

# 日本食品保蔵科学会誌

VOL. 37 NO. 5

---

会 長	高井 陸雄	副 会 長	上田 悦範	小宮山美弘	早坂 薫
編集委員長	上田 悦範				
編 集 委 員	石田 裕	稲熊 隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	竹永 章生
	津久井重紀夫	東尾 久雄	古庄 律	松田 茂樹	

---

## <報 文>

水耕栽培における施肥管理および栽培時期がミツバ (*Cryptotaenia japonica* Hassk.) の

収量および品質に及ぼす影響 ..... (217)

／嘉悦佳子・森川信也・磯部武志  
中村謙治・阿部一博

未成熟パイア (*Carica papaya* L.) の果実品質に及ぼす貯蔵条件の影響 ..... (227)

／照屋 亮・前田剛希・広瀬直人  
大城良計・秋永孝義

## <報 文> (英文)

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) のポリフェノール酸化酵素の精製と性質 ..... (233)

／アンディ ヌル ファイダ ラーマン・太田真由美  
李 英杰・中谷一哉・林 信行・藤田修二

## <研究ノート>

ケフィアグレイン菌株を用いたグレインの生成とケフィアの比較 ..... (241)

／長谷川真由美・綿貫仁美・林 一也  
馬場 修・小原直弘

小麦 (ハルユタカ) 粒中のプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の分離精製 ..... (245)

／野口智弘・新井智美・野口治子  
内野昌孝・高野克己

## <講 座>

身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (14)

パインアップル 伝来と産業化および国内生産の現状について ..... (249)

／正田守幸

<文献抄録> ..... (257)

## Food Preservation Science

## CONTENTS OF VOL. 37 NO. 5 (2011)

## &lt;Article&gt; (Japanese)

- Effect of Fertilizer Application Method and Cultivation Season on Yield and Quality of Solution-cultured Japanese Hornwort (*Cryptotaenia japonica* Hassk.)  
 KAETSU Keiko, MORIKAWA Shinya, ISOBE Takeshi,  
 NAKAMURA Kenji and ABE Kazuhiro ..... (217)
- Effect of Storage Conditions on the Quality of Immature Papaya (*Carica papaya* L.) Fruit  
 TERUYA Ryo, MAEDA Goki, HIROSE Naoto,  
 OOSHIRO Yoshikazu and AKINAGA Takayoshi ..... (227)

## &lt;Article&gt; (English)

- Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase  
 from Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.) Root  
 ANDI Nur Faidah Rahman, OHTA Mayumi, LI Yunge,  
 NAKATANI Kazuya, HAYASHI Nobuyuki and FUJITA Shuji ..... (233)

## &lt;Research Note&gt; (Japanese)

- Comparison of the Kefir Uses Strain of Kefir Grains  
 HASEGAWA Mayumi, WATANUKI Hitomi, HAYASHI Kazuya,  
 BABA Osamu and OHARA Naohiro ..... (241)
- Purification of Protein Disulfide Isomerase from Wheat (Haruyutaka) Grain  
 NOGUCHI Tomohiro, ARAI Satomi, NOGUCHI Haruko,  
 UCHINO Masataka and TAKANO Katsumi ..... (245)

## &lt;Serialization Lecture&gt; (Japanese)

- Pineapple  
 SHODA Moriyuki ..... (249)

# 水耕栽培における施肥管理および栽培時期が ミツバ (*Cryptotaenia japonica* Hassk.) の 収量および品質に及ぼす影響

嘉悦佳子\*<sup>1</sup>・森川信也\*<sup>1</sup>・磯部武志\*<sup>1</sup>  
中村謙治\*<sup>2</sup>・阿部一博\*<sup>3</sup>

\* 1 大阪府環境農林水産総合研究所

\* 2 エスペックミック (株)

\* 3 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

Effect of Fertilizer Application Method and Cultivation Season on Yield and Quality of Solution-cultured Japanese Hornwort (*Cryptotaenia japonica* Hassk.)

KAETSU Keiko\*<sup>1</sup>, MORIKAWA Shinya\*<sup>1</sup>, ISOBE Takeshi\*<sup>1</sup>,  
NAKAMURA Kenji\*<sup>2</sup> and ABE Kazuhiro\*<sup>3</sup>

\* 1 *Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefectural Government, 442 Shakudo, Habikino, Osaka 583-0862*

\* 2 *Especmic Corp, 3-11-17 Ikeda, Neyagawa, Osaka 572-0039*

\* 3 *Graduate School of Agriculture and Biological Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531*

In order to reduce excessive nitrate ion concentrations in vegetables, which may be one of the causes of high blood levels of methemoglobin, the effect of organic fertilizer on yield in hydroponics and the nitrate ion concentration in Japanese hornwort cultivated using the deep-flow technique was evaluated. To investigate seasonal variability, one series of experiments was conducted in three seasons, namely, spring, summer, and autumn. The nitrate ion concentration in Japanese hornwort decreased with the increasing proportion of organic fertilizer to total fertilizer applied; Japanese hornwort plants grown in culture medium containing both organic and chemical fertilizers were able to reduce the nitrate concentration compared with those grown in culture medium containing only chemical fertilizer. In spring and autumn, the nitrate concentration of Japanese hornwort grown in culture medium containing only organic fertilizer was the lowest, although plant height was the lowest. Additionally, when using hydroponics with Japanese hornwort cultured in medium containing only organic fertilizer, it was necessary to lower the temperature of the hydroponic solution to below 25°C. These results suggest that a reduction in nitrate ion concentration, whilst maintaining the yield of hydroponically grown plants, is possible in Japanese hornwort when chemical fertilizer is used together with organic fertilizer.

(Received Oct. 6, 2010; Accepted Jul. 11, 2011)

**Key words** : *cultivation season, hydroponics, Japanese hornwort, nitrate ion concentration, organic fertilizer*  
栽培時期, 水耕栽培, ミツバ, 硝酸イオン濃度, 有機質肥料

大阪府では、大阪の食文化に根差した農産物の中から、府内で一定量の生産があり、独自の栽培技術で生産され

ている21品目を「なにわ特産品」として認証されている<sup>1)~3)</sup>。ミツバは「なにわ特産品」の中で主要な作物で

\* 1 〒583-0862 大阪府羽曳野市尺度442

§ Corresponding author, E-mail: kaetsuk@mbox.epcc.pref.osaka.jp

\* 2 〒572-0039 大阪府寝屋川市池田3-11-17

\* 3 〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

あり、大阪府内では泉州地域を中心に生産されており、全国第7位の出荷量および全国第8位の作付面積を誇る<sup>4)</sup>。生産者は、昭和40年代からミツバの水耕栽培に取り組み、現在、大阪府産ミツバの多くは湛液型水耕栽培(作付面積の約85%)で生産されている<sup>5),6)</sup>。

しかし、水耕栽培で生産したミツバでは、硝酸イオン濃度が約8,000ppmとなったとの報告がある<sup>7)</sup>。植物は、窒素肥料の過剰供給や日照不足が要因となって、硝酸イオンを葉に蓄積する性質がある<sup>8),9)</sup>。硝酸イオンは、多量摂取によりメトヘモグロビン血症や生殖機能障害などの健康に悪影響があることが報告されていることから<sup>10)</sup>、ミツバに含まれる硝酸イオン濃度を低下させる栽培技術の開発が求められている。

筆者らは、これまでに「なにわの伝統野菜」の一種である‘毛馬’キュウリの湛液型水耕栽培において、慣行法である化学肥料の代わりに有機質肥料を施用すると‘毛馬’キュウリ果実中の硝酸イオン濃度を低下することを報告した<sup>11)</sup>。

そこで、本研究では、ミツバの湛液型水耕栽培において、化学肥料の代わりに有機質肥料を施用して、慣行の化学肥料を施用した水耕栽培と比較することにより、有機質肥料の施用がミツバに含まれる硝酸イオンに及ぼす影響を明らかにした。また、ミツバを春作と夏作ならびに秋作で栽培することで、栽培時期の差異が有機質肥料を施用した水耕栽培におけるミツバの品質に及ぼす影響を検証した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 栽培方法

300ブロックのウレタンマット2枚にミツバ‘白茎三ツ葉’(タキイ種苗)を1ブロックあたり20粒程度となるよう播種した。立枯病と根腐病対策として播種の前日に種子の殺菌を行った。播種後、人工気象器(気温:25℃)内で育苗して、1試験区あたり62ブロックずつ定植し、循環型湛液水耕栽培を行った。栽培装置は、栽培槽と貯水槽には樹脂製容器を使用した。栽培槽中に十分な溶存酸素が存在するようにエアポンプによる曝気を行い、栽培槽とその下部に設けた貯水槽の間をポンプにより常時培養液を循環させて栽培を行った。なお、栽培槽と貯水槽の水量と合わせると、試験区の水量は110ℓであった。

春作は、2009年2月24日に播種し、同年3月12日に定植した。栽培期間中の施設内の平均気温は15.2℃で、平均相対湿度は62.5%であった。また、夏作は、2009年5月13日に播種し、同年6月5日に定植した。栽培期間中の施設内の平均気温は28.7℃で、平均相対湿度は72.1%であった。秋作は、2009年9月18日に播種し、同年10月5日に定植し、栽培期間中の施設内の平均気温は18.9℃で、平均相対湿度は74.2%であった。

### 2. 設定試験区

春作は、元肥と追肥ともに有機質肥料のみを施用した有機区、有機質肥料と化学肥料を元肥とし、有機質肥料のみを追肥したハイブリッド100区、有機質肥料50%と化学肥料50%を追肥したハイブリッド50区、化学肥料のみを施用し有機区と同量の全窒素換算量の化学肥料を追肥した無機区、施肥の窒素量を考慮せず慣行法と同様にECで化学肥料を施用した対照区の5試験区で栽培を行った。

また、夏作は、春作と同様である有機区、ハイブリッド100区、ハイブリッド50区、無機区の4試験区に、有機質肥料と化学肥料を元肥として、追肥に有機質肥料10%と化学肥料90%を施用したハイブリッド10区、化学肥料のみを追肥したハイブリッド0区の2試験区を加えた6試験区で栽培を行った。

秋作は、夏作と同様の6試験区で行った。

### 3. 施肥管理

春作の対照区および春作・夏作・秋作の無機区の元肥は、化学肥料であるマツザキ1号と2号(N10.4%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2.1%, K<sub>2</sub>O 14.4%)を大塚A処方<sup>12)</sup>で施用した。対照区は、培養液をEC約3.0dS/mで管理し、これに従って追肥した。春作・夏作・秋作の有機区、ハイブリッド100区、ハイブリッド50区、ハイブリッド10区、ハイブリッド0区に施用した有機質肥料は、コーンスターチを生産する際の産業廃棄物であるコーンステーパーリカー(N3%, P3%, K2%) (以下、CSL)を施用した。篠原らが開発した有機質肥料を施用する養液栽培技術(並行複式無機化法)を参考にし<sup>13)</sup>、有機質肥料であるCSLを165gおよび土壌165gを投入し、有機態窒素が硝酸態窒素に分解するまで約2週間曝気した。ハイブリッド100区、ハイブリッド50区、ハイブリッド10区、ハイブリッド0区では、対照区の元肥の窒素供給量と同量になるように化学肥料を施用して窒素を補った。追肥は並行複式無機化法を参考にし<sup>13)</sup>、3日に1回、規定量の有機質肥料および化学肥料を培養液に添加した。また、無機区には有機区に追肥した窒素供給量と同量の化学肥料を追肥した。

### 4. 測定項目

栽培期間中は、ミツバの生育調査および培養液のECとpHならびに無機塩類濃度(調査項目:硝酸イオン濃度、亜硝酸イオン濃度、アンモニウムイオン濃度)を定期的に測定した。

全試験区から平均的な生育を示した10ブロックずつを収穫し、収穫物の調査(調査項目:草丈、根長、地上部生体重および乾物重、水分含量、根部乾物重、葉身のSPAD値)を行った。

また、収穫したミツバをナイフで細かく刻み、成分分析に供した。それぞれを含量によって5~30倍の純水を加えることによって希釈し、ホモジナイザー(PRO Scientific Inc. 製 PRO200Homogenizer)で粉碎後、

小型反射式光度計 (Merch社製 RQフレックス) で、各部位に含まれる硝酸イオン濃度を測定した<sup>14)</sup>。それぞれの測定は、3反復行った。

春作は2009年4月25日に、夏作は同年7月23日に、秋作は同年11月13日に収穫し、上記の測定を行った。

実験結果

1. ミツバ湛液型水耕栽培【春作】

(1) 生育および収量 栽培中のミツバ草丈の変化をFig.1-Iに示した。ハイブリッド100区とハイブリッド50区および無機区と対照区の4試験区は同様に生長し、収穫時の草丈も同等であった。しかし、有機区は、他の4試験区と比較して、生長が遅延した。また、春作における水耕栽培装置中の培養液温度は、栽培期間を通じて約20℃で推移した (Fig.1-II)。

収穫物の調査結果をTable 1に示した。草丈は、ハイブリッド100区とハイブリッド50区で最も高く、ついで、無機区と対照区で、最も低かったのは有機区であった。また、根は有機区で最も長かった。次に、地上部生体重は、ハイブリッド100区とハイブリッド50区、対照区で最も大きく、ついで、無機区で、最も小さかったのは有機区であった。地上部乾物重は、ハイブリッド100区とハイブリッド50区、無機区、対照区で同等であり、有機区のみが小さかった。また、水分含量は全試験区で同等であった。根部乾物重は、有機質肥料を施用した割合が高い有機区とハイブリッド100区、ハイブリッド50区で大きく、無機区と対照区で小さかった。葉身のSPAD値は、有機区で最も小さく、ついで、ハイブリッド100区とハイブリッド50区で、最も大きかったのは無機区と対照区であった。

(2) 培養液に含まれる窒素形態 春作のミツバ湛液型水耕栽培の培養液に存在する硝酸イオン濃度と亜硝酸イオン濃度ならびにアンモニウムイオン濃度の推移結果をFig.2に示した。有機区の硝酸イオン濃度は栽培初

期に約200ppmであったが、栽培中に低下し、栽培開始から2週間後および収穫時には検出されなかった。また、他の4試験区の硝酸イオン濃度は、栽培初期には同様に

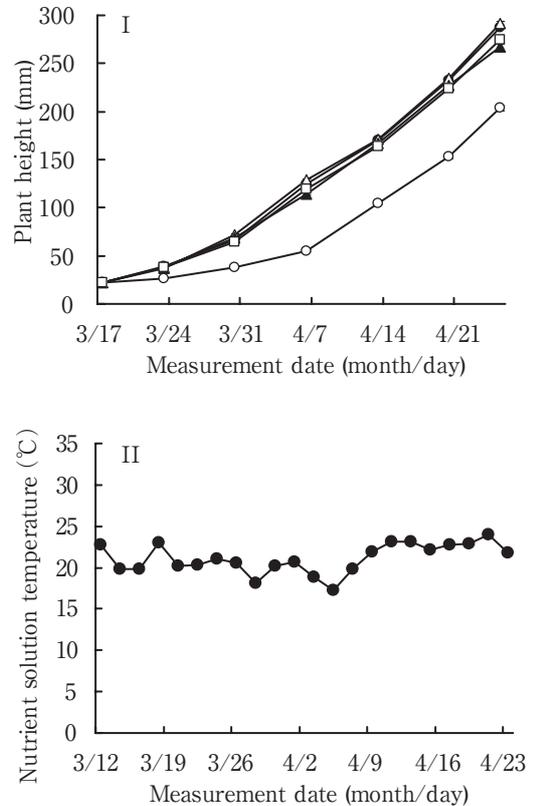


Fig. 1 Changes in plant height of Japanese hornwort (I) and temperature of the hydroponic solution (II) in spring

I : ○ : Organic fertilizer (100%) ; ● : Hybrid (additional organic fertilizer 100%) ; △ : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%]) ; ▲ : Chemical fertilizer (100%) ; □ : Chemical fertilizer (100%, conventional method)

Table 1 Effect of the fertilizer application method on yield and quality of Japanese hornwort in spring

Fertilizer application method	Plant height (mm)	Root length (mm)	Leaf and leafstalk			Root		SPAD
			Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)	Dry weight (g)		
O	203.4 c <sup>z</sup>	244.5 a	19.2 c	1.3 b	93.3 a	0.76 a	29.2 d	
H100	287.5 a	175.0 ab	33.0 ab	2.2 a	93.4 a	0.72 a	34.8 bc	
H50	291.1 a	190.7 ab	33.5 a	2.3 a	93.3 a	0.63 ab	34.6 bc	
C	267.3 b	149.8 c	30.9 ab	2.3 a	92.7 a	0.44 b	35.9 ab	
CC	274.2 b	162.1 bc	29.4 b	2.0 a	92.9 a	0.43 b	36.6 a	

<sup>z</sup> : Different letters indicate significant difference between the means at a 5% level (Fisher's least significant difference [LSD] test).

