草 類 蛋 白 質 の 栄 養 価 (第 6 報)

レッドクローバー細胞質蛋白質の随伴物質について

西 宏, 神 立 誠 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 5 月 11 日 受 理

Studies on the Nutritive Value of the Grass Protein. Part 6. On the Impurities of Cytoplasmic Protein Preparations of Red Clover

By Hiroshi NISHI and Makoto KANDATSU (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

第 1 報⁽¹⁾に述べたように草類の蛋白質は普通の方法では純粹に分離することが出来ない。J. W. H. LUGG⁽²⁾⁽³⁾はペントザン、ペクチン又はムシレージといったような物質が単離した蛋白質に混入して来るために窒素含量の高い純粹な蛋白質がえられないと述べている。しかし、これらの随伴物質の性質についての実験的根拠は示されていない。蛋白質の単離や正確なアミノ酸分析には、随伴物質の化学的性質を明らかにすることが必要なので、この点について研究を行った。

実 験

[I] 随伴物質の分離法の検討 随伴物質を蛋白質部分と出来るだけ完全に分離するために、蛋白質製品を下記の 4 つの方法で処理し、どの方法が一番よいか検討した。この実験に用いた細胞質蛋白質製品はレッドクローバーの乾燥粉末から第 1 報⁽¹⁾の方法で調製したもので、窒素含量 10.10% (水分、灰分除外) であった。

(1) 酸分解：第 1 報の結果をそのまま用いた。

(2) アルカリ分解：5 N NaOH で 18 時間加水分解し、HCl で酸性とし、生じた沈澱を集め再沈澱をもう一度行い、えられた沈澱を乾燥秤量した。

(3) 酵素分解：蛋白質試料溶液 100 cc (窒素含量 76.4 mg) に局方含糖ペプシン 200 mg を加え、これに等量の pH 1.2 の Sørensen 緩衝液を加え⁽⁴⁾、37° で 96 時間消化後、遠心分離し、沈澱を水で 3 回洗い、次に沈澱に 1 N NH₃-NH₄Cl (1:2) 緩衝液 40 cc と水 160 cc を加え⁽⁵⁾、これに局方パンクレアチンの懸濁液 2 cc (パンクレアチン 11.1 mg に相当) を加え、37° に 96 時間消化し、後 HCl を加え pH 2.6 とし、生じた沈澱を遠心分離し、水で洗滌した。ペプシン消化後の上澄液とパンクレアチン消化後の最後の沈澱について全窒素を定量した。

(4) 70% 硫酸処理：リグニンの分離法に従い、試料 0.5 g に 50 倍量の 70% 硫酸を加え、16 時間室温に放置後、水 70 cc を加え、2 時間逆流冷却器をつけて煮沸し、残渣を濾過洗滌した処、不溶物は極めて少量

Table 1. Decomposition of Cytoplasmic Protein with Various Reagents

	Humin to original preparation (%)	Nitrogen in humin (%)	Humin N to N of original preparation (%)	Soluble N to total soluble material (%)
Hot acid*	27.55	3.17	7.21	15.48
Hot alkaline	14.10	4.68	6.55	11.00
Proteolytic enzyme	47.64	8.35	39.40	12.00
Treatment with 70% H ₂ SO ₄	little	—	—	—

* data from Part I

だつた。

以上の結果を Table 1 に示す。

酸分解の値はそれ以外のもの

とは異つた試料からえられた値

で、厳密な意味での比較はむづ

かしいが、非蛋白質部分が多く

えられ、その中の窒素含量が低

い結果、即ち蛋白質部分と随伴物質が最も完全に分離される結果を示すのは酸分解であると云えよう。

なお酵素分解の際の消化率はペプシンで 26.1%，ペプシンとパンクレアチン合せて 60.6% であった。この値は A. POLLARD と A. C. CHINALL⁽⁶⁾ がオーチャード及びライグラスについてえた値 (ペプシンで 16.6%，ペプシン、トリプシン、エレプシン併用でオーチャードが 58%，ライグラスが 64%) にほぼ匹敵している。いずれにしても草類蛋白質の人工消化率は余り高くはない。

