

# ナリンギナーゼによる夏ミカン脱苦味の研究\*-I

## ナリンギン分析法の検討

下田吉夫・奥正和  
沢山善二郎・松本熊市

### STUDIES ON DEBITTERING OF NATSUDAIDAI (CITRUS NATSUDAIDAI HAYATA) WITH NARINGINASE ENZYMES.-I

#### PROBLEMS IN THE NARINGIN ANALYSES.

Yoshio Shimoda, Masakazu Oku, Zenjiro Sawayama and  
Kumaichi Matsumoto.

- 1) Naringin is known to taste quite bitter, on the other hand prunin, the intermediate glucoside in hydrolytic decomposition of naringin, does not. The latter tastes only acidic, and its presence in acidic foods gives no difficulties in canning process. Therefore, particularly in the case of acidic products such as natsudaidai, debittering can be achieved to some extent by partial hydrolysis of naringin to prunin.
- 2) The naringinase and flavonoid glucosidase activities of three kind of naringinase samples. were studied in relation to their heat stabilities and the pH dependence and effect of sugars.  
The activity of flavonoid glucosidase was lowered in acid pH (3.0, the usual pH of canned natsudaidai) and by the presence of sugars. In these conditions naringin was decomposed, but not completely, and prunin accumulated. Therefore if Davis method is used for the analysis of the enzyme activities of these naringinase samples tested, the interpretation of results are complicated ones. Thus, naringin and prunin must be determined separately.
- 3) Three available methods for separate analysis of naringin and prunin were studied, and the "partition method" was found to be the most suitable and simple one, in which the difference of partition coefficients of naringin and prunin in water-ethylacetate layers was made useful.

一般に夏ミカン缶詰を製造する場合には脱苦味をすることが多いが、最近ではナリンギナーゼを使用する方法が開発応用されるようになってきた。このナリンギナーゼの応用に関し日本では福本<sup>1) 2)</sup> 中村<sup>3) 4)</sup> 野村氏<sup>5)</sup> 等が、夏ミカンの脱苦味について研究報告しており、また米國でも Thomas,<sup>6)</sup> Dunlap<sup>7)</sup> 等がグレープフルーツの脱苦味について報告している。当研究室においても数年前より主として夏ミカンシラップづけ缶詰の脱苦味試験を行って来たが、ナリンギナーゼ

\*缶詰時報 44, No. 1, 95 (1965) 投稿論文

処理の効果を調べるのはナリンギン量を Davis 法で測定するしかなかった。ところがこの Davis 法ではナリンギン以外のアルカリ発色する成分の影響が大きく現われ、食味上の苦味の程度と Davis 値は一致しがたいことがわかった。

ナリンギンの分解反応は図1のように二段階に分れ、それぞれ別の酵素（ナリンギナーゼ、フラボノイドグルコシダーゼ）により触媒されることはよく知ら

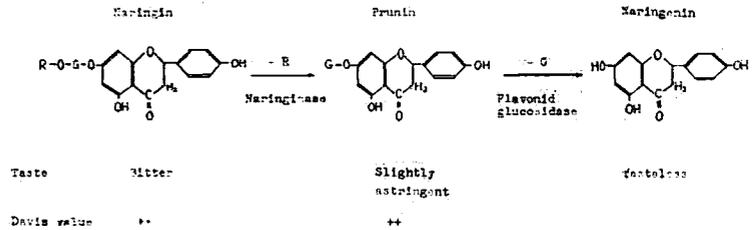


Fig. 1 Enzymatic decomposition of naringin with naringinase system.

