

①

香辛料の細菌増殖阻害作用と食品保蔵への応用

1991

金丸 芳

目次

	page
序論	…1
第1章 香辛料とその精油主成分の細菌増殖阻害	…4
第1節 逆相HPLCによる精油主成分の定量	…4
第2節 平板培養による香辛料とその精油主成分の細菌増殖阻害	…12
第3節 液体培養によるブラウンマスタード、粉ワサビ、カラシ粉 およびallyl isothiocyanate(AIT)の細菌増殖阻害	…14
第4節 小括	…29
第2章 ブラウンマスタードおよび粉ワサビと数種化合物併用による 細菌増殖阻害	…32
第1節 ブラウンマスタードと数種化合物併用による細菌増殖阻害	…32
第2節 粉ワサビと数種化合物併用による細菌増殖阻害	…37
第3節 考察	…41
第4節 小括	…43
第3章 ブラウンマスタードとAITの細菌増殖阻害作用に関する検討	…44
第1節 誘導期の長さに対する接種菌数の影響	…44
第2節 細菌の対数増殖期にマスタードを添加した場合の 細菌増殖阻害	…45
第3節 AIT存在下で生育した菌のAITに対する抵抗性	…50
第4節 細菌増殖時における培地中のAITの変化	…51
第5節 AITを分割して添加した場合の細菌増殖阻害	…53
第6節 小括	…55
第4章 AIT誘導体の細菌増殖阻害とAITとの比較	…56
第1節 allyl誘導体の細菌増殖阻害	…57
第2節 isothiocyanate誘導体の細菌増殖阻害	…61

第3節 小括	..66
第5章 ブラウンマスタードおよびクローブによる食品中微生物の 増殖阻害	..67
第1節 滅菌レバー中でのマスタードおよびクローブの細菌増殖阻害	..67
第2節 マスタード、クローブおよび酢酸による生レバー中微生物の 増殖阻害とその併用効果	..70
第3節 マスタードによる数種の食品中微生物の増殖阻害	..74
第4節 小括	..79
総括	..81
謝辞	..86
文献	..87
本論文に直接関係する研究発表	..92

近年、食品添加物の安全性が問題とされており、合成添加物について再検討されつつある。そのため、合成添加物にとって代わり、天然添加物が注目されてきている。天然着色料、天然抗酸化剤など^{1,2)}が検討され、すでに実用されているものも多い。また同様に、食品防腐の目的で利用されている合成保存料や合成殺菌料の安全性についても再検討されてきており、抗菌作用、防腐効果を有する天然物の利用が注目されている^{3,4)}。天然防腐剤として、アミノ酸⁵⁻⁷⁾やアルコール^{8,9)}およびそれらの関連化合物¹⁰⁾、脂肪酸及びそのエステル^{11,12)}、そして種々の植物成分¹³⁻¹⁵⁾があげられている。その植物成分の中で最も注目されているものの1つが香辛料である。

香辛料はその特有な香気性状に加え、抗酸化性、抗微生物作用、生理・薬理学的作用などを有することが経験的に知られており、その利用は古代エジプト・ギリシャ・ローマ時代にまでさかのぼるといわれている^{16,17)}。なかでも抗微生物作用はその喬臭作用と相まって広く食品の保存の目的や治療に利用されてきた。しかし、香辛料の抗微生物作用に関する科学的な研究がなされたのは比較的新しく、19世紀後半以後で、本格的に検討されるようになったのは20世紀に入ってからである^{16,17)}。そして1940年代まではチフス菌、コレラ菌、結核菌など種々の病原菌を対象としてそれらの制御を目的として行われていた。チフス菌にはシナモン、クローブ、ガーリックの精油が、赤痢菌にはガーリック、クローブの精油が、結核菌にはオレンジ、レモン、マスタードの精油が抗菌性を示すといわれている^{17,18)}。しかし、1940年代末以降香辛料の抗微生物作用に関する研究は、環境に普遍的に存在する微生物を対象とするようになった。そして、細菌に対してはガーリック、シナモン、クローブ、マスタードが特に抗菌作用が強く、抗菌スペクトルもかなり広いとされている¹⁹⁻²⁸⁾。そのほか、オニオン、オールスパイス、オレガノ、ナツメグ、ブラックペパー、セージ、ローズマリーなども *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *B. subtilis* などに対して効力があると言われている^{19,25-31)}。また、一般的にグラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して強い阻害作用を有することも示されている^{18,26,29,30)}。また、シナモン、クローブ、アニスシード、オールスパイスなどは *Aspergillus* などのカビ

に対して効力があり^{19, 32-35)}、酵母に対してもクローブ、シナモン、ガーリック、マスタードなどが効果があると報告されている³⁵⁻³⁷⁾。香辛料の抗微生物作用はその精油の各成分によるものであると示されている^{19, 20, 28, 29, 39-42)}。クローブは15~20%の精油を含み、その85~92%が eugenol である^{16, 43)}。これがクローブの主な抗菌性成分とされており^{16, 18, 20, 28, 29, 42, 44-46)}、ベンゼン核に直接ついたOH基を有するために、強い抗微生物作用を示すといわれている¹⁶⁾。また、シナモンは1~4%の精油を含み^{16, 44)}、主な抗菌活性はその65~80%を占めている cinnamaldehyde によるが^{19, 28, 33, 40, 45)}、これは不飽和結合を有する芳香族アルデヒドであることが活性を高めているとされている¹⁶⁾。

香辛料の食品保存効果については、マスタードがアップルジュースやグレープジュース中の耐熱性のカビの増殖を阻害すると Kosker ら⁴⁷⁾が報告しており、eugenol がウイナソーセージ中の微生物に対して制菌作用を示すと宮尾⁴⁸⁾は述べ、森ら⁴⁹⁾はウイナソーセージのネット化防止にシナモン、クミンなどが有効と述べている。その他、セージ、ガーリック、メース、ナツメグ、ペッパーなどが肉類の腐敗防止に効果があるといわれている^{31, 50, 51)}。しかし、香辛料は独特の風味を有していることから汎用性に乏しく、使用する香辛料と対象食品の組合せと使用量には一定の限界がある。そして日常的に使用している程度の使用量では必ずしも十分な保存料としての効果は期待できないという難点がある。そのため、食品保存料としての利用のためには今後解明されなければならない点が多く存在する。

著者は、日本で日常用いられている香辛料に注目した。日本では最近では食生活の国際化に伴い、香辛料の使用範囲も広まってきたが、戦前に一般に使用されていたものは、ワサビ、カラシ、サンショウ、ショウガ、トウガラシ、シソなど比較的少数であった。マスタード(カラシ)、ワサビは精油主成分として加水分解により辛味性の allyl isothiocyanate を遊離する配糖体 sinigrin を有する香辛料である^{52, 53)}。日本では古くから使用されており、ワサビは薬味として刺身、寿司を食べるときに常用されるほか、ワサビ漬けなどにも用いられる。マスタードは練りがらしとして和風、洋風、中華風のいろいろな料理に用いられている。薬味としてだけではなく、抗微生物作用をも期待した利用もあったと考えられる。そのほかマスタードには疼痛や炎症を和らげる効果があり、また、食欲増進、乳化

効果もある⁵⁴⁾。マスタードの微生物培養培地あるいは食品中での抗微生物作用についてはFabianら²⁵⁾、Foter³⁹⁾、Koskerら⁴⁷⁾が20世紀半ばに報告しており、その後、Beuchat²⁷⁾は *V. parahaemolyticus* に対して1%マスタードがTSBS培地(Difco)中で中程度の阻害力を持つことを報告している。また、太田ら⁵⁵⁾は広島菜漬においてallyl isothiocyanateがグラム陰性菌に対して殺菌作用が、また乳酸菌に対して発育阻害作用があることを報告している。しかし、微生物増殖阻害に対する香辛料とその精油成分の相互関係、香辛料の増殖阻害に関する作用形式、阻害機構などはまだあまり明らかにされていない。

以上のことより、本研究ではブラウンマスタードを中心に数種の香辛料について、腐敗菌に対する香辛料の抗菌作用・機構を解明し、他の因子との相互関係や相乗効果を知ることにより食品への実用に耐える応用を試み、安全性や保存性を高めることを目的としている。

したがって、本論文では、第1章ではまず、香辛料のアルコール抽出液中の精油主成分を逆相高速液体クロマトグラフィーで定量した。そしてその結果を基に香辛料抽出液と、それと同濃度の精油主成分について増殖阻害を検討し、両者を比較して香辛料の抗菌性に対する精油主成分の占める割合を明らかにした。第2章では香辛料と他の因子との併用効果を培地を用いて検討した。第3章では香辛料がどのように細菌増殖阻害をするか、また、細菌はどのような影響を受けるのかを検討した。第4章ではallyl isothiocyanateとその誘導体について細菌増殖阻害を検討し、これらの分子の抗菌活性を示す部位はどこかを検討した。第5章では食品モデルとしてまず、鶏レバーを取り上げて、その保存温度を変えて食品中での微生物増殖阻害を検討した。さらにいくつかの食品についても検討して、実際の食品に保存料としての利用の可能性を示した。

第1章 香辛料とその精油主成分の細菌増殖阻害

ブラウンマスタードは *Brassica juncea* L. の種子であり、ブラックマスタード (*B. nigra* L.) と同様、その中に配糖体 sinigrin が存在している。これが酵素 (myrosinase) の作用で、加水分解されて辛味成分である isothiocyanate 誘導体を生成する⁵²⁾。その中で allyl isothiocyanate (AIT) がブラウンとブラックマスタードの主な辛味成分⁵²⁾であり、抗菌性を有している。

また、カラシ粉は黒カラシと白カラシの種子の脱脂粉末を混合したものの⁵⁶⁾で、粉ワサビはホースラディッシュ (西洋ワサビ) の乾燥粉末にカラシ粉を加え、着色したものとされている⁵⁷⁾。

シナモン、カシアは *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *C. loureirii* Nees, *C. burmanni* Blume, *C. cassia* Blume の乾燥した樹皮である⁴⁴⁾。シナモンの揮発芳香性の主成分は cinnamaldehyde (CA)⁴⁴⁾ であり、抗菌性¹⁹⁾を有している。

また、クローブは *Eugenia caryophyllata* Thunb の花冠⁴³⁾で15~20%の精油を含み、その主成分は eugenol (EU) (70~95%) であり^{16, 43, 53)}、抗菌性を有している⁵⁸⁾。

スパイスの揮発性成分の分離、定量は今までガスクロマトグラフィーで数多くなされてきている⁵⁹⁻⁶⁴⁾。しかし、HPLCによる分析はまだ比較的少ない⁶⁵⁻⁶⁷⁾。

また、これらの香辛料について、それぞれの精油主成分が精油の抗微生物作用をどのくらい担っているかはまだあまり明らかにされていない。

そこで、まず、第1節では香辛料の抗微生物作用における揮発性辛味成分の役割を明らかにすることを目的として、マスタードなどのAIT含量、シナモン中のCA含量ならびにクローブ中のEU含量を逆相HPLCで定量した。また、第2節ではこの3種の香辛料とその精油主成分の抗菌性について平板培養で比較検討した。さらに第3節では1節での結果を基に腐敗菌に対するマスタード、粉ワサビとカラシ粉及びAITの増殖阻害作用について液体培養で検討を行い、その両者を比較してこれら香辛料の抗菌性におけるAITの割合を検討した。

第1節 逆相HPLCによる精油主成分の定量

ブラウンマスタード、粉ワサビ、カラシ粉のエタノール抽出液中のAITと、シナモンのエタノール抽出液中のCA、また、クローブのエタノール抽出液中のEUの分離、定量法を逆相HPLCを用いて検討し、各数種試料について実測した。

1-1. 材料と実験方法

1-1-1. 試薬

AIT（東京化成工業製）、CA（和光純薬製）とEU（和光純薬製）はメタノールに溶解して用いた。特にAITについては使用直前に溶解した。

1-1-2. 香辛料抽出液

ブラウンマスタード（朝岡香辛料）は乳鉢で粉碎し、ヘキサンで脱脂したものをサンプルとした。サンプル3gに37℃の蒸留水2mlを加えてよく練った後、37℃に1時間保温して生成AIT量を最大とし、さらに85%エタノール10mlを加えてよく攪拌し、37℃で1時間抽出した。

粉ワサビ、カラシ粉（ハウス食品工業）もそれぞれ3gに37℃の蒸留水2mlを加えてよく練り、後はブラウンマスタードと同様にした。

シナモン、クローブはマイクロブレンダーで粉碎してサンプルとし、3gに70%エタノール12mlを加えてマスタードと同様に抽出した。

いずれも抽出後、3000rpm、30分間遠心分離し、上清を20%抽出液とした。

1-1-3. HPLCによる分析

1-1-3-a. 前処理

20%抽出液をSEP-PAK C₁₈カートリッジ（Waters Co.）で前処理した。その際予め、カートリッジはメタノール、次いで水で洗浄したものをを用いた。マスタード、粉ワサビおよびカラシ粉の20%抽出液は4倍容の水を加えて5倍希釈液とし、その4mlを洗浄済みカートリッジに吸着させ、30%メタノール4mlで洗浄後、メタノールで溶出し、溶出液を10mlにし、メンブランフィルター（0.45μm）で除塵後、HPLCにその5μlを供した。シナモン20%抽出液は9倍容の水を加えて10倍希釈液とし、その1mlをマスタードと同様に吸着させ、メタノールで溶出し、溶出液を25mlにし、除塵後、HPLCにその5μlを供した。クローブはシナモンと

同様、9倍容の水を加えて10倍希釈液とし、その1mlをカートリッジに吸着させ、10%メタノール4mlで洗浄後、メタノールで溶出し、溶出液を10mlにし、後はシナモンと同様にHPLCに供した。

1-1-3-b. HPLC条件

HPLCは日立655-11型、カラムは日立ゲル#3011-O(4φ×150mm)を45℃恒温で、移動相にはクローブの場合のみメタノール90%、水10%を、それ以外は100%メタノールを用い、流速は1.00ml/min、検出は大塚電子製MCPD-3500を用いて波長200~400nmで走査し、NEC personal computerで処理した。

1-2. 実験結果と考察

1-2-1. AITの分離と定量

標準AITは吸収スペクトルより245nmに最大吸収波長を持ち、移動相にメタノールを用いることによりRT2.39minに単一のピークとして得られた。標準AITとマスタード抽出液の三次元クロマトグラムをFig.1-1に示す。ブラウンマスタード抽出液中のAITは移動相にメタノールを用いることにより良好な分離を得、245nmでRT2.39minのピークとして得られ、標準AITのそれと比較するとこれらも一致することよりこのピークがAITであると認めた。標準AITと抽出液の245nmのクロマトグラムをFig.1-2に示す。この際、SEP-PAK処理におけるAITの回収率テストをAIT5mgを用いて行った。これによるとAITの平均回収率は98.7%、変動係数は0.2%(n=6)であった。また、全行程におけるAITの回収率テストも行った。水で練った3gのマスタードに、エタノールで抽出する前にAIT25mgを添加して上記のように処理した。AITの平均回収率は96.5%で、変動係数は0.3%(n=5)であった。また、MCPD-3500 Integratorによる245nmでの吸光度のピーク面積より、常法どおり含量を算出したところ、Table 1-1に示すように、マスタード抽出液(20% w/v)中AIT含量は 1.808 ± 0.019 mg/ml(n=5)、脱脂マスタードに換算すると 9.040 ± 0.095 mg/gであった。また、粉ワサビおよびカラシ粉については、粉ワサビ抽出液(20% w/v)中のAIT含量はロットにより幾分変動したが、 1.261 ± 0.065 mg/ml(n=6)、粉ワサビに換算すると 6.305 ± 0.325 mg/g、カラシ粉(20% w/v)抽出液では 1.803 ± 0.154 mg/ml(n=6)、カラシ粉に換算すると 9.015 ± 0.770 mg/gであった。さらに、

生のワサビ *Wasabi japonica*についてもAITの定量を行った。そのAIT含量は乾燥物に換算して $2.911 \pm 0.005 \text{ mg/g}$ ($n=5$)であった。

1-2-2. CAの分離と定量

シナモン抽出液中のCAは移動相にメタノールを用いることにより良好な分離を得た。標準CAとシナモン抽出液の三次元クロマトグラムをFig.1-3に示す。シナモン抽出液中で最大吸収波長286nmでRT2.80minのピークが得られ、標準CAのそれと一致し、このピークがCAであると認めた。両者の286nmのクロマトグラムをFig.1-4に示す。CA10mgのカートリッジ処理における平均回収率は99.3%で変動係数は0.3% ($n=6$)であった。この全行程におけるCAの回収率テストは、抽出の前に、3gのシナモンにCAを100mg添加して行った。CAの平均回収率は98.5%、その変動係数は0.2% ($n=5$)であった。Table 1-1に示すようにシナモン抽出液(20% w/v)のCA含量は $6.810 \pm 0.014 \text{ mg/ml}$ ($n=5$)、シナモンに換算すると $34.05 \pm 0.07 \text{ mg/g}$ であった。

1-2-3. EUの分離と定量

クローブ抽出液中のEUは移動相にメタノール90%、水10%を用いることにより、良好な分離を得た。標準EUとクローブ抽出液の三次元クロマトグラムをFig.1-5に示す。その結果、クローブ抽出液で最大吸収波長282nmでRT2.54minのピークが得られ、標準のEUのそれと一致し、このピークがEUであると認めた。両者の282nmのクロマトグラムをFig.1-6に示す。EU 40mgのカートリッジ処理における平均回収率は97.3%で変動係数は0.3% ($n=5$)であった。また、全行程におけるEUの回収率テストは、抽出の前に3gのクローブに300mg添加して行った。EUの平均回収率は98.5%でその変動係数は0.3% ($n=5$)であった。Table 1-1に示すように、クローブ抽出液(20% w/v)のEU含量は $30.15 \pm 1.24 \text{ mg/ml}$ 、クローブに換算すると $150.8 \pm 6.2 \text{ mg/g}$ であった。

小嶋⁶³⁾が報告しているように、ガスクロマトグラフィー(GC)は香辛料のヘッドスペースガス中の成分を測定するのに適している。しかし、今回のように香辛料中の抗微生物成分を測定するには、このHPLCの方が3次元クロマトグラムのためにサンプル中の成分のリテンションタイムに加えてUVスペクトルが測定でき、GC-MSよりは簡便に処理できるので適しているといえよう。小嶋ら⁶⁴⁾はブラック

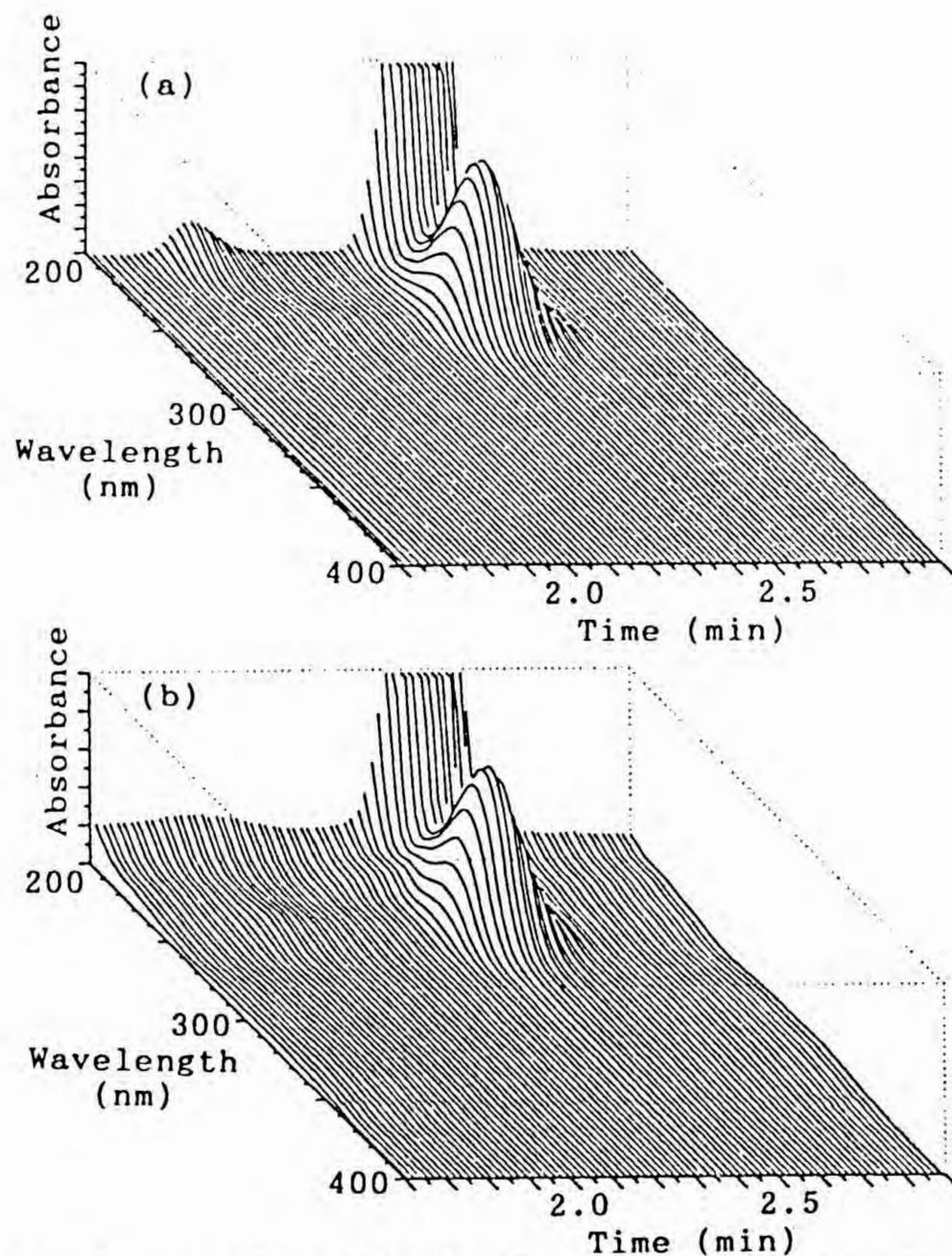


Fig.1-1 Three dimensional chromatograms of reverse-phase HPLC of standard allyl isothiocyanate (AIT) (a) and brown mustard extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-O; mobile phase, methanol; flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 200-400 nm.

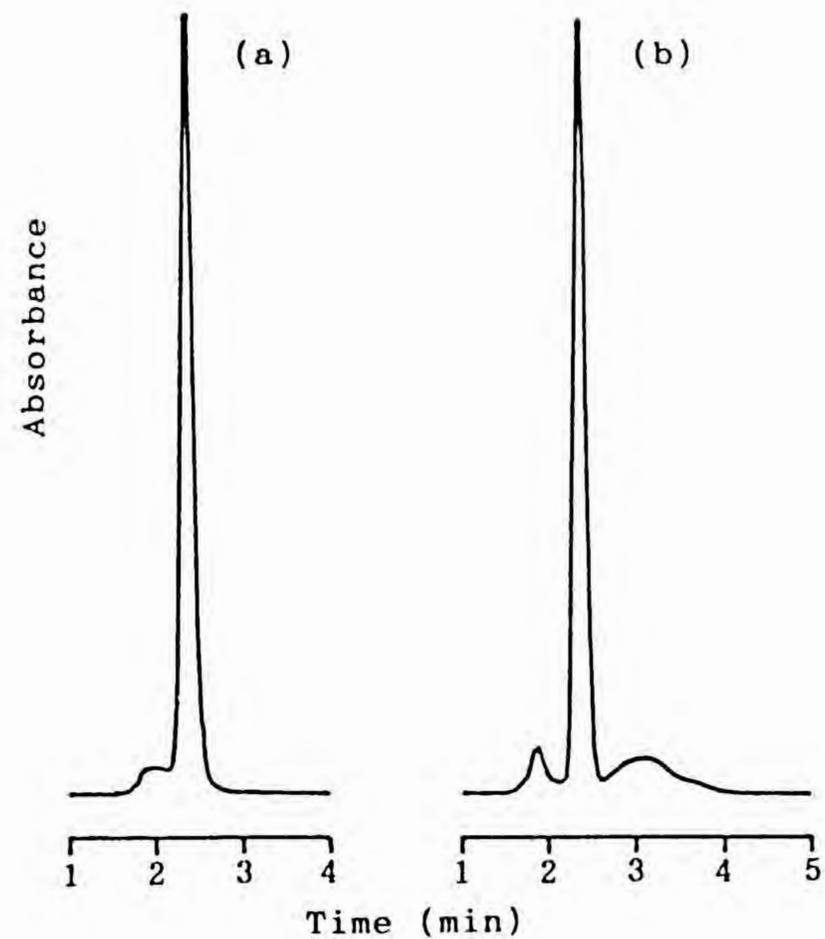


Fig.1-2 Reverse-phase HPLC chromatograms of standard AIT, injection level 0.73g (a) and brown mustard extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-O; mobile phase, methanol; flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 245 nm.

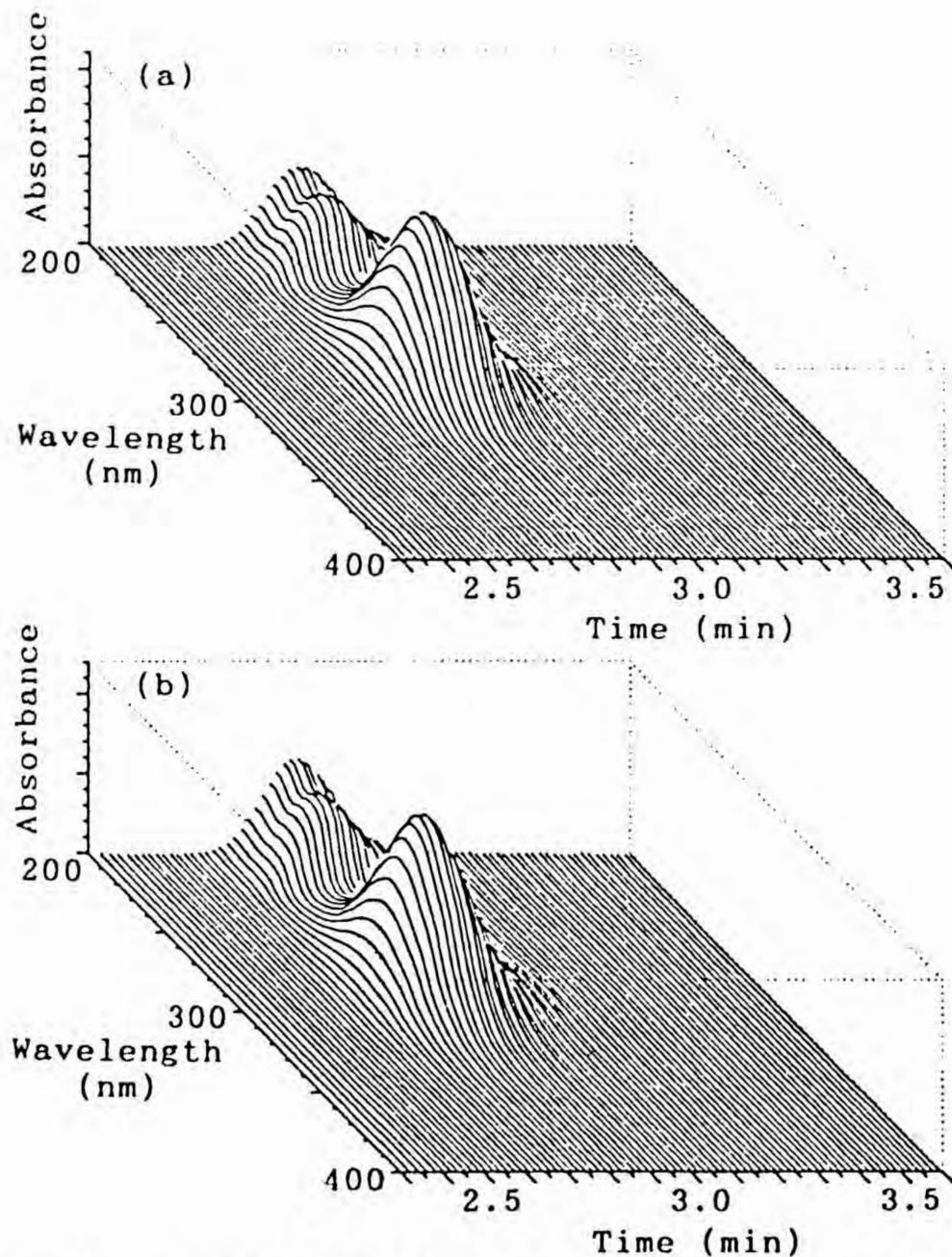


Fig.1-3 Three dimensional chromatograms of reverse-phase HPLC of standard cinnamaldehyde (CA) (a) and cinnamon extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-0; mobile phase, methanol; flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 200-400 nm.

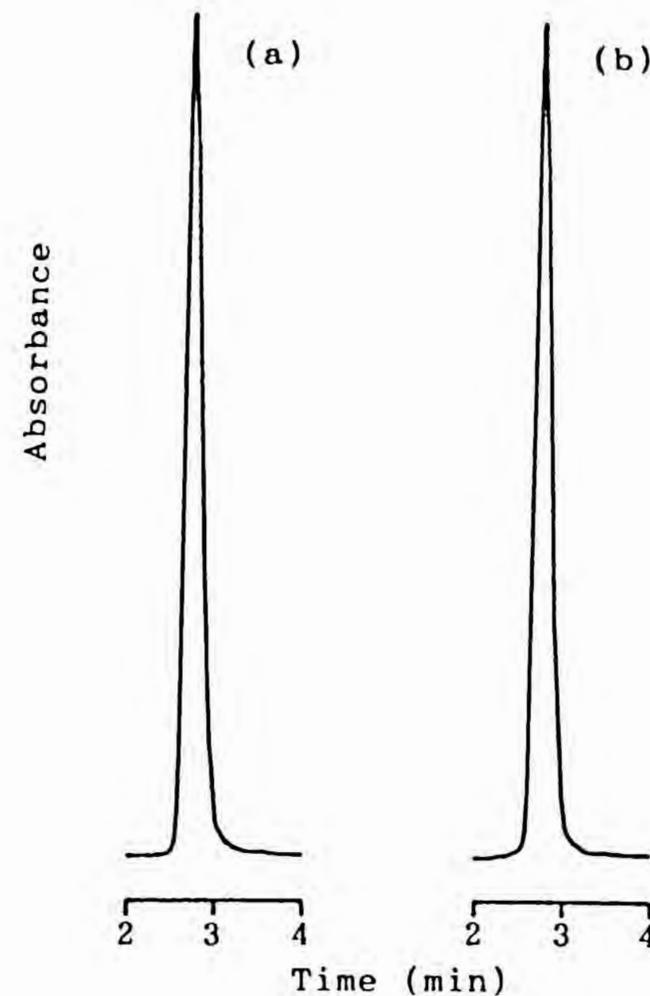


Fig.1-4 Reverse-phase HPLC chromatograms of standard CA, injection level 0.14ug (a) and cinnamon extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-0; mobile phase, methanol; flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 282 nm.

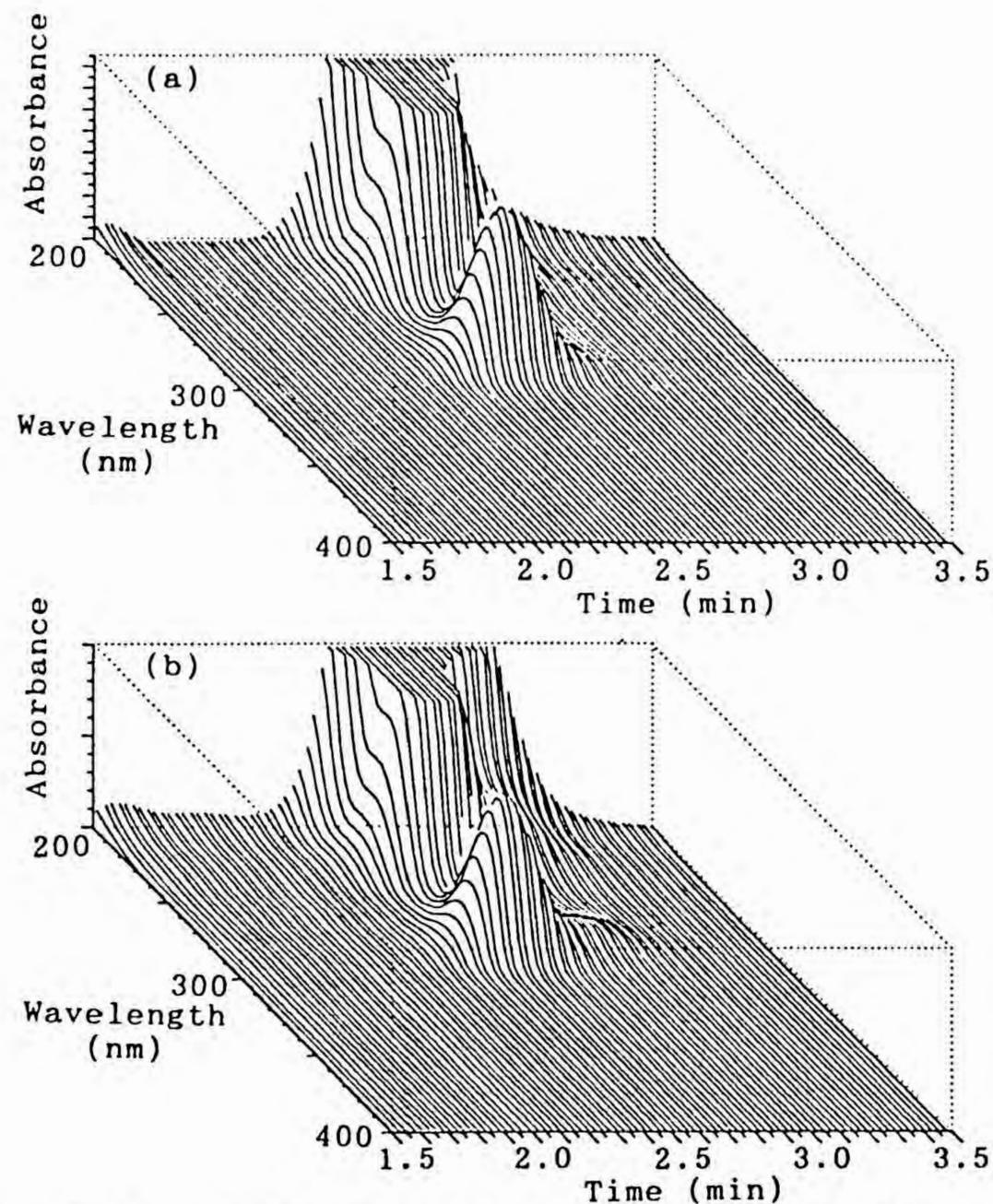


Fig.1-5 Three dimensional chromatograms of reverse-phase HPLC of standard eugenol (EU) (a) and clove extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-O; mobile phase, methanol-H₂O(90:10); flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 200-400 nm.

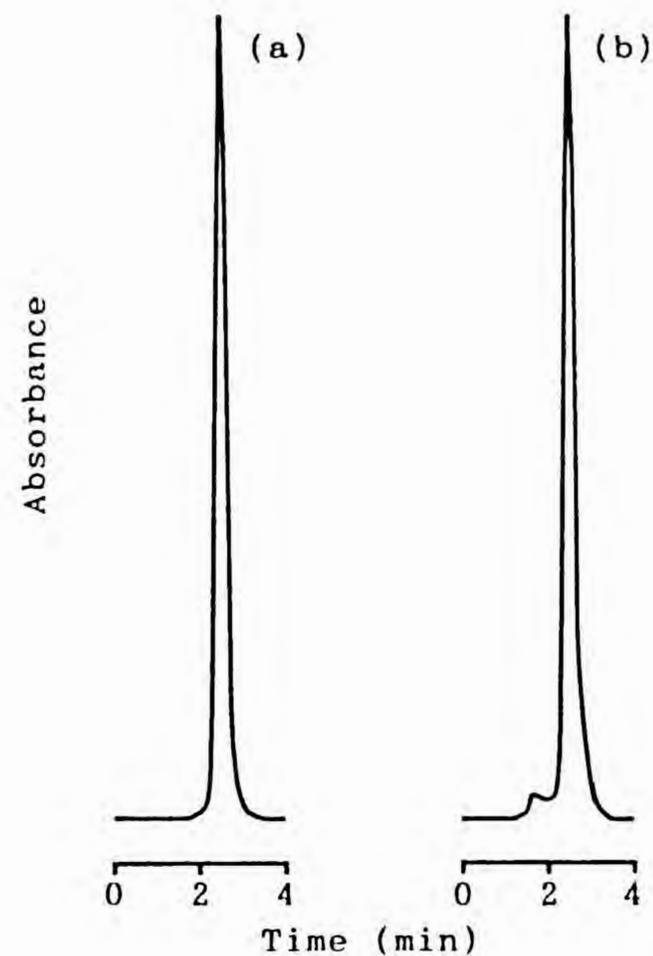


Fig.1-6 Reverse-phase HPLC chromatograms of standard EU, injection level 1.5ug (a) and clove extract (b). Conditions: column, Hitachi-gel #3011-O; mobile phase, methanol-H₂O(90:10); flow rate, 1.00 ml/min; detector wavelength, 282 nm.

Table 1-1 Contents of main component in spice extract (20%w/v).

Material		AIT (mg/ml)	CA (mg/ml)	EU (mg/ml)
Brown mustard	1	1.825		
	2	1.781		
	3	1.818		
	4	1.822		
	5	1.792		
		1.808 ± 0.019		
Kona-wasabi	6	1.142		
	7	1.243		
	8	1.259		
	9	1.299		
	10	1.313		
	11	1.309		
		1.261 ± 0.065		
Karashi-ko	12	1.885		
	13	1.988		
	14	1.876		
	15	1.611		
	16	1.617		
	17	1.842		
			1.803 ± 0.154	
Cinnamon	18		6.825	
	19		6.794	
	20		6.797	
	21		6.814	
	22		6.821	
			6.810 ± 0.014	
Clove	23			28.340
	24			29.444
	25			30.656
	26			31.290
	27			31.032
			30.152 ± 1.236	

AIT, allyl isothiocyanate; CA, cinnamaldehyde; EU, eugenol.

マスタードには AITが約 1% 含有しており、そのほか 3-butenyl, 3-methylthiopropyl, β -phenethyl, *sec*-butyl isothiocyanatesなどがわずかに含まれていると報告している。今回のブラウンマスタードはAITを0.9%含有し、ほぼ同様の結果であった。また、森⁴⁴⁾はシナモンは1~4%の精油を含み、その65~80%がCAであり、その他に eugenol, caryophyllene, linalool, cineole, cinnamylacetateなどを含有していると述べている^{44, 59, 60)}。ここで使用したシ

ナモン (*C. burmanii* Blume) の CA 含量は約 3.4% であった。また、マスタードとシナモン抽出液中の他の成分は今回の測定では殆ど検出されず、それは検出限界以下であったためと考えられる。また、クローブ中の EU 含量は 15.08% であったが、これは、クローブは精油 15~20% を含有し、そのうちの 70~95% が EU であり⁵³⁾、その他、 α 、 β -caryophyllene、acethyleugenol などを含んでいるとする文献値^{16, 43, 53)}と一致した。従って、今回の条件はマスタード、シナモンまたはクローブ中のそれぞれ AIT、CA または EU の定量をするのに適していると考えられる。

第 2 節 平板培養による香辛料とその精油主成分の増殖阻害

1 節の定量結果を基にブラウンマスタード、シナモン、クローブとそれらの精油主成分 AIT、CA、EU について、平板培養法で 7 種の細菌に対する増殖阻害作用を比較検討した。

対象に使用した腐敗細菌のうち、グラム陽性菌は *Staphylococcus aureus* と *Bacillus cereus* で、*S. aureus* はエンテロトキシン毒素による食中毒菌であり、*B. cereus* は孢子形性菌で、デンプン性の食品で腐敗を引き起こす。また、グラム陰性菌としては *Escherichia coli*、*Proteus vulgaris*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Ps. fragi*、*Aeromonas hydrophila* で、*E. coli* は汚染の指標として衛生学上重要な菌である。*Pro. vulgaris* は特に肉類で腐敗を引き起こし、タンパク質を分解して強い腐敗臭を生ずる。また *Pseudomonas* 属は魚介類、畜肉類、乳・乳製品に多く存在して腐敗を引き起こし、*Ps. aeruginosa* はピオシアニンにより牛乳の青変を引き起こし、また日和見感染などで重要視されており、*Ps. fragi* は 0℃ 付近で活発な酵素を有し、低温貯蔵における変敗が問題とされる。*A. hydrophila* も魚介類で腐敗を引き起こす。⁶⁹⁻⁷¹⁾

2-1. 材料と実験方法

2-1-1. 香辛料抽出液

1-1-1 と同様にエタノールで 20% 抽出液を調製した。

2-1-2. 精油主成分の溶液の調製

1節のHPLCの結果より、20%抽出液中のAIT含量は1.8mg/ml、CA含量は6.8mg/ml、EU含量は30mg/mlであった。70%エタノールにそれぞれこの濃度となるようにAIT、CAおよびEUを溶解して用いた。

2-1-3. 使用菌株

Escherichia coli IFO 3301、Staphylococcus aureus IFO 3761、Proteus vulgaris IFO 3851、Pseudomonas fragi IFO 3458、Ps. aeruginosa IFO 3755、Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila IFO 3820、Bacillus cereus IFO 3132を発酵研究所より入手して用いた。これらは Trypticase soy agar (TSA) (Difco, Co.)の斜面培地で30℃、48~72時間培養し、5℃で保存し、3週間毎に植え継いで使用した。

2-1-4. 接種菌

酵母エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、食塩0.1%、pH7.0の前培養培地で30℃、22~24時間静置培養したものを接種菌 (5×10^8 CFU/ml) とした。

2-1-5. 抗菌性の測定

次に魚肉エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、食塩0.1%、寒天1.5%、pH7.0の培地を100ml三角フラスコに分注して滅菌後、約50℃に冷却して香辛料抽出液または精油主成分を無菌的に添加した。これを滅菌シャーレに移して固めたものに前培養した接種菌を白金耳で直線に塗抹した。これを30℃で培養し、18、24、48時間後に生育を観察し、24時間増殖を阻止する濃度を最小阻止濃度(MIC)として表した。

2-2. 結果と考察

Table 1-2に各菌のMICを示す。クローブがどの菌に対してもかなりの阻害効果があり、次いでシナモンの効果が強かった。上田¹⁹⁾らもシナモンよりクローブのほうが阻害効果があると述べている。また、CAとEUを比較するとCAのほうが阻害効果は大きかった。また、AITはCAやEUに比べて少量でかなりの抗菌性を有していた。しかるに香辛料としてマスタードが他の2つより抗菌力が低いのはマスタード中のAIT含量が少ないためと考えられる。

Table 1-2 Minimum concentrations of spices or main components in their respective essential oil to inhibit the bacterial growth for 24 h (MIC) on plate culture.

