沖縄産暖地型牧草トランスバーラサイレージから 分離された乳酸菌の同定と性質

花ヶ崎敬資^{1a}・蔡 義民²

¹ 沖縄県畜産研究センター, 沖縄県今帰仁村 905-0426

² 畜産草地研究所, 那須塩原市 329-2793

(2009. 5. 19 受付, 2009. 11. 18 受理)

要 約 沖縄産暖地型牧草トランスバーラサイレージから 14 株の乳酸菌を分離し, 細胞形態, 生理・生化学性状および分子系統解析を行った. 分離株はすべてグラム陽性および主にカタラーゼ陰性の乳酸桿菌か乳酸球菌であり, 生理・生化学性状から 4 つのグループ (A-D) に分けた. グループ A は DL 型乳酸を生成するホモ発酵型乳酸桿菌, グループ B は D 型乳酸を生成するヘテロ発酵型乳酸球菌, グループ C は L 型乳酸を生成するホモ発酵型乳酸球菌, グループ D は L 型乳酸を生成するホモ発酵型乳酸桿菌であった. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析の結果, グループ A は *Lactobacillus plantarum*, グループ B は *Weissella paramesenteroides*, グループ C は *Pediococcus pentosaceus*, グループ D は *Lactobacillus acidipiscis* にそれぞれ同定した.

日本畜産学会報 81 (2), 143-152, 2010

暖地型牧草の一草種であるパンゴラグラス (学名: *Digitaria eriantha*, 品種: トランスバーラ) は, 生産性, 栄養価および持続性に優れるため (嘉陽ら 1996; 嘉陽ら 1997), 沖縄県の奨励品種に選定されている. トランスバーラは嗜好性に優れることや, 放牧および採草の両面で利用可能なことで沖縄県内での草地作付面積の割合は年々増加している. また, トランスバーラを用いて調製したサイレージは, その発酵品質がジャイアントスターグラスとギニアグラス (品種: ナツユタカ) などの暖地型牧草より優れるが, 貯蔵後 9 週目のサイレージでは pH が 4.5-5.7, 新鮮物中の乳酸含量は 0.12-0.75% であり, 良質ではなかったと報告されている (守川ら 2002).

通常, 暖地型牧草を用いて調製されたサイレージは pH が低く乳酸含量の高いサイレージが少なく, 酢酸や酪酸含量の高いサイレージが多いと指摘されている (Sujatha ら 1986; 安谷屋と庄子 1995). この原因については, 可溶性炭水化物含量と付着微生物菌種構成および乳酸菌が少ないことが影響していると考えられる (蔡 2001a). しかし, トランスバーラサイレージ発酵に関与する微生物の菌種構成, 特に乳酸菌の菌種同定については検討されていない.

そこで, 本研究では, トランスバーラサイレージの発酵品質の解析および暖地型牧草サイレージに存在する微生物のうち乳酸菌の菌種構成を明らかにする目的で, ト

ランスバーラロールペールサイレージを調製し, 材料草とサイレージの化学成分, 付着する微生物の菌種構成およびサイレージ発酵品質を分析した. また, 分離された乳酸菌を同定するため, 分離株の細胞形態, 生理・生化学性状, API50 CH の炭水化物発酵試験および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による分子系統解析を行った.

材料および方法

1. 供試材料

材料草として沖縄県畜産研究センター (沖縄県国頭郡今帰仁村) 圃場内にて栽培されたトランスバーラを用いた. これは 2007 年 5 月 9 日, 出穂前の再生日数 40 日 (3 番草) で刈り取り, 予乾なしで分析に供試した. トランスバーラの栽培は, 草地の多年利用の形態をとり, 植え付けてから約 6 年経過している. 刈り取り毎に N, P₂O₅, K₂O をそれぞれ 10.0, 5.0, 6.25 kg/a 施用している.

