いため、液体窒素は超急速凍結による組織の破壊防止の手段として利用し、酵素の不活性化手段は他の加熱によらない方法を考究すべきであろう。

終りに、本実験は名古屋大学農学部生化学教室において行なわれている「果実・そ菜の冷凍に関する生化学的研究」の一部を、筆者が研究生として留学中に行なったものである。実験を行なうに当たり、液体窒素を御恵与いただき、凍結方法について御指導いただいた、名古屋大学理学部物理学教室、宝来和巳助教授に、また、種々御助言いただいた、農林省の北尾次郎技官に厚く御礼申し上げます。

本研究は1964年4月、日本食品工業学会第11回大会で発表した。

文 献

- 1) VETTER, J. L., et al.: *J. Agr. Food Chem.*, **6**, 39 (1958).
- 2) 黒木征吉・瓜谷郁三: 未発表
- 3) 萩原, CONELLY, J. L., 四釜, 押野, 奥貫: 酵素化学シンポジウム, 第17集, 58 (1962).
- 4) JOSLYN, M. A.: *Advances in Enzymology*, Vol. IX, 625 (1949). (1964年4月21日受理)

酵素処理夏ミカン罐詰中のナリンギン, プルニン およびナリンゲニンの分離測定

大 橋 晋*

夏ミカン中のナリンギンの定量には一般に改良 Davis 法¹⁾が使われているが、この方法では、ナリンギンが分解されてできるプルニン、ナリンゲニンを分離して測定することができない。

DUNLAP ら²⁾は、ナリンギナーゼ C-100 のナリンギンおよびプルニンの分解力の測定にペーパークロマトグラフ法を用いて分離定量しているので、この方法を使ってナリンギナーゼ処理した夏ミカン罐詰中のナリンギンおよびその分解生産物の分離測定を行なったので、その結果を報告する。

実験および結果

1. ナリンギン, プルニンおよびナリンゲニンの分離測定

(1) ペーパークロマトグラフによる分離

結晶ナリンギン, プルニンおよびナリンゲニン 2.5 γ 〜10 γ を東洋濾紙 No. 51 (2 $\times$ 40cm) にスポットし、ブタノール, 酢酸, 水 (6:1:2) で展開し、風乾後 1% 塩化アルミニウムメタノール溶液を噴霧し、それぞれのフ

ラバノンにより発する螢光を紫外線下に調べると、その *Rf* は、ナリンギン 0.57, プルニン 0.73, ナリンゲニン 0.98 となり、明瞭に識別できた。

このスポットに鉛筆でしるしをつけ、切りとったのち、1% 塩化アルミニウムメタノール溶液 10cc を加え、セン付試験管中で約 1 時間振とう (約 200 回/分) して溶出させ、抽出液の螢光光度を 510m μ で測定した。

濾紙上にスポットした量と螢光光度との関係は第 1 図のとおりで、ナリンギンとして 20 γ までは直線関係が得られた。

第 1 図 naringin, prunin, naringenin の
螢光光度

* 大和製罐研究所 (清水市中之郷800)

The Paperchromatographic Determination of Naringin in the Naringinase Processed Natsumikan Oranges. By SUSUMU OHASHI.

第2図 AlCl_3 による naringin の蛍光分光特性

この方法による測定誤差を知る目的で、ナリンギン 5, 10, 15, 20 γ について3回ずつ測定を繰り返し、そのバラッキ $\bar{R}$ から実験誤差を計算すると $\sigma=0.53\gamma$ となり、測定値 10 γ の場合その $\pm 2\sigma$ をとれば $\pm 1.06\gamma$ となり、約 10% に相当する。したがって、正確な値を得るためには 2~3 回の繰り返しを行なうことが望ましい。

なお、ナリンギンの蛍光分光特性は第2図に示すとおりで最大光度は 510m μ 付近にあるので、この実験では蛍光光度測定は 510m μ で行なった。また、濾紙中にも塩化アルミニウムで蛍光を発する物質が微量存在するので、濾紙による補正を行なう必要がある。

(2) ナリンギン、プルニンおよびナリンゲニンの蛍光光度の比較

ナリンギンおよびその分解生産物の蛍光光度を比較するため、上記3物質のそれぞれ 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 γ を 1% 塩化アルミニウムメタノール溶液 10cc に加え、日立分光光度計 EPU-2 型 付属蛍光装置により 510m μ における蛍光光度を測定した結果は第3図のとおりで、ナリンギン→プルニン→ナリンゲニンの順で蛍光は

第3図 naringin およびその分解生産物の蛍光光度

強くなる。この実測値から求めた同一蛍光光度の場合のそれぞれの濃度は、ナリンギン 1 とした場合に、プルニン 0.80, ナリンゲニン 0.61 となって、分子量の比、1 : 0.75 : 0.47 とかなりの食い違いが認められたが、その理由は明らかでない。しかし、実際の操作では標準試料としてナリンギンだけを使い、プルニン、ナリンゲニン量は、ナリンギンとして求めた値に、上記の係数を乗ずれば、それぞれの含量を求めることができる。

