

パプリカ種子からの新規抗菌性物質の分離と
食品製造における利用

2003年2月

矢 嶋 瑞 夫

パプリカ種子からの新規抗菌性物質の分離と
食品製造における利用

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

矢嶋 瑞夫

目次

第一章 序論	1
第二章 既往の研究	3
2-1 天然抗菌剤としての香辛料	3
2-2 ワイン製造における抗菌性物質	4
2-3 産膜酵母の食品汚染に対する抗菌性物質	7
第三章 パプリカ種子からの新規抗菌性物質の分離とその構造	10
3-1 序	10
3-2 材料及び実験方法	10
3-2-1 パプリカ種子からの抗菌性物質の抽出	10
3-2-1-1 パプリカ種子からの抗菌性物質の分離に及ぼす抽出条件の影響	10
3-2-1-2 50%エタノール抽出による抗菌性物質の抽出	11
3-2-1-3 硫安塩析	11
3-2-2 パプリカ種子抽出物のゲルクロマトグラフィー	11
3-2-2-1 Sephadex G-50 クロマトグラフィー	11
3-2-2-2 Sephadex G-200 クロマトグラフィー	11
3-2-2-3 Sep-Pac ODS あるいは Cosmosil C18-OPN	12
3-2-2-4 逆相 ODS クロマトグラフィー	12
3-2-3 パプリカの超臨界炭酸ガス抽出残渣からの抗菌性物質の水抽出と Amberlite XAD-7 カラムクロマトグラフィーによる部分精製	13
3-2-4 薄層クロマトグラフィー	13
3-2-5 抗菌性物質の構造解析	13
3-2-6 菌の培養と抗菌性の測定	14
3-2-6-1 パプリカ種子の水抽出液の硫安塩析物の抗菌スペクトラム	14
3-2-6-2 産膜酵母に対するパプリカ種子-50%エタノール抽出物の抗菌性	14
3-2-6-3 96 穴 U 底プレートを用いた抗菌活性の測定（液体培地希釈法）	15
3-2-6-4 濁度計を用いた抗菌活性の測定（濁度法）	16
3-2-7 抗菌性物質の化学分析	16
3-2-7-1 タンパク質	16
3-2-7-2 中性糖	16
3-2-7-3 酸性糖	16
3-2-7-4 全フェノール	17

3-2-7-5	アミノ酸	17
3-2-7-6	単糖	17
3-2-7-7	プロテアーゼ分解	17
3-2-7-8	グリカナーゼ分解	18
3-2-8	酵母生細胞に対するザイモリアーゼの作用	18
3-2-8-1	パプリカ種子抗菌性物質に感受性および非感受性酵母の培養と集菌	18
3-2-8-2	酵母生細胞に対するザイモリアーゼの作用	18
3-2-9	酵母の細胞壁および酵母タンパク質の分離	19
3-2-9-1	酵母細胞壁の分離	19
3-2-9-2	酵母タンパク質の調製	19
3-2-9-3	酵母細胞壁のザイモリアーゼによる溶解	20
3-2-9-4	ザイモリアーゼからのZ-プロテアーゼの分離	20
3-2-10	酵母細胞壁の抗菌活性への影響	21
3-3	実験結果及び考察	21
3-3-1	パプリカ種子からの50%エタノールおよび水抽出物による抗菌性物質の分離	22
3-3-2	パプリカ種子からの抗菌性物質の抽出条件	22
3-3-3	パプリカ種子抽出物のゲル濾過による分別	27
3-3-4	ゲルろ過によって得られた抗菌性画分の分離精製	30
3-3-5	ODS オープンカラムクロマトグラフィーとODS 高速液体クロマトグラフィーを用いた抗菌性物質の分離精製	33
3-3-6	パプリカ種子から分離精製した抗菌性物質の構造	36
3-3-7	パプリカ種子から分離した抗菌性物質の作用機構	42
3-4	要約	64
第四章 パプリカ種子からの新規抗菌性物質の食品製造への応用		66
4-1	序	66
4-2	パプリカ種子抽出物を用いたワインと梅漬けの産膜酵母による腐敗の防止	66
4-2-1	序	66
4-2-2	材料および実験方法	67
4-2-2-1	パプリカ種子からの抗菌性物質の調製	67
4-2-2-2	赤ワインおよび梅酢の製造	67
4-2-2-3	供試産膜酵母	68
4-2-2-4	抗菌性試験	68
4-2-2-5	パプリカ種子抽出物の梅酢培地における経時的抗菌活性の変化	69

4-2-3	結果及び考察	69
4-2-3-1	分離した産膜酵母に対する亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩、酢酸およびパプリカ種子抗菌性物質の抗菌性	69
4-2-3-2	ワイン産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物、亜硫酸およびソルビン酸の抗菌性に及ぼす pH およびエタノールの影響	72
4-2-3-3	梅酢の保存中におけるパプリカ種子抽出物および亜硫酸の抗菌力の経時的変化	75
4-2-3-4	パプリカ種子抽出物の抗菌性に及ぼす初発酵母菌数、温度、pH、および食塩濃度の影響	77
4-2-4	要約	79
4-3	パプリカ種子抽出物と他の食品添加物との併用効果	80
4-3-1	序	80
4-3-2	材料および実験方法	81
4-3-2-1	パプリカ果実抽出物の調製	81
4-3-2-2	パプリカ種子抽出物 / 果実抽出物と食品添加物との併用効果	82
4-3-2-3	パプリカ果実抽出物の抗菌活性に及ぼす食品成分の影響	83
4-3-2-4	F2 画分を含む抗菌製剤を用いた食品保存試験	83
4-3-3	実験結果および考察	86
4-3-3-1	ワイン産膜酵母に対する亜硫酸、ソルビン酸、あるいはワインフェノールとパプリカ種子抽出物との併用効果	86
4-3-3-2	パプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣-抗菌性画分の調製	87
4-3-3-3	パプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣から分離した F2 画分の抗菌活性に及ぼす食品成分の影響とアジピン酸との併用効果	91
4-3-3-4	F2 画分を含む抗菌製剤の食品保存試験	91
4-3-4	要約	104
	総括	105
	おわりに	109
	謝辞	111
	文献	112
	博士論文関連の業績一覧	118

第一章 緒論

現在、日本では、農畜水産物が年間約 6000 万トン生産され、また、ほぼ同量のそれが輸入されている。農畜水産物は保蔵によってその価値を増し、加工によって消費にこたえる形態を与えられている。輸入依存度の高い農畜水産物の保蔵と加工の仕事は国民経済上から見てもそれらの生産に劣らず重要な意義を持っている。

食品の加工は、保存性、栄養性、嗜好性、利便性、生産性などの向上を目的として行なわれているが、欠かすことのできないのが保存性であり、大量生産や広域販売になればなるほど、保存性が重要になってくる。

食品の腐敗、変敗を防止するいわゆる保存技術には、腐敗菌、変敗菌、食中毒菌などの微生物をの抑制や排除のための、殺菌、除菌、静菌、遮断などがあり、そのための操作として加熱殺菌、低温保存、食品保存剤などの添加物の使用などが一般に行なわれている。

食品保存料は食品に添加するだけで、存在する有害微生物の増殖を抑制して腐敗、変敗を防止し、食品の保存性を延長する化合物である。その使用法は簡便であり、食品の品質にあたる影響が少なく、省エネルギー的でもあり、食品保存料は広く一般に用いられている。

食品保存料には合成保存料と天然保存料がある。現在わが国で使用許可されている合成保存料は、安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類、プロピオン酸であり、これらは全世界で使用されている。また、我が国独自に開発された天然保存料としてプロタミン、 γ -ポリリジン、ペクチン分解物、ヒノキチオール等があり、平成 3 年から「保存料」表示して使用されるようになった。しかしながら我が国では、食品添加物に対する、特に保存料に対する消費者の不信感により、加工食品への保存料の使用は忌避される傾向にある。

一方、加工食品の保存を考える上で保存料を無視することは出来ない。そこで保存料の代替品として、保存料よりは効果は弱いだが、実用上食品の保存性向上に寄与する物質（日持ち向上剤）として、使用基準のないアミノ酸や有機酸の抗菌作用を利用したり、天然物あるいは食品素材そのものに含まれる抗菌性物質を検索し、これらの利用が試みられるようになった。

著者は、安全で有用な抗菌性物質の開発を目的として、人類の経験則や学術文献などから、抗菌性物質が含まれている可能性が高く、商業ベースで入手できる植物資源である香辛料に注目し、これらを中心に抗菌性物質の探索研究を行なったところ、パプリカ種子抽出物およびパプリカ果実抽出物が食品保存剤（日持ち向上剤）として有力な物質であるこ

とを見つけた。

本論文はパプリカ種子抽出物および果実抽出物の抗菌性と食品への応用についての研究である。

本論文により得られた結果を要約すると以下の通りである。

- 1) 天然物由来の抗菌性物質として、パプリカ種子の 50%エタノール抽出物が酵母に対して抗菌性を示すことを見つけ、その MIC は 60mg/L であった。
- 2) パプリカ種子抽出物の抗菌性発現の主体は、サポニンの一種でギトゲニン配糖体であり、酵母の生育を特異的に阻害することを初めて見つけた。
- 3) 本抗菌性物質の作用機作は、サポニンの界面活性作用により、酵母細胞壁の膜透過性が変わるためであると考えた。
- 4) パプリカ種子抽出物はワイン製造や貯蔵、また梅漬け製造中に発生する産膜酵母の生育を効果的に抑制した。
- 5) 酵母に特異的に抗菌性を示すパプリカ種子抽出物と同等の抗菌性を示すパプリカ果実抽出物を用いて、これと他の薬剤を組み合わせることにより、広い抗菌スペクトルのパプリカ果実抽出物製剤ができた。
- 6) これらの製剤を用いて種々の加工食品の保存試験を行ない、ポテトサラダ、肉団子、たくあん調味液、白菜の浅漬け、焼肉のたれ、めんつゆ、イカの生珍味、塩辛、あんこ、ソース、ハンバーグについてその実用性を確認した。

第二章 既往の研究

1) 天然抗菌剤としての香辛料

一般に、抗菌性物質を食品に使用するにあたってヒトや動物に対して安全であることは必須であるが、抗菌性物質がヒトの体内で吸収され、分解、代謝されること、またそれらの代謝物が体内に蓄積されないことも重要とされる。無論、天然物起源の抗菌性物質であるからといって必ずしも安全であるとはいえないが、人々が長い年月にわたって食事に際して使ってきた香辛料や直接に食してきたものから抽出した抗菌性物質は、純粋な化学合成品よりも安全性が高いと思われ、またそれらについて必要とされる安全性テストのうちいくつかは省略できるであろう。

香辛料が種々の微生物に対して抗菌性をもつことは古くからよく知られ、古代エジプト人は食料品の保存とともに死体の防腐保護処理に植物抽出液（スパイスあるいはオイル）を用いた。Pliny、Virgil、Hippocrates が消化不良、肺炎、傷、様々な感染症をもたらす病原菌の制御を目的としてガーリック（ニンニク、ネギ）の効用を述べたのに象徴されるように、古代文明は植物抽出液の抗菌作用を認めていたが、香辛料や香辛料タイプの抽出物（シナモン、オールスパイス、クローブ、オレガノ、セイバリーなど）が保存効果をもつ科学的証拠が発見されたのは 18 世紀になってからである。

1929 年、フレミングによってペニシリンが発見されてからは、香辛料による抗微生物作用の研究は、病原菌を対象とするというよりも生活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。1989 年、Beucha と Golden は、色々な化合物の化学的性質に基づいて、食品中の天然抗菌剤についてレビューした（Beucha and Golden, 1989）。香辛料の機能性（フレーバー、アロマと抗菌成分）は主に精油とオレオレジン中にあり、抗菌性を示す種々の香味成分の同定が行われた。Conner と Beucha は、シナモン、オールスパイス、クローブの抗菌活性が、オイゲノールとシンナムアルデヒド（揮発性オイルの主成分）に由来することを見いだした（Conner and Beucha, 1984a, b）。Bullerman らは *Aspergillus parasiticus* がシンナムアルデヒドによって効果的に阻害されることを見いだした（Bullerman *et al.*, 1977）。オレガノ、セイバリー、タイムに含まれるチモールは、毒素を生産する菌を含むいくつかの微生物（*A. parasiticus*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus versicolor* など）の生育を阻害した（Buchanan and Shepherd, 1981; Hitokoto *et al.*, 1980）。Thompson は 8 つの毒素産生アスペルギルス属の菌糸体の生育の阻害にチモールとカルバクロールが効果的であることを見いだした（Thompson, 1990）。Cavallito と Bailey および Cavallito らはニンニクの球根のメタノール抽出物の水蒸気蒸留によって主要な抗菌性

物質を分離し、これらをアリシンとジアリルスルフィニック酸と同一とした (Cavallito and Bailey, 1944; Cavallito *et al.*, 1945)。Conner と Beuchat は、Candida、Cryptococcus、Rhodotorula、Torulopsis、Trichospora の真菌類の生育がニンニク抽出液に阻害されることを報告した (Conner and Beuchat, 1984a-c, 1985)。

パプリカは、ナス科 (Solanaceae) に属する唐辛子 (Capsicum pepper、Capsicum annum L.、ナス科) の一種で、原産地は南アメリカであるが、現在の主産地は、ハンガリー、ユーゴスラビアなどの東欧、スペイン、モロッコなどの地中海沿岸、米国などである。唐辛子は、極寒地を除く世界各地で栽培され、西洋野菜としてピーマンから、赤色の辛いレッドペッパーまで 90 種以上の変種がある。この中で、パプリカは、香辛料としての特徴的な香味よりも、その色調に評価の重点がおかれ、辛味成分が少なく、色素成分であるカロチノイド色素の含量が多い品種への改良が行われている。

パプリカは、果実を生のまま用いるか、その粉末をそのまま利用したり、ケチャップなどの加工食品に利用されるほか、乾燥したものを粉末あるいは荒くだきして、またアルコールやヘキサンで抽出するとオレオレジン (含油樹脂) が得られ、香辛料や着色料として古くから用いられてきた。また唐辛子にも抗菌性があることが知られており、その抗菌性を発現する物質の一つとしてカプサイシンが見いだされているが、辛味が強く、一般の香辛料抽出物と同様に水に難溶で、脂溶性が強い。したがって、唐辛子のもつ辛味以外の機能性を利用するためには、辛味の緩和や、水溶性を増すための製剤化など、かなりの工夫が必要である。

2) ワイン製造における抗菌性物質

ワイン製造において、酵母の生育を抑制する新抗菌性物質を開発研究する目的は二つある。第一に、ワイン発酵をコントロールする、たとえば進行中のワイン発酵を任意の時点で停止させることであり、第二に、発酵中あるいは貯蔵中に繁殖する腐敗酵母の生育を阻止することである。

通常、低温発酵させても、ブドウを破碎後 6 週間以内にワイン発酵は終了する。発酵可能な糖分のすべてがアルコールに変われば発酵は自然に終わるが、この方法では、製造されるすべてのワインは辛口にしかならない。発酵可能な糖分がまだ残っている段階で、アルコール発酵を止めるには、マスト中の酵母を殺すか、マストから酵母を除いてしまうか、マストを酵母が働かない状態にするか、のいずれかである。発酵しているマストから酵母を除菌あるいは殺菌するには、(1) マストを加熱する、(2) 亜硫酸、あるいはその他の抗菌性物質を添加する、(3) メンブランフィルターで濾過して除菌する、(4) ワインスピリ

ッツを加えてアルコール強化し、その濃度を 17%以上にする、などの方法がとられる。

上記の除菌・殺菌法のうち、第 4 項のアルコール強化による方法は、デザートワインの製造法なので、テーブルワインの製造には適用できない。そこで、第 1 項、第 2 項、あるいは第 3 項で記したいずれかの方法を選択せねばならない。第 1 項の発酵中のマストを加熱する方法による場合、ワインに酸化臭、加熱臭、焦臭あるいは加熱によって生成した種々の成分によるオフ・フレーバーがつく危険が大きい。第 3 項のメンブランフィルターによる無菌濾過は、予備濾過でワインを清澄化した後に精密濾過をせねばならず、また濾過装置やフィルターが高価で製造コストを著しく上昇させる原因となり、低価格高品質ワインをつくることは難しい。しかもマストの濾過中、依然として酵母は生きており、発酵は続き、残糖やアルコール量が変わり、発酵をコントロールできない。そこで、濾過前にマストを低温にし、酵母の活性を抑制してから濾過する必要性が生ずるが、この場合は冷却コストを無視できない。また、大容量タンク中のワインを所定温度にまで冷却するにはかなりの時間を必要とし、この間に発酵は進行するので、事実上冷却によって任意の時点で発酵を停止することは困難である。これらのことから、第 2 項の抗菌性物質を添加して発酵を停止する方法も研究対象となる。

さて、目的の第二にあげた発酵中あるいは貯蔵中に繁殖する腐敗酵母とは、産膜酵母を指すことが多い。産膜酵母として、*Candida*、*Pichia membranaefaciens*、*Hansenula*、*Saccharomyces bayanus*、*Brettanomyces* などがある。このうち、*Candida* と *Pichia* は通常 12%以上のアルコールを含むワインに繁殖しないので、低アルコールワインに検出される。*Hansenula* は発酵性があり、多量の酢酸エチルをつくる。*Brettanomyces* は特に赤ワインに見いだされ、古い木樽を使う場合、この酵母の存在には特に注意が必要である。通常の方法で製造したワインが産膜酵母で汚染されることは少ない。なぜならば、アルコール含量が比較的高く（11 - 13%）、亜硫酸が添加され、フィルターパッドやメンブランフィルターで濾過されているからである。しかし、*Candida*、*Pichia*、*Hansenula*、*Saccharomyces* の中になんかなり強い亜硫酸耐性菌がある。このような場合、低温殺菌と滅菌濾過を組み合わせるしかなく、完全殺菌はなかなか難しく、ワイン中で数十年生き残った例もあり、またある種の野生酵母がワイン中に 10^2 cfu/mL 存在したとき、混濁を引き起こすまでに繁殖したという報告もある（Ough, 1992）。

産膜酵母は、エタノールを酸化してアセトアルデヒドに変え、またいくつかのワイン成分を他の有機酸に変える（横塚弘毅, 1999）。この酵母が生えると、酸とアルコールが減少するのでワインはフラットで水っぽくなり、生育した酵母のために濁る。この酵母は、ワインの表面だけに生えるのではない。タンクの蓋の内側や木樽の栓の内側にも見かける。

ワインが入っているガラス瓶を首を上にして置いたときや、ワインの上部に大きなヘッドスペースがあるとき、夏になるとワインの表面に酵母膜を見ることがある。アルコール濃度が低く、清澄化や安定化処理が不完全な若いワインに見られる微生物汚染である。酵母は、カビ、乳酸菌、酢酸菌より亜硫酸に対する耐性はずっと高いので、酵母を完全に殺菌するには、ワインの pH を低くし、これに（遊離で）30 mg/L の亜硫酸を添加したり、無菌濾過や加熱（70℃、1 分間以上）濾過して瓶詰めしなければならない（横塚弘毅，1999）。

Brettanomyces は特に赤ワインに見いだされ、古い木樽を使う場合、この酵母の存在に特に注意が必要である。Candida、Hansenula、Saccharomyces の中になんかなり強い亜硫酸耐性菌がある（Ough, 1992）。このような場合、低温殺菌と滅菌濾過を組み合わせると殺菌するしかないが、完全殺菌はなかなか難しく、ワイン中で数十年生き残った例もある。また、ある種の野生酵母がワイン中に 10^2 cfu/L 存在したとき、混濁を引き起こすまでに繁殖したという報告もある。

通常、マストやワインに使われている抗菌性物質は、亜硫酸、ジメチルジカルボン酸、ソルビン酸、およびアスコルビン酸である。亜硫酸は、ワインに刺激臭、石鹼のようなおい、金属的な荒々しさを与え、また喘息患者や肺機能が弱い消費者の健康に悪影響がある。ジメチルジカルボン酸（DMDC）は、我が国でその添加は認められておらず、市販ワインに対する使用例も少ないので、その健康への影響や実用的な観点からの評価は定まっていない。ソルビン酸は、発酵や貯蔵中、しばしば 2-エトキシヘキサ-3,5-ジエン（De Rosa, 1983）やソルビン酸エチルに変化し、それらはゼラニウム様のおい（Wurdig, 1974）やセロリ パイナップル様のおいとなり、ワインに不快臭を与える。アスコルビン酸は、ワインより酸素を奪って微生物の成育を停止させるが、アスコルビン酸と酸素との反応によってデヒドロアスコルビン酸と過酸化水素が生成し、過酸化水素はポリフェノールを酸化してワインを褐変させ、また亜硫酸以外のワイン成分と反応してワインの品質を劣化させる（Ough, 1992）。

このように、上記の抗菌性物質は、酵母添加前のマストに添加したり、発酵終了後、ほとんどの酵母を除去後、瓶詰め前に添加されている。すなわち、対象とするマストやワイン中の酵母数が非常に少ない場合には有効な抗微生物剤であるが、発酵最盛期や多数の酵母生細胞が存在する場合には、酒税法で定められた濃度以下での添加はほとんど効果がない。さらに、酵母を殺菌できるほどの高濃度の添加では、抗菌性物質自身あるいは添加後のそれらの分解物による不快味や不快臭によるワインの品質の劣化が著しい。

以上のことから、ワイン酵母の生育を抑制あるいは完全に停止させる新抗菌性物質の開発が望まれている。

我が国の酒税法では、果実酒の製造に使える保存料は亜硫酸（無水亜硫酸とメタ重亜硫酸カリウム）とソルビン酸（あるいはソルビン酸カリウム）の2種に限られている。しかも、酵母類は、カビと異なり同じ真菌類でありながら、嫌気的な条件下でも容易に生育し、その上加工食品に多く使用されている天然の抗菌性物質に対して抵抗性のものが多く、あるいはほとんど感受性をもたないことが多いので（松田敏生，1998）、天然物から酵母に対する新抗菌性物質を見いだすことは非常に意義あることと思われる。

以上のことから、ソルビン酸と亜硫酸を対照として、酵母に対する新しい抗菌性物質の検索を進めることとした。

3) 産膜酵母の食品汚染に対する抗菌性物質

ワインは微生物汚染を受けにくい食品の一つである。それは、ワインのアルコール含量が高く、pHが低く、通常亜硫酸が添加され、またパッドやメンブランフィルターで濾過されているからである。しかし、ワイン発酵中および発酵後に適切な処理が行われなければ産膜酵母による汚染の危険がある。これに関与するのは、*Candida*、*Pichia membranaefaciens*、*Hansenula*、*Saccharomyces bayanus*、*Brettanomyces* などで（横塚、後藤、1955a；横塚、後藤、1955b）、亜硫酸およびアルコール耐性が強い *Saccharomyces* 属が主体であるという報告がある（飯村 穰ら 1980）。

一般に、*Candida* と *Pichia* は通常 12%以上のアルコールを含むワインに繁殖しないので、低アルコールワインに検出される。*Hansenula* は発酵性があり、多量の酢酸エチルをつくる。

産膜酵母は、先に述べたようにエタノールを酸化してアセトアルデヒドに変え、またいくつかのワイン成分を他の有機酸に変える。この酵母が生えると、酸とアルコールが減少するのでワインはフラットで水っぽくなり、生育した酵母のために濁る。酵母は、カビ、乳酸菌、酢酸菌より亜硫酸に対する耐性はずっと高いので、酵母を完全に殺菌するには、ワインのpHを低くし、これに（遊離で）30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の亜硫酸を添加したり、無菌濾過や加熱濾過して瓶詰めされている。

わが国のような高温多湿の気候風土の下で栽培されたブドウは微生物汚染されている可能性が極めて高く、特に発酵後、ワインに添加した亜硫酸が貯蔵期間が長くなるとともに消費され（結合型亜硫酸となる）、その結果、遊離亜硫酸が存在しなくなった後に、生残していた産膜酵母が増殖する可能性が高く、ワインに添加後にも長期間効力が変化しない新規抗菌性物質の開発が望まれていた。

ワインと同様に微生物汚染を受けにくい食品として塩蔵品(漬け物)がある。たとえば、

梅漬けは、水洗した梅を高濃度の食塩中で 3~4 週間、重石をのせて貯蔵したもので、製造そのものに細菌や酵母菌の関与は少なく、また食塩の存在によって水分活性が低く pH も低く、また有機酸が存在するために微生物が生え難い。そのため梅漬けの微生物汚染に関してはほとんど考慮されてこなかった。しかし、近年、国民の健康志向が高まり、梅漬け分野でも減塩梅漬けに人気が集まり、食塩濃度が低くなるとともに、梅漬けの微生物汚染のリスクが増え、特に産膜酵母による汚染は地場漬物産業にとって深刻な問題となりつつある。梅漬け製造工程の第一段階である塩蔵プロセスにおいて、耐酸性、耐塩性の産膜酵母が発生し、脱塩時あるいは調味料の添加時に、果実の表面に白いコロニーとして発達する（恩田ら、1997a, b）。それゆえ、産膜酵母に対して強い抗菌力をもつ天然添加物を見出すことが求められていた。

乾燥、冷凍、塩蔵、燻製、発酵、調理による食品の保存は数千年にわたって発展してきたが、それらは科学的というよりも経験的なものであった。食物の腐敗が微生物によって起こり、食品の熱処理がこれらの微生物の死滅に有効であり、熱処理した食品を密閉容器で保存すれば再汚染を防ぐことができることが、1864 年、Louis Pasteur によって示され、食品の保存法が科学的に理解されるようになった。しかし、最近まで、食品への化学添加物の広範囲な使用は行われなかった。それは、食品はそれぞれの生活地域で製造され、限られた地域で販売されていたからである。今日、ある一つの地域で製造された食品は、さらなる加工のために別の地域に運ばれ、また流通のために別の地域に運ばれる。食品が製造されてから消費されるまでに数ヶ月あるいは数年かかることも珍しくない。このような広範囲な食品の製造・流通を可能にした一つの理由は、食品保存技術の発展にある。

食品の保存技術は、食品の化学的また生物学的劣化を抑止するために用いられる。化学的劣化には、食品の色素、フレーバー、脂質、ビタミンの自動酸化、酵素的、非酵素的な褐変などがあり、これらの劣化に対して抗酸化剤や品質改良剤などが使われている。

一方、生物学的劣化を防ぐための手段の一つに抗菌性物質の添加がある。各々の食品に適した抗菌性物質の選択にはいくつかのファクターが存在する。抗菌性物質の生物学的、化学的特性はいうまでもないが、対象となる食品の性質や組成もまた重要なファクターである。食品成分と抗菌性物質との反応の結果として後者の構造が変化したことによる抗菌活性の低下、食品の高い pH による抗菌性物質の活性低下、食品タンパク質、でんぷんあるいはセルロースとの吸着による抗菌性物質の活性低下、脂質の存在による抗菌性の喪失などがよく知られている（Davidson and Branen, 1981）。また、食品によって微生物フローラや生菌数が非常に異なる。したがって食品の微生物制御を目的にした場合、同一の抗菌性物質のみの添加ですべての食品の保存に有効であるとは限らず、むしろそれぞれの食品

に適した抗菌性物質と保存法があるものと思われる。

第三章 パプリカ種子からの新規抗菌性物質の分離とその構造

3-1 序

これまでに香辛料の抗菌性に関する多くの研究がなされてきたが、パプリカ（唐辛子）にも抗菌性のあることが知られており、その抗菌性を発現する物質の一つにカプサイシンが認められている。しかしカプサイシンは強い辛味を持ち、添加できる食品はかなり限定されてしまう。パプリカに辛味成分以外の抗菌性物質が存在するならば、これを利用した汎用性の高い食品保存剤の開発が可能となる。

本章で、筆者は、パプリカ種子より水あるいは含水エタノールを用いた抽出物が、酵母の生育を特異的に阻害するが、細菌やカビにはほとんど作用しないことを見いだした。本抽出物は、水に易溶なこと、芳香や呈味がなく、その凍結乾燥物は無色であることなど、食品の保存に利用するために極めて有利な特徴を有している。

3-2 材料及び実験方法

3-2-1 パプリカ種子からの抗菌性物質の抽出

3-2-1-1 パプリカ種子からの抗菌性物質の分離に及ぼす抽出条件の影響

パプリカ種子からの抗菌性物質の抽出条件を検討した。抽出条件として、脱脂処理の有無、エタノール濃度、抽出温度と pH を選択した。尚、以後の実験は特に断らない限り 3 連で行ない結果はそれらの平均値で示した。

3-2-1-1-1 脱脂処理

パプリカ種子 100g をコーヒーマルで粉末状に破碎した。得られた粉末 100g あたり 800 mL のヘキサンを添加し、よく混合後、減圧濾過（TOYO No. 2 濾紙）し、濾紙上に広げて残渣を風乾した。この残渣を 50%エタノール（v/v）700 mL に溶かし、40℃で6時間保温した後、減圧濾過した。ロータリーエバポレーターを用いて濾液を 40℃で減圧濃縮した。濃縮物を脱イオン水に対して3日間透析（透析膜、サイズ 36/32、三光純薬）し、その内液を遠心分離（25,000×g、20分）し、上清を凍結乾燥して試料とした。

3-2-1-1-2 抽出温度と時間

パプリカ種子脱脂粉末 100g に 700 mL の 50%エタノールを加えて、0、20、40、60、80、あるいは 100℃で6時間保温後、減圧濾過した。以下の操作は 2-1-1-1 と同様である。

3-2-1-1-3 抽出時間

パプリカ種子脱脂粉末 100 g に 700 mL の 50%エタノールを加えて、40℃で5分～10時

間保温後、減圧濾過した。以下の操作は 2-1-1-1 と同様である。

3-2-1-1-4 エタノール濃度

パプリカ種子粉末 100g に 25、50、あるいは 75%エタノールを加え、40 ℃ で 6 時間保温後、減圧濾過した。以下の操作は 2-1-1-1 と同様である。

3-2-1-2 50%エタノール抽出による抗菌性物質の抽出

パプリカ種子 100 g をコーヒーミルで粉末状に破碎した。破碎物に 700 mL の 50%エタノールを加え、室温で 3 時間攪拌した。この溶液をコットン布で濾過後、濾液を 10,000 ×g、10 分間遠心した。得られた上清をロータリーエバポレーターを用い、40 ℃ で、約 1/2 の容量まで濃縮して試料とした。

3-2-1-3 硫酸塩析

パプリカ種子抽出物の凍結乾燥物を 1 mM のフェニルメチルスルフォニルフルオリドを含む 300 mL の脱イオン水と混合し、マグネチックスターラーを用いて 3 時間攪拌した。この溶液をブフナー漏斗上で減圧濾過後、10,000 ×g、20 分間遠心分離した。得られた上清に 80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、穏やかに攪拌溶解後、一夜放置した。生じた沈殿を 20,000 ×g、20 分間遠心分離後、20 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、この溶液を同じ緩衝液に対して透析 (透析膜、サイズ 36/32、三光純薬) し、透析内液を試料とした。

3-2-2 パプリカ種子抽出物のゲルクロマトグラフィー

3-2-2-1 Sephadex G-50 クロマトグラフィー

パプリカ種子より分離した抗菌性物質画分 (凍結乾燥物) 100 mg を 5 mL の蒸留水に溶解し、15,000 ×g、20 分間遠心分離し、得られた上清を試料液とした。予め水で膨潤させ、十分脱気した Sephadex G-50 を充填した 21 mm ID × 530 mm のガラスカラムに試料液をのせた。流速は、0.2 mL/min とした。各画分 5 mL を集め、280 nm の吸光度を測定して溶出曲線を作成した。

3-2-2-2 Sephadex G-200 クロマトグラフィー

抗菌性物質画分 (凍結乾燥物) 20 mg を 2 mL の蒸留水に溶解し、15,000 ×g、20 分間遠心分離し、得られた上清を試料液とした。予め水で膨潤させ、十分脱気した Sephadex G-200 を充填した 21 mm ID × 530 mm のガラスカラムに試料液をのせた。流速は、0.2 mL/min とした。各画分 5 mL を集め、280 nm の吸光度を測定して溶出曲線を作成した。あるいは、凍結乾燥物 (粉末状、100 mg) を 2.0 mL の水に溶かし、これを 0.2 M 塩化ナトリウム水溶液で平衡化した Sephadex G-200 (26 mm ID × 600 mm) カラムにのせ、同溶液を用い、

0.2 mL/min の流速で溶出した。溶出液中のタンパク質量および中性糖量を、それぞれ 280 nm の吸収及びフェノール-硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) で測定し、溶出曲線を作成した。各ピークを集め、酵母に対する抗菌性を調べた結果、第 2 ピークが抗菌性を示したので、これを水に対して透析し、凍結乾燥した。

3-2-2-3 Sep-Pac ODS **あるいは** Cosmosil C₁₈-OPN

Sep-Pac ODS あるいは Cosmosil C₁₈-OPN を用いたオープンカラムによって抗菌性物質を分離精製した。

Sep-Pak PLUSC₁₈ を用いたとき：ODS ゲルを充填したオープンカラム (Sep-Pak PLUSC₁₈、Waters) に試料を添加し、蒸留水 3 mL で溶出後、20、40、60、80%アセトニトリル各 3 mL で順次溶出した。溶出液 3 mL ずつを分取した。

Cosmosil C₁₈-OPN を用いたとき：試料を 5%エタノール (水溶液) で平衡化した逆相 ODS オープンカラムにのせた。ODS ゲル (Cosmosil C₁₈-OPN、ナカライテスク) は、エタノールと水でよく洗浄し、脱気後、カラム (16 × 300 mm) に充填した。300 mL の 5%エタノールで洗浄後、20%から 80%エタノールへの直線濃度勾配溶出を行ない、あるいは 5、40、60、および 80%エタノール各 300 mL でステップワイズに溶出した。最も高い抗菌活性は 60%エタノールで溶出した画分に見いだされたので、この画分を集め、ロータリーエバポレーターを用いて 40 で減圧濃縮した。

3-2-2-4 逆相 ODS クロマトグラフィー

分析用および分取用 HPLC を次のように行なった。

3-2-2-4-1 分析用 HPLC

試料を μ Bondasphere C₁₈ カラム (3.9 × 150 mm、Waters) にのせ、40、50、60、70、80、および 90%アセトニトリルでステップワイズ溶出し、ピークの検出を RI 検出器で行った。カラム温度は 45 、流速は 0.5 mL/min とし、1 mL ずつ集めた。

また、同じカラムを用い、10%メタノール (あるいはアセトニトリル) から 80%メタノール (あるいはアセトニトリル) への直線濃度勾配溶出を行なった。カラム温度は 45 、流速は 0.5 mL/min とした。溶出液 1 mL ずつを集め、各フラクションの抗菌活性を測定して溶出曲線を作成した。

3-2-2-4-2 分取用 HPLC

試料を μ Bondasphere C₁₈ カラム (19 × 150 mm、Waters) にのせ、50%エタノールを溶出液として用いた高速液体クロマトグラフィーで分別した。ピークの検出には、RI 検出器 (日立 L-3300) を用いた。

同じカラムを用い、10%アセトニトリルから 80%アセトニトリルへの直線濃度勾配溶出

を 45 °C で行った。流速は 4.0 mL とし、溶出液 20 mL づつを集め、抗菌活性を測定した。

また、3.9 × 150 mm の μ Bondasphere C₁₈ カラム (Waters) を装着した HPLC システムを用いた。カラム温度を 45 °C とし、まず 5 分間で溶出液のアセトニトリル濃度を 10% から 30% へ上げる直線濃度勾配で流し、次いで 50 分間で 30% から 80% アセトニトリルへの直線濃度勾配で溶出した。流速は 0.7 mL/min、各フラクション 0.7 mL を分取した。

