

# 貝類缶詰の緑変に関する研究—I

## 缶詰かきの緑色色素の分離と物理化学的性質

長田 博光・大塚 滋・志賀 岩雄

### Studies on Greening of Canned Shellfishies. - I

#### Isolation of green pigments of canned oysters and their physico-chemical properties.

HIROMITSU OSADA, SHIGERU OTSUKA and IWAO SHIGA

Greening of canned oysters, which has rapidly grown to one of the most serious troubles in the field of marine product canneries in Japan since a few years, is entirely different from the green oysters so far well known to green when alive and please gourmets. The phenomenon is that the brown entrails of fresh oysters turn green during heat sterilization and during storage the green pigments exude into the mantle.

The physico-chemical properties of the green pigments were investigated in order to find out whether these are bile pigments, chlorophylls or copper complexes.

The green pigments were extracted from the entrails of the canned oysters with 10% hydrochloric acid in aceton, and purified by successive chromatographies with silica gel, filter paper (band application) and Sephadex LH-20 (gel-filtration). Properties of the pigments were studied of their absorption spectra, thin layer chromatograms, behaviors on Gmelin and bilatrienes reactions (for bile pigment detection) and solubilities in organic solvents.

The green pigments of canned oysters are separated into three components each with absorption maxima at 245, 415, 600 and 655 m $\mu$ , and these pigments are negative to the reactions for bile pigment detection. It was found from the results of the thin layer chromatographies, solubilities and infra-red spectra that these pigments are different from chlorophyll a, and quite different from bile pigments. The molecular weights were estimated from the gel-filtration patterns: approx. 700 (pigment-1) and 1,000 (pigment-3).

近年、広島県下においてしばしばかき缶詰が緑色を呈する例がみられ問題となっている。これは缶に充填密封されたかきが加熱殺菌および貯蔵中に緑色に染まる現象でその出現の機構、色調などから従来のいわゆる“ミドリガキ”とはその変色の化学的機序、原因において異なり現在のところ他に類例をみない現象のようである。

いわゆる“ミドリガキ”はその呈色の条件から大別して2種に分類されよう。その1は生活体ないし新鮮時すでに緑色のかきであって、著名な例のひとつであるフランスのマレーヌ地方産の“ミドリガキ”は美味であり食通家に好まれている。その緑変の原因並びに緑色色素について多くの研究が行なわれている。高槻<sup>1)</sup>によるとこの“ミドリガキ”は2つの原因によって発生すると述べられている。すなわち硅藻色素(クロロフィル)によるものと銅によるものとである。前者はかきが餌料として硅藻を摂取し、その硅藻の緑色色素がかきに染着することによって生ずるものであり、後者は銅を含む工場排水などが海水に流入してかきの体内に銅が沈着することによって生ずるもので、わが国では宮崎県の延岡地方、徳島県の吉野川河口に棲息していると報告されている。これらの“ミドリガキ”の銅の含有量は岡田ら<sup>2)</sup>によって調べられ、正常なかきの約120倍に達すると報告されている。

“ミドリガキ”の緑色色素の性質は高槻<sup>1)</sup>によると水、エタノール、エーテル、クロロホルム、アセトン、ブタノール、アミルアルコール、弱酸および弱塩基に不溶性であり、メタノール、ピリジンには可溶性であると報告されている。山田ら<sup>3)</sup>は名古屋港内にて採取した“ミドリガキ”の緑色色素を分析し、その吸収スペクトルから銅、あるいはTuracinのような銅ポルフィリンとも明らかに異なり、銅アンモニア錯塩や銅リジン錯塩などの吸収スペクトルの類似から、それはアミン、アミノ酸およびペプチドなどの銅を配位した低分子錯塩であろうと報告している。

このように生鮮時緑色を呈しているいわゆる“ミドリガキ”の緑色色素はクロロフィル、銅のいずれかに起因することがほぼ明らかにされている。

“ミドリガキ”のいまひとつの種類は従来宮城県産のかきによって発生し、最近広島県下においても出現して問題となっている缶詰かきの緑変現象である。ここに取上げた缶詰緑変かきは後者に属し、生鮮時はもちろん製造工程中の予備加熱処理(100°C 10分煮熟)後も、あるいはくん製後も正常なかきの色彩を呈しているが、これを缶詰あるいはびん詰にして115°C、60分加熱殺菌すると内臓部が緑変し、貯蔵中にその緑色色素が外套膜に浸出してかき全体が緑色を呈する現象であり、近年わが国を始め中国あるいは米国においても大きな問題となってきている。

