

収穫後の高温処理によるカキ ‘富有’ 果肉中のカロテノイド含量の増強

新川 猛^{1*}・尾関 健^{1a}・加藤雅也^{2b}・生駒吉識²

¹岐阜県農業技術センター 501-1152 岐阜市又丸

²農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点 424-0292 静岡市清水区興津中町

Enhancement of Carotenoid Concentration in the Flesh of Japanese Persimmon ‘Fuyu’ by High Postharvest Temperature Treatments

Takeshi Niikawa^{1*}, Takeshi Ozeki^{1a}, Masaya Kato^{2b} and Yoshinori Ikoma²

¹Gifu Prefectural Agricultural Technology Center, Gifu 501-1152

²Department of Citrus Research, National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Shizuoka 424-0292

Abstract

To enhance carotenoid accumulation in the flesh of Japanese persimmons by postharvest treatment, the concentration of carotenoids and the expression of carotenoid biosynthetic genes were investigated at different storage temperatures, 25°C, 10°C and room temperature (about 15.6°C). At 25°C, the concentrations increased not only in carotenes (lycopene, β -carotene and α -carotene), which were synthesized upstream to the carotenoid biosynthetic pathway, but also in xanthophylls (β -cryptoxanthin, zeaxanthin and lutein), which were synthesized downstream to the pathway. Especially in β -cryptoxanthin, the increase was remarkable. The gene expression of lycopene β -cyclase (DK-LCYb) and β -ring hydroxylase (DK-HYb), which are related to synthesis of β -cryptoxanthin and its precursor (β -carotene), was higher at 25°C than at other temperatures. These results suggested that the storage temperature at 25°C was good for carotenoid accumulation. However, at 10°C, the massive increase was observed only in the carotene concentration, especially in lycopene concentration. During 10°C storage, the decrease in gene expression of phytoene synthase (DK-PSY) and ζ -carotene desaturase (DK-ZDS), which are related to synthesis of phytoene and lycopene, was small, although, the gene expression of DK-LCYb and DK-HYb decreased strikingly. At room temperature, carotenoid concentrations and gene expressions were between those at 25°C and 10°C.

Key Words : carotene, gene expression, xanthophylls

キーワード : 遺伝子発現, カロテン, キサントフィル

緒 言

カキは、我が国古来の果樹で、緑色が抜け赤色を呈する秋に収穫期を迎える。カキ果実の着色は、カロテノイドが蓄積したものであるが、カキにはカロテン、リコペン、クリプトキサンチン、ゼアキサンチン等が含まれており (Curl, 1960)、特にクリプトキサンチンとリコペンの比率が高い (Brossard・Mackinney, 1963)。これらのカロテノイドは、強い抗酸化性を持つ物質として、近年その機能性に関して多くの研究がなされている (西野, 2006)。

カロテノイド等の機能性成分を高めた品種の育成や高含有化果実の生産は、低迷するカキの消費を回復する方策の

一つとして有効であると考えられることから、著者らは前報 (新川ら, 2007) において、カキ ‘富有’ の成熟に伴うカロテノイド蓄積特性について調査し、外気温の高い 10 月では、カロテノイド生合成経路の下流に位置するキサントフィル類が蓄積し、気温の低下した 11 月では、リコペンを特異的に蓄積することを明らかとした。また、カロテノイドの急激な蓄積に伴って、生合成系酵素遺伝子の発現が一斉に上昇していることも確認し、このような温度条件を長く維持することによって、キサントフィル類の蓄積を高めることができるのではないかと示唆した。一方、カキは収穫後においても着色が進行していくことが明らかとなっている。中條 (1982) は収穫後の果皮のカロテノイド含量について、10°C、15°C、20°C、25°C で温度処理を行ったところ、黄色系色素の β -カロテン、クリプトキサンチン、ゼアキサンチンでは高温の 25°C で最も増加し、低温の 10°C では劣ること、またリコペン含量については処理した果実の成熟度によって好適温度が低下したと報告している。し

