

## 大根おろしの殺菌効果について

江崎 秀男 ・ 小野崎 博通

Sterilizing Effect of Grated Radish

Hideo ESAKI and Hiromichi ONOZAKI

In the previous paper, it was shown that *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (TMBI), the main pungent principle in grated radish roots, had strong antimicrobial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*.

The present study was carried out to pursue the potentiality of the sterilizing effect of isothiocyanate, when grated radish was mixed with other foods such as fish, shellfish, chicken, etc.

Experiments with the following model were undertaken in practice. Each raw oyster was contaminated with the suspension of *Escherichia coli*. At first, the contaminated oyster was treated with allyl isothiocyanate (AI) with different concentration. A highly concentrated solution of AI exhibited the strong sterilizing effect against the contaminated oyster. Furthermore, fresh radish juice was prepared with "Miyashige Daikon" and kept at room temperature. Radish juice at regular intervals was used to determine the sterilizing effect. Fresh radish juice (TMBI conc. 0.22mM) showed 36% of sterilizing rate against the contaminated oyster.

From these results, it was presumed that grated fresh radish had the sterilizing effect on other mixed foods.

### 1. 緒 言

大根、ワサビ、マスタードなどの十字花科植物の組織をすりつぶしたり、その種子を水とともに捏ねると、強い香味を示すイソチオシアナート類が生成することは、古くからよく知られていることである。そしてこれらのイソチオシアナートは、香辛味を示すのみならず、種々の生理作用を有する点において興味もたれている。例えばマスタードは、古代より薬として、また食事の薬味として利用されてきた。このマスタードの名の由来は、すでに古代ローマ時代において、ラテン語の *mustum* (ぶどうなどの果実の搾汁液) にこのマスタードを防腐剤として混合することにより *mustum ardens* (辛いぶどう液) なる保存性の高い飲物を作っていたことによる<sup>1)</sup>。また近年マスタードは、唾液量の増加、アミラーゼ活性の上昇、胃液分泌の上昇、腸管運動の促進、利胆剤、*in vitro* における抗菌性、心拍量の増大、血圧上昇、局所的血管拡張、血小板数の低下、プラスミノーゲンの活性化などの作用を示すことが確認されている<sup>2)</sup>。

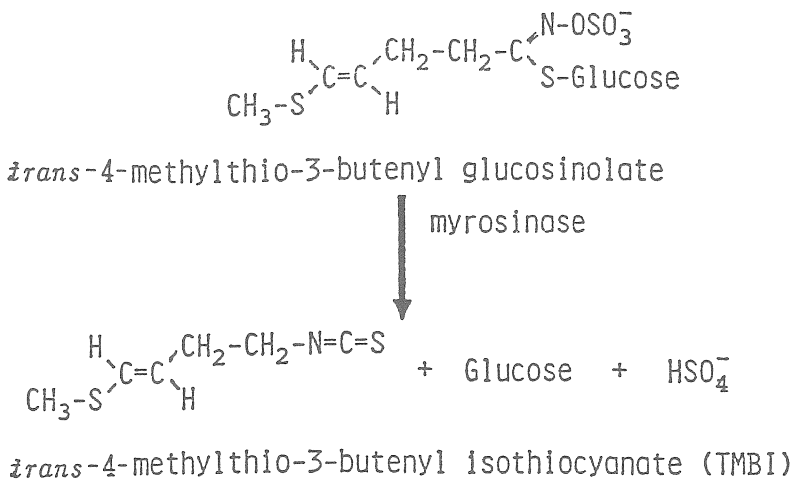
また、我国においても古くから魚毒を消すといわれて珍重されてきたワサビも、マスター

ドと同様に、食欲増進作用<sup>3)4)</sup>を有するとともに、コレラ菌、チフス菌、赤痢菌などに対して殺菌性（抗菌性）<sup>5)6)</sup>を示すことが報告されている。これらのマスタードやワサビの抗菌性は、辛味成分の前駆体（グルコシノレートといわれる配糖体の形で存在）が、共存する酵素ミロシナーゼの作用を受けてイソチオシアナートを生成し、<sup>7)8)</sup>これらのイソチオシアナートが強い抗菌性を示すためである。黒辛子、ワサビからはアリルイソチオシアナート（AI）が、また白辛子からは

