

カニ甲殻のキチンの分離について— I.

EDTA 及び酵素による分離*

武田 道夫・阿部 栄喜*

On Isolation of Crustacean Chitin— I.
Decalcification by EDTA-2Na Solution and Enzymatic
Hydrolysis of Incidental Protein

By

Michio TAKEDA and Eiki ABE

Applications of EDTA-2Na and protease in the isolation of crustacean chitin were investigated with the aim of finding the isolation method accompanied by no undesirable degradations.

The results obtained are shown in Figs. 1~8 and Table 1, and may be summarized as follows:

1. Two steps were distinguished in proceeding of the decalcification of crustacean shell (King crab) by the use of EDTA-2Na solution: 94 % of calcium to be removed was eluted within the first 4 hours, but it took more than 20 hours to reach the equilibrium.

The residue contained 9.4 % of nitrogen, and this value corresponded to its protein content of about 28 %.

2. The enzymatic hydrolysis of the incidental protein in crustacean shell also proceeded with two steps: within the first 10 hours 80~90 % protein to be hydrolysed was liberated, but it needed more than 20 hours to reach the equilibrium.

After this treatment, the residue contained 7.1 % of nitrogen, and this showed that its protein content was reduced to about 2 %.

3. The crustacean chitin obtained by these treatments remained more colored as compared with those obtained by digestion with hydrochloric acid-sodium hydroxide.
4. No aminosugars were detected during these processes.

※ 水産講習所研究業績 第352号, 1962年1月18日 受理.
Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 352.
Received Jan. 18, 1962.

* 現林兼水産工業株式会社大森工場勤務
昭和35年12月1日宮崎にて開かれた日本化学会九州中国四国支部合同常会にて発表

1. 結 言

カニ甲殻に存在するキチンは、炭酸カルシウム、タンパク質、色素等の共存物と強く結びついているために、キチンを分離するには、相当苛酷な条件の適用を必要とする。現在迄に行われた主なるキチンの分離法^{1), 2)}は、塩酸により脱カルシウム後、水酸化ナトリウム又は濃ギ酸³⁾によりタンパク質を除去し、更に残った色素を酸化剤で漂白した残渣を、キチンとしている。然し FOSTER²⁾、RICHARD⁴⁾等が指摘している如く、これらの諸操作の間に、解重合又は脱アセチル化等の分解が伴われ、天然のままのキチンとは幾分異っていると考えられる。

先に FOSTER⁵⁾等は、イチョウガニの甲殻の脱カルシウムに、エチレンジアミン四酢酸溶液を使用した場合、糖類の分離は伴わないが、尚約5%のタンパク質が残存していることを報告している。

そこで脱カルシウムを行ったカニ甲殻に、タンパク分解酵素を作用させて、温やかな条件でキチンが分離出来ないものかと検討を試みた。

2. 実験方法

2-1 試 料

実験に用いたカニ甲殻は、北洋漁場より送られたタラバガニの甲殻を、流水中に5日以上浸漬後、赤外線ランプにて乾燥し、ミキサーにて粉碎、そのうちの14~20メッシュのものである。

2-2 炭酸カルシウムの除去

試料に50~100倍量の1/10 Mエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(クレワットーN、以下 EDTA と略す)の水溶液を加え、塩化アンモニウム及びアンモニア水の緩衝液にて pH 10 に調整し、30°C の恒温槽中に浸した。各時間毎にその上澄液又はロ液中の過剰の EDTA 量を、標準カルシウム溶液で標定し、溶出した炭酸カルシウムの量を計算した。(但し炭酸マグネシウムを含む。)20時間以上反応させた後、ガラス漏斗でろ過、水洗後60°C で乾燥したものを、脱タンパク処理の試料に供した。

2-3 タンパク質の除去

タンパク分解酵素は、当所藤井実教授⁶⁾が印度洋鯨の幽門垂より抽出されたものを分けて戴いた。この酵素に pH 8.6 の緩衝液を加え、不溶解物を遠心分離機で除き、脱カルシウム試料に所定量を加えて、40°C の定温器中に静置した。各時間毎にその上澄液から所定量を採取し、銅-FOLIN 試薬を加えて、その750 m μ における吸光度を日立製分光光度計で測定した⁷⁾。尚この測定値から、用いた酵素溶液の値を差し引き、その値と同じ吸光度を示すカゼイン溶液の濃度に換算して、分解溶出したペプチド量とした。

