原 著

クロレラの栄養学的研究 (その15)

Nutritional Studies on Chlorella (Report 15)

クロレラ蛋白質の溶出分離について 2.

クロロフィル蛋白質及びその他の蛋白質の分離

On the Isolation and Extraction of Protein of Chlorella, Chlorella Vulgaris (Part 2)

Isolation of Chlorophyll-Protein and Other Kinds of Proteins from 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)

From fresh algae as in the previous report, chlorophyll-protein was isolated by the method of Takashima, and other kinds of proteins were isolated from dilute saline water extracts of algae. Protein emulsion was separated from extracts of algae by salting out with ammonium sulfate and dialysed to water. Alpha picolin was added to 60% of the emulsion of protein and this mixture was stored in a cold room for one night or a long period with dialysing to picolin water 55%. And then, dioxane was added to 20 % of supernatant of this treatment and the precipitate produced was collected with the centrifuge. One gram of this purified matter contained 2.42mg. of chlorophyll and 9.55% of nitrogen. The content of chlorophyll-protein of this algae was about 2.5%. Figure 2 shows absorption spectrum of chlorophyll-protein in picolin and others. Other kinds of proteins were separated with turbidometric titration by salting out. Figure 1 shows vividly the present of protein fraction at some degree of saturation of ammonium sulfate; 37% 46% 49% 52% 57% 60% 63% 65% and 70% of respectively. At least 9 fractions of protein are present.

¹⁾ 前報において、我々は穏和な処理による蛋白質の抽出は困難である事、自家消化によると蛋白質の溶出も相当著しく、遊離-Nの上昇にともなつて蛋白-Nも全蛋白の50%以上に達する事を見た。新鮮な状態の藻体から僅かに抽出される蛋白質も、又自家消化にともなつて溶出される蛋白質もこれを沈澱分離する場合に濃緑色の色素を供つている。これが色素蛋白の様に色素を結合部分として持つものか、或いは変性時、若しくは沈澱生成時に色素を吸着したものか、又両者の混合物であるかのいずれにしても、メタノール等溶剤処理によつて抽出され難く乾燥粉末とした場合に殆んど黒色粉末となるので、その利用上好ましくなく、蛋白の利用率にも影響するものと考えられる。²⁾ 満田らは自家消化を利用して、その際溶離する色素を除き、無色の蛋白質の分

離を行つている。クロレラ中の蛋白質は分離に際して色素を非常に供い易いものであるので、クロロフィル等の色素が蛋白質のどのような区分にともなうか、その部分が少量であれば、その分画を取り除いて置けば、相当収量の良い方法で良質の蛋白質の採取が可能であろう。

本法においてはそれらを検討するため、高島法によるクロロフィル蛋白質の分離と、塩析濁り滴定による、その他蛋白質の硫酸分画を試みたのである。

実験 I 塩析による蛋白質の分画、分離—前報と同じ藻体に充分量の 0.5N 食塩溶液を加え海砂と共に乳鉢でよくすり一夜 0°C において得た抽出液 (3000r. p, m20分遠心分離) の少量について塩析濁り滴定を行つた。

塩析濁り滴定³⁾、硫酸飽和液を用い著者の一人が前に検討した方法を使用した。

上の試料検液を直接滴定した所、他の試料の際見られた様な、曲折の著しい $\Delta C/\Delta T$ 曲線が得られなかつた。(濾紙による電気泳動も行つて見たが吸着が著しく、明瞭な分離を見ることが出来なかつた)そこで、この上澄液に種々の飽和度になる様に硫酸飽和液及び蒸溜水を加えて放置し、塩析状態を観察した所20%飽和で微かな濁りを生じ33%では少時後、沈澱を生じた。そこで33%飽和で1夜放置後生じた沈澱を遠心分離して除いて得た上澄液について塩析濁り滴定を行つた所 Fig. 1 の様な結果を得た。この結果によると硫酸飽和度35%以上70%

Fig.1 Curve of turbidometric titration with as salting out (After removal by the centrifuge precipitate at 30% saturation of ammonium sulfate)

Degree of saturation
of ammonium sulfate

に及ぶ塩析域を持つ 8~9 種の分画を認めることが出来た。又飽和度33%以下で得た沈澱は暗緑色を帯び、それ以上の飽和度で得た物質は微黄白色であつた。そこでこれらの区分を夫々充分透析して得た物質の収量を測定した所、前者は40.45、後者は71.79の比を得た。

