

透明容器詰柑橘果汁における光劣化異臭に与えるクロロフィルと pH の影響

奈賀 俊人*, 隅谷 栄伸

Mechanisms of Light-induced Off-flavor Formation Sensitized by Chlorophylls and pH in Citrus Juice

Toshihito Naka* and Hidenobu Sumitani

The mechanisms of the formation of light-induced off-flavors in sour citrus juices such as lemon and kabosu were examined. Photosensitivity of chlorophylls was observed to promote off-flavor formation, as off-flavors are formed in the presence of chlorophylls. Photosensitivity is concentration dependent, and chlorophylls at sub-ppm levels rapidly promote off-flavor formation in citrus juice. Moreover, chlorophyll photosensitivity strengthens at the strong acid region and reversely weakens at the weak acid region. These results suggest that preventing chlorophyll contamination in citrus juice products packaged in clear bottles can be achieved at low pH. That is, chlorophyll photosensitivity is weaker at the weak acid region, and thus even in the presence of chlorophylls, light can be present and not induce off-flavor formation in citrus juice. Taken together, the concentration of chlorophylls and pH of citrus juice should be strictly controlled during manufacturing to prevent light-induced off-flavors.

Key words: citrus juice, light, off-flavor, chlorophylls, pH, photosensitivity

日本国内において、PET ボトル販売が1996年以降大きく増加しており、他の容器からPET ボトルへ代替が進んでいる。容器リサイクル法（容器包装に係る分別収集および再商品化の促進等に関する法律）が制定され、業界では500 mL 容量以下の小型PET ボトル販売を自主的に規制していたが、1996年に自主規制を撤廃した。小型PET ボトルはその利便性が消費者に受け入れられたことが背景にあり急速に普及している。しかし透明容器を用いた飲料では、光劣化による異臭例が報告されている。食品から金属様臭が生成する例として乳製品で報告が見られるほか、リンゴおよびグレープフルーツ果汁飲料などでの報告がなされている¹⁾⁻⁵⁾。一部のPET ボトル詰柑橘果汁飲料において、日光または蛍光灯照射1日で異臭が生成する事例が生じた。著者らはこの異臭は金属様臭または油の酸化臭と表現できる香調を有し、シトラールやテルペン類の酸化劣化臭とは異なるものであること⁶⁾⁻¹³⁾、1日の光照射で強烈な異臭を生成し、商品価値が完全に失われるほど急速な光劣化であることを報告した¹⁴⁾。この報告の中では、1-オクテン-3-オンなどのカルボニル化合物が異臭を付与するとともに、テルペン類が酸化されて柑橘特有の香りが弱まっていること、異臭生成抑制にはビタミンCの添加や酸素バリア性ボトルの使用など酸化対策が有効であることを報告した¹⁴⁾。

本報告では、柑橘果汁における異臭成分であるカルボニル化合物を測定することにより、クロロフィルの光増感作

用と pH の影響について研究し、異臭生成機構の解明を試みた結果を報告する。

実験方法

1. 試料・試薬

当所研究農場（兵庫県川西市）にて栽培しているカボスを9月下旬に収穫し、果皮が緑色の状態を保つため冷凍保存し、使用する当日に適宜自然解凍して使用した。レモンは市販品を用いた。試験に用いた香酸柑橘（レモン、カボス、スタチなど果汁の酸性が特に強い柑橘類）果汁飲料製品は市販のものを用い、購入後すぐに冷蔵保存して試験時に室温に戻して試験に供した。

有機溶媒、各成分の標準物質およびその他の一般試薬は、和光純薬工業株式会社製あるいは東京化成工業株式会社製を用いた。超純水は超純水製造システム（Milli-Q gradient A-10, Millipore corp. 製）を用いて製造した。

2. 揮発性成分の分析

揮発性成分の分析には大容量静的ヘッドスペースガス分析法（Large Volume Static Head Space 法, LVSHS 法）を用いた。ヘッドスペースガス捕集瓶内に試料を封入して27°Cに空調された室内にて15分間気液平衡時間を設け、ヘッドスペースガス100 mLをガス自動濃縮装置で冷却捕集し、GC-MSに導入した。ガス自動濃縮装置はEntech

