果実の香気成分，とくにエステル生成に関する研究

(第2報) バナナ，イチゴ，メロンの遊離細胞よりのエステル生成

上 田 悦 範*・緒 方 邦 安*

Studies on Biosynthesis of Esters in Fruit Volatiles

Part II. Esterification of added alcohol in separated cells from banana, strawberry and melon

YOSHINORI UEDA* and KUNIYASU OGATA*

Separated cells from pulp of banana, strawberry or melon were obtained using pectinase. When butyl alcohol and acids (acetic or butyric) were added to these cells, esters were produced from separated mesocarp cells of strawberry and melon, but mesocarp cells of banana did not produce the esters. Vascular tissue separated from banana pulp showed a strong capacity of esterification in contrast to mesocarp cells. From microscopic view, vascular bundle was accompanied with bigger cells than mesocarp cells. Protoplasts from strawberry indicated also the esterification in the presence of butyl alcohol and butyrate. Addition of alcohol to separated cells or slices of these fruits indicated slightly acidic optimum peak (pH 5.5) for esterification. The addition of acid besides alcohol shifted pH optimum from 5.5 to 6.5.

(Received Nov. 18, 1975)

香気成分は果実の品質を構成している因子のひとつである。前報¹⁾においてバナナ果肉切片を用いて、おもにエステル生成の諸性質について研究し、この反応が酵素反応であり、アルコールと酸の直接反応である可能性について述べたが、今回は果実の果肉をペクチナーゼにより遊離細胞にわけ、これらにアルコール、酸を添加した場合のエステル生成について、2,3 の知見を得たので報告する。

実験方法

1. エステル生成能の測定

前報と同様、head space 法で行なった。果実、野菜類のエステル生成能の検査の場合は、切片(約 5×5×1 mm) 5 g を 100 ml フラスコに入れ、口紙に浸み込ませた 0.05 ml のアルコールを同封した。30 分後および 60 分後、head space より 5 ml とり、ガスクロマトグラフィー (GC) により、酢酸エステルを分離した。エス

テルの生成能は後半 30 分間の GC チャートのエステルピークの面積増加量 (mm²) で示した。GC のカラムは液相として tween 20 および Ucon oil LB 550 X を用いた。

遊離細胞よりのエステル生成の測定については、バナナ、イチゴ、メロンの果肉 5 g または 2 g より、後に述べる遊離細胞の作成法に従って遊離細胞を得、100 ml フラスコに入れた 0.7 M マンニット 20 ml に懸濁した。

添加アルコールは butyl alcohol を用い、約 0.4 mmol をマイクロピペットで加えた。酸は中和した希酢酸、希酪酸を等量加えた。pH を調節する場合は、反応液 20 ml 中、10 ml を 1/5 M リン液緩衝液または、1/5 M フタル酸緩衝液にした。この場合も前もって緩衝液にもマンニットを入れ、0.7 M 濃度になるようにした。反応温度は 27°C とし、18 時間インキュベーションを行なった。

* 大阪府立大学農学部 (大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804)

Laboratory of Processing and Physiology of Horticultural Products. College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591

2. エステラーゼの測定

p-ニトロフェノールアセテート法³⁾によって行なったが，バナナ果肉 10 g を pH 7(1/15 M) のリン酸緩衝液 40 ml とともに乳鉢で破碎し，10000 rpm×30 分遠心分離し，その上澄を 1 ml 使用した。この場合の *p*-ニトロフェノールの遊離量 (μmol) を新鮮重 10 g 当たりとして表わした。

3. 遊離細胞およびプロトプラストの分離

青木ら⁴⁾の方法によった。すなわち果肉 5 g または 2 g を切片にし，100 ml フラスコに入れ，0.5% ペクチナーゼ（近畿ヤクルト製マセロチーム）および 0.5% カリウム-デキストランを含む 0.7 M マンニット水溶液（20 ml）を続いて添加し，サッカードで吸引操作を行ない，27°C で振盪した。とくに酵素液は更新せず，45～60 分後プラスチック製茶コシで果肉細胞と維管束部分にわけ，維管束は傾斜法，果肉細胞は 1500 rpm，7 分間遠心分離することで 0.7 M マンニットでよく洗った。

