

温州ミカン果汁における色調の変化と エポキシカロチノイドの変換

多田 幹郎
(生物化学研究室)

Received November 1, 1986

Conversion of Epoxy-carotenoids and Color Changes of *Citrus Unshiu* Juice

Mikiro TADA
(Laboratory of Biological Chemistry)

The bright orange color of *Citrus Unshiu* juice changes to the yellow color during the processing and storage period. This color change was caused by the conversion of 5, 6-epoxy-carotenoids to 5, 8-franoxo-carotenoids with the catalysis of organic acid in juice. In practical juice processing and storage, this conversion has been taken place gradually and completed about 5 weeks time. The same conversion was caused by the silica gel catalysis, and 5, 8-franoxo-carotenoids changed color from yellow to green on the silica gel plate.

緒 言

温州ミカン果汁のすぐれた性質の一つとして、あざやかな色調が挙げられている¹⁾。

温州ミカン果汁の色調は、搾汁直後には、赤色系の鮮かさを有しているが、市販製品果汁では赤味に乏しく、黄色味が強まっている。このような色調の変化は古くから果汁製造関係者によって認められているが、この件に関する研究は見当らない。

柑橘果汁の色調は、含まれるカロチノイドの量と質によって決まる。従って、上述の現象はカロチノイドの変化に起因することが容易に予想できる。筆者らは、温州ミカン果汁の製造工程中におけるカロチノイドの量的変化は少いことを報告した⁶⁾。本報告では、カロチノイドの質的变化、とりわけエポキシカロチノイドの変化を調べ、果汁の色調の変化との関係を検討した。

材 料 と 方 法

1. 試 料

製造工程中の果汁は和歌山県の工場で、稼動中に採取し、直ちに 1N-NaOH で中和したのを持ち帰り分析に供した。また同工場で採集した製造直後のストレートタイプの缶入果汁は 5°C で貯蔵し、一定期間毎に分析した。実験室で調製した果汁の原料ミカンは、岡山大学農学部本島農場で栽培されている尾張系温州の完熟果実であり、この果肉をミキサーで破碎し、80 メッシュのスクリーンを装着した遠心濾過機に供して果汁を調製した。

2. カロチノイドの抽出

予め 1N-NaOH で中和した試料果汁から、遠心分離 (6,000 rpm×5 min) によってパルプを集め、40% メタノールで十分に洗浄した。このパルプからアセトンでカロチノイドを抽出し、ケン化処理後、不ケン化物画分を集め、n-ヘキサン溶液とし、-20°C で冷却して生じる沈澱

物を除き、全カロチノイド溶液とした。

3. ジヒドロキシカロチノイドの分画

上記全カロチノイドの n-ヘキサン溶液を分液漏斗に入れ、等量の 70% メタノールを加えてよく振盪し、分配を完全にす。70%-メタノール層を分取し、水を加えてメタノール濃度を 50% とした後、これに等量の n-ヘキサンを加えて分液漏斗中で分配させ、n-ヘキサン層を分別した。この画分には、主要成分として、2コの水酸基とエポキシド又はフラノキシド基を有するカロチノイドが含まれていることを確めた^{6,7)}

4. ジヒドロキシカロチノイドの分離と定性

溶媒分別によって得たジヒドロカロチノイド画分に含まれる個々の成分の分離には TLC を利用した。用いたプレートは、Aluminium Oxide (Type E, Merck) であり、展開溶媒系には、ベンゼン—酢酸エチル—メタノール (25:5:1) を使用した。分離した成分は、その分光学的特性を文献値⁸⁾と比較することにより定性、定量した。

結 果 と 考 察

1. 全カロチノイドの吸収スペクトルの変化

搾汁直後の新鮮果汁と、搾汁後一連の製造工程を経て製品化され、3 ヶ月間貯蔵した缶入果汁から抽出した全カロチノイドの吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。新鮮果汁のスペク

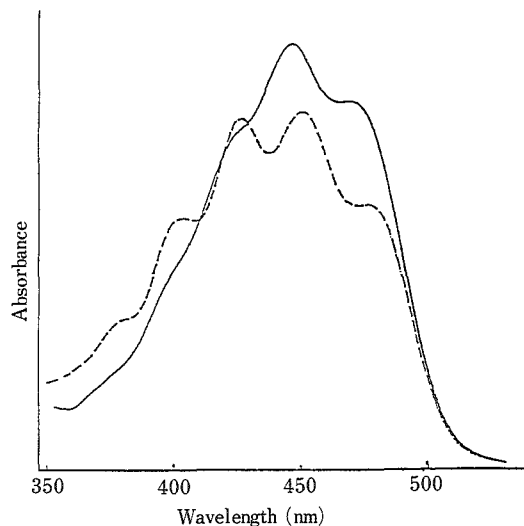


Fig. 1 Absorption spectra of total carotenoid from *Citrus Unshiu* juice (in n-Hexane, — Fresh juice, --- Stored 3 month).

