日本農芸化学会誌
(NIPPON NÔGEIKAGAKU KAISHI)

昭和 45 年

第 44 卷

報 文

[農化 第 44 卷, 第 1 号, p. 1~7, 1970]

果汁清澄酵素剤に関する研究 (第 2 報)

柑橘果汁清澄促進因子の精製とその性質

井上雅資, 岡田茂孝, 福本寿一郎*
(大阪市立工業研究所, *大阪市立大学理学部)

昭和 43 年 12 月 4 日 受理

Studies on Juice-clarifying Enzymes

Part II. Purification of Accelerating Factor for Juice Clarification
and Some Properties of the Purified Preparation

By Masashi INOUE, Shigetaka OKADA and Juichiro FUKUMOTO*
*Osaka Municipal Technical Research Institute, Osaka *Faculty
of Science, Osaka City University, Osaka*

Previous work showed that an accelerating factor obtained by cultivating a strain of *Aspergillus niger* on solid media of wheat bran was effective for clarification of cloudy citrus juices. In the present study the accelerating factor was purified by a procedure involving ammonium sulfate precipitation, alkali treatment, and chromatography on DEAE-Sephadex and Sephadex G-100 columns.

The factor so purified accelerated the juice clarification with polygalacturonase and showed high activity toward hemicelluloses prepared from rice straw and orange peel. The purification of the enzyme was about 110-fold with a yield of 5% on the basis of activity. The purified enzyme was almost homogeneous ultracentrifugally. With rice straw hemicellulose as substrate, its optimum pH and temperature were found to be 4.5~5.0 and 50°C respectively. It was stable between pH 2.0 and 9.0, but over 80% of its activity was lost at 70°C for 10 min.

Of the three fractions obtained by DEAE-Sephadex chromatography, only one fraction, hemicellulase III, accelerated the clarification of orange juice by polygalacturonase action and rapidly hydrolyzed hemicellulose from orange peel. It accelerated also the juice clarification with polygalacturonases from other sources such as *Coniothyrium diplodiella* (Sclase) and *Aspergillus niger* (Pectinol).
(Received December 4, 1968)

緒 言

著者らは、前報⁽¹⁾において *Aspergillus niger* に属

する 1 菌株 (*Asp. niger* Nrg 6) の分泌する酵素が強力な柑橘果汁清澄化力を有することを認め、その酵素系を部分精製したところ、PG (polygalacturonase), PE

(pectinesterase) 以外の別種の区分が PG による柑橘果汁の清澄化を促進する事実を指摘した。

この促進因子の性質を明らかにするため、DEAE-Sephadex クロマトグラフィーやゲル濾過等の方法によって精製を行なった結果、この因子は前報で推測したとおり、ある種のヘミセルラーゼであることがほぼ確実になったので、これらの結果について報告する。

実験方法

1. 菌の培養方法 小麦麴 1000g, 陳皮末 100g, 大豆粕粉末 50g を、硫酸 10g を溶解した水道水 850ml と混和し、オートクレイブ (120°C, 30 分間) で殺菌し、別に乾熱殺菌したアルミニウム製麴蓋 (4.5×32×52cm) 2 枚に均一に盛込んだのち、*Aspergillus niger* Nrg 6 を植菌し、27°C において 72 時間静置して培養した。なお、種培養としては、上記培養基 10g を 100ml 容三角フラスコに入れ、オートクレイブで殺菌後、菌株保存用の試験管斜面より植菌し、27°C で 48 時間培養した。本培養の植菌には、麴蓋 1 枚当りにつきフラスコ 1 本の種培養を使用した。

2. 粗酵素液の調製方法 麴蓋を 3 倍量の水で抽出し、抽出濾液の 0.3~0.8 硫酸飽和沈澱区分を濾過によって採取し、純水に溶解する。不溶物は遠心分離で除去したのち、上澄を膀胱膜を使用して水道水に対して 10°C で 24 時間透析し、つづいて pH 5.0 の 0.01M 酢酸緩衝液を外液として 24 時間透析した。この透析内液を粗酵素液として以後の精製を行なった。

