

# カニ甲殻のキチンの分離について—Ⅱ.

附随タンパク質の除去\*

武田道夫・勝浦洋

On Isolation of Crustacean Chitin—Ⅱ.

Removing of Protein by Some Proteases, Organic Solvents and Surface Active Agents

By

Michio TAKEDA and Hiroshi KATSUURA

Applications of some proteases, organic solvents and surface active agents to the isolation of crustacean chitin were investigated with the aim of finding the isolation method without undesirable degradation.

The results obtained were summarized as follows:

Among proteases, bacterial proteinase (Pronase-P), papain and enzyme extracted from tuna, Pronase-P was most effective to hydrolyze incidental protein in crustacean shell (Fig. 1 and Table 3). Protein content can be reduced to about 1 % by the combination of these enzymatic hydrolysis.

The shaking with dimethylformamide was effective, but dimethylsulfoxide had no effect.

Every surfactant used, benzalconium chloride, sodium dodecylbenzenesulfonate and sodium dodecylsulfonate, especially the latter two, was caused to solubilize the residual protein from enzymatic hydrolysis.

The results suggested that the incidental protein in crustacean shell may be almost removed by the suitable combination of these treatments.

And application of iodic acid — strong phosphoric acid decomposition method to nitrogen analysis of chitin, instead of KJELDAHL method, makes the time required for decomposition shorten and micronize the quantity of sample of necessity.

---

※ 水産大学校研究業績 第420号, 1964年1月24日 受理

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 420

Received Jan. 24, 1964

昭和38年12月6日鹿児島大学で開かれた日本化学会九州・中国四国支部合同常会で発表

## 1. 緒言

甲殻類の殻よりキチンを分離するには、従来相当過酷な条件を必要とし、その間に脱アセチル化又は解重合等の副反応を伴うものと考えられている。<sup>1) 2) 3)</sup>

第1報<sup>4)</sup>においてそれら副反応を伴わない分離法として、脱カルシウムに EDTA 溶液を、脱タンパクに分解酵素(マグロ幽門垂より抽出)を用いた結果、カルシウムは完全に除去出来るが、なお2%前後のタンパク質が残留することを報告した。

今回は更に酵素の種類による分解の相異、各種有機溶媒および表面活性剤処理によるタンパク除去の効果について検討を試みた。

なお、その窒素分析に強リン酸-ヨウ素酸法を用いた結果も併せて報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1. 試料

北洋漁業より送られたタラバガニ殻を流水中に1週間以上浸漬後、赤外線ランプ下で乾燥し、ミキサーにて粉碎。その48メッシュ以下のものを用いた。

### 2-2. 脱カルシウム処理

エチレンジアミン四醋酸ナトリウム(クレワット)飽和水溶液を pH 10 に調整して、常温で処理。水洗後乾燥した。(タンパク含有量約15~20%)。

### 2-3. 酵素によるタンパク分解

a. マグロ幽門垂よりの酵素 pH 8.6 の緩衝液にて抽出した溶液を、試料の約100倍量加え、37.5°C で60時間以上分解した。

b. プロナーゼ P (科研化学株式会社製、放射菌酵素、50,300 P.U.K./g) クエン酸緩衝液で pH 7.0 に調整、60°C で60時間以上処理。

c. パパイン<sup>5) 6)</sup> (MERK製、1:350) 醋酸ナトリウム緩衝液で pH 5.5 に調整(醋酸ナトリウム濃度 0.03~0.05 M)、これに 0.1 M シアン化ナトリウム (pH 7.0) をその濃度が 0.01 M になるように加え、又 EDTA-2Na を 0.001 M 添加して活性化を行なった。不溶解部分は遠心機で除き、37.5°C で60時間以上処理した。

以上いずれの場合も酵素処理後、ソックスレー抽出器を用いて、エチルアルコールおよびピリジンで色素を除き、エーテルで乾燥の後窒素分析を行なった。

### 2-4. 溶出ペプチドの定量<sup>7)</sup>

酵素処理中に分解溶出したペプチドの定量には銅-FOLIN法を用いて、光電比色計の750 m $\mu$ における比色によりカゼイン相当量として算出した。

### 2-5. 有機溶媒によるタンパク除去

有機溶媒としてジメチルスルホキシドとジメチルホルムアミドを用いた。それぞれ試料の50~100倍量加え、フリマゾ機で1時間振りまぜた後、液を新しく取換えた。この操作を3回繰返した後、ホモジナイザーで30分間処理して、洗浄、乾燥の後窒素分析を行なって、タンパク含有量の変化を求めた。

