

研究ノート

梅干し中の有機酸及びアミグダリン関連物質の抗菌作用

岩崎 啓子*, 野村 秀一

(長崎国際大学 健康管理学部 健康栄養学科、*連絡対応著者)

Antibacterial Activities of Organic acids and Amygdalin related compounds in pickled Japanese apricot (Umeboshi)

Keiko Iwasaki* and Shuichi Nomura

(Dep. of Health and Nutrition, Faculty of Health and Management,
Nagasaki International University, *Corresponding author)

Abstract

To identify ingredients responsible for the antibacterial properties of umeboshi, the inhibitory effects of organic acids and amygdalin-related compounds (citric acid, malic acid, acetic acid, amygdalin, benzaldehyde, and benzyl alcohol) against *Staphylococcus aureus* FDA 209P and *Escherichia coli* NIHJ JC-2 were compared at concentrations found in 20% salt pickled Japanese apricot (Umeboshi) using the paper disc diffusion method and an assay of rapid bactericidal capacity.

Citric acid showed a potent antibacterial activity, suggesting that this predominant organic acid plays a major role in the antibacterial properties of Umeboshi.

A mixture of citric, malic, and acetic acids exhibited higher antibacterial activity than citric acid alone, and the addition of salt to the mixture at a concentration of 20% resulted in a much higher activity. No antibacterial activity was observed with amygdalin, benzaldehyde, or benzyl alcohol.

These results suggested that the antibacterial properties of Umeboshi may be attributed to the synergistic effects of its organic acid content and salt added during processing.

Key words

pickled Japanese apricot (Umeboshi), organic acid, antibacterial activity

要 旨

梅干しの抗菌作用に関与する成分を明らかにするために、塩分20%の梅干しの有機酸とアミグダリン関連物質（クエン酸、リンゴ酸、酢酸、アミグダリン、ベンズアルデヒド、ベンジルアルコール）の含有量をもとにし、黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する抗菌作用をペーパーディスク拡散法及び短時間殺菌法で検討した。その結果、含有量が多かったクエン酸が強い抗菌作用を示し、抗菌作用の主体はクエン酸であることが示唆された。クエン酸、リンゴ酸、酢酸の混合液では、クエン酸単独より強い抗菌作用を示した。また、この混合液に20%の食塩を添加したものでは、さらに抗菌作用が増強した。一方、アミグダリン、ベンズアルデヒド及びベンジルアルコールの単独の含有量では抗菌作用を示さなかった。

以上のことから、梅干しの抗菌作用は梅干しに含まれる有機酸と梅干しの製造工程で添加された食塩の相乗効果によることが示唆された。

キーワード

梅干し、有機酸、抗菌作用

I はじめに

梅 (*Prunus mume*) は花梅と実梅に大別され、果実として利用されるのは実梅が主体である。梅果実の主成分は約90%の水分とわずかなタンパク質、糖質から成り、ミネラル、ビタミン及び有機酸は他の食品に類を見ないほど多様に含まれており、様々な生理活性を示す食品として高い評価を受けている。

近年では、梅抽出液が口腔細菌に対して抗菌作用を示したこと¹⁾、*Helicobacter pylori* に対する梅肉エキスの殺菌効果²⁾ や、梅中のシリンガレシノールによって *H. pylori* の運動性を抑制したこと³⁾ が報告されており、梅への関心が高まっている。この中でも特に、我が国において馴染みが深いものは梅干しである。梅干しは、梅の果実を塩漬けにした後に日干したもので保存食品として広く普及し、食卓の副食として食されてきた。また古くから防腐、解毒、抗菌効果などの作用により薬として用いられてきた食品である。

梅干し中に含まれる有機酸組成は、主要有機酸はクエン酸、リンゴ酸であり、その他、シュウ酸、コハク酸、ギ酸、酢酸等の有機酸を含有していることが報告されている⁴⁾⁻⁷⁾。

梅果肉の強い酸味の主体は、梅果肉に4~5%含まれるクエン酸、リンゴ酸や酢酸など種々の有機酸によるものである。

有機酸の抗菌作用は、pH の低下作用、特定条件下における非解離分子の量、有機酸の持つ固有の性質の要因によって発生すると考えられている⁸⁾。他にも有機酸の中で抗菌作用が最も高い酢酸は、*Escherichia coli* O157:H7 に対して、0.1%程度の酢酸で静菌作用が認められたこと⁹⁾、酢酸が主成分である食酢が *Campylobacter jejuni* の数を減少させたこと¹⁰⁾ などが報告されている。また、クエン酸においては、腸炎ビブリオに対して胆汁酸との共存下において強い抗菌作用を示したこと¹¹⁾、様々なグラム陰性菌に対して広く抗菌作用を示したこと¹²⁾ などが報告されている。さらに、梅果実の種子部(仁)に

