

穿刺したパウチサイロを用いたイネホールクroppおよび 稲わらサイレージのカビに対する安定性の評価

田中 治^{*1)}・篠田 満^{*2)}

抄 録：サイレージのカビに対する安定性を簡易に評価することを目的として、イネホールクroppおよび稲わらを材料とし、穿刺した食品包装用プラスチック袋（パウチ）をサイロとして用いた実験室規模のサイレージ調製試験を行った。この試験においては、予めサイレージとして貯蔵しておいた材料を10g、または30gパウチに入れ、これにカビ *Monascus* sp. 菌株の胞子を接種して密封後、パウチを針で穿刺して40日間貯蔵した。その結果では通常のサイレージ調製と同様に、プロピオン酸ナトリウムを原物の0.5～1%、または尿素を2%以上添加した場合には、カビの生育は観察されなくなった。以上の結果からは、穿刺したパウチサイロを用いたサイレージのカビに対する安定性の簡易評価の可能性が示唆された。

キーワード：イネサイレージ、カビ、パウチサイロ

Estimation of Stability to Mold for Whole-Crop Rice and Rice Straw Silage Using Stabbed Pouch Silos : Osamu TANAKA^{*1)} and Mitsuru SHINODA^{*2)}

Abstract : We carried out several experiments involving the laboratory-scale ensiling of whole-crop rice and rice straw into pouch silos which were stabbed with a needle to estimate the stability of the silage to mold. In these experiments, 10 or 30g of previously stored silage was transferred into a plastic pouch and inoculated with fungal spores of a *Monascus* sp. strain. After the pouch silos were closed with a vacuum sealer, they were stabbed with a needle to allow the growth of mold and stored again for 40 days. During storage, the lag period to mold growth, which was defined as the period until the time when colonies of mold were visually observed on the silage, was measured as an indication of stability to mold. The addition of 0.5 to 1% sodium propionate or 2% urea resulted in no visual mold growth on the silage as well as in farm-scale ensiling. These results suggest that ensiling into a stabbed pouch silo is a useful simple method of estimating the stability of silage to mold.

Key Words : Mold, Pouch silo, Rice silage

I 緒 言

サイレージを調製する際、貯蔵中あるいは開封後に空気が侵入すると、酵母やカビが原因となって引き起こされる好気的変敗が問題となる。このうち、開封後においては、酵母が速やかに増殖してサイレージ中の乳酸を代謝することによって好気的変敗が起こることが知られている (McDonald *et al.* 1991)。その際には、サイレージの温度やpHが上昇

して変敗が進行する (Cai・Ogawa 1998)。そのため、サイレージ開封後の安定性の指標としては、好気的安定性、すなわち、サイレージの温度が外気温よりも2℃上昇するまでの開封後の期間が通常用いられている (Danner *et al.* 2003)。

一方、サイレージ貯蔵中にも、サイロの破損や気密性の低さによって変敗することがあり、そのような場合にはカビが原因菌として重要となる (野中ら 1999)。イネホールクroppサイレージをロールベ

* 1) 農研機構東北農業研究センター (NARO Tohoku Agricultural Research Center, Morioka, Iwate 020-0198, Japan)

* 2) 農研機構近畿中国四国農業研究センター (NARO Western Region Agricultural Research Center, Ohda, Shimane 694-0013, Japan)

2013年7月1日受付、2014年2月5日受理

ールで貯蔵中にネズミや鳥の食害でラップフィルムが破損し、そのためにカビ等が生育して起こる好気的変敗が近年問題となっている (Kawamoto *et al.* 2009)。このような場合にもサイレージの温度やpHが上昇して変敗が進行する。それだけでなく、家畜に有害な物質であるマイコトキシンをカビが産生することもある (Ohmomo *et al.* 1994)。しかし、サイロの破損の程度やそれに伴う空気流入の量によってカビの生育は変動しやすいために (野中ら 1999)、サイレージのカビに対する安定性の簡易な評価方法は確立されていないのが現状である。