*：現在、東洋食品工業短期大学包装食品工学科

注：本論文は日本食品科学工学会誌, Vol. 56, No. 9, 469-474 (2009) 掲載論文で、学会より転載許可を受けている。

7100 A (Entech Instruments Inc. 製), GC に Agilent 6890 および MS に Agilent 5973 (Agilent Technologies Inc. 製) を使用した. 自動濃縮装置のガス捕集モードは MPT (Microscale Purge and Trap) モードとした. カラムは J&W DB-Wax (60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies Inc. 製), キャリアガスはヘリウム (毎分 2.1 mL) を用いてカラム出口で MS および匂い嗅ぎ装置に 1:1 の比率でスプリットした. 注入口温度は 220°C, オープン昇温条件は初期温度 60°C で 4 分間保持, 毎分 6°C で 140°C まで昇温, 続いて毎分 30°C で 220°C まで昇温, 5 分間保持した. MS の測定条件はイオン化電圧 70 eV (EI), トランスファライン温度 150°C, イオン源温度 230°C, 走査範囲 m/z (質量電荷比) = 29–350 に設定した. 著者らは柑橘果汁の光劣化異臭の匂い嗅ぎ分析結果から *n*-ヘキサナール, 1-オクテン-3-オン, (*E*)-2-ヘプテナール, (*E*)-2-オクテナールが検出され, これらの成分が異臭を特徴付ける成分であり, いずれも同様な挙動を示すことを報告した¹⁴⁾. そのため光劣化異臭の劣化指標成分として最も異臭への寄与度が高いと考えられる不飽和ケトンである 1-オクテン-3-オンを選定した. この成分は $m/z=97$ の特徴的なフラグメントイオンを生成する. そこで光劣化異臭に柑橘果汁の光劣化異臭の強度比較には, 全イオンモニタリング分析して得られた分析結果から 1-オクテン-3-オンの保持時間に検出される $m/z=97$ のイオン強度 (面積値) を算出し評価した. なお, いずれの試験においても $N=2$ の分析を行い, 平均値を算出して評価している.

3. 光照射方法

容器には 55 mL 容のネジ口試験管 (24 口径, 平均外径 23.0 mm, 平均肉厚 1.5 mm, 平均フタ下高さ 13.5 mm, イワキ株式会社製) を使用した. このネジ口試験管は 300 nm 以上の波長の光は 80% 以上の透過率を有するが, 270 nm 以下の波長の光は 1% 以下の透過率のものであった. また, 蛍光灯として白色蛍光灯 (FL40SSW/37-B, 株式会社日立製作所製) を用いた. この蛍光灯は主に 350 ~ 700 nm の波長の光を発するものであった.

各種の試料溶液に対する光照射試験は全てネジ口試験管に 50 mL を充填・密封し, 試験管立てに直立させた状態で試験管側面より 25°C の室温下 10,000 ルクス (約 6.7 mW/cm² の放射照度) で白色蛍光灯を 42 時間照射し, それを明所試料とした. 一方, 比較対照として同室内で段ボール箱詰めにして光を遮断し, それを暗所試料とした. なお, 照度はデジタル照度計 TMS-870H (タスコジャパン株式会社製) で測定し, 蛍光灯の放射照度は太陽分光放射計 SS-01 (株式会社マキ製作所製) で測定した. 光透過率は UV スペクトロフォトメーター UV-1800 (株式会社島津製作所製) で 200–1100 nm の波長の透過率を測定した.

4. レモン果汁への果皮添加試験

レモン果実を半割し, 砂じょうのみを圧搾して 10°C 冷

却下 8,000 g で 20 分間遠心分離を行って淡黄色透明のレモン果汁を得た. 残ったレモン果皮 (フラベドおよびアルベド) を 50% 重量の超純水と混合しホモジナイザーを用いて懸濁し, 続いてサラシによりろ過することによりレモン果皮懸濁液を得た. レモン果皮とは別に, 同様な操作をカボス果皮に行い, カボス果皮懸濁液を得た. レモンまたはカボスの果皮懸濁液にそれぞれ同重量のレモン果汁を加えて超純水により 10 倍に希釈した. こうして得られた試験液に各々クエン酸を添加して pH 3.30 に調整して光照射を行い, 揮発性成分の分析を行った.

