

# ナリンギナーゼによる夏ミカン脱苦味の研究—Ⅳ

人甘併用品に対する効果

下田吉夫・奥正和・森大蔵

沢山善二郎・大塚滋

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

### EFFECT ON ARTIFICIALLY SWEETENED PRODUCTS

Yoshio Shimoda, Masakazu Oku, Daizo Mori,  
Zenjiro Sawayama and Shigeru Otsuka.

Studies were made on the application of naringinase, an enzyme (or enzymes) known to decompose naringin and remove the bitterness of canned citrus products, to the canned natsudaikai (grapefruit variety) sweetened partially by the addition of artificial sweetening agents. Results obtained are as follows:

1. The canned products containing both sugar and cyclamate ("artificially sweetened products", hereafter) was found to be sterilized more easily than those sweetened only by adding sugar ("sugar-sweetened products", hereafter). Temperature at the center of the artificially sweetened canned product rises faster than that of the sugar-sweetened product.

2. The debittering effect of naringinase was found to be poorer on the artificially sweetened product, even when the time and/or temperature for sterilization are reduced.

3. Cyclamate was found to act inhibitorily on naringinase activity under some circumstances (at lower pH or higher temperature) (Fig. 5-7). The lost enzyme activity was not restored by dialysis or by incubation of the enzyme solution in the moderate conditions (Fig. 8), indicating that the enzyme was irreversibly inactivated with cyclamate.

4. Other artificial sweetening agents, saccharin and dulcin, do not significantly inhibit the naringinase activity.

5. A sufficiently debittered product is obtained by substituting 50% or more of the sweetness of cyclamate with that of saccharin. A combination of the equivalent sweetness of saccharin and sodium cyclamate seems to result in products satisfied in respect to the flavor and quality.

前報<sup>1)</sup>に報告した如く夏ミカンシラップ漬缶詰の脱苦味にナリンギナーゼ剤を応用した場合全糖製品についてはいずれも十分な脱苦味効果が得られたが、人甘併用品(サイクラミン酸ソーダ使用)についてはまだ十分な効果が得られていなかった。この原因について検討する場合先ず考えられるのは次の二点である。

第一は殺菌条件である。一般に人甘併用品は全糖品に比べて殺菌中の熱伝導がよく、したがって殺菌条件も全糖品より低くてよいと言われている。これは人甘併用品が全糖品に比べてかなり低濃度の糖液を使用するため液汁の粘度が低く熱伝導がよくなるためと考えられる。ところが前報では人甘併用品と全糖品の殺菌条件を等しくしたために人甘併用品は殺菌が過度となり酵素が失活したのではないかとも思われる。

第二の点はサイクラミン酸ソーダがナリンギナーゼに対して阻害的な作用を有するのではないかと言うことである。もし実際にサイクラミン酸塩がナリンギナーゼに対し阻害作用を有するならばサイクラミン酸塩の使用量を減少させるかまたは他の人工甘味料例えばサッカリン等を使用することによりこの阻害作用を防ぐことが出来るかどうかを確かめる必要がある。特にサッカリンについては甘味度がサイクラミン酸塩の10倍も高いので(蔗糖の300~500倍と言われる)実際の使用量も $\frac{1}{10}$ ですみこの点有利なものと考えられる。しかしサッカリンは風味の点でサイクラミン酸塩よりもかなり劣る点に問題がある。本報ではこれらの点を検討する目的で実験を行ってみた。なお本報では前に報告<sup>2)</sup>した如く夏ミカンの脱苦味に際しては第一段の反応、すなわちなリンギン $\rightarrow$ プルニンへの分解が起れば十分なことから主としてナリンギナーゼ活性についてのみ検討した。

## I 実験材料および方法

### 1. ナリンギナーゼ剤

前報<sup>1)</sup>と同様田辺製薬KKより提供を受けた市販のクミタナーゼ剤を使用した。

### 2. 夏ミカン

和歌山産のもので2~4月の原料を使用した。

### 3. ナリンギンの定量およびナリンギン、プルニンの分離定量法

いずれも前報<sup>1)</sup>通り行った。

### 4. 缶詰製品の分析法

前報<sup>1)</sup>に準じて行った。

### 5. 夏ミカン缶詰の製造法

全糖品については前報<sup>1)</sup>通り一段殺菌法により製造、酵素は1缶当り50uを使用した。

人甘併用品は常法通り肉詰し酵素液(50u/can)を添加後シラップ(pH調節剤として0.15%クエン酸ソーダを含む)を注入、バキュームパックして20rpmの回転殺菌機を使用し75°Cで8分殺菌(缶中心温度71.6°C)、冷却した。

