

牛乳の機能性タンパク質素材の分離技術

山本圭介*

(森永乳業株式会社 研究本部 素材応用研究所, 〒252-8583 神奈川県座間市東原 5-1-83)

Separation & Purification Technologies of Functional Milk Protein

Keisuke Yamamoto

(Morinaga Milk Industry Co., LTD. Food Ingredients & Technology Institute, R&D Division, 1-83, 5-Chome, Higashihara, Zama-City, Kanagawa 252-8583, Japan)

要旨

牛乳中のタンパク質は栄養価が高いたけではなく、さまざまな食品に風味や物性を付与する機能、生体調節や感染防御をはじめとした生理機能を持っている。乳タンパク質が持つこれらの機能を利用するため、乳タンパク質と他成分を分離する技術の研究が進み、実製造へ応用されてきた。乳タンパク質を選択的に分離し、産業領域で応用するための課題としては、風味や物性や生理機能などの特徴を生かせること、組成や品質を安定させ得ること、副生成物が少ないことあるいは他製品として応用できること、低コストで製造できることなどが挙げられる。

乳中に含まれるタンパク質は溶解性、分子量、等電点などの物性が異なり、この特徴を利用して工業的に分離、濃縮することができる。現在では、固液分離法、膜分離法、イオン交換法などの技術によって、カゼイン、乳タンパク質濃縮物 (MPC)、乳清タンパク質濃縮物 (WPC)、乳清タンパク質単離物 (WPI) などが製造されており、また、特定の機能性タンパク質、例えば牛乳中に僅か0.01%しか存在しないラクトフェリン (LF) を高度に精製した製品なども製造されている。

今後とも、新たな機能性タンパク質の分離に向けた継続的な技術の向上と、新たな乳タンパク質素材の開発が期待される。

1. はじめに

生体においてタンパク質は筋肉、内臓、皮膚などの構成成分として非常に重要な役割を担っている¹⁾。乳は、哺乳類の新生仔が成長するために必要な全ての栄養素を含んでいる食品であり、タンパク質についても、必須アミノ酸含量が高く、消化吸収性に優れた良質なタンパク質であるカゼインや乳清タンパク質に加えて、ラクトフェリンや免疫グロブ

リンに代表される多種多様な生体調節機能を持ったさまざまな微量タンパク質から構成されている。また我々は、乳、特に牛乳を利用してきた長い歴史の中で、乳タンパク質にはゲル化性や乳化性などの特性があることも見出しており、乳タンパク質は栄養素としての応用に留まらず、物性改良機能を持つ素材としても利用されている。

このように乳タンパク質の応用範囲は非常に広い。そのため、タンパク含量を高めた製品、特定のタンパク質成分を濃縮した製品、微量な機能性タンパク質を分離精製した製品、分解や修飾などの二次加工を行

* Tel: 046-252-3579

E-mail: ke-yamamoto@morinagamilk.co.jp

った製品などが、さまざまな食品や飲料、タンパク質を強化した食品、育児用ミルク、食品の物性改良剤や添加物、機能素材、細菌や細胞などの培養素材、工業用や化成用途用の原料として応用されており、国内外において市場が伸長している。

一方で、牛乳中には水分が約87.4%、タンパク質以外の脂肪や炭水化物、ミネラルが約9.3%含まれており、タンパク質は約3.3%しか含まれていない。生体調節機能を持った特定のタンパク質となると、その含量は更に少量となり、例えば前述のラクトフェリンなどは牛乳中に僅か0.01%程度しか含まれていない。すなわち、牛乳中のタンパク質を濃縮した製品の製造を想定した場合には、対象としたタンパク質を濃縮する技術、水分を含めた他成分とタンパク質を分離する技術の構築が必要となる。学術的な研究が発展する以前から、カゼインを主体としたタンパク質を固体として分離するチーズの製造が行われており、また、19世紀には酸沈殿や硫酸ナトリウムを用いた塩析によるカゼインの沈殿分離にかかわる学術的な論文が発表されている²⁾。乳からタンパク質を分離する技術については、古くから、多くの製造者や研究者が知見を積み重ねてきた分野でもある。

現代につながる工業的な分離技術が発展したのは1950年頃からである。当時は、育児用ミルクと母乳の組成の相違を改善するための脱塩技術、廃棄されていたチーズホエイを環境負荷低減の視点から有効活用する技術などが求められており、これらの課題を解決するために、乳成分の分離技術が発展した。水の精製、海水淡水化、製塩のために研究が進められていた膜分離、イオン交換、電気透析(ED: Electro Dialysis)技術の乳業領域への導入や発展は、今日につながる大きな転機であった³⁾。EDがホエイの脱塩に活用されたのを皮切りに⁴⁾、1960年代にはタンパク質の吸着性に優れたイオン交換体が開発され⁵⁾、1970年代にはUFやROなどの圧力駆動による膜分離技術を応用したホエイや脱脂乳のタンパク質の濃縮が盛んとなり⁶⁾、これらの技術が更に深化し、微量なタンパク質の分離精製も含めた乳

中のタンパク質の工業レベルでの分離精製技術が発展した。酸処理、レンネット処理、加熱などによるチーズ製造から明らかなように、タンパク質は化学的、生物的、物理的な処理によってその物性が変化し、場合によっては期待する機能や生理活性が失われる場合もあり、これらの物性変化を招かない分離精製技術が求められていた。この意味では、化学的、熱的な処理を加えないこれらの技術は、乳タンパク質の分離に最適であり、発展は必然であったであろう。

本稿では、主に工業的に応用されている乳中の機能性タンパク質の分離技術について概説する。尚、基本的にこの分野は、それぞれの企業の事業や資産や技術に直結するため、詳細な手法については社外秘扱いとされているものも多く、公開されている情報は限られたものであることをご理解頂きたい。

2. 基本となる分離技術

乳タンパク質はそれぞれ溶解度、変性温度、等電点、分子量などの性質が異なり、これらの特性の違いを利用して分離することができる⁷⁾。実験室レベルで実施される手法も含めて、タンパク質の分離に比較的広く用いられる分離技術を表1に示す。これらの分離技術は、食品に限らず、生化学や製薬の分野でも活用されているが、食品分野における工業的な運用を考えると、対象とした成分の変性度や生

表1 タンパク質の分離に用いられる主な手法

手 法	分離の原理
選択的沈殿・再結晶化 • 塩析・アルコール沈殿 • 等電点沈殿 • 加熱による沈殿	水(溶媒)への溶解度 塩溶液(溶媒)中の溶解度 pHによる溶解度 変性温度の違い、水(溶媒)への溶解度
クロマトグラフィー • イオン交換 • アフィニティ • ゲルろ過 • 吸着・疎水性	固定相(樹脂など)、移動相(水など)との結合・親和性 等電点・静電的結合 特異的親和性 分子量サイズ 疎水性相互作用、ファンデルワールス力など
膜分離 酵素・微生物による選択的分解・資化	分子量サイズ 基質特異性

理活性は勿論のこと、必要な資材や設備への投資額、副生成物の有無や応用の可否、廃棄物の処理、設備の稼働にかかわるコスト、工程や制御の安定性なども考慮する必要がある。すなわち、タンパク質の変性を招く処理、組成に大きな影響を与える塩類や薬剤の添加、副生成物側に影響を与えるほどの加熱、有機溶媒の添加、スケールアップの難しい工程などは、食品領域への応用技術として望ましくない場合が多い。

このような要求を満たす技術として、食品産業では、選択的沈殿や固液分離、各種の分離膜を用いた膜分離、イオン交換樹脂による選択的吸着、イオン交換膜を用いた電気透析、特異的な親和性や選択性を利用した樹脂吸着や活性炭吸着、カラムを用いたクロマトグラフィー、およびこれらの技術を組み合わせた工程が広く用いられており⁷⁾、本項にて詳細を記載する。また、牛乳の大部分を占める水と固形分を分離する濃縮や乾燥も広義では分離技術であり、かつ食品原料として保存性を高めるためにも必須な技術であるため、これらについても簡単に概説する。

1) 固液分離、選択的沈殿

同一系に存在している複数成分を、固体と液体の二相に分けて分離する手法が最も簡便な分離技術である。古くから、チーズ製造時に乳を酸処理やレンネット処理してカードを生成させ、布などを用いてろ過し、上清（ホエイ）を分離して回収するという手法が採られていた。これは、通常は乳中に安定に分散しているカゼインミセルが酸処理やレンネット処理によって不安定化し、多くのカゼインが沈殿するという物理学的特性を生かした分離方法であり、当時から非常に理にかなった分離法を実現していたと言える。

