

炭素・酸素安定同位体比分析によるりんごジュースの原料りんごの原産地判別法の検討

渡邊 彩乃, 寺田 昌市

Ayano Watanabe, Shouichi Terada

要 約

国産（日本産）及び外国産のりんごを原料としたりんごジュースについて、炭素及び酸素安定同位体比分析を利用した原料原産地判別法を検討した。

りんご果汁 118 試料（国産 65 試料、外国産 53 試料）の炭素及び酸素安定同位体比を測定し、線形判別分析により判別関数を構築した。この判別関数により、判別関数の構築に用いた試料のうち国産試料 62 点（95.4 %）、外国産試料 52 点（98.1 %）の国産・外国産の別を正しく判定した。また、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響を確認した結果、幅広い商品（ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のもの）に対して本判別法を適用できることが分かった。以上の結果から、炭素及び酸素安定同位体比分析は、りんごジュースの原料りんごの原産地表示の真正性を検証するための手法として有効であることが示された。

1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づき定められた食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、一部の加工食品に対しては原料原産地の表示が義務づけられている。現在りんごジュースについては原料原産地表示は義務づけられていないが、原料りんごの原産地が国産である旨が表示されたりんごジュースが多く販売されている。

りんごジュースの原料であるりんご濃縮果汁の平成 25 年における輸入量は 86,900 トンであり、主な輸入先（輸入量）は、中国(63,700 トン)、オーストリア (7,100 トン)、ブラジル (5,700 トン) となっている¹⁾。一方、平成 25 年の国内生産量は 12,600 トン¹⁾であり、国内生産量に比べ大量の果汁が輸入されている。

このため、りんごジュースに表示された原料りんごの原産地表示の真正性を科学的に検証する技術の開発が求められている。

これまでの原料りんごの原産地判別に関する研究では、安定同位体比分析や元素組成分析による判別の可能性が報告されている。これらの方法は、生育環境の違いが植物組織に反映されることを利用したものである。このうち、炭素及び酸素安定同位体比分析を用いた研究では、中下ら²⁾により国産及び輸入りんご果汁について、また鈴木ら³⁾により青森県産及び中国産の生鮮りんごについて、それぞれ判別の可能性が報告されている。ま

た、元素組成分析による研究⁴⁾では、生鮮りんごの果梗及び種子中の元素濃度を用いた日本産と外国産の判別の可能性が報告されている。

本研究では、炭素及び酸素安定同位体比分析を用いてりんごジュースの原料りんごの原料原産地判別法の検討を行うこととした。検討にあたり、市販されている様々な種類りんごジュースに適用できる判別法とするため、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響の確認に重点を置くこととした。

加工による安定同位体比への影響とは、りんごジュース製造時の様々な加工により安定同位体比が変動し、りんごジュースと原料りんごの安定同位体比の間に差が生じることである。原料原産地判別では、生育環境が反映された原料りんごの安定同位体比がりんごジュースに保持されていることが理想的であるため、加工による影響は小さいほど望ましい。また、いずれかの加工による安定同位体比への影響が大きい場合には、その加工が行われたりんごジュースを原料原産地判別法の適用対象から外すなどの対応が必要となる。

りんごジュースの製造時の主な加工工程と加工による炭素及び酸素安定同位体比への影響の可能性について表1にまとめた。なお、本報告では、水分以外のりんごジュースの成分のうち、糖や有機酸などの果汁中に溶けている成分を水溶性成分、食物繊維などの懸濁または沈殿している成分を不溶性成分と呼び、水溶性成分と不溶性成分を合わせて固形分と呼ぶこととした。

