

サイレージより分離した嫌気性芽胞菌の 代謝に及ぼす温度の影響

木部久衛・唐澤 豊・高瀬能久
信州大学農学部 家畜飼養飼料科学研究室

緒 論

サイレージに存在する嫌気性芽胞菌としては *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. scatologenes*, *Cl. bifementans*, *Cl. acetobutyricum*, *Cl. perfringens* および *Cl. sphenoides* が報告されており¹⁻⁴⁾, これらの Clostridia は, 炭水化物, タンパク質 (アミノ酸), 乳酸などを資化して酪酸, アンモニア, スカトールおよびヒスタミン等のアミン類を産生しサイレージの品質の劣化に関与することが知られている⁵⁾。

Clostridia の発育は温度の影響を受け一般にその至適温度は 30~40°C あるいは 35~40°C とされている^{6,7)}。22°C で Bryant と Berkey¹⁾ は Clostridia の緩慢な発育を, 15°C で佐々木³⁾ はサイレージに Clostridium が存在しないことを報告し, サイレージ発酵過程での Clostridia の増殖の抑制は, 発酵温度のコントロールによって可能であることを示している。

本実験では, サイレージの劣質化に関与する Clostridia の代謝と温度との関係を明らかにするため, サイレージから分離した Clostridia をサイレージエキス培地に接種し異なる培養温度下における培地の成分変化を経時的に比較検討した。

材料および方法

1 供試菌の分離

本学部附属農場のバンカーサイロに調製したとうもろこしサイレージを, 深層部より約 10 g 採取し, 直ちに滅菌リンゲル液 90ml を加えて 80°C で 10 分間抽出した後, この抽出液を滅菌リンゲル液で 10²~10⁵ 倍に希釈し, その 0.2ml をガス噴射法で⁸⁾ 窒素ガスを流しながら RCM 培地⁸⁾ に塗布し, 30°C で 1 週間平板培養をした。発生したコロニーを採取し単一の菌になるまで釣菌をくり返し, 最終的に 30 菌株を単離した。

2 供試菌の同定

前述のように分離した 30 菌株の他に, すでに当教室で同定した *Cl. tyrobutyricum* (菌株 No. 31) と購入した *Cl. butyricum* I.F.O. 8583 (菌株 No. 32) を加えて同定試験を行なった。

同定試験の培養はすべてガス噴射法で行ない培養温度は30°Cとした。また培地は基礎培地としてPYG培地⁹⁾を使用した。形態学的性状検査として芽胞染色¹⁰⁾、鞭毛染色⁹⁾、グラム染色¹⁰⁾、生理学的性状検査として糖分解能⁹⁾、エスクリン加水分解能⁹⁾、ゼラチン液化能⁹⁾、凝固タンパク消化能⁹⁾、牛乳培地での性状⁹⁾、インドール産生能¹⁰⁾、ガス産生能⁹⁾、アンモニア産生能⁹⁾、酸素の有無ならびにVFAパターン試験⁹⁾を行なった。その結果をTable 1に示した。Anaerobe Laboratory Manual⁹⁾の検索表からNo. 31は*Cl. tyrobutyricum*, No. 32は*Cl. butyricum*であることを再確認し、No.1と12を*Cl. tyrobutyricum*, No.4と27を*Cl. scatologenes*, No.3およびNo.5をそれぞれ*Cl. septicum*, *Cl. subterminale*と推定し、No.5, No.27, No.31, およびNo.32の4菌株を以下の実験に供した。

3 サイレージエキス培地の調製

とうもろこしサイレージの新鮮物100gに対し蒸留水200mlを加え磨砕後、三重ガーゼで濾過して抽出液を集め、これに8N NaOHを加えてpHを6.0に調整し、この抽出液8ml(*Cl. subterminale*を接種した場合は9ml)をガス噴射法で窒素ガスを流しながら2g(*Cl. subterminale*の場合1g)のセルロース(興人牌)を詰めた試験管に注入してプチルゴム栓で封をした後、121°Cで15分間オートクレーブで滅菌した。なおこのサイレージエキス培地の組成は(カッコ内の数値は*Cl. subterminale*を接種した場合)、水分80(90)%, 乳酸2530(5692)mg/100gDM, 酢酸1220(2745), プロピオン酸52(117), イソ酪酸10(23), 酪酸42(95), イソ吉草酸57(128), 揮発性脂肪酸(VFA)総量1381(3107)mg/100gDM, 全窒素(Total-N)600(1350)mg/100gDM, 揮発性塩基態窒素(VBN)29(65)mg/100gDM, VBN/Total-N4.83(4.83)%, 可溶性炭水化物(WSC)575(1293)mg/100gDMであった。