(3) 夏ミカン果汁中のナリンギンの測定

DUNLAP ら²⁾は、ナリンギン 1mg を含む試料 10cc を、酢酸エチル 15cc で4回抽出し、減圧下で酢酸エチルを除去したのち、残留物を 2cc のメタノールに溶かし、ペーパークロマトグラフ用試料としている。

著者は、夏ミカン果汁その他の加工食品中のナリンギンを測定するため、原報に準じて果汁 10cc を 15cc の酢酸エチルで4回抽出を行なったがナリンギンの抽出は不十分であった。そこで、抽出を容易にするため、試料に食塩、無水硫酸ナトリウムを加え、同時に酢酸エチルの量を毎回 20cc に増して抽出試験を行なった。その結果は第1表のとおりで、硫酸ナトリウムは抽出に有効なことがわかった。すなわち、試料 10cc に無水硫酸ナトリウム 3g を加えてある程度水分を少なくすることは、酢酸エチルによる抽出に有効であった。

つぎに抽出用酢酸エチルの使用量を試料 10cc に対し 20cc あて4回とした場合と、30cc あて4回とした場合とを比較した。

第1表 ナリンギンの抽出と添加物

	果汁 (cc)	添 加 ナリンギン (mg)	処 理	測定値 (mg)	回 収 (mg)	回収率 (%)
1	5	0	—	2.12	—	—
2	5	2.0	—	3.96	1.84	92
3	5	0	NaCl 3g	2.24	—	—
4	5	2.0	// 3g	4.08	1.84	92
5	5	0	Na ₂ SO ₄ 3g	2.48	—	—
6	5	2.0	// 3g	4.44	1.96	98

第2表 抽出方法による回収率

酢酸エチル 抽 出	果汁のみ 10cc	果汁+2mg	回 収 mg	回 収 %
20ccあて 4 回	1	2.1	4.3	2.2 110
	2	2.0	4.3	2.3 115
30ccあて 4 回	1	1.9	4.3	2.4 120
	2	2.0	3.8	1.8 90

回収試験の結果は、第2表のとおりで、誤差がかなり大きい、両者とも90~110%近い回収率を示している。酢酸エチルでの抽出は、2倍量で4回行なえばほぼ実用上差しつかえないと認められる。

以上の結果から、夏ミカン果汁中のナリンギン類のペーパークロマトグラフによる測定はつぎの方法で行なうこととした。すなわち、試料10ccに無水硫酸ナトリウム3gを加え十分に攪拌したのち、酢酸エチル20ccずつで4回抽出する。抽出液を合して無水硫酸ナトリウムで脱水したのち、減圧下で溶剤を除去する。

残留物を正確に2.0~3.0ccのメタノールに溶解し、その5~10 μ lをマイクロピペットで、東洋濾紙No.51(2 $\times$ 40cm)上にスポットし、ブタノール、酢酸、水(6:1:2)展開剤で展開する。同時に標準としてナリンギン20 γ を濾紙上に展開する。

展開後は風乾によって溶剤を除去したのち1%塩化アルミニウムメタノール溶液をスプレーし、再び風乾し、紫外線下で発する螢光により、ナリンギン、プルニン、ナリンゲニンに相当するスポットを確認し、鉛筆でマークして切り取る。これを1%塩化アルミニウムメタノール溶液10ccで振とうしながら60分抽出し、抽出液の螢光光度を510m μ で測定し、標準ナリンギンの螢光光度からナリンギン量を求める。プルニン、ナリンゲニンの場合には、1.(2)に記した係数を乗じてそれぞれの量とする。

2. ナリンギン溶液の酵素による分解

(1) 1.(3)の方法による測定

1.(3)の方法を使って、ナリンギンの緩衝液中でナリンギナーゼを作用させた場合の、ナリンギンおよびその分解生産物の消長について調べた。

酵素溶液および反応条件はつぎのとおりであった。

i) 酵素溶液

酵素溶液はナリンギナーゼAN(ケイ藻土との混合物)5gを100ccのマッキルベン緩衝液(pH 4.0)で抽出し、濾過したものを使った。

ii) 反応条件

ナリンギン水溶液 (40mg%)	50cc
マッキルベン緩衝液 (pH 4.0)	10
水	40
酵素溶液	0.5
作用温度	30°C

上記条件において反応時間0, 1, 3, 5, 7, 9時間の試料について改良Davis法で総フラバノン量を、ペーパークロマトグラフ法でナリンギンおよびその分解生産物を測定した結果は第4図のとおりであった。

