アルカリ溶解法による鯨鼻軟骨からの コンドロイチン硫酸の製法—Ⅲ.

除 蛋 白 法

中 嶋 昭 正・田 中 晴 夫

(1966 年 7 月 29 日受理)

STUDIES ON THE MANUFACTURE OF CHONDROITIN SULFATE FROM WHALE NASAL CARTILAGE BY ALKALINE LIQUEFACTION METHOD—III. DEPROTEINIZATION METHOD

Akimasa NAKASHIMA and Haruo TANAKA*

In the previous paper¹⁾²⁾, the preparation method of crude sodium chondroitin sulfate available for a medicine or food additive from a whale nasal cartilage has been studied. In order to obtain the product of high purity for a medical purpose, it is necessary to remove as exhaustively as possible the protein and its hydrolysates that are contaminants in the crude product. The present paper deals with a trial to find out an effective and simple method of deproteinization.

The cartilage was liquefied with 50% NaOH for 1.75~2.5 hrs at 40°C. After dialysis followed by deproteinization at pH 3.5, the liquefied solutions were deproteinized with active carbon, Japanese acid clay or ion exchange resins, and then sodium chondroitin sulfate was precipitated with ethanol. All these treatments were effective, and in particular the product obtained by the treatment with Dowex 50 W-X 1 was negative in biuret reaction (Table 1, 2, 3). Moreover it was found that dialysis caused low purity in the product (Table 4).

In the solution of crude sodium chondroitin sulfate obtained with omission of dialysis, these treatments gave rise to more effective results than in the liquefied solution which was dialyzed. Thus, all products were negative in biuret reaction, and the order of yield was as follows: Dowex 50 W-X 1 > active carbon > Japanese acid clay (Table 5).

著者らはさきに医薬品および食品添品物として実用に供しうる純度の粗製コンドロイチン硫酸ナトリウム (CSNa) のアルカリ溶解法による調製について報告した¹⁾²⁾。しかし、さらに純度を高めて医薬用純品として使用可能な精製 CSNa を得るには、不純物として混入してくる蛋白を完全に除去しなければならない。一般に CSNa 調製の際の除蛋白操作には、LLOYD の試薬、カオリンなどの吸着剤、燐タングステン酸³⁾、アミルアルコール・クロロホルム⁴⁾などの蛋白沈澱剤や、トリパフラビン⁵⁾、第4級アンモニウム塩⁶⁾などのコンドロイチン硫酸 (CSA) の沈澱剤が用いられているが、これらは操作が複雑であつたり、低収量であつたりして産業的利用において実用性の乏しいものが多い。

本報では活性炭、酸性白土、イオン交換樹脂などの吸着剤による除蛋白法について、長須鯨鼻軟骨のアルカリ溶解液および粗製 CSNa 溶液を用いて検討し、簡単に収量よく biuret 反応陰性の CSNa を得る条件を見出したので報告する。

* 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).
玄洋工業株式会社 (Genyo Kogyo Co., Ltd., 4~12, Tsunabacho, Fukuoka, Japan).

実 験 方 法

アルカリ溶解液および粗製 CSNa 溶液の調製: 塩蔵または冷凍鯨鼻軟骨を短冊形の薄片に切り、流水で水洗し、2 倍量の水で 15 分間煮沸し、肉挽機で細砕した細砕軟骨、またはアルカリ溶解液量を少なくするために細砕軟骨を天日で半乾燥した半乾軟骨に、それぞれ 1/8, 1/2.7 重量の 50 % NaOH 溶液を加え、40°C, 1.75~2.5 時間の条件で液化し、塩酸で中和後流水で 18 時間透析し、塩酸で pH 3.5 に調節して生ずる沈澱を吸引汙別した汙液をアルカリ溶解液とした。また、冷凍細砕軟骨をアルカリ溶解後、透析せずに pH 3.5 で除蛋白したのちに、NaOH で中和し、3 倍容量のアルコールを加えて沈澱を生じさせ、70 % アルコールで脱塩後常法で乾燥して得た粗製 CSNa を、5 % の水溶液としたものを粗製 CSNa 溶液とした。

分析方法: 製品の N の定量、収量、抽出 CSNa 量および純度計算は第一報¹⁾に、ヘキソサミンの定量は第 2 報²⁾に記載した方法によつた。ウロン酸の定量は DISHE のカルバゾール法⁷⁾、S の定量は食品添加物公定書法⁸⁾、およびキレート法⁹⁾によつた。ヘキソースはアンスロン法¹⁰⁾で測定し、DOGANGES ら¹¹⁾の補正方法にしたがつてウロン酸（グルクロン酸）とヘキソサミン（ガラクトサミン）による発色を補正し、ガラクトースとして定量した。biuret 反応は製品の 2.5 % 溶液、または 5 % 水溶液に biuret 試薬¹²⁾を等量加えて生ずる発色を肉眼で判定した。

