

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～ペプチドを指標とした既存添加物酵素の基原同定法の検討～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物製品から基原を同定できる手法について検討した。具体的には、既存添加物酵素6品目41製品をモデル試料として、ペプチドを指標としたMascot searchによる基原同定法を検討した。酵素製品由来ペプチドの試料調製方法、LC/MS条件、データベース解析条件について最適化を行った。同定結果は、データベースに大きく依存した。検討した方法は、データベースの充実化によって、既存添加物製品から精巧な基原同定が可能であることを期待させた。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 研究員

A. 研究目的

天然添加物は、平成7年(1995年)に食品衛生法が改正されるまでは、有害でない限り一般の食品と同様の扱いであり、添加物としての法的規制を受けていなかった。しかし、平成7年の食品衛生法改正以降、添加物の指定制度は、天然添加物にも適用された。このとき、今まで使用できた天然添加物が規制されると、販売業者・消費者に混乱が生じるため、少なくとも平成7年までに流通実態のあった天然添加物は、既存添加物とみなし、指定制度の例外措置がとられた。ただし、今後の既存添加物の有効性や安全性を確保するためには、早急な成分規格の作成が必要不可欠である。

既存添加物の成分規格を作成するとき、その情報の拠り所となるのが、平成8年に告示された既存添加物名簿収載品目リストとなる。このリストには、既存添加物の基原・製法・本質が記載されている。実際の流通製品を分析することで、その基原や有効成分について科学的な情報が抽出される。これらのデ

ータは成分規格の定義・含量規定・確認試験を設定するための根拠データとして使用される。特に、定義で規定される基原の意義は大きく、想定外の原料が使用されることを防ぐ効果が期待されている。しかし、既存添加物の流通製品を分析しても、基原の判断が難しい品目が多く見受けられる。その代表例として既存添加物酵素が挙げられる。

酵素は、年間を通して生産可能な微生物を基原とする製品がほとんどである。流通製品から基原情報を抽出することが難しい理由として、①酵素は高分子化合物であり、従来のHPLC分析・MS分析では基原の判断が困難、②酵素は菌体外に排出されたタンパク質を製剤化したものであることがおおく、微生物基原の同定時に汎用される遺伝子解析が物理的に不可能、が挙げられる。

すでに第9版食品添加物公定書には、イソマルトデキストラナーゼを除く全ての既存添加物酵素が収載されている。公定書に規定された既存添加物酵素の基原は、販売業者からの情報提供に基づいている。また既存添加物酵素の基原は、ひとつの生物種に規定されていない。例えば、異なる生物種に由来する製品でも、酵素活性が同じであれば、同一の品目と見なされる。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物

を基原とするものが殆どである。微生物の中には、有害物質を生産するものもある。したがって、酵素の流通製品から基原をたどれるトレーサビリティ体系を構築することは、既存添加物酵素の安全性を確保する上で重要な検討項目といえる。

そこで、本研究ではメタボローム解析などで多用される Mascot search を利用して既存添加物酵素の基原について、トレーサビリティ体系の構築を検討することにした。具体的には、酵素の本質であるタンパク質から得たペプチドの質量情報と一致するものをデータベースから探索し、そのペプチドが帰属されるタンパク質の基原情報を確認する方法を検討した。モデル試料として、日本食品添加物協会から基原の情報とともに提供があった6品目41製品を用いた。Mascot search から得られた酵素製品の基原情報と付帯情報に矛盾がないか、また基原同定法としての可能性について検討したので報告する。

B. 研究方法

B-1. 試料

既存添加物酵素の各製造企業で把握されている基原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6基原10試料、 β -アミラーゼ2基原3試料、 β -ガラクトシダーゼ2基原4試料、グルコアミラーゼ3基原8試料、セルラーゼ5基原9試料、ヘミセルラーゼ4基原7試料。付帯する基原情報はTableに記載した。

B-2. 試薬

グアニジン塩酸塩(Cat No. 17353-25)およびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Cat No. 35434-05)は、ナカライテスク(株)より購入した。ヨード酢酸ナトリウム(Cat No. I2512-25G)および重炭酸アンモニウム(Cat No. A6141-500G)は、Sigma-Aldrich社より購入した。エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物(Cat No. 343-01861)、HPLC用アセトニトリル(ACN)(Cat No. 015-08633)、トリフルオロ酢酸(Cat No. 208-02746)およびギ酸(Cat No.

063-05895)は、和光純薬工業(株)より購入した。ジチオトレイトール(DTT)(Cat No. 20291)は、Thermo Scientific社より購入した。消化酵素 Trypsin(Cat No. V5280)および rLys-C(Cat No. V1671)は、Promega社より購入した。

B-3. 試料調製

試料は、総タンパク質濃度が約1g/LとなるようにTEG(0.5M Tris-HCl, 5mM EDTA, 7M グアニジン(pH 8.0))に溶解させた。この液100 μ Lに対し、0.5M DTT 1 μ L添加し、37°Cで90分反応させた後、1M ヨード酢酸 1.2 μ L添加し、37°Cで30分間反応させ、タンパク質を還元、アルキル化した。続いて水を400 μ L添加し、あらかじめ水で平衡化させたPD Mini Trap G-25(Cat No. 28918007, GE Healthcare社製)に全量(502.2 μ L)を付加した後、目的のタンパク質を水1mLで溶出させ、凍結乾燥処理した。得られた乾燥物は、50mM 重炭酸アンモニウム40 μ Lに溶解し、0.5mLチューブに20 μ Lずつ分注した。それぞれのチューブに1 μ g/ μ LのTrypsin 0.5 μ Lと0.2 μ g/ μ LのrLys-C 1 μ Lを添加し、37°Cで16時間消化させた。消化後、1%TFA含有2%ACN 20 μ Lを添加して反応を止めた後、水60 μ Lを加えてLC/MS/MS用試料液とした。

B-4. 分析方法

装置 超高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/TOF-MS) : Waters社製 ACQUITY UPLC H-CLASS/Xevo G2 QTof

LC条件 カラム : ACQUITY UPLC Peptide BEH300 C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m, 300 \AA)、流速 : 0.2 mL/min、カラム温度 : 40°C、移動相 : 0.1%ギ酸/0.1%ギ酸含有 ACN = 99 : 1(0 min) \rightarrow 65 : 35(60 min) \rightarrow 50 : 50(70 min) \rightarrow 10 : 90(70~75 min) \rightarrow 99 : 1(75~90 min)、注入量 : 2 μ L。

MS/MS条件 イオン化モード : ESI+, キャピラリー電圧 : 3.0kV、コーン電圧 : 30V、取り込みモード : MS^E、コリジョンエネルギー : 20-40V、ソース温度 : 120°C、脱溶媒温度 : 450°C、コーンガス : 50L/h、脱溶媒ガス :

800L/h.

