イオン強度と pH による酵母分離蛋白質中の核酸の除去

浅野 三夫*・柴崎 一雄*

Reduction of Nucleic Acid in Isolated Yeast Protein by Adjusting Ionic Strength and pH Value

MITSUO ASANO* and KAZUO SHIBASAKI*

Methods for reducing the content of nucleic acids in isolated yeast protein were investigated. Isolated yeast protein prepared by acid precipitation of the extracted protein after disintegration by a vibrogen cell mill contained about 10% of nucleic acid. The influence of ionic strength and pH value on the content of nucleic acids in the isolated protein was studied. Ionic strength 2.0 and pH 6-7 gave the most suitable condition for reduction of nucleic acid in the isolated protein. Under the condition, most of nucleic acid remained in the supernatant. The content of nitrogen and nucleic acids of the precipitated protein was 12.5 and 1.6%, respectively.

(Received Mar. 24, 1980)

従来、酵母から分離蛋白質を調製するには、細胞壁を種々の方法で破碎して得た抽出液から等電点沈殿 (pH 4.0) で蛋白質を分離している。この分離蛋白質は約 10% の核酸を含んでいるために、蛋白質食品素材として好ましくないものと判断され、より低い核酸含量の蛋白質の分離法の開発が期待されている。

これまでの核酸の除去について、アルカリ¹⁾²⁾加熱³⁾⁴⁾、酵素⁵⁾⁶⁾ およびヒートショック処理^{7)~11)} によるなど種々の試みが報告されているが、このような核酸除去処理には蛋白質の変性を伴い、物性の変化することが多く、さらに経済性を考慮すると必ずしも最善な方法とは考えにくい。そこで酵母蛋白質と核酸の溶解度におよぼす pH とイオン強度の影響を検討した結果、両成分の溶解挙動に差異のあることを見出し、この差異を利用して新たに蛋白質の変性の少ない、経済的にもすぐれた分離蛋白質を調製することができたので報告する。

実験方法

1. 酵母蛋白質の調製

試料は前報¹²⁾ 同様、市販生パン酵母 (中越イースト) を充分水洗して凍結乾燥したものをを用い蛋白質を抽出し

た。抽出方法は Fig. 1 に示したようにバティプロゲンセルミルを用い、上記凍結乾燥酵母を 0.4% (0.1N) NaOH 溶液に 5% になるように試料管に懸濁し、それに 4 倍量の Glass beads (径 0.3 mm) を加えて密閉、恒温槽より 20°C の水を循環させながら 20 分間振とうして細胞壁

Fig. 1 Outline of protein extraction from baker's yeast

* 東北大学農学部食糧化学科 (〒980 仙台市堤通雨宮町 1-1)

Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University. Tsutsumidori Amamiya-cho, Sendai-shi, Miyagi-ken

を破碎, 蛋白質の抽出液を得, pH 4.0 で等電点沈でんしたものを酵母からの分離蛋白質とし, 実験に供した。

2. 窒素の定量

前報同様, 常法の Semi micro Kjeldahl 法を用いた。

3. 蛋白質の定量法

前報同様, 常法の Biuret 法で蛋白質を定量した。

4. 電気泳動

前報¹²⁾同様酢酸・尿素系のディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動で行った。

5. 核酸の定量

前報同様オルシン塩酸法で定量を行った。

6. 溶解度

(1) 濁度法

酵母の細胞を破碎して蛋白質を抽出し, この抽出液を各 pH に調整した時の濁度 (570 nm の吸光度) で示した。

(2) Biuret 法

上記同様に抽出し, 各 pH に調整後 10,000 r.p.m. 10 分間遠心分離し, その上澄中の蛋白質量を, Biuret 法で定量した。

7. イオン強度

イオン強度の調製は半井化学(株)製特級塩化ナトリウムを用いて行った。

実験結果

1. 分離蛋白質の組成

上記方法により酵母から得た分離蛋白質の諸成分を分析した結果 (Table 1) 約 70% の蛋白質, 9.7% の核酸を含んでいた。

Table 1 Component of isolated yeast protein

Component	(%)
Nitrogen	12.02
Protein	69.5
Nucleic acid (RNA)	9.7
Lipid*	12.3
Moisture	6.2

