大根辛味成分の抗菌性について

江崎 秀男, 小野崎 博通

梶山女学園大学家政学部食物学科

Antimicrobial Action of Pungent Principles in Radish Root

Hideo ESAKI, Hiromichi ONOZAKI

Department of Food and Nutrition, Faculty of Home Economics,
Sugiyama Jogakuen University, Nagoya

Antimicrobial activity of *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (TMBI) from *Raphanus sativus* L. cv. "Aokubi-Miyashige Daikon" was examined using *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus oryzae*. Isothiocyanate content of the sample used for the antimicrobial assay was determined in the form of thiourea derivative.

trans-4-Methylthio-3-butenyl thiourea (TMBT) was prepared from "Aokubi-Miyashige Daikon." Ethyl, allyl, butyl, or phenyl thiourea was prepared from each commercial isothiocyanate. Standard curves of these thioureas were made using modified Grote reagent.

Inhibitory effect of TMBI to microbial growth was detected and the value for minimum inhibitory concentration (MIC) was 2.14 mM. However, TMBT did not prevent the growth of microorganisms. Moreover, antimicrobial activity of ethyl, allyl, butyl, or phenyl isothiocyanate was assayed and each value for MIC was obtained.

From these results, it was concluded that TMBI, prepared from "Aokubi-Miyashige Daikon," was the highest in antimicrobial activity among 5 kinds of isothiocyanates examined.

(Received November 27, 1981)

辛子, ワサビの辛味成分であるアリルイソチオシアナートは, ある種のアブラナ科植物に寄生する根こぶ病菌 *Plasmodiophora brassicae* に対し抗菌力を示すことが Walker¹⁾ によって報告された。また Blum²⁾ は, ビール, ワイン等アルコール飲料製造の際に, 発酵液の表面に泡 (scum) をつくって品質を低下させる微生物の生育を抑制する物質を, 32 種の香辛料の精油およびその精油成分の中から検索した結果, 辛子中のアリルイソチオシアナートが最も強い抗菌性を示したことを報告している。

ところで大根の辛味の本体も辛子と同じイソチオシアナート類であり, そ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) である³⁾。この物質の抗菌性に関する報告はいままでのところ見当たらない。そこで著者は, 大根から分離した TMBI の抗菌力について検討するとともに, 他のイソチオシアナート類との抗菌力の比較を行なったので報告する。

実験方法

1. 供試菌

各種イソチオシアナートの抗菌力測定には次のような種類の菌株を使用した。

グラム陰性細菌 *Escherichia coli* (IFO 3806)

グラム陽性細菌 *Staphylococcus aureus* (IFO

12732)

酵 母 *Saccharomyces cerevisiae* (IFO

0306)

カ ビ *Aspergillus oryzae* (IFO 5375)

2. 抗菌力の測定法

細菌類の培養には普通寒天培地 (栄研化学) を使い, 酵母およびカビには YM 寒天培地⁴⁾ を用いた。

抗菌力の測定は寒天平板希釈法⁵⁾ に準じて行なった。すなわち 10% エタノールに新しく溶解した各種濃度のイソチオシアナート溶液 1 ml を, あらかじめ熱融解し, 55°C に保った寒天培地 10 ml に加え混合し, 減菌シャーレに平板に流し固めた。この平板の中央を通る十文字の画線をして 4 等分し, その各区分に供試菌懸濁液

を白金耳、線状に接種した。細菌は 37°C で 16 時間、酵母およびカビの場合は 30°C で 40 時間培養した後、供試菌の発育の程度を肉眼で観察した。イソチオシアナートの抗菌力の判定は、供試菌の発育が完全に阻止された平板中の、最低濃度でもって感受性値とし、そのミリモル (mM) 数を最小阻止濃度とした。

