

報 文

大豆タンパク質の定量に及ぼす調理・加工の影響

渡 邊 裕 子^{*1} 秋 山 晴 代² 大 澤 伸 彦³ 井 村 香 織⁴
伊 関 直 美⁴ 植 田 壽 美 子⁴ 政 岡 智 佳¹ 赤 星 千 絵⁵

Effect of Cooking and Processing on Quantitation of Soybean Proteins

Hiroko WATANABE^{*,1}, Haruyo AKIYAMA², Nobuhiko OSAWA³, Kaori IMURA⁴,
Naomi ISEKI⁴, Sumiko UEDA⁴, Tomoka MASAOKA¹ and Chie AKABOSHI⁵

¹ Kanagawa Prefectural Institute of Public Health: 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087, Japan;

² Teikyo Heisei University: 4-21-2 Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan;

³ Previous address Kawasaki City Institute for Public Health:

3-25-13 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-0821, Japan;

⁴ Sagami City Institute for Public Health: 1-3-41, Fujimi, Chuou-ku, Sagami City 252-0236, Japan;

⁵ Kawasaki City Institute for Public Health: 3-25-13, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-0821, Japan;

*Corresponding author

We examined the effects of cooking and processing on the quantitation of soy protein in various soy-based foods. For the phosphate-buffered saline (PBS) extraction, the total protein content was measured by bicinchoninic acid assay, and the buffer extraction containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and 2-mercaptoethanol (ME) was measured by the 2-D Quant Kit, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis (SDS-PAGE) of each extraction was performed. Furthermore, measurements were performed by various ELISAs. During the tofu cooking process, the protein concentrations of soaked soybeans and Seigo (soybean homogenized with water) fluctuated- the change in protein solubility due to the amount of water during sample homogenization was considered to be a factor. It was thought that the decrease in protein concentration due to heating of Seigo during soy-milk production was considered to indicate thermal denaturation of the protein, and that SDS and ME extraction in tofu may affect the measurement system. In cooking excluding roasted beans, proteins with a mass of 50 kDa or above and around 20 kDa were denatured, and in twice-fried tofu, proteins around 40 kDa were denatured, but the protein concentration excluding boiled soybeans did not decrease. Furthermore, the protein concentration from roasted beans, yuba, roasted okara and fried tofu increased with the cooking time, suggesting that the denaturation temperature of the protein shifted to a high temperature as the water content decreased. Both of the two types of ELISAs that comply with the official labeling system of foods containing allergenic substances were useful for detecting soybean protein by detecting proteins and peptides in processed soybean products, fermented foods excluding natto, and health foods.

(Received June 3, 2021; Accepted October 11, 2021)

Key words: 大豆タンパク質 soybean protein; 調理・加工 cooking and processing; 発酵大豆食品 fermented soybean food; 健康食品 health food; Gly m Bd 30K; β -コングリシニン β -conglycinin; 酵素免疫測定法 ELISA method; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

緒 言

大豆は豆腐や納豆等の加工食品として、醤油、味噌等の調味料として、米とともに伝統的な日本の食生活を支えてきた¹⁾。また植物性タンパク質として安価で栄養価が高いことから、加工食品の組立素材としても国内外で幅広く利用されている²⁾。さらに大豆タンパク質による血清コレステロールの低下やイソフラボンによる抗酸化作用などの大豆成分の機能性が明らかとなり、大豆の利用価値と市場が拡大している^{2)~4)}。

* 連絡先 watanabe.jnsd@pref.kanagawa.jp

¹ 神奈川県衛生研究所: 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

² 帝京平成大学: 〒164-8530 東京都中野区中野4-21-2

³ 前川崎市健康安全研究所: 〒210-0821 川崎市川崎区殿町3-25-13

⁴ 相模原市衛生研究所: 〒252-0236 相模原市中央区富士見1-3-41

⁵ 川崎市健康安全研究所: 〒210-0821 川崎市川崎区殿町3-25-13

一方、大豆は平成29年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査結果報告⁵⁾において第10位に挙げられ、花粉-食物アレルギー症候群において口腔粘膜を主体とする即時型アレルギー症状の原因物質であるPR-10ファミリーに属する大豆タンパク質Gly m4の関与が知られており⁶⁾、伝統的な日本の食習慣を反映した食物アレルギー原因物質のひとつに数えられている。ゆえに、大豆は食品表示法のアレルゲン表示推奨品目として、食品に含まれる旨を可能な限り表示することが求められている⁷⁾。

食品表示法による行政監視は原材料の表示が正しく行われることにより、表示の欠落や製造所等のコンタミネーションによる誤食を原因としたアレルギー発症を予防し、アレルギー患者の安全な加工食品の利用に繋げることを趣旨としている。表示が義務化されている7品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）の特定原材料は、アレルゲンを含む食品の検査方法（以下、アレルゲン検査法と略す）にELISAが採用され、その混入の判断基準値を10 µg/g以上としている。ただし、「なお加工による特定原材料成分の変化・分解や食品からの特定原材料成分の抽出効率の変動により、本検査法による特定原材料総タンパク質含有量の測定結果は実際の含有量と必ずしも正確に一

致しない」と序文に記載されているとおり、定量値に影響を与える要因が複雑なため、データの妥当性を判断するには様々な加工品におけるデータの蓄積が重要となる。

そこで、本検討では大豆タンパク質の定量に与える調理・加工の影響について把握することを目的とし、一般的な調理条件で大豆調理品を自家調製し、リン酸緩衝食塩水（PBS）抽出液による水溶性画分はビシンコニン酸（BCA）法、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と2-メルカプトエタノール（ME）を含んだ抽出液に可溶化した画分の総タンパク質の定量は2-D Quant Kitを用いて測定した。またSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）パターンの変化から、タンパク質の変性状態を解析した。そして旧アレルゲン検査法に準拠した抗Gly m Bd 30K抗体を用いたELISAキット⁸⁾による測定を行った。次に現在のアレルゲン検査法に準拠した抗Gly m Bd 30K抗体と抗β-コングリシニン抗体を用いた2種のELISAキットを用いて、調理品と市販品さらに大豆製品特有の発酵食品や大豆成分を含む健康食品の測定を行った。

