ヘスペリジン配糖体によるオレンジ果汁飲料中の ヘスペリジンの沈殿抑制効果

西村隆久*・米谷 俊*・中江貴司*・滝井 寛*・岡田茂孝*

Inhibitory Effects of Glycosylhesperidin on Formation of a Precipitate of Hesperidin in Orange Juice Beverage

Takahisa NISHIMURA*, Takashi KOMETANI*, Takashi NAKAE*,
Hiroshi TAKII* and Shigetaka OKADA*

* *Ezaki Glico Co., Ltd. Biochemical Research Laboratory,
4-6-5 Utajima Nishiyodogawa-ku, Osaka, 555-8502*

We found that the addition of glycosylhesperidin into orange juice solubilized hesperidin and prevented hesperidin crystal formation. We tried to use glycosylhesperidin as a hesperidin solubilizer in orange juice beverage which contain orange juice 30, 50 and 100%. When the orange juice beverage was produced, glycosylhesperidin (0.017-0.086%) was added. After 1 month, the amounts of hesperidin in supernatant and in precipitate were measured. It was found that 80-90% of the total hesperidin in the beverage were solubilized by adding the same amount of glycosylhesperidin as that of hesperidin originally in the beverage, and that the hesperidin precipitate disappeared visually. The mean size of hesperidin crystals in orange juice beverage with glycosylhesperidin (0.086%) was 7 μm , whereas that of the beverage without glycosylhesperidin was 15 μm . From these results, glycosylhesperidin has two effects, solubilization of hesperidin and prevention of crystal formation. And then we studied the mechanism of these two effects of glycosylhesperidin by measuring the amount of glycosylhesperidin in the precipitate and the difference absorption spectra. It was suspected that glucosylhesperidin molecules formed a complex with hesperidin molecules.

(Received, Dec. 17, 1998 ; Accepted, Feb. 26, 1999)

オレンジ果汁飲料は製造後、1か月程度経過すると、容器の底にパルプの沈殿が生じ、さらにその上に白色沈殿が蓄積する。この白色沈殿は見た目に悪く商品価値を低下させるばかりか、クレームの原因になっている。この白色沈殿は、オレンジ果汁由来の溶解度の低いヘスペリジンが析出することに起因している。

著者らは、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) によりヘスペリジン (Hsp) に糖を転移したヘスペリジン配糖体 (Hsp-Gn) が、みかん缶詰においてシラップ中の Hsp 結晶化を抑制し、白濁防止効果を示すことを明らかにした¹⁾。

本研究では Hsp-Gn の持つ Hsp 結晶化抑制作用に着

目し、種々の果汁濃度のオレンジ果汁飲料に応用したところ、Hsp の沈殿形成を著しく抑制することができることを明らかにし、また、そのメカニズムについても検討を行ったので報告する。

実験方法

1. Hsp-Gn

Hsp-Gn は、著者が土壌から分離した *Bacillus* 属細菌に属するアルカリ性細菌が生産する CGTase により酵素的に合成し^{2)~4)}、アンバーライト XAD-16 カラムを用いて部分精製を行った試料 (純度 65%, 平均分子量 920) を用いた¹⁾。図 1 に Hsp-Gn の構造を示した。

* 江崎グリコ株式会社生物化学研究所 (〒555-8502 大阪府大阪市西淀川区歌島 4-6-5)

図1 Hsp-Gnの構造

2. オレンジ果汁飲料中のHsp沈殿形成抑制試験

ブラジル産濃縮オレンジ果汁(6倍濃縮液, Bx 62)を蒸留水で6倍(w/w)希釈し, 果汁含有率100%オレンジ果汁を作製した。また果汁含量50%, 30%のオレンジ果汁飲料は濃縮オレンジ果汁をそれぞれ12倍, 20倍に希釈し, クエン酸濃度0.3 g/100 ml, Bx 10(蔗糖にて)に調整した。これら果汁飲料中にHsp-Gnを0.017, 0.030, 0.043, 0.086% (w/v)となるように添加し, プレート殺菌機を用いて93℃で30秒間加熱殺菌した。ついで, ペットボトル(1500 ml)に瓶詰めし, 15℃の水槽で冷却し, 品温を25℃にまで調整した。このようにして作製した果汁飲料を25℃で3か月間静置保存し, 沈殿の形成を肉眼で観察するとともに生成しているHspの結晶は以下に述べる方法で観察した。また, 果汁飲料中のHsp量はHPLCで分析した。