実 験 結 果

軟骨アルカリ溶解液の除蛋白

1. 活性炭および酸性白土: 塩蔵半乾軟骨から得たアルカリ溶解液を塩酸にて pH 3.0 に調節した後に、2~10 % の活性炭を加え、時々攪拌しながら 1 時間放置し、セライトを加えて吸引汙過した。得られた汙液を NaOH で中和後、3 倍容量のアルコールを加えて生ずる沈澱を常法によつて乾燥して CSNa 製品を得た。また、アルカリ溶解液に酸性白土を 40 % 加え、同様に処理して CSNa 製品を得た。製品の収量、分析値などを Table 1 および Table 2 に示した。

Table 1. Effect of the active carbon treatment of alkaline liquefied solution on the product.

Amount of active carbon %	Yield %	N %	Purity %	Extracted CSNa %	Biuret reaction (2.5% solution)
0	4.0	3.79	92.4	3.7	卅
2	3.1	3.14	97.3	3.0	+
5	2.8	3.10	97.6	2.7	+
10	2.3	2.88	99.2	2.3	±

Table 2. Effect of the Japanese acid clay treatment of alkaline liquefied solution on the product.

Amount of Japanese acid clay %	Yield %	N %	Purity %	Extracted CSNa %	Biuret reaction (2.5% solution)
0	4.2	5.23	81.5	3.4	卅
40	2.0	3.02	98.2	2.0	±

活性炭、酸性白土は共にかなりの除蛋白効果がみられ、活性炭 10 %、酸性白土 40 % を用いると製品の純度は 98 % 以上であつた。この際、活性炭の使用量が多いほどよく除蛋白されたが、抽出 CSNa 量はいちじるしく少なくなつた。また、活性炭、酸性白土を使用すると、除蛋白効果のみならず、同時に溶解液の

脱色効果が観察された。その効果は pH 4.0 以下、とくに pH 3.0 で最も大きいことが認められた。

2. イオン交換樹脂: 冷凍細碎軟骨から得たアルカリ溶解液を NaOH で中和し、18 時間の透析後、その 30 ml ずつを Table 3 に示してある架橋度の異なる数種の Dowex 50 W, Dowex 1 (30 ml) をつめたカラム (径 15 mm) に通した。流出液は NaOH 中和後酢酸ソーダを添加し、3 倍容量のアルコールを加えて生ずる沈澱を常法により乾燥した。得られた製品の収量、分析値などを Table 3 に示した。

Table 3. Effect of the ion exchange resin treatment of alkaline liquefied solution on the product.

Kind of resin	Yield g/30 ml	N %	Purity %	Extracted CSNa g/30 ml	Biuret reaction (2.5% solution)
Not treated	1.10	6.35	73.0	0.80	卅
Dowex 50 W-X 8 (H form)	0.71	3.45	94.9	0.67	+
Dowex 50 W-X 4 (H form)	0.71	3.07	97.8	0.69	+
Dowex 50 W-X 1 (H form)	0.58	2.75	100.0	0.58	—
Dowex 1-X 8 (Cl form)	0.90	5.58	78.8	0.71	卅
Dowex 1-X 1 (OH form)	0.86	4.49	87.1	0.75	卅
Dowex 1-X 1 (Cl form)	0.92	4.63	86.0	0.79	卅

30 ml of alkaline liquefied solution was passed through ion exchange resin column (1.5×17 cm).

Dowex 50 W でいちじるしい除蛋白効果が見られ、樹脂の架橋度の低いほど顕著で、X-1 を用いると biuret 反応陰性の製品が得られた。抽出 CSNa 量は対照に比べてかなり低いが、前項の活性炭、酸性白土処理ほどではなかった。また、Dowex 1 を用いても若干の除蛋白効果があった。

3. 透析: 冷凍細碎軟骨をアルカリ溶解後透析せずに pH 3.5 で除蛋白し、NaOH で

中和したアルカリ溶解液を用いて透析の製品の収量、分析値などに及ぼす影響を検討し、Table 4 に示した。透析しないものは透析したものに比べて純度高く収量が多かった。

粗製 CSNa 溶液の除蛋白 前項ではアルカリ溶解液に直接除蛋白操作を加えたが、純度に比較して抽出 CSNa 量が少なかった。それゆえ、より効率良く除蛋白を行なうため、アルカリ溶解液のアルコール沈澱によつて得た粗製 CSNa 溶液を用いて、活性炭、酸性白土および Dowex 50 W-X 1 の除蛋白効果を検討した。

