

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580311

研究課題名 (和文)

ホモ発酵型乳酸菌で好気的変敗を防止する試み—群集解析からのアプローチ—

研究課題名 (英文) Bacterial community analyses for the selection of homo-fermentative lactic acid bacteria with inhibitory activity against aerobic silage deterioration

研究代表者

西野 直樹 (NISHINO NAOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：50237715

研究成果の概要：

好気的変敗（発酵飼料が開封後に腐敗すること）が起こりにくい TMR サイレージ（発酵混合飼料）の細菌群集を解析して、変敗防止能をもつホモ発酵型乳酸菌の探索と作用機序の解明を試みた。培養法および PCR-DGGE による調査結果から、*L. delbrueckii*、*P. acidilactici*、*S. bovis*、*L. paracasei*、*L. plantarum* を候補細菌としてリストアップし、牧草への添加試験によって *P. acidilactici* に変敗抑制効果があることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学（畜産学・草地学）

キーワード：飼料、栄養・飼養

## 1. 研究開始当初の背景

サイレージの調製・利用においては貯蔵過程の発酵の良否が重視されるが、開封後の好気的安定性を確保することもそれに匹敵する重要性をもつ。好気的変敗は乳酸や残存糖が多いサイレージで進行しやすく、高糖材料の選択、ホモ発酵型乳酸菌製剤の利用、予乾の励行等、調製技術が進展した現代の方がその解決は困難になっている。プロピオン酸

(塩) などの薬剤が好気的変敗の防止に有効なことは明らかだが、コストおよび作業効率の問題から広く普及するには至っていない。

研究代表者らは、食品残渣を多用した TMR サイレージ（発酵 TMR）の発酵特性と品質制御に関する研究を行ってきた。その中で、TMR サイレージが開封後 2 週間以上発熱しないことを示すとともに、高レベル (>10<sup>5</sup> cfu/g) の酵母が検出されても高い好気的安定性が

認められることを報告した。酵母はサイレージを変敗させる主要因と考えられており、開封時に  $10^5$  cfu/g 以上の酵母が検出されるサイレージは変敗しやすい。TMR サイレージは酵母の増殖基質となる乳酸や残存糖も多く、その好氣的安定性を従来の知見で説明することは困難である。

ビール粕を主体とする TMR サイレージでは、しばしば微量の 1,2-プロパンジオールが検出される。研究代表者らはその原因微生物としてヘテロ発酵型乳酸菌の *Lactobacillus buchneri* を分離しており、トウモロコシやイタリアンライグラスへの添加実験から、*L. buchneri* の変敗防止能と 1,2-プロパンジオール生成能を明らかにした。*L. buchneri* は乳酸から酢酸と 1,2-プロパンジオールを生成するユニークな代謝系を有しており、増加した抗菌性の酢酸が酵母の増殖や発熱を防止する。古典的な微生物製剤にはない有用な性質と考えられるが、これまで避けるべきとされていた酢酸が多くなるので、関連研究者のなかでもまだ評価が確定していない。*L. buchneri* の変敗防止能は広く認められているが、ホモ発酵型で変敗防止能をもつ乳酸菌等が明らかになれば、すみやかに置き換えられると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、TMR サイレージの細菌群集を解析して、好氣的変敗を防止する細菌種とその作用機序を明らかにすることを目的とした。ホモ発酵型乳酸菌の組み合わせを目標としたが、栄養素の損失や飼料の健全性を損なう恐れがなければ、ヘテロ発酵型乳酸菌も候補として考えた。

## 3. 研究の方法

取り組んだ課題は、(1) TMR サイレージに見

出される細菌群集の解析、(2) ホモ発酵型乳酸菌の分離と変敗防止能の調査、(3) 実規模 TMR サイレージにおける細菌群集の解析である。(1) ではビール粕とトウフ粕を主体とする実験室規模の TMR サイレージを調査対象としたが、PCR-DGGE による群集解析から *Lactobacillus delbrueckii*、*Pediococcus acidilactici* および *Streptococcus bovis* が、培養法による解析から *L. delbrueckii*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus plantarum*、*P. acidilactici* および *S. bovis* が候補細菌としてリストアップされた。(2) ではトウモロコシとイタリアンライグラスを材料として変敗防止能を調査したが、上記のホモ発酵型乳酸菌のなかで *P. acidilactici* に変敗抑制効果があることが示された。続く(3)では国内各地から TMR サイレージを収集して実態調査を行ったが、実規模 TMR サイレージにも *L. buchneri* が見出されることや、製造工場や製造ロットによって細菌群集が変動することが示された。

