アスコルビン酸脂肪酸エステルの抗菌作用

(昭和 63 年 5 月 9 日受理)

加藤 祥子^{*1} 小林 寿^{*1} 渡辺 忠雄^{*2}

Antibacterial Action of Ascorbic Fatty Acid Esters

Sachiko Kato^{*1}, Hisashi Kobayashi^{*1} and Tadao Watanabe^{*2}

(^{*1}Department of Food and Nutrition, College of Nakamuragakuen: 5-7-1, Befu, Jōnan-ku, Fukuoka, Japan; ^{*2}Torigoe Flour Milling Co., Ltd.: 6-5-2, Hakozakifutō, Higashi-ku, Fukuoka, Japan)

Antibacterial and antioxidative actions of ascorbyl caprate (AC), ascorbyl laurate (AL), ascorbyl myristate (AM) and ascorbyl palmitate (AP) synthesized by the authors and also ascorbyl stearate (AS) obtained commercially were investigated.

AC, AL and AM showed antibacterial activity against *B. subtilis* and *S. aureus*, but AP and AS did not. None of the esters, on the other hand, had such action against *E. coli*, but AC displayed antibacterial activity against *E. coli* when sodium hexametaphosphate (HP) was added at the same time, and the combination of 0.2% HP and 0.4% AC showed bactericidal activity against *E. coli*.

Antioxidative activities of AC, AL, AM and AP were as potent as that of AS.

(Received May 9, 1988)

Key words: 抗菌作用 antibacterial action; アスコルビン酸脂肪酸エステル ascorbic fatty acid ester; 大腸菌 *Escherichia coli*; 併用効果 combined effect; 抗酸化作用 antioxidative action; ヘキサメタリン酸 hexametaphosphate

食品保存のための保存料使用は多くの問題をかかえているとはいえ、現実にはその使用を全く否定してしまうことはできない。著者は、保存料開発の一手段として既存の食品添加物についてその抗菌作用を検討した。その結果、現在乳化剤として使用されているモノグリセリドやショ糖脂肪酸エステルは、いずれも脂肪酸エステルであるが、グラム陽性菌に抗菌作用を示し、さらに縮合リン酸塩を併用することにより、*E. coli* のようなグラム陰性菌に対しても抗菌作用を示すことがわかった^{1)~5)}。そこで同じく脂肪酸エステルであるアスコルビン酸脂肪酸エステルの中にも抗菌作用と抗酸化作用を併有する化合物があるのではないかと考え、数種のアスコルビン酸脂肪酸エステルを合成し、これらについて抗菌作用並びに抗酸化作用を検討したので、その結果について報告する。

実験材料並びに方法

1. 試薬類

アスコルビン酸脂肪酸エステルは食品添加物公定書解説書⁶⁾に準じて合成を行った。すなわち、L-アスコルビン酸と脂肪酸を濃硫酸に溶かし、室温で 20 時間放置してエステル化を行った後、碎氷中に注ぎ析出した結晶をエーテルで抽出し精製を行った。合成したエステルとその融点は次のとおりであった。

L-アスコルビン酸カプリン酸エステル (以後 AC と略) mp 102~103°

L-アスコルビン酸ラウリン酸エステル (AL と略) mp 107~108°

L-アスコルビン酸ミリスチン酸エステル (AM と略) mp 110~111°

L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (AP と略) mp 113~115°

なお、合成したエステルはいずれも純度 95% 以上であった。

L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル (和光純薬工

^{*1} 中村学園大学食物栄養学科: 福岡市城南区別府 5-7-1

^{*2} 島越製粉株式会社: 福岡市東区箱崎ふ頭 6-5-2

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of Ascorbic Fatty Acid Esters on the Growth

Ester	MIC (%)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
AC	0.1	0.06	0.4<
AL	0.02	0.03	0.4<
AM	0.03	0.02	0.2<
AP	0.1<	0.1<	0.1<
AS	0.1<	0.1<	0.1<

AC : ascorbyl caprate
 AL : ascorbyl laurate
 AM : ascorbyl myristate
 AP : ascorbyl palmitate
 AS : ascorbyl stearate

業(株)製, AS と略)

ショ糖カプリン酸エステル (SC と略) は Osipow らの方法⁷⁾で合成し, 大竹の方法⁸⁾に準じてシリカゲルカラムを通したモノエステル部を使用した。

縮合リン酸塩としてヘキサメタリン酸ナトリウム (ポリホス化学(株)製, HP と略) を, その他は市販特級品もしくは一級品を用いた。

2. 供 試 菌

Bacillus subtilis IFO 3007

Staphylococcus aureus IFO 3060

Escherichia coli IFO 3301

3. 培 地

エールリッヒ肉エキス (極東製薬工業(株)製) 10 g とポリペプトン (大五栄養化学(株)製) 10 g を精製水 1,000 ml に溶かし pH を 7.0 に調整し, 1%肉エキスイオン培地とした。なお, 生菌数を測定する場合は上記ブイオン培地に 1.5%の寒天を加えて用いた。