	Mustard (%)	AIT (ppm)	Cinnamon (%)	CA (ppm)	Clove (%)	EU (ppm)
<i>S. aureus</i>	0.9 (81) ^a	72	0.4 (136)	136	0.2 (300)	600
<i>E. coli</i>	0.8 (72)	81	0.4 (136)	204	0.4 (600)	600
<i>Pro. vulgaris</i>	0.6 (54)	36	0.3 (102)	102	0.2 (300)	300
<i>Ps. fragi</i>	0.3 (27)	18	0.3 (102)	85	0.2 (300)	375
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.4 (36)	27	0.4 (136)	170	0.3 (450)	750
<i>A. hydrophila</i>	0.4 (36)	27	0.2 (68)	68	0.15(225)	225
<i>B. cereus</i>	0.5 (45)	45	0.2 (68)	68	0.15(225)	375

a, main component concentrations (ppm) contained in each spice corresponded to MIC.

S. aureus, *Staphylococcus aureus*; *E. coli*, *Escherichia coli*;
Pro. vulgaris, *Proteus vulgaris*; *Ps. fragi*, *Pseudomonas fragi*;
Ps. aeruginosa, *Pseudomonas aeruginosa*; *B. cereus*, *Bacillus cereus*;
A. hydrophila, *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*.

第3節 液体培養によるブラウンマスタード、粉ワサビ、カラシ粉とAITの細菌増殖阻害

2節の結果からAITは強い抗菌力を持つことに注目し、AITを精油主成分として持つブラウンマスタードを中心に粉ワサビおよびカラシ粉をも含めて、これらとAITとの細菌増殖阻害作用を液体培養でさらに詳しく比較検討した。

3-1. 材料と実験方法

3-1-1. 香辛料抽出液

1-1-1と同様にブラウンマスタード、粉ワサビおよびカラシ粉20%抽出液を調製した。

3-1-2. AIT溶液の調製

1節のHPLCの結果より、マスタード抽出液中のAITは1.8mg/ml、粉ワサビ抽出液中のAIT含量は1.3mg/ml、カラシ粉中のAIT含量は1.8mg/mlであった。それで70%エタノールにそれぞれ対応する濃度となるように溶解して用いた。

3-1-3. 使用菌株

E. coli IFO 3301、S. aureus IFO 3761、Pro. vulgaris IFO 3851、Ps. fragi IFO 3458、Ps. aeruginosa IFO 3755、B. cereus IFO 3132を2-1-3と同様に用いた。

3-1-4. 接種菌

酵母エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、食塩0.1%、pH 7.0の前培養培地で30℃、22~24時間静置培養したものを、0.9%食塩水で500倍希釈して接種菌 (10^6 CFU/ml) とした。

3-1-5. 培養

魚肉エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、食塩0.1%、pH 7.0の培地をアルミキャップ付き15φ×150mm試験管に取り滅菌後、20%香辛料抽出液またはAITを70%エタノールに溶解したものの0.05~0.2mlを無菌的に添加して培地を5mlにした。抽出液またはAITはエタノールに溶解しているので、この際、培地は0.7~2.8%のエタノールを含有している。同一菌に対する実験ではエタノール濃度はすべて等しくしている。また、例えばマスタード抽出液0.2mlを添加したとき培地中濃度はマスタードとして0.8%、AITとして72ppmとなる。これらの培地に接種菌を 10^4 /mlとなるように接種した。

接種後、試験管を斜め(60°)にして30℃、毎分120回往復で振盪培養した。増殖はSPECTRONIC 20A (島津、Bausch&Lomb, Co.)で波長600nmのODで測定して示した。生菌数は平板混釈法⁷²⁾で測定し、colony-forming units (CFU)/mlで示した。

3-1-6. 消費糖量の測定

培養液を3000 rpmで15分間遠心分離して、その上清について全糖量をフェノール硫酸法⁷³⁾で測定した。消費糖量は無接種の培地中の糖量から上清の糖量を差し引いたものを消費グルコース量として示した。

3-2. 実験結果と考察

3-2-1. ブラウンマスタードの抗菌性

3-2-1-a. S. aureusに対する抗菌性

S. aureusに対するマスタードとAITの抗菌性をFig.1-7の増殖曲線で示した。

スパイス抽出液の培地への添加量はスパイスに換算して%で、培地中のAIT量はppmで示している。この菌の場合、培地はテストしたマスタード抽出液とAITのすべての濃度においてエタノールを2.8%含んでいる。ここでエタノール2.8%のみ添加した培地での *S. aureus* の生育は誘導期が3時間延長しただけでコントロール即ち無添加と同様の生育を示した。マスタードとAITは培地中の濃度に応じて *S. aureus* の増殖の誘導期を延長し、マスタード0.1%でさえ20時間以上延長した。そしてマスタード0.4%では43時間、0.8%では63時間増殖が阻止された。一方、マスタード0.4%に相当するAIT36ppmでは39時間、0.8%に相当するAIT72ppmでは54時間の阻止であった。すなわち、マスタードはその培地中に含まれるAITと等濃度AITより *S. aureus* の増殖に対する阻害力は大きであった。

3-2-1-b. *E. coli*に対する抗菌性

E. coli の結果をFig.1-8に示した。本菌では培地中のエタノール濃度2.8%では誘導期の長さには影響はなく、コントロールと同様であったが、定常期における濁度の低下がみられた。マスタードまたはAIT濃度に応じて誘導期の延長と定常期における濁度の低下がみられた。マスタードとAITの *E. coli* の誘導期の延長に対する関係は *S. aureus* と同様であった。

3-2-1-c. *Pro. vulgaris*に対する抗菌性

Pro. vulgaris の結果をFig.1-9に示した。この場合、培地中のエタノール濃度は1.4%で誘導期の長さについては、影響はほとんど無く、コントロールと同様であったが、定常期における濁度の低下がみられた。マスタードとAITはいずれも本菌に対して *E. coli* や *S. aureus* よりも増殖開始をかなり遅らせ、阻害力が強かった。また、マスタードとAITの阻害を比較するとわずかにマスタードが大きかった。

3-2-1-d. *Ps. fragi*に対する抗菌性

Fig.1-10に *Ps. fragi* の結果を示す。 *Ps. fragi* では培地中のエタノール濃度は0.7%でこの濃度でわずかに誘導期が延長され、定常期の濁度もわずかに低下した。マスタードは0.2%以上で4日間以上増殖を阻止した。マスタードの阻害とそれと等量のAITの阻害を比較すると、マスタードの方がやや濁度の低下が大きく、阻害は強かった。

3-2-1-e. *Ps. aeruginosa*に対する抗菌性

Ps. aeruginosaの結果をFig.1-11に示す。培地中のエタノール濃度は1.4%で、これのみでは誘導期を4時間ほど延長しただけであった。マスタード0.35%またはAIT31.5ppm以上含む培地では4日間増殖はみられなかった。この菌に対してはAITがマスタードより阻害力は大であり、他の菌に対する結果とは反対であった。

3-2-1-f. B. cereusに対する抗菌性

Fig.1-12にB. cereusの結果を示す。培地中のエタノール濃度は1.4%であるが、この場合、誘導期は5時間でコントロールの6時間より短く、エタノールにより増殖が早く開始した。マスタードを0.05%添加すると誘導期は17時間で、これに相当するAIT4.5ppmでは12時間であった。また、マスタード0.2%で42時間、それに相当するAIT18ppmで38時間であった。マスタード0.4%で54時間、AIT36ppmで36時間の誘導期であった。マスタードのほうが等量のAITより誘導期が長く、阻害が強かった。

3-2-1-g. マスタード添加時の生菌数と糖の消費

S. aureusの培養中の生菌数と糖の消費をFig.1-13に示す。2.8%エタノールの存在下では生菌数も糖の消費もコントロールと殆ど差はなかった（図には示していない）。すなわち、2.8%エタノール存在下またはコントロールでは糖の消費は培養24時間まではCFUの対数に平行して増加しており、その後は、糖の消費量合計はずっと増加しているが、CFUは減少した。また、マスタード0.8%存在下ではCFUは培養42時間から72時間まで増加してその後減少し、糖の消費は2.8%エタノールの場合と同じ傾向にあったが、CFU当りの糖消費量は減少した。

Fig.1-14はPs. aeruginosaの結果を示す。マスタード0.2%添加では生菌数は培養24時間まで減少し、それから増加し始め、糖の消費はS. aureusと同様の傾向にあったが、1.4%エタノールの場合よりCFU当りの糖の消費量は減少した。マスタード0.4%添加ではCFUは24時間後に0となった（図示していない）。

さらにE. coliの結果をFig.1-15に示すが、糖の消費とCFUとの関係は2.8%エタノール添加時とマスタード0.8%添加時で差はなかった。

生菌数の挙動より、S. aureusとE. coliに対してマスタード0.8%は静菌作用を示し、Ps. aeruginosaに対して0.2%で殺菌作用を示した。また、S. aureusとPs. aeruginosaはマスタードにより糖の代謝が阻害されられると思われた。

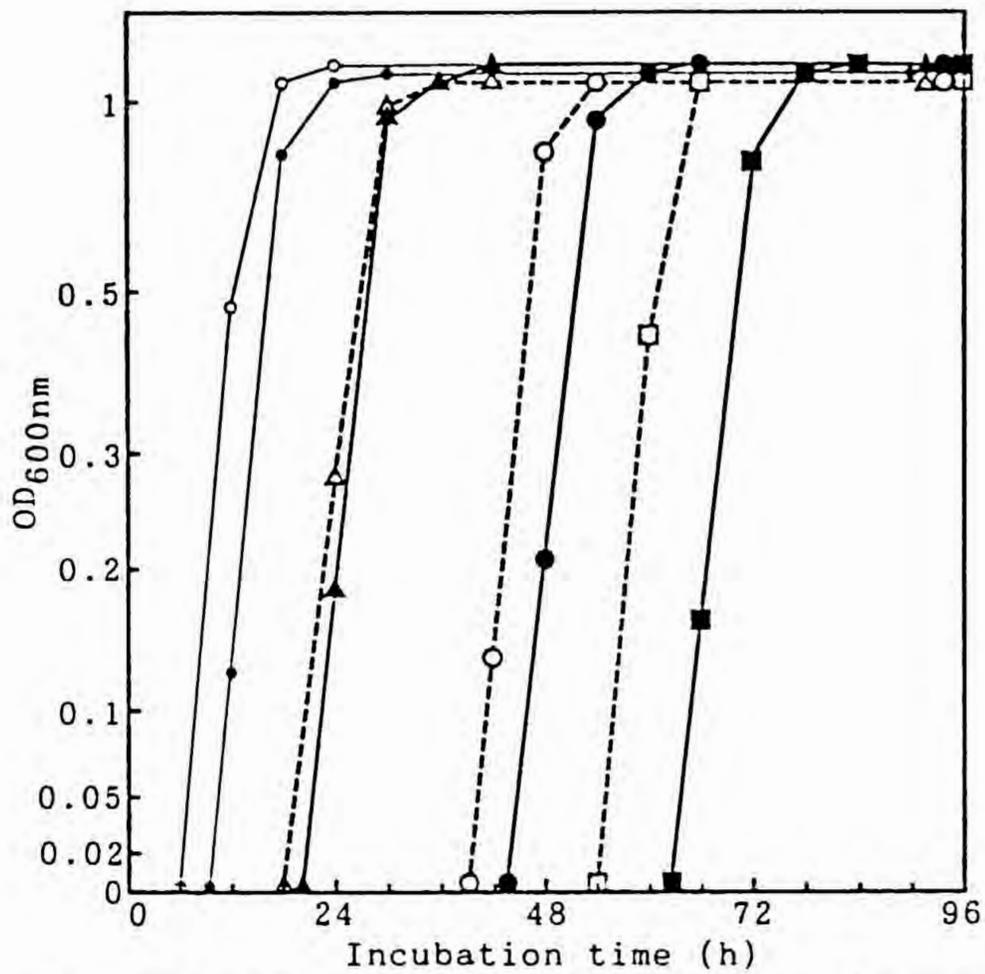


Fig.1-7 Effects of mustard or AIT on the growth of *Staphylococcus aureus*. ○, control; ●, 2.8% ethanol; ▲, mustard 0.1%; ●, 0.4%; ■, 0.8%; △, AIT 9ppm; ○, 36ppm; □, 72ppm.

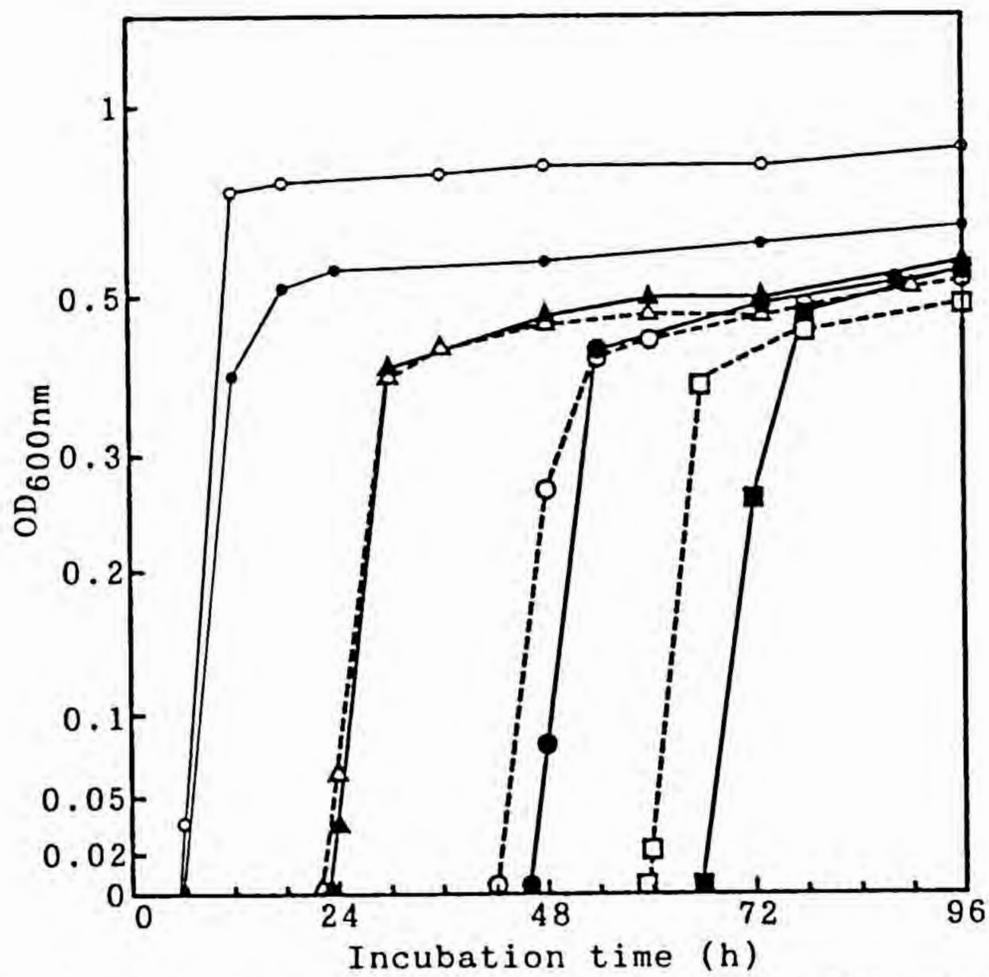


Fig.1-8 Effects of mustard or AIT on the growth of *Escherichia coli*. ○, control; ●, 2.8% ethanol; ▲, mustard 0.1%; ●, 0.4%; ■, 0.8%; △, AIT 9ppm; ○, 36ppm; □, 72ppm.

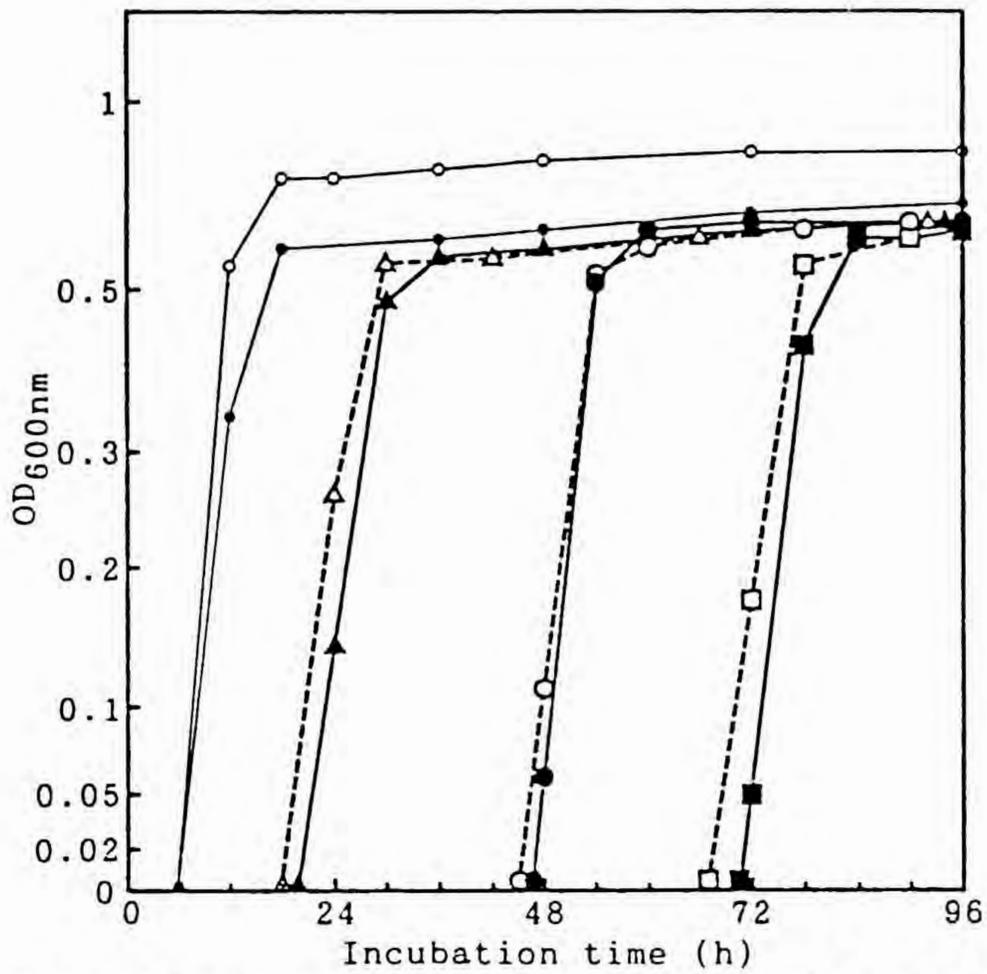


Fig.1-9 Effects of mustard or AIT on the growth of *Proteus vulgaris*. ○, control; ●, 1.4% ethanol; ▲, mustard 0.05%; ●, 0.2%; ■, 0.4%; △, AIT 4.5ppm; ○, 18ppm; □, 36ppm.

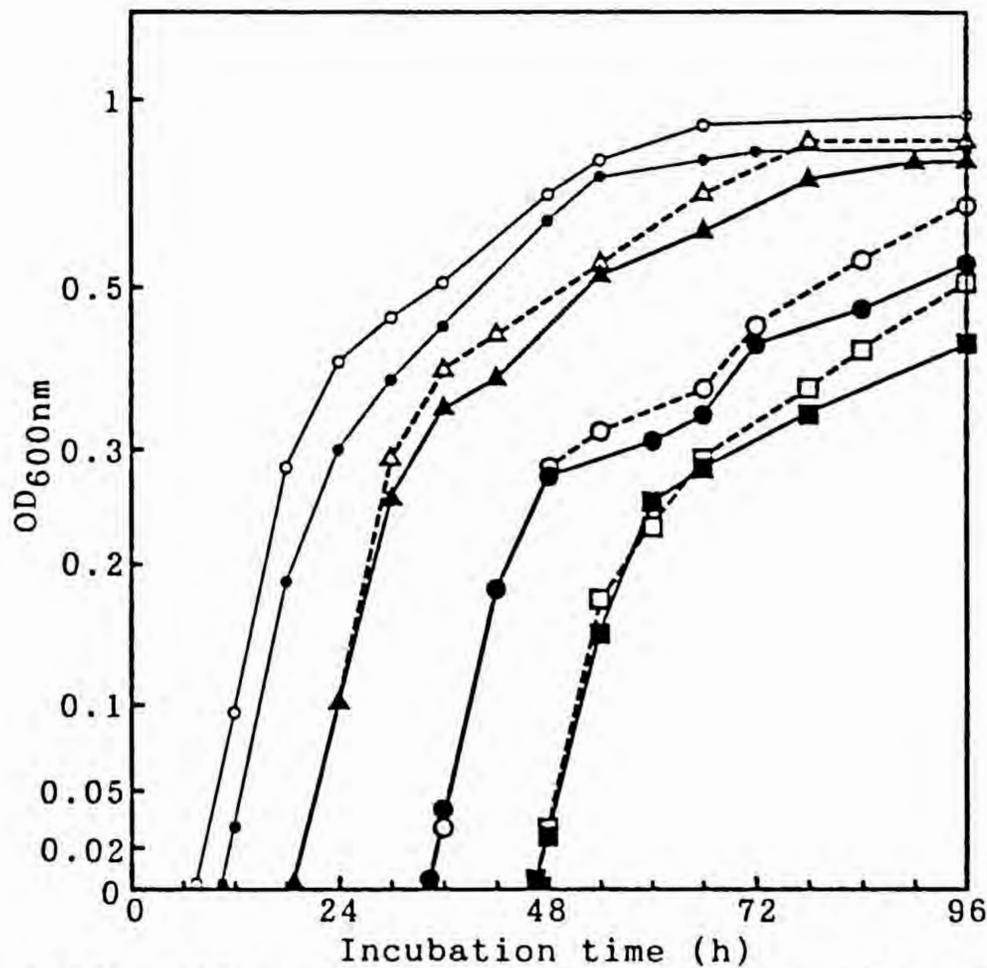


Fig.1-10 Effects of mustard or AIT on the growth of *Pseudomonas fragi*. ○, control; ●, 0.7% ethanol; ▲, mustard 0.025%; ●, 0.1%; ■, 0.175%; △, AIT 2.3ppm; ○, 9ppm; □, 15.8ppm.

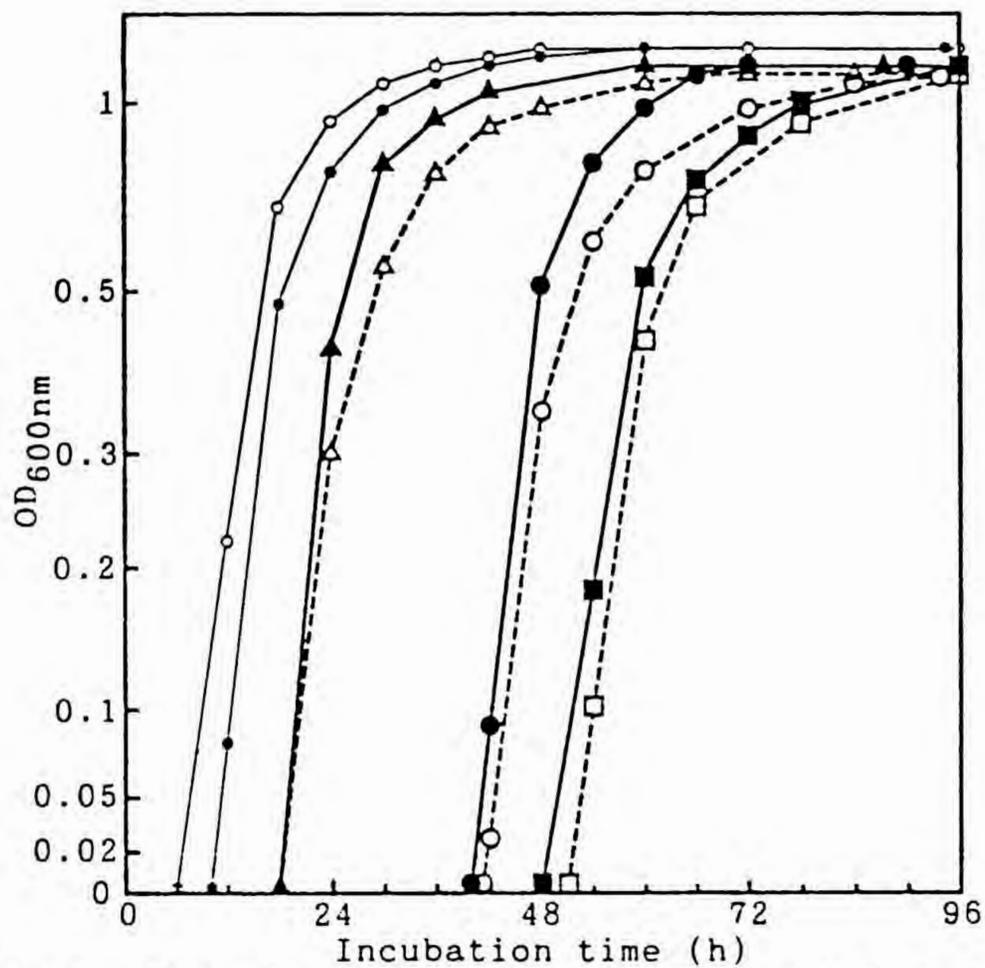


Fig.1-11 Effects of mustard or AIT on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. ○, control; ●, 1.4% ethanol; ▲, mustard 0.05%; ●, 0.2%; ■, 0.3%; △, AIT 4.5ppm; ○, 18ppm; □, 27ppm.

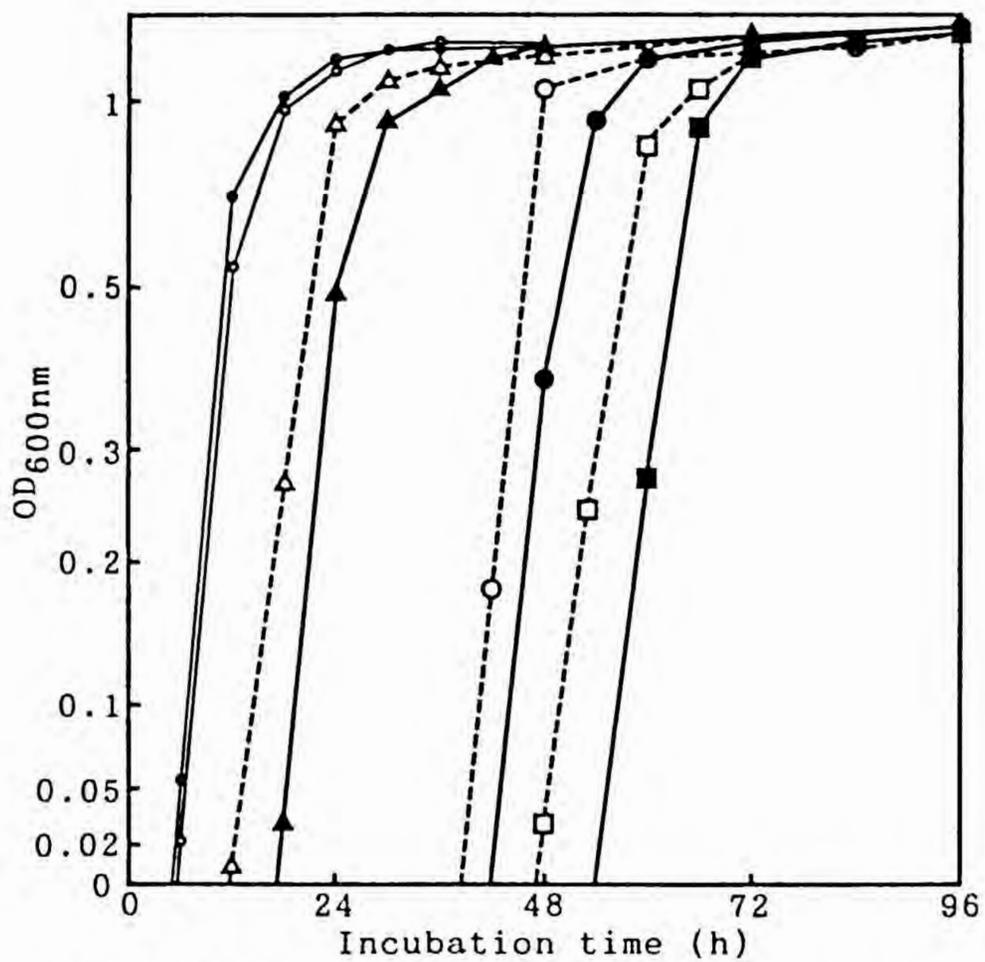


Fig.1-12 Effects of mustard or AIT on the growth of *Bacillus cereus*. ○, control; ●, 1.4% ethanol; ▲, mustard 0.05%; ●, 0.2%; ■, 0.4%; △, AIT 4.5ppm; ○, 18ppm; □, 36ppm.

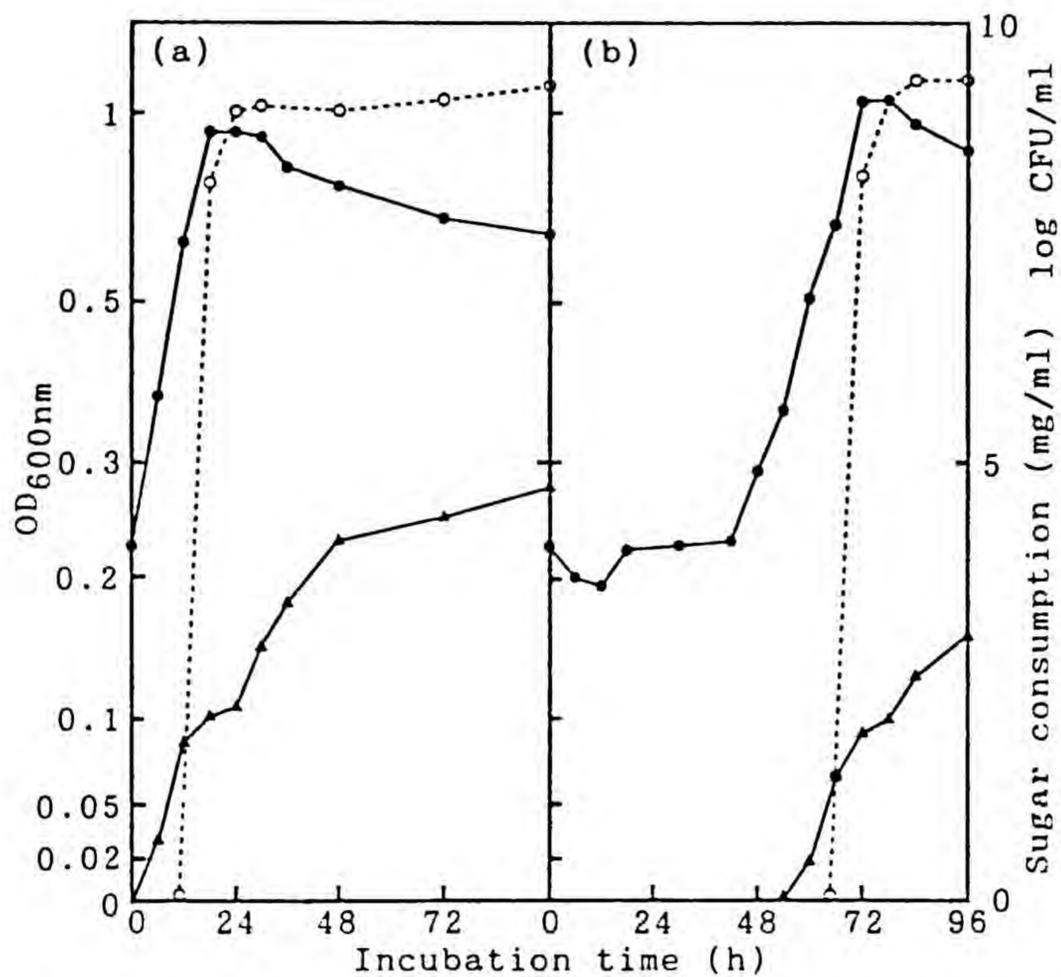


Fig.1-13 Effects of mustard on colony counts of *S. aureus* and its sugar consumption in the medium containing (a) 2.8% ethanol and (b) 0.8% mustard. •, OD_{600nm}; •, log CFU/ml; ▲, sugar consumption.

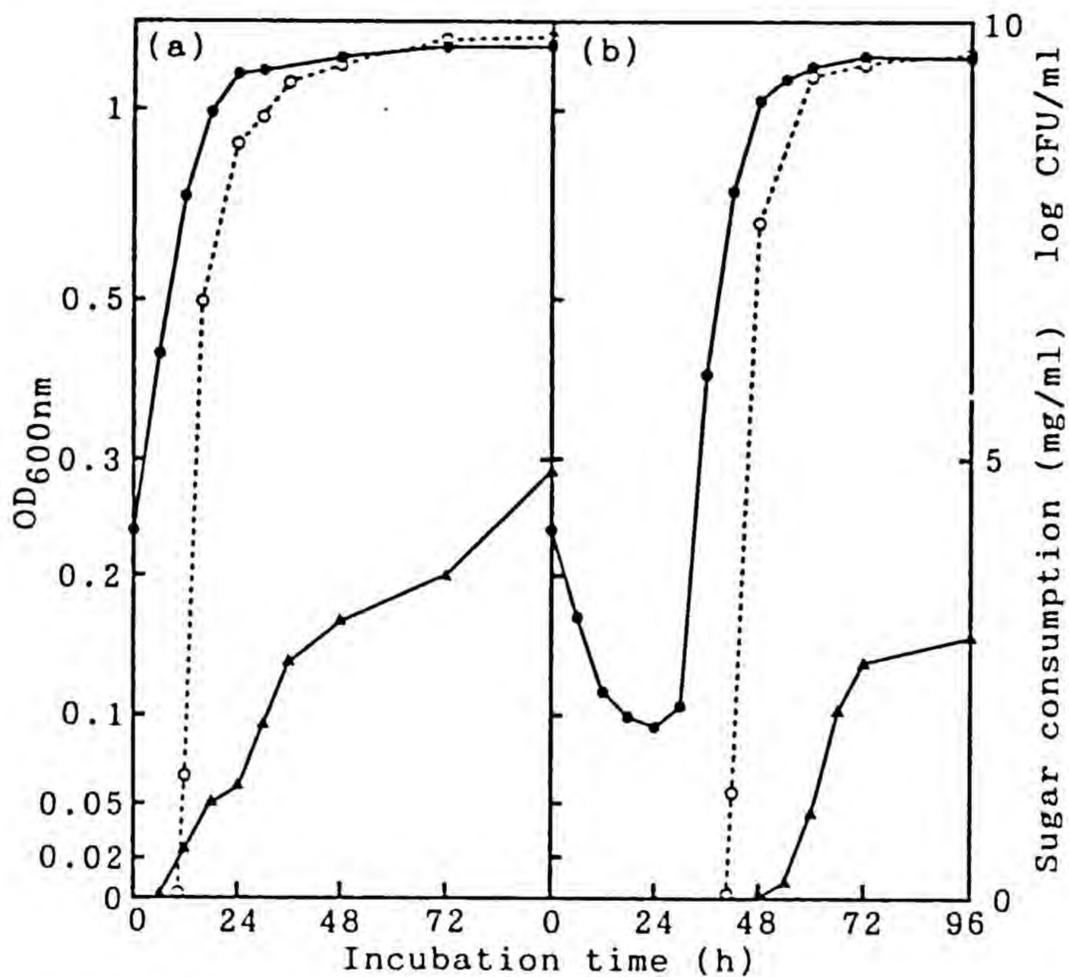


Fig.1-14 Effects of mustard on colony counts of *Ps. aeruginosa* and its sugar consumption in the medium containing (a) 1.4% ethanol and (b) 0.2% mustard. •, OD_{600nm}; •, log CFU/ml; ▲, sugar consumption.

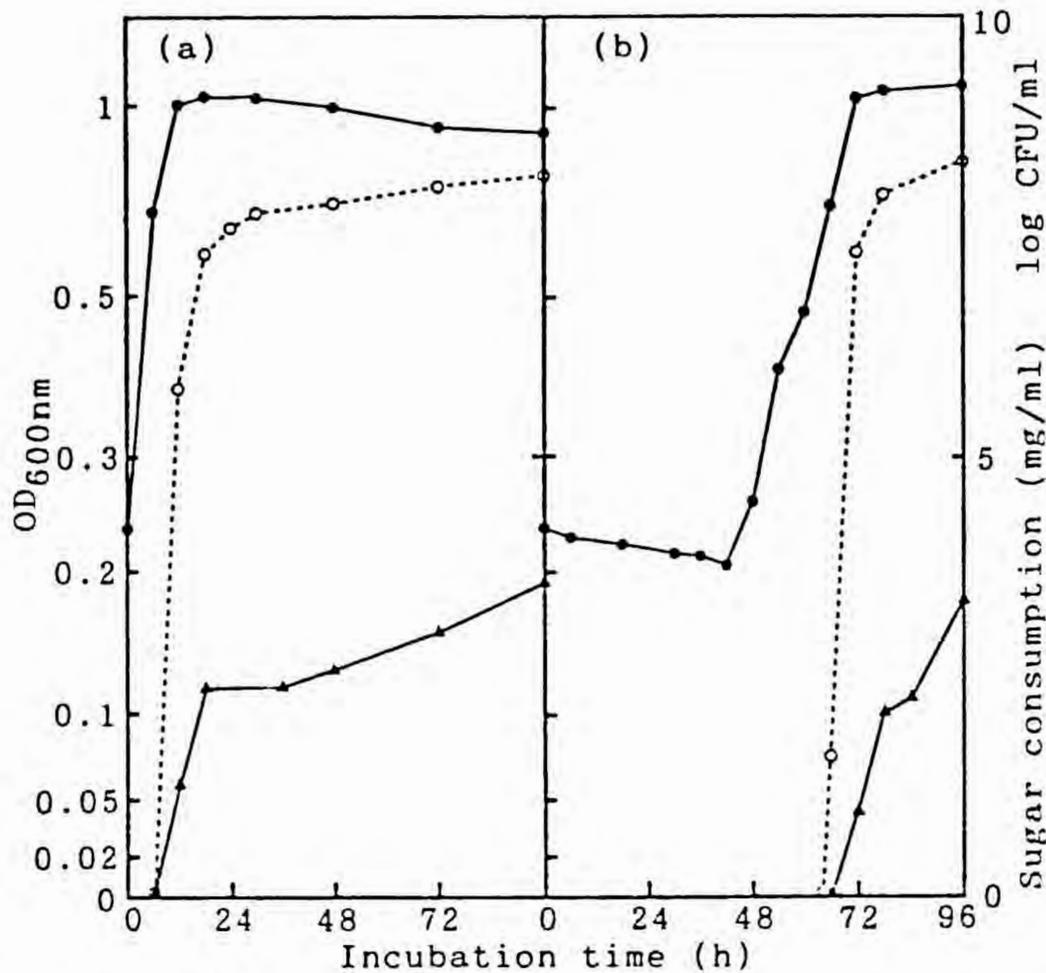


Fig.1-15 Effects of mustard on colony counts of *E. coli* and its sugar consumption in the medium containing (a) 2.8% ethanol and (b) 0.8% mustard. •, OD_{600nm}; ◦, log CFU/ml; ▲, sugar consumption.

