

[ J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 19 7~12 1984 ]

## 甲州種ブドウの味なし果と健全果のポリフェノールオキシダーゼの比較\*

中村 和夫・天野 義文・加賀美元男

## Comparison of Polyphenol Oxidase in 'Normal' and 'Ajinashi' Berries of Koshu Grapes\*

KAZUO NAKAMURA, YOSHIFUMI AMANO, and MOTOO KAGAMI

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu 400*

The effects of grape virus infection on polyphenol oxidase activity and total polyphenol content of Koshu grape berries have been studied.

In the unripe stage of the grapes, there were no great differences of the polyphenol oxidase activity and total polyphenol content between 'Normal (virus disease-free)' and 'Ajinashi (virus-infected)' berries of Koshu grapes. The very high polyphenol oxidase activity and the high content of total polyphenol in the berries were observed at the unripe stage of the grapes, but after that, they were gradually decreased and settled down to a certain value at the ripe stage of the grapes. In the ripe stage of the grapes, the polyphenol oxidase activity and the total polyphenol content of the 'Ajinashi' berry were respectively equal to that of the 'Normal' one.

Electrophoretic patterns to several phenolic substrates of the polyphenol oxidase included in ripe berries were examined with polyacrylamide slab gel electrophoresis. The number of the active bands obtained from the 'Ajinashi' grape berry was smaller than that from the 'Normal' berry, and the degree of color intensity of active band indicated by the 'Ajinashi' grape berry was lower than that by the 'Normal' one.

山梨県下に栽培されている甲州種ブドウの中には、「味なし果」と称される商品価値の低い結果樹に属するものが相当数あることが過去数年間の調査から明らかにされた<sup>1)</sup>。味なし果の原因はリーフ・ロールウィルスとフレックウィルスの重複感染によるものと考え

られている<sup>2)</sup>。味なし果の特徴は健全果と比較して果実の糖度が著しく低いことである。また、味なし果の熟期の果汁酸度は健全果に比べて若干高いこと<sup>3)</sup>、および味なし果の遊離アミノ酸含量が健全果と比較してかなり低いこと<sup>4)</sup>が報告されている。

ポリフェノールは果汁中の主要な味覚成分の一つであるが、味なし果は健全果と比較して着色が不良であると指摘されているところから、果実に含まれるフェノール性化合物に量的あるいは質的な差がある可能性

\* 日本産ブドウのポリフェノールオキシダーゼに関する研究・第4報 (*Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 122 (1983) を第3報とする。)

も考えられる。味なし果と健全果のポリフェノール量の比較研究は既に二例<sup>5,6)</sup>行われたが一致した結果が得られておらず、この点についても更に検討が必要とされる。このように、ブドウウィルス病は調査研究が立ち遅れており、近年、成分や収穫量の比較研究が開始されたばかりである。味なし果発生の因果関係をより明確にするためには、単に成分的な分析にのみとどまらず、ウィルス感染樹の酵素学的な研究が必要とされるがそのような研究報告は殆ど見当たらない。

これらの観点から、本研究ではまず味なし果と健全果の成分比較で一致した結果の得られていない果実中のポリフェノール含量を果実の生長期間を通じて測定した。さらに、これと密接に関係のある酵素、ポリフェノールオキシダーゼの活性およびその電気泳動パターンについて味なし果と健全果との比較検討を行い、その特徴を明らかにしたので報告する。

#### 実験材料および方法

**試料** 山梨大学工学部付属発酵化学研究施設の育種試験地で栽培している甲州種ブドウ樹のうち、育種試験地において健全果樹および味なし果樹に選定されているブドウ樹を供試樹とした。

供試した果実の区分は以下のようである。1) 未熟期のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール含有量の測定：健全果樹4株(A, B, C, D)と味なし果樹4株(E, F, G, H)の各4株より1983年7月11日に収穫したもの。2) ブドウ果実生育期間中のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール含有量の測定：健全果樹(A)と味なし果樹(E)の各1株より1982年6月17日から同年10月15日まで半月毎に採取したもの。3) 成熟果実のポリフェノールオキシダーゼの電気泳動：健全果樹(A)と味なし果樹(E)の各1株から1981年10月20日に採取したもの。

