

ホット缶コーヒーにおける化学変化 ～分析とその応用例～

Chemical changes in canned coffee during heating

小泉英樹

Hideki KOIZUMI

キリンビバレッジ（株）コア技術研究所

〒230-8628 横浜市鶴見区生麦1-17-1

TEL 045-503-8310

E-mail: hkoizumi@kirin.co.jp

【はじめに】

質量分析学の歴史は100年以上前にさかのぼると聞かすが、そのような学問分野の研究会で私のような人間が講演させていただく機会をいただけようとは数年前までは思いも寄らなかった。大学から社会人数年間はバイオ系研究を行っていた私が、食品化学の分野に移って初めて質量分析器に触れたのはわずか8年前の出来事である。当時は一般的な用語も、ましてや分析原理も分からず、ただただ高価な機器を壊さないだろうかという事ばかりが気になっていたのを思い出される。思えば、その数年程前から質量分析器はいわゆる「普通の分析器」となり、私のような全くの素人であっても扱う事が出来るように劇的に進化を遂げつつあった。それに伴い食品業界をはじめ、環境や材料業界など幅広い分野に普及し、今では一般分析機器として無くてはならない存在にまで発展している。

食品業界で真っ先に質量分析器が使われるようになった分野は、食の安全／安心分野である。不安心物質を分析ターゲットとし、如何にその物質を特異的に高感度で検出するかを追い求めるのには質量分析法は最適な手法であり、現在においても最も活躍している分野であろう。しかし昨今、オミックス的手法が整備されてきた事により、質量分析法は食品中で起こる様々な化学変化を探索するための手段としても有効に活用可能となっている。本講演では、そのような探索手法としての質量分析器の使い方を、機器ユーザーの立場からご紹介したい。

【缶入りブラックコーヒー飲料の劣化酸味原因物質の同定と発生抑制法の開発】

缶入りコーヒー飲料は、通常家庭や喫茶店で抽出後すぐに飲用されるコーヒーとは異なり、製造してから消費者が飲用するまで一定の期間を要する。特に冬季は加温して販売される場合があり、風味や品質の劣化が著しく促進される。その中でブラックコーヒー飲料は、高温で長期間貯蔵されると混濁物質が増加し、外観的に濁りが生じるとともに、後味に収斂味や酸味を伴う雑味（『劣化酸味』と定義する）が生じることが知られている。劣化酸味の発現メカニズムとしては、各種有機酸（酢酸、グリコール酸、ギ酸、リンゴ酸、クエン酸等）、無機酸（リン酸等）の増加や、クロロゲン酸類の分解（クロロゲン酸→カフェ酸+キナ酸）、キナ酸ラクトンやクロロゲン酸ラクトンの開裂が疑われているものの、それ

ら全ての酸類が劣化に伴い増加し、総合的に pH を低下させることで嫌な酸味が生じると
いう解釈に留まっており、明確な原因が不明な状態であった。そこで、我々は劣化酸味の
原因物質を明らかにし、その生成抑制法を開発するための検討を行った。

劣化酸味原因物質の同定

上述の仮説から劣化酸味の発現には高極性物質が関与している可能性が高いと考え、加
温していない正常コーヒーと劣化コーヒーを、それぞれ C18 固相抽出カラムに通液して、
非吸着画分を回収し試飲した。その結果、残念な事に両者に明確な味質の違いを見出せな
かった。そこで、固相吸着

物質をエタノールで溶出
し、エタノールを除去後に
試飲したところ、劣化コー
ヒーの画分にのみ明確な
酸味を感じとることがで
きた。その結果、劣化酸味
の原因物質は低極性物質
のみによって形成され、極
性の高い酸類は無関係で
ある事が示唆された。そこ
で本画分を LCMS に供し、
コーヒーが劣化する事によ
って増加するピークを
m/z=1 毎にマスクロマトグ
ラムを抽出して探索したと
ころ、5本のピークを見出
すことができた (図1)。我
々はこれらの物質が劣化酸
味の原因となっている可
能性が高いと考え、分取
LC を用いて劣化コー
ヒーから各ピークをそ
れぞれ除去した画分を
調製し試飲した。その
結果、ピーク2を除去
した画分でのみ劣化酸
味が明確に消失する事
が判明した。運が良い
事に、我々が使用した
LCMS 分析条件ではコー
ヒー中に大量に含まれ
ているクロゲン酸で

