

# 葉カラシナにおける アリルイソチオシアネート発生への栽培温度の影響

阿部 誠

## 1. はじめに

葉カラシナの辛味成分であるアリルイソチオシアネート（以下AITCと略す）は、葉などの組織細胞にグルコース配糖体（グルコシノレート）の形であるシニグリンとして存在するが、咀嚼などにより細胞が破壊されると分解酵素のミロシナーゼと接触して酵素的に加水分解されてグルコースが除かれ、揮発性のAITCとなる。

著者は、既報<sup>1)</sup>で葉カラシナを粉碎した際に発生するAITCを直接定量する方法を検討し、測定されたAITC量が口中で感じる辛味と強い相関を示し、辛味成分の測定に有用であることを報告した。

一方、野菜のイソチオシアネート類による辛味に関しては、栽培時の条件、特に温度の影響があることが知られている。例えば、夏場の大根は辛味が強いが、冬場のものは辛味が弱く甘味を感じるなど一般的なにも知られていることである。松原ら<sup>2)</sup>は播種時期の異なるカラシナについて検討し、夏播き栽培の場合にAITC含量とシニグリンの含量が高いことを示しているが、温度条件を明確に制御したものではない。栽培時の温度条件を厳密に制御した研究としては、市村ら<sup>3)</sup>がサラダ野菜のロケット（キバナズシロ）を用いて検討した報告があり、高温ほど辛味が強くイソチオシアネートの濃度が高いことを示した。

本研究では新たな定量法を用いて異なる温度条件で栽培した葉カラシナのAITC発生量を定量し、栽培温度、葉の伸長段階の影響を検討した。また、AITCを生成する基であるAITCのグルコシノレート（シニグリン）の含量について測定し、辛味発生との関連性についても検討を加えた。これらのことから、葉カラシナの辛味のコントロールの可能性について考察する。

## 2. 実験方法

### (1) 試薬およびその処理

HPLC溶出液としては、HPLC用アセトニトリル（和光純薬）およびHPLC用の蒸留水（和光純薬）を用いた。定量時の標準として、allyl isothiocyanate（和光純薬）、sinigrin（東京化成）を用いた。

デスルホ法で用いる試薬として、スルファターゼ（sulfatase from *Helix pomatia*, Type H-1, Sigma-Aldrich）70mgを遠沈管に採り3mlの純水に溶解した。エタノールを3ml加え混合後800×gで10分間遠心分離し、分取した上清に9mlのエタノールを加え混合して800×gで10分間遠心分離した。沈殿物を2mlの純水で溶解したものをスルファターゼ液として用いた。また、スルファターゼ処理を行うミニカラムの充填剤としてDEAE Sephadex A-25（GE Healthcare）を0.02M 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で攪拌する操作を2回行い活性化したものを用いた。

### (2) 分析試料と栽培

試料として葉カラシナを用いた。葉カラシナ（（株）サカタのタネ）の種子を市販園芸用土を用いてプランターで栽培した。栽培は、Shimadzu BITEC-500L中で各種設定温度下で、1日のうち12時間を人工照明下（照度約3000Lx）で、12時間を暗黒下で行った。地上部位の高さ25～30cm程度に生長した株からの葉を試料として用いた。

### (3) 葉カラシナの辛味強度の測定と葉の粉碎により発生するAITCの定量

種々の栽培条件で栽培された葉カラシナ試料について、前報<sup>1)</sup>で報告した、葉カラシナから発生するAITCの直接定量法を用いて、以下のように行った。

各種条件で栽培した葉カラシナについて葉柄を含め全長15cm以上の葉について各々葉柄の付け根から切断して採取し、葉身の先端までの長さを測定した。中心葉身を境に左右に2等分し、一方を咀嚼し辛味の強度を著者1名で5段階に評価した。他の半分について、葉の先端部から0.10gずつ5つの切片を解剖鋏で切り取り、それぞれの切片について次のようにAITCの直接定量を行った。

各切片を1.5mlマイクロチューブの底部に入れ、直ちにペンシル型ホモゲナイザーIuchi Homogenizer S-203（（株）井内盛栄堂）を用いて室温で最大回転数で5秒間の粉碎処理を行い、約30秒後270 $\mu$ lのアセトニトリルを加え十分に振動攪拌して混合後12000 rpmで2分間遠心分離した。上澄みを0.45 $\mu$ mフィルターで処理したものをHPLC分析に供した。

