

〈2017年度 バイオ環境研究科〉 博士学位論文の要旨及び審査の結果

氏名	中田 達矢
学位の種類	博士（バイオ環境） ・ 甲（課程博士） 第5号
博士論文題目	Studies on characterization of polished rice washing water fermented with milk and its inhibition activity toward tomato bacterial canker causative agent <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (米のとぎ汁発酵液の特性とトマトかいよう病菌 (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>) の増殖抑制活性に関する研究)

主調査委員	高瀬 尚文
副調査委員	若村 定男 金川 貴博
試問委員	大城 閑 松原 守

論文の概要

乳酸菌などの微生物の働きを利用した民間の農業資材が考案され、植物病害の防除や作物の健全な成育などに効果をあげている。本研究は、民間農業資材の一つである米のとぎ汁発酵液を取りあげ、その特性などについて検討した結果を取りまとめたもので、以下の内容から構成されている。

第1章では、農薬の歴史と現状、微生物農薬などの生物の機能を活用した農薬の歴史、病害虫防除のための民間農業資材、また精米とぬかなどについて取りまとめている。

第2章では、とぎ汁発酵液の特性について検討している。とぎ汁発酵液は精白米のとぎ汁と牛乳を4:1の割合で混合して容器にいれ、密栓して25℃で静置培養して調製した。培養開始後、可燃性の気体を発生させながら発酵が進み、特有の臭気や白い沈殿の生成とともに液の透明化が進行した。当初 pH 7であった発酵液は、14日目には3.5~3.7に低下し、D-乳酸が生成したことなどを述べている。

第3章では、とぎ汁発酵液の無菌ろ液を用いて抗菌活性を検討している。とぎ汁発酵液に乳酸菌が関与していることを想定して、グラム陽性菌であるトマトかいよう病菌を用いて抗菌活性を検討したところ、とぎ汁発酵液はトマトかいよう病菌の増殖を抑制することがわかった。とぎ汁発酵液は、培養10日目頃からトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示すようになり、培養100日以上発酵液でも増殖抑制活性を示した。発酵液の微生物の由来は米のとぎ汁であり、牛乳は栄養成分の供給源であることを明らかにした。またトマトかいよう病菌の増殖抑制はとぎ汁発酵液の低 pH が原因でないことも明らかにした。とぎ汁発酵液無菌培養ろ液中の増殖抑制物質は熱に安定であり、無菌ろ液中にはトマトかいよう病菌の増殖抑制物質があることが示唆された。

第4章では、グラム陽性菌である枯草菌と黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌である大腸菌に対する抗菌活性を検討したが、とぎ汁発酵液はこれらの細菌に対しては増殖の抑制を示さなかった。

第5章では、とぎ汁発酵液から乳酸菌の単離を試みている。とぎ汁発酵液から乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* を単離・同定した。*L. fermentum* の無菌培養ろ過液もトマトかいよう病菌の増殖を抑制したので、トマトかいよう病菌の増殖抑制には乳酸菌が関与していることが示唆された。

第6章では、とぎ汁培養液の増殖抑制物質の部分精製標品を得た。部分精製品は熱に安定であったが、プロテアーゼ処理でトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を失った。電気泳動で単一バンドではなかったが、新たに開発したゲル上の増殖抑制活性を可視化す

る方法によって分子量の推定を行なった。これらの結果から、増殖抑制活性物質は水溶性で熱に安定な分子サイズが 3.5-6 kD のポリペプチドであることが推定された。

第7章では、とぎ汁の代替素材として無洗米ぬか、牛乳の代替素材として脱脂粉乳、ホエー（粉末）を使用した場合も、とぎ汁発酵液と同様トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示す発酵液を調製することができることを示した。

第8章では、本研究を総括し、とぎ汁発酵液の培養につれて乳酸菌が増殖し、バクテリオシン様のポリペプチドを生成し、これがトマトかいよう病菌の増殖を抑制する作用機作を提唱し、今後に残された課題をあげている、また米のとぎ汁の有効利用は台所排水の下水道に与える負荷の軽減にも貢献することを述べている。

審査の結果

本研究は、民間農業資材のひとつである米のとぎ汁発酵液を取りあげ、その特性の一端を解明し、とぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制することやとぎ汁発酵液の代替原料などについて検討した結果を取りまとめたもので、以下の点が評価できる。

第1章では、農薬の歴史と現状、生物の機能を活用した生物農薬の歴史と現状などを簡潔に取りまとめている。特に微生物の機能を活用した民間農業資材に注目し、それらの資材の有効性の科学的根拠を明らかにすることの必要性を述べている。

第2章では、とぎ汁発酵液の特性について検討し、とぎ汁発酵液の培養中に起こる可燃性気体の発生、pHの低下、乳酸の生成などの一連の現象を明らかにし、多様な微生物群が関わっている可能性を示唆した。

第3章では、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液を用いて抗菌活性を検討した。とぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制することを初めて見出し、米のとぎ汁発酵液のそれぞれの原料が果たしている役割、発酵日数と増殖抑制活性の関連、増殖抑制活性の熱安定性などについて明らかにしている。これらの結果からとぎ汁発酵液中に増殖抑制物質があることを推測している。

第4章では、とぎ汁発酵液は枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌に対して増殖抑制活性をもたないことを明らかにしている。

第5章では、とぎ汁発酵液から乳酸菌の単離を試みている。とぎ汁発酵液から乳酸菌を単離し、*Lactobacillus fermentum*と同定した。とぎ汁発酵液と*L. fermentum*の培養ろ過液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制し、熱安定性、D-乳酸の生成など、とぎ汁発酵液と類似点も多かった。トマトかいよう病菌の増殖抑制にとぎ汁発酵液中の乳酸菌が関与している可能性を明確に示している。

第6章では、とぎ汁培養液の増殖抑制物質の部分精製標品を得てその性質を検討している。とぎ汁発酵液中の増殖抑制物質は熱に安定な水溶性物質で、分子サイズは 3.5-6 kD のポリペプチドであることが示され、増殖抑制物質の性質の一端が明らかにされた。

第7章では、無洗米ぬかとホエー粉末や脱脂粉乳の組み合わせでもとぎ汁発酵液と同等のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示す発酵液を調製可能であることを示している。無洗米ぬかの新たな活用による無洗米の流通が促進されれば、家庭での炊飯に伴うとぎ汁の発生を削減し、下水道への環境負荷の軽減にもなると述べている。

第8章では、本研究を総括し、米のとぎ汁発酵液についてその性質の一端を明らかにしたこと、トマトかいよう病菌の増殖抑制を示したことおよび増殖抑制活性にとぎ汁発酵液中の乳酸菌が関わっていることなどについて考察している。

本論文は、農家自らが考案した民間農業資材である米のとぎ汁発酵液に対してその性質の一端を明らかにするとともにトマトかいよう病菌の増殖抑制活性について新知見を得ており、学術および産業上寄与するところが大きい。

よって、本論文は**博士（バイオ環境）**の学位論文として価値あるものと認める。なお平成30年2月22日公聴会で論文内容とそれに関連した事項について試問した結果、博士の学位取得の基準を満たしていることを確認した。