2007年6月15日 受付。2007年8月29日 受理。

* Corresponding author. E-mail: niikawa-takeshi@pref.gifu.lg.jp

^a現在：岐阜地域農業改良普及センター

^b現在：静岡大学農学部

かし、可食部位である果肉における収穫後の変化や生合成に関与する酵素活性については、検討されていない。

収穫後の温度処理の実施に当たっては、商品性についても考慮する必要がある。通常、カキ‘富有’においては、室温貯蔵では、3週間程度の日持ち性があるが、高温貯蔵においては、蒸散量が多くなるため、それより短くなる。カキでは、収穫時の重量に対して5%程度の減量がおこると、果面の光沢がなくなり、シワが出てきて外観が悪くなり、同時に果肉に好ましくない特有な弾力性が出て、カキ特有の食味が失われる(樽谷, 1965)。播磨(2002)は、‘刀根早生’において、包装資材の有効性について検討しているが、無包装の果実を室温下においた場合でも、9日程度は重量損耗5%以内に維持されていることを明らかとしている。カキが収穫されてから、量販店の店頭で陳列されるまで3日程度、その後の販売期間は3から7日程度と考えられ、その期間内であれば、重量損耗率は5%には到達せず商品性は維持されると考えられる。

そこで本研究は、収穫後の貯蔵温度の違いが、カキ果実の果肉におけるカロテノイドの組成とカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を解明し、収穫後にカロテノイド含量を増強する条件について検討した。

材料および方法

1. 供試材料

2004年11月24日に岐阜県本巣市で、果頂部の果皮色がカラーチャート値5.0で収穫された‘富有’の果実を用いた。収穫翌日の11月25日に糸貫選果場において、秀品と判定されたL級果実(220g~259g)のみを選び、供試果実とした。

2. 収穫後果実の温度処理と果色の測定

供試材料は、選果終了後すみやかに10°Cもしくは25°Cのインキュベーター内と室温下(9日間の平均15.6°C)で貯蔵した。選果日を貯蔵0日として、貯蔵3日後および9日後にそれぞれ5果ずつの果実を取り出し、ヘタ、果皮および種子を取り除いた果肉を、フードプロセッサ(MK-K48: ナショナル)によって2分間均一に混ぜ合わせた。材料は、分析を行うまで-80°Cの超低温フリーザー中で貯蔵した。果色は、果皮ならびに果肉について色彩色差計(CR-200: ミノルタ)を用いて、色相角度(H°)を測定した。カラーチャート値(X)への変換は、H°と‘富有’用カラーチャートとの相関を求め、換算式 $X = -8.101 \ln(H^\circ) + 38.829$ ($r^2 = 0.994$)で換算した値をカラーチャート値とした。

3. 遺伝子発現解析

カロテノイド生合成関連酵素遺伝子の発現解析は、前報(新川ら, 2007)と同様に、カキ‘富有’のcDNA断片から作成した7種類のカロテノイド生合成関連酵素遺伝子、phytoene synthase (DK-PSY: Accession no. AB258435), phytoene desaturase (DK-PDS: Accession no. AB258434), ζ-carotene desaturase (DK-ZDS: Accession no. AB258433), lycopene β-cyclase

(DK-LCYb: Accession no. AB258436), β-ring hydroxylase (DK-HYb: Accession no. AB258438), zeaxanthin epoxidase (DK-ZEP: Accession no. AB258454)およびlycopene ε-cyclase (DK-LCYe: Accession no. AB258437)を用い、TaqManプローブによるリアルタイムPCR (ABI Prism 7000: アプライドバイオシステム)によりmRNAの発現量を求めた。PCR条件は、95°C・10分を1サイクルの後、95°C・15秒と60°C・60秒を40サイクル行った。リアルタイムPCRは各サンプル3反復行った。またmRNAの発現量は、18SリボソームRNAを内在性コントロールとして用い、初期テンプレートの濃度を補正して相対値として示した。

