

イソマルトース分析による果実飲料の真正性判定法の開発

木村 康晴、諸橋 保、平岡 久明

Yasuhare Kimura, Tamotsu Morohashi, Hisaaki Hiraoka

要 約

「加糖」と表示の無い果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュース並びに濃縮果汁、異性化液糖及び青果の搾汁中のイソマルトースを測定して、その含有量から「加糖」と表示の無い果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュース中に混入した異性化液糖の判定ができるかを検討した。

その結果、イソマルトース濃度が 100 mg/L 以上の果実種を除いた果実種からなる果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュース (n=125) 並びに濃縮果汁を果実飲料品質表示基準(平成 12 年 12 月 19 日 農林水産省告示第 1683 号)に従って希釈調製したジュース (n=46) の 171 試料から得られたイソマルトース濃度の平均値及び標準偏差はそれぞれ 16.4 及び 13.7 mg/L であり、正規 QQ (分位数-分位数) プロットで正規性を示した対数変換値から導いた [平均値 + 3 σ] 値は 89.5 mg/L であった。一方、異性化液糖のイソマルトース濃度の平均値及び標準偏差はそれぞれ 8971.4 及び 2819.1 mg/L であった。糖用屈折計示度 6、7、8 及び 9 °Bx の果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュースの糖用屈折計示度の 10 %が異性化液糖に置換されたときの異性化液糖由来のイソマルトース濃度はそれぞれ 72.7、84.8、96.9 及び 109.0 mg/L と算出できた。よって、異性化液糖の混入量が 10 %以上あれば、糖用屈折計示度 8 °Bx 以上の果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュースでその混入を判定できることが示された。

1. はじめに

果実飲料に添加される異性化液糖は糖度の調整が目的であり、果汁入り飲料を除く果実飲料に添加した場合には商品名の近接した箇所に括弧を付して「加糖」と表示することが義務付けられている。

果実ジュースの中で C3 植物由来のオレンジジュース、りんごジュース等の数種については、炭素安定同位体比による C4 植物由来物質の混入を判定する方法が報告されており、農林水産消費安全技術センターの市販品検査にも活用されている。しかし、炭素安定同位体比を用いた果実ジュースの真正性判定において、多くの果実種に対応するには果実毎の基準値策定に多大な労力が必要であり、更に 2 種類以上の果実の搾汁又は還元果汁を混合

(独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター

した果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュースの真正性の判定は難しいと考えられる。一方、イソマルトースは、澱粉から異性化液糖を製造する際に生成される物質の1つであり、Low ら¹⁾ よりりんごジュースの真正性を判定する方法として報告されている。よって、この方法の適応範囲をりんごジュースだけでなく、多くの果実ジュース、果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュース（以下「果実ジュース等」という。）に広げることができれば、果実飲料の真正性の判断方法として実用性が高い。

本調査研究では、異性化液糖、原料果実、果汁ジュース等中に含まれるイソマルトースをガスクロマトグラフ（GC）で定量し、イソマルトース量により異性化液糖の混入の判別が可能かを検討した。

2. 実験方法

2. 1 試薬及び装置

水は Milli-Q purification system（Millipore 社）で処理したものを用いた。特に指定した以外の試薬は関東化学社の試薬特級を用いた。

イソマルトース標準原液及び標準液の調製溶液は、1 L 全量フラスコにクエン酸 10 g 及びショ糖 100 g を入れて 800 mL の水を加えて攪拌し内容物の溶解後、更に標線まで水を加えて調製した。イソマルトース標準原液は 100 mL 全量フラスコにイソマルトース（研究用、林原生物科学研究所社）100.0 mg を正確に量り取り、調製溶液 80 mL を加えて攪拌し内容物の溶解後、更に標線まで調製溶液を加えて 1000 mg/L を調製した。イソマルトース標準液は、100 mL 全量フラスコにイソマルトース標準原液を個々に 0.0、2.5、5.0 及び 10.0 mL を量り取り、標線まで調製溶液を加えて、それぞれ 0.0、25.0、50.0 及び 100.0 mg/L を調製した。

