

二三酵素製剤のナリングナーゼ活性

大村, 浩久
九州大学農学部

石崎, 勝也
全国農業販売同組合連合会

箴島, 豊
九州大学農学部

山藤, 一雄
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21615>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 20 (2), pp.169-177, 1963-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



二三酵素製剤のナリンギナーゼ活性

大村浩久・石崎勝也*・箴島 豊・山藤一雄

On the naringinase activity of some enzyme preparations

H. Omura, K. Ishizaki, Y. Osajima and K. Yamafuji

我が国で豊富に産する夏ミカンには苦味物質を含むために果汁、缶詰等への利用は従来著しく制限されていた。しかしこの苦味質の本体がナリンギン（ナリンゲニン-7-ラムノグルコシド）でありそのアグリコンであるナリンゲニンは苦味を呈しないことは知られていた。従つて若し何等かの方法でこの配糖体を分解すれば夏ミカンの苦味は除かれその利用の途が大きく開かれることが期待される。

Ting¹⁾はこのナリンギンが市販のペクチナーゼ製剤に含まれる酵素によつて加水分解されることを認め、反応温度、最適 pH、温度耐性その他酵素の一般性質を検討し、更に同じくナリンギンを含むため苦味を呈するグレープフルーツ中のナリンギン除去を試みてその可能性を示した。一方野村氏²⁾も我が国で市販されているペクチナーゼ標品“三共スクラーゼ”中にも同様の酵素が存在することを確かめた。しかし実用的には出来るだけ強い活性を持つ酵素標品を使用することが望ましい。近年酵素製造化学の顕著な発展に伴いこの要望を満すことも可能になり、特に岸^{3,4,5)}、中林⁷⁾、滝口¹⁰⁾等の諸氏によつてそれぞれその豊富な経験に基づいて研究が行なわれた。こうして強力なナリンギナーゼを生ずる菌株が検索分離され、更に酵素の産生に関する基礎研究ならびにその諸性質の検討等も進められ試作品の一部は入手し得るようになった。これ等は何れも糸状菌により産生されるものであつて更にその精製、反応機作の解明等酵素的な研究は岡田氏等⁸⁾によつて行なわれている。我々はこれ等酵素剤を実際に加工等に利用するために必要な基礎知識を求めるために本実験を行なつた。

実 験

酵 素

次の3種の市販又は試作酵素標品について試験を

行なつた。

a) ペクチナーゼ：市販“三共スクラーゼ”であつて1959年11月 *Sclerotinia libertiana* から調製した乾燥製品。

b) ナリンギナーゼ標品 A : *Asp. niger* から1961年4月調製した試作品。

c) ナリンギナーゼ標品 B : *Asp. usami* mut. *shirousami* から1962年1月調製した試作品。

通常 pH 4 の 0.1 M McIlvaine 緩衝液で抽出し5分間 6,000 r.p.m. で遠心分離した褐色の透明な上澄液を酵素液としたが場合によつては水で抽出した。酵素濃度については力価に応じて適宜定めたが、これ等の酵素標品はいずれも多量の不溶物（濾過助剤等）を含んでいるので、これを含めた酵素製剤の濃度で表わした。

基 質

市販品（ハタ製薬）を用いた。水には 50 mg % でも溶けにくいので 50~60°C に温めて溶解した。

反 応 条 件

一般に反応の最適温度は 40~50°C, pH 4.0~4.5 であるといわれているので、本実験では特記しない限り pH 4.0, 40°C で作用させた。酵素濃度、基質濃度、作用時間等は適宜定めたのでその都度記載する。

活性の測定法

岸氏^{3,4,5)}、岡田氏等⁸⁾はナリンギナーゼの作用によりナリンギンから生ずる糖の量を Somogyi 法で測定し又場合によつては還元力の増加を測定した。一方中林氏⁷⁾はナリンギンの減少を以て酵素活性を求めた。我々もこの両者について先ず検討したが酵素剤が粗標品であるので Somogyi 法では酵素液だけでもかなり顕著に呈色したのでナリンギンの減少を測定する簡便な方法を採用した。

ナリンギンは Davis 法⁹⁾の一部を改良した中林氏の記載によつて測定した。即ち試料 1 ml に 90 % ジェ

* 勤務先：全国農業販売協同組合連合会

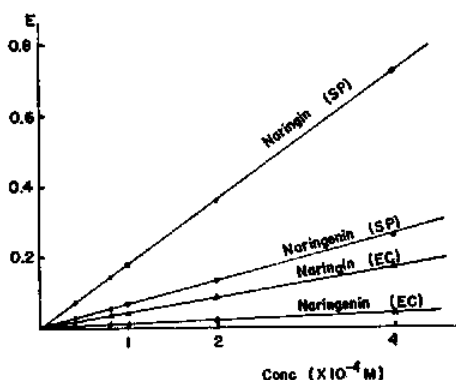


Fig. 1. Coloration of naringin and naringenin by Davis's method.

SP: Color intensity was estimated by spectrophotometer at 420 mμ.

EC: Color intensity was estimated by electric colorimeter with blue filter.

