

## クチナシ果実の発育に伴うカロテノイドパターンの変化

市 隆人<sup>a)</sup>・片山 豪・多田幹郎

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received July 1, 1993

## Changes in Carotenoid Pattern during Development of Gardenia Fruit

Takahito ICHI<sup>a)</sup>, Tsuyoshi KATAYAMA and Mikiro TADA*(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)*

Changes in the content and composition of carotenoid in gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit were examined during the development stage from anthesis to full maturity in order to elucidate the biosynthesis of crocin (digentiobiosyl 8, 8'-diapocarotene-8,8'-dioate).

The results obtained can be summarized as follows:

1) Gardenia fruits at the enlargement stage produced very small amounts of carotenoids, but after the beginning of mature process, biosynthesis of carotenoids started and carotenoid content in fruit increased sharply with process of maturation. The carotenoid content of fully matured fruit was approximately 450mg%.

2) Gardenia fruits at all stages of the mature process contained only a small amount of C<sub>40</sub>-carotenoids such as  $\beta$ -carotene, and the greater part of carotenoids accumulated in the fruit were glyco-ester derivatives of crocetin (8,8'-Diapocarotene-8, 8'-dioic acid) such as crocin.

3) Based on the changes in content of carotenoids at the various mature stage, several derivatives of crocetin appeared to be intermediates of crocin biosynthesis.

## 緒 言

クチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis) は日本、中国、東南アジアに分布するアカネ科の常緑低木であり、6~7月頃に白い花を、10~11月頃には長卵形の橙赤色の果実をつける。その完熟した果実中にはイリドイド配糖体のジエニピン、ジエニポサイド、C<sub>20</sub>-カロテノイド系黄色素のクロシン、クロセチンなどのほか  $\beta$ -カロテン、シトステロール、ノナコサン、マンニトールなどの成分が含まれ、古くから消炎、利尿、解熱、止血および鎮静薬などとして使用され、今日でも、黄疸、腎炎、血便、血尿、不安不眠などの症状に漢方薬として用いられている。また、クチナシ果実は、アヤメ科植物サフラン (*Crocus sativa*) の雌蕊と同様に、さまざまな食品の黄色着色料として昔から広く用いられてきた。近年、食品用天然色素は、そのイメージや安全性などの観点から、合成色素にかわって急激に需要が高まってきている。とりわけクチナシ黄色素は、麺類、キャンディー、飲料、漬物などの食品を黄色に着色する目的で多く使用されている<sup>1)</sup>。

a) 岡山大学大学院自然科学研究科 (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University) 在学, 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (San-Ei Gen F・F・I, Inc) 在職中

クチナシ果実及びサフランの雌蕊にも含まれる黄色素の主要成分はクロシン (crocin : Digentiobiosyl 8, 8'-diapocarotene-8, 8'-dioate) であり, その構造は, P. Karrer らによって, 炭素数20個(C<sub>20</sub>)のカロテノイド酸であるクロセチン(crocetin : 8, 8'-Diapocarotene-8, 8'-dioic acid) に2分子のゲンチオビオースがエステル結合したものであることが明らかにされた<sup>2)</sup>. このように, 古くから広く利用され, その構造も早くから明らかにされているにもかかわらず, クロシンの生合成についての研究は極めて少ない. R. Kuhn ら<sup>3)</sup>は, サフラン中にピクロクロシン及びサフランアルが検出されたことから, プロトクロシンと仮称するC<sub>40</sub>-カロテノイドの配糖体の存在を想定し, クロシンはその酸化的分解物であろうと説明している. これに対して, 梅谷ら<sup>4)</sup>は, クチナシ果実の成分分析の結果に基づき, クロシンが未知の無色物質から *de novo* 合成される可能性を指摘した. このようにクロシン生合成については殆ど未解明の現状にある. そこで本研究では, クロシン生合成に関する知見を得ることを目的として, クチナシ果実の結実から完熟に至る各発育過程におけるカロテノイド色素の含有量並びにその組成の変化を経時的に分析した.

## 材 料 と 方 法

### 1. 植物材料

植物材料には大阪府豊中市の三光源エフ・エフ・アイ株式会社の温室で栽培されているクチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis) を用い, 結実後1カ月の5月27日より完熟期の11月26日までを7期に分けて, ほぼ1カ月間隔でクチナシ果実を採取した. そして, 収穫順序に基づいてS-1~S-7の試料番号を付した. 果実は採取後直ちに凍結し, 分析に供するまでフリーザー中に保存した.

