

シラスに含まれるメラニン色素の定量法

部 伸 ・ 石 川 和 芳 ・ 浜 田 篤 信

メラニンとは生物が作り出した全ての黒色ないし褐色色素の総称であり、きわめて広範囲にわたる物質である(及川;1976)。ここで問題にしようとするメラニン色素はいわし類の稚魚であるシラスに含有されている黒色色素である。シラスがしらす干しに製造される工程で、外観を黒化させ、品質の低下を招くところから、水産加工業にとって重要である。しらす干しの品質を問題とする場合に、黒化の防止は、かつては、過酸化水素を用いるなどの対策研究と対策技術の開発が行われてきたが、最近の食品添加剤規制の強化によって、それらの技術は使用不可能となった。このような状況のなかにあって、しらす干しの品質向上に係る技術開発は、対処療法的な技術よりは、外見にとどまらず黒化の機構解明や黒化と製品の栄養物質組織との関係等の、より本質的な視点に立った、品質改良が必要と考えられる。

こうした視点にたつてシラスに含有されるメラニン色素を取り上げようとする訳であるが、メラニンの定量方法が確立されていない。メラニンの定量法については、酸、アルカリ等による加水分解後に重量法や比色法を用いて定量する方法があるが、操作が煩雑であり、数多い試料を問題とする場合には必ずしも最適の方法とは言い難い。ここでは、しらす干しの品質改良を目的に、その迅速測定法について検討を行ったので報告する。

方 法

1 試 料

シラスは大洗地先でしらす網で採集されたカタクチ・シラスで全長22-30mmのものをを用いた。

2 試料の調整

シラスを、その10倍量の純粋でガラス・ホモジナイザーをもちいてホモジナイズし、適宜希釈し、その一部(0.5-1ml)を試料とした。

3 測定値の単位

純粋のメラニンを得ることが出来なかったため、吸光度を用いた相対値による。

結果と考察

1 抽出方法の検討

10%ホモジナイズ液1mlに各種の溶媒、酸、アルカリを加えて抽出の良否を定性的に検討したところ、溶媒と30%苛性カリ水溶液では、殆ど抽出されなかったが、酸については、硫酸、塩酸、硝酸の原液でいずれも赤色状に抽出された。濃硫酸(以下に硫酸という)の吸光度が最も高い値を示したので硫酸を使用することにした。

2 測定に使用する波長と反応時間

10%ホモジナイズ液1mlに硫酸5mlを加えて1時間放置後に各波長で吸光度を測定したところ463nmに最大の波長が確認されたので、この波長を

用いることとした。

次に反応時間であるが、試料に硫酸を加えてからの経過時間と吸光度の関係を図示したものが図1である。反応直後に赤色の呈色が現れるが、吸光度は15分後に0.710、30分後に0.714、45分後に0.720、60分後の0.724と上昇し、長時間にわたって上昇し100時間後には反応直後よりも25%高い、0.901を示した。このように最初に大半のメラニンが硫酸に抽出されてはいるが、なお、極僅かずつ反応が継続している。そこで、硫酸を加えてから36°Cで1時間保ち、その後に463nmで比色定量することとした。

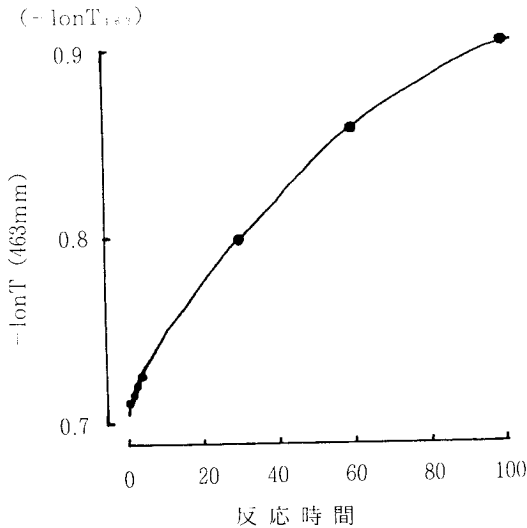


図1 シラスの10%ホモジナイズ液に硫酸を加えた時の吸光度

3 タンパク質、組織懸濁物質の妨害の除去

(1) 原理

シラス中のメラニンを以上の方法で定量しようとする、硫酸中で赤色ないし赤褐色の色を呈するのは、メラニン色素の他にタンパク質が関係するものと考えられる。この点を考慮して、試料の量は出来る限り少なくすることが望ましいが、タンパク質の呈色だけでなく、懸濁状にある組織も

吸光度にかかって来るために、誤差の原因となる。この懸濁物質はメラニンを含有しているから、遠心法や濾別することが出来ない。そこで次のような方法でこのようにして起こる誤差を取り除くこととした。

