

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580048

研究課題名(和文)短時間温度処理による青果物の品質保持効果と抗酸化機構活性化に関する研究

研究課題名(英文)Effects of short-term temperature treatments on postharvest keeping quality and anti oxidant machinery in fruit and vegetables

研究代表者

今堀 義洋 (IMAHORI, YOSHIHIRO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：40254437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：園芸生産物は活発な代謝のため貯蔵中品質が変化しやすい。低温や高温のようなストレスに園芸生産物がさらされると、組織中に活性酸素種が増加する。園芸作物は非酵素的および酵素的な抗酸化機構の両方を持ち、抗酸化の防御機能を効果的に作用させている。低温で貯蔵したジャガイモやコマツナでは抗酸化酵素の活性が低温処理によって誘導された。高温処理では酸化ストレスを生じる。酸化ストレスに対する防御作用は高温ストレスに対する重要な要素の一つである。ウメ果実では高温処理が活性酸素種の消去酵素を活性化させた。それゆえに、園芸生産物へのストレスの調節は収穫後の貯蔵期間の延長や品質保持に重要な手段となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Horticultural crops are perishable products with active metabolism during the post harvest period. When exposed to abiotic stress conditions, such as a low temperature and high temperature, production of reactive oxygen species (ROS) increases. Plants have evolved an efficient antioxidant defense system such as a series of both enzymatic and non-enzymatic detoxification systems to scavenge ROS. In cold stored potato tubers and spinach mustard leaves, the activities of antioxidative enzymes induced in response to chilling temperature. Heat treatment may induce oxidative stress. Protection against oxidative stress is an important component in determining the survival of plant under heat stress. In mume fruit, heat treatment induced the activities of antioxidative enzymes involved in ROS detoxification. Thus, the approaches to modulate or control the stresses in plant tissues are very important to improving shelf life and quality retention during postharvest handling of horticultural crop.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸・造園学

キーワード：アスコルビン酸 グルタチオンサイクル 温度ストレス 抗酸化能 抗酸化酵素 低温障害

1. 研究開始当初の背景

青果物の低温貯蔵は従来から行われている品質保持技術であり、広範囲に普及している。低温によって青果物の種々の代謝変動を抑制することで、品質保持を図っている。しかし、その温度が最適温度以下で、管理が不十分であると、低温障害が発生して品質を損ねることになる。ところが、ウメ果実では6貯蔵で低温障害が著しく発生するのに対し、さらに低い温度の1貯蔵では発生しないことが知られている。それに関して、応募者は1貯蔵では6貯蔵に比べて、抗酸化機構が活性化されていることを明らかにした(Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume(*Prunus mume*) fruit during low temperature storage, Imahori, Y., M. Takemura, J. Bai, Postharvest Biol. Technol., 49, 54-60, 2008)。また、青果物のヒート処理は亜熱帯、熱帯果実を中心として殺虫、殺菌を目的としたポストハーベスト技術として知られており、追熟抑制効果もあることが報告されている(Postharvest heat treatments, Lurie, S., Postharvest Biol. Technol., 14, 54-60, 1998)。応募者はトマト果実において高温障害が発生する温度より高い52のヒート処理で障害発生は抑制され、抗酸化機構が活性化されることを見出した(Chilling and heating induced antioxidant responses in tomatoes, Imahori, Y., J. Bai, E.A. Baldwin, HortScience, 45, 1141, 2009)。今までに短時間温度処理による低温ショック処理、ヒートショック処理が品質保持技術として検討されてきたが、明確な品質保持機構はまだ明らかになっていない。しかしながら、最近の研究では低温や高温のストレスが植物の抗酸化機構に関係し、活性酸素種生成と抗酸化能とのバランスに影響を与え、植物のストレス耐性や抵抗性の獲得に關与するデータが示されてきた(Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance, Wang, W, B. Vinocur, A. Altman, Planta, 218, 1-14, 2003)。このようなことから、短時間温度処理を青果物の品質保持に活用して、青果物の生体内に内在する抗酸化能を利用した品質維持能力を明らかにすることで、その機構解明ができるものと思われる。そして、より経済的で安全な青果物の品質保持技術の確立が目指せるものと期待できる。

2. 研究の目的

青果物の品質保持方法として短時間低温処理(低温ショック処理)や短時間高温処理(ヒートショック処理)が開発され、それらの効果について現在多角的に検討されている。低温ショック処理は追熟抑制、褐変抑制、低温障害予防などに効果があることが調べられており、生体膜への影響からその品質保持効

