

氏 名 (本籍) いし い しげ たか
石 井 茂 孝 (千葉県)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 8 6 号

学位授与年月日 昭和 4 8 年 1 0 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭和 3 8 年 3 月
東北大学農学部卒業

学位論文題目 麴菌の生産する Pectin Lyase に関する研究とその利用について

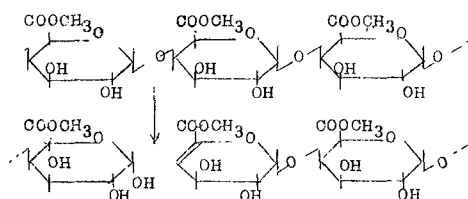
(主 査)
論文審査委員 教授 玉利 勤治郎 教授 志 村 憲 助
教授 高 橋 甫

論文内容要旨

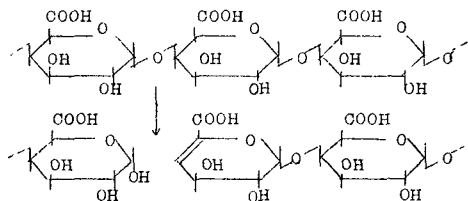
ペクチン質を分解する酵素(ペクチナーゼ)は、ペクチンのメチルエステル結合を分解する Saponifying enzyme (Pectinesterase) と、 $\alpha-1,4$ ガラクチュロナイド結合を切斷する depolymerizing enzyme に大別される。depolymerizing enzyme として加水分解酵素の他に $\alpha-1,4$ 結合を elimination 機構で分解する酵素 (Pectic lyase) も存在することが発見されたのは、比較的最近のことである。(Albersheim et al., 1960年)

Fig. 1 Eliminative Splitting of $\alpha-1,4$ -Galacturonide Bonds

Pectin lyase



Pectate lyase



Pectic lyaseは、Fig. 1に示すごとく、分解産物の非還元性末端のC4とC5の間に不飽和結合を有するGalacturonideを生成するのが特徴であるが、還元性末端は加水分解の場合と同じであり、単に還元糖の増加や粘度低下で活性を測定するだけでは加水分解酵素と全く区別がつかない。基質特異性から、ペクチンに作用する pectin lyase (pectin transeliminase) とペクチン酸に作用する pectate lyase (pectic acid transeliminase) に分けられる。

Pectate lyaseは主としてバクテリアによって生産されるが、これに関する研究は数多く、酵素学的にもかなり明らかにされている。これに対し、pectin lyaseに関しては、2.3の研究報告を見るに止まり、酵素学的検討は十分になされていない。また、ペクチナーゼが応用酵素として比較的古くから利用されている重要な酵素であるにもかかわらず、pectin lyaseの応用に関する研究は従来全くなされていなかった。

本研究は、pectin lyaseの酵素学的研究を通して応用酵素としての価値を見極めることを目的としたものであるが、本研究によって、pectin lyaseが食品加工用として極めて有効な酵素であることが初めて明らかにされた。

本論文は3章から成り、第1章は、Pectin lyaseによる植物組織の分解、第2章は、

Pectin lyase による果汁の清澄化、第3章は、Pectin lyase の酵素学的研究について記載されている。

第1章 Pectin lyase による植物組織の分解

本章は植物組織分解機構の酵素的解明とその利用について検討した。

植物組織分解酵素生産菌の検索

スクリーニングは馬鈴薯切片の崩壊作用 (macerating activity) とセルラーゼの活性により (Table 1)、

Table 1 Production of Macerating Enzyme and Cellulase by *Aspergillus oryzae* Group Tested

Maceration		Filter paper disintegrating Act.		OM-Cellulase		β -Glucosidase	
Activity	Numbers of strain	Activity	Numbers of strain	Activity	Numbers of strain	Activity	Numbers of strain
below 5	4	No change	46	below 2.0	2	below 40	11
5~10	28	9~10	40	2.0~5.0	18	4~7	22
10~20	38	7~8	26	5.0~7.5	22	7~10	23
20~30	30	6~7	9	7.5~10.0	18	10~13	8
30~40	19	4~6	4	10.0~12.5	45	13~16	37
40~50	7	2~4	2	12.5~15.0	22	16~19	8
above 50	2	Complete breakdown	1	above 15.0	1	above 19	19

Aspergillus oryzae グループから、有力な菌株として、*Aspergillus sojae* №48を得た。本菌の粗酵素は、Table 2に示すごとく、馬鈴薯のみならず、多種類の植物組織を分解することが可能であった。

Table 2 Breakdown Test of Plant Tissues by
Asp. sojae No. 48 Crude Enzyme

Materials	Incubation time (hr)	Degree of breakdown
Potato	2	###
Sweet potato	3	###
Taro	4	###
Carrot	7	###
Radish	3	###
Cucumber	2	###
Spinach	6	###
Cabbage	4	###
Garden pea	5	###
Welsh onion	4	###
Garlic	5	###
Apple	2	###
Summer orange	5	###
Mandarin orange	5	###
Banana	1.5	###
Wonglutinous rice	3.5	###
Glutinous rice	3.5	###
Soybean	4	###

Complete breakdown
80~90% breakdown

Asp. sojae No. 48 のペクチナーゼ系

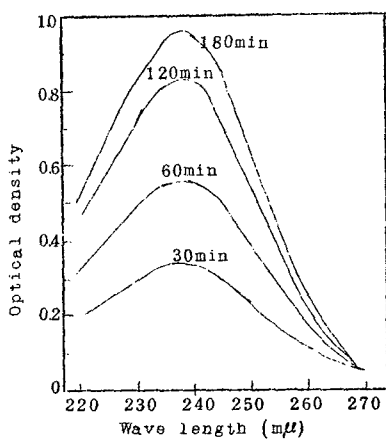


Fig. 2 Increase in Ultraviolet Absorption of Reaction Mixture.

本菌の酵素をペクチンに作用させると、
Fig. 2に示すごとく、255m μ 付近に極大吸収をもつ物質が経時的に増加した。

かかる物質はペクチン酸からは全く生成せず、合成によって得られたエステル化の高いペクチン (Linkペクチン, エステル化度98%) からの生成が市販のペクチン (エステル化度68%) より著しい (Fig. 3)、pectin lyase (PL) であることが判明した。本菌はpectin lyaseの他に加水分解酵素のpectinesterase (PE) とPolygalacturonase (PG)をも生産した。

Pectin lyase およびPGは、Fig. 4に示すごとく、還元糖の生成に比べると粘度低下が著しく、粘度の半減時におけるグリコサイド結合の分解率が1%以下であることから、いずれも

endo-型の酵素であることが判明した。

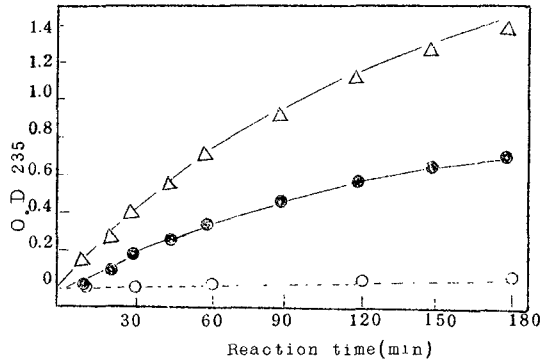


Fig. 3 Comparison of Absorbancy Changes at $235m\mu$ in Reaction Mixtures of pectic Substances with *Asp. sojae* No. 48 Enzyme.