イチゴからのプロトプラストの分離は同上の方法で，8 g の果肉から遊離果肉細胞を得，0.7 M マンニットで洗った後，セルラーゼ（近畿ヤクルト製）2% 溶液で振盪（40°）し，顕微鏡で遊離細胞がみえなくなるまで（約 40 分）行なった。破壊された細胞片とプロトプラストとの分離は，蔗糖溶液（0.85 M）の上にプロトプラストを含むマンニット液（0.7 M）を乗せ，4000 rpm 30 分間スウィング式遠心ローターで遠心分離を行なうことで良

好な結果を得た。すなわち，細胞破片は遠心管の底にたまり，プロトプラストおよび微細破片は両液の液境面のところに集まった。プロトプラストのエステル能測定には遊離細胞の方法に準じた。

実験結果

1. 果実野菜のエステル生成およびエステラーゼ

果実野菜の可食部切片 5 g を 100 ml のフラスコに入れ，0.05 ml のアルコールをロ紙片に浸み込ませて同封した。一定時間後，head space に現われるエステルを GC で分析し，エステル化能の有無を調べた（Table 1）。アルコールは butyl alcohol の他，methyl alcohol，ethyl alcohol，iso-butyl alcohol，iso-amyl alcohol を使用したが，いずれも同じ傾向であったので，表には butyl alcohol の例で示した。また果肉より得た遠心抽出液を粗酵素として，*p*-ニトロフェノールアセテート法によりエステラーゼの活性も測定した。その結果，添加アルコールのエステル化を強く示すものとして，イチゴ，メロン，バナナがあり，これらは自然追熟においても多量のエステルを生成するものである。またまったくエステル生成のないものとしてカボチャ，ナス，ジャガイモ，トマト，ブドウなどがあつた。分解酵素であるエステラーゼの活性は，エステル生成の盛んな果実では追熟中増加する傾向にあり，合成，分解ともに盛んになることがみられたが，エステル生成のないものでもエステ

Table 1. Esterification of added alcohol, and esterase activity on various fruits and vegetables

		Esterification	Esterase
strawberry (hoko wase)	white	0	0.3
	half red	29	0.6
	red	93	0.9
japanese apricot (hanakami)	green	0	0.0
	yellow	1	0.9
tomato (fukuju-2)	green	0	11.7
	pink	0	22.9
melon (prince)	unripe	0	4.6
	half ripe	8	4.8
	ripe	17	11.5
peach (oukubo)	unripe	4	1.3
	ripe	3	7.0
grape (delaware)	ripe	0	0.2
pumpkin (heiankogiku)		0	21.7
egg plant (senryo)		0	8.4
potato (danshaku)		0	2.3
banana (from philippin)	yellow	123	6.4

* increase of peak area of butyl acetate on GC (mm²) for 30 min in the case of addition of butyl alcohol to pulp slices

** decrease of *p*-nitrophenol acetate (μmol/10 g.f.w.)

ラーゼ活性の強いものがあり、エステラーゼの強さとエステル生成とは相関関係があるとはいえなかった。今回はとくに、エステル生成、エステラーゼ活性ともに強いバナナ、イチゴおよびメロンについて研究を進めることにした。

2. バナナ果肉よりの遊離果肉細胞および維管束部分の分離とエステル化能

まず遊離細胞を作るにあたって、水溶液中での切片からのエステル生成を検討した。バナナ果肉切片を水中に浸漬するとエステル生成がかなり抑えられるが、溶液の浸透圧をマンニットで上昇させるとエステル生成は増加し、遊離細胞を作成する際に使用する 0.7 M 濃度にするとかかなり改善された (Fig. 1)。図には示さないが、蔗糖液 0.7 M と同程度の浸透圧を示す KCl 0.35 M においても良好な結果を得たので、マンニットの働きというより、むしろ浸透圧の影響とみることができる。遊離細胞にしたときの浸透圧の影響はさらに強く現われ、水ではエステル化能が完全になくなった。バナナ果肉 homogenate, または遠心上澄液を反応液に加え、切片の添加アルコールのエステル化をみるとかなり抑えられることもわかったが、これは遊離したエステラーゼが、生成したエステルを分解するものと考えられる。実験方法のところで示した遊離細胞の調製法ではかなり溶液が洗滌されるのでこの心配はない。

