

サイレージ発酵がばれいしょでんぷん粕中ジャガイモそうか病菌の生残に及ぼす影響

誌名	北海道立総合研究機構農業試験場集報 = Bulletin of Hokkaido Research Organization Agricultural Experiment Stations
ISSN	21861048
巻/号	98
掲載ページ	p. 90-94
発行年月	2014年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



〔短報〕

サイレージ発酵がばれいしよでんぶん粕中
ジャガイモそうか病菌の生残に及ぼす影響*1

湊 啓子*2 清水 基滋*3

ジャガイモそうか病菌を含むばれいしよでんぶん粕は、4℃・29日間、15℃・22日間および25℃・7日間サイレージ化することにより、そうか病菌は検出されなくなり、貯蔵サイレージを土壌に混和してばれいしよを植え付けてもそうか病の発病は認められなかった。そうか病菌の生残にサイレージ化が及ぼす影響を解析したところ、でんぶん粕の貯蔵温度が高いほど、そうか病菌密度は速やかに減少し、有機酸の生成とpHの低下速度が早かった。さらに、液体培地中ではpH4.0を下回るほどそうか病菌 (*Streptomyces turgidiscabies*, *S. scabies*) は短期間で不検出となり、pH4.0の液体培地中では乳酸と酢酸の濃度が0.03%以上でそうか病菌数の減少が認められた。

緒 言

ばれいしよでんぶんの製造工程で発生するでんぶん粕は道内で年間9~10万t産出されている⁷⁾。でんぶん粕は栄養価が高く、豚、乳牛および肉牛の餌としての利用が可能であることが報告^{3, 10, 12, 13)}されている。しかしながら、飼料利用により、その中に含まれるジャガイモそうか病菌が家畜の体内を通過して糞便に排出され、堆肥として圃場に還元されることにより、そうか病の発生拡大に繋がるリスクが懸念されている。

ジャガイモそうか病は塊茎表面にかさぶた状の病斑が形成され、外観品質が著しく損なわれる難防除土壌病害である。本病の病原菌は複数の放線菌が報告されているが、北海道における主要菌種は、*Streptomyces scabies* および *S. turgidiscabies* である¹⁶⁾。著者らが2004年に道内のでんぶん工場で産出されたでんぶん粕中に含まれる両菌種のそうか病菌数を調査したところ、 $4.0 \times 10^2 \sim 4.3 \times 10^3$ cfu/生重gのそうか病菌が検出された(湊ら未発表)。

一方、でんぶん粕は水分率が高く、そのままでは腐敗しやすいため、密封貯蔵して乳酸発酵を進め、長期保存が可能なサイレージとして家畜に給与される。サイレージ発酵の過程では有機酸生成によるpH低下により、家

畜の伝染性疾患の原因菌であるサルモネラやヨーネ菌が死滅することが知られている^{1, 4)}。そうか病菌についても同様の殺菌効果が期待できるが、これまで、サイレージ発酵過程においてそうか病菌の動態を調査した報告はみられない。サイレージ化によりそうか病菌を殺菌することができれば、でんぶん粕の飼料利用によるそうか病菌の拡散リスクは極めて低いことが示され、飼料利用の拡大に資することが期待される。

そこで、本試験ではでんぶん粕のサイレージ発酵過程において、そうか病菌の消長を調査するとともに、pHおよび有機酸がそうか病菌の生残に及ぼす影響を検討した。

試験方法

1. でんぶん粕サイレージの発酵過程におけるジャガイモそうか病菌の消長(試験1)

そうか病罹病いも(平均発病度²⁾50)から製造したでんぶん粕(水分70.4%)を、密封パック器専用袋(BH-JJ1951R, 松下電器産業株式会社, 大阪)に100gずつ詰め、密封パック機を用いて脱気と密封を行い、4℃、15℃および25℃の恒温室内で29日間貯蔵した。貯蔵開始0, 3, 7, 14, 22および29日後に各1袋ずつ開封し、pH, 有機酸含量(乳酸, 酢酸, プロピオン酸および酪酸)およびそうか病菌数を測定した。

pHおよび有機酸含量は、サイレージ20gに蒸留水80mlを加え、4℃で一晩静置後に二重ガーゼで濾過し、この濾液についてpHを測定した後、有機酸含量の測定まで-20℃で凍結保存した。乳酸含量はF-キット(L-乳酸/D-乳酸; r-biopharm, Germany)を、酢酸, プロピオン酸および酪酸含量はガスクロマトグラフ(GC-17A, 島津製作