HPLCはShimadzu LC-9Aを用い、検出は244nmで行った。カラムはPEGASIL ODS

SP100 (4.6mm i.d.×250mm、Senshu Scientific Co. Ltd.) を用い、溶出液としてはアセトニトリル-水混液 (60 : 40) を用い、流速0.5ml/minで30℃で行った。記録計はShimadzu C-R8A Chromatopacを用い、ピーク面積の計算処理を行った。標準AITCとの面積比の計算によりAITC量を求めた。

#### (4) 葉カラシナ中のグルコシノレートの定量

カラシナ葉中のAITCのグルコシノレート (シニグリン) の定量は、Bjerg<sup>4)</sup>、Bjorkqvist<sup>5)</sup> および石田の方法<sup>6)</sup> に基づき、一部を改変して、以下のように行った。

##### i) グルコシノレートの抽出

試料葉1枚をラップで包み、電子レンジで170W、30秒間加熱後凍結乾燥した。凍結乾燥品を乳鉢で粉碎し、粉末化試料約50mgを精秤しキャップ付き遠沈管に採った。

80%メタノール1.5mlを加え、アルミブロックヒーターを用いて75℃で10分間加熱した。冷却後、試験管ミキサーで攪拌した後、3500rpmで5分間遠心分離し、上清を分取した。沈殿物に新たに1.5mlの80%メタノールを加え前記と同じ操作を2回繰り返して、計3回の抽出液を合わせ80%メタノールで5.0mlにメスアップした。3500rpmで10分間遠心分離してグルコシノレート粗抽出液とした。

##### ii) デスルホグルコシノレートの調製

活性化したDEAE Sephadex A-25樹脂を石綿綿で栓をした1000μl用のピペットチップに充填しミニカラムを作成した。

カラムを1.0mlの純水で洗い、ii) で得たグルコシノレート粗抽出液1.0mlをカラムに供した。カラムを1.0mlの純水で2回洗浄後、0.5mlの0.02M酢酸緩衝液 (pH 5.0) で2回洗浄した。カラム上部の溶液を樹脂ベッド中に浸み込ませた後、カラムの先端部をパラフィルムでシールして75μlのスルファターゼ液を加え、シールをはずしてスルファターゼ液をカラムベッド内に完全に浸み込ませた。再び先端部をパラフィルムでシールして、15μlのスルファターゼ液を載せ、カラム上部をパラフィルムで覆い、25℃に16～18時間放置してグルコシノレートをデスルホ化した。

酵素処理後、ミニカラムのパラフィルムを外し、カラムをバイアルで受けて0.5mlの純水で3回カラムを洗浄し、デスルホグルコシノレートを溶出させた。溶出液を0.45μmフィルターで処理したものをHPLC分析用検液とした。

##### iii) HPLC分析

HPLCはShimadzu LC-9Aを用い、検出は229nmで行った。カラムはPEGASIL ODS SPI00 (4.6mm i.d.×250mm、Senshu Scientific Co. Ltd.) を用い、溶出は純水 (A液) と20%アセトニトリル-水混液 (B液) を用い、A液99% (A : B=99 : 1) で平衡化した状態で分析用検液10μlを注入し、A液99% (A : B=99 : 1) で1分間保持した後、20分かけてB液99% (A : B=1 : 99) までのグラディエント溶出を行った。流速は1.0ml/

minで30℃で行った。記録計はShimadzu C-R8A Chromatopacを用い、ピーク面積の計算処理を行った。シニグリン標準品の80%メタノール液（400 $\mu$ g/ml）の1.0mlをグルコシノレート粗抽出液と同様にデスルホ化したもののHPLC分析を行いその面積との比較計算により試料生葉中のシニグリン量を求めた。

### 3. 結果および考察

#### (1) 栽培温度と生育状況

温度条件の設定に関しては、最初に栽培温度を昼間と夜間の温度を5℃変え、例えば25℃栽培の場合、一日のうち12時間を27.5℃、夜間の12時間を22.5℃に設定してカラシナ栽培を行った。しかし、このように日内変動を加味しても試料から発生するAITCの分析値には影響がほとんど見られなかった。そのため本研究では、条件を単純化するために一日中一定温度で栽培することとした。

