

資 料

チョウザメ由来ムコ多糖類の抽出方法の検討

上池 貴晃*・三代 恭広*・出口 智博*

1. 目 的

過疎化する中山間地の産業振興は島根県の課題の一つであり、その中で邑南町ではユニークな取組が行われている。同町の株式会社セレビアはチョウザメを養殖し、高級食材であるキャビアの生産を進め、2016年には自家種苗生産に成功し、現在は完全養殖に至っている。そのセレビアはチョウザメ養殖技術に興味を示す事業者へ養殖技術の移転を模索しており、中山間地域の産業の一つとして今後の発展が期待される。

チョウザメ養殖では、雌雄の判別が可能となるふ化後3～4年までは、全数の飼育を行い、雌雄の判別後には雌魚はさらに4から7年程度飼育した後に、キャビアの採取が行われる。キャビアが採取された魚体は、雄魚と判別された魚体と同様に、フィレ加工品としてその一部が販売されている。しかしながら、それらの大部分は廃棄されており、キャビア採取後の魚体と雄魚の活用が大きな課題となっている。

チョウザメはチョウザメ目チョウザメ科に分類され、古代魚とされる分類群の一つである。硬骨魚類に属するが、硬骨魚類の中でも軟骨の割合が大きいことが知られている¹⁾。この軟骨部分にはプロテオグリカンを含む有用な糖タンパク質やコンドロイチン硫酸を主とするムコ多糖類が含まれている²⁻³⁾。プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸は、機能的成分として多くの健康食品や化粧品に配合されており、プロテオグリカンの原料としてサケ鼻軟骨が、コンドロイチン硫酸の原料としてブタやサメ軟骨が主に利用されている。本稿ではチョウザメ廃棄部位の酵素分解により液状化および酵素分解液からのムコ多糖類の抽出精製をおこなった。酵素分解法では分解率90%以上の処理条件を見出した。また分解液から限外ろ過膜でムコ多糖類の抽出および粗精製をおこなったので報告する。

2. 方 法

2.1 供試試料

株式会社セレビアより提供されたチョウザメ廃棄部位(頭部、背骨)を試料とした。

2.2 試料の酵素分解

2.2.1 凍結乾燥試料の酵素分解

チョウザメ廃棄部位を液状化するため、次に示す方法で酵素分解条件の検討を行った。まず試料を凍結乾燥し、ブレンダーにて破碎した。この乾燥破碎試料に対して重量比10倍の水を添加し、次の3通りの条件で処理を行った。①処理温度と処理時間はそれぞれ40℃と30分に固定し、酵素添加量は0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%とした。②処理温度は40℃から60℃まで5℃間隔で変化させ、処理時間と添加量はそれぞれ30分と0.3%とした。③処理温度は50℃、処理時間は240分までの間で所定の時間とし、酵素添加量を0.3%とした。

分解酵素にはプロチンSD-NY10(天野エンザイム社製)を用いた。処理後の酵素分解液をろ紙(5A)でろ過し、ろ紙上に残った分解残渣の乾燥重量を分解前試料の乾燥重量から差し引いて分解率を算出した。

2.2.2 乾燥前試料の酵素分解

乾燥前試料の酵素分解については、試料に対して重量比2倍の水を添加し、酵素添加量0.5% (w/v)、50℃、24時間の処理を行った。

2.3 ムコ多糖類の抽出・精製

2.2.1項により調製した分解液は固形残渣を除去後、遠心分離機(クボタ商事製6200)を用いて8000rpm、20分間遠心分離し、沈殿物および油脂を取り除いた。次に限外ろ過膜(旭化成社製UFペンシル型モジュールAHP-0013D)を用いて透析液は超純水、通液速度100mL/分にて精製した。得られた精製液は凍結乾燥し、乾燥粉末とした。

