ペクチン・トランスエリミナーゼ製剤の果汁への応用

石井 茂孝・横塚 保*

Application of a Pectin *trans*-Eliminase Preparation to Fruit Juices

SHIGETAKA ISHII and TAMOTSU YOKOTSUKA

Application of a pectin *trans*-eliminase preparation from *Aspergillus japonicus* to fruit juices was investigated. A small amount of pectin *trans*-eliminase was enough for the complete clarification of an apple juice, but a considerable amount of the enzyme was necessary for clarification of grape juice. Optimal conditions of pH and temperature for clarifying fruit juice were pH 3~4 and around 50°C. However, slight differences in the effect of pH and temperature on fruit juice clarification were seen between apple and grape. When pectin *trans*-eliminase activity of several preparations obtained from this mold was adjusted to the same level, the ability of clarifying an apple juice was almost same, but that of clarifying a grape juice varied widely. These results suggest that unlike apple juice clarification, other enzyme(s) in this preparation may play a role in the grape juice clarification.

Pectin *trans*-eliminase preparation was effective on the filtration of crushed grapes resulting in the increase of yield (about 11%) and the improvement of filterability of the juice.

(Received Nov. 22, 1971)

果実中に存在するペクチン質が果実の搾汁や果汁の濾過作業を困難にし、また果汁の混濁の主たる原因になっていると考えられる¹⁾。かかるペクチン質を分解し、搾汁率の向上、濾過工程の時間短縮および果汁の清澄化の目的には古くから主としてカビの生産するペクチナーゼ剤が使用されてきた²⁾³⁾。しかしいかなる酵素が実際に関与するかという点は長い間明らかではなかった。混濁果汁の清澄化に関してはペクチナーゼの他にもプロテアーゼ、アミラーゼ、ヘミセルラーゼなどの関与が推定されていた。ところが ENDO⁴⁾ および YAMASAKI⁵⁾ らにより精製したペクチンエステラーゼ (PE) とエンドポリガラクトナーゼ (endo-PG) の添加のみによってリンゴ果汁は完全に清澄化することが判明し、リンゴ果汁の清澄化はペクチンの分解のみで達成されることが証明されて他の酵素系の関与が否定された。

著者らはさきに植物組織分解酵素生産菌として得た *Aspergillus sojae* No. 48⁶⁾ の粗酵素に強力な果汁清澄化作用のあることを認めたが、この場合、清澄化と PE, endo-PG との間には全く相関が認められず、種々検討

した結果本菌酵素の場合はリアーゼのペクチン・トランスエリミナーゼ (PTE) が清澄化に関与することが判明した⁷⁾。PTE とはペクチン分子中の α -1, 4-メチルガラクトクロノイド結合をエリミネーション機構で切断し、分解物の非還元性末端の 4, 5 の位置に二重結合をもつガラクトクロノイドを生成せしめる酵素である⁸⁾。著者らはさらに精製した *Aspergillus sojae* の PTE を用い、PTE 単独の添加でリンゴおよびブドウ果汁は完全に清澄化すること、および PTE 活性のみを同一にすることによって精製酵素は粗酵素と同等のリンゴ果汁清澄化力を示すことを明らかにした⁷⁾。このことはリンゴおよびブドウ果汁の清澄化はペクチンの分解のみで達成しうることを、および *Aspergillus sojae* の粗酵素中に存在する PE や endo-PG などの加水分解系ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼなどの酵素はほとんどリンゴ果汁の清澄化に関与しないことを示すものであり、本菌のごとく、PTE 活性の強い菌株は、粗酵素中に多少 PE, PG などのペクチナーゼの混入があっても、リンゴペクチンのごときエステル化の高いペクチ

* キッコーマン醤油(株) 中央研究所 (千葉県野田市野田 399)

Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co. Ltd. (Noda-shi, Chiba)

ンの分解には PTE が主として関与するのであろうと考えた。さらに PTE による場合は、従来の加水分解酵素 (PE と endo-PG) と異なり、清澄化過程で全くメタノールを生成しないことも報告した⁹⁾。

本報にては、*Aspergillus sojae* No. 48 よりも PTE 生産能のさらにすぐれた *Aspergillus japonicus* の酵素剤を用い、果汁への利用に関する二、三の試験を行なったので報告する。

