

ヘスペリジナーゼによるミカン缶詰 白濁防止に関する研究—II

下田吉夫・奥正和・森大蔵・沢山善二郎

STUDIES ON MUDDINESS PREVENTION IN CANNED MANDARIN ORANGE WITH ENZYMES—II.

Yoshio Shimoda, Masakazu Oku, Daizo Mori and
Zenjiro Sawayama

The present paper deals with the application of hesperidinase to the prevention of muddiness of canned citrus products caused by precipitation of hesperidin.

1. By the addition of a hesperidinase preparation either by means of the soaking method, in which the product was soaked in the hesperidinase solution before filling in the can, or of the filling method, in which the enzyme was added to the can containing the product and syrup before sealing, it was found that the product of superior quality with sufficiently transparent syrup is obtained.

The effect of the addition of hesperidinase was found to be much greater than that of methylcellulose (Fig. 1-4).

2. The major part of hesperidin was found to be decomposed to hesperetin-7-glucoside, which is soluble and gradually decomposed to hesperetin. The product was found to be clean even after 2-year storage (Table VIII-X).

3. When the enzyme is used for the artificially sweetened product, the condition for sterilization is somewhat reduced, and 50% or more of cyclamate is substituted by the equivalent sweetness of saccharin.

われわれは前報¹⁾でミカン缶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、十分な防止効果が得られることを認め、その6カ月目迄の開缶結果につき報告した。

しかし、普通市販のミカン缶詰の商品価値は製造後2年位が限度とされている。したがってヘスペリジナーゼを応用したミカン缶詰も最低2年は経時的変化を調べる必要があると考えられるので、引続き2年間の貯蔵試験を行なってみた。

また前報では薄層クロマトにより、ヘスペリジンの分解生成物の大部分はヘスペレチン-7-グルコシッドであり、ヘスペレチンは極く少量しか生成しないことを確かめたが、本報ではこれら三つの成分の分離定量を行なってみた。

さらに現在内販用のミカン缶詰として、かなりの量の人甘併用品が製造されているので、この場合におけるヘスペリジナーゼの応用についても検討してみた。

I 実験材料および方法

1. ヘスペリジナーゼ剤

前報と同様に田辺製薬KKより提供を受けた耐酸耐熱性の酵素剤ヘスペリジナーゼ(タナベ)を使用した。

なお、この市販の酵素剤は1g当り100uのヘスペリジナーゼ活性を有しているので、その10%溶液1mlは10uの酵素活性を含むことになる。以下本報では先ず10%溶液を作り、これを適当に希釈して使用した。

2. 原料ミカン

静岡地方のもので12月、1月の原料を使用した。

3. pH、糖度、固型量および透明度

前報に準じそれぞれ常法通り測定した。

4. ヘスペリジン関連物質の定量法

缶詰を開缶、液汁と果肉に分け、液汁はさらにろ紙(東洋ろ紙 No. 5C)で濾過、沈澱と透明液汁に分ける。沈澱は風乾後50% EtOHで15分煮沸溶解させた後、冷却、濾過して一定量にする。透明液汁は重炭酸ソーダを加えpH 8.0付近まで中和後、水を加えて希釈して一定量にする。

これらの試料につき中林²⁾の方法に準じて(pH 8.2のKolthoff-Vleeschhauwerのbuffer³⁾使用)インドフェノール反応法を用いて発色620m μ で比色定量した。

5. ヘスペリジン、ヘスペレチン-7-グルコシッドおよびヘスペレチンの分離定量

分離定量は酵素剤を使用したものの透明液汁についてのみ行なった。すなわち透明液汁をアンバーライト IRC-CG 50 II型カラム(H型)を通し、ヘスペリジンなどを吸着させる。よく水洗後95% EtOHで溶出、減圧下で乾固させる。これを20%ピリジン5mlに溶解し、その一定量をスポットし、薄層クロマトで展開(水飽和醋酸エチル)。風乾後各部位をかき落とし、20%ピリジン5mlを加え30分間振盪溶出した後遠心分離する。得られた上澄液につきインドフェノール反応法で比色定量した。

