

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。

II 実験方法

1. 試料

α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、カタラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ、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、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、グルコアミラーゼ 3 基原 11 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に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。ディスプレイ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,

Table 1. SDS-PAGE analyses of enzyme products

Provided information		Results and grouping			
Name ^{*1}	Origin ^{*1}	Sample number	Identical pattern	Similar pattern [*]	Molecular weights of major proteins (kDa)
α -amylase	<i>Aspergillus foetidus</i> ^{*5}	1	a		87, 50
	<i>Aspergillus niger</i>	2			64
	<i>Aspergillus oryzae</i>	3, 4, 5, 6, 7			50
	<i>Aspergillus niger</i> and <i>A. oryzae</i>	8	a		87, 50
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9			54, 24
	<i>Bacillus licheniformis</i>	10, 11, 12, 13	b		54, 43
	<i>Bacillus subtilis</i>	14, 15, 17			54
		16	b		54, 43
	<i>Saccharomonospora viridis</i> ^{*5}	18			(32), (23)
	β -amylase	<i>Triticum aestivum</i>	19		i
		24		i	55, 42, 38, 25
<i>Glycine max</i>		20, 21			54, 29
<i>Hordeum vulgare</i>		22		j	54, 36, 31
		23		j	54, 36
catalase	<i>Aspergillus niger</i>	25			80
		26			75
		27			91
β -galactosidase	<i>Micrococcus luteus</i> ^{*7}	28			57
	<i>Sus scrofa</i>	29			66, 57
	<i>Aspergillus oryzae</i>	30, 31			91, 60, 53
		32			69, 53
	<i>Bacillus circulans</i>	33			138, 108, 98, 83
glucoamylase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	34			93, 81, 48, 34
		35			93, 81, 69, 48, 34
	<i>Aspergillus niger</i>	36, 37			93, 81, 69, 48
		38, 39, 40, 41			100, 75, 64
		42			64
cellulase	<i>Rhizopus oryzae</i> ^{*4}	43, 44	c		69, 62, 51, 40
	<i>Rhizopus</i> sp.	45, 46, 47, 48	c		69, 62, 51, 40
	<i>Aspergillus niger</i>	49, 50			57, 40, 37, 25
protease		51			57, 50, 42, 26, 18
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	52			30, 27, 23, 18
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53		k	58, 54, 16
		54	d	l	61, 55
	<i>Trichoderma reesei</i>	55		k	58, 54
		56	d	l	61, 55
		57		k	58, 54, 23, 16
		58		k	58, 54, 23
	<i>Trichoderma viride</i>	59		l	61, 55, 50, 16
		60		l	61, 55, 29, 23, 16
hemicellulase	<i>Aspergillus melleus</i>	61, 62			32, 29, 27, 19
	<i>Aspergillus niger</i>	63, 64, 65	e		40
	<i>Aspergillus oryzae</i>	66, 72, 73	f	m	47, 31, 22, 20
		67, 68, 70		m	31, 22, 20
		69	f	m	44, 31, 22, 20
		71			47, 26
	<i>Aspergillus phoenicis</i> ^{*9}	74	e		40
	<i>Aspergillus</i> sp.	75		m	31, 22, 20
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	76, 78		n	54, 27
	<i>Bacillus clausii</i> ^{*10}	79			26
hemocellulase	<i>Bacillus licheniformis</i>	77, 82	g		28
		80, 81			27, 22
	<i>Bacillus</i> sp.	83	h		27, 24, 18
		84	g		28
	<i>Bacillus subtilis</i>	85		n	54, 27, 18
		86		n	54, 33, 27, 18
		87, 88	h		27, 24, 18
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ^{*11}	89, 90			31
	<i>Penicillium citrinum</i>	91			30, 20
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	92			32, 27, 23, 18
<i>Rhizopus niveus</i>	93, 94			67, 44	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ^{*12}	95			18	
<i>Streptomyces aureus</i>	96			40, 27	
hemocellulase	<i>Aspergillus niger</i>	97, 98			40
		99			59
		103			27, 22
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	100			32, 27, 23, 18
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	101			63, 16
	102			53, 43	

*1: Names and origins are provided by manufacturers.

