

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：37112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12249

研究課題名(和文)可能な限り薬剤を使用しないコラーゲン抽出手法のベストミックスを探る

研究課題名(英文)Optimization of collagen extraction method using small amount of chemical reagent

研究代表者

桑原 順子 (Kawahara, Junko)

福岡工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40289351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚鱗からコラーゲンを得るために従来の酸抽出法などと比べて簡便かつ低コストの抽出手法として、微細気泡を用いて抽出する条件の検討を行った。その結果、気泡に酸素、二酸化炭素、オゾン、空気のいずれを用いた場合でも抽出量増加は認められず、また収量に有意差はなかった。オゾンの時のみ脱臭効果が認められ、コラーゲンの分解が促進されることが明らかとなった。抽出温度は40℃付近が最適だった。また、鱗を破碎すると収率は70%を超えたが、それらはコラーゲンではなくコラーゲンペプチドであることが明らかとなった。また破碎後に人工太陽光を照射すると、コラーゲンペプチド分子の架橋化が促進されることがGPCより明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to obtain collagen from fish scales, conditions to extract using fine bubbles were investigated as a simple and low cost extraction method. As a result, when oxygen, carbon dioxide, ozone, or air was used as the bubble gas, collagen extraction rate was low, there was no difference depending on the kind of gas. However, it was found that deodorizing effect was observed only when ozone was used, and decomposition of collagen was also promoted. The extraction temperature was optimum around 40 °C. In addition, when the scales were crushed, the yield exceeded 70% over, but it became clear that they were collagen peptide rather than collagen. It was also revealed by GPC that irradiation with artificial sunlight after crushing promotes crosslinking of collagen peptide molecules.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：コラーゲン ゼラチン コラーゲンペプチド 魚鱗 抽出 人工太陽光照射 ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

一般に魚介類の可食部は5～7割程度とされ、加工時の残滓が大量に発生している。日本国内では、廃棄物系バイオマスの約3割は飼・肥料へ再資源化されるが、それ以外はコストをかけて処分されている。そこで、魚類残滓の有効利用や高付加価値化に資する技術の確立が求められており、魚類残滓からコラーゲンをはじめDHAなどの機能性成分の活用を図る動きが加速している。

代表者は、これまでに魚類残滓のカツオ皮からコラーゲンを酸処理によって抽出し、I型コラーゲンの同定、架橋化等の機能化を図った^①。結果、コラーゲンの機能化には成功したが、抽出効率が悪く、薬剤残留性の課題も残された。

通常、高純度のコラーゲンを得るには魚臭、色素、薬剤等の残留性を最小限に抑える必要があり、マイクロ・ナノレベルでの処理が適切であると考えた。コラーゲン線維間の空隙はマイクロ・ナノサイズであり、ウルトラファインバブルで定義される微細気泡の大きさに匹敵する。また、ナノサイズであれば圧壊によりフリーラジカルが発生し、洗浄作用をはじめとする様々な効果をもたらす。しかし、反応機構は未解明であり、コラーゲンの抽出にも未だ応用されていない。もし、実現できれば、残留薬剤の課題は一気に解決できる。申請者は、薬剤抽出法の代替となり得るのではないかと考え、ナノサイズの微細気泡によるコラーゲン抽出法の着想に至った。

2. 研究の目的

本応募課題では、従来の抽出法と比べて簡便、かつ低コストであり、薬剤残留性の少ないより安全な魚由来のコラーゲン抽出法を開発し、その反応機構についても明らかにする。

具体的には、水産加工残滓を粉碎し、水溶液中でナノバブルの共存下、物理的作用を利用して抽出する手法を確立する。化粧品等の原料であるコラーゲンは、酸やアルカリ、酵素等による薬剤抽出後、精製の為にイオン交換樹脂など高価な材料が使用されてきた。しかしながら、高コスト、かつ使用薬剤の残留性が問題視されており、可能な限り薬剤を使用しない抽出法の確立が期待されている。

