HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉の生化学的研究：第3報 褐変ホタテ貝柱より分離した一着色物質について
Author(s)	飯田, 優; 大石, 圭一; 村田, 喜一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 15(2), 103-115
Issue Date	1964-09
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23221
Type	bulletin (article)
File Information	15(2)_P103-115.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物筋肉の生化学的研究

第3報　褐変ホタテ貝柱より分離した一着色物質について

飯田　優・大石圭一・村田喜一
（青森県水産物加工研究所）（北海道大学水産学部水産食品化学教室）

Biochemical Studies on Muscle of Sea Animals

III. On a compound isolated from discolored *Hotate-kaibashira*, dried adductor muscle of scallop (*Pecten yessoensis*)

Atsushi IIDA, Keiichi OISHI and Kiichi MURATA

Abstract

Hotate-kaibashira (dried adductor muscle of scallop), while storing, often deteriorates in color and becomes brown and dark. Almost the same phenomenon was observed in white flesh of fish[1~12,22] and other marine animals,[3,24,25] but the phenomenon has not yet been investigated sufficiently. The present authors succeeded in the crystally isolation of a purified brown product from artificially discolored *Hotate-kaibashira* by the following procedure: non-protein fraction of aqueous extract from *Hotate-kaibashira* was purified mainly by Dowex 50W-X2 column and DEAE-cellulose column. The crystal compound is reddish brown in color. It was proved as a peptide by color test, and hydrolysed into leucine, valine, alanine, glycine, serine, arginine, lysine, and glutamic acid, and two unknown components. They were detected paperchromatographically.

白色魚介肉の乾燥製品や加熱製品は，主に貯蔵期間中に赤茶色に変色するが，従来この褐変現象の機構を考える上にメラード反応が適応されて，筋肉の褐変に関連した還元糖や含糖化合物並びにアミノ酸の消長が検討されると共に[1~7]，肉エキス中のカルボニル化合物や肉組織中の油脂が自働酸化して生成したカルボニル化合物が肉蛋白質構成アミノ酸と反応して起る蛋白質自体の着色が採り上げられており[8~12]，こうした蛋白質の着色，特に可溶性蛋白質の着色が白色肉褐変の主体をなすものとされている[7]。これらの研究の結果や，アミノ基とカルボニル基について行なわれたメラード反応のモデル的研究の結果[13~21]によると，褐変を起し易いものとして単体またはペプチド結合中のリジン，アルギニン，ヒスチジン等のアミノ酸及びリボース，アセトアルデヒド，クロトンアルデヒド等のカルボニル化合物が挙げられているが，これらのもの以外のアミノ酸やカルボニル化合物もまた，程度は少いながら褐変の素因となることは明らかである。そこで実際の白色肉製品にみられる褐変は，前記の如き蛋白質由来の着色を主体として，アミノ酸並びにペプチドに由来する着色も当然存在するものと推定されるし，また Jones[22] 氏が 1-メチルヒスチジンについて述べている如く，単独で褐変し得る物質も考えられ，白色肉製品の褐変の素因はある程度多元的なものと推察される。

しかしながら，これら褐変反応の結果として生成される着色物質や，着色関連物質については，

Chichester 氏[17]等や Hough 氏[23]等および永山氏[21]等がアミノ酸-糖反応系の褐変液中に生成した組成物質の検出や単離を行なっており，また永沢氏[24]がタラバガニ缶詰の褐変肉からアミノ酸，糖およびN・グルコシド等を構成単位とする螢光性無色物質を単離している他は，これらの物質の性質については余り知られていないのが現状である。

著者等はかねてより，ホタテ貝閉殻筋（以下貝柱と記す）の煮乾品（以下乾貝柱と記す）が保存中に褐変することについて，その防止法を目的とした着色機構の解明を行なっているが，前報[25]では主に乾貝柱の着色と pH の関連について述べた。その後更に褐変物質生成機序の手掛りを得るために，褐変の結果生成される着色物質の本体を究明せんとして，今回は先づ加熱乾燥することによって人工的に褐変させた乾貝柱から，その着色物を分離することを試みた。即ち褐変貝柱を水抽出して濁濁した黄橙色の抽出液を調製し，この液を過塩素酸処理して蛋白部を沈澱させ，黄橙色の透明液を得た。この液を HR 形強酸性カチオン交換樹脂で処理して樹脂に吸着される着色成分を集め，これを更に三分画したのち，着色度の最も高いフラクションについて精製を行ない，赤茶色のペプチドを結晶状に分離した。このものは酸加水分解によってロイシン，バリン，アラニン，グリシン，セリン，アルギニン，リジン，グルタミン酸等8種のアミノ酸と，ニンヒドリン反応陽性の二つの未知成分に分解されることを確認し，更にそのものの性質について若干の知見を得たので，以下その研究結果について報告する。

実験結果および考察

1） 褐変貝柱の調製

昭和37年1月上旬に青森県陸奥湾において漁獲された鮮度良好なホタテ貝を原料として，その266個体より貝柱を摘出し，これらの筋肉を予め 100°C に加温保持しつつある恒温器内に於いて，延べ22時間加熱乾燥を行なった。加熱当初に多量の液汁が放出されたが，これらの液汁は逐次除去して貝柱と接触することを避けた。貝柱は水分 20%以下となって急速に変色し始めたが，更に水分が7乃至 10%となる迄加熱乾燥を行なって，約 1.9 kg の乾貝柱を得た。これらの乾貝柱はいわゆる赤茶色に着色しており，その褐変程度は前報[25]の着色度で表示すると 30.5 乃至 33.0 であり，また日本色彩研究所発行の『色の標準』によって判定した色相-彩色-明度は 5-4-13 (brown), 5-3-13 (brown) および 5-3-12 (dark brown) の範囲であった。