は青酸配糖体であるアミグダリン (AM) が高濃度に存在し、酵素によって分解され、ベンジルアルコール (BeOH) や、ベンズアルデヒド (BAL)、安息香酸 (BA) などに分解され、わずかではあるが梅果肉にも含まれていると報告されている^{13),14)}。Mendel Friedman らは、BAL が *C. jejuni* に対して強い殺菌活性を示したことを報告しており¹⁵⁾、これらの AM 関連物質が梅干しの抗菌物質としての特性を示す可能性も考えられる。このように、個々の有機酸及び AM 関連物質の抗菌作用に関する報告はされているが、梅干しの抗菌作用や梅果肉中に含有される各成分含有量における抗菌作用についての報告はほとんどない。

そこで本研究では、梅干しの抗菌作用に関与する成分について検討するため、既報告¹⁶⁾ より得られた HPLC 同時定量法による塩分濃度20%及び10%紀州梅干しの成分含有量をもとに、*Staphylococcus aureus* FDA 209P 及び *E. coli* NIHJ JC-2 に対する抗菌作用について検討した。

II 方 法

1. 試 料

既報告¹⁶⁾ で用いた和歌山県産南高梅の紀州梅干し(勝喜梅、塩仕立て塩分20%及び10%)を使用した。なお、この試料(この梅干し)は、他の調味料を一切使用せず、塩のみで漬け込んだものである。

2. 試薬及び試料の調製

今回実験に用いた有機酸及び AM 関連物質は、クエン酸、DL-リンゴ酸、酢酸、シュウ酸、ギ酸、コハク酸、アミグダリン (AM)、ベンジルアルコール (BeOH)、ベンズアルデヒド (BAL) 及び安息香酸 (BA) の10種類を使用した。クエン酸、DL-リンゴ酸、酢酸、シュウ酸、ギ酸、コハク酸、BeOH、BAL 及び BA は和光純薬工業(特級)、AM は和光純薬工業(1級)を用いた。

6種類の有機酸及びAMは、使用の都度無菌的に秤量し、滅菌精製水で通常10%水溶液を調製後、希釈の際は精製水を用いて各実験濃度（8、6、4、2、1、0.1、0.01、0.003%）を調製した。BeOHはテトラヒドロフラン100%で溶解し、希釈においては精製水を用いて各実験濃度を調製した。希釈においては精製水で希釈した。BAL及びBAは、ジメチルスルホキシド（DMSO）100%で溶解し、希釈の際はDMSO/精製水（1：1、v/v）を用いて各実験濃度溶液を調製した。

試料の調製は、塩分濃度20%の梅干し果肉5.0gをはかり取り、精製水5.0mlを加えてよく攪拌し、混和したものを短時間殺菌法に用いた。

3. 供試菌株

北里大学より供与された*E. coli* NIHJ JC-2、*S. aureus* FDA 209Pの2菌株を用いた。なお、供試菌株は使用に先立ち、Heart Infusion broth（日本製薬、HI broth）を用い、37°Cで24時間培養したものを前培養菌として各実験に供した。

4. 実験方法

A) ペーパーディスク拡散法

a) 測定方法

前培養菌液は、*E. coli* NIHJ JC-2は 10^7 cfu/ml、*S. aureus* FDA 209Pは 10^6 cfu/mlとなるよう希釈した。この各被験菌液を滅菌綿棒でHI寒天培地上に均一に全面塗抹し、それぞれに調製した溶液70 μ lをペーパーディスク（ADVANTEC、厚手、直径8mm）に浸み込ませたもの及び梅干し果肉1gを置き、形成された阻止円直径をもとに各溶液の抗菌作用を判定した。なお、抗菌作用の判定は、9mm以上の阻止円が形成されたものを抗菌作用ありと判定した。

b) 測定項目

既報告で得られた和歌山県産南高紀州梅干し（勝喜梅、塩仕立て塩分20%及び10%）の各成

分含有量をもとにして、下記の各溶液を調製し、抗菌作用の測定に供した。

- 1) クエン酸、リンゴ酸、酢酸、シュウ酸、ギ酸、コハク酸及びAM関連物質の濃度を0.003～10%に蒸留水にて調製した溶液
- 2) 塩分濃度20%及び10%梅干しに含まれる有機酸含有量となるよう蒸留水で調製した、各クエン酸、リンゴ酸及び酢酸溶液（梅干しに含まれる各有機酸含有量に調製した溶液）
- 3) クエン酸、リンゴ酸、酢酸を塩分濃度20%の梅干しに含まれる有機酸含有量に蒸留水で混合した溶液（3種の有機酸混合溶液）
- 4) 3)の3種の有機酸混合溶液に20%の食塩を添加した溶液（3種の有機酸混合溶液に食塩を添加した溶液）
- 5) 塩分濃度20%の梅干しの果肉1.0g
- 6) グリシン-HCl緩衝液を使用してpHを1.1、2.0、3.0に調製した溶液
- 7) 蒸留水に食塩を20%濃度になるよう調製した溶液

