

ミロシナーゼ活性に対する食塩の影響とアブラナ科野菜の漬物加工への応用

田中 進¹, 松岡 寛樹¹, 綾部 園子¹, 小澤 好夫¹, 保坂 公平²

¹高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科, ²群馬大学医学部保健学科

概要 ダイコン、ワサビ、カラシなどのアブラナ科野菜に見出される辛味成分であるイソチオシアナートは、辛味成分前駆体からミロシナーゼの作用によって生成することが知られている。従って前駆体を含む野菜を漬物などに加工する際、ミロシナーゼ活性の変化によって辛味成分の生成量が変わり、その結果、食品の辛さが規定されると考えられる。ミロシナーゼは *in vitro* では、アスコルビン酸単独あるいはアスコルビン酸とマグネシウム(Mg²⁺)の組み合わせによって活性化されることが明らかとなっているが、Mg²⁺以外の無機質単独あるいは無機質とアスコルビン酸の組み合わせによる酵素の性状はまだ不明な点が多い。また、イソチオシアナートには抗酸化作用や抗癌作用などの多様な生理活性を有することが知られており、食品の機能性の面からもミロシナーゼの酵素学的な性状を検討することは重要であると考えられる。本研究では、食品の漬物加工への応用を視野に *in vitro* におけるミロシナーゼ活性に対する NaCl やアスコルビン酸の影響について検討し、アブラナ科野菜の中で特にダイコンに着目し、脱水、塩蔵条件、品種間について塩分量、辛味成分前駆体であるグルコシノレート、ミロシナーゼおよびアスコルビン酸の変化について検討を行った。

ミロシナーゼ活性を測定するために、ホワイトマスタード由来のミロシナーゼと西洋ワサビ由来の辛味成分前駆体シニグリンを基質に用いて酵素反応を行い、生成したグルコースをヘキシキナーゼ法により定量した結果、NaCl は終濃度 1%前後でミロシナーゼ活性を約 1.3 倍増加させたが、アスコルビン酸との相乗効果は観察されなかった。また、市販の「伯方の塩」、「沖縄の塩」について検討を行ったところ、これらの食用塩についても終濃度 1%前後(170 mmol/L)で活性を約 1.2~1.25 倍増加させることが示された。次に Na⁺ 以外の一価のカチオン(Li⁺, K⁺, Cs⁺)について着目し検討を行ったところ、Na⁺ と同様に 170 mmol/L 前後で活性の上昇を認めたが、この中で特に Na⁺ が酵素の活性化効果が高い傾向を示した。

次に日干しあるいは塩押しにより脱水したダイコンを使用して、各種塩蔵条件下での塩蔵熟成過程または品種間において、塩分量、辛味成分の生成に関与するグルコシノレート、ミロシナーゼおよびアスコルビン酸について、これらの動態を解析した。今回検討した 10 品種(干し理想, 新八州, 秋づまり, おふくろ, 白槍, 秋の郷, 冬美人, 味ごのみ, おろし, ねずみ)において塩押しダイコンの塩分量は 6.8±0.5%であり、低温塩蔵条件の 1, 2, 4, 8 ヶ月後では塩押し、日干し塩蔵ダイコンでそれぞれ大きな変化はなく、6.9±0.7%であった。また、グルコシノレートおよびアスコルビン酸は脱水あるいは塩蔵により顕著に減少した。経時的には、グルコシノレートは塩蔵開始 1 ヶ月の時点で消失しており、辛味成分への移行がほぼすべて完了したものと推察された。アスコルビン酸は塩蔵開始以降、緩やかに減少し、4 ヶ月の時点まで残存していた。また、Tissue Printing 法によりミロシナーゼタンパク質を同定したところ、新鮮ダイコンで最も高く、脱水によりわずかに減少、塩蔵開始 1 ヶ月で大きく減少した。しかしながら、8 ヶ月までわずかにミロシナーゼは残存していた。今後は、ダイコンの脱水や塩蔵熟成過程においてアスコルビン酸の添加を検討したり、塩味、苦味、辛味などに対する官能検査を通して、おいしく、機能性を有した漬物の食品加工に応用していきたいと考える。

1. 研究目的

アブラナ科野菜に存在する辛味成分であるイソチオシアナートは現在まで110種類以上が同定され¹⁾、その特徴的なものとして、ワサビやカラシのアリルイソチオシアナート(AITC)、クレソンのフェネチルイソチオシアナート、ダイコンの4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBI)などが良く知られている。イソチオシアナートは植物中で直接生合成されず、その配糖体(グルコシノレート)の状態が存在し、組織が破壊される事でミロシナーゼの酵素反応により二次的に生成される^{2,3)}。グルコシノレートとミロシナーゼは異なる細胞や同じ細胞の異なる区画に別々に存在し、アスコルビン酸はグルコシノレートの局在する細胞の液胞に存在すると考えられている⁴⁾。アスコルビン酸はミロシナーゼ活性の調節剤としての役割を持ち、細胞が損傷を受ける前は高濃度に液胞に存在し阻害剤として働き、損傷を受けると希釈され、ミロシナーゼ活性が高まるとされている。従って辛味成分前駆体を含むアブラナ科野菜を加工する際、ミロシナーゼ活性の変化によって辛味成分の含量が変わり、その結果食品の辛さが規定されるものと考えられる。ミロシナーゼは*in vitro*では、アスコルビン酸単独あるいはアスコルビン酸とマグネシウムイオン(Mg^{2+})の組み合わせによって活性化されることが明らかとなっているが⁵⁾、 Mg^{2+} 以外の無機質単独あるいは無機質とアスコルビン酸の組み合わせによる酵素の性状はまだ不明な点が多い。従って本研究において、ミロシナーゼの*in vitro*における酵素学的性状を詳細に調べることは基礎的研究として意味があるだけでなく、食品加工にも応用可能であると考えられる。また、イソチオシアナートには抗酸化作用や抗癌作用^{6,7)}などの多様な生理活性を有することが知られており、食品の機能性の面からも研究を有機的に結びつけることが可能であると考えられる。本研究では、食品の漬物加工への応用を視野に*in vitro*におけるミロシナーゼ活性のNaClやアスコルビン酸に対する影響について検討し、日本人の中で消費量が一番多いアブラナ科野菜であるダイコンに着目し、品種間および脱水や塩蔵といったタクアン漬の製造過程において塩分量、辛味成分前駆体であるグルコシノレート、ミロシナーゼおよびアスコルビン酸の動態変化について検討を試みた。