In-source
fragmentation が起きて

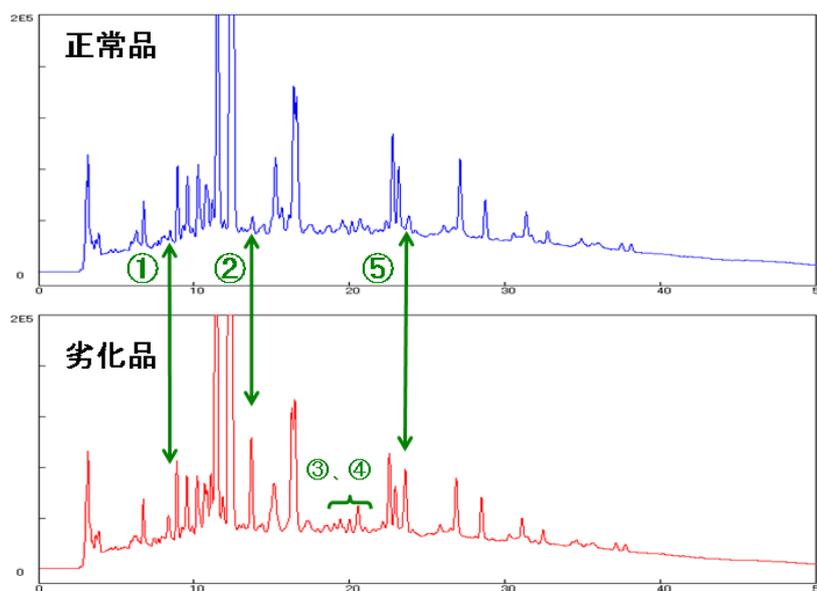


図1 正常品と劣化品の比較(UV 240nm吸収)

らみの物質が劣化酸味の原因となっている可能性が高いと考え、分取 LC を用いて劣化コー
ヒーから各ピークをそ

れぞれ除去した画分を
調製し試飲した。その
結果、ピーク2を除去
した画分でのみ劣化酸
味が明確に消失する事
が判明した。運が良い
事に、我々が使用した
LCMS 分析条件ではコー
ヒー中に大量に含まれ
ているクロゲン酸で

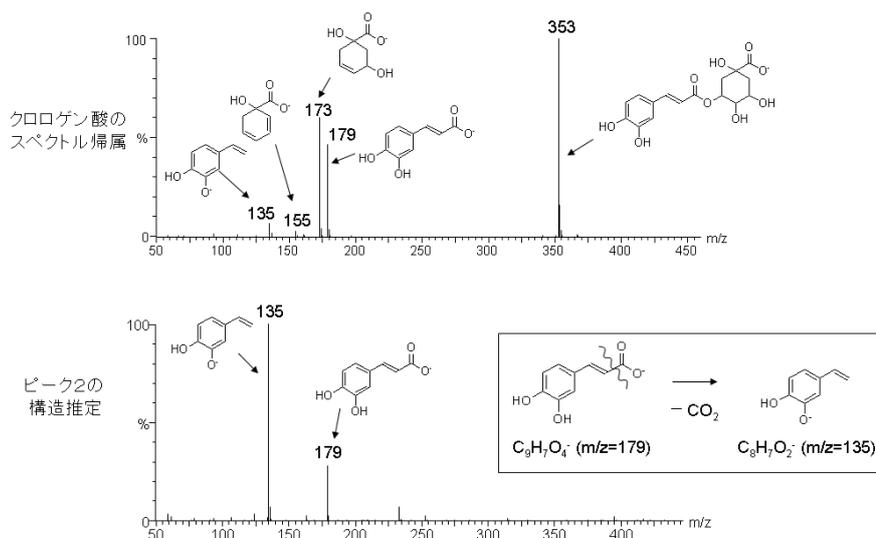


図2 マスペクトルからのピーク2の構造推定

おり、さらに各フラグメントイオンの構造が推定できた (図 2)。その結果を元に類推する事で、ピーク 2 はカフェ酸であることが推定され、実際の標品の分析により確認できた (図 2)。そこで劣化酸味が消失したピーク 2 除去画分にカフェ酸を添加して試飲すると、劣化酸味が再現されることが確認でき、カフェ酸が劣化酸味の構成成分として必須である事が明らかとなった。しかし興味深い事に、カフェ酸自身は劣化コーヒーと同等の濃度ではほとんど味がせず、さらに、正常コーヒーから同様に調製したカフェ酸除去画分にカフェ酸を添加しても劣化酸味は発現しないことが判明した。以上の結果から、劣化酸味の発現には劣化に伴い増加するカフェ酸と、劣化に伴い変動するカフェ酸以外の成分が共存する事で発現する事が示唆された。

