アルコール資化性酵母より得た分離蛋白質の 2, 3 の特性

芝 崎 勲*・安川照雄*・浅田祥司*

Preparation of Protein Concentrates and Their Functional Properties
from Cells of Alcohol-assimilable Yeast, *Hansenula* sp.

ISAO SHIBASAKI, TERUO YASUKAWA and SHŌJI ASADA

The object of this report is to describe the isolation procedure and functional properties of protein concentrates from cells of newly-isolated yeast, *Hansenula* sp.

Yeast protein concentrate was prepared with a yield of about 60% by ordinary alkali extraction. Yeast cells were incubated at 30°C for 60 minutes in 0.05 *N* NaOH solution, centrifuged and extracted protein was precipitated by the addition of mineral acid to pH 3.4. The yield of protein increased slightly in case of alkali-extracting at higher temperature and its nucleic acid content reduced to about 1%.

Cellular RNA was preferentially released from freeze-dried cells with a rate of 90% or more by incubating at 45°C for 60~120 minutes in 0.02 *M* phosphate buffer at pH 7.0. The rate of leakage of RNA was increased by applying "heat shock" at 55°C for 15 seconds during early incubating period. It was found to be necessary to incubate at higher temperature (55°C) in case of fresh yeast cells. The protein concentrate of low nucleic acid content was also obtained by using calcium chloride as a precipitant of protein.

The viscotric behavior to alcohols and viscosity change in alkali solution of the isolated protein were similar to that of soy protein. Water retention (at 4°C or 100°C) and emulsifying capacity of isolated protein were not inferior to soy protein and milk casein and especially it was found that protein concentrate precipitated by the addition of calcium chloride was superior to casein.

(Received May 7, 1974)

蛋白質食飼料資源の不足を補うものとして、種々の原料、とくに非炭水化物を基質として得られる微生物菌体の生産が注目されており、すでに中間工業的なプラントの域を脱して大量生産化が諸外国で実を結びつつあるのが現在のいわゆる single cell protein (SCP) 生産の世界的な趨勢である。

一方このようにして得られる微生物菌体を食料として利用するに当っては、食品栄養学的な面からの検討とともに食品加工技術的な面よりの研究が必要である。しかし後者、とくに微生物菌体を食品素材として利用するための系統的な基礎研究は未だ十分とはいえない¹⁾²⁾。

本研究は微生物菌体より種々の方法にて抽出分離される蛋白質標品について、他の食品素材、すなわち大豆蛋

白、小麦グルテン、カゼイン、藻類分離蛋白などと比較しながら蛋白食品素材としての価値を評価することを目的とするものである。本報では、新に分離したエタノール資化性酵母 (*Hansenula* sp.) の菌体より蛋白質を抽出し、食品素材として利用する上で重要な 2, 3 の特性ならびに低核酸含有標品を得るための方法について検討した結果を述べる。

実験方法

1. 供試酵母

本報では新に土壌試料より分離したアルコール資化性の *Hansenula* sp. を供試したが、この酵母はエタノールを基質とすると、かなり増殖速度は早く、エタノール

* 大阪大学工学部醗酵工学科 (吹田市字山田上)

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University. Suita-shi, Osaka.

ルの他にプロパノール、ブタノール、プロピレングリコール、グリセリンなどをよく資化することを認めている(比増殖速度(μ_{max}) $=0.36 \text{ hr}^{-1}$; 使用培地(1 l 当り): エタノール 20 ml, 硝酸ソーダ 3 g, リン酸二水素カリウム 1 g, 塩化カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 0.5 g; 基質に対する菌体収率は 52.6%)。

保存培地より上記培地 100 ml を含む 500 ml 容マイヤーフラスコに一白金耳接種し, 30°C, 18 時間振盪培養したものを前培養とした。本培養は上記培地 17 l を含む 30 l 容ジャーファーメンターで, 30°C, 通気量 1.0 vol/vol/min, 攪拌 300 rpm の条件で 24 時間培養した。得られた培養液より集菌, 洗浄し, 凍結乾燥 ($2 \times 10^{-8} \text{ mmHg}$) して菌体を保存し実験に供した。

