

研究論文

トマトの脇芽を利用した消毒剤の開発

伊藤雅子*1、森川豊*2

Development of Disinfectant Using Tomato Axillary Bud

Masako ITO*1 and Yutaka MORIKAWA*2

Industrial Research Center*1*2

未利用なバイオマスであるトマトの脇芽の有効利用法の開発を目的に、脇芽のもつ抗菌成分を含有する消毒剤の開発について検討した。消毒剤の試験法である試験菌懸濁法で、脇芽のエタノール抽出成分の抗菌効果について確認したところ、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果があることを明らかにした。また、脇芽の 70vol%エタノール抽出成分には、抗菌を示す成分の一つとして、トマトの花・葉・茎に含まれる抗菌性物質のトマチンが含まれていることを確認した。

1. はじめに

愛知県では植物工場によるトマトの栽培が着目されており、愛知県のトマトの農業産出額は155億円で全国第3位である¹⁾。トマトの栽培において、脇芽かきはトマトの品質を保つため、毎日行う重要な作業であり、摘み取った脇芽が多量に発生する。また、トマト栽培後には残渣として葉・茎が発生する。これら多量に発生するバイオマスの処理費用がかかっており、資源としての有効な利用方法の開発が求められている。

当グループではこれまでに、トマトの葉・茎の利用方法の開発について取り組んできた^{2),3)}。これまでの検討から、トマトの葉・茎に抗菌活性を有する成分が含まれることも確認している。本研究では、トマトの花・葉・茎等に含まれる抗菌性物質として知られているトマチン⁴⁾に着目し、脇芽から抗菌成分の抽出とそれらを含む消毒剤への利用の可能性について検討した。

2. 実験方法

2.1 脇芽からの抗菌成分の抽出

脇芽は、(株)にじまち(常滑市)より提供を受けた。脇芽は凍結乾燥後、粉碎機(フォースミル、FM-1、大阪ケミカル(株)製)を用いて粗粉碎した。抽出溶媒は水及びエタノールとし、エタノールは適宜希釈した濃度で使用した。

脇芽粉碎品と抽出溶媒を混合し、乳鉢ですり潰した。遠沈管に回収後、16,000rpmで5分、15℃で遠心分離(高速遠心分離機、CR-20F、工機ホールディングス(株))して上清を回収した。回収した上清を抽出成分(液体)とした。また、濃縮を目的に回収した上清を凍結乾燥した

場合は、抽出成分(粉体)とした。

2.2 抽出成分の抗菌活性の評価

主に製剤の開発段階で、製剤または活性物質の基本的な活性を評価する日本薬局方「試験菌懸濁法」⁵⁾に準じて行った。

指標菌は、大腸菌(*Escherichia coli* NBRC3301)と黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC12732)を使用した。普通寒天培地で35℃、1晩培養した各菌を500倍量に希釈したグイオン液体培地に懸濁し、同培地で適宜希釈した液を前培養液とした。

抽出成分(液体)は、抽出溶媒が高濃度エタノールの場合、エタノール濃度を5vol%もしくは10vol%となる様に希釈して試験液とした。抽出溶媒が濃度10vol%以下のエタノールの場合、抽出成分(液体)をそのまま試験液とした。抽出成分(粉体)は、5vol%エタノール/0.1%Tween80または10vol%エタノール/0.1%Tween80に可溶化した液を試験液とした。

試験液と前培養液を9:1の割合で混合し、攪拌後、常温で静置した。一定時間後にサンプリングし、混合液中の菌数を測定した。また、対数減少量は試験前の菌数と一定時間処理後の菌数の対数値の差とした。

2.3 トマチンの分析

トマチン標品(T0329、東京化成工業(株))を70%アセトニトリル/0.5%酢酸溶液に溶解し、トマチン標準液とした。高速液体クロマトグラフ(e2695、Waters)で、ODSカラム(Luna 5 μ C18、250 \times 4.6mm、Phenomenex)を用いて、脇芽の70vol%エタノール抽出成分を分離した。UV220nmで検出し、トマチンの分析を行った。

*1 産業技術センター 環境材料室 *2 産業技術センター 環境材料室 (現食品工業技術センター 分析加工技術室)

