柑橘のカロチノイドに関する研究

(第9報) CPTA 剤処理による温州ミカンの着色促進とリコピンの蓄積

梅田圭司*・土井 達*・大東 宏**・広瀬和栄**

Studies on Citrus Carotenoids

Part IX. The effects of CPTA on the color development and the lycopene accumulation in Citrus Unshiu peel

KEIJI UMEDA, TORU DOI, HIROSHI DAITO and KAZUYOSHI HIROSE

Effects of CPTA (2-(4-chlorophenylthio)-triethylamine hydrochloride) on the acceleration of coloring of Citrus Unshiu was investigated. CPTA aqueous solutions were sprayed at the concentrations of 1250 ppm, 2500 ppm and 5000 ppm on whole trees planted in porous pots.

All of CPTA treated ordinary Unshiu fruits developed bright red color and the appearance of treated fruits became to that of Dobashibeni-Unshiu. Determination of carotenoid groups of CPTA treated fruit peel by thin layer chromatography (TLC) showed the remarkable increase of hydrocarbon carotenoid group (H group) content. The maximum content of H group which was resulted from CPTA treatment of 2500 ppm was 9 times as much as non-treated ones. The content of the other carotenoid groups showed no significant difference between CPTA treated samples and non-treated ones.

H group of CPTA treated fruit peel was subdivided into 6 fractions by alumina-TLC with petroleum ether as solvent. These fractions were identified and relative content was determined: F₁: β -carotene + ζ -carotene (6%), F₂: ζ -carotene (4%), F₃: γ -carotene (7%), F₄: γ -carotene (8%), F₅: Cis-lycopene (15%), F₆: lycopene (60%). In non-treated samples, only F₁ and F₂ fractions were contained. The color development of fruit peel by CPTA treatment seemed to be caused by the activation of lycopene biosynthesis pathway and lycopene content was accumulated to about 12% of the total carotenoids.

(Received Nov., 10, 1973)

柑橘の着色促進剤としては、すでにエチレンがレモンの黄色の着色促進と均一着色化のために利用されている。またエチレン発生剤であるエスレル (2-chloro-ethane phosphoric acid) を用いて温州ミカン¹⁾、夏柑²⁾についても顕著な着色効果が認められている。

このほかに柑橘ではないが、同じようにカロチノイドの蓄積を促進している例として、トマトをエチレンオキサイドで処理したり³⁾、エチレンガス、エスレルで処理する方法⁴⁾、柿を放射線で処理する方法⁵⁾がある。

特殊なカロチノイドの蓄積効果を示すものとして、CPTA (2-(4-chlorophenylthio)-triethylamine hydro-

chloride) 処理によるリコピンの生成がある。COGGINS ら⁶⁾によると CPTA の水溶液に各種オレンジ、レモン、グレープフルーツを浸漬すると、数日を経てリコピンの生成がみられ、また着色増加は、5000 ppm くらいまでは CPTA 濃度と比例し、処理後は貯蔵温度が高いほど (~21°C) 着色度が増すと報告されている。

さらに YOKOYAMA ら^{7,8)}は、CPTA 処理したネーブル、グレープフルーツなどの柑橘を分析し、カロチノイド生合成系で、イオノン環1コのカロチノイドまでの経路を賦活することを認めている。

本試験では、温州ミカンに CPTA を散布してカロチ

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区堀浜1丁目12)

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Koto-ku, Tokyo.

** 農林省果樹試験場興津支場 (静岡県清水市興津中町)

Fruit Tree Research Station, Okitsu Branch. Okitsu, Shizuoka.

ノイドパターンを調べ、各カロチノイドグループの増減およびその相互の関連をみた。また紅色温州ミカンである土橋紅温州の色調と比較し、CPTA散布の際の濃度効果も検討した。

実験方法

1. CPTA 処理

5年生の普通温州ミカン(鉢植)に、1250, 2500, 5000 ppm の CPTA 溶液を樹上散布し(12月14日), 昼温 24°C, 夜温 15°C のグロースキャビネット中で10日間育生した。

2. 色調の測定

測色色差計(日本電色工業KK)で4日目および10日目に果頂部, 赤道部, 果柄部の色調を測定し, 多重検定で有意性を調べた。また10日目のものは完熟した土橋紅温州との比較も行なった。