黄熟バナナの果肉を芯の部分を除いて切片にし、ペクチナーゼとともに振盪すると遊離果肉細胞と、果肉内に

無数に走っている維管束の断片部分とに分かれる。果肉細胞は単細胞のものと数個かたまっているものがみられた。維管束細胞群は細い維管束の繊維に伴って、果肉細胞よりはかなり大型の細胞が並んでいた (Fig. 2)。緑色バナナはほとんど細胞は遊離せず、追熟するにつれて遊離しやすくなった。しかし過熟状態になると遊離果肉細胞はかなり大きな集団を形成した。従ってこの実験には yellow の熟度から full yellow 程度のもを用いた。

Fig. 1. Effect of osmotic pressure of medium on esterification of butyl alcohol in banana pulp slices

a: butyl acetate, b: butyl alcohol, c: butyl butyrate
Slices were immersed to 20 ml of medium in which the osmotic pressure was adjusted with mannitol and after 1 hr incubation at 27°C, 5 ml of head space gas was analyzed with gas chromatography (GC).

(A)

(B)

Fig. 2. Microscopic view of vascular tissue separated from banana pulp ($\times 100$)
(A) and (B) were the different figures of the same kind of vascular tissue

ペクチナーゼにより分離した遊離果肉細胞と維管束部に、butyl alcohol を添加した場合のエステル生成を比較すると、Fig. 3 にみられるように、維管束部から butyl alcohol の酢酸エステル、酪酸エステルが多量に生成し、遊離果肉細胞からの生成はほとんどなく、反応時間が進むにつれて、その差が著しくなることを認めた。このことからバナナのエステル生成の部位は維管束部分であることが推察された。遊離果肉細胞と維管束部分との重量比は約 7:3 で遊離果肉細胞が多いので単に細胞の量的な比でエステル生成に差が生ずるものではないことがわかった。

つぎにエステル生成における溶液の pH の影響を調べるため、維管束部分を各 pH の 0.7 M マンニト溶液に投入し、18 時間放置し、head space のガスを GC で分析した。結果は Fig. 4 に示すように、butyl alcohol のみを添加した場合は、バナナ切片に添加した場合¹⁾と同様 pH 5.5 付近が最適 pH であったが、butyl alcohol にさらに acetate または butyrate を等量加えると最適 pH は付 6.5 付近に移動し、かつ butyl alcohol のみを添加した場合よりもエステル生成量は増加した。

アルコールに加えて酸を添加することによってエステル生成が増加することがみられたので、さらに詳しく最適 pH での生成量を butyl alcohol のみと butyl alcohol に酸を添加した場合とについて比較した (Table 2)。butyl alcohol と acetate を添加した場合はもちろ

ん butyl acetate の生成が時間とともに増加するが、butyl butyrate の生成は完全に抑えられ、逆に butyrate を butyl alcohol とともに添加すると butyl butyrate の生成は増加するが、butyl acetate の生成は抑えられた。

3. イチゴ果実よりの遊離果肉細胞の分離とエステル化能

イチゴ果実 2 g を切片にしてバナナの場合と同様に

Fig. 4. Effect of pH on esterification in vascular tissue separated from banana pulp

—: addition of butyl alcohol (0.4 mmol)
---: addition of butyl alcohol and acetate (A) or butyl alcohol and butyrate (B)

Vascular tissue from 5 g of banana pulp was suspended with various pH of phosphate buffer (—●—) or phthalate buffer (—○—) containing mannitol (0.7 M). Incubation condition was at 27°C for 18 hr.

Table 2. Addition of acids besides butyl alcohol on esterification in vascular tissue separated from banana pulp

addition	incubation time (hr)		
	1	3	18
butyl alcohol	12*	18	72
	neg**	10	65
butyl alcohol and sodium acetate	23	59	133
	neg	neg	neg
butyl alcohol and sodium butyrate	9	30	34
	44	112	296

*: butyl acetate production which is indicated with peak area of GC (mm²)

**: butyl butyrate production Vascular tissue from banana pulp was suspended with the medium (pH 5.5 for butyl alcohol, pH 6.5 for butyl alcohol and acids). Other conditions are the same as fig. 4.

Fig. 3. Esterification of butyl alcohol in mesocarp cells and vascular tissue separated from banana pulp

---: mesocarp cells, —: vascular tissue
a: butyl acetate, b: butyl alcohol, c: butyl butyrate
These cells were suspended in 0.7 M mannitol to which butyl alcohol (0.4 mmol) was added. Incubation of the cells was at 27°C for 1 hr or 6 hr.

