

## ナイシンに関する追加資料

( 指定要請者からの成分規格変更の要請に係る資料 )

### 1. 規格の変更

国際的なナイシンの定義変更の動きに対応するため、下記の通りに変更することを要請致します。なお、菌株との記述については、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* は亜種までの分類であり、亜種までの標記に菌株と記載するのは不適當であるため、削除しました。

変更前

本品は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 菌株の培養液から得られたナイシンの塩化ナトリウム及び固形無脂肪乳との混合物である。

変更後

本品は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られたナイシンの塩化ナトリウムとの混合物である。無脂肪乳又は糖培地由来の成分を含む。

### 2. 変更の理由

2003 年 4 月のナイシン指定要請の時点では、ナイシンは乳培地 ( 脱脂粉乳に酵母エキスを添加し加水分解した培地 ) にナイシン産生菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を接種し、発酵することにより製造されていました。その後、乳アレルギーのある人へのリスクを回避するため、糖培地 ( 酵母エキスと乳由来成分を含まない炭水化物より成る ) を用いた製造方法が開発されました。

米国および米国の FCC ( Food Chemicals Codex ) を自国の規格として採用している国々においては、既に 2005 年から糖培地を用いて製造されたナイシンが流通し、使用されています。

また、オーストラリア・ニュージーランドにおいては、2008 年のコーデックス総会の結果を踏まえて、現在流通し使用されている乳培地品は、糖培地品に切り替えられる見込みです。

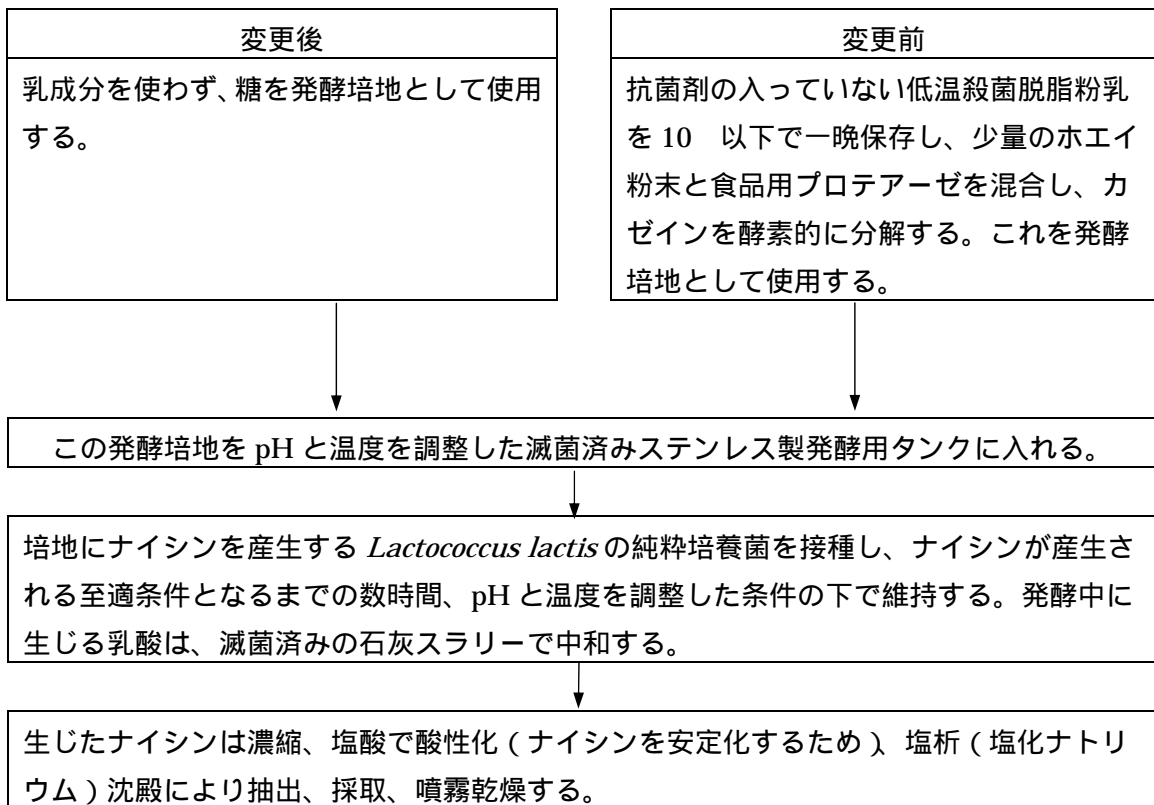
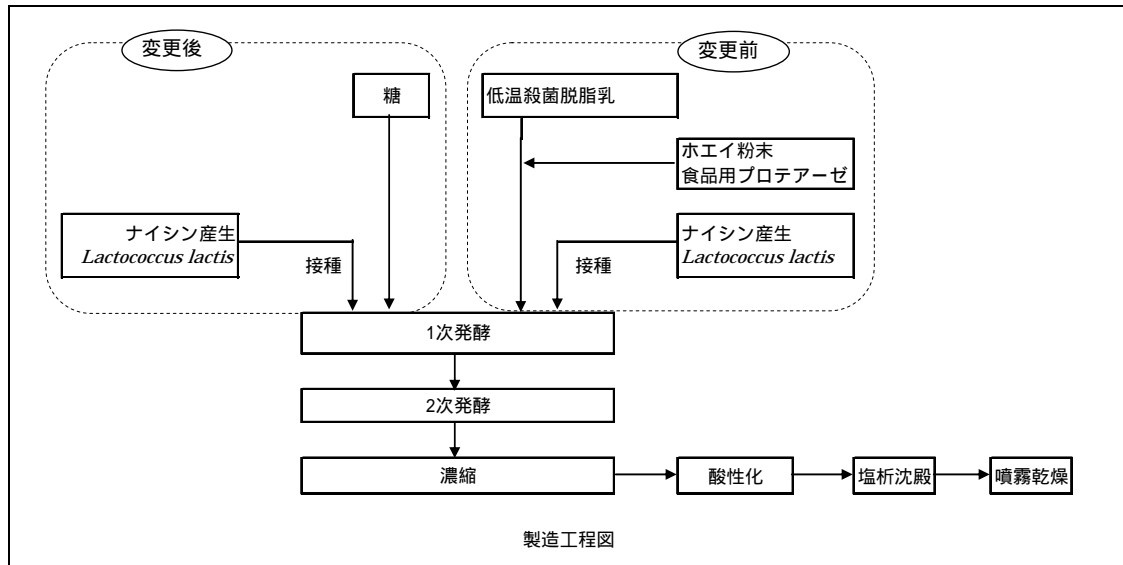
一方、EU では、2006 年の EFSA ( 添付資料 1 )、2007 年の第 68 回 JECFA 会議 ( 添付資料 2 ) での評価を受けて、EU 議会がナイシンの定義変更を採択する見込みです。製造者 ( ダニスコ社 ) は、EU 議会採択後には製造方法を乳培地から糖培地に完全に切り替え、糖培地による製造のみ行うことを決定しています。EU での切り替えは 2008 年末までには行われる見込みです。

