

日本食品保蔵科学会誌

VOL. 38 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>

- 米糠由来 α -グルコシダーゼの精製と性状, エチルグルコシド生産性について (265)
 /内野昌孝・阿部有希子・入澤友啓
 野口治子・高野克己

<研究ノート>

- 品種および収穫時期の違いが長期どり栽培されたアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の
 破断応力およびルチン含量ならびにそれらの収穫後変化に及ぼす影響 (271)
 /元木 悟・北澤裕明・酒井浩晃
 松島憲一・濱渦康範

<研究ノート> (英文)

- カルモデュリンをコードする *BoCam 1* はキャベツの鋭敏な傷害応答遺伝子である (277)
 /タンマウオン マナスイカン・ヘワジュリジ (ガンガ ナマリ) イルミ
 兼田朋子・中村宣貴・伊藤康博・椎名武夫

- オカラを添加したソーセージの品質について (285)
 /多田耕太郎・寺島晃也・中村 優・鈴木敏郎

<技術報告>

- 処理方法がマイクロバブル生成特性およびオゾンガス溶解速度に及ぼす影響 (293)
 /中村宣貴・梅原仁美・松山成江
 川崎保美・大原浩樹・松本 均
 タンマウオン マナスイカン・許 晴怡・椎名武夫

<講 座>

- 身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (19) (301)
 カンキツ /吉岡照高

- <文献抄録> (311)
 <本会記事> (312)
 <会 告> (313)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 38 NO. 5 (2012)

<Article> (Japanese)

- Purification and Characterization of α -glucosidase
 from Rice Bran and Production of Ethyl- α -D-glucoside
 UCHINO Masataka, ABE Yukiko, IRISAWA Tomohiro,
 NOGUCHI Haruko and TAKANO Katsumi (265)

<Research Note> (Japanese)

- Effects of Cultivar and Harvest Season on Rupture Stress and Rutin Content
 and Their Changes after Harvest of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.)
 Cultivated Using the Long-term Harvest Production System
 MOTOKI Satoru, KITAZAWA Hiroaki, SAKAI Hiroaki,
 MATSUSHIMA Ken-ichi and HAMAIZU Yasunori (271)

<Research Note> (English)

- The Calmodulin-Encoding Gene *BoCam1*: A Sensitive Wound-Responsive Gene in Cabbage
 THAMMAWONG Manasikan, HEWAJULIGE GANGA NAMALI Ilmi, KANETA Tomoko,
 NAKAMURA Nobutaka, ITO Yasuhiro and SHIINA Takeo (277)

- Quality of Sausages Containing 'Okara' Soybean Curd Residue
 TADA Kotaro, TERASHIMA Teruya, NAKAMURA Yu and SUZUKI Toshiro (285)

<Technical Report> (Japanese)

- The Effect of Microbubble (MB)-treatment Conditions
 on MB Characteristics and Ozone Dissolution Rate
 NAKAMURA Nobutaka, UMEHARA Hitomi, MATSUYAMA Masae,
 KAWASAKI Tomomi, OHARA Hiroki, MATSUMOTO Hitoshi,
 THAMMAWONG Manasikan, XU Qingyi and SHIINA Takeo (293)

<Serialization Lecture> (Japanese)

- Citrus Fruits
 YOSHIOKA Terutaka (301)

米糠由来 α -グルコシダーゼの精製と性状, エチルグルコシド生産性について

内 野 昌 孝^{*§}・阿部有希子^{*}・入 澤 友 啓^{*}
野 口 治 子^{*}・高 野 克 己^{*}

^{*} 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Purification and Characterization of α -glucosidase from Rice Bran and Production of Ethyl- α -D-glucoside

UCHINO Masataka^{*§}, ABE Yukiko^{*}, IRISAWA Tomohiro^{*},
NOGUCHI Haruko^{*} and TAKANO Katsumi^{*}

^{*} *Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience,
Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*

In this study, α -glucosidase from rice bran was purified by chromatography and electrophoresis. This enzyme has a molecular weight of 310 kDa and consists of 4 subunits with a molecular weight of 76 kDa or 36 kDa. The N-terminal amino acid sequence of the 76-kDa protein was found to be similar to that previously reported for a rice glycosidase. However, the molecular weight of the enzyme differed from that reported for any rice glycosidase. The enzymatic properties of this enzyme were almost similar to those of most rice α -glucosidases. However, 2 properties, that is, the pH activity and thermostability, were a little different from those reported for polished rice. This enzyme was stable in ethanol up to a concentration of 10% ethanol. In addition, its activity in ethanol did not decrease up to a concentration of 20% ethanol. Ethyl- α -D-glucoside was optimally produced at pH4.0 and 40°C.

These results show that α -glucosidase from rice bran can be used in the production of ethyl- α -D-glucoside.

(Received Sep. 8, 2011 ; Accepted Apr. 19, 2012)

Key words : *rice bran, α -glucosidase, ethyl glucoside, purification*

米糠, α -グルコシダーゼ, エチルグルコシド, 精製

近年, 健康に対する意識の向上から, 生体調節機能に影響を与える食品の三次機能への期待が高まり, 様々な製品が開発されている。機能性成分は素材中に含有されるほか, 発酵・加工過程で生じることが知られている。

日本酒やみりん中に含まれるエチル- α -グルコシド (EG) は即効性の甘味とともに遅効性の苦みを呈し, また, 消臭効果, 味質改善効果, 糖質吸収阻害効果, 腸内菌叢改善効果, 整肌効果など, 様々な機能が確認され, 新規甘味料として利用が期待される^{1)~5)}。しかし, 本物質の工業的生産方法は未だ確立されておらず, 生産コストが高いのが問題となっている。一方, α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) はマルトースの加水分解反応を触媒

するグリコシダーゼの一種だが, 一部の生物種由来のものは転移反応能力をもち, これらを利用すると転移生成物の生産が可能となる。これにより, 転移反応能力をもつ α -グルコシダーゼを利用すれば, エタノールとマルトースを基質としてEGを効率よく生産することができる。

ところで, 米糠の利用用途として米油がある。圧搾や有機溶媒による抽出により搾油し, その後の米糠粕は飼料や肥料に利用される。米糠粕にはタンパク質などの栄養成分が残るが, その中に様々な酵素が含まれる。資源の有効利用を考えると搾油後に有用な酵素を分離した後には飼料化や肥料化が望ましい。

米のグルコシダーゼに関する報告はあるものの^{6)~10)}糠

^{*} 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

[§] Corresponding author, E-mail: muchino@nodai.ac.jp

層に存在するグルコシダーゼに関する報告は少ない。IWATA¹¹⁾らは精米歩合を変えた米糠を調整し、各層での α -グルコシダーゼ活性は50%までは大きな変化がないことを示している。そのため、米糠より同酵素を取得するのは可能と考える。

そこで、本研究では米糠より α -グルコシダーゼを精製し、その性状ならびにEG生産性を調べることを目的とする。

実験方法

1. 実験材料

試料玄米には栃木県産コシヒカリを用いた。市販精米機にて90%搗精し、得られた米糠を8倍量のヘキサンで4℃にて18時間攪拌し、脂質を抽出した。その後、濾紙(No.2)を用いて吸引濾過し、続いて4倍量のヘキサンにより洗浄した。さらに、これを風乾し、ヘキサンを完全に除去したものを脱脂米糠とした。

脱脂米糠50gに、90mM塩化ナトリウムを含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)250mlを加え、ヒスコトロン(株)日音医理器械製作所)にてホモゲナイズ後、12時間、4℃にて攪拌抽出した。その後、ガーゼにて濾過、遠心分離(15,000rpm, 25分, 4℃)にて得られた上澄液に、30%飽和濃度になるように硫酸アンモニウム(硫酸)を加えた後、不溶化したタンパク質を上同様の条件にて遠心分離にて除き、得られた上澄液を粗酵素とした。

2. 酵素活性およびタンパク質量の測定

α -グルコシダーゼ活性はPNPG(p-ニトロフェニルグルコピラノシド)法にて測定した¹²⁾、20mM PNPGを含む1.0Mマックルベン緩衝液40 μ l、酵素溶液200 μ l、純水を1,360 μ l加え、37℃で30分間反応させた。その後、1Mの炭酸ナトリウム400 μ l加え、400nmにて吸光度を測定した。酵素単位は37℃、1分間にp-ニトロフェノール1 μ molを遊離する力価を1unitとした。タンパク質量はブラッドフォード法にて行った¹³⁾。

3. α -グルコシダーゼの精製

TOYOPEARL Butyl-600S(東ソー社製)を担体とした疎水クロマトグラフィー(ϕ 2.0cm \times 26cm)に調製した粗酵素を供し、あらかじめ30%飽和の硫酸を含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)にて平衡化したカラムに酵素液を添加後、同緩衝液を200ml流して洗浄し、硫酸飽和濃度30, 20, 10, 0%と順次ステップワイズ溶出(2ml/min)を行った。溶出液を各8ml、計80本分取し、主要活性画分を回収後、純水にて透析し、十分に硫酸アンモニウムを除去した。

疎水クロマトグラフィーにて回収した活性画分を分取用等電点電気泳動システム(Bio-Rad Laboratories社製: Rotofor)を用いて分画した。予備泳動後、純水を吸引除去後、活性画分にBiolyte(pI 3~10)を終濃度2%(v/v)になるよう加え、50mlに定容したものを同システムに供した。本泳動は2.25W, 4℃にて5.5時間

行い、その後、各試料室(20室)より分画液試験管を回収した。なお、陽極液には0.1Mリン酸溶液25ml、陰極液には0.1M水酸化ナトリウム溶液25mlを用いた。

4. 電気泳動およびN末端アミノ酸配列

分取用等電点電気泳動により得られた活性画分を濃縮後、Native-PAGEに供し、CBB染色によりタンパク質を検出した^{14), 15)}。また、バンドが確認された領域を切り出し、緩衝液で酵素を回収後、PNPG法にて活性確認を行なった。さらに、活性が確認されたバンドを切り出し、SDS-PAGEを行った¹⁶⁾。なお、ゲルはe-PAGEL 12.5%(ATTO社製)を用い、タンパク質の染色はCBBにて行った。

タンパク質をSDS-PAGE後のゲルから、セミドライブロットティング法にてPVDF膜へ転写し¹⁷⁾、プロテインシークエンサー(PPSQ21A SHIMADZU社製)にてN末端アミノ酸配列を解析した¹⁸⁾。

なお、今回は α -グルコシダーゼと思われる75kDaと、35kDaのタンパク質についてN末端を20残基解析した。これらをDDBJのFASTAを用いて相同性の検索^{19), 20)}を行った。

5. α -グルコシダーゼの各種条件での加水分解活性

(1) 活性に対するpHの影響 50mMのマックルベン緩衝液(pH3.0~8.0)を用い、酵素反応に対するpHの影響を試験する共に各pHにて4℃、24時間放置した後反応(pH5.0)させ残存活性を測定した。なお、活性は最大活性を100とした相対活性として求めた。

(2) 活性に対する温度の影響 30~80℃で酵素反応を行うと共に、pH5.0、上記各温度にて3時間放置したものの残存活性を測定した。なお、活性は最大活性を100とした相対活性として求めた。

(3) 活性に対するエタノールの影響 反応液に終濃度10, 20, 30, 40, 50%となるようにエタノールを加え活性測定を行った。また、10, 20, 30, 40, 50, 60%のエタノール濃度にて4℃、24時間放置した後に、透析にてエタノールを除去し残存活性測定した。活性はアルコール無添加のものの活性を100とし、相対活性として求めた。

6. α -グルコシダーゼによるEG生産性

EGの定量は、以下の操作にて行った。酵素力価を加水分解活性として0.05U, 50mMマックルベン緩衝液、マルトース濃度0.4M, エタノール濃度20%(v/v)となるよう調製し40℃にて、48時間反応させた。反応後沸騰水浴中にて10分間加熱処理し、酵素失活させ、反応後の溶液をプレフィルター(20 μ m, 東ソー社製)にて処理したものを試料とし、下記条件で測定を行った。カラム; Shim-pack CLC-NH₂, 移動相; アセトニトリル: 水=75:25, カラム温度; 40℃, 流速; 1ml/分, 検出; RID-6A(島津製作所)。

なお、結果はEGの生成量(mM)および転移率(%)として示した。転移率は、本酵素によってマルト

ースにエタノールが転移した場合、マルトース 1 分子から EG 1 分子とグルコース 1 分子が生成するため、分解生成物中の EG 量およびグルコース量を測定し、次式にて転移率を求めた。

$$\text{転移率 (\%)} = \text{EG 生成量} / \text{グルコース生成量} \times 100$$

(1) 最適 pH pH3.0~8.0 (50mM マックルベン緩衝液) にて反応を行い、pH と EG 生産量と除関係を試験した。

(2) 最適温度 30~70℃ にて 48 時間反応し、温度と EG 生成量との関係を試験した。

実験結果および考察

1. α -グルコシダーゼの精製

粗酵素を、TOYOPEARL Butyl-600S を担体とした疎水クロマトグラフィーにて精製を行った結果、硫酸飽和濃度 10, 20, 30% において、それぞれ活性ピーク（それぞれ 0.092, 1.029, 0.068U）を検出した。最も高い活性を示した硫酸飽和濃度 20% 画分において精製度は粗酵素に比べて 2.4 倍に上昇し、59.6% の活性を回収した。

次に、この硫酸飽和濃度 20% 画分を分取用 IEF により精製を行った結果、pH4.5~4.8 付近に活性ピークが得られ、このうち pH4.7 の画分を分取した。この画分を精製酵素とし、その活性は 0.21U で、精製度は 9.0 倍に上昇し、12.2% の活性を回収した (Table 1)。

本酵素の精製は比較的簡便で回収率も十分であるため、以後の実験遂行に十分なものであると判断した^{21)~36)}。

2. 米糠 α -グルコシダーゼの構造解析および N 末端アミノ酸配列解析

精製酵素を Native-PAGE に供試した結果、310kDa 付近主要なバンドが、150kDa 付近に薄いバンドが検出された (Fig. 1a)。Native-PAGE にて得られた各タンパク質バンドを切り出し、活性の確認試験を行った結果、310kDa 付近にのみ活性が確認された。このことから目的酵素は 310kDa と推察された。

Native-PAGE により得られた 310kDa 付近のタンパク質バンド領域を切り出し、回収後、SDS-PAGE に供した結果、76kDa と 36kDa にタンパク質バンドが確認された (Fig. 1b)。このことから目的酵素は 76kDa と 36kDa のサブユニットから構成されていることが考えられた。また、Native-PAGE、SDS-PAGE の挙動および染色濃度から、精製タンパクは 4 つの 76KDa のユニットおよび 1 つの 36KDa から構成されるヘテロ 5 量体のタンパク質である

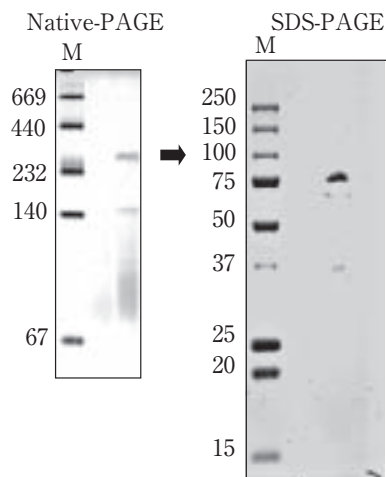


Fig. 1 Native-PAGE and SDS-PAGE of α -Glucosidase
UCHINO *et al.*

ことが推察された。

SDS-PAGE により得られた、76kDa と 36kDa のタンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列を解析し、それぞれ 16 残基を決定した。76kDa のタンパク質は VYIPYXTSAGVVGGXXNVXV であり、36kDa では ANFNKTKTKIGQGQXGXXX であった。これらの配列を FASTA にて相同性検索した結果、76kDa は米の糖質分解酵素群 (H2KW82_ORYSJ H2KW82) と 80% の相同性が、36kDa については高い相同性を示すタンパク質が検索されなかった。この結果より米糠の α -グルコシダーゼ活性を有するタンパク質の本体は 76kDa であると考えられた。山崎らは米由来 α -グルコシダーゼについて精製を行い、47.3, 58.0, 64.0, 84.0, 96.0KDa のアイソザイムを得ている^{6)~8)}。しかし、本酵素は 76KDa であったため、これらとは異なるアイソザイムまたは部分的に消化されたタンパク体と考えられる。生物全般におけるグルコシダーゼは約 25KDa (糸状菌; *Chaetomium thermophilum*) ~335KDa (ラット) と幅が広いが、その多くが 50~100KDa であり、本酵素もこの範囲であった^{32), 33)}。さらに、Native な状態は約 310kDa であり、報告にある米由来グルコシダーゼの 100KDa 以下とは異なっていた^{6)~8)}。しかし、他の生物種では複合体を形成したものが多く報告され、最大でラットの 1300KDa との報告もある³³⁾。このことから、本酵素は報告にあった米由来グルコシダーゼとは局在性や役割が異なるものと予想される。

Table 1 Purification of α -glucosidase

Steps	Total Protein (mg)	Activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification rate (fold)	Yield (%)
Crude Enzyme	375.7	4.68	4.5	1.0	100.0
Butyl Toyopearl	92.9	1.00	10.8	2.4	59.6
Rotofor	5.2	0.21	40.1	9.0	12.2

3. 米糠 α -グルコシダーゼの各条件下における加水分解活性について

米糠 α -グルコシダーゼの最適温度・pH、温度・pH安定性、エタノール存在下での活性およびエタノールに対する安定性を調べた結果をTable 2に示した。最適温度は50℃で、報告にある米由来グルコシダーゼと比較し5℃低かった。また、温度安定性は55℃まで安定であり、報告にある各種グルコシダーゼの安定温度の中間に位置していた。さらに、最適pHは4.0と米由来同酵素の報告の範囲内であったが、他の生物種と比較し、低いpHであった。また、pH安定性は3.0～8.0と報告の米由来酵素より幅広い値であった。以上より、米糠由来酵素は胚乳など、他の部位に存在するグルコシダーゼとは種類の異なるアイソザイムであることが示唆された。なお、エタノールに対し、10%まで安定であり、エタノールの活性に対する影響は20%までは活性が保持されるものの、以降では活性が低下する傾向が確認された。

4. 米糠 α -グルコシダーゼのEG生産性について

米糠 α -グルコシダーゼの温度やpHによるEG生産性の結果をFig 2に示した。最適pHはpH6.0であり、pH4.0～6.0で高いEG生成量を示した。これは加水分解の最適条件とほぼ同様であった。また、転移率はpH8.0のとき