1. 活性炭: 100 ml の溶液を塩酸で pH 3.0 とし、1 g の活性炭を加えてスターラーで 30 分間攪拌し、2 枚の濾紙 (東洋濾紙 No. 2) とセライトを用いて吸引濾過した。濾紙を通過した活性炭を除くため、濾液に等量のアルコールを加えて再濾過した。濾液を中和後酢酸ソーダを 1% 加え、アルコール沈澱し、常法により乾燥した。

2. 酸性白土: 100 ml の溶液を塩酸で pH 3.0 に調節し、4 g の酸性白土を加え、以後活性炭の場合と同様に操作した。

3. Dowex 50 W-X 1: 200 ml の溶液を Dowex 50 W-X 1 (H 型) のカラム (径 30 mm, 樹脂量 100 ml) に通した。流出液は NaOH 中和後酢酸ソーダを 1% 加え、アルコール沈澱し、常法により乾燥した。

以上の操作で得られた各製品の収量比、分析値などを Table 5 に示した。1% 活性炭、4% 酸性白土お

Table 4. Influence of dialysis of alkaline liquefied solution on the product.

Treatment	Yield %	N %	Purity %	Extracted CSNa %
Dialyzed	3.62	3.58	93.9	3.40
Not dialyzed*	3.80	3.06	97.9	3.72

* The product was washed with 70% ethanol to remove NaCl.

Table 5. Effect of the active carbon, Japanese acid clay and Dowex 50 W-X1 treatment of 5% crude CSNa solution on the product.

Treatment	Ratio of yield	N %	S %	Biuret reaction (5.0% solution)
Not treated	100	2.80	5.80	+
Active carbon	74	2.06	6.27	—
Japanese acid clay	64	2.15	6.23	—
Dowex 50 W-X 1	88	2.16	6.19	—

よび Dowex 50 W-X 1 処理のいずれでも biuret 反応陰性まで除蛋白された。なかでも Dowex 50 W-X 1 を用いると最も収量がよかつた。

考 察

軟骨からの CSA 調製の主要な操作は不純物として混入してくる蛋白の除去に関するもので、製品中の蛋白量が製品の純度の第一の指標である。緒言でも述べたように、除蛋白にはいろいろな方法が従来用いられているが、できるだけ簡易な安価な方法であることが産業上望ましい。著者らは除蛋白に関するいろいろな方法について検討してきたが、その中でとくに簡単で効果のある二、三の方法について実験結果を示した。

酸性で生ずる沈澱を除いた軟骨アルカリ溶解液に酸性白土および活性炭処理を加えると、製品の純度はかなり高くはなつたが、biuret 反応陰性にはならなかつた。しかし、アルカリ溶解液にアルコールを加えて得られた粗製 CSNa の溶液では、はるかに少量で biuret 反応陰性になつた。また、酸性白土に比べて活性炭は 1/4 量で十分であり、収量も良かつた。LLOYD の試薬（酸性白土の一種）やカオリンの効果はよく知られているが、活性炭を用いた例は報告されていないようである。

カチオン交換樹脂は架橋度の低いほどすぐれた除蛋白効果をあらわすが、Dowex 50 W-X 1 の使用によつてアルカリ溶解液、粗製 CSNa 溶液ともに biuret 反応陰性になるまで除蛋白された。Table 5 に見られるように、活性炭、酸性白土に比べて収量もよく、完全に Na 塩にすることができるところから見て最も有効な方法であると思われる。Dowex 50 W を用いる多くの実験例において、X-4 を用いても biuret 反応陰性の製品を得る場合が多いが、樹脂の蛋白吸着能力は X-1 よりもはるかに劣る。Dowex 1 を用いると若干の除蛋白効果が見られ、この場合には、CSA はアニオンであるから吸着による収量の減少が懸念されたが、本実験条件下ではわずかであり、Dowex 50 W と併用することによつて製品中に不純物として混入してくる塩類を除くことができると思われる。

Table 1~3 に示すように吸着剤を用いると無処理に比べて抽出 CSNa 量は著しく少なくなる。SCHUBERT¹³⁾ は chondromucoprotein (CSA と蛋白との複合体) 溶液をカオリンで繰返し処理すると、chondromucoprotein はカオリンに吸着され溶液中には何も残らなくなると述べている。著者らはアルカリ溶解を行なつているので、chondromucoprotein の結合は切れているものと考えられるが、最近 DOGANGES ら¹¹⁾ は牛軟骨を用いてアルカリで切れにくい結合の存在を示しているので、CSA の一部が蛋白と結びついた状態で蛋白と共に吸着される可能性があるように思える。

