

# 日本食品保蔵科学会誌

VOL. 40 NO. 2

---

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

---

## <報 文>

酸化防止剤力価評価を目的としたDPPH

およびABTSラジカル消去能評価法の特性比較…………… (55)

／山内良子・深水さやか・小浜友紀子  
島村智子・柏木丈拵・受田浩之  
穂山 浩・松井利郎・石川洋哉

## <研究ノート> (英文)

二倍体および四倍体ショウガの二次代謝成分…………… (65)

／西川和孝・石丸幹二・藤岡稔大  
後藤昌弘・今堀義洋・田中章江

## <技術報告> (英文)

真空調理におけるブロッコリーの部位別ビタミンC含有量の変化…………… (71)

／中嶋名菜・平田 咲・白土英樹  
北野直子・松添直隆

## <総 説>

青果物の輸送時における

衝撃ストレス応答解析に関する生理学的研究…………… (79)

／タンマウオン マナスイカン

## <講 座>

身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (24) アスパラガス…………… (87)

／浦上敦子

## <情 報>

HACCP教育講座 (5) 感染症の現状と防止策…………… (91)

／石井當次

<文献抄録>…………… (95)

<会 告>…………… (96)

## Food Preservation Science

## CONTENTS OF VOL. 40 NO. 2 (2014)

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

- Comparative DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity Assays  
for Evaluating Natural Antioxidants as Food Additives  
YAMAUCHI Ryoko, FUKAMIZU Sayaka, KOHAMA Yukiko,  
SHIMAMURA Tomoko, KASHIWAGI Takehiro, UKEDA Hiroyuki,  
AKIYAMA Hiroshi, MATSUI Toshiro and ISHIKAWA Hiroya ..... (55)

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

- Secondary Metabolites in the Rhizomes of Diploid and Tetraploid Gingers (*Zingiber officinale* Roscoe)  
NISHIKAWA Kazutaka, ISHIMARU Kanji, FUJIOKA Toshihiro,  
GOTO Masahiro, IMAHORI Yoshihiro and TANAKA Norie ..... (65)

## &lt;Technical Report&gt; (English)

- Changes in Vitamin C Content of Different Parts  
of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) After Cooking  
NAKASHIMA Nana, HIRATA Saki, SHIRATSUCHI Hideki,  
KITANO Naoko and MATSUZOE Naotaka ..... (71)

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

- Postharvest Physiological Study on the Stress Response Mechanism  
of Fresh Produce during Transportation  
THAMMAWONG Manasikan ..... (79)

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

- Asparagus  
URAGAMI Atsuko ..... (87)

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

- Prevention Against Foodborne Disease and its Current Topics  
ISHII Eiji ..... (91)

## 酸化防止剤力価評価を目的としたDPPH およびABTSラジカル消去能評価法の特性比較

山内良子<sup>\*1</sup>・深水さやか<sup>\*1</sup>・小浜友紀子<sup>\*1</sup>  
島村智子<sup>\*2</sup>・柏木丈広<sup>\*2</sup>・受田浩之<sup>\*2</sup>  
穂山 浩<sup>\*3</sup>・松井利郎<sup>\*4</sup>・石川洋哉<sup>\*1§</sup>

- \* 1 福岡女子大学国際文理学部  
\* 2 高知大学農学部  
\* 3 国立医薬品食品衛生研究所  
\* 4 九州大学農学研究院

### Comparative DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity Assays for Evaluating Natural Antioxidants as Food Additives

YAMAUCHI Ryoko<sup>\*1</sup>, FUKAMIZU Sayaka<sup>\*1</sup>, KOHAMA Yukiko<sup>\*1</sup>,  
SHIMAMURA Tomoko<sup>\*2</sup>, KASHIWAGI Takehiro<sup>\*2</sup>, UKEDA Hiroyuki<sup>\*2</sup>,  
AKIYAMA Hiroshi<sup>\*3</sup>, MATSUI Toshiro<sup>\*4</sup> and ISHIKAWA Hiroya<sup>\*1§</sup>

- \* 1 *Department of Food and Health Sciences, International College of Arts Sciences,  
Fukuoka Women's University, 1-1-1, Kasumigaoka, Higashi-ku, Fukuoka 813-8529*  
\* 2 *Faculty of Agriculture, Kochi University, B-200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502*  
\* 3 *Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501*  
\* 4 *Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University,  
6-10-1, Hakozaki, Higasi-ku, Fukuoka 812-8581*

To assess the quality of natural antioxidants used as food additives, it is important to establish method for evaluating antioxidant activity. In this study, the DPPH and ABTS radical scavenging methods were evaluated. The antioxidant activities of 21 reference antioxidants, including flavonoids, polyphenols, vitamins, amino acids, and peptides, were determined by these methods. In both assays, a catechol and a pyrogallol moiety contributed to antioxidant activity. In addition, a 3-hydroxyl group in the C-ring of the flavonoids and the gallic acid ester moiety of the catechins were also important for activity. The antioxidant activities determined by DPPH and ABTS were similar with the exception of catechol compounds, for which values were  $\sim 1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  higher in the DPPH assay than in the ABTS assay. We conclude that DPPH reflects reactivation of the catechol moiety of the antioxidants. A correlation study of DPPH and ABTS with the FRAP method showed that the DPPH method reflected ferric-reducing ability more precisely than did the ABTS assay. We conclude that the DPPH assay would be suitable as a standard method for evaluating natural antioxidants as food additives.

(Received Oct. 17, 2013 ; Accepted Jan. 20, 2014)

**Key words** : antioxidants, polyphenol, DPPH, ABTS, catechol compound

酸化防止剤, ポリフェノール, DPPH法, ABTS法, カテコール構造

---

\* 1 〒813-8529 福岡県福岡市東区香住ヶ丘1-1-1  
§ Corresponding author, E-mail: ishikawa@fwu.ac.jp  
\* 2 〒783-8502 高知県南国市物部乙200  
\* 3 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
\* 4 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

現在、日本国内で使用されている食品添加物は、食品衛生法において指定対象である化学合成物・天然物と、指定対象外である天然香料・一般飲食物添加物に大別されている。さらに、指定対象である食品添加物は、指定添加物と既存添加物に分類され、指定添加物は平成25年8月6日現在436品目、既存添加物は平成25年2月7日現在365品目が登録されている<sup>1),2)</sup>。指定添加物とは、国が安全性、有効性を確認した合成添加物であり、成分含量または成分組成に基づく規格基準が設定されている。一方、既存添加物は、天然由来の複雑な混合物であるものが多く、その有効成分や成分組成の特定が困難である。既存添加物の使用は、平成7年の食品衛生法の改正以降経過措置的に認められているが、有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が極めて難しい状況にあることから、新たな品質規格基準の設定が急務となっている。酸化防止剤においても、その有効性である抗酸化能に基づく新たな品質評価基準の策定が重要な検討課題の一つとなっている。

抗酸化能に基づく品質評価には、抗酸化能評価の公定法策定が必要不可欠であり、そのためには公定法候補の選定とその妥当性の評価が最重要課題となる。抗酸化能評価法として、これまでに原理や操作性の異なる多種多様な方法が報告<sup>3)</sup>されており、その選択は極めて難しい。抗酸化能の評価法は、その測定原理に基づきHydrogen Atom Transfer (HAT) 機構とSingle Electron Transfer (SET) 機構に分類される。HAT機構は、抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することで基質の酸化を抑制する原理に基づくものであり、近年注目を集めたoxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法<sup>4)</sup>やlow density lipoprotein (LDL) 酸化法<sup>5)</sup>などがこれに属する。一方、SET機構は、抗酸化物質がラジカルや酸化物などに1電子を供与することで基質を還元する原理に基づくものであり、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法<sup>6)</sup>、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法<sup>7)</sup>、ferric reducing antioxidant potential (FRAP) 法<sup>8)</sup>などがあげられる。この他に、ラジカルをスピントラップ剤の使用により測定する電子スピン共鳴 (ESR) 法<sup>9)</sup>や酵素反応を利用した活性酸素種 (スーパーオキシド) 消去活性測定法である2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt (WST-1) 法<sup>10)</sup>など様々な測定法が存在する。

私たちは、これまでの研究において、既存添加物の酸化防止剤規格試験法 (規格試験法) 候補の選定と妥当性評価を進めてきた<sup>11)</sup>。具体的には、規格試験法候補の選定条件を、①過去の研究において使用されてきた実績があること、②短時間での測定が可能であること、③特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの3項目とし、ラジカル消去活性測定法であるDPPH法とABTS法、活性酸素消去活性測定法で

あるWST-1法を候補として選定した。この3法を用いて、既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤および複数成分からなる天然物由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を比較した。各測定法のプロトコルを最適化し測定を実施した結果、いずれの測定法も研究室間での再現性が高いことが確認されたが、WST-1法に関しては他の2法と比較すると再現性が若干劣ること、また疎水性酸化防止剤への適用が困難なことなどが明らかになった。このように、抗酸化活性評価法の公定法候補として、現状ではDPPH法とABTS法が有力な状況であるが、規格試験法を策定するためには両者の違いを明らかにし、最適な抗酸化能評価法を選定することが急務となっている。

一方、食品の酸化反応において、金属イオンは反応促進因子として知られており<sup>12)</sup>、金属イオンの酸化が種々のラジカル生成の引き金になる可能性が高い。したがって、酸化防止剤として金属イオンに対する酸化抑制効果である還元能も重要な機能の一つと考えられる。DPPH法とABTS法はいずれもSET機構に基づく評価法であるが、金属イオンの還元能評価も同機構に基づくため、DPPH法およびABTS法での測定値には金属イオンに対する還元能が反映されている可能性が高い。この金属イオンに対する還元能の反映度も、規格試験法の選定における重要な判断要因と考えられる。

本研究では、酸化防止剤規格試験法の選定を目的として、まず21種類の抗酸化物を用いてDPPH法およびABTS法による抗酸化能評価を行い、DPPHおよびABTSラジカルに対する各種抗酸化物の反応特性の違いを検証した。さらに、DPPH法とABTS法を鉄イオンに対する還元能評価法であるFRAP法と比較し、両ラジカル消去能測定法に対する金属イオン還元能の反映度を検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

測定試料として、没食子酸、モリン、ケルセチン、セサモール、*trans*-フェルラ酸 (東京化成工業)、エラグ酸、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキンガレート、(-)-エピガロカテキンガレート、ケンフェロール、ミリセチン (以上シグマ)、カフェ酸、(-)-エピガロカテキン、L-システイン (以上ナカライテスク)、ケルセチン3-グルコシド (常盤植物科学研究所)、グルタチオン、L-アスコルビン酸、ルテオリン、ピロカテコール、ルチン、(+/-)- $\alpha$ -トコフェロール (以上和光純薬工業) を用いた。なお、ケンフェロールおよびルテオリンは純度90%の試薬を用い、その他測定試料に関しては純度95%以上のものを使用した。なお、試料溶液作製時には各試薬純度を基に溶液濃度を決定した。また、標準物質として(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (トロロックス) (SIGMA) を使用した。試験試薬は、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH) (和光純薬工業), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonic acid) (ABTS) (Roche Diagnostics), ペルオキソ二硫酸カリウム (和光純薬工業), 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) (東京化成工業), 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 (ナカライテスク) を使用した。試薬は, 特別の記載がない限りの特級試薬を用いた。吸光度測定には, U-2001分光光度計 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。

## 2. 試料溶液の調製

試料溶液は, 各測定試薬約 5 mg を少量の 99.5% エタノール (和光純薬工業) あるいは MilliQ 水 (ゲルタチオン, システインのみ) を添加し, 卓上型超音波バス (ヤマト科学) を用いて短時間の超音波処理 (110W, 15~30 秒間) を行い, 完全に試料を溶解させた。その後, エタノール溶液を用いて各希釈溶液を作製した。

## 3. DPPHラジカル消活性測定法 (DPPH法)

DPPH法による測定は, 既報と同様に行った<sup>11)</sup>。DPPH 溶液は, 99.5% エタノールに溶解した後, 常温暗所に 2 時間放置した。試験管に試料溶液 200  $\mu\text{l}$ , 100 mM Tris-HCl バッファー (pH7.4) 800  $\mu\text{l}$ , 0.20 mM DPPH 溶液 1 ml を添加し, 10 秒間激しく攪拌した後, 常温暗所で 30 分間静置した。反応後, 溶液の 517 nm における吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また, 0.20 mM DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度 (Ac) に対する試料添加時の吸光度の減少割合 (Ac-As) をもとに, 以下の式 (1) によって阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

得られた阻害率を試料添加濃度に対してプロットすることにより, 試料と標準物質 (トロロックス) の IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ) をそれぞれ求めた。続いて, 以下の式 (2) を用いて, 各試料のトロロックス等価活性 (TEAC) 値 ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ ) を算出した。

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}) = (\text{トロロックスの IC}_{50} (\mu\text{mol}/\text{ml})) / \text{抗酸化物の IC}_{50} (\mu\text{mol}/\text{ml}) \quad \dots\dots\dots (2)$$

## 4. ABTSラジカル消去活性測定法 (ABTS法)

ABTS法による測定も, 既報と同様に行った<sup>11)</sup>。ABTS working solution は, 7 mM ABTS 溶液 5 ml, 140 mM ペルオキソ二硫酸カリウム溶液 88  $\mu\text{l}$  をよく混和し, 常温暗所に 12~16 時間放置した。さらに, この溶液の 734 nm における吸光度が  $0.7 \pm 0.02$  となるように 99.5% エタノールで希釈したものを使用した。試験管に ABTS working solution を 1 ml 加え, 100  $\mu\text{l}$  の試料溶液を添加後, 10 秒間攪拌した。この溶液を 30°C で 4 分間インキュベーションした後, 734 nm における吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合

の吸光度をコントロール (Ac) とした。また, ABTS 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。DPPH法と同様に各阻害率 (%) を上記式 (1) によって求め, さらに TEAC 値 ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ ) を式 (2) により算出した。

## 5. FRAP法

FRAP法による測定は, DUDONNE らの方法に準じて行った<sup>13)</sup>。試料溶液 100  $\mu\text{l}$  と超純水 300  $\mu\text{l}$  を FRAP 溶液 (0.3 M 酢酸緩衝液 (pH3.6) : 10 mM TPTZ 試薬 : 20 mM FeCl<sub>3</sub> 試薬 = 10 : 1 : 1) 3 ml に添加し, 37°C で 30 分間インキュベートした後, 593 nm でのサンプル吸光度を測定した。試料濃度 (x) に対して対応する吸光度の値 (y) をプロットし, 回帰直線を求めた。同様に標準物質であるトロロックスの回帰直線の傾きを求めた後, 各試料の回帰直線の傾きの値をトロロックス回帰直線の傾きの値で除し, TEAC 値 ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ ) を算出した。

## 実験結果および考察

DPPH および ABTS 法を用いて, 合計 21 種類の抗酸化物 (Table 1) の抗酸化能を評価し, 得られた TEAC 値を Table 2 に示した。なお, 用いた化合物は, フラボノイド系化合物としてフラボノール類とその配糖体 6 種 (ケンフェロール, ケルセチン, ミリセチン, モリン, ケルセチン 3-グルコシド, ルチン), フラボン類 1 種 (ルテオリン), フラバン-3-オール類 4 種 ((-)-エピカテキン (EC), (-)-エピガロカテキン (EGC), (-)-エピカテキンガレート (ECG), (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG)) の計 11 化合物, およびその他化合物計 10 種 (*trans*-フェルラ酸, ピロカテコール, カフェ酸, 没食子酸, セサモール, エラグ酸, L-アスコルビン酸, L-システイン, ゲルタチオン, (+/-)- $\alpha$ -トコフェロール) である。