## III 実験結果

### 1. 殺菌条件の検討

最初に殺菌条件を検討するために殺菌中の液汁のpH、糖度の変化、缶中心温度の測定を行った。缶中心温度の測定は各時間毎に取り出し直ちに蓋中心に穴をあけ、温度計を缶中心まで挿入

し測定した。なお各々の測定値は全て5缶宛の平均値で示した。結果を Fig. 1～3 に示す。

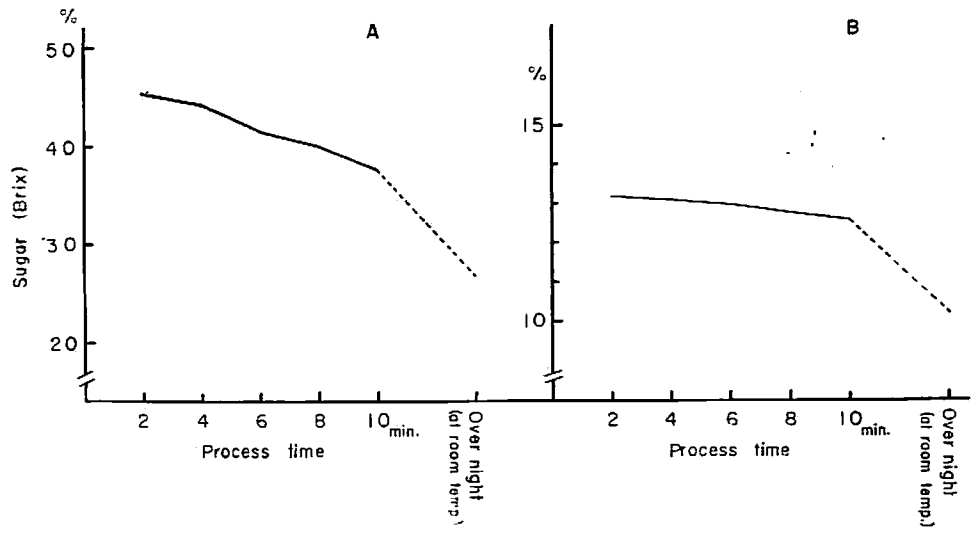


Fig. 1 Change in sugar content in syrup during processing.  
A: "Sugar-sweetened". B: "Artificially sweetened".

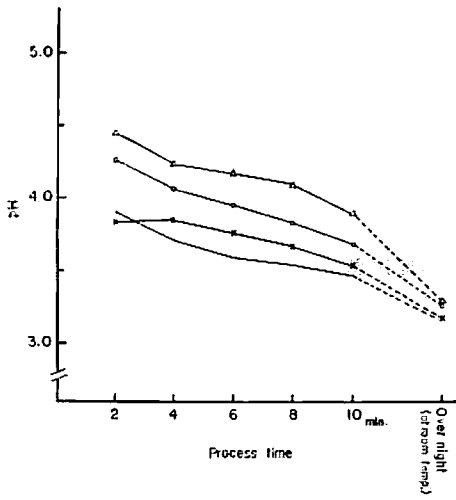


Fig. 2 Variation in pH in syrup during processing.

- ×—×: "Sugar-sweetened", with 0.1% sodium citrate, initial pH 7.52.
- : "Artificially sweetened", with 0.1% sodium citrate, initial pH 7.32.
- : "Artificially sweetened", with 0.2% sodium citrate, initial pH 7.45.
- △—△: "Artificially sweetened", with 0.3% sodium citrate, initial pH 7.52.

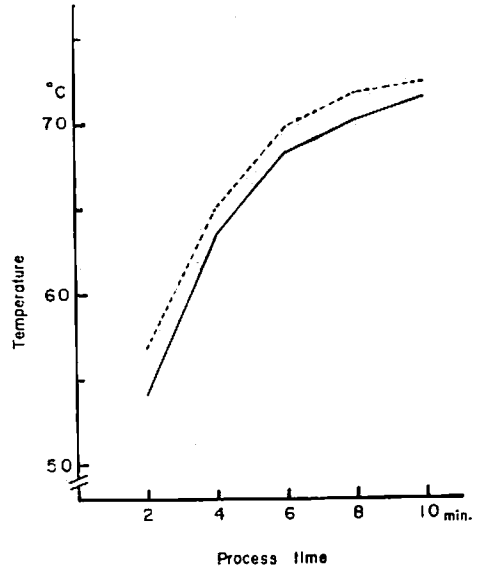


Fig. 3 Change of temperature at the central point of the can during processing.  
— "Sugar-sweetened".  
- - - "Artificially sweetened"