一方、我々はこれまでに、プラスチックフィルム袋 (パウチ) をサイロとした実験室規模のサイレージ調製方法 (パウチ法、Tanaka・Ohmomo 1994、田中・大桃 1995) を開発した。本研究においては、針で穿刺したパウチをサイロとして使用し、その中のサイレージにカビを接種して再貯蔵することにより、カビに対する安定性を簡易に評価できないか検討した。

II 材料と方法

1. 供試材料

イネホールクロップを主な供試材料として用いた。すなわち、イネホールクロップ材料を2種類 (品種、羽系604、乾物率45.5%、乾物中の水溶性糖

含量3.6%、および品種、べこあおば、乾物率40.2%、乾物中の水溶性糖含量2.8%)、ならびに乾燥した稲わら1種類 (品種羽系604、乾物率95.0%、乾物中の水溶性糖含量7.2%) に水を加えたものを材料として用いた。材料中の水溶性糖含量は酵素試薬 (Fキット Sucrose/D-Glucose/D-Fructose UV-method, ロシュ・ダイアグノスティクス、東京) で定量した。

2. サイレージの調製方法

試験に用いたサイロはパウチで飛竜N-7 (旭化成パックス、東京、サイズ17cm×25cm、厚さ0.1mm) である。このパウチサイロと供試材料を用いて、試験1、2、および3とする3種類のサイレージ調製試験を行った (Table 1)。

試験1では、好気的変敗防止効果が知られているギ酸、酢酸、およびプロピオン酸 (Cai・Ogawa 1998、Danner *et al.* 2003) によってカビの生育が阻害されるための条件を検討した。この試験では羽系604のホールクロップを用いて、まず既報の方法 (田中・篠田 2003) で直径1m×高さ1mの無添加のロールバール1個を調製して8ヶ月間貯蔵した。貯蔵後、既報 (田中・篠田 2003) で述べたようにロールバールの上部、中央部、および下部の計3カ所からコアサンプラーを用いずに手作業でランダムに1kgずつ採取し、これらを約2cmに切断した後に混合して供試材料とした。混合した供試材料が

Table 1 Experimental design.

Experimental No.	Plant materials	Additives (%) ¹⁾	Pouch silos ²⁾ are:
Experiment 1	Whole-crop rice silage	None	Not closed
〃	〃	〃	Closed & sabbed
〃	〃	Ammonium formate 0.5	〃
〃	〃	〃 1.0	〃
〃	〃	〃 2.0	〃
〃	〃	Sodium acetate 1.0	〃
〃	〃	〃 2.0	〃
〃	〃	〃 3.0	〃
〃	〃	Sodium propionate 0.5	〃
〃	〃	〃 1.0	〃
Experiment 2	Rice straw (water added)	Urea 0	Closed & stabbed
〃	〃	〃 0.5	〃
〃	〃	〃 1.0	〃
〃	〃	〃 2.0	〃
Experiment 3	Whole-crop rice	Urea 0	Closed & stabbed
〃	〃	〃 1.0	〃
〃	〃	〃 2.0	〃
〃	〃	〃 3.0	〃

1) Fresh matter basis.

2) Pouch silos to test stability to mold.

ら30gずつ採取して乾物率、発酵品質、およびカビに対する安定性の検定に供した。カビに対する安定性の検定の際には、ギ酸アンモニウムを0.5、1.0、および2.0%、プロピオン酸ナトリウムを0.5、および1.0%、または、酢酸ナトリウムを1.0、2.0、および3.0%材料に添加した。この場合、無添加のものを対照区とした。

試験2および3では、同じく好気的変敗防止効果が知られている尿素を添加した場合にカビの生育が阻害されるための条件を検討した。試験2では2cmに切断した羽系604の稲わらを5gずつ穿刺していないパウチに入れ、それらに水を5mL添加して乾物率を約50%に調節したものを密封して調製した。この場合、尿素を0.5、1.0、および2.0%添加して25℃下で40日間貯蔵した。貯蔵後、パウチの検体の乾物率と発酵品質を測定し、さらにカビに対する安定性の検定に供した。

試験3では、予乾していない材料に尿素を添加した場合にカビの生育が阻害されるための条件を検討した。長さ2cmに切断したべこあおばのホールクロップを原物で30gずつ穿刺していないパウチに入れて尿素を1.0、2.0、および3.0%添加した。貯蔵方法および貯蔵後の分析項目は試験2と同様に行った。

