

# 琉球大学学術リポジトリ

## 生甘藷組織の酵素的分解(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 石原, 昌信, Toyama, Seizen, Isihara, Masanobu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3875">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3875</a>

## 生甘藷組織の酵素的分解

当山清善\*、石原昌信\*

Seizen TOYAMA, Masanobu ISIHARA : Degradation of raw sweet-potato tuber-tissues with enzyme

### Summary

Enzymatic degradation of sweet-potato tuber-tissue was investigated with commercial cellulase preparation, Meicelase, and the enzyme from *Aspergillus saitoi*. The tuber-tissue-degrading activity of enzyme was expressed by measuring the amount of residual tissues after degradation. *Asp. saitoi* enzyme or Meicelase showed a lower activity against the tuber-tissues. With the combined action of two enzymes, however, the tuber-tissues were readily degraded to release glucose and galacturonic acid. The free galacturonic acid was increased during incubation period by the addition of *Asp. saitoi* enzyme to tuber-tissues and not by that of Meicelase.

The combined action of *Asp. saitoi* enzyme and Meicelase could not accelerate the degradation of pectic substance in the tuber-tissues. Meicelase was found to degrade cellulosic materials in the tuber-tissues, producing high-molecular-weight pectic substances. When *Asp. saitoi* enzyme and Meicelase were added to the tuber-tissues, reducing sugar and total sugar were increased significantly.

### 緒 言

甘藷等の澱粉質物を無蒸煮のまま酵素を用いて分解・糖化し、アルコール発酵の原料に供することができれば、省エネルギー的に燃料用アルコール<sup>1,8)</sup>を生産することが可能である。

芋組織中の澱粉は、セルロースを主成分とする細胞壁に囲まれて存在しており、個々の細胞はペクチン質物によって接着されているものと考えられている<sup>3,4)</sup>。従って、生甘藷組織中の澱粉を酵素糖化するに当っては、ペクチン質物を分解することにより細胞を遊離せしめるとともに細胞壁を分解して液状化を行ない、澱粉粒の放出を促進させる必要がある。

*Aspergillus* 属カビの産生するペクチナーゼ（ペクチンデポリメラーゼ）が生甘藷磨砕物を強力に崩壊（マセレーション）することが判明し、本酵素を用いた生甘藷からの省エネルギー型アルコール発酵が検討されている<sup>12,13)</sup>。酵素利用による生甘藷組織からの澱粉の回収においては、ペクチナーゼとセルラーゼの作用が必須であることが明らかにされている<sup>15)</sup>。しかし、酵素による生甘藷組織の崩壊・液状化と澱粉粒の放出との関係については詳細に検討されていない。著者らは前報<sup>14)</sup>で、生甘藷磨砕物に *Aspergillus saitoi* の産生するペクチナーゼとセルラーゼ標品を同時に添加すると芋組織の崩壊に伴ない液状化され、澱粉

\*琉球大学農学部農芸化学科

粒が遊離することを報告した。本報では、酵素利用による生甘藷からの無蒸煮アルコール発酵を実施するに当り、生甘藷組織の崩壊・液状化に関与する酵素系を明らかにする必要があると考え、生甘藷磨砕物から調製した生甘藷組織の *Asp.saitoi* 酵素とセルラーゼによる分解機構について調べた。

### 実験方法

(1)甘藷：甘藷は前報<sup>14)</sup>と同じ品種のものを用い、水分含量及び澱粉価はそれぞれ63.5%と28.5%であった。

(2)基質の調製：酵素分解反応に用いた生甘藷組織は次のようにして調製した。即ち、剥皮した甘藷を電動式磨砕機で粒状に砕いた後、水道水を加えて洗浄を行ない、澱粉粒及び可溶性成分を除去した。得られた洗浄甘藷磨砕物に95%エタノールを加えて脱水した後、室温にて乾燥して生甘藷組織を調製した。生甘藷組織中の澱粉量及びセルロース量はそれぞれ82.5%と11.4%であった。

