

平成 21年 3月31日現在

研究種目：若手研究B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760529
 研究課題名（和文） キレートアフィニティーを利用した食品バイオマスからのペプチド
 分離・回収法の開発
 研究課題名（英文） Development of Peptide Recovery Methods Based on Chelate Affinity
 from Food Resources
 研究代表者
 大島達也（OSHIMA TATSUYA）
 宮崎大学・工学部・准教授
 研究者番号：00343335

研究成果の概要：食品産業等において排出されるバイオマス廃棄物から、各種アミノ酸・ペプチド等の成分を効率的に分離・濃縮することができれば、機能性食品や薬品原料として有効利用することが可能となる。本研究では食品バイオマス中の機能性ペプチドを選択的に分離回収できる新たな分離プロセスとして、担体に固定化された金属イオンとペプチドの官能基とのアフィニティーに基づいた、吸着・限外ろ過による新たな分離法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、加工物性・移動操作・単位操作

キーワード：キレートアフィニティー、IMAC、ペプチド、分離、回収、キレート樹脂、限外ろ過、食品バイオマス

1. 研究開始当初の背景

近年、食品産業等において排出されるバイオマス廃棄物から、生理活性物質・健康機能成分等を回収し利用することへの関心が高まっている。例えば魚肉類を加工処理した後の加工廃液には各種アミノ酸および低分子量のペプチド、脂肪酸、核酸などの成分が含まれており、これらを効率的に分離・濃縮することができれば機能性食品や薬品原料として有効利用することが可能となる。

これらバイオマス廃棄物中に含まれるアミノ酸等の生体成分の市場化を考える場合、発酵法等によって工業化されるものと比較した場合の生産コストの優劣が重要な要件となり、大手メーカーによりプラント生産が確立されている比較的単純なアミノ酸類

(例：タウリン、グルタミン酸)は市場価格が安く採算が見込めない。しかし、より構造が複雑なジペプチド・オリゴペプチドでは工業生産のコストがより大きくなり、バイオマス廃棄物中から回収するプロセスの方がコスト性に優れる事例が出てくる。一例として、ヒスチジン含有ジペプチドのカルノシンはアミノ酸の10倍以上の市価で健康食品としての用途があり、牛・鶏エキス等からの抽出物がサプリメントとして販売されている。アンセリン・カルノシンは抗酸化・抗疲労作用が知られるほか、近年認知症予防作用が報告されており、未利用の資源からこうした高付加価値なペプチドを回収できれば上記の食品原料として利用することが可能となるが、食品廃棄物は多様な成分から構成されるた

め、従来法で目的成分のみを選択的に回収することは容易でなく、多大なコストを要する。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、本研究では食品バイオマス中の機能性ペプチドを選択的に分離回収できる新たな分離プロセスの開発を行った。バイオマス資源から特定のペプチドを分離回収する上の特徴は、目的のペプチドが、過剰の夾雑物と共存して希薄濃度で存在していることである。特に、液中に塩類が共存する場合、イオン交換による吸着は著しく阻害され、目的ペプチドの回収は極めて困難となる。このような資源からの選択的分離を目的とする上で、本研究では選択性の核としてペプチドの官能基と金属イオンの配位結合に基づくキレートアフィニティー（固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー、IMAC）に着目した。例えばヒスチジンのイミダゾール基は第一遷移金属（HSAB則の“中間の酸”）の Cu(II), Ni(II), Co(II), Zn(II)等への親和性が大きく、その親和性がタンパク質等の分離に幅広く利用されている。またシステインのような硫黄含有アミノ酸は Ag(I), Au(III)などの貴金属類（HSAB則の“軟い酸”）への親和性が大きい。

本研究ではこれらの金属-配位子相互作用に基づいた分離プロセスとして、(1) キレート樹脂吸着 (図1参照) (2) 水性二相分配 (3) 限外ろ過法の3種の分離プロセスを小テーマとして設定し、食品バイオマスの水抽出物を想定して目的ペプチドの分離回収を行うためのプロセスの提案と分離条件に影響する因子の調査を行なった。

