食用酵母の蛋白質成分抽出に関する研究

Studies on Extraction of Protein Fraction from Food Yeast

(昭和40年3月12日受理)

宮本 悌次郎
(Teijiro Miyamoto)遠藤 紀子
(Noriko Endo)多田 妙子
(Taeko Tada)村田 希久
(Kiku Murata)

Food yeast, *Mycotorula japonica* is a rich source of protein, but is hard to be digested. The yeast previously removed nucleic acid was treated at 37°C, for 20 hours in water solution with crude β -D-1, 3-glucanase preparation produced by mold, *Sclerotinia Libertiana*. Around 50% of crude protein (as nitrogen) originally present in the yeast was extracted by the first treatment.

From the residue, another 40% of the protein fraction was extracted with 0.5N NaOH at 37°C for 3 hours. The protein fraction of the first extraction of the yeast by the treatment with the glucanase solution was purified alternately with cation and anion exchange resin column chromatography in the yield of 50%. The most of the ash in the protein fraction was removed.

The amino acid compositions of the crude protein fraction and the purified preparation were compared with those of the original yeast.

亜硫酸パルプ 廃液を主な栄養源とする *Candida* 系酵母はその核酸成分が調味料原料としてすでに工業化されているが¹⁾, その残渣は蛋白質や B₁ 以外の B ビタミン源として²⁾ 家畜飼料に利用されているにすぎない。またこの酵母の栄養価に関する研究結果³⁾ によると消化率や生物価の点でも動物性蛋白質に及ばない。それでその蛋白質成分の有効な利用に関する研究は意義あることである。

満田⁴⁾ は酵母菌体からの蛋白質の抽出に苛性ソーダまたは尿素を用いてかなりの効果をあげている。一方江幡⁵⁾ は菌核菌の生産する β -D-1, 3 グルカナーゼが酵母細胞壁をよく溶解することを認めているので、これを酵母に作用させて抽出操作を重ねることにより菌体窒素の90%以上、1回抽出では50%程度が抽出されることを認めた。なおこの抽出物が無機物をかなり含んでいるのでその脱塩を試み、これをある程度精製した産物につきアミノ酸組成を測定し、未処理酵母のアミノ酸組成と比較したのでこれらの結果を報告する。

実験材料および定量方法

1. 使用酵母およびグルカナーゼ

実験には東洋紡績株式会社犬山工場製の酵母 (*Mycotorula japonica*) から核酸を除いた脱核酸酵母を用いた。

グルカナーゼは大阪細菌研究所製の菌核菌 (*Sclerotinia Libertiana* Fc 1) のふすま培養乾燥物に10倍量の水を加え、室温で2時間、ときどき攪拌しながら漬浸抽出し、濾過して濾液を酵素液とした。この液からある程度不純物を除くため、Visking の Cellulose tube に入れ、流水中で12時間透析した。透析により内液の窒素と灰分量は 1/10 程度に減少したが酵素活性に差はなかった。

2. 定量方法

総窒素の定量は Semimicro Kjeldahl 法, α -アミノ態窒素の定量はフォルモール滴定法により行ない、灰分量は試料をルツボ中で恒量になるまで灰化して測定した。アミノ酸の定量には常法通り試料に 6 N HCl を加え、110°C, 22 時間加圧水解したものを濃縮して塩酸を除き、pH 2.2 のクエン酸緩衝液にとかし、Spackman ら⁶⁾ に準じて日立 KLA 2 型 アミノ酸自動分析計を用いて測定した。ただしトリプトファンの測定には Spies ら⁷⁾ の方法に準じて試料を加水分解することなく硫酸中で *p*-Dimethylbenzaldehyde と反応させて比色定量した。シスチンは試料に 4 N HCl を加え、110°C, 5 時間水解後 *Leuconostoc mesenteroides* P-60 を用いる微生物定量法⁸⁾ (37°C, 22 時間培養, 比濁法) で測定した。

