イチジク果実の生育に伴う糖質変化および糖質代謝 に関する酵素活性の挙動

能 岡 浄*

Changes in Saccharides and Enzyme Activities Related to Carbohydrate Metabolism during Growth and Development of Fig Fruit (*Ficus carica* L.) on the Tree

Kiyoshi YOSHIOKA*

* Department of Clinical Nutrition Science, Osaka Prefectural Junior College of
Health Sciences, 3-7-30, Habikino, Habikino-shi, 583

The starch content in the fruits kept constantly low level through developmental period, while the sugar content rose sharply coincident with purple color development of skin surface of the fruits. Whereas α - and β -amylase, α -glucosidase(maltase), β -fructofuranosidase(sucrase) and UDP glucose-fructose glucosyltransferase(sucrose synthetase) activities showed characteristic biphasic changes having two peaks. The first peak of these enzyme activities was found at an early stage of fruit growth, which corresponding to development of intrinsical flower(fruitlet) in the fruit. Their secondary peak was found in a final course of maturation. Preceding to an increase in the sugar contents, a sharp and transient increase of both α - and β -amylase activities were observed in about 10 days prior to the mature stage. Whereas α -glucosidase, β -fructofuranosidase and sucrose synthetase activities increased coincidently with increment of the sugar contents and turned to a sharp decline at the full ripening stage. The significance of these biochemical changes was discussed in connection with the fruit ripening.

(Received Aug. 2, 1993)

イチジク果実（以下イチジク）は、果床の肥大した肉質部と、その内側に密生する複果と呼ばれる小さい花（小果）の部分が可食部となり、いわゆる偽果に属す軟弱果実である。樹上で完熟すると裂果して、微生物汚染などを起こしやすく、日持ちが悪いため、収穫適期を的確に判定することが重要である。

これまで収穫適期の判定の一助として、外果皮の着色度と糖含量などとの関連を追跡した報告^{1)~3)}や、発育期から成熟期までの生理化学的な変化を調べた報告⁴⁾はあるが、的確な収穫適期を判定する指標には至っていない。

樹上において生育果実の品質管理を行い、収穫後の保存性を向上させるためには生育期間、特に成熟過程にお

ける生理化学的变化をより詳細に検討し、成熟現象、なかでも糖質代謝機構を明確にすることが先決であると思われる。著者は以前、バナナ果実の追熟過程における生理化学的变化の様相を検討した^{5) 6)}、イチジクについても上記の収穫適期判定の基礎資料とするため、風味や食味に最も関連の深い糖質の種類と含有量の変化、および糖質代謝の諸酵素活性を経時的に調べたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 実験材料

大阪府堺市で栽培されているイチジク、品種「柘井ドーフィン」を用いて、6月から8月にわたる果実の生

* 大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床栄養学科（〒583 大阪府羽曳野市はびきの3丁目7番30号）

育期から成熟期までを、5~10日目ごとに採取して実験に用いた。

2. 糖およびデンプン抽出液の調製

それぞれの外果皮つきの可食部を均等に縮分し、そのうちの約5gを正確に秤量し、6倍量の80%エタノールを加えて磨砕し、沸騰水中で煮沸した。これを8000×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、遠心分離した。残渣の洗浄を2回繰り返し、これら上澄液を集め、減圧下55℃以下でロータリーエバポレーターで濃縮し、水を加えて一定容として糖の定量に用いた。

上述の抽出残渣に10mlの水を加えて攪拌し、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8000×gで10分間遠心分離した。残渣に5mlの水を加えて、さらに52%PCAを6.5ml加え、以下同様に処理した。この操作を3回繰り返し、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。

(1) グルコースおよびフルクトース含量の測定

前記の糖抽出液の一定量につき、下式により生成するNADPHの変化量を340nmでの吸光度から測定し、糖含量を算出した。

反応液は、抽出液に triethanolamine 塩酸緩衝液 (pH 7.6) 400 μmol, NADP⁺ 3 μmol, ATP 11.6 μmol, MgCl₂ 5 μmol と hexokinase (HK) 5.7 unit および glucose-6-phosphate dehydrogenase (G 6 PDH) 3 unit を加えて、全容量を 3.0 ml にした。

