

カンキツ果汁の品質化学的研究

II. カンキツ果汁の褐変に及ぼすアスコルビン酸、 糖類およびアミノ酸の影響

李 忠富・沢村正義・余 小林・楠瀬博三

(農学部農産製造学研究室)

Chemical Studies on the Quality of Citrus Juice

II. Effects of Ascorbic Acid, Sugars and Amino Acids on the Browning of Citrus Juices

Zhong-Fu LI, Masayoshi SAWAMURA, Xiaolin YU and Hirozo KUSUNOSE

Laboratory of Chemistry and Technology of Agricultural Products, Faculty of Agriculture

Abstract: The browning of 6 kinds of citrus juices (*yuzu*, lemon, *Satsuma* mandarin or *unshiu*, *hassaku*, *ponkan* and pummelo) during storage was investigated by addition of several components involving furfural (FUR) and 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). The results described below were similar to each kind of citrus juices.

The browning level increased greatly with the addition of dehydroascorbic acid (DHA) to the juices as compared with that of ascorbic acid (AA), while there was a great increase of FUR by the addition of AA, but little increase by DHA. The browning level of the juice induced by the addition of FUR was only one tenth that by the addition of AA. Similar behaviors were observed in all kinds of juices adjusted to pH 2.1. It was, furthermore, demonstrated that there were few effects of FUR and HMF on the browning, as shown from the result of the experiment on added sugars and amino acid to the juices.

緒 言

非酵素的褐変はカンキツ果汁製品の品質低下の主要な原因で、とくに室温で貯蔵する場合、褐変の進行に伴ってしばしば異臭を生ずることが知られている。これまでカンキツ果汁の褐変にアスコルビン酸 (AA)、糖類およびアミノ酸などの果汁成分の関与が報告¹⁻⁵⁾されており、また、標準系における AA の分解およびデヒドロアスコルビン酸 (DHA) とアミノ酸との反応による褐色色素の生成機構^{6,7)}ならびに糖とアミノ酸との褐変物質の生成反応^{8,9)}などに関して一連の研究がなされてきた。さらに、KURATA ら¹⁰⁻¹²⁾は AA の分解に関してモデル系での酸化および非酸化的分解物について検索し、それらと褐変との関連性などについて考察を行なっている。最近、著者ら^{13,14)}はカンキツ果汁の褐変と AA の分解により生成されるフルフラール (FUR) および糖の分解により生ずる 5-ヒドロキシメチルフルフラール (HMF) との関係性を明らかにするために、まず、それ

らの正確な定量法を確立した。その上で化学量論の見地から、ユズ果汁の褐変と FUR および HMF との関連性について検討した結果、それらは褐変の主要な原因でないことを明らかにした。しかしながら、FUR および HMF がアミノ酸と反応して褐色のメラノイジン色素が生成されることが報告^{4, 15, 16)}されており、また、AA の非酸化的分解物質に直接起因する褐変は比較的小さいが、酸化的分解経路との共存によって、褐変は著しく促進されること¹⁰⁾から、果汁等の比較的 pH の低い食品を大気中に放置した場合は酸化および非酸化的分解が同時に進行するので、この促進効果が関与すると考えられてきた。⁶⁾以上のことから、カンキツ果汁の貯蔵中における AA の非酸化的分解によって生成された FUR が AA の酸化的分解による褐変反応にどのように影響しているか、または FUR および HMF の重合あるいはアミノ酸などの果汁成分との反応が果汁の褐変にどの程度影響を与えるかを確かめる必要があると考えられる。そこで本研究は、前報¹⁴⁾に引き続き、数種類のカンキツ果汁に FUR, HMF および数種の果汁成分を添加し、それら成分の褐変に及ぼす影響について調べたものである。

実験材料および方法

1. 実験材料 試料として高知県果樹試験場に栽培されている次の 6 品種のカンキツ果実を使用した。ユズ: *Citrus junos* Tanaka, ウンシュウ: *C. unshiu* Marcov., ハッサク: *C. hassaku* Hort. ex Tanaka, ブンタン: *C. grandis* Osbeck forma Tosa-buntan, レモン: *C. limon* Burm. f., cv Lisbon, ポンカン: *C. reticulata* Blanco, cv Morita-ponkan。

