

## 異なる貯蔵温度下におけるブロッコリー花らの抗酸化酵素活性および 抗酸化物質含量と老化との関係

李 進才・前澤重禮\*・中野浩平

岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸

### Correlations between Antioxidative Enzyme Activities and Antioxidative Substrates and Senescence in Broccoli (*Brassica oleracea* L.) Flower Buds at Different Storage Temperatures

Jincai Li, Shigenori Maezawa\* and Kohei Nakano

Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

#### Summary

Changes in the antioxidative enzyme activities and substrates of broccoli (*Brassica oleracea* L.) flower buds stored at 8, 16 and 24°C were investigated; the correlations between senescence and these functions are discussed. The chlorophyll and protein content decreased with time; the rate of decrease was faster at the high temperature than at lower ones. The malondialdehyde content increased with increasing temperature and time. The correlations between these senescence indices and antioxidative enzyme activities differed with storage temperature. At 8°C, senescence did not progress; no relation was observed. However, at 16°C, catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were related to the senescence indices, whereas superoxide dismutase (SOD), CAT, APX and peroxidase (POX) were highly correlated to them at 24°C. However, at all temperatures high correlations between the senescence indices and content of antioxidative substances, such as ascorbic acid and  $\beta$ -carotene, existed. These results indicate that increasing antioxidative enzyme activities and the concurrent reduction in substrates are closely related to senescence of broccoli flower buds.

**Key Words:** antioxidative enzyme, antioxidative substrate, broccoli, senescence, storage temperature.

#### 緒 言

植物器官のセネッセンス(老化)は、細胞自身の生理代謝の失調に起因し、生まれながらに持っていた先天的要因よりも環境刺激による後天的要因に支配される場合が多い(笠毛, 1991; Leopold, 1975). ストレス環境下においては、活性酸素が細胞内で多く生成され、細胞内の膜脂質の過酸化などを誘発するため、それが老化の一因であると指摘されている(Borochoy・Woodson, 1989; Panavas・Rubinstein, 1998; Sohalら, 2002). 一方、植物器官は活性酸素を消去するための抗酸化機能を有している。これまでに筆者らは、生育温度や光環境によって、植物葉の抗酸化機能が異なることを明らかにした(李・松井, 2001; 李ら, 2001; 李ら, 2003; 趙ら, 2003a, b).

ブロッコリーは花らいとして収穫され、老化進行が速い。花らいのクロロフィル分解、タンパク質含量低下、脂質過酸化などは貯蔵温度によって異なる(Lejaら, 2001; Pogson・Morris, 1997; Zhuangら, 1995, 1997). また、ブロッコリー花らの抗酸化機能と老化との関連については、抗酸化酵素のペルオキシダーゼ(POX)活性(Barth・Zhuang, 1996)や抗酸化物質としての還元型アスコルビン酸(AsA)含量(Nishikawaら, 2001)が老化に伴い変化することが報告されているが、収穫後ブロッコリーの老化現象を抗酸化機能の見地から検討した例はまだ少ない。

そこで本研究は、異なる貯蔵温度下のブロッコリー花らいについて、老化指標となるクロロフィル、タンパク質、マロンジアルデヒド(MDA)含量、抗酸化機構で重要な役割を果たしている抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、POXの活性、さらに代表的な抗酸化物質のAsA、 $\beta$ -カロテンの含量の経日変化を測定し、抗酸化酵素活性および抗酸化物質含量と老化指標と

2003年9月25日 受付. 2004年1月6日 受理.

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員奨励費)(No. 01316)の助成によって行われた.

本報告の一部は園芸学会平成14年度秋季大会で発表した.

\* Corresponding author.