(3)酵素剤：生甘藷組織の酵素分解反応には、微生物起源セルラーゼ標品のメイセラゼ（明治製菓株）を用い、濃度が0.5%(%)になるように蒸留水に溶解して調製した。

(4)供試菌株の培養及び酵素液の調製：菌株は研究室保存の糸状菌 *Asp.saitoi* 3295である。

本菌株は生甘藷組織のマセレーションに関与するペクチナーゼ活性が比較的高いことが確められている。菌株の培養は、前報<sup>14)</sup>と同じ条件でフスマ固形培地に孢子を接種し、30℃で4日間静置して行なった。酵素の抽出は、培養後、麴に2倍量の蒸留水を加え、室温にて時々攪拌して行なった。遠心分離によって得られた上澄液にアセトンを冷却下で約60%飽和になるように加えて酵素を濃縮した。遠心分離して得られた沈澱部に所定量の蒸留水を加えた後遠心分離を行ない、上澄液を粗酵素液として用いた。

(5)生甘藷組織の酵素分解：酵素反応の組成は、基質250mgを50ml容三角フラスコに採り、1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 0.5ml、0.2%窒化ナトリウム0.5ml及び酵素液で総量を5.0mlとした。酵素反応は40℃でゆるく振盪して行ない、酵素反応後東洋沓紙No. 2を用いて沓過により固液分離した。酵素反応液はただちに10分間煮沸処理した後遠心分離により酵素蛋白を除いた。酵素反応液中の還元糖量は *Somogyi-Nelson* 法、全糖量はフェノール硫酸法、ガラクトロン酸量はチオバルビツール酸法及び全ガラクトロン酸量はカルバゾール法によりそれぞれ測定した。酵素反応残渣は水道水とともに小型試験管に注ぎ込み、一定量になるまで加水したのち、沈降した残渣の高さを測定した。生甘藷組織分解活性は酵素反応前の基質の高さを50%減少せしめる酵素量で表示した。

$$L = (H_0 - H_t) / H_0 \times 0.5$$

L：生甘藷組織分解活性

H<sub>0</sub>：反応前の基質の高さ (cm)

H<sub>t</sub>：反応後の基質の高さ (cm)

また、生甘藷組織中のセルロース量の測定は、*Updegraff*<sup>6)</sup>の方法に準じて行なった。

### 実験結果

生甘藷組織の崩壊・液状化に関与する酵素系を明らかにする目的で、基質に *Asp.saitoi* 酵素とセルラーゼを単独又は混合して加え、40℃で酵素反応を行ない、酵素分解性及び各種成分の変化について調べた。

#### (1)生甘藷組織の酵素分解性

酵素反応後、残渣を試験管に採り、沈降した残渣の高さを測定することにより生甘藷組織の酵素分解性を表わしたのがFig. 1である。酵素反応を48時間行なった後、基質の減少量を示したのがFig. 2 (写真)である。図に示したように、*Asp.saitoi* 酵素及びセルラーゼを単独で基質に作用させると分解率は極めて低い値であった。しかし両酵素を混合して加えると、生甘藷組織は酵素反応時間の経過とともに

Fig. 1 Enzymatic degradation of sweet-potato tuber-tissues by the crude enzyme of *Asp.saitoi* and Meicelase.

Sweet-potato-tuber were washed and mashed using a grinder. The pulverized materials were immediately soaked in tap water, filtered on a Buchner funnel, and washed with water several times until no starch and water soluble compounds were detected. The tissues were washed with 95% ethanol and dried in vacuo at 25°C. A fungal strain which we used in this study was *Asp.saitoi*. A spore inoculum was used for initial growth in the petri dish containing wheat bran medium(wheat bran:water= 1:1). After incubation at 30°C for 4 days, Koji was added to double distilled water. The extraction of enzyme from Koji was performed at room temperature for 60 min with an interval shaking.

The crude enzyme was prepared from Koji-extracts by centrifugation then dissolved in distilled water and centrifuged. Cellulase of *Trichoderma* sp., Meicelase, was obtained from Meiji seika, Tokyo, Japan. The enzyme was dissolved in distilled water and then centrifuged. The standard enzyme reaction mixture contained 0.5 ml of 1 M acetate buffer of pH 4.5, 250 mg of ethanol-washed tuber-tissues, 0.5 ml of 0.1% potassium pyrophosphate and 0.5ml of 0.5% enzyme preparation in the final volume of 5.0ml. After incubation at 40°C for an indicated time, the remaining tuber-tissues were recovered by filtration through Tokyo filter paper no.2, and poured into a small test tube with tap water. The degree of sedimentation was expressed as(initial height-residual height)/initial height x 0.5. (a) *Asp.saitoi* enzyme (b) Meicelase(c) *Asp.saitoi* enzyme+Meicelase