2. 試料の調製 上記の 6 種類のカンキツ果実それぞれ約 5 kg を用いて剥皮した後、果肉をハンドプレスラーで搾汁した。果汁はナイロン網 (76メッシュ) でろ過した後、3500 rpm, 15 min 遠心分離し、その上澄をさらに綿布でろ過したものを実験に供した。

3. デヒドロアスコルビン酸の調製 DHA は前報¹⁴⁾と同様、還元型アスコルビン酸を用いて臭素で調製した。

4. 果汁の前処理および貯蔵方法 果汁の pH の調整には 2 N 塩酸または 2 N 水酸化ナトリウムを用いた。添加実験の操作手順は次の通りである。すなわち、AA, DHA, FUR, HMF, 糖類およびアミノ酸などの化合物をそれぞれ果汁中に添加した後、10ml ずつバイアル瓶 (10ml 容) に入れ、ゴム栓をし、アルミキャップで密栓をした後、80°C, 30分殺菌した。貯蔵は 37±0.1°C で行った。

5. 測定方法 褐変度の測定は MEYDAV ら¹⁷⁾の方法に準じて行った。FUR および HMF の定量は既報¹⁸⁾の高速液体クロマトグラフィーによって行った。

結 果

1. AA および DHA による果汁の褐変促進と FUR および HMF 生成量との関係 AA および DHA の濃度を 0.1% となるように種々のカンキツ果汁に添加し、貯蔵中における果汁の褐変と FUR および HMF の生成に及ぼすそれらの影響を調べ、無添加の場合と比較した結果を Table 1 に示す。供試された 6 種のカンキツのうち、ウンシュウなどの生食用カンキツの果汁の pH が 3.0 以上に対して、酸用カンキツであるユズおよびレモンにおいては、pH が 2.6 以下であり、また、FUR の生成量が 2~4 倍高かった。低い pH で AA の非酸化的分解がより進行しやすいことが示された。褐変度には pH 3 以上の 4 種類のカンキツ果汁の間に大きな差がみられなかったが、一方、酸用カンキツ間ではユズ果汁の褐変度がレモン果汁の 2 倍以上高く、ユズ果汁にはレモン果汁より褐変を引

Table 1. Effect of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) on browning and formation of furfural (FUR) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various juices

Juice	pH	Control			+ AA (0.1%)			+ DHA (0.1%)		
		Browning*	FUR**	HMF**	Browning	FUR	HMF	Browning	FUR	HMF
<i>Yuzu</i>	2.56	0.240	72.8	187	0.370	815	150	0.460	125	163
<i>Lemon</i>	2.14	0.110	87.8	289	0.250	1196	237	0.260	138	286
<i>Unshiu</i>	3.48	0.180	16.3	88.8	0.310	167	75.9	0.490	16.6	88.2
<i>Hassaku</i>	3.00	0.210	23.8	221	0.270	384	168	0.450	22.4	201
<i>Ponkan</i>	3.44	0.180	27.0	117	0.290	182	92.9	0.510	32.3	102
<i>Pummelo</i>	3.06	0.200	37.1	203	0.270	389	186	0.560	38.7	218

* : Browning level was measured at OD₄₂₀

** : The concentration of furfural and 5-hydroxymethylfurfural was given in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.
The juice samples were stored for 4 weeks at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

き起こす成分が多く含まれていることが推察される。

一方、0.1%のAAおよびDHAの添加では、両方とも褐変促進がみられたが、AAに比べ、DHAによる褐変度の増大が著しく大きかった。一方、FURの生成量は無添加の場合に比べ、AA添加の場合、10倍程増えたが、DHAの添加ではユズおよびレモン果汁において若干の増加がみられたものの、他の4種類の果汁においてはほとんど変化が認められなかった。HMFの生成は、無添加の場合に比べ、AAの添加では若干低下する傾向がみられたが、DHAの添加ではほとんど影響が認められなかった。

