

acidの異性体である5-*O*-caffeoylquinic acid (I) および4-*O*-caffeoylquinic acid (III) と推定した。

## 2. 添加物製品中の成分の定量

Table 1にLC/MSによる添加物2製品(DO-1およびDO-2)中の各含有成分の定量結果を示した。液状製品(DO-1)の含有成分濃度は、粉末製品(DO-2)の約2分の1であったが、両製品の乾燥減量(44.1%および3.2%)を考慮すると乾燥重量当たりの濃度はほぼ等しく、また、両製品が含有する成分組成もほぼ等しいことが示された。これらの主要フラボノイドはクエルシトリン(4)、次いでヒペリン(2)であり、既存添加物名簿<sup>1)</sup>の定義に主成分として記載されているイソクエルシトリン(3)の濃度は、クエルシトリン(4)の約10分の1であった。また、3-*O*-caffeoylquinic acid (II)と、5-および4-*O*-caffeoylquinic acidの推定peak IおよびIIIの含有量(3-*O*-caffeoylquinic acid (II)換算)を合わせ、caffeoylquinic acid類として算出すると、クエルシトリン(4)と同程度で比較的多量であった。これら添加物製品の成分組成は、ドクダミの葉部のフラボノイド含有量を測定した既報<sup>3-5)</sup>の組成と類似していた。

## 3. 生薬ジュウヤク葉部から調製した抽出物の分析

ドクダミ *H. cordata* の花期の地上部を基原とする生薬ジュウヤク (*Houttuyniae Herba*) 6製品の葉部の30%(v/v)エタノール抽出物をLC/MSで測定し、Table 1に示したSIR (ESI-)選択イオンを分析した際のトータルイオンクロマトグラムをFig. 5に示す。6製品とも抽出物の成分組成はほぼ同じで、中国産(HC-1)と他の国産製品(HC-2~HC-6)との間で顕著な差異は認められなかった。これら生薬製品の抽出物は既存添加物製品の成分組成と類似し、主要成分としてクエルシトリン(4)を含み、その他にクエルセチン(5)、クエルセチン配糖体(1~3)およびcaffeoylquinic acid異性体(I~III)を含有していた。

以上の結果、今回分析対象とした既存添加物ドクダミ抽出物製品は、ドクダミの葉部からの抽出物の成分組成に関する既報<sup>3-5)</sup>に加え、ドクダミを基原とする生薬製品の葉部からの抽出物の成分組成とも類似したため、既存添加物2製品

の基原は、既存添加物名簿収載品目リスト<sup>2)</sup>に記載のあるドクダミ科ドクダミ *H. cordata* の葉であると確認された。また、今回分析した既存添加物製品のみならず、既報<sup>3-5)</sup>のドクダミの葉部に関する結果や生薬ジュウヤク葉部からの調製抽出物においても、主要フラボノイドはクエルシトリンでありイソクエルシトリンは微量であったことから、既存添加物名簿の主成分の記述については、今後再検討が必要だと考えられる。

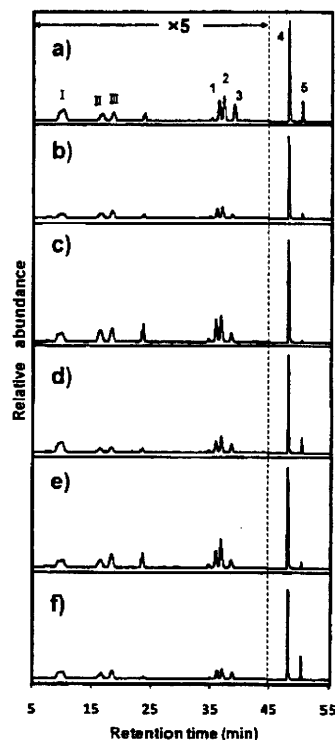


Fig. 5. LC/MS (ESI-) total ion chromatograms (SIR selected ions: see Table 1) of 30% ethanol extracts of *Houttuyniae Herba* (leaves)

a) ~ f): HC-1 ~ HC-6, respectively  
II: 3-*O*-caffeoylquinic acid, 1: rutin, 2: hyperin,  
3: isoquercitrin, 4: quercitrin, 5: quercetin  
x5: The vertical axis is enlarged to five times.

