[農化 第 35 卷, 第 14 号, p.1341~1349, 1961]

南瓜のグルタミン酸脱炭酸酵素の調製のための諸条件の検討*

大 野 明 (味の素株式会社中央研究所)

昭和 36 年 4 月 21 日 受 理

緒 言

植物体中のグルタミン酸脱炭酸酵素は 1937 年に奥貫⁽¹⁾によって初めて山百合の花粉中に発見され、続いて他の多くの植物体に存在することが確かめられたが、1946 年には O. Schales 等⁽²⁾が人蔘から水溶液として抽出することに成功し、さらに南瓜より水で抽出後凍結乾燥し、乾燥酵素として保存し、またグルタミン酸の定量にも用い得ること⁽³⁾を報告した。1952 年に奥貫^(4,5)等はこれを改良して南瓜より磷酸緩衝液で抽出後硫酸塩析法で精製し、活性の高い乾燥酵素を得、これをグルタミン酸の定量に用いると特異性の良いことを報告した。その後現在に至るまで植物体よりのグルタミン酸脱炭酸酵素調製に関する組織的研究は殆んど行われていない。

著者はグルタミン酸ソーダ製造工程中の各種不純物を含む試料の定量を、この奥貫の方法による酵素を用いて行っており、南瓜から本酵素をなるべく活性度高く、かつ収量よく得る方法を検討したので、その結果を報告する。

実験 A. 実験室スケールでの酵素調製条件の検討

1. 実験計画

(1) 特性要因図： 南瓜よりグルタミン酸脱炭酸酵素を調製する場合に酵素の収量、活性度に影響を及ぼす要因は数多くあるが、特性要因図として主要なものを纏めると第 1 図の如くなる。

(2) 因子と水準： 第 1 図に示した要因の中、本実験では南瓜の種類、磨砕条件、抽出条件、塩析条件の検討に重点をおき、次の 9 因子をとり上げた。

A. 南瓜の種類： 標示因子として性質の全く対照的な日本南瓜と栗南瓜を選んだ。

A₁, 日本南瓜菊座種 (宮崎県産) *Cucurbita moschata* Poirlet; A₂, 栗南瓜 (山梨県産) *Cucurbita maxima* Duchesne.

B. 磨砕度： 磨砕機械と磨砕時間을組合せて 4 水準とった。

B₁, mixer 1 分磨砕; B₂, mixer 5 分磨砕; B₃, homogenizer 1 分磨砕; B₄, homogenizer 5 分磨砕。

ここに mixer 及び homogenizer はともに一般市販の家庭用のもの**で、homogenizer の場合は受皿を水冷して使用した。

C. 抽出用磷酸緩衝液使用量： C₁, 2.5 l/1 kg 南瓜皮部; C₂, 1.25 l/1 kg 南瓜皮部。

D. 抽出時間： D₁, 30 分; D₂, 60 分。

第 1 図 特性要因図

( ) 内は本実験に用いた因子の記号を示す。

* Studies on the Preparative Conditions of the Glutamic Acid Decarboxylase of the Squash.
By Mei OHNO (Central Research Laboratory, Ajinomoto Co., Inc.)

** mixer : 家庭用市販品 (waring blender), 電源 100 V, 電力 180 W, 容量 800 ml, 回転数 約 10,000 r.p.m., 4 枚刃 1 段。

homogenizer : 堅型 stirrer 型, 電源 100 V, 電力 180 W, 容量 800 ml, 回転数 約 10,000 r.p.m., 2 枚刃 2 段。

F. 抽出 pH : F_1 , 6.0 ; $F_2 \equiv F_3$, 5.8 ; F_4 , 5.6. 現行は pH 5.8 であるのでダミイとして 5.8 をとった.

G. 分離方法 : $G_1 \equiv G_3$, バスケット型遠心分離機による分離 ; G_2 , ハンドプレスによる圧搾分離 ; G_4 , 布袋による搾汁法.

H. 脱澱粉法 : H_1 , 遠心沈降法 ; H_2 , 珪藻土濾過法.

I. 塩析濃度 : I_1 , 硫酸 50% 飽和 ; I_2 , 硫酸 75% 飽和.

J. 塩析 pH : J_1 , 5.0 ; $J_2 \equiv J_3$, 4.5 ; J_4 , 4.0. 現行塩析 pH は 4.5 であるのでダミイとしてとった.

L. 実験順序 : 実験は半月以上にわたるため, 原料南瓜の鮮度の変化, 実験の習熟の影響等を実験誤差と分離して検出すべく, 実験期間を前後半に 2 分してわりつけた. L_1 , 前半 ; L_2 , 後半. なおわりつけたあとの実験順序は, 前半後半それぞれの 16 回の中でランダムイズして分割法にならぬようにしてある.

交互作用は $B \times C$, $B \times D$ を検出し得るようわりつけた.

(3) わりつけ : 田口の L_{32} 直交配列表⁽⁶⁾を用い, 32 回の実験に以上の因子をわりつけた. なお, わりつけ及び計算はパンチカード方式によったが, 纏めると第 1 表の如くである.

