

## 塩ストレスを利用した高機能性・高フェノール化合物含有トマトの作出に関する研究

圖師 一文

宮崎大学農学部植物生産環境科学科

**概要** トマト生産において、品質向上のために塩ストレスの付与が試みられている。近年、トマトの機能性としてポリフェノール(フェノール化合物)が注目されているが、これまでに塩ストレス下で栽培したトマトのポリフェノール含量の変化を検討した報告は少ない。そこで本研究は、塩ストレスを与えたトマトの機能性成分の向上を目指し、塩ストレスによるポリフェノール含量の変化を明らかにすることを目的に行った。

供試品種として、塩ストレスに対する反応の異なる大玉トマト‘ハウス桃太郎(HM)’とミニトマト‘ミニキャロル(MC)’を用い、春夏期にパミスを培地とした循環型固形培地耕システムで栽培した。塩ストレス処理は培養液に 25、50、75、100 mM NaCl を加えることで行った。果実は、各品種とも第 2 果房の完熟果実を収穫し、総ポリフェノール含量および抗酸化能を測定した。また、塩ストレスによるポリフェノール含量の変化と他の食味成分(糖, 有機酸, アミノ酸)の変化の関連性を明らかにするために、ネットワーク分析を行った。

塩ストレスが生体重 1 g 当たりのポリフェノール含量に及ぼす影響は、品種およびストレス強度によって大きく異なった。すなわち、HM のポリフェノール含量は塩ストレス強度の増加に伴い上昇し、100 mM NaCl 区では対照区の 1.7 倍に達したが、MC のポリフェノール含量は 50、75 mM NaCl で対照区(0 mM NaCl)より低下した。一方、塩ストレスが抗酸化活性に及ぼす影響は、HM ではポリフェノール含量と同様な傾向を示したが、MC では異なった。次に、乾物重 1 g 当たりの含量を算出した結果、MC のポリフェノール含量は、塩ストレス(25, 50, 75, 100 mM)によって低下し、HM では処理間差が認められなかった。さらに、ネットワーク分析の結果、ポリフェノール含量の変化と関連性のある食味成分が明らかになった。

以上のことから、様々な塩ストレス強度下におけるトマトのポリフェノール含量は、品種により異なるが、強い塩ストレス強度下で上昇することが明らかになった。また、そのメカニズムとして、塩ストレスによって上昇する場合は濃縮効果に起因すること、低下する場合は生成量自体の減少に起因することが推察された。さらに、食味および抗酸化活性と同時にポリフェノール含量も上昇する場合もあることから、塩ストレスによるポリフェノールの変化は塩ストレス下で栽培したトマトの新たな特徴として挙げることができると考えられる。

### 1. 研究目的

現在、我が国の津波被害農耕地や世界の塩類集積土壌において、除塩に関する研究が広く行われているが、一方では塩を積極的に利用した農業生産も必要である。トマトは我が国を始め世界中で広く食されている野菜の一つであり、トマトに塩(NaCl)ストレスを与え、糖、有機酸およびアミノ酸などの食味成分が増加することが明らかにされている<sup>[1]</sup>。このため、トマトは塩を積極的に使用した農業生産を行う上で適した作物であると考えられる。

近年、園芸農産物の品質として外観や大きさだけでなく、食味成分や健康に良い成分(機能性成分)を多く含むものが重要視されていることから、塩を積極的に利用したトマト栽培を普及させるためには、食味だけでなく機能性を高めるための栽培技術の確立が必要である。トマトの機能性に関して、がんや動脈硬化などの原因となる活性酸素を消去する働きがあるポリフェノール(フェノール化合物)が注目されている<sup>[2]</sup>。一方、ポリフェノール含量は、トマトの栽培時期(夏, 冬)および部位(種子, 果皮)だけでなく

乾燥ストレスなどによっても変動することが報告されていることから<sup>3-7)</sup>、塩ストレスによってトマトに含まれるポリフェノール含量が変動すると推察される。しかしながら、これまでに塩ストレス下で栽培したトマトのポリフェノール含量の変化を検討した報告は少なく、品種間差や含量が増加あるいは減少するのかなどについては不明のままである。これらのことから、塩ストレスを与えたトマトにおけるポリフェノール含量の変化を明らかにし、より高めるような栽培法の開発を行うことは、塩を積極的に利用する上で重要である。

