

# 基質ミニトマトペクチンに対する ミニトマトペクチンエステラーゼ (PE) の作用性

稲荷妙子, 竹内徳男

家政学部家政学科管理栄養士専攻

(2002年9月12日受理)

## Reaction of Cherry Tomato Pectinesterase (PE) to Substrate Cherry Tomato Pectin

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Home Economics,  
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu City, Japan (〒501 - 2592)

INARI Taeko and TAKEUCHI Tokuo

(Received September 12, 2002)

### abstract

A pectinesterase (E.C. 3.1.1.11, PE) activity from cherry tomato was increased by using cherry tomato pectin of the same degree of ripeness as PE as the substrate, especially HCl-soluble pectin (HP). HP was high in methoxyl content in either degree of ripeness. The  $K_m$  value of cherry tomato PE was estimated to be 0.10% for cherry tomato pectin as the substrate.

### 緒言

果実や野菜などの高等植物では、細胞膜や細胞間充填物質の構成成分としてペクチン関連物質が細胞を保護する役目を有し、細胞の結合、組織の支持、保水性を担っている<sup>1)</sup>。

果実のペクチンは、未熟では水不溶性のプロトペクチンであるが果実の発達と共に水溶性ペクチンに分解されると考えられている。現在はペクチン加水分解酵素、特にペクチンエステラーゼ pectinesterase (E.C. 3.1.1.11, pectin pectylhydrolase) とポリガラクトクロナーゼ polygalacturonase (E.C. 3.2.1.15, poly-(1, 4- $\alpha$ -D-galacturonide)-glycanohydrolase) が、主にペクチンの分解並びに果実組織の軟

化に寄与していると考えられているが、しかしその機構はまだ明確にされていない。

トマトは世界中で最も食されている食物の1つであり、トマト果実のペクチン加水分解酵素は果実の軟化との関係について様々研究されている<sup>2-6)</sup>。最近日本ではミニトマト果実の消費が急速に増加してきている。著者らはミニトマト果実のペクチンエステラーゼ(以後、PEと略する)の精製とその理化学的性質について既に報告した<sup>7)</sup>。すなわち、ミニトマトのPE活性は果実の成熟に伴って増加が見られたことから、ペクチン加水分解酵素が果実の軟化に影響を及ぼす重要な要素であると考えられた。併せて、ミニトマトのPE活性が果実の成熟と伴に増加したことは、ミ

ニトマトの未熟果に多く含まれるタンニンが PE 活性を阻害したことから, ミニトマトの成熟に伴って PE 活性が増大する要因には, タンニン量の減少が関与すると考察し, 報告した<sup>8)</sup>。

以上のようにミニトマト中の PE 活性について様々な実験を行い報告してきたが, いずれの実験においても基質としたペクチンは市販のレモンペクチンを用いた。そこで, 今回は実際にミニトマトからペクチンを抽出し, 成熟, 抽出溶媒の異なるペクチンを基質とした時の PE 活性を測定して, 新しい知見を得ようと実験を試みた。

### ・ 実験方法

#### 1. 試料

試料は露地栽培されたミニトマト (ペペ) を未熟果, 緑熟果, 成熟果と成熟別に採取して用いた。分別方法は既報<sup>7)</sup>に従った。

#### 2. ペクチンの抽出

ペクチンは既報<sup>8)</sup>と同様成熟別に水溶性ペクチン (WP), ヘキサメタリン酸可溶性ペクチン (PP), 塩酸可溶性ペクチン (HP) を順次抽出した。なお, ミニトマトペクチンとして量的に些少な水酸化カリウム可溶性ペクチン (KP) は今回の実験から省いた。

#### 3. PE の調製

PE は成熟別にミニトマト果実から既報<sup>7)</sup>に従って抽出した粗酵素液に, 硫酸アンモニウムを40%飽和加えて塩析することにより部分精製酵素液 (pH6.0に調整) を調製した。

#### 4. PE 活性測定法

PE 活性は, 基質としてミニトマトから成熟別, 溶媒別に抽出したペクチン (0.1M NaCl 含有) を用いて測定した。基質以外の条件, 活性単位等は既報<sup>7)</sup>と同様である。

