

# カビゴケの香気成分がもつ抗カビ作用

— 4-エチルアニソールの抗カビ作用の特性を調べる —

宮崎西高校 3年 大井千春

## Abstract

*Leptolejeunea elliptica* has antifungal action and emits a strong aroma component called 4-ethylanisole. To identify its traits, verification experiment was conducted at four stages: confirmation of antifungal action, measurement of spatial concentration, specification of molecular structure and comparison effect between 4-ethylanisole and phytocide. 4-ethylanisole inhibited spore formation and mycelium formation with both ethyl and methoxy groups. Also, it is strong enough to be utilized as an antifungal agent. These days, the health problem caused by mold is serious because it often leads to allergies or respiratory disease. This is how it is very important to control growth of mold for good health, so this research must be significant.

抗カビ作用をもつカビゴケは、強い香気成分である 4-エチルアニソールを発することが知られている。しかし、4-エチルアニソールが抗カビ作用をもつという明確な文献は見つけられなかった。そこで、その特性を見つけることを目的に、クロカビやアオカビに対する 4-エチルアニソールがもつ抗カビ作用の確認、効果を示す濃度の特定、抗カビ作用をもたらす分子構造の検討、実際に使われている防カビ剤と効果の比較、の四つの実験を行った。実験の結果、4-エチルアニソールはクロカビの孢子形成、菌糸体形成を抑制することが確認された。その抗カビ作用は、4-エチルアニソールはエチル基、メトキシ基の相乗効果によるものであり、フィトンチッドの一種であるヒバ精油と比較しても、十分な強さであることが言えた。近年、カビによる健康被害が深刻な問題となっている。そのため、私たちの健康を守るためにはカビの生育の抑制が必要不可欠であり、本研究は新たな天然由来の防カビ剤作成に役立てられるだろう。

## 1. 背景

コケはあらゆるところに生えており、人間にとって最も身近な植物ともいえるだろう。特に、宮崎県は熱帯系の貴重な種を含む多数のコケがみられる、日本でも有数のコケの生息地域となっている。



宮崎県日南市には世界で唯一の蘚苔類研究機関「服部植物研究所」があり、蘚苔類学の聖地として日本及び世界のコケ研究を牽引している。さらに、同じく日南市の猪八重溪谷は「日本の貴重なコケの森」に認定されており、約 300 種以上ものコケを見ることが出来る。学校の活動や家族で訪れる機会も多く、そのことがコケに興味を抱くきっかけとなった。

コケは抗菌・抗カビ作用をもつことが知られているが、その中でも特に抗カビ作用が強いのがカビゴケ (*Leptolejeunea elliptica*, コケ類クサリゴケ科) である。カビゴケは熱帯地域に広く分布する葉上苔類で、日本では福島県以南に生息している。実際に猪八重溪谷で観察でき、近づくと非常に強いハッカに似た香りがした。この香気により抗カビ作用をもたらされているのではないかと考え論文検索を行った。すると、カビゴケの香気成分が 4-エチルアニソールであることがわかったが、4-エチルアニソールが抗カビ作用をもつという明確な文献は見つけられなかった。

## 2. 目的

近年、カビによる健康被害が深刻な問題となっており、私たちの健康を守るためにはカビの生育抑制が欠かせない。そこで、カビゴケの抗カビ作用の要因と考えられる 4-

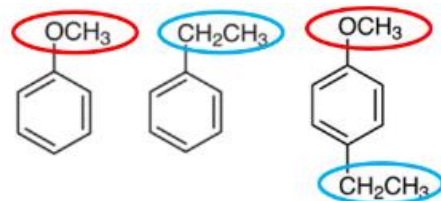
エチルアニソールの特性を探ることにした。主に次の四つの観点から研究を行っている。

(a) 4-エチルアニソールがもつ抗カビ作用の確認  
カビゴケの抗カビ作用の原因を探るため、4-エチルアニソール蒸気が十分にあるときに、カビの成長・増殖が見られないかを確認した。

(b) 4-エチルアニソールが抗カビ作用を示す濃度  
実際にカビゴケに近づくと強い香気を感じたが、仮に香気成分が薄かったときも、カビゴケは抗カビ作用を示すのだろうか。つまり、4-エチルアニソールの濃度によっては抗カビ作用の効果が異なるのではないだろうか。そこで、4-エチルアニソールの量を変えて抗カビ作用をもつ閾値を測定した。