3. 乾物率および発酵品質の分析

供試したサイレージは、既報（田中・篠田 2003）と同様に乾物率および発酵品質を調べた。乾物率は、サイレージを60℃で48時間通風乾燥して測定した。発酵品質の分析には、サイレージに蒸留水を加えて3倍に希釈し（wt/wt）、4℃下で1晩浸漬して調製した抽出液を用いた。pHはpHメータによって測定し、有機酸組成はキャピラリ電気泳動（Agilent Technologies CEシステム、Agilent Technologies、東京、石黒ら 2000）で分析した。試験1では、揮発性塩基態窒素（VBN）を水蒸気蒸留法で定量した（梶木 2001）。試験2および3では、VBNの代わりにアンモニアを酵素試薬（F-キット アンモニア、UV-method、ロシュ・ダイアグノスティクス、東京）で定量した。

4. 供試菌

サイレージのカビに対する安定性を検定するために、既報で供試したイネホールクロップロールベールサイレージ（田中・篠田 2003）から分離・同定したカビ *Monascus* sp. M1 菌株の胞子をサイレージに接種した。なお、*Monascus* 属菌はサイレージ

において検出頻度の高い菌として知られているが（原・大山1978）、この菌株の同定は、形態学的特徴（Hawksworth・Pitt 1983）に基づいて行った。

Monascus sp. M1は、ポテトデキストロース寒天培地（PDA培地、日水、東京）を用いて25℃下で14日間培養した後に材料に接種した。この場合、PDA培地10mlを直径9cmのシャーレに入れて培養し、培養後に水10mlで懸濁して接種液を調製した。この接種液中の胞子数を血球計算盤で測定した後、材料に胞子が 10^5 cells/gとなるように接種した。なお、成分値および菌数の表示は原物当たりとした。

5. カビに対する安定性の検定

サイレージの貯蔵後、試験1と3では材料を30gずつ、および試験2では材料を10gずつパウチに移し替えた。これに *Monascus* sp. M1を接種後、パウチの上端部を市販の吸引密封機で密封した。密封後にカビの生育が可能となるように、また、ロールベールなどが貯蔵中にピンホール程度の破損をした場面を想定して、パウチの中央を直径約0.5mmの針で1ヶ所穿刺して穴を開け、それを25℃下で40日間再び貯蔵した（Table 1 参照）。

サイレージのカビに対する安定性の指標としては、貯蔵中にカビの生育を肉眼で観察し、そのコロニーが肉眼で観察可能な大きさ（直径1～2cm）になるのに要する貯蔵期間の日数（以下カビ生育日数、表中では lag period to mold growth）を調べた。試験1では、無添加区においてパウチを密封しない区も設け、そのような空気の流入が明らかに多い条件にした場合にカビ生育日数は影響を受けるか否かを調べた（Table 1 参照）。

6. 統計処理

本研究のデータについては、1試験区当たり3検体、すなわちパウチ3袋ずつ供し、それらの平均値および標準誤差を表示した。カビ生育日数、尿素添加区のpH、アンモニア含量、およびn-酪酸については、平均値の有意差検定をフィッシャーのLSD法（Ostle 1963）によって行った。カビが生育していない検体のカビ生育日数は、貯蔵期間よりも1日だけ長い41日として計算した。

III 結 果

1. 試験1

試験1に供試したサイレージの発酵品質をTable 2に示した。n-酪酸およびVBNの含量は原物当たり

Table 2 Fermentation quality of whole-crop rice silage used in experiment 1.

Dry Matter (%)	pH	Organic acids (% in fresh matter)				VBN ¹⁾ (mg/100g)	V-score
		Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	n-Butiric acid		
46.2	4.61	1.05	0.58	0.01	0.13	66	74

1) Volatile base nitrogen. Fresh matter basis.

Table 3 Growth of mold on whole-crop rice silage (experiment 1).