#### 5. ペクチン中のガラクトクロロン酸, メトキシル基含量の定量

既報<sup>8)</sup>と同様に定量した。

#### 6. PE 活性に及ぼすミニトマトペクチン濃度の影響

基質として未熟ミニトマトより分画した未熟 HP を用い, その濃度を変えて, 未熟ミニトマトより抽出した PE 活性を測定し, Lineweaver-Burk のプロットからミカエリス (Km) 定数を求め, ミニトマト PE のミニトマトペクチンとの親和力を調べた。

### ・ 実験結果及び考察

#### 1. ペクチン中のメトキシル基含量

図1に熟度別の WP, PP, HP 画分のメトキシル基含量を示した。いずれの成熟段階でも WP, HP はメトキシル基が7%以上の高メトキシルペクチンであり, PP は低メトキシルペクチンであった。HP は他のペクチン画分に比べて高いメトキシル基含量を示したが, 成熟果の HP ではその含量が減少した。成熟に伴うメトキシル基含量の減少は WP でも認められた。一方, 低メトキシルペクチンであった PP においては成熟過程によって変化しなかった。

#### 2. 抽出画分, 熟度の異なるミニトマトペクチンを基質としたミニトマト PE 活性 成熟別にミニトマトから PE を抽出し, 熟

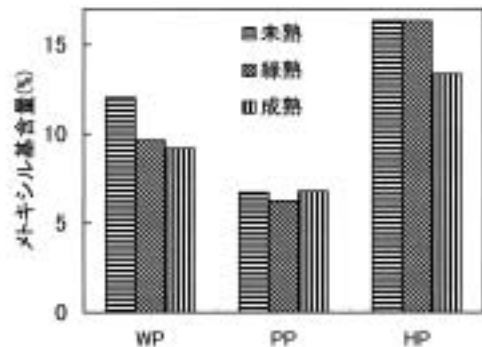


図1 ミニトマトペクチンのメトキシル基含量の変化

度, 画分別ペクチンを基質に用いて PE 活性を測定した結果を図 2 に示した。

図 2 より PE の熟度がいずれの場合も, HP に対する PE 活性は, 基質に WP, PP を用いた場合に比べて高いことが分かった。

特に PE の熟度とペクチンの熟度が同一の時, いずれの熟度においても, HP に対する PE 活性が最も高く, 次いで WP, そして PP に対する PE 活性が極めて低いという傾向が見られた。

また, WP に対する PE 活性はペクチンの熟度がいずれの場合も, 成熟 PE が, 未熟 PE, 緑熟 PE に比べて最も活性が高かった。

PP に対する PE 活性は, WP や HP に対する場合と異なり, 酵素である PE と基質であるペクチンの熟度や, 画分別の種類による活性の差はあまり見られず, いずれも低い。このことはペクチンの構造上 PE が作用しにくいのか, メトキシル基含量が少ないなどの原因が考えられる。図 1 のメトキシル基含量の結果から PP のメトキシル基含量は WP, HP

に比べてどの成熟段階でも低いことが分かった。図 1 と図 2 から PP にはメトキシル基含量が低いため, PE が作用しにくく, PE 活性が低く, その結果メトキシル含量も成熟によってもほとんど変化しないという一連の現象が, 両実験結果から裏付けられる。

次に得られた画分別ペクチンのガラクトシロン酸組成比をもとに算出したペクチン総量 (WP+PP+HP) を基質とした PE 活性 [WP の PE 活性 (U / 100 g) × ガラクトシロン酸組成比 (%) + PP の PE 活性 (U / 100 g) × ガラクトシロン酸組成比 (%) + HP の PE 活性 (U / 100 g) × ガラクトシロン酸組成比 (%) ] の算出結果を図 3 に示した。

図 3 から酵素である PE の熟度がいずれの場合も, PE の熟度と基質であるペクチンが同じ熟度のときの PE 活性は他の熟度のペクチンを基質にしたときに比べて最も高いことが判明した。このことより, 基質の成熟による変化に伴い, ペクチンの構造や酵素の活性中心などが変化する可能性が示唆された。ま