[II] 細胞質蛋白質及び酸不溶性フミンの吸収スペクトル 随伴物質の性質についての見当をつけるために生葉からえた細胞質蛋白質と酸不溶性フミンの稀アルカリ溶液の吸収スペクトルを調べた。結果は Fig. 1, 2, 3

Fig. 1. Adsorption spectra of alkaline solution of red clover cytoplasmic protein

Fig. 3. Adsorption curve of acid insoluble humin by Beckman's spectrophotometer, especially on the region of 240~280 mμ

Fig. 2. Adsorption curve of acid insoluble humin by Beckman's spectrophotometer

に示す Fig. 1 からのはつきりしたことは何も知りえなかつたが、300 mμ 附近、250 mμ 附近の山はそれぞれカテキン及びフェノール系統の物質の存在を暗示している。Fig. 2 では 270~250 mμ 附近に弱い吸収がみられ、これはリグニンの吸収の位置にほぼ等しいので更にこの範囲の吸収を測定した。結果は Fig. 3 に示した。Fig. 3. からフミンの吸収は 250~255 mμ の間が最も顕著であることがわかる。リグニンは 270 mμ ~280 mμ の間に最大吸収帯が表れるから、リグニンでないことは明かである。

〔III〕 酸不溶性フミンのニトロベンゼン酸化による分解

第 1 報に述べたようにフミンが OCH_3 基を含んでいること、溶剤に対する溶解性及び吸収スペクトルの位置等から、フミンがベンゼン核をもつた化合物の重合体ではないかと想像されたので、フミンを分解してその構成単位を検出する目的で、最初にリグニン構成物質の研究法である K. FREUDENBERG らのニトロベンゼン酸化法⁽⁷⁾を適用してみた。

フミン 6.7 g にニトロベンゼン 12.5 cc と 2 N NaOH 250 cc を加え、回転オートクレーブを用いて 3 時間 160° に加熱後放冷し濾過、濾液を水蒸気蒸溜し、ニトロベンゼン、アニリン、アゾ及びアゾキシベンゼン等の試薬や試薬の反応生成物を溜去し、残液を微アルカリ性でベンゼンで 24 時間減圧抽出した。ベンゼン抽出液は更に 20% NaHSO_3 、2 N NaOH で順次抽出し、常法によりアルデヒド分、フェノール分及び中性分をえた。ベンゼン未抽出残液は H_2SO_4 で酸性 (pH 1.5) とし、再びベンゼンで 24 時間減圧抽出し、この部分を酸分とした。

Table 2. Yields of Aldehyde, Neutral, Phenol and Acid Fraction by Nitrobenzene Oxidation of Acid Insoluble Humin

	Aldehyde Fraction	Neutral Fraction	Phenol Fraction	Acid Fraction	Residue
Yield %	0.5	15.1	2.8	7.3	63.0
Nitrogen	—	+	+	+	+
FeCl_3 reaction	—	—	—	—	—
Appearance	yellowish oil	dark brown oil	yellowish brown solid	dark brown oil	dark brown powder

最後の未抽出残液中の不溶部は濾過洗滌し、乾燥、秤量して未分解残渣とした。各区分の収量及び性質は Table 2 の通りである。

以上の区分のうち収量の大きい中性分、フェノール分及び酸

分から単一化合物の単離をこころみた。

(1) 中性分 減圧で浴温 200° まで蒸溜し、少量の溜出物中に黄色針状結晶をえた。これを PCl_5 と加熱しアゾベンゼンをえた。従つて溜出物は試薬の反応生成物であろう。中性分についてはこれ以上追究しなかつた。

(2) フェノール分 減圧昇華 (2~3 mm, 120~130°) し、えられた黄褐色柱状結晶を融点の上昇がなくなるまで減圧昇華をくりかえした。えられた結晶の性質及び分子式は次の通りである。

黄色柱状結晶、融点 152° P 及び S なし、ニンヒドリン反応：陽性

分子量測定. RAST 微量法によつた.

カンファーク : 40.00, 融点降下度 13.0°

分子量=213

分析値 C 72.08%, H 5.76%, N 13.57%, O 8.59%

$C_{12}H_{12}N_2O$ としての計算値 : C 73.33%, H 5.71%, N 13.33%, O 7.62%

分子式 $C_{12}H_{12}N_2O$

(3) 酸分 : ベンゼンに溶かし 10% $NaHCO_3$ で抽出し結晶をとろうとしたが、極少量の結晶様物質しかえられなかつた.