2. カンキツ果汁の褐変に及ぼすAA, FURおよびHMFの影響 AA, FURおよびHMFをカンキツ果汁にそれぞれ同一モル濃度になるように添加し、それらの褐変に及ぼす影響をTable 2に示す。無添加の場合に比べ、比較的高濃度のAA, FURおよびHMFの添加ではいずれも褐

Table 2. Effect of AA, FUR and HMF on browning of various juices

Juice	Control	Browning OD ₄₂₀					
		+ AA* (M)		+ FUR* (M)		+ HMF* (M)	
		5×10^{-4}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
<i>Yuzu</i>	0.160	0.190	0.330	0.170	0.200	0.170	0.280
<i>Lemon</i>	0.050	0.090	0.190	0.080	0.110	0.090	0.160
<i>Unshiu</i>	0.100	0.180	0.220	0.140	0.170	0.140	0.170
<i>Hassaku</i>	0.110	0.170	0.230	0.150	0.170	0.170	0.190
<i>Ponkan</i>	0.100	0.170	0.250	0.140	0.160	0.140	0.190
<i>Pummelo</i>	0.110	0.190	0.200	0.140	0.180	0.150	0.230

* : See Table 1 for the abbreviations.

The juice samples were stored for 2 weeks at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

変度の増大がみられた。しかしながら、本実験の添加濃度の範囲ではFURおよびHMFによる褐変度の増大はAAより低く、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ のFURの添加では $5 \times 10^{-4}\text{M}$ のAAの添加濃度にしか相当せず、FURの褐変に及ぼす影響が同一モル濃度のAAの1/10程度であることがわかった。

3. 同一 pH における種々のカンキツ果汁の褐変度, FUR および HMF の生成量の比較 供試した6種類のカンキツ果汁の pH をすべてレモン果汁 (pH 2.1) に合わせて調整し, 同一 pH におけるそれぞれの果汁の褐変度と FUR および HMF の生成量について調べた。Table 3 に示すように, 同じ pH においても, 褐変度と FUR および HMF の生成量には果汁の種類によってかなり

Table 3. Effect of AA on browning and formation of FUR and HMF in various juices adjusted to pH 2.1

Juice	Control			+ AA* (0.5%)		
	Browning	FUR*	HMF*	Browning	FUR	HMF
<i>Yuzu</i>	0.190	77.6	271	0.450	3905	215
<i>Lemon</i>	0.110	72.8	300	0.440	4438	229
<i>Unshiu</i>	0.080	19.0	777	0.310	2775	996
<i>Hassaku</i>	0.130	34.7	1025	0.340	2494	1108
<i>Ponkan</i>	0.080	32.0	1004	0.290	2991	889
<i>Pummelo</i>	0.100	50.9	947	0.270	2788	1240

* : See Table 1 for the abbreviations.

The concentration of FUR and HMF was given in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

The juice samples were stored for 3 weeks at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

の差がみられた。すなわち, 他の果汁に比べ, ユズ果汁の褐変度が著しく高く, また, ユズおよびレモンでは共に FUR および HMF の生成量が他の果汁に比べて特徴的で, FUR で1.5~4倍多く, HMF で $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ 少なかった。さらに, AA (0.5%) を添加した場合, FUR の増加が著しく各果汁で50~150倍に達した。この場合も同様に, ユズおよびレモンは他の果汁より褐変度および FUR 生成量が高く, HMF 量が低かった。

4. 糖およびアミノ酸の影響 カンキツ果汁中に含まれている主なアミノ酸を考慮し, グルコースと組み合わせてユズ果汁中に添加して, それらのアミノカルボニル反応による褐変促進について調べた (Table 4)。グルコース (5%) のみを添加した場合, 無添加の場合とほとんど差が認め

Table 4. Effect of amino acids and glucose on browning of yuzu juice

Amino acid	Browning (OD ₄₂₀)	Amino acid	Browning
Control 1*	0.190	Phe	0.220
Control 2**	0.220	Pro	0.220
Gly***	0.240	Asp	0.210
Ala	0.220	Glu	0.220
Val	0.210	Arg	0.220
Ser	0.220	Gys	0.210
Tyr	0.220	Asn	0.230

* : Neither amino acid nor glucose was added.