トランスバーラサイレージは沖縄県畜産研究センター圃場内にて栽培されたトランスバーラを用いロールペール (ROLLANT46, CLAAS, German) で調製した. サイレージ A は 2007 年 5 月 9 日, 再生日数 40 日 (3 番草) に調製し, 6 月 15 日, 貯蔵 37 日目に開封した. サイレージ B は 2007 年 7 月 9 日, 貯蔵 61 日目に開封した. 分析用試料はサイレージ A, B それぞれ 1 ロールについて, ロールペール縦方向の上, 中, 下 3 か所に分けて, それぞれ

現所属: ^a 沖縄県工業技術センター, うるま市 904-2234

連絡者: 蔡 義民 (fax: 0287-37-7804, e-mail: cai@affrc.go.jp)

約 500 g を採取し、微生物と化学分析に供した。

2. 化学分析

材料草およびサイレージの化学組成は常法（自給飼料品質評価研究会 2001）、水分含量は 70℃ 通風乾燥法（蔡 2001b）により定量した。サイレージの pH と有機酸含量の測定法は次のとおりである。試料 10 g を採取し、これに蒸留水 90 mL 加えてよく攪拌した。この抽出液を濾過し、ガラス電極 pH メーターで pH 値を測定した（蔡ら 2003）。他方、残りの抽出液をイオン交換樹脂（Amberlite IR120H⁺；東京有機化学工業、東京）で処理して高速遠心分離（12,000 rpm×5 分間）し、その上澄液を孔径 0.45 μm のフィルター（DISMIC®-13HP；東洋濾紙、東京）で濾過して高速液体クロマトグラフ（HPLC）による有機酸分析に供した。装置は HPLC 有機酸分析システム（日本分光、東京）を用い、カラムは Shodex Rspak KC-811（8 mm×300 mm；昭和電工、東京）、移動相は 3 mmol/L 過塩素酸水溶液、反応液は BTB 水溶液（0.2 mmol/L ブロモチナールブルー-8 mmol/L リン酸 1 水素ナトリウム-2 mmol/L 水酸化ナトリウム）を用いた。なお、流量は 1.2 mL/分、カラム温度は 60℃、検出波長は 450 nm とした（蔡ら 2003）。材料草およびサイレージ中のグルコース、フルクトースおよびスクロース含量は、HPLC 糖分析システム（日本分光）を用いて測定し、カラムは Shodex Suger SC1011（8 mm×300 mm；昭和電工）、移動相は水溶液、流量は 1.0 mL/分、カラム温度は 80℃、検出器は示差屈折計 RI-1530 とした（蔡ら 2003）。サイレージのアンモニア態窒素はケルテックシステム（Kjeltec Auto Sampler System 1035 Analyzer, Tecator, Hoganas, Sweden）を用いて水蒸気蒸留法で測定した（蔡ら 2003）。

3. 微生物の分離と同定

材料草とサイレージの微生物菌種構成は平板培養法で計測した（山里ら 1986）。材料草とサイレージ 10 g をストマッカー用積層フィルム袋（飛竜 KN208；旭化成ポリフレックス、東京）に採取し、滅菌水 90 mL を加えて 10 倍希釈液とし、次にこの液をさらに 10⁶ 倍まで希釈した。乳酸菌は MRS 寒天培地（DIFCO Laboratories, Detroit, USA）を使用して、嫌気培養装置（ANX-1；ヒラサワ、東京）により 30℃ で 2 日間培養した。この培地から純粋分離した 14 菌株は乳酸菌同定マニュアル（小崎ら 1992）に従い、菌形態観察、グラム染色、発酵形式の確認、カタラーゼ活性、乳酸異性体に関する試験および API50 CH（日本ビオメリユー、東京）を用いた炭水化物発酵試験を行った。好気性細菌は普通寒天培地（日水製薬、東京）を、大腸菌はブルーライト培地（日水製薬）を使用して 30℃ 2 日間好気条件で培養した。糸状菌と酵母は、10% 酒石酸を加えて pH を 3.5 に調整したポテト・デキストロース寒天培地（日水製薬）を使用して好気条件で培養した。なお、各微生物の菌数は新鮮試料 1 g 当たりのコロニー形成数（cfu/g）で表示した。酪酸菌とバチルスは

