

食品の機能性成分の分離精製法

柳 内 延 也

東海物産株式会社

1. はじめに

20年以前、非生産的になった採卵鶏は廃鶏として産業廃棄物化していた時代があった。肉質と味がブロイラーより劣るという理由である。また、鶏の胸肉も日本人の嗜好に合わないという理由で、極めて低価格で販売されてきた。

さらに野菜や海藻を原料とする調味料の製造過程においても未利用資源は多く発生する。例えば、玉ネギでは外皮と鱗茎の上下端は常に廃棄されている。また、だしなどの原料になる昆布は旨味成分を抽出した後の残滓が廃棄される。

しかし、廃棄される食品素材には可食部と同等の健康機能性成分が含有されているので、筆者らはこれら未利用資源を有効活用するために、廃棄素材から機能性成分を分離・離精する技術の開発を行ってきた。また、少子高齢化が深刻化する現代にあって、食品中の生活習慣病予防効果が期待される機能性成分を分離・精製し、高濃度化することも重要である。通常、食品素材中の機能性成分含量は、それらの機能が十分に発揮できる量を含むわけではないので、その健康効果を十分に発揮させるためにも有害になる成分を除去しながら安全性の高い機能性成分の濃縮が重要になってくる。この目的のためにも食品中の機能性成分の分離・精製技術の開発は欠かせないものと考えられる。分離精製のもうひとつの利点として、素材がもつ味や匂いの影響を軽減できることがある。未精製の状態でこれら天然素材を利用すると、その素材がもつ風味の影響を強く受ける。したがって、素材とは関連しないその他の食品へこれら機能性成分を添加・補強するなどの応用が制限されてしまうことがある。例えば、鶏肉エキスはラーメンスープに適しているが、清涼飲料水やデザート類には適さないという問題である。生活

習慣病を予防する目的で食品の機能性成分を広範囲な食品へ応用する上で、機能性成分の分離・精製技術の開発はこれからも重要になってくると思われる。

本稿では疲労回復や記憶力改善効果が期待される鶏肉中のイミダゾールジペプチド [1] を中心に、イオン交換樹脂による分離とナノろ過膜処理による精製を組み合わせた機能性ジペプチドの分離精製技術 [2] と限外ろ過膜によるアレルギー低減法 [5] について紹介したい。

2. チキンエキスのイオン交換クロマトグラフ

廃鶏の内臓を除去した中抜き屠体に水を加え、100℃、4時間加熱して得られるチキンエキス中には、タンパク質、遊離アミノ酸、有機物および無機物（塩類）が含有される。本稿の主題である機能性成分として、β-アラニンとL-ヒスチジンから構成される抗酸化活性をもったイミダゾールジペプチドがある。鶏肉のイミダゾールジペプチドはアンセリンとカルノシンとよぶ2種類のイミダゾールジペプチドが3:1の割合で混合して存在しているが（以下AC_{mix}と略記）、チキンエキス固形分の約5~10%を占める。

pH5.0の緩衝液で平衡化した陽イオン交換体へ同様にpH5.0に調整したチキンエキスを通液してAC_{mix}を吸着させることにより他の成分とAC_{mix}とを分離することができる。次に、pHを上昇させるとpK3が9.51のAC_{mix}はpH8~pH10の範囲でイオン交換体から遊離するので、アルカリ溶液によりイオン交換体から溶出・回収することができる（図1）。ここで使用する強酸性陽イオン交換体としては、市販されているDowex 50X, Lewatit S-100,あるいはDiaion SK1Bなどがいずれも同等の分離性能をもっているため利用することができる。

チキンエキスに含まれる物質の分子量分布をGPC-HPLC（ゲルろ過, TSK2500-PWX1カラム, 検出波長210 nm）で分析すると、図2に示す通りである。未処理のチキンエキスに含有されていたタンパク質、遊離アミノ酸および塩類のほとんどがイオン交換体非吸着画分として分離されており、アルカリ溶液によって溶出回収された画分には主としてAC_{mix}とクレアチニンが含有されている（図2B）。AC_{mix}の固形物あたりの純度は未精製原料の10%程度から60~70%に上昇する。

