

原 著

## 粃酢液の抗菌性要因と飼料変敗対策についての検討

二井 博美<sup>1)</sup>、節句田 恵美<sup>2)</sup>、本間 満<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 雪印種苗株式会社 東京技術推進室 千葉県千葉市美浜区、238-0002

<sup>2)</sup> 岡山情報ビジネス学院 岡山県岡山市、700-0024

<sup>3)</sup> 雪印種苗株式会社 技術研究所 北海道江別市西野幌、069-0832

**要 約** 米の生産に伴い発生する副産物である粃殻を燻炭化する際に生成する粃酢液の抗菌性について検討した。粃酢液は、木酢液・竹酢液同様に、pH は 3.0 以下と低く、水酸化ナトリウムにより pH を 6.5 に調整すると、抗菌活性は大きく低下した。また、粃酢液・木酢液・竹酢液の抗菌活性は、エバポレーションにより大きく低下することから、揮発性の成分が主たる抗菌成分であることがわかり、またそれは、酢酸・プロピオン酸であることが推察された。

不揮発性の抗菌画分を固相抽出(ステップワイズ溶出)で分画したが、Sep-Pak tC18 から 40% 濃度のメタノールで溶出される画分に弱いながらも活性が認められた。また TMR 飼料への添加試験では、粃酢液 (RB と RSH250) において試料中の総細菌数を低下させた。

これらの結果から、粃酢液の抗菌活性の主体は揮発性成分であるが、不揮発性画分にも抗菌活性物質が含まれることが分かった。粃酢液の畜産現場への利用が期待される。

キーワード: 粃酢液、抗菌活性、揮発性成分、不揮発性成分

受領: 15.06.2015. 受理: 02.09.2015.

日本畜産環境学会 No15 (1) pp27-37. 2016

### 緒 言

玄米を精米すると白米と副産物の生米糠が発生する。生米糠は、米油とその副産物の脱脂米糠に分けられる。その米油の製造過程で発生するスカムは飼料原料や抗酸化剤として近年利用されている。脱脂米糠は、すでに飼料用原料として利用されている。また稲わらは、粗飼料源として利用率は発生量の 10% 程度である。しかし、米の副産物である粃殻は、リグニンやケイ酸が多く含まれている有用資源であるが利用率は低く、その多くは資源化されていない。そこで、この粃殻を有効に活用できれば稲のすべての部位を利活用する「イネゼロエミッション」が実現可能となる

[10]。粃殻利用法としては、古くから粃殻を燻炭化する方法が行われており燻炭と燻炭液を得ることができる。燻炭は、土壤改良材や畜舎の敷料として利用され、燻炭液は、粃酢液と呼ばれ、木酢液や竹酢液と同様の抗菌性が認められているが、畜産への利活用については研究が少ない[2]。この木酢液や竹酢液の抗菌性の要因について森田らは、含有するフェノールが影響していると報告している[9]。

そこで本研究では、粃酢液の抗菌性とその要因について検討し、さらに飼料利用や畜産環境への応用の可能性について検討した。

# 靱酢液の畜産環境への利用

## 材料と方法

供試試料の製造方法の一覧を表1に示した。靱酢液の製造は3種類の方式で行なった。1つ目は、高周波過熱水蒸気装置 (High Frequency Superheated Steam Apparatus : エヌ・デイ・ケイエンジニアリング株式会社製造依頼)を用いた。この方式は、高周波により過熱した水蒸気を窯の内部に送り込む方法であり、原料である靱殻約2Lに250°Cの蒸気を1時間で1L送り込み炭化させたRSH250 (Rice husk vinegar, Super Heated)と、原料である靱殻約2Lに560°Cの蒸気を2時間で2L送り込み炭化させたRSH560を調製した。高周波過熱水蒸気方式は、短時間で効率よく炭化を行うことができる方式で靱酢液回収率も高いことが特徴である。2つ目は、蓄熱式と呼ばれ、靱殻を約2L入れた炉内の温度を3時間で500°Cに昇温し、さらに500°Cを3時間維持し炭化させたものでRS (Rice husk vinegar, Heat Stored : 青森県工業総合研究所にて自家製造)とした。蓄熱式は、一般的に燐炭を製造する場合と同じような条件での炭化方法である。3つ目は、送風型靱殻炭化装置を用いたもので、靱殻を800°Cにした炉内に加熱空気を送り込み炭化させたものでRB(Rice husk vinegar, Heated Air Blowed : 東北リサイクル株式会社製造販売品)とした。送風型は大型化した製造装置で商業的に大量生産を行っている方式である。

