

大 報 告 書

大工研報第 2067 号

依 頼 者	所在地 または住所	大阪府藤井寺市大井1丁目453番1号
	企業名 または氏名	株式会社ソーエイ 様
依 頼 事 項	わさびの成分による食品の抗菌処理に関する研究	
試 料		

平成 7年 7月 18日付第2396 号で依頼のあった件について
試験・分析・**研究**・測定・鑑定した結果次のとおり報告します。

I: 目的

- ① わさ太郎溶液のエキス成分である天然ワサビの「アリルイソチオシアネート」単体の殺菌力および抗菌力のテストおよびその実験データの作成
- ② わさ太郎ガスによる各種細菌に対する殺菌及び抗菌力のテストおよびその実験データ
- ③ わさ太郎液 (WAオイル) の改良、改善のための実験、研究

II: 材料および方法

(1) 使用した菌株

- | | |
|---|-------|
| ① Escherichia coli IFO 3301 (大腸菌) | グラム陰性 |
| ② Staphylococcus aureus FDA 209P (黄色ブドウ球菌) | グラム陽性 |
| ③ Pseudomonas aeruginosa IFO 3452 (緑膿菌) | グラム陰性 |
| ④ Bacillus subtilis PCI 219 (枯草菌) | グラム陽性 |
| ⑤ Lactobacillus plantarum ATCC 10012 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑥ Streptococcus faecalis AHU 1256 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑦ Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802(ビブリオ菌) | グラム陰性 |

(2) 使用した培地

Escherichia coli IFO 3301、Pseudomonas aeruginosa IFO 3452、Bacillus subtilis PCI 219 の3菌株については、標準寒天培地 (日水製薬株式会社製)、Staphylococcus aureus FDA 209P についてはSCD寒天培地を使用した。

SCD寒天培地

- | | |
|----------------------------|--------|
| ポリペプトン | 15g |
| ポリペプトンS | 5g |
| NaCl | 5g |
| 寒天 | 15g |
| 脱イオン水 | 1000ml |
| 1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.0に調整 | |

平成 7年 11月 10日

大阪市立工業研究所長 富 永 嘉 男



Lactobacillus plantarum ATCC 10012、Streptococcus faecalis AHU 1256 の2菌株についてはGYP寒天培地を使用した。

GYP寒天培地(乳酸菌用)

ポリペプトン 10g
酵母エキス 10g
グルコース 20g
KH₂PO₄ 2g
CaCO₃ 5g
寒天 15g
脱イオン水 1000ml
1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH6.4に調整

Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802についてはビブリオ寒天培地を使用した。

ビブリオ寒天培地

ポリペプトン 10g
肉エキス 3g
酵母エキス 3g
NaCl 29.2g
寒天 15g
脱イオン水 1000ml
1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.2に調整

1. ワサビ成分(アリルイソチオシアネート)による最小発育阻止濃度(MIC)の測定

(1) 使用した細菌

- | | |
|--|-------|
| ① Escherichia coli IFO 3301 (大腸菌) | グラム陰性 |
| ② Staphylococcus aureus FDA 209P (黄色ブドウ球菌) | グラム陽性 |
| ③ Pseudomonas aeruginosa IFO 3452 (緑膿菌) | グラム陰性 |
| ④ Bacillus subtilis PCI 219 (枯草菌) | グラム陽性 |
| ⑤ Lactobacillus plantarum ATCC 10012 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑥ Streptococcus faecalis AHU 1256 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑦ Vibrio parahaemolyticus ATCC17802(ビブリオ菌) | グラム陰性 |

(2) 試験概要

わさび成分(アリルイソチオシアネート)を、界面活性剤0.01% Tween80を含む滅菌水に溶かし、0.3~0.006%(3,000ppm~6ppm)になるように調整した。

①~⑦の溶液1mlに、それぞれに適した寒天培地9mlを加え、寒天平板(以下試験平板とする)を作成した。

28℃で1週間培養し、菌の発育を確認した。

(3) 検体

- ① 3%アリルイソチオシアネート溶液1ml
- ② 3%アリルイソチオシアネート溶液0.5ml+滅菌水0.5ml
- ③ 3%アリルイソチオシアネート溶液0.2ml+滅菌水0.8ml
- ④ ①の溶液を滅菌水にて1/10に希釈する
- ⑤ ②の溶液を滅菌水にて1/10に希釈する
- ⑥ ③の溶液を滅菌水にて1/10に希釈する
- ⑦ ①の溶液を滅菌水にて1/100に希釈する
- ⑧ ②の溶液を滅菌水にて1/100に希釈する
- ⑨ ③の溶液を滅菌水にて1/100に希釈する