2-4 炭酸カルシウム及び炭酸マグネシウムの定量⁸⁾

試料を電気炉にて灰化後、過塩素酸及び塩酸を加えて加熱分解、その塩酸溶液中のカルシウム及びマグネシウム量を5/100 M EDTA 溶液にて標定した。

2-5 窒素量の定量

試料を減圧下で赤外線ランプにより乾燥後、ケルダール法によった。なお加熱分解に約100時間を要したので、対照として硫酸アンモニウムを同じ条件で加熱し、その損失値を補正した。

2-6 アミノ糖の検出⁹⁾

ELSON-MORGAN 反応によった。即ち試料にアセチルアセトンを加え加熱後、*p*-デメチルアミノベンツアルデヒド溶液と濃塩酸を加えて発色の有無をしらべた。

3. 実験結果及び考察

3-1 EDTAによる脱カルシウム処理

EDTA溶液によるカニ甲殻のカルシウム溶出量と処理時間との関係を第1図に示した。曲線1において、

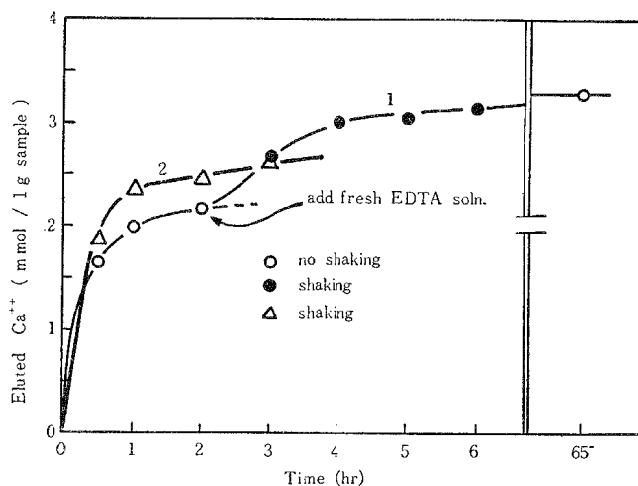


Fig. 1. Rate of decalcification of crustacean shell (King crab) by EDTA solution.

1時間以後溶出量の増加が小さくなったので、2時間目に新たにEDTA溶液を追加し、振とう機にて1時間毎に20分間振とうした。その結果、再びカルシウムの溶出量は増加し、4時間以後は殆んど平衡値に近く達した。なお4時間目における溶出量は65時間後の溶出量の94%に相当した。曲線2は始めから連続振とうした結果である。処理後の重量減は37~45%で、溶液に溶出された炭酸カルシウムの量は原試料に対し30.5%に相当した。なお原試料の分析値は灰分27.22%、炭酸カルシウム28.51%、炭酸マグネシウム2.72%となっている。この結果から65時間の処理で殆んどカルシウム分は抽出されると考えられる。なお時々振とうしながら21時間処理した残渣に、40倍量の1N塩酸を加え1時間加熱し、室温に20時間放置したもののロ液中には痕跡のカルシウム又はマグネシウムが認められた。

EDTA処理の廢液中にはカゼイン相当量1~0.5mg/mlのタンパク質の溶出が認められ、原試料にはまだ水溶性のタンパク質が残っていたことを示す。又この廢液中にはグルコサミンの存在は検出されなかった。

脱カルシウム試料をソックスレー抽出器にて、エタノール及びピリジンで処理したが、ピリジンの場合のみ僅かに色素が抽出された。

3-2 酵素による脱タンパク処理

予備実験の結果、酵素によるカニ甲殻のタンパク質除去には、かなり長時間を要することが分かったので、その間の細菌発生を防止するためトルエンを添加した効果を第2図に示した。曲線1及び3はトルエンを添加した反応系及び酵素溶液の吸光度の時間的変化を、由線2及び4はトルエンを添加しない反応系と酵素溶液の場合を示している。夫々トルエン添加により測定の見誤差が防止出来るものと考えられる。

