

ヘスペリジナーゼによるみかん缶詰白濁防止に関する研究 — I*

沢山善二郎・下田吉夫・奥 正和・松本熊市

STUDIES ON MUDDINESS PREVENTION IN CANNED MANDARIN ORANGE WITH ENZYME. — I

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

Summary

1. A method of preventing the appearance of the white turbidity in canned mandarin orange by means of the action of hesperidinase is presented.
2. The enzymic method was shown to be extremely effective when the enzyme acted either prior to (soaking method) or after (filling method) processing. However the latter is preferred in commercial canning because of the simplicity.
3. Sufficient reduction of the turbidity was demonstrated when only the first step of the two of the enzymatic decomposition (hesperidin.....→hesperetin-7-glucoside.....→hesperetin) proceeded. The enzymic method was more effective than the addition of methyl cellulose.

I 緒 言

我々は数年前よりかん詰工業への酵素の応用を研究してきた。そして既に夏みかんの苦味抜きにナリンギナーゼを応用し十分な効果が得られることを認め報告したが^{14,15)}、今回はみかんかん詰の白濁防止にヘスペリジナーゼを応用することを試みた。

このみかんかん詰液汁の白濁現象については古くから研究されており⁵⁾、その本体は果肉中に含まれているフラバノン物質ヘスペリジンであることは既に岩崎及び杉本⁴⁾、ならびに志賀により明らかにされている。一方この白濁の防止法についても種々研究されており^{6-9,16-17)} (即ちCMC, MC, 水飴等の粘質物の添加, 剥皮時のアルカリ濃度の影響等であるが) 現在の所ではMC (メチルセルローズ) の添加が最も効果的であることが認められ内販用かん詰の一部に用いられている。

しかしながらこのMCは輸出かん詰には使用出来ず、又最近問題になっている早生温州の様なヘスペリジン含量の比較的多い原料の場合には若干問題があるようにも考えられ、他の白濁防止法の研究が必要となって来た。

* 本論文は園芸学会誌に投稿中

そこで白濁防止に白濁物質ヘスペリジンの分解酵素であるヘスペリジナーゼの応用を試みた。酵素剤は大阪市立工業研究所の福本等¹⁰⁻¹²⁾により開発された耐酸耐熱性のヘスペリジナーゼを用いた。

この酵素をかん詰に使用することにより、ヘスペリジンは分解され生成物であるヘスペレチン-7-グルコシッドはシラップ中に溶解して白濁は生じないことが認められたので以下報告する。

II 実験材料及び方法

1) 酵 素 剤

大阪市立工業研究所で開発された耐酸耐熱性のヘスペリジナーゼ剤を用いた。

2) 原 料 み かん

静岡地方のもので12月上旬、1月下旬の2回に分けて試験を行なった。

3) 糖度 pH および透明度

糖度 pH 透明度 (シリンダー法) はそれぞれ常法通り測定した。

4) ヘスペリジン関連物質の薄層クロマトグラフィ

かん詰を開かんし液汁と果肉に分ける。液汁は更に沓紙 (東洋沓紙 NO 5 C) で沓過し沈澱と透明液汁に分ける。沈澱は 50% エタノールで 15 分煮沸溶解させた後減圧濃縮してクロマト用試料とした。一方透明液汁はアンバーライト IRC-CG 50 II 型 (以下 CG 50) カラム (H 型) に吸着させ水洗後 95% エタノールで溶出減圧濃縮してスポットした。

果肉は蒸留水で数回水洗し附着している液汁を充分除いた後、等量の 0.2 M NaOH と共にミキサーにかけ充分摩砕した後沓紙で沓過する。沓液を CG 50-H 型カラムに吸着、水洗し 95% エタノールで溶出、減圧濃縮してクロマトにかけた。

薄層クロマトグラフィは吸着剤にシリカゲル G (厚さ 0.25 mm) を、展開剤には水飽和酢酸エチルを用いた。検出法は 1% AlCl_3 のメタノール溶液を噴霧した後、生じた蛍光物質を紫外線ランプ¹⁾下で同定した。

5) 試験かん詰の製造法

イ) 浸 漬 法

常法通り酸アルカリ剥皮した果肉を 0.1, 0.2% の酵素液 (果肉の 1.5 倍量) に 35°C で 30 分浸漬処理後充分水洗し肉詰した。この場合対照区は 35°C の温水に浸漬した。