実験 II クロロフィル蛋白質の分離—実験 I の結果から、硫酸 1/3 飽和以下で沈澱する区分にクロロフィルが含まれていることが考えられるが、ウマゴヤシ⁴⁾よりクロロフィル蛋白質を分離する方法は既に高島⁴⁾によつて報告されている。クロレラが異常に高濃度のクロロフィルを含有することから、クロロフィル蛋白質の含量も他の一般植物と異なり、これが又蛋白質の利用性とも関係するのではないかと考えて高島の方法に準じクロロフィル蛋白質の分離を試みた。分離方法、高島法に準じたがその概要は次の通りである。

凍結したクロレラに食塩溶液を 0.5N になる様に加え、乳鉢にて攪拌混合し、0°C にて一夜放置し、4000 r. p. m. にて20分遠心分離した上澄液をとり、残渣には冷却した 0.5 N NaCl を加えて抽出をくり返して得た上澄を集め、硫酸アンモニウムを 100% 飽和になる様に加えて得た沈澱は50%飽和の硫酸アンモニウム液にて数回洗滌し、この沈澱を少量の蒸溜水に懸濁し、水道水に対して外液がネスラー試薬陰性に至る迄透析し、アルコール、エーテル処理風乾後秤量した所生ク

クロレラ100gにつき2.5gを得た。この風乾物は黒緑色の無定形物質であつた。又透析蛋白懸濁液に対して α -ピコリンを60%に加え、これを氷室中に55%ピコリン水溶液に対して透析し、生じた沈澱は遠心分離して除きデオキサンを60%加えて生じた沈澱を集め、真空デシケータに置き、N含量を求めた所9.55%であつた。デオキサン添加による沈澱生成に際しての濃度変化より見ると130mgの物質中に0.32mgのクロロフィルを含むことになる。尙高島はこの方法によつてクロロフィル蛋白の結晶を得ているので、試料をかえて数回試みた

Fig. 2 Absorption spectrum of chlorophyll protein in picoline (α)

が結晶を得る迄にいたらなかつた。

尙実験結果としてクロロフィル蛋白として得られた物質及びアルカリアルコール処理物質のピコリン中の吸光曲線をかかげる。(Fig. 2)

考察 我々は前に原色乾燥クロレラの蛋白質の人工消化或いは吸収率が、カゼイン等にくらべて著しく劣ることを見た。又これを脱色処理によつて改善し得ることをも確かめた。原色クロレラの蛋白質の消化吸収率は他の植物性蛋白質例えば穀類蛋白、豆類蛋白にくらべてもおとり、緑葉蛋白キャベツ、アルファアルファ⁵⁾ー蛋白に比してもやや劣るが、脱色処理により緑葉蛋白よりややすぐれたものになることは、原色クロレラ中に蛋白の消化を妨げる物質が存在するか、消化を妨げる状態にあり、或いはクロレラ蛋白そのものの中に消化を妨げる様な物質を結合して、それが脱色処理により除かれるという事が考えられる。

クロレラ中には他の植物組織に比べて相当にクロロフィルが多いので、これを色素部分として持つクロロフィル蛋白の様な蛋白も多く存在して、この様な蛋白が変性に際して色素を吸着して消化が劣るために蛋白の利用を妨げているのではないか、又これらの利用率を向上させるためには、クロレラより個々の蛋白を分離して夫々について消化率、アミノ酸の利用率などを検討する必要も考えられる。そこでこの報告においてはその分離方法、色素を吸着若しくは、結合する蛋白と、そうでない蛋白との分離、クロロフィル蛋白質の分離を試みたのである。これによると、クロロフィル蛋白質は他に見られたクロロフィル蛋白に比べて、量はやや多いが、全蛋白に対する割合はそれ程大きいものでなく、多くのクロロフィルはクロレラの収穫時或いは乾燥時に吸着されるものが多く、これが、蛋白への酵素の接触を妨げているものとも思われる。新鮮な状態で、抽出し得る蛋白の中、クロロフィルを含有しない蛋白は、そうでないものに比して多く、又高島法によつて得たクロロフィル蛋白もメタノールで容易にクロロフィルを遊離して白色の沈澱を生ずるので、藻体の取扱を蛋白変性を出来るだけ少くする様に注意すればおそらく処理により白色に近い脱色クロレラを得る事が可能となろう。尙我々の得たクロロフィル蛋白質は高島がウマゴヤシより得た本物質と比してピコリン中の吸収極大が短波長側(430m μ) 長波長側(670m μ)で良く一致する。N含量はやや高いが、クロロフィル含量は低く、文献値の様に1分子について2分子のクロロフィルを含有すると考えると分子量は約3倍のものとなる。しかし前述の様に著者等は結晶化して居らないのでこれらの点の検討は今後待ちたい。又ここに得られた蛋白の各区分については更に量的に採取して、消化率、アミノ酸組成、利用率等も検討したいと考えている。