3-2-3 パブリカの超臨界炭酸ガス抽出残渣からの抗菌性物質の水抽出と Amberlite XAD-7 カラムクロマトグラフィーによる部分精製

パブリカの超臨界炭酸ガス抽出残渣 100g に脱イオン水 700 mL を加え、20 ~ 60 °C の各温度で、1 ~ 40 時間攪拌した後、吸引濾過した。得られた濾液 (540 g) をオートクレーブを用いて 121 °C、15 分間殺菌した。次に、これを室温まで冷却後、ロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で 100 mL まで濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥して粉末 25 g を得た。

この乾燥粉末 25 g を脱イオン水 25 mL に溶かし、脱イオン水で平衡化した Amberlite XAD-7 (オルガノ) カラム (1.4 × 40 cm) に添加した。流速 2 mL/min で 1,500 mL の脱イオン水を流した後、95% エタノールで吸着画分を溶出した。溶出液を 10g づつ分取して溶出液の 280 nm の吸光度を測定した。溶出液のエタノール濃度は、酵素法による測定キット F-Kit エタノール (ベーリンガー・マンハイム) を用いて測定した。水で溶出した画分を F1、95% エタノールで溶出後、はじめに溶出するピークを F2、次に溶出するピークを F3 とした。それぞれの画分をエバポレーターを用いて 40 °C で減圧濃縮後、凍結乾燥した。

3-2-4 薄層クロマトグラフィー

HPLC により分離した各抗菌性画分の純度検定のため、薄層クロマトグラフィーを行なった。3 種の展開溶媒 : (1) ブタノール-1 : ピリジン : 水 (10:3:3, v/v) (2) ブタノール-1 : 酢酸 : 水 (4:1:5, v/v) (3) 酢酸エチル : 酢酸 : 水 (9:2:2, v/v) を用いた。試料を Kieselgel 60 プレート (Merk) に 3 μ L スポットし、上記 3 種の溶媒で展開後、風乾した。プレートに 20% 硫酸水溶液 (0.2% オルシノールを含む) を噴霧し、オープン中 150 °C、5 分間加熱することによって、スポットを検出した。

3-2-5 抗菌性物質の構造解析

抗菌性物質の構造は、MS、NMR そして糖組成分析により決定した。¹H-および ¹³C-NMR は Varian Unity Inova 500 を用いて 500 MHz (¹H) と 124 MHz (¹³C) で測定した。内部標準物質として tetramethylsilane (TMS) を用いた。EI-および FAB-MS スペクトルは、それぞ

れ、日立 M-80B 質量分析計と日本電子ベンチトップ型四重極質量分析計により測定した。抗菌性物質の糖組成は、試料を酸加水分解した後、HPLC により分析した (Takayanagi *et al.*, 1994)。すなわち、試料 1 mg を 2.5 M トリフルオロ酢酸 1 mL に溶解し、100 で 5 時間加水分解した。この液を遠心濃縮器により完全に乾燥するまで、50 で濃縮した。乾燥試料を、CarboPac PA-1 カラム (4 × 250 mm, Dionex) を装着した HPLC で分析した (Hardy *et al.*, 1988)。溶出溶媒として 15 mM 水酸化ナトリウム溶液を使用し、溶出される単糖を PAD (pulsed amperometric detector) により検出した。

3-2-6 菌の培養と抗菌性の測定

3-2-6-1 パプリカ種子の水抽出液の硫酸塩析物の抗菌スペクトラム

パプリカ種子の水抽出物を硫酸塩析して得られる物質の抗菌活性を 6 種のバクテリア [Bacillus subtilis IAM 1069、Staphylococcus aureus FDA 209P、Escherichia coli 3301 (K-12)、Salmonella typhimurium IF0 12529、Lactobacillus plantarum IAM 1041、Streptococcus lactis IAM 1249]、8 種の酵母 [S. cerevisiae W-3 (ワイン酵母)、S. cerevisiae RIFY 1174 (清酒酵母)、S. cerevisiae RIFY 1176 (ビール酵母)、S. cerevisiae RIFY 7461 (パン酵母)、Candida tropicalis、Hansenula anomala IF0 0140 (p)、Pichia membranaefaciens、Zygosaccharomyces rouxii IF0 0597]、3 種のカビ [Aspergillus niger、Mucor javanicus IF0 4569、Rhizopus chinesis IAM 6011] について調べた。

バクテリアは、トリプトソイ培地 (トリプトン 1.7g、ペプトン 0.3g、グルコース 0.28 g、リン酸水素 2 水素カリウム 0.25 g、塩化ナトリウム 0.5 g、水 100 mL、pH 7.0) を用い、35、24 時間前培養した。酵母は、YM 培地 (酵母エキス 0.3g、麦芽エキス 0.3g、ペプトン 0.5 g、グルコース 1.0 g、水 100 mL、pH 6.0) を用い、25、48 時間前培養した。カビは、YM-寒天培地 (酵母エキス 0.3 g、麦芽エキス 0.3 g、ペプトン 0.5 g、グルコース 1.0 g、寒天 1.5g、水 100 mL、pH 6.0) を用い、25、72 時間前培養した。種々の濃度の硫酸塩析 (沈殿) 物を含むトリプトソイ-寒天培地 (バクテリア用; トリプトン 1.7g、ペプトン 0.3 g、グルコース 0.28 g、リン酸水素 2 水素カリウム 0.25 g、塩化ナトリウム 0.5 g、寒天 1.5 g、水 100 mL、pH 7.0) あるいは Y-寒天培地 (酵母及びカビ用; 酵母エキス 0.3g、麦芽エキス 0.3g、ペプトン 0.5g、グルコース 1.0g、寒天 1.5g、水 100 mL、pH 6.0) に、前培養した色々な菌株を接種した。バクテリアは 35、48 時間、酵母は 25、72 時間培養した。最小阻止濃度 (MIC) は、それぞれの菌株の生育を肉眼で観察して決定した。

3-2-6-2 産膜酵母に対するパプリカ種子-50%エタノール抽出物の抗菌性

5つの産膜酵母 (Kloeckera apiculata YITC 203、Pichia anomala YITC 201、P. anomala YITC 256、Candida guilliermondii YITC 222、Debaryomyces hansenii YITC 214) を5%食塩を含むYM培地 (pH6.0) 中、25、48時間前培養した。5 mLの梅酢培地 (後述) を試験管 (17.5 × 130 mm) に入れ、これにパプリカ種子の50%エタノール抽出物 (凍結乾燥物) を終濃度 6.25、12.5、25、50、100、200、あるいは300 μg (乾燥重量) /mL になるように添加した。この混合物を65、15分間加熱殺菌後、酵母前培養液 50 μL (10⁵ cfu/mL、トーマ氏血球計算盤を用いて測定) を接種し、試験管の口をシリコン栓でシール後、25、10日間静置培養した。

また、P. anomala YITC 256 に対するパプリカ種子-50%エタノール抽出物と既知の抗菌性物質 (後述) の最小阻止濃度に及ぼす培養条件 [酵母の初発菌数 (10² ~ 10⁷ cfu/mL)、pH (1.5 ~ 4.0)、食塩濃度 (初発濃度の4.4%から12.4あるいは22.4%へ増加)、培養時間と温度 (10日間、10 ~ 35)] の影響を検討した。最小阻止濃度は、培養器 (液) の表面の (産) 膜の存在とその程度を観察することによって決定した。また、酵母細胞の生育は、660 nmでの吸光度を測定することによって追跡した。

産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物の抗菌性を既知の抗菌性物質のそれとの比較で行なった。用いた抗菌性物質は、メタ重亜硫酸カリウム (extrapure、昭和化学)、ソルビン酸カリウム (guaranteed reagent、東京化成)、酢酸 (JIS guaranteed reagent、昭和化学)、チアミン・ジラウリル硫酸塩 (Vitagen AS2、田辺製薬) である。メタ重亜硫酸カリウムは分解性、酢酸は揮発性であるので、梅酢培地を加熱殺菌後、これらの物質を添加したことを除いて、抗菌活性の測定は上記と同様な方法で行なった。

パプリカ種子-50%エタノール抽出物とメタ重亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム、酢酸、あるいはチアミン・ジラウリル硫酸塩のいずれかとの混合物の抗菌性を調べた。パプリカ種子-50%エタノール抽出物 (凍結乾燥物) 濃度は、6.25、12.5、25、50、100あるいは200 μg/mLであった。他の4種の抗菌性物質を種々の濃度に添加した。各々の産膜酵母の初発菌数は10⁵ cfu/mLであった。培養器を25、10日間、静置培養し、最小阻止濃度を決定した。

3-2-6-3 96穴U底プレートを用いた抗菌活性の測定 (液体培地希釈法)

滅菌済みの96穴U底プレート (8 × 12穴) のすべての穴に50 μLの滅菌水を入れた。次に1列目の穴に50 μLの抗菌性物質試料液 (湯煎中で5分間煮沸滅菌) を添加し、よく攪拌後、この溶液50 μLを採って2列目の穴に入れ、ピペットマンの吸引と放出を繰り返してよくかき混ぜた。同様に2列目の穴から50 μLを採って3列目の穴に入れて同じ操作を繰り返し、抗菌性物質の希釈系列を作成した。続いて、100 μLの1.5倍濃度のYM培地

(オートクレーブで 121 ℃、15 分間滅菌) をすべての穴に添加し、最後に各菌の前培養液 50 μL (前培養液 0.5 mL を滅菌水 19.5 mL で希釈) をすべての穴に添加し、25 ℃、48 時間培養した (合計 200 μL となる)。生育の有無を U 底に凝集した菌体の有無で視覚判定した。

3-2-6-4 濁度計を用いた抗菌活性の測定 (濁度法)

種々の濃度の抗菌性物質を含む YM 培地 (4 mL) と 1 mL の各菌の培養液 (酵母の場合、25 ℃、24 時間前培養) を混ぜ、25 ℃ でインキュベートした。濁度計 (コロナ UT-11 型) を用いて濁度を、あるいは分光光度計を用いて 660 nm の吸光度を測定することにより、培養液の菌の生育の状況を調べた。生菌数の測定は寒天平板培養法によって行なった。

3-2-7 抗菌性物質の化学分析

3-2-7-1 タンパク質

タンパク質量は、マイクロケルダール法 (Horwitz, 1975) あるいは Lowry 法 (Lowry *et al.*, 1951) によって測定した。

3-2-7-1-1 ミクロケルダール法

水に対して透析した試料中の全窒素含量をマイクロケルダール分解法で測定し、得られた値に 6.25 をかけてタンパク質量を求めた。

3-2-7-1-2 Lowry 法

標準液 (牛血清アルブミン 0.200 mg/L) あるいは試料液 0.5 mL を試験管に採り、これに A 液 (0.1 N NaOH 中 2% CuSO₄ 50 mL に 1% Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 中 0.5% CuSO₄ · 5H₂O 1 mL を混合した液) 3 mL を加え混合した。10 分以上室温に放置後、B 液 (市販 Folin-Ciocalteu 試薬を蒸留水で 2 倍に希釈した液) 0.3 mL を加え、混合した。1 時間以上 25 ℃ で放置後、750 nm の吸光度を測定した。牛血清アルブミン標準液の検量線を作成し、これより試料中のタンパク質濃度を求めた。

3-2-7-2 中性糖

中性糖は、フェノール-硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) で求めた。標準液 (グルコースを 0、25、50、75 μg/mL の濃度に溶かした液) あるいは試料液 1 mL を内径が大きい試験管に採り、5% フェノール液 1 mL を加えた。濃硫酸 5 mL を速やかに (10~20 秒) 液面に直接に滴下するように加え、10 分間放置後、よく混ぜ、一定温度 (20~30 ℃) の水浴中に一定時間 (10~20 分間) 保った後、呈色した黄色を 490 nm で測定した。グルコース標準液の検量線を作成し、それより試料液中の中性糖量を求めた。

3-2-7-3 酸性糖

カルバゾール-硫酸法 (Bitter and Ewins, 1961) に従って酸性糖の定量を行った。すなわち、氷冷した硫酸 (ホウ酸ソーダ 0.95g を濃硫酸 100 mL に溶かした溶液) 5 mL を試験管に採り、標準液 (ウロン酸を 0、5、10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に溶かした液) あるいは試料液 1 mL をその上に静かに加えた。室温以上にならないように水冷しながら混和した。試験管の口にガラス玉をのせ、沸騰湯浴中に 10 分間保った。水冷して室温とし、カルバゾール液 0.2 mL を加えて混合し、沸騰湯浴中に 15 分間保ち発色させた。室温まで水冷し、530 nm の吸光度を測定した。ウロン酸標準液の検量線を作成し、それより試料中の酸性糖量を求めた。

3-2-7-4 全フェノール

Slinkard と Singleton (Slinkard and Singleton, 1977) の方法で測定した。

3-2-7-5 アミノ酸

パブリカ種子より分離した抗菌性物質粗画分の約 1 mg (タンパク質相当量) を試験管に採り、定沸点塩酸 1 mL を加えて封管後、110 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間加水分解した。加水分解後、ロータリーエバポレーターを用いて、40 $^{\circ}\text{C}$ で減圧乾固し、さらに NaOH を含む真空デシケーター中に減圧保存し、塩酸を除去した。これを日立全自動アミノ酸分析機 (L-8500A 型) にて分析した。

3-2-7-6 単糖

試験管中に抗菌性物質を入れ、これに 400 μL の 2.5M トリフルオロ酢酸を加えて溶かし、100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 時間加水分解した。試料を冷却後、遠心濃縮器にかけ、50 $^{\circ}\text{C}$ で、乾固するまで遠心した。乾固物にメタノール 100 μL を加えて混合後、再び遠心濃縮器を用いて乾固させた。乾固試料を蒸留水 50 μL に溶かし、CarboPac PA-1 カラムを付けた Dionex HPLC システム (4 \times 250 mm) に注入し、15 mM NaOH 溶液または水で溶出した。アラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、グルコサミンの分離には 15 mM NaOH を溶出液として使い、マンノースとキシロースの分離には水を用いた。溶出した糖を pulsed amperometric 検出器 (PAD) 用いてモニターした。スタンダード糖の溶出時間とピーク面積から各ピークの同定と定量を行なった。

3-2-7-7 プロテアーゼ分解

プロテアーゼとして、プロナーゼ E (メルク、至適 pH、7.5、至適温度、37 $^{\circ}\text{C}$)、プロテアーゼ YP-SS (ヤクルト、至適 pH、2.5、至適温度、45 $^{\circ}\text{C}$)、ニューラーゼ F (天野製薬、至適 pH、3.0、至適温度、30 $^{\circ}\text{C}$)、ニュートラーゼ 0.5L (ノボ・インダストリー、至適 pH、7.5、至適温度、45 $^{\circ}\text{C}$)、PTN (ノボ・インダストリー、至適 pH、7.5、至適温度、50 $^{\circ}\text{C}$) を用いた。

抗菌性物質画分（凍結乾燥物）1.8 mgと牛血清アルブミン 2.0 mgを 1.52 mL の蒸留水に溶解した。これを 0.76 mL づつに分け、一方には蒸留水 0.04 mL を加え、もう一つには各酵素液（1000 μ g/mL）0.04 mL を加えた。混合液は、各酵素の至適 pH と至適温度で一夜反応した。

3-2-7-8 グリカナーゼ分解

グリカナーゼとして、ペクチナーゼ HL（ヤクルト、至適 pH、4.0、至適温度、45 ）、マセロチーム 2S（ヤクルト、至適 pH、5.0、至適温度、45 ）、セルラーゼ NC（ヤクルト、至適 pH、4.0、至適温度、60 ）、セルラーゼオノズカ（ヤクルト、至適 pH、4.0、至適温度、50 ）、ファンセルザイム CM（ヤクルト、至適 pH、5.0、至適温度、50 ）、ファンセルザイム PS（ヤクルト、至適 pH、5.0、至適温度、50 ）、ファンセルザイム MS（ヤクルト、至適 pH、5.0、至適温度、50 ）、ファンセルザイム CS（ヤクルト、至適 pH、5.0、至適温度、50 ）を用いた。

抗菌性物質画分（凍結乾燥物）1.8 mgと牛血清アルブミン 2.0 mgを 1.52 mL の蒸留水に溶解した。これを 0.76 mL づつに分け、一方には蒸留水を 0.04 mL 加え、もう一つには各酵素液（1000 μ g/mL）0.04 mL を加えた。混合液は、各酵素の至適 pH と至適温度で一夜反応した。

3-2-8 酵母生細胞に対するザイモリアーゼの作用

3-2-8-1 パブリカ種子抗菌性物質に感受性および非感受性酵母の培養と集菌

抗菌性物質感受性酵母として、*S. cerevisiae* W-3 および非感受性酵母として *Candida krusei* RIFY TYd3 を使用した。これらの酵母は山梨大学ワイン科学研究センターで継代培養されている。2 菌株をそれぞれ 250 mL の YM 培地に 1 白金耳接種して 25 、48 時間振とう培養した。培養液を遠心分離し（18,000 \times g、10 分間、4 ）、菌体を集めた。菌体は蒸留水（60 mL）に懸濁して洗浄し、遠心分離（4 、5,000 \times g、5 分間）して、菌体を回収した。この操作をさらに一回行い菌体を洗浄した。

3-2-8-2 酵母生細胞に対するザイモリアーゼの作用

2 種の酵母生細胞懸濁液（ A_{800} 2.00）2 mL に 0.05M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）3 mL と 300 μ g/mL ザイモリアーゼ溶液 1 mL を加え、30 、2 時間振とうし、0~120 分間における 800 nm の吸光度を測定することにより、ザイモリアーゼが酵母の生育に及ぼす影響を調べた。

3-2-9 酵母の細胞壁および酵母タンパク質の分離

3-2-9-1 酵母細胞壁の分離

3-2-9-1-1 加熱処理による細胞壁の分離

3-2-8-1 で集めた 2 種類の酵母菌体を蒸留水に懸濁して沸騰湯浴中で 10 分間加熱した後、上述のように細胞壁を遠心分離によって回収した。得られた細胞壁を蒸留水で 3 回洗浄し、以後の実験に使用した。

3-2-9-1-2 自己消化による細胞壁の分離

2 種類の酵母菌体を蒸留水に懸濁して、pH を 5.5 に調整後、45℃、45 時間保温した。保温後の懸濁液を遠心分離（4℃、5,000 ×g、5 分間）し、細胞壁画分を得た。この画分を蒸留水で 3 回洗い、上記のように遠心分離して回収した。

3-2-9-1-3 超音波破碎による細胞壁の分離

菌体を 0.5M PMSF（フッ化メチルスルフォニル、プロテアーゼ阻害剤） - 1% Triton X -100 を含む 10 mM Tris-HCl（pH 8.0）4 mL に懸濁した。この液を 2 等分して（約 2 mL）、それぞれにガラスビーズ（0.5 mm）4 g づつを添加した。ミキサーで 5 分間攪拌後、さらにガラスビーズ 2 g を添加して 2 時間超音波処理（30 分間に 1 回攪拌）した。ときどき酵母懸濁液を検鏡して、破碎が不十分なときはさらに一時間超音波処理を行なった。処理後の懸濁液を遠心分離（1,000 ×g、10 秒間）し、上清（約 2 mL）を得た。この液に 0.5 M PMSF を含む 10 mM Tris-HCl（pH 8.0）3 mL を加えて攪拌後、遠心分離（1,000 ×g、10 秒間）した。この操作を 4 回繰り返してガラスビーズを除去した。得られた溶液（約 15 mL）を遠心分離（4℃、15,000 ×g、10 分間）し、沈殿に 10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）を加えて攪拌し、再び遠心分離した。この操作を 3 回繰り返して細胞壁を洗浄して実験に用いた。

3-2-9-2 酵母タンパク質の調製

250 mL の培養液から得た各酵母菌体に 18.75 mL の SCE 緩衝液 [1 M ソルビトール（D-glucitol）54.65 g、0.1M クエン酸ナトリウム 8.82 g、0.06M EDTA 6.7 g を水 250 mL に溶かし、0.1M NaOH 溶液で pH 7.0 に調整した後、300 mL とした緩衝液] を加えてよく混合した。この菌懸濁液にザイモリアーゼ酵素液（ザイモリアーゼ 20T〔生化学工業〕7.5 mg を 10%メルカプトエタノールを含む SCE 緩衝液 1.25 mL に溶かした液）を添加し、37℃で 1 時間保温した。反応液を遠心分離（4℃、6000 ×g、1 分間）し、スフェロプラストの沈殿を得た。これに 20 mL の溶解緩衝液（0.02M EDTA と 1% SDS または 1% Triton X -100 を含む 0.05M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.0）を添加し、ガラスホモジェナイザーで 5 分間ホモジェナイズした。得られた液 24 mL に硫酸 4.22 g を加えて 30%飽和とした。これを遠

心分離（4、18,000×g、10分間）し、得られた上清 23 mL に硫安 8.19 g を添加して 80% 飽和とした。この液を上述のように遠心分離してタンパク質沈殿を得た。沈殿を蒸留水 10 mL に溶かして、一夜脱イオン水 10 L に対して透析後、酵母タンパク質溶液として用いた。

酵母タンパク質の定量は次のように行った。各酵母タンパク質溶液 10 μL に 90 μL の蒸留水を加えたものを試料液として、BCA タンパク質測定キット（PIERCE）を用いてタンパク質量の測定を行った。試料液に BCA タンパク質測定キットの試薬 A 液と B 液を 50 : 1 に混合した C 液を試薬メーカーの所定法に従って混ぜ、37、30 分間反応させた。これを室温に戻した後、560 nm の吸光度を測定し、牛血清アルブミン標準液（10 ~ 50 μg/0.1 mL）の検量線から、試料中のタンパク質を定量した。

3-2-9-3 酵母細胞壁のザイモリアーゼによる溶解

3-2-9-3-1 酵素の調製

蒸留水にザイモリアーゼ 20T(生化学工業)を 1500 μg/mL の濃度になるように溶解し、これより 20 ~ 200 μL とり、蒸留水を加えて、それぞれ全量を 1 mL とした。

3-2-9-3-2 細胞壁溶解

細胞壁の溶解の程度は細胞壁の溶解に伴う濁度 (A_{800}) の減少により測定した。各細胞壁懸濁液 2 mL に、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 3 mL と酵素調製液 1 mL を加えて全量を 6 mL とし、30、2 時間インキュベート後、800 nm の吸光度 (濁度) を測定した。

3-2-9-3-3 タンパク質と中性糖量の測定

細胞壁の酵素処理後のタンパク質の定量は 3-2-9-2 で述べた BCA タンパク質測定キットを用いて行い、中性糖の定量はフェノール - 硫酸法 (3-2-7-2) で行い、グルコース換算で糖量を表した。

3-2-9-4 ザイモリアーゼからの Z-プロテアーゼの分離

3-2-9-4-1 Sephacryl S-100 HR カラムクロマトグラフィー

Sephacryl S-100 HR (ファルマシア) を脱イオン水で十分膨潤させた。ゲル容量の 2 倍量の 0.2 M NaCl - 0.2 M K_2HPO_4 緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、デシケーターを用いて 10 分間吸引脱気後、3 × 50 cm のガラスカラムに充填し、前記の緩衝液 (溶出液) で平衡化した。溶出液 2 mL に 0.4 g のザイモリアーゼを溶かし、カラムにのせ、0.3 mL/min の流速で溶出した。溶出曲線は 280 nm の吸光度を測定して作成し、フラクションコレクターを用いて、それぞれ 10 mL づつ集め、Kitamura の方法 (Kitamura, 1982) に従って、Z-プロテアーゼ活性および -1,3-グルカナーゼ活性の測定を行なった。

3-2-9-4-2 Z-プロテアーゼ活性の測定

各試験管 (溶出液 10 mL づつ) より試料 0.1 mL をとり、これに 1.5% カゼイン溶液 (3

g カゼイン[Merck]を 200 mL の水に溶かし、1 N NaOH で pH 7.5 として完全に溶解させた後、5 分間沸騰湯浴中で加温して狭雑するプロテアーゼを失活させたもの) 0.2 mL、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 0.3 mL を加え、37 °C、1 時間反応させた。0.44 M トリクロロ酢酸 (TCA) 1.0 mL を加えて反応を停止した。反応液は 37 °C で 20 分間放置後、遠心分離 (4 °C、15,000 ×g、10 分間) して沈殿を除去した。得られた上清の 280 nm での吸光度とコントロール [各試料に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 0.3 mL を加え、37 °C、1 時間反応させ、0.44 M TCA を加えて反応を停止させた後、1.5% カゼインを加えた] の吸光度の差から Z-プロテアーゼ活性を算出した。

3-2-9-4-3 α-1,3-グルカナーゼ活性の測定

各試料 50 μL に基質として 0.2% ラミナリン (東京化成) 50 μL、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 100 μL を加え、37 °C で 60 分間反応させた。このときコントロールとして各試料 50 μL に 0.1 M リン酸緩衝液のみを加えた混合物を反応させた。反応は、フェリシアンカリウム (和光) 溶液 1 mL を加えて停止させた。コントロールには、フェリシアンカリウム溶液を添加直後にラミナリン溶液を加えた。これらの試料液を 15 分間煮沸後、室温に戻し、420 nm での吸光度を測定して α-1,3-グルカナーゼ活性とした (グルカナーゼ活性が高いほど吸光度は低くなることに注意)。

3-2-10 酵母細胞壁の抗菌活性への影響

抗菌性物質溶液は湯煎で 5 分間煮沸滅菌した。また水および 1.5 倍 YM 培地はオートクレーブ (121 °C、15 分間) により滅菌した。S. cerevisiae W-3 前培養液 0.5 mL に 19.5 mL の滅菌水を加えて 40 倍希釈した。抗菌性物質の希釈系列 (25 μL づつ) を作成し、次いでプレートの各穴に 1.5 倍濃度の YM 培地 100 μL を添加した。これらの穴に、3 つの方法 (加熱、酵素処理、超音波処理) のいずれかによって調製した細胞壁懸濁液 ($A_{800} = 7.52$ 、2.52、あるいは 1.52) 25 μL づつを添加し、最後に 40 倍希釈の S. cerevisiae W-3 前培養液を加えた。すなわち、各プレートには、抗菌性物質溶液 25 μL、1.5 倍の濃度に各成分を含む YM 培地 100 μL、酵母細胞壁懸濁液 25 μL、酵母前培養液 50 μL が添加されている。これを 25 °C、48 時間培養した。酵母の生育の程度を U 底に凝集した菌体の有無で視覚判定した。

3-3 実験結果及び考察

3-3-1 パプリカ種子からの50%エタノール抽出物による抗菌性物質の分離

パプリカ種子脱脂粉末 100 g を 3 倍量の 50%エタノールで抽出し、その抽出物を凍結乾燥後 4.92 g の粉末を得た。また、3 倍量の水抽出物から硫酸塩析 (0.8 飽和) によって塩析物 2.91 g (凍結乾燥粉末として) を得た。これらの試料のワイン酵母 (*S. cerevisiae* W-3) に対する抗菌性を調べた。50%エタノール抽出物と硫酸塩析物の最小発育阻止濃度 (MIC) は、それぞれ 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。硫酸塩析後の上清には抗菌性が全くなかった (Table 3-1、当表の Sephadex G-200 クロマトグラフィーおよび ODS クロマトグラフィーの結果については 33 ページで述べる)。そこで、硫酸塩析物の種々の微生物に対する抗菌性を検討した。硫酸塩析物は、8 種の酵母の生育を阻害し、MIC は 20 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Table 3-2)。表には示していないが、*S. cerevisiae* W-3 と共に、わが国で広く用いられているワイン酵母 *S. cerevisiae* OC-2 と Champagne eperney の MIC は、前者が *S. cerevisiae* W-3 よりもやや小さく、後者はやや大きかった。これに対して、6 種のバクテリアと 3 種のカビにはまったく抗菌性は認められなかった。これらの結果より、パプリカ種子には、タンパク質のような高分子物質を含む抗菌性物質が存在するものと考えられた。しかし、一般に植物由来の多くの抗菌性物質は疎水性であることを考慮し、疎水性物質でも親水性物質でも抽出可能と考えられるエタノール水溶液を用いてパプリカ種子からの抗菌性物質の抽出に関する研究を行なった。

3-3-2 パプリカ種子からの抗菌性物質の抽出条件

パプリカ種子からエタノール水溶液で抽出された (*S. cerevisiae* W-3 に対する) 抗菌活性物質は、セルロース膜を用いた透析時に透析内液に残ったので、高分子物質、たとえばタンパク質あるいは多糖である可能性があった。このような高分子物質を抽出する際には、種子の脂質成分が干渉することが考えられた。そこで、エタノール水溶液で抽出前に種子粉末をヘキサンで脱脂し、脱脂効果を検討した。

Table 3-3 に示したように、100 g の種子からの 50%エタノール抽出物の凍結乾燥物の重量は、ヘキサンで処理をしてもしなくても同じで、1.15 g (5 回実験の平均値) であった。また 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加濃度で *S. cerevisiae* W-3 に対してわずかな抗菌活性の差が見られたただけだったので、以後はヘキサン処理を行わなかった。さらに、ヘキサン処理により抗菌力の低下が認められなかったので、本抗菌性は油脂成分に由来する可能性は低いと考えられた。

Table 3-4 は、エタノール水溶液を用いた抽出の際、抗菌性物質画分量と抗菌活性の抽出に及ぼすエタノール濃度、抽出温度と時間の影響を調べた結果である。エタノール濃度

Table 3-1. Yield and MIC of antimicrobial fractions at each purification step.

	Yield (g) ^a	MIC (μ g/mL) ^b
Extraction with 50% ethanol	4.92	62.5
Ammonium sulfate precipitate	2.91	31.3
Sephadex G-200 chromatography	1.03	15.6
ODS chromatography	0.005	1.1

^a Yield (dry weight) from 100 g of paprika seeds.

^b *Saccharomyces cerevisiae* W-3.

Table 3-2. Antimicrobial spectrum of ammonium sulfate precipitate from water-extract of paprika seeds.

Strain	MIC (μ g/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069	> 1.0
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	> 1.0
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301 (k-12)	> 1.0
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 12529	> 1.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM 1041	> 1.0
<i>Streptococcus lactis</i> IAM 1249	> 1.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W-3	0.02
<i>Saccharomyces</i> RIFY 1174	0.02
<i>Saccharomyces</i> RIFY 1176	0.02
<i>Saccharomyces</i> RIFY 7461	0.02
<i>Candida tropicalis</i>	0.06
<i>Hansenula anomala</i> IFO 0140 (p)	0.06
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.20
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> IFO 0597	0.20
<i>Aspergillus niger</i>	> 1.0
<i>Mucor javanicus</i> IFO 4569	> 1.0
<i>Rhizopus chinensis</i> IAM 6011	> 1.0

Table 3-3. Effect of hexane treatment on extraction of antimicrobial substance from paprika seeds.

	Yield (g [dry weight] /100 g seeds)	Concentration of added antimicrobial substance (μ g/mL)		
		10	20	40
No treatment	1.15	+	-	-
Treatment with hexane	1.15	\pm	-	-

+, moderate yeast growth; \pm , weak yeast growth; -, no yeast growth.

Table 3-4. Effects of ethanol concentration, temperature, and time on extraction of antimicrobial substance from paprika seeds.

Extraction condition	Yield (g [dry weight] /100 g seeds)	Concentration of added antimicrobial substance (μ g/mL)		
		10	20	40
(a) Ethanol conc. (%) (extraction for 3 hours at room temperature)				
25	2.29	++	++	
50	1.18	+		
75	0.65			
(b) Extraction temperature ($^{\circ}$ C) (extraction with 50% ethanol for 3 hours)				
0	0.85	+		
20	1.05	\pm		
40	1.35	\pm		
60	1.40	\pm		
80	1.05	++	++	++
100	1.40	++	++	++
(c) Extraction time (hours) (extraction with 50% ethanol at room temperature)				
0 (ca 5 min)	1.05	++		
1	1.35	\pm		
3	1.05			
5	1.15	+		
10	1.00	++	++	

++, strong yeast growth; +, moderate yeast growth; \pm , weak yeast growth; -, no yeast growth.

が上がるとともに、抽出乾燥物量が下がり、逆に抗菌性は上昇した (Table 3-4a)。エタノールを全く含まない水のみで抽出を行なったとき、固形物量が多くなったが、抽出液の粘度が上がり、凍結乾燥することが難しかった。また、エタノールのみを用いたときには油脂成分が多量に抽出され、同様に凍結乾燥が困難であった。これらのことから、抗菌性の強さと凍結乾燥のし易さ、凍結乾燥物収量などを総合的に考慮して、50%エタノールを用いて抽出することにした。

Table 3-4b は、抽出温度の影響を調べた結果である。抽出温度が 0 から 60 の間では抗菌活性はほとんど差がなかったが、80 を越えると急速に活性が低下した。以上のことから抽出は室温で行なうこととした。

Table 3-4c は、抽出時間の影響を検討した結果である。約 5 分間と 1 時間抽出で得られた抗菌性画分の活性はやや低いが、1 時間以上 3 時間までの抽出時間で得られた画分の活性はほぼ同じであり、5 時間を超えると活性の低下が認められた。そこで、室温での抽出時間を 3 時間と決定した。

3-3-3 パプリカ種子抽出物のゲル濾過による分別

パプリカ種子粉末より室温で 3 時間、50%エタノールで抽出し、凍結乾燥した抗菌性物質粗画分 100 mg を Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーで分別した (Fig. 3-1a)。大きく 2 つのピークに分かれたので、第 1 に溶出するピークを F1 (試験管番号 11 - 16)、第 2 に溶出するピークを F2 (試験管番号 17 - 36) とし、これらを集めて減圧濃縮後、凍結乾燥した。前者の重量は 30 mg、後者のそれは 40 mg であった。両者のアミノ酸組成を分析した結果、F1 の 27.5% は酸性アミノ酸、14.9% は塩基性アミノ酸であるのに対して、F2 は、26.8% が酸性アミノ酸、13.5% は塩基性アミノ酸であり、かなり類似したアミノ酸組成を示した。また、2 つの画分の抗菌性を調べた結果、F1 は 10 μ g/mL の濃度で酵母の生育を阻止したが、F2 は 40 μ g/mL の添加のときでさえ良好な生育が認められた。そこで F1 の 20 mg を Sephadex G-200 クロマトグラフィーで分別したところ、Fig. 3-1b の結果を得た。図に示したように、2 つの画分、F1-1 (試験管番号 9 - 21) と F1-2 (試験管番号 22 - 40)、それぞれ 8 mg と 4 mg が得られたので、酵母に対する抗菌性を調べた。その結果、10 μ g/mL の濃度で、2 つの画分ともに酵母の生育を阻止した。

Table 3-5 は、パプリカ種子の 50%エタノール抽出物 (抗菌性あり) を Sephadex G-50 クロマトグラフィー (Fig. 3-1a) で分別した 2 つの画分、F1 (抗菌性あり) と F2 (抗菌性なし) および F1 を Sephadex G-200 クロマトグラフィー (Fig. 3-1b) で分別して得られた F1-1 (抗菌性あり) と F1-2 (抗菌性あり) の化学組成を示している。50%エタノール抽

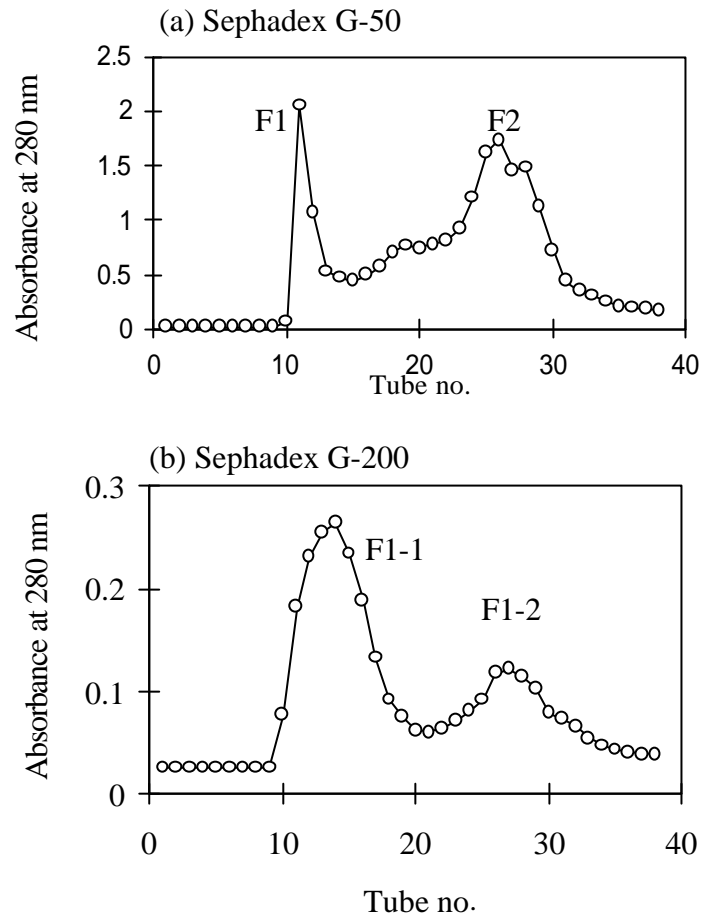


Fig. 3-1. Fractionation of paprika seed extract by Sephadex G-50 chromatography (a) and by Sephadex G-200 chromatography (b) of F1 obtained in (a) .