O : Organic fertilizer (100%)

H100 : Hybrid (additional organic fertilizer [100%])

H50 : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%])

C : Chemical fertilizer (100%)

CC : Chemical fertilizer (100%, conventional method)

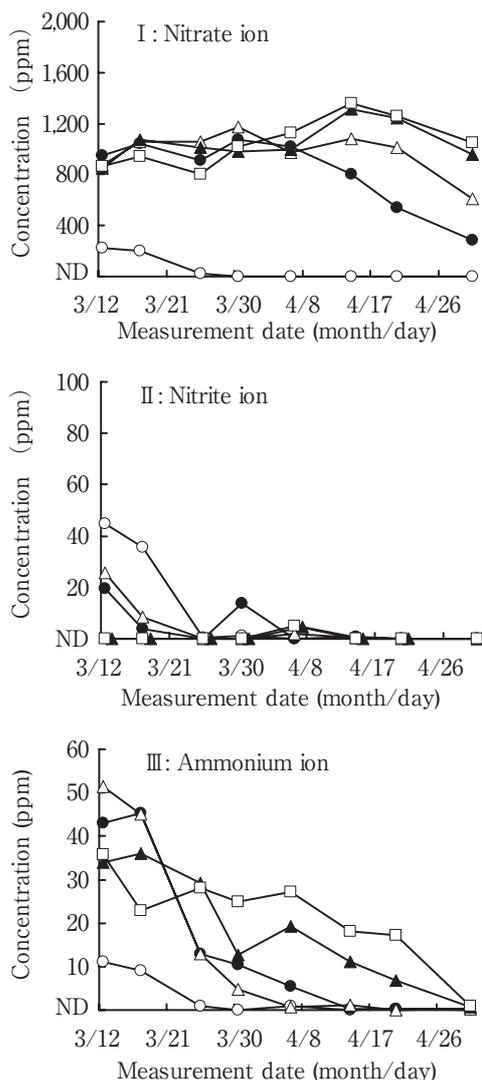


Fig. 2 Changes in nitrate (I), nitrite (II) and ammonium (III) ion concentrations of the hydroponic solution in spring

○:O;●:H100;△:H50;▲:C;□:CC (shown in Table 1)

推移していたが、栽培が進むにつれてその差が現れて、栽培後期には全施肥量中の有機質肥料の割合が高い順に小さかった。よって、全施肥量中の有機質肥料の割合が高いほど、培養液中の硝酸イオン濃度が低かった。亜硝酸イオン濃度は、有機区とハイブリッド100区およびハイブリッド50区で栽培中に低下し栽培後期には検出されなかった。無機区と対照区では栽培中に検出されなかった。アンモニウムイオン濃度は全試験区で栽培中に低下し、栽培後期には検出されなかった。

(3) ミツバに含まれる硝酸イオン濃度 春作のミツバ湛液型水耕栽培における収穫物中の硝酸イオン濃度の測定結果をFig. 3に示した。ミツバ中の硝酸イオン濃度は、約5,900ppm存在した対照区で最も高く、ついで、無機区で約4,400ppm、ハイブリッド50区で約3,000ppm、ハイブリッド100区で約2,500ppmであり、最も低かった

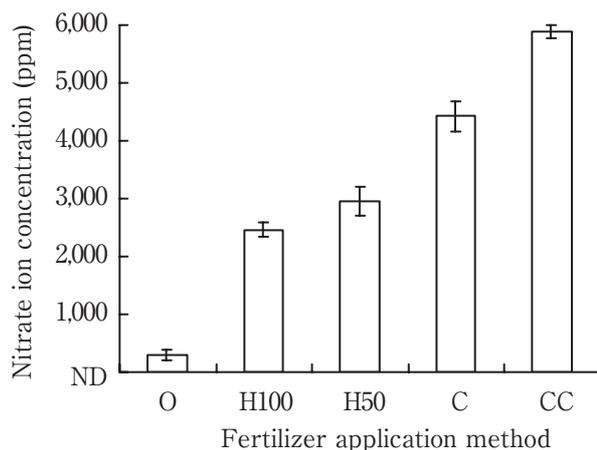


Fig. 3 Effect of the fertilizer application method on nitrate ion concentration in Japanese hornwort in spring

Values are the means of three replicates and bars represent the S.E. The horizontal axis represents the fertilizer application method shown in Table 1.

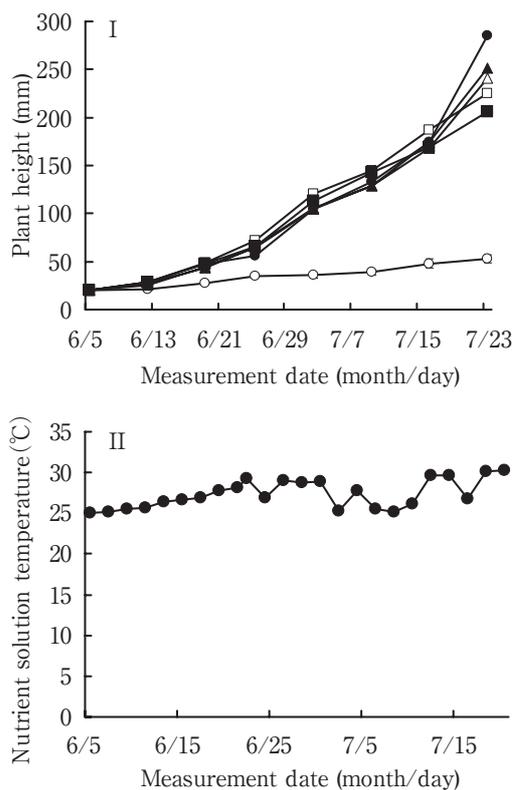
のは約300ppm存在した有機区であった。

## 2. ミツバ湛液型水耕栽培【夏作】

(1) 生育および収量 栽培中のミツバ草丈の変化をFig. 4-Iに示した。春作と同様に、ハイブリッド100区、ハイブリッド50区、ハイブリッド10区、ハイブリッド0区および無機区の5試験区は同様に生長した。しかし、有機区は、他の5試験区と比較して生長が遅延・停止して販売規格に達しなかったために、最終的に収穫できなかった。夏作における水耕栽培装置中の培養液の水温は栽培初期に約25℃であったが、栽培期間中に上昇し栽培後期には約30℃以上であった (Fig. 4-II)。

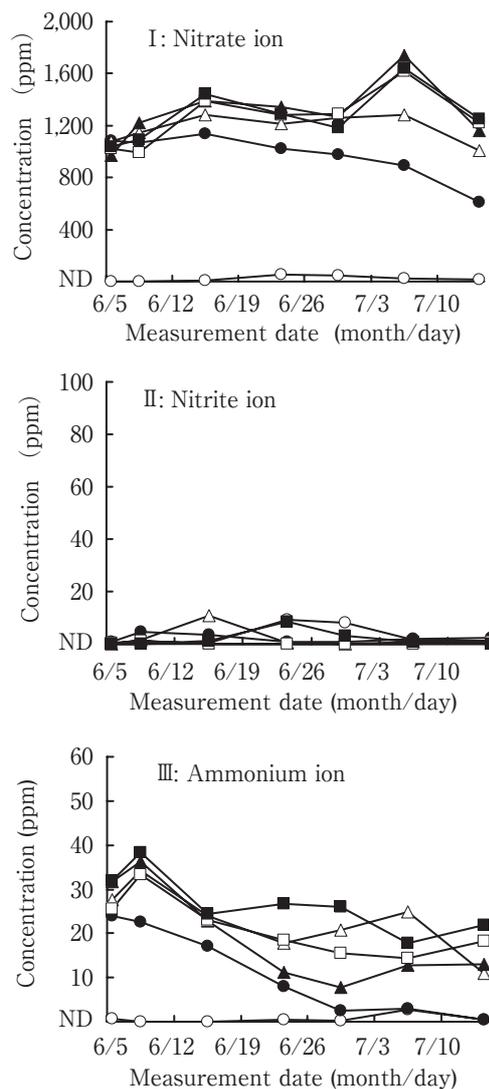
収穫物の調査結果をTable 2に示した。草丈は全施肥量中に占める有機質肥料割合の高い順に高かった。有機質肥料および化学肥料を施用した中で、草丈は、最も有機質肥料の割合が高いハイブリッド100区で最も高く、ついで、ハイブリッド50区、ハイブリッド10区、ハイブリッド0区の順で高く、最も低かったのは無機区であった。また、根長、地上部生体重および乾物重、根部乾物重は、全ての試験区ともほぼ同等であり、施肥管理との関連は見られなかった。次に、水分含量はハイブリッド100区が最も多く、ついで、ハイブリッド10区で、最も少なかったのはハイブリッド50区とハイブリッド0区ならびに無機区の3試験区であった。葉身のSPAD値は、ハイブリッド10区が最も大きく、他の4試験区は同等の結果であった。

(2) 培養液に含まれる窒素形態 夏作のミツバ湛液型水耕栽培の培養液中に存在する硝酸イオン濃度と亜硝酸イオン濃度ならびにアンモニウムイオン濃度の推移結果をFig. 5に示した。硝酸イオンは有機区では栽培中に検出されなかった。また、他の5試験区の硝酸イオン



**Fig. 4** Changes in plant height of Japanese hornwort (I) and temperature of the hydroponic solution (II) in summer

I : ○ : Organic fertilizer (100%) ; ● : Hybrid (additional organic fertilizer [100%]) ; △ : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%]) ; ▲ : Hybrid (additional organic fertilizer [10%] and chemical fertilizer [90%]) ; □ : Hybrid (additional chemical fertilizer [100%]) ; ■ : Chemical fertilizer (100%)



**Fig. 5** Changes in nitrate (I), nitrite (II) and ammonium (III) ion concentrations of the hydroponic solution in summer

○ : Organic fertilizer100% ; ● : H100 ; △ : H50 ; ▲ : H10 ; □ : H 0 ; ■ : C (shown in Table 2)

**Table 2** Effect of the fertilizer application method on yield and quality of Japanese hornwort in summer

Fertilizer application method	Plant height (mm)	Root length (mm)	Leaf and leafstalk			Root		SPAD
			Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)	Dry weight (g)		
H100	285.5 a <sup>z</sup>	126.0 b	25.4 a	2.1 b	91.9 a	0.49 a	37.1 b	
H50	240.5 b	132.5 b	23.8 ab	2.6 ab	89.2 c	0.36 b	38.4 b	
H10	251.5 b	163.0 a	26.3 a	2.5 ab	90.6 b	0.36 b	40.6 a	
H 0	225.0 c	126.0 b	19.8 b	2.3 ab	88.2 c	0.46 a	36.6 b	
C	206.0 d	124.5 b	24.4 ab	2.8 a	88.6 c	0.47 a	38.5 b	

<sup>z</sup> : Different letters indicate significant difference between the means at a 5 % level (Fisher's least significant difference [LSD] test).

H100 : Hybrid (additional organic fertilizer [100%])

H50 : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%])

H10 : Hybrid (additional organic fertilizer [10%] and chemical fertilizer [90%])

H 0 : Hybrid (additional chemical fertilizer [100%])

C : Chemical fertilizer (100%)

濃度は、栽培後期に、全施肥量中の有機質肥料の割合が高い順に低くなった。亜硝酸イオン濃度は、全試験区で約10ppm以下であった。アンモニウムイオン濃度は、有機区では検出されず、他の5試験区では栽培初期には同様に推移していたが、栽培後期には全施肥量中の有機質肥料の割合が高い順に小さくなった。

(3) ミツバに含まれる硝酸イオン濃度 夏作のミツバ湛液型水耕栽培における収穫物中の硝酸イオン濃度の測定結果をFig. 6に示した。

ミツバ中の硝酸イオン濃度は、約4,500ppm存在した無機区で最も高く、ついで、ハイブリッド0区で約4,300ppm、ハイブリッド10区で約4,100ppm、ハイブリッド50区で約3,800ppmであり、最も低かったのは約3,000ppm存在したハイブリッド100区であった。よって、春作と同様に全施肥量中の有機質肥料の割合が高いほど、培養液中の硝酸イオン濃度が低かった。

夏作におけるミツバ中の硝酸イオン濃度は、全施肥量中に占める有機質肥料の割合の増加に伴い、培養液中の硝酸イオン濃度が低下し、ミツバ中の硝酸イオン濃度も低下することが明らかになり、この結果は、春作と同様であった。

### 3. ミツバ湛液型水耕栽培【秋作】

(1) 生育および収量 栽培中のミツバ草丈の変化をFig. 7-Iに示した。栽培中のミツバの生育は、栽培初期は全試験区とも同様に生長した。その後、有機区は栽培中期から収穫時まで生長が遅延し、その他の5試験区は同様に生長した。秋作における水耕栽培装置中の培養液温度は、栽培初期から中期まで約25℃を維持したが、栽培後期には約20℃まで低下した (Fig. 7-II)。

収穫物の調査結果をTable 3に示した。草丈は、ハイブリッド10区で最も高く、ついで、ハイブリッド50区ならびにハイブリッド100区、ハイブリッド0区、無機区の順となり、最も低かったのは有機区であった。また、根長は、施肥管理との関連はみられなかった。

一方、地上部生体重および乾物重、水分含量、根部乾物重は、全試験区とも同様の結果であったが、葉身のSPAD値は有機区で最も小さく、その他の5試験区は同等であった。ハイブリッド100区は草丈が高いが地上部生体重が他の試験区と同等で、徒長傾向にあった。

(2) 培養液に含まれる窒素形態 秋作のミツバ湛液型水耕栽培の培養液中に存在する硝酸イオン濃度と亜硝酸イオン濃度ならびにアンモニウムイオン濃度の推移結果をFig. 8に示した。栽培初期の硝酸イオン濃度は、有機区以外の5試験区では約800ppmで同等であったが、栽培中に変化し、最終的には全施肥量中の有機質肥料の割合が高い順に低かった。一方、有機区の硝酸イオン濃度は栽培期間をとおして、約400ppm以下で推移した。よって、春作と同様に全施肥量中の有機質肥料の割合が高いほど、培養液中の硝酸イオン濃度が低かった。亜硝酸イオン濃度は、有機区で栽培初期に約100ppmで最も

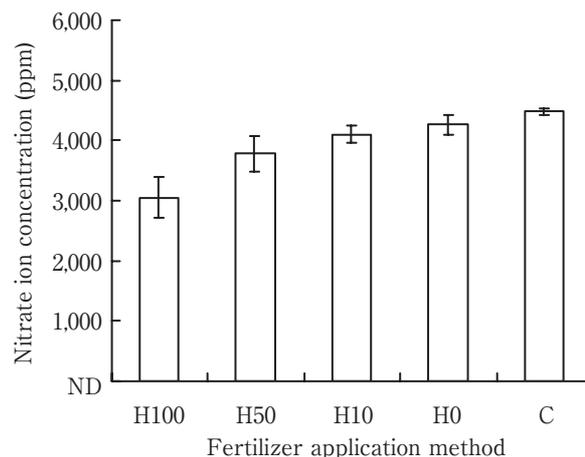


Fig. 6 Effect of the fertilizer application method on nitrate ion concentration in Japanese hornwort in summer

Values are the means of three replicates and bars represent the S.E. The horizontal axis represents the fertilizer application method shown in Table 2.

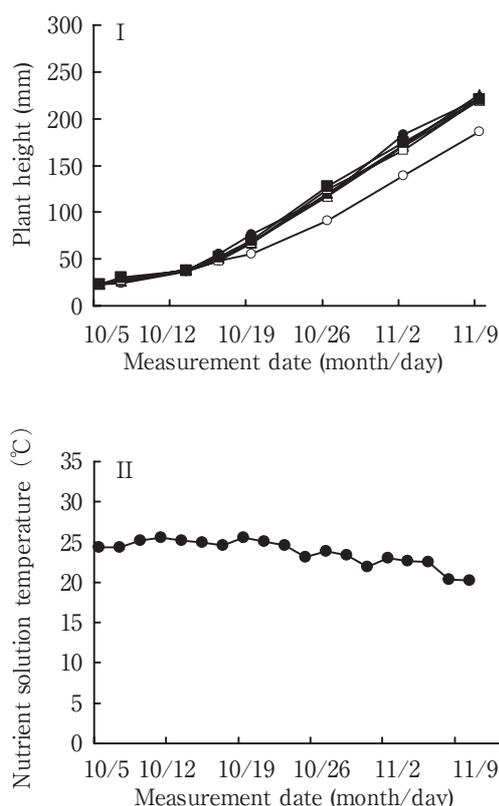


Fig. 7 Changes in plant height of Japanese hornwort (I) and temperature of the hydroponic solution (II) in autumn

I : ○ : Organic fertilizer (100%) ; ● : Hybrid (additional organic fertilizer [100%]) ; △ : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%]) ; ▲ : Hybrid (additional organic fertilizer [10%] and chemical fertilizer [90%]) ; □ : Hybrid (additional chemical fertilizer [100%]) ; ■ : Chemical fertilizer (100%)

**Table 3** Effect of the fertilizer application method on yield and quality of Japanese hornwort in autumn

Fertilizer application method	Plant height (mm)	Root length (mm)	Leaf and leafstalk			Root		SPAD
			Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)	Dry weight (g)		
O	239.0 d <sup>z</sup>	161.0 b	17.1 b	0.6 b	96.3 a	0.15 a	31.7 b	
H100	276.0 ab	108.0 c	18.4 ab	0.8 ab	95.9 ab	0.11 ab	35.2 a	
H50	276.0 ab	173.5 b	20.2 ab	0.8 ab	96.0 a	0.09 bc	34.8 a	
H10	282.0 a	201.5 a	21.5 a	0.9 a	95.9 ab	0.10 bc	35.0 a	
H 0	266.0 bc	172.5 b	19.8 ab	0.8 ab	96.0 a	0.05 cd	35.1 a	
C	252.5 cd	199.5 a	17.6 ab	0.8 ab	95.4 b	0.03 d	36.2 a	

<sup>z</sup>: Different letters indicate significant difference between the means at a 5% level (Fisher's least significant difference [LSD] test).

O : Organic fertilizer (100%)

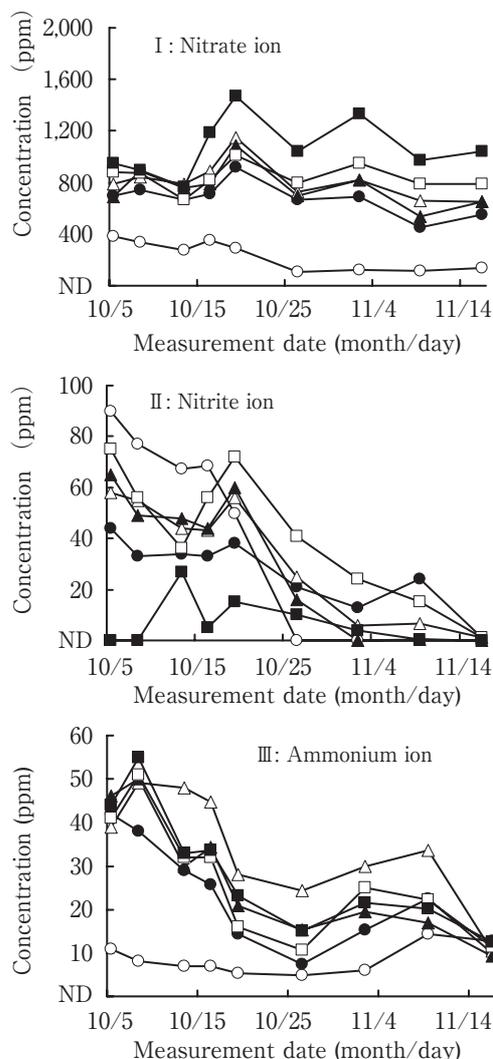
H100 : Hybrid (additional organic fertilizer [100%])

H50 : Hybrid (additional organic fertilizer [50%] and chemical fertilizer [50%])

H10 : Hybrid (additional organic fertilizer [10%] and chemical fertilizer [90%])

H 0 : Hybrid (additional chemical fertilizer [100%])

C : Chemical fertilizer (100%)



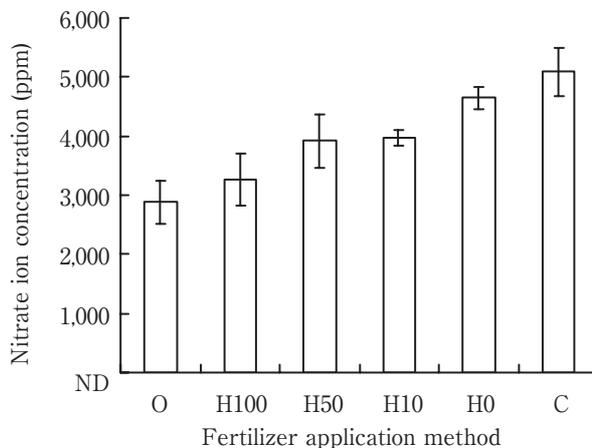
**Fig. 8** Changes in nitrate (I), nitrite (II) and ammonium (III) ion concentrations of the hydroponic solution in autumn

○ : O ; ● : H100 ; △ : H50 ; ▲ : H10 ; □ : H 0 ; ■ : C (shown in Table 3)

大きく、栽培中に低下して収穫時には検出しなかった。また、ハイブリッド100区、ハイブリッド50区、ハイブリッド10区、ハイブリッド0区の4試験区は有機区と同様に低下傾向であった。無機区では栽培中に検出しなかった。アンモニウムイオン濃度は、有機区以外の5試験区は栽培初期に約40ppmで同等であったが、栽培中に低下し、収穫時には4試験区とも約10ppmであった。有機区は栽培期間をとおして約10ppmを維持した。

(3) ミツバに含まれる硝酸イオン濃度 秋作のミツバ湛液型水耕栽培における収穫物中の硝酸イオン濃度の測定結果をFig. 9に示した。

ミツバ中の硝酸イオン濃度は、約5,100ppm存在した無機区で最も高く、ついで、ハイブリッド0区で約4,600ppm、ハイブリッド10区で約4,000ppm、ハイブリッド



**Fig. 9** Effect of the fertilizer application method on nitrate ion concentration in Japanese hornwort in autumn

Values are the means of three replicates and bars represent the S.E. The horizontal axis represents the fertilizer application method shown in Table3.

