

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32647

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750026

研究課題名(和文)小麦粉製品の低アレルギー化に向けた調理条件の提案と経口減感作療法への検討

研究課題名(英文) Proposal of cooking conditions for hypoallergenicity of flour products and examination for oral immunotherapy

研究代表者

赤石 記子 (Akaishi, Noriko)

東京家政大学・家政学部・講師

研究者番号：70459593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：加熱条件及び発酵条件の異なる小麦粉製品の抗原量に及ぼす影響について研究を行った。普通小麦粉及びスペルト小麦粉を用いてヨーグルト発酵液及び麹発酵液を添加した各種ソースを作成し、それらの抗原量を、発酵液を添加しない基準ソースの抗原量と比較した結果、いずれのホワイトソースに比べてもブラウンソースの抗原量が少なく、発酵液添加ホワイトソースでは基準ホワイトソースよりも多く低アレルギー化の可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：We studied the influence of the heating condition and the fermentation condition on the amount of the wheat flour products. Sauces containing yoghurt fermented liquid and koji fermented liquid were prepared using common wheat flour and spelt wheat flour. As a result of comparing them with the reference source in the antigen amount, the antigen amount of brown sauce was smaller than that of any white sauce. Furthermore, the possibility of hypoallergenization was more expected in the white sauce containing fermented liquid than in the reference white sauce.

研究分野：調理科学

キーワード：小麦粉 食物アレルギー 低アレルギー化 加熱 発酵 ヨーグルト 麹

1. 研究開始当初の背景

近年食物アレルギーを持つ子どもは多く、中でも小麦はうどんやパン、菓子類、ソース等、子どもが好む製品に多く使用されている為、代替食品に苦慮している。最近では症状が出ない程度に原因食物を摂取し続けて耐性獲得を目指す、「経口減感作療法」が進められており、この治療の中で低アレルゲン化された食品を利用することで、早期の耐性獲得につながる事が期待されている。

しかし、小麦粉製品の調理加工による低アレルゲン化についてはまだまだ未解明な部分が多く、調理条件による抗原の変化を明らかにすることは喫緊の課題である。本研究で得られた成果を低アレルゲン化製品の実用化に発展応用させ、アレルギー児と保護者のQOL向上をめざしたい。

2. 研究の目的

本研究では、種々の調理加工による物性変化と抗原の変化を追跡するため、小麦粉製品として子どものおやつや給食にも提供されるクッキーとルウ(ソース)を対象とした。それら製品を調製するために使用する小麦粉は、一般的な普通小麦と小麦の原種で良好な嗜好性と高い抗酸化性を持つスペルト小麦とを用いた。試料作製の調理工程において、これまでの研究からパンの発酵種に使用し抗原量の低下が期待できた発酵液(ヨーグルト、麹)で予備発酵させた小麦粉バターを原料に、クッキー及びルウを調製した。それらの外観、物性変化、抗原量(ELISA法)の測定を行い、小麦粉製品の調理加工による低アレルゲン化の方法について検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料

普通小麦粉(西尾製粉(株)製): ダーク・ノーザン・スプリング(原産地・アメリカ)

1カナダ・ウェスタン・レッド・スプリング(原産地・カナダ) ハード・レッド・ウインター(原産地:アメリカ)の3銘柄の小麦をブレンドしたもの

スペルト小麦粉(西尾製粉(株)製): 原産地ドイツ

粉糖(市販品: 共立食品(株)製)

菜種油(市販品: (有)鹿北製油製)

(2) 発酵液作成方法

麹発酵液

米麹(市販品: (株)伊勢惣製) 50g に 60℃ に温めた粥(市販品: 味の素(株)製) 50g を加えて混合し、滅菌水 200g を入れて、密封瓶に入れ、30℃ で 72 時間発酵させ、濾したものを麹発酵液とした。

ヨーグルト発酵液

滅菌水 190g と砂糖(市販品: 三井製糖(株)製) 10g、ヨーグルト(市販品: (株)明治乳業製) 100g を密封瓶で混合し、30℃ で 72 時間発酵させ、ヨーグルト発酵液とした。

(3) 発酵液添加クッキーの試料調製

基準クッキー(発酵液無添加)は、菜種油 5g に粉糖 12.5g を加えスパテラでよく混ぜ、純水 15g を加え、さらに各小麦粉 15g を入れ、よく混合した。

発酵液添加クッキーは、あらかじめ各小麦粉 25.0g と各発酵液 25.0g をピーカーに入れて混ぜ冷蔵庫内(4℃)にて発酵させ、翌日に、さらに小麦粉 25.0g と発酵液 25.0g を加えて冷蔵庫内で発酵させた。これを麹発酵種及びヨーグルト発酵種とした。次に菜種油 5g と粉砂糖 12.5g (ヨーグルト発酵種は 12.0g) をよく混合し上記発酵種を加えて、さらによく混合した。

