

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年10月12日(12.10.2023)



(10) 国際公開番号

**WO 2023/194781 A1**

(51) 国際特許分類:

*A23L 27/10* (2016.01) *A23B 7/06* (2006.01)  
*A23B 7/05* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/IB2022/053307

(22) 国際出願日: 2022年4月8日(08.04.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: ハウス食品グループ本社株式会社(HOUSE FOODS GROUP INC.) [JP/JP];  
〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町 1  
丁目 5 番 7 号 (JP).

(72) 発明者: 渡邊 岳 夫 (WATANABE, Takeo);  
〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番

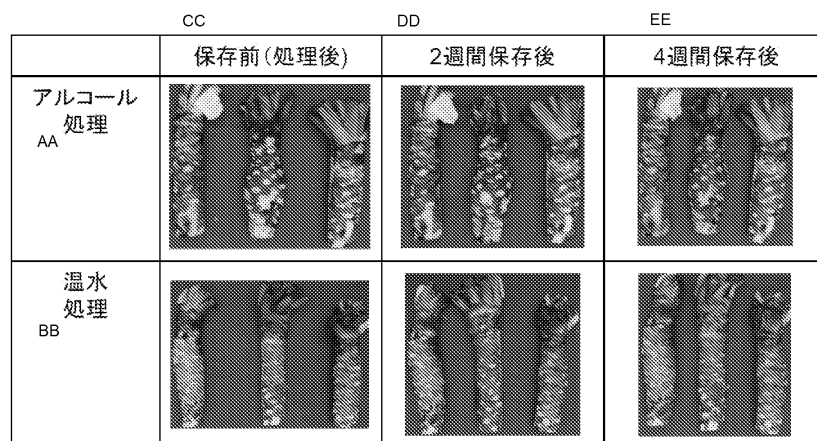
7 号 ハウス食品グループ本社株式会社内 (JP).  
中村 匡(NAKAMURA, Takeru); 〒5778520 大阪  
府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 ハウス食  
品グループ本社株式会社内 (JP). 仲田 さおり  
(NAKATA, Saori); 〒5778520 大阪府東大阪市  
御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 ハウス食品グルー  
プ本社株式会社内 (JP). 鎌田 庸宏(KAMATA,  
Yasuhiro); 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町  
1 丁目 5 番 7 号 ハウス食品グループ本社株式会  
社内 (JP). 岡 佑美(OKA, Yumi); 〒5778520 大  
阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 ハウ  
ス食品グループ本社株式会社内 (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所  
(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

(54) Title: WASABI RHIZOME IN WHICH DETERIORATION IN QUALITY IS INHIBITED

(54) 発明の名称: 品質劣化が抑制されたわさび根茎

[図8]



AA Alcohol treatment  
BB Warm water treatment  
CC Before being preserved (after treatment)  
DD After being preserved for 2 weeks  
EE After being preserved for 4 weeks

(57) Abstract: Provided are: a wasabi rhizome in which deterioration in quality is inhibited; a method for preserving the same; and a method for producing the same. The present specification discloses: a wasabi rhizome characterized by having a phenylalanine ammonia lyase activity per 1 mg of protein of less than 0.04 U/mg protein, after having the surface thereof trimmed and being preserved for 5 days at 0 °C; and a preservation method that involves preserving said wasabi rhizome at a temperature of -5 °C to 10 °C. The present specification also discloses a method for producing a wasabi

港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズMOR I タワー３２階 (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- － 国際調査報告（条約第21条(3)）
- － 白黒。出願原本にはカラー又はグレースケールの情報が含まれており、PATENTSCOPE からのダウンロードが可能。

rhizome in which deterioration in quality is inhibited, the method comprising: (1-1) immersing a wasabi rhizome in water at a temperature higher than 40°C but lower than 60°C; and/or (1-2) immersing the wasabi rhizome in an ethanol solution.

(57) 要約：品質劣化が抑制されたわさび根茎、その保存方法及びその製造方法を提供する。本明細書は、表面をトリミング処理し 0℃で 5 日間保存後のタンパク質 1 mg 当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が 0.04 U/mg タンパク質未満であることを特徴とするわさび根茎、並びに、前記わさび根茎を -5℃以上 10℃以下の温度で保存する保存方法を開示する。本明細書はまた、(1-1) わさび根茎を 40℃超 60℃未満の温度の水に浸漬すること、及び／又は、(1-2) わさび根茎をエタノール溶液に浸漬することを含む、品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法を開示する。

## 明 細 書

**発明の名称：品質劣化が抑制されたわさび根茎**

### 技術分野

[0001] 本発明は、わさび根茎及びその保存方法に関する。

本発明はまた、品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] わさび (*Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz.、**「本わさび」**とも称される) は、古来、魚肉等の調味料として広く用いられてきた香辛料である。わさびの辛味の本体は、わさび中に含まれるグルコシノレート (主としてシニグリン) とミロシナーゼとの酵素反応によって生じるイソチオシアネート (主としてアリルイソチオシアネート) である。なかでも、わさびの生鮮な根茎をすりおろしたものは、辛味及び風味が優れており、その利用価値は非常に高い。

しかし生鮮わさび根茎は保存中に容易に切断面等が変色し商品価値が低下するため、生鮮わさび根茎を商業的に流通させることは容易ではない。

[0003] 特許文献1では、収穫後の本わさび等の香辛野菜の含有水分を20%～50%の範囲に調整した後、 $-16^{\circ}\text{C}$ 以下に冷凍保存することを特徴とする、香辛野菜の凍結保存法が開示されている。特許文献1には、この方法により、完全乾燥方法による常温保存または完全乾燥に近い乾燥方法による低温保存では、香辛野菜が本来具有する色、香り、味を保持しながら保存することができない、という課題を解決できると記載されている。

[0004] 特許文献2では、根わさび (わさび根茎) を長期保存する手段として、 $42^{\circ}\text{C}$ で可塑性を保つことのできる蠟又は固形パラフィンの中に $42^{\circ}\text{C}$ 未満の温度で、新鮮な根わさびを封じ込める方法及びその製品が記載されている。

[0005] 特許文献3では、根わさび (わさび根茎) の流通中の品質劣化を抑制するために、わさびの栽培環境と同等の環境でわさびを保存し流通させることのできる、根わさび保存装置が記載されている。