-ヒドロキシルベンジルイソチオシアナートが主に生成され、これらが微生物を死滅させるのである。

ところで、大根の辛味の主成分もトランス-4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート（TMBI）であり、<sup>9)10)</sup>このイソチオシアナートも、大根組織の破壊とともに、前駆物質であるグルコシノレートよりミロシナーゼ作用により生成するものである（Scheme 1）ことを我々は認めた。<sup>11)</sup>著者らはさらにこの大根辛味成分の抗菌力について検討した結果、TMBIは、カビ、酵母、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌のいずれに対しても同様に抗菌性を示し、またその抗菌力は、同時に試験したエチル、アリル、ブチルおよびフェニルイソチオシアナートより強いものであることを報告した。<sup>12)</sup>

大根は、我国においても古くから親しまれ、煮物、漬け物のほか、生は、大根おろし、おろし和え、刺身のつま、酢のもの、サラダなどの形で利用されてきた。また、大根は食用のみならず、おろしたものは、カキ（牡蠣）のぬめりをとるために「カキのふり洗い」に利用されたり、<sup>13)</sup>塩ウニなどの渋味とあくをぬくためにも使用される。<sup>14)</sup>本実験においては、大根がおろしとして使用された場合、その中の辛味成分が、実際の食品に及ぼす殺菌（静菌）効果を、「カキのふり洗い」をモデルとして行うことにより、その有効性を検討することにした。



Scheme 1 Formation of pungent principle in radish roots

## 2. 実験方法

### 1) 供試菌

イソチオシアナートの殺菌力測定のための供試菌としては、前報<sup>12)</sup>にて使用した菌株の一つであるグラム陰性細菌 *Escherichia coli* (IFO 3806) を用いた。

### 2) 試薬および培地

試薬類は、特に記述しないかぎり市販の特級品を使用した。また、供試菌の斜面培養には普通寒天培地（栄研化学）を用い、殺菌力測定時におけるコロニー計数には大腸菌群検査用培地であるパールコア・デスオキシコーレイト培地（栄研化学）を利用した。

### 3) 殺菌リン酸緩衝希釈液の調製

生菌数測定のための希釈液は、「食品中の生菌数検査法」<sup>15)</sup> に準じて調製した。すなわち、リン酸 2 水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 34g を 500ml の蒸留水に溶解し、これに 1N の水酸化ナトリウム溶液 175ml を加え、全量を 1l とした (pH 7.2)。このリン酸緩衝原液は冷蔵庫にて保存し、使用時にこの原液 1 ml を蒸留水 800ml にて希釈し、高圧殺菌 (121℃, 15min) して用いた。

### 4) 供試菌懸濁液の調製

生ガキ汚染のための供試菌は、保存菌株である *E. coli* を普通寒天培地に接種し、37℃ で 20 時間培養したものを使用した。この斜面培養試験管に上記の殺菌リン酸緩衝希釈液 5 ml を入れ、菌体を十分に攪拌することにより均一な懸濁液を得た。この懸濁液の一部をとり、さらに殺菌リン酸緩衝希釈液にて  $5 \times 10^4$  倍希釈して供試菌懸濁液とした。

### 5) アリルイソチオシアナートの殺菌力測定

カキは、生食用の新鮮なものをスーパーにて購入し、無菌的な環境下で重量を測定することにより、できるかぎり同一重量 (± 5%) のものを実験試料に供した。一検体の生ガキをそれぞれ、ビーカーに入れ、十分に冷却した供試菌 (*E. coli*) 懸濁液を 60ml ずつ加え、時々攪拌しながら低温で 10 分間放置した。その後、この汚染ガキをビーカーの器壁で 20 回ずつたたいて余分の懸濁液をとり除き、殺菌済 100ml 容ビーカーに移し 2℃ にて放置した。