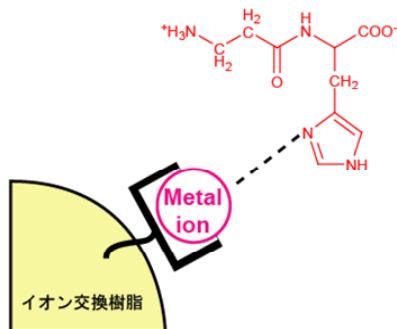


図1. IMAC法による金属配位性ペプチドの選択的吸着の概念図

3. 研究の方法

(1) キレート樹脂吸着

これまでにポリスチレン系のイミノ二酢酸 (IDA) キレート樹脂に Cu(II)を吸着固定した吸着剤によって、ヒスチジン含有ジペプチドが他のアミノ酸から選択的に吸着されることを明らかにしている。本研究ではこの手法を拡張させ、樹脂および固定金属の組合せを変えることによる各種ペプチドの吸着挙動について検討を行った。

まず、ポリスチレン系イミノ二酢酸キレート樹脂に第一遷移金属イオンで一般的にIMACの固定化金属として用いられる Cu(II), Ni(II), Co(II), Zn(II)を吸着固定し、アミノ酸・ペプチド類への吸着挙動について検討し、各種依存性 (pH、金属担持量等) について検討した。IMACに関する各種報告より、固定化金属は Cu(II) > Ni(II) > Co(II) > Zn(II)の序列でヒスチジンへの親和性が大きいことが知られており、逆の序列でタンパク質の吸着選択性が得られることが知られていることから、本研究における親和性・選択性の序列もこれに準ずるものになると予想した。

上記の検討は市販のポリスチレン系キレート樹脂を用いたが、これに対して市販されるセルロース系のキレート吸着剤 (図2) についても IMAC 法によるヒスチジン含有ジペプチドの各種吸着実験を行い、その吸着特性を合成樹脂と比較した。

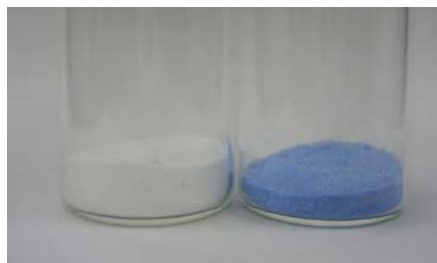


図2. セルロース系キレート吸着剤 (CF, 左) と Cu(II)担持後(Cu-CF, 右)の外観

他方、中間性の酸に分類される第一遷移金属イオンを固定化した吸着剤に対して、ソフトな酸に分類される Ag(I)を固定化したキレート吸着剤におけるアミノ酸、ペプチド、ビタミン類の吸着特性についても検討した。こうしたソフトな酸はソフトな塩基である硫黄 (S) との親和性が高いことが知られているため、システイン、メチオニンを含む硫黄を含有するアミノ酸や、ビタミン類を選択的に吸着することが期待される。具体的にはイミノ二酢酸キレート樹脂、チオ尿素キレート樹脂に Ag(I)を吸着固定化し、各種生体物質の吸着特性と影響する因子について検討した。

(2) 水性二相分配

水性二相抽出法は2種類の親水性ポリマーゲル、あるいはポリマーと無機塩によって形成される水相-水相間の分配平衡を利用する液液抽出法であり、バイオ生産物に適した分離プロセスとして研究が発達してきた。本研究では水性二相分配系においてキレートアフィニティーを利用しペプチド類を分離するプロセスを検討したが、得られるキレート剤が官能基量が少なく、ペプチドの大量処理には適さないことが明らかとなったため、その評価は行わないこととした。

(3) 限外ろ過膜分離

第3の小テーマでは、液中の低分子量物質や水は透過するが高分子量物質は透過できない限外ろ過膜 (UF 膜) を利用した、目的ペプチドの分離回収について検討した。その概要図を **図3** に示す。