[0006] 非特許文献1では、青果物の鮮度の評価基準は、青果物の種類ごとに異なり、全ての野菜に適用でき数値化が可能な鮮度評価の基準はないことが記載されている。

[0007] 非特許文献2では、カットレタスを50℃の温水に90秒間浸漬し、4℃の冷水で冷ましてから、4℃の冷蔵庫で6日間保管したところ、温水処理なしは継時的に褐変化が進行したが、温水処理したものはほとんど褐変しなかったことが記載されている。非特許文献2では、温水処理によりレタスの褐変化が抑制された原因として、褐変物質の基質であるポリフェノールの合成に関わる酵素フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の活性が温水処理により低下したことを挙げている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0008] 特許文献1：特開平3－98532号公報

特許文献2：特開平8－173026号公報

特許文献3：特開2010－124826号公報

### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：「青果物の鮮度に関する収穫後生理学」食糧：その科学と技術 56, 43-66, 2018

非特許文献2：M. Murata, et al. 「Quality of cut lettuce treated by heat shock」 Biosci. Biotechnol. Biochem., 68(3), 501-507, 2004

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 特許文献1～3に記載のように、わさび根茎の保存中の品質劣化を抑制する方法は従来から検討されているが、十分に満足できる方法はいまだ提供されていない。

そこで本明細書では、品質劣化が抑制されたわさび根茎、その保存方法及びその製造方法を提供することを解決すべき課題とする。

## 課題を解決するための手段

[0011] 本明細書には上記課題を解決するための手段として以下の一以上の実施形態を開示する。

[1] わさび根茎であって、

表面をトリミング処理し0℃で5日間保存後のタンパク質1mg当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が0.04U/mgタンパク質未満(1Uは、41℃、1時間当たりにL-フェニルアラニンから1μmolのシンナム酸を生成する活性を指す)であることを特徴とする、わさび根茎。

[2] [1]に記載のわさび根茎を-5℃以上10℃以下の温度で保存することを含む、[1]に記載のわさび根茎の保存方法。

[3] 品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、

(1-1) わさび根茎を40℃超60℃未満の温度の水に浸漬すること、及び／又は、

(1-2) わさび根茎をエタノール溶液に浸漬することを含む方法。

[4] (1-1)が、わさび根茎を、40℃超60℃未満の温度の水に5分以上180分間以下の時間浸漬する工程である、[3]に記載の方法。

[5] (1-2)が、わさび根茎を、45v/v%以上90v/v%以下のエタノール溶液に1分間以上10分間以下の時間浸漬する工程である、[3]又は[4]に記載の方法。

[6] (2)(1-1)及び／又は(1-2)の後に、わさび根茎を冷蔵保存すること

を更に含む、[3]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] (2)が、わさび根茎を-5℃以上10℃以下の温度で保存する工程である、[6]に記載の方法。

[8] 品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、

(3) わさび根茎の、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性を低下させること

を含む方法。

[9] (3) が、表面をトリミング処理し 0℃で 5 日間保存後のタンパク質 1 mg 当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が 0.04 U/mg タンパク質未満 (1 U は、41℃、1 時間あたりに L-フェニルアラニンから 1 μmol のシンナム酸を生成する活性を指す) となるように、わさび根茎のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性を低下させる工程である、

[8] に記載の方法。

[10] (4) (3) の後に、わさび根茎を冷蔵保存すること  
を更に含む、[8] 又は [9] に記載の方法。

[11] (4) が、わさび根茎を -5℃以上 10℃以下の温度で保存する工程である、[10] に記載の方法。

## 発明の効果

[0012] 本明細書に開示するわさび根茎は、冷蔵条件で長期間保存しても、変色などの品質劣化が進みにくい。

本明細書に開示するわさび根茎の保存方法によれば、保存中のわさび根茎の品質劣化を抑制することができる。

本明細書に開示するわさび根茎の製造方法によれば、冷蔵保存時の品質劣化が抑制されたわさび根茎を製造することができる。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図1は、収穫後にトリミング処理し、温水処理を行わず、0℃で 4 週間保存したわさび根茎の、保存前 (A : 上段) 及び保存後 (B : 下段) の外観の全体の写真を示す。4 週間保存後は葉柄痕の切断面が黒色に変色していた。

[図2] 図2は、収穫後にトリミング処理し、温水処理を行わず、0℃で 4 週間保存したわさび根茎の、保存前 (A : 上段) 及び保存後 (B : 下段) の葉柄根元部及び根茎下部の切断面の写真を示す。4 週間保存後は葉柄根元

部が萎れており、新芽が伸長していた。根茎下部の切断面が黒色に変色していた。

〔図3〕図3は、収穫後にトリミング処理し、条件7（45℃、30分間）の温水処理を行い、0℃で4週間保存したわさび根茎の、保存前（A：上段）及び保存後（B：下段）の外観の全体の写真を示す。4週間保存後も、変色はなく緑色を維持していた。

〔図4〕図4は、収穫後にトリミング処理し、条件7（45℃、30分間）の温水処理を行い、0℃で4週間保存したわさび根茎の、保存前（A：上段）及び保存後（B：下段）の葉柄根元部及び根茎下部の切断面の写真を示す。4週間保存後は葉柄根元部は萎れておらず、新芽もなかった。根茎下部の切断面も変色はなく緑色を維持していた。

〔図5〕図5は、収穫後にトリミング処理し、条件10（50℃、10分間）の温水処理を行い、0℃、5℃又は15℃で一定時間保存後のわさび根茎の外観の写真を示す。

〔図6〕図6は、温水処理し0℃で2週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、温水処理をせず0℃で2週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

〔図7〕図7は、温水処理し0℃で6週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、温水処理をせず0℃で6週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

〔図8〕図8上段は、アルコール処理したわさび根茎の、0℃での保存の各時点での外観の写真を示す。図8下段は、温水処理したわさび根茎の0℃で保存した各時点での外観の写真を示す。

[図9] 図9は、アルコール処理したわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、1週間後、2週間後及び4週間後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、アルコール処理をしていないコントロールのわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、1週間後、2週間後及び4週間後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

### 発明を実施するための形態

#### [0014] <わさび根茎及びその保存方法>

本発明の第一の実施形態に係るわさび根茎は、表面をトリミング処理し0℃で5日間保存後のタンパク質1mg当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が0.04U/mgタンパク質未満（1Uは、41℃、1時間当たりにL-フェニルアラニンから1μmolのシンナム酸を生成する活性を指す）であることを特徴とする。

