食品におけるセルラーゼ剤の応用に関する研究 (第2報)

Aspergillus niger 製剤 (ベルセラーゼ) の細胞分離活性について

三沢 豊*・松原 良*・羽田野誠*・原 稔*・犬塚猛雄*

Studies on the Applications of the Cellulase Preparation to Food. Part II.
Cell separating activities of the *Aspergillus niger* preparation (Vercellase).

YUTAKA MISAWA, MAKOTO MATSUBARA, MAKOTO HATANO,
MINORU HARA and TAKEO INUZUKA.

前報¹⁾においてわれわれはセルラーゼ剤を食品へ応用する目的で従来報告の少ない *Aspergillus niger* 製剤に着眼し、その基礎的な各種酵素活性につき検討を行なった。その結果、セルラーゼ以外にキシラナーゼ、アラバナーゼなどのヘミセルラーゼ、あるいはペクチナーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼなどの活性を有することを明らかにした。

しかしながら、セルラーゼ剤を食品、医薬品などへ実際に応用する場合、これら個々の酵素活性よりはむしろその総合作用としての細胞分離活性のほうが重要である。細胞分離活性は従来マセレーション活性あるいは組織崩壊活性と呼ばれたものであるが、外山²⁾は細胞分離活性と呼ぶのがもっとも適当であると提唱し、実験的にもその裏付けとなる事実を示した。いずれにしても、セルラーゼ剤の応用としてこの細胞分離活性はきわめて重要で、いわゆる C.S.E (cell separating enzyme) とセルラーゼ剤の併用により、澱粉製造³⁾、大豆蛋白質の分離⁴⁾、緑茶成分の抽出⁵⁾などに効果を上げた報告も見られる。

したがってわれわれは細胞分離活性の意義を重視し、前報と同様の見地から *Aspergillus niger* 製剤を用い、その細胞分離活性につき、実験を行ない *Rhizopus sp.* 産生細胞分離酵素剤などと比較し、興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試酵素剤

Aspergillus niger 製剤 (ベルセラーゼ)¹⁾ の他、比較

市販品として *Rhizopus sp.* 産生の細胞分離酵素剤 (K社製) および *Trichoderma viride* 産生のセルラーゼ剤 (M社製) を用いた。

2. 細胞分離作用および細胞膜溶解作用の確認

植物組織切片に一定条件で酵素剤を作用させたのち顕微鏡観察を行ない、細胞分離作用による単細胞化、細胞膜溶解による内容物質の放出を確認した。

供試植物組織：サツマイモ、ジャガイモ、ヤツガシラ

作用条件：上記植物組織を内径 8.6 mm のコルクボーラーで打抜き、長さ 35 mm に切って基質とし、これを作用液 (半量は pH 3.0 の SÖRENSEN 氏緩衝液、酵素終濃度 0.1%) 100 ml に加え、40°C 回転式振盪培養機 (振幅半径 35 mm、回転数 200 rpm) に装着し、振盪しつつ作用させた。

検鏡：作用後、残存組織を除いた液 1 滴をスライドグラスにとり、位相差顕微鏡 (オリンパス ECE Tr-1 型) により 200 倍にて観察した。

3. 細胞分離活性の測定

細胞分離活性の測定法としては、たとえば切片が一定の大きさに減少するまでの所要時間を測定する方法 (汚紙崩壊活性測定法の準用)⁶⁾、あるいは切片が一定の崩壊度 (特定装置で測定) に達するまでの所要時間を測定する方法⁶⁾ などがある。これらはいずれも切片が「一定の状態」になるまでの所要時間を測定する方法であるが「一定の状態」の判定に若干の“あいまいさ”が存在する点は否定し得ないところである。

したがって、われわれは細胞分離活性の測定法につき種々検討し、操作も簡便でしかも信頼度の高い方法を設

* 大正製薬株式会社大宮工場 (埼玉県大宮市吉野町 1-403)

Ōmiya Factory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. Ōmiya, Saitama.

第1図 作用時間—細胞分離活性曲線

定した。第1図はその1例を示すもので、ジャガイモ基質、pH 3.0、酵素濃度 0.1% の場合の作用時間—活性曲線である。

われわれの設定した方法は原理的には Suzuki らの方法⁷⁾に近いが、同法が細胞分離作用による基質乾物重量の減少を測定しているのに対し、われわれの方法は基質体積の減少を測定する方法である。次にその詳細を示す。

(1) 基質の調製

植物組織としてジャガイモ、ダイコンを用い、これらを手洗し、内径 8.6 mm のコルクボーラーで打抜き、長さ 35 mm に切り、棒状とし基質とした。

(2) 作用液の調製

所定 pH の SØRENSEN 氏緩衝液に等量の蒸留水を加え、酵素を最終濃度 0.1% となるように溶解せしめ、作用液とした。

(3) 操作法

200 ml 三角フラスコに作用液 100 ml および基質（あらかじめ 10 ml メスシリンダーにて水中沈定体積 V_0 を測定する。 $V_0 \approx 2000 \text{ mm}^3$ ）1 コを入れ、直ちに 40°C 回転式振盪培養機（前記）に装着し、一定時間振盪反応させ、終了後直ちに 60 メッシュフルイにて液を捨て、残存基質の水分を東洋汙紙 No. 1 にて去り、その水中沈定体積 V を測定し、 $\Delta V = V_0 - V$ を算出し、別に酵素を加えないで同様操作したものを盲検とし ΔV_0 を求め、両者の差より活性を求めた。

