

# 植物に含まれる抗菌性物質の利用技術の開発

長谷川撰<sup>\*1</sup> 車谷佳恵<sup>\*2</sup> 坂口絵美<sup>\*3</sup> 藤井正人<sup>\*1</sup>

## Application of Antimicrobial Compounds in Plants

Osamu HASEGAWA, Yoshie KURUMAYA, Emi SAKAGUCHI and Masato FUJII

Food Research Center, AITEC<sup>\*1</sup>, Aichi Gakusen University<sup>\*2</sup>,  
Aichi Institute of Technology<sup>\*3</sup>

新鮮なドクダミ及びコリアンダーより調製した抽出物について、水ようかん中の *B. subtilis* に対する増殖抑制効果や *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌に与える影響を検討した。水ようかん表面に *B. subtilis* 菌液を塗抹し、抽出物を添加したペーパーディスクをシャーレの蓋に貼り付けた場合には、どの抽出物も *B. subtilis* の増殖を抑制していた。また、*B. subtilis* 芽胞を含んだリン酸緩衝液に抽出物を添加して加熱殺菌を行ったところ、*B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌を促進する効果が認められた。

## 1. はじめに

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行われるが、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。

小菅ら<sup>1)2)</sup>は古来より漢方薬や民間薬として用いられているドクダミに含まれる香り成分には抗菌活性のあることを報告している。また、我々はハーブとして利用されているコリアンダーの生葉に *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性のあることを確認した<sup>3)</sup>。本研究では、ドクダミ及びコリアンダーより分離した抗菌性物質の食品の保存性向上への応用について水ようかんをモデルに用いて検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

愛知県内で採取したドクダミ及びコリアンダーの葉及

び細枝を使用した。試料は使用するまで -85℃ で保存した。

### 2.2 使用菌株

抗菌活性測定の指標菌として *Bacillus subtilis* ATCC6633 を使用した。菌は Nutrient Broth (Difco, U.S.A.) を用いて 30℃ で 18 時間振盪培養して実験に使用した。

### 2.3 エタノール抽出物の調製

試料は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 3 g 量りとり、95% エタノールを 30 ml 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 (4 640 × g、10 分間) してエタノール層を集めた。残さにはエタノールを 30 ml 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 5 ml に濃縮し、-18℃ で保存した。これをエタノール抽出物とした。

### 2.4 超臨界二酸化炭素抽出物の調製

ドクダミは凍結したまま木づちで叩いて粉碎した。粉碎物を 50 ml 液固両用容器に 12 g 量りとり、超臨界二酸化炭素抽出 (流量 5.0 ml/min、圧力 300 kg/cm<sup>2</sup>、抽出温度 80℃、抽出時間 1 時間) を行い、95% エタノールに溶解させて捕集した。コリアンダーは抽出温度 40℃ でドクダミと同様に抽出を行った。これらをロータリーエバポレーターによって 5 ml に濃縮し、-18℃ で保存した。これ

\*1食品工業技術センター加工技術室 \*2愛知学泉大学 \*3愛知工業大学

を超臨界二酸化炭素抽出物とした。

## 2.5 B. subtilis 芽胞の調製

*B. subtilis* の培養液0.1mlを標準寒天培地に塗抹し、30℃で15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℃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、芽胞懸濁液とした。なお、使用するまで冷蔵保存した。

## 2.6 水ようかんの調製

乾燥あん100gを水200mlとよく混合し、グラニュー糖120gを加え、弱火にかけてこしあんを調製した。別に水500gに寒天5gを加えて加熱溶解し、これにこしあんとグラニュー糖250g、食塩1gを加えてBrixが40となるまで煮つめた。これをオートクレーブ(121℃、15分間)で滅菌し、水ようかんとした。

## 2.7 抗菌活性の測定

抽出物の抗菌活性はペーパーディスク法<sup>4)</sup>と蒸気接触法<sup>5)</sup>によって測定した。ペーパーディスク(8mm、厚手、アドバンテック製)に抽出物50μl(冷凍品換算で120mg)を添加し、溶媒が揮散するまで放置した。ペーパーディスク法では、加熱溶解して約50℃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(90mm、厚さ15mm)に約10ml分注して冷却固化した。抽出物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、30℃で培養した。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。