表1 供試試料の製造条件とpH

試料名	略称	製造条件	pH
Rice husk vinegar Super Heated 250	RSH250	過熱水蒸気温度250°C、加水1L、ホールド1時間	2.85
Rice husk vinegar Super Heated 560	RSH560	過熱水蒸気温度250°C、加水2L、ホールド2時間	2.9
Rice husk vinegar Heated Strage	RS	蓄熱式、炭化温度500°C、ホールド3時間	2.38
Rice husk vinegar Heated Air Blowing	RB	送風靱殻炭化装置、炭化温度800°C	2.37
Bamboo vinegar Super Heated 360	BSH360	過熱水蒸気温度360°C、加水2L、ホールド2時間	2.53
Wood vinegar White Charcoal	WVW	白炭式、炭化温度1000°C	1.81

原料による違いを見る目的で、竹を上記の高周波過熱水蒸気装置を用い、360°Cの蒸気を2時間で2L送り込み炭化させたものをBSH360 (Bamboo vinegar, Super Heated : エヌ・デイ・ケイエンジニアリング株式会社製造依頼)とした。また、従来の木炭の製造方法である白炭式で製造された木酢液をWVW (Wood vinegar white charcoal : 共同産業株式会社製造販売品)とした。各試料のpHを表1に示した。

### 2-1. 抗菌性試験

#### 2-1-1. 大腸菌および酵母を用いた抗菌活性試験方法

抗菌性の指標菌として、大腸菌および酵母を用いた。大腸菌については、北海道で繋養された子牛の糞便より採取した*E. coli*を用い、酵母については、トウモロコシサイレージより採取した*I. orientaris*を用いた。これらの菌株は、DNAの粗抽出を行ない、*E. coli*は16SrRNA、*I. orientaris*は28SrRNAのD1/D2領域の塩基配列をシーケンシング

表2 菌種同定に用いたプライマーの塩基配列

ターゲット	Name	Sequence(5'→3')	出典
16S	16S-8F	AGAGTTTGATCCTGGCTC	System Appl.Microbiol. 23,267-278(2000)
	16S-1492R	GTTACCTTGTTACGACTT	
28S	NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O'Donnell,1993
	NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	

## 靱酢液の畜産環境への利用

し、Blast 解析 (NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を実施し、各々の菌種の簡易同定を行なった。使用したプライマーの塩基配列を表 2 に示した。

抗菌試験の方法は、平板円筒法とした。すなわち、寒天濃度 1.5%の培地を下層に固化し、滅菌したステンレスカップ (外径 8mm) を乗せ、供試菌培養液を 0.1%相当量混合した寒天濃度 1.0%または 0.75%の培地を重層したものを用いた。*E. coli*についてはLB培地 (Difco トリプトン 1%、Difco Bacto Yeast extract 0.5%、塩化ナトリウム 0.5%、寒天 : 下層 1.5% ; 上層 1.0%) を用い、酵母についてはポテトデキストロース寒天培地 (Nissui, 寒天 1.5%) を下層に、Potato Dextrose Broth (Difco) に寒天 0.75%を加えたものを上層に用いた。

培地を固化したのちにステンレスカップを取り除き、形成されたウェルに供試試料を適当量分注し、大腸菌については 37°C、酵母については 27°Cで 24 時間培養した。抗菌性の判定は、ウェル周辺に形成される発育阻止円の直径を比較することで行なった。

### 2-1-2. 抗菌活性に及ぼす pH による影響

供試試料の抗菌性と pH の影響を検討した。2-1-1 の方法で形成したウェルに無希釈の試料または、10M の水酸化ナトリウム水溶液で pH6.5 に調整した後に試料を 50 $\mu$ L 分注した。対照として *E. coli* については階段希釈したペニシリン・G カリウムを別のウェルに分注した。*I. orientaris* については階段希釈したナイスタチンを別のウェルに分注した。被検菌に対する発育阻止円の直径を測定して検量線を作成、供試試料の抗菌性を抗生物質相当量で評価した。

### 2-1-3. 供試試料中の有機酸組成

原液中の有機酸を HPLC にて分析した。供

試試料はイオン交換水で 10 倍希釈し、0.2 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過した。カラムは、OA-pak(300mm $\times$ 4.6mm I.D., Tosoh) を用い、10mM 硫酸を溶離液とした。カラム通過液にブロモチモールブルーを反応させるポストカラム法で、450nm の吸光度を測定した。所定濃度に調製した有機酸 (乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸) を用い検量線を作成し、絶対検量線法で定量した。

