

カキ果肉 Cube インベルターゼの性質と それによるショ糖の連続加水分解

辻 政雄・乙黒 親男・小宮山美弘*

Properties of Immobilized Invertase of Persimmon Fruit and Continuous Inversion of Sucrose by Its Enzyme

Masao TSUJI, Chikao OTOGURO and Yoshihiro KOMIYAMA

要 約

カキ果実中の固定化インベルターゼの利用可能性を確かめるため、カキ果実から果肉 Cube を調製して、その酵素化学的性質や安定性を調べ、さらに連続使用試験等を行った。

- 1) 果肉 Cube インベルターゼは、至適温度が50℃、至適pHが5.0であり、熱及びpH安定性は、それぞれ45℃以下及びpH4.0～5.0の範囲であった。
- 2) 果肉 Cube インベルターゼ活性は、-20℃で80日間変化は見られなかった。しかし、酵素反応での使用と-20℃での保存を繰り返すと、活性の低下が見られ、保存51日後では開始時の70%の相対活性値を示した。
- 3) 高濃度である70%ショ糖溶液の果肉 Cube による分解速度は遅く、反応48時間後において65%の分解率しか示さなかった。
- 4) 果肉 Cube をガラスカラムに詰め、20%及び40%ショ糖溶液を基質として5日間連続使用試験を行ったところ、その期間中、酵素活性の低下は見られず、前者では90%、後者で45%の分解率で推移した。

1. 緒 言

著者らは、カキ果実に含まれるインベルターゼの有効利用を目的とし、果実から抽出した粗酵素液による転化糖の製造を試みたところ、短時間にショ糖がほぼ完全に加水分解されることを報告¹⁾した。

インベルターゼは、植物組織内で遊離型と結合型の2種類が存在し、その大部分は細胞壁と結合した結合型インベルターゼ²⁾いわゆる固定化酵素として存在すると言われており、カキ果実インベルターゼも細胞壁に結合した状態で存在することが十分考えられる。

現在、生体内触媒である酵素は微生物、動物および植物から抽出、精製され、食品の品質改善や有用物質の生産等に幅広く利用されている³⁾が、近年、酵素を1反応ごとに捨ててしまう不経済な

使用法に代わり、繰り返しかつ連続的に利用することができる固定化酵素に関する研究⁴⁾が数多く行われ、インベルターゼについても様々な固定化剤により固定化され^{5)~9)}、その性質等が調べられている。

そこで今回、カキ果実中の固定化インベルターゼの利用可能性を確かめるため、その酵素化学的性質や安定性を調べ、さらに連続使用試験等を行った。

2. 実験方法

2-1 供試材料

山梨県石和町で収穫した“富有”ガキを用い、一部の果実は貯蔵安定性を調べるために3℃と-20℃の温度下で貯蔵した。

2-2 固定化インベルターゼの調製

固定化インベルターゼは、剥皮した果実を一辺

* 現在、山梨県衛生公害研究所

が5~7mmの立方体となるように切断し、流水で十分洗浄した果肉 Cube を用いた。

2-3 果肉 Cube の保存試験

果肉 Cube を使用する場合、この Cube 中の酵素が長期間安定であることが必要である。そこで、果肉 Cube を酵素反応に使用後、十分水洗して冷蔵(3℃)及び冷凍(-20℃)下に貯蔵する繰り返し試験を行い、その安定性について検討した。なお、冷蔵区では、Cube の腐敗が考えられたので、20%、50%及び80%エタノール溶液に浸漬した試験区も設定した。

2-4 果肉 Cube の繰り返し使用試験

回分式による果肉 Cube の使用試験は、(a)果肉 Cube 50g、20%ショ糖溶液1,000ml、温度40℃で22時間及び(b)果肉 Cube 100g、40%ショ糖溶液1,000ml、温度40℃で20時間の2通りの反応条件で行った。

2-5 果肉 Cube の連続使用試験

果肉 Cube 140g を長さ45cm、内径3cmのガラスカラムに詰め込み、流速2ml/minで基質溶液を上昇法で流し、5日間連続運転を行った。この時、基質濃度と反応温度は、20%ショ糖溶液で40℃及び40%ショ糖溶液で50℃の2通りの条件で行った。

2-6 ショ糖分解酵素活性の測定

果肉 Cube 10g と20%ショ糖溶液50mlをプラスチック容器に入れ、40℃で30分間振とうさせながら反応させた。その後、反応溶液から1mlを分取し、98℃で3分間加熱、冷却後20mlに定容し、この溶液の一定量を既報¹⁰⁾の条件により日立635型高速液体クロマトグラフで分析した。

