

# ブリウロコからのコラーゲンペプチドの調製とその特性評価

苔庵泰志\*, 栗田 修\*

## Preparation of Collagen Peptides from Scale of Yellowtail(*Seriola quinqueradiata*) and Evaluation of their Characterization

Yasushi KOKEAN and Osamu KURITA

The optimization for the preparation of collagen peptides from scale in Yellowtail were examined in this study. The collagen peptides from deashed scale of Yellowtail were prepared by the proteolysis with bromelain at 60°C for 2 hours. The yield of the peptides were 85.4%. The average molecular weight of these peptides were approximately 6.5 kDa. The peptides were completely dissolved at the pH range from 2 to 12 without the formation of precipitation. The rates of glycine to total amino acid content for the peptides were 25-30% higher than that of the merchandised collagen(20-30%). These results suggest that the peptides from Yellowtail could be available for the application to foods.

Key word: Collagen, Peptides, Yellowtail

### 1. はじめに

三重県では、尾鷲市を中心とした三重県東紀州地域で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いる。昨年度は、魚あらのうち、3 種類の魚皮からコラーゲンペプチドの抽出方法について検討し、その素材としての有効性等を明らかにした<sup>1)</sup>。魚ウロコは、約 40~50%がヒドロキシapatite（塩基性リン酸カルシウム）を含む他、残りの約 50~60%はほぼ純粋なコラーゲンである<sup>2)</sup>。ウロコ由来のコラーゲンは純度が高い上に、魚独特の魚臭も有しないことから、魚由来のコラーゲンの分離源として重要である。これらのことから国内で流通している魚由来のコラーゲンの大部

分はウロコ由来であり、本研究で主として対象とするブリウロコも、抽出源となりうる。

そこで本年度は、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ウロコからコラーゲンペプチドを調製し、その抽出・分画技術の確立及び特性評価等を行った。

### 2. 原材料

ブリ (*Seriola quinqueradiata*) ウロコは、尾鷲物産(株)において、鮮魚加工時に分離した生ウロコを、0.5N 塩酸で 2 時間脱灰処理してコラーゲン以外の灰分等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（脱灰ウロコ）。ブリ、カンパチ (*Seriola dumerili*)、サーモン（アトランティックサーモン, *Salmo salar*) の皮由来コラーゲン及びコラーゲンペプチドは、昨年度の検討で調製したものをを用いた。タンパク質分解酵素パパインは、和光純薬(株)から、ブロメラインは、ジェネンコア

\* 医薬品・食品研究課

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。

### 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

脱灰ブリウロコからのコラーゲンペプチドの調製に関して、最適な酵素処理条件を見いだすために、ブロメライン及びパパインを用い、酵素添加量、処理時間の検討を行った。脱灰ウロコは、重量の10倍量の蒸留水を加え、80℃で2時間熱水処理を行った。加熱処理後、試料重量当たり0.05~0.2% (w/w)の酵素を加え、60℃で1~4時間処理した。90℃で、30分加熱して酵素を失活させ、遠心分離(17,000×g, 20分)により不溶物を除いた。得られた上清に対して、ろ過助剤としてセライトを加えた後、5cろ紙で減圧ろ過し、凍結乾燥によりろ液を粉末化した。歩留まりは、ブリウロコ重量に対する凍結乾燥で得られたコラーゲンペプチド重量の割合とした(% , w/w)。残存率は、酵素処理液を5cろ紙でろ過後、得られたろ液を50℃で24時間乾燥し、残存物乾物重量(コラーゲン量)のブリウロコ重量に対する割合とした(% , w/w)。

#### 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ウロコ由来コラーゲンペプチドの分子量測定を行った。SEC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。

#### 3.3 コラーゲンペプチドの溶解性測定

30mgのコラーゲンペプチドを15mlの蒸留水に溶解した後、0.5N NaOH及び0.5N HClを用いてpH調整を行った。pH調整後、蒸留水を加えて、容量を30mlに合わせ(ペプチド濃度0.1% (w/v))、17,000×g, 15分間遠心分離により不溶物を除去後、分光光度計により214nmでの吸光度を測定した。

