

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-121052

(P2010-121052A)

(43) 公開日 平成22年6月3日(2010.6.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C09K 3/18 (2006.01)	C09K 3/18	4B022
C09K 3/00 (2006.01)	C09K 3/00 102	4B065
C09K 5/00 (2006.01)	C09K 5/00 Z	4H020
A23L 3/37 (2006.01)	A23L 3/37 A	
C12N 5/00 (2006.01)	C12N 5/00 D	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2008-296523 (P2008-296523)
 (22) 出願日 平成20年11月20日 (2008.11.20)

(71) 出願人 399030060
 学校法人 関西大学
 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号
 (74) 代理人 100074332
 弁理士 藤本 昇
 (74) 代理人 100114421
 弁理士 薬丸 誠一
 (74) 代理人 100114432
 弁理士 中谷 寛昭
 (74) 代理人 100134452
 弁理士 小山 雄一
 (72) 発明者 小幡 斉
 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学
 校法人関西大学化学生命工学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 餡粕抽出エキスの抗氷核活性剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】異物となる無機物、有機物等に特異的な活性を有することがなく、工業的な生産が可能であり、食品用途への応用等を期待できる抗氷核活性剤を提供する。

【解決手段】 餡粕を、熱水によって20～40分間抽出した抽出エキスの、オリゴペプチドを含む、分子量3500以下の画分を含有する、抗氷核活性剤と、その製造方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

餡粕の抽出エキスを含有することを特徴とする抗氷核活性剤。

【請求項 2】

餡粕の抽出エキ스가、熱水によって抽出されたエキスである請求項 1 記載の抗氷核活性剤。

【請求項 3】

餡粕の抽出エキ스가、分子量 3 5 0 0 以下の画分を含む請求項 1 又は 2 記載の抗氷核活性剤。

【請求項 4】

餡粕の抽出エキスの分子量 3 5 0 0 以下の画分が、オリゴペプチドを含む請求項 3 記載の抗氷核活性剤。

【請求項 5】

餡粕を熱水によって抽出し、抽出されたエキスを含有させて製造することを特徴とする抗氷核活性剤の製造方法。

【請求項 6】

餡粕の熱水による抽出時間が 2 0 ~ 4 0 分である請求項 5 記載の抗氷核活性剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、食品加工廃棄物である餡粕から抽出されたエキスを含有する抗氷核活性剤に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

餡粕は、生餡（こしあん）を製造する際に生じる食品加工廃棄物であり、小豆等の豆類から生餡を製造する際に餡粕が生じ、その餡粕の量は、原料の豆の全重量の約 2 0 % にも達する程に多いものである。しかし、従前では餡粕の有効な利用法がなく、一部が畜産農家に飼料として無償で提供されているにすぎないものであった。

【0 0 0 3】

このような点に鑑み、餡粕の有効利用を図るために、下記特許文献 1 乃至 3 のような特許出願がなされている。特許文献 1 は、調味料の製造法に関するものであり、特許請求の範囲にも記載されているように、「餡粕に麹菌を接種、増殖させ、これに加水して糖化を行い、ここに酵母を加えて増殖させ、その菌体を分解し、各種呈味成分を生成させる」ものである。

【0 0 0 4】

また特許文献 2 は、廃油処理剤及び廃油の処理方法に関するものであり、請求項 2 にも記載されているように、「畜糞、生ごみ、污泥、もみがら、餡粕、パーク、紙、その他、放線菌又はノ及び黴類培地材料の 1 以上を含む放線菌又はノ及び黴類培地に放線菌又は黴類を接種、培養し、得られた放線菌又は黴類増殖培地と廃油又は廃油含有物と接触させる」ものである。さらに、特許文献 3 は、糸状菌の培養培地に関するものであり、請求項 1 に記載されているように、「餡粕を主たる原料とし、これに米糠などの有機栄養助剤、カリウムなどの無機栄養助剤、海綿などの培養助剤、pH 調整剤を加えて水分を調整した」ものである。

【0 0 0 5】

特許文献 1 に係る発明は、餡粕に麹菌や酵母を加えるものであり、特許文献 2 に係る発明は、廃油又は廃油含有物と接触させる培地の一成分として含有させるものであり、特許文献 3 に係る発明は、糸状菌の培養培地の一成分として餡粕を用いるものであり、いずれも餡粕を菌の培養や増殖等の目的で使用するものである。