著者らはこの缶詰かきの緑変の原因が胆汁色素、クロロフィルあるいは銅とのキレート化合物のいずれに由来するかを知るために緑色色素を分離し、2, 3の物理化学的性質を調べたのでその結果を以下に報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 緑色色素の抽出方法の検討

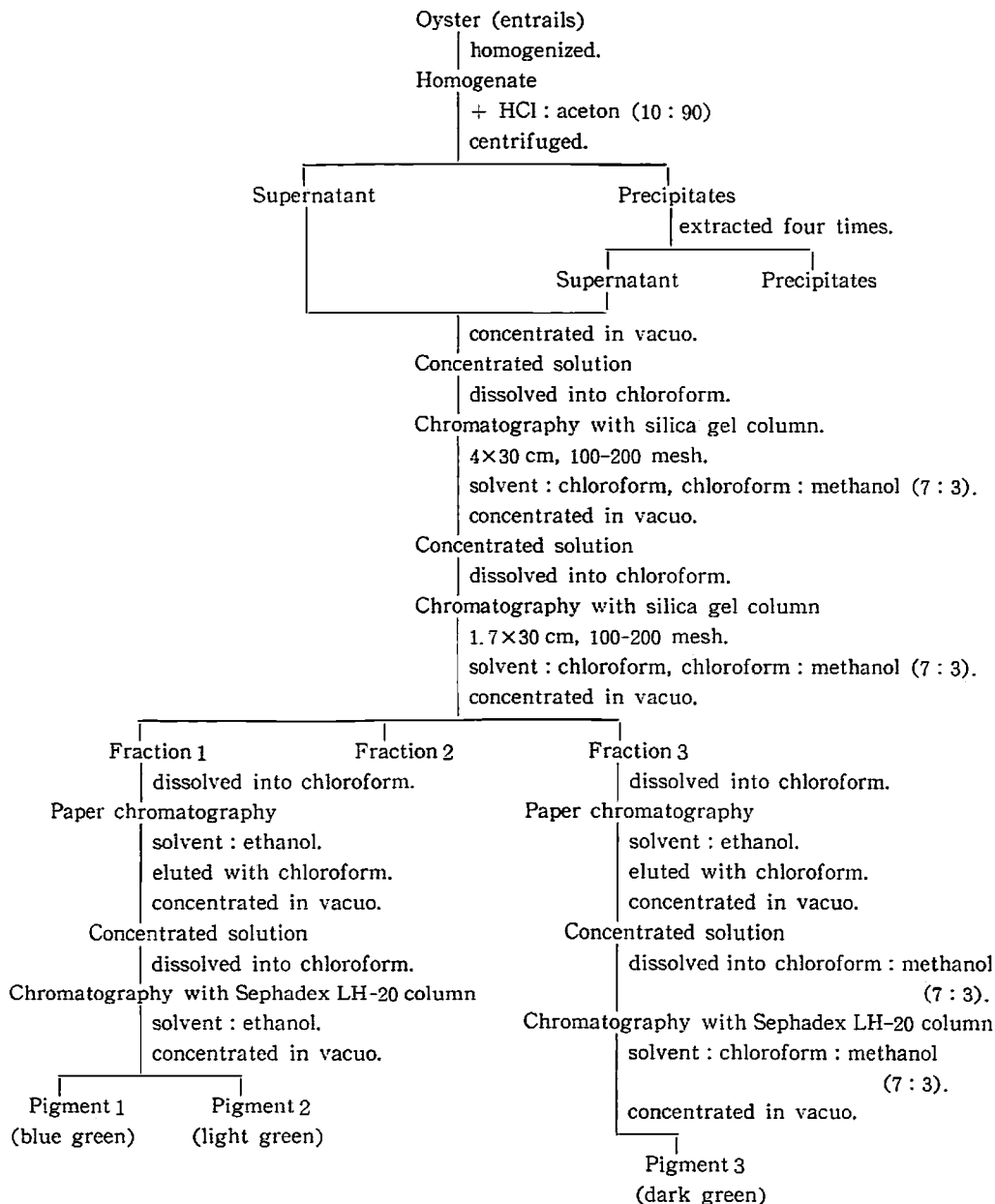
1-1. 缶詰かきをミキサーにてホモジナイズし、そのホモジネート50gにメタノール、エタノール、アセトン、塩酸-アセトン(10:90)および塩酸-メタノール(5:95)のそれぞれにて4回抽出し、濾過した後それぞれの溶媒にて500mlとし、650, 655, 660, 665, 670 m $\mu$ における吸光度を測定した。