B-5. 解析方法

データ抽出条件 ソフトウェア：

BiopharmaLynx, 抽出範囲：全イオン電流クロマトグラム 5~70 min における信号強度の高い上位 300 件のマススペクトル.

検索条件 サーバー：Mascot Server, 検索モード：MS/MS Ions Search, データベース：Swiss-Prot, 消化酵素：Trypsin または rLys-C, 修飾：Carboxymethyl(C), 価数：1 価, データフォーマット：PKL.

B-6. SDS-PAGE

Bladford 法で, 試料中の総タンパク量を測定し, 1 レーンあたり 5 μ g 相当量をロードした. 分子量マーカー：Precision Plus Protein Standard-Unstained(Cat No. 1610363, Bio-Rad 社製), ゲル：Bullet Page One Precast Gel(Cat No. 13077-04, ナカライテスク(株)製), 染色液：Bullet CBB Stain One(Cat No. 13542-81, ナカライテスク(株)製), 泳動条件：定電圧 400V(10 min).

C. 結果および考察

試料中タンパク質からのペプチド断片の生成には, 多くの論文で使用された実績があり, 比較的安価に購入できる, Promega 社の消化酵素 Trypsin および rLys-C を使用することにした. 質量分析計には, ペプチド断片の正確な質量情報を取得するために, TOF-MS を使用することにした. 検索には Mascot Server を使用し, タンパク質アミノ酸配列データベースには, 専門のキュレーターによるアノテーションを経た配列のみがまとめられた Swiss-Prot を使用した.

Trypsin を使用した際の Mascot search の結果と rLys-C を使用した際のそれから, 重複でヒットしたタンパク質について, 基原, Entry name, EC No, タンパク質名, 分子量およびアミノ酸配列カバー率の情報とともに Table にまとめた. Table には試料に付帯する基原情報と, SDS-PAGE で検出されたバンドの泳動度から推定した分子量情報を併記し(Fig. 1), Mascot search の

結果と比較し考察した. 考察は, 品目毎に下記に述べる.

C-1. α -アミラーゼ(EC 3.2.1.1, EC 3.2.1.141, EC 3.2.1.116, EC 3.2.1.133)

【試料 1】*A. oryzae* 由来 α -アミラーゼ [AMYA1_ASPOR]がヒットし, 製品に付帯する基原情報 *A. foetidus* と一致しなかった. Swiss-Prot 上には, *Aspergillus* 属の α -アミラーゼとして, *A. oryzae*(2 件), *A. niger*, *A. shirousami* および *A. awamori*(2 件)の計 4 基原 6 タンパク質が登録されており, *A. foetidus* 由来 α -アミラーゼは登録されていなかった. 寄託機関から入手できる *A. foetidus* 基準株の α -アミラーゼ遺伝子を同定し, これのアミノ酸配列を追加したデータベース利用した際, 製品に付帯する基原情報と一致するのか興味をもたれる.

【試料 2】*A. niger* 由来 α -アミラーゼ [AMYA_ASPNG]がヒットし, 製品に付帯する基原情報と一致した. 一方で, [AMYA_ASPNG]の分子量が 53kDa であるのに対し, SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量は 68kDa と 15kDa 分の差異が確認された. この 15kDa の差異が [AMYA_ASPNG]の糖鎖修飾によるものと考えられたので, 別に試料 2 に対して脱グリコシル化処理を施し, これを SDS-PAGE に付した. 検出されたバンドの移動度は, 糖鎖修飾を施していない試料 2 の移動度とほぼ変わらなかった. 試料 2 については, 使用した生産菌から α -アミラーゼ遺伝子を同定するとともに, 現在の主流である分子生物学的手法に基づく基原の同定結果とあわせて考察する必要がある.

【試料 3~5】*A. oryzae* 由来 α -アミラーゼ [AMYA1_ASPOR]がヒットし, 製品に付帯する基原情報と一致した. また, 試料 3~5 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 49kDa は, [AMYA1_ASPOR]のシグナルペプチドを除いた分子量(52kDa)とよく一致した.

【試料 6】*A. awamori* 由来グルコアミラーゼ [AMYG_ASPAW]および *A. niger*由来グルコアミラーゼ [AMYG_ASPNG]が同順位でヒットした. 両タンパク質アミノ酸配列の相同性は 100%で, これ以上の絞り込みは不可能であった. その他

A. oryzae 由来 α -アミラーゼ[AMYA1_ASPOR]がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* および *A. oryzae* と一致した。SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 71kDa と 49kDa が、それぞれ [AMYG_ASPNG]([AMYG_ASPAW]含む) と [AMYA1_ASPOR] のシグナルペプチドを除いた分子量とよく一致した。試料 6 は、デンプンやグリコーゲンを低分子化する α -アミラーゼ製品であるが、 α -アミラーゼにより生成した低分子の糖鎖をグルコース単位まで分解することを目的に、グルコアミラーゼが添加された混合製品であると推察された。

【試料 7】 *B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ[AMY-BACAM]がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 51kDa は、[AMY-BACAM] のシグナルペプチドを除いた分子量 (54kDa) とよく一致した。

【試料 8】 *B. licheniformis* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACLI] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 49kDa は、[AMY_BACLI] のシグナルペプチドを除いた分子量 (55kDa) とよく一致した。