に最大値を示したことから、高いpH条件下では加水分解が抑制されて、グルコース生成量が低下したためであると考えられた。最適温度は40℃であり、その後、反応温度上昇に伴いEG生成量は低下した。また転移率については、どの温度においてもほとんど変化がみられず、温度上昇とともに加水分解活性も抑制されたと考えられる。

芳川らは、*Aspergillus*由来の α -グルコシダーゼによるEG生産の試験を行い、pH6.0、45℃で最大の生産量を示したことを報告している²⁾。このことから、由来の異なるグルコシダーゼを利用しても、ほぼ同じ条件で生産が効率よく進むものと考えられる。

転移効率が最低でも10%あり、10mM以上のEG生産が可能であるため、米糠を利用したEG生産は未利用資源の有効活用として有用なものと考ええる。

要 約

エチル α -グルコシド生産を目的に米糠由来グルコシダーゼの研究を進めた。Native-PAGEの結果、310kDa付近に活性は確認され、このタンパク質バンドはSDS-PAGEの結果、DTT添加のみで76kDaと36kDaに分離したことから、ジスルフィド結合により結合していると考

Table 2 Characteristics of alpha-glucosidase from various organisms

Sample (Organism)	Opt. Temp.	Sta. Temp.	Opt. pH	Sta. pH	Ethanol resistant	Activity in Ethanol
Rice bran	50	~55	4.0	3.0~8.0	10%	~20%
<i>Panicum miliaceum</i> ³¹⁾	50~60	~45	4.5~5.0	2.5~8.0	—	—
<i>Oryza sativa</i> ⁸⁾	55	~50	3.0~5.0	4.0~7.0	—	—
<i>Allium fistulosum</i> ⁷⁾	55	~45	5.0	3.5~7.0	—	—
<i>Vigna radiata</i> ²⁵⁾	60~65	~65	5.0	3.5~6.5	—	—
<i>Lentinus edodes</i> ³⁴⁾	50	~40	5.0	4.0~6.0	—	—
<i>Sus scrofa</i> ³⁵⁾	60	~65	6.0~7.0	6.0~9.0	—	—
<i>Fagopyrum esculentum</i> ³⁶⁾	52	~45	5.0	4.0~7.3	—	—

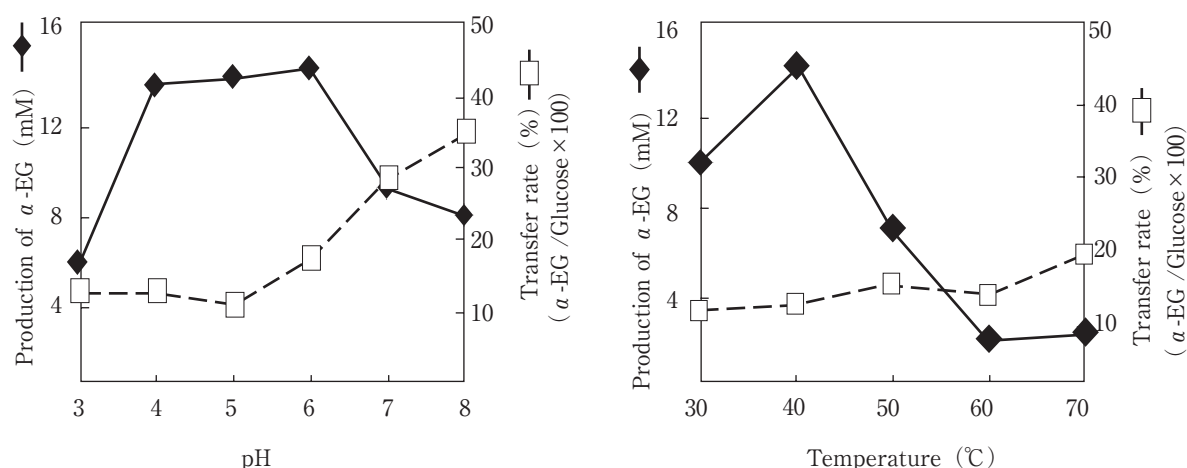


Fig. 2 Effect of pH and temperature on productivity of α -EG

UCHINO *et al.*

えられた。またN末端アミノ酸配列を解析したところ、76 kDaにおいては米糖質分解酵素群と100%の相同性が得られたことから、本精製により得られた活性タンパク質は α -グルコシダーゼであることが示唆された。

また、本酵素の諸性状において、加水分解活性では広いpH安定性と高いエタノール耐性を有していることがわかった。さらに転移活性においては、加水分解活性との最適条件の違いから、高pHで高い転移率を示した。

文 献

- 岡 智・岩野君夫・布川弥太郎：清酒醸造過程におけるエチル- α -D-グルコシドの生成，*農化*，**50**，463～468 (1976)
- 岡 智：清酒中のエチル- α -D-グルコシド，*日本醸造協会誌*，**72**，631～635 (1977)
- 芳川憲司・池田潔昭・谷川弘晃・山本一也・宮本博文・岡田茂孝：エチル- α -グルコシドの大量生産の方法と食品への応用，*日食工誌*，**41**，878～885 (1994)
- TAKENAKA, F. and UCHIYAMA, H.: Effects of α -D-Glucosylglycerol on the in vitro Digestion of Disaccharides by Rat. Intestinal Enzymes, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 1458～1463 (2001)
- KITAMURA, N., OTA, Y., HARATAKE, A., IKEMOTO, T., TANNO, O. and HORIKOSHI, T.: Effects of Ethyl- α -D-Glucoside on Skin Barrier Disruption, *Skin-Pharmacol.*, **10**, 153～158 (1997)
- YAMASAKI, Y. and SUZUKI, Y.: Two forms of alpha-glucosidase from rice seeds at the milky stage., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 707～715 (1980)
- YAMASAKI, Y. and KONNO, H.: Three forms of alpha-glucosidase from suspension-cultured rice cells, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3383～3390 (1985)
- YAMASAKI, Y. and KONNO, H.: Purification and properties of wall-bound alpha-glucosidase from suspension-cultured rice cells, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3239～3244 (1987)
- MATSUI, H., ITO, H. and CHIBA, S.: Low molecular activity alpha-glucosidase from ungerminated rice seed, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1859～1860 (1988)
- NAKAI, H., ITO, T., HAYASHI, M., KAMIYA, K., YAMAMOTO, T., MATSUBARA, K., KIM, Y.M., JINTANART, W., OKUYAMA, M., MORI, H., CHIBA, S., SANO, Y. and KIMURA, A.: Multiple forms of alpha-glucosidase in rice seeds (*Oryza sativa* L., var Nipponbare), *Biochimie*, **89**, 49～62 (2007)
- IWATA, H., SUZUKI, T. and ARAMAKI, I.: Purification and Characterization of Rice α -Glucosidase, a Key Enzyme for Alcohol Fermentation of Rice Polish., *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 106～108 (2003)
- 澱粉，糖質関連酵素実験法：中村道徳・貝沼圭二編 (1989)
- BRADFORD, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248～254 (1976)
- ORNSTEIN, L.: Disc Electrophoresis. I. background and theory, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **121**, 321～349 (1964)
- DAVIS, B.J.: Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404～427 (1964)
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680～685 (1970)
- HIRANO, H. and WATANABE, T.: Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis. Application to an insoluble protein, *Electrophoresis*, **11**, 573～580 (1990)
- EDMAN, P.: Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides, *Acta. Chemica. Scandinavica*, **4**, 283～284 (1950)
- LIPMAN, D. J. and PEARSON, W. R.: Rapid and sensitive protein similarity searches, *Science*, **227**, 1435～1441 (1985)
- PEARSON, W.R. and LIPMAN, D. J.: Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444～2448 (1988)
- BERTHELOT, K. and DELMOTTE, F. M.: Purification and characterization of an alpha-glucosidase from *Rhizobium* sp (*Robinia pseudoacacia* L.) strain USDA 4280, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2907～2911 (1999)
- BRAVO-TORRES, J. C., VILLAGOMEZ-CASTRO, J. C., CALVO-MENDEZ, C., FLORES-CARREON, A. and LOPEZ-ROMERO, E.: Purification and biochemical characterisation of a membrane-bound alpha-glucosidase from the parasite *Entamoeba histolytica*, *Int. J. Parasitol.*, **34**, 455～462 (2004)
- CHUANG, N. N., LIN, K. S. and YANG, B. C.: Purification and characterization of an alpha-glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *penaeus-japonicus* crustacea decapoda, *Comparat. Biochem. and Physiol.*, **B102**, 273～7 (1992)
- EL-FAKHARANY, E. M., SEROUR, E.A., ABDELRAHMAN, A. M., HAROUN, B.M. and REDWAN, E. R. M.: Purification and Characterization of Camel (*Camelus dromedarius*) Milk Amylase, *Prep.*

- Biochem. Biotechnol.*, **39**, 105~23 (2009)
- 25) GIUDICELLI, J., EMILIOZZI, R., VANNIER, C., DEBURLET, G. and SUDAKA, P. : Purification by affinity-chromatography and characterization of a neutral alpha-glucosidase from horse kidney, *Biochim. Biophys. Acta.*, **612**, 85~96 (1980)
- 26) JONG-ANURAKKUN, N., BHANDARI, M. R., HONG, G. and KAWABATA, J. : alpha-glucosidase inhibitor from Chinese aloes, *Fitoterapia*, **79**, 456 ~ 457 (2008)
- 27) KONISHI, Y., KITAZATO, S. and NAKATANI, N. : Partial purification and characterization of acid and neutral alpha-glucosidases from preclimacteric banana pulp tissues, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2046~2051 (1992)
- 28) MATSUI, H., YAZAWA, I. and CHIBA, S. : Purification and substrate-specificity of sweet corn alpha-glucosidase, *Agric. Biolog. Chem.*, **45**, 887~894 (1981)
- 29) TAKESUE, Y. and TAKESUE, S. : Purification and characterization of alpha-glucosidase complex from the intestine of the frog, *Rana japonica*. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.*, **1296**, 152~ 8 (1996)
- 30) TORRE-BOUSCOULET, M.E., LOPEZ-ROMERO, E., BALCAZAR-OROZCO, R., CALVO-MENDEZ, C. and FLORES-CARREON, A. : Partial purification and biochemical characterization of a soluble alpha-glucosidase II-like activity from *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**, 123~ 8 (2004)
- 31) YAMASAKI, Y., KONNO, H. and MASIMA, H. : Purification and properties of alpha-glucosidase from millet seeds, *Phytochem.*, **41**, 703~705 (1996)
- 32) GIANNESI, G. C., POLIZELI, M.L., TEREZI, H. F. and JORGE, J. A. : A novel alpha-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose : Purification and partial characterisation of the enzyme, *Process Biochem.*, **41**, 1729~1735 (2006)
- 33) REISS, U. and SACKTOR, B. : Kidney brush border membrane maltase : purification and properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 342~348 (1981)
- 34) YAMASAKI, Y. and SUZUKI, Y. : Purification and Properties of α -Glucosidase and Glucoamylase from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 971~980, 1978
- 35) CHIBA, S., SHIMOMURA, T. and HIBI, N. : Purification and Some Properties of a Neutral α -Glucosidase from Pig Serum, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1805~1812 (1976)
- 36) TAKAHASHI, M. and SHIMOMURA, T. : Biochemical Studies on α -Glucosidase from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mö nch) Part II. Purification of Buckwheat α -Glucosidase and Some Properties on Maltose and Soluble Starch, *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 929~939 (1968)
- (平成23年 9 月 8 日 受付, 平成24年 4 月19日 受理)

品種および収穫時期の違いが長期どり栽培されたアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の破断応力およびルチン含量ならびにそれらの収穫後変化に及ぼす影響

元 木 悟^{*1†}・北澤 裕明^{*2§}・酒井 浩晃^{*1}
松島 憲一^{*3}・濱渦 康範^{*3}

* 1 長野県野菜花き試験場

† 現所属：明治大学農学部

* 2 (独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

* 3 信州大学大学院農学研究科

Effects of Cultivar and Harvest Season on Rupture Stress and Rutin Content and Their Changes after Harvest of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Cultivated Using the Long-term Harvest Production System

MOTOKI Satoru^{*1†}, KITAZAWA Hiroaki^{*2§}, SAKAI Hiroaki^{*1},
MATSUSHIMA Ken-ichi^{*3} and HAMAIZU Yasunori^{*3}

* 1 Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, 1066-1, Soga, Shiojiri, Nagano 399-6461

* 2 National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

* 3 Graduate School of Agriculture, Shinshu University, 8304, Minamiminowa, Kami-ina, Nagano 399-4598

We investigated the effects of cultivars and harvest season on the rupture stress and rutin content of open-cultured asparagus by using 4 cultivars that were 6 years old: 'UC157,' 'NJ953,' 'Gijnlim,' and 'Purple Passion.' From the results of the rupture stress test, we found that 'UC157' could easily be hardened during 7-day storage throughout the harvest seasons. 'NJ953' and 'Gijnlim' also showed the tendency to harden during storage in autumn. In 'UC157,' 'NJ953,' and 'Gijnlim,' rutin contents in spring were higher than those in summer or autumn. Among the cultivars, 'Purple Passion' had the highest rutin content from summer to autumn. These results suggested that rupture stress and rutin content and their changes after harvest were affected by cultivar and/or harvest season.

(Received Sep. 21, 2011 ; Accepted Mar. 1, 2012)

Key words : long-term harvest production system, rupture stress, open culture, rutin, Spear

長期どり栽培, 破断応力, 露地栽培, ルチン, 若茎

アスパラガスは収穫後の品質低下が著しい品目とされ¹⁾, 収穫後そのままの状態におくと, 水分および糖分の急速な減少が起こるとされている²⁾。また, 収穫後も若茎の伸長が続くことから³⁾, 若茎基部の切り口から先端部に向けて組織の繊維質化が急速に進行し硬化するこ

とも収穫後の品質低下の一因として懸念される⁴⁾。これらの収穫後における品質変化に, 収穫時期や作型, 天候などが影響を及ぼすという報告^{5), 6)}もあり, 収穫後の品質低下を防止するためには, 品種や栽培条件, 保存条件と品質変化との関係を明らかにする必要がある。

* 1 〒399-6461 長野県塩尻市宗賀1066-1

† 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1

* 2 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

§ Corresponding author, E-mail: ktz@affrc.go.jp

* 3 〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304

筆者ら⁷⁾は、春どりされた若茎の外観とアスコルビン酸含量の収穫後の変化に及ぼす品種および保存温度の影響について、現在、国内で栽培されている‘UC157’、‘ガインリム’、‘パープルパッション’の3品種を用いて調査し、この収穫時期における品質と収穫後の変化に品種間差異があることを明らかにした。また、‘ガインリム’は、‘UC157’、‘パープルパッション’と比較して品質が低下しやすく、流通においては、厳密な低温管理が必要である可能性を示唆した。

アスパラガスの収穫後の品質変化に関しては、春どりされたものに関する報告が多い^{2),7),8)}。しかし、国内では長期どり栽培が全国的に広く普及していることから、春どり以外の収穫時期における品質変化について把握する必要がある。また、品質の中でもアスパラガスの若茎硬度やその収穫後の変化を調査した報告は少ない。伊藤⁸⁾は、‘メリーワシントン500W’の収穫物を、氷を詰めた箱に入れて実験室に輸送し、収穫6時間後から貯蔵温度1、5および10℃で保存試験を行ったところ、若茎の硬度は保存温度が高く、保存期間が長くなると大きく低下したと報告している。しかし、この試験では開始直前に箱内の温度が一旦18℃になったとされており、この温度上昇が試験結果に影響を及ぼした可能性が考えられた。また、この報告で供試された‘メリーワシントン500W’は、現在国内ではほとんど栽培されていない^{7),9)}。したがって、この報告をアスパラガスの収穫後における品質変化の事例として活用することは難しいと考えられた。

近年、農産物の高付加価値化の観点から、その機能性成分に対する関心が高まりつつある。アスパラガスは抗酸化作用を有する機能性成分に富み^{10),11)}、その代表的なものはルチンである^{10),12)}。これまで、若茎に含まれるルチンの大半が、若茎頭部に存在することが知られているが¹⁰⁾、品種や収穫時期による変動については不明な点が多い。

以上より本研究では、アスパラガスの収穫後の品質や成分の変化を明らかにするために、長期どり栽培された、国内で生産されている4品種の若茎を用いて品種および収穫時期の違いが部位別の破断応力と機能性成分の一つであるルチンの含量の収穫後の変化に及ぼす影響を調査した。

実験方法

1. 供試材料および栽培条件

供試材料は、旧長野県野菜花き試験場（長野県長野市）の場内圃場で露地長期どり栽培された6年株の若茎を用いた。供試品種は、国内における作付状況と育成地を考慮し⁹⁾、‘UC157’（サカタのタネ）、‘NJ953’（パイオニアエコサイエンス）、‘ガインリム’（パイオニアエコサイエンス）および4倍体品種である^{13),14)}ムラサキアスパラガスの‘パープルパッション’（サカタのタネ）の4品種とした。栽植様式は、畝幅150cm、ベッド幅80

cm、株間30cmの1条植え（栽植密度：2222株・10a⁻¹）とした。肥料は化成肥料を用いて、基肥としてN:P₂O₅:K₂O=20:20:20（kg・10a⁻¹）を、1年株では定植前に、2年株以降は萌芽前に施用した。追肥として各年とも6～8月の3か月間、半月ごとにそれぞれN:P₂O₅:K₂O=5:0:5（kg・10a⁻¹）を施用した。栽培期間中、灌水は天水のみとした。倒伏防止対策として、立茎時に培土と支柱誘引を行い、地際から50cmの高さまで下枝かきを行った。その他の栽培管理は、当場の慣行¹⁵⁾に準じた。

2. 収穫条件

収穫は、2008年5月2日～16日、同年7月18日～28日および同年9月29日～10月10日に行い、元木¹⁶⁾の分類に準じ、それぞれ順に春どり、夏秋どり・盛夏期、夏秋どり・温度降下期とした。収穫は、午前9時に行った。供試材料は、収穫時の長さが30cm以下の若茎を、出荷規格の25cm長に調製し、L級規格（長野県規格の1茎重で15g以上40g未満）に揃え、無作為に選んだものとした。ただし、‘パープルパッション’は、収穫物が他の品種に比べて太く、すべての調査に供試するためのL級規格の本数が確保できなかったため、この品種での先行知見のない、春どりにおける破断応力の調査および夏秋どりにおけるルチン含量の分析のみに供試した。