6. 試験缶詰の製造法

試験缶詰はいずれも前報¹⁾通り静岡県興津のS工場で製造した。なお人甘併用品のみは4~5rpmの回転殺菌機を使用して80°Cで10分間殺菌した。

7. 試験缶詰の運搬保管

前報¹⁾通り製造後10日以内に当大学までトラック便で輸送し、以後室温で貯蔵した。

II 実験結果

1) 浸漬法開缶結果

Table I に浸漬法の24カ月迄の開缶結果を示す。

Table I にも明らかなように、24カ月後でもヘスベリジナーゼ剤の添加による固型量の減少は全然認められず、また果肉の軟化、異味異臭の発生もなく良好な状態を保っていた。透明度の経時変化を Fig. 1 に示す。Fig. 1 に見られるように、酵素処理を行なったものは、2年後でも200mm

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

	After 1 day			After 12 months			After 24 months		
	0.2%	0.1%	Cont.	0.2%	0.1%	Cont.	0.2%	0.1%	Cont.
pH	3.30	3.30	3.30	3.38	3.38	3.31	3.34	3.34	3.34
Sugar %	17.2	17.3	17.0	18.0	17.8	17.3	17.8	17.9	17.9
Solids g	180.0	182.4	181.0	188.2	186.8	188.6	189.8	190.8	189.6
Transparency mm	194	199	199	258.2	221.4	55.6	270.0	240.2	59.2

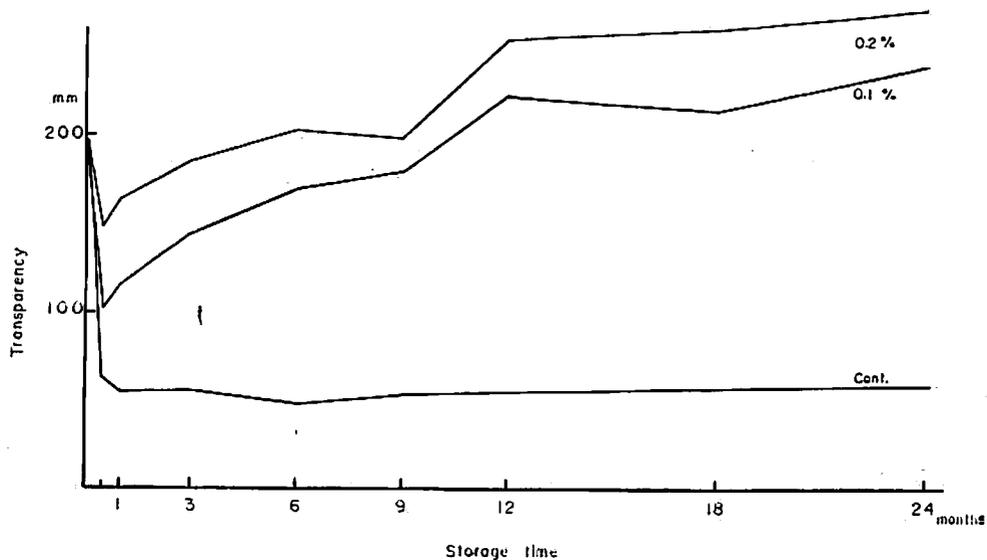


Fig. 1 Changes of transparency during storage at room temperature. ("Soaking method")

以上の透明度を示し、十分な白濁防止の効果が得られていた。

2) 投入法開缶結果

Table I ~ IV にそれぞれ第1~3回の投入法の開缶結果を示す。これらの表より明らかなように、投入法の場合でも浸漬法と同様に、酵素剤を添加しても24カ月後まで pH、糖度、固型量には変化がなくて、透明度ののみが高く良好な状態が保たれていた。またこれらの製品は、いずれも1年半あるいは2年後でも果肉の軟化崩壊等の悪影響は全然認められず、これはこのヘスベリジ

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

	After 1 day				After 12 months				After 24 months			
	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	3.30	3.35	3.30	3.29	3.31	3.34	3.29
Sugar %	17.2	17.4	17.8	17.3	19.3	18.8	18.8	17.9	18.0	18.8	18.8	17.0
Solids g	192.8	196.3	191.3	191.0	189.8	188.4	187.4	189.0	192.6	190.8	191.0	193.8
Transparency mm	165.0	184.0	157.0	148.0	161.4	216.1	37.2	81.2	163.6	230.0	38.2	75.0

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

	After 1 day				After 12 months				After 24 months			
	10 u	5 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	Cont.	M.C.
pH	3.6	—	3.6	3.4	3.51	3.39	3.47	3.39	3.53	3.40	3.50	3.34
Sugar %	17.0	—	16.9	16.9	17.0	18.0	17.6	17.5	18.8	18.8	18.8	18.4
Solids g	198.1	—	199.1	198.8	194.4	197.2	194.4	195.0	195.0	195.2	194.8	195.2
Transparency mm	134.0	—	134.0	137.0	178.0	197.2	39.2	111.0	202.2	211.2	37.6	125.8

