

[J. Ferment. Technol., Vol. 45, No. 8, p. 750~755, 1967]

## 両性界面活性剤の抗菌作用特性について

芝崎 勲・鈴木 正国

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

## On the Antimicrobial Characteristics of Amphoteric Surface Active Agent

Isao Shibasaki and Masakuni Suzuki

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka)

The present investigation was undertaken to compare the antimicrobial characteristics of amphoteric surface active agent (polyoctylpolyaminoethyglycine, Fu) with that of quaternary ammonium compound (Os) in use as a sanitizer in food plants and in other fields.

The antimicrobial activity of Fu against some typical microorganisms seemed to be inferior to Os as shown in Table 1 a) and b).

Temperature coefficients ( $Q_{10}$ ) of microbicidal action of these drugs in a lower temperature range ( $0^{\circ}\sim 20^{\circ}\text{C}$ ) were comparatively larger than the typical chemosterilizer such as halogen compounds and alkylating agents as shown in Table 2 and 3. Concentration exponents ( $n$ ), computed by the equation,  $k=AC^n$ , in which  $k$  and  $C$  are disinfection constant and drug concentration, resp., were also large ranging from 2.5 to 3.0.

From a consideration of the effect of pH and organic matters on the antimicrobial action and other factors such as low-toxicity, wetting ability, deodorising ability, it seems most reasonable to conclude that Fu would be a usefull sanitizer in food plants and in other fields.

## 緒 言

近年食品工業においては、益々食品衛生の重要性が再認識せられてきたが、この分野における化学薬剤の利用の歴史は古く、ハロゲン化合物、ホルマリン、界面活性剤が代表的な薬剤といえることができる<sup>1)</sup>。しかしすべての適用範囲において満足すべき効果が期待できるとはいえず、それぞれ薬剤の特質に対応して利用されているのが現状といえよう。両性界面活性剤は1940年頃より検討されたが、殺菌剤としての利用性を見出したのは A.Schmitz (1948) であって、以来電解質や蛋白質などに対する安定性、低毒性、脱臭性などの特性が注目されて、主としてヨーロッパで種々の分野に利用されてきた。しかしこれに関して実用的な利用面に比して、殺菌作用などについて基礎的な研究結果の発表は少なく、かつまた断片的のように考えられる<sup>2,3)</sup>。我国においても最近両性界面活性剤の食品工場などへの応用が拡大する傾向にあるが、その特性が十分認識されているとはいえない。そこで著者らは新たに得られた両性界面活性剤の1製剤を供試してその殺菌作用特性を検討することとし、とくに実用的な見地より殺菌剤選択上の基準となるべき諸特性について第4級アンモニウム塩を対照殺菌剤として検討し、2,3の知見をえたのでその結果を述べる。

## 実 験 方 法

供試薬剤としての両性界面活性剤は主として日本新薬KKより提供された「ポリオクチルポリアミノエチルグリシン」を主成分とする製剤（以下 Fu と略称する）を用い、市販の塩化ベンザルコニウム製剤（Os と略称する）を対照殺菌剤として用いた。

抗菌作用特性の検討に用いた微生物は教室保存菌株であり、静菌作用力および殺菌作用力は常法により測定した。生菌数測定条件としては、細菌……グルコース1.0, ポリペプトン1.0, 肉エキス1.0, 食塩0.3, 寒天1.5% (pH 7.0), 適温, 24~48hr; 酵母……Czapek-Dox 培地+ポリペプトン0.25%, 酵母エキス0.25%, 30°C, 2日であり、静菌作用力は、細菌……グルコース2.0, 肉エキス0.5, ポリペプトン1.0% (pH 7.0), 37°C, 48hr; かび……Czapek-Dox 培地+ポリペプトン0.5% (pH 6.4), 30°C, 72~96hr; 酵母……Czapek-Dox 培地+酵母エキス0.5% (pH 5.8), 30°C, 48hr のような条件を採用してもとめた。多数の菌種に対する殺菌作用力の比較には MLC (minimum lethal concentration) でもって表示し、これは FDA フェノール係数測定法に準じた条件で測定した<sup>4)</sup>。