3. イソチオシアナートの調製

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は市販品 (東京化成) を用い、使用時に 10% エタノールで各濃度のイソチオシアナート希釈液を調製した。大根のイソチオシアナートは、市販の青首宮重大根の最下部より調製した。すなわち細片とした冷凍大根を、同量の冷水とともにミキサーに入れ、5 分間激しくホモジナイズした。同量の冷エーテルを加え、さらに 5 分間ホモジナイズした後、ただちに遠心分離を行ないエーテル層を回収した。無水硫酸ナトリウムでエーテル部を乾燥し、4°C に保存した。使用時にこのエーテル溶液 200 ml を 25°C で減圧乾固した後、10% エタノール 5 ml に溶解し、大根のイソチオシアナート (主成分 TMBI) 原液とし、抗菌力測定を試料とした。

4. イソチオシアナートの定量

各種イソチオシアナートはチオウレア誘導体とした後、改良グロート試薬による比色定量⁹⁾を行なった。すなわち 10% エタノールに溶解したイソチオシアナート試料 0.5 ml にエタノール:28% アンモニア水 (1:1 v/v) 混液 1 ml を加え、30°C で 1 夜置いてチオウレア化した後、減圧乾固した。一定量の 75% エタノールで希釈した後、この液 1 ml に改良グロート試薬 4 ml を加え、37°C で 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。

あらかじめ作成した標準曲線からチオウレア量を求め、イソチオシアナート量に換算した。

実験結果

1. チオウレア誘導体の標準曲線

市販各種イソチオシアナートのチオウレア誘導体について、熱エタノールによる結晶化を繰り返し、それぞれのチオウレア誘導体の標準物質を得た。また大根の辛味の主成分 TMBI のチオウレア誘導体であるトランス-4-メチルチオ-3-ブチニルチオウレア (TMBT) は既報⁹⁾の方法で調製した。

各種チオウレア誘導体を 75% エタノールに溶解して標準溶液を調製し、その各 1 ml について改良グロート試薬による比色定量を行ない、その結果を Fig.1 に示す。すなわち、各種チオウレア間に呈色度の差はあるが、すべて 20~200 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線関係が成立した。

Fig.1. Standard curves of various thiourea derivatives.

Four ml of modified Grote reagent was added to 1 ml of each thiourea solution. The mixture was incubated at 37°C for 45 min. The optical density was estimated at 600 nm.

○ Ethyl thiourea, △ Allyl thiourea, □ Butyl thiourea, ● Phenyl thiourea, ▲ *trans*-4-Methylthio-3-butenyl thiourea (TMBT)

2. 大根中の TMBI の抗菌力

各種濃度の TMBI を含んだ寒天培地を用いて供試菌に対する抗菌力測定を行なった。その結果を Table 1 に示す。なお培地中の TMBI 量は、平板調製の際、実際に定量を行なって確認した。

この結果を見て明らかなように、TMBI 濃度が 2.14 mM 以上の寒天平板においては、すべての供試菌の発育が完全に阻止された。またそれ以下の濃度においても、TMBI 濃度が高くなるにしたがって供試菌の発育が抑制されることが肉眼的に観察された。しかし、大根を水とともにホモジナイズし、このホモジネートを 1 夜 4°C に放置した後、前記したイソチオシアナート調製法に従ってエーテル抽出を行ない、このエーテル部を用いて上と同様の方法で抗菌力の測定を行なった結果、いずれの供試菌に対しても抗菌作用は観察されなかった。

3. 各種イソチオシアナートの抗菌力

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を用いて上と同様にして抗菌力を測定し、TMBI の場合と比較した。使用した各種イソチオシアナート類の培地中の濃度は、平板調製の際実際に定量を行ない、抗菌力の強さは最小阻止濃度で示した (Table 2)。その結果いずれの供試菌に対しても TMBI が最大の抗菌力を示し、酵母、カビに関してはフェニルイソチオシアナートが TMBI につぎ、細菌についてはアリルイソチオシアナートが TMBI について高い抗菌力を示した。

Table 1. Inhibitory effect of *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (TMBI) to microbial growth.

