

福岡工業大学 学術機関リポジトリ

魚鱗の破碎減圧処理によるゼラチン抽出に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-12-09 キーワード (Ja): キーワード (En): Gelatin, Collagen, Extract, Fish scale, Crush 作成者: 桑原, 順子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/11478/00001694

魚鱗の破碎減圧処理によるゼラチン抽出に関する研究

桑原 順子 (工学部生命環境化学科)

Study on Gelatin Extraction by Crushing and Decompression Process of Fish Scales

KUWAHARA Junko (Faculty of Engineering, Department of Life, Environment and Applied Chemistry)

Abstract

Collagen is one of the proteins that compose the bones and skin of mammals and fish, and is sensitive to heating. Heat-denatured collagen, called gelatin, is also widely used as a raw material for pharmaceuticals, cosmetics, and foods. In this study, a new extraction method was developed to increase the efficiency of gelatin extraction from hard fish scales. When the fish scales were crushed for 2 min and then processed under vacuum at 40°C and -30 kPa in dilute hydrochloric acid, gelatin could be extracted in 64.8% yield. This results suggest an innovative method to extract gelatin from hard tissues such as fish scales with convenient and less acid.

Keywords : Gelatin, Collagen, Extract, Fish scale, Crush

1. Introduction

細胞外マトリックス (ECM; Extracellular matrix) とはヒトの組織中に存在する非細胞性の構成成分である。ECM の主な線維状タンパク質は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニンであり、そのうちコラーゲンは約 30% を占める⁽¹⁾。現在までにコラーゲンは 20 種類以上が知られているが、なかでも I 型コラーゲンは皮膚、骨、腱、靱帯に多く含まれる。特に、ヒトの真皮には I 型コラーゲンが 75-80% を占める⁽²⁾。I 型コラーゲンのポリペプチド鎖は、アミノ酸残基 Gly-Xaa-Yaa の配列の繰り返し構造である。通常、Xaa にはプロリン (Pro)、Y にはヒドロキシプロリン (Hyp) が存在している場合が多い (図 1)。特に I 型コラーゲンは α 鎖と呼ばれるポリペプチド鎖が互いに絡み合い、三重らせん構造のコラーゲン細線維を形成する。細線維は少しずつ束になりコラーゲン原線維を形成する⁽³⁾。

再生医療における細胞移植用担体としてコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分は有用である。しかしながら、抗原性部位のテロペプチドを取り除いたアテロコラーゲンや三重らせん構造を完全に保持したコラーゲンを由来動物の組織から収率よく得ることは容易ではない。コラーゲンは熱に弱く、加熱すると規則正しく整列した細線維の構造は崩壊しゼラチンへ変化する。ゼラチンのゾル溶液を冷却するとポリペプチド鎖は部分的に三重らせん構造を形成して三次元ネットワークを構築し、弾性を示すゲルへと変化する。

熱可逆的ゾル-ゲル転移を示すゼラチンは、コラーゲンと同様に医薬品、食品、化粧品、生分解性の環境材料など様々な分野で広く利用されている。現在、豚や牛など哺乳類の皮、骨などから抽出される動物由来ゼラチンと魚類の鱗や皮からの魚由来ゼラチンも世界的に流通している。

動物由来ゼラチンのゾル-ゲル転移温度、すなわち変性温度は動物の生育環境温度に依存する。哺乳類のウシ皮由来では 36.5°C であり、熱帯の淡水域に生息する魚類のナイルティラピアの変性温度は哺乳類に近く 35.6°C である⁽⁴⁾。ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) とは、アフリカ原産の淡水魚であり、河川下流域や汽水域に生息している。亜熱帯・熱帯地域で食用の需要が高く、養殖が盛んに行われている水産上重要種でもある。ナイルティラピアの鱗は中国にて大量に養殖されており、日本国内においても入手しやすい。