2013年11月1日受理

*1 本報告は、2006年度日本草地学会つくば大会で発表した。

*2 (地独) 北海道立総合研究機構畜産試験場, 081-0038 上川郡新得町

E-mail: minato-keiko@hro.or.jp

*3 同十勝農業試験場(現: 同中央農業試験場, 069-1395 夕張郡長沼町)

所, 京都, ULBON HR-20M) を用いて定量した。そうか病菌数はMPN-PCR法¹⁷⁾により定量した。すなわち, でんぷん粕サイレージ10gに滅菌蒸留水90mlを加えて10分間振盪し, 10倍希釈系列の懸濁液1mlをツアベック培地に各3枚ずつ塗抹し28°Cで3日間培養した。培養後, 培地表面に1mlの滅菌蒸留水を加えてコンラージ棒で菌体液を掻き集め, この菌体液を95°C・10分間熱処理, 攪拌後に12,000rpmで5分間遠心分離した上清をテンプレートとした。本試験で供試したでんぷん粕の原料いもが栽培された地帯は*S. turgidiscabies*の優占地域¹⁵⁾であるため, 本菌種を特異的に検出するプライマー²⁾を用いてPCR反応を行い, 最確値法によって菌数を求めた。

また, 4°Cで14, 29日, 15°Cで7, 22日および25°Cで7, 22日間貯蔵したサイレージおよび無処理のでんぷん粕各50gをそれぞれ殺菌土壌(65°C・3日間湿熱処理)4kgと混和して覆土に用い, ポリポットにばれいしょ(品種:「男爵薯」)を植え付けた。雨よけハウスで栽培して収穫時にそうか病の発病調査²⁾を実施した。

2. pH, 乳酸および酢酸がそうか病菌の生残に及ぼす影響(試験2)

S. turgidiscabies Sy9103株, および*S. scabies* N92-6-2株を, それぞれそうか病菌孢子形成培地⁶⁾に移植して28°Cで14日間培養した。培地表面に形成された孢子を掻き取り, 遠心チューブ内の滅菌蒸留水に懸濁して試験管ミキサーで攪拌した。これを, 超音波洗浄器に浸漬して600Wで2分間処理後, 孔径5μmのメンブレンフィルターで濾過した。この濾液を孢子懸濁液とし, 塩酸でpH3.0, 3.5, 4.0, 4.5および5.0に調製した酵母エキス・麦芽エキスブロス(以下, YMブロス)に接種した。25°Cの恒温室内で21日間静置培養し, 培養開始0, 1, 2, 5, 7, 10, 15および21日後に試料を採取して, 9cmのプラスチックシャーレに分注した酵母エキス・麦芽エキス寒天培地(以下YMA培地)に100μlずつ3枚に塗布, 28°Cで2週間培養後に培地上に形成されたコロニー数を計数した。

また, YMブロスに乳酸および酢酸をそれぞれ0.01~1.00%添加し, 水酸化ナトリウム溶液でpHを4.0に調整

した液体培地に, 前述の方法で作成したそうか病菌孢子懸濁液を接種して25°Cで6日間静置培養した。培養開始0, 1, 2, 3および6日後に試料を採取し, YMA平板培地に塗布してそうか病菌数を定量した。

結果

1. でんぷん粕サイレージの発酵過程におけるジャガイモそうか病菌の消長(試験1)

サイレージ発酵過程におけるそうか病菌の消長を表1に示した。詰め込み原料中のそうか病菌密度は 1.0×10^5 cfu/生重gであったが, 貯蔵温度が高いほど, でんぷん粕中のそうか病菌密度は速やかに低下し, 25°C・3日, 15°C・7日, 4°C・22日後には不検出(検出限界; 3×10^2 cfu/生重g)となった。

貯蔵温度・時間の異なるでんぷん粕サイレージを混和した土壌におけるそうか病の発病状況を表2に示した。MPN-PCR法によりそうか病菌が検出された貯蔵0日および4°C・14日貯蔵サイレージを混和した土壌におけるそうか病の病いも率はそれぞれ67%, 57%であった。これに対し, そうか病菌が不検出となったサイレージを混和した土壌においては, 15°C・7日貯蔵サイレージで病いも率2.4%とわずかな発生が認められたのみで, 4°C・29日, 15°C・22日および25°C・7, 22日貯蔵サイレージではそうか病の発病は認められなかった。