まず、UF 膜を透過できない水溶性のデキストラン (Dex) にキレート基としてイミノ二酢酸を導入した (**図4**)。このキレート性のゲル (IDA-EGDE-Dex) にヒスチジン含有ジペプチドと親和性の高い Cu(II) を固定した (Cu(II)IDA-EGDE-Dex)。ペプチド類を含む溶液とキレートゲル溶液を混合して限外ろ過を行うと、目的のペプチドのみが金属配位結合によってゲルに捕捉され透過せず、その他のアミノ酸・ペプチドは UF 膜を透過する。この過程を経て両者の分離が可能となる。

IDA-EGDE-Dex はエチレングリコールグリシジルエーテルをリンカーとしてデキストランに導入し、イミノ二酢酸を導入することで得られた。その後バッチ法で Cu(II) 溶液と接触して Cu(II)IDA-EGDE-Dex を得た。それぞれ生成物は透析または限外ろ過で洗浄を行い、凍結乾燥して粉体として得ている。

得られた Cu(II)IDA-EGDE-Dex を、ペプチド類を含む溶液と混合して、分画分子量 20,000 のポリサルホン製ろ過膜を用いて限外ろ過を行い、透過液中のペプチド濃度を定量することで金属固定キレートゲルへのペプチドの捕捉量を評価した。本法における各種アミノ酸・ペプチドの回収について pH、塩濃度、接触時間などの条件を変えて各種実験を行い、本系における目的ペプチドの分離選択性について評価を行った。

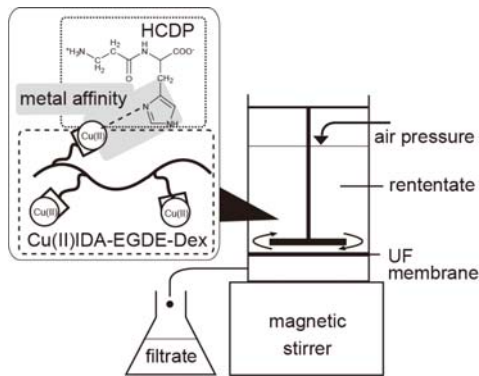


図3. IMAC法と限外ろ過を組み合わせたヒスチジン含有ペプチド回収法の概念図

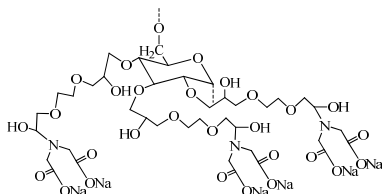


図4. ヒスチジン含有ペプチド回収に用いるキレート型デキストラン (IDA-EGDE-Dex) の構造

4. 研究成果

食品バイオマスからアンセリン・カルノシンを吸着回収する手段としての金属担持樹脂の有効性についてより詳しい知見を得るための各種試験を行った。Cu(II)、Ni(II)、Co(II)、Zn(II) をポリスチレン系イミノ二酢酸 (IDA) 型キレート樹脂 (三菱化学製 DIAION CR11) に固定化した各遷移金属担持樹脂を調製し、これらによる塩分を含む液からのアンセリン・カルノシンおよびその他のアミノ酸の吸着について比較した。

図5 に調製した遷移金属担持樹脂の外観を示す。Cu-IDA (Cu(II)担持量 $1.76 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)、Ni-IDA (Ni(II)担持量 $1.37 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)、Co-IDA (Co(II)担持量 $1.18 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)、Zn-IDA (Zn(II)担持量 $1.16 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) とそれぞれ略記する。



図5. 各遷移金属担持樹脂の外観

各種吸着剤によるカルノシン (Car) の吸着における pH の影響を **図6** に示す。NaCl 存在下ではイミノ二酢酸型キレート樹脂である IDA ~ Car は全 pH において全く吸着されない。Cu(II) を吸着担持させた Cu-IDA は Cu(II) へのイミダゾール基の金属配位結合に基づいて広い pH 域で Car を吸着した。これに対して Ni-IDA、Co-IDA、Zn-IDA では Car は吸着されなかった。すなわち、これらの金属担持樹脂は異なるアミノ酸・ペプチドへの吸着選択性を示すことが期待されたが、実験の結果、カルノシン類との結合が最も強い