TMBI concentration (mm)	3.39	2.14	1.13	0.57	0.38	0.19	0.13	0.06	0
<i>Escherichia coli</i>	—	—	±	±	+	+	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	±	±	+	+	++	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	±	±	+	+	++	++	++
<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	±	±	+	+	++	++	++
Examples of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>									

Results are means of 5 assays.

—: Microbial growth was inhibited perfectly. ±: Very slight growth was detected. +: Slight growth was detected, ++: Normal growth was detected.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of various isothiocyanate to microbial growth (mm).

Isothiocyanate	Microorganism			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ethyl	10.00	10.00	7.01	7.01
Allyl	5.60	5.60	4.34	4.34
Butyl	7.89	7.89	7.89	7.89
Phenyl	8.73	8.73	2.62	2.62
<i>trans</i> -4-Methylthio-3-butenyl (TMBI)	2.14	2.14	2.14	2.14

Table 3. Inhibitory effect of *trans*-4-methylthio-3-butenyl thiourea (TMBT) to microbial growth.

TMBT concentration (mm)	12.90	5.20	2.60	1.30	0.65	0
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Aspergillus oryzae</i>	++	++	++	++	++	++

++: Normal growth was detected.

4. TMBT の抗菌力

TMBI エーテル溶液 200 ml に, 28% アンモニア水 15 ml およびエタノール 50 ml を入れ, 1 夜 30°C でチオウレア化を行ない減圧濃縮した。得られたシラップを

10% エタノールで各濃度に希釈し, この溶液を用い上と同様にして抗菌力の測定を行なった。また培地中に含まれる TMBT 量を実際に定量した。その結果 Table 3 に見られるように TMBT 濃度を 13 mm にまであげて

も抗菌力は認められなかった。

5. TMBI の安定性

抗菌力測定中における TMBI の安定性を知るために、TMBI の経時的変化を測定した。

まずエーテル中における TMBI の安定性を検討した。すなわち大根から調製した TMBI エーテル溶液を 4°C に保ち、一定時間ごとに 1 ml を取り、ただちにチオウレア化して比色定量法によってチオウレア量を求めた。その結果は Fig. 2A に示す。

また TMBI の水溶液中における安定性をみるために、上と同じ TMBI エーテル溶液を 25°C で減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、シャーレ中で 30°C に放置した。一定時間ごとに 1 ml を取り、上と同じ方法でチオウレア量を求めその結果を Fig. 2B に示す。

これらの結果、TMBI は水溶液ではきわめて不安定であるが、無水硫酸ナトリウムで脱水したエーテル中では長時間安定であることがわかった。

考 察

大根の辛味の本体はイソチオシアナート類であり、その中でも TMBI は全体のインチオシアナート量の 90% 以上を占めている³⁾。この TMBI は大根中では配糖体の形で存在している。組織が破壊されると、自己の持つミロシナーゼ (EC 3.2.3.1) の作用を受けて TMBI が遊離し、辛味を生ずることを Kjer らが報告している⁷⁾。

Fig. 2. Stability of *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (TMBI) in ethyl ether (A) or water (B).

A: One ml of TMBI ether solution, prepared from "Aokubi-Miyashige Daikon," was reacted with mixed solution of ethanol and aqueous ammonia at intervals. After evaporating, each sirup was dissolved in 75% ethanol. One ml of this solution was used for the determination of thiourea.

B: One ml of TMBI water solution, prepared from the TMBI ether solution, was used for the determination of isothiocyanate in the same way.