3. 測定のタイミングと保存条件

既報^{1),2),7),17)}ではアスパラガスの保存期間は3～5日間程度であるが、農産物の海外への輸送など¹⁸⁾、従来と比較し流通が長時間に及ぶ事例も多くなってきていることから、各測定および分析は、収穫後3時間以内（収穫直後）および7日間保存後とした。収穫した若茎は、漆崎¹⁹⁾および元木ら²⁰⁾の報告を参考に、新聞紙に包み、10℃、湿度95%の暗黒条件下で、穂先を上にして立てた状態で保存した。

4. 破断応力の測定

若茎の部位別（切断面から2cmごとに0～10cm）の破断応力は、カッターナイフ替刃（特大H、オルファ株式会社。刃厚：0.7mm、刃幅：18mm）による切断時の最大応力として測定した。破断応力の測定には、引張圧縮試験機（SV-50型、今田製作所）を用いた。替刃はシリコン栓で挟み、これをプランジャーとして試験機に取り付けた。プランジャーの送り速度は40mm・min⁻¹とした。品種、収穫時期ごとに3～5本の若茎について測定した。

5. ルチンの定量および分析方法

ルチン抽出操作は若茎をフリーザー（-40℃）で凍結保存し凍結させたまま実施した。若茎に含まれるルチンの大半は頭部に集中して存在していることから¹⁰⁾、この部位を調査対象とした。抽出液は若茎頭部から5gの試料を採取し、水5mlおよびメタノール40mlを加え、乳鉢と乳棒ですり潰した後、ろ紙（No.5A、アドバンテック）でろ過し、さらにメンブレンフィルター（孔径0.45μm、アドバンテック）で再ろ過し、メタノールで50mlに

定容し得た。この抽出液を20 μ l採取し、HPLCシステム（ポンプ：20AB，検出器：SPD-6 A，島津製作所）に注入した。HPLCの分析条件は，流速：1.0ml・min⁻¹，カラム温度40℃，カラム：CAPCELL PAK C18（4.60×200mm，バイオクロマト）とし，移動相は，酢酸：アセトニトリル：水＝5：24：71とした。検出波長は354 nmとした。ルチンの純品（和光純薬工業）を用いて検量線を作成し，ピーク面積からルチン含量を算出した。品種，収穫時期ごとに3本の若茎について測定し，これらを反復とした。

実験結果

1. 品種および収穫時期の違いが収穫後の部位別破断応力に及ぼす影響

（1）収穫直後 品種ごとにみると，‘UC157’の基部（切断面）から2 cmと4 cmの部位における破断応力は，春どりで5.4～7.5N，夏秋どり・盛夏期で6.4～7.6N，夏秋どり・温度降下期で14.8および9.6Nであり，夏秋どり・温度降下期で高い値を示した（表1）。‘NJ953’では，切断面から8 cmの部位で収穫時期による差が認められ，春どりと夏秋どり・盛夏期で3.7N，夏秋どり・温度降下期で5.9Nであり，夏秋どり・温度降下期で高い値を示した。一方，‘ガインリム’および‘パープルパッション’では収穫時期による変化はみられなかった。

収穫時期ごとに品種間差をみると，‘UC157’，‘NJ953’，‘ガインリム’の間に有意な差はみられなかった

が，春どりで，基部から2 cmと4 cmの部位において，‘UC157’と‘パープルパッション’との間に有意差がみられ，‘UC157’が高い値を示した。夏秋どり・盛夏期では，いずれの部位においても，品種間差は認められなかった。夏秋どり・温度降下期における基部から2 cmの部位では‘UC157’と‘ガインリム’との間に有意差がみられ，‘UC157’が高い値を示した。

（2）7日間保存後 ‘UC157’はいずれの収穫時期においても収穫直後に比べて大きくなる傾向がみられた（表1）。‘NJ953’と‘ガインリム’では，夏秋どり・温度降下期において，収穫直後と7日間保存後との間に有意差が認められた。‘パープルパッション’では，調査を行った夏秋どり・盛夏期および温度降下期のいずれにおいても保存後の変化は認められなかった。

2. 品種および収穫時期の違いが収穫後のルチン含量に及ぼす影響

（1）収穫直後 いずれの品種も春どりの収穫直後のルチン含量が最も高く，品種間には差は認められなかった（表2）。一方，夏秋どり・盛夏期および温度降下期における収穫直後のルチン含量は，‘パープルパッション’がそれぞれ62.9mg・100g⁻¹FWおよび68.9mg・100g⁻¹FWであり，他のグリーンアスパラガス用3品種の同時期のルチン含量のそれぞれ21.2mg・100g⁻¹FW～33.8mg・100g⁻¹FWおよび25.7mg・100g⁻¹FW～45.6mg・100g⁻¹FWに比べて大きい値を示した。

（2）7日間保存後 ‘UC157’の夏秋どり・温度降

表1 収穫時期がアスパラガスにおける部位別の破断応力とその収穫後の変化に及ぼす影響

品 種	作型・収穫時期	基部（切断面）からの位置および破断応力（N）													
		2 cm		4 cm		6 cm		8 cm		10cm					
		収穫直後	7 日後 ^a	収穫直後	7 日後	収穫直後	7 日後	収穫直後	7 日後	収穫直後	7 日後				
UC157	春どり	7.5b ^y	10.8 ***	5.4b	8.3 **	4.4b	7.5 **	3.9a	8.1 *	4.0a	9.2 NS				
	夏秋どり・盛夏期	7.6b	13.3 **	6.4b	11.3 **	5.6ab	10.4 **	4.3a	8.6 **	3.9a	7.0 **				
	夏秋どり・温度降下期	14.8a	21.6 **	9.6a	15.6 **	7.4a	14.8 **	6.2a	11.0 **	4.0a	10.7 **				
NJ953	春どり	6.5a	9.2 NS	4.2a	6.3 NS	4.0a	4.0 NS	3.7b	4.1 NS	3.4a	3.4 NS				
	夏秋どり・盛夏期	8.4a	9.6 NS	6.1a	7.5 NS	5.5a	4.7 NS	3.7b	4.0 NS	3.0a	3.8 NS				
	夏秋どり・温度降下期	9.7a	21.9 **	7.4a	18.5 **	7.1a	15.9 **	5.9a	13.3 **	4.3a	11.5 **				
ガインリム	春どり	6.9a	8.2 NS	4.8a	6.6 NS	4.7a	5.0 NS	4.2a	4.3 NS	4.2a	4.7 NS				
	夏秋どり・盛夏期	6.7a	6.2 NS	5.7a	6.1 NS	4.9a	5.2 NS	3.4a	4.5 NS	3.0a	3.4 NS				
	夏秋どり・温度降下期	8.7a	20.7 **	6.6a	17.1 **	5.6a	12.4 **	5.1a	11.4 **	3.7a	8.4 **				
パープル	春どり	5.2	4.6 NS	4.1	3.8 NS	3.6	3.5 NS	3.7	3.7 NS	3.2	3.1 NS				
パッション	夏秋どり・盛夏期	5.8	6.4 NS	5.6	5.7 NS	4.2	6.0 NS	4.3	5.0 NS	3.2	4.3 NS				
	夏秋どり・温度降下期	— ^w	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
		NS ^v		NS		NS		NS		NS					

^z保存温度は10℃。

^y同一品種内の比較において，異なるアルファベット間にはTukey-HSD testにより5%水準で有意差あり（n＝3～5）。

^v同一の品種および収穫時期における収穫直後と7日後との比較において，t-testにより5%（*）または1%（**）水準で有意差ありまたはなし（NS）（n＝3～5）。

^w調査せず。

^vt-testにより5%水準で有意差なし（n＝3～5）（NS）。

表2 収穫時期がアスパラガスのルチン含量とその収穫後の変化に及ぼす影響

品 種	作型・収穫時期	ルチン含量 (mg・100g ⁻¹ FW)		
		収穫直後	7 日後 ^z	
UC157	春どり	117.2a ^y	103.3	NS ^x
	夏秋どり・盛夏期	21.2c	25.8	NS
	夏秋どり・温度降下期	45.6b	35.6	**
NJ953	春どり	136.4a	106.4	**
	夏秋どり・盛夏期	33.8b	26.3	*
	夏秋どり・温度降下期	40.4b	35.2	*
ガインリム	春どり	123.3a	122.6	NS
	夏秋どり・盛夏期	30.5b	28.4	NS
	夏秋どり・温度降下期	25.7b	24.3	NS
パープル	春どり	— ^w	—	—
パッション	夏秋どり・盛夏期	62.9	50.5	*
	夏秋どり・温度降下期	68.6	37.6	**

^z保存温度は10℃。^y同一品種内の比較において、異なるアルファベット間にはTukey-HSD testにより5%水準で有意差あり (n=3)。^x同一の品種および収穫時期における収穫直後と7日後との比較において、t-testにより1% (**) または5% (*) 水準で有意差あり、またはなし (NS) (n=3)。^w調査せず。^vt-testにより1% (**) または5% (*) 水準で有意差あり (n=3)。

下期, 'NJ953' のすべての収穫時期, 'パープルパッション' の夏秋どり・盛夏期および温度降下期でルチン含量が収穫直後に比べて減少したが, 'UC157' の春どりと夏秋どり・盛夏期と 'ガインリム' のすべての収穫時期では, 有意差は認められなかった (表2)。

考 察

本研究では, 露地長期どり栽培された6年株の国内で生産されている4品種を用い, 収穫直後と10℃7日間保存後の破断応力を測定した。収穫直後と7日間保存後の破断応力には品種間差および収穫時期間差が認められ, 春どりおよび夏秋どり・温度降下期において, 'UC157' の基部に近い部分で他の品種に比べて破断応力が大きくなる傾向がみられた。また, ムラサキアスパラガス用品種である 'パープルパッション' は, グリーンアスパラガス用品種と比較し, 「筋っぽく」ならないのが特徴とされている¹⁴⁾。本研究においても, 収穫時期にかかわらず, 'パープルパッション' の基部における破断応力は 'UC157' に比べて小さい値を示し, 先の報告を支持する結果であった。筆者らは, 収穫前における1日あたりの若茎の伸長量は, 頭部に近いほど大きく, 基部では小さいことを明らかにしている²¹⁾。また, 春どりにおける若茎の伸長速度を 'UC157' と 'ガインリム' とで比較した場合, 'UC157' のほうが小さいことを報告している²²⁾。したがって, 伸長量が小さい基部では硬化が進行しやすいと考えられた。また, 収穫時期を通して収穫前の 'UC157' における基部の伸長量は, 他の品種

のそれと比較し, 小さかったものと推察された。

7日間保存後の破断応力をみると 'UC157' のみが, いずれの収穫時期においても大きくなる傾向を示し, 前報²²⁾で述べた, 収穫後の若茎の伸長進行程度の品種間差が現れたものといえる。一方, 夏秋期・温度降下期においては, いずれのグリーンアスパラガス用品種も7日後に破断応力が大きくなる傾向を示し, 収穫後の若茎の硬化程度は収穫時期の影響を受けることが明らかとなった。この要因については, 今後の検討を要するものと考えられた。

なお, 岡部ら¹⁷⁾は, アスパラガスの若茎基部を熱収縮フィルム, あるいは蜜蝋により覆うことにより, 切断面からの水分減少を抑制できることを報告している。若茎硬化の要因には繊維質化の進行などの要因があり⁴⁾, 水分減少のみに支配されるわけではないものの, 基部に近い部分での硬化が著しい品種や収穫時期においては, このような対策が有効であると思われる。

ルチン含量は, いずれの品種においても春どりが夏秋どり・盛夏期に比べて高い値を示した。アスパラガスのルチン含量およびその季節変動に関する報告は少ないが, 板森ら⁵⁾は, 作型および収穫時期ごとのアスコルビン酸含量を比較し, いずれも露地普通栽培の春どりが最も高く, 次いでハウス半促成長期どり栽培の春どり, ハウス半促成長期どり栽培の夏秋どりの順となることを報告している。本研究における収穫時期の違いによるルチン含量の変動はアスコルビン酸含量の変化と類似した傾向で推移しているものと考えられた。

アスパラガスの内容成分含量が、春どりと比べて夏秋どりで小さくなる一因として、気温との関係が考えられた。若茎の1日当たりの伸長量は気温が高いほど大きくなり²³⁾、若茎の生長が旺盛な夏秋どり・盛夏期には、1日に10cm以上伸長することから³⁾、夏秋どりでは若茎の伸長量と比べて内容成分の生成量が著しく小さくなっている可能性が考えられる。これに関連し、夏秋どり・温度降下期において‘ガインリム’のルチン含量が‘UC157’と比較し有意に少なかった理由は、‘ガインリム’が北海道をはじめとした寒冷地での栽培に適した品種であり^{7), 9), 16)}、夏秋どり・温度降下期における若茎の伸長量が‘UC157’と比較し大きかったことに関連していると推察された。本研究では、春どりの‘パープルパッション’のルチン含量を分析することができなかったが、5年株を用いたMAEDA *et al.*²⁴⁾および8年株を用いた甲村・渡邊¹³⁾のいずれの報告においても、春どりされた‘パープルパッション’のルチン含量は、‘UC157’に比べて高いことが報告されている。このように株の年生の違いに関わらず、同一の傾向が得られていることから、本研究で対象とした6年株においても、‘UC157’より高かったものと推察される。さらに、今回明らかとなった夏秋どりにおける測定結果を考慮すれば、‘パープルパッション’のルチン含量が高い傾向は異なる収穫時期においても維持される可能性が高いと考えられるが、これらの点については、その他の品種との比較を含め、今後の検討を要する。

以上より、アスパラガスにおいて収穫時期や品種により、収穫直後の破断応力およびルチン含量、ならびにそれらの収穫後の変化程度が異なることが明らかとなった。現在、アスパラガスの収穫直後の調製や流通段階において、品種や収穫時期、ならびに若茎基部の硬化程度を考慮した対策は行われていないが、今後は今回明らかとなった知見を基に、収穫時期や品種に対応した鮮度保持方法を確立する必要があるものと考えられた。

要 約

露地長期どり栽培された6年株のアスパラガス4品種を用いて、品種および収穫時期がアスパラガスの部位別の破断応力およびルチン含量、ならびにそれらの収穫後の変化に及ぼす影響を調査した。‘UC157’は他の3品種と比較し、収穫後の硬化が進行しやすかった。夏秋どり・温度下降期においては、‘NJ953’および‘ガインリム’においても収穫後の硬化が認められた。ルチン含量は、春どりにおいて最も高く、夏秋どりでは、大幅に減少した。また、品種間の比較では、夏秋どりにおける‘パープルパッション’のルチン含量は他の3品種より有意に高かった。以上より、アスパラガスの破断応力およびルチン含量とその収穫後の変化は、品種や収穫時期により異なることが明らかとなった。

文 献

- 1) 一丸禎樹・犬塚和男：アスパラガスの鮮度保持に関する研究，長崎総農林試報，**32**，1～14（2006）
- 2) 八畝利郎：アスパラガス，地域資源活用食品加工総覧 第10巻 素材編，農文協，pp.19～32（2000）
- 3) 前田智雄：アスパラガスの成分と鮮度保持（元木 悟・井上勝広・前田智雄編著：アスパラガスの高品質多収技術），農文協，pp.189～199（2008）
- 4) 牛流清志：葉菜類その他の真空冷却（大久保増太郎編著：野菜の鮮度保持），養賢堂，pp.127～135（1988）
- 5) 板森敏宣・地子 立・植野玲一郎・中野雅章・目黒孝司：ハウス立茎および露地普通栽培におけるグリーンアスパラガス若茎のBrix値とアスコルビン酸含量，北海道立農試集報，**98**，51～54（2006）
- 6) 田村 晃・篠田光江：アスパラガス長期どり栽培収穫物における糖と遊離アミノ酸含量の推移，東北農業研究，**56**，219～220（2003）
- 7) KITAZAWA, H., MOTOKI, S., MAEDA, T., ISHIKAWA, Y., HAMAUZU, Y., MATSUSHIMA, K., SAKAI, H., SHINA, T. and KYUTOKU, Y. : Effects of storage temperature on the post harvest quality of three asparagus cultivars harvested in spring, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **80**, 76～81（2011）
- 8) 伊藤和彦：青果物の鮮度保持に関する研究，第1報 グリーンアスパラガスの短期包装貯蔵，北海道大学農学部邦文紀要，**15**，7～18（1986）
- 9) 元木 悟：品種を選び，その特性を活かす（元木 悟・井上勝広・前田智雄編著：アスパラガスの高品質多収技術），農文協，pp.39～56（2008）
- 10) 前田智雄：アスパラガスの成分と鮮度保持（元木 悟・井上勝広・前田智雄編著：アスパラガスの高品質多収技術），農文協，pp.189～199（2008）
- 11) 元木 悟・前田智雄・宮野幸一郎・小竹優人・吉田清志・五味文誠・芹澤啓明・北澤裕明・坂崎孝志・酒井浩晃・中村憲太郎・袖山栄次：アスパラガスの栽培法の違いが若茎の形状および機能性成分に及ぼす影響，園学研，**10**（別2），216（2011）
- 12) 津志田藤二郎・鈴木雅弘・黒木柁吉：各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定，日食工誌，**41**，611～618（1994）
- 13) 甲村浩之・渡邊弥生：紫アスパラガス‘パープルパッション’の全期立茎栽培における生育・収量特性と食味・ポリフェノール含量評価，近中四農業研究，**6**，50～56（2005）
- 14) 元木 悟：ムラサキアスパラガスの栽培，農業技術体系野菜編8（2）タマネギ・アスパラガス，農文協，pp.基299～306（2011）
- 15) 元木 悟・上杉壽和・小澤智美・小松和彦・塚田元尚：アスパラガス長期どり栽培における立茎方法および立茎数が収量に及ぼす影響，長野野菜き試

- 報, **12**, 19~29 (2004)
- 16) 元木 悟: アスパラガスの作業便利帳, 農文協, pp.155 (2003)
- 17) 岡部和広・大木 淳・工藤郁也: アスパラガス収穫物の切り口を中心とした品質低下防止技術, 東北農業研究, **60**, 207~208 (2007)
- 18) ISHIKAWA, Y., KITAZAWA, H. and SHIINA, T.: Vibration and shock analysis of fruit and vegetables transport — Cherry transport from Yamagata to Taipei—, *JARQ*, **43**, 129~135 (2009)
- 19) 漆崎末夫: 農産物の鮮度保持, 筑波書房, pp.190 (1988)
- 20) 元木 悟・川畑朋崇・濱渦康範・松島憲一・酒井浩晃・北澤裕明・前田智雄・重盛 勲: 収穫時期, 品種および保存方法の違いがアスパラガスの品質に及ぼす影響, 園学研, **9** (別1), 174 (2010)
- 21) 元木 悟・鈴木尚俊・宮下和久・塚田元尚・前田智雄・矢崎明美・小澤智美・小松和彦・金子 博: アスパラガス新品目 '生食用ホワイトアスパラガス' の特性, 園学雑, **73** (別1), 313 (2004)
- 22) MOTOKI, S., MATSUNAGA, K., MAEDA, T. and KUTSUZAWA, T.: Selection of Asparagus Cultivars for Cold Areas of Japan, *Acta Hortic.*, **776**, 357~366 (2008)
- 23) 元木 悟: 若茎の収穫, 農業技術体系野菜編8 (2) タマネギ・アスパラガス, 農文協, pp.43~47 (2010)
- 24) MAEDA, T., KAKUTA, H., SONODA, T., MOTOKI, S., UENO, R., SUZUKI, T. and OOSAWA, K.: Antioxidation capacities of extracts from green, purple, and white asparagus spears related to polyphenol concentration, *HortScience*, **40**, 1221~1224 (2005)
- (平成23年9月21日受付, 平成24年3月1日受理)
-

The Calmodulin-Encoding Gene *BoCam1*: A Sensitive Wound-Responsive Gene in Cabbage

THAMMAWONG Manasikan*, HEWAJULIGE GANGA NAMALI Ilmi*, KANETA Tomoko*,
NAKAMURA Nobutaka*, ITO Yasuhiro* and SHIINA Takeo*[§]

* National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Given that calmodulin (CaM), phospholipase D (PLD), and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) play important roles in plant stress response, we investigated the expression of CaM-encoding genes, *BoCam1* and *BoCam2*, PLD-encoding genes, *BoPLD1* and *BoPLD2*, and ACS-encoding gene, *BoACS2*, in wounded cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata* L.) leaf disk obtained from the first layer of the head using a cork borer. Normalized with the internal standard, quantitative real-time PCR revealed that wounding treatment significantly elevated *BoCam1* levels, with the highest level occurring 60 min after treatment (6.4 fold). Although *BoCam2* expression levels were low, a significant increase was also detected at 60 min (1.6 fold). For PLD-encoding genes, the expression level of *BoPLD1* was only 1.5-fold greater 120 min after treatment. The expression of *BoPLD2* also remained low, and no clear differences were observed among treatments during the investigation. Additionally, the expression level of *BoACS2* decreased at 15 min to 30 min and then its level rose again to 1.6-fold at 120 min after treatment. However, the expression level of *BoACS2* remained low during the investigation. Overall, *BoCam1* is likely a wound-responsive gene that is induced to high expression levels after encountering stress. Moreover, because of its high sensitivity to the wounding stress, *BoCam1* should be taken into consideration in further study of postharvest mechanical stress as it may be associated with the signaling cascade and cellular stress response in cabbage.

