

機関番号：43701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500698

研究課題名（和文） 岐阜県内産小麦を用いたアレルギー患者のためのパン作り

研究課題名（英文） Bread making of wheat flour produced in Gifu Prefecture for the allergic patient.

研究代表者

堀 光代 (HORI MITSUYO)

岐阜市立女子短期大学・食物栄養学科・専任講師

研究者番号：90320952

研究成果の概要（和文）：小麦粉発酵食品は、数千年の歴史があり、多くの微生物が存在している。小麦粉発酵食品の微生物酵素を加えたパンを作り、その特性を明らかにするため、パン中のたんぱく質を分析した。パンは、岐阜県産小麦とカナダ産小麦を配合し、酵母のみのパンと小麦粉発酵食品由来の微生物酵素を添加したパン（と添加しないパン）を作成した。微生物酵素を添加したパンの体積は、酵母のみの（酵素を加えない）ものより小さかった。パン中のたんぱく質を抽出し、たんぱく質とアミノ酸の分析を行った。パンに微生物酵素を添加することにより、パン中のアレルギーたんぱく質が部分的に分解されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Wheat flour fermentation foods date back thousands of years and have many kinds of microorganisms. To clarify the characteristics of bread proteins prepared using bacterial enzyme, the proteins in bread were analyzed. Bread was prepared with a mixture of Japanese wheat flour in Gifu Prefecture and Canadian wheat flour with or without adding crude enzyme prepared from microorganisms. The volume of the bread with crude enzyme prepared from microorganisms was smaller than without it. The salt-soluble proteins and free amino acids in the bread were extracted and determined. Salt-soluble proteins were then separated using SDS electrophoresis and immunoblotting, then and analyzed. The protein content of the bread with crude enzyme added was higher than without it. The addition of crude enzyme to the wheat flour served to promote protein decomposition in the bread based on the analysis by SDS electrophoresis and immunoblotting. These results clearly indicated that the allergy proteins in the bread were partly decomposed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2860,000
2009年度	800,000	240,000	1040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食生活学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：伝統発酵食品 パン 微生物 小麦粉

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、社会的な問題である。

日本における食物アレルギーの原因食物の上位3位では、1位 鶏卵、2位 乳製品、3

位 小麦になっている。特に小麦アレルギーは増加傾向にあるといわれ、主食として重要な穀類にアレルギーが認められることは深刻な問題となっている。小麦アレルギーに対応する製品として、酵素処理による製品開発が進んでおり、低アレルギー化小麦については製品化もされている。また、原因物質についても単離および解析が進んでいる。酵素処理による小麦の低アレルギー化に用いる酵素には市販酵素のコラゲナーゼ、プロテアーゼ等がある。しかし、本研究においては、上記に示した市販酵素を用いるのではなく、伝統的小麦粉発酵食品中の微生物の産生する酵素を利用することにした。これまで探索を続けてきた小麦粉発酵食品中の微生物においては、パン酵母のみならず、*Bacillus* 属等の微生物が複合的に存在していることが確認されている。その中には、プロテアーゼ活性の強い微生物があり、低アレルギー化に利用されているコラゲナーゼ様酵素活性の強いものも見出されている。

微生物の産生する酵素を利用した低アレルギー化の可能性を探索する研究や、その応用としてのパン作りについての研究はほとんど見られない。そこで本研究では、微生物の産生する酵素を利用することによる低アレルギー化の可能性を探索することを主眼とし、さらに実際の食生活に応用できるよう、伝統発酵食品から産生された微生物酵素と酵母を用いたパンの作成を試みる。

本研究は、伝統的小麦粉発酵食品の微生物を利用することにより先人の知恵を継承することであり、さらにパンを作成することで私たちの食生活に応用していくことの可能性を探りたい。

2. 研究の目的

パンを作る微生物といえば市販パン酵母（イースト）が主であり、一般的である。パン酵母を用いれば、失敗することなくパンを作ることができる。

一方、世界各地のパンや伝統的小麦粉発酵食品の中には酵母以外の多種類の微生物が存在し、各国の気候風土にあった味わいのあるパンも多くみられる。また、各地の伝統的な製法を持つものもある。これまで探索を続けてきた小麦粉発酵食品の微生物を観察すると、パン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）のみならず、*Bacillus* 属や、*Lactobacillus* 属等の微生物が複合的に存在していることが確認されている。その中にはプロテアーゼ活性の強い *Bacillus* 属において、低アレルギー化に利用されているコラゲナーゼ様酵素活性の強いものも見出されている。

本研究では、この低アレルギー作用に着目

し、伝統発酵食品から分離された微生物酵素と酵母を用いてパンを作成する。作成したパンのたんぱく質を抽出し、たんぱく質の分解等、機能性について分析を行う。また、パンの作成には、主材料となる小麦粉には岐阜県内産小麦粉を用いることにした。これは「地産地消」の活動の一助となり得る原材料を組み合わせていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) パン材料・微生物の選定

原材料として用いる岐阜県内産小麦についての小麦粉を製粉方法から検討した。具体的には、粒度と粒度分布の検討、色差の測定、製パン時の配合割合等の検討を行った。微生物酵素の作用については、たんぱく質の疎水性部分を分解する酵素活性の高いものを選択した。

