

ガーリック加工食品の大腸菌に対する抗菌活性

Antibacterial activity of garlic processed foods against *Escherichia coli*

樋口 智之*・山本 天衣*・仲 克己*

Tomoyuki HIGUCHI・Takae YAMAMOTO・Katsumi NAKA

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L.) has been used not only for food but also for medicine since ancient times around the world. Allicin is a typical organ sulfoxite compound found in garlic which is responsible for its characteristic smell and taste, and has antibacterial properties. In this study, we investigated the antibacterial activity of fresh raw garlic produced in Aomori prefecture and China, commercial grated raw garlic, and aged black garlic by diffusion plate test. The diameters of the inhibition zones formed by using grated fresh raw garlic produced in Aomori and China were 50.5 ± 1.3 mm and 50.4 ± 0.5 mm, respectively. An inhibition zone was not formed by commercial grated raw garlic. The diameter of the inhibition zone formed by aged black garlic was 20.0 ± 0.5 mm which was smaller than those of grated fresh raw garlic. This suggests that antibacterial activity of commercial grated raw garlic is lost and that of aged black garlic is lower than that of fresh raw garlic.

緒言

ガーリック (*Allium sativum* L.) はユリ科アリウム属の植物で、独特の香気を発する。昔から鱗茎は世界中で料理の香味付けに使われてきたが、食品防腐剤、精力剤および医薬品などといった食品以外の目的でも用いられてきた。ガーリックの香気は主にallicin (diallylthiosulfinate) や diallyldisulfide (DADS) などといった揮発性の有機硫黄化合物によるものである。ガーリック鱗茎は傷を付けない限り芳香を発しない。無傷のガーリックの細胞内にはallicinではなく、その前駆体である無臭の非たんぱく質性アミノ酸であるalliin (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) が存在する¹⁾。鱗茎の破壊によって細胞が壊れると、維管束鞘細胞内のalliinase (EC 4.4.1.4) がalliinに作用し、allicin、ピルビン酸そしてアンモニアが生成する²⁾。さらにallicinは高い反応性と低い熱安定性のため、還元されてdiallylsulfide (DAS)、DADS、diallyltrisulfide (DATS) およびajoeneなどといった多様な有機硫黄化合物へと変化する³⁻⁶⁾。

ガーリックは機能性食品として優れていると言われており、血圧低下作用、抗腫瘍作用、冠動脈心疾患や糖尿病リスクの低下などが期待されている。これはガーリックが持つ有機硫黄化合物による生物学的活性に起因すると考えられている⁶⁻¹²⁾。抗菌作用については古くから知られており、例えば18世紀にはガーリックを主成分としたペスト予防薬があった¹³⁾。ガーリックの細菌に対する抗菌作用はallicinによることがCavallitoらによって初めて明らかにされ、現在ではガーリックの抗菌作用は細菌のみではなく、真菌やウイルスにも効果があることが分かっている^{14, 15)}。

ガーリックは生で食する際、すりおろしや薄くスライスすることが多い。他に焼きや揚げなど高温で加熱したり、オイル漬けあるいは長期間熟成させてから食することもしばしばである。ガーリックの成分は調理・加工方法によって多様に変化することが知られており、加工の影響によってガーリックの生物学的活性および栄養学的機能性が変化することが考えられる⁴⁾。本研究では、ガーリックの

*くらしき作陽大学食文化学部

Faculty of Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

抗菌作用に注目し、大腸菌に対するガーリック加工食品の抗菌効果の違いを検討したのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 試料

本実験に使用した試料は、青森県産の生ガーリック、中国産の生ガーリック、市販品のおろしにんにく、青森県産の熟成黒にんにくである。使用した抗生物質はbenzylpenicillin（栄研化学株式会社）、kanamycin（栄研化学株式会社）、tetracycline（栄研化学株式会社）である。

