魚肉水晒し廃液中水溶性タンパク質の膜濃縮法による回収^{*1,2}

二 宮 聖・大川禎一郎・土屋隆英・松本重一郎

(1984 年 11 月 28 日受理)

Recovery of Water Soluble Proteins in Waste Wash Water of Fish Processing Plants of Ultrafiltration

Kiyoshi NINOMIYA,^{*3,*4} Teichiro OKAWA,^{*3,*5} Takahide TSUCHIYA,^{*3}
and Juichiro J. MATSUMOTO^{*3}

The goal of this study is to obtain a basis for the research of recovering and reutilizing the water soluble proteins discarded into the waste wash waters of the frozen mince (surimi) plants.

Effect of an ultrafiltration system (IHI Co., Ltd.) to recover the water soluble proteins was studied. Proteins from 5 fish species, cod, Alaska pollack, sardine, mackerel, and horse mackerel were studied. The water soluble proteins were extracted with 5~10 volumes of water and the extracts were applied to the ultrafiltration system giving rise to concentrates. The protein concentration of the extracts, 0.1-2%, was raised to 0.4-18% with yields of nearly 90%. The low molecular matters, inorganic and organic, were largely filtered off by a membrane. The molecular weight composition of the water extracts and the concentrates were analyzed by Sephadex G-100 or G-200 gel filtration. The water extracts consisted of 5-7 groups with molecular weight ranging 4,000-150,000 and the proteins higher than 10,000 were recovered in the concentrates by ultrafiltration with sieve size 20,000. Some packing effect on the sieve was suggested. These profiles were generally found for the five species tested. The applicability of the ultrafiltration system appeared optimistic.

近年、新タンパク質食糧資源の開発および既存タンパク質資源の有効利用の研究^{1,2)}が盛んである。魚肉すり身の製造においては魚肉タンパク質の 20% に及ぶ多量のタンパク質が洗液の中に空しく流出しており、³⁾ 資源を浪費しているばかりでなく加工廃水の BOD, COD, SS を高め環境上の問題を作り出している。また最近ではすり身の原料魚としてイワシ、サバなどの多獲性赤身魚の利用が求められるようになってきたが、これらを原料として用いるときには、色素、脂質等の除去のためにより強い水晒しを行う必要がある。その結果水晒し液には従来よりさらに多くのタンパク質等の有価物が流出することとなる。そこでこの有価物に富む水晒し廃液からタンパク質を回収し有効に利用することを目的として、種々の方法が研究⁴⁻⁷⁾されている。著者らは、熱処理や

化学処理を加えずにタンパク質を分離、回収、濃縮することが出来、さらにタンパク質の食品素材としての機能性を損わず、かつ作業コストが安いなどの特長をもつ膜濃縮法⁸⁾の利用について検討を行なった。

実験方法

材料魚肉 マダラ *Gadus callarias*, スケトウタラ *Thoragra chalcogramma*, マイワシ *Sardinops melanosticta*, マサバ *Scomber japonicus* およびマアジ *Trachurus japonicus* はなるべく新鮮なものを東京都中央魚市場で入手した。

水溶性タンパク質抽出液 (モデル水晒し廃液) 魚を三枚におろし皮と骨を除いた魚肉をひき肉とし 5 倍量 (v/w) の冷水 (0°C) を加えて 8 分間静かに攪拌した後

*1 水溶性タンパク質の有効利用に関する研究—I (Studies on More Efficient Utilization of Water Soluble Proteins—I).

*2 昭和 54 年度農林水産省水産加工物利用技術研究開発委託費 (多獲性赤身魚の高度利用技術開発研究) による。

*3 上智大学理工学部化学科 (Sophia University, Department of Chemistry, 7-1, Kioicho, Chiyoda, Tokyo 102, Japan).

*4 石川島播磨重工業株式会社, 技術研究所 (Research Institute, Ishikawajima-harima Heavy Industries Co., Ltd. Yokohama 235, Japan).

