

サイレージより分離した糸状菌の代謝について

木部久衛・東 保雄・唐澤 豊

信州大学農学部 家畜飼養・飼料学教室

緒 論

牧草サイレージ中の優占糸状菌として高鳥ら¹⁾は, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor* の3属を, また原・大山^{2,3)}はとうもろこしサイレージ中に *Penicillium*, *Monascus*, *Geotrichum* および *Mucor* 属の存在を認め, これらに変敗に関与することを報告している。

一方, サイロ開封後の微生物相について佐々木・佐々木⁴⁾は, pHが低くVFAの少ない良質サイレージでは酵母および糸状菌が, またpHが高くVFAの多い劣質サイレージでは細菌類が増殖し易いことを認めている。

そこで本実験においては, サイレージの好気的変敗に関与する糸状菌がサイロ開封後のサイレージの品質にどのような影響をおよぼすかを調査するため, とうもろこしサイレージより分離した3属の糸状菌をそれぞれpHの異なる人工培地(サイレージエキス培地)に移植して, 好気条件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内に調製されたとうもろこしサイレージを, サイロ開封後滅菌ピンセットを用いて表層部より約50g採取し, 直ちに試料10g当り滅菌0.05%寒天加生理食塩水90mlを加えて1分間振盪処理後, 懸濁液を $10^3 \sim 10^7$ 倍に稀釈し, その1mlをとり馬鈴薯グルコース寒天培地(PDA)に塗布し, 30°Cで5日間平板培養をした。発生したコロニーの集落形状および顕微鏡観察(固定剤としてラクトフェノール液を使用)により釣菌をくり返し, 単一の糸状菌に分離した。このようにして単離された菌株の中から宮路の検索表⁵⁾により3種類すなわち *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* に帰属すると推定される菌株をそれぞれ選定し実験に供した。なおこれら3株は, 食品薬品安全センター秦野研究所高鳥浩介研究員の厚意によりそれぞれ *Aspergillus niger* (以下 *Aspergillus* sp.), *Penicillium roqueforti* (以下 *Penicillium* sp.) および *Mucor* sp. と同定された。

2 供試培地の調製

供試培地としては, 菌を採取したと同一のとうもろこしサイレージを磨砕後, 三重ガーゼで濾過して抽出液を集め, これに稀水酸化ナトリウムと稀塩酸溶液を加えてpHを4.0~7.0まで0.5ずつ7段階(A:4.0, B:4.5, C:5.0, D:5.5, E:6.0, F:6.5およびG

: 7.0) にそれぞれ調整し, これらが元のとうもろこしサイレージの乾物含量 (17%) と等しくなるように, セルローズ粉末を加えて供試培地 (サイレージエキス培地) とした。なおサイレージエキス培地の組成は, 水分83%, 乳酸1,942mg/100gDM, 揮発性脂肪酸 (VFA): 酢酸 (C₂)327, イソ酪酸 (iC₄) 38, 酪酸 (nC₄) 16, 総VFA 381mg/100g DM, 全窒素 (TN) 590mg/100 DM, 揮発性塩基態窒素 (VBN) 60mg/100g DM, VBN/TN 比10%, 可溶性炭水化物 (WSC) 147mg/100g DM であった。

つぎに pH 値の異なる供試培地を新鮮物重量でそれぞれ 35 g ずつとり, これらを長さ 200 mm 直径 30mm の大型試験管に詰め, 綿栓をした後 121°C, 15 分間オートクレーブで滅菌した。冷却後それぞれのサイレージに 3 種類の糸状菌の孢子懸濁液をつぎのように接種した。すなわちローズベンガル 0.035g/l 添加 PDA 平板上で, サイレージ 10 g あたりそれぞれの糸状菌のコロニー数が 10⁸ 台となるように稀釈してこれらを 0.1ml ずつ無菌的に単独接種した。接種後は 30°C の恒温器内で培養し, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 日目毎にサイレージの全量を取り出して蒸留水約 70ml を加え, ホモジナイザーにて攪拌し, 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いずれも 3 連で実施し, それぞれの平均値をもって示した。

3 分析方法

培地および培養液の pH 値はガラス電極 pH メーター (日立・堀場製 M-7), 乳酸は BARKER & SUMMERSON⁶⁾ 法, 全窒素 (TN) は KJELDAHL 法⁷⁾, 揮発性塩基態窒素 (VBN) は CONWAY の微量拡散中和法⁸⁾, 揮発性脂肪酸 (VFA) は水蒸気蒸溜とガスクロマトグラフィ⁹⁾, 可溶性炭水化物 (WSC) は HANES 法¹⁰⁾ によりそれぞれ分析を行なった。

