

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500922

研究課題名(和文)未利用生物資源から吸水性・抗菌性・生分解性に優れた紙おむつ素材をつくる

研究課題名(英文)Functional materials made from an unused bioresource for disposal diaper

研究代表者

桑原 順子 (KUWAHARA, 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) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では本来廃棄される予定の水産加工残渣から有用なコラーゲンを抽出し、吸水性、抗菌活性を有する機能性材料の構築を行った。成果として、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸との共重合体は高い吸水性を示し、食品添加物に指定されている防腐剤との共重合体は高い抗菌活性を示した。石油資源の代替として天然資源が見直されてきているが、将来的には大量に廃棄され続けている天然資源の見直しが必要であり、より有用な機能性材料への転換が必要であると考えている。解決すべき課題は多いが、本研究成果の一部は医用・衛生材料分野、環境材料分野など幅広い領域での展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We applied a fish collagen collected from seafood waste for function polymer architecture. Cross-linking of collagen was achieved by chemical reaction with water soluble carbodiimide. The denaturation temperature of cross-linking collagen was higher than the natives. These fabric constructions were confirmed by SEM observations and SDS-PAGE. We also used a commercial available collagen for hybridization with poly- $\gamma$ -glutamic acid for addition of water-absorbing property. We evaluated the antibacterial activity of gelatin-polylysine or gelatin-protamine by agar dilution method. Minimum inhibitory concentration of gelatin-polylysine for against pseudomonas aeruginosa was low and specific value.

研究分野：生活科学一般

科研費の分科・細目：生活素材

キーワード：コラーゲン ポリグルタミン酸 ポリリジン 抗菌活性 ゼラチン 吸水性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、衛生環境の向上と高齢者人口の増加に伴い、使い捨て紙おむつなどの高分子吸水材を使用した衛生用品の需要は益々増えている。高分子吸水材は、水溶性高分子が三次元的に架橋した構造であり、架橋度の増加と共に易溶性から難溶性の吸水性高分子へと変化する。一般に吸水性高分子は、自重の数百倍の水を吸収する。原料はポリアクリル酸などからなり、1974年に米国で吸水性高分子が開発されて以降、世界各国で盛んに研究が行われている。日本では、この先高齢化がすすみ、紙おむつの需要は益々高まる恐れがあり、そのために吸水性高分子の原料資源の問題、焼却処理などの環境問題が生じることが強く懸念された。現在、主に使用されている吸水性高分子は、石油系が主たる原料を占めるため、将来的には現在の石油系資源からバイオマスへ原材料の転換を図る必要があった。そこで、我々の研究グループでは生体高分子であるコラーゲンに着目した。コラーゲン分子量約10万前後のタンパク質であり、主に牛・豚由来の動物性コラーゲンと魚類由来の海洋性コラーゲンに分類される。近年の狂牛病発生以降、ウシ由来コラーゲンは殆ど使用されなくなった。コラーゲンは、3つのアミノ酸  $-(\text{Gly-Pro-Xaa})_n-$  の繰り返し配列をしたポリペプチド直鎖が3本寄り集まった三重らせん構造である。3番目の-Xaaには種々のアミノ酸が入ることが明らかになっているが、最も特徴的なのは三重らせん構造は、変性温度を境に構造が劇的に変化することであった。また、変性温度は生物の生息環境と密接な関係があり、魚類では20前後、牛・豚などの動物では38付近である。海洋性コラーゲンは動物性コラーゲンに比べて変性温度が低いという欠点があるが、コラーゲン鎖間に架橋構造を導入することができれば変性温度の向上、さらにゲル特性をもたらすことが可能ではないかと予想した。そこで、本来廃棄される予定だった水産系廃棄物から抽出したコラーゲンを使用し、架橋化、他の高分子との共重合体化を行い、新しい吸水性高分子材料の創製を試みた。また、我々が既に確立している抗菌化技術および評価技術を活かして抗菌性を付与した吸水性高分子の構築を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、水産廃棄物由来コラーゲン

