

ペクチン性多糖の酵素誘導によるゲル化と その食品への応用

—愛玉子ガラクトチュロナンのゲル形成機構—

〔研究目的〕

愛玉子イタビ (*Ficus awkeotsang* Makino, Fig. 1) は台湾中央部の高地に自生するイチジクの一つで“Aw-geo”又は“Aw-geochin”と言われる。その乾燥種子の水抽出物に含まれる酸性多糖は速やかにゲルを形成することから、現地では夏期に冷菓としてシロップ等をかけて食されている。

この酸性多糖はおもにペクチン様多糖からなることが報告されているが^{1,2)}、その構造および化学的な特性に関する詳細な研究は十分ではなく、またゲル形成機構に関する研究においても、Huangら³⁾によって種子内在のペクチンエステラーゼが関与することが示唆されたが、その分離、精製および酵素化学的な詳細な研究は行われていない。これまでに我々は本多糖の抽出方法を確立し、さらにその化学特性を調べた結果、ラムノース等の中性糖を殆ど含まない直鎖の高メトキシルガラクトチュロナンであることを明らかにした⁴⁾。ここではさらに愛玉子ガラクトチュロナンのゲル形成に関

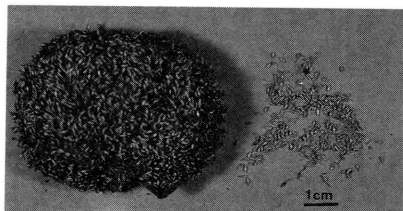


Fig. 1 Fruit Body and Seeds of “Aw-geo” *Ficus awkeotsang* Makino.

三 崎 旭 (大阪市立大学生生活科学部教授)

与すると思われる種子内在性のペクチンエステラーゼの局在部位を明らかにするとともに、本酵素の分離、精製を行うことにより諸性質を調べ、さらに愛玉子ガラクトチュロナンのゲル形成機構の解明を試みた。

〔方法〕

愛玉子ガラクトチュロナンの調製は Fig. 2 に示した方法で行った。ガラクトチュロナン酸の定量は *m*-hydroxydiphenyl 法⁵⁾ を用いて行い、タンパク質の定量は Lowry 法⁶⁾ に従った。ペクチンのメチルエステル化度の測定はこれまでに報告した酵素法であるアルコールオキシダーゼ・ホルムアルデヒドデハイドロゲナーゼ法によって行った⁴⁾。

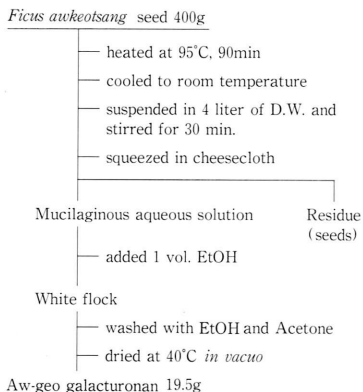


Fig. 2 Preparation of Aw-geo galacturonan

ペクチンエステラーゼの調製は愛玉子乾燥種子の花被片 (300 g) を 0.5M の食塩を含む 10mM リン酸緩衝液, pH 7.0 (3 L) に懸濁し, 30 分間の攪はん抽出を行い, 遠心分離 (16,000×g, 20 分間) により種子を除去し, 上清を得た。次に硫酸塩析 (90%飽和) により本酵素は沈澱物として得られ, 脱イオン水および 10mM リン酸緩衝液, pH 7.4 でそれぞれ透析 (2℃, 24 時間) を行って得られた透析内液を粗酵素とした。酵素の精製は 10mM リン酸緩衝液, pH 7.4 で平衡化した Q-Sepharose に粗酵素 (115.5 units, 46.2 mg protein) を添加し, 酵素の溶出は同緩衝液でカラムを洗浄した後, 0-0.5M の食塩を含む同緩衝液を用いたグラジエント法により行った。ペクチンエステラーゼ活性の測定は以下の方法で行った。0.5% 愛玉子ガラクトクロナン溶液 (29.8 ml) に酵素液 (0.2 ml) を加え, 0.1M NaOH で pH 5.4 に調整後, 反応 (25℃, 5 分間) を行い, pH-スタットを用いて遊離するカルボキシル基を 0.01M NaOH で滴定することにより酵素量を求めた。なお酵素活性 1 unit は 1 分間に 1 μmol のカルボキシル基を遊離する酵素量と定義した。