実験方法

1. 果実

リンゴは紅玉、ブドウはデラウェアとキャンベルアーリーのいずれも市販新鮮果を用いた。

2. 果汁の調製

リンゴ果汁は紅玉をおろし器ですり碎いたもの、ブドウ果汁はデラウェアをミキサーにて破碎したものそれぞれを木綿布で濾過し、得られた混濁果汁を熱処理することなくそのまま清澄化用試料とした。紅玉果汁の pH は 3.40 であり、デラウェアの pH は 3.10 であった。

3. PTE 製剤

麸 20 g に水道水 16 ml を散水したものを 1 l 容フェルンバッハプラスコに採り、120°C 30 分の殺菌後、これに *Aspergillus japonicus* を接種し 28~30°C で 60~64 時間培養した。麴を 5 倍量の水道水で室温にて 2 時間抽出し、これを木綿布で濾過しさらにセライト濾過して透明な抽出液を得た。これに 3 倍量の冷エタノールを添加するか、または 0.75 飽和になるよう硫酸を添加するかして生ずる沈殿を遠心分離して集め、沈殿を真空下で乾燥したものを PTE 製剤とした。

4. 果汁清澄化の測定法

10 ml の果汁に対し 1.0 ml の酵素液を添加して 40°C で 1 時間インキュベートした。その後ただちに沸とう浴中で 5 分間加熱して酵素反応を止め、冷却後 3000 rpm、5 分間の遠心分離を行ない、その上澄の 660 nm における透過率を測定した。

5. 果実破碎物の濾過法

紅玉はすり碎いたもの、デラウェアはミキサーにて破碎したものに酵素を添加し 40°C でインキュベートした。所定時間後、粉碎濾紙を均一に敷いたガラスフィルター (3G) 上に 100 g または 100 ml の破碎物を採り、吸引濾過して経時的に濾過液量を測定した。ブドウ破碎物の多量濾過の場合は、ブドウをコロイドミルにて破碎し、その 25 kg に酵素を添加して 40°C でインキュベートしたのち Willmess 圧搾機で濾過した。

6. PTE 活性の測定法

1% ベクチン (エステル化度 68%) 溶液 1 ml, Mc Ilvaine 緩衝液, pH 5.5 1 ml および酵素液 0.5 ml を 40°C で所定時間インキュベートし、4, 5 不飽和ガラクトクロナイドの生成によって増加する 235 nm の吸光度を日立製 101 分光光度計で測定した。PTE 1 単位とは上記反応条件で 1 分間に 235 nm の吸光度が 1.0 増加するに要する酵素量とした。

7. ブドウ果汁の成分分析法

多量濾過によって得られたブドウ果汁の成分分析法は HENNIG¹⁰⁾ および AMERINE¹¹⁾ の方法によった。

実験結果および考察

1. PTE 製剤によるリンゴおよびブドウ果汁の清澄化

(1) リンゴおよびブドウ果汁清澄化と酵素量との関係

Aspergillus japonicus 酵素剤の場合も、果汁清澄化の主たる作用は PTE によるであろうと考え本酵素剤の添加量はすべて PTE 活性単位として示した。

紅玉およびデラウェア果汁 10 ml に各単位の PTE を含む酵素液 1 ml を添加し、40°C、1 時間のインキュベーション後の各果汁の 660 nm における透過率を測定した (Fig. 1)。

紅玉果汁の場合は 0.016 単位の添加で完全に清澄化されたが、デラウェア果汁の場合には 0.016 単位では全く清澄化の効果が現われず、40°C 1 時間という条件下で完全に清澄化せしめるには、5 倍量に相当する 0.08 単位の酵素の添加が必要であった。果汁の清澄化に必要な酵素量は限らずしも一定したものではなく、Fig. 1 の結果はその一例であり、品種間での相違はもちろんのこと、同一品種においてもそのときの果汁の状態で清澄化に要する酵素量は異なった。ただしリンゴ果汁はブドウ果汁

Fig. 1. Apple Juice and Grape Juice Clarification by PTE

—●— Apple juice —○— Grape juice

に比べると数倍も清澄化されやすく、かつ清澄化に要する酵素量が品種間や果汁の状態によりあまり左右されなかった。ブドウ果汁が本 PTE 製剤で清澄化されにくいということの原因として、果汁中に存在するペクチンのエステル化の違いによることが考えられる。リンゴペクチンのエステル化は ENDO¹³⁾ により 87~90% と報告されているが、ブドウペクチンの場合は LAPSKER¹⁸⁾ により 45~55% とかなり低い値が示されている。PTE がペクチン分子中でもエステル化したガラクトuron酸の α -1, 4 結合しか切らないことから考えて、リンゴペクチンの方がブドウのそれに比べ数倍も早く分解され、それだけすみやかな清澄化が達成されるのであらうと思われる。