海外から糖培地由来のナイシンを含有する食品が輸入される場合を想定して国際整合性をとるために、本規格変更を要請します。

### 3. 乳培地又は糖培地を用いて製造されたナイシンの比較分析

( 1 ) 従来の製造方法 ( 乳培地 ) と変更後の製造方法 ( 糖培地 ) の比較

変更前後の製造方法を以下に示しました。両者の違いは、ナイシン産生菌の培養に用いる培地を乳培地から糖培地に変更した点であり、その他の製造工程は基本的に同一です。



(2) 乳培地（従来工程）と糖培地（変更工程）により製造されたナイシンの比較分析

従来工程および変更工程により製造されたナイシン製剤を組成分析、HPLC および SDS-PAGE 分析により比較しました。組成分析の結果、変更工程で製造されたナイシンは、従来工程で製造されたナイシンと同等の力価を有し、より純度が高く、（ナイシン以外の）タンパク質の残留物質、脂質、炭水化物、乳糖の含量が少ない結果が得られ、HPLC 分析の結果からは、両工程から得られたナイシンから共通のピークを検出し、そのピークはナイシン A と同定されました。従来工程から得られたナイシンには、ナイシン以外にも主要なピーク

がみられました。また、SDS-PAGE 分析においても、同様の結果が得られました。

以上より、変更工程により製造されたナイシンは、ナイシン A の純度が高く不純物が少ないことが示されました。

#### 1) HPLC 分析によるナイシン製剤の組成比較 (添付資料 3)

製造工程の異なるナイシン製剤の組成を比較すると、タンパク質 (ナイシン以外)・脂質・炭水化物・乳糖の含量は工程変更後の製剤で減少し、ナイシンの純度が高いことが示されています (Table 1)。

