インベルターゼの製造と利用に関する研究 (第1報)

液状酵素製造に関する 2, 3 の知見

大 橋 実*・小 堤 惇 一*

ショ糖加水分解酵素インベルターゼについては、EULER, WILSTÄTTER らをはじめとする多くの研究があり、その成果は NEUBERG¹⁾、その他^{2) 3)} にくわしく総説されている。

わが国では、武富により、カビ⁴⁾、酵母⁵⁾ のインベルターゼおよびこれらの応用⁶⁾ に関する詳細な先駆的研究がなされた。その後福本ら⁷⁾、根来⁸⁾ は細菌インベルターゼにつき深く研究し、界面活性剤との結合酵素の結晶化に成功するに至っている⁹⁾。また最近佐藤ら^{10) 11)} は、パン酵母の実用的特性(耐糖性)とインベルターゼ活性との間に高度の逆相関関係が存在するという、興味深い事実を見出している。なお、星野ら¹²⁾ は酵母の、丸山ら¹³⁾ はカビのインベルターゼの細胞中の分布、アイソザイムについて研究中である。

インベルターゼは、上記の多くの研究があるにもかかわらず、単独のかたちでは未だに結晶化されない酵素として注目されるものである。また、本酵素は糖類の構造究明および分析などに利用される。

しかし、本酵素の大きい利用面は、製菓、製糖などの食品工業におけるショ糖転化剤としての用途である^{14) 15)}。すなわち、欧米諸国では本酵素はテーブルシラップ、人工蜂蜜、チョコレートフォンダンクリーム、などの製造に昔からさかんに使われており、酵素剤の商業生産も確立されている。

上記した食品工業用インベルターゼの製造工程の概要は、酵母を自己消化し、消化液から酵素を水で抽出しア

ルコールで沈殿したのち、グリセリン水、または塩類溶液などでうすめて所定の酵素力価に濃度を調製し、除菌フィルターで濾過して透明な酵素液をつくり、これを滅菌したビンに詰めるという簡単なものであるが、上記工程の細部は不明である。

わが国のインベルターゼ利用の実情を調べてみると、わずかの製菓工場でチョコレートフォンダンクリーム製造に使われているに過ぎず、また使用酵素はアメリカ、イギリスからの輸入品であり、国産品は使用されていない。

著者らは、すでに非常に高い技術水準に達しているわが国の酵母工業製品の一新利用策として、インベルターゼの国産化とこれの食品製造へのより多くの利用を実現したいと考え、以下にのべる諸検討を行なった。

著者らは、インベルターゼ製造工程の具体的検討に先立って、前記方法で製造されたと推定される液状インベルターゼのサンプルを商社より入手し、後記方法により酵素活性(力価)の測定を行なった。

その結果は第1表のとおりである。

(なお、固形酵素剤のサンプルについては、別報する。)

なお、上記商品は 1 kg 3,000~4,000 円の価格で販売されているようである。

実 験 方 法

1. 実 験 材 料

(1) 酵素抽出材料(酵母)

第1表 インベルターゼ液状商品とその力価

サンプル No.	商 品 名, メ ー カ ー, (国 名)	力 価
1	“NIPA INVERTOL”, Nipa Laboratory (England)	約 200 単位
2	“CONVERTIT”, Wallerstein (U. S. A.)	“
3	“INVERTASECONCENTRATE”, Distillers Company (England)	“

* 財団法人日東理化学研究所(浦和市大字上木崎163)

Studies on Manufacture and Utilization of Invertase. Part I. Manufacture of liquid Invertase.
By MINORU OHASHI and SINICHI KOZUTSUMI.