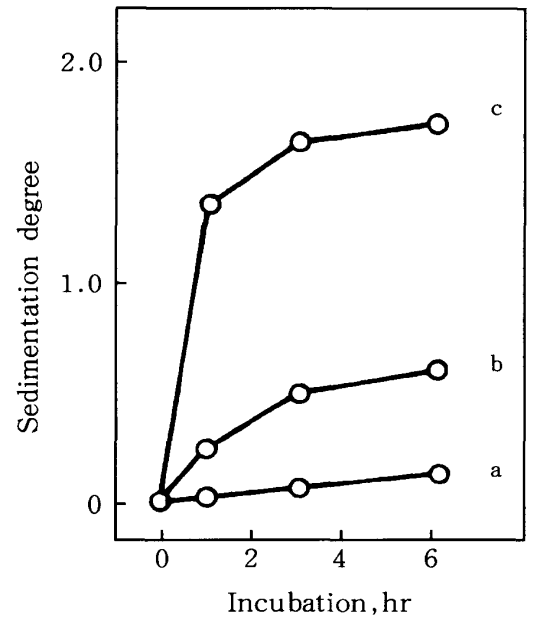
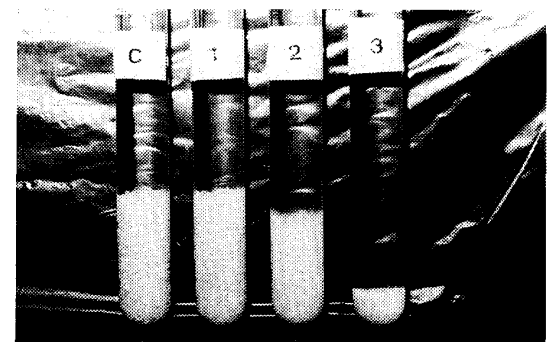


Fig. 2 Enzymatic degradation of sweet-potato tuber-tissues by the crude enzyme of *Asp.saitoi* and Meicelase

The sweet-potato tuber-tissues were incubated with *Asp.saitoi* enzyme, Meicelase and the combination of both enzymes at 40°C for 48hr. After incubation, the remaining tuber-tissues were recovered by filtration through Toyo filter paper no. 2 and poured into a small test tube with tap water.

- (a) *Asp.saitoi* enzyme
- (b) Meicelase
- (c) *Asp.saitoi* enzyme+Meicelase



Control (a) (b) (c)

著しく分解されることがわかった。以上の結果は、生甘藷磨砕物から調製した基質が酵素による生甘藷磨砕物の液状化程度を測定するのに適していることを示しており、芋組織の液状化は複数の酵素の協同作用によって進行することを示唆している。

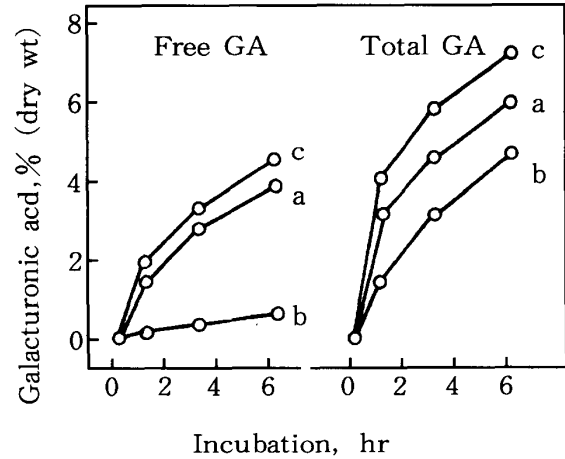
(2)酵素反応生成物中のウロン酸量

次に、酵素反応で生成されたガラクトツロン酸量について測定した結果をFig. 3に示した。酵素反応はFig. 1と同様な条件下で行なった。メイセラゼ添加では遊離ガラクトツロン酸の生成量は少ないが、*Asp.saitoi* 酵素添加では酵素反応時間の経過とともに増大することがわかった。両酵素を同時に加えると遊離ガラクトツロン酸が増加したが、*Asp.saitoi* 酵素単独で作用させた時と著しい差はみられなかった。他方、酵素反応液中の全ガラクトツロン酸量は、セルラーゼ単独で添加した場合でも反応時間の経過に伴ない増大し、*Asp.saitoi* 酵素を加えた系と近似した値を示すことがわかった。全ガラクトツロン酸量は両酵素添加で最も高い値を示したが、*Asp.saitoi* 酵素単独の場合と顕著な差は認められなかった。以上の結果から、セルラーゼ標品中には生甘藷組織のペクチン質物に作用して水可溶性のペクチン

を生成するペクチナーゼが存在することがわかった。また *Asp. saitoi* 酵素は、生甘藷組織のペクチン質物を短時間でガラクトロン酸まで分解することが明らかになった。

Fig. 3 Release of galacturonic acid on enzymatic degradation of sweet-potato tuber-tissues.

