柑橘果汁清澄用ペクチナーゼ剤の開発

(第3報) ペクチナーゼ剤の果汁清澄化力

福井尚之*・大高寿彦**・野村男次***

Pectinase Preparation for Making Clarified Orange Juice

Part III. Clarifying activity of pectolytic enzyme preparation to citrus juice

TAKAYUKI FUKUI, TOSHIHIKO OTAKA and DANJI NOMURA

The clarifying activity of the commercial enzyme preparations for citrus juice was caused by the joint action of polygalacturonase (PG) and pectinesterase (PE). Clarifying activities of PE-PG mixtures were varied with the kind of PG used in each mixture, but not with the kind of PE. The clarifying activity of PE to citrus juice was more effective than those of any other enzymes such as PGs and hemicellulase. For making effective pectolytic enzyme preparation available for citrus juice, it is most important to produce a strong PE active enzyme preparation. (Received Dec. 23, 1968)

ペクチナーゼ剤を用いてのリンゴ果汁の清澄については数多くの研究¹⁾があるが、柑橘果汁、とくに夏みかん果汁の清澄化についての研究はほとんどなく、日本では直部ら²⁾のものをみる程度である。

しかしてその清澄化力によってきたる原因も明確になっていない。遠藤³⁾はリンゴ果汁ではその清澄化がペクチンエステラーゼ(PE)とポリガラクトナーゼ(PG)(この場合のPGはendo-PG)の共同作用によって生まれることを発見したが、柑橘果汁ではかなり様子が異なる⁴⁾。福本ら⁵⁾は柑橘果汁の清澄化にヘミセルラーゼの共存が重要な役割を演じていることを報告した。筆者らはさきに柑橘果汁(夏みかん果汁)の清澄化にはとくにPEの強力なペクチナーゼ剤が必要であることを報告⁴⁾したが、この結果をより明確にするためにの実験を追加し、それを裏付ける結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

市販のペクチナーゼ剤としてつぎのものをを用いた。(1)

ペルセラーゼ(大正製薬)、(2)ナリンギナーゼ-A(三共)、(3)スクラーゼ-S(三共)、(4)ペナーゼ(田辺製薬)

2. 基質

ペクチン、ペクチン酸は市販品(東京化成製)を用い、ヘミセルロースはCOLE⁶⁾の方法によってフスマを原料に調製した。用いるときはいずれも0.5~1.0%になるように水または0.1MのMcILVAINE緩衝液に懸濁させ一夜放置して溶解した。

3. 酵素活性の測定法

(1) 清澄化力

i) 果汁：夏みかんを剥皮後ミキサーで破碎して果汁を得、カーゼを用いて濾過、濾液をオートクレープで0.7気圧、30分加熱して汁液中の天然ペクチナーゼを失活させて使用した。

ii) 操作：上記の夏みかん果汁を基質とし、その10mlを共栓試験管にとり40°Cの恒温水槽中で15分間予熱したのち、酵素液を0.5ml加え24時間反応させた。反応が終ると濾過し、水を対照として660m μ における透過率(T%)を測定した。

* 宇部短期大学食料科(宇部市文原町)
Ube junior College・Ube, Yamaguchi.

** 愛媛青果連研究所(松山市中須賀三丁目)
Institute of Citrus products, Ehime Fruit Products Co-operation. Matsuyama, Ehime.

*** 山口大学農学部(山口市吉田)
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University. Yamaguchi.

iii) 活性の表示：清澄度は透過率をそのまま用い、清澄活性 (cf) を比較する場合は、酵素液のかわりに蒸留水を用いて求めた値（盲検値 T_0 ）を測定値 (T) より減じて用いた。

(2) PE 活性

1%ペクチン溶液 5 ml と 0.1 M McILVAINE 緩衝液 (pH=4.5) 5 ml との混液に酵素液 0.5 ml を加え、40°C で 24 時間反応させたのち、1%フェノールフタレンを指示薬として 0.1 N カセイソーダ液で滴定し、その ml 数から同じように処置して得た盲検値を差し引き、ここに得られた数値を反応液 10.5 ml 中の PE 活性とした。