2） 着色物質の抽出と分画

i） 抽出液

上記の乾貝柱 1.9 kg を磨砕したのち，延べ 30 l の水で繰り返し抽出を行ない，黄橙色の濁濁液を得た。この際抽出残渣にはなお黄緑色が残るが，それらはもはや水で抽出されなかった。抽出液は氷冷攪拌しつつ，20%過塩素酸を終濃度 5%となる迄徐々に加えて静置し，淡黄緑色の蛋白部を沈澱させて，その上澄液をハイフロ・スーパー・セル層で濾過したのち，氷冷攪拌しつつ 10%苛性カリで pH 7.0 に中和し，生ずる過塩素酸カリの沈澱を濾別すると黄橙色の透明な液が得られたので，この液を着色成分分画用の試料とした。

ii） 着色の分画

試料液中の着色物のうち HR 形強酸性カチオン交換樹脂に吸着されるものを集め，更にこれを三つの粗成分に分画した。即ち試料液を Dowex 50W-X2 (H^+) (ϕ3.0×125.0 cm, 50×100 mesh) のカラム (10 本) に 1.0 cc/分の流速で流すと，着色物の大半はカラム上縁部に吸着されて赤茶色のバンドを形成するが，このバンドは試料液の流入を継続することにより，Fig. 1 に示した如く三つのフラクション（以下各々 Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3 と記す）に展開しつつカラムを降下するので，そのま

ま試料液を貫流させて各フラクションの採取を行なった。なお，このカラムに吸着されない着色成分は，当然 Fr. 1 の着色液が溶出する以前に流出し始め，流下液が極く淡い黄橙色に着色するので，この流下液の着色開始から Fr. 1 の先端が溶出する迄の液を回収してこれを Fr. 4 とした。以上の方法によって得られた各フラクションの収量と，各フラクションを 5%苛性カリ水溶液で pH 7.0 に中和した際の着色程度を Table 1 に示した。

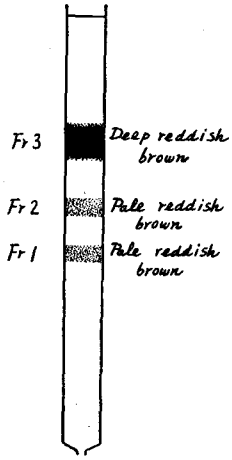

Fig. 1. The position of colored components on a column of Dowex 50W-X2 (H^+ ion type)

Table 1. Colored fractions separated with the method of frontal analysis through the colume of Dowex 50W-X2 (H^+ ion type)

Fraction number	1	2	3	4*)
Color**)	8-4-19～8-5-19 pale yellow ～yellow	7-5-18～8-5-19 reddish yellow ～yellow	7-5-17～8-5-18 dark yellow ～reddish yellow	8-3-19 pale yellow
E-value at the wave length of 400 mμ***)	0.424	0.532	0.930	0.226
Appr. yield (1)	3.2	3.0	7.0	30.0

*) Fraction 4 is non adsorbed fraction.
**) Judged by "Color Standard" (Japan Color Research Institute), and exhibited in the form of Color-Brilliance-Hue. The names of their color was judged at pH 7.0.
***) E-value at the wave length of 400 mμ was measured on each fraction at pH 7.0.

3) Fr. 3 の着色物の精製と結晶化

Table 1 の結果について Fr. 3 は Fr. 1 と Fr. 2 に比較すると，収量と着色程度が共に優越しており，上記の HR 形樹脂に吸着される着色物の主体をなすものと認められたので，以下 Fr. 3 の着色物について精製を行なった。

i) イオン交換樹脂カラムによる核酸成分等の除去

Fr. 3 の液の一部を 5%苛性カリ水溶液で pH 7.0 に中和して吸収スペクトルを測定し，その結果を Fig. 2 に示した。可視部の波長には特異的な吸収が認められなかったが，紫外部には 264 mμ 付近にピーク (E-value=11.22) を有する吸収帯が認められたので，先報[26]で記したと同様の方法で半定量的に核酸成分についてのペーパークロマトグラフィーを行なったところ，多量の AMP, Adenosine および Adenine の混在が検出された。

予備試験：先づイオン交換樹脂カラムを用いて，着色物よりこれらの核酸成分を分離除去する方法を検討した。着色物は強塩基性アニオン交換樹脂の Dowex 1, Dowex 2 の RCl 形，RSO_4 形，RCO_3