酵素の熱安定性の試験では、果肉 Cube をそれぞれの温度で1時間浸漬後、前述の方法で活性を調べた。また、pH安定性の試験では、果肉 Cube をそれぞれのpH溶液に入れ、3℃で3日間浸漬後取り出して十分水洗したのち前述の方法で活性を調べた。

2-7 ショ糖分解率

ショ糖分解率は、果肉 Cube 内へのショ糖の浸透により、全糖含量が反応中の溶液と反応開始時の溶液とは異なるため、以下のように算出した。すなわち、2-6により求めた反応液中のショ糖、ブドウ糖及び果糖含量からそれぞれの糖のモル濃度を算出後、ショ糖の加水分解によって生成した

還元糖量をショ糖の分解量に換算した。次に、反応液中の全ショ糖含量(未分解量+分解量)を求め、ショ糖分解率は、ショ糖分解量の全ショ糖含量に対する比率として算出した。

3. 実験結果

3-1 果肉 Cube インペルターゼの活性に及ぼす温度の影響と熱安定性

果肉 Cube インペルターゼの活性に及ぼす温度の影響をFig. 1及び熱安定性をFig. 2にそれぞれ示した。至適温度は50℃、熱による安定性は45℃以下であった。

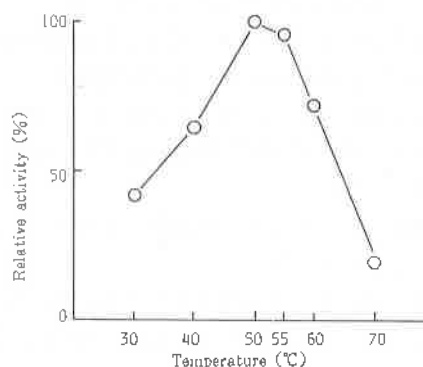


Fig. 1 Optimum temperature of invertase of cubes prepared from "Fuyu" persimmon

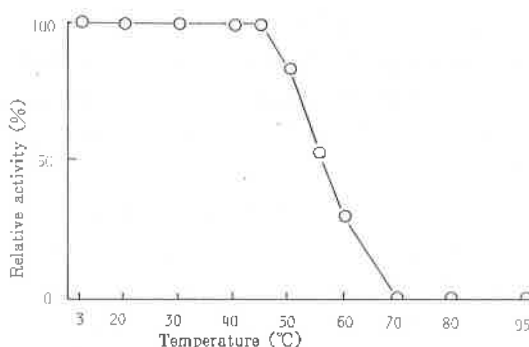


Fig. 2 Thermostability of invertase of cubes prepared from "Fuyu" persimmon

3-2 果肉 Cube インペルターゼの活性に及ぼすpHの影響とpH安定性

果肉 Cube インペルターゼの活性に及ぼすpHの影響をFig. 3及びpH安定性をFig. 4にそれぞれ示した。その結果、至適pHは5.0であり、pH安定

性は4.0~5.0の範囲にあった。

3-3 果肉 Cube インペルターゼの安定性

3-3-1 貯蔵安定性

3℃及び-20℃に貯蔵したカキ果実から随時果肉 Cube を調製してショ糖分解力を調べ、その結果をFig. 5 に示した。3℃では48日間、-20℃

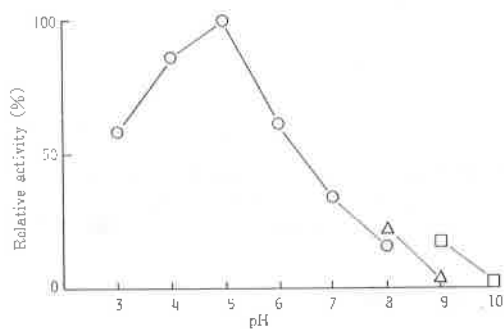


Fig. 3 Optimum pII of invertase of cubes prepared from "Fuyu" persimmon
Buffer: -○-: Na₂HPO₄-Citric acid, -△-: Tris-HCl
-□-: Glycine-NaOH

