

(博士学位論文)

米のとぎ汁発酵液の特性とトマトかいよう病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)の増殖抑制活性に関する研究

(Studies on characterization of polished rice washing water fermented with milk and its inhibition activity toward tomato bacterial canker causative agent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

中田達矢

2018. 3

目次

要約	1
第1章 緒言	2
1. 農薬の歴史と現状	
2. 生物の機能を活用した農作物の病虫害防除	
3. 微生物農薬	
4. 乳酸菌を用いた生物農薬	
5. 病虫害防除を目的とした民間農業資材	
6. 精米	
7. 本研究の目的	
第2章 米のとぎ汁発酵液の特性	7
第1節 はじめに	7
第2節 実験材料と方法	7
1. とぎ汁発酵液の調製法	
2. pH 測定	
3. 乳酸の定量	
第3節 結果	9
1. 米のとぎ汁発酵液の培養と経時変化	
2. 米のとぎ汁発酵液の pH 変化	
3. とぎ汁発酵液中の乳酸量の変化	
第4節 考察	12
第3章 米のとぎ汁発酵液によるトマトかいよう病菌の増殖抑制	15
第1節 はじめに	15
第2節 実験材料と方法	15
1. トマトかいよう病菌とその培養	
2. 米のとぎ汁発酵液の調製	
3. トマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性測定法	
4. とぎ汁および牛乳単独で調製した発酵液	
5. 加熱処理した原料を用いた発酵液の調製	
6. 熱安定性の検討	
7. 酸性条件がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響の検討	
第3節 結果	18
1. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定法	

2. 米のとぎ汁発酵液の培養期間とトマトかいよう病菌の増殖抑制活性	
3. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性に対する米のとぎ汁と牛乳の役割	
4. 米のとぎ汁発酵液の原料であるとぎ汁と牛乳の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響	
5. 米のとぎ汁発酵液の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響	
6. 培地 pH および乳酸添加がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響	
第4節 考察	26
第4章 枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌の増殖に与える米のとぎ汁発酵液の影響	28
第1節 はじめに	28
第2節 実験材料と方法	28
1. 用いた細菌と培養	
2. 米のとぎ汁発酵液の調製	
3. 米のとぎ汁発酵液が細菌の増殖に与える影響	
第3節 結果	29
第4節 考察	30
第5章 米のとぎ汁発酵液中の乳酸菌の単離とその性質	31
第1節 はじめに	31
第2節 実験材料と方法	31
1. 米のとぎ汁発酵液の調製	
2. 乳酸菌の単離	
3. 細胞の観察	
4. 16S rDNA の解析	
5. 乳酸菌の培養と培養ろ液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定	
第3節 結果	32
1. 乳酸菌の単離と同定	
2. <i>L. fermentum</i> 培養ろ液によるトマトかいよう病菌の増殖抑制	
3. <i>L. fermentum</i> 培養ろ液中の乳酸量	
第4節 考察	37
第6章 米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制物質の探索と性質	39
第1節 はじめに	39
第2節 実験材料と方法	39
1. 米のとぎ汁発酵液の調製	

2. 米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制物質の分画	
3. 脱脂発酵液の Toyopearl DEAE-650M による分画	
4. 脱脂発酵液のプロテアーゼ処理	
5. SDS-PAGE と CBB 染色	
6. SDS-PAGE と細胞増殖抑制活性可視化法	
第3節 結果	41
1. トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の精製	
2. トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の陰イオン交換樹脂による分画	
3. プロテアーゼ処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響	
4. SDS-PAGE による分子量の推定	
5. SDS-PAGE ゲル上のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の確認	
第4節 考察	47
第7章 米のとぎ汁および牛乳の代替品による発酵液の調製とトマトかいよう病菌の増殖抑制活性	49
第1節 はじめに	49
第2節 実験材料と方法	51
1. 材料	
2. 米のとぎ汁発酵液の調製	
3. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定	
第3節 結果	52
第4節 考察	54
第8章 総合考察	57
謝辞	60
引用文献	61

要約

これまで乳酸菌や枯草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・使用され、病虫害の防除や作物成育の促進などの効果をあげている。その一つに米のとぎ汁と牛乳を発酵させて作った米のとぎ汁発酵液がある。本研究は、米のとぎ汁発酵液を取りあげてその特性や病害予防などについて検討し、米のとぎ汁発酵液の科学的根拠を提供することを目的とした。

米のとぎ汁発酵液は、精白米のとぎ汁と牛乳を混合して容器にいて密栓し、25℃で静置培養して調製した。培養開始後、白い沈殿の生成、液の透明化、可燃性気体の発生などを伴いながら発酵が進行した。当初 pH 7.0 であった発酵液は、14 日目にはその pH が 3.5~3.7 に低下し、それまで検出されなかった D-乳酸の生成も確認された。これらの結果は乳酸菌の関与を示唆している。

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ころ、トマトかいよう病菌の増殖を抑制することをはじめて見出した。しかし枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌に対しては増殖抑制を示さなかった。トマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性は単に pH の低下に基づくものではないことを明らかにし、トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の存在が示唆された。

米のとぎ汁発酵液から乳酸菌の単離を試み、*Lactobacillus fermentum* を単離した。*L. fermentum* の培養液の無菌ろ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と推測した。またとぎ汁発酵液および *L. fermentum* の培養ろ液の増殖抑制物質はいずれも熱に安定であった。

米のとぎ汁発酵液の増殖抑制物質の精製を試みた。部分精製した増殖抑制物質は熱に安定であり、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活した。分子サイズは 3.5~6.5 kDa であった。これらの結果から、増殖抑制物質は熱に安定な分子サイズが 3.5~6.5 kDa のペプチドであると推定した。

米の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、ホエイについて検討した。これらの素材の組み合わせからもトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を持つ発酵液を調製することが可能であった。無洗米ぬかとホエイ粉末の組み合わせは、簡易に発酵液を調製する粉末素材として適していた。

第1章 緒言

1. 農薬の歴史と現状

農薬とは、農薬取締法第一条の二で「農作物（樹木及び農林産物を含む。以下「農作物等」という。）を害する菌、線虫、だに、昆虫、ねずみその他の動植物又はウイルス（以下「病害虫」と総称する。）の防除に用いられる殺菌剤、殺虫剤その他の薬剤（その薬剤を原料又は材料として使用した資材で当該防除に用いられるもののうち政令で定めるものを含む。）及び農作物等の生理機能の増進又は抑制に用いられる成長調整剤、発芽抑制剤その他の薬剤をいう。」と定義され、「天敵も農薬とみなす」とされている。第二条では、一部の例外を除いて「製造者又は輸入者は、農薬について、農林水産大臣の登録を受けなければ、これを製造し若しくは加工し、又は輸入してはならない。」と登録制を明示している。実際、農薬は農作物の病虫害によって被る品質の劣化や経済的な損失を防ぎ、品質の高い農作物の生産を安定的に行い、消費者に対して公平で安価な食料を供給することを通して生産者と消費者の利益を確保することを目的にして用いられている。特に日本は、欧米の先進諸国と比べて高温多湿の環境下にあるため、病虫害や雑草の発生が多く、これらに対応するための資材としての農薬の重要性は高い。

日本における農薬の歴史は古く 1670 年頃まで遡るが、主なものはウンカ対策の鯨油の使用であった。江戸時代後期になると植物を主とした粉末の散布やその燻煙、煮汁などを用いた例もあるが、その効果は限定的であったであろうと推定されている（大田，2013）。明治時代、イオウ、銅などの無機物、除虫菊、ニコチンなどの天然有機物、有機水銀、ヒ素剤などを使った防除技術が導入され、農業生産性が向上した。化学合成農薬が広く導入さえるようになったのは比較的新しく、第二次大戦後に殺虫剤である DDT（ジクロロジフェニルトリクロロエタン）がアメリカから持ち込まれ 1947 年に DDT が国内生産され農薬として用いられるようになった（日本植物防疫協会，2012）。その後も BHC（ベンゼンヘキサクロリド）や土壌燻蒸剤である臭化メチルや殺虫剤であるパラチオンが開発され使用が広まっていった。これらの化学合成農薬の普及によって日本の農業生産性はさらに向上した（日本植物防疫協会，2012；太田，2013）。しかし 1962 年、アメリカのレイチェル カーソンは著書「沈黙の春」によって、有機塩素系農薬などの化学合成農薬が人体や環境に与える影響に対する警鐘を鳴らした（Carson, 1962）。それ以降世界的に、強力な化学合成農薬の開発や過剰な使用に対する反省が広まり、現在に至るまで低毒性で残留性の低い化学合成農薬の開発や数回にわたる農薬取締法の改正などが行われてきた。その中でも近年注目されているのが有機農業と生物機能を活用した方法である。

2. 生物の機能を活用した農作物の病虫害防除

農薬の中でも最も普及しているのが化学合成農薬であるが、化学合成農薬の乱用による人体や環境への悪影響が危惧されてからは、生物の機能を上手に活用した病虫害の防除技術の開発が、低毒性の化学合成農薬の開発と並行的に行われてきた。ここでは生物を用いた植物病虫害の防除（生物的防除法）の発展について概観してみる。

生物農薬は有害生物の防除に利用される拮抗微生物、植物病原微生物、昆虫病原微生物、昆虫寄生性線虫、寄生虫あるいは捕食性昆虫などの生物的防除資材とされている（松中，2000；農薬用語辞典編集委員会編，2009）。例を挙げれば、アメリカでは移民が多かったため帰化植物も多く、アメリカに根付いた帰化植物にとって天敵が存在していなかった。帰化植物の成育域の拡大にともなう、アメリカに存在していた在来植物が大きな被害に遭うことが多かった。そこでアメリカは帰化植物が生息していた地域などから天敵となる動物などを輸入するなど対策を行った。このような流れが天敵を活用した総合防除技術（IPM）の一つに発展していった（松中，2000）。近年では弱毒性の植物病原性微生物を植物に感染させて防除する技術、コンパニオン植物技術など多くの技術が開発され、商品化されているものも多い。

生物的防除法は化学合成農薬と比べて環境汚染が少なく、毒性もひくく人体への影響も少ないことなどから人々から受け入れられやすいというメリットがある。しかし病虫害の防除効果が不安定で、天候や季節などの環境に左右されることなどがデメリットとしてあげられている。化学合成農薬との相性が悪い、コストパフォーマンスが悪い、技術的に使用しにくいなどもデメリットとしてあげられている（松中，2000）。また生物農薬の登録申請についてのガイドラインは化学合成農薬に準じて行われており、農薬として登録されるのは容易ではない。実際に商品として農家が使用できるようになるまでには長い時間を要する。1994 年から化学合成農薬とは別に生物農薬のみを対象とした検討会が発足し、検討会の開始当初は化学合成農薬と比べ判断基準が緩かったが（相野，2016）、現在では化学農薬と同様の基準が適用されるようになり、その効果の安定性やコストパフォーマンスの課題もあり、普及拡大は容易ではない状況である。

3. 微生物農薬

近年は微生物機能を活用した微生物農薬が数多く開発されている、病原微生物と拮抗する微生物、微生物生産物による病虫害の防除や植物抵抗性の誘導などの微生物機能を巧みに活用している。微生物農薬は農薬全体の売り上げに占める割合は少ないものの年々増加の傾向にある（吉田と對馬，2013）。微生物農薬に用いられる微生物は *Bacillus* 属細菌が有名であるが、その中で効果範囲が

広く代表的なものに *Bacillus thuringiensis* (通称 BT 剤) が広く利用されている。この BT 剤の歴史は古くアメリカでは 30 年以上使用され続けている。この BT 剤を含む微生物農薬群は、微生物そのものに農薬としての機能があるというより微生物が生成する物質に防除効果があるものが多い。BT 剤を例にあげると、BT 菌は孢子形成時に菌体内に殺虫効果のある結晶性タンパク質を作り、昆虫がこれを食べると体内に取り込むと消化管内で分解される殺虫性のあるペプチドに変化して作用する (鮎沢, 1976)。この BT 剤が長く使用されている背景には哺乳類と昆虫類とは殺虫性タンパク質の作用点が異なるため、人畜に対して安全性が高いことがあげられている (松中, 2000)。しかし BT 剤の材料である *Bacillus thuringiensis* は食中毒の原因菌である *Bacillus cereus* の近縁種である。これらの報告から微生物農薬といえどもその管理を徹底しないと、食中毒菌など人畜に有害な事象の発生が懸念される。

4. 乳酸菌を用いた生物農薬

近年、日本では食の安全・安心をキーワードに消費者に対し様々な取り組みが行われている。この背景には、食中毒、農薬の混入、異物混入などの様々な事件によって食材に対する消費者の不信が高まった背景がある。その事例として 2002 年の輸入された冷凍ハウレンソウの残留農薬問題や 2008 年に冷凍餃子に農薬が混入していたことによる食中毒事件があった。BT 剤に関しても食中毒菌である *B. cereus* とは近縁種であり、消費者が不安になる要素になってくる。基本的には微生物農薬として生産・販売されているものは、農薬登録の際に様々な検査により安全性が証明確認されている。一般的に消費者に対しては科学的な根拠に基づく安全性の他に安心感を持てる情報も提供する必要がある。

これらの事から「ヒトに身近で健康に良い」と言われている乳酸菌を使った農薬の開発が注目されている。乳酸菌は牛乳を原料とするヨーグルトなどの乳製品の製造に使われ、漬物などにも存在している。また多くの発酵食品に利用されたり含まれていたりすることは広く知られている、またヒトの腸内に存在する微生物でありヒトにとって最も馴染みある微生物である (乳酸菌研究集談会編, 1996 ; 斎藤ら編, 2008 ; 日本乳酸菌学会編, 2010)。植物においても常在的に存在している (乳酸菌研究集談会編, 1996 ; 津田ら, 2015 ; Tsuda et al, 2016)。

乳酸菌を用いた微生物農薬の例としては、ハクサイの軟腐病に効果のある *Lactobacillus plantarum* BY 株を用いた「ラクトガード®水和剤」などが開発され、平成 27 年 5 月に農薬登録され、上市されている (津田ら, 2016)。しかし微生物農薬を開発するにあたっては開発期間や開発コスト、安全性試験などを行う必要があり上市まで期間を要する。これは「農薬」というカテゴリーに当て

はまるからである。

この事から、安全性が高い乳酸菌などを用いかつ農家自身でも調合できる資材で植物の病害防除ができないかについて調査した。

5. 病害防除を目的とした民間農業資材

前述したように、現在では低毒性や低散布量など大幅に安全性の改善された化学合成農薬の新規開発は、開発期間も長いうえに開発コストも高い割には成功率は低い。生物農薬に関しても「農薬」の名のとおり化学合成農薬に準じた安全性評価試験を行っているため、化学合成農薬ほどではないが、開発期間がかかるとともに、販売価格も高いことが多い。一方生産者である農家は、農作物生産におけるコストカットや安全性のために各農家の知恵により様々な民間農業資材を考案し、植物病害の防除などに用いている（農山村漁村文化協会編，2013）。この民間農業資材には各家庭などで廃棄されるものを有効的に活用しているものも多い。

微生物が関与している民間農業資材は数多く報告されている（農山村漁村文化協会編，2013）。関与しているあるいは関与が推測されている微生物は、納豆菌や枯草菌、乳酸菌、麹菌、光合成細菌、放線菌など多岐にわたっている。米をといだ際に出てくるとぎ汁と市販されている牛乳を混合することにより、乳酸菌の関与していると思われる発酵が起こり、培養開始から 2 週間程度で「米のとぎ汁発酵液」が出来る（福島，2010；橋本，2015）。この米のとぎ汁発酵液をネギに散布するとネギの白絹病が発症しなくなり、色やツヤも良くなり、味も甘味が増したと報告されている。しかしこれらの民間農業資材は農業の現場においてそれなりの成果をあげているが、その資材の特性や作用機構などの科学的な根拠は必ずしも明らかになっていない。

6. 精米

本研究では米のとぎ汁を原料とした民間農業資材を取りあげるが、米の精米ととぎ汁について概観する。米は玄米の形で貯蔵されるが、精米（搗精）されて精白米とぬかに分けられる。炊飯前に精白米をといでよく洗い。その後に炊飯し、食卓に供される。しかし精白米の洗米時に排出されるとぎ汁は下水道を通して廃棄されるが、とぎ汁の環境負荷は小さくないといわれている。特に台所からでる家庭排水において、米のとぎ汁の環境負荷のウエイトはかなり高い（山田ら，1988；白杉ら，2003；鈴木，2006；三神ら，2011；佐々木，2016）。精白米にはわずかではあるが粘着性の高いぬかがまだ残留しており、とぎ汁はこの粘着性のぬかを洗浄除去した際に発生するが、多くの場合下水道に廃棄される。近年は無洗米が販売されている。無洗米はこの残留している粘着性のぬ

かをさらに除去したもので、米を洗米する必要がなく、従ってとぎ汁も発生しない（鈴木，2006；佐々木，2016）。炊飯に伴う環境負荷も低減する（白杉ら，2003；鈴木，2006；三神ら，2011；佐々木，2016）。この粘着性のぬかを精米業者は“肌ぬか”あるいは“残留ぬか”などと呼んでいるが、本研究では無洗米ぬかと呼ぶ。無洗米ぬかは、玄米の精米時に発生するいわゆるぬかとは性質を異にすると考えられている。無洗米ぬかは肥料として使われることがある（鈴木，2006）。

玄米から精白米に精米する際の歩留まりは約 91%、精白米から無洗米に精米する際の歩留まりは 97%程度である（鈴木，2006；佐々木，2016）。米の精米の程度を示す指標として白度がある。その名の通り米の白さを示す数値である。品種などによって同じ精米歩留りでも白度は異なるが、一般的に玄米の白度は 20%程度、精白米の白度は 37～40%程度である。無洗米の白度は無洗米加工機や加工方式によって異なるが、概ね 45%あるいはそれを上回る（佐々木，2016）。

7. 本研究の目的

本研究で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た。米のとぎ汁を有効活用した環境にやさしいと思われる農業資材である。また乳酸菌が関与しているといわれている。しかし米のとぎ汁発酵液もその性質やどのような微生物が関与しているのかなどについてはほとんど明らかにされていない。本研究では、米のとぎ汁発酵液の特性を明らかにするとともに病害防除の可能性について検討し、米のとぎ汁発酵液の科学的基盤の一端を明らかにすることを目的とした。またとぎ汁発酵液には乳酸菌が関与していることが推測されていたので、グラム陽性菌であるトマトかいよう病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) などを対象として抗菌活性について検討した。また米のとぎ汁などの代替原料についても検討した。第 2 章から第 7 章にかけてこれらの検討した結果を取りまとめた。

第2章 米のとぎ汁発酵液の特性

第1節 はじめに

茨城県板東市の福島は（2010）、米のとぎ汁と牛乳を混合して静置発酵させた液（米のとぎ汁発酵液）をネギに散布するとネギの白絹病発生の低減や味の向上が認められると報告している。しかしこの米のとぎ汁発酵液の実体や特徴はまだよくわかっていない。そこで米のとぎ汁発酵液を調製し、その培養過程での変化と発酵液の特性について検討を行った。

第2節 実験材料と方法

1. とぎ汁発酵液の調製法

米のとぎ汁発酵液は福島（2010）の方法に準じて調製した。精白米は、市販の京都府産あるいは滋賀県産の精白米（品種、コシヒカリ、キヌヒカリ）を用いた。用いた精白米の白度は $42.0 \pm 0.4\%$ ($n=4$) であった。精白米 600 g に対して水道水約 400 ml を加えてよくとぎ、とぎ汁を集めた。さらに水道水約 400ml を 1 回といた精白米に加え、同じ操作を行ってとぎ汁を集めた。この操作を合計 4 回繰り返した。4 回分のとぎ汁は 2,000 ml PET ボトルに入れ、水を加えて 1,600 ml とした。この PET ボトルに市販の牛乳（成分無調整）を 400 ml 加えてキャップをし、25℃、暗所で静置培養した。500 ml PET ボトルを使用した場合は、各過程を 1/4 にして行った。培養開始とともに気体が生成し PET ボトルが膨張するので、適宜キャップを緩めて気体を逃して圧力を下げた。一定期間培養したものを“米のとぎ汁発酵液”として本研究で用いた。対照として米のとぎ汁に牛乳の代わりに純水を加えた液を用いた（以後、米のとぎ汁のみと称する）。

