過酢酸の殺菌作用 (第1報)

過酢酸のカビに対する殺菌作用

(昭和 48 年 4 月 26 日受理)

堤 将 和* 今 村 寛 司*
波 多 野 昌 二* 渡 辺 忠 雄*

Antimicrobial Action of Peracetic Acid

1. Fungicidal Action of Peracetic Acid

Masakazu TUTUMI, Kanzi IMAMURA, Shōzi HATANO
and Tadao WATANABE

(Faculty of Agriculture, Kyushu University; Hakozaki, Fukuoka)

The mode of the antifungal action of peracetic acid was investigated and the following results were obtained. Peracetic acid had a strong fungicidal action against the strains tested and this action was observed in any phase of the growth process of mold. Further, peracetic acid inhibited the action of enzymes extracted from mold, protease and glucose-6-phosphate dehydrogenase, and the site of action was considered to be the amino acid residues of enzyme protein. In addition, peracetic acid acted on the biological substances such as vitamins, amino acids, nucleic acid related substances and deoxynucleic acid *in vitro*. From the results obtained in this studies, it was deduced that the mode of the fungicidal action of peracetic acid is based on the non-specific interaction between the cell components and peracetic acid, and the cells may cease to live as a result of these actions.

(Received April 26, 1973)

過酢酸の殺菌性についてはかなり以前から知られていたが、殺菌剤としての基礎的研究はほとんど見当らない。しかし近年その広い抗菌スペクトルが明らかとなり¹⁻³⁾、殺菌剤としてもにわかに注目されるようになった。

一方、過酢酸の食品への応用研究もその殺菌力に着目して研究され、Lowings がイチゴの貯蔵に⁴⁾、Greenspan らがトマトジュースの防腐⁵⁾に効果があると報告したが、その後利用面での急速な発展はみられなかった。最近、主としてヨーロッパにおいて卵殻の殺菌^{6, 7)}、野菜や果実などに用いる木製貯蔵庫の殺菌⁸⁾など食品衛生上注目すべき応用研究が数多く報告されるようになった。さらに皮膚病の治療に⁹⁾、またポリオウイルスなどに対する殺ウイルス剤^{11, 12)}として医療面からの研究もみられ、過酢酸に対する関心は各方面から一段と高まってきている。しかしその研究の方向は各種微生物に対する殺菌力の測定、他薬剤との比較、殺菌力に影響する種々の条件

の検討などに集約され、なかでもカビに対する研究はこれらの研究方向からもきわめて少ないように思われる。とくにわが国のように温暖多湿な地方では穀類など食品へのカビの汚染が起りやすく、食品衛生上も多くの問題を提起している。著者らはこれらのカビに対する過酢酸の殺菌性を明らかにすると共に、これまでほとんど検討されなかった過酢酸の殺菌機構の解明を目的として研究を行ない、若干の知見を得たので報告する。

実験および結果

(1) 過酢酸のカビに対する殺菌力

食品とくに穀類につくカビに対し過酢酸の殺菌力を検討した。使用した培地は *Aspergillus*, *Penicillium* では Czapek 培地を、*Rhizopus*, *Mucor* では Pfeffer 培地(ただし炭素源としてはブドウ糖 25 g/L, 果糖 25 g/L を用い、さらに酵母エキス 10 g/L を添加した)を用いた。これらの培地 100 ml を 500 ml の振とうフラスコにとり、胞子液 1 ml を加え、30° で 3~4 日間振とう培養を行なった。胞子液は Czapek 斜面寒天培地で 37°、

* 九州大学農学部：福岡市東区箱崎

Table 1. Effect of Spore Concentration

Counts of spores	Growth of mold
$6.5 \times 10^6/\text{ml}$	+
4.3×10^6	+
2.2×10^6	+
1.1×10^6	-

7日間培養したものに滅菌した0.005%スルホコハク酸ジオクチルナトリウム液を加えて振とうし、胞子を十分分散させた後、滅菌ガーゼでろ過し、ろ液を胞子液とした。

多くの殺菌剤の殺菌力は共存する種々の物質の影響を鋭敏に受ける場合が多いので、過酢酸の殺菌力に対する胞子濃度の影響についても検討した。カビは *Asp. versicolor* を用いた。Czapek 培地 100 ml 中における過酢酸（片山化学 K. K. 製、9%）の終濃度を 5×10^{-4} M とし、これに胞子液 1 ml を加え、24 時間後過酢酸の分解に必要な量の 1.5 倍のビタミン C を加え、さらに 3 日間培養を行なってカビの生育を観察した。