The reactions were carried out under the conditions stated in the legend to Fig. 1. After incubation, total galacturonic acid and free galacturonic acid formed were determined with carbazole method and thiobarbituric acid test, respectively.  
(a) *Asp. saitoi* enzyme (b) Meicelase  
(c) *Asp. saitoi* enzyme+Meicelase

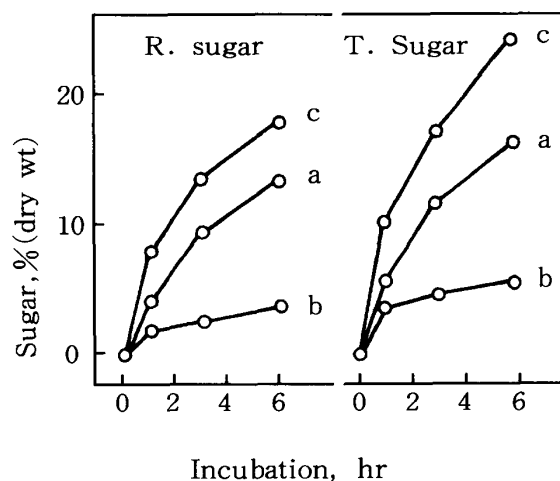


### (3) 酵素反応生成物中の糖量

Fig. 4 は方法に示した条件で酵素反応を行ない、酵素反応生成物中の還元糖量及び全糖量について測定した結果である。*Asp. saitoi* 酵素添加では酵素反応開始とともに還元糖量が増大したが、メイセラゼ添加では還元糖の生成量は少なく、反応初期でほぼ一定値を示した。両酵素を加えて反応を行なうと還元糖の生成が高められ、反応6時間で基質重量に対して約18% (w/dry wt)の分解率を示した。酵素反応液中の全糖量は、酵素をそれぞれ単独で加えた場合には還元糖量とほぼ同じ値であったが、*Asp. saitoi* 酵素とセルラーゼを同時に加えてやると還元糖量の約1.3倍高い値を示した。還元糖量及び全糖量の増加は、主に生甘藷組織中の澱粉が芋組織の分解に伴ない細胞外へ放出され、*Asp. saitoi* 酵素に含まれているアミラーゼの作用によって分解、糖化されたためである。

Fig. 4 Release of sugar on enzymatic degradation of sweet-potato tuber-tissues.

The reactions were carried out under the conditions stated in the legend to Fig. 1. After incubation, total sugar and reducing sugar were determined with phenol-sulfuric acid method and somogyi-nelson's method using glucose as a standard, respectively.  
(a) *Asp. saitoi* enzyme (b) Meicelase (c) *Asp. saitoi* enzyme+Meicelase



### (5) 生甘藷組織繊維の分解性

次に、酵素反応において生甘藷組織中のセルロースが分解されたかどうかを調べるため、酵素反応後残渣中のセルロース量の変化について追跡した。結果をFig. 5に示した。

図より、*Asp. saitoi* 酵素添加では生甘藷組織中のセルロースは分解されないが、セルラーゼでは反応

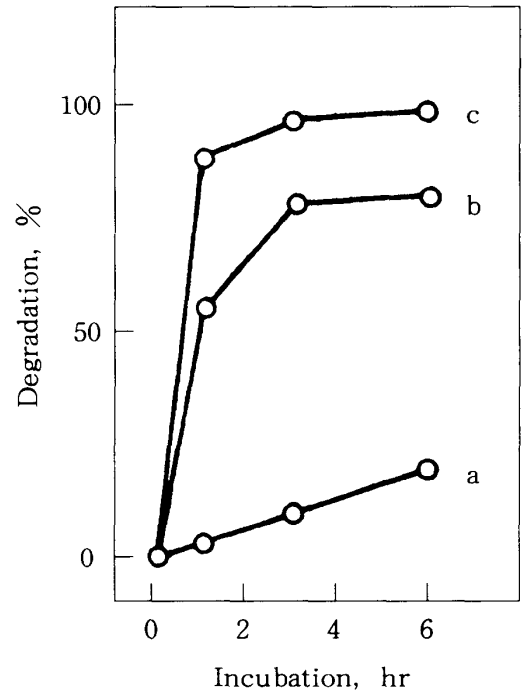
3時間で約78%の分解率を示した。

両酵素を加えた場合にはセルラーゼ単独で作用させた時よりセルロースの分解速度が促進され、分解率も高いことがわかった。両酵素添加では、生甘藷組織中のセルロースは酵素反応3時間でほぼ完全に分解され、澱粉粒の放出が観察された。

Fig. 5 Degradation of cellulose in the tuber-tissues by *Asp.saitoi* enzyme and Meicelase.

