

柑橘類の抗菌・抗真菌作用と成分間の相乗効果

班員 木元 真央 新木 慎侑子 村田 咲笑 矢田 莉音
担当教諭 合田 恵史

キーワード：クエン酸、リモネン

Experiments were conducted using the disk diffusion method to investigate the antibacterial and antifungal effects of two components of citrus fruits, citric acid and limonene, and their synergistic effects. Both showed antibacterial activity. Only limonene showed antifungal activity. Regarding antimicrobial activity, a synergistic effect was observed between the two.

1はじめに

一般的にミカンやタチバナに代表される柑橘類には細菌や真菌の増殖を抑制する抗菌・抗真菌作用があると知られている。本研究では、柑橘類に含まれる代表的な成分であるクエン酸とリモネンを使用し、それの大腸菌と真菌に対する抗菌・抗真菌作用を調べた。クエン酸はpH6～7で抗菌作用を示す、柑橘類の果肉に含まれる水溶性の有機化合物であり、リモネンは柑橘類の外果皮に含まれる疎水性、揮発性をもつモノテルペンの一種である。本研究では、最初にクエン酸、リモネンの抗菌作用、抗真菌作用の有無を調べた。柑橘類の主な病気の原因となる菌と同じ種類に分類される菌を使用することで、柑橘類のどの部分が、どのような病気に対して、抗菌、抗真菌作用を持つのかを明らかにすることを本研究の目的とした。また、抗菌作用における相乗効果を調べ、食器用洗剤やトイレの芳香剤などへの活用の可能性を探ることも目的として研究を行った。

柑橘類に含まれる成分における抗菌・抗真菌作用を調べる研究で使用される実験方法であるディスク拡散法では、揮発性の成分と揮発性でない成分の抗菌・抗真菌作用を調べる手順で異なっている。そのため、揮発性の成分どうしの組み合わせの相乗効果

を調べる研究は行われているが、揮発性の成分と揮発性の成分でない成分の組み合わせの相乗効果を調べる研究は行われていない。この研究では、ディスク拡散法で揮発成分と揮発成分でない成分の組み合わせでの抗菌作用を調べる有効的な方法を探すことも目的とし、実験を進めた。

2実験方法

100 g のレモン果汁に含まれるクエン酸の平均の量が6.5gである(1)ことから、質量濃度が6.5%となるように精製水に溶かしたクエン酸とd-リモネンを使用し、ディスク拡散法により抗菌・抗真菌作用を調べた。d-リモネンは疎水性であり希釈することができないため、元々の薬品の濃度である濃度99.8%のまま使用した。実験には、カンキツかいよう病などのグラム陰性菌の一種である大腸菌と、真菌である酵母を使用した。まず、LB寒天培地の上に菌液を塗布し、クエン酸、リモネンを染み込ませたディスクを1つのシャーレに4個ずつ配置し(図1)、30～32℃に設定し、インキュベーターの中で24時間培養した。その後、ディスクの周りに阻止円が形成されているか判断し、形成されているときには、電子ノギスを使用して阻止円の直径を測定した。実験の際は、ディスクにクエン酸をマイクロピペットで染み込ませた後、十分に乾燥させてから使用した。ま

た、リモネンを実験に使用する場合は、揮発性を考慮し、寒天培地にディスクを配置する直前にマイクロピペットでディスクに垂らす形で染み込ませて、乾かさずに使用した。この方法で実験を行うことによって、できるだけリモネンの揮発による減量がなくなるようにした。

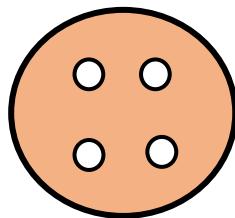


図1 ディスクの配置方法

【実験1】

クエン酸とリモネンのそれぞれの抗菌・抗真菌作用の有無を調べた。クエン酸とリモネンを先程示した方法で $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ ずつ染み込ませたそれぞれのディスクを、濃度1.0%の大腸菌の菌液または一次発酵が完了した酵母⁽¹⁾を塗布したLB寒天培地に配置し、 $30\sim32^\circ\text{C}$ のインキュベーターの中で24時間培養した。その後、ディスク周りに阻止円が形成されているか判断し、電子ノギスを使用して形成された阻止円の直径を測定した。