培地への接種の前に 75℃ で 15 分間加熱した。酪酸菌はクロストリジア測定用培地（日水製薬）を使用して 30℃、2 日間嫌気条件で、バチルスは普通寒天培地を使用して 30℃、2 日間好気条件で培養した。

4. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

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した。N-Acetylmuramidase（生化学工業、東京）と Lysozyme（生化学工業）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 を抽出した。得られたゲノム DNA を鋳型としてプライマー 27F（5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'）と 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）、TaKaRa Taq™ キット（宝酒造、京都）および GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems, Foster City, California, USA）を使用し、PCR 法により 16S rDNA の塩基配列約 1,500 bp を増幅した。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）を用いて精製した。シーケンス反応および産物の調整は Big Dye Primer Cycle Sequencing Kit と GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を使用して、Applied Biosystems プロトコルに従って行った。DNA シーケンスの解析には ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を使用した。得られた 16S rDNA の塩基配列は BLAST Homology Search により DNA データバンク（GenBank/EMBL/DDBJ）に対する照合検索を行った（Altschul ら 1997；平石 1997；篠田ら 2000）。分離株と近縁基準株との分子系統樹は、CLUSTAL W プログラム（Thompson ら 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 と Nei 1987）により作成した。

結 果

表 1 にトランスバーラ材料草とサイレージの化学成分を示した。材料草の水分含量は 74.2%，粗タンパク質含量は乾物中 10.5%，NDF 含量は 67.1% であった。サイレージの水分含量は 65.6%，粗タンパク質含量は乾物中 8.6%，NDF 含量は 73.3% であった。材料草のスクロース含量が 2.23%，グルコース含量が 0.32%，フルクトース含量が 0.42% であり、サイレージのスクロース含量が 0%，グルコース含量が 0.27%，フルクトース含量が 0.32% であった。

表 2 にトランスバーラ材料草、サイレージの発酵品質および微生物菌種構成を示した。サイレージ A の乾物含量は約 35% であった。サイレージ B の乾物含量はロール上、中、下部の採取箇所によって 33.6–42.9% の範囲で部位によるばらつきがあり、ロール上部から下部への水分移行が認められた。サイレージ A の pH はいずれの部位も 4.77 であり、サイレージ B の pH は 5.08–5.28 の範囲であった。サイレージ A と B の乳酸含量が 0.27–0.39% と 0.03–0.22% で、アンモニア態窒素含量が 0.44–0.53%

と 0.48-1.06% であった。また、すべてのサイレージから酪酸は検出された。よって、乳酸含量は低いがアンモニア態窒素含量が高く、酪酸も検出されたことからサイレージ発酵品質は劣質になった。サイレージ A の乳酸菌数は 10^6 cfu/g、サイレージ B では 10^4 - 10^6 cfu/g であった。

Table 1 Chemical composition of Transvala material and silage ensiled for 61 days*

	Material	Silage
Moisture (%FM)	74.2	65.6
Crude ash (% DM)	7.8	7.1
Crude fat (% DM)	3.3	2.7
Crude protein (% DM)	10.5	8.6
Acid detergent fiber (% DM)	37.2	40.9
Neutral detergent fiber (% DM)	67.1	73.3
Organic cell wall (% DM)	68.8	76.1
Organic cell content (% DM)	23.5	16.9
Organic b fraction (% DM)	61.7	69.1
Organic a fraction (% DM)	7.1	7.0
Sucrose (% DM)	2.23	0
Glucose (% DM)	0.32	0.27
Fructose (% DM)	0.42	0.32

* The values are means of three samples, FM : fresh matter, DM : dry matter.