表2 貯蔵温度・期間の異なるでんぷん粕サイレージ混和土壌におけるジャガイモそうか病の発病状況

温度	日数	病いも率 (%) ¹⁾	発病度 ²⁾
—	0	67.2	48.7
4°C	14	57.3	20.6
	29	0.0	0.0
15°C	7	2.4	0.6
	22	0.0	0.0
25°C	7	0.0	0.0
	22	0.0	0.0
滅菌でん粉粕施用 ³⁾		0.0	0.0
でん粉粕無施用		0.0	0.0

1) 調査いも数にしめる病いもの割合
2) 発病程度を示す指標0~100(最大)
3) 65°C・3日間湿熱処理

表1 異なる温度で貯蔵したでんぷん粕サイレージ中のそうか病菌の消長

貯蔵温度	貯蔵日数					
	0	3	7	14	22	29
	そうか病菌数 (cfu/生重g)					
4°C	1.0×10^5	4.6×10^4	1.5×10^3	4.0×10^2	ND ¹⁾	ND
15°C	1.0×10^5	4.6×10^4	ND	ND	ND	ND
25°C	1.0×10^5	ND	ND	ND	ND	ND

1) ND: 不検出(検出限界 3×10^2 cfu/生重g)

サイレージ発酵過程におけるpHの変化を図1に示した。でんぷん粕のpHは貯蔵温度が高いほどすみやかに低下し、25℃および15℃貯蔵では7日で良質サイレージの指標とされるpH4.2¹⁸⁾以下に低下した。その後もpHはしだいに低下し、29日後には15℃および25℃でそれぞれ3.6, 3.4まで低下した。4℃貯蔵のpH低下速度は緩慢で、開始時pH5.2から29日後の4.3まで緩やかに低下した。

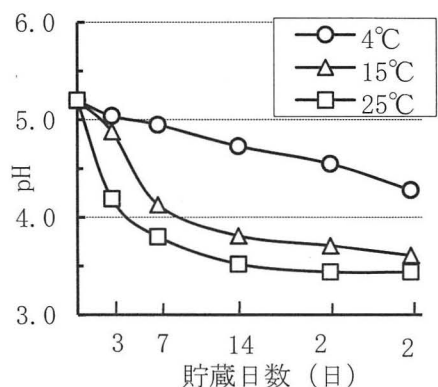


図1 異なる温度で貯蔵したでんぷん粕サイレージのpHの経時的変化

乳酸および酢酸含量の変化を図2に示した。両有機酸ともに貯蔵温度が高いほど生成速度が速く、多量に蓄積された。29日後では、乳酸含量は4℃, 15℃および25℃でそれぞれ0.04, 0.54および0.80%, 酢酸含量はそれぞれ0.08, 0.15および0.45%であった。プロピオン酸と酪酸はいずれも検出されなかった。

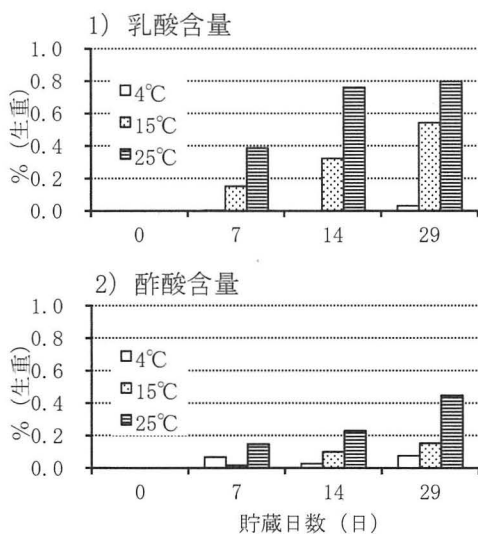


図2 でんぷん粕サイレージ発酵過程における乳酸および酢酸含量の経時的変化

2. pH, 乳酸および酢酸がそうか病菌の生残に及ぼす影響 (試験2)

pH3.0~5.0のYMブロス中におけるそうか病菌の消長を図3に示した。両菌種ともに、pH4.5以上では菌数の減少は認められなかったが、pH4.0以下では培養時間の経過に伴い減少傾向を示し、pH3.0では1~2日後、pH3.5では11~15日後、pH4.0では21日後に不検出となった。