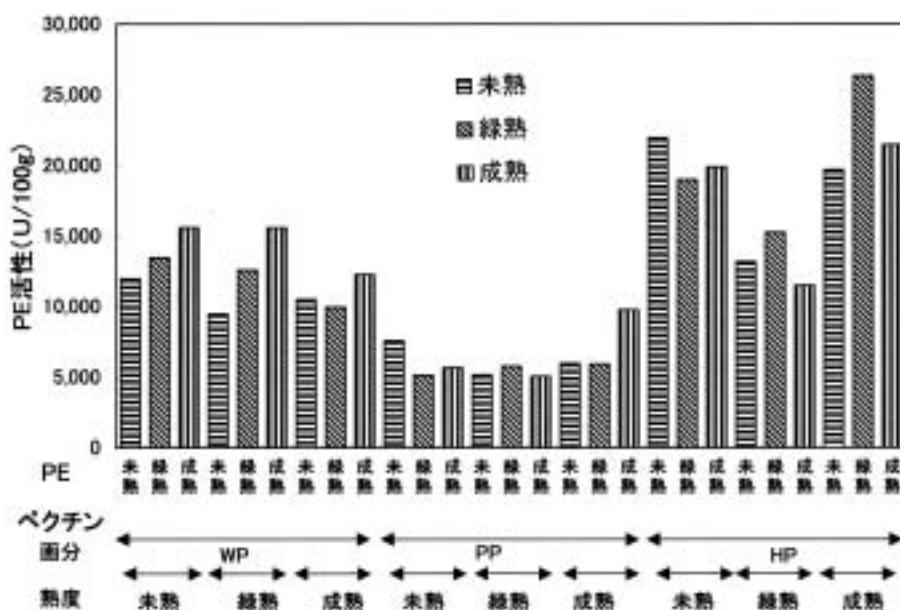


図 2 抽出画分、熟度の異なるミニトマトペクチンを基質としたミニトマト PE 活性

た、得られた画分別ペクチンのガラクチュロン酸組成比をもとに算出したPE活性の50%以上をHPに対するPE活性が占めていることも明白となった。HPのメトキシル基含量の高さとガラクチュロン酸組成比がその要因と考えられる。

3. PE活性に及ぼすミニトマトペクチン濃度の影響

未熟ミニトマトより抽出したPE活性に及ぼす未熟ミニトマトより分画した未熟HP(基質)濃度の影響を調べた。

図4にその活性の変化を示し、図5にはLineweaver-Burkのプロットを示した。その

結果、 $K_m$ 定数は0.1%ペクチンと算出された。

$K_m$ 定数の小さい酵素ほど低い基質濃度に対して高い活性をもつため、効率の良い酵素といえる。すなわち  $K_m$ 定数の小さい酵素は基質に対する親和力が高く、反対に  $K_m$ 定数が大きい酵素は基質に対する親和力が低い。

ミニトマトより抽出したPEの市販レモンペクチンを用いた場合の  $K_m$ 定数は0.48%レモンペクチンであることを以前に報告した<sup>7)</sup>。また、トマトより抽出したPEの市販レモンペクチンを用いた場合の  $K_m$ 定数は0.24%レモンペクチンと報告されている<sup>3)</sup>。未熟ミニトマトより抽出したPEの未熟ミニ