この反応で赤色ないし褐色を呈するのは色素とタンパク質の2つである。そこでタンパク質の呈色を補正する目的で、2本の試料の中の1本に過酸化水素水を添加してメラニンを分解し、その呈色を抑えた後に硫酸を加えたものを対照とする。これはメラニン抜ききのタンパク質だけの呈色であるから、この値を試験区から差し引けばメラニン起源の呈色だけを測定することになる。と同時に組織懸濁物質の妨害をも補正できる。

(2) 過酸化水素水の添加量の検討

メラニンの分解に要する30%過酸化水素水の適正量を求めるために、先の10%ホモジナイズ液を5倍に希釈し、その0.5mlを試料とし、これに30%の過酸化水素水0.01~0.1mlを加え15分後に硫酸5mlを加えて呈色させ吸光度を測定し図2の結

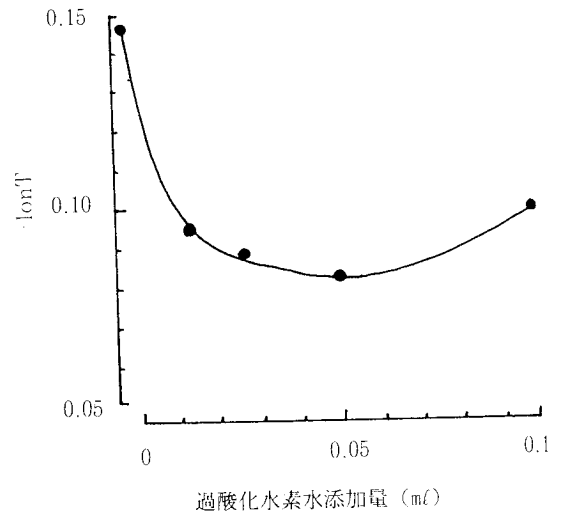


図2 過酸化水素水添加量がメラニンの呈色に及ぼす影響

果を得た。対照区では吸光度は0.15であるが、0.01ml添加区では吸光度は約1/2に低下し、0.025、0.05ml添加した区では更に低下し、0.05ml添加区で最低値を示した。0.1ml添加では若干ではあるが、吸光度が増大した。従って、対照とする空試験については試料0.5mlに対し30%過酸化水素水1滴(0.05ml)を添加し、メラニンを分解させればよいものと考えられる。

(3) 分解時間

試料0.5ml当たり1滴の過酸化水素水を添加すればよいことが分かったが、メラニンの分解に要する時間の検討が必要である。そこで10%ホモジナイズ液0.5mlに0.05mlの過酸化水素水を加え室温で静置してからの時間経過と硫酸添加後の吸光度との関係を検討した(図3)。

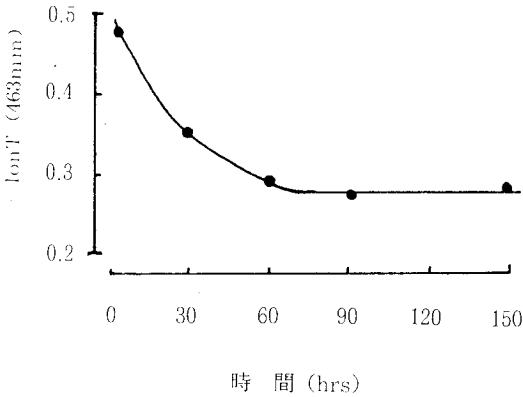


図3 過酸化水素水添加後の時間がメラニンの分解に及ぼす影響(36°C)

添加後30分では0.48であるが、時間経過に伴い分解が進み60分で平衡に達している。このことから、ホモジナイズした試料では、過酸化水素によるメラニンの酸化が速やかであり、60~90分の時間ではほぼ完全に分解され赤色を呈さなくなるものと考えられた。

4 メラニン色素の簡易定量法

試料はメラニンの分解を抑えるために0°Cに保存する。実験室に持ち帰り、氷冷下でガラス・ホモジナイザーを用いて10%ホモジナイズ水溶液を作成する。これを原試料とし必要に応じ、2~5倍に希釈して、その1mlを試料とする。1試料についてそれぞれ1mlの試料を加えた2本の試験管を用意し、片方には2滴の30%過酸化水素水を加え(対照)、もう1本には加えず、1時間室温に静置する。その後、濃硫酸5mlを加え36°Cに正確に1時間保った後に463nmの波長で吸光度を測定する。表現は1尾当たり、またはg当たりの吸光度を用いた相対値として表す。

5 測定例

ここで検討したメラニンの定量法が有効な手段であるかどうかを検討する目的でいくつかの実験を取り上げた。イキつはシラスの頭部、特に眼球中に含まれるメラニンの定量である。

