

乳酸菌 *Lactobacillus coryniformis* およびグリセロールの イネホールクロップロールベールサイレージへの接種効果

田中 治^{*1)}・大谷 隆二^{*1)}

抄 録：抗菌性物質である3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) をグリセロールから生産する乳酸菌 *Lactobacillus coryniformis* 394株をグリセロールと共にイネホールクロップロールベールサイレージに接種した場合の効果の検定を目的として、ロールベールサイレージの調製試験を行った。この試験では、サイレージの発酵品質とカビ汚染の割合を調べた。*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区においては、3-HPA含量は13ppmにとどまったが、無添加区とは異なり、不良発酵の産物である酪酸は検出されず、カビ汚染の割合も無添加区に比べて低くなった。以上の結果からは、*L. coryniformis* 394株およびグリセロールの接種は、イネホールクロップロールベールサイレージのカビ汚染の防止などに有用な可能性が示唆された。

キーワード：イネホールクロップ, *Lactobacillus coryniformis*, ロールベールサイレージ

Effect of Inoculation with *Lactobacillus coryniformis* and Glycerol in Ensiling Round Bales of Whole-crop Rice : Osamu TANAKA^{*1)} and Ryuji OTANI^{*1)}

Abstract : We carried out an experiment to examine the effect of inoculation with glycerol and *Lactobacillus coryniformis* strain 394, which ferments glycerol to the antimicrobial component 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), in ensiling round bales of whole-crop rice. In this experiment, although the concentration of 3-HPA in silage remained at 13 ppm, inoculation with *L. coryniformis* strain 394 and glycerol inhibited butyric fermentation and reduced contamination by mold on round bale silage. This result suggests that inoculation with *L. coryniformis* strain 394 and glycerol is useful in ensiling round bales of whole-crop rice.

Key Words : *Lactobacillus coryniformis*, Round bale silage, Whole-crop rice.

I 緒 言

牧草や飼料イネを機械（ロールベアラ）で直径50cmまたは1m程度の円筒形に整形し、ポリエチレンのフィルムでそれらを包装して貯蔵したもの（ロールベール）を発酵させたロールベールサイレージは、調製の際の省力化が図れることから、我が国において広く普及している。しかし、ロールベールの貯蔵中に材料がカビに汚染されることが問題となっている。徐ら（2006）は稲わらのロールベールサイレージを調製したところ、材料の約3割がカビ

に汚染されたと報告している。ロールベールの中でも、直径が50cm程度にとどまるミニロールベールは、小規模農家にとって扱いやすいサイズである反面、梱包密度が低くなってカビに汚染されやすいとされている（亀井・宗重 2007）。

一方、筆者らはカビなどに対する生育阻害物質である3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) を生成する乳酸菌をサイレージに接種することを検討してきた。3-HPA はロイテリンとも呼ばれ、カビなどを含む多くの微生物に対して生育阻害活性を有している（Axelsson *et al.* 1989 ; Nakanishi *et al.*

*1) 農研機構東北農業研究センター (Tohoku Agricultural Research Center, NARO, Morioka, Iwate 020-0198, Japan)
2016年10月13日受付、2017年2月6日受理

2002)。筆者らは、3-HPAをグリセロールから生産する乳酸菌*Lactobacillus coryniformis* 394株をグリセロールと共に実験室規模のサイレージに接種したところ、3-HPAが10~200ppm生成されて、サイレージ調製における不良発酵である酪酸発酵や、同じくサイレージ調製における変敗現象である好気的変敗が抑制されること (Tanaka *et al.* 2003, 2009)、およびサイレージ中で生産される程度の量ならば3-HPAを家畜に投与しても生育上問題はなかったこと (宮崎ら2002)などをこれまでに報告した。しかし、*L. coryniformis* 394株およびグリセロールのロールベールサイレージへの接種効果は未検討であった。そこで今回、ロールベールサイレージのカビ汚染の問題解決などを目的として、*L. coryniformis* 394株およびグリセロールをイネホールクロップのロールベールサイレージに接種した場合の効果について調べた。

II 材料と方法

1. サイレージの調製

本研究では、イネホールクロップを材料としたダイレクトカットのロールベール調製試験を行った。この試験では*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種のカビ汚染に対する影響を調べた。供試品種としては、べこあおばを用いた。これを東北農業研究センター (岩手県盛岡市) 内の水田圃場で栽培して黄熟期 (出穂約30日後) に収穫し、後述の方法でサイレージ調製を行った。また、圃場内の平均的生育地点3ヶ所からイネを1ヶ所につき3株ずつ刈り取って1~2 cmに細切してよく混合し、原料草サンプル (乾物率42.9%、乾物中の水溶性糖含量4.6%、粗蛋白質 (CP) 含量6.2%) として供した。乾物率は通風乾燥機を用いて60℃下で48時間材料を乾燥することによって測定した。乾燥後にサンプルを1 mmメッシュのフィルターを通過するように粉碎し、水溶性糖含量を酵素試薬 (Fキット Sucrose/D-Glucose/D-Fructose UV-method、ロシユ・ダイアグノスティクス、東京) で、CPをケルダール法 (阿部2001) で測定した。