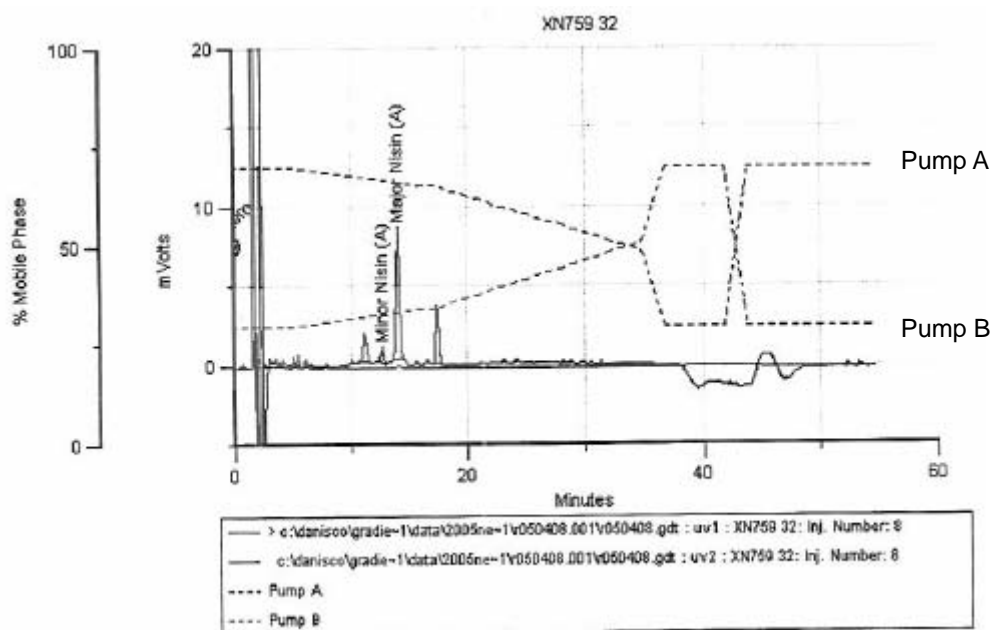
HPLC 分析によりナイシン製剤を比較すると、変更工程により製造されたナイシンは保持時間 20 分までに主要な 2 つのピークが認められましたが、従来工程により製造されたナイシンでは、これ以外にも主要なピークが確認できます (Fig. 1)。疎水性の物質を確認するため、流出溶媒アセトニトリルを 70% にして 5 分間流出させましたが、主要なピークは観察されませんでした。

