

# 植物に含まれるアリシンの抽出による防菌剤の作成

6年A組 大塚 雄大

指導教員 櫻井 昭

## 1. 要約

カビは私達の生活に非常に身近な存在であるが人間に有害な成分を持っていることがある。そして私達を用いる防カビ剤にも、人体に有害な物質を含んでいるものが存在する。そこで一部の植物が自身をカビや細菌から守るために合成しているアリシン( $C_6H_{10}OS_2$ )を利用した人体への有害性が低い防菌剤の開発を目指し研究を行った。その結果、アリシン化合物を生成することができ、この化合物の殺菌作用をディスク拡散法にて確認することができた。

キーワード ニンニク, ノビル, アリシン, 殺菌作用, 阻止円

## 2. 背景と目的

私達の生活と最も身近な自然毒は何か、を考えたときに、その一つにカビ毒が挙げられる。カビ毒はカビが生えた穀物や果実の摂取等により体内に入り体に害を及ぼす。カビ毒には様々な種類の成分があるが、その多くは加熱による分解ができないものである。例えば、O157や黄色ブドウ球菌などが生産するエンテロトキシンは $100^{\circ}C$ , 20分加熱しても分解されない。日本国内で最もよく見かけるカビの一つであるアオカビも、人体への有毒性の有無は不明であるが、マウスでの実験では有毒性が確認されている。

我々は一般的に防カビ剤を使うことでカビの発生への対処をしている。防カビ剤には、金属イオン系と呼ばれるものや光触媒系と呼ばれるものなどがあるが、人体への毒性が強い成分を含んでいるものがある。例えば金属イオン系防カビ剤はCu, Ag, Znのイオンをケイ酸塩などの無機化合物に担

持させたものを有効成分としている。メカニズムとしては金属イオンがカビの細胞内に入り脱水素酵素などの活性酵素へ直接阻害を行い、代謝を止めることで殺菌作用をもたらすが人間が金属イオンを過剰に摂取してしまうと銀沈着症の発症リスクや、発がんのリスクを上げてしまうことが分かっている。また自然界へ流出した場合、自然界の植物の成長を阻害すると言われている。

防カビ剤を使用する際の誤飲や食器などへの付着による事故の可能性や自然界への多量の流出による生態系への被害を考え、私は毒性が無い、または毒性が低い防カビ剤を作りたいと考えた。そこで私が着目したのは食物中に含まれる成分である。私たちが口にすることは毒性が低いはずであるからだ。その中でもカビへの殺菌作用を示すアリシンという物質に注目した。

アリシンはネギ属の植物が特に多く生成する物質である。ネギ属の植物はアリイン( $C_6H_6OS$ )を含んでおり、これらを液胞内に

含む細胞が破壊されるとアリインとアリナーゼ酵素が酵素反応を起こし、アリインがアリルスルフェン酸(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>OS)に分解される。二つのアリルスルフェン酸が結合することでアリシン(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>OS<sub>2</sub>)が生成される。アリシンが合成される過程からも分かるように、アリシンは外部からの刺激がない限り生成されない物質であり、あくまでも植物においては防衛手段として用いられているのである。またアリシンが還元されたものがジアリルジスルフィド(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>2</sub>)であり、アリシンとこの物質がニンニク特有の刺激臭をつくり出している。アリシンは基本的には人体に対し無害であるが、胃が弱っている際に多量摂取することで胃壁や粘膜を傷つけることが確認されている<sup>11)</sup>。とはいえ、前述の様な金属イオン系、光触媒系などの防菌剤に比較すると人体及び環境への影響が少ないことが予想される。よってアリシンを用いた防菌剤を研究することにした。

### 3. 研究内容

#### 3.1 研究材料

##### 3.1.1 材料

今回アリシンを抽出する植物として、スペイン産ニンニク、新潟県産ノビルを使用した。共にネギ属ヒガンバナ科の植物である。ニンニクは貯蔵葉(鱗茎)のみを使用。ニンニクは一般的な植物に比べるとアリシンを多量に、特に貯蔵葉(一般的に食用として販売されている部位)に多く含んでいる。先行研究<sup>12)</sup>においてアリシン抽出にニンニクが用いられていたこと、及びその入手のしやすさ、低価格であることから今回材料として用いた。

