

食品防菌剤としてのアミノ酸誘導体

高野 三郎

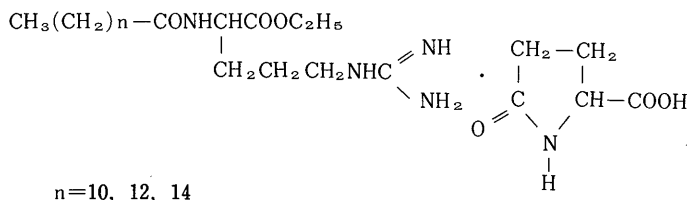
緒言

アミノ酸を主体とした化合物をつくり、これをいろいろな防菌剤として利用しようという研究は多数みうけられる。しかもこれらの中には既存の防菌、防霉剤に近い効果をもつものがいられている。¹⁾²⁾

筆者もこの点に着目し、まずアミノ酸の中でL-ロイシンなどのアミノ酸がイネの主病菌であるいもち病菌の生育を抑制するという大畑の報告³⁾をもとに数種のアミノ酸のイネいもち病菌への影響を検討した。その結果、L-アルギニンやL-メチオニンはアミノ酸単独でも試

験管内ではあるが、イネいもち病菌の成長を阻害することを認めた。⁴⁾そこでさらに食品添加物の中で保存料として用いられてきた安息香酸に注目し、これにアミノ酸をつけた化合物(N-ベンゾイル-L-アミノ酸)を合成した。そしてこの化合物の防菌効果を検討したところ、この中の一つN-ベンゾイル-L-ロイシンがバナナ輸送時の防霉剤と同等の効果を示すことを認めた。一方、その他アミノ酸を主体とした化合物の中でヤシ油とアミノ酸からできたCAE(ココイルアルギニンエチルエステル)は

CAEの化学構造式



安息香酸のアミノ酸誘導体(ベンゾイル体)より強く、かつ広範囲な防菌効果を示したので、このCAEの防菌効果の機構についても検討した。これらを併せて報告する。

実験方法

1. 実験材料

用いたアミノ酸はすべてL-アミノ酸で、これに安息香酸などを酸クロライド法により縮合させ合成した。防菌試験に際し、アミノ酸およびアミノ酸誘導体は0.1 m Mから10 m M、10~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製した。用いた菌株はイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*, バナナ炭そ病菌 *Gloeosporium musarum*, レモン白かび病菌 *Geotrichum candidum*, 大腸菌 *Escherichia coli* などで培地はジャガイモ・グルコース培地とブイヨン培地を使用した。⁵⁾

2. 試験方法

あらかじめ滅菌したペトリ皿を用い、培地に0.1~10

m M、10~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した化合物を無菌的に注入し、それぞれの菌種を接種し、それぞれの菌株の適温で24~72時間培養し、生じたコロニーや孢子より効果を検討した。

また、新鮮で未熟なバナナの青い房を用いこれを無菌的に針で傷をつけ、そこに菌を接種し、培養後N-ベンゾイル-L-ロイシンなどの100~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液に浸漬し、一定時間再培養した後にコロニーを測定し判定した。一方、レモンを用いた試験ではアミノ酸の脂肪酸誘導体(CAE)などの100~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液に浸漬後、菌接種し培養し、コロニーを測定した。

なお、あらかじめ前培養したレモンの白かび病菌などを洗浄後、CAE無添加区(対照区)と添加区に分け再培養した。次に菌体を汙別後、菌体から培養液(生理食塩水)中へ漏出したタンパク質をLowry-Folin法で測定した。⁶⁾また、同時にCAEで処理した菌体を無処理の対照区の菌体とともに常法に従い、固定を行って電子顕微鏡撮影し観察した。⁷⁾

実験結果および考察

加工食品のゼリーや漬け物に含まれる砂糖や食塩に防腐効果があることは古くから知られている事である。近年、食塩や砂糖ばかりでなく栄養素として知られる素材の防腐防黴効果も検討されるようになった。ここではアミノ酸について、これを主体とした化合物の防菌性を検討することとした。アミノ酸の防菌効果については、先ずイネに多発するいもち病菌を用いて検討した。その結果、L-メチオニンやL-アルギニンに10mMという低濃度で、試験管内ではあるが防菌効果がみられた (Table 1)。ところで防菌性のある化合物には試験管内で効果が大きでも実際の試験、例えば圃場での試験などでは環境が異なるため効果が減少または全然効果がみられなくなるものもみられる。今回はこの点も考慮に入れ、保存料として用いられてきた安息香酸のアミノ酸誘導体を合成し、直接バナナに作用させ、その主病菌とされる炭そ病菌への防菌効果を検討した (Table 2, 3)。ここではTBZ (サイアベンダゾール) にほぼ等しい効果がみられた。なおTBZはOPP (オルトフェニルフェノール) と共にレモンや果実類のカビ止め剤として使用されているが、俗にレモン戦争とまでいわれた数年前の日米間の農産物の輸出入問題の結果、日米両国首脳の間で急遽レモンの日本への大量輸入が決定し、これに伴って食品添加物として許可されたものである。TBZやOPPなどは、食品添加物の規制 (チクロなど) が一段落した後に出た問題で、日本ではそれまで毒性などに問題があるとして許可されていなかったものである。

