

ノート

ウナギ及びニジマス可食部に含まれる
コラーゲンの性質と推定含有量

西塔 正孝^{*1} 関根 泉^{*1} 森本裕美加^{*1} 鈴木 麻未^{*1}
内田 直行^{*2} 鈴木 平光^{*3}

**Characterization and Estimated Amount of Collagen from the Edible Parts of
Japanese Eel (*Anguilla japonica*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

SAITO Masataka^{*1}, SEKINE Izumi^{*1}, MORIMOTO Yumika^{*1}, SUZUKI Mami^{*1},
UCHIDA Naoyuki^{*2}, SUZUKI Hiramitsu^{*3}

Synopsis

The skin collagens of Japanese eel, *Anguilla japonica*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, were studied with respect to each chemical composition and estimated amount in the tissue. The SDS-PAGE showed that both skin collagens were typical fish type I collagens, consisting of two distinct subunits, $\alpha 1$ and $\alpha 2$, which formed $(\alpha 1)_2\alpha 2$ heterotrimers. Judging from the hydroxyproline contents in highly purified collagens of eel and rainbow trout, the type I collagen percentages in their skins were estimated to be about 14.5% and 17.1% of the wet weight tissues.

緒言

コラーゲンは細胞外マトリックスの中で量的に最も多く、高等脊椎動物においては生体タンパク質の25%あまりを占める結合組織タンパク質である¹⁾。一方、下等脊椎動物である魚類において、全魚体の粗タンパク質に対するコラーゲンの量的割合は17~43%と高等脊椎動物と比べて幾分ばらつきは見られるが、コラーゲンはミオシンと共に魚体内でも、多量に存在するタンパク質として知られている^{2, 3)}。近年、コラーゲンの食品としての機能に関して、ブタ、トリ及び魚などのゼラチンやコラーゲン分解物を経口摂取した場合、血圧降下作用、骨粗鬆症予防作用、コラーゲン合成能の促進などの効果が若干ではあるが報告されはじめ、ペプチドや消化吸收過程の分解物に由来すると考えられる生理作用が徐々に明らかになりつつある^{4, 5)}。

また、魚類コラーゲンは筋肉の運動の強度や持続性に依りて合成や蓄積され、さらに刺身として食した際の硬さや調理後のテクスチャーに関与すると考えられてい

る⁶⁻⁸⁾。そのため、高鮮度・高品質を重視して生産流通されている食用魚を対象にコラーゲン量を測定することは、品質管理の指標としての応用が期待できる。しかしながら、魚類のコラーゲン量を測定するには、酸可溶性コラーゲンを抽出した後、不溶性画分も含めて定量しなければならず、煩雑な分画操作が必要である^{6, 7)}。従来、簡便な測定法として使用されてきたハイドロキシプロリン(Hyp)の割合から魚類のコラーゲン量を推定する方法は、魚種によってHypの割合が大きく異なることから実測値との誤差が大きいことが考えられる^{2, 8)}。より正確にコラーゲン量を推定するためには、魚種ごとにコラーゲンに含まれるHypの割合を測定しておく必要がある。

そこで本研究では魚類可食部に含まれるコラーゲンの食品特性を明らかにするとともにコラーゲン量を簡便に測定することを目的として、ウナギやニジマスの皮および筋肉からコラーゲンを精製し、それらのアミノ酸組成や組織中のコラーゲン量の測定などを行うことにした。

*1 食品生産科学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Food Science and Technology, Kagawa Nutrition University

*2 海洋生物機能化学研究室, 日本大学: College of Bioresource Science, Nihon University

*3 食品機能学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Food Function, Kagawa Nutrition University

表1 コラーゲン精製に用いた試料魚の詳細

試料魚	サンプル数	平均体長 (cm)	平均体重 (g)	養殖地	備 考
ウナギ <i>Anguilla japonica</i>	5	53.9	209	愛知県	精製第①回目に使用
	2	51.0	200	鹿児島県	精製第②回目と皮及び筋肉組織のアミノ酸組成分析に使用
	1	49.0	251	愛知県	精製第③回目と皮及び筋肉組織のアミノ酸組成分析に使用
ニジマス <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2	21.0	152	長野県	精製第①②回目に使用
	2	22.5	142	長野県	精製第③④回目と皮及び筋肉組織のアミノ酸組成分析に使用