2. 研究方法

2.1 ミロシナーゼ活性の測定

ミロシナーゼは西洋ワサビ由来のミロシナーゼ(Sigma)を使用し、基質としてシニグリン(Sigma)を用いた。pH 6.6のリン酸緩衝液に任意の濃度の無機質やアスコルビン酸を加え、20°C、30分酵素反応を行い、100°C、10分で酵素を失活させた。反応の結果、生成したグルコースをヘキソキナーゼ法(J. K. インターナショナル)で定量することにより、ミロシナーゼ活性を求めた。

2.2 ダイコンの品種および脱水・塩蔵方法

2010年8月から2011年2月の間に群馬県内で栽培、あるいは購入した10品種(干し理想、新八州、秋づまり、おふくろ、白槍、秋の郷、冬美人、味ごのみ、おろし、ねずみ)を試料とし、塩押しによる脱水および塩蔵には「キングソルト白塩」(株式会社 日本海水)を使用した。塩押しによる脱水は、ダイコン重量あたり8%重の食塩、1.5倍重の重石を乗せ、5°Cで2週間塩押しを行った。品種によっては塩蔵開始48時間後に2%重食塩による追塩を行った。その後、水が上がり切らない場合は適宜6%食塩水を追加した。日干しによる脱水は、5~25日間日干しを行い、2~3段階の干し上がりになるように期間を調整し、浅干し、標準干し、深干しとした。干し理想の塩押しダイコンと標準干しダイコンを用いて塩蔵を行い、塩蔵条件は塩漬け、糠漬けおよび糠葉漬けを含む3種類とし5°Cの条件下行った。塩蔵開始時に添加した糠は群馬県内で購入し、ダイコン葉は収穫後の葉を洗浄し、ブランチング処理を行った後、凍結乾燥したものを粉砕して用いた。塩押し塩漬けダイコンは重量あたり2%重の食塩を添加した。塩押し糠漬けダイコンは重量あたり2%重の食塩、2%重の糠を添加した。塩押し糠葉漬けダイコンは重量あたり2%重の食塩、1%重の糠、0.5%重のダイコン葉粉末を添加した。日干し(標準干し)塩漬けダイコンは重量あたり8%重の食塩を添加した。日干し(標準干し)糠漬けダイコンは重量あたり8%重の食塩、6.6%重の糠を添加した。日干し(標準干し)糠葉漬けダイコンは重量あたり8%重の食塩、3.3%重の糠、1.65%重のダイコン葉粉末を添加した。重石は30kgから45kgで調整し、漬け樽のヘッドスペースの窒素置換を行った。分析用の試料は2010年12月15日に塩蔵開始、1-2ヶ月毎に8ヶ月までサンプリングを行い、液体窒素で急速凍結後、真空包装して-30°Cで保存した。

2.3 塩押し、塩蔵ダイコンの塩分測定

2.2で得た乾燥粉末試料 0.500 g から水溶性成分を抽出し、塩分分析計 (SAT-210, 東亜 DKK) により定量を行った。

2.4 脱水、塩蔵ダイコンの総アスコルビン酸の分析

2.2で得た乾燥粉末試料 0.100 g に 5% (w/v) メタリン酸溶液 5 ml 加えた後、31 kHz で 10 分間超音波処理を行った。5% メタリン酸溶液で 10 ml に定容し、ディスクシリンジフィルターでろ過を行ったものをアスコルビン酸抽出液とした。適宜 10% (w/v) メタリン酸溶液で希釈した抽出液 0.5 ml に還元剤として 10 mM DTT- 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 0.25 ml を加え、25°C で 5 分間反応を行い、アスコルビン酸をすべて還元型にし、0.2 M 硫酸 0.5 ml を加え、分析用試料とした。総アスコルビン酸は、クーロメトリック型電気化学検出器-HPLC を用いて絶対検量線にて定量を行った。

2.5 脱水、塩蔵ダイコンのグルコシノレートの分析

2.2で得た凍結乾燥粉末試料 0.100 g を 75°C で 1 分間加熱後、熱 80% メタノール 1.5 ml と内部標準溶液として 5 mM シニグリンを 0.2 ml 加え、75°C で 10 分間加熱した。冷却後、1,600g で 5 分間遠心分離を行った。上清を分取し、残渣に 80% メタノール 1.5 ml を加え、再度加熱抽出、上清の分取を行い、この操作を 2 回繰り返した。集めた上清を超純水で 5 ml に定容し、グルコシノレート粗抽出液とした。陰イオン交換樹脂、DEAE sephadex A-25 (GE ヘルスケア・ジャパン) にスルファターゼ溶液を添加し、25°C で 16~18 時間反応を行った後、超純水 0.5 ml を 3 回流し、収集したデスルホグルコシノレートを分析用試料とした。Agilent 1100-1200 System を用いてグルコシノレートの内部標準法による HPLC 分析を行った。

2.6 Tissue Printing 法によるミロシナーゼの半定量的解析

Tissue Printing 法は原ら⁸⁾の方法に準じて行った。この方法によるミロシナーゼタンパク質の可視化の反応スキームについて Fig. 1 に示した。処理を行った PVDF 膜をシャーレに乗せ、試料の切断面の水気を軽く除いた後、膜に 15 秒間押し付け、全タンパク質を転写させた。膜を 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に浸漬し、1 分間振とう洗浄を 2 回行った。洗浄後、発色液 (グルコースオキシダーゼ (Sigma), ホースラディッシュペルオキシダーゼ (和光純薬工業), *o*-ジアニシジン (MP Biomedicals), シニグリン (Sigma)) を膜全体に滴下し、暗所、室温で約 1 時間反応を行った。反応後、膜を純水に浸漬し、1 分間振とう洗浄を 2 回行った。転写結果はスキャナー (MFC-8820J, ブラザー工業) で画像データを保存した。