ロ) 投 入 法

常法通り肉詰したかんにあらかじめ一定量の酵素液を添加したシラップを注入し、常法通り巻締め殺菌を行なった。殺菌は 81~82°C で 10 分 (4~5 rpm の回転殺菌機使用) 行なった。

6) 試験かん詰の運搬保管

製造は静岡県興津の S 工場で行い、製造後 10 日以内に兵庫県川西市の当研究所までトラック便で輸送し、以後室温に保管し、経時変化を見た。

III 実験結果

第1図にヘスペリジナーゼの作用機作を示す。

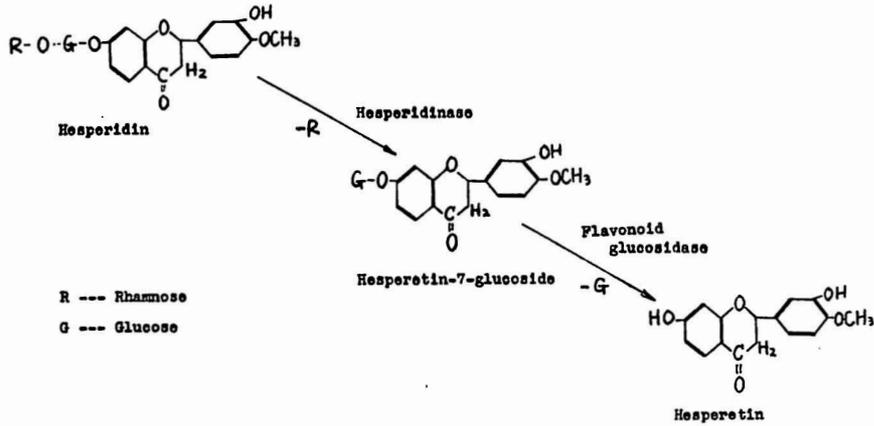


Fig. 1 Enzymatic Decomposition of Hesperidin with Hesperidinase System.

ヘスペリジナーゼもナリンギナーゼと同様に二段階の分解反応を受け、それぞれ別の酵素ヘスペリジナーゼとフラボノイドグルコシダーゼにより触媒されることが認められている。

第2図に使用したヘスペリジナーゼ剤の pH 曲線を示す。この酵素剤の最適 pH は 3.5 付近でみかんかん詰の pH である 3.4~3.5 前後では十分な活性を有することがわかった。

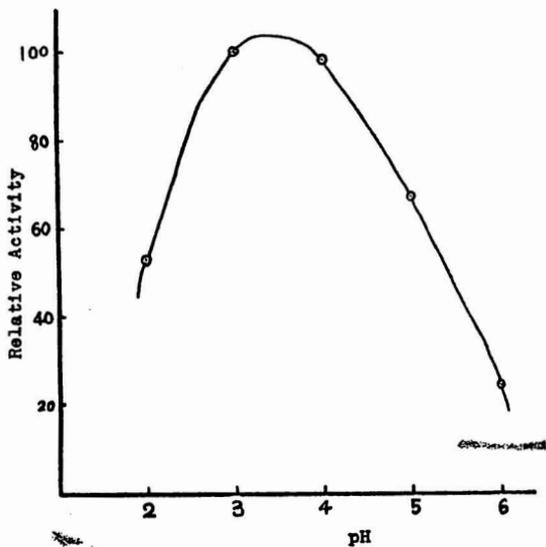


Fig. 2 pH-Dependence of hesperidinase activity.

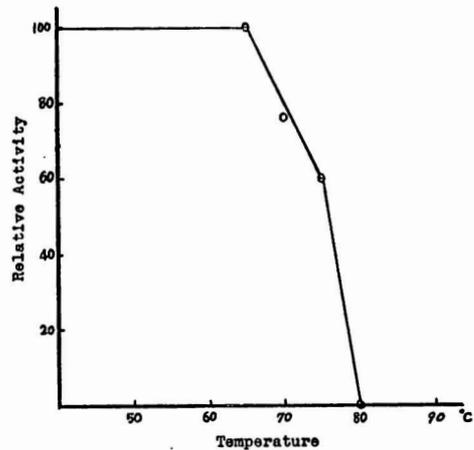


Fig. 3 Heat stability of hesperidinase in M/20 McIlvaine buffer, pH 4.0.