まず, 評価法毎に化合物の活性値を比較した。フラボノール類において, B 環の水酸基の数が異なるケンフェロール, ケルセチン, ミリセチンの DPPH 法での活性値を比較したところ, 活性値はケルセチン  $\approx$  ミリセチン  $>$  ケンフェロールの順となった。高い活性が認められたのは, 特に B 環にカテコールおよびピロガロール構造を有する場合であった。一方, フラボノールの B 環 2', 4' 位に水酸基を有するモリンの活性値は, 0.97  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  となりケンフェロールとほぼ同等であったことから, DPPH 法での活性値には B 環の水酸基の数だけでなく, 水酸基の位置が重要な活性発現要因であることが示唆された。さらに, 活性発現に重要と考えられているフラボノールの C 環 3 位の水酸基の影響を確認するため, C 環 3 位に糖が結合したケルセチン 3-グルコシドおよびルチンの活性値をケルセチンと比較した。この糖の付加によりそれぞれ 0.96 および 0.78  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  の活性値低下が確認され, C 環 3 位の水酸基が 0.8~1.0  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  程度の抗酸化に寄与していることが示唆され

Table 1 Reference compounds

Sample	Substituent	Structures	
<i>Flavonols</i>			
Kaempferol	3, 4'-OH		
Quercetin	3, 3', 4'-OH		
Myricetin	3, 3', 4', 5'-OH		
Morin	3, 2', 4'-OH		
Quercetin 3-glucoside	3-rahamnose, 3', 4'-OH		
Rutin	3-rutinoside, 3', 4'-OH		
<i>Flavons</i>			
Luteolin	3', 4'-OH		
<i>Flavan-3-ols</i>			
(-)-Epicatechin (EC)	3, 3', 4'-OH		
(-)-Epigallocatechin (EGC)	3, 3', 4', 5'-OH		
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	3-gallic acid, 3', 4'-OH		
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	3-gallic acid, 3', 4', 5'-OH		
<i>Others</i>			
<i>trans</i> -Ferulic Acid		Ellagic Acid	
Pyrocatechol		L-Ascorbic Acid	
Caffeic Acid		L-Cysteine	
Gallic Acid		Glutathione	
Sesamol		(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol	

た。同様のことがC環3位に水酸基を有さないフラボン類であるルテオリンの場合にも確認されたことから、フラボノイド類では、C環3位の水酸基の重要性が活性に重要であることが明らかとなった。フラボノイド類の構造と抗酸化能の関連性については、美甘らによっても報告されている<sup>14)</sup>。評価に用いられているのは、 $\beta$ -カロテン-リノール酸系の反応であり、DPPH法と反応メカニズムが異なるが、フラボノイドB環カテコール構造とC環3位に水酸基の重要性が特に強調されている点では本研究結果と一致していた。さらに、*in vivo*抗酸化活性試験法である細胞抗酸化活性測定法(CAA法)を用いた測定においても、フラボノイドB環カテコール構造の反

応性が高いことが指摘されており<sup>15)</sup>、カテコール構造は様々な抗酸化反応系で高い抗力を発揮する可能性を有することが示唆された。

フラバン-3-オール類であるカテキン類では、今回供試したカテキン類は総じて高い活性(3.12~4.86  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )を示した。これらのことから、カテキン類においても上述のフラボノール類の結果と同様にB環カテコール・ピロガロール構造に起因すると推察された。さらにC環3位に没食子酸が結合したガレート型カテキンのECGおよびEGCGの活性値はそれぞれ4.86, 4.83  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であり、他のカテキン類と比較して1.47~1.74  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 高い値を示した。この結果は、C

Table 2 Antioxidant activity of compounds as determined by DPPH and ABTS

Sample	DPPH ( $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ )
<i>Flavonols</i>		
Kaempferol <sup>c</sup>	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01
Quercetin <sup>b</sup>	3.18 ± 0.03	2.01 ± 0.09
Myricetin <sup>c</sup>	3.09 ± 0.11	3.11 ± 0.19
Morin <sup>c</sup>	0.97 ± 0.01	0.86 ± 0.12
Quercetin 3-glucoside <sup>b</sup>	2.22 ± 0.11	0.96 ± 0.04
Rutin <sup>b</sup>	2.40 ± 0.11	0.98 ± 0.04
<i>Flavon</i>		
Luteolin <sup>b</sup>	2.22 ± 0.07	1.04 ± 0.26
<i>Flavan-3-ols</i>		
(-)-Epicatechin (EC) <sup>b</sup>	2.73 ± 0.08	1.57 ± 0.08
(-)-Epigallocatechin (EGC) <sup>c</sup>	3.12 ± 0.05	2.98 ± 0.06
(-)-Epicatechin gallate (ECG) <sup>b</sup>	4.86 ± 0.21	3.11 ± 0.13
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) <sup>c</sup>	4.83 ± 0.18	4.67 ± 0.08
<i>Others</i>		
<i>trans</i> -Ferulic Acid <sup>c</sup>	0.71 ± 0.04	0.64 ± 0.06
Pyrocatechol <sup>b</sup>	2.73 ± 0.09	1.08 ± 0.03
Caffeic Acid <sup>b</sup>	2.46 ± 0.01	1.08 ± 0.04
Gallic Acid <sup>c</sup>	2.52 ± 0.06	2.49 ± 0.20
Sesamol <sup>a</sup>	0.78 ± 0.02	2.03 ± 0.09
Ellagic Acid <sup>b</sup>	3.84 ± 0.30	2.74 ± 0.32
L-Ascorbic Acid <sup>c</sup>	0.87 ± 0.00	1.06 ± 0.04
L-Cysteine <sup>a</sup>	0.55 ± 0.01	1.37 ± 0.07
Glutathione <sup>c</sup>	0.70 ± 0.00	0.80 ± 0.04
(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol <sup>c</sup>	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.01

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3).

<sup>a</sup>: DPPH < ABTS, <sup>b</sup>: DPPH = ABTS, <sup>c</sup>: DPPH > ABTS

環3位の没食子酸エステル構造がカテキン類において大きな活性発現要因となっていることを示唆している。今回供試したカテキン類はすべて緑茶に含まれるカテキン類であり、酸化防止剤として利用されているチャ抽出物の主成分である。チャ抽出物中には、ガレート型カテキン、特にEGCGが多く含まれると考えられることから、チャ抽出物は極めて有効な酸化防止剤であることが本結果からも明らかになった。

フラボノイド類以外の化合物について、2  $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ 以上の高いTEAC値を示したのは、ピロカテコール、カフェ酸、没食子酸、エラグ酸であり、いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有する化合物であった。特に、分子内に2個のカテコール構造を有するエラグ酸では3.84  $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ と極めて高い値を示した。この結果から、フラボノイド以外の化合物でも、分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有すれば高い抗酸化能を発現することが確認された。一方、抗酸化能をもつことで知られているL-アスコルビン酸、グルタチオン、(+/-)- $\alpha$ -トコフェロールなどの活性値は総じて1  $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ 以下の値であり、ラジ

カル消去能の面ではフラボノイド系化合物よりも効果が小さいものと判断された。

ABTS法を用いた測定では、DPPHと類似した結果が認められたが、一部で明らかな相違点が認められた。すなわち、DPPH法ではカテコール構造とピロガロール構造の反応性はほぼ同程度であったのに対して、ABTS法での活性値はカテコール構造と比較してピロガロール構造の反応性が高かった。具体的には、ABTS法では、ケルセチン>ミリセチン、EGC>EC、EGCG>ECG、没食子酸>ピロカテコール・カフェ酸などの傾向が確認された。また、カテコール構造を有するケルセチン3-グルコシド、ルチン、ルテオリン、ピロカテコール、カフェ酸などの化合物がいずれも1  $\mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ 程度の活性値しか示さなかったのも特徴的であった。

DPPH法とABTS法は、同じ測定原理に基づくラジカル消去活性測定法である。両者は類似した活性傾向を示すものと考えられており、30種類の水溶性植物抽出物を用いた抗酸化能測定試験では、DPPH法とABTS法の測定結果に高い相関があることも示されている<sup>13)</sup>。しかしながら、単一成分からなる抗酸化物を用いた試験結果で

は、一部異なる傾向が認められた。

DPPH法とABTS法の測定結果に一部異なる傾向が認められたことから、両測定法の活性値の関連性を詳細に検討した。上記21種類の抗酸化物について、DPPH法とABTS法の活性 (TEAC値) の相関を検討した結果、両者の相関係数は0.779であり、類似した傾向は認められるものの、全体的にプロットがばらついた結果となった (図は省略)。そこで、Table 2の結果を詳細に検証し、DPPH法とABTS法の活性値を比較した。その結果、DPPH法での活性値がABTS法の活性値より高いグループ (DPPH>ABTS)、DPPH法とABTS法の活性値が同程度であるグループ (DPPH≒ABTS)、DPPH法での活性値がABTS法の活性値より低いグループ (DPPH<ABTS) の3グループに大別されることが判明した。21化合物のグループ分け結果は、Table 2の化合物名にアルファベットの肩文字で示すとともに、その結果をDPPH法とABTS法の活性相関図 (Fig. 1) に示した。このグループ分けで特に興味深いのは、DPPH活性が高いDPPH>ABTS群の抗酸化物が、いずれも分子内にカテコール構造を有していることであった。一方、カテコール構造を有さない化合物群では、例外的にABTS活性が高いDPPH<ABTS群であったセサモールおよびL-システインの場合を除き、残りの化合物すべてが両法の活性値が同等 (DPPH≒ABTS) であった。そこで、抗酸化物のカテコールの有無を考慮して、カテコール構造有り群 (DPPH>ABTS群) とカテコール構造無し群 (DPPH≒ABTS群) に分けて、再度DPPH法とABTS法の活性値の相関を検討した (Fig. 2)。その結果、カテコール構造無し群では、傾きが0.957となりほぼ原点を通る回帰直線が得られた ( $y=0.957x+0.064$ ,  $r=0.998$ )。一方、カテコール構造有り群でも傾き0.901と1に近い回帰直

線が得られた ( $y=0.901x-1.048$ ,  $r=0.966$ )。両直線を比較すると直線が正の方向にほぼ平行移動した形となり、その移動量はTEAC値でおよそ $1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であった。この結果、抗酸化物質の構造内にカテコール構造が存在する場合は、DPPH法ではABTS法と比較して活性値が上乘せされることが明らかとなった。DPPH法とABTS法の活性値の違いは主として、このカテコール構造の反応性の違いに起因することが示唆され、その反応性の差が活性値で約 $1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ に相当することが確認された。抗酸化物中のカテコール構造は、ラジカル消去反応後に酸化型であるキノン構造に変化することにより反応が停止する。しかしながら、DPPH法では、ラジカル消去反応後に酸化型であるキノン構造に変化したのち、エタノールやメタノールのような極性溶媒存在下でキノン構造が還元されることによりカテコール構造が再生され、再びDPPHラジカルと反応することが報告されている<sup>16),17)</sup>。本研究において示されたDPPH法におけるカテコール構造の特異的反応性は、このカテコール構造の再生反応に起因している可能性が高いと推察された。一方、ABTS法ではDPPHと比較して短時間で反応が平衡化する傾向があるため、カテコール構造再生の影響が現れにくい可能性が推察された。

続いて、DPPH・ABTS両法での評価結果に、金属イオンの還元能がどの程度反映されているかを確認するため、両法の活性値をFRAP法の活性値 (Table 3) と比較し、その相関を検討した (Fig. 3)。Fig. 3に示したように、DPPH法とFRAP法の相関プロットでは、傾きがほぼ1である原点付近を通る回帰直線が得られた ( $y=1.007x-0.072$ ,  $r=0.939$ )。この結果は、DPPH法での活性値が鉄イオンに対する還元能を強く反映していることを示唆するものであった。一方、ABTS法とFRAP法

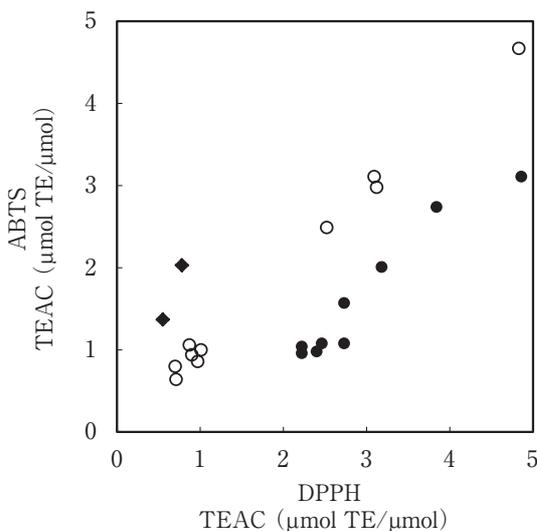


Fig. 1 Antioxidants and the correlation between DPPH and ABTS

◆ : DPPH < ABTS, ○ : DPPH ≒ ABTS, ● : DPPH > ABTS (compounds with catechol structure)

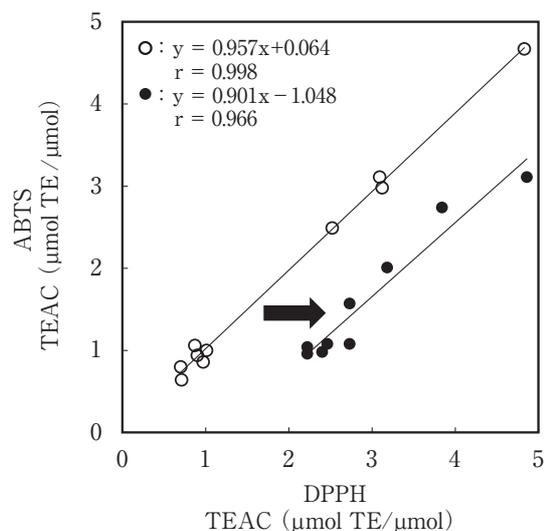


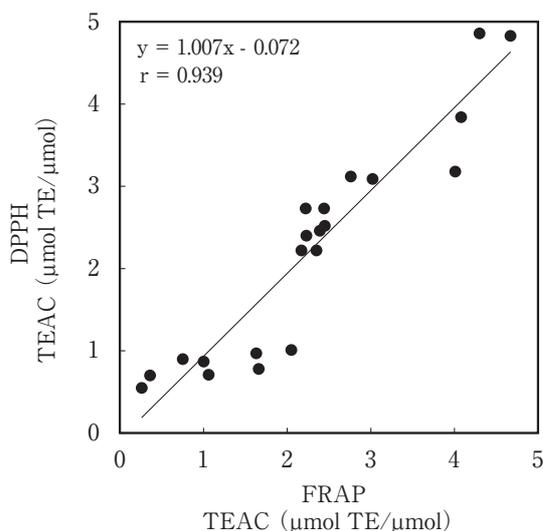
Fig. 2 The effect of catechol on the correlation between DPPH and ABTS

○ : without catechol structure (DPPH ≒ ABTS),  
● : with catechol structure (DPPH > ABTS)