表1 りんごジュースの主な加工工程及び加工による炭素及び酸素安定同位体比への影響の可能性

	加工工程の概要	加工による安定同位体比への影響の可能性
アスコルビン酸 添加	<ul style="list-style-type: none"> ・褐変防止のために搾汁時に添加される ・一般的な添加量は原料りんご重量の0.1%程度 	<ul style="list-style-type: none"> ・L-アスコルビン酸の安定同位体比及び添加量による ・添加量は微量のため影響は小さいと推測される
加熱殺菌	<ul style="list-style-type: none"> ・殺菌及びりんご由来酵素の失活のための工程 ・一般的な加熱条件は90℃で20秒間程度 	<ul style="list-style-type: none"> ・酸素安定同位体比が変動しやすい条件（高温条件下では固形分の酸素原子と水分などの酸素原子との交換が起こりやすいため） ・加熱時間が短いため影響は小さいと推測される
酵素処理	<ul style="list-style-type: none"> ・透明タイプのジュースを製造するための工程 ・濁りの原因となる不溶性成分を分解して除去する 	<ul style="list-style-type: none"> ・固形分のうち不溶性成分と水溶性成分との安定同位体比の差が大きい場合には、不溶性成分の除去による影響があると推測される ・安定同位体比の測定前に不溶性成分を除去する手順を行うことで影響を軽減できる可能性がある
加熱減圧濃縮	<ul style="list-style-type: none"> ・濃縮果汁を製造するために行われる工程 ・加熱及び減圧により水分を蒸発させて除去する 	<ul style="list-style-type: none"> ・加熱による影響は加熱殺菌の工程と同様 ・減圧による固形分の安定同位体比への影響はほとんど無いと推測される

2. 実験方法

2. 1 試料調製及び安定同位体比測定

りんご果汁の水溶性成分の試料調製は、約 2 mL を遠心分離 (20000 × g, 5 分間) し、その上清をフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過した。次に、ろ液の糖度が一定になるように蒸留水で希釈した。微量の希釈液をスズまたは銀製の固体用カプセルに採取し、加熱減圧乾燥 (90 °C、150 分間) を行った後、カプセルを包んだ。

炭素安定同位体比の測定は、元素分析計 (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific) を接続した安定同位体比質量分析装置 (Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific) を使用した。測定条件は、燃焼管温度 1000 °C、還元管温度 750 °C、GC カラム温度 50 °C とした。

酸素安定同位体比の測定用試料は、固体用カプセルを包んだ後、真空凍結乾燥機で一晩以上凍結乾燥させたものを用いた。測定は、熱分解型元素分析計 (TC/EA, Thermo Fisher Scientific) を接続した安定同位体比質量分析装置 (Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific) を使用した。GC カラムはモレキュラーシーブ 5A カラム 1.2 m を使用した。測定条件は反応炉温度 1400 °C、GC カラム温度 90 °C とした。

安定同位体比は δ 値を使って国際測定標準からの偏差として表し、単位は ‰ とした。すなわち、

$$\delta X = R_{\text{試料}} / R_{\text{標準}} - 1 \quad (1)$$

ここで X は、炭素及び酸素のそれぞれに対して、 ^{13}C 及び ^{18}O を表す。R_{試料} は試料の安定同位体比 (R ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 試料、R ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) 試料) を表し、R_{標準} は国際測定標準の安定同位体比を表す。国際測定標準は、炭素については Vienna PeeDee Belemnite (VPDB)、酸素については Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) とした。

2. 2 加工による安定同位体比への影響

水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の差の確認には、試料として国産の生鮮りんごの果汁を用いた。不溶性成分は、果汁を遠心分離 (4000 × g, 5 分間) し、沈殿を蒸留水で洗浄し、真空凍結乾燥を行った後、約 1 mg を固体用カプセルに採取し、カプセルを包んだ。水溶性成分の試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 の通り行った。成分間差が許容範囲内か否かを判断するための検定は、JISZ8402-6 8.4.9.3.2 の平均値の差の検定を用いた。

加工による影響の確認には、試料として国産の生鮮りんごの果汁を用いた。加工処理は、実験室において、①酵素処理、② L-アスコルビン酸添加、③加熱減圧濃縮、の各処理を以下の方法で行った (なお、各処理の条件は、りんごジュースの製造時に一般的に用いられているものである)。

- ①酵素処理：果汁に対して、ペクチナーゼ (MP Biomedicals) を酵素濃度 0.02 % になるように添加し、45 °C に設定したウォーターバスで約 5 時間、酵素反応を行った。
- ② L-アスコルビン酸添加：果汁に対して、10 % L-アスコルビン酸水溶液を L-アスコルビン酸濃度 0.1 % になるように加え、よく攪はんした。反応終了後、沈殿が生じたため上清のみを採取した。

③加熱減圧濃縮：果汁約 5 mL をナスフラスコに採取し、ロータリーエバポレーターで約 30 ° Brix まで濃縮した。ウォーターバスの設定温度は 90 °C とした。濃縮された果汁を採取し、蒸留水でストレート果汁と同程度の糖度になるように希釈した。

①～③のそれぞれについて、処理を行っていない果汁を比較の際の対照とした。また、試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 の通り行った。加工による影響が許容範囲内か否かを判断するための検定は、JISZ8402-6 8.4.9.3.2 の平均値の差の検定を用いた。

