

醤油醸造における大豆アレルギーの分解・除去

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	真岸, 範浩
発行元	日本醸造協会
巻/号	114巻1号
掲載ページ	p. 12-17
発行年月	2019年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去

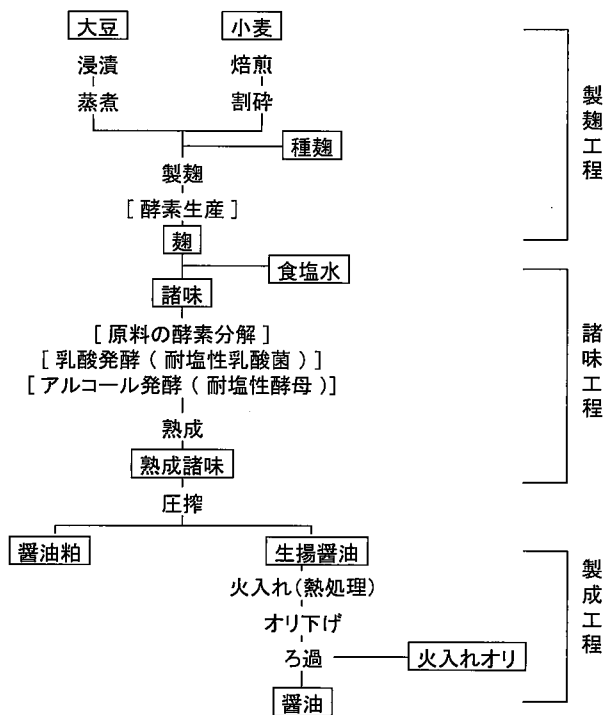
食物アレルゲンの話は、近年益々身近で重要な話になってきている。醤油は原料に、アレルゲン表示推奨品目の大豆と、アレルゲン表示義務品目の小麦を使っており、アレルゲンタンパク質残留の有無は、極めて重要な関心事である。今回は、大豆アレルゲンに焦点を絞って、醤油の製造工程とその存否の関係を丁寧に解説いただいた。醤油の大豆アレルゲンに関する重要な情報として、安全安心に関わっている品質保証関係の皆様には是非ご一読をお勧めする。

真岸 範 浩

1. はじめに

醤油は大豆と小麦を主原料とし、麴菌、酵母、乳酸菌による発酵を利用して特有の味わいや風味を醸し出

す日本の伝統的な発酵調味料である。醤油の製造工程（第1図）¹⁻⁴⁾は製麴工程、諸味工程、製成工程（火入れ・オリ下げ・ろ過）の大きく3つに分けられ、本醸造醤油では、全麴で仕込むことを特徴としている。昔



第1図 本醸造醤油の製造工程

Degradation and Removal of Soybean Allergen in the Brewing of Soy Sauce
Norihiro MAGISHI (Research Laboratory, Higashimaru Shoyu Co., Ltd.)

から「一麹、二糶、三火入れ」と言われるようにそれぞれの工程が品質を左右する重要な工程である。醤油と同じく麹菌や酵母、乳酸菌の発酵を利用する清酒や味噌でも同様の言葉があり、味噌では「一麹、二焚き、三仕込」、清酒では「一麹、二酒母（もと）、三造り」と言われる。これらの発酵食品に共通するのは原料の分解に必要な酵素を麹菌に生産させる製麹工程や香りなどの風味を醸し出す酵母・乳酸菌の発酵に関わる諸味工程（味噌では仕込、清酒では酒母、造り）が重要とされていることである。一方、醤油の製造工程では清酒や味噌とは異なり、微生物が関与しない「火入れ」、すなわち火入れ、オリ下げ、ろ過も品質に重要な工程とされている。火入れの主な目的は生揚醤油に残存する麹菌酵素の失活や酵母などの殺菌、色や香りを整えることであるが、その後のオリ下げで加熱により発生した不溶性の火入れオリを凝集させ、ろ過により火入れオリを除去し清澄な醤油を得る。火入れオリは水洗残渣重量にして醤油 1L 当たり 250～500mg であり、醤油の全窒素の約 0.2～0.4% にあたる。火入れオリの組成は約 90% がタンパク質であり、麹菌由来の酵素が主成分と考えられている^{5,6)}。火入れオリの除去が不十分であると製品醤油の保存中に二次オリと呼ばれる濁りが発生することがあるため、これまでは醸造面や品質面での意義に着目されていた。火入れの新しい意義として、本稿では醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去機構について、諸味中での大豆アレルゲンの分解と火入れでの熱変性による不溶化、不溶化した大豆アレルゲンの除去に着目し、大豆アレルギー患者の血清を用いて実施したウエスタン解析について解説する。なお、詳細な実験条件等については原著論文^{7,8)}を参照いただきたい。