### 2-6. 表面活性剤による脱タンパク処理<sup>8) 9)</sup>

カチオン活性剤として10%塩化ベンザルコニウム溶液、中性洗剤としてドデシルベンゼンスルホン酸ナト

リウムおよびドデシルスルホン酸ナトリウムを用いた。それぞれの1%溶液を試料の100~200倍と、亜硫酸水素ナトリウム<sup>10)</sup>を0.02%になるように加えて、フリマゼ機で30分間振りまぜた後、液を新しく取換えて数回同じ処理を行なった。更にその後乳鉢で、少量の亜硫酸水素ナトリウムとそれぞれの活性剤溶液と共に十分にすり合わせた後、洗浄、乾燥して窒素分析の試料とした。

2-7. 水酸化ナトリウム溶液による脱タンパク

以上の各方法と対照するために水酸化ナトリウム溶液による脱タンパク処理を行なった。すなわち1N水酸化ナトリウム溶液を試料の約100倍量加えかきまぜながら所定時間温浴上で加熱した後、洗浄、乾燥して窒素分析を行なった。

2-8. 窒素分析

a. ケルダール法<sup>15)</sup> この方法によってキチンを分解するには20時間以上の加熱を要するので、この間における窒素分の損失を検討した。すなわち標準硫酸アンモニウム溶液(20.36 mg/ml)を調整し、その一定量を試料にとり、硫酸と分解促進剤(硫酸銅・硫酸カリウム混合物, 1:9)を加え、所定時間加熱したものについての窒素分析の結果を第1表、第1図および第2図(次頁)に示した。加えた硫酸アンモニウム

Table 1. Nitrogen loss during KJELDAHL decomposition.

Duration, <i>t</i> (hr)	Nitrogen content		Nitrogen loss	
	taken, $N_0$ (mg)	found, $N$ (mg)	$\Delta N^*/N_0$ (mg/ $N_0$ mg)	$\alpha^{**}$ (mg/hr· $N_0$ mg)
22.0	42.92	42.86	0.0014	$6 \times 10^{-5}$
45.7	''	42.86	0.0014	3 ''
89.6	''	42.77	0.0035	4 ''
152.4	''	42.61	0.0072	5 ''
219.1	''	42.58	0.0078	4 ''

\*  $\Delta N = N_0 - N$

\*\*  $\alpha = N_0 - N / N_0 \cdot t$ , mean value :  $4 \times 10^{-5}$ .

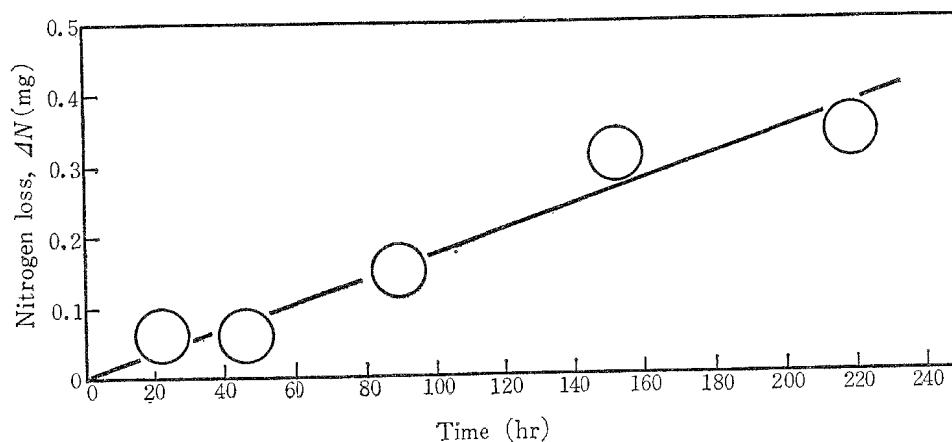


Fig. 1. Relation between nitrogen loss and decomposition time in KJELDAHL method.

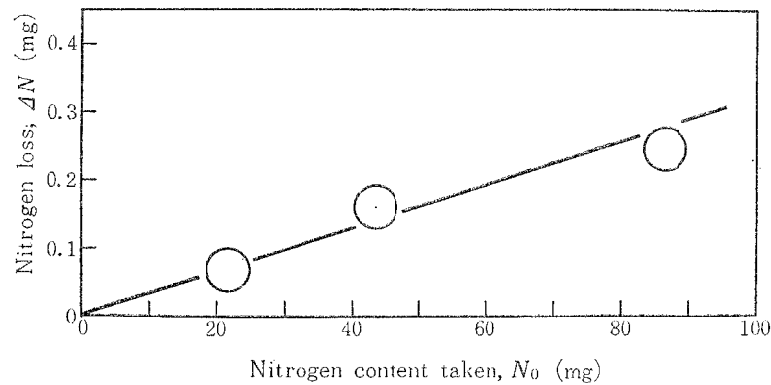


Fig. 2. Relation between nitrogen loss and nitrogen content in KJELDAHL method.  
(Decomposition time : 118 hrs)

