



食品保存料ナイシンの有効的な利用方法に関する研究

本研究は、日本農芸化学会2013年度大会(開催地 東北大学)での「ジュニア農芸化学会」において発表された。シナモンとの併用における食品保存料ナイシンの抗菌効果促進が、シナモン中のシナムアルデヒドによることを見いだすと同時に、その作用機構を複数の構造類似物から類推しようとしている。基礎的な部分もきちんと押さえ、また得られた結果を詳細に検討、考察することによって、次段階への研究へと発展させている。将来性も期待されることから、高く評価され、銅賞に選ばれた。



本研究の背景、実験方法および結果

【目的】 現在、さまざまな食品に食品保存料が使われている。食品保存料の一つであるナイシンは、乳酸菌 *Lactococcus lactics* の産生するペプチドであり、日本でも2009年に認可され、ソーセージやチーズなどの保存料として利用されている。ナイシンは、グラム陽性菌に対して細胞膜に細孔を形成し、生育の阻害や死滅をさせ、抗菌効果を示す⁽¹⁾。一方、グラム陰性菌の細胞壁は透過できないと考えられており、グラム陰性菌に対してはナイシン単独では抗菌効果を示さない⁽²⁾。しかし、ナイシンとシナモンを併用すると、グラム陰性菌(大腸菌 *Escherichia coli* O157:H7) に対しても抗菌効果が見られようになるとが示されており⁽³⁾、シナモン中のどのような成分によるものかは明らかではないものの、シナモンを含む食品に対しては、ナイシンは特に有効に抗菌作用を示すと考えられる。われわれは、カレー粉やウコン、アップルジュース、オレンジジュース、緑茶などさまざまな食品とナイシンを組み合わせる実験したが、ナイシンの抗菌効果を促進する食品を新たに発見することはできなかった。そこで、本研究では次のことを目的と

した。

- ① ナイシンの抗菌効果を促進させることがすでにわかっているシナモンについて、シナモン中のどのような成分がナイシンの抗菌効果の促進に関与しているのかを調べる。
- ② ①で判明した物質の構造をもとにして、類似した構造をもつ物質でナイシンの抗菌効果を促進する物質を探索する。
- ③ ②により、ナイシンを保存料として利用できる食品の拡大を図る。

【材料と方法】

指標菌: グラム陰性菌の指標菌として、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5a を使用し、培地は次のように調製した (Yeast Extract, 1 g; Bacto Trypton, 2 g; NaCl, 0.5 g; Agar, 2.5 g; dH₂O, 200 mL)。なお、ナイシンの効果を高めるために、培地は pH = 5.0 に調整した。

コロニー数計測による抗菌効果の測定

- ① 指標菌を 30℃ で一晩培養した。
- ② 翌日、希釈してテスト物質とナイシンを加え、30℃ で3時間培養した。
- ③ 適当に希釈したものを寒天培地にまいた。
- ④ 翌日、生えてきたコロニー数を数えて菌数を測定し、生存率を求めた。

阻止円による抗菌効果の測定

- ① 指標菌を 30℃ で一晩培養した。
- ② 翌日、寒天培地に菌液をまき、テスト物質とナイシンの混合液を寒天培地にスポットし、30℃ で1晩培養した。
- ③ 翌日、阻止円の直径を測定した。