天板にクッキングシートを敷き、生地を直径 50mm の円形になるよう約 1mm の厚さにのばした。

オーブンで各クッキー生地を 160℃、180℃、200℃ で各焼成クッキー試料を調製した。

クッキー試料の一部はデシケーターで保管し、色度測定と破断測定用試料とした。残りは -80℃ で予備凍結させた後、凍結乾燥後、粉碎したものを SDS-PAGE 分析と抗原量の測定(ELISA法)用試料とした。

(4) 発酵液添加ソースの試料調製

普通小麦粉 15g、菜種油 12g を鍋に入れて混合し、ホワイトルウは 120℃ まで攪拌加熱し、ブラウンルウは同様に 180℃ まで加熱後、5 分間保持した。

基準ソースは、ホワイトルウ、ブラウンルウに各々沸騰水を加え、100g まで煮詰めた。出来あがったものを基準ホワイトソース、及び基準ブラウンソースとした。

発酵液添加ソースは、ホワイトルウ、及びブラウンルウに麹発酵液とヨーグルト発酵液を各々 30g ずつ加え、4℃ で 2 日間置いた。その後、各発酵液添加ルウに沸騰水を加え 100g まで煮詰めた。出来あがったものを麹ホワイトソース、麹ブラウンソース、ヨーグルトホワイトソース、及びヨーグルトブラウンソースとした。

(5) 測定方法

動的粘弾性測定

上記クッキー生地及びソース試料について、動的粘弾性測定・解析装置(HAAKE 製 MARS)を用いて測定した。測定条件は、測定センサー: パラレルプレート(35 mm)、測定温度: 25℃ (クッキー生地)及び 35℃ (ソース)、平行平板間隔: 0.5 mm とした。応力 $8.9 \times 10^{-2} \sim 8.9 \times 10^2$ [Pa]、周波数 0.5 [Hz] で応力依存測定を行い、貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' を求めた。

色度測定

測色色差計(日本電色工業(株)製、ZE-6000)を用いて、クッキー 1 枚につき表面 3 箇所、 L^* 値(明度)、 a^* 値(赤度)、 b^* 値(黄度)を測定した。

破断強度の測定

クッキー試料中央部を測定対象とした。測定条件は以下のように設定し、破断試験（株山電製、RE2-33005）を実施した。ロードセル：20N、測定歪率：100%、測定速度：0.5mm/s、プランジャー：5mmの円柱型

電気泳動分析（SDS-PAGE）

試料中のタンパク質を4M尿素、20mMの2-メルカプトエタノールを含む76mMのトリスクエン酸（pH 8.6）にて抽出後、SDS-PAGEゲル（TEFCO製、8-16%グラディエントゲル）に

各サンプルを分注し、18mA、110分の条件で電気泳動を行った。泳動後のゲルをCBB染色し、スキャナーで取り込んだ。

抗原量の測定（ELISA法）

既報¹⁾に基づき、モリナガFASPEK小麦測定キット（グリアジン：株森永生科学研究所）を用いて、測定した。凍結乾燥後、粉末にした試料を測定キットの指示に従って、抽出ならびに希釈して分析試料とした。得られた結果より小麦グリアジン標準溶液の吸光度から標準曲線を作成し、検体中の小麦総タンパク質（グリアジン）濃度を求め、抗原量として算出した。

4. 研究成果

(1) 発酵液添加クッキーの結果

紙面の都合で図表を省略して結果のみ記載する。

物性及び外観（色度）

() 動的粘弾性によるクッキー生地の評価

動的粘弾性測定では、普通小麦粉及びスペルト小麦粉ともに同様の傾向が見られた。麹発酵液添加クッキー生地は基準クッキー生地よりも、弾性要素の貯蔵弾性率(G')、粘性要素の損失弾性率(G'')共に低値となり、且つ弾性的性質よりも粘性的性質が強かった。そのことから麹発酵液添加生地はオープンシートで広げやすく扱いやすい特徴があった。ヨーグルト発酵液添加クッキー生地では基準クッキー生地よりも G' 、 G'' 共に高くなった。その原因としてヨーグルト中のホエータンパク質がグルテンに作用したことが推察された。