チレンジライコール 10 ml 及び 1 N NaOH 1 ml を添加し 30°C に 30 分保持した 後生成した黄色の強さを測定した。比色は通常日立光電比色計 EPO-A 型、青色フィルター、厚さ 10 mm のセルを用いたが第 1 図に示すように供試液のナリンゲン濃度 $4 \times 10^{-4} M$ までは直線関係を示した。比色計の代りに日立分光光度計 EPU-2 型を用い 420 mμ でその吸光度を測定すると精度は更に高くなりしかも試験した最高濃度 $10^{-3} M$ まで完全に比例した。酵素の作用によりナリンゲンから生ずるナリンゲニンも本法で同様に呈色するがその呈色率はナリンゲンに比べて低く同一濃度のナリンゲニンによる吸光度は同じく第 1 図に示す通りであつて、比色計及び分光光度計の何れを用いても $10^{-3} M$ までは同様に直線関係を示しその濃度と吸光度との関係はそれぞれ次の近似式で求められる。

光電比色計	ナリンゲン	$C \div 14.43 E$
	ナリンゲニン	$C \div 85.96 E$
分光光度計	ナリンゲン	$C \div 5.58 E$
	ナリンゲニン	$C \div 22.96 E$

ここで C は濃度 ($10^{-4} M$)、E は $-\log T$ を示す。

測定は勿論単波長で行なうことが望ましいが酵素反応の精度や本実験の目的からより手軽な光電比色計を使用しても差支えない。この場合吸光値は 0.150 付近になるように反応液を設定した。即ち後述するように基質は反応液中の終濃度 0.025 % 又は 0.0125 % を最もよく用いたが、この場合それぞれ 0.5 ml 及び 1 ml について発色させた。

上述のようにナリンゲニンも同一試薬で同様に発色するので酵素活性をナリンゲニンの減少で測定する場合にはナリンゲニンの呈色を補正しなければならない。そのためナリンゲニンの分解率は次式から近似的に算出する。

$$\text{分解率} = \frac{A - C}{A - B} \times 100$$

ここで A は反応液中に初め含まれていたナリンゲニンの吸光度即ち反応時間零の場合の反応液の吸光度、C は反応後の反応液について呈色した場合の吸光度である。又 B は吸光度 A を示すナリンゲンから生ずべき即ちこれと等モルのナリンゲニンによる吸光度或は分解率 100 % の場合の反応液による吸光度であつて第 1 図から求められる。ナリンゲニンのラムノーズだけが除かれたプルニンは糸状菌の産生するナリンゲナーゼ作用の中間体であつて Davis 法により同じく黄色に呈色しその程度はナリンゲンとナリンゲニンとの中間である。従つて厳密には上記計算式は完全ではなく反応液中のプルニンによる呈色も考慮しなければならない。しかしプルニンの量を求めることは甚だ困難であり多量の試料を測定する酵素実験には適しない。勿論岡田氏等⁹⁾によつて得られた結晶酵素の場合にはプルニンで反応が停止するので上式の B は当然プルニンの値でなければならないが加工に使用するような粗酵素では所謂サリシナーゼも同時に共存し反応はプルニンで止ることなくナリンゲニンまで進行する。更にナリンゲニンの呈色率はプルニンのものよりも低いので B の値は共存するプルニンによる呈色を低く見ていることになり従つてナリンゲニンの分解率もプルニンの存在量に応じて実際よりは低くなつていて、過大に見るよりは安全である。

酵素標品の活性

先ず酵素活性の測定に適當な条件を定めるためにナリンゲニンの分解を経時的に求め第 2 図に示した。

ナリンゲナーゼ標品 A は 0.25 % 酵素液 (pH 4) と 0.05 % ナリンゲン溶液とを等量宛混合した反応液であり、標品 B は 0.75 % 又は 0.5 % 酵素水溶液 1 ml を緩衝液 5 ml 及び 0.05 % ナリンゲン溶液 2 ml の混合液に添加した。従つて基質濃度はそれぞれ 0.025 % 又は 0.0125 % であり一方酵素の濃度は A 標品 0.125 %, B 標品 0.094 % 又は 0.063 % であつた。これに対してペクチナーゼ製剤スクラーゼはナリンゲニンの分解を目的として製造された標品よりは勿論活性が低いので酵素量を多くする必要がある。第 2 図の実験は 5 %

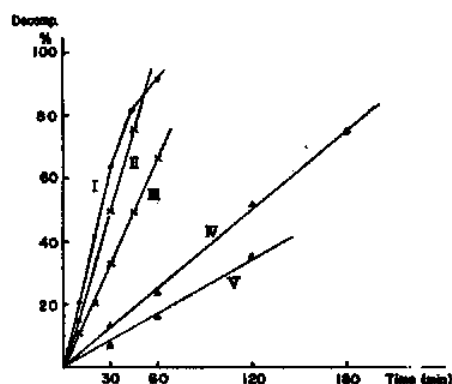


Fig. 2. Decomposition of naringin by some enzymes.