著者略歴

柳内延也

1970年 東北大学農学部農芸化学科卒業

森永乳業(株)生物科学研究所主席研究員

東海物産(株)特別研究員（現職）医学博士

〒101-0032 東京都千代田区岩本町 1-10-5

E-mail: nyanai@affrc.go.jp

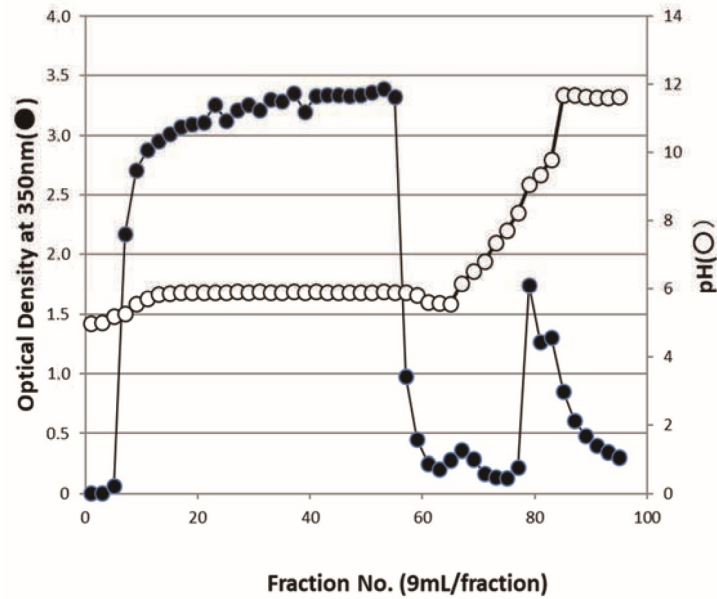


図1 強酸性陽イオン交換体Dowex 50Xによる鶏肉イミダゾールジペプチドのクロマトグラム
分画79~97を回収してナノろ過膜処理の原液とした。

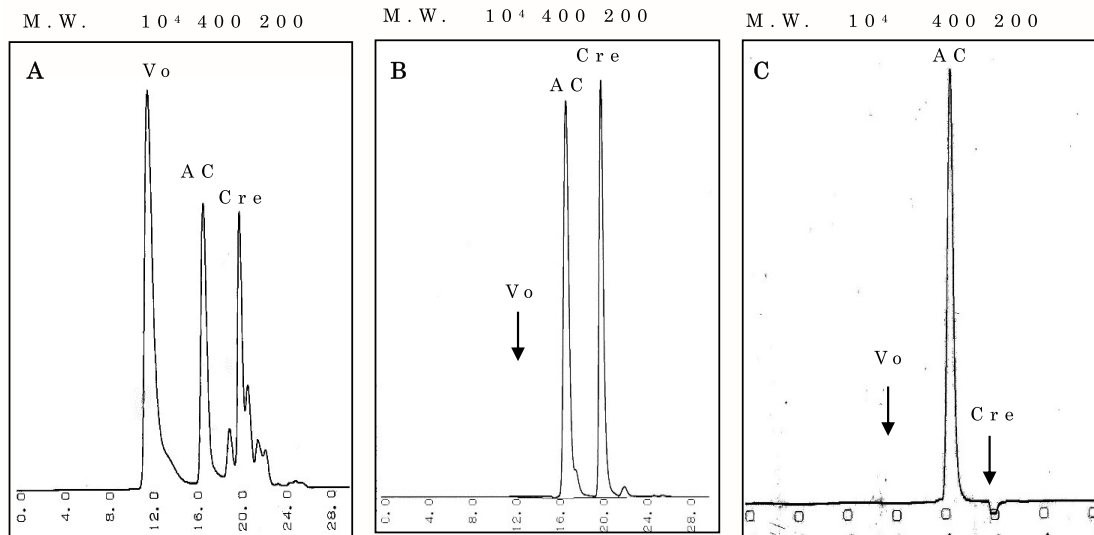


図2 各精製ステップでの鶏肉イミダゾールジペプチド試料のGPC-HPLC (ゲルろ過) クロマトグラム
A: 原料チキンエキス, B: イオン交換体溶出画分, C: NF膜処理イミダゾールジペプチド. 図中 V_0 は分子量1万以上画分, ACは AC_{mix} , Creはクレアチニン

クレアチニン以外の夾雑物としては塩基性アミノ酸やNaとKイオンが依然として残存する。ちなみに、 AC_{mix} の平均分子量は234、クレアチニンの代謝産物であるクレアチニンは113、NaClおよびKClはそれぞれ58.4と74.6である。

3. ナノろ過膜による AC_{mix} の高度精製

(1) ナノろ過膜の選抜

イオン交換体カラムから溶出された AC_{mix} は、上記した夾雑物質のほかに、イオン交換体から溶出させるために使用するアンモニア溶液が塩を形成した形 NH_4Cl (分子量53.5) で含まれる。これらの夾雑物質

から AC_{mix} を分離・精製する方法としては逆浸透膜 (RO 膜) が有効と考えられた。とくに分画分子量 (阻止分子量) 100 以上, 1000 未満, あるいは食塩阻止率 60% 以下の性能を有するルーズ RO 膜 (ナノろ過, NF 膜) が最も適している。この性能の NF 膜は平均分子量 234 の AC_{mix} を膜上に完全に阻止し, 分子量 150 以下のクレアチニンや塩類などの夾雑物質を透過させる性質を有するろ過膜である。本稿の研究ではこの条件に該当する 13 種の NF 膜を対象に, 全循環ろ過法により AC_{mix} 精製に最も適するろ過膜の選抜を行った。