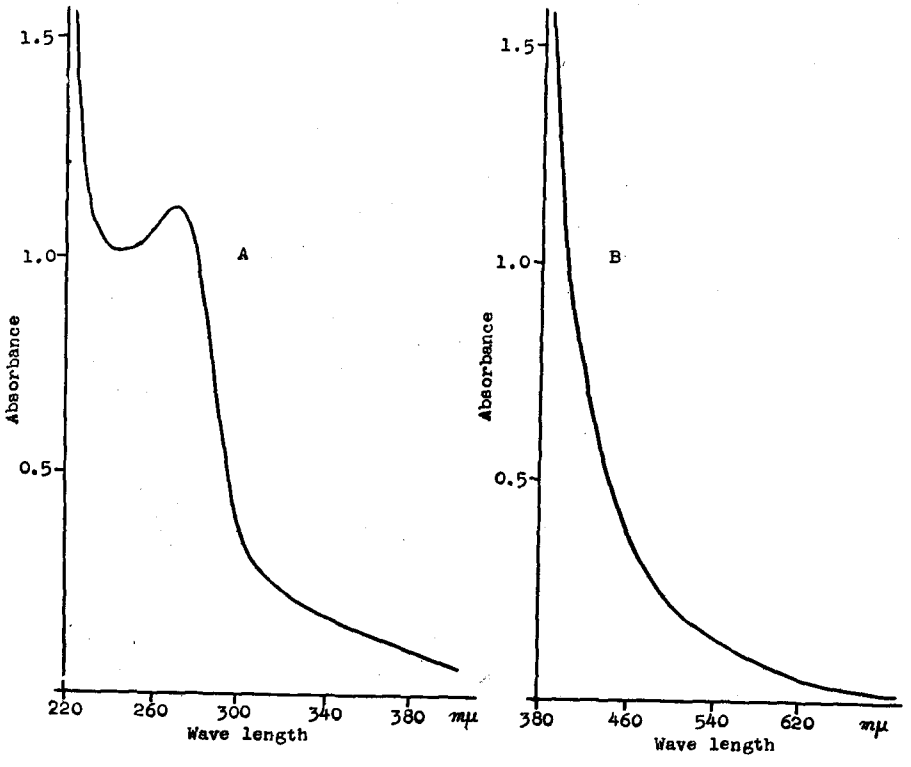

Fig. 2. Absorption spectra of fraction 3 (Fr. 3) at pH 7.0. Fig. 2-A shows figure at ultraviolet region, and Fig. 2-B at visible region. Their colors were as follows: A···pale yellow, and B···reddish yellow

形または ROH 形にはいずれも不可逆的に吸着されて回収不能となったが，前述の Dowex 50W-X2 の HR 形カラムに吸着させてから，先づ塩酸溶液で核酸溶液を溶出させ，次いで着色物を苛性アルカリ溶液で溶出することで両成分を分別採取することが出来た。

精製操作: Fr. 3 の 5.1 l を Dowex 50 W-X2 (H^+) (ϕ3.0×125.0 cm, 50～100 mesh) のカラム (5 本) に 1.0 cc/分の流速で流入し，着色物をカラム上縁部に赤茶色のバンドとして吸着させたのち，2N-HCl を流してその流下液の吸収スペクトルを測定し，260 mμ 付近の吸収極大が消失する時期を以って核酸成分溶出の後端とみなした。しかしながら，そののちの流下液の吸収スペクトルは 275～285 mμ と 310～320 mμ とに夫々吸収極大を示すので，流下液の吸収スペクトルにこれらの吸収がみられなくなる迄 2N-HCl の流入を続けた。以上の操作によって，着色物のバンドは溶

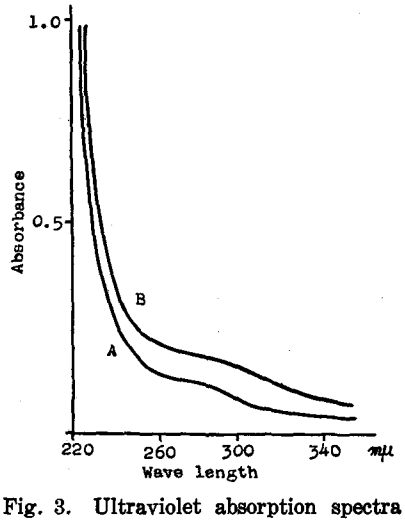

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of fraction 3-I (Fr. 3-I) at pH 1.0 (A), and pH 7.0 (B)

離も展開もせずにカラム上に残るが，このバンドはカラムを充分水洗してから 0.2N-KOH で溶離し，橙赤色の液 3.7 l として回収した。この溶液中の着色物は更に上記同様の HR 形樹脂にバッチ法で吸着させ，0.2N-KOH で溶離して液量を 560 cc (pH=10.5) に濃縮した。(以下この液を Fr. 3-I と記す)。この Fr. 3-I の液の一部を稀過塩素酸液で中和してから減圧濃縮し，そのシロップ状の液について前述の方法でペーパークロマトグラフィーによる核酸成分の検出を行なったが，既に核酸成分の存在は認められなかった。またこの液を稀過塩素酸液で pH 7.0, pH 1.0 として吸収スペクトルを測定したが，その結果は Fig. 3 に示す通り 260 mμ 付近の吸収極大は消失して，250～300 mμ にかけて shoulder のある吸収が認められた。

ii) イオン交換樹脂クロマトグラフィーによる Fr. 1, Fr. 2 等の除去

Fr. 3-I の着色液にはなお Fr. 1, Fr. 2 および Fr. 4 等が含まれているので，これらを次の方法で分離除去した。

精製操作: Fr. 3-I の液 550 cc を水で 2.3 l に稀釈して液中のカリウムイオン濃度を 0.2 モル以下としたのち，クエン酸溶液で pH を 2.2 に規整した。別に Dowex 50W-X2 (K^+) (ϕ2.4×62.8 cm, 50～100 mesh) のカラムを pH 3.8 の 0.2M-クエン酸カリ緩衝液で緩衝化しておき，これに上記の液を 1.0 cc/分の流速で流入すると，着色物はカラム上縁部に赤茶色バンドとなって吸着された。このカラムは上記の緩衝液 2 l で洗い，ひき続き pH 4.25 の 0.2M-クエン酸カリ緩衝液を流すと，3 つの淡黄橙色のバンドが相次いで溶離展開するので，これらのバンドを完全に溶出させ，次いでカラム上に残った Fr. 3 のバンドは pH 7.4 の 0.2M-燐酸カリ緩衝液で溶離し，これを濃赤茶色の溶出液 200 cc として回収した。(以下この液を Fr. 3-II と記す)。

iii) Fr. 3-II の着色物についての吟味

半透膜に対する透過性: 予備試験的に Fr. 3-II の液 10 cc を透析膜 (Visking seamless cellophane tubing) に採り，水道水に 48 時間，次いで毎回 20 倍量の蒸溜水に対して 6 時間宛 4 回換水して透析を続けたが，着色物は透析されずに膜内に残り，その赤茶色の透析内液はビューレット反応陽性であった。

