

## 酸処理剤としての乳酸のアカグサレ菌に対する致死効果

秋月 晃<sup>1</sup>・田端正明<sup>1</sup>・川村嘉広<sup>2</sup>

### Disinfectant Effects of Lactic Acid on *Pythium porphyrae* as Acid Treatment Agent

Akira AKIZUKI<sup>1</sup>, Masaaki TABATA<sup>1</sup> and Yoshio KAWAMURA<sup>2</sup>

**Abstract:** To develop acid treatment technique in nori culture, we studied the disinfectant effects of lactic acid, malic acid, citric acid, gluconic acid and tartaric acid which are involved in conventional acid treatment agents, on *Pythium porphyrae*. As the result, it was found that lactic acid affected *P. porphyrae* most strongly among the five acids under the same pH value. Moreover, lactic acid killed out *P. porphyrae* at pH 3.0 ~ 5.0, but the other four organic acids killed it out at pH about 2.0. The results indicate that lactic acid has a strong disinfectant effect.

**Key words:** *Pythium porphyrae*; Lactic acid; Acid treatment; *Porphyra yezoensis*

ノリ養殖においては、アオノリなど雑藻の混入とアカグサレ病や細菌性疾病による乾ノリの品質低下を防除するために、pH 2.0付近の酸性液に数秒～数分間ノリ網を漬け込む酸処理が行われている（伏屋ら 1980; 高山ら 1983; Fujita 1990; 川村 1998; 坂口ら 2001）。この技術は、ノリと防除対象とする生物間の酸に対する抵抗性の差を利用したものであり、食品添加物として認定されている有機酸数種類を混成した市販の酸処理剤を使用するものである。一方、魚類および二枚貝などの生物や環境に対する酸処理の影響を考慮して、現在ではノリ生産県ごとに使用方法などについての規程が定められている。

各有機酸の生物に対する致死効果としては、アオノリや付着細菌数への効果（石川・吉武 1981a, b; 川村ら 1992）が調べられている。また、酸処理剤に用いられる有機酸の一つである乳酸については、アカグサレ菌に対して殺菌効果を持つことがすでに報告されている<sup>3</sup>が、致死時間および致死濃度についての詳細は明らかになっておらず、他の有機酸についても同様である。

そこで、本研究では酸処理剤の成分として多く用い

られるリンゴ酸、クエン酸、グルコン酸、酒石酸ならびに乳酸のアカグサレ菌 *Pythium porphyrae* に対する致死効果について検討したので報告する。

#### 材料および方法

##### 実験 1. アカグサレ菌に対する有機酸の致死効果

実験に供したアカグサレ菌は2006年1月に佐賀県七浦沖のノリ養殖場でアカグサレ菌に感染したスサビノリ *Porphyra yezoensis*（以下、ノリ）から純粋分離し、トウモロコシ半海水寒天培地（佐々木・佐藤 1969）に植え継ぎ1週間以上培養して用いた。

ノリ葉体は2006年1～3月にかけて、佐賀県六角川河口域のノリ養殖場で適宜採集し、アカグサレ菌に感染していないことを確認した後、約1 cm<sup>2</sup>に細切し、5℃の海水中で静置した。ろ過および煮沸滅菌後、実験直前にSWM-Ⅲ（尾形 1970）を添加した栄養補強海水（以下、滅菌海水）2 lを入れた水槽にノリとアカグサレ菌を入れ、18℃で30～36時間通気培養し、アカグサレ菌に感染させた（以下、感染ノリ）。健康ノリとしては、18℃で同時間通気培養したノリを用いた

2007年2月10日受付：2007年5月29日受理。

<sup>1</sup>佐賀大学理工学部（Faculty of Science and Engineering, Saga University, 1 Honjo, Saga, Saga 840-8502, Japan）.

<sup>2</sup>佐賀県有明水産振興センター（Saga Prefectural Ariake Fisheries Research and Development Center, 2753-2 Ashikari, Ogi, Saga 849-0313, Japan）.

<sup>3</sup>特許第 3121259 号（P3121259）、特開平9-278609.

