

# サイレージより分離した嫌気性芽胞菌の代謝について

木部久衛・花井文和

信州大学農学部 家畜飼養・飼料学教室

## 緒 論

嫌氣的サイレージを劣化させる大きな要因が嫌気性芽胞菌に属するクロストリジウムであり、この菌は一般に原料牧草の表面にあって孢子から発育する<sup>1)</sup>が、サイレージ中におけるこの菌数は乳酸発酵が旺盛な場合には非常に少ない<sup>2)</sup>といわれている。しかしクロストリジウムの中にはサイレージ中の他の細菌と同じ程度に早く発育するもの<sup>3)</sup>もあり、また十分な乳酸発酵が行なわれた場合でも、条件によってはクロストリジウムによる酪酸発酵が起り、サイレージの品質低下を招く<sup>4) 5)</sup>といわれている。そこで本実験においては、サイレージ発酵において望ましくない菌群の1つである嫌気性芽胞菌の性質を調査するため、これをサイレージより分離して液体培地ならびに滅菌牧草培地に接種し、それぞれの培地内における代謝産物について調査した。

## 材料および方法

### 1 供試菌の分離

原料草としてイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* LAM) ならびにエノコログサ (*Setaria viridis* L.) を用いて劣質サイレージを調製し、それぞれについて供試菌の分離<sup>6)</sup>を行なった。すなわち開封後サイレージの適量を高温状態 (80°C) の滅菌液体培地に投入して密栓し約10分間保ち、ついで30°Cの恒温器中で活発なガス産生をみるまで放置した。なお嫌気性菌であるため培養容器 (100ml 容三角フラスコ) 内の空気相をできるだけ少なくするよう努めた。ついでガス産生ならびに不快臭の著しい上記培養液を選んで分離培養に供した。すなわち滅菌リングル溶液により適当に稀釈した試料についてそれぞれ BURRI 氏管を用いた重層培養法<sup>7)</sup>を行ない、クロストリジウム型の孢子を持つ二種の菌を分離して実験に供した。なお使用培地としてはイタリアンライグラスサイレージより分離した菌の発育に適した培地として Reinforced Clostridial Medium<sup>8)</sup> (RCM) を、またエノコログササイレージより分離した菌の場合には麦芽エキス培地 (MEM) をそれぞれ用いた (表1)。また分離用の固形培地として使用する場合にはこれらに1.5%寒天末を添加して使用した。

### 2 細菌の検査

イタリアンライグラスサイレージより分離した嫌気性芽胞菌を分離菌 (I)、エノコログササイレージより分離した嫌気性芽胞菌を分離菌 (II) とし、それぞれグラム染色を行なっ

Table 1. Composition of media

1. Reinforced Clostridial Medium (RCM)	
	(g/l)
Yeast extract	3.0
Peptone	10.0
Lab-Lemco	10.0
D-glucose	5.0
Sodium acetate	5.0
Cysteine	0.5
Soluble starch	1.0
pH*	
2. Malt Extract Medium (MEM)	
	(g/l)
Malt extract	20.0
Peptone	1.0
Sucrose	50.0

\*Adjusted to 6.0 with lactic acid.

て上記の発酵栓をほどき、30°Cにて培養を行なった。培養時間は液体培養の場合は分離菌 (I) で75時間、分離菌 (II) で47時間、滅菌牧草培地の場合は分離菌 (I) で122時間、分離菌 (II) で115時間とした。

培養後は顕微鏡にて菌の形態観察を行ない、接種菌と同一のクロストリジウム形菌であることを確認した後、培養液については3000rpm 10分間遠沈を行ない、上清液を分析時まで凍結保存した。一方培養後の滅菌牧草培地の方は、試料をブレンダーにて磨砕後、水抽出液を作り、同じく遠沈処理をして上清液を凍結保存した。

た後検鏡し、同時にカタラーゼ試験<sup>9)</sup>を実施した。また表面発育の有無を平板培養法により調査した。

### 3 本培養

本培養に先立って接種菌の調製を行なった。すなわち250ml容培養瓶に分解菌 (I) の場合はRCM, 分解菌 (II) の場合はMEMをそれぞれはぼ口もとまで入れ、滅菌後両菌の接種を行ない、Water sealによる発酵栓をほどこして30°Cでそれぞれ48時間培養した。ついで本培養では250ml容培養瓶にRCMならびにMEMをそれぞれ満たし、また300ml容三角フラスコに牧草 (イタリアンライグラス, 出穂期) を密に詰込み (詰込量約240g) 滅菌後、これにそれぞれ10mlの接種菌培養液を注入し