果のメカニズムが議論されている。ヒートショック処理は亜熱帯、熱帯果実を中心として殺虫、殺菌で一部実用化されており、追熟抑制、褐変抑制、低温障害予防などの効果があることが知られていて、酵素活性の抑制や新たなタンパク質合成が関係していることが報告されている。しかし、これら品質保持効果のメカニズムについてはその効果が充分期待されているにもかかわらず、調べられた青果物の種類や数も限られており、不明な点も多く、まだ明確にはなっていない。

そこで、本研究ではそれらの品質保持効果を活用した品質保持技術の確立を目指して検討していく。応募者が既に基礎的データを収集しているピーマン果実をモデルに調査する。具体的には、短時間温度処理(低温処理および高温処理)の適切な処理温度と処理時間を外観、内容成分の品質評価から明らかにする。短時間温度処理に伴うピーマン果実の抗酸化酵素の活性変化とその抗酸化物質の質的および量的変化を調べる。そして、これら温度ストレスがどのように青果物の抗酸化機構を活性化し、ストレス耐性を付与していくのかを明らかにしていくために、酵素活性の制御、遺伝子発現、タンパク質合成について調査する。最近の植物分子生理学では高等植物の環境ストレスとシグナル分子との関係が詳細に検討されており、本研究でも短時間温度処理によるシグナル分子は何なのか、それらがどのように抗酸化機構の活性化に作用しているのかについても解析していく。得られた結果から実用面も考慮して、品質評価の結果と総合的に考察し、短時間温度処理(低温処理および高温処理)の品質保持効果のメカニズムを明らかにしていく。

次に、ピーマン果実で得られた結果を基に他の青果物に短時間温度処理を行い、品質保持効果について同様に検証する。得られたデータに基づき、試験場の協力を得て実地試験および流通試験を行い、短時間温度処理による品質保持技術の確立を目指していく。

3. 研究の方法

(1) 低温処理が貯蔵中のジャガイモの抗酸化機構に及ぼす影響

材料および貯蔵方法

大阪府立大学附属教育研究フィールド産ジャガイモ「男爵」を有孔ポリエチレンフィルム袋(厚さ0.03mm, 孔数8個, 孔径6mm)に入れ、袋の口を輪ゴムでとめて、5および-0.5にそれぞれ6週間貯蔵した。試料は経時的にサンプリングし、液体窒素で凍結して、分析まで保存した。

内部褐変

経時的に外観観察し、ジャガイモの切断面での内部褐変の程度を5段階(1:なし~5:著しい)にわけて評価した。

フェノール物質含量の測定

試料を熱エタノールで抽出し、得られた抽出液をFolin-Denis法で測定した。

還元型アスコルビン酸および酸化型アスコルビン酸含量の測定

Zapata・Dufour(1992)の方法に準じて、高速液体クロマトグラフィーで分析した。

アスコルビン酸 - グルタチオンサイクルに関する酵素およびカタラーゼの抽出および活性測定

酵素抽出は Nakano・Asada(1981)の方法で行い、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は Nakano・Asada(1981)の方法で、酸化型アスコルビン酸還元酵素 (DHAR) およびモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDHAR) は Hossain・Asada(1984)の方法で、グルタチオン還元酵素 (GR) およびカタラーゼ (CAT) は Klapheck ら(1990)の方法で活性をそれぞれ測定した。

スーパーオキシドジスムターゼの抽出および活性測定

Kawakami ら(2000)の方法を改良して抽出し、活性を測定した。活性の算出はシトクロム C の還元を 50% 阻害する酵素量を 1 単位として行った。さらに、阻害剤 KCN を用いて Cu/Zn-SOD と Fe-SOD + Mn-SOD の活性を分別測定した。

マロンジアルデヒド (MDA) 含量の測定
Dipierro ら(1997)の方法で測定した。

タンパク質量の測定
Bradford(1976)の方法で測定した。

(2) 低温処理が貯蔵中のコマツナの抗酸化機構に及ぼす影響

材料および貯蔵方法

コマツナ 'ひとみ' は堺市の栽培農家でハウス栽培され、収穫したものを実験に供試した。収穫後直ちに葉の形が不揃いのもおよび傷みや虫食いのものを選別した。試料は水で洗浄して水気を取り除いた後、有孔ポリエチレン袋(厚さ 0.03mm、26×38cm、孔数 8 個)に入れ、袋の口を輪ゴムでとめて、5 および 15 の暗所下で 6 日間貯蔵した。貯蔵 0、2、4、6 日に各温度区から 3 袋ずつ取り出し、試料の葉面色を測定した後、葉身部を切片にし、液体窒素で凍結して、-80 で分析まで冷凍保存した。