トルに比べて、3 ヶ月間貯蔵した果汁のスペクトルは、450 nm 以上の高波長領域における吸収が減少し、逆に 410 nm 以下の低波長領域における吸収が増加している。このようなスペクトルの変化は、果汁製造関係者が認めている果汁の色調変化——赤味が乏しくなり黄色味が増大する——がカロチノイドの変化に起因することを示している。

実験室にて調製した果汁を用いて、吸収スペクトルの変化の要因について検討した結果、温度が重要な要因となっていることが判明した。例えば、5°Cでは吸収スペクトルの変化の完結に3週間以上を要するのに対して、60°Cでは15時間で変化が完了した。また、調製した新鮮果汁を予めアルカリで中和して、同様な実験を試みた結果、吸収スペクトルの変化は認められなかった。これらの結果は、全カロチノイドの吸収スペクトルの変化に果汁中に含

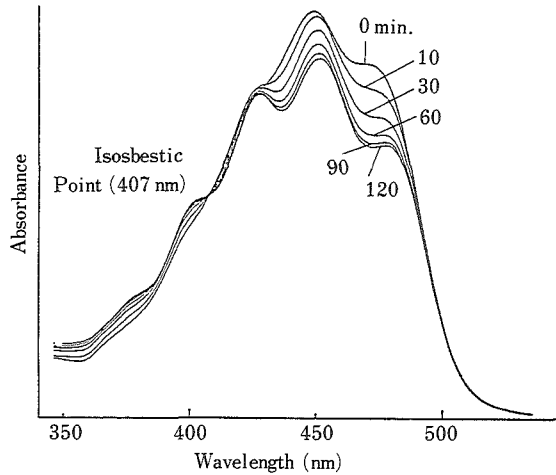


Fig. 2 Time course of absorption spectrum of total carotenoid in 0.5% citric acid-ethanol.

まれている有機酸が関与していることを予想させる。そこで、新鮮果汁から全カロチノイドを抽出し、そのエタノール溶液にクエン酸(0.5% w/v)を加えて、吸収スペクトルの変化を経時的に測定した。その結果、Fig. 2に示すように、吸収スペクトルは経時的に変化し、300分後に測定したスペクトルはFig. 1に示された3ヶ月貯蔵果汁の吸収スペクトルと殆ど同様のものとなった。

CURLらは分子内に5, 6-エポキシド基を有するカロチノイドは有機酸の存在下で5, 8-フラノキシカロチノイドに変化することを認め²⁾、その変換は吸収スペクトルの極大吸収波長の低波長側へのシフトを伴うことも明らかにした³⁾。温州ミカン果汁のカロチノイド中には、約15%のエポキシあるいはフラノキシカロチノイドが存在し⁷⁾、また果汁中には約1%のクエン酸が存在することから、Fig. 1, Fig. 2に示されたスペクトルの変化がエポキシカロチノイドのフラノキシカロチノイドへの変換に起因することが考えられる。

2. エポキシカロチノイドの変換

上述の推察を確かめるためには、新鮮果汁と貯蔵果汁中のエポキシカロチノイドとフラノキシカロチノイドの量的関係も明らかにする必要がある。また、温州ミカン果汁中のエポキシカロチノイドとフラノキシカロチノイドの大部分はジヒドロキシカロチノイド画分に存在する⁷⁾。従って、新鮮果汁と3ヶ月貯蔵果汁から全カロチノイドを抽出し、それらから溶媒分別法によって得たジヒドロカロチノイド画分について、構成カロチノイドの定性と組成比の比較をTLC分析によって試みた。

Fig. 3に示すように、新鮮果汁と貯蔵果汁の両者から、その濃度には著しい差はあるが、Rf値の等しい6スポットが確認できた。それぞれのスポットをTLCプレートからかき取り、

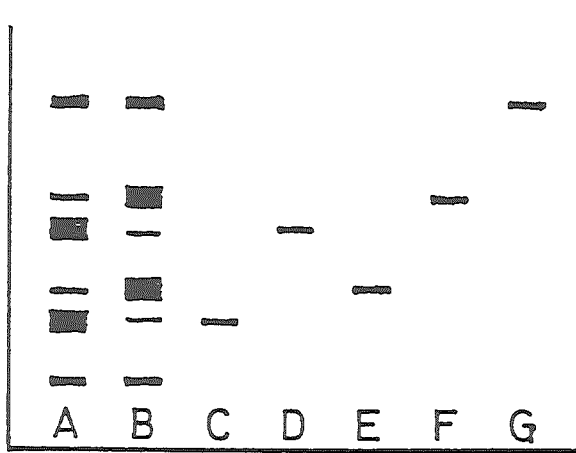


Fig. 3 Thin layer chromatogram of dihydroxy-carotenoids from *Citrus Unshiu* juice.

