

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田 中 治

飼料作物や牧草を乳酸発酵によって保存性を付与した家畜飼料をサイレージと呼び、pHが低く乳酸含量が高いほど良質とされている。しかし、その発酵の過程で十分にpHが低下しない場合には、しばしば酪酸菌が増殖してサイレージの品質低下を招く。それを防ぐためには、サイレージ調製時に乳酸生成能の高い乳酸菌を材料に接種する必要がある。

本研究では、サイレージ中において高い乳酸生成能を持ちうる菌株の選抜を目的として、まず、乳酸菌の選抜に適したサイレージ発酵モデル実験系とサイレージ発酵試験方法を新たに開発し、次にそれらを用いて、サイレージ添加用の乳酸菌菌株の選抜を行った。さらに、それら選抜株の遺伝的改良を目的として、それらのプロトプラスト再生方法とプロトプラスト融合株の作出を検討した。

1. 新規サイレージ発酵モデル実験系及びサイレージ調製法（パウチ法）の開発

簡便でかつ追試可能なサイレージ発酵モデルとして以下の実験系を開発した。すなわち、同一ロットのアルファルファ乾草粉末に水とグルコースを所定量加えてそれらの含有率を調節した培地（AHC培地）を滅菌し、これに、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*)、サイレージの不良発酵原因菌である酪酸菌 (*Clostridium butyricum*) 及びColi型細菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を接種した後、食品包装用フィルムを材質とした袋（パウチ）中に密封し嫌気条件下で培養する方法（パウチ法）である。本法によって、サイレージ中のColi型細菌が酪酸発酵の誘導に密接に関与していることを立証した。また、生の牧草を材料としたパウチ法でも、その発酵品質は従来のガラスビンサイロによる方法に比べて大差はなく、本法が実験室規模のサイレージ調製にきわめて有効に利用できることが示された。

2. パウチ法を用いた *Lactobacillus* 属及び *Pediococcus* 属乳酸菌株の選抜

パウチ法を用いて乳酸菌株を検索し、高増殖能力によって高い酪酸発酵抑制能を有する *L. plantarum* 2株と *L. pentosus* 1株、高い乳酸生成量を示す *L. rhamnosus* 1株を選抜した。次に、これらの選抜株の動態及び発酵品質に及ぼす添加効果をパウチ法で調べたと

ころ、*L. plantarum* 及び *L. pentosus* の3菌株のいずれかを *L. rhamnosus* と共に接種した場合に、各菌株を単独で接種した場合より多くの乳酸が生成し、対糖乳酸収率も向上した。従って、*L. plantarum* または *L. pentosus* 選抜株のいずれかと *L. rhamnosus* 選抜株を混合接種することがサイレージ調製に有用と考えられた。一方、サイレージから *L. curvatus* 3株及び *Pediococcus* 属菌1株を新たに分離・選抜したが、*L. curvatus* は低温条件下で良好な生育を示し、*Pediococcus* sp. は低水分の材料（乾物率65.0%）を用いたサイレージ調製において、いずれも高い乳酸生成能が認められた。従って、*L. curvatus* は低温条件下でのサイレージ調製に、*Pediococcus* sp. は低水分のサイレージ調製に有用と考えられた。

3. *Lactobacillus* 属及び *Pediococcus* 属乳酸菌選抜株のプロトプラスト再生

方法の確立ならびにプロトプラスト融合の試み

プロトプラスト融合法によって上述の乳酸菌選抜株を遺伝的に改良することを目的として、上記の選抜菌株についてプロトプラスト再生法を検討した結果、浸透圧調節剤（0.3～0.5M ラフィノース及び0.1M MgCl₂）の他に、ゼラチン、ポリビニルピロリドン（PVP）、アルギン酸カルシウム等のコロイド物質を高濃度で培地に添加することが有効であり、再生に適したコロイド物質は菌種によって異なることが示された。各菌株についてそれぞれに最適の培地組成を工夫し、嫌気条件下で培養することによって、*L. plantarum* および *L. pentosus* で88～99%、*L. rhamnosus* で30～41%、*L. casei* で10～43%、*L. curvatus* で19～33%、*Pediococcus* sp. で16～36%、の各プロトプラスト再生率が得られた。従来の報告に比べていずれもきわめて高い再生率である。次いで、*L. rhamnosus* 選抜株と *L. plantarum* 選抜株とのプロトプラスト融合株の作出を検討したが、目的とする融合株を選抜するには至らなかった。

以上を要するに、サイレージ添加用乳酸菌の選抜に適した発酵モデル実験系とサイレージ発酵試験方法を新たに開発し、それらを用いて、有用な形質を持つ菌株として *Lactobacillus* 属及び *Pediococcus* 属乳酸菌計8株を選抜した。また、選抜株の遺伝的改良を目的として、それらのプロトプラスト再生方法を新たに確立した。本研究で得られた成果は学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。