(2) 果汁清澄化の最適 pH

紅玉およびデラウェア果汁に固体のクエン酸または炭酸ソーダを添加して各 pH の果汁を調整し、清澄化におよぼす pH の影響を検討した。Fig. 2 に示すごとく、リンゴとブドウ果汁との pH-活性曲線にはやや差が認められた。すなわち、リンゴ果汁の場合は pH 3.1~4.2 の範囲においてほとんど差のない高い活性が認められるが、pH 3 以下ではきわめて活性が低くなり、ブドウ果汁の場合は pH 2.8~3.5 の範囲で最大の活性が示され、pH 2.2 付近の酸性でもかなりの活性が示されるが、pH 4.0 を越えると活性は極端に低下した。

(3) 果汁清澄化の最適温度

Fig. 3 に見られるように本 PTE 製剤による果汁清澄化の最適温度は 50°C 付近であり、60°C 以上の温度では酵素の顕著な熱失活が起きる。リンゴ果汁とブドウ果汁を比較した場合、30°C 以下における清澄化活性が

リンゴの場合は比較的高いが、ブドウの場合はきわめて活性が低くなっていた。

(4) PTE 製剤間の清澄化力の差

以上の実験結果はリンゴ果汁とブドウ果汁との清澄化には多少異なる酵素系の関与を推定させた。そこで培養条件や酵素剤の調製法を異にして得た 4 つの酵素剤を PTE 活性が同一になるように調整して、各製剤間の清澄化力の差を測定した。PTE 活性のみを同一に調整することにより各製剤中に含まれる他の酵素活性はバラバ

Fig. 3. Effect of Temperature on Fruit Juice Clarification by PTE

—●— Apple juice —○— Grape juice

Table 1. Differences among Four Lots in Ability for Clarifying Fruit Juice when Units of PTE were adjusted to the Same Level

Apple Juice "Kōgyoku"				
Units of PTE per 10 ml Juice	Transmittance at 660 mμ			
	A	B	C	D
0	26.00	26.00	26.00	26.00
0.003	38.00	39.00	38.00	38.25
0.008	79.75	82.25	79.00	80.75
0.012	95.00	96.00	95.25	96.50
0.016	96.00	95.25	96.00	96.25
Grape Juice "Delaware"				
Units of PTE per 10 ml Juice	Transmittance at 660 mμ			
	A	B	C	D
0	13.50	13.50	13.50	13.50
0.016	17.00	17.75	14.75	15.00
0.032	19.25	24.25	19.75	35.00
0.048	31.25	52.00	31.00	75.00
0.064	51.75	71.00	56.75	83.00
0.080	69.25	80.00	72.50	89.00

Fig. 2. Effect of pH on Fruit Juice Clarification by PTE

—●— Apple juice —○— Grape juice

ラの値となった。各製剤の PTE 活性は 1g 当たり A, 1387 単位; B, 637 単位; C, 159 単位; D, 147 単位であり、各製剤を、たとえば 0.016 単位になるよう果汁に添加する場合は、A 11.5, B 25.1, C 100.6, D 108.8 μ g の添加量となる。また、かようにした場合、製剤中の他の酵素活性のばらつきを相対値で示すと、A, B, C, D 各ロットの endo-PG 活性は、32 : 75 : 42 : 100 であり、ヘミセルラーゼは 35 : 100 : 54 : 83, セルラーゼの場合は 95 : 90 : 100 : 88 となった。Table 1 に示すごとく、リンゴの場合は、ロットの間に清澄化力の差がほとんど認められないが、ブドウ果汁の清澄化力には明らかな差が認められた。このことはリンゴ果汁の清澄化には *Aps. sojae* の場合と同様製剤中の PTE が主として働いていると考えられるが、ブドウ果汁の場合は PTE 以外の酵素もなんらかの形で清澄化に関与していることを推定させる。ブドウのペクチンのエステル化がリンゴに比べるとあまり高くないことから、ブドウペクチンの分解に endo-PG も働くことや、ヘミセルラーゼなどの酵素の関与も考えられ興味深く、現在この点を検討中である。

