

## サイレージ発酵乳酸菌

Lactic acid bacteria isolated from silage

蔡 義民

畜産草地研究所・飼料調製研究室

### 1. はじめに

サイレージとは、乳酸菌の力を巧妙に利用して調製された家畜の貯蔵飼料であり、その発酵品質には多くの微生物が関与するが、勿論その決め手が乳酸菌である。乳酸菌は分類学的に DNA 低 G+C 含量のグラム染色陽性、カタラーゼ陰性、原則として非運動性、リジン型を中心とした細胞壁ペプチドグリカンなど、多くの共通の性質をもっている細菌の総称であるが、複雑な栄養要求性から、多くの種類のアミノ酸、ビタミン類が存在する環境でなければ増殖できない。したがって乳酸菌は動物・植物界を中心に生息し、人間とも親しい細菌といえることができる。

乳酸菌は植物と共生するが、植物体の付着機構とその役割はまだ知られていない。しかし、乳酸菌が乳酸などの有機酸やバクテリオシンを生産するため、病原性微生物から植物体を守ると考えられている。このことは損傷を受けた植物体部位において乳酸菌が優勢となり、その他菌の増殖を抑えたと報告されている(森地 1999)。飼料作物・牧草に付着する微生物菌数は草種、植物体部位、生育ステージおよびその地域性によってそれぞれ異なるが、いずれの草種においても、サイレージ発酵能力が高い乳酸菌は少ないことが認められている(蔡ら 1991a、1994)。乳酸菌のうち、サイレージ発酵に極めて重要な役割を果たす *Lactobacillus plantarum* や *Lactobacillus casei* のような乳酸桿菌等が最も少なかった。逆に、有害菌とされる大腸菌とブドウ球菌などの好気性細菌および好気的変敗の原因菌である糸状菌と酵母が高い菌数レベルで生息していた。したがって、野生乳酸菌に依存する“自然発酵”では良質サイレージを調製するための不安定要因になるとも言える (McDonald et al. 1991、蔡 2001、Ohmomo et al. 2002)。

サイレージ発酵に関与する乳酸菌は *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Lactococcus*、*Enterococcus*、*Pediococcus* および *Weissella* など多数の属に分類される(蔡 1996、1999、2001、Cai et al. 1999b、1999d、Zhang et al. 2000、Ennahar 2003)。飼料作物に付着する乳酸菌の種類、その菌数、発酵形式および生成乳酸の光学異性は、サイレージの発酵品質ばかりでなく、栄養価値や反芻家畜の生理代謝に影響を与える(蔡 2001)。また、材料草に共生する酪酸菌、好気性細菌、糸状菌および酵母などの微生物は、乳酸菌の発酵を競合的に阻害し、サイレージ品質の劣化や発酵損失を招く原因となる(大山 1971、森地 1973、森地・大山 1982、中江 1986、蔡ら 1991b、蔡・大桃 1995、蔡 2001)。したがって高品質サイレージを調製するための微生物的制御が必要であり、サイレージ乳酸菌の分離、分類及び機能解析など、有用な菌株の探索や発掘は重要である。本稿は、筆者らの研究成果を中心として、サイレージ発酵乳酸菌について取りまとめたものである。

### 2. サイレージ発酵乳酸菌の分離法

#### (1) 小規模サイレージ発酵試験法

分離用サイレージは小規模発酵試験法により調製することができる。すなわち、供試飼料作物を 10 mm 細切り、これをエチレン、ナイロンおよびビニリデンのストマッカー用積層フィルム(飛竜 KN タイプ、180×260 mm、旭化成、東京)袋内に 100 g 入れ、バキュームシーラー(SQ-202、シャープ株式会社、大阪)で脱気して密封する。これらバッグサイロを実験室内に放置し、経時的に開封して乳酸菌の菌種構成と発酵品質を調査する。

## (2) 試料の採取

野外でサンプリングする時、サイレージ試料を採取してから乳酸菌の分離操作に取りかかるまでの経過時間は短ければ短いほど、サイレージの菌叢の変化が少ないため、運送中は可能な限り、低温に保存する。試料はポリ袋で100 g無菌的に採取し、口をひねって結ぶ。試料を運搬する際、出来る限りアイスボックスやクール宅急便を利用する。

## (3) 乳酸菌の分離

サイレージ 10 gを取り出してストマッカー用ビニール袋に入れ、滅菌した生理食塩水 90 mlを加えてから激しく振とうして 10 倍希釈液とし、つぎにこの液を  $10^{-8}$ まで希釈して平板培養法で計測する。乳酸菌はGYP白亜寒天培地（小崎ら 1992），MRS寒天培地および酢酸寒天培地（山里ら 1986）などを使用して嫌気培養装置で 30℃下に 2-3 日間培養する（図 1）。これらの培地から分離した菌株はグラム染色，形態観察，カタラーゼ反応，孢子形成及び乳酸生成試験を行ってから乳酸菌数を計測する。なお，各種微生物の菌数は 3 反復で計測し，新鮮飼料 1 g当たりのコロニー形成数（cfu/g）で表示する（蔡 2001b）。

