

食用資源に含まれる機能性成分の有効利用に関する研究 — 食用植物中の抗菌性物質の検索 —

長谷川 撰・寺尾 嘉代子*

食品の加熱殺菌は有害微生物を死滅させ保存性を高めるため用いられるが、色調や風味の変化などを伴うことから殺菌条件の選定には殺菌効果と品質に与える影響とのバランスが重要である。しかし、生菓子やデザート類のような食品においては、製品の性質上、十分な加熱殺菌ができない場合が多い。また、消費者の健康意識の高まりや嗜好の変化により、低塩・低糖の食品が好まれる傾向にある。このような食品においては保存性を付与するため、保存料の使用が必要である。しかし、合成保存料の使用は敬遠される傾向にあるため、合成保存料に代わる安全で効果的な天然抗菌剤の開発が求められている。

ハーブやスパイスなど古くから食品として利用されている植物には抗菌性をもつものが知られている^{1)~5)}。このような天然の抗菌性物質を食品の保存性向上に利用することは有用であると考えられる。本研究では、食用植物や食品の包装などに利用されている植物から抗菌性物質を分離して、その性質について検討を行った。

実験方法

1. 試料

愛知県内で栽培されたレモンバーム、ローズマリー、セージ、バジル、シソ、コリアンダー、ミツバ、モロヘイヤ、レモンバーベナ、ベイ、ハラン及び名古屋市内のスーパーマーケットで購入したフキを使用した。レモンバーベナ、ベイ、ハランは葉を、フキは葉柄と葉に分け、その他の試料は茎から葉を細枝のついたまま切り取り、使用するまで -80°C で凍結保存した。

2. 使用菌株

抗菌活性測定の指標菌として、*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. circulans* IF013626, *B. licheniformis* IF012200, *B. pumilus* IF012092, *B. sphaericus* IF015095, *B. subtilis* IF013719, *B. polymyxa* IF013003, *Lactobacillus plantarum*

IF03070, *Escherichia coli* IF03301, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC36900及び食品より分離した4株の *B. subtilis* A, B (ういろう), C (草もち), D (水ようかん) を使用した。*Bacillus* 及び *E. coli* は Nutrient Broth (Difco, U.S.A.) を用いて 30°C で、*S. cerevisiae* は YM Broth (Difco) を用いて 25°C でそれぞれ18時間振盪培養して実験に使用した。*Lb. plantarum* は MRS Broth (Oxoid, England) を用いて 37°C , 24時間静置培養して実験に使用した。

3. 抽出物の調製

試料は凍結保存し、使用時に凍結したまま木づちで叩いて粉碎した。粉碎物を遠沈管4本にそれぞれ3g量りとり、酢酸エチルを30ml加えてさらにディスペーザ(X-1020, 三田村理研工業製)で細切した。これを遠心分離(4600×g, 10分間)して酢酸エチル層を集めた。残さには酢酸エチルを30ml加えて更に2回抽出した。抽出液をあわせ、ロータリーエバポレーターによって5mlに濃縮し、 -18°C で保存した。これを酢酸エチル抽出物とした。酢酸エチル抽出残さから、さらに80%エタノールを用いて抽出して同様に抽出物を得た。これをエタノール抽出物とした。

4. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離

セージ、ローズマリーの酢酸エチル抽出物5ml及びコリアンダーの酢酸エチル抽出物2mlをロータリーエバポレーターを用いて乾固させないように溶媒をできる限り除去し、n-ヘキサンに再溶解させた。これをシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, $\phi 18 \times 100\text{mm}$)に吸着させ、図1に示した様に、ヘキサン/酢酸エチル、及びメタノールを用いて溶出させた。溶出液はセージ、ローズマリーについては5ml、コリアンダーについては2mlとなるようにロータリーエバポレーターで濃縮した。これをシリカゲルクロマト画分とした。

