

## 2. 酵素を利用して生成したグルコン酸を含むニンジンジュースの開発

福岡県農業総合試験場 馬場紀子

健康ブームを背景に、野菜や果実を原料としたジュースが数多く販売されている。しかし、原料である野菜搾汁液は酸味が乏しいものが多く、飲みやすくするためには製品化の段階で酸味付けが必要となる。これまでに行われてきた酸味付けの方法としては、酸味料やレモン果汁等を添加する方法や、微生物を利用した乳酸発酵や酢酸発酵処理があるが、微生物を用いた発酵法では原料素材の風味が大きく変化してしまうという欠点がある。

そこで、酸味料等の添加を全く行わず、かつ、原料の風味や栄養価を損なわないで酸味を付加させる方法として、搾汁液中に含まれる糖분을酵素を用いてグルコン酸とオリゴ糖に変換する技術を開発したので紹介する。

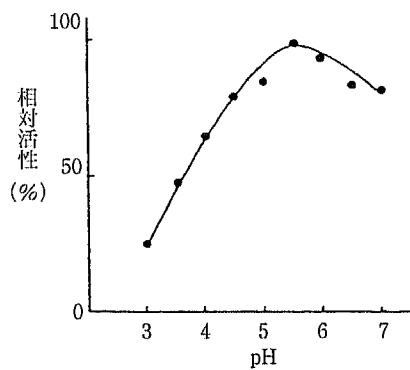
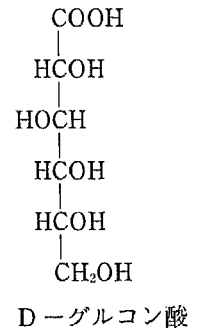
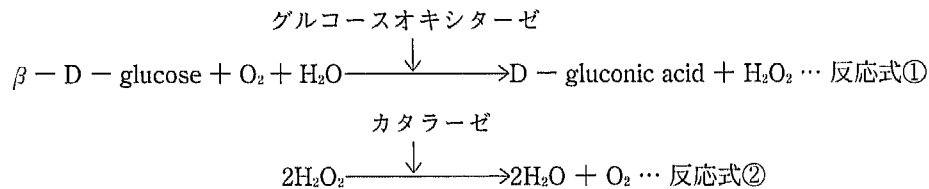
### 1. グルコン酸について

グルコン酸はまろやかで爽やかな酸味を有し、ビフィズス菌増殖作用を示すなど機能性（生体調節作用）の面でも注目されている有機酸のひとつである。

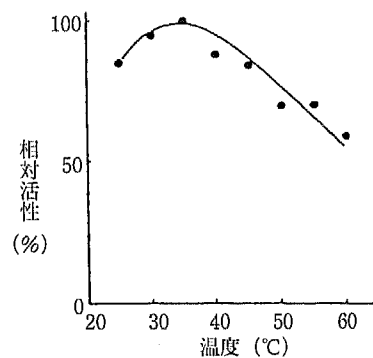
グルコン酸の生成法としては、グルコースオキシターゼによる酵素法と微生物による発酵法があるが、現在、工業的規模でグルコン酸を生産する場合は澱粉を原料とした発酵法により行われている。これは、従来の酵素法では反応効率が悪くコスト高になるという理由からであり、これまで食品加工の分野におけるグルコースオキシターゼの利用は、食品中の溶存酸素や微量グルコースを除去する目的等にしか利用されていなかった。

そこで、グルコースオキシターゼを用いた酵素法を食品加工に幅広く応用できるように、効率的なグルコン酸生成条件と、ニンジン等農産物搾汁液への利用について検討した。

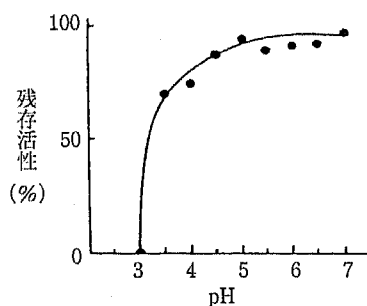
### 2. グルコースオキシターゼによるグルコン酸の生成反応



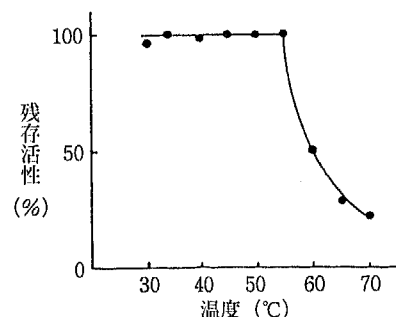
第1図 pHと活性  
(35°Cで15分間反応)



第2図 反応温度と活性  
(pH6.0で15分間反応)



第3図 pHと安定性  
(35°Cで2時間放置)



第4図 温度と安定性  
(pH6.0で2時間放置)