カフェ酸生成メカニズムの解析と劣化酸味抑制法の開発

劣化に伴い増加するカフェ酸の前駆体を探索するために、上述の LCMS 解析結果から劣化に伴い減少するピークを探索した。その結果、クロロゲン酸とクロロゲン酸ラクトンが候補物質である可能性が考えられた。そこで、クロロゲン酸、クロロゲン酸ラクトンを過剰に添加した缶コーヒーを作成し、加温に伴うカフェ酸の変動を調べた結果、いずれの場合もカフェ酸の増加速度は変化しない事が判明し、カフェ酸はこれらの物質を前駆体としていないことが明らかになった。続いて、

カフェ酸を過剰に添加した缶コーヒーを作成し、加温による変動を調べたところ、ある濃度でカフェ酸の増加が止まり、それ以上カフェ酸を添加するとカフェ酸が逆に減少することが判明した。興味深い事に、カフェ酸の増加が止まった缶コーヒーでは劣化に伴う濁りと劣化酸味の発生が抑制される事が明らかとなった。これらの結

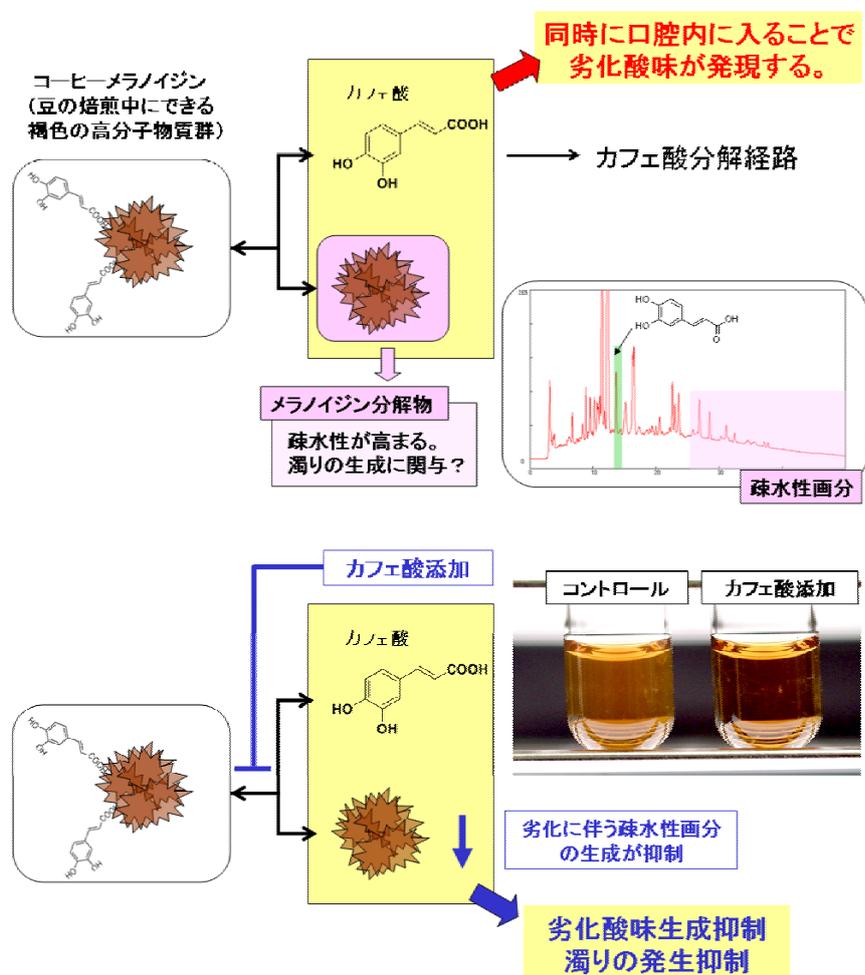


図3 カフェ酸生成と劣化酸味抑制法のメカニズム(推定)