2. pH 測定

培養中の米のとぎ汁発酵液を少量 PET ボトルから経時的に取り出し、よく攪拌しながら pH メーターで pH を測定した。3 連の発酵液を調製し、それぞれの pH を測定して平均値と標準偏差を求めた。

3. 乳酸の定量

米のとぎ汁発酵液を経時的に少量取り出し、滅菌済みの $0.2 \mu\text{m}$ の混合型セルロースエステル製フィルター (Advantec、25AS020AS) を通して無菌ろ液を得た。ろ液中の酵素を不活性化するため、無菌ろ液を沸騰水中で 10 分間加熱処理した。冷却後、乳酸の定量に供した。

乳酸の定量には、D-乳酸を特異的に酸化する D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) と

L-乳酸を特異的に酸化する L-乳酸脱水素酵素（L-LDH）を用いた D-乳酸/L-乳酸定量キット（F-キット；Roche Diagnostics/R-Biopharm）を使用した。定量はキットに添付の説明書に従って行い、無菌ろ液中の D-乳酸と L-乳酸の濃度を求めた。その概要を図 2-1 に示した。

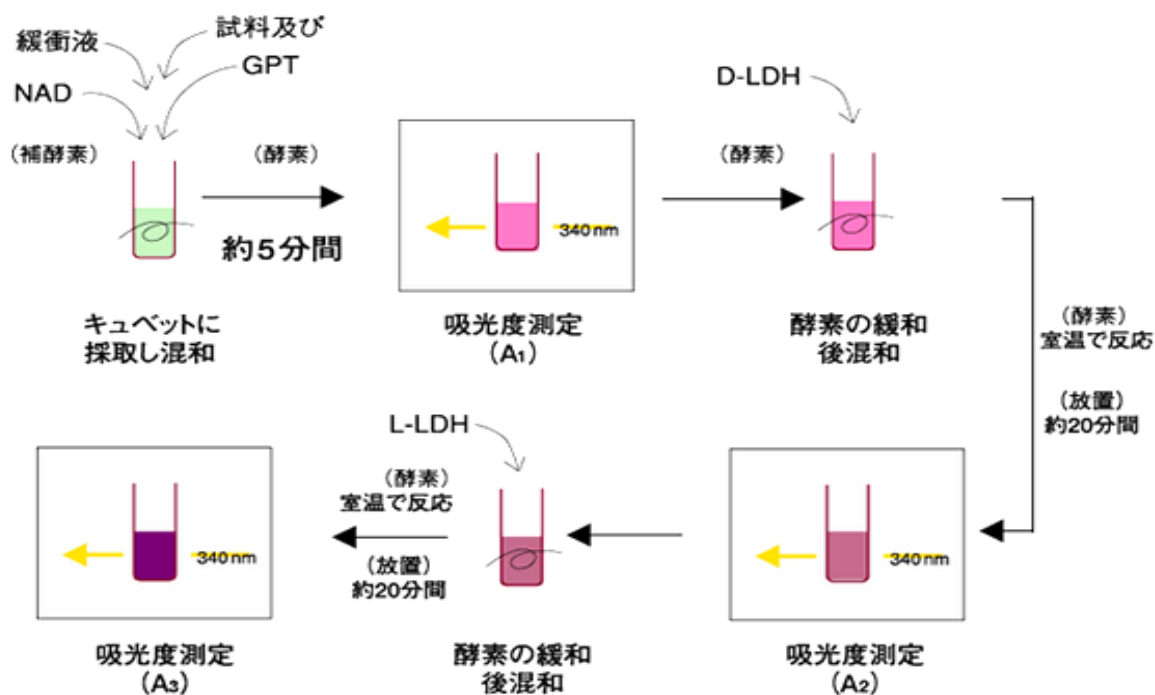


図 2-1 D-乳酸/L-乳酸の定量法の概要

NADH の分子吸光係数 (ϵ) を用いて、吸光度差 ($A_2 - A_1 = \Delta E_D$) より D-乳酸量を、吸光度差 ($A_3 - A_2 = \Delta E_L$) より L-乳酸量をそれぞれ計算した。計算法は以下のとおりである。

$$\text{D-乳酸の濃度 (mol/l)} = (V_D \times \Delta E_D) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

$$\text{L-乳酸の濃度 (mol/l)} = (V_L \times \Delta E_L) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

本研究の測定条件下では、V、v、D、 ϵ は以下の通りである。

V_D (A₂ 測定時の反応液量) : 2.24 ml

V_L (A₃ 測定時の反応液量) : 2.26 ml

v (とぎ汁発酵液試料量) : 0.10 ml

D (セルの光路長) : 1 cm

ϵ (NADH の 340 nm の分子吸光係数) : $6.3 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

(略号) NAD、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型) : NADH、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型) : GPT、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ : D-LDH、D-乳酸脱水素酵素 : L-LDH、L-乳酸脱水素酵素

第3節 結果

1. 米のとぎ汁発酵液の培養と経時変化

本研究で用いた方法で調製した米のとぎ汁は少し白色の懸濁液であり、そのまま静置しておく、いわゆるとぐことによって剥離してきた“ぬか”がペットボトルの底に沈殿した。これに牛乳を混合した直後の液（培養 0 日目の米のとぎ汁発酵液）は乳白色の懸濁液となった（図 2-2）。発酵開始後の米のとぎ汁発酵液の外観の変化を図 2-2 に示した。2 日目の発酵液にはカードなどの白色の浮遊物が生じ、発酵液の乳白色が薄くなり、透明化も若干進行した。9 日目には 2 日目に生じた浮遊物の大半が沈殿し、発酵液の色もうすい淡黄色に変化した。14 日目で浮遊物はほとんど沈殿し、発酵液の色はうすい淡黄色であったが、さらに透明化が進行した。図 2-2 に示した発酵液は、浮遊物がほとんど容器底面に沈殿した例であるが、生じた浮遊物があまり沈殿せずに、大部分が上部に浮遊したままの場合もあった。この場合も PET ボトルを振って静置しておく、かなりの浮遊物が底に沈殿した。200 日近く培養すると、PET ボトルの底には沈殿物が集積し、培養容器に中の圧力が減少したため容器がへこむ場合が多かった。発酵液そのものは淡黄色で透明度が高い液となった。

培養 0 日目の発酵液は、弱いとぎ汁の臭いと牛乳の臭いを示したが、14 日目ではヨーグルトと白菜の古漬けの臭いを混合した様な強い臭いを発した。培養が数か月以上の長期になるとこの臭いも弱くなった。また培養 2 日目位から PET ボトルが膨潤し始め、気体が発生したことが推測された。キャップを緩めるとシュッと音がして圧が抜けるとともに、ライターなどの炎を近づけると青白い炎を発して燃焼した（図 2-3）。発酵初期には可燃性の気体が発生していることが判った。培養開始後 14 日も経過すると可燃性の気体の生成も認められなくなった。

一方、米のとぎ汁のみを培養した液は、米のとぎ汁発酵液に比べて乳白色も薄く、浮遊物や沈殿物も少なかった。またその臭いはとぎ汁臭のみで、気体の発生もわずかであった。PET ボトルのキャップ付近で燃焼も起こらなかった。14 日目の対照区はとぎ汁そのものの臭いが強く感じられた。図 2-4 に培養 2 日目の写真を示した。

2. 米のとぎ汁発酵液の pH 変化

米のとぎ汁発酵液の pH は培養開始 0 日目で 6.8~7.0 であったが、培養の進行とともに低下した（図 2-5）。培養 10 日目頃には pH が 3.7 付近まで低下し、14 日目では pH は 3.6 であった。培養 10 日目以降 pH は 3.5~3.7 で、ほぼ一定の pH の値を示した。図には示していないが、150~200 日間培養した米のとぎ汁発酵液の pH は 3.5 であった。一方米のとぎ汁のみを培養した対照では、4 日目に pH

4.6 付近まで低下したが、その後の pH の低下はあまりなく、10 日目で 4.2 となり、それ以降はほぼ 4.2 付近の値を示した（図 2-5）。



図 2-2 米のとぎ汁発酵液の外観の経時変化

米のとぎ汁と牛乳を混合した液を実験方法に従って調製し、25℃、暗所で培養した。2 日目から 14 日目位までは、毎日キャップを緩めて発生した気体を逃した。数字は培養開始後の日数。

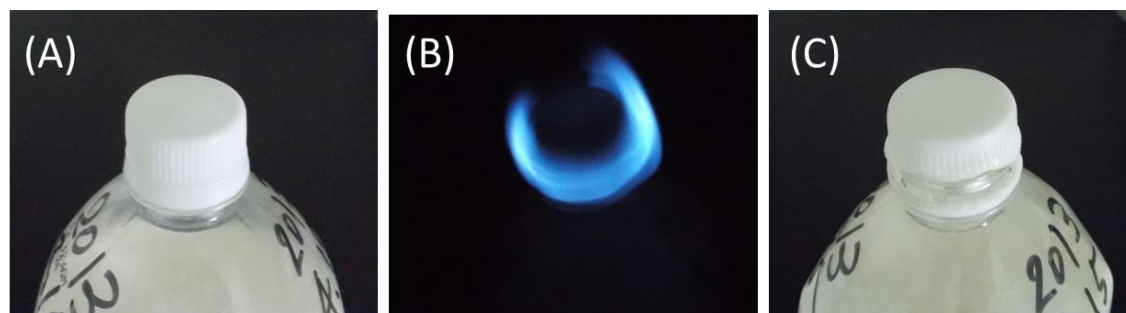


図 2-3 米のとぎ汁発酵液の培養初期に生じた可燃性気体の燃焼

米のとぎ汁発酵液を実験方法に従って調製し、5 日間培養した。(A) : PET ボトルのキャップ付近、(B) : 暗黒下でペットボトルのキャップを緩めてライターで点火した直後の炎、(C) : 燃焼後の PET ボトルのキャップ付近。

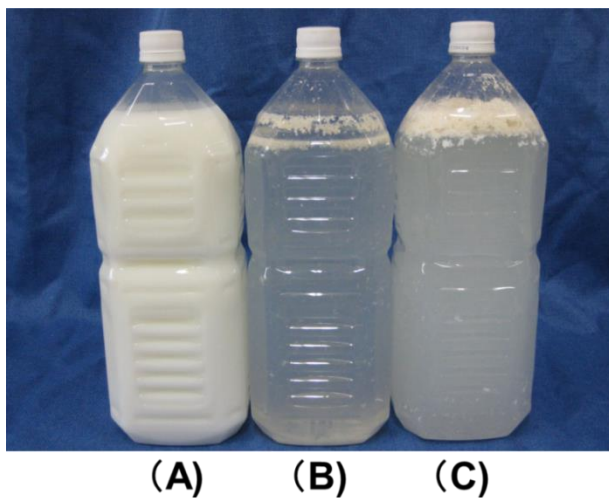


図 2-4 米のとぎ汁発酵液と米のとぎ汁のみの発酵液の培養初期の外観
 (A) 培養 0 日目の米のとぎ汁発酵液、(B) 2 日目の米のとぎ汁のみの発酵液、(C) 2 日目の米のとぎ汁発酵液。

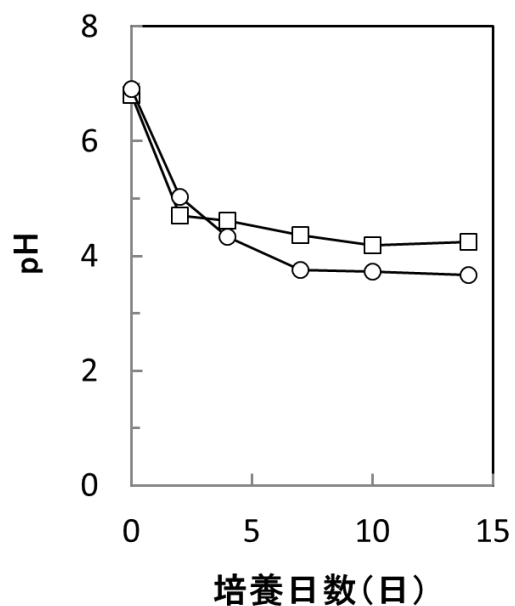


図 2-5 米のとぎ汁発酵液の pH 変化
 pH の測定は 3 連の発酵液を用いて経時的に行った。結果は平均値と標準偏差で表した。米のとぎ汁発酵液 (○)、米のとぎ汁のみの発酵液 (□)。

3. とぎ汁発酵液中の乳酸量の変化

米のとぎ汁発酵液、米のとぎ汁のみのコントロール中の乳酸量の定量の結果を図 2-6 に示した。培養開始前（培養日数 0 日）には米のとぎ汁発酵液、対照（米のとぎ汁のみ）のいずれにも L-乳酸だけが存在し、D-乳酸の存在は認められなかった。対照区では培養開始後も D-乳酸は検出されず、L-乳酸のみが検出され、その値も培養 14 日目までほぼ一定であった（45~55 $\mu\text{mol/l}$ ）。これに対し、米のとぎ汁発酵液では D-乳酸の生成が認められ、培養 4 日目では 130 $\mu\text{mol/l}$ となり、それ以降 14 日目まで 110~140 $\mu\text{mol/l}$ の値を示した。しかし L-乳酸は多少の増減はあったものの 10~44 $\mu\text{mol/l}$ の範囲内でほぼ同じレベルを保っていた。

180 日間培養した米のとぎ汁発酵液中の D-乳酸は $31.9 \pm 3.2 \text{ mmol/l}$ 、L-乳酸は $26.5 \pm 1.6 \text{ mmol/l}$ で、pH は 3.5 であった。このように長期間培養したとぎ汁発酵液では D-乳酸がさらに増加したが、同時に L-乳酸の生成量も増加することがわかった。総乳酸量は 14 日目のとぎ汁発酵液中の 300 倍以上となった。

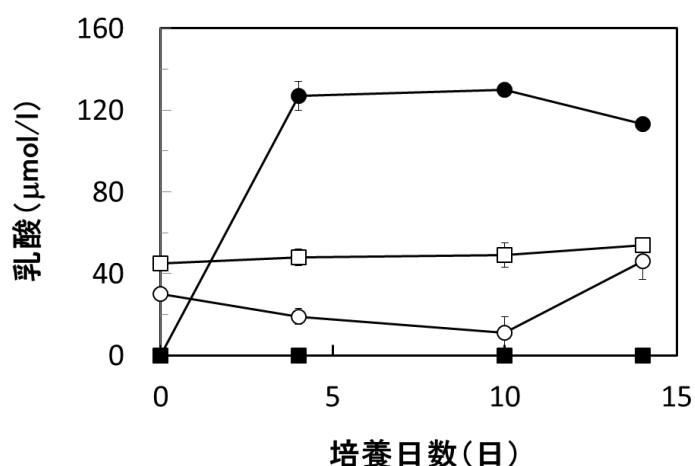


図 2-6 米のとぎ汁発酵液中の乳酸量の経時変化

測定は 3 連の発酵液を用い、平均値と標準偏差を計算した。米のとぎ汁発酵液中の D-乳酸 (●) と L-乳酸 (○)、米のとぎ汁のみの発酵液中の D-乳酸 (■) と L-乳酸 (□)。

第 4 節 考察

米を主食とする日本において、炊飯前に通常白度が 38~40%である精白米に付着している粘着性のぬかを取り除くために水で洗浄する。本章では、この米の

とぎ汁と牛乳を混合して培養した米のとぎ汁発酵液が、培養の経過とともにどのように変化するのかについて検討した。

米のとぎ汁発酵液の培養開始から 14 日目までの主要な変化は、牛乳に由来するカード（カゼインの凝固物）の生成と発酵液の透明化（図 2-2、図 2-3）、可燃性気体の生成（図 2-3）、ヨーグルトと古漬けを混合したような臭い物質の生成、pH の低下（図 2-5）、D-乳酸の生成などが明らかになった（図 2-6）。PET ボトルを密栓して培養を行なっているので培養は嫌氣的な条件下で行われたと考えてよい。食品廃棄物を微生物源を加えて嫌気培養を行なうことによって、水素と短鎖脂肪酸などの有機酸を生成することが知られている（水野ら，1997；河野ら，2004）。これらの個々の結果を総合すると、米のとぎ汁発酵液の場合も、米のとぎ汁や牛乳に含まれる有機物を米のとぎ汁中の微生物と嫌氣的に培養したことになり、培養初期に嫌氣的な水素発酵が起こり、可燃性気体として水素が発生したと考えられる。ほぼ同時に乳酸菌も増殖し、生成した短鎖脂肪酸や乳酸などの有機酸によって pH が低下し、他の細菌群の増殖が抑制されたと推測した。培養が長期になると乳酸菌の生成する乳酸が主要な酸となり、おそらく短鎖脂肪酸などの有機酸は減少したと考えられる。水素発酵は乳酸菌の増殖とともに抑制されたと考えられる（Noike et al., 2002）。pH の低下は牛乳中のカゼインのカード化を促進し、発酵液の透明化が進行したのであろう（齋藤ら，2008）。

本研究で用いた米のとぎ汁は、通常の家と同一方法でといており、特に無菌操作したわけではないので、相応の微生物が米のとぎ汁には生存していると考えられる。市販の牛乳は殺菌されているので、牛乳から発酵液への微生物の導入はないと考えられる。従って米のとぎ汁発酵液はとぎ汁由来の乳酸菌を含む微生物群によって上述の様な複合的な発酵が起こったと推察される。米のとぎ汁のみを培養した対照区では、米のとぎ汁発酵液に見られたような現象は pH の低下以外はほとんど観察されていない。しかも pH の低下も米のとぎ汁発酵液ほどではなかった。また牛乳は、培養初期にとぎ汁発酵液中の乳酸菌をはじめとする微生物群の増殖に重要な資化成分や栄養成分を供給する重要な役目を果たしていると推測される。あるいは米のとぎ汁発酵液中の微生物群の中で牛乳に依存して増殖する微生物に限定して増殖を支援している可能性も考えられる。

培養が長期化すると培養容器である PET ボトルがへこんだり、コンタミネーションによって腐敗臭がする液になったりした。これらの結果は、先にも述べたように、とぎ汁発酵液が多様な微生物を含んでおり、培養 50～100 日目までは見かけ上大きな変化はないが、培養が長期になるとそれまで増殖が抑制されていた微生物群が増殖を始め、PET ボトル内の気体を資化したり、あるいは腐敗を引き起こしたりするのではないかと考えられる。この結果から、以後の実験

には特に記載のない限り 14 日～60 日目の米のとぎ汁発酵液を使用することとした。

第3章 米のとぎ汁発酵液によるトマトかいよう病菌の増殖抑制

第1節 はじめに

白絹病は多犯性の病原性糸状菌である *Sclerotium rolfsii* Curzi によって引き起こされる病気である（米山ら，2005）。米のとぎ汁発酵液は、ネギの白絹病の発病の抑制に効果が認められたと報告されている（福島，2010；橋本，2015）。一方植物病原性細菌が引き起こす植物の病害は数多くある（米山ら，2005；Eichenlaub，2007）。第2章で得られた結果から、米のとぎ汁発酵液の発酵過程で乳酸菌が関与していることが示唆された。乳酸菌は抗菌性ポリペプチドであるバクテリオシンをはじめとする抗菌物質を生成することで知られている（乳酸菌研究集談会編、1996；Cotter et al., 2005；益田ら，2010；日本乳酸菌学会編、2010）。特に乳酸菌が生成するバクテリオシンは、一般にグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すことが多い（Schillinger and Lücke, 1989；乳酸菌研究集談会編、1996；Cotter et al., 2005；Rajaram, 2010；Punyauppa-Path et al., 2015）。

トマトかいよう病菌はグラム陽性菌である *Clavibacterium michiganensis* subsp. *michiganensis* によって引き起こされることが知られている（植松ら，1977；米山ら，2005；大谷ら，2007；Eichenlaub，2007；Kawaguchi et al, 2010；川口，2010；川口ら，2011）。*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* は古くは *Corynebacterium michiganense* と命名されて *Corynebacterium* 群に分類されていたが、近年は細胞壁型、メナキノタイプ、16S rDNA 配列などによって *Clavibacterium michiganensis* に分類され、さらにトマトかいよう病を引き起こす亜種は *Clavibacterium michiganensis* subsp. *michiganensis* と命名された（Eichenlaub，2007）。トマトかいよう病は日本でも問題となっており、その防除のための栽培技術が開発されている（植松ら，1977；大谷ら，2007；Kawaguchi et al, 2010；川口，2010；川口ら，2011）。