実験方法

1. 試料魚

ウナギ *Anguilla japonica* 及びニジマス *Oncorhynchus mykiss* は川越総合卸売市場から購入した（表1）。試料は以下の操作を行うまで -40°C に貯蔵した。

2. 真皮Ⅰ型コラーゲンの調製

試料魚から皮を剥離し、付着している筋肉及び鱗等をナイフで除去して真皮のみを採取した。以下に述べるコラーゲンの調製はすべて約 4°C の低温下で行った。まず、真皮をハサミで細切後、重量に対して40倍量のイオン交換水を加えてブレンダーミキサー（Hamilton Beach社）を用いてホモジナイズした。次に遠心分離（21,880×g, 10min）した後、沈澱物に40倍量のクロロホルム-メタノール混液（2：1）を加えて短時間脱脂を行った。それらをガーゼろ過すると同時に水洗した後、得られた真皮の40倍量の0.1M水酸化ナトリウム溶液を加え、一夜攪拌した。可溶性成分を遠心分離して除去した後、100倍量の0.5M酢酸を加えて溶解した。こうして得た真皮由来のコラーゲンの酸抽出液を遠心分離の後、常法に準じて4M塩化ナトリウム溶液を加えて分別沈澱し、酸可溶性Ⅰ型コラーゲンを単離した⁹⁾。単離したコラーゲンは、0.1M酢酸に透析した後に凍結乾燥し、分析に使用するまで -40°C に保存した。

3. 電気泳動分析（SDS-10% PAGE）

精製したコラーゲン試料を1mM塩酸に1mg/mlの濃度に溶解した後、LDSサンプルバッファー（Invitrogen社）を加え、常法に準じて電気泳動を行った⁹⁾。泳動終了後、ゲルはクマシーブリリアントブルーで染色し、タンパク質のバンドを確認した。

4. オルトフタルアルデヒド（OPA）法によるアミノ酸組成分析

コラーゲン試料を6M塩酸に溶解し、脱気封管中で $110^{\circ}\text{C}-18$ 時間の加水分解を行った。分解後、エバポ

レーターで塩酸を除去した後、クエン酸リチウム緩衝液（pH2.2）に溶解した。アミノ酸自動分析システム（島津製作所製）を用いて、次亜塩素酸ナトリウムを含むOPA法により、構成アミノ酸を分析した¹⁰⁾。

5. 真皮及び筋肉組織からアミノ酸分析用サンプルの調製

真皮または筋肉組織をミキサーにてホモジナイズ後、各々2gを精秤し、6倍量の6M塩酸を加えた後、窒素を充填して $110^{\circ}\text{C}-5$ 時間の加熱を行った。その後、加熱したサンプルの一部を加水分解管に移し、8倍量の6M塩酸を加えた後、脱気封管中で $110^{\circ}\text{C}-18$ 時間の加水分解を行った。続く分解物の処理は前述したOPA法によるアミノ酸組成分析と同様に行った。

6. ニジマスⅠ型コラーゲンの各種酵素による分解

コラーゲン凍結乾燥精製品を精秤し、1mM塩酸を1,000倍量加えて溶解した。このコラーゲン溶液に各種緩衝液とイオン交換水を加え、さらに各種酵素溶液（V：V=100：1）を添加し、直ちに 40°C でインキュベーションを行った。24時間反応後、 100°C で2分間の反応停止を行い、電気泳動用のサンプルとした。コラーゲン溶液に各種緩衝液とイオン交換水を加え同様に反応させたものを未分解サンプルとした。緩衝液には、1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0）、1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）、1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、1Mトリリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン-塩酸緩衝液（pH9.0）を用いた。また、酵素溶液はペプシン（Sigma）、アマノ、パパイン及びニューラーゼ（アマノエンザイム）、及びYP-SS（ヤクルト薬品工業）をイオン交換水に溶解し1mg/ml濃度としたものを使用した。