量より計算した窒素量を  $N_0$  (mg), 分析の結果得られた窒素量を  $N$  (mg), その両者の差 (加熱時の損失) を  $\Delta N$  (mg), および加熱時間を  $t$  (hr) とし, 試料中の窒素 1 mg の加熱 1 時間あたりの損失量  $\alpha$  (mg/hr · Nmg) を次式により算出した。

$$\alpha = \frac{N_0 - N}{N_0 \cdot t} \quad (1)$$

この結果,  $\alpha$  の平均値として  $4 \times 10^{-5}$  (mg/hr · Nmg) の値が得られた。故にケルダール法で得た分析値  $N$  (mg) に次の補正を行なった。

$$N' = \frac{N}{1 - \alpha t} \quad (2)$$

b. 強リン酸—ヨウ素酸法による窒素分析<sup>11) 12) 13) 14)</sup> ケルダール法では前記のように分解に長時間を必要とし, 又補正をしなければならないので, 強リン酸を用うる窒素分析の適用を検討してみた。リン酸を  $300^\circ\text{C}$  迄加熱濃縮して得られた強リン酸を  $5\sim 20\text{ ml}$  とヨウ素酸カリウム  $0.3\sim 0.5\text{ g}$  を分解槽に加え, 加熱しながら ( $250^\circ\text{C}$  以下) アスピレーターで吸引した後, 二酸化炭素ガスを通気し, これを数回繰返して溶存するガスを取除き, 冷却して試料を加える。試料は小ガラス球に入れて秤量したものを, 分解槽内でガラス棒で突き破った。十分に二酸化炭素ガスを通じた後,  $250^\circ\text{C}$  以上にならないように注意しながら加熱して, 発生したガスをガスダメに入れ, 分解の終了した後, 二酸化炭素ガスを通気しながらアゾトメーター<sup>16)</sup> (最高容量  $5.00\text{ ml}$ , 1 目盛  $0.02\text{ ml}$ ) に送り, その読みから次式によって窒素含有量を計算した。

$$N\% = 100 \cdot F \cdot v/s \quad (3)$$

$$v = f [v' - (c_1 + c_2)]$$

$F$  は測定時条件における窒素  $1\text{ ml}$  の重量 (mg),  $f$  はアゾトメーター中の水酸化カリウム溶液の蒸気圧

Table 2. Comparison of nitrogen analysis by KJELDAHL method and strong phosphoric acid—iolic acid decomposition method (S. P. A.).

Sample	Method	Weight of sample, (mg)	Nitrogen content, (%)	Decomposition time, (hr or min)
Decalcified crab shell	KJELDAHL	501.0	9.03	34~56 hrs.
" " "	S. P. A.	45.01	9.50	about 10 mins.
Deproteinized crab shell	KJELDAHL	512.0	7.01	28~45 hrs.
" " "	S. P. A.	45.40	7.03	about 10 mins.
" " "	"	20.02	7.08	5~7 mins.

および気圧計の読みに対する補正係数,  $s$  は試料の重量 (mg),  $v'$  はアゾトメーターの読み (ml),  $c_1$  は空試験による補正值 (ml),  $c_2$  はアゾトメーター目盛の補正 (ml) である。

同一試料を用いてケルダール法と比較した結果を第2表 (前頁) に示した。

2-9. タンパク含有量の計算

カニ甲殻に附随するタンパク質の構造が不明であるので, その窒素含有量を 16.0% として, 次式によりキチンに残留するタンパク含有量  $P$  (%) を計算した。  $P = (N - N_c) / (N_p - N_c)$ ,  $N$ ,  $N_c$  および  $N_p$  はそれぞれ試料, キチンおよび附随タンパク質の窒素含有率 (%) を表わしている。

