

学位論文題名

Study on the food functionalities of collagen and gelatin prepared from Chinese freshwater fish byproducts

（中国産淡水魚の水産加工廃棄物から調製したコラーゲン、ゼラチンの食品機能性に関する研究）

学位論文内容の要旨

コラーゲンとゼラチンは食品の物性を変えるタンパク質系食品添加物として、広く利用されている。また、食品以外分野での利用も価値も高い。資源の多さから、主にウシやブタの皮、骨から生産されたものが主として流通されている。しかし、哺乳類で起きたBSE問題などの発生後、これら製品が敬遠される傾向にある。その代替として注目されているのが、資源量の多い水圏生物由来、たとえば皮、鱗、骨など水産廃棄物からの製品である。これら廃棄物から有用製品を製造することは、環境負荷軽減となり、地球環境保持の観点からも推奨されるものである。中国は淡水魚の最大生産国であり、生産増大に伴い大量に発生する非可食部が生産される。しかし、淡水魚の皮、鱗、骨に存在するコラーゲンの特性に関する情報は少ない。コラーゲン、ゼラチンの利用の際に問題となるのが、タンパク質としての熱安定性である。一般的に魚類のコラーゲンの熱安定性は哺乳類のものに比べて低く、さら魚種間でも生息水温が低いもののコラーゲンほど不安定である。温帯産の淡水魚の場合は、海産魚と大きく状況は異なり、養殖池の水温は夏季冬季で大きな変化がある環境で生活している。果たして、このような特殊な水温変化を経験する魚類について、夏季、冬季のコラーゲンを区別して検討した例はない。そこで、対象魚としては中国で広く養殖されているコイ科のコイとハクレンとし、夏、冬を区別しながら、それぞれの皮、鱗、骨から調製したコラーゲン、ゼラチンのタンパク質化学的、物理化学的および食品機能的特性を調べた。

まず、第一章では、コイとハクレンの3種の組織（皮、鱗、骨）から酢酸で抽出される酸可溶性コラーゲン(ASC)について、3種で差があるのかを検討した。皮からのASCの収量は高かったが、鱗、骨からの収量は低く、他の魚類で得られた結果と類似した。SDS-PAGE による分析では典型的なI型コラーゲンのサブユニット組成を示し、3種で差は認められなかった。また、ゼラチン化する変性温度も

約28℃で、差は認められなかった。この変性温度はスケトウダラなどのものより高温であり、安定性が高いことが示された。すでに、魚類には $\alpha 1$ と $\alpha 2$ に加えて $\alpha 3$ ($\alpha 1$ と同じ移動度)成分を含むことが知られている。そこで、SP-Toyoperalによるクロマトグラフィーでその有無を検討したところ、コイのどの組織からのコラーゲンにも $\alpha 3$ が含まれていたが、ハクレンには検出されなかった。かなり近縁種の魚にこのような差が認められたのは興味深い。

第二章では、水温が異なる夏季(26.6℃)、冬季(2.1℃)の河川で漁獲されたコイおよびハクレンの上記3組織からASCを調製し、諸性質を比較した。両季節の3組織から得られたそれぞれの標品のサブユニット組成には差は認められなかった。それらの熱安定性を比較するため、より感度の高い新たな変性検出方法を開発した。第一の方法は、ペプシン消化性である。すなわち、コラーゲンが熱変性すればゼラチンとなりペプシン耐性を失い、分解が検出されるという原理に基づいている。コイの3組織からのASCについてはいずれも、夏の魚から調製したものの方が、より高温で加熱しないと消化分解が起こらず、冬のASCより熱安定性が高いことが初めて示された。変性温度の違いは皮、骨では約1℃、鱗では1.8℃であった。この違いは、筋肉タンパク質ミオシンで認められたような季節の差に比べ小さかった。同じ結論はハクレンのASCでも得られた。さらに、熱安定性の違いを確認するため、タンパク質の規則的な二次構造を測定できる円偏光二色性(CD)を用いて測定した。いずれのASCも15℃でCDスペクトルを測定すると、204 nm に負のピーク、220 nmに正のピークを示したが、50℃で測定すると、ピークが消失し、完全な構造破壊が起きていることが確かめられた。この加熱試料のスペクトルは一旦冷却して低温で測定しても保持されたので、不可逆的な変化であり、この方法により加熱による構造変化を検出できると判断した。ピークの再現性から、220 nmに生じる正のピークを変性の指標とすることにした。試料の温度を連続的に上昇させ、それに伴う220 nmに生じる正のピークの減少からASC 変性を追跡した。すると、夏の方がより高温で減少が起き、熱安定性が高いことが示された。変化の一次微分により、大きな変化が起きる温度を比較すると、夏のコイの鱗ASCでは36℃の一つの温度で、冬のサンプルでは33と35℃で変化が起きた。この結果は明らかに夏のASCの方が安定であることを示している。骨のASCや皮のASCでは差は鱗のものに比べ、差は小さかった。同じ結果はハクレンでも得られた。それゆえ、コラーゲンの熱安定性が季節により変化すると結論した。

