

高圧蒸気処理および江戸甘味噌製造過程における大豆アレルギーの消長

柴田 充教・三枝 静江・細井 知弘・小川 正*・沼田 邦雄

キーワード：江戸甘味噌，大豆アレルギー，タンパク質変性，低アレルギー化，高圧蒸気処理

緒言

日本では、平成14年4月から食品にアレルギーの原因物質が含まれる場合にはその旨の表示をすることが義務づけられている（平成13年厚生労働省令第23号，2001）。アレルギー原因物質には、卵、乳など表示義務がある特定原材料5品目と、表示が奨励される原材料20品目があり、大豆は表示が奨励される原材料の一つである。大豆は良質なタンパク質を含むことから重要なタンパク質源として広く利用されているが、一方、そのタンパク質の一部の成分がアレルギーとして作用し、大豆アレルギーを発症する人も多い。そのため、大豆は日本人の5大アレルギー食品の一つとなっているが、摂取時にアナフィラキシーショックを伴うような重い症状を示す場合は少ないと報告されている（小川，2003）。大豆の主要タンパク質は、その沈降係数（S）により、2S，7S，11S，15Sの画分に分類されるが、7S画分のβ-コングリシニンのαサブユニットは大豆主要アレルギーの1つとなっている。その他に、主要アレルギーとして*Gly m Bd 30K*や*Gly m Bd 28K*が知られており（小川，2003），2S画分のトリプシンインヒビターもアレルギーの一種として報告されている（Ogawa et al., 1991）。最近、主要アレルギーであるαサブユニット（*Gly m Bd 60K*）および*Gly m Bd 28K*を欠失した大豆「ゆめみのり」（平成13年に命名登録）が開発され、本大豆を加工原料とした低アレルギー性大豆加工食品の開発が検討されている（Takahashi et al., 1994）。

大豆を原料とする食品の一つに味噌があり、日本各地において、地域性豊かな特色あるさまざまな味噌が造られている。東京においても、濃赤色を呈した甘い独特の風味を持つ江戸甘味噌が江戸時代から製造され

ており、現在、江戸甘味噌は、特許庁認定の地域団体商標として登録され、また東京都の地域特産品としての認証も受けている。江戸甘味噌は、添加する食塩量が最終濃度約6%と少なく、標準的な辛口味噌の約2倍の米麴を使用するために特有の甘みを呈しており、その風味が動物性タンパク質素材とよく合うことから、鯖の味噌煮、どじょう汁、しじみ汁などの料理に利用されている。江戸甘味噌製造の特徴としては、大豆の蒸煮・蒸熟時間が2日間以上と長いこと、また麴添加後の発酵・熟成期間が10日程度と短く、発酵・熟成温度が約50℃と高いことなどが挙げられる（図1および表1）。

江戸甘味噌はこのように特色ある製造方法によって造られるが、この江戸甘味噌中の大豆アレルギータンパク質の分解度・残存性についてはこれまで未解明であった。そこで本研究では、江戸甘味噌の原料大豆、処理時間を変化させて高圧蒸気（オートクレーブ）処理した大豆および製品等に関して、高圧蒸気処理や熟成等に伴う大豆タンパク質の変性・分解をアレルギーの消長を中心に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）と*Gly m Bd 30K*およびトリプシンインヒビターに対する特異抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。

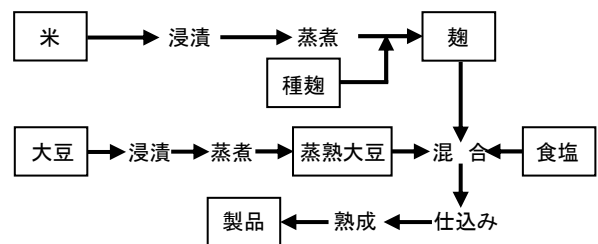


図1 江戸甘味噌の製造工程

*関西福祉科学大学

表1 江戸甘味噌と標準的な辛口味噌の製造方法の比較

	豆の蒸煮	麴歩合	塩分	発酵・熟成温度	発酵・熟成期間
江戸甘味噌	2日以上	13~15	約6%	約50℃	約10日
標準的な辛口味噌	数時間	6~10	約12%	約30℃	3ヵ月以上

材料および方法

1. 大豆・味噌試料

原料大豆(中国産)、蒸熟大豆、江戸甘味噌は、日本味噌株式会社より提供を受けた。また一部の試験には、市販の江戸甘味噌や辛口味噌を用いた。

2. 大豆の浸漬・高圧蒸気処理

原料大豆を4℃で22時間純水に浸漬後、120℃、0.1MPaで30, 60, 90, 120分間高圧蒸気処理(SX-500, トミー精工)した。

3. 江戸甘味噌のプロテアーゼ処理

Yamanishi, et al. (1996) により大豆アレルゲンを分解すると報告されている *Bacillus subtilis* 由来の酵素、プロテアーゼN「アマノ」G(天野エンザイム) 0.85 gを、Tris-HCl緩衝液(pH 6.8) 5 mlに溶解し、江戸甘味噌 5 gを入れて攪拌後、55℃で16時間反応させた。