試料に対する酵素量の相異による分解速度の変化を、第3図及び第4図に示した。この結果から0.1g酵素/50ml抽出液に対して、脱カルシウムカニ甲殻の試料は0.4g位が限界と考えた。

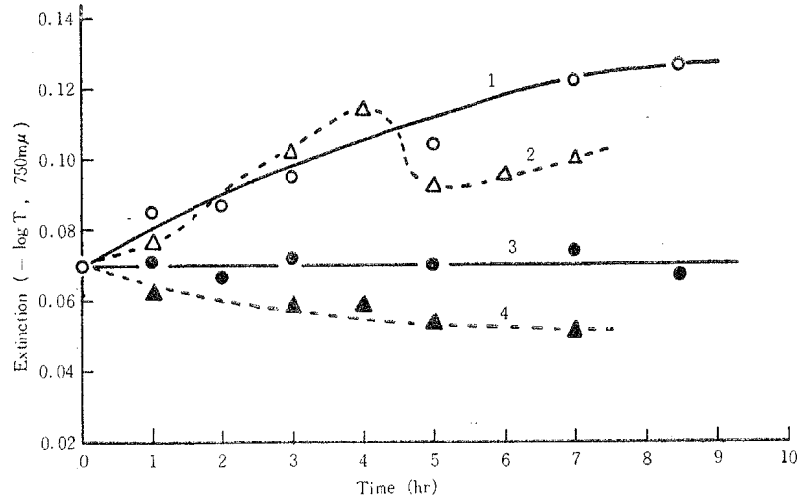


Fig. 2. Inhibitory effect of toluene on the bacterial growth in the process of enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein.
 1 : Reaction system with toluene. 2 : Reaction system without toluene.
 3 : Protease solution with toluene. 4 : Protease solution without toluene.

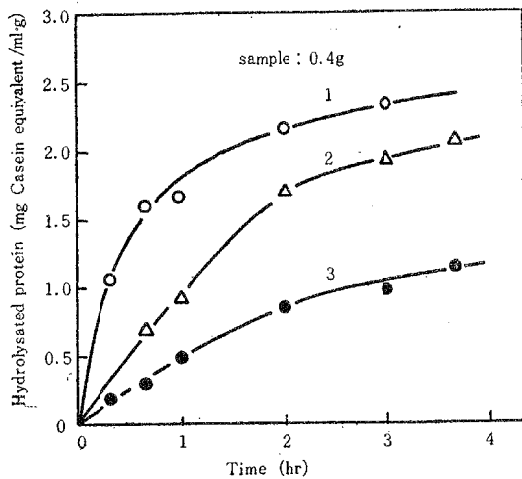


Fig. 3. Variation of the rate of enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein for different concentration of protease (extracted from powder of pyloric caeca of striped marlin).
 1 : 0.25 g protease/50 ml extracted solution. 2 : 0.1 g/50 ml. 3 : 0.05 g/50 ml.

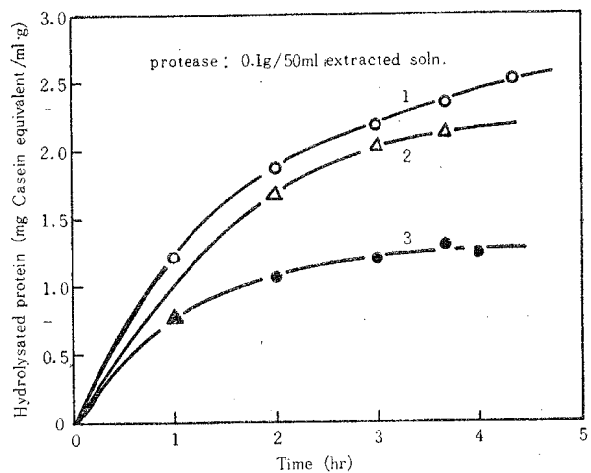


Fig. 4. Variation of the rate of enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein for different weight of substrate (Protease extracted from powder of pyloric caeca of striped marlin).
 1 : 0.4 g of substrate (decalcified King crab shell). 2 : 0.2 g. 3 : 0.1 g.