2. 3 判別関数の構築

試料は、国産試料として生鮮りんごを 65 点、外国産試料については生鮮りんごの入手が困難であるため、りんご濃縮果汁を 53 点用いた。国産試料は農業協同組合、生産者等から入手し、外国産試料は輸入商社、製造者等から入手した（表 2）。

生鮮りんごは果肉及び果皮部分を破碎、搾汁して果汁を得た。りんご濃縮果汁は、糖用屈折計示度が 10 ～ 15 °Brix になるように蒸留水で希釈した。その後の試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 と同様に行った。

線形判別分析は、国産試料 65 点、外国産試料 53 点の炭素及び酸素安定同位体比を説明変数として、判別関数及び各試料の判別得点を得た。この際、R3.2.2 の MASS パッケージに同封されている lda 関数を使用した。判別関数の構築に用いた試料について、(判別関数) = 0 を基準とした場合に国産試料を国産と判別する確率及び外国産試料を外国産と判別する確率を算出した。

表 2 判別関数の構築に用いた試料の内訳

国産試料		外国産試料	
道県名	点数	国名	点数
青森県	35	中国	34
長野県	11	オーストリア	5
岩手県	5	ブラジル	4
山形県	4	チリ	4
秋田県	3	南アフリカ	2
福島県	3	ニュージーランド	2
群馬県	3	アメリカ	2
北海道	1		

2. 4 判別関数の確認

試料として、原料りんごの原産地が国産のりんごジュース 9 点（全て混濁タイプのストレート果汁）を製造者等から入手した。入手したジュースの県別の内訳は、青森県 2 点、岩手県 3 点、長野県・山形県・秋田県・福島県各 1 点であった。

国産と外国産の判別は、2. 3 で構築した判別関数に各試料の炭素及び酸素安定同位体比を代入して判別得点を算出し、判別得点が正の場合は国産、負の場合は外国産と判定した。

3. 結果及び考察

3. 1 加工による安定同位体比への影響

3. 1. 1 酵素処理による影響

りんごジュースの製造時の主な加工工程のうち、酵素処理は不溶性成分を除去する工程である。安定同位体比の測定対象を固形分とするにあたり、酵素処理によって除去される不溶性成分と残存する水溶性成分との安定同位体比の差が大きい場合には、加工による安定同位体比への影響が生じると考えられる。このため、2種類のりんごの果汁を用いて水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の差の確認を行い、その結果を表3に示した。

表3 水溶性及び不溶性成分の安定同位体比の比較

りんご産地		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
(品種)	成分	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
青森県	水溶性	3	-27.22 ± 0.05			3	21.82 ± 0.19		
(紅玉)	不溶性	2	-30.84 ± 0.05	3.62	0.18	3	20.81 ± 0.13	1.01	0.49
長野県	水溶性	3	-27.72 ± 0.04			2	22.99 ± 0.03		
(サンふじ)	不溶性	3	-31.19 ± 0.01	3.47	0.16	3	20.36 ± 0.05	2.63	0.55

水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の平均値の差は、炭素で最大 3.6 ‰、酸素で最大 2.6 ‰であり、両方において有意差があった。この結果から、酵素処理によって炭素及び酸素安定同位体比が変動することが推測された。ただし、酵素処理による安定同位体比への影響は、測定対象である固形分に含まれる不溶性成分の割合が減少することによるものであるため、あらかじめ全ての試料について不溶性成分を除去する手順を行うことで、加工による影響を軽減できると考えられた。このため、安定同位体比の測定前の試料調製として、遠心分離およびフィルターろ過を行って果汁から不溶性成分を除去し、水溶性成分を測定することとした。

決定した試料調製の方法を用いて、酵素処理の有無による安定同位体比の差を確認した結果を表4に示した。処理の有無による安定同位体比の平均値の差は、炭素で 0.04 ‰、酸素で 0.21 ‰となり有意差は無かった。この結果は、試料調製において不溶性成分を除去したことによるものと考えられる。

表4 酵素処理による安定同位体比への影響

加工の種類	処理	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
		n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
酵素処理	無	2	-26.55 ± 0.01			3	23.67 ± 0.38		
	有	2	-26.59 ± 0.02	0.04	0.20	3	23.46 ± 0.21	0.21	0.49