4 培養試験

接種菌はそれぞれPYG培地で30°C48時間(*Cl. butyricum*は24時間)嫌氣的に培養し培養液の生菌数をカウントした後、培養液の菌数が1ml当り 1×10^8 個になるよう滅菌リンゲル液で希釈しこの希釈液0.1mlをサイレージエキス培地に無菌的に単独接種した。接種後はそれぞれの菌について20°C, 30°Cあるいは40°Cの恒温器内で培養し、1, 2, 3, 4, 9週目(場合によっては1, 2, 4週目)にサイレージの全量を取り出して蒸留水100mlを加え、ホモジナイザーで攪拌し、ポプリン布で濾過した抽出液を試料として分析に供した。なお実験は各区とも3連(1部で2連)で実施し、それぞれの平均値をもって示した。

5 分析方法

培地および培養液のpHはガラス電極pHメーター(日立・堀場製M-7), 乳酸はBaker & Summerson法¹¹⁾, 全窒素(Total-N)はKjeldahl法¹²⁾, 揮発性塩基態窒素(VBN)はConwayの微量拡散中和法¹³⁾, 揮発性脂肪酸(VFA)は水蒸気蒸留とガスクロマトグラフィー¹⁴⁾, 可溶性炭水化物(WSC)はSomogi & Nelson法¹⁵⁾によりそれぞれ分析し、生菌数はBacteria Counter(Petroff-Hausser社製)により算定した。なおClostridiaを接種したサイレージの品質評価はFlieg氏法⁷⁾によった。

Table 1. Physiological characteristics of clostridia from silage.

	No. 1	No. 12	No. 31	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	No. 3	<i>Cl. septicum</i>	No. 5	<i>Cl. subterminale</i>	No. 4	No. 27	<i>Cl. scatologenes</i>	No. 32	<i>Cl. butyricum</i>
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a	w	a	a ^w
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Fructose	a	a	a	a	a	a ^w	-	-	a	a	a	a	a
Galactose	-	-	-	-	-	a ^w	-	-	-	-	-	a	a
Gelatin	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	- ^w
Glucose	a	a	a	a	a	a	-	-	a	a	a	a	a
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^w	w	a ⁻
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ⁺	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^a
Lactose	-	-	-	-	-	a ^w	-	-	-	-	-	a	a
Maltose	-	-	-	-	a	a ^w	-	-	-	-	-	a	a
Mannitol	-	-	-	- ^w	a	-	-	-	w	-	-	a	- ^w
Mannose	a	w	a	a ^w	a	a ^w	-	-	a	a	w ^a	a	a
Meat	-	-	-	-	-	-	d	d ⁻	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	a	a ^w
Milk	-	-	-	-	c	c ^d	d	d ^c	-	-	-	c	c
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a
Salicin	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	a	a ^w
Starch	-	-	-	-	-	- ^w	-	-	-	-	-	a	a
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a
Xylose	a	a	a	- ^a	a	- ^w	-	-	a	w	a ^w	w	a
Ribose	-	-	-	-	-	v	-	-	w	w	w	w	a ^w
Gas	+3	+4	+3	4 ²	+3	4	+4	2 ⁻	+4	+2	4 ²	+3	4
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	v	+	+ ⁻	+	+ ⁻	+	+	+	+	+ ⁻
Spore location	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	T ST	ST	ST
NH ₃	+	w	w	- ⁺	+	v	+	v	w	w	+ ^w	+	- ⁺
O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legend for symbols

- : negative reaction for 90-100% of strains
+ : positive reaction for 90-100% of strains
a : strong acid -pH 5.5 or below-for 90-100% of strains
w : weak acid -pH 5.5 to 6.0-for 90-100% of strains
v : variable (strains may be either + or -)
T : terminal ST : subterminal
○^x : most strains ○, some strains ×
c : curd (milk)
d : digested (milk, meat)
+gas : a few bubbles in the area of growth
2+gas : small but complete splits in the agar
3+gas : agar raised about halfway up the tube
4+gas : agar raised to the top of the tube