【試料 9 および 10】 *B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACAM] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *B. subtilis* と一致しなかった。ただし、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」によると、*B. subtilis* と分類されていた一部の菌株は、*B. amyloliquefaciens* に再分類されたことが報告されており、すなわちメーカーにおいて、製品の基原情報 *B. subtilis* が *B. amyloliquefaciens* に更新されていない可能性がある。Swiss-Prot 上に登録されている *B. subtilis* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACSU] の分子量が 72kDa であるのに対し、*B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACAM] の分子量は 58kDa であった。試料 9 および 10 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量は 51kDa で、[AMY-BACAM] のシグナルペプチドを除いた分子量 (54kDa) とよく一致した。この結果は、製品の基原情報が製造企業において更新されていないことを支持する結果であった。

C-2. β -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)

【試料 11, 12】 *G. max* 由来 β -アミラーゼ [AMYB_SOYBN] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *G. max* と一致した。 β -アミラーゼ以外に、レクチンなどもヒットしたが、すべて *G. max* 由来であった。

【試料 13】 *H. vulgare* 由来 β -アミラーゼ [AMYB_HORVU] および [AMYB_HORVS] の 2 件ヒットし、製品に付帯する基原情報 *H. vulgare* と一致した。 β -アミラーゼ以外のタンパク質もヒットしたが、すべて *H. vulgare* 由来であった。

C-3. β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)

【試料 14~16】 *A. oryzae* 由来 β -ガラクトシダーゼ [BGALA_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. oryzae* と一致した。一方、*A. flavus* 由来 β -ガラクトシダーゼ [BGALA_ASPFN] も同じ順位でヒットしていた。両アミノ酸配列の相動性を調べたところ、100% であった。したがって、これ以上、基原を絞り込むことができなかった。

【試料 17】 データベース Swiss-Prot には、*B. circulans* 由来 β -ガラクトシダーゼが登録されていなかった。そこで、TrEMBL から “galactosidase” で検索・抽出した 80,323 件のアミノ酸配列をデータベースとして使用したところ、*B. circulans* 由来 β -ガラクトシダーゼ [E5RWQ2_BACCI] がヒットした。

C-4. グルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3)

【試料 18 および 19】 *A. awamori* 由来 グルコアミラーゼ [AMYG_ASPAW] および *A. niger* 由来 グルコアミラーゼ [AMYG_ASPNG] が同順位でヒットした。両タンパク質のアミノ酸配列の相同性は 100% で、これ以上の絞り込みは不可能であった。SDS-PAGE で検出された試料 18 のマイナーバンド および 試料 19 のメインバンドの推定分子量 69kDa は、[AMYG_ASPNG] ([AMYG_ASPAW] 含む) のシグナルペプチドを除いた分子量 65kDa とよく一致した。SDS-PAGE で検出された試料 18 の推定分

子量 112kDa のバンドに興味もたれる。

【試料 20～25】試料 20 および 21 は *R. oryzae* を、試料 15～18 は *Rhizopus* 属を基原とする製品である。Mascot search の結果は、試料 13～18 で *R. oryzae* 由来グルコアミラーゼ [AMYG_RHIOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また、試料 13～18 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 66kDa は、[AMYG_RHIOR] のシグナルペプチドを除いた分子量(62kDa) とよく一致した。Mascot search の結果および SDS-PAGE のバンドパターンより、試料 22～25 も試料 18 および 19 と同じく *R. oryzae* を基原とする製品であると推察された。

C-5. セルラーゼ(EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91)

【試料 26～28】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。その他、ヘミセルラーゼに分類される酵素(EC 3.2.1.8)もヒットしていた。

【試料 29】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*P. coccineus* 由来ヘミセルラーゼ関連タンパク質は登録されていなかった。*P. coccineus* 由来セルラーゼ関連遺伝子を単離・同定した後、これをデータベースに登録して、Mascot search の同定精度が向上するのか興味もたれる。

【試料 30, 31, 34】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼがヒットした。しかしヒットした酵素の基原は、試料付帯情報の基原と属レベルで一致するものの、種レベルで矛盾が生じていた。この 3 試料に記載された基原に由来するセルラーゼ関連酵素は、Swiss-Prot 上に登録があったため、試料付帯情報が誤っている可能性がある。

【試料 32, 33】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。

C-6. ヘミセルラーゼ(EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.78, EC 3.2.1.89, EC 3.2.1.99)

【試料 35, 36】*A. niger* 由来ヘミセルラーゼ

[MANA_ASPNC] が第一位でヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。次いで、セルラーゼに分類される酵素(EC 3.2.1.4 および 3.2.1.91)もヒットしていた。

【試料 37】上位でヒットしたわけではないが、*A. niger* 由来ヘミセルラーゼ [XYNC_ASPNC] および [XYNC_ASPNG] の 2 件がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。本製品には、別基原である *A. shirousami* 由来グルコアミラーゼや *A. awamori*, *A. oryzae* 由来 α -アミラーゼもヒットしており、複数の酵素品目を配合した酵素製品である可能性も考えられた。

【試料 38】試料 29 と同じように、データベースにヘミセルラーゼ様タンパク質の登録がなかった。

【試料 39, 40】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. longibrachiatum* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、*T. harzianum* や *T. reesei* 由来ヘミセルラーゼがヒットした。

【試料 41】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. viride* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、まったく基原が異なるパンコムギ *T. aestivum* 由来タンパク質が 9 件ヒットしたが、これらのタンパク質は、付帯情報にあった製品中に添加された小麦粉に由来するものだと推察された。

D. まとめ

本研究で得られた同定結果は以下の 6 つのパターンに分類できた。

① 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する。

【試料 3-5, 7, 8, 11-13, 17, 20-28, 32, 33, 35-37】の計 23 製品

② 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。しかし、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致しない。

【試料 2】の計 1 製品

- ③ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する。しかし、別の基原に由来する同一機能でアミノ酸配列の相同性が 100% のタンパク質が同じ順位でヒットしたため、基原を 1 つに絞り込めない。

【試料 6, 14-16, 18, 19】の計 6 製品

- ④ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。データベースの登録がなかったため、同定結果が基原と一致しなかった。

