セネデスミス及び食用酵母の

たんぱく酵素による分解について

Studies on the Digestion of Scenedesmus and Torula Yeast by Proteolytic Enzymes

(昭和36年1月25日受理)

磯 部 登 代 子
(Toyoko Isobe)

Scenedesmus and Torula yeast are considered to be useful in the terms of protein nutrition. The present paper deals with the digestibility of those microorganisms by pepsin and trypsin *in vitro*. The digestibility is expressed by the increase of non-protein nitrogen as per cent of total protein nitrogen.

The results are summarized as follows:

- 1) The digestibility of fresh, lyophilized and methanol bleached Scenedesmus by the action of pepsin at pH 2, 37°C for 24 hours was 23%, 30%, and 30%, respectively. By trypsin at pH 8 it was 40%, 59% and 51%, respectively.
- 2) The digestibility of the Torula yeast was 35% by pepsin and 40% by trypsin.
- 3) Successive digestion with trypsin after peptic hydrolysis showed almost the same digestibility as that by trypsin alone.
- 4) The approximate size of peptides formed by digestion was discussed from the determination of amino nitrogen increased.

緒 言

クロレラ、食用酵母等は蛋白質を多量に含有しているため蛋白質供給源として従来主として家畜の飼料等に使用されて来たが、蛋白資源に乏しい我が国に於いてはこれらを人の食品として用いることが研究されている。クロレラ、食用酵母の消化吸収率については必須アミノ酸資源の利用に関する研究に於いて種々の報告がみられる。

クロレラの人体消化吸収率について田村¹⁾の研究によれば被験者4名について脱色セネデスミス1日40gをビスケットに混入し、3日間投与した場合平均74.6%と報告されている。また、福井²⁾によると酵母の人体消化吸収試験では主食に酵母1%混入ビスケットを用い対照として非混入ビスケットを用いた場合、酵母ビスケットを与えた期間の蛋白吸収率は82.8%、対照期82.8%と報告されている。一方酵素による人工消化試験では福井²⁾によると酵母のトリプシン消化は0.005~10%トリプシン濃度系列で37°C 24時間、pH 8.6で46~84%、人体十二指腸液トリプシン力価附近では61~72%を示し、クロレラでは0.01%~10%の濃度系列で23~82.5%、人体十二指腸液力価附近では72~83%と報告されている。神立³⁾の研究ではクロレラのペプシン消化率は24時間で43.18

%を示し、田村¹⁾の研究ではトリプシン消化率は凍結乾燥クロレラ27.6%、メタノール脱色クロレラ64.3%、生クロレラ46%と報告され、脱色クロレラは著るしく消化率を向上している。

また、満田⁴⁾はクロレラのトリプシン消化率について凍結乾燥クロレラ59.7%、脱色クロレラ75%、原色クロレラ27.4%と報告し、またトルオール、クロロホルムにより自己消化後分離したクロレラ蛋白については著るしく消化率を向上し92.7%、93.1%と報告している。速水⁵⁾の研究ではクロレラの乾燥温度と消化率についてトリプシン消化率は脱色クロレラでは凍結乾燥66.2%、真空乾燥29.6%、原色クロレラでは凍結乾燥55.3%、真空乾燥14.4%と報告されている。筆者はペプシン、トリプシンを用いて人工消化を行ない蛋白質の加水分解によって増加するアミノ態窒素(A.N)及び非蛋白性窒素(N.P.N)を定量することにより人工消化率を測定し前記の研究を追試したので報告する。

実 験

1 材料 使用した Scenedesmus SP は新鮮セネデスミス、凍結乾燥セネデスミス、メタノール処理による脱色セネデスミスの三種で日本クロレラ研究所で培養製