2. 大豆のアレルゲンについて

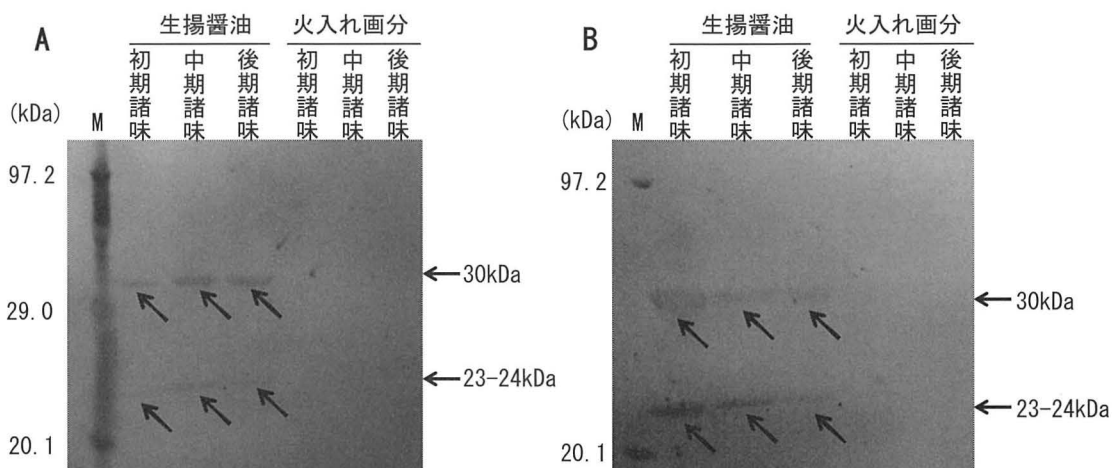
食物アレルギーは IgE 依存型と IgE 非依存型に大別され、IgE 依存型の食物アレルギーは抗原・抗体反応によるものであり、IgE 非依存型の食物アレルギーは中毒や不耐性によるものである。醤油の主原料の 1 つである大豆は主要な食物アレルゲンであり、特定原材料に準ずる 20 品目の 1 つとしてアレルゲンの表示が推奨されており、もう 1 つの主原料である小麦も省令で定める特定原材料 7 品目の 1 つとしてアレルゲン表示が義務化されているが、大豆や小麦による食物ア

レルギーは前者に分類される。大豆では、大豆アレルギー患者の血清を用いた免疫学的研究により、IgE と結合するタンパク質が少なくとも 16 個あることが分かっており、その中でも 7S グロブリン (β -コングリシニン) に含まれる Gly m Bd 68K や Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K が大豆の主要なアレルゲンであると考えられている⁹⁾。Gly m Bd 68K は主要な貯蔵タンパク質である β -コングリシニンの α -サブユニット¹⁰⁻¹²⁾、Gly m Bd 30K は大豆のオイルボディの皮膜タンパク質に付随して単離される 34 kDa oil body associated protein であり、構造的にはチオールプロテアーゼであるパピインスーパーファミリーに属する^{9,13)}。また、Gly m Bd 28K はアスパラギン結合型糖鎖を有する糖タンパク質である^{9,14,15)}。これらの主要大豆アレルゲンは、モノクローナル抗体を用いた解析により、醤油中には残存していないことが明らかになっており^{4,16-18)}、厚生労働省科学研究班による「食物アレルギーの診療の手引き 2017」では、「醤油について、大豆アレルギーでは原則除去不要」と記載され¹⁹⁾、平成 27 年 3 月に文部科学省から発行された「学校給食における食物アレルギー対応指針」では、「醤油は食物アレルギーの原因物質として小麦、大豆とも除去する必要がない調味料」と記載されている²⁰⁾。我々のウサギ由来大豆特異的抗体を用いた研究により大豆由来タンパク質は麹菌酵素による分解を受けるものの諸味中では完全には分解されず生揚醤油に残存すること、生揚醤油に残存する大豆タンパク質は火入れ工程により除去されることを報告している²¹⁾、大豆アレルゲンについては明らかとならなかった。そこで、大豆アレルギー患者の血清を用いたウエスタン解析により醤油醸造中での諸味中における麹菌酵素による分解と火入れによる除去の 2 つの低減化からなる大豆アレルゲンの分解・除去機構を明らかにした。