(以下、健康ノリ)。また、本実験で使用した海水の塩分濃度は、アカグサレ菌とノリにとって生育可能な26~28 PSUとした。

有機酸は① DL-乳酸 (以下、乳酸)、② DL-リンゴ酸 (以下、リンゴ酸)、③ クエン酸、④ グルコン酸、⑤ L(+)-酒石酸 (以下、酒石酸) を、また、⑥ 市販の酸処理剤 (リンゴ酸、クエン酸、グルコン酸、フィチン酸ならびに乳酸を含む) を対照とし、ろ過海水で pH 1.6~2.0 (以下、低 pH 区) および pH 2.0~2.4 (以下、高 pH 区) に pH 0.1 刻みに調整した。

実験は、室温  $18.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の一定条件のもとに、低 pH 区および高 pH 区の各溶液に感染ノリと健康ノリを浸漬し、前者においては10~100秒の範囲で10秒ごとに、後者においては1~10分の範囲で1分ごとに取り上げて、直ちに滅菌海水に戻した。その後、感染ノリは滅菌海水中で36~48時間培養した後に顕微鏡による観察を行い、菌体の伸長が見られないものを死滅と判定した (Fig. 1)。また、健康ノリは滅菌海水中で24~36時間培養した後に蛍光顕微鏡による観察を行い、黄色に発光している細胞は障害を受けているものと判断し、全細胞中の障害を受けている細胞の割合を障害度 (%) として表した。

#### 実験 2. アカグサレ菌に対する乳酸の致死効果

ノリ葉体は2005年12月に実験 1. と同地点で採集し、乾燥後  $-30^\circ\text{C}$  にて凍結保存したものを  $5^\circ\text{C}$  の海水中で一晩馴致させた。翌日、ノリを約  $1\text{ cm}^2$  に細切りし、約 2 l の滅菌海水に30枚ずつ入れ、 $16^\circ\text{C}$  で約24時間通気培養した。その後、実験 1. と同様に同じ菌を用いて感染ノリを作成し、別途健康ノリを用意した。

乳酸をろ過海水で pH 1.6 (濃度13.1%, 以下乳酸高濃度区)、pH 2.0 (濃度2.7%, 以下乳酸中濃度区) および pH 2.4 (濃度0.6%, 以下乳酸低濃度区) とした

溶液に、水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/l) を添加し、それぞれを pH 3.0, 4.0 および 5.0 に調整した。実験は各溶液に感染ノリと健康ノリをそれぞれ浸漬し10~100秒の範囲では10秒ごとに、また、1~10分の範囲では1分ごとに取り上げて、直ちに滅菌海水に戻した。その後、実験 1. と同様にアカグサレ菌の生死および健康ノリの障害度をそれぞれ調べた。また、対照としたクエン酸は、pH 1.6 (濃度7.3%, 以下クエン酸高濃度区)、pH 2.0 (濃度1.8%, 以下クエン酸中濃度区) および pH 2.4 (濃度0.5%, 以下クエン酸低濃度区) に調整し、同様の実験を行った。

## 結 果

#### 実験 1. アカグサレ菌に対する有機酸の致死効果

低 pH 区: 低 pH 区においてアカグサレ菌に対する有機酸の致死効果を調べた結果は Table 1 に示すとおりである。乳酸では、アカグサレ菌は全ての pH において浸漬後10秒で死滅した。乳酸以外の4種類の有機酸では、アカグサレ菌が死滅するまでの時間は、pH 1.6 で20~60秒の範囲にあり、pH 1.7~2.0では、40秒以上と乳酸に比べて長かった。対照では、アカグサレ菌は全ての pH において死滅するまで30秒以上を要した。

各有機酸の浸漬時間と障害度の関係は Fig. 2 に示すとおりである。乳酸では pH 1.8 で10~20秒、pH 1.9 で20~30秒の間に急激に障害度が上昇し、浸漬して50秒後には全ての pH で障害度が100%に達した。しかし、乳酸以外の4種類の有機酸と対照では、全ての pH で0~5%と障害度は極めて低かった。

高 pH 区: 高 pH 区においてアカグサレ菌に対する有機酸の致死効果を調べた結果は、Table 2 に示すとおりである。乳酸ではアカグサレ菌は全ての pH で1分以内に死滅した。乳酸以外の4種類の有機酸では、