果を踏まえて、現時点ではカフェ酸はコーヒー豆を焙煎した際に産生する褐色物質（メラノイジン）を前駆体とし、一種の平衡状態にあると推定している（図3）。外観の濁りや劣化酸味は、疎水性の高いメラノイジンが原因物質の1つとなっており、カフェ酸をコーヒーに添加することで平衡が左にずれ、劣化が抑制されるというモデルである。劣化したコーヒー中の疎水性の非常に高い物質群を添加して缶コーヒーを作成したところ、劣化に伴うカフェ酸の増加が抑制された事からも、このモデルは支持されると考えている。また、カフェ酸はその抗酸化力を期待して飲料の劣化抑制のために添加される場合があるが、本研究ではカフェ酸の添加量は普通のコーヒーの2倍程度で十分な効果を発揮することを見出している。コーヒーにはカフェ酸と比べて圧倒的少量のクロロゲン酸が含まれていることから、抗酸化作用とは別の力が作用している事は明らかであろう。これらの知見を実際の製品に応用する場合、実はカフェ酸単体は日本では食品添加物として認可されていないという問題点があった。我々はこの問題を解決するために、食添認可されている酵素のクロロゲン酸エステラーゼ（クロロゲン酸 → カフェ酸 + キナ酸）をコーヒー抽出液に作用させたエキスを作成し、カフェ酸の供給源として利用できる事も確認し、食品加工に応用可能な技術として完成させた。

【缶入りコーヒー飲料等の新規加熱履歴推定方法の開発】

ブラックコーヒー飲料の劣化と異なり、缶入りミルクコーヒー飲料が高温で長時間保管されると、コーヒーの劣化よりもミルク中の脂質の酸化によって品質が著しく低下することが知られている。特に脂質が分解して発生するオフフレーバーは非常に不快であるため、お客様にご迷惑をおかけする事が多い。お客様からお申し出をいただいた際には、品質保証部門において、商品の管理がどのようになされていたかを迅速に調査し、お客様に報告して安心していただく事が我々にとって責務となるが、ご納得いただける報告を行うためには、科学的知見に基づ

づく正確で客観的な製品の加熱履歴を測定したデータをお示しすることが有効だと考えられる。そのような加熱履歴推定方法は以下の3つの要件を

満たす必要がある。①開栓後の商品でも加熱履歴を推定できる事。②推定できる加熱履歴期間が実用に耐えうる長さであるこ

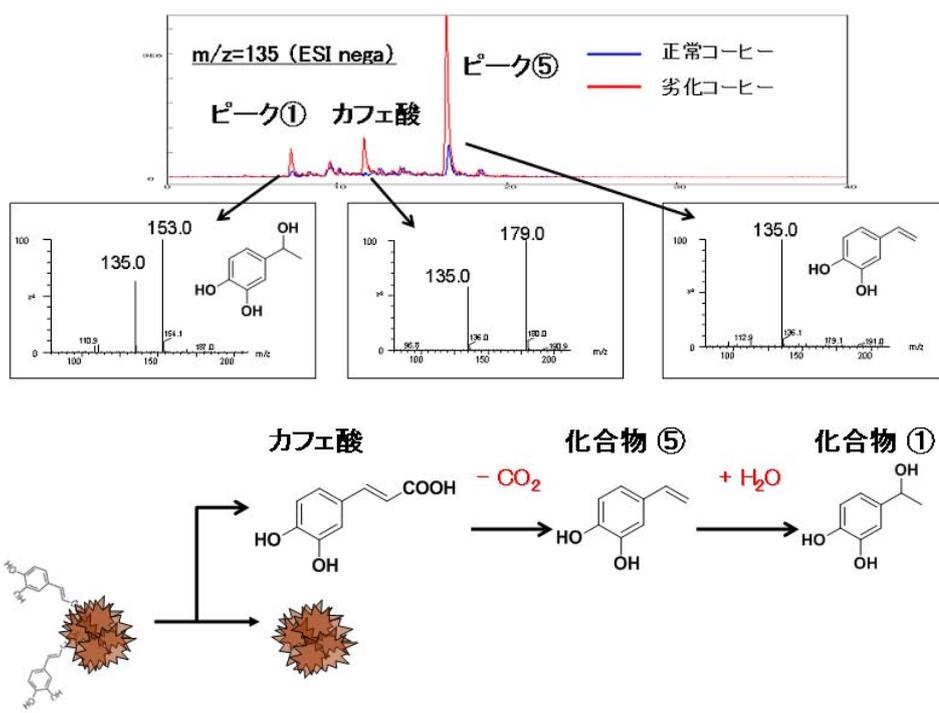


図4 カフェ酸分解経路(推定)