Table 1. Conditions of the LC/MS analysis and concentrations of constituents in Dokudami extract products (DO-1 and -2)

| Peak*<br>No. | Compound             | M.W. | LC/MS<br>conditions         |             | Concentrations**<br>(% in products) |              |
|--------------|----------------------|------|-----------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------|
|              |                      |      | SIR(ESI-)<br>( <i>m/z</i> ) | cone<br>(V) | DO-1                                | DO-2         |
| I - III      | Caffeoylquinic acids | 354  | 353                         | 20          | 0.55 ± 0.037                        | 0.91 ± 0.001 |
| 1            | Rutin                | 610  | 609                         | 50          | 0.04 ± 0.002                        | 0.10 ± 0.008 |
| 2            | Hyperin              | 464  | 463                         | 30          | 0.16 ± 0.009                        | 0.36 ± 0.031 |
| 3            | Isoquercitrin        | 464  | 463                         | 30          | 0.05 ± 0.001                        | 0.11 ± 0.004 |
| 4            | Quercitrin           | 448  | 447                         | 30          | 0.49 ± 0.026                        | 1.05 ± 0.074 |
| 5            | Quercetin            | 302  | 301                         | 30          | 0.03 ± 0.001                        | 0.03 ± 0.001 |

\* Peaks shown in Fig. 3

\*\* Concentrations (%) are expressed as means ± SD (*n* = 3).

#### 4. ドクダミ抽出物および含有成分の抗酸化活性

これまでの報告<sup>10, 11)</sup>に、ドクダミから作製した抽出物の DPPH ラジカル消去活性を調べた例はあるが、既存添加物ドクダミ抽出物製品についての報告は無い。そこでまず、既存添加物 2 製品の DPPH ラジカル消去活性を調べた。2 製品とも濃度に依存して活性が上昇し、60% の消去率を示す濃度までは相関係数 0.99 以上の直線性を持ってラジカルを消去したが、消去率 60 ~ 70% を超える濃度から頭打ちを示す傾向が認められた。DO-1 および DO-2 の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 658.0 ± 5.10 μg/mL および 289.9 ± 0.73 μg/mL、TEAC 値は 0.09 および 0.21 μg trolox/μg と算出された。

さらに、添加物製品から検出された成分の試薬製品を用いて DPPH ラジカル消去活性を測定し、IC<sub>50</sub> 値および TEAC 値を求めた (Table 2)。試薬濃度 (μg/mL) は、無水物換算で示した。なお、試薬イソクエルシトリンのみは、LC/MS による分析の結果、不純物としてクエルセチンを 4.31% 含有していたため、不純物クエルセチンに起因するラジカル消去活性を差し引いて IC<sub>50</sub> 値を算出した。いずれの成分も TEAC 値が 1 μg trolox/μg より大きく、Trolox より強い DPPH ラジカル消去活性を示した。また、今回試薬標品が入手できなかった 5- および 4-*O*-caffeoylquinic acid (peak I および III) の DPPH ラジカル消去活性は、既報<sup>12)</sup>によると IC<sub>50</sub> 値が 3-*O*-caffeoylquinic acid の約 0.9 および 1.2 倍であり、3-*O*-caffeoylquinic acid とほぼ同じレベルであることが報告されている。

Table 2. DPPH radical scavenging activity of compounds identified in Dokudami extract products

| Compound                         | IC <sub>50</sub> value*<br>(μg/mL) | TEAC**<br>(μg trolox/μg) |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid | 30.9 ± 0.42                        | 1.95                     |
| Rutin                            | 56.3 ± 0.41                        | 1.07                     |
| Hyperin                          | 40.8 ± 0.65                        | 1.48                     |
| Isoquercitrin                    | 50.5 ± 0.73                        | 1.19                     |
| Quercitrin                       | 45.9 ± 0.25                        | 1.31                     |
| Quercetin                        | 20.1 ± 0.12                        | 3.00                     |

\* IC<sub>50</sub> values were determined by regression line and expressed as means ± SD (n = 3).