市販カラシナのサイズを念頭に、植物体の全長が25～30cm程度になるまで生育させた。要した日数は、15℃および20℃で80～110日、25℃で65～70日であったが、30℃になると125～135日と生育適温より高温のためか生長速度が大きく低下した。生長速度に関しては、25℃が最適と考えられた。

#### (2) 異なる温度条件で栽培した葉カラシナの辛味強度とAITC発生量

15℃、20℃、25℃、30℃の4段階の温度で栽培し、最大の葉が葉柄を含む長さが25～30cmになった時点で栽培を終了した。

葉カラシナはひとつの株で中央部から新芽が生じ、生長につれその内側から次の新芽が生じ、伸長ステージの異なる根生葉が最大10枚程度となる。葉柄を含め15cm以上の長さの葉を対象として中心部に近い順（若い順）から8枚の葉に生長ステージNo.1～8の番号を付して辛味強度とAITCの発生量の分析対象とした。

分析結果のうち辛味強度を表1に、AITC発生量を表2に示す。

表1と表2の32サンプルおよび後に示す表3と表4の内の16サンプルを加えた計48サンプルについて、5段階で示した辛味強度とAITC発生量との間の相関係数を計算すると0.83となり、両者は高い相関を示し、前報でも示したように、AITCの発生量をもってカラシナの辛味強度の相対的比較を行うことができることを裏付けた。以下、AITC発生量でカラシナの辛味生成能とする。

AITC発生量は、同じ個体中でも葉の生長ステージで異なり、若い方が高く、古い葉になるほど低下し、多くの場合最終的には葉を咀嚼しても辛味を感じなくなった。温度に関しては、20℃と25℃の間で大きくAITC発生量が増加した。しかし、辛味の強い25℃栽培株でも生長ステージNo.5以上の葉では辛味とAITC発生量が急激に低下した。

表1. 異なる温度で栽培されたカラシナ株の各生長ステージの葉の辛味強度

葉の生長ステージ (若い順、No.)	15℃栽培	20℃栽培	25℃栽培	30℃栽培
1	+++ (22)	+++ (16)	+++++ (20)	+++++ (15)
2	++ (26)	+++ (25)	+++++ (25)	+++++ (20)
3	+ (29)	++ (30)	++++ (21)	++++ (22)
4	+ (27)	++ (29)	+++ (28)	++++ (24)
5	± (29)	+ (30)	± (22)	+++ (23)
6	- (25)	- (29)	+ (28)	+++ (23)
7	- (18)	- (28)	- (26)	++ (22)
8	- (23)	- (26)	- (23)	++ (26)

カッコ内の数字は葉柄の付け根から葉身の先端までの長さをcm単位で示す。

表2. 異なる温度で栽培されたカラシナ株の各生長ステージの葉のAITCの発生量  
(AITC  $\mu\text{g/g}$ 生葉)\*

葉の生長ステージ (若い順、No.)	15℃栽培	20℃栽培	25℃栽培	30℃栽培
1	225.7 ± 26.8	222.6 ± 27.9	1058.0 ± 207.5	1463.8 ± 199.9
2	154.2 ± 13.1	265.3 ± 48.3	733.7 ± 212.0	1690.3 ± 85.5
3	121.9 ± 17.2	175.2 ± 20.9	622.7 ± 69.5	1416.0 ± 250.3
4	48.9 ± 8.4	132.8 ± 16.8	395.0 ± 41.5	1199.3 ± 309.9
5	80.9 ± 4.5	100.0 ± 38.6	80.3 ± 45.2	807.6 ± 218.9
6	34.0 ± 8.1	77.4 ± 36.9	61.9 ± 12.1	741.5 ± 137.7
7	5.1 ± 2.7	31.4 ± 16.0	66.9 ± 25.8	511.2 ± 188.5
8	11.2 ± 4.0	23.2 ± 12.0	7.8 ± 2.1	254.2 ± 74.3