以上の結果からニトロベンゼン酸化法は、第一に未分解残渣が多く、第二に分解抽出物中に窒素がふくまれ、これが試薬に由来するものかどうか判定しにくいために、フミンの構成単位を明らかにするためには不適当に思われた。しかし本実験によりフミンがリグニンと同じ構成単位をもつものでないことは明らかである。何故ならリグニンならニトロベンゼン酸化によりアルデヒド区からヴァニリンがとれる筈であるからである。

[IV] 加里熔融 ニトロベンゼン酸化法では目的をはたせなかつたので加里熔融法を検討した。試料節約の意味でニトロベンゼン酸化後の未分解残渣を加里熔融した。

ニッケル坩堝中に 20 g KOH と 5 cc の水を加え、100° で熔融したものの中へ未分解残渣 3.8 g を順次加えてとかし、温度を 260° に上げ、255~265° の間に 30 分間保ち、冷後 450 cc の水を加え、HCl で中和し、 $NaHCO_3$ を加えて微アルカリ性とし、エーテルで 46 時間抽出した。エーテル抽出部は [III] と同様にしてアルデヒド区、フェノール区と中性区に分け、エーテル未抽出部は H_2SO_4 で pH 1.5 とし、更に 48 時間エーテル抽出した。エーテル抽出液を 10% $NaHCO_3$ で抽出し酸分とした。残液から前と同様にして未分解残渣をえた。収量及び外観は Table 3 に示す。

Table 3. Yields of Aldehyde, Neutral, Phenol and Acid Fraction obtained by Kali-fusion of Undecomposed Residue in Experiment III

Yield %	Aldehyde fr.	Neutral fr.	Phenol fr.	Acid fr.	Residue
	trace	0.6%	1.8%	10.3%	36.8%
Appearance	— brown	viscous solid	brown viscous solid	dark brown oil	dark powder

この結果では分解物が殆ど酸分に集中しているので、この部分について検索した。酸分を熱水で抽出し、活性炭でできるだけ脱色し、 H_2SO_4 で酸性とし、エーテル抽出する。エーテル抽

出液にリグロインを加え生じた沈澱をエーテルにとかし、脱色濾過し、エーテルを溜去すると淡黄色粉末をえた。これを 2 回減圧昇華 (5~10 mm, 浴温 120~130°) 白色粉末の昇華物をえた。これを再び無水エーテルにとかし、無水石油エーテルを加えて沈澱させる操作をくりかえし少量の柱状結晶をえた。この性質は次の通りである。

融点 : 192~193°

$FeCl_3$ 反応 : 褐色 (水溶液), きたない緑色 (アルコール溶液)

LIBERMANN 反応 : 陽性. Br の吸収 : なし

少量の水に溶かし pH 試験紙で明白な酸性を示す。

分析値 : C 59.09%, H 4.77%, O 36.14% S, N, OCH_3 は存在しない。

実験 [III] [IV] の結果を比較すると、第一に分解抽出物に窒素が含まれていないこと。第二に未分解残渣が少いこと。第三に分解生産物が酸分に集中するという 3 つの理由で、構成単位追究には便利である。

[V] 酸不溶性フミンの加里熔融 実験 [IV] はニトロベンゼン酸化の未分解残渣を用いたので、今度は直接酸不溶性フミンを用いて実験した。

蛋白質試料の調製は第 1 報の方法と、J. W. H. LUGG⁽⁶⁾ の方法を用いた。えられた蛋白質の収量、窒素含量の比較と、それぞれの蛋白質試料からえられた酸不溶性フミンの収量と元素分析値を第 1 報の値とあわせて Table 4 に示す。

実験によりえられる酸不溶性のフミンの元素分析値、特に OCH_3 の値が異つている。このことは蛋白質製品がその調製の時期により OCH_3 含量が異なるか、加水分解中にうける変化が少しの実験条件の差によつて影響をうけることを示しているように思われる。

上のようにしてえられた酸不溶性フミンを実験 [IV] と同様の方法で加里熔融し、微アルカリ性でエーテル抽

Table 4. Yields and Their Properties of Protein Preparations and Humin obtained from Acid Hydrolysate of Protein