れている。<sup>8)</sup> 特にこの反応の中間生成物であるプルニンが苦味はほとんど有しないのに Davis 値はナリンギンとほぼ同じ値を示すのでこのプルニンの分離定量を行わない限り苦味抜き完全なデータは取りにくいことがわかった。

さらに現在市販されているナリンギナーゼ剤は上述の2種の酵素ナリンギナーゼおよびフラボノイドグルコシダーゼの混合物であるが、この2種の酵素は当然その特性を異にしていることが考えられる。

そこでわれわれは現在大阪市立工業研究所および田辺製薬KKで新しく開発中の酵素剤を用いてナリンギナーゼ、フラボノイドグルコシダーゼの特性を別個に調べるとともにナリンギン、プルニンの分離定量を行うことを目的に実験を行ったので報告する。

## 〔I〕実験材料および方法

### 1) ナリンギナーゼ剤

本実験には現在大阪市立工研および田辺製薬で開発中の耐酸、耐熱性の酵素剤No.1およびNo.2と対照として数年前より使用している中性酵素剤No.3を用いた。

### 2) ナリンギン、プルニン

ナリンギンは110°Cで恒量にした後の m.p. 171°C<sup>9)</sup>のもの（結晶水2分子を含む）を用いた。プルニンはm.p.224°C<sup>10)</sup>で元素分析の結果が炭素58.06%（58.06%）水素5.06%（5.11%）、酸素36.8%（36.3%）（理論値）の標品を無水物として用いた。

### 3) ナリンギンの定量法

Davis法<sup>11)</sup>に準じて行った。すなわち試料1ml, デエチレングライコール10ml, 1N NaOH 1mlをよく振盪混合した後、40°Cの恒温槽中で発色させてその黄色を日立製EPU-2A型Spectrophotometerを用い420m $\mu$ で測定した。

### 4) ナリンギン、プルニンの分離定量法

#### a) ペーパークロマト法

酢酸エチルで抽出後 n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 5) の上層を展開剤とし展開、風乾後所定の部位を切取って水で抽出した後 Davis 法にて発色させ定量した。

b) 酵素法 (ナリンギンを分解せずプルニンを分解する酵素を利用)

既知量のナリンギンとプルニンの混液に酵素液 (0.5%) を加え pH 4.5 にし 40°C で反応させ一定時間ごとにその一部を採り Davis 法により測定した。なお、Emulsin は市販品を、フラボノイドグルコシダーゼは大阪市立工研より分譲されたものを用いた。

c) 酢酸エチル分配法

福本氏等<sup>12)</sup>の方法に準じて行った。

〔II〕 実験結果および考察

1) ナリンギン、プルニンの呈味性

ナリンギンとプルニンの味を比較するためナリンギン、プルニンの濃度を変え数回試験した。その一例を表 I に示す。なお、溶液としてはいずれも 20% シラップを用いた。

表 I に見られるようにプルニンは無味ではないが、ナリンギンの苦味とは明らかに異り、酸味に近い味 (渋味?) である。そして酸の共存下では 1/4 濃度のナリンギンより苦味は感じにくくなって来る。それゆえ夏ミカンのようにかなり酸味の強いものではナリンギンをプルニンまで分解すれば十分脱苦味の効果が得られることになる。

Table I. Comparison of bitterness of naringin and prunin.

Sample	Number of "more bitter"*	$\chi^2_0$	Analysis
50 mg % Prunin 12.5 mg % Naringin	17 4	8.05	**
50 mg % prunin +0.4% Citric acid 12.5 mg % Naringin +0.4% Citric acid	3 18	10.71	**

\* Number of panel who marked "more bitter"

\*\* Differences above 1% level of significance.