Enzyme solution (100 mg/ 5 ml. buffer) was kept for 5 min. in water bath at various temperatures.

第3図にこの酵素剤の耐熱性を示す。この図に示される様に 75°C 5分の処理で60%の活性が残ることから実際のかん詰殺菌条件 (80~82°C 10分) では十分な活性の残ることが予想されたので投入法も試みることにした。何故ならばこの処理は酵素をバッファー溶液中で正確に各温度で5分間保つという非常に激しい条件が要求されており、かん詰殺菌の場合には基質、糖の共存等の影響も加わって酵素の安定性はもっと増加することは既にナリンギナーゼの場合に証明されているか

らである。^{14,15)}

第1表に浸漬法の開かん結果を示す。尙製造は39年12月11日に行なった。

Table I. Analysis of canned mandarin orange treated by "soaking method".

	After 1 day			After 15 days			After 30 days		
	0.2 %	0.1 %	Cont.	0.2 %	0.1 %	Cont.	0.2 %	0.1 %	Cont.
pH	3.3	3.3	3.3	3.31	3.30	3.31	3.32	3.35	3.32
Sugar %	17.2	17.3	17.0	18.0	18.0	18.0	17.9	18.3	18.0
Solids g	180.0	182.4	181.0	183.6	182.0	181.8	181.0	181.6	182.4
Transparency mm	194	199	199	148.2	100.8	67.2	165.8	111.0	55.6

	After 90 days			After 180 days		
	0.2 %	0.1 %	Cont.	0.2 %	0.1 %	Cont.
pH	3.35	3.30	3.30	3.32	3.38	3.37
Sugar %	17.0	17.6	17.6	17.7	18.4	17.9
Solids g	186.8	182.8	187.2	186.6	182.6	185.0
Transparency mm	184.4	145.6	56.0	206.8	170.2	49.8

この表より明らかな様に果肉を0.2%または0.1%酵素液に短時間浸漬処理することにより、糖度、pH及び固型量には変化なしに、透明度のみを増加させることができた。即ち6ヶ月後の開かん結果では酵素区は両区とも対照区の5倍前後の透明度を示し十分な白濁防止の効果が認められた。

第2表には第一回目の投入法の開かん結果を示す。尙製造は39年12月11日に行なった。

Table II. Analysis of canned mandarin orange treated by "filling method" (Run 1).

	After 1 day				After 15 days				After 30 days			
	50 u	10 u	Cont.	M.C.	50 u	10 u	Cont.	M.C.	50 u	10 u	Cont.	M.C.
pH	3.3	3.3	3.3	3.3	3.31	3.31	3.31	3.33	3.35	3.37	3.35	3.38
Sugar %	17.2	17.4	17.8	17.3	18.5	18.9	18.4	17.7	18.4	18.4	18.8	18.0
Solids g	192.8	196.3	191.3	191.0	192.0	188.2	187.4	191.4	185.8	187.0	187.0	188.8
Transparency mm	165.0	184.0	157.0	148.0	131.0	170.0	43.8	102.8	138.8	190.0	44.4	101.0

	After 90 days				After 180 days			
	50 u	10 u	Cont.	M.C.	50 u	10 u	Cont.	M.C.
pH	3.32	3.30	3.30	3.38	3.30	3.33	3.39	3.39
Sugar %	18.0	18.0	18.0	17.3	18.1	18.4	18.3	17.2
Solids g	191.6	190.0	189.0	191.0	188.4	187.2	186.6	189.4
Transparency mm	114.0	202.8	35.4	80.2	147.0	167.2	30.6	69.8

この場合も酵素の添加はやはり糖度、pH 固型量には影響せず透明度のみを増加させていた。

そして第3図の酵素の耐熱性について推定した如く、この酵素剤は通常のみかんかん詰の殺菌条件程度の加熱には充分耐えることが認められた。尙この試験に於ては酵素区の方がMC添加区よりも白濁防止効果は明らかに大きかった。MCは総量に対して10 ppmの割合で添加した。

第3表に第二回の投入法の開かん結果を示す。製造は40年1月26日に行なった。

Table III. Analysis of canned mandarin orange treated by "filling method" (Run 2).

