

## 発酵米麺のアレルゲンタンパク質と プロテアーゼ産生微生物について

池田昌代, 加藤みゆき\*, 長野宏子\*\*, 阿久澤さゆり\*\*\*,  
和泉秀彦\*\*\*\*, 大森正司\*\*\*\*\*

(高崎健康福祉大学健康福祉学部, \* 香川大学教育学部, \*\* 岐阜大学教育学部,  
\*\*\* 東京農業大学応用生物科学部, \*\*\*\* 名古屋学芸大学管理栄養学部,  
\*\*\*\*\* 大妻女子大学家政学部)

原稿受付平成16年11月4日; 原稿受理平成17年5月25日

### Allergenic Protein in Fermented Rice Noodles and the Protease-producing Bacterium

Masayo IKEDA, Miyuki KATO\*, Hiroko NAGANO\*\*, Sayuri AKUZAWA\*\*\*,  
Hidehiko IZUMI\*\*\*\* and Masashi OMORI\*\*\*\*\*

*Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare, Takasaki, Gunma 370-0033*

*\* Faculty of Education, Kagawa University, Takamatsu, Kagawa 760-8522*

*\*\* Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-1193*

*\*\*\* Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*

*\*\*\*\* School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences, Nissin, Aichi 470-0196*

*\*\*\*\*\* Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357*

We determined the quantity of allergenic protein in fermented rice noodles (Mohinger) from Myanmar. We also identified the protease-producing bacterium, which is related to the digestion of the allergenic protein in rice, in order to clarify the relationship between the digestion of the allergenic protein and the enzyme producing the microorganism in the process for manufacturing fermented rice noodles. The results of ELISA and immunoblotting showed that the quantity of allergenic protein in fermented rice noodles was 10-30%, i.e. less than that in rice. We also isolated 124 strains of bacteria from soaked rice and shitogi during the manufacturing process, of which 45 were positive to gelatin liquefaction and 22 were collagenase-producing. Strain MYA644, which was isolated in soaked rice from the Inle region by using azocasein and azocollagen as substrates, showed the highest activity of the protease-producing bacteria and was identified as *Bacillus subtilis*. The allergenic protein extracted from rice and digested by SDS electrophoresis indicated no polypeptide bands beyond 20 kDa, while the band at 14 kDa had disappeared due to the action of the MYA644 protease-producing bacterium. This pattern was similar to that found with the fermented rice noodles, suggesting that the MYA644 strain had the ability to digest the 14-16 kDa allergenic protein in rice.

(Received November 4, 2004; Accepted in revised form May 25, 2005)

**Keywords:** fermented rice noodle 発酵米麺, traditional food 伝統食品, Southeast Asia 東南アジア, allergenic protein アレルゲンタンパク質, protease-producing bacterium プロテアーゼ産生微生物, *Bacillus subtilis* バシラスサブチルス.

#### 1. 緒 言

東南アジアには、今もなお伝統的手法を用いて作られる発酵米麺が存在する。発酵米麺とは、米を1~3日間水の中に浸漬し、その米を水と共に磨砕したシトギ(粿)を作り、布袋の中で1~2日間水切りし、糊

化させ、混捏後、沸騰温浴中に押し出し製造する米麺である<sup>1)~4)</sup>。ベトナムでは「ブン」<sup>4)</sup>、タイでは「カノム・チーン」<sup>1)</sup>、ミャンマーでは「モヒンガー」<sup>2)3)</sup>、ラオスでは「カオブン」、カンボジアでは「ノム・バンチョック」と呼ばれ、地域により呼称が異なり、製

造方法にも若干の違いはあるが、「米の浸漬」、「シトギの水切り」の工程は共通に存在している。工業技術が発展していない地域でのこの操作は、米を加工しやすくするための重要な工程であるが、温暖多湿な気候の中で、このような工程を経て数日間かけて製造されることにより、米が発酵し独特な風味を持つ発酵米麺となる。発酵米麺製造における「発酵」は、アジアの伝統発酵食品である魚醬<sup>5,6)</sup>や、腐乳<sup>7-9)</sup>と同様に自然発酵として製造され、利用されている。前報<sup>3)</sup>で、ミャンマーの発酵米麺であるモヒンガーを対象に成分上の特徴について検討し、発酵米麺中には原料米にみられない乳酸が検出され、総遊離アミノ酸量が増加していたことを報告した。また、発酵米麺のタンパク質が製造工程を経るごとに、低分子化されていることを明らかにした。さらに、米の主要アレルゲンタンパク質と報告されている 14-16 kDa<sup>10)-13)</sup> のタンパク質が発酵米麺製造工程において減少していることが認められた。米の 16 kDa 付近のタンパク質は、熱や一部の酵素に対して高い抵抗性を示す安定な構造を持っており、炊飯などの加熱加工だけではアレルゲン活性を低下させることは難しく、貯蔵によっても活性の低下がみられないと報告<sup>12)</sup>されている。しかし、発酵米麺では、特別な手法を用いず、自然発酵の過程でアレルゲンタンパク質が減少していることから、製造に関与する微生物を検索し、その機序を明らかにすることで、新しい低アレルゲン食材の提供につながると考えた。