なお、旧アレルゲン検査法では食品からの抽出にSDSとMEを含む抽出液を用い、現在のアレルゲン検査法ではMEではなく亜硫酸ナトリウムを用いており、特定原材料

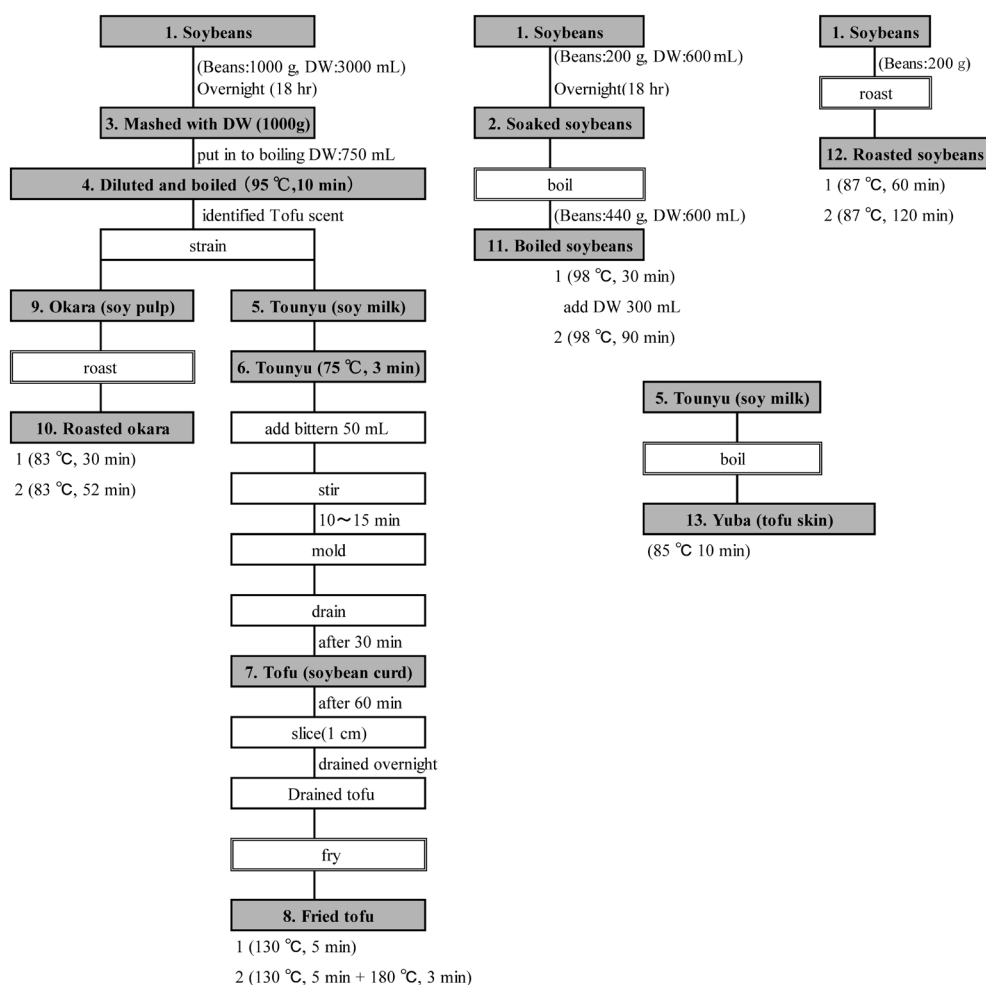


Fig. 1. Scheme of method for cooking soybean foods
The gray boxes are samples and sample numbers.

5品目についてはこれらの検査法が同等であることがメーカーより示されている。

実験方法

1. 試料

Fig. 1に示したスキームに従い、大豆（佐賀県産フクユタカ）から炒り豆、煮豆、豆乳、ゆば、豆腐、揚げ豆腐、おからの7種類の大豆調理品を作製し（試行1回）、13の調理方法による17種類の調理品を試料とした。なお、調理温度、調理時間は実測値を示した。また大豆加工品ならびに大豆成分を含む健康食品は神奈川県内で流通している製品を試料とした。

豆腐の作製には市販のにがりを使用した。

2. 総タンパク質の定量

2.1 抽出操作

大豆調理品はフードカッターにより均一化した試料を1g取り、PBS (PBS (-) 粉末「ニッスイ」) あるいは0.5% SDS、2% ME添加PBSを19 mL添加し、16時間振とう抽出した後（振とう機TAITEC SR-2s）、3000×g、20℃で20分間遠心分離した上清から油脂をなるべく取らないように分取し（遠心機TOMY GRX220）、おのおのPBS抽出液、SDS/ME抽出液とした。SDSと2-MEは生化学用を用い、水は超純水を用いた。

2.2 定量法

PBS抽出液はBCA Protein Assay Kit (TaKaRa) を用い、マニュアルに従い3ウエル併行で試料調製し、1試料につき2回測定を行い、測定にはマイクロプレートリーダー iMark (バイオラッド) を用いた。SDS/ME抽出液は2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用い、マニュアルに従い試料調製し、1試料につき3回測定を行い、測定には分光光度計V-570 (日本分光) を用いた。またいずれもマニュアルに従い検量線を作成し、定量値をえた。

3. SDS-PAGE

3.1 試料処理

総タンパク質の定量用に調製した17種類の調理食品のPBS抽出液および10倍希釈したSDS/ME抽出液に5% MEを添加したローディング緩衝液Laemmli Sample Buffer (バイオラッド) を1:2の割合で混合し、5分煮沸し試料液とした。

3.2 SDS-PAGE

3.1で調製した試料液15 μLを分子量スタンダード Kaleidoscope Prestained Standards (バイオラッド) とともにゲル（5~20% SDS 1.0 mm×18 well アトー）にロードし、WSF-1100 バージェラン-R (アトー) を用いて泳動し、ゲルをCoomassie Brilliant Blue染色（クイックCBB 富士フイルム和光純薬）した後、画像を取り込んだ。泳動用緩衝液は10×Tris/Glycine/SDS (バイオラッド) を用いた。

4. ELISAによる大豆タンパク質の定量

大豆調理品は1試料から1gずつ3回採取し、FASTKIT エライザVer.II大豆（日本ハム(株)中央研究所）により測定した。FASTKIT エライザVer. III大豆（日本ハム(株)中央研究所）ならびにモリナガFASPEK エライザII（株式会社森永生科学研究所）の2種のELISAキットによる測定では、大豆調理品及び加工品は各1g採取し、健康食品は液体、タブレットはすり鉢で粉状にし、カプセルは殻を除いた中身を各1g採取した。なお、FASTKIT エライザVer. II大豆は現在販売されていない。マニュアルに従い3ウエル併行で試料を調製し、マイクロプレートリーダー iMarkあるいはFoodmark MICROPLATE READER (バイオラッド) を用いて測定した。プレートの洗浄はマイクロプレートウォッシャーモデル1575 Immunowash (バイオラッド) を用いた。

