トマト果実の鮮度保持とその生理学的研究 (第 10 報)

トマト果実の追熟中における 2, 3 の酵素活性の変化と
それに対するポリエチレン包装の影響

大久保増太郎・石井 勝

(千葉県農業試験場)

Physiological Studies on the Extension of Shelf-life of Tomato Fruits

X. Changes of the Activity of some Enzymes during
the Ripening of Tomato Fruits and Effect
of Packaging them with a Polyethylene Bag on the Activity
of these Enzymes

Masutaro OKUBO and Katsu ISHII

Chiba Agricultural Experiment Station, Daizenno-machi, Chiba

Summary

Changes of the activity of several glucose catabolism catalyzing enzymes in tomato fruits during the after-ripening of them and the effect of packaging them with a polyethylene bag on the activity of the enzymes were investigated. The activity of succinate dehydrogenase (SDH), one of the enzymes in TCA cycle was also investigated.

1. Determination of the activity of the enzymes in each part of fruit (gelling-pip and flesh) revealed that aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH), and SDH in gelling-pip have higher activity than those in flesh do.

2. In gelling-pip the activity of aldolase decreased rapidly with the ripening of fruit, and this led to the presumption that glucose catabolism by way of EMP pathway declined. Whereas when the after-ripening of fruit was controlled by packaging them with a polyethylene bag, the activity of the enzyme was kept on the original level.

3. Although changes of the activity of G-6-PDH and 6-PGDH, the enzymes in HMP pathway, were rather small their activity contrary to aldolase showed the tendency to increase temporarily with the after-ripening of fruit. This led to the following presumption: glucose catabolism in tomato fruit particularly in gelling-pip converts from EMP into HMP pathway during the after-ripening of fruit.

4. When fruits were packaged with a polyethylene bag, the activity of G-6-PDH and 6-PGDH was controlled to rise.

5. The activity of SDH in gelling-pip was low at the preclimacteric stage of respiration, increased with the climacteric rise, and decreased again after the climacteric maximum. When fruits were packaged with a polyethylene bag the activity of SDH was kept on the original level without increasing.

緒 言

収穫後に追熟現象を示す果実では、一般に呼吸の climacteric rise がみられ、同時に呼吸の質的転換があることが指摘されている(8)。バナナでは果実の追熟の進

行に伴って、解糖系が hexose monophosphate pathway (HMP) から Emden-Myerhof-Parnas (EMP) 経路に変わることが認められている(5, 15)。リンゴでは(3, 7)組織呼吸の CO₂ 排出量に対するリンゴ酸の添加効果が pre-climacteric ではほとんどみられないが, climacteric

1973 年 3 月 12 日受理

maximum 以降では強い添加効果がみられ、また、DNP (dinitrophenol) の添加効果については、pre-climacteric で、 O_2 吸収の増加がみられるが、post-climacteric では効果がみられないことが認められている。岡本は(9) リンゴ果実から調製したアセトン粉末の抽出液を用いて、aldolase および glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH), 6-phospho-gluconate dehydrogenase (6-P-G DH) 活性を測定して、追熟中に aldolase 活性は減少し、HMP に属する酵素活性が増大することを認めて、さらに CA 貯蔵により追熟をおさえた果実では、HMP の酵素活性はむしろ低下することを報告している。このように climacteric rise の各段階で、呼吸の質的転換が行なわれることは明らかであるが、果実の種類によつてその内容は異なると考えられる。

トマト果実の climacteric rise の現象を酵素学的な立場から研究した報告は比較的少ない(2,13)。Barbour ら(1)は、トマト果実の解糖系の80%以上が EMP-TCA cycle を経て行なわれていることを報告しており、一方、Ramsey ら(14)は ^{14}C -glucose をトマト果実に供給した場合の発生ラベル CO_2 の経時的变化から、トマト果実の解糖系は、追熟中に EMP 系から HMP 系に移行することを推定している。そこで、追熟に伴う解糖系の転換の有無と、ポリエチレン包装して追熟を抑制した場合の、それらの変化を知るため、それぞれの条件下に放置した果実について、aldolase と G-6-PDH, 6-P-G DH の各酵素活性を測定した。また本研究の一連の報告で述べたように NADP レベルが部位によつて異なること(11)、およびゲル状部の酸含量が果肉部に比べて高い値を示したこと(10)などから、これら酵素活性が部位により異なることも考えられるので、果肉部とゲル状部に分けて活性の測定を行なつた。さらに TCA-cycle の酵素として succinate dehydrogenase (SDH) についても、同様測定を行なつた。

