清酒保存料としてのラウリル系化合物の 利用効果について (第2報)*¹

ラウリル系アミノ酸

(昭和 47 年 5 月 4 日受理)

原 昌道*² 大 場 俊 輝*² 菅間誠之助*²
秋 山 裕 一*² 村 上 英 也*² 奥 村 信 二*³

On the Useful Effect of Lauryl-compounds as the Preservatives for *Saké* (II) Lauryl-amino Acids

Shodo HARA*¹, Toshiteru OBA*¹, Seinosuke SUGAMA*¹, Hiroichi AKIYAMA*¹,
Hideya MURAKAMI*¹ and Shinji OKUMURA*²

(*¹ Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency: 2-6 Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo; *² Ajinomoto Co. Inc.: 1-7, Takara-cho, Chuo-ku, Tokyo)

Antimicrobial effects of 11 kinds of lauryl-amino acids listed as follows on the growth of Hiochi bacteria in *saké* (Japanese wine) were investigated: Lauryl glycinate·PCA (PCA: DL-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid), lauryl glycinate hydrochloride, lauryl DL-alaninate·PCA, lauryl DL-alaninate hydrochloride, lauryl L-valinate·PCA, lauryl L-valinate hydrochloride, lauryl L-leucinate·PCA, lauryl L-leucinate hydrochloride, lauryl ϵ -amino caprate·PCA, N-cocoyl L-arginine ethyl ester·PCA and sodium N-lauroyl glutamate.

1. Lauryl L-valinate hydrochloride, lauryl L-leucinate·PCA, lauryl L-leucinate hydrochloride and lauryl ϵ -amino caprate·PCA which had the strongest antihiochi activity among the 11 chemicals, inhibited the growth of most Hiochi bacteria at the concentration 5 ppm in diluted *saké* (13.5% of ethanol contained).

2. lauryl L-valinate hydrochloride had the highest solubility in *saké* among these 4 chemicals.

3. lauryl L-valinate hydrochloride had about 50 times as strong antihiochi activity as salicylic acid.

4. From the result of sensory test, lauryl L-valinate hydrochloride did not show any bad influence on the qualities of *saké* at 20 ppm of the concentration.

It was concluded, that the lauryl L-valinate hydrochloride seemed to be a new and good preservative for *saké*.

(Received May 4, 1972)

緒 言

前報¹⁾で著者らは9種類のラウリル系化合物について検討し、ラウリルアミンが火落菌に対する抗菌性、清酒中での溶解性の点でもっともすぐれており、3~4 ppmでサリチル酸と同程度に有効であること、この薬剤は6 ppm以上ではわずかに清酒に異臭を与え、3~4 ppm

が官能上での使用限界濃度であることを報告した。また普通の酒中に含まれる ethyl laurate^{2,3)}も有望であるが官能上問題があった。しかし、これら一連の研究においてラウリル系化合物の中には火落菌に対して非常に抗菌力の強いものが多いことが知られた。

本報告ではラウリルアミンと同程度に有効であり、かつ清酒にまったく異味異臭を与えないラウリル系化合物を検索する目的で各種ラウリル系アミノ酸について清酒防腐剤としての利用効果について検討したので報告する。

*¹ 本誌 12, 389 (1971):「清酒保存料としてのラウリル系化合物の利用効果について」を第1報とする。

*² 国税庁醸造試験所: 東京都北区滝野川 2-6

*³ 味の素株式会社: 東京都中央区宝町 1-7

実験方法

1. 供試薬剤

味の素(株)製の lauryl glycinate·PCA (PCA: DL-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid), lauryl glycinate hydrochloride·HCl, lauryl DL-alaninate·PCA, lauryl DL-alaninate hydrochloride, lauryl L-valinate·PCA, lauryl L-valinate hydrochloride, lauryl L-leucinate·PCA, lauryl L-leucinate hydrochloride, lauryl ϵ -amino caprate·PCA, N-cocoyl L-arginine ethyl ester·PCA (脂肪酸分布 C₁₂ 70%, C₁₄ 23%, C₁₆ 7%) sodium N-lauroyl glutamate の11種類の薬剤を使用した。これらの薬剤はいずれも50%エチルアルコールに溶解して使用した。

2. 火落菌

使用した火落菌は醸造試験所保存菌株で、つぎのとおりである。

L. homohiochii: H-42 (RIB 9001), S-24

L. heterohiochii: H-1 (RIB 9002), 9004, 9005, 9006, 9007, 9010, 9011, 9012, 9014, 9015, S-14, S-20

L. acidophilus: RIB 9003

3. 清酒培地

45酒造年度醸造試験所の製成酒をアルコール13.0%に加水し、65°10分間火入殺菌した酒を火落試験用清酒培地とした。

4. 火落試験

上記火落菌を1%ポリペプトン含有清酒培地、(アルコール13.0%)に接種し、30°で7~14日間培養する。つ

ぎに火落菌を10⁷/mlになるように滅菌水で希釈後、この0.1mlを薬剤添加の清酒培地(180mlびん中100ml)に接種する。

これを30°で50~60日間培養し、火落菌の増殖を肉眼で調べ、各薬剤の最少発育阻止濃度(M. I. C.)を求めた。なお薬剤添加後の清酒培地のアルコール濃度はいずれも13.5%とした。