(4) 特性値 : 特性値としては酵素の収量, 力価, 収量 $\times$ 力価 (総合収率) の 3 種を選んだ. すなわち

酵素収量 w = 乾燥酵素 (g)/南瓜 (1 kg)

力 価 f = 1 次反応速度恒数 k (min^{-1})/酵素使用量 m (mg)

ここに 1 次反応速度恒数 k (min^{-1}) の測定は次の如くして行った. すなわち Warburg 装置を用い, 純グルタミン酸ソーダ標準液 (グルタミン酸濃度 1 mg/0.5 ml) を 0.5 ml/容器, pH 5.8 の M/10 磷酸緩衝液を 2.0 ml/容器, 及び乾燥酵素粉末を 10~80 mg/容器, をそれぞれ用い, 反応温度 37° で反応を行い, 発生 CO_2 を経時的に測定して k を計算した. 1 例を第 2 図に示す.

収量 $\times$ 力価 $a = f \cdot w$

ただし $f = 0.001$ の酵素 1 mg で 1 単位 (1 a) とする.

2. 実験方法及び実験結果 原料南瓜は各実験毎に 5 kg 用い, 第 3 図に示すフローシートに従い, 各因子の条件を変えて 32 回の実験を行った. 第 1 表に実験結果を示す.

3. 解 析

(1) 分散分析 : 酵素の収量, 力価, 収量 $\times$ 力価についての分散分析表を第 2 表に示す.

(2) 主効果の推定 : 3 特性値についての各因子

第 2 図 酵素の力価の測定例

- (1) $m = 14$ mg
 (2) $m = 23$ mg
 (3) $m = 37$ mg $k = 0.046$ $f = 0.0012_6$
 (4) $m = 61$ mg $k = 0.077$ $f = 0.0012_9$
 (5) $m = 79$ mg $k = 0.096$ $f = 0.0012_3$

第 3 図 Flow Sheet

第1表 実 験 結 果

直 交 表	実 験 番 号	A (南 瓜 の 種 類)	B (磨 砕 法)	C (抽 出 液 量)	D (抽 出 時 間)	F (抽 出 pH)	G (分 離 方 法)	H (脱 澱 粉 法)	I (塩 析 濃 度)	J (塩 析 pH)	L (実 験 順 序)	収 量 (<i>w</i>) 酵 素 g 南 瓜 kg	力 価 (<i>f</i>) ($\times 10^{-3}$)	収 量 $\times$ 力 価 (<i>a</i>)
No.														
1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.48	7	3.4
2	24	2	1	1	2	4	4	2	2	4	2	1.09	7	7.6
3	32	1	1	2	1	4	4	2	1	4	2	0.34	21	7.1
4	4	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1.48	7	10.3
5	5	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	0.98	18	17.6
6	26	2	1	1	2	2	3	1	1	2	2	0.74	6	4.4
7	19	1	1	2	1	2	3	1	2	2	2	1.98	5	9.9
8	3	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	0.12	16	1.9
9	15	1	2	1	1	2	1	2	2	4	1	0.66	4	2.6
10	18	2	2	1	2	2	4	1	1	1	2	1.43	5	7.2
11	25	1	2	2	1	2	4	1	2	1	2	3.11	4	12.4
12	9	2	2	2	2	2	1	2	1	4	1	0.23	23	5.3
13	13	1	2	1	1	4	2	1	1	2	1	1.05	8	8.4
14	22	2	2	1	2	1	3	2	2	2	2	0.18	4	0.7
15	28	1	2	2	1	1	3	2	1	2	2	0.34	12	4.1
16	7	2	2	2	2	4	2	1	2	2	1	3.44	2	6.9
17	2	1	3	1	1	2	4	1	1	2	1	3.21	4	12.8
18	27	2	3	1	2	2	1	2	2	2	2	0.68	25	17.0
19	21	1	3	2	1	2	1	2	1	2	2	1.79	11	19.7
20	10	2	3	2	2	2	4	1	2	2	1	1.00	14	14.0
21	1	1	3	1	1	4	3	2	2	1	1	0.24	22	5.3
22	23	2	3	1	2	1	2	1	1	4	2	2.86	7	20.0
23	20	1	3	2	1	1	2	1	2	4	2	2.58	12	31.0
24	12	2	3	2	2	4	3	2	1	1	1	0.30	7	2.1
25	6	1	4	1	1	1	4	2	2	2	1	0.43	21	9.0
26	31	2	4	1	2	4	1	1	1	2	2	1.19	4	4.8
27	29	1	4	2	1	4	1	1	2	2	2	0.82	9	7.4
28	11	2	4	2	2	1	4	2	1	2	1	0.57	19	10.8
29	14	1	4	1	1	2	3	1	1	4	1	2.23	2	4.5
30	30	2	4	1	2	2	2	2	2	1	2	0.36	20	7.2
31	17	1	4	2	1	2	2	2	1	1	2	0.20	6	1.2
32	16	2	4	2	2	2	3	1	2	4	1	2.48	6	14.9
平		均										1.205	10.5	9.0

(表中A~Lの列の数字は水準を示す)