〔結果および考察〕

(1) ペクチンエステラーゼの局在性

まず種子内在のペクチンエステラーゼの局在部位を明らかにする為に愛玉子の種子と赤い花被片 (Tepal) および小花柄 (Fig. 3) に分け, 種子と花被片または種子のみを未加熱または, 加熱処理したのについてそれぞれ 10 倍量の脱イオン水で抽出後, 各 5 ml を試験管に分取し, 25℃ でインキュベート後, 抽出されたペクチンのメチルエステル化度の経時変化を分析した。その結果, Fig. 4 に示すように, 未加熱の種子と花被片の水抽出物は抽出後, エステル化度は速やかに低下し, 60 分後には 18.1% に減じた。これに伴い強固なゲルの

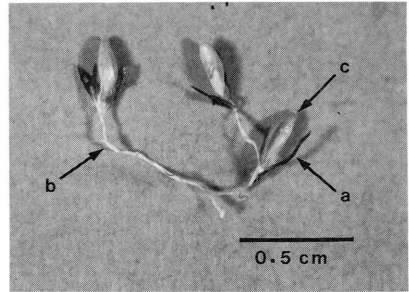


Fig. 3 Photograph of Aw-geo Seeds and Red tepals. An intrinsic pectinesterase is located in the red tepals (a) attached to the pedicels (b) of Aw-geo seeds (c).

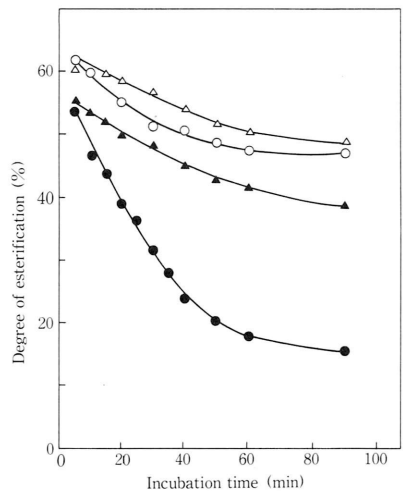


Fig. 4 Time Course of Methyl Ester Contents of Water-extracts of Aw-geo Seeds with and without Red Tepals.

The degree of methyl esterification (DE) of each extract was determined by means of enzymic method, as described in previous reports⁴⁾. ●, heat-untreated seeds with red tepals; ▲, heat-treated seeds with red tepals; ○, heat-untreated seeds without red tepals; △, heat-treated seeds without red tepals.

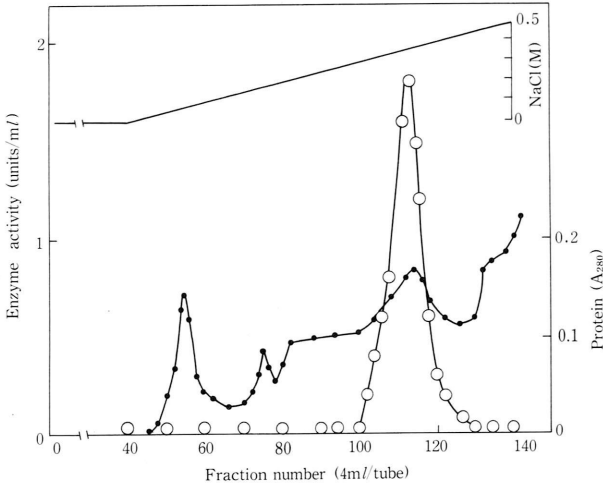


Fig. 5 Column Chromatography of the Aw-geo pectinesterase on Q-Sepharose.

The enzyme solution extracted from red tepals, containing 46.2mg protein, was placed on a column of Q-Sepharose. Pectinesterase was eluted with a linear gradient of 0 to 0.5M NaCl in 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. Fractions 104-118 were Collected.