2. 培養方法

使用菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC 10536) である。培地はパールコア普通寒天培地（栄研株式会社）35gを蒸留水1000mLに加えたものを使用した。なお培地中の成分は0.5%肉エキス、1.0%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天で、 $\text{pH}7.0 \pm 0.2$ である。培地懸濁液は121℃で20分間高圧蒸気滅菌し、 $\phi 85\text{mm}$ のペトリ皿に20mLずつ分注して固化した。その後、試料供試用に培地中心部に $\phi 12\text{mm}$ のウェルを空けた。高圧蒸気滅菌したアルミニウム製のおろし金ですりおろした試料を、培地の中心部の穴に供したのち、生理的食塩水に懸濁した70 μL の菌懸濁液を寒天培地上に供し、コンラージ棒で伸展したのち、インキュベーター（福島工業株式会社 FMU-0501）で37℃、24時間培養した。なお菌懸濁液中の菌量の調整には、マクファーランド比濁法を用いた。すなわち、-80℃で冷凍保存した*Escherichia coli*を生理的食塩水に加え、ボルテックスミキサーで十分に攪拌したのち、600nmにおける濁度を目安にして、菌懸濁液の濁度がマクファーランド0.5標準液（シスメックス・バイオメリユー社）と同様になるよう調整した。

3. 抗菌活性の測定

抗菌活性は形成された阻止円の大きさを指標にした。すなわち阻止円の最長の直径を基準として、そこから阻止円の中心角が45° になるように8本の直径を引いてそれぞれの長さを測定し、これらの平均値を阻止円の直径とした。

実験結果と考察

1. ガーリック供試量と抗菌作用の相関関係

培地に供した青森県産の生ガーリックの量が抗菌効果に対する影響について検討した。その結果、ガーリック供試量が増加するにしたがって阻止円の直径は増加した (Fig. 1)。阻止円の直径とガーリック供試量の相関関係について検討した結果、直線性が得られることが分かった (Fig. 2)。なお相関係数は $R^2=0.927$ であった。このことから、ガーリック重量と抗菌活性には正の相関関係があることが示唆される。

2. ガーリックと抗生物質の抗菌活性の比較

青森県産ガーリックの抗菌活性について、抗生物質であるbenzylpenicillin、kanamycinそしてtetracyclineと比較した。その結果、ガーリックによる阻止円はいずれの抗生物質によるものと比べて大きかった (Table 1)。本実験にはすりおろした青森県産生ガーリックを使用した⁶⁾、Uedaらは青森県産ガーリックのalliin含量は乾重量にして3230mg/100gであることを報告している¹⁶⁾。さらにこの報告によると、青森県産ガーリックの水分含量は66.1%であることから、湿重量でのalliin含量は4.9mg/gと算出できる。これは生ガーリックに含まれるallicinは、2.7~7.7mg/gとするYunらの報告と一致した¹⁷⁾。本実験には0.3gのすりおろした生ガーリックを使用した⁶⁾ので、培地に供したガーリック中には9.1 μmol のallicinが含まれていると見積もられる。比較に用いた抗生物質は、10U benzylpenicillin、30 μg kanamycin、30 μg tetracyclineであるが、benzylpenicillinは1 Uあたり0.6 μg とすると、10Uのbenzylpenicillinは0.018 μmol に相当する。30 μg の kanamycinは0.062 μmol 、そして30 μg のtetracyclineは0.068 μmol となる。このことから、培地に供したallicin量はいずれの抗生物質

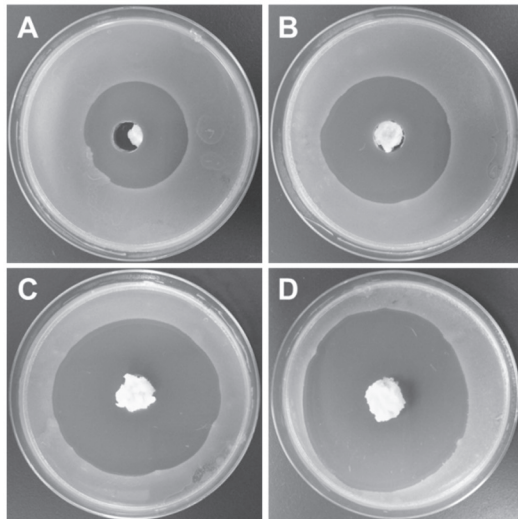


Fig. 1. Formation of the inhibition zone by grated raw garlic.

Antibacterial activity against *Escherichia coli* demonstrated on seeded agar plates using different quantities of grated raw garlic is indicated with the clear zones to show where inhibition of growth has occurred.

A, 0.10 g; B, 0.30 g; C, 0.60 g; D, 1.00 g.