3. 研究結果

3.1 *In vitro* におけるミロシナーゼ活性に対する NaCl とアスコルビン酸の影響

ミロシナーゼ活性における NaCl の影響について最初に *in vitro* で検討したところ、Fig. 2 に示すように、終濃度約 1% (約 170 mmol/L) で活性が約 1.3 倍に上昇し、その後、活性が低下することが示された。この活性の上昇が浸透圧によるものか確認をするため、0.3~3,000 mmol/L のソルビトールを使用して同様な測定を行ったところ、活性に変化が見られず (Fig. 3)、浸透圧の影響ではないことが確認された。次にアスコルビン酸の影響を調べたところ、0.1% のアスコルビン酸がミロシナーゼ活性を約 3 倍上昇させることが示された (Fig. 4)。従って、NaCl とアスコルビン酸との相乗効果を検討したが、顕著な効果は観察されな

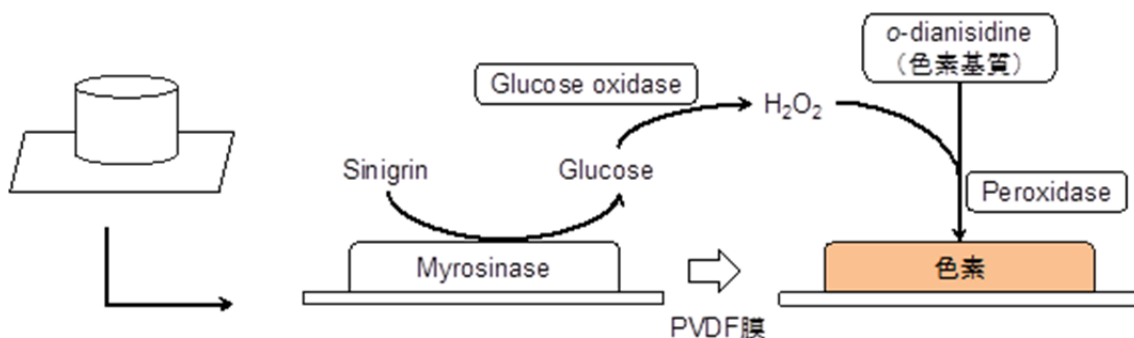


Fig. 1. Tissue Printing 法によるミロシナーゼ活性の可視化

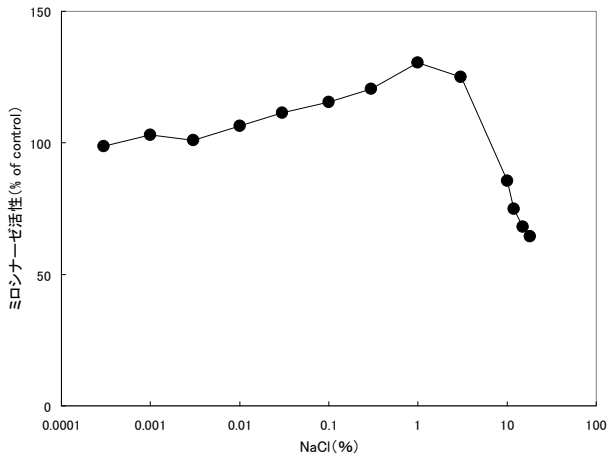


Fig. 2. ミロシナーゼ活性における NaCl の影響

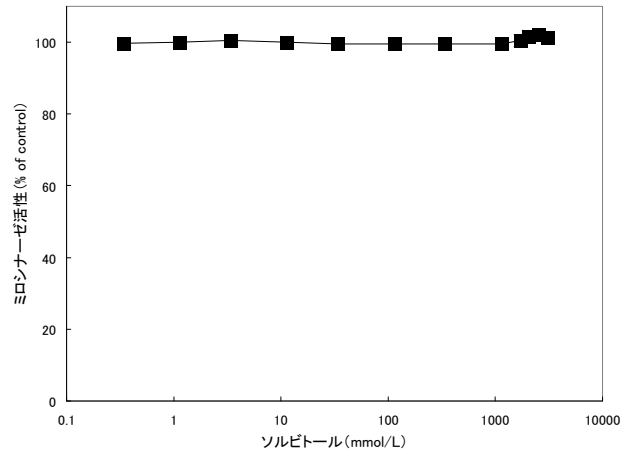


Fig. 3. ミロシナーゼ活性における浸透圧の影響

かった (Fig. 5)。次に、「伯方の塩」や「沖縄の塩」といった、食用塩について検討を行ったところ、食用塩についても終濃度 1%前後で活性が約 1.2~1.25 倍増加させることが明らかとなった (Fig. 6)。また、Na⁺以外の一価のカチオン (Li⁺, K⁺, Cs⁺) について検討を行ったところ、Na⁺と同様に 170 mmol/L で活性の上昇を認めたが、この中で特に Na⁺ が酵素の活性化効果が高い傾向を示した (Fig. 7)。

3. 2 塩押しおよび塩蔵によるダイコン中の塩分量

今回検討した 10 品種 (干し理想, 新八州, 秋づまり, おふくろ, 白槍, 秋の郷, 冬美人, 味ごのみ, おろし, ねずみ) において塩押しダイコンの塩分量は $6.8 \pm 0.5\%$ であり、干し理想の 3 種類 (塩漬け, 糠漬け, 糠葉漬け) の低温塩蔵条件 (5°C) での 1, 2, 4, 8 ヶ月後では塩押し、日干し塩蔵ダイコンともにそれぞれ大きな変化はなく、6 種類の塩分量は平均で $6.9 \pm 0.7\%$ であった。

3. 3 脱水および塩蔵によるダイコン中の総アスコルビン酸

総アスコルビン酸の結果は、Fig. 8、9 に示した。個別のデータは示していないが、各種ダイコンの分析において還元処理および未処理のものを比較したが、ほとんど変化はなく酸化型のデヒドロアスコルビン酸 (DHA) はほぼ存在していないことがわかった。すべての品種において新鮮ダイコンが $6.39 \pm 1.45 \text{ mg/g (DW)}$ 、塩押しが $1.45 \pm 0.54 \text{ mg/g (DW)}$ 、日干しが $1.33 \pm 0.44 \text{ mg/g (DW)}$ であり、品種によって差がみられ、新鮮ダイコンで含有量が最も高く、脱水後に 60%以上減少した。段階的な日干しでは乾燥の進行と共に含有量が減少した。各種処理後においても