	After 1 day				After 15 days				After 30 days			
	10 u	5 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	Cont.	M.C.
pH	3.6	3.4	3.6	3.4	3.54	3.41	3.41	3.40	3.46	3.31	3.45	3.41
Sugar %	17.0	17.2	16.9	16.9	18.4	18.1	18.0	18.0	18.2	17.4	17.8	17.5
Solids g	198.1	198.5	199.1	198.8	194.0	191.0	192.4	193.0	191.4	191.0	189.6	190.6
Trans- parency mm	134.0	137.0	134.0	137.0	131.2	118.4	42.2	105.2	125.8	142.8	32.6	92.6

	After 90 days				After 180 days			
	10 u	5 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	Cont.	M.C.
pH	3.50	3.50	3.50	3.46	3.45	3.38	3.45	3.38
Sugar %	17.6	17.4	17.0	17.0	17.5	17.4	17.0	17.2
Solids g	191.8	193.2	191.0	193.8	193.2	193.6	192.4	193.2
Trans- parency mm	122.6	172.2	28.0	101.4	157.4	167.6	31.2	106.6

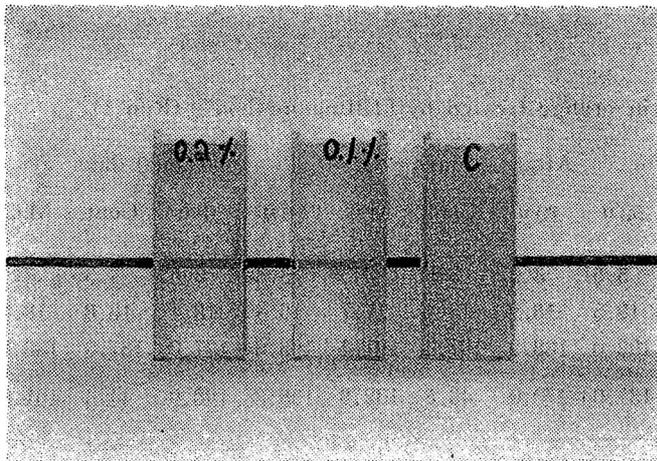


Fig. 4 a Appearance of syrup from enzyme-treated canned mandarin orange after 6-months storage at room temperature. (Soaking method)
 0.2%.....Soaked with 0.2% enzyme solution.
 0.1%.....Soaked with 0.1% enzyme solution.
 CControl.

第二回の投入法の結果も同様に酵素の添加は透明度のみを増大させ他の変化は見られなかった。そして酵素の添加量も5 u程度で充分効果があることが判った。

第4図に6ヶ月後のシラップの状態を示す。第4図aは浸漬法、第4図bは投入法の結果である。浸漬法では酵素処理区の透明度が、明らかに優れており、又投入法でも明らかに対照区の透明度が低く、次いでMC区の順となり、酵素区は両区とも充分な透明度を示していた。

シラップの透明度の経時的な変化を示したのが第5～7図である。

シラップの透明度は製造後15日目で各区とも可成り低下することが認められた。酵素処理区は何れもその後若干増加する様な傾向が見られた。又MC区は15日目に可成り低下し以後は漸減する傾

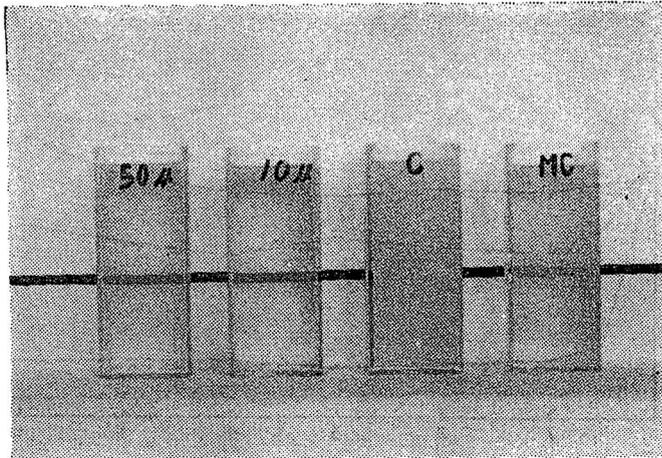


Fig. 4 b Appearance of syrup from enzyme-treated mandarin orange after 6-months storage at room temperature. (Filling method)
 50 u.....50 u/can enzyme was added.
 10 u.....10 u/can enzyme was added.
 CControl.
 MC.....10 ppm/total can content of methyl cellulose was added.

