

# 野菜・果実のポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼす イソチオシアネート類の影響

## Effect of Isothiocyanate on Polyphenol Oxidase Activity in Vegetables and Fruits

(2021年3月31日受理)

山崎(今村)真未 影山 智絵\* 太田 義雄\*\*  
Mami Yamasaki Chie Kageyama Yoshio Ohta

Key words : 酵素的褐変, ポリフェノールオキシダーゼ, 酵素活性, イソチオシアネート, 酵素阻害

### 要 約

カット野菜・果物の貯蔵・流通工程での褐変をコントロールすることは品質の重要な要因である。酵素的褐変を抑制するには、関与するポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を阻害する必要がある。本研究では野菜・果実から抽出したPPO活性に及ぼすイソチオシアネート (ITC) の影響について調べた。ITCを反応液に0.05~0.5mM加えることによりPPO活性を強く阻害し、特にナス、ジャガイモ、レタス、ゴボウ、バナナで強かった。これらのITCの阻害効果はカット野菜・果実の酵素的褐変を強く抑制することになる。今回の結果より、カットレタスの褐変抑制の阻害剤としてアリルイソチオシアネート (AITC) が有効な褐変抑制方法となることが示唆された。

### I. はじめに

イソチオシアネート (ITC) はアブラナ科の野菜類に多く存在している。アブラナ科植物はヒトが食用に供しているものが多いが、代表的なものとしてダイコン、キャベツ、カブ、コマツナ、クレソンなどの野菜やワサビ、黒カラシ、香辛料などがある<sup>1)</sup>。ITCは自然界に存在するとして、100種類ほどが知られているが、植物細胞中で直接生合成されるものではなく、前駆体であるからし油配糖体がミロシナーゼにより加水分解されて生成される<sup>2)</sup>。

ITCには多くの生理活性機能が知られており<sup>3)</sup>、食品中の微量成分として、研究されている。ITCで最も古くから研究されている生理機能は抗菌作用についてである。近年では、ITCの血小板凝集阻害作用、抗ガン作用、抗腫瘍作用が明らかにされ、注目されてきている食品成分のひとつである。ITCの多くの生理機能は生体中のたんぱく質との反応により生じると考えられている<sup>3-6)</sup>。

そこで、ITCの新たな食品への利用として、特に注目されるのがITCとたんぱく質との反応性である<sup>7,8)</sup>。ITCはたんぱく質との反応速度が速く、チオール基を官能基に持ったたんぱく質と最も反応性が高い。チオール基のあるアミノ酸としてはシステインが知られている。また、水酸基、アミノ基およびジスルフィド結合を持つアミノ酸残基とITCとの反応性が高いことが報告されている<sup>6-9)</sup>。

他方、近年増加してきているカット野菜は、流通・貯蔵工程におけるカット面の褐変が品質劣化の大きな問題となってきている<sup>10,11)</sup>。生鮮物の褐変は、酵素的酸化反応によって起こることがわかっている。そこで本研究では、キャベツの褐変がアリルイソチオシアネート (AITC) 含量により抑制されるという報告<sup>12)</sup>に注目し、ITCの褐変防止への利用について調べることとした。酸化酵素は褐変し易い野菜および果物で活性が高く、この酵素(ポリフェノールオキシダーゼ:以後PPOと略記)をITCにより活性阻害できれば、カット野菜の品質劣化を抑制する選択肢のひとつとなる。そこで今回はITCの高い反応性

\*くらしき作陽大学

\*\*元中国学園大学大学院

に着目し、野菜・果物からの PPO を抽出し、その活性に及ぼすITC類の影響について調べ、ITCの褐変防止への利用の可能性について検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試料

#### (1) 原料

試料には褐変しやすい野菜・果物を選択した。野菜ではナス、ゴボウ、サツマイモ、ジャガイモ、レタス、もやしを、果物では、バナナ、モモ、リンゴの(スターキング・ふじ)を使用した。試料となる野菜、果物は市販の新鮮なものを実験前に購入し供試した。