以上より、変更工程により製造されたナイシンは従来工程のナイシンに比べ純度が高いと考えられます。

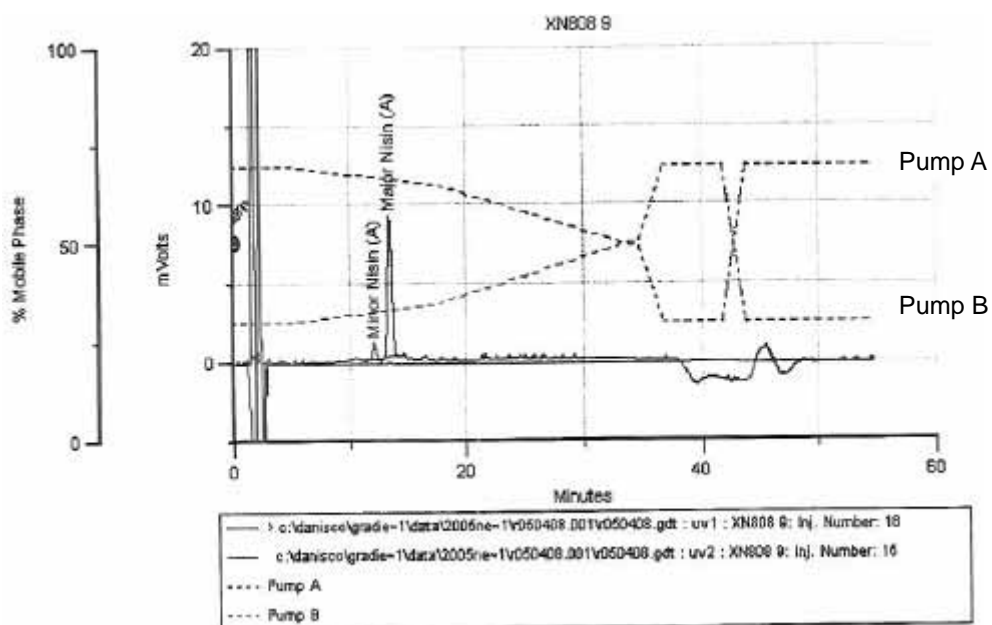
Table 1 : 従来及び変更工程により製造されたナイシン製剤の組成比較

組成	従来工程	変更工程
ナイシン	1,000,000 国際単位/g (2.5%のナイシン)	1,000,000 国際単位/g (2.5% のナイシン)
タンパク質 (ナイシン以外)	7.3 - 11.1 %	1.2 - 1.8 %
脂質	0.9 - 1.5 %	<0.1 %
炭水化物	4 - 7 %	1.5 - 3.5 %
塩化ナトリウム	60 - 85 %	75 - 86 %
灰分 (燃焼時の残渣)	75 - 86 %	90 - 94 %
乳糖	0.5 - 2 %	< 0.4 %
水分	1 - 2 %	0.5 - 1.5 %
鉛	0.02 - 0.08 ppm	0.02 - 0.08 ppm
総重金属	<10 ppm	< 10 ppm

< ナイシン製剤 (従来工程、乳培地) >



< ナイシン製剤 (変更工程、糖培地) >



Pump A: Water + 0.1%TFA  
 Pump B: Acetonitrile+0.1%TFA

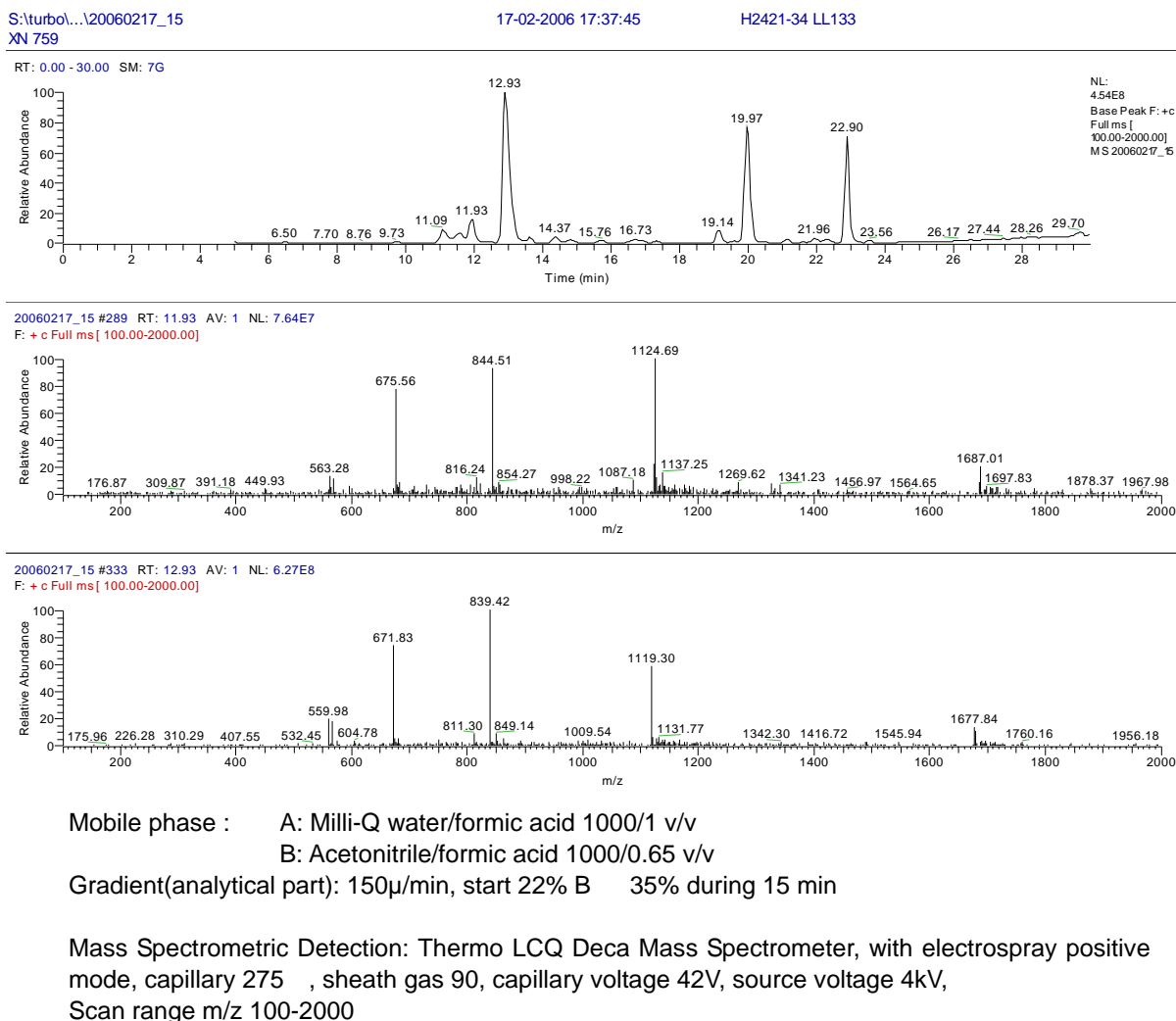
Gradient elution starting at: 30% Acetonitrile+0.1%TFA & 70% Water + 0.1%TFA  
 Temperature: 40 degrees C; Flow rate: 1 ml/min; 220 and 280 nm UV detection; injection volume: 20 µl;  
 Column: YMC ODS-AQ, particle size 3 µm, 150 x 4.6 mm internal diameter.