Fig. 1 に殺菌中の液汁の糖度の変化, Fig. 2 に pH の変化を示す. Fig. 2 に見られるように殺菌中に液汁の pH はかなり低下する. そして人甘併用品の場合には pH の低下の割合が全糖品に

比べ若干大きく、全糖品に 0.1% クエン酸ソーダを添加したものと同一程度の緩衝力を持たせるためにはクエン酸ソーダの添加量を0.15%位にする必要があると考えられる。

Fig. 3 に殺菌時の缶中心温度の上昇曲線を示す。この図から明らかなように人甘併用品は全糖品に比べてかなり温度上昇が速い。これは人甘併用品では液汁の粘度が低いので熱伝導が速いためと考えられるが、いずれにしろ人甘併用品の場合には全糖品よりも菌殺条件は若干緩やかでよいことが認められた。すなわち 20 rpm の廻転菌殺機を使用するならば 75°C で 8 分（全糖品では 10 分）で十分と考えられた。この点前報では全糖品と同様の条件で殺菌したため殺菌が過度となり酵素の失活が起った可能性があるので再度実缶試験を行ってみた。

## 2. 実缶製造試験結果

上述のように人甘併用品を全糖品と同じ条件で殺菌すると殺菌が過度になることが認められたので人甘併用品のみは殺菌条件を 20rpm で 75°C、8 分（缶中心温度 71°C 以上）に短縮して実缶製造を行なった。同時に対照として常法通りの全糖品および全糖品のシラップに更に人甘併用品に使用しただけのサイクラミン酸ソーダを添加したものも製造した。pH 調節用のクエン酸ソーダは全糖品には 0.1%、人甘併用品には 0.15% それぞれ使用した。結果を Fig. 4 に示す。

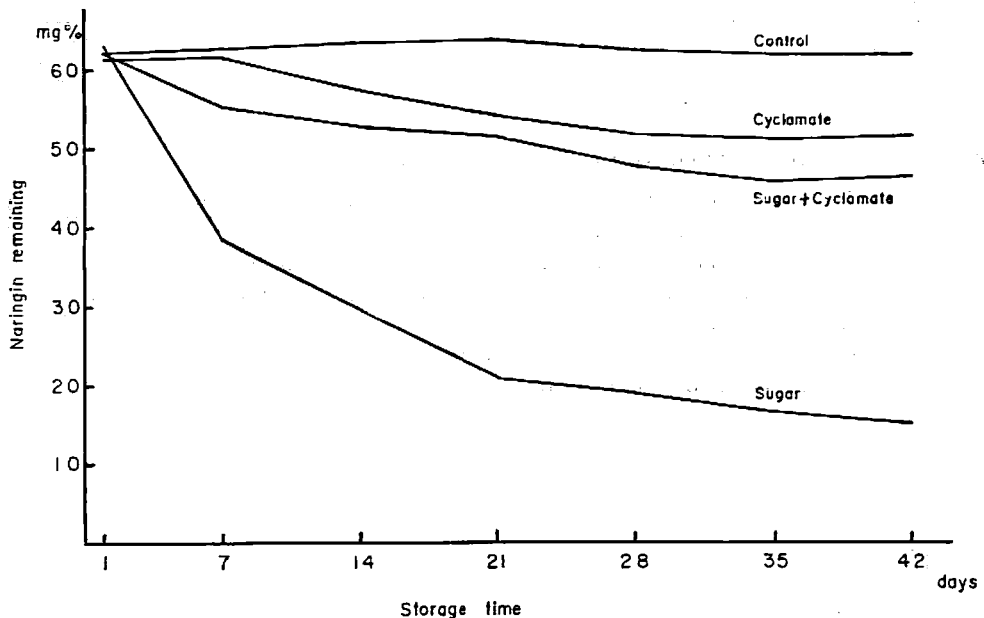


Fig. 4 Change in naringine content in canned natsudaidai during storage at 37°C.

