

国産自給飼料として的大豆ソフトグレインサイレージ からの乳酸菌の収集と系統学的分類

遠野 雅徳 ^{a)}

農研機構 畜産草地研究所

[〒329-2743 栃木県那須塩原市千本松 768]

Collection and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from
soybean soft grain silages as self-sufficient feeds in Japan

Masanori TOHNO ^{a)}

NARO Institute of Livestock and Grassland Science

1. 目的

我が国の畜産業では、トウモロコシ子実、アルファルファ乾草、大豆粕等の高タンパク質飼料の大部分を輸入に頼っている。これらの飼料の世界的な供給不足により、輸入飼料価格の高騰が畜産農家経営に深刻な悪影響を与えており、急務に解決すべき問題となっている。近年、国産自給飼料として有望な大豆ソフトグレインサイレージ(大豆 SGS)の研究・技術開発が展開されているが(河本ら, 2011)、更なる安定的な調製・貯蔵・流通技術の創成が期待されている。大豆 SGS とは、収穫後の大豆穀実をサイロ等で発酵処理することにより、長期保存可能なサイレージとして貯蔵したものである。本技術創成に向けて、大豆 SGS に認められる微生物の中でも、発酵過程において極めて重要な働きをする *Lactobacillus* 属等の乳酸菌に関する基礎的知見の蓄積に加えて、良質な大豆 SGS と関連付けられる分離乳酸菌のサイレージ添加剤への応用を目指した取り組みが必要不可欠となる。

そこで本研究では、東北農業研究センターにおいて栽培・貯蔵された大豆 SGS のうち、カビ等の発生が制御され、開封後の好氣的保管中も良好な品質を維持し続けたサンプルにターゲットを絞り、本大豆 SGS からの乳酸菌の分離を試みた。特長的な大豆 SGS には、サイレージ調製において有用な機能を有する土着の乳酸菌が存在しているという発想の下、将来的なサイレージ添加剤への応用を見据えた菌株収集・系統学的分類を行うことを目的とした。

a) (現所属) 農研機構 畜産研究部門 Institute of Livestock and Grassland Science, NARO

[〒329-2743 栃木県那須塩原市千本松 768]

2. 材料および方法

1) 大豆 SGS の調製と発酵品質

(1) 大豆 SGS の調製

平成 25 年に東北農業研究センターで栽培した大豆タチナガハの穀実を水分含量が 40%となるように、添付取扱説明書に従って調製した市販飼料添加用乳酸菌製剤であるサイマスターLP 乳酸菌液（雪印種苗株式会社）で加水後、ドラム缶サイロ（200L 容）に貯蔵し、10 ヶ月屋外に保管して大豆 SGS を調製した。開封後、ドラム缶下部の大豆 SGS を採材し、1 ヶ月間室温（約 20℃）で放置した。

(2) 発酵品質分析

主に既報に従い（Tohno et al., 2012）、一部変法を用いて、開封後に好氣的放置した大豆 SGS の発酵品質を分析した。すなわち、10g の大豆 SGS サンプルを 100mL の滅菌蒸留水に懸濁し、Promedia SH-II M ホモジナイザー（株式会社エルメックス）を用いて、5 分間十分に攪拌した。大豆 SGS 懸濁液の pH を MP230 pH メーター（メトラー・トレド株式会社）により分析した。LC-2000Plus（日本分光株式会社）を用いた高速液体クロマトグラフィー分析により、有機酸含量を測定した。新鮮物 1g 当たりの各種微生物コロニー形成単位（乳酸菌、酵母、カビ、大腸菌群、一般好気性細菌、バチルス及びビクロストリジア）を常法（Tohno et al., 2012）に従って分析した。

2) 乳酸菌の分離・同定及び分子系統解析

(1) 乳酸菌の分離

上述の大豆 SGS 懸濁液を滅菌蒸留水で段階希釈後、de Man Rogosa Sharpe (MRS) 寒天培地 (Difco) に同抽出液を塗布し、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社）を用いて、30℃で 3 日間嫌気培養した。ランダムに選択したコロニーを MRS 寒天培地上で 3 回純粋培養を繰り返し、グリセロールストックにより -80℃で保存した。

(2) 乳酸菌の生理・生化学的性状解析

グラム染色は、ファイバーG「ニッスイ」（日水製薬株式会社）により、純粋培養後の各乳酸菌分離株を用いて実施した。カタラーゼ産生試験及び API 50（シスメックス・ビオメリュー株式会社）による糖資化性試験は、既報に従って実施した（Tohno et al., 2015）。

