

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 31, 9~13 1996]

ブドウ果実成熟中の可溶性多糖の変化

高柳 勉、奥田 徹、横塚弘毅
(山梨大学工学部附属発酵化学研究施設)

Changes in Soluble Polysaccharides in Grapes During Development

TSUTOMU TAKAYANAGI, TOHRU OKUDA and KOKI YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan

Abstract

Soluble polysaccharide fractions were isolated from the skin and flesh of Semillon grapes during development and the sugar composition and molecular weight of the fractions were determined. The soluble polysaccharide fraction in the flesh increased from that at véraison, whereas that in the skin decreased during development. Gel-filtration analysis of the flesh fraction showed two peaks (43kDa and 114kDa), whereas that of the skin showed only one peak (43kDa). The main components of the flesh fraction were galacturonic acid, galactose and arabinose. The proportion of galacturonic acid to the total sugars in grapes increased remarkably after the véraison stage. The results suggest that grape berries become softer after the véraison stage due to solubilization of acidic pectin contained in the cell wall of the flesh.

緒 論

植物の細胞壁はセルロース・マイクロフィブリルとヘミセルロースの架橋による網目構造、ペクチンにより作られる網目構造そしてタンパク質などが複雑にからみあって形成されている^(1, 2)。成熟期の果実に見られる果実組織の軟化(硬度の低下)を引き起こす原因の一つは、果実細胞の細胞壁の崩壊と可溶化であると考えられており、果実の成熟にともなう多糖分解酵素の発現や細胞壁多糖の可溶化に関して、活発に研究が進められている。

ブドウ果実においても細胞壁を構成する多糖類はセルロース、ヘミセルロースそしてペクチンであると考えられている。成熟の進んだブドウ果実におけるこれら多糖類の構造に関する報告は幾つかあるものの^(3, 4, 5)、これら多糖類が果実の生長と成熟に

ともなっていて、どのように変化しているのかについては明らかになっていない。この細胞壁多糖類の変化は、成熟期のブドウ果実の軟化現象、ひいては成熟機構そのものと深く関わっているものと推測される。

本研究では、成熟期のセミヨンブドウ果実から可溶性多糖を分離し、その量、糖組成、分子量などを分析した。これらの分析により、果実に可溶性多糖が現れる時期そして果実の成熟期にその形態がどのように変化するかを検討し、ブドウ果実における細胞壁多糖の可溶化の特徴を明らかにした。

実験材料および方法

1. ブドウ試料

山梨大学発酵化学研究施設育種試験地において収

穫されたセミヨンプドウ果実を使用した。同一の試験樹から日照条件の近い100房を選択し、マーキングを行った。セミヨン果実は開花日から10日おきに、各房から、1〜3粒ずつ、合計200粒を採取した。採取果実の重量および硬度（果実硬度計、木屋製作所）を測定後、果実を液体窒素で凍結し、乳鉢を用いて粉末化した後に -80°C で保存した。

2. 可溶性多糖の抽出

果実の凍結粉末10gに、95%エタノール50gを加え、10分間煮沸後、ホモジナイズした（15,000 rpm、3分間）。この溶液を遠心分離して（27,000 g、10分間）得た沈殿に80%エタノールを20ml加えて5分間攪拌し、遠心分離（27,000×g、10分間）により沈殿を回収した。80%エタノールによるこの洗浄操作を3回行った沈殿に水20mlを加え、ホモジナイズし（15,000rpm、3分間）、遠心分離（27,000g、10分間）により上清と沈殿に分離した。水によるこの抽出操作を5回行い、得られた5回分の上清を集め、脱イオン水に対して 4°C で2日間透析した。透析内液を凍結乾燥し、可溶性多糖の抽出粉末を得た。

抽出粉末の中性糖量および酸性糖量は、それぞれフェノール-硫酸法⁽⁶⁾とカルバゾール-硫酸法⁽⁷⁾により測定した。

3. HPLCによる分子量の測定

ウルトラハイドロゲル250カラム（ $4\times 250\text{mm}$ 、Waters）を用いたHPLCにより可溶性多糖を分析した。溶出溶媒として0.2M NaClを用い（流速0.3 ml/min）、分離した多糖成分を示差屈折計（日立L-3300）により検出した。各ピークの分子量は、ポリエチレングリコール（分子量400、1,000、4,000、20,000、70,000、和光純薬）を標準物質として算出した。