二つ目の例としてしらす干し製品を取り上げ白度との関係を検討した。これらの事例はいずれも、メラニンの増減の傾向が肉眼によって確認出来る

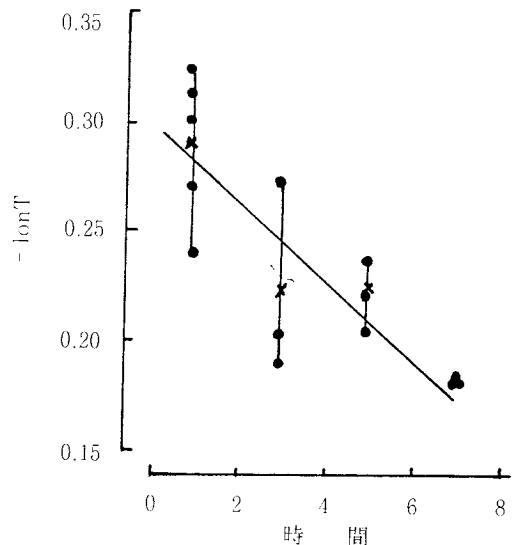


図4 時間経過にもなうシラス頭部のメラニン含有量(相対値)

ところから結果に誤りが生じれば、その誤りを容易に検知できるから、この方法の有効性の判断基準となるものである。

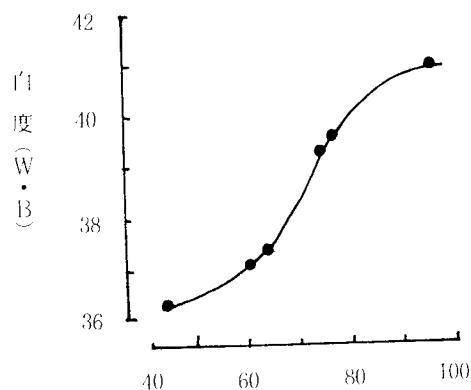
(1) 漁獲からの経過時間とシラス頭部のメラニン含有量の変化

シラスの頭部の組織切片を作成し顕微鏡で観察すると網膜から脈絡膜付近に多量のメラニンが認められる。これは肉眼でも十分確認できるが、鮮度の低下にともない色素が溶脱し、眼球付近が白くなる現象を見ることができる。シラスの鮮度低下にともない自己消化がおこるための現象と考えられる。そこで5~10℃で漁獲から1、3、5及び7時間後に製造したしらす干しの頭部を鰓蓋先端部で切り取り1個体を純水5mlでホモジナイズし、その1mlを試料とした。各固体の吸光度は表1のとうりである。1尾当たりの値はホモジナイズ液5mlの中、1mlを試験に供したので5倍した値を1尾当たりの相対値とした。

特に漁獲から1時間の試料については5尾の測定を行ったが、固体差は±20%以内であって比較的安定した値を示している。

(2) しらす干し製品中のメラニン含有率の測定
しらす干しではシラス中のメラニンが漁獲から

製造完了までの工程で失われるので、生存時に比較して低い値を示すものと考えられる。そこで漁獲直後のシラスについて大きさ別にメラニン含有量を測定し、この値を基準として、製品のメラニン含有量を評価した。即ち(メラニン含有率) = (製品のメラニン含有量/生存時のメラニン含有量)として含有率を求めた。このメラニン含有率とハンター白度(W.B)との関係を図示したものが図5である。メラニン含有量の高いもの程、



メラニンの含有率

図5 しらす干しのメラニン含有率と白度との関係

表1 漁獲後経過時間のシラス頭部のメラニン含有量

No.	時間	1	3	5	7
1		0. 2 4 2	0. 2 0 4	0. 2 0 5	0. 1 8 6
2		0. 3 0 1	0. 1 9 0	0. 2 3 9	0. 1 8 6
3		0. 3 1 5	0. 2 7 7	0. 2 2 1	0. 1 8 5
4		0. 2 7 1	—	—	—
5		0. 3 3 5	—	—	—
	平均値	0. 2 9 3	0. 2 2 4	0. 2 2 2	0. 1 8 6
	平均体重	0. 1 4 1	0. 1 1 1	0. 1 4 5	0. 1 1 4
	メラニン含有量 (1尾)	1. 4 6 0	1. 1 2 0	1. 1 1 0	0. 9 3

白度が高く、特にメラニン含有率が80%以下になると白度は急激に減少している。ここでは、その原因を明らかにすることはしないが、おそらく体内の特定の部分に高密度に蓄積されているメラニンが、自己消化によって体外の容出し、ある程度で体表面を被うのではないかと考えられる。

以上、メラニンの簡易測定法の検討を行ったが、

測定事例で判断する限り相対値の測定には十分有効な方法と考えることが出来る。

文 献

及川 淳 (1976) メラノサイトとメラニン、生化学48, (9) 872 -888.