以上の実験より、各々の菌の誘導期の長さの対数と培地中のマスタードや AIT の濃度の対数には比例関係が成立することがわかった。これより、次式(1)が導かれる。

$$\log Y = a + b \log X \quad (1)$$

ここで、Yは誘導期の長さ(h)、Xはマスタード(%)またはAIT(ppm)の培地中濃度である。また、aとbは各菌ごとの特異的な定数である。柳田⁷⁴⁾はもまた同様の式を示している。Table 1-3は各菌に対するマスタードとAITについてのa、bの値と相関係数を示す。相関係数は常に0.980以上で有意であった。この式を用いて6種の菌の生育を24時間阻止するのに必要なマスタード及びAIT濃度を計算し、Table 1-4に示した。*Ps. fragi*はマスタード及びAITの双方に対して最も強い感受性を持っている。一方、*E. coli*と*S. aureus*が他の菌より抵抗力を有している。また、この値をTable 1-2の結果と比較すると、Table 1-4の値の方がずっと低い。これは実験条件(接種菌数、培養方法の違いなど)の違いによるであろうが、菌種間の感受性の差は比較的類似している。江崎ら⁷⁵⁾はAITは*E.*

*E. coli*と*S. aureus*に対し、同レベルの阻害効果を示すと述べており、今回の結果と一致している。反対に、Shelefら³⁰⁾はグラム陽性菌がセージ、ローズマリー、オールスパイスに対してグラム陰性菌より感受性が強く、その中でも*S. aureus*のうちのコアギュラーゼ陽性菌が、特に感受性が強いと報告している。また、Farag⁴²⁾もグラム陽性菌の方が感受性が強いこと、*E. coli*は陰性菌の中でも感受性が強い方だと述べているが、AITやマスタードにはこのことは当てはまらない。ここでAITとそれと等濃度AITを含むマスタードの増殖阻害効果を比較すると、*S. aureus*、*E. coli*、*Pro. vulgaris*、*B. cereus*に対してはAITよりマスタードのほうが効果が大きであり、*Ps. aeruginosa*に対してはAITのほうが効果が大き、*Ps. fragi*においてはマスタードとAITの効果はほぼ一致することはこの表からも確かめられた。Faragら^{29, 42)}は数種の香辛料の精油の主成分のMICが数種のカビ、細菌、酵母に対して精油のMICと等しいと報告している。小嶋ら⁶⁴⁾や亀岡ら⁶³⁾はマスタードは、主なisothiocyanate類はAITで、その他、僅かであるが数種のisothiocyanate類を含んでいると報告し、江崎ら⁷⁵⁾やFoter³⁹⁾はこれらのisothiocyanate類のいくつかは抗微生物作用を有すると述べている。今回の結果と文献より、マスタード中の他のisothiocyanate類の含量がかなり少量であり、AITがマスタードの阻害効果の大部分を占めていると考えられる。

Table 1-3 Values of a, b and correlation coefficients and applicable concentration ranges of mustard and AIT for each bacterium in the equation (1).

	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>Pro.</i> <i>vulgaris</i>	<i>Ps.</i> <i>fragi</i>	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>
Mustard						
a	1.858	1.862	2.074	1.991	1.964	1.983
b	0.555	0.490	0.580	0.448	0.556	0.515
r*	0.995	0.990	0.995	0.981	0.992	0.980
range(%)	0.1-0.8	0.1-0.8	0.05-0.4	0.025-0.175	0.05-0.3	0.05-0.4
AIT						
a	0.785	0.817	0.888	1.151	0.872	0.697
b	0.512	0.516	0.605	0.411	0.594	0.671
r*	0.993	0.993	0.991	0.986	0.997	0.983
range(ppm)	9-72	9-72	4.5-36	2.3-15.8	4.5-27	4.5-36

* p<0.01

Table 1-4 Concentrations of mustard and AIT required to inhibit the growth of bacteria for 24 h in shaking culture.

	Mustard (%)	AIT (ppm)
<i>S. aureus</i>	0.138 (12.4) ^a	14.5
<i>E. coli</i>	0.104 (9.4)	12.3
<i>Pro. vulgaris</i>	0.064 (5.8)	6.5
<i>Ps. fragi</i>	0.043 (3.9)	3.6
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.089 (8.0)	7.2
<i>B. cereus</i>	0.068 (6.1)	10.4

a; AIT concentration (ppm) contained in the mustard.

3-2-2. 粉ワサビ・カラシ粉の抗菌性

3-2-2-a. *S. aureus*に対する抗菌性

S. aureus に対するこれらの香辛料の抗菌性を Fig.1-16の増殖曲線で示した。(a)は粉ワサビまたはそれに対応する濃度のAITを添加したものである。(b)は同様にカラシ粉またはAITを添加したものである。粉ワサビでは添加量に応じて誘導期が延長され、0.1%添加で24時間(図には示さなかった)、0.4%で57時間となり、0.8%では4日間生育は見られなかった。AITの場合も同様の傾向があったが、誘導期の延長は粉ワサビに比べてかなり小さく、粉ワサビ0.4%に相当するAIT26ppmで34時間、0.8%に相当するAIT52ppmでも47時間の誘導期であり、粉ワサビとAITの差は濃度に応じて開いた。

一方、カラシ粉添加でも同様の傾向があったが、粉ワサビより阻害力は小さく0.8%添加でも69時間の誘導期の後、コントロールと同程度に増殖した。同一濃度のAITと比較すると粉ワサビとAITの差ほどではないが、AITに比べカラシ粉の阻害力は大きであった。粉ワサビの阻害力がAITに比べかなり大きいことよりAIT以外の成分が明らかに阻害に関与していると示唆される。

3-2-2-b. *E. coli*に対する抗菌性

Fig.1-17に*E. coli*について検討した結果を示した。粉ワサビ、カラシ粉添加ではやはり添加量に応じて誘導期の延長が見られ、また、それに相当するAIT添加でも同様の傾向が見られたが、その差は小さかった。*S. aureus*と同様にAIT以外の成分が阻害に関与しているが、その度合は低いものと思われた。また、AIT添加では定常期における濁度の低下が見られ、これは溶媒に用いたエタノールの

影響が大きいと考えられる。逆に粉ワサビ、カラシ粉ではこの低下が見られず、エタノールの効果を打ち消す因子があると考えられる。なお、Fig.1-8に示したブラウンマスタードの場合は低下があり、マスタードには打ち消す因子が無いと思われる。

3-2-2-c. Pro. vulgarisに対する抗菌性

Pro. vulgarisについて検討した結果をFig.1-18に示した。この菌の増殖に対する阻害力は強く、粉ワサビの場合0.2%で47時間、0.3%で60時間（図には示していない）、カラシ粉の場合0.2%で50時間、0.4%で72時間増殖を抑制し、それ以上の濃度では4日間生育が見られなかった。また、AIT添加の場合、粉ワサビ0.4%に相当する26ppmでは54時間増殖を抑制した。図示していないが0.6%に相当する39ppmでも80時間後に生育が見られた。同一濃度のAITと粉ワサビを比較すると粉ワサビの方が阻害力がかなり大きく、AIT以外の成分が阻害に明らかに参与していることがわかった。カラシ粉とAITにおいても粉ワサビ程ではないが同様の傾向があった。

また、粉ワサビ、カラシ粉、のいずれの添加時にも定常期における濁度の低下が少々見られるが、これはエタノールの影響もあると思われる。

3-2-2-d. Ps. fragiに対する抗菌性

Ps. fragiに対する粉ワサビ、カラシ粉の阻害力は Fig.1-19に示すように他の菌に対する場合よりも大きかった。特にカラシ粉の阻害力が大きく、0.2%でも72時間増殖を阻止した。また、同一濃度のAITと比較すると、カラシ粉の場合はAITに比べ誘導期の延長は大きく、濃度に応じてその差は増加し、AIT以外の成分が阻害に明かに参与していることがわかる。逆に粉ワサビの場合は粉ワサビ0.3%で52時間、それに対応するAIT 19.5ppmで59時間増殖を抑制し、むしろAITの方が幾分誘導期の延長が大きく、この場合、AITの阻害力を打ち消す因子があるかとも思われる。

3-2-2-e. Ps. aeruginosaに対する抗菌性

Ps. aeruginosaに対しても、粉ワサビ、カラシ粉のいずれを添加した時にも Fig.1-20に示すように濃度に応じた誘導期の延長が見られたが、同一濃度のAITと香辛料の誘導期の差はあまり無く、AITが抗菌作用の大部分を占めていると思われる。

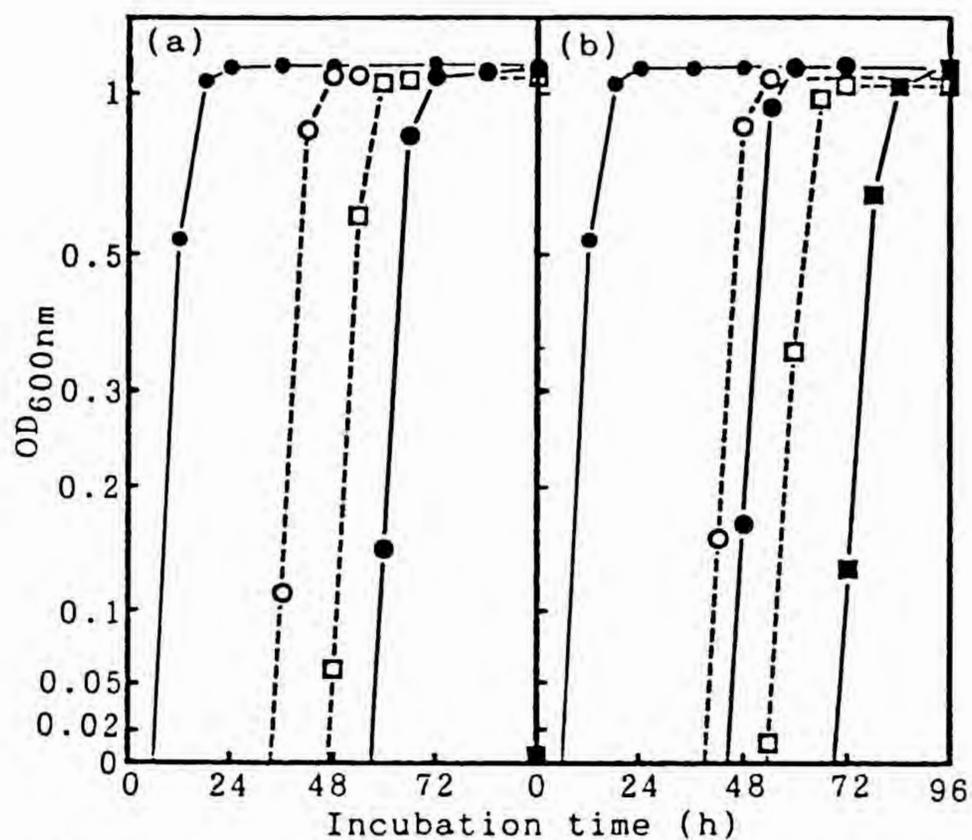


Fig.1-16 Effects of spices or AIT on the growth of *S. aureus*. ●, control; (a) ●, kona-wasabi 0.4%; ■, 0.8%; ○, AIT 26ppm; □, 52ppm; (b) ●, karashi-ko 0.4%; ■, 0.8%; ○, AIT 36ppm; □, 72ppm.

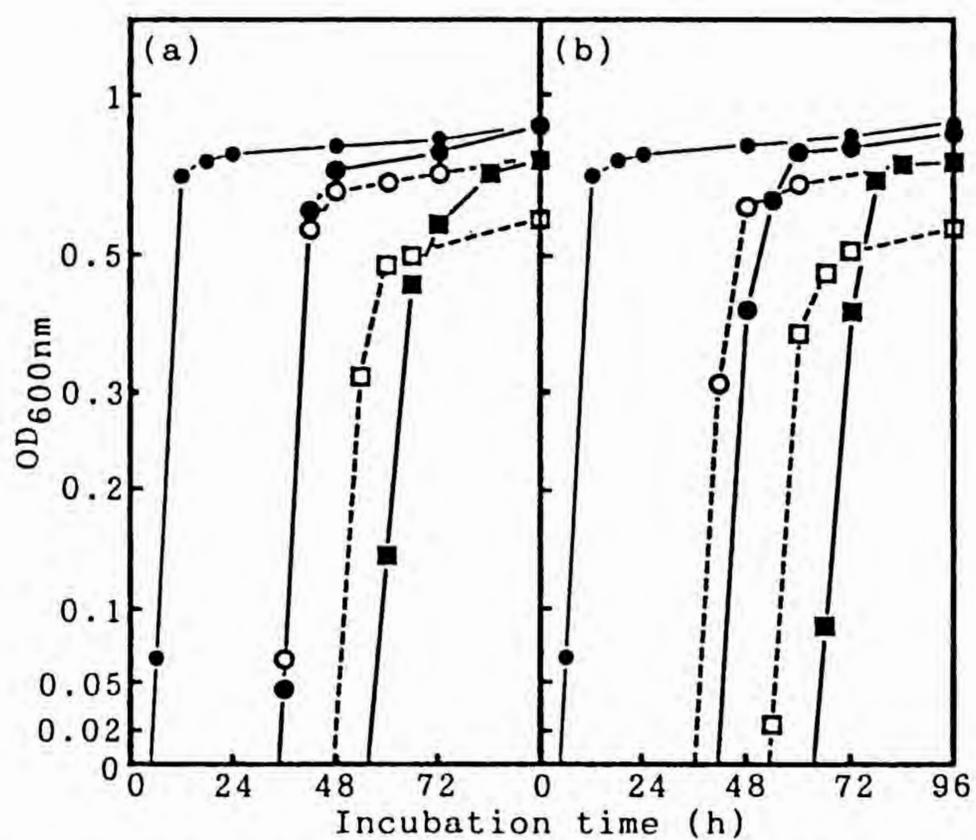


Fig.1-17 Effects of spices and AIT on the growth of *E. coli*. ●, control; (a) ●, kona-wasabi 0.4%; ■, 0.8%; ○, AIT 26ppm; □, 52ppm; (b) ●, karashi-ko 0.4%; ■, 0.8%; ○, AIT 36ppm; □, 72ppm.

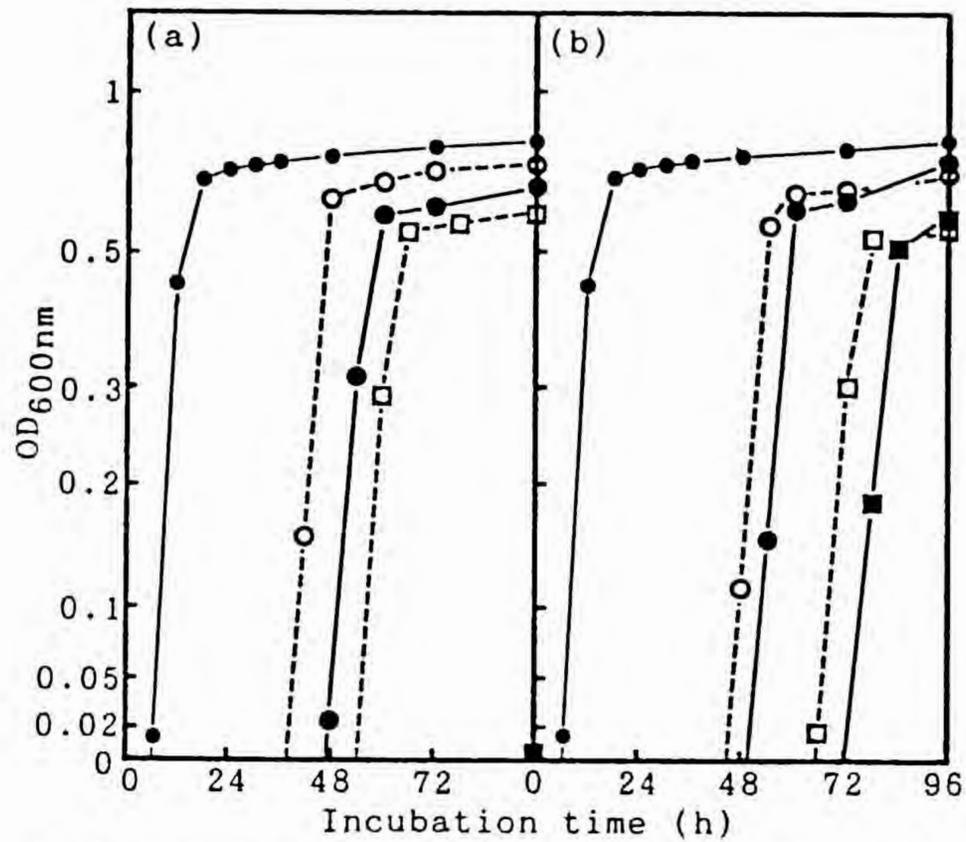


Fig.1-18 Effects of spices and AIT on the growth of *Pro. vulgaris*. ●, control; (a) ●, kona-wasabi 0.2%; ■, 0.4%; ○, AIT 13ppm; □, 26ppm; (b) ●, karashi-ko 0.2%; ■, 0.4%; ○, AIT 18ppm; □, 36ppm.

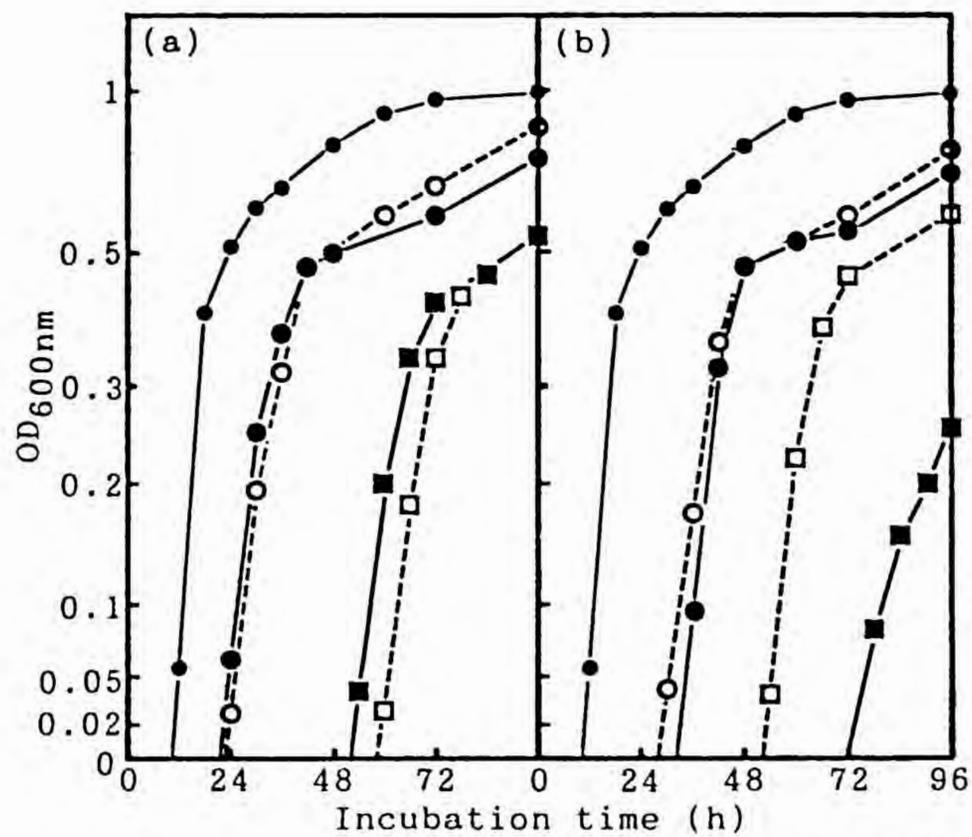


Fig.1-19 Effect of spices and AIT on the growth of *Ps. fragi*. ●, control; (a) ●, kona-wasabi 0.1%; ■, 0.3%; ○, AIT 6.5ppm; □, 19.5ppm; (b) ●, karashi-ko 0.1%; ■, 0.2%; ○, AIT 9ppm; □, 18ppm.

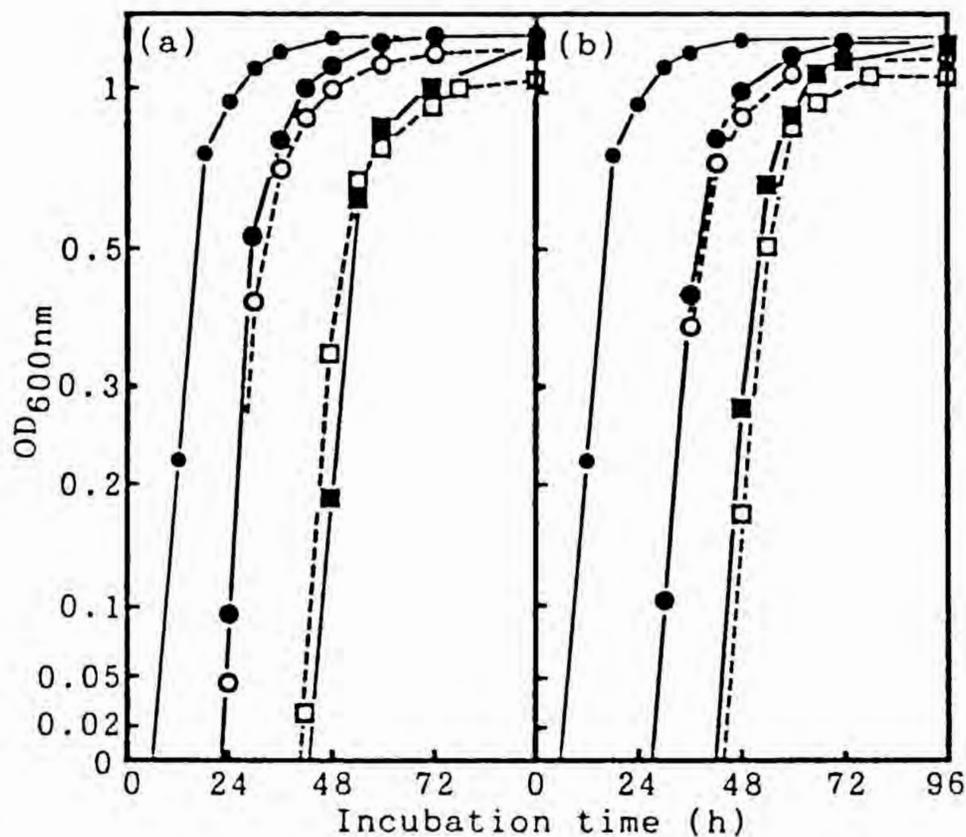


Fig.1-20 Effect of spices and AIT on the growth of *Ps. aeruginosa*. ●, control; (a) ●, kona-wasabi 0.2%; ■, 0.4%; ○, AIT 13ppm; □, 26ppm; (b) ●, karashi-ko 0.2%; ■, 0.3%; ○, AIT 18ppm; □, 27ppm.

以上の実験においてもマスタードと同様の式が成立し、相関係数は0.98以上でいずれも有意であった。Table 1-5に菌ごとに各香辛料を用いた時のa、bとそれぞれの相関係数を示した。これよりTable 1-6に24時間増殖を阻止するのに必要な培地中濃度(%)と()内にそれに含まれるAIT量を示した。なお、参考までにTable 1-4に示したAITの必要量を示した。カラシ粉は5種の菌のうちでは

Table 1-5 Values of a, b and correlation coefficients and applicable concentration ranges of kona-wasabi and karashi-ko for each bacterium in the equation (1).

	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>Pro.</i> <i>vulgaris</i>	<i>Ps.</i> <i>fragi</i>	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i>
Kona-wasabi					
a	2.047	1.841	2.117	2.165	2.012
b	0.643	0.761	0.645	0.826	0.957
r*	0.980	0.996	0.998	0.995	0.998
range(%)	0.1-0.8	0.1-0.8	0.1-0.3	0.1-0.3	0.1-0.4
Karashi-ko					
a	1.878	1.867	2.098	2.653	2.061
b	0.563	0.601	0.573	1.139	0.865
r*	0.994	0.997	0.985	0.999	0.989
range(%)	0.1-0.8	0.1-0.8	0.1-0.4	0.1-0.2	0.1-0.3

* p<0.01

Table 1-6 Concentrations of kona-wasabi and karashi-ko required to inhibit the growth of bacteria for 24 h in shaking culture.

	Kona-wasabi (%)	Karashi-ko (%)	AIT (ppm)
<i>S. aureus</i>	0.092 (6.0) ^a	0.130 (11.7)	14.5 ^b
<i>E. coli</i>	0.248 (16.1)	0.155 (14.0)	12.3
<i>Pro. vulgaris</i>	0.072 (4.7)	0.056 (5.0)	6.5
<i>Ps. fragi</i>	0.112 (7.3)	0.076 (6.8)	3.6
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.219 (14.2)	0.163 (14.7)	7.2

a; AIT concentration (ppm) contained in each spice.

b; reference from Table 1-4

*Pro. vulgaris*と*Ps. fragi*を最も強く阻害し、粉ワサビはこの2種の菌に加えて*S. aureus*も強く阻害した。また、粉ワサビとカラシ粉を比較すると、一般にはAIT量で10-20%の差であったが、*S. aureus*に対しては、粉ワサビの方が明らかに少量で有効であり、粉ワサビ中に本菌の増殖を強く阻害するAIT以外の成分の存在が考えられる。ホースラディッシュにはAITの他に3-butenyl isothiocyanateとβ-phenethyl isothiocyanateが少量含まれており⁶⁴⁾、黒カラシの場合は1-2-3で先に述べた通りである。これらisothiocyanate類の抗菌作用は比較的類似していること⁷⁵⁾、マスタードより粉ワサビ、カラシ粉の方がAITの阻害との差が大きいことなどから、粉ワサビ、カラシ粉の阻害に関与するAIT以外の成分としてはisothiocyanate類以外の未知成分も考えられる。

第4節 小括

1. ブラウンマスタード、粉ワサビおよびカラシ粉の辛味成分の主成分であるallyl isothiocyanate(AIT)と、シナモン中の主要芳香成分のcinamaldehyde(CA)ならびにクローブの芳香性主成分のeugenol(EU)を逆相HPLCで分離、定量した。マスタードは粉碎して脱脂後ミロシナーゼ作用させ、シナモン、クローブは粉碎していずれも70%エタノールで抽出し、SEP-PAK C₁₈カートリッジで前処理し、日立ゲル#3011-Oカラムを用いた逆相HPLCで移動相にメタノールを流速1.00 ml/分で用い、波長190~400nmで走査した。(1)AITは最大吸収波長245nm、RT2.39分をもつピークとして分離された。全過程のAITの回収率は96.5%であった。マスタードのエタノール抽出液(20% w/v)中AIT含量は1.808±0.019mg/mlで、脱脂

マスタード中含量は $9.040 \pm 0.095 \text{ mg/g}$ であった。粉ワサビ抽出液中のAIT含量は $1.261 \pm 0.065 \text{ mg/ml}$ ($n=6$)で、粉ワサビに換算すると $6.305 \pm 0.325 \text{ mg/g}$ であった。カラシ粉抽出液中のAIT含量は $1.803 \pm 0.154 \text{ mg/ml}$ ($n=6$)で、カラシ粉に換算すると $9.015 \pm 0.770 \text{ mg/g}$ であった。(2)CAは最大吸収波長 286 nm 、RT 2.80 分のピークとして分離された。全過程のCAの回収率は 98.5% であった。シナモン抽出液中のCA含量は $6.810 \pm 0.014 \text{ mg/ml}$ ($n=5$)で、シナモンに換算すると $34.05 \pm 0.07 \text{ mg/g}$ であった。(3)EUは最大吸収波長 282 nm 、RT 2.54 分のピークとして分離された。クローブ抽出液中のEU含量は $30.15 \pm 1.24 \text{ mg/ml}$ ($n=5$)で、クローブに換算すると $150.8 \pm 6.2 \text{ mg/g}$ であった。

2. ブラウンマスタード、シナモンおよびクローブとその精油主成分についてブイヨン培地を用いて 30°C 、平板培養法で7種の菌について抗菌性を検討した。香料はエタノール抽出液を、また、精油は 70% エタノールに溶解して用いた。クローブがどの菌に対してもかなりの阻害効果があった。次いでシナモンの効果が強かった。精油を比較すると3種のうちAITが最も抗菌力が大だった。

3. ブラウンマスタードとAITについて6種の細菌に対する増殖阻害作用を検討し、両者の阻害作用の関係をも検討した。マスタードは 70% エタノールで抽出し、上清を 20% マスタード抽出液とした。AITは 70% エタノールに溶解し、抽出液中のAITと等濃度になるように調整した。細菌は抽出液またはAITを添加したブイヨン培地で 30°C 、振盪培養した。マスタード、AIT共に濃度に応じて誘導期を延長し、場合によっては定常期の濁度を低下させた。増殖を24時間阻止する濃度は、*S. aureus*はマスタード 0.138% 、AIT 14.5 ppm 、*E. coli*はマスタード 0.104% 、AIT 12.3 ppm 、*Pro. vulgaris*はマスタード 0.064% 、AIT 6.5 ppm 、*Ps. fragi*はマスタード 0.043% 、AIT 3.6 ppm 、*Ps. aeruginosa*はマスタード 0.089% 、AIT 7.2 ppm 、*B. cereus*はマスタード 0.068% 、AIT 10.4 ppm であった。また、マスタードの阻害はほとんどそれに含まれるAITの作用によるものと示唆された。なお、マスタードは*E. coli*と*S. aureus*に対しては 0.8% で静菌的であったが、*Ps. aeruginosa*に対しては 0.2% でも殺菌的であった。

また、同様に粉ワサビ、カラシ粉についても検討した。マスタードと同様に濃

度に応じて誘導期を延長し、場合によって定常期の濁度を低下させた。増殖を24時間阻止する濃度は、S. aureusは粉ワサビ0.092%、カラシ粉0.130%、E. coliは粉ワサビ0.248%、カラシ粉0.155%、Pro. vulgarisは粉ワサビ0.072%、カラシ粉0.056%、Ps. fragiは粉ワサビ0.112%、カラシ粉0.076%、Ps. aeruginosaは粉ワサビ0.219%、カラシ粉0.163%であった。また、これら2者の阻害に対するAITの関与は、粉ワサビの場合、特にS. aureusとPro. vulgarisに対して、カラシ粉の場合、特にPs. fragiに対して抽出液中のAIT以外の成分が関与していると思われ、その他に対してはAITが占める割合が大と考えられた。

第2章 ブラウンマスタードおよび粉ワサビと数種化合物併用による 細菌増殖阻害

数種の香辛料とその主要精油成分が抗菌作用を持つことを1章で確認した。しかし、単独で食品に添加して防腐効果を期待するには培地に添加した場合よりかなり多量に添加する必要があるとされている³¹⁾。その結果、刺激性が強くなりすぎて官能的に耐えにくいことが考えられる。

そこで、2章では食品への応用を可能にするための基礎として基礎培地でのブラウンマスタードあるいは粉ワサビと他の成分との併用効果を検討した。他の成分としては水分活性(A_w)低下作用のある食塩⁷⁶⁾とグリセリン⁷⁷⁾、それ自身抗菌作用のあることが知られている天然物としてグリシン^{6,7)}、乳酸および酢酸⁷⁸⁻⁸⁴⁾を用いた。

第1節ではマスタードと他の成分との併用効果を検討し、第2節では粉ワサビの場合を検討した。

第1節 ブラウンマスタードと数種化合物併用による細菌増殖阻害

グリセリン、グリシン、乳酸あるいは酢酸のうち1種に食塩を組み合わせた培地にマスタードを添加して細菌の増殖阻害を検討し、2種あるいは3種併用による相加・相乗効果を検討した。

1-1. 材料と実験方法

1-1-1. マスタード抽出液

第1章と同様に70%エタノールで抽出し、20%抽出液とした。

1-1-2. 使用菌株

E. coli IFO 3301, *S. aureus* IFO 3761, *Ps. aeruginosa* IFO 3755を用い、第1章第3節と同様にした。

1-1-3. 接種菌

1章と同様に前培養し、0.9% NaClで100倍希釈して接種菌(5×10⁶CFU/ml)とした。

1-1-4. 培養

魚肉エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、pH 7.0の培地にグリセリン、グリシン、乳酸または酢酸のどれか1種と食塩0,1,2,3%を組み合わせて添加し、再度pH 7.0に調整し、第1章第3節と同様に分注し、121°C、15分オートクレーブした。これにマスタード抽出液を無菌的に添加して培地5 mlにし、これらの培地に接種菌を 5×10^4 /mlとなるように接種し、30°Cで静置培養した。増殖は波長600nmのODを測定して示した。

1-2. 結果

1-2-1. グリシンの影響

培地にグリシンまたはグリセリンと食塩を添加し、オートクレーブした後のAwとpHをTable 2-1に示す。Fig.2-1に*E. coli*に対するグリシンと食塩とマ

Table 2-1 Water activity (Aw) and pH of media containing glycine or glycerol and sodium chloride after the autoclaving (121°C, 15min).

NaCl (%)	0		1		2		3	
	Aw	pH	Aw	pH	Aw	pH	Aw	pH
	0.999	6.79	0.997	6.79	0.993	6.78	0.987	6.77
Glycine 1 %	0.999	6.72	0.993	6.71	0.982	6.70	0.978	6.64
2	0.993	6.65	0.988	6.64	0.979	6.61	0.974	6.53
4	0.983	6.49	0.981	6.49	0.973	6.44	0.964	6.35
Glycerol 5 %	0.989	6.75	0.984	6.70	0.974	6.70	0.967	6.70
10	0.975	6.70	0.967	6.70	0.956	6.68	0.951	6.68

スタード抽出液の併用による増殖阻害効果を示した。食塩2%単独では増殖阻害はみられず、グリシン1%単独では定常期における濁度の低下のみみられた。マスタード0.2%単独では1日増殖を阻止した。しかし、これらのうちの2種を併用しても併用効果はなかった。かえってグリシンに食塩を併用するとグリシンによる定常期の濁度の低下が阻止された。これら3種を併用すると2日生育阻止し、相加効果があった。また、3種成分添加時の増殖開始までの日数をTable 2-2に示した。グリシン1%と食塩3%の併用、グリシン2%と他の成分との2種併用では4日以上生育がみられず、かなりの相乗効果がみられた。また、*S. aureus* に対しては、マスタード0.4%と食塩1~3%あるいはグリシン4%との2種、

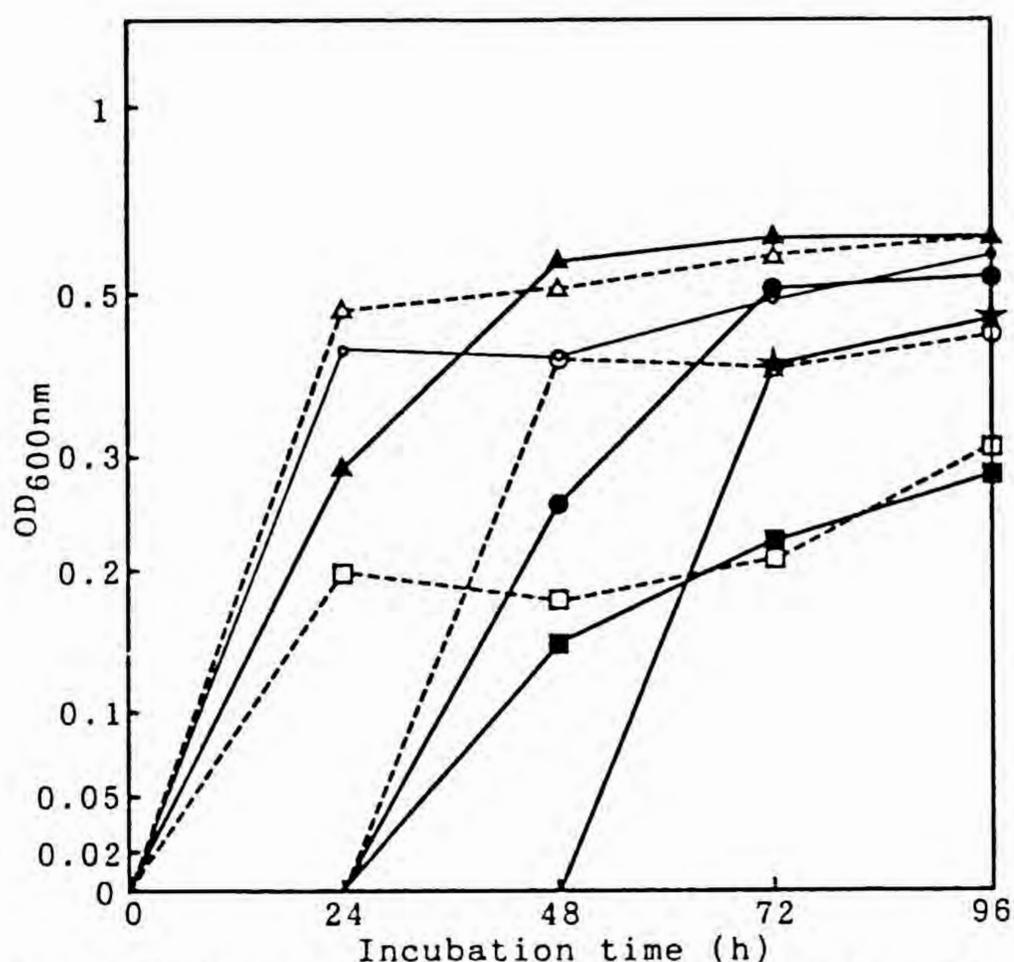


Fig.2-1 Combined effect of glycine, sodium chloride and mustard on the growth of *E. coli*. ●, control; Δ, NaCl 2%; ○, mustard 0.2%; □, glycine 1%; ▲, NaCl 2% + glycine 1%; ●, mustard 0.2% + NaCl 2%; ■, glycine 1% + mustard 0.2%; ★, mustard 0.2% + glycine 1% + NaCl 2%.

グリシン4%と食塩2, 3%との2種併用で相乗効果がみられた。なお、グリシン4%添加時では Table 2-1に示すようにpHが若干低下しており、このpHの低下の影響も考えられる。*Ps. aeruginosa*に対してはグリシン2%と食塩3%との2種併用で相乗効果があった。

1-2-2. グリセリンの影響

Ps. aeruginosa に対するグリセリンとの併用による増殖阻害効果をFig.2-2に示した。マスタード0.2%単独で1日増殖を阻止し、グリセリン10%単独、食塩2%単独では阻止はしなかったが、増殖速度もしくは定常期の濁度を低下した。2種併用では相乗効果があり、特にグリセリン10%とマスタード0.2%の併用で3日増殖阻止がみられた。3種併用ではあまり効果はなかった。Table 2-2より、この菌に対して特にマスタードと食塩との2種併用でかなりの相乗効果がみられた。また、*E. coli*でグリセリン10%と食塩3%とマスタード0.2, 0.4%での3種併用で効果あり、*S. aureus*には特に併用効果はなかった。

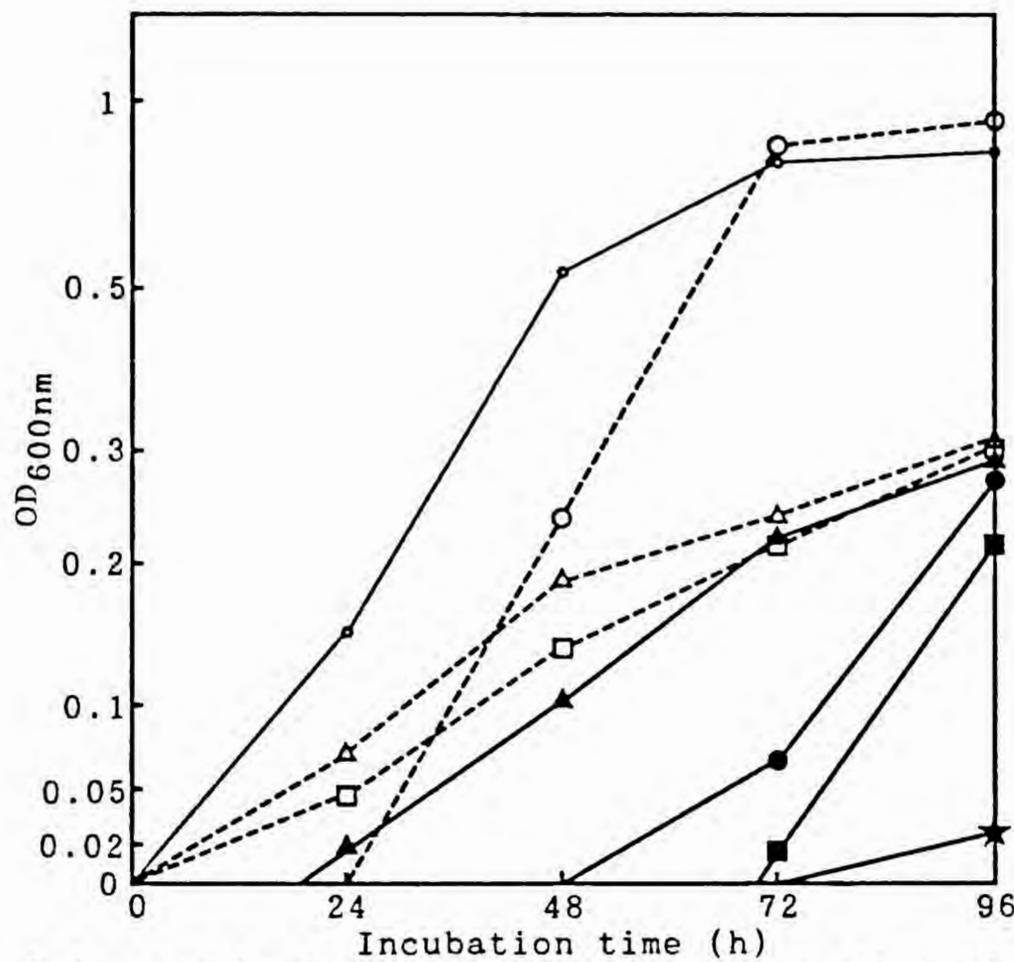


Fig.2-2 Combined effect of glycerol, sodium chloride and mustard on the growth of *Ps. aeruginosa*. ○, control; △, NaCl 2%; ○, mustard 0.2%; □, glycerol 10%; ▲, NaCl 2% + glycerol 10%; ●, mustard 0.2% + NaCl 2%; ■, glycerol 10% + mustard 0.2%; ★, mustard 0.2% + glycerol 10% + NaCl 2%.