第2表 分 散 分 析 表

要 因	収 量				力 価				収 量 $\times$ 力 価			
	平方和	自由 度	平均 平方	F_0	平方和	自由 度	平均 平方	F_0	平方和	自由 度	平均 平方	F_0
	$\times 10^{-2}$		$\times 10^{-2}$		$\times 10^{-6}$		$\times 10^{-6}$					
A(南瓜の種類)	446	1	446	12.7**	420.5	1	420.5	19.5**	0	1	0	—
B(磨 砕 法)	197	3	65.6	1.8 ₇	103.1	3	34.4	1.6 ₀	424.1	3	141.4	4.0 ₂ * (**)
C(抽出液量)	28	1	28	—	3.1	1	3.1	—	21.1	1	21.1	—
D(抽出時間)	16	1	16	—	1.1	1	1.1	—	12.5	1	12.5	—
F(抽 出 pH)	47	2	23.3	—	5.1	2	2.55	—	106	2	53.0	1.5 ₁
G(分離方法)	152	2	76	2.1 ₆	30.5	2	15.25	—	123.1	2	61.6	1.7 ₆
H(脱澱粉法)	1454	1	1454	41.4***	561.1	1	561.1	27.4**	78.1	1	78.1	2.2 ₈ (Δ)
I(塩析濃度)	29	1	29	—	24.5	1	24.5	1.1 ₄	18.0	1	18.0	—
J(塩析 pH)	157	2	78.5	2.2 ₂ (Δ)	11.3	2	5.65	—	135.3	2	67.7	1.9 ₈ (Δ)
L(実験順序)	2	1	2	—	15.1	1	15.1	—	32.0	1	32.0	—
B $\times$ C	180	3	60	1.7 ₀	92.6	3	30.9	1.4 ₄	19.1	3	6.4	—
B $\times$ D	107	3	35.6	1.0 ₀	48.6	3	16.2	—	84.9	3	28.3	—
E(誤 差)	352	10	35.2	—	215	10	21.5	—	352	10	35.2	—
計	3176	31	—	—	1532	31	—	—	1406	31	—	—

*** 0.5% 有意, ** 1% 有意, * 5% 有意, Δ 10% 有意, (Δ), (**) はそれぞれ誤差項をプールした場合の有意水準を示す。

第3表 主効果の推定値

因 子	水 準	収量 g/kg	力価	収量×力価 (a)
A 南瓜の種類	A ₁ 日 本 南 瓜	0.83	0.014	9.1
	A ₂ 栗 南 瓜	1.58**	0.007	9.1
B 磨 碎 法	B ₁ mixer 1分	0.90	0.011	7.8
	B ₂ mixer 5分	1.30 ₆	0.008	5.9
	B ₃ homogenizer 1分	1.58	0.013	15.3**
	B ₄ homogenizer 5分	1.03 ₅	0.011	7.4
C 抽出液量	C ₁ 2.5 l/皮部 1 kg	1.11	0.010	8.3
	C ₂ 1.25 l/皮部 1 kg	1.30	0.011	9.9
D 抽出時間	D ₁ 30 分	1.28	0.010	9.7
	D ₂ 60 分	1.13	0.011	8.4
F 抽 出 pH	F ₁ pH 6.0	1.11 ₅	0.011	11.1
	F ₂ pH 5.8	1.32 ₅	0.011	9.5
	F ₄ pH 5.6	1.06	0.010	6.1
G 分離方法	G ₁ 遠 心 分 離 機	0.99	0.010	7.2
	G ₂ ハ ン ド プ レ ス	1.45	0.011	11.8
	G ₄ 布 袋	1.40	0.012	10.1
H 脱澱粉法	H ₁ 遠 心 沈 降 法	1.88**	0.006	10.6△
	H ₂ 珪藻土濾過法	0.53	0.015**	7.5
I 塩析濃度	I ₁ 硫酸 50% 飽和	1.11	0.011	8.3
	I ₂ 硫酸 75% 飽和	1.30	0.010	9.8
J 塩 析 pH	J ₁ pH 5.0	0.95	0.010	5.9
	J ₂ pH 4.5	1.16	0.011	9.4
	J ₄ pH 4.0	1.56△	0.010	11.6△
L 実験順序	L ₁ 前 半	1.18	0.011	8.1
	L ₂ 後 半	1.23	0.010	10.0
(注1) 最大推定値	遠心沈降法 { 日本南瓜 (A ₁)	2.48	0.013 ₅	24.2
	(H ₁) { 栗 南 瓜 (A ₂)	3.23	0.006 ₂	
	珪藻土濾過法 { 日本南瓜 (A ₁)	1.13	0.021 ₆	21.1
	(H ₂) { 栗 南 瓜 (A ₂)	1.88	0.014 ₅	
95% 信 頼 限 界		±0.65	±0.003 ₈	±6.2

** は 1% 有意差のあるもの, △ は 10% 有意差のあるものを示す。

(注1) A及びH以外の最適水準は B₃ G₂ I₁ J₄ として計算した。実際の実験例としては

Exp. No.20 A₁ B₃ G₂ H₁ I₁ J₄: w=2.58 g/kg, f=0.012, fw=31.0

Exp. No.23 A₂ B₃ G₂ H₁ I₁ J₄: w=2.86 g/kg, f=0.007, fw=20.0

どちらも 95% 信頼限界内に入っている。

の主効果の推定値をまとめて第3表に示す。またそれぞれの最大推定値と95%信頼限界も同時に示す。

4. 考 察

(1) A. 南瓜の種類について

て: この実験に用いた日本南瓜菊座種は新鮮かつ水分の多いもので、皮は緑色で軟かく表面に凹凸のある縮緬型であり、栗南瓜は水分少く皮は濃緑黒色で硬く表面の滑かな鉄兜型であった。両者は全く対照的なものであったが、このような両極端の原料を使用しても力価×収率については全く差が認められなかった。しかし、収量は栗南瓜が良く、力価は日本南瓜が良く、いずれも高度の有意差を示しているが、栗南瓜を原料とした場合には、蛋白、糖分の如き不純物が多いために調製した酵素が不純となり、力価は低下するが収量が増す結果となっている。