*5 森永乳業株式会社, 中央研究所 (Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Meguro, Tokyo 153, Japan).

ナイロン布で濾過し、濾液を抽出液 S_1 とした。残渣に上記と同量の冷水を加え、同様の操作で抽出濾過を2回繰り返して濾過液を合わせて抽出液 S_2 とした。分離にナイロン布濾過を用いたのは、分離効率の低い実際の生産工程の条件に近づけるためである。 S_1 および S_2 の調製後、KCl を加えてそれぞれを 0.6 M 溶液とし懸濁しているタンパク質の溶解を図った。

水晒し液 スケトウタラ、マイワシ、マサバ肉から実際に冷凍すり身を製造する工程で採取した水晒し廃液(原液)を使用した。

限外濾過装置 試料(各種魚肉の水抽出液および水晒し廃液)を IHI-UWC 限外濾過装置(以後 UF と略す。)によって処理し、濃縮液および透過液を得た。スケトウタラは石巻市、マイワシ・マサバは八戸市において、それぞれ 1979 年 5 月より 9 月までの間に採取されたものである。原液、濃縮液および透過液は入手後 -3°C に冷蔵し、各処理に先立って 0.6 M KCl 溶液とした。

沈降分析 試料を 0.6 M KCl としたのち、分析用超遠心機(Phywe UL-50 型)により、50,000 rpm, 20°C で分析した。

ゲル濾過分析 試料を 0.6 M KCl 溶液としたのち、東洋-No. 2 濾紙で濾過し、得られた濾液についてゲル濾過分析を行なった。 S_1 の分析には Sephadex G-100 のカラム($\phi 2.5\text{ cm} \times 116\text{ cm}$)を、 S_2 および UF 処理液の分析には Sephadex G-200 のカラム($\phi 2.5\text{ cm} \times 90\text{ cm}$)を用い、0.6 M KCl (pH 7.0)を展開溶媒とし、上昇法で展開($15\text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)した。溶出タンパク質を分光光度計(HITACHI Model 200-20)を用いて 280 nm の吸光度測定により走査分析した。また得られた溶出曲線の各分画についてその面積比よりタンパク質組成比を求めた。要所には Lowry 法¹³⁾によるタンパク

質定量を併用した。

ディスク電気泳動分析 Tris-Glycine 緩衝液(pH 8.3)を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲル($\phi 5\text{ mm} \times 100\text{ mm}$)を支持体とする常法^{9,10)}により行なった。通電量は管当り 1 mA とした。

SDS ディスク電気泳動分析 LAEMMLI 法¹¹⁾に基き、SDS 処理後 Tris-Glycine 緩衝液(pH 8.3)を含む 10% ポリアクリルアミドゲル($\phi 5\text{ mm} \times 100\text{ mm}$)にて管当り 3 mA の通電量で行なった。

吸収スペクトル測定 分光光度計を用いて紫外線吸収スペクトルを測定した。

タンパク質の定量 ビウレット法¹²⁾ LOWRY 法¹³⁾および KJELDAHL 法¹⁴⁾を用いて定量した。

核酸の定量 SCHNEIDER 法¹⁵⁾に基き、RNA はオルシノール試薬を、DNA はジフェニルアミン試薬を用いて定量し、おのおのを AMP 量および dAMP 量に換算して表示した。

結 果

水溶性タンパク質抽出液 (モデル水晒し廃液) UF 処理を行なうにあたり予め水晒し廃液の性状を把握する必要がある。代表的な魚としてマダラ、スケトウタラ、マイワシ、マサバ、マアジを選び、おのおの肉から、水溶性タンパク質を抽出してモデル水晒し液とし、その中のタンパク質量、分子量分布を調べた。

