貯蔵青果物の品質変化に関する生化学的研究

(第4報) 低温障害バナナ果実の 20°C 昇温貯蔵に伴う
gluconeogenesis と amylolysis

能 岡 浄*

Biochemical Studies on Changes in Quality of Post-harvest Fruits during Storage

Part IV. Changes in gluconeogenesis and amylolysis during after-ripening in chilling-injured banana fruit

KIYOSHI YOSHIOKA

Changes in starch and sugar contents and in enzyme activities related to gluconeogenesis and amylolysis during the process of after-ripening in chilling-injured banana fruits were compared with those of healthy fruit.

In the healthy fruits, a linear increase in sugar contents and a sharp decline of starch contents started on the 6th day of storage at 20°C, accompanying with increase in phosphofructokinase (PFK) activity. While apparent fructose-1,6-diphosphatase (F1,6 DPase) activity stayed relatively low and constant level.

In contrast, a gradual increase in sugar contents accompanying with a remarkable increase in apparent F1,6DPase activity but no significant change in starch contents were noted in the fruits stored at 6°C.

Storage at 20°C after the storage at 6°C for 9 days caused a rapid increase in sugar contents and sharp decline of starch contents within 5 days. In these chilling-injured fruits, however, a low PFK activity and a remarkably high apparent F1,6DPase activity were noted throughout after-ripening.

These findings suggested that, in chilling-injured fruits, an increase in gluconeogenesis occurred preceding to after-ripening and an increase in amylolysis also occurred during the process of after-ripening.

(Received Apr. 24, 1973)

第3報¹⁾において、緑熟バナナ果実を 6°C に貯蔵した場合および 6°C に 9 日間置いた後 20°C に昇温貯蔵した場合の障害果と、20°C に貯蔵した果実(対照区)について、アスパラギン酸およびセリンの代謝変化を比較し、低温障害果の gluconeogenesis に関連する代謝経路を検討した。

今回はさらにデンプン、還元糖および非還元糖量の変化ならびに糖の代謝に関連する酵素活性の変化を比較して、低温障害バナナ果実の gluconeogenesis および amylolysis に関連する代謝経路を考察したので、その概要を報告する。

実験方法

1. 実験材料

試料はフィリピン産の緑熟バナナ果実 (*Del Monte*) を神戸港入荷直後に、加工業者から購入した。

2. 試薬

グルコース-6-リン酸 (G6P) ソーダ塩、フルクトース-6-リン酸 (F6P) ソーダ塩、フルクトース-1, 6-2 リン酸 (F1, 6DP) 4-シクロヘキシルアンモニウム塩, aldolase (ALD), triose isomerase (TIM), glyceraldehyde dehydrogenase (GDH) (以上 Boehringer); Anthrone,

* 大阪府立公衆衛生学院 栄養部 (大阪市住吉区大領町3丁目3)

Department of Nutrition Science, Public Health School of Osaka Prefecture. Sumiyoshi-ku, Osaka.

グリシン(以上和光); ATP ソーダ塩(協和発酵); NADH (Oriental) はすべて市販品を用いた。

3. 実験方法

試料の貯蔵条件は前報¹⁾と全く同様にし、以下の項目に分けて比較実験を行なった。

(1) 還元糖、非還元糖およびデンプンの定量

果実を輪切りにし、無傷の果皮のついた試料約5gに6倍量(v/w)の80%エタノールを加えて磨砕し、このホモジネイトを沸騰水中で煮沸した。これを8,000×gで10分間遠心分離後、残渣を30mlの80%熱アルコールで洗浄し、遠心分離する。残渣の洗浄を2回くり返し、これら上澄液を集め、水を加えて定容とし還元糖および非還元糖の定量に用いた。なおこのとき、被検液のアルコール含量は少なく、アルコールによる糖の発色妨害は認められなかった。