上記の反応液により、まずグルコースの量に比例して生成されるNADPHを測定し、次に glucosephosphate isomerase (GPI) 14 unit を加えて、次式に従ってフルクトース含量も算出した。

(2) マルトース含量の測定

(1)と同じ抽出液の一定量を0.1 M-酢酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) とし、これにα-グルコシダーゼを作用させて水解後、水で一定容にした。この一部を glucose oxidase 系からなる血糖測定用 Glucomesser DIRECT (東京臓器化学製) により、グルコースを定量した。なおこの際、抽出液中のフェノール性物質などによる発色を防止するため、37℃で20分間の加温以外は、氷冷下で操

作した。

(3) スクロース含量の測定

(1)と同じ抽出液の一定量を0.1 M-酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.5) とし、これにβ-フルクトフラノシダーゼを作用させた後、(2)と同様にグルコースを定量した。

なお(2)と(3)では、水解前後のグルコース量の差に0.95を乗じて、それぞれの糖量を算出した。

(4) デンプン含量の測定

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

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を乗じて算出した。

3. 粗酵素液の調製

果実を切断し、果皮つきの果肉約5gを正確に秤量し、0.05 M-リン酸ナトリウム緩衝液 [pH 7.0 : 10% (v/v) polyethylene glycol 400, 10 mM-EDTA および1% (w/w) 2-mercaptoethanol を含む] を4倍量 (v/w) 加えて磨砕する。ガーゼで濾過後、残渣をよく絞り、1000×gで10分間遠心分離し、得られた上澄液の容量を正確に測り、粗酵素液とした。これらの操作は、すべて0~5℃の低温下で行った。

4. 酵素活性の測定

以下の酵素活性の測定は、正確に秤量した試料と、上記の粗酵素液の容量とから、新鮮重量当りの活性として表した。

(1) α-アミラーゼ活性の測定

1% (w/w) 2-mercaptoethanol のみを除去した前記と同じ緩衝液を用いて、粗酵素液を得た。

反応液には、2% β-限界デキストリン溶液 (2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) 含有) 1.0 ml に、0.2% 酢酸カルシウム溶液 2.0 ml, 粗酵素液 2.0 ml を加え、30℃で反応させた。ブレインキュベーション3分後に、5分間隔で反応液 0.5 ml を 0.0088% ヨウ素-0.4% ヨウ化カリウムの 0.35 N-硫酸溶液 2.5 ml に注入し、これに 3.0 ml の水を加えて 575 nm での吸光度を測定した⁷⁾。

算出式は $(\log E_1 - \log E_2) / (t_2 - t_1)$ を用いた。

(2) β-アミラーゼ活性の測定

粗酵素液 1.0 ml, 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 200 μmol に基質の可溶性デンプン 10 mg を加え、反応液の全容量を 4.0 ml とし、30℃で20分間振とうして、反応前後のマルトース量の差を前記の方法で測定した⁸⁾。

(3) α-グルコシダーゼ (マルターゼ) 活性の測定

反応液は、粗酵素液 1.0 ml、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) 300 μ mol に基質のマルトースを 60 μ mol 加えて全容量を 5.0 ml とし、30°C で 20 分間振とう後、生成したグルコース量を前述の glucose oxidase 法で定量した。

(4) β -フルクトフラノシダーゼ (スクラーゼ) 活性の測定

粗酵素液 1.0 ml に、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 350 μ mol、基質のスクロース 100 μ mol を加えて、反応液の全容量を 5.0 ml とし、以下 (3) と同じ方法で測定した。

