

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380166

研究課題名（和文） アセトバクター属細菌を用いたサイレージの新しい品質マネジメント

研究課題名（英文） Evaluation of *Acetobacter* spp. as a novel inoculant to improve silage management

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（和文）：バンカーサイロで調製したトウモロコシホールクロップから *Acetobacter pasteurianus* を優勢菌として分離した。*A. pasteurianus* の存在は DGGE でも確認され、岡山だけでなく北京（中国）で行った実態調査でも *A. pasteurianus* が高頻度で検出された。分離株を用いてサイレージへの添加実験を行ったところ、*A. pasteurianus* はトウモロコシサイレージでのみ開封後の好気的変敗を遅延させた。この効果は *Bacillus* spp. の生育抑制を介したものと考えられたが、変敗抑制効果は確実なものではなく、イタリアンライグラス、ギニアグラスおよび飼料イネサイレージではまったく見られなかった。また、開封後に *A. pasteurianus* を添加すると、トウモロコシサイレージでは好気的変敗が促進した。空気が侵入しやすいバンカーサイロは *A. pasteurianus* の好適な生息場所であり、嫌気貯蔵と好気的変敗の両者において、他の細菌群集と相互作用していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：*Acetobacter pasteurianus* was isolated from bunker-made untreated corn silage as the predominant bacterium. The presence of *A. pasteurianus* was confirmed by denaturing gradient gel electrophoresis, and in other bunker-made corn silages produced in different regions including Beijing, China. Using the isolate, the effects of *A. pasteurianus* on fermentation, aerobic stability and bacterial community were determined. Addition of *A. pasteurianus* before ensiling improved aerobic stability in corn but not in grass and rice silage, whereas addition of *A. pasteurianus* after silo opening accelerated aerobic spoilage in corn silage. These results indicate that *A. pasteurianus* can inhabit bunker-made corn silage, and may show significant interactions with other bacterial species associated with anaerobic storage and aerobic deterioration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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・サイレージ・微生物

1. 研究開始当初の背景

サイレージは自給飼料の主要な貯蔵形態で

あり、栄養価や発酵特性の改善に関する研究は現在も非常に活発である。生産者の約7割が

添加剤を使用しており、微生物制御に対する意識や新規技術の普及性は非常に高い。安全性、コスト、取り扱いの簡便さ等から微生物製剤への期待は大きく、多様な調製条件でも効果が確実なものや、貯蔵性の改善だけでなく開封後の変敗防止に有効なもの等が求められている。

サイレージの微生物制御については、乳酸菌を中心にこれまで数多くの研究が行われてきた。なかでも優勢菌種と発酵特性に関する研究は多く、ホモ発酵型乳酸菌を主体とする現在の微生物製剤はそれらの知見をもとに選抜されている。サイレージ調製の基本は材料草の栄養価を高く保持することであり、ホモ発酵型乳酸菌の利用はエネルギー損失とタンパク質分解の抑制という点で絶対的に優れる。しかし、現代のサイレージは高水分の材料を細断して気密サイロに詰め込むという古典的なものではない。ロールベールは強く予乾した低水分材料を用いることが多く、十分な圧密が困難なこともあって、アルコールの生成量がしばしば有機酸のそれを上回る。バンカーサイロは細断した高あるいは中水分の材料を用いるが、サイロ上部から微量の空気が侵入しやすく、開封後は取り出し面すべてが空気に曝されるため好気的変敗が起りやすい。すなわち、現代のサイレージは貯蔵中および開封後のいずれも酵母やカビが生育しやすくなっており、それらを防止することが次代の微生物製剤には必要である。

我々は、サイレージの微生物群集を培養法および非培養法（DGGE）で解析してきた。ロールベールやバンカーサイロも調査対象としているが、2008年5月にサンプリングしたトウモロコシのバンカーサイロから、酢酸菌の *Acetobacter pasteurianus* を優勢菌として分離した。このサイレージは添加剤なしで1年以

上貯蔵されたものであったが、サイロ上層の一部では *A. pasteurianus* がほぼ単独で、下層では *A. pasteurianus* と数種の乳酸菌が共存して細菌群集を構成していた。

分離株を用いてトウモロコシサイレージへの添加試験を行ったところ、開封後の好気的変敗が1週間以上遅延することが判明した。しかも、乳酸含量は減少しておらず、サイレージ調製の基本を保持したうえで、現代のサイレージがもつ弱点を補強するという可能性が示された。本研究では、貯蔵中および開封後の真菌生育を抑制する新たな微生物製剤の開発を目的として、*A. pasteurianus* の有用性とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

