

リンゴ7品種の果実の生育中における細胞壁多糖の構造変化

Changes in the Structure of Cell Wall Polysaccharides during Fruit Growth of Seven Apple Cultivars

加藤 陽治*・齋藤 幸子**・佐藤あつ子***

Yoji KATO*, Sachiko SAITO**, Atsuko SATO***

荒川 修****・元村 佳恵****

Osamu ARAKAWA**** and Yoshie MOTOMURA ****

論文要旨

弘前大学農学生命科学部附属藤崎農場において栽培したリンゴ7品種，“ふじ”，“王林”，“国光”，“陸奥”，“スターキング・デリシャス（SKD）”，“紅玉”および“金星”を用い，生育過程（1994年8月1日，10月7日，11月10日）における果実可食部細胞壁多糖の組成変化を比較した。

いずれの品種においても，壁を構成する多糖に違いはみられないが，ペクチン含量に品種間差がみられた。また，生育過程で，特に“ふじ”，“陸奥”，および“SKD”において，細胞壁のペクチンの可溶性の可能性が示唆された。

キーワード：リンゴ，炭水化物，細胞壁多糖

1. 緒言

リンゴ果実の品質，テクスチャー，保存性などはすべてリンゴ果実の成熟と関わりをもっている。その成熟における組織軟化は細胞壁多糖とそれを分解する酵素が関与しているといわれている。これまで，リンゴの軟化時における細胞壁の変化として，ペクチン分子の分子量低下を伴わない可溶性，ガラクトース含量の低下，あるいはペクチン側鎖多糖からのガラクトースやアラビノース含量の顕著な低下などが知られている¹⁻⁸⁾。また，これらに関与する酵素の研究も進められている⁹⁻¹⁵⁾。しかし，組織軟化に関してみても品種間で大きな違いがみられ，ある品種では「ボケ」と呼ばれる粉質化が著しく進む。軟化機構解明に関しては未だ不明な点が多い。

そこで，今回はまず，同一場所で，同時期に栽培されたリンゴ7品種の生育期間中における果実細胞壁多糖の変化について把握することを目的と

した。

2. 実験方法

1) 材料

弘前市の弘前大学農学生命科学部附属藤崎農場で栽培しているリンゴ品種“ふじ”，“王林”，“国光”，“陸奥”，“スターキング・デリシャス（SKD）”，“紅玉”および“金星”の7品種を用いた。各品種果実を1994年8月1日，10月7日，11月10日にそれぞれ収穫した。

各品種の収穫果可食部を果実の4倍量のメタノールとともにミキサーにより磨砕し，磨砕物を東洋濾紙No. 2で濾過した。不溶物残渣は80%メタノールとともにミキサーで磨砕，濾過操作を3回繰り返した。最終残渣はアセトン洗浄後，風乾し，“アルコール不溶性画分”とした。アルコール抽出画分（濾液）はアセトン洗液も含め濃縮乾固して“アルコール可溶性画分”とした。

*弘前大学教育学部家政学科教室

Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

****弘前大学農学生命科学部

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

**現在 木造地域農業改良普及センター

***現在 弘前大学教育学部附属小学校

2) アルコール可溶性画分

アルコール可溶性画分は減圧下濃縮乾固した。これを水に溶解し、遠心操作 (3,000 rpm, 30分) で不溶物を除き、上清中の糖量をフェノール・硫酸法¹⁶⁾にて測定し、「単糖・オリゴ糖画分」とした。この画分の糖分析はイオンクロマトグラフDX-300 (日本ダイオネクス社) を用いて前報¹⁷⁾にならって行った。