3. 研究の方法

(1) 主な原料及び抽出装置

原料は養殖ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の脱灰済み鱗を使用した。また、ナノバブル発生装置はゼックフィールド製特殊ナノバブル発生装置 ZUFB-90-03-1-S と、比較のための装置としてマクロバブル発生装置である(株)アスプ製超微細気泡発生装置 AMB3 型を使用した。

(2) 鱗の破碎装置および破碎方法

魚鱗はラボネクト株式会社製ミニスピードミル MS-05 を使用し、7gの乾燥魚鱗を3分間破碎した。

(3) 人工太陽光照射実験

照射実験には、人工太陽照明灯 (SOLAX XC-100B, セリック株式会社) を使用した。装置はキセノン光源、色温度 5500 K、中心光度 3000 cd、照射波長域 300 ~ 780 nm、熱線は約 80% カット仕様であった。本装置の分光分布は、晴天時の正午±2時間に地表に到達する太陽光と同じスペクトルの光を出す照明灯の規格であった。また、光源ランプから試料までの照射距離を約 30 cm、光の入射角 90 度となるように調整した。光源の中心光度 3000 cd と試料までの距離 30 cm をもとに試料容器表面の照度を算出したところ 33000 lx となった。一般に夏の正午の直射日光が最大約 100,000 lx といわれており、今回の実験条件では夏の正午の直射日光の3分の1のエネルギーをもつ人工太陽光が照射された。

(4) 抽出条件(ガスの種類、時間、水温、pH等)

ガスの種類は、酸素、二酸化炭素、オゾン、空気の4種類とした。また抽出時間は0～24時間以内とし、水温は40、80℃、抽出溶媒は蒸留水及び0.1 M 塩酸、0.1 M 酢酸、0.5 M 酢酸とした。

(5) 抽出方法

ティラピア鱗に40倍容量の抽出溶媒を添加し、各温度条件下にて実験を行った。マイクロ及びナノバブルは流量6 L/minで循環する溶液中で発生され、溶液はプロペラ式攪拌装置で攪拌を行った。

(6) 収量、収率、純度の評価

収量及び収率は抽出溶液を凍結乾燥することにより仕込みの鱗重量(g)に対する収量(g)の百分率で示した。また、凍結乾燥前の抽出液中のコラーゲン濃度を定量するため、Chondrex社のcollagen定量キットを使用した。また、コラーゲン特有の三重らせん構造の有無を確認するため日本分光製円二色性分散計 J-805 を使用し、円二色性(CD)スペクトルを得た。また、抽出試料の分子量分布を確認するため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)並びにゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による分析を行った。

4. 研究成果

(1) 気泡のガス種・気泡径及び抽出溶液の違いによるコラーゲン抽出評価

バブルを通気することなく0.5 mol/L 酢酸で抽出したコラーゲン水溶液は SDS-PAGE より三重らせんコラーゲン特有の $\alpha 1$ 鎖(約120 kDa)、 $\alpha 2$ 鎖(約110 kDa)、 β 鎖(約240 kDa)を示すバンドが確認された(図1)。0.5 mol/L 酢酸の条件では、空気、二酸化炭素、酸素いずれのバブルにおいても同様の結果となり、ガスの種類による抽出特性は認められなかった。また、酢酸濃度を0.5 mol/L から0.1 mol/L に低減させた時、空気のナノバブルを通気した条件では、0.1 mol/L 酢酸にバブル通気無しの条件と同等程度の薄いバンドが確認された。一方、二酸化炭素のナノバブルを使い抽出した条件では、これらと比較して SDS-PAGE

