

動物性たん白質食品中に混和された植物性たん白質の定量的検出（その2）酵素標識免疫定量法（ELISA）による加工大豆たん白質の定量的検出

STUDY ON QUANTITATIVE DETECTION OF SOYBEAN PROTEIN ADMIXED WITH PROCESSED MEAT PRODUCTS: ENZYME-LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY OF HEAT PROCESSED SOYBEAN PROTEIN

安本教傳・和辻 徹・須戸 幹・等々力博志・鈴木鐵也（京都大学食糧科学研究所）

Kyoden YASUMOTO, Toru WATSUJI, Miki SUDO, Hiroshi TODORIKI and Tetsuya SUZUKI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

Various methods have been employed for the quantitative detection of plant proteins admixed with meat products. Most of the methods so far employed, however, have proved quite untenable for quantitation of plant proteins contained in heat-processed meat products. The present paper reports the quantitative determination of the heat denatured soybean proteins by measurement of a heat stable penta-peptide designated "SP-1", which derives from a basic subunit of soybean 11S globulin. SP-1 was detected by enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). Anti SP-1 antibody was raised in mouse by injecting into the abdominal cavity the SP-1 conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) in complete Freund adjuvant. Animals were boosted weekly for 4 weeks. The ascitic fluids were withdrawn periodically and purified by passing through a KLH-linked Sephadex column. Purified SP-1 ranging from 0.1 to 640 ng/ml gave a quantitative response when evaluated from the enzyme activity of anti-mouse IgG-peroxidase conjugate bound to the immobilized KLH-SP-1 antigen in competition with added free SP-1 and produced a workable calibration curve. Soybean protein isolate which was autoclaved and subsequently digested with trypsin could be quantitated by the competitive ELISA. Satisfactory results were also obtained for defatted soybean flakes after heat treatment and subsequent trypsin digestion. A very poor response was observed with the soybean protein and flakes when assayed before trypsin digestion. The experimental results presented in this paper allowed us to conclude that competitive ELISA for a specific peptide SP-1 can be used as a sensitive and specific tool to quantitate 11S soybean proteins in the heat processed products. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 7, 18-21, 1986.

動物性たんぱく質を主原料とする加工食品に、テクスチャ改善のためのバインダー、水分や油脂の保持能向上、栄養バランスの改善、あるいはたん白質含量

の増加などの目的で大豆たん白質や小麦たん白質が、混和されていることは良く知られている。かかる加工食品のうち、たん白質の変性や部分的分解などが避け

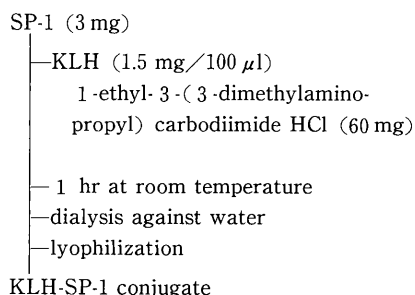
られない高温、強酸、強アルカリなどの条件下で加工、製造されたものでは、混和された植物性たん白質を正確に検出、定量することは極めて難しい。しかしながら、加工食品の品質管理のうえからも、又、食品栄養学的見地からも、混和された異種たん白質の高感度定量的検出法を開発することが重要な課題のひとつになっている。筆者らはこのような認識に立って、動物性たん白質食品中に混和された植物性たん白質の定量的検出法を確立する研究を進めている。

動物性たん白質中に混和された大豆たん白質を定量的に検出する方法の開発に関しては従来から数多くの研究報告がある。¹⁻¹³⁾ 未変性大豆たん白質の定量的検出法に関しては、ある程度実用に供し得る成績が得られているが、加熱変性大豆たん白質については、信頼に足る定量的検出法は確立されていない。本報告は、大豆 11S グロブリン中に含まれる特異的なアミノ酸シーケンスに由来するペンタペプチド SP-1^{14,15)}が、加熱変性プロセスに安定であることに着目して、SP-1 についての酵素標識免疫定量法 (ELISA) によって、加熱変性大豆たん白質の定量的検出が可能かどうかについて検討したものである。