4. 大豆タンパク質の抽出、ケルダール分析および SDS-PAGE用試料の調製

生・浸漬・高圧蒸気処理した大豆や各種味噌から、以下の抽出法でタンパク質を抽出した。試料(大豆は2 g, 味噌は5 g)にその1.5倍量の海砂を加えて乳鉢で15分間磨砕したのち、さらに規定濃度のSDS-PAGEサンプルバッファー(Laemmli, 1970を改変, glycerolをsucroseに置換, 以下同様)を試料の10倍量添加して5分間磨砕し、沸騰水中で15分間加熱した。次に、1,130×gで20分間遠心分離し、上清をさらに9,640×gで30分間遠心分離したのち、沈殿と浮遊物の中間層をタンパク質溶液として採取し、その窒素濃度をケルダール分析により測定した。ケルダール分析は、各種大豆試料から抽出したタンパク質溶液については約2 gを、味噌試料から抽出したタンパク質溶液について

は約4 gを精秤し、「五訂 日本食品標準成分表分析マニュアル」(科学技術庁資源調査会食品成分部会編, 1997)に従い、Kjeltec 2400 Analyzer(フォス・ジャパン)を用いて行なった。続いて、タンパク質溶液を、規定濃度SDS-PAGEサンプルバッファーを用いて最終窒素濃度が22μg/μlとなるように調製して泳動試料とした。

5. SDS-PAGE

SDS-PAGEは、Laemmli法に準拠して行った(Laemmli, 1970)。ケルダール分析の結果に基づき窒素量を22μg/μlに調製した泳動試料、2種のマーカーLMW Calibration Kit(GEヘルスケア バイオサイエンス)およびPrestained SDS-PAGE Standards, Low Range(バイオ・ラッド ラボラトリーズ)それぞれ10μlを、12.5%ポリアクリルアミドゲル(アトー)の各レーンに注入し、電気泳動装置AE-6400とAE-8450(アトー)を用いて20mA/ゲル、90分間の条件で電気泳動を行った。泳動後、CBB R-350(GEヘルスケア バイオサイエンス)を用いて染色を行った。

6. ウェスタンブロット

SDS-PAGE後のゲルを、転写装置TE62X(GEヘルスケア バイオサイエンス)を用いてPVDF膜(GEヘルスケア バイオサイエンス)に転写した。*Gly m Bd 30K*を検出するために、転写後の膜を1×TBS/1%カゼイン(バイオ・ラッド ラボラトリーズ)を用いてブロッキングしたのち、抗*Gly m Bd 30K*抗体(F5 mAb, 0.64μg/ml)(Tusji et al., 1993)と2.5時間反応させ、さらにHRP-Goat Anti-Mouse IgG(Zymed Laboratories, 3,000倍希釈)と1.5時間反応させた。また、トリプシンインヒビターの検出のために、転写・ブロッキング後の膜をHRP標識抗トリプシンインヒビター抗体(Rockland, 20μg/ml~40μg/ml)と2.5時間反応させた。その後それぞれについてDAB染色(Pierce)を行

い*Gly m Bd 30K*とトリプシンインヒビターの検出を行った。また陽性対照として、大豆トリプシンインヒビター（和光純薬）を用いた。

結果および考察

1. 大豆タンパク質とアレルギーに対する高圧蒸気処理の影響

大豆アレルギーに対する高圧蒸気処理の影響を検討するため、未加熱の生大豆と浸漬大豆ならびに120℃で30, 60, 90, 120分間高圧蒸気処理した大豆から抽出したタンパク質溶液を用いてSDS-PAGEを行ったところ、高圧蒸気処理の時間が長くなるに従ってタンパク質のバンドが不明瞭となった（図2-A）。また抗*Gly m Bd 30K*抗体（図2-B）および抗トリプシンインヒビター抗体（図2-C）を用いたウェスタンブロットでは、120℃での処理時間が長くなるに従って、それぞれの物質に由来するバンドが生大豆および浸漬大豆におけるバンドよりも薄くなったが、120℃、120分間処理後の試料からもバンドが認められた（図2, レーン3～9）。これらの結果は、120℃、120分間高圧蒸気処理を行っても大豆アレルギー中の抗体結合部位（エピトープ）が残存して抗体結合能を有していることを示しており、依然として経口摂取時にアレルギー反応を誘起する可能性があることを示唆している。また泳動時に、バンドが薄く不明瞭になりレーン上部に残存がみられたのは、大豆タンパク質の変性が高圧蒸気処理により進むとともに、高分子化してレーン内に進入できないタンパク質が増加したことが主要因と考えられる。Yamanishi et al. (1995, 1996) によると、120℃、20分間の高圧蒸気処理では大豆タンパク質は分解されず、*Gly m Bd 30K*の抗原性が逆に強まるという報告もあり、高圧蒸気処理のみによる大豆アレルギーの分解は困難であると考えられる。