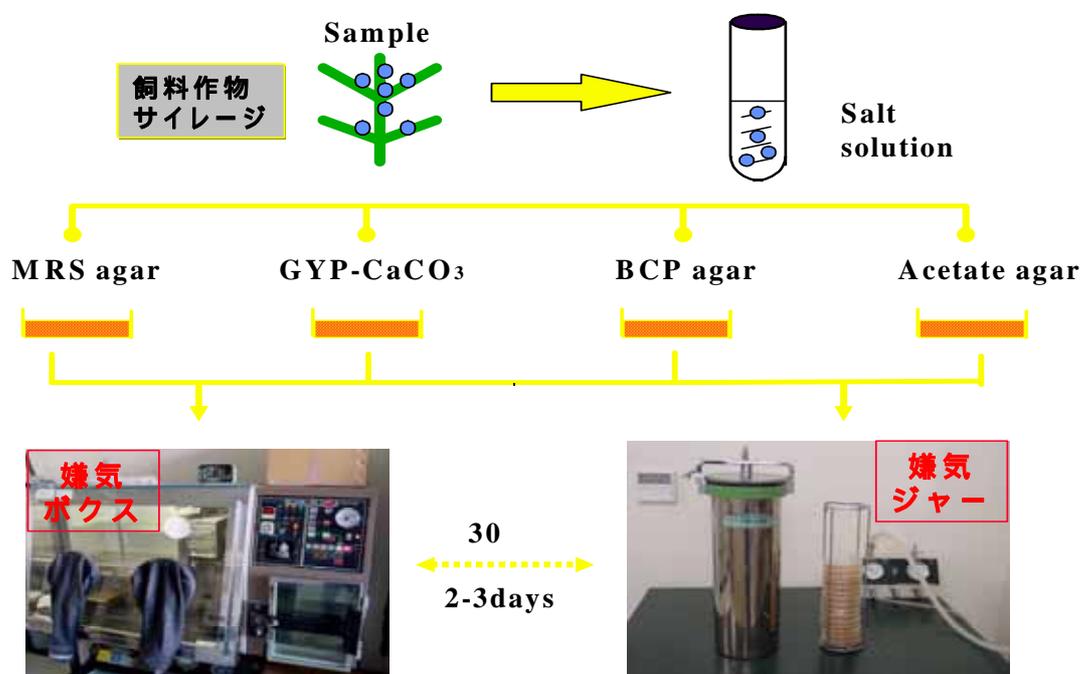


図 1 . サイレージ乳酸菌の分離法

## 3. サイレージ発酵乳酸菌の保存法

乳酸菌の保存法には、一般の微生物保存と同じように、継体培養保存法、凍結保存法および凍結乾燥保存法が用いられる。

### (1) 継体培養保存法

乳酸菌は通性嫌気微生物であることから、その継体培養は通常、MRS 寒天高層培地を使用する。乳酸菌が乳酸を生成するので、寒天培地に酸の中和剤として沈降性炭酸カルシウムを添加する場合がある。火炎滅菌した後冷した白金線の先端で乳酸菌コロニーをひっかける。その白金線を高層培地の中心部を通過させるようにして、試験管の底に到達するまで刺す。培養は接種した乳酸菌の至適温度で培養する。穿刺溝に沿った乳酸菌の生育が確認された時点で、その試験管を 5℃の冷蔵庫にいれ低温保管する。この保存状態で 2-3 か月間、生きながらえさせることができる。2-3 か月たった保存培地は、新鮮培地に接種しなおす必要がある。白金線を乳酸菌が生育している穿刺溝に刺し込み乳酸菌細胞を拾い、そのまま新鮮な高層培地に穿刺して培養・保存する。

## (2) 凍結保存法

MRS 寒天培地に生育したコロニーを滅菌棉棒で集め、10% Dimethyl sulfoxide を入れた NA 液体培地 (Bacto-Beef Extract 3 g + Bacto-Peptone 5 g/l) に懸濁し、-80 のディープフリーザーに入れて保存する。なお、凍結保存する際、乳酸菌細胞の入った培地はヌックに 0.5 ml 何本か小分けしておく。復元させるときは、凍結培地を室温程度でゆっくりと解凍させたのち、白金耳で MRS 寒天培地に塗抹して、至適温度で培養する。

## (3) 凍結乾燥保存法

乳酸菌菌体を凍結障害阻止に役立つ媒体に懸濁した後、凍結乾燥し、真空中に保たれた容器の中で保存する方法である。この方法には、冷蔵庫、真空乾燥機、アンプルチューブ、アンプル溶封器などの道具が必要である。微生物の保存、分譲、運送にはよく使われている。凍結乾燥保存方法について詳しくは小崎ら (1992) の「乳酸菌実験マニュアル」に参照したい。