\*\* TEAC (μg trolox/μg) are expressed as means (n = 3).

つぎに、LC/MS による定量値 (Table 1) および DPPH ラジカル消去活性の TEAC 値 (Table 2) の結果から、ドクダミ抽出物全体の抗酸化活性に対する各成分の寄与について考察した。各成分の寄与の大きさ = 成分の定量値 (Table 1) × 成分の TEAC 値 (Table 2) として考えると、クエルセチンの TEAC 値は、クエルシトリンおよびクロロゲン酸 (3-*O*-caffeoylquinic acid) の 2.3 および 1.5 倍と高かったものの、含有量がこれら成分の 30 分の 1 以下と極めて少量であったため、全体の抗酸化活性への寄与としては、クエルシトリンおよびクロロゲン酸類より低かった。一方、クエルシトリンおよびクロロゲン酸の TEAC 値は、クエルセチン以外のルチン、ヒペリンおよびイソクエルシトリンの 0.9 ~ 1.8 倍と、

同等かそれ以上であり、さらに含有量はこれら成分の 2.5 ~ 10.5 倍と著しく高かった。そのため今回調べた成分の内、クエルシトリンおよびクロロゲン酸類の抗酸化活性が、既存添加物ドクダミ抽出物製品全体の活性に大きく寄与していることが示唆された。

## IV まとめ

天然由来の酸化防止剤である既存添加物ドクダミ抽出物製品の品質を明らかにするため、LC/MS により含有フラボノイド成分およびクロロゲン酸類の定量を行った。ドクダミ抽出物 2 製品は性状が異なることもあり、成分濃度に 2 倍程度の違いは見られたものの、クエルセチンとその配糖体およびクロロゲン酸類が検出され、検出された成分の組成はほぼ同じであった。主成分はクエルシトリン、ヒペリンであり、既存添加物名簿<sup>1)</sup>の定義に主成分として記載のあるイソクエルシトリンは少なかった。しかしながら、既存添加物ドクダミ抽出物のフラボノイド等の成分組成は、ドクダミの成分に関する既報<sup>3-5)</sup> およびドクダミを基原とする生薬ジュウヤクの葉部からの抽出物と類似していたことから、既存添加物として提供された 2 製品の基原がドクダミ科ドクダミ *H. cordata* の葉であることが確認された。既存添加物名簿の主成分の記述については、今後再検討が必要だと考えられる。既存添加物製品および製品中から検出された各成分の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、添加物製品は抗酸化活性を有することが確認された。また、各成分の含有量と TEAC 値から、今回調べた成分の内、クエルシトリンおよびクロロゲン酸類の抗酸化活性が既存添加物製品全体の活性に大きく寄与していることが示唆された。

本研究により得られた既存添加物ドクダミ抽出物製品の品質評価の結果は、民間薬あるいは健康食品として市場に流通している各種ドクダミ製品の品質管理を行う上でも有用と考えられる。

## V 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業により実施したものである。ドクダミ抽出物の収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

## 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) Kawamura, T., Hisata, Y., Okuda, K., Noro, Y., Tanaka, T., Yoshida, M., Sakai, E.,: Pharmacognostical studies of *Houttuynia* Herba (1) flavonoid glycosides contents of *Houttuynia cordata* THUNB.. *Natural Medicines*, **48**, 208-212 (1994).
- 4) Fuse, J., Kanamori, H., Sakamoto, I., Yahara, S.,: Studies on flavonol glycosides in *Houttuynia cordata*. *Natural Medicines*, **48**, 307-311 (1994).
- 5) Meng, J., Leung, K.S.-Y., Jiang, Z., Dong, X., Zhao, Z., Xu, L.-J.,: Establishment of HPLC-DAD-MS Fingerprint of Fresh *Houttuynia cordata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1604-1609 (2005).
- 6) Shimamura, T., Matsuura, R., Tokuda, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Matsufuji, H., Matsui, T., Matsumoto, K., Ukeda, H.,: Comparison of conventional antioxidants assays for evaluating potencies of natural antioxidants as food additives by collaborative study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **54**, 482-487 (2007).
- 7) Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.,: Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2900-2911 (2003).
- 8) Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.,: Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3821-3832 (2005).
- 9) Matsui, Y., Nakamura, S., Kondou, N., Takasu, Y., Ochiai, R., Masukawa, Y.,: Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **858**, 96-105 (2007).
- 10) Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K.,: Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**, 1161-1168 (2002).
- 11) Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.C., Shibahara, N., Park, J.C.,: Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*, **10**, 544-551 (2003).
- 12) Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T.,: In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4893-4898 (2004).