(3) PG 活性

ペクチンまたはペクチン酸が酵素によって分解されて生成した生成物のアルデヒド末端を測定する WILLSTÄTTER-SCHUDEL の変法を用いて測定した。すなわち、1% ペクチンまたはペクチン酸溶液 10 ml および 0.1 M McILVAINE 緩衝液 (pH=4.5) 10 ml の混液に酵素液 1.0 ml を加え 40°C で 24 時間反応させた。反応後その 5 ml をとり、1 M Na_2CO_3 1.0 ml を加え反応を停止させ、ついで 0.1 N ヨウ素、ヨウ化カリ液 5 ml を加えて混合、ゴム栓で密栓して 20 分間室温に放置したのち 2 M の硫酸 2 ml を加えて酸性にし、残存するヨウ素を 0.1 N のチオ硫酸ソーダ液で滴定した。酵素液および基質溶液によってもヨウ素は消費されるので盲検を実施、盲検値から 24 時間反応後に得られた値を差し引き、その値を反応液 5 ml 中のヨウ素消費量とし、これを PG 活性値とした。

(4) ヘミセルラーゼ活性

SOMOGYI-NELSON 法⁷⁾により、反応液中に生成する微量の還元糖を、キシロースを基準液として 530 m μ で比色定量した。0.5% ヘミセルロース液 5 ml と 0.1 M McILVAINE 緩衝液 (pH=4.5) 5 ml との混液に酵素液 0.5 ml を加え 40°C で 24 時間反応させた。反応後その 0.5 ml を 25 ml の共栓試験管に取り銅試薬を 2 ml 加えたのち密栓して 20 分間煮沸した。流水中で 1~2 分間冷却したのち 2 ml の発色剤を加えてよく振盪したのち 5 分間放置、水を加えて 25 ml の定容とした。青色に発色したこの液を、水を対照として 530 m μ で比色して透過率を出した。同時に盲検をも実施した。標準物質としてキシロースを用いて検量線を出しておき、これと比較することによって反応液 0.5 ml 中のキシロース mg/0.5 ml を求めヘミセルラーゼ活性とした。

4. Sephadex G-200 カラムによるゲル濾過

Sephadex G-200 を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH=5.0)

第1図 Sephadex G-200 カラムによる市販ペクチナーゼ剤のクロマトグラフィー

カラム: 18 mm×380 mm,
溶剤: 0.1 M 酢酸緩衝液 pH=5.0
各フラクション容量: 10 ml
流速: 20 ml/hr

を用いて平衡化し、18 mm×380 mm のカラムを作った。これに市販のペクチナーゼ剤の 1 g を水 5 ml に溶解したものの上澄液 2 ml を注入し、同じ緩衝液を用いて分画溶出した。溶出液は 10 ml ずつ分取し、その各々についてそのタンパク濃度を 280 m μ の吸光度を求めることによって測定すると共に、それがもつ清澄化力を求めた。測定には夏みかん果汁 10 ml を共栓試験管にとり、分取したタンパク液 (酵素液) 0.5 ml を加え 40°C で 24 時間反応させる、さきに記した清澄化力測定法を用いた。その結果は第1図にみるごとくでタンパク量の極大の部分と清澄化力の極大の部分とが重なっていたのはペナーゼのみであった。ペナーゼは別の実験の結果⁹⁾でもすぐれた清澄化力を示し、ナリンギナーゼ-A、スクラーゼ-S、ペルセラーゼなどはそれよりも劣った清澄化力を示したが、清澄化力がつよい部分はいずれの酵素剤においても同じ位置 (11~12 フラクション) において溶出した。これより清澄化因子 (酵素) はある一定の分子量をもったタンパクであることが推定された。そこでその清澄化力のもっとも強い部分を精製することにした。なお粗酵素の清澄化力を比較する場合には、水または緩衝液で酵素を抽出した後これをうすめ 280 m μ

第2図 Duolite C.S-101 カラムによる F_1 および F_2 フラクシヨンの再クロマトグラフィー
 カラム: 10mm×210mm
 各フラクシヨンの容量: 10ml
 溶剤: 酢酸緩衝液 (pH=5.0)
 流速: 60ml/hr.
 —○— ナリンギナーゼ F_1
 —×— ペルセラーゼ F_2