1-2-3. 乳酸の影響

培地に乳酸または酢酸と食塩を加え、オートクレーブした後のpHを Table 2-3に示す。乳酸との併用による *S. aureus* に対する増殖阻害効果を Fig.2-3に示

Table 2-3 pH of media containing lactic acid or acetic acid and sodium chloride after the autoclaving (121°C, 15min).

NaCl (%)		0	1	2	3
0		6.79	6.79	6.78	6.78
Lactic acid	0.25 %	6.64	6.61	6.60	6.58
	0.5	6.41	6.40	6.37	6.37
Acetic acid	0.2 %	6.79	6.77	6.77	6.76
	0.25	6.79	6.77	6.75	6.74
	0.3	6.75	6.75	6.74	6.74
	0.5	6.75	6.75	6.74	6.74

した。マスタード0.2%単独では1日増殖を阻止した。食塩2%単独では阻害はなく、乳酸0.5%単独では定常期の濁度が低下した。マスタード0.2%と乳酸0.5%あるいは食塩2%との2種併用で1日増殖を阻止したが、併用効果はなかった。

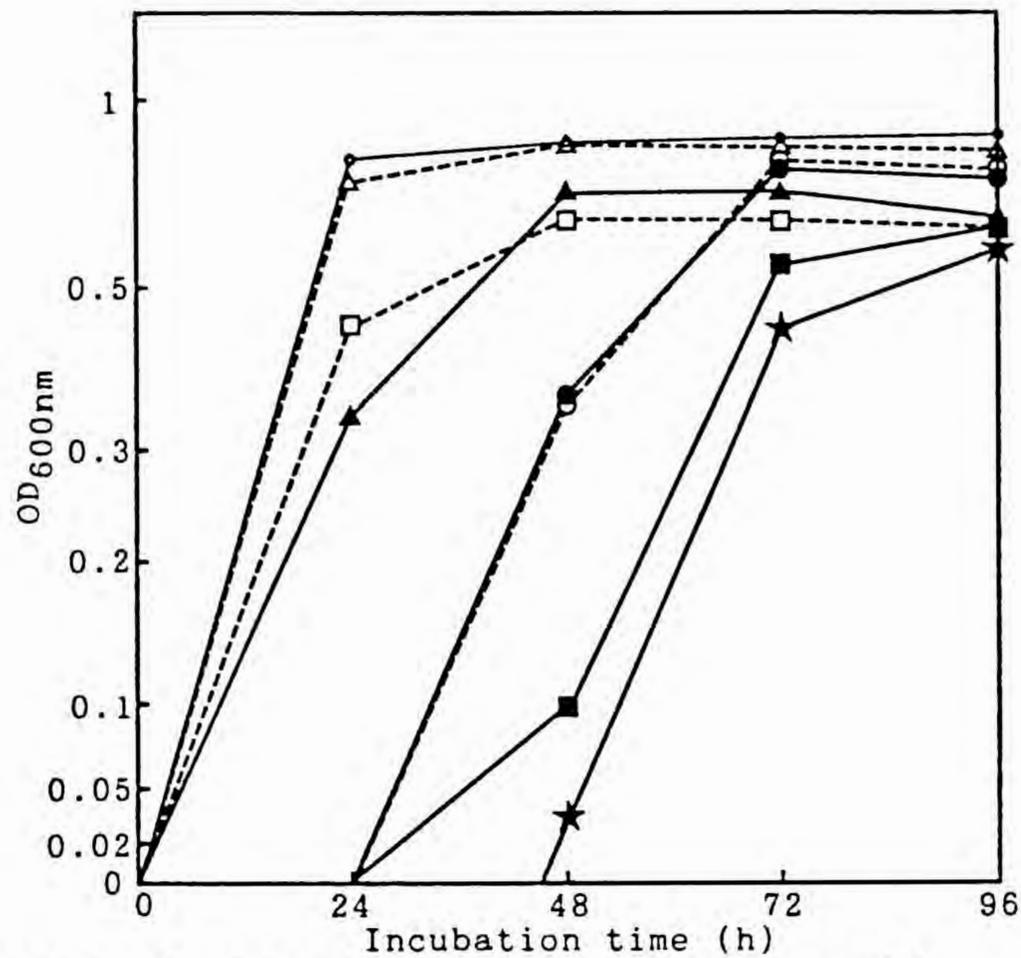


Fig.2-3 Combined effect of lactic acid, sodium chloride and mustard on the growth of *S. aureus*. ○, control; △, NaCl 2%; ○, mustard 0.2%; □, lactic acid 0.5%; ▲, NaCl 2% + lactic acid 0.5%; ●, mustard 0.2% + NaCl 2%; ■, lactic acid 0.5% + mustard 0.2%; ★, mustard 0.2% + lactic acid 0.5% + NaCl 2%.

3種併用では2日阻止し、相加効果がみられた。Table 2-2より、さらにこの菌では乳酸0.25、0.5%とマスタード0.4%との2種併用で相乗効果があり、乳酸とマスタード0.2%と食塩3%との3種併用で相加効果があった。また、*E. coli*では乳酸0.5%とマスタード0.4%と食塩3%との3種併用でかなりの相乗効果があり、乳酸0.25、0.5%とマスタード0.2%と食塩2、3%との3種併用で相加効果があった。*Ps. aeruginosa*では3種併用でかなりの相加・相乗効果があった。乳酸の阻害効果にはTable 2-3に示すようにpHが0.4程度低下しており、乳酸自身の効果のほかにpHの影響も考えられる。

1-2-4. 酢酸の影響

酢酸との併用による*Ps. aeruginosa*に対する増殖阻害作用をFig.2-4に示した。酢酸0.3%単独で増殖を1日阻止し、定常期の濁度が低下した。酢酸0.3%とマスタード0.2%との2種併用で相加効果があった。この3種併用では併用効果があった。Table 2-2より、さらにこの菌に対しては酢酸0.2%とマスタード0.2%の2種併用、酢酸0.3%とマスタード0.4%との2種併用で相乗効果があった。*E. coli*では酢酸1%と食塩3%とマスタード0.2、0.4%との3種併用で併用効果が

あった。 *S. aureus*では酢酸1%とマスタード0.4%との2種併用で相乗効果があった。

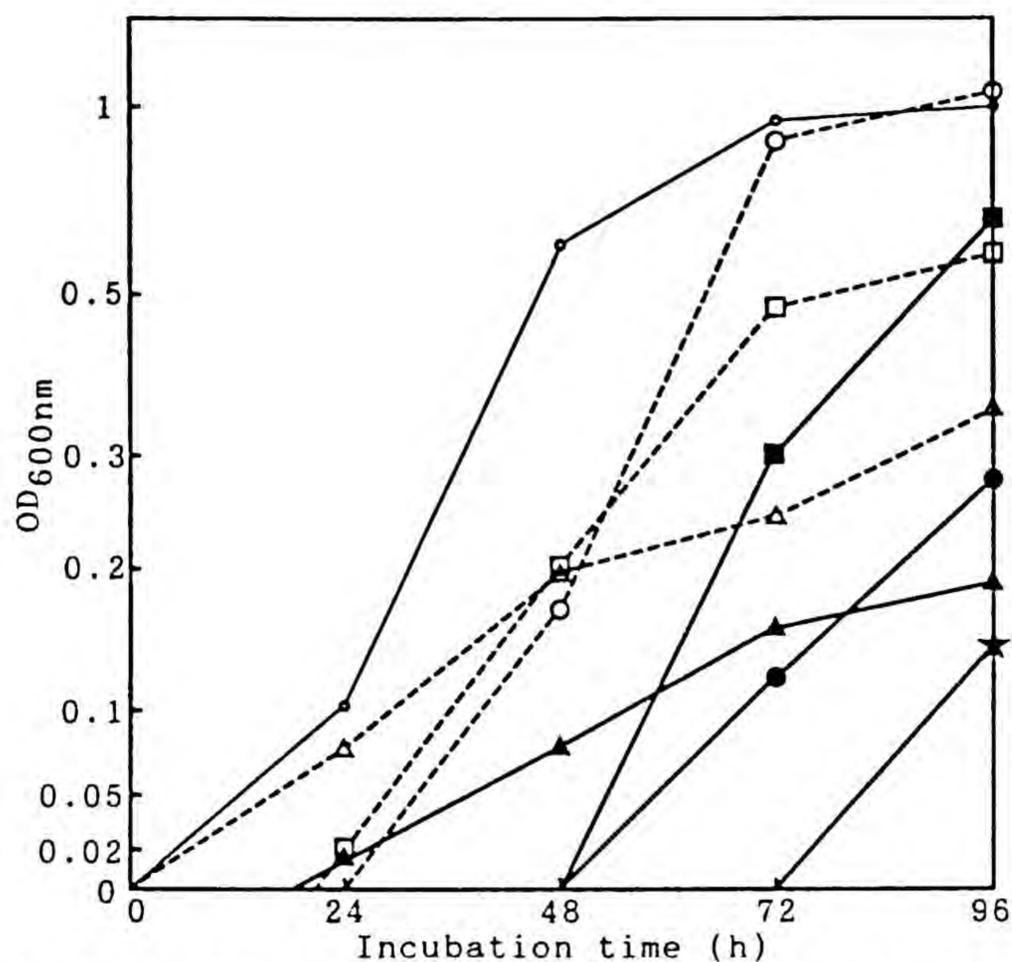


Fig.2-4 Combined effect of acetic acid, sodium chloride and mustard on the growth of *Ps. aeruginosa*.
 ○, control; △, NaCl 2%; ○, mustard 0.2%; □, acetic acid 0.3%; ▲, NaCl 2% + acetic acid 0.3%; ●, mustard 0.2% + NaCl 2%; ■, acetic acid 0.3% + mustard 0.2%; ★, mustard 0.2% + acetic acid 0.3% + NaCl 2%.

第2節 粉ワサビと数種化合物併用による細菌増殖阻害

次に同様に粉ワサビとの併用効果を検討した。

2-1. 材料と実験方法

粉ワサビは第1章と同様に20%抽出液にして使用し、後は第1節と同様の方法で行った。

2-2. 結果

2-2-1. グリシンの影響

Fig.2-5に *E. coli* に対するグリシンと食塩と粉ワサビ抽出液の併用による増殖阻害効果を示した。粉ワサビ0.4%単独では1日増殖を阻害した。粉ワサビ0.4%

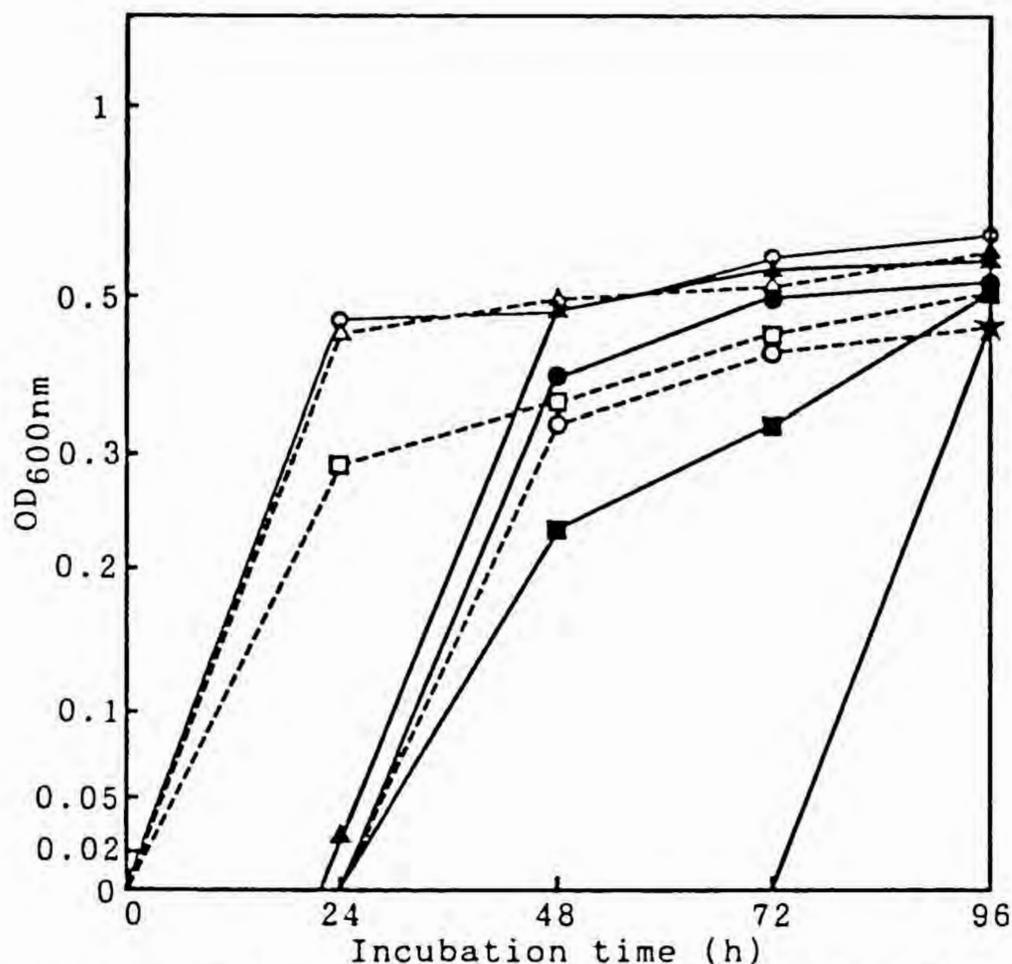


Fig.2-5 Combined effect of glycine, sodium chloride and kona-wasabi on the growth of *E. coli*. ○, control; △, NaCl 2%; ○, kona-wasabi 0.4%; □, glycine 1%; ▲, NaCl 2% + glycine 1%; ●, kona-wasabi 0.4% + NaCl 2%; ■, glycine 1% + kona-wasabi 0.4%; ★, kona-wasabi 0.4% + glycine 1% + NaCl 2%.

と食塩2%との2種併用では併用効果はなかったが、グリシン1%との2種併用では増殖速度が低下した。粉ワサビ0.4%と食塩2%とグリシン1%との3種併用では相加効果があった。また、Table 2-2より、この菌に対しては、グリシン2%と粉ワサビ0.2、0.4%とを併用すると4日以上生育がみられず、かなりの相乗効果がみられた。*S. aureus*に対しては、グリシンとの2種、3種の併用効果はなかった。*Ps. aeruginosa*に対してはグリシン2%と粉ワサビ0.2%との2種併用、粉ワサビ0.2、0.4%と食塩1、2、3%との2種併用で相乗効果があった。さらに粉ワサビ0.4%と食塩3%とグリシン2%の3種併用で併用効果があった。

2-2-2. グリセリンの影響

Ps. aeruginosa に対するグリセリンとの併用による増殖阻害効果をFig.2-6に示した。粉ワサビ0.4%単独では1日増殖が阻害された。粉ワサビ0.4%と食塩2%あるいはグリセリン10%との2種併用で相乗効果があった。さらに粉ワサビ0.4%と食塩2%とグリセリン10%との3種併用で併用効果があった。Table 2-2より、この菌に対しては粉ワサビと食塩との2種併用でかなりの相乗効果があった。粉ワサビ0.4%とグリセリン5%と食塩3%との3種併用で併用効果があっ

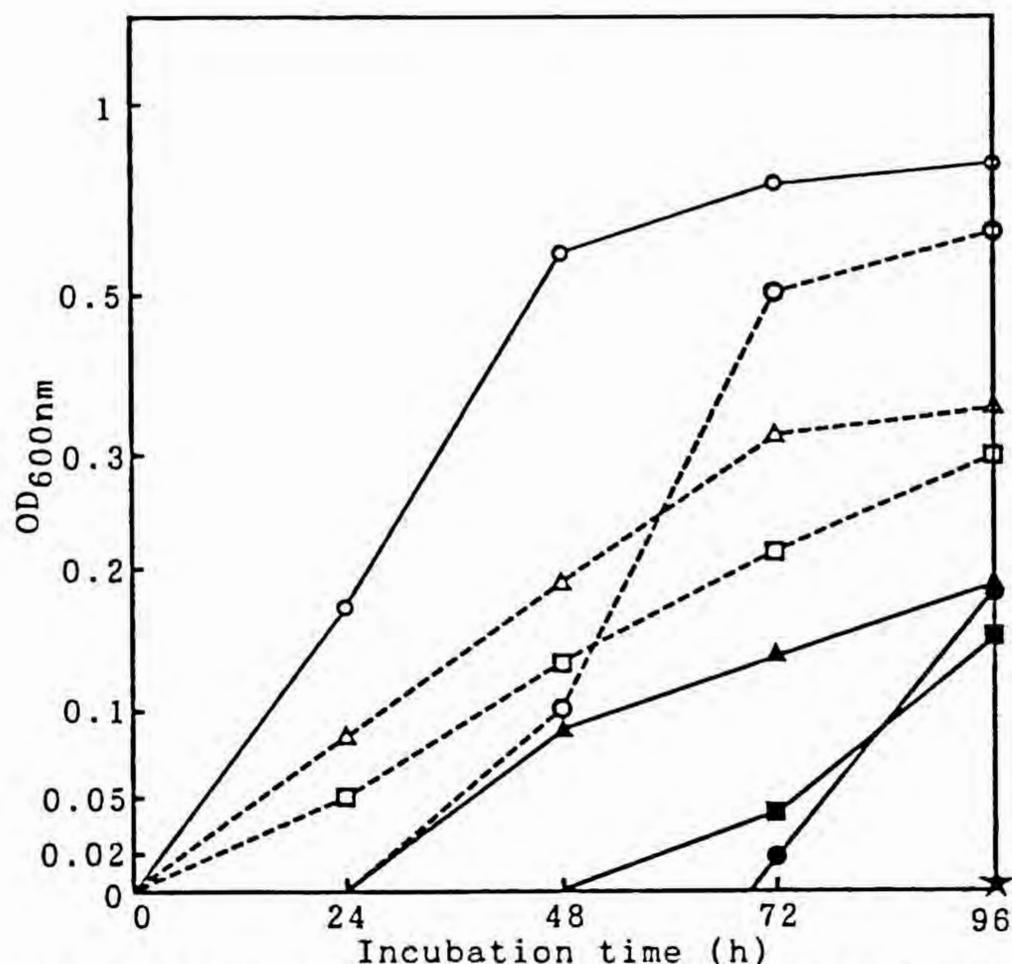


Fig.2-6 Combined effect of glycerol, sodium chloride and kona-wasabi on growth of *Ps. aeruginosa*. ○, control; △, NaCl 2%; ○, kona-wasabi 0.4%; □, glycerol 10%; ▲, NaCl 2% + glycerol 10%; ●, kona-wasabi 0.4% + NaCl 2%; ■, glycerol 10% + kona-wasabi 0.4%; ★, kona-wasabi 0.4% + glycerol 10% + NaCl 2%.

た。*E. coli*に対してはあまり併用効果はみられなかったが、粉ワサビ0.2%とグリセリン10%と食塩3%との3種併用で相加効果があった。*S. aureus*ではあまり併用効果はなかった。

2-2-3. 乳酸の影響

乳酸との併用による*S. aureus*に対する増殖阻害効果をFig.2-7に示した。粉ワサビ0.2%単独では1日増殖を阻止し、食塩3%単独では増殖速度を幾分低下させるにとどまった。粉ワサビ0.2%と食塩3%あるいは乳酸0.5%との2種併用で相乗効果があり、さらにこの3種を併用すると併用効果があった。Table 2-2より、粉ワサビ0.4%と乳酸0.25、0.5%との2種併用でかなりの相乗効果があり、粉ワサビ0.2%と乳酸0.25%との併用でもみられた。*E. coli*では粉ワサビ0.4%と食塩2%と乳酸0.5%との併用、粉ワサビ0.2%と食塩3%と乳酸0.5%との併用で相加効果があった。*Ps. aeruginosa*では粉ワサビと乳酸との併用で併用効果があり、特に粉ワサビ0.2、0.4%と乳酸0.5%でかなりの相乗効果があった。また、3種併用効果もみられた。

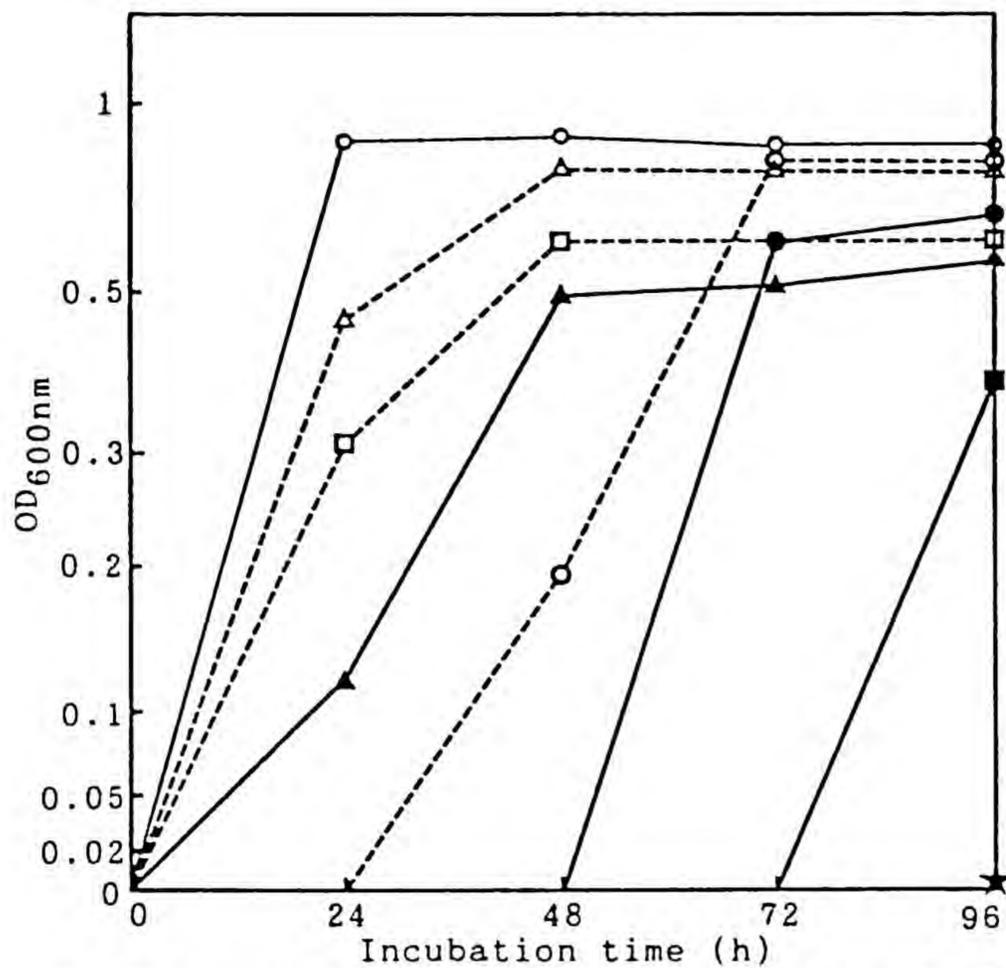


Fig.2-7 Combined effect of lactic acid, sodium chloride and kona-wasabi on growth of *S. aureus*. ○, control; △, NaCl 3%; ○, kona-wasabi 0.2%; □, lactic acid 0.5%; ▲, NaCl 3% + lactic acid 0.5%; ●, kona-wasabi 0.2% + NaCl 3%; ■, lactic acid 0.5% + kona-wasabi 0.2%; ★, kona-wasabi 0.2% + lactic acid 0.5% + NaCl 3%.

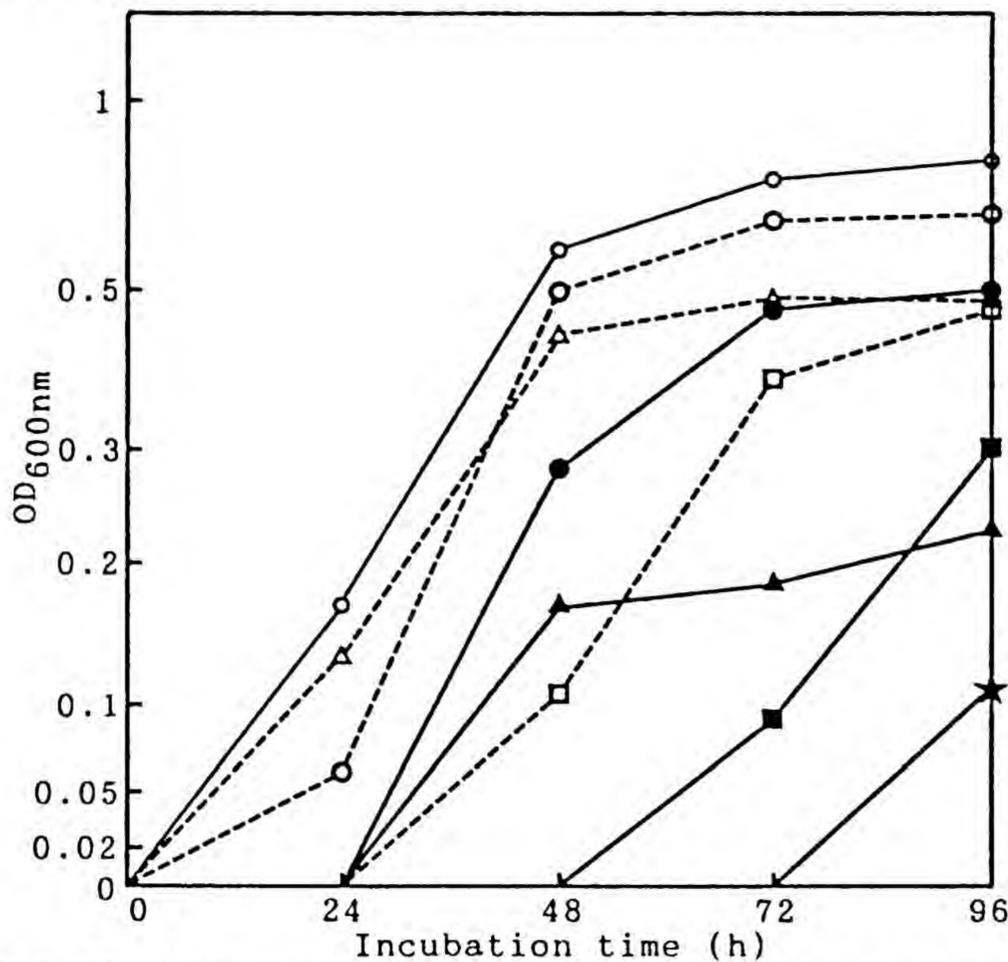


Fig.2-8 Combined effect of acetic acid, sodium chloride and kona-wasabi on the growth of *Ps. aeruginosa*. ○, control; △, NaCl 1%; ○, kona-wasabi 0.2%; □, acetic acid 0.3%; ▲, NaCl 1% + acetic acid 0.3%; ●, kona-wasabi 0.2% + NaCl 1%; ■, acetic acid 0.3% + kona-wasabi 0.2%; ★, kona-wasabi 0.2% + acetic acid 0.3% + NaCl 1%.

2-2-4. 酢酸の影響

酢酸との併用による *Ps. aeruginosa* に対する増殖阻害作用を Fig. 2-8 に示した。粉ワサビ 0.2% 単独、食塩 1% 単独では増殖速度を幾分低下させるだけであった。粉ワサビ 0.2% と食塩 1% あるいは酢酸 0.3% との 2 種併用で相乗効果があり、これらを 3 種併用すると併用効果があった。Table 2-2 より、さらにこの菌では粉ワサビと酢酸との 2 種併用で相乗効果があり、特に粉ワサビ 0.4% と酢酸 0.3% で相乗効果が大きかった。*E. coli* では併用効果はなかった。*S. aureus* では粉ワサビ 0.2、0.4% と酢酸 0.5% と食塩 2% との 3 種併用効果があった。

第 3 節 考察

微生物増殖阻害のために香辛料または精油成分と他の因子との併用はすでに Mantis²²⁾ がガーリックと pH と温度との併用を検討し、栗田ら⁸⁵⁻⁸⁷⁾ は精油成分と食塩、酢酸およびエタノールとの併用に関して一連の報告をしている。しかし、AIT またはそれを含む香辛料では行われていない。

菌種によって併用による効果は異なり、*E. coli* に対してはグリシンを併用することによりかなり阻害効果が増大し、また、わずかに乳酸も効果があった。また、*S. aureus* では乳酸の併用による効果がみられたが、マスタードより粉ワサビとの併用の方がより顕著であった。また、*Ps. aeruginosa* は併用による阻害効果を受け易く、特に乳酸、酢酸の併用効果が大きく、次いでグリセリンも効果があった。さらに食塩とマスタード、粉ワサビとの 2 種併用もかなりの効果があった。

グリセリン、食塩は Aw を低下させ、それにより微生物の増殖を阻害する。グリセリンは抗生物質と併用して *Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus bulgaricus* の酸生産を阻害すると Larsen ら⁷⁷⁾ は報告し、また、Notermans ら⁷⁶⁾ は食塩と pH と温度との併用で *S. aureus* の増殖を阻害すると報告している。しかし、今回程度の濃度では Aw 0.96 以上でその低下効果は僅かであった。しかしその僅かな低下でもマスタードと粉ワサビの抗菌力の増大に資したものと思われる。また、有機酸の微生物増殖阻害には pH の影響と有機酸自体の影響があり、同一の pH では非解離型分子の多い酢酸のほうが乳酸より阻害効果が大きいと言われ

Table 2-2 Lag time (day) for the growth cultured in media including three additives.

	NaCl (%)	Mustard (%)						Kona-wasabi (%)														
		0	0.2	0.4	0	0.2	0.4	0	0.2	0.4	0	0.2	0.4									
<i>E. coli</i>	Control	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0	1	1	1	1	1	1	2	3		
	Glycine (%)	0	0	0	1	[4]	1	1	2	[4]	1	1	1	1	[4]	1	1	1	3	[4]		
	Glycerol (%)	1	1	1	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]		
	Lactic acid (%)	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2		
	Acetic acid (%)	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	3	3		
		0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	0	1	1	1	1	1	1	1	2		
		0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2		
<i>S. aureus</i>	Control	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3			
	Glycine (%)	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2		
	Glycerol (%)	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2		
	Lactic acid (%)	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3		
	Acetic acid (%)	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	[4]	[4]		
		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	
		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3		
<i>Ps. aeruginosa</i>	Control	0	0	0	0	0	1	1	2	3	3	[4]	[4]	[4]	0	1	1	2	2	3	4	
	Glycine (%)	0	0	0	0	0	1	1	2	3	2	2	3	[4]	0	1	1	1	1	2	3	
	Glycerol (%)	0	0	0	0	0	1	1	2	3	2	2	3	[4]	1	1	1	2	2	3	[4]	
	Lactic acid (%)	0	0	0	0	0	1	2	3	3	3	[4]	[4]	[4]	1	1	2	3	3	[4]	[4]	
	Acetic acid (%)	0	0	0	0	0	1	2	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
		0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	[4]	[4]	1	1	2	3	3	[4]	[4]	
		1	1	1	1	1	2	2	3	3	[4]	[4]	[4]	[4]	2	3	3	3	[4]	[4]	[4]	

[4] indicates no growth for 4 days.

ている^{78, 81, 83, 84})。確かに単独ではその傾向は認められたが、マスタードまたは粉ワサビと併用すると乳酸のほうが概して阻害併用効果が大きかった。これは乳酸添加時の方が培地の初pHが幾分低下していたことが影響しているのではないかと考えられる。また、食塩はグリシンや酢酸との併用効果があることは既に報告されている^{7, 78, 79})。今回もその傾向はあり、さらにマスタード、粉ワサビを併用するとその効果は増大した。これらの併用より、食塩濃度を低下させて低塩分にしたり、他の保存料を減らすことができると考えられる。

また、マスタード、粉ワサビは実験に用いた濃度で食品に添加するとわずかに辛味を呈したが食べるのに支障はなかった。また、これらの化合物は今回用いた濃度では食品の味や風味をほとんど損なわず、むしろ併用した方がマスタードや粉ワサビの刺激を緩和した。

第4節 小括

ブラウンマスタードまたは粉ワサビに食塩とグリシン、グリセリン、乳酸または酢酸のうちいずれかを2種あるいは3種併用して、細菌の増殖阻害をブイヨン培地で静置培養して検討した。グリシンは *E. coli* に対して併用効果があり、マスタードまたは粉ワサビあるいは食塩との2種併用、3種併用で相乗効果があった。また、定常期の濁度を低下させる効果もあったが、食塩を併用すると低下しなかった。グリセリンは *Ps. aeruginosa* に対して、マスタードまたは粉ワサビとの併用で相乗効果があり、さらに食塩を併用すると効果は大となった。また、*Ps. aeruginosa* に対しては食塩とマスタードまたは粉ワサビとの併用で相乗効果があった。また、*E. coli* に対してはマスタード、食塩との3種併用で併用効果があったが、*S. aureus* に対しては粉ワサビ、食塩との3種併用で効果があった。乳酸は *Ps. aeruginosa* と *E. coli* に対しては3種併用で相乗効果があった。*S. aureus* に対してはマスタードまたは粉ワサビとの2種併用で効果があった。酢酸は *Ps. aeruginosa* に対してはマスタードまたは粉ワサビとの2種、3種併用で効果があり、特にマスタードとの2種併用で相乗効果があった。*E. coli* に対してはマスタード、また *S. aureus* に対しては粉ワサビとの3種併用で効果があった。

第3章 ブラウンマスタードとAITの細菌増殖阻害作用に関する検討

第1章でマスタードとその精油主成分であるAITがブイヨン培地中で数種の細菌の増殖を阻害すること、また、マスタードの抗菌力はそのAIT含量に左右されていることを述べた。しかし、マスタードやAITの微生物増殖の阻害の発現条件や機構はまだ解明されていない。

そこで、3章ではマスタード及びAITが抗菌作用を示す条件や細菌が受ける影響、並びに培地中のAITの挙動などを検討し、阻害作用の一部を明らかにした。第1節では誘導期の長さに対する接種菌数の影響、第2節では対数増殖期の菌に対するマスタードの増殖阻害、第3節ではAITに対する菌の抵抗性、第4節では培地中に添加したAITの培養時の変化、第5節ではAITの分割添加が抗菌性に及ぼす効果について検討した。

第1節 誘導期の長さに対する接種菌数の影響

第1章では接種菌数を 10^4 CFU/mlに固定して抗菌性を検討した。一般に増殖開始は菌数に影響を受けるといわれている。そこで、マスタードを添加して、接種菌の濃度を変えて接種した場合、誘導期の長さがどの様に変化するかを検討した。

1-1. 材料と実験方法

ブラウンマスタード（朝岡香辛料）は第1章と同様に調製し、70%エタノールで適宜希釈して使用した。

他は第1章、第3節に準じて行った。

接種の際、前培養した菌を0.9%食塩水で希釈して接種菌とし、主培養培地に接種菌を 10^3 , 10^4 , 10^5 CFU/mlとなるように接種した。

1-2. 実験結果と考察

Table 3-1 にマスタードを添加した時としない時の接種菌数の違いによるみかけの誘導期即ち光度計で濁りを認めうるまでの時間を示した。どの菌もマスタード無添加の場合は接種菌数を1/100にしても4~6時間の誘導期延長であった。そ

Table 3-1 Effect of inoculum size on the duration of the apparent lag phase in the presence of mustard.

Inoculum size (CFU/ml)	Mustard(%)	Lag phase (h)		
		10^5	10^4	10^3
<i>S. aureus</i>	0	5	8	11
	0.3	30	36	42
<i>E. coli</i>	0	1	5	6
	0.3	34	41	46
<i>Pro. vulgaris</i>	0	3	6	7
	0.3	54	58	69
<i>Ps. fragi</i>	0	6	11	12
	0.15	32	38	44
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	5	6	11
	0.3	40	47	54

れに対してマスタードを添加した場合は接種菌数を 1/100 にすることにより 12~15 時間延長した。マスタード濃度を増すとさらに延長時間が延びた。Karapinar⁴⁶⁾は EU、menthol、anethol の抗菌性に対して接種菌数が影響し、初発菌数が少なくなると阻害効果は増加すると述べている。マスタードも細菌の増殖阻止に初発の菌数がかかなり影響することがわかった。細菌数が減れば、1 細胞に対する障害作用が大きくなり、殺菌作用がある時は、生存菌数がさらに少なくなること、みかけの誘導期の延長に関係していると思われる。

第 2 節 細菌の対数増殖期にマスタードを添加した場合の細菌増殖阻害

第 1 章、第 3 節では菌の接種当初から阻害剤は存在しており、この時の接種菌は前培養でほぼ定常期に達しているものであった。そこで今度は対数増殖期即ち、活発に分裂増殖している菌はマスタードによってどのような影響を受けるかを検討し、菌のどの状態で阻害を受けやすく、感受性が高いかを検討した。

2-1. 材料と実験方法

第 1 章、第 3 節に準じて行った。

培地を滅菌後、接種菌を 10^4 CFU/ml となるように接種して、培養し、菌が対数増殖期の初期、すなわち OD=0.1 になった時にマスタード抽出液を数段階のレベルで添加した。増殖は OD で示した。

2-2. 実験結果と考察

Fig.3-1に *E. coli* の場合を示した。マスタード抽出液の培地への添加量は粉末マスタードに換算して%で示し、抽出液添加時に溶媒として同時に加えられるエタノール2.8%のみ添加した場合をコントロールとした。マスタードを添加した場合、エタノールの培地中濃度はすべて2.8%である。マスタードを添加すると増殖が添加濃度に比例して一定期間停止した後、増殖がみられ、0.8%添加で60時間後に増殖が再開された。また、定常期において、0.2、0.4%添加で濁度の低下がみられたが、0.6%以上の濃度では定常期の濁度低下はなく、増殖再開までの時間の長い高濃度添加時の方が、定常期の濁度は高くなった。次にFig.3-2に *S. aureus* の増殖を示した。マスタードの濃度に応じて増殖の速度が低下し、0.8%では60時間後に増殖速度が加速された。さらにFig.3-3に *Pro. vulgaris* の結果を示した。添加濃度に応じてなおしばらく速度を低下しながら増殖を継続した後、増殖を停止し、その後、*E. coli*と同様の傾向を示した。*Ps. fragi*の増殖をFig.3-4に示した。添加により増殖の停止はなかったが増殖速度の抑制と、それに伴う定常期における濁度の低下がかなりあった。最後に、Fig.3-5に *Ps. aeruginosa*の増殖を示した。増殖は添加濃度に応じて一定期間停止した後、増殖を再開し、定常期の濁度はコントロールと大差がなかった。

なお、Fig.3-6に *E. coli*の対数増殖期後期、即ちOD=0.52の時に同様にマスタード抽出液を添加した結果を示したが、エタノールのみを加えたコントロールと大差無かった。他の菌についても同様の結果であった。

また、*E. coli*の場合、対数増殖初期にマスタードを添加すると、Fig.3-1にみられるように添加時よりODが低下したのでその時の生菌数を検討した。Table 3-2にマスタード0.2、0.8%添加培地での18、42時間後の *E. coli* の生菌数を示した。0.8%添加では18時間後にODが低下し、生菌数も1/100以下に低下した。これはマスタードは溶菌を伴う殺菌作用があることを示している。Choら⁸⁸⁾が palmityltrimethylammonium iodideが対数増殖期の *B. subtilis* を溶菌し、また、加藤ら¹²⁾はモノラウリンが *B. subtilis* を溶菌すると述べている。今回、マスタードも *E. coli* に対して同様の作用を示した。また、第1章、Fig.1-12の生菌数の変化と比較すると、培養開始時の添加では生菌数の低下現象はみられなかったが、対数増殖期の添加では生菌数の低下がみられたので、対数増殖期の菌の方

がマスタードに対する感受性が強いことが確かめられた。

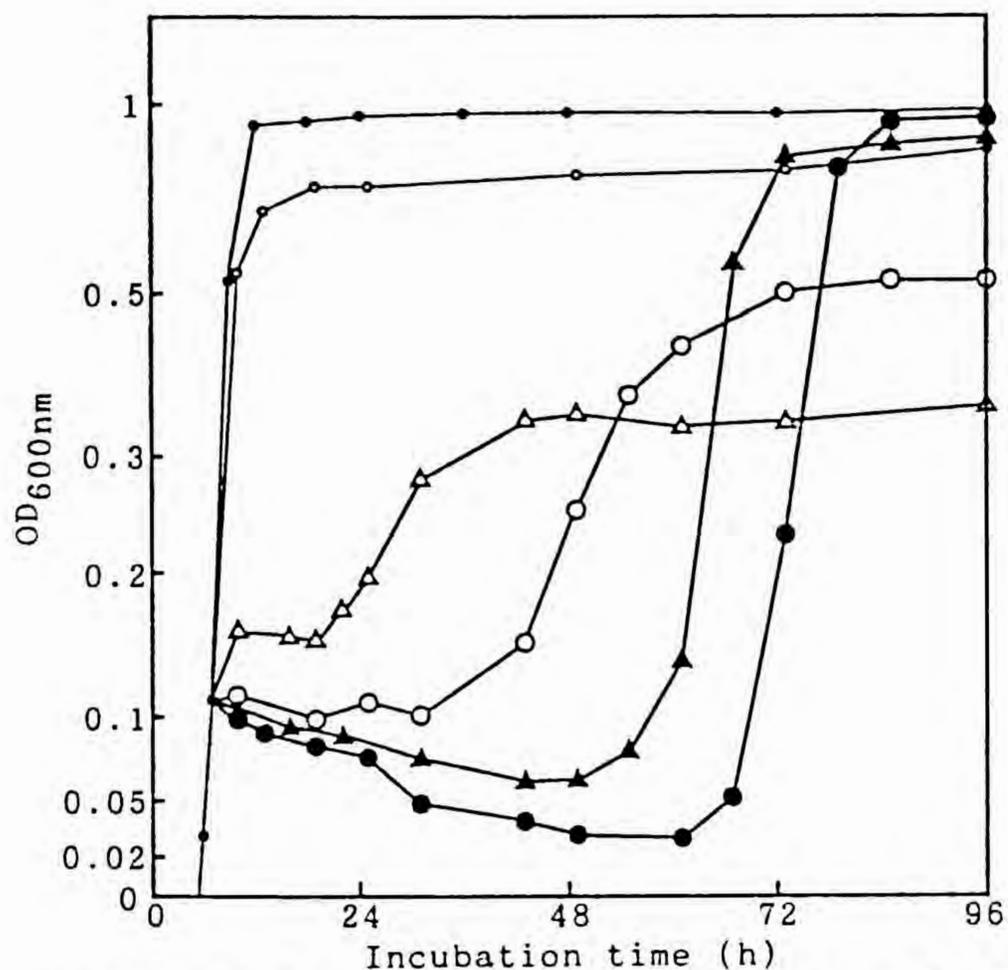


Fig.3-1 Effect of addition of mustard on *E. coli* at early stage of logarithmic growth phase (0.1 of OD). •, control; ○, 2.8% ethanol; △, mustard 0.2%; ○, 0.4%; ▲, 0.6%; ●, 0.8%.