## SDS-PAGE による既存添加物酵素のタンパク質分離パターン

(2010年3月15日受付)

(2010年3月31日受理)

秋山卓美<sup>a)</sup>、佐々木 亮<sup>b)</sup>、山崎 壮<sup>a)</sup>、棚元憲一<sup>a, c)</sup>、山形一雄<sup>b)</sup>、河村葉子<sup>a)</sup>

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 日本大学

c) 武蔵野大学

## Protein separation patterns of food manufacturing enzymes obtained by SDS-PAGE

(Received March 15, 2010)

(Accepted March 31, 2010)

Takumi Akiyama<sup>a)</sup>, Ryo Sasaki<sup>b)</sup>, Takeshi Yamazaki<sup>a)</sup>, Kenichi Tanamoto<sup>a, c)</sup>, Kazuo Yamagata<sup>b)</sup>, Yoko Kawamura<sup>a)</sup>

a) National Institute of Health Sciences

b) Nihon University

c) Musashino University

## Abstract

Food manufacturing enzymes are named according to enzyme functions in Japan. Active enzyme proteins are not identified as substances. Therefore, in the List of Existing Food Additives, most items consist of enzymes from different origins. If a chemical analysis of proteins in enzyme products can identify origins, the method will be a probable candidate for a simple identification test for enzyme origins. SDS-PAGE was applied to  $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -amylases, catalases,  $\beta$ -galactosidases, glucoamylases, cellulases, proteases, and hemicellulases. As many products as possible were collected to cover most of currently circulating products in Japan. One hundred and three products available in Japan were analyzed by SDS-PAGE. Molecular weights of major proteins were calculated. Characteristic electrophoresis patterns were found in most products. Useful information on relationships between origins and separation patterns of proteins was obtained. Identification of species was achieved for all products from plants and many products from bacteria or fungi although identification was limited to the genera level for some microorganisms like *Bacillus*.

Keywords : 食品用酵素、タンパク質、SDS-PAGE、基原  
food manufacturing enzyme, protein, SDS-PAGE, origin

## I 緒言

既存添加物名簿<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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

連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 秋山卓美

Corresponding author: Takumi Akiyama, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