2) ナリンギン、プルニンの Davis 値の比較

図 2 にナリンギン、プルニンの検量曲線を示す。

図 2 に見られるように Davis 法によるナリンギン、プルニンの吸光度は接近しており、この方法だけでは分離定量は不可能である。

図 3 にナリンギナーゼに対するグルコース阻害の一例を示す。

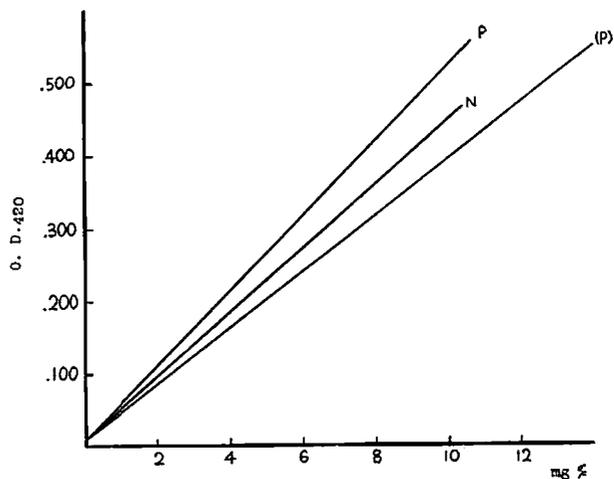


Fig. 2 Standard curve of naringin and prunin (Davis method)

後述のようにグルコースはナリンギン分解反応の第二段階、すなわちプルニン→ナリンゲニンの反応を強く阻害するのでプルニンの蓄積が起る。図3に見られるようにグルコースの存在でプルニンの蓄積が起るとナリンギン量は減少しても Davis 値はほとんど低下しないことが明らかになった。この事実は酵素処理時の条件がプルニンの蓄積を来たすような場合には Davis 法だけではだめであり、ナリンギンとプルニンの分離定量を行わねばならないことを示している。

### 3) 使用酵素の性質

図4に使用した3種の酵素剤の pH 曲線を示す。

図4 aには第一段の酵素、ナリンギナーゼの、bには第二段の酵素フラボノイドグルコシダーゼの pH 曲線を示す。この図よりも明らかかなようにbに示したフラボノイドグルコシダーゼ活性は3種とも大差はないが、aに示したナリンギナーゼ活性はNo.1、2とNo.3

の間に明らかな差が認められた。すなわち1、2は明らかに耐酸性に優れていて、夏ミカンの pH である pH 2.8 前後でも約50%の活性を有しているが中性酵素剤 No.3 は pH 2.8 ではほとんど活性を示さないことがわかった。更に3種の酵素剤とも第二段階の酵素すなわちフラボノイドグルコシダーゼ活性は pH 2.8 では約20%しか有しないことが認められた。

以上の事実から見て No. 1, 2 のような酵素剤を用いて夏ミカンの脱苦味を行う場合ナリンギナーゼおよびフラボノイドグルコシダーゼの pH に対する活性の差異からプルニンの蓄積が起り易いことは十分考えられる。

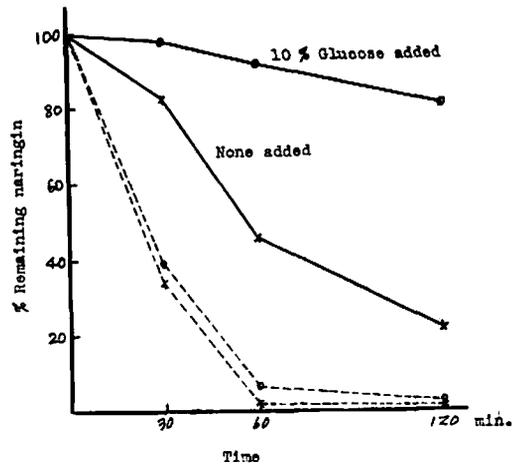


Fig. 3 Effect of glucose on naringinase activity.

— Davis value (Naringin+Prunin)  
 ..... Naringin

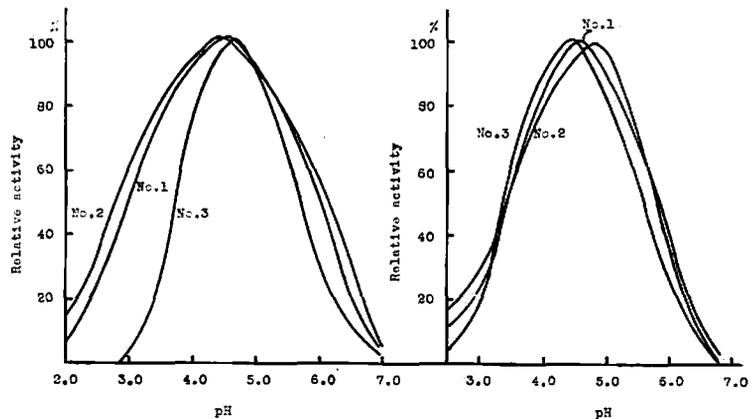


Fig. 4 a. pH-Dependence of naringinase activity of three naringinase samples. (40°C, 30 min.)