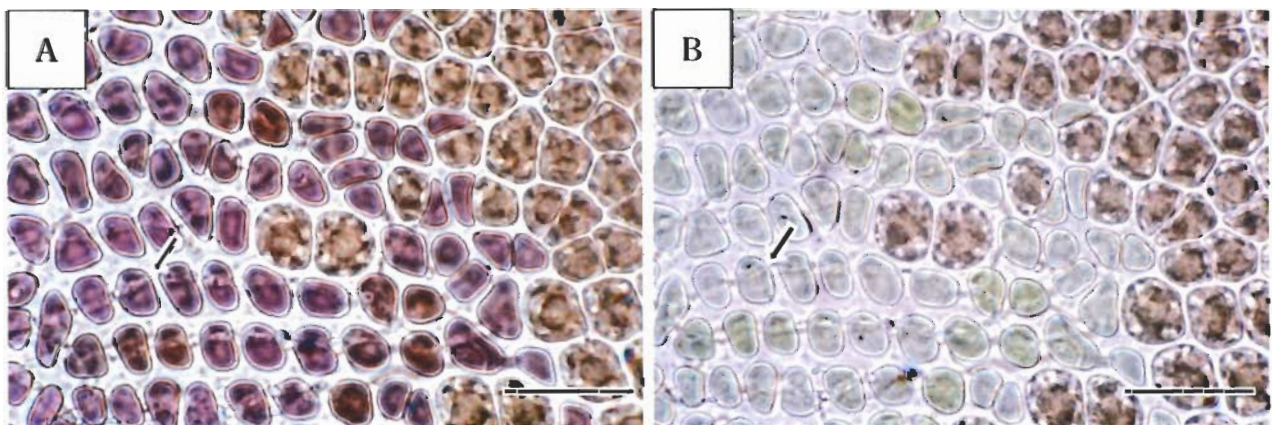


Fig. 1. Surface views of a *Porphyra yezoensis* thallus infected by *Pythium porphyrae* before (A) and after the acid treatment (B). Note that *Pythium porphyrae* is dead in (B). Arrows in (A) and (B) show the cells infected by *Pythium porphyrae* and killed by the acid treatment, respectively. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ .

アカグサレ菌が死滅するまでの時間は、pH 2.0~2.4の範囲で2~6分を要した。対照では、アカグサレ菌はpH 2.0では1分で死滅し、pH 2.1~2.4では2分で死滅した。

各有機酸の浸漬時間と障害度の関係は Fig. 3 に示すとおりである。乳酸では pH 2.2で1~2分、pH 2.4で2~3分の間に急激に障害度が上がり、浸漬して4分後には全ての pH で障害度が100%に達した。しかし、対照を含む乳酸以外の5種類では全ての pH で0~10%と障害度は極めて低かった。

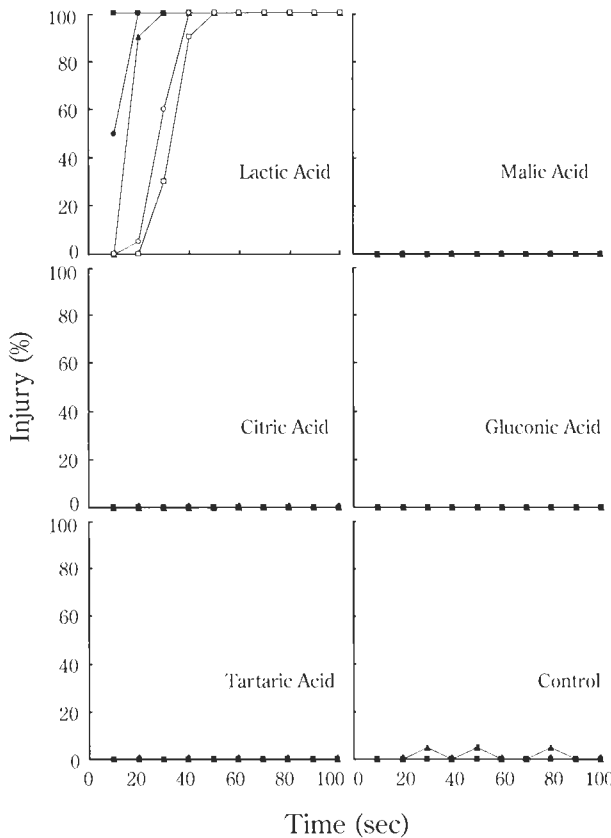
アカグサレ菌を死滅させるまでの時間は、低 pH 区では酒石酸、クエン酸、グルコン酸、リンゴ酸、次いで乳酸の順に、高 pH 区ではクエン酸、グルコン酸、酒石酸、リンゴ酸、次いで乳酸の順に短くなり、乳酸は他の有機酸に比べ、はるかに短い時間でアカグサレ菌を死滅させることが明らかとなった。しかし、乳酸以外の4種類の有機酸は、本実験中の設定濃度および時間内でノリ葉体に深刻な障害を与えることはなかったが、乳酸は長時間の浸漬によってノリ葉体へも障害を及ぼす結果となった。

