

食品製造副産物を用いた高密度乳酸菌培養と乳牛への給与効果

平康博章・藤谷泰裕・瀬山智博・笠井浩司・西村和彦・三枝尚洋*・中野長久*

High Density Culture of Lactic Acid Bacterium by Utilizing Food Waste and Effect of Lactic Acid Bacterium Administration on Milk Cows

Hirofumi HIRAYASU, Yasuhiro FUJITANI, Tomohiro SEYAMA, Kouji KASAI, Kazuhiko NISHIMURA, Naohiro MIEDA* and Nagahisa NAKANO*

Summary

The lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* (NBRC3070) was cultured in the solid media made by food wastes. The fermented media contained over 1.0×10^9 cfu/g of the *L. plantarum* and was preferred by lactating milk cows. The *L. plantarum* administrated to the lactating milk cows suppressed the increase of IL-1, IL-6 and GGT, values which are considered as markers of latent inflammation. Furthermore the administration significantly decreased BUN and MUN concentration and improved serum total protein content. These data suggest that the *L. plantarum* can ameliorate inflammation and protein metabolism of lactating milk cow.

はじめに

平成17年度に閣議決定された新たな「食料、農業、農村基本計画」¹⁾に掲げられた食糧自給率の向上のためには、飼料自給率の向上が不可欠である。また平成19年の「食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律」(食品リサイクル法)改正²⁾により食品廃棄物の再生利用率の基準が強化され、食品製造副産物の飼料利用が重要な課題となっている。食品製造副産物の飼料化および保存性向上の方法として、乾燥よりも低コストな発酵によるサイレージ化が注目されているが、家畜の嗜好性、保存性の高い高品質な食品製造副産物サイレージの生産には有用微生物を添加し発酵させることが有効である。

また、大規模集約化の進む畜産経営において、現在、牛の乳房炎をはじめとする感染による家畜の損耗が慢性化しており、生産農家の経済的損失が大きなものとなっている。これらは抗生物質等の抗菌剤や治療薬により対処されているが、近年は食品の安全性への関心が強まっており、投与薬物の残留や抗生物質長期投与による耐性菌発生の懸念を払拭するために、安全で、損耗防止につながる免疫賦活効果を持つ機能性飼料の開発が強く求められている。

最近、乳酸菌等の微生物が動物の腸内細菌叢の調整効果を有することに加え³⁾、乳酸菌の細胞壁に含まれる1,3-グルカンが動物に対して免疫賦活効果や抗ストレス作用^{4,5)}を持つことが明らかになったことから、乳酸菌の有用性が改めて注目されている。そこで、本研究では、食品製造副産物を利用して、安価に乳酸菌を高密度に増殖させる技術を開発する。また乳牛への乳酸菌の給与試験を実施して乳牛への健康増進・免疫力向上効果を検証する。

材料および方法

1. 食品製造副産物を利用した乳酸菌高密度培養(実験1)

豆腐粕(事業所から排出されたものに酵母・グルコースを噴霧⁶⁾して保存したもの)、キャベツ屑、廃シラップ(栗のシラップ漬の残さ)、小麦ふすま(飼料用)を原料に用いて培地を作製した。豆腐粕・小麦ふすま・シラップをオートクレーブ(120・20分)して滅菌し、キャベツ屑はミキサーで粉碎して流動状としたのち85・30分加熱して殺菌した。クリーンベンチ内で、これらの原料を混合し固形培地とした。乳酸菌は糖分を主な栄養

第1表．乳酸菌増殖用培地の原料割合（重量％）

	シラップ	豆腐粕	野菜屑	ふすま
培地1	0	49	5	46
培地2	4	45	5	46
培地3	20	37	5	38
培地4	50	19	5	26
培地5	100	0	0	0

源として増殖するが、高濃度の糖分は水分活性の低下による生育阻害を招くことから^{7,8)}、最適な糖分の添加割合を検討するために第1表のようにシラップの配合割合を変えて5種類の配合の培地を作成した。水分含量は小麦ふすまで調整して50%に統一した。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (NBRC 3070) をMRS液体培地 (BD社) で前培養後、 5.0×10^7 cfu/gとなるように固形培地に添加し、滅菌ポリ袋に入れて真空パックして嫌気状態で遮光、24℃で静置培養した。