ペクチナーゼ処理を行なうと、バナナの場合と異なり、ほとんど果肉細胞が遊離した。残部として少量の種子および種子に続く維管束、果皮細胞が得られるので、これら両者に butyl alcohol を添加すると、両者とも butyl acetate を生成することが観察された (Fig. 5)。すなわ

Fig. 5. Esterification of butyl alcohol and butyrate in some kinds of cells separated from strawberry

a: butyl acetate, b: butyl alcohol, c: butyl butyrate
A: seeds, peel tissue, and vascular tissue
B: flesh cells

Cells from 5g of berry were suspended in phosphate buffer (pH 5.5) to which butyl alcohol (0.4mmol) and butyrate (0.4mmol) were added. Osmotic pressure of medium was adjusted with mannitol (0.7M). Incubation condition was at 27°C for 18 hr. Mark "x2" in the figure indicates double attenuation of GC response at the peak.

Fig. 6. Effect of pH on esterification in strawberry slice and flesh cells

butyl acetate production in the following case (1) slice+butyl alcohol (2) flesh cells+butyl alcohol+acetate, and butyl butyrate production in (3) flesh cells+butyl alcohol+butyrate.

Slices or flesh cells from 2g of berry were suspended with various pH of phosphate buffer (1/10M) to which butyl alcohol (0.4mmol) or butyl alcohol plus acids (0.4mmol) was added. Incubation condition are the same as fig. 5.

ち、イチゴの場合は遊離果肉細胞からも十分にエステル生成が行なわれることがわかった。つぎにイチゴの果肉切片および遊離細胞を浸漬している液の pH の影響をみたのが Fig. 6 である。バナナ 維管束部と同様、butyl alcohol にさらに酸を添加するとエステル生成の最適 pH がかなり中性側に移動した。従って、イチゴにおいても酸とアルコールによるエステル化は pH が中性付近で最適と思われる。

イチゴの遊離細胞は赤色を帯びているものが多く、液胞および原形質が観察しやすい。そこで遊離果肉細胞をセルラーゼ溶液に浸漬処理し、プロトプラストを得た⁸⁾。プロトプラストと細胞破片とは、さきに述べた遠心操作を行ない分離した。この二層を別々の 100 ml フラスコに入れ、pH を調整したのち、butyl alcohol および butyrate を添加したところ、butyl butyrate の生成はプロトプラストの存在しているフラスコからのみ生成されることがわかった (Fig. 7)。このようにイチゴでは果肉細胞がエステル生成を行なうことがわかったが、さらに細胞壁を除去したおもに液胞と原形質からなる球形のプロトプラストにおいてもエステル生成が行なわれることがわかった。

4. プリンスメロン果肉よりの遊離果肉細胞の分離とエステル化能

プリンスメロンの果肉をペクチナーゼ処理するとほと

Fig. 7. Esterification of butyl alcohol and butyrate in protoplast strawberry

Protoplast from 8g of berry was suspended with phosphate buffer (pH 6.8). Medium was adjusted to 0.7M with mannitol to add butyl alcohol (0.4mmol) butyrate (0.4mmol). Incubation condition was the same as fig. 5. Mark "x2" in the figure indicate double attenuation of GC response at the peak.

Fig. 8. Effect of pH on esterification in melon slices and mesocarp cells

(1), (2), (3) are the same as fig. 6. See footnotes of fig. 5 and 6 for preparation and incubation condition.

んど果肉細胞ばかりが分離してくる。この遊離果肉細胞も butyl alcohol および酸の添加によりエステル生成が観察された。この場合の最適 pH の結果を Fig. 8 に示したが、切片に butyl alcohol を添加した場合は非常に広い pH 域にわたってエステル生成が起り，butyl alcohol に酸を添加した場合は，その最適 pH は中性付近であることを認めた。

考 察

果実，野菜の香気成分の生合成の研究は，*Allium* 属⁽⁴⁾にみられる S-化合物代謝の膨大な研究やキュウリなどを用いての破碎に伴うカルボニル化合物の研究⁽⁵⁾⁽⁶⁾などがあるが，果実の香気成分中のエステル生成についての研究はあまりなされていない⁽⁷⁾⁽⁸⁾。このことは揮発性 S-化合物および揮発性カルボニル化合物は野菜の破碎される際に生成される物質であり，その行程を注意深く行なえば関連酵素を抽出し，*in vitro* で反応を行ない得るのに対し，エステル生成は健全な果実組織にのみ行なわれ，