【実験2】

クエン酸とリモネンの大腸菌に対する抗菌作用の相乗効果を調べた。ディスクにクエン酸 $2\mu\text{L}$ を染み込ませて乾燥させた後、濃度1.0%の大腸菌の菌液を塗布したLB寒天培地にディスクを配置する直前に、リモネン $2\mu\text{L}$ を染み込ませ、実験1と同様に培養し、形成された阻止円の直径を測定した。クエン酸単体では $2\mu\text{L}$ の際、阻止円が形成されなかったことから、リモネン $2\mu\text{L}$ と組み合わせても、リモネン単体の抗菌作用しか発揮されず、リモネン単体 $2\mu\text{L}$ の阻止円の直径と同じ大きさの阻止円が形成されると予想し、実験1の結果と結果を比較した。

【実験3】

クエン酸は水分量が多い果肉に含まれている。そのため、実験2より果実内での実際の状態に近づけるために、クエン酸をディスクに染み込ませた後、乾燥させずに水溶液の状態で、相乗効果を調べた。また、相乗効果がクエン酸の影響によるかを調べるために比較実験として、リモネンと精製水の組み合わせの実験も行った。リモネンとクエン酸水溶液、リモネンと精製水の比が $1:1$ の混合液 $4\mu\text{L}$ をディスクに染み込ませ、リモネンの揮発性を考慮して乾燥させずにLB寒天培地に配置し、実験1、2と同様に培養し、形成された阻止円の直径を測定した。

3 結果

【実験1】

大腸菌に対して、クエン酸は $4\mu\text{L}$ 以上から阻止円が形成された。リモネンは $2\mu\text{L}$ 以上から阻止円が形成された。また、酵母に対して、クエン酸は阻止円が形成されなかった。リモネンは $2\mu\text{L}$ から阻止円が形成された。