- A: Fresh juice
- B: Stored for 3 month
- C: Violaxanthin
- D: Antheraxanthin
- E: Auroxanthin
- F: Mutatoxanthin
- G: Lutein

溶出後定性を試みたところ、原点に留っているスポット以外は全て単一成分であり、Rf 値の大きい順から lutein (3,3'-dihydroxy- α -carotene), mutatoxanthin (3,3'-dihydroxy-5,8-franoxo- β -carotene), antheraxanthin (3,3'-dihydroxy-5,6-epoxy- β -carotene), auroxanthin (3,3'-dihydroxy-5,8,5',8'-difranoxo- β -carotene), violaxanthin (3,3'-dihydroxy-5,6,5',6'-diepoxy- β -carotene) と同定できた。Fig. 4, Fig. 5 はそれぞれ単離した violaxanthin と antheraxanthin がクエン酸の存在下で、対応する 5,8-フラノキシカロチノイドである auroxanthin 及び mutatoxanthin への変換される経時変化を吸収スペクトルで追跡した結果である。そして、これらの反応生成物の TLC 上での挙動及び分光学的特性は、果汁から抽出、単離した物質と全く同一であった。上述のエポキシドあるいはフラノキシド基を有するカロチノイドは、新鮮果汁と貯蔵果汁の両者に認められるが、Fig. 3 に模式的に示したように、それらの存在比は両果汁において著しく異なる。それぞれ相当するスポットから抽出して量比を調べた結果、antheraxanthin と mutatoxanthin の比は、新鮮果汁では 89:11 3 ヶ月貯蔵果汁では 6:94 であり、violaxanthin と auroxanthin の比は、それぞれ、90:10 及び 4:96 であった。これらの事実は、果実中にはフラノキシカロチノイドは殆んど存在せず大部分あるいは全部がエポキシカロチノイドとして存在し、そのエポキシカロチノイドが果汁製造工程および貯蔵中にフラノキシカロチノイドに変換されることを示している。このような 5,6-エポキシカロチノイドの 5,8-フラノキシカロチノイドへの変換はシリカゲル薄層プレート上で容易に起こること、5,8-フラノキシカロチノイドはシリカゲルと可逆的な緑色の複合体を作ることを実験操作の過程で認めた。これらの現象はシリカゲルがカロチノイド分析に広く用いられていることと併せて考えると、分析結果の解析には十分な注意をはらう必要があると考えられる。

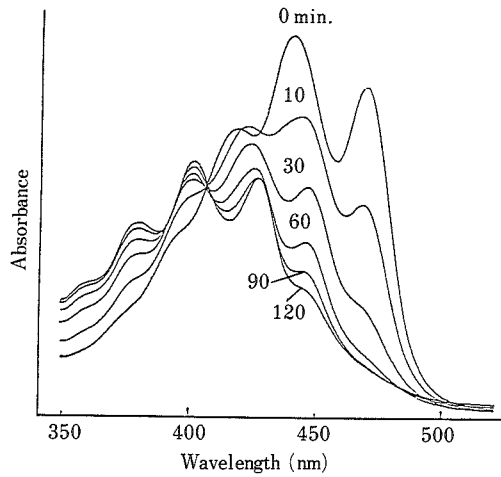


Fig. 4 Time course of absorption spectrum during rearrangement of violaxanthin to auroxanthin in 0.5% citric acid-ethanol.

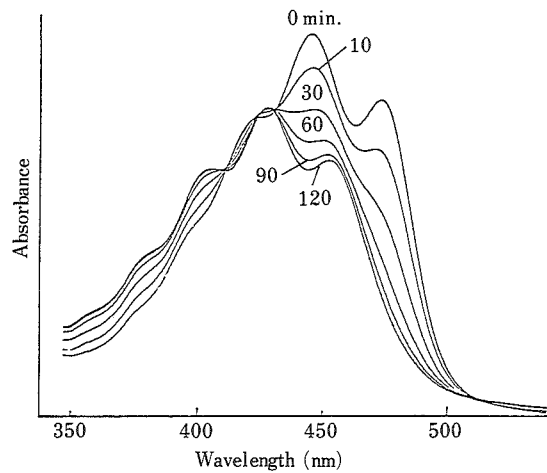


Fig. 5 Time course of absorption spectrum during rearrangement of antheraxanthin to mutatoxanthin in 0.5% citric acid-ethanol.