Pouch silos	Additives ¹⁾		LPMG(days) ²⁾	Mold Growth ³⁾
Not closed	None		12.3 ^a	++
Closed & stabbed	None		14.3 ^a	+
Closed & stabbed	Ammonium formate	0.5%	17.0 ^a	+
〃	〃	1.0%	35.0 ^{bc}	+
〃	〃	2.0%	>40 ^c	None
Closed & stabbed	Sodium acetate	1.0%	12.0 ^a	+
〃	〃	2.0%	31.7 ^b	+
〃	〃	3.0%	>40 ^c	None
Closed & stabbed	Sodium propionate	0.5%	>40 ^c	None
〃	〃	1.0%	>40 ^c	None
SEM			2.1	

Means within a column with different superscripts (a, b, c) significantly differ (n=3, P<0.05). SEM, standard error of the mean.

1) Percent is fresh matter basis.

2) LPMG, lag period to mold growth.

3) Growth of mold after 40day storage. +, silage is partly molded. ++, silage is entirely molded.

それぞれ0.13%、および66mg/100gにとどまり、Vスコアは74点で中程度の発酵品質となった。

試験1の結果をTable 3に示した。無添加区のカビ生育日数は、パウチを密封した場合もしない場合も12~14日で、有意差は認められなかった。この実験結果に基づいて、以下の試験ではパウチを密封しない区は省略した。なお、その後のカビの生育には両者の間に差が見られた。すなわち、密封しない場合には、各検体とも材料の全面がカビで被われたのに対し、密封した場合には、材料の一部がカビに被われるにとどまった。これらのカビの分生胞子の形状を顕微鏡で観察した結果からは、これらのカビコロニーは接種した *Monascus* sp. M1由来と思われるものであった。

添加物を用いた場合について見ると、プロピオン酸ナトリウムを0.5~1%添加することによって、カビの生育は観察されなくなった。一方、ギ酸アンモニウムあるいは酢酸ナトリウムを添加した場合には、カビの生育を阻止するのにそれぞれ2%および

3%の添加が必要であり、防カビ効果はプロピオン酸ナトリウムに及ばなかった。なお、プロピオン酸ナトリウム添加区については、本実験終了後も引き続き観察したところ、プロピオン酸ナトリウム0.5%添加区において貯蔵70日後にカビの生育が1検体見られたのに対し、プロピオン酸ナトリウム1%添加区においてはそのような検体はなく(データ表示せず)、カビの生育を完全に抑制するにはプロピオン酸ナトリウムを1%程度添加する必要がある。これは実際規模のサイレージの好気的変敗防止に関する従来の知見(名久井 1996)とほぼ同様であった。

2. 試験2および試験3

試験2の結果をTable 4に示した。いずれの試験区もn-酪酸は検出されなかった。尿素無添加の場合には、カビ生育日数は6日に過ぎなかった。しかし、尿素添加量が増えるにつれて、カビ生育日数は長くなる傾向があり、尿素を2%添加した場合には、サイレージ中のアンモニア含量は0.33%でpH

Table 4 Fermentation quality and lag period to mold growth (LPMG) of rice straw silage (experiment 2).

Urea ¹⁾ (%)	Dry Matter (%)	pH	Organic acids (% in fresh matter)				Ammonia ²⁾ (%)	LPMG ³⁾ (days)
			Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	n-Butiric acid		
0	47.1	5.64 ^a	0.02	0.04	ND	ND	0.01 ^a	6.3 ^a
0.5	47.4	6.43 ^b	0.26	0.09	ND	ND	0.10 ^b	13.8 ^a
1.0	48.0	7.55 ^c	0.47	0.16	ND	ND	0.20 ^c	23.0 ^a
2.0	46.9	8.25 ^d	0.32	0.16	ND	ND	0.33 ^d	NO ^b
SEM	0.4	0.08	0.06	0.04	<0.01	<0.01	0.01	7.9

All pouch silos were closed and stabbed. Means within a column with different superscripts (a, b, c, d) significantly differ (n=3, P<0.05). SEM, standard error of the mean. ND, not detected (<0.01).

1, 2) Fresh matter basis.

3) NO, not observed (>40).

Table 5 Fermentation quality and lag period to mold growth (LPMG) of whole-crop rice silage (experiment 3).