Method of Isolation	Yields of protein preparation (%)	N % of protein prep.	Humin obtained from protein prep. by acid hydrolysis				
			Yields%	C %	H %	N %	OCH ₃ %
Method described in Part I*	—	12.03	27.55	61.92	7.26	3.17	9.96
Method described in Part I**	10~15***	12.14	27.85	56.88	4.94	4.25	2.24
Method described by LUGG (1944)	35.3	11.45	20.2	58.90	5.89	3.87	2.14

* Data from Part I. Sample prepared at 20th May, 1948

** Sample prepared at July, 1951

*** We could not calculate the yield accurately, because true protein N of grasses was not estimated

Table 5. Yields of Volatile Acid, Non-volatile Acid and Non-acid Fraction (Phenol, Aldehyde and Neutral) obtained by Kali-fusion of Acid Insoluble Humin

Expl. No.	Non-acid fraction%	Volatile acid fraction %*	Non-volatile acid fraction%	Residual fraction %
1	1.8	18.0	8.0	27.0
2	3.0	10.1	7.7	30.5
3	3.7	—	9.0	40.5

* Calculated as acetic acid

出後、母液を酸性にし水蒸気蒸溜により揮発性酸を除き、再びエーテル抽出を行つた。揮発性酸は $N/10$ NaOH で滴定した。それ以外は [IV] と同様にして各区分に分けた。但し表にはフェノール、アルデヒド、中性分

は合計したものを書いた。結果は Table 5 の通りである。

酸分はエーテルに溶かし、脱水芒硝と活性炭で乾燥脱色後濾過し、減圧で濃縮し、これに白濁を生ずるに至るまで無水石油エーテルを加える。しばらく放置後上澄を傾斜する操作をくりかえすと最初は褐色粘稠な沈澱がえられるが、最後には淡黄色の粉末がえられる。これを更に繰返して精製すれば、最後に少量の白色柱状の結晶がえられる。この物質は次の通りである。

(1) 融 点 $192\sim 193^\circ$

(2) 分子量 RAST 微量法によつた。

カムファー K : 40.2. 融点降下 : 19.5° . 分子量 = 184(3) 分析値 : C 59.64, H 5.14%, N, S, OCH₃ はない。C₉H₁₀O₄ とした計算値 : C 59.34, H 5.44%. 分子式 C₉H₁₀O₄

(4) 呈色反応

FeCl₃ 褐色 (水溶液), きたない緑色 (アルコール溶液). LIBERMANN 反応 : 陽性(5) ペーパークロマトグラフィによる R_F 値 R. A. EVANS⁽⁹⁾ の方法で本物質の R_F を測定した結果 72.0 であつた。(6) アセチル化 : アセチルクロライドを用いてアセチル化⁽¹⁰⁾し白色粉末をえた。

分析値 : C 58.06, H 5.02%.

C₉H₈O₂ (OCOCH₃)₂ とした計算値 : C 58.65, H 5.26%. 従つて上の分析値から本物質が 2 価のフェノールであると云える。(7) カルボキシル基の定量 : 試料 16.4 mg を極少量のアルコールにとかし水で稀釈し 10 cc とし, $N/100$ NaOH でフェノールフタレインを指示薬として滴定した。

中和当量 158. カルボキシル基の数 1.15 (計算値) 滴定の終点が明瞭でなかつたので誤差は大きい。この数字からカルボキシル基は 1 箇と推定される。

(8) 側鎖の決定 側鎖数をしらべるため過マンガン酸加里酸化⁽¹¹⁾を行つたが、少量の黄色粉末をえたにすぎなかつた。分析値 : C 57.25%, H 5.07%

この実験からは側鎖数は推定出来なかつた

以上を総合して本物質の構造式を推定すると C₆H(OH)₂(CH₃)₂COOH 又は C₆H₃(OH)₂CH₂·CH₂·COOH が考えられる。

次にエーテル抽出されなかつた部分、即ちエーテル残液を濾過して未分解残渣を除いた濾液から次のようにして蓐酸を検出した。即ち濾液を 1/3 に濃縮し、これに BaCl₂ を加え生じた沈澱を 5% HCl で 3 回振盪抽出し、抽出液に NaOH を加え中和する。この時生じた沈澱を 1% HCl に溶かし、これに CaCl₂ 溶液を加え、生じた

沈澱を再び 1% HCl に溶かし、湯煎上に加熱しながら 10% NH_4OH で微アルカリ性とし再沈澱する操作をくりかえし、最後に濾紙上に集めた沈澱を Cl^- がなくなるまで洗滌し、100~105° で乾燥した。

分析値 : C 16.66, H 2.37, Ca 27.40%.