### 2-1-4. 抗菌活性関与物質の揮発性について

抗菌活性に関与する物質の揮発性の検討を行なった。原液 1mL をマイクロチューブに分注し、遠心エバポレーター (566 $\times$ g, 12hr, 3.75Torr, 40°C) で遠心・濃縮した。濃縮後、1mL のメタノールを添加し溶解した。2-1-1 の方法で調製した *E. coli* プレートを作成し、ウェルに試料を 50 $\mu$ L 添加した。37°Cで 24 時間培養後に形成された抗菌斑の直径を測定した。

さらに、事前に HPLC で定量した試料中の酢酸およびプロピオン酸濃度に終濃度が揃うように、濃縮した試料に添加した。上記と同様にウェルに試料を 50 $\mu$ L 添加し、培養後に形成された抗菌斑の直径を測定した。

### 2-1-5. 不揮発性物質の抗菌活性について

不揮発性の活性画分を固相抽出、メタノールによるステップワイス溶出に供した。すなわち、1N の酢酸で酸性条件とした Sep-pak tC18 (Waters) に 2mL の試料を負荷、10mL の 1N 酢酸で洗浄したのち、10%、20%、40%、60%、80%、100%のメタノールで順次溶出し、それぞれの画分を乾固、200 $\mu$ L に濃縮 (10 倍濃縮) した。2-1-1 の方法で調製した *E. coli* プレートのウェルに濃縮した試料 100 $\mu$ L を添加し、培養後に形成された抗菌斑を観察した。

## 靱酢液の畜産環境への利用

表3 総菌数定量用のプライマー配列

ターゲット	Name	Sequence(5'→3')	出典
Universal	Forward	CCTACGGGAGGCAGCAG	[6]
	Reverse	ATTACCGCGGCTGCTGG	

2-1-6. 供試試料中のフェノール類  
各試料のフェノール類の定量を行なった。定量法は、JIS K0102.28.1.2 に基づき 4-アミノアンチピリン法による比色法で行なった [4, 13]。測定は分光光度計 (U-1000 Spectrophotometer, Hitachi) で行ない、510nm の吸光度を測定した。

### 2-2. TMR 飼料添加試験

供試試料の抗菌活性が、飼料の変敗防止につながるかを評価する目的で、飼料への添加試験を行なった。水分 50% の TMR 飼料(濃厚飼料と粗飼料を混合した飼料, Total Mixed Ration)に、供試試料を 0.1% 相当量となるように噴霧しポリエチレン製の袋に入れ、密封せずに好気条件下 30°C で 3 日間培養した。供試試料と共に培養した TMR 飼料約 30g に 90mL の滅菌イオン交換水を加え、ストマッカーで 1 分間抽出を行なった。抽出液 1mL から DNA を抽出・精製し、16SrRNA 領域をターゲットとしたユニバーサルプライマー

を用い、リアルタイムPCR (Step One, ABI) により試料中の総細菌数を定量した[3]。総細菌数定量用のプライマー配列を表 3 に示した。なお、TMR 飼料の混合内容及び割合は表 4 に示した。

## 結 果

### 3-1-1. 抗菌活性に及ぼす pH による影響

表 5 に抗菌試験の結果を示した。*E. coli* に対する抗菌活性は、RB>BSH360>RSH560 >WVW>RS>RSH250 であった。試料を pH6.5 に調整した場合、活性は大きく低下したが、上位 3 つの順序は変わらず、RB>BSH360>RSH560 であり、その他の試料では抗菌活性は検出できなかった。*I. orientaris* に対する抗真菌活性は、RB>BSH360>RSH560>RS であり、*E. coli* に対して抗菌活性を示した WVW および RSH250 では抗真菌活性は検出されなかった。pH6.5 に調整した場合、いずれの試料も活性は大きく低下したが、RB および BSH360 では抗真菌活性が残存した。

表4 TMR試料混合内容及び割合 (DM中)

原料名	混合割合 (%)
トウモロコシサイレージ	27.7
オーチャードグラスサイレージ	8.4
アルファルファ乾草(US産)	4.8
チモシー乾草(US産)	5.1
ビートパルプ(US産)	7.4
過熱大豆粕	1.3
配合試料(CP19%、TDN76%*)	32.0
豆腐粕(生)	3.3
発酵TMR飼料	5.1
その他(ミネラル、食塩等)	4.9