【0 0 0 6】

10

20

30

40

50

本発明者等は、上記特許文献1乃至3のような餡粕の利用法ではなく、餡粕に過冷却点を低下させる性質、すなわち抗氷核活性を有するのではないかとの知見に基づき、鋭意研究を行った。抗氷核活性を有する物質として、細菌が生産する抗氷核タンパク質（非特許文献1）や、抗氷核多糖（非特許文献2）、さらにはポリフェノール多糖（非特許文献3）等の報告がある。

【0007】

しかし、従来の抗氷核活性物質は、異物となる無機物、有機物に特異的な活性を有していたり、工業的に生産が不可能であったり、或いは食品用途への応用が難しい等、多様な問題を有していた。

【0008】

【特許文献1】特公平4-69986号公報

【特許文献2】特開2002-247976号公報

【特許文献3】特開2002-204685号公報

【非特許文献1】H.Kawahara et al., Biocontrol Sci., 1, 11-17, 1996

【非特許文献2】Y.Yamashita et al., Biosci.Biotechnol.Biochem., 66,948-954,2002

【非特許文献3】J.Kasuga et al., Plant Cell Environ., 31, 1335-1348, 2008

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、上記のような問題を解決するためになされたもので、異物となる無機物、有機物等に特異的な活性を有することがなく、工業的な生産が可能であり、食品用途への応用等を期待できる抗氷核活性剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、このような課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、餡粕抽出エキスを優れた抗氷核活性があることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、餡粕の抽出エキスを含有することを特徴とする抗氷核活性剤を提供するものである。

【0011】

餡粕の抽出エキスは、主として熱水によって抽出される。餡粕の抽出エキスは、優れた抗氷核活性値を示すことから、分子量3500以下の画分を含むものであることが望ましい。また、同様に優れた抗氷核活性値を示すことから、上記抽出エキスの分子量3500以下の画分は、オリゴペプチドを含むものであることが望ましい。

【0012】

さらに、本発明は、餡粕を熱水によって抽出し、抽出されたエキスを含有させて製造することを特徴とする抗氷核活性剤の製造方法を提供するものである。この場合の抽出時間は特に限定されるものではないが、20～40分であることが望ましく、25～35分であることがより望ましい。

【発明の効果】

【0013】

本発明によって、異物となる無機物、有機物等に特異的な活性を有することがなく、工業的な生産が可能であり、食品用途への応用等を期待できる抗氷核活性剤を提供することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の抗氷核活性剤は、上述のように、餡粕の抽出エキスを含有するものである。本発明において、「抗氷核活性剤が餡粕の抽出エキスを含有する」とは、本発明の抗氷核活性剤が、餡粕の抽出エキスのみからなるものであってもよく、また餡粕の抽出エキスの他に、他の成分を含有していてもよいことを意味する。

【0015】

餡粕は、上述のように、生餡の製造過程で生じるものであり、その原料は小豆等の豆類

10

20

30

40

50

である。原料の小豆等の品種や産地は問うものではない。

【0016】

本発明の抗氷核活性剤に含有される餡粕の抽出エキスの抽出方法は限定されるものではないが、熱水で抽出することが望ましい。抽出時間は特に限定されないが、20～40分であることが望ましく、25～35分であることがより望ましい。

【0017】

上記のような抽出操作により得られた餡粕抽出物をそのまま抽出エキスとして使用してもよく、さらに精製して使用してもよい。本発明のエキスの精製には種々の手段、方法を用いることができ、たとえば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー法、セルロース膜や合成膜を用いる限外濾過法、逆浸透法、吸着法、有機溶媒分画等の分離法を用いることができる。

10

【0018】

また必要に応じて、生じた沈殿を遠心分離してもよい。後述のように、本発明のエキス中の抗氷核活性の多くは分子量約3500以下の画分に存在することから、分子量分画段階を精製工程中に含めることが好ましい。

【0019】

本発明の餡粕の抽出エキスは、抗氷核活性剤中に有効成分として含有される。その場合、本発明の餡粕抽出エキスを適宜濃縮あるいは希釈して用いてもよく、液状あるいは固形（粉末・顆粒等）に処理加工して用いてもよい。餡粕抽出エキスの濃縮は、たとえばエバポレーターによる蒸発により行うことができ、餡粕抽出エキスの希釈は、たとえば水等で行うことができる。いずれにしても、餡粕抽出エキスの形態は、その用途に応じて種々のものとすることができる。