4. カロテノイドの定量

カロテノイドの定量は、Katoら(2004)の方法に準じて行ったが、分析機器および溶出条件について変更した。果肉5gを塩基性炭酸マグネシウムを加えた40%メタノール溶液でホモジナイズし、減圧濾過した残渣からアセトン:メタノール=7:3(v/v)によりカロテノイドを溶出した。溶出したカロテノイドをジエチルエーテル層に分配し、20%(w/v)水酸化カリウム・メタノール溶液でケン化処理した後、不ケン化物を回収して、ロータリーエバポレーターでジエチルエーテルを留去後、TBME:メタノール=1:1(v/v)で定容し、C30カラム(Carotenoid S-4 4.6×250mm: YMC)を装着したHPLC(GULLIVER: 日本分光)で定量した。検出器は紫外可視分光光度計(UV-970: 日本分光)を用い、検出波長452nmでグラジェント溶出を行った。グラジェントは直線的に行い、ゼアキサントニン以外の定量の溶離液組成は0~30分を95%(v/v)メタノール・1%TBME・4%H₂Oとし、30~90分の間に6%メタノール・90%TBME・4%H₂Oへと変化させた。またこの条件ではゼアキサントニンとイソルテインが分離しない恐れがあることから、ゼアキサントニンの定量については溶離液組成を0~12分の間に90%メタノール・5%TBME・5%H₂Oから95%メタノール・5%TBMEへと変化させ、12~20分の間に86%メタノール・14%TBMEへ、20~30分の間に75%メタノール・25%TBMEへ、30~50分の間に50%メタノール・50%TBMEへと各々直線濃度勾配で変化させた。同定・定量したカロテノイドの種類は、ルテイン、β-クリプトキサントニン、α-カロテン、β-カロテン、リコペン、ゼアキサントニンの6種類で、それぞれの定量値の合計を総カロテノイド量とした。

結 果

1. 貯蔵温度の違いによる果色の推移

貯蔵期間が長くなるほどいずれの貯蔵温度でも果皮ならびに果肉のカラーチャート値が増加した。増加量は貯蔵温度が高い方が多く、25°C貯蔵では9日後で果皮で1.0、果肉で0.8増加した。10°Cならびに室温貯蔵の果肉のカラーチャート値の増加程度は低く、9日後でそれぞれ0.1ならびに0.3であった(第1図)。なお、すべての処理区において試験期間中に果実の軟化は発生しなかった(データ省略)。

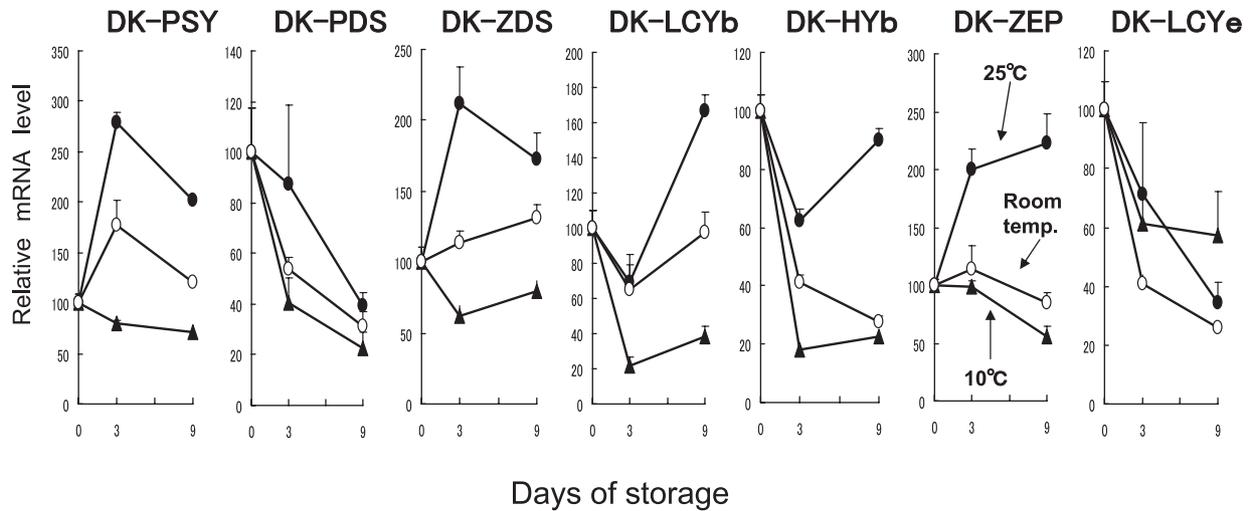


Fig. 3 Expressions of carotenoid biosynthetic genes in the flesh of Japanese persimmon 'Fuyu' during storage. The levels of gene expression were normalized by the results of 18S ribosomal RNA. Each primer sets and probes used in the real-time quantitative RT-PCR correspond to those previously reported (Niikawa et al., 2007). Vertical bars indicate SE (n = 3).