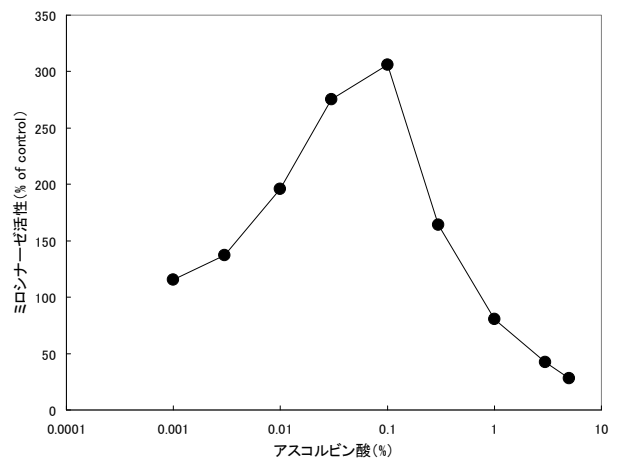


Fig. 4. ミロシナーゼ活性におけるアスコルビン酸の影響

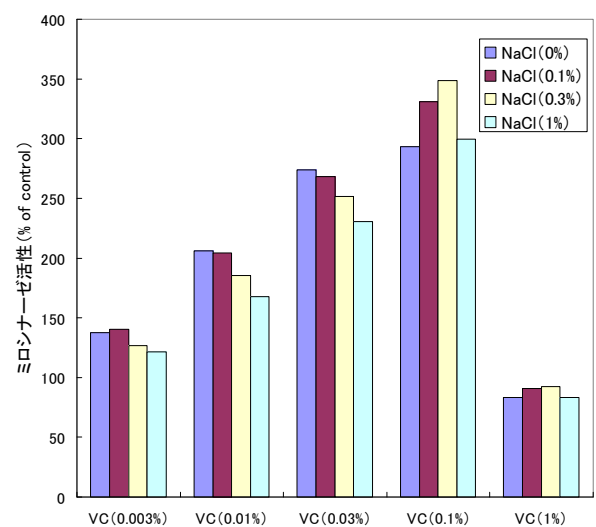


Fig. 5. ミロシナーゼ活性における NaCl とアスコルビン酸の影響

DHA はほぼ存在していなかったことから、脱水処理によりアスコルビン酸は酸化され DHA となり、その後速やかに分解されたものと推察された。またダイコンの収穫時期が遅くなるとアスコルビン酸含有量が減少するという報告から⁹⁾、収穫後の時間経過によりアスコルビン酸が減少した

ものと考えられた。経時変化ではすべての塩蔵条件において塩蔵開始以降、経時的に減少し続け、4 ヶ月の時点で新鮮ダイコンの 1/5-1/30 まで減少していた。糠および葉の影響は確認できなかった。