3. 酵素作用力の測定方法

i) PG および PE: 前報⁽¹⁾と同様に Sunkist Growers の 1% ベクチン (pH 3.6, 0.1M 酢酸緩衝液) 10ml に酵素液 1ml を加え、40°C で作用させ Ostwald 粘度計を用いて PG 活性を測り、またこれと同様な条件で反応を行ない、pH メーターを使用してアルカリ滴定することによって、PE 活性を測定した。

ii) 果汁清澄度 (JCV) および果汁清澄活性: 前報⁽¹⁾と同じ方法で測定した。

iii) ヘミセルラーゼ: イナワラより調製したアラビノキシランを基質とし、前報⁽¹⁾と同じ方法でヘミセルラーゼ活性を測定した。また温州ミカン果皮からもイナワラヘミセルロースの場合に準じてヘミセルロースを調製し、ヘミセルラーゼの基質とした。

4. PG 果汁清澄促進活性の測定に使用する清澄

Extract of wheat bran culture (A)
made 0.8 saturated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ after removal of the precipitate at 0.3 saturation
Precipitate
dissolved in water
Crude enzyme solution
dialyzed against 0.01M acetate buffer, pH 5.0
Dialyzed solution (B)
treated with NaOH at pH 9.0 and 40°C for 2hr
Alkali-treated enzyme solution
chromatographed on a DEAE-Sephadex column by using a linear gradient of NaCl concentration (0→0.5M)
Eluate
rechromatographed under the same conditions
Eluate (C)
concentrated under reduced pressure, filtered through a column of Sephadex G-100
Purified accelerating factor (D)

Scheme 1. Purification of the Accelerating Factor of *Aspergillus niger* Nrg 6.

促進因子は、Scheme 1 の方法に従って精製を行なった。また PG フラクシオンは前報⁽¹⁾において示したとおり、粗酵素液をアルカリ処理を行なわずに、0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で緩衝化した DEAE-Sephadex カラムに吸着させたのち、同じ緩衝液中の NaCl 濃度を漸次上昇 (0→0.5M) させて溶出を行なった。このうち、フラクシオン No. 42~56 を PG 区分として使用した。

5. 市販ベクチナーゼ酵素剤 市販ベクチナーゼ酵素剤としては、強力スクラーゼ (三共株式会社)、ベクチノール 10M (Rohm & Haas Co.) を使用した。また強力スクラーゼからは、遠藤の方法⁽²⁾に従い Duolite CS-101, リパノール処理、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって、endo-PG I に当る区分を分離し PG として使用した。

6. 蛋白量の測定 比活性は、酵素液中の蛋白 mg 当りの酵素単位で示した。蛋白量の測定は Lowry 法⁽³⁾の方法に従い、標準としてカゼイン (Hammarsten) を用いた。なお、クロマトグラフィーのさいの蛋白質は 280 mμ の吸光度を測定し、これをもって表示した。

7. 超遠心沈降分析 超遠心は日立分析用超遠心機 UCA-I 型を使用して行ない、蛋白濃度 0.71% の精製酵素溶液 (0.01M 酢酸緩衝液, pH 5.0) を使用し、沈降条件は回転数 60,000 rpm, 温度 21°C であった。

実験結果

果汁清澄促進因子は、前報⁽¹⁾において、部分精製して得たフラクシオンに、イナワラヘミセルロースに対する

Fig. 1. Column Chromatograms of Crude Enzyme on DEAE-Sephadex A-50.

Crude enzyme solution was applied on a column (1.9×75 cm) equilibrated with 0.01 M acetate buffer, pH 5.0. Elution was carried out with a linear gradient of NaCl concentration at a flow rate of 15 ml/hr. Fraction No. 93~101 were collected [These were rechromatographed on a column (1.5×30 cm) under the same conditions].

●.....● O. D. at 280 mμ, ○—○ Hemicellulase activity, — Concentration of NaCl.