(c) 4-エチルアニソールの抗カビ作用をもたらす分子構造の特定

4-エチルアニソールと共通した構造をもつ分子にも抗カビ作用があると予想した。4-エチルアニソールはエチル基とメトキシ基を併せもっていることから、エチルベンゼンとアニソールを用い、エチル基とメトキシ基のどちらの置換基が抗カビ作用に影響を与えているのか比較検討した。



(左からアニソール、エチルベンゼン、4-エチルアニソール)

### (d) 現在使われている抗カビ成分との比較

市販の抗カビ剤は個体のものが多い。しかし、本研究では揮発した蒸気の抗カビ作用を調べる実験を行っているため、揮発性の液体抗カビ成分であるフィトンチッドを用いた。フィトンチッドの中でも、ヒバ精油の抗カビ作用が強いことを論文で見つけ、ヒバ精油と4-エチルアニソールとの抗カビ作用の比較を行うことにした。

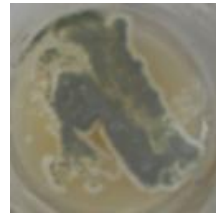
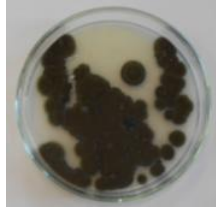
### 3. 方法

#### ○実験で使用するカビの同定

ポテトデキストロース寒天培地に、採集したカビを植菌、目的のカビの培養と単離を行った。

1つ目に用いたカビは、集落が褐色、集落の裏が黒色という形態的特徴から、クロカビと判断した。

2つ目に用いたカビは、孢子形成部が灰緑色、集落の端付近が白色という形態的特徴から、アオカビと判断した。



#### ○検証実験 A~D の手順

##### ①寒天培地の作成

カビが生育しやすい養分を含んでいるポテトデキストロース寒天培地を作製した。200g のじゃがいも(馬鈴薯)を蒸留水 1L で 20 分間煮沸後、ガーゼで濾した液に 20g のブドウ糖をいれた。蒸留水で 1L に全体の量を調節した液を 25mL ずつ広口バイオ瓶 HM に注ぎ、0.38g の培地用寒天の粉を加えて滅菌した。オートクレーブで滅菌した後の作業は、すべてクリーンベンチ内で行った。

##### ②孢子液の作成

ステアリン酸ナトリウムを溶かした生理食塩水 2mL をカビが生育したシャーレにいれ、ピペッティングを行った後、1mL をマイクロチューブに取った。界面活性剤であるステアリン酸ナトリウムを使用したのは、疎水性があるカビを溶かすためである。一般にはポリソルベート 80 やスルホコハク酸ジオクチルナトリウムなどが界面活性剤として用いられるが、今回は化学室にあったステアリン酸ナトリウムを使用した。(予備実験でカビの生育に影響がないこと確認済み)孢子を収穫後、1分以上よく攪拌した。

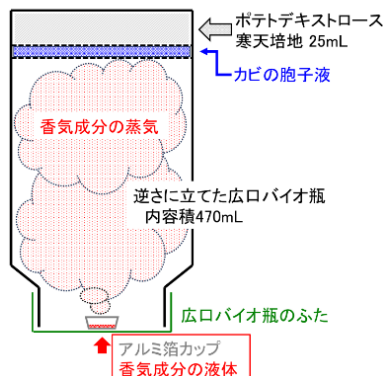
##### ③孢子数の計測・孢子液の塗布

実験で塗布する孢子液の孢子数をそろえるため、血球計算盤を用いて孢子数を計測した。プレートに 6μL の孢子液を注ぎ、目盛りを利用して孢子数を数えた。

計測後、寒天培地に塗布する孢子が  $1 \times 10^5$  になるよう毎回孢子液の量を調節して培地に塗布した。寒天培地に塗布する際にはガラスコンラージ棒を用いて、ムラのないよう塗り広げた。

##### ④香り成分の設置

今回は香り成分による抗カビ作用を調べるため、試薬の上に寒天培地を設置する方法をとった(右図)。同一容積(470mL)の広口バイオ瓶の底に一定量(25mL)の寒天培地を作製し孢子液を塗布した後、瓶をさかさまにして、蓋の中央に香り成分が入った滅菌済みアルミ箔カップを