Fig. 4 に見られるごとく、殺菌条件を全糖品より低くした人甘併用品でも酵素の添加効果は著じるしく低く、また全糖品にサイクラミン酸ソーダを添加したものの脱苦味効果も相当低下していることが認められた。

これらの事実からサイクラミン酸塩が何か酵素活性に阻害的に作用するのではないかと考えられるので、この点を検討するため以下の実験を行ってみた。

### 3. ナリンギナーゼ活性に対するサイクラミン酸塩の影響

夏ミカン缶詰の殺菌時の pH は Fig. 2 に見られるように大体 pH 4.0~3.5 の間である。そこでまず pH 3.5 の McIlvaine のクエン酸 buffer を用いナリンギナーゼの安定性とこれに対するサイクラミン酸塩の影響を調べてみた。結果を Fig. 5 に示す。

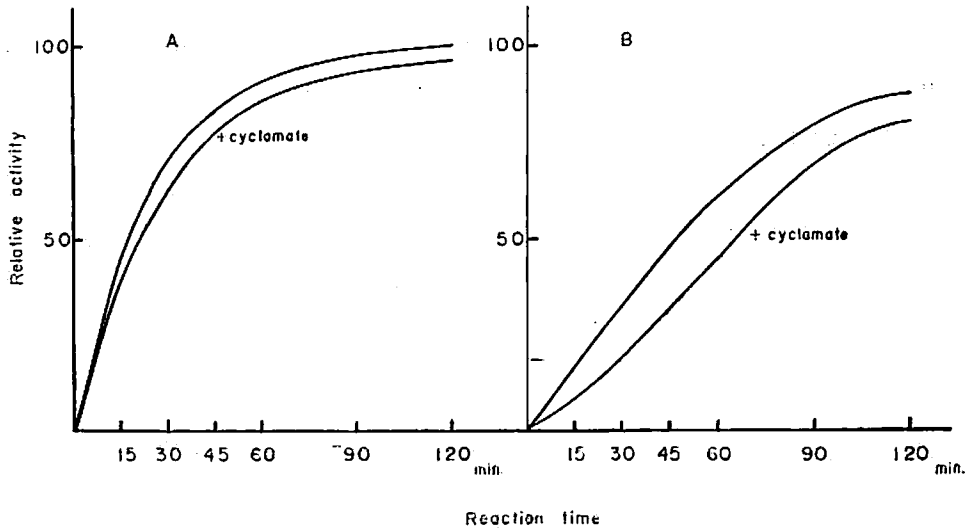


Fig. 5 Effect of preincubation with cyclamate on naringinase activity.

Naringinase and cyclamate were preincubated in citrate buffer, pH 3.5, at 40°C for 20 min. (A), at 65°C for 5 min. (B).

The preincubation mixture contained 1 ml. enzyme solution and 9 ml. of McIlvaine's citrate buffer containing 0.5% cyclamate. For control, 1 ml. enzyme solution and 9 ml. citrate buffer were incubated.

After preincubation, the mixture was cooled to 40°, and 4 ml. of 50 mg % naringin solution was added for the assay of the remaining enzyme activity.

Fig. 5 に見られるように pH 3.5 では 40°C 20分の熱処理ではサイクラミン酸ソーダの添加によりわずかに酵素活性の低下が認められたのみである。また 60°C 5分の熱処理ではサイクラミン酸塩の添加によりそれよりも若干大きな酵素活性の低下が認められたが、それでもこの程度の活性低下では Fig. 4 に見られた実缶製造時の脱苦味効果の減少は説明できず他の要因を考慮する必要がある。

そこでわれわれは夏ミカン缶詰製品の pH が 3.0~3.1 にあることから種々の pH における同様の試験を行なった。結果を Fig. 6 に示す。

Fig. 6 に見られるように 40°C 20分の前処理でもサイクラミン酸塩の阻害効果は pH の低下とともに増大し pH 3.1 では 60% 以上の失活が認められた。この 60% 阻害に缶詰殺菌時におけるサイクラミン酸塩による部分的失活を加えれば Fig. 4 に見られた人甘併用品での不十分な脱苦

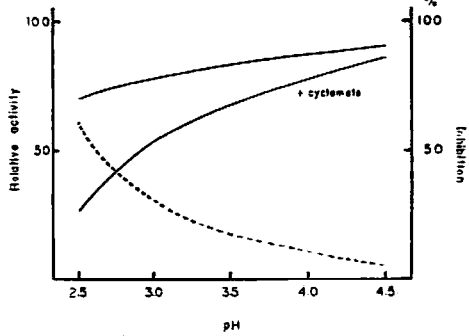


Fig. 6 Effect of preincubation with cyclamate at various pH on naringinase activity.

Naringinase and cyclamate were preincubated in citrate buffer of varying pH at 40°C for 20 min. The remaining activity was assayed as described in Fig. 5.

--- Inhibition percentage.