3. 果汁飲料中のHsp量の定量

果汁飲料中のHsp量は, 沈殿画分と上清画分で分別定量した。静置してあったオレンジ果汁飲料の遠心上清(2500×g 2分間)に1/10量の1 N NaOHを添加し攪拌によりHspを完全に溶解した。また沈殿画分は全Hsp量から上清中のHsp量を差し引くことにより算出した。つまり全体を激しく振とうし, 一定量分取後, Hspを0.1 N NaOHで完全溶解させHPLCにより全Hsp量を求めた。この値から上清中のHsp量を差し引いた値を沈殿画分中のHsp量とした。HPLCの条件は下記に示した。

HPLCの条件

カラム; ODSカラム(4.6×250 mm, メルク社製), 溶媒; アセトニトリル-水(20:80, v/v), 流速; 0.5 ml/min, カラム温度; 40℃, 検出; 280 nm。

4. Hspの結晶サイズの測定

果汁飲料中のHspの結晶を偏光顕微鏡((株)ニコン製OPTIPHOT 2-POL)を用いて観察し, (株)三谷商事製の画像処理解析ソフトウェアSUPER ASPECTを用い解析した。有意差の検定は, 分散分析としてFisherの

PLSD法⁵⁾を用いた統計解析を行い, 危険率1%以下をもって有意とした。

5. モデル系でのHsp-GnによるHsp結晶化抑制試験

オレンジ果汁飲料のモデル系の作成はBEN-SHALOMらの方法⁶⁾を用いたが, Hsp-Gnの効果を明確にするためHspの結晶化に影響を及ぼすと考えられるペクチンを除去して行った。つまり1%クエン酸, 0.67%クエン酸ナトリウムを含む溶液を基本溶液とし, 最少量の0.1 N NaOHでHspを溶解したHsp溶液を基本溶液に添加することによりモデル液(pH 3.2~3.5)を作成した。Hsp-GnのHsp結晶化抑制効果は, 溶存Hsp量をHPLCを分析する方法, あるいは寺田らの方法⁷⁾に従い濁度を660 nmの吸収で測定する方法により評価した。

6. 差吸収スペクトルの測定

差吸収スペクトルの測定は(株)島津製作所製スペクトロフォトメーターMPS-2000を用い測定した。50 mM酢酸緩衝液(pH 3.5)にHspを添加し激しく攪拌することにより, 0.02 mMの溶液を作成した。Hsp-Gn溶液はヘスペリジンモノグルコサイドおよびヘスペリジンダイグルコサイドからなる混合物(混合比, 1:1)を用い, 終濃度が0.008, 0.016および0.032 mMとなるようにHsp溶液あるいは酢酸緩衝液に添加し差吸収スペクトルを測定した。

実験結果及び考察

1. オレンジ果汁飲料中のHspの沈殿抑制試験

Hsp-Gnを果汁飲料のHspの沈殿抑制への応用について検討するために, パイロットプラントで果汁飲料を製造し, 果汁含有率100, 50および30%のオレンジ果汁飲料にHsp-Gnを種々の濃度で添加し, その沈殿形成抑制効果を検討した。その結果, 図2に示すようにHsp-Gn無添加のコントロールではいずれの果汁濃度の場合でもHspの溶解性が低く全Hspの70%程度が沈殿となっていた。しかしながら, Hsp-Gnを添加することにより沈殿中のHsp量は効果的に減少し, 溶解しているHsp量が濃度依存的に増加した。100, 50及び30%果汁含量のオレンジ果汁飲料に対し, Hsp-Gnをそれぞれ0.086, 0.030及び0.017%添加することにより, 全Hspの80.2, 81.0および81.2%を溶解し, 結晶化を抑制することができた。一方, 100, 50及び30%の果汁含有率のオレンジ果汁飲料に含まれる全Hsp濃度はそれぞれ約0.06, 0.03及び0.02%である。つまりオレンジ果汁飲料に含まれる全Hsp量と同程度のHsp-Gnを添加す

ることにより全 Hsp の 80% 以上を溶解することができた。このときのオレンジ果汁飲料の状態を図 3 に示した。

2. 結晶サイズの解析

各種果汁濃度のオレンジ果汁飲料に Hsp-Gn を添加することにより、全 Hsp 量の 80% 以上を可溶化できることが明らかとなったので、結晶化抑制のメカニズムを解明するため、わずかであるが生じている Hsp 結晶の大きさを比較検討した。すなわち、各種濃度の Hsp-Gn