5. 抗菌活性の測定

ペーパーディスク法⁶⁾によって抗菌活性を測定した。

* 愛知学泉大学

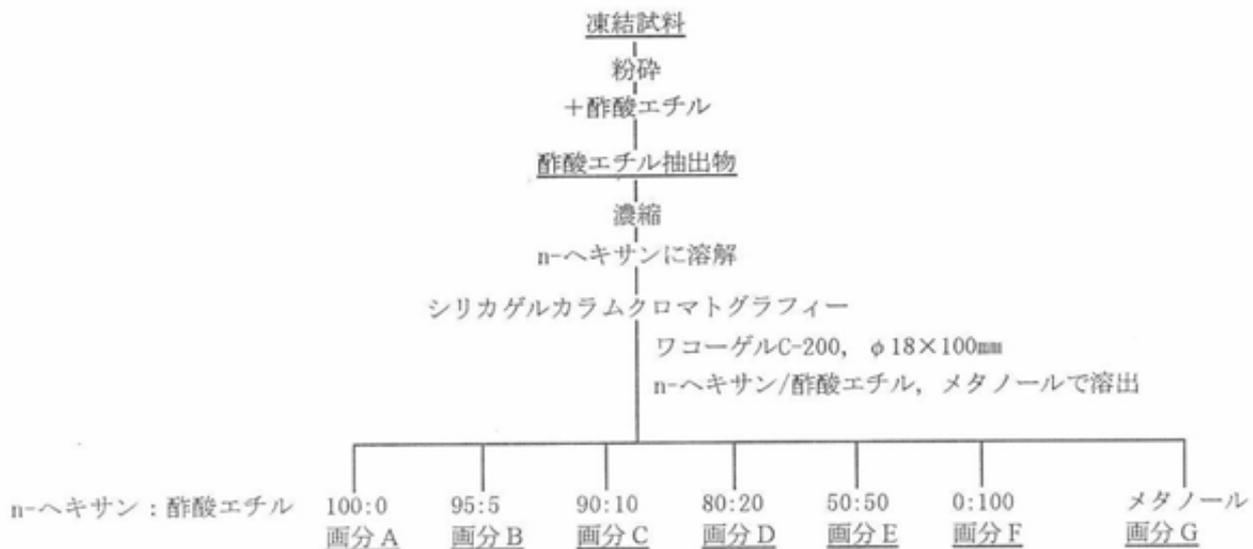


図 1 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画

ペーパーディスク (φ 8mm, 厚手, アドバンテック製) に抽出物またはシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって得られた画分50 μl (冷凍品換算で120mg) を添加し, 溶媒が揮散するまで放置した。加熱溶解して約50°Cとした標準寒天培地に指標菌を $10^6 \sim 10^7$ /mlとなるように接種, 懸濁し, シャーレ (φ 90mm, 厚さ15mm) に約10ml分注して冷却固化した。なお, *S. cerevisiae* はYM寒天培地を用いて同様に行った。試料を添加したペーパーディスクを, 指標菌を懸濁, 固化させた寒天培地上に乗せ, 細菌は30°C, *S. cerevisiae* は25°Cで72時間培養した。阻止円の直径を2方向から測定し, その平均値を抗菌活性とした。

6. *B. subtilis* 芽胞の調製と発芽阻止試験

芽胞懸濁液の濁度の低下を測定することにより, 抽出試料が芽胞の発芽に与える影響を調べた。

B. subtilis ATCC6633の培養液0.1mlをShaeffer's芽胞調製用寒天培地¹⁾ (15ml/plate) に塗抹し, 30°Cで3日間培養した。培地上に滅菌した冷イオン交換水を加えて30分間放置した後, 培地表面のコロニーをコンラージ棒で掻き取り, 菌体懸濁液を採取した。懸濁液を遠心分離 (20 000×g, 15分間) して菌体を集めた。次に, 菌体は滅菌イオン交換水で3回洗浄した後, 滅菌イオン交換水に再懸濁して80°Cで10分間加熱して栄養細胞を殺菌した。加熱後速やかに冷却し, *B. subtilis* 芽胞懸濁液とした。なお, 使用するまで冷蔵保存した。

ペーパーディスクに抽出物溶液50 μl を添加し, 溶媒が揮散するまで放置した。このペーパーディスク 8枚を50mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH7.2) 緩衝液24mlに浸漬し, 30°Cで24時間静置した。上清を5 ml ずつ試験管に分注