選抜の基準は, ① AC_{mix} に対する阻止率が 1.0 (100%) に近似し, ②クレアチニン, NaCl などの夾雑物質に対する阻止率がそれぞれ 0.6 (60%) 以下であり, ③透過流束 (ろ過速度) が $30 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上またはこの水準にあることとした。試験した 13 種類の NF 膜のうち, この基準に適合するものは最終的に 3 種 (表 1) であり, これらの NF 膜はいずれもポリアミド系ポリマーからなるものであった。

(2) ナノろ過膜処理による AC_{mix} の精製とその大量生産装置の設計

選抜された 3 種の NF 膜を用いて, 回分 (バッチ式) 濃縮法により AC_{mix} の分離・濃縮実験を行い, 次の式に示す数学モデル [3] を用いて AC_{mix} の分離・精製過程をシミュレートすることを試みた。そして, その結果に基づいて大量生産装置の設計を行った。

チキンエキスの NF 膜処理による経時的体積変化は次式で表される。

$$\frac{dV_f}{dt} = -AJ_v \quad (1)$$

A は膜面積, J_v は透過流束, V_f はチキンエキス処理液の体積である。また, NF 処理による溶質 S の濃度変化は次式で表される。

$$\frac{d(C_s V_f)}{dt} = -AJ_v C_s (1 - R_s) \quad (2)$$

C_s は溶質の濃度, V_f はチキンエキス処理液の体積, R_s は溶質 S の NF 膜阻止率を示す。そして透過流束 J_v は次式で表される。

$$J_v = D - k \ln(CF) \quad (3)$$

表 1 選抜されたナノろ過膜の分離特性

Membranes	J_v ($\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$)	CF	R_{AC}	R_{Cre}	R_{NaCl}	Required area (m^2)*
NFT-50	178	9.3	0.99	0.47	0.34	5.0
Desal DL	109	8.8	0.99	0.44	0.36	8.1
Desal DK	98	16.2	0.99	0.53	0.57	9.6