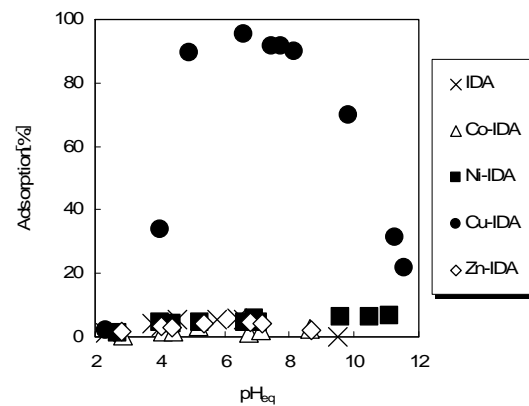


図6. 各種遷移金属担持吸着剤による Car 吸着の pH 依存性: Adsorbent, 30 mg; Volume=15 cm³; [Car]_{ini}=0.25 mM; [NaCl]_{ini}=100 mM.

Cu-IDA だけが塩分の妨害を受けずにカルノシン類を吸着回収できることが示された。

図7に Cu-IDA への Car 吸着の Cu(II)担持量依存性を示す。横軸は IDA の Cu(II)吸着容量に対する Cu(II)担持量を示す。NaCl 非存在下では吸着率は Cu(II)担持量に依らず高い値を示す。NaCl 存在下では IDA では Car は吸着されず Cu(II)の担持量を増すにつれて吸着率は大きくなった。このとき、Cu(II)担持量を飽和吸着量の 80%未満にすると Cu(II)の溶出量は最小限に抑制できることが示された。

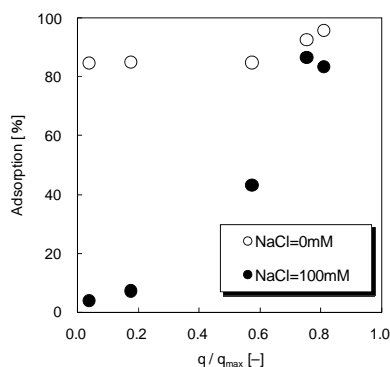


図7. Cu-IDA の Cu(II)担持量 (横軸) とカルノシンの吸着率 (縦軸) との関係: pH_{ini} 7.0, Adsorbent, 30 mg, Volume=15 mL, $[NaCl]=0$ or 100 mM, $[Car]_{ini}=0.25$ mM.

カルノシン類の回収に最も有効な Cu-IDA を充填したカラムを用いて、工業的なカルノシン類の回収・濃縮を想定した連続回収を検討した。適切な送液条件で Car 含有水溶液 (0.1mM) を通液することにより、カラム層体積の 370 倍の溶液を送りカラムが破過に達するまでカルノシンを完全に回収できることが示された。また、カルノシンが吸着されたカラムに溶離剤として酢酸水溶液を通液することで 95% のカルノシンを脱着できることを示した。この条件で回収されたカルノシンは原料液の約 20 倍に濃縮された。これらの結果から、Cu(II)担持樹脂を充填したカラムを用いて、カルノシン類を連続的に回収・濃縮できることが示された。

宮崎県内の水産加工業者より供与された鰹煮汁、鯖煮汁の成分分析を行った結果、鰹煮汁にはヒスチジン、タウリン、アンセリン、カルノシンが多く含まれており、同時にこれらのアミノ酸より過剰のナトリウムイオン (塩分) が含まれていることが分かった。分析結果に従ってこれら 4 種のアミノ酸と塩化ナトリウムを同じ量論比で含む模擬液を調製し、Cu-IDA を用いてカルノシン類の吸着実験を行った結果、実際の加工廃液組成に対しても銅(II)担持樹脂を用いてアンセリン・カルノシンを回収できることが示された。

次に、市販されるセルロース系イミノ二酢酸キレート吸着剤 (CF) に Cu (II) を吸着担持

させ (Cu-CF)、カルノシン類の吸着挙動を検討した。図8に CF および Cu-CF による Car 吸着の pH 依存性を示す。イミノ二酢酸型のセルロース系吸着剤である CF が塩存在下では Car を吸着できないのに対し、Cu-CF は Cu(II) を担持させたポリスチレン系キレート吸着剤と同様に Car を吸着回収することができた。また、Cu-CF によって塩類や他のアミノ酸が共存する溶液からカルノシン類が選択的に吸着された。

