

# 苦汁を塩析剤とした水産加工廃水からのコラーゲン回収の可能性検討

Applicability of recovery of collagen in wastewater  
from fish-processing facility by bitterm as salting-out agent

林 真<sup>\*1</sup>・柴田 公彦<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> 福島工業高等専門学校 モノづくり教育研究支援センター

<sup>\*2</sup> 福島工業高等専門学校 物質工学科

Makoto Hayashi<sup>\*1</sup>, Kimihiko Shibata<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> Manufacturing Support Center for Education and Research, Fukushima National College of Technology

<sup>\*2</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Fukushima National College of Technology

(2010年9月16日受理)

Iwaki is an eminent production area in Japan of the boiled fish paste, and has a lot of fishery processors. In this research, the possibility of the collagen recovery from the boiling soup abandoned when the fish processed food was manufactured was examined. First of all, it was confirmed that collagen was contained in the fish from Iwaki according to already reported, and made the boiling soup. Collagen was able to be recovered by adding sodium chloride to the boiling soup. Moreover, the possibility of the application as the salting-out agent of the bitterm that was the by-product when the salt was manufactured was examined in this research.

**Key words:** fish-collagen, salting-out agent, bitterm

## 1. はじめに

コラーゲンは動物組織の皮膚や骨などに存在する線維状のタンパク質で、体を構成するタンパク質の中で最も含有率が高い。コラーゲンはゼラチンとして消費されるほか、健康食品や化粧品など食品、美容、医療、工業、農業の幅広い分野で用途が拡大している。特に健康食品分野での成長は著しく、今後もコラーゲン市場の大きな拡大が予想される<sup>1)</sup>。

コラーゲンの主原料は牛であったが、感染症の流行で牛の安全性に対する不安が強まったことを背景に、原料の切り替えが急速に進んだ。現在では豚由来が主流となっているが、イメージの良さから魚類や無脊椎動物等の水産物をコラーゲン資源として利用することについても模索されている。

一次産品の高付加価値化による水産業の振興、水産加工廃棄物等の未利用資源の利活用を目指し、北海道ではホタテ貝の外套膜<sup>2)</sup>、マス寿司で有名な富山県ではマスの皮<sup>3)</sup>など各地域に特徴的な原料からコラーゲンを回収する試みがなされている。

福島県いわき市の沖合は、親潮(千島海流:寒流)と黒潮(日本海流:暖流)が交わる「潮目の海」とも呼ばれ、様々な魚が捕れる好漁場として知られており、4つの港湾と5つの漁港のほか、6つの水産物

産地市場を有している。またいわき市は、全国有数のかまぼこの生産地であり、特に包装かまぼこの生産量は全国一位(平成18年の生産量7,817トン)となっている<sup>4)</sup>。いわき市にはそのように水産加工業者も多い。しかし、全国各地で見られるような地域特性を生かしたコラーゲン抽出・回収等に関する取り組みは、本地域において見あたらない。

そこで我々は、本地域における新たなコラーゲン原料の開発および水産加工廃棄物・廃水をコラーゲン原料として利活用するための基礎を築くことを目指している。本研究ではその第一歩として、これまでにコラーゲン含有の報告がほとんど見あらず、いわき地域において比較的多く漁獲されている魚種についてコラーゲンの含有を確認した。また、魚肉加工食品を製造する過程で煮汁が廃棄されるが、その煮汁からコラーゲンを回収する際に、本地域の製塩業者から副産物として産生される未利用資源「苦汁」が塩析剤として適用できるかどうかについて検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料・試薬

魚はいわき市に水揚げされたものを市内のスー

パー等から購入した。皮の部分を除去した筋肉を、使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保存した。