3. カロチノイドの分析

処理後10日目のものを, TLC 法⁹⁾で果皮のカロチノイドパターンを調べた。また Hydrocarbon 部分をさら

に詳しく分析するために, アルミナのための薄層を用い, 石油エーテルのみで展開し, Hydrocarbon 部分のカロチノイドパターンを調べた。

結果および考察

1. 色調の変化

CPTA 処理後3日目から, 2500 および 5000 ppm 区では果面全体に, また 1250 ppm 区では果面に部分的に紅色が発現しはじめた。Table 1 は色差計で調べた結果で, 肉眼的観察とよく一致している。

表中の数値は測色色差計の読みであり, 括弧内のアルファベットが同じものは, ダンカンの多重検定では5%レベル以下で有意差がないことを示している。ただし果頂部のaは処理による有意差がみられなかった。

次に, 処理後4日目と10日目のものについて, 全試料間つまり処理したことによる有意差, 次に CPTA 処理したものとの無処理のものとの有意差, CPTA の各処理区内の個々の果実間の有意差を, また10日目のもののみについて処理区と土橋紅との有意差を*印で示した。

Table 1. Color Development of Citrus Unshiu Peel by CPTA Treatment

CPTA Treatment (ppm)	Measured figures by Color Difference Meter ¹⁾								
	Upper part of fruit			Middle part of fruit			Bottom part of fruit		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b
4 days after treatment									
0	59.3 ^(a)	26.0	34.5 ^(a)	59.8 ^(a)	25.7 ^(a)	34.1 ^(a)	57.0 ^(a)	16.2 ^(a)	31.3 ^(a)
1250	57.8 ^(a)	27.1	32.0 ^(a)	58.8 ^(a)	25.5 ^(a)	33.2 ^(ab)	55.3 ^(ab)	19.6 ^(a)	30.3 ^(a)
2500	55.8 ^(ab)	31.1	31.1 ^(ao)	56.9 ^(a)	28.9 ^(ab)	31.3 ^(bc)	53.2 ^(bc)	22.5 ^(b)	27.9 ^(b)
5000	52.2 ^(a)	28.5	28.5 ^(b)	53.9 ^(b)	32.1 ^(b)	29.0 ^(c)	52.1 ^(c)	22.7 ^(b)	27.8 ^(a)
Significance ²⁾									
In each sample	*	NS	*	**	*	**	*	**	*
Treated to non-treated	*		*	**	*	**	*	**	*
In each treated sample	*		NS	**	*	**	NS	*	NS
Replication in Treated	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
10 days after treatment									
0	59.9 ^(a)	24.5 ^(a)	34.3 ^(a)	61.2 ^(a)	25.4 ^(a)	34.9 ^(a)	57.7 ^(a)	18.2 ^(a)	32.4 ^(a)
1250	54.3 ^(ab)	27.8 ^(ab)	30.2 ^(b)	55.7 ^(b)	28.1 ^(a)	30.3 ^(b)	53.7 ^(ab)	17.9 ^(a)	28.5 ^(ab)
2500	51.4 ^(b)	28.1 ^(ab)	27.5 ^(b)	52.1 ^(c)	32.1 ^(b)	27.4 ^(c)	50.7 ^(b)	21.7 ^(b)	26.1 ^(b)
5000	50.5 ^(b)	31.6 ^(bc)	27.2 ^(b)	51.9 ^(c)	32.1 ^(b)	26.8 ^(c)	49.7 ^(b)	23.8 ^(b)	25.4 ^(b)
Dobashibeni	52.1 ^(b)	23.9 ^(c)	29.2 ^(b)	53.9 ^(bc)	34.3 ^(b)	29.2 ^(bc)	53.0 ^(ab)	29.3 ^(c)	28.6 ^(ab)
Significance ²⁾									
In each sample	**	*	**	**	**	**	**	**	**
Treated to non-treated	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Treated to Dobashibeni	NS	*	NS	NS	**	NS	NS	**	NS
In each treated sample	NS	NS	NS	**	*	*	NS	**	NS
Replication in Treated	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1) Same alphabetical letter shows not significant at 5% level by Duncan's multiple range test.

