

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12247

研究課題名(和文)食品廃棄物を含めた未利用たんぱく質から新規蛍光物質への簡易変換

研究課題名(英文) Simple conversion of unused proteins in food wastes into new fluorescent materials

研究代表者

松藤 寛 (MATSUFUJI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70287605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食品ロスや食品廃棄物の低減に世界中で関心が寄せられている。我々は、非バイオプロセスで3-O-メチルガレート(3-MGA)から蛍光物質が生じることを見出した。そこで、食品中たんぱく質を蛍光物質に化学変換する方法を検討した。3-MGAとトリプトンを中性pH、28℃で2日間反応すると効率よく蛍光物質が生成した。抗酸化物質は生成反応を阻害したが、他の食品成分は阻害しなかった。種々のたんぱく質のパンクレチン分解物から蛍光物質が生成し、最終的に、牛乳から得られた粗力ゼインのパンクレチン分解物から蛍光物質を生成できた。この簡便な変換法は、食品ロスや食品廃棄物中のたんぱく質の有効利用に貢献すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Reducing food losses and waste is an increasing global interest. We previously found that fluorescent substances were produced from 3-O-methylgallate (3-MGA) by a non-biological process. In this study, we examined a simple method for transforming proteins in food into fluorescent substances via a chemical reaction using 3-MGA. Fluorescent substances were produced effectively by incubation of 3-MGA and Tryptone at neutral pH at 28°C for 2 days. The antioxidants inhibited the production of fluorescent substances, but other food ingredients showed no inhibition. The incubation of 3-MGA with pancreatic hydrolysates of several proteins also produced fluorescent products. Finally, the incubation of 3-MGA with pancreatic hydrolysate of crude caseins prepared from commercial milk produced fluorescent substances. The simple transformation will contribute to the development of new basic techniques for the effective utilization of proteins in food losses and waste.

研究分野：食品科学

キーワード：食品廃棄物 再資源化 廃棄物利用 有機蛍光物質

1. 研究開始当初の背景

我々は、東日本大震災直後の海水より単離した *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株が低分子リグニン類を、ベンゼン環構造を含まない新規の有機蛍光物質 (NAPSFA; Non-Aromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activity) に変換することを見出した。本結果は、未利用木質バイオマスであるリグニンを有用物質にバイオ変換できる可能性を示す。そこで、詳細解析を行ったところ、低分子リグニンの一つであるシリングアルデヒド (SYAL) をシリング酸を経て 3-*O*-メチルガラレート (3-MGA) へ変換し、これが開環重合して培地中の有機物と反応して、NAPSFA を生産することが判明した (特願 2013-019971; 特許第 6090838 号)。さらに、バイオ変換しなくとも、3-MGA と培地に添加するたんぱく質分解物を混合し、約 2 日間 30 で振とうするだけで NAPSFA が効率よく生産されることを見出した (特願 2014-167282)。このことは、ゴミとして捨てられている食品廃棄物を含めた未利用たんぱく質資源を適切な条件下で処理したのち、3-MGA と混合するだけで、蛍光物質という極めて付加価値の高い物質を生産できる可能性を示す。

食品ロスは国内で 600-800 万トン/年、世界中では 13 億トン/年も発生し、大きな社会・環境問題となっている。発生を減らすべく、国民運動も実施されているが、食品衛生上の問題もあり、ゼロにすることは困難である。一方、食品廃棄物の再生利用・再資源化について、研究レベルでは、薬用、化粧品用、機能性食品素材への変換に関する研究はあるものの、消費者感情の面から実用化は困難であり、腐敗している場合は尚更利用できない。それ故、再資源化利用される場合でも、飼料、肥料、土壌改良材、燃焼剤など、資源利用の中では価値の低い利用に過ぎないのが現状である。また、原料の処理から利用までのプロセスに掛けられるコストは制限されるため、安価な素材への再資源化は結果として資源利用されない場合が多い。さらに、再資源化のプロセスには環境への CO₂ 排出削減も視野に入れる必要があり、原料由来の炭素をなるべく CO₂ の形で大気圏に排出しないようにすることも考慮する必要がある。

従って、腐敗しているような食品廃棄物でも、これをバイオマスとして資源利用の可能性を広げ、再資源化するためには、「環境負荷低減技術に加え、多くの人々が嫌忌しないより高付加価値物質への変換、並びに変換プロセスの省エネルギー化・低コスト化を開発すること」が極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

上記先行研究により、3-MGA とたんぱく質分解物を混合するだけで NAPSFA が生成することが判明し、このことはたんぱく質を適切に処理することで蛍光物質を簡便に作り出すことができること、また蛍光物質という生