他方、アリルイソチオシアナート (AI) 試料溶液は次のように調製した。まず、市販の AI (東京化成) 0.1ml を殺菌済の 0.02% Tween 80 溶液 200ml に攪拌しながら滴下した。次にこの AI 溶液を NO.101ろ紙 (Toyo Roshi Co., LTD) にてろ過することにより殺菌力測定のための試料溶液を調製した。この AI 試料溶液の 20ml は、先に準備した汚染ガキ (100ml 容ビーカー中) に加え、時々攪拌しながら室温に 2 時間放置した。また、AI 試料溶液の一部は同時に AI 含量の測定に使用した。残りの AI 試料溶液は、マグネチックスターラーにて攪拌を続け、一定時間毎に同様の実験を行った。2 時間後、100ml 容ビーカー中の汚染ガキおよび AI 溶液を殺菌済のホモジナイザー用のカップに移し、ビーカーも 50ml の殺菌リン酸緩衝希釈液にて洗浄し、その洗液もカップに合わせた。ホモジナイザーにて十分に均質化した<sup>15)</sup> 後、このホモジネート 1 ml を殺菌シャーレに移し、ここに加温溶解した

デスオキシコーレイト培地 9 ml を加え十分に混合した。冷却凝固した平板プレートは、倒置して 37℃ で 18 時間培養した後、生成したコロニー数をカウントした。また、AI 試料溶液 20 ml の代わりに、同時に、0.02% Tween 80 溶液 20 ml を汚染ガキに加えることにより対照実験を行った。

#### 6) 大根搾汁液の殺菌力測定

大根搾汁液は市販の宮重大根よりジュースにて調製した。AI の殺菌力測定の場合と同様の方法で、一定時間毎にその殺菌力および TMBI 含量を測定した。ただし、大根搾汁液は攪拌をしないで室温に放置したものを使用した。なお、対照実験としては、大根搾汁液 20 ml の代わりに殺菌リン酸緩衝希釈液 20 ml を汚染ガキに加えた。

#### 7) イソチオシアナート量の測定

AI および大根搾汁液の殺菌力を測定する場合には、同時に、試料溶液中の AI 量および大根辛味 (TMBI) 量を改良グロート試薬による比色定量法<sup>16)</sup>にて測定した。すなわち、試料溶液 10 ml にエタノール:28%アンモニア水 (1:1, v/v) 混液 20 ml を加え、密封して 30℃ で一夜放置することによってチオウレア化を行った。反応液は減圧乾固した後、一定量の 75% エタノールに溶解し、その 1 ml に改良グロート試薬 4 ml を加えた。37℃ にて 45 分間インキュベートした後、600 nm における吸光度を測定した。同時に測定したアリルチオウレアおよびトランス-4-メチルチオ-3-ブテニルチオウレアの標準曲線より、それぞれのチオウレア量を求めた。次にイソチオシアナート量に換算することにより、試料溶液中の AI および TMBI 含量を求めた。

### 3. 結 果

#### 1) アリルイソチオシアナートの汚染ガキに及ぼす殺菌効果

先ず、*E. coli* で汚染された汚染ガキに及ぼす AI の殺菌効果について検討した。新鮮な AI 溶液 (放置時間 0 分) にて汚染ガキを処理し、供試菌の生存率と同時にその際に使用した AI 溶液中の AI 含量を測定した。AI 溶液はマグネチックスターラーにて攪拌しながら室温に放置し、AI 溶液調製後、30 分、60 分および 90 分後に処理した時の供試菌の生存率および AI 含量を測定した。一定時間毎の AI 含量 (AI モル濃度) の変化を Fig. 1 の (A) に、生存率の変化を Fig. 1 の (B) に示した。なお、この場合の生存率は、汚染ガキに AI 溶液の代わりに Tween 80 溶液を加えた対照実験より得られた *E. coli* のコロニー数を 100% として表わした場合の比率である。すなわち、生存率が低い数値を示すほど、AI 溶液が強い殺菌力 (静菌力) を有していることになる。

Fig. 1 から明らかなように、新鮮な AI 溶液においては、*E. coli* の生存率が 22% であったので、逆にその殺菌率は 78% となる。この場合の AI 濃度は 5.6 mM であった。攪拌を続けた AI 溶液の 30 分後の AI 濃度は 4.1 mM で、その殺菌率は 55% に低下した。その後、60 分、90 分と時間が経過するとともに、AI 濃度はさらに減少し、その殺菌率も低下していった。90 分後の AI 濃度 0.5 mM においては、殺菌効果はほとんど観察されなかった。

