

旭川工業高等専門学校

研 究 報 文

第 60 号

---

JOURNAL

OF THE

NATIONAL INSTITUTE of TECHNOLOGY,

ASAHIKAWA COLLEGE

NO.60

---

令和 5 年 3 月 / March, 2023

## 目 次

### 学術論文

身近に見られる tractrix .....	降 旗 康 彦 1 佐々木 稔 高 橋 薫
------------------------	-----------------------------

### 研究紹介

黒色真菌の生育に対する モノテルペン類の組み合わせの影響 .....	富 樫 巖 6 高 田 恵 多
-20°C を用いたトリコデルマ属菌株の凍結保存の試み .....	富 樫 巖 15 増 羽 龍 斗
ナミダタケの木材腐朽に対する 木炭固定化トリコデルマの阻害効果 .....	富 樫 巖 24 松 下 文 也
寒冷地に分布する野生酵母の特性把握の試み .....	富 樫 巖 34 永 井 一 輝
身近なカビに対する 9 種類の精油の抗カビ活性評価 .....	富 樫 巖 42 佐 藤 明日香
組み合わせ論理回路における配線ミスの発見を 補助する教材の開発 .....	舟 木 聡 50

## CONTENTS

### Papers

A Tractrix in Your Room .....	Yasuhiro FURIHATA 1
	Minoru SASAKI
	Kaoru TAKAHASHI

### Study Introduction

Evaluation of Inhibitory Synergism of Combinations of Monoterpenes on the Growth of <i>Cladosporium</i> spp. and <i>Aureobasidium</i> spp .....	Iwao TOGASHI 6
	Keita TAKADA

Attempt of the Cryopreservation of <i>Trichoderma</i> spp. Strains at -20°C .....	Iwao TOGASHI 15
	Ryuuto MASUBA

Inhibitory effects of <i>Trichoderma</i> spp. immobilized to Charcoal-particles on the Wood Rot by <i>Serpula lacrymans</i> .....	Iwao TOGASHI 24
	Fumiya MATSUSHITA

Grasping fermentable characteristics of some wild yeasts which are distributed in a cold district. ....	Iwao TOGASHI 34
	Kazuki NAGAI

Evaluation of Inhibitory Effects of Nine Kinds of Essential Oil on the Growth of some Fungi which is familiar to Our Life .....	Iwao TOGASHI 42
	Asuka SATOH

Development of devices that assist students with incorrect wiring detection in combinational logic circuits .....	Satoshi FUNAKI 50
---	-------------------

## 身近に見られる tractrix

降旗 康彦 \*

佐々木 稔 \*\*

高橋 薫 \*\*\*

## A Tractrix in Your Room

Yasuhiko FURIHATA

Minoru SASAKI

Kaoru TAKAHASHI

### Abstract

The equation of the curve seen when brooms are stacked in a school classroom is derived. The curve obtained is identified to be the tractrix, which is often obtained as the locus of a moving point. Unlike what is usually seen, the tractrix derived in this paper is a static one.

### 1. はじめに

自然界や身近に頻繁に表れる曲線は、その再現性から背景に共通の単純な数学的・物理的原理に従って現れると考えられる。直線や円にとどまらず、カテナリー（懸垂線）、サイクロイドなどは、単純な数学的定義を持ち、興味深い性質を多く持っている。

筆者の一人佐々木は、勤務する中学校で清掃指導をしている際、生徒が複数のほうきを壁に立てかけている場面（図 1）を見かけた。線分であるほうきの柄が、全体として美しい曲線をなすことに惹かれ、その数学的表現や意味に興味を持った。

ほうきの立てかけ方から、この曲線は幾何学的考察から得られることが期待され、実際その配位は数学的にあいまいさなく表現することができる。ここで見られる曲線は tractrix（追跡線、牽引線などとも呼ばれる）であることを本論文で導出する。tractrix は歴史的にはライブニッツがその表現を見出し、性質を調べた<sup>1)</sup>。本稿では、ほうきの立てかけ方から隣り合う



図 1 何本ものほうきを立てかけた様子

ほうきの傾きについての変化量を調べ、ほうき下部の幅を 0 にする極限を取ることで直線族が満たす微分方程式を導出する。この微分方程式の解としてほうきの柄の部分による直線の 1 パラメータ集合が求められる。この直線集合の包絡線は tractrix であることがわかり、その表式は幾何学的な意味付けを持つパラメータによって表された形になっている。tractrix は何らかの「運動」の軌跡として現れることが知られているが、その曲

\* 人文理数総合科教授  
\*\* 仙台市立山田中学校教諭  
\*\*\* 仙台高専特命教授

(令和 5 年 1 月 31 日受理)

線を「静的」に見られる例としてここで扱う例は興味深い。

## 2. tractrix

17 世紀の解剖学者クロード・ペローは次の問題を提起した<sup>1)</sup>：

曲線の各点 P での接線と  $x$  軸との交点と点 P の距離が一定の長さ  $L$  になるような曲線はどのような曲線か

彼はこの問題を説明するために、懐中時計を取り出し鎖の一端をテーブルの一辺に沿って動かし、その時計の軌跡がどんな曲線を描くかを問題とした。1693 年にライプニッツは曲線の満たす微分方程式

$$\frac{dy}{dx} = -\frac{y}{\sqrt{L^2 - y^2}} \tag{1}$$

を求積し、次の解を発表した。

$$x = -\sqrt{L^2 - y^2} - L \ln \frac{L - \sqrt{L^2 - y^2}}{y} \tag{2}$$

これが tractrix の 1 つの表現であり、図 3 のような曲線となる<sup>2)</sup>。

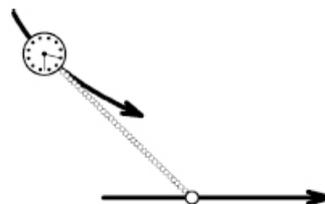


図 2 ペローの問題

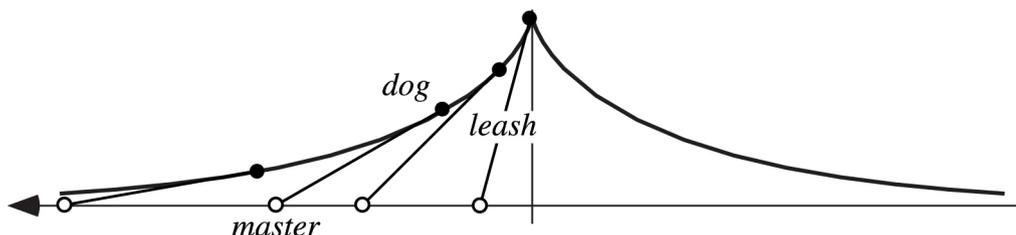


図 3 居座ろうとする犬を一定の長さのひもで引っ張るときに犬が動く軌跡。主人は直線上を動く。犬の軌跡は tractrix となる。

tractrix の表現はいくつかあり、文献 3) には下記のようなものが列挙されている。

$$x = L \sinh^{-1} \sqrt{L^2 y^{-2} - 1} - \sqrt{L^2 - y^2} \tag{3}$$

$$x = L \operatorname{sech}^{-1} \frac{y}{L} - \sqrt{L^2 - y^2} \tag{4}$$

$$x = \frac{L}{2} \ln \frac{L + \sqrt{L^2 - y^2}}{L - \sqrt{L^2 - y^2}} - \sqrt{L^2 - y^2} \tag{5}$$

$$x = t - L \tanh \frac{t}{L}, \quad y = L \operatorname{sech} \frac{t}{L} \tag{6}$$

図 2, 3 にあるように、tractrix は一定の長さのひもに付けられた物体を十分に摩擦が大きい状況で、他端を直線に沿って引っ張るときに物体が動く軌跡として現れる。また、tractrix は懸垂線 (カタナリー) の伸開線として得られることも知られている。

### 3. 重ねたほうきの幾何学と tractrix

#### 3.1 方程式の導出

図 1 に見られるほうきを接続部で可動性を持った「T」字形として表し、その図形を積み重ねることを考える。各ほうきの柄の長さを  $L$ 、ほうき下部の横幅を  $w$  とする。図 4 にあるように、点  $C$  を接地点とするほうきがあり、その可動部の  $x$  座標を  $t$  とする。また、そのほうきの柄の部分の  $x$  軸となす角を  $t$  の関数として  $\theta(t)$  とする。このほうきに次のほうき (赤色) を重ねる。重ねたほうきの上端を  $A$  とする。可動部  $B$  の座標は  $(t+w, 0)$  となる。柄が  $x$  軸となす角  $\theta$  は接地点の  $x$  座標の関数と考えているので、 $AB$  と  $x$  軸のなす角は  $\theta(t+w)$  と書ける。また、もとからあるほうきの柄の一部分  $AC$  の長さを  $a(t)$  とし、直線  $AC$  を  $\ell(t)$  と呼ぶことにする。

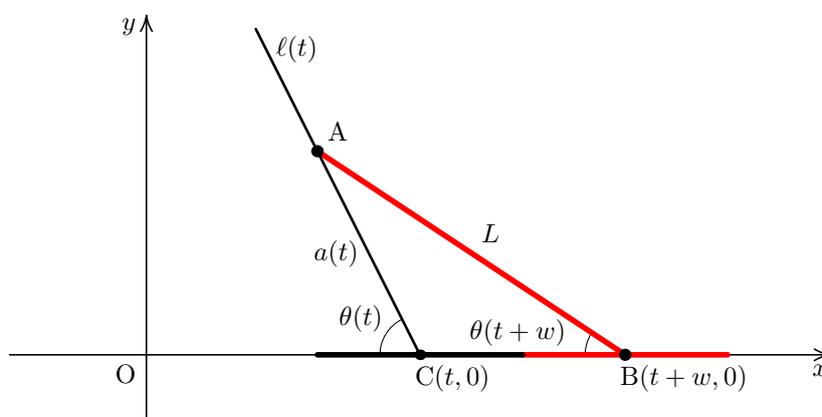


図 4 重ねたほうきの幾何学

これらの諸量の関係から、 $\theta(t)$  が満たす条件を求めることで、直線の 1 パラメータ族  $\ell(t)$  の方程式を導く。 $\triangle ABC$  について、余弦定理より、

$$L^2 = a^2 + w^2 + 2aw \cos \theta \quad (7)$$

$\theta(t+w) = \theta(t) + \Delta\theta$  とおくと、正弦定理より、

$$\frac{L}{\sin \theta} = \frac{a}{\sin(\theta + \Delta\theta)} \quad (8)$$

(7) より、

$$a = L \left[ \sqrt{1 - \left(\frac{w}{L}\right)^2 \sin^2 \theta} - \frac{w}{L} \cos \theta \right] \quad (9)$$

(8), (9) より、 $a$  を消去すると、柄の下端  $t$  が  $w$  だけ変化したときの  $\theta$  の変化  $\Delta\theta$  を決定する方程式が次のように求められる。

$$\sin(\theta + \Delta\theta) = \left[ \sqrt{1 - \left(\frac{w}{L}\right)^2 \sin^2 \theta} - \frac{w}{L} \cos \theta \right] \sin \theta \quad (10)$$

この方程式は、ひとつほうきを重ねたときの柄の部分の角度の変化  $\Delta\theta$  が、 $L, w, \theta(t)$  から決まっていることを表している。

### 3.2 ほうき下部の幅が小さい極限 $w/L \rightarrow 0$ での直線の 1 パラメータ族

(10) はほうきを重ねていったときに、どのように  $\theta$  が変化するかを完全に決めているが、解析的に  $\theta(t)$  を求めることは難しい。そこで、(10) において、 $t$  の変化量  $w = \Delta t$  が小さいとする近似をして  $\theta(t)$  の振る舞いを考察する。

$$\frac{w}{L} = \frac{\Delta t}{L} \sim |\Delta\theta| \ll 1 \quad (11)$$

と近似し、1 次のオーダーまで取ると、(10) より、

$$\Delta\theta = -\frac{\Delta t}{L} \sin\theta + \mathcal{O}\left(\left(\frac{w}{L}\right)^2\right) \quad (12)$$

この近似式より、 $\theta(t)$  に対する微分方程式

$$\frac{d\theta}{dt} = -\frac{1}{L} \sin\theta \quad (13)$$

を得る。これは、容易に積分でき、 $C$  を任意定数として

$$\ln\left(\tan\frac{\theta}{2}\right) = -\frac{t}{L} + C \quad (14)$$

を得る。ここで扱っている状況では、 $t=0$  で  $\theta = \frac{\pi}{2}$  であるので、 $C=0$  と定まる。

$$\ln\left(\tan\frac{\theta}{2}\right) = -\frac{t}{L} \quad (15)$$

これは、 $\theta$  の陽な表現は

$$\theta(t) = 2 \arctan\left(e^{-t/L}\right) \quad (16)$$

となり、ほうき下部の幅を非常に小さくとした極限における柄の傾き  $\theta$  を、接地点の座標  $t$  で表したものとなる。柄の部分を表す直線の方程式は、

$$y = -\tan\theta(t) (x - t) \quad (17)$$

(16) より  $\tan\theta = \frac{1}{\sinh(t/L)}$  であるから、結果、 $x$  軸との交点を  $(t, 0)$  とした、直線の 1 パラメータ族として

$$\ell(t): \quad y = -\frac{1}{\sinh(t/L)}(x - t) \quad (18)$$

を得る。

### 3.3 包絡線としての tractrix

得られた直線族 (18) の包絡線は、 $\ell(t)$  の方程式

$$x + y \sinh\frac{t}{L} - t = 0 \quad (19)$$

および, これを  $t$  で偏微分した

$$\frac{\partial}{\partial t} \left( x + y \sinh \frac{t}{L} - t \right) = 0 \quad \text{すなわち} \quad \frac{y}{L} \cosh \frac{t}{L} - 1 = 0 \quad (20)$$

から,  $t$  を消去して得られるが, ここでは,  $t$  を包絡線のパラメータとして残すと,

$$x(t) = t - L \tanh \frac{t}{L}, \quad y(t) = \frac{L}{\cosh \frac{t}{L}} \quad (21)$$

を得る。これは tractrix の 1 つの表現であり<sup>2)</sup>, 先に挙げた (6) と一致する。これで, 当初の問題であった曲線は, ほうきの幅が小さいという極限ではあるが, tractrix であることが分かったことになる。特に, パラメータ  $t$  は, 曲線の接線が  $x$  軸と交わる点の  $x$  座標という幾何学的な意味を持つことが, これまでの曲線の構成の仕方からわかる。

直線族  $l(t)$  とその包絡線 (tractrix) を図 5 に描いた。tractrix(赤) は図 1 の状況をうまく表現している様子が見て取れる。

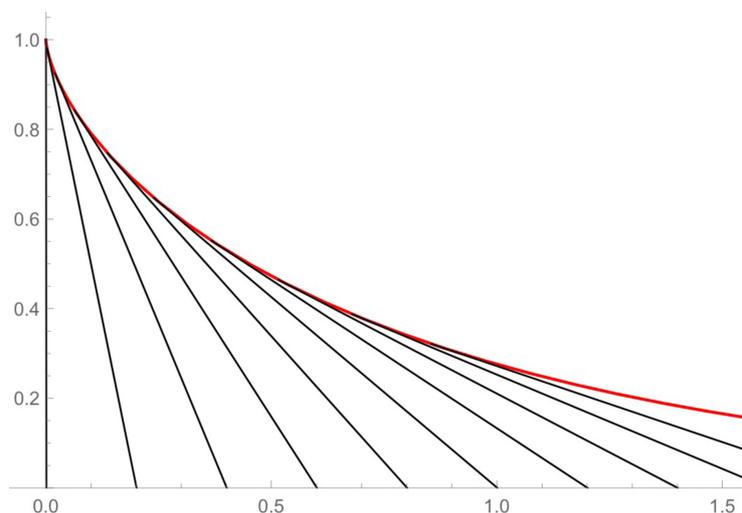


図 5 黒の線分は直線族  $l(t)$  から接地点が等間隔になるようにサンプリングしたもの。赤い曲線が tractrix。

本稿では, ほうきの幅が小さいという極限をとり tractrix を得たが, 実際に図 1 に見られるものは, ほうきの柄が作る多角形である。この多角形は tractrix の自然な差分化を与えていると考えることができる。今後の課題として, tractrix およびそれに関係した懸垂線の差分化の一つの手法としてこの多角形を利用し考察することが考えられる。

### 参 考 文 献

- 1) E. ハイラー, G. ワナー: 解析教程 (上), シュプリンガー・フェアラーク東京: 192-193 (1997)
- 2) Weisstein, Eric W.: “Tractrix.” From MathWorld—A Wolfram Web Resource.  
<https://mathworld.wolfram.com/Tractrix.html> (2022 年 7 月 3 日閲覧)
- 3) Yates, Robert C.: The Catenary and the Tractrix. Amer. Math. Monthly 66: 500-505 (1959)

## 【研究紹介】 黒色真菌の生育に対する モノテルペン類の組み合わせの影響

富樫 巖\*

高田恵多\*\*

### Evaluation of Inhibitory Synergism of Combinations of Monoterpenes on the Growth of *Cladosporium* spp. and *Aureobasidium* spp.

Iwao TOGASHI

Keita TAKADA

#### Abstract

We observed inhibitory synergism of the combinations of two kinds of monoterpenes containing  $\ell$ -menthol on the growth of six strains of dematiaceous fungi (*Cladosporium* spp. and *Aureobasidium* spp.) using direct contact experiment based on an agar medium dilution method. The mono-terpenes except  $\ell$ -menthol are menthone, (R)-pulegone, linalool, (-)-carveol and citral. All of them are included in herb. As for 0.02% (w/v) of  $\ell$ -menthol concentration, the other monoterpenes concentration was adjusted in 0.02-0.1% (v/v). For some strains, multiplier effects of antifungal activity to the fungi were observed in 0.05-0.1% (v/v) of (R)-pulegone, 0.1% (v/v) of linalool, 0.02% (v/v) of (-)-carveol, and 0.02% (v/v) of citral at 25°C. In other most combinations, it was equal to the independent antifungal activity of  $\ell$ -menthol, (-)-carveol or citral.