1. 抽出液濃度および溶出タンパク質量: スケトウタラ、マイワシ、マサバについて実験した結果は Table 1 のごとくになった。各魚種ともに 1 回目の抽出液(S_1)でその水溶性タンパク質の約 60% が溶出し、2 回の抽出液(S_2)で肉 100 g あたり合計約 3 g のタンパク質が溶出した。とくにマイワシ、マサバは全溶出タンパク質の 70% が S_1 に溶出した。また溶出窒素中非タンパク態窒

Table 1. Contents of nitrogen and protein in water extracts

Sample		Cod	Alaska pollack	Sardine	Chub mackerel	Horse mackerel
S_1	Total nitrogen (mg/cm ³)	1.5	1.1	1.5	1.4	0.84
	Protein nitrogen (mg/cm ³)	—	0.56	0.86	0.59	0.44
	PN/TN (%)	—	50	55	43	52
	Protein concn. (mg/cm ³)	—	3.5	5.1	3.7	2.7
	Protein contents (mg/g meat)	—	18	20	19	14
S_2	Total nitrogen (mg/cm ³)	0.32	0.25	0.28	0.26	0.36
	Protein nitrogen (mg/cm ³)	—	0.23	0.18	0.12	0.18
	PN/TN (%)	—	95	63	44	50
	Protein concn. (mg/cm ³)	—	1.5	1.1	0.7	1.1
	Protein contents (mg/g meat)	—	15	11	7	11
Total protein contents (mg/g meat)		—	33	31	26	25

S_1 : Primary extracts, S_2 : Secondary extracts
PN; Protein nitrogen, TN; Total nitrogen.

Table 2. Sedimentation analysis of water extracts

Sample	Cod	Alaska pollack	Sardine	Chub mackerel	Horse mackerel
S ₁	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	<u>8.8</u>		<u>8.7</u>	<u>6.3</u>	<u>6.4</u>
S ₂	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	7.9	<u>22.1</u>	<u>9.1</u>		
	29.9				
	50.9				

The under lined figures illustrate the major component.

S₁; Primary extracts, S₂; Secondary extracts.

素の割合は S₁ では全体の 50% を占め、相当量のアミノ酸、核酸関連化合物が溶出したものと考えられた。

2. 沈降分析: 各々の抽出液の沈降分析の結果は Table 2 のごとくであって、沈降定数をまとめると、S₁ では沈降定数 6.3 s~8.8 s を中心とする広がりのある成分がかなり顕著に認められたが、どの魚種においても、メニスカス付近の像の形より考えると、S₁ や S₂ は主成分のほか沈降速度が 5 s より小さな成分が相当多く含まれていることが示唆された。スケウタラ、マダラでは S₁ に比べ S₂ に沈降定数の相当大きい成分が認められた。しかしマサバ、マイワシ、およびマアジでは、それらは認められなかった。

3. ゲル濾過分析および電気泳動分析: 各々の抽出液についてのゲル濾過分析結果を Fig. 1 に示した。分子量分布はマダラとスケウタラ、マイワシとマサバ、マアジがそれぞれ類似した溶出パターンを示した。しかしながら両群とも、S₁ で K_{av1} 0.72 以下、S₂ で K_{av2} 0.6 以下 (おのおの分子量 15,000 以上) の成分が全溶出タンパク質の 85% 程度を占めていることが明らかとなった。また分子量 8,000 (K_{av1} =0.9, K_{av2} =0.72) 以下に溶出される成分は、280 nm の吸収が大きいかかわらずタンパク質含量が少ないため、核酸が含まれていると推定された。この分画について核酸の定量を行なったところ、タンパク質と核酸が 3:1 の割合で存在していることが判った。さらにこの分画には、魚臭の臭気成分が集まっていることが観察された。

各溶出成分について電気泳動分析と SDS-電気泳動分析を行なったところ Fig. 2 のようになった。SDS 処理を行なった試料のほうに多くのバンドが現われていることからこれらの分画は単一の単量体よりなっているのではなく数種の成分を含みかつそのなかには不均一のものがあると推定された。さらに SDS-電気泳動分析による分子量分布には魚種間で相違が認められた。分子量 17,000 (K_{av1} =0.7, K_{av2} =0.6) 付近の分画ではほとんどの抽出液で両電気泳動分析において濃い一本のバンド

Fig. 1. Elution patterns of gel filtration of water extract from various fish muscles.