図 2 オレンジ果汁飲料中の沈殿中の Hsp 量および溶存 Hsp 量

(A), 果汁含有率 100%; (B), 果汁含有率 50%; (C), 果汁含有率 30%

C Hsp-Gn
果汁含有率 100%

C Hsp-Gn
果汁含有率 50%

C Hsp-Gn
果汁含有率 30%

図 3 製造後 1 か月のオレンジ果汁飲料

C, Hsp-Gn 無添加; Hsp-Gn, 0.086, 0.030 および 0.017 % の Hsp-Gn をそれぞれ果汁含有率 100, 50 および 30% のオレンジ果汁飲料に添加した。

を含む果汁含量 50% のオレンジ果汁飲料を製造 3 か月の時点で生じている Hsp の結晶の大きさを偏光顕微鏡により測定した。Hsp の結晶は針状結晶であるため⁸⁾, Hsp の結晶の長軸方向の長さを測定することによりその大きさを評価した。その結果、図 4 に示すように、Hsp-Gn を添加していないコントロールでは Hsp 結晶の平均の大きさは約 15 μm であるが、Hsp-Gn を添加することによりその大きさは著しく減少した。Hsp-Gn を 0.030% 添加した場合、結晶の大きさは約 6 μm であった。ここでは示していないが結晶の数自身も大きく減少していた。このことから、Hsp-Gn には Hsp の結晶成長を抑制する作用があることが明らかとなった。

3. モデル系での Hsp の結晶化抑制効果

オレンジ果汁中で Hsp はペクチンと複合体を形成し安定した懸濁状態を形成していることが報告されている⁶⁾。これまでに述べたような Hsp-Gn によるオレンジ果汁飲料中での Hsp の結晶化抑制のメカニズムを解明するため、ペクチン等の他の物質の影響を排除したモデ

図 4 果汁含量 50% のオレンジ果汁飲料中のヘスペリジン結晶サイズ

ル系の Hsp 溶液を用いて Hsp-Gn の Hsp 結晶化抑制効果について検討を行った。モデル系溶液に Hsp-Gn を添加し 93°C で 30 秒間加熱殺菌後、25°C で 1 月間静置した後、遠心分離 (2500×g 2 分間) の Hsp 量を HPLC で測定した。図 5 に示すように 0.02, 0.04 および 0.08% の Hsp 溶液に対し、Hsp-Gn は全 Hsp 量のそれぞれ 83.3, 86.5 および 80.0% を溶解した。さらに全 Hsp 量の 80% 以上を溶解するためには Hsp 量と同程度の Hsp-Gn を添加する必要がある。これらのことは実際のオレンジ果汁飲料の場合とも全く同様な結果であった。

4. Hsp-Gn の Hsp 結晶化抑制効果に及ぼす添加時期の影響

Hsp-Gn の Hsp 結晶化抑制効果に及ぼす添加時期の影響を検討するため、0.1% Hsp を含むモデル溶液作成後、0, 0.5, 1, 3 および 4 時間後に 0.1% Hsp-Gn を添加した。本実験で使用したモデル系において析出した Hsp 量と濁度は相関関係にあることが報告されている⁷⁾。そこで本実験では経時的に濁度を測定することにより Hsp 結晶化抑制効果を評価した。図 6 に示すように Hsp-Gn を添加することにより添加した時点での濁度から増加することではなく、その値を維持していた。すなわち、Hsp-Gn は溶解している Hsp の不溶化を抑制することはできるが、一度析出し不溶化した Hsp を再び溶解する効果は低いことが明らかになった。Hsp は殺菌時の加