**Table 1.** Time (second) needed for *Pythium porphyrae* infecting *Porphyra yezoensis* to die out in low pH acid-solutions

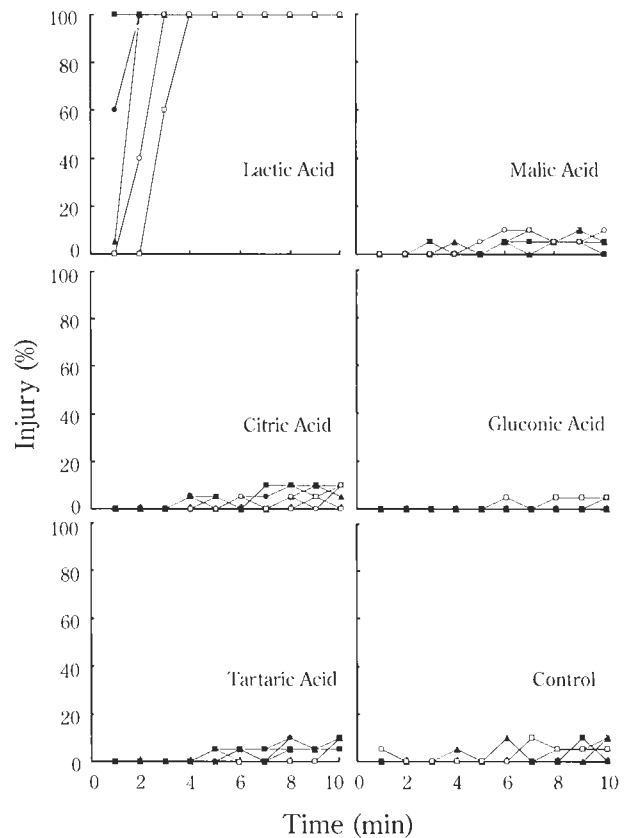
	①	②	③	④	⑤	⑥
	Lactic Acid	Malic Acid	Citric Acid	Gluconic Acid	Tartaric Acid	Control
pH 1.6	10	20	60	40	60	30
pH 1.7	10	40	70	60	100	40
pH 1.8	10	60	90	70	100	50
pH 1.9	10	90	100<	100	100<	50
pH 2.0	10	100<	100<	100<	100<	60

**Table 2.** Time (minute) needed for *Pythium porphyrae* infecting *Porphyra yezoensis* to die out in high pH acid-solutions

	①	②	③	④	⑤	⑥
	Lactic Acid	Malic Acid	Citric Acid	Gluconic Acid	Tartaric Acid	Control
pH 2.0	1	2	4	3	3	1
pH 2.1	1	2	4	3	3	2
pH 2.2	1	3	5	5	4	2
pH 2.3	1	3	5	6	4	2
pH 2.4	1	4	6	6	5	2



**Fig. 2.** Relation between soaking time and injured rate of *Porphyra yezoensis* thalli in each acid solution. ■, pH 1.6; ●, pH 1.7; ▲, pH 1.8; ○, pH 1.9; □, pH 2.0.



**Fig. 3.** Relation between soaking time and injured rate of *Porphyra yezoensis* thalli in each acid solution. ■, pH 2.0; ●, pH 2.1; ▲, pH 2.2; ○, pH 2.3; □, pH 2.4.