と。③常温では変動せず人為的に加温した時のみ変動すること。しかし、これらの要件を全て満たす分析法の確立は非常に難しく、1度の分析で満足できる結果が得られる分析法は存在しない状況であった。

上述の通り、我々は缶入りブラックコーヒーの中で起こる化学変化を調べていく中で、カフェ酸の他に劣化に伴い増加する化合物①と化合物⑤(図1)を見出していた。この2つの物質はカフェ酸の脱炭酸イオンと同じ $m/z=135$ のフラグメントイオンを持つ事から、それぞれ図4に示した構造を有しており、缶コーヒー中のカフェ酸は加温に伴い脱炭酸し、続いて、ビニル基に水が付加する化学変化を受けるものと推測していた(図4)。そこで、

これらの知見が缶コーヒーの加熱履歴推定方法に応用できるかどうか検討を行った。

各種缶コーヒーを様々な温度で経時的に加温保存した製品を作成し、溶液中のカフェ酸、及び、化合物①、⑤のピーク面積を算出した。その結

果、同一の製品であっても製品のロットや製造工場の違いによってカフェ酸類の含量が大きく異なる事が明らかとなり、各々の物質の定量分析だけでは加熱履歴指標として利用できない事が明らかとなった。また、製品を開栓後に家庭用冷蔵庫で4日間保管した缶コーヒー溶液中のカフェ酸、化合物①、⑤のピーク面積を算出した結果、カフェ酸、化合物①はほとんど変化しなかったものの、化合物⑤は著しく減少する事が判明し、化合物⑤の分析値は開栓後の製品の推定には使用できないことが明らか

となった。そこで、上述のカフェ酸分解反応が、カフェ酸を基質とし、化合物①を生成物とする擬似的な一次反応として取り扱えたと仮定し、各溶液の化合物①/カフェ酸ピーク面積比を時間軸に対してプロットしたところ、70℃保管においても8週間まで相関係数の非常に高い直線を描く事ができた(図5)。この直線は、カフェ酸含量が異なるロット違いの製品であってもほぼ一致した。また、この直線は開栓後の製品を家庭用冷蔵庫で1週