A. pasteurianus は偏性好気性菌であり、エタノールを酸化して酢酸を生成する。酢酸は酵母やカビの抑制に有効な抗菌物質であるが、サイレージ中のエタノールを酢酸に変え、開封後の変敗を防止するという発想はこれまで全くなかった。一方、偏性好気性菌の *A. pasteurianus* が、嫌気貯蔵を基本とするサイレージで生育あるいは生残できるのかは不明であり、開封後に急激な増殖があれば逆に好気的変敗を促進することも考えられる。*A. pasteurianus* を用いた微生物制御はサイレージの新しい品質マネジメントとなる可能性があるが、作用機序を明らかにしなければ、実用化に足る技術とはなりえない。そのため本研究では、有効処理条件の把握とともに、変敗防止に関わる微生物因子の解明を主たる目的とした。

3. 研究の方法

取り組んだ課題は、(1)バンカーサイロにおける細菌群集の解析と分離した *A.*

pasteurianus の微生物学的特性の調査、(2) イネ科牧草（寒地型および暖地型）、トウモロコシおよび飼料イネを材料とした *A. pasteurianus* 添加サイレージの調製と作用機序の解析、(3) *A. pasteurianus* を添加したサイレージの反芻動物による嗜好性および採食量評価である。(1)では岡山、北海道および北京（中国）でトウモロコシサイレージを採取し、DGGE で細菌群集を調査するとともに、分離した *A. pasteurianus* の微生物学的特性を調べて、サイレージの品質管理における *A. pasteurianus* の意義について検討した。(2)では *A. pasteurianus* を様々な材料に添加して実験室規模のサイレージを調製し、発酵生成物、生菌数および好氣的安定性の変化を調べて、新規微生物製剤としての有用性を明らかにした。また、DGGE で細菌群集を調べるとともに、エタノールから酢酸を生成する鍵酵素 PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (*ad*) 遺伝子の発現状況についても調査した。(3)では *A. pasteurianus* を添加したバッグサイレージを調製し、嗜好性や採食量が低下しないことを確認した。当初の計画と異なり、*A. pasteurianus* の変敗防止能はイネ科牧草や飼料イネではまったく見られなかった。また、トウモロコシでも添加効果は約 50%の確率で見られるに過ぎず、*A. pasteurianus* を新規微生物製剤として利用することは難しいと判断された。一方、北京（中国）で採取したサンプルと岡山で採取したサンプルには高頻度で *A. pasteurianus* が検出され、バンカーサイロは *Acetobacter* spp. にとって好適な生息地であることが明らかとなった。イネ科牧草やロールベールサイレージに *A. pasteurianus* を認めたことはなく、草種やサイロ形式による違いがどのような要因によるのか、それらが品質管理のうえでどのような意味を持つのかについて、現

在も調査研究を続けている。

4. 研究成果

我々は、バンカーサイロで調製したトウモロコシサイレージから、MRS 培地に生育する優勢菌として *A. pasteurianus* を分離した。MRS 培地は乳酸菌 (*Lactobacilli*) の分離・培養に適した培地であり、発酵食品/飼料の生菌数測定でもよく使われる。この培地で *A. pasteurianus* が良好に生育するのであれば、サイレージの乳酸菌動態に関するこれまでのデータは、*A. pasteurianus* を含む形で得られてきた可能性がある。一方、*Acetobacter* spp. をサイレージに検出した報告はこれまでに数編存在するが、実規模サイレージの優勢菌種を同定したものは1編しかなく、明らかにされた菌種は *A. aceti* と *A. pomorum* だけである。我々の知見が例外という可能性もあり、岡山以外の地域を対象にした実態調査を行う必要があると考えた。そこで、2009年以降も岡山でバンカーサイロのサンプリングを行うとともに、北海道および北京（中国）で同様の調査を行い、*A. pasteurianus* の検出と管理技術との関連について検討した。

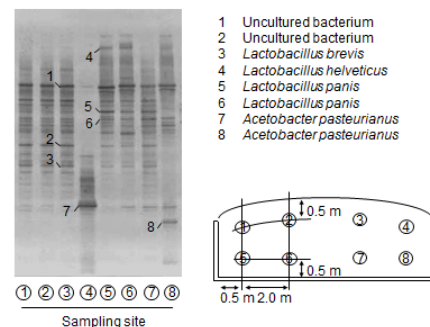


図1. *Acetobacter pasteurianus* を分離したバンカーサイロにおける細菌群集。

その結果、MRS 培地における *A. pasteurianus* の生育はEY培地（エタノールを基質とする）における生育とほとんど変わらず、嫌気条件で培養しても 10^4 cfu/g程度の生菌数が長期間維持されることが明らかとなっ