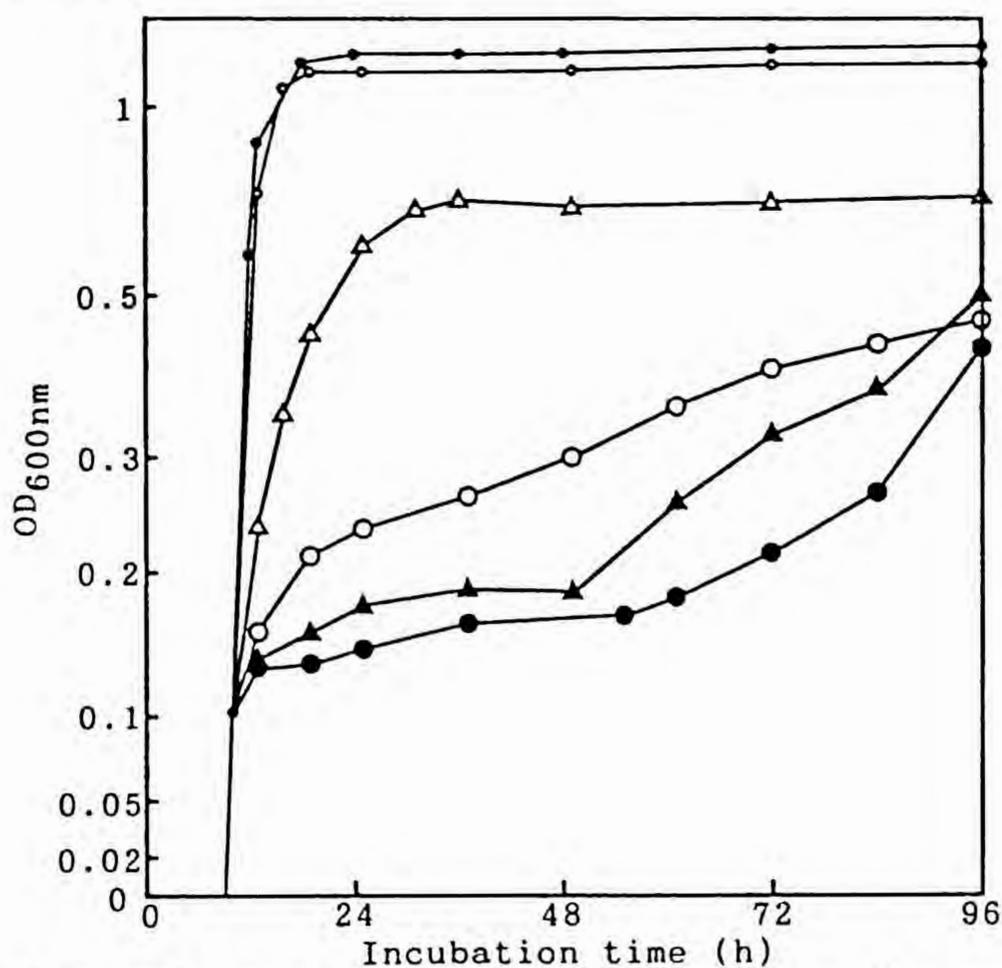


Fig.3-2 Effect of addition of mustard on *S. aureus* at early stage of logarithmic growth phase (0.1 of OD). •, control; ○, 2.8% ethanol; △, mustard 0.2%; ○, 0.4%; ▲, 0.6%; ●, 0.8%.

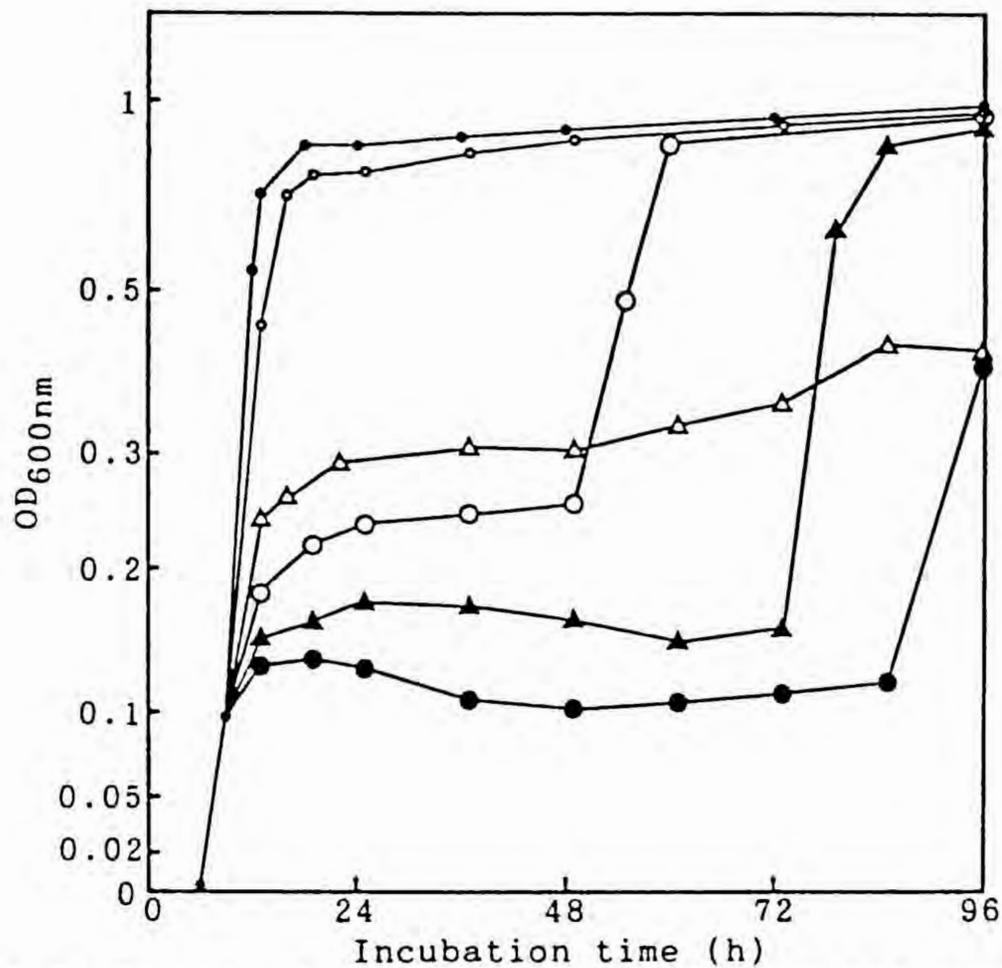


Fig.3-3 Effect of addition of mustard on *Pro. vulgaris* at early stage of logarithmic growth phase (0.1 of OD).
 ●, control; ◦, 1.4% ethanol; Δ, mustard 0.1%; ○, 0.2%; ▲, 0.3%; ●, 0.4%.

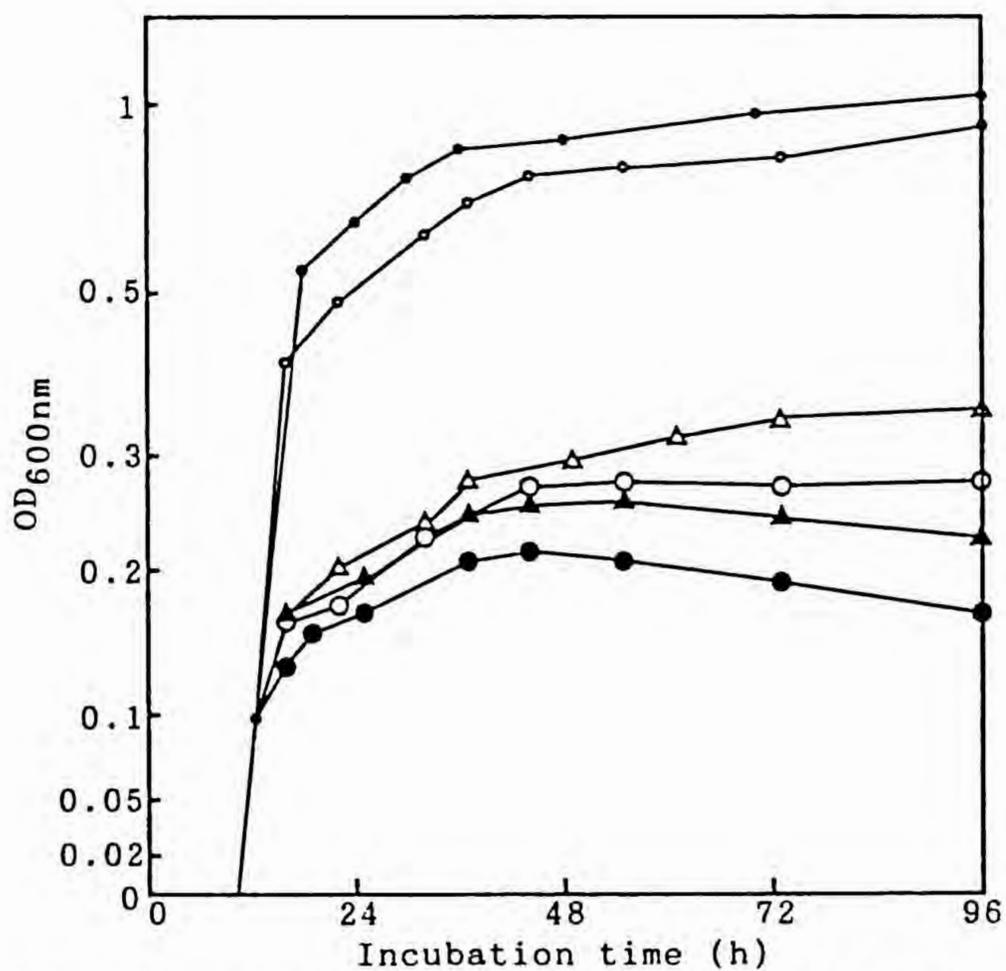


Fig.3-4 Effect of addition of mustard on *Ps. fragi* at early stage of logarithmic growth phase (0.1 of OD). ●, control; ◦, 0.7% ethanol; Δ, mustard 0.05%; ○, 0.1%; ▲, 0.15%; ●, 0.2%.

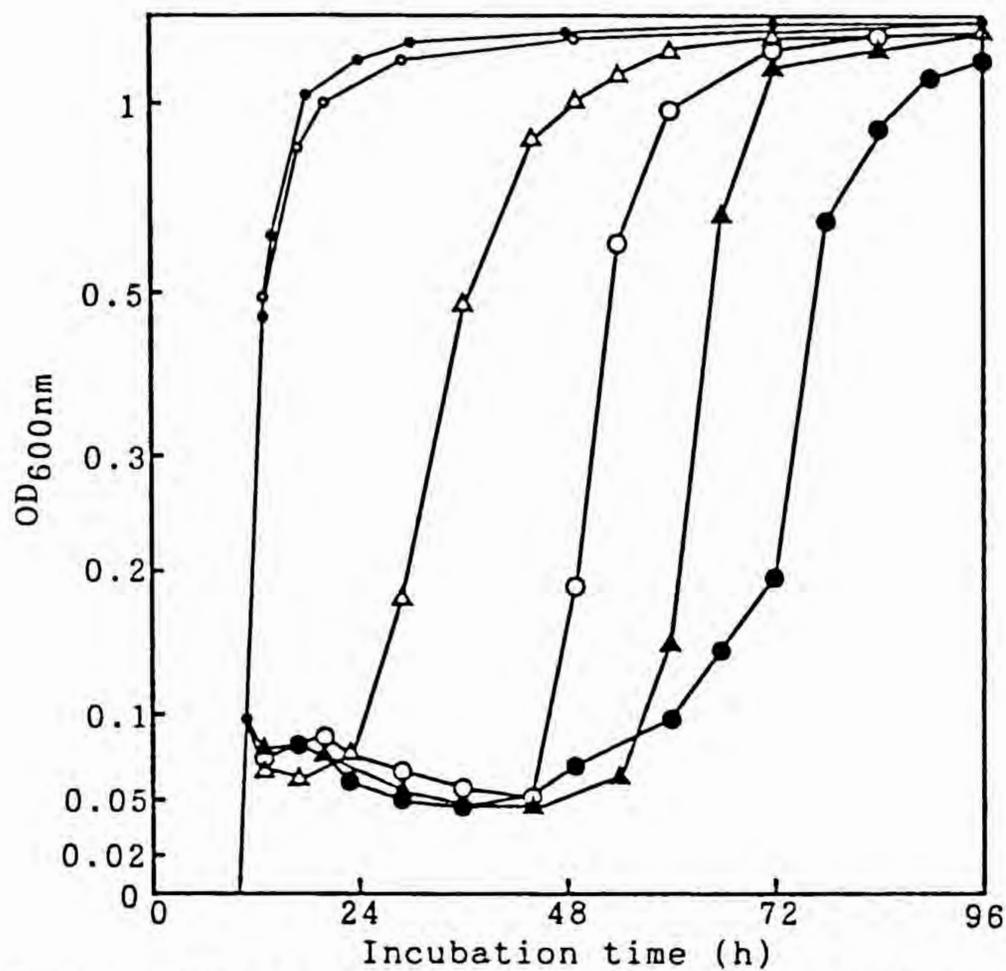


Fig.3-5 Effect of addition of mustard on *Ps. aeruginosa* at early stage of logarithmic growth phase (0.1 of OD). •, control; ○, 1.4% ethanol; △, mustard 0.1%; ○, 0.2%; ▲, 0.3%; ●, 0.4%.

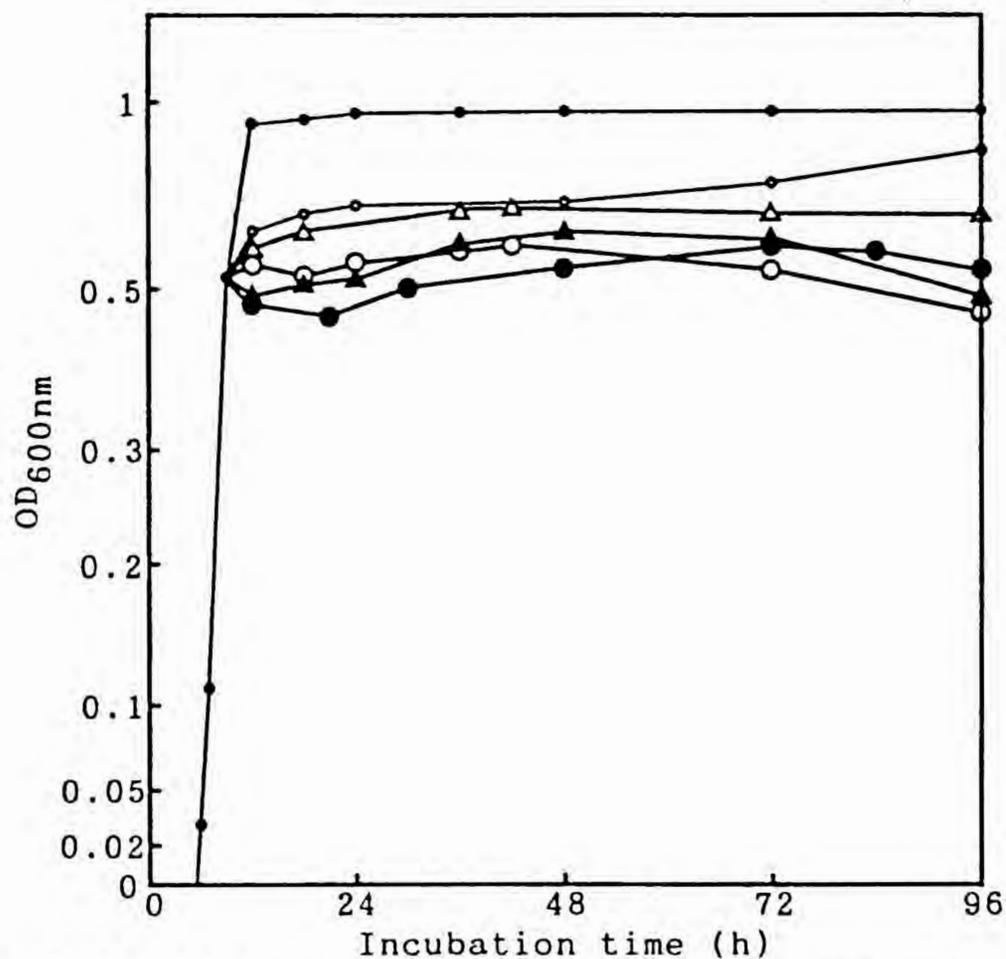


Fig.3-6 Effect of addition of mustard on *E. coli* at later stage of logarithmic growth phase (0.52 of OD). •, control; ○, 2.8% ethanol; △, mustard 0.2%; ○, 0.4%; ▲, 0.6%; ●, 0.8%.

Table 3-2 Changes of optical density and colony forming unit in incubation of *E. coli* in medium added mustard at the early stage of logarithmic growth phase.

Incubation Time ¹⁾	2.8% EtOH		Mustard 0.2%		Mustard 0.8%	
	OD ²⁾	CFU	OD	CFU	OD	CFU
0	0.10	7.90×10^7	0.10	7.90×10^7	0.10	7.90×10^7
18	0.72	8.10×10^8	0.20	7.30×10^7	0.08	1.44×10^5
42	0.74	7.60×10^8	0.34	1.52×10^8	0.03	1.34×10^5

1) Hours after addition of mustard

2) OD_{540nm}

第3節 AIT存在下で生育した菌のAITに対する抵抗性

今までの研究で多くの場合、細菌は香辛料存在下では誘導期の延長の後に増殖することがわかった。それは誘導期の中に抵抗性を得たためかどうかを検討した。

3-1. 材料と実験方法

AIT溶液は70%エタノールにAIT1.8mg/mlの割合で溶解して原液とし、70%エタノールで希釈して使用した。

培養は、第1章、第3節に準じて行い、AITを添加した主培養培地に菌を接種し、OD=0.7にまで増殖した菌を、0.9%食塩水で500倍希釈し、同濃度のAIT添加培地に1滴ずつ接種して増殖をみた。また、さらに同じことを繰り返した。

3-2. 実験結果と考察

Table 3-3に5種の細菌について各々の段階での誘導期の長さを示した。たとえば36ppmAITを添加した培地で*E. coli*は最初の培養では42時間後に増殖開始し、この菌は次の36ppmAIT添加培地に移植した場合で48時間、さらに次の培地で42時間後に増殖を開始し、各培養で誘導期に実質的な差はなかった。また定常期の濁度についても差はなかった。他の4菌についても同様の結果であった。Zaikaら^{89,90)}は乳酸菌の場合、数種の香辛料を添加した培地で誘導期の延長の後に生育してきた菌を新たに香辛料添加培地に接種すると誘導期の延長がみられず、抵抗性を得たと述べている。それに対し、この場合、AIT存在下で生育した菌がAIT添

加培地で再び誘導期が延長された後、増殖を開始するのは抵抗性を得たわけではなかったと考えられる。

Table 3-3 Lag time of bacteria repeated the cultivation in presence of mustard.

	AIT(ppm)	Lag time (h)		
		1st	2nd	3rd cultivation
<i>E. coli</i>	36	42	48	42
<i>S. aureus</i>	36	42	48	42
<i>Pro. vulgaris</i>	18	48	48	48
<i>Ps. fragi</i>	9	66	60	66
<i>Ps. aeruginosa</i>	18	60	54	54

第4節 細菌増殖時における培地中のAITの変化

AIT存在下で細菌が増殖している培地中で、AITがどのような挙動をして抗菌性を示すのかを検討した。

4-1. 材料と実験方法

AIT溶液は2.0mg/mlを70%エタノールに溶解して調製し、*E. coli* IFO 3301を使用した。培養は第1章、第3節に準じて行った。

培地中のAIT含量は第1章、第1節に準じて逆相HPLCで定量した。前処理として培地25mlをSEP-PAK C₁₈カートリッジに吸着させ、同様に30%メタノール4mlで洗浄後、メタノール2mlで溶出した。その溶出液10μlをHPLCに供した。

4-2. 実験結果と考察

AITを80ppm添加した培地に*E. coli*を接種した場合と、接種しない場合の双方について、培養している培地中のAITを経時的にHPLCで定量した。その結果をFig.3-7に示す。AITは減少し48時間後には0となり、菌を接種した場合もしない場合もあまり差はなかった。そして、*E. coli*の増殖はAIT消失後に認められた。Moleyarら⁹¹⁾は *Asp. niger*や *Rhizopus stolonifer*が精油成分を解毒すると述べているが、AITの場合は*E. coli*による解毒作用以外の原因で消失したと思われる。

次に、Fig.3-8に培養前と培養72時間後の三次元クロマトグラム（等高線）を示した。これよりAITは最大吸収波長245nmでRT2.39だが、72時間目にはRT2.06で268nmに最大吸収波長を持つ他の物質に変化したと考えられる。

次に48時間経過してAITが消失した培地にE. coliを接種すると、AIT無添加培地と同様の生育がみられ、阻害は認められなかった。このことより、AITから変化した物質にはE. coliに対する阻害効果はないと考えられる。

これらのことより、AITが培地中に残存している時のみE. coliの生育は抑制されるものと示唆される。

また、第1章、第3節では、菌の培養開始時にAITを添加した場合の抗菌性を検討したが、その場合のE. coliの誘導期の長さとは本章第2節の対数増殖期に添加した場合のE. coliの増殖停止時間の長さはほぼ同程度であった。これは、AITの消失と共に菌が増殖し始めることによると思われる。

第5節 AITを分割して添加した場合の細菌増殖阻害

第4節で、培地中のAITが消失した後に菌の生育がみられたことから、AITを一度に多量添加するよりも、少量ずつ一定時間毎に添加した方が菌の生育を長時間にわたって阻止できるとも考えられる。そこで主培養培地にAITを合計量を等しくしてこれを数回に分けて添加した場合と接種時に一度に添加した場合の抗菌性を比較した。

5-1. 材料と実験方法

AIT溶液は1.8mg/mlを原液として用い、培養は第1章、第3節に準じて行った。AITの添加法として、AITを通常どおりに接種前に添加する場合と、それと同量のAITを数回に分けて添加した場合を比較した。

5-2. 実験結果と考察

Table 3-4にAIT添加時期と添加量、およびその時の誘導期を示した。E. coliでは0時間すなわち接種時にAITを72ppm添加した場合、増殖は60時間後に開始した。一方、0、12、30、48時間毎にAITを18ppmずつ添加した場合、96時間以上生

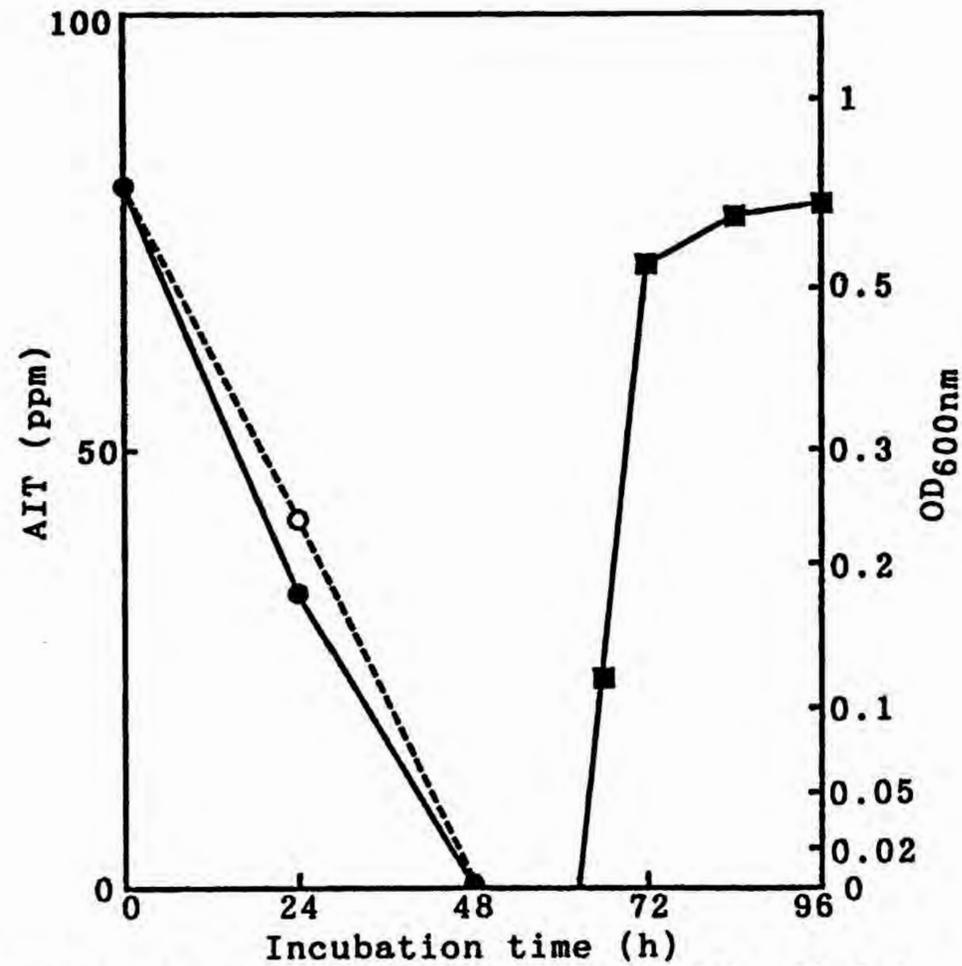


Fig.3-7 Changes of concentration of AIT added to medium and the turbidity during incubation of *E. coli*. ○, not inoculated medium (Control); ●, inoculated medium; ■, incubation of *E. coli*.

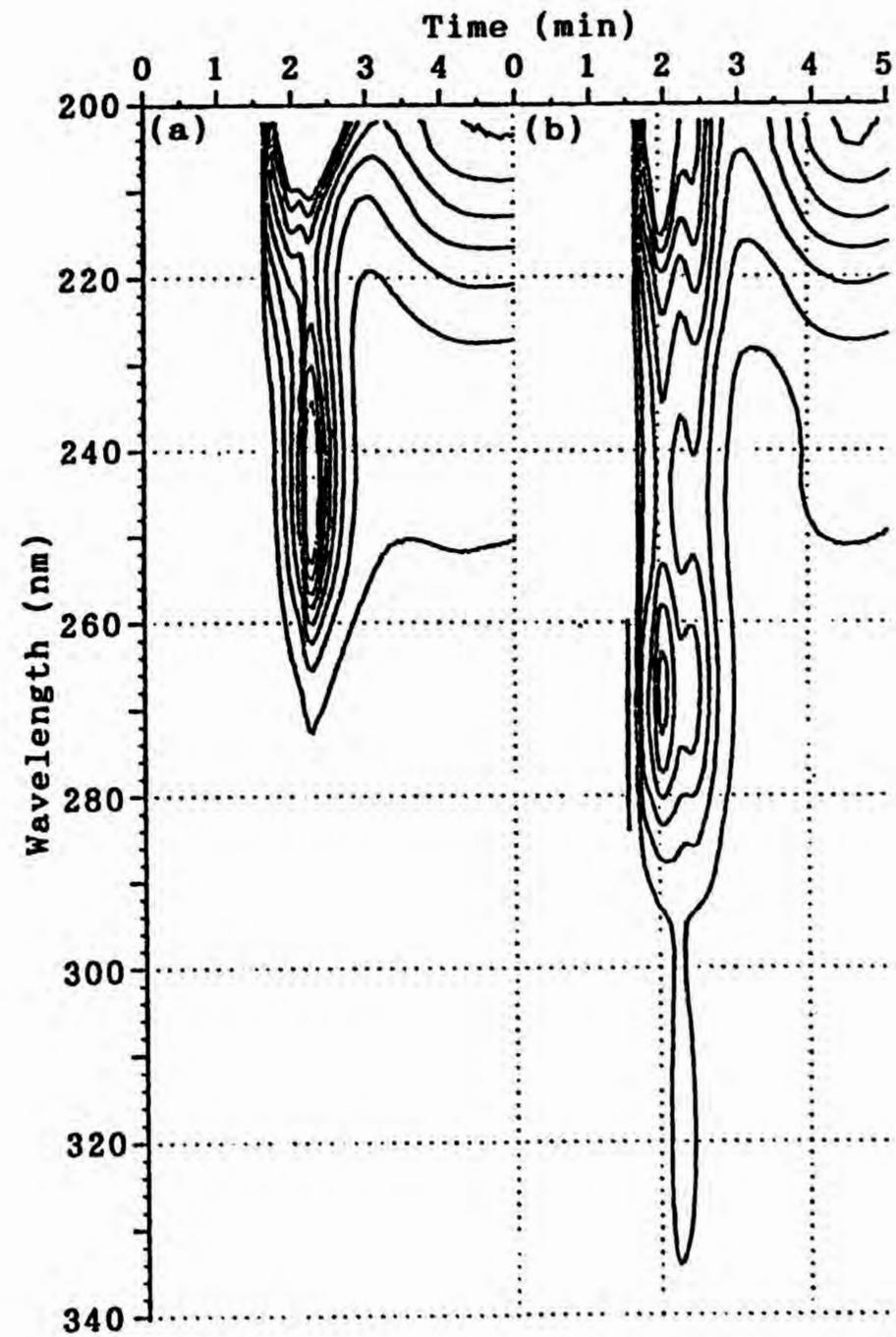


Fig.3-8 Three dimensional chromatograms of HPLC of medium containing AIT. (a), 0 h incubation; (b), 72 h incubation of *E. coli*.

Table 3-4 Comparison of the lag time by divided addition of AIT to the medium.

Time of incubation added AIT	AIT (ppm) added to medium				Lag time (h)
	0	12	30	48 (h)	
<u>E. coli</u>	18	18	18	18	96<
	36	-	18	18	96<
	54	-	-	18	90
	72	-	-	-	60
<u>S. aureus</u>	18	18	18	18	90
	36	-	18	18	90
	54	-	-	18	54
	72	-	-	-	54
<u>Pro. vulgaris</u>	9	9	9	9	96<
	18	-	9	9	96<
	27	-	-	9	54
	36	-	-	-	56
<u>Ps. fragi</u>	4.5	4.5	4.5	4.5	12
	9	-	4.5	4.5	42
	13.5	-	-	4.5	54
	18*	-	-	-	96<
<u>Ps. aeruginosa</u>	9	9	9	9	18
	18	-	9	9	60
	27	-	-	9	78
	36*	-	-	-	96<

*, outside of the range in Table 1-3.

育はみられず、AITを数回に分けて添加した方が効果があった。S. aureus, Pro. vulgarisもE. coliと同様の結果であった。しかし Ps. fragi, Ps. aeruginosa は0時間に一度に添加した方が増殖を阻止する時間は長かった。これらの結果から AITもしくはマスタード抽出液添加により誘導期が延長された後、増殖が開始するのはその間にAITが消失することによると思われる。また、第1章、Fig.1-14で Ps. aeruginosaは接種時に0.2%マスタード(18ppmAIT相当)を添加すると生菌数がかなり減少することを示した。従ってこの菌の場合、少量添加では生菌数の減少も少なく、一度に多量添加した方がかなりダメージが大きく、誘導期の延長が長くなると思われる。一方、E. coli, S. aureusは接種時に多量添加してもFig.1-15, 1-13に示すように生菌数は殆ど減少しなかった。そのため、少量ずつ数回に分けて添加する方がAITが常に残存し、誘導期が持続するものと思われる。これらのことから汚染菌の種類によって添加量を変えると、増殖阻止効果が

大きくなることが期待できる。なお、再開後の増殖程度が、菌種や条件によって異なるのは、AITから変化した物質の菌に対する作用の差などによるものとも考えられる。

第6節 小括

ブラウンマスタードと allyl isothiocyanate(AIT)の数種細菌に対する増殖阻害作用について、ブイヨン培地で30℃振盪培養で検討した。マスタードの抗菌性に対する接種菌数の影響を検討したが、接種菌数が少なくなるとみかけの誘導期の延長が長くなり、初発菌数が抗菌力に影響した。マスタード抽出液を対数増殖初期(OD=0.1)の細菌に添加すると、*E. coli*, *Pro. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*では増殖が添加濃度に応じて一時期停止した後、増殖が再開した。また、*E. coli*では添加後に溶菌を伴う殺菌がみられた。*S. aureus*と *Ps. fragi*では増殖速度の低下、*Ps. fragi*ではさらに定常期の著しい濁度低下がみられた。また、AIT存在下で誘導期延長の後に生育した菌はAIT添加培地に植え継ぐと、同様に延長された誘導期の後生育し、抵抗性を得ていないことを認めた。培地に添加したAITを逆相HPLCで経時的に測定すると、始めAIT80ppmであったのが48時間後には0となり、クロマトグラム上に新しいピークがみられ、*E. coli*の増殖はAIT消失後に認められた。また*E. coli*, *S. aureus*, *Pro. vulgaris*では培養開始時にAITを一度に添加するよりも同量のAITを少量に分けて一定期間毎に添加した方が増殖阻止時間が長く、*Ps. fragi*, *Ps. aeruginosa*は逆に培養開始時に一度に添加した方が増殖阻止時間は長かった。

第4章 AIT誘導体の細菌増殖阻害とAITとの比較

AITの誘導体をallyl誘導体とisothiocyanate誘導体に分けて、細菌増殖阻害を検討した。

第1節 allyl誘導体の細菌増殖阻害

allyl alcohol(AA), allyl chloride(ACl), allyl cyanide(AC), diallyl sulfide(DAS)および diallyl disulfide(DADS)の細菌増殖阻害を30℃、振盪培養で検討し、AITの抗菌性と比較した。

1-1. 材料と実験方法

AIT、DAS、DADS、AC（共に東京化成製）、AA、ACl（共に和光純薬製）はいずれも70%エタノールに溶解して80mMの溶液を作成し、これを原液とした。適宜70%エタノールで希釈し、各々0.05mlを無菌添加して5ml培地とした。

また、使用菌株、培養方法などは第1章、第三節と同じである。

1-2. 結果

Fig.4-1に各溶液が培地中濃度0.8mMでのE. coliの増殖を示す。コントロールは各試験溶液を添加した時に加えられるのと同濃度、すなわち0.7%のエタノールのみを添加した場合である。これは他の菌でも同様である。AIT以外ではDADSが幾分阻害を示したほかは、何れもコントロールと同様の増殖を示して阻害はなかったが、AITは66時間増殖を阻止した。また、S. aureusの場合をFig.4-2に示す。0.8mMでAITでは59時間、DADSでは34時間増殖を阻止し、他はほとんど阻害しなかった。Pro. vulgarisではFig.4-3に示すように、0.8mMでAITは4日以上増殖はみられず、DADSでは46時間増殖を阻止し、0.4mMではAITは67時間、DADSは11時間阻止した。AAでは0.8mMで定常期の濁度低下があったが、ACl、ACでは0.8mMで阻害はなかった。Ps. fragiではFig.4-4で示すようにAIT0.1mMで41時間増殖を阻止し、0.2mMでは4日間生育はなかった。それに対し、他は0.8mMで阻害はなかった。Fig.4-5はPs. aeruginosaの結果であるが、AITは0.2mMで41時間増殖を阻

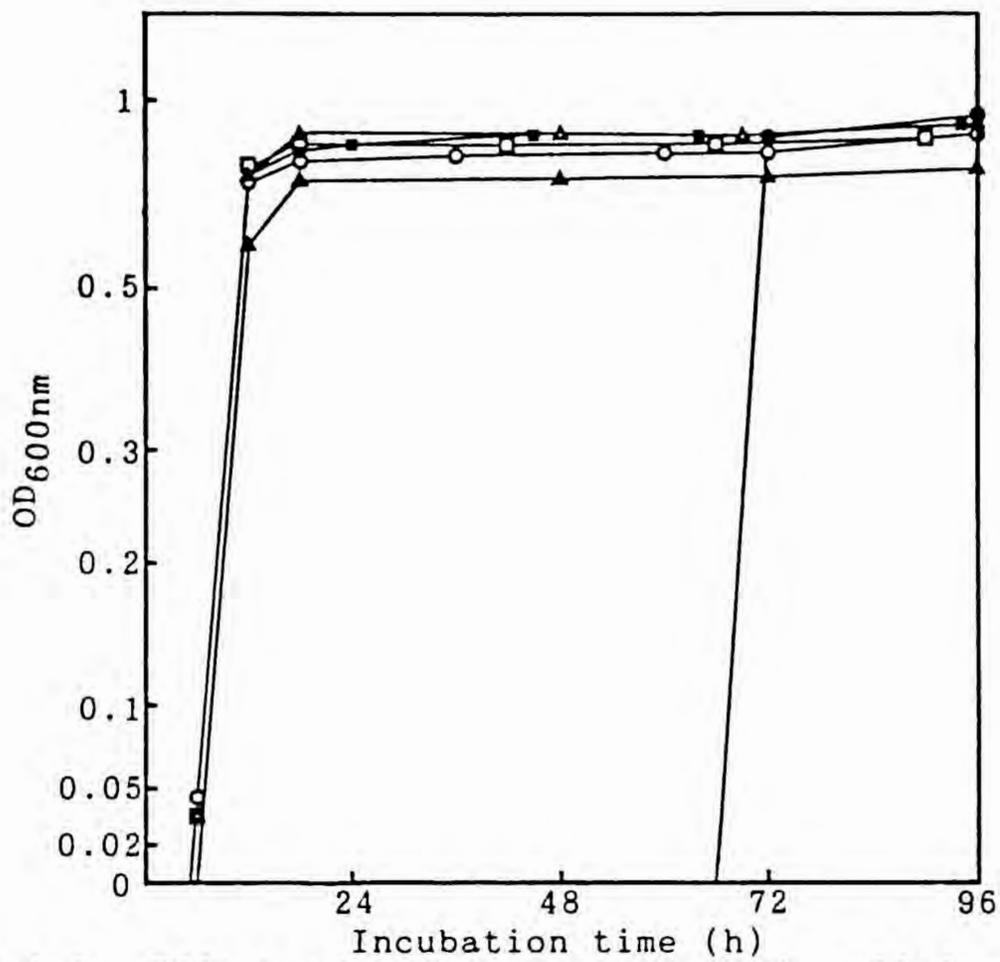


Fig.4-1 Effect of allyl alcohol (AA), allyl cyanide (AC), allyl chloride (ACl), diallyl disulfide (DADS) and AIT on the growth of *E. coli*. ■, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; □, 0.8mM ACl; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.8mM AIT.