この TMBI はアリルイソチオシアナート⁸⁾の場合と同様、水溶液中では不安定であり、時間の経過とともに消失していく傾向がある (Fig. 2B)。著者らはこの TMBI を定量する方法として、TMBI をエタノール存在下でアンモニアと反応させて安定したチオウレア誘導体とした後、改良グロート試薬を用いて比色定量を行ない、各種の新鮮な大根 100 g 中 TMBI が 10~30 mg 含まれることを先に報告した⁹⁾。

今回は TMBI の抗菌力について検討を行なったが、供試菌として用いた *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* のいずれに対しても TMBI は同様に強い抗菌性を示し、その最小阻止濃度は 2.14 mM であった (Table 1)。この値は比較した各種イソチオシアナートの中では最高であった (Table 2)。すなわちこれまで抗菌力の強いと報告のあったアリルイソチオシアナート¹⁰⁾とその最小阻止濃度を比べて TMBI は数倍強い抗菌力を有することが明らかとなった。ここに用いたイソチオシアナート類に対する供試菌の感受性については、細菌よりも真菌類のほうがやや感受性が高い傾向が見られた。

TMBI をチオウレア化した TMBT では供試菌の発育の抑制が認められなかったことは、TMBI の抗菌性発現のためにはイソチオシアナート (-N=C=S) 構造が不可欠であり、チオウレア ($\begin{matrix} \text{H NH}_2 \\ | \\ \text{-N-C-S-} \end{matrix}$) 構造となると抗菌力を示さなくなるとことが考えられる。

TMBI などイソチオシアナート類はエーテル溶液中では安定である (Fig. 2A) が、水溶液中では不安定である (Fig. 2B) ので、ホモジナイズした大根を長時間放置した後では抗菌性が消失する。抗菌力測定の方法として常法のカップ法やディスク法に変えて、寒天培地中にイソチオシアナート類を混合する方法を採った理由も、イソチオシアナートの揮散、分解等をできるだけ阻止するためである。しかし、培養中におけるイソチオシアナート類の減少は避けられなかった。実際にはここで定量して得られたイソチオシアナート濃度より小さい最小阻止濃度で微生物の生育を阻害するのではないと思われる。この点を解明するために実験方法を改良するとともに、供試菌発育の度合いを定量的に測定する方法などに関し現在検討中である。

要 約

1) 大根の辛味の本体であるトランス-4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート (TMBI) の微生物に対する抗菌力をしらべたところ、TMBI はカビ、酵母、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌等のいずれに対しても同様に抗菌性を示し、その抗菌力は、同時に試験し

た他のいずれのイソチオシアナートよりも強かった。

2) 抗菌力測定の方法は、寒天培地中にイソチオシアナートを混合し、シャーレに平板に流し固め、供試菌を接種して発育の程度を肉眼で観察した。

3) 各種イソチオシアナート類の抗菌力を上記の方法を用いて比較したところ、TMBI が最も強く、アリルイソチオシアナートの数倍であった。

4) TMBI のチオウレア誘導体である TMBT には抗菌力は認められなかった。この事実から抗菌性の発現には、イソチオシアナート ($-N=C=S$) 構造が不可欠であると思われる。

本研究の概要は、昭和56年5月、徳島市で行なわれた日本栄養・食糧学会総会で報告した。

文 献

- 1) Walker, J.C.: *Phytopathology*, 27, 142 (1937)
- 2) Blum, H.B. and Fabian, F.W.: *Fruit Prod. J.*, 22, 326, 347 (1943)
- 3) Kjær, A., Madsen, J.φ., Maeda, Y., Ozawa, Y. and Uda, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1715 (1978)
- 4) 小崎道雄, 谷村和八郎: 微生物学実験書, 146 (1973), 建帛社 (東京)
- 5) 柳田友道: 微生物学実験法, 240 (1975), 講談社 (東京)
- 6) 江崎秀男, 小野崎博通: 栄養と食糧, 33, 161 (1980)
- 7) Friis, P. and Kjær, A.: *Acta Chem. Scand.*, 20, 698 (1966)
- 8) 長島善次, 内山正昭: 農化, 33, 1144 (1959)

(昭和56年11月27日受理)