し, *B. subtilis* ATCC6633芽胞懸濁液0.2mlを添加した。この時の緩衝液中の芽胞数は 2.8×10^8 /mlであった。発芽誘起物質として0.1M L-アラニン0.05mlを加え, 37°Cで培養し, 経時的に660nmにおける濁度 (富士デジタル濁度計, 富士工業製) を測定した。

結果及び考察

表1に酢酸エチル及びエタノール抽出物の抗菌活性を示した。コリアンダー, ローズマリー, レモンバーベナ, セージの酢酸エチル抽出物は*B. subtilis*に対して強い抗菌活性を示した。ローズマリーとセージの酢酸エチル抽出物は*Lb. plantarum*に対しても抗菌活性を示した。また, ベイの酢酸エチル抽出物は*B. subtilis*と*E. coli*に対して弱い抗菌活性を示した。また, セージのエタノール抽出物は*B. subtilis*に対して, ハランのエタノール抽出物は*S. cerevisiae*に対して弱い抗菌活性を示した。

抗菌活性の認められた酢酸エチル抽出物について, 各種の*Bacillus*に対する抗菌活性を検討した結果を表2に示した。*B. subtilis* ATCC6633に対して特に強い抗菌活性を示したコリアンダー, ローズマリー, セージ抽出物は他の*Bacillus*に対しても強い抗菌性を示すことが確認された。ベイ抽出物も抗菌活性は弱かったが, どの*Bacillus*に対しても抗菌活性を示した。レモンバーベナ抽出物は*B. polymyxa* IF013003に対してのみ弱い抗菌性を示した。

表3に, 食品より分離した4株の*B. subtilis*に対する抗菌活性を検討した結果を示した。コリアンダー, ローズマリー, セージの酢酸エチル抽出物はどの菌株に対し

表 1 抽出物の抗菌活性

	酢酸エチル抽出物				エタノール抽出物			
	<i>B. subtilis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	ATCC6633	IFO3070	IFO3301	ATCC36900	ATCC6633	IFO3070	IFO3301	ATCC36900
コリアンダー	26.8	—	—	—	—	—	—	—
ハラシ	—	—	—	—	—	—	—	±
ローズマリー	18.9	17.7	—	—	—	—	—	—
レモンバーベナ	11.8	—	—	—	—	—	—	—
ベイ	±	—	±	—	—	—	—	—
セージ	18.2	14.8	—	—	±	—	—	—

抗菌活性はペーバーディスク法によって測定した。

数値, 阻止円の直径 (mm) ; ±, 阻止円の直径が10mm以下 ; —, 抗菌活性なし。

表 2 酢酸エチル抽出物の各種 *Bacillus* に対する抗菌活性

	<i>B. circulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilis</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. subtilis</i>
	IFO13626	IFO12200	IFO12092	IFO15095	IFO13003	IFO13719
コリアンダー	>20.0	>20.0	10.1	13.5	16.1	>20.0
ローズマリー	19.4	>20.0	>20.0	14.3	11.4	>20.0
レモンバーベナ	—	—	—	—	±	—
ベイ	±	±	±	±	±	±
セージ	>20.0	17.0	16.8	11.9	±	16.0

抗菌活性はペーバーディスク法によって測定した。

数値, 阻止円の直径 (mm) ; ±, 阻止円の直径が10mm以下 ; —, 抗菌活性なし。

表 3 酢酸エチル抽出物の食品より分離した

B. subtilis に対する抗菌活性

	<i>B. subtilis</i>			
	A	B	C	D
コリアンダー	>20.0	>20.0	>20.0	>20.0
ローズマリー	16.0	>20.0	>20.0	>20.0
レモンバーベナ	—	—	—	—
ベイ	±	±	11.0	±
セージ	12.9	16.2	15.7	16.5

抗菌活性はペーバーディスク法によって測定した。

数値, 阻止円の直径 (mm) ; ±, 阻止円の直径が10mm以下 ;