一方、塩ストレスによってポリフェノールの高含量化を試みる場合、食味の劣る果実では消費者に受け入れられないので、他の食味成分の変化も同時に明らかにする必要がある。我々はこれまで塩ストレスによる食味成分の変化を、要因間の関連性をビジュアル化するために用いられるネットワーク分析によって明らかにした<sup>1)</sup>。そこで、塩ストレスによるポリフェノール含量の変化と食味成分の変化との関連性をネットワーク分析によって明らかにできれば、食味と同時にポリフェノール含量の高いトマト果実の生産が可能となり塩ストレスを用いたトマトのさらなる差別化につながる。

本研究の目的は、塩ストレスを与えたトマトの機能性成分の向上を目指し、塩ストレスによるポリフェノール含量の変化ならびにその変動メカニズムを明らかにするとともに、食味成分とポリフェノール含量の変化の関連性を明らかにすることで、塩ストレスによるトマト果実のさらなる差別化のための基礎的知見を得ることである。

## 2. 研究方法

### 2.1 栽培および処理方法

供試品種として、塩ストレスに対する反応の異なる大玉系品種‘ハウス桃太郎’(HM)と小果系品種‘ミニキャロル’(MC)を用いた<sup>8)</sup>。植物は、春夏期にパミスを培地とした循環型固形培地耕システム(九州電力製)で栽培した。培養液は、大塚 A 処方培養液 0.5 単位(大塚化学製)を用い、1 週間毎に交換した。培養液の電気伝導度(EC)は、約 1.5d S m<sup>-1</sup>であった。植物体は、1 本仕立てとし、腋芽はすべて定期的に取り除いた。塩ストレス処理は、培養液に 25、50、75、100 mM NaCl を加えることで行った。50、75、100 mM 処理(50、75、100 mM NaCl)は、NaCl 添加による

急激な浸透圧ショックを防ぐために 1 日当たり 25 mM NaCl ずつ加えることで開始した。急激な対照として NaCl を加えない処理を設けた。塩ストレスは、第 1 果房の開花期から実験終了時までに行い、培養液の交換と同時に NaCl を添加した。

### 2.2 ポリフェノール含量および抗酸化活性の測定

果実は、各品種とも第 2 果房の完熟果実を収穫し、ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定した。ポリフェノール含量は、果実を凍結乾燥後、均一に粉碎した試料を 80%メタノールとともに 10°C 以下に設定した超音波洗浄器内で 1 時間抽出後、フォーリン・チオカルト法で測定した。含量は没食子酸当量で示した。なお、抽出液から糖、アスコルビン酸などの還元物質を固相抽出(Oasis HLB Cartridge, Waters, MA, USA)によって取り除き、この値を引くことで含量の補正を行った<sup>9)</sup>。また、ポリフェノールの抗酸化活性への寄与度を明らかにするために、ポリフェノールと同じ抽出液を用いて ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))ラジカル消去活性<sup>10)</sup> および DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル消去活性<sup>11)</sup> を測定し、Trolox 当量で示した。また、SOD Assay Kit-WST(Dojindo Molecular Technology Inc., Kumamoto, Japan)を用いて、スーパーオキシドラジカル消去活性(SRSA)を測定した。

### 2.3 ポリフェノール含量の変化と他の成分の変化の関連性

塩ストレスによるポリフェノール含量の変化と他の成分(主に食味と関連する糖、有機酸、アミノ酸)の変化の関連性を明らかにするために、ネットワーク分析を行った。糖、有機酸およびアミノ酸は、凍結乾燥後、均一に粉碎した試料を 80%エタノールで抽出後、Zushi and Matsuzoe<sup>1)</sup>に従い高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。ネットワーク分析は、測定した糖、有機酸およびアミノ酸含量とポリフェノール含量の相関分析を行い、1%レベルにおいて有意差の認められた項目を用いて行った。ネットワーク分析は、Zushi and Matsuzoe<sup>1)</sup>に従った。