5. 薬剤の清酒中での溶解性

薬剤を添加した清酒(アルコール15.5%)を300mlの青色ビンに入れ、25°で30日間放置後、酒の混濁の度合の表示として使用されるタービディティー値を求めた。つぎにこの酒を5°で5日間放置後、同様にタービディティー値を求め、これらの値を薬剤無添加酒のタービディティー値から差し引いて、薬剤の清酒中での溶解性をみた。なお、タービディティーの測定は森ら⁴⁾の方法によって行ない、1%シリカゾル液(スノーテックス)の散乱光度を100、蒸留水のそれを0としたときに対比する清酒の散乱光度を求めてタービディティー値とした。

実験結果ならびに考察

1. 各種薬剤の清酒中での溶解性

清酒中での各種薬剤の溶解性をTable 1に示す。表の数値は薬剤添加清酒を25°で30日放置した後のタービディティー値を、薬剤無添加清酒のそれから差し引いた値(ΔT)であり、カッコ内の数値はこの酒をさらに5°で5日間放置した後の ΔT 値である。 ΔT が15以上でわずかに酒に濁り(くもり)が認められるので、安全性をみて ΔT 10以下の薬剤として lauryl DL-alaninate の塩酸塩, PCA 塩ならびに lauryl L-valinate の塩酸塩,

Table. 1 Influence of Various Drugs on Turbidity Value of the Saké

Conc. of drug	$\Delta T = T - T_0$	
	20 ppm	30 ppm
lauryl glycinate·PCA*	7 (7)	8 (10)
lauryl glycinate hydrochloride	2 (18)	4 (59)
lauryl L-alaninate·PCA	1 (2)	2 (2)
lauryl DL-alaninate hydrochloride	2 (2)	3 (3)
lauryl L-valinate·PCA	2 (4)	5 (8)
lauryl L-valinate hydrochloride	2 (2)	2 (3)
lauryl DL-leucinate·PCA	12 (17)	45 (48)
lauryl L-leucinate hydrochloride	7 (10)	14 (19)
lauryl ϵ -amino caprate·PCA	3 (5)	7 (11)
N-cocoyl L-arginine ethyl ester·PCA	11 (12)	22 (25)

T_0 : Turbidity value of saké (alc. 16%)

T : Turbidity value of saké containing the drug

ΔT : $T - T_0$

(1) Figures show ΔT values of the saké which was kept at 25°C for 30 days

(2) Figures in parenthesis show the increased ΔT by keeping the saké described above in

(1) at 5°C for 5 days

*PCA : DL-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid

PCA 塩が有望である。またこの表から薬剤の溶解性は塩酸塩、PCA 塩の区別により差はなく、また炭素数の少ない glycine、比較的炭素数の多い leucine の lauryl ester ににがりがみられ、この中間の炭素数の alanine、valine の lauryl ester が溶解性がよいことがわかった。

2. 各種薬剤の抗火落性

Table 2 は各種火落菌を、11種類の薬剤添加酒にそれぞれ 10⁴/ml 接種した際の10, 20, 30, 40, 50日目における薬剤の最少発育阻止濃度 (M. I. C.) を示す。lauryl

glycinate·PCA の塩酸塩および PCA 塩、lauryl DL-alaninate の塩酸塩、PCA 塩は S-24 菌を除いて 10 ppm で有効で S-24 菌に対しては lauryl glycinate ester hydrochloride は 20 ppm で効いたが、他の3薬剤は 20 ppm でも火落した。また lauryl L-valinate の塩酸塩、PCA 塩、lauryl L-leucinate の塩酸塩、PCA 塩、lauryl ε-amino caprate·PCA は S-24 菌以外はいずれも M. I. C. は 5 ppm 以下であり、S-24 菌に対しては lauryl L-valinate·PCA が 15 ppm, その他は 10

Table 2. Antimicrobial Activity of Various Amino Acid Lauryl Esters against Hiochi Bacteria in *Saké*

1. lauryl glycinate·PCA

Hiochi bacteria \ Incubation days		M. I. C. (ppm)*				
		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	< 5	< 5	10
	S-14	< 5	< 5	< 5	10	10
	S-24	10	20	>20	>20	>20

* Minimal inhibition concentration

2. lauryl glycinate hydrochloride

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	< 5	10	10
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-24	10	10	15	20	20