結 果

とうもろこしサイレージ試料からは 3 属の糸状菌すなわち *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. および *Mucor* sp. が検出され, これらの糸状菌を用いて菌接種前の培地の pH の違いが菌接種後の pH の経時的变化にどのような影響をおよぼすかについて調査した結果は第 1 図に示した通りである。

これによれば *Mucor* sp. を接種した場合, 接種時の pH が 4.0~4.5, また *Aspergillus* sp. を接種したものは 4.0~5.0 の範囲のものは培地の pH の経時的变化はほとんどみられなかった。しかし *Mucor* sp. においては接種時の pH が 5.5 以上で 6 日目以降 pH の著しい上昇がみられたのに対して *Aspergillus* sp. では 8 日目以降急激な下降がみられた。また *Penicillium* sp. においては接種後 14 日以内にすべての場合 pH が上昇した。

乳酸含量の変化については第 2 図に示した。すなわち *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. および *Mucor* sp. を接種したいずれの場合も, 接種時の pH に関係なく減少する傾向を示した。なお *Aspergillus* sp. および *Mucor* sp. を接種した場合は特に pH が 5.5 以上で急激な減少を示した。

TN 含重 (第 3 図) についてはそれぞれかなり大きな変動を示したが, 接種時と 14 日目の含量を比較すると, *Mucor* sp. を接種した場合接種時の pH が 4.0~4.5 では増加し, 5.0

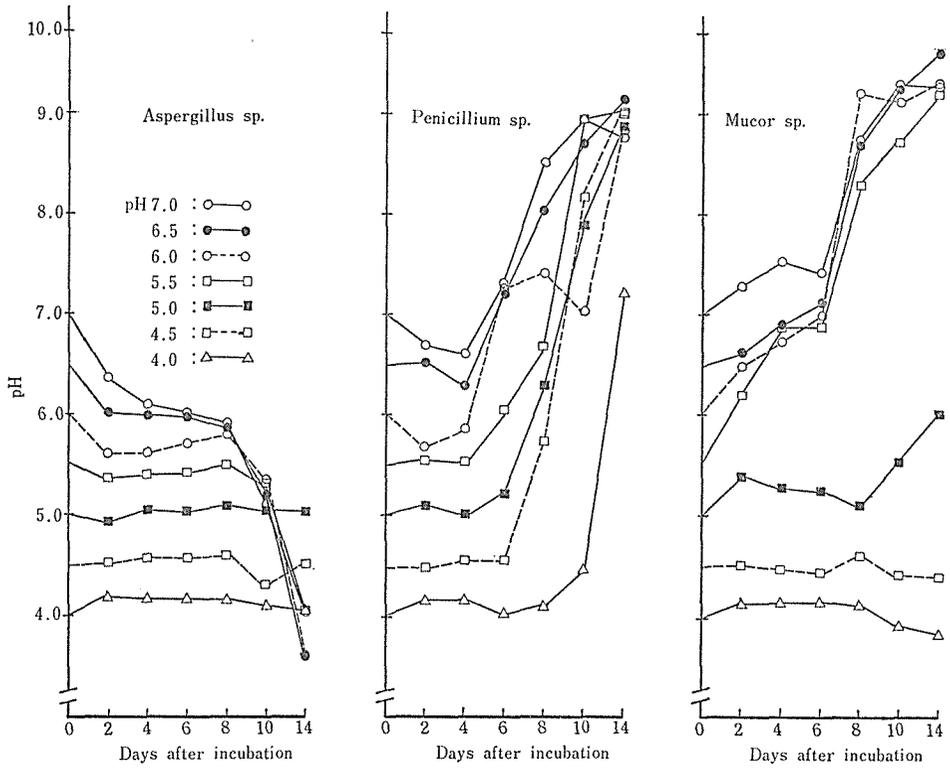


Fig. 1 Changes in pH values with time in the cultures with various levels of initial pH.