Table 1 から明らかなように、胞子数 $2.2 \times 10^6/\text{ml}$ 以上では 3 日後にカビの増殖が観察されたが、 $1.1 \times 10^6/\text{ml}$ ではカビの増殖はまったくみられなかった。したがって以下の実験ではすべて胞子数 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ になるように希釈して添加した。

カビに対する過酢酸の抗菌スペクトルを Table 2 に示した。菌株番号が記載された菌株は財団法人発酵研究所より、菌株番号のない菌株は本学微生物工学教室より分譲を受けた。結果から明らかなように、過酢酸は 5×10^{-4} M の濃度でこれらのカビの増殖を完全に阻止した。また殺菌性に関し、過酢酸の特異性は認められなかった。

カビは細菌や酵母とは形態的に異なった生活史を示すため、殺菌剤の殺菌力もまたカビの形態によって変わる場合もある。したがってまず胞子に対する過酢酸の作用について検討した。Czapek 培地 100 ml に *Asp. versicolor* 胞子液 1 ml を加え、さらに 0.1 M 過酢酸 (pH 6) 2.0 ml を加えた後、一定時間を経て 0.1 M アスコルビン酸溶液 3.0 ml を加え過酢酸を分解した。それから 4 日後のカビの増殖を Table 3 に示した。

過酢酸は胞子に対し 1 分以上の接触でその発芽を完全に阻止した。

つぎにカビの生活史の上で適当な時期を選び過酢酸を作用させ、その後のカビの生育を観察しその結果を

Table 3. Sporicidal Action of Peracetic Acid

Contact time (min.)	0.5	1	2	3
Growth of mold	+	-	-	-

Table 2. Inhibitory Effect of Peracetic Acid

Fungi		Final concentration of peracetic acid			
		5×10^{-4} M	2.5×10^{-4} M	1.0×10^{-4} M	0
<i>Asp. versicolor</i>	IFO 4411	-	-	+	+
<i>Asp. oryzae</i>		-	-	+	+
<i>Asp. awamori</i>		-	+	+	+
<i>Asp. flavus</i>		-	+	+	+
<i>Asp. glaucus</i>		-	-	+	+
<i>Asp. niger</i>		-	+	+	+
<i>Asp. quercinus</i>		-	-	+	+
<i>Asp. ochraceus</i>	IFO 4069	-	-	+	+
<i>Pen. chrysogenum</i>		-	+	+	+
<i>Pen. citrinum</i>	IFO 4631	-	-	+	+
<i>Pen. citreo-viride</i>	IFO 6049	-	+	+	+
<i>Pen. rubrum</i>	IFO 6580	-	+	+	+
<i>Pen. islandicum</i>	IFO 5235	-	+	+	+
<i>Rhiz. javanicus</i>		-	-	+	+
<i>Rhiz. nigricans</i>	OUT 1135	-	+	+	+
<i>Rhiz. delemere</i>	OUT 1076	-	+	+	+
<i>Rhiz. oryzae</i>	OUT 1088	-	+	+	+
<i>Mucor zygorincus</i>		-	-	+	+

Table 4. Growth Process and Fungicidal Action of Peracetic Acid

Addition of peracetic acid	After 1 hour	After 12 hours	After 20 hours	After 32 hours
Growth process	Spore	Germ-tube emergence	Germ-tube elongation	Septa emergence
Observation of growth of mold	Interrupted	Interrupted	Interrupted	Interrupted

Table 4 に示した。実験方法としては、Czapek 培地 100 ml に *Asp. versicolor* 胞子液 1 ml を加え、一定時間振とう培養した後 0.1 M 過酢酸 (pH 6) 2.0 ml を加え 4 日後のカビの生育状態を観察した。