\*原物中の成分値

### 3-1-2. 供試試料中の有機酸組成

供試試料の抗菌活性は 3-1-1 で示したとおり、pH6.5 に調整することで活性が大きく低下することから、抗菌性に関与しているのは酸性で機能する物質であることが示唆された。HPLC での試料中有機酸濃度の分析結果は、表 6 のとおりであった。一般的に抗菌性が高いと考えられる酢酸の濃度は BSH360 (8.67%) >RS (5.74%) >RB (5.00%) >WVW (4.20%) となり、表 1 に示した低い

## 靱酢液の畜産環境への利用

表5 供試試料の抗菌活性 (抗生物質相当量unit/mL)

試料名	<i>E.coli.</i>		<i>L.orientalis</i>	
	原液	pH6.5	原液	pH6.5
RSH250	30	n.d.	n.d.	n.d.
RSH560	230	35	101	n.d.
RS	109	n.d.	72	n.d.
RB	410	69	465	322
BSH360	253	44	192	110
WVW	141	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: not detected.

*E.coli.*ではペニシリン・Gカリウム、*I. orientalis*ではナイスタチン相当量

表6 供試試料中の有機酸濃度 (%) とフェノール含量(mg/100mL)

試料	Lactate acid	Acetic acid	Propionic acid	Phenol
RSH250	n.d.	0.14	n.d.	22.9
RSH560	0.06	0.33	n.d.	125.9
RS	0.75	5.74	0.42	7.6
RB	1.56	5.00	n.d.	133.5
BSH360	0.92	8.67	0.55	91.6
WVW	0.05	4.20	0.17	236.9

pH と関連して、高い抗菌性を示す要因ではないかと推測された。

### 3-1-3. 抗菌活性関与物質の揮発性について

上記のとおり、供試試料の抗菌性に揮発性の短鎖脂肪酸である酢酸およびプロピオン酸が関与している可能性が高いことから、これらの濃度が高く、また抗菌活性の強かったBSH360 およびRB、WVW について遠心エバポレーターで揮発成分を除去したもの、さらに揮発したであろう酢酸およびプロピオン

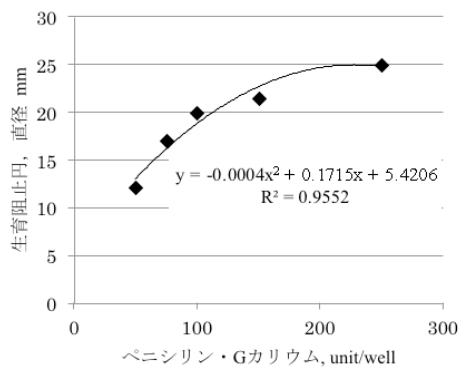


図1. *E. coli* を用いたペニシリン・Gカリウムによる検量線

酸を再添加したものの抗菌性の評価を行なった。

*E.coli* を用いた抗菌試験の結果を、図3に示した。BSH360では原液(左上)と比較して、濃縮したもの(右下)の抗菌活性は著しく低下した。HPLCにより定量した量に相当する酢酸・プロピオン酸を再添加した場合(左下)、抗菌活性は原液と同等に回復した。また同濃度の酢酸・プロピオン酸混合液のみの場合も同等の抗菌活性を示した(右上)ことから、BSH360の抗菌活性は、酢酸・プロピオン酸によるものが主

体であると推定された。

RBでは、原液と比較して、濃縮したものの抗菌活性は低下したが、酢酸・プロピオン酸混合液のみの場合、その抗菌活性は原液よりも低いことから、RBの抗菌活性は酢酸・プロピオン酸のみでは説明ができず、不揮発性の抗菌物質の存在が示唆された。

WVWについては、BSH360と同じく、酢酸・プロピオン酸が抗菌活性の主体であると推定された。

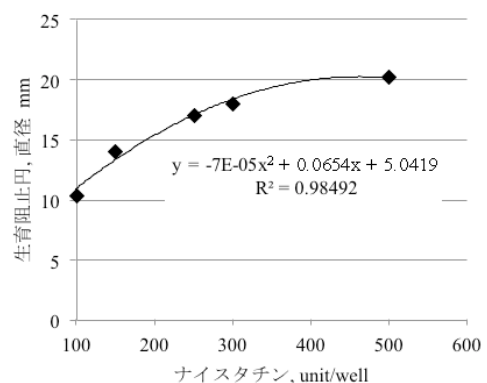


図2. *I. orientalis* を用いたナイスタチンによる検量線

## 靱酢液の畜産環境への利用

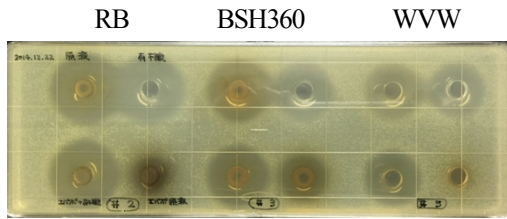


図3. 揮発性画分による *E.coli* プレート上での発育阻止円形成

(\*左上:原液、右上:有機酸、左下:濃縮+有機酸、右下:濃縮)