市販パン用圧搾酵母(ニッソーイースト)をおもに用いたが、一部の実験には実験室で培養した酵母を用いた。

(2) 試 薬

試薬は1級品を使用。また、酵素力価測定用のシヨ糖液調製にはグラニュー糖を用いた。

2. 測定方法および装置

(1) 酵素力価の測定, 表示法

力価の測定はシヨ糖の転化速度を求める常法¹⁶⁾によった。ただし、従来の多くの報告に示されている転化条件は比較的低温度(15~30°C), および比較的低糖濃度(5~10%)の条件が力価測定に採用されているが、インペルターゼの実用条件は後報でのごとく高温度高糖糖度であるので、著者らはつぎのような条件をとくに採用して力価を測定した。

すなわち、ワールポール緩衝液(水 175 ml に対し、1 M 酢酸ナトリウム 50 ml と 1 N 塩酸 25 ml を加え pH 4.5 としたもの)を 1 (V/V) % 加えた水に、グラニュー糖を 52 g/100 ml の濃度に溶解する。このシヨ糖液 50 ml に酵素液 1 ml を加え、55°C で 1 時間作用させたのち、武富¹⁷⁾に従い 1.5 N の炭酸ナトリウム 3 ml を加えて酵素を失活させ、濾過、冷却して旋光度を測定し転化糖生成量を求めた。

なお酵素力価は、上記作用条件において 1 g/hr のシヨ糖転化力をインペルターゼ活性の単位に定め、1 (I.A.) と表示することにした。

なお、力価測定のさい、酵素液は 2~8 (I.A./ml) の範囲にあるように濃度を調整した。この濃度範囲において酵素量と転化糖生成量は直線関係となる。

(2) 装 置

上記旋光度測定にはツアイスのクライスボーリメーターを用いた。

また、自己消化液から酵母細胞の抽出残渣を除くには遠心分離機を用いた。このさい少量の場合は 15~50 ml の遠心管式、大量の場合はドラパル型連続分離機 (1 HP) を用いた。

また、酵素液の清澄化には、ケイソウ土を濾過助剤としたブフナー濾斗を用い、また滅菌濾過にはザイツフィルタを用いた。

実 験 結 果

1. 各種酵母のインペルターゼ含量の検討

パン酵母は大量生産されており安価であり、インペルターゼの原料としての利用性が期待されるので、市販パ

ン酵母中のインペルターゼ含量を次のように検討した。

圧搾生酵母(水分約 70%) 10 g にトルオール 2 ml を加えよく混和し、30°C の恒温器中で 48 時間自己消化させる。つぎに消化液の約 3 倍量の水を加え少量の酢酸により液の pH を 4.5 に調整し、遠心分離して酵素抽出液をえる。さらに遠沈残渣に水を加え再度遠沈し抽出液を前の抽出液と一緒にして酵素力価を測定する。

なお、市販パン酵母の比較材料として、ビール生酵母、実験室で培養したパン酵母および野生酵母 (*Candida utilis*) のインペルターゼ含量を同様に測定した。第 1 図はこれらの結果を示す。

すでに佐藤¹⁰⁾により指摘されているとおり、市販パン酵母のインペルターゼ含量のかなり低いことが著者らの測定でも再認された。いっぽう、パン酵母に属するものであっても実験室で培養したものの中には、インペルターゼ含量のかなり高いと認められるもののあることが注目された。

なおビール、酵母もわりあいインペルターゼ含量が高く、インペルターゼ原料として利用の可能性が期待されるが、野生酵母は第 1 図に明らかなようにインペルターゼ含量がはなはだ少なく、利用性に乏しいものと判断された。

2. 自己消化およびインペルターゼ抽出条件の検討

酵素資源としての酵母の選択のつぎに、これの自己消化方法が問題である。これについては、トルオールの加え方、自己消化温度および時間について若干検討した。

トルオールの加え方としては、生酵母 100 g に対してトルオール 20 ml をよくねりませ混和する方法(以後本報では a 法と略記); 生酵母 100 g に無水酢酸ナトリウム 8 g を加えて細胞の原形質分離をおこしてから前記と

注) 野 生 酵 母: 実験室振盪培養収穫物

ビ ール 酵 母: 工場製品

パン酵母 I, II, III: 3 種の異なる菌株の培養収穫物

第 1 図 酵母のインペルターゼ力価測定値

第2表 トルオール添加方法の検討

トルオール添加方法		インペルターゼ抽出量 (I. A/g 生酵母)
略号	方法の概要	
a 法	トルオール 20 ml/生酵母 100 g	4.91
b 法	トルオール 20 ml/生酵母 100 g 無水酢酸ナトリウム 8 g	4.96
c 法	トルオール 20 ml/生酵母 25% サスペンション 100 ml	1.20