効果がほぼ満足に説明されるのではないかと考えられる。

次にこの阻害効果がサイクラミン酸塩が酵素または基質のいずれと反応して生ずるかを確認するために次の実験を行なった。

Fig. 7 に前処理条件を変えた場合のサイクラミン酸塩の酵素活性におよぼす影響を示す。

Fig. 7 に見られるごとくサイクラミン酸塩と酵素を予熱した場合にはサイクラミン酸塩と基質を前処理したものに比べて著しく酵素活性が低下することが示された。この事実から低 pH におけるサイクラミン酸塩と酵素との結合が酵素の失活に関与するのではないかと考えられる。

次にこの阻害効果が可逆的な反応か否かを確

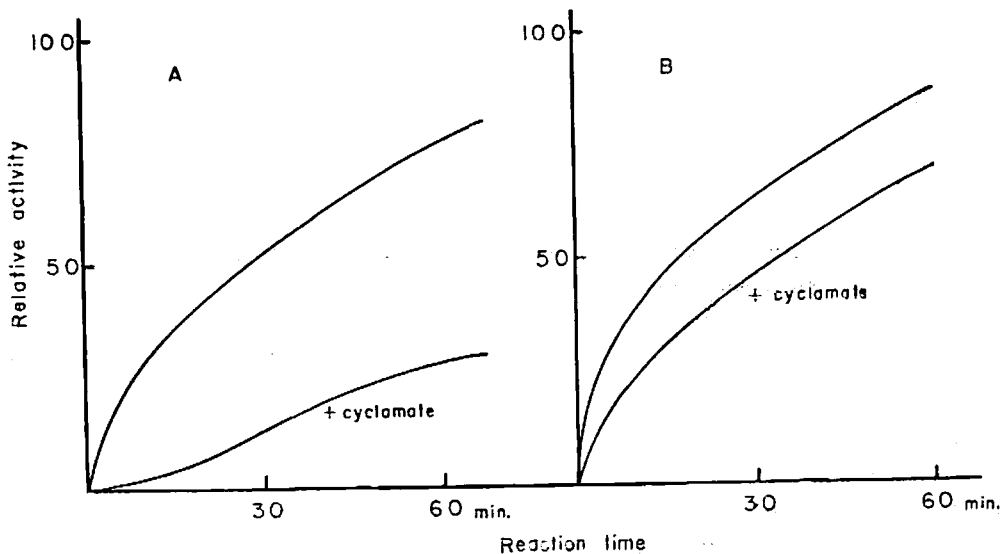


Fig. 7 Effect of preincubation of cyclamate with the enzyme (A) and with the substrate (B). Sodium cyclamate was added to naringinase solution (A) or to naringin solution (B) in citrate buffer pH 3.0, and kept for 20 min. at 40°C.

The remaining enzyme activity was assayed as described in Fig. 5.

かめる目的で次の実験を行った。すなわち酵素とサイクラミン酸塩を種々の pH の buffer 溶液中で 40°C 20 分前処理した後、溶液の pH をナリンギナーゼの最適 pH である 4.5 に調節してから基質を加え 40°C で 30 分反応させて残存酵素活性を測定した。結果を Fig. 8 に示す。

Fig. 8 にも見られるごとく pH 3.0 以下で前処理したものはサイクラミン酸塩の存在で著しく活

性を失ないその阻害効果は pH を最適 pH に戻しても減少せずこの阻害が不可逆であることを示している。更に pH 3.1 の buffer 溶液中で酵素とサイクラミン酸塩を 40°C で 20 分前処理したものを冷蔵庫中で一夜蒸溜水に対し透析を行なったがこの場合も酵素活性の回復は認められなかった。

以上の実験結果よりサイクラミン酸塩は夏ミカン缶詰の pH である pH 3.1 以下では明らかに酵素の失活を促がし、この阻害効果はサイクラミン酸塩が酵素と不可逆的に結合することにより生ずるものと考えられる。

#### 4. 各種人工甘味料のナリンギナーゼ活性に対する影響

以上の結果より明らかにサイクラミン酸塩がナリンギナーゼ活性を阻害する傾向が認められたので他の人工甘味料および、サイクラミン酸塩の分解物<sup>3,15)</sup>として報告されているもののナリンギナーゼ活性に対する影響を調べてみた。

サイクラミン酸塩の分解生成物として報告されているものにはシクロヘキシルアミン、シクロヘキサノール、シクロヘキセン等があるがこれらを用いて実験した結果を Table I に示す。

Table I Effects of Cyclamate and Its Possible Decomposition Intermediates on Naringinase Activity.