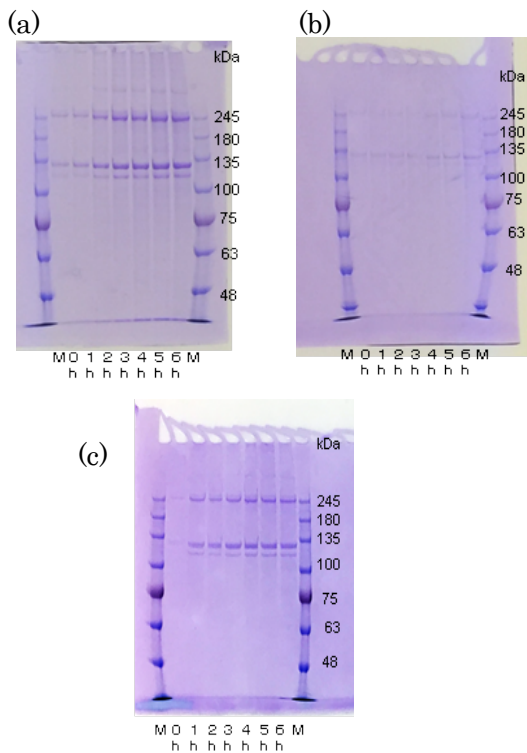


図1 抽出溶媒およびガス種の各条件での SDS-PAGE

- (a) 0.5mol/L 酢酸, バブルなし
- (b) 0.1mol/L 酢酸, Air ナノバブル
- (c) 0.1mol/L 酢酸, CO₂ ナノバブル

のバンドが濃く発生した。このことから、酢酸濃度を 0.5mol/L から 0.1mol/L に低減させても、二酸化炭素を通気することで、コラーゲンが抽出されることを確認した。ただし、0.1mol/L 酢酸に二酸化炭素のミリバブル(φ7mm のチューブから出された気泡)を通気したところ、ナノバブルと同様にコラーゲン抽出が確認された。この結果から、バブルの径とは関係なく水に溶解しやすい二酸化炭素が、抽出溶媒の pH を下げるによりコラーゲン抽出に影響を与えたことが示唆された。さらに、実験により得られたコラーゲン水溶液について、円偏光二色性 (CD) スペクトルを使い、3 重らせんコラーゲン特有の 220nm のピークの比較を行った。220 nm 付近は光学活性物質であるコラーゲンの吸収波長領域であり、その領域の差吸光スペクトルはタンパク質二次構造に代表されるらせん構造やシート構造など固有のパターンを示す。その結果、二酸化炭素を通気するコラーゲン抽出において、ミリバブルを使い抽出した方がマイクロ・ナノバブルを使った条件と比べて 3 重らせんコラーゲン抽出率が高い結果となった (図 2)。その原因として考えられた理由は、循環装置を通して水溶液中に供給され続けるナノバブルは滞留時間もミリバブルに比べて長くなるため、ナノバブルが鱗表面に吸着し 40°C 一定温度で実験を行った場合は断熱効果を与えた可能性があると考えられた。あるいは、ナ