本報告では、発酵米麺の米アレルゲンタンパク質について検討すると共に、米麺製造過程の浸漬米及びシトギから、プロテアーゼ産生能を有する微生物を分離し、微生物が産生する酵素と米タンパク質分解の関係を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) 実験試料

試料は、2000 年 8 月、12 月及び 2001 年 1 月に、Yangon の Net Chaung, Lin Lin, Tin Htay, U Pyint の 4 工場から 6 種類、Inle の Taung To Apaw の 1 工場から 2 種類、Myitkyina の Nan Mon, Mawe Mawe Kyaw の 2 工場から 5 種類、さらに Putao の Soi Moe War の 1 工場から 1 種類、計 8 工場からの 14 試料を採取した。

### (2) タンパク質の抽出

各工場より採取した原料米及び発酵米麺を、常温にて乾燥させ 80 メッシュ以下に粉碎後、Shibasaki

ら<sup>10)</sup>の方法を参考にタンパク質抽出を行った。すなわち、脱脂した試料 5 g に 0.5 M の塩化ナトリウム水溶液を加え、4℃で一晩攪拌し塩可溶性タンパク質を抽出し、20 ml に定容後遠心分離 (13,000 rpm, 10 min, 4℃) 上清液を Microcon YM-10 (Amicon 社製) で脱塩をし、イムノブロット<sup>14)</sup>、ELISA 法<sup>15)</sup> 及び米タンパク質分解試験に用いた。

### (3) 微生物の分離

光岡の方法<sup>16)</sup>に準じて微生物の分離を行った。また、各選択培地に生育する微生物より、試料中に存在する微生物の普遍性を確認した。

浸漬米及びシトギ 1 g を、滅菌生理食塩水で 10~10<sup>10</sup> 倍に希釈し、NA (普通寒天) 培地、LBS 寒天培地、TATAC 寒天培地、DHL 寒天培地、Potetodextrose 寒天培地に 1 ml ずつ接種した。これを、37℃で 24~48 時間培養し、それぞれの培地に出現したコロニーより釣菌し純粋分離株を得た。

### (4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及びイムノブロット

各地域で採取した原料米及び発酵米麺の抽出タンパク質について、Laemmli<sup>17)</sup>の方法に従い SDS-PAGE を行った。ゲルは 16% 均一ゲルを用いた。電気泳動後のゲルは、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色し泳動パターンを観察した。また、もう一方のゲルは、定電流 (1.75 mA/cm<sup>2</sup> × ゲル面積) で 30 分通電し、分離タンパク質をウエスタンブロッティング法<sup>18)</sup>により PVDF メンブランに転写させた。転写 PVDF メンブランは、1% スキムミルクを含む PBS-T (phosphate-buffer saline-tween20) で、4℃で 1 晩ブロッキング後、米の 14-16 kDa のアレルゲンに対するモノクローナル抗体 25B9 を用い、抗原抗体反応を行った。2 次抗体には、抗マウス IgG・ヤギポリクローナル抗体パーオキシターゼ標識 (コスモバイオ社製) を用いた。アレルゲンタンパク質の検出は、過酸化水素/PBS (phosphate-buffer saline) と、4-クロロナフトール/メタノール溶液を使用直前に混合し、メンブランの転写面に反応させ、暗所にて行った。

### (5) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法<sup>15)</sup>による米アレルゲンタンパク質の測定

原料米及び発酵米麺のアレルゲンタンパク質量を測定した。96 穴マイクロプレートに、試料タンパク質を注入し 4℃で一晩放置後、PBS-T 緩衝液でウェルを洗浄し、1% スキムミルクを含む PBS-T 緩衝液でブロッキング (1 h, 37℃) を行い、イムノブロットと同様

## 発酵米麺のアレルゲンタンパク質とプロテアーゼ産生微生物について

の抗体を用い、抗原抗体反応を行った。さらに、*o*-フェニルジアミンを含むクエン酸緩衝液に過酸化水素水を加えた溶液で発色させ、2 N の硫酸で反応を停止させた後、620 nm の吸光度からアレルゲンタンパク質量を測定した。