Table 3-5. Chemical composition of 50%-ethanol extract from paprika seeds and antimicrobial fractions fractionated by Sephadex G-50 (Fig. 3-1a) and G-200 (Fig. 3-1b) chromatographies.

	Proteins	Neutral sugars	Acidic sugars	Phenols	Total
	(µg/mg lyophilisate)				
50%-ethanol extract	484	225	120	25	854
F 1	82	250	160	8	500
F 2	714	157	150	26	1047
F 1-1	60	463	190	trace	713
F 1-2	70	500	315	trace	885

出物は、タンパク質、中性糖、酸性糖およびフェノールの各含有量の合計が、もとの抽出物の凍結乾燥物重量の 85.4% になり、水分含量を考慮すると、上記の 4 つの化学成分で 50% エタノール抽出物が構成されていると考えられる。50% エタノール抽出物全体（凍結乾燥粉末）に占めるタンパク質の割合は 57%、中性糖と酸性糖を合計した糖のそれは 40%、フェノールのそれは 3% であった。抗菌性画分は、Sephadex G-50 クロマトグラフィーで V_0 （排除容量）に溶出し、Sephadex G-200 クロマトグラフィーでは V_0 と $V_0 + V_i$ （排除容量+ゲル粒子内溶媒量）の間に溶出されているので、低分子物質でなく、多糖やタンパク質などを含む高分子物質と推定された。しかし、50% エタノール抽出物中の大部分のタンパク質は、抗菌性のない F2 画分中に含まれ、一方 F1-1 と F1-2 画分は、これらに占めるタンパク質の割合はそれぞれ 8.4% と 7.9% であり、一方糖の割合は F1 で 50.0%、F1-1 で 64.9%、F1-2 で 56.5% であり、タンパク質そのものが抗菌性を示すのではなく、むしろ糖成分が抗菌性を示しているとも考えられた。

Table 3-6 は、上記の各画分の 3 種の酵母、*S. cerevisiae* W-3、*S. cerevisiae* OC-2 および *C. eperney* に対する抗菌性を試験した結果である。Sephadex G-50 クロマトグラフィーで得られた画分（F1）と Sephadex G-200 クロマトグラフィーで得られた画分（F1-1、F1-2）の *S. cerevisiae* W-3 に対する抗菌活性について比較してみると、Sephadex G-50 クロマトグラフィーで分離後のピークよりも、Sephadex G-200 クロマトグラフィーで分離後のピークのほうが、やや抗菌活性が強くなることを除いてほとんど変わらず、F1-1 と F1-2 画分の MIC は約 10 $\mu\text{g/mL}$ であった。

3-3-4 ゲルろ過によって得られた抗菌性画分の分離精製

Sephadex G-200 クロマトグラフィーによって得られた F1-1 画分（Fig. 3-1）をさらに分離精製するために、糖タンパク質と特異的に結合する Con A を用いたレクチンカラムクロマトグラフィー、ウルトラハイドロゲル 250 カラムクロマトグラフィー、および Sep-pac ODS カラムクロマトグラフィーによる分離を試みた。レクチンカラムを用いた場合、カラムから最も早く溶出される非吸着画分に抗菌性が見出され、多糖類と分別できなかった。ウルトラハイドロゲル 250 カラムを用いたときに得られたすべてのピークに抗菌性は認められなかった。しかし、ODS カラムを用いたとき、カラムから 40% - 60% アセトニトリルで溶出された画分に強い抗菌性が認められた。すなわち、試料を ODS (μ Bondasphere C_{18}) カラムにのせ、アセトニトリル濃度を 10% から 70% へ直線的に上げて抗菌性物質を溶出し、220 nm の吸光度を測定して溶出図を作成した。Fig. 3-2 に示したように、アセトニトリル濃度の上昇に伴ってベースラインがほぼ直線的に増加し、いくつかの小さなピークが出現

Table 3-6. Antimicrobial activity towards three yeasts of fractions F1 and F2 separated by Sephadex G-50 chromatography of 50%-ethanol extract of paprika seeds, and of fractions F1-1 and F1-2 separated by Sephadex G-200 chromatography of F1.

Yeast	Fraction	Concentration of each fraction added (μ g/mL)					
		0.5	1	5	10	15	20
Sephadex G-50							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC-2	F1	+	+	-	-	-	-
	F2	++	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W-3	F1			++	++	-	-
	F2			++	++	++	+
<i>Candida eperney</i>	F1			++	++	++	-
	F2			++	++	+	+
Sephadex G-200							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC-2	F1-1	+	+	-	-	-	-
	F1-2	++	+	+	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W-3	F1-1			++	-	-	-
	F1-2			+	-	-	-
<i>Candida eperney</i>	F1-1			++	++	+	+
	F1-2			++	+	+	-

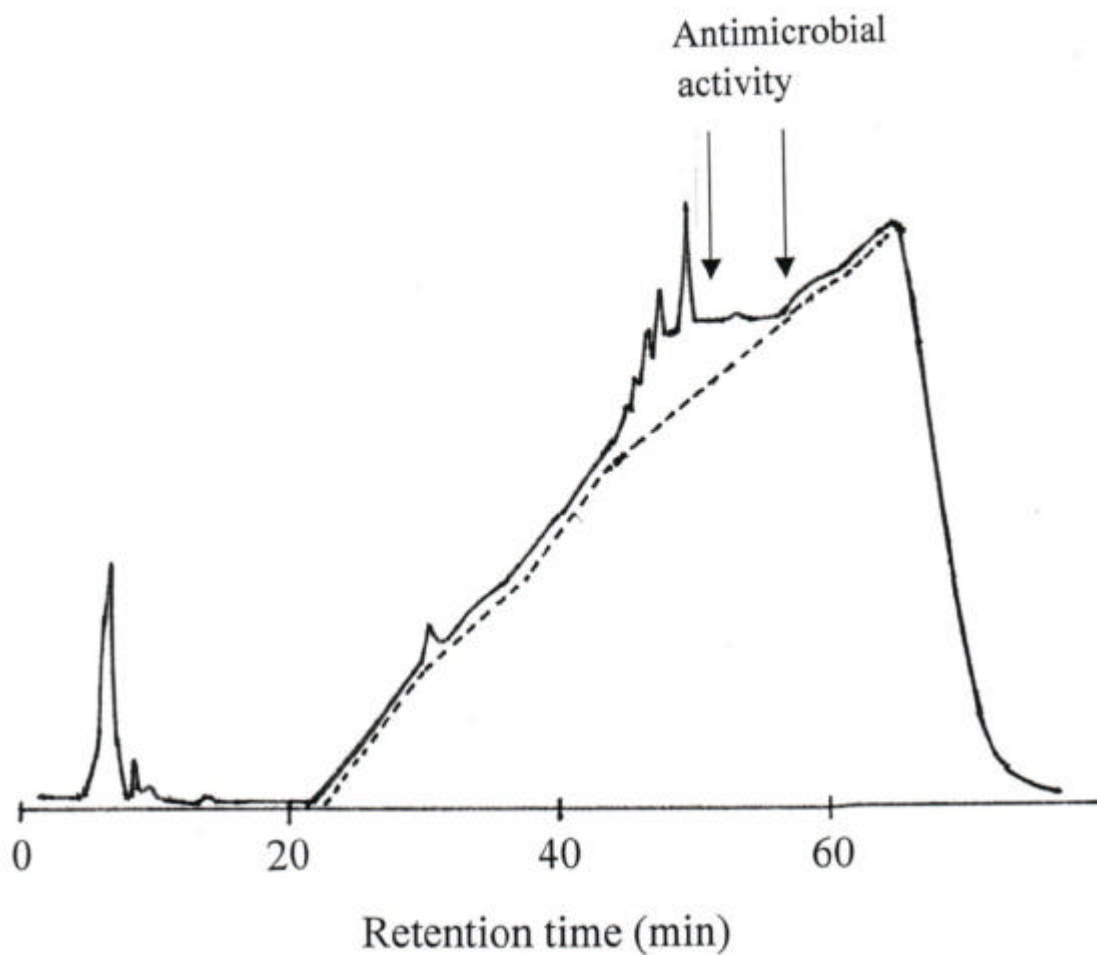


Fig. 3-2. Reverse-phase HPLC of an antimicrobial fraction obtained by Sephadex G-200 chromatography.

Chromatographic conditions: column, 3.9 X 150 mm; Solvent, 10% 70% acetonitrile/50 min; flow rate, 0.4 mL/min; detection, 220 nm.

した。しかし、強い抗菌性は 220 nm で吸収されるピークがない保持時間 50 分と 58 分の間
に溶出した。50%エタノール抽出画分の MIC が 62.5 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対して、ODS カラ
ムより溶出した画分の MIC は 1.1 $\mu\text{g/mL}$ となり非常に精製されていることが分かった
(Table 3-1)。ODS カラム溶出画分に 220 nm の吸収がないことから、本抗菌性物質はペプ
チド鎖やフェノール性側鎖をもつ可能性は低いと思われた。抗菌性画分が ODS カラムから
高濃度のアセトニトリルで溶出されたことは本物質は疎水性の強い化合物であることを意
味する。そこで、ODS カラムによる分離精製をさらに詳しく検討した。パプリカ種子より
50%エタノールで抽出した画分を、まず ODS オープンカラムで分別した。5%エタノール
で平衡化した Cosmosil 140 C₁₈-OPN カラム (16 × 300 mm) に試料をのせ、5、40、60、
80%エタノール水溶液 (各 450 mL) でステップワイズに溶出させた。溶出液の抗菌性を調
べた結果、全抗菌活性の約 90%は 60%エタノール溶出画分 (凍結乾燥物 3.2 g) にあり、
残りの 10%は 40%エタノール溶出画分 (3.9 g) に存在した。60%エタノール溶出画分の
MIC は 7.8 $\mu\text{g/mL}$ であった。

ここで重要なことは、ODS オープンカラムに添加した試料は、種子の 50%エタノール抽
出液を水に対して透析後の内液 (すなわち高分子画分と考えられる) であるということ
である。しかし、ODS カラムから溶出した抗菌性を示す画分にはタンパク質は存在せずまた
水に難溶であった。ODS カラムに添加する前の透析内液中では抗菌性物質はタンパク質と
弱い結合をして存在し、水に溶けていたのではないかと考えられる。

以上の結果、本抗菌性物質の本体は、タンパク質を含まない疎水性物質であると考えら
れたので、以後の実験では、硫酸塩析とゲルろ過による分別を行わず、パプリカ種子の 50%
エタノール抽出物を ODS カラムを用いて分離精製する方法を検討した。

3-3-5 ODS オープンカラムクロマトグラフィーと ODS 高速液体クロマトグラフィーを 用いた抗菌性物質の分離精製

前項で示したように、パプリカ種子粉末を 50%エタノールで室温、3 時間抽出し、その
抽出物を濃縮後に凍結乾燥して得た物質を ODS カラム (Cosmosil 140, C₁₈-OPN、16 × 300
mm) にかけて、これより 60%エタノールで溶出される画分 50 mg を μ -Bondasphere C₁₈ カラ
ム (19 × 150 mm) を用いた HPLC で分別した。カラムから抗菌性物質を 50%エタノール
で溶出し、RI 検出器を用いてクロマトグラムを作成し、10 個の主要なピークを得た (Fig.
3-3)。各ピークを分取し、これらを薄層クロマトグラフィーで分離した結果を Fig. 3-4
に示した。すべてのピークは単一のスポットを示し、ピーク 1、2、3、4、5、6、7、

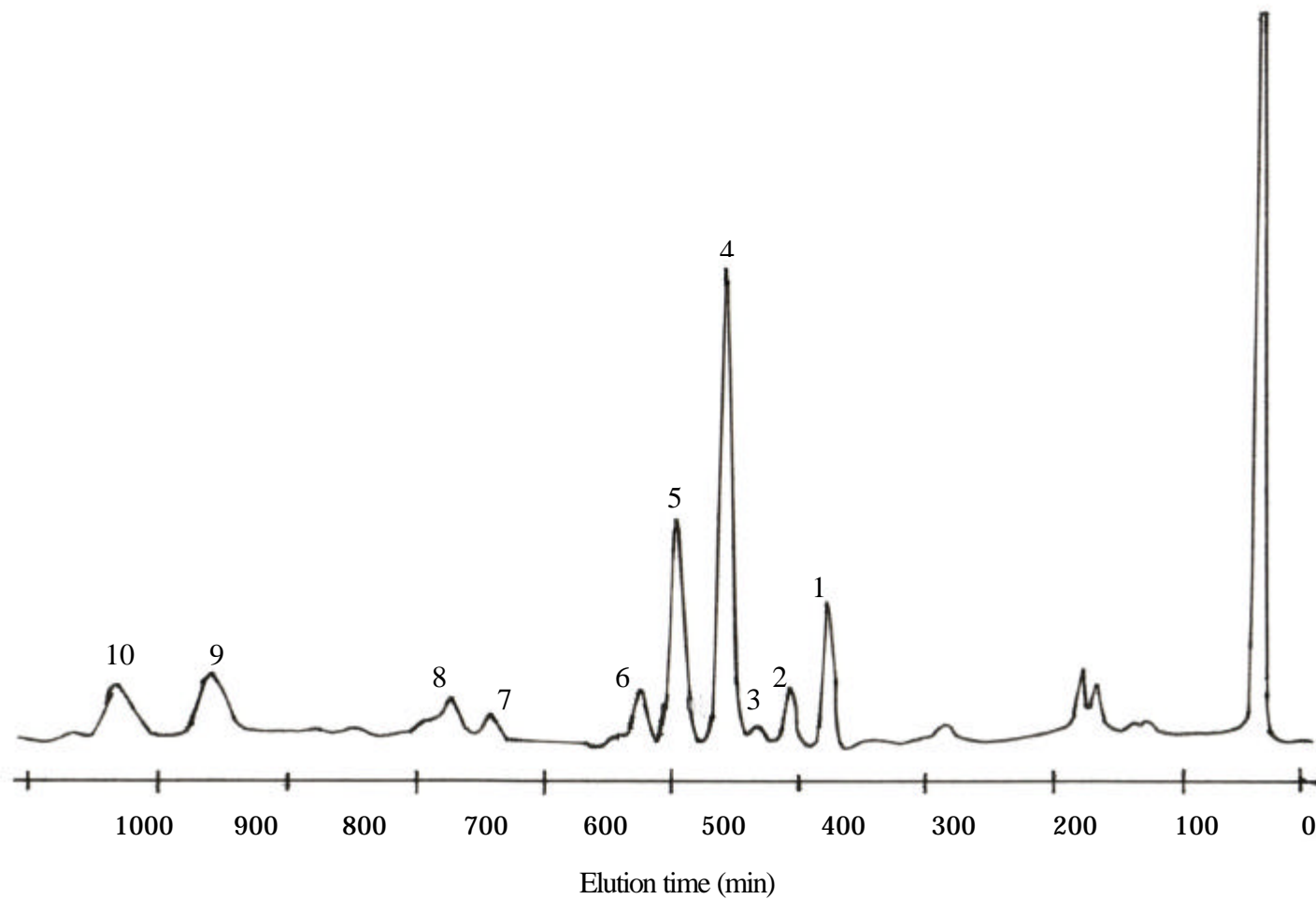


Fig. 3-3. HPLC chromatogram of the active fraction obtained from ODS open-column chromatography. The active fraction eluted at 60% ethanol was separated by reverse-phase HPLC on a μ Bondasphere C_{18} column (19 x 150 mm, Waters) using 50% ethanol as the eluent. Eluted substances were detected by an RI detector (Hitachi L-3300).

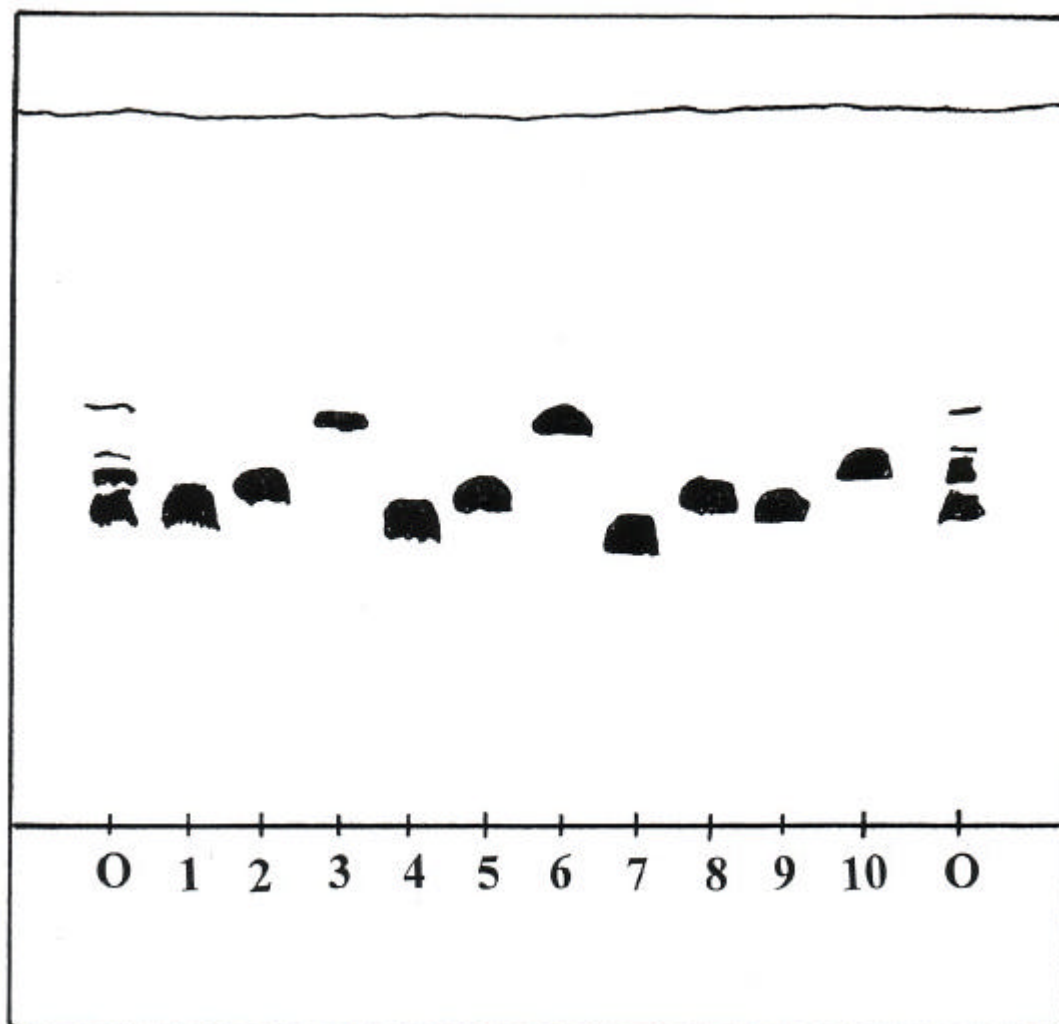


Fig. 3-4. Thin-layer chromatography of a partially purified antimicrobial fraction (O) obtained by reverse-phase open-column chromatography and ten peaks (1 to 10) fractionated by reverse-phase HPLC of fraction O.

Developing solvent: butanol-1: pyridine:water (10:3:3, v/v).

8、9、10のRf値は、それぞれ0.45、0.48、0.57、0.43、0.46、0.57、0.40、0.46、0.44、0.51であった。HPLCでの溶出位置とTLCでのRf値から、酵母に対するパプリカ種子中の抗菌性物質は、少なくとも10種類存在することが分かった。比較的多量に回収されたピーク1、4、5、6、9、10の1mg当たりのグルコースとガラクトース量をフェノール-硫酸法で測定した結果、それぞれ315と85 µg、335と75 µg、305と65 µg、250と115 µg、370と40 µg、335と108 µgであり、いずれのピークも糖を含んでいた。

Table 3-7は、逆相HPLC (Fig. 3-3) で得た10ピークの産膜酵母(山梨県工業技術センター分離酵母8株、山梨大学ワイン科学研究センター分離酵母3株)に対する抗菌性試験結果である。C. kruseiを除くすべての産膜酵母に対して各ピークは高い抗菌性を示し、それらのMICは6 µg/mL以下であった。ピーク2、5、6、10は、特に高い抗菌力をもっていた。

3-3-6 パプリカ種子から分離精製した抗菌性物質の構造

µ Bondasphere C₁₈ カラムを用いたHPLC (Fig. 3-3) によって分離した10ピークの中で、最も大きなピーク4(化合物4、MIC = 2.6 µg/mL、種子重量をもとにした収率0.1%)の構造をMS、NMRそして糖組成分析により決定した。化合物4の糖組成を酸加水分解とHPLC分析により測定した結果、化合物4はグルコースとガラクトースからなる糖鎖を持ち、その組成比は4.3:1 (Glc:Gal)であった。化合物4(10mg)を6.5% HClO₄と0.02M H₂SO₄を1:1で混合した液1mLに溶かして140℃で2時間加熱し、糖鎖を切断した。得られたアグリコンの質量分析の測定結果はm/z 432 [M]⁺であった。この質量分析と¹³C-NMRの測定結果 (Table 3-8) は、(25R)-5 β -spirostane-2,3-diolのデータと一致した (Jain, 1987; Uniyal *et al.*, 1991; Van Antwerp *et al.*, 1997)。化合物4の質量分析の結果はm/z 1241 [M - H]⁻であった。化合物4の¹H-NMRスペクトルは5つのアノメリックプロトン [4.46 (d, J = 7.8 Hz); 4.72 (d, J = 7.7 Hz); 4.87 (d, J = 7.9 Hz); 4.66 (d, J = 7.9 Hz); 5.05 ppm (d, J = 7.9 Hz)] が存在することを示した。化合物4に由来するすべてのカーボン及びプロトンのシグナルは¹H-¹H COSY, TOCSY, GHSQCにより同定した。化合物4のHMBCスペクトルはアグリコンのC3-OHとガラクトースの1'-Hにロングレンジコレーションがあることを示した (Table 3-9)。その他、グルコース-1''-Hとガラクトース-C-4'、グルコース-1'''-Hとグルコース-C-3''、グルコース-1''''-Hとグルコース-C-3''、グルコース-1'''''-Hとグルコース-C-2'の間でロングレンジコレーションが示された。糖鎖のガラクトースとグルコースのアノマー型はカップリング常数

Table 3-7. Minimum inhibitory concentration (μ g/mL) of ten antimicrobial fractions obtained by reverse-phase HPLC towards film-forming yeasts.

Film-forming yeast	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9	Peak 10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W203	2.6	0.4	2.6	2.6	0.7	1.3	1.2	1.3	1.3	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W205	1.3	0.4	2.6	5.3	2.6	1.3	2.6	0.4	1.3	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W207	2.6	0.4	2.6	2.6	1.3	1.3	0.5	1.3	0.3	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W212	1.3	0.4	2.6	1.3	0.3	1.3	0.7	1.3	0.3	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W213	0.3	1.3	5.2	2.6	1.3	1.3	2.5	5.3	5.2	5.2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W217	0.3	2.6	2.6	2.6	0.3	1.3	2.5	2.6	2.6	2.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W220	2.6	1.3	2.6	1.3	0.3	1.3	2.5	2.6	2.6	1.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 3012	1.3	0.3	2.6	1.3	0.3	1.3	0.3	0.4	0.4	0.3
<i>Candida krusei</i> RIFY Ytd3	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6
<i>Issatchenkia orientalis</i> RIFY 2024	0.3	0.4	1.3	0.4	0.6	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4

Table 3-8. ^{13}C NMR chemical shifts for aglycon of compound 4 in CDCl_3 .

Position	(ppm)	Position	(ppm)
1	45.0	15	31.7
2	73.1	16	80.8
3	76.4	17	62.2
4	35.6	18	16.5
5	44.8	19	13.6
6	27.8	20	41.6
7	32.1	21	14.5
8	34.4	22	109.2
9	54.3	23	31.4
10	37.6	24	28.8
11	21.2	25	30.3
12	40.0	26	66.8
13	40.6	27	17.1
14	56.1		

Table 3-9. ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for the sugar moiety of compound 4 in CD_3OD .

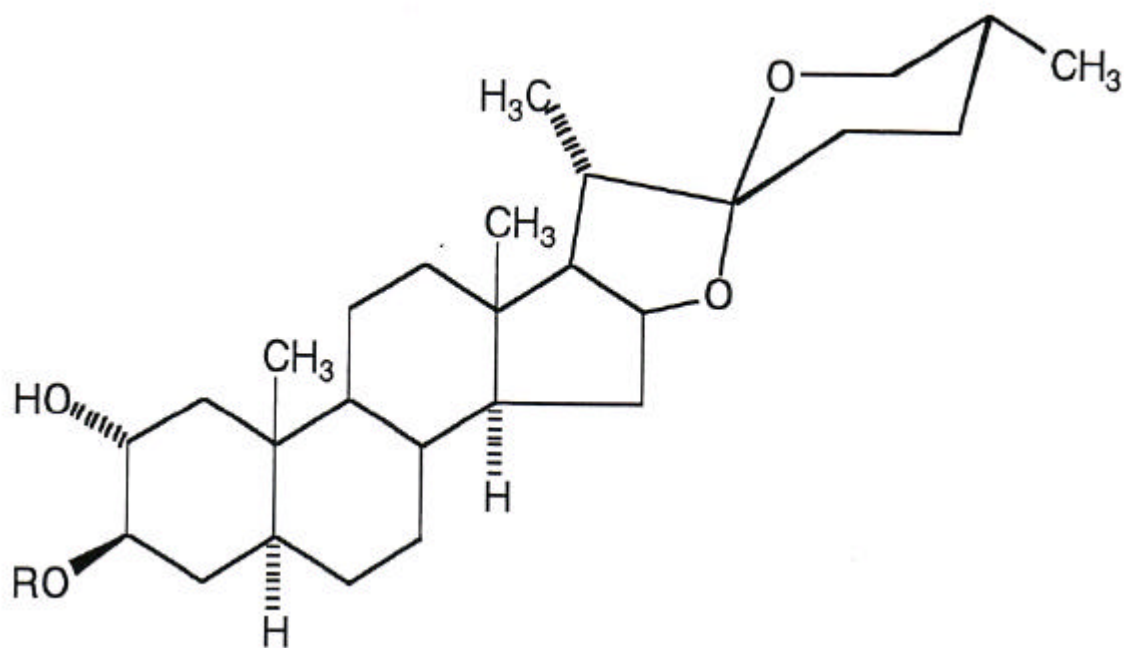
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
Gal		
1'	4.46 (d, $J = 7.8$)	103.1
2'	3.79	73.2
3'	3.64	75.8
4'	4.14	80.2
Glc		
1''	4.72 (d, $J = 7.7$)	104.7
2''	3.85	81.3
3''	3.89	87.9
4''	3.45	71.4
Glc		
1'''	4.87 (d, $J = 7.9$)	103.9
2'''	3.58	75.0
3'''	3.70	88.2
4'''	3.51	70.4
Glc		
1''''	4.66 (d, $J = 7.9$)	105.4
2''''	3.38	75.7
3''''	3.47	71.9
4''''	3.45	70.9
Glc		
1'''''	5.05 (d, $J = 7.9$)	104.4
2'''''	3.30	76.0
3'''''	3.44	78.0
4'''''	3.45	78.2

($J = 7.7 - 7.9 \text{ Hz}$) から全て β 型であると考えられた。以上の結果から、糖鎖構造は β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside であると決定された (Fig. 3-5)。

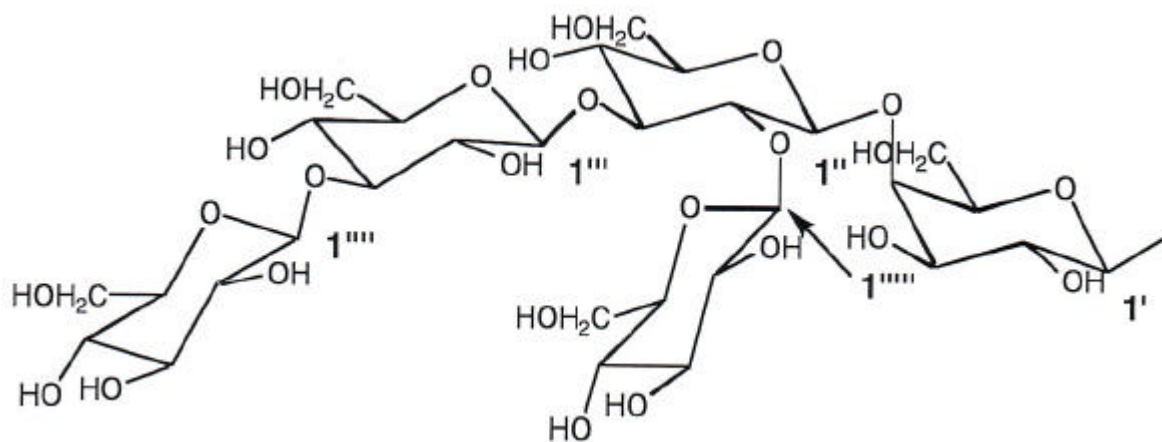
化合物 4 の構造は赤唐辛子から分離されたギトゲニン配糖体に類似していた (Yahara *et al.* 1994)。Yahara らはギトゲニンと同時にティゴゲニンを分離しているため、本論文で分離された 10 個の化合物の中で 4 以外のどれかがティゴゲニンに相当している可能性があった。ギトゲニンの生理活性としては、これまでに腫瘍プロモーターの阻害やコレステロール低下作用などが報告されている (Mimaki *et al.*, 1996; Sauvaire *et al.*, 1991)。

本論文でパブリカ種子より分離し、構造決定された抗菌性物質はサポニンに属し、そのアグリコンはステロイドサポゲニン的一种であるギトゲニンで、エタノールやアセトンに可溶であった。

サポニンに共通な性質として、その水溶液は起泡性をもち、溶血作用を示すことが知られ、この穏和な界面活性剤としての性質を利用して、細胞膜を破壊することに使われているが、本論文では、パブリカ種子から分離されたギトゲニン配糖体が酵母に対して特異的に抗菌作用を示すことを初めて見出した。



Aglycone of Compound 4: (25*R*)-5 α -spirostane-2,3-diol(R=H)



Compound 4 R=sugar moiety: -D-glucopyranosyl-(1 3)- -D-glucopyranosyl-(1 3)-[-D-glucopyranosyl-(1 2)]- -D-glucopyranosyl-(1 4)- -D-glucopyranoside

Fig. 3-5. Chemical structure of compound 4.

3-3-7 パプリカ種子から分離した抗菌性物質の作用機構

一般に、抗菌活性は、いくつかの因子、たとえば添加濃度、作用時間、温度、pH、酵母の生育相などにより大きく影響される。そこで、本論文でもパプリカ種子から分離した抗菌性物質の作用機作を検討するに先だって、抗菌活性に影響を与える種々の因子を調べた。

Fig. 3-6 は、パプリカ種子から抽出し、Sephadex G-200 クロマトグラフィーによって部分精製した抗菌性物質画分が *S. cerevisiae* W-3 の生育に及ぼす影響を調べた結果である。抗菌性物質画分を 0~31.2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で酵母培養液に加え、培養液の濁度の変化によって *S. cerevisiae* W-3 の生育曲線を描いた。抗菌性物質画分を添加していないコントロール培養液の対数増殖期は、培養開始後数時間以内に始まり、一方 7.8 $\mu\text{g/mL}$ の抗菌性物質画分を添加した培養液の対数増殖期は 50 時間後に始まったが、70 時間後にはコントロール培養液と同じ濁度となった。しかし、抗菌性物質画分を 15.6 および 31.2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に添加したとき、70 時間後には生細胞は観察されなかった。

部分精製した抗菌性物質画分 100 $\mu\text{g/mL}$ および 400 $\mu\text{g/mL}$ の存在下で *S. cerevisiae* W-3 を 25 で YM 培地中で培養し、生菌数を測定した。Fig. 3-7 に示したように、いずれの添加濃度でも、培養数時間後には 10 cfu/mL になり、24 時間後に生細胞は全く存在しなかった。培養を開始してから 2 時間後に培養液一滴をプレパラートに落とし、光学顕微鏡を用いて 600 倍で観察し、写真撮影を行なった。抗菌性物質を添加した培地中の酵母細胞は、非添加の場合に比較して、萎縮し凝集を起こしていた (Fig. 3-8)。

Fig. 3-9 中で を繋いだカーブは、*S. cerevisiae* W-3 を YM 培地中、25 で培養したときの生育状態を示している。このカーブのいくつかの時点で酵母細胞を集菌し、滅菌水中に懸濁した。濁度が一定になるように菌懸濁液を YM 液体培地に加え、ソルビン酸カリウム、50%エタノール抽出物(粗抗菌性物質画分)および Sephadex G-200 クロマトグラフィーで部分精製した抗菌性物質画分(F1-1 画分)を添加後、生菌数の変化を観察した。ソルビン酸カリウム (500 $\mu\text{g/mL}$ 添加) 粗抗菌性物質画分 (15 $\mu\text{g/mL}$ 添加) 部分精製抗菌性物質画分 (15 $\mu\text{g/mL}$ 添加) のいずれの場合でも、対数増殖期の酵母に対して最も抗菌活性が高く、定常期の酵母に対しては、抗菌性は弱い、あるいは全く抗菌性を示さなかった。一般に定常期の酵母は対数増殖期の酵母に比べて細胞壁が厚いことが知られており (Werner-Washburne *et al.*, 1993) パプリカ抗菌性物質やソルビン酸の抗菌効果は酵母細胞壁の厚さの影響も受けていると考えられた。 Fig. 3-10a に示したように、*S. cerevisiae* W-3 に対するソルビン酸カリウムの MIC は、pH 4 で 52 $\mu\text{g/mL}$ であるが pH 7 では 5,100 $\mu\text{g/mL}$ であった。

よく知られているようにソルビン酸は典型的な酸型抗菌剤として作用していることは明

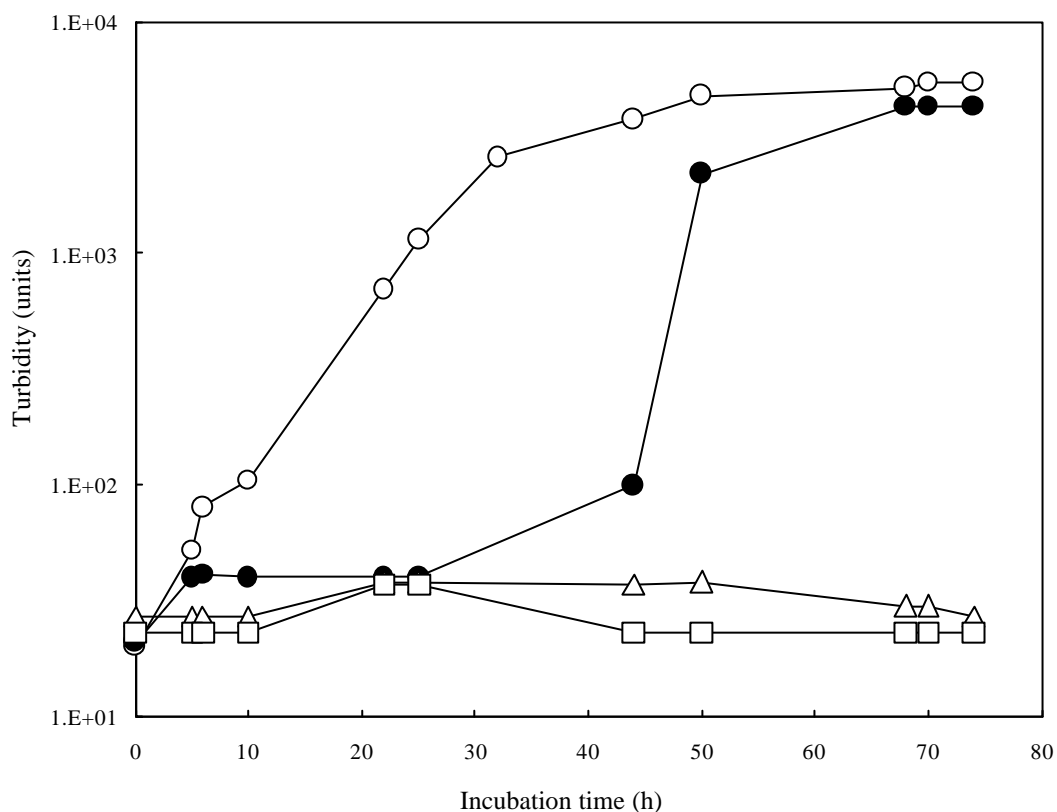


Fig . 3-6. Effect of a partially purified antimicrobial substance from paprika seeds on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* W-3.