試薬は、特に記載がない限り試薬特級を用いた。苦汁は株式会社日本海水いわき工場製を使用した。

## 2.2 コラーゲンの抽出

魚肉中のタンパク質の分画は、Satoらの方法により行った<sup>5)</sup>。具体的な抽出方法を以下に示す。

魚肉 20 g に 5 倍量の蒸留水を加え、ミキサーを用いてホモジナイズした後、遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、 $12000 \times g$ 、20 分間、以下すべて同条件) し、上清を回収した (これを水溶性画分とした)。一方、沈殿には 20 倍量の  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH 水溶液を加え、1 日間抽出した後、遠心分離し、上清を回収した。このアルカリによる抽出を合計 4 回行い、得られた上清をすべて合わせてこれをアルカリ可溶性画分とした。アルカリによる抽出後の沈殿物は蒸留水で洗浄した後、沈殿の 10 倍量の  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  水溶液を加え 3 日間抽出を行い、遠心分離し、上清を回収した。酸による抽出は合計 2 回行い、得られた上清をすべて合わせてこれを酸可溶性画分とした。酸による抽出後の沈殿は蒸留水で洗浄した後、沈殿の 5 倍量の蒸留水を加えオートクレーブを使用した抽出 ( $120^{\circ}\text{C}$ 、60 分間) 後、遠心分離し、上清を回収 (熱水可溶性画分) した。沈殿したものは抽出残渣とした。図 1 に以上の操作のフローチャートを示す。

## 2.3 タンパク質の定量

タンパク質の定量は Komsa-Penkova らの改変 Lowry 法<sup>6)</sup>に準じて行い、標準品として和光純薬工業株式会社製の I 型コラーゲン (サケ皮由来、

生化学用) を用いた。

具体的には次の方法で行った。まず試薬 A ( $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH、10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、0.4% 酒石酸カリウムナトリウム) および試薬 B ( $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH、3%  $\text{CuSO}_4$ 、2% 酒石酸カリウムナトリウム) を調製した。200  $\mu\text{l}$  の試料溶液に、試薬 A を 180  $\mu\text{l}$ 、試薬 B を 20  $\mu\text{l}$  加えた。これを  $50^{\circ}\text{C}$  で 20 分間放置し室温に戻った後、蒸留水で 16 倍に希釈したフェノール試薬 600  $\mu\text{l}$  を加えよく攪拌した。さらに  $50^{\circ}\text{C}$  で 10 分間放置し室温に戻ったら、リファレンスに対する 650nm の吸光度を測定した。分光光度計は、株式会社島津製作所の UV mini 1240 を用いた。コラーゲン標準品を  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  水溶液に溶解させて、0.0 - 0.6 mg/ml の濃度に希釈したものについても同様の操作を行い検量線を作成し、試料溶液のタンパク質濃度を算出した。

## 2.4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法<sup>7)</sup>で行った。電気泳動は、アトー株式会社製のパジェル用泳動装置と泳動電源 (Power Station 1000XP) を用いた。標準品には和光純薬工業株式会社製の I 型コラーゲン (サケ皮由来、生化学用) を用い、タンパク質分子量マーカーは、BIO-RAD 社製の Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards を用いた。ゲルはアトー株式会社製の e-PAGEL (ゲル濃度 10 - 20%) を用い、1 枚あたり 20mA の電流を流し 90 分間の泳動を行った。染色は BIO-RAD 社製の Coomassie G250 または第一化学薬品株式会社製の電気泳動用 2D-銀染色試薬・II「第一」を用いて行った。

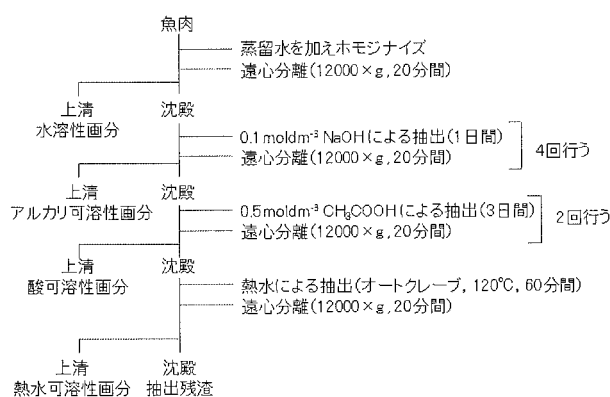


図 1 分画によるコラーゲンの抽出

## 2.5 模擬煮汁の調製

−20℃以下で保存していたマグロ切身に2倍量の蒸留水を加え85℃で4時間加熱後、デカンテーションを行い大きな固形物を除去した。調製した煮汁は使用するまで4℃以下で保存した。