	Naringin		Naringin disappeared	Inhibition
	Initial	Final		
Control	m mole 1.37	m mole 0.32	m mole 1.05	% 0
Na-cyclamate	"	1.00	0.37	64.7
Na-cyclamate+Cyclohexylamine	"	0.91	0.46	56.7
Na-cyclamate+Cyclohexanol	"	1.06	0.31	70.3
Na-cyclamate+Cyclohexene	"	1.08	0.29	71.4

Table I から認められるようにこれら三種の分解物では明確な阻害は生ぜず、むしろ阻害を抑制している傾向さえ見られた。なおここではこれら三種の分解物は使用サイクラミン酸ソーダの 1/10 量使用したが、実際の缶詰で 10% もこれらの物質が生ずれば風味等の点で商品価値はなくなり、従って実際上はこれら生成しても数%にも達しないものと考えられるからである。

次に数種の人工甘味料についてナリンギナーゼ活性に対する影響を調べて見た。なお実用化の面を考慮して各々の濃度は甘味度を等しくするようにして使用した。結果を Table II に示す。

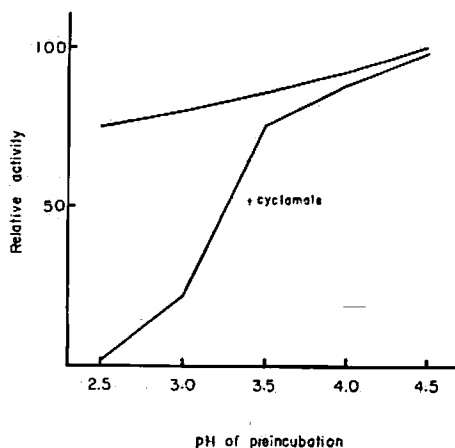


Fig. 8 Effect of preincubation of cyclamate at various pH with naringinase on the enzyme activity assayed at its optimal pH (pH 4.5).

The remaining activity was assayed as described in Fig. 5 except that pH was adjusted to 4.5.

Table II Effects of Artificial Sweetening Agents on Naringinase Activity.

Sweetening Agents	Naringin		Naringin disappeared	Inhibition
	Initial	Final		
Control	m mole 2.19	m mole 0.71	m mole 1.48	% 0
0.5% Na-cyclamate	"	1.94	0.25	82.3
0.5% Ca-cyclamate	"	2.04	0.15	90.2
0.05% Saccharin-Na	"	0.82	1.37	7.5
0.1% Dulcin	"	0.84	1.35	8.4

Table II に見られるごとくサイクラミン酸ソーダと等しい甘味度を示す濃度で使用した場合、サッカリン、ズルチンとともにナリンギナーゼ活性に対してほとんど阻害効果を示さずこれらをサイクラミン酸塩の代りに使用すれば人甘併用缶詰でも十分脱苦味できるものと考えられた。

5. サッカリンとサイクラミン酸塩の併用による実缶製造試験結果

Table II の結果よりサッカリン、もしくはズルチンを使用した缶詰を製造すればナリンギナーゼの添加により十分脱苦味ができるのではないかと考えられたので以下実缶製造試験を行なって

Table III Analysis of canned natsudaidai containing artificial sweetening agents after debittering treatment with naringinase enzymes. (Stored at 37°C)

	After 1 day				After 7 days				After 21 days			
	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin
Control	3.00	% 12.3	% 2.48	mg% 49.3	3.00	% 11.0	% 2.54	mg% 49.6	3.00	% 10.0	% 2.38	mg% 50.0
100 *	3.00	12.2	2.47	50.0	3.01	11.2	2.40	44.1	3.00	10.2	2.43	44.1
50 *	3.00	12.2	2.56	48.2	3.01	11.0	2.51	38.4	3.00	11.0	2.55	24.6
25 *	2.95	12.2	2.41	47.4	3.00	11.6	2.48	32.8	2.98	11.0	2.51	18.5
0 *	3.02	12.3	2.41	43.9	3.01	11.8	2.44	20.9	3.00	10.2	2.43	8.9
Sugar**	2.96	24.2	2.49	43.2	2.94	23.2	2.51	33.9	2.90	24.6	2.49	14.2

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

\*\* "Sugar-sweetened product" (sweetened only by adding sugar).

Table IV Analysis of canned natsudaidai containing artificial sweetening agents after debittering treatment with naringinase enzymes. (Stored at 37°C).