図 5 モデル系での Hsp-Gn による Hsp の結晶化抑制

Hsp 濃度: △, 0.02%; ▲, 0.04%; ○, 0.08%

図 6 Hsp-Gn の Hsp 結晶化抑制効果に及ぼす添加時期の影響

●, Hsp-Gn 無添加; ○, 0 時間; ▲, 0.5 時間; △, 1 時間; ■, 3 時間; □, 4 時間後に Hsp-Gn を添加

熱処理により溶解量が増加すること⁹⁾を考えると、Hsp-Gn のオレンジ果汁飲料への添加時期は、加熱殺菌前が最も効果的であることが明らかになった。

5. Hsp 結晶中の Hsp-Gn の分析

0.1% Hsp を含む溶液中に Hsp-Gn を種々の濃度で添加し、4°C で 3 日間保存した後沈殿中の Hsp 及び Hsp-Gn を分析した。図 7 に Hsp-Gn 添加量と沈殿中の Hsp/Hsp-Gn の比の関係を示した。Hsp-Gn は少なくとも 96 mg/mL 溶解することが報告されている²⁾。沈殿中にこのように非常に溶解度の高い Hsp-Gn が存在したことから、Hsp と Hsp-Gn が複合体を形成し、結晶化抑制や結晶成長抑制を行っていることが予想される。

Hsp-Gn の添加量を増やしていくと沈殿形成が大きく抑制され、生じた沈殿の Hsp/Hsp-Gn の比も減少していった。すなわち、各種濃度の Hsp-Gn を 0.1% Hsp 溶液に添加することにより、濃度依存的に Hsp が溶解するが、その溶解している Hsp は沈殿の Hsp/Hsp-Gn 比以上で複合体を作っているものと予想される。

6. 差吸収スペクトルによる Hsp・Hsp-Gn 複合体形成の確認

Hsp と Hsp-Gn が複合体を形成していることを確認するために差吸収スペクトルを測定した。図 8 に示すように 280 nm 付近および 225 nm 付近に差吸収が認められた。この測定結果からも Hsp-Gn と Hsp が複合体を形成していることが示唆された。

図 7 溶存 Hsp 量および沈殿中の Hsp/Hsp-Gn 比
 ■, 溶存 Hsp 濃度; ●, Hsp/Hsp-Gn 比

図 8 差吸収スペクトル

Hsp-Gn 濃度: (a), 0.008 mM; (b), 0.014 mM;
 (c), 0.020 mM

また 0.018 mM の Hsp 溶液に対し Hsp-Gn を 0.020 mM 添加するまで差スペクトルは増加したが, Hsp-Gn を 0.024 mM 添加してもそれ以上は増加しなかった。以上のことから, Hsp と Hsp-Gn は 1:1 で作用しているものと推測される。このことは各種果汁濃度のオレンジ果汁飲料に Hsp-Gn を添加した場合, Hsp と同濃度の Hsp-Gn を添加すると効率的に沈殿形成を抑制できるという結果とよく一致している。

したがって, Hsp-Gn は Hsp と複合体を形成することにより Hsp の結晶成長を抑制しているものと推測される。

7. オレンジ果汁飲料の沈殿形成のプロセス

以上の結果より, オレンジ果汁飲料の沈殿形成についてそのプロセスは図 9 のようにまとめられる。製造直後は微細な Hsp の結晶が見られるが, 懸濁状態にあり沈

殿は形成されていない。製造後数日から 10 日程度すると果実由来のバルブの沈殿が生じ, 容器の底部にバルブ層が出来上がる。その間に上清中では Hsp の結晶化, 結晶の成長が起こりバルブ層の上に蓄積する。そして製造後 1 か月ほどすると, バルブ層の上に多量の Hsp の結晶が蓄積し, 白色の Hsp 層ができる。一方製造時に Hsp-Gn を添加すると上清中で Hsp の結晶化がほとんど生じず, わずかに生じた結晶も成長しないまま微細な結晶となってバルブ層の上に蓄積する。

製造後 1 か月の時点で Hsp-Gn を添加していないコントロールでは上清部分に浮遊している Hsp の結晶が偏光顕微鏡の観察により確認されたが, Hsp-Gn を添加した試験区では上清部分に Hsp の結晶が認められなかった。つまり製造後 1 か月の時点においてコントロールの果汁飲料中では Hsp の結晶化がまだ進行しており, さらに新たに Hsp の結晶が沈殿となって蓄積していくが, Hsp-Gn を添加した試験区では Hsp の結晶化を完全に抑制できているものと思われる。さらに果汁含有率 100% のオレンジ果汁飲料では, 前田らの報告¹⁰⁾のように加熱殺菌により全 Hsp の約 50% が溶解される。しかしながら加熱殺菌を行う前に Hsp-Gn を添加した場合, 製造後 3 か月後でも全 Hsp の約 80% 以上 (殺菌終了直後は 95% 程度) が溶解していた。したがって, Hsp を加熱により溶解させる際に Hsp-Gn を添加しておけば, 溶解する Hsp 量を増加させる効果があることが推測される。