#### (2) 試薬

基質となる化合物として、フェノール類のドーパミン(東京化成)、ポリフェノール類としてカテコール(東京化成)、クロロゲン酸(東京化成)、およびカテキン(東京化成)の特級試薬を用いた。また、使用したITC類8種類はエチルイソチオシアネート(Etyl-ITC)、n-ブチルイソチオシアネート(n-Butyl-ITC)、アリルイソチオシアネート(AITC)、3-ブテニールイソチオシアネート(3-Butenyl-ITC)、4-ペンテニールイソチオシアネート(4-Pentenyl-ITC)、フェニルイソチオシアネート(PeITC)、 $\beta$ -フェニルエチルイソチオシアネート(PEITC)、ベンジールイソチオシアネート(BITC)を用いた。ITC試薬はすべて、東京化成(株)の特級試薬を用い、分解しないように冷蔵・冷凍保存して用いた。

### 2. PPOの抽出

野菜・果物からのPPOの抽出法については、既報<sup>14)</sup>に従い行った。抽出法の概要は、まず試料の野菜・果物をそれぞれ10~15g採取し、細かく刻んだ。これに5%イソアスコルビン酸を添加した0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)を用いて4℃以下に保ちながらすり潰した。これを、低温下(4℃)で遠心分離器にかけ上清液を採取し、冷蔵庫内で0.01Mリン酸緩衝液(pH6.8)を用いて一夜透析を行った。透析後、0.1Mリン酸緩衝液で50mlに定量し、これを粗酵素液(以後酵素液と呼ぶ)として使用した。各抽出粗酵素液は5℃で冷蔵保存した。

### 3. PPO活性測定

抽出したPPO活性測定については、既報<sup>14)</sup>に準じて行った。その概要は基質にはカテコール、クロロゲン酸、ドーパミン、およびカテキンを使用した。反応液は全量3mlとし、0.1Mリン酸緩衝液1ml、基質1mlに純水を加えたものを、27℃に設定した恒温槽で定温にした。つぎに酵素液を加え、すばやく攪拌し、30秒後から462nmの吸光度(OD)を測定した。

### 4. PPO活性に及ぼすイソチオシアネート(ITC)類の影響

#### (1) ITC溶液の調製

ITCを少量のエタノールに溶解され、ITCの添加濃度が(0.0625~0.5mM)になるように、反応液に酵素液添加の直前に加え、すばやく溶解させた。なお、添加エタノール濃度のPPO活性への影響についても検討を加えた。

#### (2) ITC添加試験

PPO活性に及ぼすITCの影響を調べるため、各反応液にITCを添加し、そのPPO活性への影響について検討した。なお、ITCはあらかじめエタノールに溶解させ、均一になるように分散・溶解させた。ITCの添加は酵素液添加直前とし、添加濃度を変化(0~0.5mM)させ、そのPPO活性への影響について調べた。OD値(462nm)は経時的に0.5~3分まで測定し、その変化を調べた。なお、ITCは水への溶解度が低いため0.5mM以上では溶解しなかった。また8種類のITCのうち、水への溶解度の低いPEITCでは果物・野菜のうち何種類かで0.5mMでは溶解しなかったため、測定できなかった。

## III. 結果および考察

### 1. 測定条件の検討

#### (1) 抽出粗酵素の活性の変化

抽出した酵素液は5℃の冷蔵庫内に保存したが、その活性の経時的変化について調べた。その結果、ナスにおいては3日目で活性が低下し、バナナでは3日目までは活性が保たれていた。以後の実験ではPPO活性を測定する際には3日以内で測定することとした。

(2) 添加酵素量

反応液中に添加する酵素量を決めるため、添加酵素液量を変えて(0.1~0.5ml)その活性の変化を調べた。その結果、添加量0.1mlではOD値が低いため、測定開始1分後のOD値が0.1を超えるよう酵素液量を0.3~0.5mlとして行うこととした。

(3) PPO活性の経時変化はPPO活性の表示

PPO活性の経時変化は各PPOのOD値は測定開始から1分ほどで急激に上昇し、測定2分以降ではOD値がフラットになる傾向が認められた。以降のPPO活性の比較においては試料量、添加酵素液量の違いを補正するため、試料1gあたりの、初速度である1分後のOD値(462nm)の値をPPO活性の値としと計算し、その値を酵素活性として表示することとした。