第3図 DEAE-セルローズカラムによる F_1-A および F_2-A フラクシヨンの再クロマトグラフィー
 溶剤: 酢酸緩衝液 (pH=5.0)
 カラム: 10mm×150mm
 フラクシヨンの容量: 10ml
 流速: 60ml/Hr
 —×— ペルセラーゼ (F_1-A)
 —○— ペルセラーゼ (F_2-A)

の吸光度を求め、これよりそのタンパク濃度を算出し使用、酵素液のタンパク濃度を一定にして比較した。この際一定濃度の酵素液を作るには主に希釈法を用い、希釈によって 280mμ の吸収光度の一定なものを作ってその一定量 (0.5~1.0ml) を用いて清澄化力を求めた。

(1) ペルセラーゼ剤の精製

ペルセラーゼ 1g を水 2ml に溶解して Sephadex G-200 カラムを通し清澄化力の極大の部分 $[F_1]$ とタンパク量の極大の部分 $[F_2]$ とに分画した。ついでこれらを濃縮 0.1M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) を用いて透析したのち Duolite CS-101 カラムで今一度分画した。(第2図)

この際使用した Duolite CS-101 カラムは 0.1M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で平衡化した 10mm×210mm の

カラムであった。前記の $[F_1]$, $[F_2]$ はそれぞれ 0.1M 酢酸緩衝液で溶出される部分 $[A]$ と 1M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で溶出される部分 $[B]$ とともに 2個の極大が得られる。そこでこの $[A]$ の部分、すなわち $[F_1-A]$ $[F_2-A]$ を 0.005M 酢酸緩衝液中で透析し、ついで Carbowax で濃縮して 2ml としたのち DEAE-セルロースカラムを通した。

また $[B]$ の部分、すなわち $[F_1-B]$, $[F_2-B]$ も 0.01M 酢酸緩衝液で処理してやはり Carbowax で濃縮して酵素液とした。その結果は第3図に見るごとくで5個の分画が得られた。この場合使用した DEAE-セルロースカラムは 0.005M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で平衡化した 10mm×150mm のカラムで、前記の $[F_1-A]$, $[F_2-A]$ を 0.005M 酢酸緩衝液で溶出させたのち(イ)、さらに 0.05M (ロ), 0.2M (ハ), 0.5M (ホ), 1.0M (ト) と順次濃度をあげた酢酸緩衝液で処理、溶出させた。ついで(ホ)のみをさらに 0.3M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で透析したのち濃縮して 2ml とし、Duolite-A-2 カラムで再クロマトした。その他の部分はおの 0.01M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で透析したのち濃縮して酵素液とした。Duolite-A-2 カラムは 0.3M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) で平衡化した 10mm×170mm カラムを使用した。

これで前記の $[F_1-A(ホ)]$ を再クロマトすると 0.75M と 1.0M の緩衝液の部分に溶出がみられた。この部分を $[F_1-A(ホ)-3]$ および $[F_1-A(ホ)-4]$ として 0.01M 緩衝液で透析したのち濃縮して酵素液とした。

(2) ナリンギナーゼ-A剤の精製

精製に使用したカラムは(a)と同じものであった。ナリンギナーゼ-A剤 5g を水 6ml に溶解抽出し、Sephadex G-200 カラムで処理して清澄化力の強い部分 F_1 のみを集め、濃縮して Duolite CS-101 カラムを通した。

ここで第2図に見るように 0.1M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) 溶出で2つの溶出部が得られた。

これを $[A]$, $[C]$ とし、さらに 1M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) での溶出をも実施し、この溶出部分を $[B]$ とした。フラクシヨンの $[A]$, $[B]$ はついで DEAE-セルロースカラムを通し、 $[C]$ は濃縮ののちそのまま酵素液として用いた。DEAE-セルロースカラム分画ではその使用酢酸緩衝液の濃度 (モル) を 0.005, 0.05, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0 および 1.0+1.0M NaCl とした。これにより分画フラクシヨンは(イ), (ロ), (ハ), (ニ), (ホ), (ヘ), (ト), (チ) となり、(第4図), これらのうち(ハ), (ニ), (ホ) の3つのフラクシヨンは緩衝液濃度を均一にするためおのをおの 0.3M 酢酸緩衝液 (pH=5.0)

