

# オオバ生葉の褐変発生における過酸化水素生成の役割と遅延発光による生理的ストレスの非破壊評価

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者	安藤, 秀樹 馬場, 正 山口, 正己
巻/号	12巻2号
掲載ページ	p. 209-213
発行年月	2013年4月

# オオバ生葉の褐変発生における過酸化水素生成の役割と遅延発光による生理的ストレスの非破壊評価

安藤秀樹・馬場 正\*・山口正己

東京農業大学農学部 243-0034 神奈川県厚木市船子

## Role of Hydrogen Peroxide in Browning and Nondestructive Evaluation of Physiological Stress by Delayed Light Emission in Freshly Harvested *Perilla* Leaves

Hideki Ando, Tadashi Baba\* and Masami Yamaguchi

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Kanagawa 243-0034

### Abstract

The *Perilla* (*Perilla frutescens* L.) leaf has a short shelf life caused by browning, which occurs several days after harvest. The objective of this study was to identify the role of reactive oxygen species on browning of freshly harvested *Perilla* leaves by measuring their hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content. Delayed light emission was measured as an indicator of photosystem degradation caused by physiological stress prior to the development of visible symptoms (wilting and browning). Leaves stored at 3°C at a low humidity (approximately 60%) lost weight at a rate of more than 25% per day, and were judged to be at the limit of marketability because of wilting before exhibiting browning. Under high-humidity storage (over 95%) at 3°C, browning occurred variably among leaves from 4 to 8 days after harvest. Browning occurred consistently when weight loss reached  $26.3 \pm 1.1\%$ . The content of  $H_2O_2$  in leaves determined following serial weight losses of 10% revealed that browning leaves contained more than twice the  $H_2O_2$  of leaves before browning, suggesting that increasing levels of  $H_2O_2$  may induce browning in *Perilla* leaves. Weight loss was significantly correlated with values of delayed light emission ( $r = 0.67$ ). Quick (several seconds), non-destructive measurement of delayed light emission can be a useful indicator of differing senescence rates in *Perilla* leaves.

**Key Words** : delayed fluorescence, nondestructive quality evaluation, reactive oxygen species, senescence rate, weight loss

**キーワード** : 遅延蛍光, 非破壊品質評価, 活性酸素種, 目減り, 老化速度

### 緒 言

オオバ (*Perilla frutescens* L.) はシソ科の1年草のアオジソから収穫された若葉であり、テンプラ、刺身のつま、薬味などに用いられている。最近では和風ハーブとして、食品加工から精油による植物天然香料まで広く利用されている。抗酸化作用、抗アレルギー性にすぐれ、また血中のアルコール分解促進成分を有するなど機能性食品としても注目を集めている(松隈ら, 2001)。現在愛知県や茨城県を主産地とし、施設栽培によって周年供給体制が取られ、安定した流通が可能となっている。しかし棚持ち期間が短く、低温高湿を維持して流通させても、早いものでは数日で褐変が起これ商品性を失う。このような褐変の原因として、強力な酸化力を有する活性酸素種の葉内における蓄積が考

えられる。

活性酸素種には、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ )、ヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などがある。これらは、呼吸や光合成の電子伝達系の他、リポキシゲナーゼなどの酵素によっても生成される。植物体内で発生した活性酸素種は強い酸化力を有しており、通常はスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、アスコルベートペルオキシダーゼなどにより速やかに消去される。しかし、植物体が低温や紫外線、乾燥などのストレスにさらされると、消去能力以上に活性酸素種が生成され、植物体内への蓄積が起これる。蓄積された活性酸素種は、老化の促進やDNAの傷害をもたらす(Hodgesら, 2001)。また、脂質から脂質ラジカル ( $L^{\cdot}$ ) を生成し、 $L^{\cdot}$  は酸化されて脂質ペルオキシラジカル ( $LOO^{\cdot}$ ) に変化し、さらに  $LOO^{\cdot}$  は他の脂質と反応し、過酸化脂質 ( $LOOH$ ) と新たな  $L^{\cdot}$  を生成するといった連鎖的過酸化脂質反応を引き起こす(金, 1997)。この反応の結果、細胞膜の酸化的傷害が進む一方、