また身や血合い等を除去した背骨破碎物の熱水抽出液(80℃、6時間処理)についても同様に精製した。

2.4 ムコ多糖類の精製度の評価

ムコ多糖類の精製度の評価はムコ多糖類の定量およびタンパク質の定量により行った。

ムコ多糖類の標準品にはコンドロイチン硫酸Cナトリウム(富士フィルム和光純薬社製)を用いた。ムコ多糖類の定量には簡易型・酸性ムコ多糖定量キット(コスモバイオ社製)およびカルバゾール硫酸法⁴⁾を用い、定法に従い試験を行った後、定量値をコンドロイチン硫酸C相当量として算出した。タンパク質の定量にはTakara BCA Protein Assay Kitを用い、定法に従い試験を行った後、

*環境技術科

定量値をBSA相当量として算出した。

2.5 ムコ多糖類の推定分子量の分析

2.3項で精製したムコ多糖類抽出液およびプルラン標準品 (SHODEX STANDARD p-82) について、ゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。分析条件を表1に示した。標準品のクロマトグラフより分子量校正曲線を作成し、ムコ多糖類の推定分子量を算出した。

表1 ゲルろ過クロマトグラフィー分析条件

HPLC装置	PU-2089 Plus (日本分光社製)
検出器	RI-2031 Plus (日本分光社製)
カラム	SHODEX LB-806M
カラム温度	40℃
溶離液	0.1mol/l NaNO ₃
流速	0.8ml/min

3. 結果および考察

3.1 チョウザメ廃棄部位の酵素分解

3.1.1 凍結乾燥試料

酵素処理による分解率は、酵素の添加量、処理温度、処理時間に依存する。そこで凍結乾燥試料について2.2.1の処理①、②、③をそれぞれ行った。図1に処理①を行った場合の酵素添加量と分解率の関係を示した。添加量0.3%において分解率は75.1%となり、それ以上酵素を添加した場合でも分解率の顕著な向上は見られなかった。

図2に2.2.1の処理②を行った場合の処理温度と分解率の関係を示した。処理温度50℃で分解率は80.1%となり、それ以上の処理温度であっても分解率の顕著な向上は見られなかった。処理温度60℃における分解率は86%であり、それ以下の温度による処理と比較すると分解率は高いが、高温下における長時間の処理は酵素の活性低下や失活を招く可能性が考えられ、以降の実験では50℃を処理温度とした。

図3に2.2.1の処理③を行った場合の処理時間と分解率の関係を示した。処理時間20分において分解率は85.2%となり、以降は緩やかに分解率が上昇し、処理時間120分においてほぼ上限となる分解率97%となった。

以上の結果から、チョウザメ残渣の酵素分解処理は酵素添加量0.3%以上、処理温度50-55℃、処理時間30分以上で行えばよいことが分かった。

3.1.2 乾燥前試料

3.1.1項で得られた処理条件をもとに、乾燥前試料の分解処理をおこなった。なお、養殖現場では頭部や背骨を細かく破碎する手段がないため未破碎のまま処理する。未破碎の生試料では分解効率が低下することから酵素添加量を0.5%とし、2.2.2項に記載した方法で処理を行った。その結果、分解率94%程度まで分解可能であり、処理後の硬骨を主体とする固形残渣は初期重量の3%程度であった。同様の方法で頭部の処理を行った場合は、硬骨が頭部には多く含まれていることにより、初期重量の10%程度の固形残渣があった。硬骨を主体とする固形残渣以外は液状化しており、この分解液をムコ多糖類の抽出用試料とした。

3.2 チョウザメ廃棄部位からのムコ多糖類の抽出・精製

3.1.2項の分解液を用いてムコ多糖類の抽出精製操作を行った。図4に各工程における分解液の外観を示した。分解液の精製が進むにつれて液の透明度が増し、かつ着色が薄くなっている。図5に分解液、限外ろ過膜精製後の液、