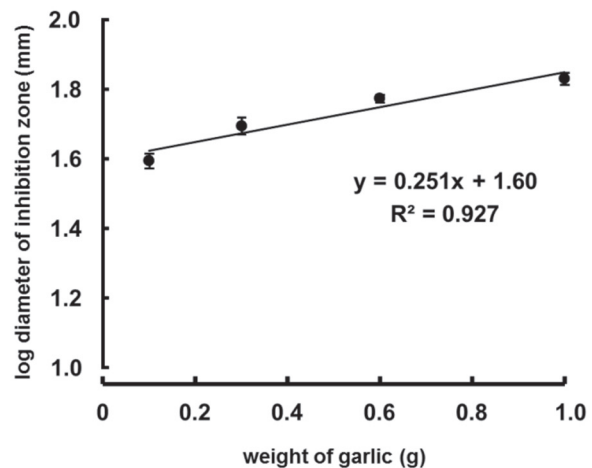


Fig. 2. Relationship between the diameter of the inhibition zone and applied weight of garlic.

This graph shows regression plots of the log of the diameter (mm) of an inhibition zone against each weight (g) of grated raw garlic applied on an agar plate. Plots are expressed in mean $\pm$ SD.

Table 1 The diameter of the inhibition zone on agar plates by garlic and antibiotics

antibiotics	garlic	benzylpenicillin	kanamycin	tetracycline
diameter (mm)	50.3 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 0.0	22.5 $\pm$ 0.6	32.0 $\pm$ 0.0

* Result expressed as mean $\pm$ SD (n=4)

よりも134~500倍多いことが示唆される。なおallicin 1分子あたりの抗菌活性は他の抗生物質1分子あたりに比べて低いことが報告されている¹⁴⁾。例えば、Borlinghausらはpenicillinやampicillin系誘導体といった β -lactam系抗生物質、あるいはkanamycinといったaminoglycoside系抗生物質は、allicinよりも抗菌活性が高いことを平板拡散試験により報告している¹⁵⁾。したがって、本実験においてガーリックにおいて最も大きい阻止円を形成したのは、ガーリック試料中のallicinの分子数が抗生物質と比較して著しく多いことに起因すると考えられる。

3. ガーリック加工品の抗菌活性

青森県産ガーリック、中国産ガーリック、市販品のおろしにんにく、青森県産熟成黒にんにくそれぞれの抗菌活性について検討した。その結果、青森県産ガーリックと中国産ガーリックの阻止円の直径にはほとんど差が無く、両者の抗菌活性はほぼ同程度であることが分かった (Table 2、Fig. 3)。Lawsonらによると、中国産ガーリックに含まれるallicin含量は湿重量で4.30~6.63mg/gである¹⁸⁾。これは前項で見積もられた青森県産ガーリックのallicin含量に近いことから、両者のallicin含量には大きな差は無いと思われる。

一方、市販おろしにんにくでは阻止円の形成がほとんど認められなかった。この結果から市販おろしにんにくには抗菌活性がほとんど無いことが示唆される。市販おろしにんにくには生のガーリック以外に、食塩、ソルビット、セルロース、酸味料、増粘剤 (キサンタン)、香料が含まれている。これは、本実験での市販おろしにんにくは他の試料と同様に0.3gを使用したのが、当該試料にはガーリック以外の原材料が含まれていることから、実際のガーリックの重量は0.3gよりも少ないことになる。またallicinは時間の経過とともに減少し、それに伴ってグラム陰性菌の*Escherichia coli*とグラム陽性

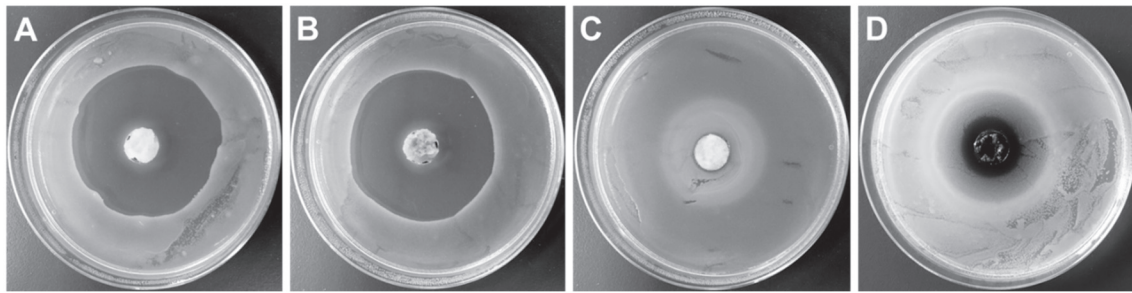


Fig. 3. Plate diffusion test by different garlic processed foods.

Antibacterial activity against *Escherichia coli* demonstrated on seeded agar plates by each 0.3g of different garlic samples are indicated with the clear zones to show where inhibition of growth has occurred.