	After 1 day				After 7 days				After 28 days			
	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin	pH	Sugar	Acid as citric	Naringin
Control	2.99	% 11.0	% 2.31	mg% 48.0	2.98	% 11.4	% 2.30	mg% 49.7	3.02	% 12.0	% 2.32	mg% 47.5
75 *	2.96	11.0	2.24	43.5	2.99	11.6	2.28	31.7	3.02	12.0	2.32	15.6
50 *	2.99	11.0	2.30	41.7	3.00	11.6	2.22	23.1	3.04	11.8	2.32	10.4
25 *	2.98	10.8	2.24	42.5	2.98	11.4	2.23	25.6	3.02	11.8	2.29	9.5
Sugar**	2.96	23.8	2.28	42.1	2.98	24.4	2.11	23.9	3.00	23.6	2.26	12.1

\*, \*\* Same as Table III.



みた。なお最近ズルチンの使用が禁止されたのでサッカリンのみ使用することにした。しかしながらサイクラミン酸塩使用の製品に比べサッカリンのみを使用した場合には風味の点で著しく劣ることを考慮してサッカリンとサイクラミン酸ソーダを適当に混合した区を設けて試験してみた。結果を Table Ⅲ, Ⅳ, Fig. 10 に示す。

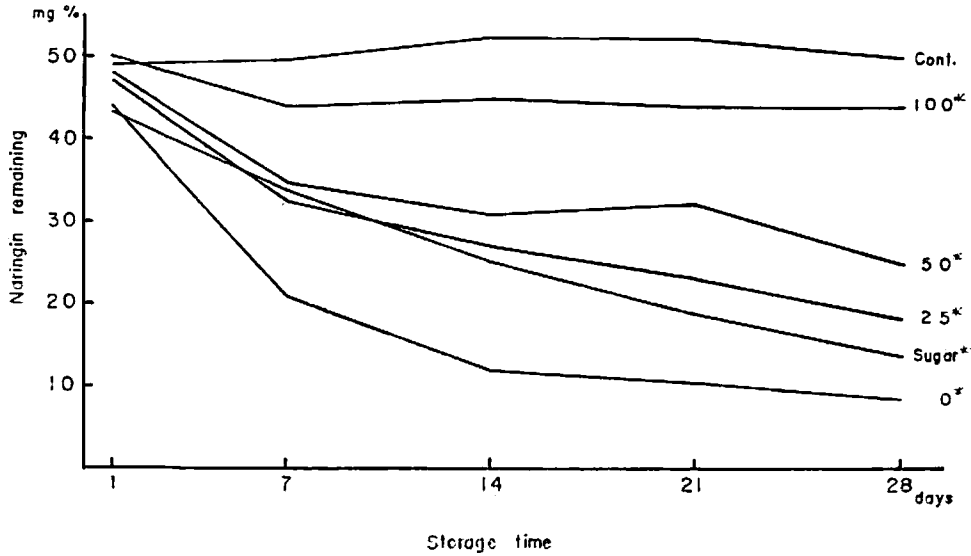


Fig. 9 Change in naringin content in canned natsdaidai containing artificial sweetening agents during storage time at 37°C.

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

\*\* "Sugar-sweetened product" (sweetened only by adding sugar).

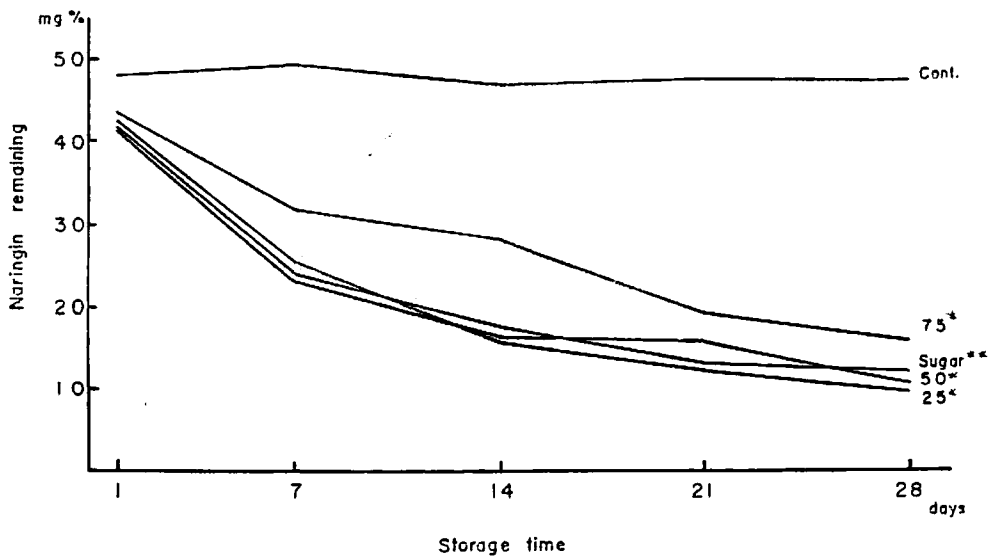


Fig. 10 Change in naringin content in canned natsudaidai containing artificial sweetening agents during storage at 37°C.

