

果実のインベルターゼ活性について

辻 政雄・小宮山美弘

Invertase Activities of Various Fruits

Masao TSUJI and Yoshihiro KOMIYAMA

要 約

カキ果実のインベルターゼ活性をモモおよびブドウ果実のものと比較検討した。

インベルターゼは細胞質中に存在すると思われるリン酸緩衝液可溶性インベルターゼと細胞壁に結合していると思われるNaCl可溶性インベルターゼにそれぞれ分画した。その結果、両インベルターゼ活性ともカキ果実とはモモ及びブドウ果実より顕著に高く、緩衝液可溶性インベルターゼ活性では、モモ果実の242倍、ブドウ果実の4.2倍であり、NaCl可溶性インベルターゼでは、モモ果実の667倍、ブドウ果実の26倍であった。

次にブドウ及びカキ果実のインベルターゼ活性の酵素的性質を検討したところ、緩衝液可溶性インベルターゼ活性の至適pHは、ブドウではpH 4、カキではpH 5であった。また緩衝液可溶性インベルターゼ活性の至適温度は、ブドウでは50~60℃、カキでは40~50℃であり、NaCl可溶性インベルターゼ活性の至適温度は、ブドウでは70℃、カキでは50℃であった。

1. 緒 言

従来、カキ果実の糖は、ブドウ糖と果糖が全糖含量のほとんどを占めるとされてきた¹⁾²⁾が、著者ら³⁾が‘富有’ガキを用い、アルコールの存在下で破碎抽出した結果、ショ糖が全糖含量の50%以上を示すことがわかった。これは糖の抽出方法による差異と考えられ、従来の方法では抽出溶媒に水を用いた結果と思われる。事実、著者ら⁴⁾がカキ果実を蒸留水とともに破碎し、経時的に糖組成の変化を検討したところ、破碎後10~20分で完全にショ糖が加水分解された。そのため、カキ果実から糖を抽出する場合は、メタノールやエタノールが用いられ、現在では果肉組織を電子レンジで1~2分加熱後、直ちに80%アルコール溶液で抽出するのが最適方法⁵⁾であるとされている。

カキ果実中にはショ糖分解酵素としてインベルターゼが存在すること⁴⁾⁶⁾が明らかにされているが、蒸留水によるカキ破碎液中のショ糖が短時間に加水分解されることから考えると、カキ果実のインベルターゼ活性はかなり強いことが予想される。しかし、果実間のインベルターゼ活性を比較したものはあまり見られない。そこで今回、カキ果実のインベルターゼ活性を、ショ糖含量が全糖

の50%以上を占めるモモ果実³⁾及びショ糖含量は低い、全糖がカキ果実とほぼ同量含まれるブドウ果実³⁾と比較検討した。

2. 実験方法

2-1 実験材料

モモ果実は‘西野白桃’、ブドウ果実は‘甲州’及びカキ果実は‘富有’の各品種を用いた。

2-2 果実のアセトンパウダーの調製

モモ、ブドウ及びカキの果肉をそれぞれ50g、100g及び40g秤量し、-20℃に冷却した10倍量のアセトンとともに磨砕した。吸引ろ過後、残渣を一夜減圧下で乾燥してアセトンパウダーを得た。なお、パウダーは分析に供するまで-20℃の冷凍庫に保存した。

アセトンパウダーの生成量は、モモ、ブドウ及びカキではそれぞれ5.63%、2.08%及び5.36%であった。

2-3 粗酵素液の調製

アセトンパウダー0.3gに0.2Mリン酸水素二ナトリウム-0.1Mクエン酸緩衝液(pH7.5)を40倍

量 (12ml) 加えた後、約 2 時間 3℃下で粗酵素を抽出し、12,000×g で 10 分間遠心分離を行い、上澄液 (20ml) と残渣を得た。得られた上澄液には 80% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、時々攪拌しながら 20~30 分放置した。これを 12,000×g で 10 分間遠心分離後、沈殿物に 0.2M リン酸水素二ナトリウム-0.1M クエン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて再溶解し、蒸留水に対して 16~19 時間透析した透析内液をろ過して粗酵素液 (Phosphate buffer soluble invertase) 30ml を得た。

一方、得られた残渣には 1 N NaCl 溶液を加えて、4℃下で 2 日間攪拌抽出し、12,000×g で 10 分間遠心分離して得られた上澄液を蒸留水に対して 16~19 時間透析した透析内液をろ過して粗酵素液 (NaCl soluble invertase) 20ml を得た。

なお、各果実の粗酵素液の pH は、Phosphate buffer soluble invertase が 4.1~4.5、NaCl soluble invertase が 6.7~6.8 の範囲であった。

2-4 インベルターゼ活性の測定

インベルターゼ反応は 2% ショ糖 0.5ml、0.2M リン酸水素二ナトリウム-0.1M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 2ml、粗酵素液 0.5ml の計 3ml で行い、生成する還元糖を Somogyi-Nelson 法⁷⁾により定量した。反応は 30℃で 20 分行い、反応後 100℃で 3 分間の加熱処理を行って酵素を失活させた。