対象を乳タンパク質とした場合には、溶解度が最も低下する等電点の違い、変性温度の違い、親水性や疎水性の度合いによる溶解度の違いなどを利用した分離手法が用いられている。例えば、酸カゼインや乳酸カゼインの製造では、脱脂乳に硫酸や塩酸な

どの酸を添加し、あるいは乳酸菌を摂取して一定時間培養してカゼインの等電点である4.6付近までpHを低下させ、生成したカードを分離、洗浄、乾燥する工程が採られている。また、ホエイタンパク質は酸性では比較的安定であるが、pHを α -ラクトアルブミン (α -LA) の等電点付近である4.2にして65°Cまで加熱することで α -LAが選択的に沈殿することが報告されている⁸⁾。微生物や細胞培養用のペプトンやアレルギー対応ミルクに配合されているペプチドなどで採用されているように、乳タンパク質を酵素分解することによって生じた沈殿や濁りを除去して清澄化する工程も固液分離工程に他ならない。

沈殿の回収には、凝集物やカードを布や紙で捕集するフィルターろ過、自然落下によるろ過、フィルタープレス、珪藻土やパーライトなどの助剤を用いたろ過、MFやUFを用いた膜ろ過、デカンターや液体サイクロンなどのような比重差と遠心力を利用した遠心分離機などが用いられる。これらの工程や機器は、乳タンパク質の分離や精製のみならず、乳業を始めとした食品産業全般で汎用されており、また、各種原料の前処理や製品の後処理に利用されることも多いので、馴染み深いのではないかと推察する。

2) 膜分離、膜ろ過 (MF, UF, NF, RO)

膜分離とは、微細な小孔をもつ膜を媒介とし、圧力を駆動力として、小孔を通過する物質としない物質とに分離する技術である。前述のような固液の分離も可能だが、液中に溶解している物質を分子量の大きさによって分離するという目的において特に真価を発揮する。孔径（分画分子量：MWCO (Molecular weight cut-off) と称される) により数種類に分けられ、大きいものから精密ろ過 (MF)、限外濾過 (UF)、ナノろ過 (NF)、逆浸透膜ろ過 (RO) と呼ばれる (図1)^{9,10)}。尚、厳密にはMFは固液分離であり、NF, ROも単なる分子量分画ではないが、本稿では一括して膜分離技術として扱う。

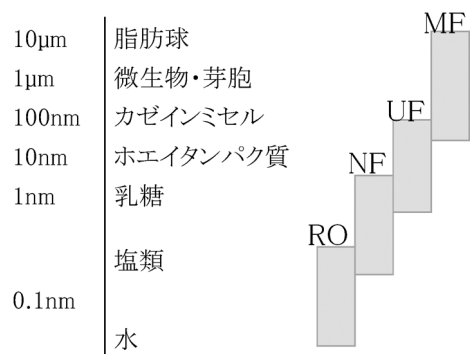


図 1 乳中の成分と膜の分離サイズの目安^{9,10)}

膜分離技術の基本的な原理は、膜の孔径より小さな分子や粒子は膜を透過し、大きな分子や粒子は透過が阻止される「ふるい分け」であり⁹⁾、この原理に加えて、膜表面に電荷や親水・疎水性などの特徴を持たせることによって、透過選択性を調整することもできる。一般的に、孔径が小さい方が液の通過が阻止されるため、高圧での運転が要求されるが、現在ではある程度の低圧でも運転が可能な NF 膜や RO 膜も上市されている。

膜の材質は無機膜と有機膜に大別される。無機膜には、アルミナ (Al_2O_3)、ジルコニア (ZrO_2)、チタニア (TiO_2)、ステンレスなどの材質が用いられ¹¹⁾、有機膜には、四フッ化エチレン (PTFE)、酢酸セルロース (CA)、ポリスルホン (PS)、ポリエーテルスルホン (PES)、ポリフッ化ビニリデン (PVDF)、ポリアミド (PA) などの材質が用いられる。初期には CA のような材質が用いられたが、耐熱性や耐 pH 性が低く、食品産業で用いるには殺菌や洗浄面の課題があったため、近年は耐熱性や耐薬品性に優れた PS, PES, PVDF, PA などの材質の膜が用いられることが多い¹²⁾。膜の形状としては、無機膜ではモノリス型と呼ばれる 1 本の円柱状あるいは多角柱状のセラミックスに多数の細孔が開けられたタイプ (蓮根のような形状) が主流であり、有機膜ではスパイラルワウンド型、平膜型 (プレートアンドフレーム型)、中空糸型、管状型などの種類がある。

無機膜と有機膜を比較すると、無機膜の方が孔径のばらつきが少なく、分離選択性、耐薬品性、耐熱

性、透過性、耐久性などが優れている一方で、衝撃に弱く、非常に高価であるという欠点もある¹¹⁾。有機膜はこれらの物理的な特性は無機膜に及ばないが、安価であり、設備設計面での柔軟性が高く、スケールメリットが大きい利点がある。また、加熱殺菌に対応できる膜、高粘度に対応できるよう膜間スペースを広げた膜、透過性の高い膜、さまざまな分子量の UF 膜や食塩阻止率の NF 膜なども上市されており、更に膜メーカーを跨いだ外寸の規格共通化が進んだこともあり、乳業領域では、ステンレスのハウジング内に複数の有機膜のスパイラルワウンド型エレメントを設置し、これを多段ループのレイアウトで組む設備が主流となっている。

尚、ろ過中に食品成分が膜表面や膜孔内に吸着、付着、目詰まりすることをファウリング¹³⁾と呼ぶが、脂肪分や重合したタンパク質が影響していると考えられ、疎水性が高い膜で起こりやすいとされており、PES や PVDF の表面を親水性のポリマーで処理したような膜素材も開発されている。

ミネラル、ビタミン、乳糖、各種タンパク質、カゼインミセル、脂肪球など、分子量やサイズの異なる多くの物質が混在する乳からさまざまな乳製品や乳素材を製造する産業である乳業においては、膜分離は対象を絞りやすく、加熱などの不可逆的な変性や沈殿を伴わず、タンパク質へのダメージを与えない分離技術であり、これらのメリットは非常に大きいため、さまざまな製造工程へ応用されている。分子量が近い乳タンパク質同士を膜分離のみで分離するのは困難であるが、膜分離技術と他の分離技術を組み合わせることによって分離効率を高めることができる。また、例えば、カゼインは単分子では MF 膜を通過するが、複数のカゼイン分子が会合してミセルとなった状態では分子サイズが大きいため MF 膜を通過できない、というように、見掛け上の分子サイズを制御することによって近縁の分子量の化合物でも分離することが可能となる。後述するイオン交換と比較すると、膜分離設備は比較的安価に設置でき、制御も容易であるため、スケールアップも行いやすい¹⁴⁾。

3) イオン交換

不溶性高分子ポリマーに電荷を持った官能基が導入、固定化された粒子状の樹脂が、プラス帯電したカチオン、マイナス帯電したアニオンとしての挙動を示すイオンや分子を取り込むと同時に、それまで保持していたイオンを代わりに放出する現象をイオン交換と呼び、この機能を持った樹脂はイオン交換樹脂やイオン交換体と呼ばれる(図2)。

担体と呼ばれる高分子ポリマーには、さまざまな官能基を導入できること、低コストであること、強度や耐久性が高いこと、液性による物性変化が少ないことから、ポリスチレンをジビニルベンゼンで架橋した強度の高いスチレン系の樹脂が汎用されており¹⁵⁾、ホエイや乳タンパク質の脱塩などの目的で使用されている。但し、タンパク質そのものを吸着対象とした場合には、スチレン系の樹脂だとポアサイズが小さく、樹脂内部までタンパク質が浸透しにくいために結合容量が少なくなる、高疎水性のため不可逆的な吸着が生じやすいという課題もあり¹⁶⁾、親水性が高く、結合容量が大きなアガロースやデキストランなどの柔軟性の高い糖類系の素材も用いられている。更に、これらの素材をベースにし、複数素材を用いて架橋し、強度や耐久性を高めた担体も開発されている。