ペーパークロマトグラフィー: 上記の透析内液の一部についてブタノール・酢酸・水 (4:1:2)，ブタノール・酢酸・水 (200:30:75) およびブタノール・エタノール・水 (40:11:19) 等 3 種の溶媒で

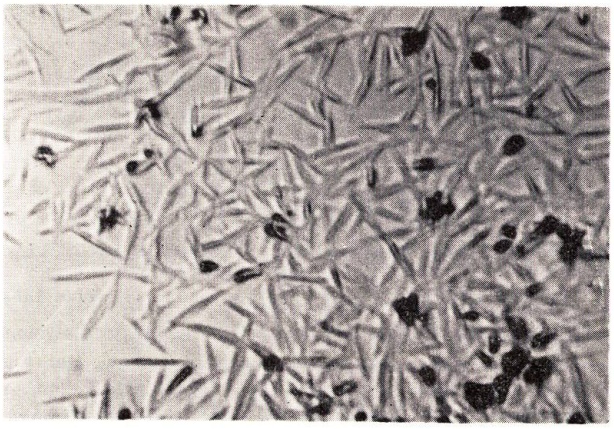

Fig. 4. Microphotograph of copper salt of colored substance extracted from dark brown *Hotate-kaibashira*

一次元ペーパークロマトグラフィーを行なったが，着色はいずれの場合も原点に留まり，各ストリップにニンヒドリン試薬，BPB 試薬[28]を反応させると，いずれのクロマトグラムも着色物のスポット相当部のみが夫々紫色，青色に顕色し，その他にこれら両反応が陽性であるものは存在しなかった。また 20%硫安水溶液を溶媒として塩析型クロマトグラフィーを行なうと，着色成分は Rf 0.7～0.8 の部分に展開し，このストリップに BPB 試薬を反応させると着色物相当部は青色に顕色したが，他に反応を呈するものは存在しなかった。

銅塩の調製: Fr. 3-II の液の半量 100 cc を透析膜に採り，前述の要領で水に対して透析したのち常法によって銅塩の調製を行なった。即ちこの液に新しく調製した水酸化銅の過剰量を加えて沸騰水浴中に 15 分間加温したのち保温濾過し，得た青緑色の濾液を半透膜に採り常温下に風を送って濃縮し，次いで減圧デシケーター中で約 5 cc 迄濃縮した。液は極めて濃厚な青緑色を呈していたが，これにメタノールを加えることにより Fig. 4 に示す様な青緑色の桿状結晶が析出したので，これを集めて水-メタノールから再結晶させて乾燥し，約 0.3 g の銅塩粗結晶を得た。

吸収スペクトル: 透析液と銅塩水溶液について紫外部と可視部の吸収スペクトルを測定し，Fig. 5 にその結果を示した。透析液は 250～300 mμ にかけて shoulder が認められたが，可視部には特異的な吸収帯がなく，一方銅塩は紫外部の shoulder が認められず，615 mμ 付近にピークを有する吸

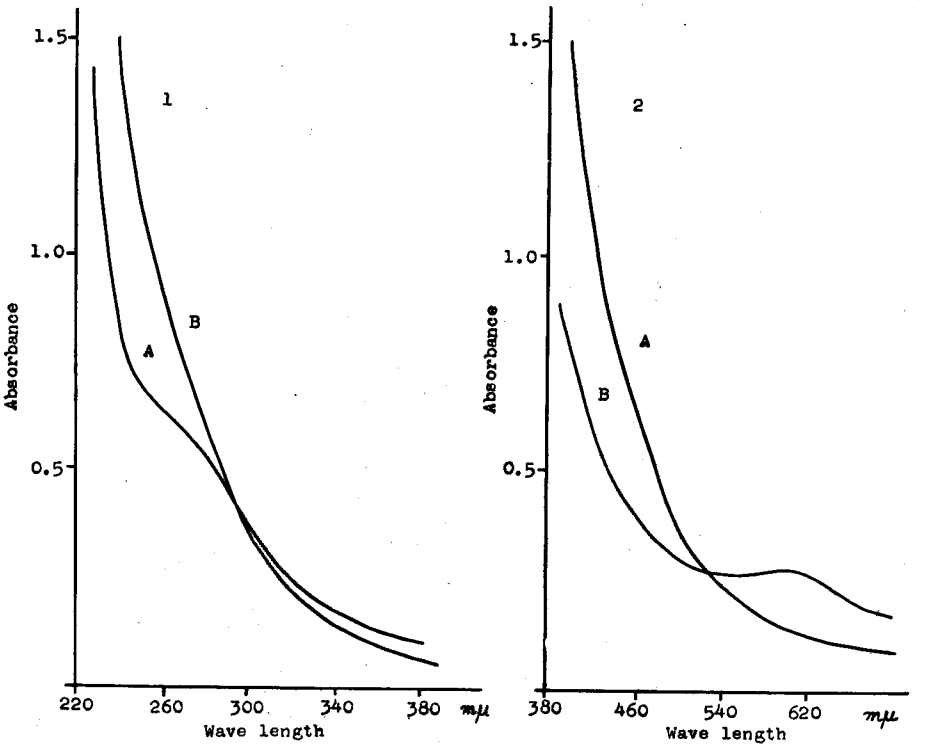

Fig. 5. Absorption spectra of fraction 3-II (Fr. 3-II). A, after dialysing, and B, copper salt, and Fig. 5-1 shows figure at ultraviolet region, and Fig. 5-2 at visible region. Their colors were as follows: 1-A···very pale yellow green, 1-B···very pale yellow green, 2-A···reddish brown, and 2-B···pale yellowish green or pale green