#### 1. はじめに

著者らはこれまでに、浴室などの住宅の水回りを汚染する黒色真菌（クロカビ：*Cladosporium* spp., 黒色酵母：*Aureobasidium* spp.）の防除に0.1～0.5% (v/v) のハッカ油またはラベンダー油と1～5% (v/v) のエタノールの組み合わせが効果的であること、両精油に含まれる主要なモノテルペン類のいくつかが高い抗カビ活性を有することを報告した<sup>1-3)</sup>。そして本研究では、精油成分の組み合わせで生じる抗カビ活性の相乗効果の把握を試みた。具体的にはハッカ油とラベンダー油の共通含有成分で抗カビ活性を有するモノテルペン類の $\ell$ -メントール<sup>4,5)</sup>に注目して両精油およびレモングラスなどハーブ類の精油に含まれる5種類のモノテルペン類との組み合わせ、すなわち $\ell$ -メントールとの2成分混合物が黒色真菌の生育に与える影響を接触実験系で観察した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 供試材料

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

### 2.1.1 供試菌株と接種源

供試菌株には、クロカビとして *C. cladosporioides* (Fresenius) de Vries の 2 株 (NBRC 4459, NBRC 6348) と旭川高専保存株の *Cladosporium* spp. の 2 株 (ANCT-11001, ANCT-11002) , 黒色酵母として *A. pullulans* (de Bary) Arnaud の NBRC 6353 と *Aureobasidium* sp. ANCT-11003 の合計 6 株を用いた。これらの供試菌株はポテトデキストロース寒天 (以下 PDA, 日水製薬製) 培地で継代培養保存されていたものである。各試験に用いる場合には PDA 平板培地 (直径 90 mm, 以下同様) を用い, 25°C にて 2 週間 (NBRC 4459, NBRC 6353, ANCT-11003) , または 3 週間 (NBRC 6348, ANCT-11001, ANCT-11002) の前培養を行った。そして, 成長した各コロニーからコルクボーラーを用いて寒天培地ごと打ち抜いた直径 5 mm の菌体ディスクを接種源として用いた。

### 2.1.2 供試材料

モノテルペン類の標品として *l*-メントール, メントン, (R)-プレゴン, リナロール, (-)-カルベオール, シトラール (いずれも和光純薬工業製, 図 1 に各構造式を示す) を用いた。なお, *l*-メントールの溶媒には特級エタノール (99.5%, キシダ化学製) を用い, その溶液濃度は 1 mg/mL とした。

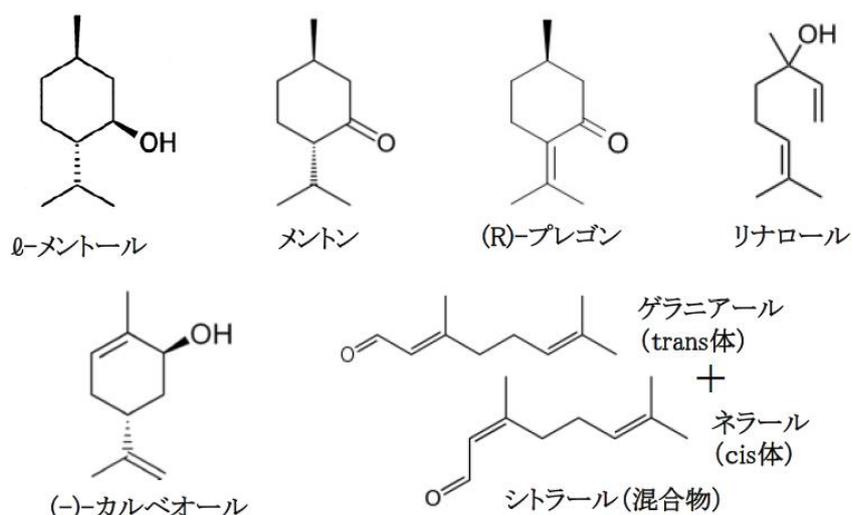


図 1. 供試したモノテルペン類の簡易構造式 (Wikipedia より引用)

### 2.3 抗カビ活性の評価

高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分) して 70°C 以下に放冷した PDA 培地に *l*-メントールが 0.02~0.5% (w/v) となるように *l*-メントールのエタノール溶液を添加, *l*-メントール以外のモノテルペン類が 0.02~0.1% (v/v) となるように添加, および 0.02% (w/v) の *l*-メントールと 0.02~0.1% (v/v) の *l*-メントール以外のいずれか一つのモノテルペン類を添加した各平板培地を作成した。以上の各平板培地の中央に 2.1.1 の各供試菌株の菌体ディスクを 1 個接種してパラフィルムでシールし, 25°C・10 日間培養後の平板培地表面に占めるコロニーの占有率 (%) を目視で評価した。加えてノーマルの PDA 平板培地をコントロールとし, 同平板培地表面に占めるコロニーの占有率を同様に求め, コントロールの結果と比較することで抗カビ活性を評価した。コロニーの占有率の表示は, 平板培地表面コロニー占有率 75% 以上を「++++」, 同 50% 以

上 75%未満を「+++」、同 25%以上 50%未満を「++」、同 5%以上 25%未満を「+」、同 5%未満を「±」、成長なしを「0」とした。成長なしについては実体顕微鏡観察による確認を行った。なお、各平板培地の繰り返しは全て 3 枚とし、上述の 25°C・10 日間の培養で菌体成長が確認されなかった各モノテルペン類の最小濃度をそれぞれの最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 l-メントールの抗カビ活性

コントロールおよび l-メントール濃度が 0.02~0.5% (w/v) の各 PDA 平板培地における供試菌株の 25°C・10 日間培養後の平板培地表面のコロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) を表 1 に示す。コントロールのコロニー占有率は菌株によって異なるが、いずれの菌株においても l-メントールの濃度上昇に伴って同占有率が低下した。そして NBRC 4459, ANCT-11001, ANCT-11003 では 0.3% (w/v) が MIC, それ以外の 3 株では 0.5% (w/v) が MIC となった (以下, 全供試菌株に対する l-メントールの MIC=0.3~0.5% (w/v))。

l-メントールの溶媒に用いたエタノールにも抗カビ活性が存在するが、これまでの著者らの検討から本研究に供試した 6 株に対しては 1% (v/v) 以下の濃度では同活性が認められていない<sup>2)</sup>。表 1 の l-メントール濃度は 0.5% (w/v) が最大で、その PDA 平板培地のエタノール濃度は 0.5% (v/v) である。

表 1. 黒色真菌 6 株に対する l-メントールの濃度別抗カビ活性 (25°C・10 日間培養)

濃度 % (w/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	+	+	+++	+	+	++
0.05	+	+	++	+	+	++
0.1	±	+	++	±	±	++
0.3	0	±	±	0	±	0
0.5	0	0	0	0	0	0

※ : 抗カビ活性評価指標, +++++ : 平板培地表面のコロニー占有率 75%以上, +++ : 同 50%以上 75%未満, ++ : 同 25%以上 50%未満, + : 同 5%以上 25%未満, ± : 同 5%未満, 0 : 成長なし

注) 菌株番号 NBRC 4459 と NBRC 6348 : *C. cladosporioides*, NBRC 6353 : *A. pullulans*, ANCT-11001 と ANCT-11002 : *Cladosporium* spp., ANCT-11003 : *Aureobasidium* sp. ; コントロール : ノーマルの PDA ; 各繰り返し数 : 3

#### 3.2 l-メントール以外のモノテルペン類の抗カビ活性

ハッカ油に含まれる主要なモノテルペン類のメントン, ラベンダー油に含まれる(R)-プレゴン, リナロールおよび(-)-カルベオール, そしてレモングラス類などの精油成分で抗カビ作用が報告されているシトラール<sup>6)</sup> (シス-トランス異性体のゲラニールとネラル混合物) の防カビ活性を評価した。コントロールお

よび各モノテルペン類の濃度が0.02~0.1% (v/v) のPDA平板培地で $\ell$ -メントールの場合と同様に測定し、供試菌株の25°C・10日間培養後の平板培地表面のコロニー占有率(抗カビ活性評価指標)をそれぞれ表2~6に示す。

表2のメントンと表3の(R)-プレゴンでは、いずれも0.1% (v/v) までの添加濃度で黒色真菌6株に対するMICを見出せなかった。著者らのこれまでの検討結果からメントンのMICは0.5% (v/v) を超え<sup>3)</sup>、(R)-プレゴンのMICは $\ell$ -メントールと同程度と想定される<sup>1,3)</sup>(以下、全供試菌株に対するメントンのMIC>0.5% (v/v)、(R)-プレゴンのMIC=0.3~0.5% (v/v))。リナロールではNBRC 6348とANCT-11003に対してのみ0.1% (v/v) がMICとなった(以下、全供試菌株に対するリナロールのMIC $\geq$ 0.1% (v/v))。一方、表5の(-)-カルベオールではNBRC 6348, NBRC 6353およびANCT-11002に対して0.05% (v/v) がMICとなり、NBRC 4459, ANCT-1101およびANCT-11003に対して0.1% (v/v) がMICとなった(以下、全供試菌株に対する(-)-カルベオールのMIC=0.05~0.1% (v/v))。表6のシトラールではNBRC 4459に対してのみ0.02% (v/v) がMICとなり、それ以外の5株に対しては0.05% (v/v) がMICとなった(以下、全供試菌株に対するカルベオールのMIC=0.02~0.05% (v/v))。

以上の結果などから、本研究で用いた6種類のモノテルペン類の黒色真菌6株に対する抗カビ活性の高さの序列は、メントン(MIC>0.5% (v/v)) <(R)-プレゴン= $\ell$ -メントール(MIC=0.3~0.5% (v/v))  $\leq$  リナロール(MIC $\geq$ 0.1% (v/v)) <(-)-カルベオール(MIC=0.05~0.1% (v/v)) <シトラール(MIC=0.02~0.05% (v/v)) となる。図1に示したモノテルペン類の官能基に注目するといずれもケトン基またはアルコール基を各1個有するが、以上の抗カビ活性の序列との整合性は見当たらない。

表2. 黒色真菌6株に対するメントンの濃度別抗カビ活性(25°C・10日間培養)

濃度 % (v/v)	コロニー占有率(抗カビ活性評価指標)*					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	++	+	++++	+	++	+++
0.05	++	+	++++	+	++	+++
0.1	++	+	++++	+	+	++

※:表1と同じ 注)表1と同じ

表3. 黒色真菌6株に対する(R)-プレゴンの濃度別抗カビ活性(25°C・10日間培養)

濃度 % (v/v)	コロニー占有率(抗カビ活性評価指標)*					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	++	+	++++	+	+	+++
0.05	+	+	+++	+	+	+
0.1	+	+	+	±	±	+

※:表1と同じ 注)表1と同じ

表4. 黒色真菌6株に対するリナロールの濃度別抗カビ活性 (25°C・10日間培養)

濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	++	+	++++	+	+	+++
0.05	+	+	+	±	±	+
0.1	±	0	+	±	±	0

※: 表1と同じ 注) 表1と同じ

表5. 黒色真菌6株に対する(-)-カルベオールの濃度別抗カビ活性 (25°C・10日間培養)

濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	+	+	+++	+	+	+
0.05	±	0	0	±	0	±
0.1	0	0	0	0	0	0

※: 表1と同じ 注) 表1と同じ

表6. 黒色真菌6株に対するシトラールの濃度別抗カビ活性 (25°C・10日間培養)

濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※					
	菌株番号					
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003
コントロール	+++	++	++++	++	++	++++
0.02	0	±	++	+	±	+
0.05	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0

※: 表1と同じ 注) 表1と同じ

### 3.3 l-メントールと他のモノテルペン類との混合物の抗カビ活性

表1に示した黒色真菌6株に対するl-メントールの抗カビ活性に注目すると、0.02% (w/v) 濃度でコントロールと比較して1~2段階下位の指標 (PDA 平板培地表面に占めるコロニーの占有率) となっている。そこで本研究では、0.02% (w/v) 濃度のl-メントールと他の5種のモノテルペン類 (濃度: 0~0.1% (v/v)) との組み合わせによる抗カビ活性の相乗効果の発現を観察した。

表7にはl-メントールとメントンの組み合わせの抗カビ活性の測定結果を示す。メントン濃度が0.1% (v/v) まで上昇してもPDA 平板培地表面に占めるコロニーの占有率に変化はなく、0.02% (w/v) l-メント

ールの抗カビ活性指標と同じであることから相乗効果はなく「*l*-メントール支配」と判断した。表 8 には *l*-メントールと(R)-プレゴンの組み合わせの抗カビ活性の測定結果を示す。同表の(R)-プレゴンの 0% (v/v) と 0.02% (v/v) を比べると ANCT-11003 のみで抗カビ活性指標が 1 段階異なる (0.02% (v/v) でコロニー占有率が「++」→「+」) が、それ以外は同じ評価となったことで 0.02% (v/v) 濃度の(R)-プレゴンとの間に相乗効果はなく「*l*-メントール支配」と判断した。0.05~0.1% (v/v) 濃度の(R)-プレゴンでは NBRC の 3 株と ANCT の 1 株 (11001 または 11003) で、表 3 に示した同一濃度の(R)-プレゴン単独および 0.02% (w/v) 濃度の *l*-メントール単独よりもコロニー占有率が 1~2 段階下位となったことから「相乗効果あり」と判断した。

表 7. 0.02% (w/v) *l*-メントールとメントンとの組み合わせの抗カビ活性 (25°C・10 日間培養)

メントン 濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※						2成分混合物の 抗カビ活性
	菌株番号						
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003	
0	+	+	++	+	+	++	<i>l</i> -メントール 支配
0.02	+	+	++	+	+	++	
0.05	+	+	++	+	+	++	
0.1	+	+	++	+	+	++	

※: 表 1 と同じ

注) 菌株番号は表 1 と同じ; いずれの濃度のメントン添加 PDA 平板培地においても 0.02% (w/v) 濃度の *l*-メントールを添加; 各繰返し数: 3

表 8. 0.02% (w/v) *l*-メントールと(R)-プレゴンとの組み合わせの抗カビ活性 (25°C・10 日間培養)

プレゴン 濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※						2成分混合物の 抗カビ活性
	菌株番号						
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003	
0	+	+	++	+	+	++	<i>l</i> -メントール支配
0.02	+	+	++	+	+	+	
0.05	±	±	+	±	+	+	相乗効果
0.1	±	±	±	±	±	±	

※: 表 1 と同じ

注) 菌株番号は表 1 と同じ; いずれの濃度の(R)-プレゴン添加 PDA 平板培地においても 0.02% (w/v) 濃度の *l*-メントールを添加; 各繰返し数: 3

表 9 には *l*-メントールとリナロールの組み合わせの抗カビ活性の測定結果を示す。同表のリナロールの 0% (v/v) と 0.02% (v/v) を比べると抗カビ活性の指標が同じであったこと、表 4 に示したリナロール単独の 0.02% (v/v) の抗カビ活性指標も考慮して「*l*-メントール支配」と判断した。同様の考え方から (表 4 の 0.05% (v/v) と 0.1% (v/v), および表 9 の 0% (v/v) を比較), 表 9 のリナロールの 0.05% (v/v) は「相乗効果不明瞭」(NBRC 6348 でコロニー占有率が 1 段階下位へ, ANCT-11001 と ANCT-11002 のコロニー占有率が表 4 より 1 段階上位へ), 同表のリナロールの 0.1% (v/v) は「菌株により相乗効果あり」(NBRC 4459,

NBRC 6353 および ANCT-11001 のロニー占有率が1~2段階下位の抗カビ活性評価指標=0へ、NBRC 6348 と ANCT-11003 のコロニー占有率が表4より1段階上位へ)と判断した。

表10にはL-メントールと(-)-カルベオールの組み合わせの抗カビ活性の測定結果を示す。同表の(-)-カルベオールの0% (v/v) と0.02% (v/v) を比べるとNBRC 6353 と ANCT-11002 のコロニー占有率が1段階下位となり、さらに表5の0.02% (v/v) との比較で両株のコロニー占有率が1~2段階下位となったことで(その他の4株は表5の0.02% (v/v) のコロニー占有率と同じ)「菌株により相乗効果あり」と判断した。表10の(-)-カルベオールの0.05~0.1% (v/v) の抗カビ活性指標は表5の各同濃度の結果と等しいことから「カルベオール支配」と判断した。

表11にはL-メントールとシトラールの組み合わせの抗カビ活性の測定結果を示す。同表のシトラールの0% (v/v) と0.02% (v/v) を比べるとNBRC 6348, NBRC 6353 および ANCT-11003 のコロニー占有率が2段階下位となり、表6の0.02% (v/v) との比較では同3株のコロニー占有率が1段階下位となったことも考慮して(ANCT-11002 のコロニー占有率は表6より1段階上位へ)「菌株により相乗効果あり」と判断した。表11のシトラールの0.05~0.1% (v/v) の抗カビ活性の指標は表6の各同濃度の指標とほぼ等しいことから「シトラール支配」と判断した。

表9. 0.02% (w/v) L-メントールとリナロールとの組み合わせの抗カビ活性 (25°C・10日間培養)

リナロール濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※						2成分混合物の 抗カビ活性
	菌株番号						
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003	
0	+	+	++	+	+	++	
0.02	+	+	++	+	+	++	L-メントール支配
0.05	+	±	+	+	+	+	相乗効果不明瞭
0.1	0	±	0	0	±	±	菌株により相乗効果

※: 表1と同じ

注) 菌株番号は表1と同じ; いずれの濃度のリナロール添加 PDA 平板培地においても0.02% (w/v) 濃度のL-メントールを添加; 各繰返し数: 3

表10. 0.02% (w/v) L-メントールと(-)-カルベオールの組み合わせの抗カビ活性 (25°C・10日間培養)

カルベオール濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※						2成分混合物の 抗カビ活性
	菌株番号						
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003	
0	+	+	++	+	+	++	
0.02	+	+	+	+	±	+	菌株により相乗効果
0.05	±	0	0	±	0	±	カルベオール支配
0.1	0	0	0	±	0	0	

※: 表1と同じ

注) 菌株番号は表1と同じ; いずれの濃度の(-)-カルベオール添加 PDA 平板培地においても0.02% (w/v) 濃度のL-メントールを添加; 各繰返し数: 3

表 11. 0.02% (w/v)  $\ell$ -メントールとシトラールとの組み合わせの抗カビ活性 (25°C・10 日間培養)

シトラール 濃度 % (v/v)	コロニー占有率 (抗カビ活性評価指標) ※						2成分混合物の 抗カビ活性
	菌株番号						
	NBRC 4459	NBRC 6348	NBRC 6353	ANCT-11001	ANCT-11002	ANCT-11003	
0	+	+	++	+	+	++	
0.02	0	0	+	+	+	±	菌株により相乗効果
0.05	0	0	0	±	0	0	シトラール 支配
0.1	0	0	0	0	0	0	

※: 表 1 と同じ

注) 菌株番号は表 1 と同じ ; いずれの濃度のシトラール添加 PDA 平板培地においても 0.02% (w/v) 濃度の  $\ell$ -メントールを添加 ; 各繰返し数 : 3

表 7~11 において「相乗効果あり」と「菌株により相乗効果あり」とした試験区数は 5 (全体の 33.3% : 全 15 試験区), 同様に「〇〇支配」とした試験区数は 9 (全体の 60%) であった。後者の「〇〇支配」では、「 $\ell$ -メントール支配」の試験区数は 5, 「カルベオール支配」と「シトラール支配」の試験区数が各 2 であった。そして, 前述の抗カビ活性の高さの序列であるメントン<(R)-プレゴン= $\ell$ -メントール $\leq$ リナロール<(-)カルベオール<シトラールを考慮すると,  $\ell$ -メントール未満および同程度の序列のモノテルペン類(メントン, (R)-プレゴン, リナロール) では「 $\ell$ -メントール支配」となり,  $\ell$ -メントールを超える序列のモノテルペン類 ((-)カルベオール, シトラール) では「カルベオール支配」と「シトラール支配」となって組み合わせたモノテルペン類のいずれかに支配される傾向が観察された。

また, 「相乗効果あり」と「菌株により相乗効果あり」とした 5 試験区において抗カビ活性評価指標が「0」(MIC 相当)となった菌株数は, 表 9 の 0.1% (v/v) リナロールで 3 株 (NBRC 4459, NBRC 6353, ANCT-11001), 表 11 の 0.02% (v/v) シトラールで 1 株 (NBRC 6348) の延べ 4 株であった。これに対して「〇〇支配」において抗カビ活性評価指標が「0」となった菌株数は, 表 10 と表 11 の 0.05% (v/v) と 0.1% (v/v) の(-)カルベオールとシトラールの延べ 19 株であった。この結果は供試した黒色真菌 6 株に対する(-)カルベオールとシトラールの MIC が 0.05~0.1% (v/v) と考えられる。一方, 0.02% (w/v)  $\ell$ -メントールと組み合わせた(-)カルベオールとシトラールの両 0.02% (v/v) 濃度で MIC 相当の相乗効果の発現はシトラールにおける NBRC 6348 のみであった。

#### 4. まとめ

本研究ではハッカ油とラベンダー油の共通含有成分で抗カビ活性を有するモノテルペン類の  $\ell$ -メントールに注目し, その他 5 種類のモノテルペン類との組み合わせによる黒色真菌に対する抗カビ活性の相乗効果発現を接触実験系にて観察した。 $\ell$ -メントールに次ぐハッカ油のメジャー成分のメントンは多少の抗カビ活性を有するものの (表 2 参照), 本研究条件でその性能は  $\ell$ -メントールの抗カビ活性に隠された (表 7 参照)。ハッカ油の抗カビ活性をまとめた前報において  $\ell$ -メントールとハッカ油の他の構成成分との相乗効果の可能性を示唆した<sup>3)</sup>が, 今回の  $\ell$ -メントールとメントンの 2 成分系では同効果を確認できなかった。今後

においては、2成分系のℓ-メントール濃度を0.02% (w/v)以上に設定する試みも不可欠と考える。

一方、ℓ-メントールとラベンダー油に含まれる(R)-プレゴン、リナロールおよび(-)-カルベオールの各2成分系において(R)-プレゴンの0.05~0.1% (v/v)、リナロールの0.1% (v/v) および(-)-カルベオールの0.02% (v/v)で「菌株により相乗効果あり」または「相乗効果あり」の結果が得られた(表8~10参照)。さらにレモンガラス類に含まれ、抗カビ活性を有す精油成分のシトラールとの2成分系でも、0.02% (v/v)のシトラール濃度で「菌株により相乗効果あり」の結果が得られた(表11参照)。ラベンダー油の抗カビ活性を精査した前報において構成成分の相乗効果の存在を推定したり。その結果、今回のℓ-メントールと(R)-プレゴン、ℓ-メントールとリナロール、そしてℓ-メントールと(-)-カルベオールの各2成分系で同精油中のモノテルペン類同士による相乗効果の発現を一部の供試菌株において確認できた。

加えて、同種の精油(ここではハッカ油とラベンダー油)中のモノテルペン類間に限定することなくモノテルペン類同士の抗カビ活性の相乗効果の発現をℓ-メントールとシトラールの2成分系で確認できた。本研究ではℓ-メントール濃度を0.02% (w/v)に限定したことで0.02% (v/v)濃度のシトラールとの組み合わせで「菌株により相乗効果あり」となったが、メントンの組み合わせと同様にℓ-メントール濃度を向上させる条件設定に興味を持たれる。今後においては以上の結果を基礎にして、モノテルペン類の2成分系に限定することなく、3成分系以上での抗カビ活性の相乗効果についても検討したい。

## 参 考 文 献

- 1) 富樫巖, 鈴木夕湖, 高橋いくり, 高橋桃子, 高田恵多, 林志門: 黒色真菌 (*Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp.) に対するラベンダー油の抗カビ活性評価—水分活性とエタノールの組み合わせ効果—. 日本菌学会会報, **59**(2): 53-59(2018)
- 2) 富樫巖, 鈴木夕湖, 林志門: *Cladosporium* spp.と*Aureobasidium* spp.に対するラベンダー油の抗カビ活性の評価. 旭川工業高等専門学校研究報文, **57**: 9-15(2020)
- 3) 富樫巖, 火ノ川知詠: 黒色真菌と灰色カビに対するハッカ油・ℓ-メントール・メントンの抗カビ活性の評価. 旭川工業高等専門学校研究報文, **59**: 37-43(2022)
- 4) Hanamanthagouda MS, Kakkalameeli SB, Naik PM, Magella P, Murthy HN, Seetharamareddy HR: Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 118(3): 836-839(2010)
- 5) 和泉光則: 北海道北見地方のハッカ(薄荷). *化学と教育*, 64(4): 188-191(2016)
- 6) Moleyar V, Narasimham P: Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*, 3(4): 331-336(1986)

## 【研究紹介】

### トリコデルマ属菌株の-20°C 凍結保存の試み

富樫 巖\*

増羽龍斗\*\*

## Attempt of the Cryopreservation of *Trichoderma* spp. Strains at -20°C

Iwao TOGASHI

Ryuuto MASUBA

### Abstract

The preservation of four strains of *Trichoderma* spp. using mycelium-agar disks (5 mm in diameter) soaked in four kinds of cryoprotectants (i.e. 40% (w/w) maltose aqueous solution, 40% (w/w) glucose one, 10% (w/w) glycerol one, and pure water) at -20°C of an experimental freezer and at around -19°C of a domestic freezer was investigated. The results obtained were as follows:

- (1) The survival rate of the four strains (NBRC 33016, 93130Tr, ANCT-05011, ANCT-05138) was 100% soaked in the maltose aqueous solution, the glucose one, and the glycerol one at -20°C for 133 days.
- (2) Using the maltose aqueous solution for the cryoprotectant, the survival rate of all two strains tested (NBRC 33016, ANCT-05011) was 100% at -20°C and at around -19°C for 240 days.
- (3) Using pure water for the cryoprotectant, the survival rate of the two strains tested (NBRC 33016, ANCT-05011) was 100% at -20°C and at around -19°C for 84 days.

