <i>A. oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	6	c	50	NO	NO	l	11.7, 12.9, 13.2
	8	a	87, 50	NO	NO	l	11.7, 12.9, 13.2
	9	d	54, 24	i	12.3, 16.9	NO	NO
<i>Bacillus subtilis</i>	10, 11, 13	e	54, 43	j	13.7, 16.8	NO	NO
	12	e	54, 43	k	14.2, 17.1	o	14.2, 17.2
	14, 15, 17	f	54	i	12.3, 16.9	NO	NO
	16	e	54, 43	j	13.7, 16.8	p	13.7, 16.9
<i>Saccharomonospora viridis</i> ^{*5}	18	g	(32), (23) ^{*7}	NO	NO	NO	NO

*1: Origins are provided by manufacturers.

*2: Samples with the same information and identical patterns are placed in the same row.

*3: Samples with identical or similar pattern are marked.

*4-5: Latin names of these producer microorganisms had been changed. Former names were as follows. *4, *Aspergillus aureus*; *5, *Thermomonospora viridis*.

*6: No apparent digestion was observed.

*7: Figures in parentheses indicate bands that appear only when large amount of a sample are loaded.

研究成果の刊行に関する一覧表
研究成果の刊行物・別刷