

カンキツの果実に含まれる苦み成分の幼苗検定法

蔵尾公紀・金好純子

キーワード：カンキツ，ナリンジン，幼苗検定

中晩生カンキツ類では，苦み成分であるナリンジンを含む品種が多く，このナリンジンは凍害によって苦味が増加するときの原因となる成分である（岩田・緒方，1976，金尾・松田・長谷川，1978，松本・奥代，1985）。一方で，苦味成分は果実の爽やかさを付加する味覚成分の一つである（化学総説，1976，Horowitz，1969）。また，カンキツ特有の配糖体成分であるナリンジンは，マウスで前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化するときに促進作用を示し，糖尿病マウスにナリンジンを投与すると，血糖値の低下など症状の改善がみられ（関谷，1997），脂肪代謝促進物質としての機能性も注目されている。

本県においては，ブンタン類，あるいはブンタン類の遺伝的形質を持つ雑柑類を育種親とした中晩柑類の新品種育成を行っている。この育成においては，ブンタン類の爽やかな風味を持ちながら，他方で凍結によって苦味が増加しないことが目標の一つであり，ナリンジン含量は新品種育成過程での重要な選抜要因である。

カンキツ類の育種では，交雑した実生苗が結実するまでに長い年月を必要とする。そのため，幼苗検定で将来果実に含まれる成分の含量が予測できれば育種の著しい効率化が可能となる。カンキツでは，果実の苦味成分の有無が実生葉で判定できる幼苗検定法が開発されている（松本・奥代，1986，松本，1995）。しかし，その含量について，果実と実生葉との関係については明らかになっていない。

本報告では，多胚性カンキツにおいて，苦味成分ナリンジンの実生葉中含量と果実中含量の間に定量的な相関関係があることを明らかにしたので報告する。

材料及び方法

1. ナリンジン分析条件の検討

果汁中に含まれている苦み成分であるナリンジンの含

量と，実際に果実を食べたときに感じる苦味の程度は，手動式搾汁器（ジューサー）を使用して果汁を圧搾採取して測定した場合，高い関連が認められることがわかっている（別所・間部，1964，間苧谷・長谷，1979）。そこで，果実からのナリンジンを次のように抽出した。じょうのう膜を完全に取り除いた果肉20gを圧搾（手動式搾汁器使用）して果汁を採取した。果汁は12,000rpmで15分間遠心分離した後，上澄を脱イオン水で10倍に希釈し，ミリポアフィルター（HA，孔径：0.45 μ m）で濾過して高速液体クロマトグラフィー法（以下 HPLC に省略する）の供試液とした（Fisher，1976，松本・間苧谷・奥代，1983）。供試品種は，ナリンジンとネオヘスペリジンを含むハッサク，‘フナドコ’を用いた。‘フナドコ’はハッサクと同様に4種のフラバノングリコシドを含み，ヘスペリジン，ネオヘスペリジンの含量がハッサクに比べ多く，図にしたとき見やすいため使用した。

使用した高速液体クロマトグラフは，検出器がUV検出器（日本分光製，Jasco875-UV）で，波長280nmで検出した。カラムにはウォータース社の逆相カラム（Waters Puresil C 18，長さ250mm 内径4.6mm）を用い，移動相は水-アセトニトリル（80+20V/V%）で，流速1.5ml/min，カラム恒温槽温度60℃，インジェクション10 μ lの条件で行った（Fisher and Wheaton，1976）。なお標品としてナリンゲニルチノシド，ナリンジン，ヘスペリジン，ネオヘスペリジンを用いた。

葉からのナリンジンの抽出は，葉片0.1gを1mm幅で細く切り，1mlの80%エタノールにより室温で2週間抽出した。抽出液20 μ lを1.5mlエッペンドルフチューブにとり，400 μ lの四塩化炭素（和光純薬，特級）と180 μ lの蒸留水を加えて振とうし，2時間静置した後，上層をHPLCの供試液とした（化学総説，1976）。供試品種は，ナリンジンとネオヘスペリジンを含むハッサクとした。

2. ナリンジン含有多胚性品種の探索

シトラスパーク瀬戸田（広島県豊田郡瀬戸田町）内の

品種展示圃で維持しているカンキツのうち、ブンタン類の遺伝形質を持ち、多胚性で苦み成分を含有する可能性のあるタンゼロ、グレープフルーツ等の32品種（表1に記載）を供試した。果実は1品種あたり1果実を3月に収穫し、種子中の胚数によって多胚性と単胚性との区別及びナリンジン含量を調査した。