#### 3.4 コラーゲンペプチドのアミノ酸分析

ブリウロココラーゲンペプチド、対照として市販品(DT[A]:(株)ニッピ製、魚類ウロコ由来、TSC:辻製油(株)製、テラピアウロコ由来、TSP:辻製油(株)製、海産魚ウロコ由来)及び昨年度調製したブリ、カンパチ、サーモンの皮由来のコラーゲンペプチドを併せてアミノ酸分析した。各試料は、6NHClで加水分解(110℃, 24時間)した後に減圧乾固し、分離用移動相に溶解後、φ0.2μmセルロースアセテートのメンブランフィルターでろ過した液を試料とした。分析は、陽イオン交換クロマトグラフィーによる各アミノ酸の分離、OPA(σ-フタルアルデヒド)を用いたポストカラム誘導体化蛍光検出法により分析した。また、凍結乾燥したコラーゲンペプチド中のタンパク質量は、全窒素分析(ケルダール法)により求めた(タンパク質換算係数:5.55<sup>3)</sup>)。分析条件は以下の通りとした。(装置:(株)島津製作所LC-20A, アミノ酸分析カラム:Shimpack Amino-Na(100mmL×6.0mmI.D.), 溶出:グラジェント溶出法, 移動相:島津アミノ酸分析移動相キットNa型, 流速:0.6mL/min, カラム温度:60℃, 反応液:島津アミノ酸反応液OPAキット, 溶離液A:次亜塩素酸ナトリウム/ほう酸緩衝液溶離液B:OPA, N-アセチルシステイン/ほう酸緩衝液, 反応液流量:0.3mL/min, 検出:蛍光光度(Ex.350nm, Em.450nm), サンプル添加量:10μL)

### 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

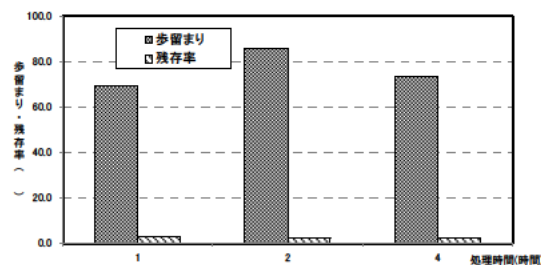


図1 酵素処理時間の歩留まりへの影響(ブリウロコブロメライン処理)

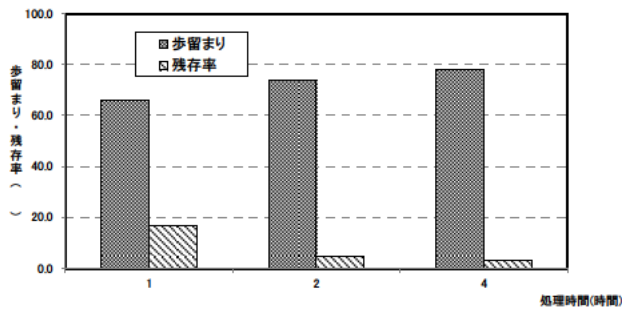


図2 酵素処理時間の歩留まりへの影響 (ブリウロコパイン処理)

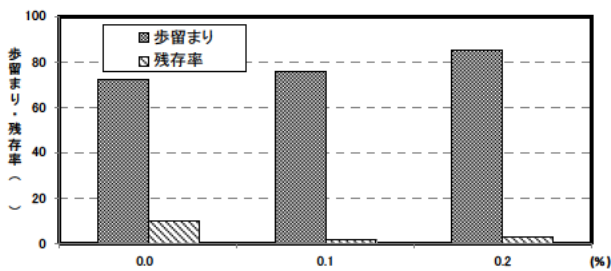


図3 酵素添加量の歩留まりへの影響 (ブリウロコプロメライン処理)

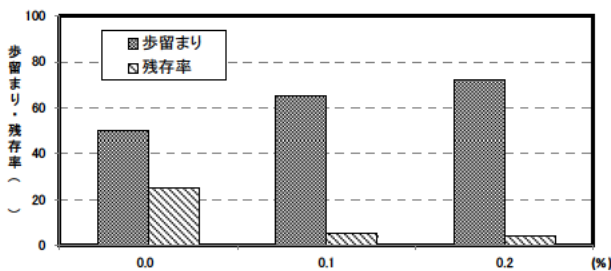


図4 酵素添加量の歩留まりへの影響 (ブリウロコパイン処理)

結果について、図 1~4 に示す。ブリ脱灰ウロコからのペプチドの調製の最適な条件は、酵素濃度、処理時間、酵素の種類について検討した (歩留まり目標値：ウロコ 70.0%以上、皮 20.0%以上)。得られた最適な酵素処理条件は、プロメライン処理 0.2% (w/w)、2 時間処理であった (歩留：ウロコ 85.4%、皮 25.5%)。