同様に各種酵素反応液を調製した後、直ちに 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 及び 70°C で24時間反応を行った。また、ペプシン、アマノ、パパイン、ニューラーゼ及びYP-SSを含む酵素反応液のpHは、それぞれ1.0、5.0、5.0、3.0及び5.0を使用した。酵素反応後、 100°C で2分間の反応停止を行い、電気泳動分析に供した。

7. 真皮及び筋肉組織中のコラーゲン含有量の推定

OPA 法によるアミノ酸分析により求めたコラーゲンの Hyp 含有量から Conversion Factor を計算し、真皮及び筋肉中のコラーゲン含有量の推定を行った。真皮及び筋肉組織中のコラーゲン含有量は以下の式により求めた。
コラーゲン含有量 (mg/g) = 組織中の Hyp 含有量 (nM/g) × Conversion Factor (mg/nM Hyp)

結果および考察

1. ウナギ及びニジマス可食部に含まれるコラーゲンの精製と性質

各魚の真皮から酸可溶性 I 型コラーゲンを精製した結果を表 2 に示す。本実験では異なる養殖地のウナギとニジマスについて、それぞれ 3 回と 4 回のコラーゲン精製を行った。合計してウナギ及びニジマス真皮からそれぞれ 580mg 及び 3,150mg の I 型コラーゲンが得られた。ウナギコラーゲンの平均収量は、ニジマス 170mg/g に比べて少ない 30.8mg/g とニジマスの約 18% であり、大部分のコラーゲンが真皮から回収されていなかった可能性がある (表 2)。ウナギコラーゲンの調製時、おそらく酸に溶解しない不溶性コラーゲンが多く残っていたため、それらの回収ができなかったことが原因としてあげられる。また、非コラーゲン性たんぱく質の除去目的で強アルカリ性の 0.1M 水酸化ナトリウム溶液を使用したため、コラーゲン繊維の変性が起きた可能性も考えられる。高等脊椎動物に比べて下等な魚類では不溶性コラーゲンの割合は比較的少ないが、それらはアリシンやヒドロキ

シアリシンなどから形成される分子間架橋がコラーゲンの不溶化に関与することが知られている^{2, 11)}。今後、ウナギからゼラチンを含むコラーゲン関連タンパク質の調製を行う際には、加熱や酵素処理を行い、不溶性コラーゲンの変性による可溶化やアテロコラーゲンの抽出なども検討する必要があると考えられる。

調製したコラーゲンの純度を確認するため電気泳動分析を行った結果を図 1 に示す。ウナギ及びニジマスともに分子量約 10~12 万の位置に I 型コラーゲンを構成する α 鎖が確認され、その他 α 鎖の二量体である β 鎖や多量体と思われる成分 (γ 鎖, δ 鎖) が検出された²⁾。その他のタンパク質性成分は検出されなかった。これらの結果は、両魚種の真皮から調製されたコラーゲンは、報告されている魚類 I 型コラーゲン¹²⁾ と同様に異なるサブユニット ($\alpha 1$ と $\alpha 2$) から構成される典型的なヘテロトリマー ($\alpha 1$)₂ $\alpha 2$ 分子を含み、さらに高純度に精製されたコラーゲンが得られたことを意味している。また、ウナギやニジマスなどの硬骨魚類の I 型コラーゲンは特有な $\alpha 3$ 鎖を含むことが知られ、SDS-PAGE では $\alpha 1$ 鎖と移動度がほぼ同様の位置に検出されることが多い¹²⁾。本実験においても、両魚種の $\alpha 1$ 鎖の位置に $\alpha 3$ 鎖が含まれることが推測されるが、サブユニット組成の詳細は数種の陽イオン交換クロマトグラフィーにより、各サブユニットを分離・同定する必要があると思われる。

ウナギ及びニジマスコラーゲンについて OPA 法によるアミノ酸組成分析を行った結果、グリシン (Gly) が全アミノ酸の約 3 分の 1 を占め、その他プロリン (Pro) やアラニン (Ala) に富むなど両魚種の I 型コラーゲンのアミノ酸組成は報告されている魚類のアミノ酸組成⁴⁾ と類似していた (表 3)。また、I 型コラーゲンの熱安定性と Hyp の割合は正の相関を示す事が報告されている¹³⁾。精製された両コラーゲンの Hyp の割合を比較すると、ウナギがニジマスに比べて約 1.2 倍高く、ウナギコラーゲンは構造上ニジマスのものより熱安定性が高いと考えられる。さらに、ニジマスに比べてウナギコラー