上記の実験結果に基づき、タンパク質の分解が平衡に達する迄測定した結果を第5図に示した。曲線1はマカジキより抽出した酵素、曲線2はキハダより抽出した酵素による分解の結果である。何れの場合も、反応は、2つの段階に分れ、先ず5~10時間位の間分解は平衡値の80~90%終了し、その後は急激に反

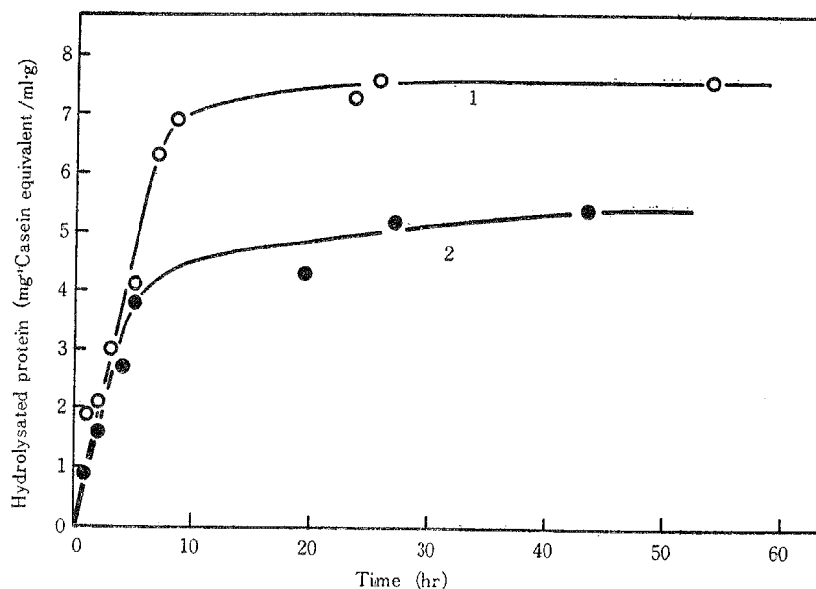


Fig. 5. Variation of hydrolysed protein of crustacean shell by protease with time.
 1 : Protease extracted from powder of pyloric caeca of striped marlin, *Makaira mitsukurii*. 2 : Protease extracted from powder of pyloric caeca of Yellow-fin tuna, *Neothunnus albacora*.

応速度は落ちて、20 時間後に平衡に達している。曲線 1 では最初の 10 時間の平均分解速度は 0.7 mg/hr であるが、次の 10 時間では 0.04 mg/hr となっている。

カルシウムを除くのに塩酸を用いた場合は、その処理の間にタンパク質の分解溶出も伴われていることは当然考えられることで、脱カルシウム処理法の相異による脱タンパク反応の比較を試みた結果を第 6 図に示

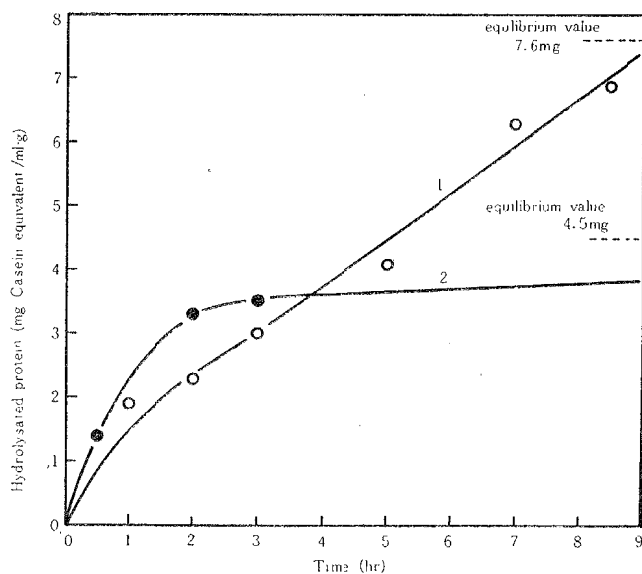


Fig. 6. Comparison of the enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein for different process of decalcification.
 1 : Decalcified by EDTA solution. 2 : Decalcified by dilute hydrochloric acid.

