

ピーマンの種子が持つ抗菌性に関する研究*

平川 良子*¹・水谷 政美*²・小窪 正人*³

Study on Antimicrobial Effect of Piment Seed Extract

Yoshiko HIRAKAWA, Masami MIZUTANI and Masato KOKUBO

ピーマン種子水抽出の抗菌性について検討したところ、酵母や細菌の増殖の抑制効果が認められた。ピーマン種子が抗菌性を発現する条件に乾燥温度と熟度が関係していた。なお、未熟ピーマンを追熟させても抗菌性は発現しないことを確認した。また、抽出物は滅菌処理後も抗菌性を維持していることから、加熱殺菌する加工食品にも対応できると考えられた。種子水抽出物抗菌剤の食品への効果的な濃度は0.3% (w/v) と考えられ、白菜漬け添加により効果が確認された。さらに、種子水抽出物抗菌剤の初発菌数の抑制のためエタノール分別を行い有効であることを確認した。

キーワード：ピーマン、種子、抗菌性、水抽出物

1 はじめに

宮崎県は、冬期温暖多照な気候を利用して、沿岸平坦地域では施設園芸野菜の産地化が進んでいる。なかでもピーマンは、宮崎県の農業においては主要品目であり、生産量は全国シェアの23%を占め全国1位である。しかし本県農産物は、輸入自由化や中国、韓国等の東南アジアからの農産物の増加で、消費量の減少、価格の低迷等深刻な問題を抱えており、ピーマンも例外ではない。現在、ピーマンは生産量の6割を関東、関西に販売しているが、県内の消費を増やすために地産地消運動が図られ、学校給食や惣菜加工へのピーマンの利用が増える見込みであり、今後未利用部位の増加が予想される。

また、ピーマンの種子には酵母のアルコール発酵を阻害する働きがあることを当センターで確認したことから¹⁾、ピーマンの未利用部位の有効利用、特に種子が持つ抗菌性とその発現についての検討並びに、抗菌剤の試作と評価を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 供試試料

抗菌性試験と抗菌剤の試作には、平成15年5月に(株)都城くみあい食品で、惣菜用に処理したピーマンの未利用部位から採取した種子を用いた。抗菌性の発現試験には平成15年10月から平成16年2月に市販された宮崎県産ピーマンから採取した種子並びに、平成15年11月に県総合農業試験場で栽培されたピーマンから採取した種子を用いた。

抗菌性試験に使用した微生物を、表1に示した。

表1 抗菌性試験用微生物

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MK021
<i>Pichia anomala</i> NBRC 0140
<i>Pichia membranifaciens</i> NBRC 0128
<i>Candida tropicalis</i> NBRC 1401
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NBRC 0597
<i>Salmonella tyhimurium</i> NBRC 12529
<i>Escherichia coli</i> NBRC 3301
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 3070
<i>Clostridium sporogenes</i> NBRC 16411
<i>Bacillus coagulans</i> NBRC 3557
<i>Bacillus subtilis subsp</i> NBRC 12210
<i>Aspergillus oryzae</i>

* 県産農産物を利用した健康志向食品の開発

* 1 現 児湯農業改良普及センター

* 2 応用微生物部

* 3 食品開発部

なお、*Saccharomyces cerevisiae* MK021は当センター保有株を用いた。その他微生物については、(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(NBRC)の分譲株を購入し、指定された復元・培養方法により増殖後使用した²⁾。

2-2 抽出物の調製

抗菌剤として食品に添加する場合、安全で低コストでかつ、抽出物が水や食品に溶けやすいことが必要であることから、「水抽出法」により、ピーマン種子抽出物を調製した。

ピーマンから採取した種子を、凍結乾燥又は、30℃から70℃の熱風乾燥後、ミルを用いて粉碎した。粉碎物に対し20倍量の水を添加後、攪拌による抽出(室温・2時間)を行った後、遠心分離(8000rpm、10℃、10分)し、上清を凍結乾燥したものを種子水抽出物とした。