2) *, ** show the significance at possibilities of 95% and 99% respectively.

NS shows no significance.

*は95%の確率で、**は99%の確率で有意差があり、またNSは有意差がないことを示している。これで見ると10日目のいずれも最後の項目、つまり各処理区間内の個々の試料間では、すべて有意差がなくなっている。これは各濃度での処理効果が均一で、きれいな処理法であることを示している。

CPTAの処理濃度が高くなるにつれてL値(明度)は減少しているが、この傾向は赤色の強さによるものである。a値(赤色)も処理濃度が高いほど値は大きくなり、土橋紅温州に近い紅色を示していた。またb値(黄色)は処理濃度が高くなるにつれて低くなり、土橋紅温州との間に有意差はなくなり、黄色味が消えてきたことを示している。なお無処理のものはオレンジ色に完全に着色していた。

2. カロチノイド量とパターンの変化

CPTA処理、未処理、土橋紅の果皮のカロチノイドをTLCにかけた結果を、Fig. 1に示した。CPTA処理区は2500ppmのみを示したが、他の濃度で処理したものも同様である。

CPTA処理区はHグループが多く、薄層上で濃いオレンジ色のバンドとなるが、未処理区のものでは淡黄色である。土橋紅では、MMグループとDグループの間にピンク色のバンドが出現する。これらはreticulataxanthin, citraurinなどと考えられるが¹⁰⁾、今回は一括してketo-carotenoidとした。

以上のように、CPTA処理区は土橋紅と同じような色調であるが、TLC上でのカロチノイドの分離とみる

Fig. 1. TLC of carotenoid mixtures in CPTA treated Citrus Unshiu peel

と、Hグループの量の増加と、その色が紅色に近いオレンジ色を示すことが未処理区のものとは異なるところである。

Table 2にはCPTA処理後10日目の各区の試料と土橋紅の全カロチノイド量とカロチノイドパターンをまとめた。これらの各カロチノイドグループについては前

Table 2. Changes of Carotenoid Pattern in CPTA Treated Citrus Unshiu Peel

(10 days after treatment)

Carotenoid group	Carotenoid									
	%	mg%	%	mg%	%	mg%	%	mg%	%	mg%
	CPTA (ppm)								Dobashibeni	
	0		1250		2500		5000			
1. Hydrocarbon	2.0	0.31	9.6	1.70	13.9	2.61	14.7	2.63	2.5	0.39
2. Monol	43.5	6.83	40.0	7.08	36.6	6.88	32.3	5.78	30.1	4.73
3. Monol monoepoxide	4.4	0.69	3.7	0.66	3.1	0.58	3.3	0.59	6.9	1.08
4. Diol	5.6	0.88	7.1	1.26	6.5	1.22	7.1	1.27	8.2	1.29
5. Keto-carotenoid									20.1	3.16
6. Diol monoepoxide-1	6.1	0.96	5.7	1.01	5.7	1.07	6.1	1.09	10.7	1.68
7. Diol diepoxyde-1	14.8	2.32	13.0	2.30	13.3	2.44	13.2	2.36	4.9	0.77
8. Diol monoepoxide-2	11.5	1.81	6.0	1.06	7.4	1.39	6.8	1.22	7.2	1.13
9. Diol diepoxyde-2	9.5	1.49	12.6	2.23	10.1	1.90	12.8	2.29	7.5	1.18
10. Polyol	2.5	0.39	2.6	0.46	3.4	0.64	3.6	0.64	1.9	0.30
Total carotenoid		15.7		17.7		18.8		17.9		15.7

報⁹⁾¹⁰⁾と同様である。

全カロチノイド量は未処理区の 15.7 mg% に対し、1250 ppm 区は、17.7 mg%、2500 ppm 区は 18.8 mg%、5000 ppm 区は 17.9 mg% といずれも増加していた。このように全カロチノイド量からみると、未処理区と CPTA 処理の 3 区との間には差はあるが、CPTA 処理の 3 区の間にはほとんど差がない。しかし、H グループの量をみると、未処理区 0.31 mg% に対し、1250 ppm 区では 1.70 mg% と約 6 倍、2500 ppm 区は 2.61 mg%、5000 ppm 区は 2.63 mg% と、ともに約 9 倍になっている。このように 2500 ppm くらいまでは濃度が高くなるとともに増加しているが、2500 ppm 区と 5000 ppm 区との間では H グループ量の間に差がなくこの場合の CPTA 処理効果は 2500 ppm くらいの濃度で飽和に達すると考えられる。