S₁: Primary extracts analyzed on Sephadex G-100 (φ 2.5×116 cm).

S₂: Secondary extracts analyzed on Sephadex G-200 (φ 2.5×90 cm).

が認められた。分子量より考えてこの成分はミオグロビンに相当すると思われた。高分子量の分画には、筋原繊維タンパク質由来のミオシン、アクチン等と推定されるタンパク質がかなり溶出していることが見いだされ既報の知見³⁾とも一致した。

Fig. 2. Disc polyacrylamide gel electrophoresis of water extracts.

*1. 7.5% polyacrylamide gel, Tris-Glycine buffer (pH 8.3).

*2. 10% polyacrylamide gel, SDS-Tris-Glycine buffer (pH 8.3).

S₁; Primary extracts, S₂; Secondary extracts.

Table 3. General properties of samples before and after ultrafiltration

Sample	Alaska pollack	Sardine	Chub mackerel
Appearance			
Water extract (A)	White Opaque	Dark red	Dark red
Concentrate (B)	Milky emulsion	Viscous	Viscous
Permeate (C)	Slightly turbid	Slightly turbid	Slightly turbid
Protein concn. (mg/cm³)			
Water extract (A)	1.32	8.69	21.1
Concentrate (B)	4.75	31.9	186
Permeate (C)	0.31	0.29	0.51
None protein nitrogen* (mg/cm³)			
Water extract (A)	0.57	1.42	0.89
Concentrate (B)	0.53	0.88	0.15
Permeate (C)	1.95	16.2	19.6

* (TN-PN)/TN; TN, Total nitrogen; PN, Protein nitrogen.

以上の結果から、水晒し廃液中のタンパク質をUF処理により回収するには分子量 15,000 程度のところで分離すればタンパク質の大部分を回収できるものと考えられた。しかしながらミオグロビン分画を除去し脱色の効果を期待するため、分画分子量 20,000 の膜を使用することとした。

限外濾過 (UF) 処理液 モデル水晒し廃液で得られた結果をもとに選定したUF膜を使用して実際の水晒し廃液 (スケトウタラ、マイワシ、マサバ) から水溶性タンパク質の回収濃縮を行ない原液、濃縮液、透過液の分析を行なった。

1. UF 処理液の一般性状: UF 処理液のうち代表的なものの性状および分析結果を Table 3 に示した。Table 3 より明らかなようにUF法によって水晒し液中のタンパク質は5~10倍に濃縮され非タンパク態窒素の割合 [(TN-PN)/TN] は減少した。

2. ゲル濾過分析: スケトウタラ、マイワシ、マサバについての原液、濃縮液、透過液の溶出曲線を Fig. 3 に示した。スケトウタラ原液の結果を生鮮スケトウタラ肉水抽出液 S₁, S₂ のそれと比較すると、原液では中間の分子量 80,000 ($K_{av}=0.35$) の成分が少ないがこれは原液の搬入までに日時を要したため、分析までの間にタンパク質が何らかの変化を起こし互いに凝集したためであると考えられる。原液と濃縮液とを比べると、膜孔径 20,000 の膜によるUF処理によって分子量 8,000 ($K_{av}=0.72$) 付近の成分の回収が認められた。透過液でも void volume に溶出している高分子量成分が見出されるがこのような高分子量成分は SDS-電気泳動分析の結果では認められないので、本来は分子量 8,000 付近に溶出する成分が膜処理の後に透過液中で凝集したものであると判断された。マイワシの原液の結果は、生鮮マイワシ肉水抽出液 S₁ よりも void volume 成分が少ないが

Fig. 3. Elution patterns of samples before and after ultrafiltration by gel filtration on Sephadex G-200.