() 色差測定による焼成クッキーの評価

クッキーの色差測定では、160、180、200の各焼成温度において基準クッキーと麹クッキーの色差がみられた。麹は発酵液中に糖やアミノ酸を多く含むため、基準クッキーよりも焼き色が付きやすく、 L^* 値の低下が見られた。同様にヨーグルト発酵液添加クッキーでは焼成温度が高温になるほど、 L^* 値は低下し、基準クッキーとの間では有意差が確認できなかった。

() 破断試験による焼成クッキーの評価

破断試験では、麹発酵液添加クッキーは焼成温度が上がるにつれ破断応力は増し、硬くなる傾向が見られたが、基準クッキーとの差はなかった。生地の粘弾性測定では差が見ら

れたが、生地を焼成すると薄いクッキーであるため物性への影響はほとんどなくなったと考えられた。ヨーグルト発酵液添加クッキーも160、180の焼成温度では基準クッキーとの差はなく、焼成温度と発酵液によるクッキーの硬さへの影響は無かった。以上より各発酵液添加クッキーの色差（外観）と物性が基準クッキーと変わらないことは、特別なものという印象を与えず好意的に受け入れてもらえ、治療に取り入れやすいのではないかと考えられる。

SDS-PAGE分析

SDS-PAGE分析では、普通小麦粉及びスペルト小麦粉共に同様の傾向が見られた。すなわちいずれの発酵液添加クッキーも焼成温度が高温になればなるほど、確認できるバンドの本数が少なくなり、バンドの濃さも薄くなっていった。このことより加熱によるタンパク質の重合による不溶化と低アレルゲン化が推測できた。しかし、各温度の基準クッキーと発酵液添加クッキーのバンドを比較すると基準クッキーより麹発酵液添加クッキーでバンドの数が多く確認され、ヨーグルト発酵液添加クッキーの方が全体的に濃いバンドが確認できた。これは各発酵液中に含まれるアミノ酸やタンパク質が表れたものと推測された。そこで、グリアジンにどの程度影響しているのかELISA法の定量で確認した。

ELISA法による抗原量の変化

ELISA法では、いずれのクッキーも高温になるほど抗原量が低下していることが確認できた。SDS-PAGE分析でも加熱温度の上昇と共にバンドが薄くなっていったことと一致していた。しかし、各温度間での基準クッキーと発酵液添加クッキーの抗原量は、麹発酵液添加クッキーと基準クッキーに有意な差はなく、ヨーグルト発酵液添加クッキーは基準より高値を示し、発酵液が抗原を分解している状況は認められなかった。

(2) 発酵液添加ソースの結果

動的粘弾性によるソースの物性

発酵液及び加熱条件の異なるソースの、動的粘弾性測定によって得られた貯蔵弾性率 G' 及び損失弾性率 G'' の結果をFig.1に示した。ホワイトソースの結果では基準ソースと比べて、麹発酵液を添加したソースとヨーグルト発酵液を添加したソースの G' 、 G'' はわずかに低値を示した。麹発酵液を添加したことで低値になったのは、麹発酵液中には麹菌が生成したアミラーゼとプロテアーゼの存在が確認されており、それらの酵素がデンプンやグルテンを分解したからであると考えられた。またヨーグルト発酵液を添加したことで低値となったのは、ヨーグルトの乳酸発酵により生成された乳酸やクエン酸がグルテンを軟化させたと考えられた。ブラウンソースの結果では、基本のソースと比較して麹

発酵液を添加したソースとヨーグルト発酵液を添加したソースの G' 、 G'' はわずかに高値を示した。発酵液自体の粘弾性測定は実施していない、ヨーグルトには粘弾性があり、それが影響し G' 、 G'' 共に高値を示したと推測された。また一般的にソースは高温で加熱すると粘度が下がると言われているが、今回の実験では麹・ヨーグルト発酵液を添加したソースは 120 加熱のホワイトソースより 180 加熱のブラウンソースの方が G' 、 G'' 共に高値を示した。これは アミノカルボニル反応により生成されたメラノイジンが影響していると推測した。メラノイジンは、 α -および β -アミラーゼ、スクラーゼ、マルターゼなどの活性を阻害することが認められている。またメイラード反応の後期段階に達したタンパク質は不溶化し、酵素による消化性は低下すると言われている²⁾。今回の実験はルウを作製してから発酵液を添加したため、すでにメラノイジンが生成されている 180 加熱のブラウンソースでは酵素の活性が抑制され、でんぷんやタンパク質の分解が抑制されたのではないかと推察された。またメラノイジンは高分子物質なので、麹が生産する酵素によって分解された 120 加熱のホワイトソースと比較して 180 加熱のブラウンソースが G' 、 G'' 共に高値を示したのではないかと考えられた。