蒸気接触法では、標準寒天培地をプラスチックシャーレ(直径6cm、厚さ1cm)に5ml分注して冷却固化した後、*B. subtilis*の培養液0.1mlを標準寒天培地に塗抹した。適当な濃度に希釈した抽出物を添加したペーパーディスクを、プラスチックシャーレの蓋に両面テープで3枚貼り付け、蓋の隙間をパラフィルムで密封して30℃で培養した。培養後の生育阻止面積を測定し、培地表面の50%以上の増殖を抑制するのに必要な抽出物量を最少

50%生育阻止量(mg/1シャーレ)とした。

## 2.8 水ようかんのB. subtilis 栄養細胞に対する抽出物の生育阻害効果

*B. subtilis*の培養液を遠心分離(4 640×g、10分間)して菌体を集めた。次に、菌体は滅菌水で洗浄した後、滅菌水に再懸濁し、菌数が $10^5$ /mlとなるように希釈し、これを希釈菌液とした。

加熱溶解した水ようかん100gを固化する直前まで冷却し、抽出物または95%エタノール1ml及び希釈菌液0.5mlを加えてよく混合した。プラスチックシャーレ(直径9cm、厚さ2cm)に約30gずつ分注して固化させ、蓋の隙間をパラフィルムで密封し、これを*B. subtilis*混釈水ようかんとした(図1(a))。

また、加熱溶解した水ようかんにプラスチックシャーレ(直径9cm、厚さ2cm)に約30gずつ分注して固化させた後、希釈菌液を表面に0.1ml塗抹した。蒸気接触法と同様に抽出物を添加したペーパーディスク3枚をプラスチックシャーレの蓋に両面テープで貼り付け、蓋の隙間をパラフィルムで密封し、これを*B. subtilis*塗抹水ようかんとした(図1(b))。

これらの水ようかんに30℃で3日間保存した後、生菌数を測定した。

## 2.9 B. subtilis 芽胞の加熱殺菌に対する抽出物の影響

滅菌済みのねじ付き試験管にエタノール抽出物を0~0.1mlとり、各試験管中のエタノールが0.1mlとなるように95%エタノールを加えた。加熱溶解した水ようかん100gを固化する直前まで冷却し、芽胞懸濁液を0.2mlを混釈した後、各試験管に10mlずつ分注し、よく混合した。これを97℃の熱水中で10分間加熱し、生残菌数を測定した。また、水ようかんの代わりにリン酸緩衝液を用いて同様の試験を行った。

## 2.10 水ようかんの原材料がB. subtilis 芽胞の加熱殺菌に及ぼす影響

水ようかんの原材料が*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌に及ぼす影響を検討するため、表1の配合に従い、原材料の一部を除去して水に置き換えたモデルを作製した。これらの原材料を混合して加熱溶解した後、100gをオートク

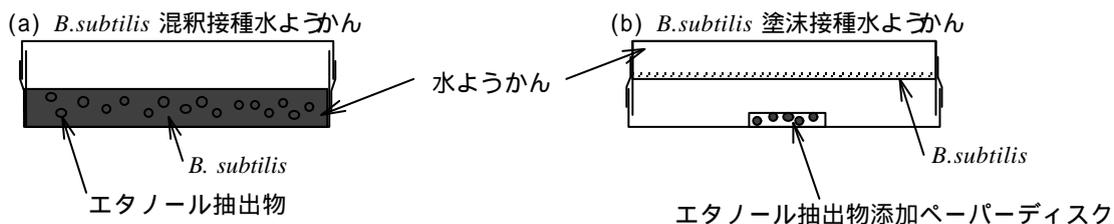


図1 水ようかん中の*B. subtilis*に対する生育阻害効果の検討法

表1 水ようかんの原材料の一部を除去したモデルの原材料配合

	原材料配合(g)				
	乾燥あん	グラニュー糖	食塩	寒天	水
コントロール	10.0	37.0	0.1	0.5	59.0
乾燥あん除去モデル	0.0	37.0	0.1	0.5	69.0
グラニュー糖除去モデル	10.0	0.0	0.1	0.5	96.0
食塩除去モデル	10.0	37.0	0.0	0.5	59.1
寒天除去モデル	10.0	37.0	0.1	0.0	59.5

表2 ドクダミ、コリアンダー抽出物の *B. subtilis* に対する抗菌活性

抽出物	ペーパーディスク法		蒸気接触法
	最少50%生育阻止量 (mg/1シャーレ)		
ドクダミ エタノール抽出物	++		15
ドクダミ 超臨界二酸化炭素抽出物	+		30
コリアンダー エタノール抽出物	+		15
コリアンダー 超臨界二酸化炭素抽出物	+++		7.5