[0015] 本実施形態に係るわさび根茎は、冷蔵保存したときに長期間、典型的には4週間以上、変色せず冷蔵保存開始前の緑色を保持しているという予想外の効果を有する。本実施形態に係るわさび根茎はまた、ミロシナーゼ活性を有しており、すりおろし等の処理により組織が破壊されると、生鮮ワサビ根茎に特有の香りと辛みを発現することができる。

[0016] 本実施形態に係るわさび根茎において、品質劣化が抑制される原因は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性が低減していることで、褐色化（黒色化）の原因物質の基質となるポリフェノールの産生が抑制されているためであると推定されるが、品質劣化抑制の機構は限定されない。

[0017] PAL活性の測定方法について具体的に説明する。

[0018] PAL活性測定のためのわさび根茎の表面の「トリミング処理」とは、わさび根茎の表面の全体を、ピーラーを用いて削ぎ取る処理を指す。削ぎ取る表面部分の厚さは、特に限定されないが、例えば0.5mm～2.0mmの範囲である。トリミング処理を行う前のわさび根茎は、予め、葉柄痕及び根茎下部を切断して切断面を露出させたわさび根茎であってよい。葉柄痕及び



根茎下部を切断して切断面を露出させる処理を「一次トリミング処理」と称する場合は、PAL活性測定のための表面のトリミング処理を、一次トリミング処理との区別のために「再トリミング処理」と称する。

[0019] 本発明者らは、品質劣化が抑制されたわさび根茎では、表面をトリミング処理後0℃で5日間保存した時点での、タンパク質1mg当たりのPAL活性が上昇せず、0.04U/mgタンパク質未満、好ましくは0.03U/mgタンパク質未満、であるのに対して、品質劣化が抑制されていないわさび根茎（例えば未処理のわさび根茎）では、表面をトリミング処理した直後のPAL活性は上昇していなくとも、トリミング処理後0℃で5日間保存した時点での、タンパク質1mg当たりのPAL活性が上昇し、0.04U/mgタンパク質以上となることを見出した。

[0020] タンパク質1mg当たりのPAL活性は、表面をトリミング処理し0℃で5日間保存後のわさび根茎の表面から0.5gの測定サンプルを採取し、実験2記載の方法により前記測定サンプルから精製酵素液を取得し、実験2記載の方法により前記精製酵素液のPAL活性とタンパク質量を測定し、測定結果から算出することができる。

実験2記載の方法による、前記測定サンプルからの精製酵素液の取得は次の手順で行うことができる。

[0021] 前記測定サンプル0.5gと、5mMの2-メルカプトエタノールを含有する0.2Mホウ酸-NaOHバッファー（pH8.8）（0.2M BB i n c l . M E）2.3mLと、ポリビニルポリピロリドン0.075gを混合し、混合物を、マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて計30秒間破碎する（破碎条件3000rpm）。得られた破碎液を1.5mLチューブに移し、遠心処理して上清のみを採取する。採取した上清を再度遠心し、上清を回収する。この時回収した上清を粗酵素液とする。

[0022] 脱塩カラムPD MiniTrap G-25（Cytiva）に0.2M BB i n c l . M Eを計10mL流し、平衡化させた。平衡化させたカラムに粗酵素液500μLを添加し、その後0.2M BB i n c l .

ME 1 mLにより溶出させる。この時溶出させて得られた溶液を精製酵素液とする。

[0023] 実験2記載の方法による、前記精製酵素液のPAL活性の測定は次の手順で行うことができる。

[0024] 0.5 Mホウ酸-NaOHバッファ（pH 8.8）750  $\mu$ L、10 mM L-フェニルアラニン溶液100  $\mu$ L、精製酵素液150  $\mu$ Lを混合して反応を開始させる。反応温度は41°Cに設定する。反応開始後5分後の反応液、及び65分後の反応液の、290 nmにおける吸光度を測定し、反応開始後5分後から65分後の間の吸光度増加量を測定する。0  $\mu$ M、1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ Mの濃度のシンナム酸溶液の290 nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成する。作成した検量線を元に、前記吸光度増加量から、精製酵素液の1時間におけるシンナム酸生成量を計算する。41°C、1時間あたりに1  $\mu$ molのシンナム酸を生成する活性を1 Unitとする。

[0025] 実験2記載の方法による、前記精製酵素液のタンパク質量の測定は、2-D Quant kit（Cytiva）付属の説明書に従い測定することができる。

[0026] 本発明の第二の実施形態は、本発明の第一の実施形態に係るわさび根茎の保存方法であって、前記わさび根茎を-5°C以上10°C以下の温度で保存することを含む方法に関する。この方法によれば、前記わさび根茎を長期間、例えば4週間以上にわたり保存したときの品質劣化が抑制される。前記温度は好ましくは-1°C以上6°C以下であり、特に好ましくは0°C以上5°C以下である。

[0027] <品質劣化が抑制されたわさび根茎の第一の製造方法>

本発明の第三の実施形態は、

品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、

（1-1）わさび根茎を40°C超60°C未満の温度の水に浸漬すること、

及び／又は、

(1-2) わさび根茎をエタノール溶液に浸漬することを含む方法に関する。

[0028] 本発明者らは、(1-1)の処理(温水処理)、又は、(1-2)の処理(アルコール処理)により処理したわさび根茎は、ミロシナーゼ活性を有しながらPAL活性が低減しており、長期間、例えば4週間以上、冷蔵保存した場合の、変色や萎れ等の品質劣化が抑制されるという予想外の効果を奏することを見出した。前記わさび根茎は、冷蔵保存後も、生鮮わさび根茎に特有の香りと辛みを呈することができる。

[0029] (1-1)及び(1-2)において、原料となるわさび根茎は、生鮮わさび根茎であればよい。原料となるわさび根茎は、葉柄痕及び根茎下部を切断して切断面を露出させる一次トリミング処理が施された生鮮わさび根茎であってよい。一次トリミング処理が施された生鮮わさび根茎を用いる場合、一次トリミング処理後できるだけ速やかに、具体的には一次トリミング処理後6時間以内に、好ましくは3時間以内に、特に好ましくは2時間以内に、(1-1)及び／又は(1-2)の処理を施すことが好ましい。