実験結果と考察

A. 酵母から蛋白質成分抽出法の検討

1. グルカナーゼ処理条件の検討

予備実験において酵母にグルカナーゼを作用させると反応液の pH が低下し、そのために反応後抽出部と残渣を遠心分離により分ける時に一度抽出された蛋白質成分が再び不溶性となり残渣の方に移行することが観察されたので反応液に緩衝液を加えるか、反応後 pH を補正して抽出蛋白質成分の沈でん部への移行を防ぐ必要を認めた。そこでまず酵母 1 g に対しグルカナーゼ液 1~10 ml を加え 37°C, 20 時間作用させてから NaOH で pH 6.0 とし、遠心分離して上清中に溶出する総窒素量を測定し、この値からグルカナーゼ液に由来する窒素量を差引いて抽出率を計算した結果を表 1 に示すが、酵素液量と抽出窒素量とは比例はしないが、この範囲内では酵素液量の多い程抽出窒素量も大となることが認められた。次に抽出時間の影響をみるために酵母 2.5 g にグルカナーゼ液 35 ml を加え、37°C, 3~24 時間作用させ、一定時間毎に反応液をとって同様に抽出窒素量を測定し、抽出率を計算した結果を表 2 に示すが、この範囲内では時間とともに抽出率が上昇することがわかった。

表 1 酵母に対するグルカナーゼ液量と N 抽出率
(酵母 1 g, 作用時間 20 hr)

グルカナーゼ液量 ml	1	2	4	6	10
N 抽 出 率 %	23	26	32	34	40

表 2 グルカナーゼ処理時間と N 抽出率
(酵母 2.5 g, グルカナーゼ液 35 ml)

処 理 時 間 hr	3	4	6	24
N 抽 出 率 %	32.5	38.0	39.5	47.0

図 1 NaOH 処理-グルカナーゼ処理方法と N 抽出率*

* 各 N 量とその抽出率の算出にはグルカナーゼ液に由来する N 量を差引いてある。

図 2 グルカナーゼ処理-NaOH 処理方法と N 抽出率*

* 各 N 量とその抽出率の算出にはグルカナーゼ液に由来する N 量を差引いてある。

2. NaOH 前処理後グルカナーゼ処理

核酸を除くまへの酵母, すなわち Magna 酵母を用いての予備実験の結果⁹⁾, まず 0.1 N NaOH で処理後, グルカナーゼを作用させて蛋白質成分を抽出するとグルカナーゼ処理のみの場合よりもかなりよく抽出されることが認められたのでこの 2 つの操作を組合わせて図 1 に示す

図 3 非透析グルカナーゼおよび透析グルカナーゼによる処理方法, N抽出率ならびに灰分量*

* 上清中N抽出率の算出にはグルカナーゼに由来するものを差引いて行なったが, Nおよびash量にはこの補正はなしていない。

図 4 グルカナーゼ処理抽出物の脱塩方式

表 3 樹脂処理におけるNならびに Ash の分布

	Total N		Formol N mg	Formol N / Total N	Ash mg	Ash / Total N
	mg	%				
グルカナーゼ処理抽出物*	194	100	75.1	0.39	322	1.66
Amberlite IR 120 透過液	38	19	8.9	0.23		
Amberlite IRA 410 透過液	50	26	26.7	0.53		
脱 塩 物	113	58	34.3	0.30	4.3	0.04

* 酵母 5 g に非透析グルカナーゼ 40 ml を 37°C, 20 hr 作用させて調整。

ように抽出した。その結果は図に示すように約69%の窒素成分が酵母細胞から抽出された。

3. グルカナーゼ処理後 NaOH 抽出

次にグルカナーゼで酵母細胞壁を溶解した後、NaOH により蛋白質成分を抽出した結果は図2・AとBに示すようで、Bでは緩衝液を使わずに反応後、遠心分離前に pH を補正するだけにとどめたが、緩衝液を使用したAの場合と窒素収量は殆んどちがわなかった。なおこの抽出残渣をさらに 0.5 N NaOH で処理すれば残る窒素成分の大部分が抽出され、全窒素抽出率は90%をこえた。

