

ナリンギナーゼ製剤のペクチン分解酵素

大村, 浩久
九州大学農学部

近野, 孝英
日本ビール株式会社

波多野, 昌二
九州大学農学部

山藤, 一雄
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21632>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 20 (4), pp.309-319, 1963-09. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



ナリンギナーゼ製剤のペクチン分解酵素

大村 浩久, 近野 孝英*

波多野 昌二, 山藤 一雄

On the pectic enzyme in naringinase preparations

H. Omura, T. Chikano, S. Hatano
and K. Yamafuji

前報¹⁾で述べたように近年数種のナリンギナーゼ製剤が調製され夏ミカンの苦味除去が可能になり、これに伴って夏ミカンの加工面への利用の増加が大きく期待されるようになった。これ等の酵素製剤は何れも *Asp. niger*,²⁾ *Asp. usamii* mut. *shisousamii*^{3,4)} 等の糸状菌から生産されるものであつて優良菌株の分離、培養及び酵素生産条件の検討、酵素製剤の調製法の改良等から更には酵素化学的諸性質や反応機構⁵⁾等についても詳細に研究されている。

他方これを夏ミカンの加工に利用する実用上の面についても検討が始められたが現状では尚解決されなければならない問題点も若干残っている。その一つは我々が入手し得る酵素製剤は試作された粗製品であるので他の酵素活性も含み特に強いペクチン分解酵素が共存していることである。これは特にナリンギナーゼを罐詰の製造や非透明果汁の生産に利用する場合果肉を軟化して品質を低下させ、或は果汁の清澄化を来す等実用上の大きな隘路となつている。従つて特殊の場合を除き一般にナリンギナーゼ製品としてはペクチナーゼを殆ど含まないことが望ましい。そのためには (1) ペクチナーゼを作らず強力なナリンギナーゼだけを生産する優良菌株の分離若しくは培養を条件改良すること、(2) 酵素を精製してペクチナーゼとナリンギナーゼとを完全に分離すること、(3) ペクチナーゼだけを失活又は阻害する適切な処理、添加剤或は反応条件等を見出すこと等の手段が考えられる。(1) についてはペクチナーゼを殆ど産生しない優良菌株が中林氏²⁾により報告され、これから製造された酵素製剤も近い将来に市販されるものと期待されるが我々の場合研究室の現状では菌株の分離は勿論培養条件の改良等に関する研究も難かしい。(2) についての可能性も勿論認め

られ岡田氏等⁶⁾はナリンギナーゼを既に結晶にまで精製しているが、実用的には酵素製剤の価格の上昇を招くために望ましいものとは考えられない。これに対して (3) の方法は別に甚だ強力なペクチナーゼ製剤が現在市販されているのでナリンギナーゼ中のペクチナーゼの回収は無駄である点からも先ず検討すべきものであると思われる。この場合酵素は食品に処理されるので阻害剤の使用は特に慎重でなければならないし、又種々の処理も (2) の場合と同様に経済性を無視することは許されない。このように我々の現状及び実用上の面から研究に際しては極めて多くの制約があるので当面の問題としては改善のものとしてナリンギナーゼに対するペクチナーゼの相対的な活性を低下させることを取敢ずの目標としなければならない。このような目的で研究を進めるに際しては酵素製剤に含まれているペクチン分解酵素の性質を先づ知ることが必要であり、ナリンギナーゼとの比較検討から初めて解決の手掛りが得られるものであるがこれについては全く知られていない。従つて種々の方法を検討するに先立つて標品中のペクチン分解酵素の一般性質について試験した。

実 験

酵 素

前報¹⁾に用いたと同じナリンギナーゼ製剤を用いた。即ち 1961 年 4 月試製した *Asp. niger* からの標品 A と 1962 年 1 月 *Asp. usamii* mut. *shisousamii* から調製した標品 B であるが試料の関係で試験は主として A について行ない重要な点については標品 B でも比較した。

酵素液も前報のものと同様にして調製した。従つて酵素濃度は多くの不溶物（濾過助剤等）を含む酵素製剤の % 濃度であつて酵素だけの濃度は実質的にはこれ

* 現勤務先：日本ビール株式会社

より遙かに低いものである。

基 質

ペクチン：市販品（柑橘ペクチン）をそのまま使用した。通常 1 ないし 2 % に水又は 0.1 M McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0 ~ 4.2) に懸濁し一晩放置して溶解した。

ペクチン酸：朝井氏等¹⁾の記載に従い次のようにして調製した。市販ペクチンを 100 倍量の 0.1 N NaOH に攪拌加温 (40 ~ 50°C) しながら少量宛加えて完全に溶かす。(この場合乳鉢で少量宛磨砕しながら溶かすと比較的効率がよいが必ずしも必要ではない)。次に HCl で酸性にすると白色ゲル状のペクチン酸が沈澱する。3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して沈澱を集め更にこれを吸引濾過し最後にアルコール、エーテルの順に洗滌しデシケーター中で減圧下に乾燥する。得られた白色粉末はペクチン同様に水又は緩衝液に溶かして基質溶液とした。

酵素活性の測定

ペクチン分解酵素としてはペクチンの 1,4-グルコシド結合の切断に関与するポリガラクトウロナーゼ (PG, ペクチナーゼ) 及びペクチンのメチルエステルを水解するペクチンメチルエステラーゼ (PE 又は PM, ペクターゼ) に大別されるが詳細については未解決の問題が多い。ここでは罐詰や果汁製造等に利用する立場から PG だけに限定したがこれは厳密にはペクチン酸を基質とするものである。しかし実用上からはペクチンを基質とする活性を測定することも必要であると考えられる。ただこの場合酵素標品中には PE も共存し、PG の作用に先行して脱メチルが行われるし、更にミカンの脱囊には酸及びアルカリ処理を行なうので基質としてはペクチン酸だけについて行なっても差支えないようである。活性の測定法としては代表的な次の 2 つの方法を用いた。²⁾

