

ブドウ果実の糖分析過程におけるインベルターゼによる ショ糖の加水分解[†]

藤原孝之*・坂倉 元*・伊藤 寿**・****・本庄達之助***・****

Effect of Endogenous Invertase on Sucrose Degradation
in Analyzing Sugars in Grape Berries

(Studies on Analysis of Sugars in Fruits Part I)

Takayuki FUJIWARA*, Hajime SAKAKURA*, Hisashi ITO**, ****
and Tatsunosuke HONJO***, ****

* *Mie Agricultural Research Center, 530, Kawagita, Ureshino-cho, Ichishi-gun, Mie 515-2316*

** *Department of Agriculture in Iga-Region, Mie Agricultural Research Center,
1240, Moridera, Ueno-shi, Mie 518-0126*

*** *Department of Kinan Citrus Fruits, Mie Agricultural Research Center,
1823, Shihara, Mihama-cho, Minami-murou-gun, Mie 519-5202*

**** *Present Address : **

The effect of invertase activity on sucrose degradation in analyzing sugars (sucrose, glucose and fructose) in grape berries was investigated. Sucrose in squeezed grape juice was degraded rapidly, and this fact was thought to be mostly caused by endogenous invertase activity. Invertase activities and sucrose degradation in squeezed juice varied remarkably with grape cultivars. Only 'Steuben' had very low invertase activity and high sucrose concentration among 7 grape cultivars investigated. Invertase activities of other 6 grape cultivars were much higher than those of strawberry, Japanese pear, melon and Satsuma mandarin. Microwave heating treatment of grape pulp was necessary before ethanol extraction against sucrose degradation during extraction for sugar analysis.

(Received Jun. 10, 1998 ; Accepted Oct. 19, 1998)

日本におけるブドウの主な生食用品種の糖成分は、ほとんどがブドウ糖および果糖であり、ショ糖含量は極めて微量とされている^{1)~3)}。しかし、ショ糖の絶対量については、0.75~0.79%⁴⁾、0.37~0.51%⁵⁾、0~0.2%⁶⁾とやや異なり、ショ糖は検出されなかったという報告も多く見られる^{7)~9)}。カキ果実では、古くはブドウ糖と果糖が全

糖のほとんどを占めると考えられていたが、これは分析操作中にショ糖分解酵素インベルターゼ (E.C. 3.2.1.26) によりショ糖が加水分解されたためであり、実際にはショ糖が多く含まれることが後の研究で明らかにされた¹⁰⁾。ブドウ果実についても、カキ果実より活性は低いもののインベルターゼ活性を有するため¹¹⁾、分析中の酵

† 果実類の糖分析法の検討 (第1報)

* 三重県農業技術センター (〒515-2316 三重県一志郡嬉野町川北 530)

** 三重県農業技術センター伊賀農業センター (〒518-0126 三重県上野市森寺 1240)

*** 三重県農業技術センター紀南かんきつセンター (〒519-5202 三重県南牟婁郡御浜町志原 1823)

**** 現在、三重県農業技術センター

素作用によりショ糖含量が低く測定された可能性がある。ブドウ果実の糖分析法としては、搾汁液を用いる方法⁸⁾⁹⁾ およびアルコール抽出による方法⁴⁾⁵⁾⁷⁾¹²⁾ が多く見られる。特に前者では、酵素を失活させる操作を行わないため、搾汁後のショ糖の分解が懸念される。そこで、搾汁液の糖組成の変化とインベルターゼ活性との関係を検討した。次に、アルコール抽出法については、抽出を高温下で行えば一般に果実類のショ糖分解酵素は失活すると考えられていた。しかし、カキ果実においては加熱抽出過程でもショ糖の分解が起こるため、抽出前に電子レンジで加熱して酵素を失活させる方法が良いと報告されている¹³⁾。そこで、ブドウ果実の糖をアルコール抽出する場合のショ糖分解についても検討した。なお、2品種のブドウ‘マスカットベリーA’および‘スチューベン’について、果実のインベルターゼ活性が極端に異なることが報告されているため¹⁴⁾、これら2品種を含め、系統の異なる多くの品種を供試した。また、果実間のインベルターゼ活性を比較した例は少ない¹¹⁾ので、数種類の果樹および果菜類についても実験を行い、ブドウの結果と比較した。

実験方法

1. ブドウ搾汁液のショ糖分解

供試品種は、欧州種の‘ガーネット’および‘ルビーオクヤマ’、米国種の‘スチューベン’、欧米雑種の‘デラウェア’、‘巨峰’、‘安芸クイーン’、および‘マスカットベリーA’であった。‘スチューベン’は三重県名張市の農家、他の品種については三重県農業技術センター伊賀農業センターで栽培されたものを用いた。いずれも成熟果を収穫し、4℃で冷蔵して2日以内に実験に供した。

