N^α-ココイル-L-アルギニンエチルエステルの

食品微生物生育抑制作用

青木誠一郎, 高野三郎, 長谷川忠男, 鈴木隆雄
(東京農業大学農芸化学科)

昭和 52 年 9 月 20 日 受理

Growth Inhibitory Actions of N^α-Cocoyl-L-Arginine Ethyl Ester to Food Microorganisms

Seiichiro AOKI, Saburo TAKANO, Tadao HASEGAWA and Takao SUZUKI
Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
Sakuragaoka-1, Setagaya-ku, Tokyo

CAE (N^α-cocoyl-L-arginine ethyl ester DL-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid salts) is the condensation product from fatty acids of coconut oil and L-arginine ethyl esters, and it is already known that CAE has antibacterial activity. So CAE has been examined with regard to the problems of a fungal growth inhibitor for lemons.

CAE showed the complete growth inhibitory action at such low concentration as 70 μg/ml to *Geotrichum candidum*, 75 μg/ml to *Penicillium italicum*, 10~300 μg/ml to another kinds of mould *in vitro*.

The colonial growth of *Geotrichum candidum* on the lemon rind were inhibited *in vivo*.

The intracellular substances such as proteins, glucides and nucleic acids were leaked out from the mycelium of fungi by treating with CAE.

When the surface of cell membrane treated with CAE were observed by electron microscopy, the big concavity occurred in the wall of mould, and the damage of mycelium were also realized.

It was considered that the antifungal activity of CAE came from the surface-active action.

(Received September 20, 1977)

緒 論

食品の保存に薬剤を用いることについて、最近世界各国では、その安全性を特に注目するようになった。わが国でもここ数年来、食品添加物の規制が厳しくなり、特にレモン輸送時の防腐剤 O. P. P. (オルトフェニルフェノール) の問題は内外に大きな波紋を投げかけた。

著者らは、人体への安全性の立場から、アミノ酸を主体とした化合物の農業利用への研究を以前から進めてきた^(1~4)。

本報では、天然脂肪酸とアミノ酸とで合成した N^α-ココイル-L-アルギニンエチルエステル-DL-2-ピロリド-5-カルボン酸塩 (以下 CAE と略)⁽⁵⁾ がレモン輸送時の防黴剤としてどのような効果を有するかを考察すると

ともに、他の一般微生物、特に食品腐敗に関係するかびおよび大腸菌についても検討を加えた。

また、CAE の有する防黴作用は、その界面活性作用によることが推定されることより、レシチン乳剤、ドデシル硫酸ナトリウム (S. D. S.) と比較しその効果を検討した。さらに CAE の物理作用については、膜への影響が第一にあげられる。またその強い界面活性力と合せて菌体膜への浸透力が大なることより膜表面に損傷を与え、これより菌体の内容物が漏出し、菌の発育が著しく阻害されるものと考え、これをもとに検討を加えたところ若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 供試薬剤 供試薬剤の CAE は前報⁽⁴⁾ 同様のの

素 K. K. より分譲されたものであるが、天然物であるが故に前報の CAE 組成と若干異なるのでここに示す。その成分組成は N^{α} -ラウロイル-L-アルギニンエチルエステル-DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸塩約 70%, N^{α} -ミリストイル-L-アルギニンエチルエステル-DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸塩約 23%, N^{α} -パルミトイル-L-アルギニンエチルエステル-DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸塩約 7% である。

2. 供試菌株および培地 供試菌株は本学栄養学科衛生学教室より分譲された *Penicillium citrinum*, *Rhizopus javanicus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, またレモンに付着する白かびは農林省興津果樹試験場より分譲された *Geotrichum candidum* (citrus race) を用い、さらに緑かび *Penicillium italicum* も用いた。培地は大腸菌がブイヨン培地を、他の菌株はマルツエキス培地、ジャガイモ半合成培地を使用した。

3. 生物活性試験 1) プレート法: 本法は CAE ならびに対照薬剤の供試菌株に対する抗菌力を求める目的で行なった。方法は従来のペトリ皿を用いての方法に従い、培地に CAE を 5~500 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、これにそれぞれ供試菌株を接種し、それぞれの菌株の適温で 24~72 時間培養後、コロニー数を測定し、これより有意差検定を行なった。

2) スライド法: 本法は液体培地による菌糸の発芽状態を顕微鏡下、スライド上で観察するとともに、本薬剤の菌糸発芽抑制濃度を求めた。

3) レモン果皮上での試験: 本法はレモン輸送時に多大な被害をもたらす白かび (*Geotrichum candidum*) を供試菌株とし、国産レモンを用いて 1 区 5 連とし、レモンを水洗後、風乾し、木綿針 10 本を 1 束としてレモン 1 個に付き 5 箇所、1 mm の深さに有傷し菌体接種後 25°C で培養した。結果は各処理区ごとに発生したコロニーの径を測定し (発芽径を x とする), $x=0$ mm を 0, 10 mm 以下を 1, 10 mm~20 mm を 2, 20 mm 以上を 3 と表わし、レモン 1 個をこれら表示数の総数として各区で比較した。