Therefore, it was revealed that the cryopreserving of *Trichoderma* spp. strains using mycelium-agar disks at around -20°C had a potential.

## 1. はじめに

通常、微生物菌株の長期保存には-196~-80°Cの凍結保存法、または凍結乾燥法や L-乾燥法が用いられる<sup>14)</sup>。一方、それらの方法には初期設備の投資やランニングコストが高価となる、または熟練技術が求められるなどのデメリットがある。そこで著者らは微生物菌株の凍結保存の低コスト化や作業の簡素化を狙って、菌体ディスク法と-20°Cの実験用冷凍庫（定温制御）や霜取り機能によって庫内温度に変動が生じる家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室（平均-19°C程度）を用い、食用菌・菌株（担子菌の菌糸体）の凍結保存の可能性を検討<sup>5-12)</sup>してきた。

本研究では-20°C定温冷凍庫と家庭用冷凍庫を用い、4種類の凍結保護液によるトリコデルマ属菌株（不完全菌）の凍結保存を試みた。供試菌株には菌糸体と分生胞子を有する通常菌株と分生胞子をほとんど持

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

たない不稔系菌株を供試し，両者の凍結保存後の差異にも注目した（図 1 参照）。

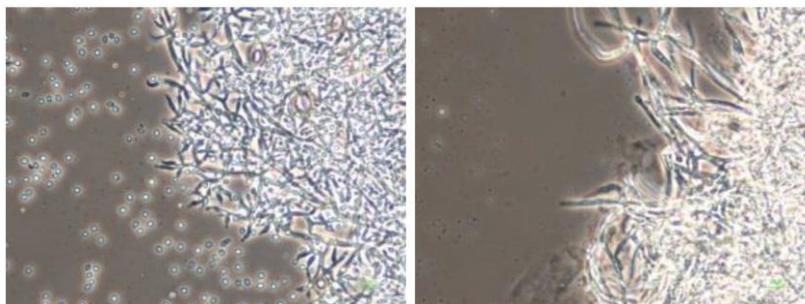


図 1. トリコデルマ属菌の通常菌株例（左：菌糸体と分生孢子）と不稔系菌株例（右：ほぼ菌糸体のみ）の位相差顕微鏡写真

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 菌株，菌体ディスク，菌糸ペレット

トリコデルマ属菌にはいずれも *Trichoderma harzianum* Rifai の NBRC 33016（通常菌株，ベノミル非感受性株）と 93130Tr（林産試験場保存株：通常菌株，ベノミル感受性株）<sup>13,14</sup>，*Trichoderma* spp. の ANCT-05011 と ANCT-05138（旭川高専保存株：両者共に不稔系菌株のベノミル感受性株，2005 年に上川管内愛別町の原木シイタケ栽培舎で分離）<sup>15,16</sup> の合計 4 株を供試した。いずれも日水製薬製のポテトデキストロース寒天（PDA）培地を用いて約 7°C で継代培養保存していたものである。

凍結保存に用いる直径 5 mm の菌体ディスク（菌体と栄養寒天培地が共存したもの）については，直径 90 mm の PDA 平板培地に各菌株を接種して 25°C で 5～7 日間（通常菌株～不稔系菌株）前培養し，成長したコロニーを培地ごとコルクボーラーで打ち抜いて作成した。また，凍結保存用の直径約 5 mm の菌糸ペレット（菌糸体のみ）については，2%（w/v）麦芽エキス液体培地 100 ml を 300 ml 三角フラスコに入れて高圧蒸気滅菌（121°C・15 分間）した後，NBRC 33016 または ANCT-05011 の菌体ディスク 1 個を接種し，25°C・60 rpm で 2 日間振とう培養することで作成した。

#### 2.1.2 凍結保護液

高圧蒸気滅菌した 40%（w/w）マルトース水溶液，40%（w/w）グルコース水溶液，10%（w/w）グリセリン水溶液，および純水を凍結保護液として用いた。なお，凍結保護液の調製に使用した試薬はいずれも和光純薬工業製の特級を使用した。

### 2.2 凍結保存試験

#### 2.2.1 凍結方法および解凍方法

1.5 ml のエッペンドルフ製マイクロチューブに 2.1.1 に示した菌体ディスク 5 個，または菌糸ペレット 5

個を入れ、2.1.2 の凍結保護液約 1.2 ml を投入して菌体ディスクまたは菌糸ペレットを覆った。前処理なしで $-20^{\circ}\text{C}$ 定温制御のアルミブロックフリーザー（トミー精工製，MC-100）または家庭用冷凍冷蔵庫（日立製作所製，401 リットルタイプ）の冷凍室へ最大 240 日間投入した。図 2 に示すように、後者の冷凍室は 24 時間平均温度 $-18.6^{\circ}\text{C}$ ，変温幅 $-20.1\sim-12.3^{\circ}\text{C}$ であった（アズワン製簡易データロガー DL171 で測定）。そして、適宜サンプリングしたマイクロチューブを  $30^{\circ}\text{C}$  のインキュベーターに 20 分間投入することで解凍した。

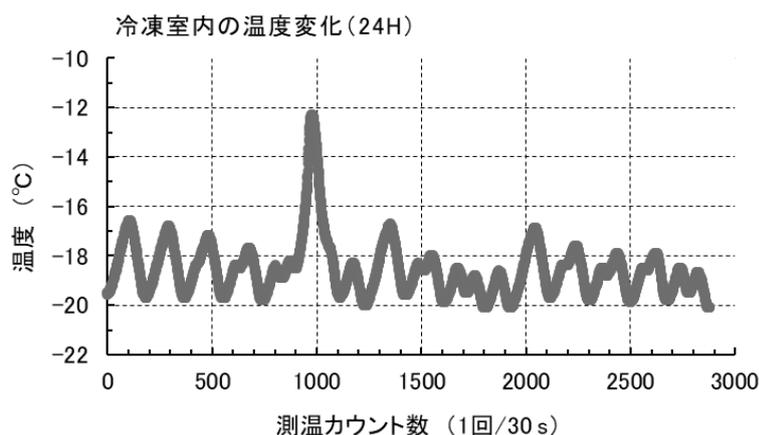


図 2. 供試した家庭用冷蔵庫冷凍庫（401 リットルタイプ）の冷凍室内の 24 時間の温度変化  
注）横軸は 30 秒間毎に温度測定したカウント数を示す（24 時間で 2880 回）；終日クローズ状態での平均温度： $-18.6^{\circ}\text{C}$ ，同変温値： $-20.1\sim-12.3^{\circ}\text{C}$ ，同 $-17.0^{\circ}\text{C}$ 以上の時間：51 分間

### 2.2.2 解凍後の生存確認方法

直径 90 mm の PDA 平板培地 1 枚に、2.2.1 に示した解凍後の菌体ディスクまたは菌糸ペレット 5 個を接種して  $25^{\circ}\text{C}$  で 7~10 日間培養し、経時的な菌体再生状況を実体顕微鏡観察した。菌体ディスクまたは菌糸ペレットから菌糸が再生して PDA 平板培地に活着した時点で生存と判断し、1 組 5 個の菌体ディスクまたは菌糸ペレットの活着で生存率 100% とした。なお、コントロールには各継代培養保存株の前培養コロニーから得た直径 5 mm の菌体ディスクを用いた。

### 2.2.3 NBRC 33016（ベノミル非感受性株）のベノミル感受性試験

ノーマルの PDA と 0.01 ~ 0.2% (w/v) 濃度になるようベンレート® 水和剤（ベノミル 50% (w/w) 含有，住友化学製）を添加した PDA を高圧蒸気滅菌して各平板培地を作成した。40% (w/w) マルトース水溶液を凍結保護液に用いて $-20^{\circ}\text{C}$ で 240 日間凍結した NBRC 33016 について、2.2.2 で生存率を測定したコロニーとコントロールの前培養コロニーから得た菌体ディスクを各平板培地の中央に 1 個接種し、 $25^{\circ}\text{C} \cdot 10$  日間培養して菌体成長量を経時的に測定した。平板培地の反復数は 3 とし、各平板培地のコロニーの半径方向 4 点を菌体成長量とした（試験区当たりのデータ数：12）。

## 3. 結果と考察

### 3.1 凍結後の *Trichoderma* spp. 菌株（菌体ディスク，菌体ペレット）の菌体再生挙動

凍結保護液には-20°C でシイタケ (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) 菌糸体に対する凍結保護性能が優れる 40% (w/w) マルトース水溶液<sup>17)</sup>，同水溶液と比べて性能が劣るがシイタケ菌糸体の-20°C凍結保護性能が期待できる 40% (w/w) グルコース水溶液<sup>17)</sup>，および超低温凍結保存で凍結保護液として汎用される 10% (w/w) グリセリン水溶液<sup>4)</sup>を用い，トリコデルマ属菌の菌体ディスクに対する凍結保護性能を-20°C 定温下で観察した。133 日間凍結後の 4 株の菌体再生挙動（生存率）の結果を表 1 に示す。

表 1. 3 種類の凍結保護液で-20°C・133 日間（19 週間）凍結保存後の供試菌株の生存率（25°C）

25°C 培養日数	凍結保護液	供試菌株			
		NBRC 33016	93130Tr	ANCT-05011	ANCT-05138
0日 (接種日)	マルトース				
	グルコース	0%	0%	0%	0%
	グリセリン				
Cont.					
1日	マルトース			0%	
	グルコース	100%	100%	0%	100%
	グリセリン			0%	
Cont.					
2日	マルトース			100%	
	グルコース	100%	100%	100%	100%
	グリセリン			100%	
Cont.					

注) 93130Tr：林産試験場保存株，ANCT-05011 と ANCT-05138：旭川高専保存株；

Cont.（コントロール）：継代保存株；-20°C のアルミブロックフリーザー使用

133 日間凍結後の生存率において，すべての供試菌株に凍結保護液の差異は観察されなかった。しかし，ANCT-05011 の菌糸再生が他の 3 株より 1 日遅れて培養開始 2 日後に生存率 100%となった。以下に示す表 2（49 日間の凍結）では 4 株の菌糸再生挙動が同一であったことから，ANCT-05011 の菌糸再生の遅延は凍結期間が延びた影響の可能性が高い。また，不稔系菌株の ANCT-05138 に菌糸再生遅延がなかったことから ANCT-05011 が-20°C凍結の影響を受け易いことが考えられた。一方，いずれの再生菌体も 3 日間 (*T. harzianum* の 2 株) または 4~5 日間 (ANCT-05011, ANCT-05138) の 25°C培養で直径 90 mm の PDA 平板培地表面すべてを覆い，各コロニー外観に異常がなかったことから，各コントロールと比べた差異は生じていなかったと推察できる。

シイタケ菌糸体の-20°C凍結保存において高濃度糖液よりも凍結保護性能が低かった 10% (w/w) グリセリン水溶液<sup>17)</sup>であるが，トリコデルマ属菌では 40% (w/w) マルトース水溶液や 40% (w/w) グルコース水溶液と同等の同性能を示した。シイタケの菌糸体と比べて，トリコデルマ属菌の菌体は-20°Cでの凍結ストレスを受け難いことが示唆された。

次に，-20°Cと-18.6°Cで 40% (w/w) マルトース水溶液と 4 株の菌体ディスクを供試して 49 日間の凍結保存を行った。その菌体再生挙動を表 2 に示す。表 1 の凍結期間と比べて短期間であるが，いずれも培養

開始1日後に菌体ディスクからの再生菌糸がPDA平板培地に活着し、生存率100%に至った。表1と同様に菌体ディスクの菌糸再生挙動がコントロールと同様であり、シイタケ菌糸体で観察された凍結保存株の菌糸再生遅延がみられなかった。そして、いずれの再生菌体も3日間(*T. harzianum*の2株)または4~5日間(ANCT-05011とANCT-05138)の25°C培養で直径90mmのPDA平板培地表面すべてを覆い、各コロニー外観に異常がみられなかった。表1に示した-20°C定温の場合と同じく、-18.6°Cでの49日間凍結で、不稔系菌株にもコントロールと比べた差異は生じていないと考えられる。

表2. 40% (w/w) マルトース水溶液で49日間(7週間)凍結保存後の供試菌株の生存率(25°C)

25°C 培養日数	保存温度 など	供試菌株			
		NBRC 33016	93130Tr	ANCT-05011	ANCT-05138
0日 (接種日)	-20°C				
	-18.6°C	0%	0%	0%	0%
	Cont.				
1日	-20°C				
	-18.6°C	100%	100%	100%	100%
	Cont.				

注) -18.6°C: 変温がある家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室使用; それ以外は表1と同じ

表2に示した両温度条件下の凍結保存において、40% (w/w) マルトース水溶液と通常菌株2株(NBRC33016, 93130Tr)の菌体ディスクの組み合わせを240日間(約34週間)まで継続した。その結果、温度条件の違いに拘わらず接種・培養開始1日後に両菌株の菌体ディスクの再生菌糸がPDA平板培地に活着し、半年を超える凍結後においても生存率100%が維持された。いずれの再生菌体も3日間の25°C培養で直径90mmのPDA平板培地表面のすべてを覆い、そのコロニー外観に異常がなかったことから、240日間の凍結保存においてもコントロールと比べた差異は生じていないと推察される。

シイタケ菌糸体の-20°C凍結保護性能が低かった純水(菌株により異なるが、生存率100%維持期間は3~14日間と短い)<sup>18,19)</sup>、そしてNBRC 33016とANCT-0511の2株を組み合わせで-20°C凍結保存を試みた。サンプリングは凍結開始28日後と84日後に行い、得られた結果を表3に示す。28~84日間の凍結後にANCT-05011の菌体再生が1日遅れたが、両菌株共に生存率100%を維持した。

表3. 純水で-20°C・84日間(12週間)凍結保存後の供試菌株の生存率(25°C)

25°C 培養日数	保存温度 など	供試菌株	
		NBRC 33016	ANCT-05011
0日 (接種日)	-20°C		
	Cont.	0%	0%
1日	-20°C		0%
	Cont.	100%	100%
2日	-20°C		
	Cont.	100%	100%

注) 両供試菌株の28日間(4週間)凍結後の菌糸再生挙動も同じ

シイタケの菌体ディスク（菌糸体+栄養寒天培地）と菌糸ペレット（菌糸体のみ）を供試して、40%（w/w）マルトース水溶液や 40%（w/w）グルコース水溶液を用いて前処理なしで-20°C凍結を行うと、菌体ディスクでは 28~42 日間程度生存率 100%を維持し、菌糸ペレットでは 7 日間以内に生存率 100%を下回った<sup>17)</sup>。そこで NBRC 33016 と ANCT-0511 の菌糸ペレットを用いて-18.6°C・28 日間の凍結保存を行い、その生存率の測定結果を表 4 に示す。表 3 と同様で ANCT-05011 で菌糸再生遅延が観察されたものの、純水を使用したにもかかわらず両者共に生存率 100%が維持された。そのメカニズムの解明は今後の課題になるが、栄養寒天培地や分生胞子の有無にかかわらずトリコデルマ属菌の菌体は-20°C凍結に耐えることが示唆された

表 4. 純水で-18.6°C・28 日間（4 週間）凍結保存後の供試菌株（菌糸ペレット）の生存率（25°C）

25°C 培養日数	保存温度	供試菌株	
		NBRC 33016	ANCT-05011
0日	-18.6°C	0%	0%
1日		100%	0%
2日		100%	100%

注) 25°C培養日数の 0 日は接種日

### 3.2 凍結後の *T. harzianum* NBRC 33016 のペノミル感受性

-20°C凍結保存で菌株に生じる遺伝的変化の可能性を観察するため、40%（w/w）マルトース水溶液を凍結保護液に用いた-20°C・240 日間凍結保存後の NBRC 33016 についてベンレート水和剤添加 PDA 平板培地での菌体成長を 25°Cで観察した。図 3 に凍結保存株とコントロール（継代培養保存株）の菌体成長挙動を示す。なお、図中のノーマル PDA はベンレート水和剤無添加の PDA 平板培地である。

結果を比較すると両者は同様の挙動を示した。すなわち、すべての試験区で培養開始 1 日後に各菌体ディスクの全てが菌体活着して菌体成長に至り、ノーマル PDA では培養開始 3 日後で平板培地表面の全てがコロニーで覆われ、ベンレート濃度が 0.01 ~ 0.1%（w/v）ではノーマルと比較してやや菌体成長が遅く同 4 日後に平板培地表面の全てがコロニーで覆われた。そして、食用菌栽培でのベンレート水和剤の使用最大濃度の 2 倍となる 0.2%（w/v）では同 5 日後に平板培地表面の全てがコロニーで覆われた。凍結保存株とコントロールの各コロニー外観にも差異がなかったことからペノミル非感受性に変化はなく、-20°C・240 日間凍結保存後において NBRC 33016 に遺伝的変化は生じていないと考えられる。

## 4. まとめ

本研究では-20°C定温の冷凍庫と霜取り機能によって庫内に温度変動が生じる家庭用冷凍庫（平均-18.6°C，変温幅-20.1~-12.3°C）で、不完全菌のトリコデルマ属菌の菌体ディスクを用いて凍結保存を試みた。供試菌株には菌糸体と分生胞子を有する『通常菌株』と分生胞子をほとんど持たない『不稔系菌株』を用い、凍結保存後の菌糸再生挙動の差異に注目した。