## 2.6 煮汁からの塩析を用いたコラーゲンの回収

煮汁からの酸と塩析を用いたコラーゲン回収は、辻らの方法<sup>8)</sup>に準じて以下のように行った。煮汁に終濃度0.5 mol/dm<sup>3</sup>となるように酢酸を添加し、珪藻土ろ過を行い固形物を除去した。次に終濃度3 mol/dm<sup>3</sup>となるようにNaClを添加して、2時間以上静置し、遠心分離した後に沈殿を回収した。沈殿に終濃度0.5 mol/dm<sup>3</sup>となるように再び酢酸を添加し、先と同量のNaClを添加し、遠心分離した。沈殿を回収して少量の蒸留水に溶解し、100倍量の蒸留水に対して1時間の透析を2回行い、これを塩析回収物とした。操作のフローチャートを図2に示す。

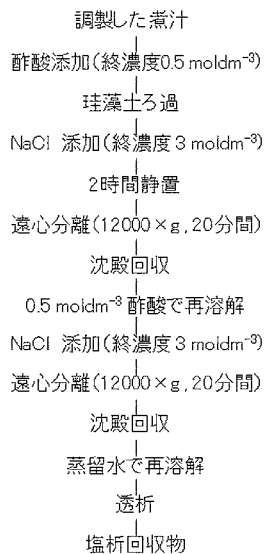


図2 酸と塩析を用いた煮汁からのコラーゲンの回収

## 2.7 コラーゲンの定量法

コラーゲンの定量は、コラーゲンと色素の特異的結合を利用して可溶性コラーゲンの定量を行うBiocolor社製のSircol Collagen Assay Kitを用

いて行った。標準品として付属のウシ酸性I型コラーゲンを使用した。分光光度計は、株式会社島津製作所のUV mini 1240を用いた。

## 2.8 苦汁を塩析剤とした煮汁からのコラーゲンの回収

NaClの代わりに苦汁を添加すること以外は2.6と同様の操作を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 いわき市主要魚種におけるコラーゲンの存在

いわき市への水揚げ量が多く、且つこれまでにコラーゲン含有についての報告がほとんど見あたらない魚種として、メヒカリ(和名:マルアオメエソ、学名:*Chlorophthalmus borealis*)、カレイ(和名:ヤナギムシガレイ、学名:*Tanakius kitaharai*)、アンコウ(和名:キアンコウ、学名:*Lophius litulon*)、サンマ(学名:*Cololabis saira*)、アナゴ(和名:マアナゴ、学名:*Conger myriaster*)を含むその他幾つかの魚種を選択し、Satoらの方法<sup>9)</sup>に従い筋肉からコラーゲンの抽出操作を行った。各魚種のコラーゲン抽出の操作によって得られた水溶性画分、アルカリ可溶性画分、酸可溶性画分、熱水可溶性画分(図1)についてSDS-PAGEによるコラーゲン存在と純度の確認を行った。例としていわき市で水揚げされたマサバ(*Scomber japonicus*)から得られた各画分のSDS-PAGEパターンを図3に示す。魚を含む動物の皮膚を構成する最も一般的なI型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 鎖(I型)が2本組になった $\beta$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖(I型)1本が集まって形成されているが<sup>9), 10)</sup>、本研究でも特に酸可溶性画分には $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\beta$ 鎖からなる典型的な泳動パターンがはっきりと観察された。熱水可溶性画分にも薄いバンド濃度ではあるが同様のパターンが観察され、この点についてもSatoらがコイ(*Cyprinus carpio*)について報告しているSDS-PAGEパターン<sup>5)</sup>と類似していた。同様の結果がアンコウ、アナゴ、サンマ、カレイ、メヒカリについても得られた(図4)。

