

干瓢粉末が及ぼすコケ原系体への影響

田中 孝国*¹, 大貫 知哉¹, 小林 康浩², 大岡 久子³, 高原 美規⁴

¹ 小山工業高等専門学校 物質工学科 (〒323-0806 小山市中久喜 771)

² 小山工業高等専門学校 電気電子創造工学科 (〒323-0806 小山市中久喜 771)

³ 群馬工業高等専門学校 物質工学科 (〒371-8530 群馬県前橋市鳥羽町 580 番地)

⁴ 長岡技術科学大学 生物機能工学課程 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

*tanakatakuni@oyama-ct.ac.jp

Influence of kanpyo powder on the protonema growth of moss

Takakuni TANAKA, Tomoya ONUKI, Yasuhiro KOBAYASHI, Hisako OOKA
and Yoshinori TAKAHARA

National Institute of Technology, Oyama College

(771 Nakakuki, Oyama City, Tochigi Prefecture 323-0806, JAPAN)

(Received January 18, 2017; Accepted February 9, 2017)

Kanpyo (dried gourd shavings) consists a low amount of sugar. We used kanpyo as growth materials of the plant. In this study, the influence of kanpyo (free sugars) on the growth of moss protonema was investigated. The result showed that 0.3wt% of gourd component nutrient media did not solidify. The gourd shaves were effective for the growth of the moss protonema (*Pohlia flexuosa* and *Racomitrium japonicum*). They were especially effective for initial growth. On the other hand, there was a lot of image photography and the setting of an analytical technique (ImageJ).

Key words: dried gourd / protonema / moss

1. 背景

栃木県の代表的な作物である干瓢(かんぴょう)は、食用が一般的な利用方法であるものの、現在大きな問題2点を抱えている。1つ目は食利用だけでは生産量を消費しきれずに廃棄干瓢が多いこと、2つ目は安価な加工品の輸入量増加により国内製品の需要が伸び悩んでいることである。

これらの問題解決を図るために、栃木県は新しい食品(もしくは干瓢含有食品として)の開発に着手しているが、消費量が依然として増えず苦戦中である。

食品としてこれまで様々な分析がされてきている干瓢は、水分95%(乾物製品としては水分含量が約7~10%とされている)、タンパク質 0.5~1.0%、脂質 0.2%、糖分 2.0%、繊維 1~2%、無機成分ではミネラルを多く含み、カリウムが 1,000~1,500ppm、カルシウムも多く含

有されていることが知られている[1]。また遊離糖として、フルクトースとグルコースを0.5~1.0%程度含んでいる(乾物状態にすると20~30%に濃縮される)[1]。また、苦味成分としてポリフェノールも多く含んでいる。このように干瓢は大部分が水分であり、繊維分やリグニンも多く含まれている。従って、乾燥後は多孔質性に富んだ構造体になる。我々は多孔質性に着目した大量消費の見込める工業用製品(乾燥剤)の開発を実施している[2]。

今回我々は、上記取り組みと並行して干瓢に含有されている遊離糖成分等に着眼した。この成分は、生物の生長に必須の成分であることから、廃棄干瓢の有効利用法の1つ、肥料化が可能であると考えられた。肥料化の対象植物として、我々はコケの原糸体を選択した。コケの原糸体は組織構造が単純であることから、形態的特徴に関する観察・定量的な測定が容易であることが報告されている[3]。以上のことから、本実験においても干瓢の有無による生長性の違いが定量的に把握できると判断し、コケの原糸体を実験に供した。使用したコケ原糸体は、ケヘチマゴケ(蘚類 ハリガネゴケ科)[4]および、エゾスナゴケ(蘚類 ギボウシゴケ科)[5]の2種類である。ケヘチマゴケは、大塩らの研究により、原糸体への糖の有効性が判明しているコケであることから採用した。またエゾスナゴケは、ケヘチマゴケとは異なる乾燥に強い種であることから、壁面緑化用のコケとして応用されているコケであるため[5]、将来の産業化を想定して採用した。

添加した干瓢成分であるが、本実験では紐状の市販製品から乾燥・ミル破碎を経て作製した干瓢粉末を添加した[2]。その理由として、干瓢成分中の特定成分の抽出法として確立された手法は確立されていないこと、また現状の廃棄干瓢は畑にそのまま(もしくは割られて)放置される例が多く見られるため、簡便な手法を採用した。