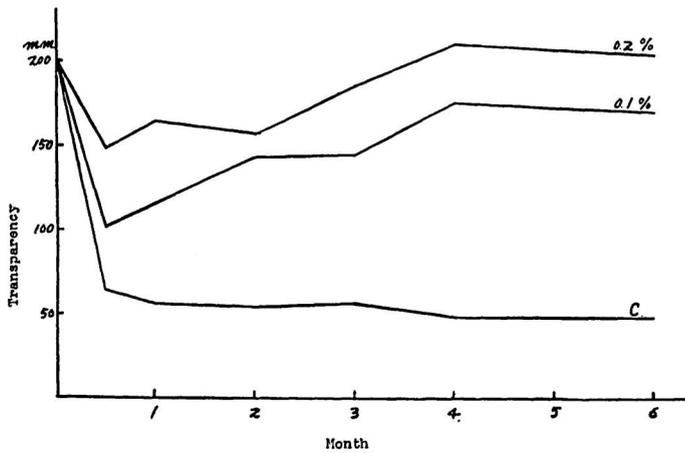


Fig. 5 Changes in transparency during storage at room temperature. ("Soaking method")

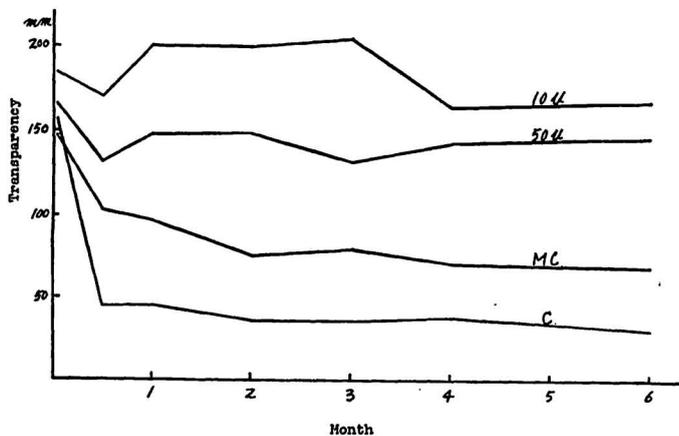


Fig. 6 Changes in transparency during storage at room temperature. (Filling method, Run 1)

向にある様である。一方対照区は15日から30日迄の間に 50 mm以下迄大きく透明度が低下し、その後は略々一定の値を示す様である。

浸漬法，投入法の何れにしる酵素処理を行なうことにより透明度は対照区に比べ3倍から5倍程度の高い値を示し，又MC添加よりも大きい白濁防止の効果が認められた。

以上の様に浸漬法，投入法の何れにせよ酵素処理を行なうことにより十分な白濁防止効果が得られた。然しながら，この防止効果は実際にヘスペリジンが分解されたために生じたのか，更にヘスペリジンは完全にヘスペレチンに迄分解されているのか，或いは中間生成物ヘスペレチン-7-グルコシッドで止まっているのかは判らない。そこでこの点を明らかにするために以下ヘスペリジン関連物質の薄層クロマトグラフィーを行なった。

第8図に透明液汁の薄層クロマトグラムを示す。

この図より明らかな様に投入法，浸漬法とも酵素処理したものはヘスペリジンは殆んどヘスペレチン-7-グルコシッドに迄分解されていた。又ヘスペレチンは90日以後のシラップ中に僅かに認められて来た。MC区，対照区は何れもヘスペリジンのみが認められた。