また、全カロチノイドから H グループを差引いた量は、未処理区 15.4 mg% に対し、CPTA 処理の各区はそれぞれ 16.0 mg%、16.2 mg%、15.3 mg% とほとんど差がない。つまり CPTA 処理によって増加するカロチノイド量は、ほとんど H グループである。このほか CPTA 処理で増加の傾向を示すものに、D、DD₂、P があるがいずれも未処理の 2 倍には達していない。

3. H グループの分離、同定

CPTA 処理区の H グループを集め、これをアルミナのみの薄層で、石油エーテルを展開剤として細分化すると 6 コのフラクションに分れる。極性の弱いものより F₁、F₂……F₆ として、その含有率を算出すると CPTA の各濃度での処理区間にはほとんど差はなく、F₁: 6%、F₂: 4%、F₃: 7%、F₄: 8%、F₅: 15%、F₆: 60% であった。これらのうち F₁ と F₂ は、CPTA 未処理区の H グループにも含まれているものであるが、F₃~F₆ は CPTA 処理によって生成したカロチノイドである。

Table 3. Absorption Maxima of Hydrocarbon Carotenoids in CPTA Treated Peel

	Absorption maxima (in <i>n</i> -hexane)	Carotenoid
F ₁	475, 449, 425, 400, 379, 360	ζ-carotene, β-carotene
F ₂	425, 400, 378	ζ-carotene
F ₃	487, 454, 431	γ-carotene
F ₄	488, 458, 435	γ-carotene
F ₅	498, 467, 440, 361	<i>cis</i> -lycopene
F ₆	502, 470, 443	lycopene
lycopene*	503, 471, 445	

* Lycopene from tomato

Table 3 に F₁~F₆ のヘキサン中での極大吸収値を示した。これらの極大吸収値から F₁ は ζ-カロチンと少量の β-カロチンの混合であり、F₂ は ζ-カロチンである。F₃ と F₄ はリコピンの末端の 1 つが環化して、β-イオノン環を形成している γ-カロチンである。

カロチノイドの共役二重結合が増加すると、極大吸収は長波長側に移動するが、その移動度は長鎖の共役二重結合であれば、20 nm、イオノン環の共役二重結合であれば 10 nm 程度である¹¹⁾。γ-カロチンは、リコピンと比較して長鎖の共役二重結合が 1 コ減り、その代りイオノン環の共役二重結合が 1 コふえたものと考えることができる。つまり差引きすると、γ-カロチンの極大吸収はリコピンよりも 10 nm 短波長側に移動することになる。同様に β-カロチンの極大吸収は、リコピンよりも 20 nm 短波長側に移動する。

F₅ と F₆ はリコピンである。F₅ は、トマトから再結を繰り返して得たリコピンと極大吸収も一致するのでトランス型である。F₆ は 361 nm にシスピークがみられるようにシス型リコピンである。F₅ と F₆ をともにヨウ素で処理して、シス型カロチノイドの混合平衡物¹⁰⁾にして極大吸収とみると、両者はともに 499, 468, 433, 361 nm と一致することからも同一カロチノイドであることは明らかである。

以上の各フラクションの TLC 上での色調は、F₁ と F₂ が黄色、F₃ と F₄ はオレンジ、F₅ と F₆ はピンクである。

CPTA で処理した各区の F₅、F₆ をまとめてリコピン量として、各 H グループ中の比率を示したのが Fig. 2 である。リコピンは未処理区土橋紅にみられず、CPTA 処

Fig. 2. Lycopene content in hydrocarbon carotenoids of CPTA treated Citrus Unshiu peel

理区の 1250 ppm では約 1.2 mg%, 2500 ppm と 5000 ppm には 2.1~2.2 mg% 含まれている。また γ -カロチンもリコピンとともに CPTA 処理によって発現するカロチノイドであり、全 H グループに対して 15% 程度である。これらのリコピンと γ -カロチンを除いた H グループの量は、CPTA 処理区、未処理区、土橋紅の間にほとんど差はない。