外観観察

経時的に外観観察し、とろけや腐敗の有無を評価した。

葉面色の測定

葉面色は測色色差計で L^* 、 a^* 、 b^* を測定し、色相角を求めた。

還元型アスコルビン酸および酸化型アスコルビン酸含量の測定

Zapata・Dufour(1992)の方法に準じて、高速液体クロマトグラフィーで分析した。

アスコルビン酸 - グルタチオンサイクルに関する酵素およびカタラーゼの抽出および活性測定

酵素抽出は Nakano・Asada(1981)の方法で行い、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は Nakano・Asada(1981)の方法で、酸化型ア

スコルビン酸還元酵素 (DHAR) およびモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDHAR) は Hossain・Asada(1984)の方法で、グルタチオン還元酵素 (GR) およびカタラーゼ (CAT) は Klapheck ら(1990)の方法で活性をそれぞれ測定した。

スーパーオキシドジスムターゼの抽出および活性測定

Kawakami ら(2000)の方法を改良して抽出し、活性を測定した。活性の算出はシトクロム C の還元を 50% 阻害する酵素量を 1 単位として行った。さらに、阻害剤 KCN を用いて Cu/Zn-SOD と Fe-SOD + Mn-SOD の活性を分別測定した。

タンパク質量の測定

Bradford(1976)の方法で測定した。

(3) 短時間高温処理が低温貯蔵中のウメ果実の抗酸化機構に及ぼす影響

材料

和歌山県産のウメ '南高' 果実を用いた。

短時間高温処理温度および時間の検討

ウメ果実を 45、50 および 55 の温水にそれぞれ 0.5、5、7 および 10 分間浸漬し、直ちに 20 の流水で冷却した後、果実の水気を除去した。それらを 3 個ずつ有孔ポリエチレン袋(厚さ 0.03mm、26×38cm、孔数 8 個)に入れ、袋の口を輪ゴムでとめて、6 の暗所で 1 週間貯蔵した。

低温貯蔵方法

45 で 5 分間処理を行った果実を有孔のポリエチレン袋(厚さ 0.03mm、26×38cm、孔数 8 個)に 15 個ずつ入れ、6 の暗所で貯蔵した。対照として無処理果実を同様に貯蔵した。

外観観察

外観観察し、短時間高温処理で発生する障害の有無を評価した。また、低温貯蔵中に発生する低温障害について発生程度を経時的に外観観察し、ピッチングの大きさや数から、1 = 発生なしから 5 = 中規模ピッチングの複数と褐変発生の 5 段階で評価した。

マロンジアルデヒド (MDA) 含量の測定

Dipierro ら(1997)の方法で測定した。

過酸化水素含量の測定

Veljovi-Jovanovic (2002) らの方法で測定した。

還元型アスコルビン酸の測定

Stevens (2006) らの方法で測定した。

抗酸化能の測定

Cano (2003) らの方法で測定した。

アスコルビン酸 - グルタチオンサイクルに関する酵素およびカタラーゼの抽出および活性測定

酵素抽出は Nakano・Asada(1981)の方法で行い、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は Nakano・Asada(1981)の方法で、酸化型アスコルビン酸還元酵素 (DHAR) は Hossain・Asada(1984)の方法で、カタラーゼ (CAT) は Aebi ら (1983) の方法でそれぞれ活性を測定した。

⑩ タンパク質量の測定
Bradford(1976)の方法で測定した。

4. 研究成果

(1) 低温処理が貯蔵中のジャガイモの抗酸化機構に及ぼす影響

貯蔵中-0.5 区が5 区と比べて、低温障害の進展は抑えられ、内部褐変の程度は貯蔵42日で5 区が3 区に対して、-0.5 区は2 区であった。

還元型アスコルビン酸含量は、貯蔵21日以降-0.5 区で増加し、5 区の約1.7倍になった。酸化型アスコルビン酸は、貯蔵中5 区が-0.5 区よりも約1.5倍の高い値を示した。総アスコルビン酸含量は、貯蔵21日以降-0.5 区が5 区よりも多く、約1.5倍となった。還元型/酸化型比では貯蔵中-0.5 区は5 区よりも高い値を示した。-0.5 区および5 区とも貯蔵中増加する傾向であり、両区とも差はなかった。貯蔵中いずれの区も減少する傾向であったが、5 区が-0.5 区に比べ、約1.1~2倍の高い値で推移した。

MDA 含量の変化は、両区とも貯蔵中増加したが、-0.5 区でその増加程度は緩やかであった。

APX 活性は両区とも貯蔵14日まで緩やかに減少した後増加した。その程度は-0.5 区で大きかった。DHAR 活性は両区とも貯蔵7日に急増し、その後漸減したが、-0.5 区では5 区より増加程度は大きく、漸減程度は小さかった。MDHAR 活性は両区とも貯蔵中増加し、その程度に差はなかった。GR 活性は5 区で貯蔵21日まで増加し、その後一定レベルを維持した。一方、-0.5 区で貯蔵14日まで一定レベルを維持した後増加したが、貯蔵28日以降は両区とも同一レベルとなった。CAT 活性は両区とも貯蔵中ほぼ同一レベルで推移した。

