

カンキツ果汁の脱苦味に用いるリモノイド分解酵素生産菌の検索

橋永文男・豊福和弘*・伊藤三郎

(青果保蔵学研究室)

昭和58年8月10日 受理

Screening of Some Microorganisms Producing Limonoid-Degrading Enzyme to be Used for the Debittering of Citrus Juices

Fumio HASHINAGA, Kazuhiro TOYOFUKU and Saburo ITOO

(Laboratory of Postharvest Physiology and

Preservation of Fruits and Vegetables)

緒 言

カンキツ果実はリモノイド系苦味物質を含むため、搾汁すると苦味が強まり、果汁として利用し難いものが多い。著者らは先に種々のカンキツ果実の成熟に伴うリモノイドの部位別含量を測定し、各リモノイドの消長を明らかにした⁶⁻⁷⁾。主要なリモノイドはリモニンとノミリンであり、これらの苦味の程度はフラボノイド系のナリンギンより強く、純水中での閾値はそれぞれ1.0 ppm と0.5 ppm である⁸⁾。

搾汁操作で種子、アルベド、じょうのう膜等からリモノイドが果汁中に溶出するとともに、無味である limonoate A-ring lactone から酸性条件下でリモニンに変換して苦味を生ずる。果汁の脱苦味法としては微生物の生産する酵素を用いてリモニンを分解する方法^{3,4,13,15)}と吸着除去する方法^{1,8)}あるいは添加剤を加えて苦味の発現を抑える方法^{2,14)}があるが、まだ実用化に至っていない。

本研究では主要な苦味であるリモニンとノミリンを分解する微生物を、とくに酵母を主体に、しかも菌体外生産酵素を指標として検索したものである。

材 料 と 方 法

1. リモニンとノミリンの調製

2月にナツミカン種子を果汁工場で集め、水洗後、80°Cで熱風乾燥した。乾燥種子を粉碎したのち、石油エーテルで脱脂した。つづいて自動抽出装置を用いてアセトンで抽出し、溶媒を留去後、ジクロロメタン

に溶解し、イソプロパノールを添加してリモニンを結晶化させた。ジクロロメタンとイソプロパノール処理を繰り返してリモニンとノミリンを分離・精製した。リモニン 27.1g, リモニンとノミリンの混合結晶 42.9gを得た。

2. 培 地

集殖用培地はナツミカン、カボスまたはブンタンの果汁 500ml, クロラムフェニコール 20mg, プロピオン酸ナトリウム 0.2g, ジフェニール 20mg, リモニン 500mg に水を加えて1000mlにし、pHを3.5に調整した。

平面用塗抹培地は果汁 100ml にグルコース 10g, ポリペプトン 3g, 麦芽エキス 2g, 酵母エキス 1g にクロラムフェニコール 20mg, プロピオン酸ナトリウム 0.2g, ジフェニール 20mg, 寒天 20g に水を加えて1000mlにしたのち pH 4.5 に調整した。また生育制御剤を除いたものを pH 5.0 にし、保存用斜面培地とした。

リモノイド分解酵素生産菌の検索用培地はグルコース 1.0%, ポリペプトン 0.3%, 麦芽エキス 0.2%, 酵母エキス 0.1% を pH 3.5 に調整した。培地 5ml にリモニンとノミリンの等量混合物 25mg を 10ml のアセトニトリルに溶解したものを 0.1ml ずつ添加した (0.25mg/5ml)。

3. リモノイド分解酵素生産菌の分離と培養

果実の腐敗果や各地の土壌約 2g を上記集殖培地 5ml に入れて、30°C で1週間振盪培養を行ったのち、培養液の 1ml を新しい培地に移し、つづいて3日間培養後、分離用平面培地に塗布してコロニーを分離した。さらに平面培養を繰り返して菌を単離した。

分離した菌株についてリモノイド分解酵素生産力を

本研究は文部省科学研究費 (No. 556027) の助成によって行った。

* 現在 和歌山ノーキョー食品工業㈱

試験した。リモノイド添加培地 5ml に上記の分離菌をそれぞれ接種し、30°C で 10 日間培養した。また既知保存酵母 8 種、*Debaryomyces hansenii* IFO 0047, *Candida utilis* IFO 0626, *Rhodotorula aurantiaca* IFO 0754, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2044, *Schizosaccharomyces octopus*, *Pichia membraeformis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* についても同様に試験した。