5. クロロフィルの影響

レモン果実からヘタのみを取り除いたほかには処理せず, 50% 重量の超純水と混合してホモジナイザーにより懸濁した. 得られた懸濁液をサラシで濾過して, 続いて超純水を用いて 10 倍に希釈してレモン懸濁液を調製した. レモン懸濁液に水溶性クロロフィルとして銅クロロフィリンナトリウムを無添加, 1 ppm, 10 ppm の 3 種類の濃度で添加した試料を調製した. このとき pH は 3.45 であった. これらの溶液に各々光照射を行った後, 揮発性成分を分析した.

6. クロロフィル類の HPLC 分析

(1) 市販飲料に含まれるクロロフィル量

市販製品に含まれるクロロフィル類の量を分析した. 分析対象はクロロフィル類 4 種 (クロロフィル a および b, フェオフィチン a および b) とした. 試料として以下の 2 点を分析した.

A. 190 g 金属缶詰 10% スタチ果汁飲料

B. 500 mL PET ボトル詰 10% カボス果汁飲料

飲料 100 mL に酢酸エチル 30 mL を加えて 15 分間激しく振とうし, 10°C 冷却下 6,000 g で 10 分間遠心分離を行って液相を分離し, 有機相を回収した. 水相に再度酢酸エチル 30 mL を加えて操作を繰り返す. 有機相は合わせて無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した. 無水硫酸ナトリウムを濾去し, エバポレーターにより濃縮した後 1 mL に定容して, その 10 μL を HPLC により分析した. 装置は LC-20 A (株式会社島津製作所製) を用い, カラムは Zorbax SB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies Inc. 製), 移動相は A 液: 酢酸エチル/メタノール/超純水 = 15/65/20, B 液: 酢酸エチル/メタノール/超純水 = 60/30/10 を用いて 70%B (0 分) -95%B (25 分) -95%B (30 分) -70%B (35 分) のグラジエント分析を行った. カラム温度は 40°C, 流速毎分 0.6 mL で, UV/Vis 検出器の測定波長は 658 nm を用いた. 各クロロフィル類の標品を 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 ppm 濃度で酢酸エチルに溶解した標準液を分析して 658 nm におけるピーク面積から検量線を作成し, 定量を行った. 分析は $N=2$ で行い, 数値は平均値を算出して評価した.

(2) HPLC 分析の妥当性

分析の妥当性を確認するため添加回収試験として製品

Bの100 mLにクロフィル類4種をそれぞれ0.03 ppm, 0.2 ppmになるように添加し, (1)と同様の抽出操作, HPLC分析を行った. 分析はN=3で行った.

検出限界の計算は0.01 ppm濃度の標準物質の分析においてクロマトグラムのピーク高さおよびノイズ幅を測定し, $S/N=3$ を使用して算出した. 同様に定量限界は $S/N=10$ を使用して算出した.

(3) 市販製品の照射試験

製品AおよびBを各々ガラス試験管にリパックして光照射し, 官能的に異臭が感知されるかどうか判断した.

7. pHの影響

前節5.と同様にして得たレモン懸濁液に重曹およびクエン酸を添加してpHを8段階(2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)に調整した. 次に各溶液に銅クロロフィリンナトリ

ウムを5段階濃度(無添加, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 ppm)で添加した. これらの試料に各々光照射を行った後, 揮発性成分を分析した.

実験結果および考察

1. レモン果汁への果皮添加試験

レモン果汁に対してカボス果皮懸濁液を添加し, 光照射試験を行った試料の揮発性成分を分析したGC-MS全イオンクロマトグラムから $m/z=97$ のマスキングクロマトグラムを作成し図1に示した. 同定は標準物質とのGC分析における保持時間および質量スペクトルの比較(図2)により行った. レモン果汁にカボス果皮懸濁液を添加した試料の暗所条件では劣化指標成分である1-オクテン-3-オンは検出されないのに対し, 明所条件では検出された. レモン果汁