本章では、トマトかいよう病菌の増殖に対して米のとぎ汁発酵液が与える影響などについて検討を行った。

第2節 実験材料と方法

1. トマトかいよう病菌とその培養

トマトかいよう病菌 (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strain 05M1-2) は、岡山県農林水産総合センター 農業研究所 病虫研究室の川口章博士より分与されたものを使用した（Kawaguchi et al., 2010；川口，2010）。培養にはジャガイモシヨ糖培地（PS 培地）を用いた（Kawaguchi et al., 2010）。PS 培地（1 l）の組成は、じゃがいも（300 g）の煮汁約 1 l、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2 g、ペプトン 5 g、ショ糖 20 g で、pH は 6.8 に調整した。PS 寒天培地は PS 培地に寒天を 15 g 加えて調製した。

トマトかいよう病菌は、PS 培地あるいは PS 寒天培地を用いて、30℃で培養した(白川と佐々木、1988)。液体培養の場合、直径 16.5 mm の試験管に PS 液体培地を 5 ml を入れ、トマトかいよう病菌の培養 24 時間目の培養液を 50 μl 加えてシリコン栓をした後、30℃で 150 rpm で往復振とう培養した。デジタル比色計(タイテック、Minipphoto 518R)を用いて 660 nm の濁度を経時的に測定し成長曲線を作成した(図 3-1)。特に記さない限り、培養開始後 24 時間目のトマトかいよう病菌培養液を増殖抑制活性の測定に用いた。660 nm の濁度が 1.0 となった時は後期対数増殖期であり、トマトかいよう病菌の細胞密度は 2×10^8 cell/ml であった。

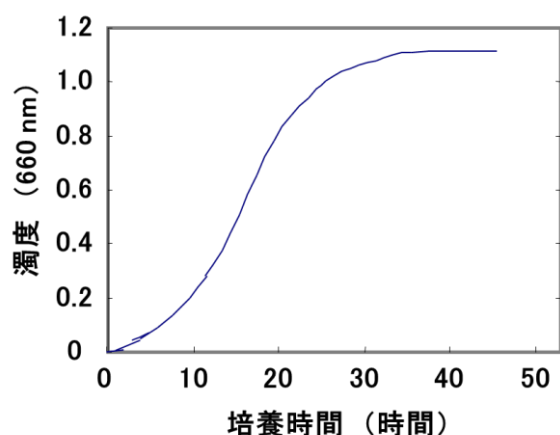


図 3-1 トマトかいよう病菌の増殖曲線

培養試験管にいた PS 液体培地 (5 ml) に 24 時間培養したトマトかいよう病菌培養液を 50 μl 加えて 30℃で往復振とう培養した。経時的に培養試験管の 660 nm の濁度を測定した。

2. 米のとぎ汁発酵液の調製

第 2 章で示した方法で米のとぎ汁発酵液を調製した。14~60 日間培養した米のとぎ汁発酵液を実験に使用した。

3. トマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性測定法

(1) 米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液の調製

滅菌済みのポアサイズ 0.2 μm のセルロースエステル製フィルター (Advantec、25AS020AS) を用いて米のとぎ汁発酵液をろ過し、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液

を得た。この無菌ろ液を以下のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定に用いた。

(2) 液体振とう培養法

試験管 (16.5 mm ϕ x 160 mm L) に、PS 培地 5 ml、濁度 (660 nm) 約 1.0 のトマトかいよう病菌培養液 50 μ l、被検液 (米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液など) 500 μ l 加えた後、30 $^{\circ}$ C、150 rpm で往復振とう培養を行い、24 時間後に濁度 (660 nm) を測定した。被検液として滅菌純水を加えたものをコントロールとした。培養は通常 3 連で行い、測定した濁度の平均値と標準偏差を求めた。

トマトかいよう病菌の増殖は、コントロールの濁度を 100% とし、PS 培地のみの濁度を 0% として計算した相対増殖率で表した。相対増殖率が低くければ増殖抑制活性は高くなる。なお場合 PS 培地にトマトかいよう病菌培養液 50 μ l を加えた直後と PS 培地のみの場合の濁度を測定するとほとんど同じであったため、PS 培地のみの場合を増殖率を 0% とした。

(3) カップ法

PS 寒天培地 5 ml を滅菌プラスチックシャーレ (直径 9 cm) に流しこんで固化させた後、中心から 2.5 cm の位置に滅菌したステンレス製ペニシリンカップを置いた。次に、トマトかいよう病菌培養液 (2×10^8 cell/ml) 150 μ l と寒天をといた PS 寒天培地 (約 70 $^{\circ}$ C) 15 ml をよく混合し、ペニシリンカップを置いたプラスチックシャーレに流しこみ、約 40 分放置して固化させた。固化した培地よりペニシリンカップを抜き取り、できたウェルにとぎ汁発酵液の無菌ろ液 150 μ l を入れ、30 $^{\circ}$ C、48 時間培養した。コントロールとして無菌ろ液に代わりに滅菌純水をウェルに加えた (図 3-2)。

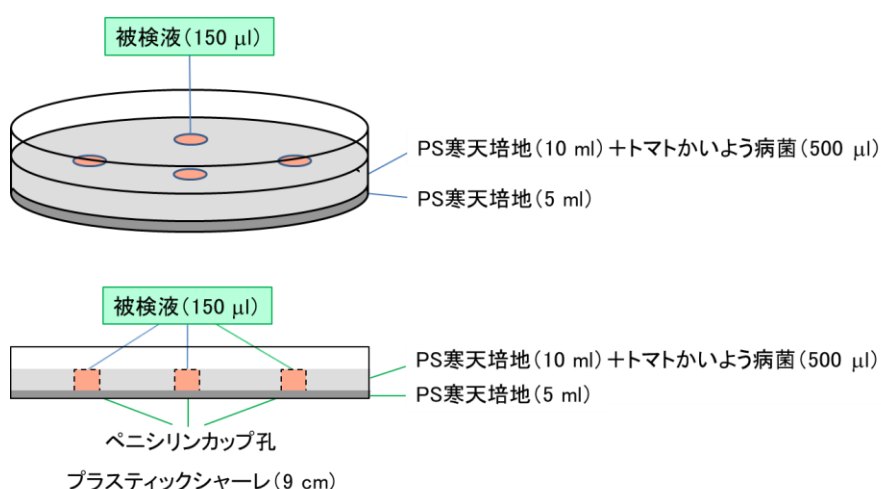


図 3-2 カップ法によるトマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定法の概要

4. とぎ汁および牛乳単独で調製した発酵液

とぎ汁のみの発酵液は米のとぎ汁と牛乳の代わりに純水を混合した後、牛乳のみの発酵液は米のとぎ汁の代わりに純水を牛乳と混合した後、それぞれ米のとぎ汁発酵液の場合と同様に培養して調製した。

5. 加熱処理した原料を用いた発酵液の調製

米のとぎ汁発酵液の原料である米のとぎ汁と牛乳をそれぞれ加熱処理（120℃、15 分）し、これらの原料を組合わせて、加熱処理とぎ汁と牛乳、とぎ汁と加熱処理牛乳の発酵液を、とぎ汁発酵液と同じ手順で調製した。

6. 熱安定性の検討

米のとぎ汁発酵液を 15 分間沸騰水中で熱し、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定法で評価をした。

7. 酸性条件がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響の検討

酸性条件でトマトかいよう病菌の増殖が抑制されるかを検討するため、以下の実験を無菌下でおこなった。

(1) 米のとぎ汁のみの発酵液ととぎ汁発酵液を調製し、トマトかいよう病菌の増殖と増殖抑制活性と測定液の pH を測定して、培地の pH と増殖の関係を検討した。

(2) pH 6.8 と pH 5.0 の PS 培地を調製して、トマトかいよう病菌の増殖に与える影響を検討した。

(3) PS 培地を調製してオートクレーブした後、D-/L-乳酸液を無菌ろ過し、殺菌済みの PS 培地に最終濃度 0~0.3 mmol/l となるように加えた。その後培地の pH を測定した。これら D-/L-乳酸を加えた培地にトマトかいよう病菌培養液を 50 μ l 加えて 24 時間、往復振とう培養し、濁度からトマトかいよう病菌の増殖を評価した。

第3節 結果

1. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定法

トマトかいよう病菌を用いて、米のとぎ汁発酵液の抗菌活性の測定法を検討した。本章の実験方法で示した液体振とう培養を用いた活性測定法に関して、米のとぎ汁発酵液無菌ろ液の添加量を検討した。加えた米のとぎ汁発酵液無菌ろ液の量が 100 μ l あるいは 200 μ l の場合は、無添加の場合と比べてトマトかいよう病菌の増殖を有意に抑制した（図 3-3）。しかし米のとぎ汁発酵液のロットによるバラつきが大きかった。米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液を 500 μ l 加えた

場合は、ロットによる増殖抑制のバラつきも小さく、米のとぎ汁発酵液無添加に比べてトマトかいよう病菌の増殖を 90%以上抑制した。これらの結果から、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定法として、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液を被検液として 500 μ l 加える液体振とう培養法を確立した。以下特に記述の無い限りこの液体振とう培養法を用いてトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定した。

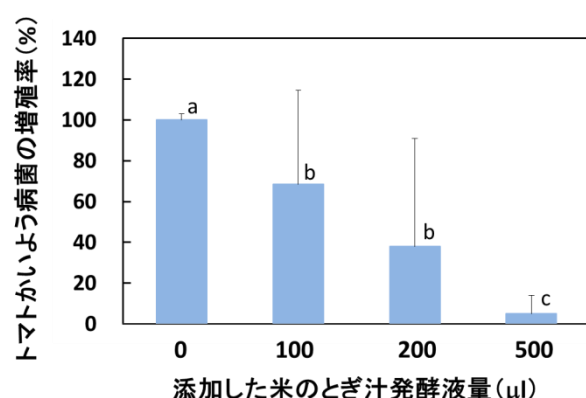


図 3-3 トマトかいよう病菌の増殖に与える米のとぎ汁発酵液添加量の影響

液体振とう培養液法において、加える米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液の量を変えてトマトかいよう病菌の増殖を測定した。米のとぎ汁発酵液無菌ろ液の加える量を減らした場合、無菌純水を加えて 500 μ l となるように調整した。米のとぎ汁発酵液は 14~30 日間培養したものを用いた。測定は 4~10 連で行い、結果は平均値と標準偏差で表した。図中に記された異なる文字間では米のとぎ汁発酵液無菌ろ液の異なる添加量間に $P < 0.05$ で有意差があった。

米のとぎ汁発酵液の無菌ろ過液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制することをカップ法でも確認した。図 3-4 に示したように、米のとぎ汁発酵液を入れたウェル 1、ウェル 3 の周囲にはトマトかいよう病菌が増殖していない透明な阻止帯が認められた、一方純水を加えたウェル 2 とウェル 4 の周辺には阻止帯は認められず、ウェルの近傍までトマトかいよう病菌が増殖し、寒天培地が不透明となった。以上米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液は、カップ法による評価でも、トマトかいよう病菌の増殖を抑制することがわかった。以上の結果は、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液の中にトマトかいよう病菌の増殖抑制物質が存在していることを示唆している。

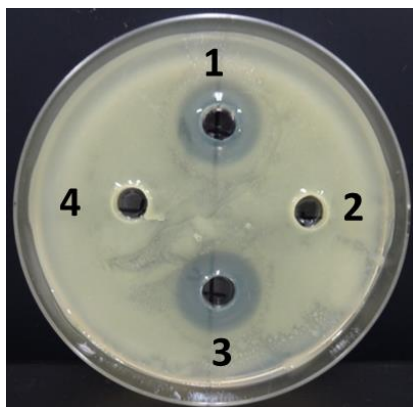


図 3-4 カップ法による米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性の検討

実験法で述べたカップ法を用い。ウェル1とウェル3には米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液をいれウェル2とウェル4、には純水を入れた。30℃で72時間培養後のシャーレの写真。

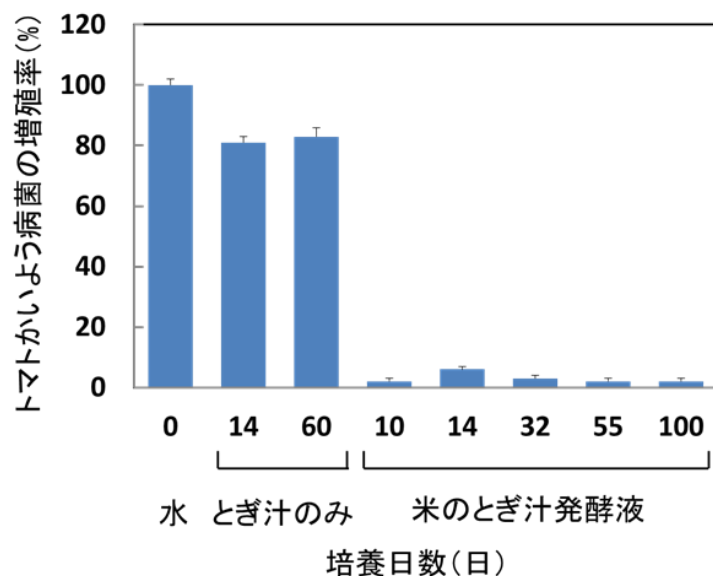


図 3-5 米のとぎ汁発酵液の培養日数とトマトかいよう病菌の増殖抑制活性の関係

トマトかいよう病菌増殖抑制活性は液体振とう培養法で測定した。とぎ汁のみは、米のとぎ汁に牛乳の代わりに純水を加えて培養して調製した発酵液。“水”はコントロールとして、被検液として発酵液の代わりに無菌水を加えてトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定した。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定は3連で行い、平均値と標準偏差で表した。

2. 米のとぎ汁発酵液の培養期間とトマトかいよう病菌の増殖抑制活性

米のとぎ汁発酵液の培養期間とトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性との関係について検討を行った。培養開始後 10 日目の米のとぎ汁発酵液はトマトかいよう病菌の増殖を抑制する活性をすでに有していることが認められた（図 3-5）。100 日間培養してもトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を有していることが確認された。図には示していないが、200 日、550 日培養してもトマトかいよう病菌増殖抑制活性を示すものもあった。一方、米のとぎ汁と純水を加えて培養したとぎ汁のみ発酵液は、培養日数の長短に関わらずトマトかいよう病菌の増殖抑制活性は低く、肉眼的にはコントロール（水）と濁度において見分けがつかなかった（図 3-5）。

これまでに 91 ロットの米のとぎ汁発酵液を調製し、トマトかいよう病菌増殖抑制活性を測定した。91 ロット中トマトかいよう病菌の増殖を 50%以上抑制する活性を持つ米のとぎ汁発酵液は 76 ロット（全体の 84%）であり、90%以上トマトかいよう病菌の増殖を抑制するとぎ汁発酵液は 63 ロット（69%）あった。十分な確率でトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を有する米のとぎ汁発酵液が得られることがわかった。培養開始 14~20 日目にトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定して増殖抑制活性が 70%以下の米のとぎ汁発酵液やひどく汚染したとぎ汁発酵液は廃棄した。図 3-5 の結果は概ねトマトかいよう病菌の増殖抑制活性がある米のとぎ汁発酵液についての結果である。

これらの実験結果より、以後の実験では予備測定で十分にトマトかいよう病菌の増殖抑制活性のあった培養日数 14 日~60 日の米のとぎ汁発酵液を使用した。

3. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性に対する米のとぎ汁と牛乳の役割

米のとぎ汁発酵液調製の原料である米のとぎ汁と牛乳の役割について検討するため、それぞれを単独で培養して得られた発酵液のトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性を測定した。米のとぎ汁と牛乳を用いて調製した米のとぎ汁発酵液はトマトかいよう病菌の増殖をほぼ完全に抑制した（図 3-6）。しかし米のとぎ汁のみの発酵液では、トマトかいよう病菌の増殖は水コントロールに対して 20%の増殖抑制しか見られなかった。図 3-4 でも示したように、米のとぎ汁のみでは 60 日間培養してもトマトかいよう病菌の増殖抑制活性は高まらなかった。牛乳のみではトマトかいよう病菌の増殖抑制は全く認められなかった。結論として、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を有する米のとぎ汁発酵液を得るためには、米のとぎ汁と牛乳の両者が必要なことがわかった。

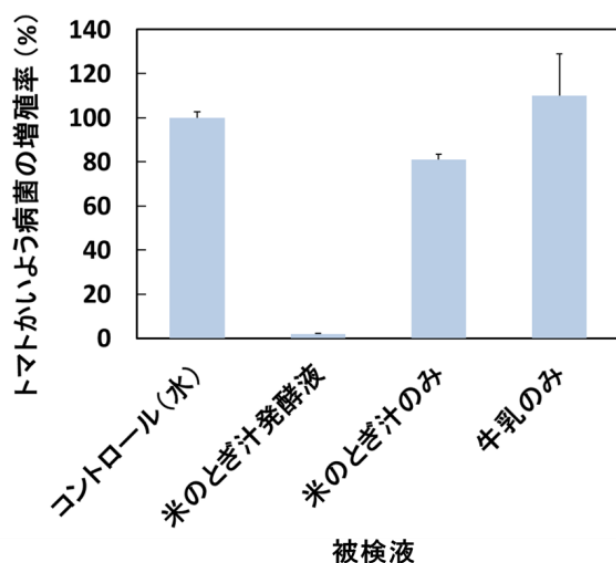


図 3-6 米のとぎ汁あるいは牛乳単独で調製した発酵液がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

米のとぎ汁発酵液は常法に従って調製した。“米のとぎ汁のみ”は、米のとぎ汁と牛乳の代わりに純水を混合して培養し、“牛乳のみ”は純水と牛乳を混合して培養した。いずれも 14 日間培養した。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は液体振とう培養法で行った。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定のコントロールとして純水を被検液として用いた。増殖抑制活性は 3 連で測定し、平均値と標準偏差で表した。

4. 米のとぎ汁発酵液の原料であるとぎ汁と牛乳の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響

米のとぎ汁発酵液の原料である米のとぎ汁、牛乳をそれぞれオートクレーブによって加熱処理をした後、それらを組み合わせて発酵液を調製し、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響を検討した。あらかじめ加熱処理した米のとぎ汁に牛乳を加えて調製した発酵液はトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示さず、コントロールと同様にトマトかいよう病菌は増殖した（図 3-7）。しかし米のとぎ汁にあらかじめ加熱処理した牛乳を加えて調製した発酵液は、米のとぎ汁発酵液と同等の高いトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示した（図 3-7）。これらの結果は、米のとぎ汁中に存在する微生物群が醗酵に重要な役割を果たしており、牛乳中の資化源や増殖に必要な栄養分の補給機能は、牛乳を加熱処理しても失われないことを示している。

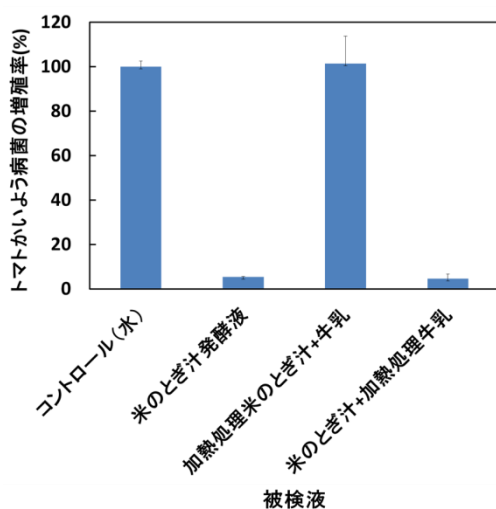


図 3-7 加熱処理した米のとぎ汁と牛乳を用いて調製した発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性

米のとぎ汁発酵液は常法に従って調製した。120℃、15 分間加熱処理した米のとぎ汁および牛乳を用いて“加熱処理米のとぎ汁+牛乳”発酵液、“米のとぎ汁+加熱処理牛乳”発酵液を調製した。いずれの発酵液も 14 日間培養した。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は液体振とう培養法で行った。コントロール被検液として殺菌水を用いた。増殖抑制活性は 3 連で測定し、平均値と標準偏差で表した。