第4図 naringinase による naringin の分解

iii) 測定結果

この結果では、酵素の作用に伴いDavis法による総フラバノン量およびペーパークロマトグラフ法によるナリンギン量は、ほぼ直線的に減少し、これとは逆にナリンゲニンの増加が認められたが、プルニンのスポットは検出できなかった。すなわち、このような条件では、ラムノシダーゼによってできたプルニンは、グルコシダーゼによって直ちに分解されてナリンゲニンとなるので、プルニンとして検出されなかったものと考えられる。

(2) グルコースを添加した実験

そこで、つぎに反応液にグルコースを添加してグルコシダーゼを阻害した場合について実験を行なった。

i) 反応条件

ナリンギン水溶液 (40mg%)	50cc
マッキルベン緩衝液 (pH 4.0)	10
水またはグルコース溶液 (5g/40cc)	40
酵素溶液 (2.(1)i) の実験と同様のもの	1

作用温度

30°C

0, 1, 3, 5時間の試料について、ペーパークロマトグラフ法で測定した結果は第5図のとおりであった。

第5図 naringinase の作用に及ぼす glucose の影響

ii) 測定結果

第5図で、グルコースを含まない場合には、前の実験と同様にプルニンはほとんど検出されないが、グルコース5%を添加した場合には、グルコシダーゼが阻害され、その結果としてプルニンが蓄積されることがよくわかる。

以上2つの実験から、ペーパークロマトグラフ法によれば、酵素による分解の過程が、Davis法よりも細かく追跡できることがわかる。しかし、ペーパークロマトグラフ法による測定値がDavis法より低いことは、酢酸エチルによる抽出が完全に行なわれたいことが影響しているものと思われる。

3. ナリンギナーゼ処理夏ミカン罐詰中のナリンギンなどの含有量

つぎに、ペーパークロマトグラフ法で、酵素処理した夏ミカン罐詰中のナリンギンおよびその分解生産物について測定した。

夏ミカン罐詰の酵素処理法については、添加法と浸漬法の2方法が行なわれるので、その比較を行なった。

(1) 製造方法の概略

著者らがさきに報告した方法^{a)}に準じ、静岡産夏ミカンを原料として下記によって試料を製造した。

原料→ブランチング(沸騰水3~4分)→身割り→予備加熱(65°C10分)→薬品処理(塩酸1%40°C40分、水酸化ナトリウム0.7%40°C10分)→水洗(換水3回)

これを3区にわけ、つぎのとおり処理した。

(対照区) { 水洗(1夜)→選別→肉詰(205g)→シラップ(Bx30°, 100g)→密封→殺菌(75°C15分)→冷却

(添加区) { 上記と同様にしてシラップ注入→酵素液2cc(S社ナリンギナーゼ0.2g相当)を加へ密封→第1回加熱(65°C25分0.8rpm)→冷却→38°C4日保温→第2回加熱(75°C15分)→冷却

(浸漬区) { 水洗した果肉を酵素液に浸漬(S社ナリンギナーゼ0.5%液40°C2時間保持後、室温に1夜放置)→水洗→肉詰以下の工程は対照区と同じ

(2) 測定結果

製造4カ月後に開罐し、固型量、Ref. Bx., 酸, pHおよび苦味の味覚審査を行ない、ナリンギンおよびその分解生産物について測定した結果は、第3表のとおりであった。

すなわち、対照区ではナリンギンだけが検出されたの

第3表 酵素処理夏ミカンの開罐成績と分析結果

処理区	内容 総量	固型 量	Bx	酸 ^{a)}	pH	濁り	苦味 ^{b)}
対 照	312	181	13.4	1.2	2.8	-	+0.47
添 加	314	182	13.7	1.3	2.9	++	-0.81
浸 漬	310	186	13.5	1.3	2.8	-	+0.33

注: a) クエン酸として b) Scheffeの平均嗜好度

分 析 結 果

処理区	ナリンギン (mg%)	プルニン (mg%)	ナリンゲニン (mg%)	Davis法 (mg%)
対 照	24.5	—	—	39.8
添 加	11.3	4.2	2.0	24.8
浸 漬	24.2	1.7	—	33.7

に対し、添加区では、ナリンギンは対照区の約 $\frac{1}{2}$ まで減少し、プルニンおよびナリンゲニンの生成が認められ、明らかにラムノシダーゼおよびグルコシダーゼがともに作用していることを示し、味見試験でも添加区だけが有意に苦味が少ないとする結果ともよく一致している。

浸漬区ではわずかにプルニンの生成が認められたが、ナリンゲニンは明らかに検出されなかった。このことは酵素液に浸漬しただけでは、ナリンギナーゼが果肉の内部にまでは作用しなことを示している。