B) 短時間殺菌法

a) 測定方法

前培養菌液を*E. coli* NIHJ JC-2は 10^7 cfu/ml、*S. aureus* FDA 209Pは 10^6 cfu/mlとなるように各調製液に0.2ml加えた。各溶液は、37°Cで振とうし、0、10、30及び60分後に各溶液から0.2mlを滅菌生理食塩水1.8mlに接種し、段階希釈液（10、 10^2 、 10^3 、 10^4 希釈）を調製した。この試料原液及び段階希釈液より、0.1mlずつHI寒天培地上に接種し、コンラージ棒で全面塗抹したのち、37°Cで24時間培養後、生菌数を測定した。

b) 測定項目（ペーパーディスク拡散法で調製した2）～7）と同じ）

- 1) 梅干しに含まれる各有機酸含有量に各々調製した溶液
- 2) 3種の有機酸混合溶液
- 3) 3種の有機酸混合溶液に食塩を添加した溶

液

- 4) 塩分濃度20%の梅果肉溶液
- 5) pHを1.1、2.0、3.0に調製した溶液
- 6) 塩分濃度20%に調製した溶液

c) pHの測定

各成分含有量に調製した有機酸溶液、塩分濃度20%の梅干し果肉5.0gを蒸留水5.0mlに混和した溶液のpHをpHメーター(HORIBA)を用いて測定した。

III. 結 果

1. ペーパーディスク拡散法による抗菌作用について

1) 梅干し中の各成分の抗菌作用

梅干しの主要有機酸であるクエン酸、リンゴ酸、酢酸及びAM関連物質の各々の抗菌作用について検討した。使用した各有機酸とAM関連物質の濃度は既報告¹⁶⁾で得られた結果をTable 1に示す。

Table 2に示した通り、クエン酸及びリンゴ酸で*S. aureus* FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2において4~10%溶液で阻止円が形成された。酢酸では、2~10%溶液でクエン酸、リンゴ酸よりも大きな阻止円を形成し、他の有機酸より強い抗菌作用を示した。

試料として使用した同じ南高梅で得られているクエン酸、リンゴ酸、酢酸以外の有機酸で果肉中に存在が確認されている有機酸¹⁾では、Table 3に示すとおり、2~10%溶液でシュウ酸、ギ酸において阻止円が形成された。コハク酸では、4~10%で阻止円が形成された。しかし、果肉中に存在する含有量における濃度では、シュウ酸、ギ酸、コハク酸ともに阻止円は形成されず、抗菌作用は認められなかった。

AM関連物質の抗菌作用について、*S. aureus* FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2に対する抗菌作用について検討した結果をFig. 1~Fig. 3及びTable 4に示した。AM及びBALはいずれの濃度においても阻止円は形成されず、抗菌

作用は認められなかった。BeOH溶液では、6~10%溶液で抗菌作用が認められたが、果肉中に存在する濃度では阻止円は形成されなかった。一方、試料からは検出されなかったBA溶液では、1~10%で阻止円が形成され、抗菌作用が認められた。

次に、梅干しに含まれる各有機酸含有量に各々調製した溶液の*S. aureus* FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2に対する抗菌作用について検討した結果をFig. 4に示した。被験菌において、塩分濃度20%梅干しのクエン酸含有量である4.63%及び塩分濃度10%梅干しのクエン酸含有量である2.00%クエン酸溶液で阻止円が形成され、抗菌作用が認められた。梅干しのリンゴ酸、酢酸含有量に調製した溶液では阻止円が形成されず、抗菌作用は認められなかった。

さらに、塩分濃度20%梅干しに含まれる有機酸含有量に調製した3種の有機酸混合溶液の抗菌作用について検討した結果をTable 5に示した。*S. aureus* FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2ともに、塩分濃度20%梅干しの含有量に調製した3種の有機酸混合溶液で阻止円が形成され、抗菌作用が認められた。また、塩分濃度20%梅干しに含まれる有機酸含有量に調製した3種の有機酸混合溶液に食塩を20%添加した溶液では、3種の有機酸混合溶液とほぼ同じ大きさの阻止円を形成し、抗菌作用が認められた。

2) pHおよび食塩の抗菌作用

S. aureus FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2に対するpHの抗菌作用について検討した。pHを1.1~3.0に調製した溶液において阻止円は形成されず、抗菌作用は認められなかった(結果未提示)。また、食塩単独の抗菌作用についても検討したが、塩分濃度を20%に調製した溶液において阻止円は形成されず、抗菌作用は認められなかった(結果未提示)。

3) 塩分濃度20%梅干しの果肉の抗菌作用

梅干し果肉の抗菌作用について検討した結果

Table 1 Analytical results of malic acid, acetic acid, citric acid, AM, BeOH, BAL and BA in pickled Japanese apricot (Umeboshi)

Sample	Malic acid (%)	Acetic acid (%)	Citric acid (%)	AM (%)	BeOH (%)	BAL (%)	BA (%)
Kishu ume (Salt content 20%)	0.53	0.17	4.63	0.037	0.004	0.004	N.D.
Kishu ume (Salt content 10%)	0.21	0.13	2.00	0.016	0.005	0.033	N.D.