第4図 DEAE-セルロースカラムによるF₂-AおよびF₂-Bフラクションの再クロマトグラフィー
 溶剤：酢酸緩衝液 (pH=5.0)
 カラム：10mm×180mm
 フラクション容量：10ml
 流出量：60 ml/hr
 ○—ナリンギナーゼ (F₁-A)
 ×—ナリンギナーゼ (F₁-B)

第5図 Dualite A-2 カラムを用いてのF₂-A-(ハ)F₂-A-(ニ), F₂-A-(ホ)フラクションの再クロマトグラフィー
 溶剤：酢酸緩衝液 (pH=5.0)
 カラム：10mm×170mm
 フラクション容量：10ml
 流量：40 ml/hr
 ナリンギナーゼ-A
 ○—F₁-A-(ハ)
 ×—F₁-A-(ニ)
 △—F₁-A-(ホ)
 ペクチナーゼ
 ■—F₁-A-(ホ)

のなかで透析して濃縮したのち Duolite A-2 カラムを通した。また他のフラクションは 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) のなかで透析したのち酵素液として使用した。この際 Duolite A-2 カラムでは使用緩衝液濃度(モル)をより細分して 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.0+1.0 M NaCl の5段階とした。これによってフラクションは (1), (2), (3), (4), (5) となり、[F₁-A-(ハ)]は第5部を、[F₁-A-(ニ)]は第4部を、[F₁-A-(ホ)]は第3部を溶出して使用した。(第5図)、これらの各フラクションは 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH=5.0) にて透析したの

ち濃縮して酵素液とした。

結果および考察

4-(1)の方法で、ペルセラーゼを第1表にみるように13フラクションに分画し、各フラクションの酵素活性を求めた。結果は第1表に見るとおりであった。この結果よりみるに清澄活性の強いものは PE 活性が強く、PG 活性やヘミセルラーゼ活性の強いフラクションも見られるが、これらは単独では清澄活性も弱く清澄には PE 活性が非常に大きく関係することが明らかになっ

第1表 ペルセラーゼ各フラクションの酵素活性 (2, 3, 4, 5 図参照)

フラクション	清澄度 (%)	PE 活性	PG 活性 (ペクチン酸)	PG 活性 (ペクチン)	ヘミセルラーゼ活性
1-A-イ	0	—	—	0.16	0.01
1-A-ロ	4	0.08	0.07	0.21	0.04
1-A-ハ	0	0.06	0.12	0.26	0.16
1-A-ホ-3	0	0.24	0.73	0.12	0.09
1-A-ホ-4	37	0.72	0.34	—	0.06
1-A-ト	33	0.72	0.21	0.56	0.02
1-B	19	—	0.49	0.21	0.06
2-A-イ	0	0.01	0.05	0.24	0.05
2-A-ロ	0	0.08	0.01	0.22	0.03
2-A-ハ	25	0.06	0.03	0.21	0.07
2-A-ホ	25	0.52	0.36	0.53	0.07
2-A-ト	21	0.41	0.64	0.40	0.04
2B	0	—	0.33	0.20	0.10

PE 活性：反応液 10.5 ml を中和するに用いた 0.1 N NaOH の ml 数

PG 活性：反応液 5 ml の消費した 0.1 N ヨウ素の ml 数

ヘミセルラーゼ活性：反応液 0.5 ml 中に生じたキシロースの mg 数

第2表 ペルセラーゼ各フラクションの組合わせによる清澄化力の変化

No	組合わせフラクション		清澄力
1	1-A-ホ-4	1-A-ホ-3	37
2	1-A-ホ-4	1-B	32
3	1-A-ホ-4	1-A-イ	28
4	1-A-ホ-4	2-A-ロ	28
5	1-A-ホ-4	1-A-ハ	18
6	1-A-ト	1-A-ホ-3	35
7	1-A-ト	1-B	9
8	1-A-ト	1-A-イ	17
9	1-A-ト	1-A-ロ	7
10	1-A-ト	1-A-ハ	13