The reactions were carried out under the conditions stated in the legend to Fig. 1. After incubation, cellulose in the tuber-tissues were determined according to the method of Updegraff<sup>(16)</sup>.

- (a) *Asp.saitoi* enzyme (b) Meicelase  
(c) *Asp.saitoi* enzyme+Meicelase



## 考 察

著者らは前報<sup>(4)</sup>で、生甘藷磨碎物の酵素による崩壊・液状化について調べた結果、生甘藷磨碎物に高いペクチナーゼ活性を有する *Asp.saitoi* 酵素とセルラーゼを同時に加えると組織の崩壊・液状化が進行することを示した。本報では、生甘藷磨碎から調製した生甘藷組織の酵素分解性を調べることにより、生甘藷磨碎物の崩壊・液状化に関与する酵素を明らかにすることを目的とした。

生甘藷組織の *Asp.saitoi* 酵素及びセルラーゼによる分解性を調べた結果、酵素をそれぞれ単独で加えても生甘藷組織の分解性は低く、両酵素を同時に加えると分解性が著しく高められ、澱粉粒の遊離が認められた。この結果は、生甘藷磨碎物の酵素による液状化程度の測定に本基質が適していることを示しており、生甘藷磨碎の液状化には二種類以上の酵素の作用が関与していることが判明した。酵素反応生成物中のウロン酸量について調べた結果、*Asp.saitoi* 酵素添加で遊離ガラクトuron酸の生成量が高い値を示した。セルラーゼ添加では遊離ガラクトuron酸の生成はほとんどみられない。両酵素を加えた場合には、*Asp.saitoi* 酵素添加とほぼ同量のガラクトuron酸量を示した。全ガラクトuron酸量は、セルラーゼ単独で作用させた場合でも酵素反応時間に伴ない増加し、*Asp.saitoi* 酵素を添加した時と近似した値を示した。両酵素を加えると全ガラクトuron酸量は最も高い値を示したが *Asp.saitoi* 酵素を加えた系と著しい差はみられなかった。以上の結果から、セルラーゼ標品中には生甘藷組織のペクチン質物を分解して可溶性のペクチンを生成する酵素が存在することがわかった。また、*Asp.saitoi* 酵素はペクチン質物をガラクトuron酸に分解する酵素であることが明らかになった。一般に、マセレーション作用をもつものは液化型 (*endo* 型) ペクチナーゼ<sup>(6,7,10)</sup>であることから、*Asp.saitoi* 酵素に含まれるペクチナーゼは液化型酵素であると思われる。他方、セルラーゼ標品中のペクチナーゼは生甘藷磨碎物に対するマセレーション作用を示さないが、高分子ペクチンを生成することから液化型酵素であると考えられる。液

化型ペクチナーゼの中には酵素の物理的性質や可溶性基質に対する特異性に差がみられないが、マセレーション作用を示さない酵素がいくつか例がある<sup>2,5)</sup>。次に、酵素反応生成物中の還元糖量及び全糖量について調べた結果、*Asp.saitoi* 酵素添加では還元糖量が増加したが、セルラーゼ添加では還元糖の生成は少なかった。両酵素を加えると還元糖の生成量が最も高い値を示した。全糖量は、各酵素を単独で加えた場合には還元糖量と著しい差はみられないが、両酵素添加では還元糖量の約1.3倍に達した。これは、生甘藷組織の分解に伴ない細胞内に存在する澱粉粒が細胞外へ放出されるとともに *Asp.saitoi* 酵素に存在するアミラーゼによって分解・糖化されたためである。酵素分解反応後、生甘藷組織中のセルロース量の変化について調べた結果、*Asp.saitoi* 酵素ではセルロースの分解はみられないが、セルラーゼでは単独でも約78%の分解率を示した。両酵素を加えるとセルロースの分解速度が促進され、分解率も高められた。以上の結果から、生甘藷磨砕物の酵素による崩壊・液状化現象は次のように解析される。即ち、生甘藷磨砕物はペクチナーゼの作用でマセレーションが起こり、個々の細胞が分離するが液状化は認められない。セルラーゼ単独の作用では、生甘藷磨砕物中のペクチン質物の分解とともにセルロースの分解がみられるが液状化には至らない。両酵素が存在すると芋組織のペクチン質物はガラクトuron酸まで分解され、これに伴ない芋組織の崩壊が起こり、次いで細胞壁の主成分であるセルロースが分解されて液状化が起こるものと推察された。