各品種について、果実100gをプレス式のハンドジューサーおよび2重のポリエステル濾布（ゴース布，C-119，東レ製）を用いて搾汁後濾過した果汁をサンプル瓶に入れて25℃下に放置し、‘巨峰’の場合は、搾汁後、5、10、15、30、45、60、120および180分後に、他の品種については搾汁直後および30分後に、ショ糖、ブドウ糖および果糖の濃度を高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC、装置：LC-10A、島津製作所）により定量した。HPLC分析は、搾汁液を蒸留水で200倍に希釈し、メンブランフィルター（DISMIC 25 AS, 0.20 μm, 東洋濾紙、後述のものも同様）で濾過したものについて行った。カラムはSCR-101C（島津製作所）、検出器は示差屈折計（RID-6A、島津製作所）、移動相は蒸留水を使用し、流

量1.0 ml/分、カラム温度80℃、試料注入量40 μlの条件で測定した。実験は3回反復し、結果は平均値で示した。

2. インベルターゼ活性の測定

インベルターゼ活性を測定する場合、ブドウ果実の試料は凍結保存できることが報告されているため¹⁵⁾、前項で用いた7品種のブドウ果実を、収穫後24時間以内に-40℃の冷凍庫に入れ、実験当日まで保存した（2~3か月間）。また、ブドウ果肉のインベルターゼ活性は、緩衝液可溶性の方が不溶性より顕著に高いので¹⁵⁾、本実験では緩衝液可溶性インベルターゼのみを測定した。

粗酵素液の抽出・精製は4℃以下で、以下のように行った。まず、果肉10gに、5 mM 塩化マグネシウム、1 mM EDTA、2.5 mM DTT および10 mM システインを含む0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.5）10 mlを加えホモジナイズして、20 000×gで10分間遠心分離した。次に、上澄に硫酸アンモニウムを100%飽和量加え攪拌し、上澄を前記条件で遠心分離後、沈殿物を少量（600~1 000 μl）の前記緩衝液で再溶解した。その液を、蒸留水に対して1晩透析し、透析内液を10 000×gで10分間遠心分離して、上澄を粗酵素液とした。なお、粗酵素液中にショ糖および還元糖は存在しないことを確認した。

インベルターゼ活性の測定は以下のように行った。粗酵素液50 μlに200 mM ショ糖溶液（0.1 M クエン酸-水酸化ナトリウム緩衝液，pH 4.0 使用）50 μlを加え、30℃のウォーターバス中に30分間入れた後、酵素反応を停止させるために沸騰水中に3分間入れ、直ちに氷水で冷却した。次に、ショ糖の加水分解量を求めるため、冷却後の反応液を蒸留水で希釈して、HPLCにより果糖を測定した。ここで、果糖を加水分解の指標としたのは、HPLCにおいてピークの分離がショ糖やブドウ糖より優れ、測定精度が高いと判断したためである。なお、粗酵素液の代わりに蒸留水を用いた空試験でも、酸性下におけるショ糖の加水分解の結果生成したものと考えられるブドウ糖および果糖が少量認められたため、粗酵素液を用いた場合の果糖量から空試験の果糖量を差し引いたものを、インベルターゼによる果糖の生成量とした。酵素活性は、果肉新鮮重1g中の粗酵素により、1時間当たり加水分解されるショ糖量として計算した。各品種について、実験を3回反復し、結果は平均値で示した。

また、ブドウ以外の果実類についても、同様にインベルターゼ活性を測定した。供試したイチゴおよびニホンナシは三重県農業技術センター、ウンシュウミカン同紀南かんきつセンター、メロンは四日市市農業センターで栽培されたもので、いずれも収穫適期の果実であっ

た。

3. アルコール抽出時のショ糖の加水分解

ブドウの供試品種は、'巨峰' (分析点数4点), '安芸クイーン' (3点), および 'ガーネット' (3点) であった。10~25果粒を1点の試料として、合計10点について実験を行った。

果肉を約1cm角に切った後、約20gを3点秤量し、電子レンジ(2450MHz, 500W)で60秒または90秒加熱する処理および無処理の3種類の処理を行い、それぞれについて以下に示す糖の抽出とHPLC分析を行った。まず、果肉に85%エタノール100mlを加えて80℃で1時間湯煎し、冷却後、ホモジナイズしたものを濾紙(No. 5A, 桐山製作所)を用いて吸引濾過した。次に、85%エタノールで200mlに定容後5mlをとり、減圧下で加熱しエタノールを蒸発させた。これに水を加えて溶解させ、100mlに定容し、メンブランフィルターで濾過したものについて、1.と同様にHPLCで糖含量の測定を行った。