*2: Samples with the same information and identical SDS-PAGE pattern are placed in the same row.

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

*4: Molecular weights of major proteins are calculated according to band mobility. Figures in parentheses indicate bands that appear only when large amount of a sample are loaded.

*5-12: Latin names of these producer microorganisms had been changed. Former names were as follows. *5, *Aspergillus aureus*; *6, *Thermomonospora viridis*; *7, *Micrococcus lysodeikticus*; *8, *Rhizopus delemar*; *9, *Aspergillus saitoi*; *10, *Bacillus subtilis*; *11, *Bacillus stearothermophilus*; *12, *Pseudomonas paucimobilis*.

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。

III 結果および考察

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もとづいて、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。他の製品との区別利用可能な大きな特徴である。Swiss-Prot には *B. amyloliquefaciens* 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 amyloliquefaciens* 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*

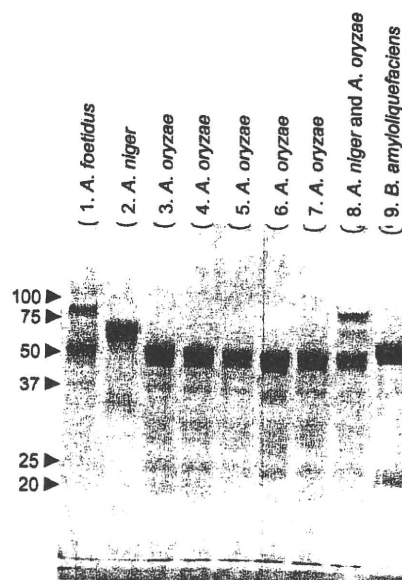
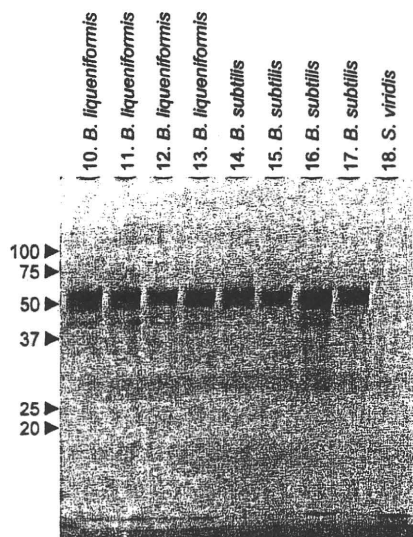


Fig. 1. SDS-PAGE of α -amylase products 1-9

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

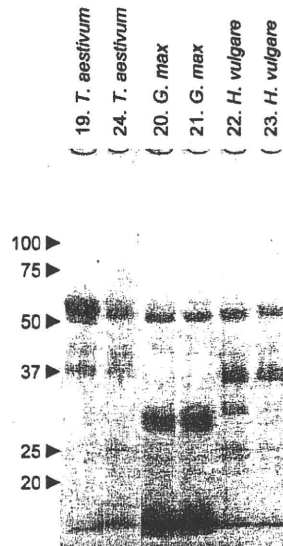
属由来の製品は特徴的な 54 kDa のバンドがあるため、属のレベルでの判定は可能である。*Bacillus* 属は同属内の菌が分類学上近縁であるとされており、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. subtilis* とは近縁であることが報告されている⁴⁾。それらに含まれる α -アミラーゼの分子量が類似していることはあり得るので、*Bacillus* 属内の同属異種の菌株由来の酵素を SDS-PAGE で相互区別することは困難であると予想される。

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。

Fig. 3. SDS-PAGE of β -amylase products

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、推定分子量に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に近い。

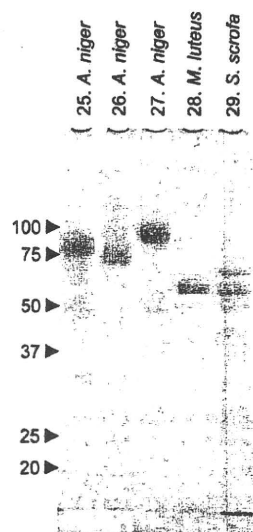


Fig. 4. SDS-PAGE of catalase products

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、多様性が高いことが判明した。また、異なる基原で同じパターンを示すものではなく、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。