**Figure 1** HPLC chromatograms of Nisin preparation

## 2) LC/MS 分析によるナisin 製剤の比較 (添付資料 4-2)

変更工程により製造されたナisin 製剤は、保持時間 11.56 分と 12.64 分にメインピークを示しました (Fig. 3、上段)。従来工程により製造されたナisin でも同様の保持時間 11.93 分と 12.93 分にピークが得られました (Fig. 2、上段)。変更工程で製造されたナisin の、保持時間 12.64 分のピークのマスペクトルから、ナisin A の 2~5 価の多価イオンと考えられるピークが、1677.44、1118.86、839.42、672.32 m/z に検出されました (Fig. 3、下段)。ナisin A+18 の、保持時間 11.56 分のピークのマスペクトルからも同様に、2~5 価の多価イオンと考えられるピークが検出されました (Fig. 3、中段)。又、従来工程で製造されたナisin でも、同様の結果が得られましたが、これらのピーク以外にも保持時間がより長い別のメインピークが、2 本検出されました (Fig. 2)。

### (乳培地)



**Figure 2** LC/MS base peak Chromatogram and MS spectrum of Nisin preparation H2421-34, Milk based fermentation process (4.0 mg/ml)

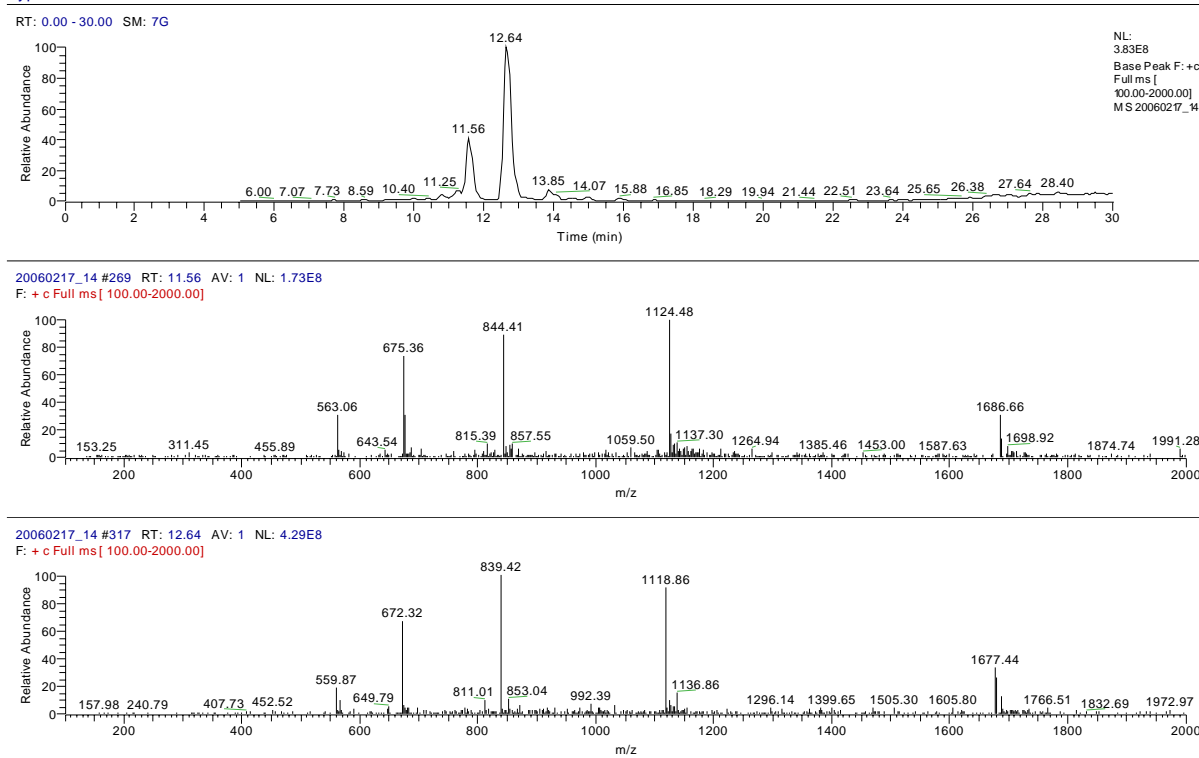
Top: LC/MS base peak chromatogram  
Middle: MS spectrum of rt. 11.93 min  
Bottom: MS spectrum of rt. 12.93 min