50区で約3,900ppm, ハイブリッド100区で約3,300ppmであり, 最も低かったのは約2,900ppm存在した有機区であった。

秋作におけるミツバ中の硝酸イオン濃度は, 全施肥量中に占める有機質肥料の割合の増加による培養液中の硝酸イオン濃度の低下に伴って, 低下することが明らかになり, この結果は, 春作と同様であった。

## 考 察

本研究では, ミツバの湛液型水耕栽培において, 施用する有機質肥料の割合が多いほど, 収穫物の硝酸イオン濃度が低下した。葎田らは, ホウレンソウの土耕栽培において, 有機質肥料を施用すると, 土壌中の硝酸イオン濃度が低下したため, 化学肥料を施用した慣行栽培より収穫物に含まれる硝酸イオン濃度が低下したと報告している<sup>15)</sup>。また, ホウレンソウの水耕栽培において, 供給される硝酸態窒素が少なくアンモニア態窒素が多い場合, 植物体はアンモニア態窒素を多く吸収することが報告されている<sup>16)</sup>。一方, 本試験の春作と秋作の結果から, 有機質肥料のみを施用すると, 培養液中の硝酸イオン濃度が低い状態で, アンモニウムイオン濃度や亜硝酸イオン濃度が栽培初期に増加して消長した (Fig. 2, Fig. 8)。このことから, ミツバが硝酸イオンの代わりにアンモニウムイオンと亜硝酸イオンの窒素形態で吸収したと考えられた。したがって, ミツバの湛液型水耕栽培において, 有機質肥料を施用すると, ミツバに蓄積する硝酸イオンが低減したと考えられた。

栽培時期について, 春作や秋作では, 培養液温度が約20℃から約25℃までに維持し, 有機質肥料のみを施用してミツバを水耕栽培できた。しかし, 夏作では, 日中の培養液温度が30℃以上になり, 有機質肥料のみを施用してミツバを水耕栽培することはできなかった。有機質肥料を分解する硝化菌は高温で死滅すると報告されており, これにより, 夏の高温時は硝化菌の働きが安定せず, 有機質肥料の分解ができなかったことが原因と考えられた<sup>13)</sup>。また, 高温のため有機物が腐敗した可能性もあり, 水温が上昇しやすい夏季の高温条件においては栽培管理の不安定さが明確になり, 有機質肥料を水耕栽培で施用することは困難であった。したがって, 有機質肥料のみを施用した水耕栽培には, 培養液温度を約25℃以下で管理することが重要であった。

また, 有機質肥料のみを施用したミツバの水耕栽培は, 化学肥料での栽培に比べ生長が遅延することから, 篠原らが報告している規定の有機質肥料施用量では湛液型水耕栽培のミツバの生育に不十分と考えられた。有機質肥料のみを施用した水耕栽培でのミツバの生産の安定化に向けて, より多くの有機質肥料を施用するためには, より多くの曝気を行って硝化に必要な溶存酸素量を増加したり, 有機質肥料の施用を3日に1回ではなく, タイマー等を使用し1日数回等の時間単位で小まめに投入した

りして, 本研究で明らかになった有機質肥料のみを施用した水耕栽培の問題点を解決する技術の確立が必要である。

以上の結果から, ミツバにおける有機質肥料と化学肥料を併用した栽培では, 慣行の化学肥料による栽培と同等の収量が得られたことに加えて, ミツバ中の硝酸イオンを低減することが示唆された。

## 要 約

メトヘモグロビン血症の原因といわれている野菜に含まれる硝酸イオンの低減を目的とし, 化学肥料の代わりに有機質肥料を施用したミツバの湛液型水耕栽培を行った。また, 栽培時期の差異が有機質肥料を施用したミツバ水耕栽培およびミツバの品質に及ぼす影響について検討した。

ミツバの硝酸イオン濃度は, 全施肥量中に占める有機質肥料割合の増加に伴い低下した。有機質肥料のみを施用してミツバを栽培すると化学肥料のみを施用する慣行法に比べ作物中の硝酸イオン濃度は著しく低減できるが, 明らかな生長遅延を生じた。しかし, 有機質肥料と化学肥料を併用すると慣行法と同等に生長し, 作物中の硝酸イオン濃度を慣行法に比べ低下させることができた。夏季の高温時を除き, 春作や秋作では, 有機質肥料のみを施用したミツバの湛液型水耕栽培を行うことができた。

したがって, ミツバの湛液型水耕栽培において, 有機質肥料と化学肥料を併用することで収量を維持しつつミツバの硝酸イオン濃度を低下することが示唆された。

## 文 献

- 1) なにわ特産品産地育成協議会協議会：なにわ特産品 (なにわ特産品産地育成協議会協議会, 大阪), 2 (1993)
- 2) 小林宏至：南大阪の野菜と果物, 関西国際空港が拓く南大阪の可能性/堺・南大阪地域学の世界, 6, 103~111 (2007)
- 3) 大阪府環境農林水産部農政室：大阪産 (大阪府環境農林水産部農政室, 大阪), 4 (2009)
- 4) 農水省統計部：平成17年度野菜生産出荷統計 (農水省統計部, 東京), 73 (2007)
- 5) 泉州農と緑の総合事務所：泉州の特産作物 (泉州農と緑の総合事務所, 大阪), 21~22 (2002)
- 6) 山崎基嘉・瓜生恵理子・嘉悦佳子・瓦谷光男・根来淳一・西田真子：種子温湯処理方法の違いがミツバ種子の発芽率に及ぼす影響, 大阪環農水研報, 2, 29~31 (2009)
- 7) 中原光久：ミツバ水耕栽培における液体ケイ酸カリ肥料の添加が生育及び硝酸イオン濃度に及ぼす影響, 農業環境工学関連7学会合同大会講演要旨集, 964 (2005)
- 8) 王子善清・高 祖明・脇内成昭・岡本三郎・河本正

- 彦：野菜中での硝酸塩及び亜硝酸塩の集積と亜硝酸塩の毒性，神大農研報，**16**，291～296（1984）
- 9) 野菜茶業研究所：野菜の硝酸イオン低減化マニュアル（野菜茶業研究所，三重），1～145（2006）
- 10) 国包章一：硝酸性窒素および亜硝酸性窒素の健康影響，水環境学会誌，**19**，965～968（1996）
- 11) 嘉悦佳子・森川信也・磯部武志・中村謙治・阿部一博：水耕栽培における施肥法および培地の差異が‘毛馬’キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Kema) の苦味発現および品質に及ぼす影響，日食保蔵誌，**36**，227～233（2010）
- 12) 池田英男：用水と培養液の調整，日本施設園芸協会編，最新養液栽培の手引き（誠文堂，東京）（1996）
- 13) 篠原 信：有機質肥料の養液栽培－並行複式無機化法による養液内微生物生態系構築法，農業および園芸，**81**，753～764（2006）
- 14) 建部雅子：作物栄養診断のための小型反射式光度計システムによる硝酸及び還元型アスコルビン酸の簡易測定法，土肥誌，**66**，147～112（1995）
- 15) 畷田隆治・有賀利光：作物における硝酸態窒素の吸収・同化とその制御1. 有機質肥料と硝酸含量，日作記，**58**，76～77（1989）
- 16) 岩田正利：窒素形態の差異と蔬菜の生育3，園学雑，**31**，39～52（1962）  
（平成22年10月6日受付，平成23年7月11日受理）
-

## 未成熟パパイヤ (*Carica papaya* L.) の 果実品質に及ぼす貯蔵条件の影響

照屋 亮<sup>\*1§</sup>・前田剛希<sup>\*2</sup>・広瀬直人<sup>\*1</sup>  
大城良計<sup>\*1</sup>・秋永孝義<sup>\*3</sup>

\* 1 沖縄県農業研究センター

\* 2 沖縄県農業研究センター宮古島支所

\* 3 元琉球大学農学部生物生産学科

### Effect of Storage Conditions on the Quality of Immature Papaya (*Carica papaya* L.) Fruit

TERUYA Ryo<sup>\*1§</sup>, MAEDA Goki<sup>\*2</sup>, HIROSE Naoto<sup>\*1</sup>,  
OOSHIRO Yoshikazu<sup>\*1</sup> and AKINAGA Takayoshi<sup>\*3</sup>

\* 1 *Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820 Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336*

\* 2 *Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Miyakojima Branch,  
2071-40 Taira, Miyakojima, Okinawa 906-0012*

\* 3 *Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213*

Immature papaya (green papaya) is used as a vegetable in Okinawa, Japan. However, there is little information regarding its storage. We investigated the relationship between storage temperature and the respiratory rate of vegetable papaya, and estimated a suitable storage temperature. Next, we examined the effect of storage conditions on the quality of papaya fruit. Chilling injury, fungal decay, and shriveling affected the quality of vegetable papayas during storage. The verified suitable storage conditions were 13°C with a relative humidity of 90%. Under these conditions, the fruit maintained a good quality for 3 weeks. During storage, the contents of malic acid and ascorbic acid in vegetable papaya increased, whereas the sugar content decreased. Furthermore, the vegetable papaya showed no surface discoloration, increased respiratory rate, or decrease in fruit firmness during storage at the suitable temperature.

(Received Apr. 4, 2011 ; Accepted Jul. 20, 2011)

**Key words :** *vegetable papaya, storage, chilling injury, fungal decay, shriveling*

野菜用パパイヤ, 貯蔵, 低温障害, カビ害, 萎び

パパイヤ (*Carica papaya* L.) は、パパイヤ科パパイヤ属の常緑性小高木の熱帯果樹であり、日本では沖縄県や南九州などで栽培されている<sup>1)</sup>。沖縄県におけるパパイヤ生産は、施設栽培の普及によってウイルスや台風被害を軽減できるようになったことから近年生産量が増加し、2005年の出荷量は1,120tである<sup>2)</sup>。この値は、成熟、未成熟果を含めた値であるが、大半は未成熟果が占めると考えられる。沖縄県で伝統的に野菜として利用される未成熟パパイヤ (以下、野菜用パパイヤ) は、果皮や果

肉が黄化する前の状態の果実である。調理法としては、果皮と種子を取り除いた果肉を千切りにし、水さらしたものを炒め物にする<sup>3)</sup>。また千切りしたものは食感が大根に近く、東南アジアではサラダや和え物にして食する<sup>4)</sup>。

ところで、パパイヤ栽培においては、開花期の高温や低温によって奇形花や花落ちが発生し、収量に直接影響することが知られている<sup>5)</sup>。沖縄県では、夏季の高温遭遇に起因した開花・結実不良による、冬春期の収穫量減

\* 1 〒901-0336 沖縄県糸満市820

§ Corresponding author, E-mail: teruyary@pref.okinawa.lg.jp

\* 2 〒906-0012 沖縄県平良市字西里2071-40

\* 3 〒903-0213 沖縄県西原町千原1

少が生じている。また一方では、夏秋期に収穫量が増加し取引単価も下落するなど、周年での安定生産が困難な状況にある<sup>6)</sup>。このため多収穫期に対応した、野菜用パパイアの貯蔵技術と、関連する基礎的研究が必要であるが、パパイアの鮮度保持に関する研究例は、成熟果に関する文献が多く<sup>7)~14)</sup>、野菜用パパイアに関する報告は少ない。

そこで本報では、野菜用パパイア貯蔵のための基礎的知見を得ることを目的とし、貯蔵温度と呼吸速度の関係を求め貯蔵適温を推測した。つぎに異なる温湿度での貯蔵試験を行い果実の生理的・化学的変化を調査することによって、野菜用パパイアの貯蔵条件を検討した。

## 実験方法

### 試験1 異なる貯蔵温度における野菜用パパイアの呼吸速度

(1) 試料 2005年6月に、沖縄県農業研究センター内ガラスハウスで栽培された‘台農5号’ (両性株, 平均440g±91g), ‘フルーツタワー’ (雌株, 平均901g±73g) および‘KC-16’ (雌株, 沖縄農研センター選抜系統, 平均1,040g±96g) を用いた。供試果の熟度は、一部着色した果実の3~4節ほど上部にある緑色果実を収穫し、傷や病害のない果実を選別した。

(2) 測定方法 呼吸速度は、密閉雰囲気中における単位時間あたりの二酸化炭素濃度上昇を測定し算出した。すなわち、供試果実1個を9.7ℓ容のデシケーターに入れ、恒温恒湿装置内で品温を安定させた。その後、デシケーターを密封して20分~1時間静置し、容器内雰囲気中の二酸化炭素排出量を、赤外線ガス分析計 (島津製作所製:CGT-7000) を用いて測定した。測定開始時の品温は5~7℃であり、そこから品温を3~5℃ずつ上昇させて測定し、最終的に41~43℃に至るまで測定を行った。測定後は、果実の体積および重量を測定し、単位時間・重量あたりの二酸化炭素排出量として算出した。

### 試験2 異なる貯蔵条件における野菜用パパイア外観品質の変化

(1) 試料 2006年7月、2008年10月に、沖縄県豊見城市で栽培された‘台農5号’ (雌株, 平均714±103g) を用い、試験1と同様に選別し、収穫した。

(2) 異なる温度による貯蔵条件 1試験区につき供試果10個を段ボール箱 (760mm×460mm×315mm) に静置し、平均7.1℃, 13.2℃, 17.9℃, 23.3℃ (相対湿度84%±2%) に調整したコールドロールボックス (ヤンマー社製:CRB1F) に貯蔵した。

(3) 異なる温湿度による貯蔵条件 試験は2回反復であり、1試験区につき供試果10個を使用し、段ボール箱に静置した。貯蔵条件は、平均5.1℃および13.3℃ (相対湿度90%RH±1%) に調整したコールドロールボックスおよび、平均5.3℃および13.0℃ (相対湿度40%±2%) に調整した低温貯蔵庫内に貯蔵した。

(4) 呼吸速度の測定 試験区あたり供試果3個を取り出し、試験1と同様にデシケーター内雰囲気中の二酸化炭素排出量を測定した。

(5) 評価方法 果実品質は、カビ害、低温障害、萎び、果皮色を指標に測定した。カビ害は、供試果に発生するカビの程度を、目視で5段階評価した。すなわち、評点1=変化なし、評点2=軸部にわずかに発生、評点3=果実表面積の5%以内に発生、評点4=5%~10%、評点5=10%以上、とした。低温障害は、PROUXらの報告<sup>8)</sup>を参考に、供試果に発生する窪み (ピッチング)、色むらを5段階評価した。すなわち、評点1=変化なし、評点2=わずかに発生、評点3=果実表面積の5%以内に発生、評点4=5%~10%、評点5=10%以上、とした。萎びは、QUINTANAらの報告<sup>9)</sup>を参考に、供試果に発生する萎びを5段階評価した。すなわち、評点1=変化なし、評点2=わずかな萎び、評点3=明確な萎び、評点4=果実の軟化を伴う萎び、評点5=強い軟化を伴う萎び、とした。果皮色は、黄化の程度を5段階評価した。すなわち、評点1=果実全体が緑色、評点2=果実表面積の5%以内が黄化、評点3=5~10%、評点4=10%~50%、評点5=50%以上、とした。各評価は、全供試果に対して行い、平均評点2を商品限界とした。

### 試験3 異なる貯蔵温度における野菜用パパイアの内容成分の変化

(1) 試料 2007年8月に、沖縄県豊見城市で栽培された‘台農5号’ (雌株, 平均694g±59g) とし、試験1と同様に選別し、収穫した。

(2) 貯蔵条件 供試果は1試験区20個とし、10個ずつ段ボール箱に静置して、平均7.0℃, 13.3℃, 18.2℃ (相対湿度:86%RH±3%) に調整したコールドロールボックスに貯蔵した。試験期間中は定期的に4個をサンプリングし、分析に供した。

(3) 内容成分の測定条件 内容成分は、果肉硬度、有機酸、糖類、アスコルビン酸 (還元型) を測定した。果肉硬度は、供試果の赤道部を約2cm幅に切断し、切断面中央部を3か所測定した。分析機器は、果肉硬度計 (藤原製作所:KM-1) に、直径12mmの円錐形プランジャーを装着して使用した。有機酸は、試料に対し10倍量の蒸留水 (w/v) を加え、ホモナイザーで磨砕、抽出した後、メンブレンフィルターで濾過したものを分析用試料とした。分離は、250mm×内径7.8mmの有機酸分析カラム (島津製作所製:SPR-H) を2本連結して行った。移動相は5mM p-トルエンスルホン酸、緩衝液は5mM p-トルエンスルホン酸, 0.1mM EDTA, 20mM Bis-Trisであり、流速は移動相、緩衝液ともに0.7ml/min、注入量は10μlとした。検出は電気伝導度検出器 (島津製作所製:CDD-6A) を使用した。糖類は、有機酸の測定に使用した試料をそのまま使用した。分離は、250mm×内径4.6mmのアミノカラム (昭和電工社製:Asahipak-NH2P-504E) を用いた。移動相は75%アセトニトリル