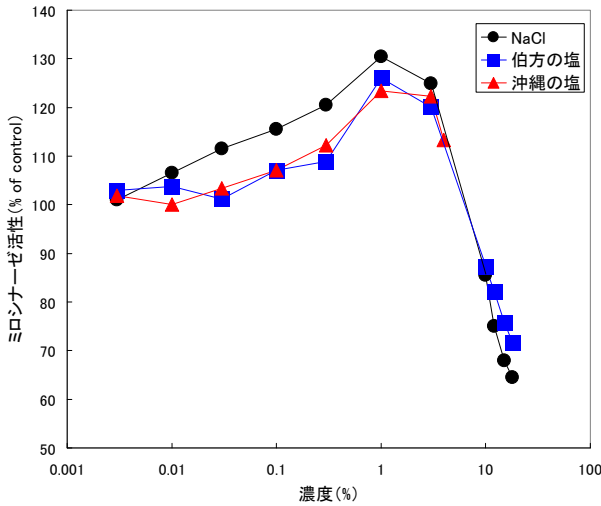


Fig. 6. ミロシナーゼ活性における食用塩の影響

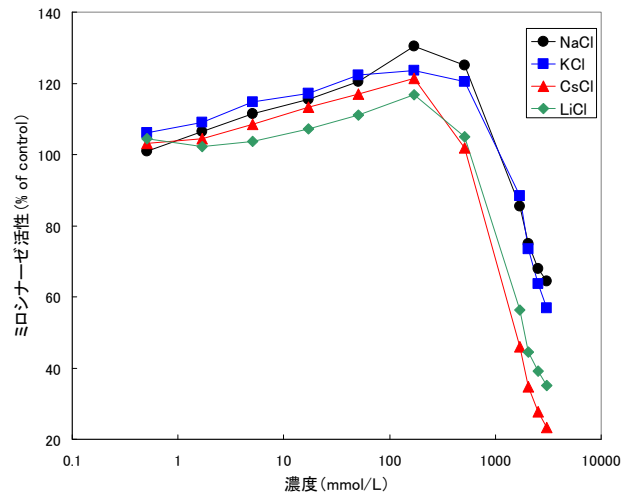


Fig. 7. ミロシナーゼ活性における一価のカチオンの影響

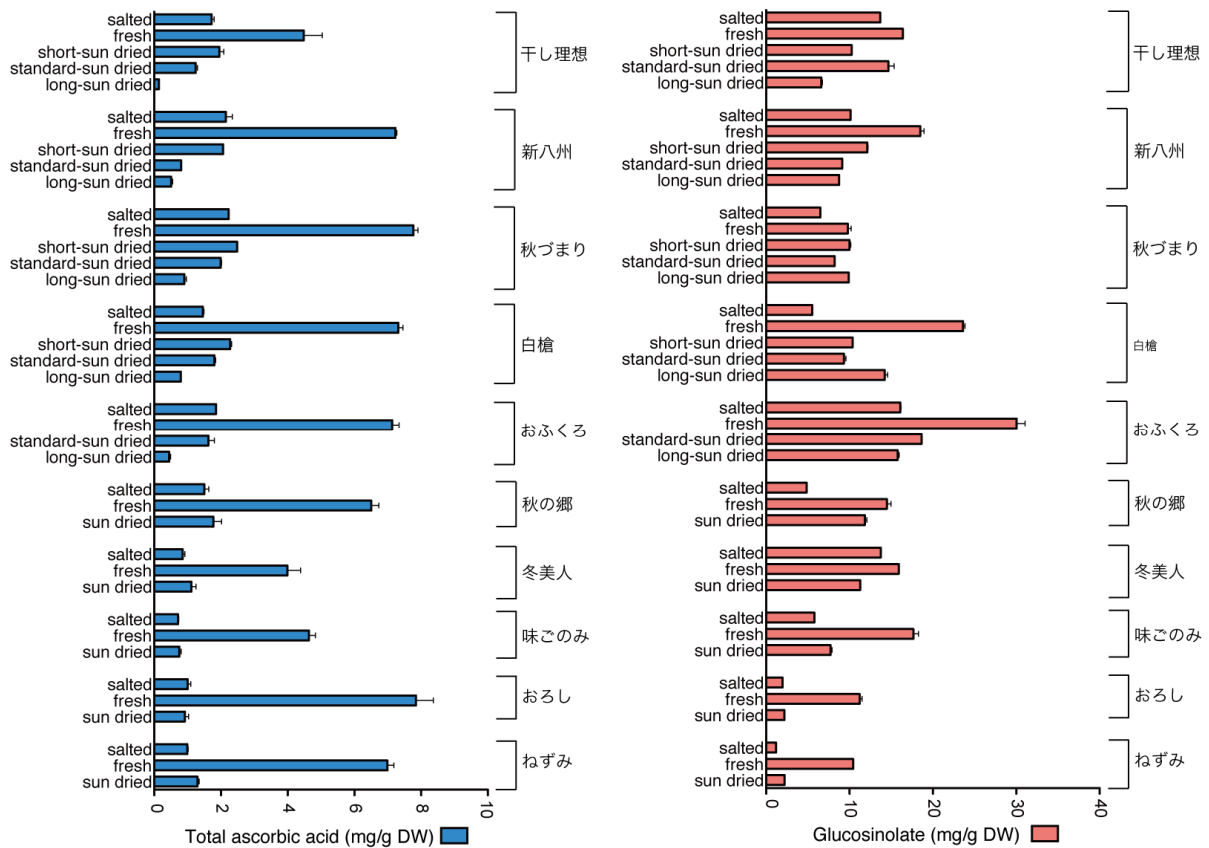


Fig. 8. ダイコンの品種間ならびに脱水処理における総アスコルビン酸およびグルコシレート量の変化

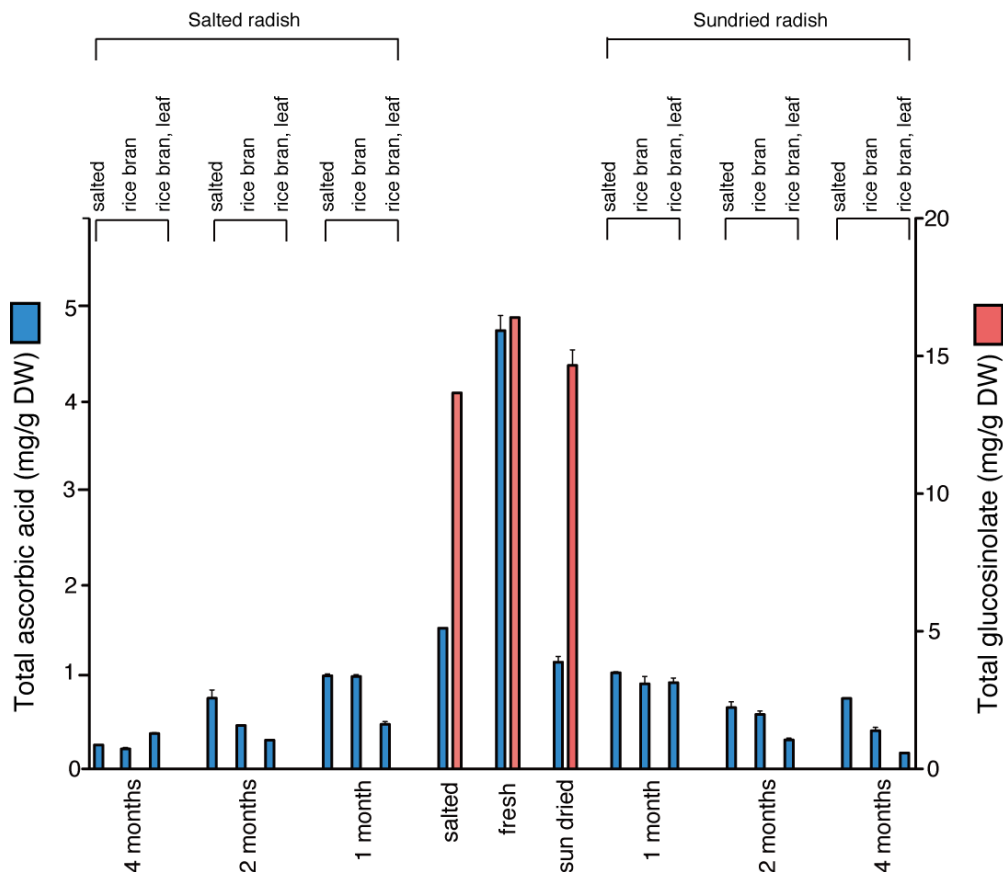


Fig. 9. 各塩蔵条件における総ビタミンC・グルコシノレートの経時的変化

3. 4 脱水および塩蔵によるダイコン中のグルコシノレート

グルコシノレートの結果を Fig. 8, 9 に示した。すべての品種において新鮮ダイコンが 16.8 ± 6.3 mg/g (DW)、塩押しが 8.0 ± 5.2 mg/g (DW)、日干しが 9.5 ± 5.1 mg/g (DW) であり、すべての品種において新鮮ダイコンで最も高く、品種によって差がみられるものの、脱水、特に塩押しにより減少した。脱水により細胞が破壊された事で、ミロシナーゼと接触しイソチオシアナートが生成されたものと示唆された。グルコシノレートは塩蔵開始 1 ヶ月の時点で検出されず、既に消失していた。このことから脱水完了から塩蔵開始 1 ヶ月の間に残存グルコシノレートの全てがミロシナーゼ反応により、イソチオシアナートへ変換したものと推察された。

