

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700598

研究課題名 (和文) 伝統発酵食品中の微生物を用いた食品アレルギー低減化の検討

研究課題名 (英文) Decreasing food allergens; microorganisms in traditional fermented foods

研究代表者

池田 昌代 (IKEDA MASAYO)

東京農業大学・応用生物科学部・栄養科学科・助教

研究者番号：10364704

研究成果の概要：東南アジアの発酵食品からプロテアーゼ産生微生物を分離し、米アレルギータンパク質分解能について検討を行った。米抽出タンパク質を基質とした時、強いプロテアーゼ活性を示した菌株は *Bacillus subtilis*, *Bacillus Megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus flexus* であった。また、分離微生物から産生されたプロテアーゼは、米アレルギータンパク質に対し強い分解能を有することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：食品化学

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、アレルギー、微生物、*Bacillus*、米

1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーの患者数が急増しており、わが国では 2002 年 4 月に食品衛生法が改正され、世界に先駆け、卵、小麦、蕎麦、落花生をアレルギー成分として表示することが義務付けられた。また EU および米国でもアレルギー成分の表示が進みつつあり、食物アレルギーは、日本のみならず世界各国で深刻な問題となっている。この対処療法として、アレルギーを含む食品を摂取しない食療法があるが、アレルギーの原因になる食品の

多くは、日常生活において摂取頻度が高く、栄養価の高い食品であるため、原因食品の全てを食卓から排除することは、アレルギー患者の栄養面の偏りからも懸念される。また食品のアレルギー活性を失活させる方法として、既存のプロテアーゼを用いた食物アレルギータンパク質の分解が考えられるが、プロテアーゼによる無差別なタンパク質分解は、食品としての食感や風味を損ない、アレルギーを除去できても、食品としての価値を著しく低下させてしまうという新たな問題を生じさせる。これらの背景から食品としての価

値を損なわず、アレルゲンを除去することができれば、急増するアレルギー患者の食生活に劇的な変化をもたらすことができると考えた。申請者は、これまで東南アジアや中国南部で食されている饅頭、納豆、発酵米麺、酸肉などの伝統発酵食品の調査・収集を行い、その成分の特徴と分離微生物の働きについて研究をすすめてきたが、その過程で原料米を自然発酵させて製造する発酵米麺においては、現在、米の主要アレルゲンと報告されている 14-16kDa や 33kDa のタンパク質が検出されないことを明らかにした。このことは、発酵米麺は自然発酵の過程で製造できる、製造コストの極めて低い、低アレルゲン化食品であることを示唆している。また、製造過程でのアレルゲンタンパク質の減少は、発酵米麺の他、食物アレルギー患者が多いとされている小麦、米、大豆を原料とした、饅頭、ライスパーパー、納豆などでも確認できたことから、伝統発酵食品の中には食品としての食味や食感を保ちながら、アレルゲンタンパク質を特異的に分解できる微生物が存在すると推察した。また、これらの分離微生物を様々な食材に作用させ食品を製造することで、新しい低アレルゲン化食品の開発ができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまで収集した伝統発酵食品由来の微生物を対象として、食品としての価値や形状を保ちながら、アレルゲンタンパク質を特異的に分解できる微生物をスクリーニングし、それらの微生物を用いた食品工業への応用を検討することを目的とした、具体的には、小麦、米、大豆、蕎麦といった、現在、日本においてアレルギー患者の多い食品から抽出したタンパク質に、微生物の産生酵素を作用させ、**SDS - PAGE** 泳動パターンによりアレルゲンタンパク質分解能を有する微生物をスクリーニングする。また、イムノブロット及び **ELISA** 法において、微生物作用後のアレルゲンタンパク質量を測定する。さらに、微生物を作用させた、小麦、蕎麦、米などを用いて、パンや麺などの食品をモデル的に作成し、食品工業への応用を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、タイ、ベトナム、カンボジア、で採取した穀類発酵食品を対象とし、下記の実験を行った。

(1) プロテアーゼ産生微生物の検索

0.5%カゼインを含む普通寒天培地及び25%濃度のゼラチン平板培地を用い、プロテアーゼ産生菌株の検索を行った。各平板培地に供試菌株を穿刺接種し、37℃(カゼイン含有培地)、25℃(ゼラチン含有培地)で24-72時間培養した。培養後、コロニー周辺の halo 直径を測定した。