(5) UDP グルコース-フルクトース グルコシルトランスフェラーゼ (ショ糖合成酵素) 活性の測定

反応液は粗酵素液 1.0 ml、Tris-マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 100 μ mol に基質の UDPG を 1 μ mol と、D-フルクトース 100 μ mol を加えて全量を 2.5 ml とし、30°C で 10 分間振とう後⁹⁾、生成したスクロース量を前記の方法で測定した。なおブランクには UDPG のみを除いたものを用いた¹⁰⁾。また生成したスクロースが β -フルクトフラノシダーゼにより分解されることを考慮し、基質のスクロース 1 μ mol 以外は上記と同じ条件で反応させ、生成したスクロース量を補正した¹¹⁾。

(2)~(5)において、1 分間に生じる生成物の量を算出して、酵素活性を表した。

以上 (2)~(5)において、3 分間のプレインキュベーション後、反応液に基質を添加して各反応を開始させ、30°C で反応させた。反応液を沸騰湯浴中で 1 分間加熱して反応を停止させ、氷冷直後、非酵素的な基質の分解による生成物の混入を防ぐため、ブランクにも反応液と等量の基質などをそれぞれ加えて、それ以後の条件を全く同一にし、生成物の差を算出することにより各酵素活性を表した。

なお、各反応系におけるそれぞれの反応時間内では、生成物の量と酵素活性の間には、直線関係が成立することを確認した。

また、それぞれの測定実験の比色定量は、島津製作所製 UV-1200 分光光度計により、光路幅 1 cm のキュベットを用いて、各波長での吸光度から測定した。

実験結果

1. 試料果実の生育状況

今回の実験に供した '樹井ドーフィン' の着果直後から完熟期までの形態変化を Fig. 1-A に、生長曲線 (果実の重量、長径、短径) を Fig. 1-B に示した。5 月末に果

Fig. 1-A Developmental changes in sections of 'Masui-Dophine' fig fruits grown on the tree

Fig. 1-B Developmental changes in average weight ($\times$), diameters in the breadth ($\blacktriangle$) and the length ($\square$) of 'Masui-Dophine' fig fruits

↓, First appearance of purple color on skin surface; ↓↓, Mature stage; ↓↓, Full ripe stage. Arrows are the same in all figures.

樹の新梢に着果した直後の果実は、長径約 6 mm、短径約 4 mm、重量は約 50 mg であった。以後は日数の経過と共に果実内が中空状態から、花器の生長に伴って赤色の蕾が果実内に充満するようになり、成熟期まで重量は指数関数的に増加し、成熟期には平均 80 g に達した。果実の長径および短径の増加率は着果直後に高く、以後は漸減して、成熟期に再び増加した。

2. 糖質含量の変化

上述した果実の生長過程における全糖量、グルコースおよびフルクトース含量を Fig. 2-A に、デンプン、マルトースおよびスクロース含量の推移を Fig. 2-B に示した。着果後から 8 月初旬まで、全糖含量は 3~6% で推移し、果皮が着色し始める 8 月中旬から顕著な増加傾向に転じた。成熟期には全糖量は約 16% に達するが、糖成分の約 90% はグルコースとフルクトースで占められ、それらの比率はほぼ 8:5 であった。また、全期間を通じてマルトースおよびスクロース含量は、約 1% 以下であった。デンプン含量は着果直後で約 0.5% を示し、その後

Fig. 2-A Developmental changes in glucose (▲), fructose (■) and total sugar (○) contents in 'Masui-Dophine' fig fruits

Fig. 2-B Developmental changes in starch (×), maltose (△) and sucrose (□) contents in 'Masui-Dophine' fig fruits.

