

ヤーコン塊根中のフルクトオリゴ糖含量保持にむけた 低温減圧貯蔵に関する研究

日本獣医生命科学大学 応用生命科学部
奈良井 朝子

1. 研究の目的と背景

南米アンデス高地原産のヤーコン (*Smallanthus sonchifolius*) はキク科の多年草植物で、地下器官に繁殖器官として種イモに利用される塊茎と食用イモの塊根がある。塊根は晩秋から初冬に収穫され、その90%近くは水分から成り、乾物の大半をフルクトース、グルコース、スクロース、そして重合度3~10 (平均重合度4.3) のイヌリン型フルクトオリゴ糖 (fructooligosaccharide: FOS, 図1) が占めている¹⁻³⁾。FOSは難消化性オリゴ糖として低カロリー甘味料の用途に加えて、これを資化する腸内有用菌のビフィズス菌群の増殖を促して腸内環境を改善するプレバイオティクス素材としても注目されている⁴⁾。また、塊根には100gあたり200~400mgのポリフェノール (クロロゲン酸とその他7種類の各種コーヒー酸エステル) が含まれており^{5,6)}、そのうち特徴的成分であるトリカフェオイルアルトラル酸は茶カテキンに匹敵するかそれ以上の強力な抗酸化活性を示し、発がんや動脈硬化に対する抑制的作用が期待されているとともに、消化管における糖質分解酵素の

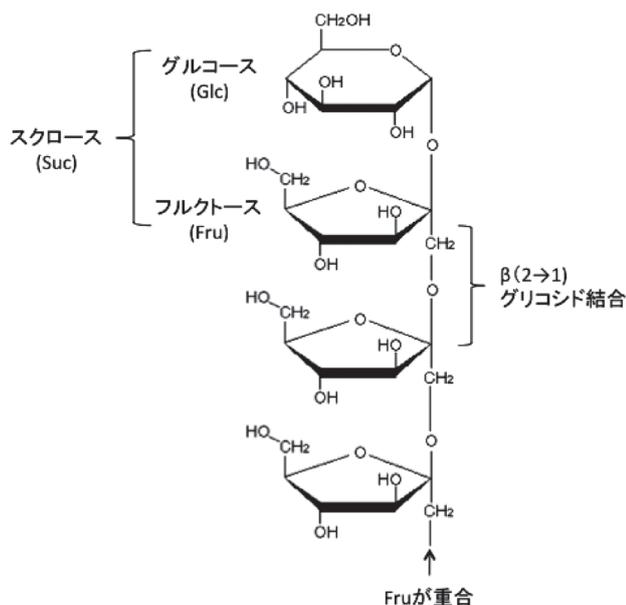


図1 イヌリン型フルクトオリゴ糖 (FOS)

スクロース (Suc) のフルクトース (Fru) 残基に $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合で Fru が重合している。Glc 残基数が1, Fru 残基数がn とすると重合度はn+1で、本稿ではGFnとして表記する。

働きを阻害して食後血糖値の上昇を抑えることが報告されている⁷⁾。このようにヤーコン塊根はこれを摂取したヒトの健康維持・増進に効果が期待される成分を豊富に含んでいる。一方で、収穫後に低温貯蔵すると、ポリフェノール量はほとんど変化しない一方で、FOSが著しく減少することが知られている^{1,5,8)}。塊根中では、内在性のフルクタン加水分解酵素 (fructan 1-exohydrolase: 1-FEH, EC 3.2.1.80) がFOSの末端フルトースを加水分解すると考えられており、本酵素によるFOS分解産物であるフルクトースの量が顕著に増加する^{1,8)}。そのため、ヤーコンの健康維持・増進効果を最大限に活用するためには、塊根のFOS量を長期間維持できる貯蔵条件の検討あるいは品種改良が課題となっている^{1,9)}。