粘度法：ペクチン或はペクチン酸溶液は非常に粘稠であるがその 1, 4 結合が切断されるとこれに伴って粘度が急激に低下する。

基質及び緩衝液混液 4 ml を Ostwald 粘度計に入れ恒温槽に保つ。所定の温度に達した後同じ温度に予め加温した酵素液 1 ml を添加して反応させる。一定時間後の反応液の粘度の減少度を測定し酵素力 A を次式により求めた。

$$A = \frac{T_0 - T_t}{T_0 - T_w} \times 100$$

T_0 ：基質 4 ml + 加熱酵素 1 ml の落下時間、秒

(又は反応時間 0 の落下時間、秒)

T_t ：基質 4 ml + 活性酵素 1 ml の反応時間 t 後の落下時間、秒

T_w ：H₂O (又は緩衝液) 5 ml の落下時間、秒

この場合 A は基質の分解率を意味する。

この粘度法は実用上の意義を示すものと思われるが顕著な欠点があり基質溶液の粘度は酵素作用がなくても低下する。即ち加熱酵素液又はその代りに水を加えた場合にも時間の経過とともに反応液の粘度が低下し作用力を求める正確な基準 T_0 の値を得ることは出来ない。そのため本実験では T_0 は加熱酵素を添加して 5 分後に測定した値を採つた。反応温度、時間等についてはその都度記載する。

還元基測定法：粘度法は特に多数の試料を測定するのには適しないので還元基の増加を測定する方法も屢々利用される。これはペクチン又はペクテン酸が酵素により分解されて生じた生成物のアルデヒド末端を測定する方法であつて Willstätter-Schudel の変法が用いられる。

我々もこれに従い次のようにして測定した。基質 (ペクチン酸又はペクチン) 溶液及び 0.1 M McIlvaine 緩衝液の混液に酵素液を加え一定温度で反応させる。所定の時間後にその 5 ml を採り 1 ml 1 M Na₂CO₃ に添加して反応を停止させる。次に 0.1 N ヨード・ヨードカリ溶液 5 ml を加えて混合しゴム栓で密栓して正確に 20 分間室温に放置した後 2 M H₂SO₄ 2 ml を加えて酸性とし残存するヨードを 0.1 M Na₂S₂O₃ で滴定した。消費されたヨードの mg 当量は遊離のガラクトウロン酸 0.51 mg 当量に相当する。酵素液ないし基質溶液によつてもヨードは消費されるので盲験として反応開始後直ちにその 5 ml を採り同様にヨードの量を測定しヨード消費の基準とした。作用条件については同じくその都度記載する。

結 果

酵素製剤中のペクチナーゼ活性

酵素標品に含まれる概略の活性を知り実験に適した酵素濃度を求めるために粘度法及び還元法を試みた。

粘度法：酵素標品 A についてのみ測定した。酵素を 1 % 及び 0.1 % になるように pH 4.2 の 0.1 M McIlvaine 緩衝液に溶かし 6,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離しその上澄を酵素液とした。基質は 2 % ペクチン又はペクチン酸溶液 (pH 4.2 の McIlvaine 緩衝液に溶かす) としその 4 ml に酵素液 1 ml を加え 30°C の

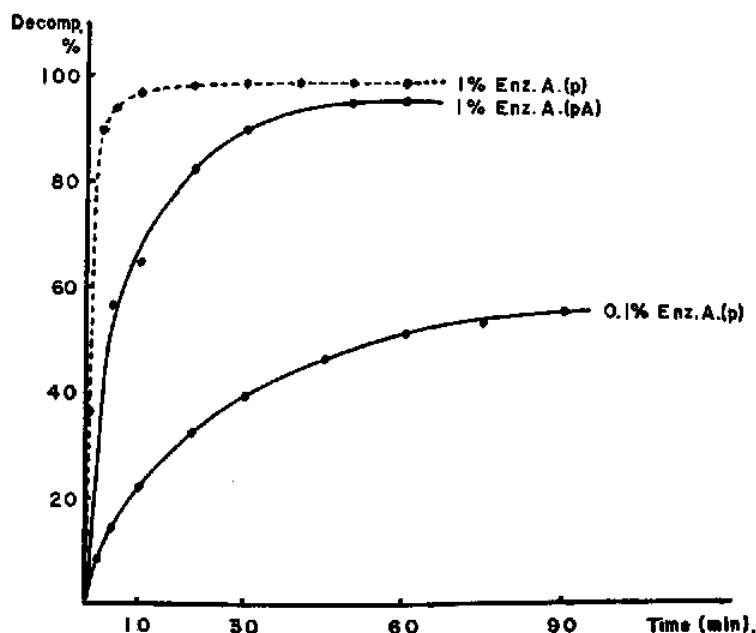


Fig. 1. Pectinase activity (Viscosity method).

Reaction mixture:

2% pectin (P) or pectic acid (PA) solution (in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.2)

4 ml and 1% or 0.1% enzyme solution (in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.2) 1 ml.

Reaction temperature: 30°C

Table 1. Estimation of viscosity of reaction mixtures.

Substrate	T ₀	T ₅	T ₁₀	T ₂₀	T ₃₀	T ₅₀	T ₆₀	T _w
Pectin	1021.7	93.4	74.5	60.0	54.2	49.6	48.3	40.6
Pectic acid	151.3	97.7	81.6	61.2	51.6	46.0	45.6	40.6

恒温槽中で反応させ反応液の粘度を経時的に測定して基質の分解率を求め第1図に示した。

1%酵素液を使用した場合は作用は極めて速やかに進行し粘度は急激に低下した。その分解率は特にペクチンを基質とした場合に顕著であつて酵素液添加後2分で既に約90%の分解が起こり10分では反応は概ね終つた。ペクチン酸の場合でも5分で50%、30分で90%の分解が認められ何れにしても酵素作用の測定にはやや強過ぎると思われた。この点 0.1%酵素液では反応は比較的に温和に進行し使用量としては適当であると思われる。唯この場合基質の種類によつて活性に非常に差があるように観察されるが反応液の粘度はペクチンの場合ペクチン酸を用いたときよりも著しく高いにも拘らず20分後にはほぼ同じ程度にまで低下したことは第1表に示す通りである。