表 2 ウナギ及びニジマスの真皮 I 型コラーゲンの精製

試料魚	真皮湿重量 (g)	コラーゲン凍結乾燥品 (mg)	コラーゲン収量 (mg/g 真皮湿重量)
ウナギ	5.65 ± 0.60	173 ± 10.7	30.8 ± 1.41
ニジマス	4.80 ± 1.30	788 ± 118	170 ± 27.1

各々精製を 3 回以上行い、それらの平均値を示す。

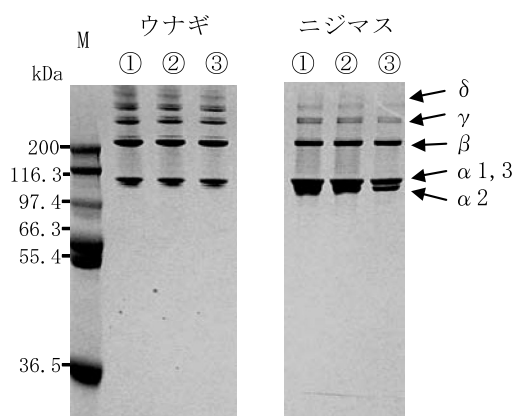


図 1 ウナギ及びニジマス I 型コラーゲンの分析 (SDS-10% PAGE)

* : M は分子量マーカーを示す。レーン当たりのサンプル量は 5 μ g を使用した。

表3 ウナギ及びニジマス I 型コラーゲンのアミノ酸組成及び推定含有量

	ウナギ			ニジマス		
	I 型コラーゲン*1 平均 (標準偏差)	皮*2	筋肉*2	I 型コラーゲン*1 平均 (標準偏差)	皮*2	筋肉*2
Aspartic acid	46 (1.2)	56	97	53 (1.2)	61	102
Hydroxyproline	57 (2.0)	51	10	48 (4.9)	48	2
Threonine	23 (0.4)	27	48	23 (0.8)	28	52
Serine	35 (0.7)	46	52	52 (1.1)	55	51
Glutamic acid	76 (2.5)	84	141	82 (2.3)	85	142
Proline	118 (3.5)	98	47	105 (7.0)	88	38
Glycine	347 (3.6)	311	109	360 (6.3)	331	88
Alanine	125 (2.8)	124	96	104 (2.7)	100	91
Valine	17 (0.7)	22	49	15 (1.5)	23	58
Cystine	0 (0.2)	1	2	0 (0.2)	1	4
Isoleucine	10 (0.4)	14	40	10 (0.2)	2	46
Methionine	14 (0.5)	15	26	16 (2.3)	19	28
Leucine	20 (0.7)	28	75	19 (0.9)	35	86
Tyrosine	2 (1.8)	8	23	2 (1.8)	8	27
Phenylalanine	14 (0.4)	17	30	13 (0.4)	18	34
Histidine	9 (0.6)	11	36	9 (0.3)	12	25
Hydroxylysine	6 (1.9)	12	4	10 (2.6)	7	0
Lysine	29 (1.8)	30	73	28 (2.0)	28	76
Arginine	52 (0.4)	45	42	51 (1.6)	51	50
total	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Conversion factor*1 (mg/nM Hyp)	0.00239 (0.00012)			0.00317 (0.00031)		
Collagen (mg/g 組織湿重量)		144.6	21.77		171.3	2.346

*1: 各々アミノ酸組成分析を3回以上行い、それらの平均値を示す。

*2: Conversion factor を用いて、各組織2回の分析によりコラーゲン量を算出した。

ゲンのアミノ酸組成は Pro や Ala が若干高く、Gly やセリン (Ser) は低値を示した。これらのアミノ酸組成の違いは、魚種によって I 型コラーゲンの一次構造に微妙な相違のあることを示唆している。