2012年8月21日 受付. 2012年12月18日 受理.  
本研究は科研費(21658012)の助成を受けて実施した。  
本研究の一部は園芸学会平成21年度秋季大会で発表した。  
\* Corresponding author. E-mail: baba@nodai.ac.jp

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) の介在する褐変現象が進行する可能性が指摘されている (Shewfelt・Rosario, 2000; Toivonen, 2003; 福岡ら, 2009). もし, オオバの褐変が活性酸素種の発生と関連があるとすれば, 活性酸素種生成を制御することにより, 褐変発生を抑えることができるかもしれない.

オオバでみられる褐変は, すべての葉ではほぼ同時に起こるわけではなく, 葉ごとに遅速がある. オオバでは一定の大きさに達した葉を収穫するため, 収穫時間や株の生育ステージの他, 栽培条件などの異なる葉が混在しており, このことが褐変の発生が葉ごとに大きくばらつく原因と考えられる. もし, 過剰な活性酸素種の発生が褐変と関連があるならば, 葉ごとの褐変発生時期のばらつきは各葉の活性酸素種生成能およびその消去能と深く関係しているものと思われる. 葉ごとのばらつきを早期に見分けて選別することで, 品質の揃ったオオバを提供することができ, 結果的に効率的なロス管理に繋がる可能性が高い.

そこで本研究では, まずオオバにおける褐変発生と活性酸素種生成との関係を明らかにするために, オオバ貯蔵中の過酸化水素量の測定を行った. 過酸化水素は, スーパーオキシドジスムターゼの作用によって生成される一方, 生体内では, カタラーゼやアスコルビン酸-グルタチオンサイクルで消去される. たとえばホウレンソウでは, 葉の老化において鍵となる活性酸素種として知られている (Hodges・Forney, 2000). さらに, 葉ごとの褐変発生時期のばらつきの要因を明らかにするために, 総フェノール物質量と呼吸量を測定した. このうち呼吸量については, ミトコンドリアが葉緑体とともに活性酸素種の主要な発生場所と考えられる (Foyer・Noctor, 2003) ため, 測定を行った. 次に, 褐変発生の遅速を早期に見分ける手段として, 生物微弱発光のひとつである「遅延発光」に着目した. 遅延発光は, クロロフィル蛍光の1%以下の強度で発光する極微弱発光現象であり, 励起光消灯後に光化学系 I (PSI) のクロロフィルから電子が逆流し, 光化学系 II (PSII) のクロロフィルが再荷電後化学的に励起され, 再び基底状態に戻ることによって発する微弱な発光である (蘆原, 2001). 遅延発光量はクロロフィル含量と相関するので, 熟度の進行に伴ってクロロフィルが減少する青果物において, 熟度の非破壊評価への利用が検討されてきた (中馬・中司, 1976; Forbus ら, 1985; Triglia ら, 1998). また, 何らかの生理ストレスによって葉緑体の電子伝達系に障害が生じた場合, 遅延発光減衰曲線に変化が生じる (Abbott, 1999). これを利用すれば, 葉緑体が受けた生理ストレスを, 目視による障害確認に先だって検出できる可能性がある (Abbott・Massie, 1985; Abbott ら, 1991, 1994). そこで, この原理をオオバにも応用し, 葉ごとの褐変発生時期の遅速を事前に非破壊で評価するために, 遅延発光の測定を行った.

## 材料および方法

全実験に共通して, 厚木市内のスーパーより購入した愛知県豊橋産のオオバを供試した. 葉の表面が濡れている場合は, 室温 25°C, 湿度成り行きの室内で, 約 20 分間乾燥させたものを利用した.