Fig. 4 b. pH-dependence of flavonoid glucosidase activity of three naringinase samples. (40°C, 30 min.)

図5に2種酵素剤の熱安定性を調べた結果を示す。

図5の結果はpH4のBufferを予じめ各温度で10分間保った後酵素液を加え、更に5分間その温度に保った後直ちに氷冷する。この溶液にそれぞれ基質を加え40°Cで30分間反応させ残存酵素活性を測定したものである。

図5 aに見られるように No.1 酵素剤のナリンギナーゼ活性は耐熱性に優れ60°C以上でもかなりの活性を残している。逆にbのフラボノイドグルコシダーゼ活性はNo.2が強いことが認められた。

しかしながら、この試験は非常に厳しい条件であり実際の場合には更に安定性が増すこ

とは十分考えられる。またある種の酵素においてその耐熱性は基質または阻害剤の共存により増大することが知られており、また中林氏によればナリンギナーゼは水溶液中よりも糖液中で安定性を増すといわれているので次の実験を行った。

図6に合成シラップ中での酵素の安定性を示す。

使用した合成シラップの組成は中林氏の報告<sup>2)</sup>に準じて糖度35%、クエン酸0.2%、pH3.4のものを用いた。

この合成シラップに酵素液を

添加し、5号白缶に入れバキュームパックし20rpmの廻転殺菌機を用いて、75°Cおよび70°Cで8分ないし10分加熱後冷却し残存酵素活性を測定したのが図6の結果である。

図6 aに見られるように耐熱性酵素剤 No.1 のナリンギナーゼ活性は75°C 8分、70°C 10分の

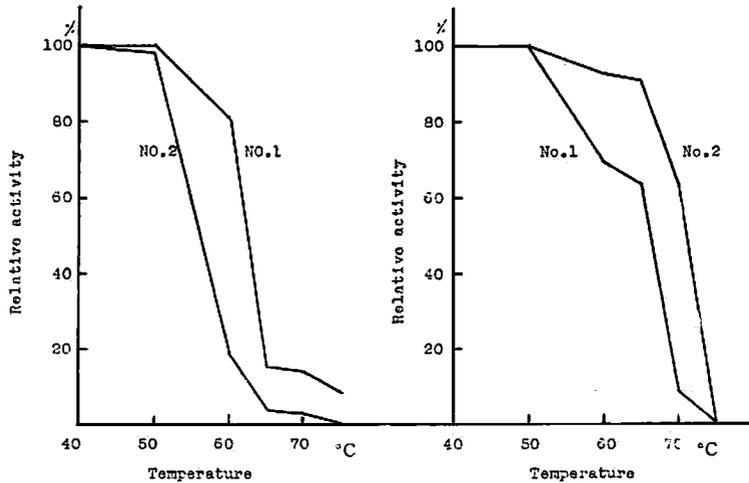


Fig. 5 a Heat stability of naringinase of two naringinase samples. (pH 4.0, 5 min.)

Fig. 5 b Heat stability of flavonoid glucosidase of two naringinase samples. (pH 4.0, 5 min.)

