

温州ミカン果皮より市販酵素剤の処理によるペクチンの調製

東 野 哲 三・藤 田 修 二

(園芸工学研究室)

昭和55年5月31日 受理

Preparation of Pectin from Satsuma Mandarin Peel by Its Maceration Treatment with Commercial Enzyme Preparations

Tetsuzo TONO and Shuji FUJITA

(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

Received May 31, 1980

Summary

The peel (pericarp) of satsuma mandarin was macerated with several commercial enzyme preparations with the intention of isolating protopectin. When the peel was macerated for 3~4 hours at 50°C and pH 3.5~4.5, the alcohol insoluble solid (AIS) of the peel was highly digested and the amount of dissolved pectic substances was 35~45% per AIS with the enzyme preparations. The hydrolyzate obtained by the treatment with a commercial preparation (Macerozyme, Yakuruto Biochem. Co.) was more viscous than those obtained with the other enzyme preparations.

Two peaks were shown in the Sephadex G-200 column chromatogram of the hydrolyzate obtained with the Macerozyme; one was eluted immediately after the void volume of the column and the other at the volume of about three times as much as the void volume. The elution pattern was similar to that of commercial high methoxyl pectin.

The pectin separated from the peel by the Macerozyme-treatment was higher both in the apparent molecular weight and in the content of methoxyl group than pectin prepared with the other enzymes and with hydrochloric acid.

緒 言

近年、ミカンの加工品なかんずく果汁の急激な生産増加に伴い、副生する搾汁粕等の廃棄物も年々ばく大な量に達し、今や、その有効な利用体制を確立することが、我が国カンキツ果汁工業の体質強化のための緊急な課題となっている。このような情勢から、ミカン搾汁粕より有用成分例えば ペクチン、糖分、色素等を回収利用しようとする研究や提案がなされてきた^{1,2)}。その中でペクチンはゲル化剤、増粘剤、乳化剤等として食品加工上その需要が増大しているが、ミカンのペクチンの回収利用については、樽谷・真部^{3,4)}の低メトキシル・ペクチンの製造に関する研究報告がみられるにすぎない。また、現在、市販されている粉末ペクチンの多くは、オレンジ等の果皮を原料として製造された外国製品であり、わが国内でのペクチン生産は全く行われていない。

一般に植物組織中に含まれるペクチン質は、可溶性のペクチニン酸と多価陽イオンまたは多糖類と結合した不溶性のペクチニン酸に区分されるが、後者の不溶性ペクチン質が量的にも多いこ

とから、これを可溶化し回収することがペクチン製造のかぎであるといっても過言ではないであろう。しかし、通常の市販ペクチンは酸抽出法によって製造されているため、その際、ペクチン分子の重合度低下は免れず、とくに、果皮の薄い温州ミカンではその影響も大きいものと思われる。そこで、本実験では、これに代わる方法として酵素的処理によるペクチンの分離、調製の条件について検討し、さらに、得られたペクチンの性状を調べたので報告する。

実験材料および方法

1. 試料の調製

材料には 本学農学部附属 農場果樹園の 松田系普通温州を用い、これをフラベド、アルベド、ジョウノウ膜、サノウの各部位に分け、それぞれ磨砕後、70%エチルアルコールで加熱抽出し、さらに、90%、99%エチルアルコールで抽出後アセトンで洗浄し、いわゆるアルコール不溶性固形物 (AIS) を調製し試料とした。また、全果皮から同様に AIS を調製し、酵素処理の実験に供した。

2. ペクチンの分別抽出

試料中のペクチンは三浦ら⁵⁾の方法に準じて抽出し、次のような3可溶性画分に分別した。

(a) 水溶性画分 (WP) 試料 4 g に 200 ml の水を加え室温に一夜放置して抽出し、抽出液を WP とした。

(b) ヘキサメタリン酸可溶性画分 (PP) (a) の残渣に 0.4%ヘキサメタリン酸ナトリウム 200 ml を加え室温で 2 時間抽出し、抽出液を PP とした。