第9図に沈澱物の薄層クロマトの結果を示す。

この図に見られる様に沈澱物中には何れもヘスペリジンのみが見出され，しかも酵素処理区はともにその量も極めて僅かであった。

第10図に果肉中のクロマト結果を示す。

この場合も略々シラップ中と同様の結果が得られ、果肉中に残っているヘスペリジンも可成り酵素によりヘスペレチン-7-グルコシッド迄分解されていることが推察された。

以上の薄層クロマトグラフィーの結果より白濁の本体はやはりヘスペリジンであり、酵素処理することはこの難溶性のヘスペリジンを比較的可溶性の

ヘスペレチン-7-グルコシッドに迄分解して結晶の析出を抑制することによって白濁防止効果を

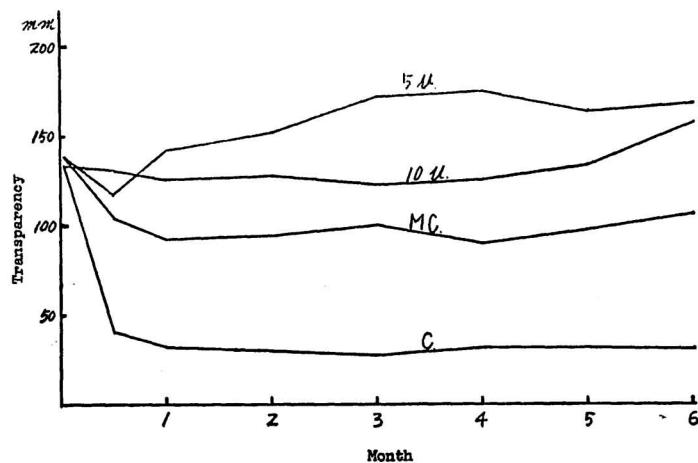


Fig. 7 Changes in transparency during storage at room temperature. (Filling method. Run 2)

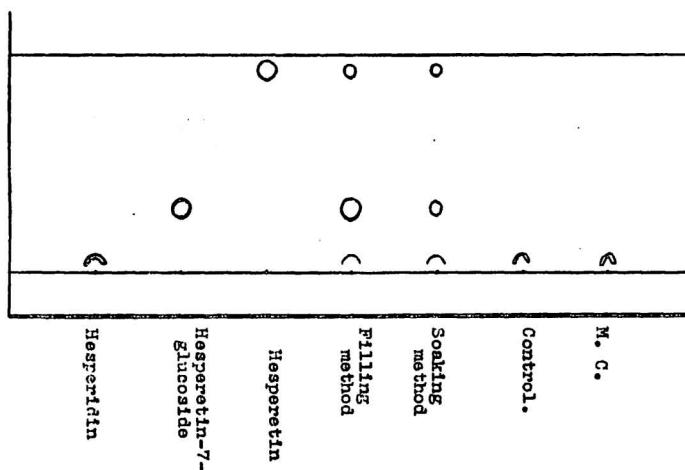


Fig. 8 Thin layer chromatogram of hesperidin and its derivatives from clear syrup of canned mandarin orange stored for 6 months.

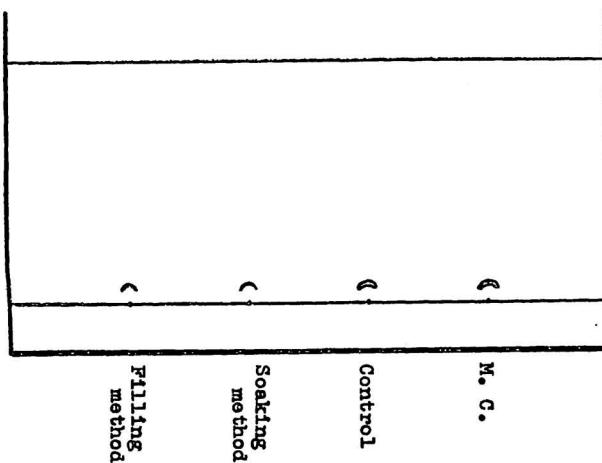


Fig. 9 Thin layer chromatogram of hesperidin and its derivatives from insoluble matter of syrup of canned mandarin orange stored for 6 months.

