エビ類の黒変に関する研究—I. 黒 変 の 成 因 に つ い て

柿 本 大 壹・金 沢 昭 夫
(鹿児島大学水産学部)

Studies on the Black Discoloration of Lobster—I.

Origin of Discoloration

Dai-ichi KAKIMOTO and Akio KANAZAWA

The cause of black discoloration of a lobster, *Panulirus japonicus*, was investigated and the following results were obtained.

1) The black discoloration was confirmed to be due to the black pigments formed by the action of an enzyme in blood on a certain constituent of the liver, as shown in Table 1.

2) The darkening, which occurred in the mixture of blood and liver, was found to be not influenced by light (Table 2) and to be most marked at about pH 7. Below pH 4, the darkening was not recognized (Table 3).

3) As shown in Diagram 1, the black pigments were separated from the incubated mixture of blood and liver by the method of melanin separation. The black pigment II was further dividable into two pigments with their solubility in N/5 HCl and gave two spots in paper chromatography. On the other hand, the black pigment separated from the mixture of blood and L-tyrosine was insoluble in the solvent and gave only one spot. The absorption curves of these pigments, however, very slightly differed each other, as shown in Fig. 1.

鮮魚介として取扱われるエビ類は、貯蔵中屢々黒変を起し、商品としての価値を低下せしめることが多いが、この場合黒変はまず関節及び脚の基部に起り、次第に全身に波及する。その原因は血液の酸化であると言われている¹⁾が、MILTON *et al.*²⁾はメラニン生成を認めている。動植物に存在するメラニン色素に関しては、主として遺伝学的に取扱われた研究があり³⁾、又馬鈴薯に起る黒色素の研究も多いが、これ等の研究によると、黒色素は主としてメラニンの生成によるか、又は糖、蛋白質の結合した物質の生成によるものと見做される⁴⁾⁵⁾。最近 KIKAWA 等⁶⁾は毛髪の色素に関する興味深い意見を述べ、水野⁷⁾は人工的に黒色素を生成せしむる等、多岐に亘る研究報告がある。著者はエビ類に屢々見受ける黒色素が、如何なる組織又は器官に於て最も著しく起るかに就いて定性的に観察した結果、比較的明確な知見を得たので、茲にその一部を報告する次第である。

実 験 の 部

試料： 本研究は初めクルマエビを用い、黒色素生成についての予備的観察を行つたが、該エビは小型のため、血液の採取、各組織、器官の分割に困難を感じたので、後ではイセエビを用いて実験を進めた。なおクルマエビは、漁獲後死んだものしか得られなかつたが、イセエビは生きているものを入手できたので、血液の採取、各器官の分離が容易に行われた。

実験方法及び結果： クルマエビを丸ごと蒸溜水に浸漬し、トルオールを加えて防腐しつつ 37°C に放置し、黒変の発生状態を肉眼的に観察したところ、24時間で体表面全体に感知し得る程度の黒褐色色素が認められた。又、同様な試料を内臓部と内臓以外の部分、即ち皮付の肉質の2つの部分に分けて、前同様トルオール防腐を施し 24 時間放置した結果、内臓部は極めて明瞭な黒色素を生成するのに対し、肉質部では肉眼

的には黒変を起したとは思われなかつた。以上の如き、予備的な観察から黒変は内臓部に起ることが分つたので、次にエビを各組織器官に分割し、その何れの部分が黒変に関与するかを知るため、次の如き実験を行った。即ち、生きたイセエビの皮殻を剥ぎ、まず鼓動している心臓から注射器を用いて採血し、直ちに凍結する。次に残体を解剖し、肝臓、生殖巣、胃、腸、鰓、筋肉、殻の各部に分割し、冷室に貯う。血液は空気中に放置する時は淡青色を帯びるが、外観的にみて、此の色調は黒変の時の色調とは異なっている。前述の各臓器及び血液等は、約 0.5 g 宛各々単独又は異なる 2 者を組合わせたものを試料とし、これに蒸留水を 5 倍容加えて、ホモゲナイズし、トルオールを加え 24 時間 37°C に放置した場合の黒色素生成を観察したが、その結果は Table 1 の通りである。

Table 1. Darkening of the mixture of each organ or tissue of *Panulirus japonicus*

Tissues or organs		Blood	Liver	Muscle	Gill	Gonad	Shell	⊙ Tyrosine
Blood	F*	—	+	—	—	—	—	+
	B**	—	—	—	—	—	—	—
Liver	F	+	—	—	—	—	—	—
	B	+	—	—	—	—	—	—
Muscle	F	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
Gill	F	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
Gonad	F	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
Shell	F	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—

The homogenized organ or tissue was combined each other and the mixture was incubated at 37°C. for 24 hrs.

