

サイレージより分離した嫌気性芽胞菌の代謝に 及ぼす培地の pH と乳酸含量の影響

唐澤 豊・高瀬能久・木部久衛

信州大学農学部 家畜飼養飼料科学研究室

緒 論

Clostridia は炭水化物，タンパク質，乳酸など家畜にとって有用な物質を資化して酪酸，アンモニア，スカトール，アミン類等の家畜に有害もしくは家畜の嗜好性を低下させる物質を産生するため，サイレージの品質の劣化に関与する主要な菌といわれている。

この菌の至適 pH は 7.0～7.4 であり¹⁾，4.2 以下では発育が抑制されることが報告されている^{2,3)}。しかしながら，A. I. V. サイレージでは pH 3.5 以下でも酪酸を含むことがあり⁴⁾ またサイレージの埋蔵過程で一旦 pH が 4 近くあるいはそれ以下になってもその後乳酸が減少し品質が劣化する例も知られている⁵⁾。このように Clostridia の発育とサイレージの pH との関係についての見解は一致していない。

Clostridia の発育は培地の乳酸によっても抑制され，この抑制効果は乳酸による培地の pH の低下と培地の乳酸閾そのものに由来すると考えられている⁴⁾ が，乳酸そのものの Clostridia の発育抑制効果についてはほとんど報告されていない。

そこで本実験では，サイレージから分離した Clostridia を，pH あるいは乳酸含量のことなるサイレージエキス培地に単独で接種し，培地成分の経時的变化を調べることにより，Clostridium によるサイレージの劣質化と培地の pH，乳酸との関連性について検討した。

材料および方法

1 供試菌と培養

本実験において使用した Clostridia は，前報⁶⁾ に述べたように分離同定された *Cl. butyricum*，*Cl. scatologenes*，*Cl. tyrobutyricum*，*Cl. subterminale* の 4 菌であった。接種菌はそれぞれ PYG 培地で 30°C 48 時間 (*Cl. butyricum* は 24 時間) 嫌氣的に培養し，培養液の生菌数が 1 ml 当り 1×10^8 個になるよう滅菌リンゲル液で稀釈してから，この稀釈液 0.1 ml 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 30°C の恒温器内で嫌氣的に培養し，1，2，3，4 週目 (*Cl. subterminale* を接種した場合は 2 週目まで) にサイレージの全量を取り出して蒸留水 100 ml を加え，ホモジェナイザーで攪拌し，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。

2 供試培地

サイレージエキス培地の調製に用いたサイレージ抽出液は、前報と同様にして得られた⁶⁾。サイレージエキス培地の pH が Clostridia の代謝に及ぼす影響を調べた実験では、サイレージ抽出液の pH は NaOH と HCl 液の添加によって 4.1 (pH 4 区), 4.9 (pH 5 区) および 5.8 (pH 6 区) に調整し、この抽出液 8 ml (*Cl. subterminale* の場合は 9 ml) をガス噴射法で窒素ガスを流しながら 2 g (*Cl. subterminale* の場合は 1 g) のセルロース(興人(株))を詰めた試験管に注入してブチルゴム栓をした後、121°C で15分間オートクレーブで滅菌した。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/100g DM, 揮発性脂肪酸 (VFA) 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), 揮発性脂肪酸総量 1381 (3107), 全窒素 (Total-N) 600 (1350)mg/100 gDM, 揮発性塩基態窒素 (VBN) 29 (65)mg/100gDM, VBN/Total-N 4.83 (4.83)%, 可溶性炭水化物 (WSC) 575 (1293)mg/100gDM であった。一方培地の乳酸含量が Clostridia の代謝に及ぼす影響を調べた実験では、培地の乳酸含量が 2.5, 5.0, 6.7, 13.0 および 15.0 % となるようにサイレージ抽出液の乳酸量を調整した。この場合のサイレージエキス培地は pH が上記の乳酸含量に対応してそれぞれ 5.8, 5.8, 5.4, 4.9, 5.4 であった。なお、この時培地の乳酸以外の成分組成は、前記のとおりであった。