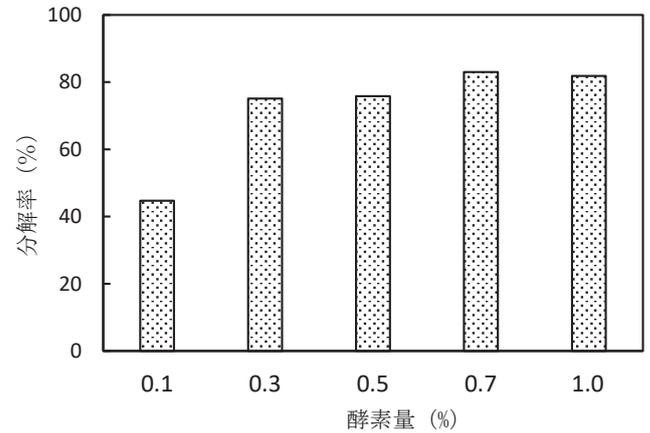


図1 酵素添加量

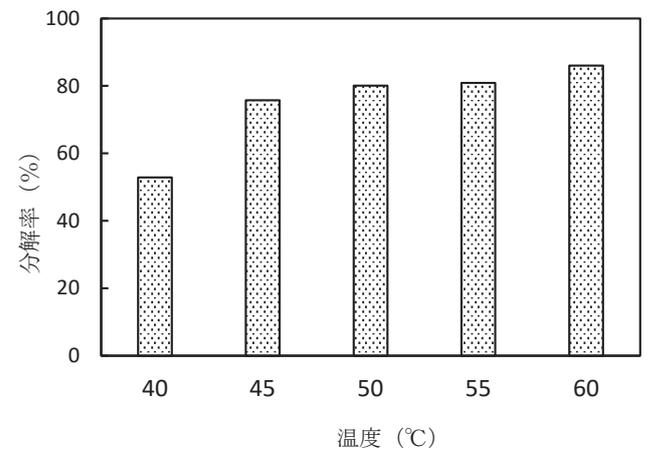


図2 処理温度

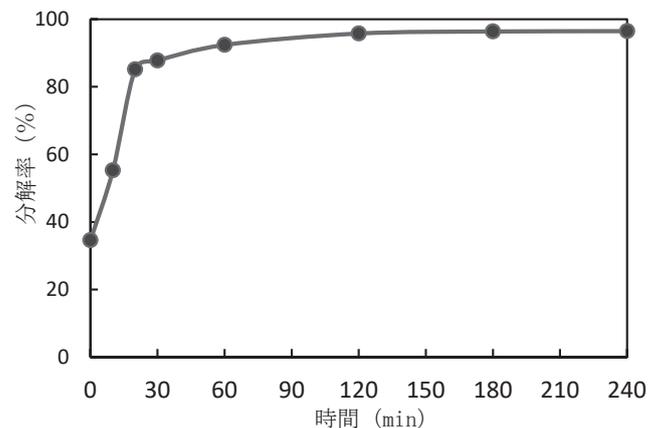


図3 処理時間

限外ろ過膜処理における廃液のそれぞれに含まれる酸性ムコ多糖とタンパク質の定量結果を示した。酸性ムコ多糖量の濃度は、分解液と限界ろ過膜精製後の液ではほぼ等しいが、タンパク質含有量は限界ろ過膜精製後では大きく減少し、廃液中に多く含まれていることが分かった。このことは、限外ろ過膜精製によって不純物であるタンパク質が除去され、ムコ多糖類の純度が上がったことを示唆している。カルバゾール硫酸法によるムコ多糖定量でも同様の傾向が見られた（データは示していない）。

2.3項に記載した熱水抽出液についても同様に精製処理を行った。酵素分解液は茶褐色であり、限外ろ過膜精製を経て白色透明の液になったが、熱水抽出液は限外ろ過膜精製を経ていないにも関わらず白色透明の液であったため、抽出液の時点で不純物が少ないことが予想された。熱水抽出液は酵素分解処理液と比較してムコ多糖類、タンパク質ともに含有量が少なく、限外ろ過膜による精製後もタンパク質量の減少は見られなかったため、ここに含まれるタンパク質は糖タンパク質である可能性がある。チョウザメの頭部にはプロテオグリカンが含まれていることが分かっており、背骨から熱水抽出された糖タンパク質もプロテオグリカンが含まれていることが予想される⁵⁻⁶⁾。これら精製溶液を凍結乾燥し、推定分子量測定に用いた。