除梗した後、果粒を0.5%酢酸で洗浄した。水道水で洗浄後、水切りを行った。

**酵素液の抽出** 10gの果粒を0.2Mリン酸緩衝液(pH8.0)100mlに加え、ホモジナイザーでホモジナイズ(15,000rpm, 3分, 0°C)した。ホモジネートを100メッシュのナイロン布で搾汁し、酸化防止のために窒素ガスを通気した搾汁液を酵素活性測定用試料とした。

電気泳動用試料には、成熟果実の搾汁液を遠心分離(6,000 rpm, 10分, 4°C)し、上澄液をSephadex G-25カラムに通し、酵素活性<sup>7)</sup>のある画分を集め、限外濾過で濃縮したものをを用いた。

**酵素活性測定法** Rank Brothers社製の酸素電

極装置で測定した。すなわち、20mMカテコール2.0ml, 0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸ニトリウム緩衝液(pH6.0)1.5mlを25°Cの恒温セルに入れ、1分間通気した後、酵素液を0.5ml注入して反応を開始し、溶存酸素濃度の経時変化から酸化活性を測定した。

**ポリフェノールの抽出<sup>8)</sup>及び定量** 種子を除いた果粒20gと80%エタノール100mlを湯浴中で10分間加熱した。冷却後、ホモジナイズ(15,000rpm, 2分)し、ホモジネート全部を再び湯浴中で20分間加熱抽出した。冷却後、吸引濾過した。濾液を80%エタノールで150mlに定容にした。残渣は再度エタノールで抽出した。この操作を3回繰り返した。ポリフェノールの定量はSingletonら<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。なお、標準物質として没食子酸を使用した。

**電気泳動** スラブ型ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を常法通り行った<sup>10)</sup>。泳動終了後、Benjaminら<sup>11)</sup>の方法に従って酵素活性バンドを染色した。染色されたゲルプレートを乾燥した後、島津クロマトスキャナーCS-930を用いてデンストグラムを測定した。活性バンドの表示は相対移動度(Rm値)を用いた。すなわち、泳動開始点からのバンドの移動距離をtracking dyeの移動距離で割った値で示した。

#### 実験結果及び考察

**未熟期の健全果と味なし果の比較** 1983年7月11日に採取した未熟期の健全果ブドウ樹(A, B, C, D), 味なし果ブドウ樹(E, F, G, H)各4株を試験樹として果実のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール量を測定した。ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定結果をFig. 1, 全ポリフェノール量をFig. 2に示した。これらより、ポリフェノールオキシダーゼ活性は健全果ではどの株も同程度の値を示し、味なし果では測定値にややばらつきは見られたが、両者の値に大きな差は認められず、ポリフェノールオキシダーゼ活性による味なし果、健全果の区別はできなかった。また、ポリフェノール含有量についても健全果、味なし果との間で明確な相違は認められなかった。

**果実の成熟中におけるポリフェノールオキシダーゼ活性の変化** 1982年6月17日から同年10月15日までの果実の生長期間における果粒のホモジネートのポリフェノールオキシダーゼ活性の変化をFig. 3に示した。6月17日の活性値は非常に高かったが、以後極端に減少していき、特に8月16日以後の成熟期においては殆ど活性値に変動がなかった。Kidronら<sup>12)</sup>は、未熟期の果実ほど活性が高く、成熟期では未熟期の約5