調製操作の上からも、栗南瓜の

場合は抽出液の比重が比較的高く、そのために酵素を塩析後遠心沈降を行う際に沈降し難い欠点があり、酵素調製の原料としては日本南瓜の方が適している。

(2) B. 磨砕法について: 予備実験によって少量処理する場合に家庭用「おろしがね」を用いると比較的収量良く、大量処理せんとして料理用大型磨砕機を用いると収量が低下することが判っていたが、その理由は磨砕度不足による抽出率の低下と、磨砕時の温度上昇による力価の低下と考えられたので、本実験で mixer と homogenizer について比較したが、低温で処理できた磨砕度もよい homogenizer の方が収量力価が大となって、実験的に確められた。

(3) H. 脱澱粉法について: 酵素抽出液の精製法として珪藻土濾過法と遠心沈降法との比較を行った結果、珪藻土濾過法では力価の高い酵素は得られるが、収量は多少低下し、遠心沈降法では収量は大であるが力価が比較的低いことが極めて判然と確認された。グルタミン酸ソーダ製造工程の各種不純試料の定量に用いる酵素としては、力価 $f > 0.01$ なることが望ましいので、実用上は珪藻土濾過法で精製する方式が良い。

第4図 標準 Flow Sheet

第 5 図 Flow Diagram

- ① 南 瓜 ⑦ 粗 碎 乳 ⑬ 抽 出 液 槽 ⑲ 酵素塗布台
 ② 洗 槽 ⑧ 粗 碎 乳 槽 ⑭ ナイアガラフィルター ⑳ 真空乾燥器
 ③ 切 削 台 ⑨ 磨 碎 機 ⑮ 硫 炭 空 ㉑ プラインコンデンサー
 ④ 切 削 皮 ⑩ 磨 碎 乳 ⑯ 塩 析 槽 ㉒ 真空ポンプ
 ⑤ 緩衝液槽 ⑪ ハンドプレス ⑰ ドラパル選心機
 ⑥ 湿式粗砕機 ⑫ 珪 藻 土 ⑱ 分 離 母 液

B: プライン

の範囲では有意差なく、従って操作或いは費用の面から都合のよい水準を取り得る。また、本実験の実験誤差は実験期間が約 1 か月にわたったが、分散分析表に見る如く比較的小さく、重要因子の効果が的確に検出されている。

実験 B. 酵素調製プラントによる調製の検討

1. 実験方法 本実験のフローシートは実験 A の最適条件を組合せ、南瓜 300 kg を用いて第 4 図に示す如き標準で運転した。

本実験に用いた装置の概要を第 5 図に示す。実験期間が夏であるため、必要な工程はプラインを用い工程全般

第 4 表 実 験 結 果

月日	皮 南瓜 (%)	Buff 皮*1 (l/kg)	酵素 皮 (g/kg)	力価 (f)	TN 皮*2 (g/kg)	fw 皮*3 (a/kg)	月日	皮 南瓜 (%)	Buff 皮*1 (l/kg)	酵素 皮 (g/kg)	力価 (f)	TN 皮*2 (g/kg)	fw 皮*3 (a/kg)
6. 4	55.8	1.79	0.61	0.007	0.066	4	7. 3	37.3	1.25	1.52	0.030	—	46
5	53.5	1.87	0.56	0.006	0.092	3	4	34.1	1.47	2.25	0.030	0.054	68
6	57.6	1.56	1.46	0.008	0.078	12	5	31.3	1.59	2.50	0.026	0.072	65
9	70.0	1.07	0.97	0.004	0.077	3	6	35.9	1.11	2.04	0.024	0.048	49
10	59.8	1.67	1.67	0.012	0.077	20	7	31.5	1.37	2.22	0.029	0.059	64
11	57.0	1.49	2.64	0.018	0.058	47	8	36.7	1.45	2.05	0.031	0.055	63
12	57.0	1.22	1.91	0.008	0.051	15	9	34.7	1.24	1.59	0.053	0.047	84
13	55.6	0.99	1.06	0.007	0.045	7	10	32.1	1.45	2.18	0.043	0.058	94
14	58.8	1.19	1.70	0.009	0.060	15	11	31.6	1.48	1.95	0.036	0.061	70
15	52.9	1.14	1.33	0.008	0.044	11	12	38.1	1.33	0.81	0.063	0.048	51
16	54.5	1.10	1.10	0.017	0.035	19	13	32.1	1.56	2.70	0.031	0.070	84
17	52.3	1.72	1.44	0.004	0.053	6	16	33.1	1.51	2.12	0.023	0.063	49
18	51.7	1.75	1.74	0.005	0.068	9	17	34.9	1.53	2.58	0.015	0.061	39
19	50.0	1.13	2.33	0.008	—	19	18	33.3	1.52	2.91	0.016	0.059	46
20	38.0	1.23	1.05	0.009	0.044	9	19	33.0	1.42	2.07	0.013	0.068	27
21	38.0	1.40	1.93	0.010	0.050	19	20	36.9	1.27	2.08	0.017	0.053	35
22	42.6	0.86	1.29	0.027	0.028	35	21	37.4	1.25	2.03	0.026	0.058	59
23	37.6	1.15	2.35	0.018	—	42	22	39.6	1.26	2.08	0.031	0.047	65
24	34.7	1.35	2.95	0.021	0.050	62	23	35.7	1.31	2.38	0.034	0.058	81
25	31.4	1.59	2.12	0.010	0.035	21	24	36.7	1.27	1.50	0.018	0.057	27
26	36.1	1.39	2.54	0.016	0.051	41	25	32.9	1.41	2.74	0.017	0.066	47
27	31.5	1.38	1.59	0.019	0.048	30	26	35.8	1.31	2.38	0.012	0.055	29
28	31.1	1.50	1.82	0.019	0.060	35	27	36.2	1.47	2.40	0.033	0.069	79
29	35.5	1.50	1.13	0.020	0.110	23	28	37.6	1.24	2.30	0.029	0.067	67
30	30.6	1.53	2.07	0.031	0.046	64	29	34.8	1.14	2.16	0.015	0.051	32
7. 1	35.4	1.32	2.59	0.014	0.051	36	30	37.7	1.24	1.75	0.009	0.060	16
2	35.2	1.42	2.08	0.025	0.051	52	31	34.5	1.06	2.65	0.029	—	77