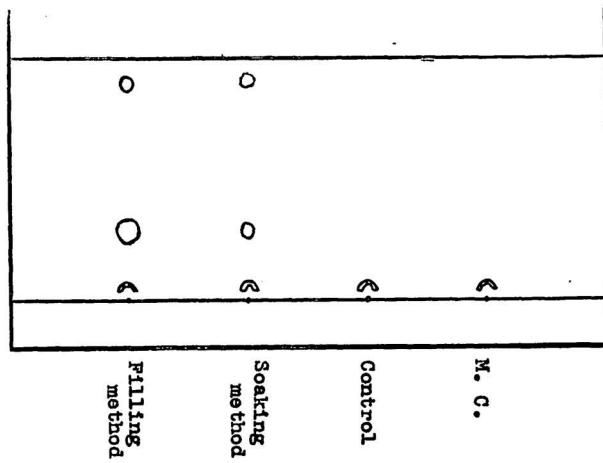


Fig. 10 Thin layer chromatogram of hesperidin and its derivatives from canned mandarin orange segments stored for 6 months.

示すのだということが結論された。

IV 考 察

先にも述べた如く、みかんかん詰の白濁現象はもともと果肉中に含まれているヘスペリジンがかん詰の殺菌過程中に高温、糖度、及び pH 等の影響でシラップ中に溶解移行し、それが冷却、保存される間に温度、糖度、pH の低下に伴い過飽和の状態になり、次第にヘスペリジンが結晶析出して白濁を生ずるのである。そしてこの結晶の析出は適当な結晶母核（蛋白質、ペクチン質等）の存在、又はかん詰製品の輸送等による動揺により促進されることは既に報告されている⁷⁾。

従って白濁の防止法はもともとヘスペリジン含量の少ない原料（品種、産地、熟度）を撰んで製造するか、又はヘスペリジンの析出を防ぐような処理をとるかの何れかである。しかし実際の工場操業上特別の品種、産地又は最適熟度の原料のみを撰沢製造することは不可能であり、矢張りヘスペリジンの析出を防ぐ方法を講ずること以外に方策がない。そしてこの方法として現在のところ可能と考えられるものに MC 等の添加法とヘスペリジナーゼの応用の二つがある。

この中 MC は先にも述べた如く、日本国内では広く使用されているが、この MC の白濁防止効果の機構の詳細については現在未だ不明のところもあるが、一応シラップ中でのヘスペリジンの析出を抑制する働きに帰すべきであると考えられる。然しヘスペリジンの果肉からシラップへの溶出を若干抑える効果もあるかも知れない。しかしながら、この MC の効果はやはり相対的なものであり、MC の添加効果はシラップの白濁を或る程度抑制し得るにとどまり、常に完全に透明に保持するわけではない。そのためヘスペリジン含量、かん詰内容物の状態如何等により突発的に白濁生成の起り得る可能性が十分に考えられる。

一方ヘスペリジナーゼの作用は白濁の本体である難溶性のヘスペリジンを分解して比較的可溶性のヘスペレチン-7-グルコシッド（又はヘスペレチン？）にすることにより白濁防止の効果を示す。ここに生じたヘスペレチン-7-グルコシッドについてはその詳細な化学的性質について報告は未だ得られておらず、その溶解性も不明の点が多い。然しながら第 6～7 図、第 8～9 図に示した如く我々の得た実験結果ではこのヘスペレチン-7-グルコシッドはヘスペリジンより明らかに溶解性が高く、少なくともみかんかん詰シラップ中では完全に溶解して結晶の析出することはない様である。こういう点が我々の実験結果（第 6～7 図）に示された様にヘスペリジナーゼの効果が MC のそれより大きかった理由であろう。

尚ヘスペレチン迄完全に分解した場合透明度がどの様に変化するかは 6 ヶ月目迄の開かん結果では、みかんかん詰中で第二段の酵素フラボノイドグルコシダーゼ活性が糖阻害を受けるためか、ヘスペレチンの生成量が非常に少ないので現在の所では断定しがたい。このヘスペレチンについては稲垣等^{2,3)}がヘスペリジン→ヘスペレチン+ルチノースの一段分解を触媒する酵素（いわばルチノシダーゼ？）を用いて試験し、白濁防止効果があると報告されているので或程度の溶解性があるものとも考えられる。

