

## Impact-Cell-Mill(ICM)による単細胞タンパク質の抽出について(第3報) : 化学的処理の併用

早川, 功  
九州大学農学部

野村, 男次  
九州大学農学部

Khai, Nguyen Duy  
Department of Water and Forests, Faculty of Agriculture, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/23111>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 26 (1/4), pp.529-535, 1972-03. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

## Impact-Cell-Mill (ICM) による単細胞 タンパク質の抽出について (第3報)

化学的処理の併用

早川 功・Nguyen Duy Khai・野村 男次

### An isolation method of protein from single cell by Impact-Cell-Mill

#### Part 3. Combining with chemical treatment

Isao Hayakawa, Nguyen Duy Khai  
and Danji Nomura

酵母など単細胞生物の細胞壁はセルロース様物質 ( $\beta$ -1, 3-グルカン), あるいはキチン様物質を主体とし, これらにタンパク質, リピッド, マンナンなどが複雑にからみあつて構成されている強靱な構造物である。<sup>3)9)</sup>したがつて, この細胞壁は細胞内容物の抽出に大きな障害となつていたが, Impact-Cell-Mill の開発により細胞壁の破砕が可能となり, 細胞内容物の抽出が非常に容易になつた。<sup>7)</sup>しかし, 生産性の向上, エネルギーのより有効な利用を考えるならば単細胞生物に種々な化学的処理を施すことも有効と考えられる。特に Impact-Cell-Mill はその名前が示すごとく超高速度 Water-Jet を Disk に衝突させ, そのとき, 単細胞生物に生じる衝撃力でその強靱な細胞壁を破砕するものである。このときの Water-Jet のレイノズ数 (Du/v) は  $1.4 \times 10^5$  前後にも達し, 非常に激しい乱流域にあることを示している。この現象は衝撃時の激しい動きと合わせて, 単細胞生物破砕処理過程中に, 細胞内に存在するタンパク質分解酵素の働きおも促進させ, タンパク質回収量を低下せしめる原因ともなる。この報告は酵母の破砕特性並びにタンパク質回収量の向上と化学的処理との関係について行なつた研究結果である。

### 実験方法

1) 供試試料: 市販パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を使用した。

2) 有機溶剤処理試料

生酵母 250 g を  $-18^\circ\text{C}$  に冷却した有機溶剤 1 l に懸濁し, ミキサーで 5 分間攪拌後, 吸引濾過し, 沈

澱に再びこの操作をくり返した後, 室温で真空乾燥し, 冷所に保存した。

3) 化学的処理試料

生酵母 1000 g を酸, 有機酸, 塩基などに常温で懸濁し, ミキサーで 2 分間攪拌後, 全量を 4,000 ml に秤量 (7.76 dry%), ICM 破砕試料とした。

4) ICM 処理条件<sup>8)</sup>

装着ノズルは口径 0.430~0.450 mm のものを用い, 衝突板 (disk) とノズルの間隙 (Clearance) は 30 mm, 噴射圧力は  $600 \text{ Kg/cm}^2$  とした。なお, 破砕処理中に Injection Tank での発熱現象は激しいので, 試料の熱変性を抑制するため試料を  $10^\circ\text{C}$  以下に冷却した。

5) 測定方法並びに分析方法

タンパク質量はマイクロケルダール法に従つて定量し, 総窒素量に 6.25 を乗じて求めた。またビュレット法も適時使用し, 標準タンパク質としては牛血清から得たアルブミン (sigma 社製) を用いた。

タンパク質回収方法は等電点沈澱法で求め, また TCA 沈澱法 (最終濃度 5%) や硫酸塩析法をも用いた。

### 実験並びに考察

1) 有機溶剤処理

酵母細胞壁の構成成分には種属によつてそれぞれ特有のパターンが存在するが, 脂質類は約 10% 存在するといわれている。<sup>11)</sup> また, 酵母などを冷アセトンで処理すると細胞壁の透過性が向上し, 細胞内容物の抽出性は飛躍的に上昇するので二, 三の溶剤処理を施し

て、ICM 処理した。その結果を Fig. 1 に示した。アセトン処理酵母がもつとも高い窒素抽出率を示したが、その値は最高 58% であった。そして、アルコール処理の 2 区は全く低い値であった。このように窒素抽出率が低いのは溶剤処理により脱水された酵母細胞壁を再び水で膨潤（破碎処理のため水懸濁液を作る）することにより“しなやか”になつたか、または、これらの溶剤処理で蛋白質に変性が生じて、不溶化したものと考えられる。