### 3-1-4. 不揮発性物質の抗菌活性について

結果を図4に示した。Sep-pak tC18 から40%メタノールで溶出される画分に活性が見られた。60%メタノールで溶出される画分にも微弱な活性が見られた(図4下段)。BSH360およびRBの40%メタノール溶出画分と比較して、WWVは活性が弱かった。

揮発性物質の検討で、BSH360の活性の主体は揮発性である、と述べたにも関わらず、不揮発性物質で活性が検出され、その強さがWWVより高い結果であった。今回の検討では、Sep-pak tC18への負荷量の検討が十分でなかったことから、定量的な抗菌性の評価は困難であるが、定性的な評価として、Sep-pak tC18から40%メタノールで溶出される画分に抗菌性があると考えられた。

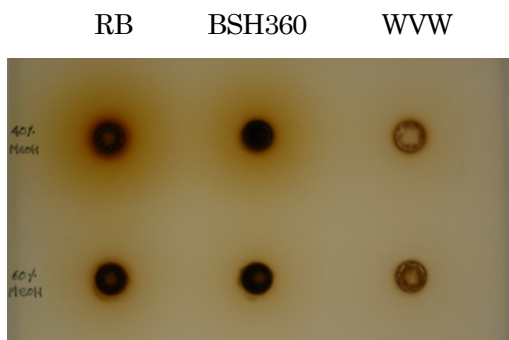


図4. 不揮発性成分結果による *E.coli* プレート上での発育阻止円形成

(\*上段:40%メタノール抽出画分、下段:60%メタノール抽出画分)

### 3-1-5. 供試試料中のフェノール類

各試料のフェノール含有量を表6に示した。WWV>RB>RSH560>BSH360>RSH250>RSの順でフェノールが含まれていた。試料による差があり、高周波過熱水蒸気装置を用いた靱酢液では、水蒸気の温度が高い方がフェノール含有量は高い傾向であった。

### 3-2. TMR 飼料添加試験

TMR 飼料へ各試料を混合して培養した結果の総細菌数は、RB、RSH250、RSH560、BSH360、RS、WWVの順で無処理区(Cont.)より総細菌数が減少した(表7)。特にRBとRSH250では、総細菌数が他の試料よりも低くなった。WWVとRSは、無処理区と総細菌数に差が無く、TMR 飼料への抗菌活性は認められなかった。フェノール含有量とTMR 添加培養結果との相関は認められなかった(図5)。

表7 TMR飼料への混合培養後の総細菌数

試料名	総細菌数(cfu/g)
RSH250	$6.81 \times 10^3$
RSH560	$1.91 \times 10^4$
RS	$1.76 \times 10^6$
RB	$1.11 \times 10^3$
BSH360	$8.0 \times 10^5$
WWV	$4.29 \times 10^6$
Cont.	$4.82 \times 10^6$

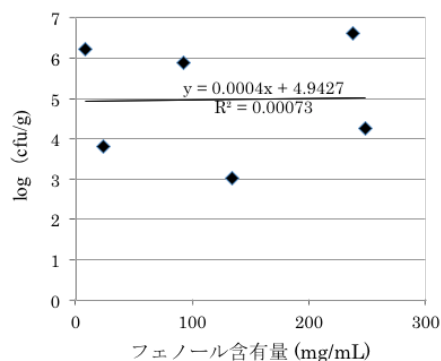


図5. フェノール含量とTMR試料中の総細菌数の相関散布



### 考 察

栗山、野本らは、木材での炭化過程から200°C前後で分解が始まり、260°Cでヘミセルロースが分解し、260~310°Cでセルロースが分解、310~450°Cでリグニンが分解すると報告している[5,12]。木酢液の酸性成分は、酢酸が主体によるものと松下らにより報告されており、リグニン、セルロース、ヘミセルロースの熱分解に由来する[8]。靱酢液の抗菌性については、佐藤らは120~270°Cで採取した靱酢液を用いて灰色カビ病菌、イネごま葉枯病菌などに対して1.0%以上の濃度で抗菌活性があると報告している[16]。また、松下らはスギ辺材の異なる温度で採取した木酢液の成分および組成は、400~800°Cでは大きな差が見られないと報告している[8]。