(c) 塩酸可溶性画分 (HP) (b) の残渣に 0.05 N HCl 200 ml を加え 85°C で 2 時間抽出し、抽出液を HP とした。

WP, PP および HP の合計を TP として表わした。

3. 酵素剤およびペクチン

市販酵素剤としては、E₁ (セルラーゼ AP₃; 天野製薬 K. K.), E₂ (ペクチナーゼ; 田辺製薬 K. K.), E₃ および E₄ (マセロチーム S およびセルラーゼ・オノヅカ 3S; ヤクルト生化学 K. K.) を供試した。これら酵素剤はいずれも 0.1% 水溶液とし、それを酵素液として使用した。また、比較として用いた市販の粉末ペクチンは、P₁ (カンキツペクチン; 片山化学 K. K.), P₂ (low methoxyl pectin; Sunkist Growers, Inc. "Exchange") である。

4. 分析方法

反応液中の溶出ペクチン量はカルバゾール・硫酸法⁶⁾により定量し、無水 D-ガラクトuron 酸 (AGA) 量として表わした。なお、ゲル濾過の際の各フラクションのペクチン濃度は Lawrence と Groves⁷⁾の方法により求めた。すなわち、溶出液の 0.5 ml に 84%硫酸 4.5 ml を加え 15 分間煮沸して D-ガラクトuron 酸を生成させた後、295 nm における吸光度を測定し、その値でペクチンの濃度を示した。反応液中の還元性物質の量は 3,6-ジニトロフタル酸を用いる百瀬法⁸⁾により求めたグルコース量で表わした。また、ペクチンのメトキシル含量は Wood と Siddiqui⁹⁾の方法によって測定し、それよりエステル化度を算出した。

5. 酵素処理および塩酸抽出

酵素処理および比較としての塩酸抽出は次のように行った。すなわち、試料（全果皮の AIS）0.1 g に酵素液と 0.1 M McIlvaine 緩衝液（pH 2.5～5.5）の合計 20 ml を添加し、振盪しながら反応させた。塩酸抽出の場合は 0.05 N または 1 N HCl の 20 ml を使用した。

6. ゲル濾過および粘度測定

反応液の一部をセファデックス G-200 のカラム（3.8×40 cm）に添加し、0.1 M NaCl で展開した。溶出液はフラクションコレクターを用いて 5 ml ずつ分取し、吸光度を測定した。反応液の粘度はオストワルド・キャノン・フェンスケ粘度計を用いて 25°C で測定した。反応液の流下時間より次に示す Kim ら¹⁰⁾ の計算式を用い Apparent Molecular Weight を計算した。

$$\text{Apparent Molecular Weight} = \frac{6((t_s/t_0)^{\frac{1}{6}} - 1)}{4.7 \times 10^{-5} C} (\text{g/mole})$$

ここに、 t_s , ペクチン溶液の流下時間（秒）； t_0 , 1%NaCl の流下時間（秒）； C , ペクチン試料の濃度（g/100 ml）。

実 験 結 果

1. ミカン各部位のペクチン含量

果実の全 AIS に対する各部位の AIS およびペクチンの割合を Table 1 に示した。各部位のペクチン量（TP）はフラベドが最も多く全ペクチンの約半量を占め、アルベド、ジョウノウ膜、サノウの順に少なくなった。各 TP については、WP, PP および HP 画分の割合にかなり相違がみられた。すなわち、フラベドでは各画分の含量差があまりみられなかったのに対して、アルベドでは PP, HP 画分が多く、ジョウノウ膜とサノウでは HP 含量が他画分に比べて高かった。

Table 1. Composition of the pectic substance of satsuma mandarin

	AIS	WP	PP	HP	TP
Peel					
Flavedo	48.04	4.33	5.46	6.70	16.49
Albedo	24.74	0.93	3.40	3.91	8.24
Segment					
Membrane	16.91	0.62	0.93	5.67	7.22
Juice sac	10.31	0.31	0.62	2.16	3.09
Total	100.00	6.19	10.41	18.44	35.04

AIS, alcohol insoluble solid; WP, water soluble pectin; PP, 0.4% sodium hexametaphosphate soluble pectin; HP, 0.05 N HCl soluble pectin; TP, total pectic substance.

All values were expressed as percent of the total amount of AIS.

