タンパク食糧に関する研究(第6報)

Studies on Protein Foods (Part 6)

炭化水素資化性細菌々体の分離タンパク質の栄養価とその精製 Nutritive Values of the Protein Isolates of Hydrocarbon Assimilating Bacteria and its Purification

(昭和44年8月27日受理)

満田久輝* 外村 辨一郎*
(Hisateru Mitsuda) (Ben-ichiro Tonomura)
杉浦正毅* 安本 教伝*
(Masaki Sugiura) (Kyoden Yasumoto)

Isolation and purification of protein from bacterial cells (*Alcaligenes sp.*) which had grown on *n*-paraffin were investigated with the purpose of utilization of microbial cell protein for human food.

Protein was extracted with 2% NaOH from the dried cells. Protein isolates obtained from the extract by isoionic precipitation and following lyophilization showed a similar pattern of essential amino acids to that of the dried cells except for methionine, the content of which significantly decreased in the protein isolates. The first limiting amino acid was the sulfur containing amino acids for the both cases. *In vitro* digestion test by pepsin showed an increased digestibility of the protein isolates, which neared that of milk casein.

Dialysis of the alkali extract against water resulted in removal of an unpleasant odor and elimination of the cell wall materials. Protein fractions were isolated from the dialyzate by addition of calcium salt and the following dialysis against water, the ethanol precipitation and the isoionic precipitation. The protein fractions of high purity were obtained in relatively good yield by those simple procedures.

炭化水素資化性微生物の菌体タンパク質がタンパク食糧資源として大きな発展性を有していることは数年来指摘されてきたところである。著者らは前2報¹⁾²⁾において、*n*-パラフィン資化性酵母の一種からのタンパク質の抽出分離および栄養価について報告した。本報においては、*n*-パラフィン資化性細菌の一種についての同様の試みの結果を報告する。

実験材料および方法

供試材料：*n*-パラフィンを炭素源として成育した細菌 (*Alcaligenes sp.*) の乾燥菌体 (以下菌体 *A* とする) およびそれを脱核酸処理後乾燥したもの (以下菌体 *B* とする) を用いた。菌体 *A* および *B* の一般組成は Table 1

* 京都大学農学部栄養化学研究室

に示す如くである。前報¹⁾²⁾ に用いた酵母菌体に比して粗タンパク質含量は高く、炭水化物量は少ない。脱核酸後の菌体 *B* では粗タンパク質含量は *A* より高い。

Table 1. Proximate composition of the hydrocarbon-assimilating bacteria (*Alcaligenes sp.*)

	A	B*
Protein (N×6.25)	73.1%**	79.1%
Carbohydrate	12.8	11.8
Fat	3.0	5.8
Ash	3.2	2.3

* Pretreated for extraction of nucleic acids

** On dry basis

タンパク質の抽出分離：抽出には前報¹⁾において酵母菌体について用いた方法に準じた。すなわち、乾燥菌体を重量の20倍量の2% NaOH 溶液に懸濁し、37°Cにて10時間、振とう攪拌した後、遠心分離によって菌体残渣を除き抽出液を得た。

この抽出液に塩酸を加え pH4.5 として等電点沈澱で得た画分を凍結乾燥の後、アミノ酸分析および人工消化試験に供した。抽出液はまた、流水に対する透析を行ない、その際に沈澱する細胞壁物質を除去した後、カルシウム塩添加と再度の透析、エタノール沈澱、あるいは酸沈澱などによりタンパク質を回収し、これを凍結乾燥して分離タンパク質標品とした。

タンパク質量法：前報¹⁾に記した方法に従った。本文中に特に断りないかぎり、ケルダール法による粗タンパク質量を用いた。

細胞壁成分の加水分解とろ紙クロマトグラフィ：前報²⁾に記した方法に従った。

アミノ酸組成：先の報告¹⁾中の方法に従った。

人工消化試験：ペプシンによる人工消化試験は先の報告¹⁾の方法に準じた。

実験結果および考察

菌体および分離タンパク質の必須アミノ酸組成：乾燥菌体 A, B およびアルカリ抽出液を塩酸にて pH4.5 にし沈澱した画分を凍結乾燥したものについてアミノ酸分析

Table 2. Essential amino acid composition of the cells and the protein isolates of bacteria (*Alcaligenes sp.*) "A" (mg/gN)