(v/v) であり、流速は1.0ml/min、注入量は10 $\mu$ lとした。検出は蒸発光散乱検出器（島津製作所製：ELSD-LT）を使用した。アスコルビン酸（還元型）は、試料に対し10倍量（w/v）の5%メタリン酸を加えてホモジナイズし、メンブレンフィルターで濾過し測定用試料とした。分離は、250mm×内径4.6mmのODSカラム（島津製作所製：Wakosil-II 5 C18,）を使用した。移動相は、5 mMリン酸であり、流速は1.0ml/min、注入量は10 $\mu$ lとした。検出は、フォトダイオードアレイ検出器（島津製作所製：SPD-20A）を使用し、波長246nmの吸光度を測定した。

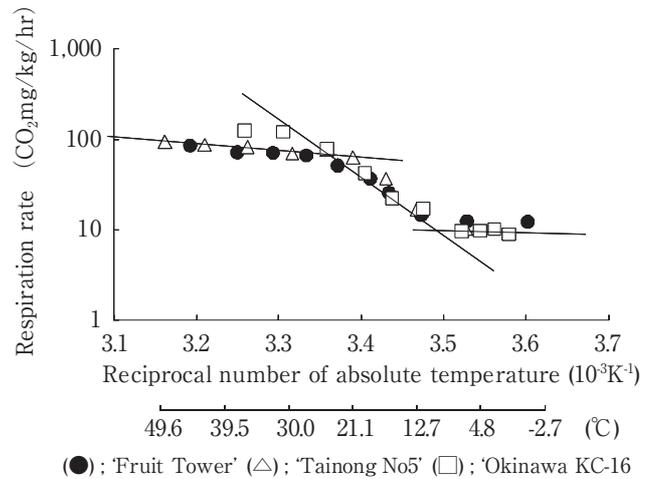
**結果および考察**

**試験1 異なる貯蔵温度における野菜用パパイアの呼吸速度**

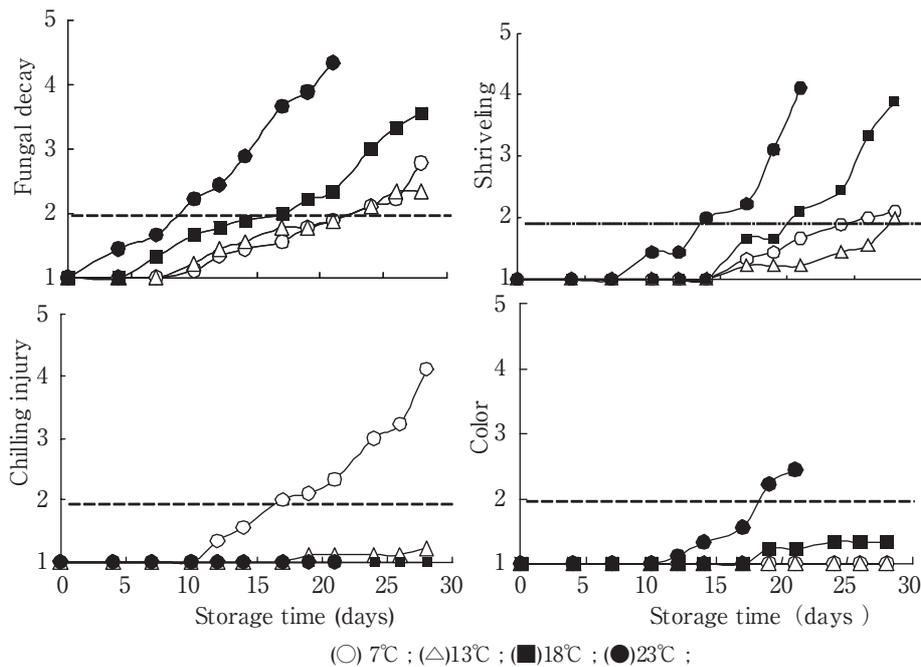
野菜用パパイア3品種の貯蔵温度による呼吸速度について、化学反応式の一つであるアレニウス式を適用し、近似線を作成した（Fig.1）。近似線は3本であり、その交点は約25 $\text{^\circ}$ Cおよび13 $\text{^\circ}$ Cであった。秋永<sup>15)</sup>は、近似線の交点が植物生理の変曲点であるとし、田尻<sup>16)</sup>は、マンゴの呼吸速度の変曲点から貯蔵適温を推測し、立証した。また、果物用パパイアの貯蔵では10 $\text{^\circ}$ C以下で低温障害が頻発することや<sup>10)</sup>、30 $\text{^\circ}$ C以上では果実の正常な追熟が困難である<sup>11)</sup>と報告されていることから、13 $\text{^\circ}$ C以下は低温障害が発生しやすくなり、25 $\text{^\circ}$ C以上では呼吸速度の増加による果実品質の急速な劣化が起これと推測した。

**試験2 異なる貯蔵条件における野菜用パパイア外観品質の変化**

野菜用パパイアの貯蔵温度における、カビ害、低温障害、萎びおよび果皮色の変化をFig.2に示した。カビ害は23 $\text{^\circ}$ Cおよび18 $\text{^\circ}$ Cで早く進行し、特に23 $\text{^\circ}$ Cでは貯蔵10日目に平均評点が2を超えた。一方、7 $\text{^\circ}$ Cと13 $\text{^\circ}$ Cでは24日に平均評点が2以上となった。また本試験で発生したカビ害は、果実用パパイアに頻発する炭疽病や軸腐れ病<sup>12)</sup>とは様相が異なり、初期は果梗部に灰褐色の菌糸を認め、その後徐々に拡大した。低温障害は7 $\text{^\circ}$ Cで顕著に発生し、7日目に商品性を失った。その一方で、13 $\text{^\circ}$ C以上の



**Fig.1** Temperature dependency of respiration rate for immature papaya fruit of three cultivars (Eq. Arrhenius)



**Fig. 2** Quality characteristics of 'Tainong No5' immature papaya fruit stored at various temperatures

The dotted line corresponds to the limit of salability.

試験区では発生が認められなかったことから、試験1での推測を一部立証する結果となった。萎びは貯蔵温度が高いほど早く進行し、23℃で14日目、18℃で21日目、7℃、13℃では24日目以降に貯蔵限界となった。果皮色は、カビ害の顕著な23℃で速やかに黄化し、18日目に貯蔵限界となった。

重量減少率と呼吸速度の変化をFig. 3に示した。重量減少率は、23℃で12日目、18℃で21日目、13℃、7℃で28日目に約8%となった。果実用パパイヤでは、重量減少率8%以上となった場合、萎びが顕著になり、商品限界に至ると報告されており<sup>17)</sup>、本試験でも同様の結果となった。呼吸速度は23℃で4日目以降上昇したが、他の試験区は安定的に推移した。また7℃と13℃を比較すると、7℃で呼吸速度が高く推移した。収穫後の青果物は、損傷を受けると呼吸速度が増大することが知られている<sup>18)</sup>。23℃では顕著なカビ害、7℃では低温障害が発生しており、このために呼吸速度が増加したと推測した。また果実用パパイヤは、典型的なクライマテリック型果実で<sup>19)</sup>、追熟とともに呼吸速度が急速に上昇することが知られているが、本試験においてそのような現象は認められなかった。

つぎに、貯蔵温湿度が野菜用パパイヤの品質に与える影響について検討した (Fig. 4)。カビ害は、低湿度では

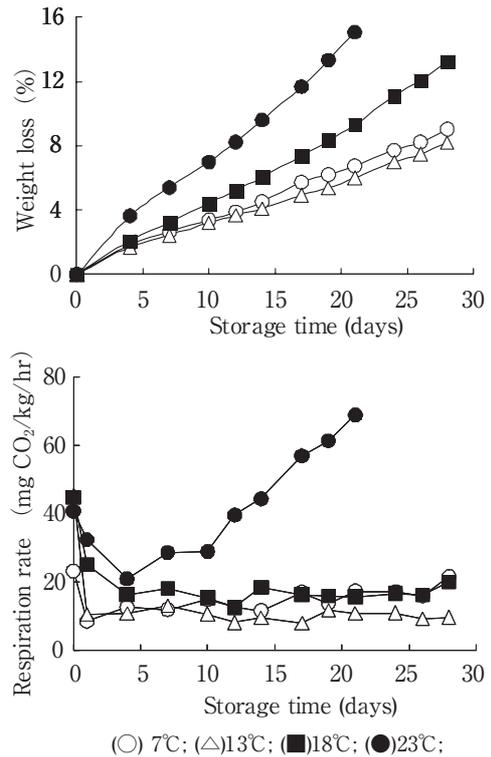


Fig. 3 Weight loss and respiration rate changes in 'Tainong No 5' immature papaya fruit during storage at various temperatures

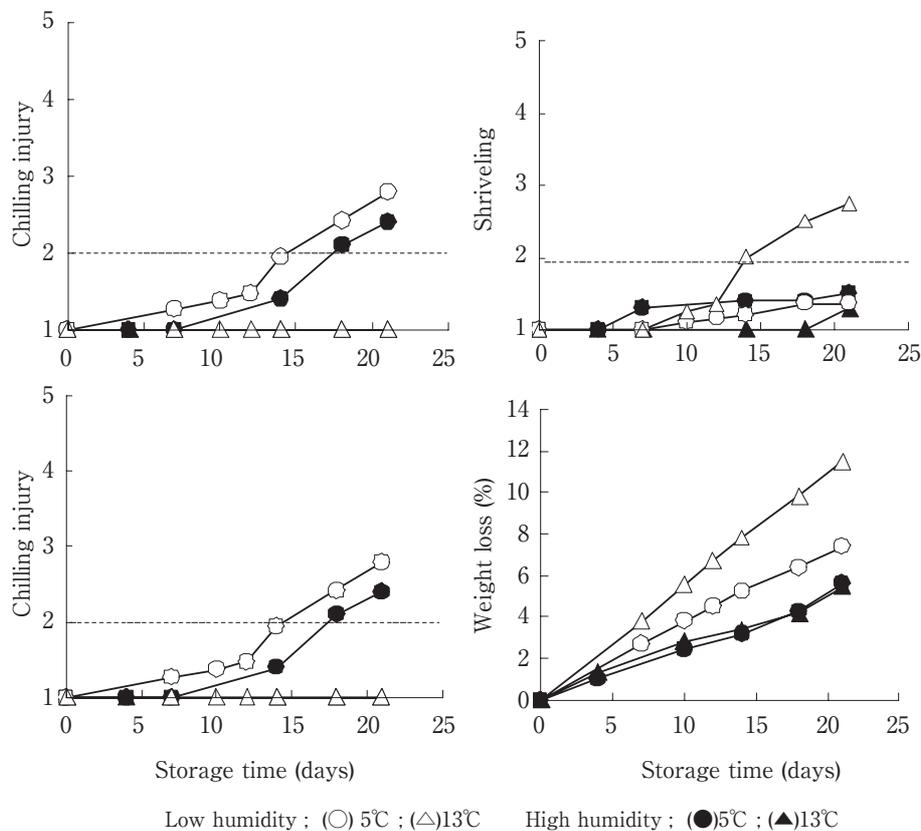


Fig. 4 Quality characteristics of 'Tainong No 5' immature papaya fruit stored at various temperatures and humidity

The dotted line corresponds to the limit of salability.

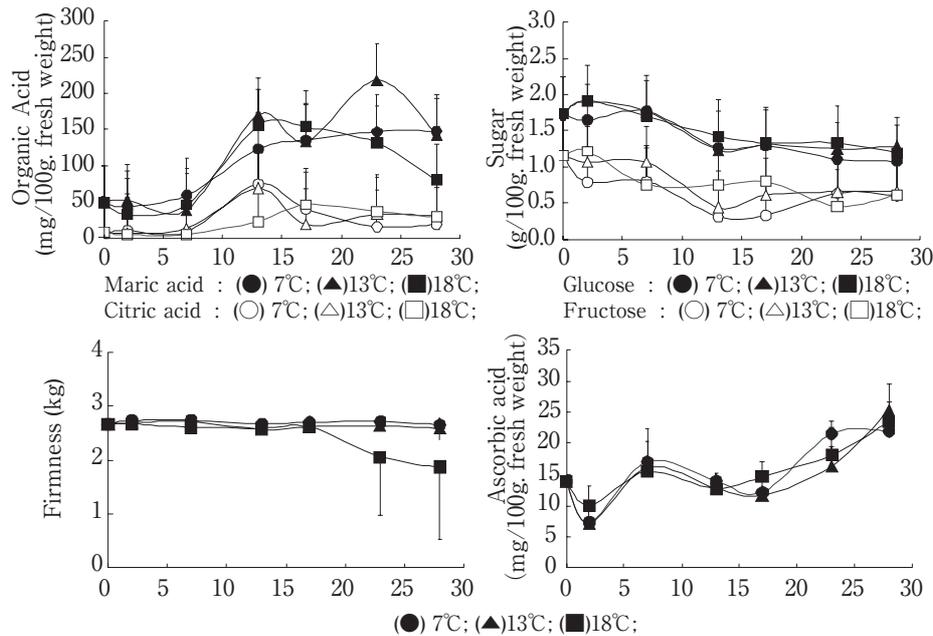


Fig. 5 Changes in organic acid, sugar, firmness, and ascorbic acid contents of 'Tainong No 5' immature papaya fruit during storage at various temperatures

Data are the mean  $\pm$  S.D.

とんど進行が認められなかったが、高湿度では進行し、13°Cで21日目に商品限界となった。低温障害は、湿度によらず、同様の傾向となった。すなわち、5°Cにおける増加が顕著であり、低湿度では14日目、高湿度では18日目に商品限界となった。萎びは、低湿度の13°Cで速やかに上昇し、貯蔵14日目に商品限界を超えた。同様に、重量減少率も低湿度で速やかに上昇し、13°Cで14日目、5°Cで21日目に約8%となった。

### 試験3 異なる貯蔵温度における野菜用パパイアの内容成分の変化

低温貯蔵時における野菜用パパイアの有機酸、糖類、果肉硬度、アスコルビン酸の変化をFig.5に示した。本試験において、貯蔵温度と成分変化の間に明確な差異は認められず、同様な変化を示した。有機酸はリンゴ酸とクエン酸を検出し、リンゴ酸は30~220mg/100g、クエン酸は6~70mg/100g新鮮重で推移した。このうちクエン酸は安定的に推移し、リンゴ酸は増加傾向を示した。糖類は果糖とブドウ糖を検出し、果実用パパイアの主要糖類であるショ糖<sup>13)</sup>は検出されなかった。果糖は0.3g~1.2g/100g、ブドウ糖は1.2g~1.9g/100gで推移し、減少傾向を示した。果肉硬度では、18°Cで23日目に硬度の低下が認められた。この現象については、供試果の一部にカビが発生し、これに伴う果肉崩壊が進んだためと考えた。一方、13°C、7°Cでは試験開始から終了時まで約2.7kg前後で安定的に推移した。アスコルビン酸はすべての試験区で増加する傾向を示した。果実用パパイアでは、追熟期間中にアスコルビン酸が前駆体から合成され、増加することが明らかとなっている<sup>14),20)</sup>。本

試験では追熟に特有な現象は認められないことから、アスコルビン酸は追熟時だけではなく、通常の代謝によっても増加すると推測した。

以上のことから、野菜用パパイアの貯蔵において、商品性を損ねる主な要因はカビ害、萎び、低温障害であり、貯蔵温湿度では、相対湿度90%、13°C貯蔵で、約3週間良好な品質を維持した。また貯蔵中の果皮色、呼吸速度および果肉硬度は大きく変化しないことから、野菜用パパイアは、貯蔵中に追熟するまでには至らず、安定した状態で貯蔵できることが示された。

本報では、沖縄県内で主に野菜用として用いられている「台農5号」を中心に試験を実施した。野菜用パパイアにおいては、専用品種は皆無であり、ほとんどが果実用品種の未成熟果を利用している。パパイアの成熟特性については、果実用パパイアの追熟進行における品種間差が報告されている<sup>7)</sup>。成熟が進行し、果肉が黄化した野菜用パパイアは、商品価値が低くなることから、今後は品種毎の収穫適期の把握が技術的課題になると思われる。また、収穫後病害であるカビ害対策については、果実用パパイアにおいて、加熱処理による防除法が報告されている<sup>21)</sup>。本技術についても、野菜用パパイアを用いた検討が必要になるものと思われる。

### 文 献

- 1) 石畑清武・岩川文寛：園芸果樹大百科17熱帯特産果樹（農文教、東京）、pp.133~149（2000）
- 2) 沖縄総合事務局：農林水産部統計資料、（2005）
- 3) 森枝卓士：世界の食文化4ベトナム・カンボジア・

- ラオス・ミャンマー (農文教・東京), p.111 (2003)
- 4) 尚 弘子・上江洲菊子・新島正子・金城清朗:日本の食生活全集47聞書・沖縄の食事 (農文教, 東京), pp.232~233 (1988)
- 5) NAKASONE, H. Y., 出花幸之介・井上裕嗣訳:パパイアにおける果実の着生と発達 沖縄農業, **32**, 68~88 (1993)
- 6) 玉城盛俊:パパイアの施設栽培による安定生産技術, 施設と園芸, **139**, 31~33 (2007)
- 7) ZHANG, L. X. and PAULL, R. E.: Ripening behavior of papaya genotypes, *Hort. Sci.*, **25**, 454~455 (1990)
- 8) PROULX, E., CECILIA, M., NUNES, N., EMOND, J. P. and BRECHT, J. K.: Quality attributes limiting papaya postharvest life at chilling and non-chilling temperatures, *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **118**, 389~395 (2005)
- 9) QUINTANA, M. E. G. and PAULL, R. E.: Mechanical injury during postharvest handling of 'Solo' papaya fruit, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **118**, 618~622 (1993).
- 10) CHEN, M. M. and PAULL, R. E.: Development and prevention chilling injury in papaya fruit, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **111**, 639~643 (1986)
- 11) AN, J. F. and PAULL, R. E.: Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit, *J. Amer. Hort. Sci.*, **115**, 949~953 (1990)
- 12) ALVAREZ, A.M. and NISHIJIMA, W. T.: Postharvest disease of papaya, *Plant Disease*, **71**, 681~686 (1987)
- 13) GOMEZ, M., LAJOLO, F. and CORDENUNSI, B.: Evolution of soluble sugars during ripening papaya fruit and its relation to sweet taste, *J. Food Sci.*, **67**, 442~447 (2002)
- 14) LAZAN, H., ALI, Z. M., LIANG, K. M. and YEE, K. L.: Polygaracturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment, *Physiologia Plantarum*, **77**, 93~98 (1989)
- 15) 秋永孝義・和田博幸・國府田佳弘:沖縄県産熱帯性果実の呼吸特性に関する研究, 琉球大学農学部学術報告, **41**, 161~167 (1994)
- 16) 田尻貴巳・秋永孝義・川崎聖司:沖縄県産マンゴー(アーウィン)の完熟果と緑熟果の最適貯蔵温度, 農業施設, **27**, 65~70 (1996)
- 17) PAULL, R. E. and CHEN, N. J.: Waxing and Plastic wraps influence water loss from papaya fruit during storage and ripening, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **114**, 937~942 (1989)
- 18) 西條了康:果樹園芸大百科21品質・鮮度保持 (農文協, 東京), pp.91~98 (2004)
- 19) 上野陽一郎:果実の鮮度保持マニュアル (流通システム研究センター, 東京), p.169 (2000)
- 20) BARATA, S. A. D., GOMEZ, M. L. P. A., MESQUITA, C. H. and LAJOLO, F. M.: Ascorbic acid biosynthesis: precursor study on plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, **16**, 147~154 (2004)
- 21) 矢口行雄・中村重正:パパイア軸腐病に対する温湯ならびに蒸熱処理の効果, 熱帯農業, **37**, 167~170 (1993)
- (平成23年4月4日受付, 平成23年7月20日受理)

## Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.) Root

ANDI Nur Faidah Rahman<sup>\*1, \*2, \*3</sup>, OHTA Mayumi<sup>\*2</sup>, LI Yunge<sup>\*2</sup>,  
NAKATANI Kazuya<sup>\*2</sup>, HAYASHI Nobuyuki<sup>\*2</sup>, FUJITA Shuji<sup>\*2, §</sup>

\* 1 *United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University,  
1-21-24, Kourimoto, Kagoshima-shi, Kagoshima 890-0065, Japan*

\* 2 *Faculty of Agriculture, Saga University, 1, Honjou-machi, Saga-shi, Saga 840-8502, Japan*

\* 3 *Department of Food Science and Technology, Hasanuddin University, Makassar 90245, Indonesia*

Polyphenol oxidase (PPO) was purified from the Japanese radish root by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, and gel filtration using phloroglucinol as a substrate. The enzyme was purified about 192-fold with a recovery rate of 15%. The purified enzyme appeared as a single band on SDS-PAGE. The molecular weight of the purified PPO was estimated to be about 44 kDa by gel filtration and 45.7 kDa by SDS-PAGE. The purified enzyme quickly oxidized phloroglucinol (1, 3, 5-trihydroxybenzene) with a  $K_m$  of 2 mM. The enzyme also oxidized 1, 2, 3-trihydroxybenzenes, such as pyrogallol and gallic acid; however, it did not oxidize *o*-diphenols, such as chlorogenic acid and dopamine. Peroxidase (POD) activity was also present in the purified enzyme preparation with the final preparation having a purification and recovery rate of 259-fold and 20%, respectively. The optimum pH for the PPO and POD activities was 8.0 and 5.0, respectively, and the measured activities were stable at 5°C for 20 h in the pH ranges of 3.0~10.0 and 3.0~11.0, respectively. Both enzyme activities were stable up to 50°C after heat treatment for 10 min and were strongly inhibited by treatment with sodium diethyldithiocarbamate, potassium cyanide, L-ascorbic acid, chlorogenic acid, and hydroquinone at a final concentration of 10 mM.

(Received May 9, 2011 ; Accepted Jul. 20, 2011)

**Key words** : *Japanese radish, polyphenol oxidase, phloroglucinol oxidase, peroxidase, characterization*

ダイコン, ポリフェノール酸化酵素, フロログルシノール酸化酵素, パーオキシダーゼ, 精製と性質

The undesirable browning of damaged tissues in fruits and vegetables occurs by the enzymatic oxidation of polyphenols. Such oxidation is mainly caused by polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1 ; *o*-diphenol : oxygen oxidoreductase, PPO). Because browning can decrease the marketability of variety of fruits and vegetables, many studies have investigated PPO with the goal of preventing this discoloration<sup>1)~9)</sup>. PPOs that originate from distinct plant sources display different substrate specificities. Most PPOs oxidize *o*-diphenols, such as catechol, chlorogenic acid, dopamine, DL - dopa, and 4 - methylcatechol. For example, purified PPOs from edible burdock<sup>5)</sup>, garland chrysanthemum<sup>6)</sup>, and apple<sup>7)</sup> are known to strongly oxidize chlorogenic acid, while banana PPO<sup>10),11)</sup> strongly oxidizes dopamine. In contrast, purified PPOs of edible

burdock<sup>12)</sup> and soybean<sup>13)</sup> oxidize pyrogallol (1, 2, 3-trihydroxybenzene) and phloroglucinol (1, 3, 5-trihydroxybenzene) but do not oxidize *o*-diphenols. However, a novel type of PPO, which only oxidizes 1, 3, 5-trihydroxybenzenes, such as phloroglucinol and phloroglucinol carboxylic acid, was found by our laboratory in Satsuma mandarin<sup>14)</sup>, cabbage<sup>15),16)</sup>, and turnip<sup>17)</sup>. These purified phloroglucinol-oxidizing PPOs (PhOs) also have strong peroxidase (EC 1.11.1.7 ; POD) activities. While purified soybean PPO<sup>13)</sup> has been shown to have dual PPO and POD activities, edible burdock PPO<sup>5)</sup> was not found to have POD activity. PhO activity was found in crude extracts of the Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) root, which is considered a cruciferous vegetable similar to cabbage and turnip. Interestingly, PPO that was purified from the Japanese radish root was found to

have dual PPO and POD activities, which is similar to that of soybean<sup>13)</sup>, cabbage<sup>15),16)</sup>, and turnip<sup>17)</sup> PPOs; however, a detailed characterization of Japanese radish root PPO has not previously been conducted. In the present study, Japanese radish root PPO was purified using phloroglucinol as a substrate, and the properties of the purified enzyme were investigated.

## Materials and Methods

### 1. Materials

Fresh Japanese radish (*Raphanus sativus* L. cv. Aokubi soufuto-L.) root was purchased from a local market in Saga City. DEAE-Toyopearl 650-M, Butyl Toyopearl 650-M, and Toyopearl HW 55-s were obtained from Tosoh Co., Tokyo, Japan. Other reagents were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan.

### 2. Measurement of enzyme activity

(1) **PhO activity** PhO activity was measured by a spectrophotometric method that was based on differences in spectra<sup>18)</sup>. The reaction mixtures consisted of 0.5 ml of 20 mM aqueous phloroglucinol, 1.4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), and 0.1 ml of each fraction obtained by chromatography. After incubation for 10 min at 30°C, 0.5 ml of the reaction mixture was removed and added to 4.5 ml of distilled water. The absorbance of the sample was then measured at 272 nm against an enzyme blank. One unit of enzyme activity was expressed as an increase in absorbance at 272 nm ( $\Delta A_{272}$ ) of 0.1 per min in a 1-cm light path.

(2) **PPO activity** PPO activity was measured by a colorimetric method<sup>10),19),20)</sup>. The reaction mixtures consisted of 0.5 ml of 10 mM aqueous solution of various polyphenols, 4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), and 0.5 ml of enzyme solution. After a 5-min incubation at 30°C, the increase in absorbance at 420 nm ( $\Delta A_{420}$ ) was measured. One unit of enzyme activity was defined as 0.1  $\Delta A_{420}$  per min (1-cm light path).

(3) **POD activity** POD activity was determined by a colorimetric method<sup>15)</sup>. The reaction mixtures contained 0.5 ml of a 0.1 M aqueous solution of guaiacol, 4.1 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), 0.2 ml of 0.1% hydrogen peroxide, and 0.2 ml of the enzyme solution. After incubation for 2 min at 30°C, the increase in absorbance at 470 nm ( $\Delta A_{470}$ ) was measured. One unit of enzyme activity was defined as 0.1  $\Delta A_{470}$  per min (1-cm light path).

### 3. Purification of the enzyme

All steps were carried out at 5°C. Whole roots from the Japanese radish (10 kg; 9~10 radishes) were homogenized with a Japanese-style grater without using buffer. After filtration of the homogenate through a cotton cloth, the filtrate was centrifuged at  $10,300 \times g$  at 4°C for 20 min. The supernatant was then brought to 80% saturation with ammonium sulfate. Precipitated protein was collected by centrifugation ( $10,300 \times g$ ), dissolved in a small volume of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), and then dialyzed against the same buffer for 36 h with the four changes of the dialysis buffer. After another round of centrifugation ( $10,300 \times g$ ), the dialyzed solution was applied to a DEAE-Toyopearl 650-M column ( $4.5 \times 15$  cm) that was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) and eluted with the same buffer. Fractions containing active PPO, which were not adsorbed onto the column, were pooled, brought to 1 M saturation with ammonium sulfate, and then applied to a Butyl-Toyopearl 650-M column ( $1.6 \times 15$  cm) that was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 M ammonium sulfate. The column was eluted using a linear gradient of ammonium sulfate (1 to 0 M ammonium sulfate in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0). Fraction containing PPO activity were pooled and dialyzed with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). The dialyzed solution was concentrated using a membrane filter (Amicon YM-10, Millipore Japan Co., Tokyo, Japan), added to a Toyopearl HW 55-s column ( $1.6 \times 80$  cm) that was equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, and then eluted using the same buffer. Fractions containing enzyme activity were collected and used for enzyme characterization.

### 4. Determination of protein

Protein content was determined using the method of HARTREE<sup>21)</sup> with bovine serum albumin (BSA, fraction V; Katayama Chemical, Industries Co., Ltd., Osaka, Japan) used as a standard. In chromatography, protein was expressed as absorbance at 280 nm.

### 5. Molecular weight determination

Molecular weight of the purified enzyme was determined by gel filtration and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Gel filtration was performed following the method of ANDREWS<sup>22)</sup> with the use of  $\alpha$ -globulin (160 kDa), serum albumin (bovine; 65 kDa), ovalbumin

(chicken egg ; 44 kDa), and cytochrome c (12.4 kDa) as marker proteins. SDS-PAGE was carried out as described by WEBER and OSBORN<sup>23)</sup> with the use of myosin (209 kDa),  $\beta$ -galactosidase (124 kDa), serum albumin (bovine ; 80 kDa), ovalbumin (chicken egg ; 49.1 kDa), carbonic anhydrase (34.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), and lysozyme (20.6 kDa) as marker proteins.

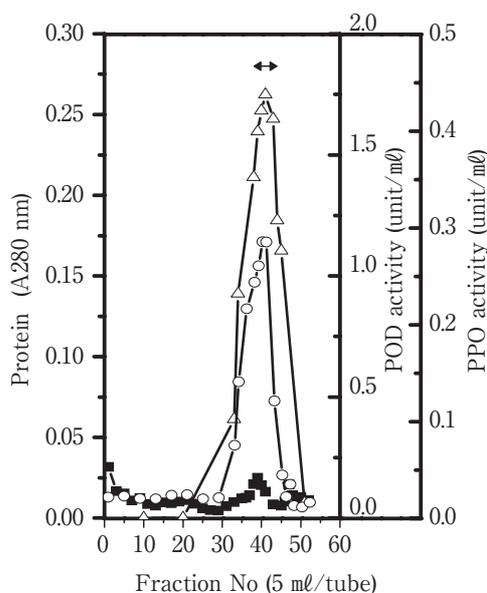
### Results and Discussion

( 1 ) **Purification of the enzyme** Fig.1 shows a typical elution pattern of PPO on a gel filtration column. Enzyme activity eluted in one peak, and the peak fractions from several columns were pooled as purified enzyme. A typical stepwise purification of PPO is shown in Table 1. After the final purification steps, the enzyme preparation

contained a specific activity that was increased 192-fold compared to that of the initial homogenate with a recovery rate of 15%.

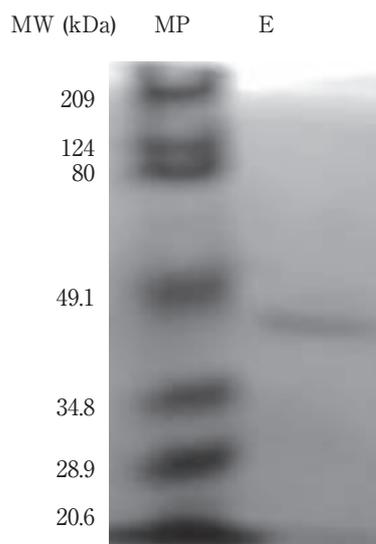
#### ( 2 ) Characterization of the purified enzyme

The purified enzyme appeared as a single band on SDS-PAGE (Fig.2). As shown in Fig. 3, the molecular weight of PPO was estimated to be about 44 kDa by gel filtration and 45.7 kDa by SDS-PAGE. These results indicate that the purified enzyme is monomeric. While the molecular weight of the purified Japanese radish root PPO was similar to soybean PPO (47 kDa)<sup>13)</sup> and leaf lettuce PPO (46 kDa)<sup>24)</sup>, it differed from those of edible burdock (40 kDa)<sup>5)</sup>, cabbage F-IA (40 kDa)<sup>15)</sup>, cabbage F-IB (43 kDa)<sup>16)</sup>, turnip (27 kDa)<sup>17)</sup>, Japanese pear (56 kDa)<sup>20)</sup>, broccoli (57 kDa)<sup>25)</sup>, and Turkish black radish (66 kDa)<sup>26)</sup>.



**Fig. 1** Elution pattern of the enzyme from the Toyopearl HW 55-s column

(↔) fraction pooled ; (○) PPO activity ;  
(■) protein ; (Δ) POD activity.

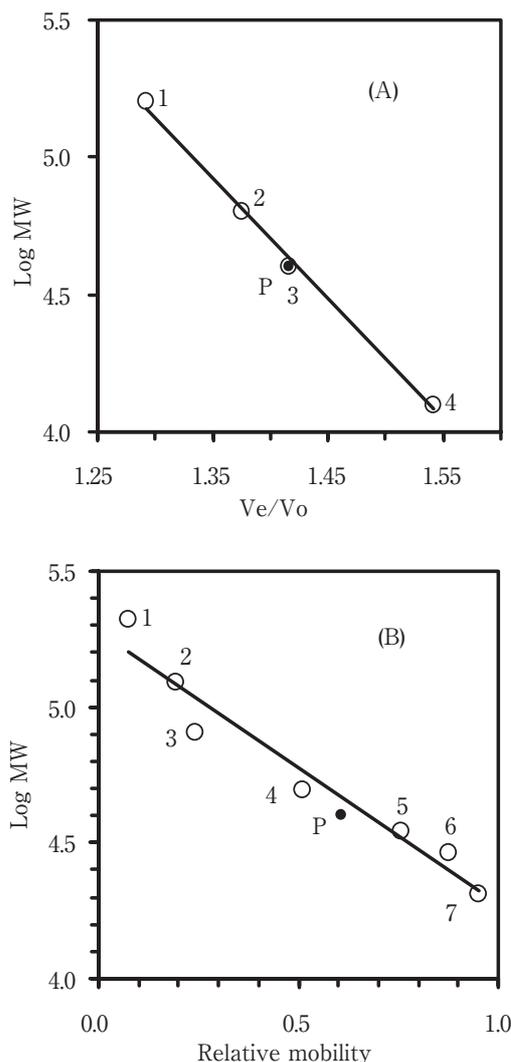


**Fig. 2** SDS-PAGE of the purified enzyme

MW, molecular weight ; MP, marker protein ; E, Enzyme.

**Table 1** Purification of the Japanese radish root enzyme

Enzyme	Volume (ml)	Phloroglucinol Oxidase (PhO)					Peroxidase (POD)			
		Total Activity (Units)	Total Protein (mg)	Specific Activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)	Total Activity (Units)	Specific Activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude Extract	6,890	689,345	35,812	19	1.0	100	1,302,210	36	1.0	100
Crude Enzyme	490	302,967	2,379	127	6.6	44	514,338	216	6.0	40
DEAE-Toyopearl 650-M	1,225	379,922	266	1,428	74.2	55	456,404	1,716	47.2	35
BUTYL-Toyopearl 650-M	931	143,421	50	2,875	149.4	21	328,696	6,589	181.2	25
Toyopearl HW 55-s	1,250	103,167	28	3,694	192.0	15	262,938	9,415	259.0	20



**Fig. 3** Molecular weight estimation of the enzyme by gel filtration on a Toyopearl HW 55-s column (A) and by SDS-PAGE (B)

(A)  $V_0$ , void volume of the column;  $V_e$ , elution volume of the substance; MW, molecular weight: 1.  $\alpha$ -globulin (160 kDa), 2. serum albumin (bovine; 65 kDa), 3. ovalbumin (chicken egg; 44 kDa), and 4. cytochrome c (12.4 kDa); P, purified enzyme.

(B) MW, molecular weight in kDa: 1. myosin (209 kDa), 2.  $\beta$ -galactosidase (124 kDa), 3. serum albumin (bovine; 80 kDa), 4. ovalbumin (chicken egg; 49.1 kDa), 5. carbonic anhydrase (34.8 kDa), 6. soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), and 7. lysozyme (20.6 kDa); P, purified enzyme.