注：使用酵母…圧搾生酵母（市販品）

第3表 自己消化温度に関する検討

自己消化温度	トルオール 添加法	インペルターゼ 抽出量
30°C/48 hr	a 法	1.2 (I. A/g 生酵母)
	b 法	1.2 (")
37°C/48 hr	a 法	0.6 (")
	b 法	1.3 (")

注：使用酵母…市販パン酵母（ニッソーイースト）

同様のトルオール添加を行なう（b法）；生酵母 100 g に水 400 ml を加えて酵母サスペンションをつくり、その 100 ml にトルオール 20 ml を加える（c法）；の3方法を検討した。これらの3方法でトルオールを加えたのち、それぞれ 30°C で 48 時間自己消化を促進したのち、各抽出液の力価を測定した。

このようにして、生酵母 1 g 当たりのインペルターゼ抽出量を求めた結果は、第2表のようである。

b法は FISHER ら¹⁸⁾の推奨した方法であるが、著者らの場合 a法に比べさ程インペルターゼ抽出量が多くもならないので、実際製造のさいには a法で十分で、酢酸ナトリウムは不要と判断した。C法は酵母当たりのトルオール量が多いにもかかわらず抽出量が少なくはなだ不利な方法である。

つぎに自己消化温度については、とくにくわしい検討をしなかったが、第3表の結果から、30°C 付近が適当と判断した。

つぎに、自己消化時間につきつぎのように検討した。

a法、30°C、の自己消化条件で、生酵母 250 g の自己消化を開始した。自己消化の途中で、抽出液を遠心分離して力価測定を行ない、沈殿部にさらにトルオールを添加して自己消化を促進させた。その経過は第2図のようであり、自己消化に必要な時間は 48 時間 程度で十分と判断された。

3. インペルターゼ沈殿剤（有機溶媒）の検討

自己消化液からインペルターゼを分離精製する方法に

第2図 自己消化時間

は、吸着剤¹⁷⁾、イオン交換樹脂¹⁸⁾、カラムクロマトグラフィ¹⁸⁾などを用いる方法もあるが著者らは操作が比較的簡単で薬剤の回収も容易な有機溶媒（アセトン、エタノールなど）による沈殿分離法を検討した。

酵母残渣を除いた自己消化液を、氷ができない範囲でできるだけ冷却し冷溶媒（0°C 以下）を加え、0°C 以下に 30~60 分保持してから冷却下に遠心分離を行ないインペルターゼの沈殿分離を行った結果は第4表および第3図のようである。

イソプロピルアルコールでは、比較的多量の使用で十分な沈殿効果が見られたのに対し、エチルアルコール、アセトンでは前者より約 1/2（自己消化液とほぼ等量）の量で十分であった。なお、沈殿部の力価と残液中の力価を合計したもの（B+C）は原液（A）にかなり近い値であり、溶媒によるインペルターゼの失活はきわめて少ないことが知られた。

以上より、検討した3溶媒はいずれも使用可能であるが、なかでもエチルアルコールは使用量も多くなく、また食品衛生的にもっとも安全であり、実用上一番好ましいものと判断された。

4. 安定剤の検討

一般に酵素剤は安定性に乏しいものであり、インペルターゼもその例外ではない。したがって、食品工業分野の実用に適するインペルターゼをつくるためにはその力価が長期間安定に維持できるようにすることが大切と考えられるので、安定剤について検討した。