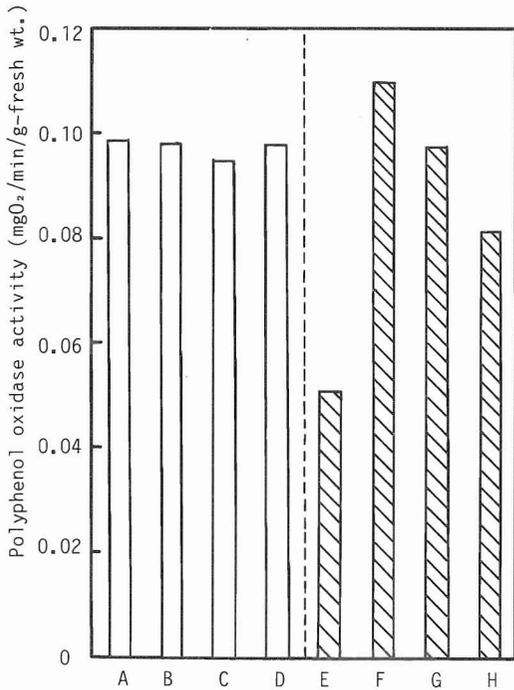


Fig. 1. Polyphenol oxidase activity of 'Normal' and 'Ajinashi' unripe berries of Koshu grape harvested in July 11, 1983.

A-D: 'Normal' grape berry, E-H: 'Ajinashi' grape berry.

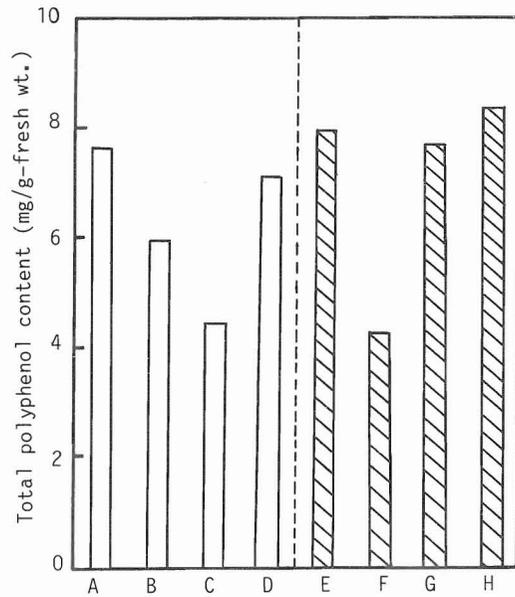


Fig. 2. Total polyphenol content of 'Normal' and 'Ajinashi' unripe berries of Koshu grape harvested in July 11, 1983.

A-D: 'Normal' grape berry, E-H: 'Ajinashi' grape berry.

%の活性になると報告しているが、本研究の活性の変化も同様の傾向を示した。

#### 果実の成熟中における全ポリフェノール量の変化

1982年6月17日から同年10月15日までの期間における果実の全ポリフェノール量の変化をFig. 4に示した。6月17日採取した幼緑果の全フェノール含量は健全果、味なし果とも非常に高い値を示したが、その後、7月16日にかけて急激に減少した。以後、僅かな増減はあったが全体に減少傾向を示した。これらの結果はKidronら<sup>12)</sup>、Kimberlyら<sup>13)</sup>による外国産ブドウにおける傾向と同様であった。

健全果の全フェノール含有量は味なし果と比較して6月17日の幼緑果では大きな値を示した。しかし、7月1日以後は含有量の差が急激に縮まり殆ど同程度の値を示していた。ゆえに、味なし果、健全果の全フェノール含有量は6月17日の幼緑期では健全果のほうが

味なし果より高かったが、測定期間全体としてはその含有量に顕著な違いは認め難い。

健全果、味なし果のポリフェノール含量を比較した結果として、小沢ら<sup>5)</sup>は1977年10月20日収穫のブドウでは味なし果からの果汁のほうがポリフェノール濃度は高いと報告している。一方、米山ら<sup>6)</sup>は未熟期から収穫期まで常に健全果のほうが高く、収穫期でも健全果のほうが高かったと報告している。この両者により報告されている値は相反しているが、その測定値はいずれも搾汁した果汁に含まれるポリフェノール量を測定したものであり、果肉、果皮を全て含んだ全ポリフェノールの測定値ではない。