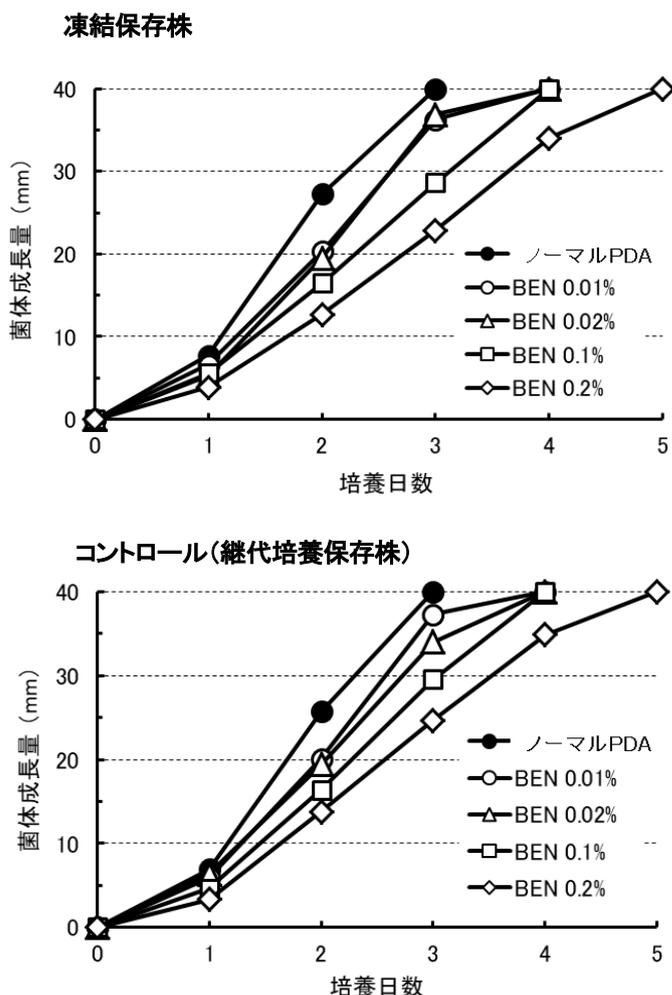


図3. 40% (w/w) マルトース水溶液で-20℃・240日間凍結保存したNBRC 33016 (上) とコントロール (下) のペノミル感受性 (25℃での菌体成長挙動)

注) ノーマル PDA : 通常の PDA 平板培地, BEN 0.01~BEN0.2% : PDA 平板培地のベンレート®水和剤 (ペノミル 50%) の添加濃度 (w/v) を示す

-20℃・133日間凍結保存において供試4株共に生存率100%が維持され、40% (w/w) マルトース水溶液、40% (w/w) グルコース水溶液および10% (w/w) グリセリン水溶液の各凍結保護液の違いは供試菌株の菌体再生に影響しなかった。そして、40% (w/w) マルトース水溶液を用いた-20℃と-18.6℃の49日間凍結後も4株の生存率100%が維持され、凍結保存中の変温の影響は観察されなかった。凍結保存後の菌体ディスクはコントロール (継代培養保存株) の菌体再生挙動と比較してほぼ差異がなく (ANCT-05011の49日間を超える凍結において菌体ディスクからの菌体再生がコントロールより1日遅延した)、トリコデルマ属菌の菌体ディスクには家庭用冷凍庫の利用を含む-20℃程度での凍結保存の可能性が期待できる。今後においては供試菌株の増大および凍結期間の延長に興味を持たれる。

加えて、シイタケの菌体ディスクの-20℃凍結保存で凍結保護液性能が低い純水は、トリコデルマ属菌の菌体ディスクでは他の凍結保護液と遜色のない結果を示した。純水を用いてトリコデルマ属菌の菌糸ペ

レット（菌糸体のみ）を $-18.6^{\circ}\text{C}$ ・28日間凍結保存した場合にも生存率100%が維持されたことから、栄養寒天培地や分生孢子の有無にかかわらずトリコデルマ属菌の菌体は $-20^{\circ}\text{C}$ 程度での凍結に耐えることが示唆された。

40% (w/w) マルトース水溶液を用いて $-20^{\circ}\text{C}$ ・240日間凍結保存後のNBRC 33016について（生存率100%）、ベンレート水和剤濃度を0.01～0.2% (w/v)としたPDA平板培地で菌体成長挙動を観察した結果、コントロール（継代培養保存株）と同様のベノミル非感受性が保持されていた。 $-20^{\circ}\text{C}$ 程度での凍結保存でトリコデルマ属菌に遺伝的変化が生じる可能性が低いことが推察される。

## 参 考 文 献

- 1) 長谷川武治：菌株の保存法. 化学と生物, **2**(3) : 45-50 (1964)
- 2) 椿 啓介：微生物の菌株保存. マイコトキシン研究会会報 (Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.), No.24 : 1-3 (1986)
- 3) 横山竜夫：きのこ学 (9章 菌株保存), 古川久彦編, 共立出版 : 230-237 (1992)
- 4) 中川恭好, 鈴木健一朗：微生物資源の確保と菌株保存の重要性. 防菌防黴, **41**(7) : 31-40 (2013)
- 5) 富樫 巖, 幸田有以：純水と $-20^{\circ}\text{C}$ を用いたエノキタケ菌株の凍結保存の試み. *New Food Industry*, **55**(1) : 6-12 (2013)
- 6) 富樫 巖, 大谷和也, 安東敬史, 細川芽衣, 曾我 瞳, 幸田有以：シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における高濃度糖水溶液と寒天培地の影響. 日本菌学会会報, **57**(2) : 93-98 (2016)
- 7) 富樫 巖, 新井 悠： $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存におけるヒラタケ菌糸体に対する高濃度グルコース水溶液の保護効果. 日本菌学会会報, **60**(2) : 37-41 (2019)
- 8) 富樫 巖, 鬼柳春花： $-20^{\circ}\text{C}$ と $-50^{\circ}\text{C}$ におけるシイタケ菌糸体とヒラタケ菌糸体の凍結保存. *New Food Industry*, **62**(6) : 391-398 (2020)
- 9) 富樫 巖, 梶 暉, 横田喬央：シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における前処理の効果. *New Food Industry*, **63**(3) : 177-184 (2021)
- 10) 富樫 巖, 西脇綾乃, 村上希生, 梶 暉, 鬼柳春花, 横田喬央：シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における凍結保護剤の性能評価～単糖, 二糖, 多価アルコール類の比較～. *New Food Industry*, **63**(5) : 360-366 (2021)
- 11) 富樫 巖, 村上希生, 川島 萌：シイタケ菌株とヒラタケ菌株の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における前処理時間の影響. *New Food Industry*, **63**(8) : 555-564 (2021)
- 12) 富樫 巖, 内海早智：家庭用冷凍庫 ( $-18^{\circ}\text{C}$ 前後)を用いたシイタケ菌株の凍結保存の試み. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.59 : 44-57 (2022)
- 13) 富樫 巖, 伊藤 清, 宜寿次盛生, 原田 陽：北海道における菌床シイタケ発生施設の糸状菌汚染状況と *Trichoderma* spp. 分離菌株に対するベノミル水和剤の影響. 木材学会誌, **42**(12) : 1258-1263 (1996)
- 14) Togashi I, Gisusi S, Harada A: Antifungal activity of commercial Disinfectants against a benomyl-tolerant strain of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Wood Science*, **44**(5) : 414-416 (1998)
- 15) 富樫 巖, 宮崎貞之：木材腐朽菌に対するトリコデルマ属菌59菌株の攻撃性評価. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.48 : 44-50 (2011)
- 16) 富樫 巖, 大谷奈緒, 芳賀 仁：北海道の原木シイタケ栽培施設に分布するトリコデルマ属菌の特性把握の試み. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.59 : 16-27 (2022)
- 17) 富樫 巖, 大谷和也, 安東敬史, 細川芽衣, 曾我 瞳, 幸田有以：シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における高濃度糖水溶液と寒

天培地の影響. 日本菌学会会報, **57**(2): 93-98 (2016)

- 18) 細川芽衣, 富樫 巖:  $-20^{\circ}\text{C}$ とグルコース水溶液を用いたシイタケ菌株の凍結保存, 化学系学協会北海道支部 2014 年冬季研究発表会 (札幌市) プログラム集: 5 (2014)
- 19) 細川芽衣:  $-20^{\circ}\text{C}$ と高濃度のグルコース水溶液を用いたシイタケの菌株保存の試み, 旭川工業高等専門学校 平成25年度物質化学工学科卒業研究論文: 1-25 (2014)

【研究紹介】

ナミダタケの木材腐朽に対する木炭固定化トリコデルマの阻害効果

富樫 巖\*

松下文也\*\*

Inhibitory effects of *Trichoderma* spp. immobilized to  
Charcoal-particles on the Wood Rot by *Serpula lacrymans*

Iwao TOGASHI

Fumiya MATSUSHITA

**Abstract**

Inhibitory effects of charcoal particles immobilized *Trichoderma* spp. on wood degradation by a psychrophilic-house fungus, *Serpula lacrymans* were examined. Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) blocks were covered with three kinds of the particles immobilized *Trichoderma* spp. (ANCT-05013, ANCT-05103 and NBRC 33016) and exposed to *S. lacrymans* (HFPR 0301 and HFPR 0502) at 20°C for 12 weeks to measure mass losses. ANCT-05013 and ANCT-05103 showed superior inhibition effects on wood degradation compared to NBRC 33016. The mass losses were 0% in the particles immobilized ANCT-05013 and ANCT-05103, 9-10% in the ones immobilized NBRC 33016, and 11-18% in the absence of the particles (control). Furthermore, *S. lacrymans* mycelial growth (HFPR 0301 and HFPR 0502) did not occur at the charcoal surface mobilized ANCT-05013 and ANCT-05103. This study revealed that the charcoal particles mobilized ANCT-05013 and ANCT-05103 had superior inhibition performance to brown rot by *S. lacrymans*. The two strains of ANCT-05013 and ANCT-05103 were accepted as NBRC 113097 and NBRC 113098 in January 2018, respectively.

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

## 1. はじめに

木材は再生産が可能なバイオマス資源であり、金属系や無機系の材料と比較して生産や加工に要するエネルギー消費量が少なく、その利用は地球温暖化防止に貢献するポテンシャルを有すると評されている<sup>1)</sup>。一方、生物材料である木材は木材腐朽菌（担子菌）やシロアリなどによる生物劣化を受けることがあり、その結果として本来の強度を失うことになる。この対策としては種々の防腐剤や防蟻薬剤を木材に塗布・注入する防腐・防蟻技術が確立している。また、化学薬剤に頼らない防腐技術として菌寄生菌である *Trichoderma* spp.（以下、トリコデルマ属菌）の生菌や代謝産物を利用するバイオリジカルコントロールが検討されたものの、防腐薬剤に代わる防腐技術として実用化には至っていない<sup>2,5)</sup>。

著者らは木炭粉砕物にトリコデルマ属菌を固定化した「固定化トリコデルマ」を用い、木製土木構造物の地際部の腐朽を遅延させる基礎技術を開発した<sup>6)</sup>（図 1 参照）。アルカリ性の担持材料（木炭）と固定化用菌株として選抜されたトリコデルマ属菌の組み合わせが、主要な木材腐朽菌のオオウズラタケ（*Fomitopsis palustris* (Berk.&M.A.Curtis) Gilb.&Ryvarden）とカワラタケ（*Trametes versicolor* (Linnaeus) Llvod）による木材分解反応を遅延させることを明らかにした<sup>7,9)</sup>。

近年、住宅内全体の空気質の改善や浄化、さらには床下の調湿を狙って木炭粉砕物を床下空間に敷き詰めるケースがある。本研究ではこの床下の木炭に注目し、家屋害菌（主には褐色腐朽菌）の被害防止に固定化トリコデルマの利用可能性を検討することとした。省エネを目的に高断熱・高気密の住宅が一般的となった北海道であるが、同住宅建設の黎明期となった 1970～1980 年代に好低温菌のナミダタケ（*Serpula lacrymans* (Wulfen : Fries) Schroter）による住宅被害が多発し<sup>10)</sup>、社会問題に発展して現在に至っている。そこで、家屋害菌・ナミダタケの木材腐朽に対して固定化トリコデルマの阻害性能を実験室レベルの実験系で観察した。

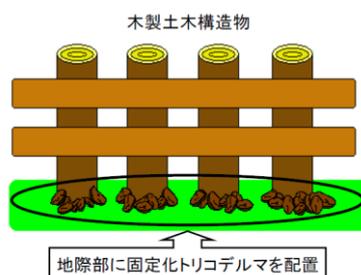


図 1. 木製土木構造物における地際部の腐朽遅延に寄与する固定化トリコデルマの利用イメージ

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 供試菌株と接種源

トリコデルマ属菌としては、旭川高専保存株の ANCT 05013 と ANCT 05103（*Trichoderma* spp. : 2005 年に上川管内の原木シイタケ栽培施設の落下菌から分離；2018 年 1 月にそれぞれ NBRC 113097 と NBRC 113098

として寄託済), および *T. harziarum* Rifi の NBRC 33016 (十勝管内の菌床シイタケ栽培施設の落下菌から分離) の 3 菌株を用いた。木材腐朽菌のナミダタケとしては, 林産試験場保存株 HFPRI 0301 (札幌市内の住宅から分離) と HFPRI 0502 (旭川市内の住宅から分離) の 2 株を用いた。以上の菌株はいずれもポテトデキストロース寒天 (以下, PDA ; 日水製薬製) 培地で継代培養保存していたものである。各種試験に供試する場合には, 直径 90 mm の PDA 平板培地を用いて 25°C で 5 日間 (トリコデルマ属菌), 20°C で 9 日間 (ナミダタケ) それぞれ培養した各コロニーから寒天培地ごとコルクボーラーで打ち抜いた直径 5 mm の菌体ディスクを接種源とした。

### 2.1.2 木炭粉砕物と暴露用木片

固定化トリコデルマ用の担持材料には市販品の土壤改良材用木炭粉砕物 (以下, 木炭 ; pH=9.3, 北海道カーボナイズ製) を用いた。暴露用木片としては市販品のシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica* Hara) の割り箸 (下川製箸製) およびスギ (*Cyptomeria japonica* D. Dou) の割り箸 (やなぎプロダクツ製) を 4×5×25 mm に切りそろえてサンドペーパー仕上げしたものを用いた (以下, シラカンバ木片およびスギ木片) を供試した。

## 2.2 固定化トリコデルマの調製

高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分) した 2% 麦芽エキス培地 400 ml を 1000 ml のピルスナーフラスコに入れ, トリコデルマ属菌の菌体ディスクを 4 個接種した後に 25°C で 2 日間攪拌培養 (120 rpm) したものを液体種菌とした。また 200 ml ガラス培養瓶に約 130 ml の木炭を投入し, 2% 麦芽エキス培地を 30 ml 加えて高圧蒸気滅菌した。そして同培養瓶 1 本当たりに上述のトリコデルマ属菌の液体種菌 20 ml を接種した後, 25°C で 2 週間培養したものを固定化トリコデルマ (水分 : 約 80%) とした。

## 2.3 トリコデルマ属菌の液体種菌中における菌体量の測定

2.2 の液体種菌を 5 ml 計り取り, 60°C で恒量化した桐山ロート用ろ紙 (No.4) で吸引ろ過し, 15 ml の純水で洗浄した後に再度同温度で恒量化することで液体種菌 1 ml 当りの乾燥菌体量を算出した。

## 2.4 ナミダタケの菌糸伸長における培養温度と培地 pH の影響把握

培養温度の影響についてはナミダタケの各菌体ディスク 1 個を直径 90 mm の PDA 平板培地中央に接種に接種して 15, 20, 25, 30 および 35°C で各 7 日間培養した際の菌体伸長量を測定した (菌体ディスクの端からコロニー末端までの距離 (mm) を平板培地当たり 4 ヶ所計測)。培地 pH の影響については 0.1N 塩酸水溶液または 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を高圧蒸気滅菌後の PDA 培地に所定量加えることで pH を 3 ~ 9 程度に調整した直径 90 mm の平板培地を作成し, 各菌株の菌体ディスク 1 個を各平板培地に接種し, 25°C で 7 日間培養した時点での菌体伸長量を測定することで観察した。

なお繰り返し数はいずれも 3 とした (試験区当たりの各データ数 12)。

## 2.5 ナミダタケの木材腐朽に対する固定化トリコデルマの阻害性能評価

200 ml ガラス培養瓶に約 30 ml の PDA 培地を分注して高圧蒸気滅菌し, ナミダタケの菌体ディスクを各

2 個接種して 20°C で 9 日間培養した。各培養瓶のコロニー上に 60°C で恒量化した後に 80°C で 1 日 3 時間の乾熱殺菌処理を 3 回施した木片を 3 本ずつ載せ、その上を固定化トリコデルマ（水分：約 80%）約 33 ml で覆って 25°C で 12 週間培養した。その後、木片を取り出して室温で 1 晩風乾し、さらに 60°C で恒量化することで質量減少率を求めた。なお、固定化トリコデルマを載せないものをコントロールとした。暴露木片の繰り返し数はいずれも 12 とした。

## 2.6 ナミダタケの木材腐朽に対する木炭の阻害性能評価

200 ml ガラス培養瓶に約 130 ml の木炭を投入し、2% 麦芽エキス培地または純水を 50 ml 加えて高圧蒸気滅菌した。固定化トリコデルマの代わりにこれらの木炭（水分：約 80%）を用いて 2.5 と同様の操作を行うことで木片の質量減少率を求めた。暴露木片の繰り返し数はいずれも 9 とした。

## 2.7 pH の測定

2% 麦芽エキス培地または 2.2 のトリコデルマ属菌の液体種菌についてはガラス電極を用いて pH を測定した。2.4 の pH を調整した PDA 平板培地については、加熱融解して 50°C 以下に冷却した後にガラス電極を用いて pH を測定した。

# 3. 結果と考察

## 3.1 トリコデルマ属菌の液体種菌の pH および菌体量

2% 麦芽エキス液体培地を用い、25°C で 2 日間振とう培養した液体種菌の pH と液体種菌中のトリコデルマ属菌の菌体量（乾燥質量）を表 1 に示す。同表には高圧蒸気滅菌後の 2% 麦芽エキス液体培地の pH についても示した。トリコデルマ属菌の至適 pH は弱酸性側であり<sup>7)</sup>、本実験中で用いた 2% 麦芽エキス液体培地の pH=5.5 はその条件を満足する。菌体量の平均値は 1.4 mg/ml で、これまでの結果の約 1 mg/ml<sup>7,9, 11)</sup> とほぼ一致した。

表 1. 液体培地と液体種菌の pH (25°C) および液体種菌のトリコデルマ属菌・菌体量

サンプル	pH	乾燥菌体量 <sup>a)</sup> (mg/ml)
2% 麦芽エキス液体培地 <sup>b)</sup>	5.5	-
液体種菌 (NBRC 113097)	5.1	1.6
液体種菌 (NBRC 113098)	5.5	1.4
液体種菌 (NBRC 33016)	5.2	1.3

a) 60°C 恒量化, 繰り返し数 2, b) 高圧蒸気滅菌済

## 3.2 ナミダタケの菌糸伸長に対する培養温度と培地 pH の影響

ナミダタケの菌糸伸長に対する温度と pH の影響を測定し、温度特性を図 2 に pH 特性を図 3 にそれぞれ示す。図 1 から低温を好むとされるナミダタケの至適温度は 20~25°C で、それを超えると急激に菌糸伸長量が低下した。図 2 から HFPRI 0301 では pH3~4, HFPRI 0502 では pH4~5 が至適 pH となり、糸状菌の一

一般的な特性と同様に酸性側を好むことが示された。参考までに高圧蒸気滅菌後の PDA 培地 100 ml に所定量の 0.1N 塩酸水溶液, または 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を添加後の培地 pH の測定結果を表 2 に示す。

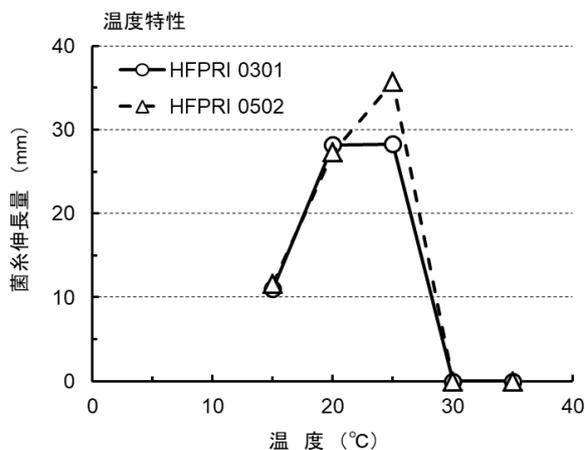


図2. ナミダタケの菌糸伸長における培養温度の影響 (15~35°C・7日間培養)