は漸減するが、成熟過程でも全く変化は認められなかった。

3. 糖質代謝関連酵素の活性変化

α -および β -アミラーゼ活性の推移を Fig. 3 に示した。両アミラーゼ活性は、着果後から漸増し、果実が急速に肥大する6月末から7月初旬にかけて、一時的にピークを形成し、その後は一旦漸減した。7月下旬から先ず α -アミラーゼが、次いで約10日遅れて β -アミラーゼ活性が、それぞれ急激に上昇し、第2のピークを示した。すなわち、第2のピークが出現する時期は、 α -アミラーゼは果皮が着色する約1週間前の8月上旬に、 β -アミラーゼは8月中旬の果皮の着色が始まる時期に一致していた。その後、成熟期から完熟期に向かうと、両酵素活性は再び急激に減少したが、この場合も α -アミラーゼ活性の変化が約1週間先行していた。

α -グルコシダーゼ (マルターゼ), β -フルクトフラノ

Fig. 3 Developmental changes in α -amylase (□) and β -amylase (■) activities in 'Masui-Dophine' fig fruit tissues

シダーゼ (スクラーゼ), UDP グルコース-フルクトースグルコシルトランスフェラーゼ (ショ糖合成酵素) の活性の推移を Fig. 4 に示した。これら3つの酵素活性は、いずれも前述のアミラーゼ活性の場合と同様、6月下旬から漸増し、果実が急速に肥大する7月初旬に一時的なピークを示したが、その後は一旦漸減した。8月中旬の果皮の着色期に一致して、活性は再び上昇し、成熟期に急峻なピークを形成した後、完熟期に達すると急減した。これらの3酵素活性の推移は、前記のアミラーゼ活性の場合と同様であるが、ピークに達する時期は、いずれもアミラーゼ活性が先行しており、アミラーゼ活性が減少に向かった後に、これら3つの酵素活性が最大値を示しているのが特徴的である。

考 察

今回の実験で、イチジク果実の生育・肥大から成熟期にかけて、糖質代謝に関連する酵素活性が、特徴的な2つのピークを形成することを見出した。着果後、果実が急速に肥大する6月下旬から7月上旬にかけて見られる最初のピークは、丁度、花器が生長する時期に相当し、果実の O_2 吸収量と CO_2 排出量とが著しく多い時期⁴⁾に一致している。したがって、本実験で観察された5つの酵素活性の第1のピークは、果実の急速な肥大および花器形成に関連する糖質代謝が盛んに進行する生理的側面を反映しているものと推察される。

さらに、イチジクの果皮の着色が始まる8月中旬から成熟期にかけて、全糖量が著しく増加するが、すでに果

Fig. 4 Developmental changes in α -glucosidase (maltase) (■), β -fructofuranosidase (sucrose) (▲) and UDP glucose-fructose glucosyltransferase (sucrose synthetase) (□) activities in 'Masui-Dopphine' fig fruit tissues

皮の着色が始まる以前に、まずアミラーゼ活性が上昇すること、 α -アミラーゼ活性の上昇が β -アミラーゼ活性に先行していること、しかもその場合、基質となるデンプンの含量は低いレベルにあって、全く変化しないことが示された。果皮の着色が始まる時期に見られる糖含量の増加に先行する上記アミラーゼ活性の著しい増大が、果実のいかなる生理学的変化を誘導しているのか注目されるところである。この現象から、未熟な果実内に含まれている α -アミラーゼが多糖類の高分子糖鎖を先ず大まかに切断し、次いで β -アミラーゼが、さらに低分子化された糖鎖をマルトース単位で分解して、これが成熟過程で急増する遊離糖の供給源になっていることが推察される。

以上、イチジクの生育・成熟に伴う糖質の集積パターン、さらには糖質関連酵素の活性と熟期あるいは収穫適期との関連をみると、およそ次のようになると考えられる。 α -アミラーゼおよび β -アミラーゼが最大活性を示す5~10日前が成熟期 (Mature stage) であり、また、これら両酵素活性が急減し、最低値に達した時点が完熟期 (Full ripe stage) とみられる。収穫適期とは、一般には流通期間の時間差を加味した最適収穫期を指しているが、イチジクの場合、採取後3日以内の消費を指標にした時の収穫適期は、本実験の範囲では α -アミラーゼと β -アミラーゼ活性がピークを示してから最低値を示す