シリル化誘導試薬は、20 mL 全量フラスコに N-トリメチルシリルイミダゾール（GC 用、東京化成工業社）4.0 mL を正確に入れ、10 mL 程度のピリジンを加えて攪拌し更に標線までピリジンを加えて調製した。

GC 装置は、5890 ガスクロマトグラフ・システム（Agilent Technologies 社）を用いた。GC 分析は、フーズド・シリカ・キャピラリー・カラム（DB-5, 30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Agilent Technologies 社）で行った。キャリアーガス及びメイクアップガスはヘリウムを用いてそれぞれ線速度 27 cm/s 及び流量 30 mL/min に調整し、注入量は 2.0 µL でスプリットレス・モード（90 s でバルブを閉じる。）で行った。検出器は FID を用いて、空気及び水素はそれぞれ 450 mL/min 及び 40 mL/min の流量とした。注入口及び検出器の温度はそれぞれ 250 °C 及び 300 °C で、カラム温度条件は初期温度 210 °C で 15 分間保持し、260 °C まで 1 °C/min で昇温し更に 290 °C まで 6 °C/min で昇温し 20 分間保持した。

2. 2 試料

本研究には、果実ジュース 25 果実種 99 試料、果実ミックスジュース 31 試料、果実・野菜ミックスジュース 9 試料、濃縮果汁 8 果実種 52 試料、砂糖混合異性化液糖を含む異性化液糖（以下「異性化液糖」という。）52 試料、青果の搾汁 8 試料を用いた。

試験に供した果実飲料は、全て市場から、表示に「ストレート」又は「濃縮還元」の記載があり「加糖」の記載が無い果実ジュース等を購入した。果実ジュースの果実種は、オレンジ（試料数 19、以下同じ。）、みかん類としてポンカン（1）、レモン（2）、りんご（16）、ぶどう（16）、パインアップル（9）、その他として柑橘類で甘夏（1）、清見（1）、シークワサー（2）、デコボン（2）、夏みかん（1）、はるみ（1）及びライム（1）、ベリー類でブルーベリー（4）、ブラックマルベリー（1）及びラズベリー（1）、他にアセロラ（1）、ガマズミ（2）、キウイ（1）、さくらんぼ（1）、ザクロ（4）、梨（1）、マルメロ（1）、マンゴー（1）及びブラ・フランス（9）の 25 種類であった。

なお、果実ジュース以外の果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュースに含まれていた原料は、アスパラガス、アロニア、いよかん、カシス、かぼちゃ、カムカム、カリフラワー、キャベツ、グアバ、クランベリー、クレソン、セロリ、にんじん、パセリ、パッションフルーツ、バナナ、ピーマン、プルーン、ブロッコリー、ほうれん草、ラディッシュ、ローズヒップ及び三つ葉の 23 果実種等であった。

濃縮果汁 52 試料及び異性化液糖 52 試料は、製造業者又は輸入業者から入手した。濃縮果汁の果実種はオレンジ（7）、うんしゅうみかん（13）、グレープフルーツ（4）、レモン（3）、りんご（4）、ぶどう（7）、パインアップル（6）及びもも（8）の 8 種類であった。

青果のアセロラ（2）、さくらんぼ（2）、パインアップル（2）及びマンゴー（2）は市場から購入した。

2. 3 試料の前処理及びイソマルトースの測定

濃縮果汁はまず果実飲料品質表示基準の別表 3（レモンの場合は別表 4）に従って水で希釈したジュース（以下「還元濃縮果汁ジュース」という）に調製した。あらかじめ振り混ぜて均一化した果実ジュース等及び還元濃縮果汁ジュースは、その 40 mL を 50 mL 遠心管に入れて室温で遠心分離（2000 × g, 15 分間）してシリル化に供する試料溶液とした。青果の搾汁はガーゼで裏ごし後その 5 mL を 10 mL 遠心管に入れて同様に遠心分離して試料溶液を調製した。異性化液糖は 40-60 °C の水浴中でガラス棒を用いて均一化し室温に放冷後その 0.3 g を水 4 mL で 5 mL ビーカーに移して混合した。次にそのビーカーの内容物を 10 mL 全量フラスコに移して水 2 mL で 2 回、ビーカー内を洗浄しその洗液を先の全量フラスコに合わせて混合して、更に標線まで水を加えて試料溶液を調製した。

