原 著

クロレラの栄養学的研究 (その 14)

Nutritional Studies on Chlorella (Report 14)

クロレラ蛋白質の溶出分離について 1.

各種試薬に対する溶出と自家消化

On the Isolation and Extraction of Protein of Chlorella, *Chlorella V. vulgaris* (Part 1)

Extraction with Some Reagents and Releasing with Autolysis of Algae

国立栄養研究所栄養化学部 (Division of Chemistry of Nutrition, National Institute of Nutrition)

馬 場 春 夫 (H. Baba)

小 畠 義 樹 (Y. Kobatake)

田 村 敦 (A. Tamura)

田 村 盈 之 輔 (E. Tamura)

Extractions of the protein from fresh frozen algae with some reagents and change of the releasing of protein with autolysis were studied. On the protein extraction, algae was ground sufficiently with a little amount of reagent and sea sand in mortar and soaked in the reagent. The supernatant obtained from this treatment after centrifugation at 4000 r. p. m. for 20 minutes was used to determine the nitrogen extracted. These results are shown in Table 1. Also, the results of changes of releasing of protein with autolysis of algae are shown in Figure 1. Considering from the results shown in the Table 1, NaOH seems most extractable of all the reagents employed, the extracted put being 50% of total nitrogen of algae. On the other hand, only a little protein-nitrogen was extracted. With autolysis for 50 hours, 70% of total nitrogen of algae and 50% of total protein nitrogen became soluble. Figure 2 also shows the results of change of protein releasing with autolysis by paper electrophoretic diagrams. Figure 3 presents the electron-microscopic photography of observation of these process of autolysis.

1-9)

吾々は前報¹⁻⁹⁾にクロレラあるいはセネデスマスの蛋白質が含量, アミノ酸組成, などにおいてすぐれた結果を示し, 原色熱風乾燥クロレラでは消化吸収率が低いが, メタノールによる脱色処理により著しく向上し, 生物価, 蛋白効率動物成長にもすぐれることを報告した。しかしその際にも見られた通り, 脱色処理藻体においても, その細胞膜の変形は殆んど認められない様であり, 呈味, 臭気についても未だ食品として適当なものとは思われない。細胞膜の破碎については種々検討の結果から困難であることを認めたが, クロレラの上に述べた様な栄養学的に良好な性状の蛋白質をいわゆる Cell-free 物質として分離した場合には, 蛋白質の消化利用は勿論, 食品としての性質をも改良し得ることが期待される。

そこでクロレラあるいはセネデスムスの細胞内容物若しくは蛋白質を溶解抽出分離を行うため、水並びに各種試薬に対する溶解性、又自家消化によつて生ずる溶出性の変化について検討した。

クロレラの蛋白質の性状については、最近利用に関連してやや多くの研究報告を見るが、特にこれら淡水藻類の蛋白質については海藻即ちアサクサノリ、ワカメ、ギアンソウ、アラメ等について古くより見られる様な蛋白化学的あるいは酵素化学的な研究は殆んど見られない様である。¹⁰⁻¹²⁾
^{13 15)} ¹⁶⁾ ¹⁷⁾ ¹⁸⁾

実験 1 各種試薬による蛋白質の抽出

クロレラはその細胞膜が非常に強固であるため、ガラス製ホモジナイザー、海砂などによる搗碎では検鏡によつても、殆んどその破砕が認められない。抽出によつて大量の蛋白質を得るためには強力な音波による処理²⁰⁾か、或いは Fowden²¹⁾の行つた様な強大な圧力によつて圧搾する操作をしなければならないが、ここではこの様な特殊な装置を用いず、又蛋白の変性等も可及的少い処理によつて抽出し、その溶出量を比較した。

試料—徳川生物学研究所において培養収獲された新鮮藻体 *Chlorella vulgaris* を使用した。

試薬—抽出には蒸留水、0.5 M NaCl、0.1 N NaOH、及びイオン強度 0.045、pH 8.5 緩衝液（ペロナールソーダ）を使用した。

実験操作—クロレラ 10g を秤取し、少量の試薬を添加海砂とともに搗碎し、後夫々 4 倍量になる様に各試薬を加え、共栓瓶に入れて浸漬後振とうする。充分振とう後 4000 r. p. m. にて 20 分間遠心分離し、その上澄の一部をとり、10%の三塩化酢酸 (T. C. A.) を同量加え更に同様遠心分離して、上澄と沈殿についてケルダール法により N を測定した。