上述の抽出残渣に10mlの水を加えて攪拌し、さらに52%の過塩素酸(PCA)を13ml加えて冷却しながら15分間攪拌後、15mlの水を加えて8,000×gで10分間遠心分離する。残渣に5mlの水を加えて、さらに52%PCAを6.5ml加え、以下同様に処理する。この操作を3回くり返し、これら上澄液を集め、水を加えて定容とし、デンプンの定量に用いた²⁾。

(i) 還元糖の定量

上述の80%アルコール抽出液の一定量をSOMOGYI-NELSON法に従い、545nmで比色定量し³⁾⁴⁾、グルコースに換算して表わした。

(ii) 非還元糖の定量

(i)と同じ抽出液の一定量に塩酸を加えて、1/30Nの塩酸溶液とし、沸騰水中で30分間加水分解した。冷却後水酸化ナトリウムで中和し、定容後その一定量を(i)と同様にし比色定量し、加水分解前後の還元糖量の差に0.95を掛け、ショ糖に換算して表わした。

(iii) デンプンの定量

上述のPCA抽出液の一定量に、冷却しながらAnthrone試薬(0.2% Anthrone 濃硫酸溶液)10mlを加えて攪拌後、沸騰水中で7.5分間加熱する。反応後ただちに流水中で冷却し、630nmで比色定量した²⁾。

なおデンプン量は、同じ方法で得られるグルコース標準曲線からの値に0.9を掛けて算出した。

(2) 酵素活性の測定

(i) 酵素液の調製

果実を輪切りにし、無傷の果皮の着いた試料約15gに0.05M-triethanolamine塩酸緩衝液[pH7.3; 10%(v/v) polyethylene glycol 400, 1%(w/w) 2-mercap-

toethanol および10mM-EDTAを含む]を約2倍量(v/w)加えて磨砕する。ガーゼで濾過後1,000×gで15分間遠心分離し、得られた上澄液を酵素液とした。

なおこれらの操作は、すべて0~5°Cで行なった。

(ii) 酵素活性の測定

(i) 見かけのglucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性の測定

酵素液およびマレイン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)30μmoleに基質G6Pを10μmole加えて、反応液の全容量を2.1mlとし⁵⁾、次式により生成するPiを定量した。

(ii) 見かけのfructose-1,6-diphosphatase (F1,6DPase) 活性の測定

反応液は酵素液、グリシン-KOH緩衝液(pH9.5)100μmoleおよびMgCl₂5μmoleに、基質としてF1,6DPを5μmole加えて全容量を2.2mlとした⁶⁾。

なおこのとき生成物のF6Pが基質となりfructose-6-phosphatase (F6Pase) 活性も関与してくるので、これを考慮してF1,6DPaseの場合と同じ反応条件で、基質F1,6DPの代わりにF6Pを5μmole加えて、F6Paseにより生成するPiを別に測定し、補正した。

以上(i)~(iii)において3分間のブレインキューベーション後、反応液に基質を添加して各反応を開始させ、30°Cで10分間振とうした。なおブランクには反応液から基質のみを除いたものを用いた。

60%のPCA0.2mlを加えて反応を止め、10分間水冷後遠心分離し、上澄液について各反応式に従って生成するPi量をFiskeらの方法により660nmで比色定量した⁷⁾。

また反応停止後の非酵素的な基質の加水分解によるPiの混入を防ぐため、PCAの添加直後にブランクにも反応液と等量の基質をそれぞれ加えて、それ以後の条件を全く同様にし、Piの生成量の差を算出することにより各酵素の活性を表わした。

なお5分間インキューベーションしたときのそれぞれの反応系におけるPi生成量は、10分間インキューベーションしたときの生成量の1/2であったので、この範囲内ではPiの生成量と酵素活性の間には直線的関係が成立する。

