

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3982831号

(P3982831)

(45) 発行日 平成19年9月26日(2007.9.26)

(24) 登録日 平成19年7月13日(2007.7.13)

(51) Int. Cl.		F I	
A 2 3 B	7/16	(2006.01)	A 2 3 B 7/16
A 2 3 L	1/00	(2006.01)	A 2 3 L 1/00 F

請求項の数 8 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平8-515369	(73) 特許権者	507089735
(86) (22) 出願日	平成7年10月31日(1995.10.31)		アメリカ合衆国
(65) 公表番号	特表平10-509032		アメリカ合衆国 メリーランド、ベルツヴ イル、ビー・エー・アール・シー・ダブリ ュー、ルーム 416、ビルディング00 5
(43) 公表日	平成10年9月8日(1998.9.8)	(74) 代理人	100073874
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/013965		弁理士 萩野 平
(87) 国際公開番号	W01996/013985	(74) 代理人	100093573
(87) 国際公開日	平成8年5月17日(1996.5.17)		弁理士 添田 全一
審査請求日	平成14年9月26日(2002.9.26)	(74) 代理人	100105474
(31) 優先権主張番号	08/336,079		弁理士 本多 弘徳
(32) 優先日	平成6年11月7日(1994.11.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 収穫後の産物用生物活性コーティング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性キトサンと、腐れに有効な少なくとも一種の拮抗性酵母と、グルコースとを、生物学的防除に有効な量含んでなる、農産物用コーティング用組成物であって、前記変性キトサンがグリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサンである、コーティング用組成物。

【請求項2】

前記変性キトサンの効果的な量が、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である、請求項1記載のコーティング用組成物。

【請求項3】

前記少なくとも一種の拮抗性酵母が、*Candida oleophila*、*Candida saitoana*、*Candida sake*、*Candida tinus*、*Candida utilis* 及び *Pichia guilliermondii* からなる群から選択される、請求項1記載のコーティング用組成物。

【請求項4】

前記少なくとも一種の酵母が、*Candida oleophila* 又は *Candida saitoana* である、請求項3に記載のコーティング用組成物。

【請求項5】

前記少なくとも一種の拮抗性酵母の前記効果的な量が、 10^6 コロニー形成単位 ~ 10^8 コロニー形成単位である請求項1記載のコーティング用組成物。

10

20

【請求項6】

前記少なくとも一種の拮抗性酵母の前記効果的な量が、 10^8 コロニー形成単位である請求項5記載のコーティング用組成物。

【請求項7】

グルコースの前記効果的な量が、 0.02% (w/v) ~ 0.2% (w/v) である、請求項1記載のコーティング用組成物。

【請求項8】

グルコースの前記効果的な量が、 0.2% (w/v) である、請求項7記載のコーティング用組成物。

【発明の詳細な説明】

10

発明の背景発明の分野

本発明は、収穫後の農産物用生物活性コーティングとして成熟を遅らせ且つ腐れを制御するのに役立つ組成物に関する。

従来技術の説明

現在使用されている収穫後の産物用コーティング（ほとんどはワックス）は、熟成を遅らせるには効果があるが、一般的に腐れは防止しない。さらに、健康面で有害な可能性があるとして調査がなされている。腐れの問題を軽減するのにコーティングに添加されていた合成殺菌剤は、最近市場から回収され、また、石油系コーティングが健康及び環境面での懸念から使用禁止の社会的圧力がある。したがって、殺菌性があるばかりでなく消費者や環境にとって安全である、現在の農産物用コーティングの代替品が非常に必要とされている。