以上のように、CPTA 処理による着色促進は、未処理のミカン果皮のカロチノイド組成に新しく生合成されたリコピンと若干の γ -カロチンがプラスされたかたちですすめられる。

このような現象は、すでに報告されている YOKOYAMA ら^{7,8)}の結果と同じ傾向を示し、CPTA 処理による温州ミカンの色調の変化もまたリコピンの生合成系の特異的な賦活によるものである。

また最近、ELAHI ら¹²⁾は *Phycomyces Blakesleanus* を用いてカロチノイド生合成への CPTA の作用機作を調べ CPTA は neurosporene と lycopene レベルにおける環化反応を阻害すると報告している。

(注: *=cyclization)

しかし、温州ミカンのカロチノイド生合成系では、単純に環化反応の阻止と考えることはできない。温州ミカン果皮からは通常リコピンは検出されないが、この理由にはカロチノイド生合成系でリコピンのターンオーバーが極端に速いか、あるいはリコピンを経ないで neurosporene → β -zeacarotene → γ -carotene → β -carotene の系をとるかの2つの考え方がある。

前者をとるならば、CPTA 処理によるリコピンの蓄積は、lycopene → γ -carotene の環化反応阻害と考えることも可能であるが、この場合 γ -カロチン以降のカロ

チノイドの量の変化が小さいことを説明しきれない。後者の方をとるならば、CPTA 処理によるリコピンの蓄積は neurosporene → lycopene の脱水素反応を賦活し、lycopene → γ -carotene への変化がないか、または極端に抑制されたと考えるべきであろう。しかしこのいずれかは現在までのデータでは判断できない。

要 約

樹上の温州ミカンに、CPTA の 1250 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm 水溶液を散布し、ミカン果皮の着色促進効果を調べた。

CPTA 処理したものはいずれも果皮が紅色に着色し、処理後 10 日目には外観的に完熟の土橋紅温州と差がなくなる。CPTA 処理ミカンの果皮のカロチノイドを TLC で分別すると、H グループの増加が著しく、2500 ppm でマキシマムに達し未処理の9倍以上になる。しかし、その他のカロチノイドグループは、処理区と未処理の間に大きな差はない。

CPTA 処理によって増加した H グループを TLC でさらに細分すると、 β -カロチン + ζ -カロチン (6%), ζ -カロチン (4%), γ -カロチン (15%), リコピン (75%) の 4 グループに分れる。このうち β -カロチンと ζ -カロチンは未処理のミカン果皮にもこの程度含まれている。以上のように CPTA 処理によるミカン果皮の着色促進は、リコピン生合成系の賦活によってすすむと考えられ、樹上散布によるリコピンの蓄積は全カロチノイド量の12%程度である。

文 献

- 1) 広瀬和栄・山本正幸・大東 広：園芸試験場報告，B, 10 号，17 (1970)。
- 2) DAITO, H. and HIROSE, K.: *Bull. Hort. Res. Sta., Japan. Ser. B*, No. 10, 35 (1970)。
- 3) MAPSON, L.W.: *Ann. Report of Low Temp. Res. Sta.*, 29 (1962)。
- 4) 大久保増太郎・梅田圭司 (未発表)
- 5) 梅田圭司・白石正英：食品工誌，18, 161 (1971)。
- 6) COGGINS, JR. C.W., HENNING, G.L. and YOKOYAMA, H.: *Science*, 168, 1958 (1970)。
- 7) YOKOYAMA, H.: *Phytochemistry*, 10, 1831 (1971)。
- 8) YOKOYAMA, H. and DE BENDICT, C.: *Phytochemistry*, 11, 1721 (1972)。
- 9) 梅田圭司・川嶋浩二：食品工誌，18, 147 (1971)。
- 10) 梅田圭司・田中芳一・佐藤貞臣：食品工誌，18, 482 (1971)。
- 11) GOODWIN, T.W.: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment*, Academic Press p. 517 (1965)。
- 12) ELAHI, M., LEE, T.H.: SIMPSON, K.L. and CHICHESTER, C.O.: *Phytochemistry*, 12, 1633 (1973)。(昭和48年11月10日受理)