実験方法

1. 大豆 11S グロブリン中に見い出される特異ペプチド SP-1 抗体の調製ならびに精製

1.1. SP-1 の調製と抗 SP-1 抗体の調製：低温脱脂大豆から単離精製した 11S グロブリン¹⁶⁾を、Bailey の方法¹⁷⁾によって、120℃、3 時間オートクレープの後、トリプシン消化を行って限定加水分解した後、限外ろ過、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを行って SP-1 を単離した¹³⁾。このようにして単離した SP-1 標品および化学合成によって得た SP-1 標品を、スキーム 1 に示す手順で keyhole limpet (カサ貝) へ



Scheme 1. Preparation of KLH-SP-1 conjugate by a modification of the method of Goodfriend et al.¹⁸⁾

モシアニン (KLH) との結合体とした後、Tung らの方法¹⁹⁾によってマウスに抗 SP-1 抗体を産生させた。すなわち、KLH-SP-1 結合体を Freund の完全アジュバンドを含むリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した後、マウス一匹当たり 500 μg の抗原を含むエマルジョン 0.2 ml を 0, 1, 3, 4 週目に腹腔内に注射し、4 週目以後に抜き取った腹水について SP-1 抗体の力価を検定後、精製して ELISA に使用した。

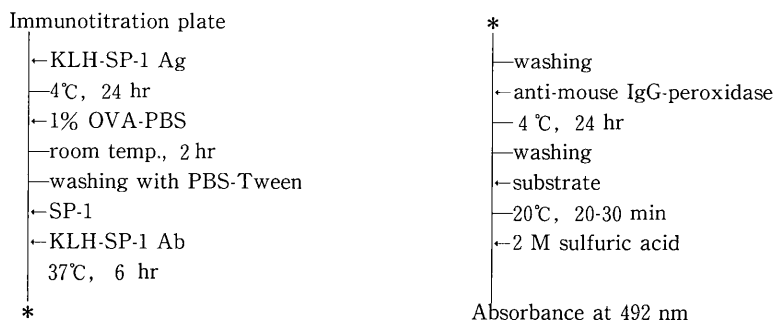
1.2. 抗 SP-1 抗体の精製：マウス腹水中から、KLH をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより、抗 KLH-SP-1 抗体 [glutaraldehyde (GAD) 処理] を精製した。

2. ELISA による大豆たん白質中の特異ペプチド SP-1 の定量

ELISA 法による SP-1 の定量は、阻害法と競合法について試みた²⁰⁾。競合法による SP-1 定量操作の概要をスキーム 2 に示した。

3. 抗 SP-1 抗体を用いた ELISA 法による加熱加工大豆たん白質の定量

分離大豆たん白質並びに低温脱脂大豆を加熱処理したのち、トリプシンによる限定加水分解を行って得られた加水分解産物を抗 SP-1 抗体を用い、競合法によ



Scheme 2. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of soybean protein by using anti-KLH-SP-1 antibody

る ELISA を行い、SP-1 が定量的に検出されるか否かを検討した。

分離大豆たん白質 (Fujipro R) 並びに低温脱脂大豆フレークを、それぞれオートクレーブを用いて、120℃、3 時間加熱した後、試料に対し 1% 濃度のトリプシンによる 24 時間の限定加水分解をおこなった。異なる濃度の限定加水分解物を抗 SP-1 抗体による ELISA に供した。

結果と考察

1. 抗 SP-1 抗体を用いた ELISA 法での特異ペプチド SP-1 に対する検量曲線

アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した抗 KLH-SP-1 抗体 (GAD 処理) を用い、阻害法並びに競合法による SP-1 に対する検量線を作成し定量性を調べた結果を Fig. 1 に示した。抗 KLH-SP-1 抗体は 100 倍希釈したものを用いた。Fig. 1 から判るように SP-1 濃度 0.1 ng/ml から 640 ng/ml の範囲で直線性が認められた。