試料溶液 50 µL を 1.5 mLGC オートサンプラーバイアルに正確に量り取り冷凍庫で凍結後、4 °C で 1 時間凍結乾燥（DRZ350WA、アドバンテック社）した。凍結乾燥した試料にシリル化誘導試薬 0.5 mL を加えてバイアルの栓をした後、75 °C で 30 分間加熱して誘導化反応を行った。

シリル化したバイアルの内容物中のイソマルトース分析は、GC-FID によってそれぞれのエピマーのクロマトグラムのピーク面積値を合わせて定量値を算出した。

2. 4 真正性判定のためのデータ処理方法

果実ジュース等及び還元濃縮果汁ジュース中のイソマルトース濃度分布は、原料青果の熟度又は果実種の相違等から裾広がりとなることが考えられるので、果実ジュース等及び還元濃縮果汁ジュースから得られた各イソマルトース値を対数変換し、その正規性をみた

ところ、正規 QQ プロットから正規性が示された。よって、データ変換の有効性が確認されたので、果実ジュース等及び還元濃縮果汁ジュース中のイソマルトース濃度から真正性判定するための基準となる濃度を推定するために、果実ジュース等に含まれているイソマルトース濃度範囲の算出を行った。

なお、イソマルトースが不検出の試料の場合には濃度を 0.0 mg/L とし、更に対数変換の際には個々のイソマルトース濃度に正の数を加えてから行った。

3. 結果及び考察

3. 1 果実ジュース等、還元濃縮果汁ジュース及び異性化液糖中のイソマルトース濃度

Low ら¹⁾及びLow²⁾の方法において、シリル化に供する試料溶液の糖用屈折計示度及び容量はそれぞれ 5.5 °Bx 及び 100 µL であった。本法では、果実ジュース等 139 試料の糖用屈折計示度が 11.7 ± 2.7 °Bx であったことから、シリル化に供する試料溶液量を 50 µL とし、Low ら¹⁾及びLow²⁾の方法の試料溶液中の糖用屈折計示度に近づけて GC に供するための前処理を行った。

果実ジュース、果実ミックスジュース、果実・野菜ミックスジュース及び還元濃縮果汁ジュース中のイソマルトース濃度は、それぞれ 46.4 ± 116.2 mg/L、 36.3 ± 86.9 mg/L、 14.2 ± 7.9 mg/L 及び 25.9 ± 28.7 mg/L (表 1) であった。イソマルトース濃度 100 mg/L 以上であった果実種は、アセロラ、パインアップル、ブルーベリー及びマンゴーであり、それぞれの試料数に対する 100 mg/L を超えた試料数は 1/1、9/15、1/4 及び 1/1 であった。イソマルトース濃度を 100 mg/L 以上を含有するこれらの果実種を除いた果実ジュース等及び還元濃縮果汁ジュース (170 試料) 中のイソマルトース濃度は 16.4 ± 13.7 mg/L であった。

異性化液糖 (52 試料) 中のイソマルトース濃度は、果実ジュース等中の濃度と比較して高いことが示され (図 1)、その濃度は 8971 ± 2819 mg/L であり (表 1)、その糖度は 74.1 ± 1.7 °Bx であった。よって、異性化液糖中の 1 °Bx 当たりのイソマルトース濃度は 121.1 mg/L であった。