近年, ビタミン P として知られている Hsp は, 血管壁を柔軟にする作用¹¹⁾ のほかに, 脂質の吸収阻害¹²⁾, 抗アレルギー作用¹³⁾¹⁴⁾, などの生理活性を有することが知られている。しかしながら, Hsp は難溶性であるため産業的にほとんど利用されていない。Hsp-Gn をオレンジ果汁飲料に添加し, Hsp の沈殿物を減少させ, 溶存 Hsp 量を増加させることは, 製品の外観上の価値を向上させるばかりでなく, Hsp を溶解させることで Hsp の持つ生理活性を効率良く引き出せることが期待できる。

要 約

Hsp-Gn の Hsp 結晶化抑制効果を果汁含有率 100, 50 及び 30% のオレンジ果汁飲料に応用した。Hsp-Gn をオレンジ果汁飲料に 0.017~0.086% (w/v) % 添加して 1 か月間静置後, 沈殿画分および上清画分に存在する Hsp 量を定量した。Hsp-Gn をオレンジ果汁飲料に含まれる全 Hsp 量と同程度添加することにより, 全 Hsp 量の約 80~90% が溶解し, 沈殿画分中の不溶性 Hsp が大

図9 オレンジ果汁飲料のHsp沈殿形成のプロセス

■, ハルプ層; —, Hsp結晶 (バーの長さは結晶の大きさを示す。)

きく減少した。これによりオレンジ果汁飲料底部に生じるHspの白色沈殿を大きく減少させることができた。

生じている結晶の大きさについても検討を行ったところHsp-Gnを添加した試験区で生じているHspの結晶サイズは $7\mu\text{m}$ 程度とコントロールの $15\mu\text{m}$ と比べ大きく減少しており、Hsp-GnにはHspの結晶成長を抑制する作用があることが解った。さらにそのメカニズムについても検討を行うために、沈殿中のHsp-Gnの分析、差吸収スペクトルの測定結果からHspとHsp-Gnが複合体を形成していることが強く示唆された。

文 献

- 1) 西村隆久・米谷 俊・岡田茂孝・小林善則・福本俊一：日食工誌, 45, 186 (1998).
- 2) KOMETANI, T., TERADA, Y., NISHIMURA, T., TAKII, H. and OKADA, S.: *Biosci. Biotech Biochem.*, 58, 517 (1994).
- 3) KOMETANI, T., TERADA, Y., NISHIMURA, T., TAKII, H. and OKADA, S.: *J. Jpn. Soc. Food Technol.*, 42, 376 (1995).
- 4) KOMETANI, T., TERADA, Y., NISHIMURA, T., TAKII, H. and OKADA, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1990 (1994).
- 5) OTT, R.L.: *An Introduction to Statistical Methods and Data Analyses*, 4th ed, (Duxbury Press, Belmont, CA.), p. 807 (1993).
- 6) BEN-SHALOM, N., PINTO, R., KANNER, J. and BERMAN, M.: *J. Food Sci.*, 50, 1130 (1985).
- 7) TERADA, Y., KOMETANI, T., NISHIMURA, T., TAKII, H. and OKADA, S.: *Food Sci. Technol. Int.*, 1, 29 (1995).
- 8) 吉野孝光：農産加工技術研究会誌, 5, 122 (1958).
- 9) 森 大蔵・岩本喜伴：東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, 16, 45 (1985).
- 10) 前田久夫・高橋保男・三宅正起・伊福 靖：日食工誌, 32, 344 (1985).
- 11) 神谷真太郎：新ビタミン学, 日本ビタミン学会編 (東京化学同人, 東京), p. 439 (1969).
- 12) MONFORTE, M. T., TROVATO, A., KIRJAVAINEN, S., FORESTIERI, A.M. and GALATI, E.M.: *Il Farmaco*, 50, 595 (1995).
- 13) 松田英秋・矢野真紀・久保道徳・飯沼宗和・大山雅義・水野瑞夫：薬誌, 111, 193 (1991).
- 14) DA SILVA EMIM, J. A., OLIVERA, A.B. and LAPA, A. J.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 118 (1994).

(平成10年12月17日受付, 平成11年2月26日受理)