1-2. 缶詰かきのホモジネート50gに10%塩酸, 10%硫酸, 10%苛性ソーダーおよび水をそれぞれ100ml加え, 100°C1時間半加熱した後アセトンを加え遠心分離した後塩酸-アセトン(10:90)にて500mlとし, 650, 655, 660, 665, 670m $\mu$ における吸光度を測定した。

## 2. 緑色素の分離精製

緑色素の抽出方法は Fig. 1 に示したごとく缶詰かきの内臓部を塩酸-アセトン(10:90)混合

Fig. 1 Procedure for purificating the green pigments of canned oysters



液とともにホモジナイズし、遠心分離する。沈澱はさらに塩酸-アセトン混合液にて3回抽出し、抽出液を60°C減圧の下に濃縮し、十分に塩酸を除去する。残りはクロロホルムに溶かし、4×30cmのシリカゲルカラムにかけ、クロロホルム、クロロホルム：メタノール(7:3)溶液にて溶出し、油脂および褐色色素を除去する。この操作を3回くり返すとほぼ褐色色素が除去できる。次に1.7×30cmのシリカゲルカラムにかけ、同様にクロロホルム、クロロホルム：メタノール(7:3)溶液にて溶出すると緑色色素は3画分に分かれる。この3つの色素のうちフラクション1と2は合わせてクロロホルムに溶かし、45×45cmの濾紙に帯状につけ、エチルアルコールにて展開する。同様にフラクション3もクロロホルム：メタノール(7:3)溶液に溶かしペーパークロマトグラフィーを行なう。この場合フラクション1と2は濾紙の上部まで移動し、フラクション3は原点にとどまる。展開後風乾してクロロホルム：メタノール(7:3)溶液にてそれぞれ溶出し、濃縮後前者はエタノールに溶かし、後者はクロロホルム：メタノール(7:3)溶液に溶かし、Sephadex LH-20を用いてそれぞれエタノール、クロロホルム：メタノール(7:3)溶液を溶出剤としてゲル濾過を行ない緑色色素を分別精製した。

### 3. 分析方法

3-1. 吸収スペクトル<sup>4,5,6)</sup> 緑色色素をクロロホルムに溶かし、日立-パーキンエルマ139分光光度計にて測定した。

#### 3-2. 薄層クロマトグラフィー<sup>7,8)</sup>

和光ゲルB10を用い、メタノール：水(1:1)、クロロホルム、エタノール、濃塩酸1%を含むメタノール溶液、ブタノール、ピリジン、濃塩酸5%を含むメタノール溶液：水(3:2)、及びクロロホルム：エタノール(1:9)の8種類の溶媒を展開剤として薄層クロマトグラフィーを行なった。