2. 江戸甘味噌製造過程における大豆タンパク質とアレルギーの変化

江戸甘味噌の原料大豆と製品に関して、タンパク質とアレルギーの分解・変性の程度を検討した。SDS-PAGEの結果においては、生大豆および浸漬大豆では大豆タンパク質のバンドが明瞭に認められたが、工場蒸熟大豆や江戸甘味噌製品ではバンドが不明瞭で

あった（図3, レーン3～7および12～13）。また、工場蒸熟大豆と比較して江戸甘味噌製品の泳動像は、高分子量領域がより薄く、反対に低分子量領域が相対的に濃くなっており、低分子の物質の割合が増加したことを示唆している（図3, レーン5～7）。泳動試料を8倍に希釈して解析した場合にも、同様の結果が得られた（図3, レーン12～13, データ一部未掲載）。ウェスタンブロットでは、主要大豆アレルギー*Gly m Bd 30K*（図4-A）およびトリプシンインヒビターのバンド（図4-B）が、工場蒸熟大豆や江戸甘味噌製品では痕跡程度に薄くなった。これらの結果は、製造の過程、特に味噌の熟成工程で、大豆タンパク質とアレルギーの分解が進むことを示唆している。

2種類の江戸甘味噌製品にプロテアーゼN「アマノ」Gを反応させたものは、SDS-PAGEで大豆タンパク質由来のバンドが消失し（図3, レーン9および10）、本酵素処理によりさらに大豆タンパク質の分解が進んだと推察される。図3, レーン9および10に新たに現れたバンドは、プロテアーゼN「アマノ」G製品に含まれるタンパク質が原因と考えられる。ウェスタンブロットでは、*Gly m Bd 30K*およびトリプシンインヒビターそれぞれの位置に、全くバンドが生じなかったことから（図4-AおよびB, レーン8および9）、江戸甘味噌中の大豆アレルギー2種の大部分はプロテアーゼN「アマノ」Gにより分解されたと考えられる。これらの結果は、特定のタンパク質分解酵素を用いて、アレルギー患者でも摂取可能なように大豆アレルギー量を低減させた江戸甘味噌を製造可能なことを示唆している。

市販の辛口味噌については、SDS-PAGEで大豆タンパク質のバンドが低分子量側で検出されたことから、原料大豆と比較してタンパク質の分解が進んでいたと考えられる（図2-A, レーン14）。しかしながら、ウェスタンブロットでは、*Gly m Bd 30K*およびトリプシンインヒビターのバンドが明瞭に検出され、これらの物質が残存していると予想される（図2-BおよびC）。一方で、味噌の製造過程において、発酵1ヶ月後には*Gly m Bd 30K*が分解されて検出できないという報告（Tsujii et al., 1997）もあることから、味噌の製造方法によりアレルギーの残存性に差異があると思われる。今後さまざまな製法の味噌について、アレルギーの残存度を検討する必要があると考えられる。

摘 要

高圧蒸気処理大豆および江戸甘味噌製造過程における、大豆タンパク質の変性と分解の程度をアレルゲンタンパク質を中心に、SDS-PAGEと特異抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。高圧蒸気処理により大豆タンパク質は変性したが、120℃、2時間高圧蒸気処理した大豆において、2種の大豆アレルゲン *Gly m Bd 30K* およびトリプシンインヒビターは残存していた。江戸甘味噌の製造過程では、麴、蒸熟大豆ならびに塩を混合した後の熟成工程で、微生物酵素の作用により大豆タンパク質の分解が若干進むことが示唆されたが、最終製品中にも2種の大豆アレルゲン *Gly m Bd 30K* およびトリプシンインヒビターが存在した。市販酵素プロテアーゼN「アマノ」G(天野エンザイム)の使用により、2種の大豆アレルゲンは分解されて検出されなくなったことから、微生物酵素を用いることにより、大豆アレルゲン量を一層低減化した江戸甘味噌を製造可能なことが示唆された。