Table IV Analysis of canned mandarin orange treated by "filling method." (Run 3)

	After 1 day					After 12 months				
	10 u	5 u	1 u	Cont.	M.C.	10 u	5 u	1 u	Cont.	M.C.
pH	3.30	3.31	—	3.30	—	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30
Sugar %	17.2	17.2	—	17.4	—	17.0	17.0	17.2	17.0	17.4
Solids g	197.2	197.0	—	195.6	—	197.8	199.2	199.2	200.4	198.4
Transparency mm	139.0	144.8	—	104.4	—	201.0	151.5	82.8	41.4	115.2

	After 18 months				
	10 u	5 u	1 u	Cont.	M.C.
pH	3.30	3.30	3.30	3.28	3.28
Sugar %	16.8	16.9	16.9	16.8	17.0
Solids g	194.8	195.6	197.4	195.6	195.4
Transparency mm	200.8	168.0	76.0	38.2	103.0

ナーゼ剤がほとんどペクチナーゼ活性を含んでいないためと考えられる。

Fig. 2～4に透明度の経時変化を示す。これらの図からも明らかなごとく、酵素を1缶当たり5 u以上使用したものの透明度は、いずれもM.C添加区よりも高く十分な白濁防止効果が得られていた。1缶当たり1 uの使用量ではFig. 4に示すごとく若干の効果は認められたが、白濁防止の点ではまだ十分ではないと考えられた。

3. ヘスペリジン関連物質の定量および分離定量結果

Table V～VIIにミカン缶詰液汁中のヘスペリジン関連物質の定量結果を示す。これらの表にみられるごとく浸漬法、投入法のいずれの場合にも酵素剤を使用したものは沈澱中にはほとんどへ

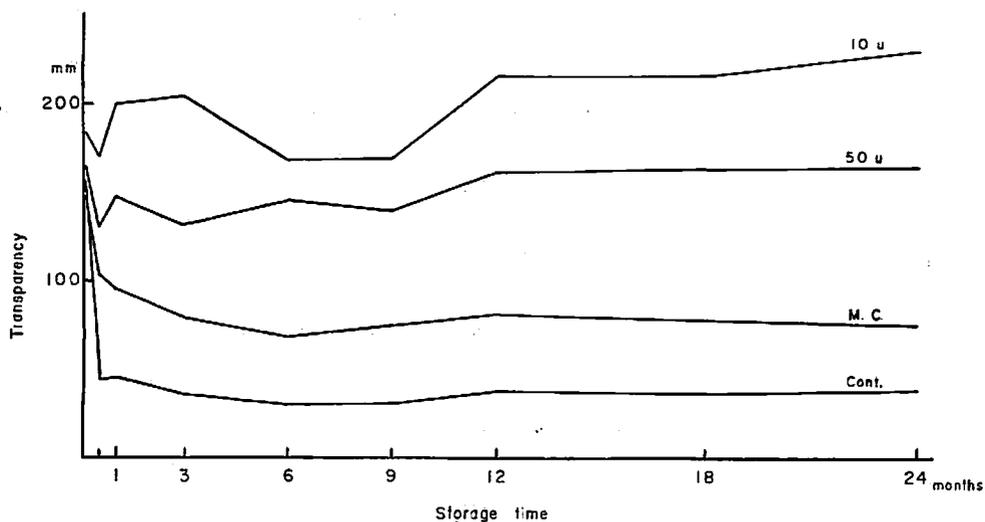


Fig. 2 Changes of transparency during storage at room temperature.
("Filling method", Run 1)

