

ニホンナシ (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*)
果実の発育に伴うポリフェノール酸化酵素の
活性および基質含量の変化

東野 哲三・藤田 修二・李 忠富*・広田隆一郎**
(生物資源利用化学講座)
平成元年 5月16日受理

Changes in Activity and Substrate Content of Polyphenoloxidase
during Fruit Development of Japanese Pear
(*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*)

Tetsuzo TONO, Shuji FUJITA, Zhong-Fu LI and Ryuichiro HIROTA
(Laboratory of Food Science)
Received May 16, 1989

Summary

Polyphenoloxidase (EC 1.10.3.1) of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*) has an oxidizing activity on *o*-diphenols (ODP) such as chlorogenic acid, (-)-epicatechin and catechol. *ortho*-Diphenoloxidase activity and natural substrate (ODP) were surveyed by the difference spectral method at different growing stages of the fruit of two pear cultivars (Kosui and Hosui). A strong *o*-diphenoloxidase activity and a relatively large amount of ODP were found in young fruits and these levels sharply dropped as the fruits developed. Two positive peaks and a negative peak appeared in the difference spectra of fruit extracts from developing pears. The positive peak at 380 nm and the negative peak at 325 nm were shown to derive from the oxidation of catechin and chlorogenic acid, respectively. The levels of these ODP calculated per fruit were comparatively low in an early growing stage (middle in May) and then increased toward the end of July, when they showed a maximum value. Afterwards, the compounds decreased until the last stage of development.

Key words : polyphenoloxidase, chlorogenic acid and catechin, difference spectra, Japanese pear (*Pyrus serotina*).

緒 言

近年、外食産業の発展に伴って、いわゆるカットフルーツ等の形でのナシ、リンゴ等果実類の需要が増加してきた。しかし、この場合、果実の剥皮または切断面が時間の経過につれて次

* 現在 愛媛大学大学院連合農学研究科 (高知大学農学部) 在学
** 佐賀県果樹試験場

第に変色し、それが商品の鮮度の低下として消費者の目に捉えられるところから、カットフルーツ等の材料としては、なるべく変色しない品種を選ぶとか収穫時期を考えるなどの対応策が求められている。またこの変色現象は酵素的褐変反応によって起こることが明らかであり、現在その面からの変色防止の方法も検討されている。

ナシ果実とくに西洋ナシについては、果実中に存在する褐変反応の基質 *o*-ジフェノール (ODP) の含量が測定されており^{1-3, 7, 10, 12, 14, 22}、またポリフェノール酸化酵素 (PPO) の精製、性質等についても多数の報告がみられる^{4, 11, 13, 15}。しかし、ニホンナシについては研究例が少なく、中林⁸および著者らの報告がみられる程度である。既報¹⁸)において、著者らはニホンナシ幸水の幼果より精製した PPO が pH 4 付近で最大活性を示し、基質としてクロロゲン酸 (Chl) および(-)-エピカテキン (Epi) を強く酸化することを見出した。またそれと関連して、果実抽出液の差スペクトルを測定することにより、その中に存在する酵素的褐変反応の基質 ODP の種類を推定しうることを明らかにした⁶。さらに、差スペクトルに基礎を置く食品中の Chl およびカテキンの酵素的定量法 (差スペクトル法) を開発した^{19, 20}。また最近、ODP とアスコルビン酸 (AsA)¹⁶との共役反応を利用してニホンナシ PPO の各種 ODP 酸化活性を測定する方法の設定を行った²¹。本研究では、それらの方法を用いて発育過程におけるニホンナシ PPO の ODP 酸化活性および基質 ODP 含量の変化等について追跡し、その結果とカットフルーツとしての果実の収穫時期との関係について論じた。

実験方法

1. 材料および分析用試験液

材料には、佐賀県の農家で栽培されたニホンナシ (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*, 幸水および豊水) の果実を1986年5月初旬より8月にかけて7回にわたり採取し使用した。同一時期に収穫した果実5個をいずれも2~16等分し、それぞれの1片ずつを集め試料とした。果重が20g以下の幼果の場合はそのまま使用した。これらの試料50~100gに100mlのエタノールを加え煮沸後、ワーリングブレンダーで磨砕し濾過した。残渣はさらに100mlの70%エタノールで2回煮沸抽出した。全抽出液を集め、減圧下でエタノールを溜去して得た液に水を加えて50~100mlに定容した。酸化防止のためこれに同量の4%メタリン酸を加えたものを試験液とし、分析に際しては必要に応じて2%メタリン酸で希釈して使用した。