(Received Sep. 21, 2011 ; Accepted Apr. 12, 2012)

Key words : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS)-encoding gene, cabbage, calmodulin (CaM)-encoding gene, mechanical stress, phospholipase D (PLD)-encoding gene, wound-responsive gene
ACC合成酵素 (ACS) コード遺伝子, カルモデュリン (CaM) コード遺伝子, キャベツ, 傷害
応答遺伝子, フォスホリパーゼ D (PLD) コード遺伝子, 物理ストレス

In plant cells, biotic and abiotic signals are perceived by receptors, resulting in rapid and transient changes in the cytosolic free calcium concentration (Ca^{2+}). Ca^{2+} sensing protein is capable of binding to free Ca^{2+} such as the calcium-modulated protein calmodulin (CaM), an acidic protein that harbors four elongation factor (EF)-hand motifs and that is present in all eukaryotes. Ca^{2+} -bound calmodulin interacts and regulates the activity of a number of proteins involved in a variety of cellular processes that respond to environmental stimuli, including abiotic and mechanical stresses^{1)~5)}. The increased expression of calmodulin genes in response to mechanical stimuli (wound, touch, wind, cold) has been described for many plant species^{6)~9)}. Different expression of the

multiple CaM isoforms in a single plant species have also been reported to be induced by particular stress signals. For example, in tobacco, expression of *NpCaM-1* responded to wind and cold shock stimulation, but *NpCaM-2* was not induced by these stresses⁶⁾. Additionally, *MBCaM-1* mRNA of mung bean exhibited a transient increase in response to touch stimulus, while *MBCaM-2* expression showed a small increase as compared to *MBCaM-1*⁷⁾.

Phospholipase D (PLD; EC 3.1.4.4) belongs to a lipolytic enzyme subclass, which hydrolyzes phospholipids to phosphatidic acid (PA), a plant lipid second messenger. The rapid increase (within minutes) of PA level has been detected in response to stresses including wounding, pathogen attack, and ethylene. Moreover, PLD has been proposed to

[§] Corresponding author, E-mail : shiina@affrc.go.jp

contribute to PA production during stress responses, and the activation of PLD results in elevated levels of PA. PLD gene transcription and protein activity are also known to increase upon exposure to various stresses^{10)~13)}. In plants, multiple PLD genes have been identified and encode isoforms with distinct regulatory and catalytic properties. Five classes: alpha, beta, gamma, delta and zeta of PLD genes have been described in *Arabidopsis thaliana* and two PLD genes were isolated from *Craterostigma plantagineum*. The involvement of PLD isoforms (*CpPLD-1* and *CpPLD-2*) in the stress response was also discussed in *C. plantagineum*^{14), 15)}. Furthermore, most plant PLD classes have been shown to harbor an N-terminal calcium-dependent lipid-binding domain and require Ca^{2+} for activity. Although the relationship remains unclear, the increases in Ca^{2+} and Ca^{2+} -bound CaM in response to stimuli may play positive roles in the stress response by regulating PLD or PA signaling^{16)~18)}.

Horticultural commodities, including fruits and vegetables, are exposed to various stresses during harvesting and postharvest handling. Some of these stresses, such as wounds and mechanical injuries, occur throughout the fresh produce distribution chain. The responses of fresh produce to mechanical stress can be detrimental, leading to physiological disorders and quality deterioration^{19)~21)}. Changes in quality of harvested fruits and vegetables may also be affected by ethylene production which is enhanced by a number of stresses. Wound stress has been reported to induce ethylene synthesis and ACS expression in fresh produce^{22)~25)}. The abundance of *BoACS1* transcripts has been found along the stem (in the first layer, the inner layer of stem, and the basal portion of curds) of harvested broccoli, whereas the predominant accumulation of *BoACS2* transcripts was detected distinctly in the first layer (wounded, cut surface) of the stem²⁶⁾. Thus, the *BoACS2* gene might be involved in stress response of harvested fresh produce, particularly in the wounded area. Moreover, according to the ethylene effects on quality deterioration process, Chen et al. also demonstrated the implication of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) gene expression during senescence of *Brassica oleracea* var. *Italica*²⁷⁾. In cabbage, the effects of wounding/cutting on volatile compounds and the influence of mechanical stress on the cracking of leaf layers have been previously

investigated^{20), 28), 29)}. Moreover, touch stimulus, insect feeding, and pathogen attack have been shown to induce changes in gene expression of cabbage and Brassica species^{30)~32)}. Nevertheless, the biochemical and molecular mechanisms that govern cellular responses to the postharvest mechanical stress in cabbage remain unknown.

Taken together, *Cam* genes and *PLD* genes are important in signal transduction cascades and stress response metabolism in plant cells. In *Brassica oleracea* species, CaM-encoding genes (*Cam1* and *Cam2*) and PLD-encoding genes (*PLD1* and *PLD2*) have been previously described³³⁾. However, the expression of these genes in response to mechanical stresses has not been yet clarified including in cabbage. Furthermore, changes in ACS gene expression of cabbage following wound stress have not been well-studied. Thus, in this study, we investigated the expression of CaM-encoding genes *BoCam1* and *BoCam2*, PLD-encoding genes *BoPLD1* and *BoPLD2* and ACS-encoding gene *BoACS2*, which are likely involved in the stress response mechanisms and subsequent quality deterioration of cabbage. The cabbage samples were subjected to mechanical wound stress, and gene expression was analyzed within 5 min to 2 h after stress treatment.

Materials and Methods

1. Plant materials and treatments

The 'Harukei 305-Gou' cabbage heads (*Brassica oleracea* var. *Capitata* L.) were obtained from a supermarket less than 1 km from the laboratory of the National Food Research Institute, Tsukuba, Ibaraki, Japan on February 6, 2011. The cabbages were carefully transported to the laboratory in a cardboard box. Upon arrival, cabbages were selected based on shape and size uniformity and the lack of wound symptoms. The selected cabbages were incubated at room temperature (approximately 20°C) for 6 h.

A cork borer (ϕ 2 cm) was used to wound the cabbages by punching the first layer of the head leaf pack on the side opposite the core (the cut end). The cabbage leaf disks were sampled at 0, 5, 15, 30, 60 and 120 min after the wounding treatment. The leaf disks at 0 min were immediately frozen in liquid nitrogen. The other leaf disks were placed on filter paper soaked with distilled water (20°C) to avoid dehydration until the sampling time. The collected samples were stored at

Table 1 Primer sequences used in the polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR analyses

Gene name	Accession no.	Forward primer	Reverse primer
<i>BoGAPDH</i>	EF123055	5' GTCATCTCTGCACCAAGCAAAG 3'	5' CTCATGCTCATTGACACCAACA 3'
<i>BoCam1</i>	AJ427337	5' AAGGATGGTGACGGTTGCA 3'	5' AGAGACCTCATCACGGTTCCA 3'
<i>BoCam2</i>	AJ427338	5' GGGCAAAACCCGACAGAA 3'	5' CCGTCAGCGTCAACTTCGTT 3'
<i>BoPLD1</i>	AF090445	5' GAGCTTCTCTCTAATCACGGATCAG 3'	5' CGGTGGTCAGAGGGAGGAA 3'
<i>BoPLD2</i>	AF090444	5' TTGAGGCGGATCGAAACTG 3'	5' AGGCACTCCAGGGAACCTTAGC 3'
<i>BoACS2</i>	AB086353	5' TGCTTCCCACGCCGTACT 3'	5' AACCCCAGTTCGCCATTTTA 3'

–80°C after liquid nitrogen freezing. The experiment was replicated four times using four distinct cabbage heads.

2. Gene expression analysis

Total RNA from each sample was extracted and purified using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Briefly, frozen sample was ground under liquid nitrogen with a pre-chilled mortar and pestle. Ground sample was lysed and homogenized in a highly denaturing guanidine -isothiocyanate -containing buffer. Then, the lysate was passed through a gDNA eliminator spin column (Qiagen) to remove genomic DNA. Ethanol was added to the flow - through to provide appropriate binding conditions for RNA. The sample was then applied to an RNeasy spin column (Qiagen), where total RNA binds to the membrane and contaminants were washed away with wash buffer. High-quality RNA was then eluted in RNase-free water. After quantifying the RNA concentration using spectrophotometric analysis, complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using a PrimeScriptTM II first cDNA strand synthesis kit (Takara Biotech, Shiga, Japan). The cDNA served as a template for polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Sets of primers for target genes, *BoCam1*, *BoCam2*, *BoPLD1*, *BoPLD2*, and *BoACS2* were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1). The qRT-PCR analyses were performed using Power SYBR Green PCR master mix and a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The thermal cycling conditions were 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 10 s and 60°C for 1 min, followed by a dissociation step. The levels of target gene expression were normalized to the input DNA levels of an internal standard *BoGAPDH* gene³²⁾.

3. Data analysis

An analysis of variance for a randomized design, with time periods after the wounding treatment as factors, was performed using SPSS (SPSS, Chicago, IL). Tukey's multiple-range test was used to test for a significant difference at a 95% confidence level for each variable.

Results and Discussion

Fruits and vegetables experience mechanical stress when incurring physical forces during postharvest handling. The physiological changes and the deterioration in quality of fresh produce subjected to postharvest mechanical stress have been extensively studied^{19), 21), 34)}. The molecular mechanisms that govern the mechanical stress response in fresh produce, however, remain elusive. To our knowledge, our results show the first demonstration of early response event of gene expression following mechanical wound stress in cabbage.

The expression of CaM-encoding genes, *BoCam1* and *BoCam2*, PLD -encoding genes, *BoPLD1* and *BoPLD2*, and ACS-encoding gene, *BoACS2*, were detected in wounded cabbage leaf disks. The relative expression levels of *BoCam1*, *BoCam2*, *BoPLD1*, *BoPLD2*, and *BoACS2* normalized against an internal standard are shown in Fig. 1, 2 and 3. *BoCam1* gene expression levels are transient in wounded cabbage. The expression of *BoCam1* decreased at 5 min but increased at 15 min after the cabbage was wounded. At 30 and 60 min, *BoCam1* exhibited 4.6- and 6.4-fold increases in expression, respectively. After 120 min, however, the level of *BoCam1* expression decreased to a 2 -fold level above baseline (Fig. 1A). Although *BoCam2* levels exhibited a significant change (1.6 fold) in expression at 60 min, the expression did not significantly increase after 120 min after wounding (Fig. 1B, $P < 0.05$). These results indicate that *BoCam1* and *BoCam2* respond

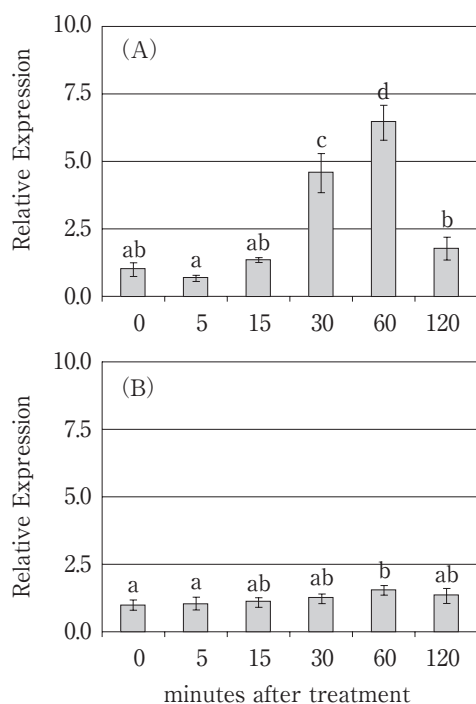


Fig. 1 Expression levels of *BoCam1* (A) and *BoCam2* (B) normalized against *BoGAPDH* in wounded cabbage based on quantitative real-time PCR analysis

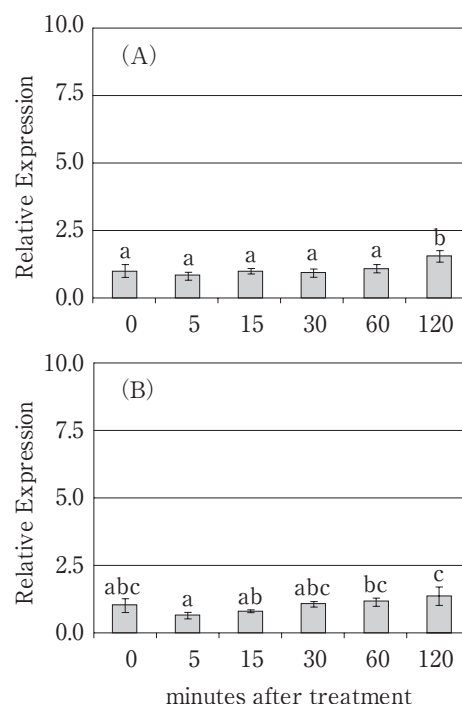


Fig. 2 Expression levels of *BoPLD1* (A) and *BoPLD2* (B) normalized against *BoGAPDH* in wounded cabbage based on quantitative real-time PCR analysis

to the wound stress in cabbage, as their expression levels were correlated with the time after stress induction. The large increase in *BoCam1* expression after stress suggests that *BoCam1* is a sensitive wound-responsive gene in cabbage. The rapid expression of CaM-encoding genes in this study indicates that the wound stress may enhance CaM production in cells, whereas stress-induced modulation of gene expression often reflects the function of the corresponding gene product in signaling. Moreover, CaM may mediate a rise in cytosolic Ca^{2+} in response to the wounding stimulus. According to its rapid and transient expression of *BoCam1*, CaM gene expression may be associated with the signaling cascade that further induces the actions of calmodulin and calmodulin-related target proteins, defensive metabolism, and enzyme activity^{(1), (2), (8)}. These cascades may also consequently influence the changes in postharvest quality of cabbage. In addition, the differential expression of *BoCam1* and *BoCam2* in response to the wound stress may be due to their different CaM isoforms^{(6), (7), (9), (35), (36)}. Considering the importance of Ca^{2+} -binding CaM in signal transduction pathway and stress response, modulation of CaM gene expression suggests that different sets of CaM isoforms in a

single plant species are probably established for different signal transduction cascades. Subsequently, different isoforms could be involved in specific metabolism and physiological changes in response to stress.

In response to stress in plant cells, PLD may break down membrane lipids and thus degrade the membrane. Elevated expression of PLD-encoding genes along with increased PLD activity would result in a loss of cell membrane integrity and a loss of cell viability^{(11)~(14)}. After the wounding treatment, we observed a slight oscillation in the expression of PLD-encoding genes in all cabbage samples. A significant increase in *BoPLD1* expression was detected at 120 min after treatment (1.5 fold) (Fig. 2 A, $P < 0.05$). The decreased expression level of *BoPLD2* was detected at 5 min after treatment, and it seemed to increase from 15 min with the highest level at 120 min (Fig. 2B). However, the expression of *BoPLD2* also remained low during the investigation. In this study, *BoPLD1* and *BoPLD2* do not appear immediately to respond to wound stress. In contrast, it is possible that the expression of *BoPLD1* and *BoPLD2* may be induced after 120 min post-wound stress.

Ethylene synthesis and ACS-encoding gene have

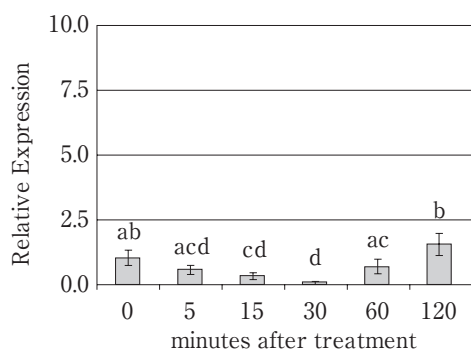


Fig. 3 Expression levels of *BoACS2* normalized against *BoGAPDH* in wounded cabbage based on quantitative real-time PCR analysis

been reported to be induced by wound stress^{(22)~(26), (37)}. Induction of ethylene synthesis and expression of ACS by wound stress might also enhance senescence and quality deterioration of fresh produce. Nevertheless, previous studies demonstrated that the occurrence of high production of ethylene results in negative feedback on the system-1 developmental pathway, and it consequently reduces the *Le-ACS1A* and *Le-ACS6* expression in tomato^{(38), (39)}. From our results, the expression level of *BoACS2* in wounded cabbage leaf disks decreased at 15 min to 30 min and then its level rose again to 1.6-fold at 120 min after treatment (Fig. 3). However, the expression level of *BoACS2* was relatively low during the investigation. Similar to those of PLD-encoding genes, *BoACS2* in cabbage seems not to be immediately induced by the wounding treatment and the expression of *BoACS2* may be increased after 120 min of treatment. In addition, although the production of ethylene was not monitored in this study, the decreased level of *BoACS2* expression might possibly be regulated by the negative feedback regulation of ethylene pathway.