○, pectinesterase activity; ●, protein.

形成は25分後から観察された。一方、加熱処理した種子と花被片からの抽出物の場合、加熱、未加熱の種子のみの場合と同様にベクチンのエステル化度の低下が顕著にあらわれないことからベクチンエステラーゼは花被片の部位に存在することが明らかになった。

(2) ベクチンエステラーゼの精製

花被片 (300 g) から調製された愛玉子ベクチンエステラーゼ (115.5units, 46.2mg protein) は Fig. 5 に示すように Q-Sepharose を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーによって部分精製され、その比活性は粗酵素に対して 21.3 倍に上昇した (60.8units, 9.84mg protein)。

(3) 酵素活性の最適 pH

愛玉子ベクチンエステラーゼの最適 pH を調べた結果を Fig. 6-A に示した。本酵素は KCl (65mM)

の添加の有無によってその最適 pH が異なることが判った。すなわち KCl 無添加の場合は pH 5.4 で最大活性を示し、添加した場合は pH 7.5~8.0 付近にシフトした。またその活性は KCl 添加によって pH 5.4 では 1.3 倍に、pH 7.0 では 7 倍に上昇した。一方、比較のために市販のレモンの皮のベクチンエステラーゼの最適 pH を調べた結果、Fig. 6-B に示す様に酵素活性の最適 pH は KCl (65mM) 添加の有無によって影響は受けず、むしろ活性化において強い影響を与えた。

一般に植物起源のベクチンエステラーゼは中性付近に、また微生物起源⁷⁻⁹⁾の場合は酸性側に活性の最適 pH を有することから、愛玉子イタビの本酵素はむしろ微生物起源の酵素に性質が似ていることが判明した。

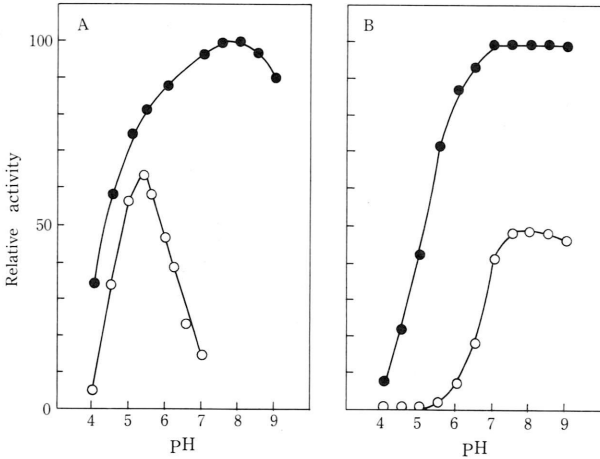


Fig. 6 Effect of pH on Pectinesterase activities

Pectinesterase activities were assayed in the presence or absence of 65mM KCl in the pH range of 4.0-9.0.

A: Aw-geo pectinesterase. ○, in the absence of KCl; ●, in the presence of KCl. B: Lemon pectinesterase. ○, in the absence of KCl; ●, in the presence of KCl.

(4) 酵素活性に及ぼすカルシウムイオンの影響

ペクチンエステラーゼ活性に対するカルシウムイオンの影響を調べる為に各濃度の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0~35mM) を添加し、pH 5.4, 6.0 および 7.0 で反応を行った。その結果を Fig. 7 に示した。本酵素の最大活性はいずれの pH においても 12.5~24.5mM で最大となり、さらに、pH 7.0 では KCl 添加と同様に酵素の活性化が顕著に認められた。

(5) 愛玉子ペクチンエステラーゼを用いた高メトキシルペクチンのゲル形成

0.5% の愛玉子ガラクトクロナン溶液 (pH 5.4) に各種金属塩 (KCl, 15.8mg; NaCl, 3.2mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 27.9mg; MgSO_4 , 4.6mg) を含む 0.5% の愛玉子ガラクトクロナン溶液 (pH 5.4) をそれぞれ 30m^l ずつゼリーグラスに入れ、25°C で 10 分間のプレインキュベート後、酵素 (5.2units) 添