2. 基質特異性

各酵素液の基質特異性について調べ、その結果を野菜はFig.1果実はFig.2に示した。野菜、果物の種類によりPPOの基質特異性はかなり差異があることがわかる。野菜のPPOでは基質別にナス、ゴボウではクロロゲン酸で活性が高かった。レタス、サツマイモではカテキンが、ジャガイモ、モヤシではドーパミンで一番活性が高い結果となった。果物のPPOの基質別では今回使用したすべての果物(バナナ、モモ、リンゴのスターキング、ふじ)でドーパミンの活性値が一番高い結果となった。野菜・果物中に含まれる、ポリフェノール類については、野菜ではナスとゴボウ、サツマイモの基質特異性は既存の報告<sup>15)</sup>と一致していた。しかしジャガイモでは、チロシンが高いことが既存のデータで報告<sup>11)15)</sup>されていたが、チロシンは溶解性が低いため、今回は基質としては使用できなかった。今回基質の中ではドーパミンで活性が高い結果を示したが、これはチロシンと同じモノフェノール類であり、類似した構造を有しているためと考えられる。これらの結果から野菜中のPPOはジフェノールやポリフェノール誘導体を基質としたカテコラーゼの酵素活性が強く、果物中のPPOは、モノフェノール誘導体を基質としたチロシナーゼ、クレソラーゼの活性が強いことが推測された。今回は実験結果に基づいて、活性の高いものを基質に選定し、以後実験を行った。しかし、モヤ

シについては、どの基質を用いてもPPO活性が非常に低いため今回は以後実験を中止した。

なお、PPO活性におよぼす添加エタノールの影響については、果物の代表としてバナナ、野菜の代表としてナスを用いて調べた結果、バナナではエタノールの影響が大きく、無添加区に比べて、0.05ml添加で42%、0.1ml添加で42%、0.2ml添加で53%、0.4ml添加で57%まで低下した。この原因については、今のところ不明であるが、褐変抑制剤としてエタノールも有効であると考えられる。ナスについてもエタノールの影響が認められたが、0.2ml添加で16%、0.4ml添加で38%まで低下した。この結果から添加エタノールはPPO活性に影響の少ない量として、0.05ml(全量3mlへの添加量としては1.67%以下)として以後の実験を行った。

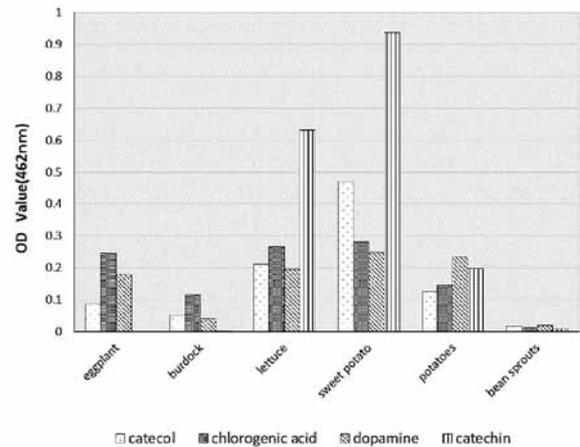


Fig.1 Effects polyphenol oxidase PPO activity extracted with Vegetables on Various phenols.

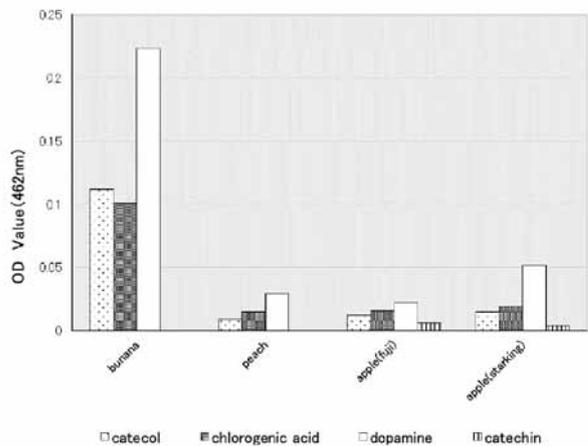


Fig.2 Effects of polyphenol oxidase PPO activity extracted with fruits on Various phenols