#### (6) プロテアーゼ産生微生物の選択及びプロテアーゼ活性試験

##### 1) プロテアーゼ産生菌株の選択法

5 種類の選択培地 (NA, LBS, TATAC, DHL, Potetodextrose) より釣菌した純粋分離株についてゼラチン液化試験<sup>19)</sup>を行った。また、ゼラチン液化陽性を示した菌株を用いてコラーゲン分解試験<sup>20)</sup>を行った。試験方法は、ゼラチン液化陽性を示した菌株を、0.2%ゼラチンを含む液体培地<sup>20)</sup> (リン酸 2 カリウム 0.7%, リン酸 2 水素カリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.01%, クエン酸 1 水和物 0.05%, 酵母エキス 0.2%, ゼラチン 0.2%, ポリペプトン 1.0%, グルコース 1.0%) に接種し、37℃, 48 時間で振とう培養し、前培養液とした。また、この前培養液を 0.9%生理的食塩水で  $10 \sim 10^{10}$  倍に希釈し、希釈液 1 ml をコラーゲン含有培地<sup>20)</sup> (リン酸 2 カリウム 0.7%, リン酸 2 水素カリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.01%, クエン酸 1 水和物 0.05%, 酵母エキス 0.2%, コラーゲン 0.3%, 寒天 1.5%) に接種後、37℃で 48 時間培養しコロニーの生育とコロニー周辺のハローの形成を観察した。またハローを形成した菌株を、コラーゲン活性陽性株とした。

##### 2) プロテアーゼ活性試験法

コラーゲン活性陽性株を用い、アゾカゼイン及びアゾコラーゲン基質に対するプロテアーゼ活性を測定した。粗酵素溶液の調製は、コラーゲン活性陽性株 1 白金耳を 0.2%ゼラチンを含む液体培地<sup>20)</sup> 5 ml に接種し、37℃で 48 時間、振とう培養を行った。この培養液を遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) し、得られた上清液を粗酵素溶液として以下の実験に用いた。

##### i) アゾカゼイン分解試験<sup>21)</sup>

アゾカゼイン (シグマ社) を基質として用い、1%アゾカゼイン溶液 (50 mM トリス塩酸緩衝液-1 mM 塩化カルシウム pH 7.5) 600  $\mu$ l に粗酵素溶液 120  $\mu$ l を加え、37℃で 30 分反応させた。これに 15%トリクロロ酢酸 (TCA) 480  $\mu$ l を加えて反応を停止させ、遠心分離 (3,500 rpm, 10 min, 4℃) した上清を 440 nm にて測定した。吸光度 0.1 の上昇を 1 ユニットに換算し、1 ml あたりの酵素活性を測定した。

##### ii) アゾコラーゲン分解試験

アゾコラーゲン (シグマ社製) を基質として用い、1%アゾコラーゲン溶液 (50 mM トリス塩酸緩衝液-1 mM 塩化カルシウム pH 7.5) 2.5 ml に粗酵素溶液 0.1 ml を加え、37℃で 30 分反応させた。これに、15%トリクロロ酢酸 2.5 ml を加えて反応を停止させ、遠心分離 (3,500 rpm, 10 min, 4℃) した。上清を 520 nm にて測定し、吸光度 0.1 の上昇を 1 ユニットに換算し 1 ml あたりの酵素活性とした。

##### (7) 分離微生物の同定<sup>22)</sup>

アゾカゼイン及びアゾコラーゲンを基質としたときに、強いプロテアーゼ活性を示した菌株の形態観察、生理生化学的性状の検討を行った。さらに、API バイオタイプ (日本ビオメリュー社製) を用いた生化学試験<sup>23)</sup> 及び Berbey's Manual<sup>24)</sup> に準拠して菌種の同定を行った。

また、同定した微生物についてイソプレノイドキノンの分析<sup>25)</sup>、グアニン+シトシン (G+C) 含量の測定<sup>26)</sup> 及び 16S rRNA の遺伝子解析<sup>27/28)</sup> を行った。

##### (8) 粗酵素溶液を用いた米タンパク質の分解

米抽出タンパク質 0.5 ml に、コラーゲン陽性株の粗酵素溶液を加え、37℃で 10 分間反応後、0.1 N の塩酸を加えて反応を停止した。

また、粗酵素溶液の代わりに蒸留水を 0.1 ml 加えて同様に操作したものを対照区とした。

酵素反応後の米抽出タンパク質及び対照区のタンパク質泳動パターンを SDS-PAGE により観察した。

### 3. 結果及び考察

#### (1) 原料米及び発酵米麺のアレルゲンタンパク質について

Yangon, Inle, Myitkyina, Putao の 4 地域で採取した原料米及び発酵米麺製造中の塩可溶性タンパク質の変化を、SDS-PAGE 及びイムノブロットにより検討した (Fig. 1)。