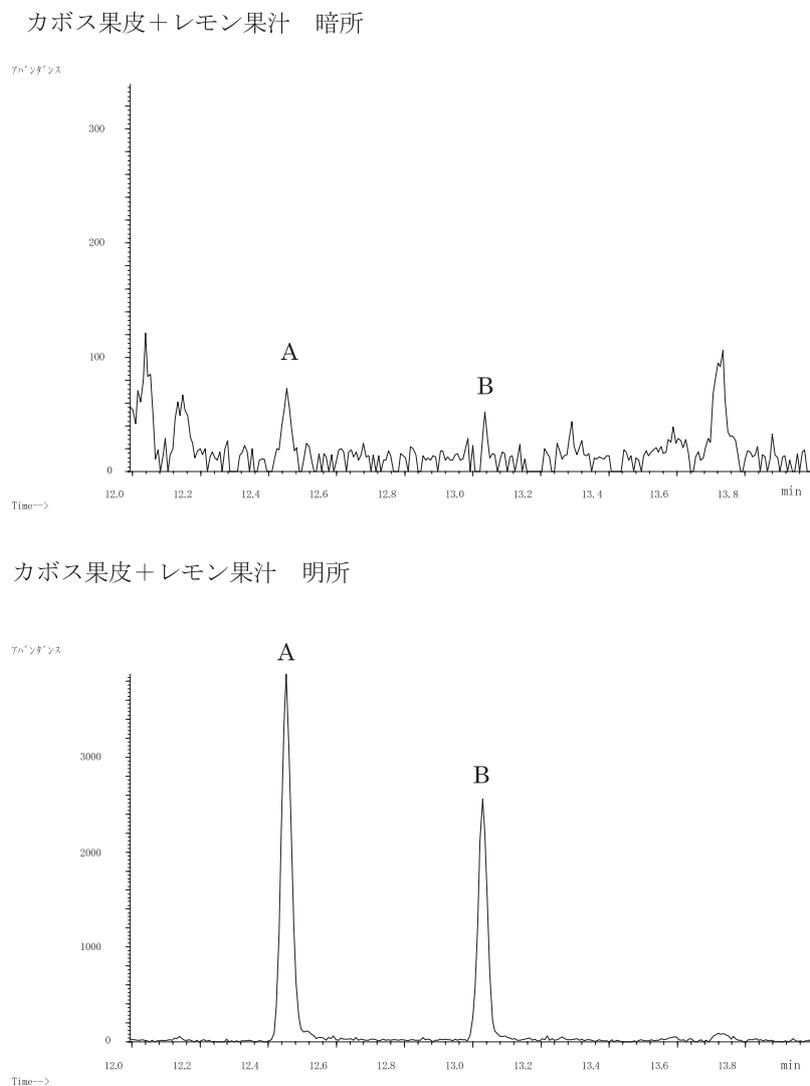
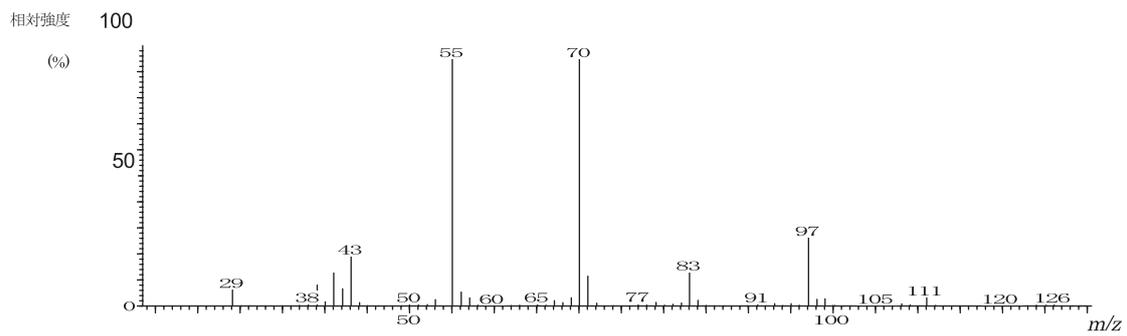
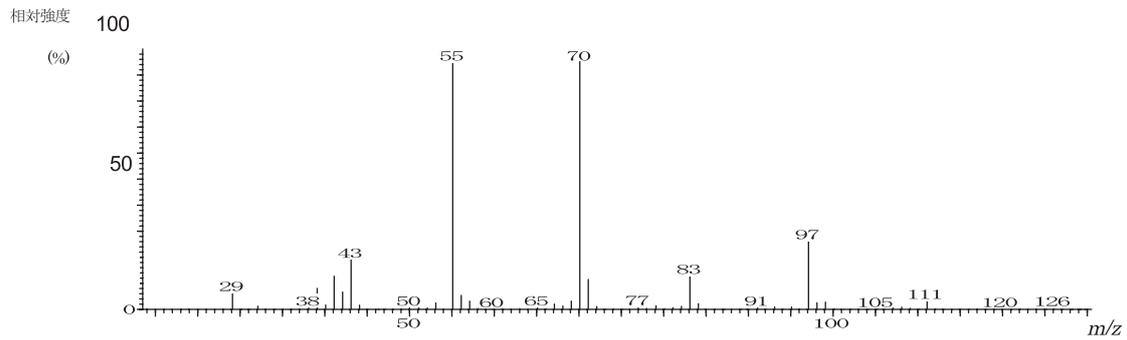
