バナナ果実の追熟に伴う oxalate の分解形態について

上 田 悦 範*・緒 方 邦 安*

Changes of Oxalates in Banana Fruits During Ripening

YOSHINORI UEDA* and KUNIYASU OGATA*

This paper describes some behavior of incorporated oxalate into pulp-homogenate.

Radioactivity of alcoholic extraction from green banana homogenate which was administrated sodium oxalate- ^{14}C gradually decreased. On the other hand, radioactivity of the extraction from yellow banana homogenate disappeared within short time.

Most of the radioactivity remained in anionic fraction and a small amount of radioactivity was found in cationic and neutral fraction. Distribution of radioactivity on silica gel chromatogram from green banana showed rapid disappearance of oxalate and corresponding increase of a acidic fraction that was eluted with 2N formic acid, while yellow banana did not show such phenomena.

Decarboxylation of oxalate by yellow banana was mainly due to subcellular particles. Relatively high activity of decarboxylation was obtained between pH 2.5 to 5.5 with optimum pH at 3.2.

Stoichiometric observation of decarboxylation of oxalate showed one volume of carbon dioxide evolution and a half of oxygen absorption. The fact indicates that the enzyme in banana pulp was oxalate oxidase (EC. 1.2.3.4).

(Received Feb. 20, 1976)

バナナ果実中の oxalate は滴定酸のなかでかなりの部分を占め、追熟するに従って減少することが知られている¹⁾。さきの報文²⁾において oxalate が呼吸の climacteric rise の CO_2 排出源となりうることにについて検討したが、今回は果実の食味に影響を与える oxalate の脱炭酸の形式および追熟中の動向について 2, 3 の結果を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

緑熟バナナ (*Musa paradisiaca* L. var. *sapientum*) を京都卸売市場より購入し、 20°C の恒温室で追熟を行ったものを熟度ごとに実験に供した。

2. 測定事項と方法

バナナの homogenate へ取り込まれた oxalate- ^{14}C の分布。バナナ果肉 50 g をリン酸カリ緩衝液

($1/10\text{ M}$ pH 6.2) 200 ml およびアスコルビン酸ナトリウム 440 mg とともに乳鉢ですりつぶし、homogenate を得た。homogenate 2 ml を GILSON RESPIROMETER の容器に入れ、側室に sodium oxalate (U)- ^{14}C ($5\mu\text{mol}$, $0.1\mu\text{Ci}$) 0.3 ml を入れた。 30°C で incubate を開始し、一定時間後エタノールおよび少量の水で反応残渣を洗い出し全量を 20 ml とした。ウォーターバスで 5 分間煮沸したのち、10000 rpm, 30 分で遠心分離し、上澄部を 80% エタノールで 30 ml に定容した。上澄部の一部は液体シンチレーションカウンタにより、ジオキサン系シンチレーターを使用して、その放射活性を測定した。また 10 分間で反応を停止した反応液については、さらにイオン交換カラム [IR 120(H^+), IRA 45(OH^-)] を用いてアミノ酸区分、有機酸区分、中性区分に分け、それぞれに取り込まれている放射活性を測定した。

有機酸区分に取り込まれた放射活性のシリカゲルクロ

* 大阪府立大学農学部 (大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804, 〒591)

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

マトグラフィー。バナナ果肉 50 g を乳鉢でつぶし、その上からリン酸カリ緩衝液 (1/10 pH 6.2) 50 ml に溶解した sodium oxalate (U)- ^{14}C , 1 μCi を入れ、一定反応時間後に沸騰するエタノール 500 ml で反応を止め、ろ過後、イオン交換樹脂により有機酸区分を得た。ついでシリカゲルカラムをもちいてクロロホルム-四級ブタノール系で展開し、oxalate と他の酸とに分けた。シリカゲルに残ったものは 2 N 硝酸で洗った。