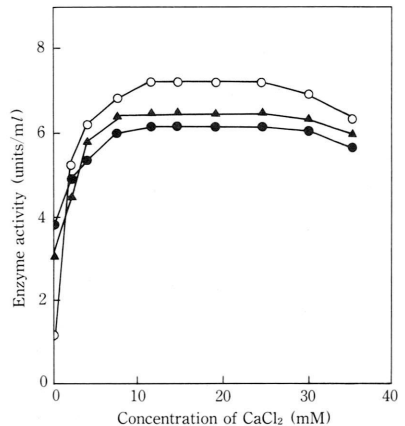


Fig. 7 Effect of the Calcium Salt Concentration on the Pectinesterase Activity.

Aw-geo pectinesterase was assayed in the presence of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at the concentration range of 0 to 35mM. ○, pH 7.0; ▲, pH 6.0; ●, pH 5.4.

Table 1 Effect of the incubation time on the gel strength of the Aw-geo galacturonan on treatment with the purified endogenous pectinesterase as a model system^a

Incubation time (min)	Firmness (dyn/cm ²)	Breaking strength (dyn/cm ²)
25	1.04 × 10 ⁴	4.25 × 10 ⁴
30	1.82 × 10 ⁴	8.19 × 10 ⁴
35	2.17 × 10 ⁴	8.97 × 10 ⁴
40	2.26 × 10 ⁴	1.08 × 10 ⁵
45	2.52 × 10 ⁴	1.16 × 10 ⁵

^a The enzymic gel-formation test was performed in the presence of appropriate concentrations of metal ions (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ and Na⁺) (see the text).

加し、1時間の反応を行った。各種金属塩の濃度は前報で述べた愛玉子種子の抽出物に含まれる金属の組成とその含有量の分析結果に準じた⁴⁾。

Table 1 に示す様に、反応開始、25分後にゲル形成が認められ、さらに45分後にはゲルの硬さが 2.52 × 10⁴ dyn/cm²、破断力が 1.16 × 10⁵ dyn/cm² に達し、Conventional な方法で直接種子から水抽出によって得られるゲルの強度に匹敵することが明らかになった。Fig. 8 で示したゲルは、1)愛玉子乾燥種子の水抽出物から調製されたゲル、2)および3)愛玉子ペクチンエステラーゼの粗抽出液お

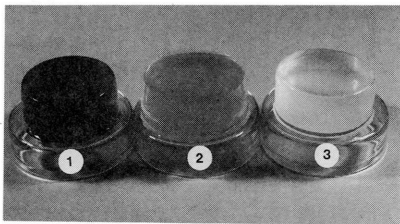


Fig. 8 Photograph of Aw-geo Gels Prepared by the Enzymic Method.

1. Prepared with the water-extract of heat-untreated seeds and red tepals; 2 and 3. prepared by incubating an aqueous solution of 0.5% Aw-geo high methoyle galacturonan with the crude or partially purified pectinesterase in the presence of metal salts, respectively.

よび部分精製酵素を各種金属塩を含む愛玉子ペクチンエステラーゼ溶液 (pH 5.4) に添加して25°C でインキュベートすることにより調製したゲルである。

以上の実験結果より、愛玉子ガラクトクロロンのゲル形成は愛玉子ペクチンエステラーゼの働きにより、水抽出により得られる高メトシキルガラクトクロロンが脱エステル化され、生じた低メトシキルガラクトクロロンの糖鎖間に多価金属イオンとして特にカルシウムイオンが挿入され、いわゆる“エッグボックス”構造¹⁰⁾を形成することにより強固なしかも粘弾性に富んだイオン結合型のゲルが生ずることが実験的に実証された(Fig. 9)。

この様に、本研究では愛玉子種子から分離、精製されたゲル形成多糖を直鎖ガラクトクロロンと特定し、また、種子の花被片 (tepal) から抽出し、高度に精製された酵素を用いることにより、エッグ・ボックス構造を介するゲル化機構をモデル実験により明確にすることができた。

今後、さらに精製酵素の諸性質について詳細に検討し、報告する予定である。また本研究の展開方向としては、愛玉子ガラクトクロロンのゲル形成機構に基づいた糖分を抑えた低カロリーペクチンゲルの調製、さらに栄養的に有効な金属塩を含むゲル化食品の製造方法などへの発展が期待されよう。

終わりに、本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました貴財団に心から感謝すると共に、益々の発展をお祈り申し上げます。なお本研究は大学院生、小前幸三氏の協力によるものである。

文 献

1) S. Miyake and S. Ohno, *J. Trop. Agric.*, **2**, 1 (1930).
 2) Y. Oda and R. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 406 (1966).