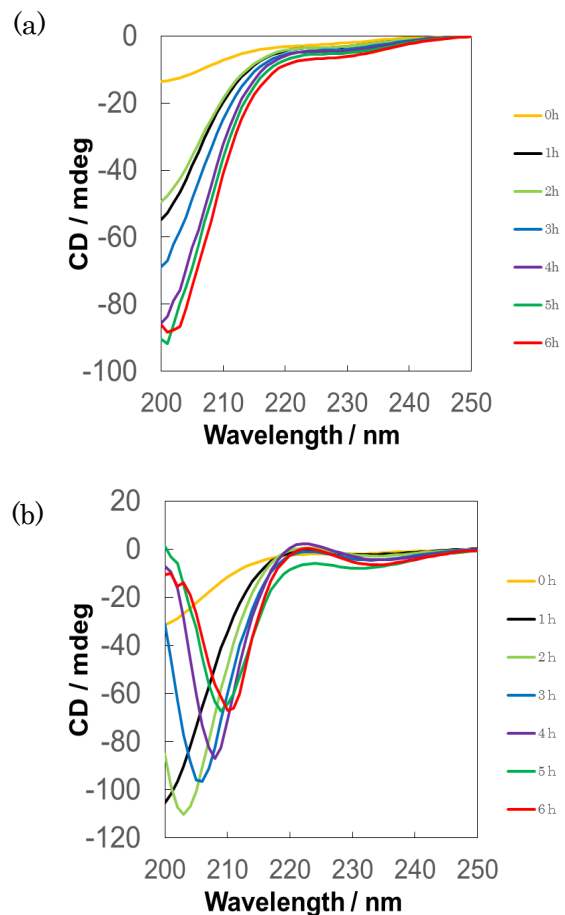


図2 抽出コラーゲン水溶液の CD スペクトル
(a) 0.1mol/L 酢酸, CO₂ ナノバブル
(b) 0.1mol/L 酢酸, CO₂ ミリバブル

ノバブルのような気液二相混合液体の場合、液体の単位体積あたりの気体体積の割合、すなわちボイド率 (α) が今回の抽出実験のコラーゲン抽出効率に影響を与えた可能性も考察された。今回の抽出条件でそれぞれのボイド率を計算したところ、ミリバブルの水は $\alpha = 0.08\%$ 、ゼックフィールド社のマイクロ・ナノバブル発生装置の水は $\alpha = 6.25\%$ であった。液体に占める気体の割合が多い、すなわちボイド率が高い方が試料の鱗に対して溶液の浸透を妨げる効果があるのではないかと推察された。

今後の検討課題として、熱の影響無い低温状態で抽出実験したり、ボイド率を一定にしてバブル径を変えて抽出効率の変化をみたりするなどして、より詳細な条件で検証することが必要である。

また、薬剤を全く使わず、蒸留水に二酸化炭素のマイクロ・ナノバブルを通気することでコラーゲン抽出の有無を確認した。しかし、SDS-PAGE においてコラーゲン特有のバンドは確認されなかった。

(2) シリウスレッド試薬によるコラーゲンの定量

シリウスレッド試薬を使い 3 重らせんコラーゲン濃度の測定を試みた。シリウスレッド

試薬は、コラーゲンの特有かつ共通な構造である [Gly-X-Y]_nヘリカル構造に特異的に結合し、明るい赤色に染色する。操作手順は、試料と色素試薬を混合し、遠心分離した上清(コラーゲンと結合しなかった色素試薬)を除去、沈殿物をアルカリ試薬で再溶解した後、555 nmの吸光度を測定する。本研究では、既知のコラーゲン濃度より検量線を作成し、サンプルのコラーゲン濃度を測定した。しかし、シリウスレッド試薬によるコラーゲンの定量は抽出時間の経過と共に収率の低下がみられた。CD スペクトルのデータでは、コラーゲン特有の極大波長 220 nm の値が抽出時間が長くなるにつれ増加したが、シリウスレッド法による

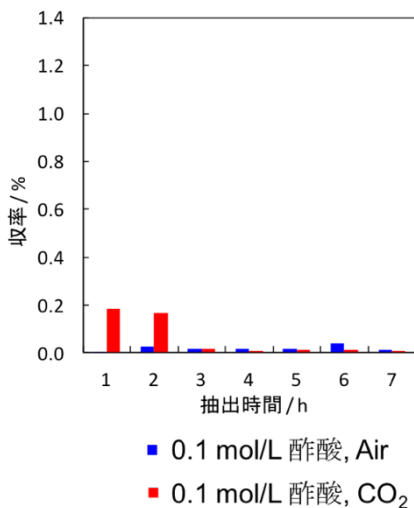
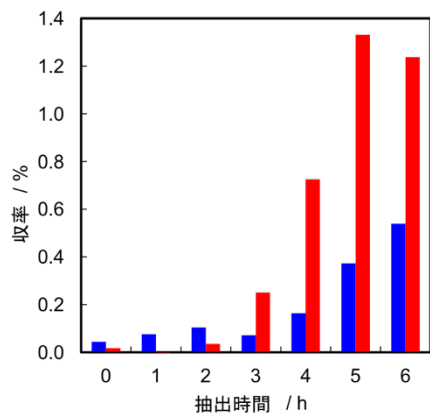


図 3 CD スペクトル及びシリウスレッド法で求めたコラーゲン収率の時間変化

る定量分析では逆の傾向となった(図3)。この現象について考察してみたところ、鱗から溶出したとみられる多量の Ca²⁺イオンがシリウスレッド分子のスルホン酸基に優先的に結合し、コラーゲンのN-末端やLys側鎖のアミノ基(-NH³⁺)への結合をCa²⁺イオンが阻害したのではないかと推察された。Ca²⁺の影響を無くすためにサンプル中のCa²⁺イオンのマ