(糖培地)

S:\turbo\...20060217\_14  
Type 5

17-02-2006 16:25:46

H2421-25 LL133



Mobile phase : A: Milli-Q water/formic acid 1000/1 v/v  
 B: Acetonitrile/formic acid 1000/0.65 v/v  
 Gradient(analytical part): 150µ/min, start 22% B 35% during 15 min

Mass Spectrometric Detection: Thermo LCQ Deca Mass Spectrometer, with electrospray positive mode, capillary 275 , sheath gas 90, capillary voltage 42V, source voltage 4kV, Scan range m/z 100-2000

**Figure 3** LC/MS base peak Chromatogram and MS spectrum of Nisin preparation H2421-25, Yeast and carbohydrate based fermentation process (4.0 mg/ml)

Top: LC/MS base peak chromatogram  
 Middle: MS spectrum of rt. 11.56 min  
 Bottom: MS spectrum of rt. 12.64 min

Table 2 Average molecular masses calculated on observed m/z					
Sample	Component	Retention	Observed	Theoretical	Deviation
		time	Mass	Mass	(Obs-Est)
H2421-34	Nisin A + 18	11.93	3372.7	3372.1	0.6
	Nisin A	12.93	3354.1	3354.1	0.0
H2421-25	Nisin A + 18	11.56	3372.0	3372.1	-0.1
	Nisin A	12.64	3354.0	3354.1	-0.1

### 3) フォトダイオードアレイを用いた HPLC 分析によるナイシン製剤の比較 (添付資料 5)

微量の不純物の有無を確認するため、従来工程および変更工程により製造したナイシン製剤を、ダニスコ実施の EFSA 評価用資料(40 mg/ml)より 4 倍高い濃度(160 mg/ml)で、同じ HPLC 条件で分析しました。その結果、新たなマイナーピークは検出されませんでした (Fig 4)。また、異なるペプチドが 220 nm で同じ保持時間に溶出されている可能性を確認するため、検出器をフォトダイオードアレイ (190-750 nm) とした場合も同様の結果が得られました (Fig. 5)。