また、果実飲料品質表示基準の別表 3 に掲げられた果実名の中で、糖用屈折計示度が低い 6 °Bx から 9 °Bx のものの果実ジュースにおいてそれぞれの糖度の 10 %、20 % 及び 30 % を異性化液糖で置換した場合のジュース中の異性化液糖由来のイソマルトース濃度は、6 °Bx で 72.7、145.3 及び 218.0 mg/L、7 °Bx で 84.8、169.5 及び 254.3 mg/L、8 °Bx で 96.9、193.8 及び 290.6 mg/L 並びに 9 °Bx で 109.0、218.0 及び 327.0 mg/L と算出された。

表1. 果実ジュース、果実ミックスジュース、果実・野菜ミックスジュース、還元濃縮果汁ジュース、異性化液糖及び青果の果汁中のイソマルトース含有量

試料	試料数	含有量 (mg/L) ^a		試料	試料数	含有量 (mg/L) ^a	
果実ジュース ^b	99	46.4	± 116.2	果実ミックスジュース ^b	31	36.3	± 86.9
オレンジ	19	21.1	± 5.4	果実・野菜ミックスジュース ^b	9	14.2	± 7.9
みかん類				還元濃縮果汁ジュース ^c	52	25.9	± 28.7
ポンカン	1	8.9		オレンジ	7	25.6	± 6.2
レモン	2	2.6	及び 4.6	うんしゅうみかん	13	8.5	± 1.6
りんご	16	6.3	± 4.1	グレープフルーツ	4	17.6	± 9.2
ぶどう	16	29.4	± 24.9	レモン	3	4.4	± 2.6
パインアップル	9	148.9	± 69.1	りんご	4	4.2	± 3.9
その他	36	62.9	± 179.2	ぶどう	7	22.7	± 17.8
柑橘類				パインアップル	6	97.3	± 13.5
甘夏	1	8.9		もも	8	27.0	± 7.5
清見	1	5.2		異性化液糖 ^d	52	8971	± 2819
シークワサー	2	6.8	及び 8.5	青果の搾汁	8		
デコポン	2	9.9	及び 19.9	アセロラ	2	0.1	及び 0.4
夏みかん	1	6.2		さくらんぼ	2	0.0	及び 12.6
はるみ	1	10.6		パインアップル	2	57.1	及び 78.1
ライム	1	0.0		マンゴー	2	2.3	及び 2.9
ベリー類							
ブルーベリー	4	121.3	± 397.4				
ブラックマルベリー	1	13.7					
ラズベリー	1	5.1					
アセロラ	1	304.5					
ガズミ	2	15.2	及び 49.3				
キウイ	1	24.8					
さくらんぼ	1	128.2					
ザクロ	4	9.9	± 10.5				
梨	1	0.9					
マルメロ	1	25.3					
マンゴー	1	705.1					
ラ・フランス	9	3.1	± 2.8				

a: 3 点以上の試料数の果実種についてはイソマルトース含有量を[平均値±標準偏差]で示し、1 又は2 点の試料数のときにはそれぞれの測定値を記載した。b: 果実の搾汁若しくは濃縮果汁のみから製造されたジュース。c: 濃縮果汁を果実飲料品質表示基準3) の別表3(レモンの場合は別表4)に従って水で調製したジュース。d: 砂糖を添加した異性化液糖を含む。

