

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580390

研究課題名(和文) 発酵TMRの好氣的安定性をサポートする乳酸菌の解明と機能性評価

研究課題名(英文) Investigation into lactic acid bacteria involving in resistance to aerobic stability of total mixed ration silage

研究代表者

西野 直樹(Nishino, Naoki)

岡山大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：50237715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品副産物を多用した発酵TMRは、乳酸優勢の発酵特性を示しながら開封後に変敗しにくいという特徴をもつ。これに関わる乳酸菌とその作用機序を明らかにし、新しいサイレージ添加剤の開発につながる知見を得ることを目的とした。自給飼料利用型発酵TMRの実規模製品を収集して細菌フローラの実態調査を行い、*Lactobacillus pontis*、*Lactobacillus fructivorans*等を候補菌として提示した。Liver Infusion Sake培地で*L. fructivorans*の分離にも成功し、小規模サイロの添加実験で変敗抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Evidence has shown that total mixed ration (TMR) silage can resist deterioration after silo opening. From culture-independent microbiota analysis of practical TMR silage, several difficult-to-culture lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus fructivorans*, were suggested to be involved. We successfully isolated *L. fructivorans* using liver infusion sake medium, and then confirmed its inhibitory activity against aerobic spoilage.

研究分野：畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌 飼料 サイレージ

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、微生物制御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、新規微生物製剤への期待およびその普及性は非常に高い。貯蔵中の栄養素損失および有害微生物の生育を抑えるというだけでは十分でなく、開封後の好気的変敗を防ぐあるいは遅延させる機能が、次世代の微生物製剤には求められている。

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。ロールペ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。微生物製剤で乳酸発酵を促進しても、乳酸資化性の酵母やカビが開封後に増殖するリスクが高まる。調製技術は格段に進歩したが、好気的変敗の解決は現代の方がむしろ困難になっている。

研究代表者らは、食品副産物を多用した発酵 TMR の貯蔵特性と品質制御に関する研究を行ってきた。その中で、発酵 TMR が開封後1週間以上発熱しないことを示すとともに、貯蔵期間を長くすると(1ヶ月程度)酵母が検出されなくなることを報告した。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。発酵 TMR が変敗しにくい理由は酵母が少ないことで説明できるかもしれないが、貯蔵中に酵母が消失する原因は不明のままである。

微量の 1,2-プロパンジオールを検出したため、その原因微生物を調べてヘテロ発酵型乳酸菌の *Lactobacillus buchneri* を分離した。その後トウモロコシやイタリアンライグラスへの添加実験を行って、分離株の変敗防止能と 1,2-プロパンジオール生成能を確認したが、*L. buchneri* や 1,2-プロパンジオールが検出されなくても、発酵 TMR は変敗しないことも判明した。サイレージ用乳酸菌製剤は数多くあるが、変敗防止に有効とされるのは、現在のところ *L. buchneri* だけである。*L. buchneri* 以外の微生物因子を同定および分離できれば、変敗防止を可能にするオプションとして、サイレージの品質管理に応用できる。

2. 研究の目的

研究代表者らの *L. buchneri* に関する知見は、ビール粕やトウフ粕を主原料とする従来型の発酵 TMR について得られたものであり、粗飼料には輸入乾草が用いられていた。近年、発酵 TMR に自給粗飼料(サイレージ)を使うことが試みられているが、研究代表者らが

平成 23 年度に行った実規模調査において、自給粗飼料利用型発酵 TMR には、ロイテリン生成に関わる酵素 glycerol dehydratase の遺伝子 (*gd*) が検出されることが明らかとなった。DGGE で調べた細菌フローラに *Lactobacillus reuteri* は存在せず、また、発酵 TMR の材料としたサイレージに *gd* は検出されていない。一方、改めて従来型の発酵 TMR を調べてみると、そちらにも *gd* が認められた。これらのことは、原因微生物は現在のところ不明であるが、発酵 TMR にロイテリンが生成して、変敗抑制作用に寄与することを示唆している。