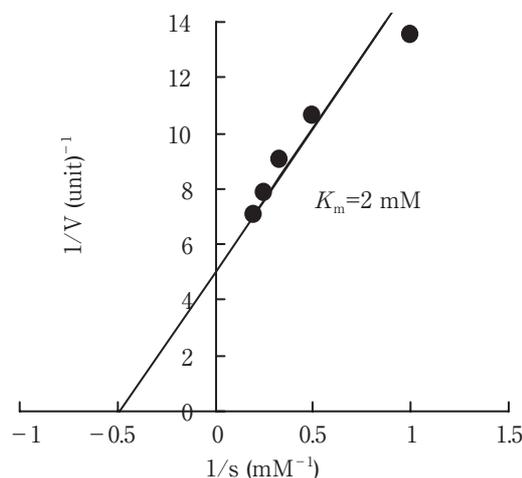
Most PPOs oxidize *o*-diphenols, such as catechol, chlorogenic acid, dopamine, DL-dopa, and 4-methylcatechol. PPOs purified from edible burdock<sup>5</sup>, garland chrysanthemum<sup>6</sup>, and apple<sup>7</sup> strongly oxidize chlorogenic acid, while banana PPO<sup>10,11</sup> strongly oxidizes dopamine. As shown in Table 2, purified Japanese radish root PPO strongly oxidizes 1, 3, 5-trihydroxybenzenes, such as phloroglucinol and

**Table 2** Substrate specificities of Japanese radish root PPO

Substrate	Specific Activity (Unit/mg)
Phloroglucinol <sup>1</sup>	3,694
Phloroglucinol carboxylic acid <sup>1</sup>	1,692
Pyrogallol <sup>2</sup>	91
Gallic acid <sup>2</sup>	16
Catechol <sup>2</sup>	0
Chlorogenic acid <sup>2</sup>	0
DL-Dopa <sup>2</sup>	0
Dopamine <sup>2</sup>	0
Resorcinol <sup>2</sup>	0

<sup>1</sup>Measured by a spectrophotometric method based on differences in spectra<sup>18</sup>

<sup>2</sup>Measured by a colorimetric method<sup>10,19,20</sup>



**Fig. 4** Lineweaver-Burk plots of phloroglucinol oxidation by the enzyme

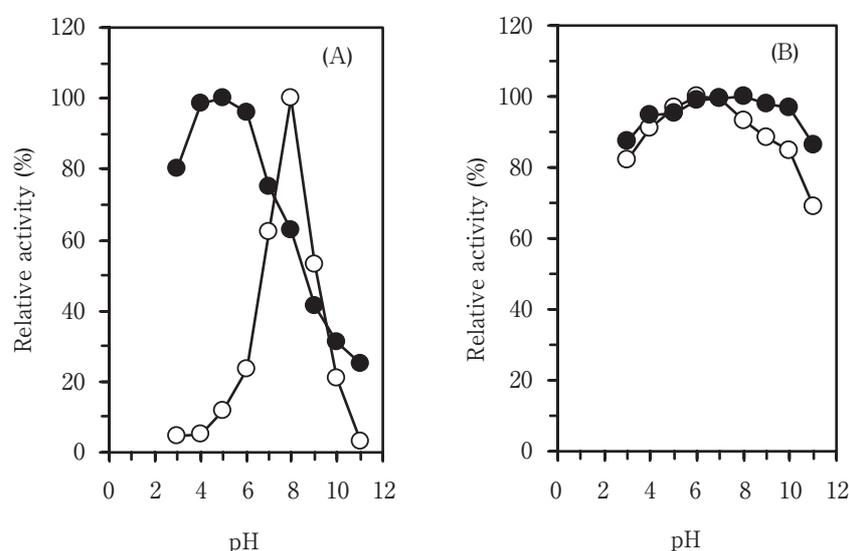
phloroglucinol carboxylic acid. The Michaelis constant ( $K_m$ ) of the enzyme for the oxidation of phloroglucinol was 2 mM (Fig. 4). This value differed from that of other plant PPOs, specifically, Satsuma mandarin PPO (0.67 mM)<sup>14</sup>, cabbage PPO F-IA (6.4 mM)<sup>15</sup>, and cabbage PPO F-IB (8.5 mM)<sup>16</sup>. PPO purified from the Japanese radish root also oxidized 1, 2, 3-trihydroxybenzenes, such as pyrogallol and gallic acid; however, it did not oxidize *o*-diphenols, such as catechol, chlorogenic acid, and dopamine, or *p*-diphenols, such as resorcinol. This enzyme was found to share a similar substrate specificity as that of edible burdock PPO<sup>12</sup> and soybean PPO<sup>13</sup>. However, the substrate specificities of these three enzymes were different from the PPOs of Satsuma mandarin<sup>14</sup>,

cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup>, which only oxidized 1, 3, 5-trihydroxybenzenes.

The purified Japanese radish root enzyme preparation was red in color with an absorption maxima at 405, 490, and 630 nm, which was similar to that of soybean PPO<sup>13</sup>. Similar results were obtained using purified PPOs of Satsuma mandarin<sup>14</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup>, which contain iron. Soybean, Satsuma mandarin, cabbage, and turnip enzymes had dual PPO and POD activities. As shown in Fig. 1, activities of both PPO and POD were detected in the same peak fraction with the final purification of the Japanese radish root enzyme. Furthermore, the purified enzyme was visualized as a single protein band on SDS-PAGE (Fig. 2). Therefore, we reasoned that the Japanese radish root enzyme has dual PPO and POD activities, similar to the soybean<sup>13</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup> enzymes. The final preparation of the purified enzyme showed a 259-fold increase in POD activity and had a recovery rate of 20% for POD (Table 1). Further characterization of the PPO and POD activities of the enzymatic preparation was conducted. The effects of pH on the activity and

stability of both PPO and POD activities of the purified enzyme are shown in Fig. 5. The optimal pH for PPO and POD activities was 8.0 and 5.0, respectively (Fig. 5 A). The effects of changes in the pH on PPO and POD activities of the PPO enzyme have also been demonstrated for PPOs in soybean<sup>13</sup>, Satsuma mandarin<sup>14</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup>. The optimal pH for the activity of the Japanese radish root PPO enzyme was similar to PPOs purified from soybean<sup>13</sup>, cabbage F-IA<sup>15</sup>, cabbage F-IB, cabbage F-II<sup>16</sup>, and turnip<sup>17</sup>, which were shown to function best in the optimal pH range of 7.4~7.6. However, the optimal pH for our purified Japanese radish root PPO differed from that of butter lettuce PPO (pH 5.5)<sup>8</sup> and vanilla bean PPO (pH 3.0)<sup>9</sup>. The optimal pH for POD activity in our purified Japanese radish root enzymatic preparation was also similar to that of Satsuma mandarin<sup>14</sup>, and turnip<sup>17</sup>, but it differed from cabbage enzyme F-IA (pH 6.4)<sup>15</sup>, and F-II (pH 6.7)<sup>16</sup>.

As shown in Fig. 5 B, both PPO and POD activities of the Japanese radish root enzyme were stable in wide pH ranges. Eighty percent of the PPO and POD activities was retained in the pH



**Fig. 5** Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of the enzyme

(○) PPO activity ; (●) POD activity

(A) PPO and POD activities were measured at 30°C in McIlvaine buffer in the pH range 3.0~8.0 and in Atkins-Pantin buffer in the pH range 9.0~11.0. Activity was expressed as a percentage of the maximum activity level.

(B) The enzyme was pre-incubated in McIlvaine buffer at different pH values, ranging from 3.0~8.0 or in Atkins-Pantin buffer at different pH values, ranging from 9.0~11.0 at 5°C for 20 h. Residual PPO and POD activities were measured under standard conditions (PPO: pH 7.0, 30°C and POD: pH 6.0, 30°C). Activity was expressed as a percentage of the maximum activity level.

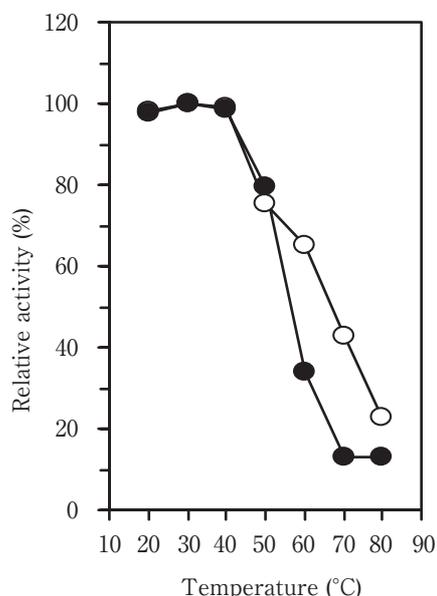
ranges 3.0~10.0 and pH 3.0~11.0, respectively. The ranges of pH stability for both PPO and POD activities differed slightly from those of cabbage F-IA PPO<sup>15</sup>, in which both activities were stable in the range of pH 5.0~11.0. Similar results were found for Satsuma mandarin PPO<sup>14</sup> and turnip PPO<sup>17</sup>.

The PPO enzyme from Satsuma mandarin<sup>14</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup> had a very high thermal stability. Fig. 6 shows the thermal stability of the purified Japanese radish root PPO enzyme. After heating at 80°C for 10 min, only 20% of the PPO activity remained; however, POD activity was almost completely lost. The thermal stability of this preparation of PPO enzyme was lower than that of the above enzymes (specifically, that of Satsuma mandarin<sup>14</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup>). In contrast, the soybean enzyme<sup>13</sup> had a similar thermal stability of PPO and POD activities as the Japanese radish root enzyme.

Table 3 shows the effects of different compounds on the PPO and POD activities of the purified enzyme. Both the PPO and POD activities were markedly inhibited by sodium diethyldithiocarbamate and potassium cyanide when used at a 10 mM final concentration. Additionally, L-ascorbic acid inhibited

both PPO and POD activities at 10 mM but not at 1 mM. CuSO<sub>4</sub> inhibited PPO activity, but did not inhibit POD activity. Remarkably, MnCl<sub>2</sub> was found to activate PPO in edible burdock<sup>12</sup>, cabbage<sup>15,16</sup>, and turnip<sup>17</sup>; however, little activation was found for Japanese radish root PPO. Both PPO and POD activities were markedly inhibited by chlorogenic acid (an *o*-diphenol) and hydroquinone (a *p*-diphenol) which is similar to studies using purified from Satsuma mandarin<sup>14</sup> and cabbage<sup>15,16</sup>.

In conclusion, Japanese radish root PPO was purified using phloroglucinol as a substrate. The purified enzyme quickly oxidized 1, 3, 5-trihydroxybenzenes, such as phloroglucinol and phloroglucinol carboxylic acid, and 1, 2, 3-trihydroxybenzenes, such as pyrogallol; however, it did not oxidize *o*-diphenols, such as chlorogenic acid and dopamine, which was similar to edible burdock PPO<sup>12</sup> and soybean PPO<sup>13</sup>. Furthermore, the substrate specificities of these enzymes differed from those of Satsuma mandarin PPO<sup>14</sup>, cabbage PPO<sup>15,16</sup>, and turnip PPO<sup>17</sup>, which only oxidized 1, 3, 5-trihydroxybenzene. POD activity was also found in the purified Japanese radish root PPO. Due to the different effects of pH, temperature, and various compounds on PPO and POD activities of the purified Japanese radish root enzyme, it probable that this enzyme has separate active sites for PPO and POD activities, and this may also be the case



**Fig. 6** Effects of temperature on the stability of the enzyme

(○) PPO activity; (●) POD activity.

The enzyme preparation was heated at temperatures ranging from 20°C~80°C for 10 min. Residual PPO and POD activities were measured under standard conditions (PPO: pH 7.0, 30°C and POD: pH 6.0, 30°C). Activity was expressed as a percentage of the maximum activity level.

**Table 3** Effects of various compounds on PPO and POD activities

Compounds	Relative Activity (%)			
	PPO activity		POD activity	
	1 mM <sup>a</sup>	10 mM <sup>a</sup>	1 mM <sup>a</sup>	10 mM <sup>a</sup>
None	100	100	100	100
Sodium diethyldithiocarbamate	11	0	89	33
KCN	87	32	0	0
EDTA	98	94	94	92
NaF	105	110	103	83
NaCl	103	100	97	92
MnCl <sub>2</sub>	128	132	93	90
CuSO <sub>4</sub>	37	13	111	96
BaCl <sub>2</sub>	115	97	108	119
ZnSO <sub>4</sub>	109	107	105	103
L-ascorbic acid	109	0	97	1
Chlorogenic acid	21	16	48	1
Resorcinol	116	104	104	96
Hydroquinone	28	26	33	1

<sup>a</sup>Final concentration of compound

for soybean<sup>13)</sup>, cabbage<sup>15),16)</sup>, and turnip<sup>17)</sup> PPOs.

### References

- 1) AJILA, C. M. and PRASADA RAO, U. J. S. : Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase, *J. of Molecular Catalysis B : Enzymatic.*, **60**, 36~44 (2009)
- 2) FUJITA, S., HAN, Y.-Z., KOUNO, C., MATSUO, T., YAMASITHA, M., HARAGUCHI, Y., LI, Y.-J., HAYASHI, N. and YANG, C.-P. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from edible yam (*Dioscorea opposita* Thunb.), *Food Sci. and Tech. Res.*, **12**, 235~239 (2006)
- 3) DING, C.-K., CHACHIN, K., UEDA, Y. and IMAHORI, Y. : Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4144~4149 (1998)
- 4) GUO, L., MA, Y., SHI, J. and XUE, S. : The Purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chem.*, **117**, 143~151 (2009)
- 5) HAN, Y.-Z., MAMIYA, A., NKYA, E., HAYASHI, N. and FUJITA, S. : Purification and characterization of chlorogenic acid oxidase from edible burdock (*Arctium lappa* L.), *Food Preser. Sci.*, **32**, 275~281 (2006)
- 6) NKYA, E., KOUNO, C., LI, Y.-J., YANG, C.-P., HAYASHI, N. and FUJITA S. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5467~5471 (2003)
- 7) MURATA, M., KUROKAMI, C. and HOMMA, S. : Purification and properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1705~1710 (1992)
- 8) Gawlik-DZIKI, U., ZLOTEK, U. and ŚWIECA, M. : Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), *Food Chem.*, **107**, 129~135 (2008)
- 9) WALISZEWSKI, K.N., MÁRQUEZ, O., PARDIO, V.T. : Quantification and characterization of polyphenol oxidase bean, *Food Chem.*, **117**, 196~203 (2009)
- 10) YANG, C.-P., FUJITA, S., ASHRAFUZAMAN, MD., NAKAMURA, N. and HAYASHI, N. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2732~2735 (2000)
- 11) YANG, C.-P., FUJITA, S., KOHNO, K., KUSUBAYASHI, A., ASHRAFUZAMAN, Md. and HAYASHI, N. : Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) Peel, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1146~1149 (2001)
- 12) MURAO, S., OYAMA, H., NOMURA, Y., TONO, T. and SHIN, T. : Purification and characterization of *Arctium lappa* L. (Edible burdock) polyphenol oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 177~180 (1993)
- 13) TOIGUCHI, S., HAYASHI, K., ADACHI, Y., MOTOKI, M. and HARAGUCHI, K. : Purification and characterization of soybean oxidase, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.*, **36**, 597~602 (1989)
- 14) FUJITA, S. and TONO, T. : Peroxidase activity of phloroglucinoloxidase from Satsuma mandarin fruits and effect of metal ions on the enzyme activity, *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **54**, 201~208 (1980)
- 15) FUJITA, S., SAARI, N., MAEGAWA, M., TETSUKA, T., HAYASHI, N. and TONO, T. : Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1138~1142 (1995)
- 16) FUJITA, S., SAARI, N., MAEGAWA, M., TETSUKA, T., HAYASHI, N. and TONO, T. : Isolation and characterization of two phloroglucinol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 59~63 (1997)
- 17) FUJITA, S. and TONO, T. : Purification of Phloroglucinoloxidase from turnip and its Properties, *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **54**, 429~435 (1980)
- 18) FUJITA, S., KAWAHARA, H., NAZAMID, S. and TONO, T. : Spectrophotometric determination of phloroglucinoloxidase activity based on difference spectra, *Bull. Fac. Agric. Saga Univ.*, **74**, 81~88 (1993)
- 19) TONO, T., FUJITA, S., KAWASAKI, H. and LI, Z. : Purification and high L-epicatechin oxidase activity in polyphenol oxidase of Japanese pear, *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **60**, 705~712 (1986)
- 20) FUJITA, S. and TONO, T. : Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*), *J. Sci. Food Agric.*, **46**, 115~123 (1988)
- 21) HARTREE, E. F. : Determination of protein : a modification of Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, **48**, 4222~427 (1972)
- 22) ANDREWS, P. : The gel-filtration behavior of protein related to their molecular weight over

- wide range, *Biochem. J.*, **96**, 595~605 (1965)
- 23) WEBER, K. and OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406~4412 (1969)
- 24) HAN, Y., HAYASHI, N. and FUJITA, S.: Purification and Properties of polyphenol oxidase from leaf lettuce (*Lactuca sativa*), *Food Preser. Sci.*, **31**, 295~301 (2005)
- 25) GAWLIK-DZIKI, U., SZYMANOWSKA, U. and BARANIAK, B.: Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleraceae* var. *botrytis italica*) florest, *Food Chem.*, **105**, 1047~1053 (2007)
- 26) ŞİŞECİOĞLU, M., GÜLÇİN, I., ÇANKAYA, M., ATASEVER, A., ŞEHİTOĞLU, M.H., KAYA, H.B. and ÖZDEMİR, H.: Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.), *J. Medical Plants Res.*, **4**, 1187~1196 (2010)

## ダイコン (*Raphanus sativus* L.) の ポリフェノール酸化酵素の精製と性質

アンディ スル ファイダ ラーマン<sup>\*1,\*2,\*3</sup>・太田真由美<sup>\*2</sup>

李 英杰<sup>\*2</sup>・中谷一哉<sup>\*2</sup>・林 信行<sup>\*2</sup>・藤田修二<sup>\*2</sup>

\* 1 鹿児島大学連合農学研究科

(〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

\* 2 佐賀大学農学部

(〒840-8502 佐賀市本庄町1番地)

\* 3 ハサヌデイン大学食糧科学工学部

(〒90245 インドネシア国マカッサル市)

ダイコンのポリフェノール酸化酵素 (PPO) をフロログルシノールを基質として、硫酸分画、イオン交換クロマト、疎水クロマトおよびゲル濾過により精製した。本酵素は192倍に精製され、回収率は15%であった。精製酵素はSDS-PAGEで単一バンドを呈した。本酵素の分子量はゲル濾過で44 kDa, SDS-PAGEで45.7 kDaと推定された。本酵素は1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノールを強く酸化し、それに対する $K_m$ 値は2 mMであった。本酵素は同時に1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロールおよび没食子酸を酸化したが、クロロゲン酸やドーパミンのような $o$ -ジフェノール類は酸化しなかった。本酵素はパーオキシダーゼ (POD) 活性を同時に有し、PODとしては259倍に精製され、回収率は20%であった。本酵素のPPOおよびPOD活性の最適pHはそれぞれ8及び5であり、PPOはpH 3.0~10.0の範囲で、PODは3.0~11.0の範囲で5℃, 20時間安定であった。熱安定性においては両活性とも50℃まで安定であった。また、両活性とも終濃度10 mMにおいて、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム, シアン化カリウムのような金属酵素阻害剤, 還元剤であるL-アスコルビン酸およびジフェノール類であるクロロゲン酸やヒドロキノンにより強く阻害された。

(平成22年5月9日受付, 平成23年7月20日受理)

## ケフィアグレイン菌株を用いた グレインの生成とケフィアの比較

長谷川真由美<sup>\*1§</sup>・綿貫仁美<sup>\*1</sup>・林 一也<sup>\*1</sup>  
馬場 修<sup>\*1</sup>・小原直弘<sup>\*2</sup>

\* 1 東京家政学院大学現代生活学部

\* 2 東京農業大学応用生物科学部

### Comparison of the Kefir Uses Strain of Kefir Grains

HASEGAWA Mayumi<sup>\*1§</sup>, WATANUKI Hitomi<sup>\*1</sup>, HAYASHI Kazuya<sup>\*1</sup>,  
BABA Osamu<sup>\*1</sup> and OHARA Naohiro<sup>\*2</sup>

\* 1 Tokyo Kasei-Gakuin University,  
22, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075

\* 2 Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The microflora of kefir grains is highly varied. Seven varieties of microflora with varying properties were compared in this study. A previous report suggested that *Candida kefir*, one of the main yeast species in kefir, causes opportunistic infections. Different combinations of the strains, except *Candida kefir*, present in kefir grains were examined. ① The weight of kefir grains increased at all combinations. The kefir grain weight, except those of the genus *Candida*, showed an increase. ② Although it was thought that yeast played a role in imparting rigidity to the kefir grains, *Lactobacillus kefir* GKL-2 and *L. kefiranofaciens* GKL-28 were found to play the main role in imparting rigidity.