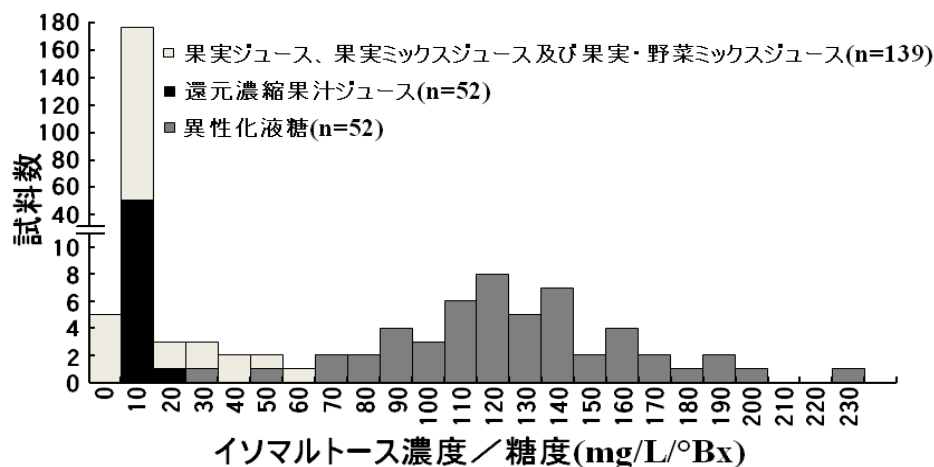


図1 果実ジュース・果実ミックスジュース・果実・野菜ミックスジュース、還元濃縮果汁ジュース及び異性化液糖中の糖度(°Bx)当たりのイソマルトース濃度 (mg/L)

これらの結果から、一部のイソマルトース含有量の高い果実種を除外し、異性化液糖の糖度に対する混入量が10%以上あるものに限定する等の条件を設定することで、果実ジュース等中への異性化液糖の混入はイソマルトースを測定することで確認できることが示された。

3. 2 イソマルトース含有量による異性化液糖の混入の確認について

表1からアセロラ、さくらんぼ、パイナップル及びマンゴーの青果の搾汁中と果実ジュースのイソマルトース濃度を比較する。

アセロラは青果の搾汁で0.1及び0.4 mg/Lであり、果実ジュースで304.5 mg/Lであった。さくらんぼは、搾汁で0.0及び12.6 mg/Lであり、ジュースで128.2 mg/Lであった。パイナップルは、搾汁で57.1及び78.1 mg/Lであり、ジュースで148.9 ± 69.1 mg/Lであり、還元濃縮果汁ジュースで97.3 ± 13.5 mg/Lであった。マンゴーは搾汁で2.3及び2.9 mg/Lであり、ジュースで705.1 mg/Lであった。これらの結果、青果から果実ジュースを製造する工程でイソマルトース濃度が高くなることが考えられるが、他の果実種のジュースのイソマルトース濃度が100 mg/Lを超えた果実種が無かったことから製造工程で数十倍以上のイソマルトース濃度となる可能性は低いと考えられる。また、ブルーベリーは、入手したジュースの4試料中1試料がイソマルトース808.1 mg/Lと高く、他の3試料は30 mg/L以下であった。一方、パイナップルは、青果の搾汁のイソマルトース濃度が50 mg/L以上と高い値を示し、果実ジュース及び還元濃縮果汁ジュースにおいても同様に高い値を示した。このことからパイナップルは他の果実種よりもイソマルトース濃度が高いことが推定される。しかしながら、アセロラ、さくらんぼ、ブルーベリー及びマンゴーにあってはイソマルトース含有量が高い品種を用いて製造されたジュースであることを否定できないことから、これらの果実種については今後も継続して情報や試料を収集する必要がある。また、パイナップルは果実ミックスジュースで使用される頻度が高いので、パイナップルを原料に含む果実ミックスジュース等の判定においては注意が必要であると考えられる。