中間の時点とみることができよう。しかし現実には追熟現象も見られるので、これらの酵素活性がピークに達した時点を通上的採取適期と推察することができる。

イチジク果実は、花床と小さい花 (小果) から構成されており、貯蔵デンプンも少なく、以前に報告した貯蔵デンプンを糖化する形で成 (追) 熟するバナナ果実の場合⁵⁾⁶⁾と異なる成熟過程をとることが分ったが、成熟過程で増加する糖の由来については不明である。イチジクの未熟な果肉中には、ゴム質 (多糖類など) とタンパク質を含んだ白色の乳液が含有されており¹²⁾、果皮が着色する時期に一致して、急激に消失する。この乳液中には、アミラーゼの他にタンパク質分解酵素のフィシンやリパーゼなども含まれていることが知られており¹²⁾、乳液の消長と、これら水解酵素の活性との関連にも興味を持たれる。本実験で示したイチジク果実の成熟期前後における一連の生化学的変化、すなわち、果皮の着色が始まる4~5日前に α -アミラーゼ活性がピークを示し、着色時には β -アミラーゼ活性が最大になると同時に、糖の急増に伴い、糖代謝の諸酵素活性が急増すると共に、果肉中の乳白液は急激に消失して熟度が進行する。そして果皮の着色後4~5日で、両アミラーゼ活性は急減し、糖代謝の諸酵素活性が最大値を示して成熟期に達する。これらの知見は、今後、果皮の着色程度や果実の硬度などの外観との関連性を明らかにすることにより、より具体的な収穫適期、果実の保存性および品質管理の指標を作成する上で役立つものと期待される。

要 約

樹上でのイチジク果実の生育と肥大に伴う糖質含量と、糖質代謝に関連する酵素活性の挙動について調べた。

デンプン含量は、いずれの果実においても低レベルであった。糖含量は、果皮の着色に伴って急激に増加した。これに対して α -および β -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ (マルターゼ)、 β -フルクトフラノシダーゼ (スクラーゼ) と UDP グルコース-フルクトース グルコシルトランスフェラーゼ (ショ糖合成酵素) の5つの酵素活性は、いずれも特異的な2相から成る2つのピークを形成した。これら5種類の酵素活性の第1ピークは、イチジク固有の花器 (小果) 形成時期と一致していた。酵素活性の第2のピークは、成熟期から完熟期にかけての最終段階において出現した。糖含量の増加に先行して、成熟期の約10日前に α -および β -アミラーゼ活性の急峻な一時的ピークが観察された。これに対して α -グルコシ

ダーゼ, β -フルクトフラノシダーゼおよびショ糖合成酵素の活性は, 糖含量の増加する時期に一致して増大し, 完熟期には急減に転じた. 成熟過程におけるイチジク果実のこれら生化学的变化と, 熟度および収穫適期との関連を推論した.

引用文献

- 1) 青柳光照・牧野 朗・佐藤治郎: 園学旨 54 春, 384 (1979).
- 2) 株本暉久・中川勝也: 近畿中国地区における新技術, 19, 91 (1986).
- 3) 伊藤裕明・高瀬尚明・佐藤栄治: 愛知農総試研報, 18, 213 (1987).
- 4) 平井重三: 大阪府立大学紀要, 18, 169 (1966).
- 5) 能岡 浄: 日食工誌, 22, 1 (1975).
- 6) 能岡 浄: 日食工誌, 26, 57 (1979).
- 7) 桐淵滋雄・中村道德: 農化, 47, 333 (1973).
- 8) BAIJAL, M., SINGH, S., SHUKLA, R.N. and SANWAL, G.G.: *Phytochem.*, 11, 929 (1972).
- 9) YEH, Dong-bor and Su, Jong-ching: *J. Chin. Biochem. Soc.*, 1, 37 (1972).
- 10) SHUKLA, R.N. and SANWAL, G.G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 303 (1971).
- 11) 中村紀雄・新井勇治・岩波洋造: 農化, 49, 469 (1975).
- 12) 井上吉之: 日本食品事典 (医歯薬出版) p. 331 (1968).

(平成 5 年 8 月 2 日受理)