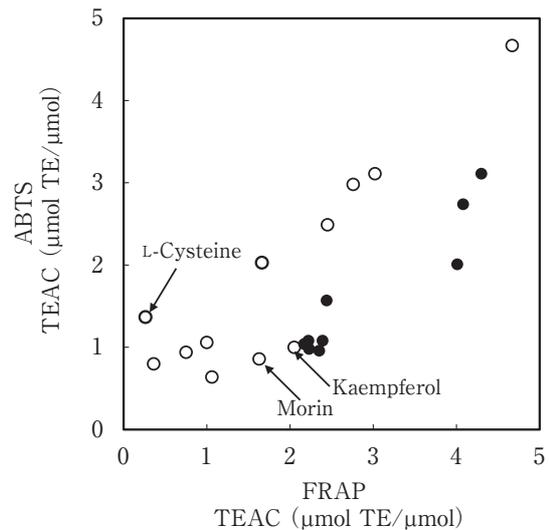
**Table 3** Antioxidant activity as determined by FRAP

Sample	FRAP ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )
<i>Flavonols</i>	
Kaempferol	2.05 $\pm$ 0.04
Quercetin	4.01 $\pm$ 0.11
Myricetin	3.02 $\pm$ 0.12
Morin	1.63 $\pm$ 0.02
Quercetin 3-glucoside	2.35 $\pm$ 0.01
Rutin	2.23 $\pm$ 0.11
<i>Flavon</i>	
Luteolin	2.17 $\pm$ 0.02
<i>Flavan-3-ols</i>	
(-)-Epicatechin (EC)	2.44 $\pm$ 0.05
(-)-Epigallocatechin (EGC)	2.76 $\pm$ 0.07
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	4.30 $\pm$ 0.08
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	4.67 $\pm$ 0.17
<i>Others</i>	
<i>trans</i> -Ferulic Acid	1.06 $\pm$ 0.04
Pyrocatechol	2.22 $\pm$ 0.09
Caffeic Acid	2.39 $\pm$ 0.05
Gallic Acid	1.66 $\pm$ 0.10
Sesamol	2.45 $\pm$ 0.04
Ellagic Acid	4.08 $\pm$ 0.01
L-Ascorbic Acid	1.00 $\pm$ 0.00
L-Cysteine	0.26 $\pm$ 0.00
Glutathione	0.36 $\pm$ 0.12
(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol	0.75 $\pm$ 0.00

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3)

**Fig. 3** Correlation between DPPH and FRAP

では、正の相関は認められたものの、DPPH法との相関と比較すると相関性が劣る結果となった ( $r=0.764$ ) (図は省略)。この原因を詳細に検討した結果、Fig. 4のABTS法とFRAP法の相関プロットに示したように、カ

**Fig. 4** Antioxidants and the correlation between ABTS and FRAP

○: without catechol structure, ●: with catechol structure

テコール構造を有する化合物群でFRAP法での活性値がABTS法の活性値より高くなる傾向が認められた。さらに、フラボノイドのB環に水酸基1つを持つケンフェロールおよびB環2', 4'位に水酸基を有するモリンでもFRAP法での活性値がABTS法の活性値より高い結果となった。なお、ケンフェロールとモリンについてはFRAP法での活性値がDPPH法の活性値より高い傾向も確認されており、FRAP法ではフラボノイドのB環がカテコールやピロガロール構造をとらなくても、単一の水酸基で高い反応性を示すことが示唆された。一方、L-システインは、FRAP法での活性値がABTS法の活性値より低い傾向を示した。分子内にチオール基を持つ化合物はFRAP法での鉄イオンとの反応が遅いことが報告されている<sup>18)</sup>。そのため、FRAP法でL-システインの活性値が低く見積もられていることがこの一因と考えられた。なお、上述のようにDPPH法でのL-システインの活性値はABTS法のものより低い傾向も確認されていることから、L-システインはABTSラジカルに対してのみ特異的に高い活性を示す可能性があることも示唆された。

以上の結果、DPPH法ではABTS法と比較して、その活性値に鉄イオンに対する還元能を強く反映していることが確認され、酸化防止剤の評価法としてより有力であることが明示された。現在、これらの結果を踏まえて、私たちの研究グループではDPPH法による複数研究機関での共同試験を実施し、試験結果の解析などに取り組み、酸化防止剤規格試験法(規格試験法)の確立を目指しているところである。

## 要 約

本研究では、既存添加物のうち、酸化防止剤に分類される品目の抗酸化能に基づく新たな規格基準の設定を最

終目的とし、その基礎となる評価法の設定に向けた検討を行った。酸化防止剤規格試験法候補として有力な DPPH法およびABTS法を用いて、21種類の抗酸化物の測定を行った結果、抗酸化物のカテコール・ピロガロール構造を中心として、それぞれの反応特性を明らかにした。さらに、両測定法の活性値の相関性を検証した結果、両法は概ね一致した活性傾向を示すものの、カテコール構造を有する化合物では、DPPH法がABTS法より約  $1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  高い活性値を示すことを明らかにした。また、両測定法をFRAP法と比較した結果、DPPH法がFRAP法と極めて高い相関を示すことを明らかにした。この結果は、DPPH法が金属イオンの還元能を強く反映していることを示している。この結果DPPH法が酸化防止剤の規格試験法候補として極めて有力であることが示唆された。

本研究は、平成23~25年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省, 指定添加物リスト, 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/>), 2013年8月8日更新
- 2) 厚生労働省, 既存添加物名簿収載品目リスト, 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/>), 2013年2月7日更新
- 3) 石川洋哉・松本 清・受田浩之・島村智子・松藤 寛・山崎 壮: 食品の抗酸化能評価法, *FFI Journal*, **215**, 5~15 (2010)
- 4) WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E. and PRIOR, R. L.: Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026~4037 (2004)
- 5) HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H., IGARASHI, O. and KONDO, K.: Antioxidant Ability of Various Flavonoids against DPPH Radicals and LDL Oxidation, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **47**, 357~362 (2001)
- 6) YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H., MATOBA, T. and TERAOKA, J.: HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201~1204 (1998)
- 7) RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C.: Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 1231~1237 (1999)
- 8) BENZIE, I. F. F. and STRAIN, J. J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Anal. Biochem.*, **239**, 70~76 (1996)
- 9) NODA, Y., ANZAI, K., MORI, A., KOHNO, M., SHINMEI, M. and PACKER, L.: Hydroxyl and Superoxide Anion Radical Scavenging Activities of Natural Source Antioxidants Using the Computerized JES-FR30 ESR Spectrometer System, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35~44 (1997)
- 10) UKEDA, H., KAWANA, D., MAEDA, S. and SAWAMURA, M.: Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485~488 (1999)
- 11) 島村智子・松浦理太郎・徳田貴志・杉本直樹・山崎 壮・松藤 寛・松井利郎・松本 清・受田浩之: 酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験, 日本食品科学工学会誌, **54**, 482~487 (2007)
- 12) 佐藤英輔・井上正康: 活性酸素, 日衛誌, **56**, 606~614 (2002)
- 13) DUDONNÉ, S., VITRAC, X., COUTIÈRE, P., WOILLET, M. and MÉRILLON, J.M.: Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1768~1774 (2009)
- 14) 美甘江利子・岡田安代・扇間昌規・伊藤誉志男・森本隆司・中村幹雄: フラボノイド類の抗酸化活性と構造との相関性に関する研究 (2), 日食化誌, **7**, 97~101 (2000)
- 15) WOLFE, K. L. and LIU, R. H.: Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8404~8411 (2008)
- 16) SENTANDREU, E., NAVARRO, J. L. and SENDRA, J. M.: Reduction Kinetics of the Antiradical Probe 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl in Methanol and Acetonitrile by the Antiradical Activity of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Acid Methyl Ester, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4928~4936 (2008)
- 17) SENDRA, J. M., SENTANDREU, E. and NAVARRO, J. L.: Kinetic Model for the Antiradical Activity of the Isolated *p*-Catechol Group in Flavanone Type Structures Using the Free Stable Radical 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as the Antiradical Probe, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5512~5522 (2007)
- 18) BOXIN, O., DEJIAN, H., MAUREEN, H. W., JUDITH, A. F. and ELIZABETH, K. D.: Analysis of Antioxidant

---

Activities of Common Vegetables Employing  
Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and  
Ferric Reducing antioxidant Power (FRAP)

Assays : A Comparative Study, *J. Agric. Food  
Chem.*, **50**, 3122~3128 (2002)

(平成25年10月17日受付, 平成26年1月20日受理)

---

## Secondary Metabolites in the Rhizomes of Diploid and Tetraploid Gingers (*Zingiber officinale* Roscoe)

NISHIKAWA Kazutaka<sup>\*1§</sup>, ISHIMARU Kanji<sup>\*2</sup>, FUJIOKA Toshihiro<sup>\*3</sup>,  
GOTO Masahiro<sup>\*4</sup>, IMAHORI Yoshihiro<sup>\*5</sup> and TANAKA Norie<sup>\*6</sup>

\* 1 Faculty of Health and Living Sciences Education, Naruto University of Education,  
748 Nakashima, Takashima, Naruto-cho, Naruto, Tokushima 772-8502

\* 2 Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-machi, Saga 840-8502

\* 3 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180

\* 4 Faculty of Home Economics, Kobe Women's University, 2-1, Aoyama, Higashi-suma, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-8585

\* 5 Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University,  
1-1 Gakuen-cho, Nakaku, Sakai, Osaka 599-8531

\* 6 Project Management Office, The University of Tokushima, 2-1 Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8506

The rhizomes of diploid and tetraploid gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) were studied for their composition of volatile and pungent compounds. The tetraploid ginger was derived from the diploid ginger by *in vitro* colchicine techniques. GC and GC-MS analyses revealed that the volatile compounds in the diploid and tetraploid gingers exhibited a similar compositional pattern. The pungent compounds were also isolated from the tetraploid ginger rhizomes and their structures were identified as [6]-gingerol and [6]-dehydroparadol by chemical and spectroscopic evidence. The HPLC analysis showed that the composition of pungent compounds in tetraploid ginger was not so different from that of diploid ginger. Therefore, tetraploid ginger showed a potential alternative to diploid ginger, since tetraploid ginger has several advantages over diploid ginger such as pollen fertility, germinability, and larger size.

(Received Sep. 18, 2013 ; Accepted Feb. 17, 2014)

**Key words** : *Zingiber officinale* Roscoe, diploid ginger, tetraploid ginger, volatile compound, pungent compound  
ショウガ, 二倍体ショウガ, 四倍体ショウガ, 香気成分, 辛味成分

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe,  $2n = 22$ ) is a monocotyledonous herbaceous plant belonging to the family Zingiberaceae. It is an important commercial species, and has been used as a source of spice and medicine in Africa, Asia, and America since ancient times<sup>1),2)</sup>. The rhizomes of ginger contain both the characteristic flavor and pungency of the spice. The volatile compounds of ginger have been found to possess various pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities<sup>3)~5)</sup>. What gives ginger its pungency are gingerols and shogaols, which consist of a homologous series of aldols, each containing a phenolic group. Additional studies have identified ginger's antioxidation, antiulcer, and antiallergic effects<sup>6)~8)</sup>. On the other hand, ADANIYA *et al.* succeeded in inducing tetraploid ginger ( $2n = 44$ ) using *in vitro* colchicine techniques<sup>9)~11)</sup>. This

tetraploid ginger demonstrates enhanced pollen fertility and germinability, and tends to grow substantially larger than the diploids in both plant and rhizome size<sup>9)~11)</sup>. However, there is little information about the secondary metabolites in the rhizomes of tetraploid ginger. As part of the search for natural food and medicine sources, the present study investigated the secondary metabolites, i.e. volatile and pungent compounds, of tetraploid ginger.

### Materials and Methods

#### 1. Plant materials

The Koganenosato ginger strain was used in this experiment. The tetraploid ginger was derived from the diploid ginger by *in vitro* colchicine treatment and the chromosome number was checked according to the methods of ADANIYA *et al.*<sup>9)~11)</sup>.

## 2. Quantitative determination of volatile compounds by GC and GC-MS

The fresh rhizomes were washed to remove any soil, peeled, and sliced. The sliced rhizomes were grated with a food cutter and filtered with gauze. The slurry (9ml) was extracted with 1ml of *n*-hexane with stirring at 3,000 rpm for 15 min. After the extract (hexane fraction) was filtered and dried over anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed by rotary vacuum evaporator at 40°C<sup>12,13</sup>. The each sample was subjected to GC (Shimadzu GC-14A, FID) analysis; column: DB-1 capillary column (0.25mm i.d. × 30m, 0.25µm film thickness, J & W Folsom, CA, USA), carrier gas: nitrogen at a flow rate of 1.8ml/min, column temperature: 50°C (2 min) → 3°C/min → 230°C (10 min), injector and detector temp.: 250°C. GC-MS was carried out on a Shimadzu GC-17A coupled with a Shimadzu QP-5000 under the same GC conditions<sup>14</sup>. Identification of the volatile compounds was based on GC relative retention index (RI), co-injection with authentic compounds, and computer matching of the mass spectra against a library of spectra built up from authentic compounds, by comparison of fragmentation patterns of the mass spectra with likely authentic compounds<sup>14</sup>.

## 3. Extraction and isolation of pungent compounds

The lyophilized rhizomes (37.47g) of tetraploid ginger were mashed and extracted at room temperature with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 ml × 4) and MeOH (400ml × 4) (Fig. 1). The extract, after concentration under reduced pressure, was subjected to Sephadex LH-20 (4.5cm i.d. × 23cm) column chromatography and eluted by H<sub>2</sub>O increasing amount of MeOH and then by CHCl<sub>3</sub> to afford four fractions (Frs. 1-4). Fr. 3 was applied on Preparative C18 125 Å (H<sub>2</sub>O-MeOH; 1:0 → 0:1 and MeOH-CHCl<sub>3</sub>; 1:0 → 0:1) and Sephadex LH-20 (H<sub>2</sub>O-MeOH; 1:0 → 0:1 and MeOH-CHCl<sub>3</sub>; 1:0 → 0:1) column chromatography to produce Compound 1 (196.5mg). Fr. 4 was purified by Sephadex LH-20 (MeOH-CHCl<sub>3</sub>; 1:0 → 0:1) column chromatography to give Compound 2 (32.2 mg). Compounds 1 and 2 were identified as [6]-gingerol and [6]-dehydroparadol, respectively, by comparison of the spectroscopic data (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR) with those in the references<sup>15-18</sup> (Fig. 2).