これまで著者らは、ヤーコン塊根のFOSを保持できる保存条件について検討を進めて来た。ヤーコンにとって貯蔵糖質と考えられるFOSの分解は、細胞の代謝活性を低下させることで抑制できるのではないかと考え、青果物の代謝活性を低下させる条件を模索してきた。単純な低温貯蔵ではFOSの減少が抑制されず^{1,8)}、これは原産地の気候条件ならびに塊根が気温の低下する時期に形成・肥大する器官であることから、低温でも細胞の代謝活性が維持されたためと予想された。一方、呼吸に必要な酸素濃度を低下させる目的で、0.7気圧の保冷室を搭載した冷蔵庫内にて1ヶ月間の減圧貯蔵を試みたところ、顕著にFOS減少が抑制された¹⁰⁾。低酸素処理では呼吸活性が低下するだけでなく、代謝産物の種類や濃度が変化し、それらが各種代謝関連酵素の発現に影響を及ぼすと予想される¹¹⁻¹⁴⁾。実際に、常圧と減圧で貯蔵したヤーコン塊根中の1-FEH活性を測定した結果では、減圧貯蔵試料で活性の低下が認められた¹⁰⁾。そこで本研究では、ヤーコン塊根の減圧貯蔵についてFOS保持効果の持続性を調べた。また、ヤーコン塊根は調理加工時の組織破碎をきっかけにポリフェノール酸化酵素 (polyphenol oxidase: PPO) を介して著しい褐変が生じる。これがヤーコン利用の妨げになると考えられるが、常圧貯蔵や減圧貯蔵が塊根中のPPO活性に及ぼす影響を調べた知見はないため、PPO活性の変動についても調べた。

2. 研究の方法

2-1. 試料と貯蔵

埼玉県鶴ヶ島市で収穫したヤーコン ((独)農研機構近畿

中国四国農業研究センター由来のペルー A 系統) 119 ~ 277 g の塊根を、皮付きのまま表面を水洗い後、貯蔵前 (B)、低温常圧貯蔵 3 週間と 6 週間 (それぞれ N3w, N6w)、低温減圧貯蔵 3 週間と 6 週間 (それぞれ R3w, R6w)、低温減圧 3 週間の後に低温減圧 3 週間 (R → N) の 6 試験群 (各群 n=4) に分けた。貯蔵前の塊根は速やかに分析用試料の調製をおこなった。貯蔵試験用の塊根は湿度を保つためポリエチレン製の袋に入れ、通気孔が確保されるように軽く口を縛った状態で日立冷凍冷蔵庫 R-SF54YM (2008 年製) の通常気圧 (1 気圧) の保冷室または 0.8 気圧の密閉間接冷却式減圧室 (いずれの室内とも 4°C に調整) にてドアの開閉をしないで貯蔵した。

2-2. 糖質の抽出と定量

塊根の皮を剥き、中心部の 10 g を採取した。乳鉢を用いて 80% エタノールに内容物を抽出し、遠心分離 (25°C, 8,400 × g, 30 min) で回収した上清と残渣の洗い液を合わせて 50 mL に定容後、減圧乾固して超純水に再溶解した。この試料を既報⁸⁾と同様 HPAEC-PAD (high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) に供して単糖、二糖、重合度 3 ~ 5 の FOS を定量分析した。各試験群の塊根 4 本それぞれについて定量し、平均値 ± 標準偏差 (n=4) を求めた。

2-3. 粗酵素の抽出と活性測定

各試験群の塊根 4 本について 2-2 に記した方法で糖質を抽出した部位近くから 50 g の塊根組織を採取して合わせ (計 200 g)、氷冷した抽出緩衝液 (10 mM EDTA, 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM クエン酸リン酸 Na 緩衝液, pH 6.0) 200 mL でホモジナイズしてガーゼ濾過後、冷却遠心 (4°C, 8,400 × g, 30 min) して得られた上清に 65% 飽和濃度の硫酸アンモニウム (硫酸) を添加した。これを 4°C で一晩静置後、再び冷却遠心して得られた沈殿を抽出緩衝液に再溶解し、粗酵素試料として -80°C で保存した。粗酵素試料のタンパク質は Bradford 法で定量し、12 mg 相当のタンパク質を含む試料を 1 mL の疎水クロマトグラフィー用樹脂 (ブチルトヨパール 650M, 東ソー) を充填したカラムに供し、硫酸濃