—△— Link pectin —●— Pectin
 ...○... Pectic acid

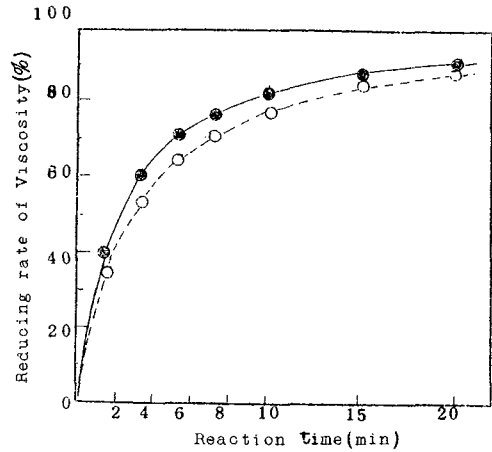


Fig. 4 Reduction of Viscosity of Pectin and Pectic Acid.

—○— Pectin
 ...○... Pectic acid

Asp. sojae No. 48 のペクチナーゼ系は、hydrolase と lyase との 2 つの酵素系から成り、ペクチン酸のごとくカルボキシル基が遊離の場合は hydrolase の endo-PG が ペクチンのごとくエステル化されている場合は lyase の pectin lyase がそれぞれ作用する。

Asp. sojae No. 48 の Macerating Activity

Table 3 Enzymatic Properties of Pectolytic Enzymes from *Aspergillus sojae* No. 48

	Pectin lyase	endo-PG	PE	Maceration
Optimum pH	5.5	4.5	5.0~5.5	5.5
Optimum Temperature	50~55 °	45 °	40~45 °	55 °
pH Stability	4~7	3~4	4~6	4~7
Heat Stability (at 55 °C for 10 min)	50%	0%	0%	50%
Effect of Calcium ion	No Effect	Inhibition		No Effect

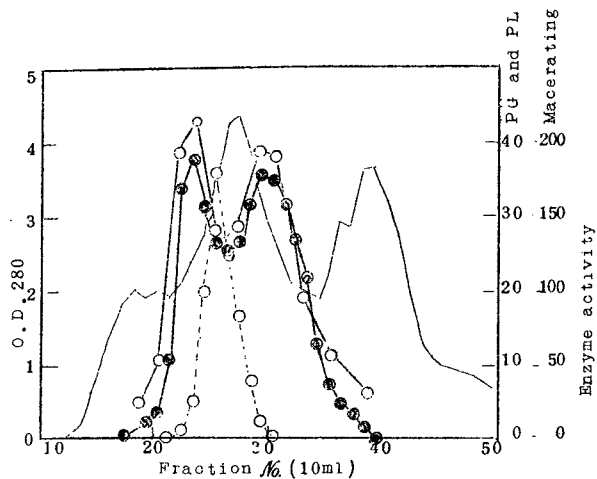


Fig. 5 Gel Filtration with Sephadex G-100

----- OD₂₈₀ -○- Maceration
 -●- PL -○- PG

粗酵素を用いたペクチナーゼと macerating activity との性質の比較 (Table 3) やゲル濾過の結果 (Fig. 5) から、本菌酵素による maceration は、endo-PG ではなく pectin lyase が主として関与するだろうと推定された。この点を証明するために、精製した pectin lyase を用いて各種の植物組織に作用せしめたところ、速度に多少の差はあるが、pectin lyase 単独の添加で崩壊を起し顕微鏡下で観察したところ、Fig. 6 に示すごとく、いずれの植物組織からも単細胞が遊離していることが認められた。

従来、エステル化のないペクチン質 (ペクチン酸) に作用して、これを endo-型に分解する酵素 (endo-PG や endo-pectate lyase) が maceration の作用を有するという結果は多いが、本研究のごとく純粋な pectin lyase が単独で、しかも広範囲の植物組織を macerate し得ることを証明した結果はなかった。このことは細胞壁間 (middle lamella) には従来一般に言われているエステル化の低いペクチン質 (Ca-pectate) の他にエステル化の高いペクチン質が存在し、これが細胞壁間接着物質 (Cell wall cementing material) として重要な働きをなしていることを証明したものである。

Asp. sojae No. 48 のその他の酵素系

本菌の粗酵素は、植物組織の maceration にひき続き、細胞壁をも分解し得るが、これに関与すると考えられる酵素系として、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、β-グルカナーゼ等について検討したが、これらの系は、maceration には直接関与しなかったのでここでは省略する。

醤油製造における植物組織分解酵素の効果

植物組織を分解する酵素が、大豆の分解や醤油製造においていかなる効果をもたらすかの検討を行った。

Table 4 Comparison of Enzyme Activities Produced by *Aspergillus sojae* X-816 and *Aspergillus sojae* No. 48 in Wheat Bran Culture

Enzyme	Activity (units/ml of extract)	
	Asp. sojae	
	X-816	No. 48
<i>β</i>-Glucanase system		
Cellulase C ₁	>0	142.8
CM-Cellulase	6.62	1.31
<i>β</i> -Glucosidase	12.6	15.0
<i>β</i> -1, 3-Glucanase	3.0	11.3
Pectinase system		
Macerating activity	<35	131.2
Pectin lyase	0.53	4.47
Endo-polygalacturonase	3.35	52.6
Hemicellulase system		
Xylanase	4.48	5.54
Arabanase	0.62	1.70
Galactanase	2.33	2.61
Protease system		
Acid protease	1.92	2.29
Alkaline protease	7.43	4.54

Table 5 Degradation of Defatted Soybean by Crude Enzyme from *Aspergillus sojae* X-816 and *Aspergillus sojae* No. 48

	Control (without enzyme)	Asp. sojae X-816	Asp. sojae No. 48
Residue (dry weight)	7.64 g	4.69 g	2.68 g
Total-N/ml	0.12%	0.81%	1.03%
Degradation rate of total-N	100 %	70.8 %	83.5 %
Reducing sugar/ml		2.05%	2.83%

Table 6 Degradation of Shoyu Koji of *Aspergillus sojae* X-816 and *Aspergillus sojae* No. 48 in the Presence of High Concentration of NaCl

	Asp. sojae X-816	Asp. sojae No. 48
NaCl	17.2 %	16.9 %
Total-N/ml	1.06%	1.70%
Degradation rate of total-N	82.8 %	86.5 %
Reducing sugar/ml	0.4 %	0.90%

