

## ミカン缶詰の白濁防止におけるヘスペリジナーゼ活性 に及ぼす残留塩素濃度の影響<sup>†</sup>

朝賀 昌志・故 毛利 威徳

### Influence of Residual Chlorine Content on Hesperidinase Activity for Prevention of Cloudiness in Canned Mandarin Orange in Syrup

Masashi ASAKA, the late Takenori MOURI

From analysis of commercial canned mandarin orange in syrup, cloudiness of the syrup was observed in some samples and hesperetin-7-glucoside (HES-7) was not detected in the syrup. The cause of this cloudiness in canned mandarin orange in syrup was studied.

As residual chlorine is a well-known substance to inhibit enzyme activity, a content of the residual chlorine in dissolving water of hesperidinase was determined. Then, the dependence of residual chlorine concentration on hesperidinase activity was investigated. The extent of residual chlorine inhibition to the hesperidinase activity was 80% at the concentration of 0.3 mg/l and 95% at the concentration of 0.7 mg/l compared with chlorine free media. These residual chlorine contents are usually observed in tap water.

Canned mandarin orange in syrup was experimentally produced with chlorinated water which contained residual chlorine at the concentration of 0.5 mg/l and with distilled water as hesperidinase solvent, and only the canned mandarin orange in syrup using chlorinated water formed cloudiness. The result obtained was that in canned mandarin orange in syrup, cloudiness was formed by a residual chlorine content usually observed in tap water. Therefore to prevent cloudiness in canned mandarin orange in syrup by hesperidinase activity, it is necessary to remove residual chlorine previously from water to dissolve hesperidinase.

温州ミカンの加工食品としてミカン飲料とミカン缶詰が古くから製造されている。ミカン飲料及びミカン缶詰でヘスペリジンが析出結晶化して白濁を生じ商品価値を低下させることがある。森らは温州ミカン飲料におけるヘスペリジン含有量<sup>1)</sup>及び白濁の要因<sup>2)</sup>について報告している。田中ら<sup>3)</sup>及び中林ら<sup>4)</sup>は合成糊料のメチルセルロースを用いた白濁防止法を報告した。しかしメチルセルロースは合成糊料表記の義務及び輸出品には添加できない等の欠点がある。そのためヘスペリジナーゼが岡田ら<sup>5)</sup>により開発された。前報<sup>6)7)</sup>でヘスペリジナーゼを用いた白濁防止法を報告した。しかしながらヘスペリジナーゼを添加したミカン缶詰でも白濁の発生がまれに認められる。

水の殺菌、消毒のために用いられている塩素ガスは、酸化作用を有するため酵素活性を阻害することは周知の事実である。しかしヘスペリジナーゼを用いたミカン缶詰の白濁防止に及ぼす残留塩素の影響について検討した報告はない。

本報では市販のミカン缶詰に生じた白濁の原因を明らかにするために、水に含まれている残留塩

†<sup>1)</sup> ヘスペリジナーゼによるミカン缶詰の白濁防止に関する研究 - Ⅱ

素がヘスペリジナーゼ活性にどのように影響を及ぼすかその割合について検討した。

## 実験方法

### 1. 試料及び試薬

ヘスペリジンはシグマ社製のヘスペリジンを50%エタノールに溶解した後再結晶化し、ヘスペリチン-7-グリコシド (HES-7と略す) はヘスペリジンをヘスペリジナーゼで酵素分解後薄層クロマトグラフィーで分離精製し結晶化したものを用いた。他の試薬は市販の特級及び一級品を用いた。

ミカン缶詰の原料は市販の温州ミカン、ヘスペリジナーゼは市販のヘスペリジナーゼ2号を用いた。

### 2. ミカン缶詰の製造方法

ミカン缶詰は温州ミカンを酸、アルカリ法で剥皮後5号缶に205g、注入液90g及び0.5%のヘスペリジナーゼ溶液10gを添加後密封し、80°C、10分間、5rpmで殺菌して製造した。

### 3. ミカン缶詰の一般開缶試験方法

ミカン缶詰の一般開缶試験方法は常法に従って行った。

### 4. フラバノン配糖体の抽出方法

ミカン缶詰シラップ中のフラバノン配糖体 (ヘスペリジン及びHES-7) の抽出は増川ら<sup>8)</sup>の方法に準じて行った。即ち試料に水酸化ナトリウムを加えpHを12以上にしてフラバノン配糖体

