

ナス, バナナ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

塩見 朱加*・太田 義雄**・山崎 真未***

Effect of Isothiocyanate on Polyphenol Oxidase Activity in Eggplant and Banana

Ayaka SHIOMI, Yoshio OHTA and Mami YAMAZAKI

Key words : ナス eggplant, バナナ banana, ポリフェノールオキシダーゼ polyphenol oxidase, 酵素阻害 inhibition of enzymatic activity, イソチオシアネート isothiocyanate

緒 言

野菜・果実を加工・調理して生で利用する際には、褐変による変色が問題となる。生果物の褐変は酵素的酸化反応であり、野菜・果実中に含まれている酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼ (PPO) が関与していることが知られている¹⁻³⁾。特に生で利用する機会が多い野菜としてはナス、果実ではバナナの褐変防止が難しい。野菜の褐変防止のひとつとしてアリルイソチオシアネート (AITC) の有効性が注目されている⁴⁾。カットキャベツの褐変が AITC により抑制されることが永田ら⁴⁾ により報告され、カットレタスにおいても低濃度の AITC で有効であることが報告⁵⁾ されている。自然界には、AITC 以外にも多くの類似化合物があり⁶⁾、アブラナ科の野菜やワサビ、黒からしに多く含まれている。これらの化合物はイソチオシアネート (ITC) と呼ばれており、独特の辛みと風味を有した食品成分である。また、ITC は香辛料としても一部利用されており、日本人にはなじみある成分である。最近、この ITC について多くの生理機能が報告され⁷⁻¹¹⁾、注目されている食品機能性成分のひとつでもある。ITC の食品生理機能は主として ITC の高い反応性に由来している。特に、生体中での生理活性の多くは、たんぱく質との反応性に起因している¹²⁻¹⁴⁾ と推察される。共著の山崎らは ITC のたんぱく質との反応性に着目して、野菜・果実の PPO 活性への ITC の影響を報告している¹⁵⁾。この ITC の PPO 活性抑制作用から、野菜・果実の褐変防止剤としての活用の可能性を指摘している。そこで、本報告では、ITC の PPO 活性に及ぼす影

響について、さらに検証を試みた。特に、調理において褐変防止の難しいとされているナス、バナナを対象として取り上げ、ITC の褐変防止剤としての可能性について調べた。

方 法

1. 原材料および試薬

ナスとバナナは市販の新鮮なものを実験前に購入して、供試した。抽出 PPO 活性測定用の基質のポリフェノール類として、クロロゲン酸 (東京化成)、ドーパミン (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)、 β -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

ナス、バナナからの PPO の抽出法については、山崎ら¹⁵⁾ の方法に準じて行った。その概要は、各試料からの PPO 抽出にはイソアスコルビン酸 Na 0.5% を添加した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) 20 ml を用いた。抽出後、冷蔵庫内で 0.01 M リン酸緩衝液 (pH6.8) を用いて一夜透析を行った。透析後、0.1 M リン酸緩衝液で 50 ml

* 広島文化学園短期大学食物栄養学科

** 広島文化学園短期大学食物栄養学科 (非常勤講師)

*** 中国学園大学現代生活学部人間栄養学科

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。

3. PPO 活性測定

PPO 活性測定については、前報¹⁵⁾ に準じて行った。その概要は、基質にはナスではクロロゲン酸、バナナではドーパミンを使用した。反応液は全量 3 ml とし、0.1 M リン酸緩衝液 1 ml, 15 mM 基質 1 ml (最終濃度 5 mM) に純水を加えたものを、27°C に設定した恒温槽で定温にした。つぎに粗酵素液を加え、すばやく攪拌し、30 秒後から 462 nm の吸光度 (OD) を測定した。

4. PPO 活性に及ぼす ITC の影響

(1) ITC 溶液の調製

ITC の調製は前報¹⁵⁾ に従って行った。その概要は、ITC を少量のエタノールに溶解させ、ITC の添加濃度が (最終濃度 0.0625~0.5 mM) になるように加えた。

(2) ITC 添加試験

ITC の添加試験も前報¹⁵⁾ のとおりである。その概要は、ITC の添加は酵素液添加直前とし、添加濃度を変化 (0~0.5 mM) させ、その PPO 活性への影響について調べた。OD 値 (462 nm) は経時的に 0.5~3 分まで測定した。PPO 活性の表示については、試料量、添加酵素液量の違いを補正し、試料 1 g あたりの、初速度である 1 分後の OD (462 nm) の値を計算し、酵素活性 (PPO 活性: $A_{462}/\text{min}/\text{g}$) として表示した。