還元基測定法：1%ペクチン又はペクチン酸溶液40 mlと酵素液10 mlとを混合し30°Cで作用させ経時的に5 ml宛採り還元基の生成量を求め第2図に示した。

ここで還元基測定法の場合には0.1%酵素液を使用しては活性の測定には十分でなく1%酵素液を用いることが望ましいと思われる。更に酵素の作用はペクチン酸に対して強くペクチンに対しては若干の還元基を生成するに過ぎず1%酵素液でもペクチン酸に0.1%酵素液を作用させた程度であつた。これ等の現象は全く粘度法の場合と逆であつた。又ペクチン酸に対する酵素の活性はナリンギナーゼAに於てBのものよりも強いことが認められたがペクチンに対する作用はほぼ同じ程度であつた。

最適 pH

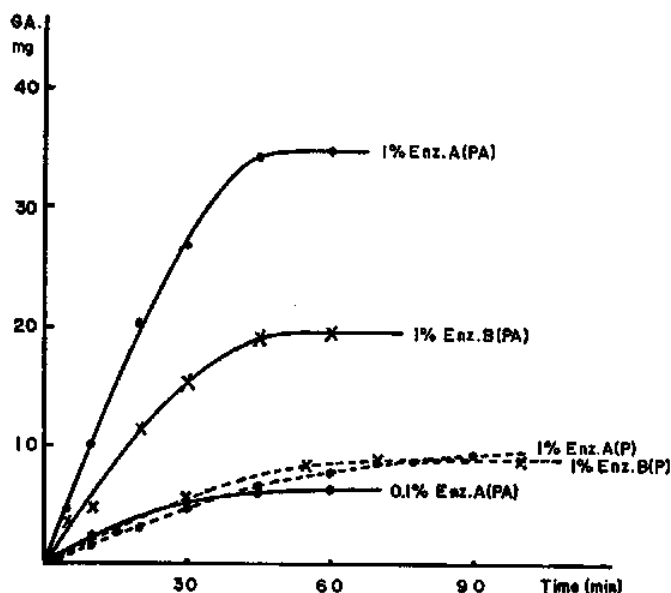


Fig. 2. Pectinase activity (Iodometry).

Reaction mixture:
1% pectin (P) or pectic acid (PA) 40 ml and 1% or
0.1% enzyme solution 10 ml.
Reaction temperature: 30°C.

両酵素標品ともかなり強いペクチン分解力を持つことが明らかになったのでその一般的性質を検討することとし先ず pH の影響を試験した。

粘度法：前項同様標品 A についてのみ試験した。pH の影響を試験するため酵素は緩衝液の代りに水で抽出、同じく 6,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離しその上澄液を用いた。粘度法では第 1 図に示したようにペクチンを基質としたときはペクチン酸の場合より粘度の低下が顕著であるので前者に対しては 0.25%，後者に対しては 1% 酵素液を使用した。又基質溶液そのものの粘度もペクチン溶液の方が高いので、0.5% ペクチン又は 1% ペクチン酸溶液を用いることとし、それぞれ 1% 又は 2% 水溶液 2 ml と種々の pH の McIlvaine 緩衝液 2 ml とを混合して基質溶液とした。これに酵素水溶液 1 ml を加え 30°C で 5 分ないし 15 分間反応させて粘度の低下を測定し分解率を求め第 3 図に示した。尚この場合 T_0 は加熱酵素を用いた反応系に於て混合 5 分後の値を採った。

還元基測定法：2% ペクチン又はペクチン酸水溶液を種々の pH の McIlvaine 緩衝液と当量宛混合し基質溶液とした。その 40 ml に酵素水溶液 10 ml を加えて反応させ 5 ml 宛について還元基の生成量を測定した。酵素標品の活性が異なるので標品 A では 0.5%，B では 1% 水溶液を用い 30°C で反応させた。更に基質によって還元基の生成量も異なるので標品 A は 2 種の基質について試験した。この場合ペクチンに対しては 90 分、ペクチン酸に対しては 60 分作用させ、一方標品 B はペクチン酸に対してのみ 40 分反応させた。これ等の結果を第 4 図に示した。

第 3、第 4 図から明らかなようにに反応の最適 pH は 4.2 付近にあることが粘度法、還元基測定法のどちらでも認められ又 pH 3 以下及び pH 6 付近よりアルカリ側では作用力は急激に低下した。このような反

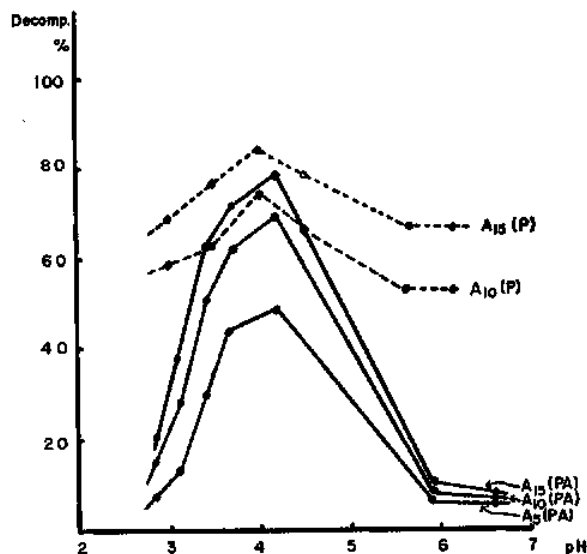


Fig. 3. Effect of pH (Viscosity method).

Reaction mixture:
0.5% pectin (P) 4 ml and 0.25% enzyme 1 ml or
1% pectic acid (PA) 4 ml and 1% enzyme 1 ml
Reaction temperature: 30°C

A₁₅ means enzyme A and reaction time 15 min.