- I: Naringinase preparation A
(naringin 0.025 %, enzyme 0.125 %)
II: Naringinase preparation B
(naringin 0.0125 %, enzyme 0.094 %)
III: Naringinase preparation B
(naringin 0.0125 %, enzyme 0.063 %)
IV: Pectinase preparation
(naringin 0.025 %, enzyme 5.0 %)
V: Pectinase preparation
(naringin 0.025 %, enzyme 2.5 %)
Concentrations were expressed by final concentration in reaction mixture.

又は 10 % 酵素液 (pH 4) を等量の 0.05 % 基質溶液と混合したものであつてナリンギナーゼ A の 20 倍ないし 40 倍使用したことになる。この場合酵素の濃度が高く酵素液自体が濃褐色を呈するので比色に際して多少影響する。そのためナリンギン測定に際しては反応液と同じ濃度の酵素液のみについて盲検を行ない補正した (0.5 ml について吸光値約 0.02)。ナリンギナーゼ標品 A 及び B については酵素濃度が低いので補正する必要はなかつた。

こうして基質濃度 0.0125 % ないし 0.05 % を用い終濃度 0.05 又は 0.1 % 程度のナリンギナーゼで測定すれば正常条件 pH 4.0, 40°C で 30 分ないし 60 分作用させれば十分に活性の測定が出来る。これに対してペクチナーゼ標品中のナリンギン分解力は弱いので反応液中の酵素濃度は少なくとも 2.5 % は必要であり、しかもこの条件で 1 時間では不十分であり 2 時間ないし 3 時間反応させなければならない。しかしこの条件を用いれば市販ペクチナーゼ標品中のナリンギナーゼ活性を十分に測定することが出来る。又反応は各酵素標品ともこれ等の条件では時間とともに直線的に進行した。

最適 pH

ナリンギナーゼ標品 A の最適 pH は 40°C に於て

4.0 ないし 4.5 であることは岸氏により既に報告されているのでここでは標品 B 及びスクラーゼのものについて測定した。標品 B については第 2 図の条件と同様に種々の pH の緩衝液を用いて反応液を調製し 40°C で 60 分間作用させた。これに対してペクチナーゼ標品では反応液の基質及び酵素の終濃度は同一であるが酵素は緩衝液の代りに水で抽出し 0.075 % ナリンギン溶液, 7.5 % 酵素水溶液及び緩衝液を等量宛混合して反応液とした。

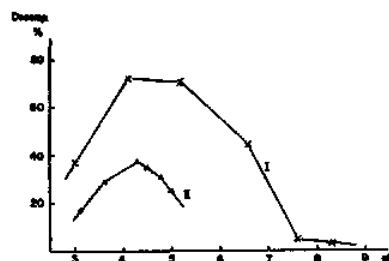


Fig. 3. Effect of pH on the reaction.

- I: Naringinase preparation B (naringin 0.0125 %, enzyme 0.05 %, 40°C, 60 min.)
II: Pectinase preparation (naringin 0.025 %, enzyme 2.5 %, 40°C, 120 min.)

第 3 図に示すように両酵素標品ともに何れも pH 4 付近に最高値を持つが特にナリンギナーゼ B は 4 から 5 にかけてかなり広い最適 pH 反応域を持ち、それから徐々に作用力は低下し 8 前後では殆ど作用は起こらなくなつた。これに対し酸性側では比較的速やかに活性を低下し、この pH-活性曲線は標品 A のものに酷似している。一方ペクチナーゼ標品中のものは pH 4 より中性側でもかなり速やかに活性が低くなる傾向が認められた。

最適温度

ナリンギナーゼ A の最適温度は 40° ないし 45°C の間にあると報告されている。これに対し標品 B のものは第 4 図に明らかなように 50° ないし 60°C で最高の活性を示し 70°C では急激に活性を低下する。これに比べスクラーゼのものは 50°C で最高値を示し 40°C でも比較的強く作用するが 60°C では極めて弱い。この場合酵素活性は第 2 図のものと同一反応液組成のものであつて特にナリンギナーゼ B では 30 分及び 60 分のものを用いて測定した。ここで温度-活性曲線はほぼ類似の傾向を示したが反応時間 30 分の場合には 50°C 及び 60°C での分解率は殆ど同一であつた。これに対して 60 分では前者が後者より若干上回っているがこれは

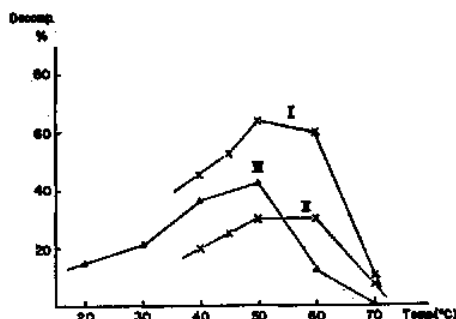


Fig. 4. Effect of temperature on the reaction.

- I: Naringinase preparation B (naringin 0.0125 %, enzyme 0.05 %, pH 4.0, 60 min.)
 II: Naringinase preparation B (naringin 0.0125 %, enzyme 0.05 %, pH 4.0, 30 min.)
 III: Pectinase preparation (naringin 0.025 %, enzyme 2.5 %, pH 4.0, 120 min.)