グルコースオキシターゼの反応は反応式①のとおりであり、グルコースオキシターゼによるグルコン酸の生成速度は、溶存酸素の供給速度に影響される。しかし、反応に空気をういたのでは溶存酸素の飽和濃度が低く(約7ppm)十分な生成速度が得られない。また、純酸素を通気しながらの反応では酸素の利用効率が悪くコスト高になるという問題点がある。そこで、酸素ポンペをつないだ密閉条件下で、加圧して溶存酸素の供給を高め、反応を行わせることができれば、酸素の利用効率を高めたうえでグルコン酸生成速度の大幅な向上が期待できる。

さらに、使用したグルコースオキシターゼ(天野製薬食品製造用粗酵素剤・*Aspergillus niger* 起源)の温度別、pH別活性および安定性は第1~4図のとおりである。至適pHは5.5付近、至適温度は35℃付近が最も活性が高く、pH5.0~7.0および温度55℃以下で安定である。酸味の少ない野菜搾汁液は一般的にpHが高く、pH5.0~7.0の範囲にあるものが多いため、グルコースオキシターゼの利用には適していると予想された。また、グルコースオキシターゼの反応により過酸化水素が生じるが、使用した粗酵素剤にはカタラーゼが含まれているため、反応式②により、過酸化水素は水と酸素とに分解されるので問題はない。

3. 農産物搾汁液中でのグルコースオキシターゼの反応

加熱処理し、種々の酵素活性を失活させた濃縮ニンジン汁、キウイフルーツ果汁、ナシ果汁およびサトウキビ汁をヒダ付き三角フラスコに入れ、粗酵素剤を添加して空気雰囲気条件下で加圧せずに回転振とうを24時間行った時の主な糖、有機酸およびpHの変化を第1表に示す。通気や加圧は行っていないが、反応24時間後には濃縮ニンジン汁では77g/lのグルコン酸が生成した。しかし、キウイフルーツ果汁、ナシ果汁、サトウキビ汁では26~40g/l程度しか生成していない。これは、原料の緩衝能が低く、生成したグルコン酸によりpHが3.3以下まで低下したため、酵素活性の低下や失活が生じ、反応が進行しなくなったためと考えられた。

一方、各農産物搾汁液でのグルコースオキシターゼ反応後の糖組成の変化をみると、濃縮ニンジン汁とサトウキビ汁にフラクトオリゴ糖のひとつであるケストースが生成している。このように、グルコン酸の生成とフラクトオリゴ糖の生成が同時に進行する現象は、*Aspergillus niger* IAM 2094等の微生物菌体を粗酵素剤として用いたときにも認められており、今回用いた粗酵素剤にも、シュークロースを基質にフラクトオリゴ糖を生成するβ-フラクトフラノシダーゼが混在しているためと考えられた。

また、サトウキビ汁はグルコースオキシターゼの基質であるグルコースを原液中に含んでいないにもかかわらずグルコン酸が生成されたのも、この混在するβ-フラクトフラノシダーゼの作用であると推測された。

4. グルコン酸生成に及ぼす酸素加圧の影響

グルコースオキシターゼを農産物搾汁液など食品加工分野に幅広く利用するためには、反応効率を高め、効率的にグルコン酸の生成を行わせる必要がある。そこで、濃縮ニンジン汁やキウイフルーツ果汁1000mlをファーメンターに入れ、粗酵素剤1g(8.7mg protein, グルコースオキシターゼ; 7300U, カタラーゼ; 173600U)を添加し、溶存酸素の供給率が高まるように酸素による加圧程度を変え、それぞれのグルコン酸生成量を測定した。

濃縮ニンジン汁の場合、ヘッドスペースが空気(常圧)の場合は溶存酸素の供給効率が低いためグルコン酸の生成はほとんど認められないが、第5図に示すように、酸素を用いて加圧するとグルコン酸の生成は速やかになり、3atm加圧下では反応3時間グルコン酸濃度は約50g/lに達した。

キウイフルーツ果汁の場合、初発pHが低いために酵素の活性が低く、濃縮ニンジ

第1表 酵素処理による搾汁液の主な糖、有機酸、pHの変化

作物	糖および有機酸	成分含量 (g/l)	
		0	24
濃縮ニンジン汁	フラクトース	71.6	72.0
	グルコース	93.7	63.3
	シュークロース	163.4	99.5
	ケストース	tr	46.7
	グルコン酸	0	76.8
	pH	5.9	3.8
キウイフルーツ	フラクトース	47.3	46.6
	グルコース	49.1	26.5
	グルコン酸	0	29.3
	クエン酸	12.7	11.7
	リンゴ酸	5.3	5.6
	pH	3.6	3.3
ナシ	フラクトース	63.8	64.4
	グルコース	46.1	23.3
	グルコン酸	0	40.0
	クエン酸	1.1	1.1
	リンゴ酸	6.8	8.9
	pH	4.8	3.3
サトウキビ	フラクトース	0.8	15.7
	グルコース	tr	12.7
	シュークロース	208.0	123.6
	ケストース	0	38.4
	グルコン酸	0	26.0
	pH	5.3	3.0