産物の利用性から食品ロスとして世界的に問題となっているゴミとして捨てられている食品廃棄物も原料資源対象とすることができることを示唆された。

そこで、本研究では食品廃棄物を含めた未利用たんぱく質の分解物から、新規の蛍光物質が生成することを明らかにすることにより、未利用たんぱく質に新しい資源価値を与え、低コストで有効利用できる新しい変換プロセスを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

市販 3-MGA と 1%たんぱく質または、たんぱく質分解物水溶液を混合し、28 で 2 日間振とう後、分光蛍光光度計にて三次元励起蛍光スペクトル及び蛍光強度を測定した。また、たんぱく質分解物は市販品及び各種酵素を用いて分解物を調製した。また、生成物の分析は、蛍光検出器付き UPLC もしくは三連四重極型質量分析計を接続した LC-MS/MS にて分析を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光物質生成反応条件の最適化

まず、3-MGA と市販力ゼイン分解物であるトリプトンを用いて、蛍光物質生成反応条件について検討した。反応 pH は中性条件下で、また反応温度は低温～室温下の方が、効率よく蛍光物質が生成することが判明した。そのため、以後の実験は、記載のない限り、pH7.0、28 で 2 日間反応させることとした。

(2) 食品成分からの蛍光物質生成について

3-MGA と食品成分が反応し、蛍光物質を生成するか否かについて検討した。糖類(単糖、二糖、多糖類)、たんぱく質類(市販および研究室粗精製物)は、3-MGA と混合しても全く蛍光物質を生成しなかった。一方、種々のたんぱく質分解物との反応においては、蛍光物質生成に強弱が認められ、また全く蛍光物質を生成しない分解物も認められた。従って、3-MGA と反応して効率よく蛍光物質を生成するためには、特定の配列を有するペプチドが必要と考えられた。

一方、アミノ酸(21 種)および各種アミン類(炭素鎖の異なるモノアミン類 8 種、ジアミン類 5 種、ジメチルアミン、トリメチルアミン)と反応させたところ、反応日数を要し(17~24 日)、また励起蛍光スペクトルは異なるものの、アミノ酸の中では塩基性アミノ酸であるアルギニンやリシンより、アミン類ではモノアミン類とジアミン類より蛍光物質の生成が認められた。アミノ酸との反応では、塩基性アミノ酸でのみ蛍光物質生成が確認されたことから、アミノ基を 2 つ以上有する化合物と、開環した 3-MGA が共重合して蛍光物質を生成すると予想していたが、共重合しないモノアミン類との反応でも蛍光物質が生成したこと、またその反応生成物の LC 分析において十数本の蛍光を有する成分ピークが検出されたことから、3-MGA との反応は

複雑多岐にわたることが示唆された。一方で、塩基性アミノ酸やアミン類からスペクトルの異なる蛍光物質が得られたことから、対象物を変更することにより簡便に様々な異なる蛍光波長の蛍光物質を得ることができることが示唆された。

(3) 反応阻害物質の探索

塩基性アミノ酸やアミン類が 3-MGA と反応して蛍光物質を生成すること、また食品中には様々な成分が含まれることから、目的の NAPSFA を生産する際に、妨害や阻害する可能性が考えられた。そこで、混合試料中での影響すなわち蛍光物質生成の反応阻害を引き起こす成分を調べるため、トリプトンと 3-MGA の混合液に、糖類、アミノ酸、アミン類を等濃度あるいは 1/10 濃度で共存させ、NAPSFA 生成に及ぼす影響を検討した(28、2 日間)。糖類、アミン類、そして多くのアミノ酸は NAPSFA の生成を阻害しなかった。単一成分の反応では蛍光物質生成を示したアルギニンやリシン、アミン類も、トリプトンと 3-MGA の反応を阻害せず、NAPSFA の生成を抑制しなかったことから、これらが共存したとしても目的の蛍光物質を生産し得ると考えられた。一方、アミノ酸の中でシステインは NAPSFA の生成を強く阻害した。二量体であるシスチンは全く阻害しなかったことから、システインのチオール-SH 基による抗酸化性の関与が考えられた。そこで、アスコルビン酸及びカテキン共存下における NAPSFA 生成を検討したところ、濃度依存的な生成阻害が認められた。従って、食品を利用して NAPSFA に変換する際、抗酸化物質の除去が必要であることが明らかとなった。一方で、抗酸化物質存在下で NAPSFA 生成が抑制されたということは、未だ不明である生成メカニズムにおいて、酸化が必須であるということが示された。

今回検討した成分は、糖類、アミノ酸、揮発性アミン類であるが、加工食品や腐敗食品にはこれら以外にも多くの成分が含まれる。今後、脂質や乳化剤等の食品添加物、また腐敗アミンには検討した揮発性アミン以外に、アミノ酸に由来する不揮発性アミンも存在することから、これらの影響を検討する必要がある。他方で、全ての食品成分を調べるのではなく、ターゲットとする食品や食品廃棄物を一次または二次精製し、そこに残存する不純物の影響を調べることが適切である、すなわち妨害となり得る成分を取り除くことを念頭に精製法を検討する必要があると考えられた。