**Table 3.** Time (second) needed for *Pythium porphyrae* infecting *Porphyra yezoensis* to die out in each acid-solution

	High concentration group pH1.6		Middle concentration group pH2.0		Low concentration group pH2.4	
	Lactic Acid	Citric Acid	Lactic Acid	Citric Acid	Lactic Acid	Citric Acid
Org. Sol'n*	10	60	10	240	20	360
pH3.0	10	600<	10	600<	40	600<
pH4.0	10	600<	40	600<	240	600<
pH5.0	30	600<	600<	600<	600<	600<

\*Original Sol'n before addition of NaOH.

### 実験 2. アカグサレ菌に対する乳酸の致死効果

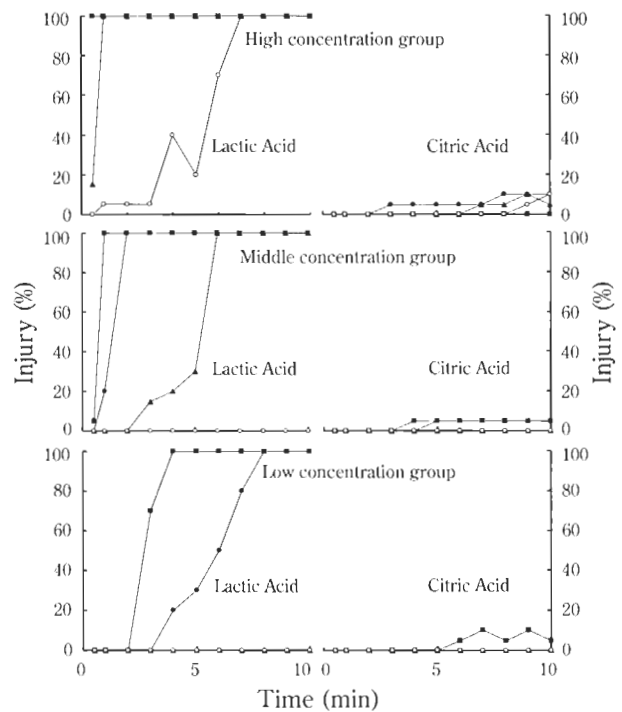
濃度と pH の異なる乳酸およびクエン酸溶液がアカグサレ菌に及ぼす影響を調べた結果は Table 3 に示すとおりである。乳酸高濃度区において、アカグサレ菌は pH 1.6, 3.0 および 4.0 では 10 秒で死滅し、pH 5.0 では 30 秒で死滅した。乳酸中濃度区において、アカグサレ菌は pH 2.0 および 3.0 では 10 秒で死滅した。また、pH 4.0 では 40 秒で死滅したが、pH 5.0 では 600 秒経過しても死滅しなかった。乳酸低濃度区においてアカグサレ菌は pH 2.4 では 20 秒、pH 3.0 では 40 秒、pH 4.0 では 240 秒でそれぞれ死滅したが、pH 5.0 では 600 秒経過しても死滅しなかった。

各濃度区における乳酸およびクエン酸の浸漬時間と障害度の関係は Fig. 4 に示すとおりである。乳酸高濃度区の pH 1.6, 3.0, 4.0 および 5.0 ではそれぞれ 30, 30, 40 および 240 秒後に障害度 100% となった。乳酸中濃度区では、同様に 1, 2, 6 および 10 分後であった。乳酸低濃度区では、障害度は低かった。一方、クエン酸では、すべての実験区で 10 分間の処理でも最大で 10% と乳酸に比べて障害度は極めて低かった。

乳酸においては、このように同じ濃度であれば pH が低い溶液ほど、また同じ pH であれば、濃度が高い溶液ほどノリに障害を与えるのに要する時間が短くなり、この傾向はアカグサレ菌に対する致死効果の結果と一致した。

