

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380167

研究課題名（和文） 副産物コラーゲンを利用した嗜好性と保健的機能性に優れた新規食品
素材の開発研究課題名（英文） Development of a collagen-derived food ingredient with palatability
and physiological functions

研究代表者

有原 圭三（ARIHARA KEIZO）

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00175994

研究成果の概要（和文）：鶏皮等の畜産副産物中のコラーゲンを原料として、新しい食品素材の開発を試みた。加熱変性させたコラーゲンをプロテアーゼ分解した後に、糖類と共に加熱処理してメイラード反応生成物を調製した。この生成物は、in vitro における強い抗酸化活性（スーパーオキシドイオン消去能）と共に、in vivo においても酸化ストレスマーカー値（血清ヒドロペルオキシド値）の低下や血圧降下作用を示した。さらに、嗜好性にも優れていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Collagen of animal by-products (e.g., chicken skin) was utilized for developing a novel food ingredient. Heat-denatured collagen was hydrolyzed by protease treatment. Hydrolyzed collagen was heat-treated after the addition of carbohydrate (e.g., Xylose). By these procedures, a Maillard reaction product from collagen was obtained. This product showed a strong antioxidative activity in vitro. Also, in vivo assay showed the decrease of oxidative stress marker value (serum hydroxiperoxide value) and the antihypertensive effect. Palatability of this products was also preferable.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：コラーゲン、ペプチド、メイラード反応、保健的機能性、嗜好性

1. 研究開始当初の背景

本研究者は、食肉タンパク質の分解により生成するペプチドの様々な保健的機能（血圧降下、抗酸化、抗疲労、抗ストレス、βアミロイド毒性緩和、ビフィズス菌増殖促進な

ど）を解明してきた。これらの成果の積極的な産業的活用を目指し、食肉を原料とするペプチド素材を完成させ、この素材を利用した食品やペットフードの誕生も実現している。

これまで本研究者は、鶏肉や豚肉といった食肉として商品の高い原料を用いてペプチド素材の開発につながる研究を進めてきたが、畜産資源の有効活用という観点から畜産副産物の利用に注目した。本研究者の所属する北里大学獣医学部は青森県十和田市に所在するが、この地域（岩手県北部～青森県南部）はわが国有数のブロイラー生産地であり、コラーゲンを多く含む鶏副産物（皮、足、手羽先など）が大量に得られる。これらの鶏副産物を原料とした付加価値の高い製品の開発は、かねてより地域産業からの要請があった。コラーゲンはサプリメントや化粧品などの素材として広く利用されてきたが、アミノ酸組成の極端な偏りから、生理活性ペプチドの原料としては魅力に欠ける部分があった。しかし、コラーゲンの構成アミノ酸として33%含まれるグリシンは、メイラード反応を起こしやすいことに気づき、コラーゲン分解物からのメイラード反応による素材開発を着想した。

メイラード反応は、アミノ化合物（アミノ酸、ペプチド、タンパク質）と還元糖の混合物を加熱した際に容易に起こり、食品においては風味や色調の形成に重要な役割を演じている。また、近年、メラノイジンなどのメイラード反応生成物は、抗酸化活性などの保健的機能を有することも示されている。一方で、メイラード反応の際にアスパラギンから発ガン物質（アクリルアミド）が生成することも危惧されているが、幸いなことにコラーゲンにはアスパラギンが含まれていない。これらの状況を背景として、コラーゲンを豊富に含む鶏皮などの畜産副産物を原料として、メイラード反応により得られる食品素材の研究開発を目指すに至った。

2. 研究の目的

本研究は、コラーゲンを豊富に含む鶏皮などの畜産副産物に注目し、嗜好性と保健的機能性に優れた新しい食品素材の開発を目指したものである。畜産副産物中のコラーゲンをプロテアーゼ処理して得られるコラーゲンペプチドに、キシロースなどの還元糖を添加してアルカリ条件化で加熱すると、効率よくメイラード反応が起こることがこれまでの本研究者の検討により示された。このとき、幅広い分子量分布の物質群が生成する。主なものとして、低分子の香気性成分、メイラードペプチド等の呈味成分、メラノイジンを主体とする抗酸化物質があげられる。本研究では、これらの複合成分の特性を生かした嗜好性と保健的機能性を兼ね備えた低コストかつ安全性の高い食品素材の開発に必要な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン分解およびメイラード反応条件