2. ポリフェノール化合物の定量

Chl およびカテキンは差スペクトル法^{19, 20}により定量した。全ポリフェノール (全 PP) の定量は Folin-Ciocalteu 試薬を用いる方法⁵) による。

3. PPO の調製および活性の測定

常法により調製したナシ果実のアセトン粉末0.5gにMcIlvaine緩衝液 (pH6.5) 50mlを加え室温で30分放置した後、東洋濾紙No.2で濾過して得られた濾液をPPO標品とした。PPOの各種ODP酸化活性の測定は既報^{17, 21})に準じ次のように行った。すなわち、0.5mM AsAを含む2%メタリン酸 (AsA溶液と呼ぶ) 0.5mlおよび0.25mM ODPを含む2%メタリン酸溶液 (ODP溶液と呼ぶ) 0.5mlに、前記のPPO液1mlを加え (そのとき反応液のpHは約4となる)、30°Cで振とう下に5分間反応させた後、直ちに4%メタリン酸3mlを加えて反応を停止する。この液のコントロール (AsA溶液、ODP溶液、4%メタリン酸およびPPO液をこの順に混合したもの) に対する5分後の ΔE_{243} 値を測定する。酵素液1ml当たり1分間での ΔE_{243} の0.01を1単位とし、それをナシ生果重 (g) で除した値を酸化活性値として表示する。

4. 吸収および差スペクトルの測定

ナシ果実抽出液の吸収スペクトルおよび差スペクトルは日立557型自記分光光度計を用いて測定した。また吸光度の測定には島津 UV-120-02型分光光度計を使用した。

実験結果および考察

1. 果実発育過程におけるニホンナシ PPO の ODP 酸化活性の変化

ニホンナシ PPO は Chl および Epi を強く酸化し、カテコール (Cat) をもかなり酸化する¹⁸⁾。そこで、幸水および豊水の果実発育過程における PPO の Chl 酸化活性、Epi 酸化活性および Cat 酸化活性を測定し、結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。発育初期においては幸水の各 ODP 酸化活性は豊水よりやや高かったが、その後、幸水は 6 月下旬まで、また豊水は 6 月中旬まで急速に低下した。しかし、それ以降はいずれも緩やかな減少に転じ、8 月下旬には極めて低い値となった。全期間を通じて、両品種とも Chl 酸化活性は Epi 酸化活性と大差はなかったが、Cat 酸化活性よりは 2~3 倍高かった。

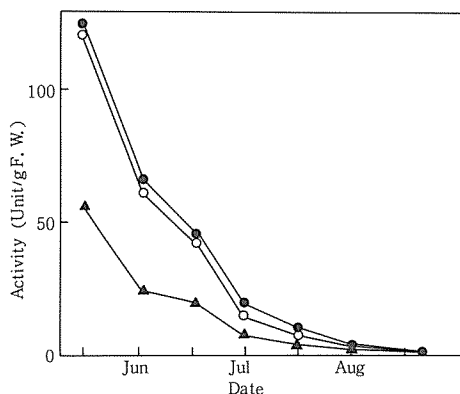


Fig. 1 Changes in the *o*-diphenoloxidizing activities of Japanese pear polyphenoloxidase during fruit development (Kosui)

—●— Epicatechin oxidase activity
—○— Chlorogenic acid oxidase activity
—▲— Catechol oxidase activity

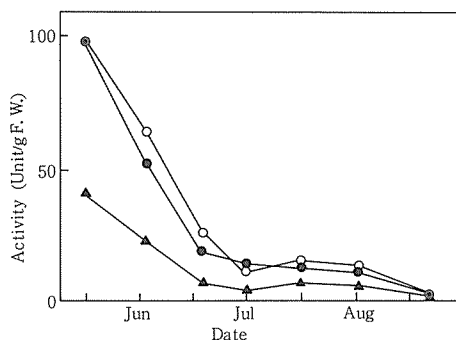


Fig. 2 Changes in the *o*-diphenoloxidizing activities of Japanese pear polyphenoloxidase during fruit development (Hosui)