3. 実験結果および考察

3-1. 酵素の種類による分解の比較

各種の酵素により分解溶出したペプチドの量と反応時間との関係を第3図に示した。

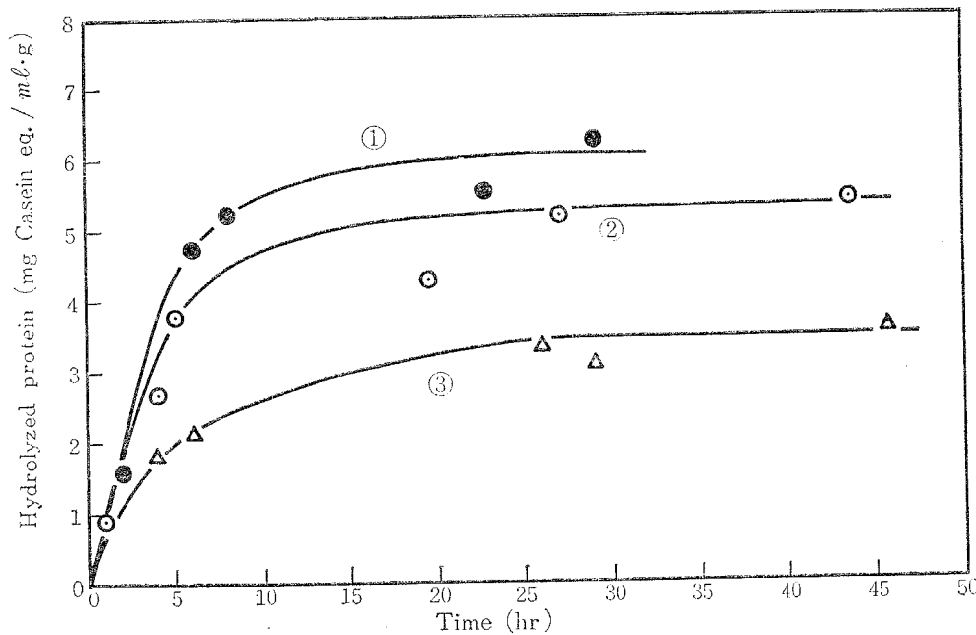


Fig. 3. Comparison of enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein for different protease.

- 1 : Pronase-P, pH 7.0, 60°C.
- 2 : Protease extracted from pyloric caeca of tuna, pH 8.6, 40°C.
- 3 : Papain, pH 5.5, 37.5°C.

その結果よりプロナーゼ-P が最も強い分解力を示しており, カニ甲殻附随タンパクの除去に適している。(但し他のタンパク質に対してはパパイニンが最も効果的な結果<sup>5)</sup>を示しているので, なおパパイニンの活性化に不十分な点があったのかも知れない。)

一方第4図の水酸化ナトリウムによる脱タンパク処理の結果から見ると、タンパク除去が完成されるには

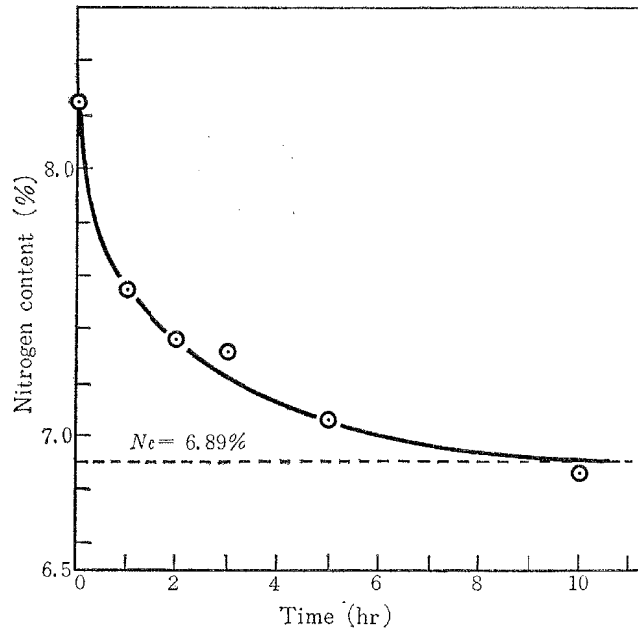


Fig. 4. Hydrolysis of the incidental protein in crustacean shell by sodium hydroxide.

$N_c$ : Theoretical nitrogen content for chitin.

10時間以上の処理を要し、タンパクの除去は相当困難であることを示している。然し乍らこの場合には、その処理によって、ほとんどタンパクを除去出来るが<sup>4)</sup>、酵素による分解では第3表に示すように、プロナーゼ-Pの場合でもただ1回の処理だけでタンパクを2%以下に減少させることはむずかしい。

Table 3. Comparison of power of removing or solubilization to incidental protein in crustacean shell by some organic solvents and surface active agents.