3. 多胚性品種の果実、実生葉、成木葉に含まれるナリンジン含量の測定

2. の調査により、多胚性でナリンジンを含み、4個以上の実生が得られた15品種（‘サマーフレッシュ’、‘オオサワ’、‘レッドブラッシュ’、‘キンコウジ’、‘シャメル’、‘スタールビー’、‘オウゴンキツ’、‘リトルシードレス’、‘インペリアル’、‘ダンカン’、‘デーデー’、‘マルメラ’、‘ソ連タンゼロ’、‘フナドコ’、‘サムソン’）の果実、実生葉及び成木葉に含まれるナリンジン含量を調査した。調査には3月中旬に収穫した果実、果実から取り出した種子（品種により得られる種子数が異なるため平均10種子程度）をバーミキュライトに播種して育苗した6ヶ月後の実生葉及び3月に採取した成木葉を使用し、上記の方法でナリンジン含量を測定した。果実は5果、実生は4～8個体各1葉、成木葉は1樹各5葉を供試し

た。分析値の部位別平均値を用いて検討した。

結 果

1. ナリンジン分析条件の検討

図1にハッサクのクロマトグラムを示した。(A)が標品、(B)が果汁、(C)が実生葉のクロマトグラムを示し、標品のナリンジンの保持時間は5.3分であった。果実、実生葉でのナリンジンの保持時間は、それぞれ5.308分、5.3分であり、標品とほとんど差がなかった。また、果汁では実生葉に比べやや夾雑物が多かったが、それぞれナリンジンと夾雑物の分離は良好に行われていた。

図2に‘フナドコ’果汁中に含まれるカンキツ類の主要フラバノン・グリコシドのクロマトグラムを示した。保持時間は、ナリンゲニルチノシドが4.64分、ナリンジンが5.3分、ヘスペリジンが6.4分及びネオヘスペリジンが7.52分であり、それぞれ分離して検出された。また、夾雑物との分離も良好であった。このように、4種のフラバノングリコシドを保有する品種においても、本法でのナリンジンの定量は可能であった。

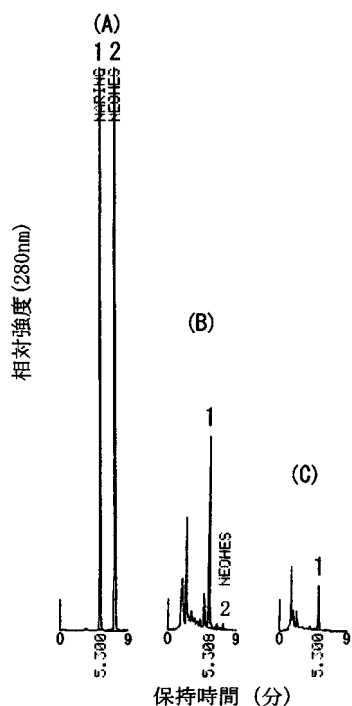


図1 HPLC法によるハッサクのナリンジンのクロマトグラム

(A) : 標品, (B) : 果汁, (C) : 実生葉
 1 : ナリンジン
 2 : ネオヘスペリジン

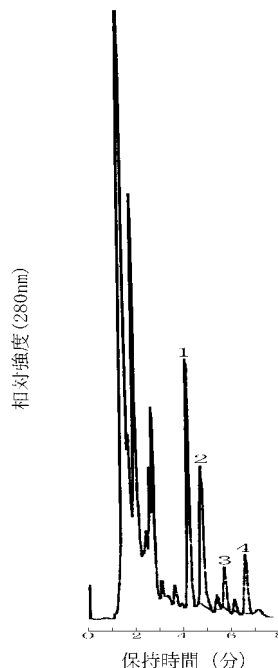


図2 HPLC法による‘フナドコ’の主要フラバノン・グリコシドのクロマトグラム

1 : ナリンゲニルチノシド
 2 : ナリンジン
 3 : ヘスペリジン
 4 : ネオヘスペリジン

2. ナリンジン含有多胚性品種の探索

幼苗検定法の開発に用いる品種を選定するため。シトラスパーク瀬戸田で採取した果実について、ナリンジンの含量を調査し、多胚性と単胚性品種に区別した。その結果、32品種のうち19品種がナリンジン含有していた(表1)。その含量は果汁10mlあたり0.15~5.04mgであった。また、そのうち種子を含んでいたのは17品種であった。得られた種子は、はく皮後、胚を分離して胚数を