The turbidity of the culture was measured as an indication of the growth of W-3 in YM medium containing various concentrations of the partially purified antimicrobial substance (, 0 $\mu\text{g/mL}$; , 7.8 $\mu\text{g/mL}$; , 15.6 $\mu\text{g/mL}$; , 31.2 $\mu\text{g/mL}$). One unit of turbidity is defined as that caused by 1 $\mu\text{g/mL}$ of kaolin powder.

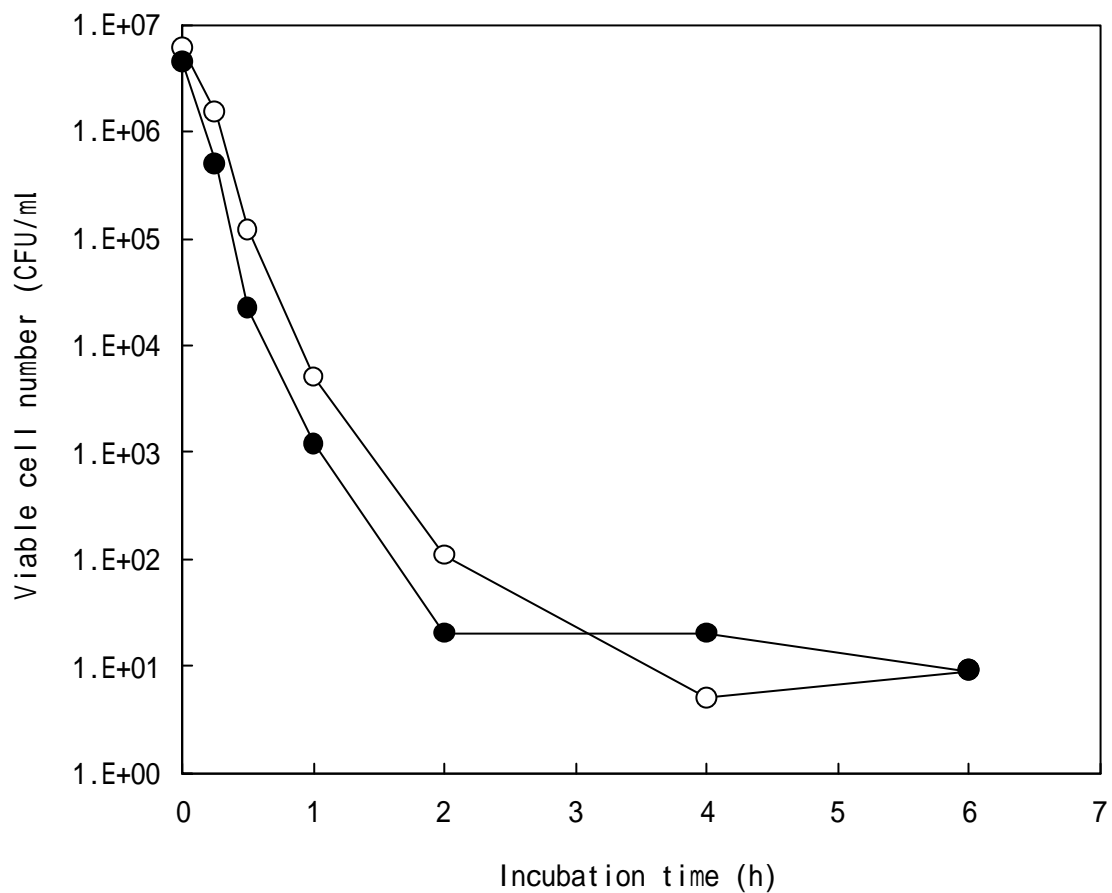


Fig. 3-7. Changes in viable yeast cell number in the presence of the partially purified antimicrobial substance (F1-1) from paprika seeds.

The viable cell number was measured in the presence of the substance (, 100 μ g/mL; , 400 μ g/mL).

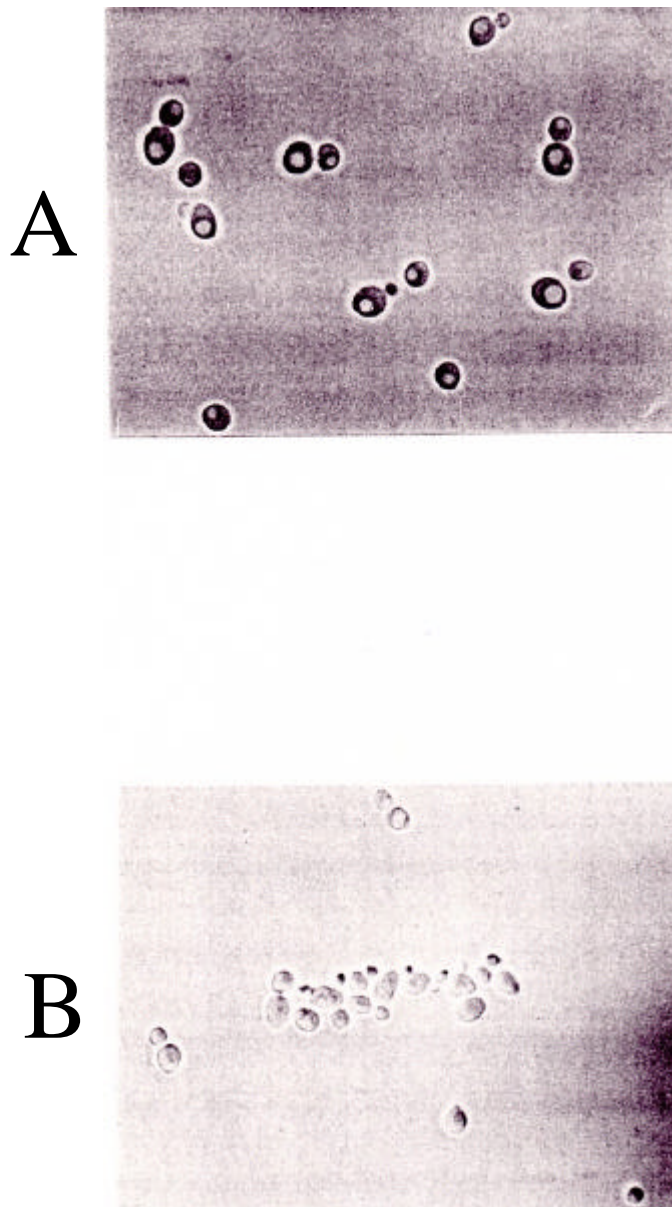


Fig. 3-8. Change in cell form in the presence of an antimicrobial substance from paprika seeds.

Cells incubated in a culture containing an antimicrobial substance (F1-1) $400 \mu\text{g/mL}$) for 2 hours were observed under a microscope (B). A is the control.

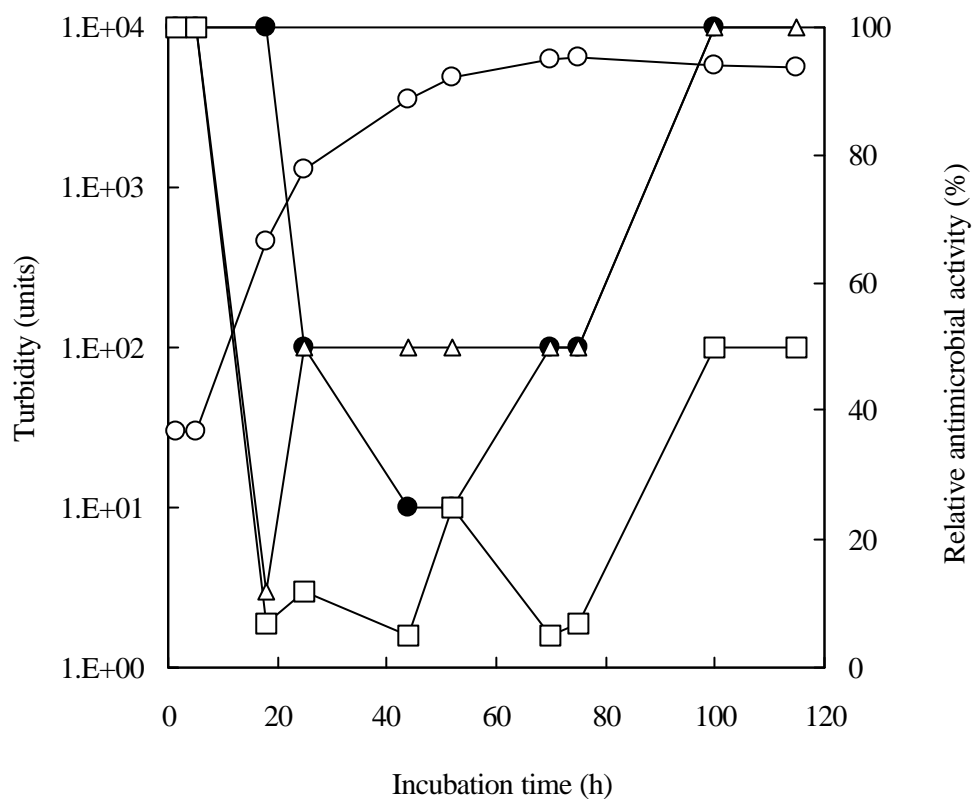


Fig. 3-9. Antimicrobial activity of potassium sorbate (, 0.5 μ g/mL) and the crude (50% ethanol extract) (, 15 μ g/mL) and partially purified (F1-1) (, 15 μ g/mL) antimicrobial substances from paprika seeds on *Saccharomyces cerevisiae* W-3 harvested at various times during growth ().

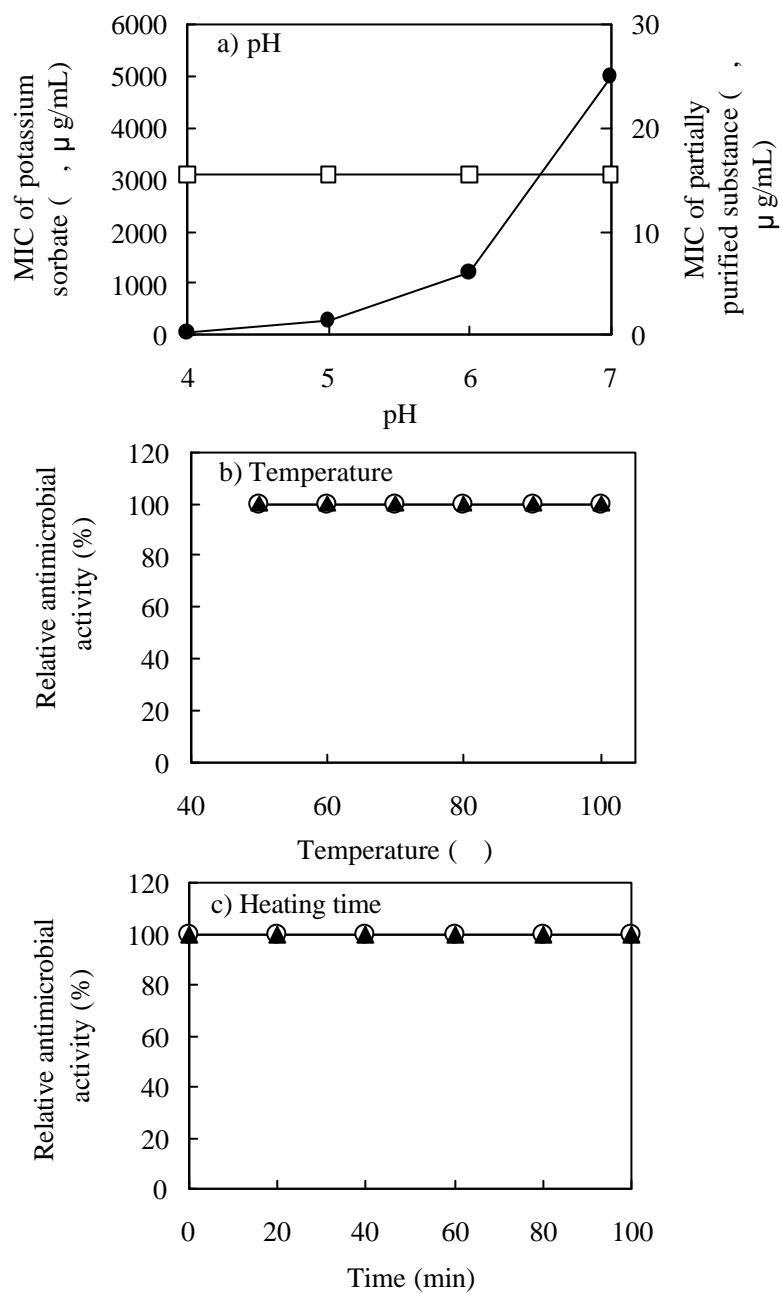


Fig. 3-10. Effects of pH (a), temperature (b), and heating time (C) on the antimicrobial activity of potassium sorbate () and crude (240 $\mu\text{g/mL}$,) and partially purified (80 $\mu\text{g/mL}$, ,) substances from paprika seeds towards *Saccharomyces cerevisiae* W-3.

らかである。一方、パプリカ種子由来の部分精製抗菌性物質の抗菌活性は、pH 4~7 の範囲で全く変化せず、その MIC は 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、pH の影響を受けない抗菌性物質という特徴を有していた。

前項で構造決定された抗菌性物質・化合物 4 の構造式から容易に想像されるが、本物質は熱に対して極めて安定である。Fig. 3-10b は、部分精製抗菌性物質を 40~100 で 20 分間保温後その抗菌性を測定した結果である。加熱によって抗菌活性の変化は全く認められなかった。また、100 で 100 分間まで加熱しても抗菌活性は変化しなかった (Fig. 3-10c)。

抗菌性物質の作用機構は次の 3 グループにほぼ分けられる：(1) 細胞膜との反応、(2) 必須酵素の不活性化、(3) 遺伝物質の破壊あるいは機能の不活性化である。本論文で見出されたサポニンのような脂溶性あるいは界面活性をもつ抗菌性物質の多くは、細胞壁や細胞膜に作用して壁や膜の透過性に障害を起こすことが知られている。そこで、酵母細胞壁あるいは細胞質成分 (酵母タンパク質) と本抗菌性物質との相互作用について検討することによって、本物質の作用機構を追求した。

Table 3-2 に示したように、パプリカ種子から得た 50%エタノール抽出物は酵母に対して特異的な抗菌活性をもつが、すべての酵母菌種に対して一様に抗菌性を示すのではなく、酵母の種類によってその抗菌力は非常に異なっていた。酵母菌株、*S. cerevisiae* W-3、*S. cerevisiae* W-203、*S. cerevisiae* W-205、*S. cerevisiae* W-207、*S. cerevisiae* W-212、*S. cerevisiae* W213 E 株、*S. cerevisiae* W-217 F 株、*S. cerevisiae* W-220、*S. cerevisiae* A 株 RIFY 3012、*Candida krusei* B 株 RIFY Ytd3 の 10 株に対するパプリカ種子抗菌性物質 (50%エタノール抽出物を ODS オープンカラムに吸着させ、60%エタノールで溶出した画分、*S. cerevisiae* W-3 に対する MIC は 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の抗菌活性を試験した結果、*Candida krusei* RIFY Ytd3 の MIC は 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であるのに対して、その他の酵母の MIC は、*S. cerevisiae* W-3 に対する MIC と同じく、数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

このように、ここで分離した抗菌性物質は、ワイン関連酵母の中で、ワイン発酵酵母である *S. cerevisiae* W-3 に高い抗菌活性を持つが、ワインの産膜酵母である *Candida krusei* RIFY Ytd3 には弱い抗菌活性しか持たなかった。この抗菌活性の違いは、二つの酵母種のいずれの性質あるいは構造に基づくのかを次に検討した。

細胞壁は酵母細胞の最も外側にあって細胞膜を囲み、ある種の酵素や静的凝集物質が存在し、物質透過や細胞間の認識反応に重要な働きを果たしている (棚橋博史, 1994)。細胞壁は骨格物質と間質物質からなり、前者は主としてグルカンやキチンであり、後者は主としてマンナン - タンパク質複合体である。別の言い方をすれば、酵母細胞の外側から順にマンノプロテイン、グルカン、細胞膜が層をなして存在し、発芽痕にはキチンが見られる

(棚橋博史, 1994)。細胞壁の組成は菌種により、また同一種でも生育条件によって変化するが、(1) 脂溶性あるいは界面活性をもつ多くの抗菌性物質は、細胞壁や細胞膜に作用して壁や膜の透過性に障害を起こし(柳田友道: 1985) また(2) 抗菌性物質と酵母細胞との相互作用は、細胞表面への抗菌性物質との結合により始まるので、本研究では、2つの酵母の細胞壁組成の相違が抗菌性に及ぼす影響を調べた。

Fig. 3-11 は、パプリカ種子抗菌性物質に強い感受性を示す *S. cerevisiae* と弱い感受性(耐性)をもつ *C. krusei* のザイモリアーゼによる溶解性の違いを実験した結果である。酵素処理により二つの酵母細胞は溶解し、浸透圧の低い溶液中では菌のバーストが起こり、時間の経過に伴って徐々に濁度の低下が見られた。*S. cerevisiae* の濁度の低下は *C. krusei* のそれよりも大きく、ザイモリアーゼによる細胞壁の溶解速度が異なることが分かった。

2種の酵母に対する抗菌性やザイモリアーゼの溶解性の相違は、これらの酵母細胞壁の構造の差異による可能性が大きいので、細胞壁を分離し、得られた細胞壁を酵素で作用させ、その酵素感受性の差異を検討した。細胞壁の調製には、沸騰湯浴中での加熱、細胞壁溶解酵素による溶解、超音波処理による破壊の3つの方法を試みた。処理後の酵母細胞を顕微鏡で観察したところ、超音波処理した酵母懸濁液が最も均一に細かく破碎されているように見えた。2種の酵母から3つの方法で調製した細胞壁に終濃度 0~50 µg/mL となるようにザイモリアーゼを加えて、濁度変化を測定した(Fig. 3-12)。加熱によって調製した細胞壁を用いたとき、最大約 10%しか濁度の減少はなく、また酵母種の相違による差異もなかった(Fig. 3-12a)。これに対して、超音波処理と溶解酵素処理によって調製した細胞壁を用いたとき、添加した溶解酵素量の増加に伴って、濁度の減少が増した(Fig. 3-12 b, c)。用いた酵素量の範囲で、濁度は約 40~60%減少し、さらに二つの酵母の濁度変化の差異が明確にあり、*S. cerevisiae* の細胞壁のほうが *C. krusei* の細胞壁よりも濁度の減少が大きかった。これらより、溶解酵素活性に対する構造上の差異が両酵母の細胞壁に存在することが明らかとなった。

両酵母の濁度の減少の差の存在を確認するため、超音波処理によって調製した細胞壁を用い、終濃度 50 µg/mL となるようにザイモリアーゼを添加して反応を行った結果、反応時間の経過とともに徐々に濁度が減少したが、反応開始後 60 分で、*C. krusei* 細胞壁の減少率が 37%であるのに対して、*S. cerevisiae* のそれは 73%に達し、両酵母の細胞壁の構造上の差異が明確となった(Fig. 3-13)。

3つの方法(沸騰湯浴中で加熱、ザイモリアーゼ処理、超音波処理)によって調製した酵母細胞壁を種々の濃度に添加して、*S. cerevisiae* W-3 に対するパプリカ種子抗菌性物質

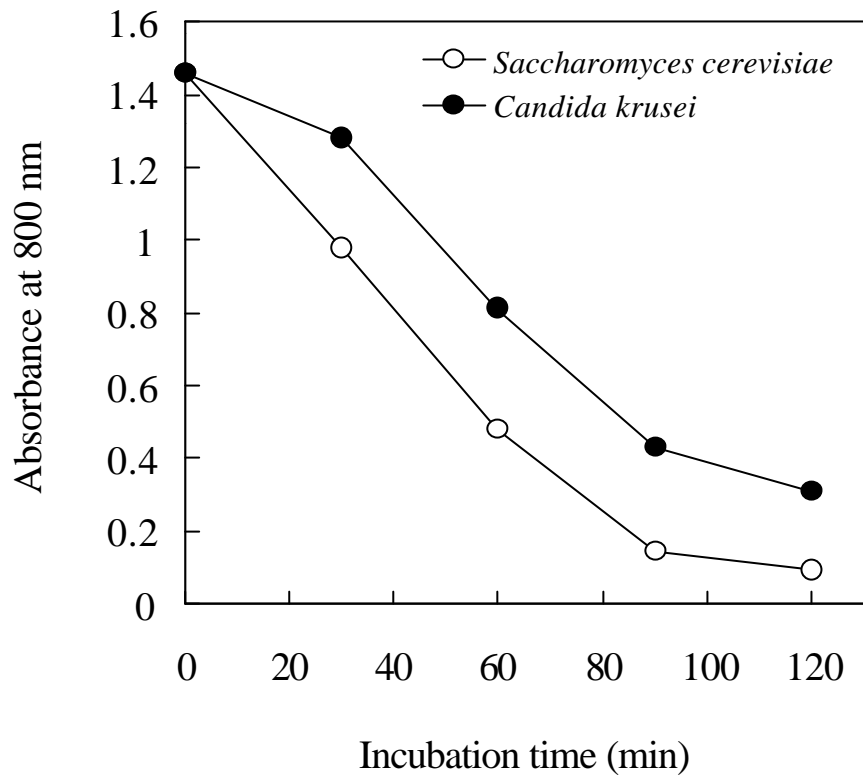


Fig. 3-11. Changes in turbidity (absorbance at 800 nm) during lysing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* cells with Zymolyase.

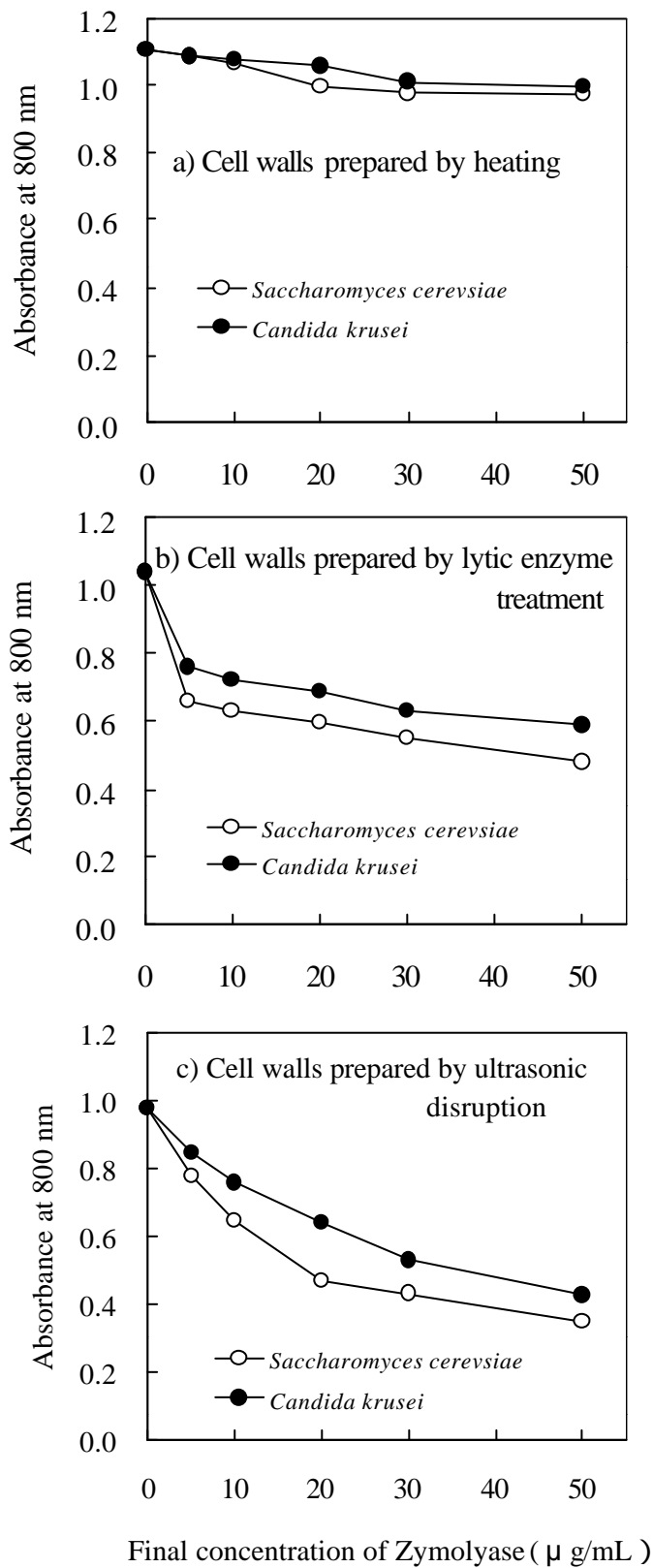


Fig. 3-12. Changes in turbidity (absorbance at 800 nm) of a suspension containing cell walls from *Saccharomyces cerevisiae* or *Candida krusei* by Zymolyase treatment.

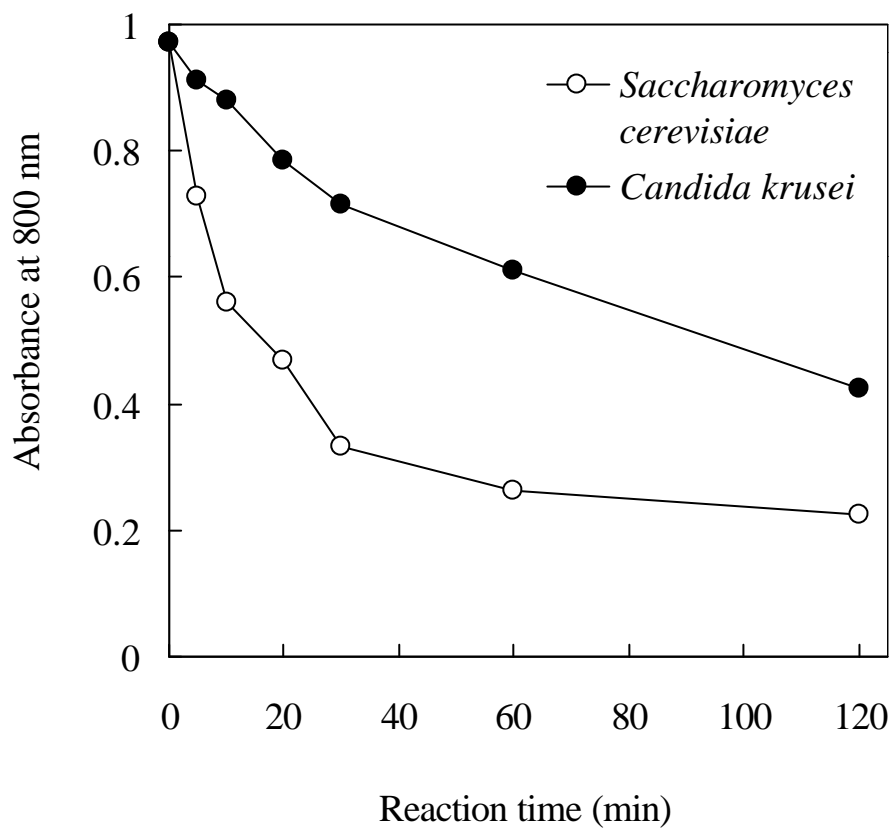


Fig. 3-13. Zymolyase treatment of yeast cell walls prepared by ultrasonic disruption.

の抗菌性に及ぼす細胞壁の影響を検討したが、明確な差異は認められなかった（データは示していない）。

酵母をザイモリアーゼで処理後、2種の界面活性剤（SDSとTriton X-100）を用いて酵母細胞質タンパク質の分離を行なった。二つの酵母ともに、SDSを用いたときよりもTriton X-100を用いたときのほうがタンパク質の回収率はよかった（Table 3-10）。いずれの界面活性剤を用いても得られたタンパク質量は*S. cerevisiae* W-3のほうが*C. krusei*よりも多かった。パプリカ種子抗菌性物質の抗菌活性に対する牛血清アルブミン（BSA）および酵母細胞壁タンパク質の影響を調べた。Fig. 3-14に示したように、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSAを添加したとき、抗菌活性は低下しなかったが、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加したときにはかなり低下した。両酵母の細胞壁タンパク質ともに、それらの添加によって抗菌活性は低下した。これらのことは、タンパク質は抗菌性物質に結合し、抗菌活性を抑制する働きがあり、その抑制作用はBSAよりも酵母細胞質タンパク質のほうが強く、また濃度依存性であることが分かった。

前述のように、酵母細胞壁の最外層はマンノプロテインであり、次にグルカン、そして細胞膜が層をなしている。酵母細胞をザイモリアーゼで溶菌するとき、マンナン、グルカン、タンパク質の遊離溶解が起こっているはずである。*S. cerevisiae*と*C. krusei*ではザイモリアーゼによる溶解速度が明らかに異なるので（Fig. 3-11）細胞壁から遊離したタンパク質や中性糖量に差異が存在すると思われる。Fig. 3-15は、自己消化あるいは超音波処理で調製した酵母細胞壁をザイモリアーゼで分解中に遊離したタンパク質量と中性糖量の経時的变化を示したものである。遊離した中性糖量とタンパク質量は全反応液（6 mL）中のそれぞれの濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で示してある。遊離した中性糖量のほうがタンパク質量よりも多く、また超音波処理で調製した細胞壁を用いたときのタンパク質量が両酵母で差異がないことを除いて、遊離したタンパク質と中性糖は*S. cerevisiae*細胞壁のほうが*C. krusei*細胞壁よりも多かった。超音波処理と自己消化によって得た細胞壁との間で、遊離したタンパク質量と糖量は異なり、特に超音波処理で得られた細胞壁では遊離した中性糖量が非常に多く、酵素反応開始後120分経過したときでさえ、中性糖量の増加は続いた。すなわち、超音波処理で得た細胞壁はザイモリアーゼの攻撃を受けやすい構造にまで破壊され、一方自己消化により得た細胞壁はかなりインタクトな構造を残しているのではないかと推定できた。これらの結果を総合的に考えると、（1）ザイモリアーゼによる細胞壁の（800 nmの吸光度で追跡した）分解時における濁度の経時的低下と、（2）遊離したタンパク質および中性糖量の経時的増加、および（3）抗菌性物質に対する酵母の感受性（抗菌性物質存在下における生菌数の減少）が、相互に関連していると考えられた。つまり、

Table 3-10. Isolation of proteins from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* using SDS or Triton X-100.

	Protein yield (mg)/125 mL culture
SDS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W-3	11.9
<i>Candida krusei</i> RIFY Ytd3	2.8
Triton X-100	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W-3	68.5
<i>Candida krusei</i> RIFY Ytd3	36.7

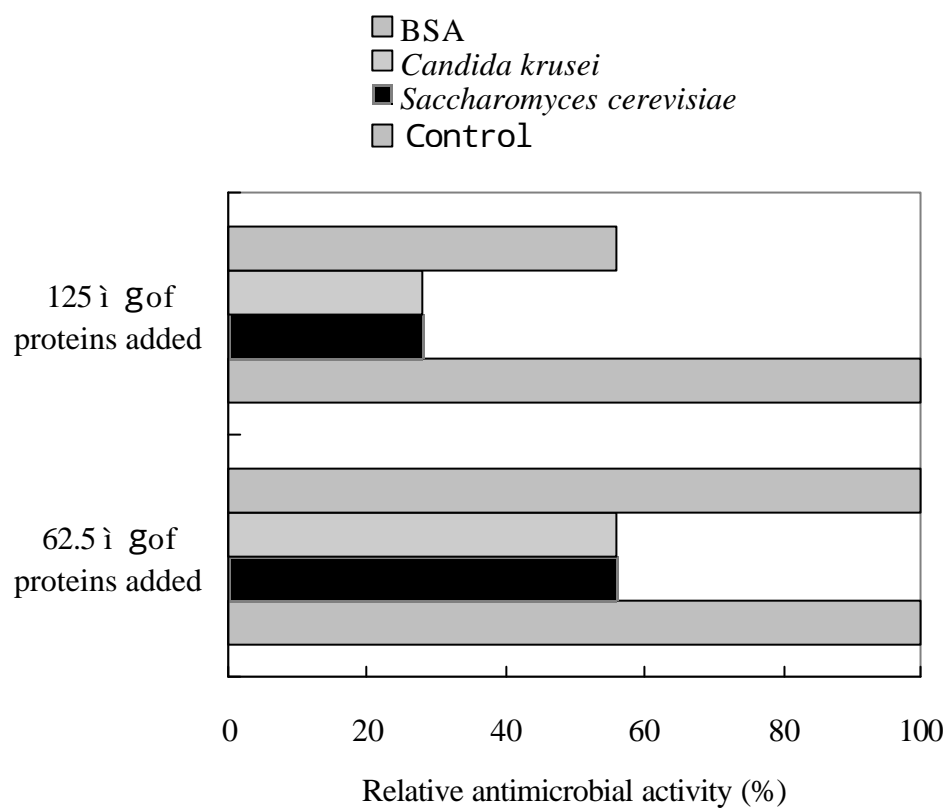


Fig. 3-14. Effects of bovine serum albumin and proteins from yeast cell walls on antimicrobial activity of the partially purified antimicrobial substance from paprika seeds.