### 1. 低湿度貯蔵時の褐変発生と過酸化水素生成 (実験 1)

オオバは, 3°C, 相対湿度約 60%, 暗黒下で貯蔵した. 貯蔵後 24 時間ごとに目視で観察を行い, 褐変発生の有無を確認した. 重量は電磁式秤 (GR-202, エー・アンド・デイ) で測定し, 貯蔵開始時からの重量減少分を開始時の重量で除して葉重減耗率を算出した. また, 葉重減耗率を 0~80% の 9 段階に分け, 各段階に達した葉を 2 枚サンプリングし, ジアニシジンの呈色反応を利用した Lee・Lee (2000) の方法に従って, 葉中の過酸化水素量を測定した.

### 2. 高湿度貯蔵時の褐変発生と過酸化水素生成 (実験 2)

オオバは, 3°C, 相対湿度 95% 以上, 暗黒下で貯蔵した. 貯蔵後 24 時間ごとに目視で観察を行い, 褐変発生の有無を確認した. 重量は電磁式秤で測定し, 葉重減耗率を算出した. また葉重減耗率が 10, 20, 30, 40 および 50% に達した時点で 2 枚サンプリングし, 実験 1 と同様の方法で, 葉中の過酸化水素量を測定した.

### 3. 高湿度貯蔵時の葉重減耗率と総フェノール物質量, 二酸化炭素生成量および遅延発光量 (実験 3)

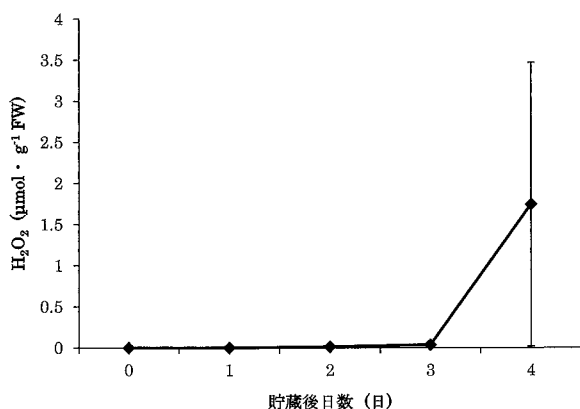
実験 2 と同様の貯蔵条件において, 48 時間貯蔵後の総フェノール物質量, 二酸化炭素生成量および遅延発光量を測定し, この時の葉重減耗率との相関を求め, 相関係数の有意性の検定を行った. 総フェノール物質量は 80% メタノールで抽出後フォリンチオカルト法 (Singleton ら, 1999) を用いて測定した. 二酸化炭素生成量は密閉容器に 1 時間貯蔵し, ヘッドスペースガスをシリンジで採取し, ガスクロマトグラフ (GC Shimadzu 8A, 島津製作所) で測定した. 検出器は TCD, カラムはモレキュラーシーブと活性炭の並列カラム, カラム温度 80°C の条件で測定した. 遅延発光量の測定は, オオバ葉を主要な葉脈を避けて約 1 cm 角に切り取り, サンプルホルダー上に乗せ, 微弱発光計測システム (PMX-6100, 浜松ホトニクス) を用いて室温 25°C 下で行った. 励起光は LED を利用し, 687 nm の波長で発光強度  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  のものを 10 秒間照射した. 励起光消灯後 10 秒間遅延発光量を測定し, 0.1~1 秒間の遅延発光積算値を 1.1~10 秒間の遅延発光量積算値で除した値を算出した.

## 結 果

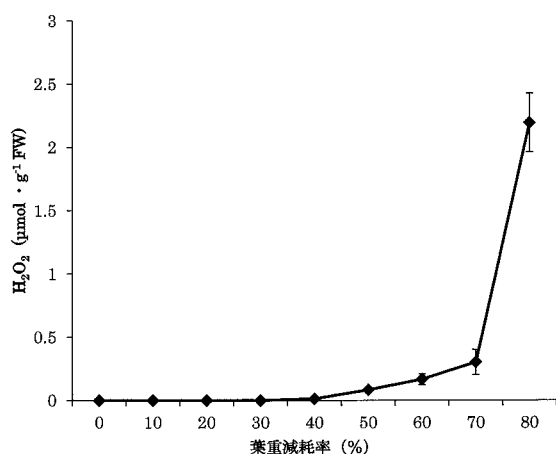
### 1. 低湿度貯蔵時の褐変発生と過酸化水素生成 (実験 1)