調査したが、17品種すべてが多胚性であった。そこで、17品種の種子を播種し、4個体以上の実生が得られた雑柑7品種、グレープフルーツ6品種、タンゼロ2品種、合計15品種を以後の分析に用いた。

3. 多胚性品種の果実、実生葉、成木葉に含まれるナリンジン含量の測定

15品種について果実中及び成木葉中のナリンジン含量

表1 供試品種の果実中ナリンジン含量と種子数

分類	品種名	ナリンジン含量 (mg/果汁10ml)	1果実あたり 種子数	多胚と単胚の 区別
雑柑	サマーフレッシュ	5.04	15	多胚
	オウゴンキツ	0.89	11	多胚
	オオサワ	2.25	62	多胚
	デーデー	0.40	12	多胚
	マルメラ	0.29	16	多胚
	キンコウジ	1.70	2	多胚
	コネジメ	1.25	40	多胚
	フナドコ	0.16	21	多胚
	ウジュキツ	0.00	16	多胚
	シュンコウカン	0.00	9	多胚
	サンボウカン	0.00	15	多胚
	スイートスプリング	0.00	0	—
グレープフルーツ	ウエブレッドブラッシュ	2.47	0	—
	チロンハホワイト	2.10	3	多胚
	レッドブラッシュ	1.89	5	多胚
	シャメル	1.22	4	多胚
	スタールビー	1.09	1	多胚
	リトルシードレス	0.88	6	多胚
	インベリアル	0.83	4	多胚
	ダンカン	0.82	8	多胚
	マーシュシードレス	0.81	0	—
タンゼリン・タンゼロ	フェアチャイルド	0.00	10	多胚
	ページ	0.00	2	多胚
	ロビンソン	0.00	1	単胚
タンゼロ	ソ連タンゼロ	0.27	7	多胚
	サムソンタンゼロ	0.15	24	多胚
	ミネオラ	0.00	6	多胚
	オーランド	0.00	6	多胚
	パール	0.00	2	多胚
	サンジャシントー	0.00	10	多胚
	セミノール	0.00	3	多胚
	ヤラハ	0.00	16	多胚

を調査したところ、両者の間に正の相関関係（相関係数0.619***）が認められ、果汁中のナリンジン含量が多くなると成木葉中のナリンジン含量も多くなった（図3）。雑柑類に分類される‘オオサワ’は果汁中成木葉中ともにナリンジン含量が15品種中最も高かった。グレープフルーツ類に分類される‘シャメル’、‘スタールビー’及

び‘インペリアル’、雑柑類に分類される‘サマーフレッシュ’は回帰式からやや外れていた。

また、成木葉と実生葉に含まれるナリンジンの量にも、正の相関関係（相関係数0.707***）が認められた（図4）。グレープフルーツ類に分類される‘シャメル’と‘リトルシードレス’、雑柑類に分類される‘オウゴンキツ’、