[0030] (1-1)の温水処理において水の温度は好ましくは41℃以上、より好ましくは42℃以上、より好ましくは43℃以上、より好ましくは44℃以上、より好ましくは45℃以上であり、好ましくは59℃以下、より好ましくは58℃以下、より好ましくは57℃以下、より好ましくは56℃以下、より好ましくは55℃以下、より好ましくは54℃以下、より好ましくは53℃以下、より好ましくは52℃以下、より好ましくは51℃以下である。

[0031] (1-1)の温水処理は、前記温度の水に5分間以上180分間以下の時間浸漬する工程であることが好ましい。前記時間は好ましくは8分間以上、より好ましくは9分間以上、より好ましくは10分間以上であり、好ましくは150分間以下、より好ましくは140分間以下、より好ましくは130分間以下、より好ましくは120分間以下である。

[0032] (1-2)のアルコール処理で用いるエタノール溶液の濃度は、特に限定されないが、好ましくは45v/v%以上90v/v%以下である。エタノ

ール溶液は好ましくはエタノール水溶液である。前記濃度のエタノール溶液としては、食品添加物として市販されている77v/v%エタノール含有アルコール製剤、及び前記アルコール製剤の希釈液が例示できる。希釈液は好ましくは水による希釈液である。

[0033] (1-2)のアルコール処理の時間は、特に限定されないが、好ましくは1分間以上、より好ましくは2分間以上、より好ましくは3分間以上であり、好ましくは10分間以下、より好ましくは7分間以下、より好ましくは5分間以下である。

[0034] 本発明の第三の実施形態に係る、品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法は、

(2) (1-1) 及び／又は (1-2) の後に、わさび根茎を冷蔵保存すること  
を更に含むことが好ましい。

[0035] 冷蔵保存とは、典型的には-5℃以上10℃以下の温度での保存である。前記温度は好ましくは-1℃以上6℃以下であり、特に好ましくは0℃以上5℃以下である。(1-1) 及び／又は (1-2) の処理を受けたわさび根茎では、ミロシナーゼ活性を有しながらPAL活性が低減されているため、長期間、例えば4週間以上にわたり保存したときの品質劣化が抑制される。

[0036] <品質劣化が抑制されたわさび根茎の第二の製造方法>

本発明の第四の実施形態は、

品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、

(3) わさび根茎の、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を低下させること  
を含む方法に関する。

[0037] 本発明者らは、わさび根茎のPAL活性を添加させたわさび根茎は、長期間、例えば4週間以上、冷蔵保存した場合の、変色や萎れ等の品質劣化が抑制されるという予想外の効果を奏することを見出した。

[0038] (3) は、好ましくは、表面をトリミング処理し 0℃で 5 日間保存後のタンパク質 1 mg 当たりの P A L 活性が 0. 04 U / mg タンパク質未満となるように、わさび根茎の P A L 活性を低下させる工程であり、より好ましくは、ミロシナーゼ活性を残存させながら P A L 活性を低下させる処理であり、具体的には、前記 (1-1)、及び／又は、前記 (1-2) である。

[0039] 本発明の第四の実施形態に係る、品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法は、

(2) (3) の後に、わさび根茎を冷蔵保存すること  
を更に含むことが好ましい。

[0040] 冷蔵保存とは、典型的には -5℃以上 10℃以下の温度での保存である。前記温度は好ましくは -1℃以上 6℃以下であり、特に好ましくは 0℃以上 5℃以下である。(3) の処理を受けたわさび根茎は、長期間、例えば 4 週間以上にわたり保存したときの品質劣化が抑制される。

## 実施例

[0041] <実験 1：温水処理による鮮度保持>

わさび根茎の収穫後に直ちに、わさび根茎の葉柄痕及び根茎下部を切断し、切断面を露出させる一次トリミング処理を行った。わさび根茎から生える葉柄の根元部を残した。

[0042] 一次トリミング処理後のわさび根茎を、温水中に浸漬した（温水処理）。温水処理後にわさび根茎の表面の水をふき取り、紙に包み、更にポリプロピレン袋に包み、発泡ポリスチレン容器内に収容した状態で、0℃、5℃又は 15℃の温度条件下に 2 週間、4 週間、6 週間又は 9 週間保存し、保存後の状態を観察した。

[0043] 比較のために、一次トリミング処理後のわさび根茎を、温水処理を行わずに同様に冷蔵保存し、保存後の状態を観察した。

[0044] 温水処理の水温及び時間、並びに、各条件のわさび根茎を 0℃で 4 週間保存後の外観の観察結果を下記の表に示す。各条件で 3 本のわさび根茎を処理した。

[0045] [表 1]

条件	水温 (°C)	時間 (分間)	0℃4週間 保存後の外観
1	温水処理 なし	温水処理 なし	黒く変色
2	30	30	黒く変色
3	35	30	黒く変色
4	40	30	黒く変色
5	45	10	変色なし 緑色を維持
6	45	20	変色なし 緑色を維持
7	45	30	変色なし 緑色を維持
8	45	60	変色なし 緑色を維持
9	45	120	変色なし 緑色を維持
10	50	10	変色なし 緑色を維持
11	50	30	変色なし 緑色を維持
12	55	10	変色なし 緑色を維持
13	60	10	黄色に変色
14	65	10	黄色に変色
15	70	10	黄色に変色

[0046] 黄色に変色していた条件13、14、15で温水処理し0℃4週間保存後のわさび根茎を喫食したところ、生鮮わさび根茎に特有の香り及び辛みは感じられなかった。辛みの発現に関与する酵素ミロシナーゼが、温水処理により失活したことが原因と推測した。

[0047] 図1及び図2に、温水処理を行わずに（条件1）0℃で4週間保存したわさび根茎の、保存前（図1A（上段）、図2A（上段））及び保存後（図1B（下段）、図2B（下段））の外観の写真を示す。保存後のわさび根茎は、褐変により切断面が黒く変色しており、葉柄の根元部分の萎れが顕著であった。また葉柄の根元部分から新芽が伸長していた。