3) アルコール不溶性画分の分画

アルコール不溶性画分 (50 mg) を10ml容栓付き遠心管に入れ、20 mMの酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 10 mlに懸濁し、沸騰湯浴中で10分間加熱処理した。室温まで冷却後、イソアミラーゼ (118単位) (*Pseudomonas*, 59,000単位/ml, 生化学工業) とグルコアミラーゼ (7単位) (*Rhizopus niveus*, 35単位/mg, 生化学工業) を加え、表面を数滴のトルエンで覆い40°Cで24時間反応させた。反応後、遠心操作 (3,000 rpm, 30分) により上清画分と沈殿画分に分けた。沈殿画分は水で洗浄後、凍結乾燥し「水不溶性画分」とした。遠心上清は沈殿洗液と一緒に濃縮乾固後水 (1.0 ml) に溶解、あらかじめ蒸留水で平衡化しておいたBio-Gel P-2のガラスカラム (4.5×22cm) にのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は2.0 mlずつフラクションコレクターで集め、そのなかから適量とりフェノール・硫酸法¹⁶⁾にて糖量を測定した。カラムのボイドボリューム (試験管番号15~20) に溶出した糖を「水可溶性多糖画分」とした。単糖溶出位置 (試験管番号40~50) に溶出した糖量をもって「デンプン」量とした¹⁸⁾。

4) 水不溶性画分の構成糖量

水不溶性画分5.0 mgを10 ml容栓付き試験管にとり72% 硫酸 (0.2 ml) に懸濁し、ソニックバス中で1時間処理し溶解した。その後、硫酸濃度が1.5 Mになるように蒸留水1.6 mlで希釈し、100°Cで2時間加水分解した。遠心操作 (3,000 rpm, 30分) により不溶物を除去した。遠心上清の一部をとり、フェノール・硫酸法¹⁶⁾にて全糖量 (グルコース相当量として)、カルバゾール・硫酸法¹⁹⁾にて酸性糖量を求めた。

中性糖量: 遠心上清の一部をとり炭酸バリウムで中和後、2-デオキシグルコースを加え、よく攪拌し濾過した。濾液をAmberlite IR-120 (H⁺型) で処理し減圧乾固した。得られた加水分解物中の

構成中性単糖はアルジトールトリフルオロアセテートとした後、ガスクロマトグラフィーにて定量した。ガスクロマトグラフは日立製のG-500を用い、カラムは1.5% QF-1/Chromosorb W (AW-DMCS) (0.4×200 cm, ガラスカラム) を用い140°Cの定温で分析した²⁰⁾。

酸性糖量: 遠心上清の一部をとりカルバゾール・硫酸法にてガラクトロン酸相当量として求めた。但し、本法では中性糖も発色するのであらかじめその影響を調べておき、上記中性糖量からその影響を算出、カルバゾール・硫酸法で求めた値から差し引き [真の酸性糖量 = カルバゾール・硫酸法にて求めた酸性糖量 - (ガスクロマトグラフィー法で求めた中性糖量 × 0.23)], それを酸性糖量とした。

3. 結果および考察

リンゴ果実の可食部をアルコール可溶性画分とアルコール不溶性画分に分けた。(図1)。表1に、実験に用いた各品種の各生育時期における果実重量、可食部重量、80%アルコール不溶性画分の重量、およびアルコール不溶性画分の可食部重量に対する割合を示した。アルコール不溶性画分の可食部重量に対する割合は2~4%程度であった。アルコール不溶性画分は、さらにデンプン画分、水可溶性多糖画分および水不溶性多糖画分に分けた(図1)。各品種の各時期におけるそれぞれの全糖量をフェノール・硫酸法にてグルコース相当量として求め、まとめたのが表2である。いずれの品種でも、また、生育期間でも主要炭水化合物は単糖・オリゴ糖で約77~91%を占めていた。単糖・オリゴ糖の組成を陰イオンクロマトグラフィーで調べると、主に、ソルビトール、グルコースおよびフラクトースからなっていた。

アルコール不溶性でかつ水不溶性画分の酸性糖と中性糖をそれぞれカルバゾール・硫酸法とフェノール・硫酸法で調べてその比率を求めたのが表3である。“ふじ”、“国光”、“陸奥”および“スターキング・デリシャス (SKD)”の品種において、生育中に細胞壁の酸性糖すなわちガラクトロン酸の減少が示唆された。そこで、水不溶性画分に含まれる多糖の構成糖を調べ、その結果をまとめたのが表4である。“ふじ”、“陸奥”および“スターキング・デリシャス (SKD)”の品種において、ガラクトロン酸の減少が確認された。