本研究結果においては、同じ靱酢液でも採取条件によりpHやフェノール含量、抗菌活性が異なることから、採取条件が影響していることが推察された。

渡辺らは、生理食塩水中の*E. coli*と*Staphylococcus aureus*を含む生理的食塩水へ濃度をそれぞれ1%、3%、5%にした靱酢液を加えて2時間保温した結果、生育率が*E. coli*は、1%区では39%、3%区では10%、5%区では6%となり、*S. aureus*は1%区では6%、3%区では3%、5%区では0%となると報告している[17,18]。畜産利用では、坂井田が木酢液による*Salmonella*や*Campylobacter*への抗菌活性について報告している[14,15]。Makinoらは、靱酢液が糞便中や牛舎の床上の一般細菌、特に腸内細菌を効率良く排除したと報告している[6]。Zhouらによると、靱酢液を1/2に希釈した場合では、*Aspergillus niger*、*Candida albicans*、*E. coli*、*S. aureus*に対して抗菌活性を示すが、さらに1/3に希釈するとその活性は低下し、1/6まで希釈すると抗菌活性は50%まで低下すると報告している[21]。

抗菌試験の結果から、今回用いたいずれの

試料の原液も*E. coli*に対して抗菌活性を示し、pH6.5に調整した場合にはRSH250とWVWに抗菌活性が認められなかった。*I. orientalis*に対して、RB、RSH560、RS、BSH360が抗真菌活性を示し、pH6.5に調整した場合にはRBとBSH360で抗真菌活性が認められた。この結果から靱酢液では、RBが*E. coli*、*I. orientalis*に対して有効であることが示唆された。靱酢液の*E. coli*に対する抗菌活性は複数報告されており、畜産環境などへの抗菌としての利用が可能であると推測されるが、散布する濃度やpHなどについて十分に検討を加える必要がある。

*I. orientalis*に対しては高温条件で採取された靱酢液の抗真菌活性が高いことから、それらはトウモロコシサイレージや嫌気性発酵させるデンプン質の多い飼料などの酵母抑制に有効であることが示唆される。TMR飼料への抗菌性試験の結果から靱酢液が総細菌数を減少させることが認められた。この要因として靱酢液は、木酢液や竹酢液と異なり木タールなどの粘ちょう性物質が少なく水に対する親和性が高いことが挙げられる[20]。靱酢液は、水に対する親和性の高さによりTMR飼料のような水分を約60~40%程度含んだ材料に対しては全体に行きわたり抗菌効果があったと推察される。

森田らは木酢液に含まれる化学成分は、約90%は水、約10%は酢酸、1%程度が有機酸やクレゾール、グアヤコールなどのフェノール性の成分であると報告し、谷田貝は、靱酢液、木酢液、竹酢液には、フェノール成分が1~3%程度含まれているとしている[9,20]。またZhouらの報告では、靱酢液に含まれている酢酸を9.43%、フェノールを13.64%含んでいるとしている[21]。西本らは、木酢液を製造6ヵ月後の分析から有機物中の酢酸が増加して、酢酸以外の成分が減少する傾向があることから木酢液中の成分に化学変化が起きて

## 靱酢液の畜産環境への利用

いると報告している[11]。靱酢液においても木酢液と同様に酢酸が増加する可能性があるために継時的な成分変化を確認する必要がある。

本研究の結果、抗菌性成分は、pH を 6.5 に調整することで活性が低くなり、また濃縮した場合も抗菌活性が低下した。濃縮した試料に原液と同量の酢酸、プロピオン酸を添加することで抗菌活性が回復することから、揮発性成分である酢酸、プロピオン酸の影響が大きいことが認められた。不揮発性成分では BSH360、RB、WVW について 40%メタノールと 60%メタノール溶出画分に抗菌活性が示されたことから、不揮発性画分においては比較的極性のものが含まれ、靱酢液、竹酢液、木酢液には共通に含まれるものと推測される。これらの結果から靱酢液や竹酢液、木酢液の抗菌性は、有機酸である酢酸、プロピオン酸が示し、不揮発性成分も抗菌活性を有する可能性が推測される。山元らは木酢液、竹酢液のウイルス不活化活性にフェノールが大きく関与しているが、フェノール単独よりも酢酸との組合せによりウイルス不活化活性が増強されるとし、木酢液、竹酢液が中性条件になるとウイルス不活化活性を喪失するとしている[19]。本研究においても pH6.5 に調整した試料では原液よりも抗菌・抗真菌活性が低下した。ウイルスと細菌・酵母の違いはあるものの、本研究は山元らの報告と同様な傾向を示している。また、Marumoto らは、木酢液よりも竹酢液においてウイルス不活化活性が高いことを示している[7]。これについても本研究でも同様の傾向を示しており、酢酸、プロピオン酸、およびフェノール含量が多い RB や BSH360 が高い抗菌活性を示したが、従来の木炭の製造により得られた WVW は、フェノール含量、酢酸含量が高いにも関わらず、抗菌活性が低いという結果を得た。このことから本研究では、Marumoto らの報告と同様に