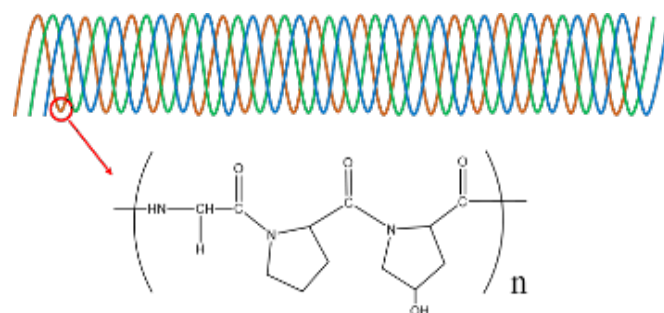


図1 コラーゲンの三重らせん構造

Fig. 1. Triple helix structure of collagen

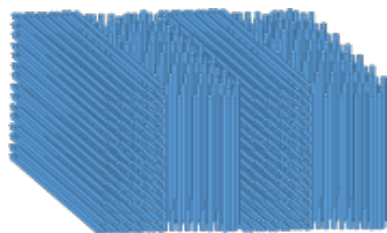


図2 一般的な魚鱗断面の模式図

Fig. 2. Schematic diagram of a fish scale in cross section.

い。

ゼラチンの主な抽出法には、酵素分解法、酸・アルカリ加水分解法、酸可溶化法などが知られている。また、皮由来の場合、クロロホルム等の有機溶剤で脱脂後、酸・アルカリ加水分解法などで抽出される。また、魚鱗はカルシウムを多く含むため強酸で脱灰処理したのち、酸・アルカリ加水分解法、酸可溶化法で抽出される。

一方、食品に調味液や酵素溶液を含浸する方法の1つとして凍結減圧酵素含浸法⁽⁵⁾が知られている。この方法は、高速含浸法の一つであり、細胞間隙のみならず細胞内含浸も可能で簡便なことから応用範囲は広い。細胞と細胞の間や細胞内に酵素溶液等が速やかに含浸することが可能であり、簡単に応用方法が広いものとされている。凍結や乾燥することで組織を膨張・収縮させ、緩みを与える。また、減圧することによって組織内部の気体の出入りが大きくなり、含浸の効率を高めることが出来る。今回の試料は魚鱗であり、図2のようにコラーゲン原線維が密に詰まっている⁽⁴⁾。そこで、本研究では凍結操作のところを破碎に置き換え、硬い魚鱗の組織に緩みを与えることにした。また、ペプシン等の酵素を使用することでタンパク質であるコラーゲンの加水分解がさらに促進されることが懸念されたため、酵素溶液から希塩酸に置き換えることにした。これまでに、本研究室では、魚鱗試料に対して加熱、紫外線照射等の物理処理を行い、ゼラチン抽出を行ってきた。しかし、いずれかの物理的処理が低分子化を招いた原因となり、原因の解明と解決策が課題となっていた。

2.Experiments

2.1 魚鱗ならびに破碎装置

ナイルティラピアの脱灰済み鱗については、株式会社新菱より提供された。ミニスピードミル MS-05 型(ラボネクト株式会社)を使用した。

2.2 魚鱗の破碎方法

脱灰済みの乾燥したナイルティラピアの鱗 7.00 g をミニスピードミルに入れ、2~4 分間破碎し、回収した。

2.3 試料抽出

500 mL 三角フラスコに 360 mL の 0.1M HCl と破碎後の鱗 4.00 g を入れた。仕込みの魚鱗と溶媒の重量比を 1:90 (w/v)と

した。12 時間、40℃下、真空定温乾燥機 DRV320DD (アドバンテック東洋株式会社)に静置し、減圧処理を行った。真空度は大気圧に対して-20kPa から-50kPa まで 10kPa おきに減圧した。マトリクス表を表1に示す。加熱減圧処理した試料の濾過を行い、濾液を回収した。濾液は小型凍結乾燥機 FDS-1000 型 (東京理化工機株式会社)で凍結乾燥を行い、試料を回収した。

表1 破碎時間と反応容器内真空度の条件

Table 1 Condition table for crushing time and vacuum.

		真空度 [kPa]			
		-20	-30	-40	-50
破碎時間 [min.]	2'00"	A1	B1	C1	D1
	2'30"	A2	B2	C2	D2
	3'00"	A3	B3	C3	D3
	3'30"	A4	B4	C4	D4
	4'00"	A5	B5	C5	D5

2.4 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

2.4.1 試薬および装置

SDS-トリス-グリシン泳動バッファー、ページブルー83 (CBB R-250)、マルチゲルIIミニ 15/20(13W)、トリス SDS β -ME サンプル処理液は全てコスモ・バイオ株式会社製を使用した。分子量マーカーはワイドビュープレステインたん白質サイズマーカーIII (和光純薬工業株式会社製)を使用した。泳動後の脱色液は、酢酸 75 mL、メタノール 50 mL、蒸留水 875 mL の混合溶液を使用した。電気泳動槽はカセット電気泳動槽 DPE-1020 (コスモ・バイオ株式会社製)を使用した。

2.4.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は *Laemmli et al.*⁽⁶⁾の方法に準じ行った。凍結乾燥試料 0.1 g を蒸留水 2 mL で溶解した溶液に対してトリス SDS β -ME サンプル処理液を 1:1 の割合で混合し、5 分間加熱した。マルチゲルIIミニに各サンプルと分子量マーカーを各レーンに 5 μ L ずつ注入し、希釈済 SDS-トリス-グリシン泳動バッファーを入れた電気泳動槽にセットし、電源装置電流 30 mA、75 分間泳動した。泳動終了後、ガラス板からゲルを取り外し、ページブルー83 染色液を加えて振とうしながら約 1 時間ゲルを染色した。その後、染色液を廃棄し、脱色液でさらに振とうしながら約 1 時間ゲルを脱色した。脱色後のゲルをスキャナーで撮影した。

2.5 円偏光二色性分散分析(CDスペクトル)測定

2.5.1 測定装置および条件

円偏光二色分散計 (J-805,日本分光株式会社製)を使用した

た。試料溶液を角型石英セル 1 mm (GL Science Inc. Japan) に入れ、4℃で 4 時間静置した試料を測定した。測定条件を窒素ガス流量 4 L/min、200 nm–250 nm、積算回数 8 回とした。

3. Results and discussion

破碎時間の条件については、魚鱗破碎時の摩擦熱によりタンパク質の変性が生じる可能性があったため、破碎時間を最長 4 分までとした。破碎前と破碎 4 分後の魚鱗試料の写真を図 3 に示す。目視では、破碎処理時間の長さによる変化はほとんど確認できなかった。これらの破碎試料を 0.1M 希塩酸浸漬の上、40℃下減圧処理を行った。濾液の凍結乾燥により得られた試料は全て白色のスポンジ状固体であった。表 1 で示された各条件での収率を図 4 に示す。

実験での収率は、下記の式で算出した。

収率 (%) = 凍結乾燥後の回収試料(g)/希塩酸浸漬した破碎魚鱗の仕込み量(g) x 100

図 4 では破碎時間が長くなるにつれ収率が增大した。破碎 4 分で -40 kPa の時、収率は 70.8% となり最大となった。しかしながら、全体的に真空度に対する収率のデータとの

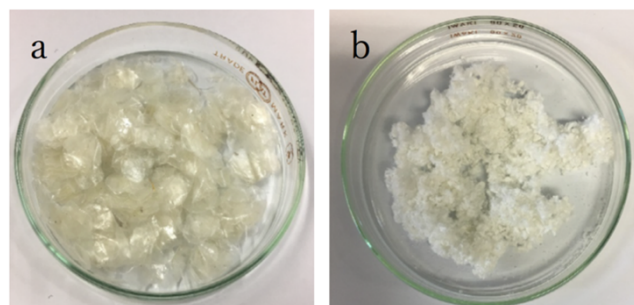


図 3 破碎前(a)と 4 分後(b)の魚鱗試料

Fig. 3. Photos of fish scales (a) before and (b) 4 minutes after crushing.

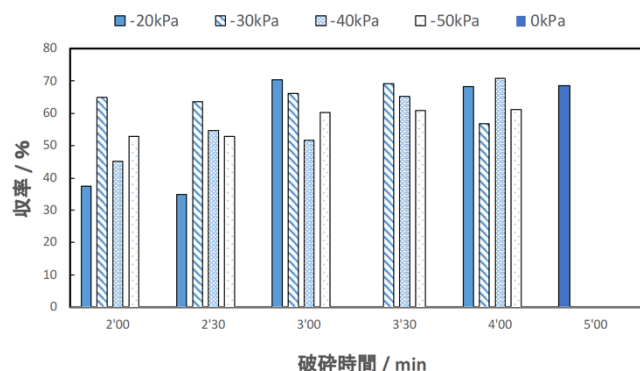


図 4 破碎時間および真空度に対する抽出ゼラチンの収率

Fig. 4. Yield of extracted gelatin versus crushing time and vacuum.

強い相関は認められなかった。また、対照実験として行った図 4 の 5 分、0 kPa のデータと比較したところ、0 kPa でも 4 分で -40 kPa の時とほぼ等しい収率となった。したがって、破碎時間の長さが収率増大に寄与していることが示唆された。

魚鱗からゼラチンを抽出する方法には、酵素法^(7,8)、加熱⁽⁹⁾、化学薬品を用いる方法⁽¹⁰⁾が知られているが、収率 70.8% (破碎 4 分、真空度 -40 kPa) を超える抽出法はなく破碎塩酸含浸処理はゼラチンを得るのに効率の良い方法であることが明らかとなった。一方、酵素法はポリペプチド鎖を構成する低分子のアミノ酸まで加水分解される懸念もある。また、破碎をせずに濃塩酸や水酸化ナトリウムのような強塩基浸漬で抽出する場合、試料に残存する薬剤や廃液処理の問題がある。今回の破碎塩酸含浸処理による魚鱗からのゼ

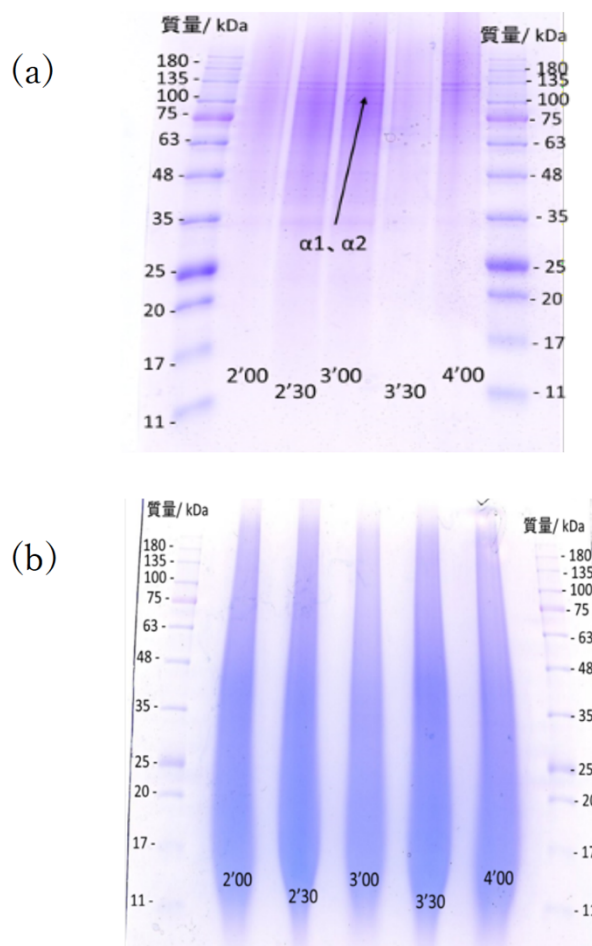


図 5 真空度 -20 kPa (a) と -40 kPa (b) の SDS-PAGE, 分子量マーカー(レーン 1, 7), 破碎時間 2 分(レーン 2), 2 分 30 秒(レーン 3), 3 分(レーン 4), 3 分 30 秒(レーン 5), 4 分(レーン 6)

Fig. 5. SDS-PAGE, vacuum -20 kPa (a) and -40 kPa (b), molecular weight markers (lane 1, 7), crushing time 2 min (lane 2), 2 min 30 sec (lane 3), 3 min (lane 4), 3 min 30 sec (lane 5), 4 min (lane 6).

ラチン抽出はこのような課題を解決できる手法の1つであるといえる。次に、得られたゼラチンの純度を SDS-PAGE で確認した。真空度-20kPa と-40kPa の試料の各破碎時間での SDS-PAGE の泳動後ゲル写真を図 5 に示す。

図 5(a)の真空度-20kPa の電気泳動パターンより、127kDa と 136kDa 付近に 2 つの太いバンドが確認された。一般にティラピアの皮膚、皮には I 型コラーゲンが多く存在し、ポリペプチド鎖の中でも $(\alpha 1)_2 \alpha 2$ 型のヘテロ三量体の鎖が存在する⁽¹¹⁾。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ のバンドはそれぞれ 136kDa と 127kDa であり⁽¹²⁾、今回の SDS-PAGE の結果と一致した。I 型コラーゲンの存在を裏付ける結果となった。これらの結果は他の魚種、例えばコイ⁽¹³⁾、ゼブラフィッシュ⁽¹⁴⁾の結果とも一致していた。一方、真空度-40 kPa の電気泳動パターンでは 127kDa と 136kDa 付近の 2 つの太いバンドは消失し、特徴的な分子量を示すバンドも出現しなかった。レーン 2 から 6 の写真からわかるように、破碎時間に関係なくレーン全体が染色された結果より、ポリペプチド鎖がランダムに切断あるいは加水分解され、より短いペプチド鎖あるいは低分子のアミノ酸にまで分解されたことが明らかとなった。したがって、破碎塩酸含浸処理は減圧によってポリペプチド鎖の低分子化が促進されることが考察された。次に、これらの試料をゲルにした際、コラーゲンおよびゼラチンに特徴的な三重らせん構造の有無を CD スペクトル測定で調べ

た。その結果を図 6 に示す。図 6 で認められる 220 nm 付近の正の極大および 210 nm 以下の波長で負に転じるパターンは、ポリペプチド鎖の主鎖（アミド結合）の吸収帯での規則的な右巻き三重らせん構造に起因するスペクトルである。220 nm の正の極大が小さくなるにつれ、ペプチド鎖は不定形、いわゆるランダム構造になり変性が生じたことを意味する。真空度-20 kPa の時に CD 値は最大を示し、-40 kPa の時に最小値を示した。ポリペプチド鎖を低分子化させずに抽出するには、真空度は低い方が適していることが明らかとなった。また、破碎時間に関係なく真空度-40 kPa で 220 nm の正の極大値が最小を示したのは、コラーゲン原線維の細密構造と真空度に関係がある可能性が示唆され、今後さらなる実験を行う必要がある。また、収率を高く保ちつつゲル形成の三次元ネットワークに必要な三重らせん構造を示す条件は、2 分間破碎し-30 kPa が適切であることが明らかとなった。

5. Conclusion

魚鱗からゼラチンを高収率で得るには破碎塩酸含浸処理は有用な抽出方法の一つであることが示された。今回の手法は、濃塩酸やアルカリおよび酵素を使用することなく、魚鱗を 2 分間破碎し、40℃下、真空度-30 kPa で静置するだけで、収率 64.8%でゼラチンを得ることができた。また、破碎時間が長くなるにつれ収率は増加するが、ポリペプチド鎖の低分子化を招くことが SDS-PAGE の結果より示された。また、CD スペクトルパターンより魚鱗のゼラチン抽出に適した真空度は-30 kPa であることが明らかとなった。このように、近年、魚鱗に限らず、様々な原料からコラーゲン・ゼラチンを抽出するために加熱や酸・アルカリ、酵素を利用した方法が多数報告されている。原料によっては、硬さ、含有油脂類やミネラルなど大きく異なる。そのため、原料ごとの適切な抽出方法の選択が重要になってくる。今後、医用材料、化粧品、食品分野においてコラーゲン・ゼラチンの選択的抽出方法の 1 方法として活用されることを期待する。

謝辞

本研究は、福岡工業大学総合研究機構 2020 年度科研費リトライ支援制度の助成により実施することができました。ここに、感謝の意を表します。

文 献

- (1) Zdzieblik, D.; Oesser, S.; Baumstark, M.; Gollhofer, A.; König, D. Collagen peptide supplementation in combination with resistance training improves body composition and increases muscle strength in elderly sarcopenic men: A randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2015, 114, 1237–1245.
- (2) Lovell, C.R.; Smolenski, K.A.; Duance, V.C.; Light, N.D.; Young, S.; Dyson, M. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br. J. Dermatol.* 1987, 117, 419–428.
- (3) Alves, A.L.; Marques, A.L.P.; Martins, E.; Silva, T.H.; Reis, R.L. Cosmetic

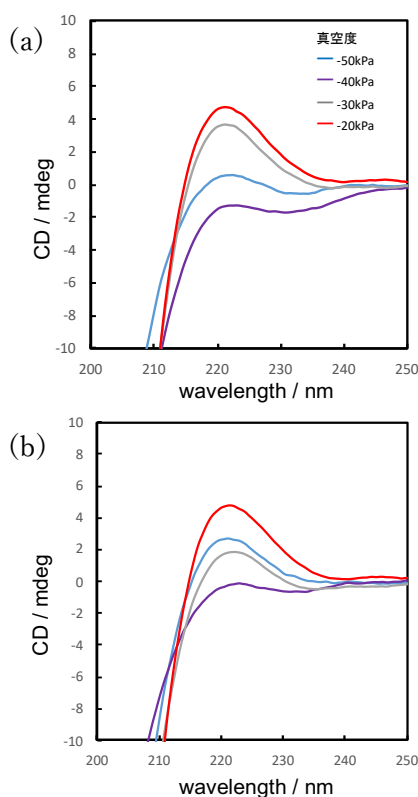


図 6 破碎 2 分間 (a) と 4 分間 (b) の CD スペクトルパターン

Fig. 6. CD spectral patterns for crushing time of (a) 2 min and (b) 4 min.

- potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics* 2017, 4, 39.
- (4) 生駒 俊之・田中 順三, 界面構造から見た人工骨, *表面科学* 2011, 32, 545–550.
- (5) 中津 沙弥香・柴田 賢哉・石原 理子・坂本 宏司, 真空包装機を用いた凍結減圧酵素含浸法による形状保持軟化食材の作製, *日本摂食嚥下リハビリテーション学会雑誌* 2009, 13, 120–127.
- (6) Laemmli, U.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 680–685.
- (7) Chen, J.; Li, L.; Yi, R.; Gao, R.; He, J. Release kinetics of tilapia scale collagen I peptides during tryptic hydrolysis. *Food Hydrocoll.* 2018, 77, 931–936.
- (8) Liu, W.; Zhang, Y.; Cui, N.; Wang, T. Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from snakehead (*Channa argus*) skin: Effects of hydrogen peroxide pretreatments and pepsin hydrolysis strategies. *Process Biochem.* 2019, 76, 194–202.
- (9) Kim, T.-K.; Ham, Y.-K.; Shin, D.-M.; Kim, H.-W.; Jang, H.-W.; Kim, Y.-B.; Choi, Y.-S. Extraction of crude gelatin from duck skin: Effects of heating methods on gelatin yield. *Polut. Sci.* 2020, 99, 590–596.
- (10) Woo, J.-W.; Yu, S.-J.; Cho, S.-M.; Lee, Y.-B.; Kim, S.-B. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocoll.* 2008, 22, 879–887.
- (11) Sun, L.; Hou, H.; Li, B.; Zhang, Y. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 99, 8–14.
- (12) Liu, D.; Liang, L.; Regenstein, J.M.; Zhou, P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem.* 2012, 133, 1441–1448.
- (13) Duan, R.; Zhang, J.; Du, X.; Yao, X.; Konno, K. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.* 2009, 112, 702–706.
- (14) Gistelinc, C.; Gioia, R.; Gagliardi, A.; Tonelli, F.; Marchese, L.; Bianchi, L.; Landi, C.; Bini, L.; Huysseune, A.; Witten, P.E.; et al. Zebrafish Collagen Type I: Molecular and Biochemical Characterization of the Major Structural Protein in Bone and Skin. *Sci. Rep.* 2016, 6, 21540.