結 果

とうもろこしサイレージから分離された4種の Clostridia をそれぞれ単独で接種したサイレージエキス培地を、20°C、30°Cあるいは40°Cで培養した時の培養液のpH、乳酸、WSC、VBN/Total-N および VFA の経時的变化は Fig.1 示したとおりである。

Cl. scatologenes あるいは *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合、pH はいずれの培養温度でも1~2週目に8近くまで急激に増加し以後その水準は9週目まで持続したのに対し、*Cl. butyricum*、*Cl. subterminale* を接種した場合のpHは、どの培養温度の場合にもほとんど変化しなかった。このようにpHは菌によって培養後著しく上昇するものとあまり変化しないものとに分れたが、それぞれの菌のpHは培養温度の差によって違いがみられずわずかに *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合に20°Cで他の温度区と比べ上昇が遅れたにすぎなかった。

乳酸含量は、*Cl. butyricum*、*Cl. scatologenes* あるいは *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合、培養温度が30°Cと40°Cの時は1週目に急激に低下し以後その低値が持続するパターンを示したのに対し、20°Cの時はこれらの低値に達するのに2週以上を要し特に *Cl. butyricum* を接種した場合には4週以上を要した。これら3菌と対照的に、*Cl. subterminale* を接種した場合の乳酸は、培養温度が20°Cの時に急激に低下した。

WSCは、どの菌を接種した場合にも、すべての培養温度区で減少したが、この2週目までの減少量は、*Cl. subterminale* を接種した場合を除き、培養温度が20°Cの時に他の温度区と比べ明らかに少なかった。一方 *Cl. subterminale* を接種した場合のWSCは、40°Cの時最も少なかった。

VBN/Total-N は、*Cl. scatologenes*、*Cl. tyrobutyricum*、*Cl. subterminale* を接種した場合、いずれの温度区でも増加した。しかし3週目までの増加量は、培養温度が20°Cの時に他の温度区と比べ少ないことが認められた。*Cl. butyricum* を接種した場合にも同様の傾向が認められたが、増加量は30°C、40°Cの時ともに他の3菌を接種した場合に比べ少なかった。

VFA総量と酪酸含量は、どの菌を接種した場合にも、すべての温度区で増加した。しかし4週目までの増加量は、*Cl. subterminale* を接種した場合を除き、培養温度が20°Cの時他の温度区と比べ少なく、特にその傾向は *Cl. butyricum*、*Cl. tyrobutyricum* を接種した場合に顕著であった。一方 *Cl. subterminale* を接種した場合のVFA総量と酪酸含量の増加には、培養温度による差が2週目まで認められなかった。酢酸含量については、*Cl. subterminale* を接種した場合にのみ増加傾向が認められ、他の菌を接種した場合には減少した。

サイレージエキス培地と培養液の Flieg 氏法による評点を Table 2 に示した。この評点法は、サイレージ中の乳酸、酢酸、酪酸の総酸量に対する各酸の比率から評点を算出し、その総点によって等級を定めるもので、81~100を優、61~80を良、41~60を可、21~40を中、0~20を下ときめている。菌接種前の培地は良と判定され、*Cl. butyricum*、*Cl. scatologenes*、*Cl. tyrobutyricum* を接種した場合、30°Cと40°Cの時培養開始後1週目に、下となったのに対し、20°Cの時は2週目以後に下となった。*Cl. subterminale* の場合は、2週目ま