### 3. PPO活性に及ぼすイソチオシアネート(ITC)類の影響

#### (1) ITCの種類の影響

##### i 野菜

ITCの種類を変えて添加した際のPPO活性への影響の結果、野菜を代表してレタスをFig. 3に示した。サツマイモ以外の野菜においては今回使用したすべてのITC添加でPPO活性に抑制効果が認められた。サツマイモについてはPeITCのみで抑制効果が大きかった。今回使用した野菜のPPO活性阻害効果については鎖状構造のITCよりもベンゼン環をもつITCで抑制効果が大きい傾向が認められた。その中でも、PeITCで最も高い抑制効果が認められた。PeITCは疎水性が高い特性であることから、野菜のPPOの活性中心も疎水的であると思われる。本実験の反応系では反応開始と同時にITCを添加しており、その阻害の発現が早いことから、ITCが酵素の活性中心に直接作用を及ぼしていることが推察される。PPOは銅酵素としてその活性中心には銅が存在していることが知られている<sup>11)</sup>。また、ITCの高い反応性はイソチオシアネート基の求電子に由来している<sup>1)</sup>ことから、PPO活性中心の銅を直接酸化するか、活性中心周辺のたんぱく質との反応により阻害している可能性も推察される。ITCとたんぱく質との反応性については多くの報告<sup>6-8)</sup>があり、野菜PPOの活性中心部周辺の-SH基、-NH<sub>2</sub>および-OH基が重要な役割をしていることも推察されるが、詳細については今後さらなる研究が必要である。

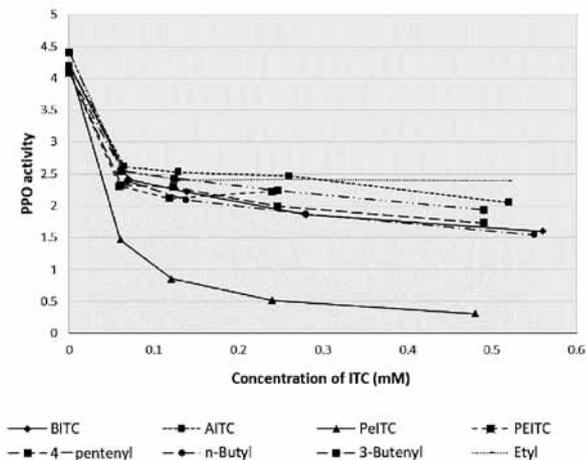


Fig.3 Changes in PPO activity extracted shredded lettuce on the concentration of ITC treated

##### ii 果物

果物PPOの結果についてはその代表としてバナナをFig. 4に示した。バナナにおいては、今回使用したすべてのITC添加で抑制効果が認められ、特に抑制効果が大きかったものはPeITCであった。しかし、モモについては抑制効果がほとんど認められなかった。リンゴでは2種類の品種で調べたがスターキングでは、PeITCのみに抑制効果が、ふじではBITCのみで抑制効果が認められた。PPOについては多くのアイソザイムが認められており<sup>12)</sup>、ITC添加の影響は果物のPPOと野菜のPPOでは、かなり異なる傾向が認められることがわかった。果物の褐変へのITCの影響についてはわずかにパパイムについて報告<sup>16)</sup>されているのみであり、ほとんど明らかでない。今回、果物PPOの基質特異性も野菜PPOのそれと異なることから、両者の酵素特性には差異が大きいことが判明した。

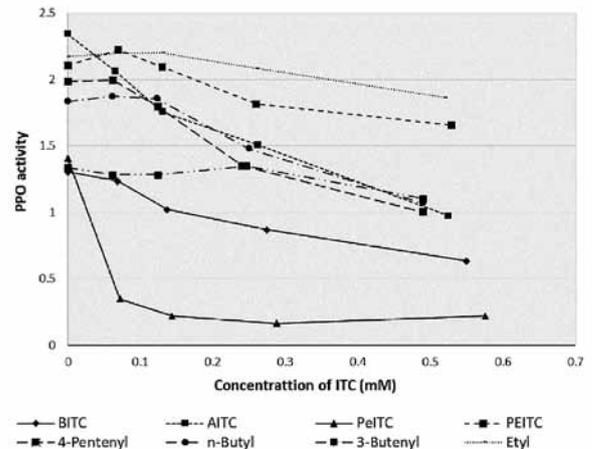


Fig.4 Changes in PPO activity extracted shredded banana on the concentration of ITC treated