大根おろしの殺菌効果について

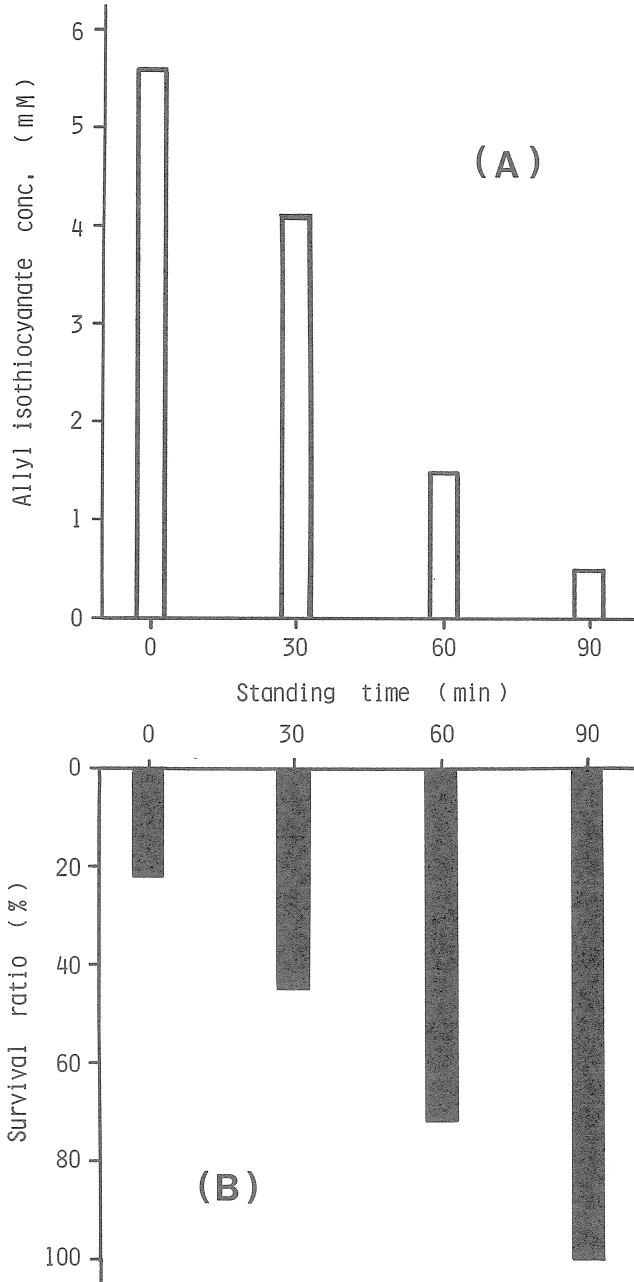


Fig. 1. Sterilizing effect of allyl isothiocyanate on contaminated oyster with *E. coli*

(A) : Content of allyl isothiocyanate at regular intervals

(B) : Survival ratio of *E. coli*

$$\text{Survival ratio (\%)} = \frac{\text{the number of colonies formed from contaminated oyster treated with allyl isothiocyanate}}{\text{the number of colonies formed from contaminated oyster treated without allyl isothiocyanate}} \times 100$$

## 2) 大根搾汁液の汚染ガキに及ぼす殺菌効果

新鮮な大根搾汁液を調製し、先の AI による実験と同様なことを行った。ただし、搾汁液は攪拌せずに一定時間毎にその殺菌力および大根辛味量 (TMBI モル濃度) を測定した。これらの結果を Fig. 2 の (A) および (B) に示した。(B) における生存率は、汚染ガキに大根搾汁液の代わりに殺菌リン酸緩衝希釈液を加えた場合の対照実験より得られた *E. coli* のコロニー数を100%として表わした数値である。

搾汁直後 (放置時間 0 分) の大根搾汁液においては、*E. coli* の生存率は64%であったので、逆に殺菌率は36%となった。また、この時の大根搾汁液の辛味量は、TMBI 濃度にして0.22mM であった。大根搾汁液も室温に放置すると、TMBI 濃度が減少するとともに、汚染ガキの *E. coli* の生存率は上昇していった。すなわち、殺菌力の低下が認められた。

## 4. 考 察

大根辛味の主成分はトランス-4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート (TMBI) であり、<sup>10)</sup> この物質は、大根をすりおろしたり、組織を破壊することによって生成する。この TMBI は分子中にイソチオシアナート (-N=C=S) 構造を有していて、わさびなどに存在するアリルイソチオシアナート (AI) と同様に強い抗菌作用を示すことを著者らは先に報告した。<sup>12)</sup> 一般に-NCS 基の炭素原子は、求電子試薬として作用するために反応性に富んでおり、アミノ基や SH 基と反応しやすいので、タンパク質や酵素中のこれらの基と反応して結合する可能性は極めて大きい。これがイソチオシアナート構造を有する物質が抗菌性を示す理由であるといわれている。<sup>17)</sup>