3. 1. 2 L-アスコルビン酸の添加及び加熱減圧濃縮による影響

L-アスコルビン酸添加及び加熱減圧濃縮の各処理の有無による安定同位体比の差を確認した結果を表5に示した。なお、加熱殺菌の処理は省略し、加熱殺菌の一般的な加熱温度と同じ 90 °C での加熱処理を行った加熱減圧濃縮の結果を用いることとした。

各処理による安定同位体比の平均値の差は、炭素で 0.02 ~ 0.03 ‰、酸素で 0.02 ~ 0.25 ‰となり、両方の処理において有意差は無かった。各加工により有意な安定同位体比の

変動がみられなかった要因としては、L-アスコルビン酸添加については添加量が微量であるため、加熱減圧濃縮については加熱時間が短いためと考えられる。また、加熱殺菌についても加熱減圧濃縮と同様に有意な影響はないものと推測された。

表 5 L-アスコルビン酸の添加及び加熱減圧濃縮による安定同位体比への影響

加工の種類	処理	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
		n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
アスコルビン酸 添加	無	2	-24.76 ± 0.02			2	24.22 ± 0.06		
	有	2	-24.74 ± 0.00	0.02	0.20	2	24.46 ± 0.01	0.25	0.60
加熱減圧濃縮	無	3	-28.10 ± 0.02			3	23.40 ± 0.05		
	有	3	-28.07 ± 0.03	0.03	0.16	3	23.42 ± 0.15	0.02	0.49

3. 1. 3 原料原産地判別法の適用対象

3. 1. 1 及び 3. 1. 2 において、各加工による安定同位体比への有意な影響は無いことを確認した。この結果から、原料原産地判別法の適用対象として、L-アスコルビン酸添加、加熱殺菌、酵素処理、加熱減圧濃縮、の各加工が行われたりんごジュースを含めることができることがわかった。りんごジュースの種類としては、ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のものを適用対象とすることができる。

3. 2 判別関数の構築

3. 2. 1 安定同位体比の分布

国産試料 65 点、外国産試料 53 点の炭素及び酸素安定同位体比を図 1 に示した。国産試料は、炭素及び酸素安定同位体比の両方において外国産よりも低い値を示す傾向がみられた。この傾向は既報²⁾と同様であった。炭素安定同位体比、酸素安定同位体比それぞれ単独では、国産と外国産の分布の重なりが大きいものの、両元素の同位体比を組み合わせることで、分布の重なりが小さくなった。

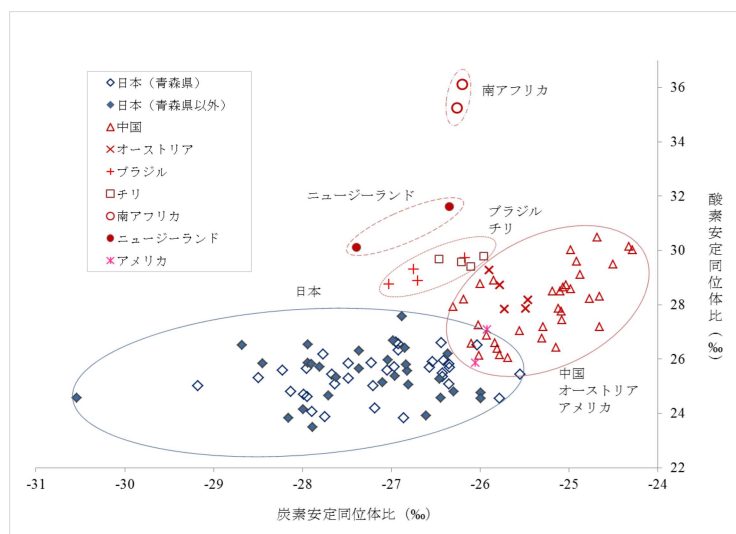


図 1 炭素及び酸素安定同位体比の分布

3. 2. 2 判別関数による判定

炭素及び酸素安定同位体比を説明変数として、線形判別分析により、国産と外国産の判別関数を構築した。さらに判別関数に判別関数の構築に用いた試料の炭素及び酸素安定同位体比を代入し、各試料の判別得点を算出した。判別得点が正の場合は国産、負の場合は外国産と判定した。この判別関数により、判別関数の構築に用いた国産試料 65 点のうち 62 点 (95.4 %) が、外国産試料 53 点のうち 52 点 (98.1 %) が正しく判定された。

今回は (判別関数) = 0 を基準として判定したため、国産試料 3 点が外国産の判定となったが、基準とする判別得点を負の方向に移動させることで、国産試料を誤って外国産と判定する確率を低くすることができる。