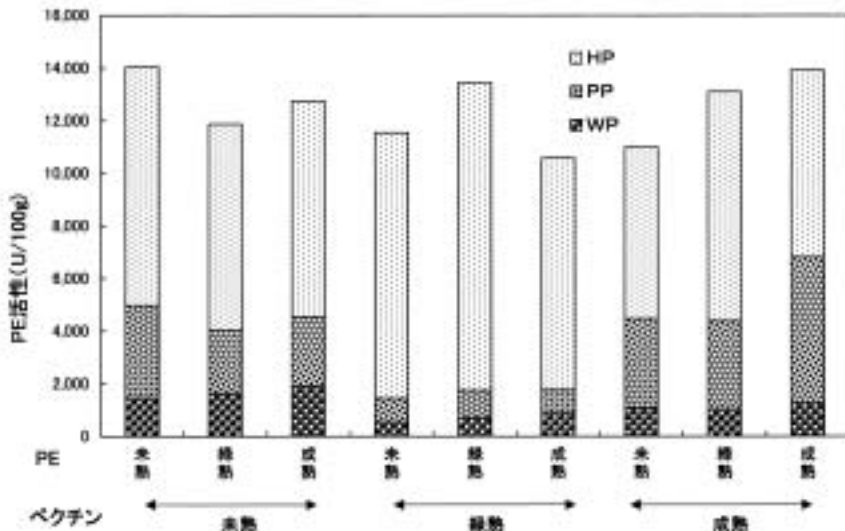


図3 熟度の異なるミニトマトペクチンを基質としたミニトマトPE活性

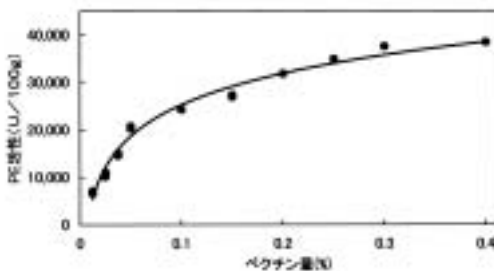


図4 基質濃度がミニトマトPE活性に及ぼす影響

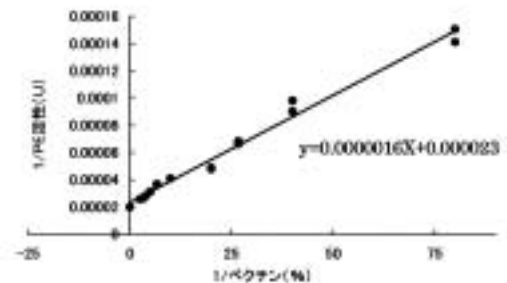


図5 基質濃度とミニトマトPE活性のLineweaver-Burkのプロット

トマトより分画した未熟 HP を用いた本研究では先に述べたように  $K_m$  定数は 0.1% ミニトマトペクチンである。したがって、ミニトマト PE は、基質にミニトマトペクチンを用いる方が基質に対する酵素の親和力が高いことが判明し、高濃度の基質は必要ないことが分かった。

以上のことから、ミニトマト PE は基質に酵素と同じ熟度のミニトマトペクチン、特に HP を用いることにより活性が高められ、低濃度のペクチンで反応できることが明らかとなった。

#### 要 約

ミニトマト中のペクチンエステラーゼ (PE) 活性について以前から報告をしてきたが、活性測定には基質に市販レモンペクチンを使用してきた。そこで、今回は実際にミニトマトからペクチンを抽出し、成熟、抽出溶媒の異なるペクチンを基質とした時の PE 活性を測定して、相違があるか否かについて検討した。その結果、

- 1) いずれの成熟段階でも WP, HP はメトキシル基が 7% 以上の高メトキシルペクチンであり、PP は低メトキシルペクチンであった。HP は他のペクチン画分に比べて高いメトキシル基含量を示し、成熟果の HP ではその含量が減少したが、低メトキシルペクチンであった PP は成熟によって変化しなかった。
- 2) いずれの熟度においても、ミニトマト PE は基質に PE と同じ熟度のミニトマトペクチン、特に HP を用いることにより活性が高められた。全体としても、画分別ペクチンのガラクチュロン酸組成比をもとに換算したペクチン総量を基質とした PE 活性はペクチンの熟度と PE の熟度

が同じときに最も高くなることが分かった。

- 3) ミニトマト PE のミニトマトペクチンを基質に用いた  $K_m$  定数は 0.1% ペクチン濃度であった。

#### 文 献

- 1) 辻啓介, 森文平; 食物繊維の科学, 朝倉書店 (1997)
- 2) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka, H.; Studies on the pectolytic enzyme ( ). *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 991 - 997 (1970)
- 3) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka, H.; Studies on the pectolytic enzyme ( ). *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 998 - 1003 (1970)
- 4) Takehana, H., Shibuya, T. and Nakagawa, H. ; Purification and some properties of endopolygalacturonase from tomato pericarp, 千葉大学園芸学部学術報告, **23**, 29 - 34 (1977)
- 5) Inari, T. and Tomoeda, M.; Texture and pectin - hydrolyzing enzymes in various fruits and vegetables. *J. Home Economics of Japan*, **36**, 617 - 621 (1985)
- 6) Inari, T.; Polygalacturonase activity during the ripening stage from strawberry. *Gifu Joshi Daigaku Kiyo*, **23**, 91 - 96 (1994)
- 7) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and Takeuchi, T.; Purification and some properties of pectinesterase from fruits of a miniature-fruited red type tomato. *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 54 - 58 (2000)
- 8) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and Takeuchi, T.; Changes in pectic polysaccharides during the ripening of cherry tomato fruits, *Food Sci. Technol. Res.*, **8**, 55 - 58 (2002)