* Fresh material, ** Boiled material, ⊙ Crystalline L-tyrosine, + Marked darkening, — No darkening.

Table 1 に見られるように、組織器官を単独に放置しても黒変は起らず、又血液のみでも一般に言われる黒変は起らない。然るに、血液と肝臓を混合した場合は極めて顕著な黒色素の生成が起り、又肝臓は煮熟したものをを用いても、血液が生であれば黒色素を生成し、この場合黒変の程度は生肝臓の場合と殆んど差異がない。併し血液を煮熟した場合には、生肝臓と混和しても黒色素の生成は起らない。従つて、黒色素の生成

Table 2. Influence of light on the darkening of the mixture of blood and liver

Conditions	pH	Optical density E %
Illuminated by 60W lamp from the distance of 10 min.	4	0.002
	6	0.53
	8	0.34
Kept in the dark	4	0.003
	6	0.55
	8	0.43

The mixture was incubated at 37°C. for 24 hrs. and the black pigments formed were then precipitated by the addition of six volumes of acetone to it. After washing with absolute alcohol, the pigments were dissolved in N/10 NaOH and absorbency was estimated with Filter 43.

は血液中の酵素が肝臓中の基質に作用して起る現象の様に想像される。のみならず、血液にチロジンを加えても同様な黒変が見られることから、チロジナーゼ作用が重要な役割を果していることも否定できない。

次に色素生成が光の影響を受けるか否かを知る為、次の実験を試みた。血液 0.5 g に 10 倍容の蒸溜水を加えてホモゲナイズし、これに 0.5 g の肝臓を 10 倍容の蒸溜水でホモゲナイズしたものを加え、径 5 cm のペトリ皿に入れて深さ 2 mm とし、トルオール防腐を施し、光を遮断した恒温器内で 37°C に保つ。一方、同一試料を 20 cm の距離から 60 W 電球で照射を行いつつ 37°C に保つ。24 時間後 6 倍容のアセトンを加え生成した黒色素を沈澱せしめた後濾過し、無水アルコールで洗滌後 N/10 NaOH に溶解し、フィルター 43 を用いて光電比色を行い、光による影響をみた。尙この場合、pH をマキルベン緩衝液で 4, 6, 8, として実験したが、その結果は Table 2 の通りであつた。Table 2 に示す如く、pH 7 で最も顕著な黒変が起り、光の影響は全く認められなかつた。

次に黒変を生ずる最適 pH 条件を知る為、前同様マキルベン緩衝液により pH を変えて実験した。温度、作用時間、黒変の測定方法等は前記の通りで、Table 3 の結果を得た。即ち pH 7.0 で最も黒変が著しくこの点を遠ざかるに従つて、黒色素の生成は減少する傾向を示すが、pH 4.0 で急激に黒変が抑えられる。これは黒変防止に対し重大な意義のある事実と思われる。

以上の知見は、主として外観的観察で得られた結果に過ぎないので、次に之等の色素は所謂メラニンであ

Table 3. Influence of pH on the formation of black pigments in the mixture of blood and liver

pH	Optical density*
4	0.0034
5	0.20
6	0.50
7	0.59
8	0.48

* See the footnote in Table 2.

Diagram 1. Preparation of black pigment

るか否か、又単一な色素の生成によるものかを知る事が必要である。依つて、血液と肝臓の混和により生成される黒色素の分離を試みた。その方法は Diagram 1 の如く、主として吉武等⁹⁾の方法を参考にしたものである。

Diagram 1 に示した方法により分離した黒色微細末Ⅱは、灰分 7.7 %を含み、定性分析の結果 Fe の存在を確認したが、Cu は検出されなかった。次に L-チロジンと血液により生ずる黒色素を同様の方法で分離したが、血液と肝臓との接触によつて生ずる色素と極めて類似している。然し肝臓から得た黒色素Ⅱは、N/5 HCl により可溶部と不可溶部に分つことが出来る。