の相関性を検討した。

## 材料および方法

### 1. 温度処理およびサンプリング

2002年3月4日にブロッコリー‘ビッグドーム’を収穫後、貯蔵温度8℃(低温区), 16℃(中温区), 24℃(高温区)に設定したインキュベータ内に6個ずつ貯蔵した。花らいを1日ごとにサンプリングして、速やかに1gずつ計量し、液体窒素で凍結後、-30℃に貯蔵した。凍結試料について以下の測定を行った。

### 2. クロロフィル、タンパク質およびMDAの定量

クロロフィルの定量はArnon (1949)の方法に従った。

タンパク質はLowryら(1951)の方法により牛血清アルブミン(ナカライテスク社製)を標準タンパク質として定量した。MDAは脂質過酸化の産物であり、趙ら(2003b)の方法に従って定量した。

### 3. 抗酸化酵素活性の測定

SOD, CATおよびAPXの活性測定は李・松井(2001)の方法に従い、新鮮重当たりの活性を算出した。POX活性の測定は趙ら(2003b)の方法に従った。

### 4. 抗酸化物質の定量

AsAはヒドラジン比色法(Roeら, 1948)により、 $\beta$ -カロテンは既報(趙ら, 2003b)に従い、酢酸エチル:アセトニトリル:メタノール(50:10:40)を移動相として液体ク

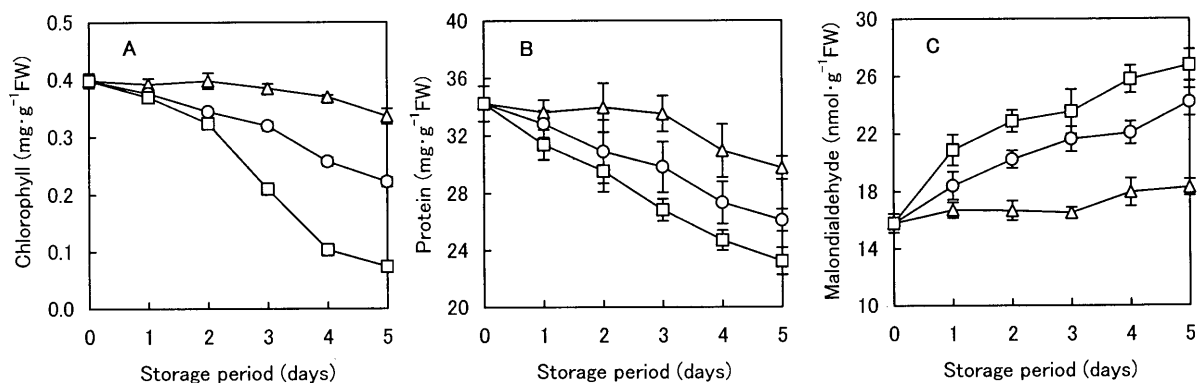


Fig. 1. Changes in chlorophyll (A), protein (B) and malondialdehyde (C) contents in broccoli flower buds stored at 8°C ( $\Delta$ ), 16°C ( $\circ$ ) and 24°C ( $\square$ ). Vertical bars indicate SE (n=3).

