九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

サイレージ埋蔵後の酪酸菌芽胞数の変動と発酵品質

大場，憲子
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門家畜生産学講座家畜飼料生産利用学研究室

福寿，玲
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門家畜生産学講座家畜飼料生産利用学研究室

飛佐，学
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門家畜生産学講座家畜飼料生産利用学研究室

下條，雅敬
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門家畜生産学講座家畜飼料生産利用学研究室

他

https://doi.org/10.15017/21113

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 56 (2), pp.229-234, 2002-02. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第56巻　第2号　229-234（2002）

サイレージ埋蔵後の酪酸菌芽胞数の変動と発酵品質

大場憲子*・福寿　玲*・飛佐　学
下條雅敬・矢野保克・増田泰久
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門家畜生産学講座家畜飼料生産利用学研究室

（2001年10月31日受付，2001年11月20日受理）

Changes in the Number of Spores of Butyric Acid Bacteria in Silage and their Effect on Fermentation Quality

Noriko OHBA*, Rei FUKUJU, Manabu TOBISA,
Masataka SHIMOJO, Yasukatsu YANO and Yasuhisa MASUDA**
Laboratory of Animal Feed Science, Division of Animal Science,
Department of Animal and Marine Bioresource Science, Faculty of Agriculture,
Kyusyu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒　　言

一般に良質サイレージは，埋蔵初期の乳酸発酵によるpHの低下によって酪酸菌やその他の細菌の活動が抑制され，安定した状態を保持している（増子，1999）．発酵基質として乳酸及び糖類を消費し，さらに蛋白質を分解してアンモニアを生成する酪酸菌の増加は，サイレージ品質を劣化させる最も大きな要因である．酪酸を生成する細菌を総称して酪酸菌とよんでいるが，サイレージにみられる酪酸菌は *Clostridium* 属がほとんどである．酪酸菌は，土壌，家畜の糞あるいは堆肥由来のもので，原料草の収穫及び埋蔵過程において原料草に付着し芽胞（胞子）の状態でサイロ内に混入していると考えられている（Östling and Lindgren, 1991）．生菌（栄養細胞）の生育適温は30から40℃（大原・高野，1971），生育可能pHは4.2以上であるのに対して，芽胞はpH及び温度条件に対して強い耐性を持ち，100℃の加熱処理でも容易に死滅しない（手塚・滝井，1985）．嫌気性菌類である酪酸菌の芽胞は，サイロ内が発芽に適当な条件になると発芽し増殖を始めるとされる．

サイレージ調製において，酪酸菌芽胞が発芽して増殖を始める時期及び生菌数の変化が品質の変化に大きく関与していると考えられている．酪酸菌の生菌の培養と計数については，菌の採取から培養期間における適当な生育環境条件，特に嫌気状態の維持が困難であるとともに，芽胞状態で採取した菌が発芽して，生菌として計数されることがあるために，正確な値を得ることが難しい．そこで，サイレージ発酵過程における酪酸菌の動態は，一般的には芽胞数の測定を行って検討している．

本研究では酪酸発酵のパターンが異なる牧草サイレージの調製を行い，埋蔵初期の酪酸菌芽胞を2通りの培養方法で計数し，芽胞数の変動と発酵品質との関係について検討した．

材料及び方法

1．サイレージ材料草

九州大学附属農場で栽培した青刈りエンバク（*Avena sativa* L.，品種名：イーグル）を1996年1

* 九州大学農学部生物資源環境学科動物生産科学コース畜産学分野家畜飼料生産利用学研究室
* Laboratory of Animal Feed Science, Program of Animal Science, Course of Animal and Marine Bioresource Science, Department of Bioresource and Bioenvironment, School of Agriculture, Kyusyu University
** Corresponding author（E-mail: ymasuda@agr.kyushu-uac.jp）

月31日に刈り取り，サイレージ材料草とした．

材料草の乾物率は19.0%，新鮮物当たりの全窒素含量（ケルダール法；須藤，1967）は0.50%であった．

2．サイレージ調製方法

材料草を1～2cmに細切し，50ml容プラスチックチューブに55g（新鮮物）詰め込み20℃で貯蔵したものを対照区とした．埋蔵時に材料草新鮮物当たり1%のグルコースを添加したものをグルコース添加区，99.5%エタノールを5%添加したものをエタノール添加区及び88%ギ酸を0.5%添加したものをギ酸添加区とした．また，対照区と同様の方法で埋蔵し貯蔵温度を35℃としたものを35℃区とした．さらに，細切した材料草を乾物率が34%になるまで通風乾燥機（40℃）で予乾し45g埋蔵後，20℃で貯蔵したものを予乾区とした．