3. 5 脱水および塩蔵によるダイコン中のミロシナーゼ

Tissue Printing 法によるミロシナーゼ活性の半定量的解析結果を Fig. 10 に示した。すべての品種、脱水条件においてダイコンの表皮もしくは形成層付近に活性が認められ

た。新鮮ダイコンでは表皮および形成層にクリアな発色が認められた。塩押しや日干しによる脱水後の試料は組織の軟化がみられ、新鮮ダイコンとは異なり、表皮付近の活性が低下し、形成層付近のみ残存活性が認められた。また、日干しよりも塩押しのほうがより鮮明な発色が観察された。全品種においても新鮮ダイコンに比べ、脱水直後ではあまり変化がみられず、わずかに低下する傾向を示した。経時的変化では、塩蔵開始 1 ヶ月の時点で発色度、発色分布に変化がみられ、形成層において、わずかに色素が確認できる程度になり、ミロシナーゼ活性が低下したことが示唆された。しかしながらごくわずかではあるが、色素は塩蔵開始 8 ヶ月まで確認することができ、このことからミロシナーゼ活性は塩蔵開始以降 1-2 ヶ月で顕著に低下するが、完全に消失はせず、8 ヶ月間の塩蔵後でも残存していることが確認された。しかしながら品種間、部位、塩蔵条件間の詳細な比較は同一試料においてもプリント毎に差が生じやすく、困難であったため行わなかった。

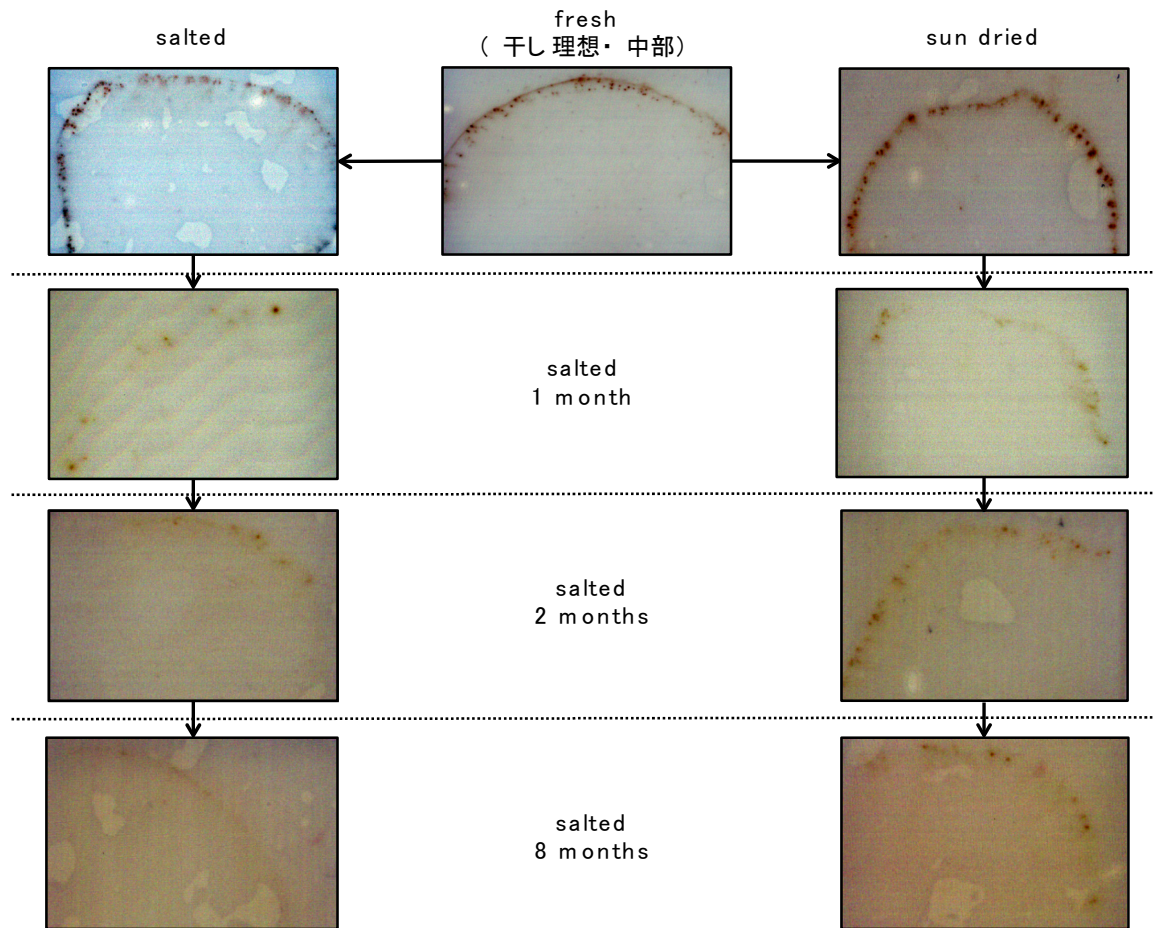


Fig. 10. 干し理想におけるミロシナーゼ活性の経時的変化

4. 考 察

食品機能研究はその歴史から3つの機能に分類されており、①栄養性としての一次機能、②感覚・嗜好性としての二次機能、③生体調節作用としての三次機能である。1990年代から日本に端を発した三次機能に重点を置いた研究が世界中で活発に行われるようになり、赤ワインのフレンチパラドックスの疫学研究をきっかけに、7,000種以上あるとされるポリフェノールの抗酸化性を中心とした研究が進んだ。さらに臨床的な効果として血糖上昇抑制、コレステロール上昇抑制、動脈硬化抑制、肝機能向上などの生活習慣病に対する健康効果が科学的に明らかにされた。これらの研究成果は食品関連業界に刺激を与え、日本では産・官・学一体の開発研究が行われるに至っている。アメリカ国立ガン研究所(NCI)は1990年、植物成分によるガン予防機能の解明を目的としたデザイナーフーズ計画を発表し、非栄養素以外の食物繊維や含硫化合物、そして前述のポリフェノール等にその効果が期待でき