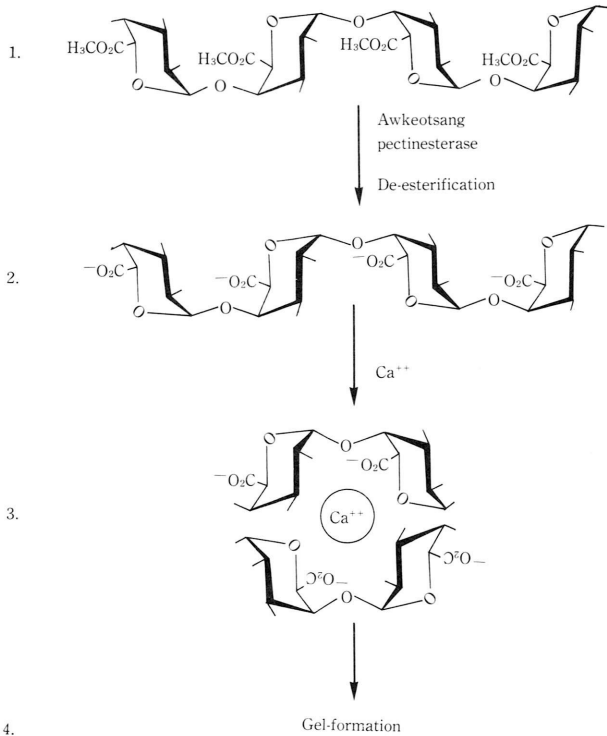


Fig. 9 A Possible Gel-formation Mechanism for the High Methoxyl Galacturonan Extracted from Aw-geo Seeds with Red Tepals.

1. highly methoxylated galacturonan of the seed extract; 2. enzymically de-esterified galacturonan; 3. formation of the "egg-box" structure.

3) Y.C. Huang, W.P. Chen and Y.P. Shao, *J. Chinese Soc. Hort. Sci.*, **26**, 117 (1980).
 4) K. Komae and A. Misaki, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1237 (1989).
 5) N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973).
 6) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

7) K.R. Barker and J.C. Walker, *Phytopathology*, **52**, 1119 (1962).
 8) A. Slezarik and L. Rexova, *Biologia*, **22**, 407 (1967).
 9) P.E. Waggoner and A. Dimond, *Phytopathology*, **45**, 79 (1955).
 10) G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith and D. Thom, *FEBS Lett.*, **32**, 195 (1973).

Enzymic Gel-formation of Pectic Polysaccharide and Its Application to Food Processing: Gel-formation Mechanism of *Ficus awkeotsang* Galacturonan.

Akira Misaki (Faculty of Science of Living, Osaka City University)

A pectinesterase (EC 3.1.1.11), responsible for the spontaneous gel-formation of the Aw-geo polysaccharide, was isolated from the red tepals of seeds of *Ficus awkeotsang* and partially purified by ion-exchange column chromatography on Q-Sepharose. The esterase showed an optimum pH of 5.4 for its enzyme activity in the absence of potassium or calcium ions, but the pH in the presence of these ions being shifted to 7.0-8.0.

As judged on comparison of the spontaneous gel-formation of the water extract of seeds and the enzyme-induced gel-formation of the Polysaccharide solution by treatment with the *Ficus awkeotsang* pectinesterase, the spontaneous gel-formation of the Aw-geo seed extract must be induced through the action of an endogenous pectinesterase on the methyl esterified linear spontaneous and then the formation of the so-called "eggbox" structure, calcium ions being placed between the Polysaccharide chains of the de-esterified α -(1 \rightarrow 4)-linked D-galacturonic acid residues.