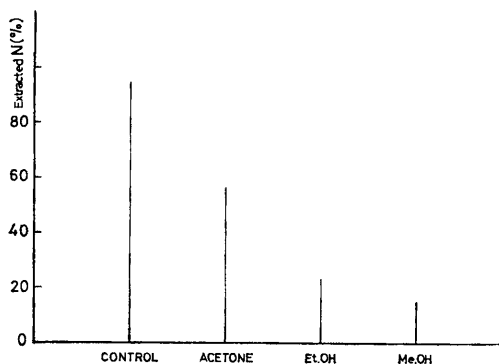


Fig. 1. Relation between the extracted nitrogen and organic solvent.

Condition to break the B. yeast cells :  
Sample concentration 7.76 dry %,  
pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

酵母細胞壁は一般に二重膜構造を示し、外層はイーストゴム質（厚さ約 0.2 μ）で組成はマンノース 50%、グルコース 30%、脂質 10%、アミノ酸 7%、ヘキサゾン 3% であるといわれている。このように糖質

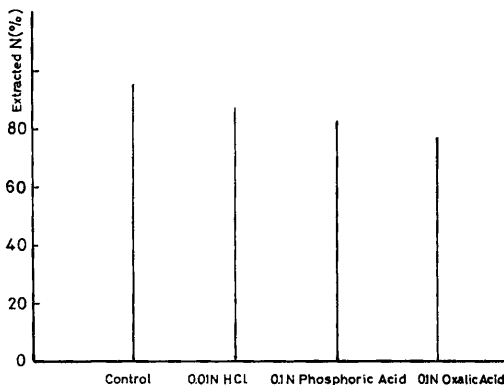


Fig. 2. Relation between the extracted nitrogen and acid treatment.

Condition to break the B. yeast cells :  
Sample concentration 7.76 dry %,  
pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

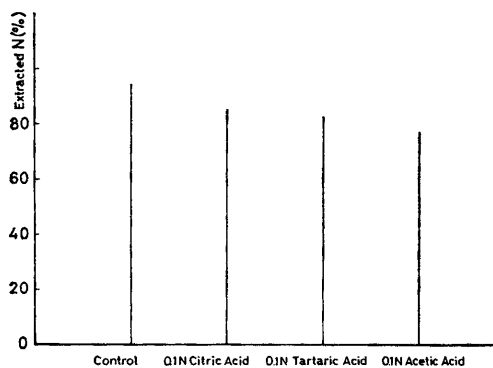


Fig. 3. Relation between the extracted nitrogen and organic acid treatment.

Condition to break the B. yeast cells :  
Sample concentration 7.76 dry %,  
pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

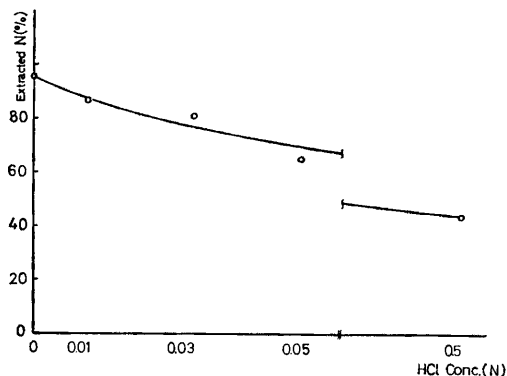


Fig. 4. Relation between the extracted nitrogen and HCl.

In this case, the B. yeast was treated with various concentration of HCl and the condition to break the B. yeast cells was as follows : Sample concentration 7.76 dry %, pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

が構成成分の 80% を占めていることから<sup>12)13)</sup> 細胞壁を変質劣化させるためには糖質に対して有効に作用する酸並びにアルカリ処理が考えられる。<sup>14)10)</sup> したがって、種々の無機酸や有機酸処理と ICM 処理の関係について検討した。その結果を Fig. 2, Fig. 3 に示した。これらの実験でもつとも高い窒素抽出率を示したものは塩酸処理 (87%) であり、シュウ酸処理がもつとも低い値 (77%) を示した。このように酸処理酵母は無処理酵母 (窒素抽出率 93%) より若干低い値を示したが、最適処理濃度が存在するものと考え塩酸濃度と窒素抽出状況の関係について検討した。その結果を Fig. 4 に示した。窒素抽出状況は酸濃度の