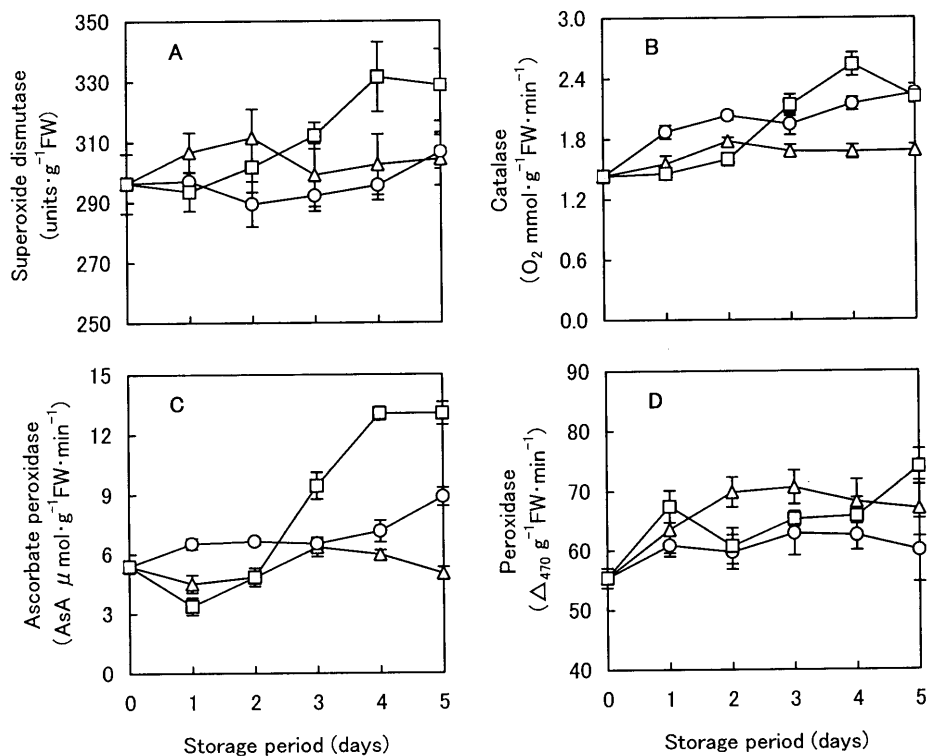


Fig. 2. Changes in superoxide dismutase (A), catalase (B), ascorbate peroxidase (C) and peroxidase (D) activities in broccoli flower buds stored at 8°C ( $\Delta$ ), 16°C ( $\circ$ ) and 24°C ( $\square$ ). Vertical bars indicate SE (n=3).

ロマトグラフィーにより分離・定量した。

測定は3反復実施し、各抗酸化酵素活性および抗酸化物質含量と老化指標のクロロフィル、タンパク質およびMDA含量との相関係数を算出し、t検定によりその有意性を評価した。

## 結 果

### 1. 老化指標の変化

第1図に8℃、16℃、24℃で貯蔵したブロッコリーの老化指標となるクロロフィル、タンパク質、MDA含量の経日変化を示した。クロロフィルとタンパク質含量は、貯蔵日数の経過に伴い低下し、貯蔵温度の高い区ほど変化幅が大きかった。MDA含量は温度の高い貯蔵区ほど増加幅が大きかった。

### 2. 抗酸化酵素活性の変化および老化指標との相関

第2図に8℃、16℃、24℃で貯蔵したブロッコリーのSOD, CAT, APX, POXの経日変化を示した。各貯蔵温度において、抗酸化酵素活性と老化指標となるクロロフィル、タンパク質、MDA含量との相関係数を算出した(第1表)。抗酸化酵素活性と老化指標との関係は貯蔵温度によって大きく異なり、低温区では全酵素において有意な相関関係が認められなかったが、高温になると高くなり、中温区ではCATとAPXにおいて、高温区では全酵素において有意な相関関係が認められた。

### 3. 抗酸化物質含量の変化および老化指標との相関

第3図に8℃、16℃、24℃で貯蔵したブロッコリーのAsAおよびβ-カロテン含量の経日変化を示した。抗酸化物質であるAsA含量は貯蔵1日目から、β-カロテン含量は貯蔵2日目から低下し、貯蔵温度の高い区ほど低下幅が大きかった。各貯蔵温度において、両抗酸化物質含