るとした。その後、その概念はガン予防だけでなく生活習慣病予防を目的としたファンクショナルフーズへと拡大した。デザイナーフーズ計画において、ニンニク・ネギなどのユリ科植物に次いで、アブラナ科野菜が重要度の高い食品に位置づけられている。同じ時期に Talalay らの研究により¹⁾、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンにガン予防効果が見出され、それまでの抗菌性を中心とした研究から、重要な三次機能を持つ食品成分であることが明らかになった。スルフォラファンはアブラナ科野菜に普遍的に存在する、辛味成分であるイソチオシアナートの一種である。イソチオシアナートはその配糖体(グルコシノレート)からミロシナーゼの酵素作用によって生成することが知られている。従って前駆体を含むアブラナ科野菜を漬物などに加工する際、ミロシナーゼ活性の変化によって辛味成分の含量が変わり、その結果食品の辛さが規定されたり食品の機能性の変化が期待できる。ミロシナーゼは *in vitro* では、アスコルビン酸単独あるいはアスコルビン酸と

マグネシウム(Mg²⁺)の組み合わせによって活性化されることが明らかとなっているが⁵⁾、Mg²⁺以外の無機質単独あるいは無機質とアスコルビン酸の組み合わせによる酵素の性状はまだ不明な点が多い。従って、本研究では、食品の漬物加工への応用を視野に *in vitro* におけるミロシナーゼ活性の NaCl やアスコルビン酸に対する影響について検討し、アブラナ科野菜の中のダイコンのタクアン漬製造過程における塩蔵ダイコンについて着目し、脱水、塩蔵条件、品種間による塩分量、辛味成分前駆体であるグルコシノレート、ミロシナーゼおよびアスコルビン酸の動態変化について検討を行った。

最初に *in vitro* におけるミロシナーゼ活性に対する NaCl とアスコルビン酸の影響を検討したところ、NaCl は、終濃度 1%で活性が約 1.3 倍に上昇させることを見出した。しかしながら高濃度の NaCl では、活性が低下することが示された。従って、漬物加工の際、NaClの濃度がイソチアシアートの生成に関与することが予想された。またこの活性の上昇や低下が浸透圧によるものか確認をするため、ソルビトールで同様な測定を行ったところ、活性に変化が認められず、浸透圧の影響ではないことが示された。次にアスコルビン酸の影響を調べたところ、0.1%のアスコルビン酸がミロシナーゼ活性を約 3 倍上昇させることを見出し、高濃度のアスコルビン酸では、逆に活性が低下することが示された。NaCl とアスコルビン酸との相乗効果を検討したが、顕著な効果は観察されなかった。従って、ミロシナーゼ活性に影響を与えるのは、アスコルビン酸であることが明らかとなった。次に、「伯方の塩」や「沖縄の塩」といった、食用塩について検討を行ったところ、食用塩についても NaCl 同様、終濃度 1%前後で活性を約 1.2~1.25 倍に増加させることが明らかとなった。また、Na⁺以外の一価のカチオン(Li⁺, K⁺, Cs⁺)について検討を行ったところ、Na⁺と同様に活性の上昇を認めたが、この中で特に Na⁺が酵素の活性化効果が高い傾向を示した。従って、ミロシナーゼ活性の上昇には一価のカチオンが寄与することが示唆された。

次に、ダイコンの脱水・塩蔵下において、塩分量、辛味成分イソチオシアートの発現に必要な前駆体(グルコシノレート)、ミロシナーゼ、アスコルビン酸について経時的変化および品種間差異の分析を行った。品種を 10 種類(干し理想、新八州、秋づまり、おふくろ、白槍、秋の郷、

冬美人、味ごのみ、おろし、ねずみ)、脱水を塩押し、日干し(浅干し、標準干し、深干し)とし、干し理想ダイコンの塩押しと標準干しにおいて塩蔵条件をそれぞれ塩漬け、糠漬け、糠葉漬けとし、5°Cの条件下で塩蔵を行った。塩分量については、今回検討した 10 品種において塩押しダイコンの塩分量は 6.8±0.5%であり、塩押しおよび標準干しで脱水した干し理想ダイコンにおける塩蔵(塩漬け、糠漬け、糠葉漬け)の 1、2、4、8 ヶ月後では、それぞれ塩分量に大きな変化はなく平均で 6.9±0.7%であった。本研究で *in vitro* ではミロシナーゼ活性は NaCl によって影響を受けることが示されたが、7.0%前後の NaCl では活性の低下は観察されず、従って、塩押しによる脱水や塩蔵による NaCl はダイコン中のミロシナーゼ活性に対して阻害作用を示さないものと推測された。次に総アスコルビン酸の結果は、すべての品種において新鮮ダイコンが 6.39±1.45 mg/g(DW)、塩押しが 1.45±0.54 mg/g(DW)、日干しが 1.33±0.44 mg/g(DW)であり、品種によって差がみられ、新鮮ダイコンで含有量が最も高く、脱水後に 60%以上減少した。しかしながらダイコン中のアスコルビン酸の濃度を計算したところ、新鮮ダイコンで 0.043±0.013%、塩押しが 0.014±0.006%、日干しが 0.034±0.012%となり塩押しでアスコルビン酸の濃度低下を示した。本研究から *in vitro* においてミロシナーゼ活性は 0.01~0.04%のアスコルビン酸で、活性が 2~3 倍上昇する結果が得られているので、塩押しや日干しによる脱水で細胞が破壊されたと考えると、脱水の過程で 0.01~0.04%のアスコルビン酸がミロシナーゼと接触することが考えられ、その結果ダイコン中のミロシナーゼ活性も上昇することが予想された。実際に辛味成分の前駆体であるグルコシノレート量を測定してみると、脱水によりグルコシノレートは顕著に減少し、更に塩蔵開始 1 ヶ月で完全に消失していることから、この時期に辛味成分への移行が行われたと考えられる。また、Tissue Printing 法によりミロシナーゼを半定量したところ、新鮮ダイコンで最も高く、脱水によりわずかに減少、塩蔵開始 1 ヶ月で大きく減少を示し、脱水によってもミロシナーゼがダイコン中に存在することが示された。しかしながら、新鮮ダイコンでは表皮と形成層にミロシナーゼが存在していたが、脱水処理により表皮部のミロシナーゼ活性は失われ、形成層のみに残存していた。つまり、脱水直後は極端な表皮の乾燥や高濃度の NaCl の影響により表皮における活