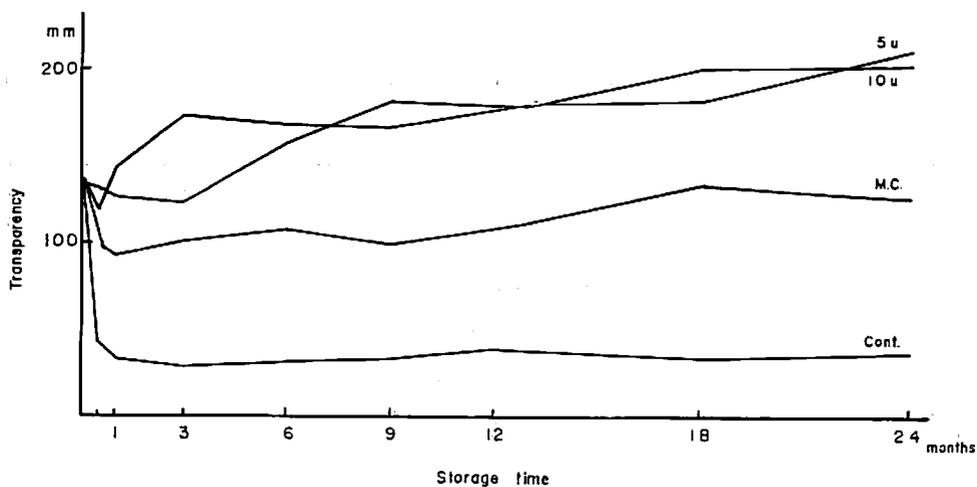


Fig. 3 Changes of transparency during storage at room temperature.
("Filling method", Run 2)

スペリジンが認められずに、その大部分が透明液汁中に含まれていた。この事実は酵素剤の添加により難溶性のヘスペリジンがなんらかの反応を受けて可溶性になり、透明液汁中に溶解したことを示している。一方対照区では液汁中のヘスペリジン含量は酵素処理したものよりかなり低く、逆に沈澱中にはより多く含まれ、貯蔵期間とともに僅かに増加する傾向が見られた。

一方MC区では液汁、沈澱物中ともに酵素区と対照区の中間の値を示している。またMC区の場合は常に沈澱物と透明液汁とに含まれている量の合計が対照区より若干少ない傾向が認められたが、これはMCの添加効果が液汁中でのヘスペリジンの沈澱析出を防ぐとともに、やはり果肉

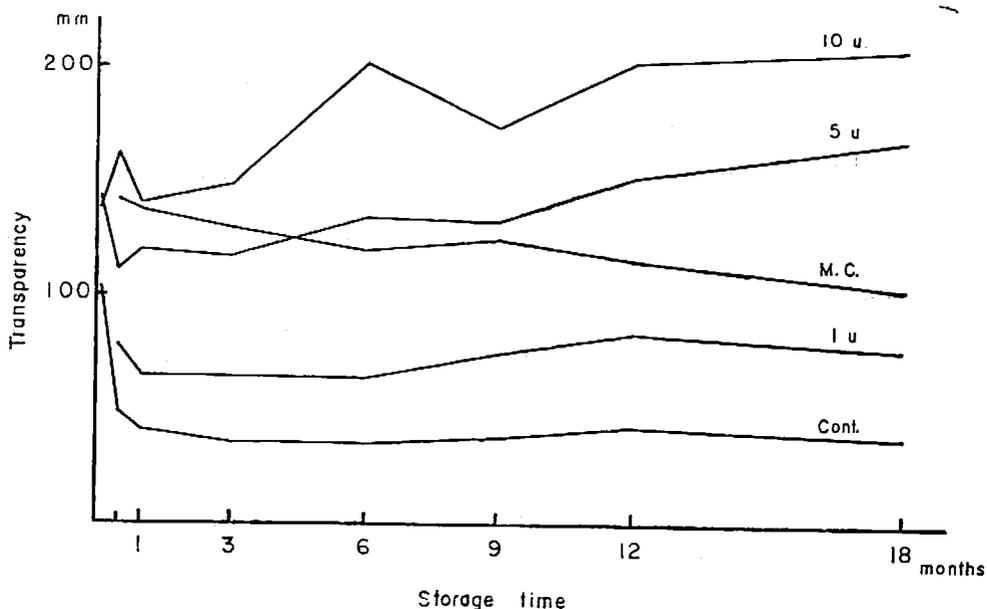


Fig. 4 Changes of transparency during storage at room temperature. ("Filling method", Run 3)

Table V Variation in contents of hesperidin and related substances in syrup during storage of canned mandarin orange. ("Soaking method")

Stored for	Enzyme (0.2%)			Control		
	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total
	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
15 days	29.3	0.9	30.2	17.5	5.6	23.1
1 month	30.0	0.6	30.6	13.5	7.8	21.3
3 months	28.8	0.6	29.4	15.3	8.4	23.7
6 "	30.8	0.9	31.7	14.0	9.3	23.3
9 "	30.8	0.7	31.5	14.3	7.1	21.4
12 "	33.0	0.4	33.4	14.0	8.8	22.8
24 "	32.0	0.3	32.3	11.8	10.5	22.3