造されたものである。酵母は東洋紡績株式会社犬山工場に於いてワルドホッフ式醗酵槽で連続培養されたもので分離水洗後ドラムドライヤーにて130°C 10秒以内で乾燥したものである。高熱処理後水洗乾燥したものそのまま水洗乾燥したものの二種を用いた。高熱処理とは或る程度水洗いたした酵母クリームを90°C 位に加熱し再び分離水洗後乾燥したものである。酵素は三国製薬製の濃ペプシン、持田製薬製の結晶トリプシンを使用した。

2 実験方法 人工消化試験 セネデススムまたは酵母を塩酸または磷酸緩衝液でペプシンの至適 pH 2.0, またはトリプシンの至適 pH 8.0 となし, Potter-Elvehjem 型のホモジェナイザーで500回転, 3分間磨砕した。基質の最終濃度は5%とした。この液に酵素を加え37°C に保温し, 一定時間毎に試料を採り, その除蛋白濾液について A. N または N. P. N を測定した。ペプシン消化は上記基質溶液 50cc に対し pH 2.0 に於いて濃ペプシン 125mg を加えて行ない, トリプシン消化は上記基質溶液 50cc に対し pH 8.0 に於いて結晶トリプシン 3.5mg を使用した。ペプシン-トリプシン 消化は前記と同様に先ずペプシンで24時間消化した後, 液の pH を 8.0 に調製し, トリプシンを添加し消化を続行したものである。

除蛋白法: Folin のタングステン酸法⁶⁾ によった。上記消化液 1cc, または 5cc に 10% Na_2WO_4 1cc, $\frac{2}{3}\text{NH}_2\text{SO}_4$ 1cc (または 2cc) を加えて全量を 10cc とし 30分後に濾過した。

A. N の測定法: Folin の比色法⁷⁾ によった。即ち除蛋白濾液 1cc について 1% Na_2CO_3 1cc, 0.5% β -ナフトキノンスルホン酸ソーダ 2cc を加え 50°C, 10 分加温後, 醋酸塩緩衝液 (pH 4.0) 2cc, 4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

2cc を加え全量 10cc とし, 530m μ に於いて吸光度を測定した。なお標準曲線はグリシンを使用し, 測定時と同様に除蛋白試薬を併用して作製した。

N. P. N の測定法: 消化液 5cc を採り前記の如く除蛋白した濾液 2cc について Micro-Kjeldahl 法により測定した。

ペプシン, トリプシンの活性: Anson^{8) 9)} のヘモグロビン消化法によった。2%変性ヘモグロビン液(牛血液で調製) 5cc に 0.2% ペプシン液 1cc, 結晶トリプシンでは 1mg% 液 1cc を加え 25°C, 10分加温後, 5%トリクロル醋酸 10cc を加え濾液 5cc に 0.5N NaOH 10cc フェノール試薬 3cc を加え発色する色調を測定してクロシン量を求め, Anson の Pepsin Unit を算定した。この実験で三国製薬製濃ペプシンは 1mg あたり 4×10^{-4} Anson 単位, 持田製薬製結晶トリプシンは 1mg あたり 1.4×10^{-2} Anson 単位で, 人工消化試験には何れも 5×10^{-2} 単位を使用した。

3 消化率の計算 2の項に記したように処理した pH 2.0 または pH 8.0 のホモジェネートについて次式にしたがって A. N 及び N. P. N % を時間を追って測定し, これによって消化の度合を制定した。

$$\text{A. N \%} = \frac{\text{消化後の除蛋白量} - \text{消化前の除蛋白量}}{\text{濾液の A. N 量} - \text{濾液の A. N 量}} \times 100$$

$$\text{N. P. N \%} = \frac{\text{消化後の N. P. N 量} - \text{消化前の N. P. N 量}}{\text{量} - \text{量}} \times 100$$