Table 2. GLC columns and operating conditions for ether soluble volatiles

Columns	2000 mm long, stainless, dual
Support	Celite 545 (60-80 mesh)
Substrates	(1) PEG 20M (20%) (2) PEG 4000 (20%) (3) PEG 1500 (20%)
Temperature	(1) 80-215°C (2) 100°C (3) 80°C
Programming	(1) 3°C/min (2) — (3) —
Carrier gas	N <sub>2</sub> , 50ml/min

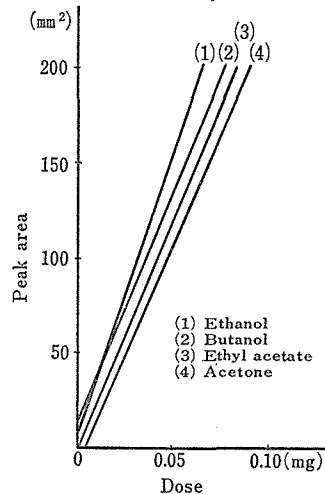


Fig. 1. Calibration curves for volatiles.

培地および培養液の pH 値はガラス電極 pH メーター，乳酸含量は BARKER & SUMMERSON 法<sup>10)</sup>，全窒素 (TN) 含量は KJELDAHL 法<sup>11)</sup>，揮発性塩基態窒素 (VBN) 含量は CONWAY の微量拡散中和法<sup>12)</sup>，揮発性脂肪酸 (VFA) 含量は水蒸気蒸溜とガスクロマトグラフィー<sup>13)</sup>，可溶性炭水化物 (WSC) 含量は HANES 法<sup>14)</sup>，揮発性成分 (主としてアルコール類) 含量は水蒸気蒸溜ならびにガスクロマトグラフィー<sup>15)</sup>によりそれぞれ分析を行なった。なお揮発性成分については表 2 に示したごとく 3 種のカラムを用いて同定を行ない，また検量線 (図 1, PEG20M 使用) によりそれぞれ定量を行なった。

なお本培養はいずれも 3 連とし，それぞれの成分分析結果については注入した接種菌培養液中の成分含量を差し引くことによって補正を行なった。

### 結果および考察

供試培地および滅菌牧草培地の組成は表 3 に示した。RCM の場合は acetate を用いているため酢酸含量が多く，さらに乳酸により pH を 6.0 に調整したため乳酸含量も幾分高かった。また全窒素もかなり多かった。これに対して MEM の方は大量の sucrose を用いたため WSC 含量が多くなった。なおイタリアンライグラスはやや高水分 (81.5%)，高蛋白質 (19.4%) であったが，有機酸がかなり含まれていたのは刈取り後滅菌処理をするまでに数時間を要したため微生物による影響が現われたのではないかと考えられる。

Table 3. Description of media and sterile herbage

	DM	pH	Organic acids (mg/l)				TN	VBN	WSC
			Lact.	Acet.	Prop.	Buty.			
	%						(mg/l)	(mg/l)	
RCM	—	5.77	103	1,967	Tra.	Tra.	2,730	68(2.4)*	6,250
MEM	—	5.23	96	112	Tra.	Tra.	160	12(7.5)	55,450
			(mg/100g DM)				(mg/100g DM)	%	
IR <sup>a)</sup>	18.5	6.40	86	680	—	12	3,110	73(2.3)	10.05

\*% of TN

<sup>a)</sup> Italian ryegrass

Tra. : Trace

分離した上記 2 種の菌はいずれも表面発育をせず，ガス産生顕著，不快臭，孢子形成，グラム陽性，カタラーゼ陰性などの諸性質よりクロストリジウムに属する菌と推定されたが同定は行なわなかった。

つぎに培養液の分析結果 (表 4) についてみると分離菌 (I) を接種した RCM ならびに分離菌 (II) を接種した MEM においては，接種前の培地にくらべていずれも pH がやや低下した。これは両者とも乳酸，酢酸が減少して酪酸が増えたことによると考えられる。特に分離菌 (I) の場合は WSC ならびに酢酸含量が著しく減少した反面，酪酸含量が顕著に増加したが，これは恐らく分離菌 (I) が RCM においては大量の糖をはじめとして酢酸ならびに乳酸の一部を資化して酪酸を産生したことが伺える。一方分離菌 (II) は MEM