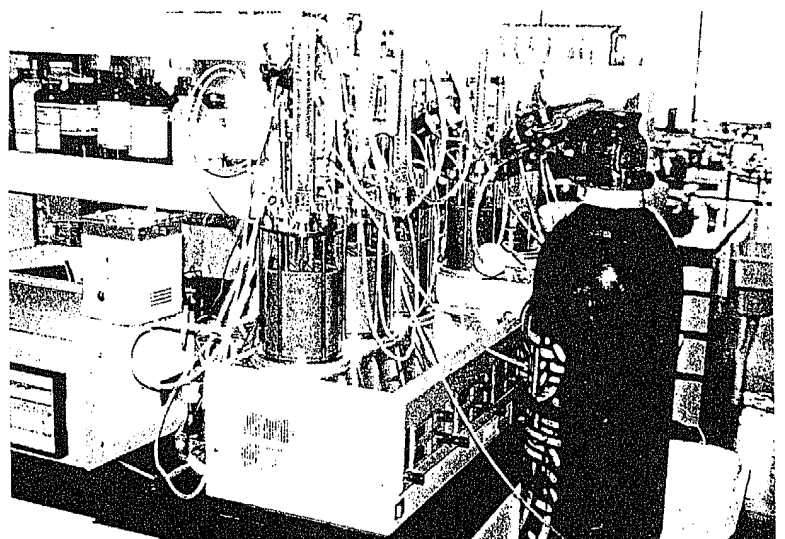


写真1 酸素加圧条件下でのグルコン酸生成

ン汁ほどはグルコン酸の生成は速やかではないが、それでも3 atm 加圧下で2時間後に約20g/lが生成した。

このように酸素加圧下で酵素反応を行わせることで、反応効率を大幅に向上させることができあ。また、密閉状態で反応を行うため、通気処理に比べ酸素使用量のロスを防ぐことができ経済的であるとともに、香気成分の保持など風味の劣化防止にも優れている。

### 5. 固定化酵素による回分反応

固定化担体にはキトパール (富士紡績 (株) BCW-4010) を使用し、Matumoto ら<sup>1)</sup> がグルコースオキシターゼを固定化した方法により、グルコースオキシターゼとカタラーゼの粗酵素を一緒に固定化した。固定化酵素は、ナイロン製メッシュ袋に入れ、ファーメンター内に装着し、酸素加圧2 atm で回分反応を行った。

第6図に濃縮ニンジン汁に固定化酵素10g-wet support (グルコースオキシターゼ; 975U, カタラーゼ; 3650U) を用いて回分反応を行った時の結果を示す。固定化した酵素単位が少なかったためか、グルコン酸の生成量は緩やかであるが、7時間後にはグルコン酸22g/lが生成している。

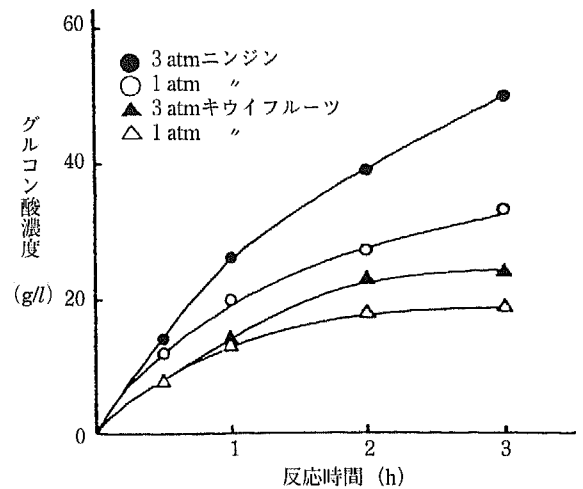
第7図にグルコースを含む緩衝液に固定化酵素27g-wet support (グルコースオキシターゼ; 700U, カタラーゼ; 2620U) を用いて全4時間の回分反応を繰り返して行ったときの結果を示す。

繰り返し回分反応が増える度に徐々に生成速度が低下し、6回以上反応を繰り返すと反応開始時の半分以下の生成速度になった。この生成速度の低下の度合は、生成したグルコン酸による原料液のpH低下による酵素の失活程度よりも大きい。このことは、使用した固定化担体が多孔質であるため生成したグルコン酸が担体内部に滞留し、固定化酵素周辺のpHが局部的に低い値で長時間維持されたままになっていることによるためと思われる。今後、生成速度の低下が起らないような担体の選定や比活性を高めるための固定化法の検討が必要である。