## 4. Quantitative determination of pungent compounds by HPLC

The lyophilized rhizomes (approximately 20mg) of both diploid and tetraploid ginger were mashed and

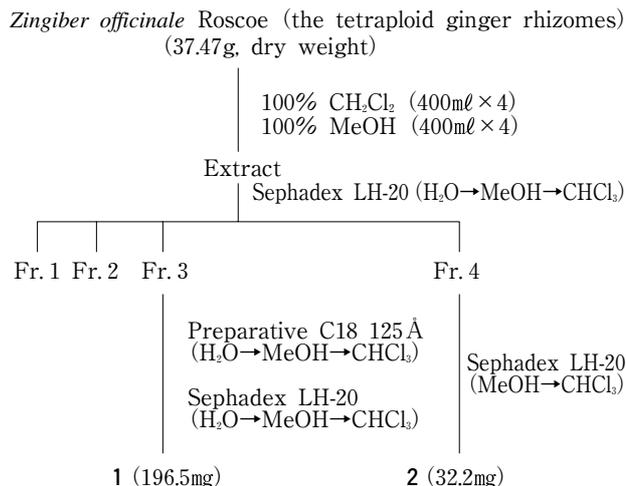


Fig. 1 Isolation of 1 and 2 from tetraploid ginger rhizomes

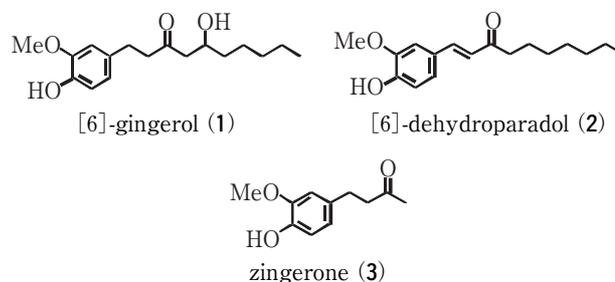


Fig. 2 Chemical structures of the ginger compounds tested in this study

extracted with EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) for 16 h at room temperature. After filtration through a filter (0.22µm, Millipore, USA), each extract was subjected to HPLC analysis<sup>19</sup>. The HPLC analytical conditions were as follows; column: TSK-gel ODS 80Ts (4.6mm i.d. × 250mm), mobile phase: MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1, in 40 min), flow rate: 0.4ml/min, column temperature: 40°C, detection: 280nm, Rt (min): [6]-gingerol (1) (8.79) and [6]-dehydroparadol (2) (9.46), and zingerone (3) (7.55). Zingerone (3) was purchased from Sigma-Aldrich Co., Ltd. Analytical HPLC was performed on the instrument equipped with a photodiode array UV-VIS detector (Gulliver, Jasco, Japan).

## Results and Discussion

The total peak area of the gas chromatograph of diploid and tetraploid gingers was almost the same. The aroma of ginger is characteristic, and many volatile compounds such as terpenoids and sesquiterpenoids have been identified in various samples of ginger<sup>13,20</sup>. In this experiment, seventeen volatile compounds were positively identified in both

diploid and tetraploid gingers (Table 1). Monoterpenoids found included five monoterpene hydrocarbons ( $\alpha$ -pinene, camphene, myrcene,  $\beta$ -pinene, and terpinolene) and seven oxygenated monoterpenes (linalool, citronellal, borneol, decanal, neral, geranial, and geranyl acetate). Sesquiterpenoids included three sesquiterpene hydrocarbons ( $\alpha$ -zingiberene,  $\alpha$ -farnesene, and  $\beta$ -bisabolene) and two oxygenated sesquiterpenes (nerolidol and farnesol). A number of volatile compounds identified from the diploid and tetraploid gingers were nearly the same as those of the most recent reports<sup>12),13),21)</sup>. As can be seen in Table 1, the total peak area (54~59%) of sesquiterpenoids was greater than that (ca. 21%) of monoterpenoids. This result corresponded with the results of CONNELL and JORDAN<sup>12)</sup>. In both diploid and tetraploid gingers, the major compounds were three sesquiterpene hydrocarbons. In particular, the peak area of  $\alpha$ -zingiberene, which has an odor unique to ginger, was the most pervasive (32~34%).

Furthermore, CONNELL and JORDAN reported that freshly cut rhizomes possessed a 'citrus-like' aroma, and identified compounds producing this 'citrus-like' odor as geranial (citral *a*) and neral (citral *b*)<sup>12)</sup>. In

this study, the 'citrus-like' odor compounds geranial and neral were also detected (a total citral content: 3.9~4.4%), but none of the samples exhibited a 'citrus-like' aroma. It seemed that geranial and neral were present in lower concentrations due to differences in the storage and cultivation of the rhizomes. Linalool (a floral and rosy odor), camphene (a camphoraceous odor), and geranyl acetate (a unique compound in fresh ginger rhizomes) were also identified<sup>12),13)</sup>. In both gingers, the content of geranial was higher than that of geranyl acetate, probably due to the oxidation of ginger rhizomes during storage. A comparison of the volatile compounds of the two gingers showed few quantitative differences, specifically in the content of borneol, decanal, and farnesol. Furthermore, no difference in volatile flavors was sensed through direct odor or taste observations. Therefore, it was considered that the composition of volatile compounds in diploid and tetraploid gingers exhibited a similar compositional pattern.

Ginger rhizomes also contain such pungent substances as gingerols and shogaols<sup>7)</sup>. Since there have been few reports concerning the pungent compounds found in the rhizomes of tetraploid ginger, the pungent compounds in the rhizomes of tetraploid ginger were investigated here. As illustrated (Fig. 1), the extracts of the rhizomes were applied to Sephadex LH-20 and Preparative C 18 columns to give rise to two compounds. Compounds **1** and **2** were identified as [6]-gingerol and [6]-dehydroparadol, respectively, by comparison with reference compounds<sup>15)~18)</sup> (Fig. 2). The main pungent compound, [6]-gingerol (**1**), was contained in both diploid and tetraploid gingers. [6]-Dehydroparadol (**2**), structurally related to the gingerols and the shogaols, was also isolated and identified in the tetraploid ginger for the first time.

As the natural pungency of ginger is known to be derived from mixtures of gingerols, we investigated the relative contributions of compounds **1**, **2** and the related paradol, zingerone (**3**) (Fig. 2), in the rhizomes of diploid and tetraploid gingers. Among the three compounds examined, [6]-gingerol (**1**) was the major compound in both diploid and tetraploid gingers (diploid, 0.74% DW; tetraploid, 0.64% DW) (Table 2). [6]-Dehydroparadol (**2**) was detected at a scant 0.07~0.09% DW, and zingerone (**3**) was hardly detected. This result is consistent with the report that zingerone (**3**) is not a natural

**Table 1** Composition of volatile compounds from diploid and tetraploid ginger rhizomes (peak area, %)

Compounds	Rt (min)	Diploid	Tetraploid
$\alpha$ -Pinene	( 7.35)	1.34 $\pm$ 0.10a	1.28 $\pm$ 0.07a
Camphene	( 7.75)	5.74 $\pm$ 0.38a	4.96 $\pm$ 0.29a
Myrcene	( 9.40)	0.60 $\pm$ 0.04a	0.51 $\pm$ 0.03a
$\beta$ -Pinene	(10.78)	6.49 $\pm$ 0.64a	7.27 $\pm$ 1.40a
Terpinolene	(13.55)	tr	tr
Linalool	(13.97)	0.07 $\pm$ 0.01a	0.06 $\pm$ 0.01a
Citronellal	(15.98)	tr	tr
Borneol	(16.39)	0.54 $\pm$ 0.06a	0.15 $\pm$ 0.03b
Decanal	(18.39)	0.81 $\pm$ 0.20b	1.95 $\pm$ 0.17a
Neral	(19.71)	0.26 $\pm$ 0.05a	0.26 $\pm$ 0.06a
Geranial	(21.10)	4.17 $\pm$ 0.41a	3.67 $\pm$ 0.49a
Geranyl acetate	(26.58)	0.87 $\pm$ 0.19a	0.90 $\pm$ 0.28a
$\alpha$ -Zingiberene	(32.03)	34.40 $\pm$ 0.86a	31.71 $\pm$ 1.42a
$\alpha$ -Farnesene	(32.58)	11.77 $\pm$ 0.51a	10.59 $\pm$ 0.42a
$\beta$ -Bisabolene	(33.38)	12.57 $\pm$ 0.26a	11.34 $\pm$ 0.62a
Nerolidol	(34.39)	0.33 $\pm$ 0.04a	0.42 $\pm$ 0.02a
Farnesol	(40.82)	0.14 $\pm$ 0.01b	0.20 $\pm$ 0.02a

tr: peak area less than 0.005% (almost undetected).

Each value is the mean  $\pm$  SE for 5 samples.

Values in the table not showing different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Student's *t*-test by using the statistical analysis system.

**Table 2** Concentrations of pungent compounds extracted from diploid and tetraploid ginger rhizomes (% as dry weight of the ginger)

Compounds	Diploid	Tetraploid
[6]-Gingerol	0.74 ± 0.07	0.64 ± 0.03
[6]-Dehydroparadol	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Zingerone	tr	tr

tr: peak area less than 0.005% (almost undetected).  
Each value is the mean ± SE for 5 samples.

compound of ginger rhizomes but an artifact derived from gingerols. The content of pungent compounds in diploid ginger was not significantly different from that in tetraploid ginger. In direct taste and scent observations, we did not sense any difference in pungency.

In this study, the volatile and pungent compounds from rhizomes of tetraploid ginger were investigated for the first time. In a review article, DHAWAN and LAVANIA showed that the productivity of secondary metabolites was enhanced in many cases of induced polyploids<sup>22)</sup>. However, our results indicated that the secondary metabolites in the rhizomes of tetraploid gingers were quite similar to those of diploid gingers, presenting only some minor quantitative differences. The induced tetraploid ginger has several advantages over diploid ginger, such as enhanced pollen fertility, germinability and size<sup>9)~11)</sup>. In terms of supplementing human diets with these secondary metabolites, the rhizomes of tetraploid ginger should be useful for the field of pharmaceuticals, as well as foods. Further studies are required regarding the secondary metabolites of tetraploid ginger.

**Acknowledgement** This study was supported by a subsidy from the Urakami Foundation.

### References

- ZARATE, R. and YEOMAN, M. M. : Studies of the cellular localization of the phenolic pungent principle of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. *New Phytol.*, **126**, 295~300 (1994)
- COE, F. G. and ANDERSON, G. J. : Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Econ. Bot.*, **50**, 71~107 (1996)
- JEENA, K., LIJU, V. B. and KUTTAN, R. : Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 51~62 (2013)
- FRIEDMAN, M., HENIKA, P. R. and MANDRELL, R. E. : Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, **65**, 1545~1560 (2002)
- MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L., GONÇALVES, M. J., DA CUNHA, A. P., VILA, R., CAÑIGUERAL, S., MAZZONI, V., TOMI, F. and CASANOVA, J. : Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tomé e Príncipe. *Planta Med.*, **67**, 580~584 (2001)
- KIKUZAKI, H. and NAKATANI, N. : Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.*, **58**, 1407~1410 (1993)
- YAMAHARA, J., HATAKEYAMA, S., TANIGUCHI, K., KAWAMURA, M. and YOSHIKAWA, M. : Stomachic principles in ginger. II. Pungent and anti-ulcer effects of low polar constituents isolated from ginger, the dried rhizoma of *Zingiber officinale* Roscoe cultivated in Taiwan. The absolute stereostructure of a new diarylheptanoid. *Yakugaku Zasshi*, **112**, 645~655 (1992)
- YAMAHARA, J., MATSUDA, H., YAMAGUCHI, S., SHIMODA, H., MURAKAMI, N. and YOSHIKAWA, M. : Pharmacological study on ginger processing. I. Antiallergic activity and cardiostimulatory action of gingerols and shogaols. *Natural Medicines*, **49**, 76~83 (1995)
- ADANIYA, S. and SHIRAI, D. : In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci. Hortic.*, **88**, 277~287 (2001)
- ADANIYA, S. : Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. *Sci. Hortic.*, **90**, 219~226 (2001)
- OKADA, M. and MATSUMOTO, M. : Induction of tetraploid ginger by tissue culture technique. *Bull. Kochi Agric. Res. Ctr.*, **2**, 37~40 (1993)
- CONNELL, D. W. and JORDAN, R. A. : Composition and distinctive volatile flavour characteristics of the essential oil from Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). *J. Sci. Fd Agric.*, **22**, 93~95 (1971)
- NISHIMURA, O. : Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution

- analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2941~2945 (1995)
- 14) MITIKU, S. B., SAWAMURA, M., ITOH, T. and UKEDA, H. : Volatile components of peel cold-pressed oils of two cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) from Ethiopia. *Flavour Fragr. J.*, **15**, 240~244 (2000)
- 15) AGARWAL, M., WALIA, S., DHINGRA, S. and KHAMBAY, B. P. : Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Manag. Sci.*, **57**, 289~300 (2001)
- 16) SURH, Y. J. and LEE, S. S. : Enzymatic reduction of xenobiotic  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones: formation of allyl alcohol metabolites from shogaol and dehydroparadol. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **84**, 53~61 (1994)
- 17) KEUM, Y. S., KIM, J., LEE, K. H., PARK, K. K., SURH, Y. J., LEE, J. M., LEE, S. S., YOON, J. H., JOO, S. Y., CHA, I. H. and YOOK, J. I. : Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Letters*, **177**, 41~47 (2002)
- 18) LOCKSLEY, H. D., RAINEY, D. K. and ROHAN, T. A. : Pungent compounds. Part I. An Improved synthesis of the paradols (alkyl 4-hydroxy-3-methoxyphenethyl ketones) and an assessment of their pungency. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3001~3006 (1972)
- 19) PATAR, A., NISHIKAWA, K., TANAKA, N., ISHIMARU, K. and MAEDA, H. : Antibacterial activities of extracts and constituents in the complex of tea catechins and soybean protein. *Jpn. J. Food Chem.*, **10**, 161~164 (2003)
- 20) SASIDHARAN, I., VENUGOPAL, V. V. and MENON, A. N. : Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivars from Sikkim. *Nat. Prod. Res.*, **26**, 1759~1764 (2012)
- 21) SUGA, T. and SAKAMURA, F. : Essential oil constituents of ginger rhizomes -*In vivo* and *in vitro* propagated ginger rhizomes-. *Koryo*, **156**, 65~73 (1987)
- 22) DHAWAN, O. P. and LAVANIA, U. C. : Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, **87**, 81~89 (1996)

## 二倍体および四倍体ショウガの 二次代謝成分

西川和孝\*<sup>1</sup>・石丸幹二\*<sup>2</sup>・藤岡稔大\*<sup>3</sup>

後藤昌弘\*<sup>4</sup>・今堀義洋\*<sup>5</sup>・田中章江\*<sup>6</sup>

\* 1 鳴門教育大学学校教育学部

(〒772-8502 徳島県鳴門市鳴門町高島字中島748)

\* 2 佐賀大学農学部

(〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄1)

\* 3 福岡大学薬学部

(〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1)

\* 4 神戸女子大学家政学部

(〒654-8585 兵庫県神戸市須磨区東須磨青山2-1)

\* 5 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

(〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1)

\* 6 徳島大学プロジェクトマネージメントオフィス

(〒770-8506 徳島県徳島市南常三島2-1)

二倍体および四倍体ショウガの二次代謝成分である香氣成分と辛味成分の分析を行った。四倍体ショウガはコルヒチン処理によって作出したものをを用いた。GCおよびGC-MS分析によって、二倍体および四倍体ショウガの香氣成分組成は、ほとんど差異がないことが明らかとなった。また、四倍体ショウガ根茎から辛味成分を単離・精製し、化学的構造解析を行った結果、[6]-gingerolおよび[6]-dehydroparadolと同定することができた。HPLC分析によって、[6]-gingerolおよび[6]-dehydroparadolともに二倍体および四倍体ショウガ間で含量に有為な差は認められなかった。そのため、栽培上の利点や大型化による商品性の向上を示す四倍体ショウガは、二倍体ショウガのよい代替え物になる可能性を示すことができた。  
(平成25年9月18日受付, 平成26年2月17日受理)

# Changes in Vitamin C Content of Different Parts of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) After Cooking

NAKASHIMA Nana\*<sup>§</sup>, HIRATA Saki\*, SHIRATSUCHI Hideki\*,  
KITANO Naoko\* and MATSUZOE Naotaka\*

\* Prefectural University of Kumamoto, 3-1-100 Tsukide, Higashi-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 862-8502

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) has a high vitamin C (VC) content, which can be reduced during the cooking process. We therefore compared two methods, vacuum cooking and boiling, with respect to changes in VC content. We cut the broccoli, and divided it into 4 edible parts: the florets, branches, and inner and outer parts of the stalk. Thereafter, we applied the two cooking methods to the prepared broccoli samples, and analyzed the VC content using the post-column derivatization method. Samples were analyzed for total VC content/100g fresh weight. For raw samples, the VC content was greatest in the branches, followed by the inner stalk, florets, and outer stalk. Significantly more VC remained after vacuum cooking than boiling in all 4 parts based on the reduced VC content eluted out under vacuum cooking ( $p < 0.01$ ). The sterilization process before vacuum-sealed packaging reduced the VC content in florets, whereas sterilization of the other 3 parts (branches, inner stalk, and outer stalk) showed minimal reduction of VC content ( $p < 0.05$ ). We concluded that the major factors maintaining VC content during vacuum cooking are control of the outflow of VC in the cooking water and deactivation of enzyme decomposition of VC by sterilization.