度 1.2 M ~ 0 M (10 mM クエン酸リン酸 Na 緩衝液, pH 6.0) の段階溶出 (各硫酸濃度につき, 1.0 mL × 5 回溶出) にて分画した。分画試料に含まれる糖質分解酵素の活性は、1-FEH の基質として 1-kestose (和光純薬) を、インベルターゼ (invertase: INV) の基質としてスクロース (関東化学) を用い、Kenealy と Jeffries による bicinchoninic acid (BCA) 試薬を用いる方法¹⁵⁾ を改変して測定した。すなわち、マイクロプレート上で 10 μL の分画試料と等量の 0.1 M の基質を含む 0.2 M 酢酸 Na 緩衝液 (pH 5.0) を混合し、30°C で 30 分間反応させた。次に BCA 試薬を 180 μL 添加し 60°C で 30 分間加熱後、プレートリーダー (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific) にて 570 nm の吸光度を測定した。基質を含まない条件で試料中のタンパク質等によって呈色した BCA の吸光度を測定し、これを差し引き、酵素反応で生成した還元糖由来の吸光度を求めた。3 回の活性測定で得られた吸光度の平均値と標準のフルクトース (関東化学) で求めた検量線から、酵素活性をタンパク質 1 g の粗酵素処理あたり 1 分間の反応で生成するフルクトースの濃度 (mM/min) で表した。分画試料に含まれる PPO の活性は、10 μL の分画試料と 100 μL の 10 mM カテコールを含む 50 mM クエン酸リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.0) を混合し、室温における 410 nm の吸光度上昇速度を測定した。

3. 研究の実施経過

常圧および 0.8 気圧の減圧条件で低温貯蔵したヤーコン塊根に含まれる単糖、二糖、重合度 3 ~ 5 の FOS を分析した。その結果、貯蔵前 (図 2 (B)) に比べて常圧貯蔵 3, 6 週間後 (図 2 (N3w, N6w)) では従来の報告のとおり、FOS が著しく減少すると同時にフルクトースの著しい増加が認められた。これに対し、減圧貯蔵した試料ではその変化が抑制されたが、貯蔵前に比べてフルクトースがわずかに増加し、貯蔵 6 週間後では 3 週間後よりも GF4 が減少していた (図 2 (R3w, R6w))。減圧下で 3 週間貯蔵後に常圧下で 3 週間貯蔵した試料では、著しい FOS 減少とフルクトース増加が認められ、減圧貯蔵による FOS 減少抑制効果は常圧環境に移すと持続しないことが示唆された

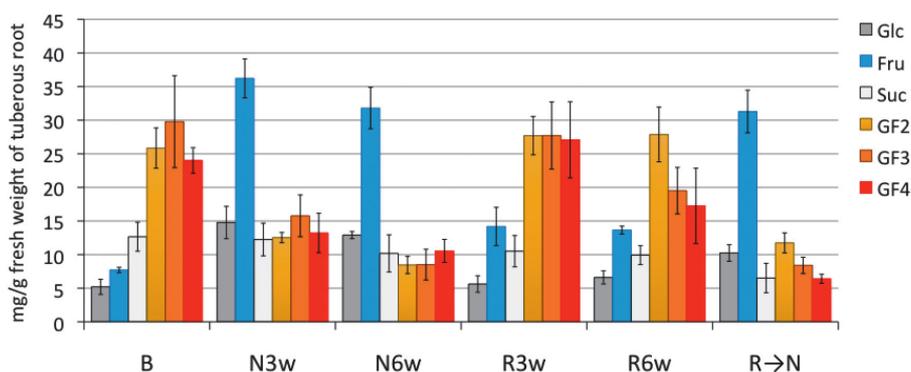


図 2 貯蔵条件の異なるヤーコン塊根内の糖質含量 (n=4)

(図 2 (R → N)).