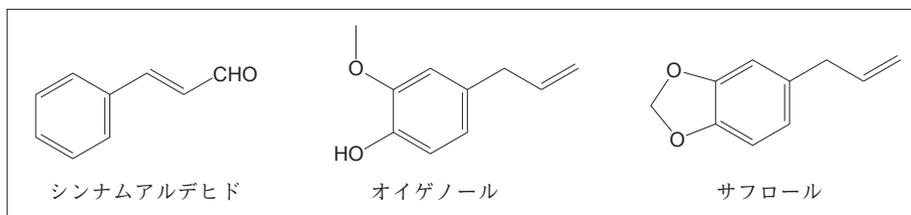


図1 ■ シナモン中の成分

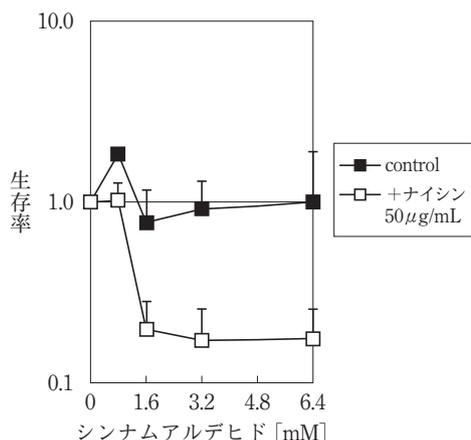


図2 ■ ナイシンとシナナムアルデヒドの相乗効果

【結果と考察】

実験1. シナモンとの相乗効果の確認

本実験系でもシナモンによるナイシンの抗菌効果の促進が見られるかどうかを確認した。シナモン単独処理 (20 μg/mL)、ナイシン単独処理 (10 μg/mL) では生存率の低下が見られなかったのに対し、ナイシンとシナモンを併用したときには、シナモン単独処理に比べて生存率が80%に低下し、本実験系でもナイシンの抗菌効果がシナモンによって促進されたことが確かめられた (data not shown)。

実験2. シナモン中成分による抗菌効果促進

シナモンによるナイシンの抗菌効果の促進について、シナモン中のどのような物質によるものかを調べた。シナモンの成分であるシナナムアルデヒド、オイゲノール、サフロール (図1) について検証した。シナモンの香りの主成分であるシナナムアルデヒドは単独では大腸菌に対して抗菌効果はもたないが、ナイシンと併用すると生存率が低下した (図2)。ナイシン濃度が一定 (50 μg/mL) である場合、シナナムアルデヒドの濃度を高くしても生存率は濃度依存的に低下し続けるのではなく、0.17程度までしか低下しないことから、シナナムアルデヒドはそれ自身の毒性によって細胞死をもたらしているのではなく、ナイシンの抗菌効果を促進しているのだということがわかった。阻止円の形成については、高濃度

表1 ■ シナナムアルデヒドによる生育阻止効果

シナナムアルデヒド	ナイシン濃度	阻止円の直径 [cm]	阻止率 (b/a)
0 mM	2.3 mg/mL	ND	—
226 mM	0 mg/mL	1.93 ± 0.16 a	100%
226 mM	0.23 mg/mL	2.06 ± 0.17 b	107%
226 mM	2.3 mg/mL	2.38 ± 0.17 b	123%

表2 ■ シナモン成分物質による生育阻止効果

ナイシン濃度	+シナナムアルデヒド 226 mM	+オイゲノール 226 mM	+サフロール 226 mM
0 mg/mL	100%	ND	ND
0.23 mg/mL	107%	ND	ND
2.3 mg/mL	123%	ND	ND

のシナナムアルデヒドに対しては阻止円が見られたが、ナイシンを加えると阻止円の直径が23%拡大した (表1)。以上のことから、シナナムアルデヒドはナイシンの抗菌効果を促進したと考えられる。オイゲノール、サフロールについては、生存率の低下も見られず、阻止円も検出できなかった (表2)。

実験3. 抗菌効果促進を示す部位の特定化

シナナムアルデヒドと共通した構造をもつ物質について、ナイシンの抗菌効果を促進するかどうかを調べた。図3に示した8つの化合物を用い、ナイシンと併用したが、いずれも生存率の低下は見られず (表3)、阻止円の増大も見られなかった (data not shown)。

乳酸菌由来の抗菌ペプチドナイシンの抗菌効果を促進する食品として、これまでシナモンが知られていたが、シナモン中のどのような物質が原因であるかは知られていなかった。われわれは、シナナムアルデヒドがその原因であることを発見した。また、シナナムアルデヒドに類似した構造をもつ物質や、シナナムアルデヒドの構造と共通したフェニル基、アルデヒド基、あるいはその両方をもつ物質について探索したが、ナイシンの抗菌効果を促進する物質は発見できなかった。このことから、フェニル基やアルデヒド基といった特定の官能基だけではなく、シナナムアルデヒドの全体の立体構造が、ナイシンの抗菌効果を促進するうえで重要な働きをもつ可能

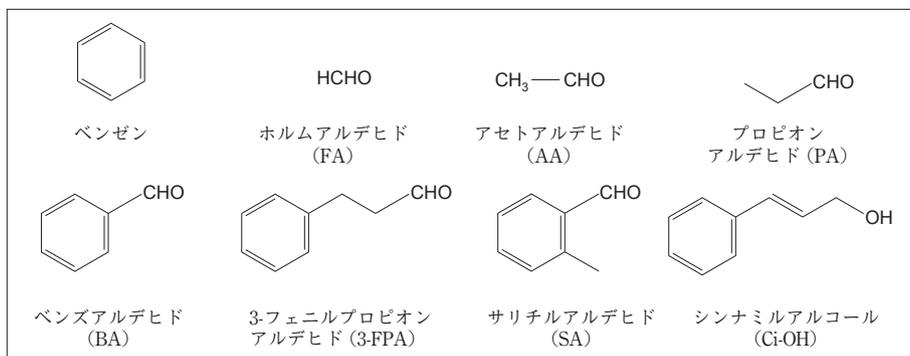


図3 ■ 本研究で用いた物質

表3 ■ シナナムアルデヒドの類似物質によるナイシンの抗菌効果の促進

	+シナナムアルデヒド 3.2 mM	+ベンゼン 3.2 mM	+FA 3.2 mM	+AA 3.2 mM	+PA 3.2 mM	+BA 3.2 mM	+3-FPA 3.2 mM	+SA 3.2 mM	+Ci-OH 3.2 mM
生存率	0.33	0.94	1.07	1.07	0.94	0.98	1.04	0.92	1.19
標準偏差	±0.11	±0.25	±0.39	±0.50	±0.24	±0.21	±0.21	±0.11	±0.39

性が示唆された。



本研究の意義と展望

乳酸菌は古来から食品に利用されており、乳酸菌が産生したペプチドの一種であるナイシンを食品保存料として使用することは、消費者の理解が得られやすい。今回、シナモン中のシナナムアルデヒドがナイシンの抗菌効果を促進していることが初めて明らかにされた。引き続き、構造の類似性からそのほかの物質でも同様な作用をもつ物質を探索することによりナイシンのより有効的な利用活用が期待される。たとえば、シナナムアルデヒドを含む芳香族アルデヒドには香料として食品に用いられているものも多く、そのような物質の中からナイシンの抗菌効果を促進する物質をほかにも発見できればナイシンを保存料として利用できる食品が拡大できると考えられる。

本研究の「効果がわかっているシナモンの原因物質を突き止め、その物質を手掛かりに、構造の類似性から追っていく」という方法論は、生徒同士のディスカッ

ションのなかから出てきたアイデアである。手近な食品を手当たり次第に試してネガティブな結果が続いていたときに、ただ闇雲に実験をくり返すのではなく、どうしたら解決できるかをディスカッションして考えたことは、自分で考えることもなく実験作業に明け暮れ、指導教官のあずかり知らぬところにデータも埋没してしまい、研究の行き先が不明となってしまう大学院生も少なくない昨今、将来の農学、生命科学分野を担う貴重な人材が育ちつつあることを感じさせる。

謝辞：本研究は、科学技術振興機構「中高生の科学部活動振興プログラム」の支援を受けて行っています。この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究に対して助言いただいた東北大学大学院農学研究科 動物資源化学研究室 齋藤忠夫教授、北澤春樹准教授、現日本大学生物資源学部動物資源科学科 川井 泰准教授に御礼申し上げます。

文献

- 1) T. Abee, L. Krockel & C. Hill: *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 169 (1995).
- 2) K. A. Stevens, B. W. Sheldon, N. A. Klapes & T. R. Klaenhammer: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3613 (1991).
- 3) J. Yuste & D. Y. Fung: *J. Food Prot.*, **67**, 371 (2004).

(文責「化学と生物」編集委員)