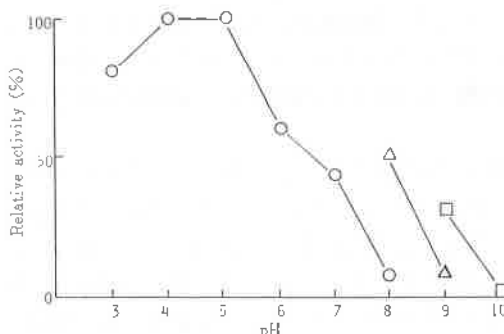


Fig. 4 pII stability of Invertase of cubes prepared from "Fuyu" persimmon
Buffer: -○-: Na₂HPO₄-Citric acid, -△-: Tris-HCl
-□-: Glycine-NaOH

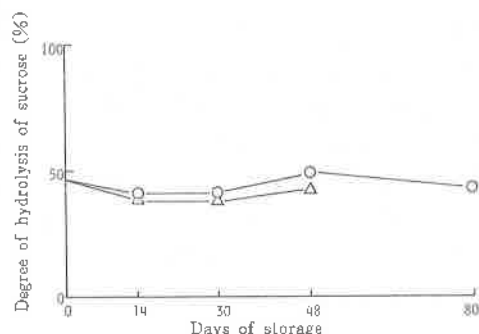


Fig. 5 Effect of storage temperature on rate of degree of hydrolysis of sucrose
-○-: cubes prepared from persimmon stored at 20°C
-△-: " " " " " " " " at 3°C

では80日間貯蔵したところ、両温度区とも貯蔵開始直後とほとんど変わらないショ糖分解力を示した。なお、3℃に貯蔵した果実は徐々に軟化し、貯蔵48日後のものでは、果肉がぐずれ、Cube を調製するのが困難な状態であった。一方、-20℃に貯蔵した果実は、解凍後果肉が軟化しているが、3℃のものとは異なり、果肉の崩壊は見られず、弾性のある、いわゆるゴム状を呈しており、Cube の調製も可能であった。

3-3-2 使用、保存の繰り返し試験下での安定性

果肉 Cube を酵素反応に使用し、十分洗浄後、各温度下に保存する繰り返し試験を行った時のインペルターゼの安定性をFig. 6 に示した。ショ糖分解力は、各試験区とも保存中に低下し、冷蔵及び冷凍区ではほぼ同様な傾向で推移しており、保存51日後には保存開始直後の70~77%の相対活性値を示した。一方、エタノール処理区は冷蔵無処理区や冷凍区より酵素活性の低下が大きいが、エタノール濃度間の差異は見られず、保存51日後においても、55~57%の相対活性値を示した。

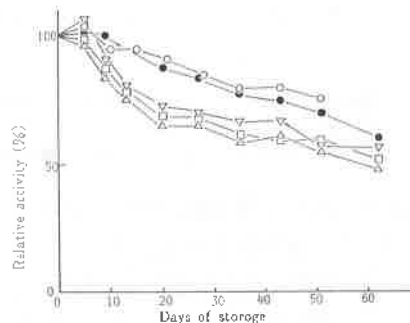


Fig. 6 Stability of invertase of cubes stored at 3°C and -20°C
-○-: 3°C ●: -20°C
-△-: " (in 20% EtOH)
-▽-: " (in 50% EtOH)
-□-: " (in 80% EtOH)

3-4 果肉 Cube インペルターゼの利用試験

3-4-1 高濃度ショ糖溶液の分解

70%ショ糖溶液1,100mlに果肉 Cube 100g を添加し、温度55℃で反応させた結果をFig. 7 に示した。ショ糖の分解速度はかなり遅く、反応48時間後においても65%の分解率しか得られなかった。なお果肉 Cube は高糖度溶液のためにその体積が半分以下に縮小しており、また糖液は Cube から

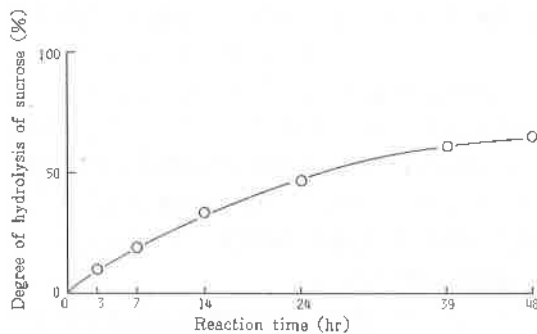


Fig. 7 Time course of hydrolysis of sucrose by cubes prepared from "Fuyu" persimmon
Sucrose concentration; 70%