A, raw garlic (Aomori); B, raw garlic (China); C, commercial grated raw garlic; D, aged black garlic (Aomori).

Table 2 The diameter of the inhibition zone on agar plates by garlic processed foods

products	raw garlic (Aomori)	raw garlic (China)	commercial raw garlic	black garlic (Aomori)
diameter (mm)	50.5 ± 1.3	50.4 ± 0.5	—	20.0 ± 0.7

* Result expressed as mean ± SD (n=4)

菌の*Staphylococcus aureus*に対する抗菌活性も低下することが報告されている¹⁹⁾。なお市販すりおろしにんにく本品は加熱処理を施していないので、抗菌成分の減少は熱の影響による可能性は低い。市販すりおろしにんにくは恐らく製造から数十日が経過しているので、抗菌活性が認められなかったのは時間経過に伴うallicinの減少に起因しているのかもしれない。allicinは時間の経過とともに、dithiinやajoeneなどといった有機硫黄化合物へ変化すると考えられている²⁰⁾。しかしながら、FujisawaらはLC-MS/MSによるallicin誘導体の分析を行ったが、分離・同定できなかった¹⁹⁾。生ガーリックのallicinが時間の経過とともにどのような運命を辿るかは更なる検討を要する。

熟成黒にんにくを使用した場合、阻止円の形成が認められたが、生ガーリックに比べて小さいことがわかった。Maldonadoらは熟成ガーリックおよびガーリックパウダーの抽出物は*Escherichia coli*に対して抗菌活性が認められないことを報告している²¹⁾。このことから熟成黒にんにくの抗菌活性は生ガーリックに比べて低下していることが示唆される。熟成黒にんにくは高温（60～90℃）高湿度（80～90%）の条件下で10日以上熟成させて製造するので^{22,23)}、抗菌活性の低下は製造に要する時間の経過と熱が影響している可能性がある。

熟成黒にんにくはフェノール類、フラボノイド、ピルビン酸、チオ硫酸などが生ガーリックに比べて多く含まれる傾向がある^{23,24)}。特に、熟成黒にんにくには、 γ -glutamyl-S-allyl cysteineを基質として γ -glutamyl transpeptidaseの生成物である水溶性有機硫黄化合物S-allylcysteine (SAC)が多い特徴がある^{23,24)}。これらフェノール類、フラボノイド、SACの増加は抗酸化作用、抗がん作用、抗糖尿病などといった効果が期待されている²³⁻²⁵⁾。さらに黒にんにくの黒色変化をもたらすメイラード反応もまた抗酸化成分を発生することから、熟成黒にんにくは強い抗酸化作用を有する可能性がある^{23,26-28)}。一方、allicinは減少して、代わりにDAS, DADS, DATSといった有機硫黄化合物が増加すると考えられている。しかしながら、これらallicinから誘導された有機硫黄化合物がどのような組成で存在しているかはよく分かっていない。DADSの抗酸化能はallicinに比べて弱いと言われている²⁹⁾。したがって、allicin誘導体は黒にんにくの抗酸化能にあまり寄与しないかもしれない。

ガーリック加工食品は新鮮なガーリックに比べて抗菌活性が低下することが明らかとなり、時間の経過に伴うallicinの減少が影響していることが考えられる。ガーリックの抗菌作用は食品の保存効果を高めるが、ガーリック加工品を使用する場合は注意を要するかもしれない。またallicinはビタミンB₁の腸管吸収を亢進する作用があるが、この効果を期待してガーリックを使用する際は、加工品ではなく新鮮なガーリックを用いるべきなのかもしれない。いずれにしても、本研究ではこれらガーリック試料中の成分を実際には分析しておらず、既報の研究から推察したに過ぎないので、成分分析を実