Table 1. Analysis of flavanone glycoside using HPLC

HPLC system	: Shimadzu LC-6 A system
Detector	: Shimadzu UV-VIS Spectrophotometric Detector SPD-6 AV
Wave length	: 283 nm
Column	: Chemcosorb 5-ODS H (4.6mmφ×150 mm)
Mobile phase	: 50 mM Phosphate buffer (pH 7.6) : Tetrahydrofuran : Acetonitrile = 43 : 8 : 3
Flow rate	: 0.5 ml/min
Column temp.	: 40 °C
Sample volume	: 10 μl

を溶解後リン酸で中和し抽出した。

### 5. フラバノン配糖体の分析方法

フラバノン配糖体の分析は高速液体クロマトグラフィーを用いた増川らの方法<sup>8)</sup>に準じて行った。高速液体クロマトグラフィーによる分析の条件はTable 1に示した。

### 6. ヘスペリジナーゼ溶液の塩素処理

1%のヘスペリジナーゼ溶液に0.14~1.4mg/lの濃度の塩素水を同量混合し、10分間室温に放置した。

### 7. 残存ヘスペリジナーゼ活性の測定方法

酵素反応は0.1%ヘスペリジン溶液1mlに0.5Mマッキルバイン緩衝液 (pH3.8) 1ml、イオン交換水2mlを混合した液に0.5%ヘスペリジナーゼ溶液1ml加え混合後、40°C、30分間インキュベートした。その後、試験管を沸騰水浴中に10分間浸漬して酵素反応を停止させた。残存ヘスペリジナー

ゼ活性は生成したHES-7量を高速液体クロマトグラフィーで測定し求めた。

#### 8. 残留塩素の測定

残留塩素はO-トリジン法<sup>9)</sup>で測定した。

Table 2. Analysis of commercial canned mandarin orange in syrup

Can size	pH	Brix (%)	Transparency (mm)	Content of hesperidin and hesperetin-7-glucoside in syrup	
				Hesperidin (mg/100g)	Hesperetin-7-glucoside (mg/100g)
No 4	3.31	14.4	85	12.7	trace
No 5	3.30	14.2	83	14.2	trace

#### 結果及び考察

##### 1. 市販ミカン缶詰の開缶試験

市販のミカン缶詰を開缶試験した結果は Table 2の如くである。シラップの透明度は4号缶で85mm、5号缶で83mmであり、かなり白濁していた。シラップ中のヘスペリジン及びHES-7を測定した結果、HES-7はほとんど検出されなかった。このことから白濁の原因として ① 酵素剤が失活していた ② 酵素の添加量不足又は無添加 ③ 殺菌処理中に酵素活性が失活 ④ クエン酸の影響 ⑤ 酵素阻害物質の混入等が考えられる。

Table 3. Condition to produce canned mandarin orange in syrup

Can size	Added hesperidinase (mg/can)	Added citric acid in syrup (%)	Condition of pasteurization (center temp.)
No 4	70	0.3	85 °C, 8 min, 5 rpm (74 °C)
No 5	50	0.3	84 °C, 9 min, 5 rpm (76 °C)

Table 4. Analysis of canned mandarin orange in syrup

Can size	pH	Brix (%)	Transparency (mm)	Content of hesperidin and hesperetin-7-glucoside in syrup	
				Hesperidin (mg/100g)	Hesperetin-7-glucoside (mg/100g)
No 4	3.31	14.3	97	10.8	trace
No 5	3.32	14.8	113	10.6	trace

## 2. 製造工場での再現試験

製造工場にて4号缶及び5号缶を用い再現試験を行った。その時の製造条件はTable 3の如くである。注入液のクエン酸濃度は0.3%、殺菌温度は缶中心温度が4号缶で74°C、5号缶で76°Cと通常の製造条件と変わらない。

再現試験した缶詰を一週間後に開缶試験した結果はTable 4の如くである。シラップの透明度は4号缶で97mm、5号缶で113mmであり、かなり白濁していた。又シラップ中にHES-7はほとんど検出されなかった。

以上のことから白濁の原因としては酵素剤が失活していたかあるいは酵素阻害物質の混入が考えられる。

Table 5. Activity of enzyme and enzyme solution used in canned mandarin orange in syrup

Sample	Activity (%)
Hesperidinase (standard)*	100
Hesperidinase used in canned mandarin orange*	97.4
Hesperidinase solution used in canned mandarin orange**	22.8

\* Hesperidinase was dissolved to 0.5% in distilled water.