量と3老化指標との相関係数を求めた結果、全貯蔵温度区において、抗酸化物質と老化指標との間に有意な相関関係が認められた(第2表)。

## 考 察

一般的に、クロロフィルやタンパク質含量の低下は植物の老化に伴う典型的な現象である。また、脂質の過酸化で生じたMDA含量の増加は生物細胞の老化に伴う固有な特徴とされている。そこで本研究ではブロッコリーにおいてもこれらの3要素を老化指標としてとらえたところ、全温区においてクロロフィル、タンパク質含量が経日的に低下、MDA含量は増加し、Zhuangら(1995, 1997)やLejaら(2001)の研究結果と一致した。また、これらの老化指標の変動幅は貯蔵温度によって異なり、低温区で小さく、中温区では大きく、高温区では中温区よりもさらに大きかった。これらの結果から、貯蔵温度は収穫後のブロッコリー花らの老化進行に大きく影響し、温度が高いほど老化進行が速く、貯蔵温度が老化進行の調節に関与していることが確認された。

植物細胞内において、活性酸素であるスーパーオキシド( $O_2^-$ )や過酸化水素( $H_2O_2$ )、反応性のより高いヒドロキシルラジカルと1重項酸素、およびフリーラジカルの3重項励起クロロフィルや脂質ラジカルなどは、クロロフィル、タンパク質、膜脂質を分解・損傷することによって、細胞の老化に関与する。 $O_2^-$ と $H_2O_2$ は主に抗酸化酵素によって消去され、他の活性酸素とフリーラジカルは抗酸化物質によって消去される(Borochoy・Woodson, 1989; 真野・浅田, 1999; Panavas・Rubinstein, 1998; Sohalら, 2002)。SODは $O_2^-$ を、CAT, APXおよびPOXは $H_2O_2$ を消去する酵素であり、これらの酵素活性は環境温

**Table 1.** Correlation coefficients between antioxidative enzyme activities, and chlorophyll, protein and malondialdehyde contents in broccoli flower buds at different storage temperature.

| Activities of<br>antioxidative enzymes                                       | Storage temperature<br>(°C) | Chlorophyll<br>(mg · g <sup>-1</sup> FW) | Protein<br>(mg · g <sup>-1</sup> FW) | Malondialdehyde<br>(nmol · g <sup>-1</sup> FW) |
|--|-----------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Superoxide dismutase<br>(units · g <sup>-1</sup> FW)                         | 8                           | 0.028                                    | -0.216                               | 0.352  |
|  | 16                          | -0.243                                   | -0.071                               | 0.207  |
|  | 24                          | -0.725**                                 | -0.656**                             | 0.591**  |
| Catalase<br>(O <sub>2</sub> mmol · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )  | 8                           | 0.066                                    | -0.01                                | 0.097  |
|  | 16                          | -0.768**                                 | -0.769**                             | 0.769**  |
|  | 24                          | -0.909**                                 | -0.813**                             | 0.749**  |
| Ascorbate peroxidase<br>(AsA μmol · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> ) | 8                           | -0.001                                   | -0.109                               | -0.001   |
|  | 16                          | -0.789**                                 | -0.638**                             | 0.568*   |
|  | 24                          | -0.952**                                 | -0.847**                             | 0.693**  |
| Peroxidase<br>(Δ <sub>470</sub> g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )     | 8                           | -0.129                                   | -0.036                               | -0.098   |
|  | 16                          | -0.316                                   | -0.348                               | 0.519*   |
|  | 24                          | -0.601**                                 | -0.666**                             | 0.608**  |

\* and \*\* indicate significant at  $P=0.05$  and  $0.01$ , respectively.