(4) ワサビ成分(アリルイソチオシアネート)によるMIC測定表

	黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	枯草菌	L乳酸菌	S乳酸菌
3000ppm	-	-	-	-	-	-
1500ppm	-	-	-	-	-	-
600ppm	-	-	+	+	+	+
300ppm	-	-	+	+	+	+
150ppm	+	+	+	+	+	+
60ppm	+	+	+	+	+	+
30ppm	+	+	+	+	+	+
15ppm	+	+	+	+	+	+
6ppm	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+

注: +は発育を、-は発育しないことをそれぞれ表わす。

- ① 黄色ブドウ球菌は、Staphylococcus aureus FDA 209P
- ② 大腸菌は、Escherichia coli IFO 3301
- ③ 緑膿菌は、Pseudomonas aeruginosa IFO 3452
- ④ 枯草菌は、Bacillus subtilis PCI 219
- ⑤ L乳酸菌は、Lactobacillus plantarum ATCC 10012
- ⑥ S乳酸菌は、Streptococcus faecalis AHU 1256
を使用した。

2. ワサビ成分(アリルイソチオシアネート)による最小殺菌濃度(MBC)の測定

(1) 使用した細菌

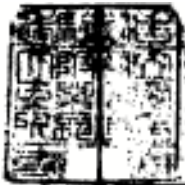
- | | |
|---|-------|
| ① Escherichia coli IFO 3301 (大腸菌) | グラム陰性 |
| ② Staphylococcus aureus FDA 209P (黄色ブドウ球菌) | グラム陽性 |
| ③ Pseudomonas aeruginosa IFO 3452 (緑膿菌) | グラム陰性 |
| ④ Bacillus subtilis PCI 219 (枯草菌) | グラム陽性 |
| ⑤ Lactobacillus plantarum ATCC 10012 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑥ Streptococcus faecalis AHU 1256 (乳酸菌) | グラム陽性 |
| ⑦ Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802(ビブリオ菌) | グラム陰性 |

(2) 試験概要

生理食塩水(含0.01% Tween液) 9.97 mlにワサビ成分(アリルイソチオシアネート) 0.03 ml加えた液をTW液とする。

- | | |
|-----------------------------------|--------------|
| ① 1/100 TW液 0 ml + 生理食塩水 2.0 ml | 0 ppm (CONT) |
| ② 1/100 TW液 0.2 ml + 生理食塩水 1.8 ml | 2 ppm |
| ③ 1/100 TW液 0.5 ml + 生理食塩水 1.5 ml | 5 ppm |
| ④ 1/100 TW液 1.0 ml + 生理食塩水 1.0 ml | 10 ppm |
| ⑤ 1/10 TW液 0.2 ml + 生理食塩水 1.8 ml | 20 ppm |
| ⑥ 1/10 TW液 0.5 ml + 生理食塩水 1.5 ml | 50 ppm |
| ⑦ 1/10 TW液 1.0 ml + 生理食塩水 1.0 ml | 100 ppm |
| ⑧ 1/1 TW液 0.2 ml + 生理食塩水 1.8 ml | 200 ppm |
| ⑨ 1/1 TW液 0.5 ml + 生理食塩水 1.5 ml | 500 ppm |
| ⑩ 1/1 TW液 1.0 ml + 生理食塩水 1.0 ml | 1000 ppm |

①~⑩の溶液に各菌液(菌数 $10^5 \sim 10^8$ 個/ml)を1 ml加え10分後、20分後、40分後に各培地に接種した。1週間後に①~⑩の菌について観察した。



(3) 培地

Escherichia coli IFO 3301、Pseudomonas aeruginosa IFO 3452、Bacillus subtilis PCI 219 の3菌株については、標準寒天培地(日水製薬株式会社製)、Staphylococcus aureus FDA 209P についてはSCD寒天培地を使用した。

SCD寒天培地

- ポリペプトン 15g
 - ポリペプトンS 5g
 - NaCl 5g
 - 寒天 15g
 - 脱イオン水 1000ml
- 1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.0に調整

Lactobacillus plantarum ATCC 10012、Streptococcus faecalis AHU 1256 の2菌株についてはGYP寒天培地を使用した。

GYP寒天培地(乳酸菌用)

- ポリペプトン 10g
 - 酵母エキス 10g
 - グルコース 20g
 - KH₂PO₄ 2g
 - CaCO₃ 5g
 - 寒天 15g
 - 脱イオン水 1000ml
- 1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH6.4に調整

Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802についてはビブリオ寒天培地を使用した。

ビブリオ寒天培地

- ポリペプトン 10g
 - 肉エキス 3g
 - 酵母エキス 3g
 - NaCl 29.2g
 - 寒天 15g
 - 脱イオン水 1000ml
- 1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.2に調整

(4) 最小殺菌濃度(MBC)測定の結果

Escherichia coli IFO 3301

	10分反応	20分反応	40分反応
①	+	+	+
②	+	+	+
③	+	+	-
④	+	+	-
⑤	+	+	-
⑥	+	-	-
⑦	+	+	-
⑧	+	-	-
⑨	-	-	-
⑩	-	-	-

Streptococcus faecalis AHU 1256

	10分反応	20分反応	40分反応
①	+	+	+
②	+	-	-
③	+	-	-
④	-	-	-
⑤	-	-	-
⑥	-	-	-
⑦	-	-	-
⑧	-	-	-
⑨	-	-	-
⑩	-	-	-

注: +は生菌の残存を、-は生菌が認められないことをそれぞれ表す。

3. わさ太郎ガスパックによる殺菌効果の測定について

(1) 試験目的：ガス噴霧による各種細菌に対する殺菌効果を確認する。

(1) 使用した細菌

(1) <i>Escherichia coli</i> IFO 3301 (大腸菌)	グラム陰性
(2) <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P (黄色ブドウ球菌)	グラム陽性
(3) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3452 (緑膿菌)	グラム陰性
(4) <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219 (枯草菌)	グラム陽性
(5) <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 10012 (乳酸菌)	グラム陽性
(6) <i>Streptococcus faecalis</i> AHU 1256 (乳酸菌)	グラム陽性
(7) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 (ビブリオ菌)	グラム陰性

(2) 試験概要

(1)~(7)の菌体を(4)の各種寒天平板培地に塗布したシャーレを20cm×30cmのナイロンポリ袋に入れて、(3)の検体溶液をわさ太郎研究用装置によりガス噴霧を20秒した後、高熱シールにて密封した。

30分後、60分後、120分後、24時間後に袋より取り出し、28℃にて培養し、48時間後に菌数(コロニー)を測定した。

(3) 検体(わさ太郎溶液)

エタノールアルコール	67.9 ml
精製水	31.99 ml
アリルイソチオシアネート	3.0 ml
L-アスコルビン酸	0.05 ml
クエン酸	0.05 ml
ミックスビタミンE	0.001 ml

(4) 培地

Escherichia coli IFO 3301、*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3452、*Bacillus subtilis* PCI 219 の3菌株については、標準寒天培地(日水製薬株式会社製)、*Staphylococcus aureus* FDA 209P についてはSCD寒天培地を使用した。

SCD寒天培地

ホリペプトン	15 g
ホリペプトンS	5 g
NaCl	5 g
寒天	15 g
脱イオン水	1000 ml
1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.0に調整	

Lactobacillus plantarum ATCC 10012、*Streptococcus faecalis* AHU 1256 の2菌株についてはGYP寒天培地を使用した。

GYP寒天培地(乳酸菌用)

ホリペプトン	10 g
酵母エキス	10 g
グルコース	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
CaCO ₃	5 g
寒天	15 g
脱イオン水	1000 ml
1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH6.4に調整	



Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802についてはビブリオ寒天培地を使用した。

ビブリオ用寒天培地

ポリペプトン	10 g
肉エキス	3 g
酵母エキス	3 g
NaCl	29.2 g
寒天	15 g
脱イオン水	1000 ml

1N-KOHまたは1N-NaOHにてpH7.2に調整

(5) 結果

別紙添付資料の通り

4. わさ太郎溶液 (WAオイル) の品質改良について

(1) 試験目的: わさび成分 (アリルイソチオシアネート) の刺激臭のコントロール
使用した溶液 (わさ太郎溶液)

エタノールアルコール	67.9 ml
精製水	31.99 ml
アリルイソチオシアネート	3.0 ml
L-アスコルビン酸	0.05 ml
クエン酸	0.05 ml
ミックスビタミンE	0.001 ml

(2) 試験概要

上記わさ太郎溶液に各種「酸溶液」を30%加えて24時間後にその刺激臭を確かめる。

- ① Lactic Acid (72% 1級乳酸)
- ② Citric Acid (特級クエン酸)
- ③ DL-Malic Acid (DL-リンゴ酸)
- ④ Succinic Anhydride (無水コハク酸)
- ⑤ Sodium DL-Lactate (DL-乳酸ナトリウム50%)

