

## 二倍体および四倍体ショウガの二次代謝成分と抗菌活性

西川 和孝・\*田中 章江・\*石丸 幹二  
(鳴門教育大学学校教育学部, \*佐賀大学農学部)

### 緒 言

ショウガ (*Zingiber officinale* Roscoe) は、ショウガ科に属する多年生草本で、熱帯アジアの原産であるが、今日では広く世界中に栽培されている。ショウガは熱帯地域においても花はつけるが結実しないことから、根茎による栄養繁殖を行っており、品種はあまり分化していない<sup>1)</sup>。通常のショウガは二倍体 ( $2n=22$ ) であるが、Adaniya らがコルヒチン処理による育種学的手法<sup>2-5)</sup>を用いることによって、四倍体ショウガ ( $2n=44$ ) の作出を可能にした。これによって、ショウガの大量増殖、花粉稔性向上等に大きく寄与することとなった。また、四倍体ショウガは二倍体に比べ大型化することが報告されているが<sup>2-5)</sup>、四倍体ショウガの有効成分についての報告はほとんどない。特に、ショウガの根茎は食用および薬用として広く利用され、その特徴としては、特異の香気と強い辛味があげられる。現在では、ショウガから分離された精油や溶媒抽出物であるオレオレジン<sup>6)</sup>は、種々の食品や飲料の風味添加物として用いられ、鎮痙作用、抗潰瘍作用、抗菌作用等を有することも報告されている<sup>6,7)</sup>。一方、ショウガの辛味成分は、gingerol 類, shogaol 類等であり、抗酸化、下痢抑制作用、抗腫瘍活性、抗アレルギー活性、強心活性等の数多くの効果を示すことが報告されている<sup>8-10)</sup>。そこで、二倍体および四倍体ショウガの二次代謝物である香気成分と辛味成分を定性・定量分析することによって有用成分の比較を

行うとともに、各ショウガ水性エタノール抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性の比較検討を行い、四倍体ショウガの食品としての有用特性を明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

#### 1. 材 料

ショウガはすべて高知県産の‘黄金の里’を用いた。四倍体の作出は、Adaniya, Okada らの方法<sup>3-5)</sup>に従い、茎頂を 0.2% コルヒチンを含む 2.0mg/L BA および 0.05mg/L NAA を添加した MS 培地にて 8 日間処理後、MS 培地にて植物体を作成した。植物体は圃場に順化後、栽培して根茎を得た。二倍体ショウガは、処理をしない茎頂を同様に培養および順化後、根茎を得た。コルヒチン処理後に再生した植物体と処理後順化して約 1 年経過した植物体について染色体を観察した。染色体数の確認は Adaniya, Okada らの方法<sup>3-5)</sup>に従い、二倍体および四倍体ショウガを同定した。ショウガの根茎は収穫・貯蔵後、冷凍保存 (-50℃) し、分析に用いた。

#### 2. 香気成分分析 (GC および GC-MS 分析)

ショウガ根茎 (鮮姜) のコルク皮を除き、おろし金ですりおろし、ろ過した搾汁 9 mL に n-ヘキサン 1 mL を加え、遠心分離 (3,000rpm, 15 分間) 後、ヘキサン画分を濃縮して香気成分を得た<sup>11,12)</sup>。得られたショウガの香気成分は、GC (島津社製 GC-14A, FID) にて定性・定量した。GC の条件は以下のとおりである<sup>13)</sup>。カラム: DB-1 キ

ャピラリーカラム (0.25mm i.d. × 30m, 0.25 μm film thickness), カラム温度: 50°C (2 min) → 3°C/min → 230°C (10min), 試料気化室温度: 250°C, 検出器温度: 250°C, キャリアーガス: 窒素, ガス流量: 1.8mL/min. また, 上記の GC 条件で GC-MS (島津社製 GC-17A/QP-5000) による定性分析も行った。