3. 果汁の色調の経時変化

Fig. 2 において、全カロチノイドの吸収スペクトル変化は 407 nm を等吸光度点とし、470 nm で最も吸光度の減少が著しいことが認められるので、これらの波長における吸光度をもとに、カロチノイドの変化の割合を算出してみた。実験室で調製した新鮮果汁のカロチノイド(変化率 0%) を 2 分し、その一部をクエン酸で処理することによって完全に変化させ(変化率 100%)、それらを混合して、任意の変化率をもつカロチノイド溶液を作成した。このカロチノイド溶液の吸収スペクトルを測定し、470 nm と 407 nm における吸光度の比を求め、変化率との関係を求めた。その結果、Fig. 6 に示すような直線関係が得られた。

この関係を目安として、果汁製造工程中および貯蔵中における、エポキシカロチノイドのフラノキシカロチノイドへの変化率を求めて Table 1 の結果を得た。製造工程のうち、加熱

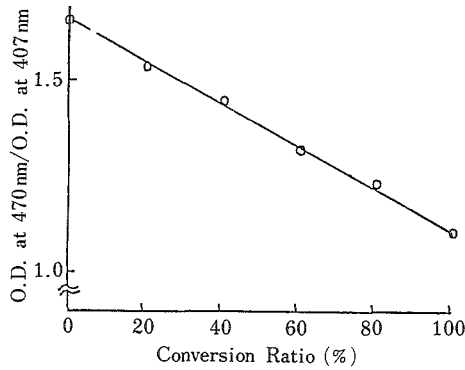


Fig. 6 Relationship between the conversion ratio of epoxy-carotenoid and the proportion of absorbance at 470 nm to at 407 nm.

Table 1 Determination of conversion ratio of epoxy-carotenoids to franoxy-carotenoids in *Citrus Unshiu* juice during the processing and storing

	Total Carotenoid	O. D. at 470nm O. D. at 407nm	Conversion Ratio (%)
(Manufacturing Process)			
	mg%		
Extraction	2.63	1.62	0
1st. Pulp Elimination	2.11	1.59	11
2nd. Pulp Elimination	1.52	1.60	10
Heating	1.49	1.54	19
Evaporation	5.89	1.47	34

(Storing at 5°C)			
Just after Produced	1.97	1.45	37
2 weeks	1.73	1.22	78
5 weeks	1.68	1.12	97
10 weeks	1.72	1.11	98

処理，濃縮工程における変化が高いのは温度の効果であろう。製造工程を通しての変化率は35%と比較的低く，その後の貯蔵中にゆるやかに変化が進み，約5週間後には変化が完了することが判明した。

以上，温州ミカン果汁の色調の変化が，5, 6-エポキシカロチノイドの5, 8-フラノキシカロチノイドへの変換に起因し，その変換が製造工程および貯蔵あるいは流過程で進行することを認めた。しかし，この変換は果汁中の有機酸によって触媒されることから，現時点でこの反応を防止する方法は見当らない。しかし，近年カロチノイド分子のエポキシド基，フラノキシド基を還元的に分解する酵素 deepoxidase が高等植物に存在することが報告されており^{5,8)}，将来，その利用による柑橘果汁の色調の保持も可能になることが予想される。

要 約

温州ミカン果汁の色調の変化は，果汁中に存在するクエン酸などの有機酸の触媒作用によって，5, 6-エポキシカロチノイドが5, 8-フラノキシカロチノイドへ変換することに起因することを認めた。この変換は果汁製造工程および流過程を通じてゆっくり進行し，約5週

間で完結することを明らかにした。また、この変換がシリカゲルによっても触媒されること、5,8-フラノキシカロチノイドはシリカゲルに吸着されると緑色を呈することも認めた。

謝 辞

試料の採集に御協力を頂いた和歌山県経済農業協同組合連合会海南食品工場の伊福靖氏と岡山大学農学部の中野幹夫助手および土居川俊二技官に感謝する。

文 献

- 1) 荒木忠治：ジャパンプードサイエンス 12 (5) 49-57 (1973)
- 2) CURL, A.L., BAILEY, G.F. : Agric. Food Chem. 2, 685-688 (1954)
- 3) CURL, A.L., BAILEY, G.F. : Agric. Food Chem. 9, 403-406 (1961)
- 4) DAVIES, B. H. : Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (T.W. GOODWIN eds.) 489-532, Academic Press (1965)
- 5) KRINSKY N.I. : Photophysiology (GEISE, A.C. eds.) vol. 3, 123-153, Academic Press (1968)
- 6) 多田幹郎・梅田圭司・平野裕二・白石正英：食品工誌 21 (1), 25-31 (1994)
- 7) 多田幹郎：岡山大農学報 69, 17-25 (1987)
- 8) YAMAMOTO, H., HIGASHI, R.M. : Arch. Biochem Biophys. 190 (2) 514-517 (1978)