数値は実験の平均値を示す。*1,000L のイオン交換溶出液を 1 時間以内に濃縮するに必要なろ過膜面積

D は拡散係数, は物質移動係数を示す。CF は容量減少率を示し, 次式で計算される。

$$CF = \frac{V_0}{V_f} \quad (4)$$

V_0 はチキンエキスの初期体積である。

上記の数学モデルを用いたデータの解析に当たっては, EQUATRAN-G 方程式解法ソフトを用い, チキンエキス中の AC_{mix}, クレアチニン, NaCl 濃度を計算した。3 種の選抜された NF 膜を用いて, イオン交換処理チキンエキスを濃縮処理した際の結果の一例を数学モデルによる解析結果とともに図 3 に示す。AC_{mix} の歩留 (Yield), 純度 (Purity) および透過流束 (J_v) の経時的な変化はほぼ実測値に近似するものであることが確認された。

これらの測定データを基に, 廃鶏中抜き屠体 2,500kg より得られたチキンエキスを用いて調製されるイオン交換体溶出液 1,000L から AC_{mix} の歩留 95% 以上, かつ固形物純度が 90% 以上の精製チキンエキスを製造するに要する NF 膜処理条件を推計した。図 3 の試験に使用した NFT-50 膜が最も優れていることが判明した。すなわち 1,000 L のイオン交換処理チキンエキスを 6 時間で処理するに要する NFT-50 ろ過膜の所要面積は 0.8 m^2 であり, 使用圧力は 4 MPa であった。そして精製された AC_{mix} は図 2C のクロマトグラムに示すように, クレアチニン, アミノ酸および塩類などが完全に除去されたものであった。

現在, イオン交換処理と NF ろ過膜処理を併用した精製法による AC_{mix} は工場生産されており, 市販されている (図 4)。また, 食品素材を純化すると健康機能

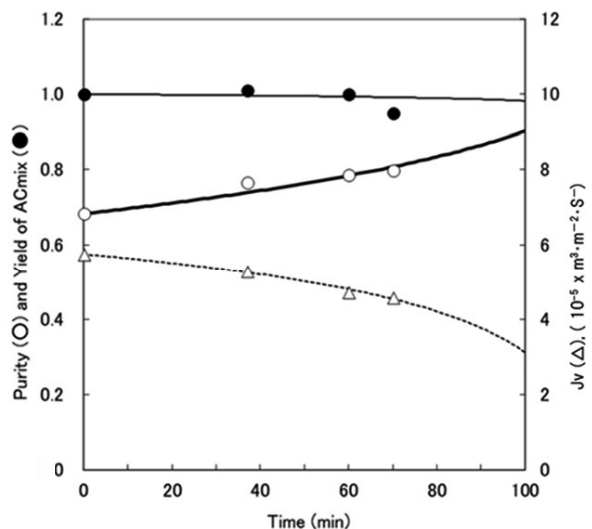


図 3 NF ろ過膜処理における AC_{mix} の純度, 歩留 m および透過流束の経時変化

○: 純度, ●: 歩留, △: 透過流束

効果が失われる可能性もあるとの指摘もあったので、本法により精製されたAC_{mix}について健康な中高年を対象にヒト試験を行い、その健康効果も調べた。イミダゾールジペプチドは強い抗酸化活性を有し、老化制御に役立つものといわれているが、健康な中高年者の生体内抗酸化作用を試験したところ、リンパ球DNAの酸化傷害を統計的に有意に軽減することが観察されている。したがって、精製処理により健康機能が損なわれることはないことが確認されている。[4]