江幡⁵⁾はグルカナーゼ作用単独よりも他の酵素との共存においてよく細胞壁を溶解するが、あらかじめ酵母を NaOH などで前処理した後に作用させると細胞壁の溶解はさらに促進されるとのべているが、本実験に用いた脱核酸酵母はすでに高温乾燥や脱核酸などの前処理が加えられているので直接粗グルカナーゼを作用させても50%以上の窒素成分が抽出された。

4. 透析グルカナーゼ液による処理

以上のように抽出した酵母蛋白成分には多量の灰分を含んでいるが、その原因の多くは用いた粗グルカナーゼ液に由来するのでこれを透析して無機物の多くを除いた酵素液による抽出を試み、非透析酵素液による抽出と比較した。その方法と結果は図3に示すようで透析酵素を用いることにより非透析酵素液による窒素抽出率と大差なく、しかも灰分含量の少ない抽出物を得ることができたが、原料酵母の灰分/窒素=0.5 には及ばなかった。

(本実験における窒素抽出率がいずれも図2の実験の際の抽出率に及ばなかったのはグルカナーゼの lot の差によるものと思われる。)

B. 抽出酵母蛋白質成分の精製

透析酵素で処理した抽出蛋白質成分でもその灰分量はかなり高かったのでイオン交換樹脂による脱塩を試みた。カチオン交換樹脂として、Amberlite IR-120、アニオン交換樹脂として Amberlite IRA-410 をそれぞれ 5% HCl または 2 N NaOH で H型または OH型としたものを、内径 2 cm のカラムにそれぞれ 40 ml ずつ充填し、図4に示すように非透析グルカナーゼによる酵母抽出液を Amberlite IR-120 カラムに通して水洗後、ニンヒドリン反応を示さなくなるまで 1 N NH₄OH で蛋白質成分を脱着し、これを減圧濃縮後 Amberlite IRA-410 カラムに通し、水洗後ニンヒドリン反応が陰性になるまで 1 N HCl で脱着して減圧濃縮したものを脱塩物とした。この操作により表3に示すように灰分/窒素=1.16から0.04に減少し、比較的無機物の少ない蛋白質成分が約60%の収率で得られた。なおこの表に示したフォルモール窒素の全窒素に対する比からグルカナーゼ抽

表4 酵母, グルカナーゼ処理抽出物および脱塩物のアミノ酸組成

Amino Acid	脱核酸酵母		透析グルカナーゼ処理抽出物	脱塩物
	g/100g	g/gN	g/gN	g/gN
Alannie	3.1	0.37	0.44	0.62
Arginine	3.1	0.37	0.15	0.55
Aspartic acid	4.5	0.55	0.67	0.51
Cystine	+	+	+	0.15
Glutamic acid	5.8	0.70	0.78	0.20
Glycine	2.6	0.31	0.34	0.21
Histidine	0.9	0.11	—	0.12
Isoleucine	2.2	0.27	0.30	0.34
Leucine	4.1	0.50	0.40	0.62
Lysine	4.5	0.54	0.42	0.54
Methionine	0.6	0.07	0.04	0.06
Phenylalanine	2.5	0.30	0.25	0.33
Proline	1.8	0.22	0.16	0.11
Serine	2.7	0.32	0.32	0.23
Threonine	2.8	0.34	0.42	0.27
Tryptophan	0.4	0.05	0.05	+
Tyrosine	1.4	0.17	0.13	0.15
Valine	3.1	0.37	0.45	0.49

出物で約40%, その脱塩物で約30%の窒素が遊離のαアミノ態窒素として存在するのでかなり低分子の状態にまで消化されていることがわかる。

C. 原料脱核酸酵母および抽出蛋白質成分のアミノ酸組成

原料の脱核酸酵母と、同酵母 100 g を透析グルカナーゼ液で処理した抽出物* ならびにそのイオン交換樹脂処理による脱塩物* のアミノ酸組成を測定した結果を表4に示す。窒素あたりのアミノ酸組成は数種のアミノ酸を除き原料酵母とグルカナーゼ処理抽出物との間に大差なく、比較的一様に抽出されているが、脱塩処理によりそのアミノ酸組成にかなりの変化がみられた。なお抽出物中にシスチン、ヒスチジンが殆んど認められないのに脱塩物中に検出されたのは抽出物では不純物のためにこれらのアミノ酸が水解中に破壊されたが、脱塩物では純化されたために破壊されずに測定されたものと考えられる。