Table 4. Chemical quality of microbial cultures and inoculated herbage

	No.	pH	Organic acids (mg/l)				TN	VBN	WSC	
			Lact.	Acet.	Prop.	Buty.				
Microbial cultures							(mg/l)			
	(A)	1	5.42	29	—	—	3,070	2,760	57(2.1)*	1,830
		2	5.42	40	—	—	3,270	2,700	52(1.9)	1,750
		3	5.41	44	—	—	3,380	2,690	49(1.8)	1,780
		Ave.	5.42	38	—	—	3,240	2,720	53(1.9)	1,790
	(B)	1	5.03	70	110	—	600	170	7.4(4.4)	24,040
		2	4.90	77	90	—	610	170	5.5(3.2)	23,720
		3	4.93	64	67	—	410	170	6.8(4.0)	24,080
		Ave.	4.95	70	89	—	540	170	6.6(3.9)	23,950
	Inoculated herbage			Organic acids (mg/100gDM)				(mg/100gDM)		
(C)		1	6.72	91	1,980	—	1,210	3,110	379(12.2)*	—
		2	6.84	78	2,530	0.04	1,330	3,110	402(12.9)	—
		3	6.75	98	2,250	—	1,200	3,110	380(12.2)	—
		Ave.	6.77	89	2,250	0.01	1,250	3,110	387(12.4)	—
(D)		1	7.38	398	1,180	30	1,690	3,110	303(9.7)	—
		2	7.04	428	1,010	—	1,630	3,110	289(9.3)	—
		3	7.18	396	1,290	—	1,720	3,110	271(8.7)	—
		Ave.	7.20	407	1,160	10	1,680	3,110	288(9.2)	—

\*% of TN

(A) RCM cultivated with anaerobe (I). Incubation time, 75 hrs.

(B) MEM cultivated with anaerobe (II). Incubation time, 47 hrs.

(C) Herbage cultivated with anaerobe (I). Incubation time, 122 hrs.

(D) Herbage cultivated with anaerobe (II). Incubation time, 115 hrs.

においては酪酸の産生は比較的少なく、また乳酸や酢酸の資化も極めて少なかった。

GIBSON ら<sup>2) 3)</sup>によれば、サイレージ中には *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* および *Cl. paraputrificum* などがあり、これらは乳酸をはじめとして有機酸の資化性にはかなりの特異性があるとされている。本実験における液体培地は炭水化物あるいは蛋白質に富むものを使用したため、有機酸の資化性についての比較検討はむつかしいが、今回の2種の分離菌のうち (I) の場合は大量の糖の他に乳酸および酢酸の一部を資化し、(II) の場合は糖以外には有機酸の資化は極めて少なかったものと考えられる。すなわち両者における有機酸の資化性にはかなりの相違があることが推察された。

なお分離菌 (I) および (II) を接種した滅菌牧草培地の場合の pH は原料草の pH よりもかなり上昇した。これは牧草中の窒素化合物が細菌によって資化された結果、VBN 比にも見られるごとくかなりの量の VBN が生成したことによるものと考えられる。なお液体培地の場合は充分なる WSC が存在したために窒素化合物の必要性は低かったものと考えられるが、牧草培地の場合は乾物中約10%の WSC が含まれていたにもかかわらず固形培地であることから糖の利用性に差が生じ、結果的に窒素化合物の資化がかなり進んだのではないかと推察された。しかし培養後の WSC 含量を測定していないので牧草中の WSC がどの程度利用されたかについてははっきりしない。

つぎに分離菌 (I) を接種した滅菌牧草培地の有機酸組成を接種前の組成と比較してみると、

かなりの量の酢酸および酪酸を産生したが、分離菌(II)の場合は大量の酪酸とともに乳酸および酢酸もかなりの量を産生した。このように同一の細菌であっても培地の違いによって有機酸の生成割合が異なる結果が示された。

両菌の液体培地ならびに滅菌牧草培地の揮発性成分の分析結果は表5に示した通りである。まず液体培地における分離菌(I)の場合は不明なピークを除いてブタノール、酢酸エチル、エタノール、アセトンなどが検出されたが、量的に顕著なものはなかった。しかし分離菌(II)の場合は大量のブタノールが検出された他、エタノール、酢酸エチルなども少量検出された。一方滅菌牧草培地においては両菌とも比較的少量のブタノール、エタノールを産生したにとどまった。

Table 5. Volatile components of microbial cultures and inoculated herbage

	Acetone	Ethyl		Butanol	Unknown peaks				
		acetate	Ethanol		1	2	3	4	5
					(3.8)(17.1)(26-28.8)(35.6)(42.8-43.4)				
Microbial cultures	(mg/l)								
(A)	4.0	10.1	6.9	29.3	Sp	—	Lp	—	Sp
(B)	—	0.8	8.8	414.5	—	—	Lp	—	Tra.
Inoculated herbage	(mg/100g DM)								
(C)	—	—	2.0	0.2	—	Lp	—	—	—
(D)	—	—	26.0	26.0	—	—	—	—	—

(A), (B), (C), and (D): Same as for Table 4.