基質溶液中の A. N 量及び N. P. N 量の総 N 量に対する%は表 I の如くである。

4 N. P. N / A. N 比 消化によって生じた非たんぱく

表 I セネデススム及び酵母の N. P. N 及び非たんぱく性 A. N 量

*** PH		新 鮮	凍 結 乾 燥	メ タ ノール	水 洗	加 熱 水 洗
		セネデススム	セネデススム	脱色セネデススム	乾 燥 酵 母	乾 燥 酵 母
2.0	N. P. N *	5.0	4.9	1.2	7.7	4.5
	A. N **	5.0	3.2	0.6	4.9	3.6
	N. P. N / A. N	1.0	1.5	2.0	1.6	1.2
8.0	N. P. N *	7.0	12.3	2.7	6.8	7.1
	A. N **	6.0	4.7	0.9	5.9	3.6
	N. P. N / A. N	1.2	2.6	3.0	1.2	2.0

* 総 N 量に対する N. P. N の %

** 総 N 量に対する非たんぱく性 A. N の %

*** 試料溶液の pH

性成分の N.P.N 量を A.N 量で除した数である。モノアミノ酸ではこの比は近似的に 1 になる筈であり、一般的には N.P.N/A.N 比の大きなもの程ペプチッド分子が大きいものと判定しうる。

実験結果と考察

実験はすべて 2 回行ないその平均値を結果として表または図示した。

表 1 は消化前、即ち基質のホモジェネートが含む N.P.N 及び A.N 量で基質の総 N 量に対する % で示してあ

る。浸出される N.P.N 成分量は pH 8.0 の方が pH 2.0 に比し一般に多い。セネデススではメタノール脱色処理を施したもので N.P.N 成分が少なく、メタノール処理中にかなりの部分が洗い去られたと考えられる。

N.P.N/A.N 比は pH 2.0 浸出では 2 以下であり N.P.N 成分が主としてアミノ酸ないしは重合度の低いペプチドであることがうかがわれる。この比は pH 8.0 では少々高くなっており、重合度の少々高いペプチドも浸出されて来たことを物語る。

表 II、図 I について：セネデススをペプシンで分

表 II セネデススのペプシンまたはトリプシンによる分解

		新鮮セネデスス				凍結乾燥セネデスス				メタノール脱色セネデスス		
		N.P.N	A.N	N.P.N/A.N		N.P.N	A.N	N.P.N/A.N		N.P.N	A.N	N.P.N/A.N
ペ プ シ ン	hr	°	°		°	°			%	%		
	0.5	3.3	0.23	14	16	1.7	9.5	15	1.7	8.8		
	1	6.9	0.57	12	19	2.4	8.0	18	1.9	9.4		
	3	14	1.6	8.7	24	3.1	7.7	19	2.8	6.7		
	6	19	3.0	6.3	26	3.4	7.6	21	3.3	5.5		
	24	23	6.1	3.8	30	6.1	4.9	30	5.5	5.4		
	48	29	8.1	3.6	35	8.0	4.3	33	6.4	5.0		
ト リ プ シ ン	hr	°	°		°	°			%	%		
	0.5	5.4	2.5	2.2	9.6	4.0	2.4	21	1.8	12		
	1	10	3.4	2.9	14	5.0	2.8	27	2.2	12		
	3	17	5.0	3.4	28	6.3	4.3	32	2.9	11		
	6	26	13	2.0	36	12	3.0	37	5.1	7.0		
	24	40	15	2.6	59	17	3.5	51	6.7	7.5		
	48	48	17	2.8	64	19	3.3	51	7.9	6.5		

図 I 新鮮セネデススのペプシンまたはトリプシンによる分解

解した場合、N.P.N から見て新鮮セネデススの消化率が少々劣るといえるかも知れないが、メタノール処理というたんぱく質の強い変性を伴う処理を施しても消化率がとくに上昇するとはいえない。N.P.N/A.N 比は初期 10~15 程度で消化物が重合度の高いペプチドであることを示すが、消化の進むにつれて低下し、24 時間で 4~5 程度に達する。このことは恐らく初期に於いてセネデススたんぱくがペプシンにより大切に分解をうけ、生じたタングステン酸可溶の大型ペプチドが後漸時消化をうけて低分子ペプチドを生ずると解釈するか、または初期に生じたタングステン酸不溶物が後漸時小切りの消化をうけ低分子ペプチドを生じたかいずれかである。いずれにせよ N.P.N から見た消化率は 30% 程度で消化率が低いことは否めない。因みにカゼインは同一条件下で 80% 以上の消化率を示す。トリプシン消化の場合はペプシンの場合に比し N.P.N 50~60% の消化率を示す。N.P.N/A.N 比を見るとペプシンの場合に比し著しい特長は新鮮セネデスス及び凍結乾燥セネデススが分