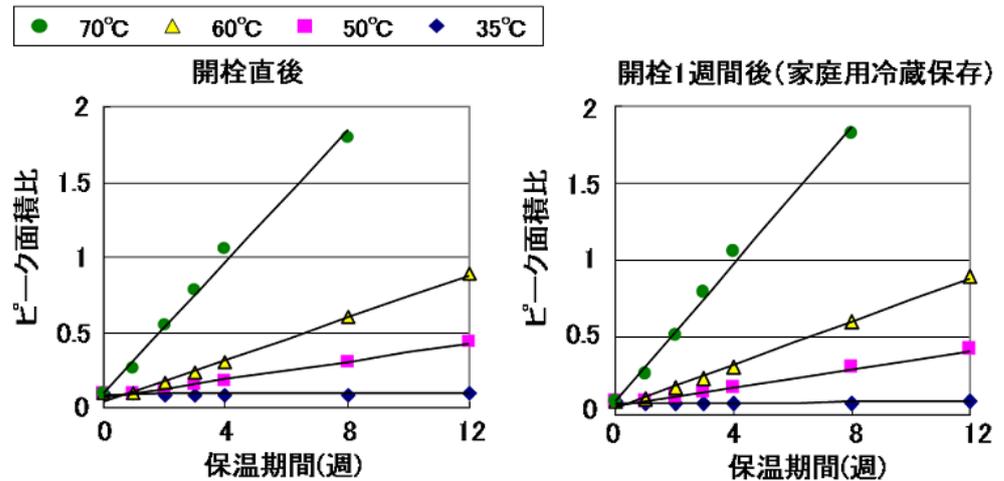


図5 化合物①/カフェ酸比の経時変化

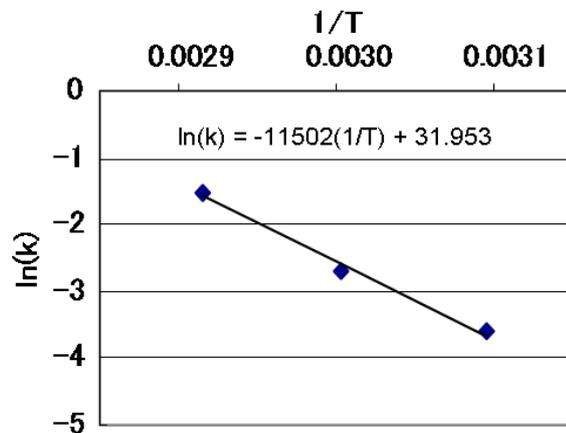


図6 アレニウスプロット

間保存してもほとんど変動しなかった (図5)。さらに化合物①/カフェ酸ピーク面積比は製品を 35°C以下で保管した際にはほとんど変動しなかった。以上のことから、本指標は常温輸送時にはほとんど変動せず、商品が加温装置に入れられてからの熱履歴を正確に反映し、70°Cの非常に高い保管条件においても8週間までは加熱履歴を反映し、さらに、開栓後の製品であっても利用できる極めて有用な指標である事が明らかとなった。加えて、直線の傾きは保管温度に依存し、アレニウスプロットを取ると美しい直線を描き、製品の加熱履歴を推定するための極めて有用な手法である事が明らかとなった (図6)。

【質量分析器への期待】

本研究はオミックス的研究手法が萌芽期であった2006年頃に行った仕事であり、用いた機器が低スペックで、かつ、解析方法もかなり泥臭い。現在は高精度の機器や、優秀なソフトウェアが普及しており、実際に我々も使用しているが、基本的な考え方は同一で何ら変わることがない。むしろ最近の質量分析器を用いて探索的研究を行っている若い人達を眺めていると、私は機器の性能やコンピューターを用いた統計解析に頼りすぎており、真の姿を見出す努力を怠っているのではないかとさえ思うことがある。探索的研究を行う場合、まずは、違いのあるサンプルをGCMSやLCMS、CEMS等を用いて分析してみて、何が違うのかを解析してみるということ自体は非難されるアプローチではなく、そこに質量分析器が果たす役割は非常に大きいと思う。しかし、質量分析器がはじき出す結果のみに頼りすぎてしまえば真理を見逃す可能性がある。今回、我々が見出したブラックコーヒーの劣化酸味原因物質がカフェ酸であるという事象も、それ自身は泥臭い実験の積み重ねがあつてこそその発見であつたし、さらには、カフェ酸は単独では劣化酸味の原因にはなり得ず、分析化学的手法では同定できない「もやっと」した物質群が共存する事で初めて劣化酸味が発現するという事実は、分析データを如何にいじっても決して導き出せないであろう。

今回紹介したような探索的研究のために質量分析器を用いている私のような人間としては、質量分析器は「インスピレーションを伴うアイデアを強くサポートする存在」であつて欲しいと考えている。そのためにはハードウェアの性能はもちろん重要ではあるが、ソフトウェアやデータベース、スペクトル解析アルゴリズムの充実などを含めてトータルとして力を発揮してもらえなくては意味が無い。さらには、調べたいと思ったことが簡単にすぐに調べられるような使い勝手の良さというものも重要になる。かつて、それらを調査するために、各分析機器メーカーにご協力いただき、長い時間をかけてデモをお願いした事がある。結果は非常に興味深く、また、私個人としては非常に良い勉強をさせていただいた。ご尽力いただいた各社のケミストの皆様には、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

最後に本研究によって、ミルク入りコーヒーのような非常に雑多な成分の複合物中で、理科の教科書に載せても恥ずかしくないような美しい化学変化が人知れず起こっている事を見出せた。質量分析器に出会わなければ、決して味わう事の出来なかった自然の神秘に触れられた事に感謝する。今後の質量分析学の益々の発展を期待したい。