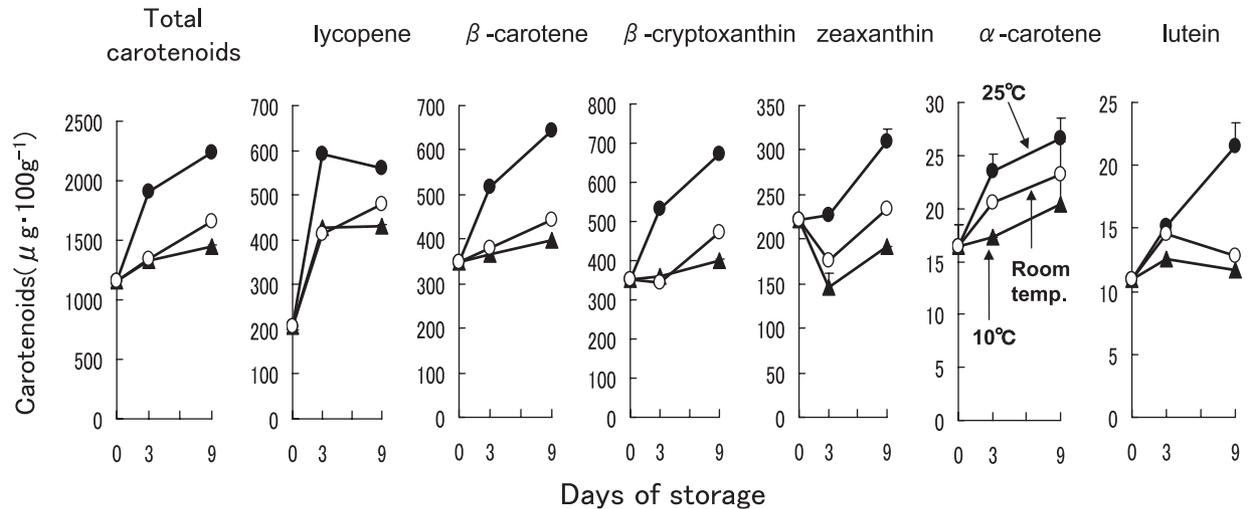


Fig. 4 Carotenoid concentration in the flesh of Japanese persimmon 'Fuyu' during storage. The value for total carotenoids was the sum of identified carotenoids (lycopene, β -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin, α -caroten, lutein). Vertical bars indicate SE (n = 3).

ノイドで25°Cと10°C貯蔵の中間を示した(第4図)。

考 察

岩田ら(1969)は、カキはエチレン生成および呼吸量の増大、果皮色の程度から軟化程度Ⅱ(全体にかなり軟らかくなるが、しっかりしている)を完熟状態としている。しかし主に流通上の都合から栽培現場では、軟化程度Ⅰ(じゅうぶんに堅い)でカラーチャート5~6程度を収穫適期としている。適期収穫した'富有'の果実が軟化程度Ⅱに到達する期間は、室温下で3週間~1か月程度あり、その期間中に果皮の赤色の発色が認められる。本試験で用いた果実も貯蔵温度に関わらず、貯蔵期間が長くなるほど果皮色カラーチャート値が増加した。果肉色についても果皮色ほど顕著ではないが、ほぼ同様の傾向が認められた。また今

回すべての貯蔵温度において総カロテノイド量が増加し、生合成に関与する遺伝子の発現が認められたことから、カキ果実では収穫後においてもカロテノイドの合成・代謝が進んでいることが明らかとなった。特に10°Cと室温貯蔵ではDK-PSYやDK-ZDSの発現レベルがあまり低下していないのに対して、DK-LCYbやDK-HYbの発現レベルが、特に10°Cにおいて顕著に低下していることから、これらの貯蔵温度では、リコペンまでの合成はそれほど抑制されず、リコペン以降の代謝が抑制されるものと考えられた。実際リコペン含量は他のカロテノイドに比べて大きく増加しており、生産現場で観察される収穫後のカキの赤色の発色が強くなることと一致した結果となった。一方、25°C貯蔵においてはリコペン以外にも β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチンといった生合成経路の下流に位置