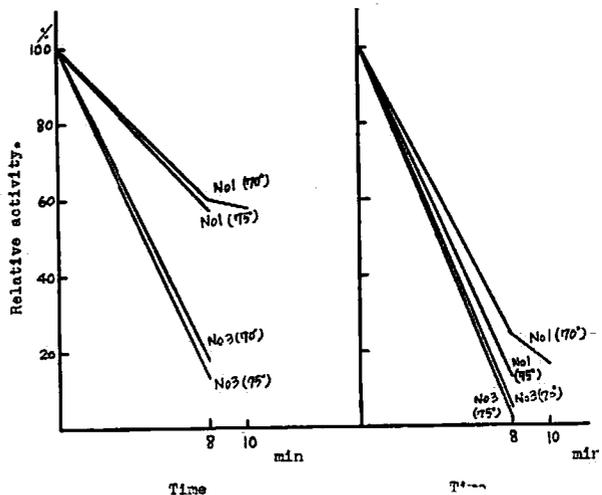


Fig. 6 a Heat stability of naringinase in syrup mixture.\*

Fig. 6 b Heat stability of flavonoid glucosidase in syrup mixture.\*

\*.....Syrup mixture were containing 34% sucrose, 0.2% citric acid and adjusted pH to 3.4.

処理後も約 60%の活性を残していた。一方図 6 bに見られるように、フラボノイドグルコシダーゼ活性は同じ処理により約 20%しか認められなかった。しかし、これはフラボノイドグルコシダーゼ活性の熱安定性が低いためではなく、後述のシュークローズ阻害が起っているためで、実際の残存酵素活性はもっと高いものであろうと考えている。

表 II に酵素活性に対する糖の影響を示す。

この表でシュークローズのみ 35%を使用したのは缶詰製造時には 40% 前後のシラップが使用されるためである。

Table II. Effects of sugar on naringinase and flavonoid glucosidase activities.

Sugar	Concn.	Per cent inhibition					
		Enzyme sample No. 1		Enzyme sample No. 2		Enzyme sample No. 3	
		Naringinase	Flavonoid glucosidase	Naringinase	Flavonoid glucosidase	Naringinase	Flavonoid glucosidase
Rhamnose	1 %	5.8%	5.2%	13.3%	2.0%	5.7%	1.7%
Glucose	1	9.2	68.9	8.2	76.4	9.8	87.4
Fructose	1	1.6	5.2	1.5	5.6	0	8.6
Galactose	1	8.9	52.8	15.6	70.4	9.7	81.6
Sucrose	35	8.3	68.2	10.7	41.6	7.8	50.4

表 II より明らかなように酵素活性に対する糖の阻害効果はいずれの場合も第二段のフラボノイドグルコシダーゼに対して強く認められる。特にグルコース、ガラクトース、シュークローズの阻害が大きいことが明らかになった。一方第一段のナリンギナーゼはこれらの糖によって余り阻害を受けないことが認められた。

以上三種酵素剤の pH の影響、耐熱性、糖阻害性を調べた結果より考察して実際の夏ミカン缶詰の製造時の条件 (pH 2.8~3.0, グルコース、シュークローズの存在) では第二段階の酵素フラボノイドグルコシダーゼ活性が抑制されることが多いと考えられる。すなわち、これらの条件ではプルニンの蓄積が起り易いこと。換言すればナリンギンとプルニンの分離定量が必須であるということになる。そこで以下ナリンギン、プルニンの分離定量法を検討してみた。

#### 4) ナリンギン、プルニンの分離定量法

表 III に現在までに報告されているナリンギンとプルニンの分離定量法の主なものを挙げる。

Table III. Methods of separate analysis of naringin and prunin.

##### a) Paper chromatographic method

- (1) Extract  $\rightarrow$  Development  $\rightarrow$  Water extract  $\rightarrow$  O. D. 420 (Davis method)
- (2) "  $\rightarrow$  "  $\rightarrow$  AlCl<sub>3</sub>  $\rightarrow$  O. D. 520 (Dunlap<sup>22</sup> method)

##### b) Enzymatic method

- (1) Flavonoid Glucosidase
- (2)  $\beta$ -Glucosidase (Emulsin)

##### c) Ethylacetate partition method

Difference in partition coefficients in water and ethylacetate layers.