3 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 (日立一堀場製 M-7), 乳酸は Baker & Summerson 法⁷⁾, 全窒素 (Total-N) は Kjeldahl 法⁸⁾, 揮発性塩基態窒素 (VBN) は Conway の微量拡散中和法⁹⁾, 揮発性脂肪酸 (VFA) は水蒸気蒸留とガスクロマトグラフィ-¹⁰⁾, 可溶性炭水化物 (WSC) は Somogi & Nelson 法¹¹⁾によりそれぞれ分析した。また Clostridia を接種したサイレージエキス培地のサイレージとしての品質評価は、Flieg 氏法²⁾によって行なった。なお、実験は各区とも 3 連 (1 部で 2 連) で実施し、結果はそれぞれの平均値をもって示した。

結 果

とうもろこしサイレージから検出された 4 種の Clostridium をそれぞれ単独で、pH の異なるサイレージエキス培地に接種し、菌接種前の培地の pH の違いが菌接種後の pH, 乳酸含量, WSC, VBN/Total-N, VFA 総量および酪酸含量の経時的变化におよぼす影響について調査した結果は Fig. 1 に示した。

菌接種時の培地の pH が 4 の時、培養開始後の pH は *Cl. subterminale* を接種した場合 2 週目迄、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合には 4 週目迄ほとんど変化しなかった。*Cl. butyricum* を接種した場合には、接種時の培地の pH が 5 および 6 の時にも培養液の pH は同様に 4 週目迄変化しなかった。

乳酸含量は、菌接種時の pH が 4 の時、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. sub-*