ノビルもニンニク同様に鱗茎のみを使用。日当たりの良い土手などに生える野草であり、食用にもなる。ニンニクに比べると生命力が高い(養分が少ない土地、降雨量が少ない土地でも生育可能)。ネギ属であることからアリシンを含んでいることが予想された。またアリシンを含んでいるとするならば、ニンニクに比べるとノビルは乾燥した土地、寒い地域での栽培が可能なことより<sup>13)</sup>、アリシンを主成分とする防カビ剤の材料としてニンニクよりも評価できると考え、今回材料として用いた。培地には標準寒天培地(酵母エキス 2.5 g, ペプトン 5.0 g, ブドウ糖 1.0 g, 寒天 15.0 g, pH7.1±0.1 日水製薬製)23.5 g に対し精製水 1000 mL を加え十分に攪拌し均一化したものに、121°C, 1 気圧で 20 分間滅菌をしたもの(滅菌後 40 分冷却)をシャーレに 20 mL ずつ分注して使用した。

##### 3.1.2 実験に用いた菌種及びその培養期間

###### *Aspergillus brasiliensis (A.brasiliensis)*

基本的には人体に対し無害だが免疫力が低下している者の体内に取り込まれた場合、日和見感染症の一つであるアスペルギルス症を引き起こすことがある。肺内や気道にコロニーができると発熱などを引き起こす。37°Cで1晩培養するとコロニーを確認することができる。

###### *Candida albicans (C.albicans)*

皮膚や腸内、口腔内に存在しているが何らかの原因で大量発生してしまった場合にカンジダ症を引き起こす原因となる。30°Cで2晩培養するとコロニーを確認することができる。

### *Escherichia coli (E.coli)*

グラム陰性細菌。人間の腸内に最も多く存在する好気性共生細菌である。一部の O157 株等はエンテロトキシンなどの毒素を産生する有毒な菌である。また無菌部位に侵入した場合、全ての種類の大腸菌が感染症を引き起こしうる。37°Cで1晩培養するとコロニーを確認することができる。

### *Bacillus subtilis subsp spizizenii (B.spizizenii)*

グラム陽性菌。自然界に広く分布しタンパク質やデンプン、ペクチンなどに対する分解酵素を生産。この酵素を利用し肌の角質を落とすことや、環境資材としての研究がされている。納豆の発酵に使われる納豆菌もこの一種であり、枯草菌は人体には無害である。37°Cで1晩培養するとコロニーを確認することができる。

### *Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa)*

グラム陰性細菌。健常者には基本的に無害であるが免疫力が低下している者には日和見感染症である緑膿菌感染症を引き起こす。呼吸器感染症の原因になる。37°Cで1晩培養するとコロニーを確認することができる。

### *Staphylococcus aureus (S.aureus)*

O157 等と同様にエンテロトキシンなどの毒素を生産し人体に取込まれることで食中毒を引き起こす黄色ブドウ球菌。また皮膚で化膿した場合、ニキビの原因となる。37°Cで1晩培養するとコロニーを確認することができる。

これら6植物の菌を標準寒天培地にて培養した後、マイクロチューブに滅菌水 500  $\mu\text{L}$  とコロニーの一部を滅菌した爪楊枝で取ったものを入れ、よく混ぜたものを

100  $\mu\text{L}$  培地に塗布し、ディスク拡散法に用いた。

#### 3.1.3 実験に用いた培地

培地には標準寒天培地（酵母エキス 2.5 g, ペプトン 5.0 g, ブドウ糖 1.0 g, 寒天 15.0 g, pH 7.1 $\pm$ 0.1 日水製薬製）23.5 g に対し精製水 1000 mL を加え十分に攪拌し均一化したものに、121°C, 1 気圧で 20 分間滅菌をしたもの(滅菌後 40 分冷却)をシャーレに 20 mL ずつ分注して使用した。3.1.2. で示した菌は全て標準寒天培地を固めて培養した。

#### 3.1.4 実験に用いた抗生物質

カナマイシン (ALS 製), アンピシリン (ALS 製) を共に 10 mg/mL を使用した。アンピシリンを当初は使用していたが *C.albicans* に対し殺菌効果が見られなかったため、カナマイシンを使用した。

## 3.2 研究方法

### 3.2.1 アリシン化合物の作成

おろし器を用いてニンニク 35.34 g, ノビル 35.40 g をすり潰し、蒸留水 100 mL とそれぞれ混ぜ合わせる。混ぜ合わせたものをガーゼで濾し、35 mL のジエチルエーテルを加え分液漏斗に移した(図 1)。