するカロテノイドも大きく増加しており、DK-LCYb や DK-HYb といった下流に位置する酵素遺伝子の発現レベルも高く推移していることから、高い貯蔵温度はカロテノイドの代謝を進めるために有効であると考えられた。浜渦ら (1994) は、収穫後のトマト果実において、20°C 貯蔵ではフィトエンとリコペンが増加するが、30°C ではβ-カロテンが増加するとしており、高温によってカロテノイドの代謝が進み、より下流に位置するカロテノイドが蓄積するという、今回のカキと同様の結果を示している。また、近・榛葉 (1987) は完熟状態で収穫したカキ‘四ッ溝’を5～10°C で貯蔵した場合、β-カロテンが増加しクリプトキサンチンが減少したため、果肉中の総カロテノイド量はほとんど増加しなかったとしている。クリプトキサンチンの減少の原因として、DK-LCYb や DK-HYb に比べて DK-ZEP の発現レベルが特に貯蔵3日後までは低下していないことから、クリプトキサンチンの代謝が進んだためと考えられるが、β-カロテンについては著者らが材料および方法で述べているようにリコペンと分離されていないためではないかと思われた。しかし、供試した果実の熟度が異なることから、熟度別の酵素遺伝子の発現パターンについては検討する必要がある。

本研究は、貯蔵中にカキの果肉中のカロテノイドを増加させる好適温度を明らかにするために実施したものであるが、最終的には、人為的にカロテノイド含量を増加させ、より商品性の高いカキ果実を生産供給し、カキの消費拡大に資することを目的としている。カキに含まれるカロテノイドの中で、β-クリプトキサンチンは供給源が限定されることから、緑黄色野菜等他品目との差別化を図る上で優位性を持つ物質であると考えられる。今回の貯蔵条件では、β-クリプトキサンチンのみを特異的に増加させる条件は見出せなかったが、総カロテノイド量を増加させ、代謝を進めることによって、他のカロテノイドと同様にβ-クリプトキサンチンの含有量も増加することから、結果として25°C で9日間貯蔵することにより、収穫直後と比べて約2倍の含有量まで増加させることが可能となった。収穫後の果実を高温で貯蔵する方法として、カンキツでは果皮色向上を目的とした20°Cでの高温予措が実用化されている。長谷川・伊庭 (1984) は、高温予措による着色向上効果は、完全着色に至っていない果実の方が効果が高いとしており、カキのようにやや未熟な段階で収穫する果実では、収穫後にカロテノイド量を大きく増加させられるものと考えられる。

一方、今回の研究結果から購入後の果実を暖かい室内に置いておくことによってもほぼ同様の効果が期待できることから、この方法をカキの貯蔵方法として消費者へ提言することも重要である。今回の貯蔵試験では、貯蔵中の軟化が起こらず、かつ高温下でも商品性を保持することができる9日間を実施したが、貯蔵期間を9日間より長くすることによって、よりカロテノイド含量が増加できるものと考

えられる。しかしその際には日持ち性の延長のため、軟化の防止方法も同時に講じる必要がある。小宮山ら (1979) はスモモでの30°C貯蔵が低温貯蔵に匹敵する効果を、小倉ら (1975) は、緑白熟期のトマトを33°C貯蔵すると果実硬度が良く保持されるとしており、これらの点について、今後カキでも検討していく必要がある。また収穫後のカキの軟化は、水分ストレスによって誘導されるエチレンが関与している (Nakano ら, 2001) とされており、水分ストレスを軽減するための防湿ダンボールの利用 (播磨ら, 2002) や、甘ガキの軟化に対して高い抑制効果を持つ1-メチルシクロプロペン (農薬登録申請中) (新川ら, 2005) を併用することによる収穫後の高温長期貯蔵条件についても今後検討していく必要がある。