今回、上記2種のコケの原糸体の培地に対して、干瓢粉末を添加し、添加の有効性について検討を実施したので報告する。

2. 実験内容

材料として用いたコケ2種は長岡技術科学大学から提供された。これらのコケは明条件下、孢子発芽し、生長した原糸体を無菌状態で継代培養されていたものを使用した。まず 改変型 Knop 寒天培地(表1)に、干瓢粉末を0, 0.1, 0.2wt%(重量%)添加し、オートクレーブ滅菌後、シャーレに分注した。続いて、寒天培地の中央部分に前処理済の透析膜を敷いた。この透析膜は、原糸体生育に影響を及ぼさないよう、大塩らの報告[3-4]に従い、以下の手順で脱硫・脱グリセリン化を実施した。まずシャーレに入るサイズに切断後、3-4hの流水洗浄、80°Cの0.3 wt %の硫酸ナトリウム水溶液で1min処理、続いて60°Cの蒸留水で2min処理、80°Cの0.2 wt %の硫酸ナトリウム水溶液で1min処理、60°Cの蒸留水で2min処理後に蒸留水に浸し、オートクレーブ滅菌を実施した。そして培養済の原子体から、適当な量の原子体を滅菌済みのメスで切断し、培地に敷いた浸透膜上に移し、25°C、蛍光灯光量下で培養を開始した。生長性を確認する手法として、一定期間ごとにマイクロスコープで画像を撮影し、撮影した画像をImageJ(アメリカのNIHで開発された医学的な画像解析で用いられるフリーソフト)により画像処理を行い、生長率を定量的に測定した[6]。ImageJを用いた画像解析法は以下の通りである。まずコケを顕微鏡下で撮影し、ImageJを用いて、2値化処理(白黒)を行う。続いて、対称とする特定領域を抽出する(本実験ではコケの原糸体部分を選ぶ)。その後、黒い部分の面積を計算(画素数をカウント)し、培地への干瓢添加の有無について、定量的な比較を実施した。

表1 改変型 Knop 寒天培地 [4]

組成	濃度 [mg/L]
KCl	120
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250
KH ₂ PO ₄	250
MnSO ₄ · 4H ₂ O	3.0

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.018
Fe citrate	10
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Agar	1500

3. 実験結果および考察

3-1 干瓢を添加した改変型 Knop 培地

改変型 Knop 培地の固化成分として、既報告[3-4]に従い、寒天を用いた。しかし、干瓢添加濃度が 0.3wt% を超えると寒天培地が固化出来ない現象が見られた。そのため、干瓢添加濃度は 0.3wt% 未満で検討を行った。固化出来なかった理由として、干瓢中に含まれる食物繊維による阻害が考えられた。

3-2 ImageJ によるコケ原糸体の観察

それぞれの原糸体の画像について、倍率 100 倍の USB 接続型のカメラで撮影を行い、ImageJ による画像解析を行った。まず 2 値化処理により、原糸体部分のみを抽出した。原糸体以外の部分は、微細なゴミや雑菌などである。続いて、ImageJ に既に組み込まれている処理(穴埋め、細線化など)を行い、定量的な解析に必要な形のみを保護することで、より正確な画像情報を得られるように画像処理を施した[7]。これらの処理後の原糸体領域の画素数(Pixel)をカウントして単面積とした。尚、ImageJ の設定条件は閾値も含め初期値の状態で行っている。ImageJ による画像解析において生じた問題点の 1 つに、寒天プレートの撮影時の背景色があった。初期生長時の細く伸び始めた根は白色であり、透明である寒天と判別することが初期設定では難しく、寒天プレートの背景色により誤差が生じることが判明した。今回本実験では背景色を白色としたため、初期の微小な生長性は確認できなかった。尚、背景色を黒色とした場合、初期設定では 2 値化処理でエラーが生じてしまうため実施していない。寒天プレートの撮影時の背景色については、

現在も検討中である。

3-3 干瓢粉末添加の有無によるコケ原糸体生長性の違い

続いて、図 1 にケヘチマゴケ原子体の ImageJ 画像、および図 2 に ImageJ を用いて解析した生長性の違いを記載した。画像による違いは見られなかったが、開始時を 0 とした場合の生長性においては 3 日後までの初期生長に影響を与えることが確認された。図 2 より、干瓢粉末 0.1wt% 添加では 0wt% の場合と違いは見られなかったが、0.2wt% 添加条件では、3 日後までの初期生長率が約 5% 向上し、その後もその差は維持されることが判明した。その後の生長については、干瓢粉末の有無に関わらず直線的であった。

