

# モノカプリンとクエン酸およびポリリン酸の併用による *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌作用

加 藤 信 行

## 緒 言

食品の腐敗菌として多種類の微生物が挙げられるが、その中でグラム陰性細菌は一般に薬剤抵抗性が強く、食品防腐剤、殺菌剤使用上の大きな問題となっている。このグラム陰性細菌のうち *Pseudomonas* 菌は薬剤感受性の最も低い菌のひとつであり、食品衛生上重要な細菌である。

著者らは既に脂肪酸およびそのエステル<sup>1)</sup>の抗菌作用について検討し、これらの薬剤とクエン酸あるいはポリリン酸を併用することにより種々のグラム陰性細菌に対して強い抗菌作用を示すことを報告したが<sup>2-3)</sup>、*Pseudomonas* 菌に対する作用力は比較的弱かった。

一方薬剤と加熱の併用（50°C付近という比較的温和な加熱条件下における薬剤処理）による各種微生物に対する抗菌作用についての報告は多いが、*Pseudomonas* 菌についての報告はほとんどない。

本報告は脂肪酸およびそのエステルのうち他薬剤（クエン酸あるいはポリリン酸）と併用したときグラム陰性細菌に対して最も強い抗菌作用力を示したグリセライドモノカプレート（モノカプリン）を試験薬剤とし、これを単独あるいは他薬剤と併用して温和な加熱条件下における *Pseudomonas* 菌に対する抗菌作用を検討した結果を述べる。

## 実験方法

### 1. 供試薬剤と供試菌

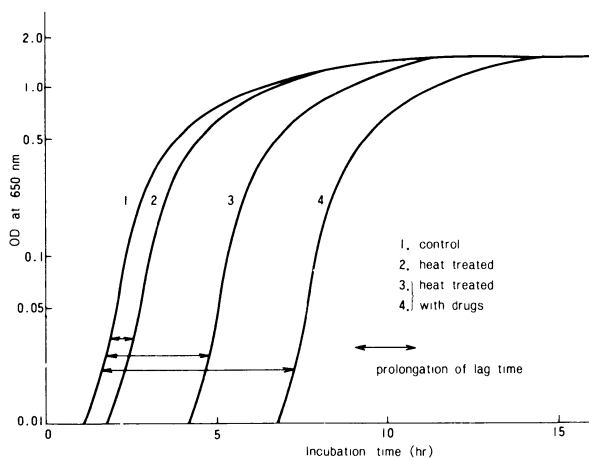
モノカプリン (MC<sub>10</sub>) は理研ビタミン油株式会社より提供された高純度試料であり、その他の薬剤はすべて市販の試薬を用いた。これらのうちクエン酸 (CA) はナトリウム塩として、ポリリン酸 (PP) はカリウム塩として pH 7.0 に調整して用いた。

供試菌としては *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 を用いた。

### 2. 抗菌作用力の検定

肉エキス・ペプトン寒天培地で 37°C, 24 時間培養した *Ps. aeruginosa* の細胞を無菌水に浮遊させ (生菌数約 10<sup>8</sup> cells/ml), これに適当量の薬剤を添加し (pH 7.0), 主として 50°C, 5 分間加熱処理した。

この処理細胞液を肉エキス・ペプトン培地に 2% となるように植菌し、微生物自動発育記録装置 (Bio Scanner OT-BS-24 型) を用いて 37°C での発育経過を記録した。その発育経過は模式図で示すと Fig. 1 の様になる。図



**Fig. 1.** Typical growth curve of *Ps. aeruginosa* in nutrient broth obtained by the automatic growth recording apparatus (Bio Scanner OT-BS-24).

中 1 は無処理, 2 は薬剤無添加で50°C, 5 分間処理, 3, 4 は適量の薬剤存在下で50°C, 5 分間処理したものの発育経過である。図に示した様に加熱単独処理あるいは薬剤存在下加熱処理を行った細胞は無処理の細胞に比べて発育遅延がみられるが, 発育速度は全く同様であった。この発育の遅れを **lag time** の延長時間 (**prolongation of lag time**) と定義し, この値をもって薬剤の抗菌作用力とした。

また同じ薬剤処理細胞液について常法による平板培養法により生菌数 (生存菌数) の測定も行った。

### 実験結果および考察

*Ps. aeruginosa* について種々の生菌数レベルの細胞浮遊液を肉エキス・ペプトン培地に植菌し, その発育経過より **lag time** の延長時間を求めると Table 1 の様な結果が得られた。この表から生菌数が $10^{-1}$  になると約1.6時間の **lag time** の延長時間が示された。すなわち 1.6 時間の **lag time** の延長は 1 ケタの生菌数低下に相当している。Table 1 は薬剤無処理の細胞についての生菌数と **lag time** の延長時間の相関関係であるが, 薬剤処理細胞についても同様な相関関係が得られた (後述)。

**Table 1.** Relationship between prolongation of lag time and viable counts of *Ps. aeruginosa*.

Prolongation of lag time (hr)	Viable counts per ml
0	$1.4 \times 10^8$
1.6	$1.4 \times 10^7$
3.1	$1.4 \times 10^6$
4.7	$1.4 \times 10^5$
6.3	$1.4 \times 10^4$
7.8	$1.4 \times 10^3$
9.4	$1.4 \times 10^2$

**Table 2.** Effect of citric acid and polyphosphoric acid on the antibacterial activity of monocaprin against *Ps. aeruginosa*.