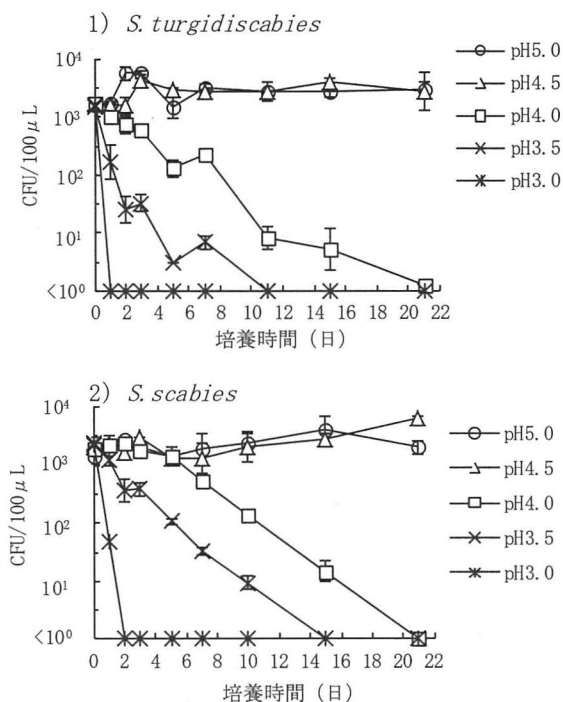


図3 pHの異なるYMブロス中におけるそうか病菌の消長
1) 値は3連の平均値
2) エラーバーは標準偏差を示す

そうか病菌の消長に及ぼす乳酸および酢酸含量の影響を図4に示した。pH4.0のYMブロス中において、両有機酸ともに0.03%以上でそうか病菌の減少が認められた。有機酸含量とそうか病菌が不検出となるまでの時間との関係は、乳酸含量0.5~1.0%では1日、0.06~0.25%では6日、酢酸含量1%では1日、0.5%では2日、0.03~0.25%では6日であった。

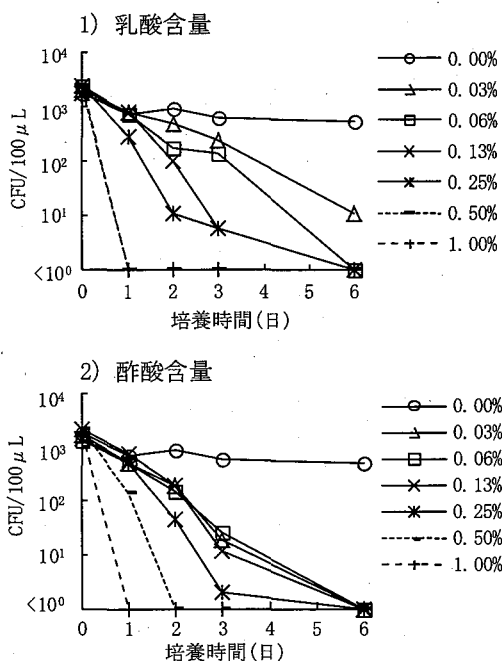


図4 乳酸および酢酸含量の異なるYMブロス中(pH4.0)におけるそうか病菌 (*S.turgidiscabies*) の消長

考 察

ばれいしよでんぷん粕のサイレージ発酵過程におけるそうか病菌の消長を調査した結果、貯蔵温度が高い程、そうか病菌は短期間で不検出となった(表1)。また、そうか病菌が不検出となった25℃・7日、15℃・22日および4℃・29日貯蔵サイレージを混和した土壌でばれいしよを栽培しても、そうか病の発病は認められなかったことから(表2)、でんぷん粕中のそうか病菌はサイレージ発酵過程で死滅したものと考えられた。

サイレージ発酵過程における病原菌の死滅要因として、低pHと有機酸の影響が報告されている⁴⁾。ばれいしよでんぷん粕のサイレージ発酵過程においても、有機酸の生成によってpHが速やかに低下した処理ほど短期間にそうか病菌は不検出となった。そこで、本試験では低pHおよびサイレージ発酵過程で生成される主要な有機酸である乳酸と酢酸がそうか病菌の生残に及ぼす影響を調査した。