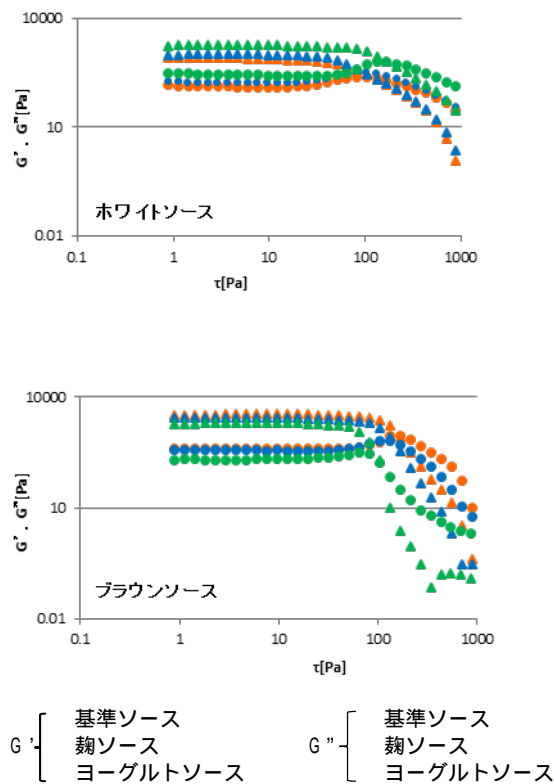


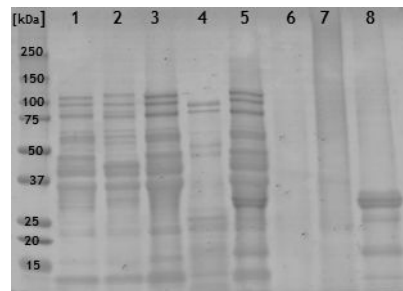
Fig.1 加熱条件及び発酵条件の異なるソースの動的粘弾性測定

SDS-PAGE 分析

加熱温度及び発酵液の添加によるソースのタンパク質分子量分布を SDS-PAGE 電気泳動分析で比較した結果を Fig.2 に示した。現在経口負荷試験に使用されているうどん、加熱操作を行っていない小麦粉も比較のために同時に SDS-PAGE 電気泳動分析を行った。

結果よりまず加熱温度を比較すると、いずれのソースもホワイトソース (120 加熱) よりブラウンソース (180 加熱) のバンドが薄く消失している。この結果から、高温で加熱することでタンパク質の低分子化と重合による抽出液への不溶化が考えられる。ヨーグルト発酵液を添加したブラウンソースにバンドが一部出ているが、25 kDa 付近は α -カゼイン、20~25 kDa 付近は β -カゼイン、15~20 kDa 付近は γ -カゼインであり、ヨーグルト由来のタンパク質であると推測される。

発酵液添加による違いをみるとホワイトソース (120 加熱) では基準のソースに比べて麹発酵液を添加したソースはバンドが全体的に薄くなっているが、ヨーグルト発酵液を添加したソースは基準との差が見られなかった。この結果から麹発酵液添加したものは、麹菌が生産するプロテアーゼによりタンパク質が分解され低分子化したためバンドが消失したのではないかと考えられた。特に麹発酵液を添加したルウでは小麦アレルギーの抗原である α -グリアジン (32kDa) の分子量付近の 37kDa のバンドの消失が見られた。



- 1: 小麦粉
- 2: うどん
- 3: 基準ホワイトソース (120 加熱)
- 4: 麹発酵液添加ホワイトソース (120 加熱)
- 5: ヨーグルト発酵液添加ホワイトソース (120 加熱)
- 6: 基準ブラウンソース (180 加熱)
- 7: 麹発酵液添加ブラウンソース (180 加熱)
- 8: ヨーグルト発酵液添加ブラウンソース (120 加熱)