す。曲線1はEDTA処理、曲線2は塩酸処理を行った試料の酵素分解結果である。明らかに塩酸処理の試料は初期の反応速度が大きく4時間後に、平衡値の80%のタンパク質が分解溶出している。一方EDTA処理試料は同時間で51%の溶出量となっている。然し乍ら塩酸処理のものは19時間後でもその溶出量は82%で、僅かに2%の増加であるが、EDTA処理のものは同時間に46%の増加が認められている。このことはカニ甲殻に含まれるタンパク質は分解を受け易い部分約90%と、残り約10%の分解を受け難い部分に分れていて、塩酸処理によって脱カルシウムの際、前者の一部が溶出し、その表面積が低下しているため、初期の加水分解反応速度が著しく大きくなっていると考えられる。然し乍ら後者のタンパク質は依然未反応のままで残っているので、平衡値に達するにはEDTA処理の試料の分解と同じ時間を要すると考える。この2種類のタンパク質が、物理的な組織の相異、即ちその表面に試薬が到達し難い相にあるためなのか、あるいはタンパク質自体が異種のものであるかは不明であり、今後の研究によらなければならない。然しながらEDTAによる脱カルシウム処理の場合にも、脱カルシウムされ難い小部分があつて、平衡値到達の時間が引延ばされていることを併せ考えて見ると、組織の相異によるものではないかと推察される。

なお、酵素によるカニ甲殻の脱タンパク処理の結果、その残渣の脱カルシウム試料に対する重量減は26~29%で、原試料は18~20%のタンパクを含有することになる。又比色によって求めた溶出タンパク量はカゼイン相当量に換算して脱カルシウム試料の29~38% (原試料に対しては20~27%)となる。含有窒素量の変化は第1表に示す。以上の値はN%からタンパク量を計算したものと大体一致しているが、酵素処

Table 1. Nitrogen and protein content.

	Theoretical value for chitin*	Decalcified residue by EDTA solution	EDTA-protease treated residue	HCl-NaOH treated residue***
N %	6.9	9.4	7.1	6.9
Protein %**	0	27.5	2.2	(C)

* Calculated for $(C_8H_{13}O_5N)_n$.

** Calculated as contained 16% of nitrogen.

*** Bleached by hydrosulfite.

理によってなお2%前後のタンパクが残在していることになる。

固—液相の接触を高めるために水銀密閉カキマゼ機を使用した結果及び粒度を48メッシュ以下に下げた試料の分解の結果を第7図に示した。カキマゼはむしろ酵素作用を疎害する効果を伴うという説もあるが、この場合も大した効果は認められなかった。粒度の低下は著しい反応速度の上昇が見られる。

魚醤油、フィッシュソリュブル等の製造用に市販されているタンパク分解酵素を使用した結果を第8図に示した。反応速度が小さいのは増量剤が添加されているのであろう。

EDTA及び酵素処理を行った残渣は、塩酸及び水酸化ナトリウム処理を行ったものに比べて、その操作の途中で色素が殆んど除去されないが、脱タンパク直後エチルアルコール又はピリジンで抽出すると或る程度脱色出来るが、塩酸—水酸化ナトリウム処理のものに比べてなおその程度は低い。第1表の窒素分析の結果から見て、まだタンパク質が残っているので、このタンパク質と色素が結びついている為かも知れない。何れにしても、酵素処理の場合は僅かに残ったタンパク質とこの色素を、分解を伴はないで完全に除去する方法を考えることが大切である。それに関しては目下研究中である。