増加により指数的に減少し、酵母細胞壁の対衝撃破碎特性は少し増強されたように考えられるが、これは細胞壁の酸による分解は考えられず、酸接触による細胞壁の収縮が生じ、衝撃に対して靱性を示したものと考えられる。

一方、処理溶液の濃度と同じく、処理時間も細胞壁に与える影響は大きいものと考え、処理時間と窒素抽出率の関係について検討した。その結果は Fig. 5 に示した。窒素抽出率は処理時間の増加により向上を示したが、これは酸処理時間の増加により破碎効率の向上を示したのではなく、むしろ酸加水分解による非蛋白態窒素の増加を生じたものと考えられる。

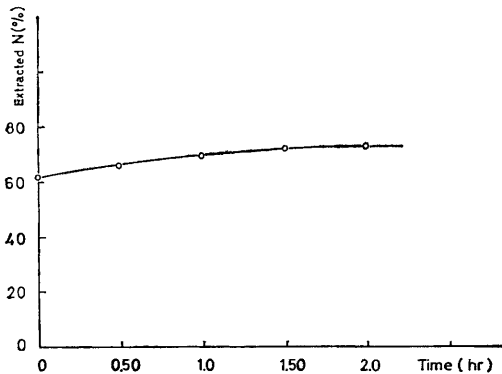


Fig. 5. Relation between the extracted nitrogen and permeated time.

The B. yeast was pretreated with 0.05N HCl and permeated for 0.50 hr, 1 hr, 2 hrs.  
Condition to break the B. yeast cells :  
Sample concentration 7.76 dry %,  
pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

また、アルカリ溶液はタンパク質の溶解性にすぐれている他に膨潤作用も大きいので、酵母のアルカリ処理は有効な手段と考えて検討した。最初は種々のアルカリ濃度液 (0.1~0.5% NaOH) に酵母を懸濁し、規定時間浸漬後酸中和して、ICM 処理を施した。その結果はいずれの実験においても良好とはいえず、窒素抽出率は 50% 前後であつた。次に酸中和操作を除き、アルカリ溶液懸濁酵母を直接 ICM 処理を施した。その結果は Fig. 6 に示した。この実験で、アルカリ濃度が 0.3% 以上になると、急速に窒素抽出率は低下したが、0.1~0.2% NaOH 溶液では良好な破碎率を示した。このときの窒素抽出率は 93~94% と無処理酵母の場合に比較して同等あるいはそれよりも若干良好な値が得られた。このようにアルカリ処

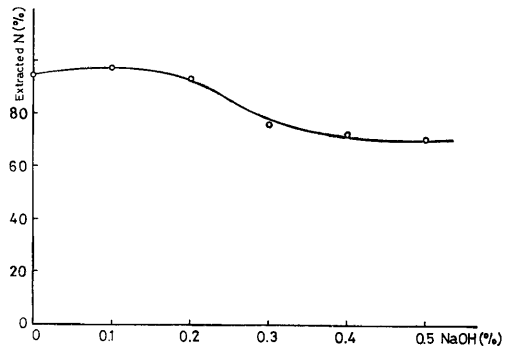


Fig. 6. Relation between the extracted nitrogen and NaOH concentration.

The B. yeast was pretreated with various concentration of NaOH.  
Condition to break the B. yeast cells :  
Sample concentration 7.76 dry %,  
pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

理で一部良好な結果が得られたが、これは ICM 処理回数と密接な関係が存在するために処理回数と窒素抽出状況について検討した。その結果は Fig. 7 に示した。この実験でアルカリの化学作用による抽出状況はアルカリ (NaOH) 濃度の増加にともない 2% (対象区)、5%、12%、18%、22% と逐次増加した。しかし、ICM 1 回処理後の窒素抽出率はいずれも 40~36% と大差なく、2 回処理以後において、0.1~0.2% 区と 0.3~0.5% 区で若干差が生じた。処理回数 4 回で 0.3~0.5% 区は抽出率 64~66%、無処理区は 69%、0.1~0.2% 区は 81~83% の値を示し、0.1~0.2% NaOH 処理の優位性が示された。しかし、処理回数 5 回以後の窒素抽出率の上昇割合は減少を示し、無処理酵母の窒素抽出状況には大きな変化もなく、処理回数 5 回以後も逐次内容物は抽出され、窒素抽出率は最終的に 93% の値を示した。