Table VI Variation in contents of hesperidin and related substances in syrup during storage of canned mandarin orange. ("Filling method", Run 1)

Stored for	Enzyme (10 u)			Control			M. C.		
	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total
	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
15 days	26.0	0.8	26.8	19.5	7.0	26.5	26.0	2.4	28.4
1 month	29.3	0.7	30.0	16.8	8.3	25.1	23.0	2.6	25.6
3 months	30.8	0.9	31.7	15.3	9.9	25.2	19.0	4.8	23.8
6 "	30.5	0.7	31.2	15.0	12.1	27.1	18.5	6.1	24.6
9 "	30.0	0.7	30.7	15.0	11.8	26.8	18.3	6.2	24.5
12 "	36.0	0.7	36.7	14.5	12.2	26.7	16.8	6.5	23.3
24 "	36.0	0.5	36.5	13.5	14.4	27.9	16.5	8.2	24.7

Table VII Variation in contents of hesperidin and related substances in syrup during storage of canned mandarin orange. ("Filling method", Run 2)

Stored for	Enzyme (10 u)			Control			M. C.		
	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total	Filtered syrup	ppt. in syrup	Total
15 days	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
1 month	22.3	1.0	23.3	14.4	8.4	22.8	24.3	1.3	25.6
3 months	26.0	0.9	26.9	17.3	8.0	25.3	19.0	2.2	21.2
6 "	33.8	0.8	34.6	15.8	11.8	27.6	20.3	2.1	22.4
9 "	34.3	0.8	35.1	14.5	11.8	26.3	18.9	2.8	21.7
12 "	30.5	1.3	31.8	13.5	10.9	24.4	16.4	3.0	19.4
24 "	32.5	1.1	33.6	14.8	11.5	26.3	15.8	3.6	19.4
	34.0	0.7	34.7	13.0	11.7	24.7	16.8	2.1	18.9

Table VIII Change in contents of hesperidin and related substances. (Analyzed with TLC) ("Soaking method")

Stored for	Hesperidin	Hesperetin-7-glucoside	Hesperetin	Total
	mg%	mg%*	mg%*	mg%*
15 days	6.2	8.4	1.1	15.7
1 month	5.3	8.8	1.1	15.2
3 months	1.8	12.1	1.3	15.2
6 "	1.3	11.4	1.3	14.0
9 "	1.2	14.7	1.1	17.0
12 "	1.0	14.7	1.1	16.8
24 "	1.0	20.5	1.1	22.6

* Calculated as hesperidin.

Table IX Change in contents of hesperidin and related substances. (Analyzed with TLC) ("Filling method", Run 1)

Stored for	Hesperidin	Hesperetin-7-glucoside	Hesperetin	Total
	mg%	mg%*	mg%*	mg%*
15 days	2.6	19.3	—	21.8
1 month	1.7	21.6	—	23.3
3 months	1.4	23.0	—	24.4
6 "	1.2	29.5	0.6	31.3
9 "	1.4	23.5	3.2	28.1
12 "	1.2	23.4	4.2	28.8
24 "	0.9	24.3	5.2	30.4

* Calculated as hesperidin.

から液汁へのヘスペリジンの溶出を抑制する作用も有しているためと考えられる。

Table VIII~X に酵素処理区の透明液汁のヘスペリジン関連物質の分離定量結果を示す。これら

の表からも明らかに酵素を添加することにより、ヘスペリジンの大部分がヘスペレチン-7-グルコシッドおよびヘスペレチンに分解されていることが認められた。しかもこの分解産物であるヘスペレチン-7-グルコシッド、ヘスペレチンは明らかにヘスペリジンと異なり、ミカン缶詰の液汁に可溶性で沈澱析出することがなく、その結果白濁が防止されたことが認められた。

Table X Change in contents of hesperidin and related substances.
(Analyzed with TLC)
("Filling method," Run 2)

Stored for	Hesperidin	Hesperetin-7-glucoside	Hesperetin	Total
	mg%	mg%*	mg%*	mg%*
15 days	1.8	19.3	0.6	21.7
1 month	2.4	19.7	0.4	22.5
3 months	2.2	18.1	1.1	21.4
6 "	1.9	21.2	2.8	25.9
9 "	2.2	18.1	2.7	23.0
12 "	1.6	13.4	5.2	20.2
24 "	1.3	10.9	8.2	20.4

* Calculated as hesperidin.