収帯がみられた。また銅塩粗結晶について赤外線吸収スペクトルを測定し，Fig. 8 にその結果を掲げた。

濾紙電気脈動：透析液と銅塩について pH 8.6 (μ=0.05) のベロナール緩衝液を電解質として濾紙泳動を行なった。東洋濾紙 No. 51 (12×40 cm) を用い，250 V で 4 時間泳動させると，着色成分はいずれも赤茶色の単一なバンドとして陽極側に移動し，その着色成分のバンドはニンヒドリン試薬[25]と BPB 試薬のどちらにも陽性であったが，陰極側には，この両試薬に対して顕色する 3 個の無機成分が夫々僅少量ながら検出された。

iv) DEAE-セルローズクロマトグラフィーによる精製

Fr. 3-II の溶液中に存在する着色物は，前項〔iii〕の結果によってペプチド状のものであると推定されるに至った。しかし濾紙泳動の結果によると，この溶液中には着色成分の他に上記の如き夾雑物が認められたので，これらを除去するため，斉藤氏[27]等の方法に準じて次のように DEAE-セルロズカラムによる精製を行なった。

精製操作：Fr. 3-II の残液 100 cc を前項の要領で水に透析して脱塩したのち，透析膜に採って常温下に風を送って濃縮，次いで減圧デシケーター中で乾涸して赤茶色の不定形物質 0.44 g を得た。このものと銅塩粗結晶の 0.22 g を合して pH 7.0 の 0.005M-燐酸カリ緩衝液 500 cc に溶解し，透明な赤橙色の液とした。別に DEAE-セルローズのカラム (ϕ2.4×17.4 cm) を前記同様の pH 7.0 の 0.005M-燐酸緩衝液で緩衝化しておき，これに上記の液を流速 1.0 cc/分で流入して，着色物をカラム上縁に赤茶色のバンドとして吸着させた。銅イオンと夾雑物は吸着されずに流下したが，ひき続いて pH 7.0 の 0.005M- および 0.05M-燐酸カリ緩衝液を順次 2 l 宛を流して，250～300 mμ に亘って shoulder を有つ無色物質を除いた。カラム上に残った着色物のバンドは 1.0M-NaCl を流して溶離し，濃厚な赤茶色の溶出液 40 cc として回収した。(以下この液を Fr. 3-III と記す)。

v) 結晶化

Fr. 3-III の液 40 cc を透析膜に採り，前回の要領で透析して脱塩した。この際少量の橙色沈澱が生じたので，これを濾過して除いた。得られた赤茶色の透析内液を稀酢酸で pH 4.0 とし，これを激しく攪拌しつつ飽和硫安水溶液を滴加してコロイド状の溷濁を生ぜしめ，氷室に放置すると Fig. 6 に示す様な微細な立方体状の結晶が析出した。結晶はやや淡い赤橙色を呈しているが，遠心分離して

Fig. 6. Microphotograph of crystalline colored substance isolated from dark brown *Hotate-kaibashira*

これを集めると赤橙色乃至赤茶色の沈澱として得られた。しかしてその上澄液はなお着色し，溷濁しているので，飽和硫安の添加による結晶の生成と結晶分離の操作を，母液が淡黄緑色となる迄繰り返し行なった。ここで得られた着色物の沈澱は合して水に透析して溶解し，再び結晶化の操作を繰り返えした。結晶が析出する硫安濃度は pH 4.0 の条件下で 0.2 飽和から 0.6 飽和の範囲であり，また pH を調整せずに硫安を加える場合や，単に pH を 3.8～3.9 に下げた場合にも不定形の沈澱が得られたが，結晶は生成しなかった。得られた結晶は合して濾紙パルプ層で減圧濾過し，pH 4.0 の 0.65 飽和硫安溶液で充分洗滌して，湿潤重量約 0.5 g の沈澱として集めた。

4) 結晶性着色物質の性質について

Fr. 3-III の液から上記の如く結晶化した着色物質について色調を観察し，またその濾紙電気泳動的性質や吸収スペクトルの状態を調べ，更にその加水分解物について検索を行なった。なお着色物を分析に供するに当っては結晶の沈澱を前述の要領で透析して脱塩したのち，減圧デシケーター内で乾燥した乾燥着色物を供試した。

i) 色調について

着色物の色調を前述の『色の標準』によって色相-彩色-明度を判定しつつ観察し，次の如き結果を得た。即ち着色物は reddish brown (3-6-14～3-7-14) または reddish orange (3-6-15～3-7-15) の母液から結晶させると，pale reddish orange (3-5-17) 乃至 light reddish orange (3-6-17) の結晶として得られたが，これを遠心分離するかまたは濾紙パルプ層上に濾過するかして集めると，視覚的な色調は濃厚となり，reddish brown (3-5-14) 乃至 dull reddish orange (3-5-15) の沈澱として得られた。またこの沈澱は水に易溶性であり，約 50 倍量の水に溶解するときは reddish brown (3-6-14～3-7-14) の水溶液となった。この液を透析膜に採って透析して脱塩しても，液の視覚的色調は変わらないが，これを減圧デシケーター中で乾燥すると，透明な赤茶色即ち reddish brown (3-6-13) の不定形物質が得られた。このものを約 40 倍程度の水に溶解するときは透明な赤茶色即ち reddish brown (3-6-13～3-6-14) の水溶液が得られるが，これに水を加えて次第に液を稀釈してゆくと，dull reddish orange (3-7-15～3-6-16) から次第に赤味を失って，500 倍稀釈程度で dark yellow (8-5-17) 乃至 yellow (8-4-18) となり，更に pale yellow (8-3-19) 乃至 pale yellow green (9-3-19) と変