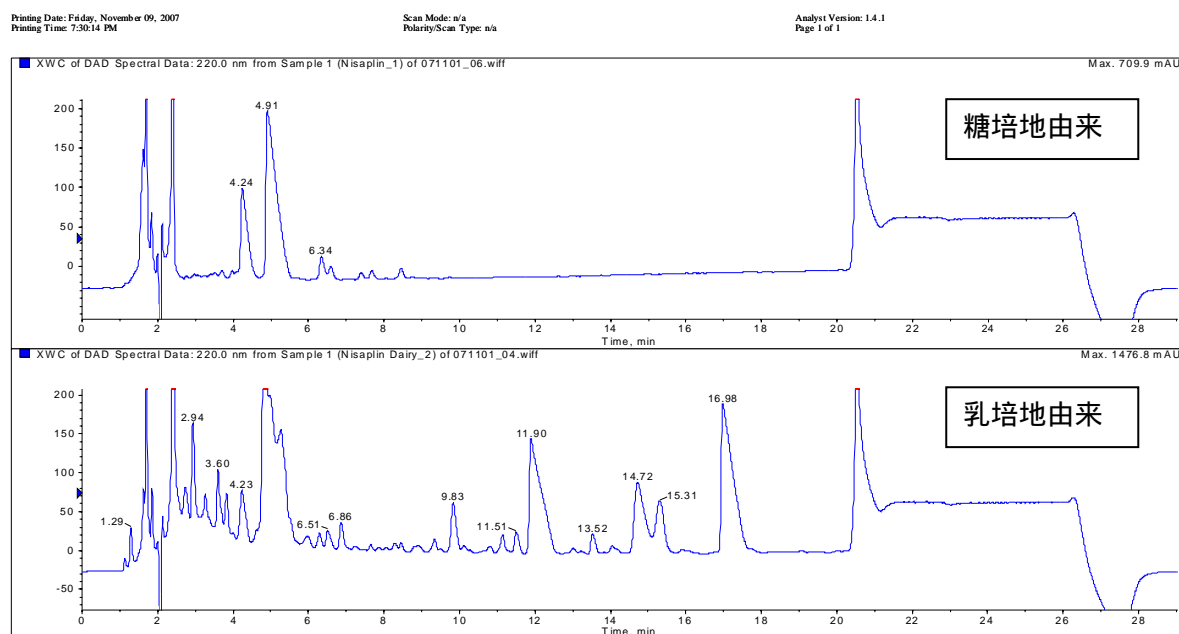


Fig.4 Nisaplin のフォトダイオードアレイのクロマトグラフ  
(220 nm、サンプル濃度 160 mg/ml)

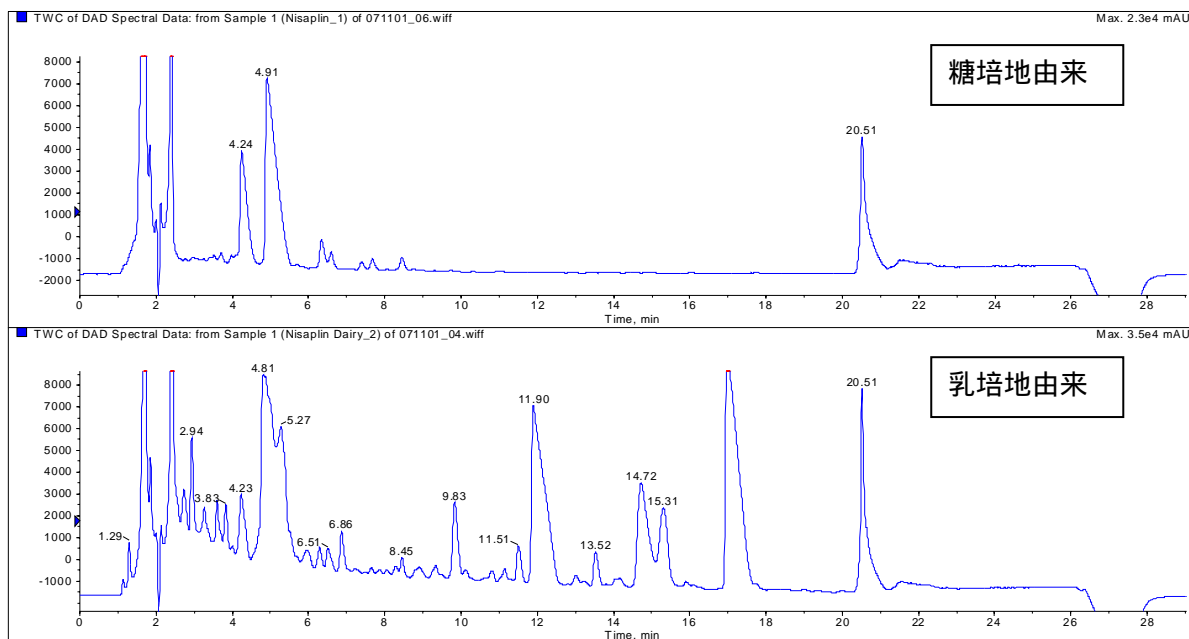


Fig.5 Nisaplin のフォトダイオードアレイのクロマトグラフ  
(190 ~ 750 nm、サンプル濃度 160 mg/ml)