原糸体の初期生長について、大塩らは、単糖であるスクロースとグルコースを 1.0wt% で添加したケヘチマゴケの原糸体の例を報告している。彼らの報告によればスクロースを添加した培地において細胞分裂が盛んになり、分枝分裂が促進されたと報告しており、外生の糖の有効性について顕微鏡観察下において定性的に報告している[8]。その一方で、グルコースによる成長抑制効果についても報告している。我々が用いた干瓢にも糖質として、割合は不明であるが遊離糖を 0.5~1.0wt% 程度含む(乾物状態にすると 20~30wt% に濃縮)との報告[9]があることから、この成分による促進作用であることが示唆される。培地に添加した干瓢粉末は市販製品であり、乾物状態であるため 30wt% の遊離糖の含有と仮定する。そして、本実験の 0.2wt% に換算すると、(0.3×0.002 より) 0.06wt% の遊離糖含有率であることが推算された。

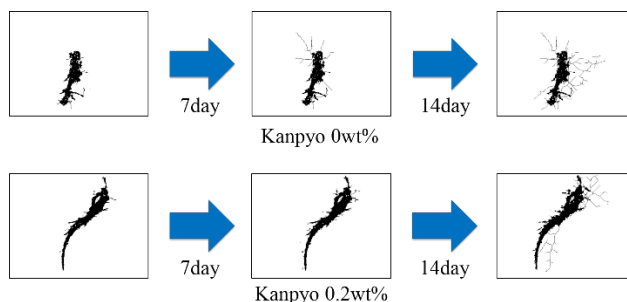


図 1 ケヘチマゴケ原子体の ImageJ 画像

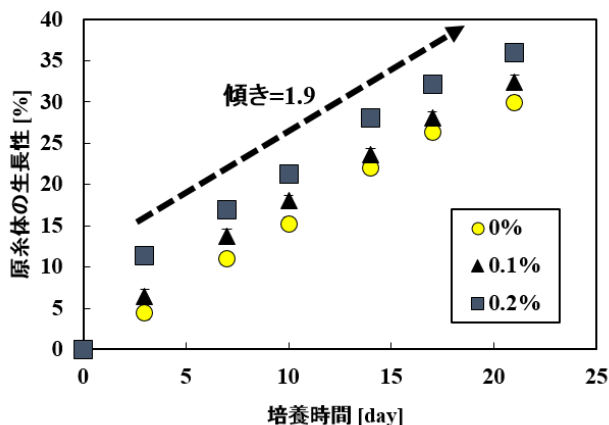


図2 ケヘチマゴケ原子体の生長性 (sample 数=3)

続いて図3にエゾスナゴケ原子体の ImageJ 画像、および図4に ImageJ を用いて解析した生長性の違いを記載した。画像による違いはケヘチマゴケ原糸体と同様に見られなかったが、開始時を0とした場合の生長性においては3日後までの初期生長に影響を与えることが確認された。干瓢粉末が0.1wt%添加時は約2%、0.2wt%添加時は約6%の生長率向上が見られた。その後の生長の傾向については、ケヘチマゴケ原糸体と同様の傾向であった。ケヘチマゴケ原糸体への糖添加効果については、前述の通り大塩らが報告しているが、エゾスナゴケ原糸体にもその作用があることが本実験結果で示唆された。