	Cell	Protein isolates
Ile	352 (127)*	366 (135)
Leu	529 (190)	552 (203)
Lys	430 (155)	372 (137)
Aromatic	517 (186)	540 (199)
Phe	276 (99)	286 (105)
Tyr	241 (87)	254 (94)
S-contng.	170 (61)	98 (36)
Cys	—	—
Met	170 (61)	98 (36)
Thr	295 (106)	295 (109)
Trp	69 (25)	62 (23)
Val	418 (150)	434 (160)
E/T ratio	2.78	2.72
Chemical score	57	34

* The figures in the parentheses represent A/E ratios

Table 3. Essential amino acid composition of the cells and the protein isolates of bacteria (*Alcaligenes sp.*) "B" (mg/gN)

	Cell	Protein isolates
Ile	352 (127)**	380 (138)
Leu	542 (196)	582 (211)
Lys	378 (137)	374 (136)
Aromatic	561 (203)	554 (201)
Phe	308 (111)	303 (110)
Tyr	253 (92)	251 (91)
S-contng.	170 (61)	65 (24)
Cys	—	—
Met	170 (61)	65 (24)
Thr	292 (106)	296 (107)
Trp	56 (20)	66 (24)
Val	414 (150)	437 (159)
E/T ratio	2.77	2.75
Chemical score	57	22

* Pretreated for extraction of nucleic acids

** The figures in the parentheses represent A/E ratios

を行ない、必須アミノ酸組成を求めた。結果は Table 2, Table 3 に示されている。

乾燥菌体 A, B の分析値を比較すると、脱核酸処理を受けた B は Lys, Phe および Trp の含量がやや減少しているが、その他のものについては両者はほとんど等しい。

分離タンパク質標品の分析値は、菌体のそれに比して、A, B とともに Met 含量が減少している。特にその減り方は B において著しい。失われた Met の行方は、つきとめられてはいない。前報³⁾で *Micrococcus glutamicus* から尿素法によるタンパク質抽出の場合について推論されたように、Met が特に難溶性構造中に大量に組込まれているということが、この *Alcaligenes* の場合にも当てはまるかどうかは疑わしい。

1965年に FAO/WHO 合同委員会により報告⁴⁾された全卵タンパク質の必須アミノ酸組成を標準として比較すると、A および B において、菌体、分離タンパク質ともに第1制限アミノ酸は含硫アミノ酸である。この点は *Micrococcus glutamicus* の場合⁵⁾と様相を異にする。すなわち、*Micrococcus glutamicus* の場合は、全菌体の第1制限アミノ酸は芳香族アミノ酸で、調製された分離タンパク質では含硫アミノ酸が第1制限アミノ酸であった。この *Alcaligenes sp.* では分離タンパク質のケミカルスコアを含硫アミノ酸量から計算すると、A=34,

$B=22$ とかなり低い。しかし、もし含硫アミノ酸を十分に強化したとすると、次の制限アミノ酸は Trp で、その含量から計算したケミカルスコアは約80となり、ただ1種類のアミノ酸の強化だけで栄養価の著しい増大がみられることになる。他の必須アミノ酸含量のパターンは全卵のそれとかなり類似している。

ペプシン人工消化試験：乾燥菌体 A および B とそれぞれからの分離タンパク質についてのペプシンによる人工消化試験を行なった。ここに用いた分離タンパク質はアルカリ抽出液から直接等電点沈澱で得たものであり、牛乳カゼインを対照タンパク質として同様に処理した。

乾燥菌体から分離タンパク質を調製することにより、消化率の明らかな増大がみられ、分離タンパク質の消化率は牛乳カゼインと同程度にまで達した。 A と B は似た値を示し、脱核酸処理がペプシンによる消化率にほとんど影響を与えていないのは興味深い。

アルカリ抽出液の流水透析による脱臭と細胞壁成分の除去ならびに細胞壁成分の同定：前報²⁾に報告した如く、 n -パラフィン質化性酵母菌体からの分離タンパク質の調製に際しては、アルカリ抽出液の流水透析が脱臭と細胞壁に由来する非タンパク性物質の除去に有効であった。この操作をここで菌体 A および B からのアルカリ抽出液に対して用いた。

流水透析24時間後、 A 、 B いずれの抽出液からも白色沈澱を生じた。この沈澱画分は窒素含量の低い物質で、粗タンパク質含量は菌体 A より得たものは10%、 B より得たものは19%であった。これらを凍結乾燥後、硫酸により加水分解し、加水分解濃縮物についてろ紙クロマトグラフィを行なった。アルカリ性硝酸銀陽性のスポットは、 A 、 B ともに主なもの1個で、 B にはその他に非常に淡いスポットが2個認められた。主スポットは菌体 A 、 B ともに D-glucose と推定された。従ってこの沈澱画分は細菌細胞壁による多糖類 (glucan) を主成分とするものと考えられる。菌体 B からの沈澱物質について得られた2個の淡いスポットの物質は未同定であるが、脱核酸処理により生じた人工的なものか、あるいは脱核酸処理により多糖類の一部がアルカリによってより抽出され易くなったものと考えられる。