破碎および抽出といった操作を行なうとエステル生成はもはや再構成がむずかしいという点にある。従って細胞内顆粒を分画してエステル生成の部位を探るということはまだ行なわれていない。そこで今回はその前段階として，組織切片より一歩進めた遊離細胞でのエステル生成を調べた。バナナ果肉をエステラーゼで処理すると遊離果肉細胞と，維管束とそれに伴う大型の連なった細胞群にわかれるが，添加アルコールのエステル生成は維管束細胞群に偏在していた。イチゴ，メロンをペクチナーゼ処理を行なうと，ほとんど遊離果肉細胞のみが得られたが，これにアルコールを添加するとエステル生成がみられた。このように果実によりエステル生成の部位が異なることが観察された。果肉細胞の形態的差異としては，バナナ果肉細胞では果実が成熟してもデンプン粒がかなりの部分を占めているのに対し，イチゴ，メロンではデンプン粒はみられず透明な大きな液胞が細胞内に存在していた。成分的な差異としては揮発性成分を測定した後試料の糖を測定したところ Table 3 のようであった。すなわち，バナナの遊離果肉細胞は極端に糖含量が少なくなるのに対しイチゴ，メロンでは 18 時間インキュベーションした後でもかなり糖が残存していた。この糖の残存量の差が膜系の形態の差を示しているのかもしれない。またバナナ果汁の浸透圧は蔗糖濃度として 0.87 M とかなり高く，0.7 M マンニットで抽出するのでは内容成分の流出が考えられるので，1 M マンニット溶液で得た遊離果肉細胞についても調べたところ，この場合でもエステル化能はみられなかった。アルコールにさらに酸を添加したときの最適 pH の中性付近への移行はバナナ，イチゴ，メロンにおいて共通にみられたが，これはアルコールと酸が中性付近で直接，エステル生成を起すと考えた場合には，アルコールのみを添加した場合のエステル生成は複雑な酵素反応が含まれているのかもしれない。

Table 3. Sugar content of separated cells from banana, strawberry and melon

		reducing sugar	refractometer index	osmotic pressure
banana	mesocarp cell	15*		
	vascular tissue	226	17.5**	0.81***
strawberry	flesh cell	186	7.8	0.42
melon	mesocarp cell	825	14.0	0.80

*: indication as mg% of original fresh pulp

**: Pressed juice of pulp was analyzed.

***: Osmotic pressure of the juice indicates as isotonic solution of sucrose (M).

要 約

バナナ、イチゴ、プリンスメロンの果肉にペクチナーゼ処理を行ない、遊離細胞を得た。これらに butyl alcohol および acetate, butyrate を添加したところ、バナナでは遊離した果肉細胞よりも、維管束部分にエステル生成能力がみられた。この維管束部分には維管束とそれに伴うかなり大型の細胞が連って存在していた。イチゴ、プリンスメロンではペクチナーゼ処理で遊離してくるのはほとんど果肉細胞であったが、この遊離果肉細胞はエステル化能を有していた。イチゴのプロトプラストを調製して butyl alcohol および butyrate を添加したところ、butyl butyrate の生成がみられた。果肉切片および遊離果肉細胞にアルコールを添加した場合、エステル生成の最適 pH はかなり酸性にかたよっている (pH 5.5) が、アルコールにさらに酸を添加すると最適 pH は中性付近 (pH 6.5~6.8) となることを認めた。

文 献

- 1) 上田悦範・緒方邦安・安田 充: 食品工誌, **18**, 461 (1971).
- 2) HUGGINS, C. and LAPIDES, J.: *Anal. Chem.* **19**, 467 (1947).
- 3) 青木茂治・建部 到: 植物の化学調節, **7**, 45 (1972).
- 4) CARSON, J.F.: *Chemistry and Physiology of Flavor*. Ed. SCHULTZ, H.W. (The AVI pub. Com.), 390 (1967).
- 5) FLEMING, H. P., COBB, W. Y., ETCHHELLS, J. L. and BELL, T. A.: *J. Food Sci.*, **33**, 572 (1968).
- 6) GROSCH, W. and SCHWARZ, J. M.: *Lipids*, **6**, (5), 351 (1971).
- 7) TRESSL, R. and JENNING, W. G.: *J. Agr. Food Chem.*, **20**, (2), 189 (1972).
- 8) 山下市二・根本芳郎: 日本食品工業学会第22回大会研究発表要旨, 4 p, (食品工誌, **22**, 1975).
(昭和50年11月18日受理)