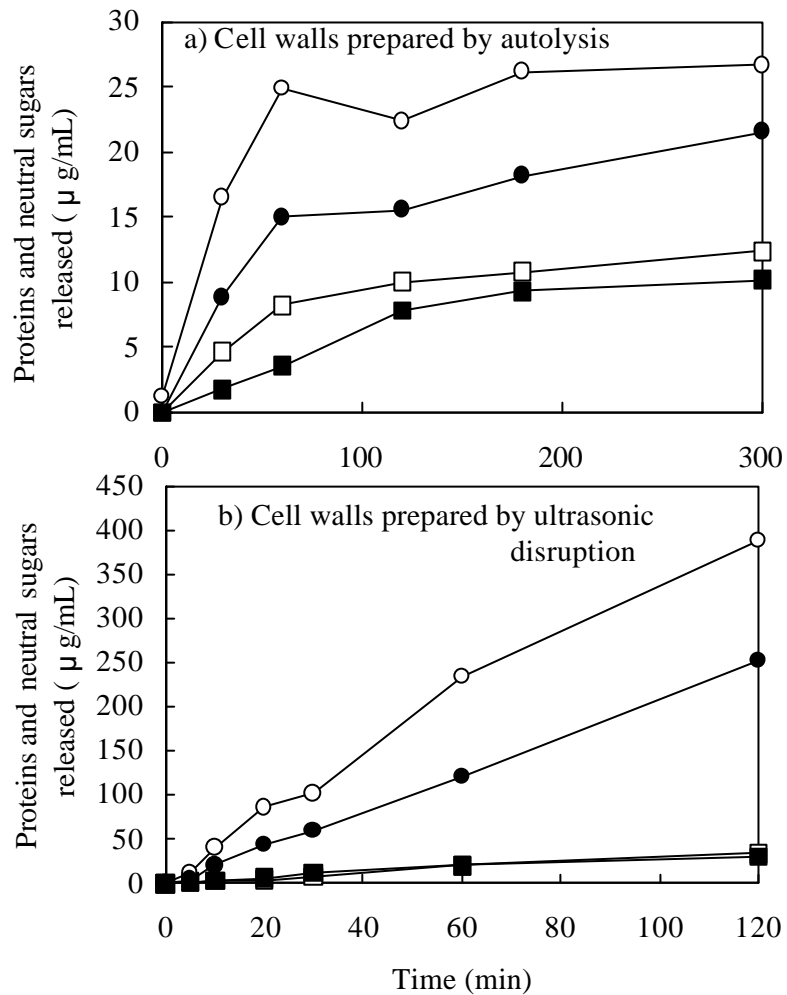


Fig. 3-15. Amounts of neutral sugars and proteins released from yeast cell walls by Zymolyase treatment.

Symbols: \circ , *Saccharomyces cerevisiae* (proteins); \bullet , *Candida krusei* (proteins); \square , *Saccharomyces cerevisiae* (neutral sugars); \blacksquare , *Candida krusei* (neutral sugars).

S. cerevisiae と *C. krusei* のパブリカ種子抗菌性物質に対する感受性は、それぞれの細胞壁の構造、すなわち細胞壁の透過性と関連している可能性があった。ザイモリアーゼ感受性の高い *S. cerevisiae* W-3 の細胞壁中のマンノプロテインの密度が低く、抗菌性物質の透過性は高く、一方ザイモリアーゼ感受性の低い *C. krusei* のマンノプロテインは密に結合していて、抗菌性物質の透過性が低く、その結果抗菌性物質に対する感受性が低くなっていると推定された。

ザイモリアーゼには、Z- α -1,3-グルカナーゼと Z-プロテアーゼ活性が存在し、前者は 2-メルカプトエタノールの存在下で酵母細胞を溶解するが、後者は、その高濃度の存在でさえ酵母細胞を溶解せず、またプロテアーゼで前処理後 α -1,3-グルカナーゼで処理すると効果的な酵母細胞の溶解が起こることが報告 (Kitamura, 1982; Zlotnik *et al.*, 1984) されているので、Z-ザイモリアーゼから Z- α -1,3-グルカナーゼとプロテアーゼを分別しそれぞれの酵素で二つの酵母の細胞壁マンノプロテイン層を分解後に、抗菌性物質に対する感受性の変化を検討した。

Fig. 3-16 は、ザイモリアーゼを Sephacryl S-100 HR で分別したときのクロマトグラムである。Z-プロテアーゼは試験管番号 35 本目から 55 本目に溶出されたが、次の実験には活性が最も多量に含まれる 47 および 48 本目の試験管中のプロテアーゼを用いた。この画分の α -1,3-グルカナーゼ活性/プロテアーゼ活性の比は 0.13 であり、大部分の活性は Z-プロテアーゼであった。一方、Z-グルカナーゼ活性は試験管番号 40 本目付近から 73 本目付近に存在した。

Z-プロテアーゼ処理後の酵母への抗菌性物質の添加効果を Fig. 3-17 に示した。Zlotnik ら (Zlotnik *et al.*, 1984) によれば、酵母生細胞のグルカナーゼによる溶解には、Z-プロテアーゼによる前処理が必要である。すなわち、最外層のマンノプロテイン層をプロテアーゼで破壊すると、Z-グルカナーゼはグルカン層に到達でき、グルカンを分解して細胞の溶解が起こると報告している。この実験では Z-プロテアーゼによって生細胞を処理しても 800 nm で測定した濁度に全く変化はなかったが、これに抗菌性物質を加えると、二つの酵母生細胞ともに顕著な濁度の減少が認められた。ここでザイモリアーゼから分離して用いた Z-プロテアーゼには約 10% のグルカナーゼ活性があったが、120 分間の反応では細胞の溶解は起こらず、この実験の目的に用いるためには Z-プロテアーゼの精製度は十分であることが分かった。プロテアーゼ処理した生細胞では、マンノプロテイン層の分解は起こっても、内層のグルカン層の分解は生ぜず、従って細胞壁の分解、細胞のバースト、溶解は起こらず、濁度の低下は見られなかった。Z-プロテアーゼ処理をしない生細胞に抗菌性物質を添加したときには、細胞の死滅は起こっているが、強固な細胞壁が存在するために細胞

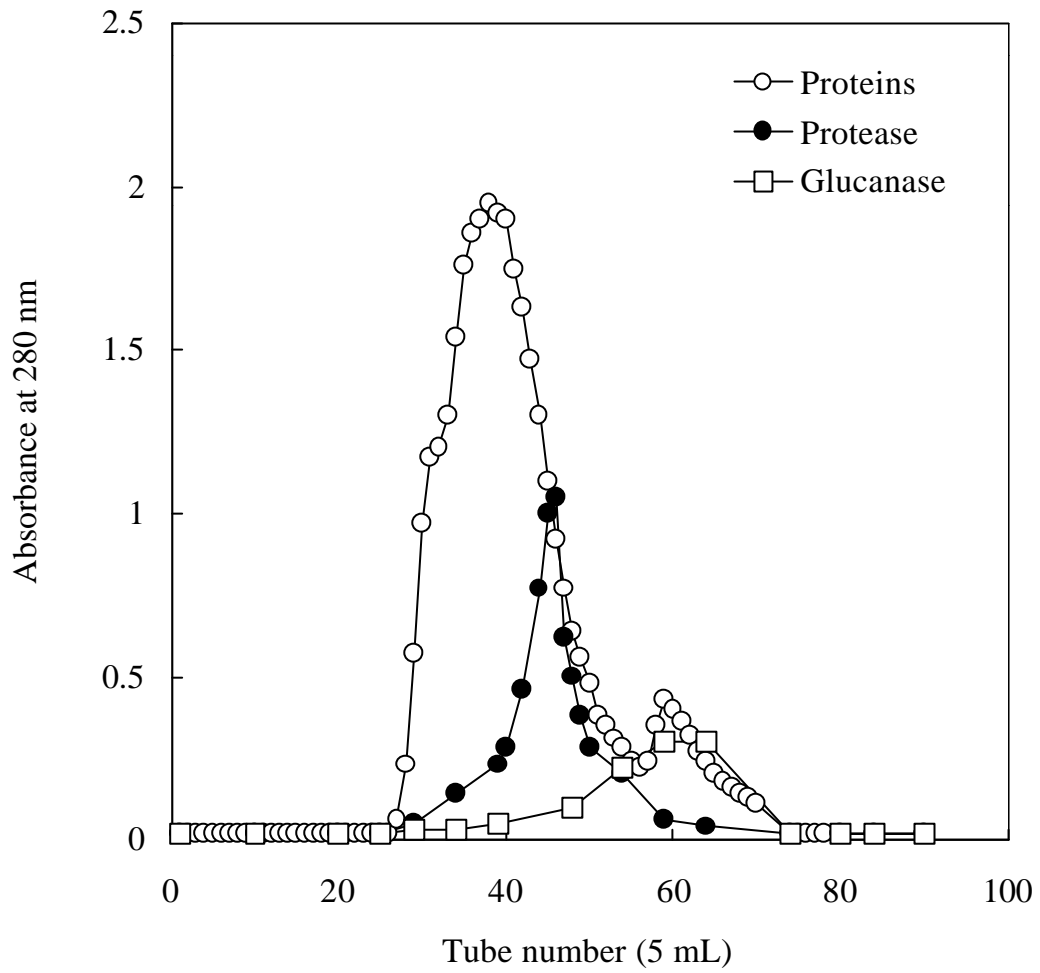


Fig. 3-16. Chromatography of Zymolyase on Sephacryl S-100 HR.

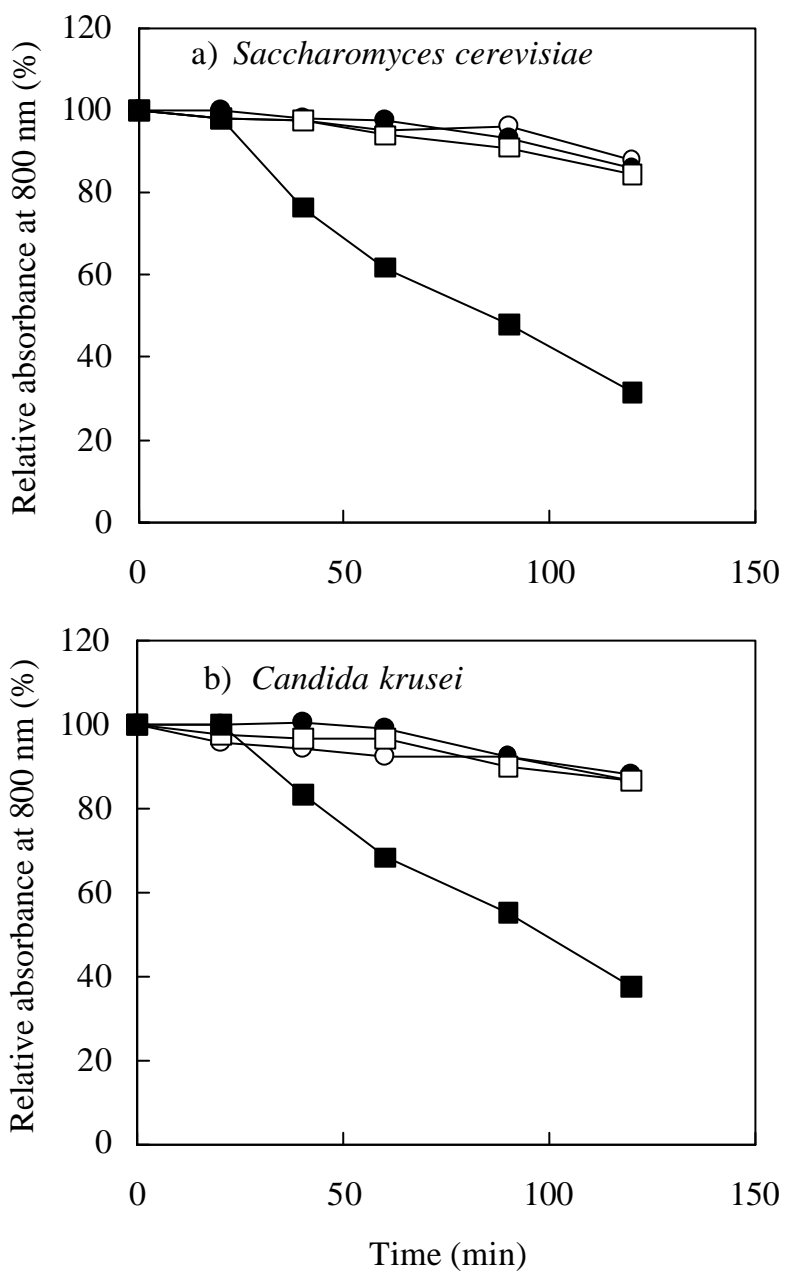


Fig. 3-17. Effect of addition of paprika antimicrobial substance on lysis of Z-protease-treated yeast cells.

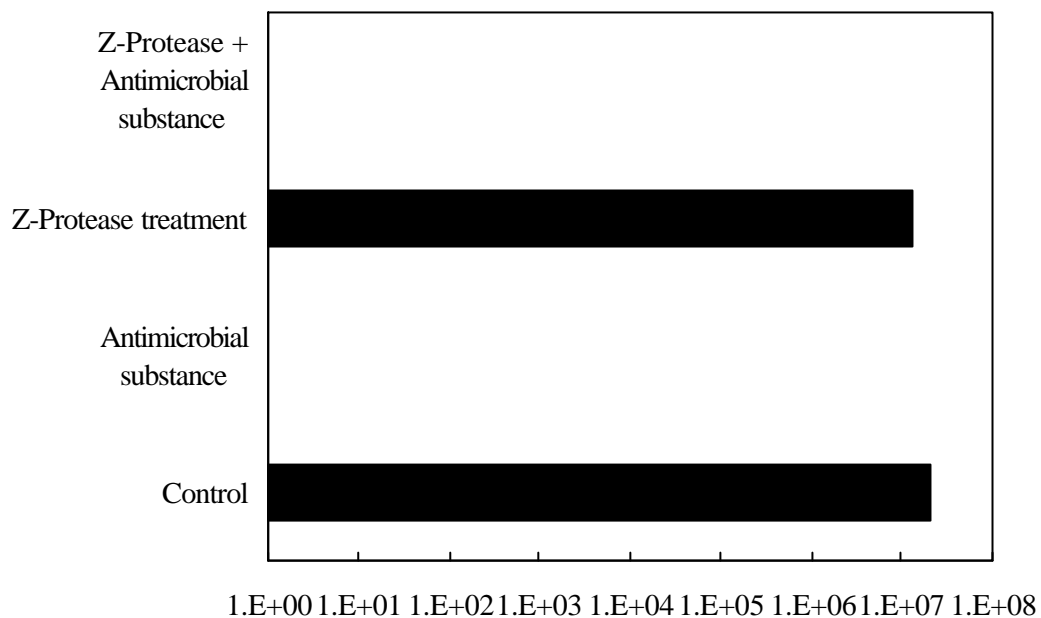
Symbols: □, control; ○, antimicrobial substance; ■, Z-protease; △, Z-protease + antimicrobial substance.

のバーストはすぐに起こらず、濁度の低下も見られなかったと考えられる。これらに対して、Z-プロテアーゼ処理した細胞に抗菌性物質を作用させたとき、菌体の死滅とともに両酵母の顕著な濁度の低下が見られた。これはマンノプロテイン層が破壊され、細胞壁の透過性が著しく変化し、抗菌性物質は菌体内部に入り込み、細胞質成分と反応して菌体のバーストが起こった可能性があった。

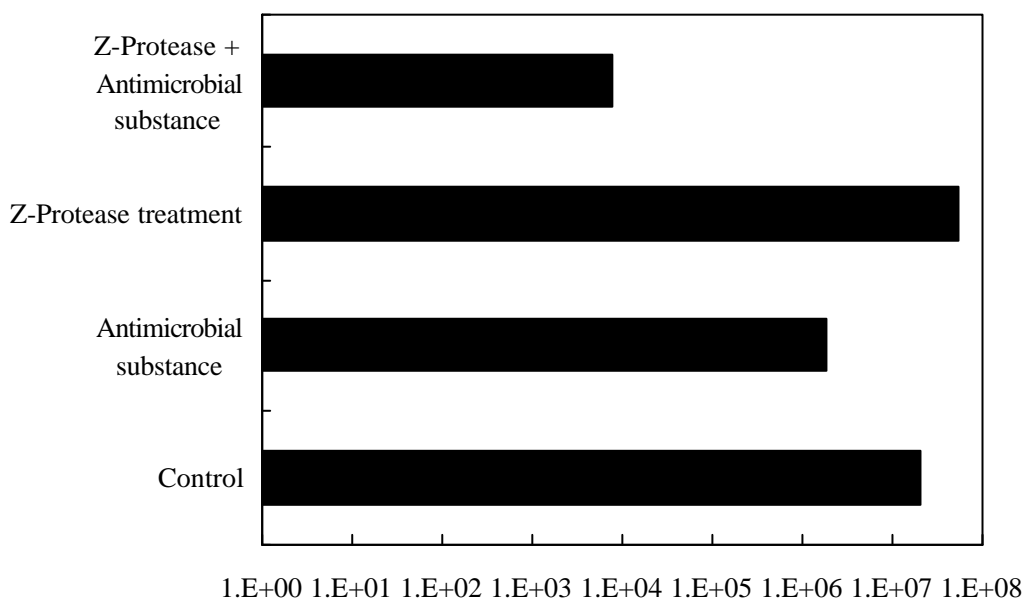
菌体懸濁液の濁度低下が菌体の死滅を表していることを確認するために、Z-プロテアーゼ処理を行った酵母菌体に抗菌性物質を添加（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）後の生菌数を測定した結果を Fig. 3-18 に示した。抗菌性物質に高い感受性を示す *S. cerevisiae* W-3 は、Z-プロテアーゼで処理しても未処理の場合でも、抗菌性物質添加によって生細胞は認められなかった。一方、弱い感受性を示す *C. krusei* RIFY Ytd3 (MIC, > 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の場合、抗菌性物質を添加（生菌数、 10^6 cfu/mL）しただけでは、コントロール（約 10^7 cfu/mL）に比べて生菌数の減少はわずかであるのに対して、Z-プロテアーゼ処理後に抗菌性物質を添加（ 10^4 cfu/mL）すると生菌数の顕著な減少が認められた。この結果より濁度が減少した懸濁液中では、菌体の死滅が起きていることが確認できた。すなわち、細胞壁の透過性に影響する表層のマンノプロテイン層がZ-プロテアーゼにより分解され、細胞壁の抗菌性物質透過性が増したのではないかと推論した。

Fig. 3-18 で、マンノプロテイン層のタンパク質部分をZ-プロテアーゼで分解すると抗菌性物質が酵母細胞内部へ入り込むことができ、細胞が溶解することを推定した。これが真実ならば、このタンパク質部分が抗菌性物質と作用し、抗菌力を不活性化している可能性がある。しかし、本研究で、細胞壁から界面活性剤を用いて抽出分離した際に得られたタンパク質の収量が著しく低かったので、細胞壁タンパク質の代わりに牛血清アルブミン（BSA）を加えて、抗菌性物質の抗菌活性に及ぼすタンパク質の影響を検討した。Fig. 3-19 がその結果である。*S. cerevisiae* を用いたとき、抗菌性物質を加えると約1時間後には明確な濁度の減少が見られたが、BSAの添加によって減少が著しく抑制された。BSAの添加効果を確認するため、種々の濃度のBSAの存在下で*S. cerevisiae* W-3に対する抗菌活性を調べた。その結果、BSAが存在しないときのMICが8mg/Lなのに対して、BSAが1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在すればMICは11.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、BSAの濃度が上がるに従ってMICは上昇した（Fig. 3-20）。すなわち、添加したタンパク質は、抗菌性物質に結合して抗菌性を弱めたものと考えられた。このことは、酵母細胞壁タンパク質はどのタンパク質もN末端とC末端の両方に疎水性の領域を持っている（下飯、飯村、2002）ので本パブリカ抗菌性物質（サポニン）は、その疎水基が容易に酵母細胞壁のマンノプロテインに吸着することが考えられ、この吸着が酵母細胞壁の膜透過性を変え抗酵母作用発現につながっている可能性が示

a) *Saccharomyces cerevisiae*



b) *Candida krusei*



Number of viable yeast cells (cfu/mL)

Fig. 3-18. Effect of Z-protease treatment on inhibitory activity of 50%-ethanol extract from paprika seeds against the growth of *Saccharomyces cerevisiae* W-3 and *Candida krusei* RIFY YTd3.

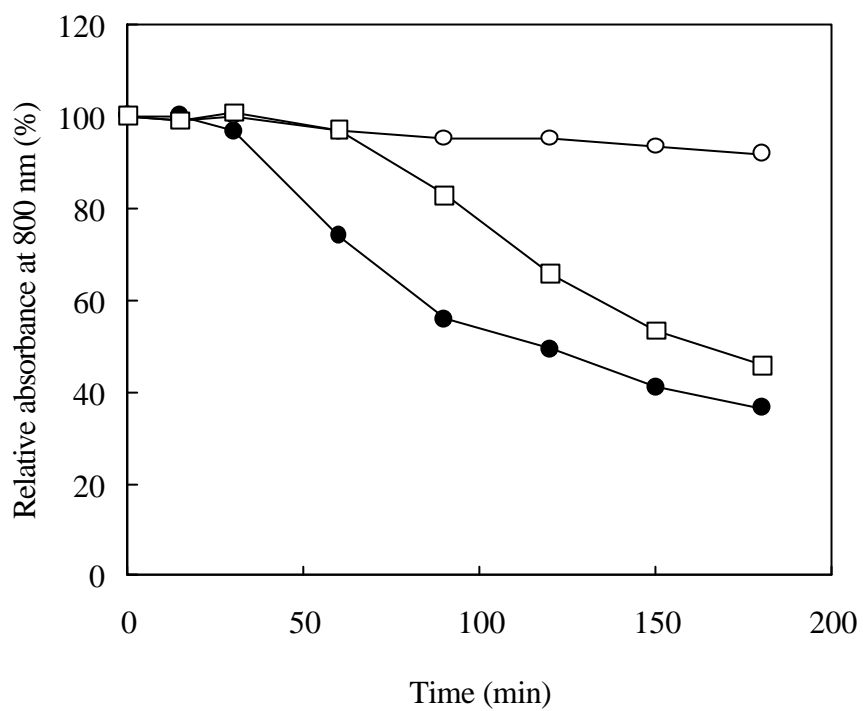


Fig. 3-19. Effect of bovine serum albumin on activity of antimicrobial substance from paprika seeds towards *Saccharomyces cerevisiae* W-3 cells treated with Z-protease.

Symbols: □, control; ○, + antimicrobial substance; ●, + antimicrobial substance + bovine serum albumin.

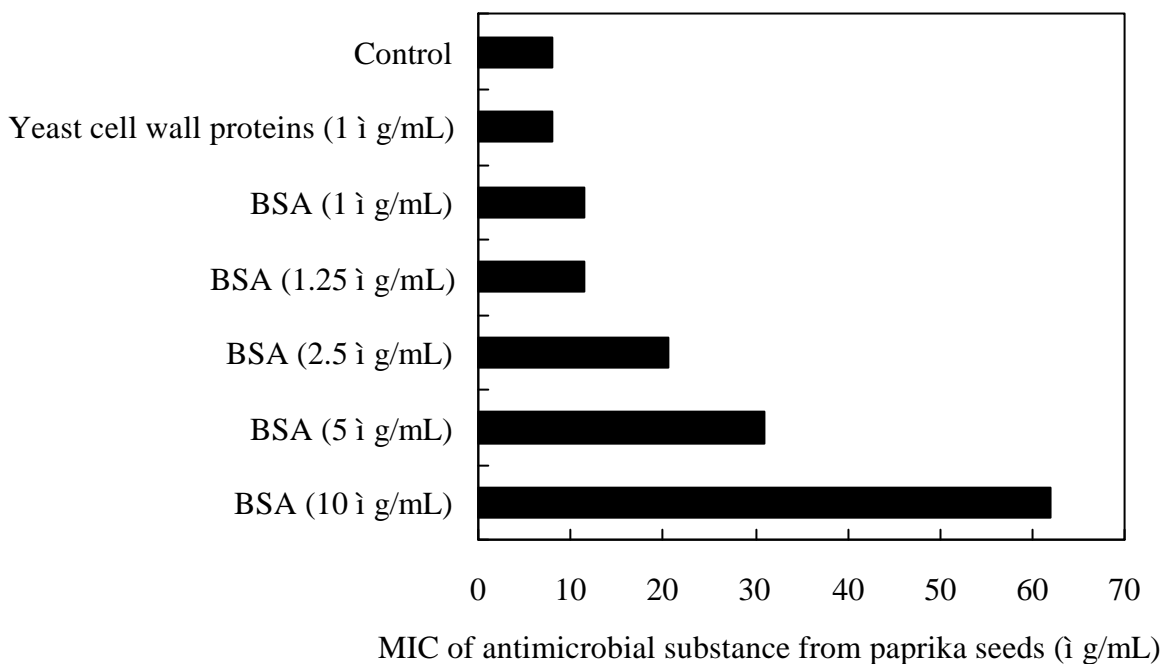


Fig. 3-20. Minimum inhibitory concentration of antimicrobial substance from paprika seeds against *Saccharomyces cerevisiae* W-3.

唆された。

3-4 要 約

1. パプリカ種子の 50%エタノール抽出物は、酵母に対して強い抗菌性を示したが、カビやバクテリアには効果がなかった。酵母に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は酵母種によって異なるが、大部分の酵母に対する 50%エタノール抽出物の MIC は約 60 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2. パプリカ種子-エタノール抽出物を Sephadex G-50 クロマトグラフィーで分別すると抗菌性を示す画分は V_0 に、その画分をさらに Sephadex G-200 クロマトグラフィーで分別すると、 V_0 と V_1 の間に抗菌活性が溶出した。後者で得られた抗菌性画分の MIC は約 16 $\mu\text{g/mL}$ であった。

3. パプリカ種子-50%エタノール抽出物を逆相 ODS オープンカラムに吸着させ、60%エタノールで溶出すると高い抗菌活性をもつ画分が得られた。この画分をさらに逆相 ($\mu\text{Bondasphere C}_{18}$) HPLC で分離精製し、10 個の抗菌性を示すピークを得、薄層クロマトグラフィーで純度を検定した結果、いずれも一成分と認められた。これらの MIC は 0.3~5.2 $\mu\text{g/mL}$ であった。すなわち、パプリカ種子中の酵母に対する抗菌性物質は 10 種類存在することがわかった。そのなかで最も大きなピーク 4 は、 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1 3)-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1 2)]\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1 4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl}\}\text{-}2\alpha\text{-hydroxyl-(25R)-}5\alpha\text{-spirostane}$ の構造と決定された。

本物質は、サポニン的一种で、ギトゲニン配糖体であり、酵母の生育を特異的に阻害することがはじめて見出された。

4. パプリカ種子抗菌性物質に感受性を示す *S. cerevisiae* W-3 と比較的耐性の *C. krusei* RIFY YTd3 を用いて、抗菌性物質の作用機作を検討した。抗菌性物質を添加した培地中の *S. cerevisiae* を光学顕微鏡で観察したところ、細胞は萎縮し、凝集を起こしていた。定常期よりも対数増殖期の酵母細胞のほうが抗菌性物質に対して感受性があった。本物質の抗菌性は、pH の影響を受けず、熱に安定であった。

5. 両酵母をザイモリアーゼで処理した結果、*S. cerevisiae* のほうがより溶解し、細胞のバーストがより多く見られた。ザイモリアーゼ処理後に細胞壁から遊離したタンパク質量と多糖量は、*S. cerevisiae* のほうが *C. krusei* よりも多かった。ザイモリアーゼ処理細胞を用いて、細胞壁タンパク質と牛血清アルブミンが本抗菌性物質の抗菌活性に与える影響を調べた結果、タンパク質は抗菌性物質に結合し、抗菌力を減殺していると考えられた。

このことは本抗菌性物質が酵母細胞壁のタンパク質に吸着し、細胞壁の膜透過性を変えている可能性が示唆された。

6. ザイモリアーゼから -1,3-グルカナーゼとプロテアーゼを分離し、それぞれを二つの酵母細胞に作用させた結果、プロテアーゼ処理しても両酵母細胞は溶解しないが、プロテアーゼ処理後に抗菌性物質を添加すると細胞の溶解が速まり、感受性菌の低い *C. krusei* でも速やかな菌体死滅と細胞溶解が起こった。すなわち、酵母細胞壁のマノプロテイン層がプロテアーゼで分解され、細胞壁の透過性が増し、菌の死滅が起こったと考えられた。

第四章 パプリカ種子からの新規抗菌性物質の 食品製造への応用

4-1 序

今までに多種多様の抗菌性物質が色々な動植物から分離されてきた。天然物から分離された抗菌性物質のなかには、人類が長く消費してきた食品のなかにすでに存在しているという理由で、毒性実験の必要もない、安全な食品添加物として認められたものもあった。しかし、近年の食品添加物に対する安全性の認識の高まり、安全性評価法の改善、微量に存在する毒性物質の検知能力の向上および法的規制により、新抗菌性物質の開発や使用は著しく制限されるようになった。ある食品添加物は使用を禁止され、またあるものには使用制限がつき、新しい食品添加物が認められるチャンスは減少しつつある。加工食品に使う食品添加物はなるべく少なくしようと考えるのは当然の事であり、それゆえ、食品添加物を使わないで食品を製造しようと様々な試みもなされてきたが、近代の量産型の食品製造と広域流通のなかで保存料など食品添加物の使用なくして存在し得ない加工食品が沢山あるのも事実である。結局、安全性に対するリスクと食品の品質の劣化あるいは食中毒を起こすリスクとのバランスの上で食品添加物の使用が決められている。

新しい保存料（抗菌性物質）の開発を困難にしているもう一つの理由は、実験室レベルでは非常に高い抗菌性を示しても、実際に商品として流通させる食品に添加したとき、著しく抗菌力が低下したり、あるいは全く抗菌性を失うことである。最も頻繁に起こる例は、食品中の微生物のタイプとレベルによって抗菌力が変動すること、食品の物理的性質（pHなど）に起因する抗菌性の変化と食品成分と抗菌性物質との反応による抗菌性物質の分解あるいは吸着などによる抗菌力の低下である。これらの問題は全ての食品に対して一様に解決できるわけではなく、一つ一つの食品について種々の条件下で抗菌性物質の使用が有効か否かをテストするしかない。特に、新規に開発した抗菌性物質は、多くの食品に実際に添加し、実用性を確認するしか方法がないのが現状である。

以上の観点から、本章では、4-2 パプリカ抗菌性物質によるワインと梅漬けの産膜酵母による腐敗の防止、および4-3 パプリカ抗菌性物質と他の食品添加物との併用効果、に分け実際の食品の系で実用性を検討した。

4-2 パプリカ種子抽出物を用いたワインと梅漬けの産膜酵母による腐敗の防止

4-2-1 序

ワインの製造や貯蔵プロセスでは産膜酵母が表面に繁殖し、ワインの品質劣化を招くことが知られている。

産膜酵母は、エタノールを酸化してアセトアルデヒドに変え、またいくつかのワイン成分を他の有機酸に変える。この酵母が生えると、酸とアルコールが減少するのでワインはフラットで水っぽくなり、生育した酵母のために濁る。酵母は、カビ、乳酸菌、酢酸菌より亜硫酸に対する耐性はずっと高いので、酵母を完全に殺菌するには、ワインの pH を低くし、これに（遊離で）30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の亜硫酸を添加したり、無菌濾過や加熱濾過して瓶詰めされている。一方わが国のような高温多湿の気候風土の下で栽培されたブドウは微生物汚染されている可能性が極めて高く、特に発酵後、ワインに添加した亜硫酸は貯蔵期間が長くなるとともに消費され（結合型亜硫酸となる）、その結果、遊離亜硫酸が存在しなくなった後に産膜酵母による汚染の可能性が高く、ワインに添加後にも長期間効力が変化しない新規添加物の開発が望まれていた。

梅漬けはもともと保存性の高い加工食品であったが、近年国民の健康指向から低塩化が進み、製造行程中における、また商品になってからの産膜酵母の発生が問題になっている。産膜酵母が増殖すると外観を損ない不快臭をともなって商品価値を無くしてしまう。それゆえ、産膜酵母に対して強い抗菌力をもつ天然添加物が求められていた。

これらのことから、ワイン並びに梅漬けの産膜酵母による汚染と腐敗を防止するためにワインから分離した産膜酵母、および梅漬けの製造段階で分離した産膜酵母に対してパプリカ抗菌性物質の有効性を検討した。

4-2-2 材料および実験方法

4-2-2-1 パプリカ種子からの抗菌性物質の調製

第3章で述べた方法に従って、パプリカ種子(50 g)を電動コーヒーミル(タイプ D3V-B; 都物産、大阪)を用いて粉末にした。この粉末を 40 の水 100 mL と混合し、40 で4時間攪拌した。この懸濁液に 70%エタノール 250 mL を添加し、40 で2時間攪拌後、吸引ろ過した。次に濾液を 85 、30 分間加熱攪拌した後、ロータリーエバポレーター(40)で約 100 mL まで減圧濃縮し、凍結乾燥した。得られた抗菌性物質の *S. cerevisiae* W-3 に対する MIC は 84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

4-2-2-2 赤ワインおよび梅酢の製造

供試した赤ワインは、1990年に山梨大学ワイン科学研究センター附属育種試験地で収穫したマスカット・ベリーAブドウを用いて、同センターワイン試験工場で常法により製造したものである。赤ワインのpHは3.46、滴定酸度は0.65%（酒石酸換算）、アルコール量は13.2%（v/v）、還元糖量は0.19%（グルコース換算）、全フェノール量は664 µg/mL（没食子酸換算）、遊離亜硫酸量は4 µg/mLであった。

梅酢は次のように製造した。1995年産の加工適熟期にあるウメ果実（甲州小梅；Japanese Apricot, Koshu koume, *Prunus mume* Sieb. et Zucc. var. *microcarpa* Makino）100 kgを水洗後、食塩（並塩）20 kgを添加し、重石をして2週間室温に放置して出来た梅酢35 L（食塩濃度17.4%、総酸4.3%、pH1.94）を水で4倍に希釈し、この液を培地（梅酢培地）として用いた。

4-2-2-3 供試産膜酵母

(a) ワイン産膜酵母

山梨県内のワイン製造工場の産膜酵母で汚染されたワインから分離した7菌株、*S. cerevisiae* (301、302、303、305、306、306、307) *Candida* sp. (304)を使用した。対照の標準菌株として山梨大学ワイン科学研究センターに保存中の*S. cerevisiae* (RIFY 3012、シェリー酵母 SJ75)、*C. krusei* (RIFY Ytd3、ワイン産膜酵母)、*C. vini* (RIFY 2024、ワイン産膜酵母)を用いた。

(b) 梅漬け産膜酵母

山梨県工業技術センターにおいて、山梨県内の梅漬け製造工場から分離・同定した6菌株（*Kloeckera apiculata* YITC 203、YITC 256；*Pichia anomala* YITC 201、YITC 256；*Debaryomyces hansei* YITC 214；*Candida guilliermondii* 222）を用いた。（恩田ら、1997a, b）

4-2-2-4 抗菌性試験

(a) ワイン産膜酵母

YM液体培地で前培養（25℃で振盪培養）した酵母菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、加熱殺菌（65℃、15分）した2倍希釈ワイン5 Lに 10^5 cfu/mLとなるように接種した。これを20℃、10日間静置培養し、生育および産膜形成状態を経時的に肉眼によって観察した。なお、生育の認められない最少濃度を最小発育阻止濃度（MIC）とした。また、パブリカ抽出物およびその他の添加物（エタノール、ピロ亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム）の抗菌力試験には、各試料を所定濃度になるように添加した2倍希釈赤ワインを加熱殺菌し

たものを用いた。しかし、亜硫酸およびエタノールを添加物として試験する場合には、それらが揮発性であることから、赤ワインを加熱殺菌後に無菌的に添加した。エタノール濃度の調整は、ロータリーエバポレーターを用いた減圧濃縮によってエタノールを除去した赤ワインに、3～15%となるようにエタノールを添加して行った。pHは、塩酸あるいは水酸化ナトリウムを用い、2.75～4.50に調整した。

(b) 梅漬け産膜酵母

梅酢培地(4-2-2-2 参照) 5 mL を試験管(17.5 mm × 130 mm) に分注し、抗菌性試験に供する物質を添加後、65℃、15 分間加熱殺菌し、食塩を5%含有するYM液体培地(pH 6.0) で25℃、2日間振盪培養した産膜酵母の前培養液 50 μL(菌体濃度はThomaの血球計による計測で10⁷ cfu/mLにした)を接種した。これを25℃、10日間静置し、産膜の形成状態を観察した。なお、前述のように、抗菌性物質の中で、亜硫酸、酢酸およびエタノールは揮発性であることから梅酢培地を加熱殺菌した後に添加した。

4-2-2-5 パプリカ種子抽出物の梅酢培地における経時的抗菌活性の変化

梅酢培地にパプリカ種子抽出物を50 μg/mLとなるように添加し、65℃、15分間加熱殺菌後、25℃に冷却した直後および1日、2日、4日、7日、10日間放置した後に *Pichia anomala* 256 の前培養液を50 μL(菌体濃度10⁷ cfu/mL)接種し、25℃で静置培養した。培地の濁度を660nmの吸光度を測定することにより各経過日数ごとに接種した菌の増殖曲線を作成し、誘導期の長さを比較することにより経時的な抗菌活性の変化を調べた。

4-2-3 結果及び考察

4-2-3-1 分離した産膜酵母に対する亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩、酢酸およびパプリカ種子抽出物の抗菌性

ワインの製造・貯蔵中の酸化や腐敗を防止するために、効果的かつ日常的に最も行われていることは、亜硫酸やソルビン酸の添加である。そこで、分離したワイン産膜酵母10菌株に対する亜硫酸およびソルビン酸の最小発育阻止濃度(MIC)を調べ、結果をTable 4-1に示した。ソルビン酸は分離菌株 *Candida* sp. 304 に対して抗菌効果が最も高く、MICは50 μg/mLであったが、他の菌株に対するMICは200～300 μg/mLで効果が弱かった。ワインより分離した産膜酵母 *S. cerevisiae* 菌株に対するSO₂のMICは100 μg/mLであり、また *C. krusei* Ytd3 に対する亜硫酸のMICは25 μg/mLであるのに対して、*C. vini* 2024 に対するMICは300 μg/mLと抗菌力が弱かった。このように、一般にワインより分離した

Table 4-1. Minimum inhibitory concentrations of paprika seed extract, sorbic acid, sulfur dioxide, thiamine dilauryl sulfate, and acetic acid towards film-forming yeasts isolated from wines and *ume-zuke*.