2. 酵素処理条件の検討

2.1 反応温度

試料の果皮 AIS を酵素濃度 0.05%, pH 4.5 において、温度 30～60°C の範囲でいずれも 4 時

間処理し，結果を Fig. 1 に示した．各酵素剤によるペクチンの溶出量は 50°C 付近が最大であった．同温度でのペクチン溶出量は E_1 処理の場合が最も高く， E_4 処理の場合が最も低かった．

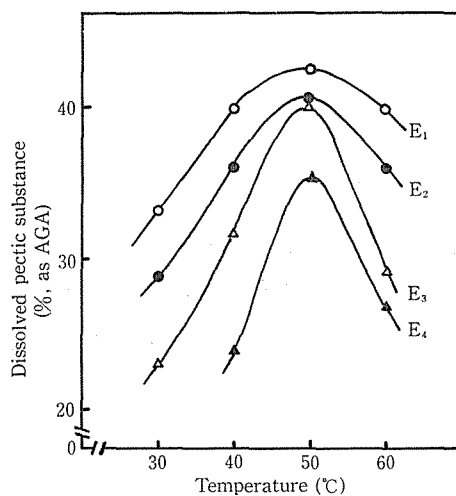


Fig. 1. Relationship between the dissolution of pectic substance and the reaction temperature.

The reaction mixture was composed of 10 ml of 0.1 M McIlvaine buffer (pH 4.5), 100 mg of AIS and 10 ml of 0.1 w/v% enzyme solution. The reaction was carried out for 4 hours.

E_1 (—○—), Cellulase AP₃ (Amano Pharm. Co.); E_2 (—●—), Pectinase (Tanabe Pharm. Co.); E_3 (—△—), Macerozyme S (Yakuruto Biochem. Co.); E_4 (—▲—), Cellulase ONOZUKA 3S (Yakuruto Biochem. Co.).

AGA, anhydrogalacturonic acid determined by carbazole-sulfuric acid method⁶⁾.

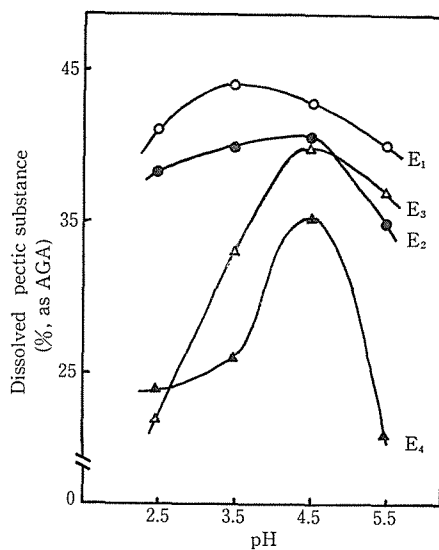


Fig. 2. Relationship between the dissolution of pectic substance and pH of the reaction mixture.

The reaction mixture and the abbreviations were the same as in Fig. 1. The reaction was carried out at 50°C .

2.2 反応液の pH

酵素濃度 0.05%，50°C において，pH 2.5～5.5 の範囲でいずれも 4 時間処理し，結果を Fig. 2 に示した。ペクチンの溶出量は E_1 処理では pH 3.5，その他の酵素処理では pH 4.5 にその最大値がみられた。pH 4.5 におけるペクチンの溶出量は E_1 処理の場合が最も高く， E_2 ， E_3 ， E_4 の順に低くなった。 E_1 ， E_2 処理の場合は pH 2.5～3.5 においてもかなり高い溶出量を示したが， E_3 ， E_4 処理の場合は溶出量は低かった。

2.3 酵素濃度

反応液 pH 4.5，50°C において，酵素濃度 0.01～0.5% の範囲で 4 時間処理し，結果を Fig. 3 に示した。各酵素処理とも，ペクチン溶出量は酵素濃度 0.01～0.05% において著しく増大し，それより高い濃度では大きな変化はみられなかった。各濃度におけるペクチン溶出量は高い方から E_1 ， E_2 ， E_3 および E_4 処理の順であった。

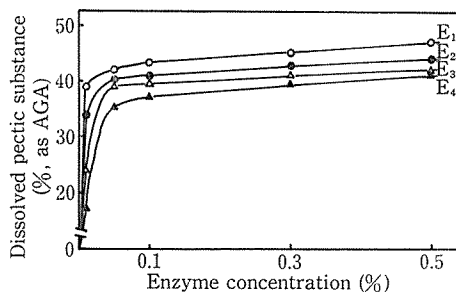


Fig. 3. Relationship between the dissolution of pectic substance and the enzyme concentration.