** : Five % of glucose were added only.

*** : Both each amino acid (0.1%) and glucose (5%) were added to yuzu juice.

The mixture was stored for 3 weeks at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

られなかった。また、種々のアミノ酸 (0.1%) とグルコースを同時に添加した場合、アミノ酸の種類によって若干の褐変促進がみられたが、全般的にみてそれほど大きな影響は認められなかった。

一方、果汁中にもっとも多く含まれているアミノ酸であるアスパラギン酸の濃度を0.1, 0.25および0.5%とし、サッカロース (5%) と同時にユズ果汁に添加して、褐変度およびHMFの生成に及ぼす影響を調べた結果を Fig. 1 に示す。無添加の場合に比べ、サッカロースの添加によって、

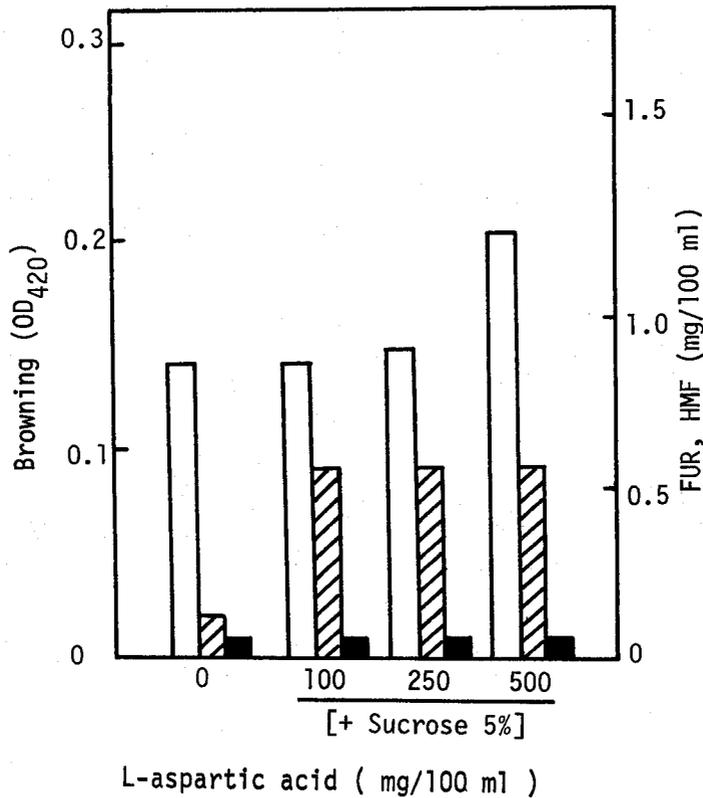


Fig. 1 Effect of sucrose and L-aspartic acid on browning, and formation of FUR and HMF in yuzu juice.

□ Browning level, ▨ HMF, ■ FUR. See Table 1 for the abbreviations.

HMFの増大がみられた。また、0.1%濃度のアスパラギン酸と同時に添加した場合、褐変度の増大はみられなかったが、それより濃度が高くなると褐変促進がみられた。それはアミノカルボニル反応によるものと考えられる。

5. 加熱による影響 加熱殺菌などの前処理によるユズ果汁の吸光度、AA、FUR および HMF の変化を Table 5 に示す。80°C、30分間の加熱殺菌において、420 nm における吸光度の増大はまったくみられなかったが、AA の減少と FUR および HMF の生成がわずかながら認められた。

Table 5. Changes of absorbance and AA, FUR and HMF contents in the yuzu juice samples before and after heating

Treatment	OD ₄₂₀	AA*	FUR*	HMF*
Yuzu juice				
Control	0.080	57.8	0	0
Heated**	0.070	52.8	10.5	112.5
Yuzu juice + AA***				
Control	0.075	179.8	0	0
Heating	0.068	168.3	24.6	113.1

* : See Table 1 for the abbreviations.

The concentration of AA, and FUR and HMF were given in mg/100 ml and μ g/100 ml, respectively.