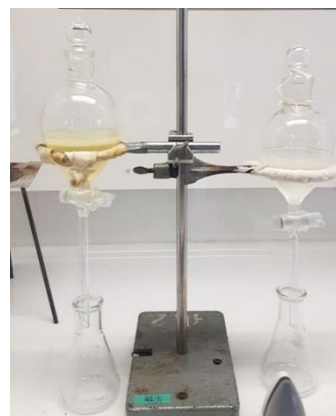


図1 分液漏斗を用いた分離

左がニンニク、右がノビルにジエチルエーテルを加え、エーテルに溶けだした成分を分離している様子である。

二日間放置した後、半日ほど間隔をあけて上澄み液のみを採取し、ジエチルエーテル 35 mL を加え、得られた液に硫酸ナトリウム(ニンニクには 37.95 g, ノビルには 42.05 g)加えた。

その後、沈殿した結晶をろ過した。ろ液はエバポレーターにて (70°C 下で 15 分~20 分) 水分を飛ばし、結晶化させた。得られた結晶は、ニンニクのろ液から 16.60 g, ノビルのろ液から 7.00 g 得られた。(よってニンニクとノビルに含まれるアリシンの質量パーセントはそれぞれ 47.02%, 19.80% となった。) 得られた結晶を実験ごとに特定の濃度になるよう滅菌水に完全に溶解させて用いた。

### 3. 2. 2 ディスク拡散法

今回の実験では、ディスク拡散法を利用してニンニク及びノビルから抽出、合成したアリシン化合物の殺菌作用の有無を確認した。この方法は菌を塗布した培地の中心に、薬剤含有ディスク (調べたい液体をしみこませたディスク) を置き、培地中の水分を吸収させることで液体を拡散させるものである。調べたい菌に対して殺菌効果が現れると、ディスク周辺でのみコロニーが発生せず阻止円 (菌が発生していない範囲が円状に現れたもの) ができる。阻止円の有無、大きさにより感受性を確認した。

### 3. 2. 3 *A. brasillius* と *C. abilicans* に対するニンニク及びノビルの殺菌作用の確認

ニンニクとノビルからそれぞれ得たアリシン化合物が 216 mg/mL になるように調整した水溶液を作成した。(以降、これをニンニク抽出液、ノビル抽出液とする。) *A. brasiliensis* と *C. abilicans* の混濁液をそ

れぞれ塗布した培地を 9 枚ずつ用意した。

ニンニク抽出液、ノビル抽出液、滅菌水、カナマイシンを各 40 µL, 70 µL, 100 µL ずつ含ませたディスクを 1 枚ずつ用意し、培地に置いた。その後、それぞれの菌を十分に培養させ阻止円の有無を確認した。また、ニンニク及びノビル抽出液の濃度を 2 倍の値である 432 mg/mL に変え、ディスクに前回同様に抽出液を含ませ同条件下で実験を再度行った。なお全ての操作はクリーンベンチ内で行った。

### 3. 2. 4 より多くの種類の菌に対する殺菌作用の確認

*E. coli*, *B. spizizenii*, *Paeruginosa*, *S. aureus* をそれぞれ発生させた培地を 9 枚ずつ用意しニンニク抽出液、ノビル抽出液 (各 432 mg/mL) を 100 µL ずつディスクに含ませたもの、滅菌水を 100 µL 含ませたもの、アンピシリン溶液 0.1 mg/mL を 100µ L 含ませたものをつくる。その後、それぞれの菌を十分に培養させ阻止円の有無を確認した。

## 4. 研究結果

### 4. 1 *A. brasiliensis*, *C. albican* に対する殺菌作用

*A. brasillius* にカナマイシン含有ディスクを置いた培地にのみ阻止円が現れた。ニンニク及びノビル抽出液の濃度を 2 倍に変えても同様の結果となった。

### 4. 2 *E. coil*, *B. spizizeni*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* に対する殺菌作用

理論上はニンニク抽出液とノビル抽出液に含まれるアリシン化合物は全く同じ成分であるのに、それぞれの *B. spizizenii* に対する作用の有無が異なっていた(表 1)。