酵素活性の比較的強い 30 菌株について菌体外酵素による試験をした。すなわち 10 日間培養したのち、菌体を除去し、培養液にリモノイド溶液 0.1ml を添加し、3 日間反応させた。

別に 15 日間リモノイド存在下で菌を培養し、経時的に酵素活性を測定し、菌の生育度と酵素の生産量との関係を明らかにした。

4. 酵素活性測定法

培養液に 0.05% BHT ジクロロメタン溶液 5ml を加えて攪拌したのち、遠心分離 (2,000 rpm, 10 分) によって生じた下層をピペットでとった。3 回の抽出液を合せ、ミニペーパー (S3 型) で減圧乾固した。アセトニトリル 2.0ml に溶解し、冷凍庫に保管した。

リモニンとノミリンの定量は薄層クロマトグラフィーによった⁵⁾。培養液に添加したリモノイド溶液を 10 倍に希釈 (0.25mg/ml) し、5, 10, 15, 20 μ l ずつ塗布して検量線を作成した。展開溶媒はクロロホルム-エチルエーテル-酢酸 (28:12:1) を使用し、シリカゲルプラスチックシート 60 で 8cm 展開した。0.5% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (エタノール 90ml に濃硫酸 10ml を添加) を噴霧後、塩酸気流中に入れて発色させた。乾燥後二波長クロマトスキャナー (島津 CS-900 型) により、リモニンとノミリンをそれぞれ測定し、添加量に対する分解率をパーセントで表わして酵素活性とした。

実験結果

1. 菌体の分離

リモニンを添加したミカン果汁培地を用い、細菌と

かびの発育を抑えながら集殖培養を行い、つづいて平面塗抹培養で分離した結果、50 点の試料から 349 種の菌株が得られた。

2. リモノイド分解酵素活性の測定

菌株のリモノイド分解力を酵母、かび、細菌に分け

Table 2. Degradation of limonin and nomilin by the culture media after 10 days of culturing

No. of strains	Limonoid-degrading activity (%)	
	Limoinin	Nomilin
A16	36	62
A18	48	56
A20	55	36
A26	25	24
A27	11	21
C52	25	21
C61	51	77
D 3	44	24
D12	47	33
D13	43	37
D 9	52	36
E 5	25	33
E18	30	27
E21	15	25
E42	38	24
F12	18	25
I 45	81	96
J 71	33	27
L 5	11	9
L11	25	55
L45	61	55
L54	28	33
L55	89	93
M42	44	55
M45	86	83
N22	32	28
N51	36	31
Q31	40	57
Q41	36	40
AG4	53	55

Table 1. Classification of the tested strains made according to their limonoid-degrading activities (number of strains)

Microorganisms	Limonoid-degrading activity (%)				Total
	≥ 80	79-60	59-40	<40	
Mold	11	13	19	76	119
Yeast	0	8	39	168	215
Bacteria	0	0	4	11	15

て Table 1 に示した。リモネンを 60% 以上分解する菌はかび 24 株、酵母 8 株であった。酵母に比べかびの方が酵素活性が高いものが多かった。

相対的にリモネン分解力の強い酵母とかびを 15 株ずつ選び 10 日間培養し、培養液の酵素活性を 30°C で 3 日間反応させて測定した。Table 2 に示したようにリモネンとノミリンを 80% 以上分解する菌は 3 株のみであった。しかも最初からリモノイドを混合して培養したもの比べ、相対的に活性が低かった。

これらの菌株の酵素生産力を経時的に 15 日間測定し、そのうち比較的酵素活性の強いものを Fig. 1 に示した。酵母は 7 日頃まであまり活性が認められなかったが、その後急激に増加し、10 日または 15 日頃に最高の活性に達した。一方、かびは 3 日目からかなり活性が増加して 7 日目にはほぼ最高値に達した。リモネンとノミリンに対する酵素の作用は同じ傾向を示し、特異的にどちらか一方のみに作用する菌は認められなかった。ただ細菌の一種のみがリモネンよりもノミリンをよく分解した。