さらに脂肪酸、ここではヤシ油の脂肪酸部とアミノ酸

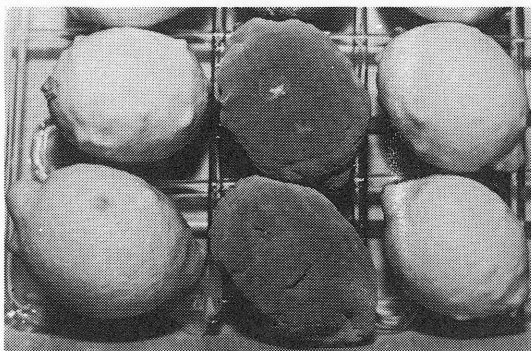


Fig.1. This Photograph Shows the Lemon Fruits Cultivated with *Geotrichum Candidum* for 10 Days *In Vivo*. Right : CAE treatment (500 μ g/ml) and inoculation, Center : no treatment and inoculation, Left : no treatment and no inoculation (control).

とを結合させたCAEについて検討した。このものは青かび (ペニシリウム) やレモンの白かび、こうじかび、大腸菌などに10~300 μ g/mlという濃度で防菌性を示した (Table 4)。そこで実際にレモンを用いてレモン白かび病菌に対する防菌性を検討したところ、CAEは本菌に対し500 μ g/mlで強い防菌性を示すことを認めた (Table 5, Fig 1)。さらにCAEの防菌性についての機構を検討したところ、レモンの白かび病菌にCAEを処理すると菌体に損傷がみられた。同時に菌体内内容物のタンパク質が菌体外へ漏出することが認められ、これらの実験結果からCAEの界面活性作用により防菌性がおこるものと推論した (Fig 2, 3)。

これら一連の研究でアミノ酸を主体とした誘導体にも防菌性の強い良好なものもみられたが、これらのものを実用化するにあたり、生体 (動植物体) における分解性や毒性なども定期的に検討し追求していくべきものと考えている。

引用文献

- (1)志田俊郎, 本間保男, 見里朝正: 農化, 48, 515(1974)
- (2)志田俊郎, 本間保男, 見里朝正: 農化, 49, 409(1975)
- (3)大畑貫一: 農業技術研究所報告, C, 20, 1 (1966)
- (4)高野三郎, 鈴木隆雄, 佐橋佳一: 農化, 46, 309(1972)
- (5)明日山秀文, 向 秀夫, 鈴木直治: 植物病理実験法, 日本植物防疫協会, 1965, p.794
- (6)O.H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1948)
- (7)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

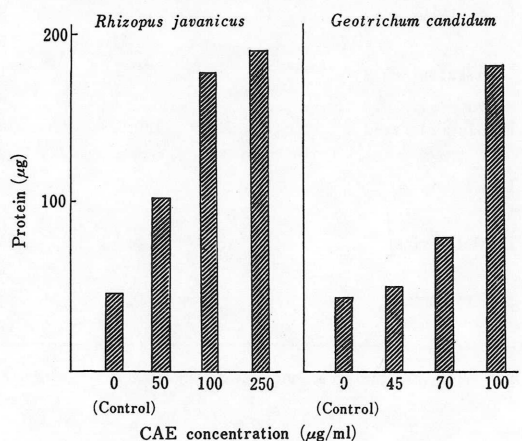


Fig.2. Effect of CAE on the Protein Leakage from Mycelium. These are shown the amount of protein leaked out from mycelium that were incubated with CAE for 5 hr.

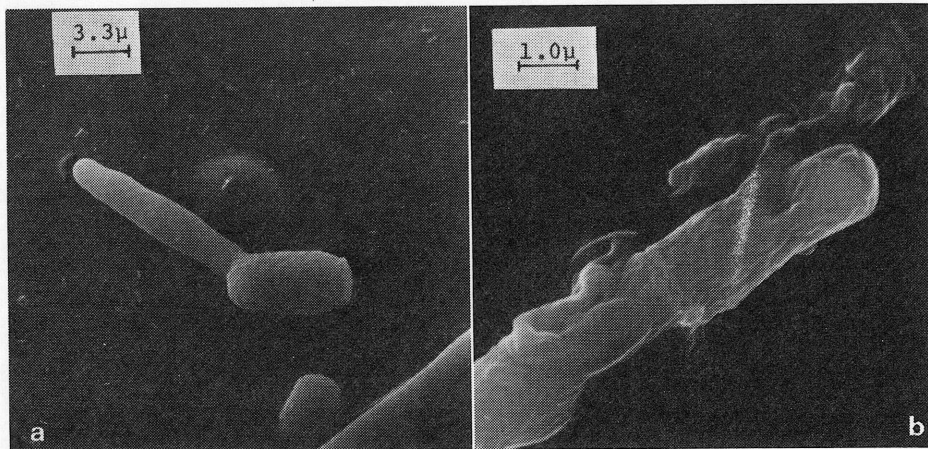


Fig.3. Effect of CAE on the Terms of *In Vivo* for *Geotrichum candidum*. a : control, b : CAE 150 μ g/ml.