## 要 約

生甘藷組織の崩壊・液状化に関与する酵素系を解明する目的で、*Asp.saitoi* の産生する酵素と *Trichoderma* 属起源セルラーゼ剤による生甘藷組織の酵素分解性と各種成分の変化について調べた。

*Asp.saitoi* 酵素及びセルラーゼによる生甘藷組織の分解性は極めて低い値であったが、両酵素を同時に添加すると酵素反応時間の経過とともに著しく分解性が高められた。酵素反応液中のガラクトuron酸量を測定した結果、*Asp.saitoi* 酵素ではガラクトuron酸が多く生成されたが、セルラーゼではガラクトuron酸生成量は少なかった。全ガラクトuron酸量は、セルラーゼ標品単独で作用させた系においても *Asp.saitoi* 酵素を加えた時と近似した値を示した。両酵素が存在してもペクチン質物の分解において相乗的効果は認められなかった。酵素反応液中の還元糖量及び全糖量は、両酵素を同時に加えた時に最も高い値を示した。生甘藷組織中のセルロースはセルラーゼ添加で良好に分解されたが、両酵素を加えると分解速度が増大した。

## 引用文献

1. Chau. J. W., Fukui. N., Wakabayashi. Y., Yoshida. T., Taguchi. H. 1984 Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy-saving production of ethanol. J. Ferment. Technol. 62:123-130
2. 遠藤 章 1966 糸状菌のペクチン質分解酵素に関する研究 農化 40:PR39~R44
3. 石井茂孝、川村敏、横塚保 1970植物組織の酵素的分解に関する研究(第4報) *Aspergillus sojae* NO.48のmacerating activityについて 農化 44:306-311
4. 石井茂孝 1987マセレーション酵素と高等植物の細胞壁接着物質 微生物 3:82~89
5. 梶 明、藤川 勇、岩原章二郎、佐藤優行 1972 *Bacillus* SP.F-11のペクチン分解酵素による植物組織の崩壊作用 農化 46:509-516
6. Manachini. P.L., Fortina. M.G., Parini. C. 1987 Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. Biotechnology Letters 9:219-224
7. Markovic. O., Slezarik. A., Labudova. 1985 Purification and characterization of pectin-

- esterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. FEMS Microbiology Letters 27:267 - 271
8. Matsuoka. H., Koba. Y., Ueda. S. 1982 Alcoholic fermentation of sweet potato without cooking. J. Ferment. Technol. 60:599 - 602
  9. Sakai. T., Okushima. M., Sawada. M. 1982 Some properties of endopolygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. Agric. Biol. Chem. 46:2223 - 2231
  10. Sakai. T., Okushima. M., Yoshitake. S. 1984 Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. Agric. Biol. Chem. 48:1951 - 1961
  11. Sreenath. H.K., Kogel. F., Radola. B.J. 1986 Macerating properties of a commercial pectinase on carrot and celery. J. Ferment. Technol. 64:37 - 44
  12. Svendsby. O., Kakutani. K., Matsumura. Y., Yamamoto. T. 1981 Ethanol fermentation of uncooked sweet potato with the application of enzyme. J. Ferment. Technol. 59:485 - 487
  13. 当山清善、石原昌信、与那覇和雄、大久保勉 1984 酵素剤利用による甘藷芋からのエタノール生産 琉大農学報 31:35 - 42
  14. 当山清善、石原昌信、与那覇和雄 1988 酵素による生甘藷組織の分解 琉大農学報 35:37-44
  15. 外山信男、藤井昇、小川喜八郎 1965 細胞分離酵素とcellulaseによる甘藷澱粉の製造(第1報)甘藷澱粉生粕および乾燥粕に対する酵素剤の作用 醸工 43:756 - 765
  16. Updegraff. D.M. 1969 Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. 32:420 - 424