そうか病菌は中性～弱アルカリ条件を好むため、土壌pHを5.0以下にすると発病が抑制できることが知られている¹⁰⁾。でんぷん粕はサイレージ発酵の過程でpHが3.5前後まで低下するため、本試験ではpH3.0～5.0の液体培地中において、そうか病菌の生残に及ぼすpHの影響を調査した。その結果、pH4.0以下ではpHが低いほどそうか病菌の死滅速度は速く、pH3.0では2日以内、pH3.5で

は約2週間、pH4.0では約3週間で不検出となった(図3)。15℃および25℃貯蔵のサイレージでは1～2週間でpH4以下に低下し(図1)、そうか病菌は検出されなくなったことから、サイレージ発酵によるpHの低下がそうか病菌の死滅を促進する要因となっていることが考えられた。

有機酸の抗菌作用は、食品の腐敗防止の観点からの研究^{5, 10)}が多くあるが、放線菌に対する抗菌作用を調べた報告は見られない。本試験では、サイレージ発酵の過程で生成する乳酸と酢酸がそうか病菌の生残に及ぼす影響を調査した。その結果、用いた液体培地のpHを考慮しても、乳酸および酢酸とも0.03%以上でそうか病菌の低減効果が認められた(図4)。試験1において、pH4以下に低下し、そうか病菌が不検出となった15℃で14日間以上および25℃で7日間以上貯蔵したでんぷん粕の乳酸含量はそれぞれ0.32～0.54%、0.39～0.80%、酢酸含量はそれぞれ0.10～0.15%、0.15～0.45%であり(図2)、試験2で低減効果が認められた濃度を上回っていた。これらの結果から、サイレージ発酵過程で生成される有機酸が、そうか病菌の死滅を促進する一因となっていることが考えられた。しかしながら、4℃・14日貯蔵サイレージでは、pHが4.7と高く、乳酸は検出されず、酢酸含量は0.03%と少量であるにもかかわらず、そうか病菌数は詰め込み時から100分の1以下に減少していた。このことから、低pHや有機酸以外にも死滅要因が存在することが推察されるが、未検討であり詳細は不明である。

以上の結果から、でんぷん粕中のそうか病菌はサイレージ発酵過程で死滅することが明らかとなり、その死滅要因として有機酸生成によるpH低下と有機酸自身の抗菌作用の影響が考えられた。でんぷん粕はサイレージ発酵の基質となる単少糖類が少ないものの、その粘土質的な物理特性から詰め込み密度が高くなり空気の混入がおこらないため、良質なサイレージを調製することができる^{9, 10)}。本試験におけるサイレージの発酵品質は既往の報告^{9, 10, 11)}で示されている品質(pH3.4～3.5、乳酸含量約0.7% (生重)、酢酸含量0.08～0.16% (生重)、プロピオン酸と酪酸は非検出)と同程度であり、通常のサイレージ化によりそうか病菌の殺菌が可能であるものと考えられた。

なお、本試験実施中の2005年、ジャガイモ塊茎褐色輪紋病が北海道で始めて発生した。本病はモップトップウイルスによって引き起こされる病害で、ジャガイモ粉状そうか病菌 (*Spongospona subterranea*) の媒介により土壌伝染することが知られている。粉状そうか病菌のサイレージ発酵過程における消長を検討した中山ら⁸⁾の報告では、その致死条件として、夏季の高温期を挟み6ヶ月以上の貯蔵期間を設けpHを3.1前後まで低下させ

る, という, 本試験で得られた知見よりもはるかに厳しい条件が示されている。現状, 粉状そうか病菌の致死条件をクリアできる実用規模のサイレージ調製技術は確立されていないため, それらが明らかになるまでの間は, でんぷん粕を給与した家畜の糞便由来の堆肥は, ばれいしょ栽培予定のない飼料作物栽培圃場に還元すべきであると考えられる。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり, そうか病罹病いもを原料としたでんぷん粕を作成頂いた, 河西郡更別村の神野でんぷん工場(株)神野正博氏に心からの謝意を表します。