結果および考察

1. ナスの PPO 活性に及ぼす ITC の影響

PPO 活性測定の基質としてはクロロゲン酸を用い、そ

の結果を Fig. 1 に示した。添加されたいずれの ITC においてもナス PPO 活性は抑制されているが、ITC の種類により差異が認められた。ナス PPO 活性抑制の高い順に、 $\text{PeITC} > \text{n-Butyl-ITC} > \text{4-Pentenyl-ITC} > \text{PEITC}$ であった。ITC は疎水性が高い化合物であるが、より疎水性の高いベンゼン環を持つ ITC に PPO 活性抑制率が大きい傾向が認められた。

つぎに、その添加濃度の影響に注目すると、いずれの ITC も添加濃度が高くなるほど、その抑制率は大きくなっている。特に抑制率の最も大きい、PeITC、n-Butyl-ITC においては、わずか 0.1 mM の添加で PPO 活性の 50% 以上抑制がされていた。

2. バナナ PPO 活性に及ぼす ITC の影響

バナナ PPO 活性測定においては、ドーパミンを基質とし、ITC の影響を調べた。その結果を Fig. 2 に示した。バナナ PPO 活性に及ぼす ITC の影響はナスの場合と同様に 8 種類すべての ITC により、その活性が抑制された。しかし、その抑制傾向はナスとかなり異なるパターンを示した。バナナ PPO 活性の抑制率は大きく 3 グループに分けられる傾向を示した。第 1 グループは最も抑制率の大きい ITC は PeITC の 1 種類のみである。第 2 グループは中程度の抑制率 (50% 以上) を示す 6 種類の ITC、第 3 グループはほとんど活性を抑制しない 2 種類の ITC に分かれた。PeITC が最も高い抑制率を示したのは、ナスと同じであった。また、添加濃度に関しては、PeITC では 0.1 mM 添加で PPO 活性の 85% 近くを抑制し、ナスの抑制率よりバナナの方が高かった。これはナスとバナナの PPO の特性が違うためと考えられる。ITC によるバナナの PPO 活性抑制については、共著の山崎らにより既

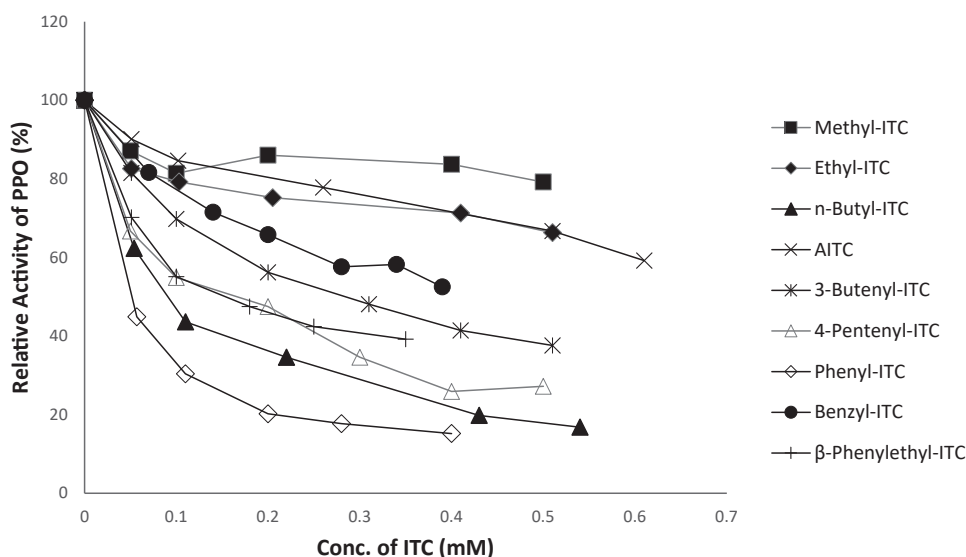


Fig. 1 Changes in relative PPO activity extracted shredded eggplant on the concentration of ITC treated
 Relative Activity = (enzyme activity treated ITC performed over concentration ranging from 0 to 0.5 mM) / (enzyme activity performed ITC 0 mM) \times 100