反応時間が長くなるため反応温度での酵素の失活の影響が現われてきたものと思われる。

pH 耐性

岸氏²⁾はナリンギナーゼAが pH 4 ないし 6 の間で安定であつて 1.7 以下では殆ど失活することを認めたが 6 以上については試験を行なつていない。

4% スクラーゼ酵素液 5 ml にそれぞれ 1 N HCl 又は 1 N NaOH で所定の pH に調節した後室温 (20~25°C) に 20 時間放置した後再び酸又はアルカリで

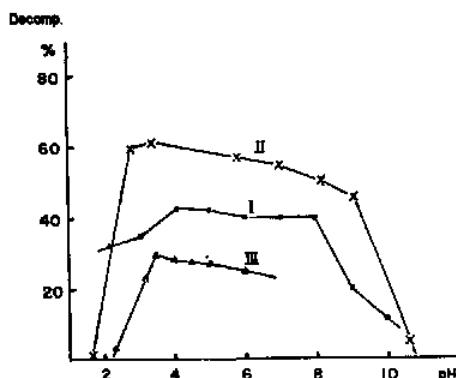


Fig. 5. Effect of pH on the stability of the enzyme.

Activities were estimated after 20 hrs. at room temperature (20°C to 25°C)

- I: Naringinase preparation A (naringin 0.025 %, enzyme 0.125 %, pH 4.0, 40°C, 40 min.)
 II: Naringinase preparation B (naringin 0.0125 %, enzyme 0.0625 %, pH 4.0, 40°C, 60 min.)
 III: Pectinase preparation (naringin 0.025 %, enzyme 2.5 %, pH 4.0, 40°C, 120 min.)

pH 4 に戻し更に pH 4 の McIlvaine 緩衝液で 6 ml にした。これに 0.1% ナリンギン溶液 2 ml を加え常法通り 40°C に 2 時間反応させて残存する酵素活性による分解率を求めた。pH を酸又はアルカリだけで調節したのでは 20 時間後に若干の変動が認められる。そこでナリンギナーゼ B は 5% 水溶液 1 ml に各 pH の緩衝液 3 ml を加え更に NaOH 又は HCl で正しく補正した。こうすると 20°C に一晩放置しても正確に pH を保持した。以下 HCl 又は NaOH で pH 4 に戻し更に pH 4 の緩衝液で 10 ml にしてそれぞれの pH で処理した 0.5% 酵素液を得、第 2 図と同一条件で反応液を調製し残存活性を測定した。一方ナリンギナーゼ A は 1% 酵素液に緩衝液 3 ml を加え以下同様に処理した後最終的に 6 ml としこれに 0.1% ナリンギン溶液 2 ml を加えて活性の測定に供した。

第 5 図から明らかなようにペクチン分解酵素剤中のナリンギナーゼ活性は pH 3.5 から 6 の間は安定であり pH 3 付近でやや低くなり pH 2.2 では殆ど活性を失つた。ナリンギナーゼ標品のものについてはより広汎にアルカリ側迄試験したが B 標品の酵素の安定域が最も広く pH 2.9 付近から中性付近迄は変化なく pH 8 ないし 9 で多少低く pH 10 を越すと失活した。標品 A のものも同様に pH 8 付近迄は安定であるが pH 9 では半減、pH 10 では 1/4 に低下した。

温度耐性

次に各酵素液 (pH 4) 10 ml を試験管に採り所定の温度に一定時間浸漬した後ナリンギン分解力を測定し第 6 図に示した。何れの酵素に於てもほぼ類似した耐熱性を持ち 40°C 及び 50°C では安定であり 60°C 30 分では半分以上に、70°C では殆ど完全に活性を失うことが認められた。試験した 3 種の酵素標品の耐熱性については顕著な差異は認められないが 60°C 30 分の場合スクラーゼ、標品 B、標品 A の順に強いようであると思われる。

酵素耐性に対する pH と温度の関係

前項の試験で酵素の活性に対する pH 或は温度それぞれ単独の影響については一応の知見が得られたがこの両者の酵素活性に対する影響は元来切り離して考えるべきものではないので更に若干の実験を行なつた。

ナリンギナーゼ B 溶液を第 5 図の条件で 20° 及び 30°C で 20 時間処理した後活性を測定し第 7 図に示した。こうして 20°C では pH 9 までは比較的安定であつて極めて徐々に活性を低下するに過ぎないが pH 9 を越すと急激に失活することは既に第 5 図に認めた

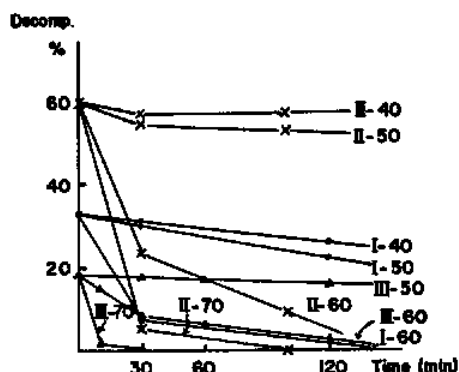


Fig. 6. Effect of temperature on the stability of the enzyme.