ロールベールの調製は、イネをブッシュカッターで刈り倒し、刈り倒したイネに*L. coryniformis* 394株が材料原物に 10^6 cells/gに、グリセロールが材料原物の1%となるように*L. coryniformis* 394株のMRS培地培養液 (30℃下で24時間培養) とグリセロール

の混合液を噴霧器で接種した。ロールベールはミニロールベール (東急機械) を用い、刈り倒したイネから直径50cm×高さ50cmのミニロールベールを4個調製した。この場合、ラップフィルム6層ロールベールに巻き付けた。無添加のものも同様にして4個調製した。これらのロールベールを屋外に8ヶ月間貯蔵した。貯蔵中ロールベールは、ネズミや昆虫の食害を防ぐためにコンクリート盤上に置いた。

2. 発酵品質などの分析

既報で述べたように (田中・篠田 2003)、貯蔵後ロールベールを1試験区につき4個ずつ開封してロールベール表面の上部、中央部、および下部計3ヶ所からカビの生えていない部分を、コアサンプラーを用いずに手作業で約200gずつ採取して1~2 cmに切断し、それらを等重量ずつよく混合してロールベールを代表するサンプルとした。pH、有機酸組成、および揮発性塩基態窒素 (VBN、柘木 2001) の測定で発酵品質を調べた。成分の分析には、既報 (Tanaka *et al.* 2009) と同様に材料を2倍の滅菌蒸留水に浸漬し、4℃下で一晩静置した抽出液を用いた。抽出液のpHはpHメータで、有機酸組成はキャピラリー電気泳動 (Agilent Technologies CEシステム、石黒ら 2000) で分析した。また乾物率を、通風乾燥機を用いて60℃下で48時間材料を乾燥することによって測定した。サイレージ中の乳酸菌および酵母菌数も併せて調べた。この場合、既報で述べたように (Tanaka *et al.* 2009)、乳酸菌は酢酸を添加して選択性を持たせたMRS寒天平板培地で、酵母は酒石酸を添加して選択性を持たせたポテトデキストロース寒天平板培地で検出した。また、濃リン酸およびトリプトファン処理による比色法 (Tanaka *et al.* 2009) で3-HPAを定量した。

3. カビ汚染率の検定

ロールベールのカビ汚染部位の割合を調べた。徐ら (2006) と同様に、ロールベールを開封後その原物重量を測定し、その後カビに汚染された部位を剥ぎ取って同じくその原物重量を測定し、(カビに汚染された部位の原物重量) / (ロールベールの原物重量) をカビ汚染率として算出した。

4. 統計処理

本研究のデータについては1試験区当たり4検体ずつ供し、本文および図表には、それらの平均値および標準偏差を表示した。平均値の有意差検定はフィッシャーのLSD法 (Ostle 1963) によって行った。

Ⅲ 結果と考察

貯蔵後、供試ロールバールのラップフィルムに破損は見当たらなかった。ロールバールの重量は無添加区で 34.4 ± 1.1 kg、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区で 34.9 ± 1.0 kgであり、有意差はなかった。ロールバールサイレージの乾物率も、無添加区で $38.1 \pm 1.3\%$ 、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区で $40.3 \pm 2.9\%$ となり、有意差はなかった。

ロールバールサイレージの発酵品質、生菌数、および3-HPA濃度を表1に示した。

発酵品質は表1に示した値から計算すると、対照区のVスコアは87点で良好だったが、不良発酵の産物であるn-酪酸が0.09%検出されたのに対し、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区からはn-酪酸は検出されず、Vスコアも98点でさらに良好だった。すなわち、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種による酪酸生成の抑制が認められた。

無添加区から3-HPAは検出されなかったが、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区の3-HPA含量は不検出～17ppmで平均値は13ppmであった(表1)。なお、加水稲わらやトウモロコシホールクロップのサイレージに*L. coryniformis* 394株およびグリセロールを接種した場合、それらの3-HPA含量は、貯蔵初期(1～3日後)に最大となるが(25～35ppm)、3-HPAは化学的に不安定であり、その後はサイレージ中の他の成分との化学反応(Claissé・Lonbaud-Funel 2000; Luethi-Peng *et al.*