材料および方法

材料

千葉県市原市の農家で栽培された大型福寿を用いた。熟度は、特に pre-climacteric, climacteric maximum, post-climacteric の各段階での酵素活性を知るため、turning stage 1 (ripeness score 1) ないしはそれよりやや熟度の若いものを収穫し、 $24^{\circ}C$ で追熟を行なつた。

実験方法

(1) **aldolase 活性の測定** aldolase 活性は、トマトの部位別に、常法によりアセトン粉末を調製し、その 0.1 g を 0.1 M の K_2CO_3 4 ml に懸濁させ、これ

第1図 Aldolase 活性の測定法

を用いて Tager ら(15)に従い第1図のような方法で測定を行なつた。すなわち、fructose diphosphate を基質として、生成した triose-P のリン酸を測定して、 $30^{\circ}C$ で 10 分間に 0.1 mg の triose-P を生成する酵素量を 1 unit として表わした。

(2) **G-6-P DH, 6-P-G DH 活性の測定** 高等植物の G-6-P DH, 6-P-G DH 活性の測定法に関する研究は、従来 2, 3 行なわれたことが(12, 17)、トマ

第2図 酵素液の調製法

* 抽出液 0.5 M KOH 8.4~9.2 ml に 0.5 M リン酸カリ buffer (pH 7.8) を加えて全量を 100 ml にする

第1表 G-6-PDH および 6-P-GDH 活性測定時の
反応液の組成

添 加 液	反応液番号		
	No. 1	No. 2	No. 3
0.25M トリス-HCl buffer (pH7.8)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
0.5 M MgCl ₂	0.1	0.1	0.1
1.2 mg/ml NADP	—	0.8	0.4
8 mg/ml G-6-P Na	—	0.4	—
3.5 mg/ml 6-P-G Na	—	0.3	0.3
水	2.2	0.7	1.5
酵 素 液	0.2	0.2	0.2

ト果実についてはその測定法が確立されていない。そこで筆者は、アカマツ花粉中の酵素活性の測定を行なつた斗ヶ沢 (16) の方法に準じて、トマトの G-6-P DH, 6-P-G DH の抽出および測定法の検討を行なつた。その結果、第2図のような抽出法により、また測定は第1表の No. 1~No. 3 のような反応液を加えて 30°C で反応させ、340 m μ で生成する NADPH を測定して、1分間に 1 μ M の NADPH を生成する酵素量を 1 unit とした。

(3) SDH 活性の測定 トマトの SDH の活性は、King (4) の方法に改良を加えた中川の方法 (6) に従つた。測定は phenazine methosulphate (PMS) を媒体として、SDH の還元作用による DCIP の退色によつた。すなわち、0.5 M リン酸カリ buffer (pH 7.4) 0.3 ml, 45 mM KCN 0.1 ml, 0.6 M succinate-Na 0.1 ml, 1.5 mM DCIP 0.1 ml, 酵素液 (0.2~0.4 ml) に水を加えて全量を 2.8 ml とし、30°C に3分間放置後、PMS 0.2 ml を添加、かくはんして1分後から 610 m μ の吸光度を1分間ごとに読みとり、5分間の OD 差を求め、酵素液 0.1 ml 当りの Δ OD/5 min で活性を表わした。

第3図は上記添加酵素量と Δ OD/5 min の関係を示したものであるが、0.1~1.0 ml の範囲で直線的であつたので、添加酵素量は Δ OD/min の読みやすい量 (Δ OD/5 min が 0.05~0.300) を用いることとした。

第3図 SDH 活性測定時における
 Δ OD/5 min と酵素液量の関係

第4図 トマトの追熟に伴う部位別 aldolase 活性の変化

●—● ゲル状態無包装 ×—× Ripeness Score 無包装
○—○ ポリ包装 ×—× ポリ包装
▲—▲ 果肉部無包装
△—△ ポリ包装

結果および考察

1. 追熟に伴う aldolase 活性の変化とポリエチレン包装の影響

結果は第4図に示した。10 g tissue 当たりで示した aldolase 活性は、ゲル状態が果肉部に比べて高い値を示した。追熟過程との関係を部位別でみると、無包装のゲル状態では果実の追熟が進行するにつれてかなり急速に活性は低下した。すなわち、ripeness score が 0.5 近辺の pre-climacteric 果ではかなり活性が高く、10 units 近い値を示すが、ripeness score の進行と逆比例するように活性は低下して、8日後には約 4 units となり半減した。一方、ポリエチレン包装果では、8日後でも 9 units 近い値を示し、活性の低下はほとんど認められず、収穫当初に近い酵素活性を示した。果肉部でも活性の絶対量は、ゲル状態に比べて低い、無包装区の活性低下が急速で、ポリエチレン包装区の活性は比較的低下が少なく、当初の活性が維持された。