担体に導入される官能基は、その特性によって、強酸性、弱酸性、強塩基性、弱塩基性に大別され、

一例としては、スルホプロピル(SP)基のような強酸を導入した強酸性陽イオン交換樹脂、カルボキシルメチル(CM)基のような弱酸を導入した弱酸性陽イオン交換樹脂、4級アミノ(Q)基のような強塩基を導入した強塩基性陰イオン交換樹脂、2級アミノ(ジエチルアミノエタノールアミン・DEAE)のような弱塩基を導入した弱塩基性陰イオン交換樹脂などが挙げられる。一般的に、強酸性や強塩基性の官能基の方が、弱酸性や弱塩基性の官能基と比較して広範囲のpH条件下でイオン交換が可能であり、イオン交換能も高いが、吸着能が高い故に脱離や再生がやや難しく、再生には交換能以上の塩が必要となる¹⁷⁾。一方、弱酸性や弱塩基性の官能基ではpH範囲によってはそのイオン交換能が失われるが、適切な条件を設定した場合には、強酸性や強塩基性の官能基とは違った選択性を持たせることが可能となる。

乳業においては、イオン交換技術は、水処理、ホエイの脱塩プロセス、乳タンパク素材のミネラル調整、ホエイタンパク質の分離、機能性タンパク質の分離精製などの工程で広く用いられている。例えば、ホエイの脱塩工程では、水素型(H⁺)に再生した陽イオン交換樹脂にホエイを通液し、ホエイ中に含まれるナトリウムやカルシウムなどの陽イオンを水素イオンに交換し、次いで水酸基型(OH⁻)に再生した陰イオン交換樹脂に通液して陰イオン

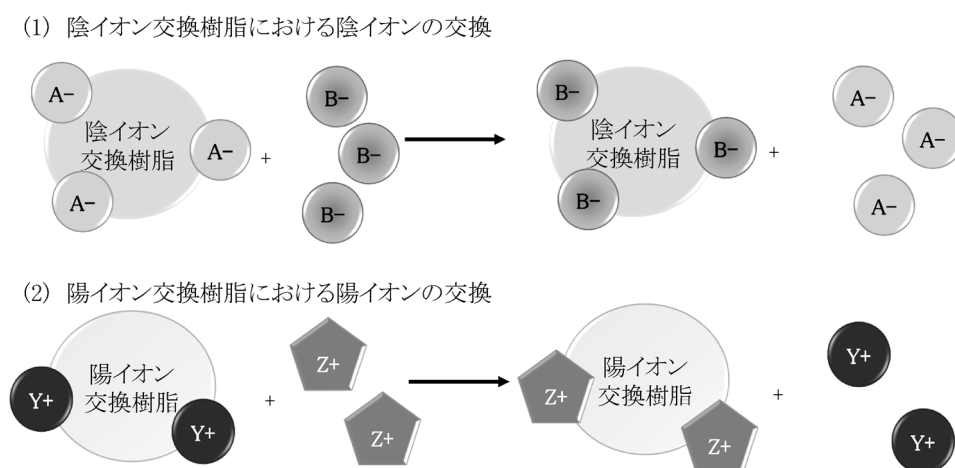


図2 イオン交換の概略図

(クエン酸, リン酸, 塩素, 乳酸) を水酸化物イオンへと置換することによって, 約90~98%の脱塩が可能となることが報告されている¹⁸⁾。

また, タンパク質は水溶液中において, その等電点よりも低いpH領域では正の, 高いpH領域では負の表面電荷を持ち, それぞれカチオン, アニオンとしての挙動を示すため, このタンパク質の電荷とイオン交換樹脂の電荷が対立していれば両者はイオン結合により相互作用し, タンパク質がイオン交換樹脂に吸着される。この原理を用いて多成分が混在する乳から選択的に目的としたタンパク質を分離することができる。吸着したタンパク質を脱離させるには, 通常, 高濃度の塩溶液を供給し, タンパク質が結合した官能基と拮抗させ, 再度イオン交換して脱離する方法が用いられる。タンパク質の表面電荷の強弱によって樹脂の官能基との結合度が異なるため, 塩の濃度を段階的に変化させることによって目的としたタンパク質を選択的に脱離することも可能である。また, pHを調整することによってもタンパク質の電荷が変化するため, 同様に選択的な脱離が可能である。このような工程で分離した脱離液は, 一般的に, 目的としたタンパク質の他に高濃度の塩を含んでいるが, タンパク質と塩の分子量は大きく異なるため, 膜分離によって容易に脱塩, 濃縮することができる¹⁹⁾。

これらの基本的なイオン交換の原理に加え, 吸着時には水素結合やファンデルワールス力 (van der Waals forces)²⁰⁾などの二次的な力, 対象とするタンパク質の分子量, イオン交換樹脂に導入されている官能基部分と担体部分の構造などの影響も受けるため, これらの要因を制御することによって分離精度を上げることができる。

イオン交換は, 適切な条件の設定によって, ごく微量にしか含まれていない成分でも選択的な分離が可能となる技術であり, 膜分離などの他の分離技術と組み合わせることによる応用範囲も広い。

4) その他の分離技術 (イオン交換膜, 合成吸着樹脂, 活性炭, アフィニティークロマトグラフィー, 疑似移動層など)

工業的な領域での応用は前述した技術と比較して限定的ではあるが, 重要な分離精製技術をいくつか記載しておく。

選択的なイオン透過性を持った陽イオン交換膜と陰イオン交換膜をプレートアンドフレームの設備レイアウトで交互に配置し, 陽イオンと陰イオンが共に濃縮される区画, これらのイオンが共に脱塩される区画を設け, 設備の両極間に直流電流を通電することによって脱塩するEDが脱塩ホエイの製造に用いられている。また, 乳タンパク質の分離への応用としては, 例えば, α -LAと β -ラクトグロブリン(β -LG)の混合液を強塩基性陰イオン交換膜に供し, 膜を透過しない α -LAと膜を透過する β -LGを分離できるという報告がある。但し, 製造できる量が少なく, 実用レベルでの工業化はされていないようである²¹⁾。

醸造や製糖産業の領域で発展してきた技術である合成吸着樹脂や活性炭を用いた分離精製技術も乳業へ応用されている。色素, 臭気, 苦みなどの不快な風味, 特定のアミノ酸などを低減し, 乳タンパク質や乳ペプチドを精製する技術が開発され, 実製造へ応用されている。また, 特定のタンパク質との選択的な相互作用を持つリガンドを利用するアフィニティークロマトグラフィーを利用した技術についても数多くの研究がなされている。研究や分析のための精製, および製薬業界におけるバイオ医薬品の精製などでは重宝されているが, リガンドが高価で大量入手が困難であり, 現時点では食品用途での大量生産にはあまり用いられていないようである。

カラムを用いたクロマトグラフィー分離の手法の一つとして, 通常は1基のカラムを用いて回分式で行われる分離を, 複数のカラムを配置し, 原液の入口と出口を順次切り替えながら連続的に設備を稼働する疑似移動層 (Simulated Moving Bed, 疑似移動床とも称される) 方式というシステムも構築されている。原理上, 3画分以上の分離は困難である

という制限はあるが、連続的に通液と分離ができる利便性があり、工業的には1基のカラムのみでは夾雑物との分離が困難な異性化糖などの製造に応用されており、乳業領域でも異性化乳糖の精製に利用されている。乳タンパク質を対象とした実施例はまだ少ないが、ラクトフェリン (LF) とラクトペルオキシダーゼ (LPO) を実験室レベルで連続的に分離する例が報告されている²²⁾。

5) 濃縮, 乾燥技術

前述した通り、牛乳中の主成分は水分であり、乳タンパク質の分離技術を想定した場合、水と固形分を如何に効率的に分離するか、ということが最も基本的かつ重要な課題となる。また、工業レベルでの乳タンパク質の応用を考えた場合、微生物の管理を含めた品質面の担保、保存性の向上、物流の効率化などの面からも、濃縮や乾燥は重要な分離技術となる。

最も汎用される濃縮, 乾燥技術は、加熱によって水分を蒸散させる方法である。蒸散効率を向上させるため、通常、濃縮工程ではチャンバーを減圧しながら加熱濃縮する操作が行われる。また、乾燥工程としては、連続的に熱風を吹き込んだチャンバー内に圧力ノズルもしくは回転ディスク(アトマイザー)によって微粒化した液を噴霧し、これを短時間で粉末化する噴霧乾燥、仕切り版で仕切ったチャンバー内に湿潤状態の沈殿を投入し、これを流動させながら乾燥する流動乾燥などが採用されている。乳業領域では、設備導入コスト、稼働コスト共に比較的安価であり、スケールアップにも容易に対応できることから、加熱工程を伴う濃縮や噴霧乾燥が標準となっており、さまざまな乳製品や乳タンパク質粉乳の製造に幅広く用いられている²³⁾。