Conclusion

Applying a mechanical wounding stimulus clearly affected the expression of calmodulin-encoding genes in cabbage. The predominant increases in *BoCam1* expression levels were observed at 30 and 60 min after treatment. These results indicate that the expression of *BoCam1* is highly induced in response to wound stress and *BoCam1* may serve as a rapid wound-responsive gene, associating with the signaling cascade and cellular response of mechanical stress in cabbage. Further study of

stress-related gene expression at the single-cell level and the evaluation of the expression characteristics of *BoCam1* during storage and distribution practices of cabbage will contribute to elucidating the biochemical and molecular mechanisms underlying stress response in cabbage.

Acknowledgements The authors thank the “Research and development projects for application in promoting new policy of Agriculture, Forestry and Fisheries” No. 22014 (funded by MAFF) for financial support.

References

- 1) RANTY, B., ALDON, D. and GALAUD, J-P. : Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: Multifaceted relays to decode calcium signals, *Plant Signal. Behav.*, **1**, 96~104 (2006)
- 2) SNEDDEN, W. A. and FROMM, H. : Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.*, **3**, 299~304 (1998)
- 3) ZIELINSKI, R. E. : Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 697~725 (1998)
- 4) POOVAIAH, B. W. and REDDY, A. S. N. : Calcium and signal transduction in plants, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, **12**, 185~211 (1993)
- 5) TREWAVAS, A. J. and KNIGHT, M. R. : Mechanical signaling, calcium and plant form, *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1329~1341 (1994)
- 6) van der LUIT, A. H., OLIVARI, C., HALEY, A., KNIGHT, M. R. and TREWAVAS, A. J. : Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco, *Plant Physiol.*, **121**, 705~714 (1999)
- 7) BOTELLA, J. R. and ARTECA, R. N. : Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli, *Plant Mol. Biol.*, **24**, 757~766 (1994)
- 8) BERGEY, D. R. and RYAN, C. A. : Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves, *Plant Mol. Biol.*, **40**, 815~823 (1999)
- 9) PHEAN-O-PAS, S., PUNTEERANURAK, P. and BUABOCHA, T. : Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 432~439 (2005)
- 10) WANG, X. : Regulatory functions of phospholipase

- D and phosphatidic acid in plant growth, development and stress responses, *Plant Physiol.*, **139**, 566~573 (2005)
- 11) MUNNIK, T., IRVINE, R. F. and MUSGRAVE, A. : Phospholipid signaling in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1389**, 222~272 (1998)
 - 12) RYU, S. B. and WANG, X. : Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves, *Biochem. Biophys. Acta*, **1393**, 193~202 (1998)
 - 13) CHAPMAN, D. : Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress, *Trends Plant Sci.*, **3**, 419~426 (1998)
 - 14) WANG, X. : Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions, *Prog. Lipid Res.*, **39**, 109~149 (2000)
 - 15) FRANK, W., MUNNIK, T., KERKMANN, K., SALAMINI, F. and BARTELS, D. : Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, *Plant Cell*, **12**, 111~124 (2000)
 - 16) BARGMANN, B. O. and MUNNIK, T. : The role of phospholipase D in plant stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 515~522 (2006)
 - 17) YANG, T. and POOVAIAH, B. W. : Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants, *Trends Plant Sci.*, **8**, 505~512 (2003)
 - 18) YANG, W. Q., LAL, Y., LI, M. N., XU, W. Y. and XUE, Y. B. : A novel C2-domain phospholipid-binding protein, OsPBP 1, is required for pollen fertility in rice, *Molec. Plant.*, **1**, 770~785 (2008)
 - 19) BERARDINELLI, A., DONATI, V., GIUNCHI, A., GUARNIERI, A. and RAGNI, L. : Damage to pears caused by simulated transport, *J. Food Eng.*, **66**, 219~226 (2005)
 - 20) HOLT, J. E. and SCHOORL, D. : Cracking and energy dissipation in cabbages, *J. Text. Stud.*, **14**, 99~111 (1983)
 - 21) ZHOU, R., SU, S., YAN, L. and LI, Y. : Effect of transport vibration levels on mechanical damage and physiological responses of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua), *Postharvest Biol. Technol.*, **46**, 20~28 (2007)
 - 22) KATO, M., HAYAKAWA, Y., HYODO, H., IKOMA, Y. and YANO, M. : Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*, *Plant Cell Physiol.*, **41**, 440~447 (2000)
 - 23) SALTVEIT, M. E. : Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables, *Postharvest Biol. Technol.*, **15**, 279~292 (1999)
 - 24) WANG, K. L.-C., LI, H. and ECKER, J. R. : Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks, *Plant Cell*, **14**, S131~S151 (2002)
 - 25) ZHENG, Q.-L., NAKATSUKA, A. and ITAMURA, H. : Involvement of negative feedback regulation in wound-induced ethylene synthesis in 'Saijo' persimmon, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5875~5879 (2006)
 - 26) KATO, M., KAMO, T., WANG, R., NISHIKAWA, F., HYODO, H., IKOMA, Y., SUGIURA, M. and YANO, M. : Wound-induced ethylene synthesis in stem tissue of harvested broccoli and its effect on senescence and ethylene synthesis in broccoli florets, *Postharvest Biol. Technol.*, **24**, 69~78 (2002)
 - 27) CHEN, Y.-T., CHEN, L.-F. O. and SHAW, J.-F. : Senescence-associated genes in harvested broccoli florets, *Plant Sci.*, **175**, 137~144 (2008)
 - 28) CHIN, H. W. and LINDSAY, R. C. : Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbage cultivars, *J. Food Sci.*, **58**, 835~841 (1993)
 - 29) HEREDIA, J. B. and CISNEROS-ZEVALLOS, L. : The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce, *Food Chem.*, **115**, 1500~1508 (2009)
 - 30) BROEKGARDEN, C., POELMAN, E. H., STEENHUIS, G., VOORRIPS, R. E., DICKE, M. and VOSMAN, B. : Genotypic variation in genome-wide transcription profiles induced by insect feeding: *Brassica oleracea*-*Pieris rapae* interactions, *BMC Genomics*, **8**, 239 (2007)
 - 31) OH, S.-A., KWAK, J. M., KWUN, I. C. and NAM, H. G. : Rapid and transient induction of calmodulin-encoding gene(s) of *Brassica napus* by a touch stimulus, *Plant Cell Rep.*, **15**, 586~590 (1996)
 - 32) ZHENG, S. J., van DIJK, J., BRUINSMA, M. and DICKE, M. : Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): Dynamics of *BoLOX* expression patterns during insect and pathogen attack, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**, 1332~1345 (2007)
 - 33) GenBank Databases, National add space Center

for Biotechnology Information, (Consult web page for further information; *BoGAPDH*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/EF123055.1>〉, *BoCam1*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ427337.1>〉, *BoCam2*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ427338.1>〉, *BoPLD1*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF090445.1>〉, *BoPLD2*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF090444.1>〉, *BoACS2*: 〈<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/21388768>〉)

- 34) MONTERO, C. R. S., SCHWARZ, L. L., dos SANTOS, L. C., ANDREAZZA, C. S., KECHINSKI, C. P. and BENDER, R. J.: Postharvest mechanical damage affects fruit quality of 'Montenegrina' and 'Rainha' tangerines, *Pesq. agropec. bras.*, **44**, 1636~1640 (2009)
- 35) DELUMEAU, O., MORERE-LE PAVEN, M.-C., MONTRICHARD, F. and LAVAL-MARTIN, D. L.: Effects of short-term NaCl stress on calmodulin transcript levels and calmodulin-dependent NAD kinase activity in two species of tomato, *Plant Cell Environ.*, **23**, 329~336 (2000)
- 36) YAMAKAWA, H., MITSUHARA, I., ITO, N., SEO, S., KAMADA, H. and OHASHI, Y.: Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3916~3929 (2001)
- 37) TATSUKI, M. and MORI, H.: Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato, *Plant Cell Physiol.*, **40**, 709~715 (1999)
- 38) BARRY, C. S., IMMACULADA LLOP-TOUS, M. and GRIERSON, D.: The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato, *Plant Physiol.*, **123**, 979~986 (2000)
- 39) NAKATSUKA, A., MURACHI, S., OKUNISHI, H., SHIOMI, S., NAKANO, R., KUBO, Y. and INABA, A.: Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening, *Plant Physiol.*, **118**, 1295~1305 (1998)

カルモデュリンをコードする *BoCam1* はキャベツの鋭敏な 傷害応答遺伝子である

タンマウオン マナスイカン*

ヘワジュリジ (ガンガ ナマリ) イルミ*

兼田朋子*・中村宣貴*

伊藤康博*・椎名武夫*

* 農研機構食品総合研究所

(〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

結球キャベツにおけるストレス応答の一端の解明を目指して、結球最外葉からコルクボーラーで切り出したディスク試料について処理後120分まで継続的に、植物のストレス応答において重要な役割を担っているカルモデュリン (Calmodulin:CaM), フォスホリパーゼD (Phospholipase D:PLD), ACC合成酵素 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase:ACS) をコードする*BoCam1*, *BoCam2*, *BoPLD1*, *BoPLD2*, *BoACS2* の各遺伝子の発現解析を行った。リアルタイム定量PCRによる解析の結果、キャベツの*BoCam1* の発現レベルは、切断処理によって著しく増大し、処理60分後には処理前に対して6.4倍に達した。また、*BoCam2* の発現レベルは、増大程度は大きくはないものの、処理60分後には処理前の1.6倍となった。一方、PLDをコードする*BoPLD1* の発現レベルは、処理前に比べて120分後に1.5倍に増大した。また、*BoPLD2* の発現レベルは、実験期間中ほぼ一定の状態を維持し、処理後の経過時間による差はみられなかった。他方、ACSをコードする*BoACS2* の発現レベルは、処理後15、30分後に一旦低下した後に増大し、120分後には処理前の1.6倍に達したものの、実験期間を通して大きな増大を示さなかった。以上の結果を総合的すると、*BoCam1* は、調査したストレス関連遺伝子の中で切断損傷によるストレスに応答して、発現レベルを最も大きく増大させる遺伝子であることが明らかとなった。さらに、*BoCam1* は、切断損傷に対して極めて鋭敏に応答することに加えて、ストレス応答のシグナル伝達および、その後のさまざまな細胞応答に影響を与えることから、収穫後のキャベツの物理ストレスに関する研究において重要な遺伝子であることが明らかになった。

(平成23年9月21日受付, 平成24年4月12日受理)

Quality of Sausages Containing ‘Okara’ Soybean Curd Residue

TADA Kotaro^{*1§}, TERASHIMA Teruya^{*2}, NAKAMURA Yu^{*1} and SUZUKI Toshiro^{*1}

^{*1} Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1737, Funako, Atsugi, Kanagawa 243-0034

^{*2} Toyama Prefectural Food Research Institute, 360, Yoshioka, Toyama 939-8153

Okara is a byproduct of soy milk production. In order to utilize okara and to develop meat products containing dietary fiber, we prepared sausages containing 5, 10, 15, and 20% of okara by substituting cured lean meat with okara (water content, 76%) and compared their quality. Moisture and dietary fiber content, pH, and L* and b* values were increased, while content of protein and lipid and a* value were decreased, in line with an increase in the okara content of the sausage. Addition of 5% okara to sausage sufficiently improved the yield. However, the addition of excessive okara disturbed the gel network structure of the meat protein, and the texture (hardness, springiness, cohesiveness, and chewiness) was significantly impaired in sausages containing $\geq 15\%$ okara. Sensory evaluation of sausages containing 5% or 10% okara was comparable with that of sausages without okara. Our findings show that the addition of okara can supplement sausages with dietary fiber and improve their water holding capacity and that an okara content of 10% is appropriate for making good quality sausages.

(Received Dec. 7, 2011 ; Accepted Feb. 16, 2012)

Key words : *sausage, okara, dietary fiber, texture, sensory evaluation*

ソーセージ, オカラ, 食物繊維, テクスチャー, 官能評価

Soybean curd residue, okara (also known as soy pulp), is a byproduct of soy milk production and is high in dietary fiber. It is known to have beneficial physiological functions in areas such as suppressing hypertension¹⁾, increasing plasma lipids²⁾ and obesity^{2,3)}, and exerting prebiotic³⁾ and antihyperglycemic effects⁴⁾. The volume of okara generated is 10% larger than the volume of the raw material, soybeans⁵⁾. However, because of its high water content and perishable feature, only a small proportion of okara is used for the production of livestock feed^{6,7)} and cookies⁷⁾, while the majority is discarded as waste. This is consequently a burden on the environment^{6)~8)}. Manufacturing of Tofu in Japan, also a soymilk product, is strong and generates a considerable amount of okara, and the common disposal of okara by incineration⁹⁾ is costly.

Meanwhile, the adaptation of the western lifestyle in Japan has led to an increase in meat consumption and a decrease in grain and vegetable consumption¹⁰⁾. Because meat does not contain dietary fiber, the dietary fiber intake in Japan has declined to approximately 15g/day/person¹¹⁾, which

falls far short of the recommended dietary fiber intake specified by the World Health Organization (25g/day/person)¹²⁾. Thus, possible health problems owing to low dietary fiber intake are of concern.

In this study, we aimed to find a new utilization for okara and to develop a novel processed meat product containing dietary fiber. Thus, we prepared sausages containing various amounts of okara and evaluated their qualities, thereby revealing the appropriate amount of okara as an additive.

Materials and Methods

1. Materials

Okara, recovered immediately after soymilk filtering and stored frozen was obtained from a Tofu manufacture in Toyama, Japan. Frozen okara was thawed before use. Lean pork meat (biceps femoris muscle) and back fat were obtained from CENTRAL FOODS Co., Ltd (Tokyo, Japan).

2. Dry curing

Lean pork meat was chopped into 5cm cubes. Salt, sugar, potassium nitrate, sodium nitrite, sodium ascorbate, and sodium tripolyphosphate were added

§ Corresponding author, E-mail : k3tada@nodai.ac.jp

Table 1 Recipe for dry curing (%)

Ingredient	Quantity
Lean pork	100.00
Salt	2.50
Sugar	0.50
Potassium nitrate	0.02
Sodium nitrite	0.01
Sodium ascorbate	0.10
Sodium tripolyphosphate	0.20

according to a recipe (Table 1) and blended with the meat cubes using a meat mixer (MS-20; TAKEUCHI Food Machinery Ltd., Kanagawa, Japan) for 10 min. The mixture was stored for three days at 5°C to produce cured meat.

3. Preparation of sausage meat

Cured meat and pork back fat were minced with a meat chopper using a grinder plate with holes of 5 mm diameter (OMC-22B, OHMACHI Co., Ltd., Gunma, Japan) and mixed with okara, iced water, and spices according to five formulations (Table 2). The minced-meat mixture was further finely chopped with a silent cutter (OMF-780, OHMACHI Co., Ltd.) and mixed well to produce sausage patties. The weight percent of back fat to the total sum of cured meat, back fat, and okara was uniform (15%) across the five preparations. Lean meat was partially substituted with okara to produce a sausage meat with an okara weight percent of 5, 10, 15, and 20%, and in turn, four sausage meat samples, namely, the 5, 10, 15, and 20% okara sausage samples, respectively. Sausage meat without okara served as a control. Substitution of cured meat with okara resulted in a decrease in salt

content in sausage meat. Thus, salt was added to the okara-containing sausage formulations to adjust the salt content to 2.0% in the final sausage meat.

4. Filling of sausage casings and cooking

The sausage meat was uniformly filled into vinyl casings (diameter, 25mm) and incubated in a water bath at 75°C for 30 min. Cooked sausages were immediately cooled under running water and then refrigerated at 5°C for 12h.

5. Composition analysis

The amount of moisture, protein, fat, dietary fiber, and ash was measured as follows: moisture; the heat drying method under normal pressure¹³⁾, protein; the Kjeldahl method¹⁴⁾, fat; the chloroform-methanol extraction method (for okara)¹⁵⁾, or the Soxhlet extraction method (for sausages)¹⁶⁾, dietary fiber; the modified Prosky method¹⁷⁾, and ash; the direct ashing method¹⁸⁾.

6. pH measurement

Okara and sausages were each suspended in distilled water of nine times their weight, and the resultant suspensions were subjected to pH measurement using a pH meter (F-52; HORIBA Ltd., Kyoto, Japan).

7. Color measurement

L*a*b* color space values of okara samples and cross-sections of sausages were measured with a spectrophotometer (CM-3500d; Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan).

8. Measurement of water holding capacity

The water-holding capacity of okara was measured according to the method recommended by the Japanese Agricultural Standards¹⁹⁾. Briefly, 6 g of thawed okara was immersed in 20 g of water in a 50mL plastic centrifuge tube, allowed to absorb

Table 2 Formulations for sausages with and without added Okara

Ingredient	Rate of okara (%)				
	0 (Control)	5	10	15	20
Cured meat	85.0	80.0	75.0	70.0	65.0
Pork back-fat	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Okara	—	5.0	10.0	15.0	20.0
Water (ice)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Onion	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
MSG ¹	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
White pepper	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Black pepper	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mace	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Salt	0.50	0.65	0.75	0.90	1.00

¹: Monosodium glutamate

water for 20 min at room temperature, and then centrifuged at $1,000 \times g$ for 5 min. After removal of the supernatant, the pellet was weighted. The water holding capacity was obtained by dividing the weight of the pellet by the dry weight of the okara sample.

9. Observation of sausage cross sections

Cross sections of sausages were observed under a microscope (Tabletop Microscope TM-1000; Hitachi High-Technologies CO., Tokyo, Japan) and by examining images taken by a digital camera (Digital Camera GR DIGITAL III; Ricoh Co., Ltd., Tokyo, Japan).

10. Yield measurement

Refrigerated sausages in their casings were returned to room temperature and centrifuged at $1,000 \times g$ for 5 min. The casings were removed after centrifugation. The skinless sausages were placed on a sieve with a mesh size of 5 mm to remove separated fluid. The yield was obtained by dividing the weight of the sausage after removal of fluid by the weight of the sausage before removal of fluid. The weight of the casing was then subtracted from the sausage weight.