## 実 験 結 果

1. 抗菌作用力 代表的な教室保存菌株に対する Fu と Os との静菌作用力および殺菌作用力を比較した結果は Table 1 a), b) に示した。本実験条件のもとでは Os の方が両作用力に関して一般に強力といえることができるが、両薬剤の作用力が同等な例も多い。供試菌種、菌株により薬剤の作用力に大きい変動のあることは当然予想されるところであり、より多くの微生物菌株について検討する必要がある。 *Pseudomonas* やかびに対して抗菌作用力の弱いのは界面活性剤の通性とみてよいであろう。Fu および Os の殺菌作用経過については、*Es. coli*, *Staph. aureus*, *Can. utilis* などについて検討を加えたが、かなり広い範囲にわたって直線的な死滅経過を示したので、以下の実験では90%死滅時間(分)(D)でもって殺菌作用力の比較を行なうことにした。

Table 1. Antimicrobial activity of amphoteric surface active agent.

## a) Minimum inhibition concentration (MIC)

Test condition:

Bacteria... glucose 2.0, peptone 1.0, meatextract 0.5% (pH), 37°C, 48<sup>hr</sup>.

Molds ... Czapek-Dox's medium+peptone 0.5% (pH6.4), 30°C, 72~96<sup>hr</sup>.

Yeasts ... Czapek-Dox's medium+yeast extract 0.5% (pH5.8), 30°C, 48<sup>hr</sup>.

Inoculum size : 10<sup>2</sup>~10<sup>4</sup> cells or spores per ml of test medium.

| Test organisms                       | MIC in $\mu\text{g/ml}$ |      |
|--------------------------------------|-------------------------|------|
|                                      | Fu                      | Os   |
| <i>Staph. aureus</i>                 | 12.5                    | 6.25 |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> | 10.0                    | —    |
| <i>Micro. flavus</i>                 | 10.0                    | 2.5  |
| <i>Sarcina lutea</i>                 | 10.0                    | 2.5  |
| <i>Es. coli</i>                      | 12.5                    | 12.5 |
| <i>Ps. aeruginosa</i>                | > 100                   | 100  |
| <i>Aer. aerogenes</i>                | 25                      | 25   |
| <i>Han. anomala</i>                  | 50                      | 50   |
| <i>Sacch. cerevisiae</i>             | 12.5                    | 6.25 |
| <i>Can. utilis</i>                   | 12.5                    | 6.25 |
| <i>Asp. niger</i>                    | 50                      | 25   |
| <i>Asp. oryzae</i>                   | 100                     | 25   |
| <i>Pen. citrinum</i>                 | 100                     | 50   |

## b) Minimum lethal concentration (MLC)

Test condition : M/10 phosphate buffer (pH7.0), 30°C

MLC ( $\mu\text{g/ml}$ ) indicates the concentration of test drugs that destroys the test organism in 10 but not 5 minute exposure and is determined using a modified FDA phenol-coefficient method.

| Test organisms             | MLC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |            |
|----------------------------|--------------------------|------------|
|                            | Fu                       | Os         |
| <i>Staph. aureus</i> T     | 25                       | 100        |
| <i>Staph. aureus</i> 209 P | 1000                     | 100        |
| <i>Sar. lutea</i>          | 50                       | 25         |
| <i>Es. coli</i>            | 500                      | 500        |
| <i>Aer. aerogenes</i>      | 250                      | 250        |
| <i>Serratia marcescens</i> | 250                      | 250        |
| <i>Ps. aeruginosa</i>      | > 1000                   | 250        |
| <i>Ach. sperfacialis</i>   | 100                      | 100 $\geq$ |
| <i>Flavo. lactis</i>       | 250                      | 100 $\geq$ |
| <i>Lact. plantarium</i>    | 250                      | 100        |

細菌胞子に対しては、界面活性剤はハロゲン系殺菌剤などのような死滅作用力をもっていない。しかし *B. subtilis* 胞子を供試した発芽、増殖実験では Fu および Os は低濃度で阻害作用を示すことを認めた。すなわち胞子発芽に対しては  $25\mu\text{g/ml}$  あるいはこれ以上の濃度で顕著な効果を示し、その後の増殖に対しては  $1.0\mu\text{g/ml}$  程度の低濃度でも強力に阻害効果のあることが明かとなった。