一方、加熱工程を伴わない濃縮や乾燥技術も幅広く利用されており、その代表的なものが膜濃縮と凍結乾燥である。程度の差はあるが、加熱を伴う水分の分離工程には、タンパク質の変性、着色や着臭、風味の変化、焦げ粉の混入、装置内部への着粉による収量ロスなどの課題もあり、また、含有量の少な

い乳中の微量成分の濃縮や乾燥を想定すると、そもそも原料を大量調達して大量製造することが困難であり、結果的に原料や稼働コストが高くなることもあるため、少量かつ高価な乳タンパク質製品の製造にはUF, NF, ROなどの膜を用いた膜濃縮や凍結乾燥が採用されることも多い。UFやNFなどを用いて濃縮を行った場合、成分分離と濃縮を同時に行うことができる。

3. 乳タンパク質の分離

1) カゼイン, ホエイタンパク質, 乳脂肪球皮膜 (MFGM) タンパク質について

牛乳中には約3.3%のタンパク質が含まれ、Tacomaらによるプロテオーム解析によって935種類ものタンパク質が同定されているが²⁴⁾、広義では、pH 4.6付近で沈殿する画分に含まれるカゼイン、それ以外の上清側であるホエイに含まれるホエイタンパク質の2種類に大別される。カゼインは乳タンパク質の約8割を占め、主に、 α 1カゼイン、 α 2カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインと呼ばれるタンパク質が3:0.8:3:1の比で含まれており²⁵⁾、これらのカゼインがリン酸カルシウムを媒介としてカゼインミセルを形成し、乳中に分散する形で存在している²⁶⁾。カゼインはタンパク質としての栄養価が非常に優れていることに加えて、カゼインミセルはカルシウムキャリアーとして非常に優秀であり、乳中の重要なカルシウム供給素材とみなされている。また、カゼインの消化時に生成したペプチドがさまざまな生理機能を示すことも知られており、カルシウムの消化を促進する機能、血圧を調整する機能なども報告されている²⁷⁾。

ホエイタンパク質は乳タンパク質の約2割を占める。市販の粉末プロテイン製品に良く使用されているが、これは、運動時のエネルギー源となり、筋合成に関わるとされる分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を多く含むこと、アミノ酸スコア (AAS) や消化性必須アミノ酸スコア (DIAAS) が高いことに加えて、「Fast Protein」と称されるように、容易に消化、吸収され、血中のアミノ酸濃度を速やかに上げ

ることによって、優れた筋合成促進効果を持つと考えられているためである。ホエイタンパク質には、 α -LA, β -LGなどのメジャーなタンパク質に加えて、後述する免疫グロブリン (Ig) や LF に代表されるような種々のマイナーなタンパク質も含まれている^{28,29)}。

近年、カゼインやホエイタンパク質に次ぐ乳中の第3のタンパク質群として、乳脂肪球皮膜 (MFGM) タンパク質が注目を集めている。脂肪球を覆うリン脂質膜に存在する膜貫通タンパク質や被膜の表面に存在するタンパク質のことを指し²⁹⁾、乳中の全タンパクの1~2%を占めている³⁰⁾。ムチン1 (MUC 1)、キサンチンオキシドレダクターゼ (XO/XDH)、ムチン15 (PAS III)、CD36 (PAS IV)、ブチロフィリン (BTN)、PAS VI/VII (ラクタドヘリン)、アディポフィリン (ADPH)、脂肪酸結合タンパク質 (FABP) などの主要なタンパク質については、すでに実験室レベルでは精製され、さまざまな機能性についての研究が進められているが、工業的、商業的にはバターミルクやホエイの脂肪画分から、リン脂質やトリグリセリドとの混合画分として分離される製品が多い。

2) カゼインとホエイの分離

2-1) 酸カゼイン、レンネットカゼインの分離

前述の通り、等電点が4.6付近にあるカゼインは酸性条件下やレンネットの作用によって沈殿する特徴を持っており、この特性を利用して、乳中からカゼインを沈殿として固液分離し、洗浄、乾燥して精製することができる。

カゼインは乳中でリン酸カルシウムを媒体としたミセルを形成し、ミセル表面に存在する κ -カゼインの親水基の作用や、ミセル自体が負に帯電していることによる静電的反発作用などによって安定的に存在している。チーズ製造に代表されるレンネット処理時においては、カゼインミセルの表面に局在化する κ -カゼインの親水性部分が切断され、ミセル表面のタンパク質が露出し、疎水性が増すことによってミセル同士が結合し、沈殿を生じる³¹⁾。ま

た、硫酸や塩酸の添加、微生物による乳酸発酵などによる酸性条件下では、リン酸カルシウムの可溶化によるミセル構造の変化や、ミセルの負電荷の中和により静電的反発が減少することによって凝集・沈殿が生じる。これらの沈殿はほぼ100%がカゼインにより形成されており、特別な精製工程を必要としないため、デカンターなどの設備で沈殿を分離し、数回の水洗を行い、その後に流動乾燥して粉末する工程でレンネットカゼイン、硫酸カゼイン、塩酸カゼイン、乳酸カゼインなどの酸カゼインが製造されている。

酸カゼインは中性や酸性の溶液には不溶であるが、塩基性の溶液には溶解する。特に、NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂などの強塩基を用いて中和し、可溶化し、噴霧乾燥したものはカゼイネートと呼ばれ、溶解性や乳化性に優れているため、さまざまな食品や飲料に幅広く利用されており、食品工業の領域では乳化剤や結着剤としても使用されている。酸の種類や中和に用いた塩の種類によって、風味や物性が異なり、カゼインやカゼイネートには多種多様な製品バリエーションがある。

尚、カゼインの沈殿に至る機構に関しては、カゼインミセルの構造と絡めて多くの研究や総説があるが、まだ解明されていない点も多い。詳細については引用文献をご参照頂きたい^{32,33)}。

2-2) ホエイの分離、WPC (Whey protein concentrate) と WPI (Whey protein isolate)

チーズ製造の際に副生されるチーズホエイ、酸カゼインなどの酸性乳素材の製造時に副生する酸ホエイは、その成分の大半が水分であり、過去には効率的かつ低コストで固形分を回収する工程が確立されておらず、使用用途も限られていたため、その大半が河川や土壤に廃棄され、環境汚染の要因となっていた³⁴⁾。

タンパク質に代表されるホエイ中の成分に優れた栄養機能があることが明らかになり、また、低コストでホエイから有価成分を回収できる膜分離技術が発展したことによって、現在、ホエイからは、乳

糖，ホエイパウダー，脱塩ホエイパウダー，ミルクカルシウム，WPC，WPI，LFやLPOのような機能性タンパク質など，多くの乳素材が製造されている。

代表的な乳タンパク質製品としては，UFによって乳糖とミネラルを除去し，タンパク質を固形分当たり34～80%まで濃縮したWPC，タンパク質濃度を固形分当たり90%以上まで濃縮するため，UFとMFを組み合わせる脂肪，乳糖，ミネラルを除去した膜ろ過WPI，同様の目的でイオン交換技術を用いて乳タンパク質を選択的に吸着分離したイオン交換WPIなどが挙げられる。イオン交換工程については，現在はホエイのpHを酸性側に調整し，ホエイタンパク質を正の荷電を持ったカチオンとして陽イオン交換樹脂に通液して吸着分離する工程が採られることが多い。詳細な工程やpHは伏せられているが，グリコマクロペプチド（GMP）が含まれていない製品が多く，GMPの等電点であるpH4以上の酸性領域でイオン交換しているものと思われる。また，過去にはチーズホエイを中性から弱酸性付近のpHのまま，アニオンとして陰イオン交換樹脂に通液し，吸着分離した製品も製造されていた。膜ろ過WPIとイオン交換WPIではその物性がやや異なり，一般的にイオン交換WPIの方がゲル強度が高く，食品の物性を改良する用途ではこちらが使用される場合もある。

2—3) MPC (Milk protein concentrate), MCC (Micellar casein concentrate) の分離

牛乳から脂肪を除去した脱脂乳をUF処理し，カゼインとホエイタンパク質の比率を牛乳中と同じ8:2に保持した状態で乳糖とミネラルを低減し，乳タンパク質を濃縮した製品も製造されている。このような工程を採った製品はMPC (Milk protein concentrate) やTMP (Total milk protein) と呼ばれている。また，脱脂乳をMF処理し，乳中に分散している状態で存在しているために膜を透過できない大きさであるカゼインミセルを保持液側へ，ホエイタンパク質，乳糖，ミネラルなどの溶解している状態で存在している画分を透過液側へ分離し，ミ