## 4. 乳酸菌の同定法

乳酸菌の分類は 1985 年まで、*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconosotoc* の 4 属と提案されてきた。そして鈴木 (1996) が指摘したとおり、1986 年に Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 が出版された直後から、乳酸菌は 16S リボソーム RNA の塩基配列に基づく系統分類学的アプローチにより属レベルの分類体系の再構築が進められた (鈴木 1996)。これまで未知の乳酸菌株が分離された時、その菌株が持つ表現形質を調べ、既に記載されたどの菌種に性状が近いかを推定し、菌種名を決定してきた。しかし、自然環境から分離される菌株や非定型的な性状を示す菌株については、菌の形態と生理生化学的性状のほか、細胞壁の成分と DNA の GC 含量など、化学分類学的手法を駆使しても菌種の同定が出来ない場合がある。また、類似した特徴を持つ菌種名をいくつか選択できても、ひとつの菌種に確定することが困難な場合、分離菌株の 16S rRNA シークエンスの解析や、基準株と分離株との定量的 DNA ハイブリダイゼーションを実施し、菌種の同定および系統分類を行う必要がある (Ezaki et al.1989、平石 1997、篠田ら 2000)。

### (1) 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

微生物系統進化の研究は、微生物間で普遍的に存在し、同じ機能を持ち、そして長い進化過程で保存されてきた相同な巨大分子の配列を比較分析することによって行われる。細菌系統学的研究のマーカー分子としてもっとも適しているものは、16S rRNA 遺伝子である (Schleifer and Ludwig 1989、Woese 1987)。この分子の一次構造には、保存領域や次第に保存の程度が弱くなった領域で配列の違いが見られ、それは異なる系統発生レベル、つまり進化の種々の段階を反映している。配列の相同性の程度は、進化の過程で蓄積された塩基あるいはアミノ酸の変異の数に反映される。距離マトリックス解析や parsimony 解析によって、系統樹を構築し、菌種間の進化関係を反映することができる。

16S rRNA シークエンスに基づく分子系統の研究手順は図 2 に示す。分離株は MRS 寒天培地に植菌し、30 での培養物を供試菌体とする。N-Acetylmuramidase (生化学工業株式会社、東京) と Lysozyme (生化学工業株式会社) などの酵素処理と界面活性剤で溶菌させ、菌体からゲノム DNA を抽出する。得られたゲノム DNA を鋳形としてプライマー 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')、TaKaRa Taq™ キット (宝酒造株式会社、京都市) および GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) を使用し、PCR 法により 16S rDNA の塩基配列約 1500 bp を増幅する。PCR 産物は DNA 回収用フィルター付遠心チューブ (SUPREC™-02、宝酒造株式会社) を用いて精製する。シークエンス反応および産物の精製は BigDye Primer Cycle Sequencing Kit と GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) を使用して、Applied Biosystems プロトコールに従って行う。DNA シークエンスの解析には ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を使用する。得られた 16S rDNA の塩基配列は BLAST Homology Search (Altschul et al. 1997) を用いて DNA データバンク (GenBank/EMBL/DDBJ) に対する照合検索を行う。分離菌株と近縁基準株との分子系統樹は、CLUSTAL W プログラム (Thompson et al. 1994) を使って複数の配列間の進化距離を計算し、近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) により作成する。