注 *1 Buff/皮: 緩衝液/皮 液比 *2 TN/皮: 全窒素抽出量/皮 *3 fw/皮: 力価×収量/皮

*4 6月4日より23日までの18日間を初期, 6月24日より7月11日までの18日間を中期, 7月12日より31日までの18日間を後期として解析した。

(4) J. 塩析 pH について: 酵素の収量を増すためには、塩析 pH を酵素蛋白の等電点にすべきところなので、現行の pH 4.5 から ±0.5 変化させたが、10% 有意で収量及び収量×力価については pH 4.0 が良いことが判り、力価の低下も pH 4.0 では認められなかった。

(5) その他の因子について: 抽出液量, 抽出時間, 抽出 pH, 粕の分離法, 塩析濃度についてはここに実験した水準

にわたって液温はほぼ 20° 以上にならぬように運転した。

2. 実験結果 約2か月にわたる調製実験の結果を第4表に示す。運転の初期には南瓜が未熟で入荷量も少なかったので約2週間は処理量が減じているが、その後は所定能力で運転した。

特性値としては、後の解析のために工程途中の特性値も含めてとった。

3. 解析 本実験は第4図に示した一定の標準に従って行ったもので、実験計画に基づいて条件を変化させて実験したのではない。しかしながら、南瓜の成熟度、抽出液比等実験に際してコントロールし難い因子も含んでいるので、実験終了後54日間のデータについて分類法による過去のデータの解析の手法⁽⁶⁾によって解析を行った。

(1) 因子と水準: 54個のデータを $2 \times 3 \times 3 \times 3$ の4因子に分類し、一応四元配置として解析する。すなわち、

A. 南瓜の成熟度→実験時期→3水準: 実験は菊座種南瓜の出始めの6月初旬より開始し、その最盛期を経て終期の8月初旬まで続けた。その間毎日新鮮な南瓜を産地千葉県富津より直送して使用したので、用いた南瓜の大きさは初期には直径7~8cmの小粒で未熟であったが、中期以降は直径15cm以上の成熟した硬い壁の細かいものになった。よって成熟度を要因としてとりあげるべく、実験時期を3期に等分して解析した。もちろん、実験順序と南瓜の成熟度とが交絡して、実験の習熟による影響も考えられるところであるが、この運転に入る前に九州産早生南瓜で約2週間の試運転を行っており、また実験Aにおいても実験順序の効果はなかったため、本運転については実験時期により差のある場合は専ら南瓜の成熟度の影響として解析し得ると考えた。

B. 皮/南瓜→2水準: 菊座種南瓜は縮緬型で表皮は多くの皺を持っているが、酵素は表皮に多いので、調製の第1工程として約50cm²程度の表皮面積毎にブロックとして表皮を切り取り果実部はなるべく残すが、この皮/南瓜(重量%)は同じ成熟度の南瓜でも皮の剥き方や南瓜の壁の多少によって異なり、これが酵素の収量、力価に対して影響があるか否かを調べる目的で2水準とり因子とした。

C. 緩衝液/皮 液比→3水準: 抽出液比に相当するもので、この値は大体一定に保つように運転したが、湿式粗砕機⑥から出た粗砕乳⑦の流動性を見て操作したため、皮部の含水率或いは磨砕度によって或る幅でバラツキを示したので因子としてとりあげ3水準をとった。

D. 全室素抽出量/皮→3水準: 抽出蛋白量のパラメーターとして全室素の抽出量をとるべく、珪藻土濾過した抽出清澄液の全室素を定量し、原料皮当りに換算して補助測定値とし(抽出全室素g/皮1kg)、酵素収量との関連を調べるため3水準に分けて因子とした。