## 3. 研究結果

### 3.1 塩ストレスが果実重に及ぼす影響

塩ストレス下で栽培した果実は、品種にかかわらず塩ストレス強度の増加に伴い小玉化し、100 mM NaCl におい

では対照区の約 50%となった (Fig. 1)。また、果実の水分含量は塩ストレス強度の増加に伴い低下した (データ省略)。

### 3.1 塩ストレスがポリフェノール含量および抗酸化能に及ぼす影響

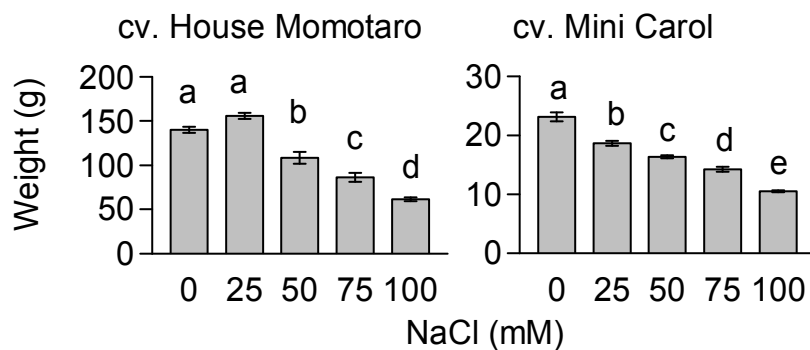
塩ストレスが生体重 1g 当たりのポリフェノール含量に及ぼす影響は、品種およびストレス強度によって大きく異なった。すなわち、HM のポリフェノール含量は塩ストレス強度の増加に伴い上昇し、100 mM NaCl 区では対照区の約 1.7 倍に達したが、MC のポリフェノール含量は 50、75 mM NaCl で対照区 (0 mM NaCl) より低下した (Fig. 2)。一方、塩ストレスが抗酸化活性 (ABTS, DPPH ラジカル消去能および SRSA) に及ぼす影響は、HM ではポリフェノール含量と同様な傾向を示したが、MC の SRSA では 100

mM NaCl 区で対照区より高まった (Fig. 3)。

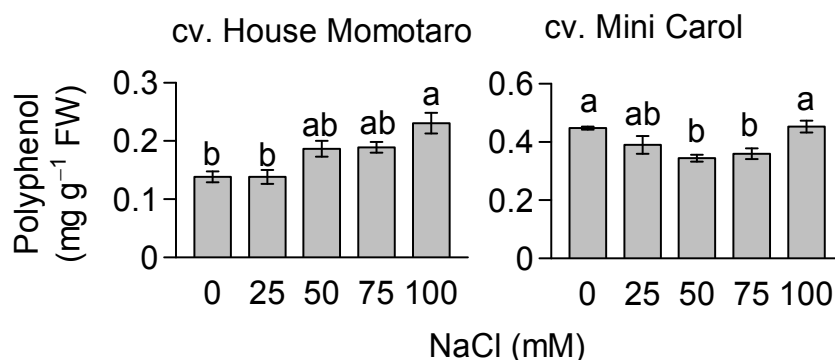
次に、生体重 1g 当たりのポリフェノール含量の変動が、単なる果実内水分の低下によるものか、真の生成量の増減によるものか明らかにするために、乾物重 1g 当たりの含量を算出した。この結果、MC のポリフェノール含量は、塩ストレス (25, 50, 75, 100 mM) によって低下し、HM では処理間差が認められなかった (Fig. 4)。一方、塩ストレスが抗酸化活性 (ABTS, DPPH ラジカル消去能および SRSA) に及ぼす影響は、両品種ともポリフェノール含量と同様な傾向を示した (データ省略)。