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

$\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、カタラーゼ、 $\beta$ -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  $\alpha$ -アミラーゼ 8 基原 18 試料、 $\beta$ -アミラーゼ 3 基原 6 試料、カタラーゼ 3 基原 5 試料、 $\beta$ -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<sup>3)</sup>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  $\mu$ L とり、1.0 mL の染色液を加え、室温で 5 分間以上置いた。デイスボーザブルキューベットに移し、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  $\mu$ g 相当量を、製品 38~103 は 1 レーンあたりタンパク質 3  $\mu$ g 相当量載せた。製品 18 はこの他にタンパク質 71  $\mu$ g 相当量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 <sup>*1</sup>            | Origin <sup>*1</sup>                          | Sample number <sup>*2</sup>                    | Identical pattern <sup>*3</sup> | Similar pattern <sup>*3</sup> | Molecular weights of major proteins (kDa) |            |
| $\alpha$ -amylase             | <i>Aspergillus foetidus</i> <sup>*5</sup>     | 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                                     |                                 | b                             | 54  |            |
|                               |   | 16   |                                 |                               | 54, 43                                    |            |
|                               |   | <i>Saccharomonospora viridis</i> <sup>*6</sup> | 18                              |                               |   | (32), (23) |
|                               | $\beta$ -amylase                              | <i>Triticum aestivum</i>                       | 19                              |                               | i   | 55, 38     |
|                               |   | 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  |            |
|                               |   | 28   |                                 |                               | 57  |            |
|                               |   | 29   |                                 |                               | 66, 57                                    |            |
| $\beta$ -galactosidase        | <i>Aspergillus oryzae</i>                     | 30, 31   |                                 |                               | 91, 60, 53                                |            |
|                               |   | 32   |                                 |                               | 69, 53                                    |            |
|                               |   | 33   |                                 |                               | 138, 108, 98, 83                          |            |
|                               |   | 34   |                                 |                               | 93, 81, 48, 34                            |            |
|                               |   | 35   |                                 |                               | 93, 81, 69, 48, 34                        |            |
| glucoamylase                  | <i>Aspergillus niger</i>                      | 36, 37   |                                 |                               | 93, 81, 69, 48                            |            |
|                               |   | 38, 39, 40, 41                                 |                                 |                               | 100, 75, 64                               |            |
|                               |   | 42   |                                 |                               | 64  |            |
|                               |   | 43, 44   | c                               |                               | 69, 62, 51, 40                            |            |
|                               |   | 45, 46, 47, 48                                 | c                               |                               | 69, 62, 51, 40                            |            |
| cellulase                     | <i>Aspergillus niger</i>                      | 49, 50   |                                 |                               | 57, 40, 37, 25                            |            |
|                               |   | 51   |                                 |                               | 57, 50, 42, 26, 18                        |            |
|                               |   | 52   |                                 |                               | 30, 27, 23, 18                            |            |
|                               |   | 53   | k                               |                               | 58, 54, 16                                |            |
|                               |   | 54   | d                               | l                             | 61, 55                                    |            |
|                               |   | 55   | k                               |                               | 58, 54                                    |            |
|                               |   | 56   | d                               | l                             | 61, 55                                    |            |
|                               |   | 57   | k                               |                               | 58, 54, 23, 16                            |            |
|                               |   | 58   | k                               |                               | 58, 54, 23                                |            |
|                               |   | 59   | l                               |                               | 61, 55, 50, 16                            |            |
| 60                            | l   |  | 61, 55, 29, 23, 16              |                               |   |            |
| protease                      | <i>Aspergillus niger</i>                      | 61, 62   |                                 |                               | 32, 29, 27, 19                            |            |
|                               |   | 63, 64, 65                                     | e                               |                               | 40  |            |
|                               |   | 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                                    |            |
|                               |   | 74   | e                               |                               | 40  |            |
|                               |   | 75   |                                 | m                             | 31, 22, 20                                |            |
|                               |   | 76, 78   | n                               |                               | 54, 27                                    |            |
|                               |   | 79   |                                 |                               | 26  |            |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus licheniformis</i>                 | 77, 82   | g                               |                               | 28  |            |
|                               |   | 80, 81   |                                 |                               | 27, 22                                    |            |
|                               |   | 83   | h                               |                               | 27, 24, 18                                |            |
|                               |   | 84   | g                               |                               | 28  |            |
|                               |   | 85   |                                 | n                             | 54, 27, 18                                |            |
|                               |   | 86   |                                 | n                             | 54, 33, 27, 18                            |            |
|                               |   | 87, 88   | h                               |                               | 27, 24, 18                                |            |
|                               |   | 89, 90   |                                 |                               | 31  |            |
|                               |   | 91   |                                 |                               | 30, 20                                    |            |
|                               |   | 92   |                                 |                               | 32, 27, 23, 18                            |            |
| <i>Rhizopus niveus</i>        | <i>Rhizopus niveus</i>                        | 93, 94   |                                 |                               | 67, 44                                    |            |
|                               |   | 95   |                                 |                               | 18  |            |
|                               |   | 96   |                                 |                               | 40, 27                                    |            |
|                               |   | 97, 98   |                                 |                               | 40  |            |
|                               |   | 99   |                                 |                               | 59  |            |
|                               |   | 103  |                                 |                               | 27, 22                                    |            |
|                               |   | 100  |                                 |                               | 32, 27, 23, 18                            |            |
|                               |   | 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 paucimobilitis*.