また、ペーパークロマトグラフ法とDavis法の測定値と比較すると、クロマトグラフ法ではDavis法の60~70%の値を示すに過ぎない。この差は、フラバノン以外のアルカリ呈色物質がDavis法の測定値に影響することだけでなく、果汁中のナリンギンの酢酸エチルに対する溶解性が、結晶ナリンギン溶液の場合に比べて少ないことが、ペーパークロマトグラフ法の値を低くしているものとも考えられるが、この点についてはさらに検討を要するものと思われる。

以上のような問題点はあるにしても、ペーパークロマトグラフ法によれば、ナリンギンの分解生成物を分離測定できるので、必ずしも対照試料がなくても酵素作用の程度を確認できるので、無処理対照試料がなければ分解量を測定できないDavis法にくらべてすぐれている。

要 約

(1) ペーパークロマトグラフ法によるナリンギン、プルニンおよびナリンゲニンの分離測定について、酢酸エチルによる抽出、濾紙上の展開、塩化アルミニウムメタノール溶液による蛍光測定などの諸条件について実験

し、夏ミカン果汁に対する適用条件を検討した。

(2) この方法により、添加法および浸漬法によってナリンギナーゼ処理した夏ミカン罐詰について、ナリンギンおよびその分解生成物の分離測定を行ない、添加法は浸漬法にくらべ、プルニンおよびナリンゲニンの生成量が多く、脱苦味法としてすぐれていることを認めた。

(3) 無処理対照試料のある場合には改良 Davis 法でナリンギナーゼの効果を測定できるが、対照試料の無い場合には、ペーパークロマトグラフ法によるナリンギンおよびその分解生成物の分離測定が有効である。

終りに、本研究に対し御指導並びに標準試料の分与を賜った静岡大学中林敏郎氏、またこの研究の発表を許可された大和製罐研究所長高橋湛氏に感謝します。

文 献

- 1) 中林敏郎: 食品工誌, 9, 24 (1962).
- 2) DUNLAP, W. J., et al.: *Food Sci.*, 27, 597 (1962).
- 3) 大橋晋・中林敏郎: 罐詰技術, 4, 62 (1963).

(1964年5月10日受理)

アルギン酸塩の食品工業への応用に関する研究(第1報)

アルギン酸ナトリウムによる各種澱粉糊化溶液の安定性

笠原文雄*・小林貢*

近年澱粉の老化機作についての報告は製パン業界の急速なる発展に伴って非常に多い。またその老化防止法についてもいろいろと研究されている。そのひとつに非イオン性の界面活性剤の利用がある。Volz¹⁾はモノグリセリド、ポリオキシエチレンモノステアリン酸塩(以下 POEMS と略記する)をそれぞれ 0.5% 添加して、その老化におよぼす影響をみた。両者とも老化防止に効果があり、とくに POEMS の効果は顕著であるとしている。その他シュガーエステルも界面活性剤の作用と同様に、澱粉と作用して表面に不溶性の複合体を形成することから老化防止に効果があるとされている。

食品衛生上、全く無害であるアルギン酸ナトリウムは、かなり複雑なコロイドの性質をもっているため、あらゆる産業に広範に使用されている。この陰電価を有するアルギン酸ナトリウムと澱粉コロイド溶液は種々興味ある性質を示し、高橋²⁾は澱粉とアルギン酸ナトリウムを混合したものは、その合算値の粘度よりもつねに高く、また腐敗に対してもきわめて安定であることを認めている。これについては界面活性的作用およびアルギン酸ナトリウム粒子が、澱粉粒子の表面を包被してここに

陰電価が増大する。すなわち澱粉粒子とアルギン酸ナトリウムのコロイド粒子との間に吸着作用が行なわれるためである³⁾といわれている。このことから著者らは、アルギン酸塩が澱粉老化防止に効果があるものと推定し、澱粉糊化溶液の安定性について検討した。澱粉の老化防止効果を比較する場合、老化測定法により異なった結論が生ずるおそれがあるので、いかなる方法で老化を測定するかが問題になる。著者らは澱粉の老化に伴ってしだいに澱粉糊化溶液が白濁し、水を分離し、ゲル化を起こす現象を利用して貯蔵中の濁度変化、毛管上昇性の変化、離水量の変化および澱粉ゲルの状態について観察した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

試料および実験方法

1. 試 料

アルギン酸ナトリウムは君津化学(株)製(1%水溶液の粘度 135c.p., pH 中性)、澱粉は市販の小麦澱粉、トウモロコシ澱粉、サツマイモ澱粉、ジャガイモ澱粉を使用した。

2. 実験方法

* 君津化学工業株式会社(千代田区神田司町1-8)

Studies on Applications of Alginate for Food Industry. Part I. On the stabilization of starch solution by sodium alginate. By HUMIO KASAHARA and MITUGU KOBAYASHI.