検量線はマイクロプレートマネージャー Ver. 6 PC データ解析ソフトウェア (バイオラッド) を用い、4係数 logistic 解析により作成し、定量値を算出した。定量限界は検量線の3ウエル併行の変動係数が安定して10%以下となる範囲である1.0~20.0 μg/gを定量範囲とし、定量範囲を超えた場合は適宜希釈し定量値をえた。

結果および考察

1. 大豆調理におけるタンパク質濃度の変化

1.1 豆腐調理過程におけるタンパク質濃度の変化

Table 1に大豆調理品のPBS抽出とSDS/ME抽出による総タンパク質濃度（以下PBS値、SDS/ME値）ならびにFASTKIT エライザVer. II大豆による大豆タンパク質濃度（以下Ver. II）を示した。また日本食品標準成分表（2015）（以下食品成分表）に掲載の大豆（乾）、豆乳、豆腐、揚げ豆腐、生おから、煮豆、炒り豆、生ゆばの総タンパク質濃度（改良ケルダール法によって定量した窒素量から算出）を参考としてTable 1に示した。

総タンパク質濃度として、SDS/ME値、Ver.IIと食品成分表の値を比較した。SDS/ME値では大豆（No. 1）と炒り大豆（No. 12）が食品成分表の8食品に近い値となり、その他は2~4倍程度高い値となった。Ver. IIでは大豆（No. 1）と豆乳（No. 5）は約2倍、豆腐（No. 7）は約3倍となったが、その他は比較的近い値であった。またVer. IIを用いた検討では大豆タンパク質を添加し100℃加熱調理した食品からの回収率がほぼ100%であったことから⁸⁾、調理条件が100℃以上の揚げ豆腐以外は大豆タンパク質が十分に可溶化されたと考えられた。

豆腐の調理過程（No. 1~7, 9）におけるタンパク質濃度の変化をみると、調理前的大豆（No. 1）のタンパク質量は、PBS値75.2 mg/g、SDS/ME値354 mg/g、Ver. II 632 mg/gであった。次に大豆に3倍量の水を加え、一晚（18時間）浸漬した。白大豆の約18時間浸漬後の吸水量115%を参考とすると⁹⁾、軽く水を切った大豆（No. 2）のSDS/ME値（311 mg/g）はほぼ15%の吸水量相当の値と

Table 1. Detection of total protein and soybean protein in soybean foods

Sample No.	Soybean foods	Total protein (mg/g)		FASTKIT ELISA Ver. II Daizu: Target allergen Gly m Bd 30K Soybean protein (mg/g) ³⁾	Total protein (mg/g) ⁴⁾
		PBS extract ¹⁾	SDS/ME extract ²⁾		
1	Soybeans	75.2	354	632±226	330~339
2	Soaked soybeans	31.2	311	189±105	/
3	Diluted (×4) and mashed	21.6	242	119±25.3	
4	Diluted (×1.75) and boiled (95℃, 10 min)	3.5	148	52.0±18.0	
5	Tounyu (soy milk)	4.2	136	66.7±23.0	34
6	Tounyu (75℃, 3 min)	5.4	117	68.6±32.0	/
7	Tofu (soybean curd)	5.8	289	209±133	
8-1	Fried tofu (130℃, 5 min)	9.9	474	262±125	
8-2	Fried tofu (130℃, 5 min+180℃, 3 min)	16.5	462	358±175	107~234
9	Okara (soy pulp)	2.2	123	39.5±15.3	61
10-1	Roasted okara (83℃, 30 min)	7.5	199	98.9±37.1	/
10-2	Roasted okara (83℃, 52 min)	9.4	143	521±308	
11-1	Boiled soybeans (98℃, 30 min)	7.9	345	130±28.7	
11-2	Boiled soybeans (98℃, 90 min)	13.3	268	123±67.1	112~148
12-1	Roasted soybeans (87℃, 60 min)	52.2	409	266±76.2	364~377
12-2	Roasted soybeans (87℃, 120 min)	61.7	354	418±178	
13	Yuba (tofu skin, 85℃, 10 min)	8.3	421	234±178	218

1) Data are average for two BCA determinations (three wells each).

2) Data are average for three 2-D Quant kit determinations (three wells each).

3) Data are average and standard deviation for three samples (three wells each).

4) according to STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN-2015 (seventh revised version); Total protein calculated by multiplying the amount of nitrogen quantified by the improved Kjeldahl method by the "nitrogen-protein conversion factors".

なったが、PBS値は約1/2、Ver. IIは約1/3となった。次に3倍量の水とともに細砕した生呉（No. 3）ではPBS値、Ver. IIはほぼ希釈相当の値となったが、SDS/ME値は希釈相当の2.7倍となった。大豆タンパク質の溶解性は抽出時の加水量に影響されることが明らかとなっていることから¹⁰⁾、PBS値、Ver. IIでは十分な水分と共に試料を均一化した生呉においてタンパク質の溶解性が上がったと考えられた。一方SDS/ME値は理論値より高い値となり、測定法への影響が考えられた。

豆乳作製のため熱湯約750 mLに生呉1000 gを添加し、95℃10分煮たものを煮呉とした（No. 4）。この時の加熱では青豆臭から豆腐の香りへの変化が調理の目安とされ、生呉の加熱条件が豆腐の風味の向上に大きく関与することが経験的に知られている¹¹⁾。この加熱前後のタンパク質濃度をみると、PBS値のみ21.6 mg/gから3.5 mg/gと1.75倍の希釈以上に減少した。加熱前の豆乳は油滴球に7Sタンパク質（主成分β-コングリシニン）と11Sタンパク質（主成分グリシニン）を主体とした大量のタンパク質が結合した状態にあるが、加熱すると油滴球からタンパク質が遊離し、11Sタンパク質が崩壊する90℃以上で80 nm前

後のタンパク質粒子が形成され、これらのタンパク質粒子や可溶性タンパク質等を主な成分とする分散液である豆乳となる¹²⁾。ゆえに生呉の煮処理によるPBS値の低下と香氣成分の変化は、豆乳・豆腐作製で重要なタンパク質の熱変性を表すものと考えられた。

次に煮呉をふきんでろ過し分離した生おから（No. 9）と豆乳（No. 5）の比較では、生おからのPBS値、Ver. IIは豆乳の約半分であったが、SDS/ME値は約0.9倍となり、食品成分表のおから（61 mg/g）の約2倍となった。