を利用した抗菌性および生分解性を示す吸水性高分子材料の開発を目的とし、段階的に実験を進めることにした。まず、(1)水産加工残渣から効率、純度よくコラーゲンを抽出する手法を確立する。(2)コラーゲン鎖間の架橋構造の導入、および $\gamma$ -ポリグルタミン酸( $\gamma$ -PGA)との架橋化などを試み、まず吸水性高分子を構築する。次に(3)抗菌性付与のためプロタミン、ポリリジンの食品添加物として指定されているペプチド系防腐剤との架橋化を図る。即ち、吸水性、抗菌性、生分解性の機能を付与した機能性材料の創製を目指した。研究代表者は、これまでに環境調和型抗菌活性ビーズ創成および評価に関する研究、ペプチド鎖を導入した抗菌性界面活性剤の合成等の複数の研究に携わり、ペプチドやタンパク質の合成および精製には精通していた。また、近年はライフサイクルアセスメントを考慮したものづくりとして環境材料に関する研究を推し進めており、目的とする水産系廃棄物を利用した抗菌性・生分解性高分子吸水材料を合成することが可能であると考え、本研究を着想し、申請するに至った。

## 3. 研究の方法

本研究では、下記の各項目にしたがって実験を進めた。

### (1) 魚皮からのコラーゲン抽出

一般的に魚皮由来コラーゲンの抽出効率は、酸抽出法より酵素法のほうがよいといわれているが、酵素法では分子量の低いコラーゲンペプチドが主に抽出されるため、今回は酸抽出法を試みた。

鯉節加工会社より提供していただいた鯉の皮を適度な大きさに切断し、MeOH : CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) にて繰り返し脱脂を行い、乾燥した。0.5M CH<sub>3</sub>COOH 水溶液中で4下、24時間攪拌した。濾過後、濾液を遠心分離装置により沈殿物と上清に分離した。上清に25% NaCl水溶液を終濃度5%になるように添加し、さらに24時間静置した。その後、遠心分離操作を行い沈殿物と上清に分離した。上清を透析処理後、得られた溶液を凍結乾燥したのち精製コラーゲンを得た。

また、鯉皮の他に鰻頭、魚骨からのコラーゲン抽出を試みたが、酸抽出法ではほとんどコラーゲンを得ることができなかった。

得られた鯉皮由来コラーゲンの純度を確認するため、SDS-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動を行った。

(2) コラーゲンの線維化および化学修飾  
コラーゲン線維化のため添加するリン酸緩衝液の pH を 5.8 から 7.8 まで段階的に変化させ、線維化の過程を観察した。また、架橋化は、水溶性カルボジイミド塩酸塩である EDC を使用し、0 mM から 200 mM まで濃度条件を変えて添加した。さらに、 $\gamma$ -PGA との複合体形成のため EDC を使用した。得られた修飾化コラーゲンは走査型電子顕微鏡(SEM)観察、円二色性分散計(CD)および蛍光色素法による変性温度の変化について調べた。

(3) 抗菌性を付与したゼラチンの構築  
抗菌活性試験を実施するにあたり、希少なコラーゲンサンプルの代替として汎用性のあるゼラチンを使用して以下の実験を行った。ゼラチンに加える物質として食品添加物に指定されているプロタミン、ポリリジンのペプチド系防腐剤を選択し、EDC および DMT-MM を使用した。抗菌活性試験は日本薬局方のチャレンジテストに基づき *Staphylococcus aureus* (NBRC12732), *Escherichia coli* (NBRC14237), *Candida albicans* (NBRC1594) *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC13275), *Bacillus subtilis* (NBRC3009)を使用し、寒天培地希釈法で評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 魚皮からのコラーゲン抽出

酢酸抽出法により水分を含む鰹皮 40.25 g あたりから得られたコラーゲンは 0.75 g、収率は 1.9% であり、白色の綿状であった。

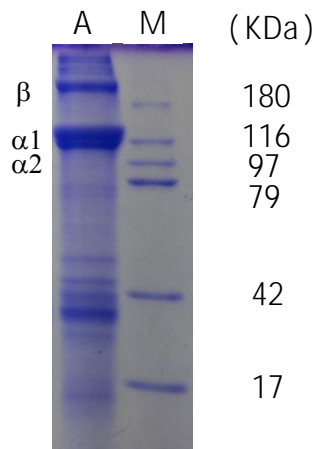


図1 鰹皮由来コラーゲンの SDS-PAGE

得られた凍結乾燥体のコラーゲンについて SDS-PAGE を行ったところ、鰹由来コラーゲンは三重らせん構造を有しており、電気泳動パターンより、 $\beta$ 鎖、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖の分子量はそれぞれ 210 kDa、125 kDa、116 kDa であることを確認した。(図1)