3. 実験結果及び考察

3.1 抽出溶媒の抗菌活性の評価

本研究においては、消毒剤の開発が目的であるため、安全性を考慮し、抽出溶媒は水及び様々な濃度のエタノールを検討した。水を抽出溶媒とした場合、抽出成分(液体)には抗菌効果が認められなかったことから(データ省略)、抽出溶媒をエタノールとして検討を進めた。エタノールは消毒剤として使用される成分であり、一定濃度以上では殺菌効果を示す⁵⁾。高濃度のエタノールで脇芽から抗菌成分を抽出すると、抽出液そのものを試験に供する場合、抽出成分の抗菌性能を確認できない。そこで、抗菌効果を示さないエタノール濃度を確認した。様々な濃度のエタノール溶液を試験液とし、前培養液と混合 15 分後に菌数を測定した。指標菌は大腸菌を使用した。結果を表 1 に示す。試験液のエタノール濃度が 10vol% 以下では、試験後、菌数の減少が認められなかった。20vol% ではわずかに菌数が減少し、40vol% では大幅に菌数が減少した。以上より、試験液のエタノール濃度を 10vol% 以下で試験をすることで、抽出成分の抗菌性能を確認できると判断した。

表 1 試験液のエタノール濃度と評価試験の菌数変化

エタノール濃度 (vol%)	初発菌数 (CFU/mL)	試験後の菌数 (CFU/mL)
1	8.1×10^6	6.3×10^6
3	8.1×10^6	8.5×10^6
5	8.1×10^6	9.5×10^6
8	8.1×10^6	7.7×10^6
10	8.1×10^6	8.3×10^6
20	8.1×10^6	3.7×10^6
40	5.6×10^6	1.0×10^1

3.2 99.5vol%エタノール抽出成分の抗菌効果

抽出溶媒を 99.5vol%エタノールとし、脇芽粉碎品と抽出溶媒を 1:5 の割合で混合し、抽出成分(液体)の抗菌効果を確認した。試験系のエタノール濃度を 10vol% 以下にする必要があるため、抽出成分(液体):リン酸緩衝液:前培養液を 1:8:1 の割合で混合して試験した。ブランクは抽出成分(液体)の代わりに 99.5vol%エタノールを使用した。結果を表 2 に示す。

表 2 各試料の評価試験における菌数変化

試料	初発菌数 (CFU/mL)	試験後の菌数 (CFU/mL)
99.5vol%エタノール 抽出成分	2.9×10^5	3.3×10^5
ブランク	2.9×10^5	4.3×10^5

初発菌数が 2.9×10^5 CFU/mL であったのに対し、試験後は 3.3×10^5 CFU/mL と菌数の減少は全く認められなかった。抽出溶媒が高濃度のエタノールであるため、評価試験時にエタノール濃度を下げる必要があり、抽出成分(液体)を希釈したことにより抗菌成分も希釈されたことが要因の一つと考えられた。

3.3 試料調製方法の検討

高濃度エタノール抽出液の溶媒除去について検討した。溶媒の除去方法は、加熱や凍結乾燥が考えられる。抗菌成分の加熱による変性の有無が確認できていないため、凍結乾燥を選択した。

抽出液の凍結乾燥を途中で止めると抽出成分の濃縮液が作製できる。この濃縮液を評価試験に供するには、エタノール濃度の測定とエタノール濃度が依然高い場合は更に希釈が必要となる。したがって、完全に凍結乾燥させて抽出成分(粉体)とし、濃度 10vol% 以下のエタノール溶液で可溶化した抽出成分の調製を試みた。

99.5vol%エタノールからの抽出成分(粉体)は、10vol%エタノール溶液には完全には溶解しなかった。そこで、界面活性剤である Tween80 を可溶化剤として添加したところ、沈殿は認められずほぼ溶解できた。

以上より、凍結乾燥を行って完全に溶媒を除去した後の抽出成分(粉体)を、10vol%エタノール/0.1%Tween80 に可溶化させることで、評価試験にそのまま供せる抽出成分(試験液)を調製できた。