要約 新鮮なクロレラ藻体より、蛋白質を抽出分離し、その成分を塩析濁り滴定により分析した所、硫酸アンモニウム飽和度30%以上において塩析域を持つ 8~9 種の成分を認めた。又これ以下の飽和度で沈澱し、クロロフィルを含有する区分を分取して、この区分より高島法によりクロロフィル蛋白質の分離を試みた。

文 献

- 1) 馬場, 小島, 田村, 田村: 栄養学雑誌 18, 3 (1960)
- 2) 満田, 河合, 鹿内, 中沢: 栄養と食糧 12, 149 (1959)
- 3) 馬場: 栄養学雑誌 16, 159 (1958)
- 4) Takashima: Nature. 169, 182 (1951)
- 5) Baldwin R. P., Loury J. R., Thiessen R. Food Research, 16, 107 (1951)

(受付: 昭和34年12月20日)

抄 録

食事中的蛋白量とアミノ酸のインバランス

Amino acid Balance and Imbalance. I. Dietary Level of Protein and Amino Acid Imbalance. A. E. Harper: J. Nutrition, 68, 405 (1959)

アミノ酸のインバランスがそれを超す蛋白の量によつてどの程度まで影響されるかをみるために、DL-メチオニン 0.3 % を補足したカゼイン 6 % を含む餌料と 8 % を含む餌料とにゼラチンをいろいろの割合に加えて鼠の成長度をしらべた。6 % カゼイン (メチオニン補足) で飼育した群はスレオニンを加えることによつて成長が刺激された。ゼラチンはスレオニンは含んでいるが、トリプトファンを含まない。これをたつた 3 % 加えるだけで成長を促進することが出来た。然し 3 % 以上加えると体重増加率はおちて、12 % のゼラチンを加えた時には 2 週間の増加がたつた 13g となつた。ゼラチンにかけているトリプトファンを加えるとこの成長のおくれを防ぐことが出来た。

次に、メチオニンを補足したカゼインを含む餌料にスレオニン欠のアミノ酸混合物を加えてインバランスを生じてみると、6 % カゼインの場合成長に大きなおくれが生じた。カゼイン含量が 4 % になるとこの成長おくれは減少し、又 6 % 以上にしても減少した。カゼイン 15 % ではこの欠陥は殆どなくなった。

又この 6 % カゼイン餌料にスレオニン欠混合アミノ酸 4 % を加えて成長度をおとし、これに 0.025~0.05 % のスレオニンをあたえるとこのおくれをとりもどすことが出来た。

最後にインバランスの度合を強めるためにスレオニン欠アミノ酸混合物を 6 % に増し、カゼイン量を 4, 7, 10 % としてみると何れも成長度がおち、特に 7 % カゼインの場合が最も著しかった。カゼインの割合に関係なく、DL-スレオニンを 0.05 % 添加しただけではこれを防ぐことは出来なかつたが、0.1 % で完全に防ぐことが出来た。これは理論的に予期したものと一致した。 (磯部)

生長期の鼠のアミノ酸要求量 The Amino Acid Composition and the Nutritive Value of Proteins. I. Essential Amino Acid Requirements of the Growing Rat. P. B. Rama Rao, V. chalam Metta, B. Connor Johnson: J. Nutrition, 69, 387 (1959)

40~50g の乳離れした雄鼠を用いて、21日間、カゼイン食を与えながら、最大の体重増加を得るような必須アミノ酸の量を求めた。

その結果、リジン、ヒスチジン、トリプトファン、イソロイシン、ロイシン、バリン、スレオニン、メチオニン+シスチン、フェニールアラニン+チロシンの要求量は、それぞれ、0.9, 0.21, 0.55, 0.69, 0.56, 0.51, 0.49, 0.72 % であつた。 (岩尾)

ミンクのB₁要求量 The Thiamine Requirement of the Mink for Growth and Fur Development. W. L. Leoschke, C. A. Elvehjem: J. Nutrition. 69, 211 (1959)

毛皮をとるミンクの生長に必要なビタミン B₁ の要求量は、飼料100g当り0.12mgであると。(岩尾)