このようにして抽出液を透析して細胞壁物質を除去した後の上澄液から回収されたタンパク質標品はいずれも無味無臭であった。本実験に用いた細菌 (*Alcaligenes sp.*) の乾燥菌体は、 A 、 B ともに特異臭を有していたが、それは前報¹²⁾において用いた n -パラフィン質化性酵母 (*Candida sp.*) 菌体の有していた臭いとは異なる種類のものではあった。

分離タンパク質の調製：さきに酵母菌体からのタンパ

ク質の分離精製に効果のあったカルシウム塩と透析の組合わせ²⁾をここに応用した結果が Table 4, Table 5 に示されている。

Table 4. Protein fractionation of the extract* from bacteria (*Alcaligenes sp.*) cells " A "

	Protein recovery	Protein content
Ppt (Ca, D-H ₂ O)**	3.0%	89.6%
Ppt (Ca, D-H ₂ O, EtOH-30%)	20.3	100.1
Ppt (EtOH-30%)	14.8	87.5
Ppt (EtOH-30%, HCl-pH 5)	12.2	99.4

* 2% NaOH at 37°C for 10 hrs. Dialysis vs. running tap water for 24 hrs.

** D-H₂O means dialysis vs. water

Table 5. Protein fractionation of the extract* from bacteria (*Alcaligenes sp.*) cells " B "**

	Protein recovery	Protein content
Ppt (Ca, D-H ₂ O)***	—	—
Ppt (Ca, D-H ₂ O, EtOH-30%)	32.1%	95.8%
Ppt (Ca, D-H ₂ O, EtOH-30%, HCl-pH5)	9.2	93.1
Ppt (EtOH-30%)	29.6	91.2
Ppt (EtOH-30%, HCl-pH5)	10.1	89.3

* 2% NaOH at 37°C for 10 hrs. Dialysis vs. running tap water for 24 hrs.

** Pretreated for extraction of nucleic acids

*** D-H₂O means dialysis vs. water

アルカリ抽出液を流水に対して透析し細胞壁成分を除去した後の上澄液に CaCl₂ を3.3%になるように加え、再び流水に対して透析した。24時間後、菌体 A より得た抽出液中には沈澱すなわち Ppt (Ca, D-H₂O) を生じたが、菌体 B から得た抽出液中には沈澱は全くみられなかった。 A の Ppt (Ca, D-H₂O) は粗タンパク質含量89.6%であったが、この画分へのタンパク質の回収率は乾燥菌体粗タンパク質量の約3%にすぎない。

Ppt (Ca, D-H₂O) を遠心分離により除いた上澄液にエタノールを加えて最終濃度30%にすると、 A 、 B いずれの場合もタンパク質画分の沈澱すなわち Ppt (Ca, D-H₂O, EtOH 30%) を生じた。 A より得たこの沈澱はタンパク質含量 100% (ケルダール法、ビウレット法ともに) であり、この画分に約20%のタンパク質が回収さ

れた。Bより同様の操作により得られた画分のタンパク質純度はケルダール法によれば95.8%、ピウレット法によれば87.5%であり、Aの場合より低い値をあたえたが、ケルダール法で得た値を基にした回収率は32.1%と高い。Bの場合はこの沈澱を除いたあとの上澄液に更に塩酸を加えてpHを5.0に調整し沈澱した画分を集めた。この画分、すなわちBのPpt(Ca, D-H₂O, EtOH-30%, HCl pH5.0)は純度93%で約9%のタンパク質がここに回収された。

塩化カルシウム添加とそれに続く透析を省略して、エタノールによる沈澱およびそれに続く酸沈澱を行なってみた。その結果は同じくTable 4, Table 5に示されている。

アルカリ抽出液を流水透析して細胞壁成分を除いた後、直ちにエタノールを加えて最終濃度30%とし、沈澱すなわちPpt(EtOH-30%)を得た。Aより得たものはタンパク質含量87.5%で、この画分へのタンパク質の回収率は14.8%であったが、Bから得たものは純度91.2%で回収率は29.6%に達した。これらの沈澱を除去した後、塩酸を加えてpH5.0にして更にタンパク質画分の沈澱すなわちPpt(EtOH-30%, HCl-pH5)を生ぜしめた。Aから得たものは純度99.4%に達し、回収率は12.2%であったが、一方Bから得たものは純度89.3%とやや低く、回収率は10.1%であった。