*L. buchneri* ほど強力ではないものの、変敗防止能をもつホモ発酵型乳酸菌として *P. acidilactici* を提示することができた。*P. acidilactici* をサイレージ用添加剤として試験した報告は過去に数例あるが、変敗防止の可能性は調べられておらず、新たな乳酸菌製剤として今後の発展が期待できる。これまでのところ作用機序がほとんど分かっておらず、科学的な裏付けをもつ添加剤とするにはさらなる実験が必要である。研究は現在も継続しており、好氣的変敗を促進する *Pichia anomala* に対して抗真菌作用をもつことが示唆されている。研究成果の公表は今後も積極的に行い、作用機序の解明を進めて *P. acidilactici* の実用化を目指したい。

## 4. 研究成果

第一の課題では、実験室規模の TMR サイレージを調製して、貯蔵中および開封後の細菌群集の変化を調査した。食品残渣を多用する TMR サイレージはバイオマスのリサイクル技術として近年多くの研究がなされているが、特筆すべき性質として開封後の好氣的安定性が非常に高いことが挙げられる。通常の牧草サイレージは開封後 1~2 日目に変敗しはじめるが、TMR サイレージは 1 週間以上変敗しない。ビール粕やトウフ粕を主たる食品残渣とすることが多く、また給与対象を高泌乳牛とする製品が多いため、地域が異なっても TMR サイレージの栄養素組成は近似している。そのことが関係しているのかもしれないが、変敗しにくいという性質は地域に関わらず認められるようである。

ビール粕を主体とする TMR をプラスチックパウチに入れて貯蔵した。乾草材料としてアルファルファとスーダングラスを用い、発酵特性の異なる TMR サイレージの調製を試みた。酵母数はアルファルファを含むサイレージで低い傾向にあり、乳酸含量はスーダングラスを含むものが少ない傾向にあった。好氣的安定性は乾草材料と貯蔵期間の組み合わせによって変化し、短期貯蔵（2 週間）ではスーダングラスを含む TMR サイレージが開封後 5 日目に変敗した。貯蔵期間を 8 週間とするといずれの TMR サイレージも発熱しなくなり、これらの変化に対応する細菌群集の差異について検討した。

16S rDNA の V3 領域を対象として PCR-DGGE を行ったところ、TMR 材料に *L. delbrueckii* と *Lactobacillus fermentum* が認められた。これらは貯蔵中および開封後も安定して検出されており、ホモ発酵型乳酸菌の *L. delbrueckii* が第一の候補細菌として挙げられることになった。一方、*Lactobacillus buchneri* と *Lactobacillus brevis* は貯蔵中

に主要菌種となっており、TMR 材料に優勢する *L. buchneri* が貯蔵中に増殖して好氣的安定性を高めるのではないことが示された。短期貯蔵で一部の TMR サイレージが変敗したことから、*L. delbrueckii* と *L. fermentum* より *L. buchneri* と *L. brevis* が変敗防止に強く関わりと推察されたが、*L. delbrueckii* は非常に安定して検出されたため、TMR サイレージの好氣的安定性に何らかの貢献をしていることが示唆された。

続く実験では、TMR サイレージの主原料としてビール粕とトウフ粕を使用した。それまでの実験では常にビール粕を使用していたが、トウフ粕もしばしば TMR 材料となる食品残渣である。製造粕の違いによる細菌群集の変化を調べたことになるが、興味深いことに、トウフ粕を含む TMR サイレージは *L. buchneri* が検出されなくても好氣的安定性が高かった。しかも、ビール粕を含むものより乳酸優勢の発酵特性を示しており、トウフ粕を含む TMR サイレージではホモ発酵型乳酸菌が変敗防止に関わっていることが示唆された。群集解析の結果は *Weissella* sp. と *L. brevis* というヘテロ発酵型乳酸菌の関与を明らかにしたが、*S. bovis* と *P. acidilactici* も検出されたため、これらのホモ発酵型乳酸菌を候補細菌として加えることにした。

この実験では、PCR-DGGE によって群集解析を行うだけでなく、MRS 培地に生育した乳酸菌を多数釣菌して同定するという培養法に基づく群集解析も行った。*L. fermentum*、*L. delbrueckii*、*S. bovis* および *Weissella* sp. は TMR 材料から分離され、*P. acidilactici*、*L. buchneri* および *L. brevis* は TMR サイレージから分離された。PCR-DGGE の結果は *Weissella* sp. と *L. brevis* が主要菌種であることを示していたが、培養法による解析では TMR サイレージに *Weissella* sp. は検出さ