第4表 有機溶媒のインペルターゼ沈殿能の検討

溶媒種類	添加量 (対自己消化液)	インペルターゼ力価			
		原液 (A)	沈殿 (B)	沈殿残液 (C)	(B+C)
イソプロピルアルコール	1/2 容	17.0	3.3	13.7	17.0
	等 容		7.1	11.3	18.4
	2 倍 容		16.2	0.8	17.0
エチルアルコール	1/2 容	20.1	10.1	8.6	18.7
	等 容		16.9	1.0	17.9
	2 倍 容		16.9	1.1	18.0
アセトン	1/2 容	21.8	16.4	2.3	18.7
	等 容		17.3	1.7	19.0
	2 倍 容		15.3	2.6	17.9

第3図 インペルターゼの沈澱剤 (有機溶媒の選択)

従来、液状のインペルターゼ剤の安定剤としては、グリセリン、ソルビトールなどの多価アルコールがよいといわれているので、これらの効果をみるとともに pH4.5 のバッファー液の効果を調べた。各試験液組成はつぎのとおりである。

多価アルコール {
 グリセリン……49%水溶液
 ソルビトール…50% “
 マンニト……6% “

バッファー液 {
 ワールポール液…酢酸ナトリウム + 塩酸
 マッキルバン液…M/5 Na₂HPO₄ + M/10 クエン酸
 リン酸1カリ液…M/15 KH₂PO₄

酵素を蒸留水に溶かしたものを対照とし、上記各液に溶解した酵素をそれぞれガラスビンに入れ密せんし、40°C の恒温中に置いて、各液のインペルターゼ力価の経日変化を測定した。第4図はその結果であり、蒸留水中では、10日後に力価は半減し、60日後には1/5に減少しており、インペルターゼは不安定な状態にある。

多価アルコール類の添加効果は期待に反しほとんど無効であった。

これに対し、バッファー液の力価安定効果は図示のよ

第4図 酵素安定剤の検討

うに顕著であり、本実験ではマッキルバン液がもっとも有効で、60日後にも初期力価の約80%に相当する力価が保持されていた。

しかし、実用上の見地から、各酵素液を用いてショ糖を転化して転化糖シラップをつくり、風味を吟味したところ、マッキルバン液を含む糖シラップにはかすかな渋味が感じられた。なおリン酸1カリ液を含む糖シラップが一番好ましい風味であり、リン酸1カリは安定化力が多少劣る傾向はあるが、実用上無難なものと判断した。

以上より、酵素液の安定剤には M/15 KH₂PO₄ 液を採用した。

5. 液状酵素剤の試作

上記の各項でのべた諸検討の結果、かなりのよい収率で長期保存可能な酵素液をつくる見通しがえられたので、小規模に市販品と同等の力価のインペルターゼ酵素液の試作を行なった。

その製造工程は第5図のようであり、図示のとおり、

- 1) 自己消化工程……48時間、30°C、トルオール 20 ml/100 g 酵母 (a 法)、
 - 2) 沈殿剤……エチルアルコール (自己消化液と等容)、
 - 3) 安定剤……M/15 KH₂PO₄、
- などの条件を採用した。

場合は 5,000 円, すなわち前者の 10 倍にも達し, 経済的にナンセンスな大きい金額となる。

以上より, インベルターゼ含量が第 1 図に示したようにはなはだ低い市販パン酵母を, そのままインベルターゼ製造に利用することは実際上不可能と考えられる。なお, 著者らはインベルターゼ製造は, 100 I.A/g 以上の酵母を利用すれば経済的に成立つと考えるが, これにはインベルターゼ高含有酵母の培養取得法の確立が前提条件となることはいうまでもない。なお, インベルターゼ高含有酵母の取得は比較的容易であり, これについては別報でのべたい。

なお, 前記理由より, インベルターゼ製造費を安くするためにエタノールの合理的使用も重要視される。酵素抽出液における沈殿工程では安価な変性アルコールを使用して, 粗酵素液から再沈殿する工程にだけ局方アルコールを使用すれば, エチルアルコール費はかなり安くなるはずである。また, エチルアルコール回収率を高める努力も必要である。

なお, エチルアルコールによる再沈殿においてインベルターゼ活性の約 40% の失活があることも大きい問題であり, 今後この点の解決ができれば製造費の一そうの低下が可能である。