性が著しく低下したが、塩蔵開始から1ヶ月の間において、形成層に存在するミロシナーゼへの NaCl の影響は小さくなり、アスコルビン酸の効果でミロシナーゼが活性化されることにより、グルコシノレートがイソチオシアナートに変換されたことが考えられた。

5. 今後の課題

本研究では *in vitro* において、NaCl やアスコルビン酸に対するミロシナーゼ活性を検討し、ダイコンのタクアン漬けの脱水、塩蔵過程において塩分量、グルコシノレート、アスコルビン酸、ミロシナーゼの動態変化の検討を行ってきた。今後は、①他のミネラルに対するミロシナーゼ活性の影響の検討、②ダイコンの脱水、塩蔵熟成過程においてアスコルビン酸添加によるグルコシノレート量の変化の検討、③カブやハクサイの浅漬けにおいて、添加した NaCl およびアスコルビン酸量とイソチオシアナート量の変化の検討などを行い、更に塩味、苦味、辛味などに対する官能検査を通して、おいしく、機能性を有した漬物の食品加工の応用を目指していきたいと考える。

謝 辞

本研究を進めるのにあたり、Tissue Printing 法において御指導をいただいた静岡大学農学部、原 正和教授に感謝致します。

文 献

- 1) Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**, 5-51 (2001).
- 2) Ettlinger, M. G., Lundeen, A. J., First synthesis of a mustard oil glucoside; the enzymic Lossen rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1764-1765 (1957).
- 3) 長島善二, 内山正照, ミロシナーゼに関する研究(第6報)ミロシナーゼによる芥子油配糖体の分解機構. *日本農芸化学会誌*, **33**, 1144-1149 (1959).
- 4) Luthy, B., Matile, P., The mustard oil bomb: rectified analysis of the subcellular organization of the myrosinase system. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **179**, 5-12 (1984).
- 5) Ludikhuyze L, Rodrigo L, Hendrickx M., The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*): influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Food Prot.*, **63**(3): 400-403 (2000)
- 6) Nakamura, Y., Iwahashi, T., Tanaka, A., Koutani, J., Matsuo, T., Okamoto, S., Sato, K., Ohtsuki, K., 4-(Methylthio)-3-butenyl Isothiocyanate, a Principal Antimutagen in Daikon (*Raphanus sativus*; Japanese White Radish). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5755-5760 (2001).
- 7) Fahey, J. W., Zhang, Y., Talalay, P., Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10367-10372 (1997).
- 8) Hara, M., Eto, H., Kuboi, T., Tissue printing for myrosinase activity in roots of turnip and Japanese radish and horseradish: a technique for localizing myrosinases. *Plant Science*, **160**, 425-431 (2001).
- 9) Ishii, G., Saijo, R., Effect of various cultural conditions on total sugar content, vitamin C content, and β -amylase activity of daikon radish root (*Raphanus sativus*). *Engei Gakkai Zasshi*, **55**, 468-475 (1987).

Effect of NaCl on the Myrosinase Activity, and Their Application in Salted Cruciferous Vegetable

Susumu Tanaka¹, Hiroki Matsuoka¹, Sonoko Ayabe¹, Yoshio Ozawa¹ and Kohei Hosaka²

¹Department of Health & Nutrition, Faculty of Health & Welfare, Takasaki University of Health & Welfare

²Department of Basic Sciences for Medicine, Gunma University School of Health Sciences

Summary

It is known that isothiocyanate—a pungent component found in cruciferous vegetables such as daikon (radish), wasabi, and mustard greens—is generated by the action of myrosinase obtained from pungent-component precursors. It has been clarified that *in vitro*, myrosinase is activated through ascorbic acid alone or the combination of ascorbic acid and magnesium (Mg^{2+}). Furthermore, isothiocyanate has various bioactivities, such as antioxidant and anticancer effects. In this study, we investigated the influence of *in vitro* myrosinase activity on NaCl and ascorbic acid from the viewpoint of applications in tsukemono (pickling processing). The quantity of NaCl, glucosinolate (pungent precursor), myrosinase, and ascorbic acid were measured in regard to both dehydrated and salted conditions in the tsukemono of different varieties of cruciferous vegetables, particularly daikon.

The results showed the myrosinase activity increased up to about 1.3-fold at 1% of NaCl (170 mmol/L), but no synergy with ascorbic acid was observed. When the commercially available salts “Hakata no Shio” and “Okinawa no Shio” were used for evaluation, a final concentration of around 1% intensified the myrosinase activity within range of 1.2 to 1.25-fold, respectively. Next, monovalent cations such as Li^+ , K^+ , and Cs^+ were investigated. These elements increased the myrosinase activity similar to that of Na^+ .

Next, kinetic analyses were performed on salt content and levels of glucosinolate, myrosinase, and ascorbic acid in different varieties of daikon. We also carried out the same determination on those compounds in pickling processes using both daikon dehydrated by sun drying and “shiooshi” (which salted fresh daikon), respectively. In “shiooshi”, the concentration of salt in pickled daikon of ten varieties (hoshiriso, shinhasshu, akidzumari, ofukuro, shiroyari, akinosato, fuyubijin, ajigonomi, oroshi, nezumi) was $6.8 \pm 0.5\%$. There was no major change in salt content between “shiooshi” and sun-dried daikon after 1, 2, 4, and 8 months under low-temperature pickling processes, which showed the concentration of $6.9 \pm 0.7\%$. Moreover, the level of glucosinolate and ascorbic acid decreased markedly after dehydration or pickling. Further, the level of myrosinase protein detected by using the tissue printing method showed the highest value in fresh daikon, while it decreased slightly in dehydrated daikon. On the other hand, that value greatly decreased after 1 month since starting pickling daikon.