醤油製造用に一般に使用されている麹菌は植物組織分解の能力を有しないが、かような菌株と *Asp. sojae* No. 48 との程度の酵素活性を比較すると、Table 4 に示すごとく、セルラーゼ C₁ (濾液崩壊活性) と pectin lyase に顕著な差が認められた。対照菌として用いた *Asp. sojae* X-816 は、特にアルカリプロテアーゼの強い変異株であるが、両菌の酵素を用いて脱脂大豆を分解したところ、Table 5 に示すごとく、蛋白質や糖の分解率の向上および残渣量の減少で *Asp. sojae* No. 48 の効果が認められた。また、両菌を用いて製麹した醤油麹をそれぞれ仕込んだ場合も、Table 6 に示すごとく、同様の効果が認められた。植物組織を分解する酵素が、植物原料の有効成分の利用において有効であることを示すものと思われた。

第2章 Pectin Lyase による果汁の清澄化

本章においては、従来の果汁清澄化酵素 (PE と endo-PG) とは異なる新しい果汁清澄化酵素としての pectin lyase の発見と、pectin lyase による果汁清澄化の特徴について述べる。

新しい果汁清澄化酵素としての pectin lyase

Table 7 Salting Out of Juice-Clarifying and Pectinase Activities with Ammonium Sulfate

Saturation	Activities in the precipitates			
	Clarifying (blank 2700)	Activity/ml		
		P E	endo-PG	P L
0.3	27.00	0	0	0
0.4	47.00	0	0	1.4
0.5	62.25	0.022	0	7.0
0.6	86.00	0.072	0.58	15.0
0.7	89.75	0.147	2.32	24.0
0.8	94.00	0.178	7.40	26.8
Original	95.75	0.206	14.51	28.0

Table 8 Heat Stabilities of Enzymes

Temp., °C	Residual activities			
	Clarifying (blank 1575)	Activity/ml		
		P E	endo-PG	P L
40	85.75	0.066	6.8	26.6
45	83.75	0.055	4.1	24.5
50	79.00	0.025	0.8	18.6
55	58.00	0	0	13.2
60	29.50	0	0	8.2
70	14.75	0	0	0
Control	85.50	0.078	7.4	27.2

Asp. sojae №48は強力な果汁清澄化作用を示すが、塩析の結果 (Table 7) や熱安定性の結果 (Table 8) において、同作用は、P E や endo-PG 活性とは全く一致せず、ゲル濾

Table 9 Juice-Clarifying and Pectinase Activities of Several Fractions Obtained by Gel Filtration on Sephadex G-100

Fraction No.	Clarifying (blank 2075)	Activity/ml		
		P E	endo-PG	P L
20	20.75	0	0	0
24	56.75	0.009	0	3.44
26	97.75	0.028	0	13.60
28	98.00	0.084	1.6	27.76
31	98.75	0.149	5.5	35.92
36	89.25	0.217	15.0	6.96
37	88.25	0.224	13.3	5.52
39	96.50	0.182	8.2	23.68
41	98.75	0.102	4.0	41.12
45	98.75	0	0	28.80
47	70.00	0	0	10.32
50	21.00	0	0	0

過の結果 (Table 9) において、果汁清澄化作用が pectin lyase

と良く一致していた。この点を明確

にするために、精製 pectin

lyase を用いて果汁清澄化の試験

を行なったところ、Fig. 7 に示す

ごとく、pectin lyase 単独の

添加で、リンゴやブドウの混濁果汁

は完全に清澄化した。ただし、ミカ

ン果汁の場合、一部混濁物質の沈降

は認められるが、完全な清澄化は得

られず、β-カロチンを主体とする

色素を含んだ油様物質がエマルジョ

ンで存在した。

果汁清澄化用に市販されているペ

クチナーゼ製剤について試験したと

ころ、試験したいずれの製剤にもほ

とんど pectin lyase の活性が

Table 10 Juice-Clarifying and Pectinase Activities of Commercial Pectinases

Pectinase	Clarification		Activity/ml of 1% enzyme solution		
	0.05%	0.005%	P E	endo-PG	P L
	A	95.00	47.00	0.25	25.0
B	98.00	95.25	1.74	218.0	>0
C	98.00	53.75	1.05	15.6	>0
D	98.00	54.75	1.75	200.0	0
E	92.00	44.50	0.02	23.2	0
F	46.00		0.10	26.7	0
G	98.00	44.50	2.42	266.6	0
H	87.00		0.82	1.4	0

(blank 42.00)

認められなかった。(Table 10) このことは、pectin lyaseが果汁の清澄化作用をもつことが知られていなかっただけでなく、本酵素を果汁清澄用として、従来一般には使用していなかったことを示すものであった。以上の点より、筆者らは「pectin lyaseによる果汁の清澄化」に関する特許権を日本および諸外国において獲得した。

Pectin lyaseによる果汁の清澄化

Table 11 Relation between Amount of PL and Clarification of Fruit Juice

Amount of PL added to 10ml of fruit juice, units	Clarification of fruit juice after 1 hr at 40°C, transmittance at 660 nm(%)				
	Apple				
	Jona-Kokko	Golden Delicous	Starking Delicious	Grape, Delaware	
0	61.50	72.50	42.25	24.75	9.00
0.006	77.50	91.75	82.25	30.00	9.25
0.012	88.50	97.00	96.00	75.25	9.00
0.018	94.00	97.00	97.00	92.00	8.50
0.024	94.00	96.75	97.25	95.50	10.25
0.048				95.50	43.50
0.072					85.25
0.120					97.00

酵素量と果汁清澄化との関係を Table 11 に示す。リンゴ果汁の場合は少量の酵素で目的が達せられた。果汁清澄化と果汁中のペクチン(75%エタノール不溶)との関係は Fig. 8 に示すごとく完全な清澄化が達せられても、果汁中には約半分のペクチンが残存しており、このペクチンを完全に分解するにはさらに長時間の反応が必要であった。

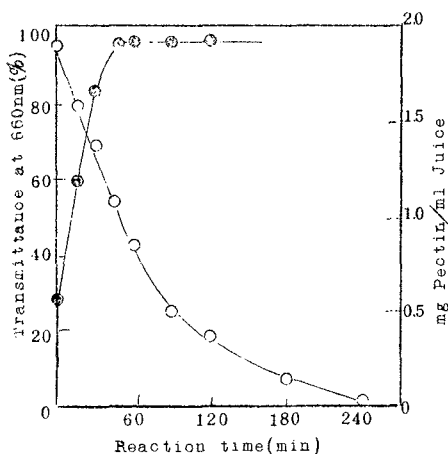


Fig. 8 Relation between clarification and degradation of pectin.