アルカリ処理酵母の窒素抽出状況は NaOH 濃度の増加に従い減少し、ICM 処理 2 回、3 回と処理回数の増加につれて無処理の場合との差が大きく現われてきた。これは酵母細胞壁の衝撃破碎特性の低下を生じたものと考えられる。そこで、細胞壁の軟化はアルカリ処理時間の増加につれて進展するものと考えて、処理時間と窒素抽出率との関係について検討した。その結果は Fig. 8 に示した。窒素抽出率はアルカリ処理時間の増加により減少し、処理時間 120 分以上の場合は ICM 処理効果が殆んど観察されず、抽出された窒素量はアルカリの化学的抽出作用によるものと考えられた。また、0.1~0.2% NaOH 処理

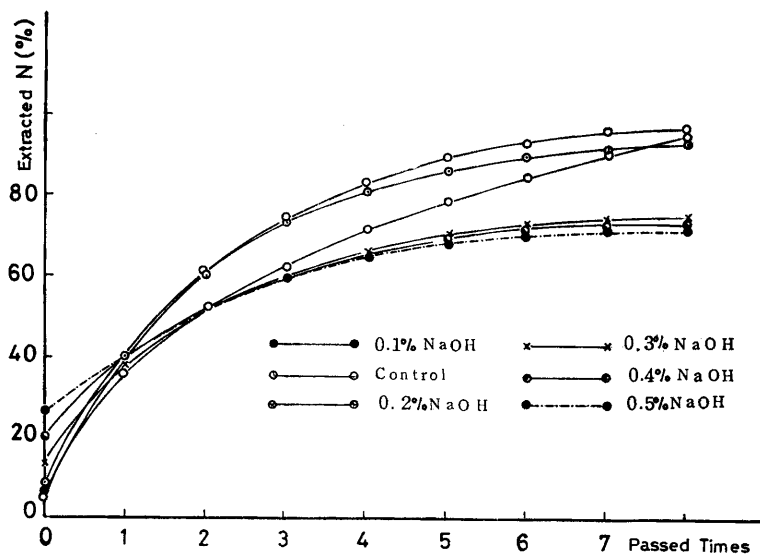


Fig. 7. Relation between the extracted nitrogen and passed times. The B. yeast suspension was pretreated with 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% NaOH.

Condition to break the B. yeast cells:

Sample concentration 7.76 dry %, pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

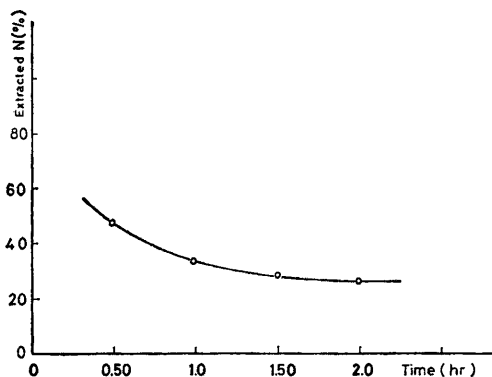


Fig. 8. Relation between the extracted nitrogen and permeated time.

The B. yeast suspension was left for 2 hrs when pretreated with 0.5% NaOH. Condition to break the B. yeast cells: Sample concentration 7.76 dry %, pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

が非常に良好な値を示し、ICM 処理回数 3, 4 回において、その優位性は顕著に現われた。これは、0.1~0.2% NaOH の細胞壁に対する軟化膨潤作用があまり活発でなく、細胞壁がまだ無処理酵母の状態に近く、衝撃破砕特性がそれほど低下していないものと考えられる。一方、酵母細胞壁に生じたわずかの亀

裂からも、アルカリ性懸濁液であるため、ICM の激しい衝撃作用で酵母内容物の抽出が促進され、無処理の酵母よりすぐれた抽出率を示したものと考えられる。

クロレラなどは加熱操作を加えることにより消化率の効上並びに臭もある程度減少することが知られている。<sup>9)</sup>これは加熱操作により細胞壁の透過性の向上並びに臭の一部が発散したものと考えられる。したがって、酵母に加熱操作を施すことにより窒素抽出率の向上が考えられるため、これらの関係について検討した。その結果は Fig. 9 に示したが、良好な値は得られず、加熱時間の増加並びに加熱温度の上昇は窒素抽出率の減少をもたらした。この処理酵母を顕微鏡下で観察するとかなり変形しているものも存在しているので破砕現象は一部生じているものと考えられるが、窒素抽出率が非常に低いことより、タンパク質が熱変性を受け不溶化したものと考えられる。