Table 4 から明らかなように、過酢酸を添加すると同時にカビの生育は阻止され、以後増殖はまったく認められなかった。また Table 4 には 32 時間培養までの結果を示したが、56 時間培養 (菌体の小球が認められる)、76 時間培養 (菌体の小球は米粒位)、128 時間培養 (小球は小豆位になりやや黒ずんでくる) においても同様の結果が得られた。

Fig. 1 には *Asp. versicolor* を 32 時間振とう培養した後過酢酸を加え、さらに 24 時間経過後の形態を図示した。細胞質は中心部に凝集し、原形質分離を起こした細胞のようにみえた。この現象はアスコルビン酸を添加し過酢酸を分解した後 4 日間観察したがカビの形態的な変化はほとんどみられなかった。

(2) 過酢酸の酵素阻害

過酢酸を作用させた後のカビの形態観察から過酢酸の細胞質に対する強い作用が推察された。したがって細胞質成分に対する作用の一つとして酵素に対する作用を検討した。酵素としてはタンパク質分解酵素とグルコース-6-リン酸脱水素酵素を選び、これら酵素に対する過酢酸の阻害作用を検討した。

a) 酵素液の調製

Asp. versicolor 菌体 (湿潤状態) 20 g に海砂を加え、低温で磨砕し、0.05 M エタノールアミン緩衝液 (pH 7.5) 30 ml を加えた後、35° で 30 分間抽出し、遠心分離して上澄液を得た。上澄液は低温で 24 時間透析した後、ふたたび遠心分離し、透明な上澄液をグルコース-6-リン酸脱水素酵素作用測定の酵素液とした。タンパク質分解酵素作用測定のための酵素液はリン酸緩衝液 (pH 7) を用いて抽出し、同様に処理して調製した。

Fig. 1. Fungus cell treated with peracetic acid

b) 測定法

グルコース-6-リン酸脱水素酵素作用の測定はグルコース-6-リン酸を基質とし、NADP の還元を 340 mμ の吸光度の増加により分光学的に測定した。反応は 25° で 20 分間行なった。タンパク質分解酵素の場合は卵白アルブミンを基質として 37° で 3 時間反応させた後、トリクロル酢酸 (TCA) を加えて反応を中止させ、沈殿を十分熟成させた後、遠心分離し、上澄液の 280 mμ の吸光度を測定した。過酢酸の酵素阻害実験では酵素液に緩衝液と過酢酸を添加し、37° で 15 分間放置 (沈殿が生じれば遠心分離して沈殿を除去) 後基質などを加えて酵素作用を測定した。以下に酵素反応組成を示す。

グルコース-6-リン酸脱水素酵素作用測定のための反応液組成

0.05 M トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.5)	1.30 ml
4×10^{-2} M グルコース-6-リン酸	0.10 ml
3×10^{-2} M NADP	0.10 ml
0.1 M MgCl ₂	0.05 ml
酵素液	2.00 ml
水 (阻害実験では過酢酸)	0.50 ml

タンパク質分解酵素作用測定のための反応液組成

0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)	1.00 ml
2% 卵白アルブミン液	0.50 ml
酵素液	2.00 ml
水 (阻害実験では過酢酸)	0.50 ml
10% TCA	2.00 ml

Table 5 の結果から明らかなように、グルコース-6-リン酸脱水素酵素は 8×10^{-2} M の過酢酸で完全に阻害

Table 5. Inhibitory of Enzyme Action by Peracetic Acid

Concentration of peracetic acid	Enzyme activity (O. D. $\times 10^3$)	
	G-6-P. dehydrogenase	Protease
0	250	540
8×10^{-5} M	230	450
8×10^{-4} M	195	220
8×10^{-3} M	120	7
8×10^{-2} M	0	2

された。タンパク質分解酵素の場合は $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ では完全に失活し、 $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ で 60% 失活した。これらの結果から過酢酸の生育阻止機構の一つに酵素系に対する作用が示唆された。

(3) 種々の細胞成分に対する過酢酸の作用

過酢酸の酵素阻害は酵素タンパク質に対する作用と推定されるので、まずタンパク質に対する過酢酸の作用を検討した。

0.2% 卵白アルブミン液 50 ml に、0.2 M 過酢酸 (pH 7) 50 ml を加え 37° で 7 時間反応を行なった。280 m μ の吸光度の測定は反応液を 3 倍に、ニンヒドリン反応は反応液を 10 倍に希釈して行なった。