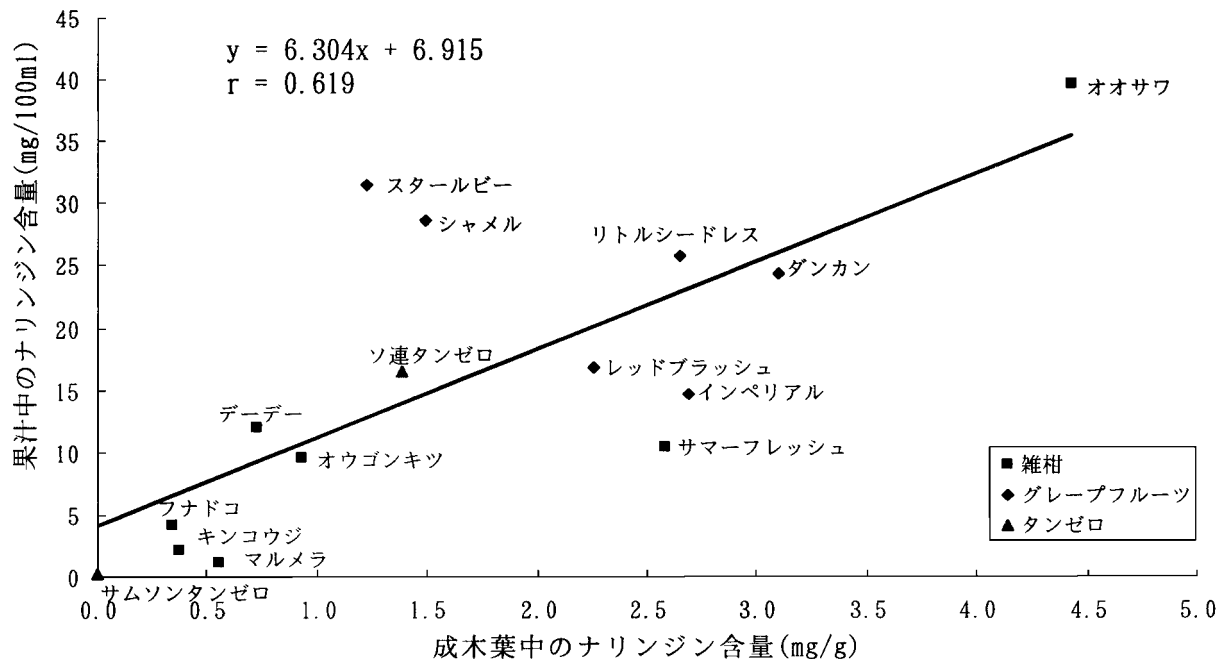


図3 カンキツの果実と成木葉中とのナリンジン含量の関係

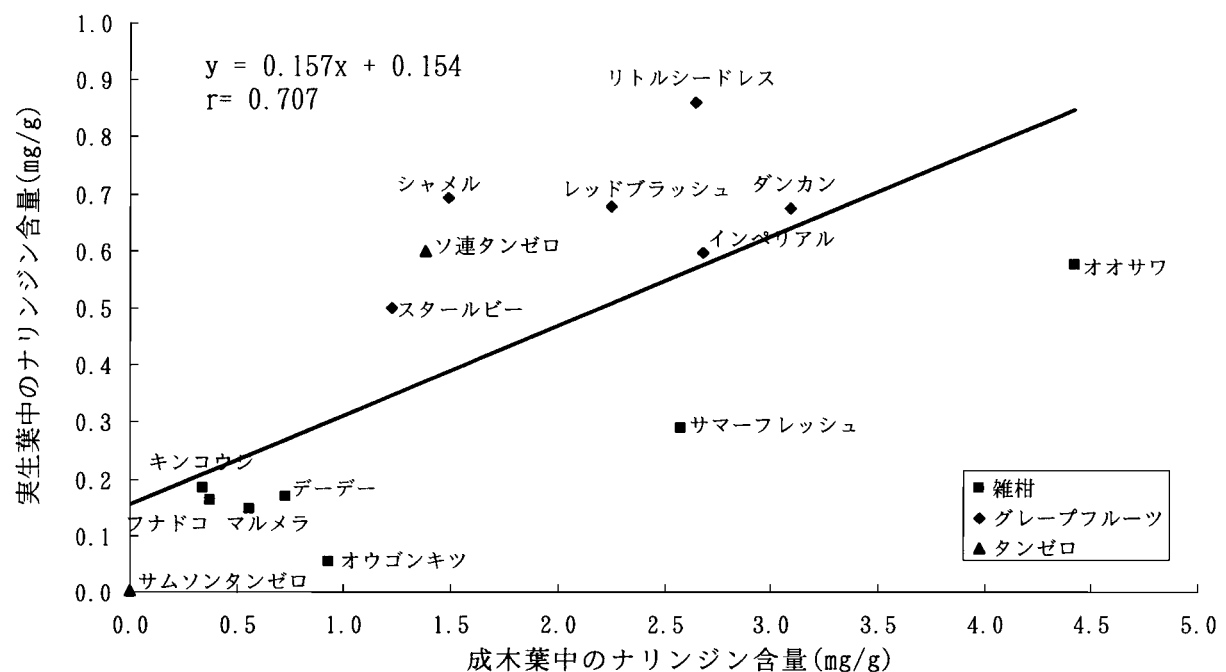


図4 カンキツの成木葉と実生葉とのナリンジン含量の関係

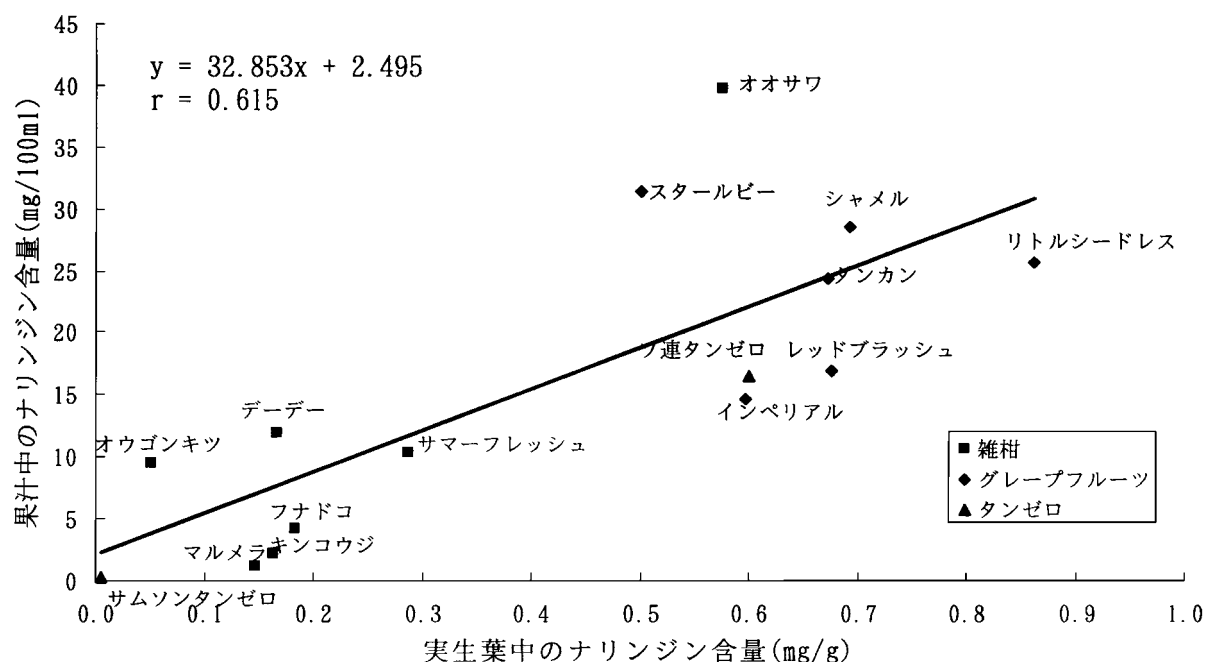


図5 カンキツの果実と実生葉中のナリンジン含量との関係

‘サマーフレッシュ’及び‘オオサワ’は回帰式からやや外れていた。

さらに果実中と実生葉中に含まれるナリンジンの量にも、正の相関関係（相関係数0.615***）が認められ、 $y = 32.853x + 2.495$ （ x ：実生葉中のナリンジン含量、 y ：果実中のナリンジン含量）の回帰式が得られた（図5）。回帰式から外れていた‘オオサワ’と‘スタールビー’では、果実中のナリンジン含量が多かった。

考 察

カンキツの育種において、幼苗検定法の開発は育種の効率化のため重要な課題である。松本ら（松本・奥, 1991）はELISA法により、実生苗の幼葉とその後結実した果実に含まれる苦味成分のフラバノン・ネオヘスペリドシドの有無が完全に一致することを報告している。ELISA法は多くのサンプルを迅速に分析できる方法であり、育種におけるフラバノン・ネオヘスペリドシドの有無の早期検定に非常に有効であると考えられる。しかし、フラバノン・ネオヘスペリドシドの含量については、実生苗の幼葉と果実との関係は明らかになっていなかった。苦味の発生は果実の商品価値を著しく低下させる等、果実品質に大きく影響することから、その含量の幼苗検定が確立できれば、育種における利用価値は非常に高い。そこで著者らは、フラバノン・ネオヘスペリドシドのうち、