た。酪酸菌はサイレージ A から検出されなかったが、サイレージ B から 10^1 - 10^3 cfu/g レベルで検出された。両サイレージから、酵母 (0 - 10^4 cfu/g)、好気性細菌 (10^3 - 10^4 cfu/g)、バチルス (10^2 - 10^3 cfu/g)、大腸菌類 (0 - 10^2 cfu/g) がそれぞれ検出されたものの、糸状菌は検出されなかった。

表 3 にトランスバールサイレージから分離された乳酸菌の形態、生理生化学性状および 16S rDNA 塩基配列相同性、表 4 に API50 CH の炭水化物発酵パターンをそれぞれ示した。サイレージ A から OK1, OK2, OK3, OK4, OK5, OK6, OK7, OK40 が、サイレージ B から OK34, OK35, OK36, OK37, OK38, OK39 はそれぞれ分離された。分離株はすべてグラム染色陽性の乳酸菌であった。細胞形態から、OK1, OK2, OK35, OK37, OK40 は桿菌、OK3, OK4, OK5, OK6, OK7, OK34, OK36, OK38, OK39 は球菌であった。OK1, OK2, OK6, OK35, OK37, OK38, OK40 はグルコースからガスを産出しないホモ発酵型で、OK3, OK4, OK5, OK7, OK34, OK36, OK39 はグルコースからガスを生成するヘテロ発酵型であった。OK3, OK5 はカタラーゼ活性で陽性反応を示したのに対し、他の分離株はすべて陰性反応であった。分離株はすべて 5°C と pH 3.0 未満および 50°C 以上で生育しなかった。OK39, OK40 以外の分離株はすべて 10°C で生育した。OK6 と OK38 株は 45°C で生育し、また OK38 のみが pH 3.0 で生育した。各グループの代表菌株と基準株間の

Table 2 Fermentation quality and microbiological analysis of Transvala material and silages*

	Material	Silage A ensiled for 37 days			Silage B ensiled for 61 days		
		T	C	B	T	C	B
Fermentation quality							
DM (% FM)	25.8	35.1	35.0	35.3	42.9	40.9	33.6
pH	5.56	4.77	4.77	4.77	5.21	5.08	5.28
Lactic acid (% FM)	nd	0.39	0.27	0.36	0.21	0.22	0.03
Acetic acid (% FM)	nd	0.15	0.14	0.11	0.22	0.04	0.18
Propionic acid (% FM)	nd	nd	nd	nd	0.05	nd	0.05
Butyric acid (% FM)	nd	0.05	0.08	0.05	0.16	0.19	0.18
Ammonia N (% FM)	0.04	0.53	0.49	0.44	1.06	0.48	0.67
Microorganism composition (log colony-forming units per gram of FM)							
Lactic acid bacteria	3.00	6.90	6.86	6.76	4.83	6.79	5.38
Clostridia	nd	nd	nd	nd	1.78	1.48	3.20
Escherichia	6.68	nd	2.00	1.00	nd	2.45	nd
Mould	3.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Yeast	3.78	4.83	4.00	4.59	nd	4.67	3.50
Aerobic bacteria	7.04	4.48	4.30	4.46	3.90	4.15	4.51
Bacilli	4.83	2.90	2.78	2.85	3.43	2.34	3.89

* The values are means of three samples, FM : fresh matter, DM : dry matter, nd : not detected.

T, C, B : samples were collected from top, centre and bottom parts of round bale silage.

Table 3 Characteristics and 16S rDNA sequence similarity with each type strain of lactic acid bacteria strains isolated from Transvala silages

Characteristics	Group A				Group B				
	OK 1	OK 2	OK 35	OK 37	OK 3	OK 4	OK 5	OK 7	OK 34
Source	Silage A	Silage A	Silage B	Silage B	Silage A	Silage A	Silage A	Silage A	Silage B
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase activity	—	—	—	—	+	—	+	—	—
Fermentation type	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero
Optical form of lactate	DL	DL	DL	DL	D (—)	D (—)	D (—)	D (—)	D (—)
Growth at temperature									
5°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10°C	+	+	+	+	w	w	w	w	w
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Growth at pH									
2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3.5	+	w	+	+	—	—	—	—	—
4.0	+	+	+	+	w	w	w	+	w
4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16S rDNA sequence similarity with each type strain (%)	100	na	99.9	na	99.4	na	na	99.7	99.6
Identified species	<i>Lactobacillus plantarum</i>				<i>Weissella paramesenteroides</i>				