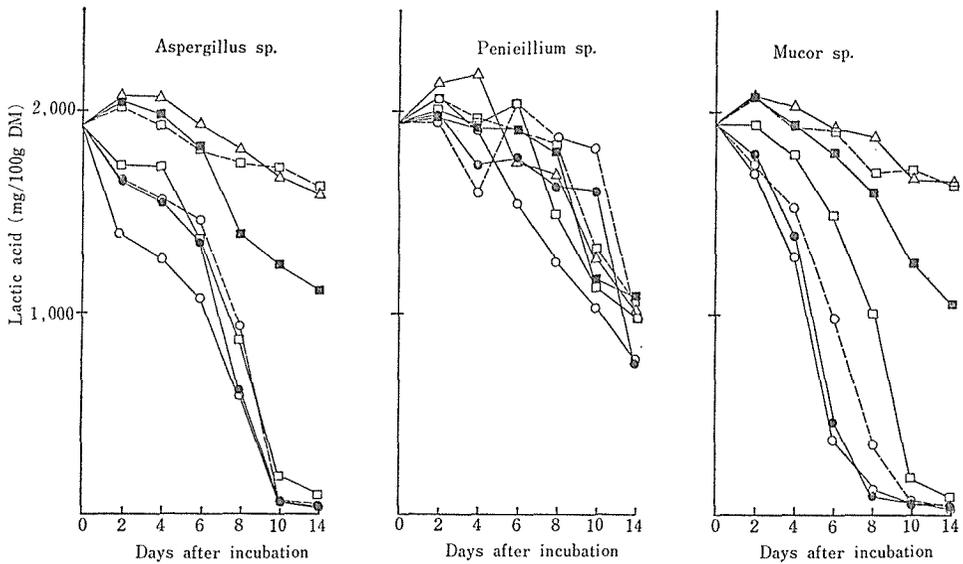


Fig. 2 Changes in lactic acid contents with time in the cultures with various levels of initial pH. Symbols are same as Figure 1.

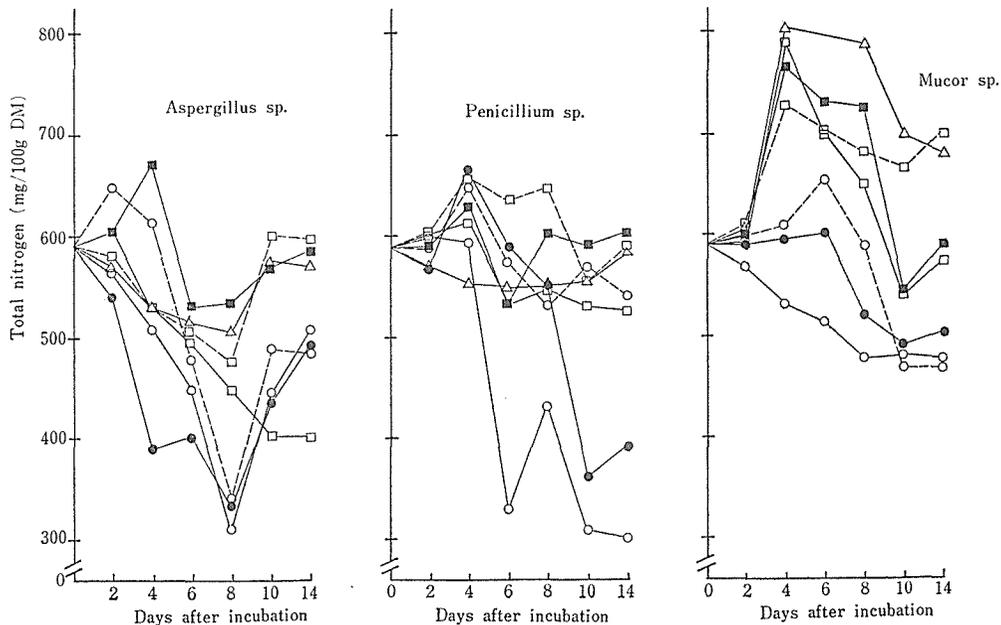


Fig. 3 Changes in total nitrogen contents with time in the cultures with various levels of initial pH. Symbols are same as Figure 1.