20

拮抗性酵母が、貯蔵病害の生物学的防除用生物防除剤として有効であることが開示された (Wilson及びEl Ghaouth, Symposium Proceeding, Beltsville Symposium XVIII, 1993)。さらに、キトサン(動物由来ポリマー)が、抗真菌性防腐剤になり得ることが分かった。キトサン及びその誘導体は、半透膜を形成すること (Auerbach, B.L., Film-forming capability of chitosan, in Proc. 1st Int. Conf. Chitin and Chitosan, Muzzarelli and Pariser, eds. MIT, Cambridge, MA, 1978, 第199頁)、数多くの病原菌を阻害すること (Allan及びHadwiger, Exp. Mycol, 1979, 第3巻、第285頁) 及びキチナーゼの刺激、フィットアレキシンの蓄積、プロティナーゼインヒビターの合成、及び木化の増加を含む植物組織における数多くの生物学的プロセスを活性化すること (Pearce等, Physiol. Plant Pathol, 1982, 第20巻、第119頁; Mauch等, Plant Physiol, 1988, 第76巻、第607頁; El Ghaouth等, Potential use of chitosan in postharvest preservation of fruits and vegetables, in Advances in Chitin and Chitosan, Brines等編, Elsevier Applied Sci., ロンドン, 1992, 第440頁; El Ghaouth等, Phys. and Mol. Plant Pathol, 1994, 第44巻、第417~422頁) が知られている。キトサンのポリカチオン性が、その物理化学的及び生物学的機能の基礎をなしていると思われる。コーティングとして適用すると、キトサンは、ガス拡散に対する選択的なバリアとしての役割を果たすことにより、イチゴ、アマトウガラシ、トマト及びキュウリの腐れを抑制し且つ成熟を遅延させた (El Ghaouth等, Advances in Chitin and Chitosan, 1992, 前出)。キトサンによる腐れの抑制は、部分的には、その抗真菌性に由来するものであると思われる。実際、生体外での研究では、キトサンは、主要な収穫後病原体の放射状成長を阻害するだけでなく、*Rhizopus stolonifer* 及び *Botrytis cinerea* において大きな形態学的変更を誘発し、さらには、上記両方の

30

40

50

菌類において、おそらく菌類形質膜を妨害することによるものと思われるが、細胞漏れが増加した (El Ghaouth等、Mycol. Res., 1992、第96巻、第769頁; El Ghaouth等、Exp. Mycol., 1992、第16巻、第173頁)。キトサンの生物学的活性は、数多くの文献に記載されているが、菌類インヒビターと植物防御反応の誘発剤の両方の役割りを果たす能力の基礎をなす機構については、まだ明らかでない。

発明の簡単な説明

キトサンは、抗真菌性からみて、拮抗性酵母との組み合わせが有効であることは予測されなかった。しかしながら、最近、本発明者等は、ある種の拮抗性酵母が、変性キトサンと適合性があり、且つ拮抗物質とこのようなキトサンの組み合わせが、腐れと成熟の抑制に有望な方法であることを見出した。変性キトサンと拮抗物質との組み合わせにより、キトサンの抗真菌性と誘発性だけでなく、拮抗物質の生物活性を利用できる。これらの組み合わせ代替物により示される作用様式が複雑であるので、病原体の抵抗性の発現がより困難となり且つ非常に複雑な病害阻害バリアが提供される。

10

この知見に鑑みて、本発明の目的は、収穫後の病原体に拮抗性のある酵母を含有する変性キトサンマトリックスを含んでなる生物活性コーティング組成物を提供することである。本発明の他の目的及び利点は、以下の記載から容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

第1図は、変性キトサンの拮抗性酵母の成長に及ぼす影響を示す図であり、

第2図は、変性キトサンと拮抗性酵母との組み合わせのリンゴ病原体に対する生物学的防除活性を示す図であり、

20

第3図は、変性キトサンと拮抗性酵母との組み合わせのセイヨウナシ及びオレンジ病原体に対する生物学的防除活性を示す図である。

発明の詳細な説明

農産物コーティング用組成物は、変性キトサンと、収穫後病原体に拮抗性があり且つ変性キトサンに対して耐性がある少なくとも一種の酵母と、を含んでなる。

数多くのキトサンが拮抗性酵母との組み合わせで試験され、変性キトサンであるグリコールキトサンとカルボキシメチルキトサンのみが効果的であることが判明した。これらの両方は、Nova Chem社(カナダ国ノバスコシア州ヘリファックス)及びSigma Chemical社(ミズーリ州セントルイス)等の業者から市販されている。効果的な拮抗性酵母は、変性キトサンに耐性があるという特殊な性質を有している。効果的であることが判明した酵母には、*Candida oleophila* (*C. oleophila*)、*Candida saitoana* (*C. saitoana*)、*Candida sake* (*C. sake*)、*Candida tinus* (*C. tinus*)、*Candida utilis* (*C. utilis*)及び*Pichia guilliermondii* (*P. guilliermondii*)などがあるが、特定の酵母が必要な耐性を示すかどうかを決定することは、培養において酵母を変性キトサンと組み合わせ、生存状態を維持し成長するかどうかを観察することにより、当業者により十分できる(例えば、実施例II参照)。