#### (2) ITC濃度の影響

##### i 野菜

ナス、ジャガイモ、レタス、ゴボウでは、すべてのITC添加により濃度依存的に阻害効果が認められた。しかし、サツマイモについてはPeITCでのみ濃度依存的に阻害効果が認められ、他の野菜のPPOとは差異があった。サツマイモのPPOに関しては研究例が少なく、その詳細については今のところ不明である。

##### ii 果物

バナナではすべてのITC添加により濃度依存的に阻害

効果が認められた。しかしリンゴのスターキングでは4-Pentenyl-ITCのみに、ふじでは3-Butenyl-ITCのみで濃度依存的に阻害効果が認められ、品種間で差異があった。既報の文献<sup>16)</sup>では、品種間(ふじ, スターキング)での部位別、熟度過程においてのポリフェノール活性の違いは明らかにされているが、品種間による褐変度の違いについては報告されておらず、今回は品種間の褐変度の違いが明らかになった。モモでは、濃度を高くしても抑制効果は認められず、ITCによる抑制効果が無いことが判明した。果物由来のPPOについてはITCでほとんど効果がないもの、あるいはITCの種類により差異が大きい傾向があった。この傾向は野菜由来のPPOの特性とは大きく異なっていることも判明した。

#### 4. PPO活性の阻害効果

各野菜でのPPO活性に及ぼすITC類の影響においては、各野菜のPPO活性の違い、および基質の違いがあるため、単純な比較は難しい。そこで、酵素活性阻害率 (PPO活性阻害率 =  $\frac{\text{ITC無添加時のPPO活性値} - \text{ITC添加時のPPO活性値}}{\text{ITC無添加時のPPO活性値}} \times 100$ ) を求め、その値を比較した。結果については、Fig. 5, Fig. 6に示した。野菜についてはFig. 5より、野菜ではナス、レタスではITCの抑制効果が大きいことが、すべての野菜においてPeITCの阻害率が高いことがわかった。一方、果物のPPO活性阻害率の結果についてはFig. 6に示した。果物中のバナナではITCが有効であることが、モモ、リンゴについてはITCの阻害効果はほとんど期待できないことがわかった。

以上の結果に基づいて、現在、カット野菜の褐変防止への利用に取り組んでいる。特にPPO活性阻害の大きかった野菜とITCの組み合わせについて検討中であり、実用的利用を目指している。

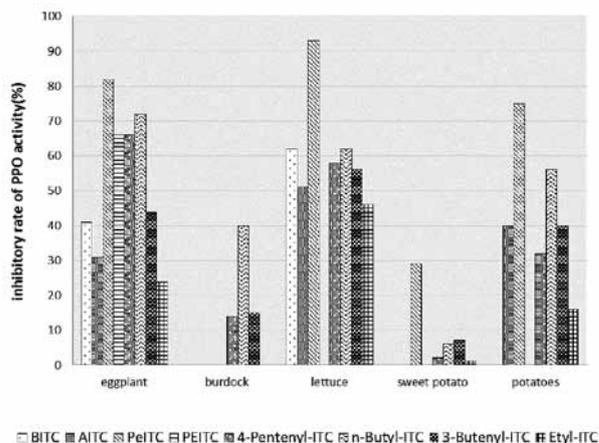


Fig.5 Inhibitory rate of PPO activity treated with ITC(0.5mM)

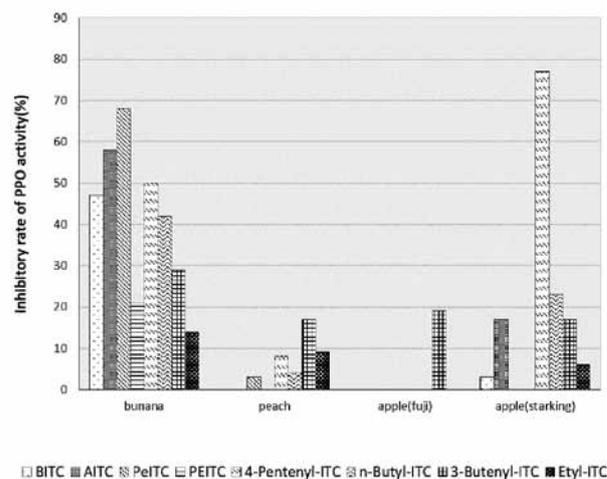


Fig.6 Inhibitory rate of PPO activity treated with ITC(0.5mM)