3．調査項目

埋蔵後1，3，5，7及び14日目に開封したサイレージの抽出液を調製し（森本，1971），pH測定（堀場製作所製pHメーター，F-13），揮発性塩基態窒素（水蒸気蒸留法；大山，1971，以下アンモニアまたはVBNと略），乳酸（比色法；森本，1971）及び酢酸と酪酸（ガスクロマトグラフ法；島津製作所，GC-17A）の定量を行った．

4．酪酸菌芽胞の培養及び計数方法

材料草及びサイレージの新鮮物30g（予乾区20g）に，0.3%ペプトン水225mlを加え抽出後，80℃で10分間湯煎し，生菌を殺菌したものを原液とした．この原液とこれを0.3%ペプトン水で10倍，100倍，1000倍と段階稀釈したものをサンプル液として培養に使用した（近藤・加藤，1981）．

①稀釈平板法（Dilution plate method）；サンプル液1mlをペトリ皿に入れ，培地約15mlを加え固めた．1.5%寒天溶液を重層し，固まった後，ペトリ皿を嫌気ポット（Gas Pack）内で嫌気状態にし，35℃で1週間培養後，ペトリ皿に出現したコロニーを肉眼で直接観察し，計数した．培地組成はTable 1に示した（Jonsson，1990）．

②最確値法（Most probable number method：MPN法）；稀釈頻度法ともいわれる．1つのサンプル当たり3段階以上稀釈したサンプル液をそれぞれ1mlずつ液体培地9mlの入った5本の試験管に入れ，流動パラフィンで水面をおおい，37℃・1週間の培養後，発泡の認められた試験管の数を稀釈段階ごとに数え，最確値表を用いて芽胞数を計算した．培地組成はTable 2に示した．

結　　果

サイレージの初期発酵についてpH，有機酸生成，アンモニア比率（VBN/Total-N）の推移をFigs. 1，2及び3に示し，6処理間で比較した．本実験におい

Table 1. Concentration of culture medium of reinforced clostridial agar used for estimating the number of spores using the dilution plate method.

D-glucose	0.5g
Soluble starch	0.1g
Bacto pepton	1.0g
Yeast extract	0.3g
Meat extract	0.5g
L-cysteine monohydrochloride,monohydrate	0.05g
Sodium acetate	0.3g
Sodium chloride	0.5g
Agar	1.5g
Distilled water	100ml
Neutral red	0.005%*
D-cycloserine	200ppm*
pH	7.4

*: Final concentration (Jonsson,1990)

Table 2. Concentration of liquid culture medium used for estimating the number of spores using the most probable number method.

D-glucose	1.0g
Bacto pepton	0.5g
K_2HPO_4	0.05g
KH_2PO_4	0.05g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001g
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001g
Sodium thioglycolate	0.05g
Distilled water	100ml
pH	7.0～7.2

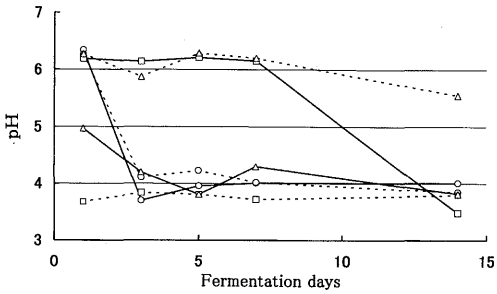

Fig. 1. Changes in pH after ensiling (-○-; Control, - -○- ; Glucose, -□- ; Ethanol, - -□-; Formic Acid, -△- ; 35℃, - -△- -; Wilting).