V 要 約

- 1) ヘスペリジナーゼをみかんかん詰の白濁防止に応用した。
- 2) 浸漬法, 投入法ともに結果は良好であったが, 実際の工場操業上からは投入法を採用するのが望ましいと考えられる。
- 3) ヘスペリジナーゼによりヘスペリジンをヘスペレチン-7-グルコシッドに分解することにより十分な白濁防止効果が得られた。そしてこの効果はMCの添加よりも大きかった。
- 4) 6ヶ月目迄の結果では未だヘスペレチンの生成量は極めて少量であった。然しこの状態でもその透明度は十分に保たれたものとみなされるので, ヘスペレチン迄完全に分解する必要性はないとも考えられるが, この点更に今後の開かん結果によって考慮したい。

終りに本実験を行なうにあたり種々御指導頂いた大阪市立大学福本寿一郎教授, 大阪市立工研岡田茂孝氏, ヘスペリジン及びその関連物質の標品を分与して頂いた武田薬品工業株式会社, 光工場崎谷幾雄氏, ヘスペリジナーゼを提供して頂いた田辺製薬株式会社に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) Dunlap W. J., Hagen R. E. and Wender S. H.; Properties of Rhamnosidase and Glucosidase Fraction from a Fungal Flavonoid Glycosidase Preparation, "Naringinase C-100". Food Science, 27, 597-601. (1962)
- 2) 稲垣長典; 密柑缶詰の白濁防止法. 日本特許, 昭30~390 (1955)
- 3) 稲垣長典, 福場博保, 小池弘子; ヘスペリジン分解酵素について, 栄養と食糧, 8, 231~234 (1956)
- 4) 岩崎康男, 杉本達也; 温州密柑の濁濁物に就いて, 糧食研究, 第108号, 293~296 (1935)
- 5) 金子義男; 密柑缶詰製造に於ける白濁生因について, 缶詰時報, 36, (8), 81~69 (1957)
- 6) 久保進, 別所康守, 宮田太郎; 密柑缶詰の研究 (第3報) 低メトキシペクチンのゲル被膜による白濁防止について, 農産技研誌, 8, 86~93 (1961)
- 7) 松井修, 伊藤三郎, 村田侃; みかん缶詰の白濁防止について (第1報) 缶詰時報, 38, (1), 110~82 (1959)
- 8) 中林敏郎, 水上豊, 本多初雄, 古井宏崇; 柑橘類フラボノイドの研究 (その3) 密柑缶詰シラップの白濁現象 (I) 農産技研誌, 6, 261~266 (1959)
- 9) 中林敏郎, 鷹野正, 本山敬三; 柑橘類フラボノイドの研究 (その4) 密柑缶詰シラップの白濁現象 (II) 農産技研誌, 7, 213~218 (1960)
- 10) 岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝, 福本寿一郎; フラボノイド配糖体加水分解酵素に関する研究 (第一報) ナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I の結晶化並びにその作用機作, 日農化, 37, 84~89 (1963)
- 11) 岡田茂孝, 岸 満, 東原昌孝, 福本寿一郎; フラボノイド配糖体加水分解酵素に関する研究 (第二報) ナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I の特異性, 日農化, 37, 142~145 (1963)
- 12) 岡田茂孝, 岸 清, 板谷公和, 福本寿一郎; フラボノイド配糖体加水分解酵素に関する研究 (第三報) プルニン並びにヘスペレチン-7-グルコシッド分解酵素の精製, 日農化, 37, 146~150 (1963)
- 13) 志賀岩雄; 密柑缶詰に就いて, 缶詰時報, 13, (12), 83~93 (1934)
- 14) 下田吉夫, 奥正和, 沢山善二郎, 松本熊市; ナリンギナーゼによる夏みかん脱苦味の研究 (第一報) ナリンギン分析法の検討, 缶詰時報, 44, (1), 95~100 (1965)
- 15) 下田吉夫, 奥正和, 沢山善二郎, 松本熊市; ナリンギナーゼによる夏みかん脱苦味の研究 (第二報) 一段殺菌法による夏みかん缶詰の脱苦味試験, 缶詰時報, 44, (1), 100~105 (1965)
- 16) 静岡缶詰協会技術部; 密柑缶詰白濁防止に関する試験 (第一, 二報) 缶詰時報, 36, (8), 68~47 (1957)
- 17) 砂川満男, 井山満雄, 今井寛; みかん缶詰の白濁防止に関する研究 (I) 缶詰時報, 39, (10), 95~101 (1965)