25% glycerol, 2% SDS, 0.01% Bromophenol Blue, 5%  $\beta$ -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:  $1 \times$  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  $10 \mu\text{L}$  を  $2 \times$  サンプルバッファー  $10 \mu\text{L}$  と混合し、 $100^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した。  $10 \mu\text{L}$  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  $2 \mu\text{g}$  または  $3 \mu\text{g}$  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. $\alpha$ -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  $\alpha$ -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. amyloliquefaciens* 由来の  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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、 $71 \mu\text{g}$  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、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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*

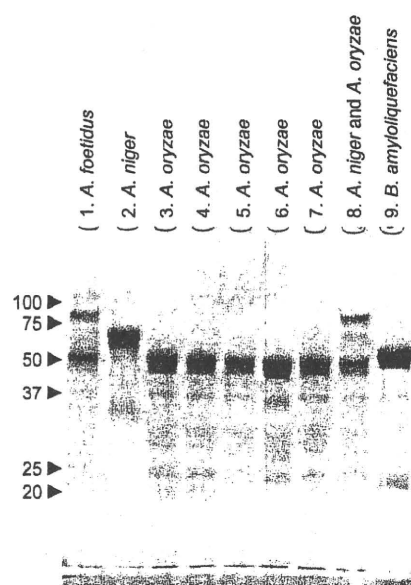
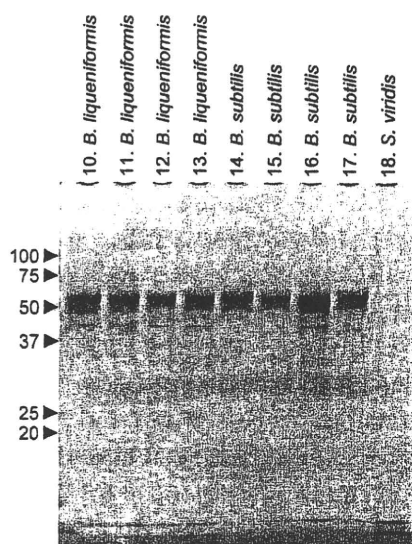


Fig. 1. SDS-PAGE of  $\alpha$ -amylase products 1-9

Fig. 2. SDS-PAGE of  $\alpha$ -amylase products 10–18

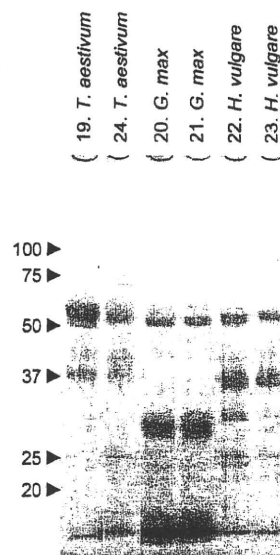
属由来の製品は特徴的な 54 kDa のバンドがあるため、属のレベルでの判定は可能である。*Bacillus* 属は同属内の菌が分類学上近縁であるとされており、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. subtilis* とは近縁であることが報告されている<sup>4)</sup>。それらに含まれる  $\alpha$ -アミラーゼの分子量が類似していることはあり得るので、*Bacillus* 属内の同属異種の菌株由来の酵素を SDS-PAGE で相互区別することは困難であると予想される。

## 2. $\beta$ -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  $\beta$ -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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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。

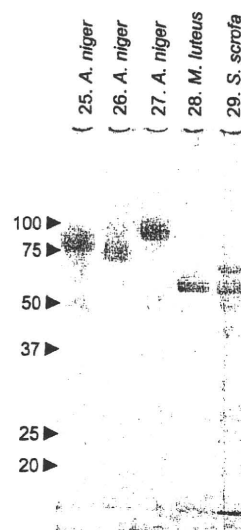


Fig. 4. SDS-PAGE of catalase products

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. $\beta$ -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  $\beta$ -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。