解初期より 2.2, 2.4 の如き低値を示し、この値がほぼ一定値のまま消化が進んでゆくことである。分解初期より小切りの消化が進んでいると思われる。これに比しメタノール脱色セネデススは表Ⅲの酵母の場合と同様初期に N.P.N/A.N 比が高く時間と共に低下するが 24 時間でなお 7.5 の高値を示している。メタノール処理がセネデススたんぱくの性質を著しく変質しているためである。

表Ⅲは酵母のペプシン消化及びトリプシン消化の結果を示したものである。24 時間に於ける N.P.N 分解率は 35~40% で半分以上がタンゲステン酸不溶分として留まっておりあまりよい消化率とはいえない。N.P.N A.N 比は初期にやはり高い値を示すが時間と共に減少する。表Ⅱの新鮮セネデスス及び凍結乾燥セネデススがトリプシン消化の場合分解初期より著しい低 N.P.N/A.N 比を示すに反し、メタノール脱色セネデススは酵母と同じような比を示すことは前に指摘したとおりである。酵母がペプシンによってもトリプシンによってもメタノール脱色セネデススと同じ行動をとるのは酵母が乾燥または加熱という操作で変性を受けているからとも解釈

表Ⅲ 酵母のペプシンまたはトリプシンによる分解

		水洗乾燥酵母			加熱水洗乾燥酵母		
		N.P.N	A. N	N.P.N A. N	N.P.N	A. N	N.P.N A. N
ペ プ シ ン	0.5	18	1.2	15	17	1.2	14
	1	21	1.7	12	20	1.7	12
	3	25	2.2	11	24	2.2	11
	6	28	3.0	9.4	25	3.1	8.0
	24	35	3.9	8.9	35	4.0	8.8
ト リ プ シ ン	48	41	5.1	8.0	40	5.1	7.7
	0.5	18	0.8	23	24	1.5	16
	1	19	1.3	15	26	1.9	14
	3	26	1.8	14	29	2.4	12
	6	28	2.3	12	34	3.3	10
	24	39	4.6	8.5	43	4.5	8.5
	48	44	5.2	8.4	50	6.1	8.0

されよう。

表Ⅳ, V, 図Ⅱ は pH 2.0 でペプシン消化を行なった

表Ⅳ セネデススのペプシン-トリプシン併用による分解

	新鮮セネデスス			凍結乾燥セネデスス			メタノール脱色セネデスス		
	N. P. N	A. N	N.P.N/A.N	N. P. N	A. N	N.P.N/A.N	N. P. N	A. N	N.P.N/A.N
ペプシン	%	%		%	%		%	%	
24 hr	20	6.0	3.3	30	5.0	6.0	32	4.6	7.0
トリプシン	32	8.0	4.0	41	7.1	5.7	40	6.9	5.9
0.5hr	34			44	7.7	5.7	41	7.5	5.5
1	36	11	3.3	48	8.4	5.6	45	7.8	5.7
3	44			53	9.2	5.7	49	9.5	5.1
6	47	13	3.6	56	11	5.0	54	12	4.5
24									

表Ⅴ 酵母のペプシン-トリプシン併用による分解

	水洗乾燥酵母			加熱水洗乾燥酵母		
	N.P.N	A. N	N.P.N A. N	N.P.N	A. N	N.P.N A. N
ペプシン	%	%		%	%	
24 hr	34	4.0	8.4	34	3.7	9.2
トリプシン	38	6.2	6.2	42	6.4	6.5
0.5hr	39	6.5	6.0	44	7.2	6.1
1	40	6.8	5.9	45	7.8	5.7
3	43	9.5	4.5	46	9.2	5.0
6	49	10	4.9	49	9.3	5.2
24						