2. 各種酵素によるニジマス I 型コラーゲンの分解性

魚類 I 型コラーゲンのプロテアーゼによる分解性を明らかにするため、得られたニジマス I 型コラーゲンを酵素分解し、その分解物の生成条件を検討した。ニジマスコラーゲンを基質に用いてパパイン、ペプシン及び微生物由来のプロテアーゼ (アマノ、ニューラーゼ、YP-SS) の5種類により pH や温度条件を変えて分解反応を行い、生成した分解物の電気泳動分析を行った (図2, 図3)。各種酵素の分解は pH や温度条件によって低分子化の程度に違いが認められ、中でもパパインがコラーゲンを最もよく低分子化することが分かった。また、こ

こでは示していないがゲル濾過 HPLC による分子量分析の結果では、パパイン分解物には推定分子量約 2,000 のペプチドが多く含まれ、市販されているコラーゲン酵素分解物 (コラーゲンペプチド) の分子量 (約 2,000~5,000) と同じ分子量まで低分子化されていることがわかった。高等脊椎動物よりも魚類のコラーゲンは化学的抵抗性が低いため、組織に含まれている分子としての性質を調べるには温和な処理条件による抽出や精製が必要だが、消化・吸収効率を高めた食品素材の開発や機能性を調べる研究材料の調製を目的とした食品産業分野では、生産工程の中でこうした酵素、加熱及びアルカリ処理などが複合的に多用されている⁴⁾。コラーゲンやそのペプチドが有する食品機能性研究の観点から、ウナギやニジマスコラーゲンの酵素分解物について、今後、生理活性の検索を行うべきである。

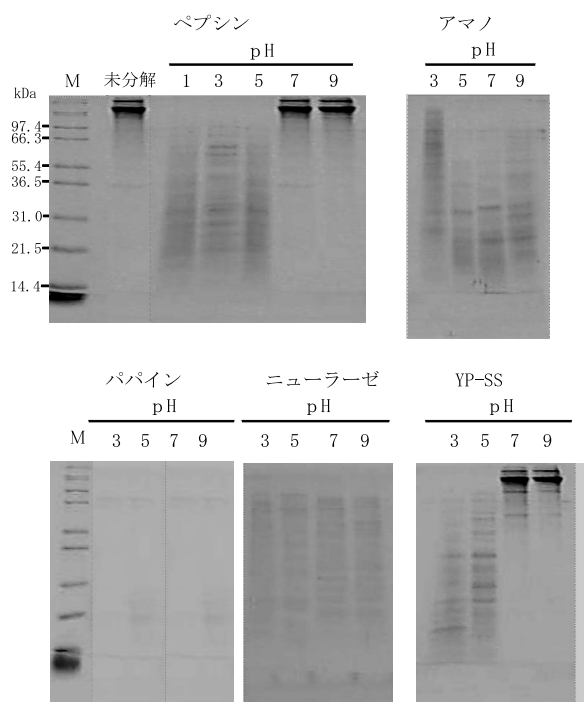


図2 各種プロテアーゼによるニジマスコラーゲンの低分子化に及ぼす pH の影響 (SDS-15% PAGE)

*: M は分子量マーカを示す。各 pH に調製したコラーゲン溶液に対して、ペプシンやパパインなどの各種酵素溶液を 100 : 1 の体積割合で添加し、40℃で24時間の反応を行った。