Table 2. Effect of temperature on the bactericidal action of amphoteric surface active agent against *Es. coli*.a) Drug concentration in M/10 phosphate buffer (pH7.0) :  $10\mu\text{g/ml}$ Initial cell number : about  $10^7$  cells per ml, prepared from 18hr broth culture.

| Temperature<br>°C | Decimal reduction time in minute (D) |       |
|-------------------|--------------------------------------|-------|
|                   | Fu                                   | Os    |
| 30                | —                                    | 2.0   |
| 20                | 1.0                                  | 7.4   |
| 15                | 4.0                                  | —     |
| 10                | 20.6                                 | 56.1  |
| 0                 | > 100                                | > 400 |

b) Drug concentration, :  $100\mu\text{g/ml}$  in M/10 phosphate buffer (pH7.0)

| Drug | Time<br>(min) | Temperature (°C)   |                    |                    |
|------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|      |               | 0                  | 10                 | 15                 |
| Fu   | 0             | $1.57 \times 10^7$ | $1.57 \times 10^7$ | $1.57 \times 10^7$ |
|      | 5             | —                  | $10^2 >$           | $10^2 >$           |
|      | 10            | $10^2 >$           | —                  | —                  |
| Os   | 5             | —                  | $6.0 \times 10^3$  | $1 \times 10^2$    |
|      | 10            | $1.5 \times 10^4$  | $10^2 >$           | $10^2 >$           |
|      | 20            | $1.8 \times 10^3$  | —                  | —                  |

**2. 殺菌作用に対する諸影響因子** 化学薬剤の殺菌作用に対しては色々な因子が影響を及ぼすのでこれらについて検討を加えた。 *E. coli* および *Can. utilis* を試験菌とした場合, Fu, Os とともに殺菌濃度効果は比較的大きく, 2.5~3.0の殺菌濃度指数 ( $n, k=AC^n$ ) の値が得られた。殺菌作用力は温度の上昇と共に増大するが, 実用的見地よりすれば室温ないしそれ以下の低温の場合を重視すべきであって, 十分検討しておく必要がある。それで20℃以下の温度条件における *E. coli* に対する殺菌作用を検討した結果を Table 2 a), b) に示した。通常殺菌剤の常温附近あるいはそれ以上の温度範囲では殺菌作用の温度係数 ( $Q_{10}$ ) は2~3の場合が多いが, a) の例では10以上の大きい値を示している。Table 3 は *C. utilis* を供試した場合の結果であってこの場合も低温度域ではかなり  $Q_{10}$  の値は大きい。この点次亜塩素酸ソーダやアルキル化剤 (エポキシド,  $\beta$ -プロピオラクトンなど) に比較して低温度域における温度依存性が大きい傾向にあるといえることができる<sup>9)</sup>。しかしながら実用的には十分高い濃度を適用するのが普通であり, 上述の殺菌剤 ( $n=1\sim1.5$ ) に比べて  $n$  値が大きいので0℃附近の低温環境のもとでも短時間に殺菌の目的を達成できることは Table 2 の b) の例でも明かなことである。殺菌作用環境における pH は薬剤の殺菌作用に対して特異的な影響をおよぼすが, Os では pH 6.0以下になると急激な作用力の低下を示し, 中性ないしアルカリ性で最高値を示すのが通例である。Fu では *Es. coli* について pH 6~7で最高作用力を有しているが, 試験微生物が異なるとその影響もかわり, *Sarcina* や *Candida* では5.3~9.0の範囲で最大の pH による作用力の変化は見出されなかった (Table 4 参照)。

Table 3. Effect of temperature on the microbicidal action of amphoteric surface active agent against *Can. utilis*.

M/10 phosphate buffer (pH 7.0)

Initial cell numbers : about  $10^8$  cells/ml, prepared from 2 days shake culture.

| Temperature (°C) | Concentration of<br>Fu in $\mu\text{g/ml}$ | D (min) |
|------------------|--------------------------------------------|---------|
| 50               | 10                                         | 0.5     |
|                  | 5                                          | 2.7     |
| 40               | 10                                         | 1.5     |
| 30               | "                                          | 5.0     |
| 20               | "                                          | 15.4    |
| 10               | 20                                         | 13.7    |
| 5                | 50                                         | 2.7     |
| 0                | 50                                         | 7.1     |

Table 4. Effect of pH on the microbicidal action of amphoteric surface active agent.