次に、貯蔵試験したヤーコン塊根の糖質分解酵素の活性について調べた。酵素抽出時の褐変を防止するために添加した金属キレート剤および還元剤は、酵素活性測定を妨害するため酵素試料から除去する必要がある。また、1-FEH が植物生理学的に果たす役割としては、イヌリンや FOS の分解を介して糖質エネルギー源を供給する以外に浸透圧調節、低温刺激や傷害といったストレスに対する耐性の付与などが挙げられている^{16, 17)}。ヤーコン塊根においても生理的役割や低温、減圧といった環境要因に対する応答が異なる複数のアイソタイプが存在している可能性がある。そのため、疎水クロマトグラフィー用担体を充填したカラムに粗酵素試料を通すことで共存試薬類を除去すると同時に、分画した酵素試料を用いて貯蔵条件の違いによって生じる 1-FEH の活性変動について調べた。さらに、多くの植物は光合成器官である葉から転流してくるスクロースを細胞壁、細胞質、液胞に存在する INV によって分解し、解糖系などに必要なグルコースやフルクトースを得ていることから¹⁸⁾、植物組織に普遍的に存在し糖質代謝に不可欠と考えられる INV の活性も併せて測定し、細胞の代謝活性を知る指標とした。

その結果、貯蔵前のヤーコン塊根由来 1-FEH はブチルトヨパール (東ソー) を用いた疎水クロマトグラフィーにおいて主に硫安 0 M, 0.25 M で溶出したことから、比較的疎水性の高いタンパク質であることが示唆された (図

3 (B))。貯蔵後の塊根試料でも貯蔵前と同様の画分に 1-FEH が溶出し、常圧貯蔵後の 1-FEH 活性は貯蔵前より低く (図 3 (N3w, N6w))、減圧貯蔵後は常圧貯蔵と同程度の活性を示した (図 3 (R3w, R6w))。減圧貯蔵後に常圧貯蔵した塊根の 1-FEH 活性は硫安 0 M, 0.25 M の両画分において貯蔵試験試料の中で最も高い活性を示した (図 3 (R → N))。一方で、INV 活性は硫安 0.5, 0.25 M で溶出した (図 4)。いずれの INV ともに常圧貯蔵 (図 4 (N3w, N6w))、減圧から常圧へ貯蔵環境を変更した塊根 (図 4 (R → N)) のそれぞれで貯蔵前 (図 4 (B)) と同等の活性を示したが、減圧貯蔵後は検出限界近くにまで活性が低下していた (図 4 (R3w, R6w))。このことから、INV 依存性の糖質代謝は減圧環境下で 1-FEH より顕著に抑制され、常圧環境に移すと回復することが明らかとなった。

常圧に比べて減圧は FOS 含量保持に一定の効果を与えうる貯蔵条件であることが確認されたので、次に調理加工時の褐変を引き起こす PPO に対する減圧貯蔵の影響を調べた。PPO についても糖質分解酵素と同様に疎水クロマトグラフィーで分画した試料を用いて活性を測定したところ、硫安 1.0 M, 0.75 M の 2 画分に活性が検出された。これらの分画試料を用いて PPO 活性を比較した結果、常圧貯蔵の期間が長いほど活性が上昇する傾向が認められたが、常圧と減圧といったガス環境差による顕著な違いは認められなかった (図 5)。