2-3 抗菌性試験

MK021の培地は、グルコース10%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及びマルトエキス0.3%、NBRC購入微生物の培地は、指定された培養基とした。各微生物用培地に対し、種子水抽出物を0.1%(w/v)添加し、滅菌(120℃、20分)後、培地添加後に 10^3 個/mlになるよう希釈した各微生物を0.1ml/ml植菌し、各微生物用試験培地とした。培養試験は、温度勾配培養装置(アドバンテック東洋(株)TN-2612)を用い、27℃で30rpmで振盪し10分間隔で、各微生物試験培地の微生物増殖に伴う660nmの吸光度の増加を測定した。なお、*Escherichia coli*と*Lactobacillus plantarum*は、植菌後L字試験管に窒素ガスを封入して試験を行った。アルコール発酵酵母MK021を用いた試験は、MK021を添加した試験培地を27℃で静置培養を行い、発酵に伴って発生する炭酸ガスによる培地重量の減少量を測定した³⁾。

ピーマンの部位別(果肉、胎座、種子)水抽出物の抗菌性については、ポテトデキストロース寒天培地(PDA培地、ニッスイ製)に対し、部位別水抽出物を0.05g/100ml添加し、滅菌(120℃、20分)後、MK021を1ml加えコロニー形成の有無を確認した⁴⁾。

2-4 種子水抽出を用いた抗菌剤の調製と評価

ピーマンから採取した種子を、50℃で熱風乾燥後、ミルを用いて粉碎した。粉碎物に対し7.5倍量の水を添加後、攪拌機を用いて抽出(室温・2時間)を行い、ナイロンメッシュでろ過し、ろ液を遠心分離(8000rpm、10℃、10分)後、上清を得た。残渣は再度、7.5倍量の水を加え攪拌機による抽出(室温・30分)を行い、遠心分離後上清を上記の上清に加えた。上清に対しデキストリン(日研化学(株))を2.5%(w/v)加えて、スプレードライ(以下SD)並びに凍結乾燥(以下FD)を行い、粉末の抗菌剤を得た。

調製したSDとFDの種子抽出物抗菌剤について、酵母MK021による炭酸ガス減量法を用いた抗菌性試験により、有効添加濃度の確認を行った。

調味液(淡口しょう油84%、砂糖15%、グルタミン酸Na1%)に対し、0.3%(w/v)のSD並びにFDの種子抽出物抗菌剤を添加し、塩漬後脱塩した白菜に加え、10℃と30℃で保存試験を行った。

2-5 FD抗菌剤のエタノール処理による抗菌性の評価

FD抗菌剤に20倍量の水を添加し、攪拌による抽出(室温・2時間)を行った後、水と同量のエタノールを加え、遠心分離(8000rpm、4℃、10分)後、上清と沈殿物に分画した。上清は減圧濃縮後凍結乾燥を行い、沈殿物は水20mlを加えて減圧濃縮後凍結乾燥を行い、エタノール上清粉末とエタノール沈殿粉末を得た。この2種類の粉末の抗菌性について、MK021を用いた温度勾配培養装置による測定を行った。

エタノール上清粉末を、白菜漬けと生みそにそれぞれ0.3%(w/w)添加し、27℃で保存試験を行った。

3 結果及び考察

3-1 ピーマン部位別水抽出物の抗菌性

ピーマンの果肉、胎座及び種子の各部位の水抽出物を添加したPDA寒天培地で、果肉と胎座ではコロニーが形成されたが、種子ではコロニーの形成が見られなかった(図1)。また、炭酸ガス減量法でも同じく、果肉と胎座では発酵が起こったが、種子では起こらなかった(図2)。

果肉と胎座には抗菌性がなく、種子のみがMK021に対し強い抗菌性を示したことから、種子には他の部位には存在しない、水溶性の抗菌物質が存在することが考えられた。

3-2 種子の乾燥温度別水抽出物の抗菌性

採取した種子について、「凍結乾燥」「30℃乾燥」「50℃乾燥」「70℃乾燥」を行い乾燥後にそれぞれ水抽出を行い、MK021に対する抗菌性の比較を行った。「凍結乾燥」はblankと同じように発酵し、「30℃」は3時間程度、「70℃」は24時間程度発酵を抑えた(図3)。

このことから、抗菌性物質の生成に必要な酵素等が、凍結では働かず、低温では活性が不十分で、高温では失活すると考えられることから、酵素等の活性を維持し、抗菌効果を発現させるための乾燥温度は「50℃」が適当であるとした。