(3) 結果と考察

- ①に関しては、かなり刺激臭がなくなった。
- ②、③に関しては、やや刺激臭がなくなった。
- ④に関しては、かなり刺激臭がなくなった。
- ⑤に関しては、全く刺激臭が消えなかった。

ただし、すべての溶液に関して、不溶性物質の沈殿がみられ、除去した後にも不溶性物質の沈殿が見られた。したがって、わさび成分 (アリルイソチオシアネート) と酸が化学反応を起こしていると思われる。

その成分の分析はおこなっていない。

わさ太郎ガスによる抗菌効果の写真
大腸菌*Escherichia coli*IF03301



CONT
菌数：271

アリルイソチオシアネート
BIO. 100がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：174

わさ太郎がス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：25



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

アリルイソチオシアネート
BIO. 200がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：100



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：41



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

アリルイソチオシアネート
BIO. 300がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：77



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：5



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

わさ太郎ガスによる抗菌効果の写真
枯草菌*Bacillus subtilis*PCI219



CONT
菌数：65

アリルイソチオシアネート
BIO. 100がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：12

アリルイソチオシアネート
BIO. 200がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：18

わさ太郎がス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：14

わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

アリルイソチオシアネート
BIO. 300がス噴霧・



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：12

わさ太郎がス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：0

わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

わさ太郎ガスによる抗菌効果の写真
 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3452



CONT
 菌数：181

アレルイソチオシアネート
 BIO. 100がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：14



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：1



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：0

アレルイソチオシアネート
 BIO. 200がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：0

アレルイソチオシアネート
 BIO. 300がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



CONT
 菌数：38

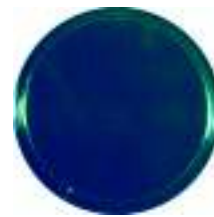
アレルイソチオシアネート
 BIO. 100がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：3



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：3



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：1

アレルイソチオシアネート
 BIO. 200がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：1



わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：0

アレルイソチオシアネート
 BIO. 300がス噴霧



わさ太郎がス環境内に30分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



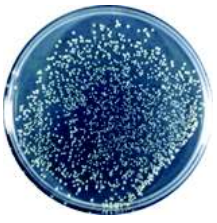
わさ太郎がス環境内に60分放置した後
 取り出し培養した。菌数：0



わさ太郎がス環境内に24時間放置した後
 取り出し培養した。菌数：0

わさ太郎ガスによる抗菌効果の写真
 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802

わさ太郎ガスによる抗菌効果の写真
黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* FDA209P



CONT
菌数：1116

アレルイソチシアネート
BIO. 100がス噴霧



わさ太郎ガス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：947

アレルイソチシアネート
BIO. 200がス噴霧



わさ太郎ガス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：950



わさ太郎ガス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：614



わさ太郎ガス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

アレルイソチシアネート
BIO. 300がス噴霧



わさ太郎ガス環境内に30分放置した後
取り出し培養した。菌数：936



わさ太郎ガス環境内に60分放置した後
取り出し培養した。菌数：630



わさ太郎ガス環境内に24時間放置した後
取り出し培養した。菌数：0

黄色ブドウ状球菌 (*Staphylococcus aureus* FDA209P)

CONT	1116/100%
BIO.10030分	947/84.86%
60分	
24H	
BIO.20030分	950/85.13%
60分	614/55.02%
24H	0
BIO.30030分	936/83.87%
60分	630/56.45%
24H	0

枯草菌 (*Bacillus subtilis* PCI219)