\* 平均値 ± 標準偏差 (n=4) で示す。

表3. 栽培温度を途中で変えた場合のカラシナ株の各生長ステージの葉の辛味強度

葉の生長ステージ (若い順、No.)	15℃栽培	15℃栽培途中で 25℃栽培へ切替	25℃栽培	25℃栽培途中で 15℃栽培へ切替
1	+++ (22)	+++++ (18)	+++++ (20)	++++ (16)
2	++ (26)	+++++ (23)	+++++ (25)	++++ (17)
3	+ (29)	+++++ (27)	++++ (21)	+++ (26)
4	+ (27)	++++ (29)	+++ (28)	+++ (28)
5	± (29)	+++ (27)	± (22)	++ (26)
6	- (25)	++ (28)	+ (28)	++ (28)
7	- (18)	- (28)	- (26)	+ (21)
8	- (23)	- (23)	- (23)	+ (23)

カッコ内の数字は葉柄の付け根から葉身の先端までの長さをcm単位で示す。

表4. 栽培温度を途中で変えた場合のカラシナ株の各生長ステージの葉のAITCの発生量 (AITC  $\mu\text{g/g}$ 生葉)\*

葉の生長ステージ (若い順、No.)	15℃栽培	15℃栽培途中で 25℃栽培へ切替	25℃栽培	25℃栽培途中で 15℃栽培へ切替
1	225.7 ± 26.8	1012.7 ± 332.2	1058.0 ± 207.5	676.2 ± 62.5
2	154.2 ± 13.1	796.3 ± 98.2	733.7 ± 212.0	515.0 ± 131.2
3	121.9 ± 17.2	875.8 ± 46.9	622.7 ± 69.5	262.2 ± 24.6
4	48.9 ± 8.4	401.8 ± 74.7	395.0 ± 41.5	261.9 ± 38.7
5	80.9 ± 4.5	325.9 ± 74.7	80.3 ± 45.2	201.5 ± 73.5
6	34.0 ± 8.1	115.5 ± 12.8	61.9 ± 12.1	195.5 ± 40.2
7	5.1 ± 2.7	50.5 ± 8.4	66.9 ± 25.8	100.0 ± 11.4
8	11.2 ± 4.0	36.8 ± 9.9	7.8 ± 2.1	194.4 ± 21.0

\* 平均値 ± 標準偏差 (n=4) で示す。

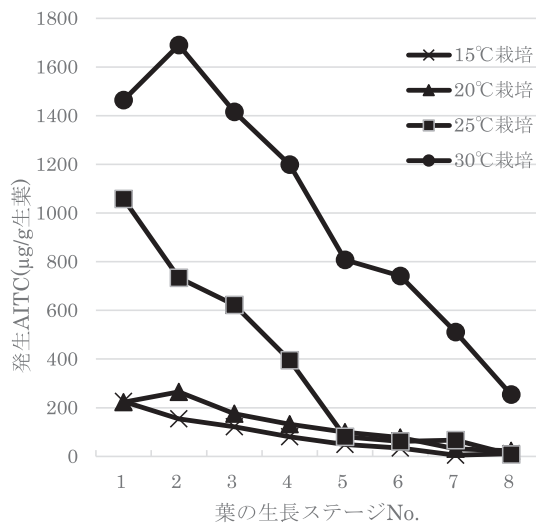


図1. 各栽培温度におけるカラシナ葉のステージごとのAITC発生量

30℃の高温栽培株では生長ステージNo.5以上の葉においても一定量のAITC発生が見られ、株全体としての辛味も強くなった (図1)。

このように、栽培温度による影響とともに葉菜類の同一株においても葉の生長ステージでイソチオシアネート類の発生量や辛味が大きく異なることを明らかにしたのは初めてであると考えられ、イソチオシアネート類による辛味を食品としての特性とする野菜類において、栽培温度とともに葉のサイズや部位なども考慮する必要性を示唆するものである。

### (3) 葉カラシナの栽培途中で温度条件を変えた場合のAITC発生量の挙動

栽培温度により葉カラシナより発生するAITC量が大きく異なることから、栽培途中で温度を変えた場合の変化を検討した。20℃と25℃の間でAITC発生量が大きく異なることから、15℃で栽培したものを途中で栽培温度を25℃に上昇させた場合と、逆に25℃で栽培したものを途中で15℃に栽培温度を低下させた場合のAITC発生量と辛味強度を調べたものが表3と表4である。