Initial cell numbers : about  $10^7$ /ml

| Test<br>organism   | Drug<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Temp.<br>(°C) | D(min)   |     |     |      |      |
|--------------------|------------------------------|---------------|----------|-----|-----|------|------|
|                    |                              |               | pH* 4.0  | 5.0 | 6.0 | 7.0  | 8.0  |
| <i>Es. coli</i>    | Fu 10.0                      | 20            | 4.75     | 4.5 | 1.1 | 0.95 | 2.9  |
|                    | Os 100                       |               | 3.2      | —   | —   | 0.6  | 0.6  |
| <i>Sar. lutea.</i> | Fu 10                        | 30            | pH** 5.3 | 5.9 | 6.6 | 7.6  | 9.0  |
|                    |                              |               | 6.9      | 6.9 | 8.7 | 8.7  | 18.2 |
| <i>Can. utilis</i> | Fu 10                        | 30            | 9.0      | 9.9 | 8.4 | 9.3  | 9.7  |

\* M/10 acetate buffer (pH 4, 5), M/10 phosphate buffer (pH 6, 7, 8)

\*\* McIlvaine buffer

Table 5. Effect of organic matters on the microbicidal action of amphoteric surface active agent.

Drug concentration : 10 $\mu$ g/mlTemperature : 20°C (*Es. coli*), 30°C (*Can. utilis*, *Sar. lutea*)

| Test organism and<br>initial cell numbers       | Drug | D (min)          |                          |                           |
|-------------------------------------------------|------|------------------|--------------------------|---------------------------|
|                                                 |      | Phosphate buffer | Peptone 1%               | Meat extract 1%           |
| <i>Es. coli</i><br>about 10 <sup>7</sup> /ml    | Fu   | 2.1              | 2.4                      | 3.2                       |
|                                                 | Os   | 3.7              | >10.0                    | >10.0                     |
| <i>Can. utilis</i><br>about 10 <sup>6</sup> /ml | Fu   | 5.3              | Meat extract 0.1%<br>6.3 | Meat extract 0.1%<br>10.1 |
|                                                 | Os   | 8.8              | 12.9                     | 13.4                      |
| <i>Sar. lutea</i><br>about 10 <sup>6</sup> /ml  | Fu   | 7.8              | Gelatine 0.1%<br>10.0    | Gelatine 0.1%<br>60.8     |
|                                                 | Os   | 5.5              | 5.2                      | 9.1                       |

殺菌剤の作用に対する環境に存在する有機物、洗剤、無機塩などの影響を検討することは実用上きわめて重要なことである。Table 5 は実験結果の 1 例であるが、ペプトンや肉エキスの共存下では Fu の方が影響が少ないが、ゼラチンでは Os の方が作用力の低下が少ないことがわかる。Os が陰イオン界面活性剤の共存で混濁し、殺菌力の低下することはすでに明らかであるが、さらにポリリン酸塩などによっても沈澱する性質をもっている<sup>1)</sup>。Fu ではこのような混濁は認められないが、ゼラチンやアルブミンの添加にて混濁することをみとめている。