た。また、実態調査では岡山 (n=5) および北京 (n=14) のサンプルから高頻度で *A. pasteurianus* が検出され、岡山のサンプルからは複数年にわたって優勢菌として *A. pasteurianus* が分離された。北海道 (n=6) のサンプルには *A. pasteurianus* が検出されなかったが、冬期 (2月) に採取したことが影響している可能性もあり、実態調査は今後も継続する。これらの結果は岡山の知見が決して例外でないことを示しており、地域に関わらず、バンカーサイロには *A. pasteurianus* が存在することが明らかとなった。

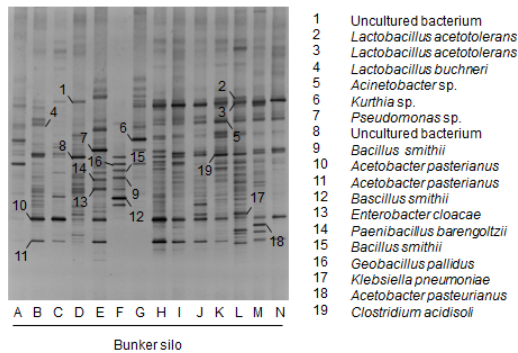


図2. 北京 (中国) 周辺の酪農家 14 件を対象としたバンカーサイロ細菌群集の実態調査。

続く実験では、*A. pasteurianus* をイタリアンライグラス、ギニアグラス、トウモロコシおよび飼料イネに添加して、実験室規模のサイレージを調製した。添加レベルは 10^5 あるいは 10^6 cfu/gとし、短期および長期間貯蔵して発酵生成物、生菌数および好氣的安定性の変化を調べた。この中で好氣的変敗の抑制効果が見られたのはトウモロコシサイレージだけであり、その効果も4回中 (年度およびトウモロコシの品種を変えて実験を行った) 2回という確実性の低いものであった。変敗抑制時でも発酵生成物の変化はほとんどなく、同目的で市販されている乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* とは異なる作用機序が示唆されたが、添加効果を安定させる処理条件を見出すことはできず、新規微生物製剤としての展開は難

しいと判断した。一方、DGGEで細菌群集を調べると、抑制効果が見られた事例では開封時および変敗試験後に *Bacillus* spp. が検出されないという特徴が認められた。*A. pasteurianus* が生残しなくても *Bacillus* spp. は消失していたことから、変敗抑制の作用機序として、同じ好氣性菌の *Bacillus* spp. を嫌気貯蔵の過程で拮抗的に抑制したことが示唆された。

A. pasteurianus を開封後に添加する実験も行った。イタリアンライグラスとトウモロコシサイレージについてのみ実験を行ったが、前者では *A. pasteurianus* による変化がなかったのに対し、後者では好氣的変敗が促進された (3回中2回)。変敗過程で *A. pasteurianus* が増菌していることも確認され、*ad* 遺伝子も明確に検出されるようになった。また、トウモロコシサイレージでは、*A. pasteurianus* を添加してなくても、好氣的変敗後にそのDNAが検出されることがあった。トウモロコシ以外で同様のことが観察されることはなく、*A. pasteurianus* の生息・生育には、明確な草種特異性が存在することが示された。なお、トウモロコシであっても、実験室規模で調製したサイレージの開封時に *A. pasteurianus* が検出されることは一度もなかった。そのため、*A. pasteurianus* はバンカーサイロで調製したトウモロコシに特徴的な細菌であり、開封後の空気侵入によってその生育が刺激されていると考えられた。サイレージ調製に関わる細菌でこれほど明確な草種特異性を示すものはなく、*A. pasteurianus* の微生物生態は今後も調査を継続して調べる予定である。

A. pasteurianus の変敗抑制効果は確実でないという判断を下したが、抑制効果が見られる時に採食量が低下しないことを確認することは重要である。*L. buchneri* による変敗抑制は草種に関わらず認められるが、乳酸を酢

酸に変えて抗真菌作用を示すことから、増加した酢酸が採食量を低下させるという懸念を示すユーザーは多い。微生物製剤の添加効果は嗜好性および採食量の査定を含めて評価されるべきであり、第3の課題として採食試験を行った。トウモロコシホールクロップを材料として15 kgサイズのバッグサイレージを調製し、反転法で選択性および自由摂取量を調査する試験を行った。この試験に用いたトウモロコシサイレージでは*A. pasteurianus*による変敗抑制効果が認められ、発酵生成物では酢酸が増加していたが、嗜好性および採食量が低下することはなかった。すなわち、添加効果が確実でないことが*A. pasteurianus*の弱点であるが、生産性の向上につながる潜在的有用性はあると考えられた。