I-40: Naringinase preparation A treated at 40°C.

II-50: Naringinase preparation B treated at 50°C.

III-60: Pectinase preparation treated at 60°C. Estimation of activity was carried out at pH 4.0 and 40°C for 60 min.

Naringinase preparation A (I): naringin 0.0125 %, enzyme 0.03 %

Naringinase preparation B (II): naringin 0.0125 %, enzyme 0.063 %

Pectinase preparation (III): naringin 0.05 %, enzyme 5.0 %

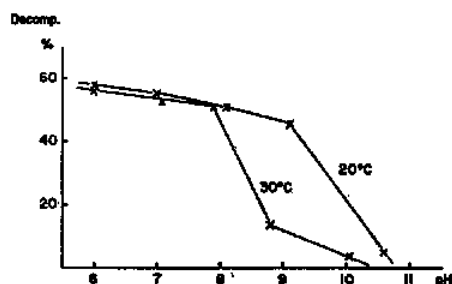


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of the naringinase activity of preparation B at various pHs.

Activities were estimated after 20 hrs.

Estimating condition of activity:

naringin 0.0125 %, enzyme 0.063 %, pH 4.0, 40°C, 60 min.

所である。これに対して 30°C では酵素の安定域は狭くなり pH 8 迄であつて pH 8.8 では活性は約 25 % に低下した。このようにアルカリ性での酵素の安定性は温度によつても影響され温度が高い程安定域は狭くなりその限界は中性側に移る。しかし pH 6 ないし 8 の安定な範囲では温度の影響は受けなかつた。

同様のことはナリンギナーゼ A でも認められる所

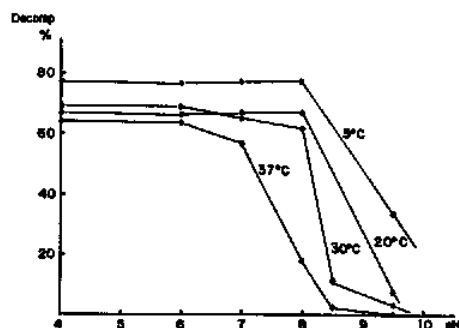


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of the naringinase activity of preparation A at various pHs.

Activities were estimated after 20 hrs.

Estimating condition of activity:

naringin 0.0125 %, enzyme 0.063 %, pH 4.0, 40°C, 60 min.

より詳細に試験しその結果を第 8 図に示した。

酵素活性の耐性に対する第 3 の因子は時間であるがこれ迄の耐性試験はすべて長時間で行なつたものである。そこで次に比較的短時間に中性よりアルカリ側での耐性を検討した。ナリンギナーゼ A 5 % 水溶液 5 ml を常法通り緩衝液及び NaOH 又は HCl で所定の pH に調節し全量を 25 ml とした。この状態で 10°C に放置し経時的に 5 ml 宛採り出し直ちに酸及びアルカリで pH 4 に戻し更に pH 4 の緩衝液で 10 ml にし 0.5 % 酵素液とした。この酵素液の保持する活性を測定し第 9 図に示した。pH 10 での失活は比較的速やかに起り 2 時間で殆ど達成された。これに対して pH 9 では 2 時間迄は殆ど影響を受けずこれより急速に失活が進み 4 時間では大部分の活性が失われた。pH 7

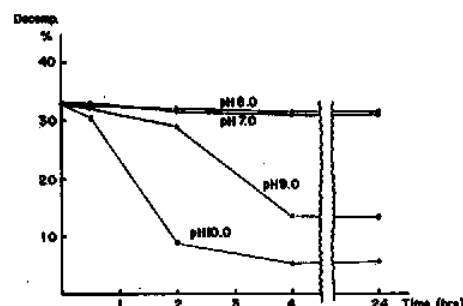


Fig. 9. Effect of treating time at 10°C on the stability of the naringinase activity of preparation A.

Estimating condition of activity:

naringin 0.0125 %, enzyme 0.03 %, pH 4.0, 40°C, 60 min.

ないし 8 では勿論活性は保持された。

pH 7 及び 8 付近の酵素耐性は後述するペクチン分解酵素のものとの関係に於て特に重要である。第 8 図に示すように pH 8 では 30°C 迄は安定であるが 37°C に一晚処理するとかなり活性を低下する。しかし第 9 図から推定されるようにこのような条件でも少なくとも 2 時間ないし 4 時間程度までは活性を保持するものと思われる点第 10 図の実験はこれを支持するものであつてナリンギナーゼ A の耐性を 30°C 及び 37°C で追跡したものである。尚ここで pH 6.5 のものは水抽出液であつてそのまま温水中に浸漬した後他のものと同様に pH 4 に調節し緩衝液 (pH 4) を加えた後活性を測定した。こうして pH 8 までは 37°C でも少なくとも 4 時間は安定であり酵素水溶液も同様に活性を保持することが確かめられた。

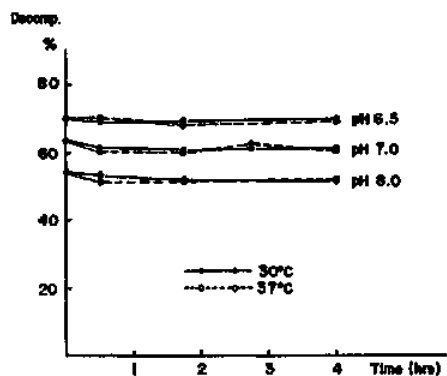


Fig. 10. Effect of treating time on the stability of the naringinase activity of preparation A.