—○— clarification
—○— degradation of pectin

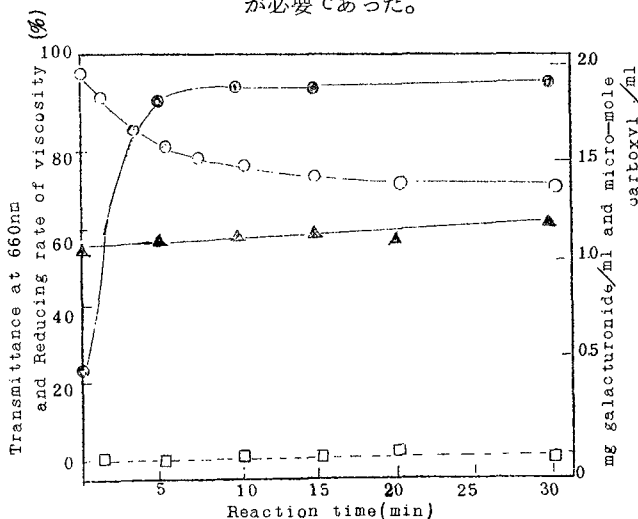


Fig. 9 Changes during course of clarification of apple juice by PL.

—○— transmittance at 660 nm ; —○— reduction of viscosity ; —▲— reducing sugars ; —□— newly appeared carboxyl group

Pectin lyaseによる清澄化過程における物理化学的变化を Fig. 9 に示す。Pectin lyase が従来の清澄化酵素と異なる点は、清澄化過程で新たにカルボキシル基を生成しない点

Table 12 Formation of Methanol in Apple Juice Clarification

Variety of apple	Methanol (mg/ml of apple juice)			Pectin content, mg/ml of original juice
	Clarified by ...			
	Control	P L	Ordinary hydrolytic pectinase	
Kokko	0.001	0.001	0.010	0.246
Jonathan	0.002	0.001	0.008	0.160
Golden Delicious	0.001	0.002	0.136	1.126
Starking Delicious	0.001	0.002	0.086	0.525

あり、このことはメタノールの生成がないことを意味していた。事実 Table 12 に示すように、従来の酵素からは果汁中にメタノールが生成したが、pectin lyase の場合は全くメタノールが生成しなかった。

従来の加水分解系果汁清澄化酵素と比較し、pectin lyaseによる清澄化の利点は、

- 1 単一の酵素で清澄化出来る。
- 2 ベクチンを直接分解出来る。
- 3 有害なメタノールを生成しない。

ことである。

以上の点を重視し、筆者は、pectin lyaseを主体とした新しいタイプの果汁清澄化用酵素剤を開発した。

Pectin lyaseによる果汁の清澄化と果汁中のベクチン

Pectin lyaseはベクチン分子中メチルエステル化された部分の結合しか切断しないが、果汁中のベクチンは、果実中に存在するPEによってそのエステル化度が低下し、かかる変化は、pectin lyaseによる果汁の清澄化に大きな影響を与えるものである。

Table 13 Pectinesterase Activity Determined as Increase of Methanol in Mashed Fruit Tissues

Variety		Methanol (μ mole/ml of juice)				
		Incubation Time (day) at 30 °C				
		0	1	3	5	7
Apple	Jonathan	0.03	0.03		0.04	0.04
	Golden Delicious	0.06		0.07		0.09
Grape	Delaware (I)	0.49	3.35	3.69		4.11
	Delaware (II)	0.69	1.18	1.34		2.19
	Campbell Early	1.08	1.37	1.78	1.84	1.89
	Bailey A	0.39	0.55	0.91	1.02	1.43

果実中のPE活性を測定すると、Table 13に示すごとく、リンゴはほとんど活性を示さないが、ブドウ果実中には強いPE活性が認められた。そのためそれぞれの果汁中に存在するペクチンのエステル化度は異なっていた。(Table 14)

Table 14 Pectin Content and Degree of Esterification of Pectic Substances Isolated from Fruit Juices

		Yield(mg/100 ml of juice)			
		Pectin (anhydro- galacturonic acid)	Neutral sugars (arabinose)	Pectin content (%)	Degree of esterifica- tion (%)
Apple	Jonathan	13.0	9.8	57.0	92.0
	Golden Delicious	52.2	7.9	86.9	90.7
Grape	Delaware(I)	51.2	20.3	71.6	65.3
	Delaware(II)	57.4	23.2	71.2	43.9
	Campbell Early	49.5	15.3	76.4	44.8
	Bailey A	34.6	14.6	70.3	57.1

果汁中のペクチンのエステル化度と Pectin lyase による果汁の清澄化との間には密接な関係があった。すなわち、Fig. 10はリンゴ果汁(ペクチンのエステル化度92%)の清澄化であ

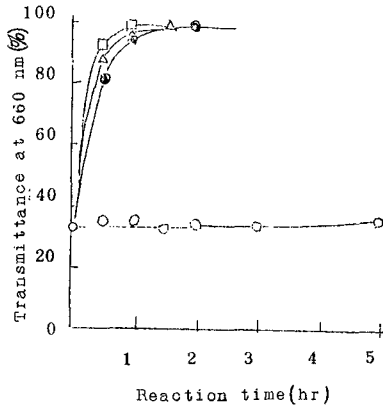


Fig. 10 Enzymatic clarification of Apple Juice

—●—purified pectin lyase; —○—purified endo-PG; —△—mixture of the purified two enzymes; —□—crude enzyme.

るが、endo-PGは全く働かず、pectin lyaseが顕著な効果を示した。ブドウ果汁の場合、(A)果汁(エステル化65%)は、pectin lyaseの方が有効であるが、endo-PGにも清澄化の作用があった。ところが同品種でも熟成度の高い果汁(B, エステル化44%)は pectin lyase はあまり効かず、endo-PGの方がむしろ有効であった。(Fig. 11)

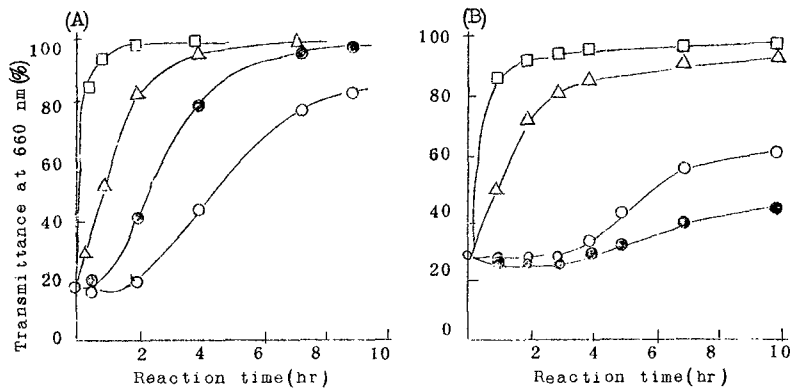


Fig. 11 Enzymatic Clarification of Grape Juice

(A) Delaware, (B) very ripe Delaware;

—○—purified pectin lyase

—○—purified endo-PG

—△—mixture of the two enzymes

—□—crude enzyme

第3章 Pectin Lyase の酵素学的研究

Pectin lyase の生産

Pectin lyase の生産はカビに限られるが、カビの中でも Table 15 に示すように、*Rhizopus*、*Absidia* は全く pectin lyase を生産せず、*Mucor*、*Fusarium* に属する菌株の生産能は低く、pectin lyase の生産能の高い菌株は *Penicillium*、特に

Table 15 Production of Pectin Lyase by Molds

<i>Aspergillus nidulans</i>	2142	20.6	<i>Fusarium roseum</i>	5010	4.8
<i>Aspergillus varians</i>	2130	33.6	<i>Fusarium sotani</i>	5013	0.4
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2323	5.2	<i>Fusarium roseum</i>	5016	17.8
<i>Aspergillus wentii</i>	2112	0.2	<i>Fusarium lini</i>	5050	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2033	44.6	<i>Fusarium oxysporum</i>	5051	0
<i>Aspergillus foetidus</i>	2032	26.6	<i>Fusarium moniliforme</i>	5062	6.6
<i>Penicillium citrinum</i>	7003	8.8	<i>Mucor alterhans</i>	1115	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	7142	17.8	<i>Mucor fuscus</i>	1137	0.8
			<i>Mucor praini</i>	1182	0
<i>Penicillium notatum</i>	7168	35.8	<i>Mucor pusillus</i>	1185	2.4
<i>Penicillium nigricans</i>	7225	16.4	<i>Mucor racemosus</i>	6125	0
<i>Penicillium italicum</i>	7247	27.8	<i>Mucor angulisporus</i>	6151	0
<i>Rhizopus nigricans</i>	1262	0	<i>Absidia butleri</i>	1001	0
<i>Rhizopus chinensis</i>	6003	0	<i>Absidia cylindrospora</i>	1008	0
<i>Rhizopus pseudochinensis</i>	6042	0			
<i>Rhizopus sexualis</i>	6048	0			

Aspergillus 属に限られるようであった。Aspergillus 属の中でも、Table 16に

Table 16 Production of Pectin Lyase by Aspergillus species

Aspergillus niger	1742	34.5	Aspergillus saitoi	1533	2.8
Aspergillus niger	1785	31.3	Aspergillus saitoi	1540	30.3
Aspergillus niger	1787	21.3	Aspergillus saitoi	1568	11.9
Aspergillus japonicus	1744	85.7	Aspergillus oryzae	1746	0.6
Aspergillus japonicus	1783	76.9	Aspergillus oryzae	1747	5.1
Aspergillus glaucus	1782	17.6	Aspergillus oryzae	1749	4.1
Aspergillus inui	1601	37.1	Aspergillus oryzae	1750	4.6
Aspergillus inui	1603	15.6	Aspergillus oryzae	1752	10.2
Aspergillus inui	1604	6.3	Aspergillus oryzae	1759	3.1
Aspergillus usami	1528	5.5	Aspergillus oryzae	1769	15.4
Aspergillus usami	1531	9.8	Aspergillus oryzae	1773	18.9
Aspergillus awamori	1708	33.4	Aspergillus oryzae	1775	6.4
Aspergillus awamori	1709	20.0	Aspergillus sojae	KS	0.4
Aspergillus awamori	1716	22.8	Aspergillus sojae	X-816	0.5
Aspergillus aureus	1619	21.4	Aspergillus sojae	HR4-1	5.4
Aspergillus aureus	1740	27.0	Aspergillus sojae	No. 20	7.7
Aspergillus aureus	1741	5.7	Aspergillus sojae	No. 50	10.7
			Aspergillus sojae	No. 48	47.4

示すように、Asp. sojae No. 48を除けば黄麹菌は一般に pectin lyase の生産能が低く、黒麹菌の中に pectin lyase 活性の高い菌株が認められ、Asp. japonicus 1744 が最も高かった。Pectin lyase の生産には、液体培養は適さず、固体培養が適していた。

(Table 17)

Table 17 Production of Pectolytic Enzyme from Aspergillus sojae No. 48

Cultivation	pH	Activity/ml of extract or culture filtrates		
		Pectin lyase	endo-PG	PE
Solid (at 30°C for 48hr) 20g wheat bran + 12ml H ₂ O (extract 100ml water)	6.5	41.2	37.5	34.2
Liquid (submerge) (at 30°C for 48hr)				
2g wheat bran + 100ml H ₂ O	7.3	0	0	0
2g wheat bran + 2g KH ₂ PO ₄ +100ml H ₂ O	5.4	1.1	0.5	0.06
2g wheat bran + 1g (NH ₄) ₂ SO ₄ +100ml H ₂ O	6.4	0.2	0.4	0.04

Pectin lyase の精製と性質

Asp. sojae No. 48 の pectin lyase を Table 18 に示す方法によって精製し、最

終標品は比活性が約940倍に上昇しており、他の酵素活性を全く示さず、蛋白的にもほぼ均一であった。

Table 18 Purification of PL from *Aspergillus sojae* No. 48

Purification step	Volume (ml)	Total		Specific activity	Yield (%)
		P L (units)	Protein (mg)		
1. Extraction	34000	26690	327760	0.081	100
2. Ammonium sulfate fractionation	1353	19930	74415	0.268	74.7
3. Batchwise treatment DEAE-Sephadex	480	12720	17808	0.714	47.6
4. CM-Cellulose column chromatography	200	7216	1278	5.65	27.0
5. DEAE-Sephadex column chromatography	120	3900	1488	26.2	14.6
6. SE-Sephadex column chromatography (first)	80	1900	340	55.9	7.1
7. SE-Sephadex column chromatography (second)	40	1029.6	14.2	72.5	3.9
8. Gel filtration with Sephadex G-100	35	397.8	5.2	76.5	1.5

分子量はゲル濾過法により約32,000と測定された。(Fig. 12)

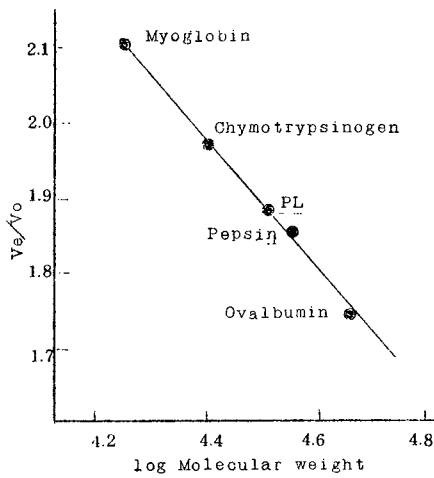


Fig. 12 Estimation of Molecular Weight by Gel Filtration.

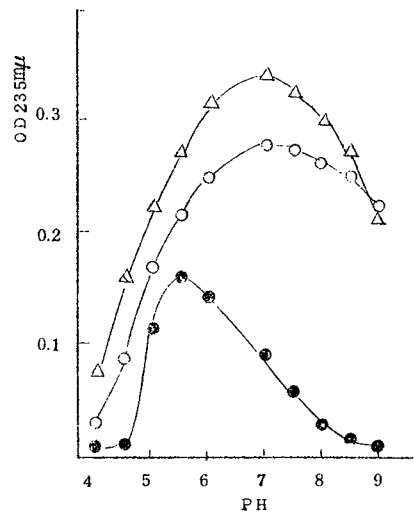


Fig. 13 Effect of pH on PL Activity.

●-● Pectin
○-○ Pectin with $5 \times 10^{-2} M$ Ca ion
△-△ Link pectin

最適 pHは、Fig. 13に示すごとく、基質および金属イオンの有無で異り、エステル化の高いペクチンを基質とした場合は pH 7.0であるが、通常のペクチン(エステル化度68%)の場合は

pH 5.5であり、これに金属イオンを添加した場合は pH 7 附近へ最適 pH が変動した。

本酵素は、Fig. 14 に示すごとく、pH 4~7 の範囲できわめて安定であるが、熱に対しては、Fig. 15 のごとく、70 °C、10 分間の処理で完全に失活した。

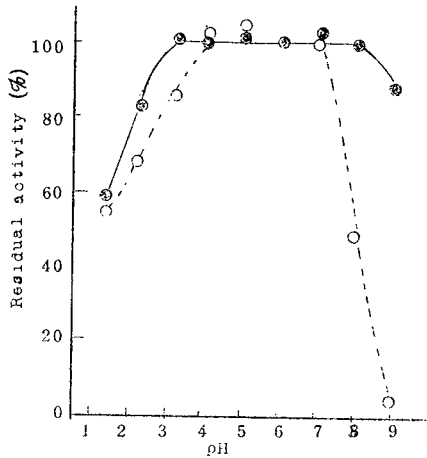


Fig. 14 Effect of pH on PL Stability.

○-○ at 4°C for 2hr ; ●-● at 30°C for 24hr

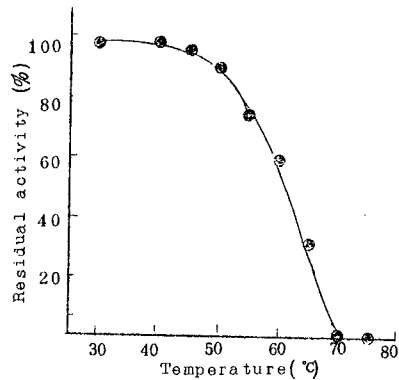


Fig. 15 Effect of Temperature on PL Stability.

Pectin lyase 活性に及ぼす金属イオンの影響を Table 19 および Table 20 に示す

Table 19 Effect of Metal Ion on PL Activity

Metal ion	Activity (%)	
	Substrate	
	Pectin	Link pectin
No addition	100	100
K ⁺	103	103
Na ⁺	104	103
Mg ²⁺	116	98
Ca ²⁺	117	103
Mn ²⁺	121	103
Co ²⁺	123	103
Ni ²⁺	-a)	99
Cu ²⁺	-a)	81
Zn ²⁺	119	94
Ag ⁺	72	90
Cd ²⁺	113	111
Ba ²⁺	124	104
Hg ²⁺	19	25
Pb ²⁺	-a)	98

a) formed gel by the addition of metal ion

が、ペクチンを基質にした場合のみ活性の増強が認められ、かつ金属イオンの最適濃度がきわめて高かった。このことは、金属イオンの影響が酵素の側にあるのではなく、基質の側にあるものと考えられる。

Table 20 Optimum Concentration of Metal ion

Final conc. (M)	Activity (%)		
	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
0	100	100	100
10 ⁻⁴ M	104	106	105
10 ⁻³ M	104	115	118
10 ⁻² M	113	141	149
5×10 ⁻² M	129	164	167
10 ⁻¹ M	139	160	160
2×10 ⁻¹ M	148	145	134
3×10 ⁻¹ M	148	128	115

すなわち、ペクチン分子中の遊離のカルボキシル基に金属イオンが結合して、分子全体のマイナ

スの Charge を減少せしめる結果、酵素との affinity が増加し、活性の増強となるのであろうと推定された。また ペクチンを基質とした場合の最適 pH の変動も、中性付近でカルボキシル基の解離が著しく、これを金属イオンが中和すると考えると理解出来た。

Table 21 Effect of Various Substances
On PL Activity

Substance	Concn.	Relative activity (%)
No addition	$10^{-3}M$	100
EDTA	$10^{-3}M$	96
o-Phenanthroline	$10^{-3}M$	99
8-Hydroxyquinoline	$10^{-3}M$	86
p-Chloromercuribenzoate	$2 \times 10^{-4}M$	90
Moniodoacetic acid	$10^{-3}M$	98
Sodium thio glycolate	$10^{-3}M$	92
Cysteine	$10^{-3}M$	98
Potassium cyanide	$10^{-3}M$	100
N-Bromosuccinimide	$10^{-3}M$	2
Iodine	$10^{-3}M$	11

Pectin lyase は、Table 21 に示すごとく、キレート剤、SH-試薬、還元剤によっては影響を受けないが、NBS、ヨード等の酸化剤で強力に阻害された。

Pectin lyase の分解産物である 4, 5 不飽和ガラクトクロナイドは従来 235 m μ に極大吸収をもち、チオバルビツール酸と反応して、548 m μ に極大吸収を持つピンクの発色を示すと報告されているが、Fig. 16 に示すごとく、紫外部の極大吸収は文献値よりやや高い 238 m μ にあり、チオバルビツール酸との反応物は 552 m μ 附近に極大吸収があった。

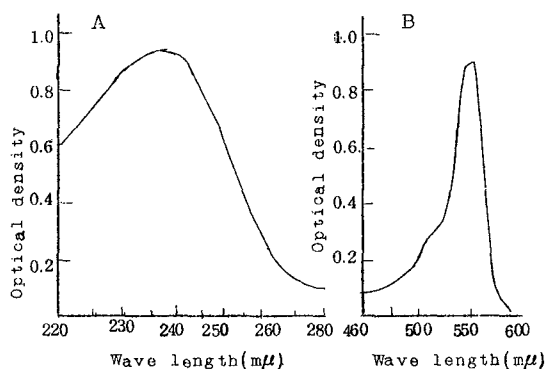
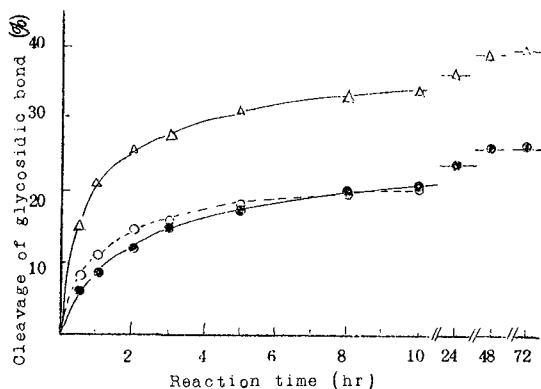


Fig. 16 A) Absorption Spectrum of
Reaction Products.
B) Absorption Spectrum of
Thiobarbituric Acid
Reaction Products.



本酵素によるペクチンおよびLinkペクチンの分解限度は、それぞれ26および40%であり (Fig. 17)、ペクチンに金属イオンを添加しても分解限度には差が生じなかった。

Fig. 17 Cleavage of Glycosidic Bond by PL
 ○—○ Pectin ; ○...○ Pectin, with $5 \times 10^{-2} M$ Ca ion
 △—△ Link pectin

分解産物の確認は、ペーパークロマトグラフィーにより、展開後の発色は次の3つの方法によつた。

- 1 還元力...benzidine—TCAを噴霧し加熱。
- 2 不飽和結合...紫外部吸収かチオバルビツール酸法
- 3 遊離カルボキシル基...BCG溶液噴霧

Authenticなガラクトキロン酸 (GA)、メチルガラクトキロン酸 (MG) および4,5-不飽和ジメチルジガラクトキロン酸、およびペクチン、Linkペクチンの分解物のクロマトグラム (展開剤、n-プロパノール:水:酢酸エチル、7:2:1) を Fig. 18 に示す。ペクチンの分解物は完全には分離しないが、Linkペクチンの分解物は分離し、いずれの成分も還元力、紫外部吸収を示すが、カルボキシル基は検出されなかった。

Linkペクチン分解物の各成分は、Fig. 19 に示すごとく、 $\log R_{MG}$ と重合度との間には、直線関係があつた。Linkペクチン分解の初期には重合度の高い成分が認められたが、monomer, dimerの生成が認められず、この点からも、本酵素がendo型であることが明らかであるが、最終的には、dimer, trimerが主体で、monomerやtetramerも認められた。

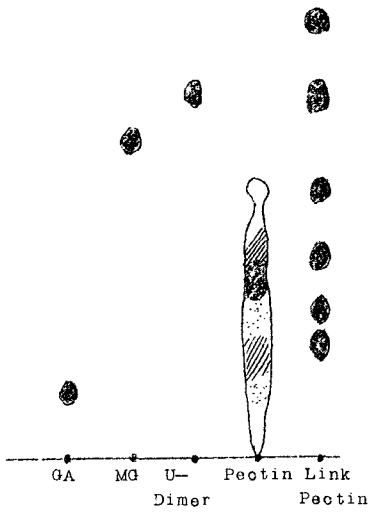


Fig.18 Paper Chromatogram of the Reaction Products of Pectin and Link Pectin.

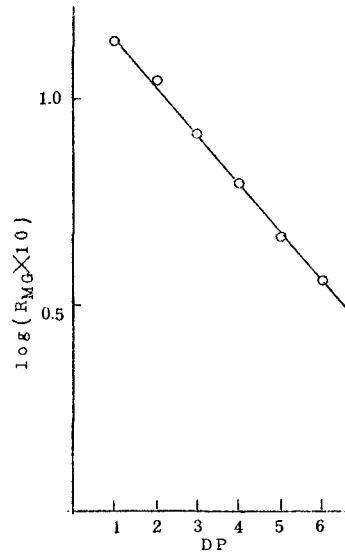
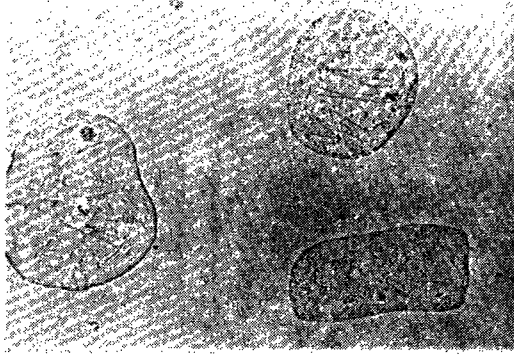
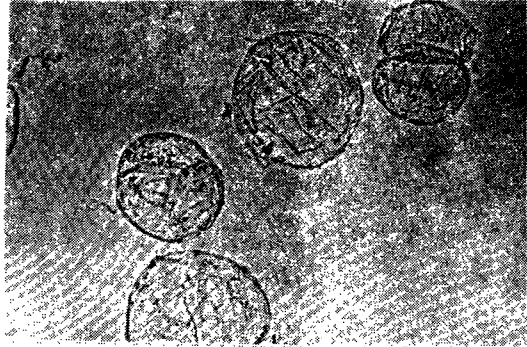


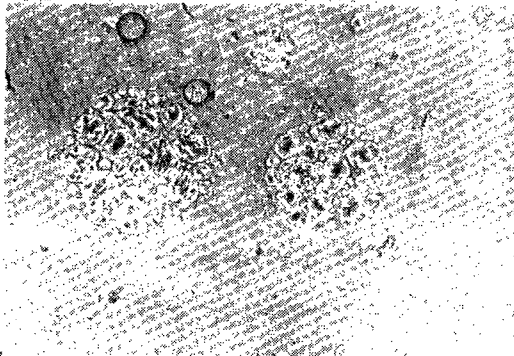
Fig.19 Relationship between the Degree of Polymerization and the R_{MG} of Unsaturated Methyl Oligogalacturonides



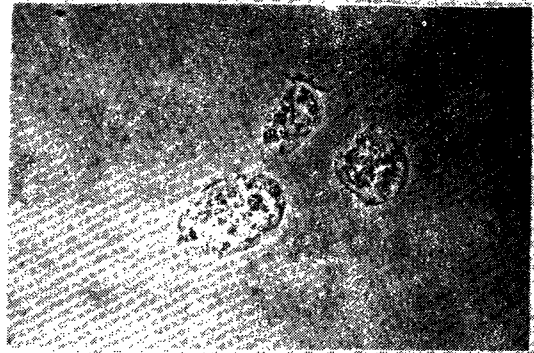
Onion x75



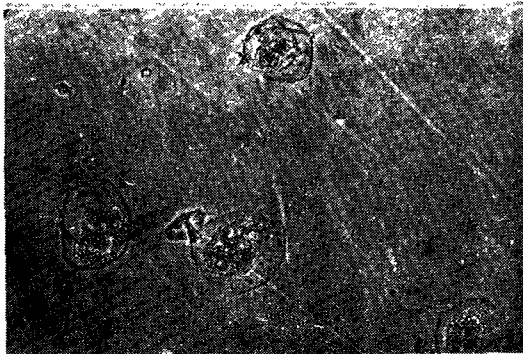
Radish x75



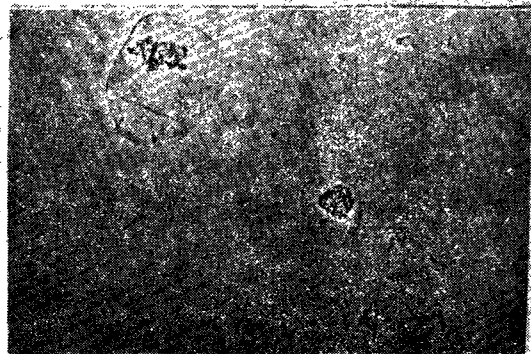
Potato x75



Cabbage x300



Spinach x150



Carrot x150

Fig 6 Micrographs of Unicells Liberated from Higher Plant Tissues by Purified Pectin Lyase

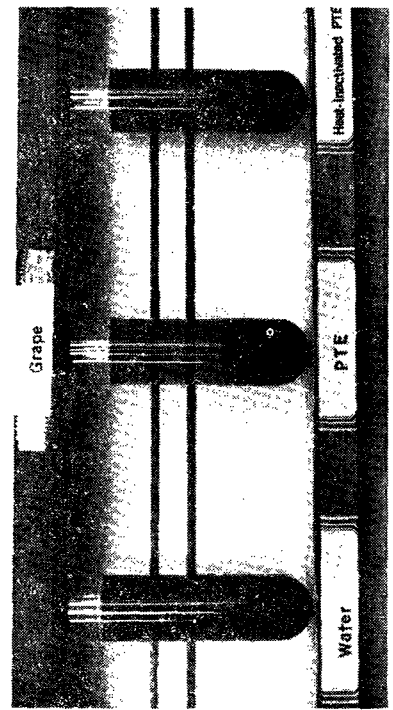
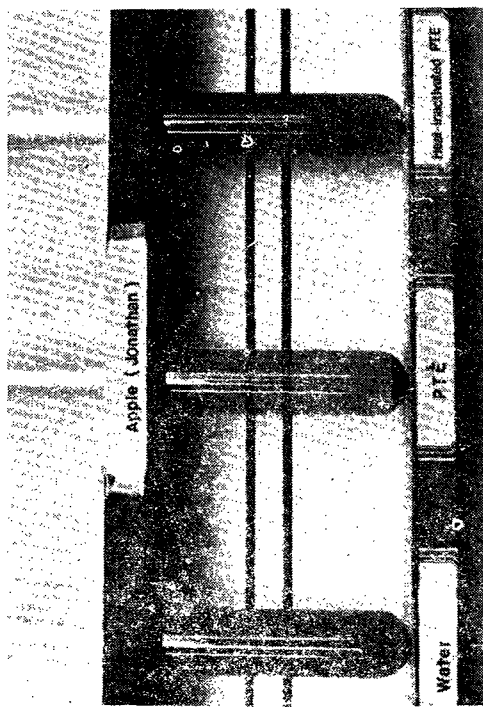
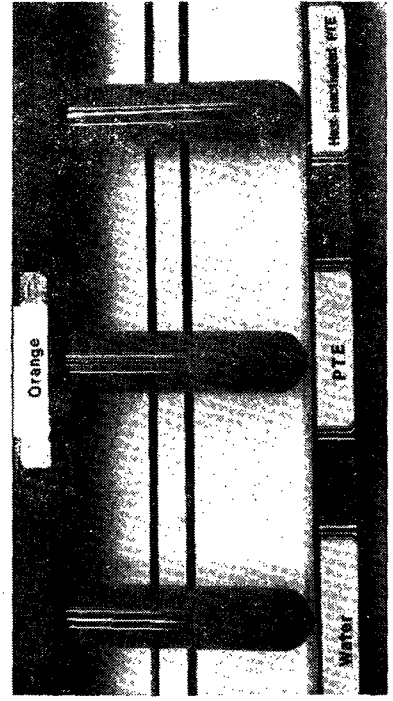
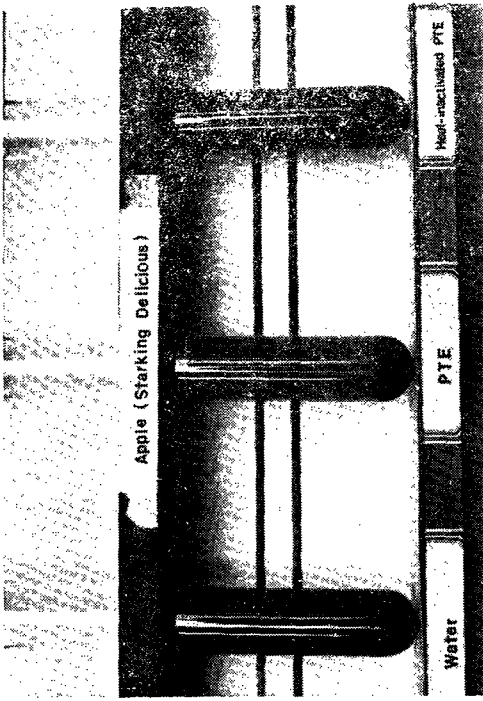


Figure 7 Clarification of fruit juice by purified PL

審査結果の要旨

ペクチン質のグリコシド結合分解酵素には、加水分解酵素系の他に lyase 系も存在し、基質特異性からペクチンに作用する pectin lyase とペクチン酸に作用する pectate lyase に分けられる。pectate lyase に比べ pectin lyase に関する研究はきわめて少なく、その詳細な性質については知られていない。また、ペクチナーゼが応用酵素として重要な酵素であるにもかかわらず、pectin lyase の利用に関する研究は従来全くなされていなかった。本研究は麹菌の生産する pectin lyase の酵素学的研究を通して本酵素の利用価値を見極めることを目的としたものである。

まず、*Aspergillus sojae* 1648 が pectin lyase を著量に生産することを認め、本酵素を蛋白質にも均一な状態にまで精製して、従来知られていなかった酵素学的諸性質を明らかにした。さらに、本酵素が植物組織を崩壊する maceration 作用を有することを明らかにした。ペクチン酸に作用する酵素が maceration 作用を有するという結果は従来多いが、pectin lyase が単独でしかも広範囲の植物組織を macerate し得ることを証明した結果はなかった。これはエステル化に富んだペクチンも細胞壁間接着物質として重要な働きをしていることを証明したものである。pectin lyase の maceration 作用が応用的には植物成分の高度利用に有効であることを醤油製造を例にとって明らかにした。果汁の清澄化が2つの加水分解系ペクチナーゼ (PE と endo-PG) の共同作用で起きることは知られていたが、本研究はこれとは別に pectin lyase も果汁を清澄化し得ることを初めて明らかにした。pectin lyase による清澄化機構を解明するとともに、かかる酵素は従来使用されていなかったことを明らかにした。応用的に従来の酵素に比べ pectin lyase による清澄化には1つの酵素で目的を達し得ること、また分解の過程でメタノールを生成しないなど多くの利点があったので、これを新しいタイプの果汁清澄化酵素として開発した。

以上のごとく本研究によって pectin lyase が酵素化学的にかなり明白になると同時に、利用面においては特徴のある新しい果汁清澄化酵素として、また maceration 作用を生かした植物成分の高度利用等食品加工用の酵素としてきわめて有用な酵素であることを明らかにした点は高く評価出来るものとして農学博士の学位を授与するに値するものと認めた。