[0048] 図3及び図4に、条件7（45℃、30分間）の温水処理を行い0℃4週間保存したわさび根茎の、保存前（図3A（上段）、図4A（上段））及び保存後（図3B（下段）、図4B（下段））の外観の写真を示す。保存後のわさび根茎は、切断面の変色はなく、緑色を維持していた。また、保存後も葉柄の根元部分の萎れはなく保存前と同程度のハリを維持していた。保存後の新芽の伸長は観察されなかった。

[0049] 条件10（50℃、10分間）の温水処理を行い0℃、5℃又は15℃で一定時間保存後のわさび根茎の外観の写真を図5に示す。0℃で2週間、4週間及び6週間保存後のわさび根茎に変色はなく緑色が維持されていた。写真は示さないが0℃で9週間保存後も条件10で温水処理したわさび根茎の切断面に変色は認められなかった。5℃で2週間及び4週間保存後のわさび根茎も変色は認められなかった。5℃で6週間保存後に黒色に変色が観察された。15℃では2週間保存後に黒色に変色した。

[0050] 条件5～12の温水処理を施したわさび根茎は、0℃で4週間保存後も生鮮わさび根茎に特有の香り及び辛みが感じられたことから、辛みの発現に関与するミロシナーゼ活性は残存していることが確認できた。

[0051] <実験2：温水処理をしたわさび根茎のPAL活性の測定>

実験1において温水処理をしたわさび根茎が冷蔵保存下で4週間以上黒く変色しなかった原因として、褐色化（黒色化）の原因物質の基質となるポリフェノールを産生するPAL（フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）活性が温水処理により失活していることを本発明者らは推定した。

[0052] 実験1と同様の手順で、わさび根茎を、収穫後に直ちに一次トリミング処理し、次いで条件10（50℃、10分間）の温水処理を行い、0℃の温度条件下に2週間又は6週間保存した。比較のために、わさび根茎を、収穫後に直ちに一次トリミング処理し、温水処理を行わずに、0℃の温度条件下で2週間又は6週間保存した。各条件のわさび根茎を10本ずつ用意した。

[0053] こうして得られた、温水処理し0℃で2週間又は6週間保存後のわさび根茎、及び、温水処理をせず0℃で2週間又は6週間保存後のわさび根茎のPAL活性を以下の手順で測定した。

[0054] (再トリミング処理)

0℃で2週間又は6週間保存後のわさび根茎の表皮の全体をピーラーで削ぎ落とした。この操作を「再トリミング処理」とした。

[0055] 再トリミング処理の直後、並びに、再トリミング処理後に0℃で3日間、5日間、及び7日間保存後に、わさび根茎の表層を、ピーラーを用いて0.5g採取しサンプルとした。

[0056] (酵素抽出)

0.2Mホウ酸-NaOHバッファー(pH8.8)に2-メルカプトエタノールを終濃度5mMになるように加えた(以下、0.2M BB in c l. MEと呼ぶ)。

[0057] 前記サンプル0.5g、0.2M BB in c l. ME 2.3mL、ポリビニルポリピロリドン0.075gを混合し、マルチビーズショッカー(安井器械)を用いて計30秒間破碎した(破碎条件3000rpm)。

破碎液を1.5mLチューブに移し、遠心処理して上清のみを採取した。採取した上清を再度遠心し、上清を回収した。この時回収した上清を粗酵素液とした。

[0058] 脱塩カラムPD MiniTrap G-25(Cytiva)に0.2M BB in c l. MEを計10mL流し、平衡化させた。平衡化させたカラムに粗酵素液500μLを添加し、その後0.2M BB in c l. ME 1mLにより溶出させた。この時溶出させて得られた溶液を精製酵素液とした。

[0059] (PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)活性測定)

0.5Mホウ酸-NaOHバッファー(pH8.8)750μL、10mM L-フェニルアラニン溶液100μL、精製酵素液150μLを混合して反応を開始させた。反応温度は41℃に設定した。



[0060] 反応開始後5分後の反応液、及び65分後の反応液の、290nmにおける吸光度を測定し、反応開始後5分後から65分後の間の吸光度増加量を測定した。

[0061] 0  $\mu$ M、1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ Mの濃度のシンナム酸溶液の290nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成した。作成した検量線を元に、前記吸光度増加量から、精製酵素液の1時間におけるシンナム酸生成量を計算した。

41℃、1時間あたりに1  $\mu$ molのシンナム酸を生成する活性を1 Unitとした。

[0062] (タンパク質定量)

2-D Quant kit (Cytiva) 付属の説明書に従い、精製酵素液のタンパク質量を測定した。

[0063] 各サンプルから抽出した精製酵素液のタンパク質1mg当たりのPAL活性 ( $U/g = \mu mol/h/mg$ ) を算出した。

[0064] (結果)

図6に、温水処理し0℃で2週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、温水処理をせず0℃で2週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

[0065] 図7に、温水処理し0℃で6週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、温水処理をせず0℃で6週間保存後のわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、5日後及び7日後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

[0066] 条件10 (50℃、10分間) の温水処理を施した後に0℃で2週間又は6週間保存したわさび根茎では、再トリミング処理後のどの時点でもPAL活性は上昇しなかった。

[0067] 一方で、温水処理を施さずに0℃で2週間又は6週間保存したわさび根茎では、再トリミング処理から3日後、5日後及び7日後にPAL活性が上昇した。再トリミング処理から5日後及び7日後のタンパク質1mg当たりのPAL活性がどのサンプルでも0.03U/mg以上であった。

[0068] この結果は、わさび根茎を温水処理することによりPAL（フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）活性が失活することが、温水処理をしたわさび根茎の、冷蔵保存中の変色が抑制される原因であることを裏付ける。

[0069] <実験3：アルコール処理による鮮度保持>

実験1と同様に、わさび根茎の収穫後に直ちに、わさび根茎の葉柄痕及び根茎下部を切断し、切断面を露出させる一次トリミング処理を行った。わさび根茎から生える葉柄の根元部を残した。

[0070] 一次トリミング処理後のわさび根茎を、アルコール製剤（食品添加物）（77%エタノール含有）に3分間浸漬した。浸漬処理後に水で洗浄し、わさび根茎の表面の水をふき取り、紙に包み、更にポリプロピレン袋に包み、発泡ポリスチレン容器内に収容した状態で、0℃の温度条件下に4週間保存し、保存前、2週間後及び4週間後の各時点の状態を観察した。