(4) 活性の表示

細胞分離活性 (C_s) は次式により算出、表示した。

$$C_s = \Delta V - \Delta V_0$$

なお ΔV および ΔV_0 の単位は mm^3 とした。

実験結果および考察

1. 細胞分離作用および細胞膜溶解作用の確認

酵素剤による植物組織の崩壊について外山²⁾は食品に

第2図 *Aspergillus niger* 製剤による細胞分離および細胞膜溶解

右=ジャガイモ 左=サツマイモ

上: 原組織 中: 反応初期 (分離された単細胞)

下: 反応後期 (細胞膜溶解により放出されたデンプン粒)

第3図 *Aspergillus niger* 製剤による
ヤッガシラの分解

対し, cell separating enzyme と cellulase を併用した場合, cell separating enzyme により, 主として cellulose より成る細胞膜が完全に露出されるので, cellulase がよく作用するようになるとしている。また黒田ら⁶⁾は同様の見地から *Rhizopus sp.* 製剤を用いジャガイモ切片よりその単細胞を調製し, しかるのち *Trichoderma viride* 製剤を作用させ細胞膜を溶解し, 細胞内部のデンプン粒子を放出せしめ, その模様を顕微鏡写真をもって示した。

われわれは *Aspergillus niger* 製剤を用いて同様の実験を行ない, 顕微鏡観察により細胞分離作用および細胞膜溶解作用の有無を追求した。その結果 *Aspergillus niger* 製剤が両作用を併有することが明確に認められた。第2図はジャガイモ切片およびサツマイモ切片が *Aspergillus niger* 製剤により, 原組織(写真上)から順次崩壊される模様を示したものである。酵素による組織の崩壊現象はまず細胞相互を接着している細胞間物質が分解を受け単細胞が分離される(写真中), ここでは細胞膜が明りょうに確認される。次いで細胞膜が溶解されデンプン粒子が放出される(写真下)。

第3図 はヤッガシラ切片を同様処理し, より詳細に崩壊過程を追求したものである。第2図および第3図から, *Aspergillus niger* 製剤は単独で細胞分離および細胞膜溶解の両作用を有していることがわかる。

以上により *Aspergillus niger* 製剤がいわゆるマセレーション作用を有することが明白となったが, これらマセレーション作用においてその中心となっている酵素について Wood⁹⁾ は各種のペクチナーゼ, ヘミセルラーゼ, プロテアーゼなどを挙げている。また Suzuki ら⁷⁾ はカラムクロマトグラフィーによる分画によりマセレーション作用の実体は主として endo-PG によるものであるとしている。

本実験に用いた *Aspergillus niger* 製剤に関してはこのような検討がなされていないので詳細は不明であるが, 前報¹⁾にも示したごとく種々の酵素活性を有していることから, これらのうちのどの成分がいかなる役割を果しているかは興味あるところである。

2. 酵素剤の起源による細胞分離活性の比較

Aspergillus niger 製剤の細胞分離作用はすでに確認したのでその活性について検討すべく, *Rhizopus sp.* 産生の細胞分離酵素剤および *Trichoderma viride* 産生のセルラーゼ剤を用いて比較実験を行なった。

第4図はジャガイモ切片を基質とした場合であり, 第5図はダイコン切片を基質とした場合である。ジャガイ

第4図 酵素剤の起源によるジャガイモ細胞分離活性の比較

○—○ *Asp. niger* 製剤
 △---△ *Rhizopus sp.* 製剤
 □.....□ *T. viride* 製剤

第5図 酵素剤の起源によるダイコン細胞分離活性の比較

○—○ *Asp. niger* 製剤
 △---△ *Rhizopus sp.* 製剤
 □.....□ *T. viride* 製剤

第6図 pH とジャガイモ細胞分離活性

○—○ *Asp. niger* 製剤
 △---△ *Rhizopus sp.* 製剤
 □.....□ *T. viride* 製剤

第7図 pH とダイコン細胞分離活性

○—○ *Asp. niger* 製剤
 △---△ *Rhizopus sp.* 製剤
 □.....□ *T. viride* 製剤

モ, ダイコンいずれの場合においても *Aspergillus niger* 製剤の活性と *Rhizopus sp.* 製剤および *Trichoderma viride* 製剤の活性との間に明らかな差が認められる。

3. 細胞分離酵素の性質

(1) 至適 pH

各 pH に調整した酵素溶液を用いて pH 2.0~6.0 における酵素活性を測定し, ジャガイモの場合を第6図に, ダイコンの場合を第7図に各々示した。

第6図によればジャガイモの細胞分離活性の至適 pH は *Aspergillus niger* 製剤では pH 2.0~3.0, *Rhizopus sp.* 製剤では pH 4.0~5.0, *Trichoderma viride* 製剤では pH 3.0~5.0 であった。