図9に各 Cu(II)担持吸着剤による Car 吸着の経時変化を示す。親水性のセルロース系の吸着剤である Cu-CF では Car の吸着は数時間で平衡に到達し、Cu(II) を担持したポリスチレン系吸着剤 (Cu-CR11) より吸着速度が大幅に速いことが示された。一方、セルロース系の吸着剤は共存タンパク質によるカルノシン類の回収の阻害が小さいことが期待されたが、検討の結果この点での優位性は小さかった。

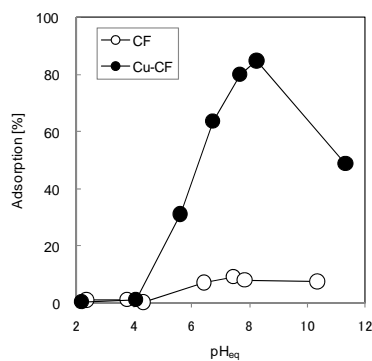


図8. セルロース系吸着剤による Car 吸着の pH 依存性: Vol; 15 cm³, 吸着剤; 30 mg, $[Car]=0.25$ mM, $[NaCl]=100$ mM.

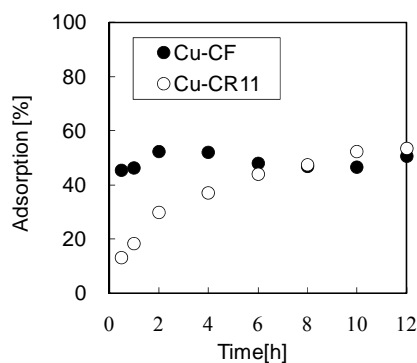


図9. Cu(II)担持キレート吸着剤による Car 吸着の経時変化: Vol; 15 cm³, 吸着剤; 30 mg, $[Car]=0.25$ mM, $[NaCl]=100$ mM, pH_{ini} 12.0.

次に、Ag(I)イオンを吸着固定化した吸着剤による、各種アミノ酸の吸着について検討した。Ag(I)を担持させるキレート吸着材としてイミノ二酢酸樹脂、チオ尿素樹脂の2種類を用いた。調製した Ag(I)担持樹脂は、いずれも担持前のキレート樹脂が吸着できない塩

存在下の条件でメチオニンを吸着することができた。しかしながら Ag(I)担持イミノ二酢酸樹脂は担持した樹脂からの銀(I)の溶出量が大きいと、Ag(I)担持チオ尿素樹脂(図10)がより適していると考えた。

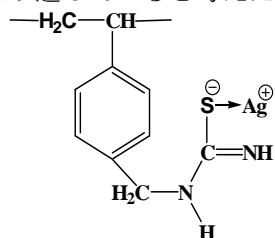


図10. チオ尿素キレート樹脂 (TP214) の構造と Ag(I)吸着の模式図

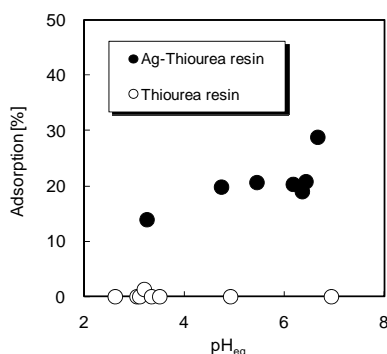


図11. チオ尿素樹脂および Ag(I)担持チオ尿素樹脂によるメチオニン(Met)の吸着における pH 依存性 : Vol;15cm³, 吸着剤; 30 mg, [Met]=0.25 mM, [NaNO₃]=100 mM.