グリセロールからロイテリン(1,3-プロピオンアルデヒド)を生成する酵素が *gd* であるが、1,3-propanediol dehydrogenase が活性化すれば、ロイテリンは 1,3-プロパンジオールに代謝される。1,3-プロパンジオールに抗菌作用は見られないため、*gd* が検出されてもそれがロイテリンの蓄積を意味するわけではない。また、グリセロールがサイレージ中にどれほど生じるかについても議論がある。しかし、発酵 TMR に 1,3-プロパンジオールを検出したことはないし、イオン排除型カラムで有機酸やアルコールを HPLC 分析すると、少量のグリセロールがしばしば認められる。そもそも、研究代表者らがロイテリンの関与および *gd* の検出に興味をもったのは、発酵生成物の分析方法を変えて、グリセロールをサイレージ中に検出したことがきっかけである。牧草類のサイレージと異なり、発酵 TMR は穀実あるいはデンプン含量が非常に高い。*L. reuteri* はサワードウ(発酵パンのスターター)にも検出されており、デンプンに富む環境が発酵 TMR の微生物フローラを特徴付けている可能性は大きい。

本研究では、発酵 TMR の好気的安定性に関わる微生物因子を明らかにするとともに、貯蔵性向上と変敗防止を達成する新しいサイレージ調製技術を提示する。*gd* ポジティブな細菌を分離してそのロイテリン生成能を調べ、サイレージ用微生物製剤としての評価および機能解析を当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *gd* ポジティブな乳酸菌の分離と機能評価
発酵 TMR の実規模製品を収集し、その細菌フローラを DGGE で調査した。収集したサンプルは自給飼料利用型が主体であり、自給飼料の細菌フローラが発酵 TMR のそれに移行するかどうかを併せて調べた。また、MRS 培地に生育する乳酸菌を約 200 株分離し、*gd* ポジティブな菌株を探索した。1 株のホモ発酵型および 1 株のヘテロ発酵型乳酸菌を得ることができ、これらの乳酸菌についてアガール拡散法およびソフトアガー重層法で抗菌活性を測定した。抗菌活性には *Bacillus pumilus*、*Pichia anomala* および *Saccharomyces exiguus* を使用したが、これらは好気的変敗に

関わる細菌および酵母である。

平成 24 年度に *gd* ポジティブな乳酸菌が得られたため、平成 25 年度に添加実験を行って貯蔵特性および好氣的安定性の変化を調査した。出穂期のイタリアンライグラス 1 番草を予乾し、カッターで 25mm に細断して、乳酸菌を 10^4 、 10^5 および 10^6 cfu/g レベルで添加した。小規模プラスチックサイロで 60 日間貯蔵し、生菌数、発酵生成物（有機酸とアルコール）および好氣的変敗の起こりやすさを比較した。

(2) *gd* ネガティブな乳酸菌の分離と機能評価

DGGE 等の非培養法で発酵 TMR の細菌フローラを調べると、培養法ではほとんど検出されない *Lactobacillus pontis*、*Lactobacillus acetotolerans*、*Lactobacillus fructivorans* 等の乳酸菌がしばしば検出される。当初の狙い通り (1) の実験で *gd* ポジティブな乳酸菌を分離したが、*gd* ネガティブであっても、これまで分離例のない乳酸菌は研究対象になると考えていた。*L. pontis* は発酵 TMR から、*L. fructivorans* は発酵 TMR と同様に好氣的変敗が起こりにくいアルファルファサイレージから分離することができた。*L. pontis* の分離は平成 26 年度に成功しており、現在までに添加実験は実施できていない。一方、*L. fructivorans* は平成 25 年度に分離できたため、平成 26 年度にイタリアンライグラスおよびトウモロコシホールクロープで添加実験を実施することができた。発酵 TMR から分離した菌株ではないが、発酵 TMR とマメ科牧草サイレージに特徴的な乳酸菌であり、本研究の一部として調査を進めた。