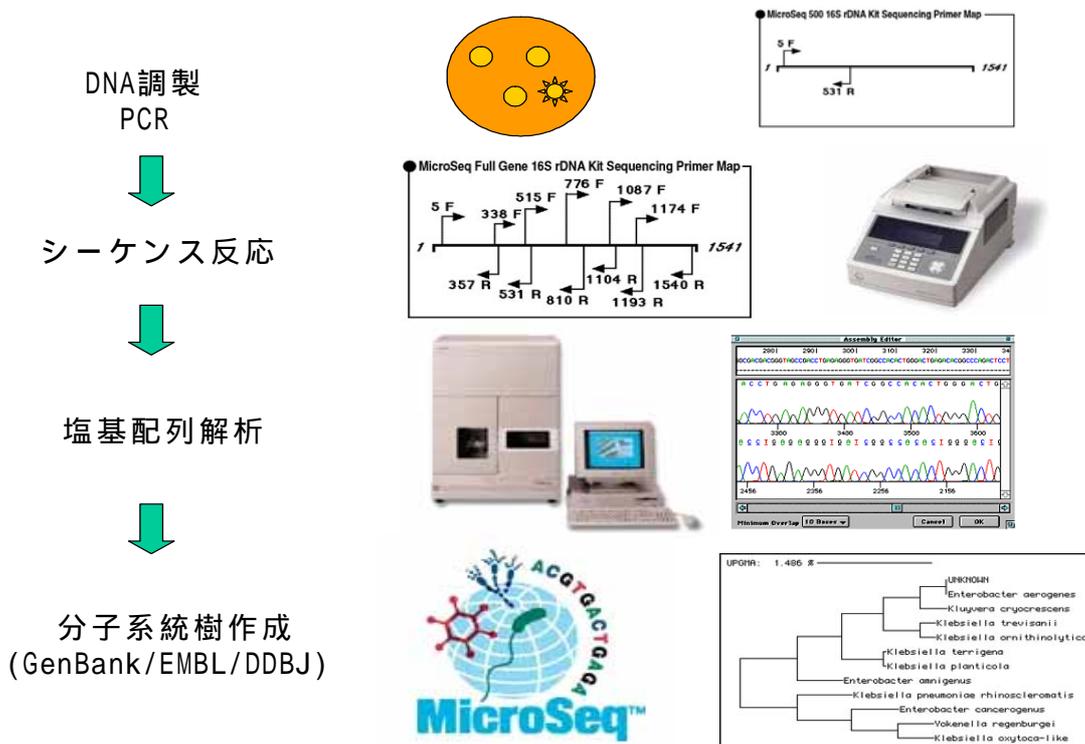


図2. 16S rRNA遺伝子の解析による微生物の同定法

## (2) DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による菌種の同定法

微生物の分類学上、独立した菌種には基準株(type strain)が存在し、菌種の分類同定は分離菌株がこの基準株にどれだけ近いかによって決定される。近年、分子生物学の手法の発達は、細菌トータル DNA の直接比較による系統関係の推定及び菌種の同定を可能とし、実際の進化過程に基づいた分類体系の確立が可能となってきた。現在、菌種間の類似性を証明するもっとも直接的な方法は、トータル DNA のホモロジーに基づく方法(ハイブリダイゼーション法)である。この分類法は Gold Standard of Taxonomy とわれ、細菌の菌種同定および系統分類に広く用いられている。国際細菌分類命名委員会は、“種 species は 70%あるいはそれ以上の DNA 相同性がある菌株を含む”という基準を定めている。一方、50%以下の相同性しか示されない菌株は独立した別の種とみなされる(図3)。

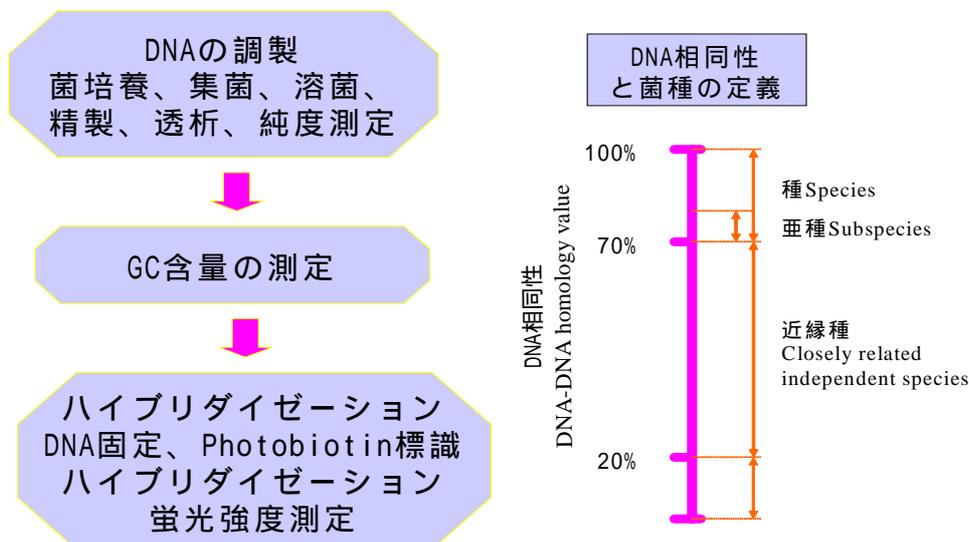


図3. DNA-DNA相同性試験法と菌種定義

DNA - DNA ハイブリダイゼーションによる菌種同定は Ezaki ら (1989)のマイクロプレート法により実施する。すなわち、MRS 液体培地で乳酸菌を培養し、12 時間後に収集した菌体から DNA を抽出・精製する。DNA の固定はまず一本鎖にした基準株の DNA をマイクロプレートに固定し、次に分離株の DNA をフォトビオチンで標識して一本鎖にしてから、マイクロプレートに分注する。一定時間の DNA ハイブリダイゼーションの後、未反応の標識 DNA を洗浄する。その後 Streptavidin-conjugated enzyme を加え、ビオチンと streptavidin とを結合させる。洗浄後、酵素の基質を加え、二本鎖になった DNA を定量し、種間の DNA 相同性を算出した。DNA-DNA 相同性試験はマイクロプレート法によって行う。すなわち、MRS 液体培地で乳酸菌を培養し、12 時間後、菌体を収集して洗浄する。収集した菌体から DNA を抽出し、精製する。DNA の固定はまず一本鎖にした基準株の DNA をマイクロプレートに固定し、そして分離株の DNA をフォトビオチンで標識し、一本鎖にしてから、マイクロプレートに分注する。一定時間の DNA ハイブリダイゼーションの後、未反応の標識 DNA を洗浄する。また、streptavidin-conjugated enzyme を加え、ビオチンと streptavidin とを結合させ、洗浄してから酵素の基質を加え、二本鎖になった DNA を定量し、種間の DNA 相同性を算出する (Ezaki ら 1989)。



乳酸菌コロニー  
(MRS寒天培地)