4. 糖組成分析

可溶性多糖試料1mgを蓋付き試験管に取り、90%ギ酸1mlを加え、ヘッドスペースを窒素ガスで置換後に密閉した。この試験管を 100°C 、1時間加熱した。加熱後の液にメタノール2mlを加え、ロータリーエバポレータで減圧乾固した。これに2.5M TFAを1ml加え、よく混合させた後にヘッドスペースを窒素ガスで置換して密閉した。この試験管を 120°C 、1.25時間加熱した。加熱後の液にメタノール2mlを加えて減圧乾固した。さらに、メタノール0.5mlを加えて減圧乾固した。この操作を3回繰り返す、TFAを完全に除去した。この乾固物を蒸留水0.5mlに溶かし、マイクロチューブに移した後に遠心エバポレータで減圧乾固した。乾固物を蒸留水50 μl に溶解し、0.45 μm のメンブレンフィ

ルターで濾過し、HPLC分析の試料とした。

HPLCによる糖分析はCarboPac PA1（ $\phi 4\times 250\text{mm}$ ）カラムを用いて行った。溶出溶媒として0.01M NaOH（流速0.8ml/min）を用い、溶出された糖は、溶出液に0.5M NaOHを添加し（流速0.4ml/min）、Programmable Electrochemical Detector（HEWLETT PACKARD1049A）を用いたPulsed amperometric法⁽⁸⁾により検出した。標準糖（フコース、ラムノース、アラビノース、グルコサミン、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノース）の溶出時間と面積からピークの同定と定量を行った。

実験結果

セミヨンプドウの平均開花日は1995年6月12日であった。ブドウ果実の生長を3つのステージ、すなわち、著しい生長の見られる第1ステージ、生長速度が一時的に遅くなる第2ステージ（lag phase）、果実の軟化、糖や色素の蓄積などの変化が起こる第3ステージに分けるCoombeらの区分にもとづく^(9,10)、セミヨンプドウの第1ステージは開花から50日後まで、第2ステージは開花後50〜60日、第3ステージは開花後60日以降と考えられる（Fig. 1.）。第3ステージの始まる開花後60日に果実はベレゾンに達し、 $^{\circ}\text{Brix}$ の急激な増加が始まった（Fig. 2.）。 $^{\circ}\text{Brix}$ の増加と同時に、果実の硬度も急

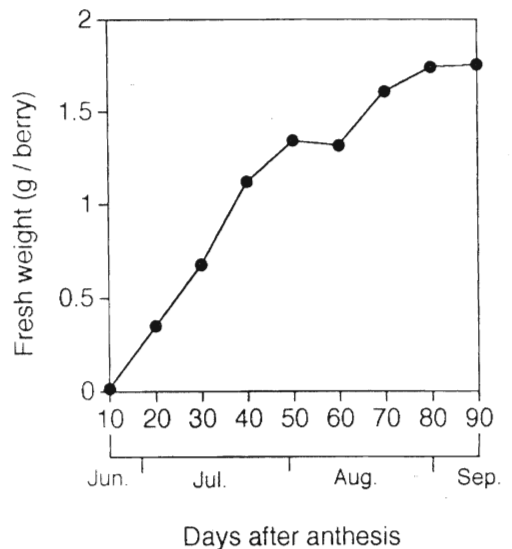


Fig. 1. Change in fresh weight of Semillon grape berries of during development ($\bar{x}=200$).

激に減少し、開花後70日で果実の破断圧力は測定限界に近い0.058kg重/cm²を示した (Fig.2.)。

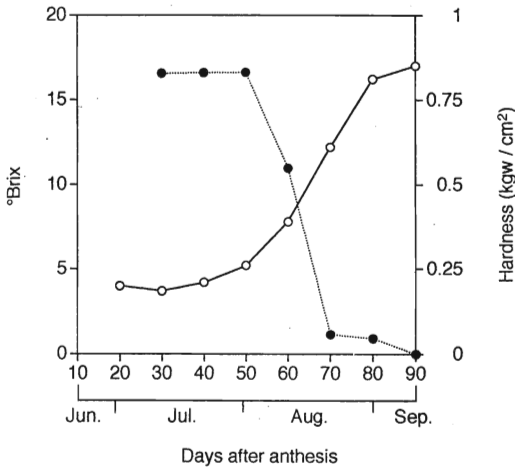


Fig. 2. Change in °Brix and hardness of Semillon grapes during development.