3. lauryl DL-alaninate·PCA

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	10
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	10	10	10
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	10
	S-24	10	15	20	>20	>20

Table 2. continued

4. lauryl DL-alaninate hydrochloride

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	10
	9003	< 5	< 5	< 5	10	10
	9007	< 5	10	10	10	10
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-24	10	15	20	>20	>20

5. lauryl L-valinate·PCA

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-24	10	15	15	15	15

6. lauryl L-valinate hydrochloride

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-24	< 5	10	10	10	10

7. lauryl L-leucinate·PCA

Hiochi bacteria \ Incubation days		10	20	30	40	50
RIB	9001	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9002	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9003	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	9007	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	S-24	< 5	10	10	10	10

Table. 2 continued

8. lauryl L-leucinate hydrochloride

Hiochi bacteria	Incubation days	10	20	30	40	50
RIB 9001		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9002		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9003		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9007		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
S-14		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
S-24		< 5	< 5	< 5	10	10

9. lauryl ϵ -amino caprate·PCA

Hiochi bacteria	Incubation days	10	20	30	40	50
RIB 9001		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9002		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9003		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9007		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
S-14		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
S-24		10	10	10	10	10

10. N-cocoyl L-arginine ethyl ester·PCA

Hiochi bacteria	Incubation days	10	20	30	40	50
RIB 9001		< 5	< 5	< 5	10	10
9002		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
9003		< 5	< 5	< 5	< 5	10
9007		< 5	< 5	< 5	10	10
S-14		< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
S-24		< 5	10	10	10	10

11. sodium N-lauroyl glutamate

Hiochi bacteria	Incubation days	10	20	30	40	50
RIB 9001		< 5	> 20	> 20	> 20	> 20
9002		< 5	20	20	20	20
9003		> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
9007		5	15	20	> 20	> 20
S-14		5	20	> 20	> 20	> 20
S-24		5	5	10	10	10

Table 3. Antimicrobial Activities of lauryl L-Valinate hydrochloride and Salicylic Acid against Various Hiochi Bacteria in *Saké*

Hiochi bacteria	Incubation days	M. I. C. (ppm)			
		lauryl L-valinate hydrochloride		Salicylic acid	
		30	60	30	60
RIB	9001	< 5	< 5	<250	<250
	9002	< 5	< 5	<250	<250
	9003	< 5	< 5	<250	<250
	9004	< 5	< 5	<250	<250
	9005	< 5	< 5	<250	<250
	9006	< 5	< 5	<250	<250
	9007	< 5	< 5	<250	>250
	9010	< 5	< 5	<250	<250
	9011	< 5	< 5	<250	>250
	9012	< 5	< 5	>250	>250
	9014	< 5	< 5	>250	>250
	9015	< 5	< 5	>250	>250
	S-14	< 5	< 5	<250	<250
	S-20	< 5	< 5	<250	<250
	S-24	10	10	>250	>250

Table 4. Sensory Test of *Saké* Containing Various Amino Acid Lauryl Esters

Sample	Conc. of drug (ppm)	Number of panel (n)	Number of panel of correct answer (a)	χ^2
lauryl glycine·PCA	20	16	12	4
lauryl DL-alaninate·PCA	20	16	9	0.25
lauryl L-valinate·PCA	20	16	8	0
lauryl L-leucinate·PCA	20	16	9	0.25
lauryl ϵ -amino caprate·PCA	20	16	9	0.25
N-Cocoyl L-arginine ethyl ester·PCA	20	16	11	2.25
lauryl glycinate hydrochloride	20	20	11	0.5
lauryl DL-Alaninate hydrochloride	20	20	14	3.2
lauryl L-valinate hydrochloride	20	20	11	0.5
lauryl L-leucinate hydrochloride	20	20	10	0

Statistic level of significance: 95% $\chi^2=3.84$ 99% $\chi^2=6.64$ *Saké* : Commercial (1st. grade)

Method : Duo-trio test

Table 5. Sensory Test of *Saké* Containing lauryl L-valinate hydrochloride

Number of <i>saké</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Conc. of lauryl L-valinate hydrochloride (ppm)	0	0	20	30	40	50	0	0	0
N	5	5	5	5	3	5	3	6	3

N: Total number of panel, who could detect different flavor or taste in each *saké* from that of *saké* without chemicalNumber of panel: 14 *Saké*: Commercial (1st. grade)

ppm であった。一方 *N*-cocoyl *L*-arginine ethyl ester-PCA の M. I. C. は S-24 菌に対しては 15 ppm, その他の菌では 10 ppm であり, sodium *N*-lauroyl glutamate は 20 ppm でほとんど効力を示さなかった。