(Received Oct. 13, 2010; Accepted Jul. 11, 2011)

**Key words** : kefir, kefir grains, *Candida*, rigidity, culture

ケフィア, ケフィアグレイン, キャンディダ, 粘性, 培養

ケフィア (英: Kefir露: Кефир) とは, ケフィアグレインという種菌を用いて発酵させた乳飲料である。ケフィアグレインとは, ケフィランという多糖類の粘性物質に, 多くの乳酸菌や酵母が共生してできたポップコーンのような形をした菌塊である<sup>1)</sup>。

起源はコーカサス地方で, 山羊の乳を運んでいる最中, 乳酸菌や酵母が入り込み, 自然発酵してできたとされている。ケフィアの最大のポイントは, 酵母と乳酸菌が“共生”発酵していることにある。酵母と乳酸菌の共生発酵は, 単にエタノールの入ったヨーグルトというだけではなく, 酵母に豊富に含まれるビタミンや酵母などが分解する糖やタンパク質を利用して, 難生育性の乳酸菌が生育していることにあるとされている<sup>2)~4)</sup>。

ケフィアには何種類もの微生物が複雑に共生しており, それら微生物は共生発酵して働いている。自然発酵では,

ケフィアグレインの基本的な菌は乳酸菌・酵母をはじめ, 連鎖状球菌・酢酸菌・芳香微生物も含まれ構成されるといわれている<sup>5)</sup>。

このケフィア中の微生物については, グルジア由来のケフィアグレイン中に3種の酵母と4種の乳酸菌が主要菌として生育していることが明らかになっている<sup>3), 6)</sup>。特に, ケフィア特有の粘性物質の生成には *Lactobacillus kefir* や *Lactobacillus kefiranofaciens* が関与していることが明らかになっている<sup>2), 7), 8)</sup>。

今回, ケフィアグレイン中の菌を殺菌し, 新たに菌種(3種類の酵母と4種類の乳酸菌)の組み合わせを変えて植菌し, ケフィアグレインの増加や, ケフィアの性状にどのような影響があるかを検討した。また, 近年ケフィアの主要酵母である *Candida kefir* が日和見感染菌とするような報告<sup>9), 10)</sup>がなされたため, この菌を除いた菌相

\* 1 〒102-0075 東京都千代田区三番町22

§ Corresponding author, E-mail: hasegawa@san.kasei-gakuin.ac.jp

\* 2 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

のケフィアグレインでのケフィア生成を試みたので報告する。

## 実験方法

### 1. 使用培地

使用した培地の組成を表1に示した。乳酸菌の前培養培地にはカビの生育を防ぐためにアジ化ナトリウム100ppmと、共生していると思われる酵母の生育を防ぐためにシクロヘキシミド100ppmを添加した。

また、酵母の前培養培地にはYM培地を用いた。さらに、サンプル中に混在している乳酸菌などの細菌の生育を防ぐためにクロラムフェニコール100ppmを添加した<sup>9)</sup>。

### 2. 菌株および培養方法

(1) 乳酸菌および前培養方法 ケフィアグレインから分離した乳酸菌 *Lactobacillus kefir* GKL-2, *Lactobacillus kefiranofaciens* GKL-28, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* Gme-17の前培養方法は既報<sup>6)</sup>に従った。

(2) 酵母および前培養方法 ケフィアグレインから分離した酵母 *Saccharomyces unisporus* GKY-75, *Candida holmii* GKY-57, *Candida kefir* GKY-40の前培養方法は既報<sup>6)</sup>に従った。

表1 培地組成

	GYP	WYAP	YM
glucose (g)	1.0		1
yeast extract (g)	1.0		0.3
malt extract (g)			0.3
peptone (g)	0.5	0.5	0.5
Na-acetate · 3H <sub>2</sub> O (g)	0.2		
salts solution* <sup>1</sup> (ml)	0.5		
Tween80 solution (ml)	1.0		
water (ml)	100		100
whey (ml)		80	
Yeast autolysate (ml)		20	
pH	6.8	5.5	5.5
CaCO <sub>3</sub> (g)	0.5		
Agar (g)	1.2	1.2* <sup>2</sup>	1.5

\*1 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 40mg · MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 2mg · FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2mg · NaCl 2mgが含まれる。

\*2 継代培養の際にはCaCO<sub>3</sub> 0.5%を加えたものを使用した。

### 3. 乳酸菌と酵母の組み合わせ

7種類の菌体の組み合わせをつくるために、まず、乳酸菌を組み合わせさせた2種類 (A) *L. kefir* GKL-2, *L. kefiranofaciens* GKL-28, (B) *L. lactis* と *Leuconostoc mesenteroides* Gme-17, 酵母を組み合わせさせた (C) *Sacch. unisporus* GKY-75と *C. holmii* GKY-57を作製した。

その後、7種類の菌体の組み合わせを作製した。7種類の菌体の組み合わせを表2に示した。No.1は既報<sup>6)</sup>によってケフィアグレインから分離した乳酸菌および酵母の全ての菌株を組み合わせ、No.7は無接種とした。

### 4. 培養方法

No.1からNo.6までの菌体の組み合わせをつくり、WYAP培地50mlに接種し、30℃で24時間培養した。培養後に遠心分離をし、集菌した。集菌した菌体を再び、WYAP培地100mlで30℃、24時間培養した。遠心分離で集菌したものを、70%エタノールに1週間浸けて殺菌後、生理食塩水で3回洗浄したケフィアグレイン10gに接種し、牛乳100ml添加後、22℃で2日培養した。No.1からNo.7の組み合わせの菌のグレインは2日ごとに新しい牛乳を入れ替え22℃で培養した。植え替えはグレイン重量測定を検討する為に36回行い、HPLC測定、粘度測定は15回植え替え後に行った。

### 5. 分析方法

(1) グレイン重量測定 0, 15, 36回植え替え後のグレイン重量を測定した。

(2) HPLC測定 乳糖, エタノール, 乳酸の測定は、15回植え替え後のケフィアを対象に、HPLC(Waters Millennium 2010 Chromatography Manager(Waters))を使用し、検出器は示差屈折計(RI)を用いて行った。乳糖, エタノールの分析にはShim-pack SCR-101N(7.9mmI.D.×300mm, 島津製作所)カラムを用い、カラム温度は60℃, 移動層は超純水, 流速は0.8ml/minで行った。乳酸の分析にはTSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A(6.0mmI.D.×40mm+7.8mmI.D.×300mm, 東ソー)カラムを用い、カラム温度は40℃, 移動相は0.75mM硫酸, 流速は0.8ml/minで行い、もとの牛乳中に含まれる乳酸を差し引いた後、3回測定平均値を求めた。

(3) 粘度測定 粘度測定は、15回植え替え後のNo.1からNo.7のグレインを22℃で0.24.36.48時間培養したケフィアをステンレスふるいでろ過後、ろ液の粘度

表2 接種菌体組み合わせ

菌体No.	接種菌体
1	(A) + (B) + (C) + <i>Candida kefir</i> GKY-40
2	(A) + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Saccharomyces unisporus</i> GKY-75
3	(A) + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Candida holmii</i> GKY-57
4	(A) + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Gme-17 + <i>Sacch.unisporus</i> GKY-75
5	(A) + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Gme-17 + <i>Candida holmii</i> GKY-57
6	(A) + (B) + (C)
7	無菌

を測定した。粘度の測定にはViscometer LVDV-IP (Brookfield) を用いた。

(4) 官能検査 官能検査は15回植え替え後のケフィアNo.1~No.6を用いて行った。パネルは女子大学生15名、官能評価の内容は甘さ・香り・舌触り・酸味・粘り・炭酸味・食味・総合評価とし、-3 (弱い・悪い) から+3 (強い・良い) の段階で評価した。評価項目ごとに平均値を求めた。ただし、No.7は無菌のものとして官能検査を行わなかった。

実験結果および考察

1. グレイン重量測定

グレイン増加量を図1に示した。グレインの重量測定から、ブランクと比較してすべての組み合わせでグレインの増加が認められた。このことから、*C. kefir* がなくともグレインの増加が行われることが明らかとなった。また、ブランクであるNo.7のグレインは36回植え替え時には、形状を保てずに崩れた状態であった。

2. HPLC測定

液体クロマトグラフィーを用いて測定したエタノール、乳糖、乳酸量の100ml中に含まれる量 (g) を図2に示した。

各サンプルのエタノール・乳糖・乳酸量をみてみると、乳糖の減少とエタノールの増加は、ほぼ比例していた。これは、乳糖が分解されエタノールが生成されていることを示していると考えられた。無菌接種のNo.7は、十分消毒したグレインを使い、クリーンベンチの無菌状態の中で植え替えを行ったが、乳糖の低下と乳酸値の上昇がみられた。このため、植え替えに使用した牛乳からの乳酸菌の持ち込みがあったのではないかと考察した。しかし、エタノールが検出されず、顕微鏡観察でも酵母が認められなかったことから、ブランクとして成立していると考えられた。

3. 粘度測定

粘度測定の結果を図3に示した。ケフィアの粘性物質生産には、(A) の*L. kefir* GKL-2と*L. kefiranofaciens*

GKL-28が不可欠であることを既報によって明らかにしている<sup>3)</sup>が、今回の結果、No.1と比較すると、No.3およびNo.5の36時間後の粘度に大きな変化がみられた。

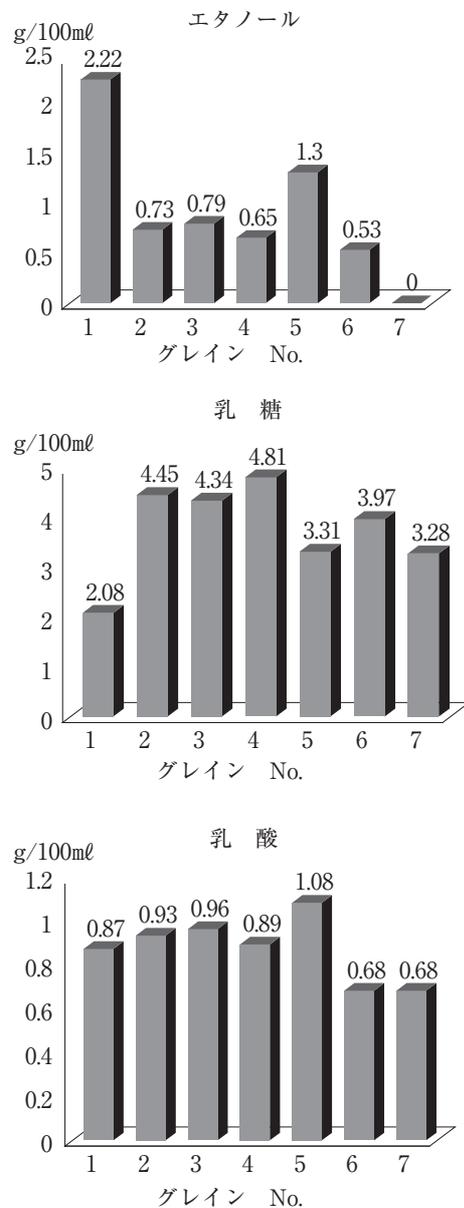


図2 植え替え15回後に含まれるエタノール・乳糖・乳酸量

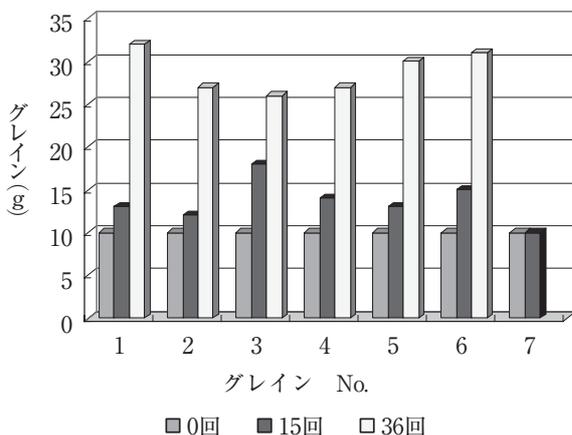


図1 ケフィアグレインの植え替えによる重量変化

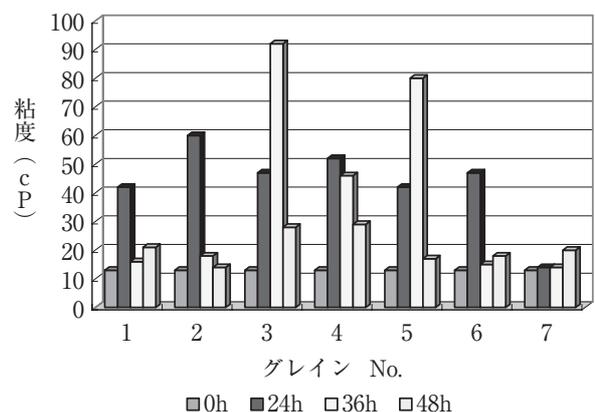


図3 植え替え15回後の各種ケフィアの粘度変化

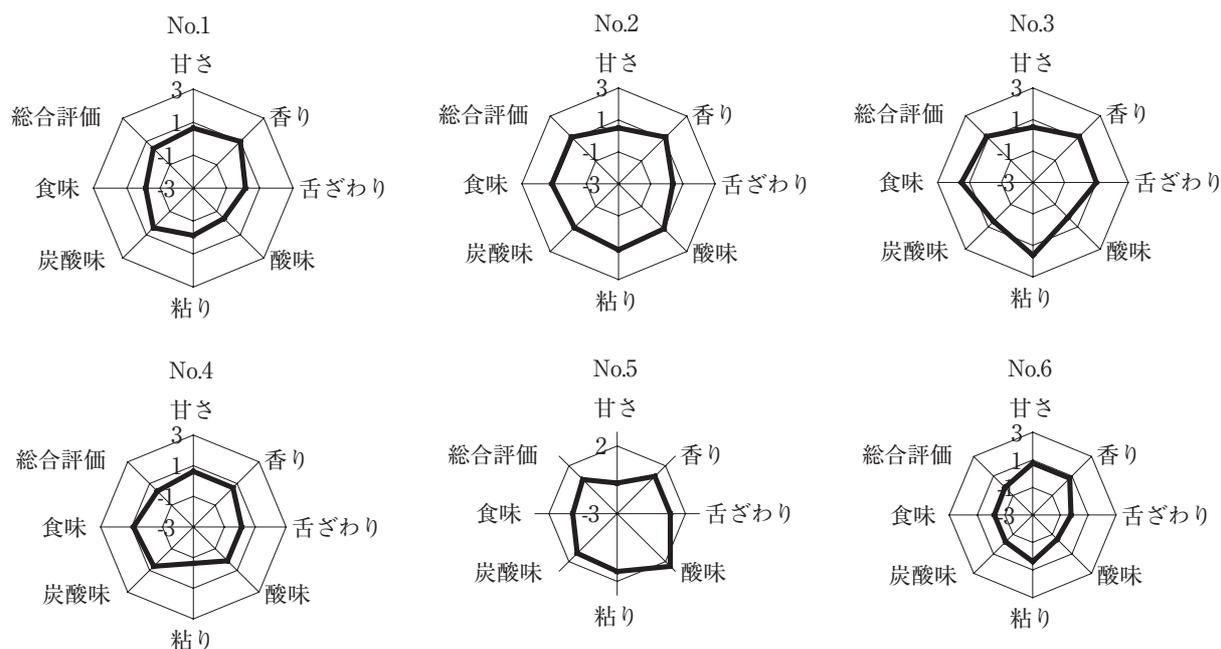


図4 各種ケフィアの官能検査

No.3およびNo.5には、酵母菌の*C.holmii* GKY-57が入っており、粘り生成には*C.holmii* GKY-57も深く関わっていると考えられた。また、培養が進むとすべてにおいて粘度が低下したが、pHの上昇によって粘性物質が沈澱し、その為に粘度が低下したと思われた。本件に関しては今後の検討課題と考える。

#### 4. 官能検査

官能検査の結果を図4に示した。No.1は、香り、甘さがやや高く、粘りが少ない評価だった。No.2は、甘さの評価が低く、舌触りも低い結果であったが、総合評価が一番良い結果であった。No.3は、炭酸、甘さと酸味が非常に低く、粘りの評価結果が高かった。また、No.2と同じく総合評価が一番よい結果であった。

No.4は甘さ、炭酸、酸味のバランスがとれており、食味の評価が高い結果であった。No.5は、甘みの評価が低く他の評価も0～1前後と低く、酸味のみが非常に高い結果であった。

No.6は、甘さ、香り、粘りが高く、食味、炭酸味、酸味、舌触りが非常に低い結果であった。また、No.2およびNo.3の評価が高かったが、総合的な味の差はあまりみられなかった。No.2およびNo.4は*Candida*属を用いておらず、*Candida*属なしでもケフィアの特徴ともいえる粘りが形成できることを明らかにした。さらに、粘性物質の生成には、乳酸菌だけではなく、酵母も深く関与していると推察できた<sup>1),7)</sup>。

今後は、ケフィア中の菌の組み合わせを変えたときの、機能性やより高い多糖の生成条件、好まれる味を作る為の培養条件などを明らかにしていく必要があると考える。

#### 文 献

- 1) 戸羽隆宏：ケフィール・ヨーグルトの乳酸菌，乳酸菌研究集談会誌，**2**，68～73（1992）
- 2) 小原直弘：ケフィールの機能と今後の課題，食品と開発，**29**（8），8～10（1994）
- 3) 小崎道夫：乳酸菌—健康を守る発酵食品の秘密（八坂書店，東京），pp.65～66（2002）
- 4) 足立 達・伊藤敏敏・戸羽隆宏・有原圭三・向井孝夫：乳酸菌の生態—*Lactobacillus kefirifaciens*によるケフィール粒の形成を例として—，微生物，**6**，15～27（1990）
- 5) 乳酸菌研究集談会：乳酸菌の科学と技術，pp.270～274（2000）
- 6) 小原直弘・内村 泰・駒形和男：凍結乾燥，水浸漬および継代培養ケフィアグレイン（グルジア）の酵母菌相の比較，日食誌，**26**，69～74（2000）
- 7) 小原直弘・鈴木正人・岡田早苗・内村 泰・小崎道雄・駒形和男：凍結乾燥ケフィアグレイン（グルジア）より分離した乳酸菌の同定，日食微誌，**13**，165～171（1997）
- 8) 戸羽隆宏，足立 達：ケフィール粒の微生物学，バイオサイエンスとインダストリー，**47**，383～386（1989）
- 9) 西川朱實：カンジダの菌学，真菌誌，**43**，126～128（2007）
- 10) KURTZMAN, C. P.: The Yeasts, A Taxonomic Study Fourth edition (Elsevier Science and Technology, Amsterdam), pp.9～12（1998）

（平成22年10月13日受付，平成23年7月11日受理）

# 小麦 (ハルユタカ) 粒中のプロテインジスルフィド イソメラーゼ (PDI) の分離精製

野口智弘<sup>\*1§</sup>・新井智美<sup>\*2</sup>・野口治子<sup>\*2</sup>  
内野昌孝<sup>\*2</sup>・高野克己<sup>\*2</sup>

\* 1 東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター

\* 2 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

## Purification of Protein Disulfide Isomerase from Wheat (Haruyutaka) Grain

NOGUCHI Tomohiro<sup>\*1§</sup>, ARAI Satomi<sup>\*2</sup>, NOGUCHI Haruko<sup>\*2</sup>,  
UCHINO Masataka<sup>\*2</sup> and TAKANO Katsumi<sup>\*2</sup>

\* 1 *Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*

\* 2 *Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-0-8502*

The protein disulfide isomerase (PDI) enzyme is involved in the formation of disulfide bonds. Here we attempted to purify PDI from wheat grain (*Triticum aestivum* cv. Haruyutaka). As a result of DEAE-Sepharose Fast Flow and affinity chromatography purification, 30.74 units of PDI activity/100g of wheat grain were observed in the adsorbed fraction from the affinity chromatography column. The molecular weight of this fraction was 63 kDa as determined by SDS-PAGE analysis. N-terminal amino acid sequencing of this 63-kDa protein showed that the sequences of wPDI and this 63-kDa protein shared 79% identity. On the basis of this result, we assumed that the 63-kDa protein that we purified from wheat (Haruyutaka) grain is the same as wPDI, which we used for genetic information, and that our expression of this protein was successful.