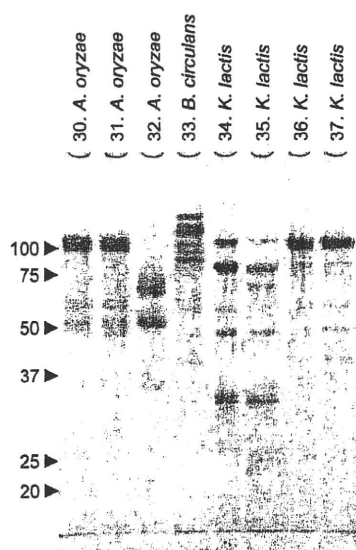


Fig. 5. SDS-PAGE of  $\beta$ -galactosidase products

#### 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。

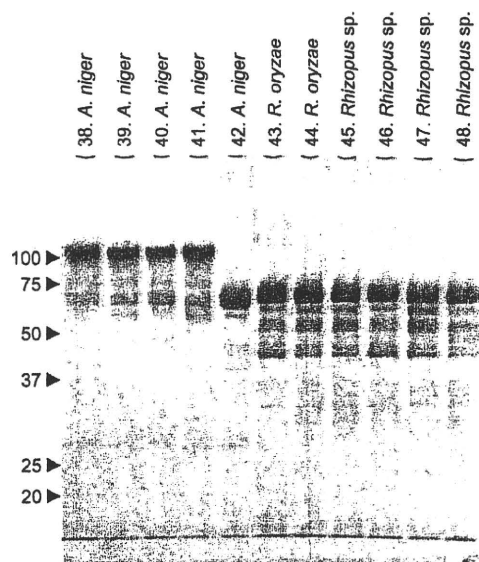


Fig. 6. SDS-PAGE of glucoamylase products

#### 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。

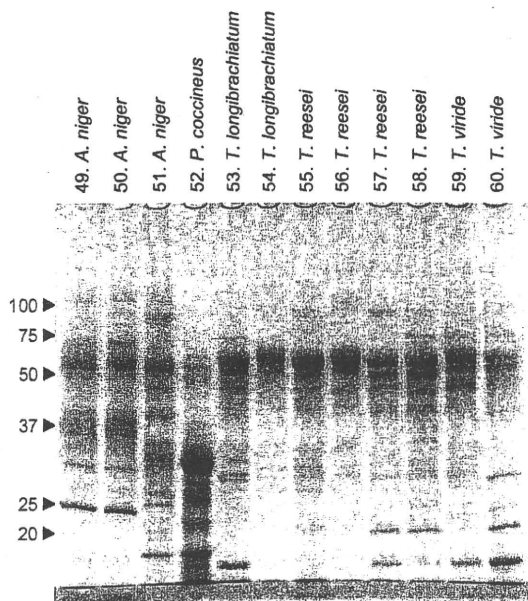


Fig. 7. SDS-PAGE of cellulase products

## 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

で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. coccinus* 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. coccinus* 由来のプロテアーゼ製品 92 は同じ *P. coccinus* 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. coccinus* 由来の製品 100 に