* Extracted with mixture of methanol and chloroform (1:1)

2. 酵母蛋白質の溶解性

(1) 溶解性におよぼす pH の影響

前報で行った酵母蛋白質抽出液の pH による濁度変化 (Fig. 2) で明らかのように等電点沈でんまでの濁度挙動 (I) と等電点沈でん後 pH を戻した場合の濁度挙動 (II) は全く異なり溶解度が著しくわることを示した。

Fig. 2 Turbidity of total extract as a function of pH

I (—○—): Change of turbidity (pH 12.0—2.0)

II (---○---): Change of turbidity (pH 3.0—12.0)

このことは酵母蛋白質が等電点沈でん (pH 4.0) することにより, 酸に敏感で不溶化したか, あるいは pH 調整時に塩が生成され, そのイオン強度の影響によることが考えられる。

(2) 溶解性におよぼすイオン強度の影響

Fig. 1 で示したように凍結乾燥しない試料を wet ppt, 透析して凍結乾燥したものを, dry ppt とし, これらの溶解性におよぼすイオン強度の影響を検討した。

Fig. 3(I) は wet ppt, Fig. 3(II) は dry ppt の溶解度曲線である。wet ppt の pH 7 および 9 では約 80% の溶解度を示していたが, イオン強度が増すにつれて溶解度が減少し, イオン強度 0.2 では pH 7 で 20%, pH 9 では 30% まで減少した。同様に dry ppt でも pH 7 で 50% から 20% まで減少した。これらの結果は, イオン強度が酵母蛋白質の溶解性に大きな影響を与えていることが明らかである。

3. 核酸 (RNA) の溶解性

酵母の蛋白質抽出液を pH 4.0 で酸沈でんさせて得た蛋白質中には, Table 1 で明らかのように, 約 10% の核酸が含まれていることが明らかになったので, 純粋な酵母 RNA を用いて, 各 pH における溶解度を調べた結果が Fig. 4 である。これらの結果から酵母蛋白質の等電点を示す pH 4.0 では RNA は単独では殆んど濁度を示さず溶解状態であることを示しており, pH 4.0 で酸沈でんした蛋白質に 10% の核酸が含まれていることは, 最初から蛋白質と核酸が結合しており沈でんしたか, 等電点沈でん時に蛋白質と核酸が何らかの相互作用をおこ

Fig. 3 Solubility of isolated protein as a function of ionic strength

I: Wet ppt. —○—: pH 7.0
II: Dry ppt. (lyophilized protein) —●—: pH 9.0

Fig. 4 Solubility of protein and RNA as a function of pH

—○— Solubility of RNA Solubility of protein

して沈でんしたものと考えられた。

4. 酵母蛋白質と RNA との共沈現象

上記のことを確認するために、脱核酸した酵母蛋白質を純粋な酵母 RNA を用い、RNA (5mg) に対する蛋白質の割合を 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, および 1:10 にしたもの 0.4% NaOH 10ml にとかし、各々 pH 4.0 に調整して遠心し、その上澄液の RNA 量を定量した結果 (Fig. 5) RNA と蛋白質の割合が 1:0 では RNA は全く沈でんせず、RNA に対する蛋白質の量が増加するに従って沈でんする RNA 量も増加し、その比が 1:10 では 95% の RNA が蛋白質といっしょに沈でんしてしまうことが明らかになった。アルカリ分解法による低核酸含量の分離蛋白質の調製を試みた田島ら²⁾も乾燥菌体に 0.2N NaOH 溶液を加え、80°C 加熱抽出した時は沈でん区分に低核酸含量の蛋白質を得るが、37°C 抽出では、核酸と蛋白質が、いっしょに沈でんすることを明らかにし蛋白質と核酸との相互作用を示唆している。

Fig. 5 Correlation between the amount of added protein and the precipitated RNA (%)

Ratio of RNA and protein (a: 5/5, b: 5/10, c: 5/25, d: 5/50)

5. 酵母の酸沈でん蛋白質より核酸の分離

Fig. 3 (I) (II) より酵母蛋白質は pH 7.0, イオン強度 0.2 の条件下では 75~80% 以上が溶解しないことが明らかである。しかしながらイオン強度 0.2 の条件下でも蛋白質と共に沈でんした核酸は pH をアルカリ側に上