4. 人甘併用品に対する効果

前述のごとく現在内販用としてかなりの量の人甘併用品が製造されている。そこで人甘併用品にヘスペリジナーゼを応用した場合の効果について検討してみた。

まず人工甘味料としてサイクラミン酸ソーダ75%、サッカリン12.5%、ズルチン12.5%（それぞれ甘味度として）を混合したシラップを調整し、それを用いてヘスペリジナーゼを添加した缶詰を製造した。この場合殺菌条件は全糖品と同様4~5 rpmの殺菌機を使用して82°Cで10分おこなった。結果をFig.5に示す。

この図に見られるごとく酵素剤を1缶当たり10 μ 添加してもMC区よりも透明度がかなり低く十分な白濁防止の効果は得られなかった。この原因としては全糖品と同じ条件で殺菌したために、殺菌過度になったためか（実際に82°C10分では缶中心温度は75°C以上で全糖品の71°Cよりかなり高かった）またはサイクラミン酸ソーダの阻害効果のためではないかと考えられる。これらの点については、先にナリンギナーゼの実験でも同様の現象が得られており、ナリンギナーゼの場合には殺菌条件の低減とサッカリンの併用で、この問題が解決している。

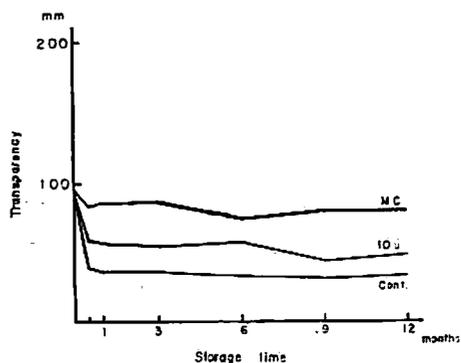


Fig. 5 Change of transparency of syrup of canned mandarin orange containing cyclamate during storage at room temperature.

Table XI Effects of hesperidinase on canned mandarin orange containing artificial sweetening agents.

	After 1 day				After 6 months				After 9 months			
	pH	Sugar	Solid	Trans- parency	pH	Sugar	Solid	Trans- parency	pH	Sugar	Solid	Trans- parency
100 *	3.33	12.3	205.3	119.0	3.30	11.2	196.8	62.2	3.31	11.7	194.2	55.4
75 *	—	—	—	—	3.31	11.0	195.2	102.0	3.29	11.4	197.6	72.4
50 *	3.40	12.2	205.3	131.7	3.30	11.2	196.2	150.0	3.41	11.9	193.4	195.8
25 *	—	—	—	—	3.30	11.6	196.2	192.4	3.41	11.7	191.6	236.8
0 *	3.35	12.4	207.0	141.0	3.34	11.2	199.0	215.0	3.43	12.0	196.0	232.0
Cont.	3.25	12.2	206.3	107.3	3.17	11.0	196.4	32.4	3.27	11.4	195.4	28.8
M. C.	3.22	12.0	203.0	160.0	3.27	10.8	194.0	86.2	3.37	11.3	193.8	89.6

* 100, 75, 50, 25, 0: Sweetness percentage of cyclamate in mixed artificial sweetening agents. (cyclamate and saccharin)

そこで次に人工甘味料として、それぞれ甘味度としてサイクラミン酸ソーダとサッカリンを適当な割合で混合した区をつくり、実缶製造試験を行なった。この場合殺菌は4~5 rpmの回転殺菌機を使用して、80°Cで10分間行なった。結果をTable XI, Fig. 6に示す。

これらの結果にみられるように、サイクラミン酸ソーダにサッカリンを甘味度として等量以上使用したものは、全糖品の場合と同様に十分な白濁防止効果が得られたが、風味の点を考慮すればサイクラミン酸ソーダとサッカリンを等量使用したものが望ましいと考えられた。

III 考 察

以上ミカン缶詰にヘスペリジナーゼ剤を応用した結果につき述べたが、浸漬法、投入法ともに2年後でもMC添加区より高い十分な透明度を保ち、白濁を完全に防止することが出来た。しかもこれらの缶詰は果肉の崩壊などの悪影響は認められなかった。さらに対照区やMC添加区の製品では、6カ月以上貯蔵すれば果肉表面にヘスペリジンの析出によってかなり顕著な白いはん点の生成が認められるのに対して、ヘスペリジナーゼを添加したのものには、この現象は全然みられず、外観上も優れた良好な製品が得られた。