### 2. 色素成分の抽出

各採取試料よりクチナシ果実(5個体)を無作為に選び出し, 50%アセトンを加えて磨砕し, 100%アセトンを用いて, 冷暗所で浸漬抽出した. この抽出操作を, 残渣にカロテノイドに由来する黄色が残らなくなるまで繰り返した. これらの抽出液を合わせて, 減圧下で濃縮乾固させ, 再びアセトンに溶解して, これを全色素溶液として以降の分析に供した. なお, C<sub>20</sub>-カロテノイドに着目した分析にはこの溶液をそのまま供したが, C<sub>40</sub>-カロテノイドの分析を行う場合には, この全色素を水と酢酸エチルエステルとで分配して得られる酢酸エチルエステル抽出物を使用した.

### 3. 全カロテノイド含量の測定

各試料の全カロテノイド含量を測定するために, 各試料の全色素溶液を適当に希釈して, 450nmにおける吸光度(OD<sub>450</sub>)を自記分光光度計(Shimadzu, UV-3000)で測定し, クロセチンの比吸光係数( $E_{1\%}^{1\text{cm}}=4320$ )<sup>5)</sup>に基づいてカロテノイド含量をクロセチン換算値として求めた.

### 4. カロテノイド組成の分析<sup>6)</sup>

クチナシ果実の発育に伴うカロテノイド組成の変化を調べるために, C<sub>20</sub>-カロテノイドのHPLCによる分析方法を検討し, 次の方法を確立して実験に用いた. カラムには, nucleosil 5 C 18(4.6mm×250mm)を用い, 移動溶媒及びそのタイムプログラムとして, 最初の15分間は50%メタノール, 15分から35分にかけて50%メタノールから100%メタノールへの連続勾配をつけ, 35分以降は100%メタノールとする条件を用い, 440nmの波長でモニターした. 装置には日本分光製HPLC(880シリーズ)を使用し, データはクロマトパック(Shimadzu C-R 4 A)で処理した.

**Table 1** Changes in morphological characteristics and color during development of gardenia fruit.

Sample No.	Date of harvest	Fruit size (cm)		Fruit weight (g)		Color of flesh
		Length	Width	Fresh	Dry	
S-1	27 May.	2.0~3.0	0.6~1.3	1.60	0.38	White gray
S-2	26 Jun.	3.4~4.5	1.3~1.6	3.79	0.76	Pale green
S-3	24 Jul.	3.9~4.7	1.2~1.9	5.98	1.08	Pale yellow
S-4	26 Aug.	4.7~6.7	1.5~2.2	5.56	1.32	Yellow
S-5	25 Sep.	4.0~6.0	1.6~2.1	3.56	1.18	Orange
S-6	27 Oct.	4.0~6.0	1.5~2.0	3.82	1.37	Reddish orange
S-7	26 Nov.	3.9~5.7	1.5~2.0	4.05	1.42	Red

### 5. カロテノイドの定性分析

カロテノイドの定性分析は薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。吸着層にはシリカゲル(Kieselgel G, Merk)を用い、展開溶媒には、酢酸エチル：メタノール：水(10：3：1)を使用した。

### 6. アルカリ加水分解

クロシンなどのカロテノイド酸の糖エステルの加水分解 (ケン化処理) には次の方法を採用した。試料を1%苛性カリ水溶液に溶かし、暗所、室温で一夜放置した後、希硫酸でそのpHを2に調整し、水と酢酸エチルエステルで分配して、カロテノイド酸を酢酸エチルエステル溶液として得た。

### 7. 乾燥重量の測定

クチナシ果実の新鮮重量 (FW) を秤量した後、約1mm厚の切片とし、恒温乾燥機中100℃で2時間乾燥後、デシケーターに入れて放冷して乾燥重量 (DW) を測定した。

### 8. クロシン及びクロセチン

クロシン標品は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社から譲り受けた。クロセチン標品はクロシンをアルカリ加水分解して調製した。

## 結果及び考察

### 1. クチナシ果実の発育

採取したクチナシ果実について、その採取日と果実の大きさ及び肉眼観察での色調などをTable 1に示した。高さ約1メートル程度のクチナシは、4月下旬に6枚の花びらを持つ白い花を咲かせ、その後すぐに結実した。結実後1カ月の果実はそのサイズは小さいが、楕円形で縦に6本の稜翼と喙を持ったクチナシ果実に特徴的な形状を有していた。この時期より結実後3カ月頃まで(S-3)にかけて果肉部分が急激に肥大し、果実が大きくなるとともに新鮮重量が増加するが、果肉への黄色素の蓄積は観察されなかった。しかし、結実後3カ月以降、新鮮重量の増加は止まり、逆に減少傾向を示した。この新鮮重量の減少は乾燥の為であり、果実サイズ、乾燥重量は変化しなかった。そして、新鮮重量の増加が止まった時点から、徐々に果肉部分が黄色味を帯びはじめ、急激なカロテノイド色素の蓄積が予想された。