また、ICM の破砕機構は非常に激しい衝撃作用のため抽出タンパク質溶液の酵素作用を促進する。したがって、酵母破砕液に存在するタンパク分解酵素の働きが促進され、タンパク質回収量の低下をもたらすので、分解状況の把握並びに抑制のため、次の実験を行なった。<sup>2)5)6)</sup>

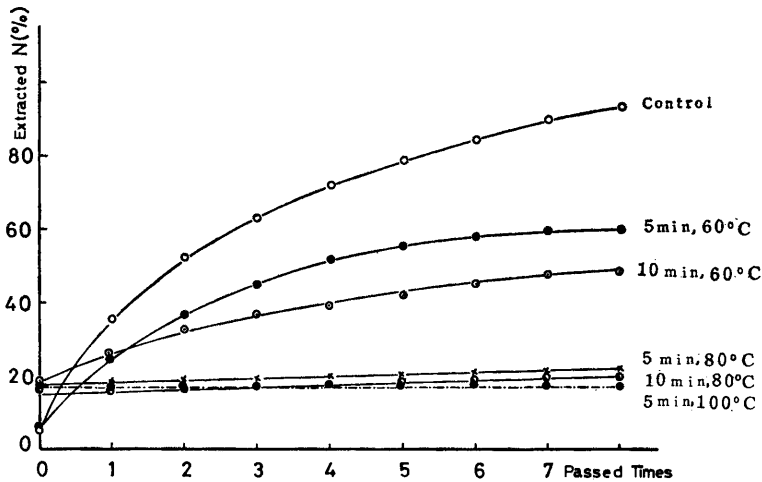


Fig. 9. Relation between the extracted nitrogen and passed times. The *B. yeast* suspension was treated with heating.

Condition to break the *B. yeast* cells: Sample concentration 7.76 dry %, pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

一般に酵素活性は低温程抑制されるため、種々な温度条件の下で ICM 処理を行ない、非タンパク態窒素の変化状況を酵素死活剤 (diisopropyl fluorophosphate) 並びに食塩添加の場合と比較検討した。その結果を Fig. 10 に示した。なお、DIFP 並びに食塩は酵母水懸濁液調整の際に添加した。低温側の破碎実験では予め ICM の高圧部分を氷水で冷却した後行ない、環境温度 23.5°C 以上の場合は室温で破碎処理を行なった。

DIFP 並びに食塩添加区では非タンパク態窒素の経時的増加は観察されず、酵素作用はほぼ完全に停止しているものと考えられた。また、ICM 破碎時の温度を 10°C 以下に冷却した場合もタンパク質分解作用はかなり抑制されており、破碎時の温度が 23.5°C 以上の場合、タンパク質分解作用は促進され非タンパク態窒素量も増加し破碎処理後、40°C、150 分経過時の非タンパク態窒素量は 34.2% まで上昇して、DIFP 使用のときの約 3 倍の値を示した。また、酸や塩基を使用した場合の結果を Fig. 11 に示した。酸性側での破碎処理では非タンパク態窒素量の増加を招き、タンパク質回収量の減少を生じ、環境温度 40°C の場合に類似していた。一方、アルカリ側での破碎処理は酵素作用を抑制し、非タンパク態窒素量も DIFP 使用の場合に類似していた。特に 0.1~0.2% NaOH 処理で良好な結果が得られた。このアルカリ濃度は ICM 処理による酵母内容物の抽出にもすぐれており

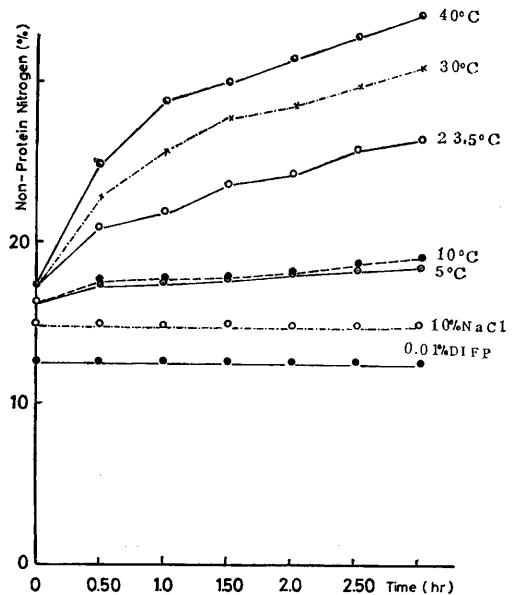


Fig. 10. Effect of temperature on the non-protein nitrogen and processing time of the broken solution.