(3) 分子系統解析

MRS 寒天培地に生じた分離株のコロニーをかき取った後、既報のダイレクト PCR 法により、27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）および 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）のユニバーサルプライマー（Suzuki et al., 1996）を用いて 16S ribosomal RNA(以下 rRNA)遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した（Tohno et al., 2013）。得られた塩基配列を基に近隣結合法により系統樹を作成した（Tohno et al., 2014）。

3. 結果

1) 大豆 SGS の発酵品質

供試大豆 SGS の pH 値は 5.20 であり、乳酸と酢酸含量はそれぞれ 0.73, 0.16 (新鮮物%) であった。吉草酸, プロピオン酸及び酪酸の産生は認められなかった。同 SGS に含まれる微生物数の検討により、乳酸菌及び酵母がそれぞれ 1.7×10^8 , 2.0×10^6 (コロニー形成単位/新鮮物 g) 認められたが、カビ, 大腸菌群, 一般好気性細菌, バチルス及びクロストリジウムは検出されなかった。また、外観上に微生物的な汚染や腐敗は認められず、官能的にも異臭は感知されなかった。

2) 分離乳酸菌の同定

供試大豆 SGS より合計 24 株の乳酸菌を分離した。本分離株のうち、市販飼料添加用乳酸菌製剤由来と考えられる乳酸菌株を除き、以下の合計 11 菌株を 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹解析に供試した [MAFF 516307 (= DG1) 株, MAFF 516308 (= DG3) 株, DG4 株, MAFF 516309 (= DG9) 株, MAFF 516310 (= DG10) 株, DG12 株, DG13 株, DG14 株, DG17 株, DG18 株及び DG23 株]。

これらの乳酸菌株は、いずれもグラム陽性、カタラーゼ陰性、桿菌様の細胞形態を示した。16S rRNA 遺伝子配列による系統樹解析により、MAFF 516307 株, MAFF 516308 株, DG4 株, DG12 株, DG13 株, DG14 株, DG17 株及び DG18 株は、*Lactobacillus buchneri* JCM 1115^T 株と同一のクラスターを形成した (図 1)。これらの分離株と JCM 1115^T 株との 16S rRNA 遺伝子配列類似性は 99.9% 以上を示した。

一方、MAFF 516309 株及び MAFF 516310 株の最近縁種は *Lactobacillus brevis* JCM 1059^T 株

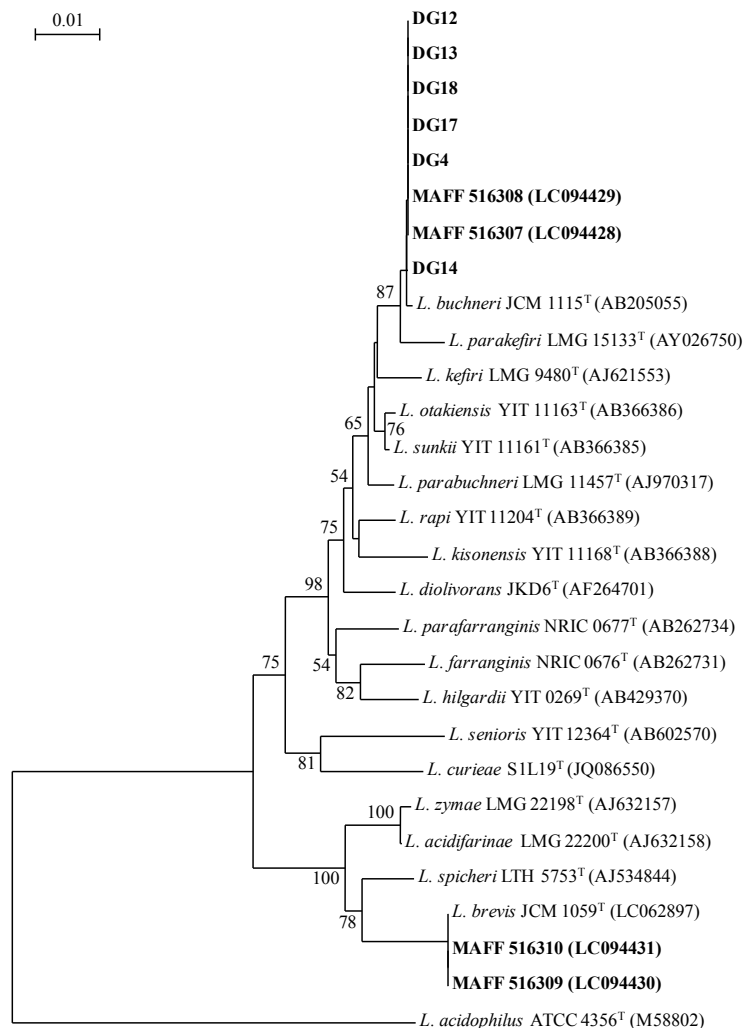


図1. 大豆SGSから分離した乳酸菌の16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹解析

Kimura two-parameterモデルと近隣結合法による16S rDNA遺伝子配列を指標とした大豆SGS由来分離株 (太字) と既知の*Lactobacillus*属近縁種により系統樹を作成した。括弧内にGenBank/EMBL/DDBJアクセスナンバーを示す。数値はそれぞれ、近隣結合法で算出された1,000反復のブートストラップ値を示す。