—, 抗菌活性なし。

でも強い抗菌活性を示し, ベイ抽出物は弱い抗菌活性を示していた。レモンバーベナ抽出物はどの菌株に対しても抗菌活性を示さなかった。

図2にコリアンダー, ローズマリー, セージの酢酸エチル抽出物が *B. subtilis* ATCC6633の芽胞の発芽に与える影響について示した。緩衝液中に芽胞だけが存在する状態では芽胞は発芽しないが, アラニンを追加することで発芽が開始され, 数分後に濁度が急激に低下した。緩衝液にローズマリーの酢酸エチル抽出物を添加すると, 濁度の低下が明らかに小さくなったことから, 芽胞の発芽が有意に抑制されたと考えられた。一方, コリアンダー

やセージの酢酸エチル抽出物を添加しても濁度の低下はほとんど抑制されないことから, これらの抽出物は芽胞の発芽にほとんど影響しないと考えられた。

表4にシリカゲルクロマト画分の抗菌活性を示した。コリアンダーについては画分 B に抗菌活性が認められた。セージやローズマリーは複数の画分に抗菌活性が認められたが, 特に画分 C, D に強い抗菌活性が認められた。

コリアンダー, セージ, ローズマリーは特有の香りがあり, 香草として食品の香り付けに利用されている。酢酸エチル抽出物はこれらの植物の特徴的な香りを有していた。これらの香気成分は食品によっては風味に好ましくない影響を与える可能性がある。これらの香り成分がどの画分に出てくるのかをにおいをかぐことで確認した結果, 3つの試料とも画分 B に特徴的な香りが認められた。ハーブに含まれる抗菌性物質を食品に応用する場合にはこれらの植物特有の香りが存在しない方が応用範囲を広げられる。セージやローズマリーについては, 特有の香りあまりしない画分 C と画分 D が強い抗菌活性を示しており, 食品への応用が期待できた。

Uedaら²⁾は香辛料として市販されているセージやローズマリーより調製したエタノール抽出物が *B. subtilis* の生育を阻害したと報告している。また, Shelefら³⁾はセ

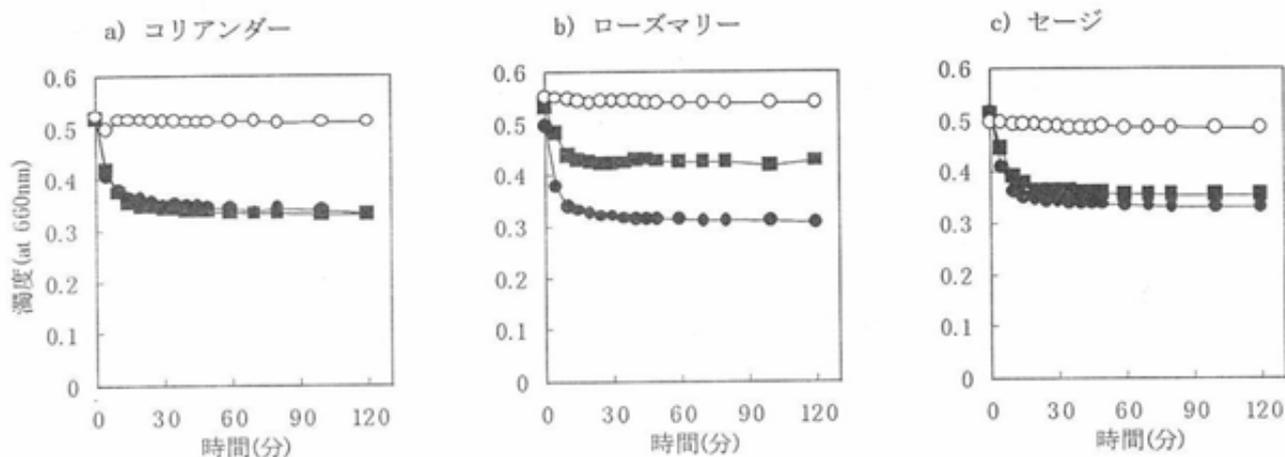


図 2 酢酸エチル抽出物の *B. subtilis* 芽胞発芽抑制効果

■, 酢酸エチル抽出物, アラニン添加 ; ●, アラニン添加 ; ○, 無添加.