2. 菌体成分の分析

粗蛋白質はマイクロキールダル法による総窒素 $\times 6.25$ で示したり, ビューレット法あるいはフォーリン・ローリー法を用いて求めた³⁾。DNA, RNA は Ogur, Rosen 法によって分画し, それぞれインドール法, オルシノール法で求めた⁴⁾。アミノ酸組成は菌体を 6 N-塩酸で 22 時間加水分解して後, 日立製アミノ酸分析計 (KLA-3B) により分析した。

3. 蛋白質抽出と除核酸処理

保存酵母菌体を乾燥重量の 20 倍量の抽出液に懸濁し, 振盪 (120 rpm) 攪拌しながら加温抽出した。一定時間保持した後, 5000 rpm, 10 分間遠心分離して細胞残渣を除去し褐色の抽出液を得た。

除核酸処理のためには, 酵母菌体を 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 5 g/l となるように懸濁し, 加温処理して一定時間ごとに 5 ml ずつ試料を遠心分離管に採り, 10,000 rpm, 10 分間処理した上澄液中に含まれる蛋白質, RNA, DNA 量を測定した。

4. 粘度など諸物性の測定

粘度はオストワルド型粘度計を用い, 測定結果は還元粘度で表わした。この場合試料は 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) に溶解し 30°C で測定したが, 一部の実験では 0.1 N 苛性ソーダ溶液に溶かした。

保水力の測定は SHARMAN の方法に準じ⁵⁾, 乳化力は INKLAAR および FORTUIN の方法によって測定した⁶⁾。

ペプシン消化試験は AOAC の方法に準じて実施した⁷⁾。

実験結果

1. 供試酵母菌体の一般成分分析

供試酵母菌体の一般成分分析値ならびにアミノ酸組成

Table 1. Analytical data of freeze-dried yeast cells employed (*Hansenula* sp.).

Cell composition (%)		Amino acid composition (g/100 g of freeze-dried cells)			
Crude protein	47.4	Lys	3.64	Ala	2.55
Crude fat	9.04	His	0.97	Cys	0.063
Crude fiber	5.2	Arg	2.21	Val	2.54
DNA	0.86	Asp	3.79	Met	0.74
RNA	9.44	Thr	2.43	Ileu	2.23
		Ser	1.95	Leu	3.38
		Glu	6.33	Tyr	1.05
		Pro	1.14	Phe	1.78
		Gly	1.96		

分析結果は Table 1 のごとくであって成分的に一般酵母に比べて特異な点は見出されない。

2. アルカリ抽出条件

酵母菌体より蛋白質を抽出するためには, 物理的, 化学的あるいは酵素的な方法があり, これらを単独ないし併用によって一般に抽出効率 60~70% の値が得られている^{8)~12)}。

供試酵母菌体については予備的に, 高压, 超音波, 苛性ソーダ, アンモニア, 沸騰水などによる抽出法について検討した。その結果常用される苛性ソーダ抽出法によって 60% 程度の抽出成績がえられたので, この方法について 2, 3 の条件を検討した。

Fig. 1 には抽出時のアルカリ濃度の影響を検討した結果を示した。0.5 N 苛性ソーダではキールダル窒素の溶出は大であるが, 一部分解を受けているようで, ビューレット反応陽性物質の抽出率よりみると 0.05 N の場合よりかなり低収率であった。それで以下の実験では 0.05 N 苛性ソーダ, 30°C, 60 分間振盪の条件を標準とした。苛性ソーダ抽出時の温度の影響について検討した結果は Table 2 に示したが, 抽出温度の上昇とともに抽出率は増加する傾向にあって 70°C 付近でピークに達しそれ以上ではかえって低下することがわかった。この場合の抽出蛋白質中の RNA 量は Table 2 に示したように抽出温度の上昇とともに低下することも認められた。