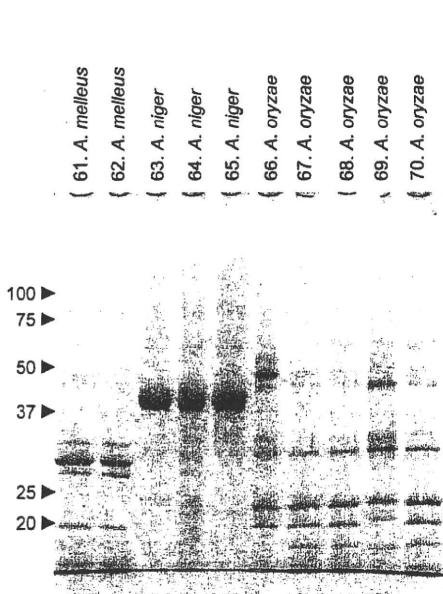


Fig. 8. SDS-PAGE of protease products 61-70

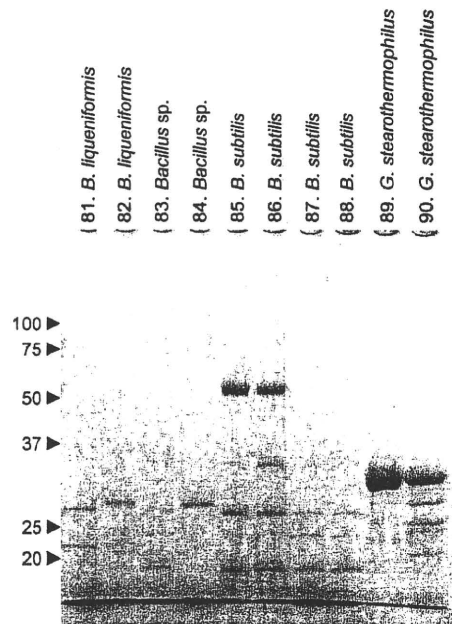


Fig. 10. SDS-PAGE of protease products 81-90

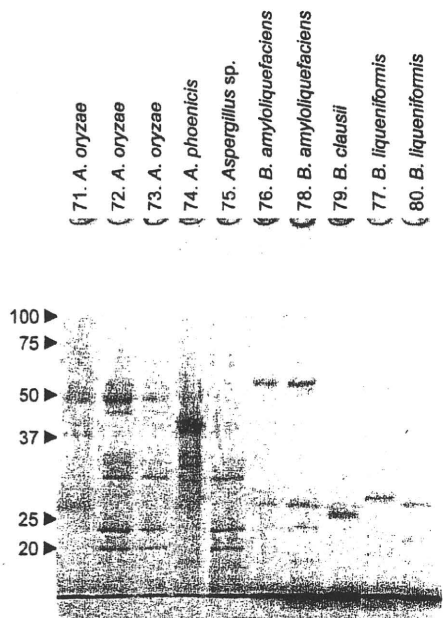


Fig. 9. SDS-PAGE of protease products 71-80

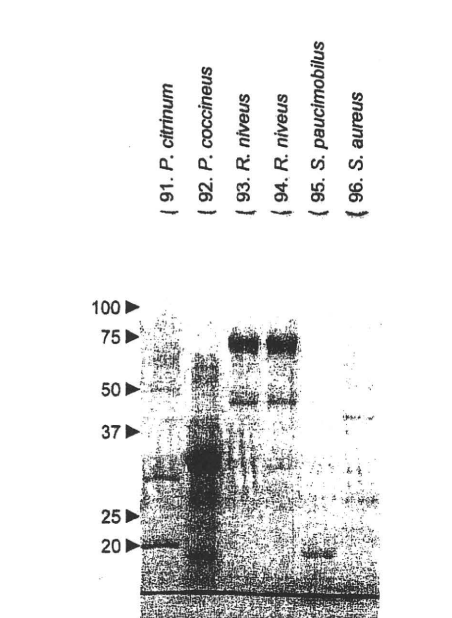


Fig. 11. SDS-PAGE of protease products 91-96

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。

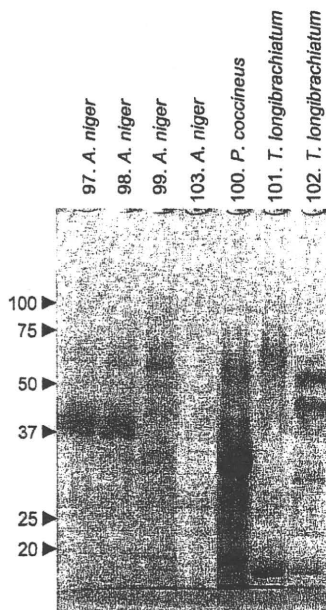


Fig. 12. SDS-PAGE of hemicellulase products

#### 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).