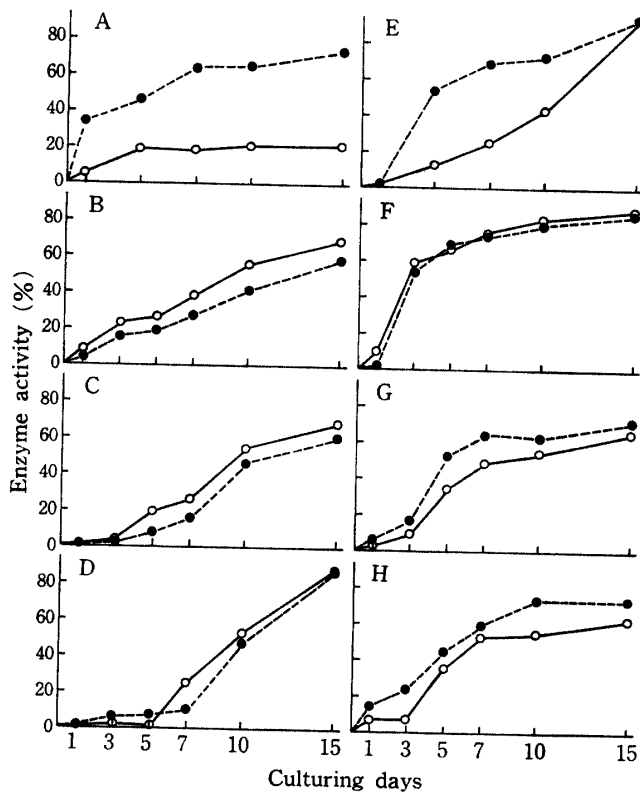


Fig. 1. Time course of limonoid-degrading enzyme production in some selected strains.

A, bacteria; B-D, yeast; E-H, mold
○—○, limonin; ●---●, nomilin

考 察

フラボノイド系苦味物質であるナリンギンやネオヘスペリジンの有無にかかわらず、リモノイド系苦味物質はカンキツ果実に広く分布し、とくに種子やじょうのう膜に多く含まれる⁵⁾。品種、系統、台木によってその含量が異なり¹⁰⁾、またエチレン処理によってもある程度苦味を減少させることもできるが^{6,12)}、果実の熟度でその含量が大いに異なるので、適期に収穫する必要がある⁵⁾。しかし搾汁した果汁ではリモネンを吸着除去あるいは酵素分解によって除去しなければならない。そのため酢酸セルロースによる吸着除去の研究が行われているが^{4,9)}、酵素によって特異的にリモネンおよびノミリンを苦味のない物質へ分解または変換できれば理想的である。

Hasegawa らは *Pseudomonas* sp.³⁾ および *Arthrobacter globiformis*⁴⁾ からリモネン分解酵素を見出した。最近 Vaks ら¹⁰⁾は *Acinetobacter* sp. を用いた脱苦味法を報告した。またリモネンの代謝経路として 17-dehydrolimonoate を生成する経路と deoxylimonin を経て deoxylimononic acid へ転換する経路が提出されている^{3,11)}。

著者らも酵素によるリモノイド分解を試み、酵母を主体に菌株を分離した。大量のリモノイドを培地に使用することは困難であるため、リモノイド含量の多いブタンやカボスの果汁を用いた。測定には TLC を用いたが、展開溶媒のクロロホルム-アセトン (9:1) を使用すると菌体の代謝産物である青色化合物がリモネンのスポットと重なったため、展開溶媒を種々検討した結果、クロロホルム-エチルエーテル-酢酸 (28:12:1) を用いることによって青色化合物をノミリンの上部に分離することができた。

リモノイド分解酵素活性の増加割合は一般に酵母は遅く、しかも活性の強いものが少なかった。そのため培養時間や反応時間が長くなったが、培養条件を変えたり、酵素を精製することによって活性を高めることが可能であろう。またリモノイド資化性菌の検索も予備的に行ったが、目的とする菌が得られなかったため、細菌も含めてもっと広く検討する必要がある。これまでに得られた有力な菌株について現在同定を進めている。

要 約

カンキツ果実の苦味成分の一つであるリモノイドを酵素的方法によって除去することを目的とし、土壌や

腐敗果実から酸性培地で成育する酵母菌を目標にして349菌株を分離した。

分離菌株および8種の保存菌株のリモノイド分解酵素活性を調べた結果、分解率80%以上のものはかび11株であり、79-60%のものはかび13株、酵母8株であった。

リモノイド分解酵素活性の強い菌株30株について10日間培養した培養液とリモノイドを3日間反応させることにより活性を測定した結果80%以上分解する菌が3株あったが、大部分の菌株はリモノイドを入れた10日間培養試験区と比較して活性が低かった。