セラカゼインを濃縮したMCC (Micellar casein concentrate) も製造されている。MCCはホエイタンパク質が膜処理によって低減されているため，そのカゼインとホエイタンパク質の比率はMPCやTMPよりも高く，9:1程度となっている。

MPC, TMP, MCCなどに含まれている主要タンパク質はカゼインであるが，化学的な処理ではなく，UFやMFを用いた物理的な操作である膜処理によってカゼインミセルが維持された状態で濃縮されているため，ミセル構造をとっていない前述の酸カゼイン，レンネットカゼイン，各種カゼイナーとは風味や物性が大きく異なる。MPC, TMP, MCCはミルク感のある自然な風味を有しており，食品に応用した場合の官能評価が高い。MPCやTMPと，MCCとのタンパク質の構成比の相違は大きくはないが，MCCの方がよりカゼインミセルが濃縮されているため，熱安定性，乳化性，ホワイトニング効果などが高く，これらの特徴を応用して使用されることもある³⁵⁾。

また，ホエイタンパク質，乳糖，ミネラルなどが含まれているMCC製造時のMF透過液をUF処理して乳糖やミネラルを除去し，ホエイタンパク質を濃縮したWPIも製造されている。チーズホエイから製造されるWPCやWPIとは異なり，チーズ製造に伴う加熱処理，微生物処理，酵素処理などの影響を受けておらず，乳中のホエイタンパク質がそのままの状態でも濃縮されているため，ネイティブホエイ，アイデアルホエイ，ナチュラルホエイなどと称され，チーズホエイ由来のWPCやWPIと区別されることがあり，育児用ミルクなどの原料として利用されている。

4. 主要な機能性タンパク質の分離

主要な牛乳中の機能性タンパク質の分子量と存在比を表2に示す^{7,36)}。機能性タンパク質として研究が進められ，工業的に分離精製されている製品にはホエイタンパク質に由来するものが多い。カゼインに関しては，酵素分解したペプチドフラグメントにかかわる生理活性についての実験室レベルでの研究

表 2 乳中の主要な機能性タンパク質^{7),36)}より改変

タンパク質	分子量 (kDa)	等電点 (pI)	牛乳中の濃度 (g/L)
β -ラクトグロブリン	18	5.4	3.2
α -ラクトアルブミン	14	4.4	1.2
免疫グロブリン	150	5.5-8.3	0.7
ウシ血清アルブミン	66	5.1	0.4
ラクトフェリン	77	7.9	0.1
ラクトペルオキシダーゼ	78	9.6	0.03
グリコマクロペプチド	8.6	<3.8	1.5
オステオポンチン	60-69	3.5	0.015-0.02

は非常に多いものの、カゼインの乳中での主要な役割は栄養素としての機能であること、乳業における伝統的な基幹製品の一つがチーズでありここでカゼインが大量に消費されること、ペプチドフラグメントのみに注目した場合には副生する画分が多量となるために工業的な製造スケールに乗りにくいことなどから、カゼインの構成成分である α , β , κ -カゼインを工業的なスケールで分離し、各成分を応用する技術の報告は多くはない。尚、各種の乳タンパク質の機能性に関しては、判りやすくまとめられた優れた総説が多々存在するので、詳細はそちらをご覧いただきたい³⁷⁻⁴⁰⁾。本稿では簡単に紹介するものとする。

1) β -ラクトグロブリン (β -LG)

牛乳中のタンパク質の約10%、ホエイタンパク質のほぼ50%を占めるタンパク質であり、通常は二量体型で存在するケースが多いが、pH 3.0未満および pH 8.0以上では、解離してモノマーとして存在するようになる⁴¹⁾。人乳には殆ど含まれていない。

Kushibiki らによる仔牛に β -LG を強化した牛乳を与えた実験では、血中レチノール濃度や血漿総脂質に占めるバルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸の割合が増加することが報告されており、すなわち、 β -LG が脂質成分の吸収を促進すること、および脂肪酸に対する結合親和性を有することが示され、これは β -LG のバレル構造内部の疎水性部にこれらが結合するためであるとされている⁴²⁾。更に、 β -LG にはビタミン D やリン脂質、芳香族化合物な

ども同様に結合することが報告されており^{43,44)}、これらの物質のキャリアとしての役割を果たしていると考えられる。また、最近の研究では、 β -LG が IgM 受容体を介して細胞増殖を促進し、免疫応答を強化する上でも重要な役割を担っていることが示唆されている⁴³⁾。但し、人乳のように、このタンパク質を殆ど含まない乳もあるため、哺乳類にとっての β -LG の生理学的意義については論点が残されている⁴⁵⁾。

牛乳中の主要なホエイタンパク質である β -LG は、育児用ミルクの母乳化に向けた成分として明確な用途や需要がある α -LA とは異なり、乳幼児を対象とした視点ではなく、アミノ酸組成に優れたタンパク質、物性改良用途での応用といった視点で機能や用途の開発が進められている。 β -LG は優れた加熱ゲル化性を持ち、形成されるゲルの性質をイオン強度や pH によって制御可能であり、工程面での汎用性や柔軟性が高いため、畜肉や魚肉加工品用の結着剤のような用途で使用されており⁴⁶⁾、 β -LG 含量が比較的高いイオン交換 WPI がヨーグルトの物性改良用途で使用されている。また、高い起泡性を有し、比較的安価であるため、価格や需給面が不安定となる場合のある卵白の代替素材としての検討も進められている^{47,48)}。

β -LG と α -LA は分子量を始めとした物性が比較的近似しているため、工業的スケールで両成分を高精度に分画することは難しく、長年、さまざまな手法を用いた技術開発が進められてきた。これらについてはまとめて次項で記載する。

2) α -ラクトアルブミン (α -LA)

α -LA は分子量およそ14,000の球状タンパク質であり、牛乳タンパク質中の約4%、人乳タンパク質中の約29%を占める。通常は四量体を形成して存在しており、カルシウムと強く結合する。フリーの SH 基を持たないため、 α -LA 単独では SH 基-SS 基の交換反応が生じず、変性しても凝集やゲル化を生じにくい。

α -LA の生理学的な役割としては、長鎖中性アミ

ノ酸に対する神経伝達物質セロトニンの前駆体であるトリプトファンの含有割合が高く、このトリプトファンが効率的に脳内に取り込まれやすいと考えられることから、脳機能への作用に興味を持たれており⁴⁹⁾、睡眠前に α -LAを摂取した時の目覚めの改善効果などが報告されている⁵⁰⁾。この他にも、血清コレステロール低下作用⁵¹⁾、胃粘膜機能への保護効果⁵²⁾、発達期消化管の成熟作用⁵³⁾など、 α -LAに関わる生理機能の報告は多い^{37,54)}。

前述の通り、共にホエイタンパク質中に占める割合が多い一方で、その物性が近似している β -LGと α -LAの分画は困難であったが、これまでに数多くの検討がなされており、さまざまな分離法が提案されている。選択的沈殿法としては、ホエイのpHを α -LAの等電点付近の4.2にして65°Cまで加熱することによって α -LAを選択的に沈殿させ、これを分離するという手法は前述した通りであるが⁸⁾、Slackらからは、脱塩した酸ホエイおよびスイートホエイをpH 4.65に調整することにより、加熱をしなくても β -LGを多く含む沈殿物が生じ、なおかつ上清には α -LAが優勢になることが報告されている⁵⁵⁾。但し、それぞれの画分は不純物も多く含んでおり、得られた沈殿物は不溶性となっている。また、Spiegelは、低乳糖かつ低ミネラルの条件下では α -LAの変性速度よりも β -LGの変成速度の方が速いことを利用し、pHを5.5~7.5へ調整したWPC溶液を82~95°Cで加熱することによって β -LGのみを選択的に沈殿させる工程を提案しており⁵⁶⁾、この技術はその後にTolkachらによって最適化され、収率75%、純度98%の未変性 α -LAを回収することが可能となっている⁵⁷⁾。