要 約

飼料酵母 *Mycotorula japonica* は高等動物の消化液では消化されにくい細胞壁をもっているが、これを菌核菌が生産する β-D-1,3 グルカナーゼを含む粗酵素液で

* 東洋紡績犬山工場において調整された。

処理して酵母蛋白質成分を有効に分離する方法を検討した結果、第 1 回の処理で酵母全窒素の約 50% が抽出され残渣をさらに 0.5 N NaOH で処理することにより全窒素成分の 90% 以上が抽出された。なお粗グルカナーゼ液にはかなりの灰分を含むため抽出物中の灰分含量が高まるが、粗グルカナーゼ液を流水透析することによりグルカナーゼ活性の低下なく、ある程度灰分を除くことができた。本酵母抽出物をカチオンおよびアニオン交換樹脂で処理することによりさらに大部分の灰分を除去した脱塩物と、その原料である脱核酸酵母およびそのグルカナーゼ処理抽出物のアミノ酸組成を測定した。

終わりに試料の提供ならびに種々のご援助をいただいた東洋紡績株式会社に感謝します。また研究費の一部は

必須アミノ酸研究委員会研究費にあおいだ。ここに併わせて感謝の意を表す。

文 献

- 1) 緒方浩一: Amino Acid and Nucleic Acid 発酵と代謝, (8), 1 (1963)
- 2) 三輪萬治: 必須アミノ酸研究, (II), 27 (1958)
- 3) 神立誠, 斎藤洋子: 本誌, 12, 75 (1959)
- 4) 満田久輝, 河合文雄, 壬生良, 鹿内健彦: 本誌, 17, 342 (1965)
- 5) 江幡淳子: 阪市大大学院理学研究科学学位論文(1963)
- 6) Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S.: *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)
- 7) Spies, J. R. & Chambers, D. C.: *Anal. Chem.*, 20, 30 (1948); *ibid*, 21, 1249 (1949)
- 8) 宮本悌次郎他: 阪市大家政紀要発表予定
- 9) 村田希久: 本誌, 15, 256 (1962)

(大阪市立大学家政学部)

ヒナの速い生長に必要な必須アミノ酸組成

ヒナを速く生長させることを目的として飼料中の必須アミノ酸量を求めた。試験に用いた基礎飼料はタンパク質+アミノ酸飼料で、このうちアミノ酸の量を種々に変えヒナの生長、飼料効率を測定した。その結果、必須アミノ酸 8.95% レベル, N 2.88% (タンパク質 18% レベル) で、次のようなアミノ酸組成をもつ飼料が最良であることを知った。

(飼料中%)		Arg	1.28	His	0.43
Lys	1.15	Leu	1.30	Ileu	0.80
Val	0.95	Phe+Tyr	1.33	Try	0.20
Met+Cys	0.73	Thr	0.78		

この組成のものは NRC 標準、ヒナの必須アミノ酸最少必要量 (8.30% レベル) の組成のものと比較するとヒ

ナの体重増において 25%、飼料効率において 15% 高かった。なお、この組成のアミノ酸量をそれぞれ 10% 減らした際の体重増は平均 1% 減、15% 減らした際は平均 5% 減、20% 減らした際は平均 10% 減である。これらのアミノ酸レベルは、ヒナの最少必要量を意味するものではない。

A Determination of the Essential Amino Acid Proportions Needed to Allow Rapid Growth in Chicks.

by D. C. Dobson, J. O. Anderson, R. E. Warnick: *J. Nutrition*, 82, (1), 67~75 (1964)

(宮崎)