(2) コラーゲンの線維化および化学修飾  
線維形成における塩濃度と pH の影響を調べるため、濁度測定を行った。吸光度が高いサンプルは濁度の上昇、すなわち線維化が進んでいるといえる。図2より、コラーゲンの線維化は緩衝液の pH および NaCl 濃度に影響を受けた。今回、酸処理を行ったコラーゲンは pH 4.5~5.6 で線維形成が進行した。一般的に酸処理したコラーゲンは pH7~9 付近に等電点を示すため、コラーゲンの線維化は等電点による沈殿生成とは別の機序で生じていると考察された。また、コラーゲンの線維化は NaCl 濃度、つまり溶液環境下のイオン強度が高くなるにつれて線維化しやすくなる傾向がみられた。また添加塩効果により、線維化する pH 領域が狭まることが分かった。

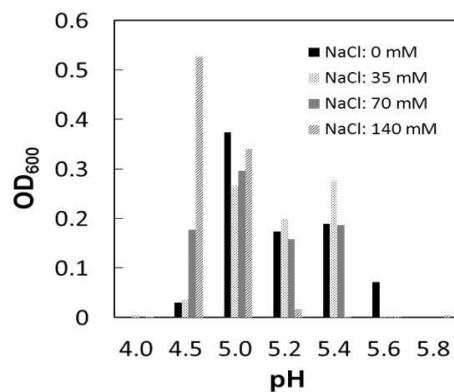


図2 鰹皮由来コラーゲンの吸光度値 (OD<sub>600</sub>) による線維化評価

コラーゲン線維の変性過程について三重らせん構造変化から評価するために、CD スペクトル測定を行った。架橋化剤 EDC を添加した架橋化コラーゲンは、非架橋の線維化コラーゲンと比べ変性温度が約 10 上昇した。さらに非架橋の線維化コラーゲンに比べて、架橋化試薬を加えた系は線維間の架橋化が進行し、網目のような形状をしていることを SEM 観察により明らかにした。(図3)

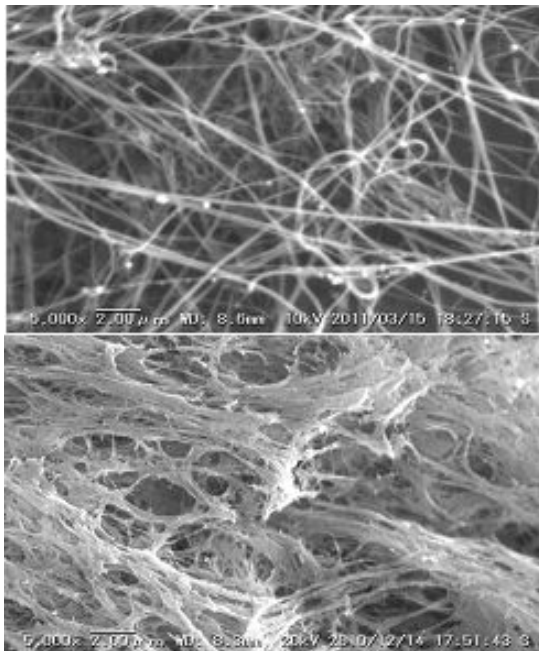


図3 線維化した鯉皮由来コラーゲン  
(上：非架橋，下：EDC 架橋)

蛍光色素法 ANS による溶液環境下でのコラーゲンの挙動について調べたところ、コラーゲン線維の変性過程は三段階（10°C ~ 25°C, 25°C ~ 35°C, 35°C ~ 60°C）の変性過程で進行することが推察された。また変性温度を境に ANS の極大波長が長波長側へレッドシフトしていることから、ANS の環境も変化していることが考えられた。三重らせんの崩壊が蛍光プローブ法によっても証明することができた。（図4）