#### 3-3. 濾紙電気泳動

pH 4.5 および 6.7 のリン酸緩衝液、pH 8.6 のベロナール緩衝液を用いて 15 mA、8 時間泳動を行なった。

#### 3-4. 分子量の推定

Sephadex LH-20 を用い、5%の割合でエタノール、アセトンを含むクロロホルム溶液を溶出剤としてゲル濾過を行ない分子量を求めた。

3-5. 赤外線吸収スペクトル<sup>9,10)</sup> 緑色色素をクロロホルムに溶かし、島津自記赤外分光光度計AR-275 IIS型にて測定した。

#### 3-6. 胆汁色素に対する反応並びにその他の反応

グメリン反応、ハウヒット反応、ピラアトリエンズ反応、ニンヒドリン反応並びに螢光反応について調べた。

#### 3-7. 溶剤に対する転溶性

水、クロロホルム、アセトン、エーテル、メタノール、エタノール、石油エーテル、ベンゼンおよびブタノールに対する転溶性について調べた。

## 結 果 と 考 察

### 1. 緑色色素の抽出方法

Table 1 に示した如く塩酸：アセトン（10：90）混合溶液にて抽出するのが最も抽出効率のよいことを認めた。

Table 1—1 Examination on extraction method of green pigments of canned oysters.

Wave length (m $\mu$ )	Ethanol	Methanol	Aceton	HCl : Aceton (10 : 90)	HCl : Methanol (5 : 95)
650	0.232	0.180	0.268	0.661	0.442
655	0.245	0.192	0.279	0.614	0.392
660	0.225	0.182	0.275	0.556	0.331
665	0.168	0.142	0.262	0.524	0.310
670	0.107	0.098	0.274	0.502	0.300

Table 1—2 Examination on extraction method of green pigments of canned oysters.

Wave length (m $\mu$ )	10% HCl	10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10% HaOH	Water
650	0.500	0.468	0.472	0.460
655	0.470	0.436	0.440	0.442
660	0.416	0.410	0.398	0.414
665	0.380	0.410	0.374	0.402
670	0.354	0.420	0.356	0.400

※ Extracted with HCl-aceton (10 90) mixed solution after heating for 1.5hrs. at 100°C.

### 2. 緑色色素の分離

缶詰かきの緑色色素は Fig. 1 に示した如く3成分に分けられる（それぞれ緑色色素1, 2および3と略称）。緑色色素1は青緑色，油状，緑色色素2は淡緑色，油状であり，緑色色素3は暗緑色，粉末であり，ほぼ 20 : 1 : 10 の割合で得られる。

### 3. 吸収スペクトル

3つの緑色色素の吸収スペクトルは Fig. 2 に示した如くいずれも 245, 415, 600, 655 m $\mu$  に吸収極大を持っており，胆汁色素であるビリベルジン<sup>11)</sup>，あるいは銅クロロフィリンとは明らかに異なりクロロフィルaとやや類似していることが認められた。

### 4. 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーの結果は Table 2 に示したごとく緑色色素1と2とは同一の Rf 値を持っており，緑色色素3とは全く異なっていることが認められた。またこれら3つの色素はいずれもビリベルジンとは明らかに異なった Rf 値を示し，クロロフィルaともやや異なっていることが明らかである。

### 5. 濾紙電気泳動

濾紙電気泳動の結果は Fig. 3 に示した如く緩衝液の pH を 4.5, 6.7 および 8.6 と変えても，ま

Table 2 Rf values in thin layer chromatography of the green pigments of canned oysters, as compared with those of chlorophyll a and biliverdin.

Solvent system	Sample	Green pigments of oyster			Chlorophyll a	Biliverdin
		1	2	3		
Methanol : Water (1 : 1)		0	0	0	0	0
Chloroform		tailing	tailing	0	0	0.95
Ethanol		0.75	0.75	0	1	1
1% HCl in methanol		tailing	tailing	0	0.89	0.80
Butanol		0.80	0.84	0	1	
Pyridine		0.91	0.91	tailing	1	
5% HCl in methanol : Water (3 : 2)		0	0	0	0	0.76
Chloroform : Ethanol (1 : 9)		0.89	0.89	0	0.92	1