The reaction mixture and the abbreviations were the same as in Fig. 1. The reaction was carried out at 50°C in McIlvaine buffer (pH 4.5).

2.4 反応時間

酵素濃度 0.05%，pH 4.5，50°C において，1～4 時間処理し，塩酸抽出の場合と比較した。塩酸抽出は 0.05 N および 1 N HCl を用いて 85°C で同様の時間処理した。それらの結果を Fig. 4 に示した。酵素処理の場合は，ペクチン溶出量はいずれも 3～4 時間でほぼ最大値に達したが，反応速度は E_1 ， E_2 ， E_3 および E_4 処理の順に遅くなるようであった。これに対して，塩酸抽出の場合は 0.05 N および 1 N HCl 処理とも E_1 処理とほぼ同様の速度で反応は進行した。一方，反応中の還元性物質の生成量は Fig. 5 に示したように，1 N HCl の場合が最も高く E_2 ， E_1 ， E_4 処理の順でこれに続いたが， E_3 処理の場合は著しく低かった。

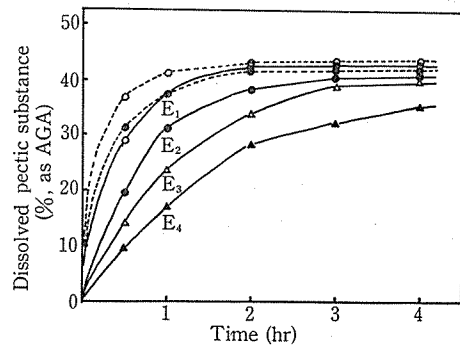


Fig. 4. Time course of the dissolution of pectic substance.

The reaction mixture and the abbreviations were the same as in Fig. 1. The reaction was carried out at 50°C in McIlvaine buffer (pH 4.5).

---○---, 1N HCl hydrolysis; ---●---, 0.05N HCl hydrolysis.

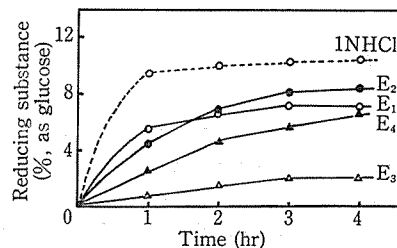


Fig. 5. Formation of reducing substance during the maceration.

The reaction mixture and the abbreviations were the same as in Fig. 1. Reducing substance was evaluated with the glucose content determined by the method of Momose⁹⁾.

3. 溶出液の粘度およびゲル濾過

酵素濃度0.05%, pH 4.5, 50°C において1~4 時間処理し, その間の各溶出液の粘度変化を測定した. その結果は Fig. 6 に示したように, E₃ 処理による溶出液が最も高い粘度を示し, 処理1 時間後で最高値に達した. E₄ 処理による溶出液の粘度もこれに続き高く, 処理2 時間後に最高値に達した. これに対して, E₁ および E₂ 処理による溶出液の粘度は著しく低かった.

そこで, これら溶出液のうち, E₂ および E₃ による4 時間処理後の溶出液の一部をセファデックス G-200 のカラム (3.8×40 cm) に添加し, 0.1 M NaCl で展開したときのゲル濾過パターンを示すと Fig. 7(a) および (b) のようであった. 比較として市販ペクチン (P₁) および D-ガラクトツロン酸溶液のパターンを Fig. 8 (c) および (d) に示した. これらの結果から明らかなように, E₃ 処理による溶出液の場合には, void volume (V₀) 直後よりフラクション No. 50 にわたるピークと No. 75~90 における低いピークとが認め

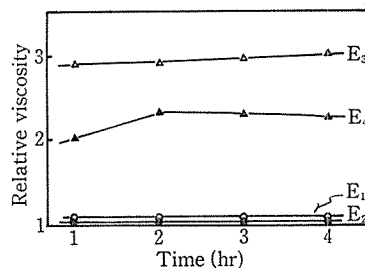


Fig. 6. The relative viscosity of the hydrolyzates obtained by enzyme-treatment.