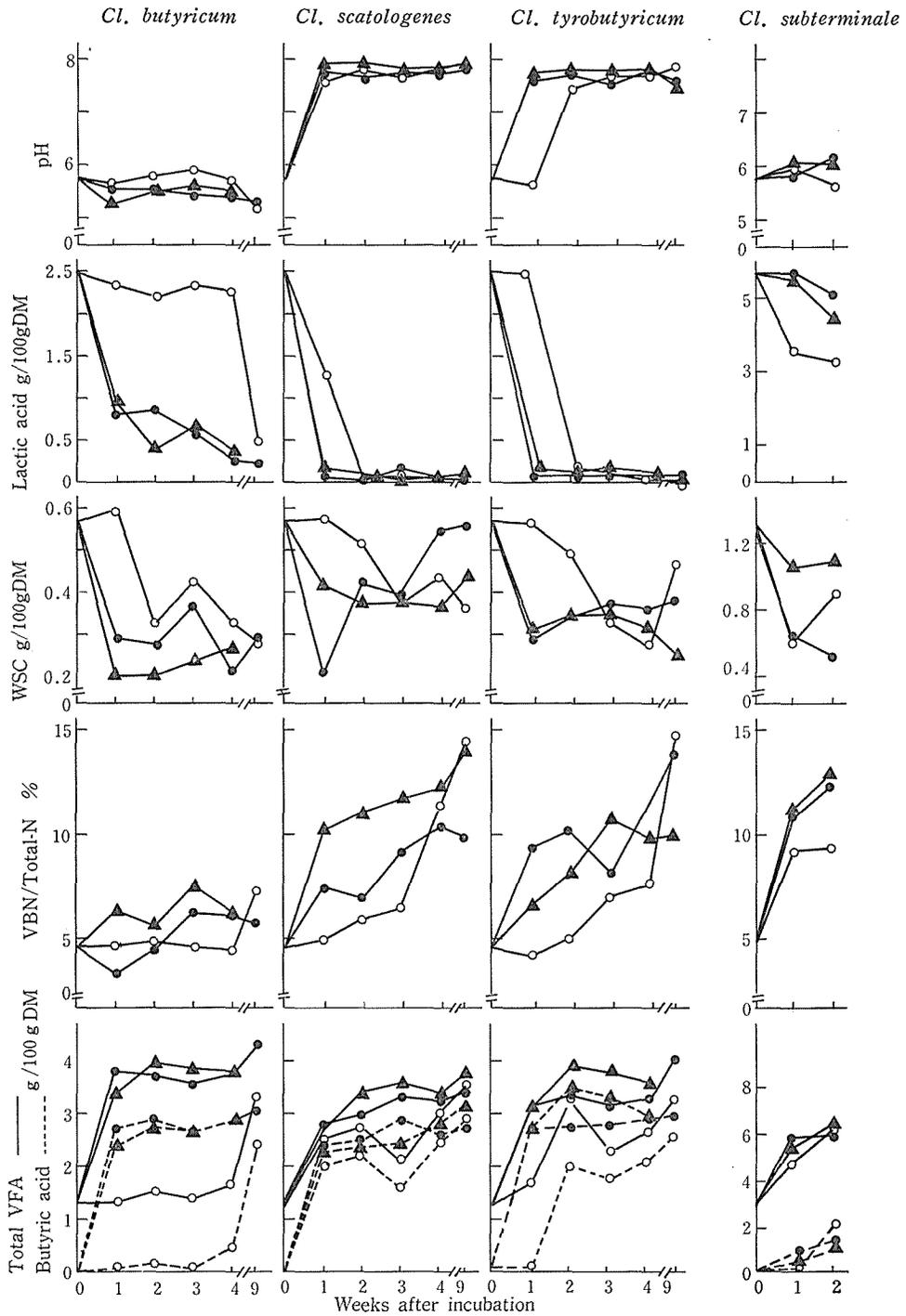


Fig.1 Effect of incubation temperature on pH, lactic acid, WSC, VBN/Total-N and VFA in cultures. Each point represents mean of triplicate.
 ○ : 20°C, ● : 30°C, ▲ : 40°C.

Table 2. Changes in the quality of silages inoculated with clostridia and incubated at 20, 30 and 40°C. (Expressed in Flieg's mark)

	Temperature	Weeks after incubation					
	(°C)	0	1	2	3	4	9
<i>Cl. butyricum</i>	20	78*	78	65	73	55	15
	30	78	15	15	10	10	10
	40	78	20	10	10	10	—
<i>Cl. scatologenes</i>	20	78	30	10	15	15	15
	30	78	15	15	15	15	15
	40	78	15	10	10	15	15
<i>Cl. subterminale</i>	20	78	60	35	—	—	—
	30	78	60	50	—	—	—
	40	78	60	55	—	—	—
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	20	78	75	10	10	15	15
	30	78	15	15	15	15	15
	40	78	15	15	15	15	—