4. 研究成果

(1) *gd* ポジティブな乳酸菌の分離と機能評価

16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べたところ、*gd* ポジティブな 2 株は *Lactobacillus plantarum* および *Lactobacillus brevis* と同定されたが、*P. anomala* あるいは *C. krusei* に対する抗菌活性は、アガーウェル拡散法およびソフトアガー重層法のいずれでも確認できなかった。添加実験はホモ発酵型の *L. plantarum* を用いて行ったが、乳酸生成を促す効果はあるものの、 10^6 cfu/g レベルで添加しても好氣的変敗を抑える効果は認められなかった。イタリアンライグラスを材料とした添加実験は平成 26 年度も行ったが、変敗抑制効果は確認できず、*gd* ポジティブな乳酸菌をスクリーニングして新規微生物製剤とする試みは中断した。

自給飼料利用型発酵 TMR の細菌フローラを DGGE で調べる実態調査は、サイレージを乾物当り 40% 配合する発酵 TMR を対象として行った。イタリアンライグラス、ソルガム、トウモロコシホールクロープ、小麦ホールクロープ等のサイレージが TMR 材料として用

いられていたが、これらの細菌フローラが発酵 TMR のそれを規定することはなく、発酵 TMR には特有の細菌フローラが形成されると考えられた。それらの中には *Lactobacillus parafarraginis*、*L. acetotolerans*、*L. fructivorans*、*L. pontis* といったサイレージから分離されることがない乳酸菌が含まれており、これらに変敗抑制能があると考えられた。

(2) *gd* ネガティブな乳酸菌の分離と機能評価

小麦ホールクロープサイレージを用いた発酵 TMR に *L. fructivorans* が検出されたが、当初はその存在に特段の注意を払っていなかった。一方、アルファルファサイレージの変敗抑制因子を調べる実験の中で、糖蜜を添加した予乾サイレージに *L. fructivorans* が優勢菌として確認された。糖蜜の添加で変敗しにくくなるという他草種にはない特徴があり、その微生物因子として *L. fructivorans* は有力であった。発酵 TMR と共通する分離例のない乳酸菌だったので、*L. fructivorans* の分離と機能性評価が重要な課題となった。数十株調べたが、MRS 培地では *L. fructivorans* は全く分離できなかった。培地を変えて試みを行ったところ、火落ち菌分離に適した Liver Infusion Sake (LIS) 培地で *L. fructivorans* を分離することができた。

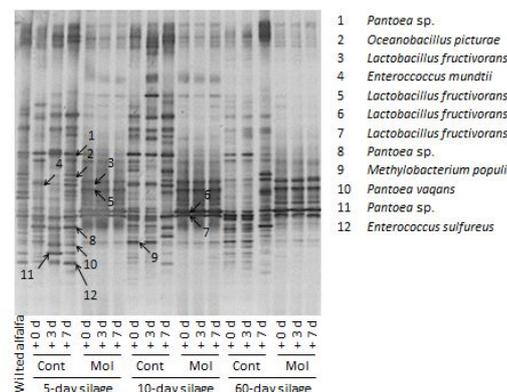


Figure 1 Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities in alfalfa with (+Mol) and without (Cont) molasses, sampled during ensiling and following exposure to air. Data for +0d, +3d, and +7d indicate samples examined at the time of silo opening and at 3 and 7 days after silo opening, respectively.

16S rRNA 遺伝子の塩基配列測定で *L. fructivorans* と *L. homohiochii* を区別することはできなかったが、メバロン酸を要求しなかったことから、分離株は *L. fructivorans* と同定した。糖類発酵性は非常に限られており、グルコースとフルクトースしか資化することができなかった。また、*gd* はネガティブであり、*P. anomala* や *C. krusei* に対する抗菌活性も認められなかった。しかし、イタリアンライグラスおよびトウモロコシホールクロープを用いて添加実験を行ったところ、強力ではないが好氣的変敗を抑制する効果が認められた。添加効果はイタリアンライグラスサイレージの方が大きく、その理由として *L.*