2. 果実破碎物の濾過試験

(1) リンゴ破碎物の濾過

紅玉破碎物を 100 g ずつ 3 区分に分け、これに酵素剤を PTE 活性として、0.1 (1), 1.0 単位 (2) 添加および無添加 (C) のそれぞれを 40°C で 2 時間作用させたのち、吸引濾過の試験を行なった。濾過時間と濾過液量との関係を Fig. 4 に示す。本酵素剤を添加した区分はいずれも清澄化された果汁が得られたが、濾過速度や搾汁量の点ではほとんど効果が現われず、むしろ多量の酵素添加はやや濾過しにくく搾汁量も悪くなる傾向であった。

(2) ブドウ破碎物の濾過

Fig. 4. Filtration of Crushed Apples

To 100 g of crushed apples "Kōgyoku" 0 (C), 0.1 (1) and 1.0 (2) unit of PTE were added and incubated at 40°C for 2 hr.

デラウェア破碎物 100 ml 当り酵素剤を PTE 活性として 0.5 (1), 2.5 (2), 5.0 単位 (3) 添加したものおよび無添加 (C) のそれぞれを 40°C にてインキュベートし、3 時間後および 20 時間後に吸引濾過の試験を行なった。その結果を Fig. 5 に示す。3 時間反応では酵素剤の添加量の多いほど濾過速度や搾汁量に顕著な効果が認められた。また無添加区および 0.5 単位添加区で得られた果汁は混濁していたが、2.5 および 5.0 単位添加で得られた果汁は完全に清澄化していた。ところで 20 時間反応させると酵素添加区はいずれも清澄化された果汁が得られるが、PTE 活性として 5 単位添加した場合は濾過速度や搾汁量の点で悪くなるという結果が得られた。

リンゴの場合も酵素の多量添加が悪いという傾向にあったが、これらのことは PTE には不溶性ペクチン(プロトペクチン)に作用してこれを可溶化せしめる働き、すなわち、マセレーション作用がある¹⁴⁾ため、酵素量が多いかまたは長時間反応させた場合不溶性ペクチンの可溶化が起き、これが濾過に影響をおよぼすのではないかと推定している。

(3) ブドウ破碎物の多量濾過

上記の試験結果より、ブドウの場合酵素の添加量および作用時間を適宜に定めれば、濾過速度や搾汁量に顕著な効果が期待できたので、次にデラウェアとキャンベルアーリーを用い、これら破碎物 25 kg に本 PTE 製剤を添加し、40°C で 3 時間作用させたのち Willmess 圧搾

Fig. 5. Filtration of Crushed Grapes

To 100 ml of crushed grapes "Delaware" 0 (C), 0.5 (1), 2.5 (2) and 5.0 (3) units of PTE were added and incubated at 40°C for 3 hr (A) and 20 hr (B).

Table 2. Effect of PTE on Crushed Grapes

Delaware Pressure (Kp/cm ²)	Filtrate (1)	
	Control	PTE (250 units)
0	5.5	9.7
1	11.7	10.1
2	0.8	0.6
3	0.4	0.3
5	0.5	0.3
Total filtrate	18.9	21.0
Pomace	4.34 Kg	2.21 Kg

Campbell Early Pressure (Kp/cm ²)	Filtrate (1)	
	Control	PTE (500 units)
0	4.0	5.7
1	5.7	7.2
2	3.3	4.7
3	2.1	1.9
5	3.9	1.8
Total filtrate	19.0	21.3
Pomace	4.50 Kg	2.36 Kg

Crushed grapes (25 Kg) were incubated at 40°C for 3 hr with or without PTE. They were pressed with Willmess Presser at indicated pressure for 10 min.

機によるブドウの圧過試験を行なった。

各圧力下での搾汁量、総搾汁量および搾汁後の粕重量の測定を行ないその結果を Table 2 に示した。本酵素剤添加区は無圧または低圧下での搾汁量が多く、すなわち圧過が容易で、総搾汁量が多く、それだけ粕量が少なかった。デラウェア、キャンベルアーリーいずれも本試験では 11% の搾汁量増加であった。原料や搾汁方法などが異なるので単純には比較できないが、本 PTE 製剤による搾汁量の増加は遠藤¹⁵⁾、小原ら¹⁶⁾ および小佐野ら¹⁷⁾の結果よりやや高いようであった。