注: 各データの繰り返し数 12

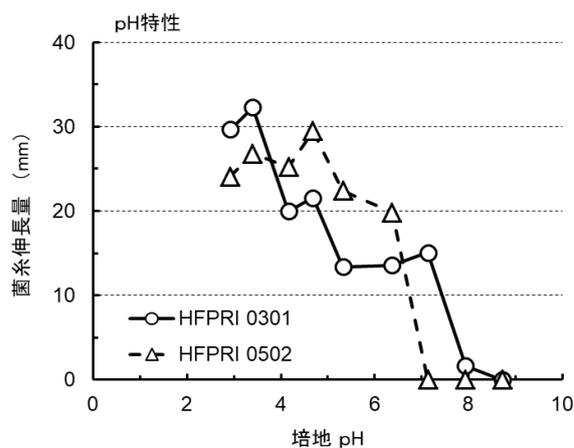


図3. ナミダタケの菌糸伸長における培地 pH の影響 (25°C・7日間培養)

注: 各データの繰り返し数 12

表 2. 0.1NHCl または 0.1NNaOH を所定量添加した PDA 培地の pH

試薬添加量 <sup>a)</sup>	試薬添加後 <sup>a)</sup> の PDA 培地の pH	
	0.1N HCl	0.1N NaOH
0 ml	5.4	
1.5 ml	4.7	6.4
3.0 ml	4.2	7.1
6.0 ml	3.4	7.9
8.0 ml	2.9	-
10.0 ml	-	8.7

a) 高圧蒸気滅菌後の PDA 培地 100 ml に添加した 0.1NHCl または 0.1NNaOH

### 3.3 ナミダタケに対する固定化トリコデルマの木材腐朽阻害性能

固定化トリコデルマと共にナミダタケに暴露したシラカンバまたはスギの木片の質量減少率をそれぞれ表 3 と表 4 に示す。試験区は固定化トリコデルマの NBRC 113097 と NBRC 113098 および NBRC 33016, そしてコントロールである。

表 3 のシラカンバ木片のコントロール区の質量減少率は HFPRI 0301 が 10.9%, HFPRI 0502 が 18.1%であった。そして、固定化トリコデルマ区の NBRC 113097 と NBRC 113098 の質量減少率はいずれも 0%, NBRC 33016 は 9~10%であった。以上から、NBRC 113097 と NBRC 113098 の固定化トリコデルマはナミダタケによる木材腐朽に対する阻害効果が期待できることが示された。表 4 のスギ木片の質量減少率では、固定化トリコデルマ区において NBRC 33016 が 3%以下, NBRC 113097 と NBRC 113098 が 0.2%と小さかった。しかし、コントロール区の質量減少率が 0.1~1%と低いことから各固定化トリコデルマの阻害性能の評価ができないと判断した。

表 3. ナミダタケに暴露したシラカンバ木片の質量減少率・

試験区 (固定化トリコデルマ等)	固定化トリコデルマ使用 (20°C・12 週間)	
	木片の質量減少率 <sup>a)</sup> (%)	
	ナミダタケ菌株	
	HFPRI 0301	HFPRI 0502
NBRC 113097 <sup>b)</sup>	0	0
NBRC 113098 <sup>b)</sup>	0	0
NBRC 33016 <sup>b)</sup>	10.2±3.25	8.5±3.59
コントロール	10.9±5.85	18.1±7.89

a) 60°C恒量化, 平均値±標準偏差, 繰り返し数 12,

b) 固定化トリコデルマ (水分: 約 80%)

表 4. ナミダタケに暴露したスギ木片の質量減少率・

試験区 (固定化トリコデルマ等)	固定化トリコデルマ使用 (20°C・12 週間)	
	木片の質量減少率 <sup>a)</sup> (%)	
	ナミダタケ菌株	
	HFPRI 0301	HFPRI 0502
NBRC 113097 <sup>b)</sup>	0	0.2±0.37
NBRC 113098 <sup>b)</sup>	0.2±0.35	0
NBRC 33016 <sup>b)</sup>	0	3.0±4.34
コントロール	0.1±0.15	1.0±2.26

a)~b) 表 3 と同じ

### 3.4 ナミダタケに対する木炭の木材腐朽阻害性能

3.3 の固定化トリコデルマの代わりに木炭 (2%麦芽エキスまたは純水を添加, 水分: 約 80%) を用い, ナミダタケに暴露したシラカンバ木片とスギ木片の質量減少率をそれぞれ表 5 と表 6 に示す。表 5 のシラ

カンバ木片の質量減少率からナミダタケによる腐朽が進行したことが分かる。表 6 のスギ木片の質量減少率は表 5 のシラカンバ木片の 1/7~1/4 の値であるが、ナミダタケによる腐朽が進行したことが確認された。両樹種の木片共に麦芽エキス添加より純水添加で質量減少率が大きい傾向がみられた。ジオキシー効果により、ナミダタケは木片より酵母エキスを優先的に代謝した可能性が推察される。さらに、表 5 でシラカンバ木片を木炭で覆っていないコントロールの質量減少率が小さかった原因としては、木炭の水分がナミダタケの木材腐朽を促進した可能性が考えられた。

表 5 と表 6 の値をそれぞれ表 3 と表 4 と比較すると、ナミダタケの木材腐朽に対する木炭のみの阻害効果は認められない。コントロールの結果を考慮すると、表 3 と表 5 から NBRC 113097 と NBRC 113098 の固定化トリコデルマは供試した 2 株のナミダタケの木材腐朽に対する優れた阻害効果を有すると判断される。

表 5. ナミダタケに暴露したシラカンバ木片の質量減少率・木炭使用 (20°C・12 週間)

試験区 (木炭等)	木片の質量減少率 <sup>a)</sup> (%)	
	ナミダタケ菌株	
	HFPRI 0301	HFPRI 0502
麦芽エキス添加 <sup>b)</sup>	35.1±8.99	49.0±5.21
純水添加 <sup>b)</sup>	41.1±5.54	49.9±20.9
コントロール <sup>c)</sup>	10.9±5.85	18.1±7.89

a) 60°C 恒量化, 平均値±標準偏差, 繰り返し数 9,

b) 木炭に 2%酵母エキス培地または純水を添加した (水分: 約 80%),

c) 表 3 のコントロール値

表 6. ナミダタケに暴露したスギ木片の質量減少率・木炭使用 (20°C・12 週間)

試験区 (木炭等)	木片の質量減少率 <sup>a)</sup> (%)	
	ナミダタケ菌株	
	HFPRI 0301	HFPRI 0502
麦芽エキス添加 <sup>b)</sup>	5.0±3.30	9.5±4.44
純水添加 <sup>b)</sup>	10.6±8.21	11.4±11.32
コントロール <sup>c)</sup>	0.1±0.15	1.0±2.26

a)~b) 表 5 と同じ, c) 表 4 のコントロール値

#### 4. まとめ

住宅床下に発現したナミダタケのコロニーは、木材およびコンクリート製の布基礎表面に菌糸体や根状菌子束を這わせて床下土壌と木材をつなぎ、土壌から水分や窒素系栄養分を獲得して生分解可能な木材を探しまわる。もしも防腐処理した木材に出会い、その木材の生分解ができないと判断すると防腐処理木材の表面に菌糸体を這わせて伸長し、未処理 (防腐処理されていない) 木材や生分解可能な防腐処理木材ま

で到達することが報告されている<sup>12-13)</sup>。従って、木造住宅などの床下空間に木炭に担持した固定化トリコデルマを敷き詰め場合でも、その固定化トリコデルマを乗り越えて土台や大引き、柱や筋交いに到達してそれらの木材を生分解する可能性がある。こうしたナミダタケの活動を阻止するためには、固定化トリコデルマの表面をナミダタケの菌糸体や根状菌子束が伸長することを阻止する必要がある。

そこで2.5と2.6に示した実験系において、ナミダタケが固定化トリコデルマまたは木炭の表面を伸長できたか否かを観察した。その様子を以下の図4以降に写真で示す。図4はナミダタケ HFPR 0301 に対し、シラカンバ木片とスギ木片を用いた2.5の実験系で12週間暴露後の様子である。コントロールでは培養ビン内側のガラス面を、NBRC 33016の固定化トリコデルマでは固定化トリコデルマ表面をそれぞれナミダタケの白い菌糸体が上っている。一方、NBRC 113097とNBRC 113098では両固定化トリコデルマの下部にナミダタケの白色の菌糸体が多少確認されるものの、固定化トリコデルマ層の途中でその菌糸伸長が停止している。同様に図5は、2.5の実験系でナミダタケ HFPR 0502 に対してシラカンバ木片とスギ木片の12週間暴露後の様子である。左側のコントロールから右側のNBRC 33016まで、図4のナミダタケ HFPR 0301 の場合と同様の結果となった。

#### シラカンバ木片と HFPR 0301



#### スギ木片と HFPR 0301



図4. 2.5の実験系でナミダタケ HFPR 0301 にシラカンバ木片（上）とスギ木片（下）を25°Cで12週間暴露した培養ビンの様子（それぞれ左からコントロール，固定化トリコデルマ NBRC 11309区，同 NBRC 113098，同 NBRC 33016）

図6はナミダタケの HFPR 0301（左）と HFPR 0502（右）を供試し、2%麦芽エキス水溶液または純水を添加した木炭を組み合わせた2.6の実験系でシラカンバ木片とスギ木片を12週間暴露した様子である。いずれの試験区でもナミダタケの白い菌糸体が木炭表面を上っている。表3と表5に示した結果を含めて

NBRC 113097とNBRC 113098の固定化トリコデルマは、供試した2株のナミダタケの木材腐朽に対する阻害効果の高さに加え、ナミダタケの菌糸伸長を阻害することが示された。以上から実験室レベルの実験であるが、ナミダタケの木材腐朽に対してNBRC 113097とNBRC 113098の両固定化トリコデルマの有効性が確認できたと考える。

シラカンバ木片と HFPR 0502



スギ木片と HFPR 0502



図5. 2.5の実験系でナミダタケ HFPR 0502にシラカンバ木片（上）とスギ木片（下）を固定化トリコデルマと共に25°Cで12週間暴露した培養ビンの様子（それぞれ左からコントロール，固定化トリコデルマ NBRC 11309区，同 NBRC 113098，同 NBRC 33016）

HFPR 0301



HFPR 0502



図6. 2.6の実験系でナミダタケ HFPR 0301（左）と HFPR 0502（右）にシラカンバ木片とスギ木片を木炭と共に25°Cで12週間暴露した培養ビンの様子（それぞれ左からシラカンバ木片・麦芽エキス添加木炭，シラカンバ木片・純水添加木炭，スギ木片・麦芽エキス添加木炭，スギ木片・純水添加木炭）

## 謝 辞

本研究の遂行に際して、ナミダタケ菌株（HFPR 0301 と HFPR 0502）を恵与いただいた（地独）北海道総合研究機構 林産試験場利用部・部長の森満範博士に深謝する。

## 参 考 文 献

- 1) 恒次裕子：木材利用と地球環境－気候変動について－，山林，No.1608：17-24(2018)
- 2) Bruce A., King B.：Decay Resistance of Wood Removed from Poles Biologically Treated with *Trichoderma*, *Holzforschung*, 45(4)：307-311(1991)
- 3) 土居修一，山田敦：Trichodermaによる木材腐朽防止，林産試験場報，6(2)：1-5(1992)
- 4) Doi S., Mori M.：Antifungal properties of metabolites produced by *Trichoderma* isolates from sawdust media of edible fungi against wood decay fungi, *Material u. Organismen*, 28(2)：143-153(1994)
- 5) Doi S., Yamada A., Mori M.：Antagonistic effects of *Trichoderma* spp. isolated from sawdust media of edible fungi against wood decay fungi, *Material u. Organismen*, 28(2)：131-141(1994)
- 6) 富樫巖：固定化トリコデルマの製造方法および木材保存方法：特開2012-095570(2012)
- 7) 富樫巖，谷口，平沢：オオウズラタケとカワラタケの木材腐朽に対する木炭に固定化した*Trichoderma* spp.の阻害性能：日本菌学会会報，53(2)：88-92(2012)
- 8) 富樫巖，高橋剛，渡部智弘，原大貴：数種類の担子菌による木材腐朽に対する木炭固定化トリコデルマの阻害効果および*Trichoderma* spp.が木材強度に及ぼす影響。日本菌学会会報，54(2)：66-69(2013)
- 9) 富樫巖，渡部智弘，高橋剛：Trichoderma virensを用いた木炭固定化トリコデルマの木材防腐性能および固定化トリコデルマにおける木炭粉砕物の働き。日本菌学会会報，56(2)：43-48(2015)
- 10) 里中聖一：ナミダタケの生理と防除－日本木材学会北海道支部第12回研究会から－。北方林業，32(10)：283-286(1980)
- 11) 富樫巖，小野寺愛，木下俊祐，宮崎貞之，黒田裕一，東真史，阿部和真：担子菌による木材腐朽に対する担持料に固定化した*Trichoderma* spp.の阻害効果。日本菌学会会報，52(2)：62-67(2011)
- 12) 土居修一：林産試験場の昭和62年度試験研究業務の概要 III林産工業における技術等の改善と新技術の開発 2.木質材料の保存性向上 4)住宅部材の耐朽性向上。林産試験場報，2(4)：18(1988)
- 13) 富樫巖，土居修一：ナミダタケの生長による土壌成分の変化。林産試験場報告，3(1)：19-21(1989)

## 【研究紹介】

### 寒冷地に分布する野生酵母の特性把握の試み

富樫 巖\*

永井一輝\*\*

### Grasping fermentable characteristics of some wild yeasts which are distributed in a cold district

Iwao TOGASHI

Kazuki NAGAI

#### Abstract

About four strains of wild type yeast that were obtained from some fruits and a flower in Asahikawa-city and Asahikawa neighbor areas, and in North Tohoku area, we observed their cell length, quantity of propagation at 5-35°C and performance of alcohol fermentation (the gas yield) at 15-35°C. The results obtained were as follows:

- (1) The cell length of ANCT-06051 isolated from a mountain ash fruit was 4.7  $\mu\text{m}$ , which was the longest in the four wild type yeasts. The quantity of propagation of ANCT-06051 was the most in the four strains at 5-35°C. The gas yield of ANCT-06051 became the maximum at 25°C, and decreased at 15°C and 35°C.
- (2) The cell length of ANCT-07017 isolated from an azalea petal was 3.7  $\mu\text{m}$ . The quantity of propagation of ANCT-07017 was a lot next to ANCT-06051 at 5-25°C. The gas yield of ANCT-07017 which was incubated for seven days at 15-35°C was the highest in the four strains.
- (3) The cell length of ANCT-07018 isolated from an apple peel was 3.5  $\mu\text{m}$ , which was the smallest in the four strains. The quantity of propagation of ANCT-07018 increased with temperature at 5-35°C. There was a little quantity of gas yield at 25°C and 35°C, but the yield was not confirmed at 15°C.
- (4) The cell length of ANCT-07023 isolated from a cherry fruit was 3.7  $\mu\text{m}$ . The quantity of propagation of ANCT-07023 was less than that of ANCT-07018 at 5-25°C. The gas yield of ANCT-07023 was approximately similar to ANCT-07018 at 15-35°C.
- (5) The cell lengths of NBRC 0308 (a sake yeast) and ANCT-07009 (a commercial dry yeast) were longer than the four wild type yeasts, and were superior in the quantity of propagation to the four yeasts at 10-25°C. Although the gas yields of NBRC 0308 and ANCT-07009 at 15°C showed a tendency to decrease, the gas yields of them at 15-35°C for 7 days were higher than that of the three wild type yeasts (ANCT-06051, ANCT-07018, ANCT-07023).
- (6) In ANCT-06051 and NBRC 0308, there was not the significant difference to the quantity of propagation and the gas yield on YM-media of pH=4.2-7.8 at 25°C.

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生および専攻科応用化学専攻修了生

## 1. はじめに

最近、ガストロノミー（英語：gastronomy）という単語をみかける。元々は美食を意味するものであるが、その解釈が広がって食の背景にある地域固有の気候や風土（四季の変化も含む）、歴史、文化などにも着目した料理や食事を指す<sup>1)</sup>とされる。食材や加工食品の地産地消による地域経済の活性化のみならず、その地域のガストロノミーを明確化・差別化して外部に情報発信することができれば、新たな旅行者を呼び込む種になる。

著者らは上述の料理や食事の解釈拡大にも注目し、各地域に分布するアルコール発酵酵母を分離・活用することで地域特有のアルコール飲料やパン類の開発に寄与できると考えた。酵母を始めとする種々の微生物は各地の環境中に分布しており、北海道や東北などの寒冷地には独自の個性・能力を持った菌種・菌株の存在が期待できる。その一歩として旭川市内のナナカマド果実や花き、さらには近隣地域産や青森産の果実から得られた数種の野生酵母を供試し、菌体生成量とアルコール発酵能（ガス発生量）に対する培養温度や培地 pH の影響把握を試みた。野生酵母の特性評価については、清酒酵母や市販のドライイースト（乾燥酵母）と比較することとした。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 供試菌株

表 1 に示す 4 株の野生酵母、および清酒酵母の NBRC 0308 (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen Strain Sakura) と市販のドライイースト（日清フーズ製）から分離した酵母 (*Saccharomyces* sp. を想定) を供試した。野生酵母の分離においては、クロラムフェニコール（和光純薬工業製）が 50 ppm 濃度になるように調製したポテトデキストロース寒天（以下 PDA, 日水製薬製）平板培地を用い、常法<sup>2)</sup>に従って表 1 に示した各分離源から分離した。その後、全供試菌株を PDA 培地で継代培養保存した。

表 1. 供試菌株一覧

菌株番号	分離源	分離年月日
ANCT-06051	ナナカマド果実（旭川市）	2006.12.17
ANCT-07017	ツツジ花卉（旭川市）	2007.7.4
ANCT-07018	リンゴ表皮部（青森県）	2007.7.4
ANCT-07023	サクランボ果実（深川市）	2007.9.10
NBRC 0308	清酒酵母	-
ANCT-07009	日清フーズ製ドライイースト	2007.6.12

注) NBRC 0308 : *Saccharomyces cerevisiae*, ANCT-07009 : *Saccharomyces* sp. を想定 ;  
リンゴ表皮部 : ジョナゴールド

#### 2.1.2 供試培地

上述の PDA 培地、および YM 培地<sup>4)</sup>（組成：ペプトン 5%、酵母エキス 3%、麦芽エキス 3%、グルコー

ス 10% ; いずれも Oxoid 製) を用いた。

## 2.2 菌体サイズの測定

50 ml の三角フラスコに YM 培地を 20 ml 分注して高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分間) し, PDA 培地で保存していた各供試菌株の菌体を 1 白金耳接種して 25°C で 1 日間 (24 時間) の静置培養を行った。その後, 菌体の懸濁液を生物顕微鏡とデジタルカメラを用いて写真撮影し, それらの画像を画像計測合成ソフト・フォトメジャー (ケニス製) を用いて解析することで各菌株の平均長径を算出した (繰返し数 20)。

## 2.3 温度特性の把握

### 2.3.1 菌体生成量の測定

50 ml の三角フラスコに YM 培地を 20 ml 分注して高圧蒸気滅菌した後, PDA 培地で保存していた各供試菌株の菌体を 1 白金耳接種して 25°C で 3 日間の前培養 (静置培養) を行った。その培養液をエッペンドルフチューブに 1 ml 分注し, 生理食塩水と遠心分離機を用いて回収・洗浄 (7500 rpm, 1 分間) を 3 回繰返した。得られた菌体と生理食塩水を用いて  $10^7$  個/ml レベルの懸濁液を調製した。菌体濃度は生物顕微鏡とトーマの血球版による全菌数カウントによって求めた。

YM 培地を試験管に 6 ml を分注し,  $10^7$  個/ml レベルの菌体懸濁液を 0.2 ml 接種した。そして 5, 10, 15, 25, および 35°C で 3 日間静置培養した後, 恒量化した孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターと純水を用いて生成した菌体を回収・洗浄した。メンブレンフィルターごと 60°C で恒量化することで菌体生成量を算出した (繰返し数 5)。

### 2.3.2 発酵能 (ガス発生量) の測定<sup>9)</sup>

高圧蒸気滅菌した YM 培地を 50 ml の三角フラスコに 16 ml 分注し, 2.3.1 と同様に調製した  $10^7$  個/ml レベルの懸濁液を 0.2 ml 接種して攪拌した後, 10 ml のアインホルン発酵管に全量投入した。そして 15, 25, および 35°C で培養して経時的なガス発生量を測定した (最大 7 日間培養, 繰返し数 5)。