【試料 1, 39, 40】の計 3 製品

- ⑤ データベースに登録がなかったため、なにもヒットしなかった。

【試料 29, 38】の計 2 製品

- ⑥ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。データベースに登録があるにもかかわらず、帰属されたタンパク質の基原が付帯情報と一致しない。

【試料 9*, 10*, 30, 31, 34, 41】の計 6 製品

*最近、種名の変更があったため、メーカーで基原情報が更新されていない可能性もある。

E. 結論

既存添加物酵素 6 品目 41 製品を対象にして、酵素製品から生成したペプチドのマスペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。ペプチド(アミノ酸)を指標にする本法は、種間を分類するための分解能が、遺伝子を指標にした方法よりも劣る。したがって、種を一つに絞り込めない場合があることを理解する必要がある。

本研究では、データベースに登録があるにもかかわらず、Mascot search の結果が付帯情報と一致しない事例が確認された(パターン⑥)。これらについては、寄託機関あるいは販売業者から菌株を入手し、遺伝子レベルでの解析を行い、そもそも販売業者の付帯情報が妥当であったのか再確認する必要がある。

本法は、Mascot Search の結果を十分吟味することが必須だが、販売業者の情報提供に依

存することなく、科学的に基原を判断することが可能で、データベースの充実化とともに、より精巧な解析が期待できる。また、タンパク質を含有する酵素以外の既存添加物製品への適用も興味もたれる。

E. 研究発表

学会発表

- 1) 西崎雄三, 鈴木綾乃, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(1)~酵素製品について~, 日本食品化学学会 第 24 回 総会・学術大会 (2018 年 4 月, 東京)
- 2) 鈴木綾乃, 西崎雄三, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(20)~酵素製品について~, 日本食品化学学会 第 24 回 総会・学術大会 (2018 年 4 月, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