コラーゲンからメイラード反応生成物の調製（図1）は、主に鶏皮を用いて行った。鶏皮中のコラーゲンを加熱変性させゼラチンとした後に、各種プロテアーゼによる分解を検討した。得られたコラーゲン分解物（ペプチド）に還元糖を添加し、加熱処理によりメイラード反応生成物を調製した。このとき、①添加糖類の種類・量、②pH（炭酸ナトリウム等の添加）、③反応温度・時間を中心に条件を検討した。

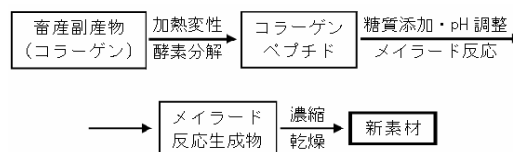


図1 メイラード反応生成物の調製方法(概略)

(2) メイラード反応生成物の in vitro アッセイ

メイラード反応生成物の in vitro の生理活性指標として、抗酸化活性（スーパーオキシドイオン消去能および DPPH ラジカル消去活性）、リノール酸酸化抑制、ACE 阻害活性等を測定した。

(3) メイラード反応生成物の in vivo アッセイ

メイラード反応生成物の in vivo における生理活性試験は、マウスおよびラットに試料を経口投与することにより行った。本研究では、とくに血清酸化ストレスマーカー（ヒドロペルオキシド）値の変動、肝臓脂質の酸化抑制、血圧降下作用について注目して検討を行なった。

(4) メイラード反応生成物の嗜好特性

メイラード反応生成物の嗜好性は、ヒトパネラーによる官能試験を実施すると共に、味認識装置（味覚センサー）により、味の客観的評価を試みた。また、開発素材はペットフードへの利用も視野にあることから、イヌやネコを用いた嗜好性試験（食い付き試験）も実施した。

(5) メイラード反応生成物中の活性成分の精製

メイラード反応生成物中の生理活性成分の精製は、逆相高速液体クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、調製用等電点電気泳動法等により試みた。香気および味成分についても、GC/MS 分析等を実施した。

4. 研究成果

(1) メイラード反応生成物の調製方法

鶏皮コラーゲンからメイラード反応生成物の調製条件を検討した結果、図2に示した条件で調製することとした。

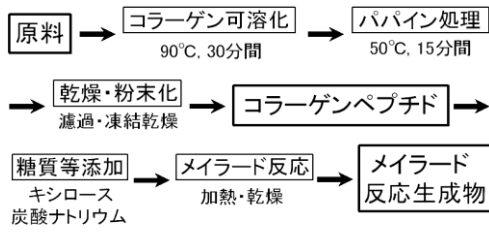


図2 メイラード反応生成物調製方法(詳細)

なお、キシロースおよび炭酸ナトリウムの添加量、メイラード反応の際の加熱条件(温度・時間)は、実験の目的に応じて変えることとした。加熱の際にキシロース添加量および反応温度を変えたときのメイラード反応の進行程度を検討した結果を図3および4に示した。なお、このとき、生成物溶液の抗酸化活性を指標として使用したが、着色程度(420nmの吸光度)を測定した場合も、ほぼ同様の結果であった。

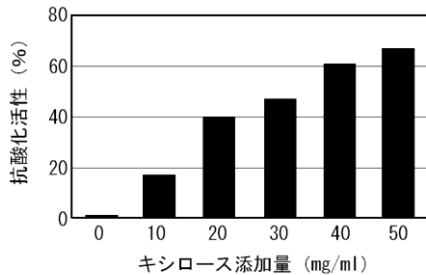


図3 メイラード反応(コラーゲンペプチド+キシロース)に及ぼすキシロース添加量の影響

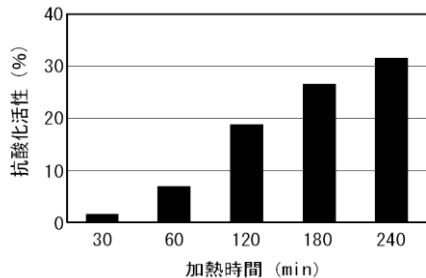


図4 メイラード反応(コラーゲンペプチド+キシロース)に及ぼす加熱時間の影響

(2) メイラード反応生成物の in vitro 活性

コラーゲン分解物に還元糖(キシロース)を添加した後に加熱した場合、図3・4に示したように、抗酸化活性の上昇が確認された。同様の変化は、DPPHラジカル消去活性を測定して場合も認められた(図5)。また、in vitroでリノール酸の酸化も抑制した(図6)。