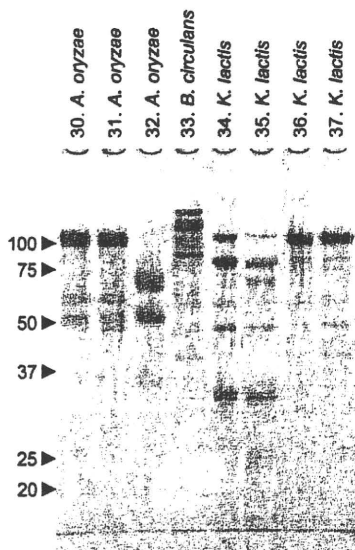


Fig. 5. SDS-PAGE of β -galactosidase products

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。

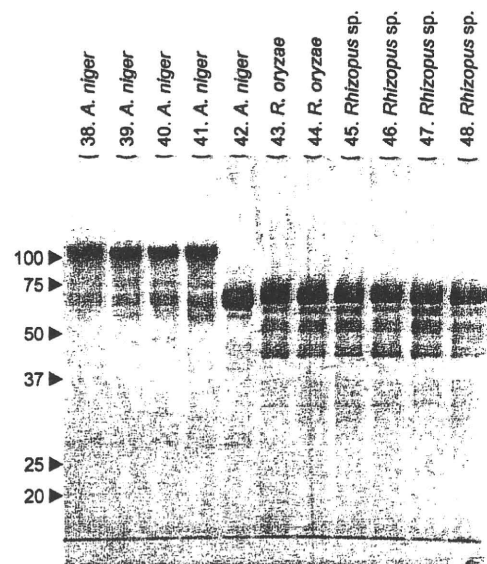


Fig. 6. SDS-PAGE of glucoamylase products

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。

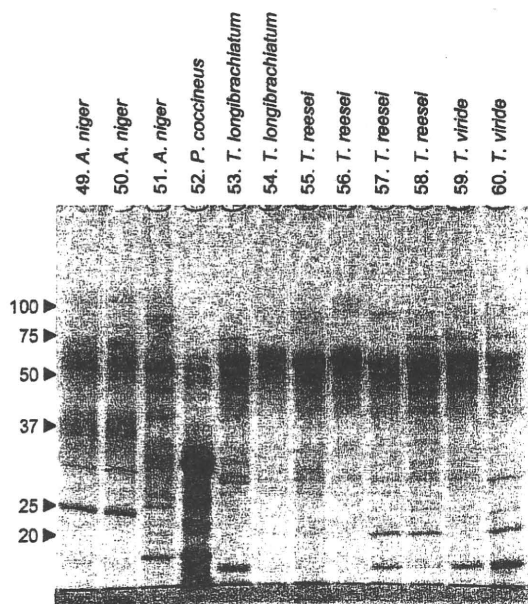


Fig. 7. SDS-PAGE of cellulase products

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、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ため、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