N.D.: not detected

Table 2 Antibacterial activity of each organic acid determined by the paper disk diffusion test (mm)

Microorganism	Inhibition zone of citric acid (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	4.63%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	32	32	30	23	17	10	—	23
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	20	19	15	12	—	—	—	12
Microorganism	Inhibition zone of malic acid (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	0.53%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	34	32	30	24	16	10	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	18	18	14	11	9	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of acetic acid (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	0.17%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	52	52	36	28	18	14	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	34	34	28	20	13	10	—	—

(more than 9 mm : antibacterial activity)

Table 3 Antibacterial activity of each organic acid determined by the paper disk diffusion test (mm)

Microorganism	Inhibition zone of oxalic acid (mm)							
	10%	8%	4%	2%	1%	0.1%	0.01%	0.003%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	29	27	18	10	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	17	16	12	9	—	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of formic acid (mm)							
	10%	8%	4%	2%	1%	0.1%	0.01%	0.003%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	32	32	23	18	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	25	21	14	14	10	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of succinic acid (mm)							
	10%	8%	4%	2%	1%	0.1%	0.01%	0.003%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	17	15	11	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	11	10	—	—	—	—	—	—

(more than 9 mm : antibacterial activity)

を Fig. 5 に示した。*S. aureus* FDA 209P 及び *E. coli* NIHJ JC-2 に対して、塩分濃度20%及び10%の梅干し果肉とともに阻止円が形成され、強い抗菌作用が認められた。

2. 短時間殺菌作用について

1) 梅干し中の各有機酸含有量及び3種の有機酸混合溶液における殺菌作用

塩分濃度20%梅干しに含まれる有機酸含有量

Fig. 1 Antibacterial activity of Amygdalin solution (1~10%) to *S. aureus* FDA 209P and *E. coli* NIHJ JC-2

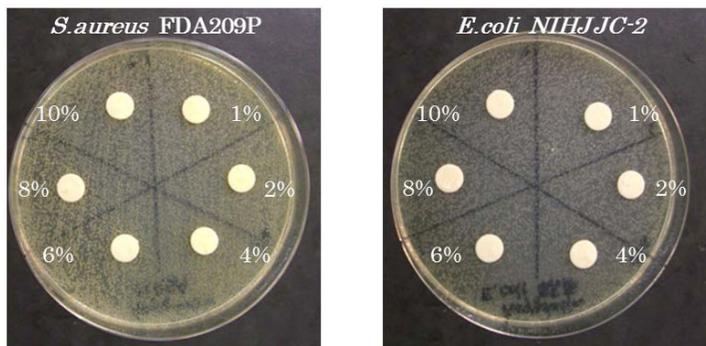


Fig. 2 Antibacterial activity of Benzylalcohol solution (1~10%) to *S. aureus* FDA 209P and *E. coli* NIHJ JC-2

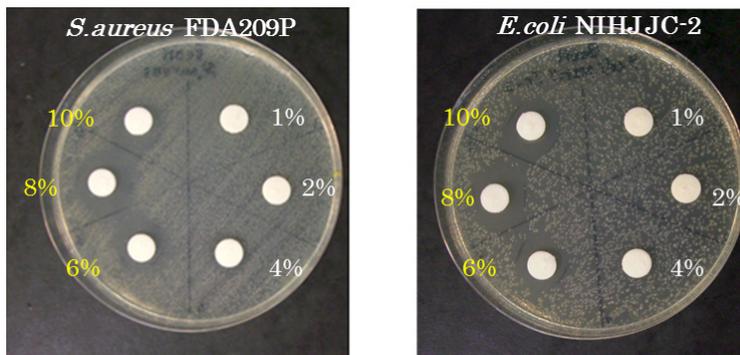


Fig. 3 Antibacterial activity of Benzaldehyde solution (1~10%) to *S. aureus* FDA 209P and *E. coli* NIHJ JC-2

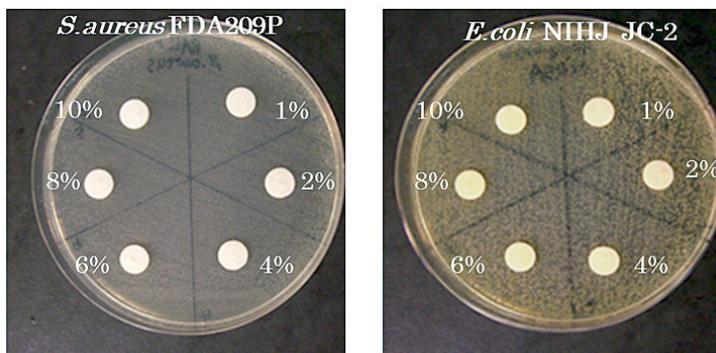


Table 4 Antibacterial activity of Amygdalin related compounds determined by the paper disk diffusion test (mm)

Microorganism	Inhibition zone of Amygdalin (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	0.037%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	—	—	—	—	—	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of Benzylalcohol (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	0.004%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	15	15	14	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	15	15	14	—	—	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of Benzaldehyde (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	0.004%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	—	—	—	—	—	—	—	—
Microorganism	Inhibition zone of Benzoic acid (mm)							
	10%	8%	6%	4%	2%	1%	0.1%	N.D.
<i>S. aureus</i> FDA 209P	33	31	30	21	14	10	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	20	18	17	13	—	—	—	—