苦味の主要因であるナリンジンについて、実生幼葉の含量で育種実生を淘汰できる幼苗検定法の開発を目指した。

カンキツ類にはフラバノン配糖体が含まれている。フラボノイドは、糖部分のラムノースとグルコースの結合位置の違いによって2群に分けることができ、苦味の無いルチノシルに分類されるヘスペリジン、ナリンゲニルチノシドと、苦味のあるネオヘスペリドシルに分類されるネオヘスペリジン及びナリンジンがある（化学総説, 1976）。苦味のある2つの成分のうち、ネオヘスペリジンは苦味が少なく、ナリンジンの1/10とされている（間苧谷・長谷, 1979）。また含量もナリンジンに比べて少ないことから、ネオヘスペリジンは苦味成分としてほとんど考慮する必要がないことが報告されている（松本, 1995）。そのため、本報告では苦味成分としてナリンジンのみの定量を行った。

HPLCによる分析では、上記の4成分はナリンゲニルチノシド、ナリンジン、ヘスペリジン、ネオヘスペリジンの順に分離する。いずれも苦味の無い構造であるルチノシルの方が早く分離し、本実験で注目したナリンジンと他の成分との分離は良好に行われていた。

また果汁、実生葉の分析では、それぞれナリンジンと夾雑物の分離が良好に行われていた。サンプル1点の分析に要する時間は9分ほどであり、オートサンプラーを用いれば1日に100サンプル程度の測定が可能であると

思われる。これらのことから、この手法は多数の育種実生の分析にも適応できると判断した。

果実に含まれる苦味成分含量の幼苗検定法を開発するためには、雑種実生葉中のナリンジン含量と、その実生が結実した時点で、果汁中のナリンジン含量とを比較する必要がある。しかし、種子を播いてから結実に至るまでに、カンキツでは長い年月を要する。そこで著者らは、苦味成分の幼苗検定を開発する材料として、珠心胚実生の活用を考えた。果樹は遺伝的にヘテロであり、実生は親とは異なった形質を持つ。一方、カンキツでは多胚現象が認められ、一種子中に雑種胚と、珠心組織から無性的に発生する多数の珠心胚が混在する(Frost, 1926)。この珠心胚は雑種胚よりも旺盛な生育をするので、種子を播くと珠心胚由来の実生が発芽する頻度が高い。また、この珠心胚実生は種子親と同じ遺伝形質を持つクローンである。このような現象を利用して、果実と、果実から採種・播種して育苗した珠心胚実生の葉の苦味成分の関係を調べ、幼苗検定法を開発することを試みた。

幼苗検定法に用いる品種を選定するため、シトラスパーク瀬戸田で維持されている品種から、果汁にナリンジン含有する多胚性品種の探索を行った。その結果、32品種のうちナリンジン含有し多胚性であったグレープフルーツ類6品種、タンゼロ類2品種、雑柑類7品種、合計15品種を分析に用いた。選定した15品種のナリンジン含量は、果汁10mlあたり0.15~5.04mgと幅広いものであり、果実と実生葉の含量の関係を調査する上で適切な材料であると考えた。

果実と成木葉中に含まれるナリンジン含量の関係を調査した結果、果実、成木葉ともにグレープフルーツ類では含量が高く、雑柑類の‘オオサワ’を除いて、雑柑類とタンゼロ類では低い傾向がみられ、果実と成木葉のナリンジン含量には、正の相関関係が認められた。このことから果実中にナリンジンを多く含む品種は、成木葉中のナリンジン含量も多いことが明らかとなった。成木葉と実生葉とに含まれるナリンジン含量を調査した結果、正の相関関係が認められた。このことから葉中のナリンジン含量は、実生から成木へと生育しても品種間の相対値が大きく変化しないことが明らかになった。

多胚性15品種における果実と実生葉に含まれるナリンジン含量の関係を調査したところ、正の相関関係がみられた。15品種のうち、‘オオサワ’、‘スタールビー’は果汁中の含量が高くて回帰式から外れており、このような品種を交配親に使用するときは、個別に検量線を作り直して、幼苗選抜の際、選抜範囲を拡大することが必要である。また本実験では、果汁と実生葉とのナリンジン含

量の相関係数は0.615であった。実生葉では葉全体からナリンジンを抽出しているのに対し、果実では果実全体ではなく、食味に近い苦味となるよう、果肉のみを圧搾した果汁からナリンジンを抽出した。この実際の食味に近い抽出法によっても実生葉との相関関係が得られたことから、食味に近い果実のナリンジン含量は、実生葉のナリンジン含量で予測できることが示された。