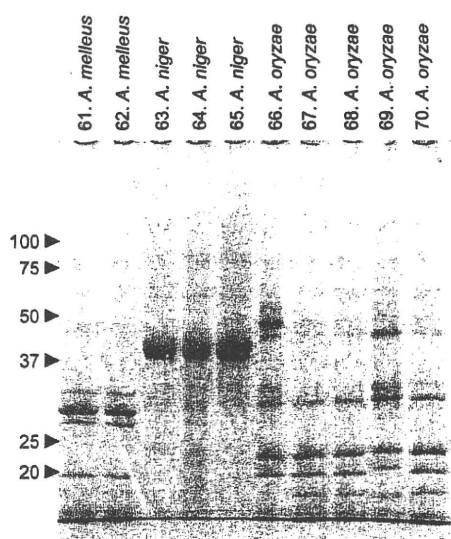


Fig. 8. SDS-PAGE of protease products 61–70

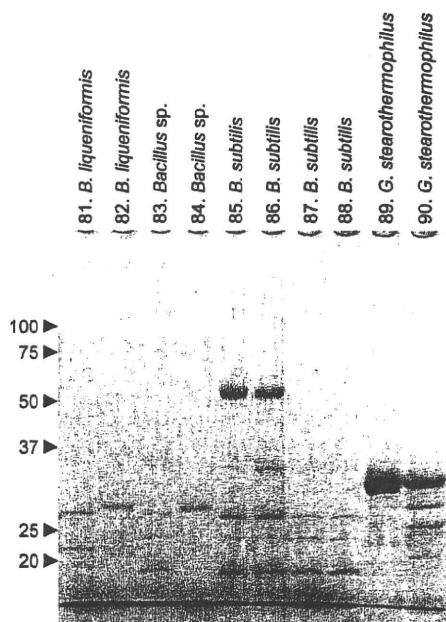


Fig. 10. SDS-PAGE of protease products 81–90

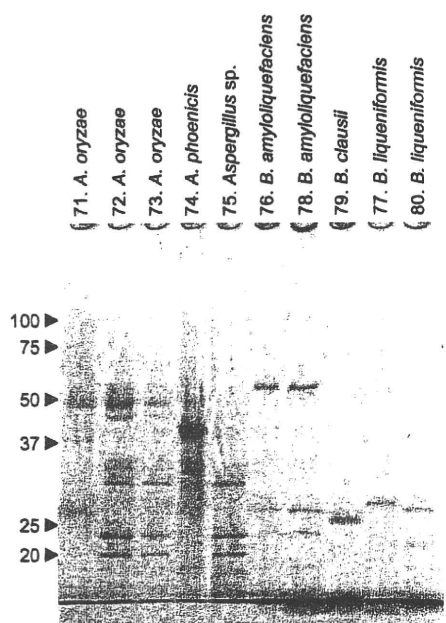


Fig. 9. SDS-PAGE of protease products 71–80

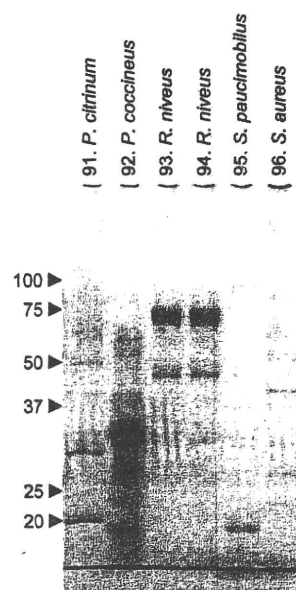


Fig. 11. SDS-PAGE of protease products 91–96

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。

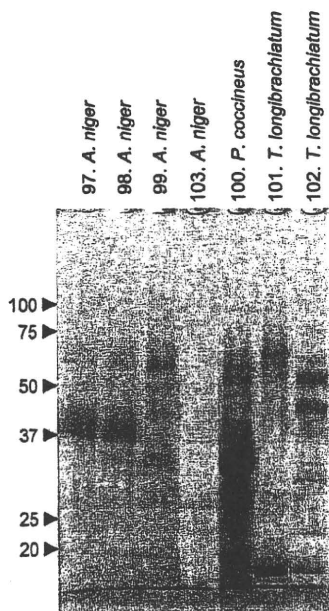


Fig. 12. SDS-PAGE of hemicellulase products

IV 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。

V 謝辞

試料を提供して下さった日本食品添加物協会に感謝いたします。本研究は厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進事業により行われた。

VI 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).



201033008A (2/2)

平成22年度 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

総括・分担研究報告書 分冊その2

既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

日本食品添加物協会

研究報告書

平成22年度 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 —既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

研究者 白須 由治

所属 日本食品添加物協会

役職 常務理事

〔はじめに〕

第9版食品添加物公定書新規収載候補である既存添加物について、成分規格原案作成のための調査研究を実施した。第4版既存添加物自主規格(平成20年)に収載された規格を見直し、新規収載候補既存添加物の自主規格の内容を再評価した。昨年度「食品・添加物等規格基準に関する試験検査等の実施について」の報告とその規格案に基づき、国立医薬品食品衛生研究所で実験的検証が行われた。本年度は自主規格の見直しと併行して第9版食品添加物公定書原案作成要領に従った表記修正を加えて第9版食品添加物公定書収載を目的とした原案を作成した。また既存添加物に関しては海外において食品扱いの品目もあるため、国際的な分類・規格などを明らかにすることを目的として調査を実施した。