以下各方法を検討した結果について述べる。

a) ペーパークロマト法

この方法については Jorio<sup>13)</sup> Dunlap<sup>7)</sup> 等の報告があるがわれわれは次のような方法を用いて行った。

すなわち抽出条件としてソックスレー液体抽出器を使用し 120°C の油浴上で 5 時間抽出後減圧濃縮して一定量にする。この液の一部を東洋濾紙 No.51A にスポットし、n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 5) の上層を展開剤として一次元ペーパークロマトを行う。風乾後一部を 1% AlCl<sub>3</sub> MeOH 溶液で発色させ、それに相当する部位を細刻し 2 ml の蒸留水で抽出、その 1 ml をとり Davis 法で比色定量した結果を表 IV に示す。

表 IV の Rf 値は Jorio<sup>13)</sup> の報告とよく一致していた。しかしこのペーパークロマト法はかなり手間がかかる上に時間的にも 2 日以上要する点、多量の試料を分析するには不適當であり更に酢酸エチルによるナリンギンの完全抽出に若干問題があるように考えられる。

Table IV. Separate analysis of naringin and prunin by paper chromatography.

	Paper chromatographic method		Ethylacetat partition method
	Rf value	mg %	mg %
Naringenin	0.91	—	—
Prunin	0.68	4.74	4.92
Naringin	0.51	3.53	3.78

b) 酵素法

図 7 に酵素法による分離定量の一例を示すこの方法は Emulsin またはフラボノイドグルコシダーゼによりプルニンのみを分解させナリンギンのみにして分離定量を行うのであるが図 7 に見られるように今回用いた酵素は両方ともに問題がある。

すなわち Emulsin の場合は非常に力価が弱く 0.5% 濃度で使用しても 18 時間でプルニンの完全分解が行われなかった。更にこの酵素は高価な点も問題である。

一方、フラボノイドグルコシダーゼはかなりの力価を示し、4 時間程度でプルニンを完全に分解しようのであるが今回用いたものは若干ナリンギナーゼ活性を有しているため徐々にナリンギンを分解し吸光度は時間とともに低下する。

更にこの酵素法を用いる場合のもう一つの欠点は、反応終点、すなわちプルニン 100% 分解点の決定がめんどうなことである。

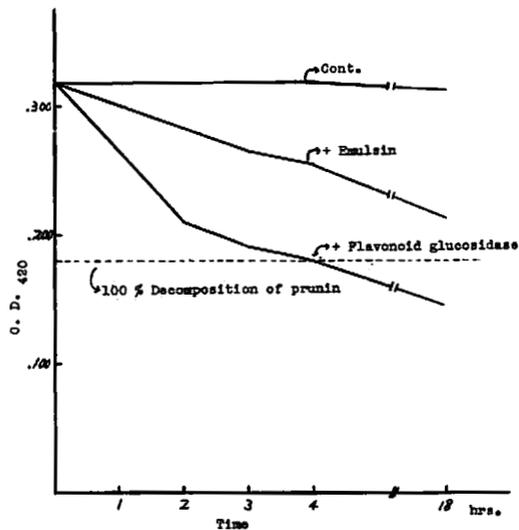


Fig. 7 Separate analysis of naringin and prunin by enzymatic method.

以上の点で酵素法によるナリンギン、プルニンの分離定量は問題があり今後更に検討改良すべきものと考えられる。

### c) 酢酸エチル分配法

この方法は最近福本氏等により報告されたものでナリンギンとプルニンの酢酸エチルに対する分配率の差で分離定量を行う方法である。

測定方法は試料 4 ml と酢酸エチル 4 ml を共栓試験管に採り、一定温度 (20°C) に保ち、1 分間激しく振盪する。しばらく静置後下層 (水層) を 1 ml 採り Davis 法で測定しその値を A とする。一方元の試料の Davis 値を測定その値を B とし、A/B を求める (残存率)。A/B を縦軸に、ナリンギンとプルニンの比を横軸に取りプロットすると 図 8 のように直線関係が得られ、この図を用いて簡単に分離定量出来ることが認められた。

なお、この方法はナリンゲニンの Davis 値を無視しているのでナリンギン、プルニン量に比しナリンゲニン量が特に多い場合は若干問題があるが、夏ミカン缶詰の脱苦味試験の場合には十分量のナリンギン、プルニンが存在するため、この方法を使用しても問題がないことが確かめられた。