(2) 穀類タンパク質分解能の検討

(1) で分離した、プロテアーゼ産生菌を用い、米、小麦、蕎麦、大豆の抽出タンパク質分解能を検討した。

①粗酵素溶液の調製

供試菌株を、NA、LB 及びコラゲナーゼ誘導培地で培養(37℃、48時間)した培養上清を粗酵素溶液として用いた。

②粗酵素溶液を用いた穀類タンパク質の分解

穀類抽出タンパク質溶液 0.5ml に、粗酵素溶液 0.1ml を加え 37℃で 30 分反応後、0.1N の塩酸 0.1ml を加え反応を停止した。また、粗酵素溶液の代わりに蒸留水を加えたものをコントロールとした。

③SDS-PAGE

酵素作用後の穀類タンパク質泳動パターンを **SDS-PAGE** により確認した。ゲルは 16% 均一ゲルを用い、泳動後のゲルはクマシブリリアントブルー(CBB)により染色を行った。

(3) 微生物の同定試験

16srRNA 塩基配列及び API 細菌検査キット(BIOMERIEUX)による同定試験を行った。

(4) アレルゲンタンパク質分解能の検討

イムノブロット及び **ELISA** により粗酵素溶液のアレルゲンタンパク質分解能を検討した。一次抗体には、米アレルゲンに対するモノクロナール抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼ産生微生物の検索

タイ、ベトナム、カンボジアの穀類発酵食品を対象にプロテアーゼ産生微生物の分離を行った。第一スクリーニングとしてカゼイン及びゼラチン含有培地を用いた。供試菌株

を、各平板培地に穿刺接種し、37℃（カゼイン含有培地）、25℃（ゼラチン含有培地）で24-72時間培養後のhaloの形成を確認したところ、計85株のプロテアーゼ産生菌が得られた。

(2) 穀類タンパク質分解能の検討

米、小麦、蕎麦、大豆から抽出したタンパク質に、プロテアーゼ産生菌の粗酵素溶液を作用させ、作用後のタンパク質の変化をSDS-PAGEにより確認した。

米抽出タンパク質に粗酵素溶液を作用させた時、分子量に変化が認められたのは35株であった。そのうち、21株では26kDa付近のバンドが消失し、14株では26kDaに加え、14-16kDa付近のバンドの減少が見られた。分子量の変化が認められたいずれのタンパク質も、6.5kDa以下に新たなバンドの出現が確認され、米タンパク質を分解する35株を特定することができた。

しかし、小麦、蕎麦、大豆の抽出タンパク質においては、いずれの粗酵素を作用させた時も分子量に変化がみられなかったことから、供試菌株の培養条件を含め、粗酵素溶液の調整方法についても検討が必要である。

(3) 微生物の同定試験

米抽出タンパク質分解能を示した35株のうち、米の主要アレルゲンである16kDaのグロブリン画分を分解した13株を対象に、16srRNAの塩基配列及びAPI細菌検査キット(BIOMERIEUX)により同定試験を行った。

同定の結果、米のグロブリン画分に分解能を示した菌株は、*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus Megaterium*, *Bacillus flexus*, であった。このうち、*Bacillus subtilis* の5株、*Bacillus cereus* の4株、*Bacillus megaterium* の3株は、16srRNAの塩基配列では同一菌種であったが、APIを用いた同定試験では、表現型が異なっていた。

(4) アレルゲンタンパク質分解能の検討

米の16kDaのアレルゲンに対するモノクローナル抗体を用いて、粗酵素溶液の米アレルゲンタンパク質分解能を検討した。分離微生物の産生プロテアーゼを米抽出タンパク質に作用させた後、残存アレルゲン量を測定したところ、作用前のアレルゲンタンパク質量と比して5-20%の低減化が見られた。

このことから、本実験で分離した*Bacillus*属の産生酵素は、米アレルゲンタンパク質分解能を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Ikeda Masayo, Matsumori Shingo and Akuzawa Sayuri 「Effect of Heat-Moisture Treatment on the Digestibility and Viscous Characteristics of Hard Wheat Flour and Separated Wheat Starch」, Journal of the Japan Association of food Preservation Scientists, 34, 4, 203-208, (2008), 査読有

② 小林明奈, Panthitra Phromraksa, 加藤みゆき, 池田昌代, Chirasak Khambonruang, 長野宏子 「タイにおける発酵米麺の改良とその特性」, 日本家政学会誌, 58, 8, 463-470, (2007), 査読有

[学会発表] (計1件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 昌代 (IKEDA MASAYO)

東京農業大学・応用生物科学部・栄養科学科・助教

研究者番号: 10364704

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者