木酢液よりも、靱酢液、竹酢液の抗菌性が高いことが示唆された。しかしながら材料である樹木の種類と木炭の生産方式による違いが抗菌性に影響することが推察される。靱酢液、竹酢液、木酢液に含まれる成分はそれぞれが関連して抗菌活性を示し、これまでの報告のように幅広く抗菌活性が認められていると示唆される[20]。

自給飼料であるグラスサイレージやトウモロコシサイレージを配合飼料などと混合して給与する TMR 飼料は、水分が 50%前後でミキサーによって攪拌されるため空気との接触による好気的変敗をしやすいものである。特に、サイレージに酪酸菌が多いとタンパク質を分解してアンモニアを生成し、嗜好性も下がることが知られている[1]。また気温の高い夏場などは、TMR 飼料自体が発熱して乾物摂取量が低下し、乳生産などに悪影響が出る。これに対して生産現場では、品質の悪いサイレージを給与しないとか夏場は TMR 飼料を調製する際に 1 回当たりの混合量を減らして給餌回数を増やすことなどの対策を行っているが十分な効果を上げていない現実もある。また、エコフィードの原料である食品残さも水分が多く変敗しやすい原料である。今回の研究により、靱酢液は、TMR 飼料や水分の多く変敗しやすい飼料原料中の細菌増殖を抑制することが示唆された。ただし、靱酢液を飼料添加した場合に家畜への嗜好性に影響する可能性もあるので給与に関して添加量と合わせて検討が必要である。

靱殻は、比重が軽く、かさが多く米の収穫後に集中的に排出される問題点がある。そのために集約して安価で効率よく靱殻燻炭を製造できるシステムの構築が必要とされる。これを確立すれば米作の副業の 1 つとなることが期待される。そのためにも靱酢液を採取する温度や時間などの条件と抗菌性の関連や抗菌活性成分の特定などの問題について検討を



## 靱酢液の畜産環境への利用

進めることが重要である。

### 謝 辞

本研究での高周波過熱水蒸気装置により靱酢液製造にご指導、ご協力いただいたエヌ・デイ・ケイエンジニアリング(株)柳沼良和氏(故人)と株式会社ハイテック飯田登氏、蓄熱方式での靱酢液採取にご指導、ご協力いただいた青森県産業技術センター工業総合研究所の岡部敏弘元所長と広瀬孝氏にお礼申し上げます。また論文作成にアドバイスいただいた雪印種苗株式会社の Lyndon. F. Quintio (Ph.D)、千葉科学大学薬学部福井貴史氏にお礼申し上げます。