** : The samples were heated for 30 min at 80 °C.

*** : The concentration of AA added to the juice was 100mg/100 ml.

考 察

本実験に用いた6種類のカンキツ果汁の添加実験において、これまでのユズ果汁についての報告^{14,16)}と同様に、AAに基づく褐変反応は主としてDHAによるものであり、FURが主要な原因でないことが確認された。

AAおよびDHAの添加実験(Table 1)では、いずれも褐変促進が認められた。しかしながら、AAの添加によるFURの生成量がDHAのそれより6~17倍も多かったが、褐変度がいずれもDHAの方が高かったこと、また、1モルのAAから1モルのFURが生成されるとして、等モルのAAおよびFURを添加した場合でも、供試された6種類のカンキツ果汁において、いずれもFURによる褐変への影響がAAのそれよりも小さかったことからFURが褐変の主な要因とは考え難い。なお、FURおよびHMFの添加による褐変度の若干の増大は、それらとアミノ酸との反応により生成された褐色物質によるものと考えられる。¹⁶⁾しかし、Table 2において、2週間程度の貯蔵では、 5×10^{-3} Mの高濃度のFURの添加による果汁の褐変度の増大はコントロールの吸光度を差し引くと、わずか0.06前後にすぎず、また、4週間貯蔵した果汁に生成されたFURの量が 10^{-6} M以下とかなり少ないこと(Table 1)、本実験の加熱殺菌などの前処理段階ではすでに少量のFURの生成がみられたこと(Table 5)から、貯蔵中に生成された少量のFURは褐変にほとんど影響していないものと考えられる。

供試した6種類のカンキツ果汁中の総AA含量は42.3~53.7mg/100mlであった。褐変はすべてAAによるものとすれば、100mg/100mlのAAの添加では、その褐変度が無添加の場合の2倍以上になることが予測される。しかしながら、本実験の結果では、100mg/100mlのAAの添加による褐変度の増大はレモンの場合を除いて無添加の場合の1.5倍前後しかみられず、褐変度とAA濃度との間に比例関係が認められなかった。このように、カンキツ果汁の褐変はAAだけによるものではないことが明らかである。AAの以外には、濃厚レモン果汁^{3,4)}においてみられたように、糖類の分解により生成される3-デオキシグルコソンおよびHMFとアミノ酸とのアミノカルボニル反応による褐色物質の生成反応が褐変の原因の一つとして挙げられる。本実験において、100mg/100ml程度のアミノ酸とグルコースおよびサッカロースとの組み合わせではほとんど影響がみられなかったものの、比較的高濃度のアミノ酸とサッカロースの添加では褐変度の増大がみられた。これは濃

厚レモン果汁の実験結果と一致するものと考えられる。しかし、本実験に用いた果汁の糖度およびアミノ酸の濃度は比較的低位のため、このような条件下で生成された少量のHMFは褐変への寄与が非常に小さいものと思われる。なお、長期間にわたって貯蔵を行う場合、3-デオキシグルコソソおよびHMFは果汁中に多く蓄積されると、カンキツ果汁の褐変因子の一つとなる可能性も考えられる。

以上の知見から、カンキツ果汁中におけるAAの分解は、基本的にはモデル系^{6,10,11)}でみられた結果と同様に、褐変物質の生成反応はAAの初期段階の酸化分解物質の重合あるいはアミノ酸とのアミノカルボニル反応によるもので、非酸化的分解の生成物であるFURはほとんど関与していないものと思われる。したがって、今後カンキツ果汁の褐変に及ぼす酸素の影響について調べる必要があるものと思われる。

要 約

6種のカンキツ果汁(ユズ, ウンシュウ, ハッサク, ブンタン, レモン, ポンカン)にFURとHMFおよび数種の果汁成分を添加し, それら成分と褐変との関連性を検討した。供試した各種カンキツ果汁では, いずれもほぼ同様な結果を得た。