Gel; Sephadex G-200 (ϕ 2.5 $\times$ 90 cm).

Eluent; 0.6 M KCl, pH 7.0.

(A) Water extract before ultrafiltration,

(B) Concentrate and

(C) Permeate obtained by ultrafiltration

両者の成分には基本的に対応が見られた。原液と濃縮液とを比較すると、分子量 15,000 以上の成分は全て回収されていることがわかった。

またスケトウタラの場合と同様に、透過液の void volume 成分は分子量 8,000 付近の成分の凝集生成物であることがわかった。マサバの原液の結果は、生鮮マサバ水抽出液 S_1 とよく対応していた。原液と濃縮液および透過液とを比較すると、分子量 10,000 以下の成分の一部と分子量 4,000 以下の成分の大部分が UF 法によって除かれていることが示された。

考 察

水溶性タンパク質抽出液 供試魚肉の水抽出液 S_1 に溶出する水溶性高分子物質は、分子量的には 5~7 群より成り、その分子量は 4,000 から 150,000 以上にわたっていた。なかでも全溶出タンパク質の 80% 以上が分子量 13,000 以上であった。また分子量 1,000 以下の群は他の群よりも多量の核酸を含んでいた。溶出タンパク質は少なくとも 20 数種の球状タンパク質を含むことが知られていることを考え合わせると、筋形質タンパク質の分子量は互いに近似しているものが多いと思われた。水抽出液 S_2 においても S_1 とほぼ同様の結果が示されたが、 S_1 に比べ高分子量のものの溶出の割合が多くなっていた。また高分子量群には、筋原繊維タンパク質

中のアクチン、ミオシンおよびその複合体であるアクトミオンがかなり多く溶出しているようであった。この筋原繊維タンパク質の水抽出液中への溶出は肉自身のイオン強度等の影響が考えられ既知の報告と一致していた。このように水晒しの繰り返しにより食品のテクスチャー形成に有用なタンパク質が溶出することに対しては、注意を要すると考えられた。

UF の膜孔径に関して分子量分布を考えると、もし上記の核酸成分を棄ててタンパク質のみを回収するためには分子量 15,000 以上を回収すればよいと考えられたが、実用の際膜の目詰り等により分画分子量が低下することを考慮すると、分画分子量 30,000 あるいは 50,000 程度を捕捉することを目標として選べば良いことが示唆された。

抽出液に太陽光を照射すると濁度が増加することが観察されたが、これがどのような機構により生じているか等については明らかにするには至らなかった。この現象を把握すれば、抽出液の濁り防止につきタンパク質の回収率向上が期待されるため、今後この濁り形成の機構の解明が必要である。

UF 法の評価 UF 法は魚肉すり身製造における水晒し廃液中からタンパク質を濃縮・回収するのに有用である。実験結果より、UF 処理によって非タンパク態低分子窒素化合物はかなり良く除去されている。タンパク質

その他、高分子量成分については、UF 膜の公称分画分子量から予想されるよりも低い分子量のものまで膜に捕捉されることが明らかになった。これはいろいろな分子量のものからなる多成分系を処理したときに膜上面にタンパク質が付着し一種のダイナミック膜^{*}が形成されたものと推定された。このことより捕捉しようとするタンパク質の分子量よりも実際には疎な膜を使用したほうが適当であると考えられる。

UF 処理により得られた濃縮液においても、ゲル透過分析の void volume に現われたような高分子量成分が増加していることが示された。このことは、処理中および処理後に凝集物が生成したことが推定されるが、限外透過で膜に捕捉されたタンパク質が、液圧によって擬似的な凝集を生じること一因をなしていると思われる。このような凝集物も目詰りの原因になっているであろう。