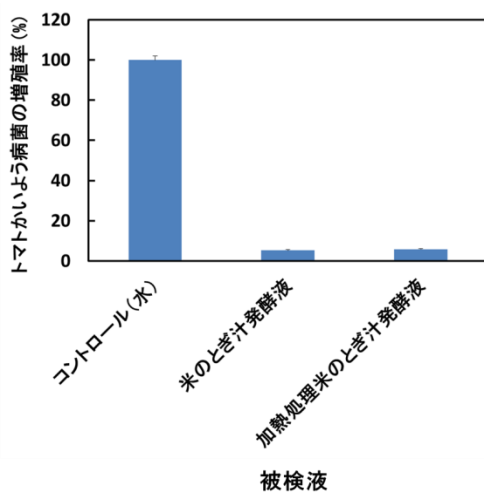


図 3-8 米のとぎ汁発酵液の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響

米のとぎ汁発酵液は常法に従って 14 日間培養したものをを用いた。コントロール被検液として殺菌水を用いた。加熱処理は米のとぎ汁発酵液を 100℃で 15 分間行なった。実験は 3 連で行い、平均値と標準偏差で表した。

5. 米のとぎ汁発酵液の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響

トマトかいよう病菌の増殖抑制活性が十分にある米のとぎ汁発酵液を 100℃で 15 分間加熱処理した後、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定した。米のとぎ汁発酵液の加熱処理はトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に影響を与えず、米のとぎ汁発酵液同様に高いトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を示した（図 3-8）。この結果は、とぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制に関わる物質が熱に安定であることを示唆している。

6. 培地 pH および乳酸添加がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

一般的に、細菌は酸性領域で pH が低下するとともに増殖が抑制されることが知られている。第 2 章で述べたように、米のとぎ汁培養液の pH は 3.5～3.7 である。そこでトマトかいよう病菌の増殖抑制が pH の低下に起因している可能性について検討した。

米のとぎ汁発酵液と米のとぎ汁のみの発酵液を用いて、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を液体振とう培養法で測定し、次いでそれぞれの活性測定用培地の pH を測定した。被検液として水のみを加えた場合のトマトかいよう病菌の増殖率を 100%とすると、米のとぎ汁発酵液を培地に加えることによってトマトかいよう病菌の増殖は強く抑制された。水コントロールに比べわずか 8%の増殖しかなかった（表 3-1）。米のとぎ汁のみの発酵液を加えた場合はトマトかいよう病菌の増殖はわずか 17%抑制されただけであった（表 3-1）。しかしこの時の測定用培地の pH は水コントロールで 6.3、増殖抑制がほとんど認められない米

表 3-1 トマトかいよう病菌の増殖と培地 pH

被検液		トマトかいよう病菌増殖率 (%)	増殖率測定用培地のpH
組成	培養期間(日)		
水	—	100 ± 4	6.3 ± 0.1
米のとぎ汁発酵液	19	8 ± 4	5.9 ± 0.1
米のとぎ汁のみ	60	83 ± 3	5.9 ± 0.1

PS 液体培地に被検液およびトマトかいよう病菌を加えて 30℃で 24 時間振とう培養した。その後トマトかいよう病菌の増殖率を測定した。またトマトかいよう病菌の増殖測定後の培養液の pH を測定した。米のとぎ汁発酵液は 19 日間培養したものを、米のとぎ汁のみの発酵液は 60 日間培養したものをを用いた。いずれも 3 連で測定を行い、結果は平均値と標準偏差で表した。

のとぎ汁のみの発酵液と強い増殖抑制を示した米のとぎ汁発酵液の pH はともに 5.9 であった（表 3-1）。米のとぎ汁発酵液と米のとぎ汁のみの発酵液添加時のトマトかいよう病菌増殖測定培地の pH は同じであるにも関わらず、トマトかいよう病菌の増殖の抑制の程度は全く異なっていた。これらの結果は、米のとぎ汁発酵液でトマトかいよう病菌の増殖が抑制された原因が、米のとぎ汁発酵液を加えたことに起因する pH の低下ではないことを示している。

次に異なる pH（5.0 と 6.8）の PS 培地を調製し、トマトかいよう病菌の増殖率を測定し、増殖率測定用培地の培養前後の pH を測定した。pH 6.8 の PS 培地に被検液として水を加えたものではトマトかいよう病菌はよく増殖し、培養後に測定用培地の pH は中性付近であった（表 3-2）。しかし pH 5.0 の PS 培地でもトマトかいよう病菌はよく増殖しており、pH 6.8 の PS 培地の水コントロールに対し 82%の増殖率であった（表 3-2）。この時のトマトかいよう病菌増殖測定用培地の pH は培養前が 5.2、培養後が 5.6 で、pH 6.8 の水コントロールより低かった。PS 培地（pH 6.8）に米のとぎ汁発酵液を加えて培養するとトマトかいよう病菌の増殖は強く抑制された（表 3-2）。その際の増殖率率測定用培地の pH は培養前で 5.4、培養後は 5.6 であった。トマトかいよう病菌がよく増殖した PS 培地（pH 5.0）の水添加の場合と増殖が強く抑制された米のとぎ汁発酵液を加えた PS 培地（pH 6.8）の場合を比較すると、両者の測定用培地の培養前後の pH はほぼ同じであった。これらの結果は、米のとぎ汁発酵液をトマトかいよう病菌の増殖測定用培地に加えることによる測定用培地の pH 低下がトマトかいよう病菌の増殖を抑制する要因ではないことを示している。

表 3-2 異なる pH の PS 培地でのトマトかいよう病菌の増殖

培地 (5 ml)	被検液 (500 μ l)	トマトかいよう病菌増殖率 (%)	増殖率測定用培地の pH	
			培養前	培養後
PS培地(pH 6.8)	水	100 \pm 1	7.0	6.7
PS培地(pH 5.0)	水	82 \pm 7	5.2	5.6
PS培地(pH 6.8)	とぎ汁発酵液	1 \pm 1	5.4	5.6

PS 液体培地に被検液およびトマトかいよう病菌を加えて 30℃で 24 時間振とう培養した後、トマトかいよう病菌の増殖を濁度から測定した。使用したとぎ汁発酵液の pH は 3.6。培養前前後の pH を測定した。トマトかいよう病菌の増殖実験は 3 連で行い、平均値と標準偏差で表した。pH は 1 連で測定した。

第2章で述べたように、とぎ汁発酵液中には乳酸が存在している（図 2-6）。そこで PS 培地に乳酸を添加して、乳酸が培地の pH とトマトかいよう病菌の増殖に与える影響について検討した。加えた乳酸量は、第2章で得られた米のとぎ汁発酵液中の乳酸量を参考にして培地中の最終乳酸量が 0.3 mmol/l までとした。培地中の乳酸量 0.3 mmol/l は、14 日間培養した米のとぎ汁発酵液（乳酸量 0.167 mmol/l）500 μ l をトマトかいよう病菌の増殖率測定用 PS 培地 5 ml に加えた場合の乳酸濃度の 20 倍に相当する。表 3-3 に示したように乳酸を 0.3 mmol/l まで添加しても pH は 5.9 にしか低下せず、トマトかいよう病菌の増殖にはほとんど影響はなかった。これらの結果から、トマトかいよう病菌の増殖抑制に乳酸あるいは乳酸生成による pH の低下は関与していないことが明らかとなった。その他酪酸、 α -ノナン酸を添加した PS 培地でもトマトかいよう病菌の増殖に与える影響を検討したが、トマトかいよう病菌の増殖の抑制は認められなかった。

表 3-3 乳酸添加が培地の pH とトマトかいよう病菌の増殖におよぼす影響

培地中の乳酸量 (mmol/l)	測定用培地の pH	トマトかいよう病菌の増殖率 (%)
0	6.8	100 \pm 1
0.1	6.0	94 \pm 4
0.2	6.0	93 \pm 4
0.3	5.9	96 \pm 5

トマトかいよう病菌増殖率測定用培地として、PS 培地に所定の濃度になるように乳酸を添加したものを調製した。乳酸添加後の測定用培地の pH を測定した。乳酸添加培地を用いてトマトかいよう病菌を 24 時間振とう培養した後にトマトかいよう病菌の増殖を測定し、増殖率を計算した。トマトかいよう病菌の増殖実験は 3 連で行い、結果は平均値と標準偏差で表した。

第4節 考察

本章で米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制する事をはじめて明らかにし、その増殖抑制活性は培養開始 10 日目頃から認められ、少なくとも 100 日目頃までは持続することを見い出した（図 3-3、図 3-5）。米のとぎ汁発酵液の中には、100 日を超えてもトマトかいよう病菌の増殖を抑制する活性を持つロットもあった。米のとぎ汁発酵液培養 10 日目では、第2章で述べたように pH の低下や D-乳酸の生成などがほぼ一定値に達している時期である（図 2-5、

図 2-6)。福島（2010）は約 2 週間後から効果があるといっていることと一致する。10 日より短い培養日数ではまだトマトかいよう病菌の増殖抑制活性は生じていなかった。そのため、本研究では米のとぎ汁発酵液を用いる際は、培養 14 日目から 60 日目の発酵液を使用した。

米のとぎ汁と牛乳の役割を考察するために、米のとぎ汁および牛乳単独の発酵液の調製、加熱処理した米のとぎ汁あるいは牛乳を用いて発酵液を調製し、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を調べた（図 3-6、図 3-7）ところ、米のとぎ汁が微生物源であり、牛乳は微生物の増殖に必要な成分供給源として機能していることがことが推測された。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を持つ米のとぎ汁発酵液を作るためには、米のとぎ汁と牛乳の両者が必要であることが分かった。

また米のとぎ汁発酵液 0 日目では低含量であった乳酸が、米のとぎ汁発酵液の培養日数の経過とともに増加してきた。特に 0 日目にはなかった D-乳酸が増加していた（図 2-6）。これらの結果は米のとぎ汁発酵液に乳酸菌が関与していることを推測させる。乳酸菌は抗菌性ペプチドであるバクテリオシンを生産することが知られている（乳酸菌研究集談会編、1996 ; Cotter et al., 2005）。米のとぎ汁発酵液でもバクテリオシンの関与が推測できるが、これについては第 5 章、第 6 章で検討する。

本章では米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を *in vitro* で抑制することを示したが、実際のは場でトマトかいよう病の防除に効果があるのかについて興味を持たれる。施設内や露地でトマトを栽培してかいよう病を発症させる実験は、周囲に病原菌を拡散させる恐れがあるため実施が困難である。そこでトマト幼苗を用いて、人工気象器内でトマトかいよう病の病徴の一つである萎凋症状を発症させることを試みたが、再現性のあるトマトかいよう病の発症には未だ成功していない。今後人為的にトマト幼苗を用いてトマトかいよう病を発症させる簡易な実験系が確立されれば、米のとぎ汁発酵液を用いてトマトかいよう病の予防や病害の軽減に関する研究が可能になる。トマト幼苗を用いたトマトかいよう病の発症系の確立が待たれる。

第4章 枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌の増殖に与える米のとぎ汁発酵液の影響

第1節 はじめに

第3章で米のとぎ汁発酵液がグラム陽性菌であるトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を有することを見出し、乳酸菌の関与を推定した。一般的に乳酸菌は抗菌物質であるバクテリオシンを生産することが知られている (Rogers, 1928 ; 乳酸菌研究集談会編, 1996 ; Cotter et al, 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; 日本乳酸菌学会編, 2010 ; 石橋ら, 2011)。乳酸菌の産生するバクテリオシンはグラム陽性菌に対して増殖抑制を示すことが多く、食品保存剤として実用化しているナイシン A はまさにグラム陽性菌に対してその効力を発揮している (Cotter et al, 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; 石橋ら, 2011)。米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌に対して特異的に増殖抑制活性を示すのか、それ以外の細菌に対しても増殖抑制活性を有するのかは興味のあるところである。

本章では、グラム陽性菌として枯草菌と黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌として大腸菌を取りあげ、米のとぎ汁発酵液がこれらの細菌の増殖に与える影響を検討した。

第2節 実験材料と方法

1. 用いた細菌と培養

(1) トマトかいよう病菌

トマトかいよう病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain 05M1-2) は第3章で述べたものを用いた。培養は PS 培地を用いて行った。

(2) 大腸菌

大腸菌 (*Escherichia coli* AB1157) は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した (ATCC 29055)。培養には LB (Luria-Bertani) 培地を用いた。LB 培地 (1 l) はトリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 10 g を含み、pH 7.0 に調整した。固形培地は寒天 15 g/l を加えて調製した。

(3) 枯草菌

枯草菌 (*Bacillus subtilis* strain 168) は、福山大学生命工学部の藤田泰太郎博士より分与されたものを用いた。枯草菌の培養には LB 培地を用いた。

(4) 黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は ATCC より入手した (ATCC 31890)。培地には *Staphylococcus* 培地 No. 110 を用いた。この培地 (1 l) は、トリプトン 10 g、酵母エキス 2.5 g、乳糖 2 g、マンニット 10 g、ゼラチン 30 g、NaCl

75 g、 K_2HPO_4 5 g から成っており、pH 7.1 に調整した。固形培地は寒天（15 g/1）を加えて調製した。

(5) 培養

液体培地での培養は、30℃で往復振とう（150 rpm）しながら行った。固形培地での培養は 30℃、暗所で行った。

2. 米のとぎ汁発酵液の調製

第 2 章で述べた方法で米のとぎ汁発酵液を調製し、実験に使用した。

3. 米のとぎ汁発酵液が細菌の増殖に与える影響

液体振とう培養法によって増殖抑制活性について評価した。米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液は第 3 章に述べた方法で調製した。それぞれの細菌用の培地に濁度（660 nm）0.9-1.0 の菌体培養液を 50 μ l、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液 500 μ l 加えた後、30℃で往復振とう培養した。培養は通常 3 連で行い、定常期に達した 20-24 時間後の濁度（660 nm）を測定し、相対増殖率（%）を求めた。その場合、細菌の培養に用いた PS 培地、LB 培地、Staphylococcus 培地 No. 110 の濁度を増殖率 0%、とぎ汁発酵液無菌ろ液の代わりに純水を加えて 24 時間細菌を培養した場合の濁度を増殖率を 100%とした。それぞれの細菌の相対増殖率から米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性を評価した。

第 3 節 結果

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の増殖に与える影響について検討した。トマトかいよう病菌を含めて 4 種類の細菌をそれぞれに適した培地に移植し、被検液として水を加えて培養したコントロールでは、それぞれの細菌はよく増殖し、20~24 時間後にはその濁度（660 nm）ほぼ 1 となった。トマトかいよう病菌に米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液を加えて培養した場合、その増殖はほぼ完全に抑制された（表 4-1）。一方同じグラム陽性菌である枯草菌や黄色ブドウ球菌の場合は、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液を添加してもこれらの細菌の増殖抑制はほとんど認められなかった（表 4-1）。グラム陰性菌である大腸菌に対しても、米のとぎ汁発酵液の無菌ろ液は増殖抑制を示さなかった。以上の結果から、米のとぎ汁発酵液は今回用いた 4 種類の細菌の中でトマトかいよう病菌に対して特異的に増殖抑制を示すことが分かった。

表 4-1 米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌の増殖に与える影響

使用した細菌	グラム染色	培地	被検液	相対増殖率 (%)
トマトかいよう病菌 (<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>)	陽性	PS	水	100±3
		PS	とぎ汁発酵液	3±1
枯草菌 (<i>B. subtilis</i>)	陽性	LB	水	100±1
		LB	とぎ汁発酵液	96±5
黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i>)	陽性	St. #110	水	100±1
		St. #110	とぎ汁発酵液	99±2
大腸菌 (<i>E. coli</i>)	陰性	LB	水	100±2
		LB	とぎ汁発酵液	96±1

とぎ汁発酵液は 32 日間培養したものを用いた。実験はそれぞれ 3 連で行い、結果は平均値±標準偏差で表した。

第 4 節 考察

米のとぎ汁発酵液はこれまで述べてきたようにトマトかいよう病菌に対して増殖抑制活性を示したが、本章の実験結果は、枯草菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌に対しては米のとぎ汁発酵液が増殖抑制活性を有しないことを示している。米のとぎ汁発酵液は、グラム陽性菌であれば増殖抑制を示すのではなく、特定のグラム陽性菌、例えばトマトかいよう病菌、に対して特異的に増殖抑制を示す可能性を強く示唆している。また特定のグラム陽性菌に対する抗菌物質が米のとぎ汁発酵液に存在することも推測させる。乳酸菌の生成するバクテリオシン、例えばナイシン A、も幅広いグラム陽性菌に対して抗菌活性を示すがすべてのグラム陽性菌に対して抗菌性を示すわけでもない (Cotter et al, 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; 石橋ら, 2011)。今回米のとぎ汁発酵液の増殖抑制活性に関して検討した細菌の種類はまだ少ないが、米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌に特異的であるのか否かについては、今後さらに多くの細菌を用いての検討が必要である。

第5章 米のとぎ汁発酵液中の乳酸菌の単離とその性質

第1節 はじめに

福島 (2010) は、根拠は示されていないが、米のとぎ汁発酵液について乳酸菌の関与を示唆している。また本研究の第2章で、トマトかいよう病菌の増殖抑制を示す10日目頃にはそれまで認められなかったD-乳酸が生成していることを示しており、米のとぎ汁発酵液に乳酸菌が関与している可能性を示唆した。一方乳酸菌が植物病害を防除する例として、ハクサイの軟腐病に対して *Lactobacillus plantaru* が有効であることが報告され (津田ら, 2015 ; Tsuda et al., 2016)、生物農薬として実用化されている (津田ら, 2016)。本章では米のとぎ汁発酵液から乳酸菌の単離を試み、得られた乳酸菌がトマトかいよう病菌の増殖抑制に対して有効であるか否かについて検討した。

第2節 実験材料と方法

1. 米のとぎ汁発酵液の調製

第2章で述べた方法で米のとぎ汁発酵液を調製した。

2. 乳酸菌の単離

TYG 液体培地 (トリプトン 10 g/l、酵母エキス 5 g/l、グルコース 10 g/l、NaCl 5 g/l、pH 7.0) を調製し、オートクレーブ後 15 ml の滅菌済みプラスチック遠心管に 5 ml ずつ分注した。100 μ l の米のとぎ汁発酵液 (17 日目) を TYG 液体培地の入った前述の遠心管にとり、密栓して、30°C で 4 日間静置培養した。培養後の遠心管を遠心し、上澄みを除いた。沈殿した菌体に新しい TYG 液体培地を 5 ml 加えてよく懸濁し、その 100 μ l を別の TYG 液体培地 5 ml を入れた遠心管に移し、上記と同様に培養した。この培養操作を 5 回繰り返した後、TYG 液体培地に懸濁し、段階的に希釈して、TYG 寒天培地上を入れたシャーレに塗布し、30°C で 4 日間培養した。適切なコロニーが得られたシャーレのコロニーを TYG 液体培地に懸濁し、再び TYG 寒天培地 (TYG 液体培地に寒天 15 g/l) を入れたシャーレに塗布し、30°C で 4 日間培養した。シャーレ内のコロニーの形状、色調などが肉眼的に同一になったことを確認し、そのうちの一つのコロニーについて以下の乳酸菌であることの確認実験に使用した。

分離したコロニーを MRS 液体培地 (ペプトン 10 g/l、肉エキス 10 g/l、酵母エキス 4 g/l、グルコース 20 g/l、 K_2HPO_4 2 g/l、ツイーン 80 1 g/l、クエン酸三アンモニウム 2 g/l、酢酸ナトリウム 5 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g/l、pH 5.7) に懸濁し、シャーレに入れた MRS 寒天培地 (寒天 15 g/l) に塗布して 30°C で 48 時間嫌気培養した。この段階で乳酸菌とともに酵母と思わ

れるコロニーが存在したため、さらに MRS 寒天培地による分離を行い、乳酸菌と思われるコロニーを分離した。

3. 細胞の観察

単離したコロニーを実体顕微鏡下でコロニーの形態や色調を観察した。グラム染色はフェイバーG「ニッスイ」(日水製薬(株))を用いて行った。グラム染色後、光学顕微鏡で細胞形態などを観察した。