\*\* Hesperidinase was dissolved to 0.5% in tap water.

## 3. 酵素溶解水の影響

ミカン缶詰の製造に使用した酵素剤及び酵素液の活性を測定した結果はTable 5の如くである。使用している酵素剤は標準の酵素剤と比較して約97%の活性を示したので使用した酵素剤に活性の失活は認められなかった。ミカン缶詰に添加した酵素液は標準酵素液と比較して約23%の活性を示した。このことから白濁の原因の一つとして酵素剤の溶解に使用した水（水道水）の影響が考えられる。

Table 6. Influence of solvent on hesperidinase activity

Solvent	Activity (%)
Distilled water	100
Tap water	42.4
Boiled tap water	103.0
Tap water stored for 1 day	78.1

Hesperidinase was dissolved to 0.5% in each solvent

そこで水道水の影響を検討した。水道水、煮沸した水道水及び一日放置した水道水のヘスペリジナーゼ活性に及ぼす影響を測定した結果はTable 6の如くである。蒸留水に溶かした酵素と比較して水道水に溶かした酵素の活性は約42%を示し活性はかなり阻害された。一日放置した水道水に溶かした酵素は78%の活性を示し、わずかに阻害された。煮沸した水道水に溶かした酵素は約103%

の活性を示し、阻害されなかった。このことから水道水に含まれる揮発性の物質により酵素活性は阻害されたものと考えられる。

Table 7. Chlorine content in solvent

Solvent	Chlorine (mg/ℓ)
Distilled water	0
Tap water	0.35
Boiled tap water	0
Water stored for 1 day	0.1

#### 4. 塩素水の影響

水道水に含まれる揮発性物質としては殺菌、消毒のために添加している残留塩素が考えられる。そこで Table 6 で試験した各検液の残留塩素濃度を測定した。その結果は Table 7 の如くである。酵素活性を強く阻害した水道水では残留塩素濃度  $0.35\text{mg}/\ell$  と高い値を示したが、一口放置した水道水では  $0.1\text{mg}/\ell$ 、煮沸した水道水では  $0\text{mg}/\ell$  と低い値を示した。

酸化作用を持つ残留塩素が酵素活性を阻害することは周知の事実である。しかしヘスペリジナーゼ活性に及ぼす影響について検討した例はない。そこで残留塩素がヘスペリジナーゼ活性に及ぼす影響の度合について検討した。試験は 1% のヘスペリジナーゼ溶液に  $0.14\sim 1.4\text{mg}/\ell$  の塩素水を同量混合後、10 分間放置した後の各検液の残存酵素活性を測定した。なお塩素水は塩素ガスを蒸留