スキング剤を添加することによってCa²⁺の多い鱗や骨のような資料でも利用可能であることが推察された。

(3) オゾンガスバブルによる魚臭低減

オゾンを通気したコラーゲンのニオイセンサーの値が低減されることを確認した。また、バブルの径とは関係なく、バブルの直径に関係なく魚臭低減の効果は得られた。しかし、ニオイセンサーの検出限界値以下ではあった試料でも魚臭を感じる程度の魚臭が残ったが、オゾンガスの通気は必要であると考えられる。また、オゾンガスを通気した試料にはコラーゲンの低分子化が認められた。SDS-PAGEの結果から、オゾンの通気はコラーゲンの低分子化を招く原因となることが明らかになった。オゾンナノバブルを10分間通気したサンプルではSDS-PAGEのバンドは消失し、3重らせんコラーゲンは分解されたと考えられた。一方、オゾンバブルを通気後、他のガスに切り替え抽出した試料のSDS-PAGEの結果より、コラーゲン特有のバンドを確認した。このことから、抽出前にオゾンを通気30分間ほど通気する処理を行うことで、魚臭が低減した3重らせんコラーゲンを得ることができると考えられた。

(4) ティラピア鱗のSEM観察

薬剤低減の実験では、0.1 mol/L 酢酸中に二酸化炭素を通気することで薬剤低減の効果はあったが、バブルの直径に影響されることを確認することはできなかった。そこで、走査型電子顕微鏡観察を行った。(図4) ティラピア鱗の表面は外敵から身を守るため滑らかな構造であり、かつ、内部の線維間には架橋構造が存在した。これまでの条件ではナノバブルが物理的にコラーゲンを分離させるだけ

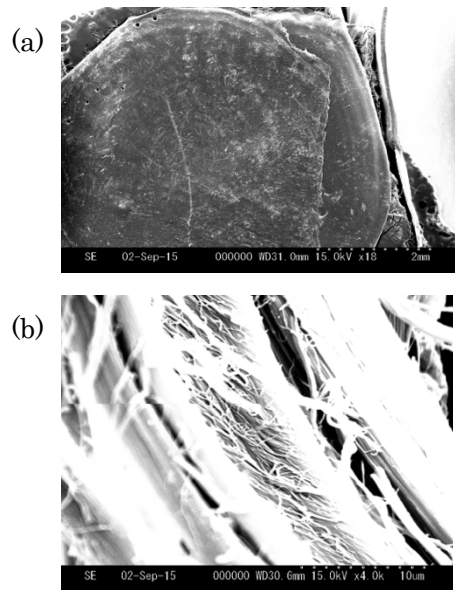


図 4 SEM 観察画像 (a) ティラピア鱗, (b) 破碎した後

のエネルギーを与えなかったと推察される。また一般的に、酸可溶性コラーゲン（酸浸漬だけで溶出されるコラーゲン）の抽出率は1桁%台と言われている。そこで、鱗の破碎、人工太陽光照射による物理的刺激によって抽出率を向上させることを試みた。

(5) 鱗の破碎および人工太陽光照射による影響

魚鱗は皮に比べて硬い組織であり、化学薬品のみによる処理やナノバブルによる抽出では抽出効率が低いことがわかった。そこで、平成28年度では鱗の破碎および人工太陽光照射による抽出効率への影響について調べた。図5の収率は、仕込みの鱗重量に対する抽出溶液（濾過液）の凍結乾燥物の重量の百分率とした。照射を行うと収率が増加し、破碎ありの試料は70%以上となった。ただし、80°C、照射時間12時間の試料については抽出を途中で終了したため低値となった。

収率は増加したが、SDS-PAGEおよびCDスペクトルによる分析により、コラーゲンではなく低分子化されたコラーゲンペプチドが生成されたことが明らかとなった。破碎時間を3分間から短縮し、破碎によって発生する熱を抑制できれば、コラーゲンを抽出することができると考えられる。