豆腐作製のためのにがり添加前の75℃3分加温（No. 5と6）では変化はなかった。にがりを添加し攪拌した後、沈殿物を型に入れ30分水を切り、豆腐とした（No. 7）。小野の報告では¹²⁾豆腐の形成はにがり添加によりタンパク質粒子間の反発イオンが中和され、油滴球の周りのタンパク質が結合したブロックとなり、このブロックがネットワーク状にその他タンパク質と水を抱き込んで結合し、豆腐カードと呼ばれる安定な形になると考えられている。豆腐のSDS/ME値、Ver. IIは食品成分表のタンパク質濃度と比較するとおのおの約5倍、約4倍となったが、Tepnel Biosystems社の変性タンパク質の検出に対応したSoya

Protein Assay kitを用いた報告のうち高い例である豆腐 240,000 ppm¹³⁾と同程度であった。一方、Ver. II測定による報告の豆腐 43.5 mg/g¹⁴⁾は食品成分表と同等であった。これらのデータの違いは、使用した大豆量や生呉作製時の水分量によるタンパク質濃度の変動といった製造の違いも考えられるが、生呉のSDS/ME値と同様に測定法への影響が考えられた。その要因として、Soya Protein Assay kitで用いている尿素とDDT（ジチオスレート）やVer. IIで用いているSDSとMEはタンパク質分子間の水素結合や疎水結合、S-S結合を変化させタンパク質を可溶化させていることから¹⁵⁾、豆腐ではこれらのタンパク質の分子構造の変化が定量法に影響を与え、値が高くなる場合があることが示唆された。

以上より豆腐調理過程における大豆タンパク質濃度の変化から、浸漬大豆と生呉のPBS値及びELISA測定値の変動は試料均一化の際の水分量による大豆タンパク質溶解性の変動と考えられ、また豆乳作製時の生呉の加熱調理におけるPBS値の低下は大豆タンパク質の熱変性を表すと考えられた。一方豆腐調理過程においてPBS値、SDS/ME値、Ver. IIはいずれもタンパク質を検出したが、豆腐のSDS/ME値、Ver. IIでは界面活性剤や還元剤などによるタンパク質の構造変化が測定系に影響し、値が高くなる場合があることが示唆された。

1.2 加熱調理によるタンパク質濃度の変化

ゆば、揚げ豆腐、炒りおから、炒り豆、煮豆調理のPBS抽出とSDS/ME抽出のSDS-PAGEによる結果

(Fig. 2)とTable 1のこれらの加熱調理におけるタンパク質濃度変化を合わせ解析した。

豆乳 (Fig. 2上⑤)とゆば (Fig. 2上⑬)のPBS抽出を比較した。ゆばは加熱変性したタンパク質の不溶化と水分の蒸発による濃縮により分子間相互反応が起こり膜ができ、膜が成長してゆばとなる¹⁶⁾。85℃加熱のゆばではβ-コングリシニンのα、α'、βサブユニット¹⁷⁾が主である50 kDa付近以上のバンドパターンが変化し、グリシニンのBasic subunit¹⁷⁾を含んだ20 kDa付近のバンドが消失した。緩衝液中のβ-コングリシニン、グリシニンの吸熱ピーク温度はおおの73℃、88℃であることから¹⁸⁾、85℃加熱のゆば調理ではこれらのタンパク質が変性したと考えられた。また、20 kDa付近には豆乳によるアナフィラキシーなどの原因物質であり、シラカバ・ハンノキ属の花粉症原因物質であるBet v1などと交差反応するGly m4やオレオシンなどが含まれ¹⁹⁾、本調理条件でこれらのタンパク質の変性が確認された。一方、タンパク質濃度はPBSで豆乳の約2倍、SDS/MEとVer. IIは約3倍となった。さらに豆腐 (Fig. 2上⑦)と比較すると、80 kDa付近のβ-コングリシニンのα、α'サブユニットのバンドが豆腐では認められず、タンパク質濃度はいずれも豆乳<豆腐<ゆばの順となった (Table 1)。またSDS/ME抽出では分子量パターンに違いはなかったことから (Fig. 2下⑤、⑬、⑦)、これらの調理による大豆タンパク質の変性は分子間結合による不溶化と凝集と考えられ¹⁵⁾、PBS抽出でみられたタンパク質変性によるタンパク質濃度の低下は見ら