3-3 ピーマンの熟度と種子水抽出物の抗菌性

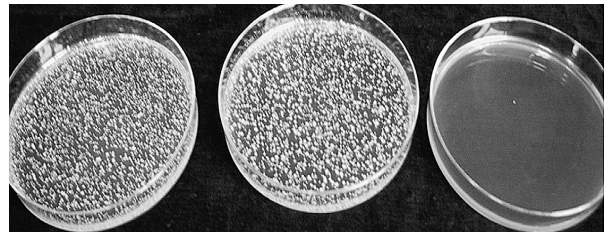
青果物として収穫する時期のピーマンを「適期」とすると、それ以前のを「未熟」、適期を過ぎたものを「中熟」、さらに赤く熟したものを「完熟」として、それぞれの種子を採取し、50℃で乾燥後、水抽出を行い、MK021に対する抗菌性の比較を行った。「未熟」と「適期」はblankと同じように発酵し抗菌性がなかったが、「中熟」で168時間程度発酵を抑え、「完熟」はこの測定において完全に発酵を抑えてた(図4)。このことから、収穫適期以降のピーマン種子内に抗菌性に関与する成分が作られると考えられ、その種子を50℃乾燥することで酵素が働き抗菌性が発現すると考えられた。

未熟ピーマンを摘果後室内にて追熟させ(7日間・30日間)、それぞれの種子を採取し、50℃で乾燥後、水抽出を行い、MK021に対する抗菌性の比較を行ったが、抗菌性は発現しないことを確認した(図5)。摘果後の追熟では、抗菌性物質の前駆体となる物質や酵素が生成されないと考えられた。

さらに、収穫適期以降のピーマン種子を特徴別に「黄熟種」、「乳白色種」に分け、それぞれの種子を採取し、50℃で乾燥後、水抽出を行い、MK021に対する抗菌性の比較を行った。「乳白色種」には抗菌性がなく「黄熟種」には抗菌性があり、