CBB 染色したゲルにおける原料米のタンパク質泳動パターンは、採取地域により異なっていた。Yangon, Myitkyina の原料米では 20-29 kDa のタンパク質が濃く現れていたが、Putao の米ではほとんどみられず、使用米の品種<sup>29)</sup> の違いがタンパク質の泳動パターンの違いに現れていた。しかし、今回、対象とした 14-16 kDa のアレルゲンタンパク質のバンドは、いずれの地域の原料米でも明確に確認することができ、この 14-16 kDa のタンパク質はミャンマーで採取した米に

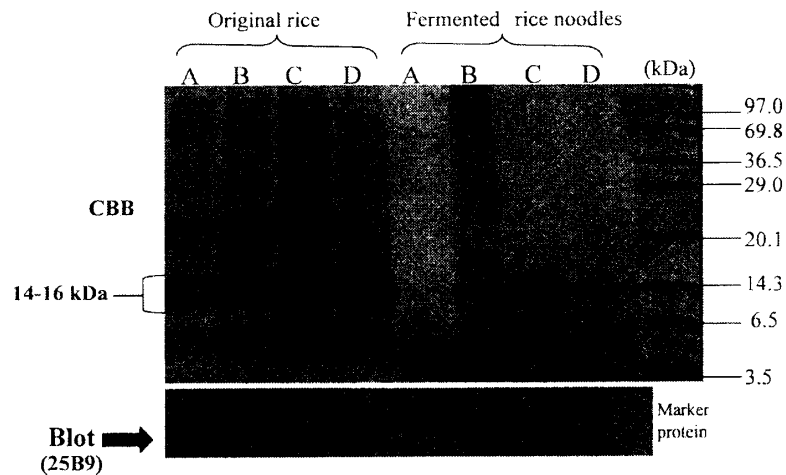


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblotting analyses of fermented rice noodles

共通する主要タンパク質であった。

一方、各原料米より製造した発酵米麺のタンパク質泳動パターンは、いずれの発酵米麺でも 20 kDa 以上のタンパク質が消失し、14-16 kDa のタンパク質が半減していた。また、6.5 kDa 以下のバンドが新たに現れていた。この変化が顕著に現れていた Yangon の米麺は、シトギを作る工場と麺を作る工場が異なり、シトギを出荷してから 2~3 日後に製麺されていた。よって、シトギにしてからの放置時間が長く、タンパク質の分解が顕著に現れていたと考えられる。

さらに、米の 14-16 kDa のアレルゲンに対するモノクローナル抗体を用い、イムノブロット法によりアレルゲンタンパク質の検出を行った結果、いずれの原料米でも PVDF 膜上に、アレルゲンタンパク質の存在を示すバンドが検出されたが、発酵米麺ではみられなかった。米から麺になる製造過程での米タンパク質の分解、さらに 14-16 kDa のアレルゲンタンパク質の変化が明らかとなった。

ELISA 法により測定した米アレルゲンタンパク質量を、原料米を基準とした相対値で表したものを Fig. 2 に示した。原料米と発酵米麺の相対アレルゲンタンパク質量を比較すると、発酵米麺のアレルゲンタンパク質量は、Yangon では原料米の 28.07%、Inle では 33.97%、Myitkyina では 12.98%、Putao では 23.08% に減少しており、イムノブロットで示された発酵米麺のアレルゲン低減化を裏付ける結果であった。

#### (2) プロテアーゼ産生微生物の選択

発酵米麺のアレルゲン低減化がブロッティングによる検出及び ELISA 値により明らかとなったため、こ

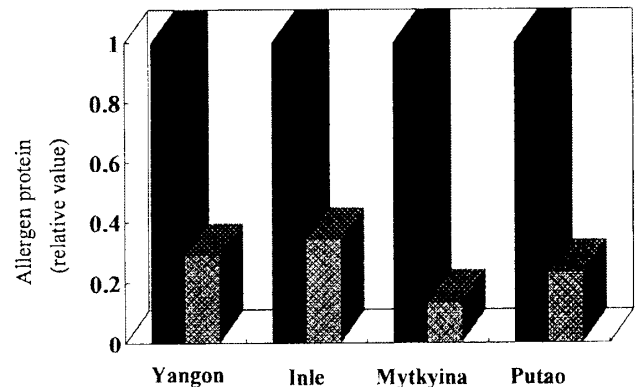


Fig. 2. Evaluation of the allergenic protein contents by ELISA

■ Original rice; ▨ Fermented rice noodles.