3. 醤油醸造での大豆アレルゲンの分解・除去機構

3-1. 諸味中での大豆アレルゲンの分解

はじめに諸味中での大豆アレルゲンの分解を解析するため、初期諸味（仕込み後 2 週）、中期諸味（仕込み後 2 ヶ月）、後期諸味（仕込み後 6 ヶ月）より調製した生揚醤油について大豆アレルギー患者のヒト血清を用いたウエスタン解析を行った。ヒト血清は、関西



第2図 ウェスタン解析による生揚げ醤油、火入れ醤油中の大豆アレルゲンの検出
大豆アレルギー患者の血清はそれぞれ単独で使用した。左図：A抗体，右図：B抗体
M：分子量マーカー，矢印は分子量から推定された大豆アレルゲン(Gly m Bd30K(34 kDa)，オレオシン(23-24kDa))。文献8より引用

医科大学小児科の大豆アレルギー患者2名(A抗体：11歳，大豆特異的IgE 1.01 Ua/ml，RAST値2，B抗体：9歳，特異的IgE抗体 10.9 Ua/ml，RAST値3)よりご提供頂いた。なお通常のSDS-PAGEでは試料にサンプルバッファーを加えた後に行う変性・可溶化のための加熱処理が火入れに相当すると考えられたため，本実験では試料にサンプルバッファーを加えた後に加熱処理をせず37℃で一晩インキュベートすることにより，変性・可溶化を行わせた。

その結果，全ての生揚げ醤油で30kDa付近と23～24kDa付近にバンドが検出され，2種類の大豆アレルゲンが残存していた(第2図)⁸⁾。A抗体，B抗体で検出された大豆アレルゲンに違いはみられなかった。これらの結果から，大豆アレルゲンは諸味中で麹菌酵素による分解を受けるものの，完全に分解されず，生揚げ醤油に残存することが示唆された。また，検出された大豆アレルゲンは分子量からGly m Bd 30K^{9,13)}とオレオシン²²⁻²⁷⁾であると推測された。