0.1% AAおよびDHAを果汁に添加すると, AAに比べDHAによる褐変度の増大が著しく, 一方, FURの生成量はAAで著しく, DHAではほとんど増加が認められなかった。同一モル濃度のAAおよびFURを果汁に直接添加した場合, FURによる果汁の褐変度の増大はAAのその1/10程度しかなかった。果汁のpHをすべて同一(pH 2.1)にした場合も同様の傾向が認められた。また, 糖, アミノ酸の添加実験の結果から, HMFの褐変への寄与は非常に小さいことが示された。

本実験の遂行にあたり, 貴重なご助言をいただいた西南学院大学高桑正義教授に謝意を表します。また, カンキツ試料のご供与をいただいた高知県果樹試験場並びに高知県北川村農業協同組合に感謝致します。

文 献

- 1) NAGY, S.: Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 8-18 (1980).
- 2) ROBERTSON, G.L. and SAMANIEGO, C. M. L.: Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *J. Food Sci.*, **51**, 184-187 (1986).
- 3) 加藤博通・桜井芳人: 果汁製品の褐変機構に関する研究(第2報), 濃厚レモンジュースの褐変に対する各種化合物添加の影響. *日食工誌*, **11**, 313-316 (1964).
- 4) 加藤博通・桜井芳人: 果汁製品の褐変機構に関する研究(第3報), クエン酸-蔗糖系における褐変機構. *農化*, **38**, 536-541 (1964).
- 5) KURATA, T., FUJIMAKI, M. and SAKURAI Y.: Red pigment produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with α -amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1471-1477 (1973).
- 6) 倉田忠男: L-アスコルビン酸の分解および着色反応機構. *農化*, **50**, 209-216 (1976).
- 7) 林建樹: 酸化型アスコルビン酸とアミノ酸の反応による新しい遊離基化合物の生成と褐変化反応. *農化*, **58**, 53-59 (1984).
- 8) 山口直彦・藤巻正生: 還元糖とアミノ酸とのかっ変反応物に関する研究(第13報), かっ変反応物から抗酸化力の強いメラノイジンの単離とその抗酸化性. *日食工誌*, **20**, 507-512 (1973).

- 9) 山口直彦・藤巻正生:還元糖とアミノ酸とのかっ変反応物に関する研究(第15報), 精製メラノイジンと各種トコフェロール同族体との抗酸化力の比較および相乗性.日食工誌, **21**, 13-18 (1974).
- 10) KURATA, T., WAKABAYASHI, H. and SAKURAI, Y.: Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction (part I), browning reactivities of L-ascorbic acid and dehydro-ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 101-105 (1967).
- 11) KURATA, T. and SAKURAI, Y.: Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of non-enzymic browning reaction (part II), non-oxydative degradation of L-ascorbic acid including the formation of 3-deoxy-L-pentosone. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 170-176 (1967).
- 12) KURATA, T. and SAKURAI, Y.: Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of non-enzymic browning reaction (part III), oxidative degradation of L-ascorbic acid (degradation of dehydro-L-ascorbic acid). *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 177-184 (1967).
- 13) LI, Z.F., SAWAMURA, M. and KUSUNOSE, H.: Rapid determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in processed citrus juices by HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2231-2234 (1988).
- 14) 李忠富・沢村正義・楠瀬博三:ユズ果汁の褐変とフルフラールおよび5-ヒドロキシメチルフルフラールについて.日食工誌, **36**, 127-131 (1989).
- 15) GRAUMLICH, T. R., MARCY, J.E. and ADAMS, J.P.: Aseptically packaged orange juice and concentrate; a review of the influence processing and packaging conditions on quality. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 402-405 (1986).
- 16) HANDWERK, R. L. and COLEMAN, R.L.: Approaches to citrus browning problem (a review). *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 231-236 (1988).
- 17) MEYDAV, S., SAGUY, I. and KOPELMAN, I. J.: Browning determination in citrus products. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 602-604 (1977).
- 18) 沢村正義・李忠富・楠瀬博三:ユズ果汁の褐変に関する研究,日本農芸化学会昭和63年度大会講演要旨集, p. 206, 名古屋 (1988).

(平成元年9月5日受理)

(平成元年12月27日発行)