なお NaOH 抽出による遊離-N が非常に多いので微生物法によりこの区分のアミノ酸数種を定量し、水抽出の夫と比較した。実験法は第 2 報に準じた。¹⁾

実験結果 結果は Table 1 及び 2 に示す通りである。すなわち全-N については NaOH による抽出が著しく多く、試料中全-N に対して 60%，水抽出の場合は最低で同じく 12% に相当する量が抽出された。

Table 1. Extractable part of nitrogen of *Chlorella* (mg % per fresh algae)

Reagent used for extraction	Trichloroacetic acid treatment		Total nitrogen
	Supernatant	Precipitate	
H ₂ O	213	35.0	248
0.5 N NaCl	276	38.9	315
0.1 N NaOH	965	32.0	997
μ0.045 pH 8.5 Buffer	633	24.7	658

Table 2. Extracted amino acids from raw *Chlorella* (mg %)

Amino acid	Water-extracted	0.1N NaOH-extracted
Threonine	1.1	40
Valine	1.5	38
Leucine	—	49
Isoleucine	2.2	34
Lysine	—	40
Phenylalanine	—	27
Methionine	—	19
Arginine	—	52

TCA により沈殿する区分の N は何れも僅少ではあつたが、NaCl の場合がやや大きかつた。NaOH 抽出物中のアミノ酸量は非常に大きく、水抽出の場合は同一試料相当量の検液では大部分定量し得なかつた。

— can not detected at same concentrate of sample

実験2 クロレラの自家消化について

1. 自家消化による溶出-N区分の変化

以上の実験から抽出によつて得られるN区分の中 TCA により沈殿するN区分は非常に僅少であることを知つたので、次に自家消化を行つて、抽出されるN区分の量的変動を検討した。

試料—実験1と同様である。

実験方法 クロレラ 50g に4倍量の磷酸緩衝液 (pH 7.8 μ 0.1) を加え、それにトルオールを添加、同様処理後沸騰水浴上30分加熱を行つた試料を対照として、37°C 恒温器中に放置し、時々振とうした。一定時後これを更に振とうしてから一部をとつて 4000 r. p. m. 30分遠心分離を行い、その上澄について実験1と同様処理してNを測定した。

実験結果 Fig. 1 に示す通りであるが非蛋白-Nは自家消化の時間的経過にしたがつて急速に上昇を示し藻体全-Nの70%以上に達し、溶出する蛋白-Nも殆んど50%以上に達する。

2. 自家消化溶出区分の濾紙電気泳動

以上の自家消化によつて溶出する区分をイオン強度 0.1 pH 7.8 の磷酸緩衝液 No. 50 (東洋濾紙) 5時間 0.6 mA/cm 室温において濾紙電気泳動を行つた。試料の application は (一) 極側支持端より 3 cm (+) 側に 0.01 ml とした。又相対的な易動度を示すため、同時にオバルブミンを添加した検液をも使用した。

実験結果は Fig. 2. に示すようであり、原点附近に時間とともに上昇する蛋白の分劃がみとめられる。易動度からいつてグロブリン様蛋白のみが著しい。

3. 自家消化の電子顕微鏡による観察

自家消化の各ステージにおけるクロレラの状態を顕微鏡で検鏡した所、48時間あたりから内容に顕著な変化が認められ、これが蛋白質の溶出と関係するものと考え、更に電子顕微鏡による観察を行つた。

結果は Fig. 3. に示す通りである。

考察 以上の実験結果より明らかな様に、クロレラの細胞膜は非常に強固であつて乳鉢でま細する様な方法では蛋白質は殆んど抽出されず、TCA によつて沈殿しない非蛋白性-Nが比較的多量に抽出され、殊に

Fig. 1. Autolysis of protein of Chlorella at pH 8.5, 37°C with toluene

Fig. 2. Paper electrophoretic diagrams of releasing of protein from Chlorella with autolysis. ionic strength 0.1 pH 7.8 0.6 mA/cm 5 hr.