### 3.2 塩ストレス下におけるポリフェノール含量を食味成分との関連性

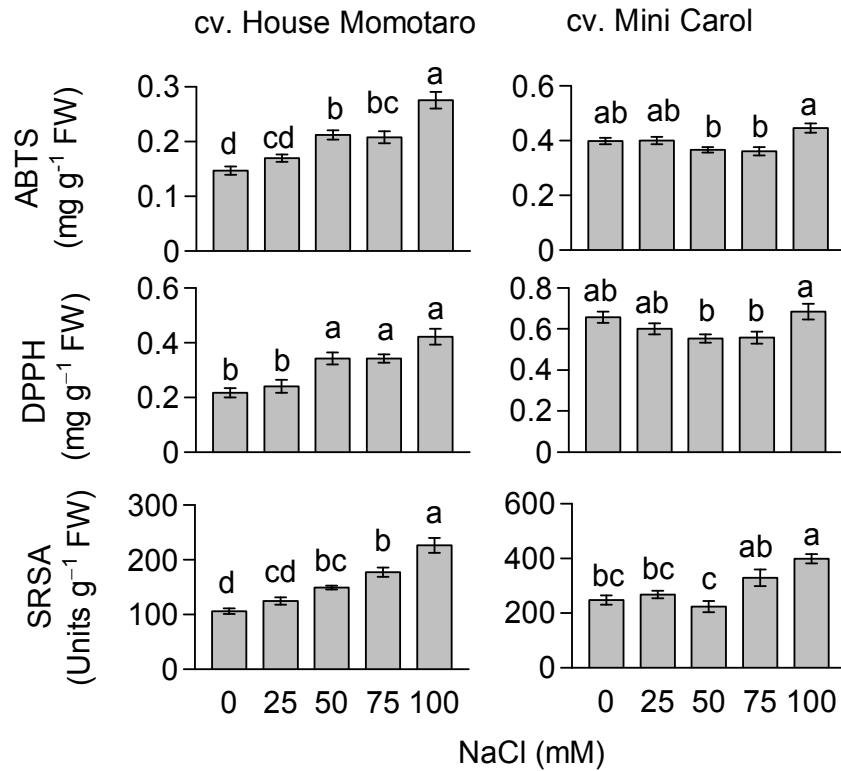
塩ストレスによるポリフェノール含量の変化と他の成分 (主に食味と関連する糖, 有機酸, アミノ酸) の変化の関連



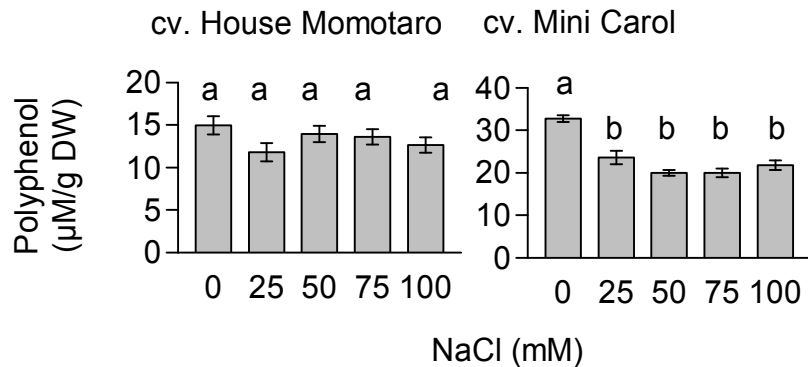
**Fig. 1.** Effect of salt stress on fruit weight (g) of cherry (cv. Mini Carol) and normal-fruited (cv. House Momotaro) tomato fruit. Data are shown as the mean  $\pm$  standard error ( $n \geq 20$ ). Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  according to the Tukey–Kramer test.



**Fig. 2.** Effect of salt stress on polyphenol content on a fresh weight (FW) basis of cherry (cv. Mini Carol) and large-fruited (cv. House Momotaro) tomato fruit. Data are shown as the mean  $\pm$  standard error ( $n \geq 6$ ). Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  according to the Tukey–Kramer test.