—●— Epicatechin oxidase activity
—○— Chlorogenic acid oxidase activity
—▲— Catechol oxidase activity

2. 果実抽出液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変化

各発育過程における幸水果実の抽出液の吸収スペクトルおよび各抽出液に 5 月 15 日採取の幼果の PPO を作用させた時の酸化反応前後における差スペクトルを測定した。吸収スペクトル (Fig. 3) においては、280 および 325nm 付近に正のピークがみられたが、差スペクトル (Fig. 4) においては、255 および 380nm 付近に正の、また 325 および 290nm 付近にそれぞれ負のピークおよび肩が認められ、それらピークの高さ (絶対値) は果実の発育につれて減少していった。既報^{19, 20)}に示したように、差スペクトルにおける 325nm の負のピークは Chl の酸化反応に、380nm の正のピークはカテキンの酸化反応に由来し、また 255nm の正のピークはこれら ODP の酸化生成物であるキノンの生成を示すものと考えられる。キノンは、さらに複雑な反応を経て

褐色色素に変化することが知られている⁹⁾。このように、ニホンナシにおいても、差スペクトルの測定により褐変反応の基質 ODP として、果実発育の各時期に Chl 類およびカテキン類の存在することが推定された。これら ODP が基質となってナシの酵素的褐変反応が進行するのであろう。なお豊水の吸収および差スペクトル (Fig. 5 および Fig. 6) とともに幸水のそれらとほぼ類似するものであった。

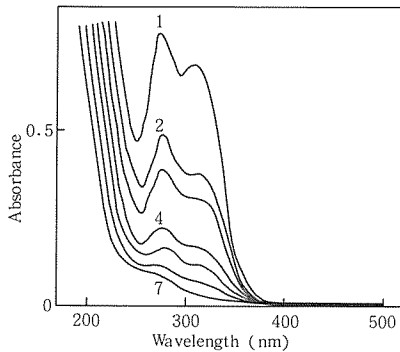


Fig. 3 Changes in the absorption spectrum of Japanese pear extract during fruit development (Kosui)
1 : 15/May, 2 : 2/Jun, 3 : 17/Jun, 4 : 30/Jun, 5 : 15/Jul, 6 : 30/Jul, 7 : 19/Aug

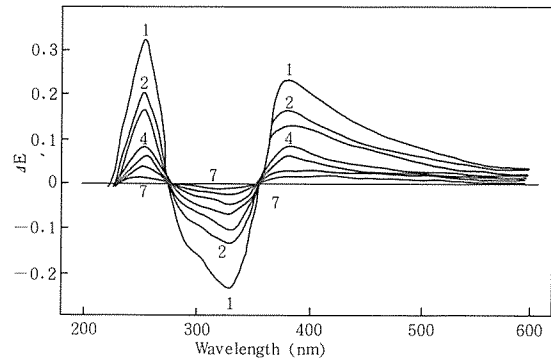


Fig. 4 Changes in the difference spectra of Japanese pear extract during fruit development (Kosui)
1 : 15/May, 2 : 2/Jun, 3 : 17/Jun, 4 : 30/Jun, 5 : 15/Jul, 6 : 30/Jul, 7 : 19/Aug

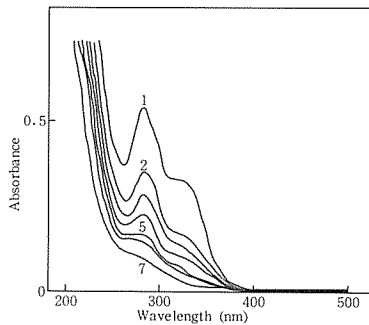


Fig. 5 Changes in the absorption spectrum of Japanese pear extract during fruit development (Hosui)
1 : 15/May, 2 : 2/Jun, 3 : 17/Jun, 4 : 30/Jun, 5 : 15/Jul, 6 : 30/Jul, 7 : 19/Aug

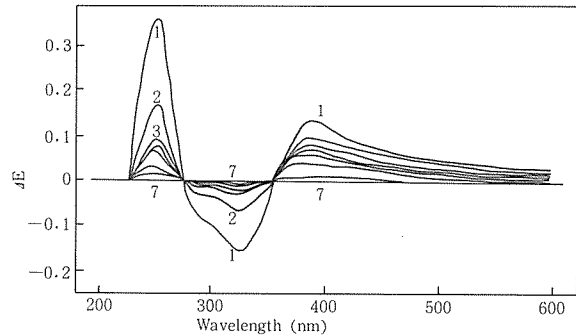


Fig. 6 Changes in the difference spectra of Japanese pear extract during fruit development (Hosui)
1 : 15/May, 2 : 2/Jun, 3 : 17/Jun, 4 : 30/Jun, 5 : 15/Jul, 6 : 30/Jul, 7 : 19/Aug

3. 果実発育過程におけるポリフェノール含量の変化

果実発育過程における Chl, カテキンおよび全 PP 含量を測定し、結果を Table 1 に示した。発育初期 (5月15日) における幸水および豊水の Chl 含量は約170および約60mg%であったが、

Table 1 Changes in the content of *o*-diphenol compounds in Japanese pears during fruit development

Date of Picking (M-D)	Average weight of fruit (g)		Chlorogenic acid (mg %)		Catechin (mg %)		Total polyphenol (mg %)	
	Kosui	Hosui	Kosui	Hosui	Kosui	Hosui	Kosui	Hosui
5-15	2.2	4.3	165.3	56.1	87.7	70.9	593	523
6-2	7.9	8.7	74.3	16.4	56.4	53.5	383	333
6-17	17.2	14.9	70.2	8.6	37.9	39.4	313	178
6-30	45.8	25.5	28.7	6.5	25.5	30.9	207	160
7-15	85.0	63.5	26.3	5.4	19.9	18.0	145	150
7-30	185.1	142.3	10.6	3.9	12.0	10.2	86	104
8-19	350.4	384.9	1.5	0.0	3.4	4.2	53	67

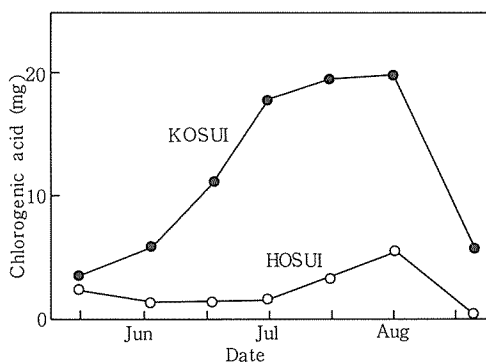


Fig. 7 Changes in chlorogenic acid content calculated per fruit of Japanese pears

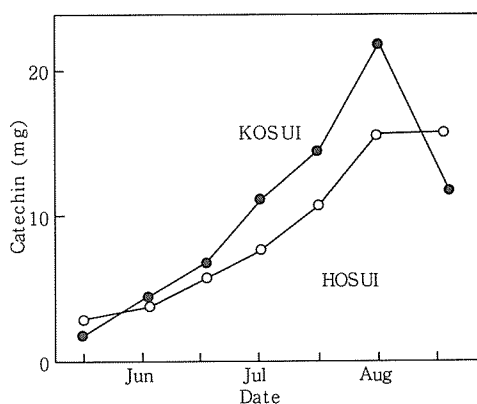


Fig. 8 Changes in the catechin content calculated per fruit of Japanese pears

2週間後にはそれぞれ約70および20mg%以下に低下した。その後は両品種ともに果実の発育につれて緩やかに減少し、8月下旬には微量となった。一方、幸水幼果のカテキン含量はChlの約50%であり、豊水のそれと大差はなかったが、両品種とも発育につれて低下し、8月下旬には3~4mg%の低含量となった。このようにChlおよびカテキン含量は両者とも成熟期には著しい低下がみられた。なお全PP含量は果実の発育につれて同様の変動がみられたが、それは全発育過程を通じて、Chlおよびカテキンの合計量より常に数倍ないし10数倍高い値であった。その差は褐変反応とは無関係なフラボノイド等のフェノール化合物によるものと思われる。

いま、Table 1より果実1個当たりのChlおよびカテキンの含量を計算すると、それぞれFig. 7およびFig. 8のような結果となった。幸水の場合、Chl含量は発育につれて7月下旬まで増加したが、それ以後は急速に低下した。一方、豊水の場合は発育初期には低レベルであったが、7月下旬にはやや増加し、それ以後は減少に転じた。カテキン含量は両品種とも発育初期には大差はみられなかったが、幸水の場合は7月下旬にピークに達した後再び低下した。これに対して、豊水の場合は同時期以後の増加は遅くなったが、ピークはみられなかつ

た。このような成熟期での ODP 含量の低下は西洋ナシの場合にも報告されている⁷⁾。

以上の結果から、果実発育初期では Chl およびカテキンの合計が100~300mg%と高く、PPO 活性も強いのでニホンナシ果実は速やかに褐変する。しかし、8月中~下旬の果実では ODP 含量、PPO 活性ともに極めて低いので、その切断面での褐変反応は遅くなる。実際に同時期の果実抽出液の差スペクトル (Fig. 4 および 6) より褐変度 (ΔE_{420}) を求めたところ、その値は極めて低いものであった。その故に、この時期の果実はカットフルーツの材料として好適と言えるであろう。因に同時期の幸水の果重および糖度はそれぞれ350 gおよび12%であった。一方、豊水の果重は380 gであったが、糖度は10%とやや低かった。このように、PPO 活性および ODP 含量の測定値はカットフルーツの材料としてのニホンナシ果実の成熟度の一指標として有効であると思われる。

摘 要

ニホンナシ果実 PPO の発育過程における ODP 酸化活性 (Chl, Epi および Cat 酸化活性) を測定した。これらの酸化活性はいずれも発育初期には高かったが、後期には著しく低下した。次に、発育過程における果実抽出液の PPO による酸化反応前後における差スペクトルを測定したところ、325nm 付近に負のピークまた380nm 付近に正のピークが認められた。これらのピークの出現から、ニホンナシにも Chl 類およびカテキン類が PPO の基質として存在することが示唆された。そこで、差スペクトル法により発育過程における幸水および豊水果実のこれら ODP 含量を測定したところ、両品種とも Chl およびカテキン含量は発育初期 (5月中旬) にはかなり高い値を示したが、その後は漸減し、後期 (8月中旬) には極めて低い含量となった。果実 1 個当たり計算したそれら ODP の含量は発育につれて増加の傾向を示し、7月下旬にピークに達した後再び減少した。このような PPO 活性および ODP 含量の変化から、幸水および豊水ナシのカットフルーツとしての収穫適期は8月中~下旬と考えられた。

本研究の結果は昭和62年10月、日本農芸化学会 関西支部・西日本支部合同大会 (於、山口) で発表した。

引用文献

- 1) Beveridge, T., J. E. Harrison and J. A. Kitson (1988). *J. Food Sci.*, **53**, 1195.
- 2) Blankenship, S. M. and D. G. Richardson (1985). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 336.
- 3) Duggan, M. B. (1969). *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 1098.
- 4) Halim, D. H. and M. W. Montgomery (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 603.
- 5) Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 556.
- 6) 藤田修二・東野哲三 (1986). 佐賀大農彙, **61**, 21.
- 7) Mosel, H-D. and K. Herrmann (1974). *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 251.
- 8) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 73.
- 9) 大村浩久・尊田民喜 (1970). 栄養と食糧, **23**, 367.
- 10) Ranadive, A. S. and N. F. Haard (1971). *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 86.
- 11) Rivas, N. J., and J. R. Whitaker (1973). *Plant Physiol.*, **52**, 501.
- 12) Ryugo, K. (1969). *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 43.
- 13) Siegelman, H. W. (1955). *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 97.
- 14) Sioud, F. B. and B. S. Luh (1966). *Food Technology*, April, 182.
- 15) Tate, J. N., B. S. Luh and G. K. York (1964). *J. Food Sci.*, **29**, 829.

- 16) Tono, T. and S. Fujita (1982). *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2953.
- 17) Tono, T., S. Fujita, K. Kawasaki and Z. Li (1987). *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2843.
- 18) 東野哲三・藤田修二・川崎宏隆・李忠富 (1986). 農化, **60**, 705.
- 19) 東野哲三・川崎宏隆・藤田修二・李忠富 (1987). 農化, **61**, 1441.
- 20) 東野哲三・李忠富・藤田修二 (1988). 農化, **62**, 1351.
- 21) 東野哲三・藤田修二・李忠富 (1989). 日食工誌, **36**, 11号印刷中.
- 22) Wang, C. Y. and W. M. Mellenthin (1973). *Hort science*, **8**, 321.