The reaction mixture and the abbreviations were the same as in Fig. 1.

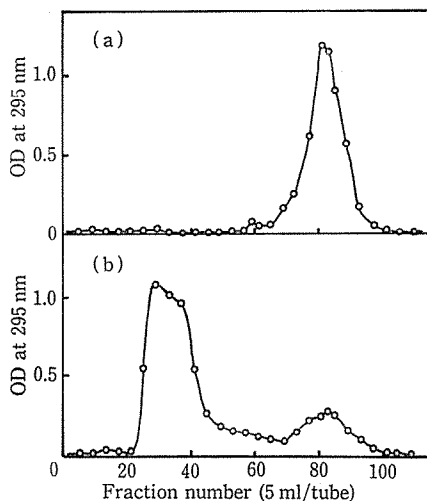


Fig. 7. Gel filtration of hydrolyzates (a) and (b) on a Sephadex G-200 column.

Hydrolyzates (a) and (b) obtained by E₃ (Pectinase)- and E₄ (Macerozyme)-treatment, respectively, were applied to a Sephadex G-200 column (3.8×40 cm). Elution was carried out with 0.1 M NaCl at a flow rate of 15 ml/hr. The concentration of pectic substance was expressed with OD at 295 nm.

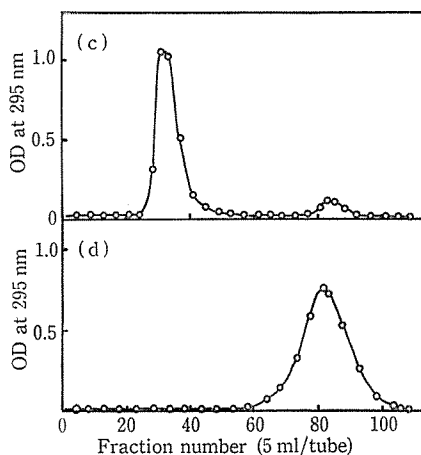


Fig. 8. Gel filtration of high methoxyl pectin (c) and D-galacturonic acid (d) on a Sephadex G-200 column.

Elution was performed with the same method as in Fig. 7.

られた (b). これに対して, E_2 処理による溶出液の場合は V_0 直後のピークはみられず, No. 70~90 におけるピークのみが認められた (a). 市販のカンキツペクチン (P_1) 溶液のゲル濾過パターンにおいては, V_0 直後にシャープなピークと No. 85 付近に低いピークがみられ (c), また, D-ガラクトツロン酸溶液のそれは No. 70~90 にのみピークが認められた (d). ペーパークロマトグラフィーによりこれら溶出液中に含まれる生成糖の検索を行ったところ, E_2 処理による溶出液の場合には, 著量の D-ガラクトツロン酸と微量の低分子量のオリゴウロニドが検出されたが, E_3 処理による溶出液の場合にはオリゴウロニドしか検出されなかった.

4. ペクチンの分子量およびエステル化度

試料の果皮 AIS 10 g に 0.1% 酵素液 (E_3) 100 ml および 0.2 M McIlvaine 緩衝液 100 ml を添加し, 前記 (Fig. 6) の処理条件で反応させた. 処理 1 時間後 溶出液を濾紙で濾過し, 濾液にエチルアルコールを 60% 濃度となるように添加してペクチンを沈殿させ, 遠心分離 (3,000 rpm) した. このペクチンの沈殿を約 100 ml の水に溶解し, 再びアルコール沈殿処理を繰返した. このようにして得られたペクチンの水溶液を脱気処理した後, 凍結乾燥し密封保存した. これをペクチン試料 MEP とした. 比較として, 果皮 AIS の 0.05 N HCl 抽出液より同様にペクチン試料 HCP を調製した. また, 市販ペクチン P_1 および P_2 についてもアルコール沈殿, 凍結乾燥処理を行い, それぞれ HMP および LMP とした. これらペクチン試料の各 1 g を 1% NaCl 100 ml に溶解し, それぞれ粘度, 無水 D-ガラクトツロン酸およびメトキシル含量を測定し, これらの値より Apparent Molecular Weight およびエステル化度を求め比較した. それらの実験結果を Table 2 に示した. ペクチン溶液の分子量は MEP が最も大きく, HMP がこれに続いた. これに対して, HCP は他の試料に比べてやや小さかった. また, メトキシル含量においても MEP が最も高く, それより計算したエステル化度は 59% と HCP および市販ペクチンに比べてかなり高い値を示した. なお, ペクチン含量は無水 D-ガラクトツロン酸としていずれも 70% 前後でやや低い値であった.