ヘミセルラーゼ活性が認められたことから、PG との併用による果汁清澄促進効果と、ヘミセルラーゼ活性の測定結果を標識として、Scheme I のような過程で精製した。なお操作は、アルカリ処理以外は 15°C 以下の温度で行なった。

1. 酵素の精製

i) アルカリ処理：塩析、透析した粗酵素液を pH 9.0 になるように NaOH にて調整し、40°C にて 2 時間処理したのち、HCl で pH 5.0 とし、1 夜氷室 (0°C) に放置後、生じた沈澱を遠心分離にて除去した。本処理において PG、PE 活性は完全に失活したが、果汁清澄促進効果およびヘミセルラーゼ活性はその約 85% が残存した。そのため、本処理過程は PG、PE を含まないヘミセルラーゼを得ることにきわめて有効であった。

ii) DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー：上記のアルカリ処理を行なった酵素液を 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して 24 時間透析し、同じ緩衝液で緩衝化した DEAE-Sephadex カラム (1.9×75 cm) に透析酵素試料を吸着させ、緩衝液中の NaCl 濃度を漸次上昇 (0→0.5 M) させて溶出を行なった (Fig. 1)。

この結果、イナワラヘミセルラーゼ活性は、3 ないし 4 つの区分に分かれたが、このうちフラクション No. 93~101 だけが果汁清澄促進効果を示した (Fig. 2)。

Fig. 2. Clarification of Orange Juice with Fractions Partially Purified by DEAE-Sephadex Column Chromatography.

The fractions were obtained as shown in Fig. 1. Incubation was made at 40°C for 3 hr.

* Juice clarification value

(I) Fraction No. 18~40

(II) Fraction No. 70~85

(III) Fraction No. 93~101

なお、各ヘミセルラーゼの呼称は Fig. 1 に示すごとく流出順に、ヘミセルラーゼ I (フラクション No. 18~40)、ヘミセルラーゼ II (フラクション No. 70~85)、ヘミセルラーゼ III (フラクション No. 93~101) と呼ぶこととした。清澄化促進効果をともなうヘミセルラーゼ III 区分は、さらに同じ条件で再クロマトグラフィーを行なって精製した。

Fig. 3. Gel Filtration of Enzyme on Sephadex G-100.

The fractions obtained by the rechromatography (see the legend of Fig. 1) were applied to the column (2.7×83 cm) equilibrated with 0.01 M acetate buffer, pH 5.0. Elution was carried out with the same buffer. Incubation for the measurement of JCV was made at 40°C for 4 hr.

●.....● O. D. at 280 mμ

○—○ Hemicellulase activity

△.....△ JCV (juice clarification value)

iii) ゲル濾過: 再クロマトグラフィーによって得られた果汁清澄促進効果を有するヘミセルラーゼⅢ区分を真空濃縮し, 上記と同じ緩衝液で調製した Sephadex G-100 カラム (2.7×83cm) に加えてゲル濾過を行なった。Fig. 3 にその結果を示す。これらの操作で, 粗酵素液に比べてヘミセルラーゼ活性として蛋白 mg 当り約 110 倍に精製されたものが得られ, またヘミセルラーゼの活性と果汁清澄促進作用との間には, おおよそ比例的な関係が認められた。

精製酵素は, 超遠心分析その他の実験に使用した。Table I に, 各精製段階の酵素液におけるヘミセルラーゼの比活性および収率を示した。

iv) 精製酵素液の超遠心沈降分析: 精製酵素液を用いて超遠心分析を行ない, 得られた沈降図を Fig. 4 に示した。

Table I. Summary of Purification Procedure of Accelerating Factor

Step*	Total activity (unit)**	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Yield (%)
A	237,000	67,700	3.5	100
B	206,000	34,900	5.9	87
C	16,600	42.5	390	7
D	11,600	28.3	410	5

* cf. Scheme I.

** Reaction mixture: 1.0ml of enzyme solution and 4.0ml of 1.25% substrate solution (rice straw hemicellulose in 0.05 M acetate buffer, pH 3.6).

Incubation: for 30 min, at 40°C. One unit of hemicellulase activity was defined as the amount of enzyme that releases 1mg of reducing sugar as xylose per 30 min.