Barbour らが報告しているように、トマトの解糖系の 80% 以上が EMP-TCA cycle であり、トマトの追熟を senescence の現象とみれば、追熟の進行と aldolase の低下が平行して起こることは、酵素タンパクの減少 (2) という観点からも首肯できる。ポリエチレン包装果の活性が比較的高く保持されたことは、senescence という意味での追熟現象の抑制としてとらえることも可能であろう。

2. 追熟に伴う G-6-P DH, 6-P-G DH 活性の変化とポリエチレン包装の影響

追熟に伴う G-6-P DH と 6-P-G DH の活性を部位

第5図 トマトの追熟に伴う部位別 G-6-PDH 活性の変化とポリエチレン包装の影響

●—● ゲル状部無包装 ▲—▲ 果肉部無包装
○...○ / 〳 ポリ包装 △...△ / 〳 ポリ包装

第6図 トマトの追熟に伴うゲル状部の 6-P-GDH 活性の変化とポリ包装の影響

●—● 無包装
○...○ ポリ包装

別に測定したのが第5, 6図である。図でみるように両者とも、果肉部に比べてゲル状部で活性が高かった。これは前報(11)で述べたようにゲル状部の NADP レベルが果肉部に比べて高い値を示すことと考え合わせて興味あることである。

ゲル状部の G-6-P DH についてみれば、果実が追熟するにつれて酵素活性は上昇し、score 5~6 前後で最大値を示し、その後は低下した。ポリエチレン包装果でも、無包装果と同様に上昇傾向を示したが、その程度は少なく、ポリエチレン包装によつて G-6-P DH の活性上昇は抑制されるものと思われた。6-P-G DH 活性は、第6図にみるように、G-6-P DH とほぼ同様な傾向が認められた。

果肉部での果実の追熟に伴う G-6-P DH 活性の変化

は、ゲル状部に比較して少なかった。追熟につれてやや上昇するが、score 4 前後から低下の方向に向かった。ポリエチレン包装果でもほぼ同様の傾向がみられたが、一たん上昇後の低下の程度がやや緩慢であつた。

NADPH 生成系である G-6-P DH, 6-P-G DH の活性は、NADP レベルの高い部位すなわちゲル状部で強く、しかも熟度の進行に伴い NADP レベルが上昇するのに前後して、酵素活性も上昇した。これは、トマト果実が追熟して lycopene が盛んに生合成される時期に、ゲル状部で NADPH ないしは NADP の関与する代謝がおう盛に行なわれることを示すものといえよう。これらの代謝は、果実をポリエチレン包装することによつて抑制され、それが lycopene 生成阻害の一因となつて、着色が抑制されるものと推測された。

3. 追熟に伴う SDH 活性の変化とポリエチレン包装の影響

追熟に伴う SDH 活性の変化は第7図に示した。別の

第7図 トマトの追熟に伴う SDH 活性の変化

●—● ゲル状部無包装 ▲—▲ 果肉部無包装
○...○ / 〳 ポリ包装 △...△ / 〳 ポリ包装

試験(11)で、トマトの SDH 活性は、果実の未熟時に高く、生育肥大するにつれて減少したことを認めているので、追熟との関連をみるための試料である ripeness score 0.5 のもの以外に、やや未熟の緑色果を同時に収穫して、その SDH 活性も比較測定した。

部位別では G-6-P DH, 6-P-G DH と同様、ゲル状部の活性が果肉部に比べて高い値を示した。ゲル状部についてみれば、緑色未熟果でやや高く、pre-climacteric 時に一たん低下してその後上昇し、climacteric maximum でほぼピークに達し、その後は再び低下の傾向を示した。一方、ポリエチレン包装果では、追熟に伴う上昇がみられず、ほぼ収穫当初の活性がそのまま持続する

第2表 Succinate 濃度の違いによる SDH 活性変化

試料 succinate の濃度	No. 1		No. 2	
	ゲル状部	果肉部	ゲル状部	果肉部
0.92%	105	108	108	104
0.55	100	100	100	100
0.18	60	51	62	59
0.05	29	27	31	30

傾向がみられた。すなわち、ゲル状部の SDH 活性はトマト果実の呼吸の climacteric な現象とほぼ等しい傾向を示した。本研究の第4報で述べたように、ゲル状部の酸含量は果肉部に比べて高く、追熟に伴って減少するが、ポリエチレン包装した場合には、その減少がおさえられることと符合する。果実の追熟に伴う果肉部の SDH 活性の変化は少なかった。ポリエチレン包装区との差もほとんどみられなかった。