ところで疎な膜を用いれば膜透過速度が上がり処理量が改善されるが、他方膜が疎になると透過液中の有機物濃度は増加する。これは廃水浄化の見地からは不利と考えられる。環境上の対処と食料資源の回収を両立させるためには UF 処理に逆浸透膜処理を組み合わせる二段階の処理が考えられる。すなわち第一段階では疎な膜である UF 膜によりタンパク質を回収し、第二段階でより密な膜である逆浸透膜で低分子量物質を捕捉するものである。この方法は処理量、最終廃水の水質の点からも利するところが多いと思われる。さらにこの方法を用いれば、赤身魚に多く含まれるミオグロビンを分離回収することも可能と考えられる。このように UF 処理はまだ解決すべきいくつかの問題を残しているが、水晒し廃液中のタンパク質を効果的に分離回収することが可能である。この回収されたタンパク質は、ほとんどが球状タンパク質であるため、そのままではペースト状の性質を示すだけであって、粘弾性や繊維性のような触感をもつ食品を生み出すことは困難と思われる。したがって得られたタンパク質に何らかの処理を加えてこのようなテクスチャー性を付与することが必要である。適当な性質を付与できる条件を探索するためには球状タンパク質の変性機構について本質的認識を深めることが必要であろう。

要 約

魚肉（マサバ、マイワシ、マアジ、マダラ、スケソウタラ）水抽出液中に溶出される水溶性タンパク質および UF 処理液中のタンパク質の分子量分布等を測定し、UF 法における膜の選定と濃縮効果について検討した。

1. 各供試魚の水抽出液中の溶出タンパク質量は肉

100 g あたり 3 g で、その分子量は 100,000 以上のものから数 1,000 のものまで広く分布していた。

2. 溶出タンパク質の 80% 以上は分子量 15,000 以上のタンパク質であり、高分子量群には筋原繊維のタンパク質も溶出していた。

3. UF 法により水晒し液中の約 90% のタンパク質を分離し 3~9 倍に濃縮して回収することが可能であった。低分子量有機物はかなりよく除去された。

4. 分離、濃縮は膜の分画分子量よりも小さい分子量で起きた。膜の選択にあたっては今後考慮を要すると思われる。

本研究は農林水産省総合開発研究「多獲性赤身魚の高度利用技術開発」の一環として行なわれたものである。

なお、沈降分析は、鈴木恵美さんに行なっていた。感謝を持って付記します。

文 献

- 1) 鈴木たね子・神名孝一・八木武郎：日水誌，44，781-788 (1978).
- 2) M. FUJIMAKI, M. YAMASHITA, S. ARAI, and H. KATO: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1325-1332 (1970).
- 3) 志水 寛・柄多 哲・西岡不二男：日水誌，42，1025-1031 (1976).
- 4) 西出英一：日本大学農獣医学部学術研究報告書，34，291-294 (1977).
- 5) 長谷川 浩・渡辺尚彦・高井陸雄：日水誌，45，1041-1043 (1979).
- 6) 西岡不二男・志水 寛：日水誌，49，795-800 (1983).
- 7) 松本重一郎：昭和 54 年度多獲性赤身魚の高度利用技術開発研究成果の概要（水産庁）1980，pp. 393-418.
- 8) 宮田康夫：日水誌，50，659-663 (1984).
- 9) L. ORNSTEIN: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349 (1964).
- 10) B. J. DAVIS: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 11) U. K. LAEMMLI: *Nature, Lond.*, **227**, 680-685 (1970).
- 12) 松本重一郎・金光庸俊：日水誌，21，284-288 (1955).
- 13) O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 14) L. HAMBRAEUS, F. FORSUM, L. ABRAHAMSSON, and B. LÖNNERDÄL: *Anal. Biochem.*, **72**, 78-85 (1976).
- 15) W. C. SCHNEIDER: *J. Biol. Chem.*, **161**, 293-303 (1945).

*1 含水酸化物やコロイドが形成する、分離能を持った動的な膜でコロイド膜とも呼ばれる。