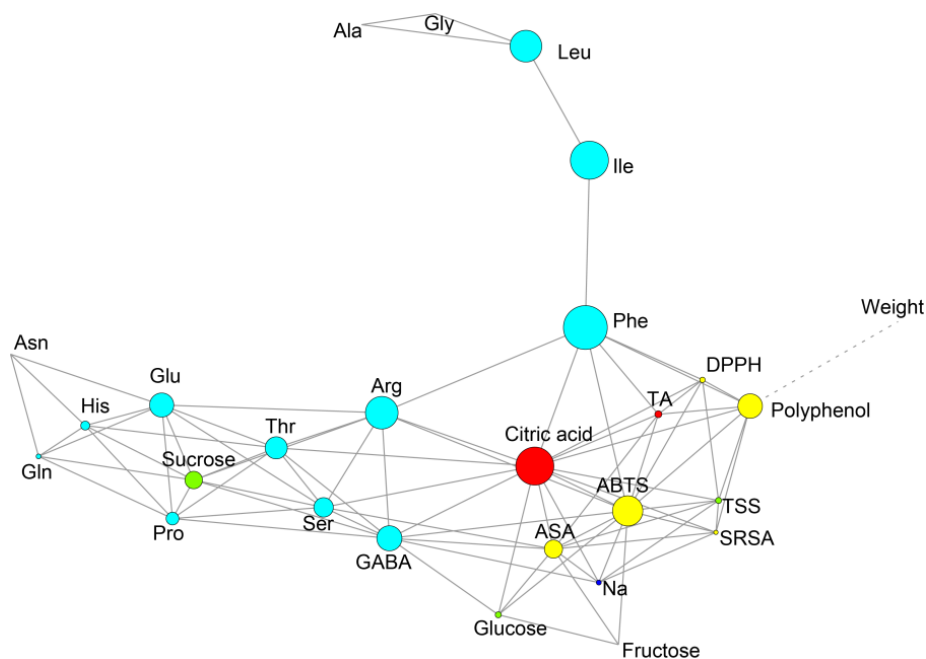
**Fig. 3.** Effect of salt stress on antioxidant capacities (ABTS, DPPH, SRSA) of cherry (cv. Mini Carol) and large-fruited (cv. House Momotaro) tomato fruit. Other details are the same as for Fig. 2.



**Fig. 4.** Effect of salt stress on polyphenol content on a dry weight (DW) basis of cherry (cv. Mini Carol) and large-fruited (cv. House Momotaro) tomato fruit. Other details are the same as for Fig. 2.

性を明らかにするためにネットワーク分析を行った。ネットワーク分析の結果、品種によってポリフェノールの変化と関連のある成分が異なった (**Fig. 5**)。すなわち、HMにおいて、ポリフェノールは食味成分の中で糖度、酸度、クエン酸、フェニルアラニンと正の相関が認められ、果重とは負の相関が認められた (**Fig. 4**)。一方、個々の糖 (スクロ

ース、グルコース、フルクトース) および食味に関連するアミノ酸 (グルタミン酸、アスパラギン酸) とは関連性が認められなかった。MC においては、ポリフェノールと食味成分との関連性は認められなかった (データ省略)。



**Fig. 5.** Correlation network analysis of polyphenol and agrochemical properties such as fruit weight, brix (%), acid (%), Na<sup>+</sup>, organoleptic compounds (sugar, organic acid, amino acid), ascorbic acid (ASA) and antioxidant activities (DPPH, ABTS and SRSA) of tomato fruit (cv. House Momotaro) grown under different salt stress intensities. Only significant ( $P < 0.01$ ) correlations are drawn. Correlations are indicated with solid lines (positive correlation) or dotted lines (negative correlation). Sizes of vertices indicate the betweenness centrality.

#### 4. 考 察

本研究において、塩ストレス下で栽培したトマト果実のポリフェノール含量は品種によって異なるが、塩ストレス強度の上昇に伴い高まる場合があることが明らかになった。これまでの報告においても、希釈海水 ( $EC = 8 \text{ dS m}^{-1}$ ) をトマトの栽培時に与えることでポリフェノール含量が 10% 上昇すること<sup>[12]</sup>、培養液に NaCl ( $EC = 10 \text{ dS m}^{-1}$ ) を添加することでポリフェノール含量が 20% 上昇すること<sup>[13]</sup> が報告されている。我々の結果では、HM に 100 mM NaCl ( $EC = 12 \text{ dS m}^{-1}$ ) 付与した場合のみ、ポリフェノール含量が対照区の約 1.7 倍 (約 70%) まで上昇し (Fig. 2)、これまでの報告より高い上昇率を示した。このことから、塩ストレス強度が 100 mM NaCl ( $EC = 12.0 \text{ dS m}^{-1}$ ) より低い場合は、ポリフェノール含量の上昇が低いか、あるいはほとんど認められないことが示唆された。また、Krauss *et al.*<sup>[13]</sup> は、塩ストレスによるポリフェノール含量の上昇率が、リコペン含量と  $\beta$ -カロテン含量の上昇率より低いことを報告している。これらのことから、ポリフェノール含量は、他の成分と比べて塩ストレスに対する感受性が弱く、比較的強いストレス強度