の分解に関与しているプロテアーゼ産生微生物の検索を試みた。

各選択培地から分離した微生物は、普通寒天培地より 68 株、LBS 寒天培地より 13 株、DHL 寒天培地より 13 株、TATAC 寒天培地より 15 株、Potetodextorose 寒天培地より 15 株の計 124 株であり、発酵米麺製造工程には、*Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属、*Enterobacteriaceae* 属、*Streptococcus* 属、Yeast, mold などの微生物が普遍的に存在していることが明らかになった。また、これらの微生物の中からプロテアーゼ産生微生物を検索するために、ゼラチン液化試験を行った。

普通寒天培地分離微生物は 68 株中 36 株がゼラチン液化陽性であり、LBS, DHL 寒天培地分離微生物では各 3 株、TATAC 寒天培地分離微生物では 2 株、Potetodextorose 寒天培地分離微生物では 1 株、計 45

## 発酵米麺のアレルゲンタンパク質とプロテアーゼ産生微生物について

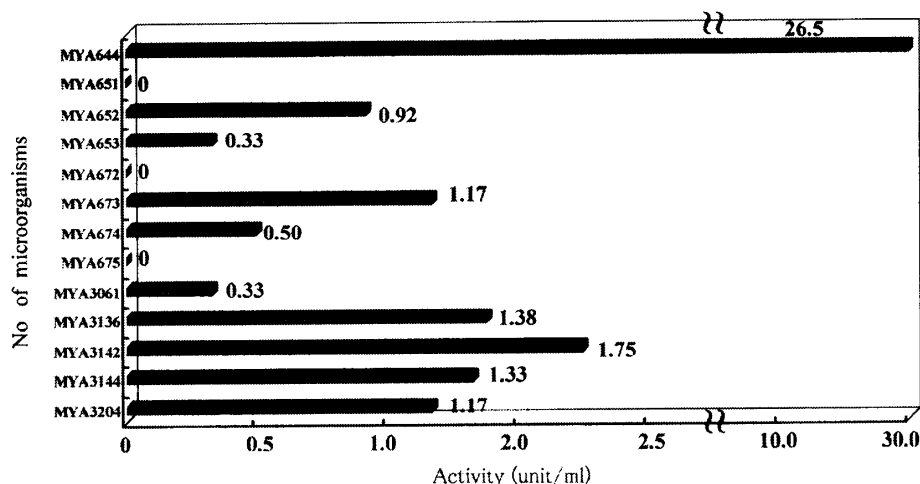


Fig. 3. Protease activity of each culture broth for azocasein

株が陽性を示した。また、ゼラチン液化陽性微生物 45 株について、コラーゲン分解試験を行った結果、普通寒天培地から分離した 22 株がコロニー周辺にハローを形成した。

## (3) 分離微生物のプロテアーゼ活性

これまでに、食品由来の微生物でタンパク質の疎水性部分を分解する微生物として *Bacillus* 属<sup>30)31)</sup> を報告しており、いずれも普通寒天培地から分離されたこと、また、今回、選択培地 (LBS, TATAC, DHL, Potetodextrose) から分離した微生物の中に、米抽出タンパク質を基質としたときに、プロテアーゼ活性を示す菌株が見出せなかったことにより、普通寒天培地から分離した微生物を対象に、アゾカゼイン、アゾコラーゲンを基質としてプロテアーゼ活性を測定した。

コラーゲン分解陽性を示した 22 株のうち、15 mm 以上のハローを形成した菌株は、MYA644, MYA651, MYA652, MYA653, MYA672, MYA673, MYA674, MYA675, MYA3061, MYA3136, MYA3142, MYA3144, MYA3204 の計 13 株であり、これらの菌株が産生した粗酵素溶液をプロテアーゼ活性試験に用いた。試験に供した 13 株のうち MYA651, MYA672, MYA675 の 3 株は、アゾカゼインを基質としたとき、プロテアーゼ活性を示さなかったが、活性を示した 10 株のなかの半数以上は 1.0 ユニット以上の値を示した (Fig. 3)。なかでも Inle の浸漬米より分離された MYA644 株は 30 分の反応で 26.5 ユニット/ml という非常に高い活性を示した。

さらに、アゾカゼインを基質としたときに 1 ユニット以上の活性を示した MYA644, MYA673, MYA3136, MYA3142, MYA3144, MYA3204 株の粗酵素

溶液を用い、アゾコラーゲンを基質としたプロテアーゼ活性試験を行った結果を Fig. 4 に示した。MYA673, MYA3142, MYA3144, MYA3204 株の活性は 6.8~9.6 ユニット/ml であり、やや強い活性がみられた MYA3136 でも 15.2 ユニット/ml であった。しかし、MYA644 株は、アゾコラーゲンを基質としても 30 分間の反応で 116 ユニット/ml と著しく高い活性を示したことから、MYA644 株の産生酵素は、コラーゲンを基質としたとき、最も高い活性が認められ、タンパク質の疎水性部分を分解する能力を有することが確認できた。