(Received Aug. 21, 2013 ; Accepted Jan. 30, 2014)

**Key words** : broccoli, stalk, vacuum cooking, sterilization, vitamin C

ブロッコリー, 茎, 真空調理法, 表面殺菌, ビタミンC

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is a bright-green colored vegetable belonging to the Cruciferae family and originates from the eastern Mediterranean area. It is high in vitamins and minerals, and in particular, contains high levels of vitamin C (VC), carotene, calcium, and iron<sup>1)</sup>. The stalk of the broccoli, which also contains abundant nutrients, can be eaten as well as the florets, thus reducing kitchen waste<sup>2)</sup>. Cooking vegetables changes, often detrimentally, the nutrient composition depending on the cooking procedure used, such as washing, cutting, boiling, exposure to air, heating, and others<sup>3)~5)</sup>. Studies on cooking methods have shown that the method influences nutritive values and functional ingredients of food items differently<sup>6)</sup>. For example, vacuum cooking has several merits compared to boiling: the nutrient loss is lower, and less seasoning is necessary<sup>7)</sup>. Additionally, vacuum cooking allows food items to retain more water, resulting in softened food items without becoming mushy through boil-collapse<sup>7),8)</sup>. Refrigerating the products of vacuum cooking allows

for immediate re-heating as needed; hence, it is hygienic, preserves the food, and is suitable for pre-prepared cooking.

MIKAEL<sup>9)</sup> studied the maintenance of vitamins and sensory evaluation after cooking of broccoli, and showed that both functional and color characteristics were better maintained by vacuum cooking than by boiling, but the results of this study were not conclusive. Thus, in this study we observed the effects of vacuum cooking on broccoli VC, and compared vacuum cooking and boiling for each edible section of the broccoli head.

## Materials and methods

### 1. Materials

Broccoli heads grown in Kumamoto prefecture were purchased in October and December of 2012. They were cut and divided into 4 parts: florets, branches, inside section of the stalk, and outside section of the stalk (Fig.1). Florets were cut into 10~13g units, and branches prepared through the same procedure. The inside section of the stalk was

§ Corresponding author, E-mail: nana-na@pu-kumamoto.ac.jp

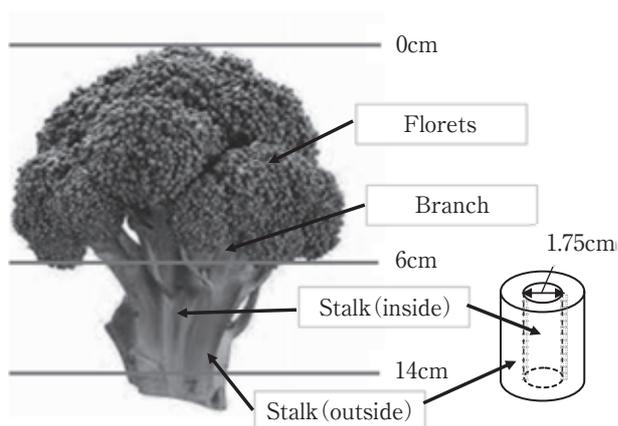


Fig. 1 Schematic representation of procedure used for sampling

hollowed out in units of 5g with a cork borer, and the remainder of the stalk labeled as the outside section. Samples from 4~8 different broccoli heads were used to eliminate the influence of individual differences. A flow chart describing this study is shown in Fig. 2.

## 2. Sample preparation

For samples without heat treatment (raw samples), VC was measured immediately on the day samples were prepared. Samples were refrigerated in centrifuge tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The day before measurements, 10 ml of 2% metaphosphoric acid was added, and samples thawed in a refrigerator at  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 3. Cooking processes

(1) **Boiling conditions** The temperature in the cooking room was kept at  $10^{\circ}\text{C}$  or less. Water ( $10\times$  broccoli weight) was added to a stainless steel pot ( $18\text{ cm} \times 7\text{ cm}$ ) and boiled over a high flame. The broccoli sample was then placed in the pot and heated for 3 minutes using an electromagnetic cooker [IC-D10B (W); Sanyo, Ltd.]. The cooker was used as it automatically controlled conditions such as time and temperature. As soon as the broccoli was boiled, it was removed and placed on filter paper (No. 2) to remove surface water. The weight of both the boiled broccoli and the cooking water was then measured. The temperature was maintained at  $95^{\circ}\text{C}$  throughout heating for precise comparison of results between experiments.

(2) **Vacuum cooking conditions** The temperature in the cooking room was kept at  $10^{\circ}\text{C}$  or less. For surface pasteurization, broccoli was placed in water at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds for sterilization. Broccoli was

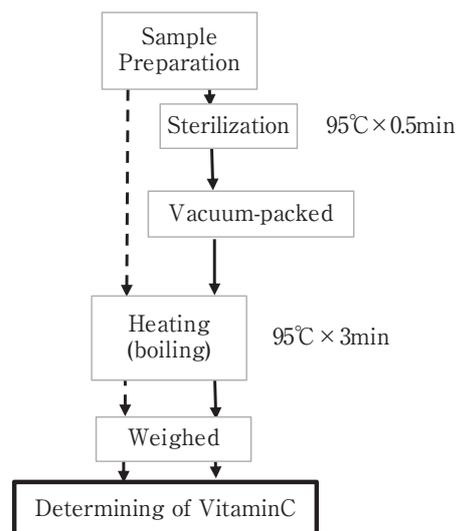


Fig. 2 Thermal processing (boiling and vacuum cooking)

--- : boiling  
 — : vacuum cooking

then placed in a vacuum-sealed package containing 1/3 of its weight in water.

For vacuum sealing, a vacuum packaging machine (ME100B1; CHUBU Corp. Ltd.) was used with SX 20-B films (Asahi-Kasei Packs Corp. Ltd.), where the degree of vacuum was 99.6% and 3 mmHg. Packaged samples were then boiled under the same conditions as above. Cooking water and solid samples from both vacuum cooking and boiling were refrigerated in centrifuge tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$  before VC analysis.

## 4. Ascorbic acid assay

For the following procedures, the temperature was maintained at  $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ . Samples of 3 types as raw samples and from 4 sections (florets, branch, inside section, and outside section) were prepared for vacuum cooking and boiling. The weight of each sample was adjusted to 5g per experiment, and the following procedure repeated 8 times. Two types of metaphosphoric acid were prepared: 4% (5 ml) and 2% (10 ml). Samples were homogenized with metaphosphoric acid for 30 seconds at 20,500 rpm. The homogenate was then centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . For each sample, 1 ml of supernatant was removed and homogenized with 4 ml of 2% metaphosphoric acid, which was then used for further analysis. For determination of VC, post-column derivatization following previously described methods was used<sup>10</sup>. HPLC analysis was performed using a SHIMADZU LC-10A Liquid Chromatograph with a Shim-pack SCR-102H column ( $300\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ ;

Shimadzu, Ltd.) at 40°C. The mobile phase consisted of acidified distilled water with a flow rate of 1.0ml/min and a sample injection volume of 10µl. Samples were detected at 300nm and expressed as total VC/100g fresh weight (fr. wt).

5. Statistical analysis

To compare VC levels in the 4 sections, 1-way analysis of variance was used (ANOVA, Tukey’s method; p<0.05) to test for significant differences. The data from the 2 cooking procedures were determined by univariate analysis of variance (t-test; p<0.05). IBM SPSS for Windows, Version 18.0 (SPSS Inc.) was used for statistical analysis.

Results and Discussion

In this study, we compared vacuum cooking and boiling with respect to VC in 4 different edible parts of a broccoli head.

1. Comparison of the solid weight of heated samples

As the sample weights were different between boiling and vacuum cooking, the two weights were

compared using the following equation <sup>7)</sup>:

Ratio of solid weight (%) = 100 - [(weight of sample before heating/weight of sample after heating) × 100]

The word “ratio” denotes the result of the above equation. The results of the ratio analysis are shown in Fig.3. For both vacuum cooking and boiling, several changes were observed in solid weight from the excess heat. For 3 parts (florets, inside section, and outside section), variations in the ratio after vacuum cooking were significantly lower than after boiling (p<0.05). The ratio of the florets increased for both boiling and vacuum cooking while the ratio was decreased in the other 3 parts, which may be due to differences in the surface area of florets, which consists of bud crowns. The ratio of the other 3 parts increased, possibly due to sample dehydration, as raw foods generally contain water in the cell walls. In this study, heating of the samples may have caused expansion of the cells, resulting in cell wall breakage and

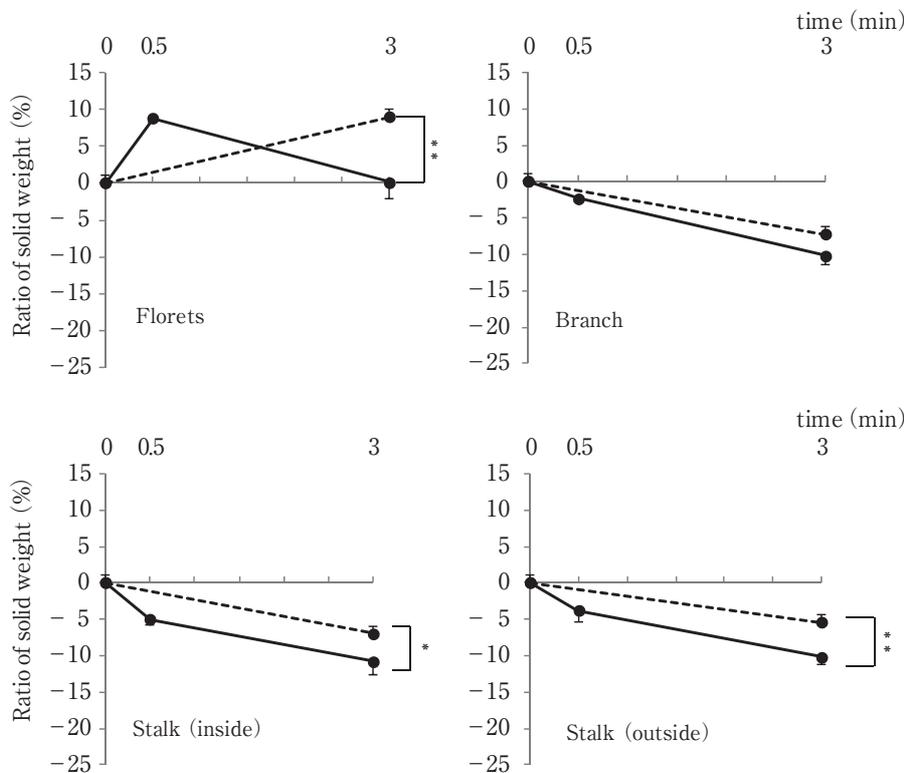


Fig. 3 Ratio of solid weight (%)

Values represent means ±SDs (n=7-8). Ratio of solid weight (%) = 100 - [(weight of sample before heating/weight of sample after heating) × 100].

●-●-● : boiling ; ●-● : vacuum cooking

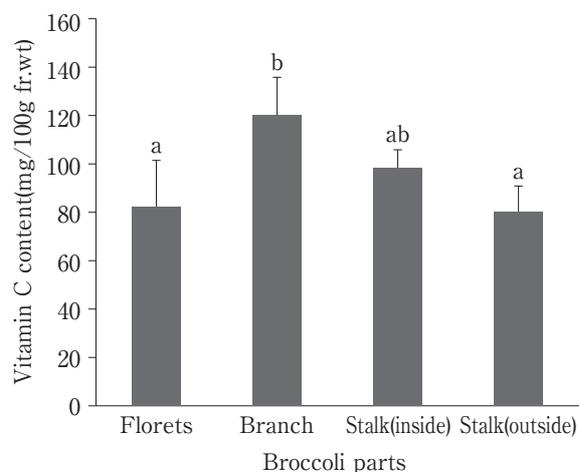
\*values are significantly different based on the Student’s t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

dehydration. In support of this hypothesis, the plant became soft after heating. ALESSANDRINI<sup>11)</sup> identified pectin loss as a reason for this softening, as pectin comprises the lamella and primary cell wall adjoining the cell wall; thus, cohesion may be lost upon cell wall breakage.

## 2. VC content of raw broccoli

Fig.4 indicates the VC level in raw broccoli. VC levels in the branches were 2 times greater than that in the florets and outside section ( $p < 0.01$ ). Most reports on broccoli focus on the florets, while reports on other parts are rare. In our study, we divided broccoli into 4 sections as described above and assayed VC contents for each part via post-column derivatization. The VC content was highest in the branches, followed by the inside section, florets, and outside section, confirming results shown by KUROSU<sup>3)</sup>.

The VC of raw broccoli inflorescence is 120mg/100g, according to the *Standard Tables of Food Composition in Japan Fifth Revised and Enlarged Edition*<sup>12)</sup>. Inflorescence corresponds to both the florets and branches in our study, where the average VC was 101.2mg/100g fr. wt., a difference of 20mg/100g from previously published results. KUROSU<sup>3)</sup> measured VC of broccoli divided into several parts, and reported that the content was 111 mg/100 g  $\pm$  9.3 mg. VC variability may be due to differences in breed rather than seasonal differences, as implied in a previous report<sup>13)</sup>. Thus, the breed of broccoli used in this study may have differed from the breed



**Fig. 4** Vitamin C content of divided parts of raw broccoli

Values represent means  $\pm$  SDs (n = 8).

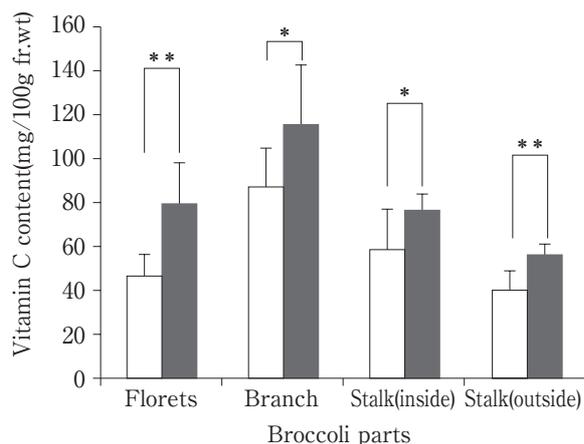
a, b; values with different letters are significantly different by Tukey's test ( $p < 0.01$ ).

used in previous studies<sup>3)</sup>.