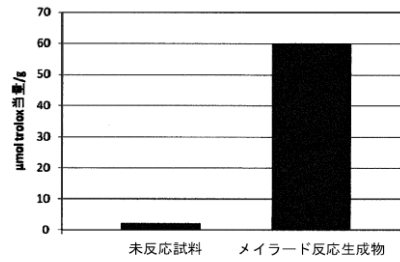


図5 メイラード反応生成物のDPPHラジカル消去活性

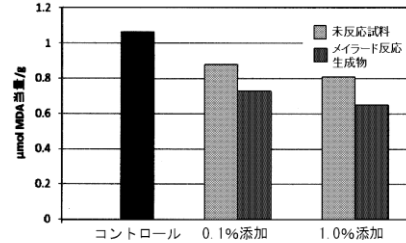


図6 メイラード反応生成物の脂質酸化抑制能(リノール酸の酸化程度を測定)

(3) メイラード反応生成物の in vivo 活性

コラーゲン分解物にキシロースを添加して加熱調製したメイラード反応生成物は、マウスやラットへ経口投与した際にも、生理的な活性を示した。ICR系マウスにメイラード反応生成物を5日間経口投与した結果、血清酸化ストレスマーカー(ヒドロペルオキシド)値が低下した(図7)。

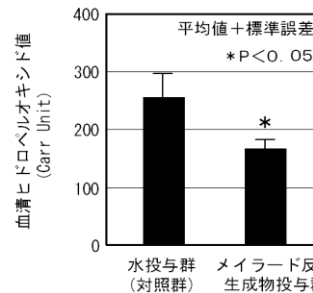


図7 メイラード反応生成物をマウスに経口投与した際の酸化ストレス度への影響

メイラード反応生成物を高血圧自然発症ラットに経口投与した際に、肝臓の脂質酸化が抑制される傾向があった(図8)。

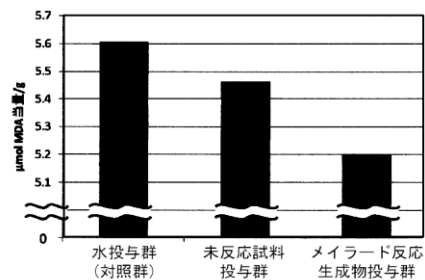


図8 メイラード反応生成物を高血圧自然発症ラットに経口投与した際の肝臓脂質酸化の抑制

抗酸化物質の中には、血圧降下作用を示すものが知られている。今回、コラーゲン分解物由来のメイラード反応生成物に強い抗酸化活性が認められたことから、高血圧自然発症ラットへの経口投与による血圧降下作用を検討した。その結果、単回投与の場合、未反応（未加熱）試料との間に顕著な差は見られず、両者共に血圧降下作用が認められた（図 10）。継続投与をした場合には、メイラード反応生成物に顕著な血圧上昇抑制効果が認められた。

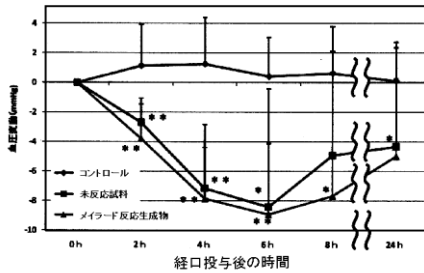


図9 メイラード反応生成物を高血圧自然発症ラットに経口投与した際の血圧変化(単回投与)

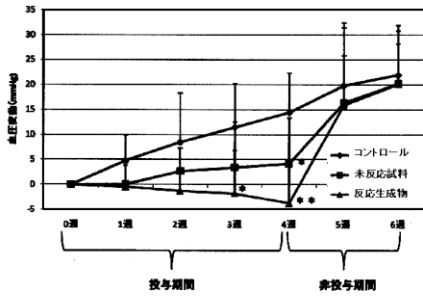


図10 メイラード反応生成物を高血圧自然発症ラットに経口投与した際の血圧変化(継続投与)

多くの血圧降下物質には、ACE 阻害活性が関与していることが知られている。そこで、メイラード反応生成物の ACE 阻害活性を測定した（図 11）。反応前の試料に比べて、メイラード反応生成物はやや ACE 阻害活性が低かったが、いずれも高いレベルの活性を有していた。このことは、メイラード反応生成物の血圧降下作用に ACE 阻害活性が関与していることを示唆しているが、未反応試料よりも血圧降下作用が高いのは、抗酸化活性によるものが大きいと考えられる。