また、吸水性高分子であるγ-ポリグルタミン酸との共重合化を図り、線維化したコラーゲン-γ-PGA 共重合体を得た。この共重合体は自重の約 4200 倍の水を吸水し、また熱に対するゾル - ゲル転移があることがわ

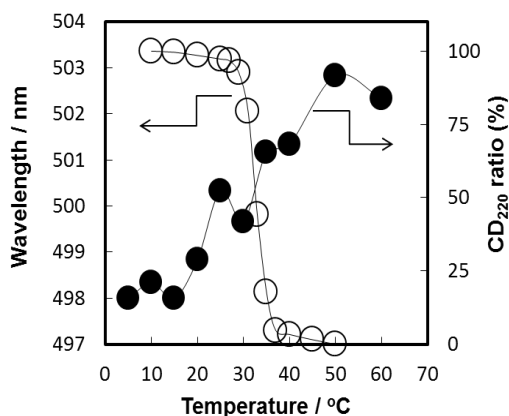


図4 蛍光プローブ ANS によるコラーゲン変性過程の評価

かった。熱応答性の機能性材料を構築することができた。

次に、抗菌活性試験の予備試験としてリシンデンドリマーと細胞膜表面を模倣した自己組織化単分子膜との分子間相互作用について表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置評価装置を用いて評価したところ、弱酸性～中性付近では良好な相互作用が確認されたものの、pH10 以上ではデンドリマー分子の自己集合が確認された。従って、弱酸性から中性付近で抗菌活性を示し、かつ生体適応性の高い試料としてポリリジンおよびプロタミンを選択することにした。

### (3) 抗菌性を付与したゼラチンの構築

寒天培地希釈法により得られた最小生育阻止濃度 MIC を比較したところ、全体的に防腐剤を結合したゼラチンは防腐剤単独より効力は低下した。

表1よりゼラチンと結合したポリリジンはプロタミン結合型より相対的に MIC は低く、ゼラチンと結合しても広い抗菌スペクトルを有することが明らかとなった。特に緑膿菌(*P. aeruginosa*)に対しては高い活性を示した。緑膿菌に対してはゼラチンの結合に関わらず高い活性を示したことからゼラチン-ポリリジン系はグラム陰性好気性桿菌である緑膿菌に対して有効な組み合わせであるといえる。医療用器具、医用材料への応用が期待される。

表1 防腐剤を結合したゼラチンの MIC

	poly-L-lysine	protamine
<i>S. aureus</i>	0.768	0.012
<i>E. coli</i>	1.6	8
<i>B. subtilis</i>	>1.536	0.8
<i>P. aeruginosa</i>	>0.048	4
<i>C. albicans</i>	1.536	4

単位：mg / mL

しかしながら、今回の実験では任意の条件で結合したサンプルの抗菌活性という定性的な評価であり、ゼラチン単位重量あたりどの程度防腐剤が結合されているか定量的に解析する必要がある。

以上、本課題では本来廃棄されるはずの水産加工残渣から有用なコラーゲンを抽出し、吸水性、抗菌活性を有する機能性材料の構築を行った。

本課題の成果として、γ-PGA との共重合体は高い吸水性を示し、食品添加物に指定

されている防腐剤との共重合体は高い抗菌活性を示した。

石油資源の代替として天然資源が見直されてきているが、将来的には大量に廃棄され続けている天然資源の見直しが必要であり、より有用な機能性材料への転換が必要であると考えている。解決すべき課題は多いが、本研究成果の一部は医用・衛生材料分野、環境材料分野など幅広い領域での展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

Satoshi Higashi, Masakazu Sueyoshi, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Keiko Watanabe and Tamaki Kato, The Effect of Methylene Chain Length in Head Group of Amino Acid-Based Surfactants, PEPTIDE SCIENCE 2013, 査読有, 2014, 297-300, ISSN 1344-7661.

桑原 順子, 魚コラーゲンの線維化および変性過程に関する研究, 福岡工業大学エレクトロニクス研究所所報, 査読無, 2013, 30, 21-24.

Fumio Nakazawa, Riki Miura, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Conformational Analysis of Fish Collagen in Denaturation Process, PEPTIDE SCIENCE 2012, 査読有, 2013, 371-374, ISSN 1344-7661.