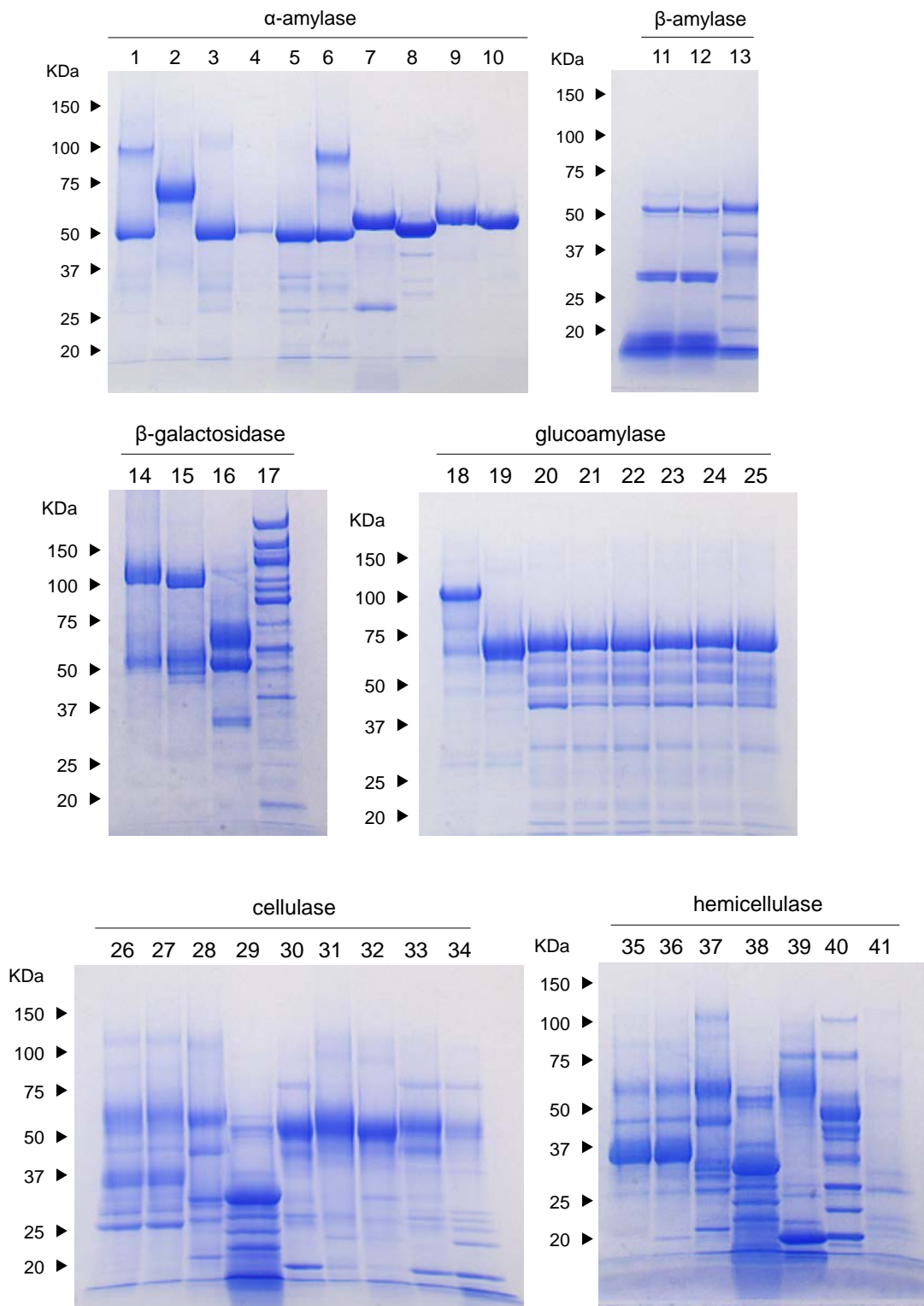


Fig. 1 酵素製品の SDS-PAGE の結果

Table 1

 α -amylase EC 3.2.1.1 EC 3.2.1.141 EC 3.2.1.116 EC 3.2.1.133

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine		Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C	
			Ranking	Organism						Ranking	Coverage
1	<i>Aspergillus foetidus</i>	95, 50	1	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	57%	1	45%
			2	<i>A. shirousami</i>	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68669	42%	3	15%
			3	<i>A. kawachii</i>	AMYG_ASPKA	EC=3.2.1.3	Glucosylase I	68752	36%	3	15%
			4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	23%	2	23%
			4	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	23%	2	23%
2	<i>Aspergillus niger</i>	65	5	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	23%	4	23%
			5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	23%	4	23%
			1	<i>A. niger</i>	AMYA_ASPNG	EC=3.2.1.1	Acid alpha-amylase	53424	25%	1	13%
			3	<i>Aspergillus oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	66%	1	59%
			4	<i>Aspergillus oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	55%	1	59%
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	1	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	67%	1	59%
			1	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	67%	1	59%
			2	<i>A. flavus</i>	PEPA_ASPFN	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42403	20%	2	9%
			2	<i>A. oryzae</i>	PEPA_ASPOR	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42403	20%	2	9%
			1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68847	47%	2	31%
6	<i>Aspergillus niger</i> and <i>A. oryzae</i>	95, 50	1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68847	47%	2	31%
			2	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	55%	1	59%
			1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	9%	1	67%
			1	<i>B. licheniformis</i>	AMY_BACLI	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58513	34%	1	31%
			1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	12%	1	71%
7	<i>Bacillus subtilis</i>	58, 25	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	48%	1	67%
8	<i>Bacillus licheniformis</i>	54, 43	1	<i>B. licheniformis</i>	AMY_BACLI	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58513	34%	1	31%
9	<i>Bacillus subtilis</i>	58	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	12%	1	71%
10	<i>Bacillus subtilis</i>	58	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	48%	1	67%

Table 1

 β -amylase_EC 3.2.1.2

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine		Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C		
			Ranking	Organism					Coverage	Ranking	Coverage
11	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	43%	1	45%
			2	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	56455	13%	2	11%
			3	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24280	35%	4	29%
			4	<i>G. max</i>	KTI1_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1	22822	31%	3	37%
			5	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	12954	39%	5	30%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10331	44%	7	31%
			8	<i>G. max</i>	2SS_SOYBN	-	2S albumin	19028	12%	6	22%
			1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	43%	1	45%
12	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16	2	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24280	40%	2	29%
			3	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	56455	18%	4	6%
			4	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	12954	39%	3	30%
			5	<i>G. max</i>	KTI1_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1	22822	26%	5	23%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10331	44%	6	31%
			1	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVU	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	59899	30%	1	28%
13	<i>Hordeum vulgare</i>	54, 42, 35, 25, 19	2	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVS	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	59891	30%	2	20%
			3	<i>H. vulgare</i>	NLTP1_HORVU	-	Non-specific lipid-transfer protein 1	12757	58%	3	70%
			5	<i>H. vulgare</i>	IAAB_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMB	17211	18%	6	17%
			7	<i>H. vulgare</i>	SPZ4_HORVU	-	Serpin-Z4	43365	13%	5	5%
			8	<i>H. vulgare</i>	BSZ7_HORVU	-	Serpin-Z7	42852	8%	8	7%
			12	<i>H. vulgare</i>	IAAA_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor Cma	16070	16%	7	16%

Table 1

 β -galactosidase_EC 3.2.1.23

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	Coverage
14	<i>Aspergillus oryzae</i>	111, 55	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	42%	1	22%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	42%	1	22%
			4	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	7%	2	11%
15	<i>Aspergillus oryzae</i>	105, 55	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	36%	1	13%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	36%	1	13%
			3	<i>Emicella nidulans</i>	BGALA_EMENI	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	111320	3%	2	2%
16	<i>Aspergillus oryzae</i>	67, 51, 31	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	40%	1	26%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	40%	1	26%
17	<i>Bacillus circulans</i>	225, 146, 127, 111, 100, 89, 74, 61, 49, 40	1	<i>B. circulans</i>	E5RWQ2_BACCI	-	Beta galactosidase	192298	35%	1	55%

Glucoamylase_EC 3.2.1.3

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	Coverage
18	<i>Aspergillus niger</i>	114, 70	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	50%	1	31%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	50%	1	31%
19	<i>Aspergillus niger</i>	70	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	44%	1	28%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	44%	1	28%
20	<i>Rhizopus oryzae</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	29%	1	7%
21	<i>Rhizopus oryzae</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	31%	1	10%
22	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	17%
23	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	36%	1	14%
24	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	14%
25	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	17%

Table 1

Cellulase (1/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of				rLys-C				
			Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
26	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	32%	1	17%
	<i>A. niger</i>		1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	32%	1	17%
	<i>A. niger</i>		2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	37%	2	20%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57503	22%	3	10%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57517	22%	3	10%
	<i>A. awamori</i>		4	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	21%	5	27%
	<i>A. niger</i>		4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	21%	5	27%
	<i>A. phoenicis</i>		5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	21%	4	27%
	<i>A. niger</i>		6	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	48734	14%	6	10%
	<i>A. kawachii</i>		7	<i>A. kawachii</i>	XYNA_ASPKW	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase A	35574	10%	8	7%
	<i>A. niger</i>		7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNC	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35580	10%	8	7%
	<i>A. niger</i>		7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNG	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35570	10%	8	7%
	<i>A. kawachii</i>		8	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	4%	9	4%
27	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	32%	2	16%
	<i>A. niger</i>		1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	32%	2	16%
	<i>A. niger</i>		2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	30%	1	20%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57503	22%	3	8%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57517	22%	3	8%
	<i>A. niger</i>		4	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	48734	16%	4	10%
	<i>A. awamori</i>		5	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	14%	6	17%
	<i>A. niger</i>		5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	14%	6	17%
	<i>A. phoenicis</i>		5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	14%	5	17%
	<i>A. kawachii</i>		6	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	4%	8	4%

Table 1

Cellulase (2/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of				rLys-C				
			Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
28	<i>Aspergillus niger</i>	61, 45, 29, 25	1	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	23%	1	17%
		19	1	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	23%	1	17%
			2	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	23%	2	17%
			2	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	23%	2	17%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	4%	3	3%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	4%	3	3%
			3	<i>Emicella nidulans</i>	CBHA_EMENI	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	48651	4%	4	3%
29	<i>Pycnoporus coccineus</i>	30, 26, 23, 19									
30	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53, 16	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	29%	2	9%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	20%	4	24%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	17%	4	20%
31	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	33%	2	10%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	33%	2	10%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	33%	2	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	20%	1	25%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	20%	1	25%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	5%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	5%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase-4	35953	3%	5	2%