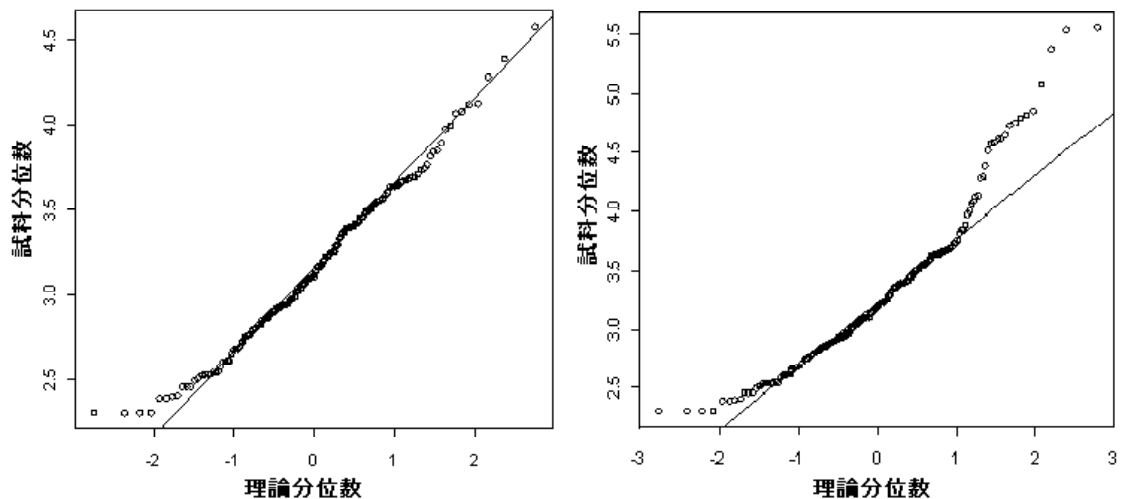
そこで、パイナップルジュースを含む果実ミックス及び果実・野菜ミックスジュースはそれぞれ31試料中17試料及び9試料中2試料であり、これらの試料からパイナップルの影響を調べた。その過程で、マンゴーとぶどうを用いた果実ミックスジュース1試料でイソマルトース濃度が476.2 mg/Lを示した試料があった。ぶどうは表1の果実ジュース及び還元濃縮果汁ジュースの結果からイソマルトースを高濃度で含有することは少ないと考えられるので、この試料中のイソマルトース濃度が高かった原因はマンゴーの影響の可能性があると考えられた。その他にマンゴーを含む果実ミックスジュースは3試料あり、イソマルトース濃度はいずれも40 mg/L以下であったのでパイナップルの果実ミックスジュースへの影響はイソマルトース濃度が高かったマンゴー含有の1試料を除外して検討した。パイナップルジュースが配合されていた果実ミックスジュース(n=17)中のイソマルトース含有量の平均値及び相対標準偏差はそれぞれ23.9 mg/L及び49.8%であり、パイナップルが配合されていないもの(n=13)のそれらはそれぞれ14.6 mg/L及び10.6%であった。よって、パイナップルを配合された果実ミックスジュースの方がイソマルトース含有量の平均値は高い値を示したが、その配合の有無によるイソマルトース濃度の有

意差 ($p < 0.05$) は無かった。また、果実・野菜ミックスジュースにおいてパイナップルを配合されたもののイソマルトース濃度は 21.7 及び 23.4 mg/L であり、パイナップルを配合しないもののイソマルトース濃度は 6.4 から 27.9 mg/L の範囲であったことからパイナップルの影響によるイソマルトースの増加を示す結果は得られなかった。よって、今回、試料として用いた果実ミックス若しくは果実・野菜ミックスジュース中のパイナップルジュースからのイソマルトースの影響は低いと判断した。

以上の結果から、更にパイナップルの果実種を除いた果実ジュース並びに果実ミックスジュース、果実・野菜ミックスジュース及び還元濃縮果汁ジュース ($n=171$) のイソマルトース含有量の対数変換^{3), 4)}を行い、さらに標準化を行って平均値を 0、分散を 1 となるように変換した値は正規 QQ プロット (図 2 a)⁵⁾から正規性が示された。

なお、BoxCox 変換³⁾における λ 値が 0 の場合には対数変換が有効であることが示されており^{3), 4)}、当該データの λ 値は 0.085 であったことから対数変換を採用した。対数変換は試料中のイソマルトース値を C mg/L とすると $[C + 10]$ としてから行った。また、図 2 は、データを昇順に並べたときの順位から、各試料分位数から Ihaka と Gentleman の方法⁵⁾により理論分位数を算出し、正規 QQ プロットを作成した。