Estimating condition of activity:
naringin 0.0125 %, enzyme 0.063 %, pH 4.0, 40°C, 60 min.

糖類の影響

本酵素によるナリンギンの分解生成物であるラムノース及び葡萄糖が酵素作用を強く阻害することは既に岸氏⁷⁾により報告されている。又中林氏⁸⁾も蔗糖及び葡萄糖の阻害度を測定し実際の缶詰製造では 80°C 前後に加熱されるとともに糖濃度も高く酵素作用が抑制

されるので苦味の除去には何か特別の処理法を考える必要があると述べている。そのため別の甘味源を用いることも一つの手段かと考えられるので先ず最近市場に出ているソルビトールについて検討した。尚比較のために蔗糖及び葡萄糖についても試験した。

反応液は 0.5 % 酵素液 1 ml, 0.05 % ナリンギン溶液 2 ml 及び表示の終濃度になるように糖液 1 ml を加え pH 4, 40°C で 30 分作用させ糖の代りに水を加えた対照との分解率を比較した。

こうして葡萄糖が低濃度で極めて高い阻害作用を示すことは岸氏、中林氏等によつて示された通りであるがソルビトールは比較的低い阻害効果を示し蔗糖よりも若干よいようである。果糖もかなり強い阻害作用を特に高濃度で示した。

考 察

供試した両標品 A 及び B の酵素反応特性には顕著な相違は認められないようである。即ち反応の最適 pH は 4.0~4.5 付近にあり最適温度は 50°C ないし 60°C に認められる。他方我が国で市販されているペクチナーゼ製剤にもナリンギナーゼ活性が含まれているがその活性はナリンギナーゼを目的として特別に調製された標品の活性よりは勿論遙かに弱い。しかしその酵素反応の特性は比較的によく似ており pH 4.2, 50°C で最高の作用力を示す。ただ最適温度は何れも 50°C ではあるがナリンギナーゼ製剤のものが 60°C 付近まで比較的に強い作用力を示すのに対しペクチナーゼ標品のものはやや低温即ち 40°C ないし 50°C で活性が強くこれを越すと急速に作用力を失う。又酵素の安定性についても試験した 3 標品のものは何れも類似の性質を持つており pH 4 ないし 8 付近までは安定であり耐熱性も 50°C 迄は安定、60°C 30 分で半分以下に活性は低下し 70°C では完全に失活する。これ等の安定性についても厳密には多少の相違は観察されるものであつて標品 B、標品 A、スクラーゼの順に酵素の安定 pH 範囲は広いようであるが例えば pH 2 付近の安定域外の低 pH では標品 A は比較的に活性を保持するのに他の 2 者は急激に活性を失う。又 60°C での耐熱性もス

Table 1. Inhibition of activity by some sugars.

Sugar	Sorbitol			Fructose				Glucose		Sucrose		
Conc., (%)	2.5	7.5	12.5	1.25	2.5	5.0	10.0	2.1	4.2	10.0	20.0	30.0
Inhibition, (%)	1	15	22	15	14	24	44	56	71	31	43	56

クラゼ、標品B、標品Aの順に強いことが一応観察された。しかしこれ等の相違は顕著なものではなく一括して述べれば類似性が強調される。このことは3種の標品が何れも糸状菌によつて産生されることに基くもの、換言すると糸状菌のナリンギナーゼは本質的には同一のものであると云うことは過早である。更に指摘された若干の相違も無視するか否かには慎重でなければならない。滝口氏¹⁰⁾は実用的立場から最適 pH での酵素活性を比較するとともに果汁の pH での活性も比較することは優良菌株の分離選抜に際して重要なことを指摘している。同様なことは温度の影響についても缶詰製造の立場から考慮すべきであろう。従つてペクチナーゼ製剤は別として、試作品A及びBについて何れが可何れが否と結論を出すことは不十分であつて、酵素を利用するそれぞれの立場からその条件に応じて検討しなければならない。我々の実験はその検討に際して採用する試験の条件を提供するにとどまるものと思われる。