また糖およびPiの比色定量は、日立製分光光度計181型により光路幅1cmのキューベットを用いて、各波

長での吸光度から測定した。

(iii) phosphofructokinase (PFK) 活性の測定

反応液は酵素液, アンモニウム-リン酸緩衝液 (pH 7.6) 10 μ mole, ATP 4.5 μ mole, $MgCl_2$ 10 μ mole, NADH 0.4 μ mole, ALD 1.4 unit, TIM 4.0 unit および GDH 1.0 unit に, 基質 F6P を 10 μ mole 加えて全容量を 2.0 ml とした⁸⁾。

反応液に基質を添加して反応を開始させ, 25°C の下式に従って減少する NADH を前報⁹⁾ と同じ方法で測定することにより活性を算出した。

実験結果

緑熟健全バナナ果実のデンプン含量が貯蔵条件によりいかに変化し, またそれに関連して還元糖および非還元糖がどのように変化するかを調べて, デンプンの減少と糖, すなわち還元糖と非還元糖の総量変化を図示したのが Fig. 1-A であり, 各果実における還元糖と非還元糖の含量を図示したのが Fig. 1-B である。

Fig. 1-A において, 20°C に貯蔵した果実(対照区)では4日目までデンプンおよび糖はほとんど変化しない。6日および8日目にデンプンは直線的に急減し, これに見合うような糖の著しい増加が認められる。10日目以後デンプンはほとんど消失しているが, 糖は増加する。なお Fig. 1-B より, この時期の糖の増加はおもに還元糖の急増に基づくことがわかる。

これに対し 6°C に貯蔵した果実では, 4 日目は対照区とあまり変わらないが, 6日および9日目ではデンプンの減少がほとんど見られないのに糖は増加している。この場合の糖の増加は Fig. 1-B より, 主に非還元糖の増加に基づく。

6°C に9日間貯蔵した果実を 20°C に昇温すると, 1 日目では昇温前と大差ないが, 3日目にはデンプンは1日目より約 0.9 g 減少するのに対し, 糖は約 2.1 g も増加する。5日および7日目になるとデンプンは著しく減少し, その減少量に見合うだけの糖の増加が見られ, 対照区の6日および8日目とよく似た傾向を示す。

ブドウ糖合成に関連する見かけの G6Pase 活性を調べたのが Fig. 2 である。

Fig. 1-A. Changes in starch and sugar contents in healthy and chilling-injured banana fruit.

Fig. 1-B. Changes in reducing and non-reducing sugar contents in healthy and chilling-injured banana fruit.

- ▲ starch contents,
- × total sugar contents, the sum of reducing and non-reducing sugar contents
- reducing sugar contents
- non-reducing sugar contents
- Control (at 20°C)
- Chilling-injured fruit stored at 6°C
- - - Chilling-injured fruit stored at 6°C for 9 days and at 20°C

Fig. 2. Change in apparent glucose-6-phosphatase activity in healthy and chilling-injured banana fruit tissues.

- Control (at 20°C)
- Chilling-injured fruit stored at 6°C
- ▲ Chilling-injured fruit stored at 6°C for 9 days and at 20°C

対照区では6日目まで貯蔵日数とともに徐々に増加し、8日および10日目にはほぼ直線的に急増し、以後わずかに減少する。

これに対し6°Cに貯蔵した果実において、4日目では対照区より活性は低く、以後少しずつ増加する。20°Cに昇温後1日目ではさらに高くなり、以後急増して5日目には最大活性となるが、その後わずかに減少する。

次に glycolysis の key-enzyme の一つである PFK 活性を調べたのが Fig. 3 である。

対照区において4日目まで活性の増加はほとんど見られないが、以後直線的に急増して8日目には最大活性になるが、その後は次第に減少する。

6°Cに貯蔵した果実において、4日目では対照区とほとんど変わらないが、6日目には2倍に活性が増加し、以

後さらに増加するが、対照区よりはかなり低い。20°Cに昇温すると1日目には昇温前と同程度の活性を示し、それ以後は日数とともに徐々に増加するが、対照区の最大活性よりはかなり低い。