oxalate の脱炭酸能の細胞内分布。前記の取り込み実験と同じ方法で得た homogenate を 2,000 rpm (900g), 5 分間遠心分離し細胞片を除いたのち、30,000 rpm (10⁵ g), 2 時間超遠心分離し、上澄区分と顆粒沈殿区分とに分けた。細胞内顆粒は上澄区分と等量の緩衝液 (pH 6.2) に混濁させた。homogenate, 上澄区, 沈殿区とも 2 ml とり、RESPIROMETER の容器にそれぞれ入れ、sodium oxalate (U)- ^{14}C (5 μmol , 0.1 μCi) 0.3 ml を添加した。排出 CO_2 は容器内の苛性カリに吸着させ、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

oxalate 脱炭酸能の pH 依存性。homogenate を 2,000 rpm, 5 分間遠心分離のち上澄部を 10,000 rpm 30 分, 遠心分離した沈殿部を 20 ml の水に溶解し、粗酵素液とした。異なった pH の緩衝液 1/10 M 1.5 ml に対し粗酵素液 0.5 ml を RESPIROMETER の容器に入れた。側室より sodium oxalate (U)- ^{14}C (5 μmol 0.1 μCi) 0.3 ml を添加して反応を開始し、20 分後、KOH に吸着した $^{14}\text{CO}_2$ を測定した。

oxalate の分解による CO_2 排出, O_2 吸収の stoichiometry。前記粗酵素を用い、最適 pH (3.2), pH 6.2 における CO_2 排出および O_2 吸収の量的関係を調べた。反応液の組成は前項と同様とした。

結果と考察

前報ではワールブルグ検圧法および oxalate- ^{14}C を用いての実験で、緑熟のバナナ果肉切片では oxalate を添

加してもほとんど CO_2 排出量が増加しないが、追熟するに従い、添加効果が大きくなり、 CO_2 排出量が増大することを指摘した²⁾。今回は sodium oxalate (U)- ^{14}C を添加した果肉 homogenate の 80% アルコール抽出液中の放射活性の変化について調べた。結果は Fig. 1 にみられるように、緑熟バナナに比べ追熟したバナナからの homogenate では 80% アルコール抽出液中の放射活性が時間とともに急減した。またこの抽出液のうち反応開始後 10 分のを、イオン交換樹脂を用いて、陰イオン、陽イオン、中性の各フラクションに分けたところ、Table 1 のような結果が得られた。陰イオンフラクションに取り込みが多いのは当然であるが、緑熟バナナは追熟したバナナに比べやや多く他のフラクションにも放射活性が移行していることが認められた。このことは緑熟バナナでは oxalate の脱炭酸が活発でないかわりに、他の系で代謝されていることを示唆するものであろう。

つぎに陰イオンフラクションを別の実験でシリカゲルクロマトグラフィーによって細分して得られた結果が Fig. 2 および Fig. 3 である。緑熟バナナ果肉の homogenate に sodium oxalate (U)- ^{14}C を添加した場合 Fig.

Fig. 1. Time course of radioactivity changes in 80% ethanol soluble part from banana pulp homogenate after addition of oxalate (U)- ^{14}C

Homogenate (2 ml) was incubated in Warburg vessel with 0.3 ml of oxalate (5 μmol , 0.1 μCi) 30°C.

* total cpm of each Warburg vessel

Table 1. Distribution of ^{14}C in 80% ethanol soluble fraction from banana pulp homogenate* and in fraction separated with ion exchange chromatography

ripening stage of banana	fraction	80% ethanol soluble	neutral	cationic	anionic
green (hard)		61,500 cpm**	1,300	2,600	48,700
yellow with green tips		46,800	130	1,500	42,000

* Homogenate was incubated for 10 min in same condition as shown in Fig. 1.