Satoshi Higashi, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Keiko Watanabe, Tamaki Kato, Self-assembly of Dialkyl-type Surfactants Bound to Amino Acids and Peptides in Aqueous Media, PEPTIDE SCIENCE 2012, 査読有, 2013, 369-370, ISSN 1344-7661.

桑原 順子, ペプチド・タンパク質を応用した機能性材料の開発, FRAGRANCE JOURNAL, 査読無, 2012, 40(6), 35-39, ISSN 0288-9803.

桑原 順子, 界面活性剤に含まれるアミノ酸・ペプチドによる抗菌効果について, FRAGRANCE JOURNAL, 査読無, 2011, 39(2), 35-39, ISSN 0288-9803.

Junko Kuwahara and Mami Uchihira, Simultaneous Detection on Antimicrobial Activities of Dendritic-L-Lys-Polystyrene Beads and Extracellular Enzyme Activities in Culture Media, PEPTIDE SCIENCE 2011, 査読有, 2012, 387-388, ISSN 1344-7661.

Fumio Nakazawa, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Extraction of Collagen from Fishery Waste and Effects of Cross-Linking Structures,

PEPTIDE SCIENCE 2011, 査読有, 2012, 343-344, ISSN 1344-7661.

桑原 順子, 中澤 歩三男, 水産加工廃棄物を利用した機能性高分子材料の開発, 福岡工業大学環境科学研究所所報, 査読無, 2011, 5, 17-21.

[学会発表] (計8件)

東 慧士, 末吉 正和, 河添 隆寿, 田中 光, 桑原 順子, 三田 肇, アミノ酸骨格を有する二鎖型界面活性剤の自己会合性および抗菌活性, 平成 25 年度 物理化学インターカレッジセミナー兼日本油化学会界面科学部会九州地区講演会, 2014 年 1 月 11-12 日, 福岡大学セミナーハウス, 福岡市

Satoshi Higashi, Masakazu Sueyoshi, Keiko Watanabe, Tamaki Kato, Junko Kuwahara and Hajime Mita, Synthesis and Characterization of Amino Acid Based Surfactants: Effects of Hydrophilic Moiety, ICEAST-2013, 2013 年 8 月 21-24 日, Bangkok, Thailand.

Higashi Satoshi, Junko Kuwahara, Keiko Watanabe, Tamaki Kato, Rod-shaped Aggregation of Cationic Surfactants and Effects of pH, Temperature and Hydrophilic Groups, World congress on Oleo Science & 29<sup>th</sup> ISF Congress, 2012 年 9 月 30 日 - 10 月 4 日, アルカス SASEBO, 佐世保市

中澤 歩三男, 桑原 順子, 三田 肇, 水産廃棄物から抽出したコラーゲンの架橋化およびその特性について, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 慶應義塾大学, 横浜市

中澤 歩三男, 桑原 順子, 三田 肇, 水産加工残渣から抽出した魚コラーゲンの特性と線維化メカニズムの解析, 平成 24 年度 物理化学インターカレッジセミナー兼日本油化学会界面科学部会九州地区講演会, 2012 年 11 月 24-25 日, 福岡大学セミナーハウス, 福岡市

Fumio Nakazawa, Junko Kuwahara, Hajime Mita, Conformational Analysis of Fish Collagen in Denaturation Process, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 7-9 日, 鹿児島県民交流センター, 鹿児島市

中澤 歩三男, 桑原 順子, 三田 肇, 水産加工廃棄物を利用した機能性高分子材料の開発, 平成 23 年度 物理化学インターカレッジセミナー兼日本油化学会界面科学部会九州地区講演会, 2011 年 11 月 19-20 日, 福岡大学セミナーハウス, 福岡市

Fumio Nakazawa, Junko Kuwahara, Hajime

Mita, Extraction of Collagen From Fishery  
Fishery Waste and Effects of Cross-linking  
Structures, 第 48 回ペプチド討論会, 2011 年  
9月27-29日, 札幌コンベンションセンター,  
札幌市

## 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・准教授

研究者番号 : 4 0 2 8 9 3 5 1