施して効果との相関関係を詳細に検討することが、今後の研究課題である。

参考文献

- 1) Cavallito, C.J., Balley, J.H., and Buck, J.S., The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and “essential oil of garlic” , *Journal of the American Chemical Society*, 67, 1032–1033 (1945)
- 2) Stoll, A., and Seebeck, E., Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic, *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 11, 377–400 (1951)
- 3) Freeman, F., and Kodera, Y., Garlic chemistry: Stability of S- (2-propenyl) 2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2332–2338 (1995)
- 4) Block, E., The chemistry of garlic and onions, *Scientific American*, 252, 114–121 (1985)
- 5) Martins, N., Petropoulos, S., and Ferreira, I.C.F.R., Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest condition: A review, *Food Chemistry*, 211, 41–50 (2016)
- 6) Majewski, M., *Allium sativum*: Facts and myths regarding human health, *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 65, 1–8 (2014)
- 7) Ried, K., Garlic lowers blood pressure in hypertensive individuals, regulates serum cholesterol, and stimulates immunity: An updated meta-analysis and review, *The Journal of Nutrition*, 146 (Suppl), 389S–396S (2016)
- 8) Rana, S.V., Pal, R., Vaiphei, K., Sharma, S.K., and Ola, R.P., Garlic in health and disease, *Nutrition Research Reviews*, 24, 60–71 (2011)
- 9) Hosseini, A., and Hosseinzadeh, H., A review on the effects of *Allium sativum* (garlic) in metabolic syndrome, *Journal of Endocrinological Investigation*, 38, 1147–1157 (2015)
- 10) Rohner, A., Ried, K., Sobenin, I.A., Bucher, H.C., and Nordmann, A.J., A systematic review and metaanalysis on the effects of garlic preparations on blood pressure in individuals with hypertension, *American Journal of Hypertension*, 28, 414–423 (2015)
- 11) Bayan, L., Koulivand, P.H., and Gorji, A., Garlic: A review of potential therapeutic effects, *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 1–14 (2014)
- 12) Schafer, G., and Kaschula, C.H., The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14, 233–240 (2014)
- 13) 武政三男, スパイスのサイエンス, 文園社, pp.96–97 (1990)
- 14) Cavallito, C.J., and Balley, J.H., Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action, *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1050–1051 (1944)
- 15) Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I.D., and Slusarenko, A.J., Allicin: chemistry and biological properties, *Molecules*, 19, 12591–12618 (2014)
- 16) Ueda, Y., Kawajiri, H., Miyamura, N., and Miyajima, R., Content of some sulfur-containing components and free amino acids in various strains of garlic, *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 38, 429–434 (1991)
- 17) Yun, H.M., Ban, J.O., Park, K.R., Lee, C.K., Jeong, H.S., Han, S.B., and Hong, J.T., Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic, *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 183–195 (2014)
- 18) Lawson, L.D., Wood, S.G., and Hughes, B.G., HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in

- garlic clove homogenates, *Planta Medica*, 57, 263–270 (1991)
- 19) Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T., and Ariga, T., Biological and chemical stability of garlic-derived allicin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4229–4235 (2008)
 - 20) Block, E., The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic-chemistry of sulfur, *Angewandte Chemie International Edition*, 31, 1135–1178 (1992)
 - 21) Maldonado, P.D., Cháñez-Cárdenas, M.E., and Pedraza-Chaverri, J., Aged garlic extract, garlic powder extract, S-allylcysteine, diallyl sulfide and diallyl disulfide do not interfere with the antibiotic activity of gentamicin, *Phytotherapy Research*, 19, 252–254 (2005)
 - 22) Kimura, S., Tung, Y.C., Pan, M.H., Su, N.W., Lai, Y.J., and Cheng, K.C., Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 62–70 (2017)
 - 23) Ryu, J.H., and Kang, D., Physicochemical properties, biological activity, health benefits, and general limitations of aged black garlic: A review, *Molecules*, 22, 919–933 (2017)
 - 24) Kim, J.H., Yu, S.H., Cho, Y.J., Pan, J.H., Cho, H.T., Kim, J.H., Bong, H., Lee, Y., Chang, M.H., Jeong, Y.J., Choi, G., and Kim, Y.J., Preparation of S-allyl cysteine-enriched black garlic juice and its antidiabetic effects in streptozotocin-induced insulin-deficient mice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 358–363 (2017)
 - 25) Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., and Niwano, Y., Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation, *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 157–160 (2006)
 - 26) Zhang, X., Li, N., Lu, X., Liu, P., and Qiao, X., Effects of temperature of the quality of black garlic, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2366–2372 (2016)
 - 27) Borek C, Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131 (Suppl), 1010S–1015S (2001)
 - 28) Bradley, J.M., Organ, C.L., and Lefer, D.J., Garlic-derived organic polysulfides and myocardial protection, *The Journal of Nutrition*, 46 (Suppl), 403S–409S (2016)
 - 29) Locatelli, D.A., Nazareno, M.A., Fusari, C.M., and Camargo, A.B., Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition, *Food Chemistry*, 220, 219–224 (2017)