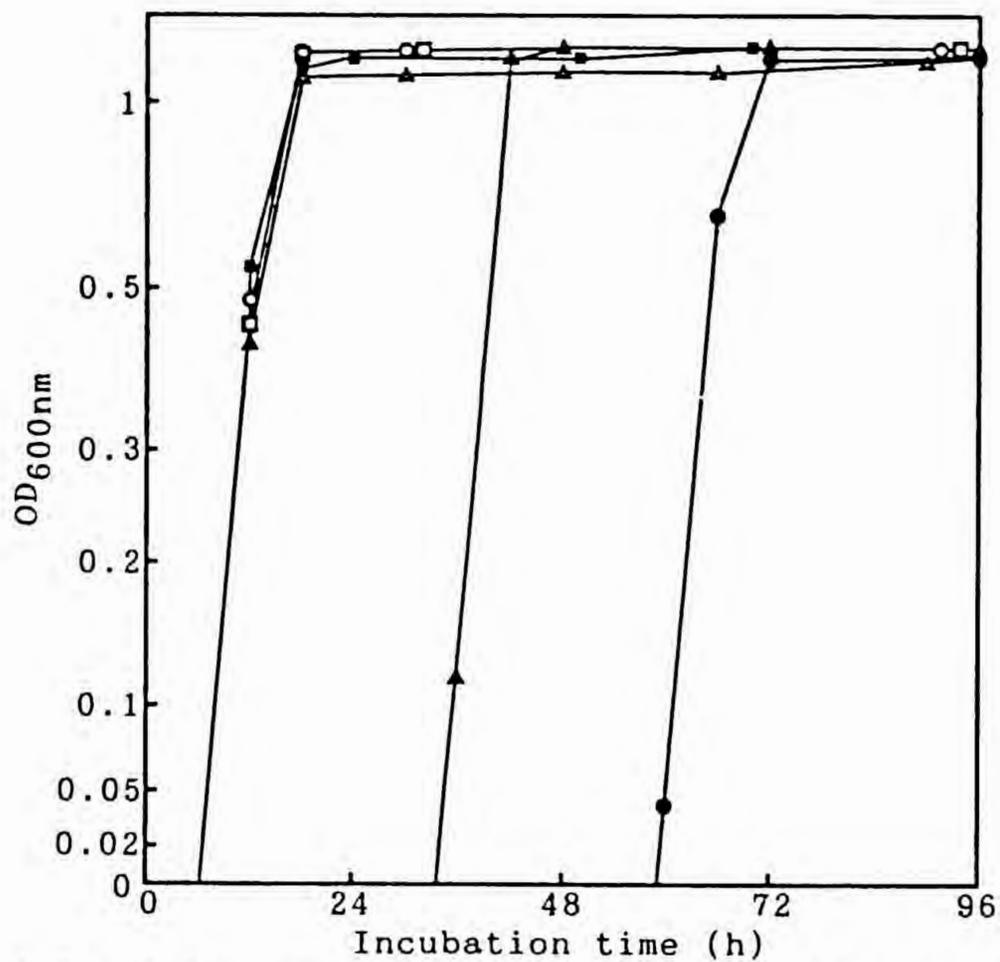


Fig.4-2 Effect of AA, AC, ACl, DADS and AIT on the growth of *S. aureus*. ■, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; □, 0.8mM ACl; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.8mM AIT.

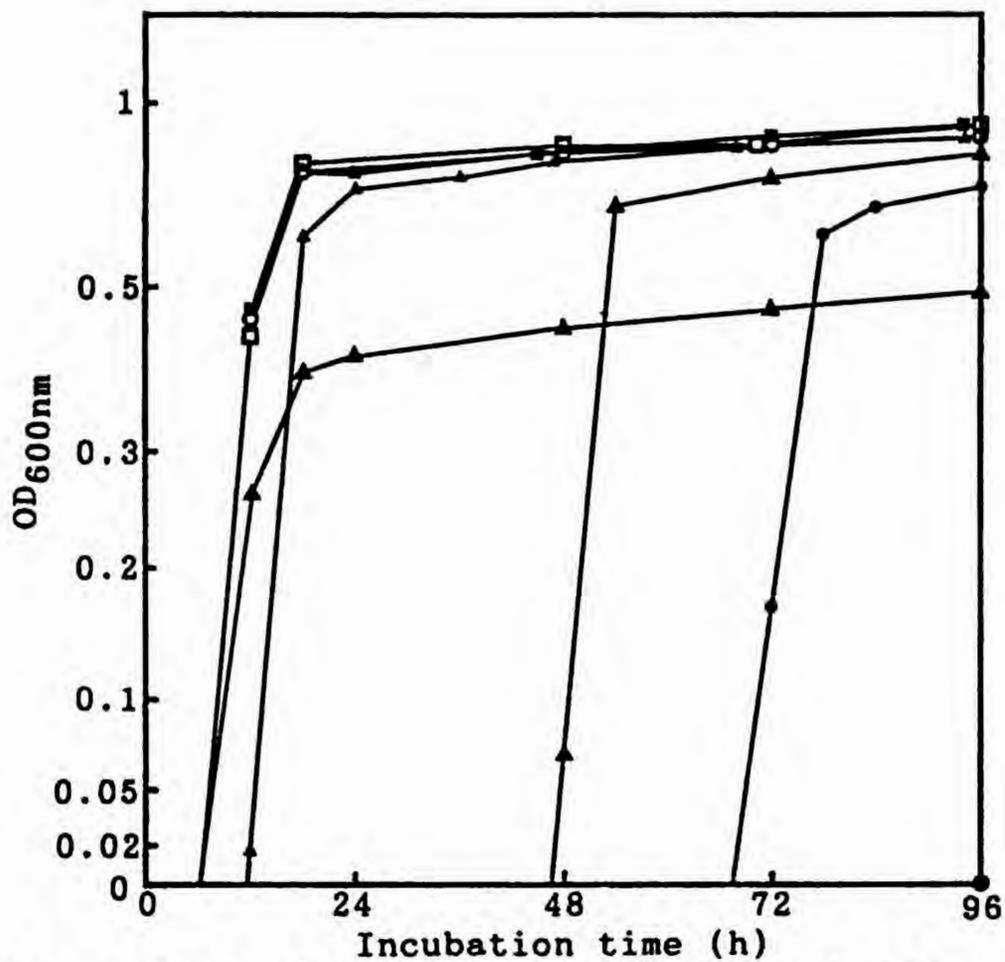


Fig.4-3 Effect of AA, AC, ACl, DADS and AIT on the growth of *Pro. vulgaris*. ■, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; □, 0.8mM ACl; ▲, 0.4mM; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.4mM; ●, 0.8mM AIT.

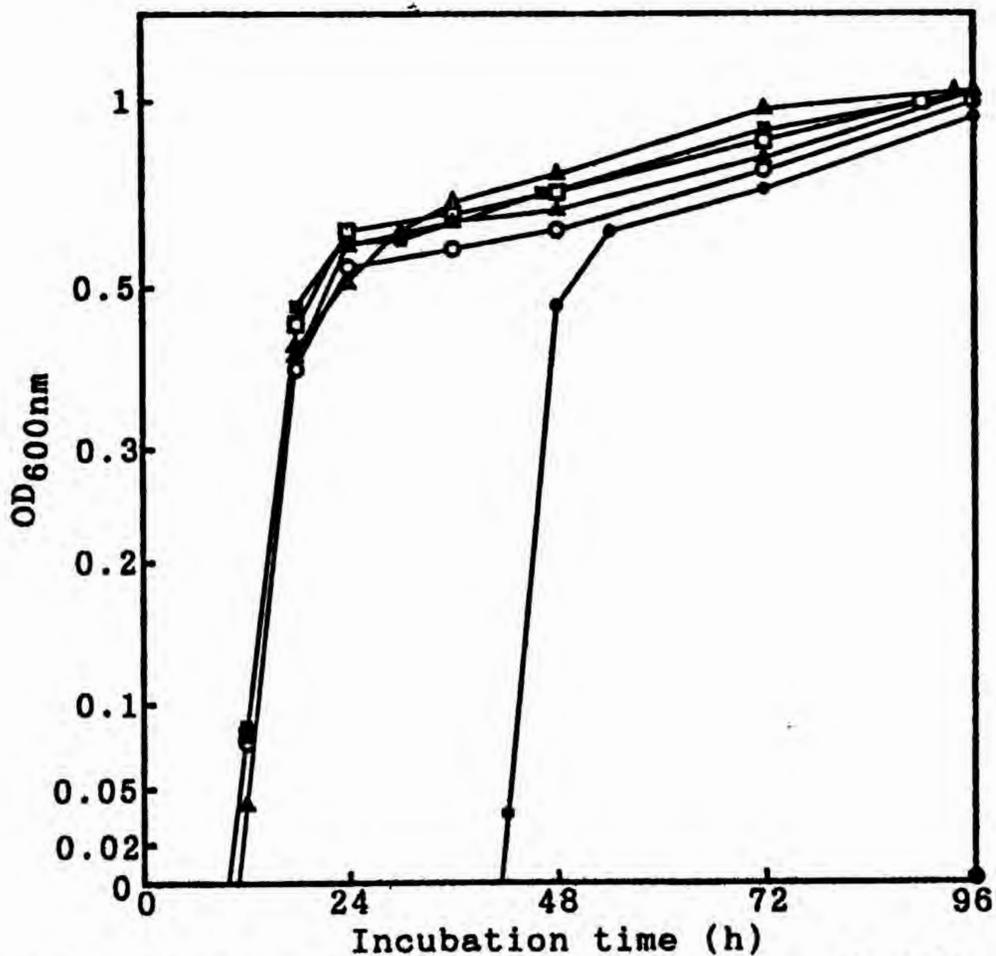


Fig.4-4 Effect of AA, AC, ACl, DADS and AIT on the growth of *Ps. fragi*. ■, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; □, 0.8mM ACl; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.1mM; ●, 0.2mM AIT.

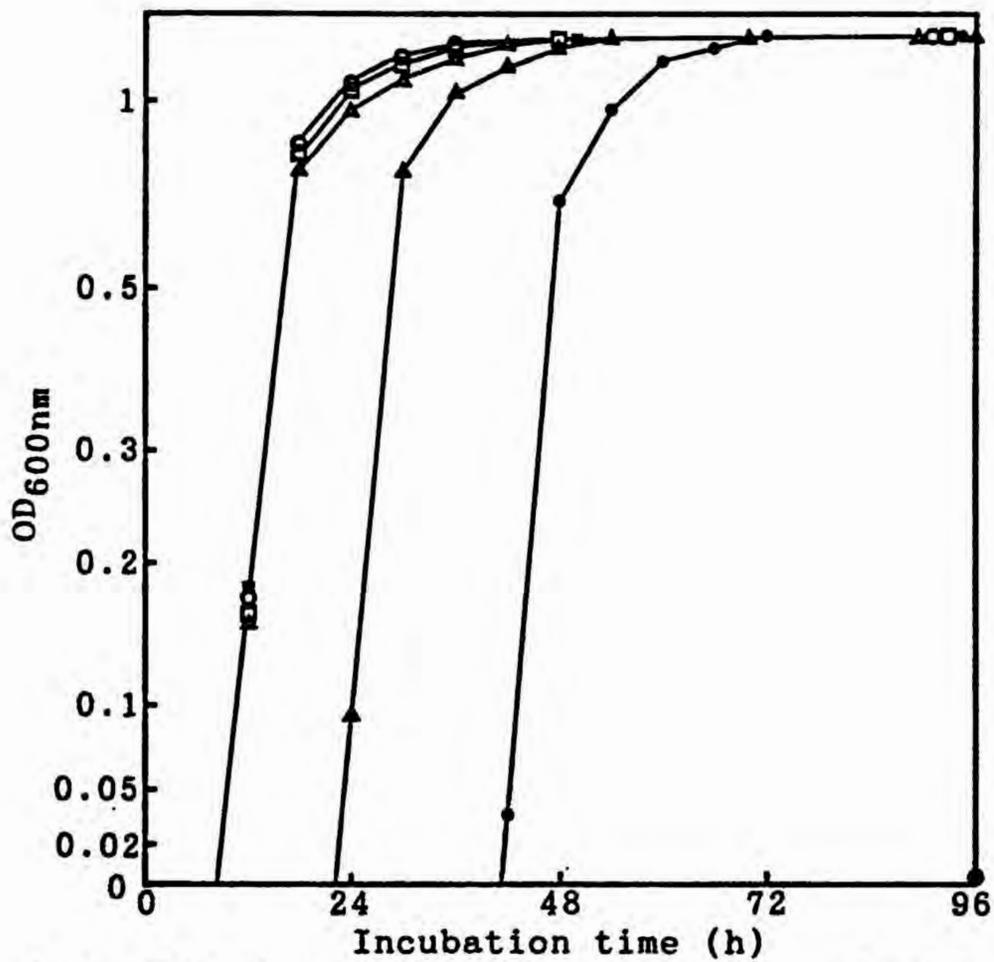


Fig.4-5 Effect of AA, AC, ACI, DADS and AIT on the growth of *Ps. aeruginosa*. □, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; ◻, 0.8mM ACI; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.2mM; ●, 0.4mM AIT.

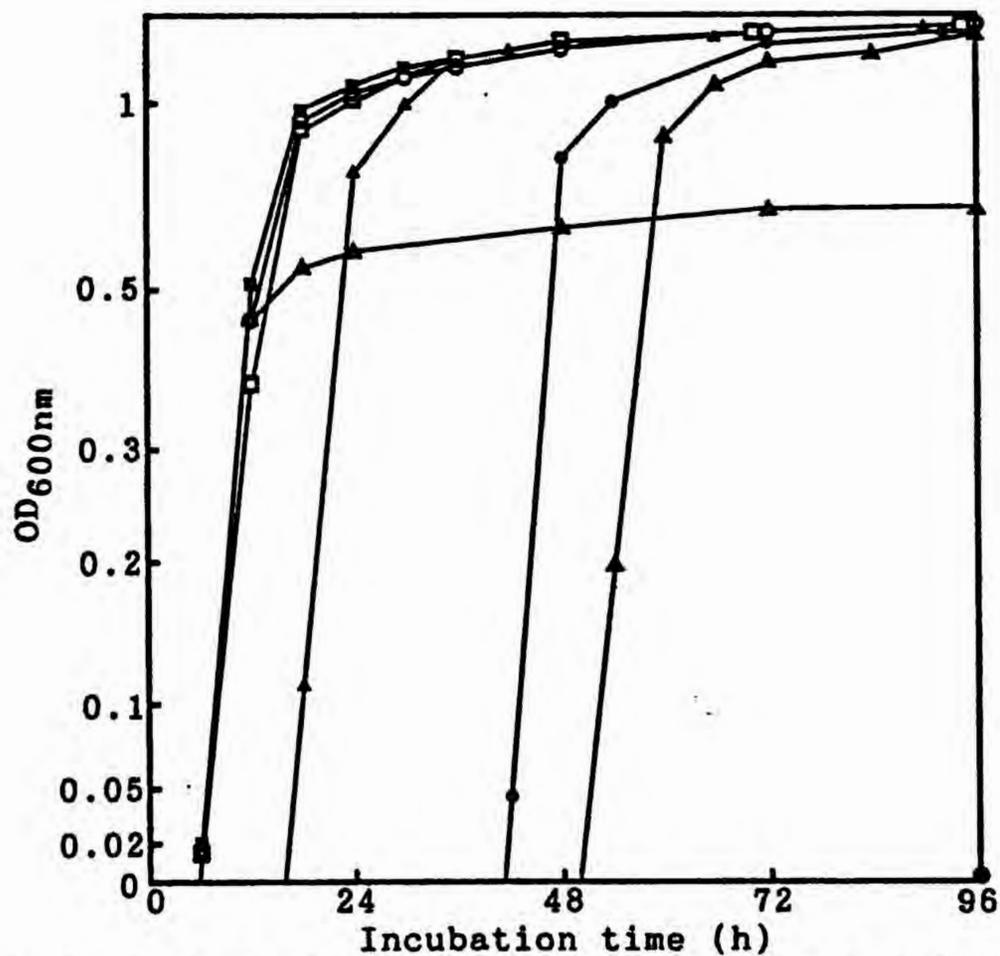


Fig.4-6 Effect of AA, AC, ACI, DADS and AIT on the growth of *B. cereus*. □, control; ▲, 0.8mM AA; ○, 0.8mM AC; ◻, 0.8mM ACI; ▲, 0.4mM; ▲, 0.8mM DADS; ●, 0.2mM; ●, 0.4mM AIT.

止し、0.4mMでは4日以上生育は見られなかった。また、DADSは0.8mMで22時間増殖を阻止したが、他は0.8mMでも阻害はみられなかった。また、Fig.4-6にB. cereusの結果を示した。AITは0.2mMで41時間増殖阻止し、0.4mMでは4日以上増殖はみられなかった。その他については、0.8mMでDADSは49.5時間増殖を阻止し、AAが定常期の濁度を低下させた他は阻害は示さなかった。以上の結果をまとめて、allyl誘導体による各菌の誘導期の長さ、定常期のODおよび増殖速度をFig.4-1に示した。

Table 4-1 Lag time, turbidity on stationary phase and growth rate of bacterial culture in the presence of allyl derivatives (0.8mM).

	<u>E.c</u>	<u>S.a</u>	<u>Pro.v</u>	<u>Ps.f</u>	<u>Ps.a</u>	<u>B.c</u>
Lag time (h)						
Control	4	6	6	10	8	6
DAS (CH ₂ :CHCH ₂) ₂ S	5	6	6	10	8	6
DADS (CH ₂ :CHCH ₂ S) ₂	6	34	47	11	22	50
ACl CH ₂ :CHCH ₂ Cl	4	6	6	10	8	6
AA CH ₂ :CHCH ₂ OH	4	6	6	10	8	6
AC CH ₂ :CHCH ₂ CN	4	6	6	10	8	6
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	66	59	96<	96<	96<	96<
OD on Stationary phase						
Control	0.89	1.40	0.87	1.05	1.60	1.92
DAS (CH ₂ :CHCH ₂) ₂ S	0.89	1.40	0.85	1.05	1.60	1.92
DADS (CH ₂ :CHCH ₂ S) ₂	0.74	1.40	0.85	1.05	1.60	1.66
ACl CH ₂ :CHCH ₂ Cl	0.85	1.40	0.89	1.05	1.60	2.00
AA CH ₂ :CHCH ₂ OH	0.89	1.30	0.49	1.05	1.60	0.65
AC CH ₂ :CHCH ₂ CN	0.85	1.40	0.85	1.00	1.60	1.82
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	0.92	1.30	-	-	-	-
Growth rate (OD/h)						
Control	0.90	0.93	0.95	1.09	1.06	0.96
DAS (CH ₂ :CHCH ₂) ₂ S	0.92	0.94	1.09	1.17	1.04	0.99
DADS (CH ₂ :CHCH ₂ S) ₂	0.91	0.92	0.98	1.07	0.98	1.08
ACl CH ₂ :CHCH ₂ Cl	0.91	0.97	0.98	1.10	1.06	1.05
AA CH ₂ :CHCH ₂ OH	0.91	0.98	1.12	1.13	1.06	0.99
AC CH ₂ :CHCH ₂ CN	0.93	0.96	0.97	1.14	1.06	0.99
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	0.84	0.95	-	-	-	-

1-3. 考察

AIT以外では、ニンニク類の成分であるDADSにのみPs. fragiを除く5種の菌に対して誘導期延長、もしくは定常期の濁度低下効果があり、AAがPro. vulgaris

と *B. cereus* の定常期の濁度低下作用を示したが、ACIとACには阻害効果はみられなかった。また、図には示していないが、DASは、いずれの菌に対しても0.8mMで阻害効果はみられず、DADSの抗菌性はSS結合によるところが大きいと考えられる。このようにallyl基を有するものが必ずしも阻害を示したわけではなく、allyl基自体が抗菌性を有しているとは限らないと考えられる。

第2節 isothiocyanate誘導体の細菌増殖阻害

methyl isothiocyanate (MIT), ethyl isothiocyanate (EIT), n-propyl isothiocyanate (PIT), n-butyl isothiocyanate (BIT) の細菌増殖阻害を同様に検討した。

2-1. 材料と実験方法

MIT、EIT、PIT、BIT、（共に東京化成製）、AITは1-1と同様に80mM溶液を調製して用いた。その他は1-1と同様である。

2-2. 結果

Fig.4-7に *E. coli* の結果を示すが、各培地中濃度は0.4mMである。BIT、PIT、EIT、AIT、MITそれぞれの誘導期は24、27、39、45、61時間であった。Fig.4-8の *S. aureus* の結果も、各0.4mMでAITは40時間、MITで55時間、BIT、EITは36時間、PITは29時間の増殖阻止を示した。 *Pro. vulgaris* ではFig.4-9に示すように、0.2mMでAITでは50時間、MITでは68時間、BITとEITでは47時間、PITは42時間増殖を阻止した。Fig.4-10に *Ps. fragi* の結果を示すが、この場合、何れも0.1mMで、MITでは72時間、AITで41時間、EITで30時間、PITで18時間、BITで12時間増殖を阻止した。 *Ps. aeruginosa* ではFig.4-11に示すが、0.2mMでAITでは41時間、EITで33時間、BIT、PITで12時間増殖を阻止し、MITでは4日間生育はみられなかった。Fig.4-12は *B. cereus* の結果であるが、0.4mMでPITは17時間、EITは23時間、BITは34時間、MITで38時間、AITで41時間増殖を阻止した。他の菌と異なり、MITとAITの阻害はほぼ同じであった。なお、増殖を開始した後の増殖速度、定常期の濁度は各菌毎に、各同族体ともだいたい同一のパターンであった。以上の結果

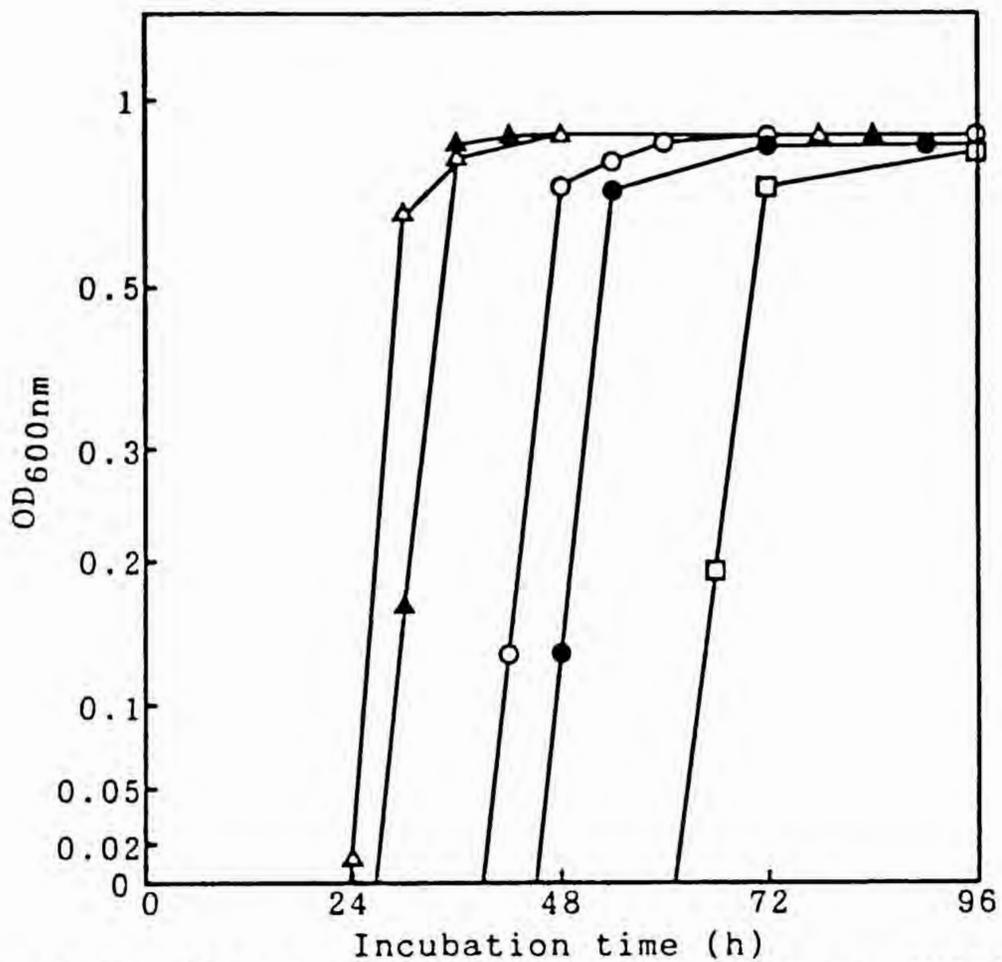


Fig.4-7 Effect of methyl isothiocyanate (MIT), ethyl isothiocyanate (EIT), n-propyl isothiocyanate (PIT), n-butyl isothiocyanate (BIT) and AIT on the growth of *E. coli*. □, 0.4mM MIT; ○, 0.4mM EIT; ▲, 0.4mM PIT; △, 0.4mM BIT; ●, 0.4mM AIT.

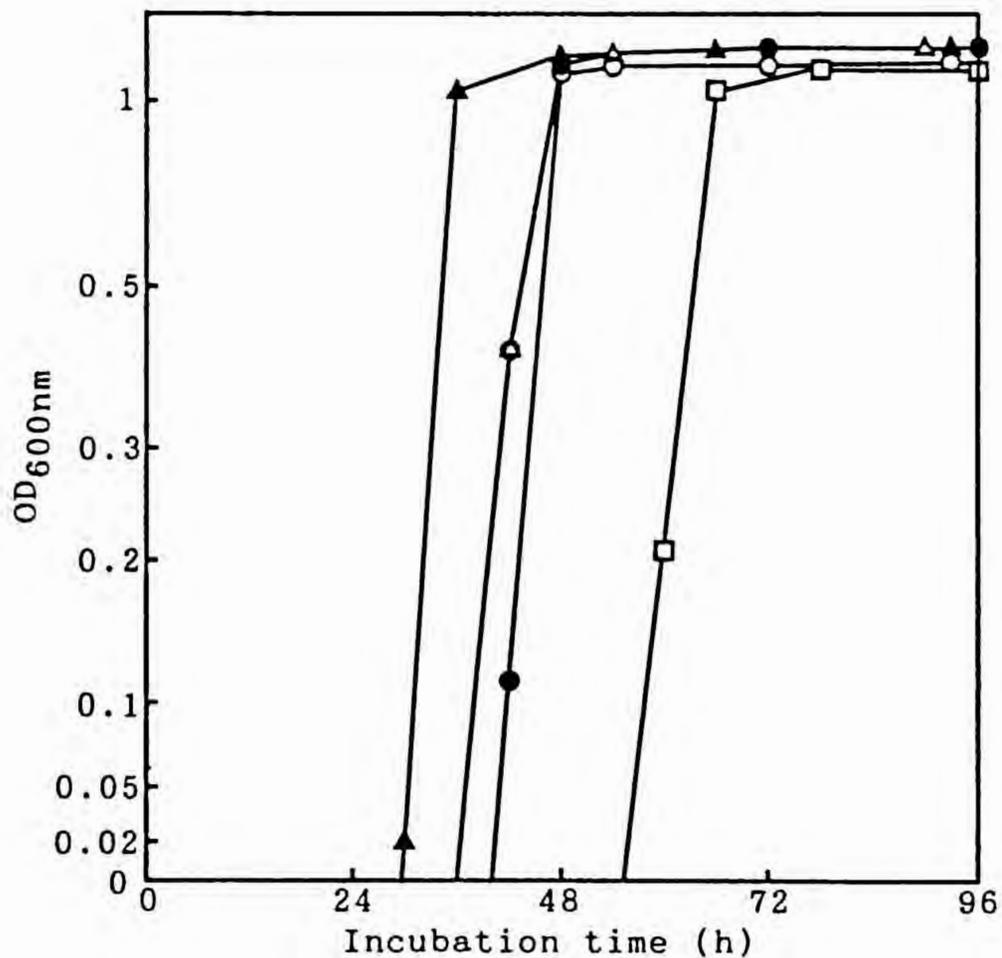


Fig.4-8 Effect of MIT, EIT, PIT, BIT and AIT on the growth of *S. aureus*. □, 0.4mM MIT; ○, 0.4mM EIT; ▲, 0.4mM PIT; △, 0.4mM BIT; ●, 0.4mM AIT.

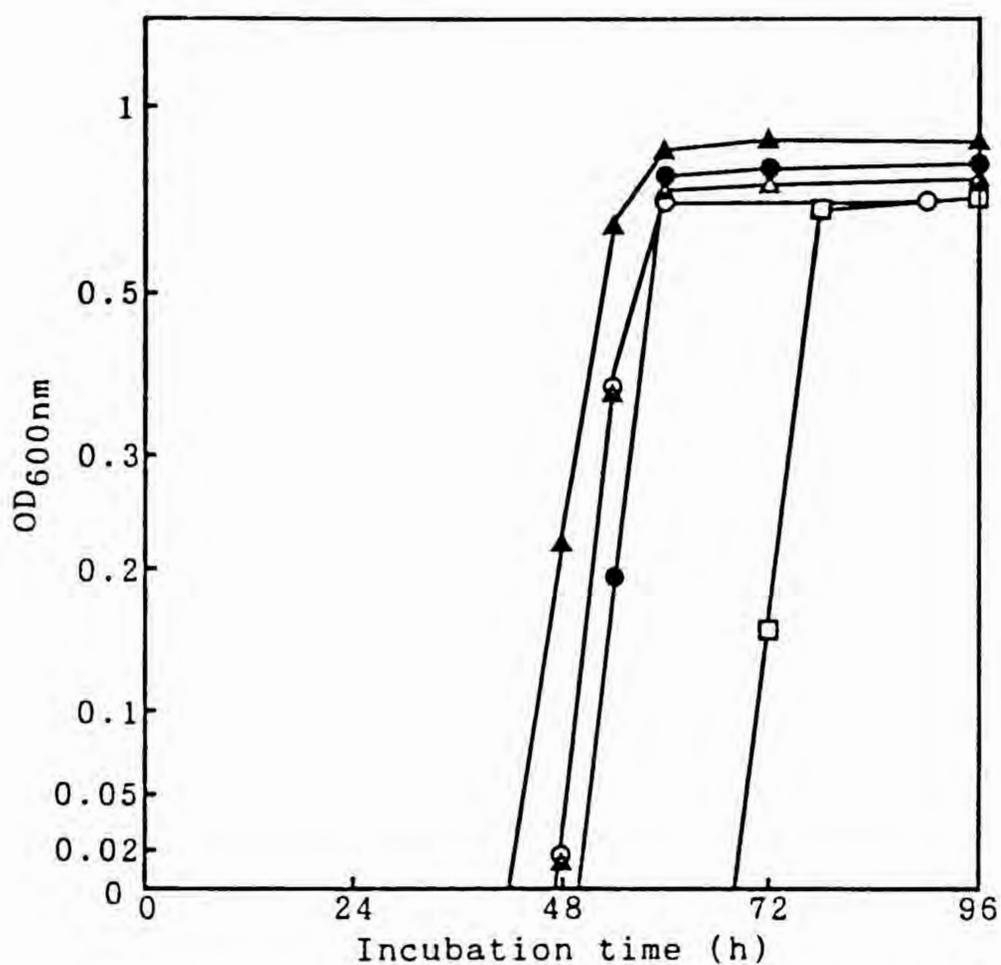


Fig.4-9 Effect of MIT, EIT, PIT, BIT and AIT on the growth of *Pro. vulgaris*. □, 0.2mM MIT; ○, 0.2mM EIT; ▲, 0.2mM PIT; △, 0.2mM BIT; ●, 0.2mM AIT.

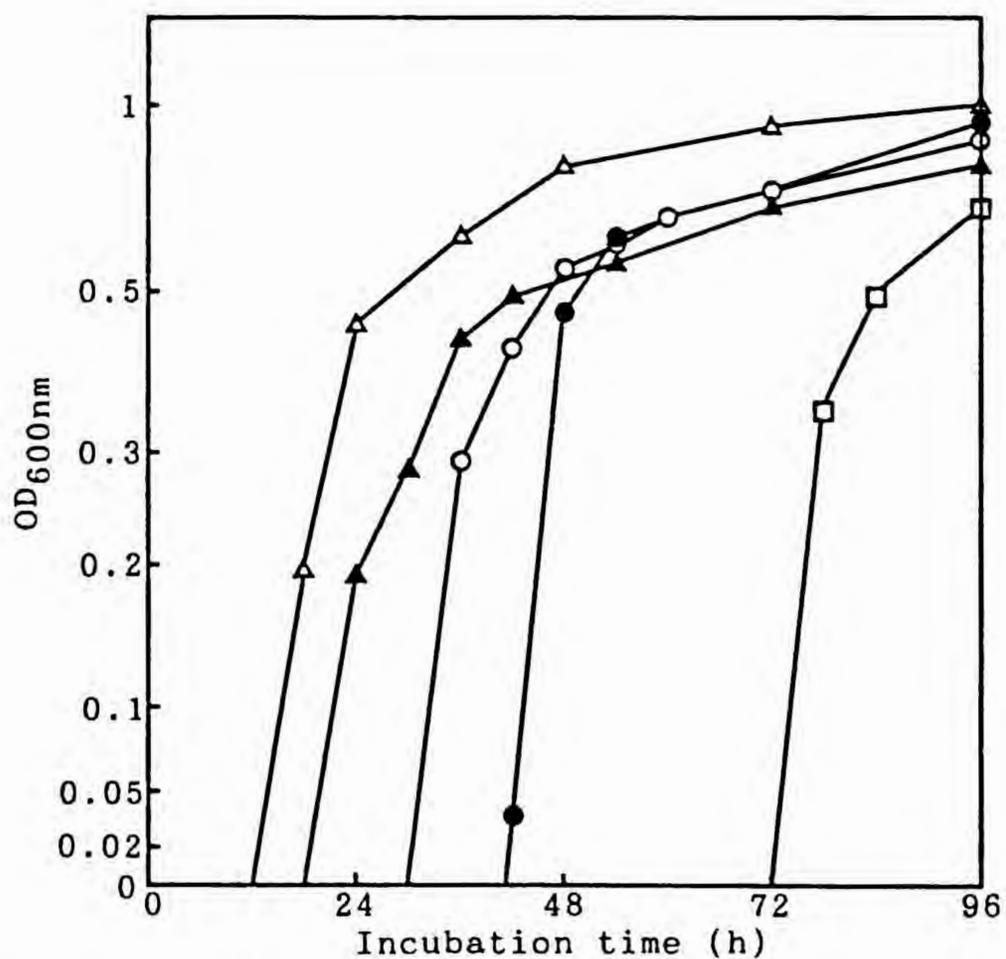


Fig.4-10 Effect of MIT, EIT, PIT, BIT and AIT on the growth of *Ps. fragi*. □, 0.1mM MIT; ○, 0.1mM EIT; ▲, 0.1mM PIT; △, 0.1mM BIT; ●, 0.1mM AIT.

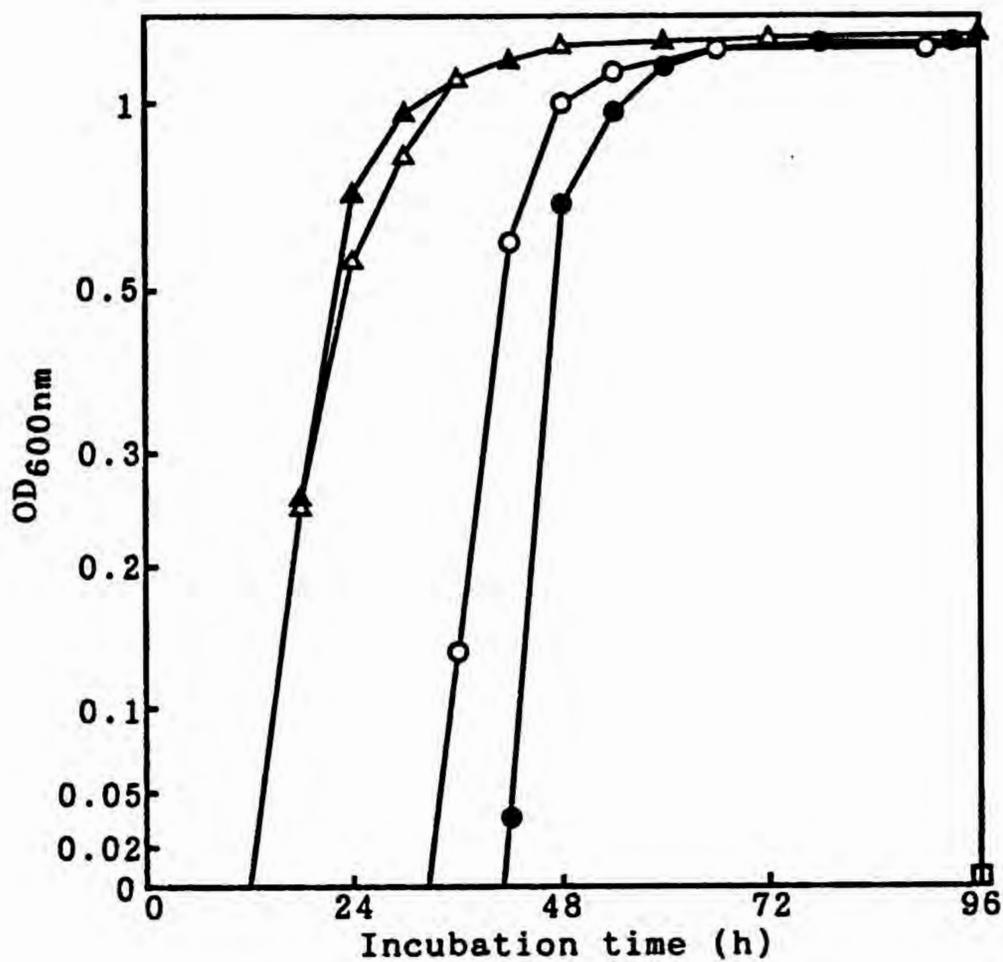


Fig.4-11 Effect of MIT, EIT, PIT, BIT and AIT on the growth of *Ps. aeruginosa*. □, 0.2mM MIT; ○, 0.2mM EIT; ▲, 0.2mM PIT; △, 0.2mM BIT; ●, 0.2mM AIT.

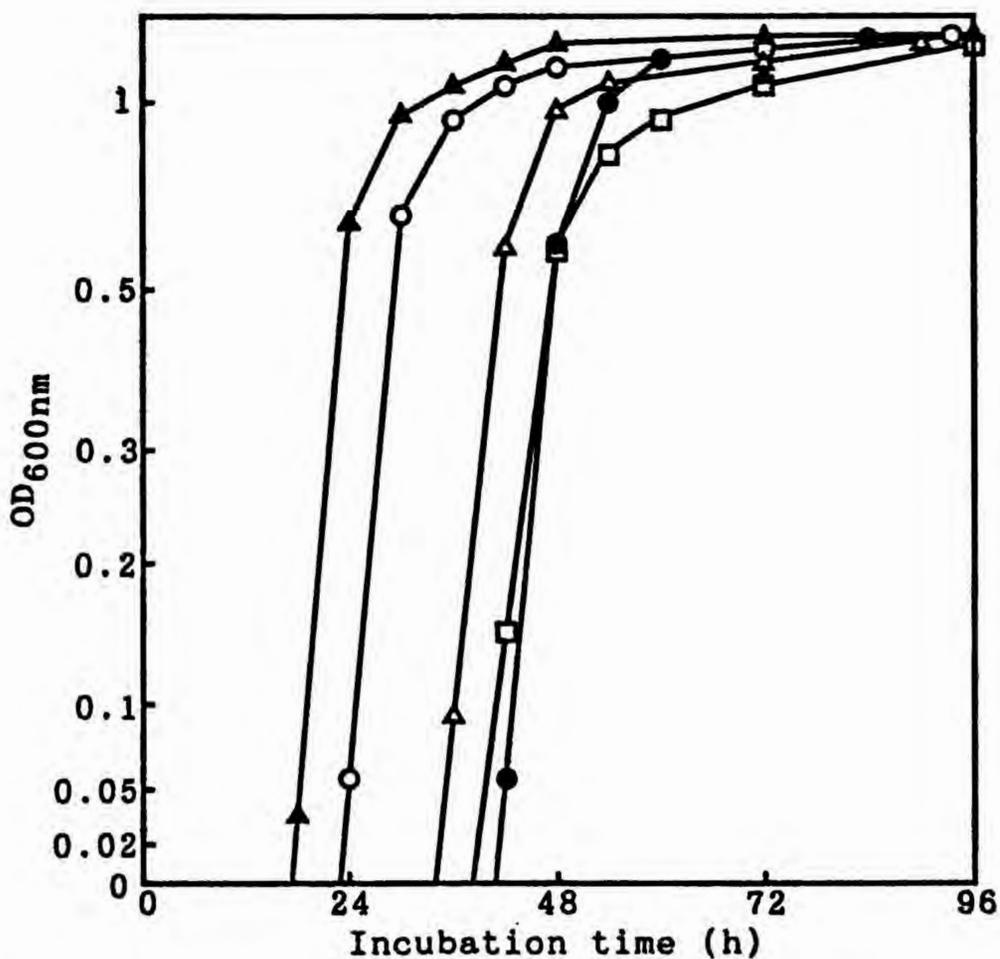


Fig.4-12 Effect of MIT, EIT, PIT, BIT and AIT on the growth of *B. cereus*. □, 0.2mM MIT; ○, 0.2mM EIT; ▲, 0.2mM PIT; △, 0.2mM BIT; ●, 0.2mM AIT.