第三章では、コラーゲンの熱変性型のゼラチンの特性について検討した。この章では定法である熱水抽出の方法で調製したゼラチンについてその諸性質を検討した。夏と冬のコイの三種の材料から調製を試みたが、皮からの収量をもっとも高かった。抽出温度を50 から 80℃まで変えたが、50℃ではほとんど抽出されず、60℃以上で抽出された。しかし、高温で抽出するほど分解が顕著になることが

SDS-PAGEの分析から示された。また、夏季、冬季の試料の種々の物理的特性（粘度、ゲル融解温度、ゲル強度）を比較すると、夏の試料の方が優れていたが、この差は、性質の違いというより、安定性の違いによる抽出過程での分解程度の差のせいであろうと推察した。

第四章では、分解のないゼラチンを得るための新たな方法の開発を行った。すなわち、コイのコラーゲンは容易に酢酸に溶解すること、低温でゼラチン化する特性を考慮し、低濃度の酢酸溶液を用いて、低温で抽出できないか検討した。その結果、真水では抽出不可能な35 °C や45 °Cのような低温でも数10 mMの酢酸溶液で抽出すれば、分解の認められずに十分に高いゼラチンが得られることが分かった。抽出温度を55 °Cに上昇させたり、高濃度（90 mM）の酢酸を用いると多少の分解が検出されるようになった。これらのことより、最適抽出条件は、30 mM酢酸、45 °C、3時間と決定した。これまでの方法で調製したものと物理化学的性状を比較すると、明らかに優れていた。たとえば、低温でのゼラチン溶液の粘度は通常ゼラチンの2倍以上であり、冷却によるゲル化に必要なタンパク質濃度も低かった。冷却ゲルの融解温度（約 32 °C）も通常のもの（約 27 °C）より明らかに高かった。このゼラチンの食品機能性である乳化能、乳化安定性に優れていた。さらに、乳化後、直ちに冷却することで、均一に分散された脂質粒子がゼラチンゲルに取り込まれ、長時間分離することなく保持できることを見出した。この特性は、低温で利用するゼラチンの新たな食品の可能性を示すものである。たとえば、飲料、ヨーグルトなどの乳製品、冷凍食品などへの展開が可能である。特に、ゲル形成能に優れたこの新しいゼラチンは低濃度でゲルを形成するので、経済的利点もある。

本論文では水産廃棄物である中国産淡水魚の皮、鱗、骨など副産物から優れたコラーゲン、ゼラチンを調製する方法を見出し、それにより養殖の増産に伴って増えてくる残渣の有効利用に関する一つの解決策を提案した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 野 久 仁 彦
副 査 教 授 高 橋 是 太 郎
副 査 教 授 佐 伯 宏 樹
副 査 助 教 袁 春 紅

学 位 論 文 題 名

Study on the food functionalities of collagen and gelatin prepared from Chinese freshwater fish byproducts

(中国産淡水魚の水産加工廃棄物から調製したコラーゲン、ゼラチンの食品機能性に関する研究)