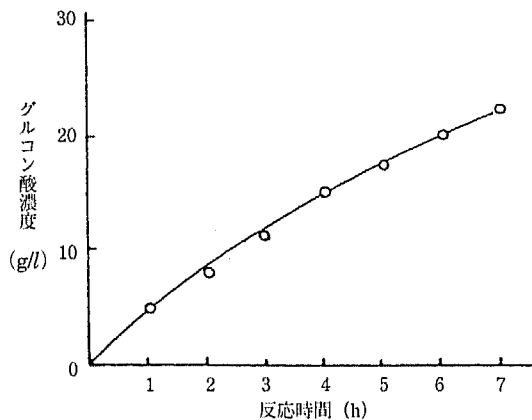
### 6. 新しいニンジンジュースの開発

ニンジンジュースは、 $\beta$ -カロテンなどの機能性成分が多く健康に良いことから多くの人に飲用されている。しかし、原料のニンジンは酸味が乏しいため、これまでの製品はレモン果汁や酸味料等を添加することで飲みやすくしてきた。そこで、 $\beta$ -カロテンなどの機能性成分を損なわず、かつ、添加物を加えることなく酸味を付加させるため、上記技術を応用してこれまでにない新しいタイプのニンジンジュースを開発した。すなわち、濃縮ニンジンジュース (Brix42, pH5.8) 1000ml にグルコースオキシターゼ粗酵素剤を加え、酸素加圧条件下で7時間反応させ、約2.6%のグルコン酸と約5.4%のフラクトオリゴ糖を生成させた (第2表)。このように酵素で処理したものを2~3倍に希釈することで、鮮やかな赤橙色で爽快な酸味を有したニンジンジュースを得ることができた。

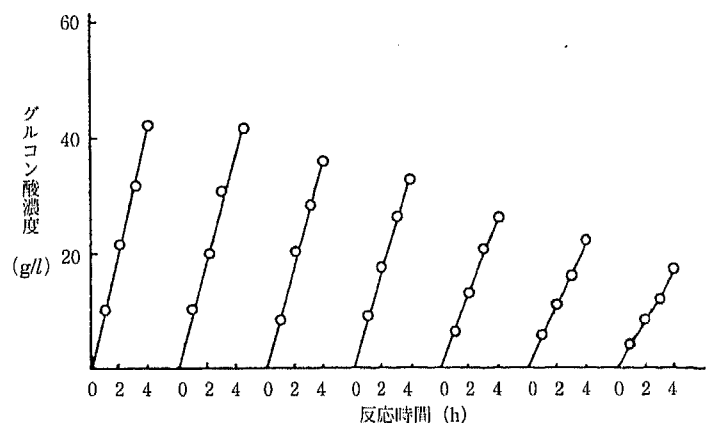
この製法で得られたニンジンジュースは、ニ



第5図 酸素加圧下でのグルコン酸生成



第6図 濃縮ニンジン汁を用いた固定化酵素による反応



第7図 固定化酵素による繰り返し回分反応

第2表 6倍濃縮ニンジンジュースの糖と有機酸組成の変化

成分	反応時間 (h)		
	0	7	
糖	フラクトース	8.3%	8.1%
	グルコース	10.2	9.7
	シュクロース	19.0	8.9
	フラクトオリゴ糖	0.1	5.4
酸	グルコン酸	0	2.6
	リンゴ酸	3.3	3.3

ンジンの機能性成分であるβ-カロテン含量や風味はそのまま、甘さが低減され、かつ、爽やか酸味が加わったこれまでにない新しいタイプのものとなる。また、生成されたグルコン酸やフラクトオリゴ糖は健康に役立つヒト腸内ビフィズス菌の増殖活性を有しており、従来のニンジンジュースにさらに機能性が付加されたものとなる。



写真2 商品化されたニンジンジュース（商品名「人参活菜」）

#### 7. おわりに

本技術は農林水産省の地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業，課題名「酵素および微生物等の利用による機能性を有する食品素材の開発」（平成3～7年度）において，福岡県工業技術センターとの共同研究によって開発したもので，1998年に特許を取得した。

現在，新しく開発したニンジンジュースについては，ジュースの加工等で専門技術を有する福岡県農業協同組合連合会（ふくれん）に実施を許諾し，ニンジン汁100%ジュース（商品名：人参活菜）として製品化されている。

また，本技術はニンジン汁だけでなく酸味の少ないサトウキビ，スイカ，カボチャ，ハチミツなど種々の液状食品に幅広く応用できるものと考えている。今後，グルコースオキシターゼを利用した本技術を用いて，原料中の糖酸組成を変化させることで，さらに新しい食品開発へつながればと期待している。

#### 引用文献

- 1) Matumoto, K., Kamikado, H., Matsubara, H., and Osajima, Y. : *Anal.Chem.*, 60, 147, 1988.