## IV. ま と め

キャベツの褐変がアリルチオシアネート (AITC) により抑制されることに注目し、野菜・果実のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性に及ぼすイソチオシアネート (ITC) の影響について調べた。その結果は下記に示した。

- (1) 褐変し易い野菜・果物からPPOを抽出し、基質特異性を調べると野菜・果物の種類、変種により大きな差異があることが分かった。
- (2) PPO活性に及ぼすITC類の影響については、野菜類ではナス、ジャガイモ、レタス、ゴボウで、果実についてはバナナのみ低濃度ITCs添加により阻害効果が認められた。

- (3) レタスの褐変については、AITCによる大きな阻害効果が認められ、実用利用への可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) 川岸瞬朗(1985) グリコノレートーその酵素分解および分解物の反応性と毒性, 日本食品工業学会誌, 32, 836-846.
- 2) 木苗直秀, 小島 操, 古群三千代(2006) グルコシノレート, 「ワサビのすべて」, 木苗直秀, 小島操, 古群三千代 編著, 学会出版センター, 東京, pp. 68-74.
- 3) 木苗直秀, 小島 操, 古群三千代(2006)ワサビの生理活性, 「ワサビのすべて」, 木苗直秀, 小島操, 古群三千代 編著, 学会出版センター, 東京, pp. 93-164.
- 4) 太田義雄(2003) アブラナ科野菜の漬物の特性とその機能性, 食品と科学, 45, 78-82.
- 5) 内田浩二(1995) Phase II解毒酵素誘導によるがん予防, 「がん予防食品の開発」, 大澤俊彦 監修, シーエムシー, 東京, pp. 37-45.
- 6) 中村宜督(2004) イソチオシアネートによるがん予防の可能性, Environ. Mutagen. Res., 26, 253-258.
- 7) Shunro Kawakishi and Mituo Namiki(1982) Oxidative cleavage of the disulfide bond of cystine by allyl isothiocyanate, J. Agric. Food Chem., 30, 618-620.
- 8) Shunro Kawakishi and Toshiyuki Kaneko(1987) Interaction of proteins with allyl isothiocyanate, J. Agric Food Chem., 35, 85-88.
- 9) 太田義雄, 川岸瞬朗(1998) アリルイソチオシアネートの分解に及ぼすアミノ酸の影響, 日本食品工業学会誌, 45, 744-747.
- 10) 村田容常, 本間清一(1998) ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御, 日本食品工業学会誌, 45, 177-185.
- 11) 吉田宗弘 (2016) 酵素的褐変, 「食品学総論」第3版, 森田潤司, 成田宏史編, 化学同人, 京都, pp. 178-179.
- 12) 矢野昌充, 西條了康, 太田保夫(1986) イソチオシアネートによるカットキャベツの褐変防止とエチレン生成阻害, 園芸学会誌, 55, 194-198.
- 13) 西條了康 (1989) イソチオシアネート類によるカットキャベツの褐変防止, 生物と化学, 26, 48-49.
- 14) Kazuko Oba , Norio Iwatuka, Ikuzo Uritani, Angelina M. Alvarez, and Virgilio V. Garcic(1992) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isozymes in banana bud, Biosci. Biotech. Biochem., 55, 1027-1030. (大羽和子, 岩槻紀夫, 瓜谷郁三, アンヘオアM.アルバレオ, バーヒリオV. ガルスア, 食用バナナつぼみにおけるポリフェノールオキシダーゼアイソザイムの部分精製とその性質, 日本農芸化学会欧文誌)
- 15) 吉岡倭子(2003) 酵素による食品成分の変化, 「食品学」, 久保田紀久栄, 森光康二郎 編著, 東京化学同人, 東京, pp. 129-131.
- 16) Chung-Shin Tang (1974) Benzyl isothiocyanate as a naturally occurring papain inhibitor, J. Food Sci., 36, 94-96.
- 17) 山王丸靖子, 片山 脩, 檜村芳記, 金子勝芳(1998) リンゴの部位別および成熟過程におけるポリフェノール成分とポリフェノールオキシダーゼ活性の変化, 日本食品工業学会誌, 45, 37-43.