れなかった。一方、PCR-DGGE の結果と同様、トウフ粕を含む TMR サイレージに *L. buchneri* はほとんど存在しなかった。ビール粕を含む TMR サイレージには高頻度で *L. buchneri* が見出されており、培養法と非培養法による結果は似かよった部分とそうでない部分が存在した。また、上記以外の乳酸菌として *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus paracasei* および *Leuconostoc pseudomesenteroides* が分離された。

第二の課題では、トウモロコシホールクロップを用いて、分離株の変敗防止能を調査した。ポジティブコントロールとして *L. buchneri* を用い、*L. delbrueckii*、*S. bovis* および *P. acidilactici* を有望菌種として添加実験を行った。その他の分離株もすべて実験に使用し、開封後の温度変化から変敗防止能の有無を判断した。対照サイレージは開封後 2 日目に變敗し、その他のサイレージもほぼ同時期に變敗したが、*P. acidilactici* を添加したサイレージでは温度上昇が 4 日目まで遅延された。*L. buchneri* を添加したサイレージは 7 日間発熱しなかったが、*P. acidilactici* には強力ではないものの變敗抑制効果があることが明らかとなった。*L. delbrueckii* と *S. bovis* にも同様の効果が期待されたが、それらを添加したサイレージで温度上昇の遅延は見られなかった。

微生物製剤の効果を一回の実験で判断することはできないため、イタリアンライグラスとトウモロコシホールクロップを材料として添加実験を繰り返した。ここでは *P. acidilactici* と *L. brevis* を添加菌種としたが、これは前述の培養法に基づく群集解析で、トウフ粕を含む TMR サイレージに *P. acidilactici* と *L. brevis* が優勢してことが理由である。PCR-DGGE による群集解析は

*Weissella* sp. と *L. brevis* の関与を示していたが、前年の添加実験で *Weissella* sp. を単独で添加してもトウモロコシサイレージの変敗はまったく抑制されなかった。*L. brevis* も単独添加では効果を示さなかったため、*Weissella* sp. と *L. brevis* の組み合わせではなく、*P. acidilactici* と *L. brevis* を単独あるいは組み合わせで実験した。その結果、イタリアンライグラスでは *P. acidilactici* の變敗抑制効果が単独添加でも確認されたが、トウモロコシホールクロップでは *P. acidilactici* と *L. brevis* を組み合わせた場合にのみ弱い變敗抑制効果が認められた。

*P. acidilactici* の變敗防止能は *L. buchneri* ほど強力ではなく、開封後の酵母増殖をイタリアンライグラスでも抑制できていない。しかし、乳酸主体の発酵特性というホモ発酵型乳酸菌の長所は明確に示されており、開封後 7 日目でも pH と乳酸含量は開封直後とほとんど変わらなかった。*L. buchneri* の短所は酢酸含量を著しく高めることであり、そのような懸念がない *P. acidilactici* はたとえ變敗防止能が中程度であってもユーザーに受け入れられる可能性がある。トウモロコシサイレージで *P. acidilactici* の効果が再現しなかったのは説明が難しいが、*P. acidilactici* と *L. brevis* が相乗効果をもつことが示されたのは前進であった。サイレージ用微生物製剤は現在でも混合型がいくつか存在するが、それらは単に相加的な効果を期待して組み合わせられたものである。相乗効果をもつ細菌種の組み合わせは非常に多いと考えられるが、有望な組み合わせを示す情報がまったくなければ、それらを検証することは難しい。本研究は、不完全ではあるが、群集解析による細菌種の絞り込みとそれに基づいた検証試験

というアプローチの有用性を示していると考えられる。

第三の課題では、実規模 TMR サイレージを収集して細菌群集を調査した。研究代表者らのこれまでの知見は、すべて実験室規模のサイロおよび岡山県で製造された TMR サイレージの調査結果に基づいていた。ビール粕やトウモロコシはそれぞれ 1 社から生産されたものを用いており、地域や工場に起因するある種の偏りを否定できなかった。そのため、多様な地域からサンプルを収集して実態調査を行うことにしたが、この実験では同一工場から複数個のサンプルを採取して製造時期や製造ロットによる変動も調べた。その結果、実規模 TMR サイレージにも *Weissella* sp.、*L. fermentum*、*L. brevis*、*L. buchneri* といった多様なヘテロ発酵型乳酸菌が検出された。*L. buchneri* の存在が好氣的安定性に必須でないことも確認されたが、*L. delbrueckii* や *P. acidilactici* といったホモ発酵型乳酸菌は検出されなかった。また、高値の乳酸含量を示す TMR サイレージに *Weissella* sp. だけが検出されるという事例も認められた。ヘテロ発酵型乳酸菌が主体でも、乳酸優勢で高い好氣的安定性を示すサイレージが製造できる可能性もある。*Weissella* sp. に変敗防止能がないことは添加実験で明らかにしているが、他因子との相乗効果も考えられるため、これらの実験も継続している。PCR-DGGE による菌種同定も継続中であり、調査事例を増やして新しい微生物製剤の開発につなげたい。