24時間後、培地中の乳酸菌生菌数を、MRS寒天培地 (BD社) を用いてコロニーカウント法で測定した。また、28日間にわたって同様に培養を行い、培地のpHをTwin pHメーターB-212 (堀場製作所) で、有機酸 (乳酸、酢酸、蟻酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸) 濃度をHPLC (LaChrom Elite 有機酸 (BTB法) 分析システム, HITACHI) で測定して培地の変化を検討した。

2. 高密度発酵飼料調製の実証と乳牛への嗜好性試験 (実験2)

実験1で確立した乳酸菌培養方法によって、実用化を視野に入れて第2表のような条件で非滅菌環境でスケールアップした発酵飼料調製の実証試験を行った。実験1の結果からシラップ4%の配合割合で総重量20kgとなるよう飼料原料を混合し、発酵原料の滅菌程度により、乳酸発酵が優位になるか検討を行った。条件1, 2には50mlのPBSに懸濁した *L. plantarum* を 5×10^7 cfu/gとなるよう添加した。条件3は乳酸菌を添加しない場合の対照サンプルとした。それぞれを2重にしたプラスチック袋に詰め、掃除機で内部の空気を抜き、24℃で48時間にわたって培養を行った。

発酵終了後、乳牛への嗜好性試験により、飼料としての適性を調べた。乳酸菌給与と試験に使用した牛とは別の泌乳牛5頭に対して、条件2で調製した乳酸菌発酵飼料とその原料である小麦ふすまの比較、または乳酸菌発酵飼料と日常給与している固形配合飼料 (ハイフレックふじ, 日本配合飼料株式会社) を比較するために、それぞれ150mlカップ1杯分ずつ同時に供試牛の飼槽中央から左右それぞれ50cmの位置に提示し、採食行動を1分間

第2表．乳酸発酵飼料の調製条件

条件1	原料を滅菌後、乳酸菌を植菌
条件2	原料を滅菌せず乳酸菌を植菌
条件3	原料を滅菌せず、植菌もしない

観察した。また飼料を与える位置を反転させて、延べ10頭分の試験結果を得た。

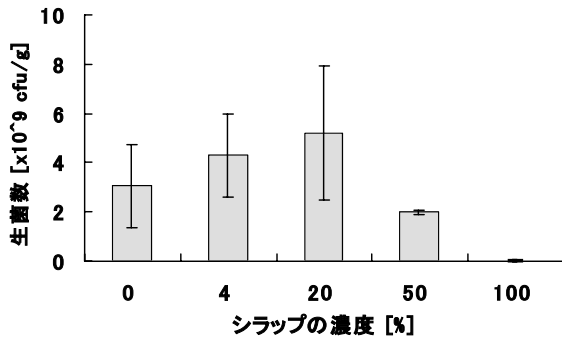
3. 泌乳牛に対する高密度乳酸菌の給与効果 (実験3)

泌乳ステージ中～後期の乳牛5頭に対して、実験1, 2で使用した乳酸菌 *L. plantarum* の給与の影響を調べた。MRS液体培地で培養・増殖させた *L. plantarum* を遠心して回収し、生菌数が 1.0×10^{10} cfu/mlとなるよう生理食塩水に溶解して14日間毎日16時に経口給与した。給与量は給餌量10kgあたり100mlとした。すなわち生菌 1.0×10^{10} cfu/mlを飼料の1%与えた。給与開始日から給与終了7日後まで、乳 (朝・夕の搾乳時) と血液 (朝1回) を週1回採取して、乳生産性に対する影響、免疫能や健康状態に対する影響を調べた。乳成分は生乳検査所に測定を依頼した。血中のIL-1, IL-6はELISA (BIOSOURCE Immunoassay Kit) によって測定し、その他の項目はフジフィルム社ドライケム (DRI-CHEM3500V) で測定した。乳については給与開始7日前にも採取し、給与期間終了後も搾乳の可能な4頭 (No.2~5) については給与開始日から98日間、乳を14日間隔、血液を7日間隔で採取した。