チオ尿素樹脂および Ag(I)担持チオ尿素樹脂におけるメチオニン(Met) 吸着の pH 依存性を図11に示す。チオ尿素樹脂において全 pH 領域で Met が吸着されないのに対し、Ag(I)担持樹脂においては同 pH 領域で Met が吸着され、pH 6-7 付近で最も高い吸着率を示した。Met は塩存在下で吸着されており塩 (NaNO₃) 濃度依存性を調べた結果、吸着は共存塩による阻害をほとんど受けなかったことから、担持された Ag(I)との配位結合に基づいて吸着が行われていることが示唆された。またメチオニンの飽和吸着量は樹脂への銀(I)イオンの担持量を増すほど大きくなった。

Ag(I)担持樹脂によるアミノ酸混合溶液からの吸着実験結果を図12に示す。図より Met, Tyr, Phe, Trp, His の吸着率が大きかった。硫黄(S)、芳香環等を有するアミノ酸が Ag(I)との親和性によって選択的に吸着されたと考えられる。

また、Ag(I)担持樹脂に吸着されたアミノ酸は水で浸透することで簡単に脱着された。さらに、Ag(I)担持樹脂は同じく硫黄を分子構造内に有するビタミン B₁ も吸着できることが示された。ただし、塩化物イオン (Cl⁻) が存在する溶液に対して銀(I)担持樹脂を用いると塩化銀沈殿を生じるために樹脂の有効性

が損なわれる。このため Ag(I)担持吸着剤の用途は限定的であると考えられる。

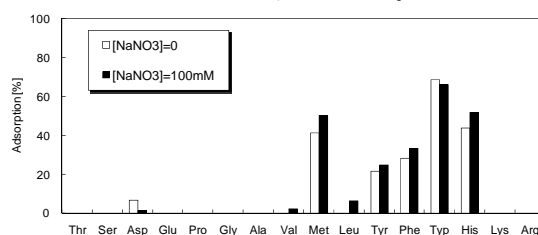


図12. Ag(I)担持樹脂による混合溶液からの各種アミノ酸の吸着 : Vol;15 cm³, 吸着剤; 100 mg, [Amino acids]=0.25 mM (respectively), pH_{ini} 6.2-6.7.

IMAC 法と限外ろ過を組み合わせたヒスチジン含有ジペプチドの回収について、まず水溶性キレートゲルの開発を行った。デキストラン (Dex) を原料に調製したイミノ二酢酸を導入したデキストラン (IDA-EGDE-Dex) には Cu(II)が 0.44 mmol g⁻¹ 固定された。Cu(II)担持デキストラン (Cu(II)IDA-EGDE-Dex) にカルノシンを保持させて限外ろ過で分離した結果、1 時間程度でカルノシンが回収され、ポリスチレン系キレート樹脂を用いた場合より短時間でカルノシンを回収できることが示された。

Cu(II)担持デキストランによる Car 回収の pH 依存性を図13に示す。NaCl 存在下において Dex および IDA-EGDE-Dex は Car を全く回収できなかったのに対し、Cu(II)IDA-EGDE-Dex は高い Car 回収率を示し、pH8-9 付近で回収率は最大となった。回収率は NaCl 濃度に依存せず、1M NaCl 存在下でもカルノシンが回収された。

Cu(II)IDA-EGDE-Dex による混合系からの各種アミノ酸および HCDP の回収率を図14に示す。多くのアミノ酸の回収率が低い値を示したのに対し、His, Car および Ans の回収率は比較的大きく、選択的に目的ペプチドを回収できることが示された。

Cu(II)IDA-EGDE-Dex で回収された Car の各種脱離剤による脱離を検討した結果、10 mmol dm⁻³ 以上の酢酸、イミノ二酢酸、イミ

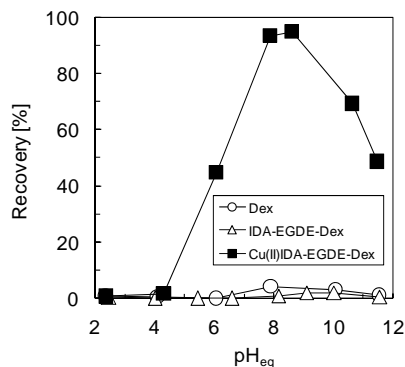


図13. デキストラン誘導体によるカルノシン回収の pH 依存性 : Vol;15 cm³, 吸着剤; 100 mg, [Car]=0.10mM, [NaCl] = 100 mM, reagent = 30mg.