引用文献

- 五訂 日本食品標準成分表分析マニュアル (1997) 科学技術庁資源調査会食品成分部会編. 社団法人 資源協会, 東京. pp.13-17.
- 厚生労働省 (2001) 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令. 平成13年厚生労働省令第23号.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Ogawa, T., N. Bando., H. Tsuji, H. Okajima, K. Nishikawa and K. Sasaoka (1991) Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 37: 555-565.
- 小川 正 (2003) ダイズのアレルゲンタンパク質の同定と構造. 総合農業研究叢書 第44号 わが国における食用マメ類の研究. 海妻矩彦・喜多村啓介・酒井真次編. 独立行政法人 農業技術研究機構 中央農業総合研究センター, 茨城. pp.573-579.
- Takahashi, K., H. Banba, A. Kikuchi, M. Ito and S. Nakamura (1994) An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Breeding Sci.* 44: 65-66.
- Tsuji, H., N. Bando, M. Kimoto, N. Okada and T. Ogawa (1993) Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich ELISA of the major soybean allergen, *Gly m Bd 30K*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39: 389-397.
- Tsuji, H., N. Okada, R. Yamanishi, N. Bando, H. Ebine and T. Ogawa (1997) Fate of a major soybean allergen, *Gly m Bd 30 K*, in rice-, barley- and soybean-koji miso (fermented soybean paste) during fermentation. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.* 3: 145-149.
- Yamanishi, R., T. Huang, H. Tsuji, N. Bando and T. Ogawa (1995) Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with *Bacillus natto*. *Food Sci. Technol. Int.* 1: 14-17.
- Yamanishi, R., H. Tsuji, N. Bando, Y. Yamada, Y. Nadaoka, T. Huang, K. Nishikawa, S. Emoto and T. Ogawa (1996) Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42: 581-587.

Summary

Mitsunori Shibata, Shizue Saegusa, Tomohiro Hosoi, Tadashi Ogawa (Kansai University of Welfare Sciences) and Kunio Numata (2007): The fate of soybean allergens in autoclaved soybeans and 'Edo-ama' miso.

Key words : 'Edo-ama' miso, soybean allergens, protein denaturation, allergen degradation, autoclaving

We investigated whether soybean proteins including allergens are denatured and/or degraded during autoclaving and 'Edo-ama' miso production. SDS-PAGE analysis suggested that soybean proteins are denatured by autoclaving. Two soybean allergens, *Gly m* Bd 30K and trypsin inhibitor, were detected in soybeans even after autoclaving at 120°C for 120 minutes by Western blot analysis. During the aging process of 'Edo-ama' miso production, it is likely that the proteins including the two allergens were partially degraded, possibly due to the microbial enzymatic digestion. However, the two soybean allergens still remained in the final products of 'Edo-ama' miso. A commercially available enzyme, protease N 'Amano' G, almost completely hydrolyzed the two soybean allergens. These results suggest that utilization of certain microbial enzymes makes it possible to produce modified 'Edo-ama' miso containing lesser amounts of soybean allergens.

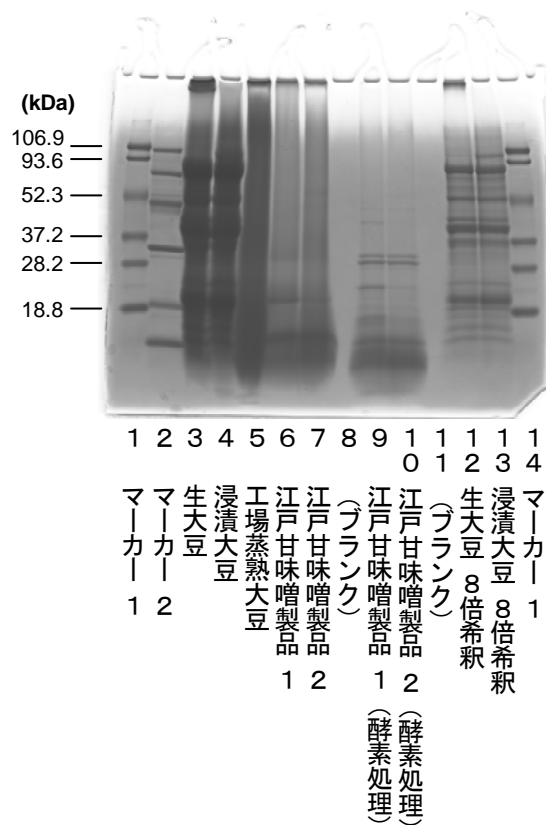


図3 江戸甘味噌の原料および製品と、プロテアーゼ処理した江戸甘味噌製品に含まれるタンパク質のSDS-PAGE解析結果

レーン9および10：プロテアーゼNアマノG処理実施（55°C, 16時間）

マーカー1：Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad)

マーカー2：LMW Marker (GE Healthcare Bio-Sciences)