*Lactococcus lactis*  
subsp.*lactis*(球菌)



*Lactobacillus plantarum*  
(桿菌)

図4. 乳酸菌のコロニーと細胞形態

表1. MAFFジーンバンクが保存しているサイレージ発酵乳酸菌

MAFF番号	菌種名	分離源	採取地	採集年	同定者	寄託者	登録時株名
516027	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	飼料イネ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 1
516028	<i>Leuconostoc</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 13
516029	<i>Leuconostoc</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 29
516030	<i>Leuconostoc</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 65
516031	<i>Leuconostoc</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 100
516032	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 3
516033	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 4
516034	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 15
516035	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 30
516036	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 52
516037	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 6
516038	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 16
516039	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 67
516040	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 21
516041	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 23
516042	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 37
516043	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 44
516044	<i>Lactococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 57
516045	<i>Weissella confusa</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 5
516046	<i>Pediococcus acidilactici</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 17
516047	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 36
516048	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 39
516049	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 53
516050	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 70

表1. MAFFジーンバンクが保存しているサイレージ発酵乳酸菌(続き)

MAFF番号	菌種名	分離源	採取地	採集年	同定者	寄託者	登録時株名
516051	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 83
516052	<i>Pediococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 85
516053	<i>Lactobacillus brevis</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 66
516054	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 77
516055	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 78
516056	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 95
516057	<i>Enterococcus faecalis</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 90
516058	<i>Enterococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 92a
516059	<i>Enterococcus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 92b
516060	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 22
516061	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 40
516062	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 43
516063	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 69
516064	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 73
516065	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 81
516066	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 87
516067	<i>Lactobacillus plantarum</i>	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 7
516068	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 8
516069	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 48
516070	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 64
516071	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 68
516072	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 80
516073	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 88
516074	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 91
516075	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 94
516076	<i>Lactobacillus</i> sp.	サイレージ	栃木県大田原市	1999/11	蔡義民	蔡義民	R O 101
516077	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 1
516078	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 2
516079	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 10
516080	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 12
516081	<i>Pediococcus acidilactici</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 11
516082	<i>Pediococcus acidilactici</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 24
516083	<i>Pediococcus acidilactici</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 25
516084	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 13
516085	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 15
516086	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 17
516087	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 22
516088	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 26
516089	<i>Lactobacillus plantarum</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 28
516090	<i>Enterococcus faecalis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 16
516091	<i>Enterococcus faecalis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 30
516092	<i>Enterococcus mundtii</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 18
516093	<i>Lactobacillus sakei</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 19
516094	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 20
516095	<i>Lactobacillus brevis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 21
516096	<i>Lactobacillus brevis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 23
516097	<i>Lactobacillus brevis</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 29
516098	<i>Pediococcus acidilactici</i>	飼料作物	栃木県西那須野町	2000/6	蔡義民	蔡義民	A L 27
516099	<i>Leuconostoc citreum</i>	食品副産物	栃木県西那須野町	2000/2	蔡義民	蔡義民	N J 1
516100	<i>Leuconostoc lactis</i>	食品副産物	栃木県西那須野町	2000/2	蔡義民	蔡義民	N J 2
516101	<i>Lactobacillus casei</i>	食品副産物	栃木県西那須野町	2000/2	蔡義民	蔡義民	N J 3
516102	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	食品副産物	栃木県西那須野町	2000/9	蔡義民	蔡義民	N J 4
516103	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	食品副産物	栃木県西那須野町	2000/9	蔡義民	蔡義民	N J 5
516104	<i>Leuconostoc citreum</i>	飼料作物	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	G U 1
516105	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	飼料作物	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	G U 2

表1. MAFFジーンバンクが保存しているサイレーシ発酵乳酸菌 (続き)

516106	<i>Enterococcus gallinarum</i>	飼料作物	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU3
516107	<i>Leuconostoc citreum</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU4
516108	<i>Lactobacillus plantarum</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU5
516109	<i>Leuconostoc citreum</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU6
516110	<i>Weissella paramensenteroides</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU7
516111	<i>Pediococcus acidilactici</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU9
516112	<i>Leuconostoc citreum</i>	サイレーシ	熊本県西合志町	2000/9	蔡義民	蔡義民	GU10
516113	<i>Lactobacillus casei</i>	トウモロコシ	栃木県西那須野町	2001/9	蔡義民	蔡義民	CO70
516114	<i>Lactobacillus casei</i>	トウモロコシ	栃木県西那須野町	2001/9	蔡義民	蔡義民	CO71
516115	<i>Lactobacillus casei</i>	トウモロコシ	栃木県西那須野町	2001/9	蔡義民	蔡義民	CO73
516116	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	トウモロコシ	栃木県西那須野町	2001/9	蔡義民	蔡義民	CO74

表2. 飼料イネから分離された乳酸菌の性状<sup>a</sup>

	Groups									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Number of strains	14	21	4	18	11	32	39	4	11	7
Representative strain	RO6	RO3	RO95	RO17	RO90	RO1	RO7	RO5	RO66	RO97
Shape	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Rods	Rods	Rods	Rods
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation type	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Homo	Hetero	Hetero	Hetero
Catalase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
α Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
α Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
N acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Arbutine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Saccharose	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Starch	w	w	-	-	w	-	-	-	-	-
Glycogene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β Gentiobiose	+	+	+	w	+	+	+	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	w	w	w	-	+	+	+	w	w	w
2 ceto-gluconate	-	-	w	-	-	w	-	-	-	-

<sup>a</sup>

+, positive; -, negative; w, weakly positive; Homo, homofermentative; Hetero, heterofermentative.