4. 16S rDNA の解析

DNA の単離、16S rDNA の解析は、(株) テクノスルガ・ラボにて行った。以下その概要を示す。単離した細菌からの DNA の抽出はアクロモペプチダーゼを用いる方法で行った。この DNA を鋳型にして、9F、1510R をプライマーとして(中川と川崎, 2001)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ(株))を用いて PCR を行った。得られた DNA 断片に対して、9F、536R をプライマーとし BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行ない、ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer System で塩基配列を決定した。相同性検索および分子系統解析は、アポロン DB-BA7.0 および GenBank/DDBJ/EMBL のデータベースを用いて行った。

5. 乳酸菌の培養と培養ろ液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定

単離した乳酸菌を MRS 液体培地にて 30℃ で 48 時間密栓して静置培養した後、培養液の上清を滅菌済みフィルター (0.2 μm , Advantec, 25AS020AS) でろ過し、無菌培養ろ液を得た。この培養ろ液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を、第 3 章に記した液体振とう培養法によって測定した。加熱処理培養ろ液は、乳酸菌培養液の無菌ろ液を沸騰水中 (100℃) で 10 分間加熱して調製した。

第 3 節 結果

1. 乳酸菌の単離と同定

培養開始 17 日目の米のとぎ汁発酵液から単離した乳酸菌と推測されるコロニーはやや黄色身を帯びており、グラム染色陽性であった(図 5-1、表 5-1)。また光学顕微鏡観察から短径 0.9-1.0 μm 、長径 1.5-2.5 μm の桿菌であった。

単離したコロニーを用いて、9F と 1510R のプライマーで 16S rDNA の 524 塩基の配列を決定した(図 5-3)。アポロン DB-BA7.0 データベースで *Lactobacillus fermentum* の基準株の配列と 99.6% の相動性を示した。国際塩基配列データベース (GenBank/DDBJ/EMBL) に対する相同性検索の結果、単離した細菌の塩基配列は、*Lactobacillus fermentum* の配列と 99.8% の相同性を示した(表 5-2)。そこで米

のとぎ汁発酵液から単離した乳酸菌は *Lactobacillus fermentum* であると推定した。図 5-1、表 5-1 に示した淡黄色のコロニー、グラム染色陽性で桿菌であることは *L. fermentum* であることと矛盾しない。

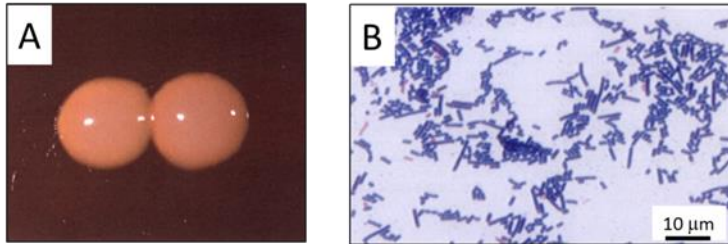


図 5-1 単離したコロニーとグラム染色像

(A) MRS 寒天培地上のコロニー。(B) グラム染色後の光学顕微鏡観察像。

表 5-1 単離したコロニーの性質

項目	結果
コロニー色調	淡黄色
細胞形態	桿菌 (0.9–1.0 × 1.5–2.5 μm)
グラム染色	陽性

2. *L. fermentum* 培養ろ液によるトマトかいよう病菌の増殖抑制

単離した *L. fermentum* を MRS 培地にて振とう培養し、その培養液の無菌ろ液のトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性を測定した。MRS 培地のみの添加でもトマトかいよう病菌の増殖を約 30%抑制したが、*L. fermentum* の培養ろ液を加えた場合トマトかいよう病菌の増殖を完全に抑制した (図 5-3)。従って *L. fermentum* の培養ろ液は、米のとぎ汁発酵液と同様にトマトかいよう病菌の増殖を抑制する活性があることがわかった。

MRS 培地で *L. fermentum* を振とう培養した後の培養ろ液を加熱処理したものは、加熱処理しなかった培養ろ液と同様にトマトかいよう病菌の増殖を完全に抑制した (図 5-4)。このことから *L. fermentum* が産生する抗菌物質は熱に対して安定であることがわかった。

```

SIID11149-B1 1:GATGAACGCCGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGTTGCCCAATTGATTGA 60
L. fermentum 1:GATGAACGCCGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGTTGCCCAATTGATTGA 60
*****

SIID11149-B1 61:TGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT 120
L. fermentum 61:TGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT 120
*****

SIID11149-B1 121:AGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAA 180
L. fermentum 121:AGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAA 180
*****

SIID11149-B1 181:ACGTTGTTGCGATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACC 240
L. fermentum 181:ACGTTGTTGCGATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACC 240
*****

SIID11149-B1 241:TGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAG 300
L. fermentum 241:TGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGTAAYGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAG 300
*****

SIID11149-B1 301:TTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAG 360
L. fermentum 301:TTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAG 360
*****

SIID11149-B1 361:CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGA 420
L. fermentum 361:CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGA 420
*****

SIID11149-B1 421:AGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTCA 480
L. fermentum 421:AGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTCA 480
*****

SIID11149-B1 481:TACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGC 524
L. fermentum 481:TACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGC 524
*****

```

図 5-3 単離した乳酸菌の塩基配列

単離した乳酸菌 (SIID11149-B1) とデータベース (アポロン DB-BA7.0) の *L. fermentum* 基準株の塩基配列。‡ は二者の間で同じ塩基を示す。囲みは配列が異なる塩基。

表 5-2 単離した乳酸菌の塩基配列と国際塩基配列データベース (GenBank/
DDBJ/EMBL) 上位 30 塩基配列の相同率

登録名	株名	Accession No.	相同率
Lactobacillus fermentum	30-149	HQ697614	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	KN02	HQ650232	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	CECT5716	CP002033	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	G65-6	HM058946	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	S34-1	HM058634	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB75-1	HM058241	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB51-1	HM058160	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB37-5	HM058119	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB37-2	HM058116	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB36-4	HM058114	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB32-4	HM058100	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGB32-1	HM058097	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	MGA48-7	HM057998	523/524 (99.8%)
Lactobacillus sp.	TBZ2	GU197388	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	IMAU70053	GQ131169	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	IMAU20050	FJ844970	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	NRIC0147	AB362628	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	NRIC0135	AB362616	523/524 (99.8%)
uncultured bacterium	-	AM234674	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	SFCB2-3	DQ399352	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	KLD	AF302116	523/524 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	SRJ-21	JN798180	522/524 (99.6%)
Lactobacillus fermentum	ZLG4-3-1	JF812168	522/524 (99.6%)
Lactobacillus fermentum	MGA48-2	HM057993	522/523 (99.8%)
Lactobacillus fermentum	NBRC3071	AB680002	522/524 (99.6%)
Lactobacillus fermentum	NBRC3961	AB680190	522/524 (99.6%)
Lactobacillus fermentum	-	FR873939	522/524 (99.6%)
Lactobacillus fermentum	-	FR873855	522/524 (99.6%)
Lactobacillus sp.	TRC7	JN860205	522/524 (99.6%)
Lactobacillus sp.	CF38	JF811579	522/524 (99.6%)

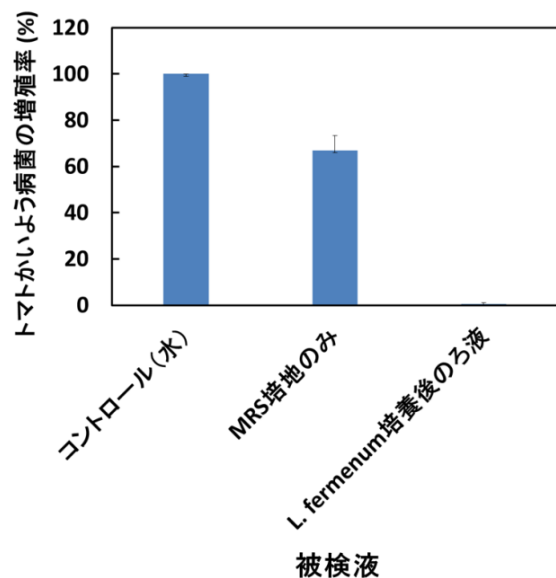


図 5-3 *L. fermentum* 培養ろ液のトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性

L. fermentum は MRS 培地で 30℃、48 時間振とう培養した。コントロールの被検液は水とした。また被検液として MRS 培地のみにについても活性測定を行った。実験は 3 連で行い、平均値と標準偏差で示した。

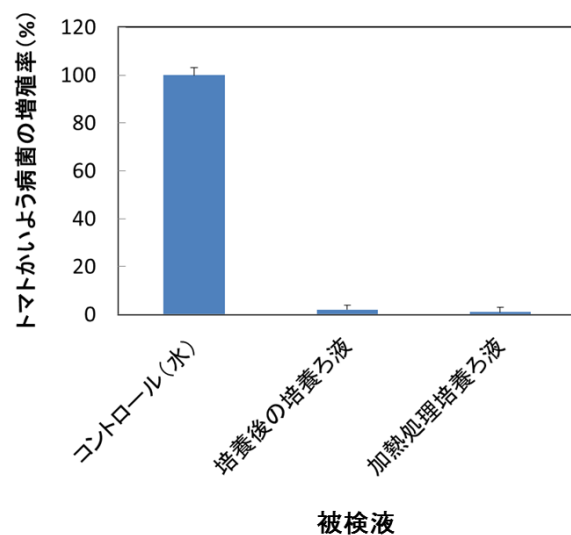


図 5-4 *L. fermentum* 培養ろ液の加熱処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に及ぼす影響

コントロールの被検液は水とした。培養後の培養ろ液は、*L. fermentum* を MRS 培地で 48 時間液体振とう培養したもの無菌ろ液。この培養ろ液を加熱処理（100℃、10 分間）を行って加熱処理培養ろ液とした。実験は 3 連で行い、平均値と標準偏差で示した。

3. *L. fermentum* 培養ろ液中の乳酸量

L. fermentum の培養ろ液中の乳酸量を測定した。*L. fermentum* の培養ろ液中には D-乳酸が 190 $\mu\text{mol/l}$ 、L-乳酸が 21 $\mu\text{mol/l}$ 含まれていた (図 5-5)。MRS 培地中にも乳酸が含まれており、D-乳酸が 47 $\mu\text{mol/l}$ 、L-乳酸が 3 $\mu\text{mol/l}$ であった。*L. fermentum* の培養中に培地中に D-乳酸が 143 $\mu\text{mol/l}$ 、L-乳酸が 18 $\mu\text{mol/l}$ 蓄積されたことになり、*L. fermentum* は L-乳酸よりも D-乳酸を多く生成することが推定される。

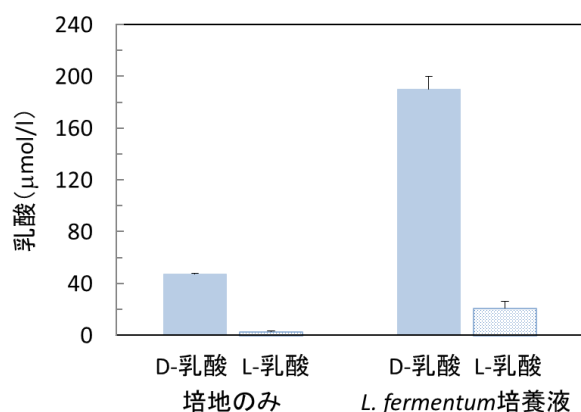


図 5-5 *L. fermentum* 培養後の MRS 培地中の乳酸量

MRS 培地および *L. fermentum* を 30°C、48 時間培養した後の培地の無菌ろ過液中の D-乳酸と L-乳酸を第 2 章で述べたキットを用いて定量した。実験は 3 連で行い、平均値と標準偏差で示した。

第 4 節 考察

米のとぎ汁発酵液から乳酸菌 *L. fermentum* を単離した。これまで米のとぎ汁発酵液には乳酸菌が関与しているといわれていた (福島, 2010) が、今回初めて米のとぎ汁発酵液中に乳酸菌が存在することを明らかにした。今回 *L. fermentum* を見い出したが、これ以外の属・種の乳酸菌が米のとぎ汁発酵液中に存在する可能性は十分にある。特に米のとぎ汁発酵液の異なるロットや培養の経過とともに乳酸菌の属・種が異なってくる可能性がある。米のとぎ汁発酵液と乳酸菌の種類については今後研究する必要がある。米のとぎ汁発酵液および *L. fermentum* 培養液中に D-乳酸が優先して存在していたことは、米のとぎ汁発酵液に乳酸菌が関与していることと一致する。

今回単離した *L. fermentum* を MRS 培地にて培養して得られた培養ろ液が米のとぎ汁発酵液と同様にトマトかいよう病菌に対して増殖抑制活性を持つこと、

培養ろ液を加熱処理しても増殖抑制活性を保持していることが確認された (図 5-3、図 5-4)。これらの結果は、米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質は *L. fermentum* の培養液に含まれている増殖抑制物質と同一である可能性を示唆している

乳酸菌が抗菌物質であるバクテリオシンを生産することは広く知られており (Rogers, 1928 ; 乳酸菌研究集談会編, 1996 ; Cotter et al, 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; 日本乳酸菌学会編, 2010 ; 石橋ら, 2011)、Cotter らによってその分類が整理された (Cotter et al, 2005)。一般的に乳酸菌が生成するバクテリオシンはグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すことが多い (Schillinger and Lücke, 1989 ; 乳酸菌研究集談会編, 1996 ; Cotter et al., 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; Rajaram, 2010 ; 石橋ら, 2011 ; Punyappa-path et al., 2015)。産業的に重要な乳酸菌が生成するバクテリオシンとしてナイシン A があり (Rogers, 1928 ; Cotter et al, 2005 ; 佐藤と小磯, 2009 ; 益田ら, 2010 ; 石橋ら, 2011)、グラム陽性菌に対して強い抗菌力を示し、食品の保存料としての使用が日本を含む 50 ヶ国以上で認可されている。これらのことを踏まえると、米のとぎ汁発酵液でもバクテリオシンをはじめとする乳酸菌由来の抗菌物質が機能している可能性が高い。一方乳酸菌が乳酸、酢酸、有機酸、ジアセタールなどの低分子抗菌物質を生成することも古くから報告されている (井上, 2004)。乳酸や有機酸の存在そのものあるいはそれに由来する低 pH がトマトかいよう病菌の増殖を抑制する可能性については、第 3 章ですでに述べたようにその可能性はほとんどないと考えてよい。

第6章 米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制物質の探索と性質

第1節 はじめに

これまでの結果から米のとぎ汁発酵液にはトマトかいよう病菌の増殖を抑制する熱に安定な物質が含まれていることが明らかになった。また米のとぎ汁発酵液中に乳酸菌が存在することも明らかになり、この増殖抑制物質と乳酸菌の関連にも興味を持たれる。乳酸菌にはこれまでに述べてきたように抗菌活性を有するポリペプチド性のバクテリオシンと低分子の抗菌物質を生成することが報告されている（乳酸菌研究集談会編，1996；Cotter et al, 2005）。そこで本章では、米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の探索と精製を試み、またその性質について検討した。

第2節 実験材料と方法

1. 米のとぎ汁発酵液の調製

第2章で述べた方法で調製した。

2. 米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制物質の分画

70日間培養した米のとぎ汁発酵液 600 ml を 5,000 *g* で 15 分間遠心分離した後、上清を取りだし、菌体除去発酵液（A）とした。得られた上清をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、乾固した。乾固した発酵液に純水 100 ml を加え、沈殿を溶かした（B：濃縮発酵液）。再溶解した発酵液を透析チューブ（分画分子量：3,500）に入れ、外液の純水を2回交換しながら12時間透析を行なった。透析チューブ内の液を取り出し、これを透析後発酵液（C）と名付けた。透析した発酵液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、得られた固形物にクロロホルム/メタノール（2：1）を加えてガラス棒で固形物を粉砕しながらよく洗浄した。次いで内容物を遠心管に移し、5,000 *g* で 15 分間遠心分離した。上清を除去し、残った沈殿にクロロホルム/メタノール（2：1）を再び加えて沈殿をよく洗浄した後、再度遠心分離して上清を除去、沈殿を回収した。この脱脂操作を合わせて3回繰り返した。最後に得られた沈殿中に含まれているクロロホルム/メタノールを完全に除去するため、ロータリーエバポレーターにて乾固した。乾固した沈殿に純水 100ml 加えて沈殿をよく溶かした（D：脱脂発酵液）。

これまでの操作で得られた発酵液の画分（A、菌体除去発酵液；B、濃縮発酵液；C、透析後発酵液；D、脱脂発酵液）はトマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定に供した。

3. 脱脂発酵液の Toyopearl DEAE-650M による分画

前項 2 と同じ方法で、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を十分有していた培養 60 日目の米のとぎ汁発酵液から脱脂発酵液を調製した。この脱脂発酵液を Toyopearl DEAE-650M を用いてバッチ法で分画を行った。特に記述の無い限り、Toyopearl DEAE-650M への吸着・溶出操作は 4℃で行った。

脱脂発酵液 20 ml に 20 ml の Toyopearl DEAE-650M 樹脂をいれてゆっくりと攪拌した。その後、1,000 g で 10 分間遠心分離を行ない、上清を回収した。残った樹脂に 5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.2) を 20 ml 加え攪拌した後遠心分離 (1,000 g, 10 分間) して上清を回収した。この洗浄操作を合わせて 2 回繰り返した。回収した上清を合わせ、“未吸着画分”として以下の分析に供した。

遠心管に残った樹脂に 0.5 M NaCl を含む 5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) を 20 ml 加え、よく攪拌後遠心分離 (1,000 g, 10 分間) を行った。上清を回収し、残った樹脂に 0.5 M NaCl を含む 5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) を 20 ml 加えた。よく攪拌した後遠心分離 (1,000 g, 10 分間) を行い上清を回収した。回収した上清は合わせて 0.5 M NaCl 溶出画分とした。

遠心管に残った樹脂に 1 M NaCl を含む 5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) を 35 ml 加えてよく攪拌した後、遠心分離 (1,000 g, 10 分間) を行った。上清を回収し、遠心管に残った樹脂に再度 1 M NaCl を含む 5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) を少量加えてよく攪拌した後遠心分離 (1,000 g, 10 分間) を行なった。再度同じ洗浄操作を行い、上清を得た。得られた上清は合わせて “1 M NaCl 溶出画分”とした。

未吸着画分、0.5 M NaCl 溶出画分、1 M NaCl 溶出画分は透析チューブ (分画分子量 : 3,500) を用いて純水に対して透析を行った。透析後の各画分はロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、純水 20 ml に溶かしてトマトかいよう病菌の増殖抑制活性測定に供した。

4. 脱脂発酵液のプロテアーゼ処理

トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の性質検討のため、十分なトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を有していた 30 日間培養した米のとぎ汁発酵液から脱脂発酵液を調製した。ただし脱脂後の粉体は 20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.0) に溶解した。この脱脂発酵液を用いて、プロテアーゼに対する感受性を検討した。

プロテアーゼは、*Tritirachium album* 由来のプロティナーゼ K (EC 3.4.21.14、和光純薬工業、169-21041)、豚膵臓由来トリプシン (EC 3.4.21.4、和光純薬工業、201-19181)、パパイヤラテックス由来パパイニン (EC 3.4.22.2、Sigma、P-3125)

を用いた。

それぞれのプロテアーゼを最終タンパク質濃度 0.1 mg/ml となるように脱脂発酵液に加えた後、30℃で 24 時間インキュベーションした。それぞれの処理液を 100℃で 10 分間加熱して酵素を失活させた後、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を液体振とう培養法で測定した。

5. SDS-PAGE と CBB 染色

20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE は定法に従って以下の条件で行った。泳動バッファの組成は以下の通り： 25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1% (w/v) SDS。サンプルバッファは 12.5 ml の 62.5 mM Tris-HCl バッファ (pH 6.8) に SDS 2 g、グリセロール 10 ml、ブロモフェノールブルー 10 mg、2-メルカプトエタノール 5 ml を加え、純水で 100 ml としたものを使用した。泳動後のゲルは、CBB R-250 1 g に 400 ml のメタノール/酢酸/水 (5 : 1 : 4, v/v) を加えてよく攪拌して調製した CBB 染色液を用いて染色した。脱色液はメタノール/酢酸/水 (5 : 7 : 88, v/v) を使用した。マーカーは、低分子領域マーカー (Sigma-Aldrich)、高分子領域マーカー (和光純薬工業)、アプロチニン、子牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