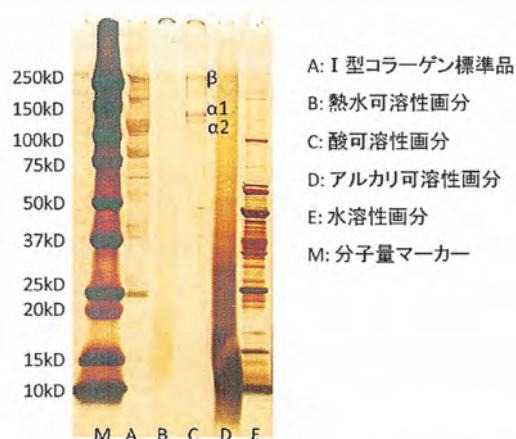


図3 マサバ由来の各画分の SDS-PAGE

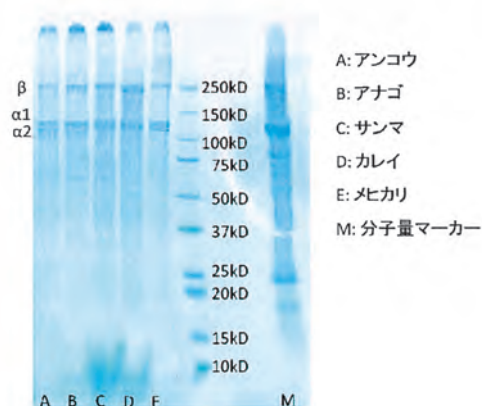


図4 各魚種の酸可溶性画分の SDS-PAGE

以上の様にいわき市の代表的な魚種について、酸可溶性画分および熱水可溶性画分にコラーゲンの存在が確認できたため、Sircol Collagen Assay Kit を用いて各画分のコラーゲン定量を行い、総コラーゲン含量を算出した。その結果、いわき市へ水揚げされたメヒカリの総コラーゲン含量が 390 mg /100 g 湿重量、ヤナギガレイが 1200 mg/100g 湿重量、アンコウが 190 mg/100g 湿重量、サンマが 240 mg/100 g 湿重量、アナゴが 1400 mg/100 g 湿重量であった。ヤナギガレイについては、Sato らによって報告されている類似のマコガレイ (1080 mg /100g 湿重量)<sup>11)</sup>とよく似た値を示した。

以上の結果から、本市へ水揚げされている魚種についてもコラーゲン原料になりうること、またそのような魚種の水産加工後の廃棄物や廃水もまたコラーゲン原料として利活用できる可能性があることが示唆された。

### 3.2 水産加工廃棄物の煮汁からのコラーゲン回収

#### 3.2.1 模擬煮汁の調製と NaCl を用いたコラーゲンの回収

水産加工廃水としての煮汁からのコラーゲン回収について検討するにあたり、本研究では地元の水産食品製造業者から提供されたマグロ解体後の廃棄部位あるいは可食部位から模擬煮汁を調製した。その模擬煮汁を用いて検討を行うことの適正性を確認するために、辻らが報告しているスケトウダラ残滓煮汁から酸と塩析を用いてコラーゲンを回収した方法<sup>8)</sup>に従って、模擬煮汁からのコラーゲンの回収を試みた。

模擬煮汁についてコラーゲン回収操作を行ったところ、回収率約 40 %、純度約 90 %でコラーゲンが得られた。辻らがスケトウダラ残滓煮汁に関して報告しているコラーゲンの回収率約 30 %、純度約 80 %<sup>8),12)</sup>と同程度の値であったことから、以後のコラーゲン回収に関する検討ではこの模擬煮汁(以降、煮汁と略す)を使用することとした。

#### 3.2.2 コラーゲン回収に与える NaCl 濃度の影響

NaCl の代替品として苦汁の有効性を検討するにあたり、NaCl 濃度がコラーゲン回収に及ぼす影響を調査した。コラーゲンを回収する際の NaCl 濃度を 0.0 mol $\text{dm}^{-3}$  から 4.0 mol $\text{dm}^{-3}$  まで変化させたときの結果を図 5 および図 6 に示す。SDS-PAGE および Sircol Collagen Assay Kit による定量のいずれにおいても、NaCl の終濃度 1.5 mol $\text{dm}^{-3}$  以下の塩析により得られた塩析回収物ではコラーゲンの存在が確認できず、コラーゲンの回収には 2.0 mol $\text{dm}^{-3}$  以上の NaCl 濃度が必要であることが明らかとなった。一方、NaCl の終濃度 2.0 mol $\text{dm}^{-3}$  以上の塩析により得られた塩析回収物にはコラーゲンの存在が確認された。NaCl 濃度 3.0 mol $\text{dm}^{-3}$  までは NaCl 濃度が高くなるにつれてその回収率が上昇する傾向が認められたが、それ以上の濃度では回収率に大きな変化はなかった。NaCl 終濃度 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mol $\text{dm}^{-3}$  の塩析回収物中のコラーゲンの純度は、それぞれ 45 %、63 %、72 %、56 %、55 %であり、NaCl 終濃度 3.0 mol $\text{dm}^{-3}$  で最も純度の高いコラーゲンが得られることがわかった。