(more than 9 mm : antibacterial activity)

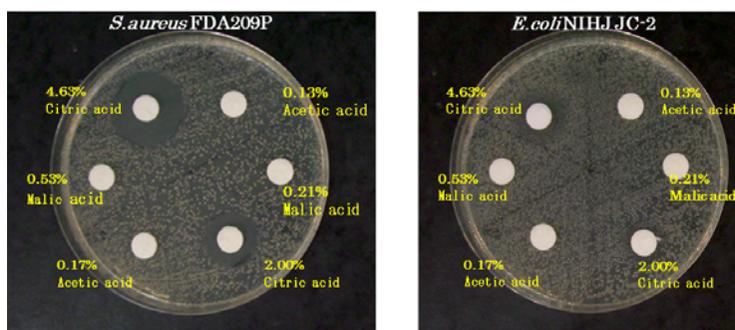
Fig. 4 Antibacterial activity in content of each organic acid in pickled Japanese apricot (Umeboshi) to *S. aureus* FDA 209P and *E. coli* NIHJ JC-2

Table 5 Antibacterial activity of mix organic acid determined by the paper disk diffusion test (mm)

Microorganism	Inhibition zone (mm)	
	3 organic acid mix	3 organic acid mix added NaCl 20%
<i>S. aureus</i> FDA 209P	24	25 (+1)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	13	15 (+2)

(more than 9 mm : antibacterial activity)

に調製した4.63%クエン酸、0.53%リンゴ酸、0.17%酢酸溶液及び3種の有機酸混合溶液の短時間殺菌作用について検討した結果をFig. 6 (a)~(e)に示した。4.63%クエン酸溶液では *S. aureus* FDA 209P においては10分間後には菌は検出されず、短時間で殺菌された。一方、*E. coli* NIHJ JC-2 においては、継時的に生菌数が減少し、60分間後には菌は検出されなかった。0.53%リンゴ酸溶液では、*S. aureus* FDA 209P において

10分間後には菌が検出されず、短時間で殺菌された。一方、*E. coli* NIHJ JC-2 は10分間後に生菌数が減少したが、それ以降、生菌数の減少は認められなかった。0.17%酢酸溶液では、継時的な生菌数の減少は見られず、殺菌作用は認められなかった。

3種の有機酸混合溶液では、10分間後には菌は検出されず、短時間殺菌作用が認められた。また、3種の有機酸混合溶液に食塩を20%添加

Fig. 5 Antibacterial activity of pickled Japanese apricot (Umeboshi) to *S. aureus* FDA 209P and *E. coli* NIHJ JC-2

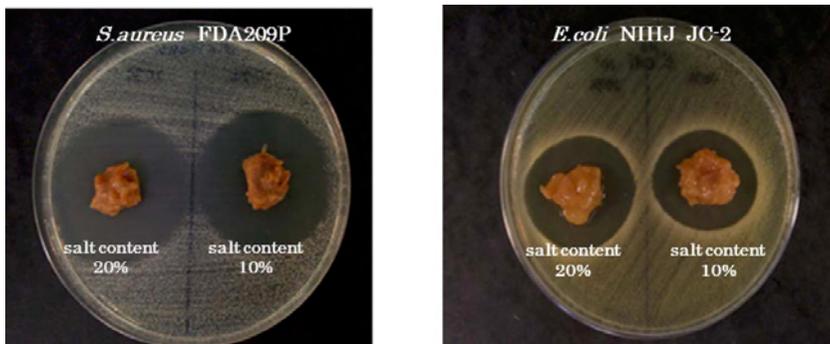
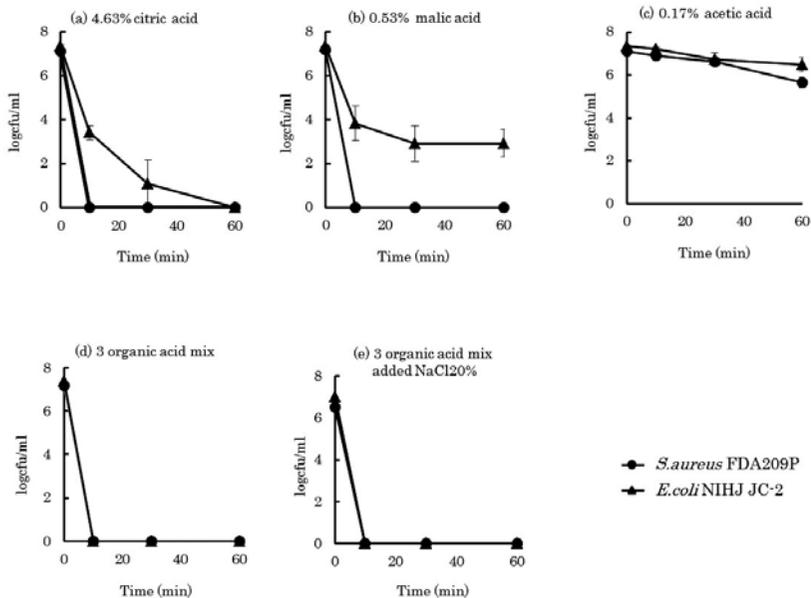