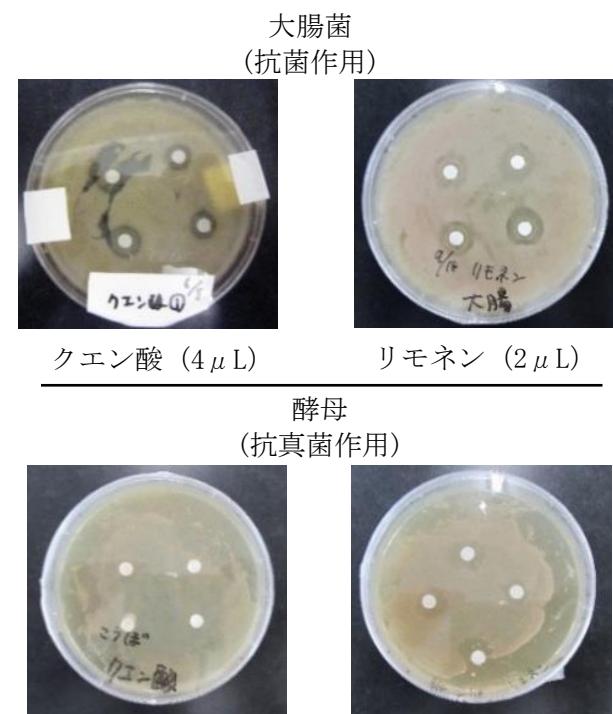


図2 クエン酸とリモネンの大腸菌と酵母に対する抗菌・抗真菌作用の結果

表1 抗菌・抗真菌作用作用の有無まとめ

	クエン酸 (4 μL)	リモネン (2 μL)
大腸菌 (抗菌作用)	○	○
酵母 (抗真菌作用)	×	○

【実験2】

実験1でのリモネン単体2 μLで形成された阻止円と比べ、有意に大きな阻止円が形成された（図3, N=4, p<0.01 t-test）。

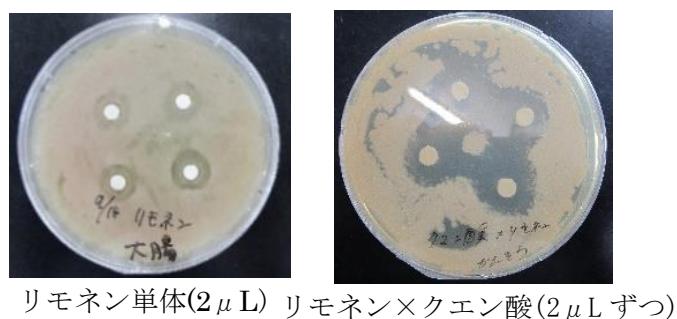


図3 リモネン単体2 μL(左)とリモネンとクエン酸を組み合わせた(右)の阻止円の比較

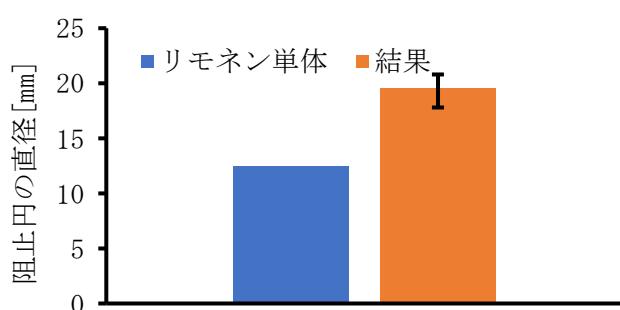
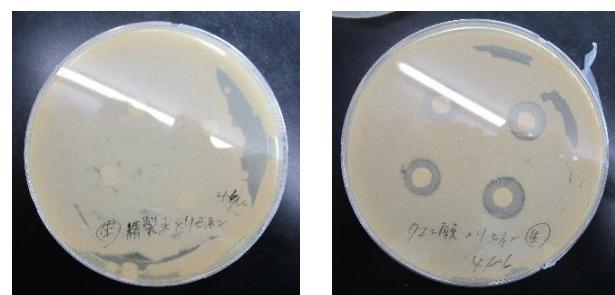


図4 リモネン単体(左)とリモネンとクエン酸を2 μLずつ組み合わせた(右)の阻止円の直径の比較

【実験3】

精製水とリモネンの混合液は大腸菌に対して阻止円を形成せず、クエン酸溶液とリモネンの混合液は阻止円を形成した。実験1でのリモネン単体2 μLの阻止円と比べ、有意な差はみられなかった。

(N=4, p>0.05 t-test)



リモネン×精製水(4 μL) リモネン×クエン酸溶液(4 μL)

図5 リモネン×精製水(左)とリモネン×クエン酸溶液にできた(右)阻止円の比較

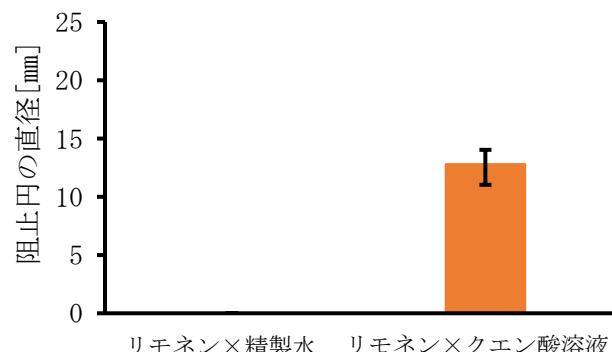


図6 リモネン×精製水(左)とリモネン×クエン酸溶液にできた阻止円直径の比較(右)