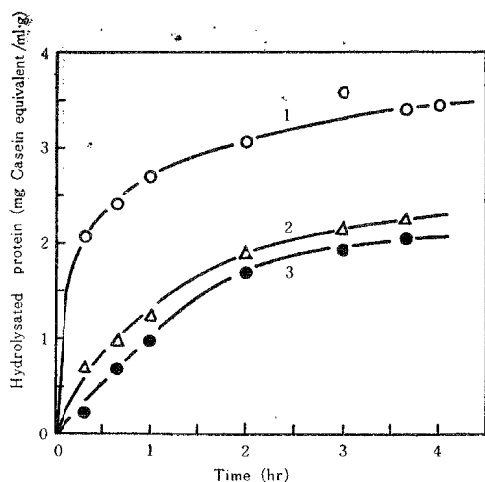


Fig. 7. Effect of agitation and pulverization on the rate of enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein.

1 : Particle size below 48 mesh with agitation.
 2 : 14~20 mesh, with agitation. 3 : 14~20 mesh, without agitation.

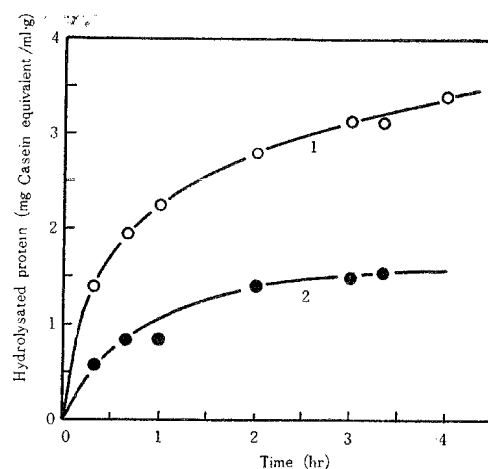


Fig. 8. Comparison of the enzymatic hydrolysis of crustacean shell protein for different protease.

1 : Protease extracted from powder of pyloric caeca of striped marlin. 2 : Neo-Sumitase.

4. 結 言

カニ甲殻からキチンを分離するのに、EDTA及びタンパク分解酵素を使用して次の結果を得た。

1. EDTAによる脱カルシウムは4時間以内に94%の溶出を見たが、平衡に達するには20時間以上を要し、反応は2つの段階に分れている。この間にアミノ糖の脱離は見られなかった。
2. 鮪幽門垂より抽出したタンパク分解酵素によるカニ甲殻の脱タンパク反応は、やはり2つの段階に分れ、最初の10時間で平衡値の80~90%のタンパク質が溶出したが、平衡に達するにはその後10時間以上を要する。塩酸処理を行った試料の分解と比較して、カニ甲殻の組織に分解の難易の部分があるのではないかと考えた。
3. 酵素による脱タンパク残渣は窒素含有量から計算してなお2%前後のタンパク質が残在している。
4. 酵素による脱タンパク廢液中にはアミノ糖は検出されなかった。
5. EDTA及び酵素処理を行ったカニ甲殻には色素の残存が多いので、分解を伴はない脱色素法を考究しなければならない。
6. 酵素によるカニ甲殻のタンパク分解にカキマゼの効果は薄い。

最後に酵素を供せられた上、種々の御指導を賜った当所藤井実教授、窒素分析を手伝って下さった当所河内正通教官及び試料を供せ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) HACKMAN, R. H., 1954 : *Australian J. Biol. Sci.*, **7**, 168.
- 2) FOSTER, A. B. and J. M. WEBBER, 1960 : *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **15**, 378.

- 3) HOROWITZ, S. T., S. ROSEMAN and H. J. BLUMENTHAL, 1957: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046.
- 4) RICHARDS, A. G., 1951: *The Integument of Arthropods*. University of Minnesota Press, Minneapolis, Minn.
- 5) FOSTER, A. B. and R. H. HACKMAN, 1957: *Nature*, **180**, 40.
- 6) 藤井 実, 1961: 本報告, **10**, 381.
- 7) 小林 恒夫, 1958: 実験化学講座, **24**, 39.
- 8) 佐藤寅男, 池上明路, 1957: 分化, **6**, 706.
- 9) 阿武喜美子, 瀬野信子, 1957: 実験化学講座, **23**, 428.