ところで、この大根おろしは、「種々の酵素を豊富に含むため、食物の消化を助ける」という理由で、そのまま大根おろしとして食されるほかにも、魚介類をはじめとする様々な食品とのおろし和えとして利用されている。大根おろし中のジアスターゼは消化を助け、またプロテアーゼは和えものの組織を軟化させてくれる。しかしながら、このおろし中の辛味成分が殺菌性の面から果たす役割については全く報告例もない。また、「カキのふり洗い」や「塩ウニのあく抜き」などにおける殺菌効果についても同様である。本実験においては、この大根おろし中の辛味成分が、食品中の汚染微生物に対して殺菌効果を示すか否かを「カキのふり洗い」実験を通して検討した。

一般にカキは、殻からとり出しても1~2日間は生きており、その新鮮なものは一種特有の味となめらかな食感を有するため生食される場合が多い。<sup>18)</sup> しかし、カキは多量の海水を体内にとり入れることによって餌を捕食しているので、高レベルのマイクロフローラが生息し、<sup>19)20)</sup> その中には好冷腐敗菌も多く存在し、これが、カキのシェルフ・ライフを縮少している理由でもありといわれている。<sup>21)</sup>

佐藤<sup>22)</sup> は、我国における市販の食肉およびカキにおける病原大腸菌の分布を調べ、カキが最も高い比率 (31.6%) でこの大腸菌によって汚染されている事実を報告した。また小久保ら<sup>23)</sup> は、主として東京都中央卸市場に入荷した生ガキの大腸菌汚染状況を EC テストによりチェックし、分離された大腸菌については、エンテロトキシン産生能の有無を調べた。その結果、食品衛生法に基づく基準値 (生食用カキの大腸菌数230/100g) を上回るものが検体中9.6%あり、この中には数こそ少ないが、エンテロトキシン産生性の大腸