## 5. MAFF ジーンバンクが保存しているサイレージ発酵乳酸菌の特性

MRS (Difco) 等の寒天培地を用いて飼料作物やサイレージなどから多種多様な乳酸菌を分離した(図4、表1)。これら乳酸菌の生理・生化学性状試験、16S rRNA 遺伝子シーケンスの解析とDNA-DNA 相同性試験により、菌種の同定を行った。同定結果の一部は表2に示したように、それら分離株の表現形質から10菌群(A-J group)に分けられた。分離菌株はすべてグラム陽性、タカラゼ陰性で多量の乳酸を生成する乳酸菌であった。RO3、RO6、RO95、RO17およびRO90菌株はグルコースからガスを産生しないホモ発酵型で、主にL(+)乳酸異性体を生産する乳酸球菌であったが、RO1とRO5菌株はグルコースからガスを産生するヘテロ発酵型で、主にD(-)型乳酸異性体を生成する乳酸球菌であった。一方、RO7菌株はホモ発酵型で、DL型乳酸異性体を生成する乳酸桿菌であったが、RO66とRO97はヘテロ発酵型でDL型乳酸異性体を生成する乳酸菌であった。各菌群の代表株について全領域の16S rRNA シーケンスを決定し、他菌種の分子系統位置と比較したところ、これら菌群の代表株ではRO1が *Leuconostoc* 属、RO3とRO6が *Lactococcus* 属、RO17とRO95が *Pediococcus* 属、RO90が *Enterococcus* 属、RO7、RO66とRO97が *Lactobacillus* 属、RO5が *Weissella* 属のクラスターにあった(図5、図6)。

分離菌株のDNAG+C含量とDNA-DNA 相同性は表3に示した。これら分離菌株のDNA G+C含量は36.9-48.5%の範囲であった。DNA-DNA 相同性試験の結果、これらの分離株はそれぞれの基準株との間に85%以上のDNA-DNA 相同性を示した。このため、RO1は *Leuconostoc pseudomesenteroides*, RO3とRO6は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, RO17は *Pediococcus pentosaceus*, RO95は *Pediococcus pentosaceus*, RO90は *Enterococcus faecalis*, RO7は *Lactobacillus plantarum*, RO66とRO97は *Lactobacillus brevis*, RO5は *Weissella kimchii* とそれぞれ同定された。これらの菌の生理的性質およびサイレージの調製適性試験を行い、発酵品質を評価した。乳酸菌のうち、*Leuconostoc* 属と *Weissella* 属の菌株は、ヘテロ発酵型および主にD(-)乳酸を生成する球菌であったため、添加サイレージのD(-)乳酸生成比率、ガス生成量および乾物損失率を増大させた(Cai et al. 1998)。一方、*Pediococcus acidilactici* と *Lactobacillus plantarum* は耐酸性が強く、低pH条件下でよく生育し、MRS液体培地で培養した場合、多量の乳酸を生成し、培養液の最終pHを3.6まで低下させた。両菌株の添加によって、サイレージ発酵初期に旺盛に増殖し、好気性細菌および酪酸菌の増殖を抑えた。また添加サイレージはpH値、酪酸およびアンモニア態窒素含量が低く、乳酸含量が高く、かつガス生成量と乾物損失率が減少し、高品質であった。とくに *Pediococcus acidilactici* は50℃まで生育できるため、高温(48℃)条件下で貯蔵したサイレージでは、市販乳酸菌に比べてより高品質で調製された(Cai et al. 1999c、蔡2001a、2002)。このように、飼料作物には多種多様な乳酸菌が分布しており、その中には優れた機能を示す菌株が存在していた。これらの結果は、乳酸菌の分類とサイレージの発酵機能の探索について興味深い示唆を与えている。

乳酸菌は有史以来、今日まで人類に多大な恩恵を与え続けている安全性の高い菌群である(森地1999、富田2000)。近年、動物腸管に定着した乳酸菌によるプロバイオティクス効果が取り上げられ、乳酸菌による動物の整腸効果および家畜生産性向上への応用について注目を浴びている(Tannock 1999)。畜産の分野でも先端的な視点から乳酸菌の役割を見つめることにより、未知乳酸菌の探索や潜在している機能の発掘が期待されている。

