

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 20 17~20 1985]

ノ ー ト甲州種ブドウのポリフェノールオキシダーゼ活性に
およぼす果実貯蔵温度の影響*

中村和夫・天野義文・加賀美元男

Effect of Storage Temperature on Polyphenol Oxidase
Activities of Koshu Grapes.

KAZUO NAKAMURA, YOSHIFUMI AMANO, and MOTOO KAGAMI

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

The effects of storage temperature of Koshu grapes were studied on the polyphenol oxidase activity of the grape juice. The grape clusters harvested were stored at three different temperatures (-20°C , 4°C , 25°C) for the period from 0 to 10 days before analysis. Each of the the grape berries stored at the three temperatures were homogenized separately and then filtered through nylon cloth layers. The enzyme activity of the filtered homogenate of the grapes stored at -20°C was twice as high as the activity of the grapes stored at 4°C . The enzyme activities of the grapes during the period of storage at 4°C were hardly changed for 10 days. The storage of the grapes at 25°C decreased in the activities gradually. The crude enzyme solutions were extracted from the acetone powders made from the grapes stored at -20°C or 4°C . The specific activity of the enzyme solution made from the grapes stored at -20°C was about twice higher than that of the solution from 4°C storage grapes. The extracts were applied to the polyacrylamide slab gel disc electrophoresis. The number of the enzyme active bands of the grape sample stored at -20°C were smaller than that of 4°C stored grapes.

植物の各種組織および果実などに含まれるポリフェノールオキシダーゼは、果皮や粒子区分の強固な組織中に存在する。また、組織を破壊して抽出しようとする場合、酵素がフェノール性物質と結合したりするため可溶性の酵素が抽出されにくい。ブドウのポリフェノールオキシダーゼも例外でなく、このためPVPP処理、界面活性剤の使用やアセトン粉末化などによる各種のくふうが試みられている¹⁾。

本研究では、ブドウ果実を収穫した後、ホモジナイズを行う前にブドウ果実の前処理（保存法）によって抽出効果を上げる方法について検討した。果実採取後、果実をホモジナイズするまでの間の保存法と

して、 -20°C に保存する場合²⁾や、 2°C に保存する方法³⁾などが試みられている。本実験では、甲州種ブドウ果実を採取後、 -20°C 、 4°C 、 25°C の各温度に保存した後、果実よりホモジネートを作製し、これに含まれるポリフェノールオキシダーゼ活性を測定して、貯蔵温度および日数の酵素活性におよぼす影響の比較を行った。さらに、アセトンパウダーを作製し、これより抽出した酵素液の電気泳動パターンの違いについても検討したのでここに報告する。

ポリフェノールオキシダーゼ活性におよぼすブドウ

*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5報

果実保存温度の影響 供試料は山梨大学工学部発酵化学研究施設の育種試験地で栽培された甲州種ブドウを1983年10月11日に採取したものである。ブドウは房のまま0.5%酢酸水溶液につけて農薬を洗い落した後、水洗し、水切りを行った。2房ずつ除梗せずにポリエチレン袋に入れシールし、 -20°C 、 4°C 、 25°C の温度に保存した。0、2、4、6、8、10日目に1袋ずつ取り出し、ブドウ房から果粒を10gずつ採取し、0.2Mリン酸緩衝液(pH 8.0) 100 mlを加え、15,000 rpm, 3分間、 0°C においてホモジナイズした。ホモジネートを100メッシュのナイロン布で搾汁し、搾汁液を氷冷し窒素ガス置換したものを酵素溶液とした。酵素活性はカテコールを基質として、pH 6.0、 25°C における酸素吸収速度を酸素電極法で測定した。

Fig. 1に示すように、 25°C に保存した場合、2日目より徐々に酵素活性が減少していくことがわかった。

日本梨を 22°C に保存すると10日目まではポリフェノールオキシダーゼ活性が減少することが認められているが⁴⁾、甲州種ブドウでも室温保存では活性が低下していくことが示された。また、 4°C で保存した場合、10日目まで酵素活性は収穫日に測定した活性と比較して殆ど変化しなかった。一方、 -20°C に保存した場合は、貯蔵によりポリフェノールオキシダーゼ活性が収穫日の試料より高くなり、2日目から10日目まで 4°C の場合の約2倍の酵素活性を示した。凍結保存した試料のほうが酵素活性が高いという結果は、凍結によりブドウ果実組織内に氷晶が形成され、細胞膜や壁が破壊されたためにブドウ果実からポリフェノールオキシダーゼが細胞外に抽出されやすくなったためと考えられる^{5,6)}。