### 2. クチナシ果実の発育に伴うカロテノイド色素含有量の増加

Fig. 1に発育に伴うカロテノイド含有量の変化をクチナシ果実の乾燥重量の変化と共に示した。上述の観察結果のように、発育初期の果実(S-1, S-2)にはカロテノイド色素は殆ど認められず、3カ月後の果実(S-3)においてもそのカロテノイド含量は0.23mg/g-DWと少なく、肥大成長が終った果実(S-4)でも0.45mg/g-DWであった。しかし、乾燥重量の

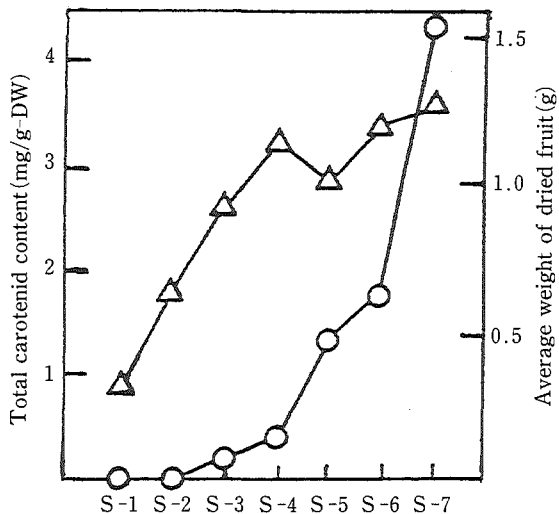


Fig. 1 Changes in carotenoid content during development of gardenia fruit. (○); carotenoid content, (△); Average weight of dried fruit.

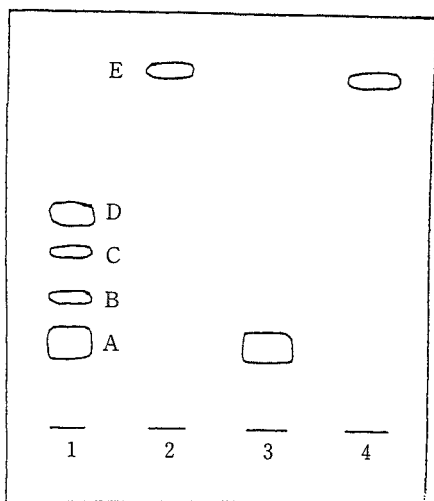


Fig. 2 TLC patterns of total carotenoid from matured gardenia fruit. The fruits harvested at full mature stage (S-7) were used for analysis. Lane 1; unsaponified total carotenoid, Lane 2; saponified total carotenoid, Lane 3; crocin, Lane 4; crocetin.

増加が止まり成熟過程に入ると、カロテノイド色素の含有量は急激に増加し、結実後7カ月目の完熟した果実(S-7)では4.49mg/g-DWとなった。この結果は、クチナシ果実においては、肥大成長が続いている間はカロテノイド生成は殆ど行われず、成熟過程で生合成が活発に進行することを示している。また、最終収穫果実のカロテノイド含有量は、単位重量当たりのカロテノイド色素量としては非常に高く、この時期に収穫したクチナシ果実は食品着色料の原料として商業的に有益であることを示している。

### 3. クチナシ果実中のカロテノイドの定性

梅谷ら<sup>4)</sup>はクチナシ果実の成分分析を行い、R. Kuhnらが想定したプロトクロシンは存在せず、 $\beta$ -カロテン等の $C_{40}$ -カロテノイドも検出されなかったと報告している。本研究においてもプロトクロシンと思われる物質の検出・確認はできず、また $C_{40}$ -カロテノイドについては、その存在を確認したがその量は極めて少量しか存在していないことを認めた。そこで以後の実験では、クロシン、クロセチンをはじめとする $C_{20}$ -カロテノイドに注目して、これらの色素について検討を行った。

結実後7カ月目の完熟クチナシ果実(S-7)の全カロテノイド色素のケン化処理前後のTLCパターンをFig. 2に、そしてHPLCパターンをFig. 3に示した。TLCにおいてケン化前の試料は4つの色素スポット(A, B, C, D)に分離され、ケン化処理後それらのスポットは消失し、Rf値の大きい色素スポット(E)の1つだけになった。そして、標品との比較から、スポットAはクロシン、スポットEはクロセチンに相当することが判明し、スポットB, C及びDに存在する色素のカロテノイド母核がクロセチンであることを示した。HPLC