## 2.4 pH 特性の把握

高圧蒸気滅菌した YM 培地 100 ml あたりに 6 ml の 0.1N 塩酸溶液および 4 ml の 0.1N 水酸化カリウム溶液を添加し, それぞれ酸性側 (pH=4.2) およびアルカリ性側 (pH=7.8) の培地を調製した。通常の YM 培地 (pH=6.2) を含む 3 種類の培地を用い, 供試菌株の NBRC 0308 と ANCT-06051 の 25°C での菌体生成量とガス発生量を 2.3.1 と 2.3.2 と同様に測定した。なお, 各 YM 培地の pH (25°C) は, ポータブル型 pH テスター (ハンナインストルメント・ジャパン製) を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 酵母の菌体サイズ

供試菌株の平均長径を表 2 に示す。5  $\mu\text{m}$  を超えた菌株は NBRC 0308 (清酒用母) と ANCT-07009 (ドライイースト) であり, 野生酵母 4 株の平均長径は ANCT-06051 が 4.7  $\mu\text{m}$ , 残り 3 株が 3.5~3.7  $\mu\text{m}$  となつて

ANCT-07009 の半分程度であった。

表 2. 供試菌の平均長径

	菌 株 番 号					
	ANCT-06051	ANCT-07017	ANCT-07018	ANCT-07023	NBRC 0308	ANCT-07009
平均長径 ( $\mu\text{m}$ )	4.7 $\pm$ 0.73	3.7 $\pm$ 0.44	3.5 $\pm$ 0.64	3.7 $\pm$ 0.56	5.5 $\pm$ 0.86	7.0 $\pm$ 1.11

注) YM 培地使用, 25°C・24 時間の静置培養, 繰り返し数 20

### 3.2 酵母の温度特性

#### 3.1.1 菌体生成量

5~35°Cにおける温度別の菌体生成量を図 1 に示す。ANCT-07018 以外の 5 株は 15°C付近で菌体生成量がピークに達し, 5°Cと 35°Cで菌体生成量が大きく低下した。一方, ANCT-07018 は培養温度の上昇と共に菌体生成量が増加し, 35°Cで最大値 (3.8 mg) を示した。

15~25°Cでは NBRC 0308 の菌体生成量が最も多く (15°C : 10.0 mg), 以下 ANCT-07009 (15°C : 9.6 mg) と ANCT-06051 (15°C : 9.0 mg) が続いた。全般的な傾向として, 表 2 に示した平均長径の大きいものほど菌体生成量が多くなる傾向が観察された。

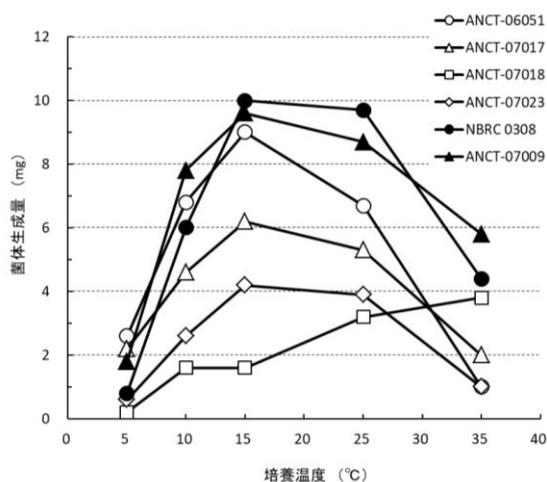


図 1. 菌体生成量に対する培養温度の影響

注) YM 培地使用, 5~35°Cで各 3 日間静置培養, 繰り返し数 5

#### 3.1.2 発酵能 (ガス発生量)

供試菌株の 15, 25, 35°Cでの発酵能 (ガス発生量) の測定結果を図 2 に示す。各温度で安定して高い発酵能を示したのは ANCT-07009 であった。25°Cでのガス発生量は NBRC 0308 が最も多く (10.0 ml), ANCT-07017 と ANCT-07009 が続いた (それぞれ, 9.2 ml と 8.9 ml)。そして NBRC 0308 と ANCT-07009 で発酵の立ち上がりが早く, 野生酵母が緩慢な発酵挙動をする傾向がみられた。35°Cでのガス発生量は

ANCT-07009が最も多く、ANCT-07017が続いた（それぞれ、10.0 mlと8.8 ml）。ANCT-07017は春～夏に開花するツツジ花卉から分離した野生酵母であり、高い温度を好む可能性が推察される。

一方、秋～冬の果実であるナナカマド果実から分離したANCT-06051は25°Cでのガス発生量が多く（6.6 ml）、15と35°Cでは少なかった。これに対して春～夏の果実であるサクランボ果実から分離したANCT-07023は、リンゴの果皮から分離したANCT-07018と類似の傾向を有し、両野生酵母共に15°Cではガス発生量が確認されなかった。

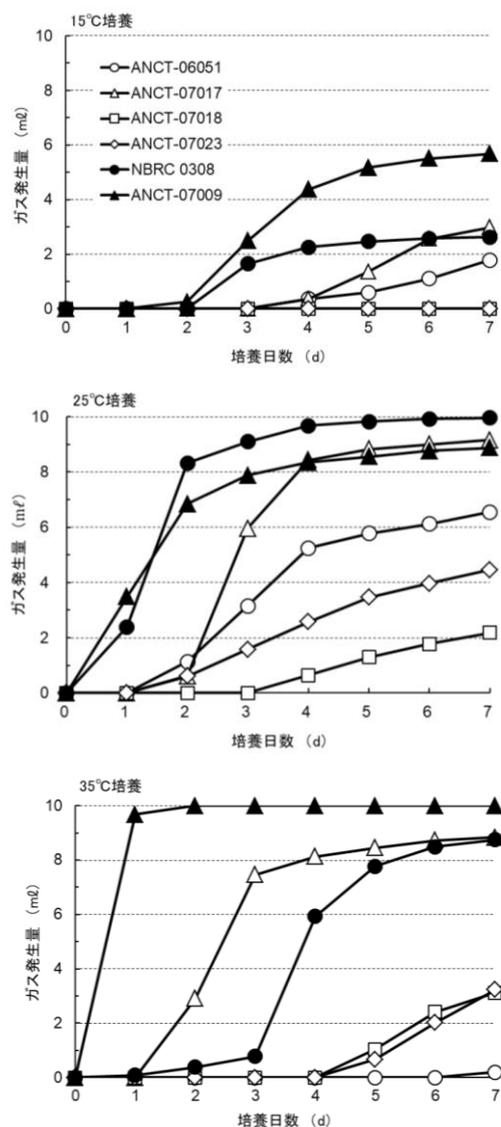


図2. ガス発生量に対する培養温度の影響（上：15°C，中：25°C，下：35°C）

注）25°Cと35°Cの凡例は15°Cと同じ，アインホルン発酵管とYM培地使用，繰り返し数5

### 3.3 酵母のpH特性(ANCT-06051, NBRC 0308)

清酒酵母やドライイーストに次いで平均長径が大きく、両酵母に次いで10～25°Cで菌体生成量が多く、かつ25°Cのガス発生量に優れるANCT-06051に注目してNBRC 0308と共にpH特性を観察した。

### 3.3.1 菌体生成量

通常のYM培地 (pH=6.2) に加え、pHを4.2と7.8に調整したYM培地を用いて測定したANCT-06051とNBRC 0308の菌体生成量を表3に示す。pH幅が4.2~7.8において、両菌株の菌体生成量に1%の危険率で有意差は認められなかった。清酒の醸造工程では雑菌対策のためにpH=4程度の酸性側で行われることが一般的であるが、両菌株共にpH=4.2~7.8の各菌体生成量間のt検定(危険率1%)において有意差は認められなかった。

表3. ANCT-06051とNBRC 0308のpH別菌体生成量 (mg)

菌株番号	pH		
	4.2	6.2	7.8
ANCT-06051	6.6±1.14	6.8±0.45	6.4±0.55
NBRC 0308	9.2±0.84	10.0±0.71	9.4±0.55

注) YM培地使用, 25°C・3日間の静置培養, 繰り返し数5

### 3.3.2 発酵能 (ガス発生量)

ANCT-06051とNBRC 0308のガス発生量に対する培地pHの影響を図3に示す。図2の25°Cの結果と同様でNBRC 0308ではいずれのpHでも発酵の立ち上がりが早く、培養3日後におけるpH=4.2~7.8の各ガス発生量間にt検定(危険率1%)で有意差は認められなかった。一方、ANCT-06051ではNBRC 0308と比べて発酵の立ち上がりが緩慢であった。培養7日後のガス発生量は、通常のYM培地(8.0 ml)、酸性側(6.8 ml)、アルカリ性側(5.9 ml)の順に低下しているが、各ガス発生量間にt検定(危険率1%)で有意差は認められなかった。以上から両菌株共にガス発生量に対する培地pHの影響は生じなかったと判断する。原因は不明であるが、通常のYM培地・培養7日間のガス発生量を図2の25°Cと比較するとANCT-06051で増加し、NBRC 0308で減少した。

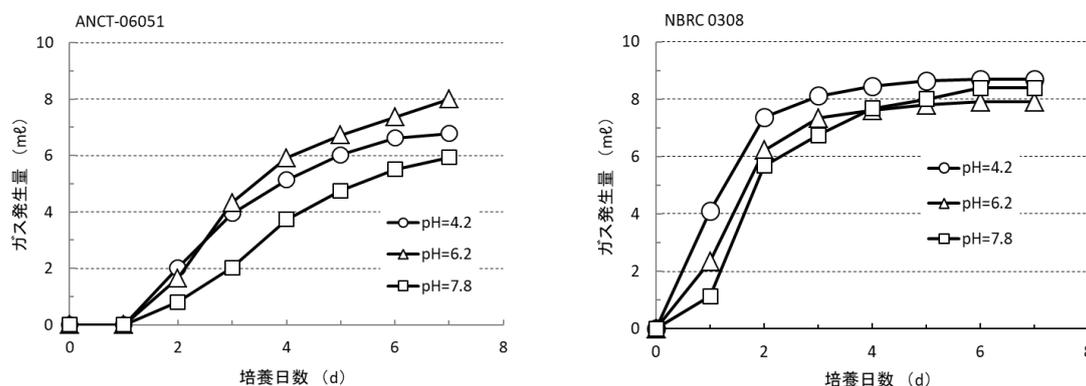


図3. ガス発生量に対する培地pHの影響 (左: ANCT-06051, 右: NBRC 0308)

注) アインホルン発酵管とYM培地使用, 25°C培養, 繰り返し数5

#### 4. まとめ

旭川市や近隣地域および北東北の果実や花きから得られた 4 株の野生酵母を供試して菌体長径, 5~35°C での菌体生成量, 15~35°C でのアルコール発酵能 (ガス発生量) を観察した。10~25°C で菌体生成量が多く, 25°C のガス発生量に優れる ANCT-06051 (ナナカマド果実から分離) については, NBRC 0308 (清酒酵母) と共に 25°C での菌体生成量とガス発生量に対する培地 pH の影響を観察した。得られた結果を以下に示す。

- 1) ANCT-06051 は菌体長径が 4.7  $\mu\text{m}$  と野生酵母 4 株中で最も大きく, 5~35°C での菌体生成量は同 4 株中で最大であった。ANCT-06051 のガス発生量は 25°C で最も多く, 15°C と 35°C で減少した。
- 2) ANCT-07017 (ツツジ花卉から分離) は菌体長径が 3.7  $\mu\text{m}$  で, 5~25°C での菌体生成量は ANCT-06051 に次いで多かった。15~35°C での 7 日間培養後のガス発生量は野生酵母 4 株中で最大であった。
- 3) ANCT-07018 (リンゴ果皮より分離) は菌体長径が 3.5  $\mu\text{m}$  と最も小さかった。その他の菌株とは異なり 5~35°C の温度上昇と共に菌体生成量が増加を続けた。25°C と 35°C でのガス発生量は少なく, 15°C では確認されなかった。
- 4) ANCT-07023 (サクランボ果実より分離) の菌体長径は 3.7  $\mu\text{m}$  で, 5~25°C での菌体生成量は ANCT-07018 より少なかった。15~35°C のガス発生量は ANCT-07018 とほぼ同様であった。
- 5) NBRC 0308 (清酒酵母) と ANCT-07009 (市販のドライイースト) は野生酵母と比べて菌体長径が大きく, 10~25°C での菌体生成量が優れていた。野生酵母と同様に 15°C のガス発生量は低下傾向を示したものの, 15~35°C で ANCT-07017 を除く野生酵母より高いガス発生量を示した。
- 6) 培地 pH=4.2~7.8 の 25°C における ANCT-06051 と NBRC 0308 の菌体生成量とガス発生量に有意差は認められなかった。

旭川高専物質化学工学科 准教授の辻 雅晴 博士と 2020 年度旭川高専物質化学工学科 卒業生の河端 唯氏によって, ANCT-06051 は *Candida sake* (Saito & Oda) van Uden & Buckley ex Meyer & Ahearn と同定された<sup>9)</sup>。

#### 謝 辞

野生酵母の同定研究にご尽力頂いた辻 雅晴 博士と河端 唯氏に深謝する。

#### 参 考 文 献

- 1) 北海道新聞, 2022年8月3日, 夕刊, 今日の話題 ガストロノミー
- 2) 中西載慶, 川本直樹, 佐々木一憲, 篠山浩文, 丸井正樹, 安田和男: 微生物利用 (第6章酵母の分離と培養), 実教出版: 113-126(2015)
- 3) 好井久雄, 後藤昭二, 森 治彦, 野白喜久雄, 伊藤 寛: 微生物の分離法 復刻版 (III 種々の環境および資料からの分離法 6 醸造・発酵材料, 加工食品), R&Dプランニング: 286-315(2001)
- 4) 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹: 微生物の分離法 復刻版 (培地名および培地組成一覧表), R&Dプランニン

グ : 775-877 (2001)

- 5) 化学実験テキスト研究会 : バイオテクノロジー (4章 生化学実験 4.8 アルコール発酵能の測定) , 産業図書 : 120-123 (2003)
- 6) 河端唯 (指導教員 辻雅晴) : 旭川産天然酵母の分類学的検討, 2020年度 旭川工業高等専門学校 物質化学工学科 卒業研究発表会要旨集 : 12 (2021)

## 【研究紹介】

### 身近なカビに対する 9 種類の精油の抗カビ活性評価

富樫 巖\*  
佐藤明日香\*\*

#### Evaluation of Inhibitory Effects of Nine Kinds of Essential Oil on the Growth of some Fungi which is familiar to Our Life

Iwao TOGASHI  
Asuka SATOH

#### Abstract

We tested the inhibitory effects of nine kinds of essential oil and ethanol on the growth of four strains of fungi (i.e. *Cladosporium cladosporides* NBRC 4459, *C. sphaerospermum* NBRC 6348, *Aureobasidium pullulans* NBRC 6353, *Aspergillus oryzae* ANCT-07058) using direct contact experiment based on potato-dextrose-agar medium dilution method. The essential oils were a bergamot oil, a cedar one, a clove one, a eucalyptus one, a heliotrope one, a lavender one, a lemon one, a peppermint one, and a rose one. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the bergamot oil, the cedar one, the eucalyptus one, and the lemon one to NBRC 6348 and ANCT-07058 were over 2% (v/v) at 25°C. MIC of the lavender oil and the peppermint oil were 0.3-0.5% (v/v) to the four strains. MIC of the clove oil, the heliotrope one and the rose one were 0.025-0.1% (v/v) to all strains. MIC of the rose oil and ethanol was 0.05-0.1% (v/v) and over 2% (v/v), respectively. On the other hand, MIC of the rose oil combined with 2% (v/v) ethanol was 0.025% (v/v) to the four strains.

## 1. はじめに

---

\* 旭川高専名誉教授

(令和 4 年 9 月 28 日受理)

\*\* 物質化学工学科卒業生および専攻科応用化学専攻修了生

我々の生活空間にはヒトの活動に適応した種々の微生物が分布・生息している。例えば、住宅の水回り個所ではクロカビ (*Cladosporium* spp.) や黒色酵母 (*Aureobasidium* spp.)<sup>1,2)</sup> などによるカビ汚染が顕在化し、酒類や発酵食品の製造では各現場に適したコウジカビ類 (*Aspergillus* spp.)<sup>3)</sup> が分離され、利用されている。

前者のカビ汚染とその対策に注目すると、一般的に次亜塩素酸ナトリウムやベンツイミダゾール系などの無機系・有機系化合物からなる各種防カビ剤・殺カビ剤が利用される<sup>4)</sup>。一方で消費者は、化学合成した薬剤よりも安全性イメージの高い天然物利用を好む傾向がある<sup>2)</sup>とされる。抗菌性・抗真菌性を有する身近な天然物としては草本・木本植物由来の精油<sup>5)</sup>がある。旭川市を中心とした道北地域・オホーツク地域では有用な精油が得られる植物の栽培が行われており、バラ (当麻町)、ラベンダー (中富良野町周辺)、ハッカ (滝上町) の各産地が形成されている。

本研究では、住宅の水回りに発現するクロカビや黒色酵母<sup>1,2)</sup>、味噌などの発酵食品の製造に不可欠なコウジカビを供試し、市販精油 9 種類の抗カビ活性の把握 (最小発育阻止濃度 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) と最小殺カビ濃度 MLC (Minimum Lethal Concentration)<sup>6)</sup>を試みた。また、一部の精油については食品の保存に使用される低濃度のエタノール<sup>7)</sup>との組み合わせによる抗カビ活性の変化を観察した。

バラ、ラベンダー、ハッカの各精油の抗カビ活性の高さが確認されるならば、上述の地域における資源の利用拡大および産業振興に繋がる期待可能性が生まれると考える。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 供試菌株と接種源

クロカビの *C. cladosporides* (Fresenius) G. A. de Vries NBRC 4459 と *C. sphaerospermum* Penzig NBRC 6348, 黒色酵母の *A. pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud NBRC 6353, およびキコウジカビの *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn の旭川高専保存株 ANCT-07058 の合計 4 株を供試した。いずれもポテトデキストロース寒天 (以下 PDA, 日水製薬製) 平板培地で継代培養保存されていたものである。

菌糸成長量の測定に際しては、供試菌株を直径 90 mm の PDA 平板培地に接種し、25°C でそれぞれ 10 日間 (ANCT-07058, NBRC 6353), 14 日間 (NBRC 4459), 21 日間 (NBRC 6348) 培養した各コロニーからコルクボーラーで培地ごと打ち抜いた直径 5 mm の菌体ディスクを接種源とした。

#### 2.1.2 供試精油

キシダ化学製の 9 種類の精油, すなわちベルガモット油 (oil of bergamot), シダー油 (oil of cedar), 丁字油 (oil of clove), ユーカリ油 (oil of eucalyptus), ヘリオトロップ油 (oil of heliotrope), ラベンダー油 (oil of lavender), レモン油 (oil of lemon), ハッカ油 (oil of peppermint) およびローズ油 (oil of rose) を供試した。

### 2.2 抗カビ活性の評価方法

#### 2.2.1 菌糸成長量の測定

高圧蒸気滅菌処理 (121°C, 15 分) 後に 70°C 以下に放冷した PDA 培地に、濃度が 0.01~2% (v/v) になるように精油を添加して各平板培地を作成した (設定濃度: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, および 2%

(v/v) )。同平板培地の中央に 2.1.1 の供試菌株の菌体ディスクを 1 個接種後、25°C・10 日間培養して経時的な菌糸成長量を測定した。通常の PDA 平板培地での菌糸成長をコントロールとし、各平板培地の菌体ディスクの縁からコロニー先端までの半径方向 4 点を菌糸成長量とし、それぞれの試験区における平板培地の繰り返し数を 3 とした (試験区当たりのデータ数 : 12)。

### 2.2.2 最小発育阻止濃度 MIC と最小殺カビ濃度 MLC の測定

上述の 2.2.1 で 10 日間の培養後に菌糸成長が確認されなかった各平板培地の菌体ディスクについて、最小濃度の値を MIC とした。また、菌糸成長が確認されなかった各平板培地の菌体ディスクを通常の PDA 平板培地に再接種し、25°C・10 日間培養することで菌糸再生の有無を観察し、菌糸成長が認められない最小濃度を MLC とした。