対数変換後の値の平均値及び標準偏差はそれぞれ 3.16 及び 0.47 であった。よって、[平均値 + σ]、[平均値 + 2σ] 及び [平均値 + 3σ] の値はそれぞれ 3.6、4.1 及び 4.6 であり、これらをイソマルトース濃度に戻すと 26.6、50.3 及び 89.5 mg/L となった。本法におけるアセロラ、さくらんぼ、ブルーベリー、マンゴー及びパイナップルの果実種を除いた果実種から製造される果実ジュース等のイソマルトース含有量による異性化液糖混入の確認は、工程における品質特性値のばらつきが偶然原因か異常原因のいずれかに起因するかを見分けるシューハート管理図の上方管理限界線^{6), 7)}の概念を準用し、[平均値 + 3σ] を基準とすることとした。これにより果実ジュース等の真正性の判定が可能であると判断した。



a パインアップルを含まない果実ジュース並びに果実ミックスジュース、果実・野菜ミックスジュース、還元濃縮果汁ジュース (n=171) の対数変換

b パインアップルを含む果実ジュース、果実ミックスジュース、果実・野菜ミックスジュース及び還元濃縮果汁ジュース (n=186) の対数変換

図 2 パインアップルジュースの影響によるイソマルトース値の正規QQプロット⁶⁾の比較

4. まとめ

果実ジュース等、還元濃縮果汁ジュース、異性化液糖及び青果の果汁中のイソマルトース濃度を測定した結果、果実ジュース等中に混入した異性化液糖の判定が可能であることが示された。

果実ジュースの中で、イソマルトース濃度が 100 mg/L 以上の果実種（アセロラ、さくらんぼ、ブルーベリー、パインアップル及びマンゴー）があり、これらの果実種については青果の搾汁中のイソマルトース濃度と比較して異性化液糖を含有している可能性が否定できないことから、今後のデータ収集が必要と判断した。この中でパインアップルは青果、果実ジュース及び還元濃縮果汁ジュースともにイソマルトース濃度が高いため、他の果実種と比較してイソマルトース濃度が高いことが示唆された。しかし、今回、試料として用いた果実ミックスジュース及び果実・野菜ミックスジュースにおいてパインアップルの配合の有無にかかわらずイソマルトース濃度への影響は低いと考えられた。

果実ジュース等に異性化液糖が混入されたとする判断基準については、異性化液糖 (n=52) のイソマルトース濃度の平均値から、糖用屈折計示度 6、7、8 及び 9 °Bx の果実ジュースの糖度の 10 % が異性化液糖に置換されたと仮定したときの異性化液糖由来のイソマルトース濃度は、それぞれ 72.7、84.8、96.9 及び 109.0 mg/L と算出された。また、イソマルトース濃度が 100 mg/L を超えた果実種を除いた果実ジュース及び還元濃縮果汁ジュース (n=171) のイソマルトース濃度を対数変換し、標準化した値は正規 QQ プロットから正規性が示され、[平均値 + 3σ] の値は 89.5 mg/L であった。よって、果実ジュース等、還元濃縮果汁ジュース及び異性化液糖中のイソマルトース濃度の測定から果実ジュース等

中への異性化液糖の混入量が 10 %以上あれば、糖用屈折計示度 8 °Bx 以上の果実ジュースにおいてその混入を判定できることが示された。

5. 文 献

- 1) Low, N.H., McLaughlin, M. A., Page, S. W., Canas, B. J., Brause, A. R., Identification of hydrolyzed inulin syrup and high-fructose corn syrup in apple juice by capillary gas chromatography. 2001. J. AOAC Int. 84, 486-492.
- 2) Low, N.H., Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection. 1996. J. AOAC Int. 79, 724-737.
- 3) Box, G.P.E., Cox, D.R., An analysis of transformations (with discussion). 1964. J. Roy. Statist. Soc. B26, 211-252.
- 4) Hamasaki, T., Isomura, T., Ohtaki, M., Goto, M., Power transformation and its modifications. 1999. J. Appl. Stat. 28, 179-190.
- 5) Wilk, M.B., Gnanadesikan, R., Probability plotting methods for the analysis for the analysis of data. 1968. Biometrika, 55, 1-17.
- 6) JIS Z 9020-1:2011.管理図－第 1 部：一般指針
- 7) JIS Z 9021:1998.シューハート管理図