ポリフェノールオキシダーゼの電気泳動パターンにおよぼすブドウ果実保存温度の影響 4°C および

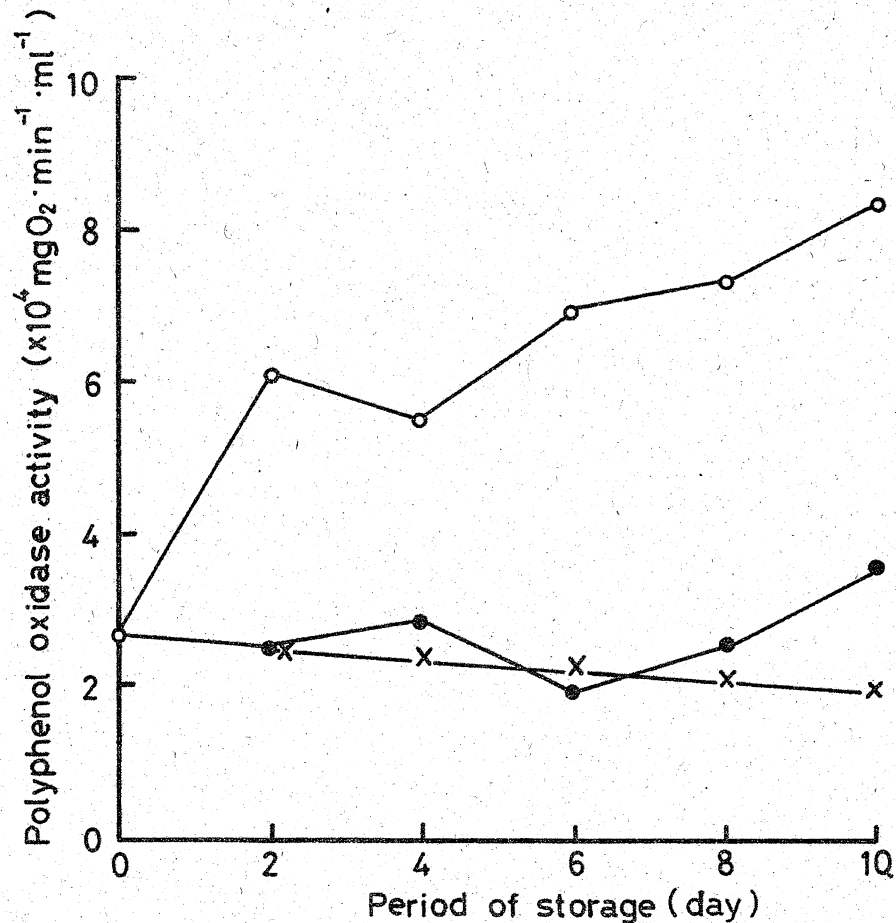


Fig. 1. Changes in polyphenol oxidase activity of Koshu grape berries stored with three different temperatures. Storage temperature, ○: -20°C , ●: 4°C , ×: 25°C .

-20°C にそれぞれ保存したブドウ果実からアセトンパウダーを作製した。アセトンパウダー 1 g に 0.05 M リン酸緩衝液 (1.0 M KCl を含む, pH 7.0) 30 ml を加え, 4°C で振とう抽出した後, 0.1 M リン酸緩衝液 (7.0) で透析して粗酵素液を得た。凍結ブドウ果実 (-20°C) から作製した粗酵素溶液の比活性は, 4°C から調製したものに比較して約 2 倍であった。このことより, ホモジネート搾汁液と同様にアセトンパウダーを作製してこれより粗酵素液を抽出する場合にも, 果実の凍結処理によって試料酵素液の比活性を増大させる効果があることがわかった。

次に, 2 種類の粗酵素をポリアクリルアミドゲルスラブディスク電気泳動にかけ, 泳動後, ゲルをカタコールを基質として活性染色した。その泳動パターンを Fig. 2 に示した。-20°C の場合は R_m (泳動度) 値が 0.28, 0.38 の 2 本のピークが認められた。一方, 4°C の場合は $R_m=0.29, 0.37, 0.43, 0.77$ の 4 本にピークがあり, 果実の保存温度によってアイソザイムの数が増えることがわかった。