また、イチゴ('女峰', 'とよのか' および '章姫'), ニホンナシ('豊水', '新星', '新高' および '二十世紀'), メロン('アールスフェボリット'の秋系F1) およびウンシュウミカン('崎久保早生', '興津早生' および '青島温州')についても、ブドウと同様に実験を行った。

実験結果および考察

1. ブドウ搾汁液のショ糖分解とインベルターゼ活性との関係

図1のように、ブドウ'巨峰'搾汁液のショ糖は時間経過とともに減少し、ブドウ糖および果糖は増加した。そして、ブドウ糖および果糖の合計増加量はほぼショ糖の減少量に相当したところから、ショ糖が加水分解されたものと推察された。搾汁後30分のショ糖減少量と果実のインベルターゼ活性には、図2のように高い正の相関が認められた。そのため、ブドウ果実の搾汁後のショ糖分解は、おもにインベルターゼの作用によるものと判断された。また、ブドウ果実中のショ糖含量は一般的に極めて低いが、'スチューベン'他いくつかの品種では特異的に高い含量を示すことが報告されている⁶⁾。本実験においても、搾汁直後のショ糖濃度は、'スチューベン'(4.52% (w/v))が他の6品種(0.37~0.69% (w/v))より著しく高かった。なお、ブドウ果実の還元糖の蓄積にはインベルターゼ活性が関係し、'マスカットベリーA'は'スチューベン'よりインベルターゼ活性が著し

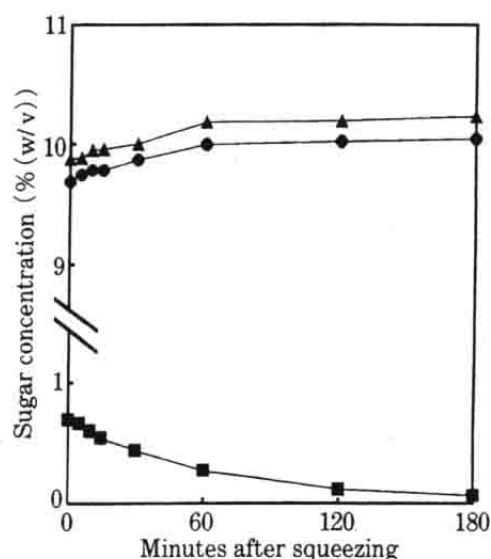


Fig. 1 Change of sugar composition of 'Kyoho' grape juice at 25°C after squeezing

■ : Sucrose, ▲ : Glucose, ● : Fructose.

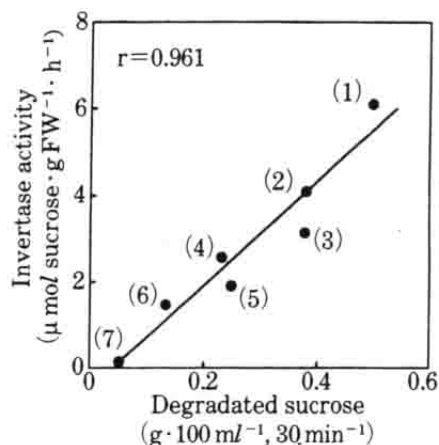


Fig. 2 Relationship between sucrose degradation of grape juice and invertase activities of grape berries

a): Kept at 25°C during thirty minutes after squeezing.

Cultivars: (1) Garnet, (2) Muscat Bailey A, (3) Delaware, (4) Ruby Okuyama, (5) Kyoho, (6) Aki Queen, (7) Steuben.

く高い結果、ショ糖含量が低くなると考えられている¹⁴⁾。本実験においても、'スチューベン'以外の品種は、図2に示したように、すべてインベルターゼ活性が'スチューベン'より顕著に高かった。

他の果実類についてもインベルターゼ活性(単位は図2と同じ)を測定したところ、イチゴ'女峰' 0.81, 'とよ

Table 1 Effect of microwave heating pretreatment for ethanol extraction on analyzed values of sugar contents in grape berries

Microwave pretreatment ^{a)}	Sucrose	Glucose	Fructose	Total
Control	0.60±0.46 ^{b)}	6.96±1.42	8.42±0.98	15.98±2.45
60 sec	0.74±0.46	6.83±1.36	8.24±0.94	15.81±2.32
90 sec	0.73±0.44	6.80±1.71	8.22±1.08	15.75±2.56

** : Significant at 1% level by t-test between two treatments.
 NS : Not significant at 5% level.

Ethanol extraction : 20 g of pulp was kept in 100 ml of 85% ethanol at 80°C for 1 hour.