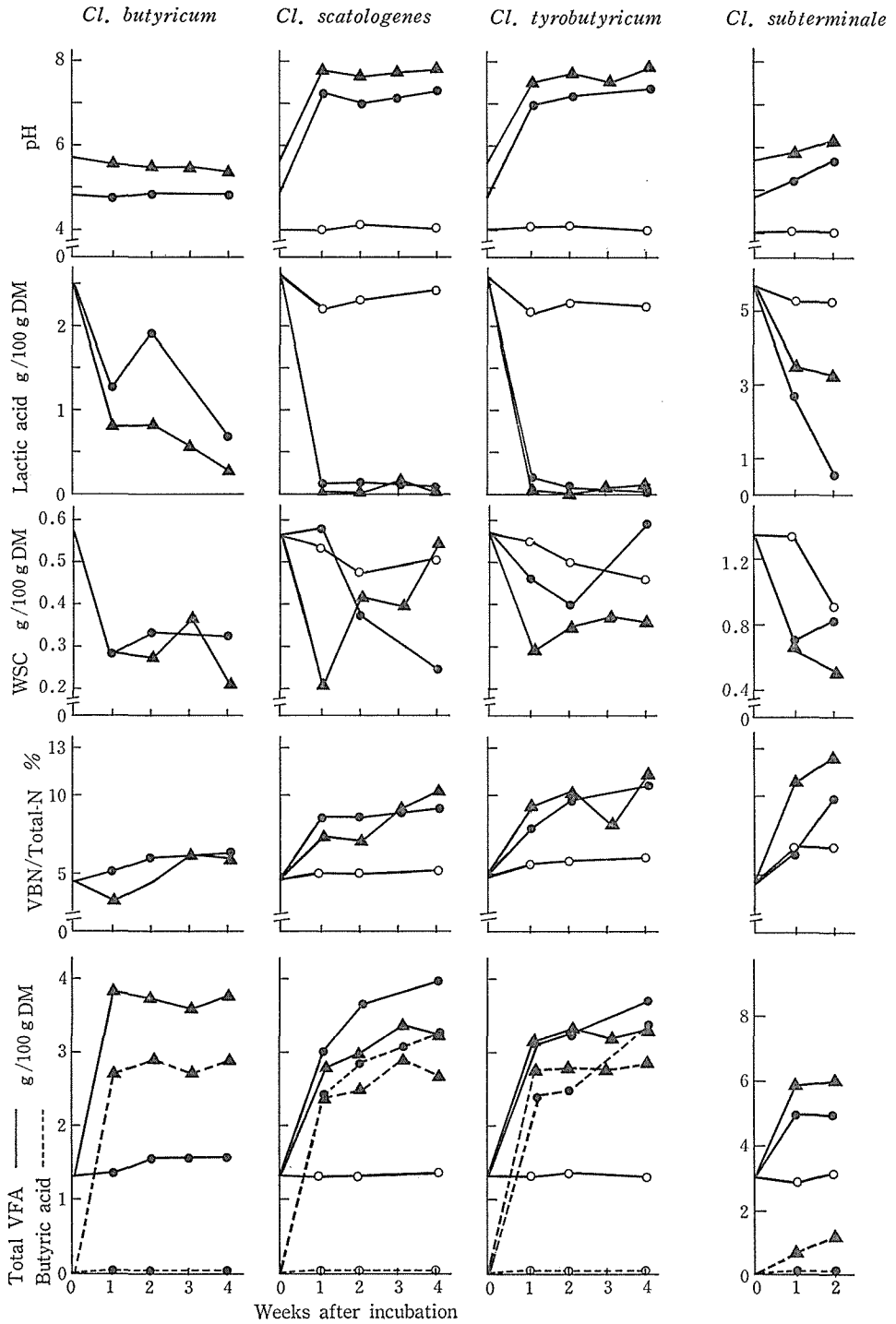


Fig.1. Changes in pH, lactic acid, WSC, VBN/Total-N and VFA with time in the cultures with various levels of initial pH. Each point represents mean of triplicate. ○: pH4, ●: pH5, ▲: pH6.

terminale を接種した培養液では2～4週目までほとんど変化しなかった。これに対し、菌接種時の pHが5, 6の時の乳酸含量は、どの菌を接種した場合にも1週目に急激な低下がみられ、特に *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合1週目で0近くまで低下した。

菌接種時の pHが4の時の WSC 含量は、*Cl. subterminale* を接種した場合に減少し、*Cl. tyrobutyricum*, *Cl. scatologenes* を接種した場合には減少の傾向を示した。しかしこれらの低下は、培地の pHが4以上の場合にみられた低下より小さいものであった。

VBN/Total-N は、菌接種時の pHが4の時ほとんど変化しないか若干の増加傾向を示すにすぎなかったが、pHが5, 6の時は *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合増加した。しかしながら、*Cl. butyricum* を接種した場合の VBN/Total-N は、菌接種時の pHが5, 6であってもわずかに増加するにすぎなかった。

VFA 総量はどの菌を接種した場合にも酪酸量と同様の経時の変化を示した。すなわち、菌接種時の pHが4の時ほとんど変化せず、pHが5, 6の時は1週目に急激に増加しその後はずかに増加するかほとんど変化がみられなかった。

異なる pHのサイレージエキス培地とそれらに Clostridia を接種した培養液の Flieg 氏法による評点を Table. 1 に示した。菌接種時の pHが4の時、どの菌を接種した場合にも評点の低下は認められず品質は優あるいは良と判定されたが、pHが5, 6の時、評点の明らかな低下が認められた。しかしながら、pH 5, 6の時の培養液の評点の低下の程度は、接種した菌によって違いがみられた。すなわち、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合で菌接種時の pHが5, 6の時および *Cl. butyricum* を接種した場合で菌接種時の pHが6の時には、1週目に評点は急激に低下し(品質：下)、*Cl. subterminale* を接種した場合および *Cl. butyricum* を接種した場合で菌接種時の pHが5の時には、評点は緩慢な低下を示した。

Table 1. Changes in the quality of silages with various levels of initial pH after the inoculation of clostridium. (Expressed in Flieg's mark)

	pH	Weeks after incubation				
		0	1	2	3	4
<i>Cl. butyricum</i>	5	78*	65	70	—	45
	6	78	15	15	10	10
	4	78	78	83	—	83
<i>Cl. scatologenes</i>	5	78	15	15	—	15
	6	78	15	15	15	15
	4	78	83	83	—	83
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	5	78	15	15	—	15
	6	78	15	15	15	15
	4	78	78	78	—	—
<i>Cl. subterminale</i>	5	78	60	45	—	—
	6	78	60	50	—	—
	4	78	78	78	—	—

* Mean of triplicate or duplicate.