低湿度貯蔵時におけるオオバの減耗率は, 最初の 24 時間で約 25% に達し, 貯蔵 4 日後まで大幅に減耗し続けた. 4 日後以降は減耗率が小さくなり, 実験終了時との明確な差はみられなくなった. 葉の褐変は速いものでは貯蔵 2 日

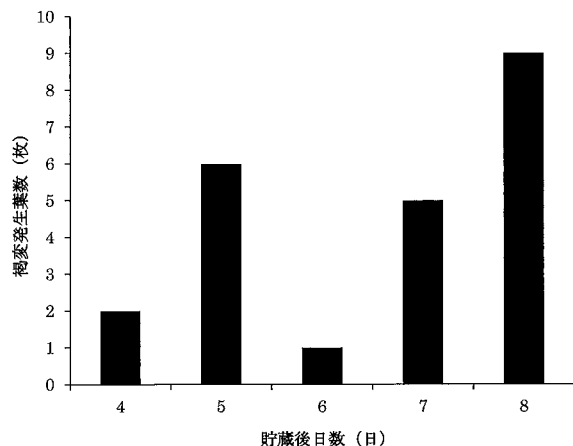
後にみられた。過酸化水素は貯蔵1日後までは検出されなかったが、貯蔵2日後から約  $0.015 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  と微量ではあるものの検出された (第1図)。3日後までの増加は微量であったが、4日後に大幅な増加がみられた。



第1図 低湿度貯蔵中における貯蔵後日数と過酸化水素発生量との関係 (n=3)



第2図 低湿度貯蔵中におけるオオバ葉重減耗率と過酸化水素発生量との関係 (n=3)



第3図 高湿度貯蔵中における貯蔵日数ごとのオオバ葉の褐変枚数 (n=23)

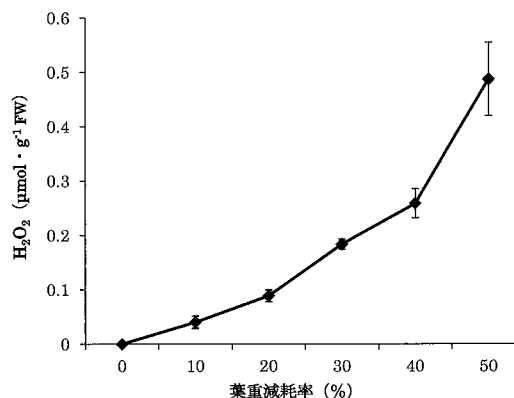
葉重減耗率ごとの過酸化水素量は、葉重減耗率0~30%までは検出されなかったが、40%において  $0.015 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  検出された (第2図)。その後70%までは減耗率と比例的に増加し、さらに80%で大幅に増加した。

## 2. 高湿度貯蔵時の褐変発生と過酸化水素生成 (実験2)

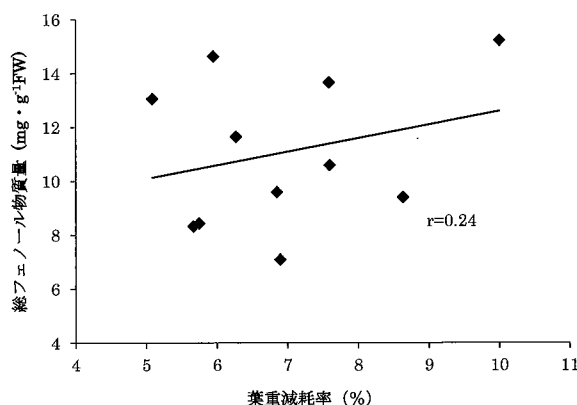
低温高湿度貯蔵時におけるオオバの葉重減耗率は、1日当たり約5~10数%と2倍以上のばらつきが認められた。褐変は速いものでは貯蔵4日後からみられ、貯蔵8日後にはすべての葉で褐変が発生した (第3図)。褐変発生時の葉重減耗率は、 $26.3 \pm 1.1\%$  とほぼ一定であった。第4図は葉重減耗率10%ごとの過酸化水素量を示したものである。減耗率10%からわずかに検出し始め、減耗率0~20%までは10%ごとに約  $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  ずつ過酸化水素量の増加がみられたが、20~30%の間では約  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  と2倍に増加し、その後も増加し続けた。