MYA644 株を分離した Inle のシトギは、浸漬日数を長くすることで米を軟化させ、機械を使わず手で潰して作るという最も古典的な手法を用いて製造されていた。このため、他の地域と比較すると米の浸漬やシトギの水切りに長い時間をかけており、製造の初期段階から米タンパク質への微生物の関係も大きいと考えられた。

## (4) 分離微生物の同定

プロテアーゼ産生能の強い分離微生物 MYA644 株は、タイプカルチャーである *Bacillus subtilis* ATCC 6051 より生育温度が高く、L-アラビノース、D-キシロースからの酸生成、クエン酸の分解で異なる性状を示したが、その他の性状は *Bacillus subtilis* と一致した。また、DNA の G+C 含量は 43 mol%, 主要キノンは MK-7 であった。さらに、16S rRNA の遺伝子解析においても既知の *Bacillus subtilis* の全塩基配列<sup>32)</sup> と 99 % の相同性を得たため、本微生物を *Bacillus subtilis* MYA644 株とした。

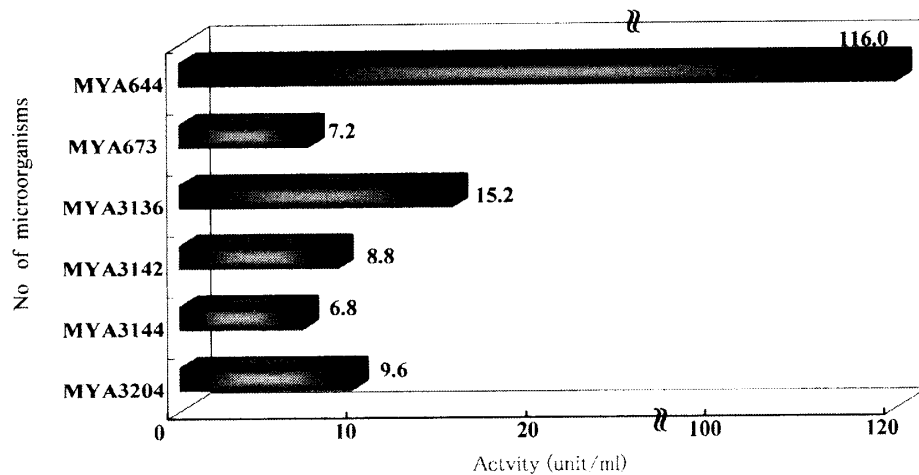
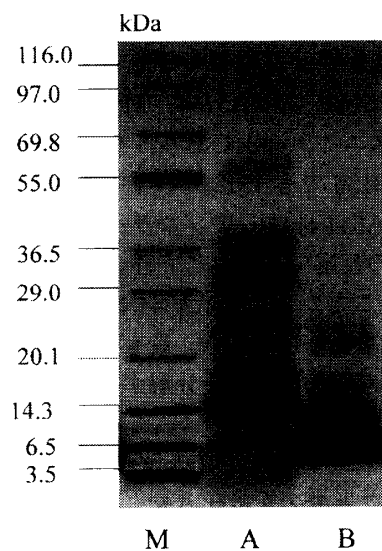


Fig. 4. Protease activity of each culture broth for azocollagen

Fig. 5. SDS-PAGE patterns of rice protein metabolites for *Bacillus subtilis* MYA644

A: control; B: enzyme for *Bacillus subtilis* MYA644; M: marker protein.

(5) *Bacillus subtilis* MYA644 株産生酵素を用いた米抽出タンパク質の分解

*Bacillus subtilis* MYA644 株の粗酵素溶液を米抽出タンパク質に作用させ、その分解能を SDS-PAGE により確認した結果を Fig. 5 に示した。

米抽出タンパク質に *Bacillus subtilis* MYA644 株産生酵素を作用させたときには 20 kDa 以上のタンパク質バンドがほとんどみられず、米の主要アレルゲンとして検出された 14.3 kDa 付近のバンドも減少し、代わって 14.3 kDa 以下のバンドが凝集して現れていた。これは、発酵米麴の泳動パターンと同じ挙動<sup>3</sup>であり、

*Bacillus subtilis* MYA644 株が、米のタンパク質を低分子化すると共に、14-16 kDa のアレルゲンタンパク質を分解する能力を有することを示唆していると考えた。

*Bacillus subtilis* は自然界に広く分布している細菌であるが、非病原性の細菌であり、タンパク質、デンプン分解酵素を産生するため食品工業<sup>33, 35)</sup>にも活用されている。また、長野らは、伝統発酵食品であるラオスやベトナムの魚醬、モンゴルの小麦粉発酵食品から、タンパク質の疎水部分を分解する酵素を産生する *Bacillus subtilis*<sup>30, 31)</sup> を分離しており、これらのプロテアーゼを用いたアレルゲン低減化の可能性を示唆している。また、アレルゲンを低減化すると報告されているプロテアーゼ N<sup>36)</sup> は *Bacillus subtilis* 由来の酵素であることから、今回、分離した *Bacillus subtilis* MYA644 株も、プロテアーゼ産生機構を明らかにし、食品工業への応用を検討する価値があると考ええる。