2. 精製酵素の 2, 3 の性質

上記のごとく精製を行なった清澄促進区分について, 2, 3 の酵素的性質を検討した。

i) pH および熱安定性: pH 安定性を知る目的で, 各 pH の緩衝液 (0.05 M) 中に 40°C で 2 時間放置したのち, 残存するヘミセルラーゼ活性 (基質, イナワラヘミセルロース) ならびに果汁清澄促進活性を測定した (Fig. 5)。その結果, 安定 pH 域は, 両活性とも 2~9 に認められた。また熱安定性は, 0.02 M の酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で各温度に 10 分間処理し, 急冷後残存する酵素活性を測定した。その結果, 両活性とも, 75°C, 10 分間の処理で完全に失活することがわかった (Fig. 6)。

Fig. 5. Effect of pH on Enzyme Stability.

The enzyme was incubated in various buffers (pH 1~4, 0.02 M glycine+NaCl+HCl; pH 4~6, 0.02 M acetate buffer; pH 6~8, 0.02 M phosphate buffer; pH 8~11, 0.02 M borate buffer) at 40°C for 2 hr. After dilution the enzyme solutions were assayed for hemicellulase activity by the same method as described under Table I. With these enzyme solutions JCV was measured, incubation being made at 40°C for 4 hr.

●—● Hemicellulase activity
○-----○ JCV (juice clarification value)

Fig. 4. Ultracentrifugal Sedimentation Patterns of 0.71% Accelerating Factor.

Times after full speed (60,000rpm) are 5, 20, 60 and 90 min (from right to left).

Temperature was 21°C and bar angle 60~70°.

Fig. 6. Effect of Temperature on Enzyme Stability.

The enzyme solutions (pH 4.5) were incubated for 10 min at indicated temperature. After being rapidly cooled in ice these were assayed for hemicellulase activity by the same method as described for Table I. Incubation for the measurement of JCV was at 40°C for 4 hr.

●—● Hemicellulase activity
○—○ JCV (juice clarification value)

Fig. 7. Effect of pH on Enzyme Activity.

Reaction mixture: 1.0 ml of enzyme solution, 1.0% rice straw hemicellulose, 0.05 M buffers; total volume, 5 ml.

The buffers used: acetate buffer for pH 3.0~5.5, phosphate buffer for pH 6.0~7.0.

Fig. 8. Effect of Temperature on Enzyme Activity.

The reaction mixtures are the same as described under Table I. After incubation for 30 min at temperature indicated, the activities were assayed by the same method as in Table I.

ii) 最適 pH と温度: 本区分のヘミセルラーゼ活性の最適 pH と温度を, イナワラヘミセルロースを基質として測定した結果を Fig. 7 と 8 に示した. 最適 pH は 4.5~5.0 に, また最適温度は 50°C 付近に認められた.

iii) ヘミセルロースに対する 3 種ヘミセルラーゼの作用: 本菌株 *Asp. niger* Nrg 6 の分泌する 3 種のヘミセルラーゼの作用特異性を比較するため, ヘミセルラーゼ I, II, III を適当に希釈し, 温州ミカン果皮より調製したヘミセルロースに対する反応速度をほぼ等しくして, これらの酵素をイナワラならびに温州ミカン果皮ヘミセルロースに作用させた結果は Fig. 9 (A), (B) のとおりであった. 分解率は, 各ヘミセルロース 1% 溶液 2 ml に 2 N HCl 2 ml を加え, 沸とう湯浴中で 2 時間, 加水分解を行なって得た還元性物質の量を 100 として換算した. その結果, イナワラヘミセルロースを基質とした場合, ヘミセルラーゼ I が最も分解率が高く, 温州ミカン果皮ヘミセルロースでは, 逆に清澄促進作用をとともなうヘミセルラーゼ III が最も高い分解率を与えることがわかった. また, 反応 2 時間目の加水分解液を加熱 (100°C, 10 分間) して酵素を失活させたのち, ペーパークロマトグラフィーによって反応生成物の分析を行なったところ, いずれの基質からもヘミセルラーゼ I は, キシロースおよび各種のオリゴ糖を遊離し, ヘミセルラーゼ II と III はアラビノース, キシロースをいずれも遊離するが, 生成するオリゴ糖において異なるものが認められた. すなわち, 3 者のヘミセルラーゼはこれらのヘミセルロー

Fig. 9. Hydrolysis of the Hemicelluloses from Rice Straw and Orange Peel by Hemicellulases I, II and III.