Reagent	Protein content (%)		Remove (%) (R)
	Before treat. ( $P_1$ )	After treat. ( $P_2$ )	
Protease from tuna	15.59	5.16	70.47
Pronase - P	15.59	2.74	84.80
" "	5.16	1.01	81.24
Papain	19.10	...	...
Dimethylsulfoxide	3.29	3.41	(0)
Dimethylformamide*	1.01	(0)	(100)
Benzalkonium chloride	5.16	0.55	89.83
Sodium dodecylbenzensulfonate*	5.16	0.33	93.91
Sodium dodecylsulfonate*	5.16	(0)	(100)

\* With sodium hydrogen sulfite.

マグロ幽門垂よりの酵素によって処理した試料(タンパク含有量約5%)に更にプロナーゼ-Pを作用させ

ると約  $P_2 = 1\%$  に低下しているが酵素の種類を変えてもこれ以下にすることは困難ではないかと思う。

### 3-2. 有機溶媒および表面活性剤による脱タンパク効果

第3表に各処理の結果を示した。なお、各処理前後の試料のタンパク含有率を  $P_1$  および  $P_2$  (%), 処理によって除かれたタンパク量を  $p$  (g/g試料) としてタンパク除去率  $R$  (%) を次式により計算した。

$$R = \frac{100(P_1 - P_2)}{P_1(100 - P_2)} = \frac{100p}{P_1} \quad (4)$$

有機溶媒ではジメチルスルホアミドが有効で、プロナーゼ-P によって分解出来なかったタンパクも除去出来た。

使用した界面活性剤はどれもタンパクを可溶化する力を持っているようで、除去率90%以上を示している。特にスルホン酸系の中性洗剤による処理は有効であった。処理後の試料はどれも微クリーム色を呈しており、酵素処理後に比較して色素の残留も少ないようであるが、これは亜硫酸水素ナトリウムによる漂白作用のためか、或は可溶化力に対する相乗効果があったのか不明である。

ケルダール法又は強リン酸法によっても、これ以上微量のタンパクの存在を確認することは困難であるので、更にクロマトグラフ法等を利用して調査しなければならない。

これらの処理中に脱アセチルや解重合等の反応がおこっているかどうかについては、更に実験中である。

## 4. 結 言

カニ甲殻に附随するタンパク質を除くために、タンパク分解酵素、有機溶媒および表面活性剤を使用して次の結果を得た。

1. タンパク分解酵素としてマグロ幽門垂より抽出した酵素、プロナーゼ-P およびパパインを用いた結果、プロナーゼ-P が最も効果があった。これら酵素の処理を組合わせて、タンパク含有量約1%迄低下出来た。
2. 有機溶媒ではジメチルスルホアミドが有効であった。
3. 表面活性剤では中性洗剤であるドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムおよびドデシルスルホン酸ナトリウムが効果があった。
4. これらの処理の組合わせにより、タンパクは、ほとんど除去出来るが、窒素分析では確認出来ない程の量の存在の検出については更に研究中である。
5. キチンの窒素分析に強リン酸-ヨウ素酸分解法を使用して、分析時間を短縮し、試料のマイクロ化が可能となった。

酵素を供せられた当大学 藤井 実教授、実験の便を計って下さった河内正通講師および試料を贈られた北洋水産株式会社 手塚久雄氏に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) FOSTER, A. B. and J. M. WEBBER, 1960: "Advances in Carbohydrate Chemistry," 15, 378. (Academic Press).
- 2) RICHARD, A. G., 1951: "The Integument of Arthropods," 9. (Interscience Publishers, Inc.).
- 3) HACKMAN, R. H., 1963: *Australian J. Biol. Sci.*, 15, 526.
- 4) 武田道夫・阿部栄喜, 1962: 本報告, 11, 9.

- 5) HILLAND, R. L. and W. R. SCHMIDT, 1962 : *J. Biol. Chem.*, **237**, 389.
- 6) 高橋健治, 1963 : 蛋白質, 核酸, 酵素, **8**, 229.
- 7) 小林恒夫, 1958 : 実験化学講座, **24**, 39.
- 8) 藤井徹也, 1961 : 化学と工業, **14**, 1128.
- 9) 二国二郎・檜作 進, 1958 : 高分子実験学講座, **12**, 49.
- 10) FOSTER, J. F., J. J. YANG and N. H. YUI, 1959 : *J. O. A. C.*, **42**, 441.
- 11) 木羽敏泰, 1960 : 分化, **9**, 651.
- 12) 高木友雄・本多次徳, 1962 : 分化, **11**, 286.
- 13) 高木友雄・林 永, 1957 : 日化, **78**, 145.
- 14) 瀬戸寿太郎, 1960 : 分化, **9**, 669.
- 15) 池中徳治, 1957 : 実験化学講座, **23**, 32.
- 16) 三井哲彦, 1959 : 実験化学講座, **16**, 211.