6. SDS-PAGE と細胞増殖抑制活性可視化法

20% SDS-ポリアクリルアミドゲルの左右に同じサンプルをチャージして SDS-PAGE を行った。電気泳動終了後のゲルを切り分け、一方は CBB 染色を行なってタンパク質バンドの確認を行った。他の一方はトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の確認のため以下の操作を行なった。切り離したゲルは 20% メタノールで 3 回洗浄を行った後、トマトかいよう病菌培養液 50 μ l を薄く一様に塗布した PS 寒天培地上に乗せ、30℃で 24 時間でインキュベーションした。このゲルを黒い紙を背景にして写真撮影した。トマトかいよう病菌が増殖していない領域は背景の黒い紙が写って、写真上では黒い領域として認識できる。この方法を細胞増殖抑制活性可視化法と呼ぶ。

第3節 結果

1. トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の精製

米のとぎ汁発酵液の精製の初期段階として、菌体除去、濃縮、透析、脱脂の各操作を行い、各段階でトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定した。米のとぎ汁発酵液には培養後もとぎ汁由来の難溶性物質、牛乳のカゼイン由来のタンパク質の沈殿、菌体などが存在していた。そこで遠心操作によって菌体を取り除き菌体除去発酵液 (A) を得た。この菌体除去発酵液には元のとぎ汁発酵液

同等のトマトかいよう病菌増殖抑制活性が認められた (図 6-1)。菌体除去発酵液を濃縮乾固・再溶解によって濃縮発酵液 (B) を得た。濃縮発酵液にも十分高い増殖抑制活性が認められた (図 6-1)。濃縮乾固の際に留去した液体について増殖抑制活性を調べたが活性は認められなかった。この濃縮発酵液 (B) を透析することによって低分子物質を取り除いた。透析後の溶液 (透析後発酵液 : C) についてトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を測定したところ、十分に高い活性を有していた (図 6-1)。透析外液を濃縮して増殖抑制活性を測定したが、活性はほとんど認められなかった。このことは増殖抑制物質の分子サイズが 3.5 kDa 以上であることを示している。透析後脱脂操作を行い、脱脂発酵液 (D) を得た。脱脂発酵液にもトマトかいよう病菌の増殖抑制活性が認められた (図 6-1)。脂質抽出に用いたクロロホルム/メタノール画分を濃縮乾固後、水に溶解させた溶液には増殖抑制活性は認められなかった。今回用いた精製法の各段階で高いトマトかいよう病菌の増殖抑制活性が認められた。

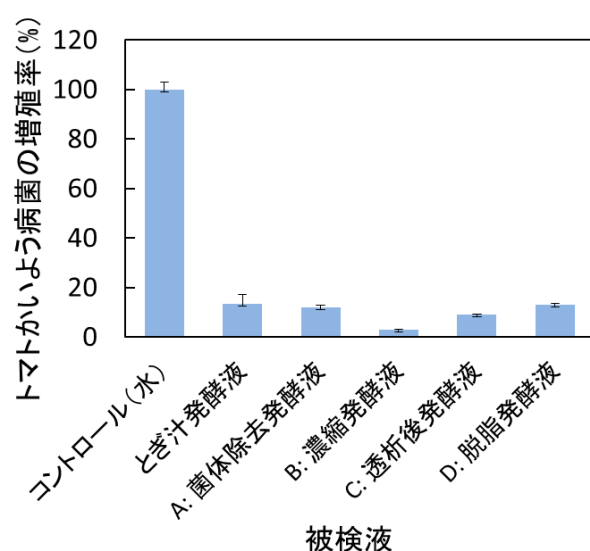


図 6-1 米のとぎ汁発酵液の各精製段階のトマトかいよう病菌増殖抑制活性

70 日間培養した米のとぎ汁発酵液の結果を示した。コントロールでは水を被検液として用いた。A～D は精製の各過程で得られた発酵液。3 連の測定の結果を平均値と標準偏差で表した。

2. トマトかいよう病菌の増殖抑制物質の陰イオン交換樹脂による分画

60 日間培養した米のとぎ汁発酵液から調製した脱脂発酵液を Toyopearl DEAE-650M を用いてバッチ法で分画し、未吸着画分、0.5M NaCl 溶出画分、1.0 M NaCl 溶出画分を得た。溶出に用いた 5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.2)、

0.5 M NaCl を含む 5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.2)、1.0 M NaCl を含む 5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.2) は、トマトかいよう病菌の増殖に影響を与えなかった。未吸着画分、0.5 M NaCl 画分、1 M NaCl 画分を透析・濃縮した後、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を調べた。いずれの画分もトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性を有していた (図 6-2)。

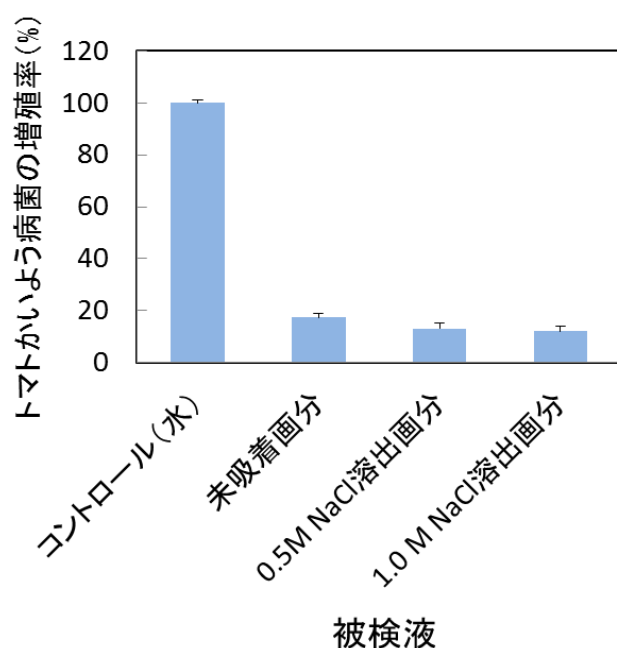


図 6-2 Toyopearl DEAE-650M で分画した各画分がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

60 日間培養した米のとぎ汁から調製した脱脂発酵液を本実験に用いた。コントロールは被検液として水を用いた。測定は 3 連で行い、平均値と標準偏差で示した。

3. プロテアーゼ処理がトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に与える影響

30 日間培養した脱脂発酵液に対してプロティナーゼ K、トリプシン、パパイイン処理を行った。酵素処理は酵素の至適 pH の近傍の pH 8.0 で行った。プロテアーゼ処理後の脱脂発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を調べたところ、プロティナーゼ K とパパイイン処理で発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性が失われ、トマトかいよう病菌は増殖した (図 6-2)。トリプシン処理はトマトかいよう病菌の増殖抑制活性に対して影響を与えなかった。

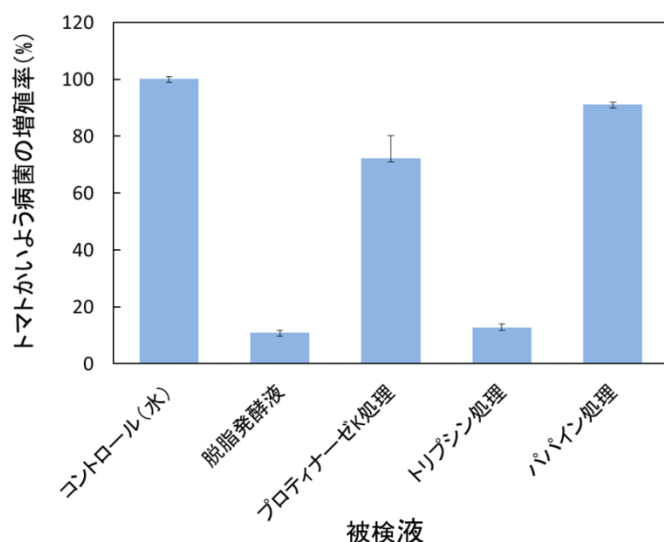


図 6-3 脱脂発酵液のプロテアーゼ処理がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

30 日間培養したとぎ汁発酵液から調製した脱脂発酵液を用いた。コントロールでは被検液として水を用いた。プロテイナーゼ K 処理、トリプシン処理、パパイン処理はそれぞれのプロテアーゼで処理した脱脂発酵液を示す。測定は 3 連で行い、平均値と標準偏差で表した。

本実験で用いたプロテアーゼの性質は以下のように報告されている。トリプシンは動物の子牛や豚の膵臓から精製 (Northrop and Kunitz, 1931) されており、至適 pH は 8.0 付近である (Higaki and Light, 1985)。ペプチド結合、アミド結合、エステル結合しているアルギニンとリシン残基のカルボキシ側を加水分解する (八木ら、2008)。プロテイナーゼ K は *Tritirachium album* のプロテアーゼである。至適 pH は 7.5~12 である (Ardelt and Laskowski, 1985)。変性タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、アミノ酸エステルに対して広い切断活性を持っている (Ebeling et al, 1974 ; Hilz et al, 1975)。パパインはパパイアの乳液から精製され、至適 pH は 6.0~7.5 である (Sluyterma and Wijdenes, 1972)。ペプチド結合に対し広い特異性を示すプロテアーゼであり、アルギニン、リシン、ヒスチジン残基のカルボキシ側などを優先的に加水分解する (Arnon, 1970 ; Kimmel and Smith, 1954)。

脱脂発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質は切断部位特異性の低いプロテアーゼ (パパイン、プロテイナーゼ K) 処理によってその増殖抑制活性を失うことが分かった。この結果は、発酵液中の増殖抑制物質の主要な成分がペプチドであることを示している。

4. SDS-PAGE による分子量の推定

培養日数 60 日目のとぎ汁発酵液から調製した脱脂発酵液を用いて Toyopearl DEAE-650M で分画した未吸着画分、0.5 M NaCl 溶出画分、1 M NaCl 溶出画分を SDS-PAGE に供した。その結果を図 6-4 に示した。CBB 染色の結果、未吸着画分、0.5 M NaCl 溶出画分、1 M NaCl 溶出画分のどの画分においても複数のバンドが観察され、Toyopearl DEAE-650M の段階ではトマトかいよう病菌の増殖抑制物質が単一に精製されていないことが分かった。

CBB 染色後のバンド観察の結果、全画分に 6.5 kDa 以下の領域に共通のバンドが認められ、未吸着画分と 0.5 M NaCl 溶出画分には 10 kDa およびそれ以下の領域に共通のバンドが認められ、0.5 M NaCl 溶出画分と 1 M NaCl 溶出画分では 15 kDa 付近および 6.5 kDa 以下の領域に共通のバンドが認められた（図 6-4）。そこで SDS-PAGE 後のゲル上で増殖抑制物質の存在を確認する方法を試みた。

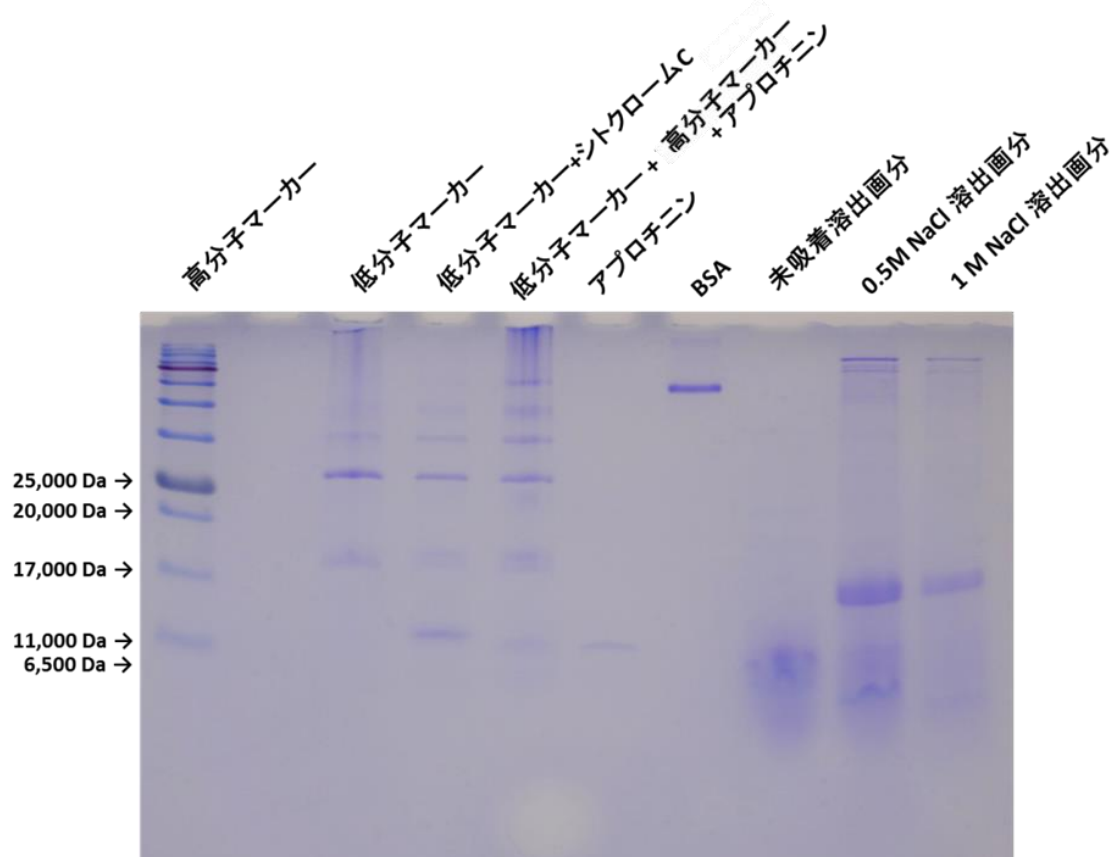


図 6-4 脱脂発酵液を Toyopearl DEAE-650M で分画した画分の SDS-PAGE

60 日間培養した米のとぎ汁発酵液から調製した脱脂発酵液を、Toyopearl DEAE-650M を用いて未吸着画分、0.5 M NaCl 溶出画分と 1 M NaCl 溶出画分に分画した。各画分を分子量マーカーとともに泳動し、CBB 染色を行った。

5. SDS-PAGE ゲル上のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の確認

トマトかいよう病菌の増殖抑制物質がない場合、PS 寒天培地にトマトかいよう病菌を塗布するとトマトかいよう病菌が増殖して透明な培地が白く濁ってくる。しかしゲルに増殖抑制物質が含まれている領域では寒天培地のトマトかいよう病菌が増殖しないため該当する領域の寒天培地は透明のままである。この寒天培地を黒い紙を背景にして写真撮影すると増殖抑制物質が存在する領域が黒いバンドとなって可視化できることを確認した。この方法を細胞増殖抑制活性可視化法と称した。Toyopearl DEAE-650M で分画した画分の SDS-PAGE を行ない、CBB 染色と細胞増殖抑制活性可視化法に供した。

CBB 染色の結果は図 6-5 および図 6-6 に示したようにほぼ同じであった。ただ図 6-6 では CBB 染色が弱かったため、検出されたバンドは薄く、バンド数も少なかった。細胞増殖抑制活性可視化法によって未吸着溶出画分、1.0 M NaCl 溶出画分のトマトかいよう病菌に対する増殖抑制活性が存在する領域が確認された（図 6-5、図 6-6）。

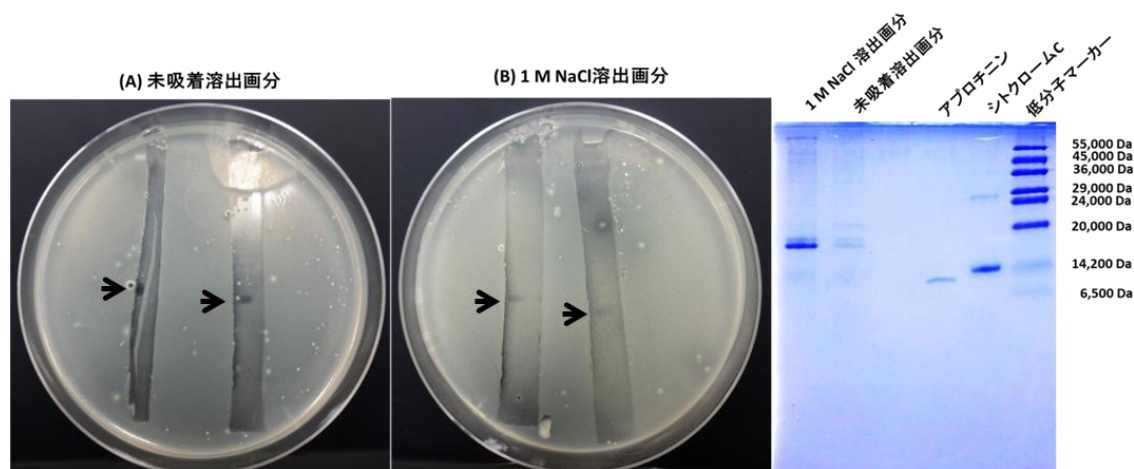


図 6-5 脱脂発酵液を Toyopearl DEAE-650M で分画した画分の SDS-PAGE のゲルの CBB 染色と細胞増殖抑制（その 1）

60 日間培養した米のとぎ汁発酵液から脱脂発酵液を調製し、さらに Toyopearl DEAE-650M を用いて未吸着画分、0.5 M NaCl 溶出画分と 1 M NaCl 溶出画分に分画した。図の右側に示のように未吸着画分、1 M NaCl 溶出画分、分子量マーカーをロードし、さらに未吸着画分、1 M NaCl 溶出画分を残りの複数レーンにロードして SDS-PAGE を行なった。分子量マーカーと未吸着画分、1 M NaCl 溶出画分のある部分のゲルを切り話し CBB 染色した（図の右側）。別の未吸着画分、1 M NaCl 溶出画分のレーンはゲルから切り離し、各レーンを細胞増殖抑制活性可視化法に供した（図の右側シャーレ A と B）。矢印は細胞増殖抑制活性可視化法によって可視化された領域を示す。

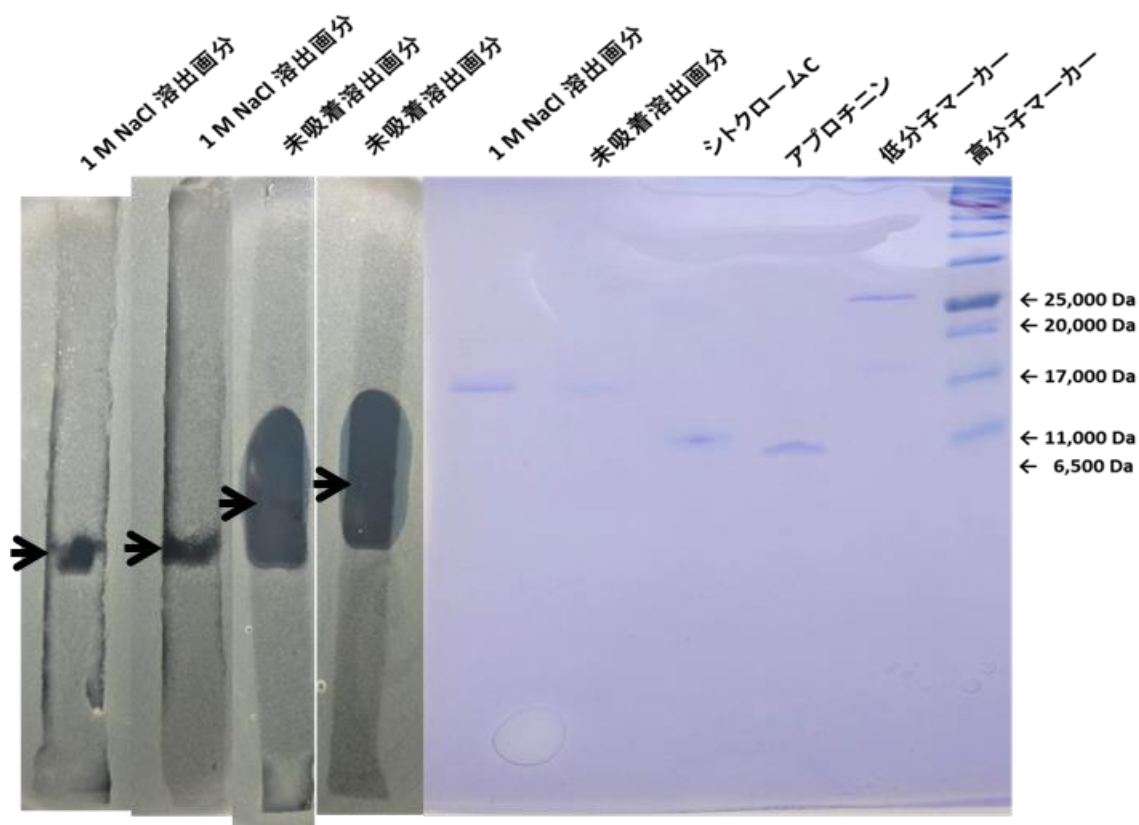


図 6-6 脱脂発酵液を Toyopearl DEAE-650M で分画した画分の SDS-PAGE のゲルの CBB 染色と細胞増殖抑制活性（その 2）

図 6-5 と同じ試料を SDA-PAGE し、CBB 染色（右側ゲル）と細胞増殖抑制活性可視化法（図左側の 4 レーン）に供した。ゲルに示した矢印は細胞増殖抑制活性可視化法によって可視化された領域を示す。