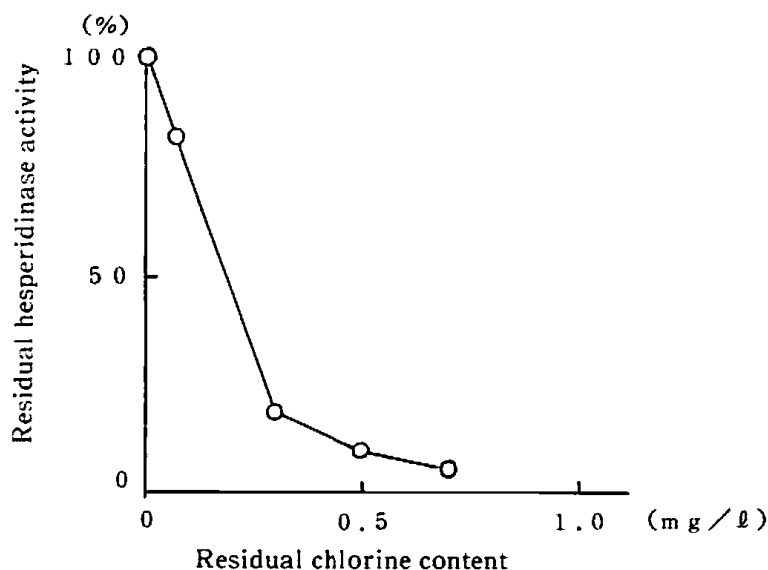


Fig. 1. Influence of residual chlorine on hesperidinase activity

水に溶かして調整した。その結果は Fig. 1 の如くである。残存ヘスペリジナーゼ活性は蒸留水と比較して残留塩素濃度が  $0.07\text{mg}/\ell$  の濃度で約 85%、 $0.3\text{mg}/\ell$  の濃度で約 20%、 $0.7\text{mg}/\ell$  の濃度で約 5% 示し、通常水道水に含まれる残留塩素濃度 ( $0.3\text{mg}/\ell \sim 0.7\text{mg}/\ell$ ) でヘスペリジナーゼ

活性は強く阻害された。

#### 5. 実缶試験

通常水道水に含まれる残留塩素濃度でヘスペリジナーゼ活性は阻害されることが認められたので、白濁防止に及ぼす残留塩素の影響を明らかにするために実缶試験で確認した。二週間後に開缶試験

Table 8. Influence of chlorinated water on cloudiness in canned mandarin orange in syrup

Chlorine* (mg/ℓ)	pH	Brix (%)	Transparency (mm)	Content of hesperidin and hesperetin-7-glucoside in syrup	
				Hesperidin (mg/100 g)	Hesperetin- 7-glucoside (mg/100 g)
0	3.43	14.5	>200	6.0	4.2
0.5	3.41	14.6	75	10.1	trace

No. 5 can was used for this test and canned mandarin oranges in syrup were analyzed after storage at room temperature for 2-weeks.

\* Chlorine: chlorine content in used solvent of hesperidinase.

した結果は Table 8 の如くである。酵素を溶解する水の残留塩素濃度が0.5mg/ℓで製造したミカン缶詰は透明度が75mmであり、かなり白濁していた。またシラップ中にHES-7はほとんど検出されなかった。酵素を溶解する水に塩素を含まない水を用いて製造したミカン缶詰は透明度が200mm以上で白濁は認められず、シラップ中のHES-7量は4.2mg/100g存在していた。このことから通常の水道水に含まれる残留塩素濃度でミカン缶詰に白濁の生じることが明らかになった。

以上の結果から市販のミカン缶詰で生じた白濁はヘスペリジナーゼを水道水に溶かしてミカン缶詰を製造したため、水道水中に含まれる残留塩素によりヘスペリジナーゼ活性が阻害されたためと推察された。従ってヘスペリジナーゼによるミカン缶詰の白濁の防止には酵素を溶解する水の残留塩素をあらかじめ除去することが必要である。

#### 要 約

1. 市販のミカン缶詰を開缶試験した結果、白濁を生じ、そのシラップ中にHES-7はほとんど検出されない缶詰を認めた。
2. ヘスペリジナーゼ活性に及ぼす残留塩素の影響の度合を調べた結果、通常の水道水に含まれる残留塩素濃度(0.3~0.7mg/ℓ)でヘスペリジナーゼ活性は著しく阻害された。
3. 実缶試験で確認した結果、0.5mg/ℓの残留塩素を含む水にヘスペリジナーゼを溶かした缶詰で白濁が生じ、そのシラップ中にHES-7はほとんど検出されなかった。

#### 文 献

- 1) 森 大蔵・岩本喜伴：本誌，15，68 (1983)。
- 2) 森 大蔵・岩本喜伴：本誌，16，45 (1985)。
- 3) 田中清道・幸野憲二・鶴園亀助：神奈川県農産加工指導所研究報告，3 (1960)。
- 4) 中林敏郎・鷹野 正・本山敬三：農産技研誌，7，213 (1960)。

- 5) 岡田茂孝・岸 清・東原昌孝・福本寿一郎：日農化, 37, 84 (1963).
- 6) 沢山善二郎・下田吉夫・奥 正和・松本熊市：園芸学会誌, 35, 29 (1966).
- 7) 下田吉夫・奥 正和・森 大蔵・沢山善二郎：本誌, 8, 130 (1968).
- 8) 増川健二・小松広由・藤村紀夫・福山 司・福島正範・石川 勉：日食工誌, 32, 864 (1985).
- 9) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 p745 (1980).