Reaction mixture: 150 units of hemicellulase, 1.0% hemicellulose, 0.05 M acetate buffer; final volume, 25 ml; final pH 4.5.

x—x Hemicellulase I
●—● Hemicellulase II
○—○ Hemicellulase III

スに対する分解率や分解生成物の点で違っており, 作用特異性を異にするものと考えられる。

3. 温州ミカン果汁に対する清澄促進効果

i) 清澄促進因子と PG を別々に加えたときの清澄促進効果: PG と清澄促進因子を混合して作用させた場合と, あらかじめ PG または清澄促進因子のみを果汁に作用させ, 反応の途中で清澄促進因子あるいは PG を加えた場合の清澄化を測定した結果は Fig. 10 に示すとおりである。完全な清澄化は両者を混合して同時に作用させた場合にのみ認められた。前報⁽¹⁾においては, あらかじめ PG または促進因子のみを果汁に作用させ一度加熱失活後, 促進因子あるいは PG を加えた場合の清澄促進作用を調べたが, いずれの場合も清澄促進因子の効果は現われず, やはり, 両者を混合して同時に作用させた場合にのみ十分な効果が認められた。

Fig. 10. Successive Action of PG and Accelerating Factor on Orange Juice.

PG or accelerating factor was added to the reaction mixture at the time indicated by arrows. Incubation was made at 40°C.

P, PG; A, accelerating factor.

○—○ Accelerating factor, △—△ PG, ●—● Accelerating factor+PG.

ii) 市販酵素剤に対する清澄促進因子の効果: 本清澄促進因子は, 本菌 *Asp. niger* Nrg 6 の分泌する PG の温州ミカン果汁清澄作用を促進することは明瞭であるが, 本報ではさらに他菌種からつくられる市販果汁清澄剤や, それから得られた PG に対して清澄化促進の作用を示すか否かを検討した。その結果, 本促進因子はスクラーゼ (*Coniothyrium diplodiella*) から部分精製された PG による清澄化を同様に促進することがわかった。また程度の差はあったが, 市販酵素剤であるペクチノール 10 M (*Aspergillus niger*) や, 強力スクラーゼにも促進効果を示すことが判明した (Fig. 11)。

Source of PG	Enzymes	JCV (%)	
		50	100
<i>Aspergillus niger</i> Nrg 6	PG	40	60
	PG+HIII*	80	100
Sclase	crude PG	40	60
	crude PG+HIII*	80	100
	PG**	40	60
	PG** + HIII*	80	100
Pectinol	crude PG	40	60
	crude PG+HIII*	80	100

Fig. 11. Cooperation of Hemicellulase III with PG from Various Sources for the Clarification of Orange Juice.

Incubation was made at 40°C for 4 hr.

* Hemicellulase III

** Partially purified endo-PG

考 察

前報⁽¹⁾において, *Aspergillus niger* Nrg 6 の分泌する果汁清澄化酵素は, PG とある種の清澄促進因子と考えられる区分に分離されることを指摘した。このうち, 清澄促進因子と考えられる区分には比較的強力なヘミセルラーゼ作用が認められたことから, 本研究ではヘミセルラーゼと清澄促進活性を測定しながら清澄促進因子の精製を行なった。その結果, ヘミセルラーゼはイナワラを基質とすると, 3ないし4種類存在するが, そのうちの1つには清澄促進作用があり, 精製の各段階において両作用は同じ挙動を示し, かつ pH や熱に対する安定性からも, この両作用は同一酵素による反応と推定された。

従来, リンゴ果汁ではその中に含まれるペクチンのエステル化度が柑橘ペクチンに比べて高く⁽⁴⁾, PG の作用に先行して PE による脱エステル化が必要であり, PE-PG 系によってリンゴ果汁の清澄化が起こることが証明されている⁽⁵⁻⁷⁾。