従って増殖抑制物質の分子サイズは 6,5 kDa 以下であると推定された。分画分子量が 3,500 の透析チューブを用いて透析していることと合わせ考えるとトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の分子サイズは 3.5~6.5 kDa の範囲であると推定した。しかし図 6-5 及び図 6-6 からわかるように CBB 染色では対応する明確なバンドは確認されなかったため、増殖抑制物質の量は極めて少ないと考えられる。

第 4 節 考察

本研究で行った精製方法のみではトマトかいよう病の増殖抑制物質の単離はできなかった。しかし細胞増殖抑制活性可視化法を考案することによって、米

のとき汁発酵液の増殖抑制物質の分子サイズが 3.5~6.5 kDa の範囲にあることを示すことができた (図 6-5、図 6-6)。低分子有機酸やジアセチルなどが乳酸菌の生成する抗菌物質として報告されている (乳酸菌研究集談会編、1996 ; 井上、2004)。しかし脱脂処理に至るまでの精製過程で、透析を行ったところ透析内液に増殖抑制活性が存在した為、発酵液中に含まれる分子サイズが 3,5 kDa 以下の抗菌物質は除去されているはずである (図 6-1)。また乳酸や酪酸がトマトかいよう病菌の増殖を抑制しないことは第 3 章で述べた。脱脂発酵液のプロテナーゼ K あるいはパパイン処理によって増殖抑制活性が失活することが確認された (図 6-3)。これら本研究で得られた結果から、米のとき汁発酵液中に含まれるトマトかいよう病菌の増殖抑制物質は、分子サイズが 3.5~6.5 kDa で熱に安定なペプチド性の物質であることが分かった。乳酸菌が生成する抗菌性ペプチド、バクテリオシンである可能性が高いと考えている。ただ現在得られている結果から、米のとき汁発酵液中のペプチド性抗菌物質が 1 種類なのか複数種類から構成されているのかについては不明であり今後の研究が必要である。さらに今回の精製方法では精製過程で活性の損失が高く、ロットによっては精製途中で活性が失われることもあった。今後効率の良い精製法の検討が必要である。

第7章 米のとぎ汁および牛乳の代替品による発酵液の調製とトマトかいよう病菌の増殖抑制活性

第1節 はじめに

米のとぎ汁と牛乳から調製した発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を抑制することは第3章で確認した。米のとぎ汁そのものは廃棄物であり、その使用に際してコストは発生しない。しかし恒常的に、場合によっては大量に入手しようとする場合にとぎ汁の入手に困難が生じることが予想される。一方、牛乳は我々の貴重なタンパク質をはじめとする栄養供給源である食品であるとともにバター、チーズなど乳製品製造の際の原料でもある。米のとぎ汁発酵液の調製に使用するには難がある。また一般的には購入しなければならずコストが発生する。そこで米のとぎ汁と牛乳の代替素材について検討することにした。

玄米は通常精米されて精白米として使用する。米ぬかとは、玄米（白度、17～20%）を精白米（白度、約40%）へと精米する際にとれる果皮、種皮、糊粉層のことを指す（佐々木，2016）。精白米の歩留まりは90～91%である。しかし精白米にはわずかではあるが粘着性の高いぬかが残留している。精白米をさらに精米し、この残留しているぬかを除去すると無洗米（白度、約45%あるいはそれ以上）が得られる（北尾ら，1998；佐々木，2016）。この残留しているぬかの呼称は精米機メーカーによって異なり、肌ぬか、微粉ぬか、残留ぬかなどと呼ばれている。例えば、東洋ライス株式会社ではBG無洗米調製時に排出されるぬかを“肌ぬか”と呼んでいる（東洋ライス株式会社，2014）。従って、本論文ではこれらのぬかを総称して無洗米ぬかと呼ぶことにした。

精白米を炊飯する前に米をとぐが、このとぎ汁は環境への負荷が大きいことが知られている（山田ら，1988；白杉ら，2003；鈴木，2006；三神ら，2011；佐々木，2016）。無洗米の使用は炊飯にあたってとぐ必要がなくなり、環境負荷の低減にもなる（白杉ら，2003；鈴木，2006；三神ら，2011；佐々木，2016）。

表 7-1 玄米、精白米、米ぬかの 100 g 当りの主要成分

種 類	エネルギー (kcal)	水 分 (g)	タンパク質 (g)	脂 質 (g)	炭水化物 (g)	灰 分 (g)	ビタミンB群 (mg)
玄米	353	14.9	6.8	2.7	74.3	1.2	0.90
精白米	358	14.9	6.1	0.9	77.6	0.4	0.22
米ぬか	412	10.3	13.4	19.6	48.8	7.9	6.60

日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)より抜粋・作成

精白米のとぎ汁には無洗米ぬかに相当するものが含まれていると考えられる。玄米、精白米、米ぬかの成分を表 7-1 に示した。米のとぎ汁の代替品として、米ぬか、無洗米ぬかが考えられる。

牛乳の代替素材としては脱脂粉乳とホエーが考えられる。日本の乳牛は 95 % がホルシュタイン種である。ホルシュタイン種の牛乳の全乳固形成分は 12 % であり、そのうちタンパク質は概ね 3.1%である。脱脂粉乳はバターやクリームなどを分離したあとの液体を乾燥したものであり、脂質含量が低下しているが、栄養化は高い。ホエーは牛乳からカゼインを取り出したり、チーズを製造した後の乳清と呼ばれる液体である。牛乳の栄養価の約 50%がホエーに残っており、ホエーの全固形分は 60~70 g/l、タンパク質、カルシウム、乳糖などを含んでいる（斎藤ら、2008）。ホエーは過去には廃棄されていたが、現在では日本の大手乳業メーカーはホエーのほとんどを乾燥粉末化して、製菓、乳飲料、栄養補助食品などの幅広い分野への販路を開拓しつつある（斎藤ら、2008）。脱脂粉乳、ホエー粉末の組成を表 7-2 に示した。

表 7-2 牛乳、脱脂粉乳、ホエー粉末の 100 g 当りの主要成分

種 類	エネルギー (kcal)	水分 (g)	タンパク質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)	灰分 (g)	ビタミンB群 (mg)
普通牛乳	67	87.4	3.3	3.8	4.8	0.7	0.22
脱脂粉乳	359	3.8	34.0	1.0	53.3	7.9	2.17
ホエー粉末	362	2.2	12.5	1.2	77.0	7.1	2.82

日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)より抜粋・作成

表 7-3 ダイズ、おからの 100 g 当りの主要成分

種 類	エネルギー (kcal)	水分 (g)	タンパク質 (g)	脂 質 (g)	炭水化物 (g)	灰 分 (g)	ビタミンB群 (mg)
黄大豆	422	12.4	33.8	19.7	29.5	4.7	1.48
おから(生)	111	75.5	6.1	3.6	13.8	1.0	0.20
おから(乾燥)	421	7.1	23.1	13.6	52.3	3.8	0.76

日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)より抜粋・作成

おからは豆乳や豆腐製造時にでる残渣である。水溶性成分は豆乳に移行するが、難溶性の成分はおからに残っている。表 7-3 にその成分を示した。

本章では、米のとぎ汁の代替素材として米ぬかと無洗米ぬかを、牛乳の代替素材として脱脂粉乳、ホエー（液体および粉末）、おからを取りあげ、とぎ汁と牛乳を含めて様々な組み合わせで米のとぎ汁発酵液あるいは米のとぎ汁発酵液類似品を調製した。次いで、それぞれの発酵液についてトマトかいよう病菌の増殖抑制活性について検討した。

第2節. 材料と方法

1. 材料

無洗米ぬか 1（肌ぬか）は株式会社京山から、精白米から白度約 45%まで搗精した際の無洗米ぬか 2 および通常の精白米調製時の米ぬかはひのまる工房・中野精米所から得た。

脱脂粉乳は市販の“北海道スキムミルク”（雪印メグミルク株式会社製）を使用した。ホエー（液体）は株式会社北海道酪農公社のクリームチーズを製造する際にできるホエーを使用した。ホエー粉末は健康生活研究所（株式会社自然健康社）から販売されている株式会社明治製のものを使用した。おからは亀岡市内の豆腐製造販売店から入手した。

2. 米のとぎ汁発酵液の調製

米のとぎ汁代替品の使用量は以下のように算出して。玄米 1000 g を精米して精白米とする場合の歩留まりは 90～91%なので、1000 g 精白米に対して 100 g の米ぬかが得られるとした（佐々木、2016）。精白米 1000 g から無洗米ぬか（肌

表 7-4 代替素材を用いた発酵液の組成（総容量 2000 ml）

名 称	とぎ汁およびその代替品	牛乳およびその代替品
とぎ汁+牛乳（とぎ汁発酵液）	米のとぎ汁(1600 ml)	牛乳(400 ml)
とぎ汁+脱脂粉乳	米のとぎ汁(1600 ml)	脱脂粉乳40 g+水(400 ml)
とぎ汁+ホエー（液体）	米のとぎ汁(1600 ml)	ホエー(400 ml)
とぎ汁+ホエー粉末	米のとぎ汁(1600 ml)	ホエー粉末24 g+水(400 ml)
米ぬか+牛乳	米ぬか(20 g)+水(1600 ml)	牛乳(400 ml)
無洗米ぬか1(9)+牛乳	無洗米ぬか1(9 g)+水(1600 ml)	牛乳(400 ml)
無洗米ぬか1(18)+牛乳	無洗米ぬか1(18 g)+水(1600 ml)	牛乳(400 ml)
無洗米ぬか1(9)+ホエー粉末	無洗米ぬか1(9 g)+水(1600 ml)	ホエー粉末24 g+水(400 ml)
無洗米ぬか2(9)+ホエー粉末	無洗米ぬか2(9 g)+水(1600 ml)	ホエー粉末24 g+水(400 ml)

ぬか) は 15~30 g 得られると報告されている(鈴木, 2006; 東洋ライス株式会社, 2014)。無洗米ぬかは、この報告に基づいて表 8-4 に示した量を使用した。牛乳代替品についての使用量は以下のように設定した。脱脂粉乳は乳固形分量、カゼイン含量などから牛乳 1000 ml に相当する脱脂粉乳量は 100 g とした。ホエー粉末は、ホエー中の固形成分が 6~7% であることより牛乳 1000 ml に相当する脱脂粉乳量は 60 g とした。なおホエー(液体)は牛乳と同じ量を使用した。代替素材を用いた主な発酵液の組み合わせ組成を表 8-4 に示した。発酵液の調製は 2,000 ml で行うことを基本としたが、試料の入手状況によっては 500 ml 規模でも行なった。

3. トマトかいよう病菌の増殖抑制活性の測定

第 3 章、第 2 節に記した液体振とう培養法でトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を調べた。

第 3 節 結果

米のとぎ汁の代替品について、米ぬか、無洗米ぬかについて検討した。精白米 600 g に相当するぬか 60 g と牛乳を使って 2000 ml の発酵液を調製したところ、培養後に無菌ろ過液を収集することが困難であった。そこでぬかの添加量を 20 g として培養を行って無菌培養ろ液を得、トマトかいよう病菌の増殖抑制活性を検討した。図 7-1 に示したように米ぬかで調製した発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性は低かった。無洗米ぬか 1 (BG 精米の肌ぬか) を用いた場合、600 g の精白米のとぎ汁相当の 18 g、及びその半量の 9 g ともトマトかいよう病菌の増殖をほぼ完全に抑制し、高い増殖抑制活性を示した(図 7-1)。

牛乳代替品については、脱脂粉乳とホエー、おからについて検討した。とぎ汁と脱脂粉乳、とぎ汁とホエー(液体)、とぎ汁とホエー粉末のいずれの組合せでもトマトかいよう病菌の増殖を強く抑制した(図 7-2)。しかしとぎ汁とおからの混合物では培養後の培養液の pH は 3.7 まで低下したものの、気体の発生も認められず、発酵はほとんど進まなかった。またトマトかいよう病菌の増殖もほとんど抑制されなかった。

とぎ汁代替品および牛乳代替品の結果から、無洗米ぬかとホエー粉末の組合せについて検討した。無洗米ぬか 1 あるいは無洗米ぬか 2 とホエー粉末の組合せで調製した発酵液は、トマトかいよう病菌の増殖に対して高い増殖抑制活性を示した(図 7-3)。

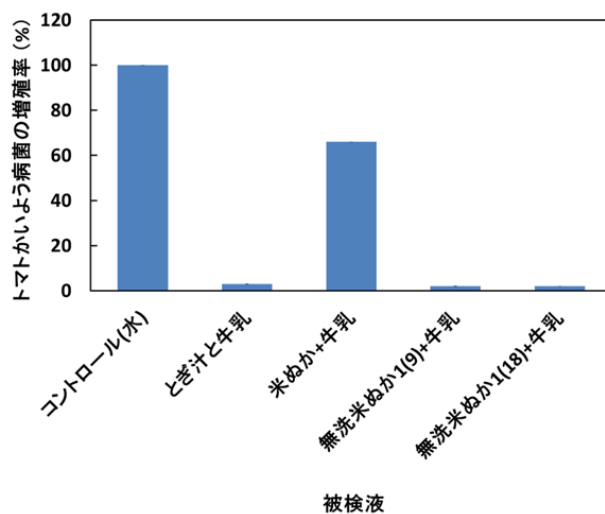


図 7-1 米のとぎ汁代替素材を使用して調製した発酵液のトマトかいよう病菌増殖抑制活性

トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は液体振とう培養法で測定した。用いたとぎ汁発酵液（とぎ汁と牛乳）、米ぬかと牛乳の発酵液は培養 16 日目のものを、無洗米ぬか 1 と牛乳の発酵液は培養 18 日目のものを使用した。測定値は 3 連の実験の平均値と標準偏差で示した。

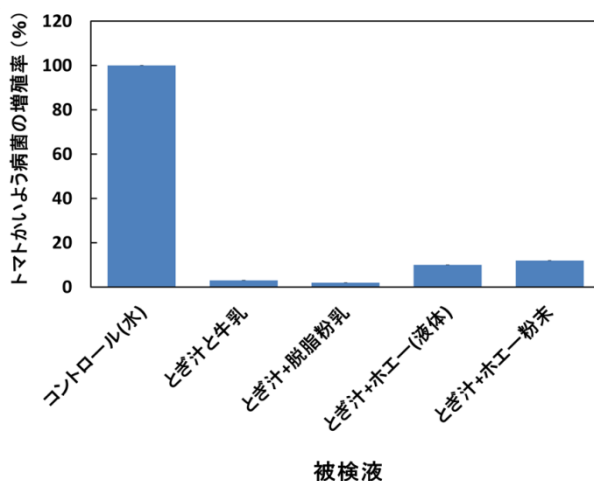


図 7-2 牛乳代替素材を使用して調製した発酵液のトマトかいよう病菌増殖抑制活性

トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は液体振とう培養法で測定した。用いたとぎ汁発酵液（とぎ汁と牛乳）は培養 16 日目のものを、とぎ汁と脱脂粉乳の発酵液は培養 20 日目、無洗米ぬか 1 (9 g) と牛乳の発酵液は培養 18 日目のものを使用した。とぎ汁とホエー（液体）発酵液は培養 55 日目、とぎ汁とホエー粉末発酵液は培養 16 日目のものを使用した。測定値は 3 連の実験の平均値と標準偏差で示した。

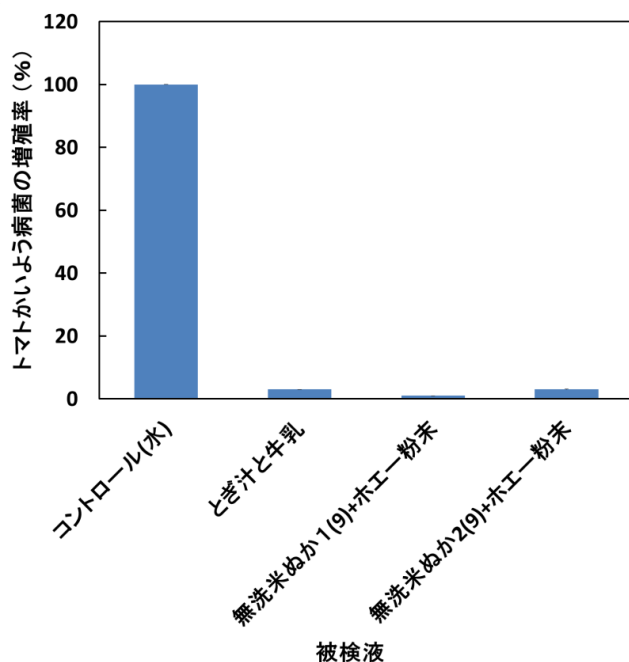


図 7-3 米のとぎ汁と牛乳の代替素材を使用して調製した発酵液のトマトかいよう病菌増殖抑制活性

トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は液体振とう培養法で測定した。無洗米ぬか 1 とホエー粉末は培養 18 日目、無洗米ぬか 2 とホエー粉末は培養 29 日目の発酵液を使用した。測定は 3 連で行い平均値と標準偏差を示した。

第 4 節 考察

図 7-2、図 7-3 の結果から、米のとぎ汁の代替素材として無洗米ぬかが使用できることが明らかとなった。BG 精米方式による無洗米ぬか 1（肌ぬか）および精白米をさらに精米する方式による無洗米ぬか 2 の両者とも米のとぎ汁の代替素材として使用できたことより、無洗米の調製方式は関係ないものと思われる。米のとぎ汁および無洗米ぬかの発酵液における役割は、第 3 章で述べたように微生物源であると考えられる。ぬかを使用して調製した発酵液はトマトかいよう病菌増殖抑制活性を示したが、その増殖抑制活性は低く、良好な代替素材とは言えない。その原因は無洗米ぬかに比べて多様な成分を含んでおり、また含まれる微生物種も多用であるため、トマトかいよう病菌の増殖抑制物質を生産する乳酸菌などの微生物群が優先種になれないのであろうと推定した。

牛乳の代替素材としては脱脂粉乳、ホエー（液体）およびホエー粉末が使用できることを明らかにした。図 7-2 の実験に用いたホエー（液体）は、北海道

から宅配されてきたものを 1 週間以内に使用した場合の結果であるが、液体のまま低温で貯蔵すると色調などが変化してきた。また小分けして冷凍保存したが、長期間冷凍保存したホエー（液体）を使用して調製した発酵液はトマトかいよう病菌の増殖抑制活性を安定的に示さなかった。一方ホエー粉末は市販品が容易に入手できる。また粉末であるため、保存も低温、暗所、乾燥の 3 点に気を付ければよく、ホエー粉末は 2 年以上安定的に発酵液を調製することができた。米のとぎ汁発酵液調製における牛乳の役割としては、第 3 章でのべたように乳酸菌をはじめとする微生物群の育成に必要な栄養成分を供給することであると考えられるが、脱脂粉乳とホエーは栄養供給源としての機能を十分にもっていることがわかる。カゼインの大部分が除去されたホエーを使用してトマトかいよう病菌の増殖を抑制することができることから、牛乳に大量に存在するカゼインは必要でないと考えられる。