表 4 シリカゲルクロマト画分の *B. subtilis* ATCC6633 に対する抗菌活性

	画分 A	画分 B	画分 C	画分 D	画分 E	画分 F	画分 G
コリアンダー	-	+	-	-	-	-	-
ローズマリー	-	±	>20	11.5	±	-	±
セージ	-	±	17.8	16.0	±	±	-

抗菌活性はペーパーディスク法によって測定した.

数値, 阻止円の直径 (mm) ; ±, 阻止円の直径が10mm以下 ; -, 抗菌活性なし.

ージやローズマリーの粉末や熱水抽出物を添加した寒天培地上に *B. subtilis* を塗抹し, *B. subtilis* に抗菌効果を示すことを確認している. これらの報告には, セージやローズマリーの抗菌活性がどのような物質によるものなのかは示されていない. 本実験で最も強い抗菌活性を示した画分 C と D (表 4) はローズマリー特有の香りを有しなかったため, これらの画分の抗菌活性に香油 (精油) 成分が関与している可能性は低いと考えられた. 中谷¹⁰⁾ はローズマリーの非揮発性成分であるカノルソール, ロスマノール, エピロスマノール, イソロスマノールが *B. subtilis* に対して抗菌活性を示すことを報告しており, 本実験で認められた抗菌活性がこれらの物質と関連があるのか今後検討する必要がある. 一方, 抗菌活性を示したコリアンダーの画分 C にはコリアンダー特有の香りがあった. このことから, コリアンダーの香油成分には抗菌活性があるかも知れない. いずれにしても, 今後精製を行って抗菌性物質の同定と性質について検討を行う予定である.

要 約

食用あるいは食品の包装などに利用される12種類の植

物の抗菌活性について検討した.

(1) コリアンダー, ローズマリー, レモンバーベナ, セージの酢酸エチル抽出物は *B. subtilis* に対して強い抗菌活性を示した.

(2) ローズマリーとセージの酢酸エチル抽出物は *Lb. plantarum* に対しても抗菌活性を示した.

(3) *B. subtilis* ATCC6633 に対して特に強い抗菌活性を示したコリアンダー, ローズマリー, セージ抽出物は他の *Bacillus* や食品より分離した *B. subtilis* に対しても強い抗菌性を示していた.

(4) ローズマリーの酢酸エチル抽出物は *B. subtilis* 芽胞の発芽を抑制したが, コリアンダーやセージの酢酸エチル抽出物は芽胞の発芽にほとんど影響を与えなかった.

(5) シリカゲルクロマト画分のうち, コリアンダーについては画分 B が, セージやローズマリーは画分 C, D が *B. subtilis* に対して強い抗菌活性を示した.

文 献

- 1) 上田成子・山下晴美・中島真理子・桑原祥浩 : 日食工誌, 29, 111 (1982).

- 2) 佐藤昭子・寺尾通徳・本間ゆかり : 食衛誌, 31, 328 (1990).
- 3) Kanemaru, K., and Miyamoto, T. : 日食工誌, 37, 823 (1990).
- 4) Kubo, I., Himejima, M., and Muroi, H. : *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1984 (1991).
- 5) Kang, R., Helms, R., Stout, M. J., Jaber, H., Chen, Z., and Nakatsu, T. : *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2328 (1992).
- 6) 石黒幸雄・岡本賢治・園田洋次 : 日食工誌, 40, 353 (1993).
- 7) 近藤雅臣・渡部一仁 : スポア実験マニュアル (技報堂出版, 東京), p.76 (1995).
- 8) Ueda, S., Yamashita, H., and Kuwabara, Y. : 日食工誌, 29, 389 (1982).
- 9) Shelef, L.A., Naglik, O.A., and Bogen, D.W. : *J. Food Sci.*, 45, 1042 (1980).
- 10) 中谷延二 : 日本食品微生物学会雑誌, 12, 235 (1996).