Characteristics	Group B		Group C		Group D
	OK 36	OK 39	OK 6	OK 38	OK 40
Source	Silage B	Silage B	Silage A	Silage B	Silage A
Shape	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Rod
Gram stain	+	+	+	+	+
Catalase activity	—	—	—	—	—
Fermentation type	Hetero	Hetero	Homo	Homo	Homo
Optical form of lactate	D (—)	D (—)	L (+)	L (+)	L (+)
Growth at temperature					
5°C	—	—	—	—	—
10°C	w	—	+	+	—
15°C	+	w	+	+	+
45°C	—	—	+	+	—
50°C	—	—	—	—	—
Growth at pH					
2.5	—	—	—	—	—
3.0	—	—	—	w	—
3.5	—	—	+	+	—
4.0	+	w	+	+	—
4.5	+	+	+	+	+
5.0	+	+	+	+	+
6.0	+	+	+	+	+
16S rDNA sequence similarity with each type strain (%)	na	na	99.9	99.9	99.5
Identified species	<i>Weissella paramesenteroides</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Lactobacillus acidipiscis</i>

+ : positive reaction, — : negative reaction, w : weakly positive reaction, na : not analyzed.

Table 4 API50 CH fermentation patterns of lactic acid bacteria strains isolated from Transvala silage

Carbohydrate	Group A				Group B								Group C		Group D
	OK 1	OK 2	OK 35	OK 37	OK 3	OK 4	OK 5	OK 7	OK 34	OK 36	OK 39	OK 6	OK 38	OK 40	
Glycerol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	w	
Erythritol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D-Arabinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ribose	+	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	
D-Xylose	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
L-Xylose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Adonitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
β-Methyl-xyloside	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Galactose	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Mannose	+	+	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	
L-Sorbose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Rhamnose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Inositol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Mannitol	+	+	+	+	—	—	w	—	—	—	—	—	—	+	
Sorbitol	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
α-Methyl-D-mannoside	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	
α-Methyl-D-glucoside	—	—	—	—	+	+	+	w	+	+	+	—	—	+	
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+	w	w	w	+	+	+	+	+	+	+	
Amygdaline	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
Arbutine	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
Esculine	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
Salicine	+	+	+	+	w	—	w	—	—	—	w	+	+	+	
Cellobiose	+	+	+	+	+	—	+	—	w	w	+	+	+	+	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
Lactose	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	—	—	
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	—	—	
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	—	+	+	
Inuline	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Melezitose	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D-Raffinose	—	w	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	
Amidon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Glycogene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Xylitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
β-Gentiobiose	w	w	—	+	w	—	—	—	w	w	w	w	w	w	
D-Turanose	+	+	+	—	+	—	+	—	+	w	+	—	—	—	
D-Lyxose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D-Tagatose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	
D-Fucose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
L-Fucose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D-Arabitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
L-Arabitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Gluconate	—	—	w	—	w	—	+	—	w	w	—	—	—	—	
2-keto-gluconate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5-keto-gluconate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

+ : positive reaction, — : negative reaction, w : weakly positive reaction.

16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性はすべて 99% 以上を示した。

細胞形態、生理・生化学性状および API50 CH の炭水化物発酵パターンから、分離株は A, B, C, D の 4 つのグループに分類された。API50 CH の炭水化物発酵パターンより、各グループの分離株はすべて D-glucose から酸を生成した。また、グループ A の OK1, OK2, OK35, OK37 は Mannitol, Sorbitol から、グループ B の OK3, OK4, OK5, OK7, OK34, OK36, OK39 は α -Methyl-D-glucoside から、グループ C の OK6, OK38 は D-Tagatose から、グループ D の OK40 は Glycerol, Mannitol, α -Methyl-D-glucoside から、それぞれ酸を生成し、各グループ間の炭水化物発酵パターンの差異を示した。