Condition to break the *B. yeast* cells: Sample concentration 7.76 dry %, pressure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45 φ, clearance 30 mm.

酵母懸濁液濃度 7.76 dry % の破碎液水素イオン濃度は 0.1% NaOH で pH 6.3, 0.2% NaOH で pH 9.5 を示し、等電点回収タンパク質の着色も弱く、

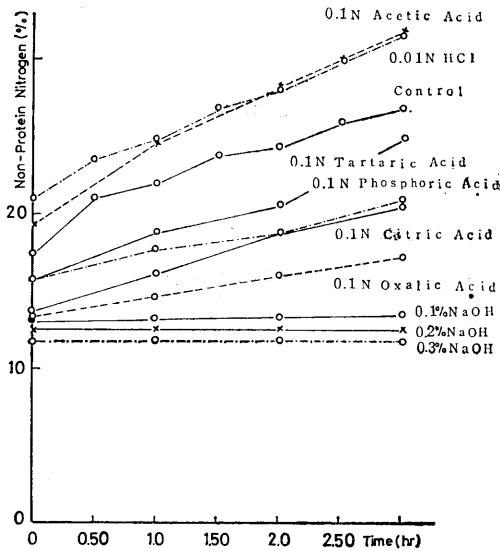


Fig. 11. Relation between the non-protein nitrogen and the progress time.

Condition to break the B. yeast cells:  
Sample concentration 7.76 dry %, pres-  
sure 600 kg/cm<sup>2</sup>. Nozzle diameter 0.45  
φ, clearance 30 mm.

白もしくは淡黄色のものが得られた。酵母に種々な化学的処理を施し、ICMにて分離抽出した酵母タンパク質を凍結真空乾燥して、純度を検討した結果を Table 1 に示した。等電点回収タンパク質の純度は約 70%，硫酸塩析（80% 飽和）法では約 80% の値を示した。比較として、尿素抽出法や TCA 最終濃度 5% 沈澱法を行ない、それぞれ 80% と 84.5% という結果を得た。等電点回収タンパク質の純度が他の回収方法に比較して、低い値を示したが、パン酵母には脂質が 8~10% 含まれており、<sup>11)</sup> 灰分含有率も低いことから、

これらにはかなりの polysaccharide の結合並びに抱込共沈現象が存在しているものと考えられた。しかし、ICM 方式による窒素回収率は最高 83%（等電点回収率）を示し、非タンパク態窒素量（Fig. 10 参照）約 11% を補正するとタンパク態窒素回収率は 94% に達し、酵母からタンパク質の大量を分離抽出する方法として ICM 方式が有効であることが明らかとなった。今後はタンパク質と核酸の分離回収並びに回収タンパク質のレオロジー的性質について研究を進展させる予定である。

## 摘 要

市販パン酵母からタンパク質の分離抽出方法として、化学的処理と Impact-Cell-Mill 処理の併用を検討し、次の結果を得た。

1) 無処理酵母並びに 0.1~0.2% NaOH 処理酵母の窒素抽出状況は良好であつたが、回収率並びにタンパク質の着色状態では 0.1~0.2% NaOH 処理がすぐれていた。

2) タンパク質の抽出にはアルカリ濃度の高いもの（0.3~0.5% NaOH）より低いもの（0.1~0.2% NaOH）が良好であり、0.2% NaOH 処理の併用により最高 94% の窒素抽出率がえられた。

3) Impact-Cell-Mill を用いて、粗タンパク質 45% 含有の酵母から粗タンパク質 70% のタンパク質が得られ、窒素回収率で 83% 粗タンパク回収率で 94% であつた。

終りに臨み、終始御鞭撻いただいたカルピス研究所々長稲神馨氏に感謝の意を表す。またこの研究に協力された研究生塚本美知子氏に感謝する。終りにこの報告の要は昭和 46 年度日本農芸化学会大会（東京）で発表したことを付記しておく。

Table 1. The ash, purity and nitrogen recovery of B. yeast protein.