ダイコンの場合 (第7図) は *Aspergillus niger* 製剤では pH 2.0~4.0, *Rhizopus sp.* 製剤では pH 4.0~6.0 に至適 pH を有し, ジャガイモの場合に似ている。しかし *Trichoderma viride* 製剤ではジャガイモの場合と異なり, pH 2.0~3.0 に至適 pH がある。

(2) 温度安定性

一定量の酵素溶液を 0, 10, 20, 30, 40, 50°C の各温度に 30 分間放置したのち残存活性を測定した。第8図にジャガイモを基質とした場合の活性残存率を示した。第9図はダイコンの場合である。

Aspergillus niger 製剤, *Rhizopus sp.* 製剤ともジャガイモ, ダイコンの両細胞分離活性において同程度の安定性が認められる。

(3) pH 安定性

一定量の酵素溶液を 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 の各

第8図 ジャガイモ細胞分離活性の温度安定性

○—○ *Asp. niger* 製剤
△---△ *Rhizopus sp.* 製剤

第10図 ジャガイモ細胞分離活性のpH安定性

○—○ *Asp. niger* 製剤
△---△ *Rhizopus sp.* 製剤

第9図 ダイコン細胞分離活性の温度安定性

○—○ *Asp. niger* 製剤
△---△ *Rhizopus sp.* 製剤

第11図 ダイコン細胞分離活性のpH安定性

○—○ *Asp. niger* 製剤
△---△ *Rhizopus sp.* 製剤

pH に 30°C, 30 分間放置後, pH を 3.0 に調製し, 残存活性を測定し, 第10図にジャガイモを基質とした場合の活性残存率を示した。第11図はダイコンの場合である。

Aspergillus niger 製剤ではジャガイモ, ダイコン両細胞分離活性ともに pH 2.0~3.0 においてきわめて安定で, 微酸性におけるよりも残存率が高く, 耐酸性である。*Rhizopus sp.* 製剤では pH 5.0~6.0 において安定であるが, 低 pH 領域ではかなりの失活が認められる。

要 約

われわれは第1報¹⁾において *Aspergillus niger* 産生

セルラーゼ剤がベクチナーゼ, ヘミセルラーゼ, セルラーゼ, プロテアーゼ, アミラーゼ, リパーゼなどの各種酵素活性を有していることを明白にした。

今回は同一酵素剤について天然食品へ応用する目的から, その細胞分離作用および細胞膜溶解作用について検討を行ない, *Aspergillus niger* 製剤が両作用を併せ持っていることを確認した。また細胞分離作用の活性度および酵素特性については起源の異なる酵素剤との比較を行なった。その結果を総括的に示したものが第1表である。

本表によれば *Aspergillus niger* 製剤は *Rhizopus sp.* 産生の細胞分離酵素剤および *Trichoderma viride* 産生

第1表 生産菌の異なる酵素製剤による細胞分離活性の比較

生産菌株名	相対活性*	至適 pH	pH 安定性
<i>Aspergillus niger</i>	100	3.0	2.0~4.0 で安定
<i>Rhizopus sp.</i>	55~78	4.0~5.0	5.0~6.0 で安定
<i>Trichoderma viride</i>	13~55	2.0~3.0	—

注：* *Aspergillus niger* 製剤の活性=100 として算出

のセルラーゼ剤に比して活性が強く、酸性（pH 3.0）に至適 pH を有し、酸処理に対し安定で、いわゆる耐酸性細胞分離活性を有することが明白となった。

すなわち、食品中の種々の栄養物質は遊離の状態で存在するのではなく、細胞膜に包まれ、さらに細胞は細胞間物質により相互に接着されて組織を形成しているので細胞分離作用および細胞膜溶解作用を併有する *Aspergillus niger* 製剤は無理なく食品に含まれる栄養物質の遊離化を行なうことができるのである。この特性は食

品加工上きわめて重要な意義を持つものと考えられる。

終りにのぞみ、本研究に終始御理解ある御援助をいただいた大正製薬株式会社 寺島文一郎常務、田中英之工場次長に対し深甚の謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 三沢 豊・松原 良・羽田野誠・原 稔・犬塚 猛雄：食品工誌，14，(7)，286 (1967)。
- 2) 外山信男：醱酵工学，43，683 (1965)。
- 3) 外山信男・藤井 昇・小川喜八郎：醱酵工学，43，756 (1965)。
- 4) 原田安正・外山信男：醱酵工学，44，835 (1966)。
- 5) 外山信男・大渡久行：醱酵工学，44，830 (1966)。
- 6) 梶 明・田川 清・山下昌之：農化，40，209 (1966)。
- 7) SUZUKI, H., ABE, T., URADE, M., NISHIZAWA, K. and KURODA, A.: 醱酵工学，45，73 (1967)。
- 8) 黒田彰夫・今井豊彦：醱酵工学，44，854 (1966)。
- 9) WOOD, R.K.S.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11, 299 (1960)。

(1967 年 4 月 7 日受理)