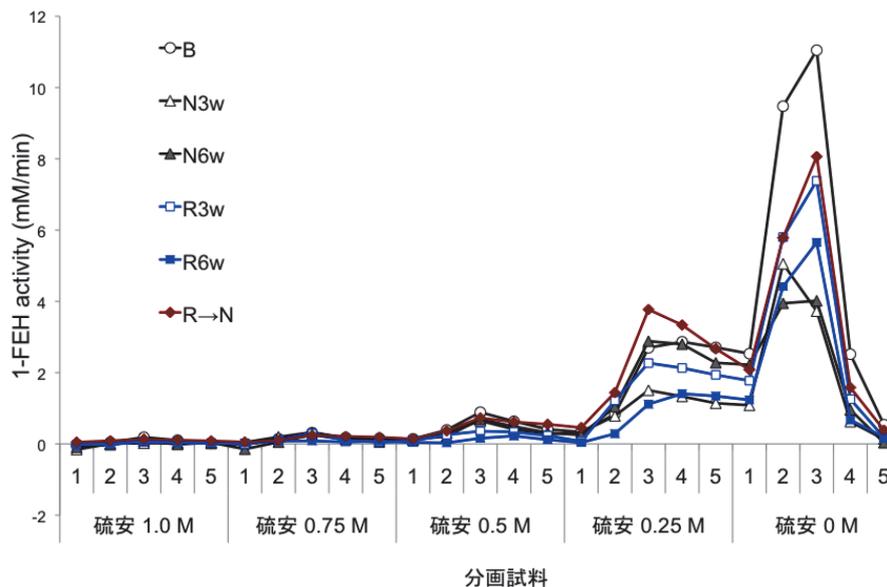


図 3 貯蔵条件の異なるヤーコン塊根内の 1-FEH 活性

(○: 貯蔵前 (B), △: 常圧冷蔵 3 週間 (N3w), ▲: 常圧冷蔵 6 週間 (N6w), □: 減圧冷蔵 3 週間 (R3w), ■: 減圧冷蔵 6 週間 (R6w), ◆: 減圧 3 週間と常圧 3 週間 (R → N))

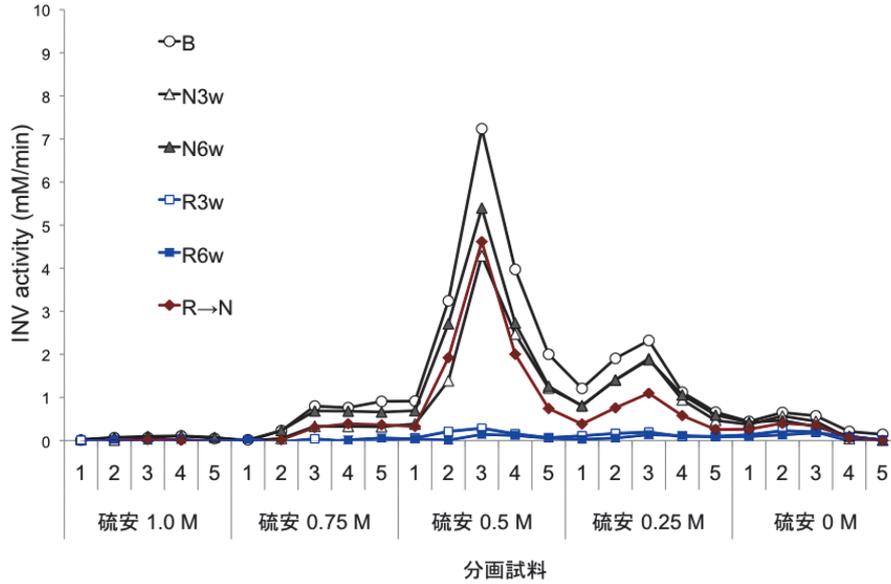


図4 貯蔵条件の異なるヤーコン塊根内のINV活性

(○: 貯蔵前 (B), △: 常圧冷蔵3週間 (N3w), ▲: 常圧冷蔵6週間 (N6w), □: 減圧冷蔵3週間 (R3w), ■: 減圧冷蔵6週間 (R6w), ◆: 減圧3週間と常圧3週間 (R→N))