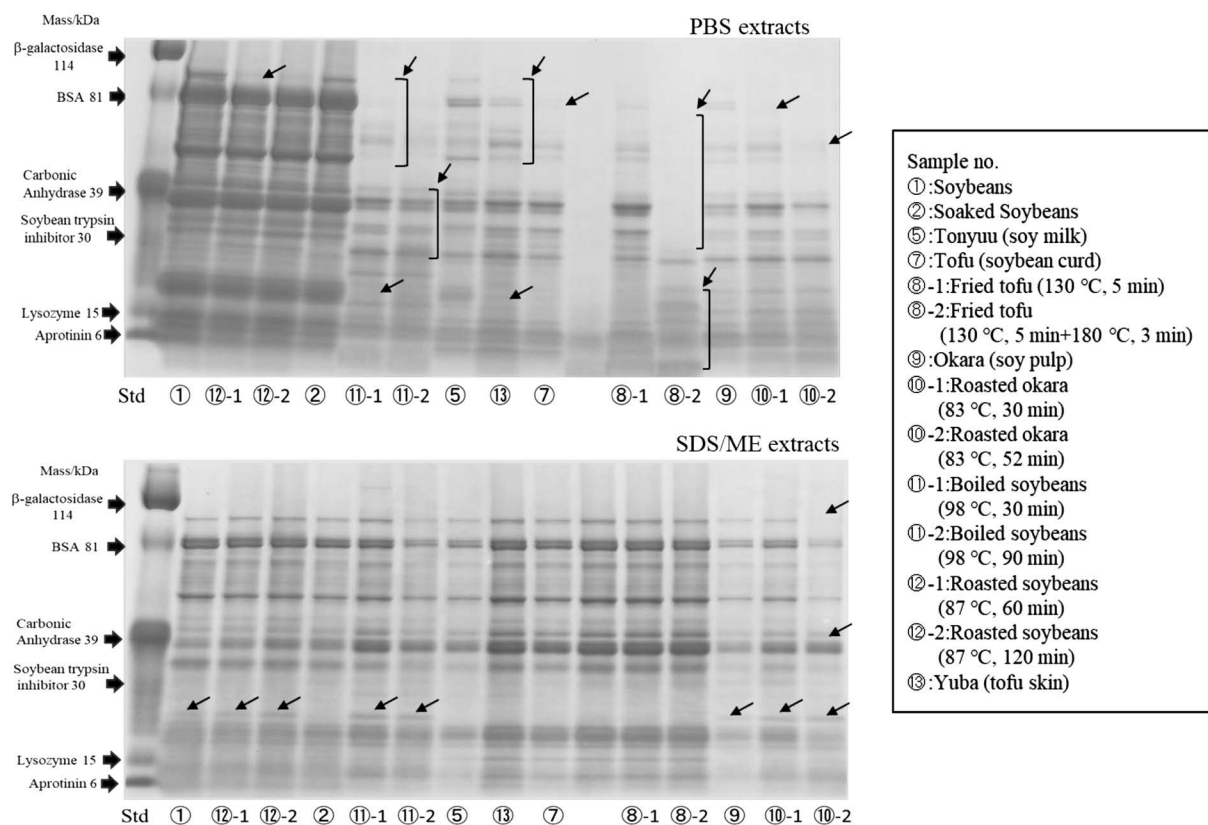


Fig. 2. SDS-PAGE profiles of the PBS (×1) or SDS/ME (×10) extract in soybean foods (CBB dyeing)

れなかった。

揚げ豆腐は豆腐を一晩水切り後、厚さ1 cm程度に切った豆腐を油で130℃5分揚げ (Fig. 2⑧-1), さらに180℃3分で2度揚げした (Fig. 2⑧-2)。PBS抽出の130℃揚げのバンドに変化はなかったが、2度目の180℃揚げでは30 kDa付近以上のバンドの消失と20 kDa以下にバンドが出現し、タンパク質変性と低分子化が観察された (Fig. 2上⑧-2)。前述した緩衝液中の β -コングリシニン (73℃)、とグリシニン (88℃) の吸熱ピーク温度から¹⁸⁾、130℃は変性に十分な温度と考えられたが、揚げ豆腐調理では変化はなかった。さらに、水分量の低下に伴いこれらのタンパク質は熱変性温度が高くなることが知られているが¹⁸⁾、食品成分表の豆腐 (90%) と揚げ豆腐 (76%) の水分量変化では、いずれも約2, 3℃の変化であった。SDS/ME抽出では分子量パターンに変化はなく (Fig. 2下⑦, ⑧-1, ⑧-2), タンパク質濃度は2度揚げ調理によりPBS値、Ver. IIともに増加傾向となり、SDS/ME値に変化はなかった。また調理後の揚げ豆腐は外側のみ茶褐色に変色した状態であったことから、水分の低下と外周部分のタンパク質の変性と考えられた。

炒りおから (No. 10) では、83℃30分炒りでPBS値とVer. IIはおのおの3.4倍、2.5倍、さらに52分炒りでは4.3倍、13.2倍に増加し、調理時間とともに水分が減少し定量値が上ったが、SDS/ME値は30分で増加した後減少した (Table 1)。SDS-PAGEのPBS抽出では (Fig. 2の⑨, ⑩-1, ⑩-2), 30分 (Fig. 2上の⑩-1) で80 kDa付近のバンドが消失し、52分 (Fig. 2上の⑩-2) では60 kDa付近のバンドの消失が観察された。SDS/ME抽出では30分 (Fig. 2下の⑩-1) で全体にバンドがやや濃くなり、52分 (Fig. 2下の⑩-2) で90 kDa付近のバンドが消失し、40 kDa付近以外のバンドが全体に薄くなり、SDS/ME値の変化と一致した。炒りおからの調理時間による水分量変化のデータは採取していないが、 β -コングリシニンは水分量が約50%でも変性温度が約85℃と低く、一方グリシニンは約100℃であることから¹⁸⁾、調理時間とともに β -コングリシニンの変性が進んだと考えられた。

炒り豆 (No. 12) は大豆 (No. 1) をフライパンで87℃60分と120分乾炒りした。PBS値は試料のなかで未調理大豆が最も高く、調理品の中では炒り豆が最も高くなった (Table 1)。SDS/ME値は60分炒りで低下し、120分では増加したが、PBS値とVer. IIに変化はなかった。SDS-PAGEのPBS抽出では60分炒り (Fig. 2上の⑫-1) で90 kDa付近のバンドが消失したが、60分と120分 (Fig. 2上の⑫-2) の炒り時間による差はなく、またSDS/ME抽出も差はなかった (Fig. 2下の⑪, ⑫-1, ⑫-2)。食品成分表の大豆 (乾) の水分量は約10%であることから、 β -コングリシニンなどの主要なタンパク質の変性温度は120℃以上となる¹⁸⁾。大豆を浸漬処理しない炒り豆では調理によりさらに水分量が低下し、これらの主要なタンパク質が熱変性を受けにくいと考えられた。

煮豆 (No. 11) は大豆 (No. 1) を18時間浸漬後 (No. 2), 1.4倍量の水を加え、98℃で30分と90分煮た。PBS抽出では30分煮 (Fig. 2上, ⑪-1) で20 kDa付近と50 kDa付近以上のバンドが消失したが、90分煮 (Fig. 2上, ⑪-2) においても30~40 kDa前後のバンドに変化はなかった。一方SDS/ME抽出では30分煮 (Fig. 2下, ⑪-1) で20 kDa付近にバンドが現れ、このバンドは大豆、炒り豆、炒りおからにも見られたことから殻由来と考えられた。90分煮 (Fig. 2下, ⑪-2) では煮崩れもみられバンドが全体的に若干薄くなり、PBS値、SDS/ME値、Ver. IIはいずれも減少傾向となった (Table 1)。煮豆の調理条件はグリシニンの変性に十分な水分量と温度であると考えられたが、炒りおからと同様に40 kDa付近のグリシニンを含むバンドに変化はなかった (Fig. 2上下, ⑪-1, ⑪-2)。

以上の結果から、約80~100℃の加熱処理のゆば、煮豆、炒りおからと130℃で揚げた揚げ豆腐のSDS-PAGEによる分析では、50 kDa付近以上と20 kDa付近のタンパク質の変性は観察されたが、40 kDa付近のタンパク質の変性とタンパク質の低分子化が観察されたのは130℃と180℃で2度揚げした豆腐のみであった。一方、煮豆を除きこれらのタンパク質変性によるタンパク質濃度の低下は見られなかった。さらに加熱調理時間による大豆タンパク質濃度の変化では炒り豆、ゆば、炒りおから、揚げ豆腐で増加を示したことから、食品中のタンパク質の変性温度が水分の低下とともに高温にシフトしたと考えられた。またPBS値、SDS/ME値、Ver. IIはいずれも加熱調理品のタンパク質を検出し、煮豆を除いた加熱による変化はPBS値とVer. IIは同じ傾向を示した。