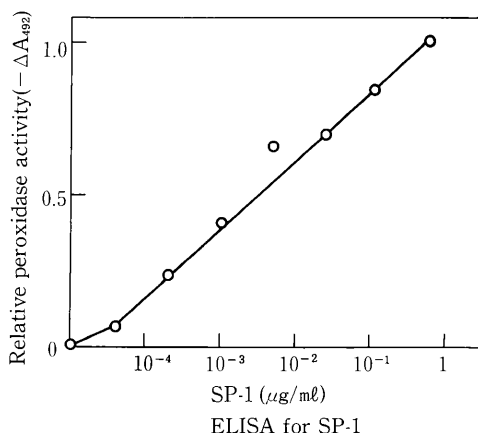


Fig. 1. Standard curve of soybean pentapeptide "SP-1" in competition ELISA. The assay was run as described in Scheme 2. Ordinate, assay response (peroxidase activity) expressed in terms of absorbance changes at 492 nm; abscissa, SP-1 added (μg/ml).

2. 抗 SP-1 抗体を用いる ELISA 法による加熱大豆たん白質の定量

分離大豆たん白質 (Fujipro R) 並びに脱脂大豆フレークを高温 (120℃、3 時間) で、加熱変性させた後、トリプシンにより限定加水分解した試料について、抗 KLH-SP-1 抗体を用いる ELISA による定量的検出が可能かどうかを競合法並びに阻害法を用いて検討を行った。その結果、競合法では Fig. 2 に示す様に分離

大豆たん白質 (Fujipro R)、脱脂大豆たん白質の加熱処理、限定加水分解物については、それぞれ 10 ng/ml から 6,400 ng/ml および 50 ng/ml から 6,400 ng/ml の範囲で定量性を示すことが判った。

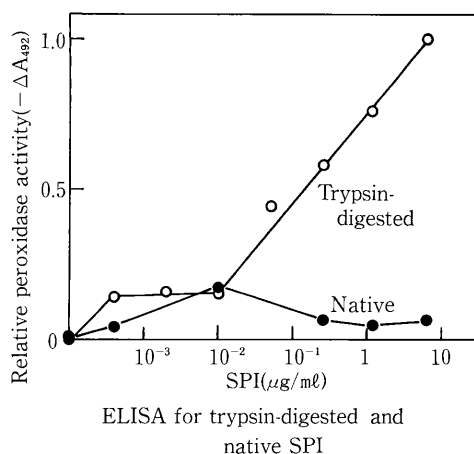


Fig. 2. Titration curves in competition ELISA for soybean protein isolate before and after autoclaving (120°C, 3 hr) and trypsin digestion (37°C, 24 hr). The assay was run as described in Scheme 2. Ordinate, assay response (peroxidase activity) expressed in terms of absorbance changes at 492 nm; abscissa, soybean protein isolate added (μg/ml).

一方、加熱処理も限定加水分解も行わなかった分離大豆たん白質では、全く定量性は得られなかった。この結果は高温処理、限定加水分解を行っても大豆ペプチド SP-1 は、抗原性を失うことは無く、ELISA 法との組み合わせにより、加熱加工大豆たん白質の定量が可能であることを示している。また、限定加水分解を行わなかった分離大豆たん白質が定量性を示さなかったのは、限定加水分解をすることなくしては SP-1 と抗 SP-1 抗体との間の抗原-抗体反応が起こらないことを示しており、ELISA 法による定量を標準化する際にトリプシンによる限定加水分解が必要不可欠なプロセスであることを示している。

これまでも免疫法による動物性食品に混和された大豆たん白質の定量的検出法がいくつか提唱されてきたが、それらはいずれも未加熱あるいは比較的低温での加熱加工大豆たん白質⁹⁾について得られたもので、100℃を越える高温での加熱加工大豆たん白質については良い結果は得られていなかった。今回、筆者らが得た結果は、抗体価の点で不満は残っているが、特異ペプチド SP-1 とその抗体を用いる ELISA 法によ