Table 1

Cellulase (3/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of					rLys-C			
			Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
32	<i>Trichoderma reesei</i>	55	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	34%	2	10%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	34%	2	10%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	34%	2	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	15%	1	25%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	15%	1	25%
			4	<i>Triticum aestivum</i>	IAA1_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.19	13908	32%	4	21%
			4	<i>Triticum aestivum</i>	IAA5_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.53	13698	32%	4	21%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	8%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	8%
33	<i>Trichoderma viride</i>	56, 48, 17	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	29%	2	9%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
34	<i>Trichoderma viride</i>	58, 29, 22, 19	1	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	2%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	2%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	23%	2	3%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	20%	2	3%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	20%	2	3%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	20%	2	3%

Table 1

Hemicellulase (1/2) EC 3.2.1.8 EC 3.2.1.32 EC 3.2.1.78 EC 3.2.1.89 EC 3.2.1.99

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine			Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C			
			Ranking	Organism	Ranking					Coverage	Coverage		
35	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	1	<i>A. niger</i>	1	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mann	41627	37%	1	20%	
			2	<i>A. niger</i>	2	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	23%	2	16%	
			2	<i>A. niger</i>	2	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	2	16%	
			3	<i>A. awamori</i>	3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	7%	3	14%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	3	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	7%	3	14%	
			1	<i>A. niger</i>	65, 50, 36	1	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mann	41627	37%	1	20%
			2	<i>A. niger</i>	65, 50, 36	2	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	23%	4	7%
			2	<i>A. niger</i>	65, 50, 36	2	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	4	7%
36	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	3	<i>A. awamori</i>	3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	17%	3	24%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	17%	3	24%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	3	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	17%	2	24%	
			1	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	1	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	25%	1	25%
			1	<i>A. phoenicis</i>	26, 19	1	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	25%	1	25%
			2	<i>A. shirousami</i>	26, 19	2	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68669	23%	4	15%
			3	<i>A. awamori</i>	26, 19	3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	25%	2	34%
			3	<i>A. niger</i>	26, 19	3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	25%	2	34%
			4	<i>A. awamori</i>	26, 19	4	AMYA_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A	55367	9%	3	27%
			4	<i>A. awamori</i>	26, 19	4	AMYB_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase B	55408	9%	3	27%
37	<i>Aspergillus niger</i>	63, 48, 33, 29	4	<i>A. oryzae</i>	63, 48, 33, 29	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	9%	3	27%	
			4	<i>A. oryzae</i>	63, 48, 33, 29	AMYA3_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-3	55291	9%	3	27%	
			5	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	4%	6	3%	
			5	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	4%	6	3%	
			5	<i>E. nidulans</i>	63, 48, 33, 29	CBHA_EMENI	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	48651	4%	6	3%	
			6	<i>A. kawachii</i>	63, 48, 33, 29	XYNA_ASPKW	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase A	35574	10%	8	7%	
			6	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	XYNC_ASPNC	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35580	10%	8	7%	
			6	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	XYNC_ASPNG	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35570	10%	8	7%	
			7	<i>A. kawachii</i>	63, 48, 33, 29	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	12%	9	7%	

Table 1

Hemicellulase (2/2) EC 3.2.1.8 EC 3.2.1.32 EC 3.2.1.78 EC 3.2.1.89 EC 3.2.1.99

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of Trypsine			Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C	
			Ranking	Organism	Ranking					Coverage	Ranking
38	<i>Pycnoporus coccineus</i>	56, 33, 27, 24, 20	No data								
39	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	83, 63, 17	1	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	20%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	17%	5	3%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	8%	2	2%
			2	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	8%	2	2%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.91	Endoglucanase-4	35953	2%	4	2%
40	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	115, 83, 51, 45, 35, 28, 22, 18	1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	12%	3	9%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			8	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase-4	35953	3%	7	2%
41	<i>Trichoderma viride</i>	26	1	<i>Triticum aestivum</i>	IAA1_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.19	13908	63%	1	21%
			2	<i>Triticum aestivum</i>	IAA5_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.53	13698	52%	1	21%
			3	<i>Triticum aestivum</i>	IAA2_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.28	17368	44%	6	7%
			6	<i>Triticum aestivum</i>	IAC16_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16	16410	30%	5	18%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT4_WHEAT	-	Glutenin, high molecular weight subunit 89352	1	1%	2	6%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT5_WHEAT	-	Glutenin, high molecular weight subunit 90529	1	1%	2	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THNB_WHEAT	-	Purothionin A-1	15485	5%	3	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THN2_WHEAT	-	Alpha-2-purothionin	15418	5%	3	6%
			14	<i>Triticum aestivum</i>	IAAC2_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	16030	16%	4	16%

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物の基原生物の学名調査～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物名簿収載品目のひとつである「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、定義に含まれる73種の基原生物の学名・和名について、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に従い調査した。また、相当する基原生物について、海外や天然香料における規格の有無を調査した。得られた情報をもとに、基原種として相応しいと思われる和名や学名に修正し、必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。本研究により、「香辛料抽出物」成分規格のうちの定義原案を整備した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 研究員

A. 研究目的

「香辛料抽出物」は、平成8年に作成された既存添加物名簿に収載されている品目の一つであり、74種の基原生物を原料とする抽出物である。このうちのひとつであるチャービルは、平成31年に作成された第四次消除名簿に収載されているが、残り73基原についての規格は未整備のままである。これまで多くの既存添加物名簿収載品目の規格を整備し、食品添加物公定書への収載を行ってきたが、香辛料抽出物に関しては原料とする基原種が多い。このため、実際に流通している製品の製法や成分組成が大きく異なることが予想されることから、成分規格の整備が遅れている。しかし、香辛料抽出物は流通量も比較的多いため、規格整備は大きな課題となっている。