これに対し gluconeogenesis の key-enzyme の一つである見かけの F1,6 DPase 活性を調べたのが Fig. 4 である。

対照区では8日目まで貯蔵日数とともに徐々に増加し、10日目には約3倍に急増するが、12日目には半減する。

6°Cに貯蔵した果実において、4日目では対照区と大差ないが、6日目には急増して対照区の約6倍の値を示し、以後も活性はあまり変らない。20°Cに昇温後1日目で活性はさらに増加し、3日目には減少するが、5日目には再び増加して対照区の最大活性の約3倍となる。

考 察

対照区において6日および8日目ではデンプンの減少量に見合うだけの糖の増加が認められ、「追熟に伴って、デンプンの分解により糖が増加する」という邸田らの報告¹⁰⁾と一致する。また PFK 活性もほぼ直線的に急増し、追熟に伴って glycolysis が盛んになることが推察される。特に8日目では第2報⁹⁾において、pyruvate decarboxylase および alcohol dehydrogenase 活性の著しい増加に伴ってアルコールが生成され、isocitrate dehydrogenase および glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性も増加するため CO₂ 排出が盛んとなり、いわゆる climacteric rise の現象が起るものと考察したが、これを裏づけるように、この時期にはデンプンの減少が著しく、PFK は最大活性となる。また8日目以後還元糖は直線的に急増し、それに見合うように見かけの G6Pase 活性も10日目まで急増する。

10日目以後の対照区ではデンプン含量は著しく低下し、デンプンが減少する割合も低下するが、それ以上に糖が増加する。また PFK 活性は8日目に比べて低下するが、見かけの G6Pase および F1,6 DPase 活性は高くなる。しかるに第1報¹¹⁾において、7日目の対照区に多量含まれていたセリンが13日目になると急減し、また第3報¹⁾において、10日目の対照区では¹⁴C-セリンの糖区分への取込みは、有機酸への取込み量の138%と他の時期に比べて多いことを報告した。

これらのことから、10日目以後の対照区での過熟化に伴う糖の増加現象は、それ以前に多量蓄積されていたセリンが糖へ転換した結果に基づくものと考えられる。

Fig. 3. Change in phosphofructokinase activity in healthy and chilling-injured fruit tissues.

- Control (at 20°C)
- Chilling-injured fruit stored at 6°C
- ▲--▲ Chilling-injured fruit stored at 6°C for 9 days and at 20°C

Fig. 4. Change in apparent fructose-1,6-diphosphatase activity in healthy and chilling-injured banana fruit tissues.

- Control (at 20°C)
- Chilling-injured fruit stored at 6°C
- ▲--▲ Chilling-injured fruit stored at 6°C for 9 days and at 20°C

Fig. 5. Changes of metabolic carbon path in chilling-injured banana fruits

6°C に貯蔵した果実において、4日目では対照区と大差ないが、6日と9日目の果実および6°Cに9日間置いた後20°Cに昇温して1日および3日目の果実では、デンプンはほとんど減少しないが、それ以上に糖、特に非還元糖の増加が認められる。また見かけのF1,6DPase活性は対照区の5~9倍も高い。しかるに第3報¹⁾において、¹⁴C-アスパラギン酸および¹⁴C-セリンの有機酸への取込みに対する糖への取込みの割合は、対照区よりも著しく高いことを報告した。

これらの事実から6°Cに6~9日間貯蔵した果実および20°Cに昇温後1~3日の果実では、アスパラギン酸およびセリンなどのアミノ酸がFig. 5-Aの太字の矢印のように糖へ転換してゆく割合、すなわちgluconeogenesisが対照区に比べて著しく高いものと推定できる。

6°Cに9日間貯蔵した果実を20°Cに昇温すると5日および7日目にはデンプンが著しく減少し、この減少量に見合うだけの糖の増加が認められ、対照区の6日および8日目と同じような傾向を示す。しかし対照区の8日目よりPFK活性はかなり低く、見かけのF1,6DPase活性は著しく高い。しかるに第2報²⁾において、昇温後5~7日目のphosphoenolpyruvate (PEP)-carboxykinase活性は他の果実に比べて著しく高く、また第3報¹⁾において、この時期には¹⁴C-アスパラギン酸および¹⁴C-セリンの有機酸への取込みに対する糖への取込みの