ここにエタノールと塩酸で得た2つの画分を合わせてみると、Aでは約27%の回収率で純度約93%のものが、Bでは約40%の回収率で純度約90%のものが得られたことになる。純度においてはAがやや勝り、回収率においてはBがすぐれている。脱核酸の処理によって、より多量のタンパク質が分離可能になったけれども、それに含まれている少量の夾雑物は脱核酸処理によって、かえって除き難い状態になったのではないかと考えられる。

カルシウム塩と透析を用いる方法、およびエタノールと塩酸だけの方法で得た沈澱をそれぞれ合わせて計算し比較してみると、菌体Aではカルシウム添加によった場合は、回収率約23%で純度約98%のものを得、カルシウム添加のない場合では回収率約27%で純度約92%のものを得た。菌体Bからはカルシウム添加により回収率約41%で純度95%のものを、カルシウム非添加では回収率約39%で純度90%のものが得られた。いずれの場合もさきに酵母(*Candida sp.*)菌体から同様の方法によって得た分離タンパク質標品よりも純度はかなり高いが、殊にカルシウム添加により得たものは極めて高い純度を示した。

なお、これまで記してきた回収率はすべて出発物質の乾燥菌体の粗タンパク質含量に基づいたものであった。

いまアルカリ抽出液を流水透析し細胞壁物質を除去した段階での粗タンパク質含量は、Aでは用いた乾燥菌体粗タンパク質量の41.4%、Bでは58.6%であった。

従って、この点からの上記の分離タンパク質標品への回収率はAでは約60%、Bでは約68%となる。これらは前報²⁾にて示した酵母(*Candida sp.*)乾燥菌体からのカルシウム添加による分離タンパク質の調製の一例の場合とはほぼ等しい値である(第5報, Fig 2 参照)。

一般に細菌々体の粗タンパク質含量は酵母のそれよりも高く³⁾、本実験に用いた細菌(*Alcaligenes sp.*)の場合も、さきに報告した酵母(*Candida sp.*)よりもその粗タンパク質含量は高い。従って本報にて得た*Alcaligenes*菌体からの分離タンパク質標品の純度が酵母(*Candida sp.*)のそれよりもかなり高いことは驚くには当たらない。しかしながら、この比較的簡単な操作は、本細菌々体にはかなり有効に作用したといえよう。他の細菌類にもこれがそのまま応用出来るか否かはまだ不明で、今後の研究に待たねばならないが、本報告の結果だけからみれば、タンパク食糧資源として微生物菌体を利用する場合、もし、集菌操作の技術的困難さが克服されれば、細菌の方が酵母より有利な一面を有していると考えられる。

要 約

- (1) *n*-パラフィン資化性細菌の1種(*Alcaligenes sp.*)の乾燥菌体および、同菌を脱核酸処理したものの乾燥菌体から食糧としての利用を目的としてタンパク質の抽出分離精製を試み、その栄養価を測定した。
- (2) 2%NaOHによる抽出液から等電点沈澱により得たタンパク質標品の必須アミノ酸組成はメチオニンを除いては菌体のそれに近似していた。いずれの場合も第1制限アミノ酸は含硫アミノ酸であった。この分離タンパク質標品のペプシンによる人工消化率は乾燥菌体より著しく増大し、牛乳カゼインのその約95%に達した。
- (3) 2%NaOH抽出液を流水に対して透析して、脱臭および細胞壁成分の除去を行なった後、カルシウム塩の添加とそれにつづく透析、アルコール沈澱と等電点沈澱を組合わせて、タンパク質の分別を試み、高純度(87~100%)のタンパク質区分を比較的好収量で得た。

本研究の要旨は第23回日本栄養・食糧学会総会(昭和44年4月19日、於京都)において報告した。本研究の一部は文部省科学研究費(特定研究45019号)の援助により行なわれた。

文 献

- 1) 満田久輝, 杉浦正毅, 安本教伝, 外村辨一郎: 栄養と食糧, **23**, 62 (1970)
 - 2) 満田久輝, 杉浦正毅, 外村辨一郎, 安本教伝: 栄養と食糧, **23**, 66 (1970)
 - 3) 満田久輝, 安本教伝, 古川忠康: 栄養と食糧, **20**, 40 (1967)
 - 4) Joint FAO/WHO Expert Group: Protein Requirement (1965)
 - 5) Anderson, R. F. & Jackson, R. W.: *Applied Microbiol.*, **6**, 369 (1958)
-