果肉の生重量あたりの可溶性多糖量は、中性および酸性可溶性多糖ともに、果実の重量増加の著しい第1ステージ (開花後10~50日) において、ほぼ一定の値を示したが、ベレゾーン (開花後60日) 以後急激に増加した (Fig.3.)。中性可溶性多糖と酸性可溶性多糖の量を比べると、第1ステージにおいて中性可溶性多糖の方が多いのに対して、ベレゾーン以降は酸性可溶性多糖量の増加が著しく、開花後80

日の最大値と比較すると、酸性可溶性多糖量は中性可溶性多糖量の1.85倍であった。

果皮の中性および酸性可溶性多糖量は、開花後50日に最大値を示した後に、開花後60日に急激に減少し、それ以後徐々に低下した。中性可溶性多糖と酸性可溶性多糖の量を比較すると、常に中性可溶性多糖の方が大きな値を示した。

果皮および果肉の可溶性多糖画分をゲル濾過カラムを用いたHPLCにより分析したところ、果皮で1つ、果肉で2つの多糖に由来するピークが得られた。ポリエチレングリコールを分子量標準として求めたこれらピークの分子量は、果皮で43kDa、果肉で43kDaと114kDaであった。果皮における43kDaピークと果肉における43kDaおよび114kDaピークは、測定したすべての採取日において存在し、その他の多糖由来のピークは検出されなかった。果肉におけるベレゾーン以後 (開花後60日以後) の可溶性多糖の急激な増加は、主に43kDaのピークの増加に由来していた (Fig.4.)。

果皮および果肉の可溶性多糖画分の糖組成比の変化をFig.5.に示した。果肉の可溶性多糖において最も含有比の高いのはガラクトuron酸で、ベレゾーン以後 (開花後60日以後) 急激に増加し、開花後90日に67.7%に達した。次に含有比の高いガラクトースそしてアラビノースは開花後10日から徐々に減少した。グルコースは、開花後10日から増加し、開花後50日に最大値 (22.3%) を示し、その後、減少した。その他のラムノース、キシロース、マンノー

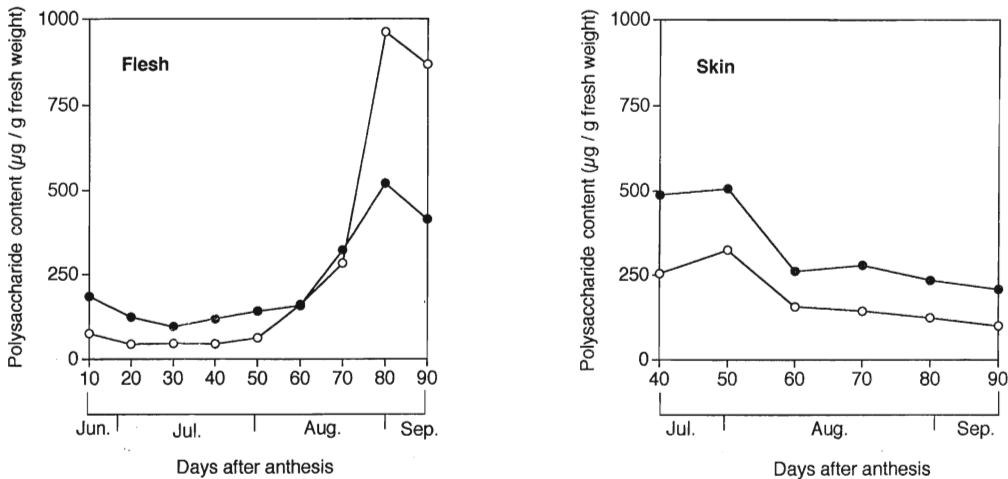


Fig. 3. Changes in polysaccharide content in flesh and skin of Semillon grapes during development.