(2) 特性値: 特性値としては実験Aの場合とはほぼ等しく、次の4種を選んだ。ただしここでは皮当りの収量もとった。すな

要 因	特性値	第5表 分散分析表				第5表 分散分析表				第5表 分散分析表				第5表 分散分析表			
		収量×力価/皮				収量×力価/南瓜				収量×力価/皮				収量×力価/南瓜			
A (成熟度)	B (皮/南瓜)	C (緩衝液/皮液比)	D (全室素抽出量/皮)	E (誤差)	計	F ₀	平方平均	自由度	平方和	F ₀	平方平均	自由度	平方和	F ₀	平方平均	自由度	平方和
1	1	1	1	1	1	11.3***	24977	2	49954	14.7***	1370	2	2739	33.8***	8017	2	16034
2	2	2	2	2	2	3.3 ₂	7326	1	18	—	156	1	156	—	156	1	156
3	3	3	3	3	3	2.5 ₇	5680	2	203	1.0 ₉	210	2	421	—	421	2	421
4	4	4	4	4	4	2.4 ₄	5374	2	97	—	190	2	380	—	380	2	380
5	5	5	5	5	5	1.7 ₃	3815	2	100	—	29	2	57	—	57	2	57
6	6	6	6	6	6	1.8 ₉	4161	2	496	1.2 ₁	288	4	1153	—	1153	4	1153
7	7	7	7	7	7	—	875	4	523	1.4 ₆	188	4	750	—	750	4	750
8	8	8	8	8	8	2.7 ₆	6068	2	271	—	164	2	327	—	327	2	327
9	9	9	9	9	9	—	820	2	812	5.6 ₂ **	1331	2	2661	—	2661	2	2661
10	10	10	10	10	10	—	992	4	59	—	85	4	340	—	340	4	340
11	11	11	11	11	11	—	2210	4	2612	—	237	4	10637	—	10637	4	10637
12	12	12	12	12	12	—	186803	53	7930	—	53	53	32916	—	32916	53	32916

*** 0.1% 有義, ** 1% 有義, * 5% 有義を示す。

われ, 収量×力価/南瓜 (a/kg), 収量×力価/南瓜 (a/kg), 力価 (f), 収量/皮 (g/kg).

(3) 分散分析: まず分類法を用いて, 因子 A→B→C→D の順で分類し, 4 特性値について分散分析を行って第 5 表を得た.

4. 考 察

(1) 分散分析表について: 第 5 表に示した如く, 4 特性値についていずれも因子 A すなわち南瓜の成熟度のみが高度の有意差を示し, 他の因子の主効果は認められない. このことは本実験が実験 A で得られた最適調製条件で運転されたもので, 南瓜の成熟度以外は実験 A でとりあげた因子に比べて影響が少いことを意味する. また因子 B, C, D が有意差を全く示さなかったため, 分類法 A→B→C→D の順で分類して解析した場合に, 因子 A に対して B, C, D の水準がバランスしていなくても, 因子 A にそのための偏りは殆んど入らないと考えてよいので, この場合は因子 B, C, D の修正をしなくても A の効果が有意で他の因子の効果は有意でないことは変りない. なお, 2 特性値について交互作用 B×D が有意差を示したが, B 及び D の主効果は全く認められず, B, D の水準値にも偏りはないので, 過去のデーターの解析の際にしばしば入り込むランダムイズされていないための第 1 種の過誤と考えられ, 特に B×D の交互作用の意味はないから無視してよい.

第 6 表 主効果推定値

特性値	収量×力価	収量×力価	力価	酵素/皮
	南瓜 a/kg	皮 a/kg		
初 期	8.2	16.4	0.011	1.37
中 期	18.1	43.7	0.027	1.80
後 期	18.0	42.1	0.024	2.07

第 7 表 収量, 力価の比較

	収量×力価/南瓜 a/kg	力 価
条 件 検 討 前	11.8~12.8	0.006~0.010
前 報 最 適 条 件 (日本南瓜, 珪藻土法)	21.1±6.2	0.022±0.004
本報, 中期, 後期	18.0~18.1	0.024~0.027

(2) 南瓜の成熟度の主効果について: 因子 A すなわち南瓜の成熟度に対する 4 特性値の主効果の推定を行うと第 6 表の如くである.

運転期間を解析の便宜上 18 日宛の 3 期に分けたが, 中期と後期とでは南瓜の成熟度は変らず成熟したものであり, 初期には未熟であったため第 6 表の如き結果が得られたものである. すなわち 4 特性値とも, 初期の未熟南瓜を原料とした場合に著しく低い値を示しており, 中期, 後期については力価, 収量に大差はない. 実験 A ではこの成熟度について因子としてとりあげなかったが, 本実験でその影響が明らかとなった.

(3) 実験室的調製との比較: 本実験に採用した

実験 A での最適条件, すなわち日本南瓜菊座種を用い珪藻土濾過法を行った結果と, 本報中期及び後期の結果を比較すると第 7 表の如くなり, 実験室的器具よりパイロット装置に換え約 60 倍にスケールアップした場合でも両者の収量, 力価は 95% 信頼限界内でよく一致した. またこれらの結果と条件検討前の実績と比較すると, 力価において 2~2.5 倍, 収量においても 2 倍程度向上している.

実験 C. 酵素の保存条件の検討

1. 実験計画 実験 B により得られた酵素を, 力価を低下せしめることなく保存するための条件を検討するために以下の如く実験を行った.

(1) 因子と水準

A. 酵素のロット: 力価の異なる酵素及び調製後保存するまでの履歴の異なる酵素を組込み 4 水準とった. すなわち, A₁, f=0.022, 調製後直ちに保存; A₂, f=0.018, 調製後直ちに保存; A₃, f=0.016, A₁ の酵素を 2 週間室温常圧下に褐色デシケーターに入れておいたもの; A₄, f=0.008, 調製後 2 週間室温常圧下に放置せるもの.