11. Texture measurement

Sausages were returned to room temperature and cut into 25 mm-thick slices for texture profile analysis (TPA) using an Instron Universal Testing Machine (Model 5543; Instron Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan). Briefly, the sliced sausage samples were compressed twice with disk plungers (diameter, 75 mm) at the compression speed of 50 mm/min, to reduce the height of the sausage sample by 50%. Resulting pressed samples were subjected to measurement of hardness, springiness, cohesiveness, and chewiness.

12. Sensory evaluation

Appearance, flavor, texture, juiciness, taste, and overall impression of sausages cooked at 70°C for 20 min were judged by 23 volunteers (11 men and 12 women; age range, 15-55 years) using a seven-point scale (1, very bad; 2, bad; 3, fairly bad; 4, average; 5, fairly good; 6, good; 7, very good).

Results and Discussion

1. Composition, pH, color, and water holding capacity of okara

Table 3 shows the composition, pH, color and water holding capacity of okara. Okara contained a large amount of moisture (approx. 76%), and was

Table 3 Chemical and physical properties of okara

Moisture (%)	76.01 \pm 0.69	
Protein (%)	6.77 \pm 0.32	(28.20 \pm 0.69) ¹
Fat (%)	2.25 \pm 0.22	(9.35 \pm 0.63) ¹
Ash (%)	0.93 \pm 0.13	(3.87 \pm 0.44) ¹
Insoluble fiber (%)	8.01 \pm 0.44	(33.37 \pm 0.99) ¹
Soluble fiber (%)	2.03 \pm 0.07	(8.47 \pm 0.12) ¹
pH	6.72 \pm 0.01	
Colors L*	84.32 \pm 0.20	
a*	1.25 \pm 0.03	
b*	18.87 \pm 0.06	
WHC ²	11.83 \pm 0.55	

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6)

¹: Dry Matter

²: Water holding capacity

high in protein (approx. 7%) and dietary fiber (approx. 10%). On the dry weight basis, the mean content of protein, fat, ash, and dietary fiber was approximately 28, 9, 4, and 42%, respectively, which is comparable to that of 19~38, 8~23, 3~5, and 32~58%, respectively, reported in previous studies^{(1), (4), (6), (7), (20), (24)}. This suggests that the okara used in the present study has standard properties.

The okara suspension was close to neutral (pH 6.72). The color of okara was a pale yellowish-white with L*, a*, and b* values of 84.32, 1.25, and 18.87, respectively.

The water holding capacity was 11.83, indicating that the okara was able to absorb approximately 10 times its dry weight in water. This high water holding capacity is consistent with previously reported results^{(21), (22), (24)~(26)}, probably owing to the high content of dietary fiber in okara⁽²¹⁾.

2. Compositions of sausage samples

Compositions of sausage samples are shown in Table 4. Moisture content and dietary fiber increased and protein and fat decreased as the amount of okara was increased. The 10, 15, and 20% okara sausage samples contained significantly more moisture and significantly less fat than the control sample ($p < 0.05$). Okara content-dependent differences in the content of protein and dietary fiber were significant between any two samples ($p < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference in the ash content among samples. The content of moisture, protein, fat, and ash in the lean pork meat was 71.8, 21.8, 5.1, and 1.0%, respectively, indicating that the lean pork meat contained less moisture and more protein and fat than okara. The differences in the composition of sausage samples

Table 4 Composition of sausages formulated with okara

	Rate of okara (%)				
	0 (Control)	5	10	15	20
Moisture (%)	68.03 ± 0.93 ^a	68.75 ± 0.94 ^{ab}	69.09 ± 0.62 ^b	69.39 ± 0.60 ^b	69.41 ± 0.72 ^b
Protein (%)	14.99 ± 0.43 ^a	14.20 ± 0.43 ^b	13.59 ± 0.27 ^c	13.00 ± 0.26 ^d	12.53 ± 0.30 ^c
Fat (%)	12.92 ± 0.37 ^a	12.62 ± 0.38 ^{ab}	12.47 ± 0.25 ^b	12.34 ± 0.24 ^b	12.32 ± 0.29 ^b
Ash (%)	2.82 ± 0.08 ^a	2.80 ± 0.08 ^a	2.77 ± 0.06 ^a	2.78 ± 0.05 ^a	2.78 ± 0.07 ^a
Insoluble fiber (%)	—	0.33 ± 0.01 ^d	0.64 ± 0.01 ^c	0.96 ± 0.02 ^b	1.28 ± 0.03 ^a
Soluble fiber (%)	—	0.09 ± 0.00 ^d	0.16 ± 0.00 ^c	0.24 ± 0.00 ^b	0.32 ± 0.01 ^a

All values are expressed as mean ± standard deviation (n=6)

Values with different superscripts within a row are significantly different ($p < 0.05$)

can likely be attributed to the different substitution rates of lean meat with okara.

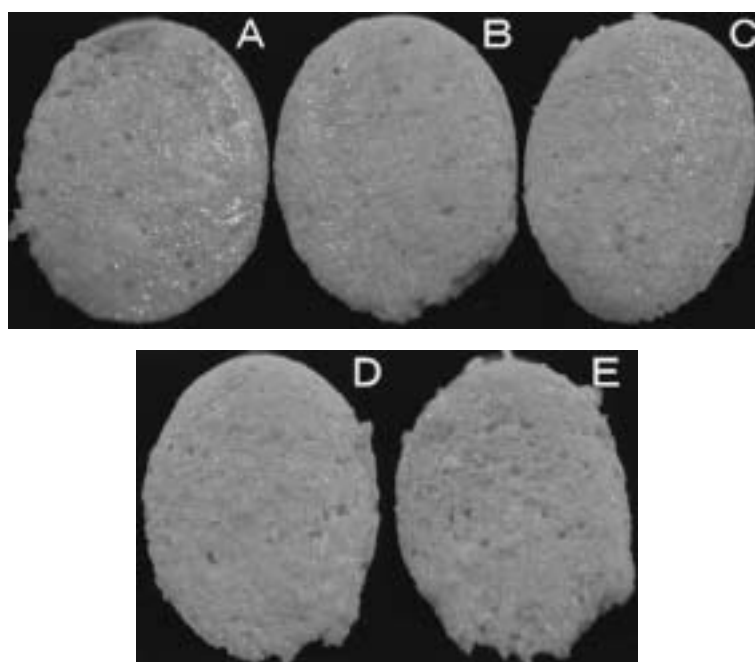
3. Morphology of sausage samples

The external appearance of sausage sample cross sections is shown in Fig.1, and the microstructures in sausage samples are shown in Fig.2. The control and the 5% and 10% okara sausage samples were almost externally identical and showed a smooth cross section and a clear outline. On the other hand, the sausage outline was slightly disturbed in the 15% okara sausage sample and badly disturbed in the 20% okara sausage sample. The surface of the cross section was visibly rough and uneven, and many okara granules were scattered across the surface in the 20% sample. Microstructure analysis

revealed smooth gel formation by meat protein in the control sample, while a unique bee nest-like structure of okara fiber²⁷⁾ was present in the okara-containing samples. The bee nest-like structures were scattered, which disturbed the smooth gel structure of the meat protein. In particular, the bee nest-like structures became prominent enough to present a coarse appearance with large voids in the 20% okara sausage sample.

4. pH, color, and yield of sausage samples

Table 5 shows pH, color parameters, and yield of sausage samples. The pH of the control samples was 6.36 and increased as the amount of added okara increased, reaching a pH of 6.48 in the 20% okara sausage sample. The pH of the control and

**Fig. 1** Sectional images of sausages formulated with okara

A : Control ; B : 5 % Okara ; C : 10% Okara ;
D : 15% Okara ; E : 20% Okara

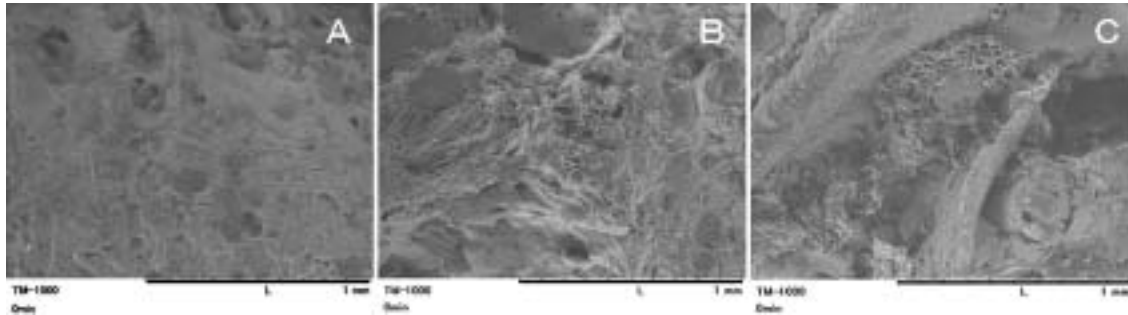


Fig. 2 Tissue morphology of sausages formulated with okara

A : Control ; B : 10% Okara ; C : 20% Okara

Black bar indicate 1 mm

Table 5 pH, color parameters, and yield rate of sausages formulated with okara

		Rate of okara (%)				
		0 (Control)	5	10	15	20
pH		6.36 ± 0.00 ^d	6.37 ± 0.02 ^d	6.41 ± 0.01 ^c	6.43 ± 0.02 ^b	6.48 ± 0.01 ^a
Color	L*	69.39 ± 0.24 ^d	69.95 ± 0.33 ^c	70.29 ± 0.51 ^c	70.68 ± 0.22 ^b	71.41 ± 0.52 ^a
	a*	8.53 ± 0.26 ^a	7.64 ± 0.50 ^b	6.99 ± 0.26 ^c	6.87 ± 0.33 ^c	5.99 ± 0.30 ^d
	b*	8.87 ± 0.29 ^d	9.18 ± 0.24 ^c	9.56 ± 0.23 ^b	10.03 ± 0.39 ^a	10.76 ± 0.29 ^a
Yield rate (%)		96.85 ± 0.75 ^b	98.37 ± 0.29 ^a	98.62 ± 0.39 ^a	98.73 ± 0.33 ^a	98.77 ± 0.49 ^a

All values are expressed as mean ± standard deviation (n=6)

Values with different superscripts within a row are significantly different ($p < 0.05$)

that of the 5% okara sausage sample were not significantly different, but both of the pH values were significantly different from the pH of the 10, 15, and 20% okara samples ($p < 0.05$). The pH of the 15% okara sausage sample was significantly higher than that of the 10% okara sausage sample, while significantly lower than the pH of the 20% okara sausage sample ($p < 0.05$). The cured meat contained ascorbic acid and thus its pH was lower in the control sample (6.36) than in okara (6.72). It was considered that the addition of okara skewed the pH to a higher value.

L* and b* increased while a* decreased as the okara content increased in the sausage sample, because the yellowish white area containing okara increased while the red area containing lean meat decreased. However, the color of the sausage sample was not a pure subtractive mixture of the colors of lean pork meat and okara. The color of the areas other than the scattered okara-rich areas in the okara-containing sausage samples was similar to that of the control sample. Scattered okara-rich areas were not noticeable in the 5 and 10% okara sausage samples. Thus, these two okara-containing samples were not distinguishable in color from the

control sample by the naked eye, despite their significantly different spectrophotometry results compared with the control results ($p < 0.05$). On the other hand, okara-rich areas were prominent in the 15 and 20% okara sausage samples, and these samples were clearly distinguishable from the control sample with the naked eye.

The yield of the control sample was 96.85%, indicating a small loss of drip. The drip loss was almost absent in the 5% okara sausage sample, and its yield was significantly higher (98.37%) than the yield of the control sample ($p < 0.05$). The yield was further slightly improved as the okara content increased, but the differences in the yields among the four okara-containing sausage samples were not significant. These results suggested that an okara content of 5% is sufficient to increase yield. As shown in Table 3, okara has a high water holding capacity, suggesting that a drip was adsorbed by the okara fiber structure, resulting in prevention of drip loss, an in turn, in high yields of the sausages supplemented with okara.

Okara content-dependent changes in pH, color, and yield of the sausage samples were similar to those of beef patty samples supplemented with

okara shown by SADETTIN *et al*^{(22), (24)}.

5. Texture of sausage samples

Table 6 shows texture changes in sausages containing okara. Hardness and chewiness values were not significantly different between the control and the 5% okara sausage sample but were significantly reduced ($p < 0.05$) in the 10%, 15%, and 20% okara sausage samples in an okara content-dependent manner. Only the 20% okara sausage sample showed significantly lower springiness than the control sample ($p < 0.05$). The cohesiveness values of the control and the 5% and 10% okara sausage samples were not significantly different. On the other hand, the cohesiveness of the 15% okara sausage sample was significantly lower than that of the sausage samples containing less okara ($p < 0.05$) but significantly higher than that of the 20% okara sausage samples ($p < 0.05$). TPA measurements tended to decrease with a decrease in meat content, suggesting that the gel network structure of the meat protein⁽²⁸⁾ was quantitatively decreased and also more severely disturbed by the okara fiber structure as the okara content increased. Such structural changes were most prominent, and all TPA measures were markedly reduced in the 20% okara sausage sample, indicating structural

impairment.

6. Sensory evaluation

The results of sensory evaluation are shown in Table 7. Scores on the 7-point sensory scale were not significantly different among the control and the 5% and 10% okara sausage samples, and all three samples showed a mean scores of ≥ 5 for all sensory parameters. On the other hand, when the okara content exceeded 15%, texture, taste, and overall impression scores were significantly reduced as the okara content increased ($p < 0.05$). The mean overall impression scores of the 15 and 20% okara sausage samples were 3.39 and 2.09, respectively, both of which were markedly lower than 4, the "average" score. Texture scores on the sensory scale appeared to correlate with TPA results. Overall impression scores were similar to texture scores, suggesting that texture is the main factor influencing the overall sensory characteristic of the okara-containing sausages prepared in this study. The mean flavor and juiciness scores of all sausage samples were > 5 and not significantly different, suggesting that good flavor and juiciness were retained in okara-containing sausage samples. The okara used in this study was almost unscented and thus did not appear to interfere with the

Table 6 Texture profile analysis of sausages formulated with okara

	Rate of okara (%)				
	0 (Control)	5	10	15	20
Hardness (N)	27.32 ± 0.93 ^a	26.40 ± 1.64 ^a	23.36 ± 2.06 ^b	20.88 ± 1.88 ^c	10.93 ± 0.83 ^d
Springiness (mm)	9.54 ± 0.21 ^a	9.54 ± 0.17 ^a	9.44 ± 0.19 ^a	9.36 ± 0.14 ^a	8.56 ± 0.11 ^b
Cohesiveness	0.80 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.03 ^a	0.71 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.02 ^c
Chewiness (N)	208.16 ± 20.05 ^a	198.80 ± 17.13 ^a	173.45 ± 19.86 ^b	138.69 ± 12.36 ^c	47.06 ± 3.94 ^d

All values are expressed as mean ± standard deviation (n=6)

Values with different superscripts within a row are significantly different ($p < 0.05$)

Table 7 Sensory evaluation of sausages formulated with okara

	Rate of okara (%)				
	0 (Control)	5	10	15	20
Appearance	5.30 ± 1.52 ^a	5.52 ± 1.44 ^a	5.35 ± 1.56 ^a	3.96 ± 1.55 ^b	3.04 ± 1.52 ^c
Flavor	5.22 ± 1.41 ^a	5.26 ± 1.39 ^a	5.35 ± 1.34 ^a	5.30 ± 1.36 ^a	5.30 ± 1.33 ^a
Texture	5.39 ± 1.23 ^a	5.48 ± 1.44 ^a	5.22 ± 1.44 ^a	3.26 ± 1.10 ^b	2.09 ± 1.04 ^c
Juiciness	5.57 ± 1.20 ^a	5.61 ± 1.27 ^a	5.61 ± 1.23 ^a	5.43 ± 1.34 ^a	5.39 ± 1.27 ^a
Taste	5.30 ± 1.15 ^a	5.52 ± 1.16 ^a	5.35 ± 1.40 ^a	3.83 ± 1.37 ^b	2.70 ± 1.18 ^c
Overall	5.35 ± 1.07 ^a	5.43 ± 1.12 ^a	5.22 ± 1.38 ^a	3.39 ± 1.16 ^b	2.09 ± 0.85 ^c

All values are expressed as mean ± standard deviation (n=23)

Values with different superscripts within a row are significantly different ($p < 0.05$)

characteristic flavor of the sausage. In addition, it was considered that the drip absorbed in the okara structure in sausage samples was sufficiently released upon mastication.

Taken together, this study demonstrated that the addition of okara to sausage meat suppresses drip loss and improves yield. However, excessive okara in sausage meat, or insufficiency of lean pork meat, weakens the gel network structure of the meat protein and consequently impairs sausage texture. Sensory evaluation results showed that the 10% okara sausage sample, but not the 15% and 20% okara sausage samples, was acceptable, indicating that the addition of okara ($\leq 10\%$) to the final protein/fat mixture is appropriate. The dietary fiber content in the 10% okara sausage sample was 0.8%, which means that one sausage (approx. 20 g) made according to the same recipe provides a little less than 0.2g of dietary fiber. The increase in dietary fiber intake by consumption of this okara-supplemented sausage is low; however, our findings suggest that processed meat products supplemented with okara can serve as a source of dietary fiber. In addition, this study suggests that the large amount of moisture contained in okara can possibly be utilized by using frozen okara as a partial alternative to iced water to reduce the frictional heat generated during the mincing, mixing, and blending stages of the sausage making process.

