Lauroylsarcosine 並びに Sodium-lauroylsarcosinate

の抗菌性, 毒性並びに食品保存効果について

Studies on Antimicrobial Activities, Toxicities and Preservative Effects of Lauroylsarcosine and of Sodium-Lauroylsar upon Food Stuffs

千葉大学腐敗研究所 (主任 相磯和嘉教授)

讃 井 秀 夫

Hideo Sanui

The Institute of Food Microbiology, Chiba University

(Director: Prof. Dr. K. Aiso)

緒 言

Lauroylsarcosine $C_{11}H_{23}CON(CH_3)CH_2COOH$ は水溶液としてある種の細菌, カビ, 酵母の発育を抑制したり, 細菌酵素に活性を阻害する作用を有するが, これをソーダ塩とすると更に界面活性の性質をおび各種の実用価値をもつようになる。Geigy Industrial chemicals においては, この sodiumlauroylsarcosinate を製造し Sarkosyl と名付けて販売している。その用途は歯磨, シャンプー, 洗剤, 清浄用 クリーナ, 食料品 その他工業用防蝕剤, 減磨剤等多方面にわたっている。我が国においてはライオン油脂株式会社で Geigy chemical とは別の製造法で本品を製造している。著者は同社からラウロイルサルコシン並びにラウロイルサルコシン酸ソーダ(SLS)の試作品の提供をうけ, 各種食品微生物に対する発育阻止作用の諸条件, 食品に添加した場合の保存効果並びに毒性について検討を加えた。以下の記載においては lauroylsarcosin を LS, sodiumlauroylsarcosinate を SLS と略称する。

1. 食品細菌に対する発育阻止作用

LS は常温では黄褐色の液体であり $10^{\circ}C$ 以下では固化し白色となる。1%水溶液は pH 5.8 を示し, 白濁した浮遊状態であつていわゆる石けんの匂ひがわずかに残るが 0.1% ではほとんど匂ひが無い。SLS は白色の粉末で水によくとけ匂ひも着色もない。各濃度の LS 及び SLS を添加した nutrient agar plate を作成し agar str-

eak method によつて, 各種食品細菌に対する発育阻止作用を検討した。第1表は当研究所保存¹⁾の菌株のうち代表的の7種の好気性食品細菌から教室にて被験菌株として使用している7株を選んで行つた実験の成績である。Staphylococcus には $4,000 \sim 8,000 \times$ まで, Bacillus subtilis には $4,000 \times$ までで発育を阻止しグラム陽性菌には抗菌性のあることを示している。グラム陰性桿菌では大腸菌, 螢光菌, 靈菌にはなんらの抗菌作用が見られないが Flavobacterium には $8,000 \times$, Proteus vulgaris にも $8,000 \times$ までで発育阻止を示し撰択的作用のあることを示している。特に E. coli F₁ 株のように比較的他の抗菌物質には感受性の高いはずの菌に無効であるのに, プロテウス菌に有効であることは注目されることである。又 SLS と LS では抗菌価にほとんど差異は認められなかつた。そこで当研究所保存になる各食品細菌の菌属の多数の株について同様の抗菌力検査を行つた。第2表にあげたようにグラム陽性球菌では Staphylococcus は4株共 $10,000 \times$ まで, Sarcina は $4,000 \times$ で全株阻止されたのに Micrococcus 18株には全く阻止力が無かつた。好気性芽胞菌も42株中13株が $1,000 \times$ 以下で阻止された。これに反しグラム陰性菌では Escherichia, Achromobacter, Pseudomonas, Serratia は全株 $100 \times$ で発育しており, わずかに Proteus の8株と, Flavobacterium の多数の株に抗菌力が見られた。すなわち本剤は抗細菌作用は強力ではなくかつ撰択性の強い物質であることが判明した。

第 1 表 LS 並びに SLS の細菌に対する発育阻止作用

organism	dilution	0	500	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000
Staphylococcus 209 P	SLS	+	—	—*	—	—	±	+
	L S	+	—	—	—	—	+	+
Escherichia coli F 1	SLS	+	+	+				
	L S	+	+	+				
Bacillus subtilis PCI	SLS	+	—	—	—	—	+	+
	L S	+	—	—	—	+	+	
Pseudomonas aeruginosa	SLS	+	+	+				
	L S	+	+	+				
Flavobacterium F-101	SLS	+	—	—	—	—	—	+
	L S	+	—	—	—	—	—	+
Serratia marcescens	SLS	+	+	+				
	L S	+	+	+				
Proteus vulgaris Y 0-1	SLS	+	—	—	—	—	—	+
	L S	+	—	—	—	—	—	+

agar streak method, 27°C, 24 hrs.