げることによって溶解してくる。

酵母の酸沈でん蛋白質を脱塩水に懸濁し、1N NaOHを用いてそれぞれ pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 に調整後、遠心分離し、上澄と沈でん区分に分け各々の核酸含量を調べた結果を Fig. 6 に示した。pH を上げることによって上澄液中の核酸含量が増加し、逆に沈でん区分の核酸含量は減少していった。このことは沈でんしていた核酸が pH を上げることによってとけ出し上澄区分に移行することを示している。しかし、pH 7.0 附近において上澄区分の核酸含量がピークを示し、pH 7.0 よりアルカリ側では減少

Fig. 6 Change of RNA content (%) in isolated protein as a function of pH

—○— RNA content in the precipitate
---○--- RNA content in the supernatant

Fig. 7 Electrophoretic pattern of each dissolved protein fraction

(pH 7.0—pH 13.0)

A: pH 13.0, B: 10.0, C: 9.0, D: 8.0, E: 7.0

Fig. 8 Electrophoretic pattern of each precipitated protein

(pH 4.0—pH 9.0)

A: pH 9.0, B: 8.0, C: 7.0, D: 6.0, E: 5.0, F: 4.0

する傾向が見られた。これは pH が高くなることにより沈でんしていた蛋白質が溶けて上澄区分に移動し、相対的に核酸含量が減少したものと思われる。これらのことを確認するため、各 pH における上澄区分および沈でん区分の電気泳動分析を行った結果 (Fig. 7~8) pH 8.0 以上になるに従って上澄区分に蛋白質のバンドが現われ、逆に沈でん区分からは減少していった。

6. 核酸除去におよぼすイオン強度と pH の効果

上記結果から蛋白質は沈でん状態で、共存している核酸だけを溶かして除去するにはイオン強度と pH が関係するので各種のイオン強度 (μ) および pH における蛋白質および核酸の溶解性を詳細に調べた結果を Fig. 9, 10 に示した。コントロールでは pH を上げることによって溶解性も増し、pH 7.0 で約 90% が溶解した。しかしイオン強度を 0.1 以上にするによって蛋白質の溶解性が著しく低下し、 $\mu=0.1$ で 28%, $\mu=0.3, 0.5, 1.0$ ではほぼ同程度で 24~27%, $\mu=2.0$ では 15% しか溶解

Fig. 9 Effect of ionic strength and pH on solubility of protein

A (—●—): Control, B (—○—): $\mu=0.1$, C (---○---): 0.3, D (—△—): 0.5, E (—×—): 1.0, F (—○—): 2.0

Fig. 10. Effect of ionic strength and pH on solubility of RNA

A (—●—): Control, B (—○—): $\mu=0.1$, C (—○—): 0.3, D (—△—): 0.5, E (—X—): 1.0, F (—○—): 2.0

Fig. 11 Electrophoretic pattern of protein fraction dissolved with each ionic strength

A: Control, B: $\mu=0.001$, C: 0.01, D: 0.02, E: 0.05, F: 0.1, G: 0.5, H: 1.0, I: 2.0

しなかった。これらの結果を確認するため、各イオン強度 (pH 7.0) における上澄区分を電気泳動的に調べた結果 (Fig. 11) 溶解挙動と電気泳動的成分挙動は同じ傾向を示し、 $\mu=0.05$ までは蛋白質が鮮明なバンドとして現れ、 $\mu=0.1$ 以上では急激にバンドが薄くなり、 $\mu=2.0$ ではバンドがほとんど確認できなかった。

これに対し、核酸はイオン強度を増すことによって溶解性が増加し、 $\mu=2.0$ では、pH 7.0 で約 90% 以上が溶解することが明らかになった。

次に上記結果から核酸除去の最適条件を検討するために蛋白質と核酸の pH による溶解挙動を各イオン強度別に図示した。(Fig. 12) コントロールでは蛋白質と核酸共に同じ挙動を示し核酸を除くことは不可能である。しかしイオン強度を増すことによって蛋白質と核酸の溶解度の差が大きくなり $\mu=2.0$ では pH 5.0~10.0 の広い