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月は、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物418品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度は、第8版食品添加物公定書への収載候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。平成18年度には、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直し改定を行った。平成19年度には、新たに22品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、26品目について見直し改定を行った。

平成20年度は、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目(既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目)に加えて78品目を新規収載した。また、新たに18品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、11品目について「第4版既存添加物自主規格」の見直し改定を行った。なお、自主規格未策定品目には、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等も多いことから、平成19年度に導入した「参考規格」の概念を継続適用することにより策定品目の拡大を推進した。また、「第4版既存添加物自主規格」の試験法について妥当性を確認するため、検証作業を実施した。

昨年度は、新たに6品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、6品目について第4版既存添加物自主規格の見直しを行った。

本年度は第9版食品添加物公定書新規収載候補品目を中心に既存添加物自主規格の改善検討を行い、結果について本研究報告書に反映させた。また、自主規格の新規作成については、米国、EUを中心として、米国FDA、EU規格、JECF規格と日本の既存添加物規格を比較できる資料を作成するために、国内と海外における分類・規格の比較表を作成した。今後の自主規格作成のための基礎資料とする予定である。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、その内容の妥当性を評価・検討したものである。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

1-1. 自主規格の策定及び見直しと第9版食品添加物公定書の原案策定

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格（案）を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。さらに第9版食品添加物公定書原案作成要領に従ってその原案を策定した。

1-2. 既存添加物の規格基準に関する国際比較

近年の国際統合化を考慮して、既存添加物に関する海外規格との比較を実施した。すなわち米国、EUを中心とした分類・規格などについて国内基準との異同を明かにして国際比較表を作成した。

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

3-1. 自主規格の策定及び見直しと第9版食品添加物公定書の原案策定

本年度は「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第4版既存添加物自主規格」として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した自主規格案の内容についての見直しを行うとともに、新規収載候補品目の選定基準を策定して候補品をリスト化した。これら候補品に関して新たな試験方法の導入検討や妥当性検証を行うことにより、第9版食品添加物公定書原案作成要領を参考にして原案を作成した。

次の基準に基づき新規収載候補品目を選定した。

- (1) 広範囲に流通が認められるもの
- (2) 第4版既存添加物自主規格（日本食品添加物協会）の制定されているもの
- (3) 規格内容が第8版食品添加物公定書のレベルに達しているもの（国際規格、日本薬局方規格の定められているものを含む）

1) 新規収載候補品目分類概要

現時点における新規収載候補品目分類概要は次のとおりである。

甘味料	2	酵素	6 1
着色料	1 1（一般飲食物＝4）	酸味料・製造用剤	2
保存料・製造用剤	1	苦味料	1
増粘安定剤	2	乳化剤	1
強化剤・酸化防止剤	0	製造用剤・強化剤	3
ガムベース	4	（合計）	8 9（一般飲食物＝4）

2) 新規収載候補品目

現時点における新規収載候補品目（89品目）は次のとおりである。

分類	既添番号	品名お
甘味料	146	酵素分解カンゾウ
甘味料	397	Ｌーラムノース
着色料	14	アナトー色素
着色料	60	カカオ色素
着色料	85	カロブ色素
着色料	151	コウリヤン色素
着色料	218	タマネギ色素
着色料	219	タマリンド色素
着色料	333	ベニコウジ黄色素
着色料	一般飲食物	アカダイコン色素
着色料	一般飲食物	エルダーベリー色素
着色料	一般飲食物	シソ色素
着色料	一般飲食物	ブドウ果汁色素
保存料	310	ブドウ種子抽出物
増粘安定剤	39	ウエランガム
増粘安定剤	64	カシアガム
ガムベース	114	グッタペルカ
ガムベース	159	ゴム
ガムベース	177	ジェルトン
ガムベース	228	チクル
酵素	3	アガラーゼ
酵素	4	アクチニジン
酵素	6	アシラーゼ
酵素	7	アスコルビン酸オキシダーゼ
酵素	12	α -アセトラクトートデカルボキシラーゼ
酵素	16	アミノペプチダーゼ
酵素	17	α -アミラーゼ
酵素	18	β -アミラーゼ
酵素	26	アルギン酸リアーゼ
酵素	29	アントシアナーゼ
酵素	30	イソアミラーゼ
酵素	35	イヌリナーゼ
酵素	38	インベルターゼ
酵素	42	ウレアーゼ
酵素	43	エキソマルトテトラオヒドロラーゼ
酵素	45	エステラーゼ
酵素	66	カタラーゼ
酵素	75	α -ガラクトシダーゼ
酵素	76	β -ガラクトシダーゼ
酵素	84	カルボキシペプチダーゼ
酵素	92	キシラナーゼ
酵素	95	キチナーゼ
酵素	97	キトサナーゼ
酵素	117	グルカナーゼ