* SLS の結晶が析出する

第 2 表 SLS の各種食品細菌並びにカビ類、
酵母類に対する抗菌作用

organism	(strains)	0.1 [△]	0.25	0.5	1.0	10	10<
Staphylococcus	(4)	4	0	0	0	0	0
Micrococcus	(18)	0	0	0	0	0	18
Sarcina	(16)	14	2	0	0	0	0
Bacillus	(42)	1*	0	1	30	0	10
Escherichia	(19)	0	0	0	0	0	19
Aerobacter	(19)	0	0	0	0	0	19
Proteus	(77)	0	4	4	0	0	69
Serratia	(16)	0	0	0	0	0	16
Flavobacterium	(40)	10	0	5	5	6	14
Achromobacter	(11)	0	0	0	0	0	11
Pseudomonas	(50)	0	0	0	0		50
Mycobacterium	(2)	0	2				
Mold & Yeast	(29)	0	11	5	4	0	9

* 数字は各濃度 (mg/cc) における発育阻止菌株数

2. カビ、酵母類に対する発育阻止作用

食品に関連して収集された各カビ類、酵母類に対する抗菌作用を観察するため、細菌の場合と同じ方法で実験した。その成績は第 2 表に示したごとくである。すなわち 29 菌株中 4,000 × き釈で阻止されたもの 11 株、2,000 × のもの 5 株、1,000 × のもの 4 株で、20 菌株に対し阻止作用が見られ細菌の場合よりも広い抗菌像を示している。又各菌株の抗菌価は第 3 表にあげたごとく Trichophyton 類, Zygosaccharomyces 類, Willia, Torula などの野生酵母菌にもよく作用しているが見られた。

3. SLS の抗菌作用の安定性

SLS の抗菌作用が各種条件によりいかに影響されるかについて Flavobacterium F-101 菌株を用いて検討した。本株は SLS に感受性が高く 10,000 × き釈で発育が阻止される程度のものである。先づ培地の pH による影響については第 4 表に見るように pH 6.8~pH 7.8 まで全く抗菌力が阻害されることはなかった。次に pH 2.0, 7.0, 10.0 の SLS 水溶液の夫々を 100°C, 60°C 4°C に保ち時間の経過に伴う力価の推移をペーパーディスク法及びき釈検定法によつて観察したが第 5 表にあげたようになんらの阻害影響もなかった。SLS 水溶液を 20°C~27°C の室温に放置した場合と 5°C~7°C の氷室に保存した場合の力値の変化も調べたが第 6 表の如く 15 日間全く同じ抗菌力を保持していた。更に, Cystein, Glucose, Starch などの培地に添加して見たが第 7 表に示した様にやはり阻害作用は見られなかった。

4. 空中落下菌の発育阻止作用

抗菌剤を添加した寒天培地平板を空气中に一定時間さらした後培養して発生する集落を薬剤無添加の対照の平板のそれと、数的にまた質的に比較することによつて抗菌剤の効果を調べる方法は、相磯らによつてしばしば試みられているが、本法は落下菌の 1 つ 1 つがきわめて微量であるので agar streak method のごとく大量の被験菌を使用するのに比して鋭敏に現れるために有益な実験法である。著者は 18cm の直径を有する大型シャーレに 1 % にブドウ糖を添加した nutrient agar をベースとして、これに SLS を 2,000 × き釈になるように添加したもの

第 3 表 SLS のカビ、酵母菌に対する発育阻止作用 Agar streak method により 48 時間判定

被 検 菌	濃度 mg/cc	0.1 0.25 0.5 1			
		0.1	0.25	0.5	1
Absidia orchidis Hagen(+)		+	+	+	+
Absidia orchidis Hagen(-)		+	+	+	+
Absid. septata van Teghem		+	+	+	+
Cryptococcus pararesus		+	+	+	-
Crypt. rabrorugosus		+	-	-	-
Monilia albicans		+	+	+	+
Trichophyton interdigitale Takagi		+	-	-	-
Tricho. interdigit. Kato		+	-	-	-
Tricho. prupreum Kosaka		+	+	-	-
Streptococcus scabies Wackman		+	+	+	+
Candida cruse		+	+	+	-
Candida albicans		+	+	-	-
Zygosaccharomyces salus Nagao		+	-	-	-
Zygosacch. salus Takahashi		+	+	-	-
Zygosacch soya Takahashi		+	-	-	-
Aspergillus oryzae		+	+	+	-
Aspergillus niger		+	-	-	-
Nocardia NN-1		+	+	+	+
Saccharomyces Sake		+	+	-	-
Myoderma sp		+	-	-	-
Willia anomala		+	-	-	-
Torula rubra		+	-	-	-
Mucor musedo		+	+	+	+
Rhizopus nigricans		+	+	+	+
Pichia niso mogi		+	-	-	-
Oidium lactis		+	+	+	+
Pen. glaucum		+	-	-	-
Pen. crysogenum Q 176		+	+	-	-
Pen. cry. Q 176 pigmentless		+	+	-	-