の場合でないと影響が現れないと考えられる。

一方、これまでの報告において、塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響の品種間差については検討されていない。本研究において、大玉系品種と小果系品種を比較した結果、塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響は異なった。すなわち、大果系品種である HM は塩ストレスによって生体重 1g 当たりのポリフェノール含量は高まったが、小果系品種である MC では影響がなかった。また、乾物重 1g 当たりにおいても、品種間差が認められた。このことは、塩ストレスによるポリフェノール含量上昇を試みる場合、品種の選択が重要であることを示している。トマト果実におけるポリフェノール含量の品種間差は、多くの研究で報告されている<sup>[2, 4]</sup>。本実験で供試した品種において、ポリフェノール含量を対照区で比較した場合、HM のポリフェノール含量は MC の約 1/2 であり、塩ストレスを与えることによって MC の対照区と同程度に達した (Fig. 2)。したがって、塩ストレスによって効果的にポリフェノール含量を高める場合、ポリフェノール含量が比較的 low、塩ストレス反応に感受性の高い品種の選択が必要で

ある。

塩ストレスによるポリフェノール含量の変動メカニズムについて、Krauss *et. al.* [13]は、ストレスに対する防御反応によってポリフェノール含量が上昇することを示唆している。しかしながら、本実験における、乾物重 1g 当たりのポリフェノール含量は、HM では影響が認められず、MC では25、50、75、100 mM NaCl で対照区より低下した (Fig. 4)。このことから、HM における塩ストレスによる生体重 1g 当たりのポリフェノール含量の上昇は、生成量の変化を伴わない果実の小玉化に伴う‘濃縮効果’であると考えられる。一方、MC における塩ストレスによるポリフェノール含量の変化は、ポリフェノール含量の生成量自体の減少に起因すると考えられる。これまでの研究において、MC では塩ストレスが引き起こす活性酸素の生成に対する抗酸化システムによって、抗酸化成分の一つであるアスコルビン酸が低下することが示されている<sup>[8, 14]</sup>。本研究において、MC におけるポリフェノール含量の低下メカニズムは明らかでないが、塩ストレスによって抗酸化システムが活性化し、ポリフェノールがアスコルビン酸と同様に活性酸素の消去に利用されたことに起因するかもしれない。

一般に、トマトを含め食品の機能性を評価する場合、さまざまな抗酸化活性を測定し、抗酸化活性の多少で機能性を評価するとともに、抗酸化活性に寄与する成分を明らかにする。本実験において、塩ストレス下で栽培した果実の抗酸化活性は品種および測定項目によって影響が異なり、HM では塩ストレスによって上昇したが、MC ではSRSA のみ上昇した。さらに抗酸化活性の変化とポリフェノール含量の変化は、HM では一致したが MC では異なった (Fig. 3)。これらのことから、塩ストレスによるポリフェノール含量の変化は、MC では抗酸化活性への寄与が低いことが明らかになった。

塩ストレスによってポリフェノール含量の高含量化を試みる場合、他の食味成分にも影響が生じるため、食味成分の変化を同時に明らかにし、それらの関連性を検討する必要がある。そこで、本実験においてネットワーク分析を用いてポリフェノール含量と他の食味成分の関連性を検討した結果、HM では、ポリフェノール含量の変化と糖度、酸度、クエン酸、フェニルアラニンなどの食味成分と正の相関が認められたことから、塩ストレスによってポリフェノール含量と同時に食味成分含量も高めることができることが

明らかになった。しかしながら、ポリフェノール含量の変化が実際の食味にどのような影響を及ぼすかは今後の検討課題である。一方、MC においては、ポリフェノールと食味成分との関連性は認められなかったことから、他の成分とは異なる経路で含量の変化が生じていると考えられる。

以上のことから、様々な塩ストレス強度下で栽培したトマトのポリフェノール含量は、品種により異なるが、強い塩ストレス強度下で上昇することが明らかになった。また、そのメカニズムとして、塩ストレスによって生体重当たりで上昇する場合は濃縮効果に起因すること、乾物重当たりで低下する場合は生成量自体の減少に起因することが推察された。さらに、食味および抗酸化活性と同時にポリフェノール含量も上昇する場合もあることから、塩ストレスによるポリフェノールの変化は塩ストレス下で栽培したトマトの新たな特徴として挙げることができると考えられる。