#### 4. 2 コラーゲンペプチドの分子量測定

ブリ脱灰ウロコ由来のコラーゲンペプチドの分子量測定結果を、図 5 及び図 6 に示す。歩留まり及び分子量の結果により、魚皮、ブリウロコ共にペプチドの調製は、プロメライン処理 0.2% (w/w)、2 時間程度で可能であると思われる (分子量目標値：

8.0kDa 以下、分析値 6.5kDa)。

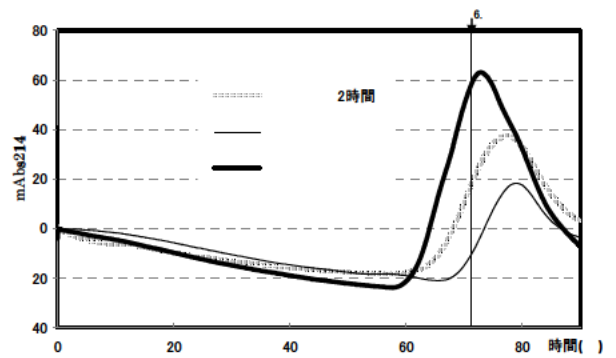


図5 プロメライン処理コラーゲンペプチドの分子量 (ブリウロコ)

プロメライン処理濃度 0.2% (w/w) TSP：海産魚ウロコ由来 (市販品) DT [A]：魚類ウロコ由来 (市販品)

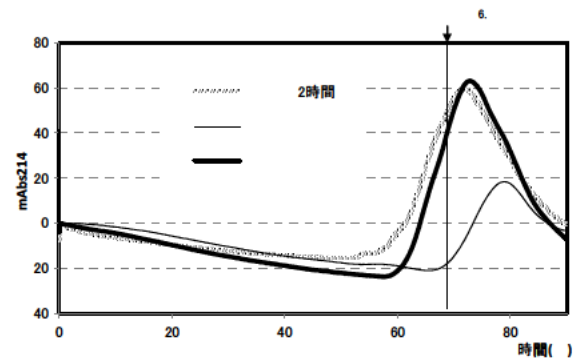


図6 パイン処理コラーゲンペプチドの分子量 (ブリウロコ)

パイン処理濃度 0.2% (w/w) TSP：海産魚ウロコ由来 (市販品) DT [A]：魚類ウロコ由来 (市販品)

#### 4. 3 コラーゲンペプチドの溶解性

調製したペプチドの各種 pH に対する溶解性を図 7 に示す。ブリウロコ及び魚皮由来のペプチドは共に、pH の違いによる沈殿等は認められず、測定した全ての pH 領域で溶解性は良好であった。このため、乳酸飲料や果実飲料等、pH の低い飲料においても問題なく利用できると思われる。

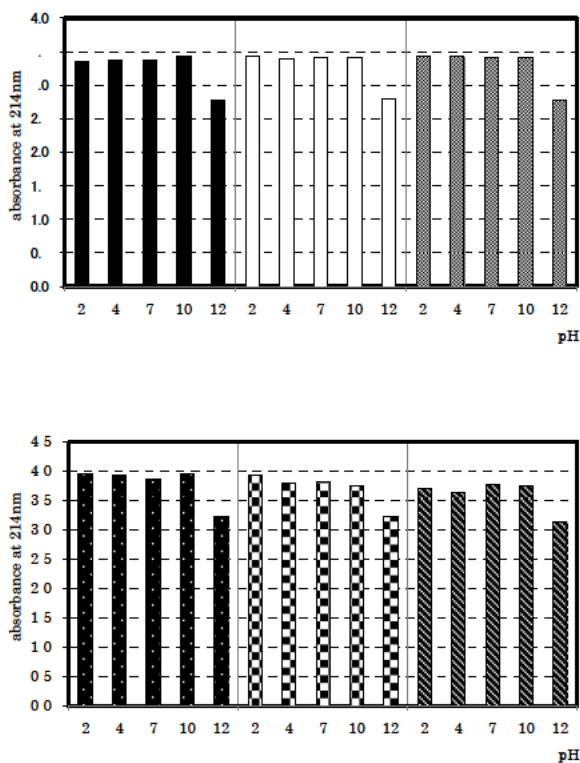


図7 コラーゲンペプチドの溶解性

- ①TSC：テラピアウロコ由来（辻製油） ②TSP：海産魚ウロコ由来（辻製油） ③DT [A]：魚類ウロコ由来（ニッピ） ④タラ皮由来（辻製油） ⑤ブリウロコ由来（ブロメライン 0.2%, 2hr 処理） ⑥ブリ皮由来（ブロメライン 0.2%, 2hr 処理），ペプチド濃度 0.1%（w/v）