置いた。(先行研究ではガラス製ペトリ皿に寒天培地を作製していたが、本研究ではより広い空間を持つ広口バイオ瓶を用いた。また、本来は円筒ガラス製カップを用いたところだったが、入手が困難であったためアルミ箔カップを滅菌し利用した。)時間の経過とともに規定量の香り成分が蒸発し、香り成分に抗カビ作用があった場合、蒸気によって上方に設置された寒天培地でのカビの生育が抑制される。

試薬を置きバイオ瓶の蓋を閉めた後、コンタミを防ぐためにバイオ瓶と蓋との境目をパラフィルムで密封し、全体をラップで覆った。

##### ⑤孢子数の計測

暗い部屋で保管した後、③で述べたようにして孢子数を計測した。これにより、実験の結果を見た目だけでなく数値的に表すことができた。

#### 検証実験 A

(a)について、4-エチルアニソールが十分な量あるとき、カビを抑制する働きが見られると考え、実験を行った。4-エチルアニソールと比較対象の水を十分量の 50μL 置き、2週間後にクロカビ、アオカビの孢子数を計測した。約1週間で孢子形成が見られたため、以後の実験 B、C では統一して6日後に孢子数を計測した。

#### 検証実験 B

(b)について、4-エチルアニソール蒸気がカビの成長・増殖に影響を及ぼす閾値が存在すると考え、実験を行った。4-エチルアニソールの量を 0~40μL の範囲で 5μL ずつ変えて大まかに検討を付けた後、閾値を探るため、さらに範囲を狭め実験した。検証実験 A で試薬 50μL がすべて揮発していたことから、量を変えれば香り成分の空間濃度を段階的に変化させられると考えた。

#### 検証実験 C

(c)について、アニソールとエチルベンゼンでは抗カビ作用に違いが現れる、と考えて実験を行った。試薬として 15、30、50μL のエチルベンゼン、アニソール、ベンゼンを用いて実験した。ベンゼンを用いたのは、ベンゼン環が影響するかどうかを確かめるためである。

#### 検証実験 D

(d)について、4-エチルアニソールはヒバ精油と比べても十分な抗カビ作用をもち、防カビ剤として用いることができると考えて実験を行った。検証実験 B から、4-エチルアニソールが抗カビ作用をもつ閾値は 7μL であることが言えたため、ヒバ精油 7μL で同様の実験を行い、検証実験 B の結果と比較した。

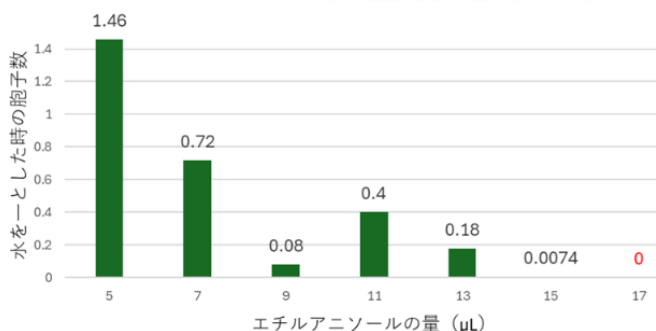
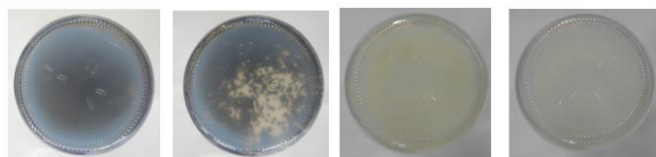
## 4. 検証実験の結果・考察

#### 検証実験 A

	クロカビ		アオカビ	
	孢子数	孢子数の比	孢子数	孢子数の比
水	$3.34 \times 10^5$	1	$6.54 \times 10^5$	1
エチルアニソール	$6.00 \times 10^4$	0.017	$1.33 \times 10^4$	0.002

クロカビもアオカビも 4-エチルアニソールの方は明らかに生育せず、それぞれ孢子数水(対照)のときの約 1.7%、0.2%まで抑えられたことから、4-エチルアニソールはクロカビ、アオカビ何れに対しても孢子形成抑制効果をもつといえる。また、アオカビでは培地に白斑が見られたが、これは後の実験から菌糸と推察できた。4-エチルアニソールがアオカビの菌糸体形成を抑制できなかった理由として、アオカビ自体の繁殖力が強かったか、4-エチルアニソールが影響しにくかったか、と考えられる。