3. 除核酸のための処理条件

酵母菌体は核酸含有量が高く栄養的にみて必ずしも好ましいものではなく, むしろ有害とされていて¹³⁾, 色々の除去方法が提案されている³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。供試菌体の除核酸のためまず処理温度条件を検討した結果, 45°C が適当していることを認めたが, 菌体懸濁液の pH は Fig. 2 に示したように 7.0 が最適であって, 45°C, 120 分の処理

Fig. 1. Effect of alkali concentration on protein extraction at 30°C
Extraction efficiency was calculated by the following formula:

$$\text{Extraction efficiency} = \frac{\text{Extracted N} \times 6.25 \text{ or protein}}{\text{Total protein (Total N} \times 6.25)} \times 100$$

Extracted N $\times 6.25$ { 1: 0.095 N NaOH
2: 0.05 N NaOH
3: 0.5 N NaOH
Extracted protein (Biuret reaction positive substance) { 1': 0.005 N NaOH
2': 0.05 N NaOH
3': 0.5 N NaOH

Table 2. Effect of extraction temperature on protein yield and its RNA content

Extraction temperature (°C)	Yield of protein* (%)	RNA content in extracted protein (%)
20	52.4	5.14
30	53.6	3.61
50	56.3	2.47
60	60.3	1.41
70	61.6	1.16
80	56.1	1.24
90	52.6	1.07
100	49.8	1.02

* precipitated from alkali extracted solution by the addition of HCl to pH 3.4.

で95%のRNAを除去することができた。この場合、振盪条件によって影響を受けるが、本実験条件下では菌体濃度が5~10 g/lの範囲で最高の抽出効果が得られた

Fig. 2. Effect of pH on the release of RNA from yeast cells at 45°C for 120 minutes.

The following buffers were used:
pH 3—0.02 M acetate buffer
pH 5—0.02 M citrate buffer
pH 7.8—0.02 M phosphate buffer
pH 10.5—0.02 M carbonate buffer

Fig. 3. Release of intracellular materials from yeast cells

Yeast cells (5 g/l) were suspended in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) and incubated at 45°C.
1: RNA 2: DNA 3: protein

が、菌体濃度の影響は顕著なものではなかった。Fig. 3には0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に5 g/l となるように懸濁させた場合の菌体内成分の漏洩経過を示しているが、45°C、30~40分の処理で90%以上のRNAを優先的に除去することができた。従ってこのような予備処理を行った後アルカリ抽出を行うことによって、1%以下の低核酸含有量の蛋白質標品を得ることができる。

MAUL ら¹⁴⁾は加熱条件を検討し、“heat shock”の有効なことを認め、三段階に温度条件をかえて振盪抽出し

Fig. 4. Effect of heating conditions on the release of RNA from yeast cells

- 1: incubated at 45°C
- 2: incubated at 45°C after heat shock at 55°C for 15 seconds
- 3: incubated at 45°C after heat shock at 55°C for 1 minute

ている。Fig. 4 は供試菌体について“heat shock”を行った場合の効果例を示したものであるが、55°C、15秒という処理の有効なことがわかった。しかし、45°C、120分という条件に比べて必ずしも顕著な効果があるとはいえない。また55°C、1分処理では初発の抽出効果はかなり大であるがその後の抽出率は著しく劣っていた。さらに菌体の除核酸の効率を上昇させる目的で、ホモゲナイザーまたは超音波処理、あるいはリボヌクレアーゼの添加を試みたが十分な併用効果は認められなかった。