ただし、CAE は 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 対照薬剤区はベンレート水和剤 1000 $\mu\text{g/ml}$ を用いた。

4. CAE による菌体外漏出効果 1) たんぱく質定量: 本法は中西ら⁽⁶⁾の方法に準じて行なった。まず 24 時間培養を行なった菌体を 1 l~3 l の液体培地に接種し、43~72 時間 30°C または 37°C で通気培養し、集菌後

0.85% 生理食塩水で洗浄し供試菌体とした。次にこれをそれぞれ 1 g ずつ無栄養培地 (生理食塩水) に入れ、CAE 無処理区、CAE 添加区に調製して、毎分 150~200 往復で振盪し、経時的に培地を無菌的に取りメンブランフィルター (東洋濾紙, TM-300) を通して濾液を検体とした。検体は Lowry-Folin 法⁽⁷⁾に準じて定量した。

2) 糖の定量: 4. 1) より得た検体を Anthrone 法⁽⁸⁾に準じて定量した。

3) 核酸の定量: 核酸の定量は S. T. S. 変法⁽⁹⁾を用いた。本法は特に微生物微量定量に改良したものである。ここでは最終の培地 20 ml 中の RNA, DNA 量を分光光度計の 260 nm の吸光度で示した。

5. 電子顕微鏡を用いた試験 1) *in vitro* における試験: 4. 1) と同様に集菌した菌体を CAE 無処理区、CAE 150 $\mu\text{g/ml}$ 処理区とし毎分 150~200 往復で 60 分間振盪培養後集菌し、1/10 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄したものを検体とした。

次に常法⁽¹⁰⁾に従って 2% グルタルアルデヒド、1% オスミック酸で二重固定した後、30%, 100% エチルアルコールで順次脱水した。次に資料台上に 1 滴取り自然乾燥させた後、イオン蒸着 (Au, Pt) を行なって Scanning Electron Microscope (以下 S. E. M. と略)-35 で観察した。

実験結果および考察

寒天培地を用いてのプレート法においては、白かびおよび緑かびに効果が高く、それぞれ 70, 75 $\mu\text{g/ml}$ で生育抑制効果が認められた。また *E. coli* では 10 $\mu\text{g/ml}$ とさらに高い効果を示した。対照薬剤として用いた S. D. S. は CAE とほぼ同等の効果であったが、レシチン乳剤においては、その効果は 1000 $\mu\text{g/ml}$ でも認められなかった。さらにスライド法による結果は液体培地によるため、その効果はさらに強いことが認められた (Table I)。

またレモン果皮上における試験でも CAE の効果は強く認められ、一般に柑橘類の防黴剤として使用されているベンレート水和剤よりも強く、18 日目、26 日目での差異を認めた (Table II)。

菌体内容物の菌体外への漏出は、たんぱく質、糖質、核酸などすべてに認められた。たんぱく質においては *Geotrichum candidum* に効果が強く認められ (Fig. 1), *Rhizopus javanicus*, *Aspergillus niger* にもその効果

Table I. Effect of CAE on the Fungi at Minimum Inhibitory Concentration

Fungi	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CAE	S.S.D.	Lecithin (emulsifier)
<i>Aspergillus niger</i>	{ a) 100** b) 60**	—	a) none*
<i>Penicillium citrinum</i>	{ a) 300** b) 100**	—	a) none*
<i>Penicillium italicum</i>	{ a) 75** b) 50**	—	a) none*
<i>Rhizopus javanicus</i>	{ a) 100** b) 25**	a) 100**	a) none*
<i>Geotrichum candidum</i>	{ a) 70** b) 30**	a) 100**	a) none*
<i>Escherichia coli</i>	a) 10**	a) 50**	a) none*

* Indicate no activity in case of using the solution 1000 $\mu\text{g/ml}$. ** The antibacterial activity is shown as 1% significant level by *t*-test.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined under the following condition:

a) Plate culture were incubated at 27°C for 24 ~ 72 hr, but *E. Coli* was incubated at 37°C.
b) Slide culture were incubated at 27°C for 6 ~ 13 hr.

Table II. Effect of CAE on the Lemon Ride Inoculated by *Geotrichum candidum*

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Number of lemon	18 days	26 days
Control	No. 1	14 ^{a)} (5) ^{b)}	15 ^{a)} (5) ^{b)}
	No. 2	3 (3)	3 (3)
	No. 3	2 (2)	14 (5)
	No. 4	2 (2)	14 (5)
	No. 5	15 (5)	15 (5)
CAE 500	No. 1	1 (1)	15 (5)
	No. 2	15 (5)	15 (5)
	No. 3	3 (3)	4 (3)
	No. 4	9 (4)	9 (4)
	No. 5	1 (1)	1 (1)
CAE 1000	No. 1	2 (2)	7 (4)
	No. 2	15 (5)	15 (5)
	No. 3	1 (1)	3 (2)
	No. 4	3 (3)	7 (5)
	No. 5	1 (1)	3 (3)
Benlate 1000 (hydrate)	No. 1	15 (5)	15 (5)
	No. 2	12 (5)	15 (5)
	No. 3	3 (3)	15 (5)
	No. 4	15 (5)	15 (5)

A piece of lemon were inoculated by *Geotrichum candidum* in 5 places.