Strain	Minimum inhibitory concentration ^{a)}				
	Paprika seed extract	Sorbic acid	Sulfur dioxide	Thiamine dilauryl sulfate	Acetic acid
Wine					
(μ g/mL wine diluted two-fold with water)					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 301	100	200	100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 302	100	300	100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 303	100	300	100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 305	100	300	100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 306	100	300	100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 307	100	300	100		
<i>Candida</i> sp. 304	100	50	100		
Standard yeast strain					
(μ g/mL wine diluted two-fold with water)					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 3012	100	200	100		
<i>Candida krusei</i> RIFY Ytd3	300	200	25		
<i>Candida vini</i> RIFY 2024	50	300	300		
Ume-zuke					
(μ g/mL <i>ume</i> -vinegar medium)					
<i>Kloeckera apiculata</i> YITC 203	50	100	3.1	50	3000
<i>Pichia anomala</i> YITC 201	100	50	6.3	50	3000
<i>Pichia anomala</i> YITC 256	100	100	3.1	50	3000
<i>Candida guilliermondii</i> YITC 222	100	25	12.5	50	3000
<i>Debaryomyces hansenii</i> YITC 214	100	100	6.3	10	3000

^{a)} Dilution method.

T4-1 産膜酵母に対して亜硫酸の高い抗菌活性が認められたが、ソルビン酸のそれはかなり低かった。

第3章で、50%エタノール抽出と ODS カラムクロマトグラフィーで分離精製したパプリカ種子抽出物の *S. cerevisiae* W-3 に対する MIC は数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることを示した。しかし、このような分離精製法で得られた小さな MIC をもつ抗菌性物質は、実用上必要ではなく、またその収量が低く、かつ精製コストが非常に高いので、本実験ではパプリカ種子より 50%エタノール抽出で得られた抽出物の凍結乾燥物（パプリカ種子抽出物）を用いた。収量は種子 1 kg から 97 g であり、その *S. cerevisiae* W-3 に対する MIC は 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。分離したワイン産膜酵母 10 菌株に対するパプリカ種子抽出物の抗菌効果は、酵母菌株によってかなり異なり、標準菌株の *C. krusei* Ytd3 に対する抗菌効果が最も低く、MIC は 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった（Table 4-1）。しかし、産膜汚染を引き起こした 7 つの分離菌株に対する MIC はいずれも 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、顕著な添加効果が認められた。このように、ワインより分離した産膜酵母に対してパプリカ種子抽出物および亜硫酸の抗菌活性が明確に認められたが、ソルビン酸のそれはパプリカ種子抽出物よりもずっと弱かった。以上のパプリカ種子抽出物、ソルビン酸および亜硫酸の生育抑制効果をもとに、供試したワイン関連の産膜酵母菌株を次の 4 タイプに大別できた：（1）パプリカ種子抽出物に対してのみ高感受性の菌株（*C. vini* 2024）、（2）亜硫酸に対してのみ高感受性の菌株（*C. krusei* Ytd3）、（3）ソルビン酸に対して弱い感受性を示すとともに、またパプリカ抽出物および亜硫酸に高い感受性を示す菌株（*S. cerevisiae* 3012）、（4）パプリカ抽出物および亜硫酸に対して弱い感受性を示す菌株（*S. cerevisiae* 全 7 菌株）。

上でワイン培地として用いた赤ワインは pH が 3.46 と低いので、一般微生物が繁殖し難い食品であるが、梅酢の pH はさらに低く 1.94 である。本研究では、これを水で 4 倍に希釈した液を培地（梅酢培地）として使用した。ワイン由来の産膜酵母に対する抗菌性物質として二酸化イオウ、ソルビン酸、パプリカ種子抽出物を用いたが、梅酢培地では、これらに加えて梅加工品に保存剤として広く使用されているチアミンラウリル硫酸塩と酢酸を用いた。

甲州小梅に食塩を添加し、重石をした直後と塩蔵後 1 週間～6 週間の間に得られた梅酢から 4 種、13 菌株の産膜酵母が得られた。産膜は塩添加後 3 週間目から肉眼で観察され、6 週間後に約 0.5 cm の厚さになった。梅漬製造中に発生する主な産膜酵母は、*Kloeckera apiculata*、*Pichia anomala*、*Candida guilliermondii*、および *Debaryomyces hansenii* であった（恩田ら，1997a, b）。*Kloeckera* は小梅にもともと付着しているのでこの酵母がまず出現するが、高濃度の食塩や pH に対する耐性が低く、やがて *Pichia anomala*、

Candida guilliermondii、さらに *Debaryomyces hansenii* が主要な産膜酵母となった。3 ヶ月後には、ほとんど *Debaryomyces hansenii* だけが見られた。そこで、希釈した梅酢中で上記の 4 酵母を生育させ、これに各種の抗菌性物質を加えて、その生育効果を観察した。Table 4-1 に示したように、パプリカ種子抽出物とその他の 4 種の添加物の産膜酵母に対する抗菌性試験の結果、パプリカ種子抽出物は、塩蔵中の異なった時点で分離された産膜酵母のうちの 4 種、5 菌株に対して抗菌性が認められ、*Kloeckera apiculata* 203 の生育は 50 $\mu\text{g/mL}$ で阻止され、その他の 3 酵母の生育は 100 $\mu\text{g/mL}$ で阻止された。二酸化イオウ、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩、および酢酸は、それぞれ 3.1~12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、25~100 $\mu\text{g/mL}$ 、10~50 $\mu\text{g/mL}$ 、3000~7000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で産膜酵母の生育を阻止した。二酸化イオウとチアミンラウリル硫酸塩の MIC は、パプリカ種子抽出物の MIC よりも低い、ソルビン酸のそれは 5 酵母中の 2 つと同じであり、その他の 2 菌株より高かった。

4-2-3-2 ワイン産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物、亜硫酸、およびソルビン酸の抗菌性に及ぼす pH およびエタノールの影響

供試した 5 種の酵母菌株に対するパプリカ種子抽出物、ソルビン酸および亜硫酸の抗菌効果に及ぼす pH の影響を検討した (Fig. 4-1)。菌株によりそれらの影響は一様でなかったが、ソルビン酸および亜硫酸は、低い pH ほど両者の MIC は低下し、抗菌効果は強くなる傾向が認められた。これに対して、パプリカ種子抽出物が 100 あるいは 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に添加されたとき、pH によって *C. krusei* に対する抗菌活性が若干変化したが、その他の菌株については pH 変化によるパプリカ種子抽出物の抗菌活性に変化はなかった。第 3 章で述べた本抗菌性物質の構造から明らかなように、この物質は酸型の抗菌性物質ではなく、pH の変化による抗菌性物質自体の化学的あるいは物理的な構造変化による抗菌効果の変動はないものと結論した。一方、ソルビン酸および亜硫酸などの酸型保存料の抗菌力は、細胞膜の透過性を有する非解離型分子の濃度に依存することが報告されている (Amerine and Ough, 1974)。すなわち、pH が低いほど両者の非解離型分子の割合は増加するために抗菌力が強まることが知られている。この実験でも産膜酵母に対して pH が低いほどソルビン酸や亜硫酸の抗菌性が強くなる傾向が認められ、従来の知見と一致した。

ワインのエタノール濃度は、低アルコールワインといわれる 8~10% エタノールを含むものから約 18% エタノールを含むポートワインやシェリーまで様々である。エタノールに抗菌性があることはよく知られ、エタノールの存在下におけるパプリカ種子抽出物の抗菌性に興味もたれた。そこで、ワイン発酵用酵母や産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物、ソルビン酸および亜硫酸の抗菌効果に及ぼすエタノール濃度の影響を検討した (Fig. 4-2)。

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 305	4.50																			
	4.00																			
	3.50																			
	3.00																			
	2.75																			
<i>Candida</i> sp. 304	4.50																			
	4.00																			
	3.50																			
	3.00																			
	2.75																			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 3012	4.50																			
	4.00																			
	3.50																			
	3.00																			
	2.75																			
<i>Candida krusei</i> RIFY YTd3	4.50																			
	4.00																			
	3.50																			
	3.00																			
	2.75																			
<i>Candida vini</i> RIFY 2024	4.50																			
	4.00																			
	3.50																			
	3.00																			
	2.75																			
Strain	pH	0	25	50	100	200	0	25	50	100	200	0	25	50	100	200				
		Paprika seed extract (μ g/mL)						Sorbate (μ g/mL)					Sulfur dioxide (μ g/mL)							

Fig. 4-1. Effect of pH on the inhibitory effects of paprika seed extract, sorbate, and sulfur dioxide.

Symbols indicate the degree of film-formation as follows: \square , no growth; \square , slight growth on test tube wall; \square , moderate growth on test tube wall and wine surface; \square , abundant or very abundant growth on test tube wall and wine surface.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 305	15	■					■					■				
	12	■					■					■				
	9	■					■					■				
	6	■					■					■				
	3	■					■					■				
<i>Candida</i> sp. 304	15	□					□					□				
	12	■					■					■				
	9	■					■					■				
	6	■					■					■				
	3	■					■					■				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 3012	15	□					□					□				
	12	■					■					■				
	9	■					■					■				
	6	■					■					■				
	3	■					■					■				
<i>Candida krusei</i> RIFY YTd3	15	□					□					□				
	12	■					■					■				
	9	■					■					■				
	6	■					■					■				
	3	■					■					■				
<i>Candida vini</i> RIFY 2024	15	□					□					□				
	12	■					■					■				
	9	■					■					■				
	6	■					■					■				
	3	■					■					■				
Strain	Ethanol (%)	0	25	50	100	200	0	25	50	100	200	0	25	50	100	200
		Paprika seed extract (μg/mL)					Sorbate (μg/mL)					Sulfur dioxide (μg/mL)				

Fig. 4-2. Effect of ethanol concentration on the inhibitory effects of paprika seed extract, sorbate, and sulfur dioxide.

The symbols are the same as in Fig. 4-1.

ソルビン酸および亜硫酸は、エタノール濃度が高くなるほど両者の MIC は低下し、併用効果が認められた。特にエタノール濃度が 9 % 以上ではその傾向が顕著であった。ソルビン酸あるいは亜硫酸とエタノールとの同時添加は、相乗的というよりも相加的效果であると考えられ、またエタノールの添加により亜硫酸あるいはソルビン酸のイオン化が抑制され、エタノール無添加の場合よりも非解離分子がより多く存在したことも一因であると考えられる。これらのことから、ソルビン酸あるいは亜硫酸はワインの pH やエタノールの影響を強く受けることが分かった。これに対して、パプリカ種子抽出物の MIC は、*S. cerevisiae* (RIFY 3012) と *Candida sp.* 304 でわずかに影響が見られた以外は、低いアルコール濃度でも抗菌活性の変化は少なかった。すなわち、パプリカ抽出物とエタノールとの間には、はっきりとした相乗効果は見られなかった。低アルコールワインに対して通常の濃度の亜硫酸やソルビン酸を添加したとき、産膜酵母の生育を阻止することが難しい場合がある。このような場合でも、パプリカ種子抽出物を添加すれば、効果的に産膜酵母の生育を阻止できると考えられる。

また、わが国、特に高温多湿の本州や九州で収穫されるブドウの pH は高く、糖度は低くなる傾向がある。補酸や補糖をしないで、これらのブドウから造ったワインのアルコール含量は低く、pH は高くなることが予想される。このような高 pH、低アルコールワインに対して通常の濃度の亜硫酸やソルビン酸を添加しても産膜酵母の生育を阻止することは難しいが、このようなブドウマストあるいはワインでも、パプリカ種子抽出物を添加すれば、効果的に産膜酵母の生育を阻止できると考えられ、本パプリカ種子由来の抗菌性物質は、亜硫酸やソルビン酸に代わる新しいワイン用保存料となる可能性がある。

4-2-3-3 梅酢の保存中におけるパプリカ種子抽出物および亜硫酸の抗菌力の経時的変化

梅漬け製造には数週間の期間を要することから、梅酢中におけるパプリカ種子抽出物の抗菌力の持続性が問題となる。そこでパプリカ種子抽出物を梅酢培地に添加後 10 日間放置し、その間の産膜酵母 (*P. anomala* YITC 256) に対するパプリカ種子抽出物の抗菌力の変化を調べた。パプリカ種子抽出物の添加にあたっては、酵母の発育を完全には阻止しない添加濃度 (50 $\mu\text{g/mL}$) とした。その結果、パプリカ種子抽出物を添加後、1 ~ 10 日間保存した梅酢培地に植菌し、培養しても、保存日数と酵母の生育度合いとの関連性はなく梅酢中でパプリカ種子抽出物は安定な抗菌活性を示すことが考えられた (Fig. 4-3a)。

これに対して、本実験で用いた物質中、最も抗菌力の強い亜硫酸では、日数を経るに従って酵母の増殖速度が速くなり抗菌力が低下していることが認められた (Fig. 4-3b)。そこで亜硫酸 6.3 $\mu\text{g/mL}$ を添加した梅酢中の遊離亜硫酸量を改良ランキン法で測定したとこ

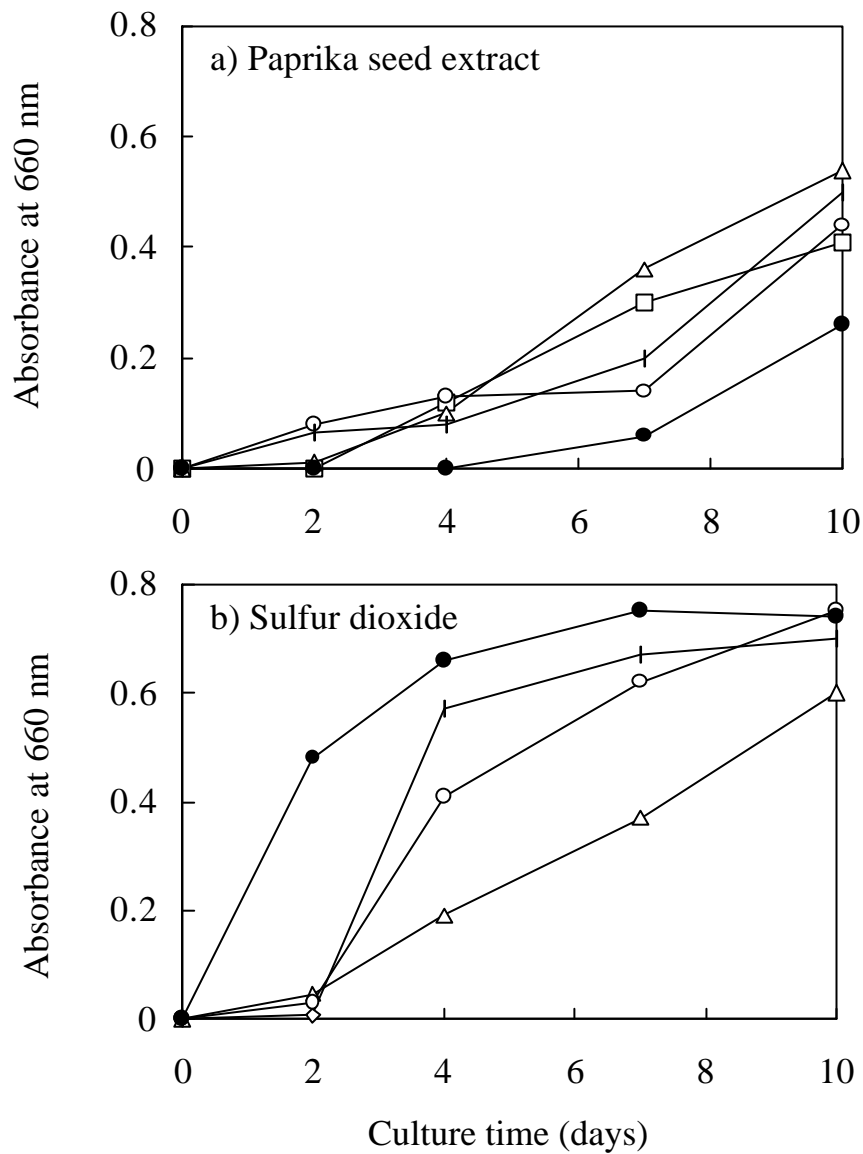


Fig. 4-3. Changes in antimicrobial activity of paprika seed extract and sulfur dioxide against *Pichia anomala* YITC 256 during storage of *ume-zuke*.

After 50%-ethanol extract of paprika seeds (50 μ g/mL) or sulfur dioxide (6.3 μ g/mL) had been allowed to stand in an *ume*-vinegar medium for 1 (), 2 (), 4 (), 7 (), or 10 () days, *Pichia anomala* YITC 256 was inoculated and cultivated. The absorbance at 660 nm was measured to ascertain the growth of the organism.

る、添加直後は 3.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 日後は 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、4 日後には検出されなくなり、遊離亜硫酸の減少が抗菌活性に影響することが認められた。

4-2-3-4 パプリカ種子抽出物の抗菌性に及ぼす初発酵母菌数、温度、pH、および食塩濃度の影響

Fig. 4-4 は、パプリカ種子抽出物の抗菌性に及ぼす *P. anomala* YITC 256 の初発菌数 (a)、温度 (b)、pH (c)、食塩濃度 (d) の影響を示している。*P. anomala* YITC 256 は低 pH の梅酢に最も頻繁に見出される産膜酵母である。この菌株は膜が形成され始めたときに存在し、梅漬けの産膜形成阻止の最も重要な菌株である (恩田ら、1997a, b)。4.4% 食塩を含む梅酢培地 (pH 2.0) 中の酵母の初発菌数を $10^2 \sim 10^6$ cfu/mL とし 25 °C で培養したとき、パプリカ種子抽出物の MIC は 25 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ であった。しかし、初発菌数が 10^7 cfu/mL のときには、抽出物添加濃度が 300 $\mu\text{g/mL}$ のときでさえ菌の生育を阻止できなかった (Fig.4-4a)。初発菌数が 10^5 cfu/mL の梅酢培地は透明な溶液であり、 10^6 cfu/mL の梅酢培地はやや濁っており ($A_{660} =$ 約 0.1)、一方 10^7 cfu/mL の培地は非常に濁っていた。これらの結果は、梅漬けが濁る前にパプリカ種子抽出物を添加すれば、産膜形成を効果的に阻止できることを示している。

P. anomala YITC 256 の初発菌数が 10^5 cfu/mL の梅酢培地を用いて種々の温度 (10 ~ 35 °C の範囲で 5 °C 間隔) で 10 日間培養し、パプリカ種子抽出物の酵母に対する抗菌性を測定した。MIC は培養温度が低いほど顕著に低かった。培養後の菌数は測定しなかったが、培養温度が高いほど菌の増殖が速かった (Fig.4-4b)。

梅酢培地の pH を 1.5 ~ 4.0 に調整し、MIC を測定した結果、pH が低いほどパプリカ種子抽出物の酵母に対する MIC は低かった (Fig.4-4c)。この pH 効果はカルボン酸型抗菌性物質で観察されている効果と同じであった。Pitt は、pH 2.5 ~ 3.0 で 100 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 3.5 で 200 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 4.0 で 300 $\mu\text{g/mL}$ のソルビン酸濃度では依然として産膜酵母 (*P. membranaefaciens*) の生育が見られることを報告している (Pitt, 1974)。Nomoto らは *S. cerevisiae* に対するソルビン酸の MIC は pH 3.8 で 20 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 5.3 で 200 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ であることを報告している (Nomoto *et al.*, 1955)。

山本らは、pH 5.0 において 1% 以上の酢酸は非耐塩生酵母の生育を抑制し、完全に生育を阻止するには 3.5% ~ 4.0% を必要とし、また耐塩性酵母の生育を阻止するには、食塩 18% 培地では 1.3 ~ 1.4%、エタノール 1% を含む食塩 18% 培地では 0.4% 酢酸が必要であることを報告している (山本ら、1984)。対照的に、本研究におけるソルビン酸と酢酸の MIC は彼らの報告よりも小さかった。これは培地組成と pH による差と思われる。同じそれ

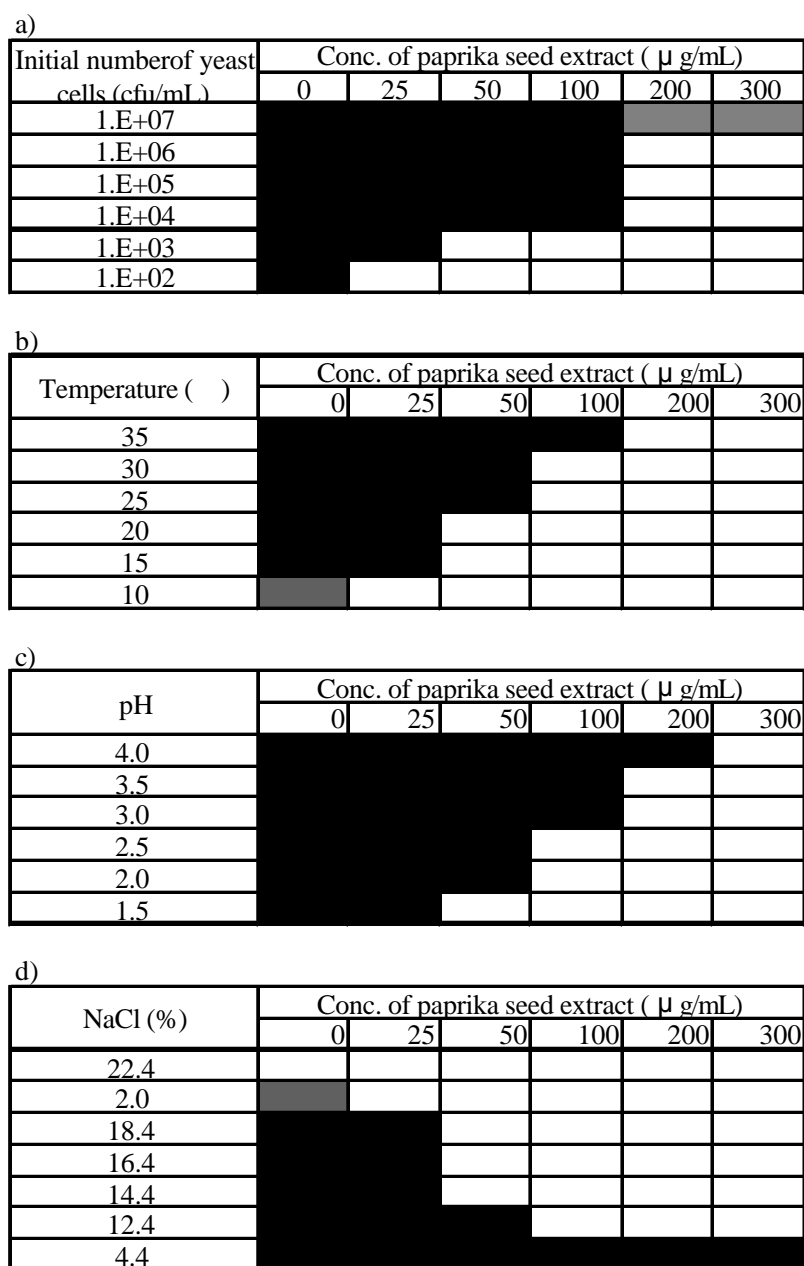


Fig. 4-4. Effects of initial number of *Pichia anomala* YITC 256 cells (a), temperature (b), pH (c), and sodium chloride (d) of the culture medium (*ume*-vinegar) on yeast antimicrobial activity.

The initial number of yeast cells in (b), (c), and (d) was 10^5 cfu/mL. The pH was adjusted using 1 N HCl or 1 N NaOH.

Shading: ■, strong yeast growth; ■ weak yeast growth.

(a) Temperature 25 °C, pH 2.0, NaCl 4.4%. (b) pH 2.0, NaCl 4.4%. (c) Temperature 25°C, NaCl 4.4%. (d) Temperature 25°C, pH 2.0.

同じそれぞれの有機酸濃度で、本研究の梅酢培地における酢酸とソルビン酸の非解離酸濃度は、Pittらや山本らによって報告された培地のそれらよりもずっと大きかった。それは、梅酢培地の pH は Pittらや山本らによって用いられた培地の pH よりも低いからである。ソルビン酸の pKa は 4.75 であり、非解離ソルビン酸の割合は全体の約 98% であるので、3.0 以下の pH ではソルビン酸の抗菌活性はほぼ同じである (Sofos and Busta, 1981)。

本論文で分離したパブリカ種子抗菌性物質は、サポニン的一种であるので、その抗菌性が pH の影響を受けにくいと考えられるにもかかわらず、Fig. 4-4c に示したように、その MIC は培地の pH の低下とともに小さくなった。ゆえによく知られているカルボン酸型抗菌剤の特徴そのものであった。

加藤と芝崎は、*B. subtilis* を試験菌として用い、 C_{12} 化合物の抗菌力に及ぼす pH の影響を検討した結果、ラウリン酸では pH の影響が顕著であったが、モノラウリンや蔗糖モノラウレートでは pH 6、7、8 で同程度の抗菌力を示し、一方 pH 5 では両者ともかなり抗菌力の増大を認めている (加藤、芝崎、1975)。しかし、加藤、芝崎の研究および筆者の研究の両方で、抗菌性物質の抗菌力が pH によって変化したのではなくて、対象とした微生物の生理活性が変化したものと筆者は考えた。いずれにしても、パブリカ種子抗菌性物質の抗菌力と構造との関連は不明確で、今後詳細な研究を行う必要がある。

食塩濃度は *P. anomala* YITC 256 の産膜形成に影響し、事実 22.4% の食塩を含む梅酢培地ではこの酵母は生育しなかった。一般に、食塩濃度が高ければ高いほどパブリカ種子抽出物の MIC は小さくなった (Fig. 4-4d)。

以上の結果、パブリカ種子抽出物は、梅の塩蔵期間中に生育する産膜酵母に対して抗菌性を示し、培地の初発菌数、温度、pH が低いほどその MIC は小さく、また食塩濃度が高いほど小さかった。ゆえに、十分に殺菌した梅果実と高濃度の食塩の存在下で pH の低い梅酢を用い、低温でよく衛生管理された梅製造プラントを用いれば、梅漬け保存剤としてパブリカ種子抽出物はその抗菌力を最大限に発揮できると思われる。

4-2-4 要約

1. ワインから分離した産膜酵母 7 菌株 (*S. cerevisiae* 6 菌株および *Candida* sp. 1 菌株)、ワイン関連の産膜酵母標準 3 菌株、並びに梅漬けから分離した産膜酵母 5 菌株 (*Kloeckera* 1 菌株、*Pichia* 2 菌株、*Debaryomyces* 1 菌株、*Candida* sp. 1 菌株) に対するパブリカ種子抽出物、亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩、酢酸の抗菌性を検討した。

2. ワインから分離した7菌株および *C. krusei* (RIFY Ytd3)を除いた保存産膜酵母2菌株 (*S. cerevisiae* RIFY 3012 と *C. vini* RIFY 2024)のいずれに対してもパプリカ種子抽出物は高い抗菌性を示し、そのMICは50~100 µg/mLであった。また、保存産膜酵母株、*C. krusei* RIFY FTd3 はパプリカ種子抽出物に対して弱い感受性しか示さず、亜硫酸には感受性を示し、そのMICは25 µg/mLであった。パプリカ種子抽出物に対して耐性が弱い標準株 *C. vini* (RIFY 2024)は、ソルビン酸および亜硫酸に対するMICが300 µg/mLと高く、菌株により特徴ある生育抑制効果が認められた。

3. 梅漬けより分離した産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物とその他の4種の添加物(亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩および酢酸)の抗菌性試験を行った結果、塩蔵中の異なった時点で分離された産膜酵母のうちの4種、5菌株に対して抗菌性が認められた。*Kloeckera apiculata* 203の生育はパプリカ種子抽出物50 µg/mLで阻止され、その他の3酵母の生育は100 µg/mLで阻止された。二酸化イオウ、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩および酢酸は、それぞれ3.1~12.5 µg/mL、25~100 µg/mL、1~50 µg/mL、3000~7000 µg/mLの濃度で産膜酵母の生育を阻止した。二酸化イオウとチアミンラウリル硫酸塩のMICは、パプリカ種子抽出物のMICよりも低い、ソルビン酸のそれは5種の酵母菌株中の2つと同じであり、その他の2菌株より高かった。

4. ワインから分離した5種の産膜酵母菌株に対して、pHが低いほど、またエタノール濃度が高いほど、ソルビン酸および亜硫酸のMICは低下したが、パプリカ種子抽出物の抗菌性に対するpHの影響は少なかった。梅漬けより分離した産膜酵母 *P. anomala* に対するパプリカ種子抽出物の抗菌性は、培地中の初発酵母菌数、温度、食塩濃度によって影響されたが、pHによる変動は少なかった。

5. 以上の結果、パプリカ種子抽出物は、ワイン製造や貯蔵時、また梅漬け製造中に発生する産膜酵母の生育を効果的に抑制し、汚染防止に極めて効果的であることが分かった。

4-3 パプリカ種子抽出物と他の食品添加物との併用効果

4-3-1 序

食品の保存に関する食品添加物は、食品の化学的、生物学的劣化を抑制するために用いられる。化学的劣化には、食品の色素、フレーバー、脂質、ビタミンの自動酸化の防止、酵素的、非酵素的な褐変防止、テクスチャーの変化の抑制や改善などが含まれる。一方、生物学的劣化を防ぐ手段として糖や塩による浸透圧の制御、酸やアルカリによるpHのコント

ロール、抗菌性物の利用およびそれらの組み合わせ使用などがある。各々の食品に適した抗菌性物質の選択にはいくつかの要因が存在する。抗菌性物質の生物学的、化学的特性はいうまでもないが、対象となる食品の性質や組成もまた重要な要因である。食品成分と抗菌性物質との反応の結果として後者の構造が変化したことによる抗菌活性の低下、食品の高い pH による抗菌性物質の活性低下、食品タンパク質あるいは澱粉と抗菌性物質との結合による活性低下、脂質の存在による抗菌性の喪失などがよく知られている (Davidson and Branen, 1981)。また、食品によって微生物フローラや生菌数が非常に異なる。このように、同じ腐敗微生物の増殖抑制を目的にしても、食品が異なれば単一の抗菌性物質のみの添加ですべての食品の保存に有効であるわけではなく、むしろそれぞれの食品に適した抗菌性物質と保存法があるといったほうが適当とも考えられる。

本項では、ワインや梅漬け、沢庵漬け、ミートボールなどから分離した産膜酵母や他の腐敗微生物に対するパプリカ種子抽出物の抗菌性を調べるとともに、パプリカ種子抽出物と他の食品添加物との併用効果を検討し、パプリカ種子抽出物の食品工業における実用的価値について論じた。

4 - 3 - 2 材料および実験方法

4 - 3 - 2 - 1 パプリカ果実抽出物の調製

第 3 章および本章第 1 節で述べた方法によってパプリカ種子粉末の 50% エタノール抽出物 (パプリカ種子抽出物) を調製し使用するとともに、ここでは新たに「パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣」から次の方法で抗菌性画分 (パプリカ果実抽出物) を抽出分離して使用した。

パプリカの乾燥果実 50 kg から 500-L 容量の超臨界ガス装置を用いて、抽出圧 160 kg/cm²、抽出温度 40 ℃、分離圧力 60 kg/cm²、分離温度 40 ℃、炭酸ガス流量 2,000 kg/h の処理条件でカプサイシンおよびカロチノイド系色素を抽出分離した。このとき得られた残渣 100 g に脱イオン水 700 mL を加え、20~60 ℃ で 1~40 時間攪拌した後、吸引濾過した。得られた濾液 (540 g) を 40 ℃ で約 100 mL まで減圧濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥して粉末 25 g を得た。凍結乾燥粉末を脱イオン水 25 mL に溶かし、脱イオン水で平衡化したアンバーライト XAD-7 (オルガノ株) カラム (1.4 × 40 cm) に添加した。流速 2 mL/min で 1,500 mL の脱イオン水を流した後、95% エタノールで吸着画分を溶出した。溶出液を 10 g ずつ分取して各々の溶出液の 280 nm の吸光度を測定した。水で溶出した画分を F1、95% エタノールで溶出したピークを F2、次に溶出するピークを F3 とした。各々の画分をロータリ

ーエバポレーターを用いて 40 ℃ で減圧濃縮後、凍結乾燥した。抗菌性試験を行った結果、F2 に強い活性が認められたので、これを以後の実験にパプリカ果実抽出物として用いた。

4-3-2-2 パプリカ種子抽出物 / 果実抽出物と食品添加物との併用効果

次に示した 13 の食品添加物をパプリカ種子抽出物と組み合わせて抗菌力試験を行った：プロトカテキユ酸、没食子酸、シナム酸、p-クマール酸、コーヒー酸、フェルラ酸、(+)-カテキン、メタ重亜硫酸カリウム（一級、昭和化学㈱）、ソルビン酸カリウム（特級、東京化成㈱）酢酸（特級、昭和化学㈱）アジピン酸（特級、昭和化学㈱）、フマル酸（特級、昭和化学㈱）、コハク酸（特級、昭和化学㈱）、DL-乳酸（特級、和光純薬工業㈱）、50% グルコン酸水溶液（藤沢薬品工業㈱）、DL-リンゴ酸（一級、昭和化学㈱）、クエン酸（無水）（一級、昭和化学㈱）、エチルアルコール（99.5%、国産化学㈱）、グリシン（特級、昭和化学㈱）、チアミンラウリル硫酸塩（ビタゲン・AS2 号、田辺製薬㈱）。

ワイン関連の産膜酵母に対する抗菌性試験を次のように行なった。YM 液体培地で前培養（25 ℃ で振盪培養）した酵母菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、予め加熱殺菌（65 ℃、15 分間）しておいた 2 倍希釈ワイン 5 mL に 10^5 cfu/mL になるように接種した。これを 20 ℃、10 日間静置培養し、酵母の生育および産膜形成状態を経時的に肉眼によって観察した。パプリカ種子抽出物およびその他の添加物、あるいはそれらの混合物の抗菌力試験には、各試料を所定濃度になるように添加した 2 倍希釈赤ワインを加熱殺菌したものをを用いた。