Fig.2 加熱条件及び発酵条件の異なるソースの SDS-PAGE

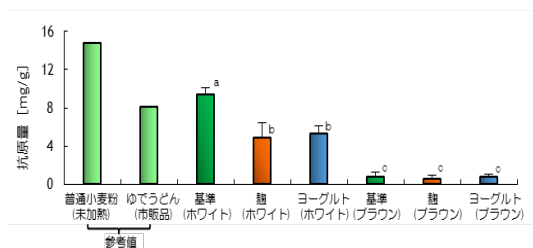
ELISA 法による抗原量の変化

SDS-PAGE 分析より加熱条件と発酵条件によりバンドに差異が認められたため、ELISA 法にて抗原量の測定を行った。結果を Fig.3 に示した。

基準ホワイトソース（120 加熱）と基準ブラウンソース（180 加熱）の間で抗原量は有意に ($p < 0.01$) 低下し、各発酵液のホワイトソースとブラウンソースの間でも抗原量は有意に低下していた。SDS-PAGE 結果で見られた加熱による抗原の低分子化と不溶化が考えられる。発酵液添加による影響をみると基準のホワイトソースよりも麹発酵液添加ホワイトソースとヨーグルト発酵液添加ソースの抗原量は有意に低下していた。前述の SDS-PAGE ではヨーグルト発酵液添加ソースではバンドの消失等は認められなかったが、ELISA 法では減少が見られた。これは、SDS-PAGE 上にはヨーグルトのたんぱく質成分も現れており、ELISA 法ではグリアジンのみを検出するようになっていたためと考えられる。この結果より、麹発酵液だけでなくヨーグルト発酵液も抗原に作用することが明らかとなった。

ブラウンソースの結果では基準と各発酵液間に有意な差は見られなかった。に考察した通り、メラノイジンの生成が酵素作用を阻害したことが推測された。

以上の結果より、加熱条件により抗原量の低下が認められ、且つ発酵液の作用を阻害するメラノイジンが生成されていないホワイトソースでは、基準よりも発酵液による抗原量の低下が期待できた。



n=3 異符号間に有意差あり： $p < 0.01$
Fig.3 加熱条件及び発酵条件の異なるソースの小麦抗原量 (ELISA 法) の比較

(3)まとめ

本研究で得られた結果を総合的に考察すると、発酵液添加クッキーでは加熱による抗原量の低下は認められるものの、発酵液が抗原に作用することは確認できなかった。それに対して発酵液添加ソースでは加熱による抗原量の低下と発酵液の作用と考えられる抗原量の低下が認められた。このような違いが生じたのは、試料調製時のグルテン生成度合いにあると推測している。クッキー生地では未加熱の小麦粉と発酵液（水分）を混合しており、グルテン形成が進行し、酵素や酸が抗原のエピトープを切断するほどの作用を果たせなかったと考えられる。一方、ソースはあらかじめ油脂と小麦粉を加熱させ、グルテンが活性を失ったところへ発酵液を混合している。それにより、グルテン形成が進行

しにくい状況にあり、酵素や酸が作用しやすかったのではないかと考えられる。既報¹⁾でヨーグルト発酵液添加パンの抗原量低下を報告しているが、乳酸菌と酵母の併用が抗原量低下をもたらすという先行研究³⁾もあるため、今回のクッキー生地も酵母を混合することで抗原量が低下する可能性も考えられる。

今後は、低下が認められた発酵液ソースの嗜好性の検証と消化過程における抗原性の発現の有無についての追跡を考えている。

<引用文献>

- 1) 赤石記子, 舛田美和, 岩田力, 長尾慶子 (2013), 調理条件を変えることによる小麦粉調理品中の抗原量の変化, 日本調理科学会誌, **46** (3) 231 - 235
- 2) 並木満夫, 松下雪郎, 1990, 食品の品質と成分間反応, 東京, 講談社, p.240, pp.243 - 246
- 3) Leszczynska, J., et al (2009), Decrease of wheat flour allergenicity via lactic acid fermentation, *Food Agric. Immunol.*, **20**, 139-145

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

赤石記子, 石井亜実, 小林理恵, 長尾慶子, 小麦粉ソースの低アレルギー化に及ぼす調理条件の影響, 日本調理科学会平成 28 年度大会, 平成 28 年 8 月 28, 29 日, 名古屋学芸大学 (愛知県日進市)

〔図書〕(計2件)

長尾慶子, 近堂知子, 平尾和子, 楠瀬千春, 武田珠美, 三橋富子, 小林 (粟津原) 理恵, 安藤真美, 赤石記子, 四宮陽子, 津田淑江, 中澤弥子, 三神彩子, 八千代出版(株), 調理を学ぶ [改訂版] 2016, pp.122-143

山内知子, 安藤真美, 村上恵, 九木野睦子, 富永しのぶ, 丸山智美, 杉山寿美, 赤石記子, 医歯薬出版(株), たのしい調理: 基礎と実習, 2016, pp.152-198

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤石 記子 (AKAISHI, Noriko)
東京家政大学・家政学部・講師
研究者番号: 70459593

(2)研究協力者

長尾 慶子 (NAGAO, Keiko)
東京家政大学大学院・客員教授

岩田 力 (IWATA, Tsutomu)

東京家政大学・子ども学部・特任教授