て、高温加熱加工した大豆たん白質でも定量的検出が可能であることを示すものである。現在、実用に供しうる標準法を設定するための基礎データを収集中である。

文 献

- 1) Parsons, A. L. and Lawrie, R. A. (1978) : Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products. *J. Food Technol.*, **7**, 455-492.
- 2) Guy, R. C. E., Jayaram, R. and Willcox, C. J. (1973) : Analysis of commercial soya additives in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1551-1563.
- 3) Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E. C. and Briskey, E. J. (1975) : Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends. *J. Food Sci.*, **40**, 380-383.
- 4) Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E. C. and Forsythe, R. H. (1976) : Detection of various nonmeat extenders in meat products. *J. Food Sci.*, **41**, 589-593.
- 5) 橋詰和宗, 野口明德(1978) : 動物蛋白食品に加えられた植物蛋白質の鑑別法として SDS ゲル電気泳動法の検討. 日本食品工業学会誌, **25**, 628-634.
- 6) 橋詰和宗, 小原忠彦, 安藤洋子(1978) : 尿素系ポリアクリルアミドゲル電気泳動による動物蛋白食品に加えられた植物蛋白質の鑑別. 日本食品工業学会誌, **25**, 635-640.
- 7) Armstrong, D. J., Richert, S. H. and Rieman, S. M. (1982) : The determination of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products. *J. Food Technol.*, **17**, 327-337.
- 8) Llewellyn, J. W., Dean, A. C., Sawyer, R., Bailey, F. J. and Hitchcock, C. H. S. (1978) : The determination of meat products by peptide analysis. *J. Food Technol.*, **13**, 249-252.
- 9) Koh, T. Y. (1978) : Immunochemical method for the identification and quantitation of cooked or uncooked beef and soya proteins in mixtures. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment*, **11**, 124-128.
- 10) Flint, F. O. and Meech, M. V. (1978) : Quantitative determination of texturized soya protein by a sterological technique. *Analyst*, **103**, 252-258.
- 11) Lindqvist, B., Ostgren, J. and Lindberg, I. (1975) : A method for the identification and quantitative investigation of denatured proteins in mixtures based on computer comparison of amino acid patterns. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **159**, 15-22.
- 12) Eldridge, A. C. and Holmes, L. G. (1975) : Evaluation of a fluorometric technique for quantitative determination of soy flour in meat-soy blends. *J. Food Sci.*, **44**, 763-764.
- 13) 安本教傳, 等々力博志, 鈴木鐵也(1985) : 動物性たん白質食品中に混和された植物性たん白質の定量的検出. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **6**, 21-27.
- 14) Bailey, F. J., Llewellyn, J. W., Hitchcock, C. H. S. and Dean, A. C. (1978) : The determination of soy protein in meat products using peptide analysis and the characterization of the specific soya peptide used in the calculations. *Chem. & Ind.*, No. 13, 477-478.
- 15) Staswick, P. E., Hermanson, M. A. and Nielsen, N. C. (1984) : The amino acid sequence of the A²B^{1a} subunit of glycinin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13424-13430.
- 16) Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1976) : Major proteins of soybean seeds. A straightforward fraction and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117-1121.
- 17) Bailey, F. J. (1976) : A novel approach to the determination of soya protein in meat products using peptide analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 827-830.
- 18) Goodfriend, T. L., Levine, L. and Fasman, G. D. (1965) : Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science*, **144**, 1344-1346.
- 19) Tung, A. S., Ju, S-T., Sato, and Nisonoff, A. (1976) : Production of large amounts of antibodies in individual mice. *J. Immunol.*, **116**, 676-681.
- 20) 西岡久寿弥, 嶋田孝吉, 真崎知生編(1985) : 役に立つ免疫実験法. p.72, 講談社.