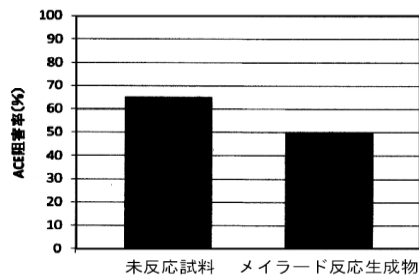


図11 メイラード反応生成物のACE阻害活性

(4) メイラード反応生成物の嗜好性評価

コラーゲン分解物由来のメイラード反応生成物の嗜好性を検討した結果（パネラー30人による官能試験）、反応程度（加熱温度・時間）が評価に大きな影響を及ぼしたが、概ね嗜好性に優れた素材であることが判明した（図 12）。香りを重視する場合は加熱条件を強め（反応生成物①）、味を重視する場合は、加熱条件を穏やかにするとよい。

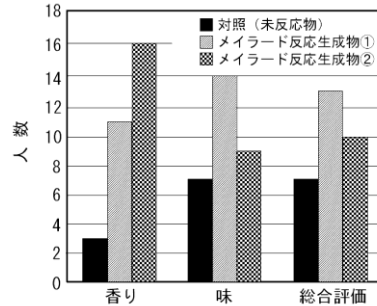


図12 メイラード反応生成物の官能試験による評価

また、メイラード反応前後の試料を味覚センサで測定した結果、旨味などの項目において、メイラード反応の程度（加熱温度・時間）との間に明瞭な関連が見い出された（データ省略）。この結果から、メイラード反応生成物の客観的評価に味覚センサが効果的に利用できるものと推定された。メイラード反応生成物中の嗜好性に寄与する香気成分や味成分の同定についても、現在継続して検討を進めている。

(5) 活性成分の精製

メイラード反応生成物中の抗酸化成分であるメラノイジン等の物質は、精製が困難であることが知られている。本研究では、各種クロマトグラフィーなどで精製を試みたが、部分精製の段階にとどまった。ここでは、調製用液体等電点電気泳動法により精製した結果を紹介しておく。図 13 にメイラード反応生成物を等電点電気泳動法で分画した結果を示した。明瞭なピークは出現しなかったが、A～Dの4画分の性質を調べた結果、抗酸化活性の最も強かった画分Dは特徴的な性質を有することが判明している。

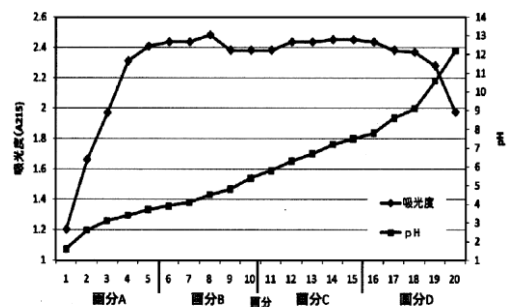


図13 調製用液体等電点電気泳動法による分画例

(6) その他

本研究の検討結果は、コラーゲン分解物から調製したメイラード反応生成物が、嗜好性と保健的機能性を兼ね備えた食品素材として有望であることを示した。紙面の制限からデータを掲載できなかったが、ペットフード素材としても優れた性質を有していたことから、広く産業的に活用できるものと確信するに至っている。

また、コラーゲン以外の食品タンパク質からも、同様の機能を有する素材の開発は可能であると考えられる。本研究者は、すでに食肉（骨格筋）タンパク質を原料とするメイラード反応生成物についても検討を進めており、良好な成績を得ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件）

- ① Ghassem M, Arihara K, Babji A S, Said M, Ibrahim S. Isolation, purification and characterisation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from catfish muscle protein thermolysin hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology* (査読有). 2012 (印刷中).
- ② Arihara K. Meat-based bioactive compounds and functional meat products (Review). *Food Science and Technology* (査読有) 26:26-28, 2012.
- ③ Escudero E, Aristoy M-C, Nishimura H, Arihara K, Toldrá F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science* (査読有) 91:306-311, 2012.
- ④ Escudero E, Toldrá F, Sentandreu M A, Nishimura H, and Arihara K. Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat. *Meat Science* (査読有) 91:382-384, 2012.
- ⑤ Ghassem M, Arihara K, Babji A S, Said M, Ibrahim S. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food Chemistry* (査読有) 129:1770-1777, 2011.
- ⑥ 有原圭三. 牛乳および食肉の機能性食品への展開（総説）. *ブレインテクノニュース* (査読無) 141:1-7, 2010.
- ⑦ Escudero E, Sentandreu M, Arihara K, Toldra F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (査読有) 58:2895-2901, 2010.
- ⑧ 大畑素子, 有原圭三, 石川伸一, 伊藤良. 鶏肉あるいは鯉肉をパパインで分解して調製したペプチド性キャットフード素材の嗜好性に対する影響. *ペット栄養学会誌* (査読有) 13:1-13, 2010.
- ⑨ 有原圭三, 大畑素子. 食肉・食肉製品の機能性研究：とくに食肉タンパク質由来のペプチドについて. *食肉の科学* (査読無) 50:202-211, 2009.