Table 2. Color reaction of crystalline colored substance

Reaction or reagent	Color reaction	Remarks
Biuret's	Blue	Same as protein and peptide
Ninhydrin[28]	Bluish gray	Same as protein, peptide and amino acid
Bromphenol blue -$HgCl_2$ [28]	Blue	Same as protein and peptide
Silver nitrate[28,36]	Gave a white color	Differs from reduced substance which shows gray
KIO_4-Schiff's-H_2SO_3 [28]	No reacted	Differs from glucoprotein or polysaccharide which shows red
Ammonium molybdate[29]	No reacted	Differs from phosphate which shows purple

ってゆくのが観察された。

ii)　濾紙電気泳動

乾燥着色物質について前述と同様 pH 8.6 (μ=0.05) のベロナール緩衝液を電解質として濾紙電気泳動を行なったが，着色成分は陽極側に移動し，赤橙色の単一な像を形成した。得られたクロマトグラムに各種呈色試薬を噴霧してその反応を検討したところ，着色成分の像は前述の結果と同様ニンヒドリン試薬と BPB 試薬に反応を示して，夫々緑青色，青色に顕色して Fig. 7 に示す如きクロマトグラムを得た。これらのクロマトグラムは蛋白結合多糖類の検出試薬[28]に反応せず，又着色部は還元糖の硝酸銀試薬[28),36)] によって白斑となったがその呈色反応の結果をまとめて Table 2 に示した。

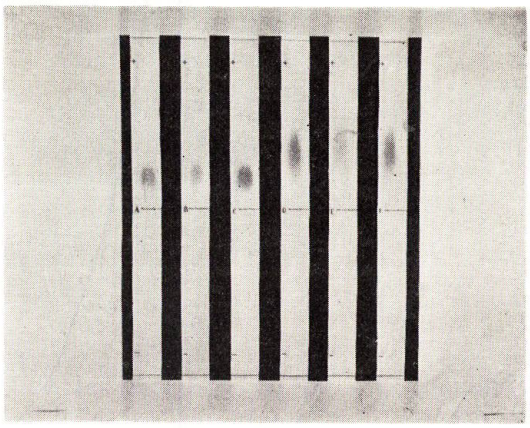

Fig. 7.　Paper electrophoretic patterns of crystalline colored substance isolated from dark brown *Hotate-kaibashira*. Veronal buffer (pH 8.6, μ=0.05), 0.3 mA/cm; 260 V–210 V; A, B and C, 2 hrs; D, E and F, 4 hrs. The strip was reacted with reagents as follows: A, D···ninhydrin. B, E···control, i.e., No reagent reacted, but heated. The positions of colored band were apeared distinctly. C, F··· bromphenol blue solution

iii)　吸収スペクトル

乾燥着色物質について赤外線吸収スペクトルを測定し，その結果を銅塩粗結晶のスペクトルと比較

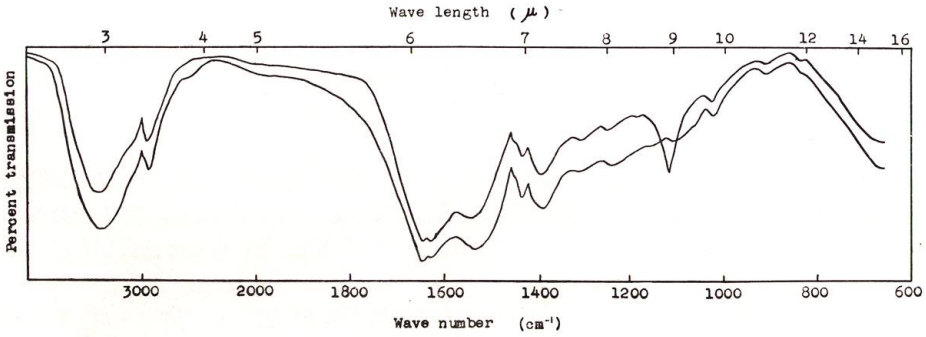

Fig. 8.　Infrared spectra of crystalline colored substance (below) and its copper salt (above)

して Fig. 8 に掲げた。また同じく着色物乾燥体の水溶液について紫外部および可視部の吸収スペクトルを測定し，その結果を Fig. 9 に掲げたが，可視部には特異的な吸収帯はなく，紫外部の 250～300 mμ に亘って緩慢な shoulder が認められた。