## 3. VC content of broccoli sections, cooking water, and sterilization

Changes in VC content in the 4 sections after heating is shown in Fig.5. For each part, the VC level in samples prepared by vacuum cooking was significantly greater than that in samples prepared by boiling ( $p < 0.05$ ). In Fig.6, the VC levels in cooking water from vacuum cooking and boiling are compared. In all sections, the amount of VC eluted from vacuum cooking were significantly less than those from boiling ( $p < 0.01$ ), indicating that vacuum cooking retained significantly more VC than boiling, and that the VC of cooked broccoli was eluted into the cooking water and not decomposed by heating. We know two reports<sup>14),15)</sup> that claim there are primary three process reducing the volume of functional ingredients. Namely, they are decomposition by heating, elution into cooking water by boiling, and decomposition by action of enzyme. It is referred in these reports that decrease of the volume with decomposition by heating is quite small compared to the other two processes. Our data support the above results, implying the usefulness of vacuum cooking with respect to controlling VC outflow into cooking water. Significant decreases in the VC content were seen with the inside and outside section of the stalk, likely influenced by the cutting surface area. The inside and outside of the stalk were separated by cylindrical hollowing out of the stalk. Thus, there was a major difference in vulnerability to outflow between the inflorescence sections and the stalk. Cutting of vegetables causes integral damage, and nutrients such as vitamins and minerals may be eluted into the cooking water upon boiling of the vegetables. Furthermore, such damage can lead to chemical changes in the vegetable due to contact of its components with various enzymes<sup>16)</sup>.

VC contents eluted from vacuum cooking were significantly less in all sections than those with boiling ( $p < 0.01$ ). Based on this result, we can infer that heating does not cause VC decomposition, and that vacuum cooking greatly reduces the outflow of VC into cooking water. We have reported a similar result with potatoes<sup>17)</sup>, and our results coincide with a previous report<sup>18)</sup>. In the previous report by ABE<sup>18)</sup>, they stated that branching did not change chlorophyll content in broccoli, though it reduced VC content and hypothesized that VC content was



**Fig. 5** Vitamin C content of divided parts of broccoli after heating

Values represent means  $\pm$  SDs (n=7-8).

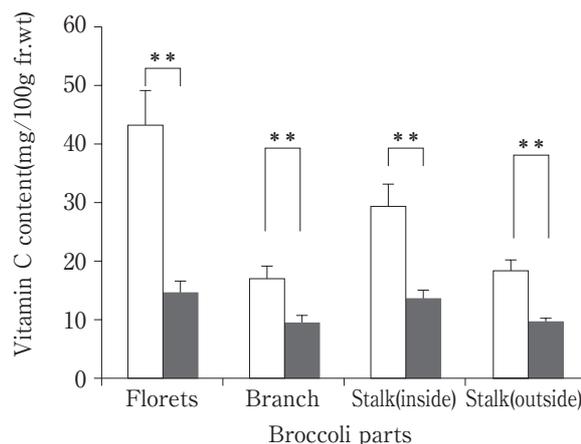
□: boiling; ■: vacuum cooking

\*values are significantly different by the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

reduced due to both heating decomposition and outflow of VC into water. Since VC is water-soluble, VC elutes more easily than other vitamins, which implies that vacuum cooking is an ideal method to prevent VC elution.

The effect of sterilization before vacuum sealing, described in 3-2, is demonstrated in Figs.6 and 7. In Fig.7, a comparison of VC levels in the 4 parts is shown, resulting in 2 significant observations ( $p < 0.05$ ). First, sterilization before vacuum sealing reduced the VC content of florets (Fig.6), and second, for the other three broccoli sections examined, sterilization controlled the reduction in the VC content.

Unfortunately, we could not verify changes in materials that may influence VC content in this article or whether changes in water content may affect VC content. However, we concluded that factors influencing VC content during vacuum cooking were: controlling elution of VC into the cooking water, and deactivation of enzymes that decompose VC by sterilization. We investigated changes in VC content for the 4 sections, focusing particularly on the stalk (inside and outside). The broccoli stalk is often thought to be non-important, and there are few articles on stalk-specific VC content. We therefore examined VC content in this study in the different sections for effective VC usage.

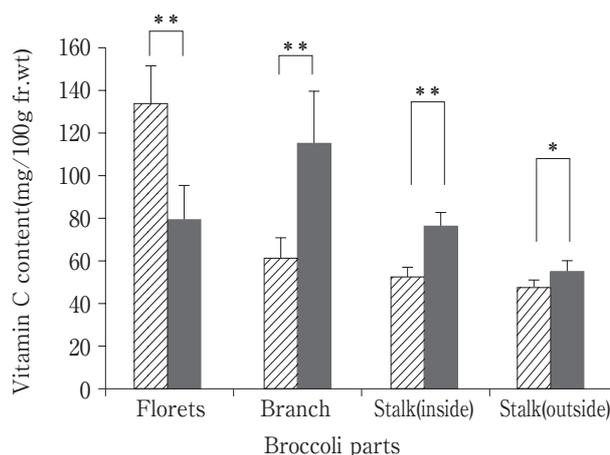


**Fig. 6** Vitamin C content of cooking water

Values represent means  $\pm$  SDs (n=4).

□: boiling; ■: vacuum cooking

\*values are significantly different by the Student's *t*-test (\*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 7** Vitamin C content of divided parts of broccoli after vacuum cooking

Each value is the means  $\pm$  SD (n=8).

▨: non-sterilization; ■: sterilization

\*values are significantly different by the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## Conclusions

Broccoli contains a large amount of VC, and 2 cooking methods were compared to determine their effects on the VC content. We compared vacuum cooking and boiling after dividing the broccoli head into 4 edible sections: florets, branches, inside section of stalk, and outside section of stalk. The 2 methods were then applied to the prepared broccoli using post-column derivatization.

Results were expressed as total VC/100g fresh

weight. For raw samples, the VC content was greatest in branches, followed by the inside section, florets, and outside. Significantly, more VC remained after vacuum cooking than boiling in all 4 parts due to significantly less elution of VC during vacuum cooking ( $p < 0.01$ ). These results suggest that vacuum cooking effectively reduces VC elution from all 4 sections of broccoli. We conclude that factors influencing VC content at vacuum cooking included controlling elution of VC into the cooking water, and deactivation of enzymes that decompose VC by sterilization.

### References

- 1) ZHANG, D. and HAMAIZU, Y.: Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, *Food Chem.*, **88**, 503~509 (2004)
- 2) DAY, G. L., SHOREC, R. E., BLOTB, W. J., MCLAUGHLIN, J. K., AUSTIND, D. F., GREENBERG, R. S., LIPPE, J. M., MARTIN, S. P., SARKAR, S., SCHOENBERG, J. B. and FRAUMENI, J. F.: Dietary factors and second primary cancers: a follow-up of oral and pharyngeal cancer patients, *Nutr. Cancer*, **21**, 223~232 (1994)
- 3) KUROSU, Y., JUJISAWA, M. and OGAWA, S.: Analysis of Vitamin C Content in Each Part of Broccoli, *Journal of human environmental engineering*, **8**, 84~89 (2006)
- 4) KAWAKAMI, A., SASAKI, H. and SUGAWARA, T.: Cooking loss of minerals in "Kizami Diet" -In case of vegetables-, *Journal for the integrated study of dietary habits*, **17**, 141~149 (2006)
- 5) OBA, K.: Enzymatic Studies on the Chemical Changes of Food Materials in Cookery Science, *Japan society of home economics*, **53**, 869~876 (2002)
- 6) YUAN, G., SUN, B., YUAN, J. and WANG, Q.: Effect of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli, *J. of Zhejiang University Science B*, **10**, 580~588 (2009)
- 7) TAMURA, A., SASAKI, M., KINOSHITA, I. and SUZUKI, K.: Effect of Vacuum Packaging on the Boil-collapse of Potatoes, *The Japan Society of Cookery Science*, **39**, 296~301 (2006)
- 8) OHIDE, K., SATO, R. and KONNO, A.: Sensory Attributes by Vacuum Cooking of Potatoes, *Journal of Shokei Gakuin College*, **57**, 1~6 (2009)
- 9) PETERSEN, M. A.: Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets, *Z Lebesm Unters Forsch*, **197**, 375~380 (1993)
- 10) OBA, K., WATANABE, A., KAIMOTO, H., TOMOTO, A. and MORIYAMA, M.: Comparative Study on the Vitamin C Content of Fresh and Cooked Vegetables at Mealtime, *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*, **58**, 499~504 (2011)
- 11) ALESSANDRINI, L., ROMANI, S., ROCCOLI, P., SJOHOLM, I. and DALLA, R. M.: Effect of steam cooking on the residual enzymatic activity of potatoes cv. Agria, *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 2140~2145 (2011)
- 12) KAGAWA, Y.: Standard Tables of Food Composition in Japan Fifth Revised and Enlarged Edition (Kagawa Education Institute of Nutrition, Tokyo), pp.80~81 (2009)
- 13) IKEDA, H., FUJISE, T., MIYAGI, K. and IBARAKI, T.: Effects of Harvest Season on Respiration Rate, Chemical Composition and Quality Stability of Broccoli (*Brassica oleracea* L. italica), *Food preservation science*, **34**, 3~9 (2008)
- 14) TAKENAKA, M., NAKAYAMA, K., ISOBE, S. and MURATA, M.: Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 172~177 (2006)
- 15) TAKENAKA, M., SAOTOME, I., NAKAYAMA, K. and ISOBE, S.: Changes in Phenolic Compounds during Heating a Potato, *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*, **56**, 171~176 (2009)
- 16) NIWA, Y., MORIYAMA, M. and OBA, K.: Change in the Content of Antioxidants in Plant Food Materials after Vacuum Cooking, *Japan Society of Cookery Science*, **40**, 257~265 (2007)
- 17) NAKASHIMA, N., HAMADA, T., MATSUZOE, N., KITANO, N. and SHIRATSUCHI, H.: Effect of vacuum cooking on the vitamin C and texture of potatoes, *Journal of the Japanese Society of Taste Technology*, **11**, 29~34 (2012)
- 18) ABE, K., KAETSU, K. and ACHIWA, N.: Effects of Cutting and Blanching on the Chlorophyll and Ascorbic Acid Contents in Some Vegetables, *Food Preser. Sci.*, **39**, 207~212 (2013)

## 真空調理におけるブロッコリーの 部位別ビタミンC含有量の変化

中嶋名菜\*・平田 咲\*・白土英樹\*

北野直子\*・松添直隆\*

\* 熊本県立大学環境共生学部

(〒862-8502 熊本県熊本市東区月出3-1-100)

野菜の栄養成分は、洗浄・切断・ゆで・加熱などの調理操作段階で損失することが知られている。特に、水溶性であるビタミンC（以下、VC）は、ゆで水に溶け出すため注意が必要である。ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*) はVCが豊富で栄養的に優秀な食材である。本研究ではブロッコリーの可食部（花蕾、花茎、茎の内側、茎の外側）のVC含有量、ならびに調理操作によるVC残存量を調査した。通常調理法は試料重

量の10倍の沸騰水中（ゆで水）で約95℃で3分間加熱した（ゆで加熱）。真空調理法は試料と試料重量の1/3に相当する水をフィルムに入れ真空包装し、通常調理法と同様に加熱した。VCの定量はHPLCポストカラム誘導体法を用いた。未調理のブロッコリーのVC含量は、花茎、茎の内側、花蕾、茎の外側の順で高かった。調理後のVC含量は真空調理法が通常調理法（ゆで加熱）に比べすべての部位で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。VCのゆで水への溶出量は真空調理法では通常調理法（ゆで加熱）に比べてすべての部位で有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。真空調理の表面殺菌の有無によるVC含量は、花蕾以外のすべての部位で表面殺菌有りのほうが有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。以上のことから、真空調理法による各試料のVC量は通常調理法（ゆで加熱）に比べて高く、優位性が示された。

(平成25年8月21日受付, 平成26年1月30日受理)

# 青果物の輸送時における 衝撃ストレス応答解析に関する生理学的研究

平成25年度日本食品保蔵科学会奨励賞

タンマウォン マナスイカン\*§

\* 農研機構食品総合研究所

## Postharvest Physiological Study on the Stress Response Mechanism of Fresh Produce during Transportation

THAMMAWONG Manasikan\*§

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

**Key words** : fresh produce, impact stress, response mechanism, gene expression

青果物, 衝撃, ストレス応答, 遺伝子発現

### 1. はじめに

収穫, 調製, 選別, 包装, 荷役, 輸送, 保管・貯蔵などにおいて発生する圧迫, 静荷重, 振動, 衝撃などは, 青果物に物理的ストレスを与え, 損傷を生じさせる。易損傷性の青果物は, これらの物理的ストレスを受けると外部(表層)や内部に傷害が生じるとともに, 生理的および化学的にも大きく影響を受け, 代謝変動や品質変化をきたす。損傷を生じない作業, 包装, 輸送などの条件解明, ならびに, 損傷耐性品種の開発などのためには, 収穫時および収穫後の流過程で生じる物理的ストレス・損傷と, その品質への影響を定量化する必要がある。加えて, 物理的ストレス・切断傷害を受けた青果物では, ささまざまな生理的・化学的变化が生じ, 栄養・機能性成分や嗜好特性を変化させることから, その影響を最小化するための保存手法の開発が不可欠である。

### 2. 植物の環境ストレス

環境ストレスは, 植物の生育, 発達, 生産性に悪影響を与える外的因子である。環境ストレスには, 生物的なものと非生物的なものがある。移動能力をもたない植物は, ささまざまな環境条件下に柔軟に対応する機構, すなわち, 高温, 乾燥, 接触, 荷重, 昆虫, 病原菌などのストレスによる阻害を最小限に抑えるために, 各ストレスに応じたシグナルを出し, 代謝反応, 遺伝子発現などをその状況に合わせて変動させる生理的適応能力をもって

いる<sup>1)~5)</sup>。生育中の植物においては, 細菌やウイルス, 真菌などの生物的脅威に対する防御手段である全身獲得抵抗性(Systemic Acquired Resistance, SAR)が植物体全体のストレス耐性を高める重要な働きをもっている。すなわち, ある部位に生じた生物的ストレスが, 植物体全体の生物的ストレスへの耐性を高める働きがある。

一方, モデル植物等による研究から, 環境ストレス, 病害, 傷害への応答は, それぞれアブシジン酸(ABA), サリチル酸(SA), ジャスモン酸(JA)によって制御されていること, また, それらが互いに拮抗的に作用することが明らかにされている。例えば, 植物においてSARと, 温度・乾燥・塩分などの物理的ストレスに対する抵抗性とが拮抗関係にあることが知られている。すなわち, 傷害を受けると, 病害および環境ストレスに対する耐性が低下すると考えられる<sup>6)</sup>。