30

コーティング組成物は、変性キトサンの効果的な量を水に溶解した後、拮抗性酵母の効果的な量を添加することにより調製される。変性キトサンの効果的な量は、約500 µg/ml ~ 約10,000 µg/mlであり、約500 µg/ml ~ 約5000 µg/mlが好ましく、約500 µg/mlが特に好ましいことが判明した。酵母は、約10⁶コロニー形成単位(cfu) ~ 約10⁸ cfuが効果的であり、約10⁸ cfuが好ましいことが判明した。しかしながら、最適濃度は個々の状況により異なり、当業者は実施例により記載されている等の以下の通常の試験法により十分最適な配合に到達することができる。

40

さらに、グルコースを、約0.02% (w/v) ~ 約0.2% (w/v)、好ましくは約0.2% (w/v)、組成物に含有させる。

本発明の実施において、組成物を農産物の外表面に適用して保護コーティングを形成する。適用の具体的な方法は本発明にとっては重要ではなく、コーティング組成物中に産物を

50

浸漬又はローリングする方法、組成物をアプリケータ、例えば、ブラシ、ローラ又はワイパー、により産物に適用する方法（ブラッシング、ローリング、ドリッピング、ワイピング又はラビング等）、組成物を産物に、例えば、噴霧器又はアトマイザーを用いて噴霧する方法等の多種多様な周知の適用方法を使用できる。組成物は、室温で適用した後、乾燥してよい。さらなる取扱い又は処理の前に、コーティングの乾燥を促進する工程をとることができる。

収穫後の真菌性病原体に感染しやすい収穫したいずれの農産物も、新規な組成物による処理に相当である。これらの産物には、果実、野菜及びナッツなどがある。

変性キトサンと拮抗性酵母との組み合わせの抗真菌活性により、この配合物は、収穫した産物の表面上に拮抗性酵母を維持及び分布さえ確実にでき、したがって、生物学的制御剤の有効性を増加できる点で、既存のコーティングよりも優れた代替防腐剤となる。

以下の実施例は、本発明をさらに説明することのみを意図し、請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例 I：変性キトサン溶液及び酵母の調製

変性キトサンであるグリコールキトサンとカルボキシメチルキトサンとを水に溶解し、そして高（960K）、中（即ち、実用的グレード）（750K）及び低（400K）分子量キトサンを50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）に溶解した。続いて、得られた溶液を希釈して、濃度500µg/ml及び5000µg/mlとした。グルコースを濃度0.2%（w/v）に添加した。上記キトサン類は、Aldrich Chemical社及びNovaChem社（前出）から入手したものである。

Penicillium expansum Link（*P. expansum*）、*Penicillium italicum*（*P. italicum*）及び*Botrytis cinerea* Pers. Fr.（*B. cinerea*）の培養を、感染果実から得て、ジャガイモデキストロースアガー（PDA）上で維持した。*B. cinerea*、*P. italicum*及び*P. expansum*の2週齢培養を、Tween80を0.1%（v/v）含有する無菌蒸留水でフラッディングすることにより、孢子懸濁液を得た。血球計算盤を用いて孢子カウントを測定し、孢子濃度を無菌蒸留水により 10^5 分生子又は孢子/mlに調整した。

C. oleophila（分離株251）及び*C. saitoana*（分離株240）をトマト及び柑橘から得て、27℃で48時間成長させた。栄養源 - 酵母肉汁50mlの震盪フラスコ培養を、酵母約 10^8 cfuから開始し、200rpmに設定したオービタルシェーカーにより24時間インキュベーションした。3000gで20分間遠心分離することにより酵母細胞を集め、無菌蒸留水に再懸濁し、遠心分離し、必要に応じて蒸留水に再懸濁して濃度 10^8 とした。

成熟リンゴ（cv. Red Delicious）を、ウエストバージニア州カーニースピレにあるAppalachian Fruit Research Stationで、手で収穫した。セイヨウナシとオレンジを、地元で購入し、4℃で保存した。これらの果実をえりわけて明らかな損傷や感染が認められるものを取り除き、ランダムに18のロットに分けた。

実施例 II：キトサンの酵母及び病原体の成長に及ぼす影響

病原体である*B. cinerea*、*P. expansum*及び*P. italicum*に対する各種キトサンの抗真菌性を測定した。変性キトサンであるグリコールキトサン、カルボキシメチルキトサン並びに低、中及び高分子量キトサンを1/10濃度の麦芽エキスに最終濃度が0.500又は5000µg/mlとなるように添加したものをオートクレーブ処理し、各々100µlを24ウェルマイクロタイタープレートのウェルに分配した。各ウェルに、*B. cinerea*及び*P. expansum*の孢子500個を接種した。一処理当りの各菌について、4つのウェルを使用した。マイクロタイタープレートを、24℃の暗所でインキュベーションした。孢子発芽率（%）を、5日間にわたって定期的に測定した。