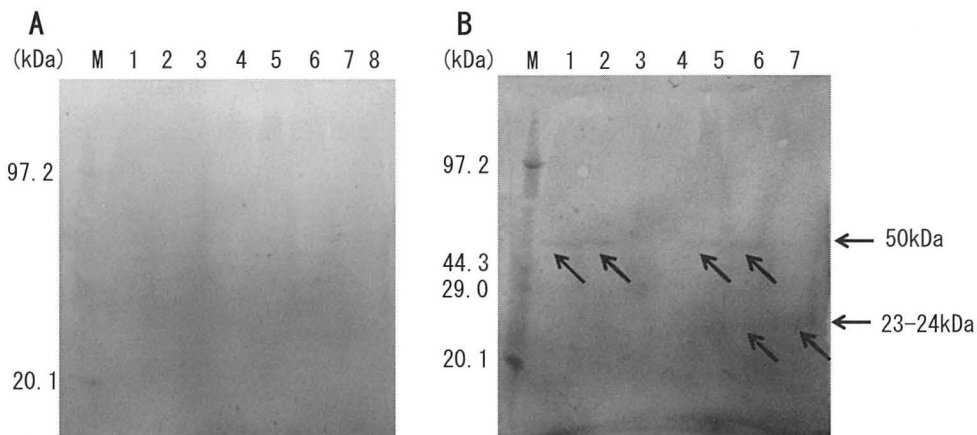
3-2. 火入れ工程による大豆アレルゲンの除去

次に各生揚げを85℃達温で加熱，遠心処理した上清を火入れ画分とし，生揚げ醤油と同様のウェスタン解析を行ったところ，大豆アレルゲンは検出されなかつ

た(第2図)⁸⁾。一方で，加熱処理で生じた沈殿部を18% (w/v) 食塩水で洗浄後に4M尿素/0.1M Tris-HCl (pH8.6) で可溶化した火入れオリ画分には大豆アレルゲンが検出された(データ未記載)⁸⁾。これらの結果から生揚げ醤油に残存する大豆アレルゲンは火入れにより熱変性を受けて不溶化し，火入れオリとしてろ過により除去され，火入れ醤油には大豆アレルゲンが残存しないことが示唆された。また，諸味の熟成期間に関わらず大豆アレルゲンが除去されていたことから，醤油における大豆アレルゲンの低減には火入れによる大豆アレルゲンの除去が重要であることが明らかとなった。

4. 市販醤油の大豆アレルゲン

さらに自社品含む「生揚げ醤油とラベルに記載していない」市販醤油8品(濃口3品，たまり2品，再仕込2品，淡口1品)について大豆アレルギー患者のヒト血清(A抗体，B抗体のプール血清)を用いたウェスタン解析を行った結果，8品すべて大豆アレルゲンは検出されなかった(第3図A)⁸⁾。一方，「生揚げ醤油(火入れを行っていない)とラベルに記載している」市販醤油7品(濃口4品，再仕込1品，たまり1品，淡口



第3図 ウェスタン解析による市販醤油中に残存する大豆アレルゲンの検出

大豆アレルギー患者のヒト血清は A 抗体と B 抗体を混合した抗体を使用した。

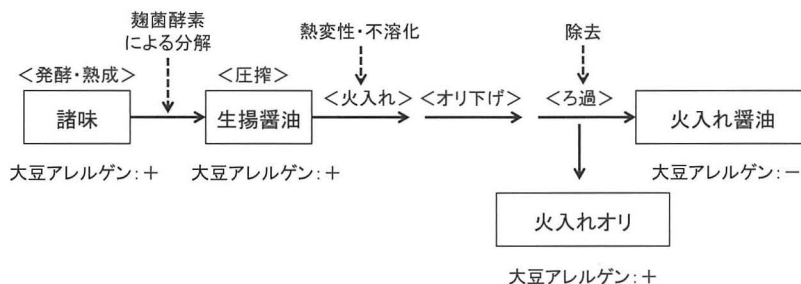
A: 「ラベルに生醤油と記載していない」市販醤油の大豆アレルゲンの検出

レーン 1～3: 濃口醤油, 4～5: たまり醤油, 6～7: 再仕込醤油, No.8: 淡口醤油, M: 分子量マーカー。文献 8 より引用

B: 市販生醤油(火入れをしていない)の大豆アレルゲンの検出

1～4: 濃口醤油, 5: 再仕込醤油, 6: たまり醤油, 7: 淡口醤油, M: 分子量マーカー

矢印は分子量から推定された大豆アレルゲン(β -コングリシニン β サブユニット (50 kDa), オレオシン (23-24 kDa))。文献 8 より引用



第4図 醤油醸造における大豆アレルゲンの分解・除去機構

+ : 大豆アレルゲン検出, - : 大豆アレルゲン不検出

文献 8 より引用

1 品) について同様のウェスタン解析を行った結果、濃口 2 品と再仕込 1 品, たまり 1 品で約 50kDa 付近にバンドが検出され, たまり 1 品と淡口 1 品で 23～24kDa 付近にバンドが検出され, 生醤油製品 7 品中 5 品で大豆アレルゲンが残存していることを確認した(第 3 図 B)⁸⁾。また, 検出された大豆アレルゲンは分子量から β -コングリシニン β サブユニット³¹⁾と, オレオシン²²⁻²⁷⁾であることが推測された。これらの結果より, 火入れ, オリ下げ, ろ過の工程がないと考え