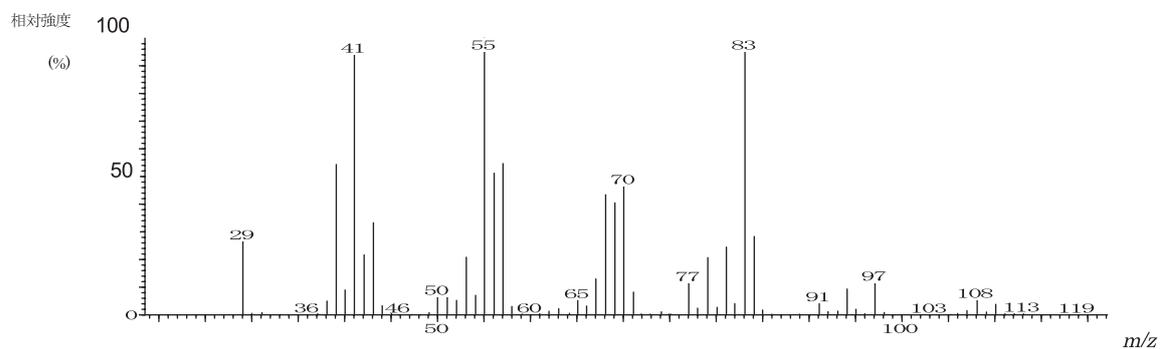
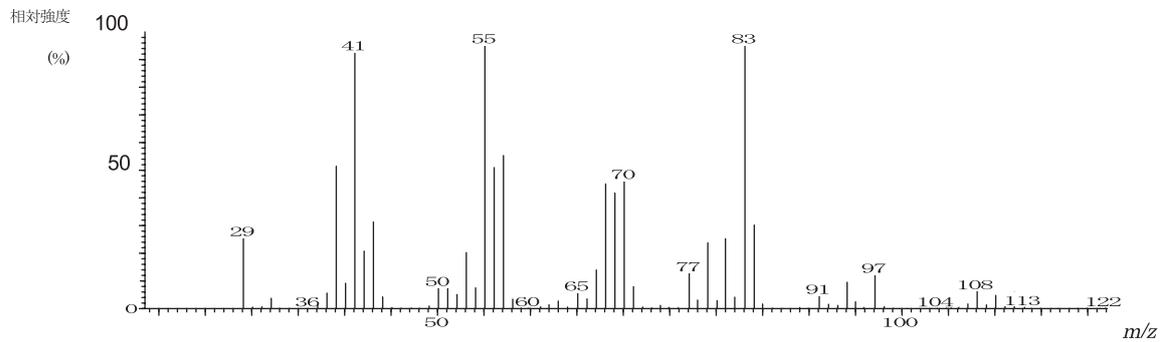