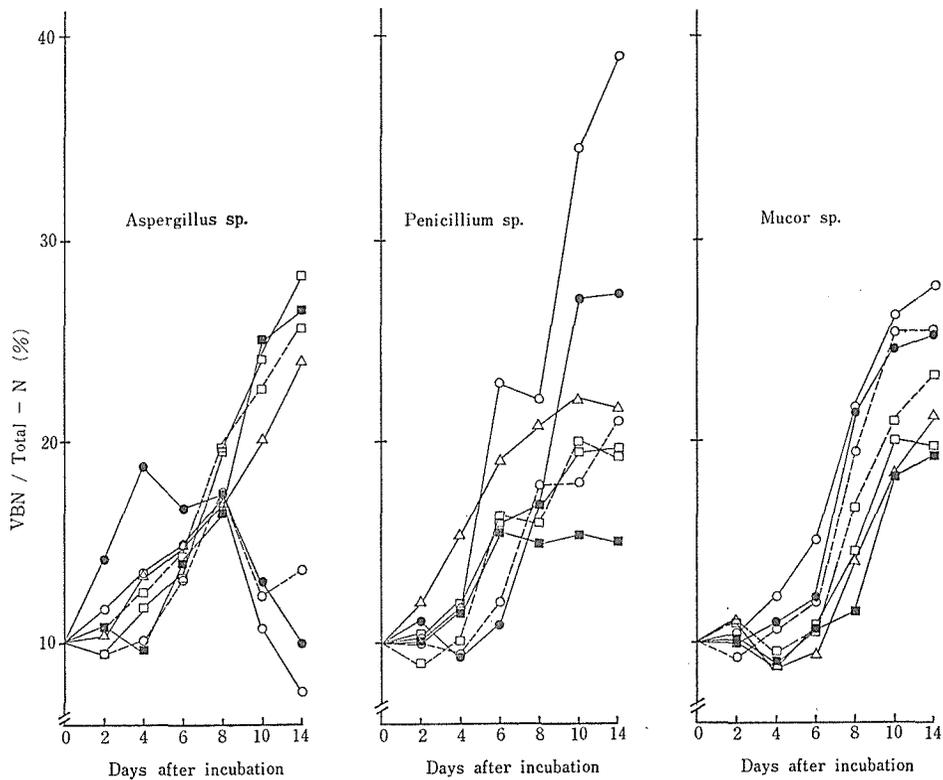


Fig. 4 Changes in ratios of VBN/Total-N with time in the cultures with various levels of initial pH. Symbols are same as Figure 1.

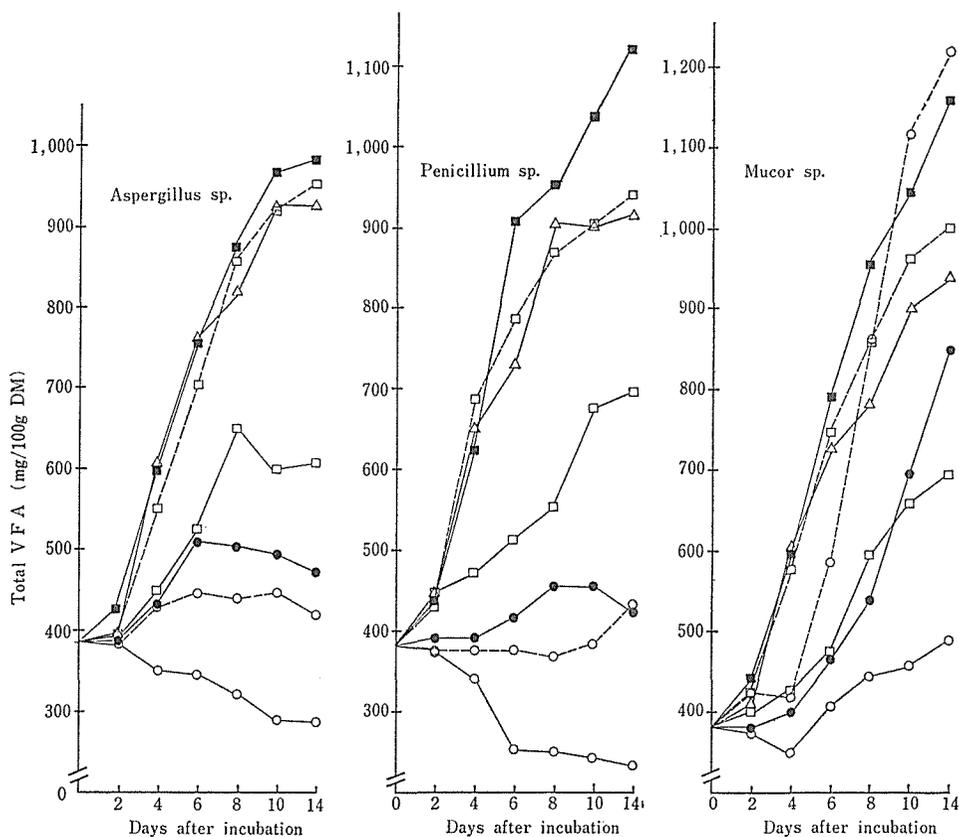


Fig. 5 Changes in Total VFA contents with time in the cultures with various levels of initial pH. Symbols are same as Figure 1.