以上の結果、米のとぎ汁に加えて無洗米ぬかを使用することができ、また牛乳については脱脂粉乳およびホエー粉末が使用可能であることがわかった。米のとぎ汁と牛乳という液体素材の組合わせに替えて、無洗米ぬかとホエー粉末という粉末資材を使うことが可能であることが図 7-3 からわかる。すなわち、無洗米ぬか 9 g とホエー粉末 24 g を 2,000 ml PET ボトルにいれ、水道水でボトルを満たしてキャップで線をして 2 週間放置しておけば発酵液が完成することになる。必要なときにいつでも簡単に調製することができる。

しかし材料の入手法やコストを考慮した場合、無洗米ぬかは今回は大手精米業者あるいは地域の精米所から入手したが、一般的に入手しづらい。そのため、とぎ汁の代替素材には入手可能であれば無洗米ぬかを、入手が難しいのであればとぎ汁を用いるのが良いと考えられる。

牛乳の代替素材である脱脂粉乳の価格は、例えば雪印メグミルクの”北海道スキムミルク”は 200 g 税込み 378 円で購入でき、1 回の発酵液の調製には約 75 円かかる。健康生活研究所から購入した粉末ホエーは 680 g 税込み価格 1,836 円で販売されており、1 回の発酵液の調製には約 66 円掛かる。牛乳は身近な食品としてスーパーマーケットやコンビニなどで販売されており、1,000 ml で 180 円（税込み価格）で購入でき、1 回の発酵液の調製には約 72 円かかる。市販品でコストを考慮すると、現時点では牛乳の代替素材は粉末ホエーが適当であると考えられる。今後賞味期限が切れた牛乳などの活用が可能になれば、より安価に米のとぎ汁発酵液様発酵液が調製できる。

米のとぎ汁が生活排水の中でも大きな環境負荷を与えていることは本章の第 1 節で述べたが、これまで廃棄されていた米のとぎ汁を米のとぎ汁発酵液として活用できれば米食に由来する環境負荷の低減に寄与することができる。また炊飯用として無洗米を使用することでも環境負荷の低減と家事労働の軽減に寄与

することができる。その際副産物として発生する無洗米ぬかは、本章で示したように、発酵液の素材として利用することによって有効活用ができる。さらに賞味期限の切れた牛乳などの活用ができれば廃棄食品の有効活用にも貢献できるであろう。

第8章 総合考察

本研究で米のとぎ汁発酵液の特性の一端を明らかにした。第2章で述べたように米のとぎ汁と牛乳を混合して PET ボトルで静置培養することによって、可燃性の気体の生成、それまで存在しなかった D-乳酸の生成、pH の低下、カゼインカードの形成を伴いながら発酵が進行することなどを明らかにした。これらの結果は複数の微生物によって発酵が行われており、優先的な微生物群が時間とともに変化していることを示唆している。とぎ汁発酵液の微生物群の由来は米のとぎ汁であること、牛乳の機能はこれら微生物群の増殖に必要な資化源や栄養成分を供給することであることを明らかにした。第7章で述べた米のとぎ汁や牛乳の代替素材を用いた実験の結果もこの結論を支持している。また乳酸菌が植物に常在的に存在すること（乳酸菌研究集談会編，1996；日本乳酸菌学会編，2012；津田ら，2015）、イネにも乳酸菌をはじめとした一般細菌や糸状菌が付着していることが報告されている（蔡ら，1994）。第5章では米のとぎ汁発酵液から乳酸菌、*L. fermentum*、を単離し、米のとぎ汁発酵液に乳酸菌が関与していることを初めて示した。とぎ汁発酵液中に D-乳酸が生成することや pH が低下することに対して、乳酸菌の存在が説得力のある説明を可能にした。

病原菌による植物病害と乳酸菌が関与する発酵液の関係を考えれば、乳酸菌の生産する低分子抗菌物質やペプチド性の抗菌物質（バクテリオシン）が機能している可能性が考えられる。本研究では、グラム陽性菌であるトマトかいよう病菌を取りあげて、米のとぎ汁発酵液がその増殖に与える影響を検討した。米の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を、米のとぎ汁発酵液の機能として初めて明らかにした。同じグラム陽性菌である枯草菌や黄色ブドウ球菌の増殖は抑制せず、トマトかいよう病菌に特異的であった。グラム陰性菌の大腸菌に対しては、予想されるように増殖抑制活性は有しなかった。第5章で乳酸菌（*L. fermentum*）を単離したが、*L. fermentum* の培養ろ液もトマトかいよう病菌の増殖を抑制した。米のとぎ汁発酵液および *L. fermentum* の培養ろ液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性は加熱処理によっても活性が失われなかった。これらの結果から米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性の実体は乳酸菌の生成物による可能性が大であることが示された。

ところで米のとぎ汁発酵液が植物の病害防除に効果がある場合の作用機作について、以下のような仮説が考えられる。

- 仮説① 米のとぎ汁発酵液中の微生物が、直接病原微生物の生育を抑制
- 仮説② 米のとぎ汁発酵液中の微生物生産物が、病原微生物の生育を抑制
- 仮説③ 米のとぎ汁発酵液が、植物自身が有する病原抵抗機構を活性化

仮説④ 米のとぎ汁発酵液が、病原微生物の増殖を抑制する常在性の拮抗微生物あるいは抑制物質生産微生物を活性化

仮説⑤ 上記の作用機作の複合したもの

第3章で述べた米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制活性(物質)は仮説②に基づく研究である。仮説③に関連した最近の例は、乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)を用いたハクサイの軟腐病に対する生物農薬の開発があげられる(津田ら, 2015; 津田ら, 2016; Tsuda et al., 2016)。彼らはハクサイを *L. plantarum* の死菌体で処理しても軟腐病を予防することができ、誘導抵抗性が強く示唆される報告をしている。

米のとぎ汁発酵液はネギ白絹病の防除に効果があると報告されている(福島, 2010)。最近の研究から、白絹病菌(*Sclerotium rolfsii* Curzi)の菌核からの発芽の抑制は認められない。また菌核の発芽直後の菌糸の増殖を一時的に抑制するが、やがて菌糸の増殖も旺盛になり、コントロールの菌糸の増殖との差も認められなくなる(家村と關谷, 私信)。この結果は、米のとぎ汁発酵液がネギの白絹病に対する抵抗性を誘導している可能性(仮説③)を想起させる。従って今後米のとぎ汁発酵液についても仮説③に基づく研究を進める必要がある。

米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の単離、同定を試み、その性質の一部を明らかにすることができた。熱に安定で、分子サイズが3.5~6.5 kDa のペプチド性の抗菌物質、おそらくバクテリオシンの一種であることが分かった。これまでに報告されている *L. fermentum* から単離されたバクテリオシンについては、加熱処理で抗菌活性が失われず、プロティナーゼK、トリプシン、パパインにより抗菌活性が失われると報告されている(金桶, 2004; Pascual et al., 2012; Udhayashree et al., 2012)。一方で加熱処理により抗菌活性は失われませんが、少々低下するという報告もある(Sabia et al., 2014)。これらの報告と合わせ考えると、本論文で部分精製された米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質は、報告されている *L. fermentum* のバクテリオシンの性質と一致する部分が多い。米のとぎ汁発酵液のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質の単離が待たれる。

本研究の成果は、米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の増殖を *in vitro* で抑制する現象とそれに関連したものであり、実際のは場や施設でトマトかいよう病を防除できるか否かについては課題として残された。実験植物としてトマトかいよう病に罹病したトマト幼苗の作成を試みたが、安定的に多数の罹病トマト苗を作成することができなかった。露地栽培トマトで自然にトマトかいよう病の発症を待ったが、トマトかいよう病を発症したトマトは確保できなかった。露地や施設内で栽培中のトマトにトマトかいよう病菌を人為的に接種す

ることはできないので、トマトかいよう病に罹病したトマト苗の安定的作出とそれを使用した防除実験が今後に残された課題である。

第7章では、トマトかいよう病の増殖抑制活性を有する発酵液調製のために、米のとぎ汁や牛乳の代替素材について検討した。おからやぬかは発酵液の素材としては適していなかったが、精白米から無洗米を調製する際に発生する無洗米ぬかが米のとぎ汁の代替素材として使用できることを明らかにした。米のとぎ汁や無洗米ぬかを活用することは、炊飯に伴う環境負荷の低減に寄与することが期待できる（山田ら，1988；白杉ら，2003；鈴木，2006；三神ら，2011；佐々木，2016）。牛乳の代替素材としては脱脂粉乳、ホエイ粉末が使用可能であることを明らかにした。またこれらを組合わせて使用しても米の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できることを示した。例えば、発酵液を手軽に調製するには、無洗米ぬかとホエイ粉末をPETボトルに入れ、水道水を加えて2週間置くことによってトマトかいよう病菌の増殖を抑制する発酵液を調製することができる。

最後に、本論文で米のとぎ汁発酵液の特性の一端を明らかにしたが、さらに多くの民間農業資材の科学的根拠が明らかにされることを期待している。またこれらの民間農業資材が、病虫害の軽減や安全でおいしい農作物の生産に活用されるようになることを願っている。

謝辞

本論文は筆者が京都学園大学大学院バイオ環境研究科博士課程後期バイオ環境専攻に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻 關谷次郎教授（現京都学園大学名誉教授）には主指導教員として本研究実施の機会を与えていただき、また研究実施にあたって終始御指導をいただいた。また同専攻 高瀬尚文教授、若村定男教授、金川貴博教授、深見治一教授、Rafael Prieto 准教授には数々の有益な御助言と御指導をいただいた。これらの先生方に深甚の謝意を表する。

本研究において使用したトマトかいよう病菌は岡山県農林水産総合センター農業研究所病虫研究室 川口章博士に、枯草菌は福山大学生命工学部 藤田泰太郎教授（現福山大学名誉教授）に御提供していただくとともに有益な御助言をいただいた。ここに感謝の意を表する。

米のとぎ汁発酵液の代替素材としての米ぬかと無洗米ぬかはひのまる米工房・中野精米工場社長 中野恵二氏から、無洗米ぬか（肌ぬか）は株式会社京山から、ホエーは日本酪農協同組合株式会社 吉田秀幸氏と株式会社北海道酪農公社から御提供いただいた。ここに感謝の意を表する。米の白度の測定には宝田工業株式会社社長 天野正明氏に協力していただくとともに有益な御助言をいただいた。ここに謝意を表する。本研究の実施にあたり、元京都学園大学客員研究員、瀧井幸男博士には研究手技の御指導と有益な御助言をいただいた。この場をかりて感謝申し上げる。

本研究の一部は 2012 年度亀岡市大学院生地域研究奨励金（中田達矢）の研究助成によって行われた。

引用文献

相野公孝：微生物殺菌剤の普及拡大に向けた課題と展望～ナスカ青枯れ病を例として～. 第57回近畿アグリハイテクシンポジウム“微生物を用いた病害防除技術.” 講演要旨集, 特定非営利活動法人近畿アグリハイテク, pp. 10-14 (2016).

Ardelt, W., Laskowski M Jr. : Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same Leu18-Glu19 reactive site. *Biochemistry*, 24, 5313-20 (1985).

Arnon R. : Papain, *Methods in Enzymology*, 19, 226-243 (1970).

鮎沢啓夫：細菌による害虫防除 -わが国における *Bacillus thuringiensis* 製剤の利用を中心にして-. *日本農薬学会誌*, 1, 359-363 (1976).

Brocklehurst, K., Carlsson, J., Kierstan, M. P., Crook, E. M. : Covalent chromatography. Preparation of fully active papain from dried papaya latex. *Biochemical Journal*, 133, 573-84 (1973).

蔡 義民, 大桃 定洋, 熊井 清雄：飼料作物・牧草に付着する乳酸菌の分布とその乳酸発酵特性. *日本草地学会誌*, 39, 420-428 (1994)

Carson, R. : “Silent Spring.” Boston, Riverside Press (1962).
(青樹築一訳、“沈黙の春” 新潮文庫, 1974)

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. : Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788 (2005).

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., Lang, H. : Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*, 47, 91-97, (1974).

Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Burger, A. : *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. “Plant-associated bacteria.” ed. Gnanamanickam, S. S., Springer, pp. 385-421 (2007).

福島みよ子：米のとぎ汁で集めた乳酸菌でネギの病気 1/10. *現代農業*, 89(4), 52-57, (2010).

橋本實：手作り乳酸菌液で白絹病が広がらない. *現代農業*, 94(11), 107 (2015).

Higaki, J. N., Light, A. : The identification of neotrypsinogens in samples of bovine trypsinogen. *Analytical Biochemistry*, 148, 111-120 (1985).

Hilz, H., Wiegers, U., Adamietz, P. : Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *European Journal of Biochemistry*, 56, 103-108 (1975).

井上喬：食品とジアセチル. *日本醸造協会誌*, 99, 315-323 (2004).

石橋直樹, 斎藤威史, 園元謙二：乳酸菌バクテリオシンー戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッションPJまで一. *日本乳酸菌学会誌*, 22, 38-48 (2011).

金桶 光起：米麴から分離した乳酸菌が生産するバクテリオシン. *日本醸造協会誌*, 99, 554-557 (2004).

川口章：雨除け栽培で発生するトマトかいよう病の疫学的解析による伝染源の解明. *植物防疫*, 64, 647-652 (2010).

川口章, 谷名光治：栽培環境で異なる病徴を呈するトマトかいよう病の病原性について. *関西病害虫研究会報*, 53, 57-58 (2011).

Kawaguchi, A., Tanina, K., Inoue, K. : Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in green houses in Japan. *Plant Pathology*, 59, 76-83 (2010).

河野孝志, 和田克士, 李玉友, 野池達也：複合基質からの嫌気性水素発酵に及ぼす基質濃度と pH の影響. *水環境学会誌*, 27, 473-479 (2004).

Kimmel, J. R., Smith, E. L. : Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation. *Journal of Biological Chemistry*, 207, 515-531 (1954).

北尾敦子、倉賀野妙子、奥田和子：環境にやさしい食生活―無洗米の調理特性と消費者の意識―. *日本調理科学会誌*, 31, 220-226 (1998).

益田 時光, 善籐 成史, 園元 謙二：ナイシン-類稀な抗菌物質-. *Milk Science*, 59, 59-65 (2010).

松中 昭一：“農薬のおはなし,” 日本規格協会, (2000).

三神 彩子, 佐藤 久美, 伊藤 貴英, 村上 和雄, 長尾 慶子：モデル献立調理時のエコ・クッキングによる排水汚濁負荷削減効果の分析. *日本調理科学会誌*, 44, 367-374 (2011).

水野修, 大原健史、野池達也：嫌気性細菌による食品加工廃棄物からの水素生成. *土木学会論文集*, 573/**VII**-4、111-118 (1997).

文部科学省：“日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）.” [http://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/1365297.htm] (2017 年 8 月 18 日閲覧) .

中川恭好、川崎浩子：遺伝子解析法 16S rDNA 遺伝子の塩基配列決定法. 日本放線菌学会編“放線菌の分類と同定.” 日本学会事務センター, pp. 88-117 (2001).

日本乳酸菌学会編：“乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス.” 京都大学学術出版社 (2010).

日本植物防疫協会編：“農薬概説.” 一般社団法人日本植物防除協会 (2012).

Noike, T., Takenaka, H., Mizuno, O. and Ohba, M. : Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1367-1371 (2002).

Northrop, J. H. and Kunitz, M. : Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. *Science*, 73, 262-263 (1931).

農山村漁村文化協会編：“微生物パワー とことん活用読本.” 農山村漁村文化協会 (2013).

農薬用語辞典編集委員会編：“農薬用語辞典.” 一般社団法人日本植物防疫協会 (2009).

乳酸菌研究集談会編：“乳酸菌の科学と技術.” 学会出版センター, (1996).

大田博樹：日本の農薬産業技術史—農薬のルーツを深訪する—, *日本農薬学会誌*, 38, 161-166 (2013).

大谷洋子, 増田吉彦, 白井雄祐：トマトかいよう病の伝染に及ぼす保菌残渣の土壌中分布と湿度の影響, *関西病害虫研究会報*, 49, 31-33 (2007).

Pascual, L. M., Daniele, M. B., Giordano, W., Pajaro, M. C., Barberis, I. L. : Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, 56, 397-402 (2008).

Punyauppa-path, S, Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P. : Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *International Journal of Current Research and Review*, 7, 47-53 (2015).

Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B. and Saravanakumar, : A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advanced Journal of Food Science and Technology*, 2, 138-144 (2010).

Rogers, L. A. : The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16, 321-325 (1928).

Sabia, C., Anacarso, I., Bergonzini, A., Gargiulo, R., Sarti, M., Condò, C., Messi, P., Niederhausern, de, S., Iseppi, R., Bondi. M., : Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe*, 26, 41-45 (2014).

齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司編：“現代チーズ学.” 食品資材研究会 (2008).

佐々木泰弘：“ポストハーベスト技術で活かすお米の力。” 農村漁村文化協会, (2016).

佐藤良, 小磯博昭：日本におけるナイシンの食品保存料としての利用について. *FFI ジャーナル*, 214, 95-101 (2009).

Schillinger, U. and Lücke, F. -K. : Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906 (1989).

白川隆, 佐々木次雄：トマトかいよう病細菌の検出用選択培地. *日本植物病理学会報*, 54, 540-543 (1988).

白杉（片岡）直子、小谷スミ子、中村恵子、栗津原宏子：調理および食器洗浄方法の工夫による台所排水の環境負荷低減効果. *日本調理科学会誌*, 36, 130-138 (2003).

Sluyterman, L. A., Wijdenes, J. : An agarose mercurial column for the separation of mercaptopapain and nonmercaptapapain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200, 593-5 (1970).

Sluyterman, L. A., Wijdenes, J. : Sigmoidal progress curves in the polymerization of leucine methyl ester catalyzed by papain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 289, 194-202 (1972).

園元 謙二：乳酸菌バクテリオシン探索のハイスループット化と発酵生産の総合システム化. *浦上財団研究報告書*, 18, 116-122 (2011).

Srionnual, S., Chen, Y., Yanagida, F. : Searching for bacteriocin-like inhibitory substances (BLISs) - producing lactic acid bacteria in Thai fermented foods. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 19, 89-95 (2008).

鈴木敬子：無洗米の現状と課題、将来性. *日本調理科学会誌*, 39, 320-324 (2006).

東洋ライス株式会社：“BG 無洗米” [http://www.toyo-rice.jp/bg_musenmai/]

(2014 年 8 月閲覧)

津田和久, 梅村賢司, 辻 元人 : 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を使った微生物農薬の開発. *日本農薬学会誌*, 40, 12-16 (2015).

Tsuda, K., Tsuji, G., Higashiyama, M., Ogiyama, H., Umemura, K., Mitomi, M., Kubo, Y., Kosaka, Y. : Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions. *Biological Control*, 100, 63-69 (2016).

津田 和久, 梅村 賢司, 辻 元人 : 乳酸菌を使った微生物農薬 “ラクトガード® 水和剤 ” の開発. *植物防疫*, 70, 157-160 (2016).

Udhayashree, N., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Nithya, K., gurusamy, R. : Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Paccific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 406-410 (2012).

植松勉, 藤井薄, 大畑貫一 : トマト潰瘍病 *Corynebacterium michiganense* の接種方法と種子感染. *日本植物病理学会報*, 43, 412-418 (1977).

八木 達彦, 福井 俊郎, 一島 英治, 鏡山 博行, 虎谷 哲夫 : “酵素ハンドブック (第 3 版).” 朝倉書店 (2008).

山田健二郎, 林久緒, 吉川サナエ, 鈴木勲 : 生活雑排水における食品由来の COD, BOD 負荷量の調査研究. *川崎市公害研究所年報*, 15, 42-46 (1988).

米山信吾, 根本久, 上田康郎, 都築司幸 : “図説 野菜の病気と害虫”. 農山漁村文化協会 (2005).

吉田重信, 對馬誠也 : 植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望. *化学と生物*, 51, 541-547 (2013)