図1 レモン果汁に対するカボス果皮添加試料の照射試験結果

揮発性成分分析における $m/z=97$ のマスキングクロマトグラム. A=1-オクテン-3-オン, B=(E)-2-ヘプテナール. 上: 暗所保存, A, Bともに不検出. 下: 明所 A, Bを検出.



(i) 1-オクテン-3-オールのマススペクトル



(ii) (E)-2-ヘプテナールのマススペクトル

図2 劣化指標成分のマススペクトル

上段：該当するリテンションタイムに得られたマススペクトル，
下段：標準物質を測定したライブラリのマススペクトル

にレモン果皮懸濁液を添加した試料からは暗所条件および明所条件ともに劣化指標成分を検出しなかった。また明所条件のカボス果皮添加試料は官能的にも光劣化異臭を感知したがレモン果皮添加試料は感知しなかった。暗所条件ではいずれの試料からも光劣化異臭を感知しなかった。

以前著者らは市販柑橘飲料を用いて光劣化異臭に関する調査を行い、スタチ果汁飲料では異臭が確認できたがレモン果汁飲料では確認できなかったことを報告している¹⁴⁾。一方食用油脂においてクロロフィルの光増感作用により脂質の酸化が促進されることが知られている¹²⁾。果皮が青色のカボスやスタチの未熟果は独特の風味が好まれるため、果皮や種子由来のクロロフィルが果汁中に入ることが推測される。

2. クロロフィルの影響

暗所条件ではいずれの試料も劣化指標成分を検出しなかった。明所条件においてはクロロフィル無添加（ピーク面積 16,393）に対し、1 ppm 添加（同 121,414, 7.4 倍）、10 ppm 添加（同 277,092, 16.9 倍）と添加量に応じて劣化指標成分が増加した。クロロフィルの光増感作用により光劣化が促進されていると考えられ、光増感作用は濃度依存性を示した。特に 1 ppm までの濃度で顕著な増加が見られ、その変曲点は 0.3 ~ 0.8 ppm の間に存在することが示唆された。このことからクロロフィルの光増感作用により光劣化が促進され、極微量のクロロフィルの存在でも、柑橘果汁飲料の光劣化異臭生成リスクが高まると考えられる。

3. クロロフィル類の HPLC 分析

(1) 市販飲料中に含まれるクロロフィル量

市販香酸柑橘果汁飲料中のクロロフィル類の含有量を分析した結果、スタチ飲料においてクロロフィルは a および b ともに不検出であったが、フェオフィチン a を 0.24 ppm, b を 0.19 ppm 検出した。カボス飲料からはクロロフィル類 4 種全てにおいて不検出であった。

(2) HPLC 分析の妥当性

クロロフィル類 4 種の標準物質を HPLC 分析した結果、クロロフィル類を良好に分離でき、0.01 ppm ~ 10 ppm の範囲で良好な直線性 ($R^2=0.9999$) が得られた。この HPLC 分析の妥当性を確認するため検出限界、定量限界を求め、クロロフィル類の検出されなかった製品 B を用いて添加回収試験を行い、結果を表 1 にまとめた。添加回収試験においてクロロフィル a および b は、クロロフィルとしては検出されず、それぞれフェオフィチン a および b として検出された。クロロフィルは酸によりフェオフィチンに変化することが知られている¹⁵⁾。酸性の柑橘果汁に添加したことにより、抽出するまでの間にフェオフィチンに変化したと考えられる。クロロフィルを添加して回収されたフェオフィチンの濃度を算出し、表 1 にはその回収率を示した。フェオフィチンの添加回収率は概ね良好であった。

市販柑橘飲料中ではクロロフィルはフェオフィチンに変化していると考えられ、本法を用いて変化したフェオフィチンを抽出・測定するには妥当であると考えられた。

(3) 市販製品の光照射試験

製品 A および B に光照射したところ、フェオフィチンを含むスタチ飲料 A から異臭を感知し、カボス飲料 B からは異臭を感知しなかった。このことよりクロロフィル類の存在が光劣化異臭の生成に重要な役割を果たしていることが確認されたほか、サブ ppm オーダーの混入でもリスクがあることが分かった。

クロロフィル類は未熟柑橘果実の果皮に含まれるほか、柑橘の種子にも含まれる。よって未熟果実から搾汁する際にはクロロフィル類が混入するリスクが高い。実際市販製品よりクロロフィル類が検出されたことから、搾汁方法によっては混入しうることが確認された。PET ボトルなど透明容器を使用する場合、柑橘果汁中にクロロフィル類が存在すると光劣化リスクが高まることから、搾汁時にクロロフィル類を除去するような工夫が必要であると考えられる。