引用文献

- 1) 阿部知行, 中村紀文. サルモネラのサイレージ内生性検査. 養牛の友. 8, 68-71 (2007)
- 2) 馬鈴しょそうか病総合防除法開発研究班編. ジャガイモそうか病総合防除法開発試験成績集. 北海道馬鈴しょ生産安定基金協会, 2004, p48
- 3) 橋爪徳三, 藤田 裕, 松岡 栄, 市川淳治, 石井一良. バレイショ生でんぷん粕の飼料価値と貯蔵中の品質変化. 帯広畜産大学学術研究報告. 8, 595-604 (1974)
- 4) 片山信也, 田中ちぐさ, 藤田巧, 斉藤美英, 鈴木秀歌, 小野内栄治. サイレージ発酵がヨーネ菌の生残に及ぼす影響. 日本草地学会誌. 46, 282-288 (2000)
- 5) 松田敏生, 矢野俊博, 丸山昌弘, 熊谷秀彦. 有機酸類の抗菌作用—各種pHにおける最小発育阻止濃度の検討. 日本食品工業学会誌. 41, 687-702 (1994)
- 6) 松本和夫, 石井正義. ジャガイモそうか病菌の孢子形成培地と菌の保存法. 日植病報. 43, 91-92 (1977)
- 7) 村井 勝. ばれいしょでんぷん粕の有効利用. でん粉情報. 40, 23-29 (2011)
- 8) 中山尊登, 村井 勝. バレイショデンプン粕中に含まれるジャガイモ粉状そうか病菌の生存に及ぼすサイレージ発酵の影響. 北日本病害虫研報. 63, 46-51 (2012)
- 9) 岡田 舞, 渡邊 彩, 松岡 栄, 三浦俊治, 小田有二, 河合正人. 乳酸生成糸状菌 (*Amylomyces rouxii*) 添加ポテトパルプサイレージ貯蔵中における化学成分および発酵品質の経時的変化. 北海道畜産学会報. 47, 59-64 (2005)
- 10) 大下友子, 三谷朋弘, 宮地 慎, 青木康浩, 秋山典昭. 無添加および乳酸菌添加バレイショでんぷん粕サイレージの発酵特性および消化特性. 日本草地学会誌. 53, 201-207 (2007)
- 11) 大下友子, 三谷朋弘, 宮地 慎, 青木康浩, 秋山典昭. 尿素およびしょうゆ粕の添加がバレイショでんぷ

- ん粕サイレージの発酵品質, 栄養価および窒素出納に及ぼす影響. 日本草地学会誌. 55, 302-309 (2010)
- 12) 杉本亘之. 脱水馬鈴しょ澱粉粕サイレージの豚における飼料価値. 滝川畜産試験場研究報告. 20, 1-4 (1983)
 - 13) 杉本昌仁, 齋藤早春, 左 久, 木田克弥, 大井幹記, 佐藤幸信, 斉藤利朗. 肉用牛に対する尿素処理デンプン粕サイレージの利用. 栄養生理研究会報 51, 7-13 (2007)
 - 14) 田村 元, 竹内晴信, 田中文夫. ジャガイモそうか病に対する土壌酸度調整資材の抑制効果と残効性. 北海道立農試集報. 73, 57-62 (1997)
 - 15) 田中文夫. ジャガイモそうか病の同定と識別・定量ならびに土壌環境制御による防除に関する研究. 北海道立農試報告. 96, 1-66 (2000)
 - 16) 田中文夫. ジャガイモそうか病菌の同定・識別と発病機構. 土と微生物. 58, 69-77 (2003)
 - 17) 田中民夫, 印藤 馨, 木口忠彦. MPN-PCRによるジャガイモそうか病菌 *Streptomyces turgidiscabies* の定量. 日植病報. 68, 103 (2002)
 - 18) 内田仙二. サイレージ科学の進歩. (株) デーリー・ジャパン社, 東京, 1999, p.91-92
 - 19) 山本 泰, 東 和男, 好井久雄. 有機酸の抗菌作用. 日本食品工業学会誌. 31, 525-530 (1984)

Effect of Silage Fermentation on Survival of Potato Scab Pathogen in Potato Grounds

Keiko MINATO^{*1}, Motosige SIMIZU^{*2}

^{*1} Hokkaido Research Organization Animal Research Center, Shintoku, Hokkaido, 081-0038 Japan
E-mail: minato-keiko@hro.or.jp

^{*2} Tokachi Agricultural Experiment Station (Present ; Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan)