

# ブリ皮からのコラーゲンペプチドの調製とその分子量分布

苔庵泰志\* , 栗田 修\*

## Preparation of Collagen Peptides from Skin of Yellowtail(*Seriola quinqueradiata*) and its Molecular Weight Distribution

Yasushi KOKEAN and Osamu KURITA

### 1. はじめに

コラーゲンは、動物組織の皮膚等に存在する繊維状のタンパク質で、体を構成する全タンパク質の約30%を占めており、組織の保水性等に関与している。生体内では3本のポリペプチドがラセン状になった分子構造をしており、水に不溶性である。コラーゲンに水を加えて加熱すると3重ラセン構造が壊れて可溶性のゼラチンとなる<sup>1)-3)</sup>。ゼラチンおよびコラーゲンを酵素処理や酸分解したものがコラーゲンペプチドである。ウシやブタ等の家畜由来のゼラチンは、古くからゲル化剤等として、食品や飼料、工業製品に広く利用されてきた。しかしながら近年では、BSE(狂牛病)問題等で家畜由来の素材への信用が低下している。一方で、保湿等の美容目的等でのコラーゲンペプチドは、その需要の高まりから、魚類由来のコラーゲンやコラーゲンペプチド<sup>4)-5)</sup>の健康食品・医薬品等への利用が広がっており、大きなマーケットになりつつある<sup>6)</sup>。

魚由来コラーゲンやコラーゲンペプチドの抽出源としては現在、主に外国産の淡水魚等のウロコが用いられている。一方、三重県では、尾鷲市を中心とした三重県東紀州地域では鮮魚加工業が盛んであり、国産の養殖魚をコラーゲンの抽出源にすることができれば、トレーサビリティが確保された原料供給が可能である。現在鮮魚加工においては、可食部(最大70%)以外のほとんどが魚加工残渣(魚あら)として焼却されるか一部は農業用肥料になって

\* 医薬品・食品研究課

いる。そこで本研究では、魚あらの有効利用と減量化を目的に、安定した量を確保できるブリ及び対照としてカンパチ、サーモンの皮からコラーゲンペプチドを調製し、その抽出・分画技術を確認し、特性評価等を行った。

### 2. 原材料

ブリ(*Seriola quinqueradiata*)、カンパチ(*Seriola dumerili*)、サーモン(アトランティックサーモン、*Salmo salar*)の皮は、尾鷲物産(株)において、鮮魚加工時に分離した生皮を、皮重量に対して10倍容の1%Ca(OH)<sub>2</sub>溶液に48時間浸漬してコラーゲン以外の不純物を除去したものを、コラーゲンペプチド抽出用試料とした(図1)。タンパク質分解酵素パインは、和光純薬(株)から、プロメラインは、ジェネンコア協和(株)から購入した。タラ皮コラーゲンペプチド、テラピアウロココラーゲンペプチドは、辻製油(株)から提供された。

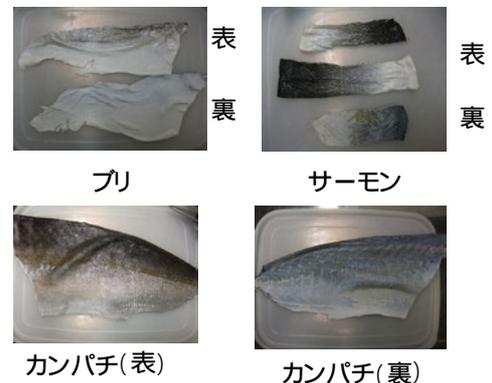


図1 アルカリ処理魚皮

### 3. 実験方法

#### 3.1 酵素処理によるコラーゲンペプチドの調製

サンプル量の0.2% (w/w) のタンパク質分解酵素を加え60℃で、2~6時間処理した。90℃で、30分間加熱して酵素失活させた後、遠心分離(10k rpm, 20min)により不溶物を除いた。得られた上清は、ろ過助剤としてセライトを加えた後に5cろ紙で減圧ろ過し、凍結乾燥により粉末化した。また、酵素処理前に、前処理として以下に示す熱水抽出を行い、ペプチド抽出の効率を上げる検討を行った。細断した魚皮に重量の10倍容の蒸留水を加え、80℃で2時間コラーゲンを抽出した。冷却後の酵素処理時間は2時間として、前記の方法と同様に行った。なお、酵素処理にはプロメライン、パパインを用いた。

#### 3.2 コラーゲンペプチドの分子量測定

高速液体クロマトグラフ(HPLC, 島津製作所LC10)を用い、排除限界クロマトグラフィー(SEC:Size Exclusion Chromatography)により熱水処理後に酵素処理したブリ、カンパチ、サーモン由来コラーゲンペプチドの分子量測定を行った。SEC分析用カラムはShodex OHpak SB-804 HQ+SUGAR KS-806を用い、カラム温度60℃で、100mM NaCl, 50mM リン酸緩衝液(pH7.2)を溶離液として、流速1.0mL/minで紫外分光検出器(UV)により214nmでの吸光度を測定した。また、SDS-電気泳動では、5-20%ポリアクリルアミド濃度勾配ゲルにより約10~200kDaまでの分子量分布を検討し、15-20%トリシン濃度勾配ゲルにより分子量約3kDa~10kDaの低分子範囲を検討した。SDS-PAGEの検討には、対照となる市販品として、タラ皮由来およびテラピア由来のコラーゲンペプチドを用いた。

### 4. 結果と考察

#### 4.1 酵素処理によるコラーゲンペプチドの調製

熱水抽出無しで2~6時間で、酵素処理により調製により調製したコラーゲンペプチドの歩留まりは、魚種にかかわらず、抽出時間の違いで大きな変化を示さなかった。酵素別の歩留まりは、ブリ、サーモンはプロメライン、パパイン処理では19.0~21.7%であったが、カンパチでは悪かった(13.2~15.2%)。一般に魚皮中のコラーゲン含有量は20%

前後であることから換算すると、今回の酵素処理で、ブリ、サーモンの皮に含まれるコラーゲンは、ペプチドとしてほぼ100%近く抽出できたと考えられ、酵素処理時間は2時間でも十分であると思われる。

2時間の酵素処理により調製したコラーゲンペプチドの歩留まりを、表1に示す。魚種別の歩留まりに差が認められ、サーモンが最も優れ、次いでブリ、カンパチの順となった。熱水抽出の効果としては、プロメライン処理では全ての魚種で熱水抽出により、歩留まりが向上した。一方、パパイン処理時にカンパチでは、熱水抽出による歩留まりの変化はほとんど示さなかった。これらのことから、カンパチの皮に関しては、熱水処理後のコラーゲンペプチド抽出への効果は認められなかった。コラーゲンの酵素分解は、コラーゲンに特異的に含まれるアミノ酸であるヒドロキシプロリン(Hyp)の存在により、分解抵抗性を示す<sup>7)</sup>ことから、カンパチに関しては、Hyp含量がブリやサーモンに比べて多いことが考えられる。

表1 酵素処理で調製したコラーゲンペプチドの歩留まり

	酵素	熱水抽出無し	熱水抽出有り
ブリ	B	19.7	24.2
	P	20.4	23.0
カンパチ	B	13.5	15.8
	P	13.6	13.7
サーモン	B	20.0	24.0
	P	21.5	26.7

酵素処理時間:2時間, B:プロメライン処理 P:パパイン処理

#### 4.2 コラーゲンペプチドの分子量測定

SDS-PAGEの結果では、熱水抽出無しでの酵素処理では用いた3魚種全てにおいて、6時間の酵素処理した場合においても高分子のバンドが見られ、酵素作用を受けていないコラーゲンが確認できた(データ示さず)。一方、魚皮を、熱水(80℃, 2時間)抽出後に酵素処理することにより、熱水抽出無しの場合と比べて、高分子でのバンドが少なくなり、コラーゲンの分解性が向上したことが確認できた(図2)。また、プロメライン処理したコラーゲンペプチドの水溶性画分の分子量は、約6.5kDa以下であった(図3~図5)。一般に、食品用として用いられているコラーゲンペプチドの分子量は、5~15kDa程度であり、今回調製したコラーゲンペプチドの分

分子量分布は、市販品と大差がないことを確認した。図3~5のSECの結果では、同量の試料の添加でも、プロメライン処理に比べてパパイン処理では溶出画分が魚種にかかわらず少なかった。これらの知見は、図2でのSDS-PAGEでのバンドの濃淡と逆の結果となっており、パパイン処理では、SDS処理により可溶化した不溶性のペプチドが、多く検出されたと考えられる。今後は、アミノ酸分析等により、酵素処理と魚種による特性の関係が明らかになるとと思われる。

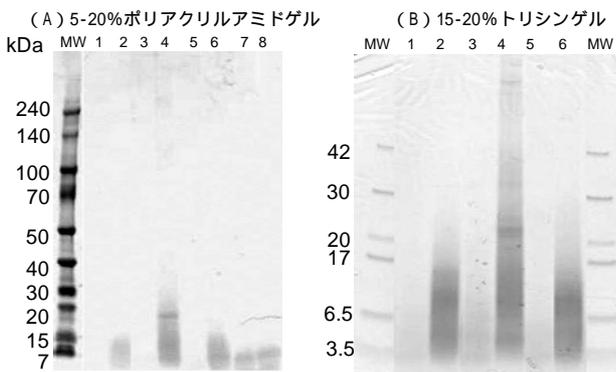


図2 魚皮コラーゲンペプチドの電気泳動分析

B: プロメライン処理 P: パパイン処理

NO.1: B-ブリ, NO.2: P-ブリ, NO.3: B-カンパチ,  
NO.4: P-カンパチ, NO.5: B-サーモン, NO.6: P-サーモン  
NO.7: タラ皮(市販品), NO.8: テラピアウロコ(市販品)

MW: 分子量マーカー

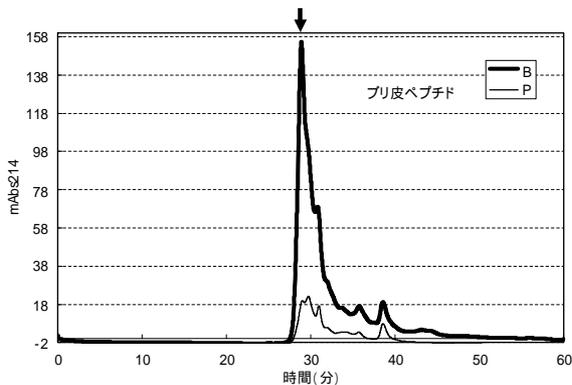


図3 ブリ皮コラーゲンペプチドの排除限界クロマトグラフィー (SEC) による分子量の分析

B: プロメライン処理 P: パパイン処理 : 6,5kDa

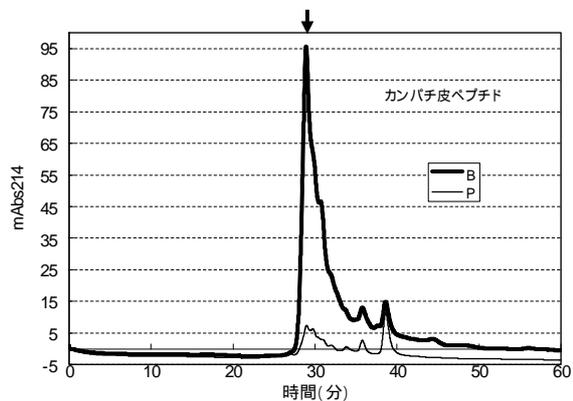


図4 カンパチ皮コラーゲンペプチドの排除限界クロマトグラフィー (SEC) による分子量の分析

B: プロメライン処理 P: パパイン処理 : 6,5kDa

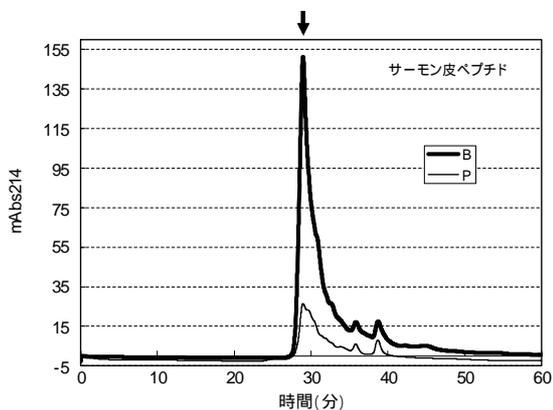


図5 サーモン皮コラーゲンペプチドの排除限界クロマトグラフィー (SEC) による分子量の分析

B: プロメライン処理 P: パパイン処理 : 6,5kDa

## 5. まとめ

魚あらを用いてタンパク質分解酵素で処理することにより、コラーゲンペプチドを調製した。ブリ、カンパチ、サーモンの皮を、タンパク質分解酵素であるプロメライン及びパパインを用いて60、2~6時間処理したところ、2時間程度の処理で、分子量10kDa以下の低分子コラーゲンペプチドが調製できた。魚皮からのコラーゲンペプチドの調製は、熱水(80、2時間)抽出後に酵素処理することにより、その歩留まりやコラーゲンの分解性が向上した。コラーゲンの分解性はサーモンが最も優れ、次いでブリ、カンパチの順となった。また、ゲルろ過、電気泳動での分析より、プロメライン処理したコラーゲンペプチドは、パパイン処理ペプチドより水に対する溶解性が高く、分子量は約6.5kDa以下であっ

た .

### 参考文献

- 1)大原浩樹ほか：“コラーゲンペプチド経口摂取による皮膚角層水分量の改善効果”．日本食品科学工学会誌，56（3），p137-145(2009)
- 2)Shrieber et al: “ Gelatin production, the six step to maximum safety ”. Dev., Biol., Stand., 80 , p195-198(1993)
- 3)大崎茂芳：“コラーゲンと人体”，大崎茂芳，コラーゲンの話，中公新書，p1-40(2007)
- 4)Ogawa et al: “ Biochemical properties of bone and scale collgens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia croms*) and sheepshead seabream (Archosargus

probatocephalus) ” . Food Chemistry.,88(4) , p495-501(2004)

- 5)Ikoma et al: “ Physical property of type I collagenextracted from fihs scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas* ”. Int. J. Biol. Macromole., 32(3-5) , p199-204(2003)
- 6)食品と開発編集部ほか：“美容食品の開発と展望”，食品と開発，44(7)，p4-32(2009)
- 7)吉本久仁男ほか：“牛肉結合組織画分に対する各種プロテアーゼの分解能について”，Res., Bull. Obihiro Univ. , 8 , p405-415(1974)

（本研究の一部は，平成 21 年度科学技術振興機構重点地域研究開発推進プログラム( ニーズ即応事業 ) の支援を受けて実施されました )