* : Mean of triplicate or duplicate

では20°Cで中, 30°Cと40°Cで可となった。

考 察

サイレージに存在する嫌気性芽胞菌として, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. scatologenes*, *Cl. bifermensans*, *Cl. acetobutyricum*, *Cl. perfringens*, *Cl. sphenoides* が報告されている¹⁻⁴⁾。本実験でもこれらのうち, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. scatologenes* と推定される菌株を分離することができ, さらに今まで報告されていない *Cl. septicum*, *Cl. subterminale* と推定される菌株を分離することができた。しかしながら, *Cl. septicum* と推定された菌株は Anaerobe Laboratory Manual⁹⁾ に記載された生理学的性状と 2, 3 の点で一致せずさらに検討を要するものとする。

本実験において Flieg 氏法によるサイレージの品質の評価は *Cl. subterminale* を接種した場合にはどの培養温度であっても2週目までに下にならず, *Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* をそれぞれ接種した場合は, 30°C, 40°C の時1週目に下となり20°Cの時2週目以降に下となることが示された。このことは *Cl. subterminale* は他の3菌と比べサイレージの劣質化に関与する度合が少ないことを示しているものと思われる。また同時に, *Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes* あるいは *Cl. tyrobutyricum* によるサイレージの劣質化は, 20°C のような低温発酵によって遅らせることが可能であることを示している。

一般に Clostridia の発育の至適温度は30°C~40°C⁷⁾ あるいは35°C~40°C⁶⁾ とされており, 22°Cでは発育は緩慢になる¹⁾か抑制され¹⁶⁾15°Cではサイレージ中に Clostridium が存在しない³⁾といわれている。本実験においても, *Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl.*

tyrobutyricum を接種した場合、培養後の乳酸とWSCの減少また VBN/Total-N, VFA 総量および酪酸の増加は、培養温度が30°Cと40°Cの時では同じ傾向を示して培養開始後直ちに起こり、20°Cの時これらの変化は遅れることが示された。したがってこれらの結果は、すでに報告されている事実をサイレージエキス培地法で確認するとともに、サイレージの低温発酵調製法が *Clostridium* の発育と代謝の抑制の面からみて有効な方法であることを示唆した。

Cl. scatologenes, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合の pH はどの培養温度の場合にも2週目までには8近くまで急激に増加したが、これは乳酸の減少と VBN/Total-N の上昇によるものと思われる。一方 *Cl. butyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合は、それぞれ乳酸の減少と VBN/Total-N の顕著な増加がみられたにもかかわらず、pH はいずれもほとんど変化しなかった。木部ら¹⁷⁾は、*Aspergillus* sp. をサイレージエキス培地に接種した場合、乳酸が急激に減少するにもかかわらず pH は低下し、この低下は同時に増加する不揮発性有機酸のクエン酸によるものであると考察している。本実験においては不揮発性有機酸の測定を行なわなかったが、乳酸、WSCの減少と VBN の増加から考えると、*Cl. butyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合にもクエン酸等の有機酸が増加して pH の上昇を抑制した可能性もある。

要 約

とうもろこしサイレージより分離した *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* および *Cl. subterminale* と推定される3菌株と既知の *Cl. butyricum* をサイレージエキス培地 (pH 5.8, 乾物含量20%ただし *Cl. subterminale* の場合10%) に無菌的に単独接種し、20°C, 30°Cおよび40°Cで嫌氣的に培養して、*Clostridia* の代謝に及ぼす温度の影響を比較検討した。

Cl. scatologenes, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合の pH は、培養開始後いずれの培養温度でも、2週目迄に急激に増加しそれ以後はほとんど変化しなかった。これに対し、*Cl. butyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合の pH はどの培養温度でも評価しうる変動を示さなかった。

Cl. subterminale を接種した場合を除き、乳酸とWSCの減少また VBN/Total-N, VFA 総量および酪酸の増加は、培養温度が30°Cと40°Cの時では同じ傾向を示して培養開始後直ちに起こり、20°Cの時これらの変化は遅れることを示した。*Cl. subterminale* を接種した場合、他の菌の場合と同様、いずれの培養温度でも乳酸とWSCは減少し VBN/Total-N VFA 総量および酪酸は増加したが、これらは培養温度の違いによって一定の傾向を示さなかった。