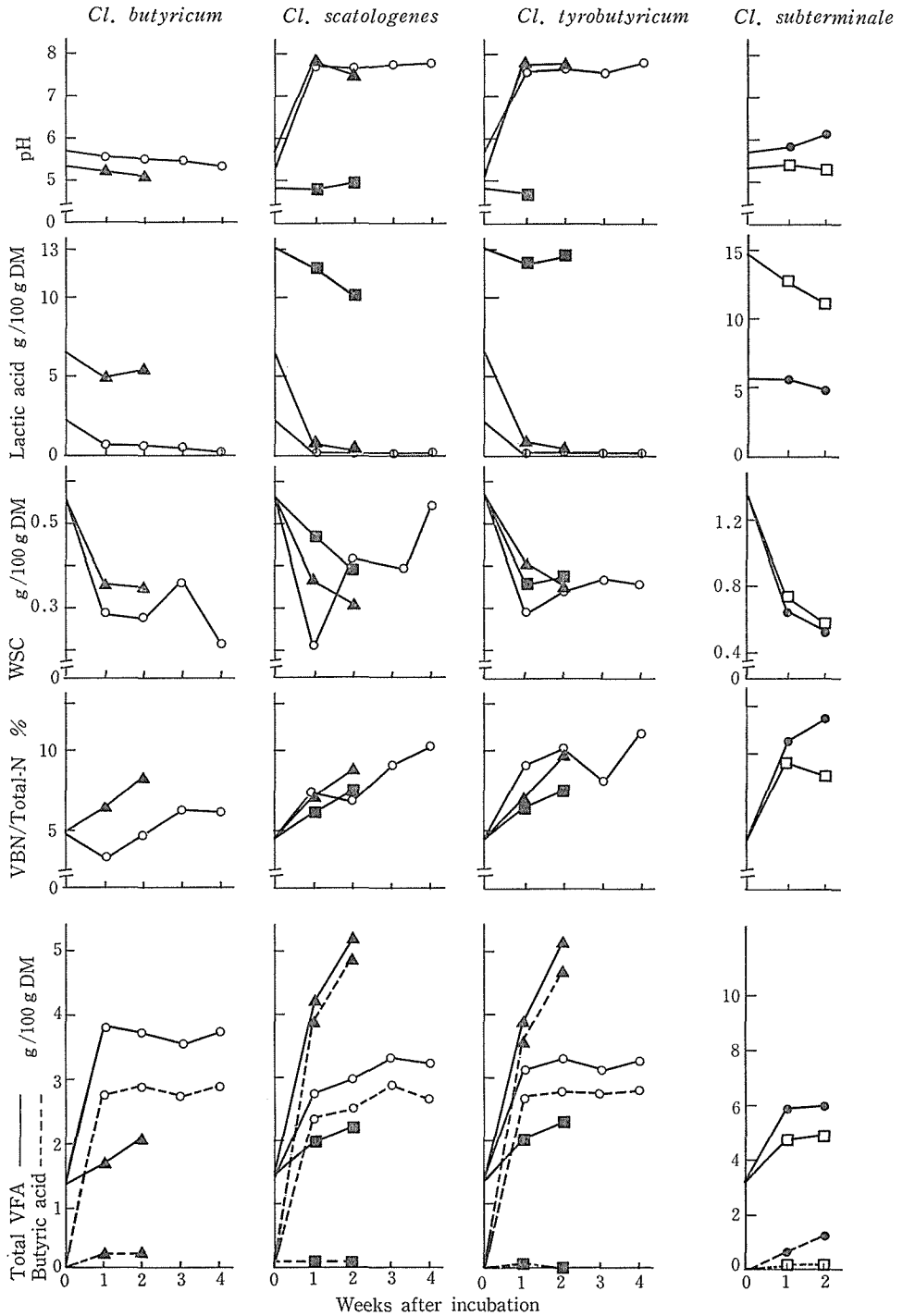


Fig. 2. Changes in pH, lactic acid, WSC, VBN/Total-N and VFA with time in the cultures with various levels of initial lactic acid content. Each point represents mean of triplicate. ○:2.5%, ●:5%, ▲:6.7%, ■:13%. □:15%.