### 2.2.3 ローズ油とエタノールの混合効果の観察

上述の 2.2.1 と同様に高圧蒸気滅菌・放冷後の PDA 培地に、濃度が 0.01 または 0.025% (v/v) になるようにローズ油を添加した後、濃度が 0.5, 1, 2% (v/v) になるようにエタノール (和光純薬工業製, 99.5% (v/v), 特級) を添加した各平板培地を作成した。ローズ油を添加せず、濃度が 0.5, 1, 2% (v/v) になるようにエタノールのみを添加した PDA 平板培地および通常の PDA 平板培地 (コントロール) も作成した。それぞれの平板培地の中央に 2.1.1 の供試菌株の菌体ディスクを 1 個接種し、2.2.1 および 2.2.2 と同様の方法で菌糸成長量および MIC を測定した。

## 2.3 培地 pH の測定

上述の 2.2.1 と 2.2.3 の各平板培地の pH については、それぞれを加熱溶解して 50°C 以下に冷却後にポータブル pH メーター (ハンナインスツルメンツ製) を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 供試菌株に対する 9 種類の精油の菌糸成長阻害性能 (MIC と MLC)

クロカビ NBRC 6348 とキコウジカビ ANCT-07058 の 2 株を用い、9 種類の精油の MIC と MLC の把握を試みた結果を表 1 に示す。ベルガモット油、シダー油、ユーカリ油およびレモン油の 4 種類は MIC に達せず、本実験の最大濃度の 2% (v/v) を超えることが分かった。その他の精油 5 種類 (丁字油、ヘリオトロップ油、ラベンダー油、ハッカ油およびローズ油) の MIC は、NBRC 6348 に対して 0.025~0.3% (v/v) , ANCT-07058 に対して 0.05~0.5% (v/v) となった。MIC が得られたことで MLC の測定を行ったところ NBRC 6348 と ANCT-07058 共に 0.1~>2% (v/v) となり、ラベンダー油とハッカ油で 2% (v/v) を超える試験区が確認された。

供試するカビ菌株によって MIC と MLC の値に差異が生じるが、精油の種類によって抗カビ活性が大きく異なることが確認された。MIC が 2% (v/v) を超えたベルガモット油、シダー油、ユーカリ油およびレモン油については抗カビ活性が低いと判断し、残り 2 株の供試菌株のクロカビ NBRC 4459 と黒色酵母 NBRC 6353 に対しては MIC が 2% (v/v) 未満の 5 種類の精油のみを供試して MIC と MLC の把握を試みた。その結

果を表 2 に示す。

表 1. 供試菌株 (NBRC 6348, ANCT-07058) に対する 9 種類の精油の MIC と MLC (単位 : % (v/v))

各精油の MIC/MLC		供 試 菌 株	
		NBRC 6348	ANCT-07058
ベルガモット油	MIC	>2	>2
	MLC	-	-
シダー油	MIC	>2	>2
	MLC	-	-
丁字油	MIC	0.025	0.05
	MLC	0.1	0.1
ユーカリ油	MIC	>2	>2
	MLC	-	-
ヘリオトロップ油	MIC	0.025	0.3
	MLC	0.1	0.3
ラベンダー油	MIC	0.3	0.5
	MLC	1	>2
レモン油	MIC	>2	>2
	MLC	-	-
ハッカ油	MIC	0.3	0.5
	MLC	>2	>2
ローズ油	MIC	0.1	0.05
	MLC	0.1	1

注) - : 未測定, >2 : 2% (v/v) を超える濃度, PDA 培地使用 (各繰り返し数 3),  
 精油添加濃度 : 0.01 ~ 2% (v/v)

表 2. 供試菌株 (NBRC 4459, NBRC 6353) に対する 5 種類の精油の MIC と MLC (単位 : % (v/v))

各精油の MIC/MLC		供 試 菌 株	
		NBRC 4459	NBRC 6353
丁字油	MIC	0.05	0.05
	MLC	0.1	0.1
ヘリオトロップ油	MIC	0.1	0.3
	MLC	0.3	0.3
ラベンダー油	MIC	0.5	0.5
	MLC	-	-
ハッカ油	MIC	0.5	0.5
	MLC	>2	>2
ローズ油	MIC	0.1	0.1
	MLC	0.1	0.3

注) 表 1 と同じ

NBRC 4459 と NBRC 6353 共に, 丁字油, ヘリオトロップ油, ラベンダー油, ハッカ油およびローズ油の

MIC と MLC はそれぞれ 0.05~0.5% (v/v) と 0.1~>2% (v/v) になり, 表 1 に示した NBRC 6348 と ANCT-07058 の値とおおきくは変わらなかった。一部に未測定があるが, MLC についてはハッカ油で 2% (v/v) を超えた。表 1 と表 2 の結果から, 供試 4 菌株に対して丁字油, ヘリオトロップ油, ローズ油の精油グループの抗カビ活性が優れ, 以下にラベンダー油とハッカ油の抗カビ活性が続くと判断できる。最初に述べたように道北地域にバラの産地が存在することから, ローズ油の抗カビ活性に注目して以下の検討を試みた。

### 3.2 供試菌株の菌糸成長に対するローズ油とエタノールの混合効果

#### 3.2.1 供試菌株に対するエタノールの菌糸成長阻害性能

濃度が 0.5, 1, 2% (v/v) になるようにエタノールを添加した各 PDA 平板培地および通常の PDA 平板培地で各供試菌株の菌糸成長挙動を観察し, 得られた結果を図 1 に示す。添加濃度の上昇に伴ってエタノールの抗カビ活性が向上しているが, 最大濃度の 2% (v/v) でも全供試菌株の MIC に至らなかった。

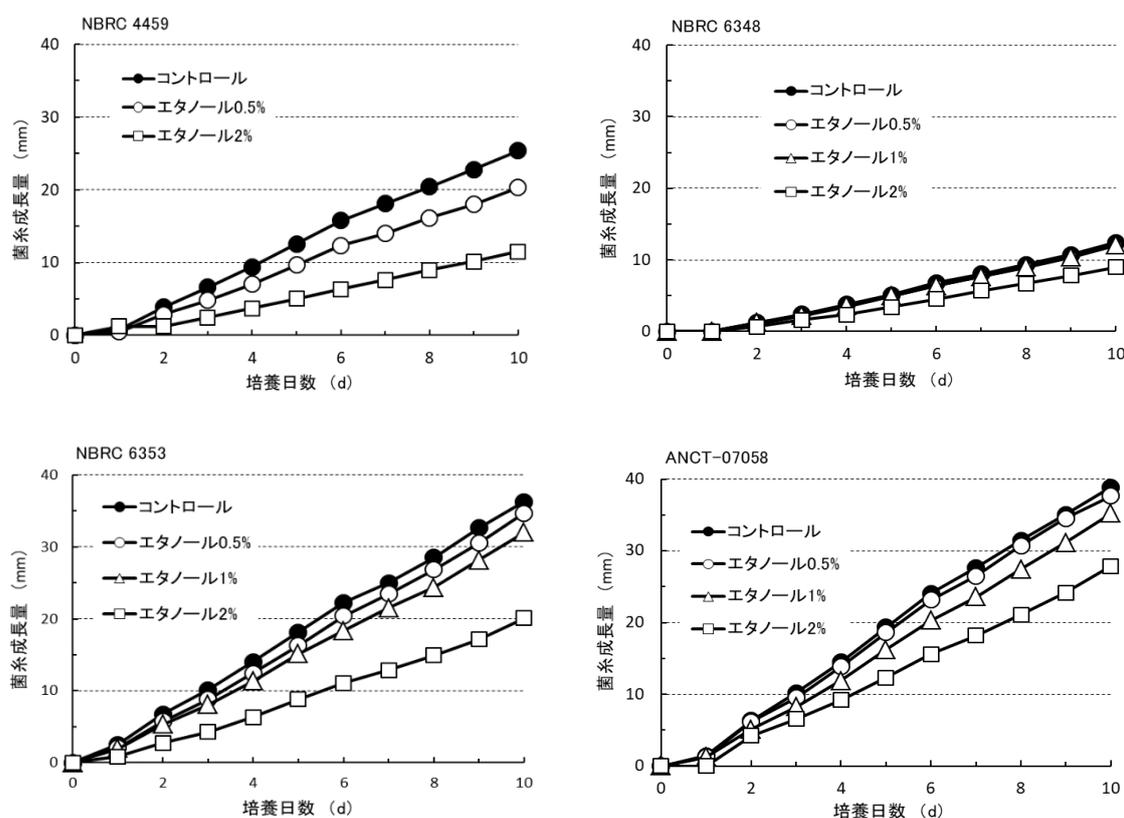


図 1. 供試菌 4 株に対するエタノールの菌糸成長阻害性能 (25°C)

注) 図中のコントロールは通常の PDA 平板培地を示す,  
 各試験区の平板培地の繰り返し数 3 (各試験区のデータ数: 12)

#### 3.2.2 供試菌株の菌糸成長に対するローズ油とエタノールの混合効果

ローズ油濃度が 0.01% (v/v), そしてエタノール濃度が 0.5, 1, 2% (v/v) になるように混合した PDA 平板

培地で供試菌株の菌糸成長挙動を観察した。その結果の一例 (NBRC 6348, NBRC 6353) を図 2 に示す。図中のコントロールは通常の PDA 平板培地での菌糸伸長量の結果である。エタノール濃度の上昇に伴って抗カビ活性が向上しているが、2% (v/v) 濃度のエタノールと組み合わせた 0.01% (v/v) 濃度のローズ油では図 2 の 2 株を含む供試菌 4 株の菌糸伸長を阻止することができなかった。

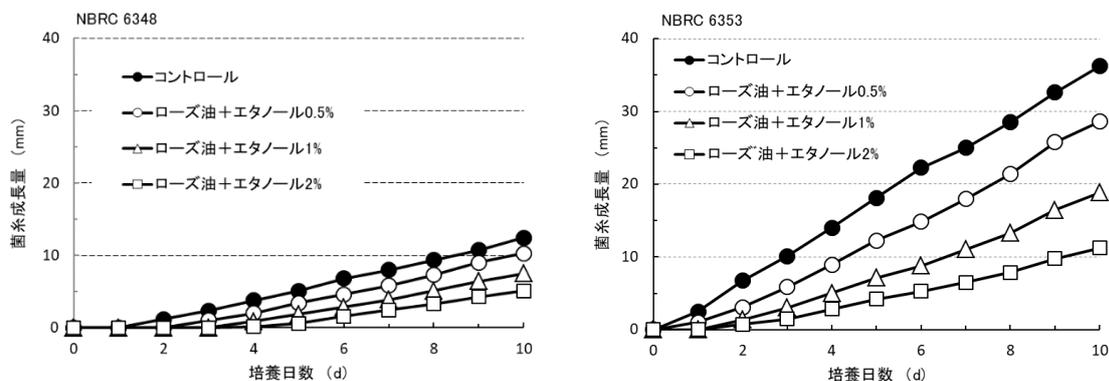


図 2. NBRC 6348 と NBRC 6353 の菌糸成長に対する  
 0.01% (v/v) 濃度のローズ油とエタノールの混合効果 (25°C)

注) 図 1 と同じ

次にローズ油濃度を 0.025% (v/v), そしてエタノール濃度を 0.5, 1, 2% (v/v) になるように混合した PDA 平板培地で供試菌株の菌糸成長挙動を観察し, 得られた結果を図 3 に示す。図 2 と同様にエタノール濃度の上昇に伴って抗カビ活性が向上し, 2% (v/v) で供試菌 4 株の菌糸伸長が 10 日の培養期間に渡って停止した。表 1 と表 2 からローズ油単独の MIC は 0.05~0.1% (v/v) であったが, エタノールを 2% (v/v) 濃度追加することで供試菌 4 株に対する MIC は 0.025% (v/v) となった。抗カビ活性の相乗効果が発現したと判断できる。

### 3.3 培地 pH と抗カビ性能の関係

各精油を添加した培地 pH は 5.0~5.4, エタノールのみ添加した培地 pH は 5.2~5.4, ローズ油を 0.01% (v/v) または 0.025% (v/v) とエタノールを添加した培地 pH は 5.3~5.4, 通常の PDA 培地 (コントロール) pH は 5.3~5.5 であった。以上から, 本研究の実験条件において供試菌株の菌糸成長に対する pH の影響は無視できると推察する。

## 4. まとめ

クワカビの *C. cladosporides* NBRC 4459 と *C. sphaerospermum* NBRC 6348, 黒色酵母の *A. pullulans* NBRC 6353, キコウジカビの *A. oryzae* ANCT-07058 の合計 4 株を供試し, 9 種類の精油 (ベルガモット油, シダー油, 丁字油, ユーカリ油, ヘリオトロープ油, ラベンダー油, レモン油, ハッカ油およびローズ油) の抗カビ活性を PDA 平板培地への混釈法 (添加濃度: 0.01~2% (v/v)) を用いて評価した。さらにローズ油

については、低濃度エタノール（添加濃度：0.5～2% (v/v)）との組み合わせによる抗カビ活性の変化を観察した。以上の結果を以下に示す。

- 1) NBRC 6348 と ANCT-07058 の最小発育阻止濃度 MIC が 2% (v/v) を超えたベルガモット油、シダー油、ユーカリ油およびレモン油の 4 種類は 9 種類の精油において抗カビ活性が低いグループと評価した。
- 2) 供試菌 4 株の MIC が 0.025～0.1% (v/v) となった丁字油、ヘリオトロップ油およびローズ油の 3 種類は抗カビ活性が優れるグループ、同 4 株の MIC が 0.3～0.5% (v/v) となったラベンダー油とハッカ油は抗カビ活性が中庸なグループとそれぞれ評価した。
- 3) 最小殺カビ濃度 MLC は、抗カビ活性が優れるグループで 0.1～1 % (v/v) ，抗カビ活性が中庸なグループで 2% (v/v) を超えた。
- 4) 0.025% (v/v) 濃度のローズ油と 2% (v/v) 濃度のエタノールを組み合わせることで、供試菌 4 株の菌糸成長が 25°C・10 日間観察されなかった。ローズ油の MIC は 0.05～0.1% (v/v) ，エタノールの MIC は 2% (v/v) を超えることから両者の混合によって抗カビ活性の相乗効果が発現した。

以上の成果を基礎にして、著者らはクロカビと黒色酵母の 6 株（本研究の供試菌 3 株を含む）に対するローズ油の抗カビ活性の精査を試み、詳細なデータを日本菌学会会報<sup>9)</sup>などで公表している。

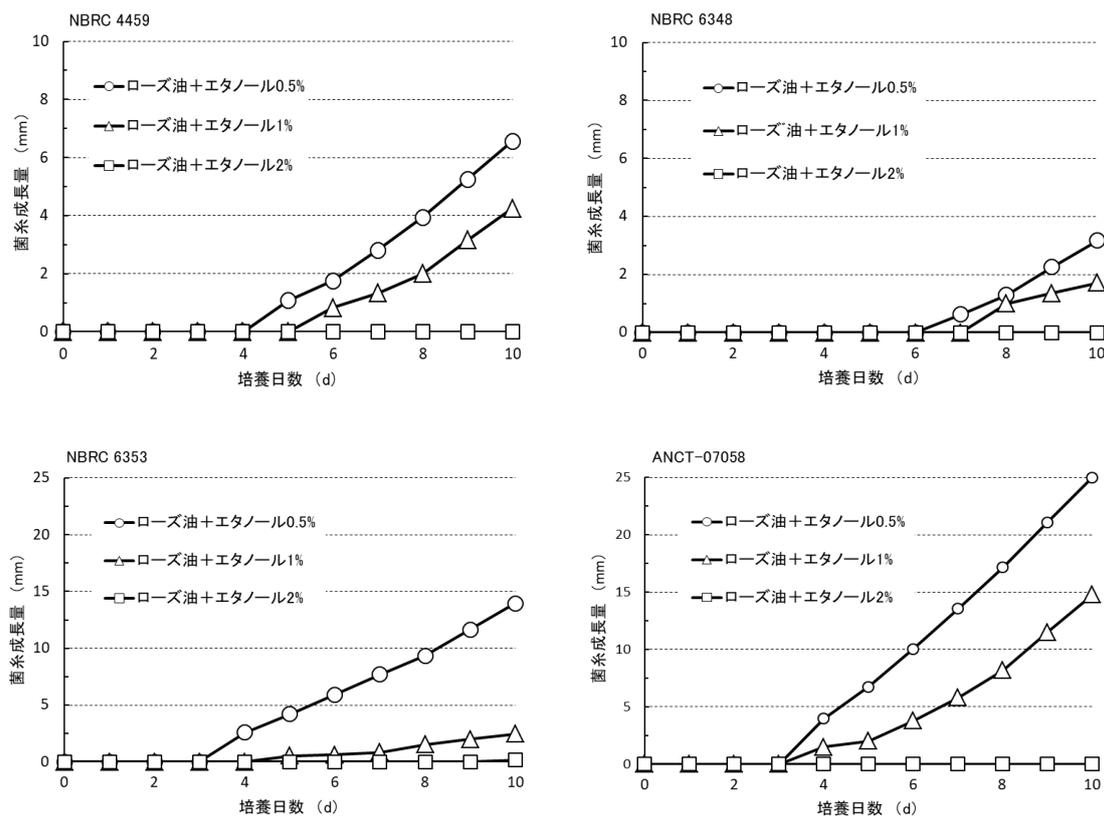


図3. 供試菌 4 株の菌糸成長に対する 0.025% (v/v) 濃度のローズ油とエタノールの混合効果 (25°C)  
 注) 図1と同じ

### 参 考 文 献

- 1) 倉田浩, 倉澤喜久雄: 住宅環境とカビ, 化学工業, **48**(11): 874-881(1997)
- 2) 菅原文子: 住宅環境におけるカビの生態 1) 住居, 防菌防黴, **25**(12): 719-725(1997)
- 3) 一島英治: 国際的に認知される日本の国菌, 化学と生物, **53**(4): 261-264(2015)
- 4) 氏家昌行, 長谷川誓, 岡本明, 諸角聖, 一言広: 市販の塩素系防カビ剤, アルコール系殺菌剤およびカビ防止剤の真菌防除効果. 防菌防黴, **17**(10): 473-481(1989)
- 5) 岡村大悟, 鮫島正浩, 田貝光克: 樹木の精油成分とその抗菌活性, 木材保存, **28**(6): 224-235 (2002)
- 6) 柴崎 勲: 改訂微生物制御用語事典. 文教出版, 121(1995)
- 7) 山本 泰, 東 和男, 好井久雄: エタノールの抗菌作用, 日本食品工業学会誌, 31(8): 531-535 (1984)
- 8) 富樫巖, 佐藤明日香: 黒色真菌 (*Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp.) に対するローズ油の生育阻害効果. 日本菌学会会報, **54**(1): 32-37(2013)

## 組み合わせ論理回路における配線ミスの発見を補助する教材の開発

舟木 聡\*

### Development of devices that assist students with incorrect wiring detection in combinational logic circuits

Satoshi FUNAKI

#### Abstract

In experiments, students are training design and assembly combinational logic circuits. These circuits use for decode BCD (Binary Code Decimal) to 7 segment LED display. Since this assembling requires a lot of wiring, there is a high possibility that connections will be mistaken. It is difficult for students to repair circuits, because they can't detect the incorrect wiring. The purpose of this study was to develop devices that assist students with incorrect wiring detection.