2. アレルゲン検査法に準拠した2種のELISAキットによる測定

2.1 大豆調理品の測定

豆腐関連の調理品10試料のFASTKIT エライザVer.III測定結果 (以下Ver. III) ならびにモリナガFASPEK エライザII測定結果 (以下FASPEK) をTable 2に示した。

2種のキットはターゲットタンパク質が異なり、Ver. IIIで用いる抗体のターゲットであるGly m Bd 30Kは、パパインファミリーに属するthiol protease類に分類され、一方FASPEKで用いる β -コングリシニンは糖鎖結合タンパク質で大豆種子中のタンパク質の約25~30%を占め、クラスI食物アレルギー原因物質とされている¹⁹⁾。また、アレルゲン検査法で示されている標準品規格が大豆では設定されていないことから、2キットの定量値を単純に比較することはできないが、測定値の傾向を把握し、特異性を明らかにすることはデータの妥当性を判断するために重要である。

そこで、調理品をこれらのキットを用いて測定し、Table 1のVer. IIの結果と合わせ、その傾向を比較した。その結果、煮豆 (No. 4), 豆乳 (No. 5, 6), おから (No. 9) 以外は、大豆タンパク質に占める割合が高い β -コングリシニンをターゲットとするFASPEKがVer. IIIと比べ2倍以上

Table 2. Detection of soybean protein in soybean foods

Sample No.	Soybean foods	FASTKIT ELISA Ver. III Daizu: Target allergen Gly m Bd 30K Soybean protein (mg/g)	Morinaga FASPEK ELISA Kit II Daizu: Target allergen β -conglycinin Soybean protein (mg/g)
1	Soybeans	100	379
3	Diluted ($\times 4$) and mashed	17	57
4	Diluted ($\times 1.75$) and boiled (95°C, 10 min)	14	20
5	Tounyu (soy milk)	15	24
6	Tounyu (75°C, 3 min)	17	26
7	Tofu (soybean curd)	56	137
8-1	Fried tofu (130°C, 5 min)	59	143
8-2	Fried tofu (130°C, 5 min+180°C, 3 min)	61	136
9	Okara (soy pulp)	8	12
13	Yuba (Soy milk skin) (85°C, 10 min)	50	112

Data are for one ELISA determination (three wells each).

上の高い値となった。

次に豆乳と豆腐の値を比較すると、Ver. II (Table 1, No 5, 6, 7) と Ver. III (Table 2, No 5, 6, 7) では、Ver. IIIはVer. IIの1/4程度となり、食品成分表に近い値となった。一方FASPEK (Table 2, No 5, 6, 7) は豆乳では食品成分表に近い値となったが、豆腐は食品成分表の値の約2倍となった。加熱調理では煮呉で、PBS値 (Table 1, No. 4) と同様にFASPEK (Table 2, No. 4) は1.75倍希釈以上に低下し、揚げ豆腐ではVer. II (Table 1, No. 8-1, 8-2) は130°Cと180°Cの2度揚げに伴い増加したが、Ver. IIIとFASPEK (Table 2, No. 8-1, 8-2) はほとんど変化がなく、熱変性タンパク質の検出に違いがみられた。

さらに参考として調理品と同じ市販品を測定した。測定結果は、調理おからのFASPEK 12 mg/g, Ver. III 8 mg/gに対し、市販品はおのおの1~35 mg/g (n=3), 14~36 mg/g (n=3), 調理揚げ豆腐の136 mg/g, 61 mg/gに対し、市販品75 mg/g, 164 mg/gと72 mg/g, 155 mg/g, 調理豆乳の24 mg/g, 15 mg/gに対し、市販品83~191 mg/g (n=3), 36~82 mg/g (n=3), 調理豆腐の137 mg/g, 56 mg/gに対し、市販品 (木綿) 69~103 mg/g (n=5), 54~92 mg/g (n=5) となった。測定結果からFASPEKのおからを除き、市販品の製品による値の幅は2倍程度となった。

以上より、アレルゲン表示検査に準拠した2種のELISAキットは大豆調理・加工品のタンパク質を検出することができ、測定値の傾向としてはVer. IIIに比べFASPEKの値が高かった。また加熱調理による測定値の変動は、Ver. IIとVer. III, FASPEKとでは異なり、Ver. IIIよりFASPEKで影響がみられた。

2.2 大豆発酵食品の測定

市販の醤油15試料、納豆12試料、味噌5試料の2種のELISAキットによる測定結果をTable 3に示した。

蒸した大豆または脱脂加工大豆と炒った小麦で作った麴に塩水を加えて仕込み、長時間熟成させた諸味を圧搾してえたものを生醤油という²⁰⁾。その後、醤油は殺菌や品質の安定化等のために通常火入れを行うが、近年火入れを行わ

ずる過殺菌処理を行うことで異なる香りを有した生醤油が製品として定着している^{20), 21)}。そこで、醤油7試料と生醤油8試料を測定した。醤油ではVer. IIIはいずれも不検出 (<1 μ g/g) であったが、FASPEKは7試料のうち1試料で1 μ g/g検出された。一方、生醤油は8試料のうちVer. IIIで1試料、FASPEKで3試料検出され、うちNo. 10は10 μ g/g以上であった。醤油の火入れは60~120°Cで数秒から数10分間加熱処理を行うため、残存した酵素等が高分子多糖などを巻きこんだ変性タンパク質の凝集塊となり、火入れ釜となって沈殿する²¹⁾。ゆえに醤油では大豆タンパク質がほぼ除去されていたが、生醤油のろ過殺菌では10 μ g/g以上残存する場合があることが確認された。

納豆12試料測定の結果、FASPEKはいずれも大豆タンパク質が検出され、食品成分表の納豆 (153~168 mg/g) との比較では0.2%以下となり、製品による幅は約6倍となった。また既報との比較では、SDSと尿素を含む抽出液による抗 β -コングリシニン抗体のELISAは2.3 mg/gとなり²²⁾、FASPEKの10倍以上となった。一方、Ver. IIIでは2試料で数 μ g/g検出されたのみでその他は不検出となった。さらに旧キットVer. IIの報告においても納豆は1 μ g/gとなったが⁸⁾、その後抽出時の80°C 15分の加熱処理により菌の酵素を失活することで0.8 μ g/gが1402 μ g/gに上がったと報告された¹⁴⁾。納豆の製造では煮豆に納豆菌が摂取されてから約2日で製品となり、その後も発酵が進むことから²³⁾、納豆の発酵過程の報告を参照すると、尿素とMEを含む抽出液による抗Gly m Bd 30K抗体のELISAでは煮豆約6 mg/gから発酵10時間以降には約1~5%にまで分解し²⁴⁾、検出値は約60~300 μ g/gの検出となる。ゆえに納豆菌の酵素による影響は測定系により異なることが示唆され、Ver. IIIならびにFASPEKにおいてどの程度影響があるのか、さらに検討する必要がある。