ペーパーディスク法はペーパーディスク1枚あたり、生の植物に換算して120mgとなるように抽出物を添加した。

ペーパーディスク法における抗菌活性：+++、阻止円の直径50mm以上；++、50～20mm；+、20～10mm。

蒸気接触法での抽出物の添加量は抽出に用いた生の植物の重量に換算して表した。

表3 ドクダミ、コリアンダー抽出物による水ようかん中の *B. subtilis* に対する生育阻害効果

抽出物	試料	
	<i>B. subtilis</i> 混釈水ようかん*1	<i>B. subtilis</i> 塗沫水ようかん*2 (蒸気接触法)
ドクダミ 95%エタノール抽出物	-	+
ドクダミ 超臨界二酸化炭素抽出物	-	±
コリアンダー 95%エタノール抽出物	-	+
コリアンダー 超臨界二酸化炭素抽出物	-	+
コントロール (95%エタノール)	-	-

\*1：抽出物は水ようかん1gあたり生の植物に換算して24mgとなるように抽出物を添加した。

\*2：抽出物は水ようかん1gあたり生の植物に換算して12mgとなるようにペーパーディスクに付着させた。

生育阻害効果：+、完全に生育が阻害されている；±、コントロールに比べて生育が遅れている；

-、全く生育を抑制していない。

レーブ(121、15分間)で滅菌した。これらを固化する直前まで冷却し、芽胞懸濁液を0.2mlを混釈した後、滅菌済みのねじ付き試験管に10mlずつ分注し、よく混合した。これを97の熱水中で10分間加熱し、生残菌数を測定した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 抽出物の抗菌活性

表2にエタノール抽出物及び超臨界二酸化炭素抽出物の抗菌活性を示した。ドクダミはペーパーディスク法、蒸気接触法ともにエタノール抽出物の方が抗菌活性が強かった。また、コリアンダーはペーパーディスク法、蒸気接触法ともに超臨界二酸化炭素抽出物の方が抗菌活性が強かった。蒸気接触法のように、抗菌活性を有する成分を直接培地に添加せず、一度蒸気となった後、培地表面の菌に対して抗菌活性を示す成分として、アリルチオ

シアネートが知られている<sup>6)~10)</sup>。ドクダミやコリアンダーの抽出物中にも、アリルチオシアネートと同様に一度蒸気となった後に培地表面の菌に対して抗菌活性を示す成分が含まれていると考えられた。

#### 3.2 水ようかん中の *B. subtilis* 栄養細胞に対する抽出物の生育阻害効果

表3に水ようかん中の *B. subtilis* の栄養細胞に対する抽出物の生育阻害効果を示した。水ようかんに菌を混釈し、抽出物も同時に混合したものについてはいずれも *B. subtilis* の増殖を抑制しなかった。一方、菌を塗沫し、抽出物を添加したペーパーディスク3枚をプラスチックシャーレの蓋に貼り付けたものについては、どの抽出物も *B. subtilis* の増殖を抑制していた。水ようかん1gあたりの抽出物の使用量は、水ようかんに混合したものの方が多くにもかかわらず、増殖抑制効果はシャーレの蓋にペーパーディスクを貼り付けた場合の方が強かった。