であり、16S rRNA 遺伝子配列類似性は 100%一致した (図 1)。

3) 分離乳酸菌の糖資化性

表 1 に供試 11 菌株の糖資化性試験結果を示した。 *L. buchneri* と同定された 9 菌株において、D-xylose, methyl- β -D-xylopyranoside 及び D-turanose の資化性に菌株間の違いが認められた。 *L. buchneri* 分離株と *L. brevis* 分離株との比較により、 *L. buchneri* 分離株においてのみ N-acetyl-glucosamine, salicin 及び 2-keto-gluconate が陰性であった一方、 methyl- α -D-glucopyranoside, D-lactose, D-sucrose, D-melezitose 及び D-raffinose が陽性であった。

4. 考察

開封後に 1 ヶ月以上好氣的放置したにも拘わらず、顕著なカビ汚染や二次発酵が認められなかった大豆 SGS より乳酸菌を分離することにより、本大豆 SGS における乳酸菌叢への理解と有用分離乳酸菌株の今後の活用の可能性を検討した。供試大豆 SGS は、有害微生物の活性阻害を伴う良質牧草サイレージの基準となる pH 値 4.2 (McDonald, 1991) よりやや高値であったものの、一定量の乳酸及び酢酸が認められたことから、発酵過程により生産された有機酸が十分に残存していることが示唆された。しかしながら、乳酸や酢酸含量が 1.0%未満の比較的低量であったことから、有機酸による有害微生物阻害効果のみならず、発酵過程に生成された他の抗菌性化合物の関与も十分に考えられた。微生物解析により、 10^8 (コロニー形成単位/新鮮物 g) オーダーの多数の乳酸菌が認め

表1. 大豆SGSからの乳酸菌分離株の糖資化性

	<i>Lactobacillus buchneri</i>									<i>Lactobacillus brevis</i>	
	MAFF 516307	MAFF 516308	DG4	DG12	DG13	DG14	DG17	DG18	DG23	MAFF 516309	MAFF 516310
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Methyl- β -D-xylopyranoside	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl- α -D-glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5-Keto-gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, 陽性; -, 陰性. すべての供試菌株において, glycerol, erythritol, D-arabinose, L-xylose, D-adonitol, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- α -D-mannopyranoside, amygdalin, arbutin, D-cellobiose, D-trehalose, inulin, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitolの資化性は認められなかった。

られた一方で、好気的変敗の一原因微生物と考えられる酵母は、 10^6 オーダーの低値を示した。また、カビ、大腸菌群及びクロストリジア等の有害微生物は認められず、外観上の微生物学的腐敗や異臭も感知されなかった。以上のことから、本大豆 SGS が開封後も良質な品質を維持していたと考えられる。

分離された乳酸菌の同定と系統学的分類の結果、分離株は *L. buchneri* と *L. brevis* であることが明らかとなった。これらの *Lactobacillus* 属乳酸菌は、使用した市販飼料添加用乳酸菌製剤には含まれない菌種であり、供試した大豆穀実に寄生した「大豆由来」の乳酸菌であると考えられる。

イタリアンライグラスサイレージへの *L. brevis* 供試株の単独添加により、発酵促進効果と好気的変敗抑制効果が認められたが、コーンサイレージへの添加には同有益効果は認められなかったと報告されている (Li et al., 2016)。サトウキビサイレージへの *L. brevis* DSM 23231 株の添加により、無添加区と比べて開封後の変敗が悪化する傾向が認められている (Daniel et al., 2016)。一方、*L. buchneri* の複数の菌株は、コーンサイレージの発酵品質を促進するのみならず、開封後の好気的変敗を抑制することが知られている (Danner et al., 2003 ; Tabacco et al., 2011)。*L. buchneri* はサイレージ発酵スターターとして活用例も多く、カビ発生制御や好気的変敗防止を含むサイレージ品質維持における有益効果が総説として取り纏められている (Holzer et al., 2003)。大豆 SGS に対する *L. buchneri* の添加効果に関する検証例はなく、上述した他のサイレージ素材における知見を一概に引用することは難しいものの、本大豆 SGS に認められた発酵品質維持効果は、*L. buchneri* によるものである可能性が強く示唆される。さらに、市販飼料添加用乳酸菌製剤を添加しても、本供試サンプルにおける開封後の優れた品質維持効果が認められない例もあることから (データ未掲載)、良質な発酵品質の維持効果は、供試大豆に本来付着する *L. buchneri* 等の優れた有益機能を有する乳酸菌の初発菌数や微生物活性といった不安定要素に影響を受けることが想定される。