においてはケン化処理前の試料から11コの明確なピーク(P-1~P-11)が検出でき[Fig. 3(a)], ケン化処理によって10コのピーク(P-1~P-10)が消失し、3つのピーク(P-11~P-13)だけが認められた[Fig. 3(b)]. これらのピークのうち、P-2とP-11はそれぞれクロシンとクロセチンであることを標品の保持時間との一致から確認した。また、ヨード触媒による異性化反応後の保持時間の比較によってP-3と

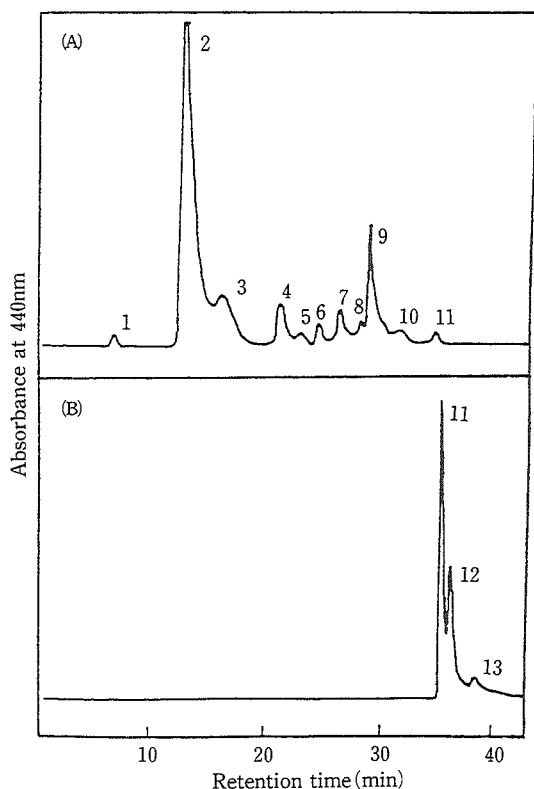


Fig. 3 HPLC patterns of total carotenoid from matured gardenia fruit. Fruits harvested at full mature stage (S-7) were used for analysis. A, unsaponified total carotenoid, B, saponified total carotenoid. P-2 and P-11 were identified by comparing their retention times with those of references, respectively.

V. K. Dhingra ら<sup>7)</sup>は、サフランの雌蕊中にはクロセチンの両カルボキシル末端にゲンチオピオースやグルコース等の糖類がいろいろな組み合わせであるいは一方の末端だけにエステル結合した物質が存在することを報告している。クチナシ果実のクロセチン誘導体はいずれも水溶性であり、希酸によって容易に加水分解される。従って、上述の7種のクロセチン誘導体は糖エステルであり、結合している糖の種類とその数に起因する極性の差によって分離されたものと推察している。

#### 4. 発育過程におけるカロテノイド組成の変化

クロシン生合成についての知見を得るために、クチナシ果実中の各発育段階におけるカロテノイド組成の変化について、クロシン、クロセチンおよび7種のクロセチン誘導体の9成分の組成比を求めることによって追跡した。なお、組成比はHPLCにおける9成分のピーク面積の和に対する個々のピーク面積の占める割合(%)で表した(Table 2)。肥大成長が続いている時期の果実(S-3)中にはP-1, P-4, P-8の3成分は検出されず、主要成分としてP-9成分が32%を占め、次いでクロシン(P-2とP-3)が28%, P-6とP-7成分もそれぞれ16%, 19%と多く存在している。そして、この発育段階では遊離クロセチン(P-11)が3%存在した。ところが、成熟過程(S-4)に入るとカロテノイド組成は一変して、クロ

P-12はそれぞれクロシン及びクロセチンのシス異性体であり、P-5はP-4成分のシス異性体であると判断した。P-13については、量的に少ないために、それが由来するピークの同定も構造も明確にすることは未だ出来ていないが、その極性からクロセチンの有している2つのカルボキシル基の1つがアルデヒドあるいはアルコールになっているものと推察される。TLCとHPLCパターンの対比をTLCのスポットからの抽出物をHPLCに供することによって行った。その結果、スポットAにはクロシン(P-2)とそのシス異性体(P-3)が、スポットBにはP-4とそのシス異性体であるP-5及びP-6が、スポットCにはP-7とP-8が存在し、スポットDからはP-9とP-10が検出された。TLCにおいてP-1と遊離クロセチン(P-11)が検出されなかったのは、それらの量が少ないためであると思われる。

これらのピーク成分についての定性結果とケン化処理前後のHPLCパターンの比較から、完熟クチナシ果実中にはクロシン以外のクロセチン誘導体が少なくとも7種(P-1, P-4, P-6~P-10, シス異性体は除く)存在することが示唆された。これらクロセチン誘導体に関して、

Table 2 Changes in carotenoid composition during development of gardenia fruit.