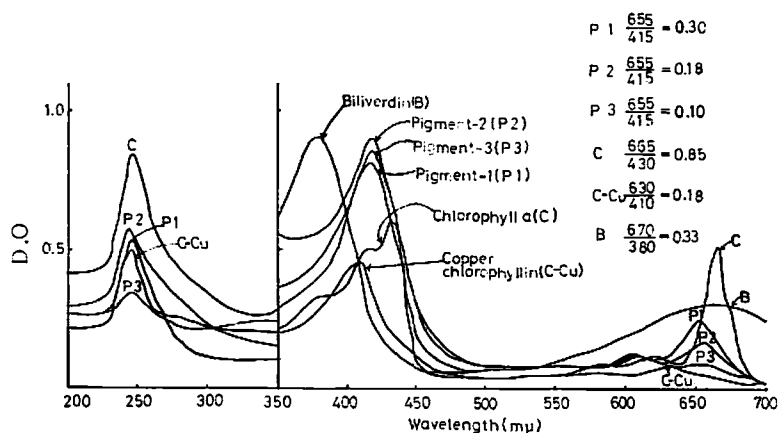


Fig. 2 Absorption spectra of the green pigments of canned oysters after treatment in a column of Sephadex LH-20, biliverdin, chlorophyll a and copper chlorophyllin.

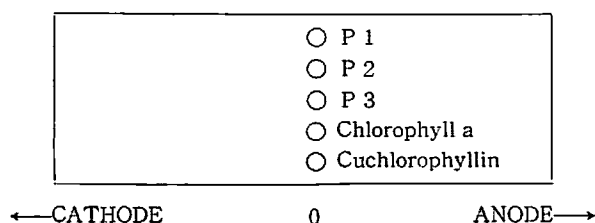


Fig. 3 Paper electrophoretic patterns of the green pigments of canned oysters, chlorophyll a and copper chlorophyllin in phosphate buffer, pH 4.5-6.7 and veronal buffer, pH 8.6, after 8 hrs.

P1.2.3 : green pigment of cannd oysters.

た泳動時間あるいは電流量を変えてもいずれも泳動しなかった。

### 6. 分子量の推定

3つの色素のうち緑色色素1の分子量はクロロフィルaよりも少なく、ビリルビンよりも多く約700であり、緑色色素3の分子量はクロロフィルaとほぼ同じで約1,000であることが Fig. 4より明らかである。なお緑色色素2はきわめて少量のため分子量の推定ができなかった。

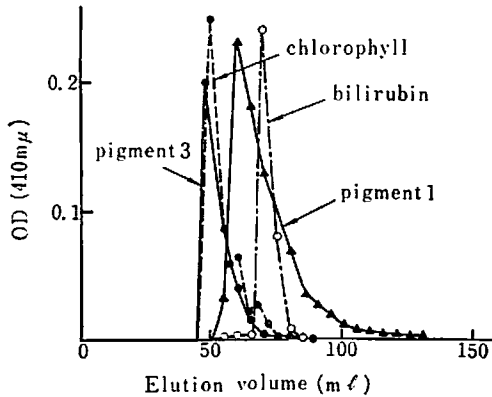


Fig. 4 Chromatograms of the green pigments of canned oysters, chlorophyll a and bilirubin in a column of Sephadex LH-20. Solvent: 5% ethanol and acetic acid in chloroform.

### 7. 赤外線吸収スペクトル

赤外線吸収スペクトルの結果は Fig. 5, 6 に示した如く緑色色素 1 はクロロフィル a とやや異なり 9.6 および 9.7  $\mu$  に吸収極大が認められる。いっぽう緑色色素 3 はクロロフィル a とほぼ同一のスペクトルを持っていることが認められる。またこれら 2 つはビリルジンの赤外線吸収スペクトル<sup>9)</sup>とは明らかに異なる。