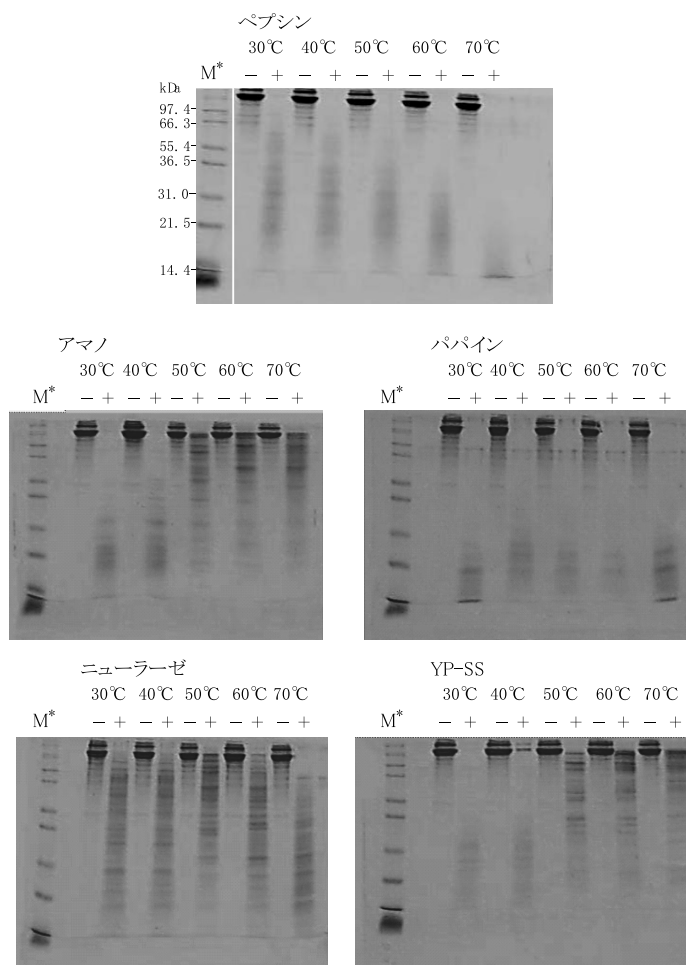


図3 各種プロテアーゼによるニジマスコラーゲンの低分子化に及ぼす温度の影響 (SDS-15% PAGE)

*: M は分子量マーカを示す。コラーゲン溶液に対して各種酵素溶液を添加した後、24時間の酵素反応を行った。ペプシン、アミノ、パパイン、ニューラーゼ及び YP-SS を含む酵素反応液の pH は、それぞれ 1.0, 5.0, 5.0, 3.0 及び 5.0 を使用した。

表4 ウナギ及びニジマス筋肉組織中のコラーゲン含有量

	筋 肉 部 位	コラーゲン量* (mg/g 湿重量)	平均コラーゲン量 (mg/g 湿重量)
ウナギ	腹	27.64	27.73
		27.82	
	背	24.52 21.28	22.90
ニジマス	尾	10.90 18.45	14.68
	腹	1.451 1.812	1.632
	背	2.575 2.561	2.568
	尾	2.565 3.114	2.839

*: Conversion factor を用いて、各々筋肉部位毎に2回の分析を行い、コラーゲン量を算出した。

3. 組織中のコラーゲン含有量の推定

ウナギ及びニジマス真皮や筋肉組織に含まれるコラーゲンの含有量を推定するため、各組織のアミノ酸組成を調べた(表3, 4)。両魚種の真皮はGlyを3割程度含み、さらにHypやヒドロキシリシン(Hyl)などを含むことから、真皮の主要なタンパク質はI型コラーゲンであることが確認された。一方、筋肉はそれらのアミノ酸の割合はいずれも低かった。使用した各部位の普通筋肉は皮に比べて筋原線維タンパク質が主成分であるため、コラーゲン特有のHypの割合は少なかったことが考えられる。測定したウナギI型コラーゲン中のHypの割合からConversion Factorを求め、真皮及び筋肉組織中のコラーゲン含有量を推定した結果、それぞれ145mg/g及び21.8mg/g組織湿重量となり、部位別に見るとウナギでは腹側ほどコラーゲン含有量が高い傾向を示した(表3, 4)。また、ニジマス真皮及び筋肉コラーゲンに関しては、それぞれ171mg/g及び2.35mg/g組織湿重量となり、部位別では尾側のコラーゲン含有量が若干高かった。魚類普通筋肉のコラーゲン含有量は、魚種や遊泳型式によって異なり、体を大きく屈曲させる部位ほどコラーゲンを多く含むことが推測されている⁶⁾。例えば、ウナギはヘビのように体を横にくねらせて波打たせることで推進力を得ていることから胴体のコラーゲン含有量が高く、尾を振り泳ぐようなニジマスの場合には尾に近い部位ほどコラーゲン含有量が高いと考えられている⁶⁾。本実験結果においても、両魚種とも部位によってコラーゲン含量に同様な違いのあることが確認された。