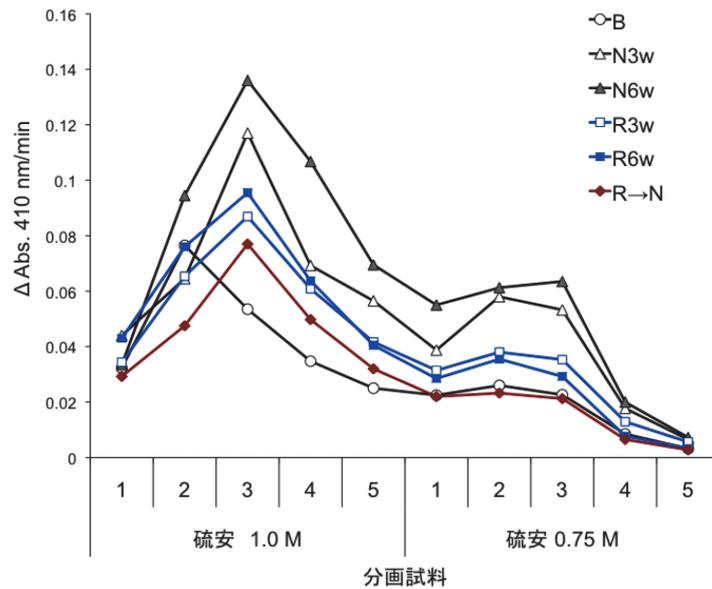


図5 貯蔵条件の異なるヤーコン塊根内のPPO活性

(○: 貯蔵前 (B), △: 常圧冷蔵3週間 (N3w), ▲: 常圧冷蔵6週間 (N6w), □: 減圧冷蔵3週間 (R3w), ■: 減圧冷蔵6週間 (R6w), ◆: 減圧3週間と常圧3週間 (R→N))

4. 研究から得た結論・考察

低温減圧貯蔵したヤーコン塊根では、内在性1-FEHが常圧貯蔵試料と同程度の活性を保持しているにも関わらず、FOS含量が保持されていた。この効果は貯蔵6週間まで持続していたが、減圧貯蔵3週間後に常圧環境へ移してさらに3週間貯蔵した塊根ではFOSの減少が認められた。よって、FOS保持効果は減圧条件下に限定的である

ことが明らかとなった。INV活性は減圧環境に限って著しく低下したことから、環境中の気圧または酸素濃度が下がるとINV依存性の糖質代謝が抑制されると考えられる。INVについては3%以下の低酸素環境下に移したトウモロコシ根の先端で数時間内にmRNA量の減少と活性の低下が確認されている¹⁹⁾。一方、1-FEHはINV依存性の糖質代謝とは独立して発現および活性の制御を受けていることが示唆された。

以前おこなった0.7気圧における1ヶ月間の貯蔵試験では、減圧貯蔵試料でINV活性が今回の結果と同様に検出されず、1-FEHの活性は常圧貯蔵試料よりも低下していたため、1-FEH活性とFOS含量に負の相関があると結論づけた。しかし、今回の0.8気圧下では1-FEHが常圧下とほぼ変わらない活性を保持しているながら、FOSの減少が抑制されていた。1-FEHの活性変動の違いが減圧環境の0.1気圧分の差に由来するかどうかは明確ではない。糖分析の結果を見ると、スクロース含量は貯蔵条件の違いによって有意な差はないが、グルコース含量は減圧貯蔵よりも常圧貯蔵で有意に増加していた(図2)。このグルコース増加分と同量のフルクトースはINVによるスクロースの分解で生成しており、1-FEHによるGF2の分解を介して減少分のスクロースが補給されていると考えられる。イヌリン型フルクタンやFOSを蓄積するキク科植物由来の1-FEHについては、スクロースによって活性が阻害される例がある^{16, 20, 21)}。これは、光合成器官から転流されるスクロースが枯渇すると1-FEHが貯蔵糖質であるFOSを分解し、生成フルクトースを細胞のエネルギー獲得に利用しようとする仕組みと関係があると考えられている。しかしながら、常圧貯蔵後のヤーコン塊根では極めて大量のフルクトースが蓄積されており、フルクトースの蓄積にはエネルギー供給とは別の生理学的意義があると思われる^{16, 17)}。6週間の減圧貯蔵でFOSは減少傾向にあったことから、活性を維持している1-FEHがFOSの分解に関与しているだろう。ただし、減圧貯蔵下の塊根ではINVの機能低下により、細胞内のスクロースが減少することなく活性型1-FEHを阻害した可能性がある。今後は、ヤーコン塊根内における活性型1-FEHの働きを阻害する細胞内の制御機構、ならびに1-FEHやフルクトースの生理学的役割を解明することで、FOS減少を効果的に抑える貯蔵条件を検討する必要がある。