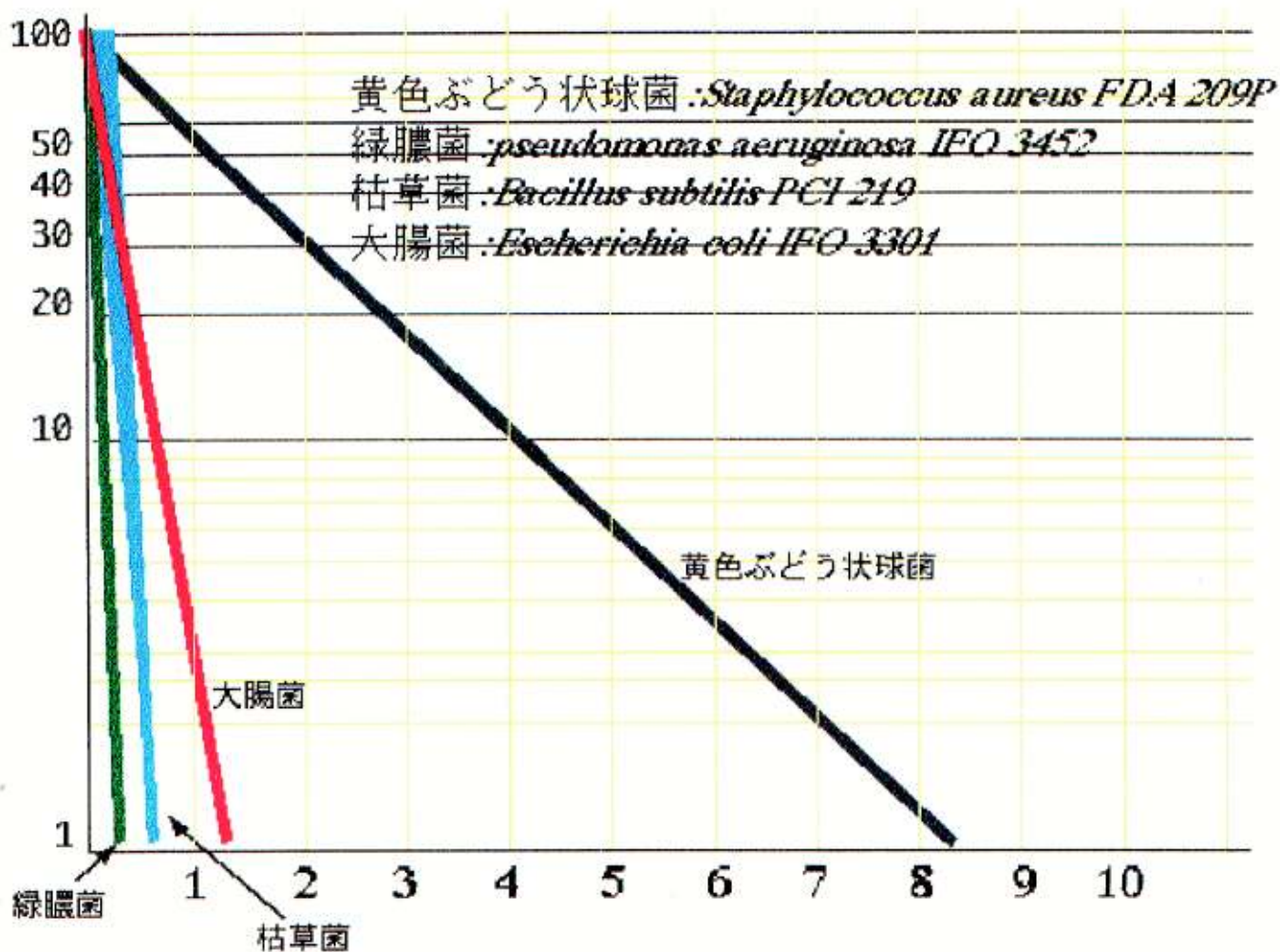
CONT	65/100%
BIO.10030分	12/18.46%
60分	
24H	
BIO.20030分	18/27.69%
60分	14/21.54%
24H	0
BIO.30030分	12/18.46%
60分	0
24H	0

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* IFO3452)

CONT	181/100%
BIO.10030分	14/7.73%
60分	1/0.55%
24H	0
BIO.20030分	0
60分	0
24H	0
BIO.30030分	0
60分	0
24H	0

大腸菌 (*Escherichia coli* IFO3301)

CONT	271/100%
BIO.10030分	174/64.21%
60分	25/9.23%
24H	0
BIO.20030分	100/36.90%
60分	41/15.13%
24H	0
BIO.30030分	77/28.41%
60分	5/1.85%
24H	0



腸炎ビブリオ (*Vibrio paraphaemolyticus* ATCC17802)

CONT	38/100%
BIO.10030分	3/7.89%
60分	3/7.89%
24H	1/2.63%
BIO.20030分	1/2.63%
60分	0
24H	0
BIO.30030分	0
60分	0
24H	0

乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC10012)

CONT	143/100%
BIO.10030分	112/78.32%
60分	82/57.34%
24H	19/13.29%
BIO.20030分	86/60.14%
60分	79/55.24%
24H	10/6.99%
BIO.30030分	49/34.27%
60分	32/22.38%
24H	3/2.10%

乳酸菌 (*Streptococcus faecalis* AHU1256)

CONT	207/100%
BIO.10030分	158/76.33%
60分	65/31.40%
24H	21/10.14%
BIO.20030分	100/48.31%
60分	31/14.98%
24H	7/3.38%
BIO.30030分	72/34.78%
60分	24/11.59%
24H	3/1.45%