B. 乾燥剤: B₁, P₂O₅; B₂, Mg(ClO₄)₂; B₃, シリカゲル; B₄, 乾燥剤なし.

C. 保存雰囲気: C₁≡C₄, 真空 (0.1 mmHg 以下); C₂, N₂ ガス置換; C₃, 常圧空気.

ただし真空, N₂ ガス置換の場合は洩れを防ぐために乾燥剤とともに 100 ml のアンプルに封入した.

D. 貯蔵容器の色: D₁, 無色; D₂, 褐色.

F. 保存温度: F₁, 7~10°; F₂, -20°; F₃, 2°; F₄, 20~25°.

G. 保存期間: G₁, 3 か月; G₂, 7 か月.

(2) わりつけと実験方法: 4³×3¹×2² 型であるので, L₃₂ 型直交配列を用いることにし 32 回の実験を行った. すなわち 32 個のアンプルを用意し, A₁~A₄ の 4 種の酵素を 10 g 宛おのおの 8 本のアンプルに入れ, 第

第8表 実験結果										
実験 番号	A (酵素 ロット)	B (乾燥 剤)	C (雰囲気)	D (容器の 色)	F (保存 温度)	G (保存 期間)	力 価 (f)			
1	1	1	1	1	1	1	0.021	0.020	0.026	0.023
2	1	2	1	2	2	1	0.027	0.022	0.023	0.025
3	1	3	2	1	3	1	0.022	0.028	0.024	0.026
4	1	4	3	2	4	1	0.009	0.009	0.010	0.011
5	2	1	2	2	2	1	0.019	0.017	0.020	0.021
6	2	2	3	1	1	1	0.019	0.019	0.017	0.020
7	2	3	1	2	4	1	0.018	0.015	0.012	0.013
8	2	4	1	1	3	1	0.019	0.020	0.021	0.018
9	3	1	3	2	3	1	0.014	0.014	0.012	0.011
10	3	2	2	1	4	1	0.013	0.012	0.013	0.011
11	3	3	1	2	1	1	0.014	0.016	0.014	0.014
12	3	4	1	1	2	1	0.012	0.016	0.016	0.012
13	4	1	1	1	4	1	0.005	0.005	0.004	0.005
14	4	2	1	2	3	1	0.008	0.008	0.009	0.008
15	4	3	3	1	2	1	0.007	0.008	0.009	0.008
16	4	4	2	2	1	1	0.008	0.009	0.008	0.008
17	1	1	2	1	4	2	0.011	0.013	0.012	0.010
18	1	2	3	2	3	2	0.019	0.024	0.017	0.019
19	1	3	1	1	2	2	0.025	0.025	0.032	0.027
20	1	4	1	2	1	2	0.022	0.026	0.023	0.024
21	2	1	1	2	3	2	0.016	0.014	0.017	0.021
22	2	2	1	1	4	2	0.016	0.015	0.017	0.016
23	2	3	2	2	1	2	0.020	0.024	0.022	0.019
24	2	4	3	1	2	2	0.021	0.015	0.015	0.018
25	3	1	1	2	2	2	0.012	0.014	0.013	0.014
26	3	2	1	1	1	2	0.014	0.017	0.017	0.015
27	3	3	3	2	4	2	0.010	0.010	0.009	0.012
28	3	4	2	1	3	2	0.012	0.015	0.013	0.016
29	4	1	3	1	1	2	0.007	0.007	0.006	0.006
30	4	2	2	2	2	2	0.007	0.007	0.007	0.007
31	4	3	1	1	3	2	0.008	0.006	0.007	0.007
32	4	4	1	2	4	2	0.005	0.005	0.005	0.005

第9表 分散分析表				
要 因	平方和	自由 度	平均 平方	F
A (酵素の 種類)	$\times 10^{-6}$ 3446	3	$\times 10^{-6}$ 1149	55.2**
B (乾燥剤の 種類)	132	3	44	2.1 Δ
C (雰囲気)	135	2	67.5	3.24 $\Delta\Delta$
D (容器の色)	15	1	15	—
F (保存温度)	757	3	252	12.1**
G (保存期間)	2	1	2	—
e ₁ (実験誤差)	375	18	20.8	(5.77**)
e ₂ (測定誤差)	347	96	3.6	
計	5207	127		

** 1% 有意, $\Delta\Delta$ 10% 有意, Δ 25% 有意
e₁ を e₂ で検定し高度に有意なるため A~G は e₁ で検定す。

第10表 主効果の推定	
因子及び水準	推定値 (f)
酵素の 種類	A ₁ (f=0.021)* 0.0205 $\pm$ 0.0018
	A ₂ (f=0.018) 0.0179 $\pm$ 0.0018
	A ₃ (f=0.016) 0.0133 $\pm$ 0.0018
	A ₄ (f=0.008) 0.0068 $\pm$ 0.0018
乾燥剤	B ₁ (P ₂ O ₅) 0.0134 $\pm$ 0.0018
	B ₂ (Mg(ClO ₄) ₂) 0.0153 $\pm$ 0.0018
	B ₃ (シリカゲル) 0.0160 $\pm$ 0.0018
	B ₄ (乾燥剤なし) 0.0139 $\pm$ 0.0018
雰囲気	C ₁ (真 空) 0.0155 $\pm$ 0.0012
	C ₂ (N ₂ ガス) 0.0148 $\pm$ 0.0018
	C ₃ (常圧空気) 0.0129 $\pm$ 0.0018
保 存 温 度	F ₁ (7~10°) 0.0164 $\pm$ 0.0018
	F ₂ (-20°) 0.0163 $\pm$ 0.0018
	F ₃ (2°) 0.0154 $\pm$ 0.0018
	F ₄ (20~25°) 0.0105 $\pm$ 0.0018