3.4 調製後の試料の評価試験

前節の方法で調製した試料の評価試験を行った。結果を図 1 に示す。ブランクは 10vol%エタノール/0.1%Tween80 を試験液とした。

大腸菌では、ブランクで菌数の減少が認められなかったのに対し、抽出成分は培養 1.5 時間後に菌数が 10^3 CFU/mL から 10^1 CFU/mL 以下と減少した。対数減少量は 2.7 以上となった。脇芽の抽出成分には、大腸菌に対する抗菌効果があることが明らかとなった。

黄色ブドウ球菌では、大腸菌と同様、抽出成分で、培養 1.5 時間後に菌数が 10^3 CFU/mL から 10^1 CFU/mL 以下と減少した。しかし、ブランクでも同様の結果となったことから、黄色ブドウ球菌は低濃度の 10vol%エタノールで殺菌されたと考えられた。黄色ブドウ球菌の試験では、エタノール濃度をさらに低くするため、以後の試験では可溶化剤として、5vol%エタノール/0.1%Tween80 を使用することとした。

3.5 抽出時のエタノール濃度の違いによる抗菌効果の差

次に、抽出時のエタノール濃度による抗菌効果の差について検討した。抽出溶媒を 10vol%及び 70vol%エタノール溶液とし、抽出成分(粉体)を調製した。これらを

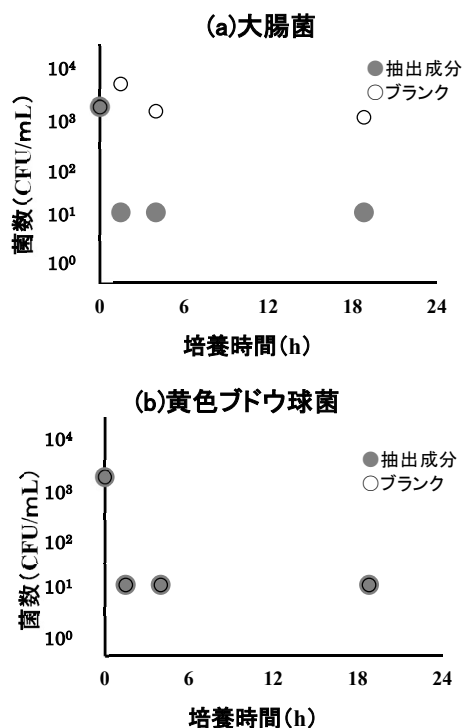


図1 抽出成分の培養時間による菌数変化

5vol%エタノール/0.1%Tween80 に可溶化し、試験液とした。ブランクは 5vol%エタノール/0.1%Tween80 を試験液とし、培養時間を 30 分として抗菌性試験を行った。その結果を表 3 に示す。

大腸菌は初発の菌数が 8.9×10^7 CFU/mL であった。試験後は、10vol%エタノール抽出成分が 7.7×10^6 CFU/mL、70vol%エタノール抽出成分が 3.5×10^6 CFU/mL となった。初発菌数が標準の試験条件より高かったにも関わらず、どちらの抽出成分も抗菌活性値は 1 を越える結果となった。

黄色ブドウ球菌は初発菌数が、 7.5×10^6 CFU/mL であった。試験後は 10vol%エタノール抽出成分が 8.1×10^5 CFU/mL、70vol%エタノール抽出成分が 3.9×10^5 CFU/mL となった。大腸菌と同様に、初発菌数が標準の試験条件より高かったにも関わらず、どちらの抽出成分も抗菌活性値は 1 を越える結果となった。

以上より、抗菌成分はエタノールの濃度に関わらず抽出され、10vol%エタノール抽出成分より 70vol%エタノール抽出成分にその効果が高いことがわかった。また、黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果があることを明らかにすることができた。

トマトの茎葉部の抗菌作用については、石田ら⁹⁾がジエチルエーテルで抽出した成分の大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌に対する効果を定性試験で確認している。その結果、ジエチルエーテル抽出成分は大腸菌、サ

表 3 各試料の抗菌性試験における菌数変化

(a)大腸菌

試料	初発菌数 (CFU/mL)	試験後の菌数 (CFU/mL)	対数減少量
10vol%エタノール抽出成分	8.9×10^7	7.7×10^6	1.1
70vol%エタノール抽出成分	8.9×10^7	3.5×10^6	1.4
ブランク	8.9×10^7	3.5×10^6	0.9