研究成果は以上のように要約されるが、群集解析によるアプローチという点では、培養法も PCR-DGGE も同程度のメリットがあると考えられた。サイレージは閉鎖型の発酵システムであり、古典的な培養法と PCR-DGGE などの非培養法による結果が大きく異なるということは少ない。腸内細菌のように、発酵基質

や細菌が継続的に流入・流出するシステムでは違いが大きいかもしれないが、サイレージの場合はいずれかの手法が圧倒的に優れるということはなさそうである。ただし、PCR-DGGE の結果がなければ *P. acidilactici* などのホモ発酵型乳酸菌に目を向けることもなかった。非培養法のメリットはサイレージ研究でも非常に大きく、培養法と非培養法を組み合わせることで群集解析を行えば、新たな機能をもつ微生物製剤の開発を高い効率で進められると考えられる。なお、好氣的変敗は酵母をはじめとする真菌の役割が非常に大きい現象であるが、本研究では真菌の群集解析をまったく行わなかった。体制の不備がその理由であるが、精緻な制御を行うには細菌とともに真菌の動態を把握する必要がある。真菌の群集解析はサイレージ研究に欠けている分野であり、体制を整備してそれらの課題にも取り組みたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Wang, F. and Nishino, N. (2009) Association of *Lactobacillus buchneri* with aerobic stability of total mixed ration containing wet brewers grains preserved as a silage. *Animal Feed Science and Technology*, 149, 265-274. 査読有
- ② Wang, F. and Nishino, N. (2008) Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage: effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation characteristics and aerobic stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 133-140. 査読有
- ③ Wang, F. and Nishino, N. (2008) Ensiling of soybean curd residue and wet

brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 91, 2380-2387. 査読有

④ Wang, F. and Nishino, N. (2008) Effect of aerobic exposure after silo opening on feed intake and digestibility of total mixed ration silage containing wet brewers grains or soybean curd residue. *Grassland Science*, 54, 164-166. 査読有

⑤ Nishino, N. (2008) Progress in silage research in relation to animal production and food safety. In: *Multifunctional Grasslands in a Changing World (Proceedings of the 11th International Grassland Congress)*, Guangdong People's Publishing House, Beijing, pp. 639-643. 査読有

[学会発表] (計7件)

① Wang, C and Nishino, N. (2009) A survey of bacteria community structure of commercial total mixed ration silage. 15th International Silage Conference, Wisconsin. (presentation is due in July).

② Nishino, N., Wang, C., Li, Y., Suraya, P. and Kan, K (2009) Occurrence and survival in whole crop corn silage of *Acetobacter pasteurianus*. 15th International Silage Conference, Wisconsin. (presentation is due in July).

③ 王 超・西野直樹 (2009) 子牛糞便あるいは発酵飼料から分離した乳酸菌のトウモロコシサイレージにおける生残性. 日本草地学会第65回発表会. 藤沢市. 2009年3月30日

④ 韓 紅燕・李 雁氷・王 超・Suraya Parvin・西野直樹 (2009) バンカーサイロにおける微生物分布の不均一性-1年以上貯蔵

した無添加トウモロコシサイレージにおける調査事例- . 日本草地学会第65回発表会. 藤沢市. 2009年3月30日

⑤ 王 超・西野直樹 (2009) 国内で流通している発酵TMRの実態調査. 日本畜産学会第110回大会. 藤沢市. 2009年3月29日

⑥ 王 福金・西野直樹 (2008) 開封後1週間空気にさらした発酵TMRの飼料価値. 日本草地学会第64回発表会. 仙台市. 2008年3月26日

⑦ 王 福金・西野直樹 (2008) ビール粕を主体とする発酵TMRの好氣的安定性に関わる微生物. 日本畜産学会第109回大会. 水戸市. 2008年3月27日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 直樹 (NISHINO NAOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 50237715