表3. 分離菌株のDNAG+C含量および分離菌株と基準株間のDNA-DNA相同性

Characteristic	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RO6	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RO3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> RO95	<i>Pediococcus acidilactici</i> RO17	<i>Enterococcus faecalis</i> RO90
DNAG+C含量(%)	38.0	36.9	39.3	44.4	39.2
分離株と基準株間のDNA-DNA相同性(%)	95.5	88.6	85.5	98.2	85.0
Characteristic	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> RO1	<i>Lactobacillus plantarum</i> RO7	<i>Weissella confusa</i> RO5	<i>Lactobacillus brevis</i> RO66	<i>Lactobacillus brevis</i> RO97
DNAG+C含量(%)	40.8	45.5	48.5	48.0	46.1
分離株と基準株間のDNA-DNA相同性(%)	90.5	81.6	93.8	87.7	85.9



図5. サイレージから分離された*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*属菌種と関連乳酸菌の16S rRNA分子系統樹 (Knucで求めた進化距離をNJ法で作成)

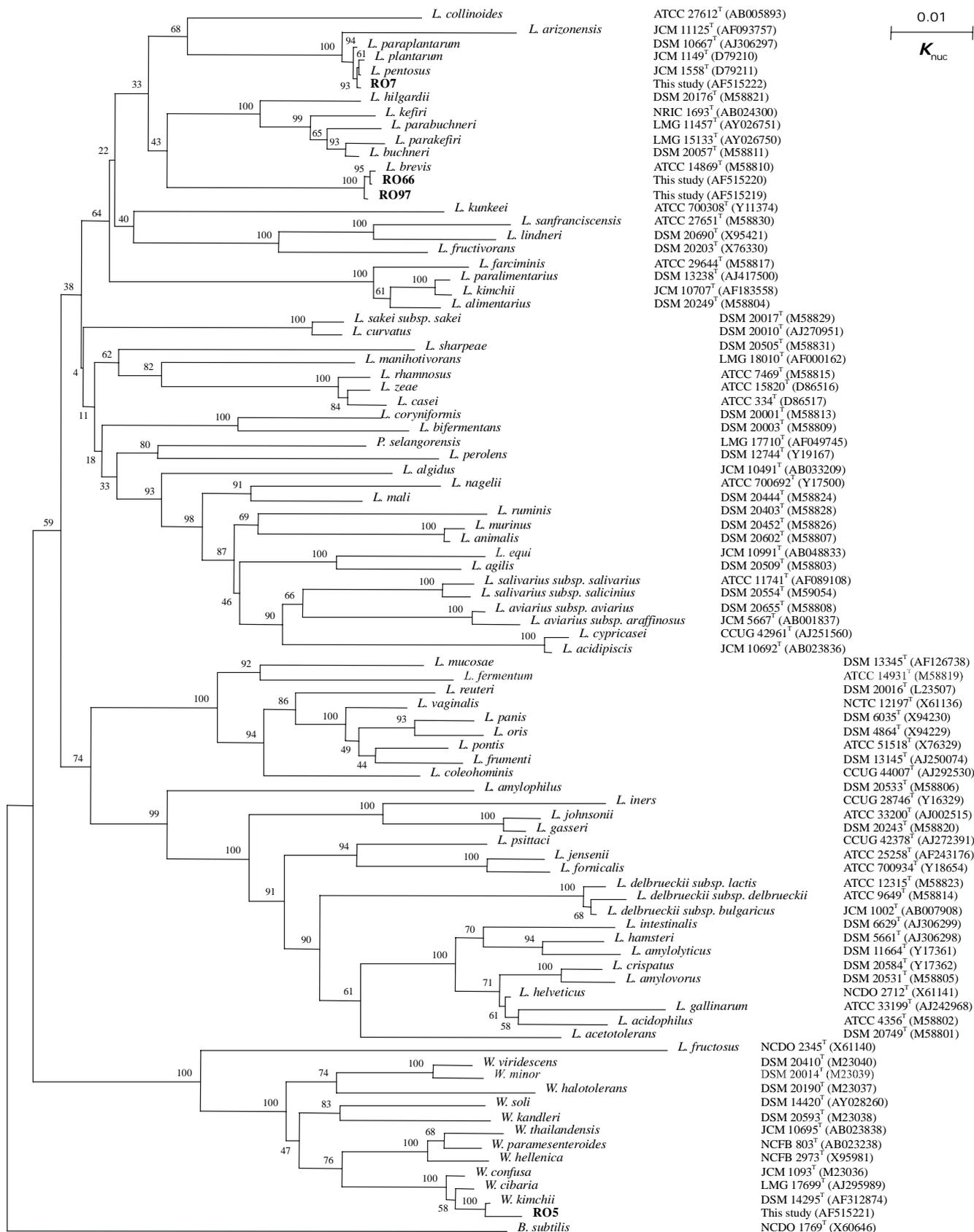


図6. サイレージから分離された*Lactobacillus*属と*Weissella*属菌種と関連乳酸菌の16S rRNA分子系統樹 (K<sub>nuc</sub>で求めた進化距離をNJ法で作成)