### 考 察

ノリ養殖におけるアカグサレ病の病原菌であるアカグサレ菌は、卵菌綱、腐敗カビ目、*Pythium* 属の一種である (新崎 1947; Takahashi et al. 1977; 有賀 2000)。本菌は、酸処理による防除効果が確認されている (Fujita 1990; 川村 1998; 坂口ら 2001) にもかかわらず、水温、塩分などの環境条件によっては病勢が強くなり (Fujita 1990)、酸処理を行っても病気が進行する。一方、酸処理剤の使用は、昭和 59 年度に水産庁次長通達が出され、魚類および二枚貝への影響を含めた漁業環境への影響 (水産庁 2001) を考慮したものとなっている。現在、ノリ養殖における酸処理剤



**Fig. 4.** Relation between soaking time and injured rate of *Porphyra yezoensis* thalli in each pH solution of each acid-concentration group. ■, Original Sol'n; ●, pH 3.0; ▲, pH 4.0; ○, pH 5.0.

の使用は生産性や品質を上げるために不可欠な技術となっており、今後も使用して行くには技術の改良が必要であると考えられる。

酸処理は、防除対象とする生物とノリ葉体の酸に対する抵抗性の差を利用する技術である。本実験 1 において 5 種類の有機酸溶液のアカグサレ菌への致死効果を調べた結果、乳酸が最も強い効果を持つが、ノリ葉体への障害が大きく、ノリとアカグサレ菌の抵抗性はいずれの pH でも差が小さいことがわかった。

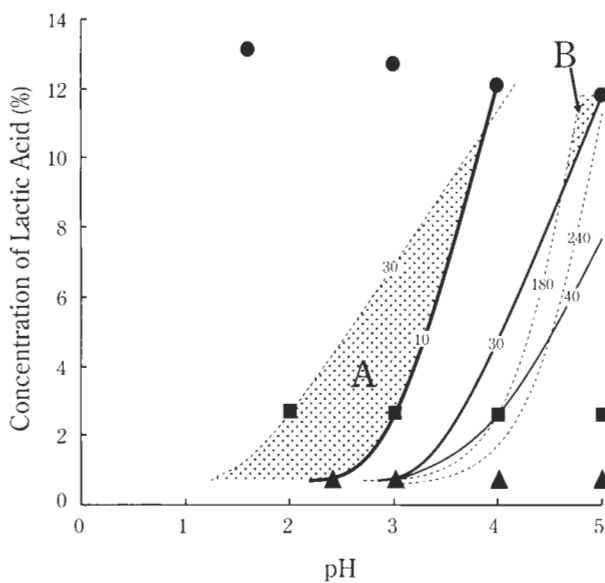
一方、本実験 2 において、クエン酸では全ての濃度区の pH 3.0 以上で 10 分間処理してもアカグサレ菌の死滅は確認できず、アカグサレ菌は pH 3.0 以上のクエン酸溶液に耐性を持つと推察された。しかし、乳酸では、低濃度区の pH 4.0 や高濃度区の pH 5.0 においても死滅している。このことから、乳酸の場合、溶液の pH だけでなく、溶液中の乳酸成分自体がアカグサレ

菌やノリ葉体に影響を与え、それは乳酸の濃度に比例していると考えられる。

酸処理剤を実際のノリ養殖場で使用する際には、処理開始後、アカグサレ菌が死滅してからノリ葉体に障害が現れるまでの時間が酸処理剤の優劣を判断する指標になる。アカグサレ菌を短時間で死滅させ、且つ、ノリ葉体に障害を与えない、即ち、障害が現れるまでの時間の長い酸処理剤がノリ養殖場における使用に適していることになる。

そこで、乳酸における処理でアカグサレ菌が死滅するまでの時間とノリ葉体に障害がでるまでの時間との関係を Fig. 5 に示した。即ち、乳酸濃度を約10%以下とし、pH 2.0~3.5の処理条件にすれば (Fig. 5-A)、アカグサレ菌を死滅させるまでの時間が10秒、障害が出るまでの時間は30秒となる。また、乳酸濃度を約9%以上とし、pH 4.5~5.0の処理条件とすれば (Fig. 5-B) 同じく30秒、3分となる。以上から、この条件に合致するように乳酸と他の有機酸との調合を検討すれば、アカグサレ菌を防除するためにノリ養殖場で使用するには有効ではないかと考えられる。