以上の結果は凍結乾燥菌体を用いた場合の結果であるが、生菌体についても検討を加えた。その場合の温度条件としては45°C、55°C、60°Cを採用したが、高温ほどRNAの漏洩速度は大となるが、60°Cでは処理10分以降の漏洩の増加はなく、55°C、30~60分処理が最も有効であり、90%以上RNAを除去することができた(この場合も、65°C、1分というheat shockが有効なことも認めている)。

以上のほか、アルカリ抽出温度の上昇によって分離蛋白質中のRNA含有量がTable 2に示したように低下するし、さらにTable 3に示したように抽出液より蛋白質を塩化カルシウムあるいは塩化ナトリウムによって沈澱させることによっても低核酸含有の蛋白質標品を得ることができた。

Table 3. Yield of isolated protein by the addition of CaCl_2 and NaCl and RNA content in isolated protein

Concentration of precipitant (mM)		Isolated protein	
		Yield (%)	RNA content (%)
CaCl_2	20	23.2	0.96
	40	30.1	1.23
	60	48.4	0.77
	80	84.1	1.03
	100	85.0	1.16
NaCl	20	15.3	0.64
	40	16.6	0.69
	60	48.7	0.76
	80	53.3	0.93
	100	50.4	0.84

Protein was isolated by 0.05 N NaOH at 70°C for 60 minutes.

Fig. 5. Scheme for isolation of protein from yeast cells
* pretreated for the reduction of nucleic acid

4. 酵母菌体より蛋白質の分離

以上の実験結果をもとにしてFig. 5に示したような分離法を設定した。分離蛋白質標品Protein 1, 2, 3は灰白色ないし淡褐色の弱い酵母臭を有する粉末であって、その成分分析値はTable 4に示した。Protein 3は除核酸処理した場合のProtein 1であって、いずれも蛋白質含有量は80%以上であり、菌体から抽出される蛋白質に対しProtein 1 64%, Protein 2 25%の収率であった。セファディックス G 75のカラムクロマトグラフィーによって分子量を推定すると、両者とも55%が分子量4万, 30%が2.5万, その他は1万前後の蛋白質よりなることが明かとなり、抽出温度が高くなるほど、蛋白質、核酸とも低分子化することが認められた。

5. 分離蛋白質標品の2, 3の特性

Table 4. Analytical data of isolated protein preparations

Component	Protein 1	Protein 2	Protein 3
Crude protein	80.9	86.4	86.5
Crude fat	9.84	10.64	—
DNA	0.25	0.12	—
RNA	4.37	0.64	0.61

Fig. 6. Effect of protein concentration on the reduced viscosity

Soy protein (water soluble protein fraction) and Protein 1 were dissolved in 0.01 M tris buffer solution at pH 8.6.

1: soy protein 2: Protein 1

Fig. 5 の分離方法によって得た標品について食品素材として重要な 2, 3 の特性を検討した。Fig. 6 は Protein 1 について種々の濃度における還元粘度の値を大豆蛋白(脱皮大豆を水抽出し噴霧乾燥したもの)の場合と比較したものであっていずれも 4% 前後の濃度から著しい粘度上昇が認められた。Protein 1 の粘度は pH 11 附近で最高となり、42°C に粘度に対する温度効果の break point があった。一般に蛋白質は変性をうけると粘度の増加が認められるが、この点大豆蛋白とアルカリ溶液中での粘度変化、およびアルコールに対する挙動について比較した結果、両者の傾向はかなりよく類似した。さらにまた種々の塩類の添加効果を調べたが、カルシウム、バリウム、マンガン塩の添加によって粘度の増加を、塩化カリウム、塩化マグネシウムの添加では減少の傾向にあることを認めた。大豆蛋白では加熱とゲル化の関係がよく検討されているが¹⁴⁾、Protein 1 では 70°C 以上の加熱によって粘度の上昇をきたすことも認めている。

酵母分離蛋白質の保水性ならびに乳化力を大豆蛋白、

Table 5. Water retention capacity of protein preparations

Sample	Water retention capacity (%) at 4°C	Water retention capacity (%) at 100 °C
Protein 1	42.0	58.3
Ca Protein 1*	64.0	70.3
Protein 3	—	60.4
Soy protein	62.6	74.2
Milk casein	70.6	46.0

* Prepared by the addition of calcium chloride to a protein solution.