浸漬法の効果については今回の試験に用いた酵素剤が耐熱性の標品であったため Fig. 1に見ら

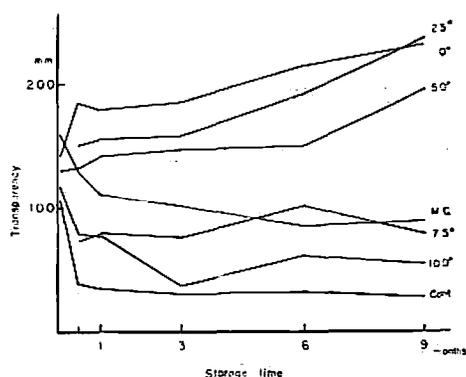


Fig. 6 Change of transparency of syrup of canned mandarin orange containing cyclamate during storage at room temperature.

* 0, 25, 50, 75, 100: Sweetness percentage of cyclamate in mixed artificial sweetening agents. (cyclamate and saccharin)

れるように、浸漬処理の効果だけでなく、缶詰殺菌後も酵素作用が継続しているものと考えられる。いずれにしろ浸漬法は手間もかかり、ブロークンの発生も多く、実際の工場操業上不可能であり、投入法を用いるのがよいと考えられる。

ヘスペリジナーゼの白濁防止効果が難溶性のヘスペリジンをヘスペレチン-7-グルコシッドまたは、ヘスペレチンに分解して可溶化することにあるのは前報の薄層クロマトの結果よりも明らかであるが、本報ではさらに定量を行なって確認した。Table IX, X に示したごとく酵素添加により液汁中のヘスペリジンの大部分は、15日以内にヘスペレチン-7-グルコシッドに分解される。そしてそれが1年あるいは2年と貯蔵される間に徐々にヘスペレチンに分解されていくことが認められた。このヘスペレチンの溶解性については、前報の結果(6カ月目迄)ではその生成量が少なく疑問が残っていたが、Fig. 3およびTable Xの結果から、ミカン缶詰液汁中では十分可溶性であることがわかった。なおこのヘスペレチンの生成がかなり遅く、特に1年以後に増加することから、ミカン缶詰中で酵素活性が1年以上も残存するように考えられる。

次に人甘併用品について試験した結果ヘスペリジナーゼの場合もナリンギナーゼと同様に、サイクラミン酸ソーダのみを使用すれば、白濁防止効果は得られず、何か阻害的作用のあることがみられた。しかしヘスペリジナーゼの場合、ミカン缶詰のpHが3.3~3.5で酵素の最適pH付近であることから、pHの影響はあまり考えられず、この場合には殺菌時の高温によって影響されているものと思われる。

IV 要 約

ヘスペリジナーゼをミカン缶詰の白濁防止に応用して、次のような結果を得た。

- 1) 浸漬法、投入法のいずれにしろヘスペリジナーゼ剤を使用することにより、2年後でも十分透明度が高くそして品質の点でも優れた製品が得られる。またこのヘスペリジナーゼの白濁防止効果は、MCよりも大きい。
- 2) ヘスペリジナーゼの添加により、ミカン缶詰液汁中のヘスペリジンは15日以内に、その大部分がヘスペレチン-7-グルコシッドに分解され可溶性となり、白濁が防止される。そしてこのヘスペレチン-7-グルコシッドは、その後徐々にヘスペレチンに分解されていく。
- 3) 人甘併用品に応用する場合には、全糖品より殺菌条件を若干低くする。そして人工甘味料として、サイクラミン酸ソーダ単独では十分な効果が得られず、甘味度として50%またはそれ以上のサッカリンを併用する必要がある。

終りに本実験を行なうに当たり、種々御指導を頂いた大阪市立大学福本教授、酵素剤を提供していただいた田辺製薬KK、実缶製造に御協力して頂いた清水食品KKに深謝致します。

文 献

- 1) 沢山, 下田, 奥, 松本: 園学誌, 35, 29 (1966)
- 2) 中林: 農産技研誌, 7, 80 (1960)
- 3) 村井: 薬学誌, 78, 745 (1958)
- 4) 下田, 奥, 森, 沢山: 本誌投稿中