第 4 表 培地 pH による抗菌力の安定性

pH	5,000×	10,000×	20,000×
6.8	-	-	+
7.0	-	-	+
7.2	-	-	+
7.8	-	-	+

を作製し、11月の某日、実験室の玄関口に50分さらしてから27℃に培養し時間と共に発生する集落をかぞえかつ肉眼的に大まかでわあるが、カビの集落と細菌の集落との比をとつて見た。第8表に見るようにSLS無添加の平板では24時間後 216, 48時間後 525, 72時間後は集落が重なつて数えられない程度にまで細菌やカビの発生が認められたのに対して2,000 ×にSLSを添加したものでは、48時間で2～5ケの集落、72時間でも4～19ケの集落しか認められなかつた。96時間では13～30ケになりこれを集落から判断して分析するとカビは8～19ケ、細菌は5～11ケを数え、カビの方が稍数量が多いように見えた。次に集落の拡大をふせぎかつカビの集落を見分けやすいように Czapek Dox 培地をベースとして4,000 ×にSLSを添加して研究室の内外で同様の実験を繰り返して見た。第9表に示すごとく落下菌の集落発生阻止効果はきわめて強く表現された。(写真参照)

SLS及びLSの毒性

1. LS及びSLSをマウスに腹腔内注射したときの急性毒性

体重15～20gのDD系マウスを用い、LSの水浮遊液を腹腔内に注射して5日間観察した。この際、注射量は100mg/kg から 260mg/kg までを6分し、各濃度に応じてマウスを6群とした。各群は6匹である。24時間後

第 5 表 pH, 温度, 時間による安定度

温 度	pH	2.0					7.0					10.0				
	時 間	0	1	3	6	12	0	1	3	6	12	0	1	3	6	12
100℃	ヘーパーディスク 阻止円直径 (cm)	1.0	1.0	1.0	1.0		1.0	1.0	1.0	1.0		1.0	1.0	0.9	0.9	
	き 釈 倍 率	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
60℃	ヘーパーディスク 阻止円直径 (cm)	1.2	1.2	1.2	1.2		1.2	1.1	1.1	1.2		1.1	1.2	1.2	1.1	
	き 釈 倍 率	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
4℃	ヘーパーディスク 阻止円直径 (cm)	1.2	1.2	1.1	1.1		1.2	1.1	1.1	1.2		1.1	1.2	1.1	1.2	
	き 釈 倍 率	200	200	200	209	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

pH 2.0, 7.0, 10.0 の SLS 水溶液を 100℃, 60℃, 4℃ に保ち時間経過に伴う力価の推移をヘーパーディスク法及びき釈検定法によつて見た (2 mg/cc を原液として)

第 6 表 室温並びに氷室における
水溶液の安定性

保存温度	日数	10,000×	20,000×
室温 (20~27°C)	3	—	+
	5	—	+
	7	—	+
	15	—	+
氷室 (5~7°C)	3	—	+
	5	—	+
	7	—	+
	15	—	+

第 7 表 培地に添加された諸物質による影響

添加物質とその濃度	1,000×	2,000×
普通寒天に Cystein を 0.1 % 加えた場合	—	+
普通寒天にブドウ糖を 2.0 % 加えた場合	—	+
普通寒天に澱粉を 2.0 % 加えた場合	—	+

第 8 表 空中落下菌の発育阻止作用
(1% Glucose nutrient agar)

濃度	平板	24	48	72	96
2,000 ×	1	0	2	4	13 { 8 カビ 5 細菌
	2	0	5	19	30 { 19 カビ 11 細菌
0	1	216	525	無数	無数

研究所玄関 11 月某日 16 時・曇天 50 分曝気

第 9 表 空中落下菌の発育阻止作用
(Czapek Dox agar)