表1 実験3.2.4の結果

○は阻止円が確認されたことを示し、×は阻止円が確認されなかったことを示す。

菌種 \ ディスクに含ませた溶液	ニンニク抽出液	ノビル抽出液	滅菌水	アンピシリン
<i>E.coli</i>	○	○	×	○
<i>P.aeruginosa</i>	×	×	×	×
<i>S.aureus</i>	○	○	×	○
<i>B.spizizenii</i>	×	○	×	○

そこで *B.spizizenii* に対する殺菌作用の有無を再確認するために *B.spizizenii* のみ再実験を行った。*B.spizizenii* において2回実験を行ったところ、ニンニク抽出液をディスクに含ませた培地、ノビル抽出液をディスクに含ませた培地の両方に阻止円は現れず *B.spizizenii* に対する殺菌作用は現れなかった。

## 5. 考察

実験3.2.4より①ニンニク、ノビルのそれぞれの抽出液は、*A.brasilius* と *C.abilicans* に対して殺菌作用を持たないこと、そして②アンピシリンの殺菌作用は *C.abilicans* に対してはたらないことが分かった。

また *B.spizizenii* に対する殺菌作用を調べた際に、ニンニク抽出液を用いた場合と、ノビル抽出液を用いた場合で異なった結果が当初得られた。考えられる可能性としては、ニンニク抽出液の殺菌作用がはたらかなかつた、もしくは何らかの原因でノビル抽出液含有ディスクの方の培地には *B.spizizenii* のコロニーが発生しなかったことが考えられる。

今回得られた結果よりニンニク及びノビルから得られたアリシン化合物は *E.coil* と

*S.aureus* に対し殺菌作用があることが分かった。よってこれらの菌に対する防菌剤として利用できる可能性があると考えられる。

## 6. 今後の課題

私は当初、現在、一般的に使用されている防カビ剤は人体に有害であることや、環境への配慮がされてないことを問題として取り上げこの研究を始めた。しかし実際に今回得られたアリシン化合物が体内に取り入れられた場合、どのように身体に吸収されるか、そもそもその過程で身体に害を及ぼさないか、といった点や、川や海に流れた場合に水質に影響を与えないか、土中に含まれた場合に微生物等に影響をもたらすのか否か、といった点は十分に調べていない。今後はこれらの点において研究したい。

研究当初はあくまでも防カビ剤としての利用を考えていたが、仮に体内で無害な物質として吸収されるならば、体内に菌が取り込まれた際にアリシン化合物を摂取することにより体内での菌の発生を抑制できるのではないかと考えた。ただ、どのような方法で利用するにせよ、アリシン化合物の特有の臭いを除去する必要がある。アリシン化合物はいわばニンニクの刺激臭の原因物質であり、散布することや口腔から摂取することには向いていない。ゆえに他物質と混合させることや、更に細かく分離させることにより殺菌作用を残したまま臭いを除去できるか研究を進めたい。そして体内でも培地上と同様に殺菌効果が得られるかは不明であるため今後、この点を明らかにし、植物由来のアリシン化合物を身体に無害な防カビ剤として多用できるようにしたい。

## 7. 参考文献

[1]身の回りのありとあらゆるものを化学式で書いてみた, 2020, pp69-72.

[2]ニンニク(*Allium sativum*L.)鱗茎部の含硫化合物成分の系統間差異(藤井理恵子・森光康次郎・柳野利哉・野村弘司・田代亨), 1999. pp67-71.

[3]野蒜とは, [greensnap.jp/article/9725](https://greensnap.jp/article/9725)

## 8. 資料

阻止円が確認された *E.coli* 及び *S.aureus* の滅菌水及びニンニク, ノビル抽出液の培地の様子。



図2 *E.coli* の滅菌水に対する反応  
陰性対照実験。ディスクの周りに阻止円は確認されなかった。



図3 *E.coli* のニンニク抽出液に対する反応  
ディスクの周りに阻止円が確認された。



図4 *E.coli* のノビル抽出液に対する反応  
ディスクの周りに阻止円が確認された。



図5 *S.aureus* の滅菌水に対する反応  
陰性対照実験。ディスクの周りに阻止円は確認されなかった。



図6 *S.aureus* のニンニク抽出液に対する反応  
ディスクの周りに阻止円が確認された。



図7 *S.aureus* のノビル抽出液に対する反応  
ディスクの周りに阻止円が確認された。