2002)などを起こして分解し、減少する傾向にあることを先に報告した(Tanaka *et al.* 2009; 田中ら 2015)。それら既報の結果を考慮すれば、本研究においても、貯蔵初期にはより多くの3-HPAが生成されており、その後サイレージ中の他の成分との化学反応などで分解して開封時には13ppm程度まで含量が減少した可能性が高いと考えられた。

なお、酵母菌数は、無添加区と*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区との間で有意差は認められなかった。その理由については、現在のところ不明である。

次に、開封後のロールバール表面にはカビの生育が認められた。ロールバールのカビ汚染部位の原物重量は無添加区で 6.9 ± 2.2 kg、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区で 2.3 ± 0.8 kgであり、有意差が認められた。

ロールバールのカビ汚染率を図1に示した。両試験区を比較してみると、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区のカビ汚染率の値は6.8%と無添加区の20.4%に比べて有意に低く、これらの接種によってカビの生育が抑制可能なことが示された。

既報(Tanaka *et al.* 2003)では、*L. coryniformis* 394株を単独で実験室規模の加水稲わらサイレージに接種したところ、サイレージ貯蔵後のカビ生育抑制効果はほとんど認められなかった。一方、*L. coryniformis* 394株をグリセロールと共に接種すると、カビの生育が遅延することが認められた。この加水稲わら材料を用いた追試を行ったところ、*L. coryniformis* 394株およびグリセロール接種区の貯蔵後の3-HPA濃度は約17ppm程度にとどまった

Table 1 Fermentation quality and microbiological composition of round bale silage of whole-crop rice inoculated with *Lactobacillus coryniformis* strain 394 and glycerol.

Inoculant	pH	Organic acids ¹⁾ (% in fresh matter)				VBN/ T-N ²⁾ (%)	Microbial cells ³⁾ (log cfu/g)		3-HPA (ppm in fresh matter)
		Lact.	Acet.	Prop.	n-But.* ⁴⁾		LAB	Yeast	
Untreated	4.36	0.65	0.46	0.02	0.09	6.9	8.0	6.9	ND (<3)
	± 0.08	± 0.14	± 0.02	± 0.01	± 0.02	± 1.6	± 0.3	± 1.1	
<i>L. coryniformis</i> +glycerol	4.30	0.98	0.46	0.05		4.5	8.0	7.7	13
	± 0.07	± 0.53	± 0.01	± 0.03	ND (<0.01)	± 0.5	± 0.3	± 0.2	± 22

Data are presented as (means) \pm (standard deviations).

1) Lact.; lactic acid, Acet.; acetic acid, Prop.; propionic acid, n-But.; n-butyric acid, ND; not detected.

2) VBN/T-N; volatile basic nitrogen in total nitrogen.

3) LAB; lactic acid bacteria.

4) Asterisk represents a significant difference between the two groups.

* : $p < 0.05$, $n=4$.

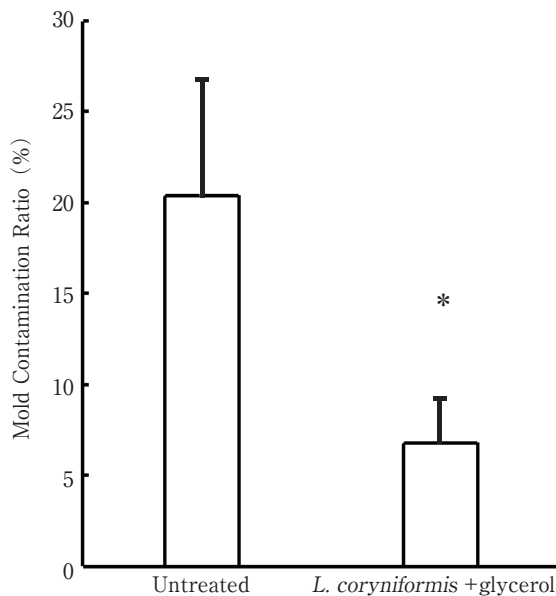


Fig.1 Contamination by mold on round bale silage of whole-crop rice. Bars indicate standard deviations.

Asterisk represents a significant difference between the two groups.

* : $p < 0.05$, $n = 4$.