本研究の結果では、成熟期(Fig. 4における9/16~10/15期間)のブドウに含まれる全ポリフェノール量は約4 mg/gであった。健全果を常法通り搾汁して得た(搾汁率60%)果汁のポリフェノール含量は約567~688 mg/lである<sup>5,6)</sup>。これらの結果を参考にすると、果実から果汁へ移行するポリフェノールの量は果実全ポリフェノールの約8%にすぎないことがわか

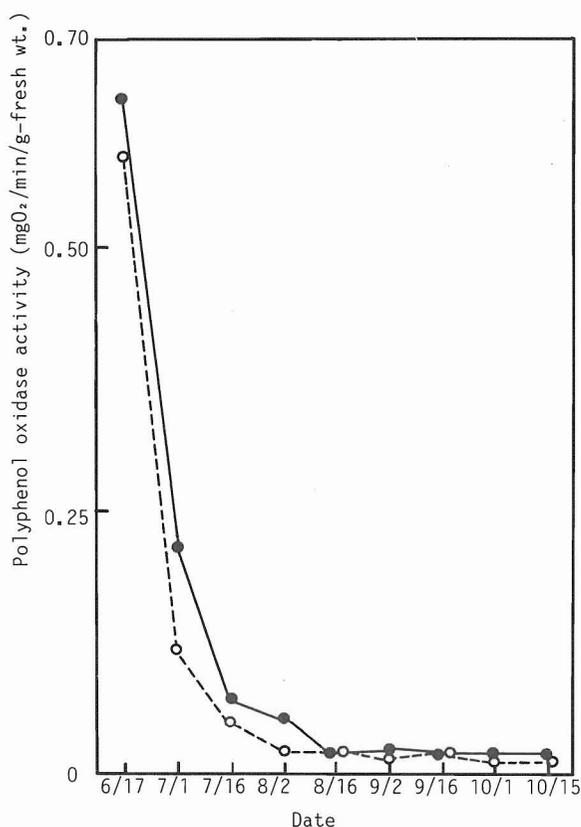


Fig. 3. Seasonal changes in polyphenol oxidase activity of 'Normal' and 'Ajinashi' berries of Koshu grape harvested in 1982.

●: 'Normal' grape berry (A), ○: 'Ajinashi' grape berry (E).

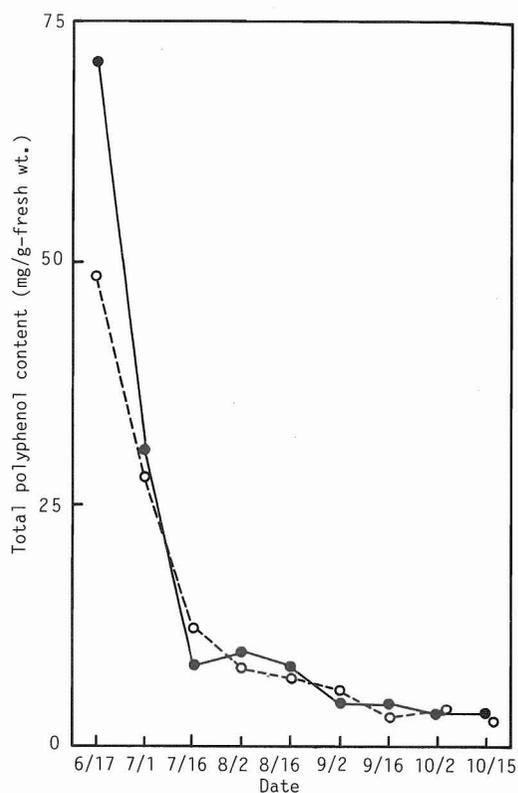


Fig. 4. Seasonal changes in total polyphenol content of 'Normal' and 'Ajinashi' berries of Koshu grape harvested in 1982.

●: 'Normal' grape berry (A), ○: 'Ajinashi' grape berry (E).