今回、新たに乳酸の致死効果を明らかにできたが、



**Fig. 5.** Disinfectant effect of lactic acid on *Pythium porphyrae* and its influence on *Porphyra yezoensis* thalli in different concentrations of lactic acid and pH values. The solid lines show *Pythium porphyrae* died out at the soaking time of 10, 30 and 40 seconds, respectively. The broken lines show the *Porphyra yezoensis* thalli concentration injured to 10% or more at the soaking time of 30, 180 and 240 seconds, respectively. Zone (A) and (B) denote the recommended conditions for the acid treatment at the soaking of 10–30 seconds (A) and 30–180 seconds (B), respectively. ●, High acid concentration group; ■, Middle acid concentration group; ▲, Low acid concentration group.

実際に養殖場において使用するに際しては生物や環境に及ぼす影響を検討することも必要である。

### 要 約

ノリ養殖において酸処理剤および酸処理技術の向上のため、酸処理剤に使用されている有機酸のうち、特に強い殺菌効果を持つと言われている乳酸と主な4種類の有機酸（リンゴ酸、クエン酸、グルコン酸、酒石酸）とによるアカグサレ菌の致死効果について検討した。その結果、乳酸は他の4種類の有機酸に比べ、同じpH値であれば強い致死効果を示した。また、4種類の有機酸では、pH 2.0前後でのみアカグサレ菌を死滅させたが、乳酸ではpH 3.0~5.0でも死滅させたことから、その成分自体が致死効果を持つと考えられた。

### 謝 辞

本研究を進めるにあたり、有益なご助言を頂いた第一製網(株)の高本裕昭氏、(有)飛雄商事の星野善一氏に深謝致します。本研究は文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業「有明海における環境調和型ノリ養殖体系の確立とゼロエミッション型ノリ産業の創出」(平成17~19年度)の一環として行われた。

### 文 献

新崎盛敏 (1947) アサクサノリの腐敗病に関する研究. 口水誌, **13**, 79-90.  
 有賀祐勝 (2000) 養殖海藻の病害. 藻類学実験・演習 (有賀祐勝・井上 勲・田中次郎・横濱康繼・吉田忠生編), 講談社, 東京, pp. 148-149.  
 Fujita, Y. (1990) Diseases of cultivated *Porphyra* in Japan. In "Introduction to Applied Phycology" (ed. by I. Akatsuka), SPB Academic Publishing, Hague, pp. 170-190.  
 伏屋 満・高尾允英・日比野光 (1980) クエン酸等によるノリ赤腐病防除試験. 愛知県水産試験場業務報告, pp. 47-49.  
 川村嘉志 (1998) 支柱式養殖のノリ生産基本マニュアル. 佐有水研報, **18**, 37-52.  
 川村嘉志・馬場裕文・山下康夫・楠田理一 (1992) ノリ葉体付着細菌に及ぼす酸処理の影響. 水産増殖, **40**, 105-110.  
 石川祐司・吉武 肇 (1981a) グリーンカットに関する試験 - I アオノリに対する駆除効果. 大分県浅海漁業試験場事業報告, 5-8.  
 石川祐司・吉武 肇 (1981b) グリーンカットに関する試験 - II 各種水産動植物に対する影響. 大分県浅海漁業試験場事業報告, 9-14.  
 尾形英二 (1970) 新しい海藻培養液 SWM-III について. 藻類, **18**, 171-173.

坂口研一・C. S. Park・柿沼 誠・大野秀臣(2001) 高塩分処理を利用したアマノリ赤腐れ病抑制手法の検討. 水産増殖, **49**, 77-83.

佐々木実・佐藤重勝(1969) ノリ赤腐菌の培地組成と培養温度について. 東北水研研報, **29**, 125-132.

水産庁(2001) のり酸処理試験研究成果の概要. pp. 1-52.

Takahashi, M., T. Ichitani and M. Sasaki (1977) *Pythium*

*porphyrae* Takahashi et Sasaki, sp. nov. causing red rot of marine red algae *Porphyra* spp. *Trans. mycol. Soc. Japan*, **18**, 279-285.

高山繁昭・吉岡貞範・山本 翠(1983) 海苔網に着生したアオノリの酸処理による駆除. 山口県内海水産試験場報告, **12**, 58-68.