Pretreatment	N. Recovery	Purity %	Ash %
B. Yeast (Control)		45.1	5.4
B. Yeast, ppt by 5% TCA	76.5	84.1	0.7
8 M Urea, 72hrs extracted	33.0	79.6	6.1
0.01N Hydrochloric Acid	65.0	68.2	3.2
0.03N Hydrochloric Acid	62.2	68.2	3.2
0.05N Hydrochloric Acid	51.3	68.2	3.2
0.1N Phosphoric Acid	67.4	69.6	3.3
0.1N Oxalic Acid	62.6	69.6	4.8
0.1N Tartaric Acid	65.4	70.3	2.6
0.1N Acetic Acid	56.7	71.1	4.2
0.1% Sodium Hydroxide	81.0	70.6	4.4
0.2% Sodium Hydroxide	83.0	70.6	4.4
0.3% Sodium Hydroxide	63.4	70.6	4.4
Acetone	37.5	66.1	1.3
Me.OH	03.1	68.4	8.3
Et.OH	04.0	67.6	6.9

## 参 考 文 献

- 1) Bieber, H., 1969, A new method for obtaining Protein isolates from *Chlorella* Algae, *Torula* Yeast and other microbial cells, Chem. Eng. Progress Symposium Series, vol. 65 (American Institute of chem. Engineers), p. 93
- 2) Doi, E., Hayashi, R., Hata, T., 1967, Purification of Yeast Proteinases (Part II), *Agr. Biol. Chem.* : **31**, 160-169.
- 3) 福井作蔵, 1965, 細膜質膜の構造と機能, *化学と生物* : **3**, 109-111.
- 4) 原田省三・松下雪郎, 1966, 酵母たんぱく質の抽出調製法について, *食糧研究所報告* : **29**, 1-8.
- 5) Hata, T., Hayashi, R., Doi, E., 1967, Purification of Yeast Proteinases (Part I), *Agr. Biol. Chem.* : **31**, 150-159.
- 6) Hata, T., Hayashi, R., Doi, E., 1967, Purification of Yeast Proteinases (Part III), *Agr. Biol. Chem.* : **31**, 357-367.
- 7) 早川 功・稲神 馨, 1971, Impact-Cell-Mill (ICM) による単細胞タンパク質の抽出について (第1報), *日本食品工業学会* 投稿中
- 8) 早川 功・稲神 馨, 1971, Impact-Cell-Mill (ICM) による単細胞タンパク質の抽出について (第2報), *日本食品工業学会誌* 投稿中
- 9) 林部正也, 1966, 酵母の Cell wall, *化学と生物* : **4**, 682-683.
- 10) Powell, C. R., Nevels, M. E., McDowell, E. M., 1961, *Algae Feeding in Humans*, *J. Nutrition* : **75**, 7-12
- 11) Rose, H. A., Harrison, J. S., 1969, *The Yeast* vol. 1, (Academic Press), p. 235.
- 12) Rose, H. A., Harrison, J. S., 1970, *The Yeast* vol. 3, (Academic Press), p. 430.
- 13) Rose, H. A., Harrison, J. S., 1969, *The Yeast* vol. 1, (Academic Press), p. 233.

## Summary

A combined method with Impact-Cell-Mill and a chemical treatment was used for the making of protein preparation from Baker's yeast.

On the operation, the condition of Impact-Cell-Mill were controlled as follows:

- a) the spouting pressure was adjusted at 600 kg/cm<sup>2</sup>
- b) the clearance from nozzle to disk was taken 30 mm
- c) the concentration of yeast suspension was 7.76 % (at dry basis).

And following results were obtained:

Raw yeasts that was treated with 0.1-0.2 % of sodium hydroxide were destructed very easily by Impact-Cell-Mill and the obtained yeast protein was almost no coloured with the treatment. 0.1-0.2 % NaOH treatment was more suitable for protein extraction than 0.3-0.5 % NaOH treatment. By the treatment, about 70 % protein content samples were obtained from Baker's yeast and the protein recovery was about 94 %.

According to this result, the authors concluded that the method is available for the production of protein from single cell in large scale continuously.