(Received Mar. 31, 2011; Accepted Jul. 21, 2011)

**Key words** : Protein Disulfide Isomerase, PDI, Wheat, Disulfide Bond, Dough

プロテインジスルフィドイソメラーゼ, PDI, 小麦, ジスルフィド結合, 生地

小麦は主に製粉され小麦粉として利用されている。小麦粉は水を加えて練ることで、他の穀類にはみられない独特の粘弾性を示す生地を形成することから、パンや麺、菓子など様々な食品に加工されている。この生地は小麦の主要構成タンパク質であるグリアジンとグルテニンに水を加えて混捏することで形成するグルテンによるものである。

グルテンの形成は、様々な分子間相互作用や結合が関与していると考えられているが、中でもジスルフィド結合が最も重要であると考えられている。しかしながら、生地混捏時の物理的作用のみでジスルフィド結合が形成されるとは考えにくい。

Protein Disulfide Isomerase (PDI; EC5.3.4.1) は

タンパク質のリフォールディングを触媒する酵素である。PDIは様々な生物でその存在が明らかにされており、小麦のPDIについても様々な研究が行われている。近年、小麦粉内在PDIをコードするcDNAが分離され<sup>1)</sup>さらに小麦PDIについてその種類や詳細な遺伝子解析が行われている<sup>2)</sup>。一方で、小麦より部分精製されたPDIとアスコルビン酸を同時に添加することで、生地の物性が向上することも示されている<sup>3)</sup>。筆者らは、これまでに小麦mRNAからリコンビナントPDI (wPDI) の発現・精製に成功し、その性状を報告している<sup>4)</sup>。しかしながら、小麦よりPDIを分離精製し取得した報告は、これまでにない。そこで、国内産小麦のハルユタカを用い小麦粒からのPDIの分離精製を試みた。

\* 1 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: tomo@nodai.ac.jp

\* 2 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

## 試料および実験方法

### 1. 試料

試料には、北海道産ハルユタカ (*Triticumaestivum* cv Haruyutaka) を用いた。

### 2. 酵素の抽出

酵素の抽出はKAINUMA<sup>5)</sup> (1998) らの方法を用いた。小麦全粒を、マルチビーズショッカーにて破碎し、4倍容 (w/v) の5 mMジチオトレイトール (DTT), 50 mM塩化ナトリウム, 10 mMエチレンジアミン-N, N, N, N-テトラ酢酸 (EDTA), 2 mMフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF), 0.1% (w/v) Triton X-100を含む50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を加え、ヒストコロン (日本医理科機械製作所製) にてさらに破碎し、遠心分離 (10,000rpm, 20min, 4℃) により得られた上澄液を粗抽出液 (F1) とした。F1を20%飽和硫酸アンモニウムにて塩析し、氷冷下で1時間静置した後、遠心分離 (15,000rpm, 20分間, 4℃) 後、得られた上澄液を分画分子量25,000の透析膜を用い、20 mMトリス塩酸 (pH8.0) にて1晩 (4℃) 透析することで、PDI活性に近似した活性を示す分子量13,000のタンパク質 Thioredoxin<sup>6)</sup> や低分子の還元物質を取り除き、遠心分離 (15,000rpm, 20分間, 4℃) 後の上澄液を粗酵素 (F2) とした。

### 3. 小麦PDIの精製

PDIの分離精製は、20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて平衡化したDEAE-Sepharose Fast Flowカラム (φ20×160mm, GEヘルスケア社製) に、F2を供した。溶出条件は1.0 ml/min, 5.0 ml/tubeにて行い、未吸着画分を溶出後、吸着画分をNaClを含む同緩衝液にてステップワイズ (0.1, 0.2, 1.0M) を行った。PDI活性が確認された画分は、さらに抗PDI抗体 (mouse Antiserum to wPDI) を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し精製を行った。カラムにはHi Trap NHS-activated HP (5 ml, GEヘルスケア社製) を用い、遺伝子情報より発現調製した小麦リコンビナントPDI<sup>4)</sup> を抗原として作成したPDIポリクローナル抗体をリガンドとして用いた。先のDEAE-Sepharose Fast FlowにてPDIの活性の得られた画分を20 mMリン酸, 0.15 M NaCl, pH7.0にて平衡化したカラムにアプライ後、未吸着画分を溶出させた後、1.0 Mグリシン-塩酸, 0.5 M NaCl, pH4.0にて溶出を行った。なお、溶出は1.0 ml/min, 2.0 ml/tubeにて行い、酵素活性の保持のため、あらかじめフラクションチューブに1.0 Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.0) を1.0 ml入れ溶出した。

### 4. PDI活性測定法

PDIの活性測定は、ARNEらの方法<sup>7),8)</sup> に従いのインスリンを用いた方法にて行った。基質である1% (w/v) インスリン溶液はインスリン (和光純薬社製) を50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、1 N塩酸を加え

溶解後、1 N水酸化ナトリウムにてpH8.0に調整後、50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) にて定容し調製した。試験管に0.4 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 0.25 ml, 8 mM EDTA 0.25 ml, インスリン溶液0.1 ml, 純水 0.284 mlをとり、小麦粒から抽出した酵素溶液0.05 mlを加えた後、5 mM DTT 0.066 mlを加え、全量を1.0 ml (終濃度: 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5), 2 mM EDTA, 1 mg/mlインスリン, 0.33 mM DTT) として、25℃で60分間酵素反応を行った。生じたインスリンの濁度を吸収波長650 nmにて測定した。酵素力価はpH 7.5, 25℃でDTT存在下において1 mg/mlのインスリンのA650を1分間に0.01変化させる力価を1 Uとした。なお、酵素液中のタンパク質量は、Coomassie<sup>®</sup> Plus Protein Assay Reagent Kit (PIERCE社製) およびLowryの改良法にて測定した。

### 5. SDS-PAGEおよびウエスタンブロットによる解析

アフィニティークロマトグラフィーで分離した画分は、SDS-PAGEに供しタンパク質の分子量の解析を行うとともにウエスタンブロットにてPDIの検出を行った。タンパク質の染色は銀染色 (銀染色IIキットワコー, 和光純薬工業社製) にて行い、ウエスタンブロットの検出には、1次抗体に小麦PDIポリクローナル抗体 (mouse Antiserum to wPDI) を用い、2次抗体は, Mouses IgG, Horseradish Peroxidase Linked Whole antibody from sheep (GE Healthcare社製), 検出試薬はAmersham ECL Plus Western blotting reagent pack (GE Healthcare社製) を用いて、得られたシグナルを化学蛍光検出機 (Gel-Doc Bio Rad社製) にて検出した。

### 6. N末端アミノ酸配列解析

SDS-PAGE後のゲルをセミドライブロットティングによりPVDF膜に転写, CBB染色した。得られた精製酵素バンドを切り出した後、プロテインシーケンサー (PPSQ-21/23, shimadzu社製) に供しEdman法にてN末端アミノ酸配列を解析した。

## 結果および考察

### 1. 陰イオン交換体クロマトグラフィーおよび抗PDI抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いた小麦PDIの分離精製

DEAE-Sepharose Fast FlowカラムにF2を供し分離精製を行った結果、未吸着画分 (A1) および吸着画分 (A2, ~4) の計4つのタンパク質ピークが得られ (Fig. 1), これら各画分 (A1~4) のPDI活性を測定したところ (Table 1), A3にて156.6 units/小麦粒100 gと最も高い活性を確認した。そこで、次に小麦PDIポリクローナル抗体 (mouse Antiserum to wPDI) をリガンドさせた抗PDI抗体アフィニティークロマトグラフィー (Hi Trap NHS-activated HP) を用い、A3画分のさらなる精製を試みたところ、未吸着画分 (C1) および吸着画分 (C2) にタンパク質ピークを確認した

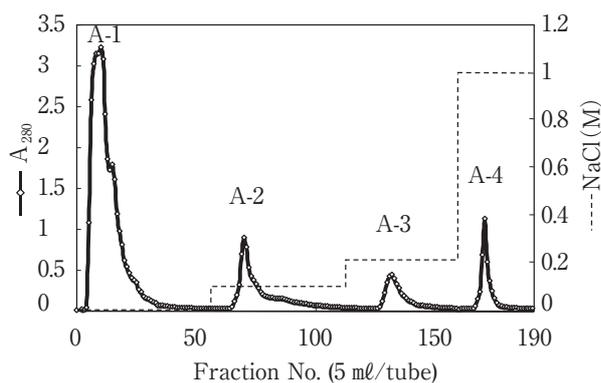


Fig. 1 DEAE - Sepharose chromatography of PDI extracted from Haruyutaka grain

Column : DEAE-Sephacrose Fast Flow ( $\phi 20 \times 160$ mm)  
 Buffer : 20mM Tris-HCl buffer (pH8.0)  
 Speed : 1 ml/min.

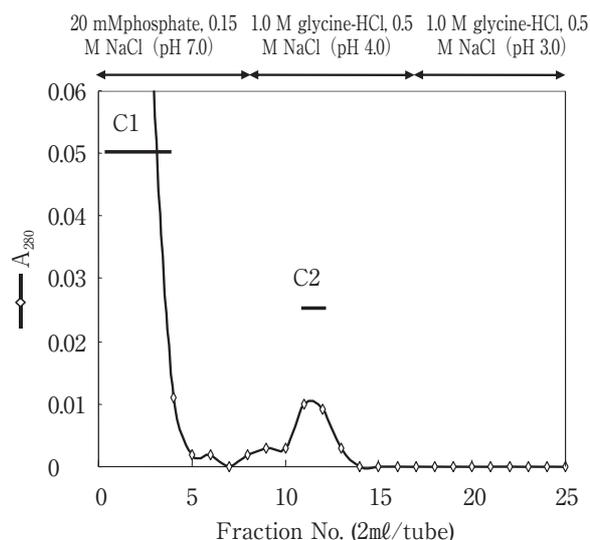


Fig. 2 Antibody affinity chromatography of pooled eluates ( A 3 ) from the DEAE - Sepharose chromatography column

Column : HiTrap NHS-activated HP ( 5 ml )  
 Speed : 1 ml/min

Table 1 Purification summary of PDI from Haruyutakagrain

Step	PDI Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification rate	Yield (%)
F 1	642.2	2948.8	0.22	1	100
F 2	323.9	1565.4	0.21	0.95	50.4
A 1	N.D.	714.8	-	-	-
A 2	59.1	259.8	0.23	1.04	9.2
A 3	156.6	150.6	1.04	4.77	24.4
A 4	N.D.	21.1	-	-	-
C 1	N.D.	8.5	-	-	-
C 2	30.7	0.4	74.8	341	4.8

(Based on 100g Wheat grain)

(Fig.2)。C1およびC2のPDI活性測定を行った結果 (Table 1), アフィニティークロマトグラフィーの吸着画分であるC2において30.74units/小麦粒100gの活性が得られた。

## 2. SDS-PAGEおよびウエスタンブロットを用いた解析

アフィニティークロマトグラフィーによって得られた各画分をSDS-PAGE (Me+) に供し銀染色にてタンパク質の検出を行ったところ (Fig. 3A), C2にて50および63kDaのタンパク質バンドを確認した。さらに, 小麦PDI抗体を用いたウエスタンブロットにて, PDIのシグナルを確認したところ (Fig. 3B), 63kDaに強いシグナルが得られ, この63kDaのバンドが小麦粒中のPDIであることが示唆された。

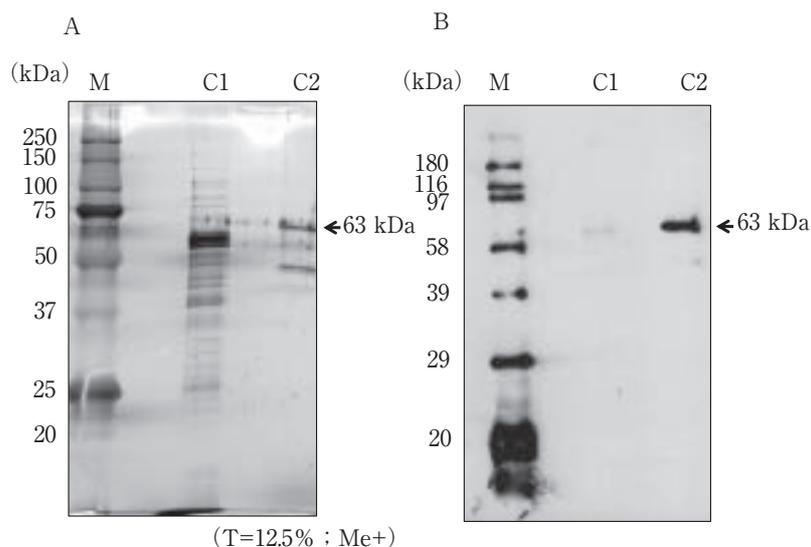
## 3. N末端アミノ酸配列解析

SDS-PAGEおよびウエスタンブロットにて確認した63kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析した

(Fig.4)。その結果, 63kDaタンパク質のN末端配列は, 筆者らが遺伝情報より発現に成功したりコンビナント小麦PDI (wPDI)<sup>4)</sup>の26残基目からと79%の相同性を示したことから, 63kDaタンパク質は, 小麦粒中に存在するPDIであることが明らかとなった。

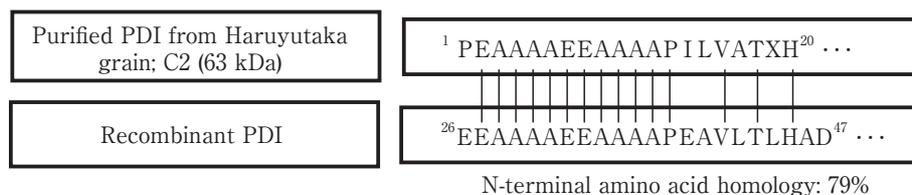
## 要 約

国内産パン用小麦であるハルユタカの小麦粒より, Protein Disulfide Isomeraseの分離精製を試みた。DEAE-Sephacrose Fast Flowおよび抗PDI抗体アフィニティークロマトにて検討を行ったところ, アフィニティークロマトグラフィーの吸着画分に, 30.74units/小麦粒100gのPDI活性が得られた。さらに, SDS-PAGEおよびPDI抗体を用いたウエスタンブロットにより63kDaのタンパク質にPDIのシグナルが確認された。また, この63kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析したとこ



**Fig. 3** SDS-PAGE (A) and western blot (B) of antibody affinity chromatography of Haruyutaka grain

M: Molecular standard, C 1 and C 2 : Eluted fractions by Antibody affinity chromatography.



**Fig. 4** N-Terminal amino acid sequence of recombinant PDI and purified PDI from Haruyutaka grain

ろ、小麦遺伝情報より取得したwPDIの配列と79%の相同性が得られたことから、ハルユタカ粒より取得した63 kDaタンパク質は、小麦PDIであることが明らかとなった。

## 文 献

- 1) SHIMONI, Y., ZHU, X., LEVANOY, H., SEGAL, G., ZHU, X. and GALILI, G.: Purification, characterization, and intracellular localization of glycosylated Protein Disulfide Isomerase from wheat grains, *Plant Physiol.*, **108**, 327~335 (1995)
- 2) CIAFFI, M., PAOLACCI, A. R., D'ALOISIO, E., TANZARELLA, O.A. and PORCEDDU, E.: Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences, *Gene*, **366**, 209~218 (2006)
- 3) EVERY, D., SIMMONS, L. D. and ROSS, M. P.: Distribution of Redox Enzymes in Millstreams and Relationships to Chemical and Baking Properties of Flour, *Cereal Chem.*, **83**, 62~68 (2006)
- 4) ARAI, S., NOGUCHI, T., UCHINO, M. and TAKANO, K.: Purification and characterization of protein disulfide isomerase from wheat expressed in *Escherichia coli.*, *Japan Food Preservation Sci.*, **37**, 173183 (2011)
- 5) KAINUMA, K., OOKURA, T., KITTA, K., MANABE, M., and KAWAMURA, Y.: Protein Disulfide Isomerase Activity of Some Plant Seeds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 369371 (1998)
- 6) PIGET, V. P. and SCHUSTER, B. J.: Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 76437647 (1986)
- 7) ARNE, H.: Thioredoxin Catalyzes the Reduction of Insulin Disulfides by Dithiothreitol and Dihydroliipoamide, *J. Bio. Chem.*, **254**, 96279632 (1979)
- 8) JOHANNA, L. and ARNE, H.: Protein Disulfide-isomerase Is a Substrate for Thioredoxin Reductase and Has Thioredoxin-like Activity., *J. Bio. Chem.*, **265**, 91149120 (1990)

(平成23年3月31日受付, 平成23年7月21日受理)