Sample No.	Carotenoid composition (%)									Total carotenoid content (mg/g-DW)
	P-1	P-2 + P-3	P-4 + P-5	P-6	P-7	P-8	P-9	P-10	P-11	
S-3	N.D. <sup>a)</sup>	28.00	N.D. <sup>a)</sup>	15.60	18.90	N.D. <sup>a)</sup>	31.70	2.90	2.90	0.05
S-4	1.55	60.84	3.20	1.79	14.55	3.16	11.30	3.51	0.10	0.18
S-5	1.84	70.74	3.29	1.52	8.36	2.18	8.80	3.20	0.07	0.81
S-6	1.34	69.26	7.11	1.25	6.76	1.80	9.46	2.89	0.13	1.76
S-7	1.07	71.59	5.84	2.02	4.19	1.43	10.78	2.93	0.15	4.49

a) Not detected

シンが圧倒的に多く61%を占めるようになり、遊離のクロセチンは微量しか存在せず、S-3において最多成分であったP-9とP-6は激減し、それぞれが占める割合は21%及び14%も低下した。また、S-3において検出されなかった3成分がこの時期に出現した。さらに熟成が進み完熟期に向かう過程では、その組成比に大きな変動は認められなかったが、クロシンの占める比率が70%になるのに連動するように、P-7とP-9の2成分の組成比が低下した。このようなカロテノイド組成の変化から、P-6、P-7及びP-9の3成分はクロシン生合成の直接的な中間前駆体であることが強く予想された。この予想を確かめるために、それぞれの色素の構造決定を行っている。

### 摘 要

クチナシ果実中の主要色素であるクロシン (crocin : Digentiobiosyl 8, 8'-diapocarotene-8, 8'-dioate) の生合成についての知見を得ることを目的として、クチナシ果実の結実から完熟に至るまでの各発育段階におけるカロテノイド色素の含有量とその組成の変化を調べ、次の結果を得た。

(1) 肥大成長過程のクチナシ果実には殆どカロテノイド色素が認められず、成熟過程の開始後から生合成が始まり、完熟期にかけて急激な蓄積が起こった。そして、完熟期の乾燥果実は450mg%のカロテノイド色素を有していた。

(2) 成熟過程の何れの段階の果実にも $\beta$ -カロテンなどの $C_{40}$ -カロテノイドは少量しか含まれておらず、カロテノイド色素の大部分がクロシンを代表とするクロセチン (crocetin : 8, 8'-Diapocarotene-8, 8'-dioic acid) の誘導体であった。そして、これらのクロセチン誘導体は何れも糖エステルであると推察された。

(3) クチナシ果実の発育に伴うカロテノイド組成の変化を調べた結果から、クロセチン誘導体の幾つかは、クロシン生合成の中間前駆体であることが予想された。

### 文 献

- 1) 谷村彰雄・片山 修・遠藤英美・黒川和雄・吉積智司：天然着色料ハンドブック，569—626，光琳，東京（1979）
- 2) Karrer, P. and K. Miki : Pflanzenfarbstoffe XV. Der Zucker des  $\alpha$ -Crocins. *Helv. Chim. Acta.*, 12, 985 (1929)
- 3) Kuhn, R. and A. Winterstein : Constitution of picrocrocin and its relationship to the carotene pigments of saffron. *Ber. Chem. Ges.*, 67 B, 344 (1934)
- 4) 梅谷康子・福井宏至・田端 守：クチナシ果実の発育にともなう成分含量の変化。薬学雑誌100(9)，920—924 (1980)
- 5) Davies, B.H. : CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF PLANT PIGMENTS, Vol, 2,

- (Goodwin, T. W. ed) (2 nd Ed), 149—155, Academic Press, London, New York, San Francisco (1975)
- 6) Hanspeter, P. and R. Martin : Separation of crocetin glycosyl esters by high performance liquid Chromatography. *J. Chromatography*, **234**, 443—447 (1982)
  - 7) Dhingra, V. K. and T. R. Seshadri : Minor Carotenoid Glycosides from Saffron (*Crocus Sativus*) . *Indian Journal of Chemistry*, **13**, 339—341 (1975)