Table 2. Some properties of satsuma mandarin pectins and commercial pectins

Sample	Methoxyl-content (%)	Anhydrogalacturonic acid content (%)	Degree of esterification (%)	Apparent molecular weight (Kg mol^{-1})
MEP	9.65	72.0	59.1	72
HCP	9.00	67.6	55.1	55
HMP	7.98	74.7	48.9	68
LMP	4.90	69.5	30.0	63

MEP, pectin prepared by E_3 (Macerozyme)-treatment; HCP, pectin prepared by 0.05 N HCl-treatment; HMP, high methoxyl pectin (Katayama Chem. Co.); LMP, low methoxyl pectin (Sunkist Growers Inc.).

考 察

供試した温州ミカンの場合も他のカンキツ類と同様³⁾, PP, HP など不溶性ペクチンの画分が多く, とくに, ジョウノウ膜とサノウでは HP 含量が高かった (Table 1). この HP は多糖類とペクチニン酸とが結合したいわゆる プロトペクチンに相当する画分と考えられており, これを native な状態で抽出するためには, 植物組織におけるこの多糖類との結合を選択的に切断し, 可

溶化させるような方法の開発が望ましい。しかし、現在のところ、そのような効果的方法は見出されていない。例えば、市販の粉末ペクチンの製造に通常用いられている塩酸抽出法の条件(pH 1.9~2.2, 約 80°C)では、溶出したペクチン自体もかなり分解され低分子化されることが予想される。そこで、これにかわる方法として、酵素処理によるペクチンの調製方法について検討した。これまでに、果実加工において酵素剤が利用された研究報告としては、果実の剥皮^{11,12)}、搾汁¹³⁾ 或いは果汁の澄清化^{14~16)} などがみられるが、その際溶出すると思われるペクチンの性状についてはほとんど知られていない。本実験では、それらの研究に使用されたペクチナーゼ、セルラーゼおよび macerating enzyme など市販酵素剤のうちから4種を選び、それらによるミカンペクチンの溶出条件を検討した。すなわち、まず、試料よりペクチンを最も多く溶出する酵素処理の条件を調べたところ、各酵素剤とも反応温度は 50°C, pH は 3.5~4.5 が好適であり、酵素濃度は 0.05% 程度で十分であることが認められた (Fig. 1~4)。これらの条件下における各酵素処理によるペクチンの溶出速度を比較すると、E₁ 処理の場合が最も速度が大で、塩酸抽出の場合とほとんど変らなかったが、E₃, E₄ 処理の場合はやや遅いようであった。一方、溶出液中の還元性物質の生成量を比較すると、E₃ 処理の場合が他の酵素処理区に比べて著しく低かった。また、各溶出液の粘度については、E₃ と E₄ 処理の場合が他の酵素処理のものより 2~3 倍高い値を示した。このように、E₃ 処理による溶出液においては、還元性物質の生成量が低く、かつ高粘度であることから、他の酵素処理や塩酸抽出のものに比べて高分子量のペクチンが溶出したことを意味するものと思われる。このことは、これら溶出液および市販ペクチンのセファデックス G-200 ゲル濾過のパターンからも容易に理解される。すなわち、E₃ 処理による溶出液のパターンは市販のカンキツペクチン (P₁) のそれと類似して、大部分のペクチンが V₀ 直後に溶出し比較的高分子量であることが考えられた。これに対して、E₂ 処理の場合は、ペクチンの分解が著しく進行し、ほとんどが D-ガラクトuron酸にまで分解されているように思われた (Fig. 7, 8)。