したがってラウリル系アミノ酸の火落菌に対する抗菌力は塩酸塩, PCA 塩の区別による差はほとんどないこと(分子量の違いによる差はある), *L*-型のみならず *DL*-型でも同様な効力が認められること, glycine alanine よりも炭素数の多い valine, leucine の方が効力が強いこと, アミノ酸のカルボキシル基とラウリルアルコールがエステル結合をしたアミノ酸ラウリルエステルの方がラウロイル基がアミノ基と結合した *L*-ラウロイルアミノ酸よりも効力が高いことが知られた。

3. 各種火落菌に対する lauryl *L*-valinate hydrochloride と salicylic acid の抗菌力の比較

Table 3 は 15 種類の火落菌に対する lauryl *L*-valinate hydrochloride と salicylic acid の抗菌力を示す。lauryl *L*-valinate hydrochloride の M. I. C. は S-24 菌は 10 ppm, その他の火落菌に対しては 5 ppm 以下であった。一方 salicylic acid は培養日数 60 日目の結果で 9007, 9011, 9012, 9014, 9015, S-24 菌に対して 250 ppm では効いていない。以上の結果から lauryl *L*-valinate hydrochloride は 5 ppm で salicylic acid 250 ppm と同程度の効力を示した。なお lauryl *L*-valinate *DL*-PCA 塩の経口毒性は LD_{50} 9.90 g/kg 体重であった。

4. 薬剤添加酒の官能検査

市販酒に各種薬剤を 20 ppm 添加し, 薬剤無添加酒と比較する duo-trio 法を用いて清酒の風味に対する影響を調べた結果を Table 4 に示す。lauryl glycinate-PCA のみ 20 ppm の濃度において 5 % の危険率で有意であったが, その他の薬剤はすべて有意でなかった。Table 5 は 9 点の清酒のうち 4 点に lauryl *L*-valinate hydrochloride が 20, 30, 40, 50 ppm になるよう添加し, この濃度の順に 1 ~ 9 番目の任意の場所に配置した清酒(この試験では 3, 4, 5, 6 番目)を 1 番目より順に啗酒して, 対照においた無添加酒と比較して異味, 異臭を感じたものをチェックする方法で行なった場合の解答数を示す(パネル 14 名)。これより lauryl *L*-valinate hydrochloride は 50 ppm でも酒に異味異臭を与えないことが知られた。この薬剤の有効濃度は 5 ppm であり, 清酒防腐剤として官能上まったく問題はないと考えられ

る。

要 約

lauryl glycinate-PCA, lauryl glycinate hydrochloride, lauryl *DL*-alaninate hydrochloride, lauryl *L*-valinate-PCA, lauryl *L*-valinate hydrochloride, lauryl *L*-leucinate PCA, lauryl *L*-leucinate hydrochloride, lauryl amino caprate-PCA, sodium *N*-cocoyl *L*-arginine ethyl ester-PCA, *N*-lauroyl glutamate の計 11 種類のラウリル系アミノ酸の清酒に対する防腐作用を検討した。

1. 火落菌に対する抗菌力は塩酸塩, PCA 塩の区別による差はほとんどないこと, *L* 型のみならず *DL* 型でも同様の効力が認められること, 炭素数の少ない glycine, alanine よりも炭素数の多い valine, leucine の方が効力が強いこと, アミノ酸ラウリルエステルの方が *N*-lauroyl amino acid よりも効力が高いことが認められた。そして供試薬剤 11 種類のうちでは lauryl *L*-valinate hydrochloride, lauryl *L*-leucinate の塩酸塩および PCA 塩, lauryl ϵ -amino caprate がもっとも抗菌力が強く 5 ppm の濃度で大部分の火落菌の増殖を阻止した。

2. もっとも抗菌力の強い 4 種の薬剤のうちでは lauryl *L*-valinate hydrochloride がもっとも清酒に対する溶解性がよく, 30 ppm の添加で酒にまったく濁りを与えなかった。

3. lauryl *L*-valinate hydrochloride は 5 ppm で salicylic acid 250 ppm と同程度の効力を示した。なお lauryl *L*-valinate *DL*-PCA 塩の経口毒性は LD_{50} 9.90 g/kg 体重であった。

4. 官能検査の結果から lauryl *L*-valinate hydrochloride は 20 ppm の添加で酒にまったく異味異臭を与えなかった。

以上の結果から lauryl *L*-valinate hydrochloride は清酒防腐剤としてすぐれていることをみとめた。終りに有益なご助言を賜った京都大学工学部谷 喜雄博士に感謝します。

文 献

- 1) 原 昌道, 村上英也, 大場俊輝, 志水伸一: 食衛誌, **12**, 389 (1971).
- 2) 菰田 快, 山田正一: 日農化誌, **40**, 173 (1966).
- 3) 吉沢 淑: 醸協誌, **61**, 481, 629 (1966).
- 4) 森 太郎, 嘉納芳治: 醸酵工誌, **35**, 43 (1957).