酵素 1 unit は、30℃で 1 分間に 1 μg の還元糖 (ブドウ糖として表示) を生成する量とした。酵素活性は果肉 1g 当たり (全活性) あるいは可溶性タンパク質 1mg 当たり (比活性) の unit で表した。

2-5 粗酵素液中のタンパク質の定量

タンパク質は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry らの方法⁸⁾により定量した。

3. 実験結果及び考察

3-1 各果実のインベルターゼ活性

モモ、ブドウ及びカキ果実のインベルターゼ活性を表 1 に示した。その結果、細胞質中に存在していると思われる⁵⁾リン酸緩衝液可溶性インベルターゼは、全活性及び比活性ともカキ果実が最も高く、全活性ではモモ果実の 242 倍、ブドウ果実の 4.2 倍であった。また比活性ではモモ果実の 79

倍、ブドウ果実の 2.2 倍であった。

一方、細胞壁にイオン結合していると思われる⁵⁾NaCl 可溶性インベルターゼは、緩衝液可溶性インベルターゼと同様に、カキ果実が最も高く、全活性ではモモ果実の 667 倍、ブドウ果実の 26 倍、比活性ではモモ果実の 326 倍、ブドウ果実の 9 倍であった。

このようにカキ果実のインベルターゼ活性は、モモやブドウ果実より顕著に高いことが明らかになったが、平井ら⁶⁾もリンゴ、ミカン、バナナに比較して、カキ果実のものがかなり高いことを報告しており、カキインベルターゼ活性がいろいろな果実に比較して高いことがわかった。

次に各果実間の緩衝液可溶性インベルターゼと NaCl 可溶性インベルターゼを比較すると、カキ果実の比活性を除き、全活性、比活性とも緩衝液可溶性インベルターゼの方が高かった。

3-2 ブドウ及びカキ果実のインベルターゼ活性に及ぼす pH の影響

表 1 においてモモ果実のインベルターゼ活性はほとんど認められなかったが、ブドウ果実ではカキ果実より活性は低いものの、インベルターゼ活性が認められた。そこでブドウ果実とカキ果実のインベルターゼ活性の性質を比較するために、pH の影響を検討し、図 1 に示した。その結果、緩衝液可溶性インベルターゼの至適 pH は、ブドウでは pH 4、カキでは pH 5 であり、カキ果実のほうが高かった。

3-3 ブドウ及びカキ果実のインベルターゼ活性に及ぼす温度の影響

ブドウとカキ果実の緩衝液可溶性インベルターゼおよび NaCl 可溶性インベルターゼ活性に及ぼす温度の影響を図 2 に示した。その結果、緩衝液可溶性インベルターゼ活性の至適温度は、ブドウでは 50~60℃、カキでは 40~50℃であった。一方、NaCl 可溶性インベルターゼ活性の至適温度は、ブドウでは 70℃、カキでは 50℃であった。このように両インベルターゼ活性の至適温度は、ブドウ果実のほうがカキ果実よりも高く、両インベルターゼ間では、ブドウ及びカキ果実とも細胞壁に結合した NaCl 可溶性インベルターゼの方が高かった。

ブドウ果実の両インベルターゼ活性は70℃の高温下で高い活性を示したが、中西ら⁹⁾はワイン用ブドウ14種類について検討を行い、これらブドウ

の至適温度はすべて75℃付近で、耐熱性も70℃付近までであることを報告しており、ブドウインベルターゼ活性の反応温度領域の高いことがわかった。

Table 1 Invertase activities of various fruits

Fruits	Phosphate buffer soluble invertase		NaCl soluble invertase	
	Total activity (unit/g fresh fruit)	Specific activity (unit/ μ g protein)	Total activity (unit/g fresh fruit)	Specific activity (unit/ μ g protein)
Peach (‘Nisinohakuto’)	3	0.02	0.4	0.01
Grape (‘koshu’)	173	0.71	10	0.34
Persimmon (‘Fuyu’)	726	1.58	267	3.26