[0071] 比較のために、実験1と同様に、一次トリミング処理後のわさび根茎を50℃の温水に10分間浸漬処理し、0℃の温度条件下に4週間保存し、保存前、2週間後及び4週間後の各時点の状態を観察した。

[0072] 図8上段に、アルコール処理したわさび根茎の0℃で保存した各時点での外観の写真を示す。図8下段に、温水処理したわさび根茎の0℃で保存した各時点での外観の写真を示す。アルコール処理したわさび根茎は、温水処理したわさび根茎と同様に、0℃で4週間保存後も黒色への変色はみられなかった。

[0073] アルコール処理したわさび根茎は、0℃で4週間保存後も生鮮わさび根茎に特有の香り及び辛みが感じられたことから、辛みの発現に關与するミロシナーゼ活性は残存していることが確認できた。

[0074] <実験4：アルコール処理をしたわさび根茎のPAL活性の測定>

実験3において3分間アルコール処理をしたわさび根茎を3本用意した。

コントロールとして、収穫後に直ちに一次トリミング処理したわさび根茎を3本用意した。

[0075] 各わさび根茎の表皮の全体をピーラーで削ぎ落とした。この操作を「再トリミング処理」とした。なお実験2と異なり、再トリミング処理の前にわさび根茎の冷蔵保存は行わなかった。

[0076] 再トリミング処理の直後、並びに、再トリミング処理後に0℃で3日間（0.43週）、7日間（1週間）、14日間（2週間）及び28日間（4週間）保存後に、わさび根茎の表層を、ピーラーを用いて0.5g採取しサンプルとした。

実験2に記載の手順に従い、各サンプルから抽出した精製酵素液のタンパク質1mg当たりのPAL活性（ $U/mg = \mu mol/h/mg$ ）を算出した。

[0077] 図9に、アルコール処理したわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、1週間後、2週間後及び4週間後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き四角で示し、アルコール処理をしていないコントロールのわさび根茎の、再トリミング処理の直後、3日後、1週間後、2週間後及び4週間後の、タンパク質1mg当たりのPAL活性を白抜き丸で示す。

[0078] アルコール処理したわさび根茎では、再トリミング処理後のどの時点でもPAL活性は上昇しなかった。

[0079] 一方で、アルコール処理をしていないコントロールのわさび根茎では、再トリミング処理から3日後、1週間後及び2週間後にPAL活性が上昇した。

## 請求の範囲

- [請求項1] わさび根茎であって、  
表面をトリミング処理し0℃で5日間保存後のタンパク質1mg当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が0.04U/mgタンパク質未満（1Uは、41℃、1時間当たりにL-フェニルアラニンから1μmolのシンナム酸を生成する活性を指す）であることを特徴とする、わさび根茎。
- [請求項2] 請求項1に記載のわさび根茎を-5℃以上10℃以下の温度で保存することを含む、請求項1に記載のわさび根茎の保存方法。
- [請求項3] 品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、  
（1-1）わさび根茎を40℃超60℃未満の温度の水に浸漬すること、及び／又は、  
（1-2）わさび根茎をエタノール溶液に浸漬することを含む方法。
- [請求項4] （1-1）が、わさび根茎を、40℃超60℃未満の温度の水に5分間以上180分間以下の時間浸漬する工程である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] （1-2）が、わさび根茎を、45v/v%以上90v/v%以下のエタノール溶液に1分間以上10分間以下の時間浸漬する工程である、請求項3又は4に記載の方法。
- [請求項6] （2）（1-1）及び／又は（1-2）の後に、わさび根茎を冷蔵保存すること  
を更に含む、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] （2）が、わさび根茎を-5℃以上10℃以下の温度で保存する工程である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 品質劣化が抑制されたわさび根茎の製造方法であって、  
（3）わさび根茎の、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性を低下させること

を含む方法。

[請求項9] (3) が、表面をトリミング処理し 0℃で 5 日間保存後のタンパク質 1 mg 当たりのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が 0.04 U/mg タンパク質未満 (1 U は、41℃、1 時間あたりに L-フェニルアラニンから 1 μmol のシンナム酸を生成する活性を指す) となるように、わさび根茎のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性を低下させる工程である、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10] (4) (3) の後に、わさび根茎を冷蔵保存することを更に含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

[請求項11] (4) が、わさび根茎を -5℃以上 10℃以下の温度で保存する工程である、請求項 10 に記載の方法。

[圖1]

A



B



[圖2]

A



B





[図3]

A



B





[圖4]