図 1, 図 2 にトランスバーラサイレージから分離された *Lactobacillus* 属, *Weissella* 属および *Pediococcus* 属の代表菌株 (OK1, OK3, OK6, OK7, OK34, OK35, OK38, OK40) と関連乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の分子系統樹を作成した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統の解析結果では、OK1, OK35, OK40 は *Lactobacillus* 属のクラスター、OK3, OK7, OK34 は *Weissella* 属のクラスター、OK6, OK38 は *Pediococcus* 属のクラスターにあるため、グループ A, D の分離株は *Lactobacillus* 属の菌種、グループ B の分離株は *Weissella* 属の菌種、グループ C の分離株は *Pediococcus* 属の菌種に同定した。また、分子系統位置で OK1, OK35 は *Lactobacillus plantarum* 基準株に、OK40 は *Lactobacillus acidipiscis* 基準株に、OK3, OK7, OK34 は *Weissella paramesenteroides* 基準株に、OK6, OK38 は *Pediococcus pentosaceus* 基準株にそれぞれ最も近縁な関係を示した。

考 察

通常、サイレージの発酵過程においては、飼料作物に付着する乳酸菌が嫌気条件下で材料草中の可溶性炭水化物 (WSC) を乳酸に変換し、それによって pH が低下する。その結果として、不良微生物の増殖が抑えられ、良質サイレージとして長期に保存することができる (大山ら 1971; McDonaldら 1991; 蔡ら 1994; Caiら 1999a, b, c, 2000; Zhangら 2000; Ohmomoら 2002)。良質サイレージを調製するためには、嫌気条件の保持、材料草の水分調整、十分な糖含量および乳酸生成能と酸耐性が優れる優良乳酸菌の存在という諸条件が重要である。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 (蔡 2001a)。本試験で供試した材料草には、表に示したように好気性細菌 10^7 cfu/g および大腸菌群 10^6 cfu/g が高い菌数レベルで付着したのに対して、乳酸菌が 10^3 cfu/g と低い菌数レベルであった。

トランスバーラ、ジャイアントスターグラスおよびギ

ニアグラスなどの暖地型牧草サイレージは一般に、酢酸、酪酸、アンモニア含量が高く pH の高いサイレージになりやすく、良質なものが少ないと指摘されている (Sujathaら 1986; 安谷屋と庄子 1995)。その原因については、沖縄などの暖地型牧草に付着する乳酸菌の乳酸生成能力のほか、乳酸菌発酵基質となる単少糖類などの WSC 含量もサイレージ発酵品質に大きく影響すると考えられる。本研究で供試したサイレージの pH が 4.77~5.28 と高い値であり、乳酸含量が 0.39% 以下と低く、酪酸およびアンモニア態窒素含量が高い劣質なものとなり、上記に報告された暖地型牧草サイレージの一般的な発酵の特徴と一致した。サイレージ A は採取箇所による pH と有機酸含量などのばらつきはほとんどなく、ロールの上、中、下部での発酵品質がほぼ均一になった。一方、サイレージ B はロールの上、中、下部の採取箇所の順に乾物率が高くなった。また、採取箇所下部で pH 値が最も高く、乳酸含量が少なくなる傾向を示した。このことから、ロールの上部から下部への水分移行により、サイレージ発酵品質にも影響を与えることが推測された。

通常、良質サイレージ発酵には新鮮材料中の WSC 含量 2% 以上が必要である (森本 1985; 蔡 2001a, 2002)。表 1 のトランスバーラ材料草の WSC 含量が 3.0% DM であるが、新鮮物中に換算すると 0.8% 以下となり、新鮮物中で 5.0% を超えるトウモロコシに比べ遥かに低いことが示された。乾物中の WSC 1.7% の東北地域産飼料イネでは乳酸菌製剤である畜草 1 号 (*Lactobacillus plantarum*) を添加したところ、サイレージの発酵品質が大幅に改善されたと報告されている (蔡ら 2003)。本研究で供試したトランスバーラ材料草の WSC 含量は飼料イネに近いことから、トランスバーラサイレージの調製には発酵能力の高い乳酸菌の添加で発酵品質の改善が可能と思われる。

サイレージ発酵に関与する乳酸菌は *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* および *Weissella* など多数の属に分類される (Barnett 1954)。飼料作物や牧草に付着する微生物菌数は草種、植物体部位、生育ステージあるいはサイレージを調製する地域によっても異なるとされる (蔡ら 1991, 1994)。本試験では分離株が細胞形態、生理・生化学性状および API50 CH の炭水化物発酵パターンにより 4 つのグループに分類された。16S rDNA 塩基配列解析の結果に基づき、これらの分離株はそれぞれ *Lactobacillus* 属, *Weissella* 属, *Pediococcus* 属のクラスターに入った。分離株と各基準株間との 16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性では 99% 以上を示すため、各グループの菌株はそれぞれ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Weissella paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* に同定した。