種子の特徴別により抗菌性を判別することができた(表2)。

以上のことから、収穫適期以降にピーマン種子内に抗菌性物質の前駆体となる物質や酵素等が徐々に生成され、それに伴い種子に変化が現れることを確認した。



果肉 胎座 種子

図1 MK021に対する部位別水抽出物の抗菌性

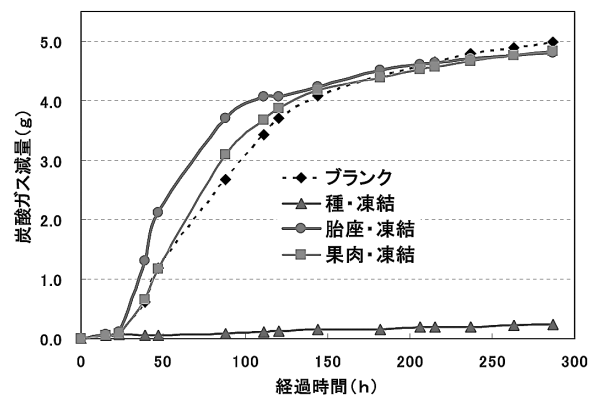


図2 MK021に対する部位別水抽出物の抗菌性

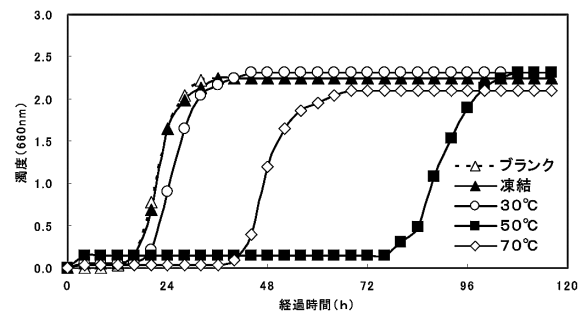


図3 種子の乾燥温度別水抽出物の抗菌性

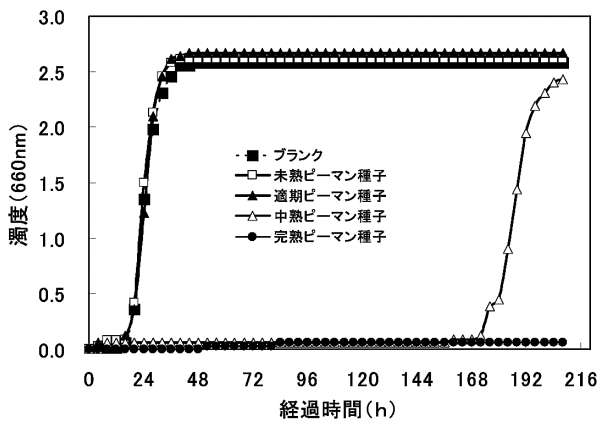


図4 ピーマンの熟度と種子水抽出物の抗菌性

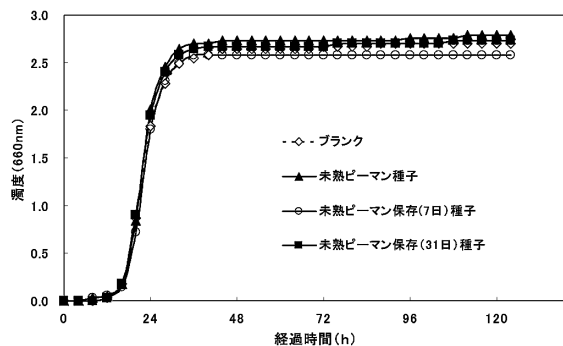


図5 未熟ピーマン追熟後の抗菌性

表2 抗菌性の有無による種子の特徴

特徴	抗菌性を持つ種子	抗菌性を持たない種子
色	黄色	乳白色
硬さ	充実 (硬い)	水っぽい (柔らかい)
乾燥後重量	20%以上	10%以下

3-4 微生物に対する種子水抽出物の抗菌性

MK021以外の酵母に対する種子水抽出物は、*Candida tropicalis*にはほとんど抗菌性を示さなかったが、耐浸透圧性で糖分や塩分の高い食品の変敗原因菌である*Pichia anomala*や、漬物面に皮膜を形成したりビールやワインの有害菌である*Pichia membranifaciens*には強い抗菌性を示し、有用菌ではあるが耐塩性でしょうゆ等のおりの発生にも係る*Zygosaccharomyces rouxii*には6日間まで強い抗菌性を示した(図6)。

細菌に対する種子水抽出物は、食中毒菌の

*Salmonella typhimurium*と、大腸菌の*Escherichia coli*に対して抗菌性を示さなかったが、乳酸菌*Lactobacillus plantarum*に対しては、増殖を抑制する効果が認められた(図7)。また、耐熱性芽胞細菌である*Clostridium sporogenes*と、*Bacillus subtilis subsp*に対しては、強い抗菌性を示し、*Bacillus coagulans*には増殖を抑制する効果が認められた(図8)。

以上のことから種子水抽出物は、糖分や塩分の高い食品で酵母が原因で発生する変敗や腐敗を抑え、さらに120℃、20分間の滅菌後にも抗菌性を維持し、レトルト食品や缶詰の変敗等の原因菌である耐熱性芽胞細菌に対し、その効果を維持していた。このことからピーマン種子水抽出物は、非加熱食品の腐敗、さらには加熱殺菌を行う食品の殺菌後の腐敗を抑える効果も期待できる天然素材の抗菌剤として使用可能であると考えられた⁵⁾。