Table 1. Changes in individual VFA contents with time in the cultures with various levels of initial pH (mg/100g DM)

pH	Moulds	VFA	Days after incubation						
			0	2	4	6	8	10	14
4,0	M	C2	327	358	509	590	623	712	724
		iC4	28	42	66	87	100	116	146
		nC4	16	19	30	44	58	72	69
		Total	381	419	605	721	781	900	939
	A	C2	327	326	524	649	666	743	725
		iC4	38	43	57	74	97	119	129
		nC4	16	21	30	43	57	68	71
		Total	381	390	611	766	820	930	925
	P	C2	327	381	554	654	751	711	528
		iC4	38	42	47	77	104	121	112
		nC4	16	22	29	42	53	68	66
		Total	381	445	630	773	908	900	706

(Continued)

pH	Moulds	V F A	Days after incubation						
			0	2	4	6	8	10	14
4.5	M	C2	327	361	483	630	687	771	779
		iC4	38	43	62	88	118	130	155
		nC4	16	19	32	42	54	63	69
		Total	381	423	577	760	859	964	1,003
	A	C2	327	332	469	595	723	770	772
		iC4	38	40	45	61	72	77	112
		nC4	16	20	36	49	65	78	67
		Total	381	392	550	705	858	825	924
	P	C2	327	361	595	639	691	686	743
iC4		38	44	52	80	101	127	124	
nC4		16	24	35	61	75	90	76	
Total		381	423	682	780	867	903	934	
5.0	M	C2	327	368	499	643	771	829	857
		iC4	38	47	58	91	118	135	204
		nC4	16	23	37	57	68	81	106
		Total	381	438	594	791	957	1,045	1,167
	A	C2	327	354	455	620	696	761	762
		iC4	38	51	76	94	123	148	159
		nC4	16	23	36	42	56	63	65
		Total	381	428	597	756	875	972	986
	P	C2	327	362	521	774	779	859	872
iC4		38	45	64	78	103	134	170	
nC4		16	22	38	57	72	77	79	
Total		381	429	623	909	954	1,070	1,121	
5.5	M	C2	327	312	298	255	238	200	156
		iC4	38	67	86	161	279	360	425
		nC4	16	26	41	58	77	94	114
		Total	381	405	425	474	594	654	695
	A	C2	327	328	366	424	534	471	477
		iC4	38	39	51	64	76	82	88
		nC4	16	24	32	37	48	43	45
		Total	381	391	449	525	648	596	610
	P	C2	327	385	362	350	336	413	412
iC4		38	38	72	115	146	191	200	
nC4		16	21	36	50	69	70	84	
Total		381	444	470	515	551	674	696	
M	C2	327	349	295	234	200	179	174	
	iC4	38	54	85	286	581	828	954	
	nC4	16	20	39	65	84	110	123	
	Total	381	423	419	585	865	1,117	1,251	

(Continued)

6.0	A	C2	327	331	367	377	366	361	328
		iC4	38	39	37	41	40	46	51
		nC4	16	17	25	28	32	39	37
		Total	381	387	429	446	438	446	416
	P	C2	327	326	318	310	293	297	334
		iC4	38	37	42	43	48	54	62
		nC4	16	15	16	23	27	28	35
		Total	381	378	376	376	358	379	431
6.5	M	C2	327	296	262	189	167	149	149
		iC4	38	51	86	200	255	417	555
		nC4	16	33	59	77	118	130	145
		Total	381	380	407	466	1,006	696	849
	A	C2	327	333	351	398	370	353	327
		iC4	38	39	49	66	74	78	79
		nC4	16	17	31	53	60	42	210
		Total	381	389	431	517	504	473	616
	P	C2	327	335	318	320	342	338	307
		iC4	38	36	42	53	68	76	72
		nC4	16	18	26	40	45	42	41
		Total	381	389	386	413	455	456	420
7.0	M	C2	327	317	260	232	219	163	139
		iC4	38	37	61	109	177	201	246
		nC4	16	20	29	62	76	95	102
		Total	381	374	350	403	472	459	487
	A	C2	327	327	295	284	252	210	210
		iC4	38	38	37	42	44	53	47
		nC4	16	17	19	23	27	27	28
		Total	381	382	351	349	323	290	285
	P	C2	327	322	294	214	215	196	188
		iC4	38	35	34	31	27	31	29
		nC4	16	16	14	11	11	13	11
		Total	381	373	332	256	253	240	228

Values are means of triplicate.

M : *Mucor* sp. A : *Aspergillus* sp. P : *Penicillium* sp.

～5.5 ではほぼ接種時のレベルを保ち、6.0～7.0 では減少する結果となった。*Aspergillus* sp. および *Penicillium* sp. を接種した場合の TN 含量は両者とも同様なパターンを示し、pH4.0～4.5では接種時とほぼ同含量となり、その他の pH ではそれぞれ減少する傾向がみられた。

つぎに VBN/TN 比については第 4 図に示した通りである。*Penicillium* sp. および *Mucor* sp. を接種した場合は全体的に著しい増加を示したが、特に *Penicillium* sp. の場合は pH 7.0 における増加が顕著 (39.4%) であった。*Aspergillus* sp. の場合は 8 日目までは接種時の pH に関係なくそれぞれ増加したが、その後 pH 6.0～7.0 の範囲の場合のみ減