次に異なる乳酸含量のサイレージェキス培地に Clostridia を単独で接種し、培地の乳酸含量が培養液の pH, 乳酸, WSC, VBN/Total-N, VFA 総量および酪酸含量に及ぼす影響を調べその結果を Fig. 2 に示した。

Cl. scatologenes, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合の pH は、菌接種時の培地の乳酸含量が2.5%, 6.7%の時1週目に8近くまで急激に増加したが、乳酸含量が13%の時はほとんど変化しなかった。これに対し、*Cl. subterminale*, *Cl. butyricum* を接種した場合の pH は、乳酸含量が2.5, 5, 6.7あるいは15%の時にもほとんど変化しなかった。

乳酸含量は、*Cl. scatologenes* を接種した場合、菌接種時の乳酸含量にかかわらず1~2週目に急激な減少がみられ、2.5%, 6.7%区では2週目にほとんど0近くになった。*Cl. tyrobutyricum* を接種した場合にも同様に菌接種時の乳酸含量が2.5, 6.7%の時は減少し2週目に0近くになったが、13%の時にはほとんど変化がなかった。*Cl. subterminale* を接種した場合、培地の乳酸含量が15%の時は *Cl. scatologenes* を接種した場合と同様急激に低下したが5%の時はほとんど変化しなかった。*Cl. butyricum* を接種した場合の乳酸の低下は、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合と比べ遅い傾向がみられた。

WSC は、どの菌を接種した場合にも、培地の乳酸含量に関係なく1週目から2週目にかけて急激に低下した。しかし菌接種時の培地の乳酸含量と WSC の低下との間には一定の関係が認められなかった。

VBN/Total-N は、どの菌を接種した場合にも培地の乳酸含量に関係なく増加した。VBN/Total-N の増加量と菌接種時の培地の乳酸含量との間には一定の関係は認められなかったが、菌間では *Cl. subterminale* を接種した場合の増加量が最も多かった。

VFA 総量はどの菌を接種した場合にも酪酸と同様の経時的变化を示した。*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合の VFA 総量の増加は、培地の乳酸含量が6.7%の時最も多く次いで2.5, 13%の時の順に多かった。また *Cl. butyricum* を接種した場合の VFA 総量は、2.5%の時の方が6.7%の時より多く増加し、*Cl. subterminale* を接種した場

Table 2. Changes in the quality of silages with various levels of initial lactic acid contents after the inoculation of clostridium. (Expressed in Flieg's mark)

Inocula	pH	Weeks after incubation				
		0	1	2	3	4
<i>Cl. butyricum</i>	2.5	78*	15	15	10	10
	6.7	95	85	80	—	—
<i>Cl. scatologenes</i>	2.5	78	15	15	15	15
	6.7	95	53	30	—	—
	13.0	95	95	95	—	—
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	2.5	78	15	15	15	15
	6.7	95	20	15	—	—
	13.0	95	95	95	—	—
<i>Cl. subterminale</i>	5.0	78	60	50	—	—
	15.0	95	75	83	—	—

* Mean of triplicate or duplicate.

合の増加量は5%の時の方が13%の時より多かった。酪酸は、培地の乳酸が *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合は15%の時、*Cl. butyricum* を接種した場合は6.7%の時いずれもほとんど増加しなかった。

異なる乳酸含量のサイレージエキス培地とそれらに Clostridia を接種した培養液の Flieg 氏法による評点を Table. 2 に示した。評点の最も急激な低下は、*Cl. butyricum*, *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合培地の乳酸含量が2.5%の時に、また *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合には6.7%の時にもみられ、培養後1週目に品質の評価は下となった。*Cl. scatologenes* を接種し培地の乳酸含量が6.7%の時および *Cl. subterminale* を接種し培地の乳酸含量が5.0%の時にも品質の低下が認められ2週目に評価はそれぞれ中、可となった。これに対し、*Cl. butyricum* を接種し、培地の乳酸含量が6.7%の時、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種し乳酸が13%の時および *Cl. subterminale* を接種し培地の乳酸が15%の時、評点はわずかに低下するかほとんど変化がみられなかった。

考 察

Clostridia の成長のための至適 pH は、一般的に7.0~7.4であるといわれ、酸性条件に耐えることができないとされている¹⁾。事実 pH 4.2 以下のサイレージでは、Clostridia の発育は困難であることが報告されている^{2,3)}。しかしながら、A. I. V. サイレージでは、pH 3.5 以下でもたびたび酪酸を含むという報告や⁴⁾、サイレージの埋蔵過程で一旦 pH が4近くあるいはそれ以下になっても、この後乳酸が減少し最終的に品質が劣化する例も知られている⁵⁾ ことから、3.5—4という低 pH によって Clostridia の成長あるいは代謝がいつも抑制されるとは必ずしもいえない。このような見解の相違は、Clostridia の成長できない pH はサイレージ原料草の Water activity によって変る¹²⁾ こととの関連性が考えられている。