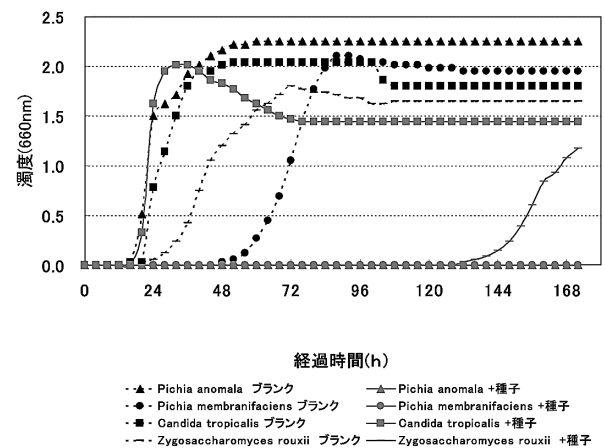


図6 酵母に対する種子水抽出物の抗菌性

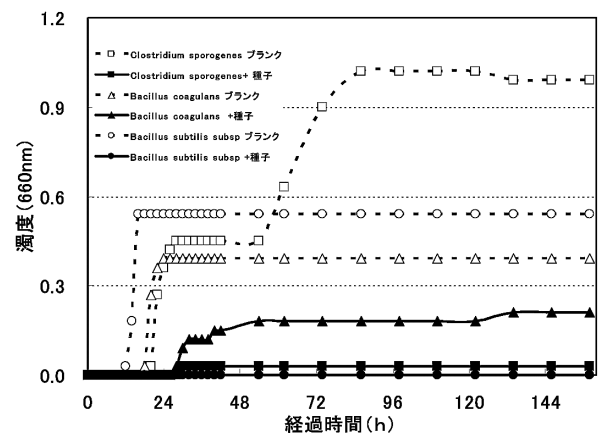


図7 細菌に対する種子水抽出物の抗菌性

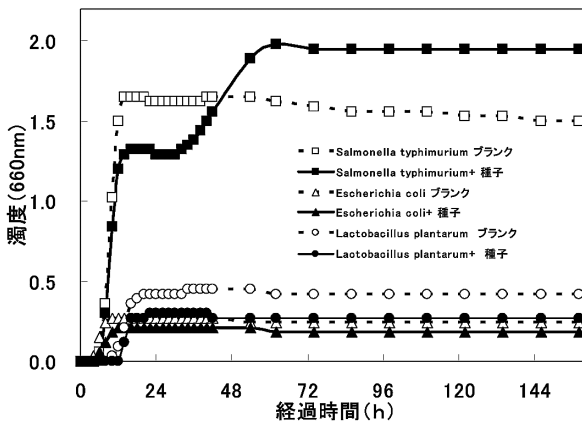


図8 細菌に対する種子水抽出物の抗菌性

3-5 種子水抽出物抗菌剤の有効添加濃度と抗菌剤の評価

抗菌剤として食品に添加する場合のSD抗菌剤やFD抗菌剤の有効添加濃度については、0.1% (w/v) 以上であると考えられた (図9、図10)。

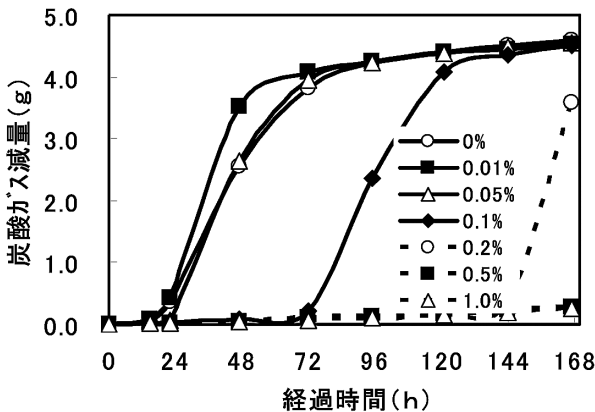


図9 MK021に対するSD抗菌剤の添加の影響

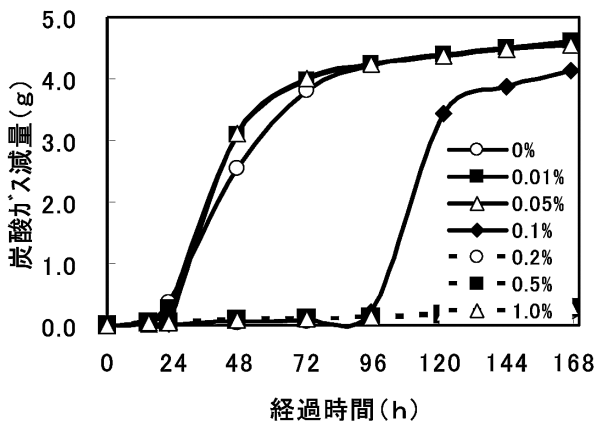


図10 MK021に対するFD抗菌剤の添加の影響



無添加 0.3% (w/v) FD抗菌剤添加

図11 白菜漬けに対するFD抗菌剤の効果

なお、種子水抽出物抗菌剤は、加熱により凝集することと、抽出物由来の色が残ることから、その影響を添加する食品に与えない濃度として、0.3% (w/v) が適性であると判断した。

SD抗菌剤及びFD抗菌剤を添加した白菜漬けは、30°C保存で2週間目には無添加と、SD抗菌剤添加のものは全て膨れを生じた。しかし、FD抗菌剤添加したものは3サンプルのうち2サンプルが膨れを生じなかった (図11)。このことはFD抗菌剤添加により、白菜漬け (初発菌数 1.4×10^4 個/ml) のガスを発生する酵母等の菌の増殖を抑えたことを示していた。

なお、今回調製した抗菌剤は、SD抗菌剤が 1.9×10^5 個/g、FD抗菌剤が 1.4×10^4 個/gと比較的高い一般生菌数であったことから、一般生菌数を減少させるためにFD抗菌剤のエタノール処理を検討した。