** total cpm of each Warburg vessel

Fig. 2. Radioactive distribution of anionic fraction from homogenate of green banana pulp treated with oxalate (U)- ^{14}C

A: oxalate, B: fraction eluted with 2N formic acid from silica gel column, C: other organic acids

Fig. 3. Radioactive distribution of anionic fraction from homogenate of yellow banana pulp treated with oxalate (U)- ^{14}C

A: oxalate, B: fraction eluted with 2N formic acid from silica gel column, C: other organic acids

2 にみられるようにその放射活性の割合は oxalate (A) からシリカゲルカラムより酸で溶出される物質(B) に速やかに変わることが観察された。一方追熟したバナナ果肉では、放射活性の割合は oxalate のみ 100% 近くを占め、他のフラクションにはほとんどみられなかった。すなわち、緑熟バナナでは oxalate を脱炭酸する酵素の活性はきわめて弱く、基質の oxalate もバナナ果肉内部で代謝されやすいことがわかった。

Fig. 4. Optimum pH of carbon dioxide production of sub-cellular particle from yellow banana

Subcellular particle was obtained by centrifuging of one volume of homogenate at 10^4g for 30 min and resuspended with 2/5 volume of distilled water. Reaction mixture includes 0.5 ml of sub-cellular particle, 1.5 ml buffers (1/10 M), 0.3 ml of oxalate (U)- ^{14}C (5 μmol , 0.1 μci) and incubation time was 20 min at 30°C . A: HCl-KCl buffer, B: HCl-phthalate buffer, C: potassium phosphate buffer.

このようにバナナ果実の熟度が進むにしたがって、oxalate の脱炭酸酵素の活性が強まり、基質の oxalate も他の代謝系路に使われることなく脱炭酸に利用されやすくなることが認められたが、この脱炭酸酵素活性の発達が細胞内のどの部位で起っているのかを調べるため、果実の各熟度ごとに homogenate の遠心分離を行い、酵素活性の細胞内分布を比較した。homogenate を 10^5g , 2 時間超遠心し、上澄と沈でん部に分け、沈でん部は元の容積に緩衝液で戻したものを細胞内顆粒部とした。homogenate およびこれら各分画 2 ml に 0.1 μci の sodium oxalate (U)- ^{14}C を与えると、30 分後には Table 2 のような $^{14}\text{CO}_2$ 排出がみられた。熟度が進行するにつれて、上澄部、細胞内顆粒部とも $^{14}\text{CO}_2$ 排出量は増大するが、細胞内顆粒部では追熟初期に著しく増大することが認められた。従ってこの oxalate を脱炭酸す

Table 2. Carbon dioxide- ^{14}C production of homogenate and its centrifugalized material

fraction	homogenate	supernatant*	subcellular particle*
ripening stage of banana			
green (hard)	4380 cpm**	13	86
green (soft)	13600	62	4800
full yellow	41700	1870	5340

* Homogenate was centrifuged at 10^5g for 120 min and the precipitation resuspended to initial volume with phosphate buffer solution (pH 6.2).

** cpm of $^{14}\text{CO}_2$ produced from 2 ml of each fraction treated with oxalate (U)- ^{14}C (0.1 μci) for 30 min incubation.

Fig. 5. Stoichiometry of gases in relation to the degradation of added oxalate (5 μ mol) in the subcellular particles from yellow banana pulp

The experiment was made in same reaction mixture as shown in Fig. 4.

る酵素は細胞内構造に吸着しているものの方が多いことが推察された。

さらにこの脱炭酸酵素の性質を調べるためつぎの実験を行った。上記のように調製した homogenate では respirometer で CO_2 排出量, O_2 吸収量を測定すると内生の CO_2 排出量, O_2 吸収量がかなり多いので、遠心沈でん部を使用した。この細胞内顆粒部を粗酵素として使用すると、わずかにそれ自体からの CO_2 排出量, O_2 吸収量しか示さないで、この分画を用いて最適 pH およびガス収支の実験を行った。そうすると Fig. 4 のようにこの脱炭酸酵素の粗酵素の最適 pH は広く 2.6 ~ 4.0 であることがわかった。つぎに最適 pH (3.2) および中性 (pH 6.2) における添加 sodium oxalate (5 μ mol) のガス収支を gilson respirometer によって調べたところ (Fig. 5), 最適 pH 3.2 の場合は 5 μ mol $\times 2$ の物質が気体になったときの理論値にきわめて近い値の CO_2 排出量と、5 μ mol の理論値 (112 μ l) に近い O_2 吸収量を示した。一方中性付近の pH 6.2 では CO_2 排出量および O_2 吸収量ともに理論値より低い値が観察されたが、とくに O_2 吸収量は 1/2 程度になった。これは中性付近でのカタラーゼ活性の存在によるものと考えられる。この oxalate の分解には三つの系が知られている⁸⁾。すなわち (1) oxalate $\rightarrow$ oxalyl CoA を経て脱炭酸ののち 2 分子の炭酸ガスを生ずるもの⁴⁾⁵⁾、(2) oxalate 1 分子の分解に 1 分子の酸素吸収と 2 分子の炭酸ガスを放出する oxalate oxidase といわれるもの、(3) 解媒量の O_2 存在のもとに等モルの 2 分子の炭酸ガスを生成するもの⁶⁾⁷⁾ とがある。バナナ果肉の場合、1 モルの O_2 吸収量と 2 モ