References

- 1) O'TOOLE, D.K.: Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 363~371 (1999)
- 2) MATSUMOTO, K., WATANABE, Y. and YOKOYAMA, S.: Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 720~727 (2007)
- 3) ANTONIO, J.E.S., MARIA, D.T., IRENE, E.M. and PILAR, R.: Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 7495~7501 (2008)
- 4) AHMED, L.A., HASSAN, D.R. and HEMEDA, H.M.: Anti-Hyperglycemic Effects of Okara, Corn Hull and Their Combination in Alloxan Induced Diabetic Rats. *World Applied Sci. J.*, **9**, 1139~1147 (2010)
- 5) KHARE, S.K., JHA, K. and GANDHI, A.P.: Physico-chemical and functional properties of okara protein isolate. *J. Dairying Foods Home Sci.*, **12**, 132~136 (1993)
- 6) RINALDI, V.E.A., NG, P.K.W. and BENNINK, M.R.: Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. *Cereal Chem.*, **77**, 237~240 (2000)
- 7) XIE, M., HUFF, H., HSIEH, F. and MUSTAPHA, A.: Puffing of okara/rice blends using a rice cake machine. *J. Food Sci.*, **73**, E341~E348 (2008)
- 8) VAN DER RIET W.B., WIGHT A.W., CILLIERS J.J.L. and DATEL J.M.: Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chem.*, **34**, 193~202 (1989)
- 9) OHNO, A., ANO, T. and SHODA, M.: Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB 22 in solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 23~27 (1993)
- 10) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Japan: FY 2009 Annual Report on Food, Agriculture and Rural Areas in Japan, p.10 (2010)
- 11) HARASHIMA, E., TSUJI, K., NAKAGAWA Y. and URATA, G.: Time-series analysis between dietary fiber intake and prevalence of diabetes mellitus in Japanese people. *J. Home Economic. Japan*, **45**, 1079~1087 (1994)
- 12) World Health Organization: Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. In Report of a joint WHO / FAO Expert consultation. *WHO technical Report Series*, 916 (2003)
- 13) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.19 (2000)
- 14) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.24 (2000)
- 15) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.59 (2000)
- 16) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.57 (2000)
- 17) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.135 (2000)
- 18) SUGAHARA, T. and MAEKAWA, A.: Handbook of foods analysis (Kenpakusha Co., Ltd.), p.152 (2000)
- 19) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Japan: Japanese Agricultural Standard (http://www.maff.go.jp/j/kokuji_tuti/kokuji/k0001024.html)
- 20) MA, C.Y., LIU, W.S., KWOK, K.C. and KWOK, F.: Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research Int.*, **29**, 799~805 (1997)
- 21) SUREL, O. and COUPLET, B.: Influence of the dehydration process on active compounds of okara

- during its fractionation., *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 1343～1349 (2005)
- 22) SADETTIN, T., HASAN, T. and INCI, S.: Utilization of wet okara in low-fat beef patties., *J. Muscle Foods*, **18**, 226～235 (2007)
- 23) ARACELI, R.C., MA, J.V.S. and INMACULADA, M.A.: Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods., *Food Chem.* **108**, 1099～1105 (2008)
- 24) SADETTIN, T., HASAN, T. and INCI, S.: Characteristics of beef patties using okara powder., *J. Muscle Foods*, **20**, 89～100 (2009)
- 25) MATEOS, A.I., MATEOS, P.C. and RUPEREZ, P.: High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean., *Innovative Food Sci. Emerging Tech.*, **11**, 445～450 (2010)
- 26) VISHWANATHAN, K.H., GOVINDARAJU, K., SINGH, V. and SUBRAMANIAN, R.: Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology., *J. Food Sci.*, **76**, E158～E164 (2011)
- 27) KUAN, Y.H. and LIONG, M.T.: Chemical and physicochemical characterization of agrowaste fibrous materials and residues., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 9252～9257 (2008)
- 28) FIDEL, T.: Handbook of meat processing (WILEY-BLACKWELL), pp. 127～133 (2010)

オカラを添加したソーセージの品質について

多田耕太郎^{*1}・寺島晃也^{*2}

中村 優^{*1}・鈴木敏郎^{*1}

* 1 東京農業大学農学部畜産学科
(〒243-0034 神奈川県厚木市船子1737)

* 2 富山県食品研究所
(〒939-8153 富山県富山市吉岡360)

豆乳生産時の副産物であるオカラの有効利用と食物繊維を含んだ新規な肉製品の開発を図るため、オカラ（水分76%）を塩漬肉と置換することで5、10、15および20%添加したソーセージを製造し、その品質を検討した。その結果、オカラ添加量の増加に伴いソーセージの水分、食物繊維、pH、L*値およびb*値は増加し、タンパク質、脂質およびa*値は減少した。歩留まりはオカラを5%添加することでドリップの流出が抑制され向上した。過度なオカラ添加は肉タンパク質が形成するゲルネットワーク構造を粗くし、テクスチャー（かたさ、弾力性、凝集性および咀嚼性）は15%以上のオカラ添加で著しく低下した。オカラを5および10%添加したソーセージはオカラ無添加のものと同等の官能評価を得た。本結果から、オカラを添加することで食物繊維を含有し、保水性が高いソーセージ製造の可能性が示され、オカラの添加量は10%程度が適当であることが明らかになった。

（平成23年12月7日受付，平成24年2月16日受理）

処理方法がマイクロバブル生成特性 およびオゾンガス溶解速度に及ぼす影響

中村 宣貴^{*1}・梅原 仁美^{*1}・松山 成江^{*1}
川崎 保美^{*2}・大原 浩樹^{*2}・松本 均^{*3}
タンマウォン マナスイカン^{*1}・許 晴怡^{*1}・椎名 武夫^{*1§}

* 1 独立行政法人農業食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

* 2 (株)明治食機能科学研究所

* 3 (株)明治海外菓子事業部

The Effect of Microbubble (MB)-treatment Conditions on MB Characteristics and Ozone Dissolution Rate

NAKAMURA Nobutaka^{*1}, UMEHARA Hitomi^{*1}, MATSUYAMA Masae^{*1},
KAWASAKI Tomomi^{*2}, OHARA Hiroki^{*2}, MATSUMOTO Hitoshi^{*3},
THAMMAWONG Manasikan^{*1}, Xu Qingyi^{*1} and SHIINA Takeo^{*1§}

* 1 National Food Research Institute, NARO, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642

* 2 Meiji Co., Ltd., 540 Narita, Odawara-shi, Kanagawa 250-0862

* 3 Meiji Co., Ltd., 1-2-10 Shinsuna., Koto-ku, Tokyo 136-8908

The effect of microbubble (MB)-generation and treatment conditions on the characteristics of MB and MB containing water was evaluated. For MB generation, a MB generator based on the pressurizing dissolution method (operated at 0~0.5MPa) was used, and the high discharge pressure likely resulted in small bubbles and highly turbid (which indicates the MB density) MB containing water. The most effective discharge pressure for the preparation of ozonized water was 0.2 MPa. However, this pressure was different from the optimal pressure for MB generation. The MB treatment (mechanical agitation) increased the ozone dissolution rate. Moreover, the ozone dissolution rate and equilibrium concentration of dissolved ozone varied with the addition of particular substances. For example, when NaCl or a surfactant (L-150A) were added, the ozone dissolution rate and equilibrium concentration of dissolved ozone were higher and lower, respectively, than the rate and concentration of control condition (RO water). Moreover, the addition of citric acid resulted in an ozone dissolution rate and equilibrium concentration of dissolved ozone that were similar to and higher than, respectively, the rate and concentration of control. Finally, considering the results for the discharge pressure and ozone dissolution rate, it can be concluded that the MB-generation method and MB-treatment conditions should be selected in strict accordance with the intended use of MBs.

(Received Aug. 3, 2011 ; Accepted Feb. 20, 2012)

Key words : Micro bubble, Mechanical agitation, pressurizing dissolution, dissolved ozone concentration

マイクロバブル, 機械攪拌, 加圧溶解, 溶存オゾン濃度

近年, マイクロもしくはナノメートルオーダーの気泡
がもつ特異な機能が注目されている。食品分野において
は, 水環境の改善, 対象物の洗浄・殺菌, 生理活性・成

長促進作用, 物性変化など多岐にわたる効果が期待され
ている^{1)~3)}。筆者らのグループでは, 界面活性剤を用い
たマイクロバブル (以下, MB) 水について, 発生方法

* 1 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

§ Corresponding author, E-mail: shiina@affrc.go.jp

* 2 〒250-0862 神奈川県小田原市成田540

* 3 〒136-8908 東京都江東区新砂1-2-10

の違いがMBの特性に及ぼす影響⁴⁾、塩の添加によるMBの物性の向上⁵⁾、大豆油由来の新規界面活性剤を用いて作製したMBの特性⁶⁾について報告してきた。

MBは、通常の気泡と比較して、浮上速度が小さい（ストークスの式で表される）ため水中に長時間滞在する。また、MBは、内圧が高い（ヤングラプラスの式で表される）ためにガスの溶解速度が大きい（ヘンリーの法則により示される）。これらの理由により、MB処理はガスを効果的に溶解させるのに有効であるとされている⁷⁾。MBを用いた水中への気体の溶解の効率化については、酸素⁸⁾、オゾン⁹⁾について検討されており、いずれの研究においてもMB処理によりガス溶解が効率化できると報告されている。しかし、MB水を実際の洗浄や水環境改善に用いる際には、様々な物質が浮遊・溶解した溶液を対象とすることが想定されるが、溶質の存在がMB処理を利用したガスの溶解に及ぼす影響については十分な検討がなされていない。

本研究では、MBもしくはMB水を利用した洗浄の基礎的な知見を得ることを目的として、青果物の洗浄において利用が検討されているオゾンガスを用いたMB^{1)~3)}に着目し、MB処理によるオゾンガスの溶解特性について検討を行った。まず、加圧溶解式のMB作製装置を用いて、様々な環境下で作製したMBの粒度分布について調査を行った。加えて、オゾン含有ガスを用いたMB処理によるオゾン水の作製に対して、溶質（NaCl、クエン酸および界面活性剤）が及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. MB水の作製

Table 1 に、本研究で用いた装置の呼称および詳細を示す。MB水の作製方法がオゾンガスの溶解特性に及ぼす影響について検討を行うため、2種類の方法（加圧溶解式、機械攪拌式）を用いた。加圧溶解式では、加圧タンク中で気体を水中に溶解し、急激に大気圧まで減圧することで過飽和となった気体がMBとして放出される⁷⁾。機械攪拌式では、高速回転する刃が導入された気泡を剪

断することでMBが生じる⁴⁾。本研究の装置構成では、加圧溶解式では大容量、機械攪拌式では小容量のMB処理が可能であるため、処理水の容量を、前者では40 ℓ、後者では1 ℓとした。

加圧溶解式のMB作製装置（㈱ニクニ製、マイクロバブルジェネレータ、MBG20ND07ZE 1 CG005）は、混合ノズル部、ポンプ部、溶解タンク、分離タンク、ボール弁、圧力計、ガス流量計、制御板等で構成されている（Fig. 1）。基本的な運転条件は、流量 $17.6 \text{ ℓ} \cdot \text{min}^{-1}$ 、吸込圧力 -0.022 MPa （大気圧基準）、吐出圧力 0.4 MPa （大気圧基準）、ガス流量 $0.4 \text{ ℓ} \cdot \text{min}^{-1}$ （大気圧基準）として、実験内容により各項目を調整した。そして、本装置に大気もしくはオゾン含有ガスを導入しながら外部に設けた容器内の液体を循環させることで、MB処理を行った。

機械攪拌式でのMB処理には、ホモジナイザ（マイクロテック・ニチオン社製、ヒスコトロン：ドライブユニットNS-51、ジェネレーターシャフトNS-20CG、回転数10,000rpm、処理可能量5－2000ml）を用いた。そして、散気管（東京光信理化学製作所製、円筒型ガス噴射管、直径25mm×長さ20mm）を用いてガスを液中に導入（ガス

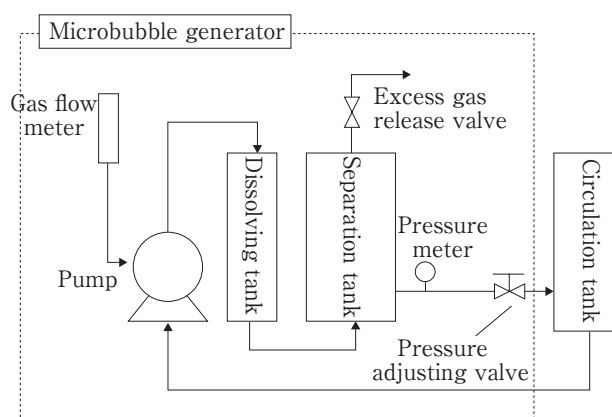


Fig. 1 Schematic of the microbubble-generator system (based on pressurizing dissolution method) used in this study

Table 1 Equipment used for MB treatment or ozonization in this study

Method (title in this paper)	Manufacturer	Model	Volume (l)	MB treatment	Ozone dissolution test
Pressurizing dissolution method (加圧溶解式)	Nikuni Co., Ltd.	Microbubble generator: MBG20ND07ZE 1 CG005	40	○	○
Mechanical agitation method (機械攪拌式)	Microtech Niton Co., Ltd.	Homogenizer: Hiscotron Shaft: NS-20CG	1	○	○ (in conjunction with air diffusion method)
Air diffusion method (散気管式)	Koshin Rikagaku Seisakusho Co. Ltd.	Ceramic filter: Type-B, $\phi 20 \times 15$	1	—	○

流量 $0.4\ell \cdot \text{min}^{-1}$)しながら機械的に攪拌することでMB処理を行った。

いずれの試験区も水にはRO水(ミリポア社製, Elix 10)を用い、水温を 25°C に調整して実験を行った(以下同様)。

2. MBの粒度分布測定

MBの粒度分布測定には、レーザ回折式粒度分布測定装置(株島津製作所製, SALD2000)を用いた。循環型のセルを用い、セルの出口側からMB水をペリスタルティックポンプ(ヤマト科学(株)製, 7524-40)で引いて循環させ、粒度分布を測定した。また、粒度分布測定時の屈折率は $1.00-0.01i$ とし、流量は $0.4\ell \cdot \text{min}^{-1}$ とした。流量が粒度分布測定に及ぼす影響については、 $0.1, 0.2, 0.4$ および $0.8\ell \cdot \text{min}^{-1}$ について事前に検討を行い、安定的な測定が可能である $0.4\ell \cdot \text{min}^{-1}$ を選択した。なお、流量が小さいと、測定結果にばらつきが多く、平均粒径が若干大きくなる傾向がみられた(データ省略)。これは、送液に時間がかかることで配管中の気泡の粒径およびその分布が変化^{(6), (10), (11)}することが原因と推察された。

また、光学顕微鏡による観察も行い、レーザ回折式粒度分布測定装置の測定結果と比較した。光学顕微鏡観察は、デジタルマイクロスコープ(株キーエンス製, VHX-900)を用いて、外部容器からスポイトで採取したサンプルをスライドガラスに乗せ、カバーガラスを被せて行った。

3. 濁度測定

MBは、作製条件によって気泡の数密度(以下、気泡密度)が異なると考えられる。そこで、溶液の濁度を測定し、気泡密度の指標とした。測定には、濁度チェッカー(オプテックス(株)製, TC-3000)を用いた。本装置は、センサ表面にワイパー機能を備えており、気泡のセンサ表面への付着が測定に及ぼす影響を低減できる。

4. オゾン含有ガスの作製

オゾン含有ガスの作製には、無声放電式のオゾンガス発生装置(株荏原製作所製, OZSD-3000A)を用いた。なお、本装置によるオゾン生成時に窒素が混入すると、 NO_x の発生が懸念される⁽¹²⁾ため、本研究では、オゾン含有ガスの材料として酸素の純ガスを用いた。また、オゾン含有ガスは、ガス流量 $0.4\ell \cdot \text{min}^{-1}$ 、オゾン濃度約5%(発生装置の出力最大時の濃度)とした。なお、オゾンガス発生装置と散気管および加圧溶解式MB作製装置との接続には、漏れの発生による誤差要因の排除と実験時の安全確保のため、耐オゾン性の高いポリテトラフルオロエチレン製のチューブを用いた。

5. 溶存オゾン濃度の測定

溶存オゾン濃度の測定には、ヨウ素滴定法⁽¹³⁾を用いた。過剰なヨウ化カリウムと測定対象の溶液 200mL を反応させた後、酸化生成物からヨウ素を遊離させるために、 $\text{pH} 4$ 以下に調整した。そして、 0.1 規定のチオ硫酸ナトリ

ウムで滴定し、滴定量からオゾン濃度を算出した。

6. 実験条件

(1) MBの粒度分布・濁度特性評価 加圧溶解式における吐出圧力、溶質の種類が作製されるMBの特性に及ぼす影響を明らかにするために、運転開始から5 min経過時点における粒度分布および濁度について検討を行った。なお、機械攪拌式のMB水は、界面活性剤を用いた試験区(L-150A区)以外では気泡密度が低く、粒度分布を測定することはできなかったため、粒度分布および濁度の測定は行わなかった。吐出圧力は $0 \sim 0.5\text{MPa}$ として、RO水、0.85%のNaCl溶液、 $\text{pH} 3$ のクエン酸溶液および0.01%の界面活性剤、L-150A(シヨ糖ラウリン酸エステル38%を含有、第一工業製薬(株)製)溶液について検討を行った。なお、吐出圧力は、本実験条件において装置からの漏れなどを生じず、安定的に動作する圧力として 0.5MPa を上限とした。NaCl濃度は、青果物洗浄時に浸透圧による影響が小さいと考えられる生理食塩水と同等の濃度(0.85%)として、 pH は、オゾン分解が抑制される強酸性域($\text{pH} 3$)⁽¹⁴⁾としてそれぞれ条件を設定した。界面活性剤L-150A濃度は、予備実験の結果から、過剰なフォームを形成しない濃度として0.01%を選択した。

(2) オゾンを用いたMB処理条件が作製されるオゾン水特性に及ぼす影響 MB処理の方法の違いがオゾン水作製に及ぼす影響を明らかにするため、オゾン含有ガスを用いたMB処理条件が、溶存オゾン濃度に及ぼす影響について検討を行った。まず、機械攪拌式および加圧溶解式のそれぞれの標準的な運転条件において、溶液の種類が処理後のオゾン濃度に及ぼす影響について評価した。溶液には、前述の(1)と同様に、RO水、0.85%のNaCl溶液、 $\text{pH} 3$ のクエン酸溶液および0.01%のL-150A溶液を用いた。処理時間は、機械攪拌式で3 minおよび20 min、加圧溶解式で60 minとした。機械攪拌式については、機械攪拌式に用いたものと同じ散気管によるバブリング処理区(以下、散気管区)と比較検討した。加圧溶解式については、RO水を対象に、吐出圧力($0 \sim 0.5\text{MPa}$)と処理後の溶存オゾン濃度との関係を調査した。

さらに、加圧溶解式のMB処理において、作製される気泡が、加圧下で過剰に溶存したガスのみによるものかどうかを確認するため、ガスを供給せずに装置を運転し、その時の濁度および溶存酸素濃度の変動を調査した。

結果および考察

1. MBの粒度分布・濁度測定

Table 2に、レーザ回折式粒度分布測定装置により測定した加圧溶解式のMB水の平均気泡径、および濁度の測定結果を示す。吐出圧力 $0 \sim 0.5\text{MPa}$ におけるRO水のMB処理区では、測定された平均粒径は $30 \sim 60\mu\text{m}$ 程度であり、吐出圧力が大きいほど平均粒径が小さく、濁度が

Table 2 Effect of discharge pressure and dissolved substances (NaCl, citric acid, and L-150 A on the average bubble diameter and turbidity after 5 min of MB treatment (pressurizing dissolution method) at 25 °C

Dissolved substance	Discharge pressure (MPa)	Average diameter (μm)	Turbidity (NTU*)
RO water	0	74.2 ± 9.5	96.7 ± 11.5
	0.1	58.6 ± 3.0	861.7 ± 40.1
	0.2	64.3 ± 1.6	1,313.3 ± 20.8
	0.3	60.0 ± 2.3	1,488.3 ± 54.8
	0.4	45.8 ± 2.6	1,965.0 ± 173.0
	0.5	53.6 ± 1.4	2,711.7 ± 191.1
NaCl (0.85%)		55.8 ± 3.6	785.3 ± 24.2
Citric acid (pH : 3)	0.4	60.8 ± 2.8	600.4 ± 41.5
L-150A (0.01%)		0.4 ± 0.1**	>3,000

*Nephelometric Turbidity Units. Indicator for MB concentration in this study.