また基質濃度の差によるトマト果実の SDH 活性の変化をみたのが第2表である。前述の活性測定時に用いた SDH の濃度は 0.55% に相当するので、この濃度での活性を 100 として示した。結果は表にみられるように、ゲル状部、果肉部とも基質濃度が減少するにつれて、活性は低下し 1/10 の濃度では活性は約 1/3 に低下した。ゲル状部の SDH 活性は、apoenzyme 量からみても、基質濃度からしても果肉部に比較して高いことが首肯された。

摘 要

トマト果実の追熟時における解糖系酵素の活性変化と、それに対するポリエチレン包装の影響を検討した。また TCA cycle の酵素の一つである SDH についても同様測定を行なった。

1. 果実の部位別にみた aldolase, G-6-P DH, 6-P-G DH, SDH の活性は、ゲル状部で高く、果肉部で低かった。

2. ゲル状部についてみると、aldolase 活性は、果実の追熟に伴って急速に減少し、EMP の解糖系の低下が推定された。一方、ポリエチレン包装して追熟を抑制すると、活性の低下はおさえられた。

3. HMP の酵素である G-6-P DH と 6-P-G DH 活性の、追熟に伴う変化は比較的小さかったが、aldolase とほぼ逆の傾向を示し、追熟につれて一時上昇傾向を示した。このことから、トマト果実の追熟時には EMP→HMP の解糖系の転換が、果実とくにゲル状部で行なわれていることが推定された。

4. G-6-P DH, 6-P-G DH 活性の上昇は、果実をポリエチレン包装すると抑制された。

5. ゲル状部の SDH 活性は、呼吸の pre-climacteric

時に低く、climacteric maximum で上昇し、その後は低下した。ポリエチレン包装して果実の追熟を抑制した場合には、SDH 活性の上昇もおさえられた。

謝 辞 本研究を行なうにあたり、種々の御指導御助言をいただいた東北大学農学部柴崎一雄教授および千葉県工業試験場長前沢辰雄博士に深く感謝の意を表する。

引用文献

1. BARBOUR, R.D., D.R. BUHLER, and C.H. WANG. 1958. Identification and estimation of catabolic pathways of glucose in fruits. *Plant Physiol.* 33: 396-400.
2. DICKINSON, D.B., and J.B. HANSON. 1965. Comparison of mitochondria from tomato fruits at various stages of ripeness. *Plant Physiol.* 40: 161-165.
3. HULME, A.C. 1961. *Advances in Hort Sci and Jheir Appl.* 1: 77.
4. KING, T.E. 1963. Reconstitution of respiratory chain enzyme system. *J. Biol. Chem.* 238: 4032-4036.
5. 古衡山, 邨田卓夫, 緒方邦安, 1965. パナナ果実の追熟生理および貯蔵に関する研究(第2報), 食品工誌. 12: 163-167.
6. 中川弘毅, 小池俊介, 小倉長雄, 竹花秀太郎. 1967. トマト果実のコハク酸脱水素酵素について. 昭和 42 年度日本農芸化学関東支部大会講演要旨および私信による。
7. NEAL, G.E., and HULME, A.C. 1958. *J. Exptl. Botany.* 9: 403.
8. 緒方邦安. 1963. 果実の追熟生理と貯蔵. 食品工誌. 10: 470-481.
9. 岡本辰夫. 1968. 青果物における CA 貯蔵の原理. 日本食品工業学会第 15 回大会シンポジウム要旨。
10. 大久保増太郎. 1968. 青果物の鮮度保持に関する研究(第5報) トマト果実の呼吸に及ぼす環境条件とくにガス組成の影響. 園学雑. 37(3): 256-260.
11. ———. 石井 勝. 1971. トマト果実の鮮度保持とその生理学的研究(第9報) トマトの追熟中の NADP レベルおよび ATP, ADP の変化とポリエチレン包装の影響. 園学雑. 42(1): 70-74.
12. OOTA, Y., Y. YAMAMOTO, and R. FUJII. 1953. Dehydrogenase pattern in bean seed embryo. *J. Biochem.* 40: 187-203.
13. PADWAL-DESAL, S.R., E.M. AHMED, and R. A. DENNISON. 1969. Some properties of mitochondria from irradiated tomato fruit. *J. Food. Science.* 34: 332-335.
14. RAMSEY, J.C., and C.H. WANG. 1962. Catabolic changes in ripening tomato fruit. *Nature.* 193: 800-801.
15. TAGER, J.M., and J.B. BIALE. 1957. Carboxylase and aldolase activity in the ripening

- banana. *Physiol. Plantarum*. 10: 79-85.
16. 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三. 1969. アカマツ花粉のグルコース-6-リン酸, 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼについて. 昭和44年度日本農芸化学大会講演要旨および私信による.
17. YAMAMOTO, Y. 1961. A metabolic pathway of isocitric acid in cotyledons of a bean, *Vigna sesquipedalis*. *Plant Cell Physiol.* 2: 277—289.