要 約

酵母工業製品の一利用策として, いまだ国産化されていないシヨ糖転化酵素インベルターゼを製造し, これを食品工業に広く利用することを考えて研究に着手した。

まず, 輸入商品のインベルターゼ液について簡単な調査を行ない, これと同等の酵素液の製造工程について検討し, つぎの知見をえた。

(1) インベルターゼ抽出原料としては, ある種のパン酵母が有望とみられるが, 現在市販されているパン酵母, 食飼料用野生酵母などはインベルターゼ含量がはなはだ低くインベルターゼ原料としての希望が持てない(第 1 図参照)。

(2) 酵母細胞よりのインベルターゼ抽出は, 圧搾酵母にトルオールを 20 ml/100 g 酵母の割合に混和, 30°C で 48 時間自己消化後, 水抽出すればよい(第 2 図参照)。

(3) インベルターゼ抽出液とほぼ等量の冷エチルアルコールを添加すれば, インベルターゼをほぼ定量的に沈殿分離できる(第 3 図参照)。

(4) 沈殿酵素は, pH 4.5 の緩衝液に溶解しておけば長期間活性を保持できる(第 4 図参照)。

(5) 上記各工程の検討にもとずき, 酵素液の試作を

行なった(第 5 図参照)。

酵素液製造は技術的には比較的容易であるが, インベルターゼ低含有率の酵母を用いると沈殿剤の所要量が増し, 非常にコスト高になる。インベルターゼ高含有率の酵母を用いれば, 酵母 1.5 kg より酵素液 1 l を約 500 円の材料費で製造可能と認められる。

(6) 酵母からインベルターゼを製造するさいに重要な点は, ①インベルターゼ高含有率の酵母から出発すること, ②沈殿剤添加時の温度をできるだけ低く保ち失活をふせぐこと, ③沈殿剤(エチルアルコール)の回収, 合理的使用に意を用いる, ④酵素液は pH 4.5 付近の液に保存する, などである。

この研究の要旨は, 1965 年 4 月, 日本食品工業学会第 12 回大会で講演した。

終りに, この研究の発表を許可された所長加藤二郎博士, 御教示賜った農林省食糧研究所食品栄養部長佐藤友太郎博士, 大阪市立大学理工学部福本寿一郎教授, 御援助いただいた大日本製糖株式会社に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) NEUBERG, C. and ROBERT, I.S.: Invertase Monograph, Scientific Report Series, No. 4, (New York, Sugar Research Foundation Inc.) (1946).
- 2) 橋谷義孝: 酵母学, (岩波書店) p.152 (1948).
- 3) 赤堀二郎編: 酵素研究法, (朝倉書店), 1, p.312; 2, p.100 (1956).
- 4) 武富昇: 工化, 38, 1246 (1935); 39, 427 (1936); 41, 420 (1938); 43, 955 (1940).
- 5) 武富昇: 工化, 44, 553, 1023 (1941); 45, 176 (1942); 46, 337, 1310, 1312 (1943).
- 6) 武富昇: 工化, 45, 176 (1942).
- 7) 福本寿一郎・根来秀夫: 科学と工業, 28, 292 (1954); 29, 132, 283, 286 (1955); 30, 142 (1956).
- 8) 根来秀夫: 農化, 31, 153, 158, 250, 256, 312, 316, 319 (1957).
- 9) 根来秀夫: 農化, 31, 253 (1957).
- 10) 佐藤友太郎・津村信蔵・田中康夫: 醸協, 57, (1), 74; (2), 67 (1962); 醱酵工学, 39, (12), 718 (1961).
- 11) 佐藤友太郎・林部正也・野瀬芳夫: 醱酵協, 20, (2), 1 (1962).
- 12) HOSHINO, J., KAYA, T. and SATO, T.: Plant & Cell Physiol., 5, (1964); 彼谷俊夫: 農化, 38, (9), 417 (1964).
- 13) 丸山芳治・小野寺一清・舟橋三郎: 第 15 回酵素化学シンポジウム, 156 (1963); 第 16 回酵素化学シンポジウム, 191 (1964); 昭和 40 年度農化大会講演要旨, 15 (1965).