3. 3 判別関数の確認

判別関数の構築にあたり、外国産試料としてりんご濃縮果汁を、国産試料として生鮮りんごを用いたため、生鮮りんごとりんごジュースの間で安定同位体比の分布にズレが生じていないことを確認するために原料りんごの原産地が国産のりんごジュースを用いて国産の分布の確認を行うこととした。なお、国産試料として生鮮りんごを用いた理由は、生鮮りんごの輸入先がニュージーランドのみで輸入量もごくわずかであるため¹⁾、国内で流通している生鮮りんごのほとんどが国産であり、複数の国から大量に輸入されているりんご果汁と比較して、より原産地の確かな試料を収集することができる考えたためである。

判別関数の確認用として入手した原料りんごの原産地が国産のりんごジュース 9 点の分布を、判別関数の構築に用いた試料の分布 (図 1) に重ね合わせたものを図 2 に示した。判別関数確認用のりんごジュースの分布は、生鮮りんごを用いて構築した国産試料の分布の範囲内であった。また、構築した判別関数でりんごジュース試料を判定した結果、全 9 点を正しく国産と判定した。この結果より、りんごジュースに対して構築した判別関数を適用できることを確認した。

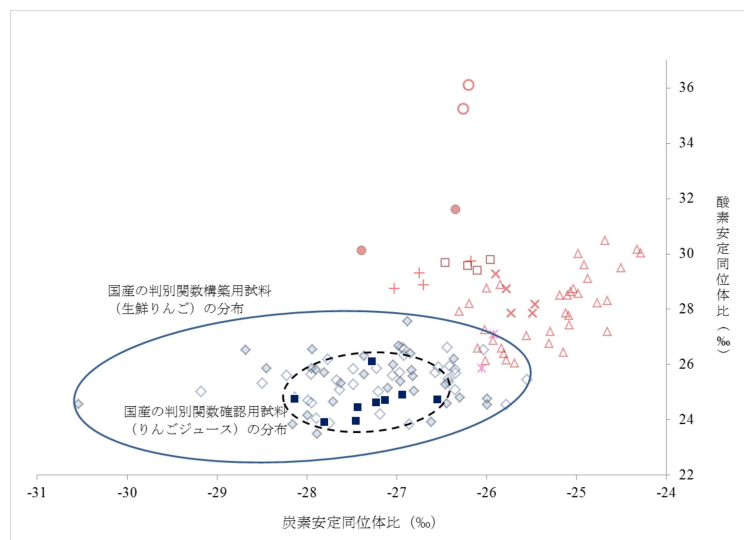


図 2 判別関数の確認用試料の分布

4. まとめ

本研究では、炭素及び酸素安定同位体比分析によるりんごジュースの原料りんごの原産地判別法の検討を行った。線形判別分析により構築した国産と外国産の判別関数により、判別関数の構築に用いた国産試料の95.4%、外国産試料の98.1%が正しく判定された。また、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響を確認した結果、L-アスコルビン酸添加、加熱殺菌、酵素処理、加熱減圧濃縮の各処理による影響を受けないことが分かった。このため、ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のものに対して本判別法を適用することができる。以上の結果から、炭素及び酸素安定同位体比分析は、原料りんごの原産地表示の真正性を検証するための方法として有効であることが示された。

なお、今後、原料りんごの栽培地域や輸入先の変化などにより判別関数の判別能力が変化していくことがあるため、定期的に原産地の確かな試料を用いて、判別関数の妥当性の確認を行うことが望ましい。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供及び製造工程の調査にご協力いただきました生産者、農業協同組合、輸入商社、卸売業者、製造業者等の皆様に心より御礼申し上げます。

6. 文 献

- 1) 農林水産省, 品目毎の農林水産物への影響について, 平成 27 年 11 月
- 2) 中下留美子, 鈴木彌生子: 安定同位体比分析による国産及び輸入りんご果汁の原産地判別の可能性, 分析化学, 58(12), 1059-1061 (2009)
- 3) 鈴木彌生子, 中下留美子, 河邊亮, 北井亜希子, 富山眞吾: 炭素・酸素安定同位体比分析による青森県産および中国産りんごの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, 59(2), 69-75 (2012)
- 4) 井上博道, 梅宮善章, 喜多正幸: りんご「ふじ」の果梗および種子中元素濃度を用いた日本産と外国産との判別: 日本土壤肥料学雑誌, 80(6), 583-588 (2009)