〔学会発表〕（計6件）

- ① 西村仁志, 大鷲智慧, 和地俊, 大畑素子, 有原圭三. 食肉タンパク質分解物から調製したメイラード反応生成物の保健的機能. 第114回日本畜産学会大会（十和田）2011年8月26日.
- ② 内田冴子, 大畑素子, 柳内延也, 山本和貴, 有原圭三. 食肉発酵調味料の生体内発生活性酸素に対する抗酸化能の評価. 第114回日本畜産学会大会（十和田）2011年8月26日.
- ③ 大畑素子, 池田真穂, 有原圭三. キャットフードの調製におけるペプチドおよび糖の添加が香気成分生成量に及ぼす影響. 第114回日本畜産学会大会（十和田）2011年8月26日.

- ④ 渡邊えり香, 大畑素子, 有原圭三. 味覚センサを用いたペットフードの評価方法の確立. 第114回日本畜産学会大会(十和田) 2011年8月26日.
- ⑤ 大畑素子, 有原圭三, 石川伸一, 伊藤良. 鶏肉パepsin分解物添加キャットフードの香気寄与成分の検索. 第112回日本畜産学会大会(東京) 2010年3月29日.
- ⑥ 有原圭三. 食肉タンパク質由来ペプチドの機能解明と利用開発. 日本畜産学会主催シンポジウム「乳・肉の機能性因子の発見と実用の展望」(東京) 2010年3月27日.

[図書] (計8件)

- ① 有原圭三. “機能性ペプチド” 機能性アミノ酸・ペプチドの技術と市場. シーエムシー出版. 2012 (印刷中).
- ② Arihara K. “Functional Foods” Encyclopedia of Meat Sciences (2nd Edition). Elsevier (Oxford). 2012 (印刷中).
- ③ Arihara K. “Relevance of peptide bioactivity in foods” Proteomics in Foods: Principles and Applications. Springer (New York). 2012 (印刷中).
- ④ 有原圭三. “食肉と食肉製品の機能性と健康への寄与” 畜産物利用学. 文永堂出版 p.198-206. 2011.
- ⑤ Arihara K., & Ohata M. “Functional meat products” Functional Foods: Concept to Products (2nd Edition). Woodhead Publishing (Cambridge) p.512-533. 2011.
- ⑥ Arihara K., & Ohata M. “Functional meat products” Handbook of Meat Processing. Wiley-Blackwell (Ames) p.423-439. 2010.
- ⑦ 有原圭三 (監修). 機能性ペプチドの最新応用技術. シーエムシー出版. 2009
- ⑧ Arihara K. “Possibilities and limitations of functional foods” Agriculture

re-Environment-Medicine. Yokendo (Tokyo) p.208-212. 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ペットフード用の嗜好性向上・改善剤
 発明者: 大畑素子, 有原圭三
 権利者: 学校法人北里研究所
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-093079
 出願年月日: 2012年4月16日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計2件)

名称: 食肉タンパク質由来の抗疲労ペプチド
 発明者: 有原圭三, 富田耕平, 石川伸一, 伊藤良, 秋元政信, 鮫島隆
 権利者: 学校法人北里研究所
 種類: 特許
 番号: 特許第4828890号
 取得年月日: 2011年9月22日
 国内外の別: 国内

名称: ビフィズス菌増殖促進ペプチド
 発明者: 有原圭三, 石川伸一, 伊藤良
 権利者: 学校法人北里研究所
 種類: 特許
 番号: 特許第4726129号
 取得年月日: 2011年4月22日
 国内外の別: 国内

[その他]

株式会社フード・ペプタイドホームページ
 (トピックスページ)
<http://topics.foodpeptide.com/>

北里大学獣医学部食品機能安全学研究室ホームページ
<http://food-kitasato.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有原 圭三 (ARIHARA KEIZO)
 北里大学・獣医学部・教授
 研究者番号: 00175994

(2) 研究協力者

大畑 素子 (OHATA MOTOKO)
 北里大学・獣医学部・助教
 研究者番号: 60453510