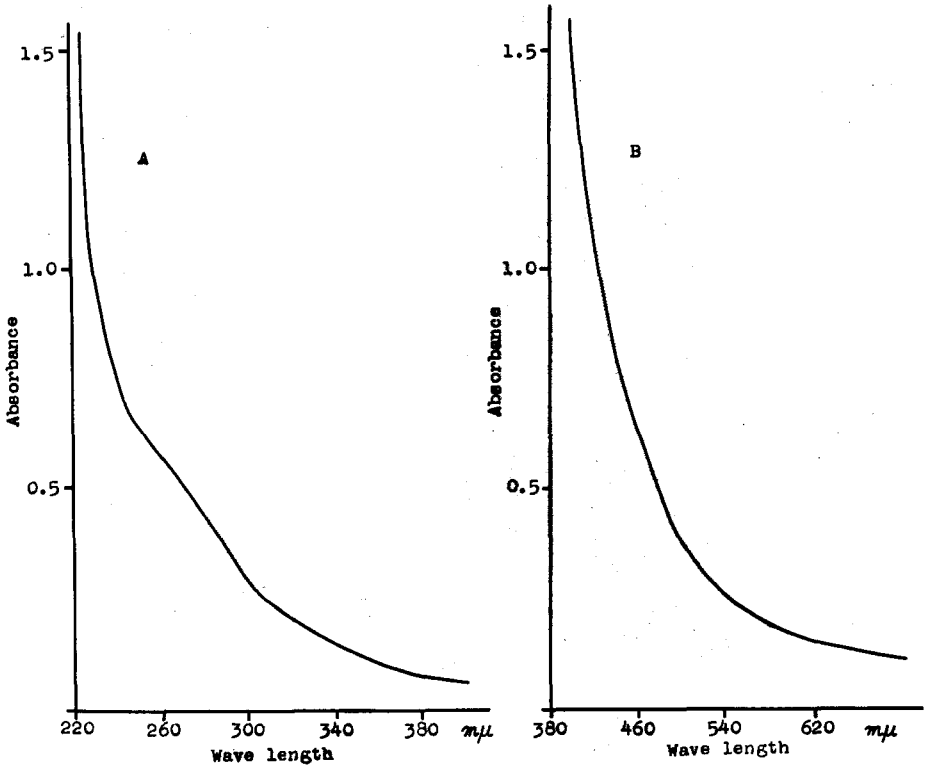

Fig. 9. Absorption spectra of crystalline colored substance isolated from dark brown *Hotate-kaibashira*. Fig. 9-A shows figure at ultraviolet region, and Fig. 9-B at visible region. Their colors were as follows: A···pale yellow, and B··· reddish yellow

iv) 酸加水分解物のペーパークロマトグラフィーによる検索

以上の様にいろいろ検討を行なった結果，単離された着色物質はペプチド状の物質であることが明らかになったので，その構成単位成分を解明するため，着色物の加水分解物をペーパークロマトグラフィーで検索した。

加水分解：乾燥着色物質約 50 mg を 30 倍量の 2N-HCl と共に封管内に採り，100°C の恒温器中に 10 時間保って分解を行なった。分解終了後に内容液を採り出して減圧下に減圧乾燥したのち，水を加えて再び濃縮乾涸を行ない，この操作を更に 5 回反覆して出来るだけ塩酸を除去して試料とした。

ペーパークロマトグラフィー：この試料について東洋濾紙 No. 51 を用い，ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) を展開溶媒とする一次元クロマトグラフィー，フエノール・アンモニア水 (4:1) を一次元側，ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) を二次元側の展開溶媒とする二次元ペーパークロマトグラフィー

を行なった。得られたクロマトグラムの組成分は，ニンヒドリン試薬とクロール・ヨード澱粉試薬[30]のほか，各種のアミノ酸検出試薬その他の試薬で反応させて同定し，存在が推定されたものは試料とその純品を混合展開して確認を行なった。即ちアルギニンは坂口反応[31]を，セリンは過沃素酸・ネスラー試薬[32]を夫々反応させて存在を推定確認したが，ジアゾ試薬[33]，エールリッヒ試薬[34]，FPR[35]に対する反応は凡て陰性であり，従ってイミダツオール，インドール，フェノール等の化合物は検出されず，また硫黄化合物はニトロプルシドソーダ・シアンソーダ試薬[36]と沃化白金酸試薬[37]を，プロリン，オキシプロリンはイサチン試薬[34,37]とワニリン試薬[38]とを夫々反応させたが，共に検出されなかった。その結果 Fig. 10 に示したように，ロイシン，バリン，アラニン，グリシン，セリン，アルギニン，リジンおよびグルタミン酸等8種のアミノ酸の存在を確認し，他にニンヒドリン反応陽性の2個の不詳スポットを認めたが，以上の加水分解物の組成から，今回単離された着色物質は或る種のペプチドであると思われる。なお上記の未知スポットはアンモニア性硝酸銀を反応させると共に白色斑となるが，これらの性質については検討を続け次報に報告の予定である。

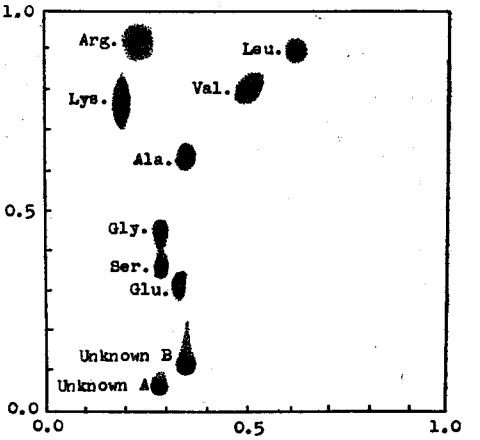

Fig. 10. Paper chromatogram of the hydrolysate. Solvent system: First dimension (vertical axis), phenol-water (ammoniacal) (4:1) Secondary dimension (horizontal axis), *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:2). Reagent: Ninhydrin in acetone

吟味：既に述べた如く，アミノ酸のうちでも特にリジン，アルギニンおよびヒスチジンは褐変し易く，褐変に際して消費され易いものとされているが，この様に褐変によって着色したペプチド中になおリジン，アルギニンが検出されたと云うことは，アルギニン，リジンを含むこれら8種のアミノ酸の他に，更に一層褐変し易い例えばヒスチジンの様なアミノ酸が存在しており，これがリジン，アルギニンに先立って消費されてしまったか，または褐変に際しては同じリジン，アルギニンであっても，末端基として存在するものでなければ消費されず，従ってアミノ基がペプチド結合して存在していたリジンやアルギニンが検出されたものか，そのいずれかであると推定される。また以上の組成分の検索結果からは，このペプチドが何故赤茶色の色調を呈するのか，その着色機構乃至は呈色機構に関する手掛りは得られていないが，それは上記の未知構成組成分の存在に起因するとも考えられるので，これらの点について今後更に検討されるべきものと考えられる。