大根おろしの殺菌効果について

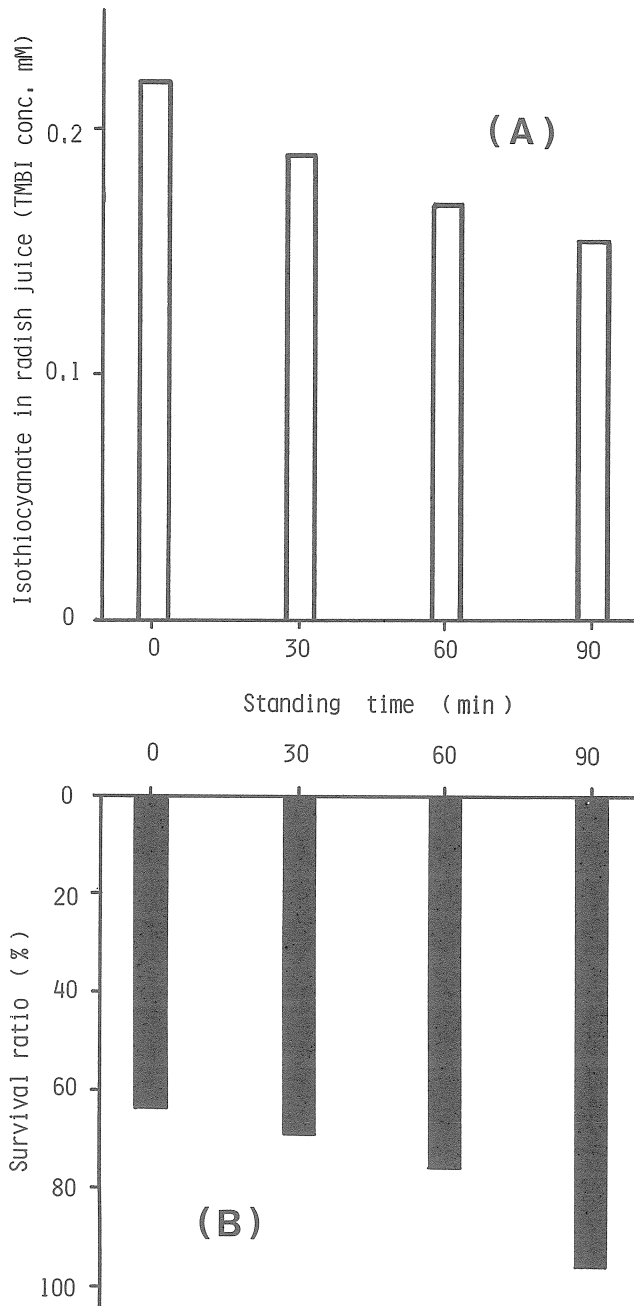


Fig. 2. Sterilizing effect of radish juice on contaminated oyster with *E. coli*

(A) : Content of *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (TMBI) at regular intervals

(B) : Survival ratio of *E. coli*

$$\text{Survival ratio (\%)} = \frac{\text{the number of colonies formed from contaminated oyster treated with radish juice}}{\text{the number of colonies formed from contaminated oyster treated without radish juice}} \times 100$$

菌も存在していた。

大根中の辛味成分が、これらの汚染された生ガキ中の微生物に対してどのような影響を及ぼすかは、極めて興味ある課題である。しかしながら、同一菌種で、同一程度に汚染された生ガキを実験用の試料として準備するのは、非常に難しいことが予測される。そこで本実験においては、新鮮な生ガキを *E. coli* にて人為的に汚染させ、この汚染ガキに対するイソチオシアナートの殺菌効果を検討することにした。

まず、AI の殺菌効果の有効性を検討した。イソチオシアナート類は、一般に揮発性が強く、また水の中では不安定であるので、<sup>17)</sup> 経時的に AI 含量を測定すると同時に、汚染ガキへの殺菌効力を調べた。AI は油溶性成分であるので、溶解性を高めるために界面活性剤である Tween 80 を利用し、また短時間における AI 濃度の顕著な変化を生じさせるために、AI 試料溶液については連続的に攪拌し続けた。Fig. 1 の (A) から明らかなように、AI 濃度は、調製直後、30分後、60分後および90分後において、それぞれ 5.6mM、4.1mM、1.5mM および 0.5mM を示した。これらの AI 濃度の異なる試料溶液を用いて汚染ガキの *E. coli* 生存率を測定したところ、Fig. 1 の (B) に示されるように、調製直後の AI 溶液 (AI 濃度 5.6mM) においては生存率が 22% となった。従って殺菌率は 78% となる。また、30分、60分と放置時間が経過すると、試料溶液中の AI 含量が低下するために、その殺菌効果も著しく減少した。90分後の 0.5mM においては、殺菌効果はほとんど認められなかった。

次に、実際に大根おろしを調製して、一定時間毎に大根おろし中のイソチオシアナート含量を既報<sup>11)</sup> に準じて測定すると同時に、カキを汚染している *E. coli* の殺菌効果を検討した。おろし中のイソチオシアナート含量は経時的に減少したが、汚染ガキの殺菌効果における実験においてはバラツキの多い結果を得ることになった。この原因は明らかでないが、例えば、大根おろしと汚染ガキを「カキのふり洗い」を想定してガラス棒にて十分に攪拌した後、カキをおろしよりとり出してその生存率を測定したが、この場合、カキの表面のぬめりの除去率が一様でなかったことが推察される。従って、カキ表面のぬめり上に、汚染させた *E. coli* の多くが附着しておれば、バラツキの原因となることが十分に考察される。また、汚染ガキより一様に大根おろしをとり除くことも難しかったように考えられる。

そこで、これらのバラツキの問題を解消するために、大根おろしの代わりに大根搾汁液を用いて、AI の殺菌効果を測定した場合と同様の方法で大根辛味成分の殺菌効果を調べた。Fig. 2 の (A) (B) に示されるように、大根搾汁液においても、搾汁直後のジュースを使用した場合には殺菌率 36% 程度の殺菌効果を示した。また、この大根搾汁液中のイソチオシアナートも、揮発性が強く水中で不安定であるので、<sup>12)</sup> 時間の経過とともに TMBI 濃度も減少し、その殺菌効果も低下していった。なお、本実験に用いた大根の搾汁液には、0.2mM 程度の低い含量の TMBI が含まれていたが、著者らがこれまでに定量してきた大根の辛味量<sup>11)16)</sup> は一般的にこれより 3~8 倍 TMBI 含量の高いものであった。