### 考察および総括

界面活性剤のうち陽イオン界面活性剤、とくに第 4 級アンモニウム塩の殺菌作用特性に関しては多くの研究があり、食品工場その他食品を取扱う分野において多量に利用されている<sup>1,3,6,7)</sup>。両性界面活性剤のうち Tego 系のはドイツにおいて 1950 年頃より実用せられ、欧州では第 4 級アンモニウム塩に匹敵する程利用されているといわれている<sup>2)</sup>。しかし後者に比し基礎研究結果の発表は断片的であり、とくにこれら殺菌剤を選別する際の指針を欠くものである。本研究ではこの点を明かにするのが目的であって、Os と比較検討することによって両性界面活性剤の殺菌剤としての価値をかなり明らかにすることができた。静菌作用、殺菌作用力共に Os に比しかなり劣る結果が得られているが、これはある限られた保存菌株を供試した場合の結果であり、実際に遭遇する微生物には著しい薬剤耐性の変動が予想されるし、かつまた適用条件の影響、たとえば、有機物、洗剤などによる影響を考慮するとき、Os に近い殺菌効果が期待できる場合も多いと見られる。この点については Schmitz ら<sup>2,8)</sup> が強調しているようであるが、しかし長期にわたる工場実験によって確かめる必要があろう。工場環境衛生に利用する殺菌剤では低温度域で使用する場合が多いが、この点について検討した例は少ない。Fu についての結果は Table 2 および 3 に示したが、この結果より、Fu, Os 共に塩素系殺菌剤などに比して不利のように考えられるが、殺菌濃度効果の大きい点によってこれを補うことができるということが出来る (ハロゲン系殺菌剤その他では  $n=1\sim 1.5$  であるが、Os, Fu は  $n=2.5\sim 3.0$ )。pH の影響については Os に比しかなりひろい範囲で変動が少ないといえるようである<sup>6)</sup>。有機物など共存物質による殺菌作用力の低下は、いずれの殺菌剤でも認められるものであり、ハロゲン系殺菌剤はこの点顕著である。しかし界面活性剤は一般的にみて比較的少ない部類に入れることができる。血清などの共存の影響の検討により両性界面活性剤の方が第 4 級アンモニウム塩より殺菌力の低下の少ないことが Schmitz<sup>8)</sup> により示されている。著者らが食品工場で遭遇すると予想される有機物などについて比較検討した結果でも大体以上の Schmitz の結論に到達することができるが、しかしゼラチンとか卵アルブミンのように逆に Fu の方に影響が大きい物質もあるので注意が肝要であり、これらの点につい

てはさらに多くの物質について検討する必要がある。

以上現在食品を取扱う環境における有力な殺菌剤としての Os を対照としながら、両性界面活性剤の 1 つの製剤を供試して抗菌作用力の比較を行なうと共に、殺菌作用特性に関し、濃度効果、作用環境温度（とくに低温度に重点をおいて）、pH、有機物の共存の影響を検討し、抗菌作用力その他今後実地に検討を要する点も多いが、その洗滌性、脱臭性、低毒性などという両性界面活性剤特有の食品工業の分野での殺菌剤として好ましいところの特性を考慮する場合、かなり広い利用面が見出されるものと期待できる。

本研究の概要は昭和41年生物化学工学シンポジウム（防腐と殺菌）で発表した。

終りに本研究実施に当り種々御便宜を賜った日本新薬株式会社に深謝の意を表す。

## 文 献

- |                                                                                                           |                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Parker, M. E., Litchfield, J. H. : "Food Plant Sanitation", 124, Reinhold Pub. Corp., New York (1962). | 34, D. Van Nostrand Co. Inc. (1958).                                                   |
| 2) Schmitz, A., Harris, W. S. : <i>Manufacturing Chemist</i> , <b>29</b> (2) 1(1958).                     | 5) 芝崎, 照井: 本誌, <b>40</b> , 125 (1962).                                                 |
| 3) 堀口: 合成界面活性剤, 311, 398, 三共出版 (1963).                                                                    | 6) Dunn, C. G. : <i>Adv. Food Research</i> , <b>2</b> , 117 (1949).                    |
| 4) Sykes, G. : "Disinfection and Sterilization",                                                          | 7) Sykes, G. : "Disinfection and Sterilization," 288, D. Van Nostrand Co. Inc. (1958). |
|                                                                                                           | 8) Schmitz, A. : <i>Milchwissenschaft</i> , <b>7</b> , 253 (1952).                     |
|                                                                                                           | (昭 42. 5. 6. 受付)                                                                       |

## 質 疑 応 答

戸田 清 (東大応微研)

- (1) Table 1b) の両性界面活性剤の殺菌作用力測定結果において試験菌の濃度、薬剤の接触時間によって殺菌濃度値がちがってくるものが考えられないでしょうか。
- (2) 殺菌作用経過を viable count で測定する際、残存薬剤によりコロニー形成が阻害される場合があると思いますが、

芝崎

- (1) 当然変動する筈ですが、一定条件のもとでは殺菌剤の比較には利用できると思います。ここでは Fu と Os の比較のため多数の菌株について簡単に実施できる点より利用しました。
- (2) これらの薬剤の生菌数測定培地への carry-over による影響は十分考慮して行なっております。ここに示しましたデータはこれらの影響が無視できる範囲のものです。