4. 抗菌力の測定

供試菌を 1%肉エキスイオン培地中で 30°17 時間振盪培養した後, 同培地中で波長 660 nm における吸光度 (OD₆₆₀) を 0.3 に調整して菌液とした。エステルあるいは HP を設定濃度になるように溶かした培地 9.5 ml に上記菌液 0.5 ml を加え 30°で振盪培養を行い, OD₆₆₀ の増加から菌の増殖を判定した。OD₆₆₀ の測定は東京光電(株)製の光電比色計 Type I 型を用いた。

5. 抗酸化力測定

抗酸化力の測定は, 各エステルを大豆油 (和光純薬工業(株)製) に添加後 37°恒温器中に静置し, 経時的に過酸化価 (POV) を測定した。POV の測定は食品衛生検査指針 I⁹⁾の方法を用いた。すなわち, 試料油にヨウ化カリウム溶液を加え暗所に 5 分間放置後, 遊離したヨウ素を 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した。

また別にリノール酸の自動酸化に対する抗酸化力測定を行った。すなわち, 0.1M リノール酸のエタノール溶

Table 2. Combined Effect of Ascorbic Fatty Acid Esters and HP on the Growth of *E. coli*

Ester (%)	Growth (OD ₆₆₀)				
	HP (%)				
	0	0.1	0.2	0.5	
Control	0	0.43	0.37	0.37	0.34
AC	0.2	0.46	0.12	0	0
	0.4	0.34	0	0	0
AL	0.2	0.49	0.49	0.46	0.36
	0.4	0.52	0.41	0.44	0.28
AM	0.2	0.36	0.40	0.34	0.34

HP: sodium hexametaphosphate

液 5 ml, 各エステルのエタノール溶液 0.5 ml を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 25 ml 定容とし, 37°恒温器内に放置後経時的に過酸化物量を測定した。過酸化物量の測定は満田らのロダン鉄法¹⁰⁾を用いた。すなわち, 試料溶液 0.1 ml に 75%エタノール 4.7 ml, 30%チオシアン酸アンモニウム 0.1 ml, 0.02M 塩化第一鉄 0.1 ml を加え発色させ, 3 分後に OD₅₀₀ を測定した。

なお, エステルの終濃度はいずれも 0.01%とした。

実験結果

1. 最小発育阻止濃度 (MIC)

培養開始前と 24 時間培養後の OD₆₆₀ の差が 0.03 未満の場合を発育阻止とした。その結果, *B. subtilis*, *S. aureus* に対して AC, AL, AM は抗菌作用を発揮したが, AP, AS は抗菌作用を示さなかった。一方, *E. coli* に対してはすべてのエステルが抗菌作用を示さなかった (Table 1)。なお, 各エステルの培地に対する溶解性からエステルの最高濃度を AC, AL は 0.4%, AM は 0.2%, AP, AS は 0.1% とした。

2. *E. coli* に対するエステルと HP の併用効果

モノグリセリドが HP 共存下において *E. coli* に対して抗菌作用を発揮している²⁾ので, アスコルビン酸脂肪酸エステルと HP の併用効果を検討した (Table 2)。その結果, AC は *E. coli* に対し抗菌作用を発現したが AL 並びに AM は抗菌作用を示さなかった。すなわち, 0.4% AC 単独ではほとんど抗菌作用を示さなかったが, 0.1% HP を併用することにより抗菌作用を示すことが分かった。さらに, 0.2% HP を併用したときは, AC 濃度を 0.2%に下げても抗菌作用を示した。また, Table 3 に示したとおり, AC のみを添加したとき, 無添加のときより経日的に吸光度を増した。しかもその増加は AC 濃度が高いほど著しかった。また, この際培地は着色してきた。0.4% AC と 0.1 あるいは 0.2% HP を併用したとき 5 日後においても *E. coli* の増殖は認められなかった。そこで, AC と HP を併用したときの生菌数を測定した (Table 4)。その結果, 0.2 あるいは 0.4% AC と

0.2% HP を併用したとき生菌数の減少が認められた。特に 0.4% AC と 0.2% HP を併用したとき生菌数の急激な減少が起こり、3 時間後にはほとんど生菌は認められなくなった。