- 14) WHITE, J.: *Yeast Technology* (Chapman and Hall Ltd.), p. 313 (1954).
- 15) UNDERKOFFLER, L.A.: *Industrial Fermentations* (Chemical Publishing Co. Inc.), II, p.748 (1954).
- 16) 橋谷義孝：酵母学，（岩波書店），p. 163 (1948).
- 17) 武富昇：工化，44, 553 (1941).
- 18) 日本化学会編：実験化学講座，（丸善），24, 312 (1958).
- 19) YAMAMOTO, T.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, (3), 185 (1957). (1965年7月30日受理)

食品の凍結および凍結乾燥に関する研究（第3報）

凍結乾燥ニンジン，カボチャの貯蔵中における色
およびカロチンの変化について

柴崎 一雄*・浅野 三夫*・伊藤 京子*

凍結乾燥品（以下凍乾と略す）は従来の乾燥品に比べてすぐれているが，表面積が非常に大きいので吸湿や酸化による変退色が著しいといわれている。前報¹⁾では凍乾，熱乾および真空乾燥ニンジンの組織を顕微鏡的に観察し，その組織と復水性について報告した。

元来食品の風味を左右するものは色，味，香などであるが，とくに色の良否は非常に重要な要素である。しかし表面色については専ら感覚に頼ることが多く，科学的表現を行なったものが少ない。そこで本報では酸化による退色著しいカロチンを含むニンジン，カボチャを用い，凍結条件によって組織的に異なった凍乾品および熱乾品を各種温度に貯蔵し，色およびカロチンの変化について検討した。

木村らは脂肪および脂溶性成分の酸化防止を検討する目的で凍乾ニンジンおよびトマトのカロチノイドの変化を追求し，かつ，酸化防止剤の効果について報告²⁾し，また酸化防止剤を間接に使用する新しい方法を考案し，この間接添加条件を詳細に検討，報告³⁾している。MACKINNEYら⁴⁾は乾燥ニンジンおよびモデルを用いて，真空度のカロチンの安定性および乾燥に及ぼす影響を報告している。

実験方法

1. 試料の調製方法

(1) 試料の調製

ニンジン：市販のニンジンから太さ，色調の同じよう

なものを選り水洗して厚さ 3 mm に輪切りし，2 分間沸騰水に浸漬して前処理した。

カボチャ：生産地より同一品種のカボチャを購入し，4 つ切りにして表皮部および中心部（種のあるところ）を除き色調の安定しているところのみを厚さ 3 mm に切り，1.5 分間沸騰水に浸漬して前処理を行なった。

(2) 凍 結

急速凍結はドライアイス粉末で，緩速凍結は -20°C のフリーザー（静止空気）のなかに入れ 15 時間予備凍結させた。

(3) 乾 燥

凍乾は共和式真空凍結乾燥機（RL-H 1000 S）を用い，乾燥には乾燥板温度 50°C で 20 時間（ニンジン），35 時間（カボチャ）を要した。なお乾燥は 10 秒間で真空度の戻り $10\ \mu\text{Hg}$ で終点とした。

熱風乾燥は 60°C に調整した通風乾燥機を用い，ニンジンは 48 時間，カボチャは 56 時間を要した。

(4) 貯 蔵

乾燥品は各々密閉容器に入れ，30，0， -20°C の各恒温室に 5 カ月間貯蔵し，経時的にそれらの色およびカロチン含量を測定した。

2. 測定方法

(1) 測 色

ニンジン，カボチャとも色素の分布によるばらつきをなくするためコーヒーマルで粉末にし，さらに 60 メッシュのふるいにかけて測色用シャーレ（径 30 mm，深さ

* 東北大学農学部食糧化学科（仙台市北六番丁）

Studies on Freezing and Freeze-drying of Foods. Part III. Color and carotene stability in stored freeze-dried carrot and pumpkin. By KAZUO SHIBASAKI, MITSUO ASANO and KYOHKO ITOH.