Table 1 Inhibitory Action of Amino Acids as Reflected by Colony Appearance of a Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara P₂ (C-1)

Amino acids	Concentration (mM)	mean counts/1 petri dish		Colony appearance rate relative to the control
		Control	Amino acids added	
L-Alanine	10	22.3	18.3	81.2
	1		20.4	91.5
L-Valine	10	6.6	4.4	66.7
	1		6.4	96.9
L-Leucine	10	9.6	8.5	89.0
	1		8.8	92.0
L-Isoleucine	10	63.1	55.6	88.1
	1		56.7	89.9
L-Serine	10	63.1	47.5	75.3 **
	1		48.9	77.5 **
L-Arginine	10	11.7	6.4	54.7 **
	1		7.2	61.5 *
L-Asparagine	10	11.2	11.6	103.5
	1		9.5	85.1
L-Glutamic acid	10	30.7	30.8	100.3
	1		27.2	88.6
L-Glutamine	10	57.0	60.4	106.0
	1		59.3	104.0
L-Methionine	10	55.3	31.2	56.2 **
	1		32.7	59.1 **
L-Tryptophan	10	20.0	12.9	64.5 *
	1		17.7	85.5

** The antibacterial activity is shown as 1% significant level *t*-test. (* 5% level)

Table 2 Elemental Analysis and Properties of N-Benzoyl Amino Acid Derivatives

Derivatives	yield (%)	Recryst. solvent	m.p. (°C)	Analysis (%)						IR ν KBr max cm^{-1}			
				Calcd.			Found			νNH	$\nu\text{C=O}$ (COOH)	$\nu\text{C=O}$ (amide I)	$\nu\text{C-N}$ νNH (amide II)
				C	H	N	C	H	N				
N-Benzoyl-L-leucine	61.7	ether ligroin (1:1)	104~105	66.38	7.23	5.96	66.68	7.14	6.12	3350	1732	1640	1538
N-Benzoyl-L-isoleucine	35.7	Chloroform	118~119	66.38	7.23	5.96	66.62	7.25	6.00	3350	1720	1628	1538
N-Benzoyl-L-methionine	39.1	ethanol	141	56.92	5.93	5.53	56.69	5.91	5.62	3305	1736	1626	1540
N-Benzoyl-L-Valine	20.4	ethanol	125~126	65.01	6.79	6.33	65.01	6.78	6.31	3350	1726	1626	1538
N ² N ⁶ -Dibenzoyl-L-lysine	42.3	acetone	145	68.08	6.21	7.91	68.08	6.25	8.14	3280	1732	1638	1548

Table 3 Appearance rate of an attack of disease on a fresh banana fruit inoculated Anthracnose of banana, *Gloeosporium musarum* after culture for 4 days.

Compounds	Concentration (ppm)	Appearance rate of an attack of disease (%)
Control		30.0
(I) In case of inoculation after soak in the drug solution		
Thiabendazole	100	0 **
Thiabendazole	1,000	0 **
N-benzoyl-L-leucine	100	15.0
N-benzoyl-L-leucine	1,000	5.0**
(II) In case of soak in the drug solution after inoculation		
Thiabendazole	100	20.0
Thiabendazole	1,000	0 **
N-benzoyl-L-leucine	100	0 **
N-benzoyl-L-leucine	1,000	0 **

(I) Each one drop of the spore suspension was inoculated in 20spots injured by the needles on two banana rinds that were soaked in the drug solution after wash and the air dry. Then they were kept at 25°C for 96 hours and were counted number of disease spots to be over 10mm diameter.

(II) The spore suspension solution were inoculated directly on two banana rinds after wash and the air dry. Then they were soaked in fruits dried up by the air dry, and kept again at 25°C for 48 hours. They were counted number of disease spots to be over 10mm in diameter.

**The antibacterial activity is shown as 1% significant level *t*-test.

Table 4 Effect of CAE on the Fungi at Minimum Inhibitory Concentration

Fungi	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CAE	S. D. S.	Lccithin (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>Getrichum 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 5 Effect of CAE on the Lemon Ride
Inoculated by *Geotrichum candidum***

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Number of lemon	18days	26days
Control	No.1	14a)(5)b)	15a)(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)
CAE1000	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)
Benlate1000 (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.