20

【0020】

さらに、本発明の餡粕の抽出エキスを含有する抗氷核活性剤を製剤化する場合の剤形も特に限定されるものではなく、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、カプセル、顆粒、粉末、クリーム、軟膏、等、その種類は問わない。

【実施例】

【0021】

以下、本発明の実施例について説明する。

【0022】

（実施例1）食品加工廃棄物からの抗氷核活性剤のスクリーニング

そば粕、ワイン粕、餡粕、カカオハカスを熱水等で抽出し、それぞれ100 μ lずつ準備した。これらの試料は、一般的な食品加工メーカーや酒造メーカーから入手したものである。これらの試料に濃度1mg/mlのヨウ化銀1mlを添加し、140rpmで20分攪拌した。

30

【0023】

次に、これらの試料の抗氷核活性を測定した。各試料の濃度は1mg/mlとした。抗氷核活性は、Valiの小滴凍結法によって測定した。Valiの小滴凍結法の原理は、銅版の上にアルミニウムのフィルムを置き、その表面に各試料及びブランクの試料を10 μ lずつ30箇所に滴下し、毎分1.0の速度で温度を低下させて、30個の小滴の50%が凍結する温度を T_{50} とする。

40

【0024】

各試料の上記小滴凍結時の温度をSample T_{50} とし、ブランクの試料の上記小滴凍結時の温度をBlank T_{50} とすると、抗氷核活性値 T_{50} () は、

$$T_{50} () = \text{Blank } T_{50} - \text{Sample } T_{50}$$

で求められる。各試料は、上記ワイン粕、餡粕、カカオハカスからの抽出エキスをヨウ化銀を添加してものものであり、ブランクの試料はヨウ化銀のみからなるものである。

【0025】

尚、上記のようなValiの小滴凍結法によって抗氷核活性を測定する前に、各試料をリン酸緩衝液で調製する必要があるが、本実施例では、リン酸緩衝液として、50mMの

50

リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

【0026】

Vali の小滴凍結法の原理は上述のとおりであるが、実際には微水滴凍結測定装置が用いられる。本実施例では、微水滴凍結測定装置として、ミツワモデル K - 1 (山本テクニカル株式会社製) を用いた。

【0027】

上記抗氷核活性の測定の結果、そば粕、ワイン粕、カカオハカスの抗氷核活性値がそれぞれ 0.8、0.5、0.5 であったのに対し、餡粕の抗氷核活性値は 1.2 であり、そば粕、ワイン粕、カカオハカスに比べて餡粕の抗氷核活性値の方が大きいことがわかった。

10

【0028】

(実施例 2) 濃度変化に伴う抗氷核活性値の変化

次に、濃度変化に伴う餡粕の抗氷核活性値の変化を確認した。抗氷核活性値の測定は、上記ミツワモデル K - 1 (山本テクニカル株式会社製) を用い、上述のような Vali の小滴凍結法によって行った。その測定結果を図 1 のグラフに示す。図 1 から明らかなように、乾燥重量濃度の増加に伴って抗氷核活性値が増加することが確認できた。具体的には、乾燥重量濃度 0.5 mg/ml で抗氷核活性値 0.8 であり、乾燥重量濃度 1.0 mg/ml で抗氷核活性値 1.4 であり、乾燥重量濃度 2.0 mg/ml で抗氷核活性値 2.0 であり、乾燥重量濃度 4.0 mg/ml で抗氷核活性値 2.6 であり、乾燥重量濃度 8.0 mg/ml で抗氷核活性値 3.0 であった。

20

【0029】

(実施例 3) 餡粕エキスの抽出及び試料の調製

次に、餡粕エキスの抽出を行った。具体的には、先ず餡粕 1 g を準備し、これに蒸留水 5 ml を添加した後、その蒸留水を煮沸して餡粕エキスを抽出した。このような煮沸による抽出 (熱水抽出) は 30 分間行った。このような煮沸による抽出後、抽出された餡粕エキスを凍結乾燥し、後述の実施例で用いる餡粕抽出試料とした。

【0030】

(実施例 4) 透析による分画

次に、上記実施例 3 で得た餡粕抽出試料を水に溶解して乾燥重量濃度 1.0 mg/ml とし、その水溶液について透析による分画を行った。具体的には、上記餡粕抽出試料を限外濾過膜 (分画分子量 3500 : Advantec 社製) によって、分子量 3500 以上の画分と分子量 3500 以下の画分とに分画した。