Fig. 6 Bacterial activity in the content of each organic acid in pickled Japanese apricot (Umeboshi) to various bacterial



した溶液においても同様に短時間殺菌作用が認められた。

2) pH 及び食塩の短時間殺菌作用

Fig. 7 に、pH を1.1、2.0、3.0に調製した溶液の短時間殺菌作用を示した。pH 1.1では、10分間後には菌が検出されず、短時間で殺菌された。pH 2.0では、*S. aureus* FDA 209P は短時間で殺菌されたが、*E. coli* NIHJ JC-2 は経時的に生菌数が減少し、60分間後に菌は検出されなかった。pH 3.0では、60分間後において *S. aureus* FDA 209P でわずかな生菌数の減少が認められたが、*E. coli* NIHJ JC-2 で生菌数の減少は認められなかった。

また、Fig. 8 に示した通り、塩分濃度を20%に調製した溶液の *S. aureus* FDA 209P と *E. coli* NIHJ JC-2 に対する殺菌作用について検討したが、経時的な生菌数の変化はなく殺菌作用は認められなかった。

3) 塩分濃度20%梅干し果肉溶液

塩分濃度20% 梅干し果肉溶液の *S. aureus* FDA 209P と *E. coli* NIHJ JC-2 に対する殺菌作用について Fig. 9 に示した。10分間後には菌が検出されず、強い短時間殺菌作用が認められた。

IV 考 察

既報告¹⁶⁾ で試料とした梅干しは、和歌山県みなべ町を中心として生産される南高梅で、梅の最高ブランドとして知られている品種で、その果実は生産から加工工程まで基準化されており、果実に含まれる有機酸をはじめとする成分がほぼ均一であることが報告されている⁵⁾。また梅干し以外、梅肉エキス、梅酒などの加工品の原料として幅広く利用されている。

このような理由から、本研究の試料とし、梅干しの抗菌作用に関与する成分を明らかにするため、各有機酸及び AM 関連物質の *S. aureus* FDA 209P 及び *E. coli* NIHJ JC-2 の2菌株に対する抗菌作用についてペーパーディスク拡散

Fig. 7 Effect of pH on antibacterial activity

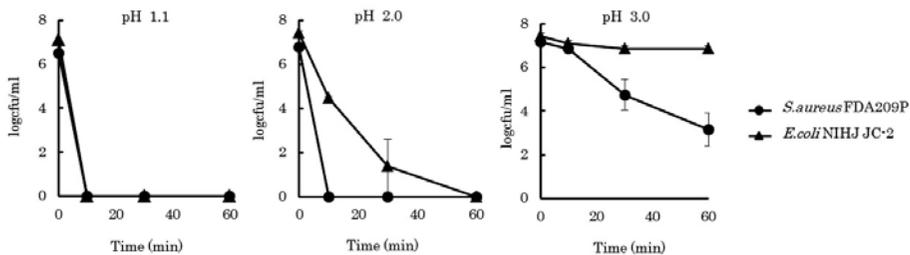


Fig. 8 Effect of NaCl on antibacterial activity

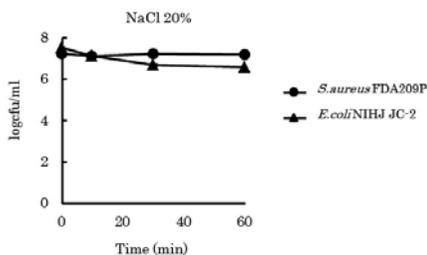
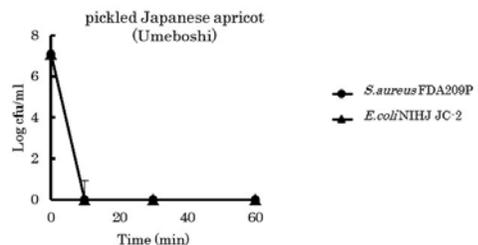


Fig. 9 Effect of pickled Japanese apricot (Umeboshi) on antibacterial activity



法を用いて比較検討した。

クエン酸とリンゴ酸溶液は4~10%濃度、酢酸溶液は2~10%濃度で全ての菌株に対して濃度依存的に抗菌作用を示したことから、梅干しに含まれる各有機酸はそれぞれ単独で抗菌作用を有することが明らかとなった。また、使用した試料と同じ南高梅の果肉中に存在することが確認されている⁴⁾ シュウ酸、ギ酸、コハク酸ともに4~10%濃度で抗菌作用を示したが、果肉に含まれる含有量の0.003%では抗菌作用を示さなかった。

AM及びBALでは、抗菌作用は認められなかった。また、BAでは4~10%溶液、BeOHでは6~10%溶液において抗菌作用が認められたが、BAは今回供試した梅干しからは検出されなかったこと、塩分濃度20%梅干しに含まれるBeOHの含有量は0.004%と微量であることから、AM関連物質の梅干しにおける抗菌作用への直接的な関与はないものと考えられた。