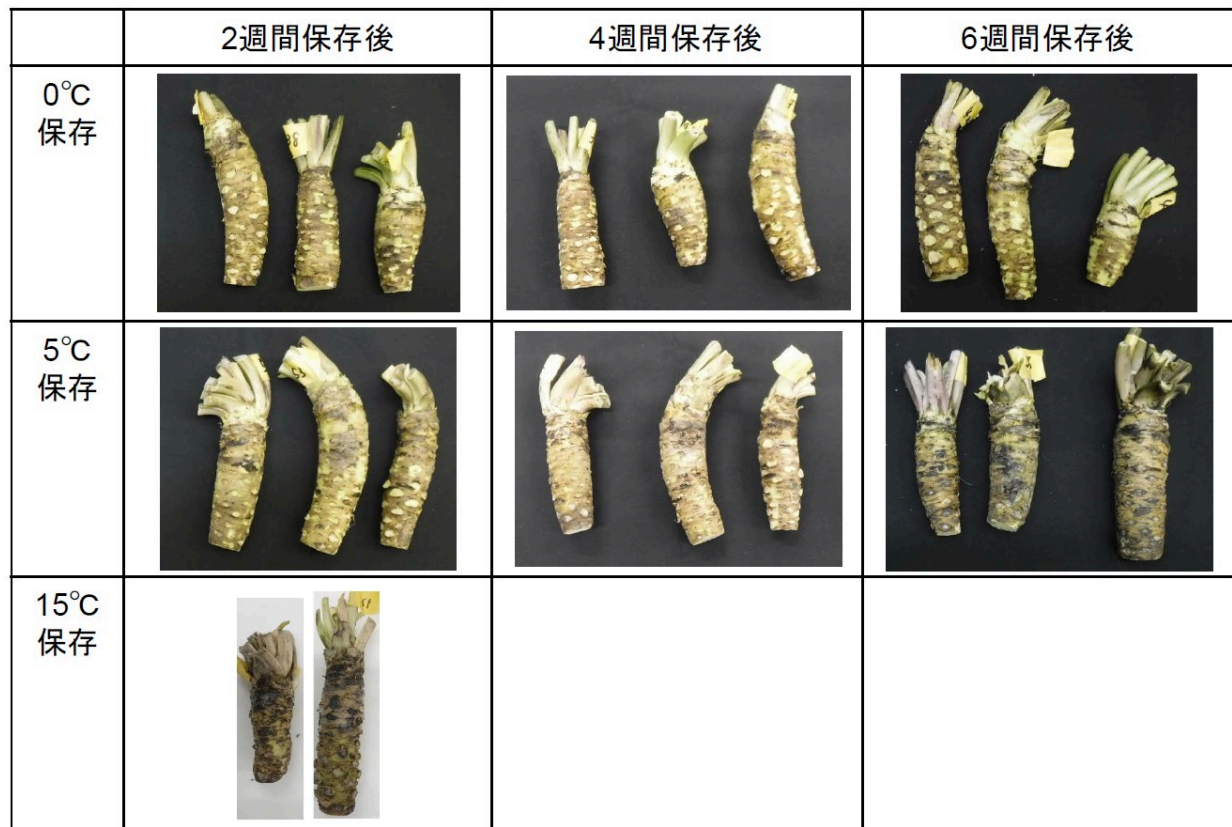
A



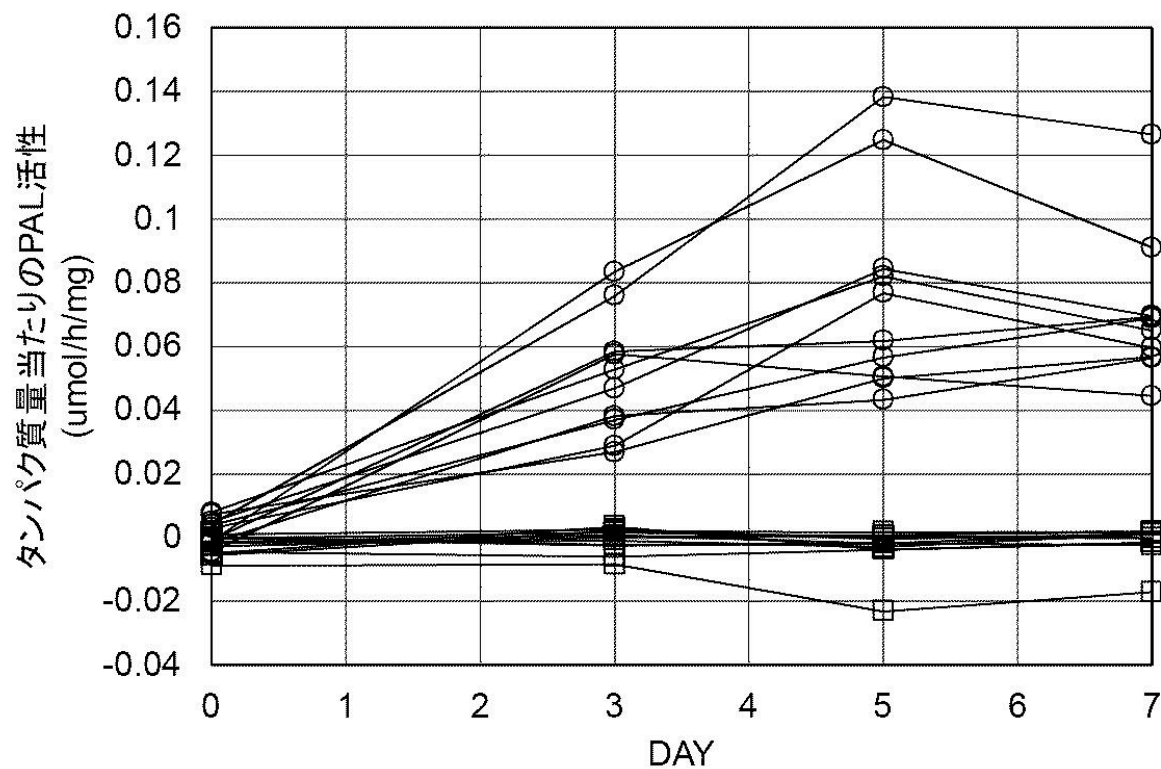
B



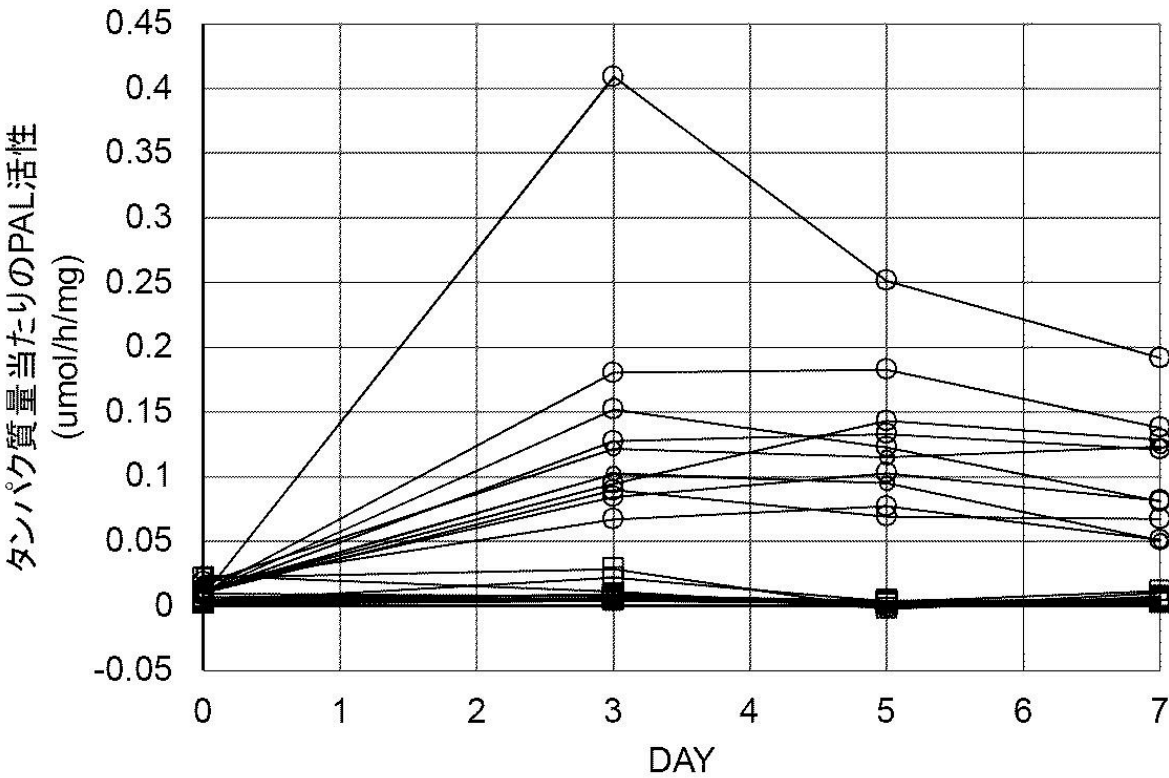
[図5]