割合は、他の障害果に比べて低いが、¹⁴C-アスパラギン酸のpentoseおよびhexoseへの取込みは逆に多いことを報告した。

以上の事実を考え合わせると、昇温後5~7日の果実ではFig. 5-Bの太字の矢印のように、昇温前のgluconeogenesisが引き続き盛んであると同時に、これらの果実における糖の急増は主にデンプンの分解に基づくものと考えられる。またその糖がglycolysisによりさらに分解されてゆく割合は、対照区の8日目に比べてかなり低く、いわゆるamylolysisが盛んであると思われる。

なお本論文でのG6PaseおよびF1,6DPaseの両酵素活性は見かけ上の活性であり、本酵素そのものの活性以外に基質範囲の広いphosphatase活性が関与している可能性がある。今後この点については、より詳細に検討して行きたい。

要 約

フィリピン産の緑熟健全バナナ果実を6°Cに貯蔵したもの、6°Cに9日間置いた後20°Cに昇温貯蔵したものおよび20°Cに貯蔵した果実(対照区)についてデンプン、還元糖および非還元糖の変化と、見かけのG6Pase, PFKおよび見かけのF1,6DPase活性の変化を調べて次の結果を得た。

対照区において、4日目までは初めとほとんど変わらないが、6日および8日目になるとデンプンが著しく減少し、それに見合うだけの糖の急増が認められ、同時にPFK活性も急増する。また8日目以後還元糖が急増し、見かけのG6Pase活性も8~10日目まで直線的に急増する。10日目以後デンプンはほとんど含まれなくなり、PFK活性は次第に減少するが、見かけのG6Pase活性は急増し、糖はさらに増加する。見かけのF1,6DPase活性は貯蔵日数とともに少しずつ増加し、10日目には約3倍に急増するが、以後半減する。

6°Cに4日間貯蔵した果実は対照区と大差ないが、6日および9日間貯蔵した果実および6°Cに9日間置いた後20°Cに昇温すると1日および3日目では、デンプンの減少はほとんど認められないが、それ以上に糖、特に非還元糖が増加する。また見かけのG6PaseおよびPFK活性は対照区よりも低い、見かけのF1,6DPase活性は著しく高い。

6°Cに9日間置いた後20°Cに昇温して5日および7日目の果実ではデンプンが急減し、それに見合うような糖の著しい増加が認められ、対照区の6日および8日目と同じような傾向を示す。しかし酵素レベルで対照区の8日目と比較すると、見かけのG6Pase活性は高いが、PFK活性はかなり低い。いっぽう見かけのF1,6DPase

活性は著しく高い。

以上の結果に基づき、糖の代謝経路を考察した。

おわりに本実験遂行にあたり、種々御討議いただいた大阪府立大学農学部生物化学研究室の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) 能岡 浄: 食品工誌, 20 (10), 456 (1973).
- 2) McCREADY, R.M., et al.: *Anal. Chem.*, 22, 1156 (1950).
- 3) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1955).
- 4) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- 5) SWANSON, M.A.: *J. Biol. Chem.*, 184, 647 (1950).
- 6) POGELL, B.M., et al.: *J. Biol. Chem.*, 208, 149 (1954).
- 7) FISKE, G.H., et al.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
- 8) LINDELL, T.J., et al.: *J. Biol. Chem.*, 243, 907 (1968).
- 9) 能岡 浄・本田幸一郎: 食品工誌, 19 (4), 131 (1972).
- 10) 邨田卓夫・古 衡山・緒方邦安: 食品工誌, 12 (4), 121 (1965).
- 11) 能岡 浄・本田幸一郎: 食品工誌, 17, (11), 489 (1970). (昭和48年4月24日受理)