(b)黄色ブドウ球菌

試料	初発菌数 (CFU/mL)	試験後の菌数 (CFU/mL)	対数減少量
10vol%エタノール抽出成分	7.5×10^6	8.1×10^5	1.1
70vol%エタノール抽出成分	7.5×10^6	3.9×10^5	1.3
ブランク	7.5×10^6	7.5×10^6	0.8

ルモネラ菌には抗菌効果があり、黄色ブドウ球菌には認められなかったと報告している。本研究では、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対しては、脇芽のエタノール抽出成分に抗菌効果があることを定量的に明らかにすることができた。今回、脇芽のエタノール抽出成分は消毒剤としての有効性指標の対数減少量 3.0 には満たなかったが、大腸菌では対数減少量 2.7 以上の結果となったことから、抽出時の固形分割合や濃縮方法等、抽出方法を工夫することにより、脇芽からのエタノール抽出成分の消毒剤としての利用が期待できる。

3.6 トマチンの分析

トマトの葉・茎・花などに、抗菌性物質としてトマチンが含まれていることがわかっている⁴⁾。脇芽からのエタノール抽出成分のトマチンの有無を確認するため、高速液体クロマトグラフィーによるトマチンの分析を行った。試料は 70vol%エタノール抽出成分(粉体)を、70%アセトニトリル/0.5%酢酸溶液に溶解して用いた。結果を図 2 に示す。

トマチンの標準試料は、今回の分析条件で 4.01 分に検出された。脇芽からの 70vol%エタノール抽出成分にも 4.02 分にピークが検出され、抗菌性物質のトマチンが含まれていることがわかった。脇芽からの 70vol%エタノール抽出成分の抗菌性を示した成分の一つとしてトマチンがあると考えられた。

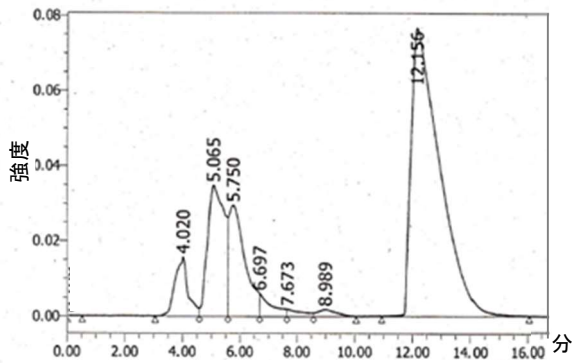


図 2 70vol%エタノール抽出成分のクロマトグラム

4. 結び

多量に発生するバイオマス資源、トマトの脇芽の有効利用法の開発を目的に、脇芽から抗菌成分の抽出と抽出成分を含有した消毒剤への利用について検討した。

- (1) 脇芽の水抽出成分に大腸菌、黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果は認められず、脇芽のエタノール抽出成分に、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果があることを定量的に明らかにできた。特に大腸菌に対しては、対数減少量 2.7 以上を確認できた。
- (2) 脇芽の抗菌成分は濃度に関わらず、10vol%以上のエタノールで抽出されることがわかった。
- (3) 脇芽の 70vol%エタノール抽出成分には、抗菌性物質として知られているトマチンが含まれていた。

以上より、脇芽のエタノール抽出成分は、天然の抗菌成分含有の、器具等非生体を対象とした消毒剤として利用が期待できる。多量に発生するバイオマス資源の新たな有効利用法を提案できた。

付記

本研究の一部は、平成 31 年度内藤科学技術振興財団研究助成を受けて実施した。

文献

- 1) 令和 2 年度東海 3 県(岐阜・愛知・三重)の食料・農業・農村：農林水産省東海農政局(2020)
- 2) 特許第 5681923 号
- 3) 特許第 6421305 号
- 4) Awiyant, T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyumu, S., and Takikawa, Y.: *Ann Phytopathol. Soc. Japan*, **60**, 421(1993)
- 5) 消毒法及び除染法：第十七改正日本薬局方
http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/JP17_SANKOU.pdf (2022/5/10)
- 6) 石田健治, 小林史幸, 池浦博美, 塚本菜月, 早田保義: *園芸学研究*, **7**, 241(2008)