3. 緩衝液中における *E. coli* に対する脂肪酸エステルの作用

E. coli に対する AC の作用及び培養中の着色の原因を知るため、培地成分を含まない *E. coli* の懸濁液に脂肪酸エステルを作用させた。すなわち、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した *E. coli* に AC 溶液を設定濃度になるように加え、30° 恒温に保ち経時的にその OD₆₆₀ を測定した。同時に SC についても行った。その結果 Fig. 1 に示したように、いずれの場合も OD₆₆₀ の減少が認められた。しかも AC 溶液中での OD₆₆₀ の減少は SC 溶液中より著しかった。また、Fig. 2 に示したように AC 濃度が高いほどその減少は大きく、0.4% AC に 0.2% HP を併用したときはさらに著しい減少を示した。このとき、溶液の着色は認められなかった。

Table 3. Combined Effect of AC and HP on Growth of *E. coli*

AC (%)	HP (%)	Growth (OD ₆₆₀)				
		Incubation time (day)				
		1	2	3	4	5
0	0	0.40	0.48	0.46	0.46	0.45
	0.1	0.31	0.33	0.30	0.27	0.25
	0.2	0.27	0.29	0.26	0.21	0.18
0.1	0	0.35	0.49	0.63	0.65	0.61
	0.1	0.15	0.34	0.44	0.44	0.44
	0.2	0.07	0.25	0.34	0.39	0.38
0.2	0	0.46	0.70	0.80	0.87	0.89
	0.1	0.12	0.42	0.63	0.66	0.68
	0.2	0	0.36	0.52	0.58	0.58
0.4	0	0.34	0.63	0.77	0.86	0.91
	0.1	0	0	0	0	0
	0.2	0	0	0	0	0

Fig. 1. Effect of AC or SC on *E. coli*

—●— control; —■— 0.4% AC; —▲—
0.4% SC
SC: sucrose caprate

Fig. 2. Synergistic effect of AC and HP on *E. coli*

—●— control; —○— 0.2% HP; —▲—
0.2% AC; —△— 0.2% AC+0.2% HP; —■—
0.4% AC; —□— 0.4% AC+0.2% HP

Table 4. Survival of *E. coli* Treated with AC and HP

Treatment (hr)	AC (%)	Viable cell count (cell/ml)					
		0		0.2		0.4	
	HP (%)	0	0.2	0	0.2	0	0.2
0		4.0×10^7	3.6×10^7	3.4×10^7	4.1×10^7	4.1×10^7	4.0×10^7
1		4.7×10^7	3.4×10^7	4.0×10^7	1.7×10^4	1.5×10^7	2.1×10^2
3		4.2×10^8	1.2×10^8	2.0×10^8	1.7×10^4	3.3×10^7	3>
6		5.5×10^8	3.2×10^8	1.1×10^8	1.0×10^3	7.1×10^7	0
24		2.0×10^9	4.7×10^8	1.8×10^8	3.3×10^2	2.1×10^8	0

Medium: nutrient agar (pH 7.0)

Incubation: 37°C 24hr.

Fig. 3. Comparison of antioxidative activity of ascorbic fatty acid esters on soy bean oil
—□— control; —△— AC; —▽— AL;
—▲— AM; —▼— AP; —■— AS

4. 抗酸化作用

大豆油にアスコルビン酸脂肪酸エステルを0.01%添加してその抗酸化作用を検討した。その結果、Fig. 3に示したようにいずれのエステルも市販のASに劣らぬ抗酸化作用を示した。また、リノール酸を用いた抗酸化作用においても、Fig. 4に示したように大豆油の場合と同様にいずれのエステルも市販のASに劣らずリノール酸の自動酸化を抑制した。

考 察

乳化剤であるモノグリセリドやショ糖脂肪酸エステルの中には抗菌作用を有するものもある。強化剤であるASは油性食品の酸化防止剤として一般に利用されている。ASにも抗菌作用があればその利用価値はさらに拡大するという考えに基づき、AS並びにその同族体の抗菌作用について検討した。

AC, AL, AMは*B. subtilis*並びに*S. aureus*に対し有効であったが、*E. coli*に対してはほとんど効果が認められなかった。しかし、HPと併用したときはACのみが*E. coli*に対し抗菌作用を発現した。これらのことは、モノグリセリドやショ糖脂肪酸エステルがグラム陽性菌に対してのみ有効であり、また、HPとの併用により抗菌

Fig. 4. Comparison of antioxidative activity of ascorbic fatty acid esters on linoleic acid
—□— control; —△— AC; —▽— AL;
—▲— AM; —▼— AP; —■— AS

性は拡大するが脂肪酸の炭素数に影響を受けるという報告^{1), 2), 4)}と同様で、限られた炭素数のエステルのみが有効であった。0.4% ACと0.1%並びに0.2% HPを併用したとき、5日後も全く*E. coli*の増殖が認められず、新培地に移植しても菌の増殖が認められなかったし、また生菌数を経時的に測定した結果でも生菌はほとんど認められず、致死的に作用していることが分かった。