イオン交換樹脂を用いた分離方法も数多く報告されている。例えば、Yeeらからは、レンネットホエーを原料とした2種類のイオン交換クロマトグラフィーによる分離手法が報告されている⁵⁸⁾。この工程では、まず、pH 6.5の条件で強酸性陽イオン交換体であるSP樹脂に通液し、カチオンとしての挙動を示すLFやLPOなどの塩基性タンパク質を除去し、次いでpHを8.5に調整して強塩基性イ

オン交換樹脂である第4級アミノエチル(Q-AE)樹脂にアニオンとしての挙動を示す α -LAと β -LGを共に吸着させ、次いでこのpH条件下で0.1 M塩化ナトリウム(NaCl)溶液を通液し、 α -LAを選択的に脱離する。 β -LGについてはpH 6.8でより高濃度の0.1~0.25 M NaCl液によって脱離する。尚、pHやイオン強度条件を変更した場合、強塩基性のQ-AE樹脂ではなく弱塩基性のDEAE樹脂を使用した際には、 β -LGのみが吸着され、 α -LAは吸着されないこともある。実際にpH調整をしないスイートホエイ(pH 6.3~6.6程度)をDEAE樹脂に流すことで、 β -LGのみが吸着されたとの報告もある⁵⁹⁾。

膜分離法としては、分画分子量30~50 kDaの無機UF膜で α -LAを透過液側に分離できたとの報告はあるが⁶⁰⁾、 α -LA/ β -LG比は2.5程度に留まっている。膜分離法と沈殿法のような他の技術を組み合わせた工程、膜孔や膜種の精査、pHやイオン強度の制御、金属と複合体を形成させることによる分画効率の向上、などの検討も行われている⁶¹⁾。保持液側に濃縮された β -LGの含量を高める場合には、別途、分画分子量100 kDa程度のUF膜を使用してIgやLFなどの分子量の大きなタンパク質と β -LGとを分離する。

3) ラクトフェリン (LF)

LFはトランスフェリンと類似の構造をもつ分子量約80,000の鉄結合性の糖タンパク質である^{62,63)}。報告されている機能性は多岐に渡り、乳児に対する感染防御や消化器官の発達への寄与を始め、抗菌・抗ウィルス作用、免疫調節作用⁶⁴⁾、細胞増殖・分化促進能⁶⁵⁾、プレバイオティクス作用、風邪罹患率の低減など⁶⁶⁾、多種多様な機能が報告されている。また、LFのペプシン分解によって生成するN末端側に由来するラクトフェリシンと呼ばれるペプチド、あるいはLFを酸によって分解することによって生じたペプチドフラグメントは、鉄結合能などの機能が消失しているにもかかわらず、LFよりも高い抗菌活性を持つことが知られている^{67,68)}。

カゼイン、 β -LG、 α -LA を始めとした多くの乳タンパク質はその等電点が酸性側にあり、通常、中性から弱酸性の pH 域にある牛乳やホエイ中では負に帯電しているが、LF は等電点が約8.0である塩基性タンパク質であり、他のタンパク質とは異なって正に帯電しているため、陽イオン交換樹脂によって選択的に分離、吸着、精製することができる。但し、乳中の塩基性タンパク質としては、アンジオジェニンや LPO などの他の微量タンパク質も存在するため、工業的なスケールで高純度の LF を製造する場合、これらの夾雑物と LF を如何にして分離するかという技術が重要となる。精製方法としては、CM 基を有した弱酸性陽イオン交換樹脂に脱脂乳やホエイを供し、LF を始めとした塩基性タンパク質を吸着させ、水洗によって非吸着物質を除去した後に、0.4~12%の範囲で段階的に濃度を調整した NaCl 溶液を供し、樹脂と各タンパク質との親和性が異なることを利用して段階的に溶出する方法^{69,70})や、樹脂に吸着した LF 以外のタンパク質を 0.35 M の NaCl 溶液で溶出し、続いて 1.0 M の NaCl で LF を溶出する方法⁷¹)などが報告されている。いずれの方法も LF と LPO などの他の塩基性タンパク質の樹脂への親和性が異なることを利用し、低濃度の塩類溶液の通液によって LPO を始めとした夾雑物を選択的に脱離し、その後高濃度の塩類溶液を通液することによって脱離液中に高純度で LF を脱離することを可能としている。工程上、この LF 脱離液には多量の NaCl が含まれるが、LF と NaCl の分子量は大きく異なるため、適切な UF 膜を用いることによって容易に分離することが可能である。これらの分離技術の工業的な確立と各種製品への応用を評価頂き、弊社は2003年に「ラクトフェリンの工業的な製造法の開発」で平成15年度の文部科学大臣賞を頂いた。

イオン交換樹脂を用いる工程の他に、LF に特異性を持ったアフィニティ担体を用いた分離法もいくつか報告されており、例えば LF と高い親和性を持つことが知られているヘパリンを用いた例も報告されている⁷²)。実験室レベルでの分離や分析には応

用されているが、リガンドの大量入手が困難であること、担体の物理強度が弱く設備面で課題があることから、工業レベルでの実用化は進んでいないようである⁷³)

4) ラクトペルオキシダーゼ (LPO)

LPO は乳中に含まれる酵素活性を持つタンパク質であり、過酸化水素とチオシアン酸イオン (SCN^-) の存在下で、菌体に作用して抗菌作用を発現するヒポチオシアン酸イオン (OSCN^-) を生成する。この抗菌作用は強力であり、冷蔵条件を確保できない環境で生乳を保存するための化学的な手段としても使われており、歯周病菌を含む病原菌に対する機能なども報告されている^{74,75})。また、LPO には、乳酸菌の酸生成調整作用⁷⁶)、抗炎症作用⁷⁷)、大腸炎抑制作用⁷⁸)、抗ウィルス作用⁷⁹)なども報告されている。LF の項で記載した通り、LPO は塩基性タンパク質であるため、LF と同様に陽イオン交換樹脂を用いて吸着、分離することができる。LF との吸着性の相違を利用して選択的に脱離することができる。LPO を含んだ脱離液も LF 脱離液と同様に多量の塩類を含んでいるが、LF 脱離液よりも濃度が低いため、UF での脱塩は比較的容易である。また、前述の通り、疑似移動層を用いたクロマト分離で LPO を精製する技術も報告されている²²)。

実質的に LPO は LF の製造に伴う副産物として得られるが、あえて塩基性タンパク質である LF と LPO を分離せず、LF と LPO の双方を含む共溶離物 (Co-Isolate) として製品化される場合もある。抗菌活性やバイオフィーム抑制作用を持つ LF と LPO を共に摂取することにより、両タンパク質の作用機序が異なることに起因する相乗効果によって口臭抑制効果が向上するとの報告があり⁷⁴)、LF と LPO の双方を含んだ口腔衛生素材や製品が上市されている。また、LF や LPO のみならず、乳中あるいはホエイ中の陽イオン交換樹脂に吸着する全ての画分、すなわち、他の塩基性タンパク質であるアンジオジェニンやシスタチンなども含めた複合タン

パク質素材に骨形成の促進機能があるということも報告されている⁸⁰⁾。

5) グリコマクロペプチド、カゼイノマクロペプチド (GMP, CMP)

κ -カゼインはレンネット中の酵素キモシンの作用により切断され、不溶性の画分であるパラ κ -カゼインと、可溶性の画分である GMP が生成する。GMP はチーズホエイ中のタンパク質の約20%を占め、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンを含有しないアミノ酸組成であるため、高度に精製されたものはフェニルケトン尿症の患者に対して安全なタンパク質の一つになり得る⁸¹⁾。GMP は糖鎖が結合している糖ペプチドであり、その構造は一定ではなく、少なくとも数種類が存在することが知られている。分子量は約8~10 kDa であるが、アミノ酸構造に由来する分子量は約7 kDa で、残りは糖鎖部分に由来するとされている⁸²⁾。pH によって存在形態が異なることも示唆されており、kawasaki らのゲルろ過分析では pH 7 では20~50 kDa、pH 3.5 では10~30 kDa と報告されており⁸³⁾、一方、Nakano らは、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、GMP は3つのモノマーの凝集体であり、真の分子量は pH の変化の影響を受けないと報告している⁸⁴⁾。他にも可逆的な結合や乖離をくり返しているとの報告は多い。