表 1 クロロフィル類の HPLC 分析の妥当性

サンプル	クロロフィル		フェオフィチン	
	a	b	a	b
検出限界 (ppm)	0.0077	0.0040	0.0107	0.0072
定量限界 (ppm)	0.0258	0.0133	0.0357	0.0240
添加回収率 (%)	0.03 ppm	99.0*	107.0*	80.7
	0.2 ppm	86.9*	88.5*	70.0

*フェオフィチン a または b としての回収率を示した。

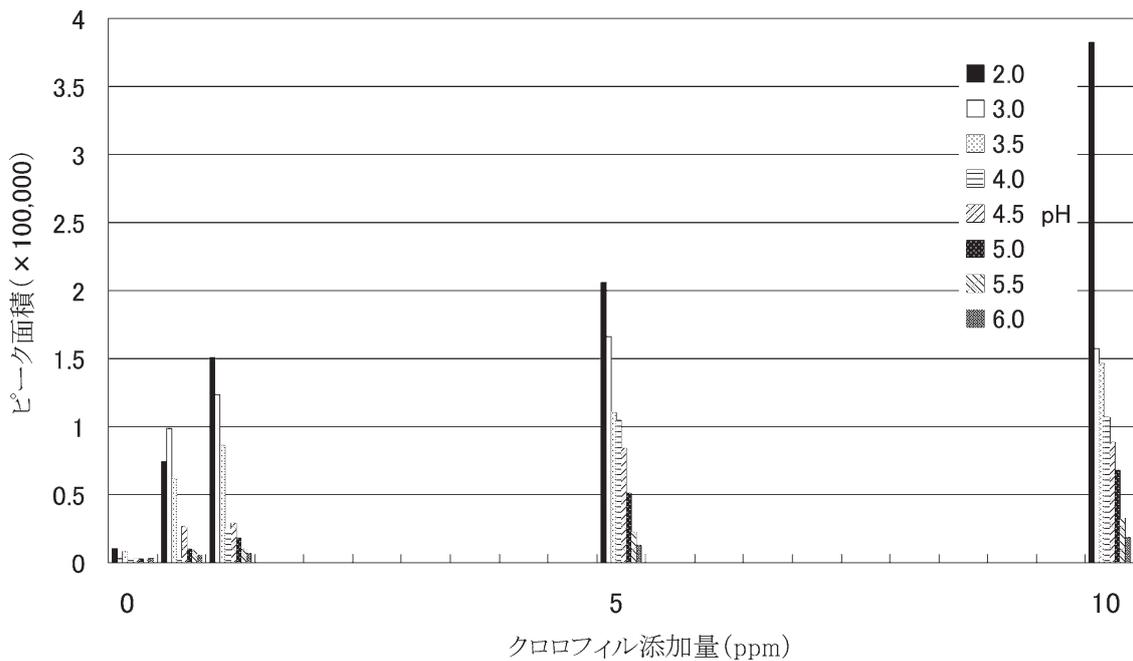


図3 レモン果汁光劣化異臭の生成に及ぼすクロロフィル添加量と pH の影響

揮発性成分の GC-MS 分析の結果, トータルイオンクロマトグラムより $m/z=97$ のイオン抽出を行い, ピーク面積を比較することにより 1-オクテン-3-オンの量を比較.

4. pH の影響

酸性条件下で pH とクロロフィル量を調整したレモン試料に照射を行い, 劣化指標成分の生成量を比較した結果を図 3 に示した. クロロフィルを 10 ppm 濃度で添加した結果より強酸性領域で劣化指標成分が多く, クロロフィルの光増感作用は強酸性領域で強くなることが示された. 逆に, 弱酸性領域ではクロロフィル量を増加させても劣化指標成分増加量は小さく, クロロフィルの光増感作用は弱いことが分かった. つまりクロロフィルの光増感作用は pH 依存性があることが示された.

従って強酸性領域ではクロロフィルの影響を強く受けて光劣化反応が進行しやすく, 逆に弱酸性領域では光劣化に対して安定であるといえる.

クロロフィルは光のない暗所では逆に抗酸化作用を示すことが知られるが¹²⁾, 柑橘果汁の光劣化防止の観点から言えば, 光が照射される条件下でも暗所下でも保存時には pH を高めにしておくことが良いと考えられる.