酵素	118	グルコアミラーゼ
酵素	120	α -グルコシダーゼ
酵素	121	β -グルコシダーゼ
酵素	122	α -グルコシルトランスフェラーゼ
酵素	124	グルコースイソメラーゼ
酵素	125	グルコースオキシダーゼ
酵素	126	グルタミナーゼ
酵素	169	酸性ホスファターゼ
酵素	179	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ
酵素	208	セルラーゼ
酵素	225	タンナーゼ
酵素	237	5'-デアミナーゼ
酵素	240	デキストラナーゼ
酵素	250	トランスグルコシダーゼ
酵素	257	トランスグルタミナーゼ
酵素	259	トレハロースホスホリラーゼ
酵素	261	ナリンジナーゼ
酵素	278	パーオキシダーゼ
酵素	286	パンクレアチン
酵素	300	フィシン
酵素	301	フィターゼ
酵素	302	フルクトシルトランスフェラーゼ
酵素	313	プルラナーゼ
酵素	315	プロテアーゼ
酵素	325	ペクチナーゼ
酵素	329	ヘスペリジナーゼ
酵素	342	ペプチダーゼ
酵素	344	ヘミセルラーゼ
酵素	350	ホスホジエステラーゼ
酵素	351	ホスホリパーゼ
酵素	354	ポリフェノールオキシダーゼ
酵素	362	マルトースホスホリラーゼ
酵素	363	マルトトリオヒドロラーゼ
酵素	371	ムラミダーゼ
酵素	392	ラクトパーオキシダーゼ
酵素	401	リパーゼ
酵素	402	リポキシゲナーゼ
酵素	413	レンネット
酸味料	33	イタコン酸
酸味料・製造用剤	302	フィチン酸
苦味料	73	カフェイン(抽出物)
乳化剤	188	植物性ステロール
製造用剤	393	ラクトフェリン濃縮物
強化剤・製造用剤	187	骨焼成カルシウム
強化剤	364	サンゴ未焼成カルシウム

3-2. 既存添加物の規格基準に関する国際比較

JECFA、米国FDA、EUを中心とした分類・規格などについて国内基準との異同を明かにして国際比較表を作成し別紙資料2に示した。

4. 研究結果の詳細

(1) 自主規格の策定及び見直しと第9版食品添加物公定書の原案策定

研究結果の詳細は、別紙資料1のとおりである。

(2) 既存添加物の規格基準に関する国際比較

調査研究結果の詳細は、別紙資料2のとおりである。

今後の自主規格案作成予定品目は次の通りである。

	品目数	備考
既存添加物品目総数	365	
第8版食品添加物公定書収載品目	127	
第4版既存添加物自主規格収載品目	69	
小計	296	
既存添加物自主規格未作成品目	69	
既存添加物自主規格案作成済み品目	約33	
食添品が海外のみで流通のもの	約14	
作成不能なもの	約2	香辛料抽出物他
自家消費で作成・管理不能なもの	約5	
自主規格案作成必要な品目	約15	

以上

別紙

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	白須由治	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	大倉裕二	キリン協和フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	高見健一	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	伊藤秀行	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田裕次	三菱商事フードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	皆藤光雅	三菱化学フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	北村智	三栄源I7・I7・AI株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西山浩司	三栄源I7・I7・AI株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西宮隆	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	佐藤祐一	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	高橋仁一	日本食品添加物協会
技術顧問	山田隆	日本食品添加物協会