fructivorans の生残性がトウモロコシホールクロップよりイタリアンライグラスで大きいことが考えられた。

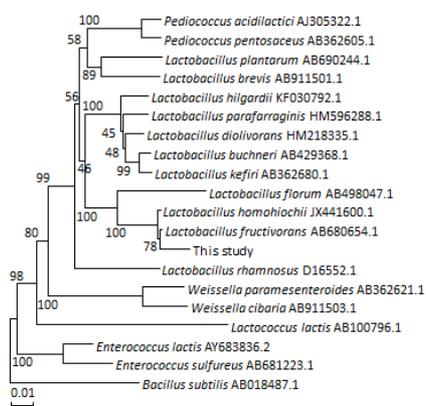


Figure 2 Phylogenetic tree showing the genetic relatedness of the *Lactobacillus* species isolated in the study. Numbers at nodes are bootstrap values based on a neighbour-joining analysis with 1000 replications. *Bacillus subtilis* is used as the outgroup.

このように、*gd* ポジティブな乳酸菌をターゲットとして本研究を開始したが、発酵 TMR からの分離には成功したものの、変敗抑制作用を確認することはできず。当初の計画通りに研究を進めることはできなかった。一方、*L. fructivorans* というサイレージから分離されたことがない乳酸菌が変敗抑制に関わっていることを明らかにすることができ、一定上の新しい知見は得られていると評価できる。非培養法で見出された乳酸菌を培養法で分離し、添加実験でその機能を評価するという流れも示すことができた。これらの実績が評価された結果、第 17 回国際サイレージ学会において「New trends in silage microbiology」というテーマで招待講演をすることも決まっている。*L. pontis* の添加実験も予定されており、発酵 TMR の好氣的安定性に関わる乳酸菌の探索研究は今後も継続して実施したい。

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 6 件)

Wu, B. and Nishino, N. (2015) Identification and isolation of *Lactobacillus fructivorans* from wilted alfalfa silage with and without molasses. *Journal of Applied Microbiology*, (accepted for publication).

Nishino, N., Ogata, Y., Han, H. and Yamamoto, Y. (2015) Identification of bacteria in total mixed ration silage produced with and without crop silage as an ingredient. *Animal Science Journal*, 86: 45-50 (査読有).

Han, H., Ogata, Y., Yamamoto, Y., Nagao, S. and Nishino, N. (2014) Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to

assess the survival of silage bacteria in the gut. *Journal of Dairy Science*, 97: 5754-5762 (査読有).

Tu T.T.M., Van, N.H. and Nishino, N. (2014) A pilot examination of the fermentation products, aerobic stability and bacterial community of total mixed ration silage produced in Vietnam. *Grassland Science*, 60: 63-68 (査読有).

Wang, C. and Nishino, N. (2013) Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 1687-1695 (査読有).

〔学会発表〕(計 10 件)

Nishino, N. (2015) New trends in silage microbiology. in “Proceedings of the 17th International Silage Conference”, Piracicaba, Brazil, 1-3 July, (invited oral presentation).

呉白乙拉・西野 直樹 (2015) アルファルフアサイレージから分離された *Lactobacillus fructivorans* の特性. 日本畜産学会第 119 回大会, 宇都宮市, 3/27-3/30.

Wu, B. and Nishino, N. (2014) Isolation of *Lactobacillus homohiochii* from aerobically stable alfalfa silage. in “Proceedings of the 5th Japan-Korea-China Grassland Conference”, Changchun, China, 20-24 August.

Tu T.T.M., Ogata, Y., Van, N.H. and Nishino, N. (2013) Total mixed ration ensiling as a means of well preservation and high aerobic stability of by-products and forages in the tropics. in “Proceedings of the 11th World Conference on Animal Production”, Beijing, China, 15-20 October.

Nishino, N. and Wang, C. (2012) Bacteria associated with ensiling fermentation and aerobic stability of total mixed ration silage. in “Proceedings of the 16th International Silage Conference”, Hameenlinna, Finland, 2-4 July (selected oral presentation).

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野直樹 (NISHINO NAOKI)

岡山大学大学院環境生命科学研究科・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