Water retention capacity was determined by Sharman's procedure.⁵⁾

Fig. 7. Emulsifying capacity of protein preparations

1: soy protein 2: milk casein

3: Protein 1 4: Ca protein 1

Emulsifying capacity was determined by INKLAAR and FORTUIN's procedure⁶⁾.

カゼインと比較した結果が Table 5 および Fig. 7 であって、Protein 1 の低温 (4°C) での保水力は他の試料に比べて小さいが、加熱によってかなり向上するし、Ca Protein 1 ではほぼ大豆蛋白と同程度の値が得られた。乳化力は Protein 1, 3 はカゼインと同程度であったが、Ca Protein 1 では大豆蛋白にまさる値が得られた。

ペプシン消化試験では、Protein 1 は凍結乾燥菌体より当然消化性がすぐれており、45°C、16 時間で大体 75% の値がえられた (Fig. 8 参照)。

考 察

すでに非炭水化物を基質とする SCP の工業生産は確立されるとともに、その食飼料への利用のための基礎研究も進展している。しかし従来微生物菌体の食品栄養学的研究発表は多いが、食品加工のための基礎研究の発

Fig. 8. Time course of pepsin digestion of protein preparations

1: casein 2: Protein 1
3: freeze-dried cells of *Hansenula* sp.
4: freeze-dried cells of *Saccharomyces cerevisiae*
Digestibility was determined by AOAC method.⁷⁾

表は比較的少ない。本研究ではこの点を考慮して、種々の基質より得られる微生物菌体の食糧化を目標とした蛋白質の分離法の確立、および食品素材としての利用のための基礎的研究を行なうことを目的としているが、本報では新に分離したアルコール資化性の *Hansenula* sp. について検討してえた結果を述べた。

微生物菌体より蛋白質を分離するためには色々の方法があるが、予備試験の結果をもとにして汎用されているアルカリ抽出法を採用し、菌体濃度 5~10 g/l, 0.05 N 苛性ソーダ, 30°C, 60 分, pH 3.4 での酸性沈澱, という条件を設定した。しかしこれは一応の標準条件としたものであって、得られる蛋白質標品の食品素材として具備すべき諸特性との関連においてさらに検討を要するものと考えている。酵母菌体は核酸含有量が 10% にも及ぶが、このような菌体をそのまま多量摂取するとき尿中の尿酸量が異常に増加することが認められ色々の身体障害の起ることが示されていて、安全なレベルまで核酸含有量を低下させる必要があるといわれている¹³⁾。このために色々の方法が考えられるが²⁾、この場合の処理条件としては、菌種、培養条件、菌体の前処理などによって変動する可能性があるが、供試酵母の凍結乾燥菌体では、45°C, pH 7.0, 60~120 分という条件で 90% 以上の除核酸ができた。生菌体では 10°C 程度高い温度条件が必要であったが、これは凍結乾燥という前処理の影響によるためといえよう。MAUL ら¹⁴⁾が提案している“heat shock”処理の有効性は一応認められるが必ずしも顕著な効果は得られなかった。さらに核酸の漏洩速度を増大さす目的で、ホモゲナイザーや超音波による前処理ある

いは核酸分解酵素の添加なども上記加温操作に加味して検討を加えたが、現在までのところみるべき併用効果を認めていない。しかしこれらの点についてはなお検討の余地があると考えられる。高温でアルカリ抽出することにより RNA 含有量の低い蛋白質標品のえられることを示したが (Table 2), この場合蛋白質の変化も十分考慮しなければならず、抽出温度上昇が必ずしも有利であると断定できない。抽出蛋白溶液より蛋白質標品をうるためには通常等電点沈澱を行なうが、この場合、カルシウム塩を用いて凝集沈澱させるとき、除核酸の目的に有効であるとともに食品素材としての特性もすぐれていることは注目に値する。