乳酸菌は細胞形態から桿菌と球菌に分類される。Lac-

暖地型牧草サイレージの乳酸菌

Figure 1 Phylogenetic tree showing the relative positions of isolates as inferred by the neighbor-joining method of complete 16S rDNA sequences. Bootstrap values for a total of 100 replicates are shown at the nodes of the tree. *B. subtilis* is used as an outgroup. The bar indicates 1% sequence divergence. *L.*, *Lactobacillus*; *W.*, *Weissella*. *K_{nuc}*, nucleotide substitution rates.

Figure 2 Phylogenetic tree showing the relative positions of isolates as inferred by the neighbor-joining method of complete 16S rDNA sequences. Bootstrap values for a total of 100 replicates are shown at the nodes of the tree. *B. subtilis* is used as an outgroup. The bar indicates 1% sequence divergence. *Le.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Lactococcus*; *P.*, *Pediococcus*; and *E.*, *Enterococcus*. Knuc, nucleotide substitution rates.

tobacillus plantarum のような乳酸桿菌は、乳酸発酵能力が高く耐酸性も強くサイレージ発酵品質の改善に有効である(蔡ら 2003)。一方、乳酸球菌は酸素が比較的少ない環境でよく生育し、サイレージ発酵の初期段階でスタートの役割として活発に増殖する。これらの菌株が生産する乳酸やバクテリオシンなどの抗菌物質が好気性細菌や酪酸菌を抑制し、その後の乳酸桿菌による優勢発酵へのスムーズな移動を助ける環境づくりに役割を果たしていると考えられている(千葉 2002; Ennahar ら 2003)。このようにサイレージ発酵初期における付着乳酸菌の増殖は、サイレージ発酵では重要であるが、これら乳酸球菌は耐酸性が弱く、pH 4.2 以下の条件下では生育ができないため、乳酸発酵能の高い乳酸菌を添加しない限り、サイレージ発酵品質の十分な改善が難しいと考えられる。

本研究では沖縄産トランスバーラサイレージから *Lactobacillus* 属の *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidipiscis* の乳酸桿菌の他に、*Weissella* 属の *Weissella paramesenteroides* や *Pediococcus* 属の *Pediococcus pentosaceus* の乳酸球菌も分離された。*Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* については寒地型サイレージからも分離されており(蔡 2001a)、寒地型と同じ菌種であった。今回の試験で供したトランスバーラサイレージからは、*Lactobacillus acidipiscis* が分離された。*Lactobacillus acidipiscis* はタイ魚発酵食品で確認されている(Tanasupawat ら 2000)が、日本では、本試験で供した沖縄産トランスバーラサイレージから初めて分離された。今後、他の暖地型牧草についてもサイレージ中の乳酸菌を分離・同定し、その性質を明らかにすることが、暖地型牧草サイレージの高品質化に寄与する優良乳酸菌の選抜に向け必要と考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、沖縄県農林水産部畜産課長利真幸主任にはサンプルの採取にご協力をいただいた。ここに記して深く感謝申し上げる。

文 献

安谷屋謙二, 庄子一成. 1995. ラップサイレージ品質安定化技術. (3)刈取りステージと水分がラップサイレージの飼料品質に及ぼす影響(ギニアグラスの伸長期と出穂期). 沖縄畜試研報 **33**, 145-154.

Altschul SF, Madden TF, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.

Barnett AJG. 1954. *Silage Fermentation*. pp. 5-67. Butterworths Scientific Publication, London.

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. 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). pp. 25-35. 日本草地種子協会, 東京.

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, Benno Y, Ogawa M, Kumai S. 1999c. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science* **82**, 520-526.