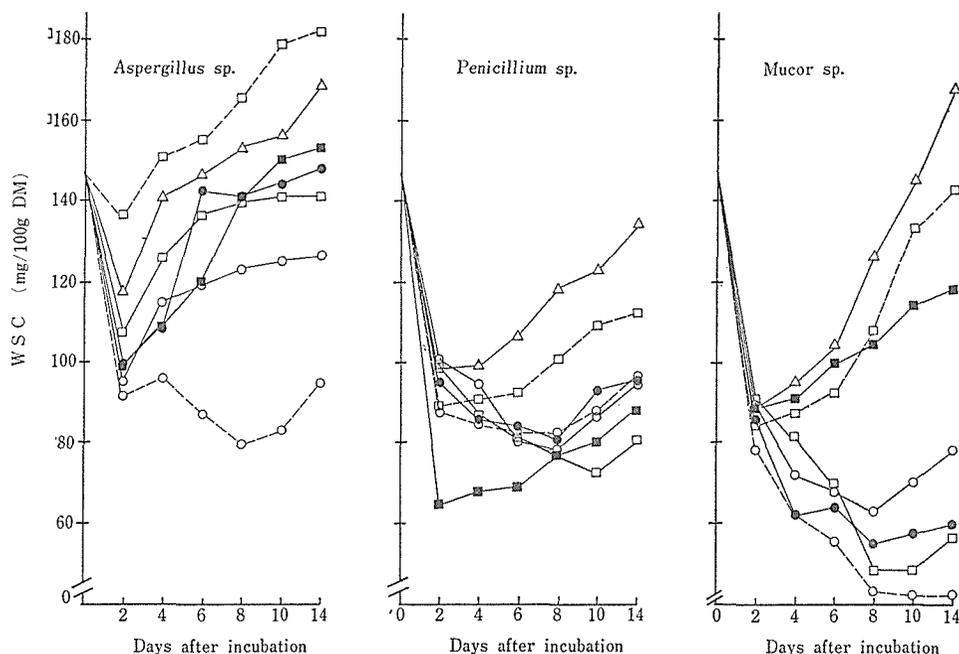


Fig. 6 Changes in WSC contents with time in the cultures with various levels of initial pH. Symbols are same as Figure 1.

少傾向を示した。

VFA 総量については第5図に示した通り、3菌株ともに接種時の pH が5.5以下では急激に増加する傾向がみられた。なお VFA の組成(第1表)についてはすべての場合に酢酸、イソ酪酸、酪酸が検出されたが、*Mucor* sp. の場合は特に接種時の pH が高く(5.5以上)なるほど、酢酸含量が経時的に減少し、イソ酪酸、酪酸含量が増加する傾向がみられた。

WSC 含量については第6図に示した。これによれば3菌株を接種したすべてのサイレージで、2日目に含量が急激に減少したが、その後の経時変化は *Aspergillus* sp. では直ちに漸減傾向を示したのに対して、*Penicillium* sp. の場合は pH が4.0~5.0では漸増傾向となり、また pH が5.0以上の場合はさらに低下してから漸増する傾向を示した。また *Mucor* sp. の場合も *Penicillium* sp. の場合と傾向は類似したが変化の程度は大きくなった。

考 察

牧草サイレージに分布する優占糸状菌として *Aspergillus* sp. および *Mucor* sp. が認められており¹⁾、また佐々木¹¹⁾は、土壌由来の糸状菌はサイレージの熟成過程でほとんど消滅し、代って *Geotrichum* sp. や *Aspergillus* sp. が多くなり *Mucor* sp., *Rizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. なども出現することを認めている。原・大山²⁾はとうもろこしサイレージで *Penicillium* sp. と *Monascus* sp. の分布を認め、また Britt and Huber¹²⁾はとうもろこしサイレージの変敗には *Geotrichum* sp. が関係し、*Aspergillus* sp.

および *Penicillium* sp. は殆んど影響をおよぼさないと述べている。なおかび臭のするとうもろこしサイレージからは *Aspergillus Fumigatus* を検出したという報告¹⁶⁾もある。

これらの報告から本実験で分離された *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. および *Mucor* sp. はとうもろこしサイレージに分布し、かつ何らかの形で変敗に関与する糸状菌であろうと考えられた。