大豆蛋白、カゼインを対照として粘度、保水性、乳化力およびペプシン消化性を検討した。この場合諸特性の試験方法の吟味も必要と思われるが、典型的な一つの方法を採用して比較した。その結果、酵母分離蛋白質は粘性特性において大豆蛋白と類似するところ多く、保水性は対照蛋白に比べて劣っていたが、加熱によりかなり改善され、さらに Ca Protein では大豆蛋白に近い値が得られた。水と大豆油とを用いた乳化力試験では分離蛋白質はカゼインと同程度の値を示したが、この場合も Ca Protein が大豆蛋白にまさる乳化力を示した。

酵母分離蛋白質のペプシン消化性については通常の酵母に比べて劣るとはいえない。

本報によってアルコール資化性酵母 *Hansenula* sp. の菌体より分離した蛋白質標品は食品素材として大豆蛋白やカゼインに劣るものではないことが明かとなったが、これらについては培養条件、抽出分離条件、除核酸処理条件などと関連しながらさらに詳細な研究が必要である。

要 約

新に土壌より分離したアルコール資化性酵母 *Hansenula* sp. を供試し、通常の 苛性ソーダ抽出法を適用しほぼ 60% の収率で分離蛋白質標品を得た。分離蛋白質の除核酸の目的には、pH 7.0 で 45°C, 60~120 分処理が有効なことを示し、その効果はそれほど顕著とはいえないが“heat shock”の有効なことも認めた。この他高温アルカリ抽出、カルシウム塩による凝集沈澱によっても核酸含有量 1% 以下の分離蛋白質標品を得ることができた。

得られた蛋白質標品 (蛋白質含有量は 80% 以上) の粘度特性は大豆蛋白と類似する点が多く、保水性、乳化力も大豆蛋白やカゼインに劣らないことを認めた。

文 献

- 1) TANNENBAUM, S.R.: *Food Technol.*, **25**, 962 (1971).
- 2) KIHLEBERG, R.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 427 (1972).
- 3) 京都大学農学部食品工学教室編：食品工学実験書，上巻，（養賢堂），p. 366 (1970).
- 4) 京都大学農学部食品工学教室編：食品工学実験書，上巻，（養賢堂），p. 436 (1970).
- 5) SHARMAN, P.: *Food Technol.*, **15**, (2), 79 (1961).
- 6) INKLAAR, P.A. and FORTUIN, J.: *Food Technol.*, **23**, (1), 103 (1969).
- 7) HORWITZ, W.: *Official Methods of Analysis on the Association of Official Analytical Chemists*, 11th ed. (AOAC), p. 127 (1970).
- 8) 満田久輝・杉浦正毅・安本教伝・外村弁一郎：米養と食糧，**23**, 62 (1970).
- 9) 早川 功・稲神 馨：食品工誌，**19**, 1 (1972).
- 10) 宮本悌次郎・遠藤紀子・多田妙子・村田希久：米養と食糧，**18**, 115 (1965).
- 11) 星野直司・白石正之・海老根英雄・渡辺篤二：食品工誌，**19**, 353 (1972).
- 12) 星野直司・白石正之・海老根英雄・渡辺篤二：食品工誌，**19**, 359 (1972).
- 13) EDOZIEN, J.C. and UDO, U.U.: *Nature*, **228**, 180 (1970).
- 14) MAUL, S., SINSKEY, A.J. and TANNENBAUM, S.R.: *Nature*, **228**, 181 (1970).
- 15) HEDENSKOG, G. and MORGREN, H.: *Biotech. and Bioeng.*, **15**, 129 (1973).
- 16) 青木 宏：食品工誌，**17**, 129 (1970).

(昭和49年5月7日受理)