応の pH 特性は両標品ともに認められるがナリンギナーゼ B のものが A よりもやや広い作用域を示すようである。

最適温度

還元基測定法でのみ試験した。2%ペクチン又はペクチン酸溶液 4 ml と pH 4 の McIlvaine 緩衝液 4 ml とを混合して基質とし、同じく緩衝液で抽出した 1% 酵素液 2 ml を添加して反応液とし直ちに 5 ml を採って盲験値とした。残りの 5 ml について種々の温度で反応させた後還元基の生成量を測定した。たびたび述べたように基質によって還元基の生成量が異なるのでペクチンに対し 60 分、ペクチン酸に対しては 30 分反応させた結果を第 5 図に示した。

A 酵素標品の場合ペクチンに対しては 35°C で最も活性が高く温度の上昇又は低下に伴って還元基の生成量は徐々に減少した。ペクチン酸を基質にした場合には 40°C に最適温度が認められるがその範囲は広く 35°C 付近から 50°C 付近までは最適温度のものに近い活性を示し 60°C では急激に活性を低下した。これに対して 35°C 以下の低温側では相当量の還元基を生成した。一方標品 B の

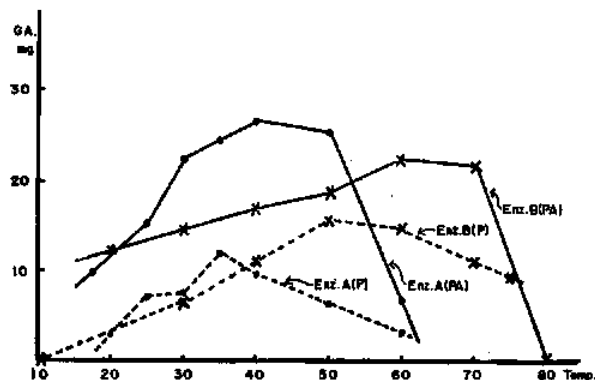


Fig. 5. Effect of reaction temperature (Iodometry).

Reaction mixture:
2% pectin (P) or pectic acid (PA) 4 ml, 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.0 4 ml and 1% enzyme 2 ml.
Reaction time:
60 min. to pectin; 30 min. to pectic acid.

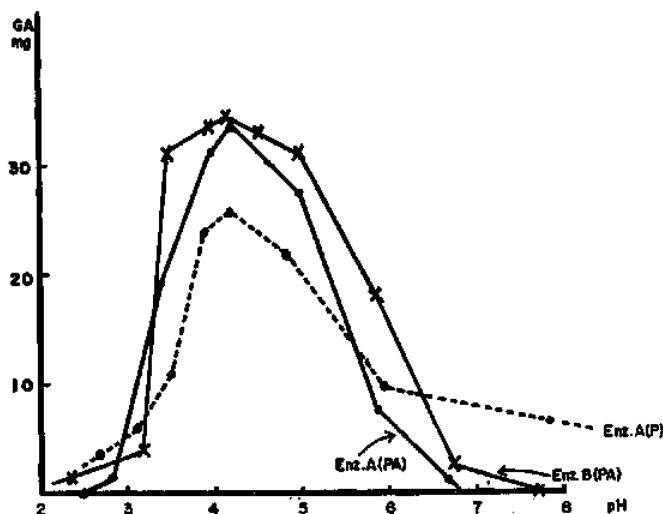


Fig. 4. Effect of pH (Iodometry).

Reaction mixture:
2% pectin (P) or pectic acid (PA) 20 ml, 0.1 M McIlvaine buffer 20 ml and 0.5% enzyme A or 1% enzyme B 10 ml.
Reaction temperature: 30°C
Reaction time:
Enz. A (P) 90 min.; Enz. A (PA) 60 min.; Enz. B (PA) 40 min.

最適温度は A のものよりも高くペクチンに対しては 50°C、ペクチン酸に対しては 60°C であった。更に後者に対しては 70°C でも顕著な活性が認められペクチンにも勿論かなりの活性で酵素は作用した。尚酵素液或は基質を除いた反応液についても同様に種々の温度で盲験を行なつたが還元力の増加は殆ど認められなかった。

耐熱性

酵素活性は勿論温度処理により活性を失う。1%酵素液 (pH 4) を種々の温度の熱水に浸漬し経時的に 1 ml を採り出し 1%ペクチン酸溶液 4 ml に加え 30°C 30 分間で生成する還元基の量を測定した。尚対照として温度処理を行わない酵素液について同一条件で活性を測定して比較の基準とした。この温度処理による活性低下を第 6 図に示した。

A 標品に含まれるペクチナーゼは温度に対して抵抗性は弱く 70°C 5 分で 90%, 10 分では完全に活性を失った。又 60°C でも 10 分間加熱で約 85% の失活が起つたが 30 分間処理しても尚若干の活性を残した。50°C でも

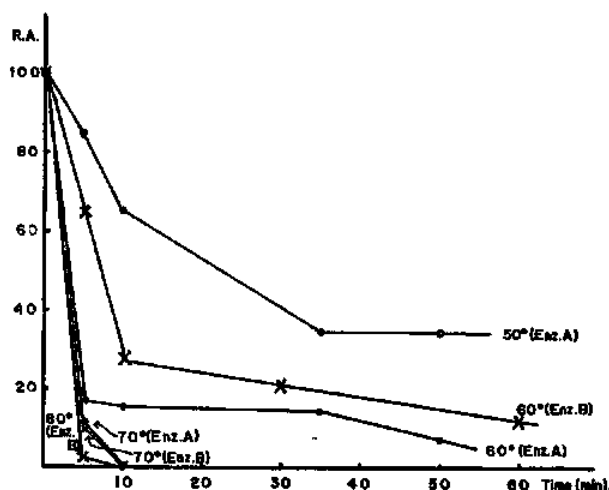


Fig. 6. Stability of enzyme against to heating.