Table 3において、ACを添加したときのOD₆₆₀が経時的に増大し、このとき培地の着色が認められた。しかし、*E. coli*の菌数測定の結果はAC無添加のときとほとんど変わらなかった。従って、この吸光度の増大は培地の着色によるものであって、*E. coli*の増殖によるものではないことが分かった。さらに、この着色現象はAC以外にAL, AM添加のときも認められたがSC添加では認められず、また、*E. coli*を接種しない培地、*E. coli*を接種してもAC, HP共存下で致死的な作用を受けた培地や*E. coli*とACだけでは認められなかったことから、この着色現象には*E. coli*、培地、アスコルビン酸エステルの3者が必要であると考えた。

AC, AL, AM, AP並びにASはいずれも大豆油並びにリノール酸に対して抗酸化作用を示した。綾野ら¹¹⁾並びに山口ら¹²⁾は、ASはラードに対し抗酸化力は示さないが、トコフェロールとの併用により相乗作用を示すと報

告している。また、青山らのパーム油を使った報告¹³⁾では AS とトコフェロールの相乗性を認めていない。このように AS とトコフェロールの相乗性については明確ではない。本実験においては、結果は示していないが使用した大豆油中にはトコフェロールを含んでいたため、エステル類の大豆油に対する抗酸化力はエステルとトコフェロールの相乗作用による可能性も考えられる。また、山口らは AS はリノール酸に対してはほとんど抗酸化力を示さなかったと報告¹²⁾しているが、本実験では AC, AL, AM, AP, AS 共にリノール酸の自動酸化を抑制した。いずれにしても AC, AL, AM 並びに AP は市販の AS に劣らぬ抗酸化力を発揮した。

以上の結果から、AC は単独でも *E. coli* から漏洩は引き起こすが抗菌作用は示さない。しかし、AC は HP を併用することによりグラム陰性菌である *E. coli* に対し致死的に働くことが明らかになった。この併用効果をモノグリセリドあるいはコール酸と HP の *E. coli* に対する併用効果の報告^{2), 3), 14)}と比較してみると、AC の作用はかなり強力であると推論できる。AC は抗酸化力を有し、水に対する溶解度もかなりあることから食品への利用は大いに期待できると考える。

要 約

1. AC, AL, AM は *B. subtilis*, *S. aureus* に対し抗菌作用を示したが *E. coli* に対しては抗菌作用を示さなかった。

2. AP, AS は *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* のいずれに対しても抗菌作用を示さなかった。

3. AC は HP と併用することにより *E. coli* に対し抗菌作用を発現した。

4. 0.4% AC と 0.2% HP の併用は *E. coli* に対し致死

的に働いた。

5. 合成した AC, AL, AM, AP はいずれも大豆油並びにリノール酸に対し市販の AS に劣らぬ抗酸化作用を示した。

文 献

- 1) 加藤信之, 芝崎 勲: 醸工, **53**, 793~801 (1975).
- 2) 堤 将和, 安井紀久代, 一色賢司, 渡辺忠雄: 食衛誌, **18**, 341~345 (1977).
- 3) 須田郁夫, 宮山哲夫, 須田真理, 堤 将和, 渡辺忠雄: 食衛誌, **23**, 302~307 (1982).
- 4) 加藤祥子, 小林 寿: 中村学園研究紀要 **15**, 253~256 (1982).
- 5) 加藤祥子, 小林 寿, 渡辺忠雄: 食衛誌, **27**, 218~228 (1986).
- 6) 石館守三, 谷村顕雄監修: “第五版食品添加物公定書解説書” D-18 (1987), 広川書店.
- 7) Osipow, L., Snell, F. D., York, W. C., Finchler, A.: Ind. Eng. Chem. **48**, 1,459~1,464 (1956).
- 8) 大竹俊樹: 精糖技術研究会誌, **12**, 25~34 (1963).
- 9) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針” I, p. 351 (1973), 日本食品衛生協会.
- 10) 満田久輝, 安本教傳, 岩見公和: 栄養と食糧 **19**, 210~214 (1966).
- 11) 綾野雄幸, 古橋樹雄, 渡辺幸雄, 本橋和夫: 日食工誌, **24**, 372~374 (1977).
- 12) 山口直彦, 平野真由美, 山口幸寛: 同上 **34**, 282~287 (1987).
- 13) 青山 稔, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 勲, 塚本正人, 東海林 茂, 松本太郎: 油化学 **34**, 123~127 (1985).
- 14) 堤 将和, 安井紀久代, 松岡麻男, 渡辺忠雄: 食衛誌, **19**, 190~194 (1978).