10

20

30

40

50

各種キトサン溶液の*C. saitoana* (分離株240)及び*C. oleophila* (分離株251)に対する影響も評価した。分離株のペレットを、上記実施例Iに記載の種々の濃度(0、500、及び5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の変性キトサン溶液及び未変性キトサン溶液に懸濁した。得られた懸濁液を、24で保存した。アリコットを毎週40日間にわたって採集し、酵母マルトースアガー培地に3重反復希釈プレーティングした。得られたプレートを24でインキュベーションし、48時間後にコロニーをカウントした。低濃度の未変性キトサンは、グリコールキトサンやカルボキシメチルキトサンよりも、*B. cinerea*及び*P. expansum*の孢子発芽の阻害に効果的であった。濃度250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でキトサンは両方の病原体の孢子発芽を完全に阻害したのに対して、グリコールキトサン及びカルボキシメチルキトサンについては、それぞれ濃度500及び5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に阻害した。濃度250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で未変性キトサンは*C. saitoana*及び*C. oleophila*の成長を完全に阻害したが、一方、グリコールキトサン及びカルボキシメチルキトサンは濃度5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で拮抗性酵母の成長に影響しなかった(第1図)。

10

実施例III: 変性キトサンと拮抗性酵母との組み合わせの生物学的防除活性

C. saitoana (分離株240)及び*C. oleophila* (分離株251)の48時間培養から得た酵母細胞を、遠心分離によりペレット化し、無菌蒸留水に再懸濁し、そして遠心分離した。得られたペレットを、各種濃度(0、500及び5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の種々の変性キトサン溶液及び未変性キトサン溶液(全ての溶液が0.2%グルコースを含む)に懸濁した。酵母懸濁液の濃度は $10^8 \text{cfu}/\text{ml}$ に調整した。リンゴ、セイヨウナシ及びオレンジ果実を、個々にコルクボーラーにより傷つけた。果実の傷を、拮抗性酵母を含有する種々のキトサン溶液で処理した。即ち、各処理液50 μl を各傷中に入れ、傷を室温で30分乾燥した。その後、傷に、実施例Iに記載の病原体孢子懸濁液(リンゴについては*B. cinerea*、セイヨウナシについては*P. expansum*及びオレンジについては*P. italicum*)30 μl を誘発接種し、果実をプラスチック製トレイ中において、24、高湿度(相対湿度:95%超)でインキュベーションした。

20

非接種対照とキトサン処理果実を、同じ保存条件下で保持した。処理ごとに18個の果実の4リブリケートをランダム化完全ブロックデザイン配列した。試験を3回反復した。損傷直径及び感染率(%)を、誘発後14日間にわたって処理ごとに測定した。結果を、第2図及び第3図に示す。

30

実施例IV: 変性及び未変性キトサン濃度の拮抗性酵母に及ぼす影響

変性及び未変性キトサン各種濃度の、損傷部での*C. saitoana* (分離株240)及び*C. oleophila* (分離株251)の生存に及ぼす影響を、リンゴ果実を用いて検討した。果実を傷つけ、実施例1に記載の方法で、変性キトサン及び未変性キトサンの0、500又は5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液に酵母 $10^8 \text{cfu}/\text{ml}$ を添加して調製した細胞懸濁液で処理し、24で保存した。完全にランダムに、一処理当たり5個の果実の4リブリケートを用い、各サンプリング日に、一処理当たり3リブリケート果実からサンプルを採取した。傷については、接種後0、1、2及び3日目にサンプルを採取した。損傷組織は、無菌接種針で引っ掻き集めた。掻き落とした物質を無菌水10 ml 中に懸濁し、ガラス棒でふやかし、渦流とし、酵母マルトースアガー培地に3重反復希釈プレーティングし、得られたプレートを24でインキュベーションした。コロニーを、48時間後にカウントした。その結果、変性キトサン中で成長した酵母のみが生存した。

40

実施例V: 処理果実の低温保存の影響

グリコールキトサン及びカルボキシメチルキトサンと*C. saitoana* (分離株240)及び*C. oleophila* (分離株251)との組み合わせの生物防除活性に及ぼす低温保存の影響を測定するため、リンゴ果実を用いてさらなる試験を行った。果実の傷を、0.2%グルコース含有グリコールキトサン及びカルボキシメチルキトサン(0、500又は5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)に酵母 $10^8 \text{cfu}/\text{ml}$ を添加して調製した懸濁液50 μl で処理した。30分後、傷に、*B. cinerea*の孢子懸濁液30 μl を誘発接種