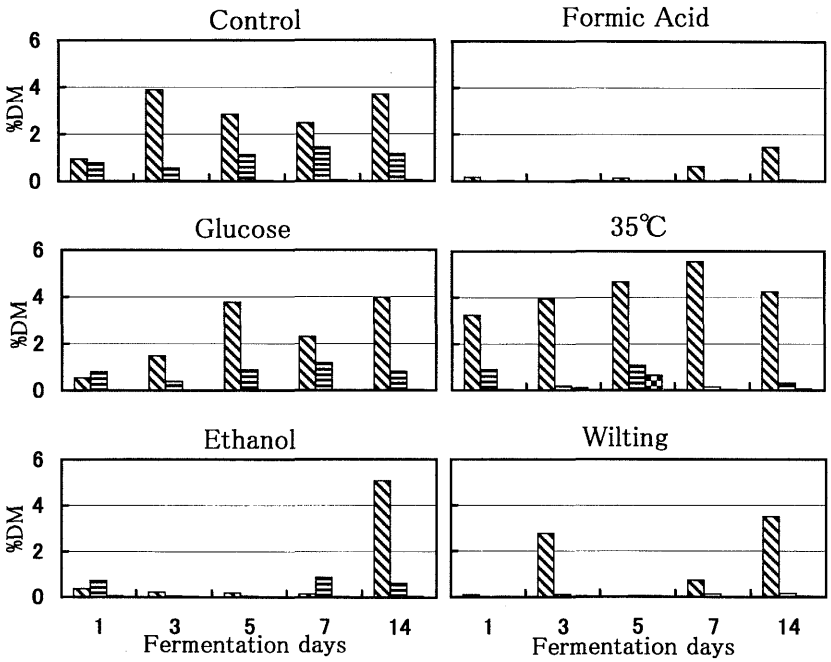

Fig. 2. Changes in the concentration of organic acids after ensiling (▧ ; Lactic Acid, ▤; Acetic Acid, ▩; Butyric Acid).

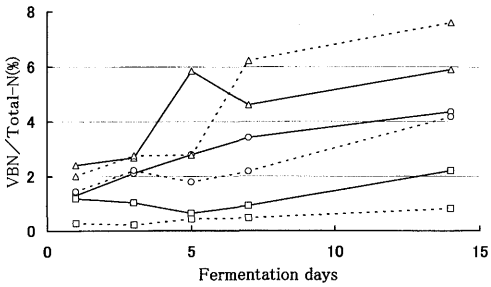

Fig. 3. Changes in volatile basic nitrogen/total- nitrogen (VBN/Total-N) after ensiling (—○— ; Control, - ○ - ; Glucose, —□— ; Ethanol, - □ - ; Formic Acid, —△— ; 35℃, - △ - · ; Wilting).

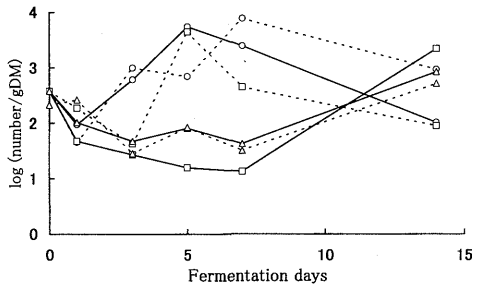

Fig. 4. Changes in the number of spores of butyric acid bacteria counted using the dilution plate method (—○— ; Control, - ○ - ; Glucose, —□— ; Ethanol, - □ - ; Formic Acid, —△—; 35℃, - -△-; Wilting).

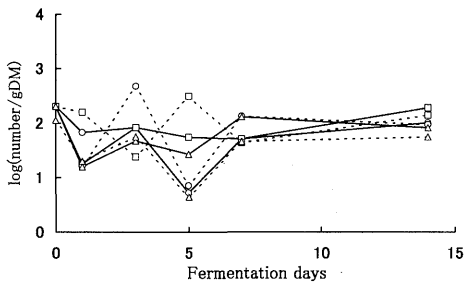

Fig. 5. Changes in the number of spores of butyric acid bacteria counted using the most probable number method (—○—; Control,- ○ - ; Glucose, —□—; Ethanol, - □ -; Formic Acid, —△— ; 35℃, - △ - ; Wilting).

て対照区では埋蔵後1日から3日目に多量の乳酸が生成され，pH は4以下になった．その後，わずかに乳酸の減少，酢酸の増加そしてアンモニアの増加がみられたが，14日目まで酪酸の生成はほとんどなく，pH も安定していた．グルコース添加区については乳酸の増加が対照区の場合と比べゆるやかであった．アンモニア及び酢酸の生成が少なく，pH は14日目まで低下を続けた．

ギ酸添加区では埋蔵直後から pH は3.7を示し，乳酸だけが5日目以降わずかに増加した．予乾区においても，酢酸及び酪酸はほとんど生成されなかったが，14日後の乳酸含量は3.5%（乾物当たり）と比較的高い値を示した．しかしながら，アンモニア比率は1日目に2%，さらに5日目から増加し，7日目以後6処理で最も高い比率となった．エタノール添加区では埋蔵後7日間は有機酸の変動は認められず，埋蔵14日目の乳酸含量は5%，pH は3.5で，アンモニアの生成はほとんどみられず最も良好な品質となった．