本実験では、果実とその果実中の種子から得られた珠心胚実生の葉中のナリンジン含量には正の相関があることを明らかにした。この結果をもとに、今後は育成を行っている交雑実生においてナリンジン含量が多い個体を淘汰する幼苗検定法への活用を試み、育種の効率化を図りたい。

摘 要

カンキツの苦味成分であるナリンジン含量について、果実と実生葉との関係を検討した。多胚性品種の果実及び珠心胚実生葉中に含まれるナリンジン含量には、正の相関関係(相関係数0.615***)があり、 $y=32.853x+2.495$ の回帰式が得られた(y =果汁中のナリンジン(mg/100ml 果汁中)、 x =実生葉中のナリンジン(mg/g 葉中))。このことから播種6ヶ月後の実生葉に含まれるナリンジン含量を測定すれば、将来結実する果実のナリンジン含量が予測できる。

引用文献

- 別所康守・間部孝明・児玉雅信・久保進. 1964. 夏ミカン利用に関する研究(第一報)夏ミカン中のナリンギンの分布状況について. 食品工試. 11: 385-389.
- Fisher, J. F. and T. A. Wheaton. 1976. A High-pressure liquid chromatographic method for the resolution and quantitation of naringin and naringenin rutosid in grapefruit juice. J. Agric. Food Chem. 24: 898-899.
- Frost, H. B. 1926. Polyembryony, heterozygosis and chimeras in citrus. Hilgardia 1: 365-402.
- Horowitz: 1964. Relations between the taste and structure of some phenolic glycosides. In Biochemistry of Phenolic Compounds, J. B. Harbone ed., Academic Press, New York.
- R. M. Horowitz, B. Gentili: 1969. J. Agr. Food Chem. 17: 696.
- 岩田 隆・緒方邦安: 1976. ナツミカン果実の凍結によ

- る苦味の増大について. 園学雑. 45:187-191.
- 化学総説:1976. 味とにおいの化学. No.14:129-156.
- 金尾素健・松田弘明・長谷川正男:1978. Citrus 属の果皮に含まれるフラバノン配糖体. 薬学雑誌. 98:245-247.
- 間苧谷 徹・長谷嘉臣・松本亮司:1979. カンキツの苦味に関する研究(第1報) ナツダイダイ果実の味覚に合致した苦味成分(ナリンジン)の測定法. 園学雑. 47(4):546-552.
- 松本亮司・間苧谷 徹・奥代直己:1983. ナツミカンの凍害果実中のナリンジン含量の経時変化について. 園学雑. 52(1):1-6.
- 松本亮司・奥代直己:1985. カンキツの苦味成分(フラバノン・ネオヘスペリドシド)含量と凍害による苦味発現の品種間差異について. 果樹試報. D7:1-10.
- 松本亮司・奥代直己:1986. カンキツ果汁のフラバノン・グリコシドの遺伝. 果樹試報. D8:1-12.
- 松本亮司・奥代直己:1991a. 抗ナリンギン抗血清を用いた酵素免疫測定法によるカンキツの苦味成分フラバノン・グリコシドの早期検定法について. 園学雑. 60(1):201-207.
- 松本亮司:1995. カンキツの苦味に関する育種・遺伝学的研究. 果樹試報 特別報告 第6号:1-74.
- 関谷敬三:1997. カンキツ抽出物による前駆脂肪細胞の分化促進作用. 日本農芸化学会誌71講演要旨集.

Nursery Test of the Bitter Substance Contained in the Citrus Fruits

Masaki KURAO and Junko KANEYOSHI

Summary

Using high-speed liquid chromatography, we analyzed the bitter taste ingredient the naringin content in the citrus and got the fixed relation about the content of fruits and a seedling leaf. It turned out that there is positive correlation (correlation coefficient 0.615^{***}) between the naringin content contained in the fruits of polyembryonic cultivar, and the leaves of nucellar seedlings. Moreover, the regression of $y=32.853x+2.495$ was obtained (naringin in y =fruit juice (mg/100 ml fruit juice), naringin in x =seedling leaf (mg/g leaf)). Measuring the naringin content contained in the seedling leaf six months after sowing, the naringin content of the fruits which will become fruitful in the future can be predicted.

Keyword : citrus, naringin, seedling, nursery test