最近、飯野・小曾戸¹⁷⁾ は搾汁法の相違によるトマト果汁中のペクチンのゲル濾過パターンを調べ報告しているが、それによると、cold break process 果汁の水溶性のペクチンは、トマトのペクチン分解酵素により分解されて、本実験における E₂ 処理の場合と類似した溶出パターンを示している。そこで、本実験で使用した市販酵素剤の pectinesterase (PE) および exo-polygalacturonase (PG) 活性を測定したところ、E₁ と E₂ とはともに両活性が著しく高く、それらの作用により E₂ は試料中のペクチン質を速やかに分解するであろう。これに対して、E₃ と E₄ の PE, PG 両活性は極めて低いようであった。E₃ は Rhizopus 属起源の macerating enzyme であり、endo-polygalacturonase, hemicellulase および cellulase 等の活性を有し、それらの共同作用により植物組織を崩壊することが知られている。したがって、そのような活性を有する酵素剤 E₃ により、比較的に native な状態でプロトペクチンが可溶化され、溶出したペクチンが他の酵素剤処理や塩酸抽出法によって調製されたものより高分子量で、かつ高メトキシルのペクチンであることが理解されるであろう (Table 2)。以上のことから、macerating enzyme の処理によるペクチンの抽出法は、ミカン果皮などの材料からの native なペクチンの分離、調製法として有効な方法であろうと思われる。

摘 要

温州ミカンの果皮よりペクチンを native な状態で分離することを目的として、種々市販酵素剤により果皮の AIS を処理した。各酵素剤による処理条件は酵素濃度 0.05% で、pH 3.5~4.5, 50°C, 3~4 時間処理の場合が好適であり、ペクチンの溶出量は AIS 当り 35~45% であった。そ

れら市販酵素剤のうちで、macerating enzyme (マセロチーム S, ヤクルト生化学 K.K.) による溶出液は他の酵素剤処理のものより高粘度であり、また、セファデックス G-200 によるゲル濾過では二つのピークが認められた。その一つは V_0 直後に、他は V_0 の約 3 倍の位置に溶出し、市販のカンキツペクチンと類似した溶出パターンであった。macerating enzyme 処理した後、アルコール沈殿によって分離したミカン果皮のペクチンは、塩酸抽出によって得られたものおよび市販のペクチンより、分子量およびメトキシル含量ともに高い値を示した。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費（昭和54年度）の補助を受けて行ったもので、本学卒業生の尾形雅孝（現在、ジャスコ K.K.）、松原克典（現在、福岡県警）、大崎泰男（現在、加商 K.K.）の諸君の熱心な協力によりなされた。ここに、厚く感謝の意を表します。なお、本研究の一部は第32回日本栄養・食糧学会総会（昭和53年5月、於福岡）において発表した。

引 用 文 献

- 1) 宮崎 肇・寺田一萬士 (1974). 食品工業 17 下, 81.
- 2) 岡田茂孝 (1979). 科学と工業 53, 200.
- 3) 樽谷隆之・真部正敏 (1963). 食工誌 10, 316.
- 4) 真部正敏・樽谷隆之 (1965). 食工誌 12, 432.
- 5) 三浦 洋・萩沼之孝・水田 昂 (1962). 園学雑 32, 27.
- 6) 古谷貞治・飯島 豊 (1965). 九大農芸誌 22, 35.
- 7) Lawrence J. W. and K. Groves (1954). *J. Agr. Food. Chem.* 2, 882.
- 8) 百瀬 勉・向井良子・河辺節子・鈴木順子・山本恭子 (1962). *Japan Analyst* 11, 956.
- 9) Wood, P. J. and I. R. Siddiqui (1971). *Anal. Biochem.* 39, 418.
- 10) Kim, W. J., V. N. M. Rao and C. J. B. Smit (1978). *J. Food Sci.* 43, 572.
- 11) 辻阪好夫・奥村 晋・竹西繁行・岡田茂孝 (1973). 醸工 51, 464.
- 12) 富士縄昭平・小川浩三・中島宣郎・木村 博・中谷弘実 (1973). 農化 47, 7.
- 13) 重山俊男 (1966). 園学雑 36, 259.
- 14) 三澤 豊・松原 良・羽田野誠・原 稔・犬塚猛雄 (1968). 食工誌 15, 83.
- 15) 遠藤 章 (1966). 農化 40, R39.
- 16) 福井尚之・野村男次 (1969). 食工誌 16, 555.
- 17) 飯野久栄・小曾戸和夫 (1977). 食工誌 24, 350.