以上の実験結果より、古くから生活の知恵としてカキのぬめりをとり除くために行われてきた「大根おろしによるカキのふり洗い」は、殺菌性という食品衛生学的見地からも有効であることが考察される。また、新鮮な大根おろしが、魚介類などのおろし和えに利用された場合においても、殺菌 (静菌) 効果は十分に期待できるのではないだろうか。この点については、さらに今後の課題としたい。



## 5. 要 約

大根おろし中の辛味成分であるイソチオシアナートが、実際の食品に及ぼす殺菌（静菌）効果を、「カキのふり洗い」をモデルとした実験を行うことにより、その有効性を検討した。

まず、*Escherichia coli* にて汚染させた生ガキに対するアリルイソチオシアナート（AI）の殺菌効果を調べたところ、AI濃度5.6mM、4.1mM、1.5mMおよび0.5mMにおいて、殺菌率は、それぞれ78%、55%、28%および0%であった。

次に、市販大根より搾汁液を調製し、汚染生ガキに対する殺菌効果を経時的に測定した。また同時に、搾汁液中の辛味成分（TMBI）の定量も行った。その結果、新鮮な大根搾汁液（TMBI濃度0.22mM）においては、殺菌率36%程度の殺菌効果を示した。また、搾汁液中の辛味成分は時間の経過とともに減少し、その殺菌効果もそれに比例して低下した。

以上の結果より、大根おろしが「カキのふり洗い」や魚介類などのおろし和えに利用された場合、殺菌、或いは静菌効果が十分に期待できると考えられる。そしてその殺菌効果は、大根おろし中の辛味成分量の影響を受けることが推察される。

## 引用文献

- 1) 日本香料協会編：香りの百科，P 390 (1989) 朝倉書店（東京）
- 2) スタインエッガー・ヘンゼル：生薬学（下）（糸川秀治他訳），P 370 (1981) 広川書店（東京）
- 3) 阿部達夫：栄養と食糧，**12**，51 (1959)
- 4) 小嶋 操：食品と開発，**23**，No. 6，32 (1988)
- 5) 鉄本總吾：農化，**10**，123 (1934)
- 6) 西田ミツエ：ビタミン，**8**，319 (1955)
- 7) O. Kosker, C. R. Fellers and W. B. Esselen Jr.: *Glass Packer*, **28**, 818 (1949)
- 8) M. Ohtsuru and H. Kawatani: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2249 (1979)
- 9) P. Fris and A. Kjær: *Acta Chem. Scand.*, **20**, 698 (1966)
- 10) A. Kjær, J. Φ. Madsen, Y. Maeda, Y. Ozawa and Y. Uda: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1715 (1978)
- 11) 江崎秀男，小野崎博通：家政誌，**33**，513 (1982)
- 12) 江崎秀男，小野崎博通：栄養と食糧，**35**，207 (1982)
- 13) 河野友美：食品大辞典，P 514 (1970) 真珠書院（東京）
- 14) 阿部孤柳：現代日本料理技術事典，P 185 (1988) ジャパンアート社（東京）
- 15) 新井武利，金子精一，工藤泰雄：最新微生物検査法の実際，P 114，P 128 (1978) 日本衛生技術研究会（東京）
- 16) 江崎秀男，小野崎博通：栄養と食糧，**33**，161 (1980)
- 17) 川岸舜朗：日食工誌，**32**，836 (1985)
- 18) 杉田浩一，梶忠一，森雅央：新編日本食品事典，P 233 (1982) 医歯薬出版（東京）
- 19) R. R. Colwell and J. Liston: *Appl. Microbiol.*, **8**, 104 (1960)
- 20) R. A. Murchelano and C. Brown: *J. Invertebrate Pathol.*, **11**, 519 (1968)
- 21) E. A. Fieger and A. F. Novak: In "Fish as Food," (Ed) G. Borgstrom, P561 (1961) Academic Press, New York
- 22) 佐藤昭子：食衛誌，**12**，473 (1971)
- 23) 小久保弥太郎，松下秀，甲斐明美，山田満，小沼博隆：食衛誌，**19**，117 (1978)