### 3. 辛味成分の抽出と単離, 同定

四倍体ショウガ根茎 (干生姜) (乾燥重量 37.47g) をメタノール (800mL × 3回) およびジクロロメタン (800mL × 3回) で抽出した (全体で 16 時間, 室温下)。得られた抽出エキスをエ

バポレーターにて濃縮した。濃縮エキスを水と混合し Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付した。さらに得られた画分を, Preparative C<sub>18</sub> また Sephadex LH-20 等のカラムクロマトグラフィーにて精製し, 化合物 **1** (196.5mg) および **2** (32.2mg) を単離した (Fig. 1)。精製した化合物については, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, また UV スペクトル等を測定した。それらのスペクトルデータを文献値<sup>14-16)</sup> と比較することにより, 化合物 **1** は [6]-gingerol, 化合物 **2** は [6]-dehydroparadol と同定した (Fig. 2)。

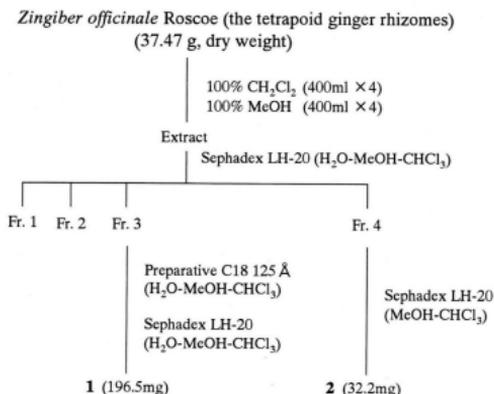


Fig. 1 Isolation 1 and 2 from the tetraploid ginger rhizomes

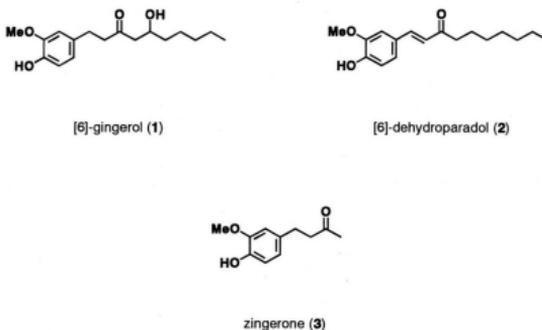


Fig. 2 Chemical structures compounds of ginger tested in this study

## 4. 辛味成分の定量分析 (HPLC 分析)

ショウガ根茎 (干生姜) の辛味成分の定量分析は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。干生姜を 50% 水性エタノールにて室温下 16 時間抽出した<sup>17, 18)</sup>。抽出液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$  m, Millipore 社, USA) にて濾過し、得られる各抽出エキス (2mL) を 25°C 遠心エバポレーター (UNIVAPO 100H, UNIJET II, UniEquip 社, Germany) にて濃縮 (1mL まで) 後、滅菌蒸留水を加えて 2mL に秤量した。得られた抽出エキスを HPLC 分析に供した<sup>18)</sup>。HPLC 分析は以下のとおりである<sup>1)</sup>。カラム: TSK-gel ODS 80Ts (4.6mm i.d.  $\times$  250mm), 移動相溶媒: MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1, 40min), 流速: 0.4 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出: 280nm, Rt (min): [6]-gingerol (1) (8.79), [6]-dehydroparadol (2) (9.46), zingerone (3) (7.55), Zingerone (3) は市販品 (Sigma-Aldrich 社) を用いた。

## 5. ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性

ショウガ (干生姜) の上記抽出エキスおよび辛味成分について、グラム陰性菌の *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* PAO4290, *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella enteritidis* 11654, *Vibrio parahaemolyticus* Na2, *Yersinia enterocolitica* SYT-11-72 およびグラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* ATCC25923,