**This value is considered an error caused by light scattering due to high turbidity.

Each value is mean ± S.D. (N=3).

高くなる傾向がみられた。また、光学顕微鏡による観察においても、同様の傾向が確認された。

一方、0.4MPaにおけるNaCl、クエン酸区の粒度分布は、RO水区と同等であったが、濁度は非常に小さい値を示した。この濁度の測定結果は、目視による判断と同様であった。また、NaClおよびクエン酸区の気泡密度は小さく、光学顕微鏡を用いての観察は困難であった。界面活性剤存在下では、塩の添加により気泡の安定性は向上すると報告されているが⁵⁾、界面活性剤のない条件では、塩添加による気泡の安定化効果が得られないものと推察される。また、0.4MPaにおけるL-150A区の平均粒径の測定値は1 μm以下であったが、光学顕微鏡では数十μm程度の気泡が多数観察された。このとき、濁度の測定値は検出限界以上であり、測定セル内の気泡密度が大きすぎたため多重散乱を起こし、測定に悪影響を及ぼしたものと推察された。MBの測定においては、気泡の密度や測定機器の利用方法などに留意する必要がある。

2. MB処理によるオゾン水の作製

(1) 溶質の影響 Fig. 2に、オゾン含有ガスを用いた散気管式のバブリング処理、もしくは機械攪拌式のMB処理により作製されたオゾン水の溶存オゾン濃度を示す(処理液量1 ℓ, 処理時間3 minおよび20min)。処理時間3 minでは、溶存オゾン濃度は機械攪拌式のMB処理区において散気管処理区より高かったが、処理時間20minでは、処理方法の違いによる明確な差はみられなかった。また、溶存オゾン濃度は、処理時間10minと20 minとの間には顕著な差はみられず、処理時間10min未満で平衡濃度に達していたと思われる。以上の結果より、本実験条件においては、MB処理はオゾンの効率的な溶解に寄与するが、平衡濃度には影響しないことが示された。

次いで、溶質の種類が溶存オゾンの平衡濃度に及ぼす

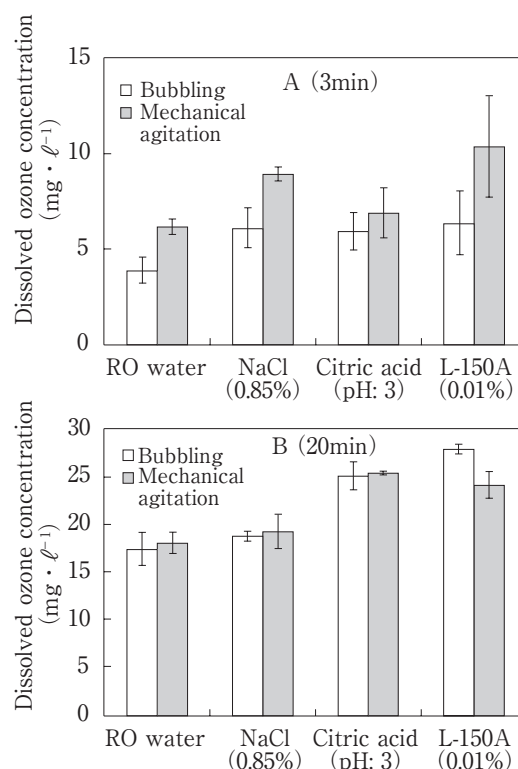


Fig. 2 Effect of dissolved substances (NaCl, citric acid, and L-150A) on dissolved ozone concentration during MB treatment (mechanical agitation) using ozone gas

Each solution (1 ℓ) is ozonized at 25°C with 5% ozone gas (0.4 ℓ · min⁻¹) by bubbling or bubbling accompanied by mechanical agitation (10,000rpm).

Each value is mean ± S.D. (N=3).

影響について検討を行った。平衡オゾン濃度は、機械攪拌式によるMB処理(処理液量1 ℓ, 処理時間20min)では、クエン酸、L-150A区>RO水区, NaCl区であった(Fig. 2)が、加圧溶解式(処理液量40 ℓ, 処理時間60

min) では、クエン酸区>RO水区 \geq L-150A区>NaCl区であった (Fig. 3)。

ところで、溶存オゾン濃度変動は、オゾンガスの溶解と水中におけるオゾンの分解により説明できる。そこで、水中におけるオゾン分解に関する知見を得るために、各水溶液を用いてオゾン水を作製し、オゾン含有ガス供給停止後の溶液中のオゾン濃度変動を調査した。その結果、オゾン供給停止から30min後のオゾン残留割合は、RO水、NaCl、クエン酸、L-150Aの各試験区においてそれぞれ57, 24, 85, 41%であり (Fig. 4), 溶質の存在によりオゾン分解速度が異なることが認められた。オゾンは、共存塩のイオン強度の上昇によりオゾン自己分解の反応速度定数が上昇すること¹⁵⁾, pHの低下により分解速度が低下すること¹⁴⁾が知られており、本研究の結果はこれと符合する。界面活性剤添加によるオゾン分解特性につ

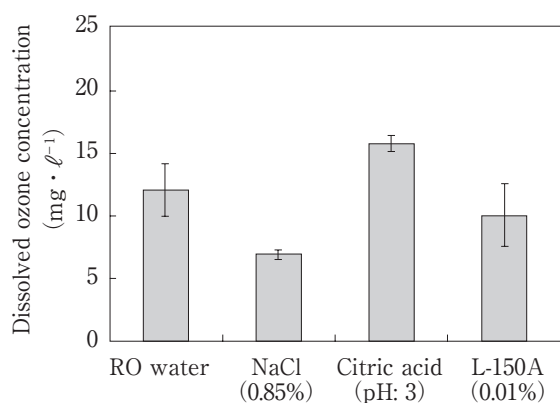


Fig. 3 Effect of dissolved substances (NaCl, citric acid, and L-150A) on dissolved ozone concentration during MB treatment (pressurizing dissolution method) using ozone gas

Each solution (40L) is ozonized for 60 min at 25°C with 5% ozone gas ($0.4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) by using MB equipment. Each value is mean \pm S.D. (N=3).

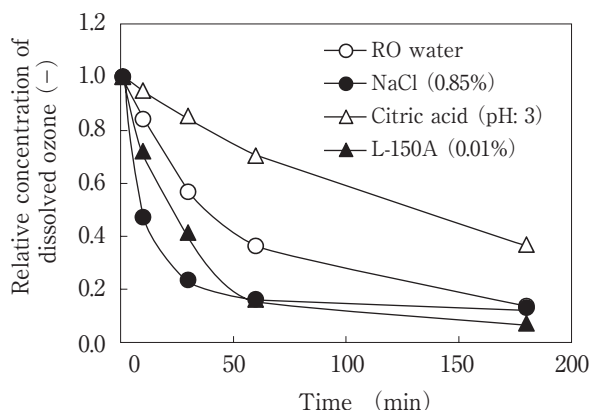


Fig. 4 Changes in dissolved ozone concentration for different solutions at 25°C after ozonation with 5% ozone gas ($0.4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)

The values are average of measured value (N=3).

いて論じた報告はみられないが、オゾンが界面活性剤と反応することにより、経時的に溶存オゾン濃度が低下したものと推察される。すなわち、水溶液をMB処理することで作製されるオゾン水の平衡濃度は、溶質の添加による溶解速度および分解速度の変化に影響を受けたものと考えられる。NaClおよびL-150A水溶液の溶存オゾン平衡濃度は、単位水量あたりのオゾン含有ガス供給量が相対的に大きい場合は、溶質の添加によるオゾン溶解速度向上により高くなり、逆に、単位水量あたりのオゾン含有ガス供給量が相対的に小さい場合は、溶質の添加によるオゾン分解速度増大により低くなったと考えられる。クエン酸水溶液については、オゾンガスの溶解速度はRO水と同等であるが、pHの低下による分解速度低下により、結果として平衡オゾン濃度が高くなると結論づけられた。

(2) 吐出圧力の影響 加圧溶解式のMB処理において、吐出圧力が溶存オゾン濃度に及ぼす影響を検討した結果を、Fig. 5に示す。MB密度が高い条件である吐出圧力0.4および0.5MPaより、0.2MPaにおいて溶存オゾン濃度が高かった。ヘンリーの法則から、オゾン溶解タンク中の溶存オゾン濃度は、タンク内が高圧であるほど高くなると考えられ、本研究の結果は一見矛盾する。

ここで、Fig. 6に、加圧溶解型のMB装置を、吐出圧力0および0.4MPaの条件下において、気体を供給せずに運転したときの、濁度および溶存酸素濃度の変化を測定した結果を示す。0.4MPaの条件下において、濁度の一時的な上昇および溶存酸素濃度の低下が観察された。この現象のメカニズムは明らかでないが、金属精錬法における、金属品質に悪影響を及ぼすガス（水素など）の除去方法が参考となる。この方法は、溶鋼中に気泡化した不活性ガスを導入し、溶存する有害ガスを気泡内に取込み、系外に排出するというプロセスである¹⁶⁾。気体供給なしの0.4MPaにおいて観察された溶存酸素濃度の低

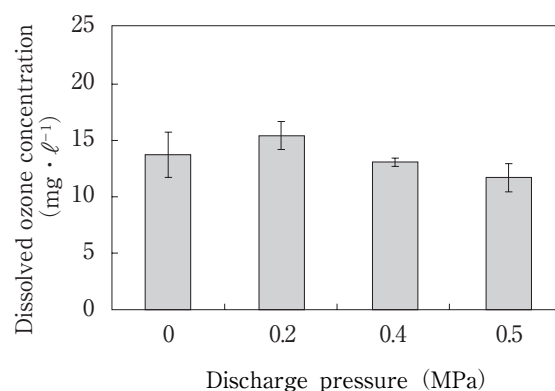


Fig. 5 Effect of discharge pressure on dissolved ozone concentration during MB treatment (pressurizing dissolution method) using ozone gas

Each solution (40L) is ozonized for 60 min at 25°C with 5% ozone gas ($0.4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) by using MB equipment. Each value is mean \pm S.D. (N=3).

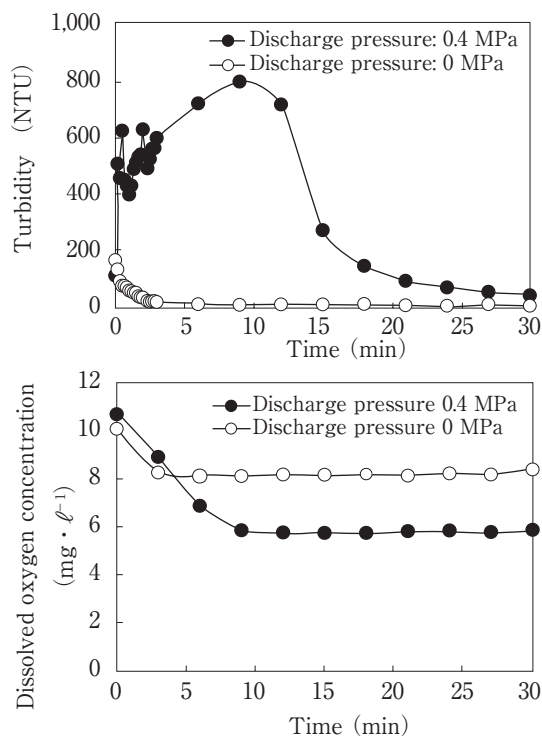


Fig. 6 Effect of discharge pressure on dissolved oxygen concentration at 25°C during MB treatment (pressurizing dissolution method) when no gas was supplied during measurements

The values are average of measured value (N=3).

下も同様に、吐出時の減圧によりMB化される過程で、発生した気泡中に溶存ガスが取り込まれた結果であると推察される。加圧溶解式によるオゾン水作製においても、最適なMB作製条件と溶存オゾン濃度を高める条件が一致しない原因は、MB発生時に溶存オゾンの一部が気泡内に取り込まれるためであると推察される。

なお、吐出圧力が高い条件においては、ポンプ部における温度上昇により溶存ガス濃度が低下することもあると考えられるが、検討した結果、ポンプ前後における温度差は0.34℃程度であり、オゾン濃度変動に及ぼす影響は小さいと考えられる。

以上の結果より、MB処理の条件により、粒度分布、気泡密度、ガスの溶解量は異なることが明らかとなった。MB技術を実用化する際には、利用目的に合致したMB作製方法および条件を用いることが重要である。また、過去の研究において、加圧溶解式のMB処理による水中へのガス供給効果について、気体の供給量の影響が大きく、吐出圧力の影響は小さい^{8),9)}と報告されている。しかし、本実験の結果から、加圧溶解式のMB発生装置を用いて溶存ガス濃度を制御する際には、供給ガス流量に加えて吐出圧力も制御因子に加える必要があることが明らかとなった。今後、MB処理により作製されたMB水および高濃度にガスが溶存する溶液を利用した、生鮮青果物を含む食品の品質管理技術開発について検討する予

定である。

要 約

マイクロバブル（以下、MB）の食品産業への応用に必要な基礎的な知見を得ることを目的として、MB処理条件と作製されるMB水の物性との関係およびオゾンガスのMB処理により作製されるオゾン水の特性について検討を行った。

- ① 加圧溶解式のMB作製装置では、吐出圧力0～0.5 MPaの範囲において、吐出圧力が高いほど気泡密度の指標である濁度が高く、平均粒径の小さいMB水が作製される傾向がみられた。また、MB水の濁度は、NaClおよびクエン酸の添加により顕著に低下し、L-150A（界面活性剤）の添加により顕著に増大した。
- ② 機械攪拌式のMB処理を行うことで、オゾン溶解効率が向上した。また、RO水と比較して、NaCl区およびL-150A区では、オゾン溶解効率は高いが平衡濃度は低く、クエン酸区では、オゾン溶解効率は同程度であるが平衡濃度は高いことが確認された。
- ③ 加圧溶解式のMB装置を用いて、吐出圧力が溶存オゾン濃度に及ぼす影響について検討した結果、溶存オゾン濃度は、MB作製に最適な0.4MPaではなく、0.2MPaで最も高くなった。この現象は、MB作製に最適な条件下では、溶存オゾンの一部が気泡内に取り込まれ、系外に排出されるためと推察した。

謝 辞 本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「食品素材のナノスケール加工及び評価技術の開発」により実施されたものである。

文 献

- 1) 中村宣貴・椎名武夫：殺菌・洗浄，マイクロバブル・ナノバブルの最新技術（シーエムシー出版，東京），pp.197～203（2007）
- 2) 許 晴怡・中村宣貴・椎名武夫：マイクロ・ナノバブル水の製造と利用，フードナノテクノロジー（シーエムシー出版，東京），pp.150～157（2009）
- 3) 許 晴怡・中村宣貴・椎名武夫：マイクロ・ナノバブルの食品産業への応用，食品と開発，**45**，7～9（2010）
- 4) XU, Q., NAKAJIMA, M., ICHIKSWA, S., NAKAMURA, N. and SHINA, T. : A comparative study of microbubble generation by mechanical agitation and sonication, *Innov. Food Sci. Emerg.*, **9**, 489～494（2008）
- 5) XU, Q., NAKAJIMA, M., ICHIKSWA, S., NAKAMURA, N., ROY, P., OKADOME, H. and SHINA, T. : Effects of surfactant and electrolyte concentrations on bubble formation and stabilization, *J. Colloid Interf.*

- Sci.*, **332**, 208~214 (2009)
- 6) XU, Q., LIU, Z., NAKAJIMA, M., ICHIKSWA, S., NAKAMURA, N., ROY, P., OKADOME, H. and SHIINA, T.: Characterization of a soybean oil-based biosurfactant and evaluation of its ability to form microbubbles, *Bioresour. Technol.*, **101**, 3711~3717 (2010)
- 7) 高橋正好：微細気泡の最新技術（株式会社エヌ・ティー・エス，東京），pp.3~12（2006）
- 8) 李 攀：水処理におけるマイクロバブルの基礎研究，マイクロバブル・ナノバブルの最新技術（シーエムシー出版，東京），pp.126~132（2007）
- 9) 山田哲史・吉見裕子・寺田隆史・大野健一・南川久人：加圧溶解法により発生したマイクロバブルの水中への酸素供給効果に関する研究，混流相，**21**，84~90（2007）
- 10) 米本幸弘・功刀賛彰：マルチスケール混相流体方程式に基づく微細気泡の合一・反発挙動に関する基礎的研究，日本機械学会論文集（B編），**75**（757），1790~1797（2009）
- 11) SEBBA, F.: Foams and Biliquid Foams, Aphrons (John. Wiley & Sons, New York), p.32 (1987)
- 12) 宮崎泰至・佐藤孝紀・伊藤秀範：パルス放電による水中の難分解性化学物質分解，電気学会論文誌A（基礎・材料・共通部門誌），**128**，172~178（2008）
- 13) 杉光英俊：オゾン滴定法，オゾンハンドブック（日本オゾン協会，東京），pp.137~139（2004）
- 14) SOTELO, J. L., BELTRAN, J., BENITEZ, F. J. and BELTRAN-HEREDIA, J.: Ozone Decomposition in Water: Kinetic Study, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **26**, 39~43 (1987)
- 15) SOTELO, J. L., BELTRAN, F., J., BENITEZ, F., J. and BELTRAN-HEREDIA, J.: Henry's law constant for the ozone-water system, *Wat. Res.*, **23**, 1239~1246 (1989)
- 16) 常川雅功：精練用フラックスによるアルミニウム溶湯処理技術，軽金属，**54**，75~81（2004）
（平成23年8月3日受付，平成24年2月20日受理）