30

【0031】

得られた分子量 3500 以上の画分、及び分子量 3500 以下の画分について、それぞれ抗氷核活性を測定した。抗氷核活性値の測定は、上記ミツワモデル K - 1 (山本テクニカル株式会社製) を用い、上述のような Vali の小滴凍結法によって行った。

【0032】

測定の結果、分子量 3500 以上の画分の抗氷核活性値が 0.4 であったのに対して、分子量 3500 以下の画分の抗氷核活性値は 1.0 であった。この結果から、餡粕抽出エキスのうち、抗氷核活性を示すものの多くが分子量 3500 以下の画分にあることがわかり、抗氷核活性を示す物質は低分子量の物質である可能性が示唆された。

40

【0033】

(実施例 5) 吸収スペクトルの測定

上記餡粕抽出エキスの分子量 3500 以下の画分について、分光光度計を用いて紫外線吸収スペクトルを測定した。吸収スペクトルのチャートを図 2 に示す。図 2 から明らかなように、波長 200 nm の近辺に吸収を示した。この吸収スペクトルの測定の結果から、分子量 3500 以下の画分に、タンパク質 (ペプチド) が含有されていることが推測される。

【0034】

(実施例 6) 成分分析

50

上記実施例5の結果に基づき、上記餡粕抽出エキスの分子量3500以下の画分について、タンパク質、糖、ポリフェノールの定量分析を行った。定量分析の結果、タンパク質が223.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、糖が140.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ポリフェノールが64.93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で含有されていることがわかった。

【0035】

タンパク質量の測定は、BCA法によって行った。BCA法には、Pierce社のBCA Protein Assay Kitを用いた。すなわち、上記の試料50 μl と、試薬A：試薬Bが5：0.1になるように混合した溶液1mlを添加し、60、30分間処理を行った。ここで、試薬A及び試薬Bとは、上記Pierce社のキットに、BCA Reagent A、BCA Reagent Bとして含まれている試薬である。その後、調製した溶液は、分光光度計を用いて波長570nmの吸光度を測定した。検量線は、牛血清アルブミンを用いた。

10

【0036】

また、糖の量の測定は、フェノール硫酸法によって行った。すなわち、上記の試料50 μl と5%フェノール水溶液500 μl を混合し、攪拌する。それに濃硫酸2.5ml添加し、すぐに10分間激しく攪拌する。室温に20分以上放置した後、分光光度計を用いて波長490nmの吸光度を測定した。検量線は、グルコースを用いた。

【0037】

さらに、ポリフェノール量の測定はFolin-Ciocalteuの方法によって行った。すなわち、試料200 μl と水3.2mlを試験管に入れて攪拌し、飽和炭酸ナトリウム溶液を400 μl 加え30分間放置した。その後、調製した溶液は、分光光度計を用いて波長760nmの吸光度を測定した。検量線は、カテキンを用いた。

20

【0038】

上記の成分分析の結果から、餡粕抽出エキスのうち、分子量3500以下の画分は、タンパク質(ペプチド)を多く含むものであることがわかった。

【0039】

(実施例7)ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

上記餡粕抽出エキスの分子量3500以下の画分について、さらにゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った。担体にはセファデックスLH-20を用い、溶出液には50容量%のメタノールを用いた。また、カラムのサイズは、1.0cm \times 120cmのものを用い、流速は1.0ml/minとした。ゲル濾過クロマトグラフィーとしては、フラッシュクロマトグラフSYS16020(東京理科器械株式会社製)を用いた。

30

【0040】

得られたチャートを図3に示す。図3において、横軸には溶出液量を示し、縦軸には285nmにおける吸光度を示している。図3からも明らかなように、溶出液量の4箇所の位置(75ml、105ml、130ml、150ml)にピークが認められた(図3において1、2、3、4の番号で示す)。ピークが認められた溶出液量の4種類のフラクション(図3の1、2、3、4の番号で示すもの)を採取し、それぞれのフラクションについて抗氷核活性値を測定した。

【0041】

抗氷核活性値の測定は、上記ミツワモデルK-1(山本テクニカル株式会社製)を用い、上述のようなValiの小滴凍結法によって行った。その結果、溶出液量が75mlのフラクションは0.4であり、溶出液量が105mlのフラクションは0.6であり、溶出液量が130mlのフラクションは2.2であり、溶出液量が150mlのフラクションは2.6であった。