Reaction mixture:

1% enzyme, pH 4.0 (heated at various temperature for various time) 1 ml and 1% pectic acid, pH 4.0, 4 ml

Reaction temperature: 30°C

Reaction time: 30 min.

Relative activity (R.A.) was expressed by comparing the activity of the treated enzyme to that of the enzyme without treatment.

多少の活性低下が認められ 30 分で力価は半減したが更に長時間加熱してもそれ以上に活性は低下しなかつた。これに対して反応最適温度の高い標品Bの酵素はA標品のペクチナーゼよりも強い温度耐性を持つものと推定されたが 70°C ではA標品の場合と同様に失活した。しかし 60°C では若干耐性が高く 10 分加熱して約 70%, 30 分では 80% の活性を失った。従つて第5図の反応温度特性と比較するとき、高温部では反応の初期に於ても酵素の活性はかなり低下するにも拘らず相当顕著な還元基の生成が認められているので、ごく短時間の反応では低温域での活性に対する高温域の活性の比は更に高いことが推定される。このことは特に短時間加熱殺菌処理を行う罐詰製造に於て重要な事項である。

pH 耐性

最後に種々の pH での酵素の安定性を試験した。A標品 5% 水溶液 1 ml に種々の pH の McIlvaine 緩衝液 (NaOH 又は HCl で所定の pH 値に正しく補正) 3 ml を加え室温 (15°C) に一晩放置した。1 N NaOH 又

は HCl で pH を 4 に戻した後 pH 4 の緩衝液で 10 ml にした。このようにして各 pH で処理した 0.5% 酵素液が得られたのでその各々 1 ml を 1% ペクチン酸 4 ml に加え 30°C 60 分で生じた還元基の量を測定した。第7図の結果はナリンギナーゼ製剤Aに含まれているペクチン分解酵素力は概略 pH 2.5 ないし 6 の間で安定であつて pH 1.5 以下及び pH 7 以上では相当著しい失活が起こつた。特に中性以上で酵素が活性を失うことは標品Bのものと同様であつて 30°C に 18 時間処理した後Aの場合と同一条件で測定し同じく第7図に示した結果からも明らかである。

これはナリンギナーゼと異なる重要な特性であつて最適 pH、最適温度及び耐熱性は極めてよく似ているが pH 8 ないし 9 付近まで安定であるナリンギナーゼのものよりも pH 耐性は低い。このことは我々の研究目的に極めて好都合であつてペクチナーゼを回収利用しない限りに於てこの pH 耐性の差を利用してナリンギナーゼ標品中のペクチナーゼ活性を除去することは可能であると思われるので更

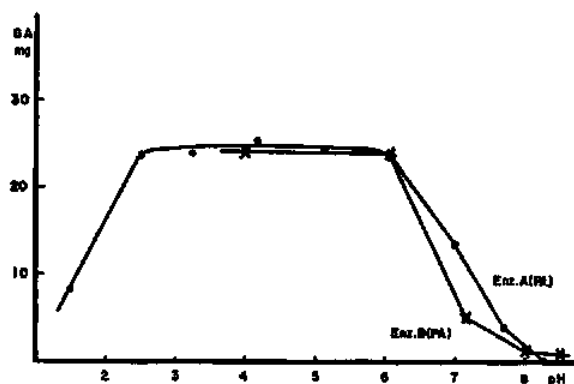


Fig. 7. Stability of enzyme at various pHs.

Treatment of enzyme:

5% enzyme 1 ml was mixed with 3 ml of 0.1 M McIlvaine buffer (at various pH adjusted with NaOH or HCl) and the mixtures were kept at room temperature overnight (Enz. A) or at 30°C for 18 hrs (Enz. B). Then pH of the mixtures was adjusted to 4.0 with HCl or NaOH and made up to 10 ml of final volume with 0.1 M McIlvaine buffer of pH 4.0.

Reaction mixture:

enzyme solution obtained as above 1 ml and 1% pectic acid 4 ml

Activity was estimated by iodometry after 60 min. at 30°C.

に詳細に主として標品Aについて検討した。

還元基の生成量はペクチン酸を基質とした場合とペクチンの場合とではかなり異なるのでアルカリ処理の影響を改めて試験した。pH 処理は既述の方法に準じ 22°C に 20 時間行ない活性はペクチン酸に対し 60 分、ペクチンに対しては 90 分作用させて測定した。第 8 図に示すようにペクチン酸に対する活性は pH 7 で半減、pH 8 で約 90% を失った。これに対してペクチンを基質とした場合中性付近でも比較的安定であり pH 8 でも相当量の活性が残ったがこれを越すと急激に活性を失った。しかし還元基の生成量はペクチン酸の場合よりも著しく低く無処理酵素でもペクチン酸に対するものの 25% 程度に過ぎない。

種々の pH での酵素の安定性は温度にも影響される。上記のように調製した各 pH での酵素液をそれぞれの温度に 20 時間放置し残存活性をペクチン酸に対し測定した。第 9 図から酵素の pH 耐性は温度が高い程低いことが明らかに認められる。即ち 5°C では pH 8 迄は変化なく 8.5 で 35%、9.5 で 70% の

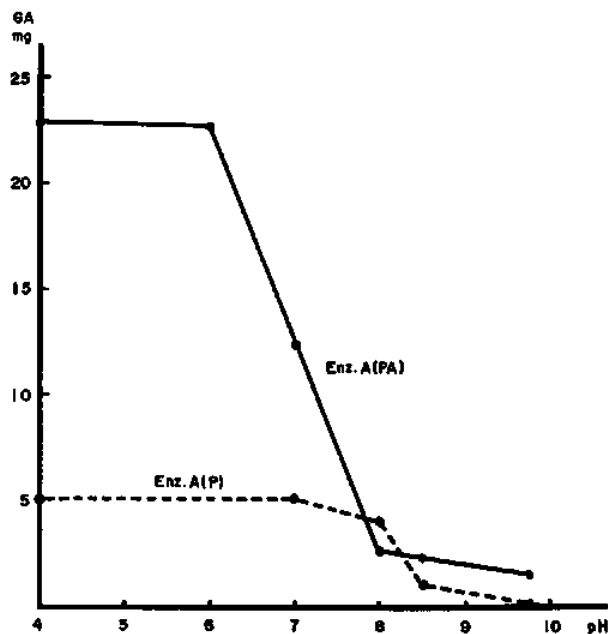


Fig. 8. Activity of enzyme treated at various pHs.

Treatment of enzyme:

same as in Fig. 7 but at 22°C for 20 hrs.

Activity was estimated by iodometry at 30°C for 60 min. (PA) or 90 min. (P).

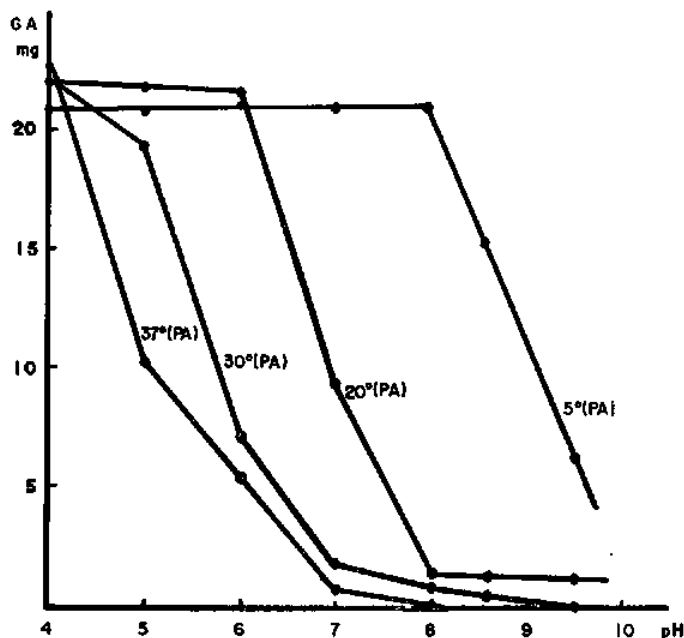


Fig. 9. Effect of temperature on pH stability of enzyme.

Treatment of enzyme: same as in Fig. 7 but at various temperature indicated for 20 hrs.

Activity was estimated by the same procedure as in Fig. 8.

活性を失った。20°C では pH 6 迄は安定であり 7 では 60%、8 では 95% の失活が起つた。これに対して 30°C では pH 6 でもかなり不安定であつて 30% の活性が残るに過ぎず pH 7 では 10% 以下に低下した。勿論更に温度の高い 37°C では pH 5 でも 60%、6 で 80% の活性低下が認められ中性点では殆ど完全に活性を失った。しかし何れにしても pH 4 では安定であつて活性の低下は殆ど起らなかった。酵素の pH 耐性に影響する他の因子は勿論時間であるので室温で経時的に活性の変化を追及し第 10 図に示した。この場合活性はペクチン酸のほかペクチンに対しても測定した。ペクチン酸に対する場合一般にアルカリ側になる程失活現象が速やかに起ることが明瞭であるが中性よりアルカリ

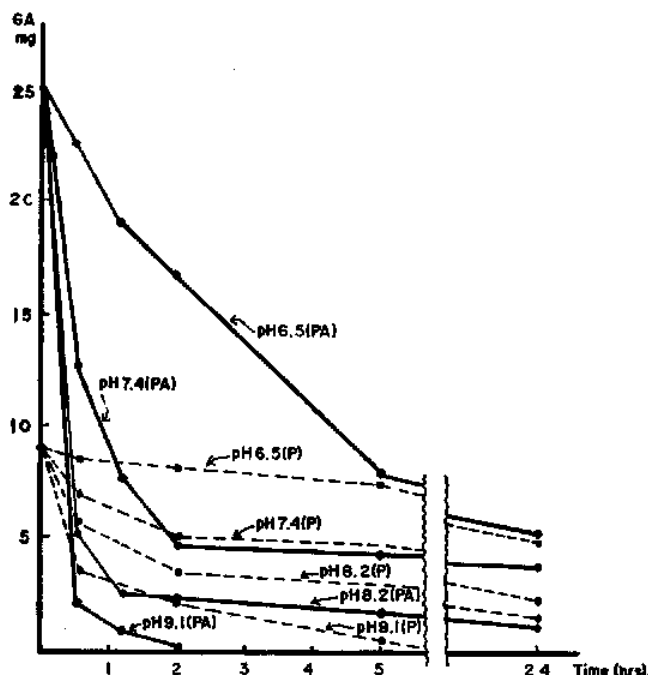


Fig. 10. Effect of treating time on pH stability of enzyme at room temperature.

Treatment of enzyme: same as in Fig. 7

Estimation of activity: same as in Fig. 8.

側では2時間で失われるべき活性の大部分が消失しそれ以後は僅かに活性低下が進行するに過ぎない。pH 6.5 は酵素の水抽出液であるがこの場合もかなりの失活は免れなかつた。しかしその程度は勿論緩慢であつて約 70% を失つた5時間迄は時間の経過とともに活性が低下した。何れにしても2時間ないし5時間で失活作用は終了するものと考えられる。これに対してペクチンに対するものは何れの pH でも活性の低下度が低いことは既に第8図でも示したが短時間の場合でも同様である。しかしその低下度はペクチン酸の場合と同様に約2時間迄はそれ以後のものよりも著しい。何れにしても度々述べたようにペクチンに対する活性そのものがペクチン酸に対するものよりも極めて低いので酵素の耐性が高いといつても殆ど問題ではない。

考 察

本報から明らかなように試験したナリンギナーゼ標品はかなり強いペクチン分解酵素を含んでいる。しかもこの酵素はナリンギナーゼと同様に最適 pH 4.2, pH 3.5 ないし pH 5 の酸性域でかなり強く作用し、又 50°C を中心とする比較的高温に適温を持つてい

る。これ等は両酵素がかなり緊密なものであることを示唆するようであり更に市販のペクチン分解酵素製剤がナリンギナーゼ活性を含むことにも相通じるものがあるようにも思われる。

しかし厳密にはかなり顕著な相違が認められる。反応は確かに同様の酸性域で強く行なわれるがペクチナーゼは pH 3 では殆ど作用せず又 pH 6 でも著しく作用力を低下するがナリンギナーゼ作用は保持されている。又ナリンギナーゼ作用は 50°C ないし 60°C で強く作用し 70°C では急激に低下するが同じ標品のペクチナーゼは 70°C まで強い活性を示し以後急速に反応力を失う。このような反応特性に見られる差異以上に酵素そのものの性質は互に異なっている。即ちナリンギナーゼは 50°C では安定であり 60°C 30 分で半減、70°C では完全に失活するが、ペクチナーゼは更に不安定であつて 50°C

で 60%, 60°C で 80% の活性を失い 70°C では既に 10 分で完全な失活が起こる。又種々の pH での安定性にしても特にアルカリ側で弱く中性点でもかなり顕著な活性の低下が認められる。このような事実は酵素蛋白特に活性発現に関与する部分が明瞭に異なることを示すものであつて酵素産生に於ても両者は必ずしも密接な関係を持つものとは考えられない。中林氏⁴⁾は既にペクチナーゼを含まずナリンギナーゼだけを産生する優良な菌株の分離に成功している。特にペクチナーゼの安定性がナリンギナーゼのものより低いことは実用上にも好都合であつて、最初に述べたようにナリンギナーゼに対するペクチナーゼの活性を低下させる可能性を与えるものである。即ち 50°C 処理又はアルカリ耐性の差を利用すればこのことを達成出来ると思われる。このうち前者はかなり危険も伴いしかもペクチナーゼを完全に失活させる条件でもないのでアルカリ処理の方が望ましいように考えられるが詳細な条件については更に検討しなければならない。酵素のアルカリ耐性に関する若干の追加実験からナリンギナーゼの場合と同様に安定性は温度にも支配されその安定な限界は温度が高い程狭くなる事実も認められた。又その失

活もかなり急速に進行し2時間ないし5時間で終了することもナリンギナーゼと同様であるが初期の比較的安定な部分は全く認められなかった。

供試標品A及びBのナリンギナーゼについては反応温度以外には顕著な差異は殆ど認められなかったが、これはペクチナーゼでも同様であつた。標品Bのペクチン分解酵素が標品Aのものよりも高い温度で作用し得ることは第5図より明らかであつてこの点に関する限りナリンギナーゼの場合と一致する。しかし耐熱性、或はアルカリ耐性に関してはナリンギナーゼ以上に標品A及びBのペクチナーゼは互によく似ていることが認められた。ペクチナーゼがナリンギナーゼ製剤の利用に際して好ましくない影響を及ぼすので酵素製剤としてはペクチナーゼ活性の弱い方が望ましいのは当然である。この点標品A及びBのペクチナーゼ活性はそれぞれの最適条件ではほぼ同じ程度であるが、最適温度が異なるので例えば40°Cでは標品Bの活性がAのものよりも低く、一方60°Cでは逆にAのペクチン分解力はBのものに比べて著しく弱い事実等を考慮し酵素の使用条件に応じて取捨選択しなければならない。

これ等ナリンギナーゼ製剤のペクチン分解酵素の研究に関連し酵素活性そのものの測定にも若干の問題点が観察された。粘度法で酵素活性を測定するに際してはペクチンを基質にした場合はペクチン酸を用いた場合よりも反応が速やかに起こつた。しかしこの相違は反応のごく初期に起こるものであるがペクチンの粘度がペクチン酸のものよりも著しく高いことも一つの原因となつているかとも考えられる。他方基質溶液の粘度が時間とともに非酵素的に低下することも何等かの関連を持つものと思われるが更にこのことは活性測定に於ける粘度低下を比較する正確な基準の設定を困難にしこれに伴い粘度法の信頼性を減ずる。これに対して還元基の増加を測定する活性測定法はペクチン酸を基質とした場合にペクチンに対する場合よりも強く現われる。ペクチン分解酵素の研究が殆ど進んでいないので、これ等の問題点は研究の進展とともにいずれは解決されるものと思われるが、ペクチンエステラーゼの問題もこれに関係する重要な事項と推定される。何れにしても粘度法による場合と還元基定量法による場合とで望ましい基質が異なる事実は実用上の面から酵素を検討する場合測定法及び使用基質の選択に重要な問題となつてくる。更に酵素のペクチナーゼ活性と果汁の澄清化力とが必ずしも平行しない事実⁹⁾も加わつてペクチナーゼそのものについても早急に解決を要する問題点が多く残つている。

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、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

2種のナリンギナーゼ試作標品について特に実用上の立場からペクチン分解酵素活性について検討した。

(1) 供試した2種のナリンギナーゼ製剤にはペクチン分解酵素力が認められた。活性の測定条件について検討したが、粘度法の場合ペクチン、還元基定量法の場合にはペクチン酸を基質として使用する方が他を基質とするよりも活性が強く現われた。

(2) 反応の最適 pH は pH 4.0 付近にあり pH 3.5 ないし 5 の間でかなり強く作用した。しかし pH 3 以下では殆ど作用せず pH 6 以上でも反応は著しく弱かつた。

(3) 標品Aのペクチナーゼは40°Cを中心とし30°Cないし50°Cで強く作用し60°Cでは急激に低下した。一方標品Bは50°Cないし70°Cのより高温で作用し70°Cを越すと速やかに活性を失つた。

(4) 酵素の耐熱性はナリンギナーゼよりも低く、50°C 30分で40%、60°C 10分で20%に低下し70°C 10分で完全に失活した。

(5) 酵素は pH 3 ないし 6 で安定であり中性付近でもかなり活性を低下した。特にこのアルカリ性での耐性は温度によつてもかなり影響され温度が高い程失活率も大きく安定域も狭くなつた。

(6) 酵素のアルカリによる失活もナリンギナーゼ同様に時間によつて影響されるが比較的速やかに起り2時間ないし5時間で完了した。

文 献

- 1) 朝井勇宣, 斉藤日向, 1952. 農化, 26, 381.
- 2) 福本寿一郎, 1956. 酵素研究法Ⅱ, p. 163.
- 3) 岸 清, 1955. 科学と工業, 29, 140.
- 4) 中林敏郎, 1961. 缶詰時報, 40 (7), 1.
- 5) 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.
- 6) 大村浩久, 石崎勝也, 幾島 豊, 山藤一雄, 1963. 九大農芸誌, 20, 169.
- 7) 滝口 洋, 1961. 日本農芸化学会 関東支部 第212回 例会講演.
- 8) 滝口 洋, 1962. 日本農芸化学会 1962年 大会講演.
- 9) 滝口 洋, 1962. 私信.

Summary

The naringinase preparation contains pectinase activity as well as naringinase activity. When the enzyme preparation is employed to remove bitterness of some citrus fruits, pectinase brings about softening of the fruits. Therefore, prior to employing the preparation, pectinase activity contaminated must be removed or at least diminished without affecting upon the activity of naringinase. Before investigating this problem, it is necessary to examine concerning the properties of pectinase itself in the naringinase preparations.

Pectinase was estimated by determining viscosimetrically the falling of viscosity of reaction mixture or iodometrically the formation of galacturonic acid, both pectin and pectic acid being as substrate. The naringinase preparations, A and B, were the same as those studied in the preceding paper.

In the case of viscosimetry, the activity was expressed by the rate of decomposition of substrate which was derived from viscosity. Into 4 ml of 2% pectin or pectic acid in a Ostwald's viscosimeter at 30°C, 1 ml of 1% or 0.1% enzyme solution of 30°C was added and viscosity of the mixture was determined at definite intervals at 30°C. As solvent of both enzyme and substrate, 0.1 M McIlvaine's buffer of pH 4.2 was employed. Degree of decomposition of substrate was shown in Fig. 1. Substrates were depolymerized very rapidly with 1% enzyme solution, even though viscosity of pectin was reduced more quickly than that of pectic acid. At any rate, 1% solution of the preparation seemed to be too strong for the enzymatic assay. However, it was found that reaction proceeds moderately if 0.1% enzyme solution was used.

When pectinase activity was determined iodometrically, the activity was shown with the amounts of galacturonic acid formed. Reaction mixture consisted of 40 ml of 1% pectin or pectic acid and 10 ml of 1% or 0.1% enzyme solution of pH 4.2. At definite intervals at 30°C, 5 ml of reaction mixture were taken off and the amounts of galacturonic acid were estimated. As indicated in Fig. 2, much galacturonic acid were formed from pectic acid than from pectin, on the contrary to viscosimetry. It was observed that 1% enzyme solution was suitable for the estimation of pectinase activity, since very less amounts of the acid were produced by 0.1% enzyme solution in spite of using pectic acid as substrate. Furthermore, it was pointed out that the naringinase preparation A contained higher activity of pectinase than the preparation B.

Regardless of the procedure of the assay, viscosimetry or iodometry, pectinase activity of both the preparations A and B was the highest at pH 4.0 to 4.2 as indicated in Figs. 3 and 4. Reaction was very slow, however, in acidic range below pH 3.0 and in alkaline media over pH 7.0.

On the contrary, effect of temperature on the pectinase reaction of the preparation A was differ from that of the preparation B. As shown in Fig. 5, the pectinase activity of the preparation A to pectic acid had the wide reactive range from 35°C to 50°C with the peak at 40°C, while that to pectin showed the optimum temperature at 35°C. However, the optimum point of the preparation B was higher than that of the preparation A, 60°C to pectic acid or 50°C to pectin. Even at 70°C, fairly much amounts of galacturonic acid were formed from pectin as well as pectic acid.

It was assumed from their optimum temperatures that pectinase of the preparation B had more resistance to heating than that of the preparation A. In fact, as indicated in Fig. 6, higher heat resistance of the preparation B at 60°C was established, causing 70% loss for 10 min. and 80% for 30 min. On the other hand, about 85% of pectinase activity of the preparation A were lost by heating at 60°C for 5 min., but no more reduction of activity was provoked by treating of much longer time. Even at 50°C for 30 min., half an activity was diminished. However similar falling of pectinase activity was brought about in both the preparations A and B by heating at 70°C, 90% diminution for 5 min. and completely inactivation for 10 min.

Pectinase was less stable than naringinase in alkaline range, and it is the most remarkable difference among the properties of pectinase and naringinase. The results in Fig. 7 indicated that pectinase in the preparation A is stable between pH 2.5 and 6.0, but inactivated below pH 1.5 and over pH 7.0. Similar reduction of the activity of the preparation B in alkaline media was also took place. However, alkaline inactivation was rather different between the activities to pectin and that to pectic acid as shown in Fig. 8.

Stability of pectinase at various pHs was also influenced with temperature as in the case of

naringinase. Similar to naringinase, stability was much lower at higher temperature. Fig. 9 is an example. At 5°C for 20 hrs., decrease of the activity was not observed until pH 8.0 but 35 % loss at pH 8.5 and 70 % at pH 9.5. At 20°C, 60 % lowering of pectinase activity was brought about at pH 7.0 and 95 % at pH 8.0, while that was stable at pH 6.0. On the other hand, pectinase was instable at pH 6.0, retaining only 30 % of its activity and 10 % at pH 7.0, at 30°C. Of course, pectinase was the most instable at 37°C and reduction of 60 % at pH 5.0, 80 % at pH 6.0 and almost complete inactivation at pH 7.0 were observed.

Diminution of pectinase activity at alkaline pH was attained fairly quickly, at least within 2 to 5 hrs., as indicated in Fig. 10.