る。破碎果実(搾り粕)中にはまだ多量のポリフェノールが残存しており、搾汁における僅かの強弱がポリフェノール抽出量の多少に著しく影響することは明らかである。これまでの報告の中で、味なし果と健全果で果汁中のポリフェノール量の大小に一致した傾向が見られなかったのは上記の原因によるものと考えられる。従って、味なし果、健全果中のポリフェノールは量的には大差がないものと結論される。

電気泳動パターンによる健全果と味なし果のポリフェノールオキシダーゼの比較 1981年10月20日に採取した健全果と味なし果を用いて、スラブディスクゲル電気泳動を行った。各フェノール基質に対して発現す

る活性バンドのデンストグラムを Fig. 5 に示した。

o-ジフェノールである L-DOPA を基質として活性バンドを検出した場合、健全果と味なし果の両者に共通して  $R_m=0.3, 0.7$  のピークが認められたが、味なし果には  $R_m=0.9$  のピークが殆ど認められなかった。また、カテコールを基質としたときは、 $R_m=0.7, 0.9$  のピークが両者に認められたが、 $R_m=0.3$  のピークは味なし果には認められなかった。トリフェノールであるピロガロールを基質とした場合、 $R_m=0.7$  のピークは健全果と味なし果の両者に認められた。しかし、 $R_m=0.9$  のピークは味なし果には殆ど認められなかった。モノフェノールの p-クレゾー

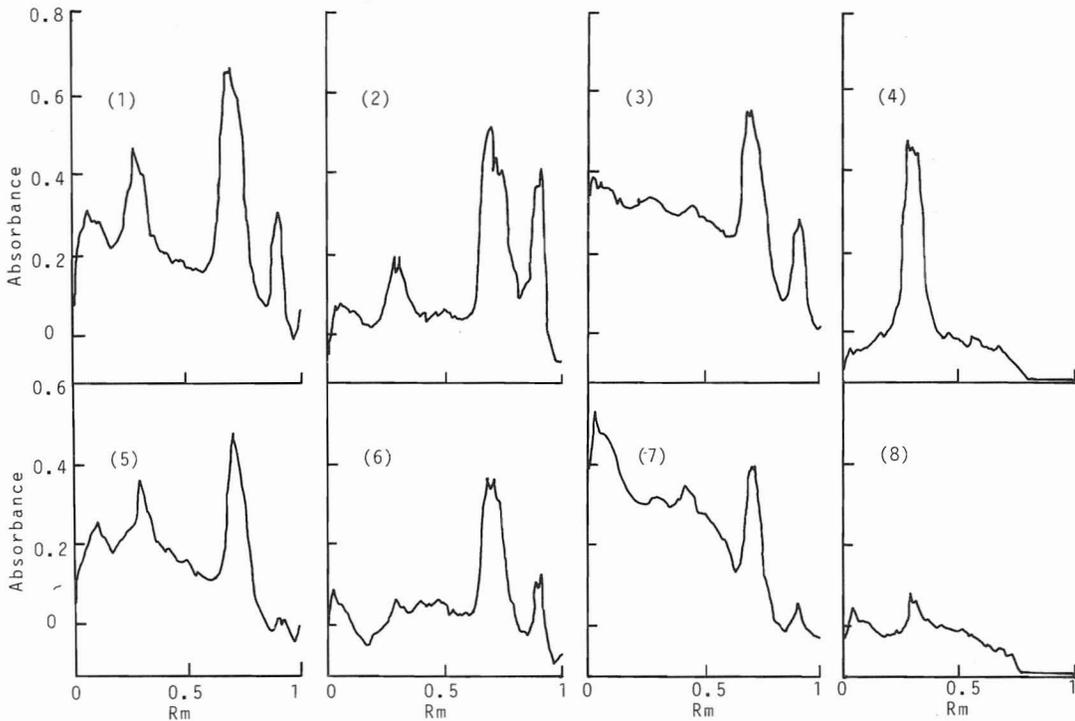


Fig. 5. Densitometric traces of polyphenol oxidase activity to several phenolic substrates in polyacrylamide slab gel.