これまで、KneeとBartley¹⁻⁴⁾は、成熟中のリン

図1 リンゴ果実可食部炭水化物の分画

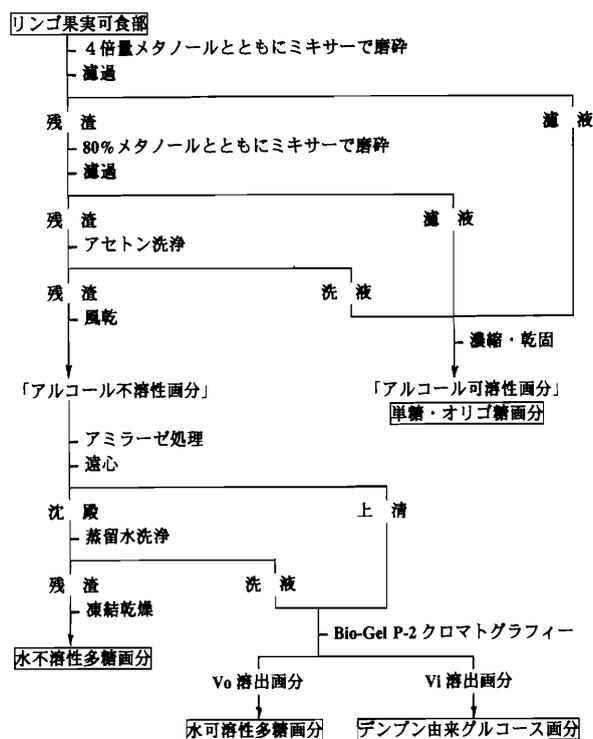


表1 リンゴ果実の総重量に対する可食部の割合および可食部に対するアルコール不溶性画分の割合

品 種	生 育 時 期**	総 量 (A)(g)	可食部 (B)(g)	80% メタノール 不溶性画分(C)(g)	(B)/(A) (%)	(C)/(B) (g/100g)
ふ じ	I	516.5	372.3	11.765	72.1	3.160
	II	460.6	350.0	9.724	76.0	2.779
	III	721.3	589.7	13.136	81.8	2.228
王 林	I	513.9	390.3	11.101	75.9	2.844
	II	505.1	387.0	13.397	76.6	3.462
	III	512.3	340.0	13.267	66.4	3.320
国 光	I	437.5	300.0	10.900	68.6	3.633
	II	345.3	271.8	10.785	78.7	3.969
	III	461.6	371.8	11.136	80.5	2.995
陸 奥	I	621.9	495.2	14.420	79.6	2.912
	II	431.2	351.6	11.559	81.5	3.287
	III	516.8	427.7	11.483	82.8	2.685
SKD*	I	461.6	331.8	8.920	71.9	2.689
	II	421.8	333.4	8.755	79.0	2.626
	III	466.9	356.0	7.767	76.2	2.182
紅 玉	I	549.7	408.5	10.950	74.3	2.681
	II	410.9	314.2	7.960	76.5	2.533
金 星	I	438.4	302.3	8.457	69.0	2.798
	II	401.0	315.8	9.558	78.8	3.027

* スターキングデリシャス

** I, IIおよびIIIは, それぞれ8月1日, 10月7日および11月10日に採集した試料。

表2 リンゴ果実の生育に伴う可食部の炭水化物組成の変化
(mgグルコース相当量/100g可食部生重量)

品 種	生育 時期**	単 糖 及び オリゴ糖	デンプン	非デンプン性多糖類		合 計
				水可溶性	水不溶性	
ふ じ	I	7,268	36	145	1,809	9,258
	II	7,395	224	139	1,173	8,931
	III	8,218	53	119	831	9,221
王 林	I	10,958	57	251	1,908	13,147
	II	6,918	471	221	1,224	8,834
	III	9,196	175	83	1,123	10,577
国 光	I	14,957	28	161	2,477	17,623
	II	7,801	458	281	1,582	10,122
	III	6,266	71	114	1,215	7,666
陸 奥	I	11,095	32	137	1,883	13,147
	II	6,855	430	240	1,324	8,849
	III	7,507	69	87	884	8,547
SKD*	I	7,493	51	133	1,505	9,182
	II	8,412	325	155	934	9,826
	III	8,422	123	103	647	9,295
紅 玉	I	9,018	32	123	1,470	10,643
	II	7,411	28	76	1,124	
金 星	I	8,463	45	139	2,144	10,791
	II	7,137	233	260	972	8,602