温度との関係を考慮して特に詳細に検討した酵素のアルカリ耐性は特に興味深いものであつて酵素の失活はアルカリ処理の温度にも比較的強く影響される。温度が低い程酵素が安定であることは一般に云えることであつてナリンギナーゼのアルカリ耐性も勿論これに従うが比較的鋭敏であつた。しかも pH 8 以上の不安定部でこの影響は顕著であるが少なくとも 30°C 以下では pH 6 ないし 8 の安定域では影響は受けなかつた。しかし 37°C での標品A、或は 30°C での標品Bの耐性をそれより低温に於ける耐性と比較するとき、温度の上昇に伴つて酵素の安定な限界も狭くなつて中性側に移る傾向が認められる。特にこの安定性が狭くなり始める温度の相違は両酵素標品の特性の差として本質的なものであるか否かは明らかでないが、少なくとも 30°C 以下の我々の日常経験する温度範囲内でのこの両者の相違は実用上重要なものとして留意しておく価値はあると思われる。酵素耐性に対する時間の影響もまた無視出来ないがアルカリによる失活は比較的速やかに進行する。この場合厳密には例えば第9図の例が示すように pH 9 での最初の 2 時間、pH 10 での 30 分は比較的安定でありそれより急速に不活性化が進み前者では 4 時間、後者では 2 時間で殆ど完了する。従つて 37°C に於ける pH 7 ないし 8 での不活性化もごく初期の安定時間内では起こらない筈であつて少なくとも 4 時間はこの範囲に属することを第10図の結果は示している。これ等の実験は後述す

るペクチン分解酵素との関連からアルカリ性についてのみ行なつたが酸性側についても必要ではないかと思われる。更にこのようなアルカリ耐性或は酸耐性の問題は実用上の価値があるだけでなく、特に比較的温和な温度にも影響される事実とともに酵素活性の解明にも有力な端緒を与える可能性があるとも推定される。

糖による阻害は中林氏が指摘しているように実用上の見地から特に酵素の有用性に重大な影響を及ぼす問題であるのでこの解決は早急に行なわれなければならない。特に糖の化学構造が酵素阻害に密接な関係を持つか否かは反応機構の解明にも役立つものと思われるが、逆に反応機構の解明が糖の阻害問題の解決に有効な手段を提供するものと考えられる。ソルビトールの試験結果はこれに対する解答を与えるものではないが研究の第一歩であつて引続いて継続されなければならないのは当然である。しかしここで食品添加剤である事実と経済性とを忘れてはならないので多くの制限も予想される。

本研究は文部省試験研究費（代表者野村男次）で行なつたものである。研究に際し種々御助言を頂き又貴重な試料を頂戴した山口大学農学部野村男次博士、静岡大学農学部中林敏郎博士及び三共株式会社石橋慶次郎博士に心から感謝申し上げる。

総 括

市販ペクチナーゼ製剤三共スクラーゼ及び優良糸状菌から試作した2種のナリンギナーゼ標品についてナリンギナーゼ作用を試験し若干の観察を行なつた。

(1) 酵素活性は基質ナリンギンの減少を比色的に Davis 法で測定して求めた。この場合ナリンゲニンの呈色を補正する近似式を求めこれによつて分解率を算出した。

(2) 測定条件を検討しナリンギナーゼ標品の場合基質濃度 0.0125 % ないし 0.05 %, 酵素濃度 0.05 % ないし 0.1 % の反応液で pH 4.0, 40°C 30 分ないし 60 分で活性を測定出来たが、スクラーゼの場合更に大量の酵素（終濃度 2.5 %）と長い反応時間（2 ないし 3 時間）とを要した。

(3) 反応の最適 pH は何れも pH 4.0 付近にあり pH 7.5 よりアルカリ側では殆ど反応しなかつた。

(4) 反応の最適温度は何れも pH 4.0 で 50°C 付近に認められたがナリンギナーゼ製剤のものは 60°C でも殆ど同じ程度の作用力を示し 70°C で急激に活性

を低下した。一方スクラーゼ標品の酵素は 40°C でも 50°C のものに近く強く作用したが 60°C ではかなり弱かった。

(5) 酵素は何れも pH 4 ないし 8 で安定であつたがその安定の範囲は酵素標品によつて若干異なつた。しかし pH 2 付近より酸性側及び pH 9 付近よりアルカリ側ではかなり顕著に失活した。

(6) 酵素活性は何れも 50°C で安定であるが 60°C 30 分では半減、70°C では殆ど完全に失活した。

(7) 酵素のアルカリ耐性に対する温度の影響を更に詳細に検討した。一般にアルカリ性での酵素の安定性は温度によつても影響され温度が高い程活性を低下した。又或る温度以上では酵素の安定域も狭くなつた。

(8) 酵素のアルカリによる失活は時間によつても影響されるが比較的速やかに進行した。この場合アルカリ処理の初期に比較的安定な時期が認められた。

(9) 数種の糖類による反応の阻害度を測定したが、葡萄糖が最も顕著な阻害効果を示し果糖も比較的に強

く阻害した。これに対してソルビトールの阻害作用はかなり低かつた。

文 献

- 1) Davis, W. B., 1947. Anal. Chem., 19, 476.
- 2) 岸 清, 1955. 科学と工業, 29, 140.
- 3) 岸 清, 1957. 科学と工業, 31, 329.
- 4) 岸 清, 1958. 科学と工業, 32, 389.
- 5) 岸 清, 1959. 科学と工業, 33, 185.
- 6) 野村男次, 1961. 私信.
- 7) 中林敏郎, 1961. 缶詰時報, 40 (7), 1.
- 8) 岡田茂孝, 岸 清, 福本寿一郎, 1962. 酵素化学シンポジウム (福岡) 予講集, p. 10.
- 9) 滝口 洋, 1961. 日本農芸化学会関東支部第 212 回講演.
- 10) 滝口 洋, 1962. 日本農芸化学会 1962 年大会講演.
- 11) Ting, S. V., 1958. Agr. Food Chem., 6, 546.