GMP の生理活性機能についてはこれまでに多くの報告があり、一例としては、胃酸分泌抑制効果、インフルエンザウィルスの感染防止効果、病原性大腸菌群への選択的結合性、プレバイオティクスとしての効果、ラクトバチルスやビフィズス菌の増殖促進、骨や歯の差石灰化の促進、胃液分泌の抑制などが挙げられる⁸²⁾。また、物性面においては強固なゲル形成能を持つことが知られ、特にこの特性は酸性域で顕著であり、pH 4.5以下では3~10%程度の GMP 溶液は加熱せずとも時間依存的にゲル化を引き起こす⁸⁵⁾。チーズホエイ由来の WPC には一定量が含まれており、発酵乳などのレオロジーに影響を及ぼしている要因の一つと考えられる。

製造法としては、分子量が比較的小さいことや pH によって存在形態が異なる特性を利用し、チーズホエイを主原料として UF で膜分離する方法、等電点が酸性側にあることを利用したイオン交換樹脂を用いる方法、およびこれらを組み合わせた方法が報告されている⁸³⁾。例えば、pH 3.5では、GMP は分画分子量20~50 kDa の UF 膜を透過する一方で、 β -LG、 α -LA、Ig などの大部分のホエイタンパク質は透過が抑制される。一方で pH 7.0では前述の通り非共有結合による凝集を形成し、見掛け上の分子量が大きくなるため、同孔径の膜を使用しても GMP は保持液側に残る。本手法における GMP の回収率は約34%であったと報告されている。

また、陽イオン交換樹脂に pH 3 に調整したホエイを供すると、GMP 以外の主なタンパク質は吸着されるが、GMP は吸着せずにそのまま溶出される⁸⁶⁾。もしくは pH 4.0以下における陰イオン交換樹脂処理により、GMP を選択的に吸着させるという手法も報告されている⁸⁷⁾。GMP は比較的加熱に強いいため、pH 中性付近で加熱し、その後に MF もしくは50 kDa 以上の UF を用いて変性して会合したホエイタンパク質を保持液側に、GMP 画分を透過液側に回収する手法でも成分を濃縮できるという報告がある⁸⁸⁾。

6) オステオポンチン (OPN)

OPN は高度にリン酸化された糖タンパク質で、生物のほとんどの組織と体液に存在するが、特に乳に多く含まれている。分子サイズは牛 OPN では262残基、ヒト OPN では298残基程度であり、乳中の含量については人乳で138 mg/L、牛乳では18 mg/L との報告がある^{40,89,90)}。OPN が乳児の免疫機能の発達に関与し、免疫系の成熟を促進し、病原性感染症から保護することを示唆する研究もなされており、OPN は新生児の胃液によるタンパク質分解に対して比較的耐性があり⁹¹⁾、Th1 型免疫を誘導できること⁹²⁾、インテグリンに結合し、標的細胞のインテグリンへのウイルスモチーフの結合を防ぐことにより、さまざまな病原体に対する耐性を高

めること、などが報告されている⁹³⁾。

OPNの分離法としては三段階での膜処理による工程が報告されている。酸ホエイを原料として、pH 4.55で10 kDaの分画分子量のUFで分離し、pH 6.0～8.5で1.4 μm のMF濃縮を行い、次いでpH 3.0で5 kDaの分画分子量のUFで精製することによって、OPNを粉当たり14.8%、タンパク質当たり16%まで濃縮された粉末を製造できることが報告されている⁹⁴⁾。また、より簡便かつ高純度でOPNを回収する技術として、イオン交換を用いた工程が報告されており、Bertelsenらは、pH 3.6～6.5において、25°Cで4～10 mS/cmの範囲の電導度にある供給液を強塩基性イオン交換樹脂に供することによってOPNの吸着が可能であることを報告している⁹⁵⁾。チーズホエイを原料とする場合には等電点が近似しているGMPとの分離が鍵となる。ある一定のpHと電導度の範囲内では高純度のOPNが得られ、この範囲を外れると夾雑する他タンパク質の割合が増え、OPNの収率も下がることが報告されている⁹⁵⁾。一部で商業生産もされており、OPNを使用した臨床試験の報告例も増えている。

7) 免疫グロブリン (Ig)

Igは、免疫応答の結果として生成される抗体であり、病原体に対する防御上、極めて重要な役割を持っているタンパク質であり、いくつかのサブクラスがある。人の母乳中にはIgA、特にセクレタリーコンポーネントを持つ分泌型sIgAが多く含まれており、牛乳中にはIgGが主として存在する。受動免疫の強化目的で使用されることもあり、法規法令上、日本での応用は難しいが、免疫した牛の初乳に由来するIgを摂取することで、乳児と成人のロタウイルスと腸管毒素原性大腸菌による感染を防ぐことができることが報告されている⁹⁶⁾。

Igは、硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換、および膜プロセスによって濃縮が可能であり、特に他の乳タンパク質と比較して分子量が大きいため、膜分離で比較的容易に濃縮することができ、例えば

100 kDaのUF膜、0.1 μm のMF膜による濃縮例が報告されている^{36,96)}。

5. おわりに

本稿においては、工業的な領域で応用されている乳タンパク質の分離技術と、主要な乳タンパク質の分離工程を記載した。これらの各種の乳タンパク質に加えて、プロテオースペプトン、ウシ血清アルブミン (BSA)、乳タンパク質の酵素分解によって生成された乳ペプチドなどを対象とした分離技術についても研究が進んでおり、さまざまな乳タンパク質や乳ペプチド素材が開発され、応用されている。乳中には、まだその機能の詳細が解明されていない、あるいは産業的にはあまり利用されていない微量タンパク質も多い。これらの乳タンパク質の有益な機能が明らかになるに従い、その分離技術も発展するものと思われる。

近年、SDGsの視点から、工業的スケールでの分離精製技術にも、環境負荷の低減、用水使用量の削減やリサイクル、エネルギーコストの抑制、副生成物や廃棄物の低減、素材ハンドリングの向上、精製度の向上などが求められている。バター、クリーム、脱脂粉乳などの例を挙げるまでもなく、乳という単独の素材から、さまざまな分離精製技術を駆使し、風味や組成や物性の異なるさまざまな乳製品や乳素材を製造することは乳業の基幹工程である。今後とも既存の技術に留まることなく、分離精製技術が発展し、新たな乳タンパク質素材が開発されることを期待したい。

参考・引用文献

- 1) 野間晃幸, 神田淳, 中山恭佑, 斎藤佳絵, *Milk Science*, **67**, 206–212 (2018)
- 2) O'mahony, J. A. and Fox, P. H., *Milk proteins: introduction and historical aspects*, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition, 43–85 (2013)
- 3) 田村吉隆, 斎藤仁志, *MRC news*, **29**, 70–81 (2003)