Flieg 氏法によるサイレージの品質の評価は、*Cl. subterminale* を接種した場合にはどの培養温度であっても2週目までに下にならず、*Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* をそれぞれ接種した場合は30°C, 40°Cの時1週目に下となり20°Cの時は2週目以降に下となることが示された。

以上の結果から、サイレージの劣質化と *Clostridium* の代謝は、20°Cのような低温でサ

イレージ発酵をさせることによって、遅延・抑制することが可能であると考えられる。

引用文献

- 1) BRYANT, M.P. and L.A. BURKEY, *J. Bact.*, 71:43-46. 1956.
- 2) ROSENBERGER, R.F., *J. Appl. Bact.*, 19:173-180. 1956.
- 3) 佐々木博, 北大農邦文紀要, 8:188-251. 1972.
- 4) GIBSON, T., *J. Appl. Bact.*, 28:56-62. 1965.
- 5) 大山嘉信, 日畜会報, 42:301-317. 1971.
- 6) 兼子達夫, サイレージの技術, 酪農学園短期大学酪農学校刊, 1975.
- 7) 安藤文桜, 越智茂登一, 新版サイレージのすべて, 酪農事情社, 東京, 1976.
- 8) 小酒井望, 鈴木祥一郎, 嫌気性菌と嫌気性菌症, 医学書院, 東京, 1968.
- 9) HOLDEMAN, L.V., E. P. CATO and W.E.C. MOORE, *Anaerobe Laboratory Manual* 4th Edition, Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA, 1977.
- 10) 京都大学農学部農芸化学教室編, 農芸化学実験書, 第2巻, 産業図書, 東京, 1973.
- 11) BARKER, S.B. and W.H. SUMMERSON, *J. Biol. Chem.*, 138:535-554. 1941.
- 12) CLARK, E.P., *Semi-Micro Quantitative Organic Analysis*, 42. Academic Press., N. Y., 1943.
- 13) CONWAY, E.J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 95. Crosby Lockwood and Son Ltd. London., 1950.
- 14) KIBE, K., *Jap. J. Zootech. Sci.*, 38:141-147. 1967.
- 15) 森本 宏, 動物栄養試験法, 342-344, 養賢堂, 東京, 1971.
- 16) GIBSON, T., A.C. STIRLING, R.M. KEDDIE and R.F. ROSENBERGER, *J. Gen. Microbiol.*, 19:112-118. 1958.
- 17) 木部久衛, 東 保雄, 唐澤 豊, 信州大学農学部紀要, 18:21-32. 1981.

Effects of Incubation Temperatures on Metabolism of Clostridia in Anaerobic Silage Extract Media

By Kyuei Kibe, Yutaka Karasawa and Norihisa Takase

Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science,
Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

The strains of clostridia were isolated from representative colonies obtained from poor silages. The strains, No.1 and No.31, No.4 and No.27, No.3 and No.5, and No.32 were assumed to be *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl. septicum*, *Cl. subterminale* and *Cl. butyricum*, respectively. Effects of incubation temperatures on growth and metabolism of *Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* and *Cl. subterminale* obtained above were examined with the anaerobic silage extract media.

Each incubation of *Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes* and *Cl. tyrobutyricum* at 20°C resulted in slower increases in total VFA, butyric acid and VBN/Total-N contents of cultures and in slower decreases in lactic acid and WSC contents of cultures than that at 30°C or 40°C. Incubation of *Cl. subterminale* at 20°C, 30°C and 40°C also caused increases in total VFA, butyric acid and VBN/Total-N contents of cultures and decreases in lactic acid and WSC contents of cultures, but consistent effects of incubation temperatures on these contents were not observed. At all incubation temperatures, pHs of the cultures showed rapid increases in inoculations of *Cl. scatologenes* and *Cl. tyrobutyricum*, but little change in inoculations of *Cl. butyricum* and *Cl. subterminale*.

These results suggest that the incubation at 20°C or lower temperature has a suppressive effect on growth and metabolism of clostridia and results in a delayed reduction in silage quality.