コラーゲンとゼラチンは食品のみでなく、広く利用されている。現在流通しているものは主にウシやブタの皮、骨から生産されたものである。しかし、BSE問題発生後、これら製品が敬遠される傾向にある。その代替として資源量の多い水圏生物由来、たとえば皮、鱗、骨など水産廃棄物からの製品である。中国は淡水魚の最大生産国であり、生産増大に伴い大量に発生する非可食部が生産される。コラーゲン、ゼラチンの利用の際に問題となるのが、タンパク質としての熱安定性である。一般的に魚類のコラーゲンの熱安定性は哺乳類のものに比べて低く、さら魚種間でも生息水温が低いもののコラーゲンは不安定である。温帯産の淡水魚の場合は養殖池の水温は夏季冬季で大きな変化がある。そこで、夏季、冬季のコイとハクレンのコラーゲンの特性を調べた。

三種の組織（皮、鱗、骨）から抽出されるコラーゲンで差はなかった。しかし、夏季、冬季の魚の3組織から得たいずれのコラーゲンにも熱安定性の違いが検出され、夏のもの熱安定が高いことがコラーゲンのペプシン消化性の手法と円偏光二色性の測定から確かめられた。その差は最も大きい鱗のコラーゲンで2°C程度であった。また、夏では一つの温度で構造変化するのに、冬では二つの温度で変化が起こり、内部構造の違いが示唆された。

コラーゲンタンパク質のもう一つの利用形態はゼラチンとしての利用である。そこで、コイやハクレンの3組織から調製したゼラチンの特性を、夏と冬で比較した。その結果、熱水抽出するには60°C以上を用いる必要があり、これまでの海産魚の結果と同じであった。しかし、どの温度で抽出しても、熱

によるタンパク質分解が認められ、特に冬の試料では顕著であった。その結果、冬季の試料の種々の物理的特性（粘度、ゲル融解温度、ゲル強度）は夏のものより劣った。

そこで、これまで報告されていない、高温の熱水抽出の代わりに、低温で分解が起こらない環境での新たなゼラチン調製法を開発した。ここでは、魚類のコラーゲンの特性である、組織から容易に酢酸で溶解すること、低温でゼラチン化することを考慮し、ゼラチン化が起きるなるべく低温で、さらになるべく低濃度の酢酸溶液を用いて、抽出を試みた。その結果、真水では抽出不可能な35 °C や45 °C のような低温でも数10 mMの酢酸溶液を用いれば、コラーゲンのサブユニットの分解が全く起こっていないゼラチンが数時間で抽出できることを見出した。種々検討した結果、抽出温度が55 °Cのように比較的高温では、通常ゼラチンに比べれば程度は低いが、分解が起こること、また、用いる酢酸濃度が高くなるほど（90 mM）分解が検出されるようになった。これらのことより、分解の起こらない最適抽出条件は、30 mM酢酸、45 °C、3時間と決定した。これまでの方法で調製したものと物理化学的性状を比較すると、明らかに優れていた。たとえば、低温でのゼラチン溶液の粘度は通常ゼラチンの2倍以上であり、冷却によるゲル化に必要なタンパク質濃度も低かった。冷却ゲルの融解温度（約 32 °C）も通常のもの（約 27 °C）より明らかに高かった。このゼラチンの食品機能性である乳化能、乳化安定性に優れていた。さらに、乳化後、直ちに冷却することで、均一に分散された脂質粒子がゼラチンゲルに取り込まれ、長時間分離することなく保持できることを見出した。この特性は、低温で利用するゼラチンの新たな食品の可能性を示すものである。たとえば、飲料、ヨーグルトなどの乳製品、冷凍食品などへの展開が可能である。特に、ゲル形成能に優れたこの新しいゼラチンは低濃度でゲルを形成するので、経済的利点もある。

本論文では水産廃棄物である中国産淡水魚の皮、鱗、骨など副産物から優れたコラーゲン、ゼラチンを調製する方法を見出し、それにより養殖の増産に伴って増えてくる残渣の有効利用に関する一つの解決策を提案した。よって、審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格があると判定した。