		48	72	144
室内	4,000 ×	4	19	86
	0	107	233	無数
室外	4,000 ×	55	84	142
	0	104	246	無数

死するものもあるが 5 日間経過しないと変動は安定しない。その結果 LD₅₀ は 170mg/kg となつた。SLS についてはさきに協同研究者と共に発表²⁾ したようにマウスの腹腔内注射による LD₅₀ は 150mg/kg であつて、若干 LS の方が毒性が低いようにも見なされるが、もち論本質的な差異は見られない。

2. LS のマウス経口投与による毒性

Sodium lauroylsarcosinate 並に lauroylsarcosine の空中落下菌に対する発育阻止作用
研究室玄関 12 月 15 日、午後 4 時 40 分曝気

写真 1 薬剤無添加、バクテリア、カビが無数に増殖している

写真 2 SLS 3,000×き積濃度に添加、殆んど集落の発生は見られない

写真 3 LS 3,000×き積濃度に添加、殆んど集落の発生は見られない

LSを食塩水に浮遊させてマウス（1群4尾）に経口投与して5日間観察するとマウス当り0.06ccでは全例生存，0.08ccでは3例生存，0.1ccでは2例，0.12ccでは2例，0.14ccでは1例が生じ0.16ccでは全例が死亡した。LD₅₀は0.11cc/マウス，本品の1ccは0.925gであつたのでLD₅₀は5.1g/kgとなつた。

3. SLSの長期経口投与による毒性

体重50～80gのラットを用い本剤を一日一回ゾンドを以て強制投与して3ヶ月の長期実験を行った成績についてはすでに報告したし，このラット投与終了後の病理組織学的所見については小倉助教授らによつて報告されているので詳細は省略するが，体重の増加曲線は第1図にかかげたごとくである。瓶によれば50mg/kg投与群では肝，腎の変化は陰性であるが，100～300mg/kg群では若干病変が見られるとき所見を呈したが，高度のものではないと云う。

食品の保存実験

LS並にSLSが抗細菌，抗カビ，酵母菌作用を有する所から，本剤を食品に添加した場合の保存効果について，2，3の実験を行つて見た。

1) SLSの醤油に対する防カビ効果

野田醤油株式会社より加熱してないかつ防カビ剤の添加されてない醤油の分与をうけ，これを200ccづつ滅菌ガラス瓶にいれSLSを添加して27℃に保存して発カビの防止効果を見た。第10表にあげたごとく対照の醤油は

第 10 表 SLS の醤油に対する防カビ効果

濃度	保存日数	0	6	8	9	10	20	30	40	50	60
0		—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8,000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ZSS 移植		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

ZSS: Zygosaccharomyces sulsus, 保存温度 27℃

6日目より発カビを見，漸次拡大し9日では可食できない程度に全面に発カビをきたした。しかるに2,000×，4,000×，8,000×にSLSを添加したものは60日まで全く発カビを認めなかつた。たゞし各群とも表面にうすくSLSの結晶の析出したのを見た。8,000×き釈で有効であつたのはむしろ予期しない成績であつたので更にこの点は繰返し検討したい。なお4,000×の別のサンプルには Zygosaccharomyces sulsus を移植して見たが矢張の増殖は見られなかつた。

2) 魚肉ソーセージの防腐試験

自身の魚肉を用いてライフエンケーシングの魚肉ソーセージを自家製作して，あらかじめすり身にSLSを2,000×に添加して保存効果をみた。その成績は第11表のごとくでガスの発生は対照に比し6～7日遅れ，細菌数も増加が減少しているが見るべき効果はなく，実用には適しないと推定された。

第 11 表 魚肉ソーセージ*の防腐試験

濃度	検査事項	5	11	16	19日
SLS無添加	ガス	+	++	+++	+++
	NH ₃ -N	15.0			21.6
	細菌数	5×10 ⁵	3×10 ⁵	4×10 ¹⁰	
SLS 2,000×	ガス	—	+	++	++
	NH ₃ -N	15.0			18.0
	細菌数	5×10 ⁵	4×10 ⁷	28×10 ⁸	

保存温度 27℃ * ライフエンケーシング

3) カマボコの保存効果

自家製のカマボコについて保存効果を観察したが第12表に見るように，ネトの発生，カビの発生が10～20時間遅れた程度で見るべき効果をおさめることはできなかつた。その他果汁，食アンなどの保存試験も行つて見たが，従来の保存剤よりすぐれた効果は認められなかつた。