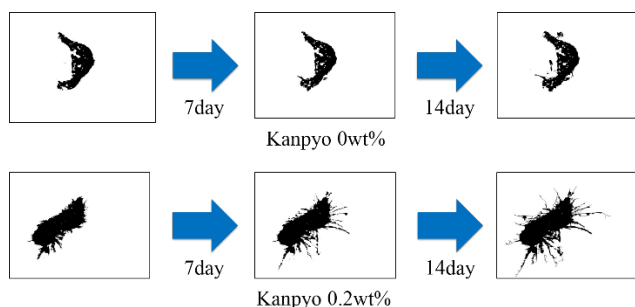


図3 エゾスナゴケ原子体の ImageJ 画像

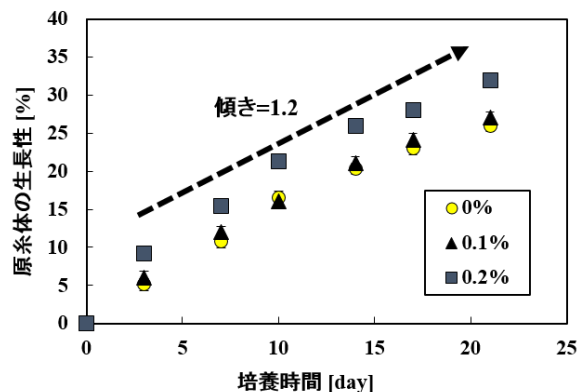


図4 エゾスナゴケ原子体の生長性 (sample 数=3)

図5に図2,4の2種類のコケ原糸体の3日後までの生長時における、干瓢粉末添加の影響をまとめた。0%を1として比較している。この結果からも、3日後までの生長に干瓢の含有する糖成分の影響が初期生長促進効果を示していることが判明した。理由は不明であるが、ケヘチマゴケの方が強い影響を受けていることが判明した。3日後以降は前述の通り21日後までその差を維持し、生長する現象が観察された。

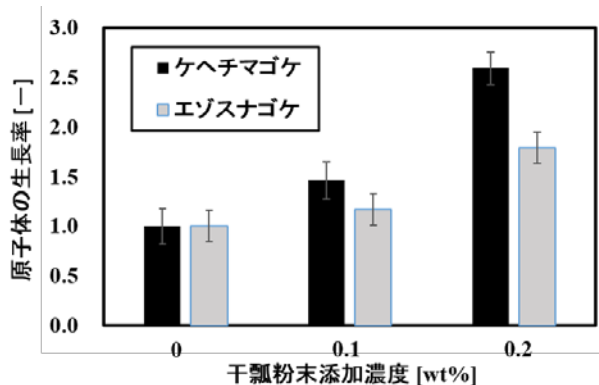


図5 3日後までのコケ原子体の生長性に及ぼす干瓢粉末の影響 (sample 数=3)

4. 現在までのまとめ

今回、干瓢粉末がコケ原糸体の初期生長に与える影響について検討を行った。その結果、干瓢粉末はコケ原糸

体(ケヘチマゴケおよびエゾスナゴケ)の生長に有意な影響を持つことが判明した。その一方で、画像撮影時の背景色や、ImageJ を用いて 2 値化処理を実施した際の画像範囲の正確性などに検討項目が多く存在することがわかった。今後、それらの問題を解決し、コケ原糸体の種類についても増やしていく予定である。

参考文献

- [1] 橋本智：「とちぎ農作物はじまり物語」, pp.7-26, 随想舎 (2009)
- [2] 田中孝国, 江口智之, 高屋朋彰, 川越大輔：「かんぴょうを材料とした乾燥剤の作製と評価」, 電気化学会 技術・教育研究論文誌, Vol. 20, No.1, pp.39-44 (2013)
- [3] 大塩愛子, 高原美規：「ケヘチマゴケ原糸体を用いた実験方法の開発」, 蘚苔類研究, Vol.10, No.12, pp.401-406 (2013)
- [4] 大塩愛子, 高原美規：「ケヘチマゴケ原糸体の生長に及ぼす糖の影響」, 蘚苔類研究, Vol.11, No.1, pp.6-10 (2014)
- [5] 大澤啓志：「エゾスナゴケ」, 日本緑化工学会誌, Vol.37, No.2, p.334 (2011)
- [6] 上村逸郎, 中村明子：「ImageJ とは」, 画像ラボ, No.2, pp.59-64 (2007)
- [7] 山本修司 他：「ImageJ で学ぶ実践医用・バイオ画像処理 第 22 回 画像の 2 値化について」, INNERVISION, Vol.21, No.10, pp.75-77 (2006)
- [8] 大塩愛子, 高原美規：「培地への糖添加に対する原糸体生長の変化(一般講演,第 37 回日本蘚苔類学会秋田大会特集)」, 蘚苔類研究, Vol. 9, No.10, p.327 (2008)
- [9] 津志田藤二郎：「地域農産物の品質・機能性成分総覧」, サイエンスフォーラム, pp.477-480 (2000)