### 8. 胆汁色素に対する反応並びにその他の反応

胆汁色素に対する反応はこれら 3 つの緑色色素はいずれも陰性であり、胆汁色素に由来する色素でないことが明らかである。またニンヒド

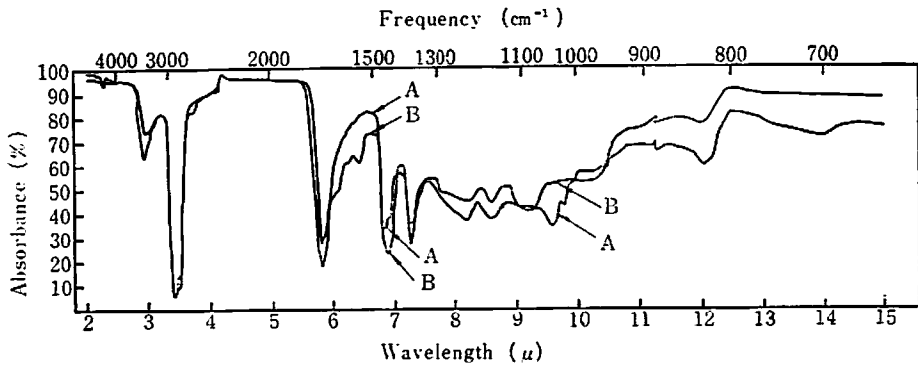


Fig. 5 Infrared spectra of the green pigment 3 of canned oysters and chlorophyll a in chloroform solution.

A : Green pigment 3 of canned oysters.  
B : Chlorophyll a.

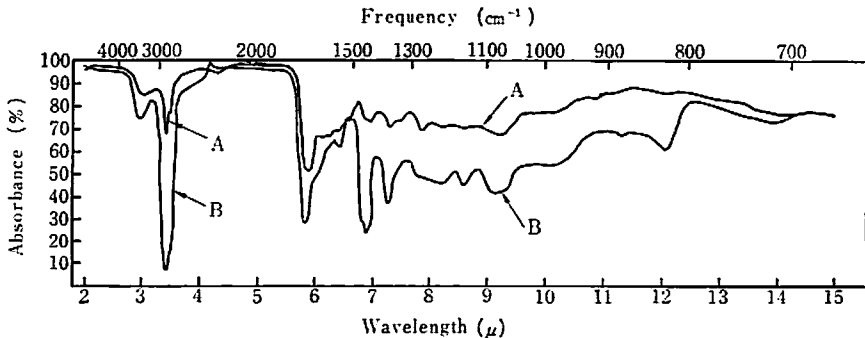


Fig. 6 Infrared spectra of the green pigment 1 of canned oysters and chlorophyll a in chloroform solution.

A : Green pigment 1 of canned oysters.  
B : Chlorophyll a.

Table. 3 Properties of the green pigments of canned oysters, as compared with those of chlorophyll a and biliverdine.

	Green pigments of oyster			Chlorophyll a	Biliverdine
	1	2	3		
Melting point	131°—132°C		above 280°C	117°—120°C	206°—207°C
Absorption maximum (m $\mu$ )	245, 415, 655	245, 415, 655	245, 415, 655	245, 415, 620 430, 665	245, 380, 667
Gmelin reaction	negative	negative	negative	negative	positive
Fouchet reaction	negative	negative	negative	negative	positive
Reaction of bilatrienes	negative	negative	negative	negative	positive
Reaction of ninhydrin	negative	negative	negative	negative	negative
Fluorescence					
Solubilities (room temperature)	positive	positive	positive	positive	nil
Water	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
Chloroform	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
Acetone	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
Ether	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
Methanol	soluble (insoluble)	soluble	slightly soluble	sparingly soluble	soluble
Ethanol	soluble	soluble (insoluble)	insoluble	soluble	slightly soluble
Petroleum ether	soluble (insoluble)	insoluble	insoluble	soluble	insoluble
Butanol	soluble	soluble	slightly soluble	soluble	
Benzene	soluble	soluble	slightly soluble	soluble	

リン反応もいずれも陰性であるので、これらの緑色色素はアミン、アミノ酸類を含んでいない。これより銅アミノ酸錯塩、あるいは銅アミン錯塩とも明らかに異なる (Table. 3)。

#### 9. 溶剤に対する転溶性

これら3つの緑色色素はいずれも水に不溶性であり、クロロホルム、アセトンおよびエーテルに可溶性である。また緑色色素1および2はメタノール、エタノール、ブタノールおよびベンゼンに可溶性であるが緑色色素3はエタノールに不溶性であり、メタノール、ブタノールおよびベンゼンにわずかに可溶性である。石油エーテルには緑色色素1は可溶性であるが、緑色色素2と3はいずれも不溶性であることが認められた (Table. 3)。

以上の実験結果より缶詰かきの緑色色素はほぼ3成分より成り、これらはいずれも水に不溶性であり、塩酸アセトン混合溶液によって完全に抽出することができる。種々の物理化学的性質によりこれら3つの緑色色素は胆汁色素あるいは銅アミノ酸でもなく、またクロロフィルaそのものとも異なっている。