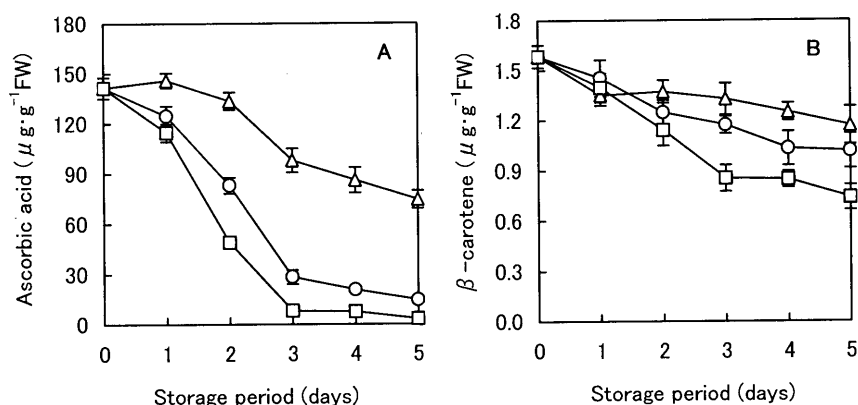


Fig. 3. Changes in ascorbic acid (A) and  $\beta$ -carotene (B) contents in broccoli flower buds stored at 8°C (△), 16°C (○) and 24°C (□). Vertical bars indicate SE (n=3).

Table 2. Correlation coefficients between antioxidative substance, and chlorophyll, protein and malondialdehyde contents in broccoli flower buds at different storage temperature.

| Content of antioxidative substances<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) | Storage temperature<br>(°C) | Chlorophyll<br>( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) | Protein<br>( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) | Malondialdehyde<br>( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) |
|---|-----------------------------|---|---|---|
| Ascorbic acid   | 8                           | 0.686**   | 0.749**   | -0.678**  |
|   | 16                          | 0.900**   | 0.812**   | -0.901**  |
|   | 24                          | 0.886**   | 0.914**   | -0.873**  |
| $\beta$ -carotene   | 8                           | 0.582*  | 0.673**   | -0.540*   |
|   | 16                          | 0.836**   | 0.757**   | -0.791**  |
|   | 24                          | 0.888**   | 0.878**   | -0.805**  |

\* and \*\* indicate significant at  $P=0.05$  and  $0.01$ , respectively.

度によって変化し(李・松井, 2001; 李ら, 2003), 老化進行に伴っても変化する(Imahori ら, 2000; McRae・Thompson, 1983; Yamane ら, 1999). 収穫後のブロッコリー花らいにおいて, 老化がほとんど進行しない 8°C 貯蔵の低温区において, CAT と POX 活性は上昇したが, 老化指標との相関は認められず, 両酵素活性の上昇は老化に関与せず, 低温ストレスに寄与すると思われる. 一方, 16°C 貯蔵の中温区では CAT と APX 活性が, 24°C 貯蔵の高温区では全酵素活性が経日的に上昇し, 老化指標との間に高い相関が認められた. これらの結果から, ブロッコリー花らいの抗酸化酵素は高い貯蔵温度によって老化進行が促進されるとその活性を上昇させて, 活性酸素を積極的に消去すると思われる. 言い換えれば, 貯蔵温度が高いほど, ブロッコリー花らいで活性酸素が多く生成し, 老化を誘導すると推察される.

ブロッコリーに多く含まれる抗酸化物質である AsA や  $\beta$ -カロテンは(香川, 2001), 貯蔵温度の高い区ほど低下し, 全温度区で老化指標との間に高い相関が認められた. このことから, 収穫後のブロッコリーでは花らいの抗酸化物質レベルはその老化進行に密接に関与し, 抗酸化物質レベルの低下が老化の要因の一つであると考えられる.

## 摘 要

異なる貯蔵温度(8, 16, 24°C)下におけるブロッコリー花らいの老化に伴う抗酸化機能の変化を調べ, 抗酸化機能と老化との関係について検討した. 老化指標となるクロロフィルとタンパク質含量は貯蔵温度の高い区ほど経日的に低下し, マロンジアルデヒド含量は温度の高い区ほど経日的に増加した. 抗酸化酵素活性と老化指標との間の関係は貯蔵温度によって異なり, 老化がほとんど進まない 8°C の低温区では有意な相関が認められず, 16°C の中温区ではカタラーゼ(CAT)とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)において, 24°C の高温区ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD), CAT, APX およびペルオキシダーゼ(POX)との間に有意な相関が認められた. 抗酸化物質の還元型アスコルビン酸,  $\beta$ -カロテン含量と老化指標との間には貯蔵温度に関わらず, いずれも高い相関が認められた. これらの結果から, ブロッコリー花らいの老化には, 抗酸化酵素は活性の上昇により積極的に関与し, 抗酸化物質含量の減少も密接に関与することが考えられる.

