

氏名	李雁冰
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第4288号
学位授与の日付	平成23年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Bacterial and fungal community associated with anaerobic storage and aerobic spoilage of crop silage (牧草サイレージの嫌氣的貯蔵および好氣的変敗に関わる細菌および真菌群集に関する研究)
論文審査委員	准教授 西野直樹 教授 近藤康博 教授 宮本拓

学位論文内容の要旨

Of the many factors that can affect the crop ensiling, the type of microorganisms that dominate the process often dictates the quality of the silage produced. The type of silage microorganisms can be affected by various factors, e.g. crop species, dry matter (DM) content, availability of sugar substrates, stage of maturity at harvest, storage temperature and density of the silage mass. Traditional culture-based assays may be biased by the growth characteristics of the microorganisms studied, and less than 10% of the microbial diversity present is estimated to be cultivable. In this study, culture-independent microbial community analyses were employed to investigate the effects of DM level (wilting), ensiling period, crop species and lactic acid bacteria (LAB) inoculation on anaerobic storage and aerobic spoilage. A survey of large-scale silo was also carried out to determine the diversity of microbial communities in farming practice.

First, the effects of crop species, DM level and ensiling period on silage bacterial community were examined. 2,3-butanediol, acetic acid and lactic acid were the dominant products in Italian ryegrass, guinea grass and whole crop corn silages, respectively, and diverse species of enterobacteria and LAB were identified by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as the bacteria accounting for the fermentation.

Next, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* were inoculated to Italian ryegrass and whole crop corn to examine how bacterial inoculant can function in the process of ensiling and aerobic spoilage. LAB inoculation eliminated parts of the indigenous bacterial community in Italian ryegrass silage, while the inoculated species were found only as additions in whole crop corn silage. Upon spoilage, substantial changes occurred in bacterial community in Italian ryegrass silage. Fungal community was markedly altered due to spoilage in whole crop corn silage.

Following experiment was a survey to monitor the variations in the bacterial community of large-scale practical silos. Silage samples were collected in 2008 and 2009 from 3 dairy farms, wherein the farmers arranged for a contractor to produce corn silage using bunker silos. Lateral and perpendicular differences were found within a silo both in the fermentation products and bacterial community.

Finally, the role of *Lactobacillus acetotolerans*, which was isolated from the above survey, was evaluated. Italian ryegrass and whole crop corn silages were prepared, and the activity of fermentation improvement and spoilage inhibition was compared with that of *L. buchneri*. Both *L. acetotolerans* and *L. buchneri* suppressed aerobic spoilage regardless of the silage crops, and the inoculated LAB species survived long storage.

The above findings have shown that the microorganisms that affect the quality of silage can be well understood by employing culture-independent community analyses in addition to conventional culture-based assays and fermentation products determination. The microbial community may be much more diverse than reported in previous literatures, and the efficacy and activity of silage additive will be clearly shown as how indigenous microbial community is affected by the treatment. Association of unexpected microorganisms can be detected easily, facilitating the development of novel microbial inoculants. These experiments will enable ensiling to improve the quality and safety of animal products.

論文審査結果の要旨

本研究は、サイレージ（発酵飼料）の貯蔵および好気的変敗に関わる微生物群集を、培養法および非培養法のDGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）によって調べたものである。サイレージ調製における微生物の役割とその重要性は古くから認識されているが、培養法に基づくこれまでの知見は、優勢菌とされる乳酸菌に特化したものが多かった。微生物の分類・同定法の進展により、近年は、選択培地を使わない群集解析が可能となっている。それらを飼料の微生物研究に応用し、以下に示すような知見を得た。

イタリアンライグラス、ギニアグラスおよびトウモロコシホールクロップを用いて、アルコール、酢酸および乳酸主体の多様なサイレージを調製した。細菌群集を調べたところ、アルコール発酵には大腸菌群が強く関わっていること、酢酸発酵は乳酸菌の代謝活性が長期貯蔵で変化すること示され、非培養法による群集解析がこれまでの知見を改定しうる有用な手法であることが明らかとなった。

次に、乳酸菌製剤による発酵改善と細菌および真菌群集の関連について調査した。乳酸菌添加は顕著に発酵特性を変化させたが、添加菌種が他をすべて駆逐することはなく、多様な細菌群集の一部となって改善効果を示すことが明らかとなった。また、開封時の微生物群集が好気的変敗を起こすとは限らず、少数の細菌および真菌種が新たに増殖・出現して変敗が起こる事例も示された。

続いて、これらの解析手法を実規模サイロの実態調査に応用することを試みた。岡山県笠岡市の大型サイロを対象にして細菌群集を調査したところ、*Lactobacillus acetotolerans*や*Lactobacillus panis*といった、これまで報告例のない多様な乳酸菌が複数の大規模酪農家に共通して存在することを明らかにした。2年目の実態調査時に*L. acetotolerans*の分離にも成功し、モデルサイロを用いた添加実験によって、*L. acetotolerans*に発酵改善および変敗防止能があることを明らかにした。

これらの知見は、牧草サイレージの嫌气的貯蔵および好気的変敗に多種多様な微生物種が関わっていること、事前の予想をとまなわない非培養法で微生物群集を調べることがきわめて重要であることを示している。*L. acetotolerans*の検出と新規製剤化へのアプローチは、関連分野の研究者に対するインパクトも大きい。よって、李 雁冰氏は自然科学研究科の博士（学術）の学位を受ける資格があるものと判断した。