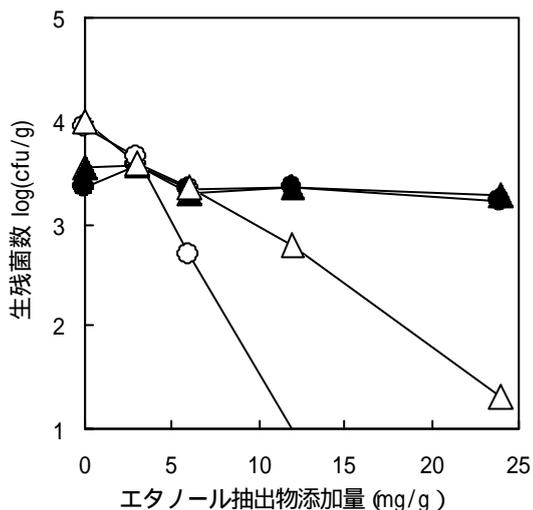


図2 水ようかん、リン酸緩衝液中の *B. subtilis* 芽胞の殺菌

- ドクダミ抽出物、水ようかん中
- ▲—コリアンダー抽出物、水ようかん中
- ドクダミ抽出物、リン酸緩衝液中
- △—コリアンダー抽出物、リン酸緩衝液中

97 で10分間加熱殺菌をおこなった後、生残菌数を測定した。  
抽出物添加量は生の植物に換算して表した。

シャーレの蓋にペーパーディスクをおいた場合、一度蒸気となった成分は水ようかん内部よりも表面に偏って吸収されるためではないかと考えられた。

### 3.3 *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌

図2にエタノール抽出物を添加した水ようかん及びリン酸緩衝液中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌後の生残菌数を示した。水ようかん中に添加する抽出物の量を増やしても、芽胞の生残菌数は抽出物を添加しなかった場合とほとんど変わらなかった。一方、リン酸緩衝液中では、抽出物の添加量が増えるに従い、生残菌数は低下した。

図3に水ようかんの原材料の一部を除去したモデルに添加した *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌の結果を示した。乾燥あんを除去したモデルは、加熱殺菌後の生残菌数が  $1.0 \times 10^2$  cfu/g以下であり、グラニュー糖を除去したモデルは  $1.6 \times 10^2$  cfu/gであった。他のモデルは生残菌数が  $1.8 \times 10^3$  cfu/g以上であったことから、乾燥あんやグラニュー糖が *B. subtilis* の芽胞の加熱殺菌を困難にしており、そのために水ようかん中にエタノール抽出物を添加しても加熱殺菌の促進効果がみられないのではないかと考えられた。

## 4. 結 び

今回調製したドクダミ及びコリアンダーの抽出物は水ようかん表面の *B. subtilis* の増殖を抑制し、リン酸緩衝

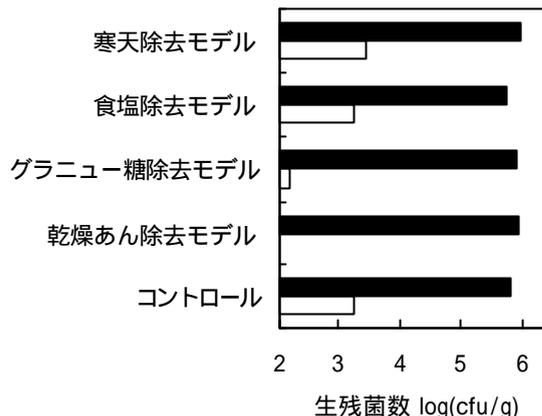


図3 水ようかんの原材料の一部を除去したモデル中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌  
加熱殺菌前 加熱殺菌後

97 で10分間加熱殺菌をおこなった後、生残菌数を測定した。

液中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌を促進する効果を有していた。しかしながら、抽出物には植物由来の香りがあるため、マスキングにより香りの影響を抑えたり、pH調整剤等とともに利用することで抽出物の使用量を減らす必要があると考えられた。

また、今回試験に使用した水ようかんでは抽出物を添加した場合の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌の促進効果がみられなかったが、リン酸緩衝液中では *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌が促進されていたことから、食品の組成によっては抽出物を添加して加熱殺菌を行うことで殺菌効果が増すのではないと思われる。

## 文 献

- 1) 小菅卓夫：薬誌，72，1227(1952)。
- 2) 小菅卓夫・磯谷遙：薬誌，73，435(1953)。
- 3) 長谷川撰・寺尾嘉代子：愛知県食品工業技術センター年報，41，6(2000)。
- 4) 石黒幸雄・岡本賢治・園田洋次：日食工誌，40,353(1993)。
- 5) 牛腸忍：防菌防黴，20,585(1992)。
- 6) Inoue, S., Goi, H., Miyauchi, K., Muraki, S., Ogiwara, M. and Iwanami, Y.: J. Antibact. Antifung. Agents, 11,609(1983)。
- 7) Goi, H., Inoue, S. and Iwanami, Y.: J. Antibact. Antifung. Agents, 13,199(1985)。
- 8) 徳岡敬子・森理三郎・一色賢司：日食工誌，39,68(1992)。
- 9) 徳岡敬子・一色賢司：日食工誌，41,595(1994)。
- 10) 小川哲朗・一色賢司：食科工，43,535(1996)。