いずれも温度変更前に所定の温度で20cm程度まで生長後、栽培温度を10℃変化させて栽培を継続し全長が30cm程度になるまで栽培したものを試料とした。

15℃で20cmまで生長後（栽培期間85日間）25℃に栽培温度を上昇させた場合は、最初から25℃で栽培したものとほぼ同じレベルの辛味強度となり、AITC発生量も同じレベルとなった。25℃での栽培期間は28日で最初から25℃で栽培されたものが25℃に晒された期間（68日間）より短期間で同程度の辛味を示すようになったと言える。このことから辛味のないあるいは弱い葉カラシナは比較的短期間の高温栽培に晒すことで辛味を増強することが可能であると考えられる。

次に、25℃で20cmまで生長後（栽培期間53日間）15℃に栽培温度を低下させた場合は、最初から15℃で生育させたものと同レベルの辛味までは減少しないが、25℃栽培のものよりは辛味が減少した。ここで興味深いのは、生長ステージNo.5以上の葉では最初から25℃栽培したものよりも辛味が強く、AITC発生量もやや多いという結果になった点である。明確な理由は不明で再現性等確認する必要はあるものの、低温処理により葉カラシナ株全体の辛味を減少させるとともに生長ステージによる葉の辛味のバラツキを小さくすることが可能となるかもしれない。

### (4) AITC発生量とグルコシノレート量との関係

カラシナ葉中のイソチオシアネート類のグルコシノレート分析のHPLCのクロマトグラムを図2に示す。デスルホシニグリンのみが認められ、カラシナ葉中にはグルコシノレートとしてはAITCのグルコシノレート、すなわちシニグリンのみであることが確認された。

各種栽培温度で栽培された葉カラシナ中のシニグリン含量の定量結果を表5に示す。

4段階の温度で栽培されたカラシナの各ステージの葉に含まれるシニグリンの量はそれぞれの葉から生じるAITC量と類似の動きを示しており、両者の相関係数を求めると、15℃栽培では0.996、25℃栽培では0.907、15→25℃栽培では0.979、25→15℃栽培では0.870となり、非常に強い相関を示した。このように前駆物質であるグルコシノレート含量がAITC発生量に大きく影響することはワサビでも認められている<sup>7)</sup>。

咀嚼などで葉の細胞組織が破壊されて発生するAITCの量がカラシナが栽培された温度により大きく異なるのは、葉の中に含まれるシニグリンの量の違いによるものであり、

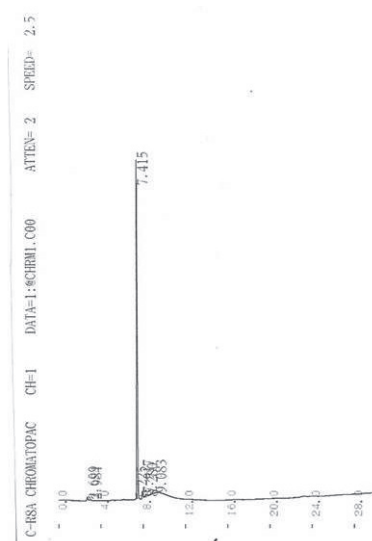


図2. デスルホシニグリンのHPLCクロマトグラム

表5. カラシナ葉中のAITCグルコシノレート含量 (シニグリン $\mu\text{g}^*/\text{g}$ 生葉)

葉の生長ステージ (若い順、No.)	15℃栽培	15℃栽培途中で 25℃栽培へ切替	25℃栽培	25℃栽培途中で 15℃栽培へ切替
1	1611	6594	4685	4537
2	1081	6282	4474	1942
3	953	5509	5490	1964
4	428	3522	3068	1283
5	573	2363	1433	1240
6	174	816	936	1054
7	49	775	338	1359
8	81	1337	178	757

\*シニグリン水和物換算値

栽培温度の違いは葉で生合成されるシニグリンの量に影響していると考えられる。高温栽培は植物にとってのストレス負荷であり、シニグリンの生合成増加はストレス適応の反応の結果と考えることができよう。

表4と表5に基づき、カラシナ葉から生じるAITC量と葉中のシニグリンの定量値をモル濃度に換算して示したものが表6である。また、15℃栽培の場合を例にAITC発生量と葉中のシニグリンのモル濃度比較をグラフ化したものが図3である。AITCのほとんどの数値がシニグリンの50%から60%となり、前報<sup>1)</sup>で開発したAITC発生量の測定法では、摩砕により葉の中のAITCのグルコシノレートの50～60%が測定されているこ