次に、梅干しに含まれる有機酸含有量における抗菌作用を明らかにするために、塩分濃度20%梅干しの各有機酸含有量に調製した溶液の*S. aureus* FDA 209Pと*E. coli* NIHJ JC-2に対する抗菌作用をペーパーディスク拡散法で測定した。クエン酸含有量4.63%において阻止円が形成され、抗菌作用を有することが明らかとなった。一方、リンゴ酸含有量0.53%及び酢酸含有量0.17%では阻止円は形成されなかった。このことから、有機酸が拡散法によって阻止円を形成するためには、一定以上の濃度が必要であることが示唆された。

低濃度の有機酸における抗菌作用を明らかにするために、塩分濃度20%梅干しの有機酸の各含有量における短時間殺菌作用について検討した。まず、クエン酸含有量4.63%溶液では、*S. aureus* FDA 209Pに対しては強い短時間殺菌作用を示し、*E. coli* NIHJ JC-2に対しては継時的な生菌数の減少が見られ、弱い殺菌作用を示した。次に、リンゴ酸含有量0.53%溶液では、*S. aureus* FDA 209Pに対して強い短時間殺菌作用

を示し、*E. coli* NIHJ JC-2に対しては静菌作用を示した。また、酢酸含有量0.17%溶液では静菌作用を示した。これらのことは、本来抗菌作用を有している有機酸は、低濃度において直接的に細菌と触れることで抗菌作用を示すことが示唆された。以上のことから、梅干しの抗菌作用に関与する成分は有機酸であることが立証された。

梅干しに含まれる有機酸の中では酢酸が最も強い抗菌作用を有していたが、その含有量は少なく、今回供試した梅干しにおいて含有量の最も多いクエン酸でのみ、単独で強い抗菌作用を示したことから、梅干しの抗菌作用の主な成分はクエン酸である可能性が示唆された。

梅干しには多くの有機酸が含まれており、今回は主な有機酸のクエン酸、リンゴ酸、酢酸の存在が確認されたが、その他、シュウ酸、ギ酸やコハク酸など多くの有機酸が存在することが報告されている¹⁷⁾。梅干しの抗菌作用に関与する有機酸は主にクエン酸であることが示唆されたが、リンゴ酸、酢酸も抗菌作用を有していることから、クエン酸とリンゴ酸及び酢酸の相乗効果により、その抗菌作用が増強することが考えられることから、3種の有機酸の含有濃度での混合溶液の抗菌作用及び短時間殺菌作用について検討した。

その結果、3種類の有機酸混合溶液において形成された阻止円直径は、*S. aureus* FDA 209P及び*E. coli* NIHJ JC-2ともに12~24mmであり、クエン酸、リンゴ酸の各4%濃度と酢酸2%濃度で形成した阻止円とほぼ同等の直径であった。また、短時間殺菌作用においては3種類の有機酸混合溶液では、10分間後の生菌数は検出されず、強い短時間殺菌作用が認められた。これらの結果は、クエン酸の抗菌作用がリンゴ酸や酢酸との相乗効果によって、その抗菌作用が増強されたことを示唆している。

塩分濃度は、温度や酸素などととも細菌の増殖に影響を及ぼす因子であり、通常、外部の塩分濃度が高すぎると浸透圧の関係により細菌

の増殖は阻害される⁸⁾。食塩20%溶液において、生菌数の減少は認められず静菌作用を示した。さらに、本報告から3種類の有機酸混合溶液に食塩を添加した溶液について検討した結果、3種類の有機酸混合溶液の抗菌作用で得られた結果とほぼ同じであり、食塩添加の直接的な効果は認められなかった。以上のことから、食塩は殺菌作用を示すのではなく、細菌の増殖を抑制する静菌作用を示すことによって、有機酸の抗菌作用を増強するように働いていることが示唆された。また、*E. coli* O157:H7は食酢単独の場合では抵抗性を示したが、食酢と食塩を組み合わせた場合、その抵抗性が減少し、食酢と食塩の相乗効果が認められている⁹⁾。このことから、梅干し中の有機酸と食塩との相乗効果が生じる可能性が示唆された。

有機酸はそのほとんどが弱酸性状態にあり、非解離状態で存在し細菌の細胞膜を通過することで細胞内に侵入する。菌体の細胞内pHは、細菌の恒常性維持のためにほぼ中性に維持されているため、細胞内で有機酸が解離してプロトン[H⁺]を遊離し、細胞内を酸性に変化させることで代謝や物質移動を阻害し、生育が阻害されて死滅する。また、有機酸は細菌の存在する外部環境のpHが低い場合は有機酸の解離が抑えられ、非解離状態の分子が多くなるために細菌菌体の細胞内に侵入する量が増え、抗菌作用が増強されることが報告されている⁸⁾。なお、pHの影響については、pH 1.1~3.0に調製した溶液において抗菌作用は認められなかったが、短時間殺菌作用では、pH 1.1溶液において強い短時間殺菌作用を示した。これは、細菌の生育環境のpHが強酸性環境となることで、細菌の生育に必要な代謝系が何らかの障害を受け、死滅したものと考えられる。また、有機酸の存在下での細菌へのpHの影響に関しては、クエン酸4.63%溶液のpHは1.76、リンゴ酸0.53%溶液のpHは2.33、酢酸0.17%溶液のpHは3.19であった。3種類の有機酸混合溶液のpHは1.80、3種類の有機酸混合溶液に20%の食塩を添加した