破碎あり、40°Cで静置した試料の照射0

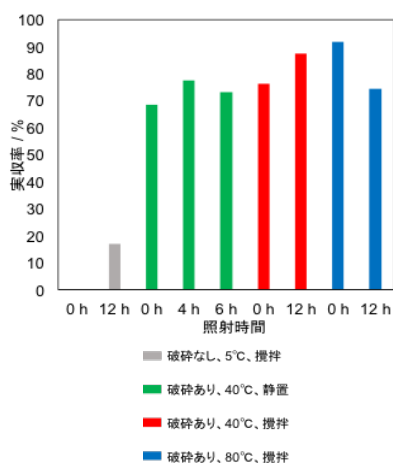


図5 人工太陽光の照射時間および破碎処理した鱗からの収率変化

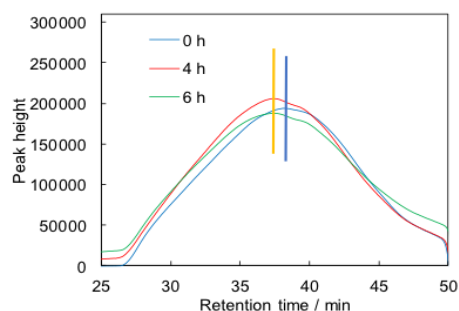


図6 人工太陽光照射時間の異なる試料のGPCクロマトグラム

h、4h、6hにおけるGPC測定の結果を図6に示す。0、4、6hの保持時間は検量線より、それぞれ38.207、37.447、37.510 minとなり、分子量は26915、30903、30549 Daであった。照射なし試料のピークトップ（青色）、照射サンプルのピークトップ（黄色線）を比較すると、照射により試料の保持時間が短くなり、溶出された物質の分子量が約4000程度増加したことが明らかとなった。この結果は、破碎によって断片化されたコラーゲンペプチドが人工太陽光照射によって再架橋化が部分的に生じたことが示唆された。

<引用文献>

①Fumio Nakazawa, Riki Miura, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Conformational Analysis of Fish Collagen in Denaturation Process, *PEPTIDE SCIENCE 2012, (2013), 371-374*

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

①Junko Kuwahara, Tetsuya Marume, Hajime Mita, Screening Evaluation of the Interaction of Linear-Chain or Branched-Chain Peptides with Multilamellar Vesicle, Using Confocal Laser Microscopy, *Journal of Oleo Science*, 査読有, Vol. 66, No. 6, 2017, pp. 647-651. DOI: doi.org/10.5650/jos.ess16250

②桑原 順子, 加熱または人工太陽光照射による福岡県産ツルムラサキ由来色素の分解に界面活性剤が与える影響, *Journal of MMIJ*, 査読有, Vol. 133, No. 5, 2017, pp. 92-97. DOI: doi.org/10.2473/journalofmmij.133.92

③桑原 順子, 魚由来コラーゲンとその線維化機序, *皮革科学*, 査読無, Vol. 62, No. 2, 2016, pp. 93-96. <http://jglobal.jst.go.jp/public/201602231957783689>

④桑原 順子, ティラピア鱗からのコラーゲン抽出及び定量評価に関する研究, *福岡工業大学エレクトロニクス研究所所報*, 査読無, Vol. 33, 2016, pp. 67-69. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40021005198>

[学会発表] (計2件)

①三橋 向輝, 桑原 順子, 三田 肇, 水産廃棄物由来のコラーゲンおよびゼラチン抽出法とその特性に関する研究, 平成28年度資源・素材学会九州支部若手研究者および技術者の研究発表会, 平成28年6月3日, 九州大学(伊都)

②Koki Mihashi, Junko Kuwahara, Hajime

Mita, Study on Extraction of Fish
Collagen and Fibril Formation, The 1st
FIT-ME Symposium-Chemistry and
Applications of Inorganic Layered
Materials, 平成 28 年 5 月 16 日, Fukuoka
Institute of Technology, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

①桑原 順子, (株)シーエムシー・リサーチ, 化粧品素材としてのアミノ酸・ペプチド最前線, 2016 年, pp.108-113.

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑原 順子 (KUWAHARA, Junko)
福岡工業大学工学部生命環境科学科・准教授
研究者番号 : 40289351

(4)研究協力者

三橋 向輝 (MIHASHI, Koki)