そこで本実験においては、Water activity の決定要因である水分含量は、*Cl. subterminale* を接種した場合の培地は90%その他の場合は80%とし、培地の pH の違いが Clostridia の代謝に及ぼす影響を検討した。Clostridia は一般に高水分条件を好み培地の乾物含量が30%以上では菌の活動が制限されるので¹³⁾、本実験で用いた水分含量は菌の発育にとって好条件といえる。しかしながら、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. subterminale* を接種した場合、培地の pH が4の時酪酸の産生はなくアンモニアの増加もきわめて少ない量であった。また *Cl. butyricum* を接種した場合には、培地の pH が5の時でも酪酸の産生は制限された。一方 Flieg 氏法による培地のサイレージとしての評価の結果も、pH 4 では質の低下は抑制され、*Cl. butyricum* の場合には pH 5 でも質の低下は遅延されることを明らかにした。これらの事実は、Clostridia が発育のために好条件下にあっても、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. subterminale* の発育は4以下の pH によって、また *Cl. butyricum* の発育は5以下の pH によって、それぞれ抑制されること、また成長が抑制される pH は菌によって異なることを示しており、Clostridia によるサイレージの劣質化は pH 4 以下の低 pH によって抑止し得るものと思われる。

Clostridia の発育に対する乳酸の抑制効果は、培地の乳酸閾そのものおよび乳酸による培地の pH の低下に由来すると考えられている⁴⁾。しかしながら、乳酸そのものの Clostridia

の発育抑制効果については明らかにされていない。本実験の結果は、培地の乳酸含量が、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合は13%の時、*Cl. subterminale* を接種した場合は15%の時、また *Cl. butyricum* を接種した場合は6.7%の時菌の発育は抑制されることを示した。なおこの時、乳酸の添加に伴う培地の pH の低下が特に13%区で認められ pH は5になったので、乳酸13%区の Clostridia の発育の抑制効果はこの pH の低下に起因するものとも考えられるが、pH が5と等しく乳酸含量が2.5%の場合この pH では抑制効果がなかった (Fig. 1) ことから、本実験の結果は乳酸そのものの抑制効果を示しているといえる。また Flieg 氏法による培地のサイレージとしての品質の評価の結果は、*Cl. butyricum* を接種した場合は6.7%以上の乳酸で、その他の菌の場合は13%以上の乳酸でサイレージの質の低下を抑止あるいは遅延することができることを示した。したがって本実験の結果は、サイレージの劣質化は乳酸濃度の上昇そのものによっても抑制し得ることを示唆している。

Wieringa¹⁴⁾は、*Cl. tyrobutyricum* は pH 4.1 に HCl で調節した broth でも成長することができるが、この菌の成長は broth の NaCl 量が増加するにつれより高い pH によっても抑制されることを示した。このことは、NaCl の添加によってサイレージの Water activity が低下することによるものといわれ、前述の本実験の乳酸の抑制効果もこのような Water activity の低下に乳酸が関与している結果かもしれない。

Cl. butyricum の代謝は他の菌と比べ、比較的高い pH と低い乳酸含量で抑制された。したがってこの菌の活動を許容する条件の幅は狭く、他の3菌と比べサイレージの劣質化における役割は小さいものと予想される。

要 約

サイレージから分離した4種の Clostridium を、pH が4.1, 4.9, 5.8のように異なる培地あるいは乳酸含量が2.5, 5.0, 6.7, 13.0および15.0%であるサイレージエキス培地に単独接種し、培地成分の経時的な変化を調べることにより、Clostridium によって起こるサイレージの劣質化と培地の pH, 乳酸との関連性について検討した。