(4) 蛍光物質生成に必要なたんぱく質分解条件と分解物調製

市販トリプトンはカゼインのパンクレアチン分解物であり、複数のメーカーから市販されている。しかし、カゼインの種類、パンクレアチンの種類、その反応条件等の詳細な調製法は企業秘密となっており、不明である。これまでの検討より、未利用たんぱく質を蛍

光物質に変換するためには、たんぱく質の低分子化が必要であることから、まず市販カゼインの分解酵素及びその分解条件について検討した。パンクレアチン、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンを用いてカゼイン酵素分解物を調製し、これらと 3-MGA を反応させたところ、いずれの酵素分解物からも蛍光物質生成が確認された。カゼインや酵素そのものとの反応からは蛍光物質生成は認められず、酵素分解によって生成したペプチドと 3-MGA が反応することで蛍光物質が生成することが改めて判明した。一方、各酵素分解物のペプチドを LC 分析したところ、共通ピークは認められず、様々なペプチドと反応して蛍光物質を生成していると考えられた。しかし、市販トリプトンと 3-MGA の反応物の蛍光物質生成量と比較すると、調製分解物由来のものは 1/10 程度であり、最適分解条件の検討が必要と考えられた。

パンクレアチンの添加濃度及び反応時間を変化させ、それぞれのカゼイン・パンクレアチン分解物と 3-MGA を反応させたところ、分解が進むにつれて蛍光強度の増加が認められたが、分解が過度に進むと蛍光強度の低下が認められた。パンクレアチンは複合酵素であり、アミラーゼやリパーゼの他、トリプシン、キモトリプシン、エステラーゼやカルボキシペプチダーゼ等の様々なたんぱく質分解酵素を含むことから、過度の分解はペプチドをアミノ酸まで分解することによると考えられた。

以上のことから、効率よく蛍光物質に変換できるペプチドをカゼインから調製する酵素分解条件を設定できた。

次いで、他のたんぱく質(市販ラクトアルブミン、市販大豆たんぱく質、市販鶏卵アルブミン、脱脂ピーナッツたんぱく質)に本条件を適用し、3-MGA との反応による蛍光物質生成について検討した。いずれの分解物からも、蛍光物質の生成が確認され、カゼイン以外の様々なたんぱく質もパンクレアチン分解することで、蛍光物質の生成が可能であることが判明した。しかし、たんぱく質が異なると、パンクレアチン分解条件を変更しなければならず、たんぱく質ごとに分解条件を最適化する必要が生じた。また、それぞれの分解物から生成される蛍光物質のスペクトルはわずかに異なっていたことから、詳細な構造解析も必要であると考えられた。

(5) 実試料からの蛍光物質の生産

実際の食品から蛍光物質が生産できるかどうかについて、市販牛乳からの蛍光物質生成について検討した。牛乳中のたんぱく質の約 80%はカゼインが占めることが知られている。また、世界中での牛乳の年間生産量は 6.6 億トン(2016 年度)であり、国・地域によって異なるものの、生産量の 10-25%が廃棄されている。廃棄理由はいろいろあるが、搾乳牛の病気(乳房炎)、農場と流通拠点間の輸送中の損耗および品質劣化(発展途上国などのコ

ールドチェーン流通の遅れなど)、工場での牛乳の処理(殺菌や製造ラインの洗浄)による廃棄およびチーズやヨーグルトへの牛乳の加工中の損耗、小売やスーパーマーケット等の市場における残余廃棄、家庭世帯による残余や消費期限切れによる廃棄などが挙げられており、生産現場から加工、流通、消費の至るところで廃棄され、廃棄率の大きい食品の一つである。

食品を対象とした場合、たんぱく質の抽出・精製が必要であるが、その操作は簡便な方が適すると考えられる。そこで、酢酸でpHを酸性(4.5)にし、等電点沈殿を利用することで、沈殿物の粗カゼイン画分を入手した。成分表から牛乳1Lには27.2gのカゼインが含まれると計算されたが、等電点沈殿で得られた沈殿物は37.8gあり、カゼイン以外の不純物を含むことが示唆された。一方、ブラッドフォード法により沈殿物中のたんぱく質量を求めたところ、79.4%(30.0g)であり、酸添加と遠心ろ過という簡便な操作で粗カゼインを入手できた。次いで、本沈殿物をパンクレアチンで酵素分解し、その後3-MGAと反応させた。市販カゼインのパンクレアチン分解物と比較すると、蛍光物質生成量は約8割弱であったが、牛乳を簡便な操作で蛍光物質に変換することが可能であることを初めて明らかにした。