味噌は一般的な米味噌の測定を行った。米味噌5試料からいずれも大豆タンパク質が検出され、FASPEKは108~295 μ g/gとなり、製品による値の幅は約3倍であった。一方、Ver. IIIは全て1000 μ g/g以上となり、FASPEKに比

Table 3. Detection of soybean protein in fermented soybean products

Sample No.	Fermented soybean products	FASTKIT ELISA Ver. III Daizu: Target allergen Gly m Bd 30K Soybean protein (μg/g)	Morinaga FASPEK ELISA Kit II Daizu: Target allergen β-conglycinin Soybean protein (μg/g)
1	Soy sauce	<1	<1
2	Soy sauce	<1	<1
3	Soy sauce	<1	<1
4	Soy sauce	<1	<1
5	Soy sauce	<1	<1
6	Soy sauce	<1	1
7	Soy sauce	<1	<1
8	Soy sauce (unheated)	<1	<1
9	Soy sauce (unheated)	<1	<1
10	Soy sauce (unheated)	20	6
11	Soy sauce (unheated)	<1	<1
12	Soy sauce (unheated)	<1	<1
13	Soy sauce (unheated)	<1	3
14	Soy sauce (unheated)	<1	<1
15	Soy sauce (unheated)	<1	4
16	Natto (fermented soybeans)	<1	138
17	Natto	<1	231
18	Natto	<1	114
19	Natto	<1	62
20	Natto	1	80
21	Natto	<1	38
22	Natto	<1	60
23	Natto	<1	81
24	Natto	<1	46
25	Natto	<1	46
26	Natto	2	157
27	Natto	<1	65
28	Miso (fermented soybean paste)	>1000	272
29	Miso	>1000	295
30	Miso	>1000	178
31	Miso	>1000	108
32	Miso	>1000	245

Data are for one ELISA determinations (three wells each).

べ1桁以上高くなった。また、前述した旧キットVer. IIの加熱処理による検討では、納豆と同様に米味噌は処理前の約2.7倍の6795 μg/gに上がったことが報告されている¹⁴⁾。さらに発酵食品を測定した報告では、SDSとMEを含む抽出液による抗Gly m Bd 30Kモノクロナル抗体によるELISAの報告では、味噌、納豆、醤油は不検出となった²⁵⁾。味噌も納豆と同様に麹菌により発酵熟成されることから、味噌の熟成を検討した報告を参照すると^{26), 27)}、味噌の水溶性窒素画分は全体の60%程度でそのほとんどはアミノ酸または平均アミノ酸鎖長5以下のペプチドであり、不溶性窒素画分中の大豆タンパク質は10日以内に分解され、残存したタンパク質は40日後まで観察された。これらのことから、味噌では測定系に与える菌の酵素の影響は納豆に比べ小さいと考えられるが、分解産物であるペプチドや残存した大豆タンパク質と抗体との認識部位により測定値が大きく異なることが示唆された。一方FASPEKでは納豆、味噌共にほぼ同程度の測定値となり、Gly m Bd 30Kとβ-コングリシニンの納豆菌、麹菌による分解の違い

も考えられ、発酵食品の測定は興味ある結果となった。

2.3 大豆成分を含む健康食品の測定

大豆成分を含む健康食品について2種のELISAキットによる測定結果をTable 4に示した。

No. 1~10は大豆イソフラボンによるホルモン作用、抗酸化作用等の機能性^{2)~4)}をうたうもので、大豆原材料は大豆イソフラボン、大豆抽出物であった。その他原材料は美容や精力増進等を付加価値としたコラーゲンや動物性エキス、ビタミン類等であり、製品により含まれるものが異なった。形態はタブレット、カプセル、液体があった。10試料のうち8試料はいずれかのキットで数μg/g程度の検出となったが、タブレットNo. 1はいずれも1000 μg/g以上検出され、カプセルNo. 6はVer. III 51 μg/g、FASPEK 28 μg/gと10 μg/g以上となり、類似製品でも大豆タンパク質濃度が大きく異なった。一方2キットの測定値に大きな差はなく、また大豆タンパク質濃度と大豆イソフラボン含有表示量との間に相関はなかった。

No. 11~15は大豆ペプチドによる血中コレステロール

Table 4. Detection of soybean protein in soybean health foods

Sample No.	Form	Product Label		FASTKIT ELISA	Morinaga FASPEK
		Soybean-derived content	Soy aglycom isoflavones (mg/g)	Ver. III Daizu: Target allergen Gly m Bd 30K Soybean protein (μg/g)	ELISA Kit II Daizu: Target allergen β-conglycinin Soybean protein (μg/g)
1	Tablet	Soybean extract (isoflavones)	94	>1000	>1000
2	Tablet	Soybean isoflavones	16	1	<1
3	Tablet	Soybean extract (isoflavones)	67	2	1
4	Tablet	Soybean isoflavones	96	4	2
5	Tablet	Soybean extract (isoflavones)	5	2	2
6	Capsule	Soybean embryo bud extract (isoflavones)	15	51	28
7	Capsule	Soybean extracts (isoflavones 80%)	28	<1	<1
8	Capsule	Soybean extract	8	1	2
9	Capsule	Soybean isoflavone extract	25	<1	<1
10	Liquid	Soybean embryo bud extract (isoflavones)	no data	<1	1
11	Tablet	Soybean peptides	—	>1000	>1000
12	Tablet	Soybean peptides	—	>1000	>1000
13	Tablet	Soybean peptides	—	>1000	>1000
14	Tablet	Soybean peptides	—	>1000	>1000
15	Powder	Soybean peptides	—	>1000	>1000

Data are for one ELISA determination (three wells each).