透析を省いて得た製品は透析したものに比べて、純度が高い。これはアルコール沈澱において、共存する蛋白あるいは蛋白分解物が NaCl 含有アルコールに可溶性となるためと考えられる。N 量の高い粗製 CSNa を NaCl 飽和 70 % アルコールで洗滌することにより、いちじるしく N 量が低下した著者らの結果¹⁴⁾からも推定される。透析の省略はアルコールの所要量を少なくするので有用な方法と考えられる。

Table 5 の実験に使用した粗製 CSNa は透析省略法で調製したもので比較的高いものであるが、これを除蛋白して得られた CSNa の N 量は 2.1~2.2 % であり、理論値 (2.78 %) に比べてかなり低い。Table 6 に Dowex 50 W-X 1 で処理して得られた CSNa 製品の分析値を示したが、他の二例の N 量は

Table 6. Analytical data of the product obtained by the Dowex 50 W-X 1 treatment.

	N	S	Hexosamine	Uronic acid	Hexose
	%	%	%	%	%
A *	2.16	6.19	26.9	40.0	1.31
B	2.52	6.17	30.0	32.8	2.18
C	2.70	6.13	31.5	35.3	3.24
Theoretical value of CSNa (C ₁₄ H ₁₉ O ₁₄ NSNa ₂)	2.78	6.36	35.5	38.5	0

* The product is the same as that shown in Table 5.

2.52 %, 2.70 % であつた。瀬尾¹⁵⁾の調製した鯨 CSNa (電気泳動分画前のもの) は N 量 3.07 % であり、やや高く、一方 LLOYD ら¹⁶⁾の調製した鯨 CSNa (アルコール分画前のもの) は N 量 2.3 % であり、低い値を示している。鯨軟骨 CSA の主成分は CSA-A であるが、Table 6 の分析値に見られるようにヘキソースの存在からケラト硫酸の混在が認められるが、ケラト硫酸の理論 N 量は CSNa のそれよりわずかに高い。また、CSA の末端にガラクトース、キシロースが存在して、chondromucoprotein の蛋白部分との結合に関与していることが最近認められたが¹⁷⁾、N 量に大きい影響を与えるほどの量ではない。N 量の低い原因は今後なお検討を要する。

要 約

鯨鼻軟骨アルカリ溶解液および粗製 CSNa 溶液の除蛋白法について検討し、次の結果を得た。

1. アルカリ溶解液を活性炭、酸性白土、イオン交換樹脂処理をしたところ、それぞれかなりの除蛋白効果が認められたが、とくに Dowex 50 W-X 1 で処理されたものは biuret 反応陰性まで除蛋白された。
2. アルカリ溶解液の透析の省略は除蛋白法として有効であつた。
3. 粗製 CSNa 溶液は 1 % 活性炭、4 % 酸性白土および Dowex 50 W-X 1 処理で biuret 反応陰性まで除蛋白された。
4. Dowex 50 W-X 1 などの処理で得られた CSNa はその N 量が理論値に比べて低い値を示した。

本研究を行なうに当たり、終始懇切な御指導と御鞭撻とを賜つた恩師富安行雄先生ならびに豊水正道先生に謹んで謝意を表し、また発表を許可された玄洋工業株式会社渡辺荒次郎会長に感謝する。

文 献

- 1) 中嶋昭正・森永晃平・田中晴夫：本誌，**30**，500~505 (1964)。
- 2) 中嶋昭正・田中晴夫：本誌，**32**，1049~1053 (1966)。
- 3) O. FÜRTH and T. BRUNO: *Biochem. Z.*, **294**, 153~173 (1937)。
- 4) M. G. SEVAG: *Biochem. Z.*, **273**, 419~429 (1934)。
- 5) 左右田徳郎・江上不二夫・堀米徳二：日化，**61**，46~49 (1940)。
- 6) 柴田哲夫・井谷 彰・関野和夫・堀越久雄：特許公報，昭和 37-18496。
- 7) Z. DISCHE: *J. Biol. Chem.*, **167**, 189~198 (1947)。
- 8) 厚生省食品衛生課編：食品衛生関係法規集 100/126ノ4~6 (1966)。
- 9) 古橋 保・内田和子：生化学，**33**，537~540 (1961)。
- 10) W. E. TREVELYAN and J. S. HARRISON: *Biochem. J.*, **50**, 298~303 (1952)。
- 11) P. T. DOGANGES and M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1498~1505 (1964)。
- 12) A. SOLS: *Nature*, **160**, 89 (1947)。
- 13) M. SCHUBERT: *Federation Proceedings*, **17**, 1099~1105 (1958)。
- 14) 中嶋昭正・田中晴夫：未発表
- 15) 瀬尾信子：生化学，**33**，465~470 (1961)。
- 16) A. G. LLOYD and R. G. PRICE: *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 496~504 (1964)。
- 17) J. D. GREGORY, T. C. LAURENT and L. RODEN: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3312~3320 (1964)。