(2) パンの作成

一般的なパンの作成方法として用いられるストレート法と中種法の2種類でパンを作成し、それぞれの製法において、微生物酵素添加、酵母のみ（無添加と）の比較と製法間の比較を行った。パンの体積の算出には菜種法を用いた。体積を重量で除し、比容積を算出した。微生物酵素を添加したパンに適した製法を見出した。

(3) たんぱく質の抽出とその分析

作成したパンからたんぱく質の抽出を行った。抽出試料からたんぱく質の挙動、アミノ酸組成、小麦アレルギーの分析等を行った。

① SDS-PAGE

たんぱく質の泳動パターンをSDS-PAGEにより確認した。12.5%の均一ゲルを用い、泳動後、クマシブリアントブルー（CBB）にて染色を行った。

② アミノ酸組成分析

たんぱく質抽出液を試料とし、高速液体クロマトグラフィー（L-7200 日立製作所）を用いて遊離アミノ酸を定量した。カラムはカスタムイオン交換樹脂（#2629）カラム温度 55°C、試料注入量 10 μ l、流量は 0.4ml/min とした。検出はOPA蛍光法で行った。検出波長は Ex:340nm Em:450nm とした。

③ アレルギーたんぱく質分解能の検討

イムノブロットにより小麦アレルギーたんぱく質の分解における検討を行った。イムノブロットは、ウエスタンブロット法にて電気泳動したゲルをPVDF膜に転写した。転写したPVDF膜は、0.3%スキムミルクを

含む TBS-T で 4℃ 1 晩ブロッキング処理後、小麦アレルギー患者血清を用いて小麦アレルギーたんぱく質を検出した。2 次抗体には、抗ヒト IgE・ウサギポリクロナール抗体/パーオキダーゼ標識を用いた。その後、化学発光試薬を用いて検出し、X 線フィルムに露光し、現像した。

4. 研究成果

(1) パン材料・微生物の選定

岐阜県内産小麦（中国 152 号）について製粉方法の違いによる粒度の面から検討した。ロール製粉機による製粉（以下ロール製粉とする）とテストミルによる製粉（以下テストミル製粉とする）の 2 種類で製粉した小麦粉の粒度、色差、製パン性を比較した。小麦粉の平均粒度は、ロール製粉 95.5 μm、テストミル製粉 56.9 μm であった。両者は、粒度分布タイプも異なり、ロール製粉にはふすまの混入が示唆され、色差にも差がみられた。

製パン結果では、比容積は、テストミル製粉のパンがロール製粉のパンより高い値を示し、製パン性が良好であった。クリープ試験結果では、テストミル製粉はカナダ産小麦の 1CW に近く、ロール製粉と比べ、顕著な差がみられた。これらの結果から、テストミル製粉の小麦粉を選定した。小麦粉の配合割合については、実験結果を検討した結果、外国産小麦（1CW）と岐阜県産小麦との混合とし、3:1 の混合割合を選定した。

伝統発酵食品中の微生物の選定については、これまで研究で用いた 5 種類の *Bacillus* 属より微生物の産生する粗酵素を小麦粉抽出液に作用させ、たんぱく質の分解を検討した結果、最も分解がみられた微生物酵素を選定した。

(2) パンの作成

パンの製法は、ストレート法と中種法の 2 種類について作成した。いずれも酵母と伝統発酵食品から産生された微生物酵素を添加したものと、酵母のみで微生物酵素を添加しないものについて比較を行った。



	(A)	(B)	(C)	(D)
比容積	3.30	3.87	2.68	3.48
(A)	酵素添加なし	ストレート法		
(B)	酵素添加なし	中種法		
(C)	酵素添加あり	ストレート法		
(D)	酵素添加あり	中種法		

図 1 パン作成結果

ストレート法、中種法のいずれにおいても、微生物酵素を添加しない (A) と (B) の膨化が良く、比容積も高かった。しかし、中種法において、微生物酵素を添加した (D) は (A) より高い比容積結果を示した。これらの結果より、製法は中種法を用いることにした。