Symbols: ●, neutral polysaccharide; ○, acidic polysaccharide.

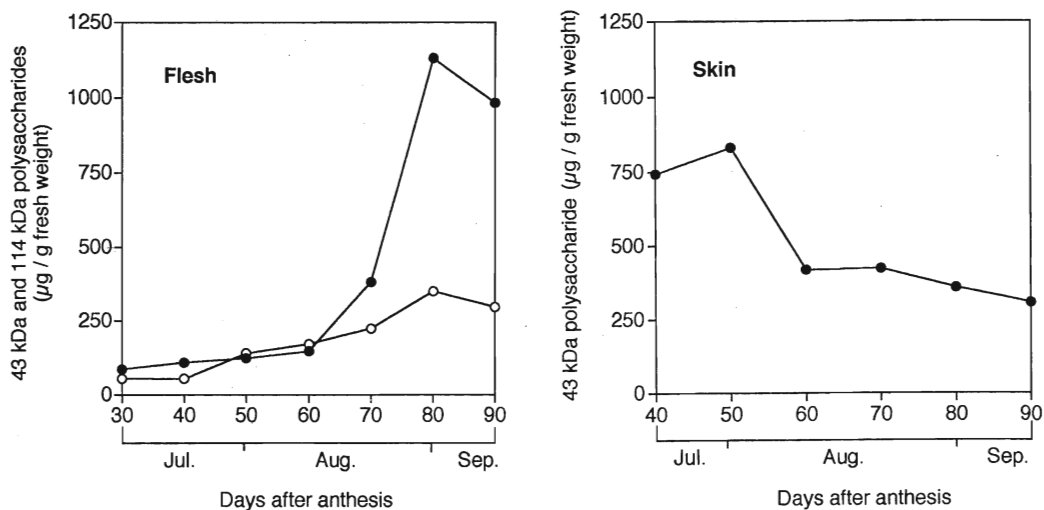


Fig. 4. Changes in 43kDa and 114kDa polysaccharides in flesh and skin of Semillon grapes during development.

Symbols: ●, 43kDa polysaccharide; ○, 114kDa polysaccharide.

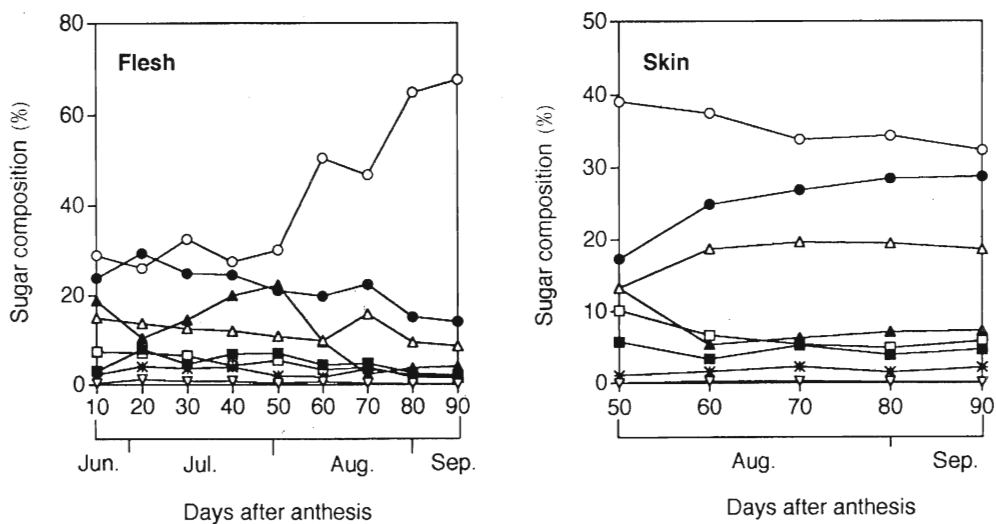


Fig. 5. Sugar composition of polysaccharides in flesh and skin of Semillon grapes during development.