蔡 義民, 藤田泰仁, 村井 勝, 小川増弘, 吉田宣夫, 北村亨, 三浦俊治. 2003. 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* 畜草 1 号)の利用. 日本草地学会誌 **49**, 477-485.

蔡 義民, 熊井清雄, 福見良平. 1991. 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. 日本草地学会誌 **37**, 247-253.

Cai Y, Kumai S, Ogawa M, Benno Y, Nakase T. 1999b. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied Environmental Microbiology* **65**, 2901-2906.

Cai Y, Matsumoto M, Benno Y. 2000. *Bifidobacterium lactis* is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis*. *Microbiology and Immunology* **44**, 815-820.

Cai Y, Okada H, Mori H, Benno Y, Nakase T. 1999a. *Lactobacillus Paraalimentarius* sp. Nov. isolated from sourdough. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1451-1455.

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. 日本草地学会誌 **39**, 420-428.

千葉寿夫. 2002. 水田飼料作物の生産利用拡大. *Grass* **15**, 19-28.

Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. 2003. Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 444-451.

平石 明. 1997. PCR を利用した 16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究一追補版一, 日本微生物生態学会報 **12**, 19-26.

自給飼料品質評価研究会(編). 2001. 改訂 粗飼料の品質評価ガイドブック. pp. 1-196. 日本草地畜産種子協会, 東京.

嘉陽 稔, 川本康博, 庄子一成. 1996. *Digitaria* 属の 3 草種の生育特性と生産性の比較. 沖縄畜試研報 **34**, 101-104.

嘉陽 稔, 川本康博, 庄子一成. 1997. *Digitaria* 属 3 草種の草高の違いによる栄養価の比較. 沖縄畜試研報 **35**, 113-117.

小崎道雄, 内村 泰, 岡田早苗. 1992. 乳酸菌実験マニュアル. pp. 34-64. 朝倉書店, 東京.

McDonald P, Henderson N, Heron S. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd edn. pp. 11-62. Chalcombe Publications, Berkshire.

Ohmomo S, Tanaka O, Kitamoto H, Cai Y. 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly* **36**, 59-71.

守川信夫, 与古田稔, 真境名元次, 眞眞嗣平. 2002. パンゴラグラス品種トランスバーラにおけるサイレージ発酵品質の検討. 沖縄畜試研報 **40**, 108-113.

森本 宏. 1985. 飼料学. pp. 327. 養賢堂, 東京.

大山嘉信. 1971. サイレージ発酵に関連する諸問題. 日本畜産学会報 **42**, 30-317.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method of reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.

- 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.
- Sujatha P, Allen VG, Fontenot JP, Jayasuriya MN. 1986. Ensiling characteristics of tropical grasses as influenced by stage of growth, additives and chopping length. *Journal of Animal Science* **63**, 197-207.
- Tanasupawat S, Shida O, Okada S, Komagata K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1479-1485.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹. 1986. 微生物の分離法. pp. 435-444. R and D プランニング, 東京.
- Zhang J, Cai Y, Kobayashi R, Kumai S. 2000. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1455-1460.

Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Transvala Silage in Okinawa

Takashi HANAGASAKI¹ and Yimin CAI²

¹ Okinawa Industrial Technology Center, Uruma, Okinawa 904-2234, Japan

² National Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan

Corresponding : Yimin CAI (fax : +81 (0) 287-37-7804, e-mail : cai@affrc.go.jp)

Fourteen strains of lactic acid bacteria isolated from Transvala silage in Okinawa were identified and characterized. All isolates were Gram-positive and mainly catalase-negative bacteria. According to morphological and biochemical characters, these isolates were divided into four groups (A-D). Group A strains were homofermentative rods that formed DL-lactic acid. Group B strains were heterofermentative cocci that formed D-lactic acid. Group C strains were homofermentative cocci that formed L-lactic acid. Group D strain was homofermentative rod that formed L-lactic acid. On the basis of the phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequence, strains in group A, B, C and D were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidipiscis*, expectively.

Nihon Chikusan Gakkaiho 81 (2), 143-152, 2010

Key words : Lactic acid bacteria, 16S rRNA gene, Transvala silage, Tropicalgrass.