## 6. 引用文献

- Altschul, S.F., T.F. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- 蔡義民 (1996) サイレージ乳酸菌の分類と生態 (理研シンポジウム). 乳酸菌の分類と生態. 和光. pp. 29-32.
- Cai, Y. (1999) Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 82: 2466-2471.
- 蔡義民 (2001a) サイレージ乳酸菌の役割と高品質化調製. 日本草地学会誌 47: 527-533.
- 蔡義民 (2001b) サイレージの分析法. 改訂粗飼料の品質評価ガイドブック (自給飼料品質評価研究会編). 日本草地種子協会. 東京. pp. 25-35.
- 蔡義民 (2002) サイレージ発酵の微生物的制御. 土と微生物 56: 75-83.
- Cai, Y. and S. Kumai (1994) The proportion of lactate isomers in farm silage and the influence of inoculation with lactic acid bacteria on the proportion of L-lactate in silage. *Jan. J. Zootech. I Sci.* 65: 14-21.
- Cai Y., H. Okada, H. Mori, Y. Benno and T. Nakase. (1999a) *Lactobacillus paraalimentarius* sp. nov. isolated from sourdough. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1451-1455.
- 蔡 義民・熊井清雄・福見良平 (1991a) 標高と季節の差異が飼料作物・牧草に付着する微生物、とくに乳酸菌数に及ぼす影響. 日草誌 37: 247-253.
- 蔡 義民・熊井清雄・福見良平 (1991b) 乳酸菌添加が各種サイレージの乾物回収率、乳酸異性体産生比率および飼料価値に及ぼす影響. 日草誌 37: 428-434.
- 蔡 義民・大桃定洋 (1995) 乳酸菌とセルラーゼ添加がサイレージ発酵過程における微生物相、ガス生成量及び乾物損失率に及ぼす影響. 日畜会報 66: 941-948.
- 蔡 義民・大桃定洋・熊井清雄 (1994) 飼料作物に付着する乳酸菌の分布とその乳酸発酵特性. 日草誌 39: 420-428.
- Cai, Y., S. Kumai, J. Zhang and Y. Benno (1999b) Comparative studies of lactobacilli and enterococci associated with forage crops as silage inoculants. *Anim. Sci. J.* 70: 188-194.
- Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, Y. Benno and T. Nakase (1999c) Characterization and Identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2901-2906.
- Cai, Y., Y. Benno, M. Ogawa and S. Kumai (1999d) Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *J. Dairy Sci.* 82: 520-526.
- Cai, Y., Y. Benno, M. Ogawa, S. Ohmomo, S. Kumai and T. Nakase (1998) Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2982-2987.
- Ennahar, S., Y. Cai and Y. Fujita (2003) Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 444-451.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto and E. Yabuuchi (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacteria strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 224-229.
- 平石明 (1997) PCR を利用した 16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究-追補版-, 日本微生物生態学会報 12: 19-26.
- McDonald P., N. Henderson and S. Heron (1991) *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications. Berkshire. pp.11-162.
- 森地敏樹 (1973) 畜産における乳酸菌. 日畜会報 44: 535-553.
- 森地敏樹 (1999) 乳酸菌利用技術の発達と今後の展望. 乳酸菌学会誌 9: 69-81.
- 森地敏樹・大山嘉信 (1982) サイレージにおける微生物の動態. 土と微生物 24: 7-15.
- 中江利孝 (1986) 畜産における乳酸菌の利用: 最近の動向. 日畜会報 57: 279-287.

- Ohmomo, S., O. Tanaka, H. Kitamoto and Y. Cai (2002) Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly* 36: 59-71.
- 小崎道雄・内村泰・岡田早苗 (1992) 乳酸菌実験マニュアル. 朝倉書店. 東京. pp. 34-64.
- 大山嘉信 (1971) サイレージ発酵に関連する諸問題. 日畜会報 42: 301-317.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schleifer, K.H. and W. Ludwig (1989) Phylogenetic relationships among bacteria. In: The Hierarchy of life. Fernholm B, Bremer K, Jprnwall (Eds.), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. pp. 103-117.
- 篠田吉史・加藤暢夫・森田直樹 (2000) 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類法. 島津評論 57: 121-132.
- 鈴木健一郎 (1996) 乳酸菌の分類体系と分子系統 (乳酸菌研究集談会編). 乳酸菌の科学と技術. 学会出版センター. pp. 24-26.
- Tannock, G.W. (1999) Probiotics -A Critical Review. Horizon Scientific Press, Norfolk, pp.1-4.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
- 富田房男 (2000) 乳酸菌のニューバイオテクノロジー : 乳酸菌研究の動向. *HEALTH DIGEST* 15: 1-8.
- Woese C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-222.
- 山里一英・宇田川俊一・児玉徹・森地敏樹 (1986) 微生物の分離法. R and D プランニング. 東京. pp. 435-444.
- Zhang, J., Y. Cai, R. Kobayashi and S. Kumai (2000) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1455-1460.

**生物研資料**

平成 16 年 1 月

January, 2004

**微生物遺伝資源利用マニュアル (15)**

2004 年 1 月 24 日 印刷

2004 年 1 月 31 日 発行

編集兼  
発行者 独立行政法人農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences

〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2