米アレルゲンタンパク除去の研究は数多く報告されているが、これまでの研究は、既存の酵素を用いたもの<sup>37)</sup>や、育種の段階での突然変異株を利用したもの<sup>38)</sup>であり、製造コストも高価であった。しかし、本研究で明らかとなった発酵による米の主要アレルゲンタンパク質の除去は新しい知見であるため、さらに他のアレルゲンタンパク質に対しても検討の余地があると考えられる。

このように、人々が長い間、食し続けた自然発酵食品の生活の知恵を再認識すると共に、日本ではまだ馴染みの薄い発酵米麴を、アレルゲン低減化食材として普及させることで、米アレルギー患者や学校給食における米の使用にも有効であり、我が国における米の消

## 発酵米麺のアレルゲンタンパク質とプロテアーゼ産生微生物について

費拡大にもつながると考える。

今後、既存の酵素を用いたときのアレルゲンタンパク質の抑制率の比較も検討していきたいと考える。

## 4. 要 約

ミャンマーの発酵米麺のアレルゲンタンパク質量の測定と、アレルゲンタンパク質の分解に関与しているプロテアーゼ産生微生物の検索を行った。

(1) モノクローナル抗体を用い、原料米と発酵米麺のアレルゲンタンパク質量を測定した結果、発酵米麺のアレルゲンタンパク質量は原料米の10~30%に減少していた。

(2) 発酵米麺製造工程より採取した試料から124株の微生物を分離し、プロテアーゼ活性試験を行った結果、タンパク質分解能の優れた *Bacillus subtilis* MYA644 株を見出すことができた。

(3) *Bacillus subtilis* MYA644 株産生酵素を米抽出タンパク質に作用させ、SDS-PAGE でタンパク質の挙動を観察した結果、*Bacillus subtilis* MYA644 株は、米抽出タンパク質を低分子化し、米の主要アレルゲンタンパク質も分解していた。

本研究を遂行するにあたり、モノクローナル抗体 25 B9 をご提供いただきました、名古屋大学大学院生命農学研究科教授 松田幹先生に感謝申し上げます。

## 引 用 文 献

- 1) 内村 泰, 高尾哲也, 菊池孝治, 新村洋一, 岡田早苗, 小原直弘, Wiwut Daengsubaha, 小崎道雄: タイ国発酵米麺 (Khanom Jeen) 中の乳酸菌の同定, 日食科工誌, **38**, 465-475 (1991)
- 2) 加藤みゆき, 関 宏美, 長野宏子, 阿久澤さゆり, 池田昌代, 大森正司, 荒井基夫: ミャンマーにおける発酵米麺 (モヒンガー) の製造上の特色, 食生活学会誌, **12**, 274-278 (2001)
- 3) 池田昌代, 加藤みゆき, 長野宏子, 阿久澤さゆり, 大森正司: ミャンマーにおける発酵米麺 (モヒンガー) の成分と微生物の特徴, 家政誌, **54**, 263-269 (2003)
- 4) 長野宏子, 安藤純子, 粕谷志郎, Le Van Nhung, To Kim Anh, 川口剛司, 住谷順一, 荒井基夫, 庄司善哉, 飯淵貞明, 大森正司, 加藤みゆき, 田中直善: ベトナムにおける米を利用した伝統食品, 食生活研究会, **22**, 23-30 (2001)
- 5) 小崎道雄: 東南アジアの伝統発酵食品に関する微生物学的研究, 日食科工誌, **38**, 651-661 (1991)
- 6) 石毛直道: 『ケネス・ラドル: 魚醬とナレズシの研究』, 岩波書店, 東京, 11 (1990)
- 7) 包啓安: 中国の乳腐, 醸協, **82**, 167-174 (1987)
- 8) 金鳳燮: 中国の味噌様大豆発酵食品 (醬, 乳腐) について, 醸協, **87**, 629-634 (1992)
- 9) 角野 猛, 遠藤英子, 影山志保, 千原理沙, 山田幸二: 腐乳の諸成分及び微生物について, 日調科誌, **36**, 157-163 (2003)
- 10) Shibasaki, M., Suzuki, S., Nemoto, H., and Kuroume, T.: Allergenicity and Lymphocyte-Stimulating Property of Rice Protein, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **64**, 259-265 (1979)
- 11) Usui, Y., Nakase, M., Hotta, H., Urisu, A., Aoki, N., Kitajima, K., and Matsuda, T.: A 33-kDa Allergen from Rice (*Oryza sativa* L. Japonica), *J. Biol. Chem.*, **27**, 11376-11381 (2001)
- 12) Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R., and Torii, S.: Purification and Properties of an Allergenic protein in Rice Grain, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1465-1470 (1988)
- 13) Izumi, H., Sugiyama, M., Matsuda, T., and Nakamura, R.: Structural Characterization of the 16-kDa Allergen, RA 17, in Rice Seeds. Prediction of the Secondary Structure and Identification of Intramolecular Disulfide Bridges, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2059-2063 (1999)
- 14) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.: Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979)
- 15) Matsuda, T., Watanabe, K., and Nakamura, R.: Ovomucoid and Ovoinhibitor Isolated from Chicken Egg White Are Immunologically Cross-Reactive, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 75-81 (1983)
- 16) 光岡知足: 『腸内細菌の世界』, 叢文社, 東京, 53-92 (1980)
- 17) Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 18) Kyhse-Andersen, J.: Electroblotting of Multiple Gels: A Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide to Nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209 (1984)
- 19) 谷村和八郎 (監修): 『生活微生物基礎実験』, 地人書館, 東京, 112-113 (1988)
- 20) Hisano, T., Abe, S., Wakashiro, M., Kimura, A., and Murata, K.: Isolation and Properties of Collagenase with Caseinolytic Activity from *Pseudomonas* sp., *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 399-403 (1989)
- 21) Maeda, T., Takagi, M., and Imanaka, T.: Purification and Characterization of New Metal Protease Which Hydrolyzes the Cyclic Decapeptide, Gramicidin S, *J. Ferment. Bioeng.*, **75** (3), 173-177 (1993)
- 22) Gordon, R. E., Haynes, W. C., and Pang, C. H. N.: *The Genus Bacillus*, Agricultural Handbook, No. 427, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C., 1-283 (1973)
- 23) Logan, N. A., and Berkeley, R. C. W.: Identification of