要 旨

甲州種ブドウを 3 種類の温度で貯蔵したとき, それぞれの貯蔵果実より調製した果汁のポリフェノールオキシダーゼ活性およびこの酵素のアイソザイムパターンが貯蔵温度により, どのような影響をうけるか検討した。試料のブドウは収穫後, ブドウ房を 3 つに区分けし, 各温度 (-20°C, 4°C, 25°C) で 10 日間貯蔵し, その間, 適宜分析した。ブドウ果実をホモジナイズしナイロン布で搾汁した試料をホモジネートとして酵素活性を測定した。-20°C で保存したブドウからのホモジネートの活性は, 4°C の場合の約 2 倍であった。4°C で保存している期間中, 酵素活性は殆ど変化しなかった。25°C 保存の場合は活性が徐々に減少した。-20°C と 4°C に貯蔵したブドウより作製したアセトンパウダーから粗酵素を抽出し, ポリフェノールオキシダーゼ活性を測定したところ, -20°C で保存した場合の粗酵素の比活性は, 4°C の場合の約 2 倍であった。この粗酵素液をポリアクリルアミドスラブゲルディスク電気泳動にかけたところ, ポリフェノールオキシダーゼ活性を示すバンドの数は, -20°C のほうが 4°C の場合よりも少なかった。

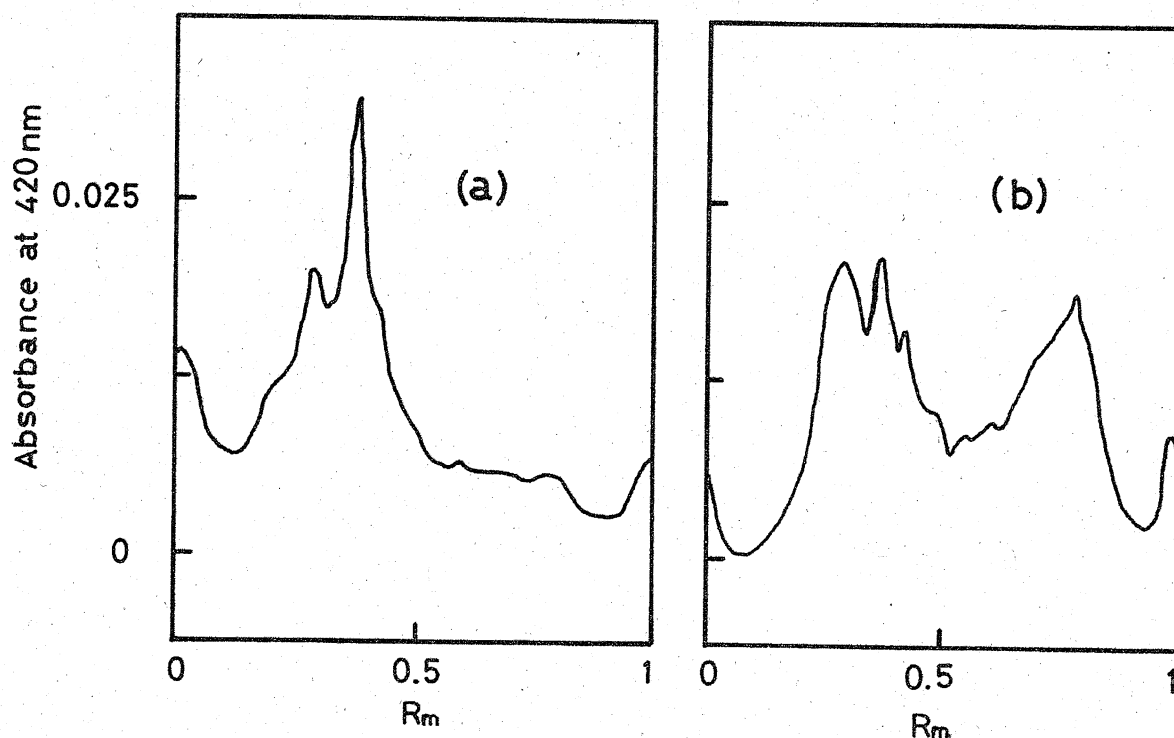


Fig. 2. Effect of storage temperature on the densitometric trace patterns. Polyacrylamide gels were used for the development of polyphenol oxidase from Koshu grapes stored at the temperatures, -20°C (a) or 4°C (b).

文 献

- 1) 竹尾：植物酵素・蛋白質研究法, p.261, 共立出版 (1970).
- 2) Cash, J. N., Sistrunk, W. A., Stutte, C. A. : *J. Food Sci.*, **41**, 1398 (1976).
- 3) Harel, E., Mayer, A. M. : *Phytochemistry*, **10**, 17 (1971).
- 4) 小倉, 鎌田, 佐藤, 中川：千葉大学園芸学部学術研究報告, **32**, 45 (1983).
- 5) 三井, 満田, 秦：農芸化学実験書, p.600, 産業図書 (1981).
- 6) 西沢, 志村：新・入門酵素化学, p.6, 南江堂 (1984).

(1985. 8. 31受理)