## 引用文献

- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1–15.
- Barth, M. M. and H. Zhuang. 1996. Packaging design affects antioxidant vitamin retention and quality of broccoli florets during postharvest storage. Postharvest Biol. Technol. 9: 141–150.
- Borochoy, A. and W. R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. Hort. Rev. 11: 15–43.
- 香川芳子監修. 2001. 五訂食品成分表 2001. 女子栄養大学出版部. 東京. p. 64–103.
- 笠毛邦弘. 1991. 発芽から老化まで—植物の成長—. 太田次郎・石原勝敏・黒岩澄雄・清水 碩・高橋景一・三浦謹一郎編. 基礎生物学講座. 5 植物の生理. 朝倉書店. 東京. p. 172–211.
- Imahori, Y., Y. Kanetsune, Y. Ueda and K. Chachin. 2000. Changes in hydrogen peroxide content and antioxidative enzyme activities during the maturation of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 690–695.
- Leja, M., A. Mareczek, A. Starzyńska and S. Rozek. 2001. Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. Food Chemistry 72: 219–222.
- Leopold, A. C. 1975. Aging senescence and turnover in plants. Bioscience 25: 659–662.
- 李 進才・松井鑄一郎. 2001. 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. 園学雑. 70: 360–365.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001. 光ストレスおよび遮光栽培における *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性および色素含量の変化. 園学雑. 70: 372–379.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎・前澤重禮. 2003. 低温順化した *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の過酸化水素含量および抗酸化酵素活性の低温処理による変動. 園学研. 2: 205–208.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- McRae, D. G. and J. E. Thompson. 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. Planta 158: 185–193.
- 真野純一・浅田浩二. 1999. 光酸素ストレスを回避する分子機構. 蛋白質核酸酵素. 44: 2239–2245.
- Nishikawa, F., M. Kato, T. Kamo, R. Wang, H. Hyodo, Y. Ikoma, M. Sugiura and M. Yano. 2001. Enzymatic catabolism of ascorbate in florets of harvested broccoli during senescence. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70: 709–715.
- Panavas, T. and B. Rubinstein. 1998. Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Heimerocallis hybrid*) petals. Plant Sci. 133: 125–138.
- Pogson, B. J. and S. C. Morris. 1997. Consequences of cool storage of broccoli on physiological and biochemical changes and subsequent senescence at 20°C. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 553–558.
- Roe, J. H., B. M. Mary, M. J. Oesterling and M. D. Charlottle. 1948. The determination of diketo-L-gulonic acid, dehydro-L-ascorbic acid, and L-ascorbic acid in the same tissues by 2, 4-dinitrophenyl hydrazine method. J. Biol. Chem. 174: 201–208.
- Sohal, R. S. 2002. Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radic. Biol. Med. 33: 575–586.
- Yamane, K., S. Kawabata and N. Fujishige. 1999. Changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase during senescence of gladiolus florets. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 798–802.
- 趙 習コウ・李 進才・松井鑄一郎・前澤重禮. 2003a. *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の色素含量および抗酸化酵素活性に及ぼす紫外線の影響. 園学雑. 72: 446–450.
- 趙 習コウ・李 進才・松井鑄一郎・前澤重禮. 2003b. キュウリにおける節位の異なる葉の抗酸化レベル. 園学雑. 72: 324–328.
- Zhuang, H., D. F. Hildebrand and M. M. Barth. 1995. Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem. 43: 2585–2591.
- Zhuang, H., D. F. Hildebrand and M. M. Barth. 1997. Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. Postharvest Biol. Technol. 10: 49–58.