### 3. 収穫後青果物における 環境ストレス応答と品質変化

収穫後青果物においては, SARに基づく微生物侵襲耐性などストレス応答が品質保持の観点からポジティブに作用する場合もあるが, ネガティブに作用する場合もある。つまり, 収穫後の青果物では, 傷害が生じた部分だけではなく, 離れた部分でのストレス応答を引き起こし, 結果として, 全体の品質低下を招くことも考えられる(図1)。すなわち, 収穫後の青果物が傷害を受けると, 傷害により誘導される品質低下(Wound-induced

\* 〒308-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

§ E-mail: manasika@affrc.go.jp

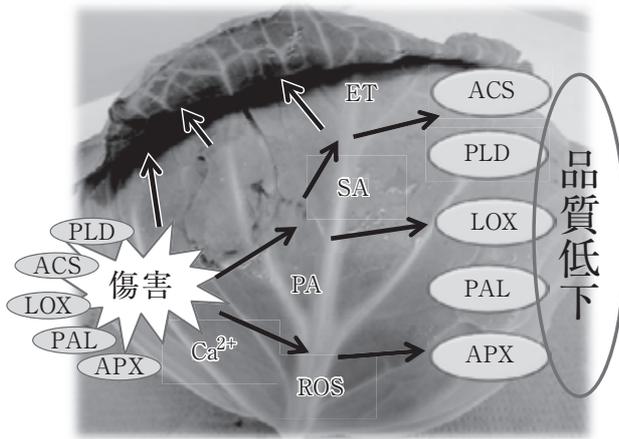


図1 収穫後の青果物における傷害により誘導される品質低下 (Wound-induced Local/Systemic Deterioration, WLSLD)

Local/Systemic Deterioration, WLSLD) が生じることが懸念される。

このように、物理ストレスは、青果物において直接の損傷のみならず、ストレスに起因するその後の品質変化にも影響を及ぼすと考えられることから、その応答解析は品質保持技術の開発において重要である。

#### 4. 青果物の衝撃ストレス応答に関する生理学的研究

青果物のバルク物流技術の開発の一環として、バルク輸送を想定した落下衝撃がトマトとキャベツのストレス応答および品質変化に及ぼす影響について検討した。バルクコンテナ物流においては、温度、湿度、ガス組成の変動などに加えて、振動、衝撃、傷の発生などがストレス要因となる。

モデル植物を用いた研究から、これらのストレス因子が発生した場合、細胞膜のレセプターにおいてストレスが認識され、化学的、生化学的ネットワークに状態変化を生じることが知られている。すなわち、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の急増、カルモジュリンなどのカルシウム結合性たんぱく質の活性化、活性酸素等のラジカルの発生、核内遺伝子の発現変動、たんぱく質・酵素の生成などが連鎖的に発生する<sup>7)~16)</sup>。それらの変動に伴って、結果として青果物の品質低下が進行することになる (図2)。

##### (1) 傷害によるキャベツのストレス応答の遺伝子発現変動

キャベツについて、コルクボーラーを用いて傷害処理を施した際のストレス応答を、数種遺伝子の発現解析により検討した<sup>17)~18)</sup>。また、図3Aのように、キャベツ最外葉から2cmのコルクボーラーで切り出したサンプルを乾燥を防いで保存し、さらに、1cmのコルクボーラーでくりぬいた中心部とその周辺部に分けて遺伝子発現解析を行い、受傷部とその周辺部におけるストレス応答を評

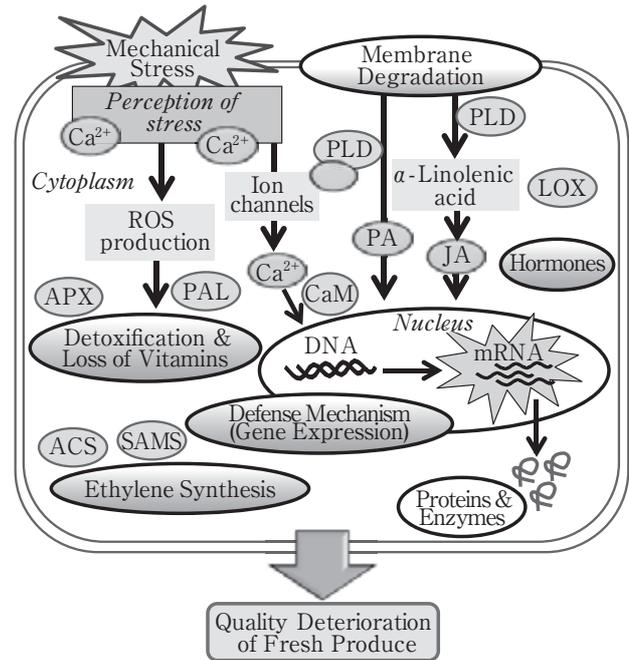


図2 物流過程における青果物の物理ストレス応答と品質変化

価した。ここでは、カルシウム結合性たんぱく質の1つであるカルモジュリンのアイソフォームのうちの *BoCam1*、およびホスホリパーゼDのアイソフォームの1つである *BoPLD2* の発現解析結果を図3Bに示す。傷害部位においてストレス応答遺伝子の発現変化がみられるとともに、直接傷害を受けていない部位においても、ストレス応答遺伝子の発現変化がみられた。また、遺伝子発現レベルは、ストレスの種類、遺伝子の種類、経過時間に依存して変動した (図3B)<sup>19)</sup>。

##### (2) 微小落下によるトマト‘桃太郎’のストレス応答

エチレンは、ストレス応答にかかわる植物ホルモンであり、トマトにおいてはエチレンの前駆体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) の合成反応がエチレン生成の律速段階であることが知られている。そこで、緑熟トマトについて、落下衝撃ストレス (高さ5cmから赤道部をコンクリート床へ落下) と、ACC合成酵素 (ACS) 遺伝子の発現との関係を詳細に調査した。その結果、*Le-ACS1A*、*Le-ACS2*、*Le-ACS4*、*Le-ACS6* の4つのアイソフォームのうち *Le-ACS2* が落下ストレスに大きく関与していることを明らかにした。また、*Le-ACS2* の発現が、落下部位からの果実表面上の距離にほぼ反比例することも明らかにした (図4)<sup>20)</sup>。

衝撃を含む物理的ストレスは、園芸農産物の生理・生物的特性を変化させ、その結果、食味、外観品質などに大きな影響を及ぼす。そこで、微小落下衝撃が緑熟トマトの呼吸速度、エチレン生成速度に及ぼす影響について検討した。初めに、実験途中でのクライマクテリックによる呼吸速度、エチレン生成速度の変化の影響を排除するため、収穫直後のエチレン生成速度から、熟度を詳細

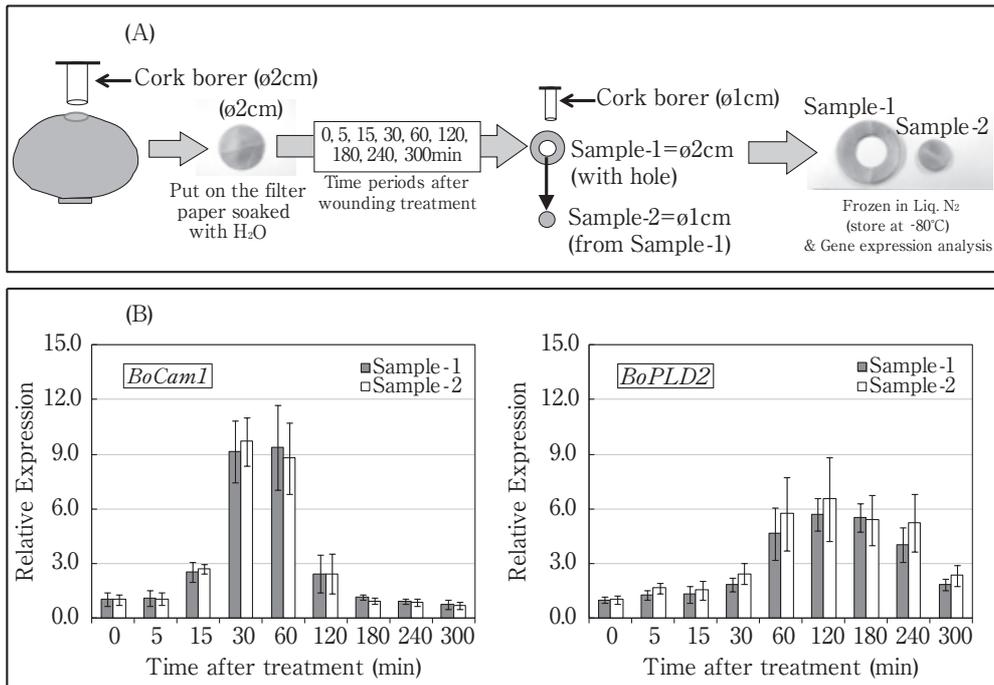


図3 キャベツの傷害ストレス応答の遺伝子発現解析

(A) キャベツ最外葉から2 cmのコルクボーラーで切り出したサンプルを乾燥を防いで保存し、さらに、1 cmのコルクボーラーでくりぬいた中心部とその周辺部に分けて遺伝子発現解析を実施。  
 (B) コルクボーラーを用いて傷害処理 (図3 A) を施した際のストレス応答の遺伝子発現変動。

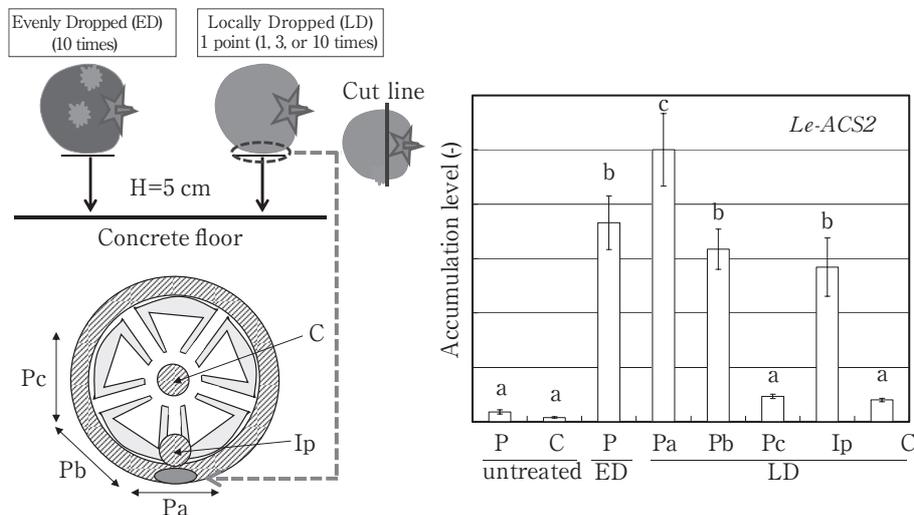


図4 落下ストレス (高さ5 cmからの赤道部をコンクリート床へ落下) とトマトのACC合成酵素遺伝子 (*Le-ACS2*) の発現との関係

・正確に評価することを試みた。その結果、収穫直後のエチレン生成速度が8.2nmol/kg/h以下であれば、48時間の実験中にクライマクテリックライズに至らず、緑熟状態が維持されることが明らかになった。

このスクリーニング手法により、実験期間中に緑熟状態が維持されることが確認されたトマトを、5 cmの高さからコンクリート床へ1, 3, 10回落下処理した。このごく小さな落下衝撃にもかかわらず、トマトの呼吸速度、

エチレン生成速度は顕著に上昇した。興味深いことに、エチレン生成速度は1回のみの落下によっても上昇し、その程度は、呼吸速度のそれと比べて大きかった。さらに、落下処理前にエチレン作用阻害剤である1-MCPを処理した場合であっても、呼吸速度とエチレン生成速度の上昇は抑えられなかった。

これらの結果と、落下処理した果実において目視による損傷が確認されなかったことから、エチレン生成は、

落下処理によるトマトの生理的变化を最も顕著に示す指標であると考えられた。したがって、エチレン生成速度は、トマト果実における物理的ストレスの発生を敏感に検出する重要な指標として位置づけられる。加えて、収穫時のエチレン生成速度は、トマトに関して化学的、物理的な処理が代謝や品質に及ぼす影響を解明する研究において、正確で均一な熟度の果実を選択するための有効な指標であると考えられた。

さらに、同じ落下処理に伴うトマトの呼吸速度およびエチレン生成速度の変化について解析し、1~10回の範囲で落下回数が多いほど変化程度が大きいことを明らかにした(図5)<sup>21)</sup>。

### (3) 落下衝撃がキャベツの生理的・化学的特性および遺伝子発現に及ぼす影響

収穫後のキャベツにおいて、落下処理が処理直後の呼吸速度の上昇と、保存中の糖含量の減少に及ぼす影響に

ついて検討した。

キャベツのバルクハンドリング時の衝撃を想定して、平面剛性体(コンテナ底面を模擬)への落下高さを10, 20, 40, 80cm(図6A)としたときの呼吸速度の経時変化を図6Bに示した。呼吸速度は、落下直後に落下高さに応じて増大した後、1日後にはコントロールと差がないレベルに低下していることが分かる。また、糖含量は、3日後まで落下処理による大きな変動は認められないものの、貯蔵6日後に落下高さが40cmでコントロールと比べて含量低下が有意であることがわかる(図6C)<sup>22)</sup>。

一方、CA環境を含めた適切な環境の維持によりストレスの軽減と品質劣化の抑制が可能であるかどうかについて検討を行った<sup>22)</sup>。平面への落下高さが20cmと80cmを比較すると、80cmで呼吸速度の上昇が顕著であり、落下高さを20cm程度以内に抑える必要があることがわかった