* 保存前の力価を示す。

8表に記した如き保存条件下に保存を開始し, G₁ については3か月後, G₂ については7か月後に開封してそれぞれ力価を測定した。力価の測定は実験Aに述べた方法によったが, 測定精度を高めるために各試料について4回繰返して測定した。

2. 実験結果 第8表に実験結果を示す。表中のA~Gの欄の数字はそれぞれの因子の水準を示し, 特性値は保存後の力価で4回の測定値を掲げた。

3. 解 析

(1) 分散分析: 分散分析表を第9表に示す。なお分散分析は1次誤差(実験誤差)と2次誤差(測定誤差)に分けて検定した。

(2) 主効果の推定: 保存後の力価の変化について, 各因子の主効果の推定値を第10表に示す。なお95%信頼限界を併記した。

4. 考 察

(1) 実験誤差について: 力価の測定誤差 e₂ に比して実験誤差 e₁ が高度に有意となっているが, e₁ の中には2因子交互作用, たとえば雰囲気と保存温度, 保存温度と保存期間等の影響が誤差として包含されているためである。また, 力価の測定誤差は小さいことも判る。

(2) A. 酵素のロットについて: A₁~A₄ の4種の力価の異った酵素を試料として用いたので高度の有意差が検出されたのは当然であるが, A₃, A₄ すなわち調製後約2週間室温に放置されたものはその期間に力価の低下が起っており, 保存前後の力価の比較を行うと第9表に示した通りで有意差は認められない。

(3) C. 雰囲気について: 雰囲気については危険率10%で有意差がある。真空にしておくのが最も良く, N₂ ガス封入がこれに次ぐ。常圧で空気を共存させたままにするのは好ましくない。

第 6 図 保存温度の効果

条件 酵素 ロット	第 11 表 保存条件の良否による 7 か月後の酵素力価の比較	
	最 良 条 件 (シリカゲル, 真空, 10° 以下)	最 悪 条 件 (乾燥剤なし, 常圧, 室温)
A ₁	$f=0.022_3 \pm 0.003_3$	$f=0.008_7 \pm 0.003_3$
A ₃	$f=0.015_2 \pm 0.003_3$	$f=0.001_6 \pm 0.003_3$

(4) F. 保存温度について : 保存温度については高度に有意である。第 6 図にも示す如く保存温度は 10° 以下ならば力価の低下は殆んど認められないが, 20° 以上になると力価の低下は著しい。従って普通の冷蔵庫中に保存すればよい。

(5) G. 保存期間について : 3 か月後と 7 か月後と力価に有意差は認められなかった。本実験に引続いて 14 か月後の力価を測定したが, 本実験で得られた最適保存条件下では全く力価の低下が認められないことを確認した。

(6) 保存条件の相違の比較 : 保存条件の良否による保存 7 か月後の酵素力価の差を比較すると第 11 表の如くで著しい差が認められる。

要 約

南瓜よりのグルタミン酸脱炭酸酵素の調製条件を検討し, 次の知見を得た。

(1) 日本南瓜と栗南瓜を比較すると, 酵素の総合収率については差がないが, 力価については日本南瓜の方が良いものが得られる。

(2) 酵素の総合収率を高めるためには南瓜の磨砕度をよくする必要がある。

(3) 酵素抽出液を珪藻土濾過することによって, 得られる酵素の力価を高め得る。

この実験から得られた最適条件, すなわち日本南瓜を原料とし, 磨砕度をよくするために 2 段の湿式磨砕を行った後, 珪藻土濾過法による精製を行う方法で, 南瓜処理能力 300 kg/day の製造プラントにスケールアップし運転, 解析を行った結果, 実験室で得られた結果と収量及び力価においてほぼ同じ成績を得た。またこの実験で南瓜の成熟度が得られる酵素の力価, 収量に影響することを認めた。

かくして得られた酵素について保存条件を検討し, 0.1 mmHg 以下の真空中で 10° 以下の冷暗所に保存すれば, 14 か月後でも力価を低下せしめることなく保存し得ることを確認した。

本研究に対し御指導賜った大阪大学奥貫一男教授, 御鞭撻頂いた当研究所大枝春臣所長, 元崎信一第一研究部長に深謝致します。また本実験に協力された当研究所竹西忠男, 中村朝郎, 永嶋伸也, 紀谷孝彦, 辻公次の諸氏及び川崎工場青木嶋雄, 松本泰二の両氏に感謝いたします。

- (1) K. Okunuki : *Bot. Mag. (Tokyo)*, 51, 270 (1937).
- (2) O. Schales, S. S. Schales : *Arch. Biochem.*, 10, 455 (1946).
- (3) O. Schales, S. S. Schales : *ibid.*, 11, 445 (1946).

- (4) 奥貫一男, 稲垣 稔, 脇坂義治 : 酵素化学シンポジウム, 7, 90 (1952).
- (5) K. Okunuki, M. Inagaki : *Proc. Jap. Acad.*, 27, 658 (1951).
- (6) 田口玄一 : 実験計画法, 上巻 (1957).