Ripe berries of Koshu grapes ('Normal' and 'Ajinashi' berries) were harvested in October 20, 1981. Densitogram: (1)

— (4) 'Normal' grape berry (A), (5)  
— (8) 'Ajinashi' grape berry (E).  
Substrate: (1), (5) L-DOPA;  
(2), (6) Catechol; (3), (7)  
Pyrogallol; (4), (8) *p*-Cresol.

ルを基質とした場合、健全果には  $R_m = 0.3$  に強いピークが認められたが、味なし果では  $R_m = 0.3$  付近に極めて弱いバンドが検出されただけであった。すなわち、クレゾラーゼ活性を示すバンドが健全果と味なし果では大きく異なっていることが明らかとなった。

このように、適当な基質を選択すれば健全果と味なし果のポリフェノールオキシダーゼの電気泳動パターンは明確に異なることが示された。Frankenら<sup>14)</sup>は既に病気感染(リケッチア様菌)したブドウのパーオキシダーゼの電気泳動パターンが健全樹のものとは異なることを報告している。

現在、ウィルスフリー樹への植え換えの計画が山梨県下で進められつつある。しかし、ウィルスフリー樹への再感染の問題は解決されておらず、常にウィルス病感染のための検定が必要とされる。リーフロール、

フレックウィルスの検定に関しては接木検定法が最も確実な方法とされている<sup>15)</sup>。しかし、この方法は判定結果を得るのに長期間(半年~1年)を要し、実用上問題点がある。先に述べた電気泳動パターンから味なし果樹を判定できる方法が確立されれば、きわめて便利であるが、今後更に季節や樹令の影響についても詳しく検討がなされなければならない。

#### 要 約

甲州種ブドウの健全果樹と味なし果樹の特徴を果実中のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール含有量および電気泳動法により種々のフェノール基質に対する泳動パターンで比較検討した。

未熟期においては、健全果と味なし果のポリフェノールオキシダーゼ活性および全ポリフェノール含有量に

大きな差は認められなかった。

ブドウ生育期間の間、未熟期の果実のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール含有量は非常に高い値を示したが、その後しだいに減少し、成熟期では一定の値になった。成熟期のポリフェノールオキシダーゼ活性と全ポリフェノール含有量は健全果と味なし果の両者とも殆ど同じ値であった。

成熟ブドウ果実から抽出したポリフェノールオキシダーゼの種々のフェノール基質に対する泳動パターンを比較した結果、味なし果は健全果に比べて活性バンドの数が少なく、また、味なし果の活性バンドは健全果に比べて呈色度が弱かった。

本研究を行うに当り、試料のブドウをご提供いただいた山梨大学山川祥秀助教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 足立：山梨の園芸，28，24 (1980)。
- 2) 寺井：第26回作物栄養学会総会講演要旨，4 (1978)。
- 3) 山川，清水，櫛田：園芸学雑誌，50，454 (1982)。
- 4) 戸川，井理，木下，上野：昭和59年度日本農芸化学会大会講演要旨集，238 (1984)。
- 5) 小沢，飯野，樋川，加々美：山梨県食品工業指導所報告，12，26 (1980)。
- 6) 米山，櫛田：山梨大発研報告，16，9 (1981)。
- 7) 中村，天野，加賀美：山梨大発研報告，16，15 (1981)。
- 8) 森，原田，坪井：日本缶詰協会研究所研究報告，5，10 (1975)。
- 9) Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144 (1965)。
- 10) 永井：蛋白質，核酸，酵素，11，744 (1966)。
- 11) Benjamin, N. D., Montgomery, M. W.: *J. Food Sci.*, 38, 799 (1973)。
- 12) Kidron, M., Harel, E., Mayer, A. M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, 30 (1978)。
- 13) Kimberly, W. W., Lee, C. Y.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 206 (1980)。
- 14) Franken, B., Nienhaus, F.: *Wein-wiss.*, 35, 303 (1980)。
- 15) Martelli, G. P.: *UCD Grape and Wine Centennial Symposium Proceedings* (Ed. Webb, A. D.), 28 (1980)。  
(1984・8・31 受付)