褐変の原因酵素であるPPOについては、減圧貯蔵したヤーコン塊根でも貯蔵前と同程度の活性が維持されていた。一般的に、PPOと基質のポリフェノールは植物細胞内で局在が分かれており、細胞や組織が傷害を受けると酸化反応と酸化重合物による褐変が進行する。今回、総ポリフェノール量は調べていないが、糖および酵素の抽出操作の際に減圧貯蔵試料でも通常の褐変は観察された。よって、減圧貯蔵には調理加工時の褐変を抑える効果はないことが示唆された。減圧や低酸素濃度がPPOに及ぼす影響についてはこれまでに知見がないが、ある種の植物では構成的に発現しているPPOの他に、傷害や植物ホルモンの1種ジャスモン酸メチルによって発現が誘導されるPPOの存在が知られており²²⁾、これらは植物体の保護作用を担っていると考えられている²³⁾。本研究では、長期常圧貯蔵したヤーコン塊根では減圧貯蔵に比べてPPO活性が高かった。6週間低温貯蔵した塊根の皮表面には、白色カビの付着が減圧より常圧で多く目視で観察されたことから、侵襲性の菌類が組織を傷害したことを刺激にPPO活性が上昇した可能性がある。

5. 残された課題、今後の課題

著者らが実施した0.7~0.8気圧程度の減圧は、ヤーコン塊根のFOS含量保持に効果的であることが明らかとなった。しかし、このような穏やかな減圧下であっても貯蔵期間が6週間以上の長期に及ぶと、水分含量が高く皮が薄い塊根では乾燥や萎れ、嫌気呼吸を介した腐敗などが起こることが懸念される。別途、真空ゲージつきデシケーターで0.76気圧を維持して3か月間、4℃で冷蔵したところ、常圧貯蔵の試料よりも異常な食味を呈していたことから、今後は抽出成分の分析を進めて嫌気呼吸産物の影響を確認する。また、減圧貯蔵した塊根で1-FEH活性が保持されているにも関わらずFOSの減少が抑制された作用機構を分子レベルで解明するため、タンパク質の網羅的発現解析、または、代謝産物や植物ホルモンの種類または濃度の変化についても解析を進める。その結果、長期にわたって低温減圧貯蔵の有効性を発揮させるために最適な温度、ガス条件、その他必要な因子を明らかにすることを今後の課題としたい。