4. 限外ろ過による動物エキスからのタンパク質の除去

食品の安全性に関わるもう1つの重要な課題として、食品アレルギーの問題がある。食事として摂取される動物性たんぱく質の多くが抗原性をもっている。この抗原蛋白質(アレルゲン)に対する抗体をもっていたり、過敏に反応したりする消費者が摂取してアレルギー症状を起こすことがある。加工食品などでは、アレルゲン物質の有無やアレルゲンとして指定された原料の表示義務が課されているが、これは消費者の注意を喚起するものである。表示に気付かず、食品アレルギーをもつ消費者が誤って摂取して事故が発生することも珍しくない。

肉類などを原料として製造されるエキス類は化学調味料に代わる天然調味料として加工食品の製造に広く使われている。そして肉類を原料とするエキスにはタンパク質が豊富に含まれていることも多い。したがって、天然素材として肉エキスの本来の風味を損なわないで、アレルゲン物質を除去ないしは極力低減化しておくことも食品の安全性に寄与する重要な課題である。

一般に、タンパク質はアミノ酸が10個以上結合したポリペプチドになると抗原性、すなわちアレルゲン性をもつといわれている。このことから肉類エキスから分子量数千以上のポリペプチド、蛋白質を除去するこ

とが重要である。筆者らは、限外ろ過膜(UF膜)処理によるポリペプチドの除去法を開発してきた[5]。

肉類エキスに含まれる成分の分子量分布をGPC-HPLCで分析すると、図5の上段(A)に示すとおりである。鶏肉、牛肉および豚肉エキス中には分子量数千以上のポリペプチドが存在する。これらのエキスを分画分子量3,000のUF膜処理を行うことによって、抗原性をもつこれらのポリペプチドはほぼ完全に除去されることが確認されている(図5下段B)。

UF膜処理肉エキスをアレルゲンフリーという範疇に含めることはできないが、調味料素材として加工食品の製造に利用した場合には、従来の肉エキスに比べてそのアレルゲンとしての危険性は大幅に低下し、安全性が増していると考えられる。

5. おわりに

廃鶏屠体から得られるチキンエキスは調味料やスープとして利用されているが、これらの食品から摂取できるAC_{mix}の量は限られている。バランスの取れた食事を毎日摂取している人は、肉や魚からイミダゾールジペプチドは1日平均500~600mg程度摂取していると推定されているが、その健康機能性を発揮するためにはさらに400mg以上、すなわち1日1,000mg程度の量を摂取することが望ましいと考えられている。したがって、2倍量の肉や魚を摂取しなければならないことになるが、それは極めて困難なことである。そこで精製したイミダゾールジペプチドを広い範疇の食品へ添加・応用することによって、健康機能を発揮させるための必要な量を補充することが可能だと考えられる。

ちなみに本稿のAC_{mix}はチキンエキスの風味を完全に除去されているので、清涼飲料水でも、デザート類でも使用することが可能である。このことは生活習慣病を予防する効果が期待されるイミダゾールジペプチ