- 4) JUDA, W. and MCRAE, W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1044 (1950)
- 5) 祐川金次郎, 乳タンパク質, 実業図書株式会社, 417-420 (1971)
- 6) 小此木成夫, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 144-155 (1985)
- 7) R. Etzel, M., *The Journal of Nutrition*, **134**, 996-1002 (2004)
- 8) Pearce, R. J., *Australian J. Dairy Technol.*, **38**, 144-149 (1983)
- 9) 関信夫, 乳業技術, **66**, 35-47 (2016)
- 10) Kumar, P., et al., *J. Anim. Sci.*, **26**, 1347-1358 (2013)
- 11) 都留稔了, 膜, **35**, 175-181 (2010)
- 12) 陣岩, 吉田勲, 猪迫耕二, 鳥大農研報, **49**, 23-30 (1996)
- 13) 中西一弘, 田中孝明, 崎山高明, 膜, **21**, 86-94 (1996)
- 14) Kamau, S. M., et al., *Compr. Rev. In Food Sci. and Food Safety*, **9**, 197-212 (2010)
- 15) 斎藤恭一, 日本イオン交換学会誌, **11**, 45-52 (2000)
- 16) 草野裕志, イオン交換樹脂技術の系統化調査, 国立科学博物館産業技術史資料情報センター, 67-69 (2014)
- 17) 板垣孝治, 日本海水学会誌, **45**, 95-110 (1991)
- 18) 溝田輝彦, イオン交換, ミルク総合事典, 朝倉書店, 372-377 (1992)
- 19) 伊藤光太郎, イオン交換, 上野川修一・他編, ミルクの事典, 朝倉書店, 302-305 (2009)
- 20) 船津軍喜, 化学と生物, **7**, 292-300 (1969)
- 21) Bhattacharjee, S., et al., *Journal of Membrane Science*, **275**, 141-150 (2006)
- 22) Andersson, and J., Mattiasson, B., *J. Chromatogr. A.*, **1107**, 88-95 (2006)
- 23) 勝俣弘好, 濃縮・乾燥, 上野川修一・他編, ミルクの事典, 朝倉書店, 326-342 (2009)
- 24) Tacoma, R., et al., *J. Proteomics*, **130**, 200-210 (2016)
- 25) Schmidt, D. G., Association of caseins and casein micelle structure, *Developments in Dairy Chemistry Vol. 1 Proteins*, P. F. Fox ed., Appl. Sci. Publ. London, UK., 61-86 (1982)
- 26) 青木孝良, 日暖畜報, **53**, 9-16 (2010)
- 27) 金丸義敬, 乳業技術, **52**, 11-26 (2002)
- 28) 桑田有, *Milk Science*, **61**, 95-103 (2012)
- 29) 松田幹, MFGM タンパク質, 上野川修一・他編, ミルクの事典, 朝倉書店, 19-21 (2009)
- 30) Riccio, P., *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 458-461 (2004)
- 31) 小野伴忠, *Milk Science*, **54**, 53-62 (2005)
- 32) 仁木良哉, *Milk Science*, **51**, 111-120 (2002)
- 33) 青木孝良, 水野礼, 木村利昭, 堂迫俊一, *Milk Science*, **66**, 125-143 (2017)
- 34) 清澤功, *Milk Science*, **51**, 13-26 (2002)
- 35) 松永徹也, 食品と開発, **55**, 18-21 (2020)
- 36) Rodrigues, L., Teixeira, J. A. C., Potential Applications of Whey Proteins in the Medical Field, *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*, CRC Press, 221-252 (2010)
- 37) 青木孝良, 乳業技術, **59**, 15-25 (2009)
- 38) Patel, S., *Journal of Functional Foods*, **19**, 308-31 (2015)
- 39) 堂迫俊一, *Milk Science*, **59**, 283-294 (2012)
- 40) 上野宏, *Milk Science*, **68**, 106-116 (2019)
- 41) Lozano, J. M., et al., *International Dairy Journal*, **18**, 55-63 (2008)
- 42) Kushibiki, S., et al., *J. Dairy Res.*, **68**, 579-586 (2001)
- 43) Tai, C. S., Chen, Y. Y., and Chen, W. L., *Biomed. Res. Int.* **2016**, ID 7123587 (2016)
- 44) Kontopidis G., Holt C., and Sawyer L., **87**, 785-796 (2004)
- 45) 金丸義敬, ホエイタンパク質, 上野川修一・

- 他編, ミルクの事典, 朝倉書店, 11-18 (2009)
- 46) Chatterton, D. E. W., et al., *International Dairy Journal*, **16**, 1229-1240 (2006)
- 47) Smithers, G. W., et al., *J. Dairy Sci.*, **79**, 1454-1459 (1996)
- 48) Foegeding, E. A., et al., *Food hydrocolloids*, **20**, 284-292 (2006)
- 49) 折笠修三, 岩附慧二, *Milk Science*, **61**, 1-9 (2012)
- 50) Markus, C. R., Jonkman, L. M., Lammers, J. H. C. M., Deutz, N. E. P., Messer, M. H. and Rigtering, N., *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 1026-1033 (2005)
- 51) 長岡利, ホエイペプチドの脂質代謝改善機能, *月刊フードケミカル*, **9**, 34-39 (1993)
- 52) Ushida, Y., Shimokawa, Y., Matsumoto, H., Toida, T. and Hayasawa, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 577-583 (2003)
- 53) 和泉裕久, 清水隆司, *Milk Science*, **61**, 25-32 (2012)
- 54) Hakansson, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 8064-8068 (1995)
- 55) Slack, A. W., et al., *J. Food Process. Preserv.*, **10**, 19-30 (1986)
- 56) Spiegel, T., Production of high approximately a-lactalbumin content whey protein concentrate useful in foods for infants by heating to ease subsequent separation off of aggregated by product, DE19950240A1 (2001)
- 57) Tolkach, A., Steinle, S., Kulozik, U., *Food Science*, **70**, E557-566 (2005)
- 58) Ye X., Yoshida S., Ng, T.B., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**, 1143-50 (2000)
- 59) 島村誠一, 富村俊雄, 市橋信夫, 野尻めぐみ, ホエイ蛋白分画の製造法, 特開平6-62756 (1992)
- 60) Mehra, R., and Kelly, P. M., *Bulletin. International Dairy Federation*, **389**, 40-44 (2004)
- 61) 玉置祥二郎 他, ホエイタンパク質の分画方法, α -ラクトアルブミンを含む組成物の製造方法及び β -ラクトグロブリンを含む組成物の製造方法, WO2017154867 (2017)
- 62) Saito, H., et al., *Proceedings of the 4th International Whey Conference Chicago 2005*, 364-377 (2005)
- 63) 山内恒治, *日本食品科学工学会誌*, **53**, 193-195 (2006)
- 64) 上野宏, *Milk Science*, **61**, 105 (2012)
- 65) Wakabayashi, H., et al., *Int. Dairy J.*, **16**, 1241-1251 (2006)
- 66) 織田浩嗣, *Milk Science*, **62**, 105-109 (2013)
- 67) 織田浩嗣, *Milk Science*, **61**, 271-275 (2012)
- 68) Saito, H., et al., *J. Dairy Sci.*, **74**, 3724-3730 (1991)
- 69) 小此木成夫 他, 特開昭63-152400 (1987)
- 70) 田村吉隆, 齋藤仁志, 膜, **30**, 192-197 (2005)
- 71) Kussendrager, K. D., et al., Process for isolating lactoferrin and lactoperoxidase from milk and milk products, and products obtained by such process, WO1993013676A1 (1993)
- 72) 川上浩 他, 乳からラクトフェリンを分離, 精製する方法, 特開昭63-255299 (1987)
- 73) 重松明典 他, ラクトフェリンの製造方法, 特開2004-307344A (2003)
- 74) 中野学, 若林裕之, 山内恒治, 阿部文明, *Milk Science*, **65**, 227-234 (2016)
- 75) 新光一郎, ラクトペルオキシダーゼ, 上野川修一・他編, ミルクの事典, 朝倉書店, 441-442 (2009)
- 76) Nakada, M., et al., *Int. Dairy. J.*, **6**, 33-42 (1996)
- 77) Shin, K., et al., *J. Med. Microbiol.*, **51**, 231-237 (2002)
- 78) Shin, K., et al., *Int. Immunopharmacol.*, **9**, 1387-1393 (2009)
- 79) Shin, K., et al., *J. Med. Microbiol.*, **54**, 717-

- 723 (2005)
- 80) 鳥羽保宏 他, 日本農芸化学会誌, **77**, 36-37 (2003)
- 81) 今井哲哉, Milk Science, **55**, 227-235 (2007)
- 82) Córdova-Dávalos, L. E., Jiménez, M., and Salinas, E., Nutrients, **11**, 598 (2019)
- 83) Kawasaki, Y., et al., Milchwissenschaft, **48**, 191-196 (1993)
- 84) Nakano, T. and L. Ozimek, Milchwissenschaft, **57**, 128-130 (2002)
- 85) Sharma R. N., Rajput, Y. S., Mann, B., a review. Dairy Sci Technol., 21-43 (2013)
- 86) 島谷雅治 他, シアル酸類含有組成物の製造方法, 特開平 4-316450 (1991)
- 87) 川崎功博 他, κ -カゼイングリコマクロペプチドの製造法, 特開平 4-330100 (1991)
- 88) 島谷雅治 他, κ -カゼイングリコマクロペプチド含有量の高い組成物の製造方法, 特開平 5-271295 (1992)
- 89) Schack, L., et al., J. of Dairy Science, **92**, 5378-5385 (2009)
- 90) Christensen, B., and Sørensen, E. S., International Dairy Journal, **57**, 1-6 (2016)
- 91) Chatterton, et al., Trends Food Sci Technol, **15**, 373-383 (2004)
- 92) Ashkar, S., et al., Science, **287**, 860-864 (2000)
- 93) Belin, M. T., Boulanger, J. Gen. Virol., **74**, 1485-1497 (1993)
- 94) Sørensen, E. S., et al., A process for isolation of osteopontin from milk, WO2001049741A2 (2000)
- 95) Bertelsen, H., Wejse, P. L., Trúgvason, T., Method for isolating osteopontin using feeds containing cmp or casein species, WO2012117119A1 (2011)
- 96) Lee M. Huffman, W. James Harper, Journal of Dairy Science, **82**, 2238-2244 (1999)