\*, \*\*Same as Fig. 9.

これらの結果に見られるごとく、サイクラミン酸塩の半量またはそれ以上をサッカリンで置き換えたシラップを使用したものでは全糖品の場合と同様に十分な脱苦味効果が得られた。また風味の点でもサッカリンとサイクラミン酸塩を等甘味度量使用したものは十分満足出来ることが認められた。したがって今後人甘併用品にナリンギナーゼの応用を試みる場合にはサッカリンとサイクラミン酸塩を甘味度として等量使用すれば十分に脱苦味され風味の点でも良好な缶詰製品が得られることが認められた。

### Ⅲ 考 察

人甘併用品に対する有効なナリンギナーゼ剤の応用法について検討した。そして人甘併用品は殺菌中の液汁の pH の変化および熱伝導の速度が速く、したがって殺菌条件は全糖品よりも若干低減できることが確認された。

しかしながら人甘併用品の場合には殺菌条件を低下せしめただけでは十分な脱苦効果は得られず、また全糖品に更にサイクラミン酸ソーグを添加した場合にも脱苦味効果が著しく低下することからサイクラミン酸塩がナリンギナーゼ活性を阻害する傾向を有することが考えられた。

そこでナリンギナーゼ活性に対するサイクラミン酸塩の影響につき種々検討した結果、ある条件（特に pH 3.1 以下または高温下）のもとでは明らかにサイクラミン酸塩はナリンギナーゼ活性を阻害することが認められた。

サイクラミン酸が確かにナリンギナーゼ活性そのものの阻害剤として作用するかどうか、またその反応機作はどのようなものかという点に関しては、今回使用した酵素が市販の粗酵素剤をそのまま使用したことも考慮すれば、上述の実験のみで結論づけることは当然不可能である。しかしながら実際工場て夏ミカン缶詰に市販ナリンギナーゼ剤を応用する際にはこの阻害的反応が起るのは事実でありその点は十分注意する必要がある。

次に他の人工甘味料、特にサッカリンについてナリンギナーゼ活性に対する影響を調べたところ、サイクラミン酸塩と等しい甘味度を示す量を使用すればほとんど阻害的効果は認められず更に実缶製造試験の結果でも十分な脱苦味効果が得られた。

更にサイクラミン酸塩とサッカリンを等量使用した場合には脱苦味の点でも風味の点でも十分良好な結果が得られたが、この場合にサイクラミン酸塩の濃度が  $\frac{1}{2}$  になったため阻害効果が無くなったのか、あるいはサッカリンとの併用により何か抑制的な作用を生じたのかは、今後更に検討を要する問題である。

### Ⅳ 要 約

人甘併用品にナリンギナーゼ剤を応用した場合に全糖品と同様に十分脱苦味できる条件を選ぶ目的で試験した結果次のことが認められた。

1. 人甘併用品では全糖品に比べ殺菌中の液汁の pH の変化、缶中心温度の上昇の速度が大きく殺菌条件は全糖品よりも若干低減できる。

2. サイクラミン酸塩のみを使用した人甘併用品では殺菌条件を若干低減しても十分な脱苦味効果は得られない。

3. サイクラミン酸塩はある条件下（低 pH 域または高温時）ではナリンギナーゼ活性に対し何か阻害的効果を示し、その効果は不可逆的な反応らしい。

4. サイクラミン酸塩以外の人工甘味料であるサッカリン、ズルチンはナリンギナーゼ活性にほとんど影響しない。

5. サッカリンを甘味度としてサイクラミン酸塩の等量以上使用して缶詰を製造すれば十分に脱苦味された製品が得られる。ただし風味の点を考慮すればサッカリンとサイクラミン酸塩を等量使用するのが最も好ましいと考えられる。

#### 文 献

- 1) 下田, 奥, 森, 沢山: 本誌, 8, (投稿中)
- 2) 下田, 奥, 沢山, 松本: 缶詰時報, 44, No. 1, 100 (1965)
- 3) 丸山, 川鍋: 食衛誌, 4, 265 (1963)
- 4) 益田, 末永, 長田: 衛生化学, 4, 33 (1965)
- 5) 樋口, 小野, 沢山, 下田: 食衛誌, 6, 448 (1965)