Symbols: ○, galacturonic acid; ●, galactose; △, arabinose; ▲, glucose; □, mannose; ■, xylose; *, rhamnose; ▽, fucose.

ス、フコースの含有比は低く、採取した期間を通して、ほぼ一定であった。果皮の可溶性多糖画分で最も含有比が高かったのは果肉と同様に、ガラクトロン酸であった。ただし、果皮の場合には、開花後10日に最大値(39.1%)を示し、それ以後減少した。次に含有比の高いのは、ガラクトースそしてアラビノースであり、この順番は果肉と同様であったが、果皮のガラクトースとアラビノースは開花50日から70日にかけて増加した。

考 察

セミヨンブドウ果実において、ベレゾーン(開花後60日)以降に可溶性多糖量の急激な増加が始まった。ただし、可溶性多糖の増加は果肉においてのみ顕著に見られ、果皮では、ベレゾーン期にむしろ減少している。成熟の進んだブドウ果実の主な多糖として、ポリガラクトロン酸を主鎖とする酸性ペクチン⁽³⁾とアラビノガラクトン^(4, 5)が報告されている。開花後80日の果肉には酸性可溶性多糖が中性可溶性多糖の1.85倍含まれていた。糖組成分析の結果、この時期のガラクトロン酸の含有率は60%を越えており、酸性可溶性多糖の主体は酸性ペクチンであると考えられる。そして、次に含有率の高い糖成分のガラクトースとアラビノースはアラビノガラクトンの主成分であることから、この時期の主な中性可溶性多糖はアラビノガラクトンであると考えられる。

果皮においては、中性可溶性多糖の方が酸性可溶性多糖量よりも常に多く、ガラクトースとアラビノースの含有率も果肉に比べて高かった。このことは果肉に比べて、果皮のアラビノガラクトン含量が多いことを示唆している。果皮および果肉の両方において、主要な可溶性多糖の分子量は43kDaで、酸性ペクチンとアラビノガラクトンの両方がこの分子量に属すると考えられる。

ベレゾーン以降の果実において、果肉部分では様々な糖分解酵素による細胞壁の可溶化が起こっていると考えられる。そのなかで最も量的に多いのが酸性ペクチンの可溶化である。それに対して、果皮ではベレゾーン以後も糖の能動的な取り込みが行わ

れ、生理的にアクティブであり、細胞壁多糖の可溶化や、それに付随した細胞構造の崩壊⁽¹¹⁾が見られないものと推測される。

ペクチンと同様にセルロースも細胞壁を構成する主要な多糖である。セルロースが可溶化するならばその主成分であるグルコースが可溶性多糖の成分として検出されるはずである。しかし、ベレゾーン以降のグルコースの含有比は小さく、そして減少していた。このことから、成熟期の果肉組織のセルロースの可溶化のレベルは小さく、果実内の細胞間における接着と硬度保持が、主にペクチンによって行われていることが推測される。

引用文献

- (1) G.P.Bolwell, *Int. Rev. Cytol.* 146, 261-324 (1993).
- (2) J.E.Varner and L.-S.Lin, *Cell*, 56, 231-239 (1989).
- (3) L.Saulnier and J.-F.Thibault, *Carbohydr. Polym.*, 7, 329-343 (1987).
- (4) L.Saulnier and J.-M.Brillouet, *Carbohydr. Res.*, 182, 137-144 (1989).
- (5) L.Saulnier and J.-M.Brillouet, *Carbohydr. Res.*, 188, 137-144 (1989).
- (6) M.Dubois, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, and F.Smith, *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956).
- (7) T.Bitter and R.Ewines, *Biochem. J.*, 81, 43 (1961).
- (8) M.R.Hardy, R.R.Townsend, and Y.C.Lee, *Anal. Biochem.*, 170, 54-62 (1988).
- (9) B.G.Coombe and C.R.Hoale, *Plant Physiol.*, 51, 629-634 (1973).
- (10) A.K.Kanellis and K.A.Roubelakis-Angelakis, in "Biochemistry of Fruit Ripening" ed. by G.B.Seymour et al, Chapman & Hall, London, 1993, pp.189-254.
- (11) A.Lang and H.During, *Physiol. Plant.*, 82, 191-196 (1991).