以上のことから、この簡便な変換法は食品ロスや食品廃棄物中のたんぱく質の有効利用に貢献すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Fuji Y., Matsufuji H. (他 4 名, 6 番目) Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages. PLOS ONE, **13**, e0194449 (2018) DOI: 10.1371/journal.pone.0194449 (査読有)

Iwabuchi N., Matsufuji H. (他 4 名, 6 番目) Development of a simple nonbiological method for converting lignin-derived aromatics into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activity. ACS Sustainable Chem. Eng, **4**, 4411-4416 (2016) DOI:10.1021/acssuschemeng.6b01009 (査読有)

Miyabe R., Matsufuji H. (他 7 名, 3 番目) Purification and partial characterization of X-proryl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus gasseri* ME-284, Food Sci. Technol. Res. **21**(3), 445-451 (2015) DOI: 10.3136/fstr.21.445 (査読有)

Iwabuchi N., Matsufuji H. (他 4 名, 6 番目) Transformation of lignin-derived

aromatics into non-aromatic polymeric substances with fluorescent activities (NAPSFA) by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1, ACS Sustainable Chem. Eng, **3**, 2678-2685 (2015) DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00503 (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

廣川侑美、大槻崇、岩淵範之、松藤寛、市販牛乳酵素分解物からの有機蛍光物質生産について、日本農芸化学学会 2018 年度大会 (2018)

岩淵範之、松藤寛、他 3 名、リグニン由来の芳香族化合物を変換して生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質について、日本農芸化学学会 2018 年度大会 (2018)

守屋佑里子、松藤寛、岩淵範之、他 3 名、*Pseudomonas* sp. ITH-B52 の生産する有機蛍光物質の化学的性質の検討、日本農芸化学学会 2018 年度大会 (2018)

廣川侑美、大槻崇、岩淵範之、松藤寛、食品廃棄物中未利用たんぱく質の有機蛍光物質への変換について、日本食品科学工学会第 64 回大会 (2017)

廣川侑美、大槻崇、岩淵範之、松藤寛、食品廃棄物系バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産、日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会 (2017) 若手優秀発表賞ポスター発表部門受賞

廣川侑美、岩淵範之、松藤寛、他 4 名、タンパク質 - パンクレアチン分解物と 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について、日本農芸化学学会 2017 年度大会 (2017)

松藤寛、岩淵範之、他 4 名、アミンと 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について、日本農芸化学学会 2017 年度大会 (2017)

坂野優稀、砂入道夫、松藤寛、岩淵範之、ベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の非バイオプロセスによる生産、日本農芸化学学会 2017 年度大会 (2017)

岩淵範之、松藤寛、他 2 名、木質バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産、日本農芸化学学会 2017 年度大会 (2017)

廣川侑美、岩淵範之、松藤寛、他 2 名、たんぱく質 - パンクレアチン分解物からの有機蛍光物質生産について、日本食品科学工学会平成 29 年度関東支部大会 (2017)

Sakano Y., Matsufuji H., Sunairi M., Iwabuchi N., Transformation of lignin-derived aromatics into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activities by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1, The 11th SPSJ International Polymer Conference (2016)

廣川侑美、岩淵範之、松藤寛、他 3 名、未利用たんぱく質の有機蛍光物質への簡易化学変換に関する研究、日本食品科学工学会第 63 回大会 (2016)

坂野優稀、松藤寛、砂入道夫、岩淵範之、
低分子リグニン類から生産されるベンゼン
環を含まない新規有機蛍光物質の生成機構
の検討、日本農芸化学会 2016 年度大会(2016)

坂野 優稀 (SAKANO, Yuki)
廣川 侑美 (HIROKAWA, Yumi)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：蛍光物質及び製造方法
発明者：岩淵範之、松藤寛、他 3 名
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：特許願 2017-030189
出願年月日：平成 29 年 2 月 21 日
国内外の別：国内

名称：蛍光物質及びその製造方法
発明者：岩淵範之、松藤寛、他 4 名
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：特許願 2016-160123
出願年月日：平成 28 年 8 月 17 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

日本大学生物資源科学部食品生命学科食
品分析学研究室ホームページ
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~foodanalysis/>

アグリビジネス新技術説明会「食品廃棄物
から蛍光物質をつくる」松藤寛、主催：科学
技術振興機構、首都圏農学系私立 5 大学、後
援：特許庁(2017)

プレゼン動画は YouTube で公開。
<https://www.youtube.com/watch?v=sNSXe5i5QiY>

発表資料のダウンロード可。
https://shingi.jst.go.jp/list/agribiz/2017_agribiz.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松藤 寛 (MATSUFUJI, Hiroshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：70287605

(2)研究分担者

岩淵 範之 (IWABUCHI, Noriyuki)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：90328708

(3)連携研究者 無し

(4)研究協力者