(Tanaka *et al.* 2009)。

これまでの検討 (Nakanishi *et al.* 2002) からは、13~17ppm程度の3-HPA濃度におけるカビ類の生育抑制効果は低く、既報 (Tanaka *et al.* 2003) や今回のカビ生育抑制効果を3-HPAのサイレージ中での蓄積だけで説明するのは不十分と考えられる。しかし原因は不明にしても、上記の加水稲わらを用いた試験結果では、*L. coryniformis* 394株を単独で接種するのではなく、本菌株をグリセロールと共に接種した場合にカビの生育抑制が認められたわけであり、この知見からは、今回の*L. coryniformis* 394株接種区におけるカビ生育抑制も本菌株をグリセロールと共に接種したことによるものと考えられる。

一方、前報 (田中ら 2015) では、トウモロコシホールクロップサイレージにおいて3-HPAがサイレージ中の他の成分と化学反応を起こして分解されることが示唆された。既報 (Tanaka *et al.* 2003) および今回の試験結果の原因を解明するためには今後、サイレージ中に3-HPA分解産物が存在しないか、またそのような分解産物が存在する場合には、それがカビに対して生育阻害活性を有していないか調べる必要があると思われる。

また、接種コストの低減や接種液の取り扱い性の改善の見地からは、グリセロールの必要添加量を低減できないか検討が必要であろう。

以上の結果からは、*L. coryniformis* 394株およびグリセロールの接種によってイネホールクロップロールベールサイレージの発酵品質改善やカビ汚染抑制ができる可能性が示唆された。そのような可能性を実験室規模でないロールベールの調製試験で示唆したことに本研究の意義がある。ただし、本研究の接種方法の実用化のためには、今後さらにロールベール調製試験を重ねて接種効果の再現性を示す必要がある。

引用文献

- 1) 阿部 亮. 2001. 一般成分 (6成分). 石橋晃監修, 新編動物栄養試験法. 養賢堂. 東京. p455-466.
- 2) Axelsson, L. T.; Chung, T. C.; Dobrogosz, W. J.; Lindgren, S. E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microb. Ecol. in Health and Disease. 2 : 131-136.
- 3) Claisse O.; Lonvaud-Funel, A. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. Food Microbiol. 17 : 513-519.
- 4) 石黒瑛一, 日比野洋, 曾我朋義, 柳井博子, 澤田浩和. 2000. キャピラリー電気泳動法による配合飼料中の8種類の有機酸の同時定量. 食品衛生学会誌 41 : 261-267.
- 5) 徐 春城, 蔡 義民, 守谷直子, 吉田宣夫. 2006. 乳酸菌添加による稲ワラロールベールサイレージの発酵品質, 乾物摂取量および栄養価の改善. 日草誌 52 : 166-169.
- 6) 亀井雅浩, 宗重 学. 2007. 飼料用稲の小型ロールベール収穫・調製型マニュアル. 農研機構 近畿中国四国農業研究センター. 福山. 26p.
- 7) Luethi-Peng, Q.; Schaerer, S.; Puhani Z. 2002. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 : 73-80.

- 8) 榎木茂彦. 2001. 揮発性塩基態窒素. 石橋 晃監修, 新編動物栄養試験法. 養賢堂. 東京. p500-501.
- 9) 宮崎 茂, 板橋久雄, 大桃定洋, 田中 治, 藤田泰仁, 蔡 義民, 山中典子, Guruge, K.S. 2002. 乳酸菌が産生する抗菌性物質ロイテリンの牛第一胃機能への影響評価. 第134回日本獣医学会講演要旨 : 216.
- 10) Nakanishi, K.; Tokuda, H.; Ando, T.; Yajima, M.; Nakajima, T.; Tanaka O.; Ohmomo S. 2002. Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin. Jpn. J. Lactic Acid Bact. 13 : 37-45.
- 11) Ostle, B. 1963. Statistics in research, 2nd edn. Ames. Iowa State University Press. 585p.
- 12) 田中 治, 篠田 満. 2003. イネホールクroppサイレージのロールベールサンプリング方法及び乳酸菌添加効果. 日草誌 49 : 163-169.
- 13) Tanaka, O.; Cai, Y.; Fujita, Y.; Miyazaki, S.; Ohmomo, S.; Nakanishi, K. 2003. Effects of inoculation of reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* on ensiling rice straw. Grassl. Sci. 49 : 222-228.
- 14) Tanaka, O.; Komatsu, T.; Oshibe, A.; Cai, Y.; Miyazaki, S.; Nakanishi, K. 2009. Production of 3-hydroxypropionaldehyde in silage inoculated with *Lactobacillus coryniformis* plus glycerol. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73 : 1494-1499.
- 15) 田中 治, 出口 新, 内野 宙, 魚住 順, 北村 亨, 中西載慶. 2015. 乳酸菌*Lactobacillus coryniformis*およびグリセロールの実験室規模トウモロコシホールクroppサイレージへの接種効果. 日草誌 60 : 235-239.