既に流通しており、有効性と安全性が確認されているとみなされる既存添加物の規格整備において、規格の設定根拠となる情報収集は特に重要であり、由来(基原の学名・和名)と成分(含量)が正しく設定されているかという情報は

規格整備時に不可欠である。このうち、基原の学名の設定は、その添加物に想定外の原料が使用されることを防ぐ目的がある。和名のみでは基原生物が一義的に特定されないことが少なくなく、この曖昧さが悪用されて原料の不正使用などが起こる恐れがある。また、既存添加物は国内で自生も栽培もされていない植物や海外で生産される微生物に由来するものも多く、適切な和名が存在しない基原もある。既存添加物の基原種を正しい学名で設定するということは、その添加物の品質と安全性を確保するために必須である。

動植物や微生物の学名・和名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的である。法的な拘束力がある公的な規格を作成する際には、最新の知見も重要ではあるが、定義中の基原種の学名及び和名は、最新情報よりも設定根拠のトレーサビリティ、すなわち、堅牢性を重視して設定することされている。実際に、第9版食品添加物公定書を作成するにあたっては、一般的に認知されたデータベースや書籍を参照し、これらに示された学名と和名が既存添加物の定義に採用されており、設定根拠のトレーサビリティが確保されている。第10版食品添加物公定書の成分規格作成を行っている現在は、基原生物種の学名記載を

どのような根拠のもと行うかについて、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に明記してある。一方、既存添加物名簿作成時、基原の学名・和名については一定の基準の元に調査がなされたが、その当時より既に20年が経過しており、「香辛料抽出物」に含有される73種の基原の学名・和名については、規格案作成にあたって見直しが必要となっている。

「香辛料抽出物」の基原の多くは海外原産であり、海外の流通品を購入して使用するケースも多いことが予測される。したがって、規格案を検討するための参考資料として、海外の規格も考慮に入れる必要があると考えられる。また、「香辛料抽出物」と似た基原物質を用いている食品添加物のひとつに天然香料がある。天然香料は、食品衛生法第四条第3項において、「動植物から得られたもの又はその混合物で、食品の着工の目的で使用される添加物」と定義されたものである。天然香料の基原物質名及び別名は、「天然香料基原物質リスト」²⁾に記載されており、香辛料抽出物として流通する食品添加物と基原生物が重なると思われるものが複数存在している。天然香料として用いられている基原生物と香辛料抽出物の基原生物とを比較することも、基原についての情報を整理する上で不可欠であると考えられる。

そこで本研究では、「香辛料抽出物」の規格案作成にむけて、1)香辛料抽出物」記載73基原の学名と標準和名の検討、2)海外規格の調査とその基原生物との比較、3)天然香料の基原生物との比較を行った。さらに、香辛料抽出物の定義を提案すべく、本研究で収集した情報を元に基原案を作成した。

B. 研究方法

B-1. 基原物質の学名及び標準和名調査

食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に記載の基原生物の学名と標準和名の調査法に従い、香辛料抽出物について基原生物の学名と標準和名を調査した。

基原の記載方針

- 1) 「和名(学名)」のスタイルで示す。
- 2) 学名は「属名+種小名」の二名法で記す。必

要なときは変種(var.)等を示し、三名法を用いる。

- 3) 種が特定できない場合は属名まで示す。その場合は「属」を付記する。
- 4) Synonym(シノニム=別名)が広く使用されている場合には、synonymをカッコ書きで併記する。
- 5) 学名の命名者は、各生物群の一般的な表記法(拠り所とした資料・データベース)を参考に、以下のように設定する。
 - a) 植物:短縮形がある命名者については短縮形で表し(例 Linné→L.)、さらに旧命名者をカッコ内に示す。
 - b) 動物・魚類・昆虫:ラテン語で表記する(例 Linné→Linnaeus)。
 - c) 藻類・菌類・細菌:命名者は示さない。
- 6) 和名は以下のスキームに従って設定する。

・リスト(カッコ書き・基原製法本質)に和名(カタカナ)はあるか? no→標準和名

↓ yes

・和名は正しく基原生物を表しているか?

↓ yes

no ↓修正して標準和名

・和名は学名のカタカナ読みか?

↓ no

yes ↓標準和名があるか?

↓

↓ no yes ↓標準和名

カッコ書き定義の和名を用いる(標準和名・別名・慣用名は問わない)

なお、和名と学名が1:1対応でないものについては、表示された学名のみが基原であることを明示するために「～に限る。」を加える。

- 7) 和名学名の確認には、生物群ごとに以下に示した資料及びデータベースを用いて行う。○高等植物:東京大学小石川植物園園長の邑田仁教授のご指導のもと、以下に示す2つのデータベースを用いた。

a) 学名及び英語慣用名:Tropicos (<http://www.tropicos.org/>)

b) 和名:BG Plants 和名-学名インデックス BGplant が閉鎖のため現在は YList (<http://ylist.info>)

「BG Plants 和名-学名インデックス」は BG

Plants データベースで用いられる植物名、特に、日本産植物の和名と学名に関する詳細情報の整備を目的として、米倉浩司（東北大学）と梶田忠（東京大学〔現・千葉大学〕）を中心に作成された。

B-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に挙げられている 73 基原について、以下の海外規格に記載されているかを調査した。香辛料抽出物に挙げられている 73 基原と学名が一致している品目を規格ありとみなした。

- a) FCC11 : Food Chemicals Codex (米国食品用公定化学品集)
- b) CFR : Code of Federal Regulation Title 21 (米国 FDA が規制する連邦食品医薬品化粧品法 (FFDCA : Federal Food, Drug, and Cosmetic Act))
- c) GB2760-2014 : 中国食添使用基準

B-3. 天然香料規格との比較

日本添加物協会の協力により、現在日本国内で流通していると思われる天然香料の原料について学名等の情報を得られた。これらのうち、香辛料抽出物に挙げられている 73 基原について、Tropicos や Ylist を参考にしながら基原生物を比較した。