以上のことから、-0.5 貯蔵ではジャガイモのアスコルビン酸 - グルタチオンサイクルが活性化されることにより低温で生じる酸化ストレスを抑制した。ジャガイモのアスコルビン酸代謝が活発となって、抗酸化活性が高められて、貯蔵中での低温障害の発生が抑制されることがわかった。

(2) 低温処理が貯蔵中のコマツナの抗酸化機構に及ぼす影響

貯蔵中の葉の黄化は、15 区で進展したのに対して、5 区では抑制された。

還元型アスコルビン酸含量は貯蔵期間を通して5 区で維持されたが、15 区では貯蔵4日まで減少した後、その低いレベルを維持した。酸化型アスコルビン酸含量は両区とも貯蔵2日まで減少し、その後一定レベルであった。

SOD は全 SOD 活性が両区とも貯蔵中一定レベルであったが、Cu/Zn-SOD 活性は15 区で貯蔵2日以降増加したのに対して、5 区では貯蔵4日まで低下した後、貯蔵6日に15

区と同一レベルまで増加した。一方、Fe-SOD + Mn-SOD 活性は15 区で貯蔵中一定レベルであったのに対して、5 区では貯蔵4日まで増加し、貯蔵6日には15 区と同一レベルまで低下した。

APX 活性は5 区で貯蔵4日に、15 区では貯蔵2日にそれぞれ一時増加が認められたが、両区には有意な差はなかった。DHAR 活性もいずれの区とも貯蔵2日に一時増加が認められたが、両区には有意な差はなかった。MDHAR 活性は両区とも貯蔵中変化はあまりなかった。GR 活性は5 区で貯蔵4日に一時増加が認められ、15 区では貯蔵6日に増加したが、両区には有意な差はなかった。CAT 活性は5 区で貯蔵中一定レベルを維持したのに対して、15 区では貯蔵4日に増加し、その後高いレベルを維持した。

5 貯蔵ではコマツナの葉に広く分布するCu/Zn-SOD を制御することにより、活性酸素種の生成を抑え、活性酸素種の消去に必要な抗酸化物質を保持することで、葉の黄化を抑制した。それに対して、15 貯蔵では活性酸素種の分解が促進されたものの、Cu/Zn-SOD の活性化により活性酸素種の生成が促され、それらのバランスが取れなくなり、抗酸化物質を消費して、葉の黄化が進行したと考えられる。低温を受ける時間が長いほどそれらの活性化のレベルも高いことが、また低温の程度が小さいと活性酸素種の生成と分解のバランスが取れないことがわかった。

(3) 短時間高温処理が低温貯蔵中のウメ果実の抗酸化機構に及ぼす影響

45 処理では処理開始5分まで、50 区では0.5分まで水浸状障害が発生しなかった。しかし、55 区では障害がすべての処理時間で見られた。一方、MDA 量は、50 0.5分間処理が無処理と同程度であったが、45 5分間処理はそれらの2/3程度であった。それゆえ、短時間高温処理は45 5分間とした。

無処理区は経時的に低温障害が進展し、貯蔵3週には発生程度5に達したのに対して、処理区は障害発生が軽減されて、発生程度は3であった。還元型アスコルビン酸量はいずれも2週まで減少し、その後一定であったが、処理区が高レベルで維持した。貯蔵中の抗酸化能の傾向は還元型アスコルビン酸量と同様であった。MDA 量は貯蔵期間中両区とも増加したが、処理区ではその程度は小さかった。過酸化水素量もMDA 量と同様の傾向であった。

APX 活性は貯蔵期間中両区とも減少したが、処理区は無処理区よりも傾向が緩やかであった。CAT 活性は両区とも貯蔵3週まで変化がなかったが、貯蔵4週で処理区が有意に高くなった。DHAR 活性は貯蔵期間中処理区で有意に高かった。

以上より、短時間高温処理は低温貯蔵したウメ果実の抗酸化機構を高め、生成される過酸化物を消去することで低温障害を防ぎ、品質を保持することがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

今堀義洋、小寺和樹、流通経路の違いがコマツナの品質に及ぼす影響、日本食品保蔵学会第61回大会、2013年6月15日、山形大学農学部(鶴岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今堀義洋 (IMAHORI, YOSHIHIRO)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科
(系)・教授

研究者番号：40254437