これまでコラーゲンの凍結乾燥重量やHypの比色定量法により魚類普通筋肉のコラーゲン含有量は、筋肉湿重量のおよそ0.3~2.2%であり、魚種や部位によって含有量が異なることが報告されている^{2, 8)}。一方、マダイ酸可溶性コラーゲンから求められたConversion Factor(0.0012)を用いて推定されたマダイ背肉中のコラーゲンは0.81~1.27mg/gと季節によって含有量が異なるこ

とが報告されている¹⁴⁾。本研究ではウナギ及びニジマス筋肉中のコラーゲン推定量は真皮に比べて著しく少ない値を示したが、報告されている魚類筋肉中のコラーゲン含量^{2, 8, 14)}に近い値を示したことから、得られたConversion Factor(ウナギ0.00239, ニジマス0.00317)を使用することで、簡便にウナギ及びニジマスのコラーゲン量を測定することは十分可能であると思われる。

現在、生態が徐々に明らかになり、完全養殖の期待が高まっている国産ウナギや関東近県でブランド化されているニジマスなど高級魚として取引される養殖魚について、コラーゲンの含有量をより正確にかつ簡便な方法でモニターすることは、機能性が期待されている食品成分の表記や生産流通時の品質評価として一つの指標となる可能性を含むと考えられる。今後、さらに両魚種について生産地や季節変化などを考慮したサンプリングを行い、コラーゲン含有量を比較することで品質評価の基盤となるデータを蓄積することが必要であろう。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました財団法人東和食品研究振興会に心よりお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Miller, E.J.: Collagen types: structure, distribution, and functions, in "Extracellular Matrix Biochemistry" (ed. by Piez, K.A., and Reddi, A.H.), Elsevier Science Publishing, Co. Inc., New York, pp41-81 (1984).
- 2) 木村 茂: 支持組織, 水産利用化学(橋本周久, 鴻巣章二編), 恒星社厚生閣, pp256-279 (1992).
- 3) Kimura, S., Ohno, Y., Miyauchi, Y., and Uchida, N.: Fish skin type I collagen: wide distribution of an $\alpha 3$ subunit in teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B, 27-34 (1986).
- 4) 小山洋一: 天然素材コラーゲンの機能性, 皮革科学, 56(2), 71-79 (2010).
- 5) 西塔正孝: 魚類コラーゲンの性質と新規食品素材としての利用, 養殖, 599(12), 56-59 (2010).
- 6) Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., and Shimizu, Y.: Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Nihon Suisan Gakkaishi*, 52(9), 1595-1600 (1986).
- 7) Yoshinaka, R., Sato, K., Abe, H., Sato M., and Shimizu, Y.: Distribution of collagen in body muscle of fishes with different swimming modes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B, 147-151 (1988).
- 8) 畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎: 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与. 日本水産学会誌, 55(11), 2001-2007 (1986).
- 9) Saito, M., Kunisaki, N., Hirano, I., Aoki, T., Ishida, M., Urano, N., and Kimura, S.: Partial characterization of cDNA clones encoding the three distinct pro α chains of type I collagen from rainbow trout. *Fisheries Sci.*, 64, 780-786 (1998).
- 10) Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., and Suzuki, H.: Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J. Agric. Food*

- Chem.*, **57**, 10477-10482 (2009).
- 11) Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K., Nakao, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Tsukamasa, Y., and Kawasaki, K.: Pyridinoline concentrations in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Sci.*, **72**(5), 1104-1108 (2006).
 - 12) Kimura, S., and Saito, M.: Characterization of Fish Type I Collagen in Extracellular Matrix of Fish and Shellfish (Sato, K., Sakaguchi, M., and Bremner, H.A. eds.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp1-13 (1999).
 - 13) Rigby, B.J.: The thermal stability of collagen: its significance in biology and physiology. *Adv. Chem. Phys.*, **21**, 537-555 (1971).
 - 14) Touhata, K., Tanaka, M., Toyohara, H., Tanaka, H., and Sakaguchi, M.: Seasonal change in collagen content of red seabream muscle. *Fisheries Sci.*, **66**, 553-557 (2000).