計算値 $(\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ として : C 16.44%, H 1.37, Ca 27.40.

よつてえられた物質は $(\text{OOC})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ で加里熔融により蓚酸のえられたことも明らかである。

考 案

1. レッドクローバー蛋白質製品の随伴物質の化学的性質を明らかにするため、蛋白質製品を酸分解してえた酸不溶性フミンを加里熔融しその構成単位を追究した。その結果カルボキシル基を含む二価のフェノールとその蓚酸をえた。

2. 随伴物質が J. W. H. LUGG⁽²⁾⁽³⁾ の云うように多糖類系統に属するものであれば、フミンを加里熔融してもフェノール物質はえられないであろう。蓚酸は多糖類の加里熔融からもえられるが、リグニンの加里熔融によつてもえられている⁽¹²⁾。従つて蓚酸がえられたことは随伴物質が多糖類である証明にはならない。又第 1 報に述べたように蛋白製品中には多糖類は検出されていない。

以上の事実から随伴物質が多糖類とは考えにくく、むしろフェノール性物質の重合体であると考えの方が合理的であろう。

3. 蛋白質中のフェノール性物質については、生草中のフェノール性物質が磨砕の際に重合し、蛋白質と結合し、それ以後の操作で終始蛋白質と行動を共にすることが推定される。

尚、元素分析は東大農学部農芸化学科マイクロ分析室の方方におねがひした。記して謝意を表する。

研究費の一部は農林省応用試験研究費によつた。

(1) 神立, 西 農化, 25, 562 (1952).

(2) J. W. H. LUGG Protein Metabolism in the Plant (by A. C. CHIBNALL). appendix (1939).

(3) J. W. H. LUGG : Advance in Protein Chemistry, Vol. V. 233 (1949).

(4) E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. G. KÜSTER : Z. Physiol. Chem., 171, 70 (1927).

(5) R. WILLSTÄTTER u. H. PERSIEL Z. Physiol. Chem., 142, 245 (1925).

(6) A. POLLARD and A. C. CHIBNALL : Biochem. J., 28, 326 (1934).

(7) K. FREUDENBERG, W. LAUTSCH u. K. ENGLER Ber., 73, 167 (1940).

(8) J. W. H. LUGG and R. A. WELLER :

Biochem. J., 38, 408 (1944).

(9) R. A. EVANS, W. H. PARR and W. C. EVANS : Nature, 164, 674 (1949).

(10) R. L. SHRINER and R. C. FUSON : The Systematic Identification of Organic Compounds 3rd Ed. 87.

(11) *ibid.*, 198.

(12) A. WINSHOLD : Cellulose Chemie, 13, 158 (1932).

訂正 第 1 報 (本誌, 25, 562 (1952)) の 566 頁, 第 7 表中次の点を訂正します。

		誤	正
Histidine	N	3.68	4.18
Cystine	N	1.18	0.68

Summary

1. For the purpose to clarify the chemical properties of impurities in the protein preparation of red clover, acid insoluble humin obtained by acid hydrolysis of protein preparation was degraded by alkali fusion, and dihydroxyphenyl mono-carboxylic acid and oxalic acid were found in the degradation products.

2. If the impurities were polysaccharide-like substances — mucilage etc. — as J. W. H. LUGG⁽²⁾ assumed, phenolic substances would have not been found. As oxalic acid is obtained from polysaccharides by alkali fusion and also from lignins, the presense of oxalic acid in the degradation products do not prove that the impurities are polysaccharides. Also, polysaccharides were not detected in the protein preparations as described in Part I.

From these facts it may be more reasonable to assume that the impurities are the phenolic substances rather than the polysaccharides.