パプリカ果実抽出物とアジピン酸との併用試験は、次のように行なった。アジピン酸 0.1、0.3、あるいは 0.5% を添加したトリプトソイ寒天培地を 1 N NaOH で pH 5.5 に調整後、オートクレーブ（121 ℃、15 分間）で滅菌し、60 ℃ の恒温器中で保温した。別に、パプリカ果実抽出物を終濃度 0、100、200、400、あるいは 500 μ g/mL になるようにシャーレに入れ、これに先に保温した各濃度のアジピン酸を含むトリプトソイ寒天培地を注入して溶解混合した。培地が固化した後、トリプトソイ液体培地中で 30 ℃、3 時間前培養した被検菌をマイクロプランター MIT-P（東洋測器㈱）を用いて接種した。これを 30 ℃、72 時間恒温器中で培養後、出現したコロニーの有無を観察した。なお、被検菌としては市販食品から分離した酵母 3 株、乳酸菌 2 株、グラム陽性桿菌 1 株およびグラム陰性桿菌 1 株、計 7 菌株を用いた。

パプリカ果実抽出物 15 g と酢酸ナトリウム 48 g、アジピン酸 18 g、フマル酸 10 g、フマル酸一ナトリウム 9 g を混合して抗菌製剤を調合した。これを Table 4-2 に示した組成のたくあんの調味液、ポテトサラダおよび肉団子に添加して 20 ℃ で保存し、たくあんの調味液の濁りの肉眼観察およびポテトサラダの一般生細菌数、肉団子の一般生細菌数と乳酸

菌数を測定した。さらに、たくあんの調味液には市販のたくあんから分離した酵母と乳酸菌をそれぞれ 1.2×10^2 cfu/mL、 1.2×10^3 cfu/mL 接種して保存試験を行なった。一般細菌は、標準寒天培地（栄研化学株）を用いた混釈培養（30、48 時間）、乳酸菌は、BCP 加プレートカウント寒天培地（栄研化学株）を用いた混釈培養（30、72 時間）を行い、出現したコロニー数を計測した。

4-3-2-3 パプリカ果実抽出物の抗菌活性に及ぼす食品成分の影響

パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣をアンバーライト XAD-7 カラムに吸着させ、65%エタノールで溶出して分離した抗菌性画分（F2）の抗菌力に及ぼす食品あるいは食品成分の影響を調べた。食品および食品成分として、牛乳 5%、乳カゼイン 2%、ゼラチン 2%、卵白〔粉末〕 2%、卵黄〔生〕 5%、グルコース 5%、砂糖 5%、 α -サイクロデキストリン 1%、可溶性デンプン 5%、小麦粉（薄力粉）2%、小麦粉（強力粉）2%、乳化剤（HLB-15）0.1%、ラード 1%と乳化剤（HLB-15）0.1%の混合物、サラダ油 1%と乳化剤（HLB-15）0.1%の混合物、寒天 2%、ペクチン 5%、グルコマンナン 2%、キサンタンガム 0.2%、プルラン 2%、カラギーナン 0.2%およびカードラン 2%を用いた。トリプトソイ寒天培地（1.5%寒天、pH5.5）をオートクレーブ（121、15 分間）し、寒天が固化する前に食品素材を各濃度になるように加えて攪拌溶解させた。シャーレに F2 を終濃度が 100 から 1000 μ g/mL になるように入れ、食品成分の入ったトリプトソイ寒天培地を注入し、シャーレ内で混合して食品あるいは食品成分を含有する F2 の希釈系列を作成した。これらのシャーレにトリプトソイ液体培地中で 30、3 時間培養した *S. cerevisiae* OC-2 の菌懸濁液（約 10^4 cfu/mL）をマイクロプランターを用いて接種した。30、72 時間培養後、コロニー形成の有無から、各食品あるいは食品成分の共存下で被検菌の発育を阻止した F2 の最大希釈倍率を求め、食品あるいは食品成分を添加していない培地における F2 の発育阻止最大希釈倍率に対する百分率を相対活性として算出した。

4-3-2-4 F2 画分を含む抗菌剤を用いた食品保存試験

F2 画分（パプリカ果実抽出物）を含む次の抗菌剤を調製し、実用化実験を行った。抗菌剤は、F2 画分 15 g、アジピン酸 18 g、酢酸ナトリウム 48 g、フマル酸 10 g およびフマル酸一ナトリウム 9 g を混合して調製した。

4-3-2-4-1 白菜の浅漬け

白菜に 3%重量の食塩を振り混ぜ、重石をして一夜漬け込み、これを 5 cm に切断した後、水洗した。この下漬けした白菜 1 重量部に対してさし液（5%食塩水）2 重量部の割合で混

合した。抗菌製剤はさし液に溶かし、白菜とさし液の全量に対する濃度を計算して添加した。ポリエチレン袋に入れ、ヒートシールして室温（14～24℃）で保存して濁りの観察を行った。

4-3-2-4-2 たくあん調味液

Table 4-2 に処方のだくあん調味液に乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）を 1.2×10^3 cfu/mL 接種し、50g づつポリエチレン袋に入れ、ヒートシール後、室温（16～24℃）で濁りの観察を行なった。

4-3-2-4-3 焼肉のたれ

焼肉のたれを Table 4-2 の処方で試作し、これに産膜酵母（*Hansenula anomala*）を接種後、全量に対して抗菌製剤を 0.15%あるいは 0.3%添加した。各試験区の焼肉のたれをポリエチレン袋に入れてヒートシールし、室温（15～22℃）で静置し、膨れの観察を行なった。

4-3-2-4-4 めんつゆ

ストレートタイプのめんつゆに腐敗しためんつゆを少量添加して一般生菌数 3.0×10^4 cfu/mL とし、これに抗菌製剤を添加して、室温（15～23℃）でめんつゆの濁りを観察した。

4-3-2-4-5 イカ珍味

イカ珍味は、Table 4-2 に処方の調味液を用い、調味液：イカ = 5：1 の割合で混合し、試作した。抗菌製剤は調味液中に、全量（調味液 + イカ）に対して、0.15 および 0.3%含まれるように添加した。それを室温（16～24℃）に保存し、一般生菌数および pH の測定を行なった。

4-3-2-4-6 塩辛

市販の塩辛（食塩濃度 6.4%、Brix 28%）に抗菌製剤を 0.3%あるいは 0.5%加え、10 で 0～22 日間保存し、一般生菌数、カビ・酵母菌数、乳酸菌数を測定し、また官能試験を行なった。

4-3-2-4-7 あんこ

あんこは、Table 4-2 の処方に抗菌製剤を全量に対して 0.2%あるいは 0.3%添加した後、加熱し、これを蓋付きカップに入れ、30℃ に保存し、外観およびにおいの観察を行なった。

4-3-2-4-8 ソース

市販ソース（食塩濃度 5.4%、Brix 35%）に抗菌製剤を 0.15%あるいは 0.3%加えて 0～90 日間保存後、一般生菌数、カビ・酵母菌数、乳酸菌数を測定した。

4-3-2-4-9 ハンバーグ

ハンバーグは、Table 4-2 で示した処方で試作し、これに抗菌製剤を全量に対して 0.3%

Table 4-2. Compositions of various preserved foods.

Liquid seasoning for pickled radish (pH 4.7)	Soy sauce	1.0 (w/w)
	Table salt	3.6
	Vinegar	0.5
	Sweet sake	0.5
	Sweet G	0.02
	Yeast extract	0.5
	Amino acid powder	1.0
	Water	92.9
Potato salad	Steamed potato	70%
	Boiled carrot	10
	Cucumber	10
	Mayonnaise	10
Meat balls	Ground pork	78.0%
	Welsh onion	11.6
	Hen egg	6.2
	Flour	2.0
	Table salt	0.1
	Soy sauce	0.1
	Sake	2.0
Sliced steak sauce (dipping sauce)	Sugar	7.6%
	Soy sauce	20
	MSG	0.4
	Ginger	0.25
	Sake	2.3
	Sweet sake	2.3
	Sesame oil	0.15
	Water	67
Liquid seasoning for cuttlefish <i>nama-chinmi</i>	Table salt	10%
	Sake	5
	Sweet sake	5
	MSG	1
	Sugar	3
	Water	76
	Bean jam	Bean powder jam
Sugar		30
Water		10
Hamburger steak	Minced meat	60 g
	Welsh onion	20
	Flour	10
	Hen egg	4
	Dogtooth violet starch	5
	Table salt	1
	Pepper	0.05
	MSG	0.5

添加後、開放系で室温 1 ~ 7 日間保存し、一般生菌数を測定した。

4 - 3 - 3 実験結果および考察

4-3-3-1 ワイン産膜酵母に対する亜硫酸、ソルビン酸、あるいはワインフェノールとパプリカ種子抽出物との併用効果

本章 4-2-2-3 で、ワインから分離した各種の産膜酵母に対するパプリカ種子の 50% エタノール抽出物（パプリカ種子抽出物）、ソルビン酸、および二酸化イオウの MIC は、それぞれ 50 ~ 100、50 ~ 300、25 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることを述べた。ワインは、長期に保存可能な代表的な飲料である。その最も大きな理由は、ワインが高濃度のエタノールを含み、またその pH（約 2.9 ~ 3.8）が非常に低いことであるが、さらに、ワインに含まれる種々のフェノール化合物が抗菌作用を発揮している可能性がある（Singleton and Esau, 1969）。そこで、まず、ワインに存在する 6 つのフェノール化合物とシナナム酸の産膜酵母に対する抗菌性を調べた（横塚弘毅、1995）。ワインの代表的な非フラボノイド型フェノールであるカftarリック酸とタータリック酸（それぞれコーヒー酸あるいは *p*-クマール酸と酒石酸のエステル）はシナナム酸の誘導体であるが、抗菌性テストに十分な量をワインから分離するのは難しい。そこで、これらのエステルに代えて、コーヒー酸、*p*-クマール酸およびシナナム酸を用い、ワインの産膜酵母 5 菌株（*S. cerevisiae* 305、*Candida* sp. 304、*S. cerevisiae* 008、*C. krusei* 022、*C. vini* 037）に対する抗菌性を調べた。その結果、シナナム酸（フェノールではない）の MIC は 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と低く、5 菌株すべてに抗菌効果が認められたのに対して、供試したフェノールのすべての MIC は 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。すなわち、*Candida* sp.304 および *C. krusei* 022 に対してシナナム酸は 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC で強い抗菌効果があるにもかかわらず、シナナム酸系のフェノールである *p*-クマール酸、コーヒー酸およびフェルラ酸の MIC は 400 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、それらの抗菌効果は弱く、また他の 3 菌株に対しては 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも生育を阻止できなかった。一方、カテキンおよび安息香酸系フェノール（プロトカテキュ酸および没食子酸）の MIC は 5 菌株全部に対し 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも生育を阻止できなかった。一般に、植物性抗菌性物質の多くは、フェノール類、香辛料成分、香辛料精油、有機酸と植物色素とそれらに関連する化合物であることが報告されている（Nychas, 1995）。フェノールではないが、シナナム酸やその類縁化合物、また安息香酸あるいはその誘導体が酵母の増殖を抑制することが報告されている（Singleton and Esau, 1969; Nychas, 1995; Baranowski et al., 1980; 天野義文ら、1982）。しかし、今回ワインより分離した産膜酵母 5 菌株に対して、ヒドロキシシナナム酸、安息香酸誘導体

およびカテキンのいずれについても顕著な抗菌効果は認められなかった。これは、ワイン産膜酵母の増殖は、ワインに存在するフェノールによって抑制できないことを意味する。しかし、ワインフェノールと各種抗菌剤とを組み合わせれば、併用効果があるのではないかと考えられたので、上記5菌株に対するパプリカ種子抽出物とフェノール化合物（プロトカテキユ酸、没食子酸、*p*-クマール酸、コーヒー酸、フェルラ酸、カテキン）との併用効果を種々の濃度で調べたが、相加効果、相乗効果とも認められなかった。同様に、同じ産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物と亜硫酸あるいはソルビン酸との併用効果に関する実験を行ったが、両効果ともに見出せなかった。

4-3-3-2 パプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣-抗菌性画分の調製

比活性が高く、かつ安全性の高い抗菌性物質があったとしても、それが使用しやすく、安価でなければ実用性に乏しい。また、抗菌性物質中に、毒性成分や辛味・渋み物質のような好ましくない成分が含まれていれば、実用上利用できない。パプリカ種子より50%エタノールで抽出して得られた抗菌性物質は、安全性に優れ、強い抗菌力をもつ優れた添加物となる可能性が高いが、パプリカ果実（唐辛子）より種子を分離するのにコストがかかるので、種子だけを分離し、これから抗菌性物質を分離して利用するのではなく、パプリカ果実から抗菌性物質を直接に分離できれば、その経済的価値は大きい。しかし、パプリカ果実には強い辛味をもつカプサイシンが含まれ、これ自身も抗菌性をもつが（Huhtanen, 1980; 伊藤均, Meixu, 1984; Gal, 1969）カプサイシンの辛味のために添加できる食品は限られてしまう。本論文で見出した抗菌性物質は、カプサイシンとは異なるサポニン的一种であるので、パプリカ果実からカプサイシン、さらに赤色素を抽出して別途利用後、その抽出残渣から抗菌性物質を抽出できれば安価で汎用性の高い食品保存剤が開発できることになる。

パプリカ果実は主に果肉と種子で構成されているが、果肉の50%エタノール抽出物の抗菌性についても検討したところ、*S.cerevisiae* W-3 に対する MIC は 1000 µg/mL 以上であり抗菌性は低かった。従ってパプリカ果実抽出物の抗菌性の主体は種子由来であることがわかった。

近年、超臨界抽出技術が食品工業に利用されるようになり、パプリカ果実についても超臨界炭酸ガスを用いて辛味の強い唐辛子樹脂（オレオレジン）から赤色素を抽出する技術が開発された（茂利, 1992）。このときの残渣は辛味成分が取り除かれているので、これより抗菌性物質を抽出できれば、対象とする食品の味に影響を与えない食品保存剤として利用できる可能性が高い。

そこで、パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣から、種々の条件で水を用いて抽出して得られた物質の抗菌性を調べた。乾燥粉末状態のパプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣と水との混合割合を変えて攪拌抽出を行なったところ、残渣1に対して水7（重量比）のとき、抽出される固形物量が最大を示し、さらに水の割合を増やしても得られる抽出物重量は増加しなかった。そこで以後の実験では残渣1重量部に水7重量部を加えて抽出した。次に、30 で抽出時間を1時間から40時間まで変えて抽出した物質の抗菌性試験を行った。その結果、抽出を開始して3時間までの比較的短時間の抽出で得られた抽出物は、全ての被検菌に対して抗菌活性を示さなかった。これに対して24時間以上の抽出で得た物質は、*S. cerevisiae* OC-2 に対してのみ0.5%以上の抽出物の添加濃度で生育を阻害し、他の3菌株に対しては、1%添加しても生育を阻止しなかった。抽出時間を40時間まで延長して得た抽出物の抗菌活性は24時間のそれと同等であった。

さらに水抽出時間を24時間と一定にし、抽出温度を20 から60 まで10 ごとに变えて抽出を行い、得られた抽出物の *S. cerevisiae* OC-2 に対する抗菌活性を調べた。40 での抽出物は、抽出物の0.3%以上の添加濃度で生育阻止効果があり、他の温度に比べて強い抗菌性を示した。60 まで温度を上げて得られた抽出物は、全く抗菌活性が認められなかった。各温度で、パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣100gから水抽出して得られた乾燥物の重量はほぼ一定（24.6~25.4g）であったので、40 で抽出した物質の乾燥物重量当たりの活性が最も高いことになる。

本論文で得た抗菌性物質は、サポニン的一种で水に難溶で有機溶媒に可溶であると述べた（第3章）。しかし、本稿ではパプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣から水抽出によって抗菌性物質を得ている。第3章でも論議したように、本抗菌性物質は、タンパク質に結合しやすく、あるいはパプリカ果実内でタンパク質と結合して存在することによって、水に可溶になり、また水系食品や生体内で抗菌性をより発揮しやすくなっている可能性がある。このことは、本抗菌性物質の食品添加物としての利用価値を非常に高めていると考えられる。

超臨界炭酸ガス抽出残渣（100g）の水抽出物（25g）から抗菌活性の高い画分を分離するためにアンバーライト XAD-7 クロマトグラフィーを行なった（Fig. 4-5）。水抽出物をカラムに添加後、水で洗い（図中、F1画分、凍結乾燥物重量11.9g）つぎに95%エタノールで溶出すると280nmに吸収をもつ画分F2（1.1g）が得られた。この後、続けて95%エタノールで溶出することによって得られた画分をF3（0.4g）とし、3つの画分の抗菌活性を調べた（Table 4-3）。F1画分の *S. cerevisiae* OC-2 に対するMICは5000 µg/mL以上であり、F2画分はカラム添加量の4.4%しか回収されなかったが、そのMICは200

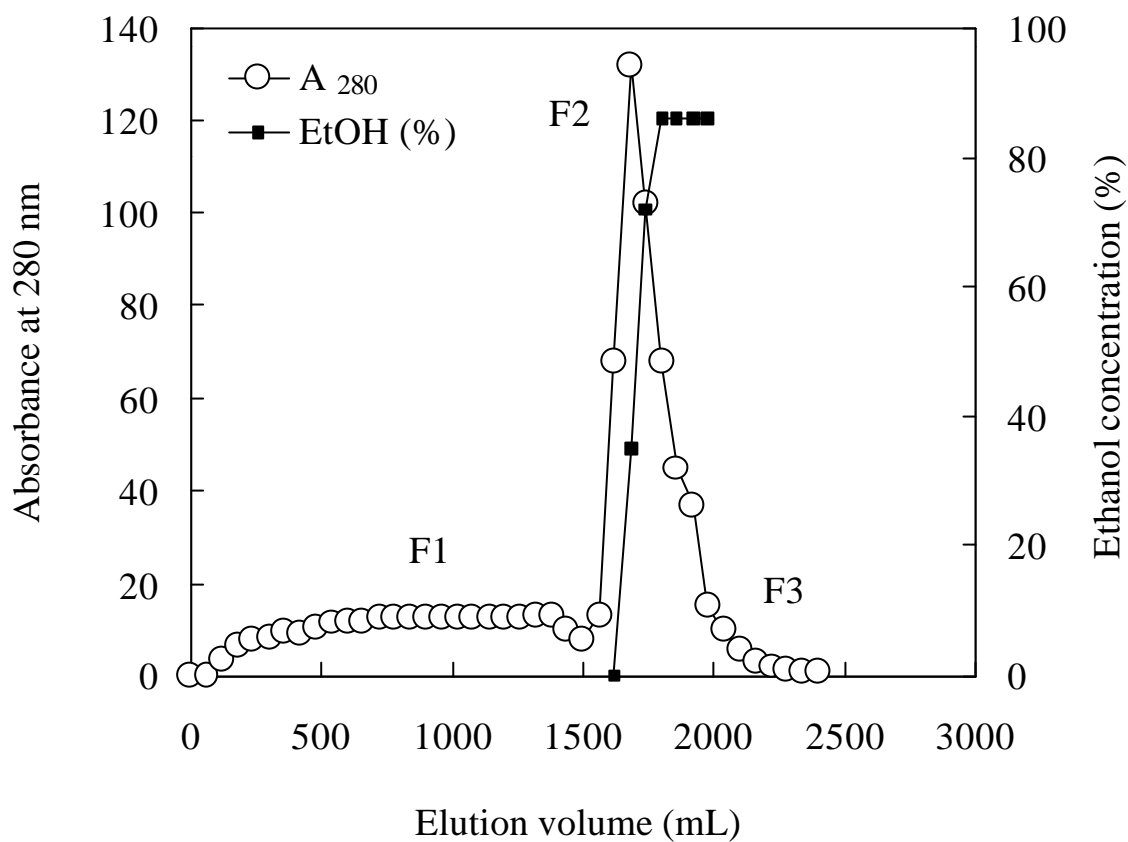


Fig. 4-5. Amberlite XAD-7 chromatography of water extract (antimicrobial fraction) of the residue obtained after supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum annuum* L.

The water-extract solution (25 g/25 mL) was applied to an Amberlite XAD-7 column (1.4 x 40 cm) equilibrated with water. After washing the column with 1500 mL water, an active fraction was eluted with 95% ethanol at a flow rate of 120 mL/h.

Table 4-3. Yield and minimum inhibitory concentration of fractions (lyophilisates) obtained by Amberlite XAD-7 chromatography of the water-extract of the residue obtained by supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum annuum* .

Fraction	Yield		Minimum inhibitory concentration ¹⁾ (μ g/mL)
	Weight (g)	(%)	
Water-extract	25.0	100	3000
F1	11.9	47.6	> 5000
F2	1.1	4.4	200
F3	0.1	0.1	> 5000
Total	13.1	52.4	

¹⁾ Towards *Saccharomyces cerevisiae* OC-2.

μg/mLであった。この抗菌活性は分別前の乾燥物の活性の約 15 倍であり、無味無臭であった。得られた抗菌性物質画分は、水に対して透析したとき、透析内液に残り、透析外液には抗菌活性は認められなかった。本物質のタンパク質含量は 33%、中性糖量は 35%であり、抗菌性物質はこれらの高分子成分と結合していると思われた。

4-3-3-3 パプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣から分離した F2 画分の抗菌活性に及ぼす食品成分の影響とアジピン酸との併用効果

パプリカ果実-超臨界炭酸ガス抽出残渣の水抽出液をアンバーライト XAD-7 カラムで分離精製して得た F2 画分の抗菌活性が食品中で維持されるのか、あるいはどのような食品成分により抗菌活性が影響を受けるかを検討した (Table 4-4)。Table 4-4 において、相対抗菌活性が 90%以上の食品成分は、ゼラチン、グルコース、砂糖、乳化剤 (HLB-15)、ラード、寒天、キサンタンガム、プルランであった。したがって、これらにより構成される加工食品中では F2 画分の抗菌活性はほとんど影響を受けないと考えられる。一方、牛乳や卵が共存すると抗菌活性は 70%以下に低下し、両食品を多く使用して製造した食品中では抗菌力が弱まるものと推定される。

F2 画分の抗菌活性は、酵母に対して特異的であり、細菌に対してはまったく抗菌作用を示さないので、F2 画分を食品の保存に用いる場合は他の保存剤と併用する必要がある。食品の酸味、調味、pH 調整のために用いられているアジピン酸を本抗菌性物質と併用した場合、市販食品より分離した 3 種の酵母菌株、2 種の乳酸菌、グラム陰性菌および陽性菌各 1 菌株に対する抗菌性を寒天培地を用いて検討した (Table 4-5)。アジピン酸のみを添加したときには市販の加工食品から分離したいずれの被検菌も発育したが、F2 画分と 0.1%アジピン酸とを併用した場合には、酵母に対して本抗菌物質 300~500 μg/mL、乳酸菌に対して 500 μg/mL で発育を阻害した。アジピン酸の濃度が 0.3 および 0.5%と高くなると F2 画分の各被検菌に対する発育阻止作用は強くなり、乳酸菌やグラム陽性桿菌および陰性桿菌に対しても抗菌効果が認められるようになった。したがって複数の汚染菌によって起こる食品の腐敗を防止するためには、F2 画分とアジピン酸とを併用することが有効と考えられた。

4-3-3-4 F2 画分を含む抗菌剤の食品保存試験

アジピン酸との併用により抗菌スペクトルが拡大したことから、他の有機酸との併用効果も期待された。そこで、F2 画分を含む抗菌剤を調製し、実用化実験を行った。それは、F2 画分 15%、アジピン酸 18%、酢酸ナトリウム 48%、フマル酸 10%およびフマル酸一ナ

Table 4-4. Effects of various ingredients on the antimicrobial activity of the F2 fraction obtained by Amberlite XAD-7 chromatography.

Ingredient	Concentration of ingredient	Relative activity ^{b)}
Control (medium ^{a)})		100
Bovine milk	5	69
Casein	2	74
Gelatin	2	93
Egg white (powder)	2	68
Egg yolk	5	63
Glucose	5	100
-Cyclodextrin	1	62
Soluble starch	5	68
Soft flour	2	72
Hard flour	2	71
Emulsifier (HLB-15)	0.1	93
Lard	1	
+ emulsifier (HLB-15)	0.1	91
Salad oil	1	
+ emulsifier (HLB-15)	0.1	88
Agar	2	91
Pectin	5	89
Glucomannan	2	73
Xanthan gum	0.2	100
Pullulan	2	93
Carrageenan	0.5	84
Curdlan	2	72

a) Trypto-soy agar medium (1.5% agar, pH 5.5).

b) Percentage of antimicrobial activity (each sample/control x 100) against *Saccharomyces cerevisiae* OC-2.

Table 4-5. Effects of the combinations of the F2 fraction and adipic acid on the antimicrobial spectrum.

Adipic acid (%)	F2 fraction (μ g/mL)	Microorganism ^{a)}						
		1	2	3	4	5	6	7
0.1	0	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	-	-	+	+	+	+
	400	-	-	-	+	+	+	+
	500	-	-	-	-	+	+	+
0.3	0	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	-	-	+	+	+	+
	300	-	-	-	+	+	+	+
	400	-	-	-	-	+	-	+
	500	-	-	-	-	-	-	+
0.5	0	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	-	-	+	+	+	+
	200	-	-	-	±	+	+	+
	300	-	-	-	-	-	±	+
	400	-	-	-	-	-	-	±
	500	-	-	-	-	-	-	-

Antimicrobial activity was determined by the agar plate dilution method (trypto-soy agar medium, 30°C, 72 hours).

+, good growth; ±, slight growth; -, no growth.

1. Yeast isolated from commercially available pickled radish.
2. Yeast isolated from commercially available ground beef.
3. Yeast isolated from commercially available food boiled in kelp soy.
4. Lactic acid bacteria isolated from commercially available pickled radish.
5. Lactic acid bacteria isolated from commercially available steamed chicken.
6. Gram-positive rod isolated from commercially available egg omelet.
7. Gram-negative rod isolated from commercially available chow mein.

トリウム 9 %を混合して製剤化した日持ち向上剤(商品名：アジナンバー201)である。Table 4-6 に、*B. subtilis*(枯草菌)、*Staph. aureus*(ブドウ状球菌)、*E. coli*(大腸菌)、*Salmonella tryhimurim*(サルモネラ菌)、*Strept. lactis*(乳酸菌)、*S. cerevisiae*(パン酵母)、*H. anomala*(ハンゼヌラ菌)、*P. membranaefaciens*(産膜酵母)、*Pen. decumbens*(青カビ)に対する本抗菌製剤(food additive A と表記)の抗菌力を示した。pH 4.8 で、30、72 時間培養後の各菌の生育状況を肉眼で観察した結果、本製剤濃度が 0.05 % のときには、*B. subtilis* を除き抗菌力を示さなかったが、0.1 % 濃度で *H. anomala*、*P. membranaefaciens*、*Pen. decumbens* 以外の 6 菌株には抗菌力を示し、0.2 % 濃度では供試したすべての菌の生育を抑制した。培地の pH を 4.5、5.5、6.5 と変化させて培養した結果(Table 4-7) 本製剤の酵母に対する抗菌力はあまり影響を受けなかったが、細菌類に対してはかなりの影響を示した。pH 6.5 において、本製剤を 0.2 % ~ 0.4 % 添加すればほとんどの微生物の発育を抑制できた。Table 4-8 は、本製剤の抗菌力に及ぼす食塩濃度の影響を調べた結果である。本製剤濃度を 0 ~ 0.5 % とし、食塩濃度を 0 ~ 7 % とし、pH 4.5 のトリプトソイ寒天培地を用いて 30 で 6 菌株を培養し、72 時間後の生育状況を観察した。加工食品の低塩化が進み、漬物においてもトレーパック品で食塩濃度は約 7 %、袋詰品で 3 ~ 5 % 程度である。Table 4-8 に示したように、7 % 食塩濃度 のとき、0.05 % の本製剤が存在すれば、全ての被検菌の生育が抑制され、また食塩濃度が 0 % のときでさえ、0.2 % の本製剤が存在すれば全ての被検菌の生育が見られなかった。このように、低塩漬物の保存性の向上に本製剤の添加は非常に有効であることが分かった。以上の結果から、パプリカ果実より工業的に抽出された抗菌性物質と種々の有機酸を混合して製剤化された上記の抗菌製剤は効果的に色々な微生物の生育を抑制することが分かったので、次に実際の加工食品をつくって本製剤の実用化試験を行なった。

(ポテトサラダ)

ポテトサラダに 0 ~ 0.3 % の抗菌製剤を添加し、室温で 6 日間保存し、サラダ中の一般生細菌数の変化を調べた。その結果、抗菌製剤の添加量の増加に伴ってサラダ中の一般生細菌数の増加が抑制された (Fig. 4-6a)。

(肉団子)

肉団子に抗菌製剤 0.3 % を添加し、20 で 8 日間保存した。畜肉加工食品の場合には乳酸菌が関与することが多いことから、肉団子では一般生細菌数に加えて乳酸菌数も測定した。その結果、コントロール(抗菌製剤無添加区)に比べて一般生細菌数とともに乳酸菌数の増加も抑制された (Fig. 4-6b)。肉団子の製造には加熱工程が含まれるが、熱安定性に優れた F2 画分を含む本抗菌製剤が加熱後も安定して抗菌活性を発現していることが示さ

Table 4-6. Activity of the antimicrobial preparation consisting of the F2 fraction and organic acids.

Microorganism tested	Control	Concentration of food additive A (%)		
		0.05	0.1	0.2
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-
<i>Streptococcus lactis</i>	+	+	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	+	+	+	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	+	+	+	-
<i>Penicillium decumbens</i>	+	+	+	-

Microorganisms were grown in trypto-soy agar medium (pH 4.8) at 30°C for 72 hours.

+, good growth; -, no growth

Table 4-7. Effect of pH on the activity of the antimicrobial preparation consisting of the F2 fraction and organic acids.

pH	Conc. of the additive	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>Pichia membra.</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
4.5	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	-	-	-	+	+	+
	0.1	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
5.5	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+
	0.1	-	±	+	+	+	+
	0.2	-	-	-	-	±	+
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
6.5	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+	+	+
	0.2	±	±	-	+	+	+
	0.3	-	-	-	-	-	+
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-

+, good growth; ±, slight growth; -, no growth.

Microorganisms were incubated at 30°C for 72 hours in trypto-soy agar medium.

Table 4-8. Effect of NaCl concentration on the activity of the antimicrobial preparation consisting of F2 fraction and organic acids.

NaCl (%)	Conc. of the additive	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>Pichia membra.</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
0	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	-	-	+	+	+	+
	0.1	-	-	-	+	+	+
	0.2	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
3	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	-	-	+	+	+	+
	0.1	-	-	-	±	±	±
	0.2	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
5	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	-	-	+	+	+	+
	0.1	-	-	-	-	-	±
	0.2	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
7	0	+	+	+	+	+	+
	0.05	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-

+, good growth; ±, slight growth; -, no growth.

Microorganisms were incubated at 30°C for 72 hours in trypto-soy agar media (pH 4.5) containing various concentrations of NaCl.

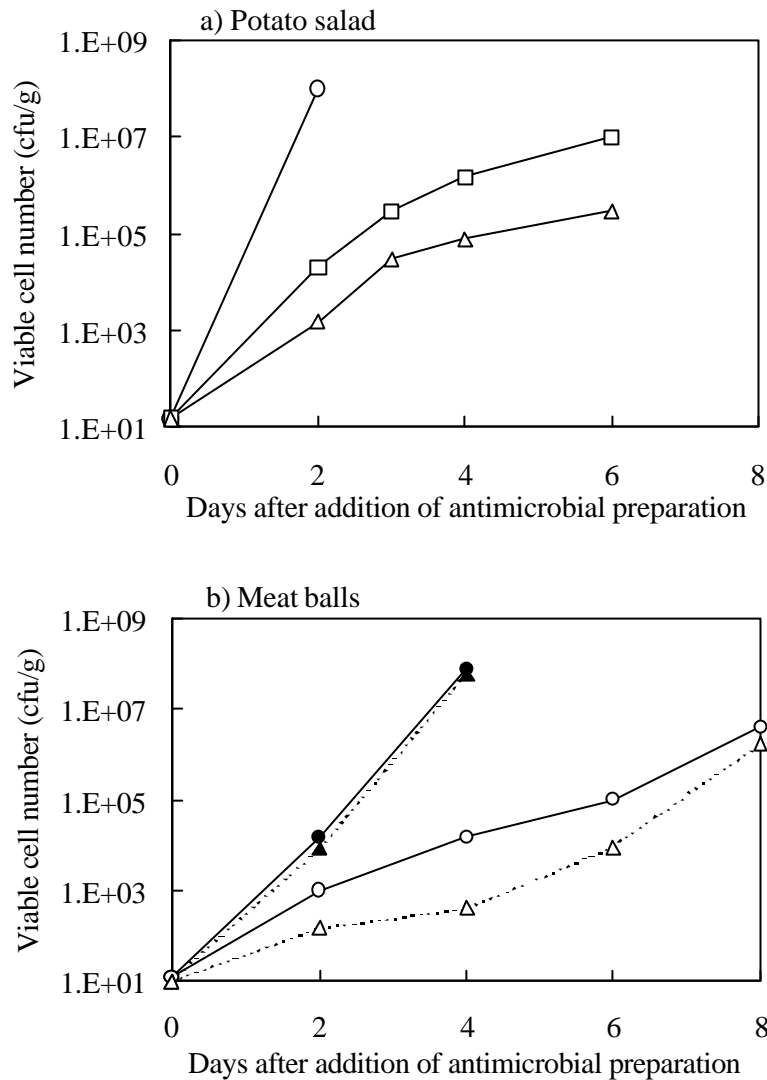


Fig. 4-6. Effect of the antimicrobial preparation consisting of the F2 fraction and organic acids on the viable cell number of microorganisms during preservation of potato salad and meat balls.

(a) Potato salad

The preservation test was carried out at room temperature (19 - 24°C). The number of viable cells in potato salad containing 0% (), 0.15% (), or 0.3% () antimicrobial preparation was monitored for 6 days.

(b) Meat balls

Solid and dotted lines respectively show viable cell numbers of total bacteria and lactic acid bacteria. The preservation test was carried out at 20°C. The number of viable cells in meat balls containing 0% (and) or 0.3% (and) antimicrobial preparation was monitored for 8 days.