第3表 市販のナリンギナーゼ-Aの分画

No. フラクシオン	清澄度	PE 活性	PG 活性 (ペクチン酸)
1 1-A-イ	4	—	0
2 1-A-ロ	4	—	0.20
3 1-A-ハ-(1)	3	—	0.20
4 1-A-ハ-(2)	5	—	0
5 1-A-ハ-(3)	5	—	0.20
6 1-A-ハ-(4)	0	—	0.30
7 1-A-ハ-(5)	5	0.26	0
8 1-A-(ニ)-(2)	0	—	0
9 1-A-(ニ)-(3)	9	0.43	0.37
⑩ 1-A-(ニ)-(4)	11	0.75	0.04
⑪ 1-A-(ニ)-(5)	11	0.55	0.10
12 1-A-ホ-(3)	5	—	0
⑬ 1-A-ホ-(4)	16	0.55	0.10
⑭ 1-A-ホ-(5)	16	0.65	0.10
⑮ 1-A-ヘ	13	0.43	0.06
16 1-A-ト	6	—	0.37
17 1-A-チ	4	—	0.63
18 1-B-イ	4	0.03	0.50
19 1-B-ロ	4	0.02	0.21
20 1-B-ハ	4	—	0.26
21 1-C	2	0.03	0.23

第4表 ナリンギナーゼ-A各フラクシオンの組合せによる清澄化力の変化

No.	組合せフラクシオン		清澄力
1	1-A-ホ-4	1-A-イ	12
2	1-A-ホ-4	1-A-ロ	20
3	1-A-ホ-4	1-A-ハ-(1)	26
4	1-A-ホ-4	1-A-ハ-(2)	17
5	1-A-ホ-4	1-A-ハ-(3)	18
6	1-A-ホ-4	1-A-ハ-(4)	23
7	1-A-ホ-4	1-A-(ニ)-(2)	22
8	1-A-ホ-5	1-A-ホ-(3)	19
9	1-A-ホ-5	1-A-ト	24
10	1-A-ホ-5	1-A-チ	30
11	1-A-ホ-5	1-B-イ	33
12	1-A-ホ-5	1-B-ロ	22
13	1-A-ホ-5	1-B-ハ	28
14	1-A-ホ-5	1-C	25

た。ついで PE 活性の強いフラクシオンを、2つえらびこれに PG 活性やヘミセルラーゼ活性の強いフラクシオンを加え、その清澄活性の変化を調べた。その結果は第2表のごとくで、PE 活性の強いフラクシオンに endo-PG の強いフラクシオン (1-A-ホ-3)(1-B) などを加えるとその活性はある程度向上したが、exo-PG の強いフラクシオンの添加では清澄化力の増加はみられなかった。またヘミセルラーゼの強いフラクシオンを加えた場合においても余り効果はあがらなかった。

この関係を再確認するために 4-(2) の方法でナリンギナーゼ-A を 21 フラクシオンに分画して試験した。結果は第3表、第4表にみるごとくで、ペルセラーゼについての結果に一致した。

以上の結果より単独でも清澄化力の強いフラクシオンは PE 活性の強いものが多く、PG 活性 (endo-PG) を有するフラクシオンの添加によってその効果はより上昇することが明らかになったが、しかしこの程度に分画ではまだ PE, PG の完全精製は不可能であり、他の清澄化因子の混入も考えられるのでさらに研究を進める必要がある。しかし柑橘果汁清澄には PE 活性の強力なものを開発することがさしあたり重要であることはこれによってより明確化した。

要 約

柑橘果汁の清澄には PE 活性の強力なペクチナーゼ剤が必要であり、ある程度強力な PE 活性をもつものにさらに PG 活性をもつものを加えるとその清澄化力は増強されたが、PE 活性の弱いものには PG 活性をいかに追加増強しても清澄効果はあがらないことがわかった。またヘミセルラーゼの添加も清澄化には余り役立たなかった。

文 献

- 1) 中浜敏雄: 京都府大報告, No. 20, 83 (1968).
- 2) 真部正敏・梶 明・樽谷隆之: 食品工誌, 13, 269 (1966).
- 3) 遠藤章: 食品工誌, 10, 237 (1963).
- 4) 野村男次・福井尚之・中山靖: 山口大学農学部学術報告, No. 18, 1045, 1055 (1967).
- 5) 福本寿一郎・山本武彦・辻阪好夫・岡田茂孝: 日本応用酵素協会誌, 2, 5 (1967).
- 6) Cole E.W.: *Cereal Chem.*, 44, 411 (1967).
- 7) 福井作蔵: 化学と生物, 3, 432 (1965).

(1968年12月23日受理)