Urea ¹⁾ (%)	Dry Matter (%)	pH	Organic acids (% in fresh matter)				Ammonia ²⁾ (%)	LPMG ³⁾ (days)
			Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	n-Butiric acid		
0	33.1	5.02 ^a	0.03	0.15	0.02	0.74 ^a	0.02 ^a	NO ^b
1.0	34.5	7.25 ^b	0.75	0.10	ND	0.18 ^b	0.33 ^b	13.8 ^a
2.0	35.6	8.56 ^c	1.14	0.44	ND	ND	0.63 ^c	NO ^b
3.0	35.2	8.85 ^d	1.06	0.35	ND	ND	1.18 ^d	NO ^b
SEM	0.4	0.03	0.05	0.03	<0.01	0.06	0.07	0.7

All pouch silos were closed and stabbed. Means within a column with different superscripts (a, b, c, d) significantly differ (n=3, P<0.05). SEM, standard error of the mean. ND, not detected (<0.01).

1, 2) Fresh matter basis.

3) NO, not observed (>40).

は8以上となり、カビの生育は観察されなくなった。

試験3の結果をTable 5 に示した。無添加区は、抗カビ作用を有するn-酪酸 (Cai・Ogawa 1998) の含量が0.74%に達し、カビの生育は観察されなかった。尿素を1%添加した場合には、n-酪酸含量は0.18%に減少し、カビ生育日数は約14日となった。しかし、尿素添加量を2%以上にすると、サイレージ中のアンモニア含量は0.63%でpHは8以上となり、カビの生育は再び観察されなくなった。この場合、n-酪酸も検出されなかった。

以上の結果から、尿素を2%程度添加することによってイネホールクroppおよび稲わらサイレージのカビ生育を抑制できた。この場合のpHは8以上でアンモニア含量は0.33~0.63%であった。これは実際規模のサイレージの好気的変敗防止に関する従来の知見 (吉田ら 1986, 1998) とほぼ同様であった。

IV 考 察

1. カビ生育日数とサイロへの空気流入の度合いについて

これまでも本研究で述べているカビ生育日数を指標として、サイレージのカビに対する安定性を調べた例はあるが (吉田ら 1986, Tanaka *et al.* 2003)、サイロへの空気流入の度合いがどの程度カビ生育日数に影響を及ぼすか検討した例は見当たらなかった。

そこで本研究では試験1において、パウチを密封しない区とパウチを密封した後に針で穿刺した区という空気流入の度合いが明らかに異なる試験区を設けて比較した。その結果では、コロニーが肉眼で観察されるようになった後のカビの生育は、パウチを密封するか否か、すなわち、空気流入の度合いに左右された (Table 3)。にもかかわらず、コロニーが肉眼で観察されるようになるまでのカビの生育、すなわち、カビ生育日数はパウチを密封するか否か

には影響されなかった。これは、供試菌のような *Monascus* 属のカビは、サイロのような低酸素状態になりやすい環境でも生育可能とされていること (原ら 1978) が原因であると思われる。サイレージのカビに対する安定性の検定には、そのような低酸素条件下でも生育可能な菌が被検菌として必要であると言えよう。

2. 添加剤の防カビ効果について

次に本研究の結果では、カビの生育抑制にはギ酸アンモニウムと酢酸ナトリウムの添加は効果が低く、プロピオン酸ナトリウム 1% (Table 3)、または尿素 2% 以上の添加が必要であった (Table 4 および 5)。なお、尿素はサイレージ貯蔵中に、アルカリ条件下で抗菌性を有するアンモニアに分解されることで好気的変敗防止をもたらすことが知られている (吉田ら 1998)。これらの結果は、実際規模のサイレージの好気的変敗防止に関する従来の知見 (吉田ら 1998; 名久井 1996) とほぼ同様であった。このことから、パウチによる本実験系を用いた各種添加剤の防カビ効果の検定が可能と考えられた。

これらの防カビ剤は、従来から好気的変敗の防止に有効とされてきたが、サイレージ調製のコスト低減の見地からは、好気的変敗防止のために必要な添加量を減らすことができないか今後検討することが望ましい。その際にも本実験系は有用であると考えられる。