溶液のpHは1.00であった。そこで、クエン酸4.63%溶液のpH 1.76と3種類の有機酸混合溶液のpH 1.80の短時間殺菌作用を比較した結果、その作用が増強されていたことから、pHは抗菌作用の発生に必要な要因ではあるが絶対的な要因ではなく、有機酸の持つ固有の性質等との条件が重なることで、その作用が発現するものと考えられた。

本研究より、梅干しの抗菌作用に関与する成分は有機酸でありクエン酸が主成分であること、さらに、リンゴ酸及び酢酸、梅干しの加工工程で添加された食塩との相乗効果によって、梅干しの抗菌作用が発現していることが示唆された。

梅干しの抗菌作用を日常生活でうまく利用することで細菌性食中毒の予防が期待される。

参考文献

- 1) Seneviratne, C.J., Wong, R.W., Hagg, U., et al. (2011) 'Prunus mume extract exhibits antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria.' *Int. J. Paediatric Dent.*, 21(4), PP.299-305.
- 2) 藤田きみゑ, 長谷川美幸, 藤田麻里, 他 (2002) 「*Helicobacter pylori* に対する梅肉エキスの殺菌効果」『日本消化器病学会雑誌』, 第99巻第4号, 379-385頁.
- 3) Miyazawa, M., Utsunomiya, H., Inada, K., et al. (2006) 'Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot.' *Biol. Pharm. Bull.*, 29(1), PP.172-173.
- 4) 垣内典夫, 石川和子, 森口早苗, 他 (1985) 「梅果実の有機酸と遊離アミノ酸の熟度及び品種別変化」『日本食品工業学会誌』, 第32巻第9号, 669-676頁.
- 5) 古市幸生, 水野隆文, 山下佳伸, 他 (2005) 「和歌山県産南高梅の梅干加工工程におけるミネラル及び有機酸含量の変化」『日本食品科学工学会誌』第52巻第10号, 472-478頁.
- 6) 露木英男, 阿部輝雄 (1976) 「梅干しの遊離有機酸について」『日本大学農獣医学部学術研究報告』第33号, 410-419頁.
- 7) Zhihong, Gao., Jing, Shao., Hailong, Sun., et al. (2012) 'Evaluation of different kinds of

- organic acid and their antibacterial activity in Japanese apricot fruits.' *Afr. J. Agric. Res.*, 7(35), PP.4911-4918.
- 8) 松田敏生 (2004) 「有機酸の抗菌作用」『食品衛生学雑誌』, 第45巻第3号, 189-196頁.
 - 9) 菅谷幸一 (1998) 「食酢の殺菌・静菌作用」『防菌防霉』, 第26巻第4号, 187-197頁.
 - 10) Birk, T., Gronlund, AC., Christensen, BB., et al. (2010) 'Effect of Organic Acids and Marination Ingredients on the Survival of *Campylobacter jejuni* on Meat' *J. Food. Prot.*, 73(2), PP.258-265.
 - 11) 能勢征子, 風戸実香, 坂井千三 (1986) 「腸炎ビブリオの酸損傷からの回復・増殖に及ぼすクエン酸と胆汁酸の影響」『食品衛生学雑誌』, 第27巻第5号, 492-500頁.
 - 12) 七山征子 (2000) 「食品中の抗菌物質—梅干し, 梅肉エキスは食中毒予防に効果がある—」『食生活研究会』, 第20巻, 18-24頁.
 - 13) 寺田久屋, 山本勝彦 (1992) 「高速液体クロマトグラフィーによる梅加工食品中のシアン配糖体, ベンズアルデヒド及び安息香酸の同時定量法の検討」『日本食品衛生学会誌』, 第33巻第2号, 183-188頁.
 - 14) 寺田久屋, 山本勝彦 (1992) 「梅加工食品中のシアン配糖体及びその分解物の含有量調査」『日本食品衛生学会誌』, 第33巻第2号, 189-195頁.
 - 15) Friedman, M., Henika, PR., Mandrell, RE., (2003) 'Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*' *J. Food Prot.*, 66(10), PP.1811-1821.
 - 16) 岩崎啓子, 出口雄也, 長岡 (浜野) 恵, 他 (2010) 「高速液体クロマトグラフィーを用いた梅干し中の有機酸, アミグダリン及び安息香酸関連物質の一斉検出」『日本食品化学学会誌』, 第17巻第1号, 65-68頁.
 - 17) 畑中久勝, 金田吉雄 (1985) 「梅肉エキスの衛生学的検討」『食品衛生学雑誌』第26巻第4号, 350-356頁.