摘 要

カキ果実の果肉中のカロテノイド含量を増強するため、収穫後の貯蔵温度 (10～25°C) がカロテノイド組成およびカロテノイド生成関連酵素の遺伝子発現レベルに及ぼす影響について調査した。果肉に含まれる全てのカロテノイド類は、収穫後のどの貯蔵温度でも増加し、特にリコペンの増加は著しかった。25°C貯蔵では、カロテノイド生成系の上流に位置するリコペン等のカロテン類だけでなく、下流に位置するβ-クリプトキサンチン等のキサントフィル類も増加した。また、生成酵素のDK-LCYb や DK-HYb の遺伝子発現レベルも高く推移していた。このことから、貯蔵温度25°Cはカロテノイド生成が進みやすい条件であると考えられた。一方、10°C貯蔵では、カロテン類のみ増加し、DK-PSY や DK-ZDS の発現低下は少なく、DK-Lcyb や DK-Hyb の発現が低下するため、リコペンの特異的な蓄積が起こったものと考えられた。また室温貯蔵では、両者の中間の傾向を示した。

引用文献

- Brossard, G. and G. Mackinney. 1963. The carotenoids of *Diospyros Kaki* (Japanese Persimmons). *J. Agric. Food. Chem.* 11: 501–503.
- 中條利明. 1982. 富有カキ果実の発育ならびに品質に及ぼす温度条件に関する研究. *香川大農学部紀要.* 37: 1–63.
- Curl, A. L. 1960. The carotenoids of Japanese persimmon. *Food Res.* 25: 670–674.
- 浜渦康範・宮本裕子・茶珍和雄. 1994. 収穫後のトマト果実におけるカロチノイド色素の消長に及ぼす高温の影響. *園学雑.* 63: 675–684.
- 播磨真志. 2002. カキ‘刀根早生’促成栽培果実の流通中の早期軟化防止技術の確立に関する研究. *和歌山農総技セ特別研報.* 4: 1–94.
- 播磨真志・中野龍平・山内 勲・久保康隆・稲葉昭次・北野欣信. 2002. カキ‘刀根早生’促成栽培果実の出荷容器の改善による軟化抑制. *園学雑.* 71: 583–587.

- 長谷川美典・伊庭慶昭. 1984. カンキツ類の貯蔵に及ぼす温度の影響 II 貯蔵前の予措温度について. 果樹試報. B11: 53-61.
- 岩田 隆・中川勝也・緒方邦安. 1969. 果実の収穫後における成熟現象と呼吸型の関係 (第 1 報). 園学雑. 38: 194-201.
- Kato, M., Y. Ikoma, H. Matsumoto, M. Sugiura, H. Hyodo and M. Yano. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruits. *Plant Physiol.* 134: 824-837.
- 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄. 1979. 高温貯蔵 (30°C) がスモモの品質に及ぼす影響. 日食工誌. 26: 371-374.
- 近 雅代・榛葉良之助. 1987. 四ッ溝柿の成熟, 貯蔵および干し柿加工中のカロチノイド組成の変化. 日食工誌. 34: 155-162.
- Nakano, R., E. Ogura, S. Inoue, S. Harima, Y. Kubo and A. Inaba. 2001. Involvement of stress-induced ethylene biosynthesis in fruit softening of 'Saijo' persimmon fruit. *J. Japan. Soc. Hort.* 70: 581-585.
- 新川 猛・稲荷妙子・尾関 健・三井萬丈. 2005. 1-メチルシクロプロペンによる完全甘ガキの果肉硬度保持. 食科工. 52: 68-73.
- 新川 猛・鈴木哲也・尾関 健・加藤雅也・生駒吉識. 2007. カキ '富有' の成熟に伴うカロテノイドの蓄積特性. 園学研. 6: 251-256.
- 西野輔翼. 2006. 食品成分によるがん予防. 農林水産技術研究ジャーナル. 29: 31-37.
- 小倉長雄・中川弘毅・竹花秀太郎. 1975. 緑白熟期トマト果実の短期高温貯蔵がその後の室温貯蔵性におよぼす影響について. 農化. 49: 189-196.
- 樽谷隆之. 1965. 果実の貯蔵と加工. 農及園. 40: 1017-1020.