別紙資料1

自主規格の策定及び見直しと 第9版食品添加物公定書の原案策定

平成 23 年 3 月

第一部会（甘味料）第 9 版食品添加物公定書新規収載既存添加物候補品目の成分規格の整備に関する
調査研究報告書

日本食品添加物協会 第一部会
研究者所属：丸善製薬株式会社
アルプス薬品工業株式会社
三菱商事フードテック株式会社

1. 目的

第 9 版食品添加物公定書新規収載既存添加物候補品目の成分規格案を、既存添加物の第 4 版自主規格等を基に作成する。

2. 検討対象既存添加物

以下の二品目について成分規格案を検討した。

酵素分解カンゾウ

L-ラムノース

3. 成分規格案

各既存添加物の説明に記載の通り。

以上

酵素分解カンゾウ

研究者所属：丸善製薬株式会社

1. 緒言

本報告は、既存添加物「酵素分解カンゾウ」について、丸善製薬株式会社にて、第 9 版食品添加物公定書新規収載既存添加物候補品目の成分規格案策定結果を基にまとめたものである。

2. 目的

第 9 版食品添加物公定書新規収載候補品目として成分規格案を作成する。

3. 検討経過・内容

第 4 版既存添加物自主規格(平成 20 年)に収載された規格を見直し、確認試験の簡略化、重金属試験に代えて鉛試験を行う等を検討し、結果を「平成 21 年度 食品・添加物等規格基準に関する試験検査等の実施について」で報告した。その規格案に基づき国立医薬品食品衛生研究所で実験的検証が行われ、平成 22 年 11 月、同案は妥当であるとの報告を得た。

平成 21 年度案に第 9 版食品添加物公定書原案作成要領に従った表記修正を加え、第 9 版食品添加物公定書収載案を作成した。

4. 成分規格案

別紙 1 に示す。

以上

「第9版 食品添加物公定書」新規収載候補品目資料

1. 成分規格名(食品添加物名)

酵素分解カンゾウ

2. 成分規格(案)概要

規格項目	規格概要
定義	本品は、カンゾウ抽出物(ウラルカンゾウ(<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer), チョウカカンゾウ(<i>Glycyrrhiza inflata</i> Batalin), ヨウカンゾウ(<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linné), 又はそれらの近縁植物の根又は根茎から得られた, グリチルリチン酸を主成分とするものをいう。)を酵素分解して得られたものである。主成分はグリチルレチン酸-3-グルクロニドである。
含量	本品を乾燥したものは, グリチルレチン酸-3-グルクロニド($C_{36}H_{54}O_{10}$ =646.81)とグリチルリチン酸($C_{42}H_{62}O_{16}$ =822.93)の和として 40.0%以上を含み, グリチルレチン酸-3-グルクロニドとグリチルリチン酸の和の 25%以上は, グリチルレチン酸-3-グルクロニドである。
性状	本品は, 白～黄褐色の粉末である
確認試験	本品につき, 定量法の操作条件で高速液体クロマトグラフィーを行うとき, 検液の主ピークの保持時間は, 標準液のグリチルレチン酸-3-グルクロニドとグリチルリチン酸のピークの保持時間と一致する。
純度試験	
(1) 鉛 (Pbとして)	2.0 μ g/g以下(5.0g, 第1法)
(2) ヒ素 (As ₂ O ₃ として)	4.0 μ g/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)
乾燥減量	8.0%以下(105°C, 1時間)
強熱残分	15.0%以下
定量法	液体クロマトグラフィーの絶対検量線法

3. 成分規格(案)

別紙1のとおり

4. 国際規格等(JECFA, FCC, 日局, 局外規, 外原規, 薬添規, 及び第4版既存添加物自主規格)の有無及び規格設定の根拠

別紙2のとおり

国際規格等:第4版既存添加物自主規格

5. 試験法検証作業完了項目

性状, 純度試験(2), 乾燥減量, 強熱残分, 定量法

6. 裏付け資料

別紙3のとおり

7. 特性, 溶解性, 用途等

別紙4(既存添加物名簿収載品目リスト注解書(日本食品添加物協会))のとおり

8. 特記事項

なし

以上