3.3 ムコ多糖類の推定分子量の分析

3.2項で得られた凍結乾燥試料を用いて試料に含まれるムコ多糖類の推定分子量分析を行った。図6に酵素処理液



図4 ムコ多糖類精製工程における分解液の外観（左：酵素分解液，中：遠心分離後，右：UF膜精製後）

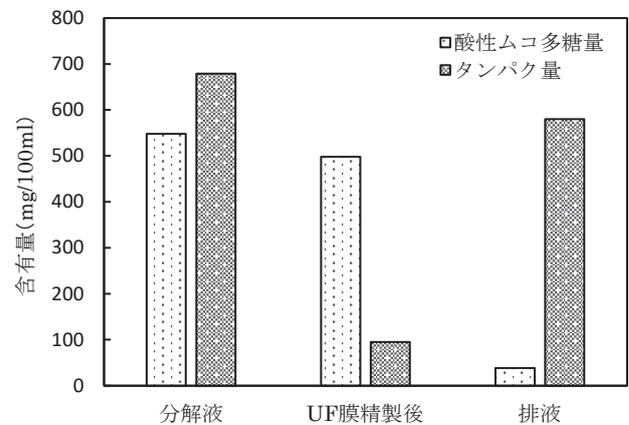


図5 各工程の酸性ムコ多糖量およびタンパク量

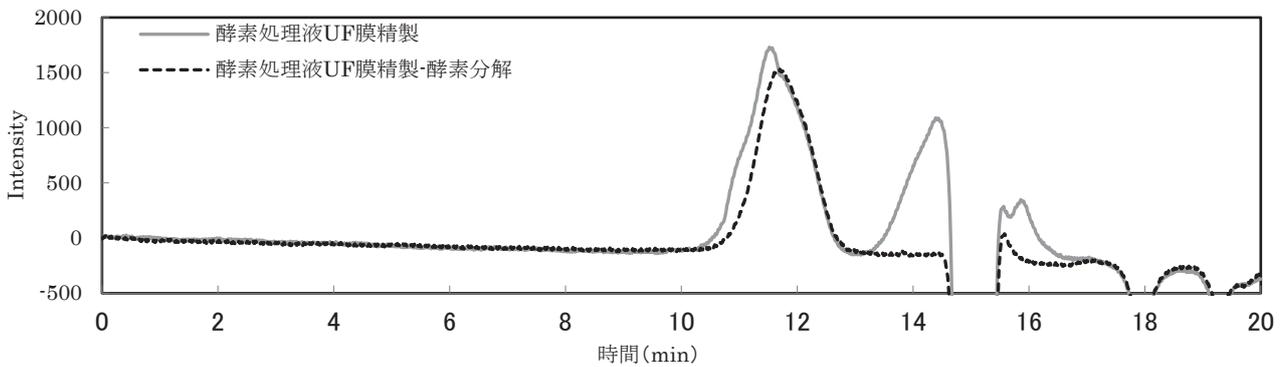


図6 酵素処理液のGPC-クロマトグラム

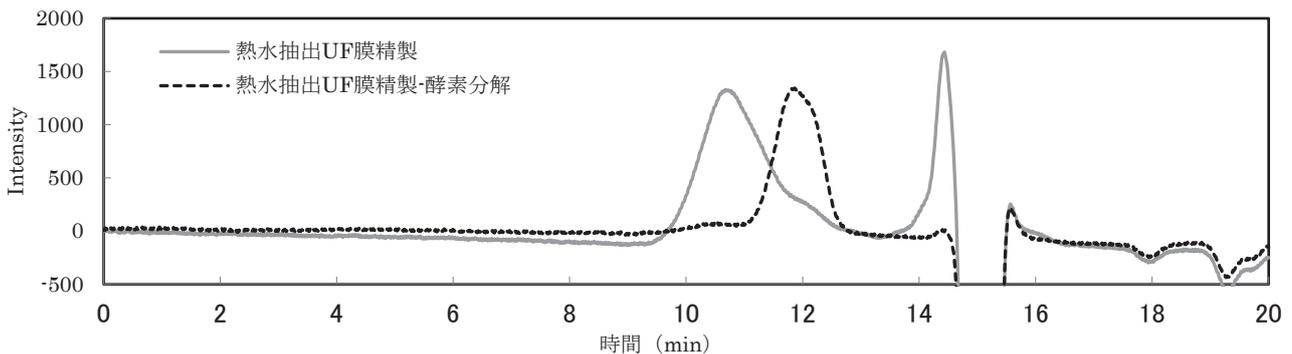


図7 熱水抽出液のGPC-クロマトグラム

精製溶液のプロテアーゼ処理前後のゲルろ過クロマトグラムを、図7に熱水抽出・限外ろ過膜精製液のプロテアーゼ処理前後のクロマトグラムを示した。熱水抽出液から精製したムコ多糖類のゲルろ過クロマトグラフィーをおこなったところ、プロテアーゼ処理前の推定分子量は36万、プロテアーゼ処理後の推定分子量は5万であった。コンドロイチン硫酸の平均分子量は2万～5万とされていることから⁷⁾、チョウザメ廃棄部位より抽出された多糖類はムコ多糖の一種であるコンドロイチン硫酸であると予想される。

3.4 まとめ

酵素分解法を用いることで、チョウザメ廃棄部位を破碎せずに分解率94%程度まで分解することができた。また分解液より簡易な手法でムコ多糖類の抽出が可能であることを示した。部位別では、背骨分解液からのムコ多糖類の抽出及び限外ろ過膜法による精製は容易であったが、頭部分解液は骨以外の組織も多く不純物を取り除けないため、精製工程を増やす必要があると考えられた。

酵素分解液から抽出したムコ多糖類の推定分子量は5万であり、コンドロイチン硫酸であると予想された。また熱

水抽出されたムコ多糖類は糖タンパク質と推察された。今後、ムコ多糖類およびプロテオグリカンの有用な原料として、チョウザメ廃棄部位の利用が期待される。