#### 4) SDS-PAGE 分析によるナisin製剤の比較 (添付資料 6)

従来工程および変更工程により製造したナisin製剤を、HPLC と原理の異なる分析法である SDS ポリアクリルアミド電気泳動を用いて、高分子のペプチド分析を実施しました。メインバンドのナisin A(3.4 kDa)が認められ、分子量 6 kDa より高分子領域にバンドは認められませんでした (Fig. 6)

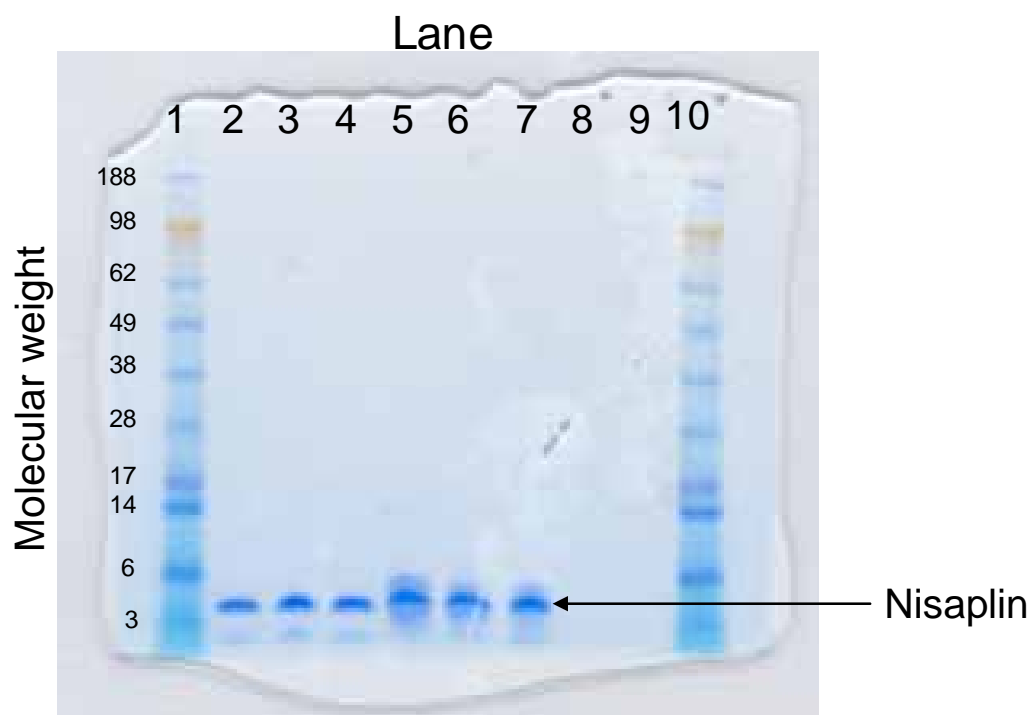


Figure 6 SDS-PAGE gel of Nisin preparations

- Lane 1, 10 ; 分子量マーカー
- Lane 2 ~ 4 ; ナisin製剤 (変更工程、糖培地)
- Lane 5 ~ 7 ; ナisin製剤 (従来工程、乳培地)
- Lane 8, 9 ; ブランク

#### 4 . 添付資料

1. EFSA 評価資料 ( 2006 年 10 月 20 日採択 )

「Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on the safety in use of nisin as a food additive in an additional category of liquid eggs and on the safety of nisin produced using a modified production process as a food additive」

( [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific\\_Opinion/afc\\_op\\_ej314b\\_nisinuseineggs\\_op\\_en\\_0.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/afc_op_ej314b_nisinuseineggs_op_en_0.pdf) )

2. JECFA 規格「NISIN PREPARATION」( 2007 年 )

( <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-295-m4.pdf> )

3. ダニスコ社が欧州委員会に提出した規格変更、液卵用途追加の要望資料 ( 2005 年 10 月 24 日 ) 「Nisin (E234) new specification – process modification/ liquid eggs application」

4. ダニスコ社が JECFA に提出した規格変更の要望資料 ( 2006 年 11 月 24 日 )

4-1 Re:Nisin (INS 234) - Specification Modification, November 24, 2006

4-2 Nisin (INS 234) - Specification Revision, November 24, 2006

5. 三栄源エフ・エフ・アイ(株) 社内資料、「乳培地及び糖培地由来ナイシン A の HPLC 分析比較」, 2007 年 11 月

6. ダニスコ 社内資料 「SDS-PAGE Analysis of Nisaplin and Nisaplin Dairy」, 2007 年 11 月 14 日