Summary

Naringin (naringenin-7-rhamnoglucoside), a bitter substance in some kinds of citrus fruits such as *C. Natsudaoidae* and grapefruit, can be hydrolysed by the action of naringinase, resulting in loss of bitterness. It was already reported that some commercial pectinase preparations contain naringinase too. Recently, a few excellent strains of molds, which produce naringinase of high activity, were selected and isolated by several Japanese authors and trial preparations of enzyme were prepared by them.

In order to obtain the fundamental basis for employing the enzyme preparation to agricultural manufacture, naringinase was examined using a typical Japanese commercial pectinase preparation, "Sankyo Sucrase" from *Sclerotinia libertiana* as well as two kinds of trial naringinase preparations, A from *Asp. niger* and B from *Asp. usami* mut. *shirousamii*.

Naringinase activity of preparations was estimated by determining decrease of naringin and expressed with the rate of its decomposition. Determination of naringin was carried out colorimetrically by Davis's method using a Hitachi electric colorimeter, type EPO-A, with blue filter or a Hitachi spectrophotometer, type EPU-2, at 420 m μ . Since the reaction product, naringenin, also develops the similar yellow color by the Davis's reagents, coloration of the reaction mixture must be corrected for naringenin to calculate the degree of naringin decomposition by means of the equation of approximation.

It was found that "Sucrase" contains naringinase activity even though it was less active than that in the naringinase preparations. Then the conditions for estimating the activity of three enzyme preparations cited above were discussed. The final concentration of naringinase preparations A and B in the reaction mixture was suitable from 0.05% to 0.10% and that of substrate, naringin, from 0.0125% to 0.05%, when the reaction was performed at 40°C and pH 4.0 for 30 to 60 min. However, since the naringinase activity of the pectinase preparation is much less than that of the naringinase preparations, concentration of enzyme must be at least from 2.5% to 5.0% and reaction time from 120 to 180 min. Under these conditions, decomposition of naringin by enzyme was directly proportional to reaction time as shown in Fig. 2.

Naringinase of the preparation A was already reported to hydrolyse naringin most actively between pH 4.0 and 4.5. Similarly, naringinase of the preparation B and "Sucrase" was reactive between pH 4.0 and 5.0. However, activity was gradually reduced over pH 5.0 and below

pH 4.0, as indicated in Fig. 3.

It had been also reported that optimum temperature of naringinase of the preparation A was from 40°C to 45°C. However, Fig. 4 showed that naringinase of the preparation B decomposed naringin most actively at 50°C to 60°C but not at 70°C. On the contrary, "Sucrase" exhibited the maximum activity at 50°C and rather pretty high activity at 40°C too, but very low at 60°C.

Activity of the preparation A was also established to be stable from pH 4.0 to 6.0, upper limit tested, but inactivated almost completely below pH 1.7. From Fig. 5, it was indicated that activity of the preparation B was stable between pH 2.9 and about 7.0, decreased a little from pH 8.0 to 9.0 and inactivated at pH 10.0 at room temperature (20°C to 25°C). Stable pH range of naringinase of "Sucrase" was a little narrower, with lower limit at pH 3.5, than that of the preparation B and activity was inactivated at pH 2.2. Whereas activity of the preparation A was stable at pH 8.0 while that was fallen to about 50% at pH 9.0 and to about 25% at pH 10.0.

Of course naringinase activity of all three preparations was similarly diminished by heating. As obvious from Fig. 6, activity was retained at 40°C and 50°C but reduced to below 50% at 60°C for 30 min., while that was inactivated at 70°C.

Stability of naringinase at various pHs was varied with treating temperature and time. For example, Fig. 7 showed that naringinase of preparation B was fairly stable until pH 9 and inactivated sharply over pH 9 at 20°C, whereas that was stable until pH 8 but reduced to about 25% of original activity at pH 8.8 at 30°C. Similar phenomena were also indicated in Fig. 8 in more detail at 5°C, 20°C, 30°C and 37°C concerning the preparation A.

Fig. 9 showed that inactivation of naringinase in alkaline media proceeded in short time. At pH 10.0, naringinase activity was diminished within 120 min. even at 10°C. However, at pH 9.0, activity was retained during first 120 min., but falling of activity was carried out for successive 120 min. Of course lowering of activity did not take place at pH 7.0 and 8.0 within 4 hrs. even at 30°C and 37°C as pointed out in Fig. 10.

Rhamnose and glucose were formed from naringin by molt's naringinase and enzymatic reaction was strongly retarded by these sugars. Such sugar inhibition disturbs the employment of the naringinase in agricultural manufacture, since sugar was preferentially used. Therefore, fructose, glucose, sucrose and sorbitol were also examined. As shown in Table 1, all sugars tested inhibited remarkably the reaction, but sorbitol had the most least inhibiting ability.