れた。

(白菜の浅漬け)

Fig 4-7 は、白菜の浅漬けにおける抗菌製剤の保存効果を示したものである。室温保存において、無添加区が 29 時間後に濁りが発生したのに対して、抗菌製剤の 0.15% 添加区では約 2 倍の日持ちの延長が認められた。0.3% 添加区ではさらに日持ちが延び、5 日後に濁りの発生が見られた。抗菌製剤を 0.3% 添加した浅漬けの官能検査を行なったが、色調、におい共に異常はなかった。

(たくあん調味液)

市販のたくあんから分離した酵母と乳酸菌をたくあんの調味液に接種し、直ちに抗菌製剤を添加すると、調味液に濁りが発生するまでの期間が無添加区に比べて長くなり、この長さは添加した抗菌製剤の濃度に依存していた (Fig. 4-8a)。また、無添加区では 2 日目で膨れが発生したが、抗菌製剤 0.15% 添加区では 2 倍の日持ち延長が見られ、0.3% 添加区ではさらに日持ちが向上した。濁りの主な原因は酵母や乳酸菌の増殖によることから、たくあんの調味液中の酵母と乳酸菌の増殖が抗菌製剤により抑制されることが分かった。

(焼肉のたれ)

焼肉のたれを Table 4-2 に示した処方で試作し、これに酵母 (*Hansenula anomala*) を接種後、全量に対して抗菌製剤を 0.15% あるいは 0.3% 添加後、室温で静置し、膨れの観察を行なった。その結果、無添加区では 2 日目で膨れが発生したのに対して、0.15% 添加区では 4 日目、0.3% 添加区では 5 日目に膨れが発生し、明らかに日持ちの延長が認められた (Fig. 4-8b)。

(めんつゆ)

ストレートタイプのめんつゆに、腐敗しためんつゆを少量添加後、抗菌製剤を添加し、室温で保存し、めんつゆの濁りを観察した。その結果、無添加区では 1.5 日目に濁りが発生したのに対し、抗菌製剤 0.15% 添加区では 2.5 日目、0.3% 添加区では 4 日目に濁りが発生し、明らかに日持ちの向上が認められた (Fig. 4-8c)。

(あんこ)

あんこは、水分や糖濃度を調節することにより、ある程度、微生物による変敗を抑えることができるが、最近では低糖化傾向が強いために、水分活性が高く変敗しやすくなっている。あんこに抗菌製剤を加え、加熱保存し、においと外観の観察を行なった。抗菌製剤無添加区では 4 日目に、0.2% 添加区では 25 日目に異臭が発生したが、0.3% 添加区では 30 日後でさえ異臭も外観の変化もなかった (Fig. 4-8d)。

(イカ生珍味)



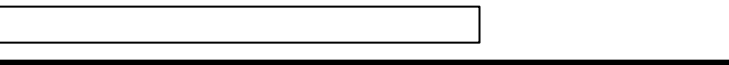
Additive	Initial total number of microorganisms (CFU/mL)	pH of pouring water	Turbidity formation time (hours)		
		pH of whole product	20	40	60
No addition	7.2×10^3	6.8			
		5.8			
Preparation concn. 0.15%	6.5×10^3	4.2			
		5.2			
Preparation concn. 0.30%	4.5×10^3	4.2			
		5			

Fig. 4-7. Turbidity formation time of a fresh Chinese cabbage preserved with salt and malt in the presence or absence of the antimicrobial preparation consisting of the F2 fraction and organic acids.

The fresh Chinese cabbage was stored at room temperature (14 to 24°C).

a) Liquid seasoning for pickled radish

Conc. of antimicrobial preparation (%)	pH	Turbidity formation time (days)		
		2	4	6
0%	4.8			
0.15%	4.6			
0.30%	4.6			

b) Sliced steak sauce

Conc. of antimicrobial preparation (%)	pH	Gas formation (swelling of bag) time (days)		
		2	4	6
0%	4.9			
0.15%	4.7			
0.30%	4.7			

c) Noodle soup

Conc. of antimicrobial preparation (%)	pH	Turbidity formation time (days)		
		2	4	6
0%	5.2			
0.15%	5.0			
0.30%	4.9			

d) Bean jam

Conc. of antimicrobial preparation (%)	Off-odor formation time (days)		
	10	20	30
0%			
0.15%			
0.30%			

Fig. 4-8. Formation times of turbidity, swelling, and off-odor of liquid seasoning for pickled radish, sliced steak sauce, noodle soup, and bean jam in the absence or presence of the antimicrobial preparation consisting of the F2 fraction and organic acids.

Liquid seasoning for pickled radish, sliced steak sauce, noodle soup, and bean jam were all stored at room temperature (15 to 25°C).

生珍味はその触感が好まれ、消費が増加傾向にあるが、保存性が悪く、品質低下が早いことが問題となっている。そこで、抗菌製剤を 0.15 あるいは 0.3% を含む調味液とイカを 5:1 の割合で混合し、室温に保存して菌数と pH の変化を調べた。その結果 (Table 4-9) 腐敗していないイカ珍味の pH は 6.5 付近であったが、一般生菌数が増加するとともに pH は低下し、 10^8 cfu/g 以上では pH 6.0 あるいはそれ以下になった。抗菌製剤無添加区においてイカ生珍味は 2 日目で一般生菌数が 10^8 cfu/g のオーダー以上となり腐敗したのに対して、抗菌製剤 0.15% 添加区では一般生菌数が 10^8 cfu/g のオーダー以上となったのは 3 日目で、一日の日持ち延長が認められた。

また 0.3% 添加区では 3 日目においても一般生菌数が 8.6×10^6 cfu/g であり、さらに日持ちの延長が認められた。

(塩辛)

塩辛は最近、低塩志向が強く、その保存性の悪さが問題になっている。Table 4-9 に抗菌製剤添加による塩辛の保存試験の結果を示した。10 日保存において無添加区は保存 14 日目に腐敗臭が出たのに対して、抗菌製剤を 0.3% 添加したとき腐敗が出始めたのは 18 日後であり 4 日の延長が認められた。さらに、0.5% 添加区では、8 日の日持ち延長が認められた。塩辛の初発の一般生菌数は 10^4 cfu/g、カビ・酵母数は 10^2 cfu/g、乳酸菌数は 10^3 cfu/g のオーダーであるが、各微生物群の菌数が初発菌数の約 100 倍になると確かな腐敗臭が検出された。

(ソース)

Table 4-9 に、本抗菌製剤添加による市販ソースの保存試験結果を示した。抗菌製剤無添加のソースは、試験開始から 90 日後、一般生菌数が 4.0×10^5 cfu/mL、カビ・酵母数が 2.0×10^3 cfu/mL、乳酸菌数が 2.0×10^2 cfu/mL になったのに対して、抗菌製剤を 0.15% あるいは 0.3% 添加した試験区では、各菌種とも増殖は認められず、日持ち延長効果が明らかとなった。

(ハンバーグ)

Table 4-9 に、ハンバーグの保存試験結果を示した。本抗菌製剤無添加のハンバーグでは、4 日目に異臭が出始めたが、本抗菌製剤を 0.3% 添加したハンバーグでは 7 日保存後においても異臭の発生はなく、一般生菌数は 2.0×10^2 cfu/g と明らかに増殖が抑制され、顕著な日持ち延長効果が認められた。

以上の実用化試験の結果から、本抗菌製剤が加工食品の日持ち向上剤として幅広く利用できることが分かった。

Table 49. Changes in viable cell numbers of microorganisms during storage of cuttlefish *nama-chinmi*, salted guts of cuttlefish, Worcester sauce, and Hamburger steak in the presence or absence of the antimicrobial preparation consisting the F2 fraction and organic acids.

Additive (%)	Microorganism	Viable cell number (cfu/mL)				
<u>Cuttlefish <i>nama-chinmi</i></u>		Storage time (days)				
		0	1	2	3	
0	Bacteria	3.0×10^2	3.3×10^5	$> 10^8$		
0.15	Bacteria	1.1×10^2	4.0×10^4	8.0×10^6	$> 10^8$	
0.3	Bacteria	2.0×10	3.8×10^3	9.3×10^4	8.6×10^6	
<u>Salted cuttlefish guts</u>		Storage time (days)				
		0	10	14	18	22
0	Bacteria	4.4×10^4	5.6×10^4	1.1×10^5	3.3×10^7	
	Molds, yeast	5.0×10^2	2.6×10^2	4.6×10^3	2.3×10^4	
	Lactic acid bacteria	1.5×10^3	1.7×10^3	1.9×10^3	6.9×10^4	
0.3	Bacteria	2.8×10^4	1.2×10^4	1.2×10^5	2.1×10^5	2.8×10^6
	Molds, yeast	1.2×10^2	2.4×10^2	1.0×10^3	6.7×10^3	6.5×10^4
	Lactic acid bacteria	1.4×10^2	1.7×10^3	3.8×10^4	9.5×10^4	1.6×10^5
0.5	Bacteria	3.6×10^4	3.1×10^4	5.8×10^4	5.4×10^5	9.5×10^5
	Molds, yeast	1.5×10^2	9.0×10^2	1.0×10^2	7.8×10^3	4.0×10^3
	Lactic acid bacteria	1.8×10^3	2.5×10^3	8.8×10^4	3.1×10^4	1.6×10^4
<u>Worcester sauce</u>		Storage time (days)				
		0	10	32	60	90
0	Bacteria	1.0×10	2.0×10	3.0×10	1.0×10^2	4.0×10^5
	Molds	10	< 10	< 10	1.0×10^2	2.0×10^3
	Lactic acid bacteria	10	< 10	< 10	< 10	2.0×10^2
0.15	Bacteria	-	< 10	1.0×10	1.0×10	< 10
	Molds	-	< 10	< 10	< 10	< 10
	Lactic acid bacteria	-	< 10	< 10	< 10	< 10
0.3	Bacteria	-	< 10	< 10	< 10	< 10
	Molds	-	< 10	< 10	< 10	< 10
	Lactic acid bacteria	-	< 10	< 10	< 10	< 10
<u>Hamburger steak</u>		Storage time (days)				
		1	2	4	5	7
0	Bacteria	1.0×10	1.8×10^4	2.3×10^6	2.7×10^6	
0.3	Bacteria	< 10	1.0×10	< 10	2.0×10^2	

これらの結果を拠りどころにして、本抗菌剤は日持ち向上剤「アジナンバー201」という商品名で発売され、日本国内だけでなく韓国、台湾、中国、東南アジア諸国にも輸出され、加工食品に幅広く使用されている。

4-3-4 要約

1. ワインフェノールであるコーヒー酸、*p*-クマール酸、あるいはシナム酸並びにワイン用添加剤である亜硫酸あるいはソルビン酸とパプリカ種子抗菌性物質とのワイン産膜酵母に対する併用効果を検討したが、相加効果、相乗効果ともに認められなかった。
2. パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣（100 g）を40℃、24時間抽出し、抽出液を凍結乾燥して25gの粉末を得た。これをアンバーライト XAD-7 クロマトグラフィーで分離するとMICが200 µg/mLの抗菌性画分（パプリカ果実抽出物、1.1 g）が得られた。本物質は、無味無臭で、水に対する透析でその内液に残り、抗菌性物質がタンパク質と結合した形で存在し、水溶性であるので、水溶性抗菌性物質として用途範囲が広いことが示された。
3. 種々の食品成分がパプリカ果実抽出物の抗菌活性に及ぼす影響を調べた。ゼラチン、グルコース、砂糖、乳化剤、ラード、寒天、キサンタンガム、プルランは抗菌活性影響しないが、牛乳と卵白、卵黄は抗菌力を弱めた。
4. パプリカ果実抽出物は酵母以外の微生物に対して抗菌性を持たないので、乳酸菌および各種細菌に対する抗菌性を付加した抗菌剤を調製することを試みた。その結果、パプリカ果実抽出物15%、アジピン酸18%、酢酸ナトリウム48%、フマル酸10%、フマル酸一ナトリウム9%を混合して製剤化した抗菌剤が、ワイン酵母、パン酵母、産膜酵母だけでなく、枯草菌、ブドウ状球菌、大腸菌、サルモネラ菌、乳酸菌、青カビにも抗菌性を示し、広い抗菌スペクトルを有することが分かった。
5. この抗菌剤を用いて、ポテトサラダ、肉団子、たくあん調味液、白菜の浅漬け、焼肉のたれ、めんつゆ、イカの生珍味、塩辛、あんこ、ソース、ハンバーグの保存試験を行った結果、効果的な日持ち延長効果が認められ、実用性も確認できた。
6. この抗菌剤は「アジナンバー201」という商品名で発売され、国内のみならず近隣諸国の加工食品業界でも使われ、食品の安全性と経済性の向上に役立っている。

総 括

本研究は安全で有用な食品用の抗菌性物質の開発を目的とした研究である。著者は人類の経験則や学術文献に基づいて抗菌性物質が含まれている可能性が高く、しかも商業ベースで入手できる植物資源として香辛料に着目し、これらを中心に抗菌性物質の探索研究を行なったところ、パプリカ種子抽出物および果実抽出物が食品保存剤（日持ち向上剤）として有力な物質であることを見つけた。

これまでに香辛料の抗菌性に関する多くの研究がなされてきたが、パプリカにも抗菌性のあることがわかっており、その抗菌性を発現する物質の一つにカプサイシンが知られている。しかしカプサイシンは強い辛味を持ち添加できる食品はかなり限定されてしまう。パプリカに辛味成分以外の抗菌性物質が存在するならば、これを利用した汎用性の高い食品保存剤の開発が可能となる。

著者はパプリカ種子および果実より、水あるいは含水エタノールを用いた抽出物が酵母の生育を特異的に阻害し、細菌やカビにはほとんど作用しないことを見いだした。また本抽出物は水に易溶なこと、芳香や呈味がなく、その凍結乾燥物は無色であることなど食品添加物として利用するうえで極めて有利な特徴を有していた。

パプリカ種子抽出物中の抗菌性物質の同定と作用機作の解明

本論文ではまず、パプリカ種子抽出物の抗菌性画分を精製しアクティブの同定と作用機作の解明を行なった。

パプリカ種子の 50%エタノール抽出物（パプリカ種子抽出物）は、酵母に対して強い抗菌性を示したがカビやバクテリアには効果がなかった。酵母に対する最小発育阻止濃度（MIC）は酵母種によって異なるが、大部分の酵母に対するパプリカ種子抽出物の MIC は約 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

パプリカ種子抽出物を Sephadex G-50 クロマトグラフィーで分別すると抗菌性を示す画分は V_0 に、その画分をさらに Sephadex G-200 クロマトグラフィーで分別すると、 V_0 と V_i の間に抗菌活性が溶出した。後者で得られた抗菌性画分の MIC は約 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

パプリカ種子抽出物を逆相 ODS オープンカラムに吸着させ、60%エタノールで溶出すると高い抗菌活性をもつ画分が得られた。この画分をさらに逆相（ $\mu\text{Bondasphere C}_{18}$ ）HPLC で分離精製し、10 個の抗菌性を示すピークを得、薄層クロマトグラフィーで純度を検定した結果、いずれも均一と認められた。これらの MIC は 0.3~5.2 mg/L であった。そのなかで最も大きなピーク 4 は、 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1-3)}\}\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1-3)}\text{-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1-2)}]\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1-4)}\text{-}\beta\text{-D-galactopyrano-}$

syl }-2 α -hydroxyl-(25R)-5 α -spirostane の構造と決定された。

本物質は、サポニン的一种で、ギトゲニン配糖体であり、酵母の生育を特異的に阻害することがはじめて見出された。

パブリカ種子抗菌性物質に感受性を示す *S. cerevisiae* W-3 と比較的低い感受性の *C. krusei* RIFY YTd3 を用いて、抗菌性物質の作用機作を検討した。抗菌性物質を添加した培地中の *S. cerevisiae* を光学顕微鏡で観察したところ、細胞は萎縮し、凝集を起こしていた。定常期よりも対数増殖期の酵母細胞のほうが抗菌性物質に対して感受性があった。本物質の抗菌性は、pH の変化で変動せず、熱に安定であった。

抗菌性物質に高い感受性の *S. cerevisiae* W-3 と低い感受性の *C. krusei* RIFY YTd3 を細胞壁溶解酵素であるザイモリアーゼで処理した結果、前者のほうがより溶解し、細胞のバーストがより多く見られた。ザイモリアーゼ処理後に細胞壁から遊離したタンパク質と多糖量は、*S. cerevisiae* のほうが *C. krusei* よりも多かった。ザイモリアーゼ処理細胞を用いて、細胞壁タンパク質と牛血清アルブミンが本抗菌性物質の抗菌活性に与える影響を調べた結果、両タンパク質は抗菌性物質に結合し、抗菌力を弱めたと考えられた。

このことは本抗菌性物質が酵母細胞壁のマノプロテインに吸着し、細胞壁の膜透過性を変えて抗菌性を発現させている可能性を示唆していた。

ザイモリアーゼより -1,3-グルカナーゼとプロテアーゼを分離し、それぞれを二つの酵母細胞に作用させた。その結果、プロテアーゼ処理しても両酵母細胞は溶解しないが、プロテアーゼ処理後に抗菌性物質を添加すると細胞の溶解が速まり、低感受性菌 *C. krusei* でも速やかな生育阻止および細胞溶解が起こった。すなわち、酵母細胞壁のマノプロテイン層がプロテアーゼで分解され、細胞壁の透過性が増し、抗菌性物質が細胞壁を通過(ギトゲニンの界面活性作用)しやすくなり、菌の死滅が起こったと考えられた。

結論として、本物質の抗菌作用機作は、パブリカ種子抗菌性物質の *S. cerevisiae* に対する MIC が数 $\mu\text{g/ml}$ という少量であることから、酵母細胞壁への吸着作用と界面活性作用が膜透過性を高めていることにあると考察した。

パブリカ種子抽出物の食品保存料としての基礎的研究

新しい保存料(抗菌性物質)の開発の困難さの一つに、*in vitro*(試験管実験)で効果があっても *in vivo*(実際の食品系)では著しく抗菌力が低下したり、あるいは全く抗菌性を示さないことがある。頻繁に起こる例として、食品中の微生物のタイプとレベルによって抗菌力が変動すること、食品の物理的性質(pH など)に起因して抗菌性が変化すること、食品成分と抗菌性物質との反応による抗菌性物質の分解あるいは吸着などによって抗菌力が低下することなどがある。これらの問題は全ての食品に対して一様に解決できるわ

けではなく、一つ一つの食品について種々の条件下で抗菌性物質の有効性をテストするしかない。特に、新規に開発した抗菌性物質は、多くの食品に実際に添加し、実用性を確認するしか方法がないのが現状である。

そこで、パプリカ種子抽出物が酵母に対して特異的に抗菌力を示すという特長を生かして、主に酵母が変敗の原因菌になっている食品の例として、ワインと梅漬けを取り上げ、それらの産膜酵母による変敗防止の検討を行なった。

まず、ワインから分離した産膜酵母 7 菌株 (*S. cerevisiae* 6 菌株および *Candida* sp. 1 菌株)、ワイン関連の産膜酵母標準 3 菌株、並びに梅漬けから分離した産膜酵母 5 菌株 (*Kloeckera* 1 菌株、*Pichia* 2 菌株、*Debaryomyces* 1 菌株、*Candida* sp. 1 菌株) に対するパプリカ種子抽出物および比較対照として亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩、酢酸の抗菌性を検討した。

ワインから分離した 7 菌株および *Candida krusei* (RIFY Ytd3) を除いた保存産膜酵母 2 菌株 (*S. cerevisiae* RIFY 3012 と *Candida vini* RIFY 2024) のいずれに対してもパプリカ種子抽出物は高い抗菌性を示し、その MIC は 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、保存産膜酵母株、*C. krusei* RIFY FTd3 はパプリカ種子抽出物に対して弱い感受性しか示さず、亜硫酸には感受性を示し、その MIC は 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。パプリカ種子抽出物に対して耐性が弱い標準株 *Candida vini* (RIFY 2024) は、ソルビン酸および亜硫酸に対する MIC が 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高く、菌株により特徴ある生育抑制効果が認められた。

梅漬けから分離した産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物とその他の 4 種の添加物 (亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩および酢酸) の抗菌性試験を行った結果、塩蔵中の異なった時点で分離された産膜酵母のうちの 4 種、5 菌株に対して抗菌性が認められた。*Kloeckera apiculata* 203 の生育はパプリカ種子抗菌性物質 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で阻止され、その他の 3 酵母の生育は 100 mg/L で阻止された。亜硫酸、ソルビン酸、チアミンラウリル硫酸塩および酢酸は、それぞれ 3.1 ~ 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3000 ~ 7000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で産膜酵母の生育を阻止した。亜硫酸とチアミンラウリル硫酸塩の MIC は、パプリカ種子抽出物の MIC よりも低いが、ソルビン酸のそれは 5 種の酵母菌株中の 2 つと同じであり、その他の 2 菌株より高かった。

ワインから分離した 5 種の産膜酵母菌株に対して、pH が低いほど、またエタノール濃度が高いほど、ソルビン酸および亜硫酸の MIC は低下したが、パプリカ種子抽出物の抗菌性に対する pH の影響は少なかった。梅漬けから分離した産膜酵母 *Pichia anomala* に対するパプリカ種子抽出物の抗菌性は、培地中の初発酵母菌数、温度、食塩濃度によって影響されたが、pH による変動は少なかった。

以上の結果、パプリカ種子抽出物は、ワインの製造や貯蔵時、また梅漬け製造中に発生

する産膜酵母の増殖を効果的に抑制し、汚染防止に効果的であることが分かった。

また、ワインフェノールであるコーヒー酸、*p*-クマール酸、あるいはシナム酸並びにワイン用添加物である亜硫酸、ソルビン酸とパプリカ種子抽出物とのワイン産膜酵母に対する併用効果を検討したが、相加効果、相乗効果ともに認められなかった。

パプリカ果実抽出物を用いた食品系での実用化試験

今まではパプリカ種子抽出物（50%エタノール抽出物）で研究を進めてきたが、パプリカの抽出原料としてパプリカ果実（粉碎物）の超臨界炭酸ガス抽出残渣が工業的に入手可能となり、予め脂溶性物質が除かれていて、水抽出に有利なこの原料を用いてパプリカ果実抽出物の調製と食品系での実用化試験を行なった。

すなわち、パプリカ果実の超臨界炭酸ガス抽出残渣（100g）を40℃、24時間水抽出し、抽出液を凍結乾燥して25gの粉末を得た。これをアンバーライト XAD-7 クロマトグラフィーで分離すると産膜酵母に対するMICが200 µg/mLの抗菌性画分（パプリカ果実抽出物）1.1gが得られた。本物質は、無味無臭で、水に対する透析でその内液に残り、抗菌性物質がタンパク質と結合した形で存在し、水溶性であった。

そこで、パプリカ果実抽出物と有機酸および有機酸塩を組み合わせ、抗菌スペクトルの広い食品保存剤（製剤）を調製し、実際の食品系で実用化試験を行なった。

まず、種々の食品成分がパプリカ果実抽出物の抗菌活性に及ぼす影響を調べたところ、ゼラチン、グルコース、砂糖、乳化剤、ラード、寒天、キサンタンガム、ブルランは抗菌活性に影響しないが、牛乳と卵白、卵黄は抗菌力を弱めた。

パプリカ果実抽出物は酵母以外の微生物に対して抗菌性を持たないので、乳酸菌および各種細菌に対する抗菌性を付加した抗菌製剤の調製を試みた。その結果、パプリカ果実抽出物15%、アジピン酸18%、酢酸ナトリウム48%、フマル酸10%、フマル酸一ナトリウム9%を混合して製剤化した抗菌製剤が、ワイン酵母、パン酵母、産膜酵母だけでなく、枯草菌、ブドウ状球菌、大腸菌、サルモネラ菌、乳酸菌、青カビにも抗菌性を示し、広い抗菌スペクトルを有すること分かった。

この抗菌製剤を用いて、ポテトサラダ、肉団子、たくあん調味液、白菜の浅漬け、焼肉のたれ、めんつゆ、イカの生珍味、塩辛、餡、ソース、ハンバーグの保存試験を行った結果、それぞれの対象について効果的な日持ち延長効果が認められ、実用性が証明された。

おわりに

昭和 47 年（1972 年）に日本酒の防腐剤サリチル酸が禁止になったが、著者はその前からサリチル酸代替品の研究を始めていた。そして卵白リゾチームが清酒の火落菌に対して抗菌作用を示すことを見つけ、清酒、みりんの保存剤としてのリゾチームの用途を開発した（矢嶋、日高、松岡、1968；矢嶋、日高、松岡、1971）。この研究は日本のみならず世界における天然保存剤研究の先駆けとなった。

著者はそれ以来「安全で有用な天然保存剤」の開発をテーマにして素材のスクリーニングと基礎研究、商品化研究を行ない、リゾチーム、メラノイジン（メイラード反応生成物）、ペクチン分解物（オリゴガラクツロン酸）、プロタミン（サケ白子たんぱく）、ホップ抽出物（キサントフモル）、バクテリオシン（乳酸菌由来）、パプリカ抽出物等を開発することができた。これらの素材は天然保存料、日持ち向上剤として商品化され、世間で高い評価を得て現在広く市場に流通している。また、いずれの素材も特許品（製法、用途）になっており会社の業績に大きく貢献している。

本論文では、パプリカ種子から新規の抗菌性物質を分離し、物質の構造を決定し、作用機作を解明した。

パプリカ種子抽出物の食品製造への応用として、ワインと梅漬物の産膜酵母による変敗防止について検討し、良い結果が得られた。

また、パプリカ果実抽出物は、有機酸および有機酸塩と組み合わせることにより、抗菌スペクトルが広がり、漬物、液体調味料、水産珍味、あん、ハンバーグ等の保存剤として幅広い応用面の開発ができた。

これらパプリカ抽出物の今後の展開として、ワイン醸造への応用や梅漬物への普及拡大を図っていきたい。また、パプリカ抽出物製剤の加工食品への応用についても一段と明るい展望を持っている。即ち、現今、コンビニエンスストア（CVS）における弁当惣菜類の流通量は年間数百万トンあると言われている。平成 13 年の秋に CVS トップのセブンイレブンが消費者重視の立場から保存料（食品衛生法でいう）不使用の方針を打ち出し、2 位以下の CVS も同調した。パプリカ抽出物は消費者に与える安心イメージの高いことから、保存料代替品として CVS での採用が増えてきている。具体的には、本論文で研究した組み合わせ製剤「アジナンバー201」などが弁当惣菜おにぎりなどに保存の目的で使われている。

ところで、理想的な食品添加物像として考えられることは、1) 人類の長い食経験があり、かつ日常よく食するものから抽出されているもの、2) 味や臭いや色等のくせの少ない

もの、3)生理活性が無いもの、4)資源として集めやすい原料由来のもの、 などであろう。これらの点に照らし合わせてみても、パプリカ抽出物は理想的な食品添加物であると考えられる。

21世紀の日本のキーワードは「安心」「安全」といわれている。天然食品添加物の開発は食の面からこの安心、安全に貢献できると思われる。

「微生物との戦い」は食品加工にとって永遠の課題であり、「安全で有用」な天然食品添加物の開発をこれまで以上に努めてゆきたいと考えている。

謝 辞

本論文について種々の有益なご助言と御校閲を賜った筑波大学応用生物化学系田中秀夫教授に心から感謝の意を表します。

また、博士論文の作成にあたりましては、同大学同学系教授小澤哲夫博士、同教授内山裕夫博士および向高裕邦博士に多大な御教示を賜りました。ここに、厚く御礼申し上げます。

また本研究について終始懇切なるご指導、ご助言と御高閲を賜った山梨大学ワイン科学センター機能成分学研究部門横塚弘毅教授に衷心より感謝申し上げますとともに、抗菌性物質の分離精製並びに物質の同定に関してご助言を頂いた山梨大学ワイン科学センタ 果実遺伝子工学研究部門高柳勉助教に心から謝意を表します。

さらに本研究の推進にあたりご鞭撻を頂いたアサマ化成株式会社代表取締役中島智恭氏に深く感謝申し上げます。

文 献

天野義文，中村和夫，加賀美元男，後藤昭二：シンナム酸ソーダによるワイン産膜酵母の増殖阻害．山梨大発研報告，17: 37-46，1982.

Amerine, M. A. and C. S. Ough: Wine and must analysis, p. 81, John Wiley & Sons. New York, 1974.

Baranowski, J. D., P. M. Davidson, C. W. Nagel and A. L. Branen: Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. J. Food Sci. 45: 592-594, 1980.

Beucaht, L. R. and D. A. Golden: Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol. 43:134-142, 1989.

Bitter, T., and R. Ewins: Modified carbazole reaction for uronic acids. Biochem. J. 81:p 43, 1961.

Buchanan, R. L. and A. J. Shepherd: Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. J. Food Sci. 46:976-977, 1981.

Bullerman, L. B., F. Y. Lieu, and S. A. Seier: Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. J. Food Sci. 42:1107-1109, 1977.

Cavallito, C. J. and J. H. Bailey: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. J. Am. Chem. Soc. 66:1950-1951, 1944.

Cavallito, C. J., J. H., Bailey, and J. S. Buck: The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and essential oil of garlic. J. Am. Chem. Soc. 67:1032-1033, 1945.

Conner, D. E.: Inhibitory effects of essential oils and oleoresins from plants on food spoilage yeasts. M. S. thesis, University of Georgia, Athens. 1983.

Conner, D. E. and L. R. Beuchat: Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* 49: 429-434, 1984a.

Conner, D. E. and L. R. Beuchat: Inhibitory effect of plant oleoresins on yeasts. In *Microbial Associations and Interactions in Food*, edited by I. Kiss, T. Deak, and K. Incze, Hungarian Academy Science of Budapest, pp. 447-451, 1984b.

Conner, D. E. and L. R. Beuchat: Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 229-233, 1984c.

Conner, D. E. and L. R. Beuchat: Recovery of heat-stressed yeasts in media containing plant oleoresins. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 49-55, 1985.

Davidson, P. M. and A. L. Branen: Antimicrobial activity on non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Prot.* 44: 623-632, 1981.

De Rosa, T., G. Margheri, I. Moret, G. Scarponi, and G. Versini: Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. Its efficacy and adverse flavor effect associated with ethyl sorbate formation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34: 98-102, 1983.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356, 1956.

Gál, I. E.: Kapszicin antibakteriális hatására vonatkozó vizsgálatok. *Elelmiszervizsgalati Közlem.* 15: 80-84, 1969.

Hardy, M. R., R. R. Townsend, and R. R. Lee: Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric

detection. Anal. Biochem., 170: 54-62, 1988.

Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sasaki, and H. Kurata,: Inhibitory effects of spices on the growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 39: 818-822, 1980.

Horwitz, W.: (ed.) AOAC 12th ed. pp 927-928. Method 47.021. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1975.

Huhtanen, C. N.,: Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. J. Food Prot. 43: 195-196, 1980.

伊藤 均、Meixu, G. : 香辛料抽出物の微生物増殖抑制と照射の影響. 食品照射、29: 1-7, 1984.

Jain, D. C: Gitogenin-3-O- -D-laminaribioside from the aerial part of *Agave cotntala*. Phytochemistry, 26: 1789-1790, 1987.

加藤信行、芝崎 勲 : 脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用力の比較、発酵工学雑誌、53: 793-801, 1975.

Kitamura, K.: Re-examination of Zymolyase purification. Agr. Biol. Chem. 46: 963-969, 1982.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. Biol. Chem. 198: 265-275, 1951.

松田敏生: 食品微生物制御の化学、幸書房 (東京)、 p 8、1998.

Mimaki, Y., T. Kanmoto, M. Kuroda, Y. Sashida, Y. Satomi, A. Nishino, and H. Nishino: Steroid saponins from *Hosta longipes* and their inhibitory activity on tumor promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells.

Phytochemistry, 42: 1065-1070, 1996.

茂利 昭：公開特許公報 平 4-144664 .

Nomoto, M., Y. Narahashi, and Y. Niikawa.: Studies on the antimicrobial action of sorbic acid. - The effect of medium pH on its inhibitory power. J.Agric. Chem. Soc.Jpn. 29: 805-809, 1955.

Nychas, G. J. E.: New Methods of Food Preservation(Chapman and Hall) ,p. 58, 1995.

恩田 匠、乙黒親男、飯野修一、後藤昭二：梅加工品から分離した産膜酵母の同定とその性状、日本食品科学工学会誌. 44: 407-417, 1997a.

恩田匠、乙黒親男、飯野修一、後藤昭二：梅漬塩蔵中の変敗原因となる産膜酵母の発生機構の解析. 日本食品科学工学会誌、44: 463-469, 1997b.

Ough, C. S.: Winemaking Basics. pp. 94-103, 183-185, 280-281, Food Products Press, An Imprint of the Haworth Press, Inc. New York, 1992.

Pitt, J. I: Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. Food Technol. Aust. 26, 238-241, 1974.

Sauvaire, Y., G. Ribes, J. C. Baccou, and M. M. Loubatieeres-Mariani: Implication of steroid saponins and saponigens in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. Lipids, 26: 191-197, 1991.

Singleton, V. L. and P. Esau.: Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. Adv. Food Res. Sup. 1, pp. 122-131, 159-166, Academic Press, New York, 1969.

Slinkard, K. and V. L. Singleton: Total phenol analysis: automation and

composition with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 20, 86-91, 1977.

下飯仁、飯村穰：酵母細胞表層糖鎖の操作技術の研究.大蔵省国税庁醸造研究所報告 2002

Sofos, J. N. and F. F. Busta: Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* 44: 614-621, 1981.

Takayanagi, T., A.Kimura, S.Chiba, and K.Ajisaka: Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing β -D-galactofuranosyl linkage in *Aspergillus niger* β -D-galactosidase. *Carbohydr. Res.* 256: 149-158, 1994.

棚橋博史：ワイン中の多糖類の起源とその役割、化学と生物、日本醸造協会雑誌、89: 524-529, 1994.

Uniyal, G. C., P. K. Agrawal, O. P. Sati, and R. S. Thakur: Agavieside C., a steroidal glycoside from *Agave cantala*. *Phytochemistry*, 30: 1336-1339, 1991.

Van Antwerp, C. L., H. Eggert, G. D. Meakins, J. O. Miners, and C. Djerassi: Additivity relationship in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of dihydroxy steroids. *J. Org. Chem.* 42: 789-793, 1997.

Yahara, S., T. Ura, C. Sakamoto, and T. Nohara: Steroid glycosides from *Capsicum annuum*. *Phytochemistry*, 37: 831-835, 1994.

矢嶋瑞夫、日高義雄、松岡芳隆：卵白リゾチームの清酒防腐剤としての利用研究、醗酵工学雑誌、46: 782, 1968.

矢嶋瑞夫、日高義雄、松岡芳隆：卵白リゾチームの清酒防腐剤としての利用研究（第二報）、醗酵工学雑誌、49: 693, 1971.

山本 泰、東 和男、好井久雄：酵母に対する酢酸の生育抑制作用、日本食品工業学会誌、31: 772-776, 1984.

柳田友道：微生物科学 2、成長、増殖、増殖阻害、p. 442、学会出版センター、東京、1985.

横塚 勇、後藤昭二：日本産葡萄酒産膜酵母に関する研究（第1報）有胞子産膜酵母の分類、農芸化学会誌、29: 39-41, 1955a.

横塚 勇、後藤昭二：日本産葡萄酒産膜酵母に関する研究（第2報）無胞子産膜酵母の分類、農芸化学会誌、29: 123-128, 1955b.

横塚弘毅：ワインの品質とフェノール化合物（総説）、日本食品工業科学会誌、42: 288-297, 1995.

横塚弘毅：醸造の基本技術 - ワイン製造（その2）、日本醸造協会誌、94: 956-965, 1999.

Werner-Washburne M., E.Braun, G.C.Johnston and R.A.Singer : Microbiol Rev. 57: 383-401 1993.

Wurdig, G., H. A. Schlotter, and E. Klein: Uber die Ursachen des sogenannten Geranientones. Allg. Deut. Weinfachztg. 110: 578-583, 1975.

Zlotnik, H., M. P. Fernandez, B. Bowers, and E. Cabib: *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. J. Bacteriol. 159: 1018-1026, 1984.

博士論文関連の業績一覧

Yajima M., T.Takayanagi, I.Matsuo and K.Yokotsuka: Isolation and structure of antimicrobial substances from paprika seeds. Food Sci. Technol. Res. 6: 99-101, 2000.

Yajima M., K.Nozaki, T.Takayanagi, C.Otoguro and K.Yokotsuka: Growth inhibition of film-forming yeasts during production of Ume-zuke(pickled Japanese apricots) by an antimicrobial fraction extracted from paprika seeds. Food Sci. Technol. Int. Tokyo, 4: 199-202, 1998.

矢嶋瑞夫、乙黒親男、松土俊秀、奥田徹、高柳勉、横塚弘毅：ワインから分離した産膜酵母に対するパプリカ種子抽出物の抗菌性、日本醸造協会誌、93: 671-676, 1998.

矢嶋瑞夫、野崎一彦、高柳勉、横塚弘毅：トウガラシの超臨界炭酸ガス抽出残液から抽出された抗菌画分の食品保存への利用、防菌防黴、25: 131-137, 1997.

Yajima M.,T.Takayanagi, K.Nozaki and K.Yokotsuka: Inhibitory effect of paprika seed extract on the growth of yeast. Food Sci. Technol. Int. 2: 234-238, 1996.