#### 4. 4 コラーゲンペプチドのアミノ酸分析

ペプチドに含まれるグリシン（コラーゲンでは通常 20~30%）<sup>4)</sup>を指標として、コラーゲンの純度を検討した（表1~3）。分析の結果、調製したペプチドのグリシン含量は全て 25~30%であり、高純度のコラーゲンペプチドであると考えられる。

ブリ皮、サーモン皮では、ブロメライン処理により未処理の時と比べてヒドロキシプロリン含量は減少し、ブリウロコ、サーモン皮では増加した。また、ブロメライン処理ブリウロコでは、TSPとほぼ同等、DT[A]、TSCよりは少なかった。酵素処理後のヒドロキシプロリン含量の増減は、コラーゲンタンパク質中（一次構造）でのヒドロキシプロリンの配置の違いが、タンパク質一次配列中の切断部位の相違となり、アミノ酸やペプチドの流亡の変化となった可能性もある。また、ヒドロキシプロリンの増減とコ

ラーゲンの生合成促進等の生理機能への効果<sup>5)</sup>については、動物実験等で検討する必要がある。

表1 コラーゲンペプチドのアミノ酸組成（標準品）

( )			
	11.1	11.0	10.1
	4.	4.8	4.8
	.1	.1	.
	.4	.	.2
	0.0	2.	2.
	0.	1.	1.2
	2.	2.8	2.6
	6.8	.	6.
	10.4	10.2	10.
	11.	11.	10.
	1.6	2.0	2.0
	0.0	0.8	1.1
	0.8	1.0	1.0
	2.1	2.4	2.1
	1.6	1.	1.4
	2.	2	2

表2 コラーゲンペプチドのアミノ酸組成（ブリ皮、ブリウロコ）

( )				
	8.6	.8	8.	.
	1	8	0	0
	0	.	8	1
	.	.	.	.
	28	26.4	0.8	2.8
	1.0	1.8	1.0	1
	2	0	2.6	0
	6	.	1	0
	10.4	.	10.4	.8
	11.	11.0	10.	10.
	1.8	2.2	1.8	2.2
	1.2	1	1.2	1.2
	1.0	1	1.0	1
	2.0	2	2.0	2.1
	2.0	2.2	2.2	2.0
	4	.	2	.

表3 コラーゲンペプチドのアミノ酸組成（カンパチ皮、サーモン皮）

( )				
	6.	.	2	8.6
	8	6.1	4	.
	.	.8	4	.
	4.0	4	.	.
	1	2.8	2.8	28.0
	1	1	1.2	1
	2.1	2.4	2.6	0
	6	4	6.6	.
	0	8	10.8	10.1
	10.0	10.	11.0	10.6
	1.	1.6	1.8	2.4
	1.	1	1.0	1.1
	0	1.1	1.1	1.4
	2.0	2	2.2	2
	2	2.0	2.0	2.2
	2	1	.	.

#### 5. まとめ

魚あらの有効利用と減量化を目的に、脱灰ブリウロコからコラーゲンペプチドを調製した。タンパク質分解酵素であるブロメライン及びパパインを用いて 60℃、2 時間の処理で、分子量 6kDa 以下の低分子コラーゲンペプチドが調製できた。調製したコラーゲンペプチドの溶解性は、pH2-12 の領域で良好であった。アミノ酸分析によるグリシン含量の結果から、今回調製されたコラーゲンは市販品と同等の純度であることが明らかとなった。

## 参考文献

- 1) 苔庵泰志ほか：“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”. 三重県工業研究所研究報告, 34, p144-147(2010)
- 2) 原田 修ほか：“高圧熱水を用いたイワシ鱗からのゼラチン抽出”. 日本食品科学工学会誌, 54 (6) , p261-265(2007)
- 3) 科学技術庁資源調査会編：“五訂 日本食品標準成分表”, 表 7 窒素-たんぱく質換算係数, 大蔵省印刷局, p12(2000)
- 4) 申 鉉日ほか：“ペプシンで可溶化したホタテガイ外套膜由来コラーゲンの特性”. 日本食品科学工学会誌, 52 (9) , p398-405(2005)
- 5) 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)

(本研究の一部は、平成 22 年度科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業（ニーズ即応事業）の支援を受けて実施されました.)