(3) 抽出たんぱく質の分析結果

たんぱく質の泳動パターンについて SDS-PAGE およびイムノプロットの結果を図 2 に示した。

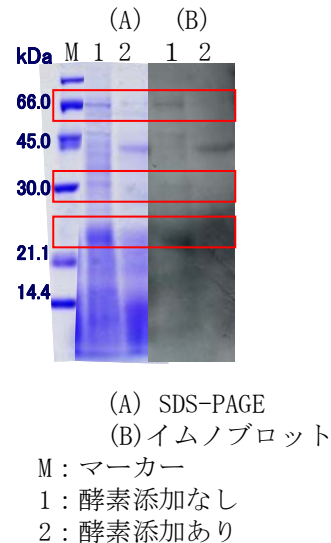


図 2 パンから抽出したたんぱく質の SDS-PAGE およびイムノプロット結果

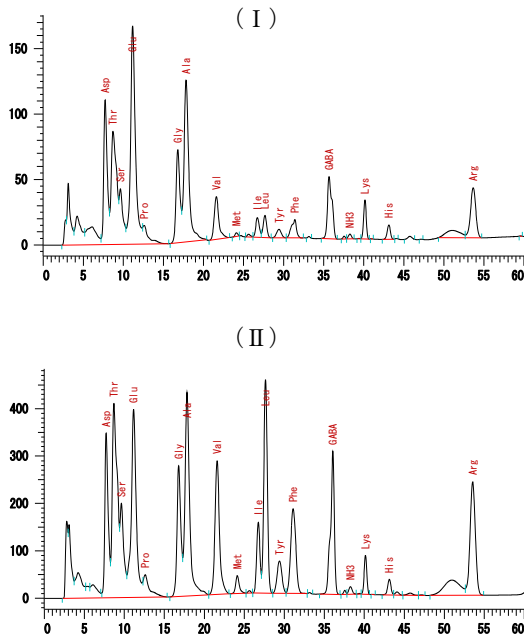
SDS-PAGE の結果から、酵素添加したものは、たんぱく質の分解がみられた。イムノプロットの結果からは、66 kDa、30 kDa、25 kDa 付近においてバンドが薄くなっており、アレルギーたんぱく質の分解が示唆された。しかし、一方では、43 kDa 付近には新たなバンドの出現がみられた。

パンの中のたんぱく質のアミノ酸について図 3 に結果を示した。

合計のアミノ酸量は、酵素添加なしでは、88.92 (g/dry)、酵素添加では、434.64 (g/dry) となり、約 4.9 倍になった。

個々のアミノ酸については、特に Val と Leu の増加が顕著であった。Val では、酵素添加なし 0.49 (g/dry) から 39.84 (g/dry) に、Leu では、酵素添加なし 1.16 (g/dry) から 30.52 (g/dry) になっていた。また、Glu も約 2 倍に増加し、酵素を添加することにより、アミノ酸の増加が明らかとなった。

以上の結果から、パンの原材料となる小麦粉を岐阜県産小麦とカナダ産小麦を配合し、



(I) 酵素添加なし
(II) 酵素添加あり

図3 作成したパンのアミノ酸分析結果

微生物酵素を添加したパンと添加なしのパン作成し、比較検討を行った。微生物酵素を加えたパンの体積は、酵素を加えないものより小さいものであった。しかし、製法を中種法にすることにより、改善がみられ、遜色なく作成できることが明らかとなった。パン中のたんぱく質を抽出し、たんぱく質とアミノ酸の分析を行った結果、微生物酵素を添加したパンでは、パン中のアレルギーたんぱく質が部分的に分解されていることが示唆された。また、アミノ酸の分析結果からは、微生物酵素を添加することにより、アミノ酸量が増加していた。特に Val と Leu の増加が顕著にみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

①堀 光代、長野宏子、阿久澤さゆり、下山田真、吉田一昭、岐阜県内産小麦粉の製パン性の検討—製粉法による粒度の面から—、日本調理科学会雑誌、**43** (1) 31-37 (2010)、査読有

②Panthra PHROMRAKSA, Hiroko NAGANO, Yoshihiro KANAMARU, Hidehiko IZUMI, Chikako YAMADA and

Chirasaku KHAMBOONRUANG
Characterization of *Bacillus Subtilis*
Isolated from Asian Fermented Foods Food
Sci. Technol. Res., **15**(6), 659-666 (2009) 査読有

③堀 光代、長野宏子 スイス (ルツェルン) における小麦粉発酵食品、岐阜市立女子短期大学紀要、**58** 81-85 (2009)、査読無

④Chenjian LIU and Hiroko NAGANO
Purification and Characterization of
Proteolytic Enzyme from *Bacillus subtilis*
M2-4 J. Home Econ Jpn **59** (8) 565-573
(2008)、査読有

〔学会発表〕(計2件)

①都竹智恵子、長野宏子、粕谷志郎、堀 光代、下山田真、石釜焼成によるパンの特徴、日本家政学会第62回大会、広島大学東広島キャンパス、(2010)

②Mitsuyo HORI and Hiroko NAGANO
Bread making with the addition of bacteria
enzymes to wheat flour
IFHE(International Federation of Home
Economics) (2008) Lucerne, Switzerland

〔図書〕(計2件)

①加藤みゆき、津田淑江、長野宏子、阿知波弓子、大迫早苗、永島伸浩、西堀すき江、堀光代、森山三千江、地人書館、身近な調理の科学実験、(2008)、p 40-41、p72-79

②有村誠、大田正次、河原太八、加藤謙二、笹沼恒男、佐藤洋一郎、武田和義、丹野研一、辻本壽、富永達、長野宏子、西田英隆、森直樹、森川利信、吉村作治、渡部武、北海道大学出版会、麦の自然史—人と自然が育んだムギ農耕、(2010)、p 253-278

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 光代 (HORI MITSUYO)

岐阜市立女子短期大学・食物栄養学科・専任講師

研究者番号：90320952

(2) 研究分担者

長野宏子 (NAGANO HIROKO)

岐阜大学・教育学部・教授

研究者番号：40074984