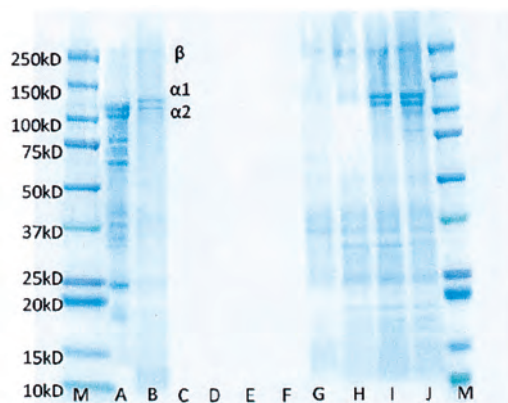


図5 様々なNaCl濃度で得られた煮汁からの塩析回収物のSDS-PAGE

- M: 分子量マーカー  
 A: I型コラーゲン（標準品）  
 B: コラーゲン回収前のマグロ煮汁原液  
 C: 0.0 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 D: 0.5 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 E: 1.0 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 F: 1.5 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 G: 2.0 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 H: 2.5 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 I: 3.0 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物  
 J: 3.5 mol $\text{dm}^{-3}$  NaClによる塩析回収物

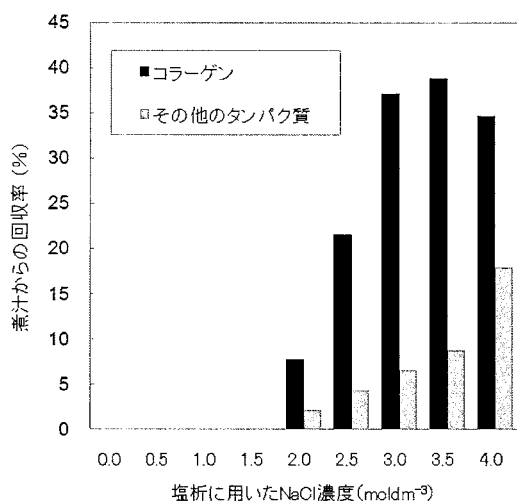


図6 NaCl濃度が煮汁からのコラーゲン回収率に与える影響

### 3.2.3 塩析剤として苦汁を用いたコラーゲン回収

地元の製塩業者から提供された苦汁の主要成分であるMgCl<sub>2</sub>、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、CaSO<sub>4</sub>の濃度を合

計した塩濃度は約30%であった。先の検討で最も純度の高いコラーゲンが得られたNaCl濃度は3.0 mol $\text{dm}^{-3}$ であったが、この濃度を重量パーセント濃度に換算すると約15%となる。そのため苦汁を煮汁に添加した際に、苦汁中の主要な塩の終濃度の合計が15%またはそれよりも濃い20%となるように苦汁を添加して塩析を行った。その時のコラーゲンの回収率を図7に示す。このように、辻らにより報告されている酸とNaClによる塩析を用いたコラーゲンの回収法<sup>8),12)</sup>において、NaClのかわりに本市の未利用資源の一つである苦汁を用いても、コラーゲンが回収できることが分かった。終濃度15%(3.0 mol $\text{dm}^{-3}$ )となるようにNaClを添加した塩析のコラーゲン回収率が37%であったのに対し、主要な塩の終濃度の合計が15%あるいは20%となるように苦汁を添加した場合の回収率はそれぞれ5%、12%であった。苦汁を用いた場合に回収率が低下した原因として、塩組成の違いのほか、NaClが粉末であるのに対し苦汁が液体であることが原因の一つと考えられる。硫酸分画のような塩を用いるタンパク質の塩析において、タンパク質の濃度がその沈殿量に影響することは一般的に知られており、今回の場合は苦汁の添加により煮汁中のコラーゲンが希釈されたため沈殿量が低下し、結果として回収量が低下したと考えられる。

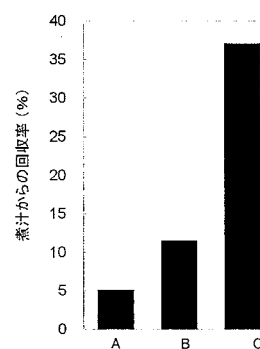


図7 塩析剤として苦汁を用いた際の煮汁からのコラーゲン回収率

- A: 煮汁中の主要な塩の終濃度の合計が約15%となるように、煮汁に苦汁を添加  
 B: 苦汁中の主要な塩の終濃度の合計が約20%となるように、煮汁に苦汁を添加  
 C: NaClの終濃度が15%(3.0 mol $\text{dm}^{-3}$ )となるように、煮汁にNaClを添加