35℃区については，埋蔵1日目に乳酸含量3%以上で pH5.0まで低下したが，5日目には酪酸及びアンモニア含量が6処理中最も高いサイレージとなった．

稀釈平板法により計数した酪酸菌芽胞数の各処理ごとの変化を Fig. 4 に示した．芽胞数が一端減少した後大きく増加し，7日以降減少した三角型（対照区，グルコース添加区及びギ酸添加区）と，7日目までゆっくりと減少し，14日目には材料草の芽胞数よりやや高い値を示した船型（エタノール添加区，35℃区及び予乾区）の2タイプに分かれた．

最確値法による酪酸菌芽胞数の変化（Fig. 5）については，7日目までの5回の計数値には，材料草の芽胞数より低いレベルでの小さな増減が認められた．6処理すべてにおいて，7日目と14日目の芽胞数はほぼ同様で，7日目以降の酪酸菌の変動もごく小さなものと考えられた．グルコース添加区では，1日から3日目に材料草の芽胞数以上となる比較的大きな増加がみられた．

Fig. 6 において，稀釈平板法と最確値法による計数結果の比較を行った．一部の芽胞数については，両計数法において同じ値が示された．全般的には最確値法の計数値が低かったが，6処理による変動傾向はそれぞれ類似していた．

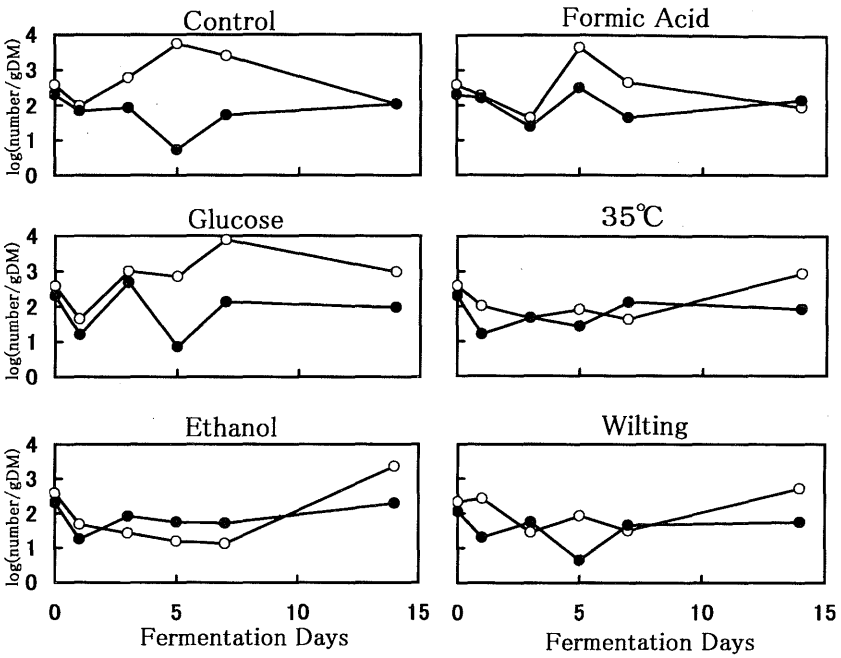

Fig. 6. Changes in the number of spores of butyric acid bacteria (—○—; Dilution plate method, —●—; Most probable number method).

考　　察

本実験では，6処理すべてのサイレージにおいて酪酸の生成量が14日まで0.1%以下，アンモニア比率は最高値が7.6%という低い範囲で推移した．このことから，酪酸菌の増殖は盛んではなかったと考えられるが，酪酸菌芽胞数の変化及び芽胞の計数法とサイレージの処理あるいは経時的な発酵品質の変化について検討した。

2つの培養方法で計数した酪酸菌芽胞数とサイレージの発酵品質の関係について回帰分析を行った結果，平板法での計数結果と発酵品質の間に相関関係が認められた．すなわち，pHと芽胞数の間には有意な負の相関（$r=-0.605$, $p<0.001$）が認められ，pHの低下は芽胞数を増加させることが示唆された．酢酸含量が増加すると芽胞数が増加する傾向にある（$r=0.342$, $p=0.064$）ことも示唆された．一方，最確値法の計数結果については，pHとの関係が最も高いことが示されたが，両者の相関関係は有意なものではなかった．

酪酸菌がpHによって影響されて，芽胞を形成すること，芽胞数の変化からpHの変化が推定されることが本実験より確認された．このことから，酪酸菌の菌数は，pHの変化，pHを変化させる乳酸あるいはアンモニアの生成などと関連があることが推察された．また，酪酸菌芽胞数の培養・計数は平板培養法が適していると思われた．