3. 結論

以上の結果からは、イネホールクropp、または稲わらのサイレージにカビを接種して、穿刺したパウチサイロに貯蔵することによって、それらのカビに対する安定性および添加剤の防カビ効果を簡易に評価することが可能と考えられた。今後、生稲わらを含めた他の草種を材料としたサイレージに対しても本研究で検討した、カビに対する安定性評価方法が適用可能か検討する必要がある。

引用文献

- 1) Cai, Y.; Ogawa, M. 1998. Effect of ammonium tetraformate on the aerobic deterioration of corn silage. *Grassl. Sci.* 44 : 90-92.
- 2) Danner, H.; Holtzer, M.; Mayrhuber, E.; Braun, R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 562-567.
- 3) 原 慎一郎, 大山嘉信. 1978. とうもろこしサイレージの好気的変敗と微生物相-プロピオン酸の変敗防止効果との関連. *日畜会報* 50 : 288-295.
- 4) Hawksworth, D.L.; Pitt, J.I. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Aust. J. Bot.* 31 : 51-61.
- 5) 石黒瑛一, 日比野 洋, 曾我朋義, 柳井博子, 澤田浩和. 2000. キャピラリー電気泳動法による配合飼料中の8種類の有機酸の同時定量. *食品衛生学会誌* 41 : 261-267.
- 6) Kawamoto, H.; Kimura, S.; Komatsu, T.; Oshibe, A.; Shimada, T. 2009. Reduction of rat damage to forage paddy rice stored as round-baled silage by modifying the storage layout. *Grassl. Sci.* 55 : 110-112.
- 7) 柁木茂彦. 2001. 揮発性塩基態窒素. 石橋 晃監修, 新編動物栄養試験法. 東京. 養賢堂. p.500-501.
- 8) McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. 1991. *The biochemistry of silage*, 2nd edn. Bucks. Chalcombe Publications. 404p.
- 9) 名久井 忠. 1996. 北日本におけるトウモロコシホールクroppサイレージの効率的調製・貯蔵のモデルと栄養価並びに養分収量推定法の開発に関する研究. *北農試研報* 162 : 1-121.
- 10) 野中和久, 名久井 忠, 大下友子. 1999. フィルムおよび水分含量がチモシー低水分ラップサイレージの品質・貯蔵性に及ぼす影響. *日草誌* 45 : 270-277.
- 11) Ohmomo, S.; Kitamoto, H.K.; Nakajima, T. 1994. Detection of roquefortines in *Penicillium roqueforti* isolated from moulded maize silage. *J. Sci. Food Agric.* 64 : 211-215.
- 12) Ostle, B. 1963. *Statistics in research*, 2nd edn. Ames. Iowa State University Press. 585p.
- 13) Tanaka, O.; Ohmomo, S. 1994. A repeatable model system for silage fermentation in culture tubes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 : 1407-1411.
- 14) 田中 治, 大桃定洋. 1995. プラスチックフィルムを用いた小規模サイレージ発酵試験法 (パ

- ウチ法) の開発. 日草誌 41 : 55-59.
- 15) 田中 治, 篠田 満. 2003. イネホールクロップサイレージのロールペールサンプリング方法及び乳酸菌添加効果. 日草誌 49 : 163-169.
 - 16) Tanaka, O.; Cai, Y.; Fujita, Y.; Miyazaki, S.; Ohmomo, S.; Nakanishi, K. 2003. Effects of inoculation of reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* on ensiling rice straw. Grassl. Sci. 49 : 222-228.
 - 17) 吉田宣夫, 富田道則, 武政安一, 高橋哲二. 1986. 飼料用稲のホールクロップ利用技術の確立に関する試験 II. 稲ホールクロップサイレージに対するアンモニア添加量差異が発酵特性並びに飼料価値に及ぼす影響. 埼玉畜試研報 24 : 65-68.
 - 18) 吉田宣夫, 清水博之, 山井英喜, 並木勝治. 1998. 飼料用稲の安定貯蔵・流通化技術の確立. 埼玉畜セ研報 2 : 87-91.