第 12 表 カマボコの保存効果

添加濃度	検査事項	0	1	2	3	4
SLS無添加	官能検査			腐敗臭 ネト	腐敗臭 ネト	同左カビ ネト
	pH	5.8	5.7	5.9	5.9	
	NH ₃ -N	17.0	19.6	30.8	30.8	39.2
SLS 2,000×	官能検査			ネト—	カビ ネト±	腐敗臭 カビ
	pH	5.8		5.7	5.8	5.9
	NH ₃ -N	17.0		22.4	25.2	36.4

考按並びに総括

界面活性剤が各方面に利用されるようなつて，その研究も格段の進歩を見せた。sodium lauroylsarcosinate もその一つである。この物質は lauroylsarcosine そのものが抗細菌，抗糸状菌性更にまた抗酵素性を^{3,4)}有することからその利用の範囲ははなはだ広範にわたっている。食物にこのような界面活性剤を添加することの可否については幾多の問題があるであろうが，実験的研究として

は興味あるテーマの一つであると考えられる。著者は lauroylsarcosine と sodium lauroylsarcosinate の両者を比較しながらその抗菌力の程度、抗菌像の広さ、抗菌力の安定性を検討して本物質が食品微生物に対してかなり興味ある発育阻止作用を有することを知り得たのであるが、さらに毒性を調べ必ずしもきわめて低い毒性とは云えないにしても動物が長期投与に堪えられることを観察した。ただし食品の 2, 3 に保存剤として添加して防腐、防カビ効果を調べたところでは醬油を除き必ずしも満足すべき成績ではなかった。著者の得られた成績を一括して列記すると次のごとくであった。

1. Lauroylsarcosine(LS) と Sodium-lauroylsarcosinate (SLS) はその抗菌作用は同程度で本質的な相違はない。グラム陽性球菌のうち Staphylococcus, Sarcina には 4,000 ~ 8,000 倍き積で発育を阻止するが Micrococcus の中には抵抗菌が少くない。好気性芽胞細菌の多くは 1,000 × ~ 10,000 × で阻止される。グラム陰性桿菌では Flavobacterium が感受性が高く、Proteus の中にも 8,000 × で阻止される菌株があるが、全般的には大腸菌を始めとして抗菌作用は認められない。

2. 本物質は細菌数に対するよりもカビ類、酵母菌類に抗菌力が強く、被験菌 29 菌株中 20 株が 1,000 ~ 4,000 × で阻止されており糸状菌、酵母菌に同じ程度作用している。

3. 本物質の抗菌力は pH, 熱, 水溶液での保存, 阻害剤の影響などをうけることなくきわめて安定な性質をもっている。

4. 本物質を 2,000 × ~ 4,000 × に添加した平板で空中落下菌の発育阻止を見ると、きわめて明確に発育阻止

効果が表現され無添加平板に生じた集落数の 90 ~ 95% が発育を抑制される。

5. 本物質のマウスの腹腔内注射時の LD_{50} は LS で 170mg/kg, SLS で 150mg/kg であり、経口投与の場合は LS で 5.5 g/kg 程度であった。ラットを用いて 50 mg/kg ~ 300 mg/kg の濃度を 3 カ月長期投与した場合の体重増加曲線は殆ど有意の差異は見られなかった。

6. SLS を防カビ剤無添加の加熱処理のしていない生醬油に 2,000 × ~ 8,000 × き積になるように添加して 27 °C に保存すると 2 カ月にわたって防カビ効果が見られたが表面に SLS の結晶の析出が見られた。

7. 魚肉ソーセージ, カマボコ等に SLS を 2,000 × に添加しても見るべき保存効果は認められなかった。

稿を終るに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲の労を賜った恩師相磯教授に深甚なる謝意を表し、あわせて種々御教示と御援助をいただいた飯田講師始め教職員各位の御助力に感謝の意を表する。なお Lauroylsarcosine 及び Sodium-Lauroyl-sarcosinate の提供を受けたライオン油脂株式会社に感謝する。

文 献

- 1) 腐敗研究所要覧, 31 (1956)
- 2) 相磯和嘉, 讃井秀夫, 飯田宏美: 'Sodium-N-lauroylsarcosinate の毒性に関する研究, 腐研報, 12, 4 (1959)
- 3) 藤正樸夫: 磨歯剤の効用に関する細菌学的研究, 十全医学会雑誌, 61, 68 (1959)
- 4) Cullum, D. C.: The determination of Sodium Laurate in Sodium N-Lauroylsarcosinate, Analyst 82, 120 (1957)

(受付 1960 年 1 月 9 日)