得られたブドウ果汁の分析値を Table 3 に示すが、総酸やタンニンの増加が認められる以外は酵素処理と無処理との間にはほとんど成分的な差が認められなかった。

なお得られた果汁に糖濃度が 23% になるように補糖し、さらにメタカリを SO₂ として 75 ppm 添加し、これに酒母 2% を接種して 20°C にて醗酵を行なった。経時的に CO₂ 発生量を測定したところ、本 PTE 製剤添加処理果汁と無処理果汁の間には醗酵速度に全く差が認められなかった。

Table 3. Analysis of Grape Juice

	Delaware		Campbell Early	
	Control	PTE-treated	Control	PTE-treated
Density	1.090	1.090	1.056	1.058
Extract	19.45%	19.48%	11.08%	11.17%
Reducing Sugar	21.0%	21.5%	11.94%	12.06%
Total Acidity	0.558%	0.718%	0.715%	0.786%
Volatile Acidity	0.001%	0.001%	0.003%	0.007%
Amino-Nitrogen	0.059%	0.059%	0.051%	0.050%
Total Tannin	0.046%	0.065%	0.137%	0.157%

3. その他の利用

苺や柑橘類の破砕物に本 PTE 製剤を添加すると無添加の場合に比べてきわめて圧過は容易になり、かつ搾汁量が増加した。また本 PTE 製剤は柑橘類の瓢のうの剝皮にも効果が示された。

その他、本 PTE 製剤はマセレーション作用すなわち植物組織の崩壊作用をもち¹⁴⁾この特徴を生かした用途も二、三考えられた。

要 約

PTE 製剤を広く果汁に応用する目的で、*Aspergillus japonicus* の酵素剤を用いて検討を行なった。結果はつぎのとおりであった。

(1) 果汁 10 ml 当り本酵素剤を PTE 活性として 0.016 単位添加すればリンゴ果汁は 40°C、1 時間で完全に清澄化されるが、ブドウ果汁の場合はさらに数倍の添加が必要であった。

(2) 本酵素剤による果汁清澄化の最適条件は、pH 3 ~4 の範囲、温度は 50°C 付近であったが、リンゴ果汁とブドウ果汁とではやや傾向が異なっていた。

(3) リンゴ果汁の清澄化の場合は *Aspergillus sojae* の場合同様本酵素剤中の PTE が主として関与していると考えられるが、ブドウ果汁の清澄化には他の酵素の関与も推定された。

(4) ブドウ破砕物への本酵素剤適量添加は、圧過を容易にし、かつ搾汁量増加にも効果が現われた。

終りにのぞみ、本実験の一部を担当し、協力していただいた相島はつえ嬢に謝意を表する。

文 献

- 1) PILNIK, W. and VORAGEN, A. G. J.: *The Chemistry of Fruits and their Products*, 1, 53(1970).
- 2) JOSLYN, M. A., MIST, S. and LAMBERT, E.:

- Food Technol.*, **6**, 133 (1952).
- 3) NEUBECK, C.E.: *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, **43**, 374 (1959).
- 4) ENDO, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 129 (1965).
- 5) YAMASAKI, M., KATO, A., CHU, S. and ARIMA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 552 (1967).
- 6) 石井茂孝・菊地忠昭・横塚 保: 農化誌, **43**, 536, 544 (1969).
- 7) ISHII, S. and YOKOTSUKA, T.: *J. Agr. Food. Chem.*, **19**, 958 (1971).
- 8) ALBERSHEIM, P., NEUKOM, H., and DEUEL, H.: *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422 (1960).
- 9) 石井茂孝・横塚 保: 農化大会発表, 昭和46年4月1日(東京).
- 10) HENNIG, K.: Chemische Untersuchungs Methoden für Weinbereiter und Sussmosthersteller p. 20 (1959).
- 11) AMERINE, M.A.: *Laboratory Procedures for Enology*, p. 1 (1952).
- 12) ENDO, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 137 (1965).
- 13) LAPSKER, Z.I., BALTAGA, S.V. and TROFIMENKO, N.M.: *Sadovod. Vinograd. Vinodel. Mold.*, **25**, 25 (1970).
- 14) ISHII, S. and YOKOTSUKA, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1157 (1971).
- 15) 遠藤 章: 醸工, **39**, 39 (1961).
- 16) 小原 巖・櫛田忠衛・野々村英夫: 醸協誌, **50**, 460 (1955).
- 17) 小佐野吉泰・高橋雅二・山田浩一: 醸協誌, **17**, 265 (1959).
- (昭和46年11月22日受理)