表6. カラシナ葉から発生したAITC量と葉中のAITCグルコシノレート含量とのモル数比較

葉の生長ステージ (若い順、No.)	AITC発生量 ( $\mu$ mol AITC/g生葉)		AITCグルコシノレート含量 (シニグリン $\mu$ mol/g生葉)	
	15°C栽培	15°C栽培途中で 25°C栽培へ切替	25°C栽培	25°C栽培途中で 15°C栽培へ切替
1	2.28 / 3.88	10.21 / 15.87	10.67 / 11.28	6.82 / 10.92
2	1.55 / 2.60	8.03 / 15.12	7.40 / 10.77	5.19 / 4.68
3	1.23 / 2.29	8.83 / 13.26	6.28 / 13.22	2.64 / 4.73
4	0.49 / 1.03	4.05 / 8.48	3.98 / 7.39	2.64 / 3.09
5	0.82 / 1.38	3.29 / 5.69	0.81 / 3.45	2.03 / 2.99
6	0.34 / 0.42	1.16 / 1.96	0.62 / 2.25	1.97 / 2.54
7	0.05 / 0.12	0.51 / 1.87	0.67 / 0.81	1.01 / 3.27
8	0.11 / 0.20	0.37 / 3.22	0.08 / 0.43	1.96 / 1.82

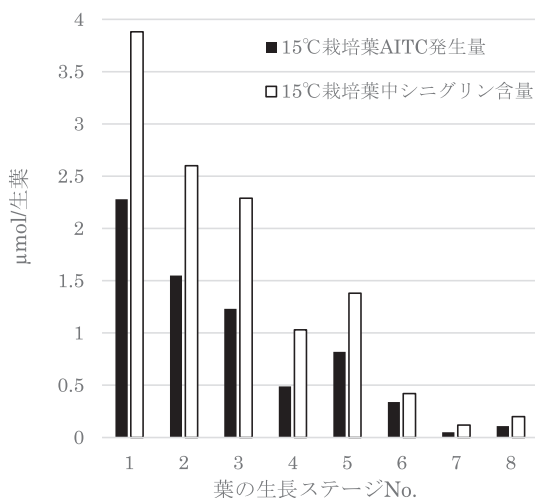


図3. 15°C栽培時のカラシナ葉からのAITC発生量と葉中のシニグリン含量のモル数比較

とを示している。

#### 4. おわりに

葉カラシナを各種栽培温度条件で栽培し、葉から発生するAITC量と葉に存在するAITCのグルコシノレートを定量し、次の結論を得た。

- (1) 葉カラシナの辛味強度と磨碎時のAITC発生量は同じ株中でも葉の生長ステージにおいて大きく異なり、若い葉の方が咀嚼時に多くのAITCが発生し辛味が強い。
- (2) 栽培温度が高いと磨碎時のAITC発生量が多くなり、辛味も強い。この傾向は特に葉の生長ステージNo.1～5で顕著である。
- (3) 栽培温度を栽培途中で変えることでAITC発生量や辛味を変えることが可能である。
- (4) 葉カラシナの栽培温度の違いによるAITC発生量の違いは、葉中で生合成され蓄積されるグルコシノレートの量に依存する。

#### 参考文献

- 1) 阿部誠：学習院女子大学紀要16号, 53-61 (2014).
- 2) 松原甲、小河拓也、田畑広之進、井上喜正：兵庫農技研報（農業）, 47, 59-62 (1999).
- 3) 市村匡史、野口有里紗、木村正典：東京農大農学集報, 53, 1-4 (2008).
- 4) B. Bjerg and H. Sorensen : J.P. Wathelet (ed.), Glucosinolates in rapeseeds : Analytical aspects, Nijhoff Publishers, pp.125-150 (1987).
- 5) B. Bjorkqvist and A. Hase : J. Chromatogr. , 435 , 501-507 (1988).
- 6) 石田正彦：食品機能性の科学編集委員会編、食品機能性の科学、産業技術サービスセンター、pp.1099-1103 (2008).
- 7) 荒川博、伊奈健宏、松浦英之、大場聖司、種石始弘、中根健：静岡県農業試験場研究報告 第46号, 35-43 (2001).

(本学教授)