しかし本菌によって分泌されるペクチナーゼ系酵素による柑橘類果汁の清澄化の場合には, 前報⁽¹⁾にも述べたように PE の効果はほとんど認められず, 主として PG によって清澄化は進行する。そして本報によって指摘することく, ある種のヘミセルラーゼがこの PG による清

澄化を促進するものと考えられる。

リンゴ果汁の混濁粒子中にもヘミセルロースが存在していると考えられるが、第 1 報⁽¹⁾にみられるように、リンゴ果汁ではヘミセルラーゼⅢによる清澄化促進効果が認められないのは、含まれているヘミセルロースの構造の相違によるものであるか、あるいはその他の原因によるのかは明らかではない。ただ供試したイナワラヘミセルロースやミカン果皮ヘミセルロース、ミカン果汁の混濁粒子中のヘミセルロースには、いずれも 10% 以上のキシロースとアラビノースを含んでいるが、リンゴ果汁の混濁粒子中にはキシロースはほとんど認められないか⁽⁶⁾、認められたとしても微量であり⁽⁶⁾、ヘミセルロースの構造にはかなりの相違があるものと考えられる。

ヘミセルラーゼⅢはイナワラヘミセルロースに比べて温州ミカン果皮ヘミセルロースをよく分解する。このように、果汁清澄促進効果と温州ミカン果皮ヘミセルロース分解作用が並行することは、酵素の特異性の面からみて、はなはだ興味ある問題を含んでいるように考えられる。すでに *Asp. niger* の 1 株から単離された 2 種のヘミセルラーゼのうち、一方だけが玄米の外皮を剥皮する作用の強いことが明らかにされており⁽⁹⁾、この場合もヘミセルラーゼの特異性の一面を示しているのではないかと考えられる。

要 約

Aspergillus niger Nrg 6 の分泌する柑橘果汁の清澄化促進因子の精製を行ない、そのいくつかの性質を明らかにした。

(1) *Aspergillus niger* Nrg 6 の菌麩抽出液を精製し、果汁清澄促進因子を蛋白 mg 当りの活性として約 110 倍に精製した。この精製を通じて、イナワラヘミセルロースを基質とするヘミセルラーゼは 3 ないし 4 つの区分に分離されたが、そのうちの 1 つにだけ果汁清澄促進作用が認められた。また、この区分の各精製段階にお

いて促進作用を示す区分には、常にヘミセルラーゼ作用が認められた。

(2) 精製した促進因子の pH 安定域は 2.0~9.0 であり、また熱に対しては 60°C まで安定で、75°C, 10 分間の処理では完全に失活したが、この標品のイナワラヘミセルロースを基質とするヘミセルラーゼ活性も全く同じ安定性を示し、両酵素活性は同一酵素によって発現されているものと考えられた。

(3) 清澄促進因子は、本菌株が分泌する PG との混合作用の場合のほか、スクラーゼより部分精製した PG や、スクラーゼ、ペクチノールの粗酵素剤と混合して作用させても促進効果を示した。

なお、実験に際し超遠心分析に助力を得、また有益なる御助言を得た大阪市立工業研究所生物化学課辻好夫博士、ならびに竹西繁行氏に厚く感謝の意を表します。

本報告の要は昭和 41 年 4 月、日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 岡田茂孝, 井上雅資, 福本寿一郎: 農化, **43**, 99 (1969).
- (2) A. Endo: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 741, 751 (1963).
- (3) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (4) 遠藤 章: 農化, **40**, R 42 (1966).
- (5) A. Endo: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 129, 137 (1965).
- (6) M. Yamasaki, T. Yasui and K. Arima: *ibid.*, **28**, 779 (1964).
- (7) M. Yamasaki, A. Kato, S.-Y. Chu and K. Arima: *ibid.*, **31**, 552 (1967).
- (8) A. J. Barrett and D. H. Northcote: *Biochem. J.*, **94**, 617 (1965).
- (9) 福本寿一郎, 辻好夫, 岡田茂孝, 東原昌孝, 竹西繁行, 佐々木靖彦, 那部浩一: 昭和 40 年度日本農芸化学会大会講演発表。