Cl. scatologenes, *Cl. tyrobutyricum* あるいは *Cl. subterminale* を接種した場合、培地の pH が4の時酪酸の産生および pH 値、乳酸濃度の変化はなくアンモニア濃度の増加もきわめて少ない量であった。*Cl. butyricum* を接種した場合、培地の pH が5であっても酪酸の産生はなくアンモニアの増加もわずかで pH 値の変動もなかった。一方培地のサイレージとしての Flieg 氏法による評価の結果は、*Cl. butyricum* の場合には pH 5でその他の場合は pH 4で質の低下を抑止、遅延させることを示した。

培地の乳酸含量が、*Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* を接種した場合は13%以上の時、*Cl. subterminale* を接種した場合は15%以上の時、また *Cl. butyricum* を接種した場合は6.7%以上の時、酪酸の産生と pH の変動はほとんどなく乳酸の減少も少なかった。また Flieg 氏法による評点は、*Cl. butyricum* を接種した場合は6.7%以上の乳酸で、その他の菌の場合は13.0%以上の乳酸で、サイレージの質の低下を抑止あるいは遅延することができることを示した。

以上の結果から、サイレージの pH が 4 以下あるいは乳酸含量が 13% 以上であれば、Clostridia の発育と代謝を抑制することができるものと思われる。

本研究は昭和 57 年度文部省科学研究費一般研究費 C (課題番号 56560316) の交付を受けた。

引用文献

- 1) BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 2) 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, 1976.
- 3) 大山嘉信, 柁木茂彦, 日畜会報, 39:61-67. 1968.
- 4) 大山嘉信, 日畜会報, 47:301-317. 1971.
- 5) 大山嘉信, 柁木茂彦, 森地敏樹, 日畜会報, 41:9-15. 1971.
- 6) 木部久衛, 唐澤 豊, 高瀬能久, 信州大学農学部紀要, 20 107-115. 1983.
- 7) BAKER, S. B. and W. H. SUMMERSON, *J. Biol. Chem.*, 138: 535-554. 1941.
- 8) CLARK, E. P., *Semi-Micro Quantative Organic Analysis*, 42. Academic Press, N. Y., 1943.
- 9) CONWAY, E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 95. Crosby Lockwood and Son Ltd., London., 1950.
- 10) KIBE, K., *Jpn. J. Zootech. Sci.* 38: 141-147. 1967.
- 11) 森本 宏, 動物栄養試験法, 342-344, 養賢堂, 東京, 1971.
- 12) WEISBACH, H. E., L. SCHMIDT and E. HEIN, 12th Intern. Grassld Congr. Moscow, 1974: 663-681. 1974.
- 13) McDONALD, P. *The Biochemistry of Silage*, John Wiley & Sons, New York. 1981.
- 14) WIERINGA, G. W. *Neth. J. agric. Sci.* 6: 204-210. 1958.

Metabolism of Clostridia in Anaerobic Silage Extract Media with Various Levels of Initial pH or Lactic Acid Content

By Yutaka KARASWA, Norihisa TAKASE and Kyuei KIBE

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

Summary

This experiment was carried out to examine the effect of pH value or lactic acid content of silage extract medium on metabolites by clostridia and on quality of the culture as silage. Initial pH values of the silage extract media consisted of silage juice plus pulp cellulose powder were adjusted to 4.1, 4.9 and 5.8, and lactic acid contents of the media were to 2.5, 5.0, 6.7, 13.0 and 15.0%. Clostridia tested in this experiment were *Cl. scatologenes*, *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* and *Cl. subterminale* isolated from corn silage.

In silage extract media with initial pH 4, butyric acid was not produced, pH values and lactic acid contents were not changed and ammonia contents were little increased by *Cl. scatologenes*, *Cl. tyrobutyricum* or *Cl. subterminale*. Little or no increase in butyric acid and ammonia contents and in pH value in the silage extract medium inoculated with *Cl. butyricum* was observed even when the initial pH was 5.

No production of butyric acid, little change in pH value and less reduction of lactic acid were caused by *Cl. scatologenes* and *Cl. tyrobutyricum* when the initial lactic acid content was 13%, by *Cl. subterminale* when it was 15% and by *Cl. butyricum* when it was 6.7%.

The estimation of the silage extract cultures by Flieg's method showed the reduction of the silage quality to be inhibited by the initial medium pH of 4 and by the initial lactic acid content of 13.0%.

These results suggest that the reduction of the silage quality by clostridia is inhibited when the silage is lower than 4 in pH value or contains lactic acid of more than 13%.