ルの CO_2 発生量があることから、(2) に示した oxalate oxidase (EC 1.2.3.4) としているものであることがわかった。

この酵素の存在は *Bougainvillea spectabilis*⁸⁾, *Begonia*⁹⁾, *Chenopodium ambrosioides*¹⁰⁾ の葉で chloroplast に偏在していることが知られているが、本実験でバナナ果肉の果肉部のような chloroplast のない組織でも存在することが認められた。

以上、食味に影響を与えるバナナ果肉中の oxalate は代謝の最終生産物としてのみ存在しているのではなく、緑熟果の場合、一部分は他の物質に代謝され、また追熟が進むと oxalate oxidase により速やかに減少していくことがみられた。このことがバナナ果実の追熟に伴う渋味の消失の一因となるのかも知れない。

要 約

前報で緑熟バナナは oxalate を添加しても CO_2 排出がなく、追熟するに従って添加 oxalate を CO_2 に分解することを明らかにしたが、本研究にその分解形態について調べたものである。

1) 緑熟バナナ果肉では oxalate 脱炭酸の活性はほとんどないが、この果肉の homogenate に sodium oxalate を添加すると除々に代謝され、oxalate の半量は 80% エタノール可溶性区分とどまった。しかし追熟がはじまると添加 oxalate は CO_2 となって急速に排出されるので、ほとんどこの区分にはとどまらないことを認めた。

2) 緑熟バナナでは取り込まれた oxalate は短時間 (2 分以内) に末同定の酸性物質に変化した。追熟果ではそのようなことがみられなかった。

3) 追熟果にみられる oxalate の脱炭酸酵素はおもに顆粒部分に存在し、酵素活性の強い pH 域は pH 2.5 ~ 5.5 にまたがり、最適 pH は 3.2 であった。

4) oxalate の分解において、ガス収支は pH 3.2 において理論値にきわめて近い CO_2 排出量を示すとともに CO_2 の半量の O_2 吸収量を示したことから、このバナナ果肉の oxalate 分解酵素は oxalate oxidase (EC 1.2.3.4) であることを認めた。

最後に、本実験に対して終始ご鞭撻を賜った京大食糧科学研究所、葛西善三郎教授ならびにアイソトープの指導をいただいた現在宮崎大農学部下川敬之氏に謝意を表します。

文 献

- 1) WYMAN, H. and PALMER, J. K.: *Plant Physiol.*, **39**, 630 (1964).
- 2) SHIMOKAWA, K., UEDA, Y. and KASAI, Z.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2021 (1972).
- 3) 早石 修: 生化学, **29**, 339 (1957).
- 4) GIOVANELLI, J. and TOBIN, N. F.: *Plant Physiol.*, **39**, 139 (1964).
- 5) QUAYE, J. R.: *Biochem. J.*, **87**, 40 (1963).
- 6) EMILIANI, E. and BEKES, P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 488 (1964).
- 7) LILLEHOJ, E. B. and SMITH, F. G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 216 (1965).
- 8) SRIVASTAVA, S. K. and KRISHNAN, P. S.: *Biochem. J.*, **85**, 33 (1962).
- 9) SASAKI, K.: *Botan. Mag.*, **76**, 48 (1963).
- 10) NAGAHISA, M. and HATTORI, A.: *Plant Cell Physiol.*, **5**, 205 (1964).

(昭和51年2月20日受理)