以上のように、*A. pasteurianus*を用いた新しい品質マネジメントを、研究期間中に具体化することはできなかった。しかし、バンカーサイロの実態調査や好気的変敗に関わる微生物群集の解析を繰り返したところ、サイレージの微生物制御に関する新たな知見を多数得ることができた。培養法と非培養法を組み合わせた研究手法の有用性も高く評価され、国際学会における招待講演も研究期間中に受けることができた。*A. pasteurianus*の明確な草種特異性など、研究を継続すべき興味深い知見も多数得られている。雑誌論文として公表していない研究成果については、今後順次発表していく予定である。

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3件)

①Li, Y. and Nishino, N. 2011. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with

Enterococcus faecium, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1561-1570.

②Li, Y. and Nishino, N. 2011. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 314-321.

③Li, Y. and Nishino, N. 2011. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassland Science*, 57, 184-191.

[学会発表] (計11件)

①Nishino, N., Wang, C., Li, Y., Parvin, S. and Han, H. 2009. Occurrence and survival in whole crop corn silage of *Acetobacter pasteurianus*. Proceedings of the 15th International Silage Conference, Wisconsin, July 29th.

②Li, Y. and Nishino, N. 2009. Variations in bacterial community and survival of inoculated bacteria in bunker silos assessed by denaturing gradient gel electrophoresis profiles. Proceedings of the 15th International Silage Conference, Wisconsin, July 29th.

③西野直樹, 韓紅燕, 王超, 李雁冰, Parvin, S. 2009. バンカーサイロから分離した *Acetobacter pasteurianus* の性質とトウモロコシサイレージにおける生残性. 関西畜産学会第59回大会, 鳥取市, 8月27日.

④李雁冰, 西野直樹. 2010. イタリアンライグラスサイレージの貯蔵および好気的変敗過程における微生物フローラの変化. 日本草地

学会第66回発表会, 津市, 3月26日.

⑤韓紅燕, 西野直樹. 2010. トウモロコシサイレージの好気的変敗に対する *Acetobacter pasteurianus* の添加効果. 日本草地学会第66回発表会, 津市, 3月26日.

⑥李雁氷, 西野直樹. 2010. コントラクタが調製したトウモロコシサイレージの細菌群集. 日本畜産学会第112回大会, 千代田区, 3月29日.

⑦李雁氷, 西野直樹. 2011. イタリアンライグラスおよびギニアグラスから調製したダイレクタットおよび予乾サイレージの発酵特性と細菌フローラ. 日本草地学会第67回発表会, 宇都宮市, 3月26日.

⑧韓紅燕, 西野直樹. 2011. トウモロコシサイレージの貯蔵および好気的変敗における *Acetobacter pasteurianus* の役割. 関西畜産学会第61回大会, 岡山市, 9月13日.

⑨Han, H. and Nishino, N. 2011. Effect of inoculation of *Acetobacter pasteurianus* at ensiling and after silo opening on fermentation products, aerobic stability, and bacterial community of whole crop corn silage. Proceedings of the 2nd International Symposium on Forage Quality and Conservation, Sao Pedro, November 17th.

⑩呉白乙拉, 西野直樹. 2012. アルファルファサイレージの発酵特性と好気的安定性に関わる細菌フローラ. 日本畜産学会第114回大会, 名古屋市, 3月29日.

⑪Wu, B., Cui, Y. and Nishino, N. 2012. Ensiling fermentation, aerobic stability and bacterial community of direct-cut and wilted alfalfa silage with and without

addition of *Lactobacillus rhamnosus* and molasses. Proceedings of the 4th Japan-China-Korea Grassland Conference, Aichi, March 31th.

〔図書〕 (計2件)

①Nishino, N. 2011. Aerobic Stability and Instability of Silages Caused by Bacteria. in *Proceedings of the 2nd International Symposium on Forage Quality and Conservation* (Daniel, J. L. P., Zopollatto, M., and Nussio, L. G. eds.), pp. 127-141. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, Brazil.

②西野直樹. 2011. サイレージ発酵の原理. 最新サイレージバイブルサイレージと TMR の調製と給与ー (安宅一夫監修), pp. 16-23. 酪農大学エクステンションセンター, 江別市.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

該当なし

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし