

植物体中のペクチン物質分解酵素について

竹花秀太郎・小倉長雄

(農産製造学研究室)

Hidetaro TAKEHANA and Nagao OGURA: On the Pectic Enzymes from Plant Tissue.

緒 言

Pectin 物質は広く植物体中に含まれる複雑な高分子化合物で、纖維素等と結合して組織の強化に役立っている。これを分解する酵素群は細菌及び黴に見出されて居り、植物病理学上重要な、Pectin 物質を分解して組織を崩壊せしめ、意義があり、又麻の精練や果汁の清澄にも利用されている。

即ち KERTESZ¹⁾ が *P. glaucum* の酵素を用いて果汁を清澄せしたのに始まり、GREEN²⁾, BESON³⁾, 岩崎⁴⁾, 皆川⁵⁾ 氏等の研究がある。又 Pectinol, Filtragol, クリナーゼ, スクララーゼ等の果汁清澄剤が市販されているが、これ等は何れも微生物の酵素である。

植物体中の酵素に就ては TEREVITINOW⁶⁾ がクローバの茎葉搾汁中に Pectase が存在し、果汁の清澄効果を認めている。その後 PITHAWALA⁷⁾, MACCOLLOCH⁸⁾ はトマト果実中に、又 MACDONNELL⁹⁾ はオレンジに酵素の存在する事を報告している。

著者等も植物体中に果汁を清澄させる酵素の存在を認め、その中より清澄効果の大きいトマト果、クローバ、ルーサン、馬鈴薯の茎葉より Pectine-esterase を分離し、これを Pectin に作用させ、その性質を調べたので報告する。

なお本報告の一部は 1951 年 4 月園芸学会、同 5 月農芸化学会、1952 年 4 月農芸化学会に発表したものである。

実 験

I. 果汁に対する植物搾汁の作用

(1) 果汁の清澄試験による Pectin 分解酵素の分布

酵素源としては 47 種の植物茎葉を圧搾し、得られる汁液をそのまま酵素液として用いた。

基質としてはリンゴ、ナシ、ビワの果汁をそのまま用いた。これら果汁の pH 及び Pectin 含量は次の通りである。

第1表 果汁の pH と Pectin 含量

各果汁 20~30c.c. に酵素液 1c.c. を加え、40°C に 2 時間保ち、その清澄度を比較した。

47 種の内約半数のものに清澄効果が見られ、特にマメ科、ナス科のものに強く、ニンジン、ハコベ等にも可成り強く現れた。

	pH	Pectin (Ca-pectate) として
リンゴ果汁	4.0	2.6gr/100c.c.
ナシ果汁	5.0	0.6gr/100c.c.
ビワ果汁	4.6	1.4gr/100c.c.

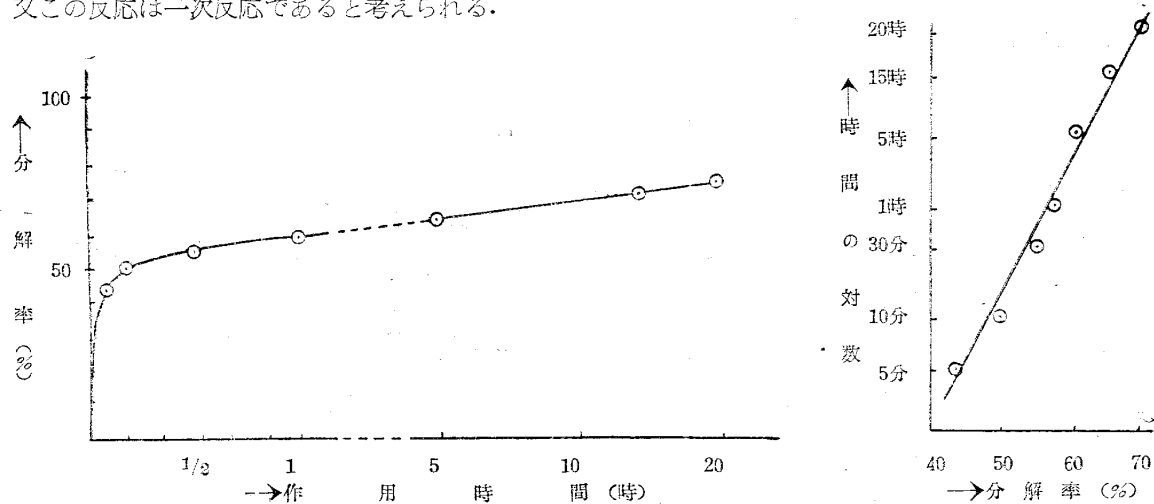
酵素を添加した果汁の状態は酵素源及び果汁の種類により異り、沈澱の形態、Gel 化の有無、等に差異が見られるが、これ等は pH, Pectin 含量等によるものと思われる。

(2) 果汁の清澄試験による分解酵素の性質

実験(1)に於て効果の著しかった馬鈴薯搾汁を酵素源として用い、果汁の清澄効果の條件を調べた。

(a) 作用時間の影響. 基質としてはビワ果汁を用いた。即ち果汁 20c.c. に Mac Ilvain-Buffer 10c.c. を加え、pH を 4.6 に保ちこれに酵素液 1c.c. を加え、40°C で一定時間保った後加熱して酵素作用を停止せしめ、濾過後濾液の Pectin を Ca-pectate 法で定量した。

結果は第1図の通りである。即ち5~10分で約50%が分解され、それ以後は反応はそれ程進行しない。又この反応は一次反応であると考えられる。

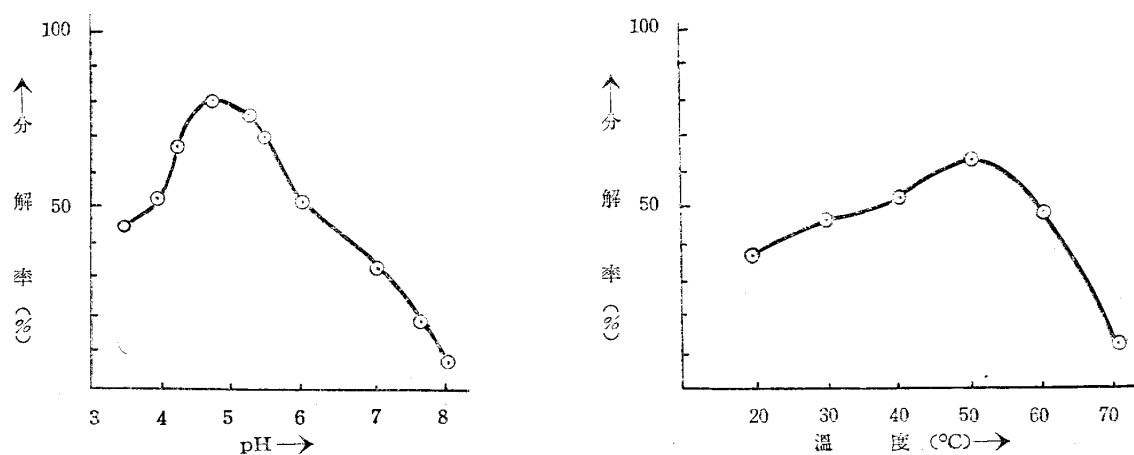


第1図 作用時間の影響

(b) pH の影響. MacIlvain-Buffer で pH を一定保ち、40°C、10 時間後の Pectin 含量を定量した。結果は第2図に示す。

即ち最適 pH は 4.8 附近で、pH 3 以下及び pH 8 以上ではその作用は殆んど認められない。

(c) 作用温度の影響. pH 4.8 で 20~70°C で 30 分保ち、Pectin 含量を定量した。結果は第3図の通りである。即ち 50°C 附近に最適温度があり、70°C で作用は殆んど認められなかった。



第2図 pH の影響

第3図 温度の影響

以上の結果より植物組織中の Pectin 分解酵素は微にある酵素に比較し著しい差異が認められた。

即ち KERTESZ¹⁾ は微の酵素は pH 3.5, 45°C で活性が減少し、50°C、30 分で不活性になる事を認め、古市氏¹¹⁾ によれば Filtragol は 5 時間で 7%, 24 時間で 50% の Pectin を分解し、opt. temp は 35~40°C, opt. pH は 4.2 である。本実験では pH 4.8, 50°C で 30 分作用せしめる事により 60% の Pectin が分解された。

II. Pectin 溶液に対する Pectin 分解酵素の作用

植物搾汁を Pectin 溶液に作用させた場合、滴定酸度の増加は見られたが、粘度変化や還元糖の増加は認められなかった。この酸の増加は Pectin の Methoxyl 基を分解して Methanol を遊離せしめ、同時に酸を生成する酵素作用による。即ちこの酵素は Pectin-esterase (PE) 或いは Pectase と呼ばれている酵素である。

基質 Pectin は夏蜜柑より調製した。即ち内果皮の白色部分を 1% 枸橼酸で煮沸抽出し、濾過後濾液に Ethanol を加えて生ずる Pectin の沈澱を乾燥粉末とした。各実験では 1% 溶液として用いた。

PE の活性度の測定方法は KERTESZ¹²⁾ の方法を用いた。即ち遊離する酸を NaOH で滴定する方法で、トマト果より得た酵素を用いて行つた吟味の結果については既に報告した¹⁰⁾。即ち基質は 1% Pectin 液 10c.c. を用い、酵素液は最初の滴定数が N/50-NaOH 0.6~1.2c.c. になる様に調製し、10~15 分毎に Methyl Red を指示薬として滴定し、1.5~2 時間に消費された NaOH の合計量より分解された Methoxyl 量を算出する。即ち N/10-NaOH 1cc=3.1mg. -OCH₃。

又 Pectin 中の Methoxyl は過剰の N/10-NaOH を加え、2 時間放置後 N/10-H₂SO₄ で中和し、消費された NaOH の量より同様算出した。

これらの方法による値は Zeizel 法の値とよく一致した。

(1) Pectin-esterase の分離

WILLAMAN はクローバより CHCl₃ で抽出後 Ethanol で沈澱し、又 MacCOLLOCH⁸⁾ はトマトより NaCl で抽出後 (NH₄)₂SO₄ で沈澱し、MacDONNEL⁹⁾ はオレンヂより CH₃·COONa で抽出し、夫々強力な酵素を得ている。著者等はトマトより Na₂HPO₄¹⁰⁾ を用い、pH8 で抽出後 (NH₄)₂SO₄ 12~70% 飽和で酵素を沈澱せしめた結果については既に報告したが、本報告では馬鈴薯、クローバ、ルーサンの茎葉組織より分離した酵素について記す。

(a) 馬鈴薯茎葉組織より PE の分離。茎葉を各区 100gr 宛採り、乳鉢にて磨碎し、抽出剤 50gr を加え、pH を調節した後 2 時間放置し、(NH₄)₂SO₄ で沈澱せしめ、得られた粗酵素の活性度を測定した。即ち各区の沈澱を真空乾燥し、1%-Pectin 液 10c.c. に 0.025gr を加えて 50°C で 2 時間作用せしめ、分解した Methoxyl 基を定量した。その結果を第 2 表に示す。

第 2 表 馬鈴薯茎葉より酵素分離の条件と活性度 (1)
(分解率の最高のものを指数 100 とした)

抽出		沈 澱	(NH ₄) ₂ SO ₄ -10% 飽和			(NH ₄) ₂ SO ₄ -40% 飽和			(NH ₄) ₂ SO ₄ -70% 飽和		
抽出剤	pH		分解された Methoxyl (mg)	分解率 (%)	指数	分解された Methoxyl (mg)	分解率 (%)	指数	分解された Methoxyl (mg)	分解率 (%)	指数
N/10- Na ₂ HPO ₄	4		0.24	4.8	7	1.72	44	71	1.04	25	39
	6		0.25	4.9	7	1.91	49	78	1.48	36	55
	8		0.25	4.9	7	2.44	63	100	1.68	39	62
1M-NaCl	4		0.28	5.6	9	1.40	35	57	0.96	23	35
	8		0.36	7.0	11	1.96	50	80	0.97	23	34
H ₂ O	6		0.20	4.0	6	1.10	28	45	1.09	26	41
	8		0.21	4.1	6	1.40	35	57	1.20	29	43

即ち抽出剤としては Na₂HPO₄ が最もよく、pH8 で最もよく抽出される。

又 (NH₄)₂SO₄ による沈澱は 40% 飽和のものが最も高い活性を示し、10% 飽和では沈澱物の PE の活性は極めて低い。

又 CHCl₃ で抽出し、Ethanol で沈澱せしめたものも極めて高い PE の活性を示した (第 3 表)。

第3表 馬鈴薯茎葉より酵素分離の條件と活性度 (2)

抽 出	沈 澱	分解された Methoxyl (mg)	指 数
Na_2HPO_4 (pH=8)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10~70% 飽和	1.40	54
CHCl_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -70% 飽和	1.54	59
	Ethanol-2 倍添加	2.63	100

(b) クローバ茎葉組織より PE の分離. 茎葉を各区 200gr 宛用い, 水及び塩類溶液で 2 回抽出を行い, 各区総抽出液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え, 10~70% 飽和で沈澱する部分を集め, 各抽出液及び沈澱物につき PE の活性度を測定した. 即ち抽出液の場合は酵素液として 1cc. 宛, 沈澱物の場合は 0.05gr を 5c.c. の水にとかしたものを各 1cc. 宛用い, 基質は 1%-Pectin 溶液 10cc. を用い, 40°C に 1.5 時間保ち乍ら 15 分毎に滴定した.

結果は第4表に示す.

第4表 クローバ茎葉より酵素分離の條件と活性度 (1)

抽出 条件	抽 出 液			沈 澱 物		
	液 量	分解された Methoxyl	分 解 率	沈 澱 量	分解された Methoxyl	分 解 率
	(c.c.)	(mg)	(%)	(gr)	(mg)	(%)
第1回 H_2O	140	3.53	76	1.54	3.41	73.5
第2回 Na_2HPO_4	100	3.00	64			
第1回 Na_2HPO_4	200	3.72	80	2.63	3.53	76.0
第2回 H_2O	100	2.17	40			
第1回 CH_3COONa	200	4.03	86	1.74	3.92	84.3
第2回 H_2O	100	2.60	56			

この結果より PE は水にても可成りよく抽出されるが塩類では更によく抽出され, 又 1 回の抽出のみでは充分抽出されず塩類としては CH_3COONa がよい事を知った. 又 PE は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の 10~70% 飽和により大部分が沈澱する.

又組織の搾汁に次の 4 種の処理を行つて主として葉緑素を除き, 各濾液につき PE の活性度を測定した. 同時に組織を $\text{CH}_3\cdot\text{COONa}$ で抽出して得られる抽出液に各処理を行い, 更にこれに $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えて 70% 飽和で得られる沈澱についても活性度を測定した. 測定方法は前と同様である. その結果を第5表に示す.

第5表 クローバより酵素分離の條件と活性度 (2)

処 理	濾 液		抽 出 液		沈 澱	
	分解された Methoxyl	分 解 率	分解された Methoxyl	分 解 率	分解された Methoxyl	分 解 率
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
10%-(NH_4) ₂ SO ₄	3.56	86.8	3.20	80.0	2.72	68.0
50~55°C に 1 分間加熱	2.26	55.0	2.60	67.3	2.53	63.0
CH_3COOH にて pH=4	2.91	71.0	2.67	68.0	2.43	60.0
CHCl_3	1.92	47.6	-	-	-	-

即ち各区共可成り PE の活性は残つて居り, 殊に pH 4 に保つたものでは良好な結果が得られている.

(c) ルーサン茎葉組織より PE の分離. 茎葉 200gr を用い, 馬鈴薯の場合と同様, 磨碎, 抽出, 沈澱を行い, 各区の沈澱物につき PE の活性度を測定した結果を第6表に示す.

第6表 ルーサンより酵素分離の条件と活性度

分 離 条 件			活 性 度	分解された Methoxyl	分 解 率	指 数
	pH			(mg)	(%)	
N/10-Na ₂ HPO ₄	8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.69	20.0	85
	6	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.60	17.3	72
	4	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.18	5.6	22
N/10-CH ₃ COONa	8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.81	23.1	100
	4	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.17	4.8	21
1M-NaCl	8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.42	11.6	51
	4	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% 飽和		0.13	4.5	19
CHCl ₃	-	(NH ₄) ₂ SO ₄ 70% 飽和		0.37	10.8	46
	-	Ethanol 添 加		0.56	16.0	69

馬鈴薯の場合に比し活性度は低い、同様の結果が得られた。即ち抽出剤としては CH₃COONa が良く、pH 8 で強く抽出される。又 CHCl₃ で抽出したものは Ethanol による沈澱が活性は強い。併し塩類で抽出したものでは Ethanol による沈澱物は活性を示さない。

以上抽出及び沈澱による酵素分離の条件と活性度との関係について見ると各植物とも略同様の結果が出ている。

即ち水でも抽出されるが塩類溶液で良く抽出され、塩類としては CH₃COONa, Na₂HPO₄ が良く、又抽出の際の pH にも大きく左右され、pH 8 で最もよく抽出される。又 CHCl₃ も抽出剤として良い結果を表している。

沈澱剤としては (NH₄)₂SO₄ が良く、10~70% 飽和で大部分の酵素は沈澱する。Ethanol も CHCl₃ を抽出剤として用いた場合好結果が得られて居り、この酵素に対しては阻害作用は認められない。

これ等の結果はトマトよりの PE 分離の際の条件とよく一致し、植物体中の Pectin 分解酵素は同一の酵素即ち Pectin-Esterase をもつものと考えられる。

馬鈴薯茎葉、クローバ、ルーサン三者を比較するとクローバより最も高単位の酵素が得られた。

(2) Pectin-esterase の性質

植物のもつ PE の性質については PITHAWALA⁷⁾ 等のトマト果、BELL¹³⁾ のキュウリ、EDWARD¹⁴⁾ のオレンジ中より分離したものについて報告があり、著者等もトマト果より分離した PE について報告した。この実験では馬鈴薯、クローバ、ルーサンより分離した粗製酵素につき活性度を測定してその性質を調べた。

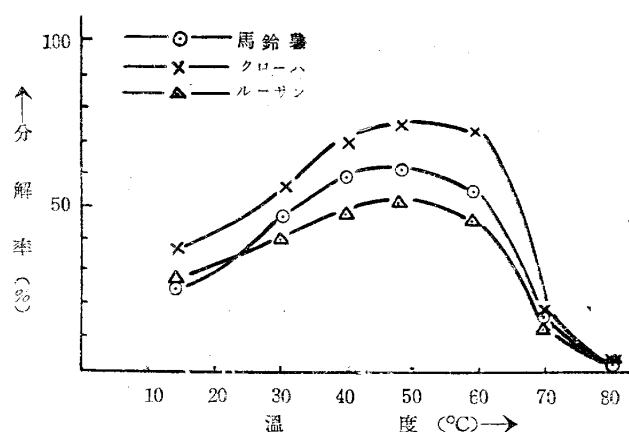
各酵素の分離条件及びその活性度は第7表の通りである。

なお活性度の測定方法は前実験と同様 1% Pectin 溶液に酵素を加え 40°C に2時間保ち、その間15分毎に NaOH で滴定して遊離する酸を中和し消費された NaOH の総量より分解された Methoxyl を算出した。

第7表 酵素の分離条件及び活性度

酵 素 源	抽 出 条 件	沈 澱 条 件	酵 素 添加量	分解された Methoxyl	分解率	指 数
			(mg)	(mg)	(%)	
馬 鈴 薯	CHCl ₃	Ethanol	10	2.62	61.6	81
クローバ	CH ₃ ·COONa, pH 8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 15~70% 飽和	10	3.25	76.5	100
ルーサン	CH ₃ ·COONa, pH 8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 15~70% 飽和	30	2.18	51.3	67

(a) 作用温度の影響. 温度を 15~80°C の間に取り他の条件を前の実験と同様にして作用させた結果を



第4図 作用温度と活性度との関係

第4図に示す.

この結果すべての酵素は 50°C に opt. temp. を有し, 70°C で急激に減少し, 80°C では殆んど活性は残っていない.

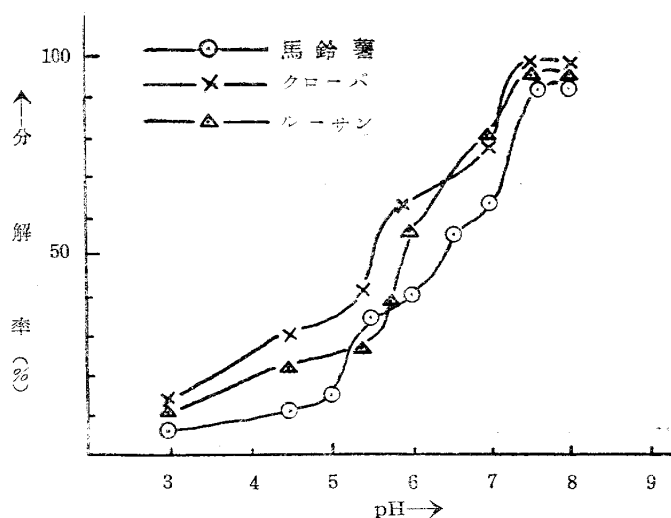
(b) pH の影響. Pectin 溶液に酵素を加えると直ち分解が始まり, CH₃OH を遊離し一方酸が生成し, 反応液は次第に酸性に傾く. これを放置すると作用は次第に緩慢となり遂に作用は行われなくなる. 併し NaOH で中和すると再び分解が始まりその分解率は 80% に迄達する.

従つてこの酵素は酸によつて阻止され, pH 3.8 以下では反応は進行しない. 但し pH 2.3 で 1 昼夜放置したものもその作用力は失われない.

Mac Ilvain-Buffer で pH を 3~8 に調節し, 他の条件を前の実験と同様にして作用せしめた結果を第5図に示す.

この結果より最適 pH は 7~8 にあり, この pH では短時間で 80% 以上の分解率を示す. 併し pH 4 以下では殆んど作用しない. これは三者とも同様の傾向で, トマト果の PE についての PITHAWALA⁷⁾ 等及び著者等の結果とよく一致している.

(c) 酵素作用に対する塩類の影響. (NH₄)₂SO₄ を飽和して沈澱せしめた粗製酵素の水溶液を透析又はイオン交換樹脂により精製するとその活性は減少する. 併しこの精製酵素に (NH₄)₂SO₄ や CaCl₂ を添加する



第5図 作用 pH と活性度との関係

と活性は再び増加する. 即ち粗製酵素 2gr. を H₂O 100c.c. に溶解し, 透析後その 0.5c.c. を酵素液として用い活性度に及ぼす塩類の影響を調べた.

即ち塩類の濃度は何れも 0.1M になる如くし, 作用温度は 50°C で他の条件は前実験と同様に行つた. その結果は第8表に示す.

第8表 酵素作用に対する塩類の影響

(表中の数字は分解された Methoxyl の mg. 数)

	粗製酵素	精製酵素				
		無添加	NaCl	Na ₂ HPO ₄	CaCl ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄
馬鈴薯	2.58	1.73	1.89	1.83	2.24	2.15
クローバ	3.18	1.10	1.63	1.05	2.45	2.38
ルーサン	2.10	0.75	1.42	-	1.88	1.35

この結果より CaCl₂, (NH₄)₂SO₄ は酵素作用を促進し, NaCl, Na₂HPO₄ は影響が認められない.

(d) 粘度及び還元力の変化. 基質に Pectin 及び Pectic acid を用い, これ等の酵素を作用せしめたが, 粘度変化や還元力の増加は認められなかつた. この事から植物より分離した酵素は Pectin の脱 Methoxyl 作用即ち Pectin-esterase のみであり, Polygalacturonase や Depolymerase は存在しないものと考えられる.

以上各酵素の性質は何れも極めて類似し, トマトより分離した Pectin-esterase の特性と一致する. 特に精製せる酵素を HCl にて分解し, そのアミノ酸組成を見るに, Aspartic acid, Glutamic acid, Glysin Alanine が強く認められ, Leucine, Cystein が極めて微弱に認められる程度でトマトの場合と一致する. この点から植物体中の Pectin 分解酵素は本質的には同一のもので何れも Pectin-esterase のみが存在するものと思われる.

文 献

1. Z. I. KERTESZ, J. W. WILLAMAN; Fruit Products J. 10. (1931).
2. E. GREEN, Z. I. KERTESZ; *ibid*, 10. 44 (1931).
3. BESON, W. CRUESS; *ibid*. 20. 365 (1941).
4. 岩崎康男; 食糧研究, 340 (昭14). 1(昭15). 17(昭16). 1 (昭19).
5. 皆川豊作; 農業及園芸 14. 2551 (昭14).
6. TZEREVITINOW; C. A. (1931).
7. H. PITHAWALA, G. SAVUR; Arch. Biochem. 17. 235. (1948).
8. R. MACCOLLOCH, J. C. MOYER, Z. I. KERTESZ; *ibid*, 10. 79 (1946).
9. MACDONNELL; *ibid*, 8. 113 (1945).
10. 竹花秀太郎, 小倉長雄; 園芸学会 (昭26), 農芸化学会 (昭26.27).
11. 古市誠; 農業及園芸 10, 2553 (昭10). 11. 2197 (昭11).
12. Z. I. KERTESZ; J. Biol. Chem. 121. 589 (1937).
13. T. A. BELL, J. L. ETCHELLS; Arch. Biochem. 31. 431 (1951).
14. J. W. EDWARD, M. A. JOSLYN; *ibid*.

Summary

1. Plant tissue, especially belonged to Solanaceae and Leguminosae, contains a enzyme which clarifies the fruit juice.
2. The enzyme is extracted from plant tissue by the salt solutions, sodium phosphate and sodium acetate, or chloroform, and precipitated by ammonium sulphate or ethanol.
3. The enzyme has optimum temperature at 50°C, and optimum pH 7~8.
4. The reaction of the enzyme is accelerated by calcium chloride and ammonium sulphate, but not inhibited by alcohol.
5. The enzyme decomposes the pectin molecule and produces the pectic acid and the methanol, followed the first order reaction. But the changes in viscosity or the increase of reducing power does not observed.
6. The enzyme from plant tissue is considered as pectin-esterase.