Sugars were analyzed by HPLC.

^{a)} : Heating 20 g of pulp with microwave oven.

^{b)} : Mean±standard deviation (% (w/w), n=10).

** : Significant at 1% level by t-test between two treatments.

NS : Not significant at 5% level.

のか' 0.34, ニホンナシ '豊水' 0.11, '新星' 0.06, メロン 'アールスフェボリット' 0.34, ウンシュウミカン '崎久保早生' 0.04 および '青島温州' 0.03 であり, いずれもブドウ ('スチューベン' を除く) より活性が低かった。以上のことから, ブドウの多くの品種は, 果実類の中でインベルターゼ活性が比較的高いものと考えられた。

2. アルコール抽出時のショ糖分解

エタノール抽出前のブドウ試料へのマイクロ波処理の有無による各糖含量測定値の比較を表1に示した。このように, マイクロ波処理を行うとショ糖含量は高く, ブドウ糖および果糖含量は低くなった。このため, ブドウの糖をエタノールにより抽出する場合, カキ¹³⁾¹⁶⁾と同様に抽出中にショ糖の分解が起こるため, 抽出前のマイクロ波処理が必要と考えられた。なお, 表1の結果から, 処理時間は60秒で十分と考えられた。

データは省略するが, イチゴ, ニホンナシ, メロンおよびウンシュウミカンについては, マイクロ波処理の有無による各糖含量の測定値に有意差は認められなかったため, エタノール処理前のマイクロ波処理は不要と考えられた。これは, 前述のように, いずれの果実もブドウよりインベルターゼ活性が低いためと考えられた。

要 約

ブドウ果実の糖分析中のショ糖分解に及ぼすインベルターゼの影響を検討した。

1. ブドウ果実の搾汁液においては, ショ糖の加水分解が急激に起こり, 主にインベルターゼの作用によるものと判断された。搾汁液のショ糖分解程度およびインベルターゼ活性には, 大きな品種間差異が認められた。

2. 今回供試したブドウ7品種の中で, 'スチューベン' のみは特異的にインベルターゼ活性が低く, ショ糖含量が高かった。

3. 'スチューベン' を除くブドウ各品種のインベルターゼ活性は, イチゴ, ニホンナシ, メロンおよびウンシュウミカンより極めて高かった。

4. ブドウの糖分析において, エタノール抽出を行う場合, 抽出時のショ糖分解を抑えるために, 抽出前に果肉切片をマイクロ波処理することが必要と判断された。

インベルターゼ活性測定法を指導いただいた三重大学生物資源学部助教授平塚伸博士に深謝します。

文 献

- 1) 小林 章：ブドウ園芸（養賢堂，東京），p. 287（1970）。
- 2) 角 利昭：果実の成熟と貯蔵，伊庭慶昭・垣内典夫・福田博之・荒木忠治編（養賢堂，東京），p. 172（1985）。
- 3) 垣内典夫：果実の科学，伊藤三郎編（朝倉書店，東京），p. 118（1991）。
- 4) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌，32，522（1985）。
- 5) 広保 正・石井 弘・ユンバニユツ：千葉大学園芸学部学術報告，22，：41（1974）。
- 6) 白石美樹夫・白石真一：園学雑，66（別1），76（1997）。
- 7) 松井弘之・湯田英二・中川昌一：園学雑，48，9（1979）。
- 8) 久保田尚浩・李 相根・安井公一：園学雑，62，363（1993）。

- 9) 伊藤 寿・輪田龍治：三重県農業技術センター研究報告, **23**, 29 (1995).
 - 10) 辻 政雄・小宮山美弘：日食工誌, **34**, 425 (1987).
 - 11) 辻 政雄・小宮山美弘：山梨県工業技術センター研究報告, **5**, 93 (1991).
 - 12) KLIEWER, W.M. : *Plant Physiol.*, **41**, 923 (1966).
 - 13) 鄭 国華・杉浦 明：園学雑, **59**, 281 (1990).
 - 14) TAKAYANAGI, T. and YOKOTSUKA, K. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 403 (1997).
 - 15) ARNOLD, W.N. : *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134 (1965).
 - 16) MATSUI, T. and KITAGAWA, H. : 日食工誌, **35**, 448 (1988).
- (平成10年6月10日受付, 平成10年10月19日受理)
-