以上各分離定量法を検討した結果、実際夏ミカン缶詰の脱苦味試験を行う場合には酢酸エチル分配法が簡便で短時間にしかも多種類の試料を同時に行える点最も適していることが明らかになった。

### 〔Ⅲ〕 要 約

- 1) ナリンギンとプルニンの味は異っていてプルニンの味は酸味に近く、夏ミカンのように酸味の強いものではナリンギンをプルニンまで分解すれば十分脱苦味出来ることがわかった。
- 2) 三種の酵素剤の pH 活性、耐熱性、糖阻害の影響をそれぞれナリンギナーゼ活性、フラボノイドグルコシダーゼ活性に分けて調べた。その結果これらの酵素剤では pH、糖の影響等でフラボノイドグルコシダーゼ活性が特に抑制され易く、ナリンギンは完全分解されずにプルニンの形で蓄積される場合がかなり多いという事実を確認した。したがってこのような種類のナリンギナーゼ剤を用いて脱苦味を行う場合には Davis 値のみでは判定が困難で、ナリンギン、プルニンの分

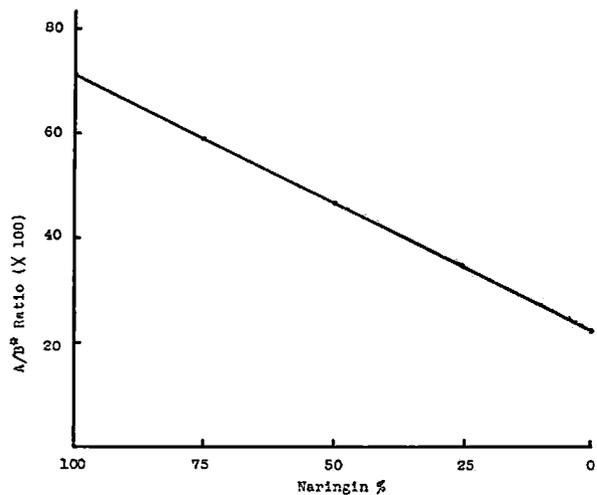


Fig. 8 Partition pattern of naringin and prunin in ethylacetate.  
\* A.....Davis value, after treating with ethylacetate.  
B.....Initial Davis value.

離定量を行う必要のあることが明らかになった。

3) ナリンギン、プルニンの分離定量法としては酢酸エチル分配法が簡便で最も適していることがわかった。

終りにのぞみまして本実験を行うにあたり種々ご指導いただいた大阪市大福本教授、大阪市立工研岡田茂孝氏、試料を提供していただいた田辺製薬KK、プルニンの元素分析に際し種々ご便宜をはかっていただいた大日本製薬K.K.中央研究所長筒井清氏に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 福本, 岡田: 科学と工業, 35, 400 (1961)
- 2) 福本, 岡田: 化学, 18, 614 (1963)
- 3) 中林: 缶詰時報, 40, No.7, 44 (1961)
- 4) 中林: 缶詰時報, 41, No.9, 23 (1962)
- 5) 野村, 秋山, 新本, 串山: 食品工誌, 10, 115(1963)
- 6) D. W. Thomas, C. V. Smyth, M. D. Labbee: Food Research, 23, 591 (1958)
- 7) W. J. Dunlap, R. E. Hagen, S. H. Wender: Food Science, 27, 597 (1962)
- 8) 岡田, 岸, 東原, 福本: 日農化, 37, 84 (1963)
- 9) Merck Index (Merck & Co., Inc.) 7th Edition, p 708 (1960)
- 10) M. Hasegawa: J. A. C. S., 79, 1738 (1957)
- 11) W. B. Davis: Anal. Chem., 19, 476 (1947)
- 12) 岡田, 矢野, 福本: 醸酵協会誌, 22, 371 (1964)
- 13) M. A. Jorio: Ann. Chim. (Rome) 49, 1929 (1959)