Fig. 12. Effect of ionic strength and pH on solubility of the protein and RNA

—○—: Change of solubility of protein by pH
--○--: Change of solubility of RNA by pH
A: Control, B: $\mu=0.1$, C: 0.3, D: 0.5, E: 1.0, F: 2.0

Table 2 Component of isolated yeast protein after removing nucleic acid (RNA)

Component	(%)
Nitrogen	12.50
Protein	76.9
Nucleic acid (RNA)	1.6
Lipid*	11.8
Moisture	7.0

* Extracted with mixture of methanol and chloroform (1:1)

pH 範囲で核酸を除くことが可能であり、とくに $\mu=2.0$ pH 6.0~7.0 が蛋白質の損失が少なく最良の条件と思われた。

上記方法にて核酸除去処理を行った蛋白質の分析結果を Table 2 に示したが、乾物あたり核酸含量 1.6% で除去前の約 85% が除去出来た。

要 約

酵母蛋白質は等電点沈でんすることによって約 10% の核酸が蛋白質と共に沈でんしているが、これらの核酸を簡単に除去する方法を検討した。

(1) 精製酵母 RNA を用いて等電点時の蛋白質と核酸との相互作用を検討した結果、酵母蛋白質と RNA の比が 10:1 の場合、加えた RNA の 95% が蛋白質といっしょに共沈することが明らかになった。

(2) 蛋白質および核酸の溶解性を詳細に調べ、蛋白質は溶解せずに核酸のみ溶解するイオン強度 (μ) および pH 条件を検討した結果 $\mu=2.0$, pH 6~7 が核酸除去の最適条件であった。

(3) これらの方法で酵母蛋白質の核酸含量が、10% から 1.6% と約 85% 除去することが出来た。

文 献

- 1) 満田久輝・河合文雄・壬生 良・鹿内健彦: 栄養と食糧, **17**, 34 (1964).
- 2) TAJIMA, M. and YOSHIKAWA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 611 (1975).
- 3) HENDENSKOG, G. and EBBINGHAUS, L.: *Biotech. Bioeng.*, **14**, 447 (1972).
- 4) VANANUVAT P. and KINSELLA, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 216 (1975).
- 5) CASTRO, A.C., SINSKY, A.J. and TANNENBAUM, S.R.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 422 (1971).
- 6) 野村男次・早川 功・篠原和毅: 醗酵工学, **52**, 35 (1974).
- 7) MAUL, S.B., SINSKEY, A.J. and TANNENBAUM, S.R.: *Nature*, **228**, 181 (1970).
- 8) OHTA, S., MAUL, S. and SINSKEY, A.J., TANNENBAUM, S.R.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 415 (1971).
- 9) TAJIMA, M. YOSHIKAWA, S.: Xth and International Congress of Nutrition, Kyoto (1975).
- 10) ZEE, J.A. and SIMARD, R.E.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 59 (1974).
- 11) 芝崎 勲・安川照雄・浅田洋司: 日食工誌, **21**, 545 (1974).
- 12) 浅野三夫・佐藤 亘・柴崎一雄: 日食工誌, **27**, 172 (1980).

(昭和 55 年 3 月 24 日受理)

新 刊 紹 介

人間の栄養における食用油脂の役割 FAO/WHO 合同専門家委員会報告 金田尚志監訳

1977 年 9 月 21~30 日, ローマにおいて行なわれた FAO/WHO 合同専門家委員会の報告の邦訳である。目次を示すと次のとおりである。

1. 定 義
2. エネルギー源としての脂肪
3. 成人と小児の食物における油脂の利用
4. 必須脂肪酸
5. 発育初期における必須脂肪酸の役割

6. 心臓疾患, 肥満 および 糖尿病の予防と治療における油脂の役割
7. 油脂の栄養価に及ぼす加工処理の影響
8. 特別考慮事項
9. 油脂の生産, 流通および消費に関する最近の傾向
10. 油脂の品質と組成に 及ぼす 動植物の育種と管理の影響
11. 勧 告

書物の表題から与える印象は、本書の内容が行政的勧告のように思えるが、実際は、油脂に関する最近の研究の紹介に近い。参考文献も 227 と多く、油脂の加工、栄養の研究者にとって有用である。

A5 版 99 頁

医歯薬出版 2,000 円