50

し、プラスチック製トレイ中4で保存した。処理ごとに、18個の果実の4リプリケートをランダム化完全ブロックデザイン配列した。実験は、2回反復した。果実を、病害の発現について40日間にわたって定期的に評価し、病害を被った果実はその後速やかに廃棄した。

低、中及び高分子量キトサンと拮抗性酵母との組み合わせでは、腐れの抑制に顕著な向上はみられなかった。このことは、上記キトサンが酵母拮抗物質を阻害することによると思われる。リンゴについては、グリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサン(500 µg/ml)とC. saitoana又はC. oleophilaとの組み合わせが、拮抗物質単独又は変性キトサン単独で使用した場合よりも、腐れの抑制に効果的であった(第2図)。グリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサン濃度を500 µg/mlから5000 µg/mlに増加しても、上記組み合わせの有効性に顕著な向上はみられなかった。24で14日間貯蔵後、グリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサンとC. saitoana又はC. oleophilaとを組み合わせる処理したリンゴは40%未満が感染したのに対して、C. saitoana単独又はC. oleophila単独で処理した果実は、それぞれ75%及び65%が病害を被った。グリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサンで処理した全ての果実及び対照は、病害を被った(第2図)。生物活性コーティングによる同様な腐れの抑制が、それぞれP. expansum及びP. italicumで誘発接種したセイヨウナシ及びオレンジでも観察された(第3図)

10

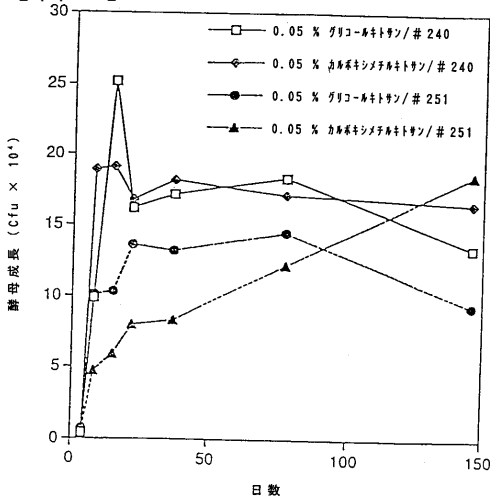
生物活性コーティングの阻害効果は、低温でさらに増幅する。生物活性コーティングにより、4で最大40日間腐れが完全に抑制された。

20

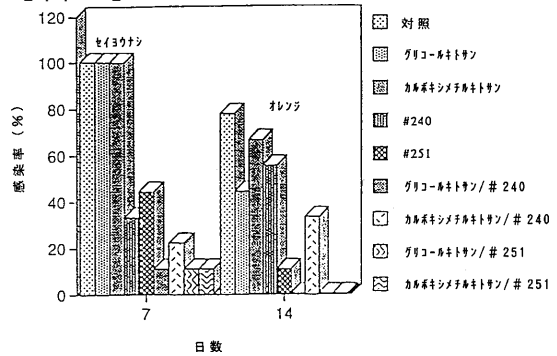
C. saitoana又はC. oleophilaとグリコールキトサン又はカルボキシメチルキトサンとの組み合わせによる腐れの抑制に関する有効性は、拮抗性酵母の生物学的活性とキトサンの抗真菌性及び誘発性との相互作用によるものと思われる。

上記で引用したすべての文献は、引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

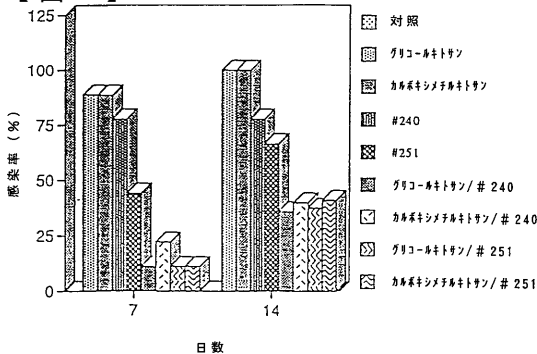
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ゴース,アーメド・エル
アメリカ合衆国 メリーランド,フレデリック,ナンバー21 ウイローデール・ドライブ 12
6

(72)発明者 ウイルソン,チャールズ・エル
アメリカ合衆国 メリーランド,フレデリック,エツラー・ロード 5709

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表平05-507734(JP,A)
特開平05-137463(JP,A)
Mycological Reseach, 1992年 9月, Vol.96, No.9, p.769-779

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23B 7/16
A23L 1/00, 3/3454 - 3/3571