Table 6 の結果から、高濃度過酢酸はタンパク質の構成アミノ酸に作用しているものと推定した。低濃度過酢酸 (10^{-3} M) を同じ条件で作用させた場合、280 m μ の吸光度の減少値は 0.025 であり、ニンヒドリン反応の吸光度の減少値は 0.04 であった。しかしこの濃度でも酵素反応を阻害することから、タンパク質に対しても何らかの作用があるものと考えられ、低濃度過酢酸の作用も一義的にはタンパク質に対する作用と推定した。

Table 6. Effect of Peracetic Acid on Ovalbumin

Reaction time (hr.)	O. D. (280 m μ)	Ninhydrin reaction O. D. (570 m μ)
0	0.310	0.240
7	0.120	0.090

過酢酸は酵素以外の種々の細胞質成分にも作用していると思われる。したがって細胞質成分として生理的にも重要な核酸ならびに核酸関連物質、さらに補酵素の構成成分であるビタミン類、タンパク質の構成成分で紫外部に吸収を示すアミノ酸の一つであるチロシンに対する過酢酸の作用を検討した。過酢酸はいずれも終濃度 0.1 M (pH 7) とし 37° で反応を行なった。また反応液 1 ml 中に含まれる種々の物質の含量は DNA 2 μg 、グアニン 3 mg、ATP 5.5 mg、チアミン 3 mg、リボフラビン 0.2 mg、ピリドキシン 1 mg、ニコチン酸アミド 3 mg、チロシン 0.1 mg とした。これらの物質と一定時間反応を行なった後、水で適当に希釈し、それぞれの物質の最大吸収波長における吸光度の変化を測定した。試料として用いた DNA は仔牛の胸腺より SDS 法¹⁰⁾により調製し、0.14 M NaCl-0.014 M Na-citrate 溶液に溶解した。他の試料は市販品 (特級) を用いた。

Fig. 2 の結果から明らかなように、過酢酸はニコチン酸アミド以外のすべての物質に顕著に作用した。

考 察

過酢酸のカビに対する殺菌性については Greenspan⁵⁾ の報告がある。これによれば過酢酸の殺菌力は強力であるが、有機物の存在でかなり効力の減退がみられる

Fig. 2. Variation of the optical density of various biological active substances

ことを示している。しかし殺菌剤として実用に供し得ることも示唆している。

著者らも過酢酸のカビに対する殺菌力について検討し、その作用は強力であり多くのカビに対し非特異的に作用することを明らかにした。とくにカビの胞子に対しても短時間で強く作用し、胞子の発芽を完全に阻止した。またカビの生活史のあらゆる時点で作用し、作用後のカビの増殖はまったく認められなかった。

抗微生物作用を有する物質のうち、とくに抗生物質の殺菌機構はある特定の growth phase において最も強く作用し、あるいは細胞構造または細胞成分の特定の生合成系にのみ作用するなど、その作用時期や作用点が限定されている場合が多いようであるが、過酢酸の場合は細胞の種々の成分と顕著に作用することから、抗生物質の作用とは異なった機作で微生物に作用するものと推定した。

過酢酸を作用させた後、数日間カビはその形態を保っていたが細胞質は中心部に凝集していた。このことから過酢酸は細胞膜を透過し細胞質に対しても作用しているものと推察し、酵素系に対する作用を検討した。まずタンパク質分解酵素作用の阻害を測定したところ顕著な阻害が認められた。またカビなど好気性菌は菌の生育時にグルコースの 2/3 は解糖系よりは五炭糖リン酸系を経て