[図6]



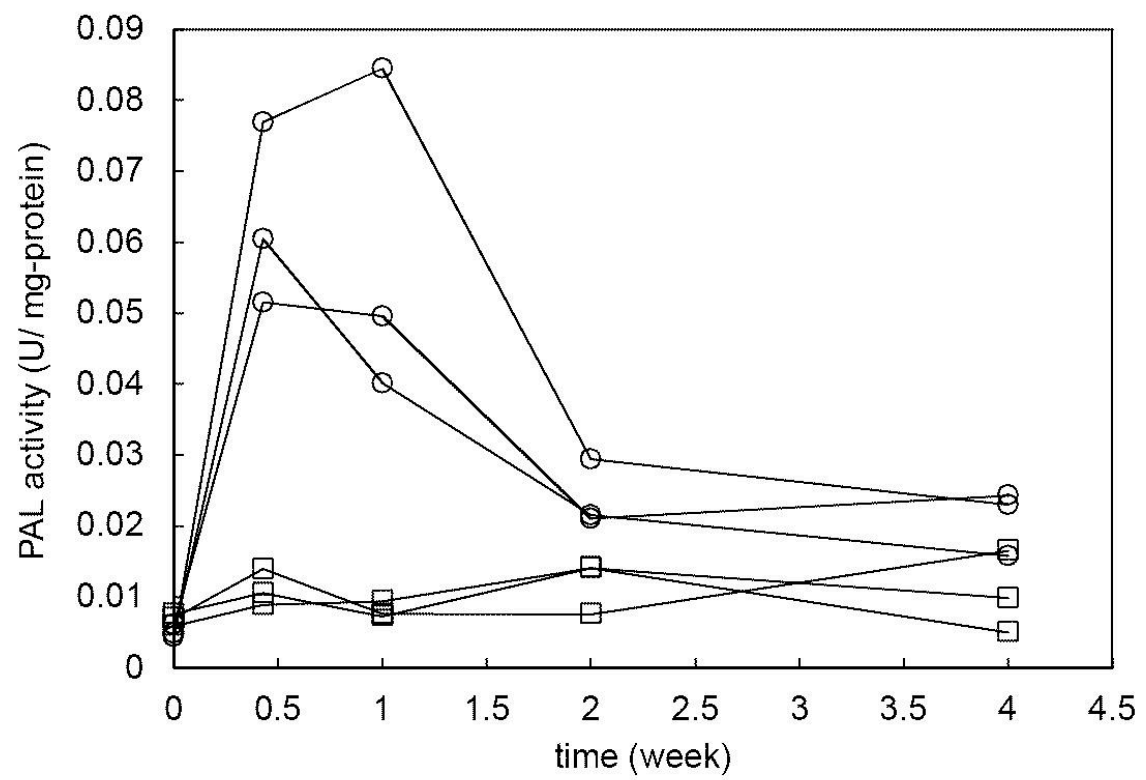
[図7]



[図8]

	保存前(処理後)	2週間保存後	4週間保存後
アルコール 処理			
温水 処理			

[圖9]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/053307

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A23L 27/10**(2016.01)i; **A23B 7/05**(2006.01)i; **A23B 7/06**(2006.01)i

FI: A23L27/10 D; A23B7/06; A23B7/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L27/10; A23B7/05; A23B7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-271225 A (KAMEYA FOODS CORP.) 12 October 2006 (2006-10-12) paragraphs [0010], [0022], [0027], examples 1, 5, 7	1-11
X	JP 61-21061 A (HASU, Yasumasa) 29 January 1986 (1986-01-29) claims, p. 2, right column, lines 5-7, p. 2, right column, lines 9-11	1-2, 8-11
A		3-7
A	JP 5-49436 A (KIBUN SHOKUHN K.K.) 02 March 1993 (1993-03-02)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2022

Date of mailing of the international search report

28 June 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)  
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915  
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/IB2022/053307**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2006-271225 A	12 October 2006	(Family: none)	
JP 61-21061 A	29 January 1986	(Family: none)	
JP 5-49436 A	02 March 1993	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A23L 27/10(2016.01)i; A23B 7/05(2006.01)i; A23B 7/06(2006.01)i FI: A23L27/10 D; A23B7/06; A23B7/05														
B. 調査を行った分野														
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A23L27/10; A23B7/05; A23B7/06														
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2022年													
日本国実用新案登録公報	1996-2022年													
日本国登録実用新案公報	1994-2022年													
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)														
C. 関連すると認められる文献														
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	JP 2006-271225 A (カメヤ食品株式会社) 12.10.2006 (2006-10-12) [0010]、[0022]、[0027]、実施例1、5、7	1-11												
X	JP 61-21061 A (連 泰政) 29.01.1986 (1986-01-29) 特許請求の範囲、2頁右欄5行-7行、2頁右欄9行-11行	1-2, 8-11												
A		3-7												
A	JP 5-49436 A (株式会社紀文食品) 02.03.1993 (1993-03-02)	1-11												
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
国際調査を完了した日  21.06.2022	国際調査報告の発送日  28.06.2022													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  澤田 浩平 40 3338  電話番号 03-3581-1101 内線 3461													

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/IB2022/053307

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2006-271225	A	12.10.2006	(ファミリーなし)	
JP	61-21061	A	29.01.1986	(ファミリーなし)	
JP	5-49436	A	02.03.1993	(ファミリーなし)	