* スターキングデリシャス

** I, IIおよびIIIは, それぞれ8月1日, 10月7日および11月10日に採集した試料。

表3 リンゴ果実水不溶性画分の酸性糖量と中性糖量の割合

品 種	生 育 時 期**	酸性糖量 /中性糖量	品 種	生 育 時 期**	酸性糖量 /中性糖量
ふ じ	I	25.2 : 74.8	SKD*	I	27.5 : 72.5
	II	21.8 : 78.2		II	23.7 : 76.3
	III	19.6 : 80.4		III	20.2 : 79.8
王 林	I	18.2 : 81.8	紅 玉	I	24.9 : 75.1
	II	24.5 : 75.5		II	23.6 : 76.4
	III	21.4 : 78.6			
国 光	I	24.5 : 75.5	金 星	I	26.2 : 73.8
	II	21.3 : 78.7		II	25.9 : 74.1
	III	20.9 : 79.1			
陸 奥	I	26.2 : 73.8			
	II	22.0 : 78.0			
	III	21.8 : 78.2			

* スターキングデリシャス

** I, IIおよびIIIは, それぞれ8月1日, 10月7日および11月10日に採集した試料。

表4 リンゴ果実の生育に伴う可食部の水不溶性多糖構成糖組成の変化

品 種	生育 時期**	糖 組 成 (重量%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
ふ じ	I	13.9	2.0	1.0	17.1	6.6	4.9	39.0	15.4
	II	16.0	1.8	1.1	14.7	7.4	3.2	42.5	13.3
	III	9.7	2.3	1.2	17.2	8.3	2.9	47.6	10.7
王 林	I	4.6	1.3	1.4	16.7	12.5	3.1	38.1	22.3
	II	9.4	1.5	1.4	15.5	9.0	3.3	38.9	20.8
	III	9.5	1.9	1.7	15.4	8.0	3.2	37.8	22.4
国 光	I	8.4	1.5	1.2	18.8	7.7	4.4	39.3	18.7
	II	4.1	1.1	1.1	19.7	4.0	2.9	39.8	27.4
	III	6.4	2.0	1.3	20.9	2.8	3.9	41.9	20.9
陸 奥	I	22.8	1.0	1.2	20.0	7.6	2.9	27.2	17.5
	II	16.9	1.6	1.6	20.6	7.6	3.1	29.8	18.8
	III	15.4	1.7	1.4	20.6	6.6	3.3	33.5	17.5
SKD*	I	21.5	1.4	0.9	16.0	7.1	4.1	31.3	17.7
	II	19.6	1.5	1.6	16.9	8.9	3.0	35.7	12.8
	III	5.5	2.6	2.2	15.4	7.0	3.1	48.1	16.0
紅 玉	I	16.4	1.7	1.5	21.1	7.1	5.2	30.5	16.6
	II	17.6	1.8	1.8	16.4	8.4	4.7	33.3	16.1
金 星	I	16.8	1.5	1.8	15.1	10.6	4.1	34.2	15.8
	II	19.3	1.4	1.6	14.4	10.9	3.8	33.0	15.5

* スターキングデリシャス

** I, IIおよびIIIは, それぞれ8月1日, 10月7日および11月10日に採集した試料。

ゴ, 特に収穫後の貯蔵中における細胞壁の変化について検討し, 顕著な量のガラクトース残基の消失, およびラムノガラクトン (ペクチン) の可溶性画分への出現を見いだしている。さらに, FisherとAmado⁷⁻⁸⁾は“ゴールドデリシャス”を用いた実験で, アルコール不溶性画分のペクチンのガラクトース残基に減少がみられ, アルコール不溶性画分のガラクトン酸の変化は僅かであると報告している。

今回のわれわれの実験結果において, 生育期間中のリンゴ7品種において, アラビノースやガラクトースの顕著な量の消失はみられなかった。しかし, “ふじ”, “陸奥” および “SKD” において, ペクチンに由来すると思われるガラクトン酸の消失がみられた。このことは, 生育中でのペクチン分子の修飾, あるいは生合成メカニズムに品種間で時期的な違いがあることが考えられる。