3-6 FD抗菌剤のエタノール処理による抗菌性の評価

FD抗菌剤にエタノールを添加することで得られた上清区と沈殿物のMK021に対する抗菌性は、沈殿物に効果がなく、上清区に強い効果が確認された (図12、13)。このことは、種子水抽出物の抗菌性物質はエタノールに可溶であることを示していた。さらに、エタノール処理したことで、FD抗菌剤の初発菌数を 1.4×10^4 個/gから300個/g以下に抑えることができた。抽出効果が上がり単

位重量当たりの抗菌性を増すことができたと考えられた (図13)。また、エタノール上清粉末を白菜漬けと生味噌に、それぞれ0.3% (W/W) 添加した保存試験は、FD抗菌剤添加の保存試験より高い効果が認められた。

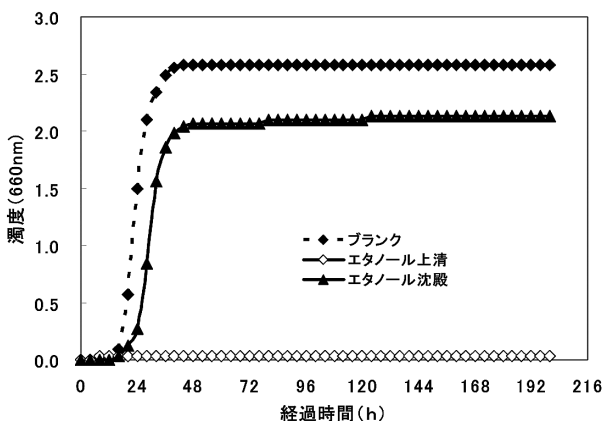


図12 FD抗菌剤エタノール処理による上清区と沈殿物の抗菌性

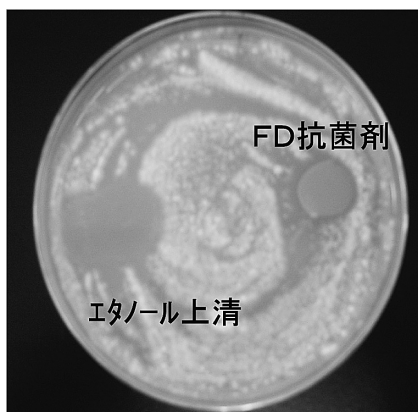


図13 みそ麹菌に対するエタノール上清とFD抗菌剤の効果

4 まとめ

ピーマンの未利用部位の有効利用、特に種子が持つ抗菌性と抗菌性の発現についての検討及び、抗菌剤の試作と評価を行い以下のことが分かった。

- 1) 種子水抽出の抗菌性について検討したところ、酵母や細菌の増殖の抑制効果が認められたことから、天然素材の抗菌剤として食品に使用可能であると考えられた。
- 2) 種子に抗菌性を発現させるための乾燥温度は、50℃が適していた。
- 3) 収穫適期以降に種子内に抗菌性物質の前駆体となる物質や酵素が徐々に生成されると考えられた。なお、未熟ピーマンを追熟させても抗菌性が発現しないことも確認した。
- 4) 種子抽出物は滅菌処理後も抗菌性を維持していることから、加熱殺菌する加工食品にも対応できると考えられた。
- 5) 種子水抽出物抗菌剤の食品への効果的な濃度は0.3% (w/v) と考えられ、白菜漬け添加により効果が確認された。さらに、種子水抽出物抗菌剤の初発菌数の抑制のためエタノール分別が有効であることを確認した。
- 6) 本研究については、2004年7月5日付けで特許出願を行った⁶⁾。

5 参考文献

- 1) 水谷政美, 工藤哲三, 日高照利, 岡崎益己, 柏田雅憲. 宮崎県食品開発センター報告, **46**, 149 (2001)
- 2) L-乾燥標品の開封と復元方法, (独) 製品評価技術基盤機構
- 3) 水谷政美, 工藤哲三, 日高照利, 岡崎益己, 柏田雅憲. 宮崎県食品開発センター報告, **45**, 153 (2000)
- 4) 春田三佐夫他, 目で見える食品衛生検査法, 中央法規, 48~49 (1994)
- 5) 金子精一他, 実務食品衛生, 中央法規, 136~137
- 6) 水谷政美, 平川良子, 小窪正人, 特願2004-197813