ダゾールで効率的に脱離し回収することができ、酢酸およびイミダゾールでは脱離に伴う Cu(II)の溶出も少なかった。さらに、回収および脱離の繰り返しを行った結果、5回の繰り返しでも Car を回収率は維持された。

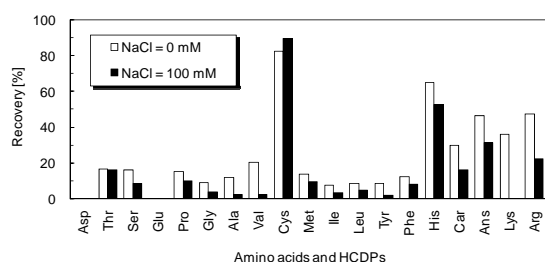


図 14. Cu(II)IDA-EGDE-Dex による混合系からの各種アミノ酸および HCDP の回収 : Vol;15 cm³, Cu(II)IDA-EGDE-Dex; 30 mg, [Amino acids]=0.10 mM (respectively), pH_{ini} 8.0.

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 3 件)

T. Oshima, K. Kanemaru, K. Ohe, Y. Baba, Adsorption Behavior of Carnosine and Anserine on Copper (II) immobilized cation exchange resins, *J. Ion Exchange*, 18, 190–193, 2007

T. Oshima, K. Kanemaru, H. Tachiyama, K. Ohe, Y. Baba, Adsorption of histidine- containing dipeptides on copper (II) immobilized chelating resin from saline solution, *J. Chromatogr. B*, 876, 116-122, 2008

T. Oshima, Y. Yamanaka, K. Ohe, Y. Baba, Adsorption of sulfur-containing amino acid and vitamin on silver (I) immobilized chelating resin, *Solv. Extr. Res. Dev. Jpn.*, 16, *in press*, 2009

[学会発表] (計 9 件)

金丸兼三、大栄薫、大島達也、馬場由成、金属担持樹脂によるアンセリン・カルノシンの回収、第 44 回化学関連支部合同九州大会、2007/07/07

金丸兼三、大栄薫、大島達也、馬場由成、キレートアフィニティーを利用したアンセリン・カルノシンの選択的吸着回収、化学工学会 39 秋季大会、2007/9/13-15

T.Oshima, K.Kanemaru, K.Ohe, Y.Baba, Adsorption Behavior of Carnosine and Anserine on Copper (II) immobilized cation exchange resins, The 4th International Conference on Ion Exchange, 2007/10/15-19

金丸兼三、大島達也、大栄薫、馬場 由成、金属キレートアフィニティーに基づいた限外ろ過法によるカルノシン類の回収、化学工学会沖縄大会、2008/8/8-9

大島 達也、山中 佑一郎、金丸 兼三、大栄 薫、馬場由成、銀(I)担持キレート樹脂によるアミノ酸類の吸着特性、化学工学会第 40 回秋季大会、2008/9/24-26

大島達也、金丸兼三、立山 穂津美、大栄 薫、馬場 由成、銅(II)担持キレート樹脂による塩類存在下でのカルノシン類の吸着特性、化学工学会第 40 回秋季大会、2008/9/24-26

大島 達也、金丸 兼三、立山 穂津美、大栄 薫、馬場 由成、遷移金属担持キレート樹脂による塩水からのカルノシン類の吸着特性、第 24 回日本イオン交換研究発表会、2008/10/11-12

金丸兼三、大島達也、大栄薫、馬場 由成、IMAC 法と限外ろ過を組み合わせたヒスチジン含有ペプチド分離法の開発、化学工学会第 74 年会、2009/3/18-20

大島 達也、立山 穂津美、大栄 薫、馬場 由成、遷移金属担持キレート樹脂を用いたカルノシン類の分離濃縮、化学工学会第 74 回年会、2009/3/18 - 20

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：金属担持高分子を用いた多成分混合溶液からのヒスチジン含有ペプチドの回収方法

発明者：大島達也

権利者：宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2008-204212

出願年月日：2008/8/7

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島達也 (OSHIMA TATSUYA)

宮崎大学・工学部・准教授

研究者番号：00343335