—: not applicable

低下や血圧上昇抑制等の機能性をうたうもので^{2)~4)}、形態はタブレットと粉末があった。原材料が大豆ペプチドのみはNo. 15 (粉末) となり、その他の原材料は甘味料、香料等であった。タンパク質濃度は2キットのいずれも 1000 μg/g 以上となった。大豆ペプチドは大豆タンパク質をプロテアーゼ処理した様々なアミノ酸の組み合わせによる低分子ペプチドの混合物であるが²⁸⁾、いずれのキットにおいても検出された。

以上よりアレルギー検査法に準拠した2種のELISAキットは大豆調理・加工品からタンパク質をいずれも検出し、Ver. III に比べFASPEKの値が高い傾向があり、FASPEKの方が加熱調理による影響を受けた。また醤油や大豆成分を含む健康食品に残存するタンパク質とペプチドを検出することができた。一方発酵食品の納豆と味噌では2種のELISAキットで測定値が大きく異なった。

ま と め

自家調製した大豆調理品を用いて、大豆タンパク質の定量への調理・加工の影響を検討した。抽出法にPBSまたはSDS/MEを用い、おのおのBCA法、2-D Quant Kitによる測定ならびにSDS-PAGEによる分析を行い、さらに各種ELISAにより測定した。豆腐調理過程のタンパク質濃度の変化では、PBS値とVer. IIの浸漬大豆と生呉で大きく変動し、これは試料均一化時の水分量によるタンパク質溶解性の変動と考えられた。また豆乳作製時の生呉の加熱でのPBS値の低下はタンパク質の熱変性を表すと考えられた。一方豆腐のSDS/ME値、Ver. IIでは界面活性剤や還元剤などによるタンパク質の構造変化が測定系に影響し、値が高くなる場合があることが考えられた。

加熱調理品のSDS-PAGEによる分析では、炒り豆を除き50 kDa付近以上と20 kDa付近のタンパク質の変性が観察され、130℃と180℃の2度揚げ豆腐のみで40 kDa付近のタンパク質の変性と低分子化がみられたが、煮豆を除きこれらのタンパク質変性によるタンパク質濃度の低下はみられなかった。さらに、炒り豆、ゆば、炒りおから、揚げ豆腐で調理時間に伴いタンパク質濃度が増加したことから、タンパク質の変性温度が水分の低下に伴い高温にシフトしたと考えられた。

アレルギー検査法に準拠した2種のELISAによる測定では大豆調理品および市販品のタンパク質を検出することができ、FASPEKがVer. IIIより値が高く、FASPEKの方が加熱調理の影響を受けた。また納豆を除いた発酵食品と大豆成分を含む健康食品に含まれるタンパク質とペプチドをいずれのキットも検出したことから、大豆調理・加工食品のタンパク質の検出に有用であると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」ならびに神奈川県健康医療局先行調査・モニタリング調査事業により実施した。

文 献

- 堀井正治. 食品栄養学的視点から見た日本人の食生活. 日本食品保蔵学会誌, **27**, 303-311 (2001).
- Singh P., et al. Functional and edible uses of soy protein products. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., **7**, 14-28 (2008).
- 真鍋久. 大豆たんぱく質の機能性を探る. 日本調理科学会

- 誌, **38**, 204–208 (2005).
- 4) 後藤一寿. 大豆における多様な用途別需要と企業の製品戦略. 農林業問題研究, **187**, 103–108 (2012).
 - 5) 消費者庁「食物アレルギーに関する食品表示に関する調査研究事業」平成29(2017)年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査結果報告. アレルギー, **69**, 701–705 (2020).
 - 6) 海老澤元宏. 食物アレルギーの診断の手引き2020, 食物アレルギーの診断の手引き2020検討委員会, 2020, p. 4–10.
 - 7) Akiyama H. Notified detection method for allergic substances. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **44**, J168–J177 (2003).
 - 8) Morishita N. et al. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of soybean proteins in processed foods. J. Agric. Food Chem., **56**, 6818–6824 (2008).
 - 9) 瓦家千代子. 豆の調理. 生活衛生, **30**, 48–52 (1986).
 - 10) 青木宏. 大豆タンパク質と食品加工 (III) 大豆タンパク質の新しい食品利用一特に溶解性との関連. 調理科学, **6**, 38–46 (1973).
 - 11) 小林彰夫他. 豆腐の風味形成に関与する香気成分. 日本食品科学工学会誌, **47**, 613–618 (2000).
 - 12) 小野伴忠. 大豆から豆乳・豆腐が生成する機構とそれに影響を与える諸因子 (大豆加工における成分相互作用の解明と応用に関する研究). 日本食品科学工学会誌, **55**, 39–48 (2008).
 - 13) Pedersen M. N., et al. Soybean allergen detection methods-A comparison study. Mol. Nutr. Foods Res., **52**, 1486–1496 (2008).
 - 14) Morishita N., et al. Detection of soybean proteins in fermented soybean products by using heating extraction. J. Food Sci., **79**, T1049–T1054 (2014).
 - 15) 添田孝彦. 加熱による大豆タンパク質分子形態変化の検討. 日本食品工業学会誌, **41**, 676–681 (1994).
 - 16) 岡本奨. ゆば膜の生成と利用. 調理科学, **9**, 135–141 (1976).
 - 17) Saito T., et al. Novel method using phytase for separating soybean β -conglycinin and glycinin. Biosci. Biotechnol. Biochem., **65**, 884–887 (2001).
 - 18) Tsukada H., et al. Effect of sorbed water on the thermal stability of soybean protein. Biosci. Biotechnol. Biochem., **70**, 2096–2103 (2006).
 - 19) 森山達哉. 大豆アレルギーの多様性と味噌の低アレルギー性の検証. 日本醸造協会誌, **106**, 645–655 (2011).
 - 20) 小幡明雄, 桑垣傳美. 話題の調味料: 生しょうゆ. 日本調理科学会誌, **46**, 402–404 (2013).
 - 21) 田村順一. 醤油火入れ缶について一発生のメカニズムと火入れ缶の出ない生醤油一. 醸協, **85**, 858–862 (1990).
 - 22) Moriyama T., et al. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of soybean β -conglycinin, a major soybean storage protein, in soybean and soybean food products. J. Nutr. Sci. Vitaminol., **51**, 34–39 (2005).
 - 23) 三星沙織. 納豆. 日本調理科学会誌, **52**, 33–37 (2019).
 - 24) 青木雄二郎他. 納豆発酵過程における大豆アレルギー蛋白質の変動. 日食化誌, **5**, 32–37 (1998).
 - 25) Tsuji H., et al. Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of the major soybean allergen, Gly mBd 30K. J. Nutr. Sci. Vitaminol., **39**, 389–397 (1993).
 - 26) 新国佐幸. 味噌熟成中の大豆蛋白質の分解. 醸協, **84**, 216–221 (1989).
 - 27) Nikkuni S., et al. Changes in SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of water-insoluble fraction during miso fermentation. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi, **31**, 502–510 (1984).
 - 28) 大森俊宏, 北川さゆり. 大豆ペプチドの栄養学的効能及び発酵食品への利用. 醸協, **104**, 25–36 (2009).