### 文 献

- [1] 安宅一夫 (1984) サイレージの理論と実際: 42-46, 酪農学園大学, 北海道.
- [2] 加藤哲郎 (2001) 土壌改良と資材 改訂第2版: 289-291, 財団法人日本土壌協会, 東京.
- [3] S. Koike, H. Yabuki, Y. Kobayashi (2007) Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria: *Animal Science Journal*: 78 (2): 135-141.
- [4] 倉田泰人 (1992) 環境におけるフェノール類の分析: 埼玉県公害センター研究報告: 19: 1-32.
- [5] 栗山旭 (1979) 木材の炭化過程に関する研究: 林業試験場報告: 329: 7-76.
- [6] S. Makino, H. Cheun, H. Tabuchi and T. Shirahata (2000) Antibacterial Activity of chaff Vinegar and its practical application: *Japanese Society of Veterinary Science*: 62(8): 893-895.
- [7] S. Marumoto, S. Yamamoto, H. Nishimura, K. Onomoto, M. Yatagai, K. Yazaki, T. Fujita and T. Watanabe (2012) Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyrolytic acid: *Journal of agricultural and food chemistry*: 60 (36) : 9106-9111.
- [8] 松下洋一、菅本和寛、日高健一、松井隆尚 (2002) スギ辺材およびその構成成分から調製した木酢液の分析: *日本化学会誌* : 3 : 383-391.
- [9] 森田康弘、岡部敏弘、光源寺宏治、福井徹、福田清春 (2011) 木材の熱分解から調製した木酢油の抗菌活性と木材保存剤としての利用: *木材保存* : 37 (4) : 165-170.
- [10] 二井博美 (2015) 牛による「イネゼロエミッション」: *畜産の研究* 69 (3) : 189-194.
- [11] 西本円佳、堀啓映子、谷田貝光克、榎本雄司 (2002) 木酢液の継時変化: 第52回日本木材学会講演要旨 : 613.
- [12] 野本寛、本庄孝子 (2011) バイオマス半炭化の原理と応用: *高温学会誌* : 37 (2) : 43-49.
- [13] 尾崎知良 (1958) 光電比色計による微量フェノール類の分析: *JAPAN ANALYSIS* : 7 : 278-283.
- [14] 坂井田節 (2007) 炭と木酢液の有効活用 (29): *鶏の研究* : 81 (8) : 56-59.
- [15] 坂井田節 (2007) 炭と木酢液の有効活用 (30): *鶏の研究* : 82 (9) : 56-59.
- [16] 佐藤拓道、田尻明男、野呂裕美子、藤田潤子、佐々木甚一、原田幸雄 (1999) 農産廃棄物から得た木酢液の成分と抗菌性: *木質化学会誌* : 2 (1/2) : 59-66.
- [17] 渡辺紀元 (1999) 靱酢の除菌能: *水処理技術* : 40 (5) : 211-214.
- [18] N. Watanabe and M. Kishi (1999) Bacteria-scavenging ability of rice hull vinegar: *Memoirs of Hokkaido Institute of Technology* : 27 : 273-279.
- [19] 山元誠司、丸本真輔、西村裕志、尾野本浩司、谷田貝光克、矢崎一史、藤田尚志、渡辺隆司 (2012) 木竹酢液のウイルス不活化物質の探求: *生存圏研究* : 8 : 49-54, 京都

## 粃酢液の畜産環境への利用

大学、京都.

[20] 谷田貝光克 (2013) 木竹酢液ハンドブック：特性と利用の科学： 23-135, 18-19、海青社、滋賀.

[21] Zhou Jian-bupn, Chi Fei, Qin Heng-fei

(2011) Component analysis, Inhibitory and germicidal performances of rice husk vinegar: Chemistry and Industry of Forest Products: 31(2): 63-68.

Original Article

**A study on the antibacterial activity and use against feed spoilage of rice husk vinegar**

Hiromi Nii <sup>1)</sup>, Megumi Sekkuden <sup>2)</sup>, and Mitsuru Honma <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Snow brand seed Co., LTD. Tokyo Extension, Mihama-ku, Chiba-shi, Chiba-ken, 238-0002

<sup>2)</sup>Okayama Information College Okayama-shi, Okayama-ken, 700-0024

<sup>3)</sup>Snow brand seed Co., LTD. Bacteria Research Center Ebetsu-shi, Hokkaido, 069-0832

Antimicrobial activity of rice husk vinegar, which is a by-product of the process of rice husk charcoal production, was investigated. Rice husk vinegar as well as wood vinegar and bamboo vinegar, was highly acidic with a low pH (<3.0), and after adjustment of pH to 6.5 by using sodium hydroxide, antimicrobial activity was decreased. In addition, the antimicrobial activity of rice husk, wood and bamboo vinegars after removal of volatile matters by evaporation decreased. It may suggest that the activities originate from acetic acid or propionic acid. Non-volatile matters obtained by solid-phase extraction (step-wise elution) using Sep-Pac tC18 to 40% density of methanol showed weak antibacterial activity. Furthermore, addition of rice husk vinegar (RB and RSH250) on TMR feed reduced the total number of bacteria. From these results, antibacterial activities of the rice husk vinegar liquid are mainly contained in a volatile fraction; however, weak active matters were contained in nonvolatile fractions. This suggests that rice husk vinegar will be a useful antimicrobial material in animal production.

Key words: rice husk vinegar, antimicrobial activity, volatile antibacterial action, non-volatile antibacterial action

**Corresponding: Hiromi Nii** (e-mail: cattleland@gmail.com)