40

【0042】

(実施例8)マススペクトルによる分子量分画

上記のようにゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った後の試料について、液体クロマトグラフィーマススペクトル(LC-MS)を行った。LC-MSの質量分析装置としては、アプライド株式会社製のAPI-3000を用いた。また、LC-MSのHPLCとしては、Agilent社製の1100seriesを用いた。HPLCの移動相にはアセトニトリ

50

ル/水を用い、カラムのサイズは4.6 mm × 150 mmのものを用い、流速は1.0 ml/minとした。

【0043】

得られたチャートを図4に示す。図4からも明らかなように、分子量が360のあたりに吸収が認められた。このことから、分子量360近辺の画分のもものが多く含まれていることがわかった。

【0044】

(実施例9) 定性、定量試験

上記マススペクトルによる分子量分画を行った360近辺の画分のものについて、ニンヒドリン反応を行ったところ陽性を示した。また、上記360近辺の画分のものについて吸収スペクトルを測定したところ、215 nmと285 nmに吸収ピークが認められ、カルボン酸の存在が確認でき、上記360近辺の画分のもものがペプチドであることが示唆された。さらに、BCA法を行ったところ、ペプチドの存在を確認することができた。BCA法は、上記実施例6と同様に行った。

10

【0045】

これらの結果から、本実施例で確認できた物質がペプチドであると認められ、分子量が上述のように約360程度であることから、オリゴペプチドであると認められる。

【産業上の利用可能性】

【0046】

本発明の餡粕抽出エキスを含有する抗氷核活性剤は、冷凍食品品質保持剤等の食品分野、霜害防除剤、霜付着阻害剤等の環境分野、細胞保存液、臓器保存液等の医療分野等に広く適用することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0047】

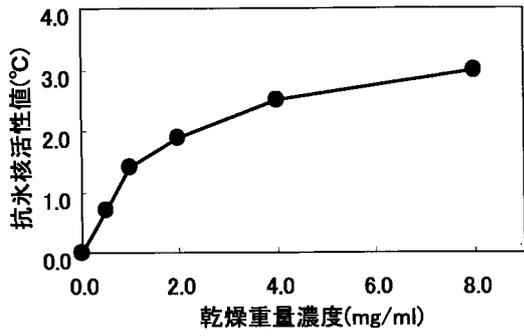
【図1】乾燥重量濃度の変化に伴う抗氷核活性値の変化を示すグラフ。

【図2】分子量3500以下の画分の吸収スペクトルを示すチャート。

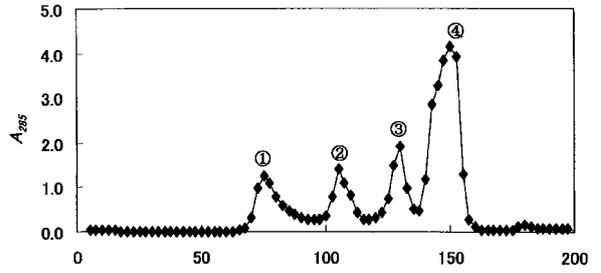
【図3】分子量3500以下の画分のゲル濾過クロマトグラフィーのチャート。

【図4】分子量3500以下の画分のマススペクトルチャート。

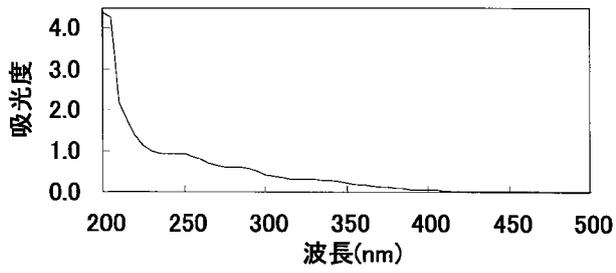
【 図 1 】



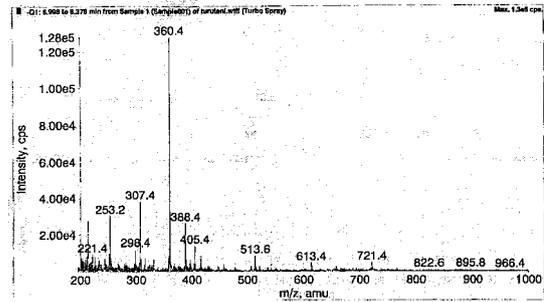
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 河原 秀久

大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学化学生命工学部内

Fターム(参考) 4B022 LB01 LB09 LJ04

4B065 AA90 AC03 BD09 BD12 BD39 BD43 CA41 CA44 CA55

4H020 AA03 AB01