られる生醤油製品には大豆アレルゲンが残存する可能性があることが示された。なお, 大豆アレルゲンが検出されなかった生醤油製品は, 限外ろ過等の精密ろ過を行い, 大豆アレルゲンが除去されたのではないかと考えられた。

今回の解析では主要な大豆アレルゲンと考えられる Gly m Bd 30K 以外にオレオシンや β -コングリシニン β サブユニットが検出された。オレオシンはオイルボディ膜タンパク質であり, アナフィラキシーを起こ

引用文献

- 1) Kobayashi M and Hayashi S : Modeling combined effects of temperature and pH on growth of *Zygosaccharomyces rouxii* in soy sauce. *J Ferment Bioeng* **85** : 638-641,1998.
- 2) Kobayashi M and Hayashi S : Supplementation of NaCl to starter culture of the soy yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Ferment Bioeng* **85** : 642-644, 1998.
- 3) Nagai H, Kobayashi M, Tsuji Y, Nakashimada Y, Kakizono T and Nishino N : Biological and chemical treatment of the solid waste from the process of soy sauce manufacture. *Water Sci Technol* **45** : 335-338, 2002.
- 4) Kobayashi M, Hashimoto Y, Taniuchi S and Tanabe S : Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce. *Int J Mol Med* **13** : 821-827, 2007.
- 5) 橋本彦堯 : 醤油の(オリ)に関する研究. 醸工 **55** : 294-300, 1977.
- 6) 田村順一, 相羽富夫, 茂木孝也 : 醤油火入れ珪生成について(第一報)火入れ珪生成促進物質の存在. 醬研 **13** : 199-204, 1987.
- 7) Magishi N, Yuikawa N, Kobayashi M, and Taniuchi S : Degradation and removal of soybean allergen in Japanese soy sauce. *Mol Med Rep* **16** : 2264-2268, 2017.
- 8) 真岸範浩, 結川直哉, 古林万木夫, 谷内昇一郎 : 醤油醸造における大豆アレルギーの分解・除去機構. 醬研 **44** : 45-50, 2018.
- 9) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Sasaoka K : Investigation of the IgE-binding proteins by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol* **37** : 555-565, 1991.
- 10) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K : α -subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotech Biochem* **59** : 831-833, 1995.
- 11) Krishnan HB, Kim WS, Jang S and Kerley MS : All three subunits of soybean beta-conglycinin are potential food allergens. *J Agri*

すゴマやピーナッツの主要なアレルギーであることが報告されている²²⁻²⁷⁾。また β -コングリシニン β サブユニットは主要大豆アレルギーである Gly m Bd 68K (β -コングリシニン α サブユニット)と高い相同性をもつことが報告されており¹¹⁾、いずれもアレルギー症状を引き起こす恐れのあるアレルギーである。以上の結果より、醤油醸造での大豆アレルギーの分解・除去機構を第4図に示した。火入れ工程は香りや色調、清澄化といった醤油の醸造や品質面だけでなく、大豆アレルギーの除去といった醤油の低アレルギー性にとっても重要であることが示唆された。

5. おわりに

一連の研究により、大豆アレルギーは、醤油諸味中では完全には分解されないこと、火入れ工程により熱変性を受けて不溶化し、火入れオリとして除去されるため、火入れ醤油中には残存しないことが明らかとなった。一方、醤油のもう1つの主原料である小麦のアレルギーは製麹工程や諸味工程中で麹菌酵素による完全分解を受け、生揚醤油には残存しないことが小麦アレルギー患者の血清を用いたウエスタン解析により明らかとなっている^{4,28-30)}。小麦アレルギーの研究と合わせ、醤油の低アレルギー性が示され、大豆や小麦アレルギー患者においても安全に使用していただける可能性が示唆された。