これに対し、チロジンより生成された色素は N/5 HCl には全く不溶である。この HCl 可溶の黒色素は、酵素作用時間が不足な為に生じた中間体ではないかと考えたので、作用時間を 48 時間とし追試したが、結果は全く同様であつた。

前記分離方法に記載したⅡの試料並に N/5 HCl 可溶部と血液チロジンにより生成した黒色素を、ベックマン分光光度計を用い紫外部、可視部に於ける吸光度を測定した結果は、Fig. 1 の如くである。尚Ⅱの試料と血液+チロジンよりの色素は N/10 NaOH に溶解したもので測定し、HCl 可溶色素は N/5 HCl に溶解したものをを用いて測定した。即ち可視部に於ては、肝臓+血液、チロジン+血液による両黒色素の吸光曲線には何等顕著な差違はなく、有賀等の示した家蚕幼虫斑紋の色素（メラニン）とはほぼ一致した吸光曲線が得られている。之に対し紫外部では、270 mμ 附近に何れの色素もピークを与えるが、これは恐らく混在するチロジンによるものと考えられる。この場合 HCl を溶媒としたものが位置的に若干ズレを生じている。吸光曲線の上からは、之等の色素はチロジンと血液とから生ずるものに一致はするが、血液と肝臓の接触によつて、塩酸に可溶の色素が生成される事実から想像して、他の黒色素の存在も肯定出来る。よつて、次に之等の色素を濾紙クロマト法で分割することを試みた。

ブタノール・酢酸及びフェノール・水等の展開剤では、上記両色素とも原点に止まり分離しなかつたが、1%炭酸アンモニウム水溶液に n-ブタノールを常温に於て飽和せしめた展開剤を使用したところ、チロジン+血液によつて生成した黒色素は、依然原点より移動しなかつたが、血液、肝臓の組合せによる色素は、原点即ち Rf 0 のメラニンによる外、Rf 値 0.79 に今一つの黒褐色の斑点を与えた。即ち、この方法によつて血液と肝臓から生成される色素には、いわゆるメラニン以外の色素の存在が想像される。然し乍ら、この物質はメラニン生成の中間体であるか、又は全然未知の前駆体から生成される色素であるかに就いては、今後の研究にまつ。

摘 要

貯蔵中に於けるエビ黒変の原因を探究し、次の事実を明らかにした。

1. エビの黒変は、血液中の酵素が肝臓と接触することにより生成した色素に起因する。
2. 血液と肝臓の接触により生ずる色素の生成には、光線は関与しない。
3. これ等の色素の生成に対する最適水素イオン濃度は、pH 7.0 附近で pH 4.0 では殆んど黒色素の生成は起らない。

4. 上記の色素は、メラニン色素の分離法により分離精製されるが、単一のものでなく、N/5 HCl に可溶及び不溶の少くとも二色素が存在し、この両色素は濾紙クロマト法により分離することが出来る。但し吸光曲線から之等両色素を明瞭に区別することは出来なかつた。

尚終りに、本研究に終始御指導並に論文の御校閲賜つた当学柏田教授、貴重な文献を賜つた東大農学部有賀教授、実験に御意見を賜つた当学今井助教授、ベックマン光度計に御指導を賜つた農学部山本助教授に深謝の意を表す。

Fig. 1. Absorption curves of black pigment.
—— Black pigment II in diagram I. (Solvent N/10 NaOH)
..... Black pigment produced in the mixture of L-tyrosine and blood. (Solvent N/10 NaOH)
--- N/5 HCl soluble fraction of black pigment II. (Solvent N/2 HCl)

文 献

- 1) 小倉善平・富士川溍：朝鮮水試, p. 156. 大 14.
- 2) M. E. BAILEY and E. A. FIEGER : *Food Technol.*, **8**, 317 (1954).
- 3) 有賀久雄：農業及園芸, **27** (4), 5 (1952).
- 4) 小幡彌太郎・坂村貞雄：農化, **27**, 766 (1953).
- 5) " : " " 769 (1953).
- 6) 本田幸一郎・小田圭昭：" **29**, 32 (1955).
- 7) H. KIKAWA, Z. OGITA and S. FUJITO : *Science*, **14**, 43 (1955).
- 8) 水野勝義：生化学, **26**, 438 (1954).
- 9) 吉武成美・有賀久雄・渡辺兵一郎：日蚕雑, **20**, 439 (1951).