をまとめて、isothiocyanate誘導体による各菌の誘導期の長さ、定常期のODおよび増殖速度をFig.4-2に示した。

Table 4-2 Lag time, turbidity on stationary phase and growth rate of bacterial culture in the presence of isothiocyanates.

	<u>E.c</u> 0.4mM	<u>S.a</u> 0.4mM	<u>Pro.v</u> 0.2mM	<u>Ps.f</u> 0.1mM	<u>Ps.a</u> 0.2mM	<u>B.c</u> 0.2mM
Lag time (h)						
Control	4	6	6	10	8	6
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	45	40	50	40	41	41
n-BIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NCS	23	36	47	12	12	34
n-PIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ NCS	27	30	42	18	12	17
EIT CH ₃ CH ₂ NCS	39	36	47	30	33	23
MIT CH ₃ NCS	61	55	68	72	96<	38
OD on Stationary phase						
Control	0.89	1.40	0.87	1.05	1.60	1.92
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	0.82	1.40	0.77	0.92	1.70	1.74
n-BIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NCS	0.85	1.40	0.74	1.00	1.70	1.66
n-PIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ NCS	0.85	1.40	0.82	0.77	1.70	1.74
EIT CH ₃ CH ₂ NCS	0.85	1.22	0.68	0.85	1.70	1.68
MIT CH ₃ NCS	0.80	1.19	0.68	0.77	-	1.49
Growth rate (OD/h)						
Control	0.90	0.93	0.95	1.09	1.06	0.96
AIT CH ₂ :CHCH ₂ NCS	1.05	0.92	1.12	1.01	0.93	0.91
n-BIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NCS	0.91	0.99	1.04	1.22	1.14	1.05
n-PIT CH ₃ CH ₂ CH ₂ NCS	1.06	0.84	1.17	1.22	1.12	0.94
EIT CH ₃ CH ₂ NCS	1.05	0.99	1.05	1.09	1.11	0.97
MIT CH ₃ NCS	1.14	1.20	1.10	1.04	-	1.14

2-3. 考察

MITが B. cereusを除いていずれの菌に対しても効果が強く、ついでAITが効果があり、EIT、PIT、BITの効果はAITより低かった。isothiocyanate類はその阻害力に大小、また菌種によって多少の差はあれ、抗菌力を有していた。このことより、isothiocyanate基が抗菌性に重要な役割を有すると思われる。Foter³⁹⁾は数種の細菌に対して EIT、AIT、MITの順で抗菌性が増大すると述べているが、やはり、同様の傾向にあった。alkyl系では E. coli, Ps. fragi, Ps. aeruginosaに対してはMIT、EIT、PIT、BITの順で阻害力が大きく、炭素数の少ない方が阻害力は大きくなり、S. aureus, Pro. vulgaris, B. cereusに対してはPITが最も阻害力が低く、炭素数の一番少ないMITが阻害力が最も大きく、EIT、BITは両者の中間で

あった。このことより alkyl isothiocyanate は炭素数の少ない方が一般的に抗菌力が大きいといえる。また、不飽和結合をもつ alkenyl 系の AIT は炭素数の少ない EIT や同じ炭素数を有する PIT より抗菌力は強く、二重結合が抗菌力を増大させており、このことが AIT に強い抗菌性を与えていると考えられる。なお、MIT は CS_2 と methylamine から合成されたもので天然物ではないが、その毒性はラットに対する経口 LD_{50} が 305mg/kg で、AIT の 339mg/kg と大差はない⁹²⁾。

AIT は isothiocyanate であることより抗菌性を有し、allyl 基に二重結合があることがその抗菌性を増大させていると考えられる。

第3節 小括

allyl 誘導体では diallyl disulfide 以外はいずれもほとんど抗菌性はなかった。また、isothiocyanate 類は抗菌性を有し、alkyl isothiocyanate 類では、methyl 基をもつものが最も抗菌性が大きく、次いで ethyl 基が大きく、n-propyl 基、n-butyl 基は抗菌性が低い傾向にあり、alkyl 基の炭素数が少ない方が抗菌性が強かった。また、二重結合を持ち、炭素数が3である allyl isothiocyanate (AIT) は、alkyl 系の炭素2個の ethyl isothiocyanate や、同じ炭素数の n-propyl isothiocyanate より抗菌力が強く、二重結合が抗菌性を増大させることを認めた。

この結果、AIT の抗菌性は isothiocyanate 部分が重要で、allyl 基は二重結合を持つことよりその効果を増大させていると考えられる。

第5章 ブラウンマスタードおよびクローブによる食品中微生物の増殖阻害

ブイヨン培地で検討した香辛料の細菌増殖阻害効果を、食品保存料として応用することは重要課題である。食品中で香辛料の抗菌性を期待する場合、培地中よりもかなり高濃度を要するといわれ³¹⁾、また、香辛料は独特の風味を有するため、食品への利用は制限されることがあり、香辛料を保存料として利用するためには検討すべき問題が多い。

そこで、第5章では、食品のモデルとして鶏のレバーを中心にマスタード、クローブの抗菌性を検討した。第1節では滅菌したレバー磨砕物中での粉碎マスタードおよびクローブの *E. coli*, *S. aureus* に対する抗菌性を検討し、さらにブイヨン培地中での抗菌性と比較した。第2節では粉碎マスタードおよびクローブの生のレバー磨砕物中の微生物増殖阻害を検討し、酢酸との併用、温度の影響をも検討した。第3節では第2節の結果を基にマスタードの種々の食品中微生物増殖阻害を検討した。

第1節 滅菌レバー中でのマスタードおよびクローブの細菌増殖阻害

ブイヨン培地でのマスタード、クローブの抗菌性は前述のようにかかなり強いことを確認した。宮本ら⁹³⁾は香辛料による鶏がらスープ中での細菌増殖阻害を検討しており、クローブの阻害が強く、ブイヨン培地よりスープ中の方が阻害が弱いこと、また、*E. coli* より *S. aureus* の方が感受性が強いことを報告している。そこで、培地中でマスタードおよびクローブの阻害を受けた細菌が、スープよりは更に濃厚なレバー磨砕物中ではどのような阻害を受けるかを検討し、ブイヨン培地での抗菌性と比較した。

1-1. 材料と実験方法

1-1-1. 滅菌レバー磨砕物とブイヨン培地

市販の鶏レバーをワーリングブレンダーで磨砕して同量の蒸留水を加え、金網上でガスバーナーを用いて10分間沸騰加熱攪拌処理し、さらに乳鉢ですりつぶし、アルミニウムキャップ付きの試験管に3gずつ分注し、121℃、5分間オートク

レーブしたものを滅菌レバーとした。

対照には魚肉エキス、ポリペプトン、グルコース各1%、食塩0.1%でpH 7.0に調整したブイヨン培地を用いた。

これらに下記の粉末香辛料を添加した。

1-1-2. 粉末香辛料

ブラウンマスタード（朝岡香辛料）は粉碎後、ヘキサンで脱脂し、クローブ（朝岡香辛料）は粉碎して、殺菌のため、双方とも15分間紫外線照射（10W, 50cm）処理したものを、それぞれ粉末マスタード、粉末クローブ試料とした。粉末クローブは滅菌レバーもしくはブイヨン培地に添加して、5分間沸騰水中で処理後、また、粉末マスタードは添加して30℃で30分保温後、下記の通り菌を接種して培養した。両者併用の場合はクローブ、次いでマスタードを上記と同様の方法で添加した。

1-1-3. 接種菌株と培養方法

接種菌株は、*S. aureus* IFO 3761と*E. coli* IFO 3301で、第1章、第3節と同様に接種菌を準備した。そして上記の培地またはレバー磨砕物に $10^4 \sim 10^5$ /mlになるように接種後、30℃で静置し、経時的に増殖を測定した。

1-1-4. 増殖測定

生菌数は酵母エキス0.25%、ポリペプトン0.5%、グルコース0.1%、寒天1.8%（pH7.0）の培地で30℃、48時間平板混釈法⁷²⁾で培養して測定し、CFUで示した。

1-1-5. タンパク質量の測定

培地と磨砕物について窒素含量をケールダール法で測り、6.25を乗じてタンパク質量とした。

1-2. 実験結果と考察

実験に先立って、スパイス由来の微生物はスパイスの紫外線処理により完全に死滅したことを確認した。*S. aureus* に対する結果を Fig.5-1に示す。滅菌レバー中でもクローブ6%で幾分殺菌作用を示し、またマスタード6%で増殖速度を低下させた。クローブ2%またはマスタード4%各単独ではほとんど阻害効果がなかったが、2者を併用すると生菌数が1日後に10倍に増加するにとどまり、以後3日目まで増加せず、かなり併用効果があった。一方、ブイヨン培地中では

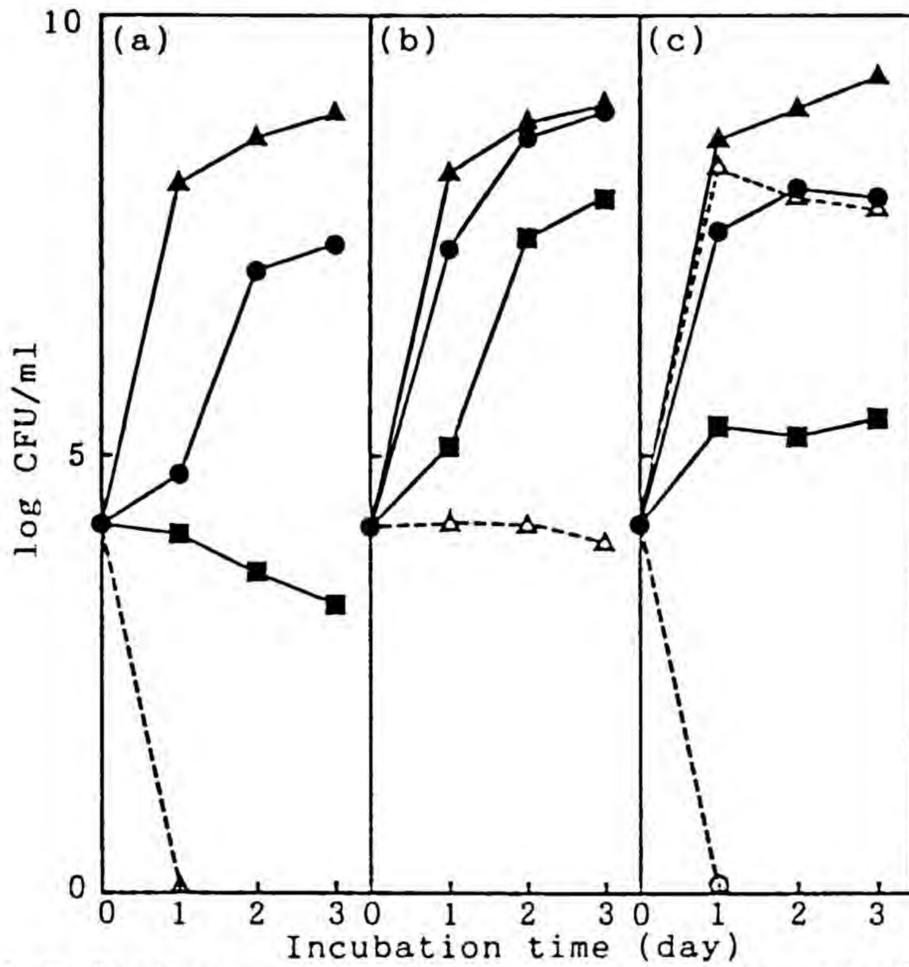


Fig.5-1 Effect of mustard and clove on the growth of *S. aureus* in autoclaved liver homogenate (ALH) and bonite medium (BM). (a) ▲, 2%; ●, 4%; ■, 6% clove in ALH; △, 2% clove in BM. (b) ▲, 2%; ●, 4%; ■, 6% mustard in ALH; △, 2% mustard in BM. (c) ▲, control in ALH; △, control in BM; ●, 2% clove + 2% mustard; ■, 2% clove + 4% mustard in ALH; ○, 2% clove + 2% mustard in BM.

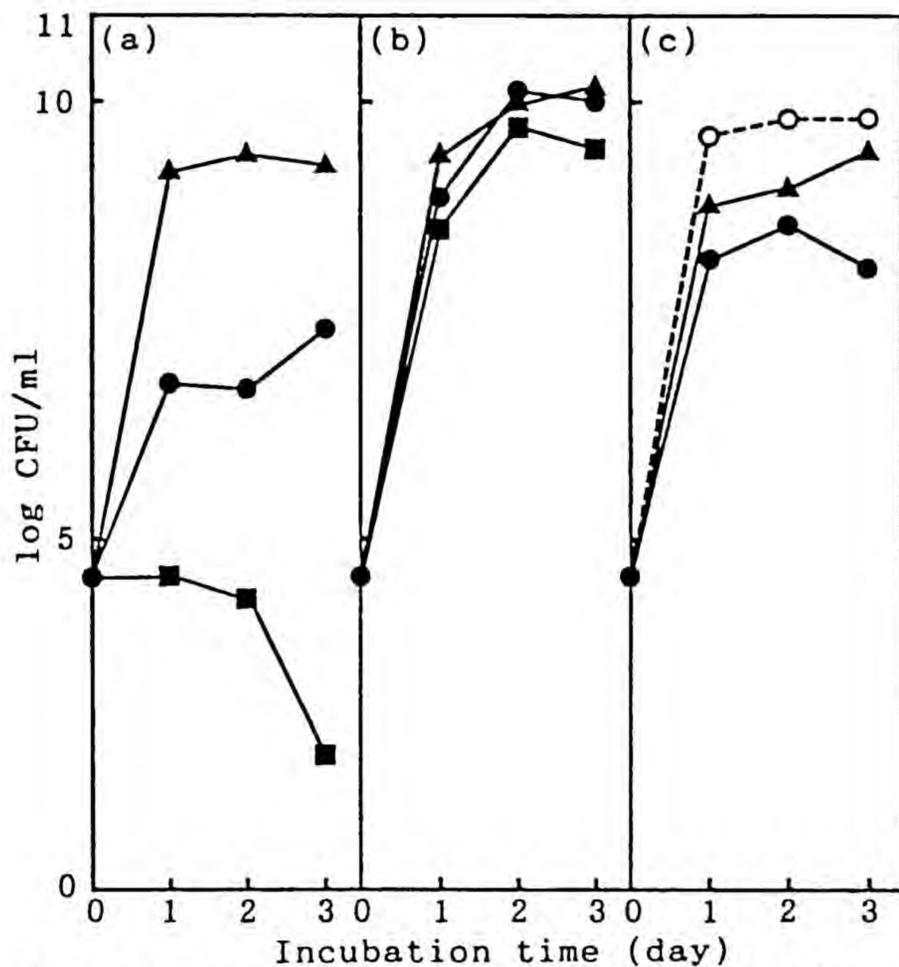


Fig.5-2 Effect of mustard and clove on the growth of *E. coli* in ALH. (a) ▲, 2%; ●, 4%; ■, 6% clove. (b) ▲, 2%; ●, 4%; ■, 6% mustard. (c) ○, control; ▲, 2% clove + 2% mustard; ●, 2% clove + 4% mustard.

クローブ2%で1日後に完全に滅菌、マスタード2%で3日間生菌数の増加阻止がみられた。

Fig.5-2に滅菌レバーでの*E. coli*に対する結果を示した。クローブ4%以上では阻害効果はかなりあったが、マスタードの阻害は僅かであり、クローブ2%とマスタード4%の併用でも比較的効果は少なく、*S. aureus*より抵抗力があった。これらの結果は宮本らの結果とも一致する。

食品試料の一つとして取り上げたレバー中での抗菌性がブイヨン培地中より低下したので、その原因を考察した。Shelefら³¹⁾はセージのMICが食品中ではかなり高濃度であり、特に肉ではそれが大きく、タンパク質がセージに対するバクテリアの感受性を低下させると報告し、Rico-Muñozら⁹⁴⁾はタンパク質がBHAの抗菌力を低下させると報告している。また、山本ら⁹⁵⁾はレバーエキスが酢酸の阻害から細菌を保護し、酵母に対する抗菌力を低下させ、それは比較的低分子の物質によると述べている。今回の実験結果からも、レバー磨砕物中での香辛料の細菌増殖阻害効果がブイヨン培地に対して低下した。ブイヨン培地の粗タンパク質含量は測定の結果1.38%であったのに対し、滅菌レバーの粗タンパク質含量は10.8%であり、ブイヨン培地の約8倍であった。レバー中の脂肪、炭水化物の含量は低いので、レバー中の特殊成分の存在、またはブイヨン培地に較べてタンパク質濃度の増加、あるいは水分含量の低下が阻害力を低下させていると思われ、抗菌性低下作用の本態については更に検討すべきであると考えている。

このように香辛料単独では食品中でその阻害効果を期待するにはかなりの高濃度を要し、それは食味に耐えかねた。そこで、主成分の異なる2種の香辛料の併用を検討したが、今後は、第2章で検討したような化合物の併用や保存温度を含めて実用可能な組合せの検討が重要課題と考えられる。

第2節 マスタード、クローブおよび酢酸による生レバー中微生物の増殖阻害とその併用効果

食品中で、クローブおよびマスタードの微生物増殖阻害を期待するにはブイヨン培地よりかなりの高濃度を要することがわかった。食品中では種々の微生物相

があり、それらがいろいろな要因でそれぞれの挙動を示している。そこでマスタードおよびクローブがレバー中に存在する微生物相にどのように阻害を示すかを生レバー磨砕物を用いて検討した。また、それに及ぼす酢酸併用効果および保存温度の影響をも併せて検討した。

2-1. 材料と実験方法

2-1-1. 粉碎香辛料

1-1-2と同様に紫外線照射殺菌したものをを用いた。

2-1-2. 酢酸

酢酸（和光純薬工業製、特級）はそのまま用いた。

2-1-3. 生レバー磨砕物

市販の鶏レバーをワーリングブレンダーで磨砕して、アルミニウムキャップ付きの試験管に3gずつ分注した。これに粉碎香辛料、酢酸を添加して10℃あるいは20℃で保存した。

2-1-4. 生菌数の測定

全好気性細菌（総菌）は Plate Count Agar (Difco Co.)、乳酸菌は M.R.S. Agar (Oxoid Co.)、大腸菌群は Violet Red Bile Agar (Difco Co.)、酵母は Potato Dextrose Agar (Difco Co.) を用いて平板混釈法⁷²⁾で生菌数を計数し、CFUで示した。

2-1-5. 官能検査

当研究室の8名をパネラーに、磨砕したレバーに醤油10%を添加して加熱攪拌し、そこにスパイスおよび酢酸を添加したものについて可食性を官能検査により調べた。

2-2. 実験結果と考察

2-2-1. クローブと酢酸の効果

クローブ6%と酢酸0.5%について単独あるいは併用による阻害効果をFig.5-3に示す。10℃では酢酸は酵母に対しては2日、他の微生物については4日間生菌数増加を阻止した。クローブは総菌と乳酸菌では2日間、酵母では4日間生菌数増加を阻止し、大腸菌群に対しては生菌数を減少させ、3日目で0となった。酢

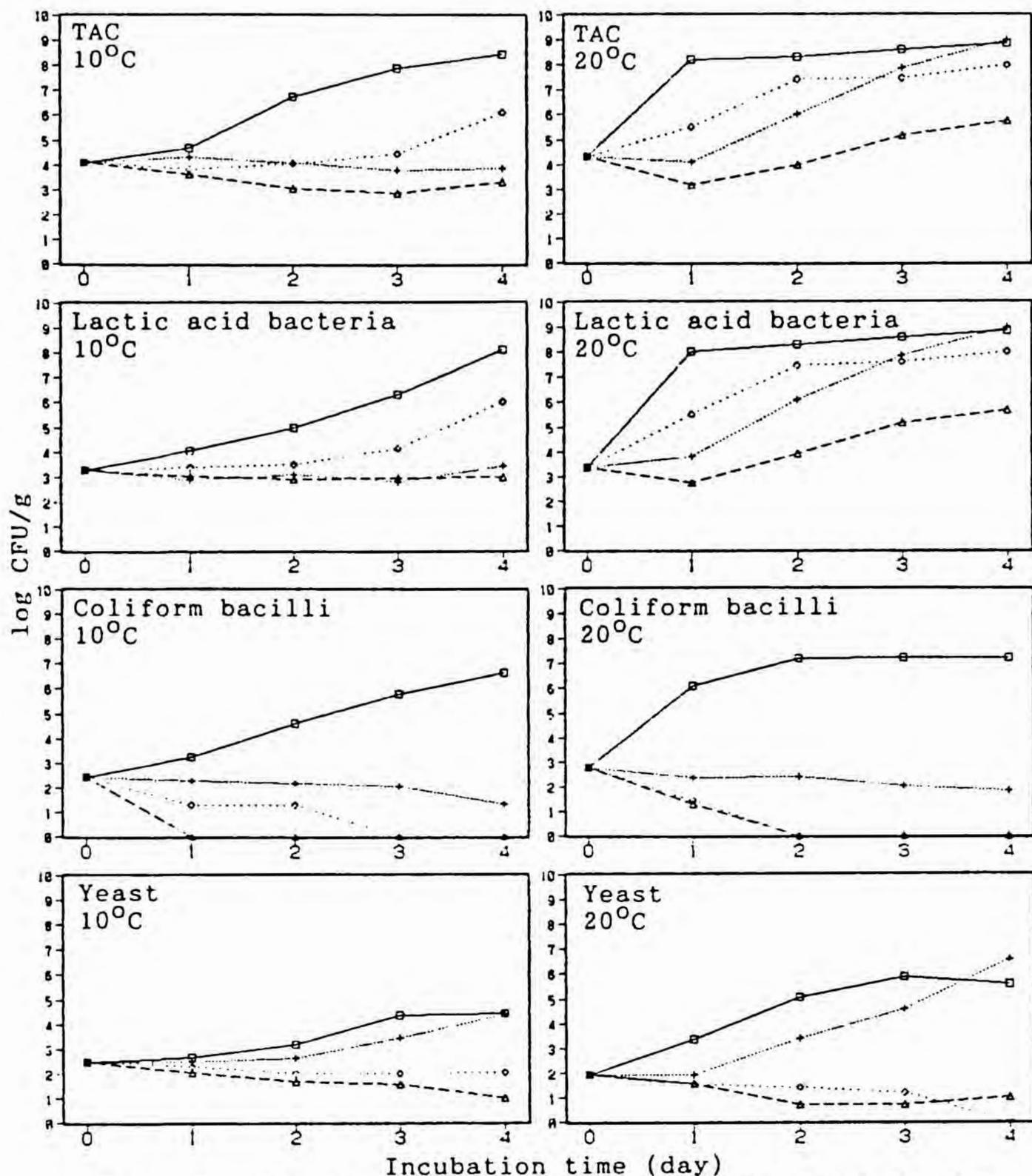


Fig.5-3 Effects of clove and/or acetic acid on the growth of microorganisms in chicken liver homogenate.
 □, control; ○, clove 6%; +, acetic acid 0.5%; △, clove 6% + acetic acid 0.5%.

酸との併用効果は特に大腸菌群に対して大きく、1日目で生菌数0となった。20℃では酢酸は大腸菌群に対しては生菌数を減少させたが、他の微生物に対しては1日生菌数増加を阻止するにとどまった。クローブは大腸菌群と酵母に対して生菌数を減少させ、大腸菌群で2日目、酵母で4日目に生菌数0となった。総菌、乳酸菌に対しては増殖速度を低下させた。併用効果は総菌と乳酸菌に対してみられ、1日後には生菌数が幾分低下し、その後増殖したが速度はコントロールよりかなり低下した。

2-2-2. マスタードと酢酸の効果

マスタード 6% と酢酸 0.5% について単独あるいは併用による阻害効果を Fig. 5-4 に示す。10°C ではマスタードは酵母の生菌数を減少させ、他の微生物については 2 日間生菌数増加をほぼ阻止した。酢酸との併用効果は大腸菌群と酵母でみられた。20°C ではマスタードは総菌、乳酸菌に対しては阻害効果はなかった。一方、大腸菌群と酵母に対してはほとんど 4 日間生菌数増加を阻止した。併用効果は大腸菌群と酵母でみられ、いずれも 4 日目で生菌数 0 となり、滅菌された。

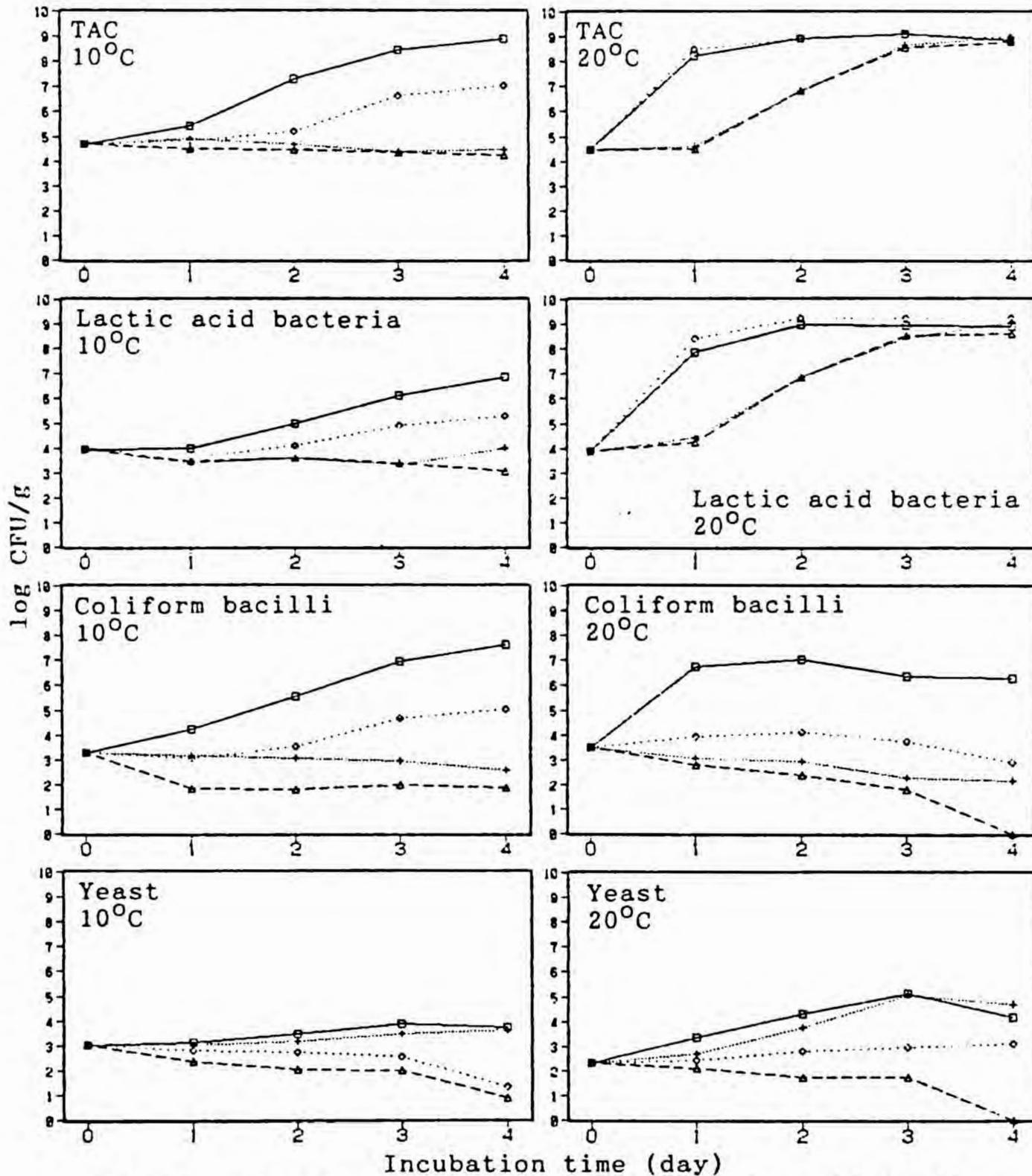


Fig.5-4 Effects of mustard and/or acetic acid on the growth of microorganisms in chicken liver homogenate.
 □, control; ◇, mustard 6%; +, acetic acid 0.5%; △, mustard 6% + acetic acid 0.5%.

2-2-3. 官能検査によるスパイス添加レバーの可食性

マスタードは 6% でも 8 人中 7 人が食することが可能としており、4% では 8

人中8人ともむしろ消臭効果があり、食べ易くなったという結果を得た。クローブ2%は8人中5人は食することが可能としているが6%では8人全てが食味に耐えかねるといった結果であった。また、酢酸は今回使用した濃度では味に悪い影響がなく、併用した場合、むしろ香辛料の刺激を緩和するとの結果を得た。

生レバー中の微生物に対する香辛料の阻害は微生物の種類、香辛料、温度で異なり、併用効果も異なることがわかった。大腸菌群はどの場合もかなり阻害されており、併用効果も強かった。このことは食品の保存の点からみると、かなり有効と考えられる。また、大腸菌群は10℃より20℃のほうが阻害を受け易く、これは20℃のほうが菌の増殖に適しており、そのためダメージを受けたとも考えられる。また、総菌と乳酸菌の傾向は類似しており、特に20℃で顕著であった。このことより、レバー中の微生物で乳酸菌の占める割合は大きいものと思われる。また、官能検査より、クローブの場合、濃度を2%以下に低下させることが必要である。マスタードは今回の実験濃度では10℃保存ならば十分利用可能であるが、20℃での利用の場合は更に他の成分との併用を検討する必要がある。

第3節 マスタードによる数種の食品中微生物の増殖阻害

第2節より、官能検査の結果をふまえて、マスタードが有効と考え、他のいくつかの食品への応用を試みた。

3-1. 材料と実験方法

3-1-1. 食品材料

材料は1990年4月から9月にかけて住吉区杉本で購入した、鶏のササミとモモ（皮なし）、ブタのロース（脂身なし）、ウシのモモ（脂身なし、和牛）、サバの皮を除いた可食部およびシバエビの頭、殻と尾を除いた可食部を試料とした。いずれもストマッカーで磨砕してマスタードを添加し、20℃で保温した。

3-1-2. マスタード

2-1-1と同様に調製した。

3-1-3. 生菌数の測定

2-1-4 に準じて行った。

3-2. 実験結果と考察

鶏ササミに対する阻害効果をFig.5-5に示す。総菌、乳酸菌に対しては9%で1日生育を阻害し、大腸菌群に対してはマスタード濃度に応じて阻害を示し、9%で生菌数の増加を1日阻止した。酵母は無添加でもあまり増殖がみられないが、マスタードの添加により完全に生菌数の増加を阻止した。鶏モモに対する結果をFig.5-6に示す。モモに対してはマスタード濃度に応じて阻害を示し、特に大腸菌群に対して顕著であった。酵母は無添加でもほとんど生菌数は増加しなかったが、添加により完全に阻止し、9%では殺菌作用がみられた。ブタロースに対する結果をFig.5-7に示す。総菌、乳酸菌に対しては鶏ササミと同様の傾向にあった。大腸菌群に対して顕著な効果があり、9%では4日間生菌数の増加を阻止し、3%でも生菌数が無添加より減少していた。酵母に対しては無添加でも生菌数の増加はなかったが、添加により生菌数の減少がみられた。ウシモモに対しての結果をFig.5-8に示す。大腸菌群に対してかなりの阻害効果があり、6%で1日生菌数の増加を阻止し、その後は僅かに増加した。そして、9%では生菌数が減少した。酵母に対しても効果があり、6、9%では生菌数が減少した。サバに対する結果をFig.5-9に示す。総菌に対しては6%で1日増殖阻止したが、3%ではむしろ促進傾向にあった。乳酸菌、大腸菌群に対しては9%で阻害を示した。酵母は無添加でも検出されなかった。エビに対する結果をFig.5-10に示す。エビでは大腸菌群、酵母に対して阻害を示したが、総菌、乳酸菌には効果がなかった。

検討した食品で共通していえるのは大腸菌群に対してかなり阻害効果を示したことである。しかし、乳酸菌に対しても一定の効果がある場合が多く、酵母は元来増殖速度が低い、少なくとも増殖阻止が認められた。そして獣、鳥肉の微生物に対してはよく似たパターンがみられるが、サバ、エビの場合はこれらと違うパターンであった。いずれの場合もさらに他の因子を併用するとかなり利用できると期待できる。

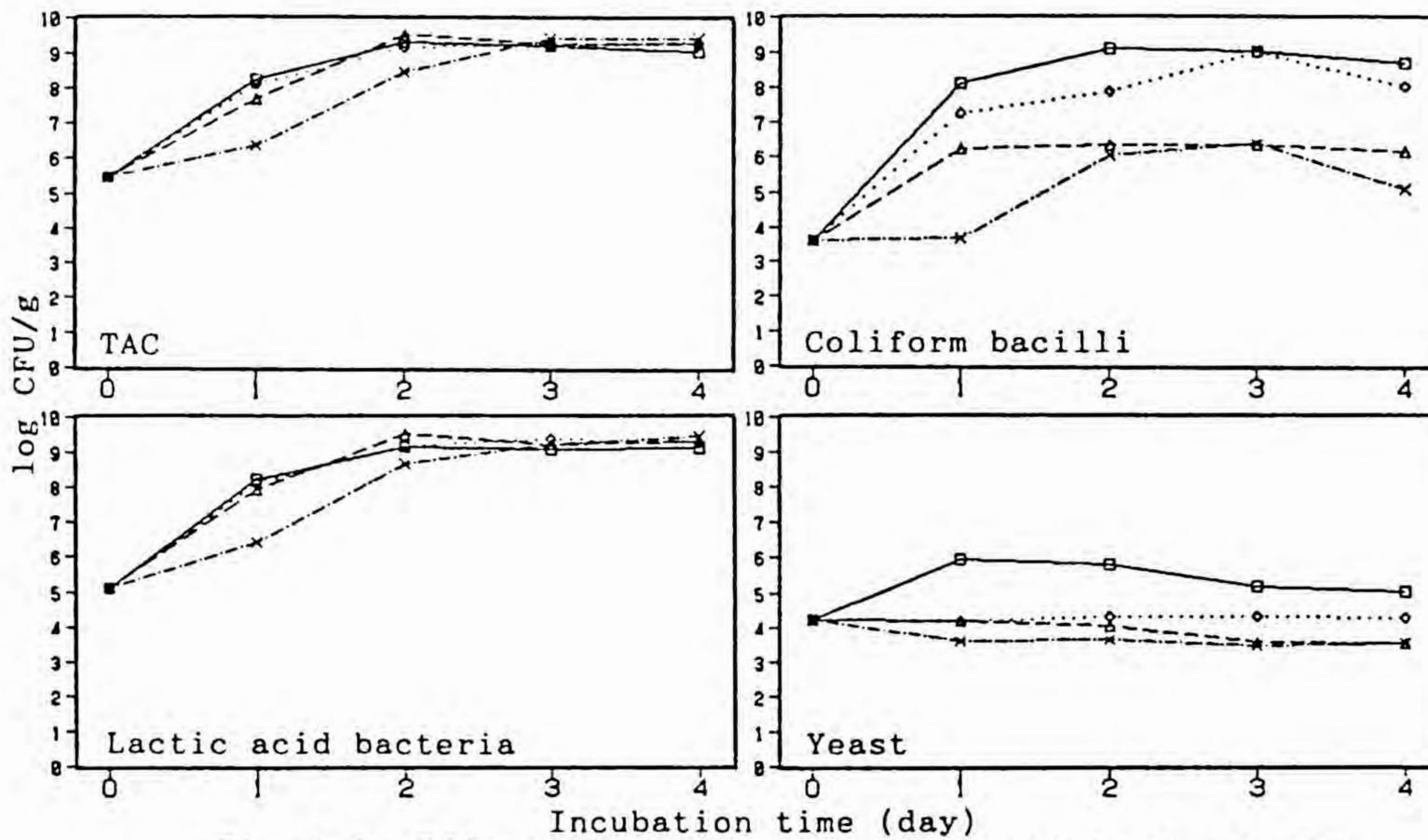


Fig.5-5 Effect of mustard on the growth of microorganisms in chicken sasami homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

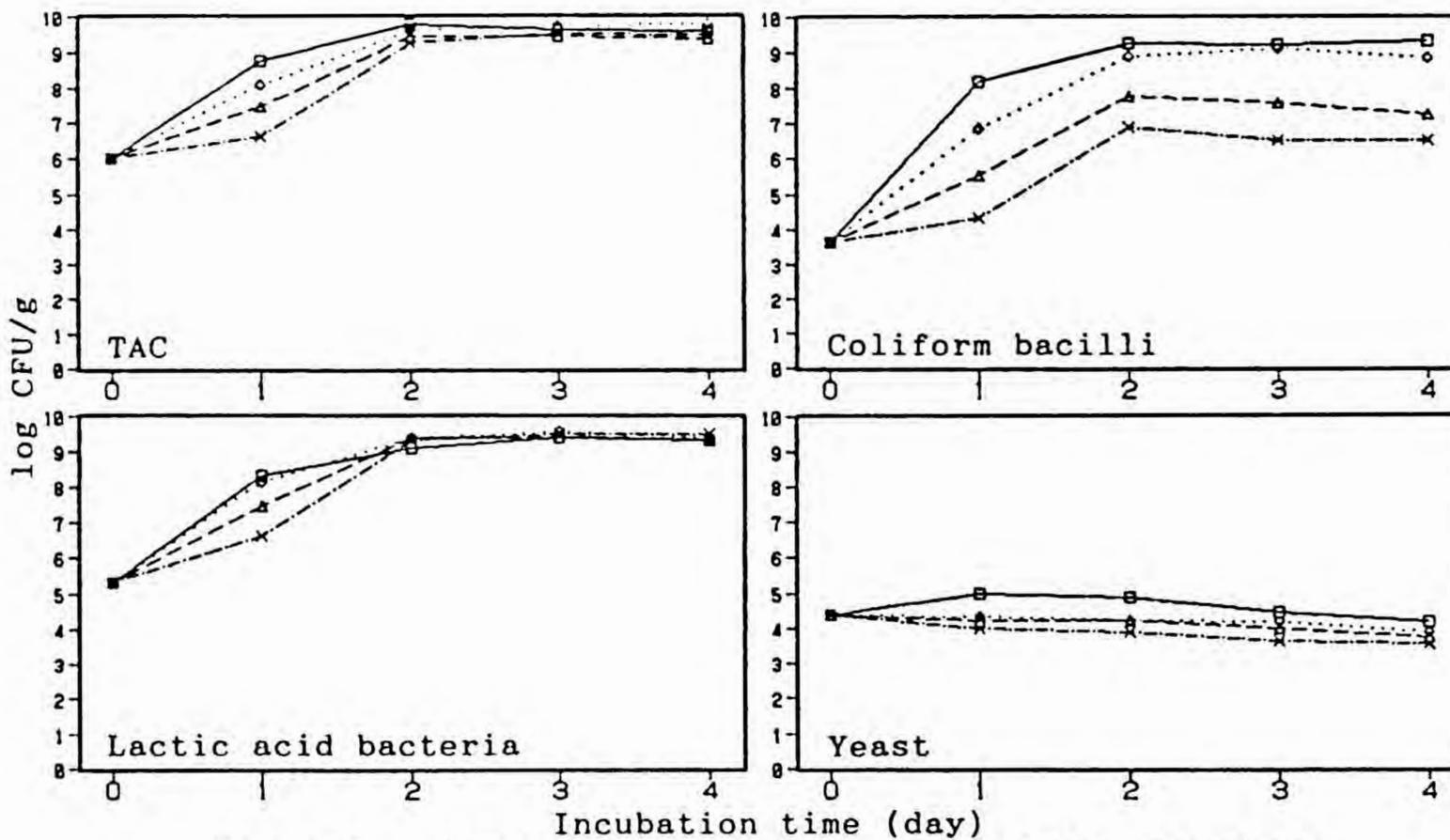


Fig.5-6 Effect of mustard on the growth of microorganisms in chicken thigh (flesh only) homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