代謝されるといわれている。この解糖系と五炭糖リン酸系の岐路に位置しているグルコース-6-リン酸脱水素酵素はカビの糖質代謝において重要な酵素であり、過酢酸が本酵素の作用も強く阻害したことから、過酢酸の酵素阻害は非特異的なものであると推察した。この過酢酸の酵素阻害の機作は酵素タンパク質の化学的な変化に基づくものと推定し、卵白アルブミンを用いて過酢酸のタンパク質への作用を検討したところ、過酢酸はタンパク質の構成アミノ酸に作用していることが明らかとなった。また著者は15種のアミノ酸に対する過酢酸の作用を検討し、過酢酸はこれらアミノ酸全部に強く作用することを明らかにした¹¹⁾。これらのことから過酢酸のタンパク質に対する作用は構成アミノ酸残基に対する作用であろうと思われる。過酢酸による酵素の失活も、一次的にはこのような反応に基づくものとすれば、過酢酸の非特異的酵素阻害は容易に理解できる。したがってタンパク質分解酵素やグルコース-6-リン酸脱水素酵素の作用阻害も特異的なものではなく、過酢酸は広く酵素一般を阻害するものと推定した。

過酢酸はタンパク質以外に核酸 (DNA) に対しても作用した。核酸に対する作用は 260 mμ の吸光度の変化から核酸塩基に対する作用と推定し、グアニンや ATP に対する作用を検討したところ、これらの物質に対しても同様に作用した。このように過酢酸が他の核酸塩基にも作用するとすれば、生体内でのエネルギー代謝などに重要な核酸塩基関連物質に対しても作用するものと考えられ、今後より詳細な検討が必要である。

その他過酢酸は補酵素の構成成分である種々のビタミン類に対しても作用し、過酢酸の生体成分に対する作用の非特異性が示唆された。この過酢酸の生体成分に対する作用機作は過酢酸の酸化作用に基づくものと思われる。

以上これまでの研究報告や著者らの研究結果から、過酢酸は種々の微生物に対し広く殺菌作用を示し、またその作用は微生物の生活史とは明瞭な関係を示さず、さらに種々の細胞成分と顕著に反応することから、過酢酸は微生物の特定の細胞構造や生活機能に作用するのではなく、不特定の細胞成分に広く作用し、その総合された作用の結果生育阻害が起こり死滅するという過程をとるものと推定した。また個々の細胞成分に対する過酢酸の作用については次報以後に詳述する予定である。

要 約

1) 一般の殺菌剤と同様過酢酸の殺菌力もまた薬剤の

濃度のみに依存するのではなく、孢子濃度にも関係することが明らかとなった。

2) 過酢酸はカビに対しても強い殺菌力を示した。またこの殺菌力はカビの生活史に関係なくどの生育時点でも作用した。

3) 過酢酸はタンパク質分解酵素やグルコース-6-リン酸脱水素酵素の作用を阻害した。この酵素阻害は酵素タンパク質、とくにタンパク質の構成アミノ酸に対する作用であると推定した。したがって過酢酸の酵素阻害は特異的なものではなく、他の一般酵素に対しても同様の阻害が推定された。

4) 過酢酸はタンパク質の他、核酸とも反応した。この核酸に対する作用は核酸塩基に対する作用であることが明らかとなった。このことから核酸塩基関連物質など生理的に重要な細胞成分との反応も示唆された。また過酢酸は補酵素の構成成分であるビタミン類に対しても顕著に作用し、過酢酸の作用の複雑さが示唆された。

5) 以上のことから過酢酸の殺菌機構は特定の作用機作に基づくものではなく、細胞の不特定成分との広い反応に基づくものと推定した。

文 献

- 1) Sproessig, M., Muecke, H.: Pharmazie 23, 665 (1968).
- 2) Bohumil, T.: Vojenske Zdravot Listy 33, 45 (1964).
- 3) Krzywicka, H.: Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 21, 595 (1970).
- 4) Lowings, P. H.: Appl. Microbiol. 4, 84 (1956).
- 5) Greenspan, E. P., Mackellar, D. G.: Food Tech. 5, 95 (1951).
- 6) Cihova, H., Bilek, V., Navrat, K., Svoboda, K.: Cesk. Hyg. 15, 249 (1970).
- 7) Tanosek, J., Halama, D.: Cesk. Hyg. 14, 120 (1969).
- 8) Vilem, M., Alena, M.: Prum Potravin 18, 30 (1967).
- 9) Sproessig, M., Muecke, H.: Acta. Biol. Med. Ger. 14, 199 (1965).
- 10) Hashinaga, F., Murakami, H., Yamafuji, K.: Enzymologia 30, 179 (1966).
- 11) Tutumi, M., Ueki, M., Hatano, S., Watanabe, T.: unpublished.