一般に果実の軟化の際に, ペクチン分子の分解はendo-ポリガラクトナーゼおよびペクチンメチルエステラーゼの増加と深く関係していることが知られている²¹⁾。しかし, ストロベリー²²⁾やマスクメロン²³⁾, あるいはバナナ²⁴⁾においてはendo-ポリガラクトナーゼ活性は見いだされていないが, これらの果実は軟化する。リンゴでは, exo-ポリガラクトナーゼの存在が知られている¹¹⁾。また, 最近endo-ポリガラクトナーゼも見いだされている¹⁴⁾。

われわれは, アルコール不溶性多糖を水可溶性および水不溶性に分け, 不溶性画分のみ構成糖分析を行ったが, 今後, 水可溶性画分の構成糖分析を行うとともに, 細胞壁ペクチン分子全体の变化の詳細な検討が必要であると思われる。

引用文献

- 1) Knee, M.: Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*, **12**, 1543-1549 (1973)
- 2) Knee, M.: Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochemistry*, **17**, 1261-1264 (1978)
- 3) Bartley, I. M.: Changes in the glucans of ripening apples. *Phytochemistry*, **15**, 625-626 (1976)
- 4) Bartley, I. M. and Knee, M.: The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.*, **9**, 47-58 (1982)
- 5) Yoshikawa, H., Aoba, K. and Kashimura, Y.: Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **117**, 600-606 (1992)
- 6) Yoshikawa, H., Kashimura, Y. and Kaneko, K.: Solubilization and distribution of neutral sugar residues derived from polyuronides during the softening in apple fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **63**, 173-182 (1994)
- 7) Fischer, M. and Amado, R.: Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 1: Analysis of the alcohol-insoluble residue. *Carbohydr. Polym.*, **25**, 161-166 (1994)
- 8) Fischer, M., Arrigoni, E. and Amado, R.: Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydr. Polym.*, **25**, 167-175 (1994)
- 9) Bartley, I. M.: β -Galactosidase activity in ripening apples. *Phytochemistry*, **13**, 2107-2111 (1974)
- 10) Bartley, I. M.: A further study of β -galactosidase activity in apples ripening in store. *J. Exp. Bot.*, **28**, 943-948 (1977)
- 11) Bartley, I. M.: Exo-polygalacturonase of apple. *Phytochemistry*, **17**, 213-216 (1978)
- 12) Wallner, S. J.: Apple fruit β -galactosidase and softening in storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **103**, 364-366 (1978)
- 13) Dick, A. J., Opoku-Gyamfua, A. and DeMarco, A. C.: Glycosidases of apple fruit: A multi-functional β -galactosidase. *Physiol. Plant.*, **80**, 250-256 (1990)
- 14) Wu, Q., Szakacs-Dobozi, M., Hemmat, M. and Hrazdina, G.: Endopolygalacturonases in apple (*Malus domestica*) and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.*, **102**, 219-225 (1993)
- 15) Yoshikawa, H., Kashimura, Y. and Kaneko, K.: β -D-Galactosidase and α -arabinofuranosidase activities during the softening of apples. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **63**, 871-878 (1995)
- 16) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 17) 加藤陽治, 齋藤幸子, 齋藤博敏: リンゴ果実中のデンプン, 弘前大学教育学部教科教育紀要, **25**, 13-21 (1997)
- 18) 加藤陽治, 松倉純子: 主要葉菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要, **71**, 61-71 (1994)
- 19) Bitter, T. and Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962)
- 20) Kato, Y., Ito, S., Iki, K. and Matsuda, K.: Xyloglucan and β -D-glucan in cell walls of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 351-364 (1982)
- 21) Huber, D. J.: The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hort. Rev.*, **5**, 169-219 (1983)
- 22) Huber, D. J.: Strawberry fruit softening: The potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J. Food Sci.*, **49**, 1310-1315 (1984)
- 23) McCollum, G. T., Huber, D. J. and Cantliffe, D. J.: Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiol. Plant.*, **76**, 303-308 (1989)
- 24) Wade, N. L., Kavanagh, E. E., Hockley, D. G. and Brady, C. J.: Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 61-68 (1992)