平板法による芽胞数の変動を2タイプ，三角型と船型に分けたが，pHについてみると，pHが3日目に4.2以下まで低下したかどうかで2つのタイプに分かれたのではないかと思われた．すなわち，三角型の3処理区（対照区，グルコース添加区，ギ酸添加区）はpH4.2以下まで低下した．船型の3処理区（エタノール添加区，35℃区，予乾区）については，35℃区のみ3日目にpH4.2まで低下した．35℃区では1日目にpHは5.0に低下し，5日目にはpH3.8となった．しかし，対照区及びグルコース添加区において，pHの4.2までの低下は埋蔵後1日目から3日目の間に起きた．埋蔵直後から，あるいは1日目から短期間にpHが低下することも酪酸菌芽胞の形成及び発芽に影響しているものと思われた．

要　約

サイレージ調製において，発酵品質の劣化の大きな要因である酪酸菌の増殖について基礎的な情報を得ることを目的として実験を行った．

青刈りエンバク（*Avena sativa* L.，品種名：イーグル）を材料として，グルコース，エタノール，またはギ酸の添加，材料の予乾，あるいは無添加で貯蔵温度を20℃（対照区）または35℃にしたものを調製した．埋蔵後，1，3，5，7及び14日目にサイレージを開封して発酵品質の調査及び酪酸菌の培養・計数を行った．酪酸菌は材料草及びサイレージから採取した芽胞を平板培養法あるいは最確値法によって計数して，サイレージ中の酪酸菌菌数の基本データとした．

14日目までの発酵品質は，酪酸及びアンモニアの生成がわずかで，予乾処理サイレージを除いてpHは4.0以下という良質なサイレージが調製された．各処理区において2計数法による酪酸菌芽胞の計数結果については，変動傾向はほぼ同様となったが，菌数は最確値法による計数値が低かった．発酵品質との間には，平板法の計数結果とpHに有意な負の相関関係（$r=-0.605$，$p<0.001$）があり，pHが低下すると酪酸菌芽胞数は増加することが認められた．

文　献

Jonsson, A. 1990 Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silage using neutral red, D-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *J. Dairy Sci.*, **73**: 719-725

近藤　熙・加藤邦彦　1981　土壌中の微生物計数法，土壌微生物研究会編：土壌微生物実験法，第4版．養賢堂，東京，21-25頁

増子孝義　1999　サイレージの発酵，内田仙二編：サイレージ科学の進歩．デーリィ・ジャパン社，東京，86-141頁

森本　宏　1971　サイレージの分析および品質鑑定，森本　宏編：動物栄養試験法．養賢堂，東京，412-416頁

大原久友・高野信雄　1971　放牧・乾草・サイレージ，酪農シリーズ10．明文書房，東京，111頁

大山嘉信　1971　水蒸気蒸留法，森本　宏編：動物栄養試験法．養賢堂，東京，421-422頁

Östling, C. E. and S. E. Lindgren 1991 Bacteria in manure and on manured and NPK-fertilised silage crops. *J. Sci. Food Agric.*, **55**: 579-588

須藤　浩　1967　飼料学講義．養賢堂，東京，72-77頁

手塚泰彦・滝井　進訳　1985　キャンベル：微生物生態学，第2版，基礎微生物学5．培風館，東京

Summary

In ensiling forages, the increase in the activity of butyric acid bacteria is the most effective cause to lower fermentation quality. The objective of this study was to investigate the relationship between silage fermentation quality and the number of spores of *Clostridium* counted using two different methods. Forage oat (*Avena sativa* L.) was cut and treated with either 1 % (fresh weight basis of material) glucose or 5 % ethanol or 0.5% formic acid or wilting without additives. In each treatment materials were ensiled into a laboratory silo and stored at 20℃ for 1, 3, 5, 7 or 14 days. There was one more treatment without additives or wilting, where forage oat was ensiled and stored at 35 ℃ for the same periods. Thus, there were six treatments including control. After the silos were opened the samples of silages were analyzed for fermentation quality; pH, organic acids and volatile basic nitrogen. The number of spores of *Clostridium* was counted with two methods; dilution plate method and most probable number method.

Silages showed good fermentation quality in almost all treatments with low values of pH and volatile basic nitrogen, and no butyric acid. The number of spores counted using dilution plate method showed similar changes but larger values compared to most probable number method. There was a significantly negative correlation between pH of silages and the number of spores when counted with dilution plate method ($r=-0.605$, $p<0.001$).