## 3. 高湿度貯蔵時の葉重減耗率と総フェノール物質、二酸化炭素生成量および遅延発光量 (実験3)

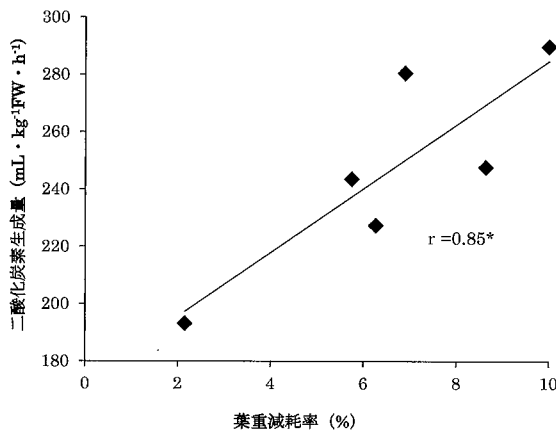
総フェノール物質量は、最も低いもので約  $7 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 、高いものでは約  $15 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  となり、2倍以上の差異がみられた。総フェノール物質量と48時間貯蔵後の葉重減耗率



第4図 高湿度貯蔵中におけるオオバ葉重減耗率と過酸化水素発生量との関係 (n=3)

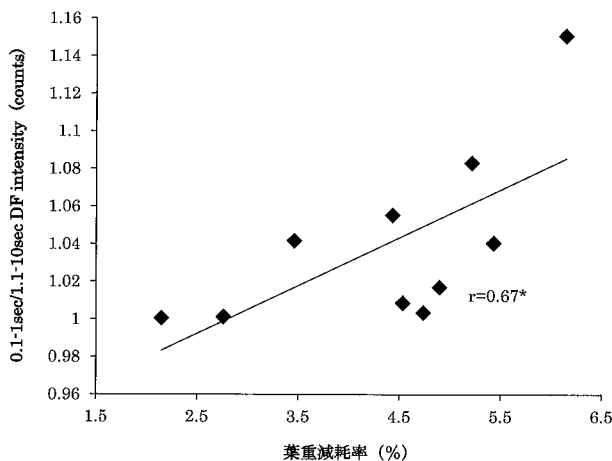


第5図 貯蔵48時間後におけるオオバ葉重減耗率と総フェノール物質量の関係 (n=11)



第6図 貯蔵48時間後におけるオオバ葉重減耗率と二酸化炭素生成量との関係 (n=6)

\*は無相関検定の結果、5%水準で有意性があったことを示す



第7図 貯蔵48時間後におけるオオバ葉重減耗率と遅延発光量との関係 (n=10)

\*は無相関検定の結果、5%水準で有意性があったことを示す

との間には、 $r=0.24$ の相関が得られたが、統計的には有意な値ではなかった(第5図)。

二酸化炭素生成量においても、約190～約290 mL·kg<sup>-1</sup>FW·h<sup>-1</sup>まで1.5倍程度の差異が認められた。二酸化炭素生成量と48時間貯蔵後の葉重減耗率の間には、 $r=0.85$  ( $p<0.05$ )の有意な相関が得られた(第6図)。

遅延発光量の0.1～1秒までの積算値を1.1～10秒までの積算値で除した値は、0.99～1.16までばらついた。48時間貯蔵後の葉重減耗率との間で、葉重減耗率が大きいほど遅延発光量の値が大きくなる傾向がみられ、 $r=0.67$  ( $p<0.05$ )の有意な相関となった(第7図)。