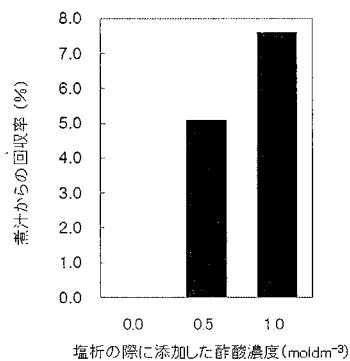


図8 塩析剤として苦汁(主要な塩の終濃度の合計15%)を用いた際に酢酸濃度がコラーゲン回収率に与える影響

この回収率の低下を改善するための1つの試みとして、添加する酢酸の濃度が苦汁を用いた塩析に与える影響も調査した(図8)。酢酸は苦汁によるコラーゲン回収に必須であり、終濃度が1 moldm<sup>-3</sup>になるように酢酸を添加することで、わずかではあるがコラーゲンの回収率を向上させることができた。现阶段で十分な回収率とは言い難いが、さらなる検討による回収率の向上は見込まれる。

#### 4. まとめ

いわき市へ水揚げされ、特産品とされている魚種にコラーゲンの含有が確認され、これらがコラーゲン原料になりうること、またそのような魚種の水産加工後の廃棄物もまたコラーゲン原料として利活用できる可能性があることが示唆された。

その水産加工廃水である煮汁からコラーゲンを回収する際の塩析剤として、苦汁が使用できることがわかった。本市の製塩業者から副産物として産生される苦汁は未利用資源の1つであり、その新規用途の可能性を示した。

#### 謝辞

苦汁および成分データをご提供いただきました株式会社日本海水小名浜工場様、マグロ加工後の廃棄部位をご提供いただきました山菱水産株式会社様に厚く御礼申し上げます。また本研究を行う機会を与えていただき、貴重なご助言もいただきました福島工業高等専門学校名誉教授大隈信行先生に深謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 2008年度版 生物由来有効成分・素材市場徹底調査(2008) 株式会社富士経済
- 2) えび谷幸司、小玉裕幸、今村琢磨: 未利用水産原料からのコラーゲン回収技術に関する調査, 北海道立網走水産試験場事業報告書, 2003, 118-119 (2005).
- 3) 小善圭一: 低・未利用水産資源の有効利用技術の開発-マスの皮からコラーゲン-, とやま食研だより, 28, 2 (2009).
- 4) 平成21年度いわき市の農林水産業(2009) いわき市
- 5) Kenji Sato, Reiji Yoshinaka, Mamoru Sato, and Shizunori Ikeda: A simplified method for determining collagen in fish muscle, Bull. Japan. Soc. Sei. Fish., 52(5), 889-893 (1986)
- 6) Regina Komsa-Penkova, Rositza Spirova, and Blagovest Bechev: Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement., J. Biochem. Biophys. Methods 32, 33-43 (1996)
- 7) Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., Nature, 227, 680-675 (1970)
- 8) 辻浩司、宮崎亜希子、北川雅彦、飯田訓之: 未利用水産原料からのコラーゲン回収技術に関する調査研究, 北海道立釧路水産試験場事業報告書, 2004, 121 (2005).
- 9) 藤本大二郎: コラーゲン物語, 東京化学同人 (1999)
- 10) 常見崇史、太田高敏、北村英三: 魚由来コラーゲンの化学修飾及び架橋による改質, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 第2巻, 115-119 (2004).
- 11) Kenji Sato, Reiji Yoshinaka, Mamoru Sato, and Yutaka Shimizu: Collagen content in the Muscle of fishes in Association with their swimming movement and meat texture, Bull. Japan. Soc. Sei. Fish., 52(9), 1595-1600 (1986)
- 12) 辻浩司、飯田訓之、宮崎亜希子、大堀忠志: 未利用水産原料からのコラーゲン回収技術に関する調査研究, 北海道立釧路水産試験場事業報告書, 2003, 118-119 (2005).