謝 辞

本研究を行うのにあたり、チョウザメを提供して頂いた株式会社セレビアに深謝いたします。

文 献

- 1) 浅野 安信, 中倉 敬. JSCE. 2016, vol. 42, no. 159, p.87-89.
- 2) Shionoya, K.; Suzuki, T.; Takada, M.; Sato, K.; Onishi, S.; Dohmae, N.; Nishino, K.; Wada, T.; Robert JL.; Toida, T.; Higashi, K. Comprehensive analysis of chondroitin sulfate and aggrecan in the head cartilage of bony fishes: Identification of proteoglycans in the head cartilage of sturgeon. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, vol. 208, p.333-342.
- 3) Francesca, M.; Fabrizio, F.; Nicola, V. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. *Carbohydrate Research*. 2010, vol. 345, p.1575-1580.
- 4) 福井作蔵. 還元糖の定量法Ⅲ. *化学と生物*. vol. 3, no.10, p.45-51.
- 5) 後藤昌史, 末川裕, 花田友香子, 山本和司, 柿崎育子. *応用糖質科学*. 2017, 7巻, 第1号, p.23-28.
- 6) 三浦 絢子, 伊藤 聖子, 加藤 陽治. *日本食品科学工学会誌*. 2013, vol. 60, no. 5, p.237-241.
- 7) 阿武 喜美子. *高分子*. 1968, 17巻, 4号, p.285-295.