要 約

レモンやカボスなどの香酸柑橘果汁飲料において生じた急速に進行する光劣化異臭の生成機構を解明するため試験を行った. クロロフィル類の存在により光劣化異臭の生成が促進されたことより, クロロフィルが光増感物質として促進作用を示していることが分かった. クロロフィルの

光増感作用は濃度依存性があり, 柑橘果汁中にサブ ppm オーダーでも存在すると光劣化異臭生成リスクが高まると考えられた. 酸性条件下で pH の影響を調べたところ, クロロフィルの光増感作用は pH 依存性があり, 強酸性領域でクロロフィルの光増感作用は強くなり, 弱酸性領域では光増感作用は非常に弱いことを示した.

以上のことから, 柑橘果汁製品に透明容器を使用する場合クロロフィルの混入をできるだけ避けることが望ましく, pH が低めに設定される製品ではクロロフィル濃度を減らす方法を検討しなければならない. また, クロロフィルが存在しても酸化に対して安定な領域も存在し, 光劣化防止のためには柑橘果汁の pH を高くして保存することが有効であると認められた. 以上より光劣化異臭を防止するために, 製造時に果汁中のクロロフィル類の量と pH を厳格に管理することが求められる.

文 献

- 1) Kim, G.Y., Lee, J.H., and Min, D.B., Study of Light-Induced Volatile Compounds in Goat's Milk Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1405-1409 (2003).
- 2) Chapman, K.W., Whited, L.J., and Boor, K.J., Sensory Threshold of Light-Oxidized Flavor Defects in Milk. *J. Food Sci.* **67** (7), 2770-2773 (2002).
- 3) Shiota, M., Takahashi, N., Konishi, H., Yoshioka, T., Impact of Oxidized Off-flavor of Ice Cream Prepared

- from Milk Fat. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **81** (5), 455-460 (2004).
- 4) Hashizume, M., Gordon, M.H., and Mottram, D.S. Light-Induced Off-flavor Development in Cloudy Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9177-9182 (2007).
- 5) 梅川知洋, 蛍光灯暴露下におけるグレープフルーツ果汁飲料の金属様異臭の物質特定および前駆物質の推定, ソフト・ドリンク技術資料, **3**, 257-262 (2000).
- 6) Pfannhauser, W., Rauscher, H. and Thaller, A., Untersuchungen über Veränderungen von Orangenlimonaden-Aromastoffen während der Lagerung. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **83**, 307-314 (1987).
- 7) Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N., and Kishino, K., Changes of Lemon Flavor Components in an Aqueous Solution during UV Irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 463-466 (1997).
- 8) Masuda, H., Ueno, T., Muranishi, S., Irisawa, S., Ho, C-T., Inhibition of Citral Deterioration. *ACS Symposium Series*, **807**, 176-187 (2002).
- 9) Kimura, K., Iwata, I., Relationship between acidcatalyzed cyclization of citral and deterioration of lemon flavor. *Agric. Biol. Chem.* **46** (5), 1387-1389 (1982).
- 10) Kimura, K., Nishimura, H., Iwata, I., Mizutani, J., Deterioration mechanism of lemon flavor. 2. Formation mechanism of off-odor substances arising from citral. *J. Agric. Food Chem.* **31** (4), 801-804 (1983).
- 11) Clark, Jr. B. C. and Chamblee, T. S., Acid-catalyzed reaction of citrus oils and other terpene-containing flavors, "Off-flavor in foods and beverages" Edited by Charalambous, G., (Elsevier, Amsterdam, Netherlands) pp. 229-285 (1992).
- 12) 薄木理一郎, 食品成分の光劣化メカニズム, 「食品の光劣化防止技術」, 第1版, 津志田藤二郎, 寺尾純二, 平田孝編, (Science Forum, 東京), pp. 29-35 (2001).
- 13) 熊沢賢二, 和田善行, 増田秀樹, カンキツ果汁の香気成分と加熱による香気変化, 食科工, **54** (6), 266-273 (2007).
- 14) 奈賀俊人, 隅谷栄伸, PET ボトル詰柑橘飲料の光劣化異臭, 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, **27**, 65-69 (2009).
- 15) Moberg, L., Karlberg, B., Blomquist, S., Larsson, U., Comparison between a new application of multivariate regression and current spectroscopy methods for the determination of chlorophylls and their corresponding pheopigments. *Analytica chimica acta*, **411**, 137-143 (2000).