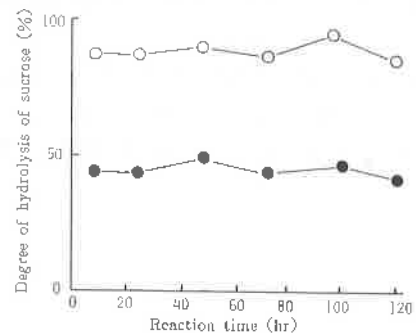


Fig. 9 Continuous hydrolysis of sucrose by cubes prepared from "Fuyu" persimmon
Sucrose concentration; -○: 20%, -●: 40%

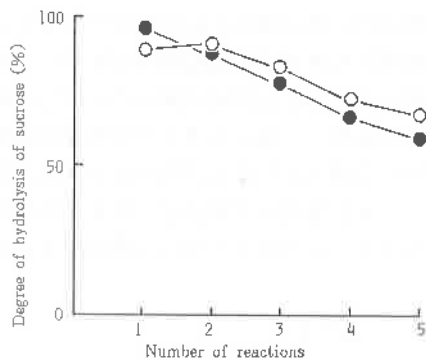


Fig. 8 Repeated use of cubes prepared from "Fuyu" persimmon
Sucrose concentration; -○: 20%, -●: 40%

の色素溶出のため、多少黄色を呈していた。

3-4-2 繰り返し使用試験

果肉 Cube を繰り返し使用した結果を Fig. 8 に示した。ショ糖分解力は、両試験区とも繰り返し使用により減少したが、20%ショ糖区は40%ショ糖区よりその減少程度は低く、5回目の反応において前者では1回目の76%、後者では62%の値を保持していた。

3-4-3 連続使用試験

3-4-2 の繰り返し試験の結果、果肉 Cube インペルターゼが安定であったことから、果肉 Cube をカラムに詰め、ショ糖を連続的に加水分解させる試験を行い、その結果を Fig. 9 に示した。反応5日間ではあるがその期間中20%ショ糖区では90%、及び40%ショ糖区では45%のショ糖分解率を示しそれぞれ酵素活性の低下は認められなかった。

4. 考 察

カキ果実から調製した果肉 Cube を用いて、固定化インペルターゼの至適温度や pH さらに熱安定性を調査したところ、著者らが¹⁰⁾アセトンパウダーからリン酸緩衝液により可溶化したインペルターゼのそれらとほとんど同様であり、酵素の存在形態による酵素化学的性質の差異は見られなかった。

酵素の保存性は、実際の利用面では非常に重要であるが、今回の固定化インペルターゼは、カキ果実を冷蔵または凍結後調製した果肉 Cube の活性が、保存期間中その変化が見られず、非常に保存安定性が高いことがわかった。しかし、果肉 Cube の使用、保存を繰り返すと、インペルターゼ活性は減少する傾向が認められた。これは、酵素の失活や反応時または水洗時の酵素流出が考えられる。

インペルターゼは、DEAE-セルロース⁹⁾を用いるイオン結合法、ポリアクリルアミドゲル⁷⁾を用いる包括法、放射線⁸⁾を用いる重合法などさまざまな方法により固定化され、その性質やショ糖の連続加水分解反応が行われ、この中でポリアクリルアミドゲル法⁷⁾では一週間の連続反応によって活性の減少はほとんど認められないと報告されている。今回のカキ固定化インペルターゼも5日間ではあるが、連続反応による活性の低下は見られなかった。しかし、基質濃度が低い場合における微生物による腐敗、また Fig. 7 に見られるように基質濃度が高い場合の加水分解速度の低下などの問題点もあり今後さらに検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 辻 政雄・小宮山美弘：山梨工技セ報、1、127～129 (1987)
- 2) IKI, K., NAKAGAWA, H., OGURA, N and TAKEHANA, H.: Agric. Biol. Chem., 41 (7)、1311～1312 (1977)
- 3) 増田宏志・菅原四郎：農化47 (3)、147～152 (1973)
- 4) 一島英治編：食品工業と酵素 (朝倉書店) (1985)
- 5) 千畑一郎編：固定化酵素 (講談社サイエンティフィック) (1981)
- 6) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: Agric. Biol. Chem., 40 (6)、1151～1157 (1976)
- 7) 宇佐美昭次・倉都祥行：醸工、51 (11)、789～794 (1973)
- 8) 宇佐美昭次・野田治郎・後藤邦久：醸工、49 (7)、598～603 (1971)
- 9) 根来秀夫：醸工、48 (11)、689～697 (1970)
- 10) 辻 政雄・小宮山美弘：日食工誌、34 (7)、425～431 (1987)