*Listeria monocytogenes* 4A (AFISC2318), *Bacillus cereus* IFO 3131 に対する抗菌テストを行った。各種菌株を **Table 1** の各種条件下にて培養した<sup>19)</sup>。各種サンプルの最小発育阻止濃度 (MIC) は、微量液体希釈法により各種薬剤濃度に対する感受性を検査して算出した<sup>18)</sup>。また、対照薬剤として penicillin G および erythromycin を用いた。最初の接種菌量は、 $2 \times 10^5$  cfu/mL に調製した。24 時間培養後、各サンプルの抗菌活性をマイクロプレートリーダー (655nm 検出, Model 450, Bio-Rad 社, USA) によって MIC 値を測定した。

## 結果および考察

## 1. 香氣成分分析 (GC および GC-MS 分析)

二倍体および四倍体ショウガ中の香氣成分組成を GC および GC-MS にて分析した結果、17 種類の成分を同定した (**Table 2**)。モノテルペン類は、5 種類の炭化水素 ( $\alpha$ -pinene, camphene, myrcene,  $\beta$ -pinene, terpinolene) および 7 種類の含酸素化合物 (linalool, citronellal, borneol, decanal, neral, geranial, geranyl acetate) であり、セキステルペン類は、3 種類の炭化水素 ( $\alpha$ -zingiberene,  $\alpha$ -farnesene,  $\beta$ -bisabolene) および 2 種類の含酸素化合物 (nerolidol, farnesol) であった。これらの同定成分はすべて既報のものであった<sup>11, 12, 20, 21)</sup>。モノテルペン類とセキステルペン

**Table 1** Organisms and growth conditions tested in this study

| Organisms                      | Media                         | Culture temp. (°C) |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Gram-negative bacteria         |                               |                    |
| <i>Escherichia coli</i>        | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Salmonella enteritidis</i>  | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Nutrient broth with 1.0% NaCl | 35                 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Nutrient broth with 0.5% NaCl | 30                 |
| Gram-positive bacteria         |                               |                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | Nutrient broth                | 35                 |
| <i>Bacillus cereus</i>         | Nutrient broth with 0.5% NaCl | 35                 |

**Table 2** Composition of volatile compounds from diploid and tetraploid ginger rhizomes (peak area %)

| Compounds             | Rt (min) | Diploid                       | Tetraploid                    |
|-----------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|
| $\alpha$ -Pinene      | (7.35)   | 1.34 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>  | 1.28 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  |
| Camphene              | (7.75)   | 5.74 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>  | 4.96 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>  |
| Myrcene               | (9.40)   | 0.60 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.51 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  |
| $\beta$ -Pinene       | (10.78)  | 6.49 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>  | 7.27 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>  |
| Terpinolene           | (13.55)  | tr <sup>b</sup>               | tr                            |
| Linalool              | (13.97)  | 0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  |
| Citronellal           | (15.98)  | tr                            | tr                            |
| Borneol               | (16.39)  | 0.54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>  | 0.15 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  |
| Decanal               | (18.39)  | 0.81 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>  | 1.95 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>  |
| Neral                 | (19.71)  | 0.26 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 0.26 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>  |
| Geranial              | (21.10)  | 4.17 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>  | 3.67 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>  |
| Geranyl acetate       | (26.58)  | 0.87 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>  | 0.90 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>  |
| $\alpha$ -Zingiberene | (32.03)  | 34.40 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup> | 31.71 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup> |
| $\alpha$ -Farnesene   | (32.58)  | 11.77 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 10.59 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup> |
| $\beta$ -Bisabolene   | (33.38)  | 12.57 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup> | 11.34 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup> |
| Nerolidol             | (34.39)  | 0.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  |
| Farnesol              | (40.82)  | 0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup>Trace (peak area less than 0.005%). Each value is the mean  $\pm$  SE for 6 samples. Values in the table not sharing a different superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Student's *t*-test using the statistical analysis system.

類の組成率は、二倍体および四倍体ショウガともに前者が約 21%，後者が 54～59% とセキステルベン類が高く、Connel & Jordan の報告と一致していた<sup>11)</sup>。二倍体および四倍体ショウガともに 3 種類のセキステルベン炭化水素が主要成分あり、その中でもショウガ特有の香りである  $\alpha$ -zingiberene が最も多く含まれていた (32～34%)<sup>11)</sup>。その他の香気成分では、新鮮なショウガに含まれる柑橘様芳香の neral と geranial、スズラン様芳香の linalool、樟脳様芳香の camphene が検出された<sup>11, 12)</sup>。また、日本産ショウガで特徴的な香気成分の一つとして報告されている geranyl acetate もわずかではあるが検出された<sup>12)</sup>。二倍体および四倍体ショウガともに geranial より geranyl acetate の含量が少なかったのは、ショウガ貯蔵中の酸化の影響が考えられた。また、今回検出した香気成分のうち、borneol, decanal および farnesol 以外は二倍体および四倍体間で有意差は認められなかった (Table 2)。特に、日本産ショウガの特徴的な香気成分の一つで柑橘様芳香の decanal は四倍体に、また樟脳様芳香の borneol は二倍体に多く含まれていたが<sup>12)</sup>、実際にはほとんど感知できない程度であった。従っ

て、二倍体および四倍体ショウガの香気成分組成は、ほとんど差異がないと考えられた。

## 2. 辛味成分の抽出と単離，同定および定量分析 (HPLC 分析)

ショウガ根茎には、gingerol 類、shogaol 類等の辛味成分が 0.6～1.0% 含まれていることが知られている<sup>6)</sup>。今回材料に用いた四倍体ショウガの辛味成分に関する研究報告はほとんどなく、辛味成分の解明および二倍体ショウガとの比較を行うことにより、四倍体ショウガの食品素材としての有用性を調査した。四倍体ショウガ乾燥根茎の抽出エキスを各種カラムクロマトグラフィーに付し、[6]-gingerol (1) および [6]-dehydroparadol (2) を単離・精製した (Fig. 1)。[6]-Gingerol (1) は、二倍体ショウガに最も多く含まれ、主な辛味成分であることが知られているが、四倍体ショウガにも同様に含まれていた。また同時に単離した [6]-dehydroparadol (2) は、Surh らによる報告はあるが<sup>5, 16)</sup>、四倍体ショウガから単離した報告はなく、新しい知見として注目される。

これらの化合物 (1, 2) と zingerone (3) を指標として、二倍体および四倍体ショウガの辛味成分の定量分析を行った。HPLC 分析の結果、二

**Table 3** Concentrations of pungent compounds extracted from diploid and tetraploid ginger rhizomes (% as dry weight of the ginger). [ ]  $\mu\text{g/mL}$ 

| Compounds          | Diploid               | Tetraploid |
|--------------------|-----------------------|------------|
| [6]-Gingerol       | 0.74 [237]            | 0.64 [206] |
| [6]-Dehydroparadol | 0.07 [ 21]            | 0.09 [ 14] |
| Zingerone          | tr <sup>a</sup> [ - ] | tr [ - ]   |

<sup>a</sup>Trace (peak area less than 0.005%). Each value is the mean for 5 samples.

Values in the table not sharing a different superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Student's t-test using the statistical analysis system.

倍体および四倍体ショウガともに [6]-gingerol (1) が乾燥重量当たり約 0.7% と最も多く含まれていた (Table 3)。また, [6]-dehydroparadol (2) は, [6]-gingerol (1) 程多くはないが乾燥重量当たり 0.07 ~ 0.09% とわずかに含まれていた。[6]-Gingerol (1) および [6]-dehydroparadol (2) とともに二倍体および四倍体ショウガ間で含量に有意差は認められなかった。また, zingerone (3) はほとんど検出されなかった (Table 3)。実際に食してみても辛味成分の違いはほとんど感じられず, 二倍体および四倍体ショウガの辛味成分の組成はほとんど変わらないと考えられた。

### 3. ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性

二倍体および四倍体ショウガ根茎の抽出エキスの抗菌スペクトルおよび MIC 値を Table 4 に示す。ショウガ抽出エキスは供試したグラム陽性菌に対し, 高い抗菌活性を示した。特に, 二倍体および四倍体ショウガとともに, *Staphylococcus*

*aureus* および *Bacillus cereus* に対し, 明らかな抗菌性を示した (MIC: 4mg/mL)。また, *Listeria monocytogenes* に対する MIC 値も 8mg/mL (二倍体) および 4mg/mL (四倍体) と比較的高いことがわかった。一方, グラム陰性菌に対しては, 低い抗菌性であり, 今回調査した菌種 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* および *Yersinia enterocolitica*) および濃度において活性を示さなかった。*Pseudomonas aeruginosa* および *Vibrio parahaemolyticus* に対しては, 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスの MIC 値は 16mg/mL とわずかな抗菌性を示した。これは, 植物由来の抽出エキスがグラム陰性菌よりグラム陽性菌に対し感受性を示すという今迄の知見と一致していた<sup>22)</sup>。以上の結果から, 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスに含まれている化合物が, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* および *Listeria monocytogenes* のグラム陽性菌に対し, 比較的強い抗菌活性を有することが明らかとなった。

次に, 化合物 1-3 と抗菌活性の関連性について調査した。化合物 1-3 の MIC 値は Table 5 に示す。その結果, [6]-dehydroparadol (2) および zingerone (3) はグラム陽性菌および陰性菌に対してもほとんど抗菌活性を示さなかった。[6]-Gingerol (1) は, [6]-dehydroparadol (2) および zingerone (3) に比べて抗菌性があり, さらに

**Table 4** Antibacterial activities of the extracts of diploid and tetraploid ginger rhizomes (MIC values in mg/mL)

| Organisms                      | Diploid | Tetraploid |
|--------------------------------|---------|------------|
| Gram-negative bacteria         |         |            |
| <i>Escherichia coli</i>        | >16     | >16        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 16      | 16         |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | >16     | >16        |
| <i>Salmonella enteritidis</i>  | >16     | >16        |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 16      | 16         |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | >16     | >16        |
| Gram-positive bacteria         |         |            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 4       | 4          |
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | 8       | 4          |
| <i>Bacillus cereus</i>         | 4       | 4          |

Table 5 Antibacterial activities of pungent compounds in ginger rhizomes (MIC values in  $\mu\text{g/mL}$ )

| Organisms                      | [6]-Gingerol | [6]-Dehydroparadol | Zingerone | Penicillin G | Erythromycin |
|--------------------------------|--------------|--------------------|-----------|--------------|--------------|
| Gram-negative bacteria         |              |                    |           |              |              |
| <i>Escherichia coli</i>        | 1,000        | >1,000             | >1,000    | 15           | 62.5         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 500          | 1,000              | >1,000    | >1,000       | 125          |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | 1,000        | >1,000             | >1,000    | 0.25         | 125          |
| <i>Salmonella enteritidis</i>  | 1,000        | >1,000             | >1,000    | 0.5          | 125          |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 500          | 1,000              | 1,000     | 250          | 4            |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1,000        | >1,000             | >1,000    | 250          | 64           |
| Gram-positive bacteria         |              |                    |           |              |              |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 250          | 1,000              | 1,000     | 0.03         | 1            |
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | 500          | 1,000              | 1,000     | 4            | 62.5         |
| <i>Bacillus cereus</i>         | 500          | 1,000              | >1,000    | 125          | 0.25         |

グラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して抗菌性が認められた。特に、[6]-gingerol (1) の MIC 値は、*Staphylococcus aureus* に対し  $250 \mu\text{g/mL}$ 、*Pseudomonas aeruginosa*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Listeria monocytogenes* および *Bacillus cereus* に対し  $500 \mu\text{g/mL}$  であった。四倍体ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性は penicillin G や erythromycin のような市販の抗生物質と比べ低い活性であったが (Table 5)、[6]-gingerol (1) はショウガ水性エタノール抽出エキスに多く含まれており (Table 2)、ショウガの抽出エキスの抗菌性の多くは [6]-gingerol (1) に起因するものと思われる。また、zingerone (3) より [6]-dehydroparadol (2) が、*Pseudomonas aeruginosa* および *Bacillus cereus* に対して、若干強い抗菌性を有していた。このことは、Ficker らの報告<sup>23,24)</sup> のとおり gingerol 類の炭素鎖長の違いと水酸基数が抗菌性に重要な役割を持つと考えられる。

Dhawan & Lavania は、倍数体を作出するとその二次代謝成分は増加する傾向があると報告している<sup>25)</sup>。しかし、今回調査したショウガの場合、香気成分、辛味成分ともに変化は認められなかった。四倍体ショウガは大型化されるが<sup>2~5)</sup>、有用二次代謝成分は保持されており、その食品としての有効性は変わらないと考えられる。また、二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスおよび化合物の抗菌活性を評価することができた。四倍体シ

ョウガの水性エタノール抽出エキスおよびショウガに含まれる辛味成分である gingerol 類がグラム陽性菌に対し、抗菌活性を示した。MIC 値にて表したように、四倍体ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性は penicillin G や erythromycin のような市販の抗生物質と比べ低い活性であった。しかしながら、食生活における近年の国際化と健康指向による低塩化は、香辛料の使用を増大させている。そのため今回の研究材料である四倍体ショウガは新たな香辛料の一つとして、合成保存料とは違った食中毒細菌に対する食品添加物としての可能性があるのではないかと考えられる。

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝の意を表しますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

## 文 献

- 1) Nakasone, Y., Yonaha, M., Wada, K., Adaniya, S., Kikuzaki, H. and Nakatani, N: Evaluation of pungency in the diploid and tetraploid types of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidative activity of their methanol extracts. *Jpn. J. Trop. Agric.* **43**: 71-75 (1999)
- 2) Ramachandran, K: Polyploidy induced in ginger by colchicine treatment. *Curr. Sci.* **51**: 288-289 (1982)
- 3) Adaniya, S. and Shirai, D: In vitro induction of tetraploid

- ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci. Hort.* **88**: 277-287 (2001)
- 4) Adaniya, S.: Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. *Sci. Hort.* **90**: 219-226 (2001)
- 5) Okada, M. and Matsumoto, M.: Induction of tetraploid ginger by tissue culture technique. *Bull. Kochi Agric. Res. Ctr.* **2**: 37-40 (1993)
- 6) Yamahara, J., Hatakeyama, S., Taniguchi, K., Kawamura, M. and Yoshikawa, M.: Stomachic principles in ginger. II. Pungent and anti-ulcer effects of low polar constituents isolated from ginger, the dried rhizoma of *Zingiber officinale* Roscoe cultivated in Taiwan. The absolute stereostructure of a new diarylheptanoid. *Yakugaku Zasshi* **112**: 645-655 (1992)
- 7) Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrell, R.E.: Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **65**: 1545-1560 (2002)
- 8) Kikuzaki, H. and Nakatani, N.: Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* **58**: 1407-1410 (1993)
- 9) Huang, Q., Matsuda, H., Sakai, K., Yamahara, J. and Tamai, Y.: The effect of ginger on serotonin induced hypothermia and diarrhea. *Yakugaku Zasshi* **110**: 936-942 (1990)
- 10) Yamahara, J., Matsuda, H., Yamaguchi, S., Shimoda, H., Murakami, N. and Yoshikawa, M.: Pharmacological study on ginger processing. I. Antiallergic activity and cardiotonic action of gingerols and shogaols. *Natural Medicines* **49**: 76-83 (1995)
- 11) Connell, D.W. and Jordan, R.A.: Composition and distinctive volatile flavour characteristics of the essential oil from Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). *J. Sci. Fd. Agric.* **22**: 93-95 (1971)
- 12) Nishimura, O.: Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 2941-2945 (1995)
- 13) Mitiku, S.B., Sawamura, M., Itoh, T. and Ukeda, H.: Volatile components of peel cold-pressed oils of two cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) from Ethiopia. *Flavour Fragr. J.* **15**: 240-244 (2000)
- 14) Agarwal, M., Walia, S., Dhingra, S. and Khambay, B.P.: Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Manag. Sci.* **57**: 289-300 (2001)
- 15) Surh, Y.J. and Lee, S.S.: Enzymatic reduction of xenobiotic  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones: formation of allyl alcohol metabolites from shogaol and dehydroparadol. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **84**: 53-61 (1994)
- 16) Keum, Y.S., Kim, J., Lee, K.H., Park, K.K., Surh, Y.J., Lee, J.M., Lee, S.S., Yoon, J.H., Joo, S.Y., Cha, I.H. and Yook, J.I.: Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Letters* **177**: 41-47 (2002)
- 17) Gughani, H.C. and Ezenwanze, E.C.: Antibacterial activity of extracts of ginger and African oil bean seed. *J. Com. Dis.* **17**: 233-236 (1985)
- 18) Patar, A., Nishikawa, K., Tanaka, N., Ishimaru, K. and Maeda, H.: Antibacterial activities of extracts and constituents in the complex of tea catechins and soybean protein. *Jpn. J. Food Chem.* **10**: 161-164 (2003)
- 19) Hara, Y. and Ishigami, T.: Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **36**: 996-999 (1989)
- 20) Martins, A.P., Salgueiro, L., Goncalves, M.J., da Cunha, A.P., Vila, R., Canigual, S., Mazzoni, V., Tomi, F. and Casanova, J.: Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tome and Principe. *Planta Med.* **67**: 580-584 (2001)
- 21) Suga, T. and Sakamura, F.: Essential oil constituents of ginger rhizomes — *In vivo* and *in vitro* propagated ginger rhizomes —. *Koryu* **156**: 65-73 (1987)
- 22) Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S. and Antolic, A.: Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. *J. Ethnopharmacol.* **52**: 119-122 (1996)
- 23) Ficker, C., Smith, M.L., Akpagana, K., Gbeassor, M., Zhang, J., Durst, T., Assabgui, R. and Arnason, J.T.: Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother. Res.* **17**: 897-902 (2003)
- 24) Yamada, Y., Kikuzaki, H. and Nakatani, N.: Identification of antimicrobial gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Antibact. Antifung. Agents* **20**: 309-311 (1992)
- 25) Dhawan, O.P. and Lavania, U.C.: Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica* **87**: 81-89 (1996)

## Secondary Metabolites and Antibacterial Activities of the Rhizomes of Diploid and Tetraploid Gingers (*Zingiber officinale* Roscoe)

Kazutaka Nishikawa, \*Norie Tanaka and \*Kanji Ishimaru

(Naruto University of Education and \*Saga University)

The rhizomes of diploid and tetraploid gingers (*Zingiber officinale* Roscoe), 'Koganenosato', were studied in the composition of volatile and pungent compounds and the antibacterial activity. The tetraploid ginger was derived from the diploid ginger by *in vitro* colchicine techniques. GC and GC-MS analysis revealed that the composition of volatile compounds in diploid and tetraploid gingers exhibited a similar compositional pattern. The pungent compounds were also isolated from the tetraploid ginger rhizomes and their structures were established as [6]-gingerol and [6]-dehydroparadol by chemical and spectroscopic evidence for the first time. Moreover, HPLC analysis showed that the composition of pungent compounds in tetraploid gingers was not altered from that of diploid ginger. In addition, extracts and pungent compounds in the rhizomes of diploid and tetraploid gingers were screened for their antibacterial activity against 6 Gram-negative bacteria and 3 Gram-positive bacteria. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of extracts and pungent compounds in the rhizomes were determined by the microdilution method ranged from 0.49 to 16,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.03 to 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Extracts and pungent compounds in the rhizomes exhibited a fairly high antibacterial activity against the spectrum of most Gram-positive bacteria tested.