Values in parentheses indicate the retention time (min.).

Lp: Large peak. Sp: Small peak.

以上の結果から同一菌種であっても、培養後の液体培地と滅菌牧草培地における有機酸組成や揮発性成分に著しい相違が現われた理由については不明であるが、クロストリジウムの場合、栄養源あるいは培養条件によって資化性や代謝性にかかなりの相違を生ずることが考えられるので、これらの点については今後さらに検討する必要があるものとする。

## 要 約

サイレージの品質を低下させる嫌気性芽胞菌の特性を調査するために、劣質サイレージより分離した2種の菌を液体培地ならびに滅菌牧草培地に接種して、それぞれの培地内における代謝産物を調査した。

2種の嫌気性芽胞菌すなわち劣質イタリアンライグラスサイレージより分離した分離菌(I)および劣質エノコログササイレージより分離した分離菌(II)は、いずれも表面発育をせず、ガス産生顕著、不快臭、孢子形成、グラム陽性、カタラーゼ陰性などの諸性質からクロストリジウムに属する菌と推察された。

分離菌(I)は液体培地において糖をはじめ酢酸や乳酸の一部を資化して大量の酪酸を産生したが、滅菌牧草培地においてはかなりの量の酢酸および酪酸を産生した。

分離菌(II)の場合は液体培地における酪酸の産生は少なかったが、ブタノールの産生量は多かった。

### 引用文献

- 1) GIBSON, T., *J. appl. Bact.* **28**: 56-62. 1965.
- 2) GIBSON, T., A. C. STIRLING, R. M. KEDDIE, and R. F. ROSENBERGER, *J. appl. Bact.* **24**: 60-70. 1961.
- 3) GIBSON, T., A. C. STIRLING, R. M. KEDDIE, and R. F. ROSENBERGER, *J. gen. Microbiol.* **19**: 112-129. 1958.
- 4) BEYNUM, J. van, and J. W. PETTE, *Versl. landbouwk. Onderz.* **40 C**: 543. 1934.
- 5) BEYNUM, J. van, and J. W. PETTE, *Zbl. Bakt.* **93**: 198. 1935.
- 6) 宮地憲二 応用菌学 下巻 243 岩波書店 東京 1963.
- 7) BURRI, R., *Cent. Bakt.* II **8**: 533. 1902.
- 8) HARRIGAN, W. F., and M. E. MCCANCE, *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. 360. Academic Press. 1976.
- 9) SIROCKIN, G., and S. CULLIMORE, *Practical Microbiology* 63-64. McGraw-Hill. London. 1969.
- 10) BARKER, S. B., and W. H. SUMMERSON, *J. Biol. Chem.* **138**: 535-554. 1941.
- 11) CLARK, E. P., *Semi-Micro Quantitative Organic Analysis* 42. Academic Press. N. Y. 1943.
- 12) CONWAY, E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error* 95. Crosby Lockwood and Son Ltd. London. 1950.
- 13) KIBE, K., *Jap. J. Zootech. Sci.* **38**: 141-147. 1967.
- 14) HANES, C. S., *Biochem. J.* **23**: 99. 1929.
- 15) KIBE, K., J. M. EWART, and P. McDONALD, *J. Sci. Fd Agric.* **28**: 355-364. 1977.

## Chemical Studies with Anaerobic Spore Formers from Silages in Artificial Media and Sterile Herbages

Kyuei KIBE and Fumikazu HANAI

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

### Summary

This experiment was carried out to study the chemical changes brought about in artificial media and sterile herbages inoculated with culture of anaerobe (I) isolated from poor Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* LAM) silage and anaerobe (II) from poor Green Bristle Grass (*Setaria viridis* L.) silage respectively.

The results obtained were as follows:

1. Both anaerobes did not grow in surface culture, produced gas and undesirable odor, formed endospores, and also were gram-positive catalase-negative rods. Therefore, it would be considered that these rods belonged to the genus *Clostridium*.
2. The pH values in microbial broth cultures of both anaerobes were slightly lower than those in media, but pH values in inoculated herbage cultures of both anaerobes were higher than in sterile herbage.
3. While anaerobe (I) produced a large amount of butyric acid in RCM cultures, they produced a fairly amount of acetic and butyric acids in sterile herbage cultures.
4. The microbial MEM cultures of anaerobe (II) contained small amounts of butyric acids, but large amount of butanol appeared in same cultures.