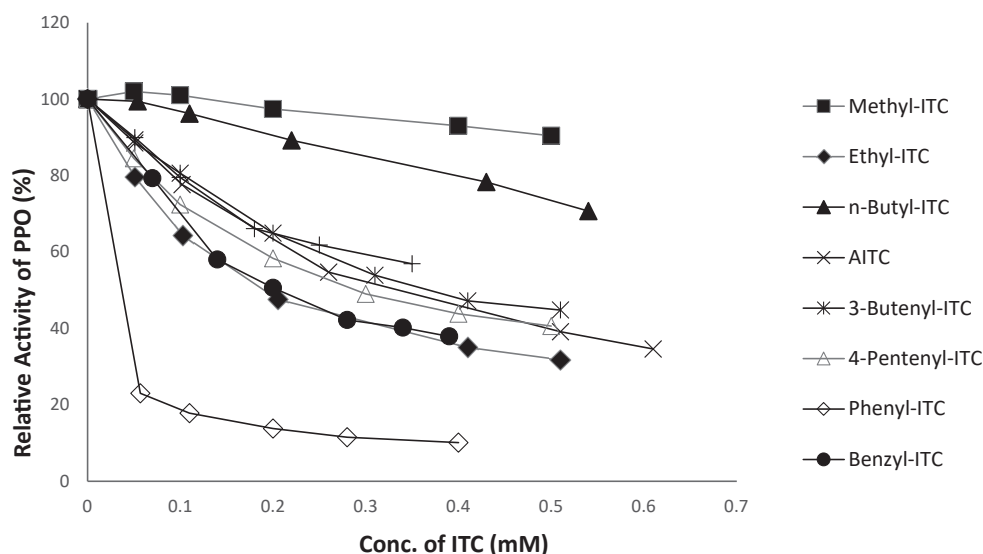


Fig. 2 Changes in relative PPO activity extracted shredded banana on the concentration of ITC treated. Relative Activity and symbols are same in Fig. 1.

に報告¹⁵⁾されている。前報¹⁵⁾の結果と今回の結果を比較すると、その抑制パターンにはかなりの差異が認められた。特に、前報¹⁵⁾ではITC添加0 mMでのデータのバラツキが大きく、今回のパターンと違いが認められる。この要因としては、測定の実験誤差の影響が大きいと考えられる。今回の結果の方が真の傾向を示していると思われる。今回の再試験の結果より、共著者の前報¹⁵⁾のバナナのデータを訂正する。

3. ITC 利用の可能性

ナス、バナナのPPOに関する報告はいくつかあるが、PPO活性抑制に関してはアスコルビン酸とシステインの還元作用に効果があることが報告されている^{16,17)}。しかし、ナス、バナナの褐変抑制へのITCの利用に関する研究はほぼ無い¹⁵⁾。今までに、ITCによる野菜・果実の褐変防止については、キャベツおよびレタスへのAITCの利用が報告されている^{4,18)}。AITCによる褐変抑制機構としては、カットキャベツでは褐変の基質となるポリフェノールの生合成の律速酵素であるフェニルアラニンアンモニアナーゼ (PAL) 活性の誘導が抑制され、傷害面でのポリフェノール総量の上昇が抑制されるためである^{4,19)}とされている。レタスの褐変に関しては、茨木ら¹⁸⁾がAITCはPPO活性を強く抑制すると報告している。基質であるポリフェノールが誘導される遅延型³⁾の酵素的褐変では、PALとPPOのどちらかの活性を抑制すれば褐変の抑制ができると考えられる。しかし、基質であるポリフェノールが最初から十分量存在する即時型の褐変反応³⁾においては、PPO活性を抑制しなければ褐変の抑制は難しい。したがって、即時型に近いナス、バナナの褐変抑制には酸化酵素であるPPO活性抑制が重要である。一方、阻害物質であるITCの特性としては、酵素たんぱ

く質との反応性の関与が大きいと考えられる¹²⁻¹⁴⁾。特に、添加直後から抑制されていることから、PPOの活性部位近傍へのITCの反応関与が推測される。ナス、バナナともPPO活性抑制にはより疎水性の高いベンゼン環を持つPeITCの抑制率が大きかった。前報⁵⁾のレタスPPO活性においてもPeITCが高い抑制率を示している。今後さらに多くのデータが蓄積されれば、PPO活性とITCの化学構造相関からの抑制メカニズムへの解明も期待される。

今回の結果より、キャベツ、レタスと同様にナス、バナナの褐変防止にITCは有望な物質と考えられる。ナス、バナナでPPO活性抑制の大きかったPeITCを直ちに食品に利用することは難しいが、自然界に存在するITCや食品添加物として許可されているITCの利用は可能である。例えば、ナスにおいては4-Pentenyl-ITC、バナナにおいてはAITCが利用可能であると考えられる。さらに検討は必要であるが、ナス、バナナの褐変抑制剤としてITCは有望であると思われる。