水酸化ナトリウムで中和したサイレージは、中和後に酪酸を添加した場合に比較して変敗が早まることが認められており¹³⁾、これは好気的変敗を抑制する作用のある VFA の中和によるものであらうと云われている。本実験においては *Aspergillus* sp. と *Mucor* sp. を接種した場合、接種時の pH が 4.0~5.0 の範囲では菌株の発育の遅れが観察された。しかしこの場合 VFA 中特に酢酸含量の増加 (第 1 表) がみられたが、このことは糸状菌の持つ酵素セルラーゼ¹⁴⁾の働き (特に *Aspergillus* sp. の場合セルラーゼの至適 pH は 4.5~5.2 となっている) により増加した WSC (第 6 図) が資化された結果によることが推察された。一方、*Mucor* sp. において接種時の pH が 5.5 以上の場合、WSC が増加しなかった点についてはこの菌株の持つ酵素の特性によることが考えられる。

さらに *Mucor* sp. を接種した場合は、接種時の pH が 5.5 以上で乳酸含量が急激に減少した反面、VBN 含量が増加したことからサイレージの pH は上昇し、また VFA の組成 (第 1 表) からも明らかなように酢酸が経時的に減少して、イソ酪酸および酪酸が増加したが、これは pH が高い (5.5 以上) 場合には特に乳酸、酢酸あるいは WSC などから酪酸を産生することが伺われた。

また *Mucor* sp. を接種した pH 4.0~5.0 の場合の TN 含量は、接種 2 日目から急激に上昇した。このことについては大山・榎木¹⁵⁾も変敗の際に蛋白態窒素が増加する例があるとしているが、今回の増加は果して糸状菌の増殖による菌体蛋白質の合成によるものかどうかは明らかではない。

つぎに *Aspergillus* sp. を接種した場合の pH の経時的变化は、他の 2 菌株と全く異なる特徴を示した。すなわち乳酸の急激な減少にかかわらず pH が低下している点については、乳酸以外の不揮発性有機酸の産生が考えられ、分析の結果 *Aspergillus* sp. の液体培地におけるクエン酸産生量は、培養後 10 日目で 226mg/100ml となったのに対して、*Penicillium* sp. および *Mucor* sp. の場合はそれぞれ 55 および 3mg/100ml となりクエン酸の産生量は少なかった。このことから *Aspergillus* sp. の場合の pH の低下はクエン酸の増加によるものと考えられた。

Penicillium sp. を接種した場合は、接種時の pH が 4.0 から 7.0 の範囲でいずれも pH が上昇したが、この理由については乳酸の低下とともに VBN 比が接種時の pH に関係なく増加したためと考えられる。なお接種時の pH が 6.5 および 7.0 の場合に VBN/TN 比が増大したことは、同時に TN 含量がかなり低下したことから VBN 含量の増加によることが考えられるが、TN 含量の低下の原因は明らかではない。*Aspergillus* sp. の場合にも同様の傾向がみられた。

本実験においては *Penicillium* sp. と *Mucor* sp. を接種した場合の成分組成の変動は、その傾向がよく類似した。

以上の結果からサイレージの著しい品質低下を招く好気的変敗においては、一般に有機酸

の減少や VBN の生成などによって pH が上昇するといわれているが、このような現象に対する糸状菌の影響は菌種によってかなり異なることが予想され、今回使用した菌株の培養結果からは、*Aspergillus* sp. よりも *Penicillium* sp. および *Mucor* sp. の方がより大きな影響をおよぼすことが考察された。

要 約

サイレージの好気的変敗に対する糸状菌の影響を調査する目的で、pH の異なるサイレージエキス培地にとうもろこしサイレージより単離した糸状菌を接種した場合にみられる成分変化を調査した。供試したサイレージエキス培地はとうもろこしサイレージの抽出液とセルローズ粉末から成り、その乾物含量はとうもろこしサイレージと同じレベルの17%となるように調整した後、それぞれ大型試験管に詰めて綿栓をほどこした。なお滅菌に先立って培地の初期 pH がそれぞれ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 および 7 となるように 2.5N NaOH と HCl を用いて調整した。

とうもろこしサイレージより単離された3種類の糸状菌は *Aspergillus*, *Penicillium* および *Mucor* に帰属するものと推定された。これら3種の糸状菌は滅菌リンゲル溶液で稀釈して新鮮物 10 g 当り 10^8 台となるようにそれぞれ培地に接種し、30°C で培養した。培養後 0, 2, 4, 6, 8, 10 および 14 日後に培地の成分の変化をそれぞれ調査した。

Mucor sp. においては接種時の pH が 5.5 以上で培地の pH の著しい経時的な上昇がみられたのに対して、*Aspergillus* sp. の場合は急激な下降がみられたが、これは *Aspergillus* sp. のクエン酸産生によることが示唆された。また *Penicillium* sp. の場合はすべてにおいて pH が経時的に上昇した。乳酸含量の変化については3菌株を接種したいずれの場合も、接種時の pH に関係なく経時的に減少する傾向を示した。*Penicillium* sp. および *Mucor* sp. を接種した場合の VBN/TN 比は経時的に著しく増加したが、*Aspergillus* sp. の場合は初期 pH の高い (6.0—7.0) 場合に減少を示した。3菌株を接種した場合の VFA 総量は、接種時の pH が 5.5 以下でいずれも急激に増加する傾向がみられた。またすべての場合に酢酸、イソ酪酸および酪酸が検出された。培地の WSC 含量は3菌株を接種した直後にいずれも急激に減少したが、その後の経時的変化は菌株ならびに pH によりそれぞれ異なる傾向がみられた。