(A) 0 hr. Autolysis (fresh)

(B) 12 hr. Autolysis

(C) 48 hr. Autolysis

Fig. 3. Electron-microphotos of autolysing *Chlorella*.

稀アルカリ溶液抽出によると、この量は全-Nの約半量にも達し、この成分として微生物法によるアミノ酸を相当量認めた。この著量の非蛋白性-N若しくはアミノ酸の溶出が、試薬による膜の透過性の変化によつて細胞内にプールされたアミノ酸等が抽出されたものか、或いは蛋白合成途次のものが解離して来たものかは、明らかでないが、蛋白質の溶出は僅か乍ら、稀塩溶液で多い。即ちクロレラ蛋白質の溶出はpHよりもイオン強度に多く影響され、非蛋白性-Nの溶出がpHに影響される所が大きい事がうかがわれるので、アルカリ性の場合膜に蛋白分子は溶出されないが、より小分子のものが浸出する様な変化が生じたものと思われる。又自家消化による溶出については、消化そのものは非常に激しく、36時間乃至50時間内に殆んど大部分のNが溶出するが、その中の蛋白-Nの溶出は比較的緩慢である事を認めた。この事は自家消化によつても初期には膜の変化が少く、内容蛋白質の分解によつて生じた非蛋白-Nのみが増加するのであろう。これは電子顕微鏡像にも見られる通りで、12時間内外でリオフィリックな物質と思われる透明な部分が不透明な部分から分離し、50時間に至つて漸く膜の変化が生じている様に見られるので、この時におそらく漸次内容蛋白質の分解をうけないもの、或いは分解途次のものが溶出して来るものと思われる。この透明な部分は色素蛋白若しくはその変化したもので、自家消化の後期の遠心分離上清が濃緑色を呈するのはこれらの溶出によるもので、満田らのクロレラ蛋白の分離法はこの色素部分の溶離と、膜の変化を利用したものであろう。¹²⁾

要旨 可及的新鮮なクロレラ藻体を試料として、水及び各種試薬による抽出を試み、且つ自家消化によつて生ずる溶出の変化について検討した。全-Nについていえば、水、0.1 N NaOH, 0.5 N NaCl, pH 8.5 μ 0.045 緩衝液の中 NaOH 抽出が最大で、試料全-Nの約 50% が抽出される。又蛋白についていえば、いずれも僅少部分のみが抽出された。50時間の自家消化によると試料全-Nの70%以上が溶出し、蛋白-Nでは約50%が溶出する。これらの結果は抽出液を検液として行つた濾紙電気泳動並びに電子顕微鏡による観察においても認め得た。

終りに臨み、藻体の御供与をうけ徳川生物研究所、電子

顕微鏡写真撮影の労をとられた農業技術研究所水沢技官，微生物法によるアミノ酸定量について御協力頂いた本研究所松野ゆき技官に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) 田村，西原，磯部，松野：栄養学雑誌 17, 19 (昭34)
- 2) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 73 (昭34)
- 3) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 75 (昭34)
- 4) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 77 (昭34)
- 5) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 87 (昭34)
- 6) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 89 (昭34)
- 7) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 91 (昭34)
- 8) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 95 (昭34)
- 9) 田村，馬場，田村，小島：栄養学雑誌 17, 97 (昭34)
- 10) 島藺：必須アミノ酸資源の利用，研究報告 2 (昭32)
- 11) 神立：必須アミノ酸源の利用，研究報告 8 (昭32)
- 12) 満田，河合，鹿内，中沢：栄養と食糧 12, 149 (1959)
- 13) Kylin: Z. physiol. chem., 69, 169 (1910)
- 14) Svedberg, Katsurai: J. Am. chem. soc., 51, 3573 (1929)
- 15) 赤堀，藤原：日本生化学会総会 (1957)
- 16) 多勢：日農化 7, 732 (1931)
- 17) 田所，安部，吉村：北大海藻研報 3, 61 (1934)
- 18) 大平：日農化 18, 915 (1942)
- 19) 高木：日水誌 19, 798 (1953)
- 20) 東大農学部応微研，50—2 強力音波振とう器試験報告書 (1958)
- 21) Fowden: Biochem. J., 50, 535 (1952)

(受付：昭和34年10月30日)