4 考察

【実験1】

クエン酸は抗菌作用のみ見られ、リモネンには抗菌作用と抗真菌作用の両方が見られた。クエン酸に抗真菌作用が見られなかつた理由として、大腸菌に対して抗菌作用が見られるのは pH 4.5、酵母に対して抗真菌作用が見られるのは pH 3以下より、実験に使用した pH 5~7のクエン酸では抗菌作用のみしか働かなかつたと考えられる。このことから、柑橘類は、果実と外果皮の両方に抗菌作用を持っており、また、外果皮のみ抗真菌作用を持っていると考えられる。

【実験2】

クエン酸単体2 μLでは阻止円が形成されなかつたが、リモネンとクエン酸を組み合せ

た時には、リモネン単体 $2\mu\text{L}$ より有意に大きな阻止円が形成されたことから、クエン酸とリモネンはお互いの抗菌作用を増幅させており、この2つの成分には相乗効果があると考えられる。

【実験3】

精製水とリモネンの混合液が阻止円を形成しなかった理由として、リモネンの抗菌作用が精製水の水分によって弱くなつたと考えられる。また、クエン酸溶液とリモネンの混合液が阻止円を形成した理由は、水分によってリモネンの抗菌作用が弱くなつたが、クエン酸によって抗菌作用がはたらいたためだと考えられる。つまり、実際の柑橘類の状態に近づけた時にも、抗菌作用において相乗効果がはたらいたと考えられる。

5 結論

柑橘類の代表的な成分であるクエン酸とリモネンの両方は抗菌作用を持っており、リモネンのみ抗真菌作用を持っている。また、果実全体で細菌から果実内の種子を守り、外果皮が真菌から果実内の種子を守っている。クエン酸とリモネンでは、大腸菌に対する抗菌作用において、それぞれが単体の時より高い抗菌作用が見られたため、相乗効果がある。よって、この相乗効果を利用して、これまでよりもさらに強い抗菌作用を持つ食器用洗剤やトイレの芳香剤を作ることができると考えられる。また、リモネンは水分によって抗菌作用が弱まるが、クエン酸によって抗菌作用を強めることができる。しかし、自然の状態では果実の部分と外果皮は内果皮やアルビドによって隔てられており、柑橘類の果実の成分と外果皮の成分が混ざり合わさることがないため、実際の柑橘類は相乗効果を利用して病気から果実を守っているわけではない。

6 参考文献

- (1) 日本食品標準成分表（八訂）増補2023年から出典

- (2) 石島早苗, 安部茂 “安全で簡易な抗真菌活性の測定法マニュアル”. 帝京大学. 2012, vol. 3 no. 1, p. 7-16.
- (3) 松田敏生, 矢野俊博, 丸山晶弘, 熊谷英彦. 日本食品工業学会誌. 有機酸類の抗菌作用—各種pHにおける最小発育阻止濃度の検討—. 1994, vol. 41, no. 10, p. 687-701
- (4) 藤岡 千代子. “リモネンによる病原糸状菌の病原性制御と宿主植物における誘導抵抗性に関する研究”. 岡山大学大学院自然科学研究科. 2016. https://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/5/54320/2016091414495555474/K0005337_fulltext.pdf
(参照 2024-07-18)
- (5) 生駒吉識, 小川一紀, 杉浦実, 尾崎嘉彦. “「農水産物機能性活用推進事業」報告書, 2.機能性成分・活用性等調査－各種機能性成分を有した国産農作物（国産カンキツ類）－（2）ウンシュウミカン”. 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構. 2010. <https://www.shokusan.or.jp/wp-content/uploads/2019/03/582pdf3.pdf>
(参照 2024-07-18)
- (6) 鈴木俊吉 [ほか]編. 微生物制御実用事典, フジ・テクノシステム, 1993.12. 4-938555-38-7, 10.11501/13641839. https://ndlsearch.ndl.go.jp/books/R100000074-IALIS_QQ00107310