大豆穀実には約 12% の可溶性炭水化物が含まれており、主に sucrose, raffinose 及び stachyose が含まれていると報告されている (Hagely et al., 2013)。本研究で得られた供試株のうち、*L. buchneri* においてのみ sucrose と raffinose の資化能が認められたことから、大豆 SGS 発酵過程において本菌種分離株が有利に発酵に関与したことが示唆される。*L. buchneri* における sucrose と raffinose 資化性は同種異株で異なることが知られており、11–89% の *L. buchneri* の菌株が陽性であるとされ (Hammes et al., 2009)、極めて多様性に富んでいる。すなわち、本研究における *L. buchneri* 分離株の両糖質の資化性は 100% 認められたが、本特徴は *L. buchneri* において必ずしも認められるものではないことから、分離株が大豆 SGS の発酵に関与できる特徴的な *L. buchneri* であると考えられる。これらの分離株の糖資化性プロファイルと大豆由来可溶性炭水化物の関連を基礎として、より最適な大豆 SGS 発酵に貢献するサイレージ用乳酸菌添加剤の選択・提案に繋がるものと考えられる。

本研究により、優れた発酵品質を維持した大豆 SGS より、今後添加剤として有効活用が期待できる複数の乳酸菌株を分離することに成功した。これらの分離乳酸菌株や同効果を期待できる乳酸菌株を大豆 SGS に添加し、予め高活性かつ高濃度の菌数によって発酵を促進させることにより、国産自給飼料としての大豆 SGS の安定的な調製・貯蔵・流通が可能となると期待できる。

5. 謝辞

大豆栽培及び大豆 SGS 調製・貯蔵試験は、東北農業研究センターの河本英憲氏・嶺野英子氏らの研究グループにより実施され、同 SGS に含まれる有用乳酸菌の分離を共同研究として実施した。ここに記して深謝の意を表する。

6. 参考文献

- Daniel, J.L.P., Checchi, M., Zwielehner, J., Junges, D., Fernandes, J. and Nussio, L.G. (2015). The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205:69–74.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E. and Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562–567.
- Hagely, K.B., Palmquist, D. and Bilyeu, K.D. (2013). Classification of distinct seed carbohydrate profiles in soybean. *J. Agric. Food Chem.* 61:1105–1111.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. (2009). Genus I. *Lactobacillus*, In W. Ludwig, K. H. Schleifer and W.B. Whitman (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 3. pp.465–511. Springer, New York, NY.
- Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. and Braun, R. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21:282–287.
- 河本英憲・増田隆晴 (2011). くず大豆のサイレージ発酵品質と発酵に伴うタンパク画分の変化. 日草誌 57 (別) :177.
- Li, Y., Wang, F. and Nishino, N. (2016). Lactic acid bacteria in total mixed ration silage containing soybean curd residue: their isolation, identification and ability to inhibit aerobic deterioration. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29:516–522.
- McDonald, P., Henderson, N. and Heron, S. (1991). *The biochemistry of silage*, Second edition, Chalcombe Publications, Bucks, pp.12, 84-85, 108–111, 167.
- Suzuki, K., Sasaki, J., Uramoto, M., Nakase, T. and Komagata, K. (1996). *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:88–93.
- Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A. and Borreani, G. (2011). Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94:5589–5598.
- Tohno, M., Kobayashi, H., Tajima, K. and Uegaki, R. (2012). Strain-dependent effects of inoculation of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* on fermentation quality of paddy rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) silage. *FEMS Microbiol. Lett.* 337:112–119.

- Tohno, M., Kitahara, M., Inoue, H., Uegaki, R., Irisawa, T., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2013). *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:1417–1420.
- Tohno, M., Kitahara, M., Matsuyama, S., Kimura, K., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2014). *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi*, *Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii* and *Aerococcus sanguinicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:1229–1236.
- Tohno, M., Kitahara, M., Irisawa, T., Ohmori, H., Masuda, T., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2015). *Lactobacillus mixtipabuli* sp. nov. isolated from total mixed ration silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:1981–1985.