B-4. 「香辛料抽出物」定義案の作成

- ① 原則、
 - ・和名は Ylist (<http://ylist.info/index.html>),
 - ・学名は Tropicos (<https://www.tropicos.org>) のものを採用した。海外や天然香料の規格と比較して、どの規格でも全く同じ種を基原としているものについては、その種を基原生物として提案した。
- ② 海外や天然香料の規格で基原として挙げられていても、データベースなどの情報から現在の香辛料抽出物の基原種と別種と考えられる場合は、基原種の範囲を広げず、既存添加物名簿収載品目リスト注解書の基原生物を提案した（ただし、学名・和名は B-1. に示す基原の記載方針に則って修正した）。

なお、学名について、Ylist と Tropicos が異なる場合は、各国の規格も比較しつつ、原則 Tropicos のものを採用した。一方、和名については、Ylist に記載のない基原生物の和名は基原に記載しない案を提案した。

C. 結果および考察

C-1. 香辛料抽出物の基原物質の学名及び標準和名の検討

植物由来の香辛料抽出物 73 基原について、基原植物の和名および学名を調査検討した。和名については Ylist で確認し、学名については Tropicos および Ylist で確認した。多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものが散見された。学名の命名者についても省略表記及び追記・修正などの変更が必要と判断された。また、和名においても標準和名ではなく別名が用いられている基原が複数存在した。さらに、今回参考にしたデータベース間（Ylist と Tropicos）で学名に対する見解が異なるものも見られた。これらの基原については詳細な調査が必要と考える。

C-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に含まれる植物由来の 73 種について、米国（FCC11 及び CFR Title21）及び中国（GB2760-2014）にて品目の有無を調査した。品目は、既存添加物名簿に記載の学名のほか、今回の調査でより一般的と思われるものとして明らかになった学名でも検索を行った。

既存添加物である香辛料抽出物のうち、今回調査した規格に収載されていなかった品目は、アサノミ、アジョワン、カレーリーフ、クレソン、シャロット、ソーレル、ミョウガ、ワサビの 8 品目であった。

また、今回調べたどの規格でもほぼ同じ基原種が用いられていた品目は、アサフェチダ、ウイキョウ、ウコン、オールスパイス、カシヤ、カモミール、カンゾウ、キャラウェイ、クミン、クローブ、ケシノミ、ケーパー、ゴマ、コリアンダー、サッサfras、サフラン、サボリー、

サルビア、シソ、シヨウガ、スターアニス、セイヨウワサビ、セロリー、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、ニンジン、バジル、パセリ、パプリカ、ヒソップ、フェネリーグ、ペパーミント、リンデン、レモングラス、レモンバーム、ローズマリー、ローレルの43品目であり、半数以上であった。

一方で、ワサビなど日本の規格にのみ含まれているものも存在した。

C-3. 天然香料規格との比較

日本添加物協会から得られた、国内で流通する天然香料の原料について、香辛料抽出物の73基原の基原生物と比較した。なお、天然香料原料として報告された学名については、Tropicosで確認した上で比較した。

73基原のうち、トウガラシとパプリカについては香辛料抽出物と天然香料とで扱いが異なっていた。香辛料抽出物ではトウガラシとパプリカは別の品目として扱われており、トウガラシの基原物質は「トウガラシ」と「キダチトウガラシ」であるのに対し、パプリカの基原物質は「トウガラシ」のみ（使用部位はトウガラシと同じ）と、区別されている。一方、天然香料では、トウガラシとパプリカは同一のものとして扱われているようであった。今回の調査では、香辛料抽出物のパプリカは天然香料のトウガラシとの比較することで考察した。

香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いていると思われるものは、半数の37品目であった。また、両者を比較して、天然香料の方が幅広い基原を用いていると思われるものが26品目、香辛料抽出物のほうがより多くの種を基原としていると思われるものが4品目であった。さらに、香辛料抽出物と天然香料とで異なる植物種を基原としていると思われるものが6品目（アジOWN、オレンジピール、カッシア、シャロット、ソーレル、バニラ）であった。

C-4. 「香辛料抽出物」定義案の作成

これまでの調査結果から得られた内容を精査

し、「香辛料抽出物」の基原としてふさわしいと判断し提案した73基原生物案を表1に示す。提案した基原生物種の学名および和名は、研究方法の項に示すとおり、これまでの調査結果に従い、和名はYlist、学名はTropicosで標準とされているものを採用した。

香辛料抽出物の基原生物となっている種には日本に自生していないものも多く、そもそも和名が存在しない種が多く存在した。このような場合、第9版公定書作成時には、和名の代わりに学名のラテン語読みをカタカナ表記で記載していた。しかし、今回の香辛料抽出物には、1品目中の基原種が多くそのほぼすべてに和名が存在しないといったケースがあり、学名のラテン語読みをカタカナ表記しては要領を得ないものが複数あった。学名がある時点で基原種は一義的であること、カタカナ表記にすることで余計な混乱が生じることやそれを上回るメリットが感じられないことから、今回の基原種名の提案では、和名のないものは学名のみを記載することも併せて提案した。

D. 結論

既存添加物名簿収載品目のひとつである香辛料抽出物について、73基原の情報収集を行い、それをもとに規格案作成を見据えて基原の提案を行った。

73種の基原について、示された和名及び学名の妥当性をYList及びTropicosをもとに検討したところ、多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものも散見された。このうち、誤記と思われるものについては、海外の規格でも同様の誤りが見られた。

また、約半数の基原で、天然香料の基原と一致していた。その一方で、同じ名称であっても香辛料抽出物と天然香料とで異なる基原を用いているものもあった。さらに、海外の規格とも比較し、学名まで精査したところ、日本独自の基原のものや、日本では2つの基原として区別して扱われているものが他国ではひとつの基原として示されているものもあった。

以上の情報をもとに、73種の基原について、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に従いながら、基原種として相応しいと思われる和名や学名を整備した。必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。その結果を、成分規格の定義原案として提案した。

E. 参考資料

- 1) 食品添加物の成分規格作成の解説 <http://www.nihs.go.jp/dfa/_src/624/sakuseiforweb_191018.pdf> (accessed 2019-11-22).
- 2) 消費者庁通知「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」消食表第377号，平成22年10月20日。

F. 研究発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し