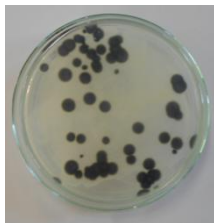
## 検証実験 B



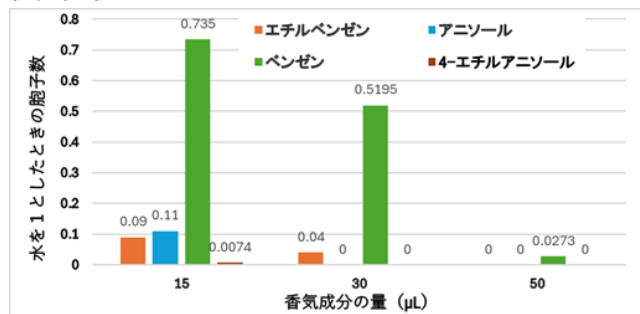
香り成分量  $7\mu\text{L}$  以上で孢子数が減少していることから、孢子形成抑制の閾値は約  $7\mu\text{L}$  と考えられる。 $9\mu\text{L}$  のとき孢子数が少なくなっているのは、時間の都合上前日に孢子液を作り冷蔵保存していたことが影響したと考えられる。 $10\mu\text{L}$  のとき  $0.36$  の孢子数比が確認されたため、 $9\mu\text{L}$  も本来それ以上の孢子数があると考えた。

また、 $10\sim 18\mu\text{L}$  で培地に白濁が見られた。正体を突き止めるために白濁のみを採集、寒天培地に塗布したところ、クロカビのコロニーが形成された。(写真下)

カビは菌糸を伸ばし菌糸体を形成した後、成熟した菌糸から孢子をつくる。そのため、白濁、白斑は菌糸であると考えられ、 $19\mu\text{L}$  以上では菌糸さえ確認できなかったため、菌糸体形成抑制の閾値は約  $19\mu\text{L}$  だといえる。



## 検証実験 C



$15\mu\text{L}$  で孢子数比が  $0.1$  程度であったため、アニソール、エチルベンゼンの何れも  $15\mu\text{L}$  以上で孢子形成抑制効果をもつと思われる。また、 $30\mu\text{L}$  のエチルベンゼンとアニソールを比較すると、エチルベンゼンでは菌糸が確認されたが、アニソールでは確認されなかったため、菌糸体形成抑制の閾値は、アニソールが  $15\sim 30\mu\text{L}$ 、エチルベンゼンが  $30\sim 50\mu\text{L}$  の間にあることがわかる。ベンゼンのみではほとんど孢子形成が抑制されなかったため、4-エチルアニソールの抗カビ作用は、メトキシ基とエチル基の相乗効果によるものであり、ややメトキシ基の影響の方が大きいと考えられる。

## 検証実験 D

水を1としたときの孢子数は、4-エチルアニソールが  $0.72$ 、ヒバ精油が  $0.76$  であった。つまり、4-エチルアニ

ソールはヒバ精油よりもやや抗カビ作用が強く、実際に防カビ剤として用いても十分な効果を得ることができると考えた。

## 5. 参考文献

- 藤井 久子(2011).「こけはともだち」.Little More社.
- 林修一、上隆保、松尾昭彦、安藤久次、関太郎 (1977).「苔のにおい」.日本蘚苔類学会会報、2(3)、p. 40
- 浅川 義範 (1984)「苔類の生理活性物質」.化学と生物、22(8)、p. 495-502
- 上村繁樹、山口菜摘、大久保努、吉井文子 (2013).「香りの抗菌活性の評価方法と改変と香り分子の組合せによる抗菌活性の向上」.におい・かおり環境学会誌、44(6)、p. 397-404
- 李 賢俊、李 新一 (2020).「カビの分離同定と抗カビ試験」.日刊工業新聞社.
- 酒井 温子、奥田 晴啓、伊藤 貴文、森井 良一(2006).「像膜型木材塗料用の防カビ剤としてのヒバ精油およびヒノキ精油の有効性」.奈良県森林技術センター研究報告、35、p1-10