小笠原<sup>12)</sup>は缶詰かきの緑色色素が試料あるいは銅に由来するものではないと述べている。しかし木村<sup>13)</sup>は試料中のクロロホルムの吸収スペクトルと缶詰かきの緑色色素の吸収スペクトルとが一致することより、この緑色色素はクロロフィルであり試料中のプランクトンのクロロフィルに由来すると報告している。しかしクロロフィルは加熱によって分解し、フェオフィチンとなり褪色す



るのが普通であるが、本色素は加熱によって生成する。また被還元性を有することよりクロロフィルの性質とは明らかに異なる。

以上の実験結果より本色素は缶詰製造工程中の 115°C 60 分加熱殺菌中における酸化反応による生成物であろうと推定される。

## 要 約

1. 缶詰かきの緑色色素が胆汁色素、クロロフィルあるいは銅とのキレート化合物のいずれに由来するかを知るために緑色色素を抽出分離し、2, 3 の物理化学的性質を調べた。

2. 緑色色素を塩酸アセトン混合溶液で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーおよび Sephadex LH-20 によるゲル濾過にて分離精製した結果 3 成分に分けられた（それぞれ緑色色素 1, 2 および 3 と略称）。これら 3 つの色素はいずれも 245, 415, 600 および 655 m $\mu$  に吸収極大を持っており、緑色色素 1 と 2 は油状、緑色色素 3 は粉末であり、ほぼ 20 : 1 : 10 の割合で得られた。

3. 薄層クロマトグラフィーでは緑色色素 1 と 2 とは同一の R<sub>f</sub> 値を示すが、緑色色素 3 の R<sub>f</sub> 値は前二者と全く異なる。

4. 分子量は緑色色素 1 は約 700 で、緑色色素 3 は約 1,000 であると推定される。

5. 緑色色素はいずれも胆汁色素に対する反応およびニンヒドリン反応は陰性であり、蛍光反応は陽性であった。溶剤に対する転溶性試験ではいずれの色素も水に不溶性であり、また緑色色素 3 はエタノール、石油エーテルに不溶性であるが、他の有機溶剤にはいずれの色素も可溶性あるいはやや可溶性である。

6. 赤外線吸収スペクトルあるいは他の物理化学的性質より缶詰かきの緑色色素はビリベルジンあるいは銅とのキレート化合物とは明らかに異なり、クロロフィル a とやや異なっていることを認めた。

終りに試料を提供下さった青旗缶詰株式会社の甘日出要之進社長、齊藤勲管理開発部長に厚く感謝致します。また本研究にあたりご助力下さった東洋食品研究所の西郷英昭、加藤育代の両氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) 高槻俊一：牡蠣。(枝報堂), p. 58 (1949).
- 2) 岡田郁之助, 本橋邦郎：水産研究誌, 3, 1 (1948).
- 3) 山田敏郎, 河野正清, 江上不二夫：生化, 26, 462 (1954).
- 4) TSUCHIYA, Y. and NOMURA, T.: *Tohoku J. Agr. Res.*, 6, 75 (1955).
- 5) TSUCHIYA, Y. and NOMURA, T.: *Tohoku J. Agr. Res.*, 9, 81 (1958).
- 6) KOCHIYAMA, YAMAGUCHI, K. and HASHIMOTO, K.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32, 867 (1966).
- 7) TSUCHIYA, Y. and NOMURA, T.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 155, 34 (1961).

- 8) YAMAGUCHI, K. KOCHIYAMA, Y. HASHIMOTO, K. and MATSUURA, F.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32, 873 (1966).
- 9) NOMURA, T. and TSUCHIYA, Y.: *Tohoku J. Agr.*
- 10) 仲原節, 岡山医, 72, 109 (1966), *Res.*, 16, 213 (1966).
- 11) LEMBERG, R. and LEGGE, J.W.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 18, 95 (1940).
- 12) 小笠原義光: 私信
- 13) 木村知博: 昭和43年度日本水産学会秋季大会講演要旨, p.59 (1968).