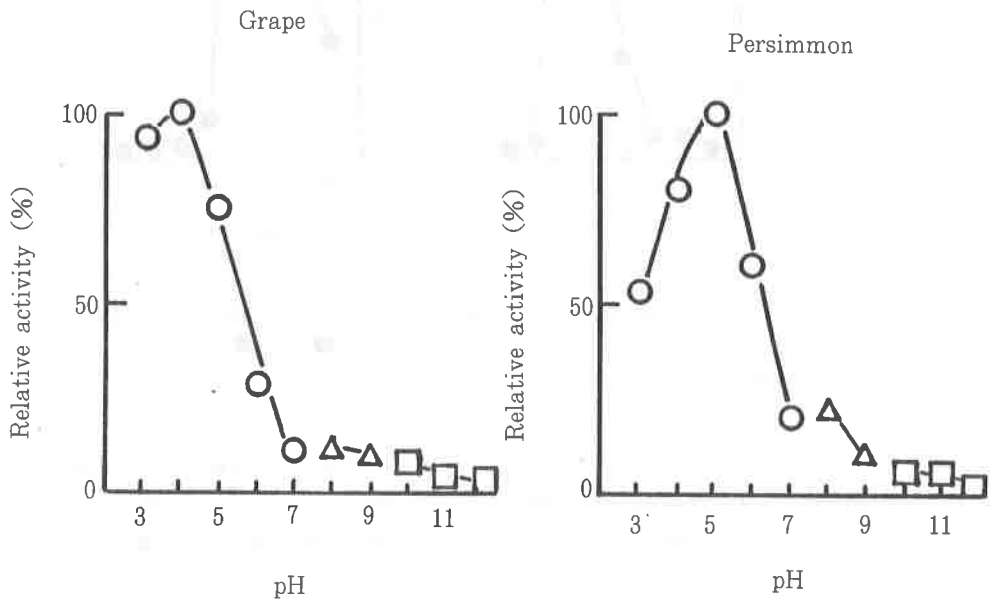


Fig. 1 Effect of pH on phosphate buffer soluble invertase activities of grape and persimmon fruits

- — ○ : 0.2 M phosphate-0.1 M citrate buffer
- △ — △ : Tris-HCl buffer
- — □ : Glycine-NaOH buffer

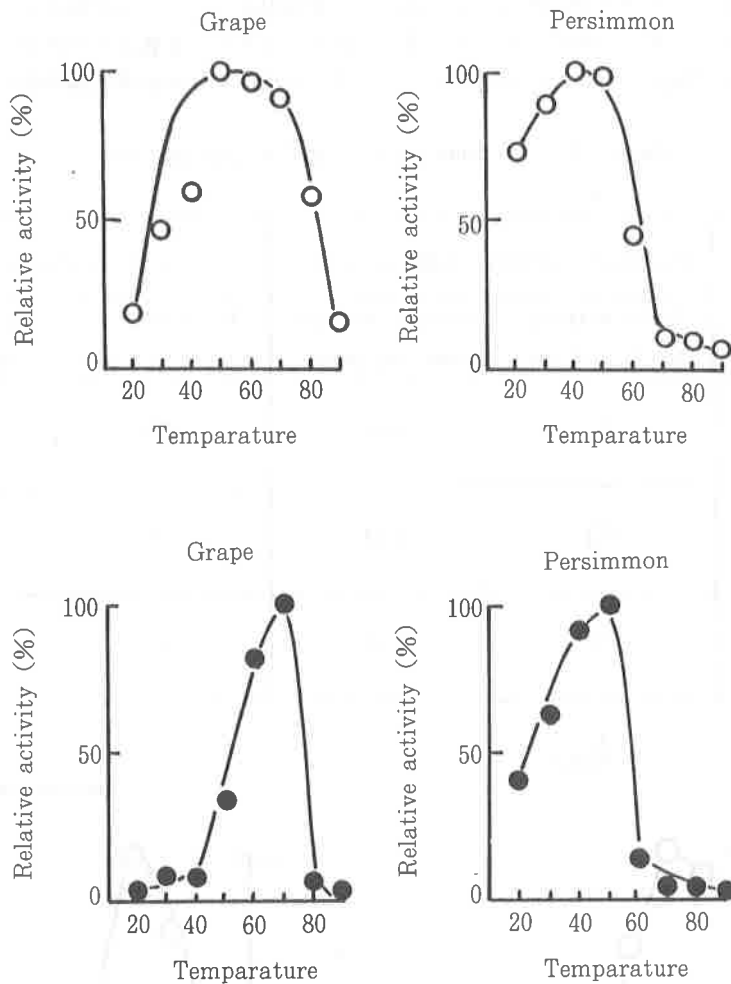


Fig. 2 Effect of temperature on phosphate buffer soluble invertase (○—○) and NaCl soluble invertase (●—●) activities of grape and persimmon fruits

文 献

- 1) 麻生 清・渡辺敏幸・大久保増太郎・山崎哲雄：農化, 30 (4), 187~191 (1956)
- 2) HULME, A. C. : The Biochemistry of Fruits and Their Products (Acad. Press, London and N. Y.) Vol. 2 p. 287 (1971)
- 3) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌, 32 (7), 522~529 (1985)
- 4) 辻 政雄・小宮山美弘：日食工誌, 34 (7), 425~431 (1987)
- 5) 鄭 国華・杉浦 明：園学雑, 59 (2), 281~287 (1990)
- 6) 平井俊次・六波羅明香・清水純夫：日食工誌, 33 (6), 369~374 (1986)
- 7) 福井作蔵：還元糖の定量法, 学会出版センター (1981) p. 10
- 8) 菅原 潔・副島正美：蛋白質の定量法, 学会出版センター, (1981) p. 98
- 9) NAKANISHI, K. and YOKOTSUKA, K. : Journal of Fermentation and Bioengineering, 69 (1), 16~22 (1990)