要　　約

1) 加熱乾燥によって人工的に褐変させたホタテ乾貝柱から，褐変の本体である着色物質の一つを結晶状に単離し，このものの性質について二三検討を加えたので，その分離方法と今迄明らかになった性質について記載した。

2) 単離された着色物質は赤茶色を呈し，水に溶けて赤茶色の水溶液となるが，普通に色素と呼ばれているものとは異って，その吸収スペクトルは可視部波長の全域に亘って特異的な吸収帯を持たず，また紫外部吸収スペクトルは 250～300 mμ に緩慢な shoulder が認められた。

3) 単離された着色物質は呈色反応やその加水分解物の検索結果からペプチドであることが認められ

た。即ち加水分解物をペーパークロマトグラフィーによって検索した結果，構成組成分としてロイシン，バリン，アラニン，グリシン，セリン，アルギニン，リジンおよびグルタミン酸等8種のアミノ酸を確認し，他にニンヒドリン反応陽性の2個の未知スポットの存在を認めたが，これらの未知成分についてはニンヒドリン反応陽性ということ以外にその性質は知り得ていない。また着色物質の着色乃至呈色の機構に関する手掛りはこれら加水分解物の組成からは未だ得られていないが，この未知構成組成分の究明と共に，この機構の解明を継続して行なう予定である。

本研究において御援助を頂いた北海道大学高木光造助教授，青森県水産物加工研究所荒木功所長に対し，深く謝意を表する。

文　　献

1) Tarr, H. L. A. (1953). *Nature*, **171**, 344.
2) ——— (1954). *Food Technol.*, **8**, 15.
3) Nagasawa, Y. (1958–'59): *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 535; **24**, 816; **24**, 900; **24**, 971; **24**, 976.
4) Jones, N. R. (1959). *Nature*, **24**, 704.
5) 永山文男 (1959). 日水誌 **24**, 833.
6) ——— (1962). 同誌 **28**, 1188.
7) ——— (1960). 同誌 **26**, 1026.
8) Tarr, H. L. A. (1950). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **8**, 74.
9) ——— (1948). *Progress. Rept. Pacific Coast Stans., Fish. Res. Bd. Canada*, **74**, 17.
10) ——— (1952). *Ibid.*, **92**, 23.
11) 豊水正道・折田不折・富安行雄 (1963). 日水誌 **29**, 1037.
12) 小泉千秋・黒部宗市・野中順三九 (1959). 同誌 **25**, 368.
13) Friedman, L. & Kline, O. L. (1950). *J. Biol. Chem.*, **184**, 599.
14) Hannan, R. S. & Lea, C. H. (1951). *Nature*, **168**, 744.
15) Giri, K. V., Rama Rao, P. B. & Rajagopalan, R. (1952). *Food Res.*, **18**, 217.
16) Hodge, J. E. (1953). *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 928.
17) Chichester, C. O., Stadman, F. & Mackinney, G. (1952). *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3418.
18) Willits, C. O., Underwood, J. C., Lento, Jr., H. G. & Ricciuti, C. (1958). *Food Res.*, **23**, 61.
19) Lento, Jr., H. G., Underwood, J. C. & Willits, C. O. (1958). *Food Res.*, **23**, 68.
20) 永山文男 (1960–'62). 日水誌 **26**, 1107; **27**, 28; **27**, 34; **27**, 158; **28**, 45; **28**, 49.
21) ——— (1962). 同誌 **28**, 165.
22) Jones, N. R. (1956). *Nature*, **177**, 748.
23) Hough, L., Jones, J. K. N. & Lichards, E. L. (1952). *J. Chem. Soc.*, 3854.
24) Nagasawa, Y. (1960). *Memoirs of the Fac. of Fish. Hokkaido Univ.*, **8**, 1–98.
25) 飯田優・荒木功・村田喜一・大石圭一 (1961). 北大水産彙報 **12**, 239.
26) 飯田優・荒木功・村田喜一 (1961). 同誌 **12**, 151.
27) Saitō, T., Ishihara, Y., Maita, Y. & Itō, Y. (1962). *Jap. Soc. Sci. Fish.*, **28**, 1015.
28) 森五彦・小林茂三郎 (1960). 濾紙電気脈動法の実際. 〔356 p.〕. 東京; 広川書店.

29) Burrows, S., Grilis, F. S. M. & Harrison, J. S. (1952). *Nature*, **170**, 800.
30) Rydon, H. N. & Smith, P. W. G. (1952). *Nature*, **169**, 922.
31) Acher, R. & Crocker, C. (1952). *Biochem. Biophys. Acta.*, **9**, 704.
32) Consden, R., Gordon, A. H. & Martin, A. J. P. (1946). *Biochem. J.*, **40**, 33.
33) Baldridge, R. C. & Lewis, H. B. (1953). *J. Biol. Chem.*, **202**, 169.
34) Smith, I. (1953). *Nature*, **171**, 43.
35) Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). *J. Biol. Chem.*, **73**, 627.
36) Toennies, G. & Kolb, J. J. (1951). *Anal. Chem.*, **23**, 823.
37) Saifer, A. & Oreskes, I. (1954). *Science*, **119**, 124.
38) Curzon, G. & Giltrow, J. (1953). *Nature*, **172**, 356.
39) Partridge, S. M. (1948). *Biochem. J.*, **42**, 238.