^{a)} Indicate the exponential number calculated from total sizes of diameter in the pathogenic colony. ^{b)} The number of colony in the lemon ride are designated in parentheses.

Fig. 1. Effect of CAE on the Protein Leakage from Mycelium. // These are shown the amount of protein leaked out from mycelium that were incubated with CAE for 5 hr.

Fig. 2. Protein Leakage from Mycelium of *Aspergillus niger* by CAE.

Fig. 3. Protein Leakage from Mycelium of *Penicillium citrinum* by CAE.

が確認された (Fig. 2). しかし, *Penicillium citrinum* においてはその効果に持続性が認められなかった (Fig. 3). また, 糖質においても同様な効果が認められ, *Geotrichum candidum* では 100 $\mu\text{g/ml}$, *Rhizopus javanicus* では 250 $\mu\text{g/ml}$ で効果を認めた (Fig. 4). さらに核酸についても同様な漏出効果が確認され, 特に RNA 画分にその差異を認めた (Fig. 5).

電子顕微鏡を用いた *in vitro* の条件における試験では CAE の 150 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で処理すると菌体の外壁

に大きな凹が認められたり, 菌糸が一部損傷を受けることが明らかになった (Fig. 6). さらに *in vivo* の条件に菌接種し, 10 日間培養したものにおいては, CAE の効果が実用的であることも確認された (Fig. 7).

CAE は *in vitro* の条件において, 10~300 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で菌生育抑制効果を示した. CAE は多種類の菌株に対して抗菌効果が認められ, 本剤の広範囲な殺菌性が示された. またレモンを用いての *in vivo* の試験においてはさらにその効果を裏付ける結果を得たことより本剤の実用性も考えられた.

また, 本剤の作用機作については, 菌体内内容物が菌体外に漏出することおよび電子顕微鏡による観察結果か

Fig. 4. Effect of CAE on D-Glucose Leakage from Mycelium. ▨ These are shown the amount of D-glucose leaked out from mycelium that were incubated with CAE for 5 hr.

Fig. 5. Effect of CAE on Nucleic Acid Leakage from Mycelium. ▨ RNA, □ DNA.

Fig. 6. Effect of CAE on the Terms of *In Vivo* for *Geotrichum candidum*. a : control, b : CAE 150 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 7. This Photograph Shows the Lemon Fruits Cultivated with *Geotrichum Candidum* for 10 Days *In Vivo*. Right : CAE treatment (500 μ g/ml) and inoculation, Center : no treatment and inoculation, Left : no treatment and no inoculation (control).

ら界面活性作用を確認することができた。

要 約

(1) CAE は *in vitro* の試験では 10~300 μ g/ml の低濃度で菌生育抑制効果を示した。

(2) レモンの果皮を用いた試験で CAE はレモンに付着する白かびに対し 500 μ g/ml で菌生育抑制効果を認めた。

(3) 菌体内容物の菌体外への漏出はたんぱく質, 糖質, 核酸などすべてに認められた。

(4) 電子顕微鏡を用いた *in vitro* の試験で CAE を処理すると, 菌の外壁に大きな凹が認められたり, 菌糸の損傷がみられた。

(5) CAE の抗菌作用はそれの有する界面活性作用によるものと考えられた。

終りにのぞみ電子顕微鏡使用にあたりご指導いただきました本学電子顕微鏡室中村重正助教授, 斉藤紀子助手に厚くお礼申し上げます。

本報告の概要は昭和 52 年度日本農芸化学会大会で講演した。

- (1) 高野三郎, 鈴木隆雄, 佐橋佳一 : 農化, **46**, 309 (1972).
- (2) 高野三郎, 長谷川忠男, 向 秀夫, 鈴木隆雄 : 農化, **48**, 325 (1974).
- (3) 高野三郎, 長谷川忠男, 向 秀夫, 中村重正, 鈴木隆雄 : 農化, **49**, 123 (1975).
- (4) 高野三郎, 長谷川忠男, 鈴木隆雄, 鍵渡徳次, 中村重正, 向 秀夫 : 農化, **50**, 377 (1976).
- (5) 日本特許公告, **47**-313.
- (6) 中西逸朗, 高日幸義, 富田和男 : 日植病報, **41**, 321 (1975).
- (7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (8) D. L. Morris : *Science*, **107**, 254 (1948).
- (9) 水野重樹 : 核酸の一般的分離定量法, 東京大学出版会, 1974, p. 30.
- (10) 田辺良美編 : 走査電子顕微鏡(基礎と応用), 日本電子顕微鏡学会関東支部編, 共立出版, 1976, p. 26.