経時的に活性を測定すると酵母は3~5日目から酵素活性が急増するのに対し、かびは1~3日目から増加するものが多かった。

文 献

- 1) Chandler, B.V. and Johnson, R.L.: New sorbent gel forms of cellulose esters for debittering citrus juices. *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 825-832 (1979)
- 2) Guadagni, D.G., Maier, V.P. and Turnbauch, J.G.: Effect of neodiosmin on threshold and bitterness of limonin in water and orange juice. *J. Food Sci.*, **41**, 681-684 (1976)
- 3) Hasegawa, S.: Metabolism of limonoids. Limonin D-ring lactone hydrolase activity in *Pseudomonas*. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 24-26 (1976)
- 4) Hasegawa, S., Bennett, R.D., Maier, V.P. and King, A.D., Jr.: Limonoate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1031-1034 (1972)
- 5) 橋永文男・江島 宏・永浜秀人・伊藤三郎: カンキツ類のリモノイドに関する研究 I. ポンカン, タンカン, 早生ウンシュウ, ナツダイダイ果実のリモノイド組成の時期別変化. 鹿大農学術報告, **27**, 171-180 (1977)
- 6) Hashinaga, F. and Ito, S.: Seasonal changes of limonoids in the component parts of several citrus fruits. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **2**, 901-905 (1981)
- 7) 橋永文男・伊藤三郎: ハッサク及びブンタン果実のリモノイドの時期別変化. 園学雑, **51**, 485-492 (1983)
- 8) Johnson, R.L.: Effect of cellulose acetate gel bead column treatment on the acceptability and composition of navel orange juice. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 1042-1048 (1982)
- 9) Johnson, R.L. and Chandler, B.V.: Reactivation of the cellulose acetate gel bead column used for the removal of limonin from citrus juices. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 1191-1196 (1981)
- 10) Kefford, J.F. and Chandler, B.V.: The chemical constituents of citrus fruits, p. 150-164, Acad. Press, New York (1970)
- 11) Maier, V.P., Bennett, R.D. and Hasegawa, S.: Limonin and other limonoids. In Nagy, S., Shaw, P.E. and Veldhuis, M.K. (eds), Citrus science and technology. **vol. 1**, p. 355-396. Avi. Westport, Ct. (1977)
- 12) Maier, V.P., Brewster, L.C. and Hsu, A.C.: Ethylene-accelerated limonoid metabolism in citrus fruits: A process for reducing juice bitterness. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 490-495 (1973)
- 13) 野村男次: 夏ミカン苦味“リモノイド”分解酵素に関する研究 第2報 リモノイド分解酵素の探索. 山口大農学術報告, **17**, 903-910 (1966)
- 14) Shaw, P.E. and Wilson, C.W.: Debittering citrus juices with β -cyclodextrin polymer. *J. Food Sci.*, **48**, 646-647 (1983)
- 15) Vaks, B. and Lifshitz, A.: Debittering of orange juice by bacteria which degrade limonin. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 1258-1261 (1981)

Summary

With the intention of chiefly obtaining yeasts as well as for the purpose of removing limonin bitterness of citrus juices by means of enzymatic methods, screening was carried out on the microorganisms producing limonoid-degrading enzyme which grows in an acidic medium, making use of 349 strains separated from the rotten fruits or soils.

As the results of the assessment of the limonoid-degrading enzyme capacities both in the selected strains and in the 8 types of culture-strains, it was indicated that the capacity of degrading more than 80% of limonin was noted in the 8 molds and that of degrading 79-60% of limonin was noted in the 13 molds and 8 yeasts.

The 30 strains holding a strong enzyme activity were cultured for 10 days and then determination was made on the enzyme activities of the cultured media after the incubation for 3 days. As the result of this operation, it was ascertained that there were 3 strains having the capacity of conversing more than 80% of limonin; on the other hand most of the strains excepting those showed the capacity which was weaker than those cultivated for 10 days in the media containing limonin.

When the activity was measured in accordance with the lapse of time needed for the cultivation, it was ascertained that in case of yeasts a rapid increasing of the enzyme activity was occasioned after 3 or 5 days, while in the cases of molds other than yeasts it was occasioned after 1 or 3 days.