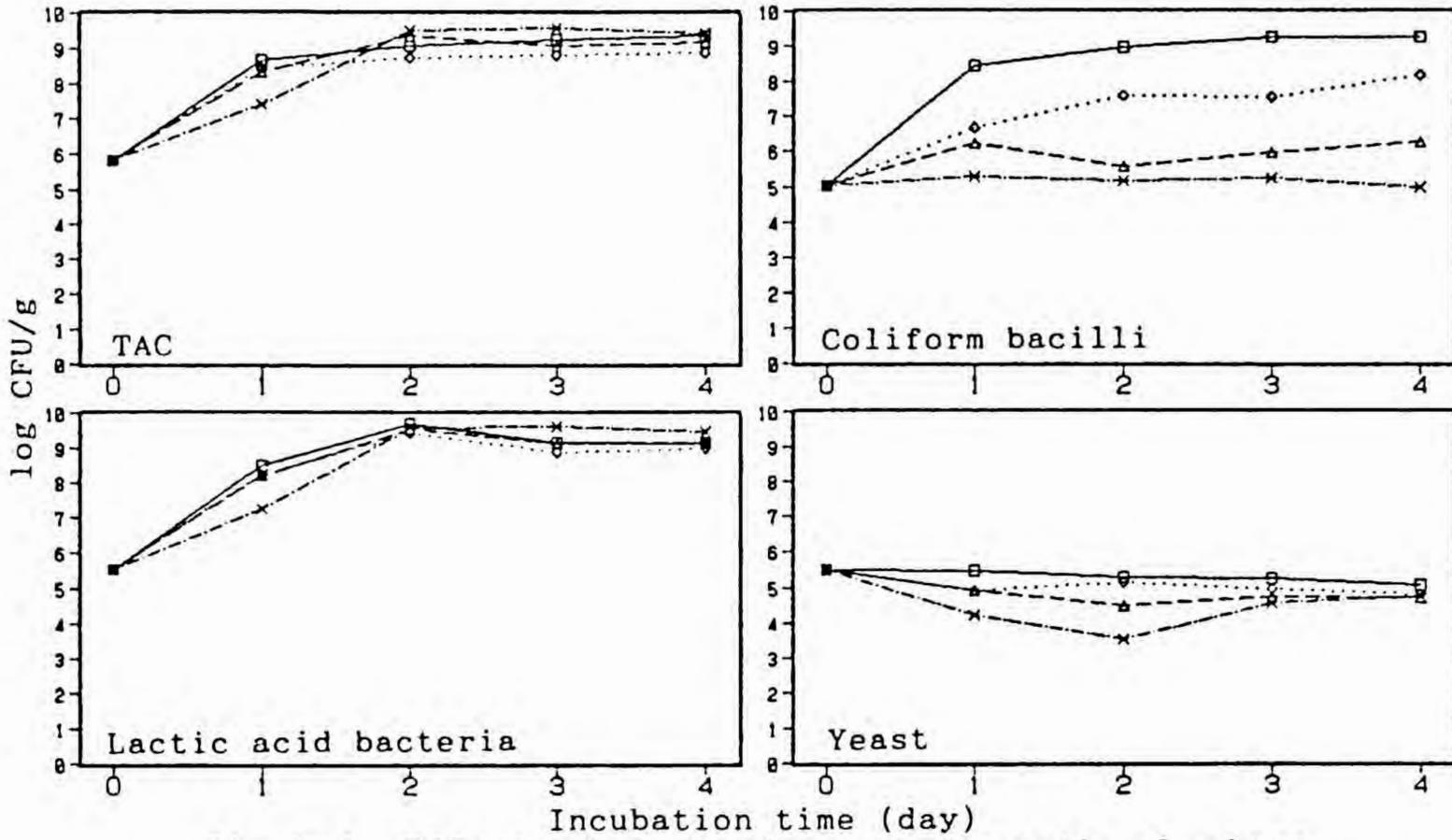


Fig.5-7 Effect of mustard on the growth of microorganisms in pork loin (separable lean) homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

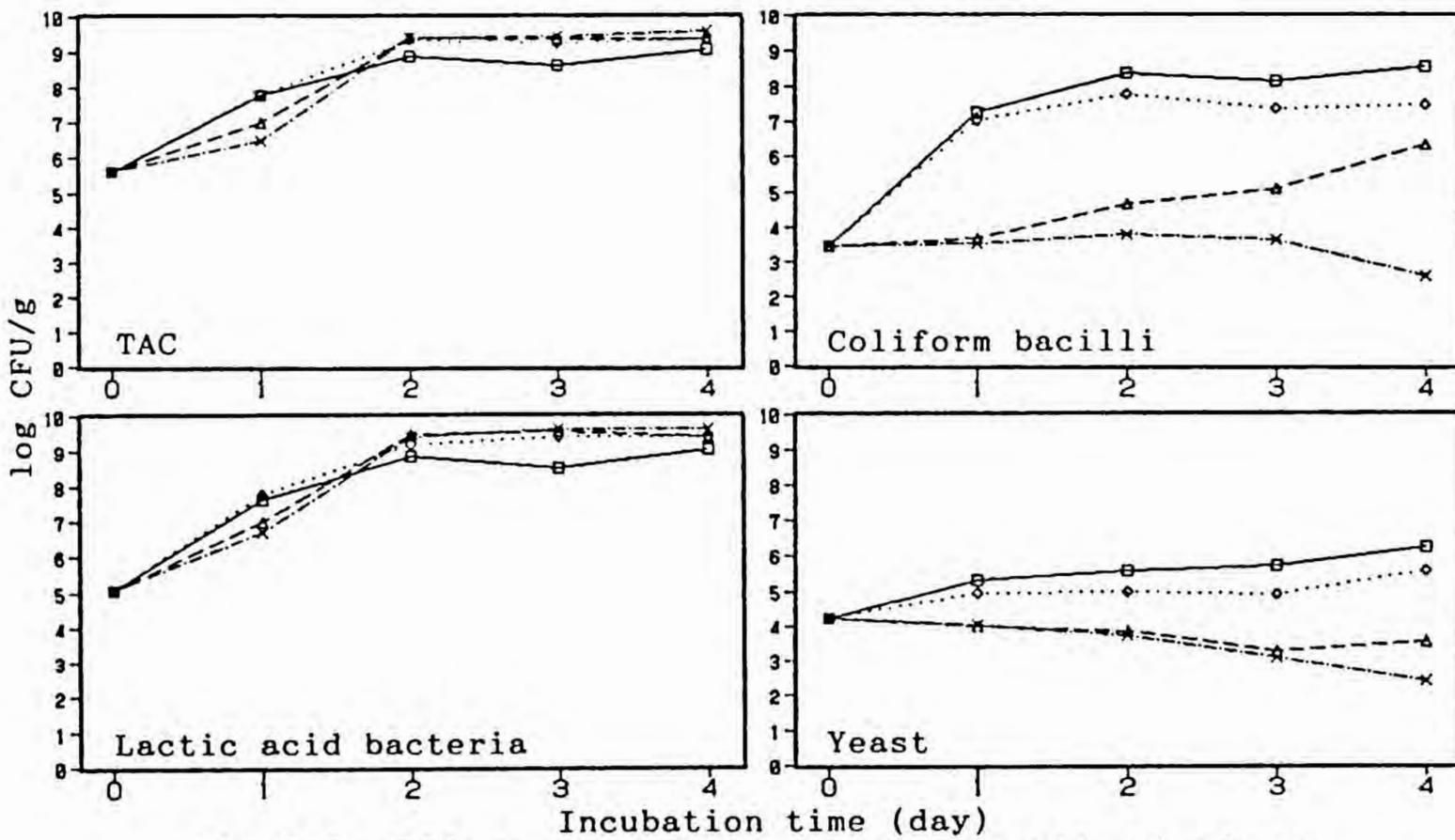


Fig.5-8 Effect of mustard on the growth of microorganisms in beef inside round (separable lean) homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

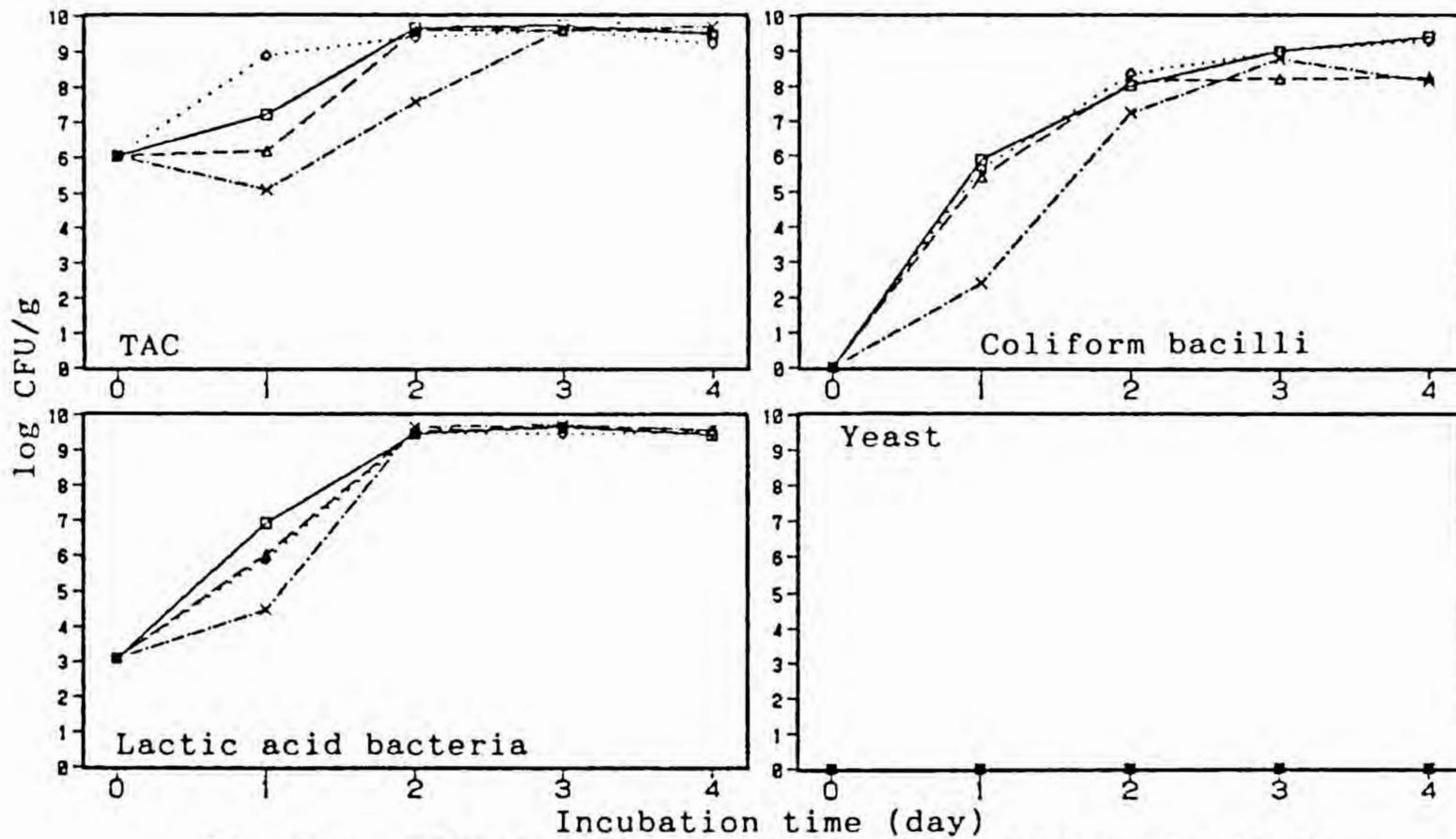


Fig.5-9 Effect of mustard on the growth of microorganisms in mackerel homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

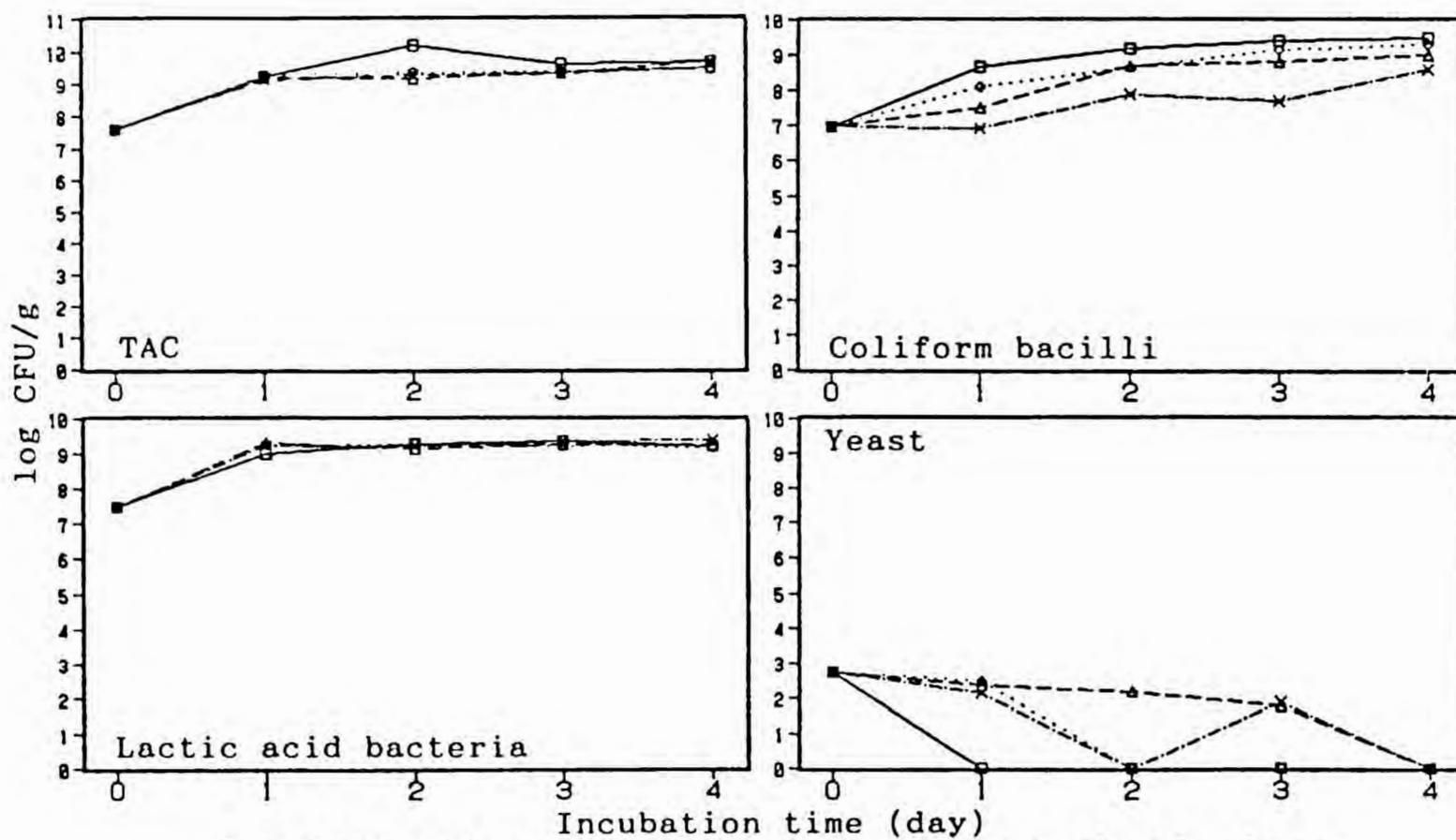


Fig.5-10 Effect of mustard on the growth of microorganisms in shiba-shrimp homogenate. □, control; ◇, 3%; △, 6%; ×, 9% mustard.

第4節 小括

1. 滅菌鶏レバー磨碎物に粉末ブラウンマスタードあるいはクローブを添加して *E. coli* あるいは *S. aureus* の増殖阻害を検討し、ブイヨン培地での効果と比較した。滅菌レバーでは *S. aureus* に対してクローブ4%またはマスタード6%で増殖速度を低下させただけであったが、ブイヨン培地ではマスタード2%で3日間増殖を阻止し、クローブ2%で1日目に滅菌された。また、*E. coli* は *S. aureus* より抵抗力があり、阻害効果は少なかった。実際の食品での細菌増殖阻害のためにはブイヨン培地で得た濃度よりもかなり高い濃度を必要とした。

2. 食品中に存在する微生物をどのように阻害するか検討した。生の鶏レバー磨碎物に粉碎マスタード、クローブを添加して10℃または20℃に保温して検討し、さらに酢酸との併用の影響を検討した。

酢酸0.5%は10℃で総菌、乳酸菌、また、10、20℃で大腸菌群の生菌数の増加を4日間阻止し、20℃で総菌、乳酸菌、酵母の生菌数の増加を1日阻止し、10℃で酵母に対して2日間阻止した。

クローブ6%は10、20℃で酵母の生菌数増加を4日間阻止し、さらに20℃では4日目に0となった。大腸菌群は10℃で3日目に、20℃で2日目に生菌数が0となった。10℃では総菌、乳酸菌の生菌数増加を3日間阻止したが、20℃では増殖速度を低下させるにとどまった。

クローブ6%と酢酸0.5%を併用すると10℃では特に大腸菌群に対して併用効果があり、1日目で生菌数が0となり、滅菌された。20℃では総菌、乳酸菌に対して併用効果があり、2日間生菌数増加を阻止した。

マスタード6%は10、20℃で酵母、20℃で大腸菌群の生菌数増加を阻止または減少させ、10℃で総菌、乳酸菌、大腸菌群の増殖速度を低下させた。しかし、20℃では総菌、乳酸菌に対しては効果がなかった。マスタード6%と酢酸0.5%を併用すると、特に20℃で大腸菌群、酵母の生菌数が4日目に0となり、併用効果があった。

また、クローブ2%以上は官能的に耐え難いが、マスタードまたはこれと酢酸の併用は官能的にも十分可能であり、またレバー特有の臭いを消す効果があり、

むしろ好まれた。

3. マスタードの食品中の微生物増殖阻害をいくつかの食品について20℃で同様に検討した。

食品によって多少異なるが、獣鳥肉の場合、大腸菌群には6%でも増殖阻害し、総菌、乳酸菌に対しては9%で阻害した。また、酵母はマスタードを添加しなくてもあまり増殖しなかったが、添加すると殺菌作用を示すことがあった。また、サバは9%で乳酸菌、大腸菌群の増殖を阻害し、総菌に対しては若干殺菌作用を示した。エビでは6%で大腸菌群にのみ有効であった。

総括

ブラウンマスタードを中心に香辛料とその精油主成分の細菌増殖阻害作用と、食品保存料としての応用を検討した。

1. 香辛料の精油主成分を定量し、香辛料とその精油主成分の細菌増殖阻害を調べ、その両者を比較検討した。

1) ブラウンマスタード、粉ワサビおよびカラシ粉の辛味成分の主成分の allyl isothiocyanate (AIT) と、シナモンの芳香性の主成分の cinnamaldehyde (CA) ならびにクローブの芳香性主成分の eugenol (EU) を逆相 HPLC で分離、定量することを試みた。マスタードは粉碎して脱脂後、粉ワサビとカラシ粉はそのまま、ミロシナーゼ作用させ、シナモン、クローブは粉碎していずれも 70% エタノールで抽出し、SEP-PAK C₁₈ カートリッジで前処理し、日立ゲル #3011-O カラムを用いた逆相 HPLC で移動相にメタノールを用い、45°C 恒温で流速 1.00 ml/分とし、波長 200~400 nm で走査した。(1) AIT は最大吸収波長 245 nm、RT 2.39 分をもつピークとして分離され、脱脂マスタード中含量は 9.04 ± 0.10 mg/g (n=5) であった。粉ワサビ中の AIT 含量は 6.31 ± 0.33 mg/g (n=6) であった。カラシ粉中の AIT 含量は 9.02 ± 0.77 mg/g (n=6) であった。(2) CA は最大吸収波長 286 nm、RT 2.80 分のピークとして分離された。シナモン中の CA 含量は 34.1 ± 0.1 mg/g (n=5) であった。(3) EU は最大吸収波長 282 nm、RT 2.54 分のピークとして分離された。クローブ中の EU 含量は 150 ± 6 mg/g (n=5) であった。

2) ブラウンマスタード、シナモンおよびクローブとその精油主成分についてブイヨン培地を用いて 30°C、平板培養で 7 種の菌について増殖阻害を検討した。クローブがどの菌に対してもかなりの阻害効果があった。次いでシナモンの効果が強かった。精油を比較すると 3 種のうち AIT が最も阻害力が大であった。

3) ブラウンマスタードと AIT について 6 種の細菌に対する増殖阻害作用を検討し、両者の阻害作用の関係をも検討した。細菌は抽出液または AIT を添加したブイヨン培地で 30°C、振盪培養した。マスタード、AIT 共に濃度に応じて誘導期を延長し、場合によっては定常期の濁度を低下させた。そして誘導期の対数とマスタードもしくは AIT 濃度の対数は比例関係にあることを認め、回帰式を求めた。

増殖を24時間阻止する濃度は、S. aureusはマスタード0.138%、AIT14.5ppm、E. coliはマスタード0.104%、AIT12.3ppm、Pro. vulgarisはマスタード0.064%、AIT6.5ppm、Ps. fragiはマスタード0.043%、AIT3.6ppm、Ps. aeruginosaはマスタード0.089%、AIT7.2ppm、B. cereusはマスタード0.068%、AIT10.4ppmであった。また、マスタードの阻害はほとんどそれに含まれるAITの作用によるものと示唆された。なお、マスタードはE. coliとS. aureusに対しては0.8%で静菌的であったが、Ps. aeruginosaに対しては0.2%でも殺菌的であった。

また、同様に粉ワサビ、カラシ粉についても検討し、マスタードと同様の結果を得た。但し、粉ワサビの場合、特にS. aureusとPro. vulgarisに対して、カラシ粉の場合、特にPs. fragiに対して抽出液中のAIT以外の成分が関与していると思われる結果を得た。その他に対しては阻害にAITが占める割合が大と考えられた。

2. ブラウンマスタードまたは粉ワサビと、他の因子すなわちグリシン、グリセリン、乳酸または酢酸のうちいずれか1種と食塩を組み合わせ併用した場合の細菌の増殖阻害をブイヨン培地で30℃、静置培養で検討した。使用したE. coli、S. aureus、Ps. aeruginosaのうち最も併用効果があったのはPs. aeruginosaであった。グリシンはE. coliに対して併用効果があり、マスタードまたは粉ワサビあるいは食塩との2種併用、3種併用で相乗効果があった。グリセリンはPs. aeruginosaに対して、マスタードまたは粉ワサビとの併用で相乗効果があり、さらに食塩を併用すると効果は大となった。また、この菌に対しては食塩とマスタードまたは粉ワサビとの併用で相乗効果があった。E. coliに対してはマスタード、食塩との3種併用で併用効果があったが、S. aureusに対しては粉ワサビ、食塩との3種併用で効果があった。乳酸はPs. aeruginosaとE. coliに対しては3種併用で相乗効果があった。S. aureusに対してはマスタードまたは粉ワサビとの2種併用で効果があった。酢酸はPs. aeruginosaに対してはマスタードまたは粉ワサビとの2種、食塩を加えた3種併用で効果があり、特にマスタードとの2種併用で相乗効果があった。E. coliに対してはマスタード、またS. aureusに対しては粉ワサビと食塩の3種併用で効果があった。

このようにマスタード、粉ワサビ共に他の成分との併用が期待できること、ま

た、その併用効果は菌によって異なっていることがわかった。単一では十分な抗菌性を期待できない場合でも他の因子と併用することにより、食品においてかなり高い抗菌性を期待できると共に食品の味、風味を損なう事なく、より安全性、保存性の高い食品をつくることができると考えられる。

3. ブラウンマスタードもしくはAITの数種細菌に対する増殖阻害作用について、増殖阻害を示す条件や細菌が受ける影響、並びに培地中のAITの挙動などを検討した。まず、マスタードの阻害に対する接種菌数の影響を検討したが、接種菌数が少ないと増殖が認められるまでの時間が長くなった。次に、マスタード抽出液を対数増殖初期 (OD=0.1) の細菌に添加した。 *E. coli*, *Pro. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*では増殖が添加濃度に応じて一時期停止した後、増殖を再開した。また、*E. coli*では添加後に溶菌を伴う殺菌がみられたが、接種時に同濃度のAITを添加した場合は殺菌現象はみられなかった。 *S. aureus*と *Ps. fragi*では添加後、増殖速度の低下、*Ps. fragi*ではさらに定常期の著しい濁度低下がみられた。また、AIT存在下で誘導期延長の後に生育した菌はAIT添加培地に植え継ぐと、同様に延長された誘導期の後生育し、抵抗性を得ていないことを認めた。培地に添加したAITを経時的に測定すると、始めAIT80ppmであったのが30℃48時間振盪後には0となり、新しいピークがクロマトグラム上にみられた。そして、*E. coli*の増殖はAIT消失後に認められた。また *E. coli*, *S. aureus*, *Pro. vulgaris*では培養開始時にAITを一度に添加するよりも同量のAITを少量に分けて一定期間毎に添加した方が増殖阻止時間が長く、*Ps. fragi*, *Ps. aeruginosa*は逆に培養開始時に一度に添加した方が増殖阻止時間は長かった。

以上AITおよびそれを含む香辛料は細菌に抵抗力を与えず、細菌は培地からAITが何らかの理由で消失してから増殖すると思われる結果を得た。また、対数期の菌の方が感受性が高いことも認めた。

4. AITの誘導体をallyl誘導体 (allyl alcohol, allyl chloride, allyl cyanide, diallyl sulfide, diallyl disulfide) と isothiocyanate誘導体 (methyl isothiocyanate, methyl isothiocyanate, n-propyl isothiocyanate, n-butyl isothiocyanate) の細菌増殖阻害を検討し、AITと比較した。その結果、allyl誘

導体では diallyl disulfide 以外はいずれもほとんど抗菌性はなかった。一方、isothiocyanate 類は抗菌性を有し、alkyl isothiocyanate 類では、methyl 基が最も抗菌性が大きく、次いで ethyl 基が大きく、n-propyl 基、n-butyl 基は抗菌性が低い傾向にあり、alkyl 基の炭素数が少ない方が抗菌性が強かった。また、二重結合を持つAITは炭素数が3でも一般にalkyl系の炭素2個のmethyl isothiocyanate や同じ炭素数のn-propyl isothiocyanate より抗菌力が強く、二重結合が抗菌性を増大させることを認めた。

AITはisothiocyanateであることより抗菌性を有し、allyl 基が二重結合を有することが抗菌性を増大させていると考えられる。

5. 香辛料による食品中微生物の増殖阻害を検討した。

1) 滅菌レバー磨碎物に粉末マスタードあるいはクローブを添加して *E. coli* あるいは *S. aureus* の増殖阻害を検討し、ブイヨン培地での効果と比較した。滅菌レバーでは *S. aureus* に対してクローブ4%またはマスタード6%で同程度の阻害効果があった。それに対し、ブイヨン培地ではクローブ2%で1日後に生菌がなくなり、マスタード2%で3日間増殖を完全に阻止した。*E. coli* は *S. aureus* より抵抗力があった。そして実際の食品中での細菌増殖阻害のためには、ブイヨン培地で得た濃度よりもかなり高い濃度が必要なことを確認した。

2) 次に、食品中に存在する微生物の阻害を検討した。生の鶏レバーの磨碎物に粉碎マスタード6%またはクローブ6%を添加して定温に保持し、さらに酢酸0.5%との併用と温度の影響を検討した。酢酸は10℃では総菌数の増加を4日以上阻止したが、20℃での阻止は1日だけであった。しかし、大腸菌群は4日間阻止された。クローブは10℃では総菌数の増加を3日間阻止し、大腸菌群は3日目に0となった。20℃では総菌の増殖速度を低下させ、大腸菌群は2日で死滅させた。また、クローブと酢酸の併用は10℃の総菌、大腸菌群、20℃の総菌、乳酸菌に有効であった。しかし、6%クローブは官能的に可食性がなく、実用性に乏しいと思われる。マスタードは10℃では総菌の増殖を阻害し、酵母には殺菌作用を示したが、20℃では大腸菌群、酵母のみを阻止した。マスタードと酢酸の併用は10℃、20℃とも大腸菌群、酵母に有効であったが、総菌と乳酸菌には効果がなかった。また、マスタード、及びマスタードと酢酸併用は官能的には十分可能であ

るのみならず、むしろレバー特有の臭いを消す効果があった。

3) さらにマスタードの食品中微生物の増殖阻害をいくつかの食品について20℃で同様に検討した。

食品によって多少異なるが、獣鳥肉の場合、大腸菌群には6%でも増殖阻害し、総菌、乳酸菌に対しては9%で阻害した。また、酵母はマスタードを添加しなくてもあまり増殖しなかったが、添加すると殺菌作用を示すことがあった。また、サバは9%で乳酸菌、大腸菌群の増殖を阻害し、総菌に対しては若干殺菌作用を示した。エビでは6%で大腸菌群にのみ有効であった。検討を行った食品中では大腸菌群に対してかなりの阻害効果があった。

以上総括すると、マスタード、シナモン、クローブの精油主成分AIT、CA、EUは逆相HPLCで定量でき、マスタードの抗菌性は主成分のAITにあることを認めた。AITの抗菌性はisothiocyanate基が重要であり、2重結合を有するallyl基はその効果を強めている。また、菌種、環境などによってマスタードの阻害はそれぞれ異なっており、他の因子との併用も菌種やそれらの組合せによって異なっていた。AITがその環境に存在している間は菌の増殖がみられないことやAITによって受ける障害は菌によって異なることなどから、増殖阻害を維持するにはAITの添加法を菌種によって選択することが好ましいと考えられる。また、食品中の微生物に対しては香辛料は培地で得た結果よりかなりの高濃度を要する。食品保存にマスタードを応用する場合、その食品の種類、微生物相、その食品の置かれる環境などを考慮して、増殖を阻止しようとする微生物に焦点を当て、添加法、他の因子との組合せを官能的な可食性と併せて考えることが必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、長年にわたり御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました大阪市立大学生活科学部、宮本悌次郎教授に心から深謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、有益なる御助言と御指導を戴きました大阪市立大学生活科学部、三崎旭教授並びに中谷延二教授に深謝致します。

さらに、本研究を進める上で、有益なる御助言を戴きました大阪市立大学生活科学部、高谷友久講師並びに山本由喜子講師に心よりお礼申し上げますと共に、実験に御協力戴きました食品プロセス科学（旧調理科学）研究室の皆様に感謝致します。

文献

- 1) 中谷延二：香辛料成分の食品機能，岩井和夫・中谷延二責任編集（光生館，東京），p.73（1989）。
- 2) 広末トシ子・松沢睦子・入江逸子・川井英雄・細貝祐太郎：日食工誌，35，630（1988）。
- 3) 芝崎勲：防菌防黴，5，T279（1977）。
- 4) 芝崎勲：防菌防黴，9，291，（1981）。
- 5) 角野猛・佐久間久仁子：家政学雑誌，34，118（1983）。
- 6) 宮尾茂雄：天然物による食品の保蔵技術，芝崎勲・笹島正秋監修（お茶の水企画，東京），p.217（1985）。
- 7) 角野猛・会田久仁子・島貫光治郎・等々力達也：調理科学，19，132（1986）。
- 8) 古橋樹雄：天然物による食品の保蔵技術，芝崎勲・笹島正秋監修（お茶の水企画，東京），p.182（1985）。
- 9) Parish, M.E. and Carroll, D.E.: J. Food Sci., 53, 237 (1988).
- 10) Madden, R.H.: J. Food Protect., 52, 881 (1989).
- 11) 鍋谷修・加持芳男・浅度拓司・澤田玄道：日食工誌，35，293（1988）。
- 12) 加藤信行・芝崎勲：醗酵工学，53，793，（1975）。
- 13) 村清司・飯 洋二・谷村和八郎・醗酵工学，64，417（1986）。
- 14) Sofos, J.N., Maga, J.A. and Boyle, D.L.: J. Food Sci., 53, 1840, (1988).
- 15) Lavigne, C., Zee, J.A., Simard, R.E. and Béliveau B.: J. Food Sci., 54, 30 (1989).
- 16) 桑原祥浩：天然物による食品の保蔵技術，芝崎勲・笹島正秋監修（お茶の水企画，東京），p.75（1985）。
- 17) 神田豊輝・山本忠敬・斉藤浩：食品工業，73，（1971）。
- 18) Shelef, L.A.: J. Food Safety, 6, 29 (1983).
- 19) 上田成子・山下晴美・中島真理子・桑原祥浩：日食工誌，29，111（1982）。
- 20) Al-Khayat, M.A. and Blank, G.: J. Food Sci., 50, 971 (1985).

- 21) Srivastava, K.C., Perera, A.D. and Saridakis, H.O.: *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 15, 75 (1982).
- 22) Mantis, A.J., Koidis, P.A., Karaioannoglou, P.G. and Panetsos, A.G.: *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 12, 330 (1979).
- 23) Saleem, Z.M. and Al-Delaimy, K.S.: *J. Food Protect.*, 45, 1007 (1982).
- 24) Dababneh, B.F.A and Al-Delaimy, K.S.: *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 17, 29 (1984).
- 25) Fabian, F.W., Krehl, C.F. and Little, N.W.: *Food Res.*, 4, 269 (1939)
- 26) Maruzzella, J.C. and Sicurella, N.A.: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 49, 692 (1960).
- 27) Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, 41, 899 (1976).
- 28) Ueda, S., Yamashita, H. and Kuwabara, Y.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 389 (1982).
- 29) Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S.A.: *J. Food Protect.*, 52, 665 (1989).
- 30) Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen D.W.: *J. Food Sci.*, 45, 1042 (1980).
- 31) Shelef, L.A., Jyothi, E.K. and Bulgarelli, M.A.: *J. Food Sci.*, 49, 737 (1984).
- 32) Bullerman, L.B.: *J. Food Sci.*, 39, 1165 (1974).
- 33) Bullerman, L.B., Lieu, F.Y. and Seier S.A.: *J. Food Sci.*, 42, 1107 (1977).
- 34) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T. Sakai, S. and Kurata, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 818 (1980).
- 35) Maruzzella, J.C. and Liguori, L.: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 47, 250 (1958).
- 36) Anderson, E.E., Esselen, Jr., W.H. and Handleman, A.R.: *Food Res.*, 18, 40 (1953).
- 37) Webb, A.H. and Tanner, F.W.: *Food Res.*, 10, 273 (1945).

- 38) Conner, D.E. and Beuchat, L.R.: J. Food Sci., 49, 429 (1984).
- 39) Foter, M.J.: Food Res., 5, 147 (1940).
- 40) Pauli, A. and Knobloch, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 185, 10 (1987).
- 41) Knobloch, K., Pauli, A. Iberl, B., Weigand, H. and Weis, N.: J. Ess. Oil Res., 1, 119 (1989).
- 42) Farag, R.S., Daw, Z.Y. and Abo-Raya, S.H.: J. Food Sci., 54, 74 (1989).
- 43) Farrell, K.T.: Spices, Condiments, and Seasonings (The AVI Pub. Co., Inc., Connecticut), p.86 (1985).
- 44) 森一雄：食品工業，藤巻正生・三浦洋・犬塚謙一・河端俊治・木村進編（恒星社厚生閣，東京），p.1131 (1985)。
- 45) Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. and Takahara, Y.: Agric. Biol. Chem., 45, 945 (1981).
- 46) Karapinar, M. and Aktuğ, S.E.: Int. J. Food Microbio., 4, 161 (1987)
- 47) Kosker, O. Esselen, Jr., W.B. and Fellers C.R.: Food Res., 16, 510 (1951).
- 48) 宮尾茂雄：食衛誌，16，412 (1975)。
- 49) 森一雄・澤田玄道・鍋谷修・丸尾重昭：日食工誌，21，285 (1974)。
- 50) Salzer, U.J.: Fleischwirtschaft, 62, 885 (1982)。
- 51) Al-Delaimy, K.S. and Barakat, M.M.F.: J. Sci. Food Agric., 22, 96 (1971)。
- 52) Farrell, K.T.: Spices, Condiments, and Seasonings (The AVI Pub. Co., Inc., Connecticut), p.151 (1985)。
- 53) 長谷川忠男：栄養と食糧，32，267 (1979)。
- 54) 斎藤浩：スパイスの話（柴田書店，東京），p.84 (1981)。
- 55) 太田義雄・高谷健市：日食工誌，29，672 (1982)。
- 56) 木村進・福場博保・三浦洋：食品の貯蔵と加工（同文書院，東京），p.191 (1985)。
- 57) 木島勲・福沢佳子・今井慎一・伊奈和夫：日食工誌，27，591 (1980)。

- 58) Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weis, N. and Weigand, H.:
Bioflavour'87 (Walter de Gruyter & Co., Berlin), p.288 (1988).
- 59) Wijesekera, R.O.B., Jayewardene, A.L. and Rajapakse, L.S.: J. Sci.,
Food Agric., 25, 1211 (1974).
- 60) Senanayake, U.M., Lee, T.H. and Wills, R.B.H.: J. Agric. Food Chem.,
26, 822 (1978).
- 61) Heide, R.: J. Agric. Food Chem., 20, 747 (1972).
- 62) Fang, J.M., Chen, S.A. and Cheng, Y.S.: J. Agric. Food Chem., 37,
744 (1989).
- 63) 亀岡弘・橋本清二：日農化, 54, 535 (1980).
- 64) 小嶋操・浜田浩・利光典子：日食工誌, 33, 199 (1986).
- 65) Archer, A.W.: J. Chromatogr., 351, 595 (1986).
- 66) Baranowski, J.D.: J. Chromatogr., 315, 471 (1985).
- 67) Ross, M.S.F.: J. Chromatogr., 118, 273 (1976).
- 68) 小嶋操：日食工誌, 24, 637 (1977).
- 69) Jay, J.M.: Modern Food Microbiology, 3rd ed., (Van Nostrand Reinhold
Co. N.Y.), p.18 (1986).
- 70) 高尾彰一：応用微生物学 I, 相田浩・柄倉辰六郎・高尾彰一・齊藤日向・
高橋甫共著, (朝倉書店, 東京), p.14 (1978).
- 71) 栗飯原景昭：食糧保蔵学, 藤卷正生編, (朝倉書店, 東京), p.60 (1980).
- 72) 微生物研究法懇談会編：微生物学実験法, (講談社, 東京), p.203
(1984).
- 73) 福井作蔵：還元糖の定量法, 生物化学実験法, 瓜谷郁蔵・志村憲助・
中村道德・船津勝編, (学会出版センター, 東京), p.45 (1978).
- 74) 柳田友道：微生物科学 II, (学会出版センター, 東京), p.416 (1981).
- 75) 江崎秀男・小野崎博通：栄養と食糧, 35, 207 (1982).
- 76) Noterman, S. and Heuvelman, C.J.: J. Food Sci., 48, 1832 (1983).
- 77) Larsen, R.F. and Añón, M.C.: 54, 922 (1989).
- 78) 井川房欣：天然物による食品の保蔵技術, 芝崎勲・笹島正秋監修
(お茶の水企画, 東京), p.134 (1985).

- 79) 山本泰・東和男・好井久雄：日食工誌, 31, 772 (1984).
- 80) Ahmed, S.A., Miwa, M. and Tajima, M.: Rept. Natl. Food Res. Inst., 42, 68 (1983).
- 81) 山本泰・東和男・好井久雄：日食工誌, 31, 525 (1984).
- 82) 角野猛・佐久間久仁子：調理科学, 15, 119 (1982).
- 83) Adams, M.R. and Hall, C.J.: Int. J. Food Sci. Technol., 23, 287 (1988).
- 84) Ahamad N. and Marth E.H.: J. Food Protect., 52, 688 (1989).
- 85) Kurita, N., Koike, S.: Agric. Biol. Chem., 46, 159 (1982).
- 86) Kurita, N., Koike, S.: Agric. Biol. Chem., 46, 1655 (1982).
- 87) Kurita, N., Koike, S.: Agric. Biol. Chem., 47, 67 (1982).
- 88) Cho, H.Y., Tsuchido, T., Ono, H. and Takano, M.: J. Ferment. Bioeng. 70, 11 (1990).
- 89) Zaika, L.L. and Kissinger, J.C.: J. Food Sci., 46, 1205 (1981).
- 90) Zaika, L.L., Kissinger, J.C. and Wasserman, A.E.: J. Food Sci., 48, 1455 (1983).
- 91) Moleyar, V. and Narasimham, P.: J. Sci. Food Agric., 39, 239 (1987).
- 92) Windholz, M.: The Merck Index (Merck & Co., Inc., Rahway), p.295, p.5952, (1983).
- 93) 宮本悌次郎・山崎匡美・松田生恵・山本由喜子：調理科学, 21, 274 (1988).
- 94) Rico-Muños, E. and Davidson, P.M.: J. Food Sci., 48, 1284 (1983).
- 95) 山本泰・平岩孝啓・東和男・好井久雄：日食工誌, 36, 1 (1989).

本論文に直接関係する研究発表

- 1) 金丸芳・高谷友久・宮本悌次郎：市販粉ワサビ、カラシ粉の細菌増殖阻害作用。
大阪市立大学生活科学部紀要, 37, 1-7 (1989)
- 2) 金丸芳・藤原和子・宮本悌次郎：市販粉ワサビと数種化合物併用による
細菌増殖阻害作用。大阪市立大学生活科学部紀要, 37, 9-13 (1989)
- 3) Kanemaru, K., Takaya, T. and Miyamoto, T.: Separation and Quantitation of Allyl Isothiocyanate in Brown Mustard and Cinnamaldehyde in Cinnamon by Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography.
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 565-568 (1990)
- 4) Kanemaru, K. and Miyamoto, T.: Inhibitory Effects on the Growth of Several Bacteria by Brown Mustard and Allyl Isothiocyanate. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 823-829 (1990)