- Bacillus* Strains Using the API Systems, *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1871-1882 (1984)
- 24) Claus, D., and Berkeley, R. C. W.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (ed. by Sneath, P. H. A., Mair, N. S., and Sharp, M. E.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1105-1139 (1986)
  - 25) Komagata, K., and Suzuki, K.: Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics, *Methods Microbiol.*, **19**, 161-207 (1987)
  - 26) Tamaoka, J., and Komagata, K.: Determination of DNA Base Composition by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125-128 (1984)
  - 27) Takagi, H., Shida, O., Kadowaki, K., Komagata, K., and Udaka, S.: Characterization of *Bacillus brevis*, with Description of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 221-231 (1993)
  - 28) Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., and Komagata, K.: Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 939-946 (1996)
  - 29) 松野 正, 藤田雅史: ビルマ稲作生産性に関する調査研究—第2報 米作生産体制と市場・流通構造—, 熱帯農業, **30**, 229-241 (1986)
  - 30) Nagano, H., and To Kim, A.: Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 181-183 (2000)
  - 31) Tran, L. H., and Nagano, H.: Isolation and Characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and Its Collagenase Production, *J. Food Sci.*, **67**, 1184-1187 (2002)
  - 32) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new Generation of Protein Database Search Programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402 (1997)
  - 33) Kim, H. Y., and Park, K. H.: Characterization of Bacterial Alpha-Amylase by Determination of Rice Starch Hydrolysisproduct, *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, **29**, 248-254 (1986)
  - 34) Loey, A. M. van, Haentjens, T. H., Hendrickx, M. E., and Tobback, P. P.: The Development of an Enzymic Time Temperature Integrator to Assess Thermal Efficacy of Sterilization of Low-Acid Canned Foods, *Food Biotechnology*, **11**, 147-168 (1997)
  - 35) Fernandez-Garcia, E., Lopez-Fandino, R., Alonso, L., and Ramos, M.: The Use of Lipolytic and Proteolytic Enzymes in the Manufacture of Manchego Type Cheese from Ovine and Bovine Milk, *J. Dairy Sci.*, **77**, 2139-2149 (1994)
  - 36) Yamanishi, R., Tsuji, H., Emoto, S., and Ogawa, T.: Reduction of the Allergenicity of Soybean by Treatment with Proteases, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **42**, 581-587 (1996)
  - 37) Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Y., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T., and Arai, S.: Production of Hypoallergenic Rice by Enzymatic Decomposition of Constituent Proteins, *J. Food Sci.*, **55**, 781-783 (1990)
  - 38) 西尾 剛, 飯田修一: 米蛋白質の改変—低グルテリン米・低アレルギー米の育種—, 研究ジャーナル, **18** (1), 41-45 (1995)