要 約

加工・調理の際、褐変抑制が難しいナス、バナナについて、イソチオシアネート (ITC) のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性抑制を指標として、その褐変抑制の可能性について調べた。その結果、ナス、バナナとも8種類のITCによるPPO活性抑制が認められた。その抑制パターンは、ナス、バナナにより差異を示したが、最も大きな抑制効果を示したのは、両者ともフェニルイソチオシアネート (PeITC) であった。しかも、0.1 mM PeITC添加でナス、バナナPPO活性の70~85%の活性抑制率を示した。このことから、自然界に存在するITCを有効に利用すれば、ナス、バナナの褐変防止剤としてITCは有望と考えられる。

文 献

- 1) 村田容常, 本間清一: ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御, 日本食品科学工学会誌, **45**, 177-185 (1998).
- 2) 藤田修二: 青果物のポリフェノール酸化酵素に関する基礎的研究, 日本食品保蔵科学会誌, **31**, 121-126 (2005).
- 3) 村田容常: 酵素的褐変とその制御, 化学と生物, **45**, 403-410 (2007).
- 4) 永田雅晴, 矢野昌充, 西條了康: アリルイソチオシアネートによるカットキャベツの褐変抑制機構, 日本食品工業学会誌, **39**, 322-326 (1992).
- 5) 塩見朱加, 山崎真未, 太田義雄: アリルイソチオシアネートによるカットレタスの褐変抑制, 広島化学学園短期大学紀要, **55**, 投稿中.
- 6) 川岸舜朗: グルコシノレート—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 (1985).
- 7) Hitomi Kumagai, Naoki Kashima, Taiichiro Seki, Hidetoshi Sakurai, Kenji Ishii and Toyohiko Ariga: Analysis of Volatile Components in Essential Oil of Upland *Wasabi* and Their Inhibitory Effects on Platelet Aggregation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2131-2135 (1994).
- 8) 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.
- 9) 中村宜督: 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 (2004).
- 10) 福家洋子, 大石芳江, 岩下恵子, 小野晴寛, 篠原和毅: 沢わさびの胃ガン細胞増殖抑制作用, 日本食品工業学会誌, **41**, 709-711 (1994).
- 11) Ohta, Y., Yamaki, K., Osawa, T. and Kawakishi, S.: Effects of Isothiocyanate on Tumor Necrosis Factor- α Production in J774A.1 (BALB/c macrophage) Cells, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 1375-1378 (2004).
- 12) Shunro Kawakishi and Mituo Namiki: Oxidative cleavage of the disulfide bond of cystine by allyl isothiocyanate, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 618-620 (1982).
- 13) Shunro Kawakishi and Toshiyuki Kaneko: Interaction of proteins with allyl isothiocyanate, *J. Agric Food Chem.*, **35**, 85-88 (1987).
- 14) 太田義雄, 川岸舜朗: 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, 日本食品科学工学会誌, **45**, 744-747 (1998).
- 15) 山崎 (今村) 真未, 影山智絵, 太田義雄: 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, 中国学園紀要, **20**, 107-112 (2021).
- 16) 浅川牧夫, 久保研一, 彌富道男: 熊本県産ナス「筑陽」からのポリフェノールオキシダーゼの精製および性質, 熊本大学教育学部紀要, **51**, 105-115 (2002).
- 17) Chang-Peng Yang, Shuji Fujita, MD Ash- rafuzzaman, Naoko Nakamura and Nobuyuki Hayashi: Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum L.*) Pulp, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2732-2735 (2000).
- 18) 茨木俊行, 鶴 暁子, 中村 駿, 松本明芳: フェニルアラニンアンモニリアラーゼ活性およびポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制によるレタス切り口の褐変防止法, 福岡県農業総合試験場研究報告, **14**, 95-98 (1995).
- 19) 永田雅晴, 田中喜之, 平井正志, 西條了康: アリルイソチオシアネートがカットキャベツの PAL 活性の上昇を抑制する機構について, 日本食品工業学会誌, **40**, 52-55 (1993).

Summary

It is difficult to suppress the enzymatic browning of eggplants and bananas during processing and cooking. As one method to solve this problem, we investigated the possibility of inhibiting browning of eggplant and banana using the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) activity by isothiocyanate (ITC) as an index. As a result, 8 types of ITCs inhibited PPO activity in both eggplant and banana. The inhibition pattern showed difference between eggplant and banana.

Phenyl isothiocyanate (PeITC) showed the greatest inhibitory effect in both eggplant and banana. Moreover, addition of 0.1 mM PeITC inhibited the PPO activity of eggplant and banana by 70-85%. From this, if ITC is used effectively, ITC seems to be promising as an agent for preventing browning of eggplants and bananas.