大豆アレルギーは小麦アレルギーに比べ、麹菌酵素による分解を受けにくいことが考えられ、完全には分解されずに生揚醤油に残存するが、これまで主に醤油の品質、醸造面での意義が着目されていた火入れ工程において、大豆アレルギーが除去されるという安全面での新しい意義がみられた点は非常に興味深い。醤油醸造の各工程ではまだ解明されていない部分も多く、これまでに分かっていない役割等を担っている可能性があり、今後も醤油ならびに醤油醸造の新たな価値を見出していきたいと考えている。

謝辞

本研究にあたり、共同研究者として研究を推進していただきました谷内昇一郎博士、ならびに終始ご指導とご助言をいただきました古林万木夫博士に厚く御礼申し上げます。

(ヒガシマル醤油株式会社 研究所 醸造開発課)

- Food Chem* **57** : 938-943, 2009.
- 12) Adachi A, Horikawa T, Shimizu H, Sarayama Y, Ogawa T, Sjolander S, Tanaka A and Moriyama T : Soybean beta-conglycinin as the main allergen in a patient with food-dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu : food processing alter pepsin resistance. *Clin Exp Allergy* **39** : 167-173, 2009.
 - 13) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu YI, Hirano H and Nishikawa K : Identification of soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem* **57** : 1030-1033, 1993.
 - 14) Tsuji H, Bando N, Hiemori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K and Ogawa T : Purification and characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K. *Biosci Biotech Biochem* **61** : 942-947, 1997.
 - 15) Tsuji H, Hiemori M, Kimoto M, Yamashita H, Kobatake R, Adachi M, Fukuda T, Bando N, Okita M and Utsumi S : Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Biochem Biophys Acta* **1518** : 178-182, 2001.
 - 16) Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Kimoto M and Ogawa T : Measurement of Gly m Bd 30K, a major soybean allergen, in soybean products by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosci Biotech Biochem* **59** : 150-151, 1995.
 - 17) Ogawa T, Samoto M and Takahashi K : Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol* **46** : 271-279, 2000.
 - 18) Bando N, Tsuji H, Hiemori M, Yoshimizu K, Yamanishi R, Kimoto M and Ogawa T : Quantitative analysis of Gly m Bd 28K in soybean products by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Nutr Sci Vitaminol* **44** : 655-664, 1998.
 - 19) 食物アレルギー研究会 HP : <http://www.foodallergy.jp/>
 - 20) 文部科学省 HP : http://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/detail/_icsFiles/afieldfile/2015/03/26/1355518_1.pdf
 - 21) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 田辺創一, 谷内昇一郎 : 特異的抗体を用いた醤油原料(大豆, 小麦)の分解機構の検討. *醤研* **31** : 217-222, 2005.
 - 22) Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guenard L, Beaudouin E, Flabbee J and Hatahet R : Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies : evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin Exp Allergy* **33** : 1046-1051, 2003.
 - 23) Chen JC, Lin RH, Huang HC and Tzen JT : Cloning, expression and isoform classification of a minor oleosin in sesame oil bodies. *J Biochem* **122** : 819-824, 1997.
 - 24) Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JT, Morisset M, Guerin L and Kanny G : Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy* **61** : 349-356, 2006.
 - 25) Pons L, Olszewski A and Guéant JL : Characterization of the oligomeric behavior of a 16.5 kDa peanut oleosin by chromatography and electrophoresis of the iodinated form. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **706** : 131-140, 1998.
 - 26) Huang AHC : Oilbodies and oleosins in seeds. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43** : 177-200, 1992.
 - 27) Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC and Guéant JL : The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy* **57** : 88-93, 2002.
 - 28) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 : 醤油醸造における小麦アレルゲンの分解. *醤研* **30** : 213-218, 2004.
 - 29) 吉田多恵子, 橋本裕一郎, 古林万木夫, 高畑能久, 森松文毅, 谷内昇一郎 : 市販ELISAキットを用いた醤油中の小麦アレルゲンの定量. *醤研* **30** : 219-224, 2004.
 - 30) 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 : 醤油醸造における小麦アレルゲンの分解機構. *醸協* **100** : 96-101, 2005.