#### 1. はじめに

本校では電気情報工学科第3学年の学生実験において、組み合わせ論理回路の設計と製作を実施している。その実験の目的は、すでに授業で学習している設計方法の確認と、設計した回路を実際にブレッドボード上に製作する技術の獲得である。この実験では、回路を製作する技術を身に着けるため、少し複雑な4入力7出力の組み合わせ論理回路である『7セグメント・デコーダ』を題材にしている。適切な簡略化を行っても配線が50本程度必要であるため、配線作業に慣れていない学生では、接続を間違える可能性が高く、間違えた場合には回路の修正が必要となる。その際、間違えた箇所を発見できずに、全ての配線を抜いて最初からやり直している学生をよく見かける。どのような間違いをしたのか分からないままでは、技術の向上に繋がることはない。そのため、同じ間違いを繰り返すことが多く、貴重な時間を無駄にしているように思える。そこで本研究では、配線ミスの発見を補助する装置を開発することで、学生自身が間違いを発見できる実験環境の構築を目的とした。

本稿では、実際に学生が行っている組み合わせ論理の実験内容を紹介した後に、動作確認を簡易に行うことが可能になる「ロジックゲート基板」と、開発したデバイス「論理回路チェッカー」の説明を行う。また、令和元年度に行った教材を使用した学生に対するアンケートの結果について報告する。

\* 技術創造部・技術専門職員

(令和5年1月20日受理)

## 2. 学生実験の内容

### 2.1 7セグメント・デコーダの設計

7セグメントLEDは、並べられた7個のLEDの点灯を制御することで、数字や一部のアルファベットを表示することができる素子である。学生実験では、4つのスイッチによって入力した2進数10進数(BCD)を、図1の表示例に従ってLEDを点灯させる回路の設計と製作を課題としている。設計の手順としては、真理値表を作成し、各セグメントの論理式を加法標準形で求め、図2のようにカルノー図によって簡略化を行っている。簡略化を行った後の式は(1)～(7)式ようになる。求めた論理式には、下記のように共通信号にマークを付けるように指導している。これは、ゲート数を削減するためである。座学の授業では、単一出力の回路設計が多く、カルノー図による簡略化で設計が完了となる。しかし、出力が複数ある回路では、共通する信号は複数の入力に接続することで、ゲートの削減が可能であることを学ぶ目的の実験である。

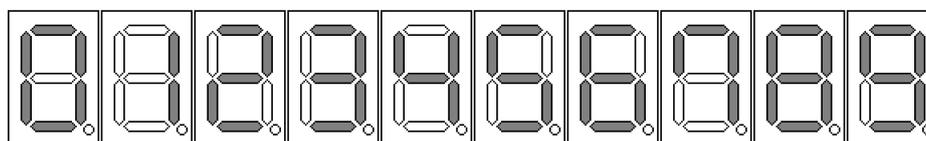


図1 10進数(0~9)の表示例

a	b	c	d																																																																																																				
<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>01</th><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	1	0	0	01	1	0	0	0	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*	<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>01</th><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	0	0	0	01	0	1	0	1	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*	<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><th>01</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	0	0	1	01	0	0	0	0	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*	<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>01</th><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	1	0	0	01	1	0	1	0	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	1	0	0																																																																																																			
01	1	0	0	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	0	0	0																																																																																																			
01	0	1	0	1																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	0	0	1																																																																																																			
01	0	0	0	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	1	0	0																																																																																																			
01	1	0	1	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			
<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><th>01</th><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>1</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	1	1	0	01	1	1	1	0	11	*	*	*	*	10	0	1	*	*	<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><th>01</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	0	1	1	1	01	0	0	0	0	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*	<table border="1"> <tr><th><math>X_3X_2 \setminus X_1X_0</math></th><th>00</th><th>01</th><th>11</th><th>10</th></tr> <tr><th>00</th><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><th>01</th><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><th>11</th><td>*</td><td>*</td><td>*</td><td>*</td></tr> <tr><th>10</th><td>0</td><td>0</td><td>*</td><td>*</td></tr> </table>	$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10	00	1	1	0	0	01	0	0	1	0	11	*	*	*	*	10	0	0	*	*	* : don't care																									
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	1	1	0																																																																																																			
01	1	1	1	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	1	*	*																																																																																																			
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	0	1	1	1																																																																																																			
01	0	0	0	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			
$X_3X_2 \setminus X_1X_0$	00	01	11	10																																																																																																			
00	1	1	0	0																																																																																																			
01	0	0	1	0																																																																																																			
11	*	*	*	*																																																																																																			
10	0	0	*	*																																																																																																			

図2 カルノー図

$$a = \overline{X_2} \overline{X_1} \overline{X_0} + \overline{X_3} X_2 X_1 X_0 \quad (1)$$

$$b = \overline{X_2} \overline{X_1} X_0 + \overline{X_2} X_1 \overline{X_0} \quad (2)$$

$$c = \overline{X_2} X_1 \overline{X_0} \quad (3)$$

$$d = \overline{X_2} \overline{X_1} \overline{X_0} + \overline{X_2} X_1 X_0 + \overline{X_3} X_2 X_1 X_0 = a + \overline{X_2} X_1 X_0 \quad (4)$$

$$e = X_0 + \overline{X_2} \overline{X_1} \quad (5)$$

$$f = \overline{X_2} X_1 + \overline{X_3} \overline{X_2} X_0 \quad (6)$$

$$g = \overline{X_3} \overline{X_2} \overline{X_1} + \overline{X_2} X_1 X_0 \quad (7)$$

## 2.2 7セグメント・デコーダの製作

実験で用意している IC は NOT (74LS04), 2 入力 AND(74LS08), 2 入力 OR (74LS32) の 3 種類である。正しく簡略化されていれば, NOT ゲート 3 個, AND ゲート 12 個, OR ゲート 6 個で回路を組むことが可能である。学生には図 3 の状態のブレッドボードと配線 (6 色, 各 10 本) を提供し, 回路製作を行わせた。最初の動作確認では正常に動かない場合が多く, 途中信号の確認が必要になるため, 図 4 の実体配置図を提供し, 出力信号の記録を付けながら作業を行うように指導している。配線後は図 5 のように配線が雑然となり, 正常に動作しない回路の修正を困難にさせる一番の要因となっている。

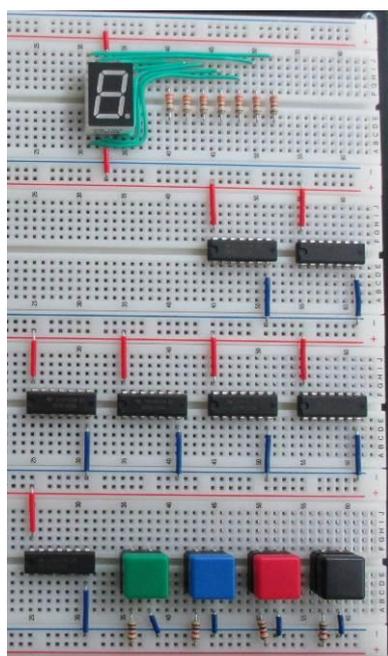


図 3 配線前

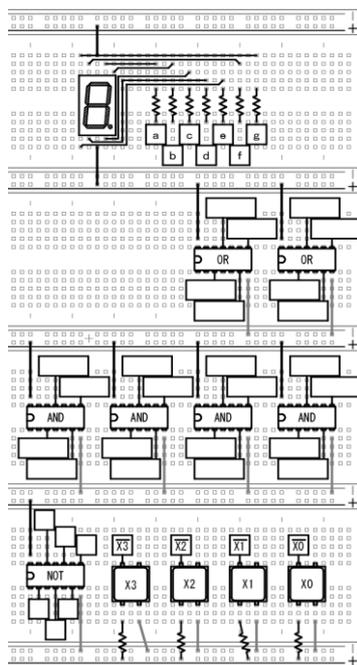


図 4 実体配置図

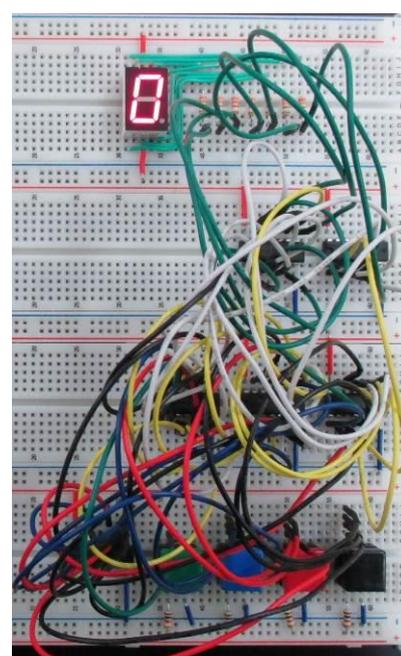


図 5 配線後

## 2.3 実験内容の変遷

この実験テーマは, 平成 20 年度にテキストを作成し, 現在まで実施を継続している。当初は, ブレッドボード, ロジック IC, 7セグメント LED, スイッチ, 抵抗を個別の状態ですべてに提供していた。しかし, 型番の見間違いや, 抜き差し時のピン折れ, 電源の逆接続が多くみられた。これらのミスは, 電子部品を破損させることがあり, 部品が故障した場合には修正により多くの時間を必要とする。また, 以前よりも授業時間が短縮されたことから, 信号線以外は事前に接続済みの状態で実験を開始する内容に変更した。部品位置を決めておくことで, 実体配置図を提供することが可能になった。以前から作成済みの信号位置は記録するように指示をしていたが, 記録の手間を惜しんだり, 記録方法の理解不足だったりして, 記録を取らない学生も多かったため, 事前に用意した図に信号を書き込み提出するように変更した。これらの変更により, 回路製作時の間違いを減らすことができたが, 実験においては間違いから学ぶことも多いので, 失敗をしない実験を目指すのではなく, 要点を変えずに内容修正を行うように心がけている。近年では, ロジック IC を使用して実際に回路を製作する機会は減っていることを考慮し, この実験では, 実際の回路を製作する際の記録の重要性や, 手順を模索し作業性を向上させることを要点としている。

### 3. ロジックゲート基板

#### 3.1 製作目的

回路を修正する際は、配置図へ記録した式と回路の出力信号が一致するかの確認が必要となる。その一番簡易的な方法は出力に LED を接続し、スイッチを操作したときの点灯・消灯によって確認する方法である。しかし、1 つずつ LED を接続し、確認後に外す作業には時間がかかり、作業中に誤って関係のない配線を抜いてしまう事態が多く発生する。その作業負担軽減のために、IC に LED を取り付けることを思いつき図 6 右側のように試作を行った。結果として、取り付けは可能だが必要な数を用意することは難しい作業難易度であるため、IC と置き換え可能な基板を設計することにした。専用基板では基板上に自由に文字や図形を印刷することができるため、図 7 のようなピンアサインを表示する設計とした。これにより、IC とテキストのピンアサインを見比べる必要がなくなり、配線作業の効率化にも役立つと考えている。

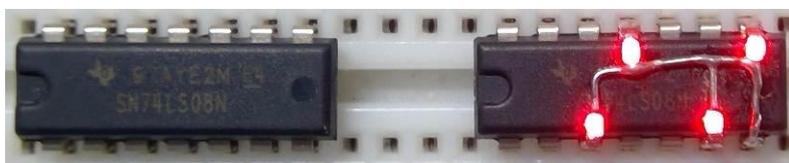


図 6 LED 表示試作 (74LS08)

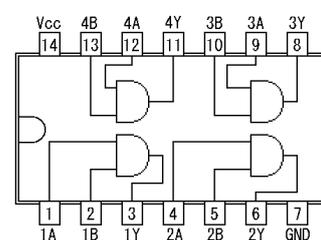


図 7 ピンアサイン

#### 3.2 ゲート基板の説明・改良

現在、実験で使用しているゲートは NOT, AND, OR の 3 種類だが、今後の実験内容の発展を考え NAND の基板も製作した。完成した基板を図 8 に示す。ゲート種類の見間違いを防止するために、発光色の異なる LED を用いて製作した。最初に設計した基板が図 8 上側であるが、問題点がいくつか見つかったため、改良した基板 (図 8 下側) を設計した。青色の光が強すぎたため電流制限抵抗の変更と、使用していないゲートの LED が不安定に点滅するため入力端子にプルアップ抵抗の追加を行った。軽微な変更点としては、電源接続ピンの表極性示 (+, -) と、バイパスコンデンサの追加を行った。しかし、部品点数が増えたことにより製作の手間が大幅に増え、現在は改良前の基板で実験を行っている。

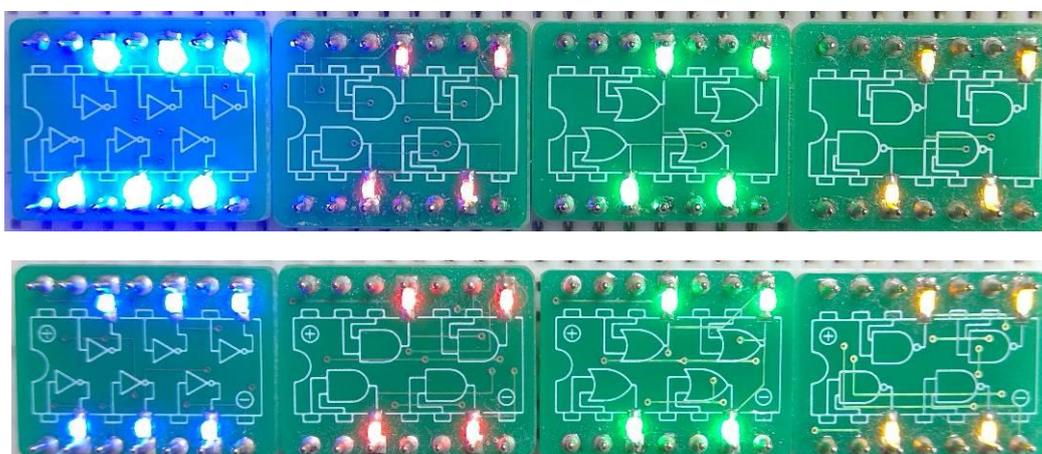


図 8 ロジックゲート基板 (上 改良前, 下 改良後)

## 4. ロジックチェッカー

### 4.1 製作目的

実験の指導を行ってきた経験上、出力に接続した LED による信号の確認方法は、一度の説明では理解できず、すぐに実践することができる学生は少ないと感じている。そこで、簡単な操作で信号の論理式を確認することができるデバイスが作れないかと考えた。マイコンを用いて、信号の確認を自動化するデバイス（ロジックチェッカー）の製作を行った。マイコンは、最初に 16 通りの信号を論理回路に入力し、対応する出力信号の記録を行っている。記録した信号を基にカルノー図を作成し、簡略化した論理式を求めてディスプレイに表示を行っている。この一連の操作を誰でも短時間で可能にすることが、マイコンを用いたデバイスを製作した目的である。

### 4.2 デバイスの説明

製作したデバイス（ロジックチェッカー）を図 9 に示す。操作方法は、確認したい信号出力に配線を繋ぎ、基板上のスイッチを一度押し、BUSY の LED が消灯して結果が表示されるまで待つだけである。表示部左側には簡略化した論理式が表示され、右側にはカルノー図が表示される。表示される論理式には別解が存在する場合もあるので、カルノー図を表示させている。また、スイッチを誤った場所に接続すると入力信号が変化しなくなるため、スイッチの信号が正しく変化していることを確認する機能を搭載している。マイコンには AVR マイコン（ATMega328P-AU）を用い、スイッチはプルアップされているため、トランジスタはオープンコレクタの状態ですwitchと並列接続する。表示には、グラフィック LCD（128x64 ドット）を用いている。このデバイスを実験に導入してから 4 年が経過したが、配線が断線する以外のトラブルは起きていないので、動作の安定性に問題はないと判断している。プログラムには改善の余地は残っており、グラフィック LCD の表示も早くないため、現状ではスイッチを押してから表示までに約 3 秒程度の時間が掛かっているが、手動で確認することに比べれば、十分な速度で信号の確認が可能である。



図 9 ロジックチェッカー

## 5. 教材の評価

### 5.1 アンケートの集計結果

開発した教材を導入した最初の年度である令和元年に、学生36人を対象に無記名アンケートを実施した。集計結果の一部を図10に示す。

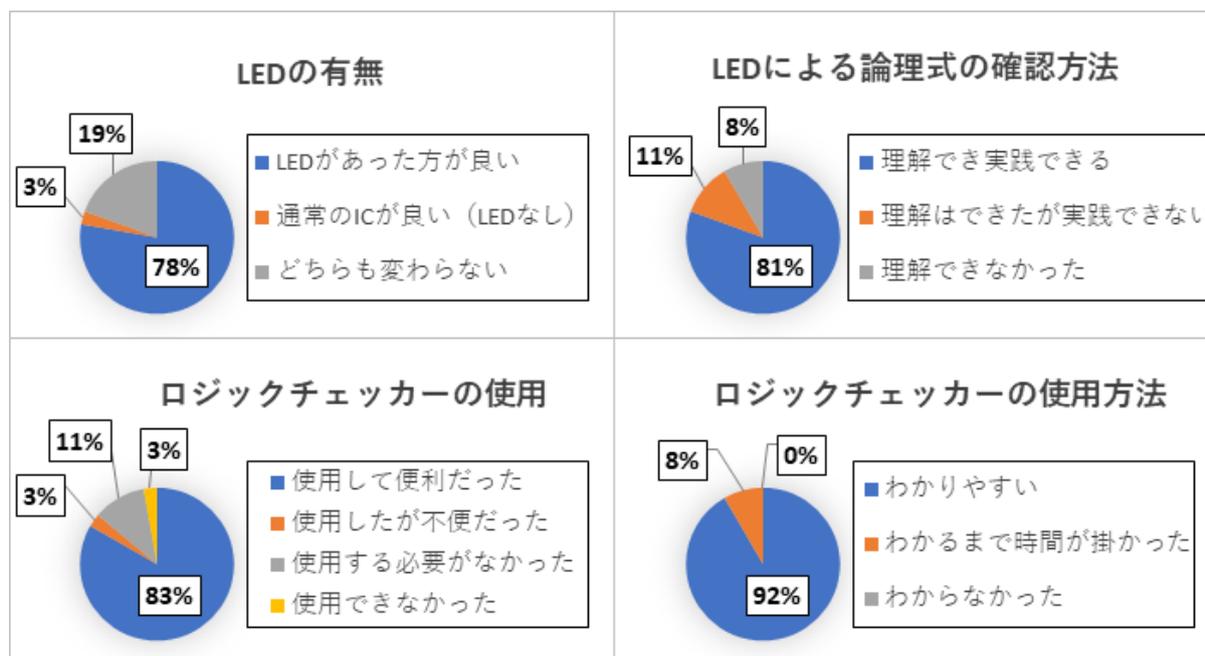


図10 アンケート集計結果

ロジックチェッカーの使用方法については、出力端子にロジックチェッカーの配線を接続して、スイッチを押すだけで良いため、『わからなかった』という回答は0%となり、使用方法には問題はないことが確かめられた。また、『便利だった』と回答した83%の学生には有効活用してもらえたと考えている。しかし、『不便だった』と『使用できなかった』と回答した学生も少ないが存在した。残念ながら理由を記述する欄が空白であるため、原因は特定できていない。実験中に配線が断線したことが一度あり、それが原因ではないかと推測している。使用理由については、『間違えた箇所を探すため』を選択した学生が64%となり、実験中の様子からも、ロジックチェッカーは配線ミスの発見に十分に役立つことがわかった。記述欄の意見として、文字表示が小さい、カルノー図の表示はなくて良いという意見があり、表示部分についてはマイコンで使用可能な、視認性の良い表示器を見つけたときには、改善したいと考えている。

ロジックゲート基板のLEDの有無については、『通常のICが良い』が0%となり、基板を製作した価値はあったと考えられる。LEDによる論理式の確認方法については『理解でき実践できる』が81%という結果が出ているが、実験中はいつでもロジックチェッカーを使用できる状態であったため、LEDによる確認を実践している学生を見かけることはなかった。この結果については、こちらの意図が学生に伝わっていない可能性が高く、この項目を評価するためには実験方法を工夫する必要があると考えている。

## 5.2 実験にかかる時間の比較

学生が回路製作にかかる時間の比較を行った。時間割の関係で計測方法を同じにすることはできなかったが、集計結果を表 1 に示す。平均時間については、導入前に比べて長くなる結果となった。時間は厳密に計測できているわけではなく、テキストも毎年修正を行っているため、条件をそろえることができていないことを考慮すると、大きな差ではないと見ている。ただし、導入前に比べ、学生からの質問件数、回路修正の手伝いが必要になる回数は減少した。このことから、本研究の目的である『学生自身が間違えを発見できる環境の構築』を達成できたと考えている。

表 1 回路製作にかかる時間

年度	平均時間
平成 30 年度 (教材導入前)	67 分
令和元年度 (教材導入後)	76 分
令和 2 年度	74 分
令和 3 年度	93 分
令和 4 年度	83 分

## 6. まとめ

この研究は、私が担当する実験テーマの 1 つに着目し、内容の改善に取り組んだものである。IC と置き換えて使用するロジックゲート基板と、出力信号を短時間で確認可能なロジックチェッカーを製作することで、学生が自身で問題を解決しやすい環境を構築した。現在、担当している実験は 10 テーマあり、他のテーマについても、学生が学習し易い環境への改善に取り組んでいる。社会ニーズにより技術は発展し続け、解決すべき問題がなくなることはない。自ら思考し、問題を解決に導ける技術者の育成を目標に、学生への支援をこれからも継続していきたいと思う。

## 謝 辞

本研究は、JSPS 科研費 (奨励研究 19H00161) の助成を受けて実施している。ここに感謝の意を表す。

## 参 考 文 献

- 1) 田丸 敬吉：論理回路の基礎 (改定版)，工学図書株式会社 (2005 年発行)
- 2) 廣田 修一：AVR マイコン・プログラミング入門，CQ 出版社 (2010 年発行)