## 5. 今後の課題

当初の計画では、個々のポリフェノール組成の変化および関連酵素活性測定することによる変動メカニズムの解明を行う予定であったが、研究助成期間内では十分に検討できなかった。今後は、個々のポリフェノール組成およびその変動メカニズムをより詳細に検討し、塩ストレスによってポリフェノール含量を高めるための基礎的知見を得ていきたい。また、本研究において、塩ストレスがポリフェノール含量に与える影響には品種間差が認められたことから、今後、塩ストレスによってポリフェノール含量が高まる品種のスクリーニングも行う予定である。

## 6. 引用文献

- [1] Zushi, K. and N. Matsuzoe, 2011. Utilization of correlation network analysis to identify differences in sensory attributes and organoleptic compositions of tomato cultivars grown under salt stress. *Scientia Horticulturae* 129, 18-26.
- [2] Slimestad, R. and M. Verheul, 2009. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 1255-1270.
- [3] Luthria, D.L., S. Mukhopadhyay, and D.T. Krizek, 2006.

- Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 771-777.
- [4] Martínez-Valverde, I., M.J. Periago, G. Provan, and A. Chesson, 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 323-330.
- [5] Dorais, M., D. Ehret, and A. Papadopoulos, 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews* 7, 231-250.
- [6] Toor, R.K., G.P. Savage, and A. Heeb, 2006. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 20-27.
- [7] Toor, R.K., G.P. Savage, and C.E. Lister, 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 1-10.
- [8] Zushi, K. and N. Matsuzoe, 2009. Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia Horticulturae* 120, 181-187.
- [9] George, S., P. Brat, P. Alter, and M.J. Amiot, 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1370-1373.
- [10] Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- [11] Oki, T., M. Osame, M. Masuda, M. Kobayashi, S. Furuta, Y. Nishiba, T. Kumagai, T. Sato, and I. Suda, 2003. Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breeding Science* 53, 101-107.
- [12] Incerti, A., F. Navari-Izzo, A. Pardossi, and R. Izzo, 2009. Seasonal variations in polyphenols and lipoic acid in fruits of tomato irrigated with sea water. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 1326-1331.
- [13] Krauss, S., W.H. Schnitzler, J. Grassmann, and M. Voitke, 2006. The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 441-448.
- [14] Zushi, K., N. Matsuzoe, and M. Kitano, 2009. Developmental and tissue-specific changes in oxidative parameters and antioxidant systems in tomato fruits grown under salt stress. *Scientia Horticulturae* 122, 362-368.

## Production of Tomato Fruit Containing High Health-Promoting Properties and High Phenolic Compounds Using Salt Stress

Kazufumi Zushi

University of Miyazaki

### Summary

In the tomato production, salt stress has been applied to improve the organoleptic and health-promoting qualities. However, although many researches about the effects of salt stress on fruit qualities were accumulated, changes in health-promoting quality such as polyphenol content are not conducted. Here we investigate the effect of salt stress on polyphenol content of tomato fruit. Two tomato cultivars used in this study; normal-fruited type 'House Momotaro' (HM) and cherry type 'Mini Carol' (MC). Plants were grown under different salt stress intensities (25, 50, 75, 100 mM) at a closed irrigation system. Red-ripe fruits were harvested on the second truss, and polyphenol and antioxidant capacity were measured. In the HM, polyphenol content on a fresh weight (FW) basis was higher in the 100 mM salt-stressed fruit than in the control fruit. In contrast, in the MC, polyphenol content was not affected by the salt stress. In antioxidant capacity, in the HM, all antioxidant capacities were higher in the 50, 75 and 100 mM salt-stressed fruit than in the control fruit. However, although in the MC, only SRSA was higher in the 75 and 100 mM salt-stressed fruit than in the control fruit. Furthermore, polyphenol contents and antioxidant activities on a dry weight basis were significant lower in the salt-stressed fruit than in the control fruit in the MC fruit, but not in the HM fruit. To visualize the interaction of polyphenol and organoleptic data profiles, by using a network-based analysis, we indicate that salt stress modulates the design principles of interactions, and their interactions depend on cultivars. We concluded that polyphenol content on a FW basis was increased by the salt stress, but the effect largely depends on cultivars. In the physiological mechanism, the higher level of polyphenol content on a FW basis may be contributed to the 'concentration effect', but the lower level on a dry weight basis led to regulate of salt-induced metabolic changes.