終りに、培地に使用したセルローズ粉末を提供された(株)興人研究部に対し深甚の謝意を表す。

引 用 文 献

- 1) 高島浩介, 坂本京子, 大久保薫, 小西辰雄, 弓野克吉, 日畜会報, **51**: 325-330. 1980.
- 2) 原慎一郎, 大山嘉信, 日畜会報, **50**: 288-295. 1979.
- 3) 原慎一郎, 大山嘉信, 日畜会報, **50**: 375-385. 1979.
- 4) 佐々木酉二, 佐々木博, 農化, 昭和48年度大会要旨, 187頁, 1973.
- 5) 宮路憲二, 応用菌学, 下巻, 422-444頁, 岩波書店, 東京, 1963.
- 6) BARKER, S. B. and W. H. SUMMERSON, J. Biol. Chem., **138**: 535-554. 1941.

- 7) CLARK, E.P., Semi-Micro Quantitative Organic Analysis, 42. Academic Press., N. Y., 1943.
- 8) CONWAY, E.J., Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 95. Crosby Lockwood and Son Ltd. London., 1950.
- 9) KIBE, K., Jap. J. Zootech. Sci., **38** : 141-147. 1967.
- 10) HANES, C.S., Biochem. J., **23** : 99. 1927.
- 11) 北原覚雄編, 乳酸菌の研究, 116-137頁, 東京大学出版会, 1969.
- 12) BRITT, D.G. and J.T. HUBER, J. Dairy Sci., **58** : 1666-1671. 1975.
- 13) 山下良弘, 山崎昭夫, 北農試研報, **110** : 81-95. 1975.
- 14) 西澤 一俊, 化学の領域選書8. セルラーゼ, 35-47頁, 南江堂, 東京, 1974.
- 15) 大山嘉信, 榎木茂彦, 日草誌, **17** : 176-183. 1971.
- 16) SMITH, D.F. and G.P.LYNCH, J. Dairy Sci., **56** : 828-829. 1973.

Chemical Studies with Silage Moulds in Artificial Media

Kyuei KIBE, Yasuo AZUMA and Yutaka KARASAWA

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

Summary

In order to investigate the influence of silage moulds on aerobic deterioration, the chemical changes brought about in the silage extract media with various levels of initial pH by the moulds isolated from corn silage were studied. The silage extract media consisted of silage juice plus pulp cellulose powder and the dry matter contents of the media were adjusted to about 17% which was the same level as corn silage by adding pulp cellulose powder and the media were prepared in cotton-plugged culture tubes. Moreover, initial pH values of these media were adjusted to 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 and 7 with 2.5N NaOH or HCl prior to autoclaving, respectively.

Three genera of moulds selected were *Aspergillus* sp. (*A. niger*), *Penicillium* sp. (*P. roqueforti*) and *Mucor* sp.. Each culture of the moulds was diluted with sterile Ringer's solution and introduced into the medium to give initial counts of $10^8/10g$ fresh matter for *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Mucor* sp., respectively. The cultures were incubated at 30°C and the changes in chemical composition of cultures at 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 14 days after incubation were measured, respectively.

Large increases in pH at 8 days in the cultures of *Mucor* sp. were found in the higher initial pH values (range of 5.5-7.0), whereas there was a rapid decrease in pH against the lower lactic acid content in the case of *Aspergillus* sp.. This is probably due to the production of citric acid by *Aspergillus* sp. used. In all of the cultures of *Penicillium* sp. pH values markedly increased with time. In spite of initial pH values, lactic acid contents in the cultures of three genera of moulds decreased with time. In the cultures of *Penicillium* and *Mucor* sp. the ratios of VBN/TN fairly increased with time, but in the cultures of *Aspergillus* sp. the ratios decreased in the cases of higher initial pH values (range of 6.0-7.0). Total VFA contents in the cultures of three genera of moulds remarkably increased in the case of lower initial pH values (range of 4.0-5.5). Acetic, iso-butyric and butyric acids were found in all of the cultures. The WSC contents in the cultures decreased immediately after incubation in all cases. And then, the different trends were observed on the changes in WSC contents with time among genera of the moulds and initial pH values of media.