## 考 察

オオバ生葉の褐変誘導物質として活性酸素種に着目し、葉重減耗率10%ごとに過酸化水素量の測定を行ったとこ

ろ、褐変が観察される葉重減耗率において大幅に過酸化水素が増加した。乾燥ストレスは、植物体内での活性酸素種の生成量を増加させ(Hodges, 2003)、細胞膜の酸化的障害の結果、PPOの介在する褐変誘導系が活性化し、褐変現象が誘導されるといわれている(Toivonen, 2003; 福岡ら, 2009)。オオバ葉においても、活性酸素が体内に蓄積されることによって褐変が引き起こされていることが示唆された。

低温高湿度条件下では、葉ごとに褐変発生時期にばらつきがあったものの、褐変発生時期の葉重減耗率は26%前後とほぼ一定であった。また褐変が顕在化していない貯蔵24時間後までの葉重減耗率と、活性酸素生成能の指標と考えられる呼吸量、葉緑体の生理的狀態を反映する遅延発光量との間に有意な相関(それぞれ $r=0.85, 0.67$ )がみられた。

好気呼吸では、ミトコンドリアでの電子伝達系における余剰電子などにより活性酸素が生成されるため、呼吸量の大きいものほど過酸化水素が早い段階で内部に蓄積されている可能性がある。この結果は、貯蔵24時間後の呼吸量の大小から葉重減耗率の差異や褐変発生の遅速を推定できることを意味する。ただし呼吸量の測定には一定時間以上を要する。もうひとつ有意な相関のみられた遅延発光量は、減耗率の高い葉ほど、0.1～1秒までの積算値の割合が大きくなった。これは励起光消灯後、早い段階で電子の逆流が起こっていることを示し、その原因として乾燥ストレスに伴うH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の発生がチラコイド膜を損傷し、伝達阻害された電子がPSII反応中心に逆流し、クロロフィルの化学的励起を増加した結果、遅延発光量が増加したと理解できる。励起消灯直後の発光量が増加する現象は、化学物質によって光合成阻害を行った藍藻でも観察されている(勝又ら, 2005)。呼吸量と違って遅延発光量は、秒単位で迅速に測定が可能であることから、流通のいずれかのステップで、個々の葉の老化速度の違いを非破壊で見極めるツールとして利用できる可能性がある。

遅延発光量は、有意な相関は得られたものの葉重減耗率の差異を高い精度では推定できなかった。これは測定の際のサンプル切断の影響が大きいと思われる。今後は非破壊で測定できるようにサンプルホルダーを改造する他、栽培条件や収穫時間、株の生育ステージ、収穫場所(主枝側枝)などを特定した実験を行う必要があるだろう。それでも遅延発光量を測定することにより、迅速かつ非破壊で葉重減耗率を推定できる可能性が示されたことは、オオバで鮮度低下速度を揃えた商品を出荷できる可能性を示したとともに、今後、栽培・収穫条件が鮮度保持に及ぼす影響について、ストレス応答の観点から研究を進めていくうえで重要な結果と思われる。

一連の結果から、オオバの過酸化水素の発生は葉重の減耗と強く関係しており、乾燥ストレスに対する過酸化水素の急激な増加により細胞膜の酸化的障害が進み、PPOの介在する褐変誘導系を活性化した結果、褐変が顕在化すると