6. 謝辞

本研究の遂行に対してご支援を賜りました公益財団法人東洋食品研究所の皆様および審査員の先生方に深く感謝致します。また、貯蔵試験用の冷凍冷蔵庫に関して相談に応じていただきました日立アプライアンス株式会社の船山敦子氏、ヤーコンの栽培と収穫にご尽力を賜りました日本獣医生命科学大学の時田昇臣准教授、実験試料の分析に協力して下さった研究室の学生諸氏(丸山暁子さん、大木真美さん、千賀美侑さん)に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 浅見輝男, 南沢究, 土屋哲郎, 狩野佳弥子, 堀幾太郎, 大山卓爾, 久保田正亜, 月橋輝男, 栽培・保存期間中におけるヤーコンのフラクトオリゴ糖など各種糖類の成分変化. 日本土壤肥料学雑誌, **62**, 621-627 (1991).
- 2) Goto, K., Fukai, K., Hikida, J., Nanjo, F. and Hara, Y., Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2346-2347 (1995).
- 3) Lachman, J., Fernández, E.C. and Orsák M., Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use—a review. *Plant Soil Environ.*, **49**, 283-290 (2003).
- 4) Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson G.R., Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.*, **87**, S193-S197 (2002).
- 5) 竹中真紀子, 七山和子, 小野裕嗣, 仲島日出男, 五十部誠一郎, ヤーコンの生育, 貯蔵および加工過程におけるポリフェノール化合物の変動. 日本食品科学工学

- 会誌, **53**, 603-611 (2006).
- 6) 竹中真紀子, 七山和子, 井上栄一, ヤーコンの16品種・系統間のポリフェノール含有量等の特性評価. 日本食品科学工学会誌, **58**, 537-541 (2011).
 - 7) 寺田澄男, 伊藤紀久夫, 吉村朗, 野口直人, 石田崇, ヤーコン地上部の抗酸化活性と α -グルコシダーゼ阻害活性に関する成分. 薬学雑誌, **126**, 665-669 (2006).
 - 8) Narai-Kanayama, A., Tokita, N. and Aso K., Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. *J. Food Sci.*, **72**, S381-S387 (2007).
 - 9) 杉浦誠, フルクタン蓄積作物ヤーコン研究の現状と今後. 根の研究, **7**, 66-68 (1998).
 - 10) 奈良井(金山)朝子, 時田昇臣, 船山敦子, 麻生慶一, ヤーコン塊根のフルクトオリゴ糖含量とフルクタン分解酵素に対する低温減圧貯蔵の影響. 日本食品科学工学会誌, **60**, 148-152 (2013).
 - 11) Kader, A.A., Influence of preharvest and postharvest environment on nutritional composition of fruits and vegetables. In: B. Quebedeaux and F.A. Bliss (eds.), Horticulture and human health—Contributions of fruits and vegetables. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., pp.18-32 (1988).
 - 12) 上田悦範, 青果物の減圧貯蔵. 食品と低温, **7**, 124-130 (1981).
 - 13) 近藤悟, 大垣智昭, 金珉, 減圧貯蔵法における減圧度が果実品質に及ぼす影響. 園芸学会雑誌, **52**, 180-188 (1983).
 - 14) Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M., and Stitt, M., Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chem.*, **381**, 723-740 (2000).
 - 15) Kenealy, W.R., and Jeffries T.W., Rapid 2,2'-bicinchoninic-based xylanase assay compatible with high throughput screening. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1619-1623 (2003).
 - 16) Michiels, A., Van Laere, A., Van den Ende, W., and Tucker, M., Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *J. Exp. Bot.*, **55**, 1325-1333 (2004).
 - 17) Asega, A.F., do Nascimento, J.R., Schroeven, L., Van den Ende, W., and Carvalho, M.A., Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1185-1195 (2008).
 - 18) 吉田みどり, 上野敬司, 川上顕, 塩見徳夫, 植物フルクタン研究とその代謝遺伝子利用. 化学と生物, **41**, 787-795 (2003).
 - 19) Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., and Koch, K.E., Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant physiol.*, **121**, 599-608 (1999).
 - 20) Marx, S.P., Nösberger, J., and Frehner, M., Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytol.*, **135**, 267-277 (1997).
 - 21) De Roover, J., De Winter, M., Van Laere, A., Timmermans, J.W., and Van den Ende, W., Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiol. Plant.*, **106**, 28-34 (1999).
 - 22) Constabel, C.P. and Ryan, C.A., A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry*, **47**, 507-511 (1998).
 - 23) Yoruk, R. and Marshall, M., Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.*, **27**, 361-422 (2003).