サンプルについて液の pH を 8.0 にあげたのちトリプシンを加えて消化をすすめたものである。N.P.N の分解率は 50% 程度で表Ⅱ, Ⅲのトリプシンの単独消化の場合より高いことはない。二重消化の効果は全く見られない結

果である。表Ⅳ, V の特長は N.P.N/A.N 比がほぼ一定値を保って時間に伴う変化の見られないことである。このことはペプシン消化によって生じたタンゲステン酸可溶性ペプチドが更にトリプシンの攻撃をうけて一層低重合度のペプチドを生ずる反応が殆んど行なわれていないことを示すもので、興味深い事実といえるであろう。従って、ペプシン消化に引続くトリプシン消化で増加する N.P.N 成分はペプシン消化をまめがれたトリクロール不溶分由来するものと推定される。

総 括

以上の実験から得られる結論は次のようである。

1) 新鮮、凍結乾燥、メタノール脱色の三種のセネデススの N.P.N 消化率は 24 時間ペプシン (pH 2.0) で 20~30% であり、トリプシン (pH 8.0) では 40~60% で

図Ⅱ 凍結乾燥セネデスモスのペプシン-トリプシン併用による分解

ある。凍結乾燥およびメタノール脱色処理セネデスモスは新鮮セネデスモスに比しわずかに消化率が大い。

2) 水洗乾燥および加熱後水洗乾燥酵母は上記条件でペプシンで35%, トリプシンで40%程度分解される。水洗乾燥酵母と加熱後水洗乾燥酵母との間に大きな差異を認めない。

3) セネデスモスまたは酵母をペプシン消化しついでトリプシンを作用せしめても分解率がとくに高まるとい

うことはない。

4) アミノNの測定により消化によって生じたペプチドの重合度について考察した。

本研究は東京大学島菌教授ならびに平井助教授の御指導によるものである。記して深甚なる謝意を表する。なおこの研究の研究費は必須アミノ酸研究会に負うところが大きい。合せて感謝の意を表する。またセネデスモスは徳川研究所の佐々博士、酵母は東洋紡績株式会社の三輪氏の御供与による。ここに感謝の意を表する。本報告の要旨は昭和35年5月栄養・食糧学会総会において口演した。

文 献

- 1) 田村： 必須アミノ酸研究 I 必須アミノ酸資源の利用に関する研究委員会 14 (1958)
- 2) 福井： " " " 23 (1958)
- 3) 神立： " " " 7 (1958)
- 4) 満田： 本誌, 12, 155 (1959)
- 5) 連水・篠： 本誌, 12, 69 (1959)
- 6) Folin-Wu: *J. Biol., Chem.*, 38 81 (1959)
- 7) Folin, O: *J. Biol. Chem.*, 51 377 (1922)
- 8) Anson, M. L.: *J. Gen. Physiol.*, 22 79 (1939)
- 9) Northrop, T. H.: "Crystalline Enzymes" p. 152 (Columbia University Press, New York.) (1939)

(共立女子大学 家政学部)

リ シ ン リ ッ チ な 酵 母 の 製 造

Saccharomyces cerevisiae からの 2-oxoadipic acid リジンからの生合成を、パン酵母製造と同様の醗酵条件で試み、糖蜜のみを炭素源とする培地で16%の熱水抽出できるリジンを含む酵母をえた。2-oxoadipic acid のリジンへの転化効率率は0.63であった。2-oxoadipic acid からリジンへの転化は大部分菌体の増殖中におこり、培

養時の通気量、先駆物質の添加量および添加時間等が菌体のリジン含量、転化効率に影響する。

Production of Lysine-Rich Yeast

by A. L. Jensen and P. Shu.

Applied Microbiol., 9, 12 (1961)

(津 村)