思われた。また、葉重減耗のばらつきの要因として呼吸量の差異が考えられ、また遅延発光量がこのばらつきを非破壊で評価する指標となる可能性が示された。

## 摘 要

オオバ (*Perilla frutescens* L.) 生葉は、棚持ち期間が短く、早いものでは数日で褐変し商品性を失う。本研究では、オオバ生葉の褐変発生における活性酸素種の役割を明らかにするため、葉中の過酸化水素量の測定を行った。また外観的变化に先立って起こる光化学系の劣化を評価できる遅延発光量を測定した。低湿度下 3°C で貯蔵した場合、1 日当たりの葉重減耗率は 25% に達し、褐変発生より先に激しく萎れて商品性を失った。高湿度下 3°C での貯蔵では、褐変発生は速いもので 4 日後、遅いもので 8 日後と葉ごとに遅速があった。しかし褐変発生時の葉重減耗率は  $26.3 \pm 1.1\%$  で、葉ごとのばらつきは非常に少なかった。そこで葉重減耗率 10% ごとに過酸化水素量を測定したところ、褐変がみられた葉重減耗率 20 ~ 30% でそれまでの 2 倍以上に増加していた。このことから、乾燥ストレスに伴う過酸化水素の急激な増加が、褐変を誘導していると思われた。葉ごとの葉重減耗率は、遅延発光量と 5% 水準で有意な相関がみられた ( $r=0.67$ )。遅延発光量は、秒単位で測定できるので、葉ごとの老化速度の違いを見極める非破壊指標になると思われた。

## 引用文献

- Abbott, J. A. 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 207-225.
- Abbott, J. A., T. A. Campbell and D. R. Massie. 1994. Delayed light emission and fluorescence responses of plants to chilling. *Remote Sens. Environ.* 47: 87-97.
- Abbott, J. A. and D. R. Massie. 1985. Delayed light emission for early detection of chilling in cucumber and bell pepper fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 42-47.
- Abbott, J. A., A. R. Miller and T. A. Campbell. 1991. Detection of mechanical injury and physiological breakdown of cucumbers using delayed light emission. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 52-57.
- 中馬 豊・中司 敬. 1976. 果実・野菜の光学的性質とその選別工程への利用 (第4報) —トマトの Delayed light emission 特性—. *農機誌.* 38: 217-224.
- Forbus, W. R., S. D. Senter and R. L. Wilson. 1985. Measurement of tomato maturity by delayed light emission. *J. Food Sci.* 50: 750-753.
- Foyer, C. H. and G. Noctor. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119: 355-364.
- 福岡信之・池下洋一・金森友里・増田大祐. 2009. サツマイモ '高系 14号' の内部褐変症の発生に関する組織形態的および生化学的要因の検討. *園学研.* 8: 47-53.
- 菘原昌司. 2001. 遅延発光. p. 404-406. (独) 食品総合研究所編. *食品大百科事典.* 朝倉書店. 東京.
- Hodges, D. M. 2003. Overview: Oxidative stress and postharvest produce. p. 1-12. In: D. M. Hodges (ed.). *Postharvest oxidative stress in horticultural crops.* The Haworth Press, New York.
- Hodges, D. M. and C. F. Forney. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 51: 645-655.
- Hodges, D. M., C. F. Forney and W. V. Wismer. 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 611-617.
- 勝又政和・小池 隆・西川正隆・土屋広司. 2005. 除草剤および無機水銀の藍藻 (*Spirulina platensis*) への影響評価に対する遅延発光時間分解計測技術の応用. *水環境学会誌.* 28: 23-28.
- 金 順姫. 1997. ラットの肝臓トリアシルグリセロールならびに血清中の過酸化脂質に及ぼす緑茶の影響. *聖カタリナ女子短大紀要.* 30: 153-163.
- Lee, D. H. and C. B. Lee. 2000. Chilling stress-induced changes in antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159: 75-85.
- 松隈美紀・馬場良子・吉岡慶子・藤田 守. 2001. シソの葉の貯蔵による色調および形態変化に関する研究. *中村学園研究紀要.* 33: 211-219.
- Shewfelt, R. L. and B. A. del Rosario. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience* 35: 575-579.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152-178.
- Toivonen, P. M. A. 2003. Postharvest treatments to control oxidative stress in fruits and vegetables. p. 225-246. In: D. M. Hodges (ed.). *Postharvest oxidative stress in horticultural crops.* The Haworth Press, New York.
- Triglia, A., G. L. Malfa, F. Musumeci, C. Leonardi and A. Scordino. 1998. Delayed luminescence as an indicator of tomato fruit quality. *J. Food Sci.* 63: 512-515.