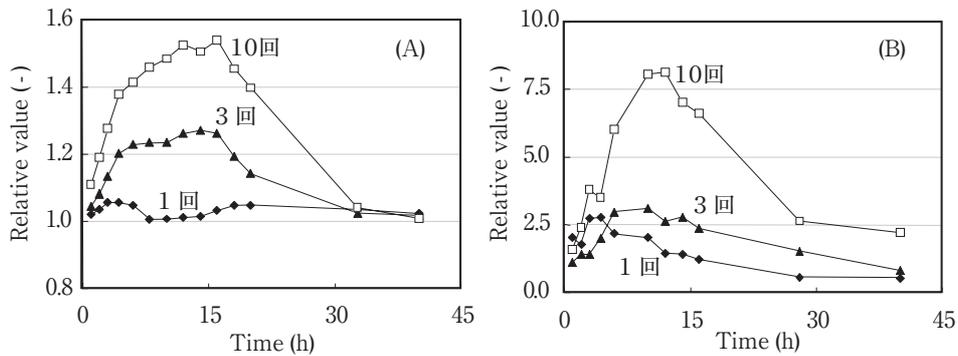


図5 落下処理がトマトの呼吸速度 (A) およびエチレン生成速度 (B) の変化に及ぼす影響

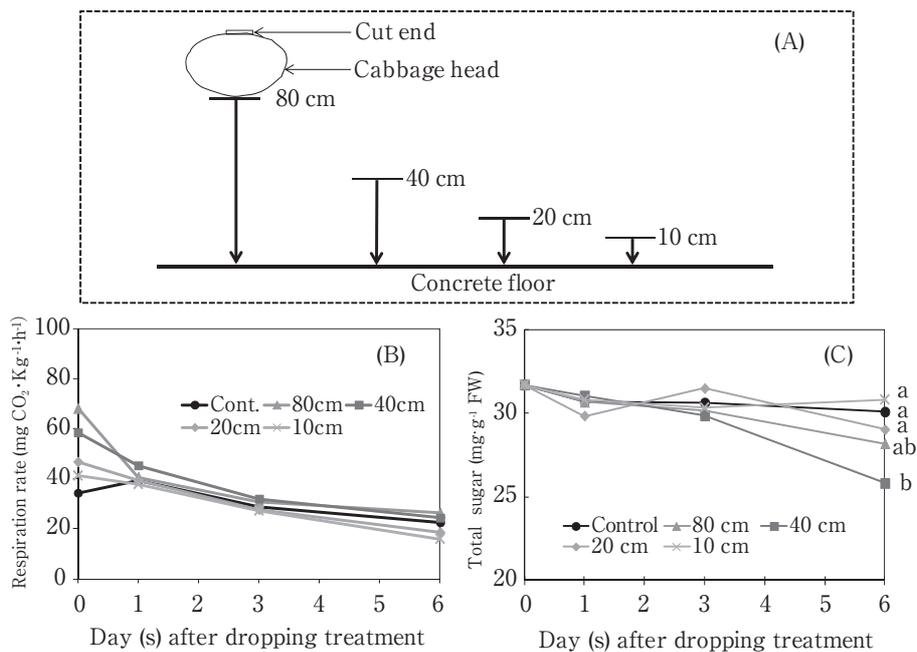


図6 落下処理後の保蔵キャベツの呼吸速度, 糖含量変化

(A) 落下処理条件, (B) 呼吸速度変化, (C) 糖含量変化

(図7A)。同じ落下処理を施した試料を、CAガス環境下に保蔵した時の呼吸速度変化から、CA環境下では落下ストレスによる呼吸速度の上昇が大幅に抑制されることがわかった(図7B)<sup>22)</sup>。

次に、コンテナに先に入ったキャベツの切り口に後から入ったキャベツの頂部が当たる状態を再現するために、切り口を模擬した円柱形コルク(周囲にはゲル状の保冷剤を配置)へ落下処理(図8A)した。落下処理キャベツからサンプリングした試料(図8B)を用いて、数種遺伝子の発現解析を行った<sup>23),24)</sup>。ここでは、ストレスで生じる過酸化水素の還元作用を示すアスコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソフォームである*BoAPX 2*について、コルクによる受傷部とその周囲における発現レベル

の変化を測定した結果を示す(図9)。コルクへの落下で生じる傷が原因となり、ストレス応答遺伝子*BoAPX 2*の発現レベルが増大した。なお、落下高さが5cmであっても発現レベルが増大したことから、傷害を引き起こしやすい落下を防止することの重要性と、遺伝子発現解析による低レベルストレスの高感度評価の可能性が示された。

### 5. おわりに

以上のように、モデル植物におけるストレス応答研究による最近の知見を活用し、遺伝子発現解析手法、ガス代謝解析手法等を駆使して、振動、落下などの物理ストレスによる青果物の生理変化への影響を迅速に評価する

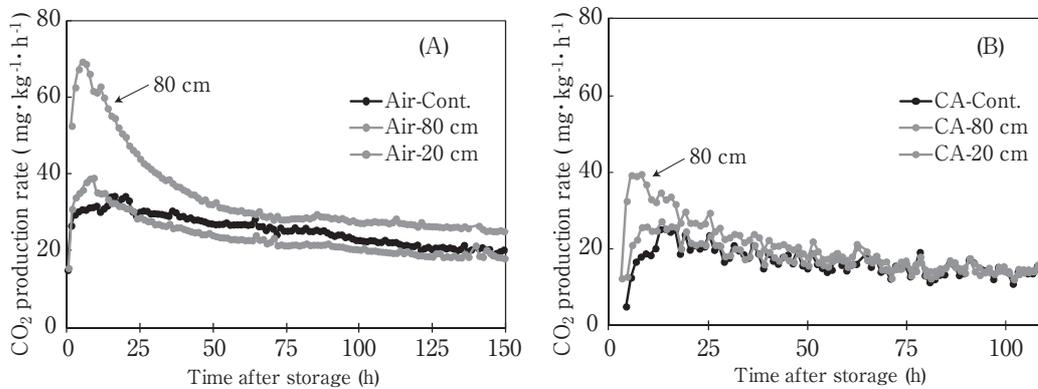


図7 平面落下処理後のキャベツの呼吸速度変化  
(A) 大気下, (B) CAガス環境下

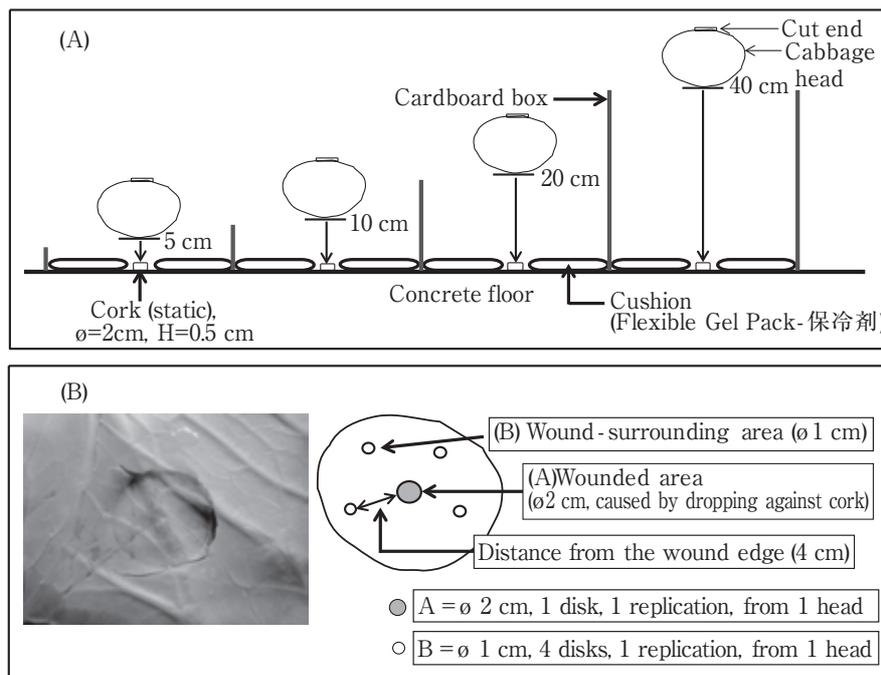


図8 落下高さがキャベツの衝撃応答に及ぼす影響の解析方法  
(A) 落下処理の方法(コルクと保冷剤により下段キャベツをモデル化)  
(B) 落下処理による受傷部写真(左)とサンプリング方法(右)

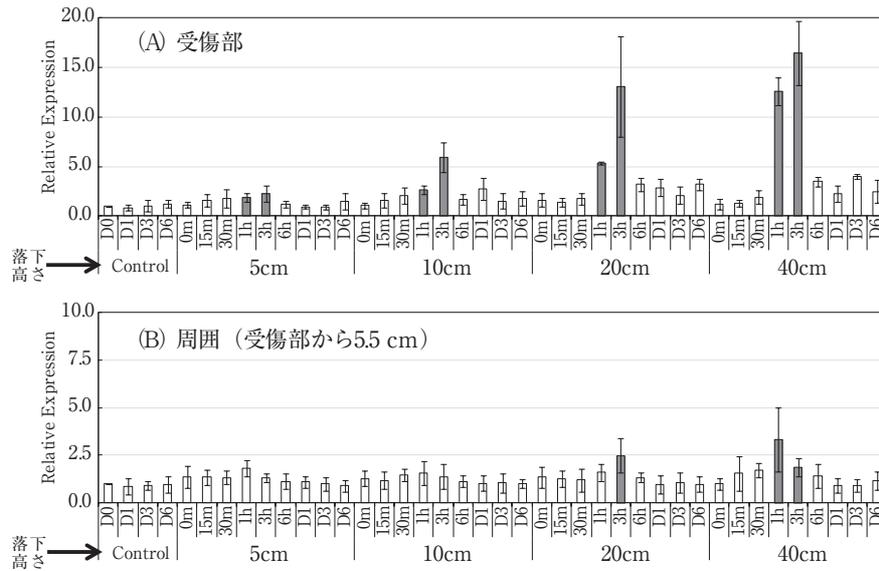


図9 落下処理によるキャベツの受傷部とその周囲におけるBoAPX2の発現レベルの経時変化

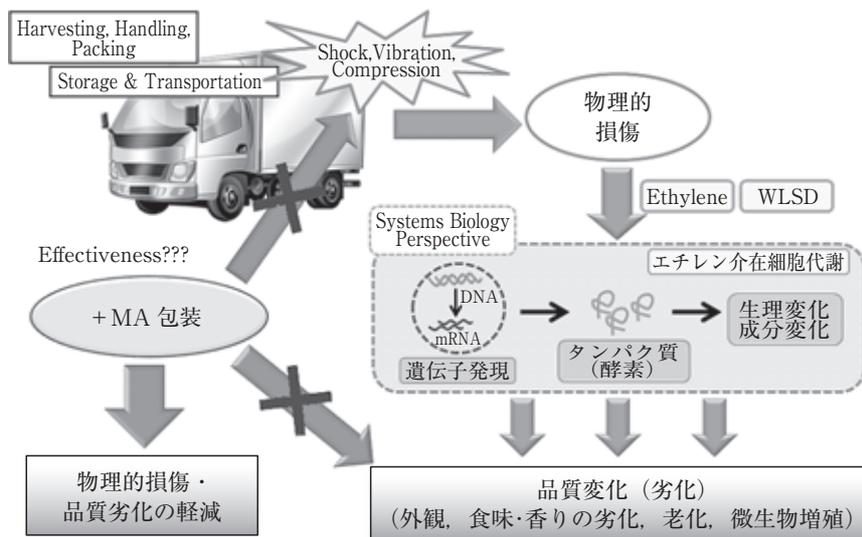


図10 MA包装が振動等の物理的ストレスによる品質変動を抑制する効果に関するシステム生物学的研究

手法の開発、および開発手法によるストレスの限界条件の解明に取り組み、品質上の問題を生じることのないコンテナ形状、品質変動を最小化するためのハンドリング条件（積載条件、輸送振動条件）等を解明した。

現在、JSPS外国人特別研究員制度により、青果物の品質保持技術の開発を目的として、MA包装が振動等の物理的ストレスによる品質変動を抑制する効果について、特にエチレンを介した代謝変動に着目した、システム生物学的研究を推進している（図10）。

#### 文 献

- 1) BRAAM, J. : In touch : plant responses to mechanical stimuli, *New Phytologist*, **165**, 373~389 (2005)
- 2) WALLY, J. W., COUGHLAN, S., HUDSON, M. E., COVINGTON, M. F., KASPI, R., BANU, G., HARMER, S. L., and DEHESH, K. : Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element, *PLoS Genetics*, **3** (10), e172 (2007)
- 3) 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)
- 4) PORAT, R., PAVONCELLO, D., BEN-HAYIM, G., and LURIE, S. : A heat treatment induced the expression of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport gene (*cNHX1*) in citrus fruit, *Plant Sci.*, **162**, 957~963 (2002)

- 5) PASTUGLIA, M., ROBY, D., DUMAS, C., and COCK, J. M. : Rapid Induction by Wounding and Bacterial Infection of an *S* Gene Family Receptor-like Kinase Gene in *Brassica oleracea*, *The Plant Cell*, **9**, 49~60 (1997)
- 6) RIKEN RESEARCH : 植物のストレス抵抗性にみられる競い合い, (Consult web page for further information ; <http://www.rikenresearch.riken.jp/jpn/research/5555>)
- 7) KIM, M. C., CHUNG, W. S., YUN, D.-J., and CHO, M. J. : Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants, *Molecular Plant*, **2** (1), 13~21(2009)
- 8) GALON, Y., FINKLER, A., and FROMM, H. : Calcium-regulated transcription in plants, *Molecular Plant*, **3** (4), 653~669 (2010)
- 9) 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)
- 10) SNEDDEN, W. A. and FROMM, H. : Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.*, **3**, 299~304 (1998)
- 11) WANG, K. L.-C., LI, H. and ECKER, J. R. : Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks, *Plant Cell*, **14**, S131~S151 (2002)
- 12) WANG, X. : Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development and stress responses, *Plant Physiol.*, **139**, 566~573 (2005)
- 13) MUNNIK, T., IRVINE, R. F. and MUSGRAVE, A. : Phospholipid signaling in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1389**, 222~272 (1998)
- 14) 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)
- 15) CHAPMAN, D. : Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress, *Trends Plant Sci.*, **3**, 419~426 (1998)
- 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) THAMMAWONG, M., HEWAJULEGE, G.N.I., KANETA, T., NAKAMURA, N., ITO, Y., and SHIINA, T. : The calmodulin-encoding gene *BoCam 1* : A sensitive wound-responsive gene in cabbage, *J. Jap. Food Preserv. Sci.*, **38** (5), 277~283 (2012)
- 18) THAMMAWONG, M., KANETA, T., UMEHARA, H., NAKAMURA, N., ITO, Y., and SHIINA, T. : Expression of physical wound stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), *ISHS Acta Horticulturae*, **989**, 73~78 (2013)
- 19) THAMMAWONG, M., KANETA, T., SOGA, A., YOSHIDA, M., NAKAMURA, N. and SHIINA, T. : Analysis of stress-relating gene expression in wounded cabbage: mechanical stress simulation under bulk container distribution, *Proceeding of the 61st Annual Meeting of the Japanese Association of Food Preservation Scientist*, **66** (2012)
- 20) USUDA, H., NEL, D., ITO, Y., NAKAMURA, N., ISHIKAWA, Y., UMEHARA, H., ROY, P., OKADOME, H., THAMMAWONG, M., KITAGAWA, M., SATAKE, T., and SHIINA, T. : Effect of dropping on *Le-ACS 2* accumulation around the mechanically stressed site of the tomato fruit, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **133** (5), 717~722 (2008)
- 21) THAMMAWONG, M., USUDA, H., NEL, D., UMEHARA, H., NAKAMURA, N., ROY, P., SATAKE, T., and SHIINA, T. : Ethylene production rate : A sensitive indicator for determining the occurrence of mechanical stress in tomato fruits, *J. Jap. Food Preserv. Sci.*, **38** (3), 159~167 (2012)
- 22) THAMMAWONG, M., KANETA, T., SOGA, A., YOSHIDA, M., NAKAMURA, N. and SHIINA, T. : Influence of impact stress on the postharvest physiological and chemical properties of cabbage heads, *J. Jap. Food Preserv. Sci.*, **37** (6), 273~282 (2011)
- 23) THAMMAWONG, M., UMEHARA, H., YOSHIDA, M., SOGA, A., KANETA, T., NAKAMURA, N., ITO, Y., NAKANO, K., and SHIINA, T. : Changes in gene expression of harvested cabbage in response to mechanical wound stress, *ISHS Acta Horticulturae*, **1005**, 117~123 (2013)
- 24) SHIINA, T., UMEHARA, H., YOSHIDA, M., SOGA, A., NAKAMURA, N., ITO, Y., NAKANO, K., and THAMMAWONG, M. : Response mechanisms of cabbage head to different strength levels of mechanical impact stress, *ISHS Acta Horticulturae*, (under review)