図4 工場生産用イオン交換クロマトグラフとNF膜ろ過装置
左：イオン交換塔，右：NF膜モジュール

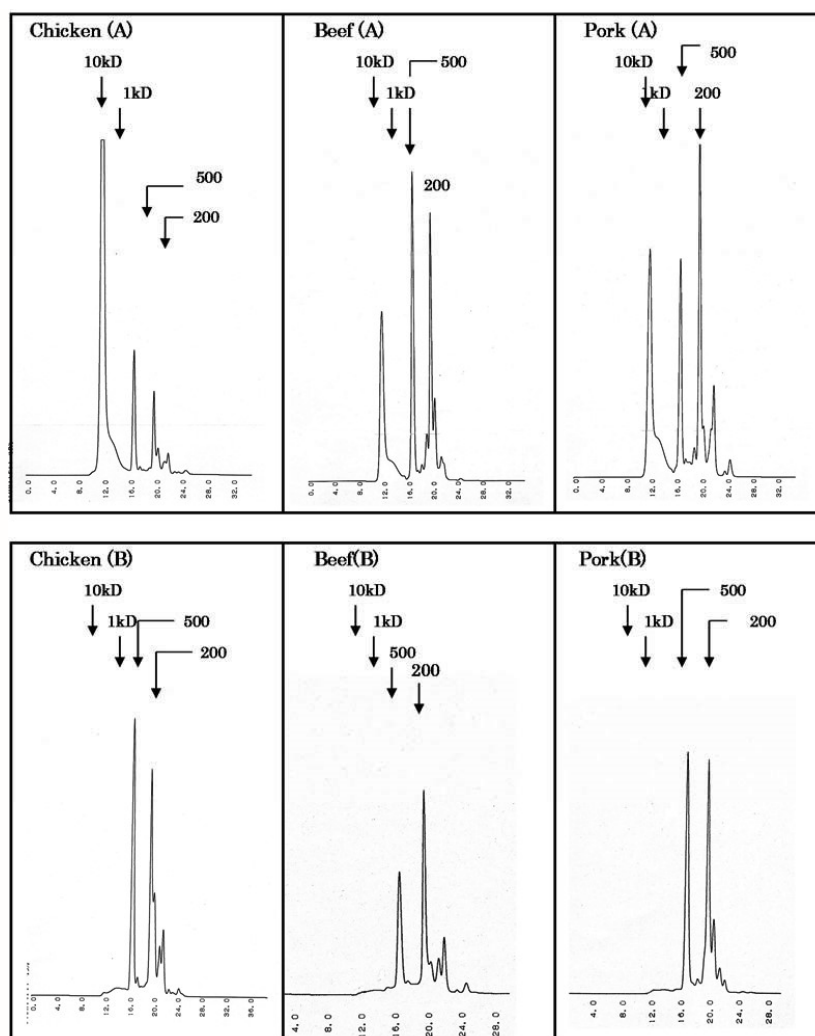


図5 各種肉エキス成分の分子量分布
上段：未処理肉エキス，下段：限外ろ過膜処理肉エキス

ドの摂取機会を拡大することに寄与し、健康寿命の延伸を実現することに貢献するものと考えられる。また、イオン交換法やNF膜ろ過に加えて、UF膜も天然素材に含有される機能性成分や低分子の風味成分を損なうことなく、有害、無用な成分を除去することができる優れた利点をもっている。

これらのことから本稿で紹介したチキンエキスをイオン交換体とNF膜処理を組み合わせた比較的シンプルな精製プロセスは、UF膜処理と同様に省エネルギー的にも有効な方法であり、チキンエキスのみならず、そのほかの動物エキスの用途範囲を大幅に広げられる可能性をもつ食品加工技術の1つであると考えている。そして、これらの食品加工技術から生産された食品の健康機能効果を検証しながら、少子高齢化時代の中で、生活習慣病の発生を抑え、健康寿命の大幅な延伸、すなわち「健やかな長寿」を実現できる新たな食品の創出に取り組んでゆきたい。

参考文献

- 1) A. A. Boldyrev, S. E. Severin, The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: Distribution, properties and biological significance, *Adv. Enzyme. Regul.* **30**, 175-188 (1990).
- 2) 柳内延也, 塩谷茂信, Joosh Baljinnyam, 穂原昌司, 鍋谷浩志, 中嶋光敏. チキンエキスからの機能性ジペプチドの抽出・精製とその利用膜, **32**, 197-202 (2007).
- 3) M. Cheryan, "Ultrafiltration and Microfiltration Handbook", Technomic Pub. USA, 1998.
- 4) N. Yanai, T. Niitsuma, S. Shiotani, S. Hagiwara, H. Nabetani; A Mixture of Histidine-Dipeptides, Vitamin C, and Ferulic Acid Reduces Comet Assay Scores in Normal Middle-Aged Men, *Food Sci. Tech. Res.* **20**: 485-491 (2014).
- 5) 特許第 4348425 号.