MC <sub>10</sub> \ Drug	Prolongation of lag time (hr)				
	—	CA (%)		PP (%)	
		0.1	0.5	0.1	0.5
—	0.7	1.0	2.7	1.2	2.1
100 $\mu\text{g/ml}$	1.1	2.9	6.3		
200	2.8	3.6	10.2	4.5	7.9
1,000	5.5	8.2	10.3	8.5	>12
2,000	5.9				

The cells were treated in distilled water with each drug at 50°C for 5 min. The treated cells were inoculated into nutrient broth at a rate of 2% and incubated at 37°C. Lag time was calculated from the recorded growth curve.

MC<sub>10</sub>: monocaprin

CA: citric acid (Na salt)

PP: polyphosphoric acid (K salt)

*Ps. aeruginosa* に対してモノカプリンを単独あるいはクエン酸またはポリリン酸の存在下 50°C, 5 分間処理した時の抗菌作用力を Table 2 に示した。モノカプリンは単独でも濃度の上昇と共に作用力が増大し, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  で 5.5 時間の lag time 延長時間 (生菌数  $10^{-3} \sim 10^{-4}$  低下) が見られたが, その抗菌作用力は著るしく強いとは言えない。そしてモノカプリンとクエン酸あるいはポリリン酸を併用して処理すると, それぞれの単独処理による lag time の延長時間を加えた値 (相加効果) より大きな lag time の延長が見られ, 併用した 2 薬剤間における相乗効果が認められた。そしてその効果はモノカプリン 200  $\mu\text{g/ml}$  — クエン酸 0.5%, モノカプリン 200  $\mu\text{g/ml}$  — ポリリン酸 0.5% の組合せで強く見られた。またクエン酸, ポリリン酸は単独処理で同等の lag time の延長効果があったが, モノカプリンへの添加効果は若干異っていた。

薬剤—加熱併用効果についての研究は多く, 抗生物質<sup>4-6)</sup>, 無機化合物<sup>7-10)</sup>,

ガス殺菌剤<sup>11-13)</sup>、有機酸、アルコール、アルデヒド等<sup>5,13,14-20)</sup>、界面活性剤<sup>5,21)</sup>についての報告があり、対象微生物についてもかび孢子<sup>8)</sup>、酵母<sup>4,16,19,20)</sup>、細菌<sup>9,13-15,17,18)</sup>、細菌孢子<sup>5-7,10-12,21)</sup>が検討されている。その中で中鎖あるいは長鎖の脂肪酸については Michener<sup>5)</sup>らが細菌孢子に対して検討しているにすぎない。

著者らは既に脂肪酸およびそのエステル加熱併用効果(50°Cにおける薬剤処理)を主として *Escherichia coli* を対象に検討し、 $10^{-6}$ あるいはそれ以上の生菌数の低下を認めると共に、この薬剤加熱併用効果に対する種々の影響因子の作用について報告している<sup>22)</sup>。また同時に他のグラム陰性細菌に対する薬剤加熱併用効果も検討し、*Ps. aeruginosa* に対してモノカブリン、ラウリン酸、モノラウリンがかなり強い抗菌作用を示すことも認めている<sup>22)</sup>。またモノカブリンとクエン酸またはポリリン酸の併用により常温でグラム陰性細菌(*Ps. aeruginosa* を除く)に対して強い抗菌作用を示すことも報告している<sup>1-3)</sup>。

本実験は薬剤併用処理を50°Cで行うという薬剤併用と薬剤加熱併用を同時に行ったものであり、その結果薬剤抵抗性の非常に強い *Ps. aeruginosa*

**Table 3.** Relationship between prolongation of lag time and viable counts determined with same sample.

Drug (concentration)	Prolongation of lag time (hr)	Viable counts per ml
—	0.7	$1.0 \times 10^8$
MC <sub>10</sub> (1,000 $\mu$ g/ml)	5.2	$1.6 \times 10^5$
MC <sub>10</sub> (200)	2.2	$1.3 \times 10^7$
CA (0.5%)	3.0	$4.1 \times 10^7$
MC <sub>10</sub> (1,000) + CA (0.5)	10.3	$5.0 \times 10^2$
MC <sub>10</sub> (1,000) + CA (0.1)	7.7	$4.7 \times 10^3$
MC <sub>10</sub> (200) + CA (0.1)	5.4	$1.5 \times 10^5$

The test condition was the same as that shown in Table 2.

Initial viable count :  $1.9 \times 10^8$ /ml

**Table 4.** Effect of temperature on the antibacterial activities of monocaprin and citric acid against *Ps. aeruginosa*.

Temperature (°C) Drug	Prolongation of lag time (hr)			
	37	45	50	55
—	0	0	0.6	3.9
MC <sub>10</sub> (1,000 µg/ml)	0	0.2	5.4	10.8
CA (0.5%)	0	0.7	3.0	6.4
CA (0.1)	0	0.1	1.0	5.1
MC <sub>10</sub> (1,000) + CA (0.1)	0.1	1.8	9.2	>12

The cells were treated in distilled water at various temperatures for 5 min.

に対する顕著な抗菌作用が見出された。

次に薬剤処理を行った細胞について lag time の延長時間と生菌数の関係を Table 3 に示した。各種濃度の薬剤処理細胞において lag time の延長時間より予想されるほど実際の生菌数低下は起っていない（この傾向はクエン酸単独処理の場合強く見られた）。しかし両者はほぼ一致しており、このことより lag time の延長時間で示された抗菌作用は薬剤処理による生菌数低下すなわち殺菌作用によるものであると言える。

最後に薬剤処理温度を変えた場合の抗菌作用力を検討した結果を Table 4 に示した。この表より 37°C での薬剤処理では抗菌作用はまったく見られず、45°C で処理しても作用力は微弱であり、50°C 処理ではじめて強い抗菌作用力を示すことを認めた。また 55°C 処理では薬剤無添加でもかなりの抗菌作用が見られ、薬剤単独処理で強い作用力を示し、薬剤併用効果は判然としなかった。この様に薬剤処理温度が抗菌作用力増大に大きく寄与していることが判明したが、処理温度が 50°C を越えると加熱のみによる大きな lag time の延長が見られ、薬剤の作用力は判定しにくくなっていた。

## 要

## 約

食品衛生上重要な微生物である *Pseudomonas* 菌に対する薬剤併用処理を

比較的温和な加熱条件下で行った。

その結果モノカプリンとクエン酸あるいはポリリン酸を組合せることにより 50°C, 5 分間の処理で薬剤感受性の非常に低い *Ps. aeruginosa* に対して強い抗菌作用を示すことを見出した。

そしてその抗菌作用は殺菌作用に基づくものであることが判明した。またこの薬剤併用による抗菌作用力は 45°C 以下では微弱であることも認められた。

#### 文 献

- 1) 加藤, 芝崎: 防菌防黴誌, **3**, 355 (1975) .
- 2) 加藤, 芝崎: 防菌防黴誌, **4**, 254 (1976) .
- 3) 加藤, 芝崎: 防菌防黴誌, **5**, 473 (1977) .
- 4) York, G. Y. : Appl. Microbiol., **14**, 451 (1966) .
- 5) Michener, H. D., Thompson, P. A., Lewis, J. C. : Appl. Microbiol., **7**, 166 (1959) .
- 6) Heinemann, B., Voris, L., Stumbo, C. R. : Food Technol., **19**, 592 (1965) .
- 7) Wyatt, L. R., Waites, W. M. : J. Gen. Microbiol., **89**, 337 (1975) .
- 8) Cheng, M. K. C., Levin, R. E. : J. Food Sci., **35**, 62 (1970) .
- 9) Kohl, F. : Food Technol., **25**, 1176 (1971) .
- 10) Toledo, R. T., Escher, F. E., Ayres, J. C. : Appl. Microbiol., **26**, 592 (1973) .
- 11) McConnell, J. E. W., Collier, C. P. : Food Eng., **34** (12), 96 (1962) .
- 12) Kuzminsky, L. N., Howard, G. L., Stumbo, C. R. : J. Food Sci., **34**, 561 (1969) .
- 13) Lategan, P. M., Vaughn, R. H. : J. Food Sci., **29**, 339 (1964) .
- 14) Garibaldi, J. A. : Food Technol., **23**, 1031 (1968) .
- 15) Thomas, S., Russell, A. D. : Appl. Microbiol., **28**, 331 (1974) .
- 16) Splittstoesser, D. F., Lienk, L. L., Wilkinson, M., Stamer, J. R. : Appl. Microbiol., **30**, 369 (1975) .
- 17) Parkinson, J. C., Pickett, J. M. : J. Appl. Bact., **27**, 471 (1964) .
- 18) Tsuchido, T., Ozawa, O., Shibasaki, I. : J. Ferment. Technol., **53**, 363 (1975) .
- 19) 芝崎, 飯田: 食品工誌, **15**, 447 (1968) .

- 20) Shibasaki, I., Tsuchido, T. : *Acta Alimentaria*, **2**, 327 (1973) .
- 21) Briggs, A. , Yazdany, S. : *J. Appl. Bact.*, **37**, 623 (1974) .
- 22) 加藤, 芝崎 : 醸工, **53** 802 (1975) .