結果および考察

1. 食品製造副産物を利用した乳酸菌高密度培養 (実験1)

培養24時間後、*L. plantarum* は、培地中のシラップの割合が0~50%の間では 1.0×10^9 cfu/g以上の密度に増殖した (第1図)。これは現在良質とされるサイレージ中の乳酸菌数 1.0×10^7 cfu/g ~ 1.0×10^8 cfu/gを上回るものである。シラップ20%での培養においては最高 3.2×10^{11} cfu/gの生菌密度が得られた事例があった (Data not shown)。シラップ50%では4%以下のものよりも増殖が低下し、シラップのみを培地としたときには乳酸菌生菌は検出できなく (1.0×10^5 cfu/g以下) になった (第1図)。シラップ4~50%の間に乳酸菌増殖に最適な配合割合があることが推察された。シラップ50%以上での増殖低下の理由には、水分活性の低下が菌の生育を妨げたことに加え、他の原料由来の栄養素 (微量元素等) が不足したことも考えられる^{7,8)}。



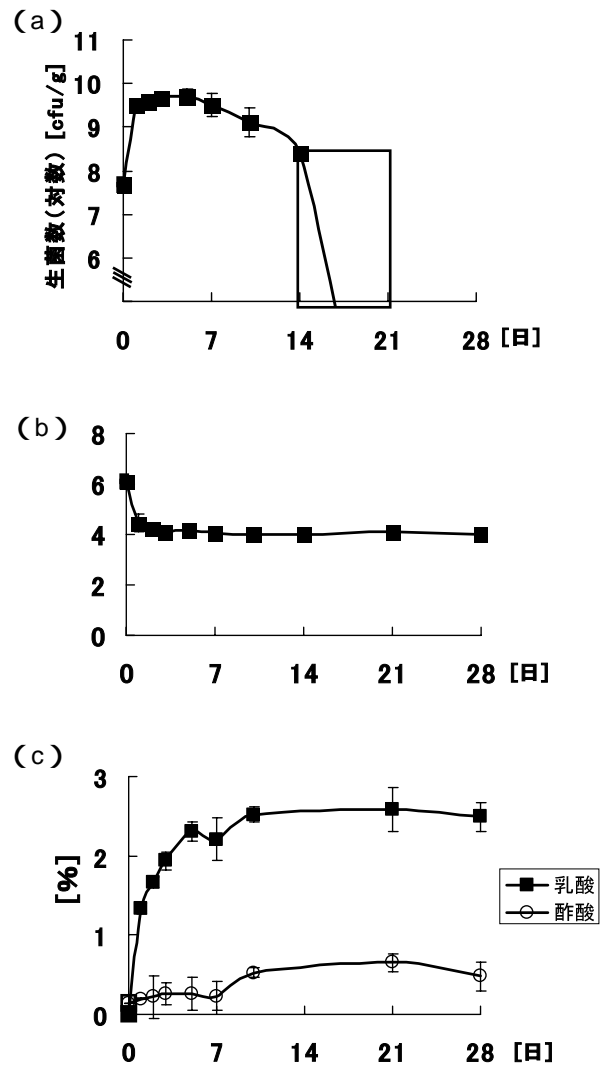
第1図．培地へのシラップ添加濃度と乳酸菌の増殖

シラップ4%の配合で28日間の培養を行った結果、培養7日間は菌数(生菌数)は高密度を維持したが、10~14日後から菌数(生菌数)が急激に低下し、21日後には 10^5 cfu/g以下になった(第2図a)。このことから、この培養条件では、培地が高密度の乳酸菌生菌を含む飼料として利用できるのは調製後10日頃までであることが明らかになった。培地のpHは3日目には4.0まで低下した(第2図b)。培地中の有機酸は、乳酸、酢酸が10日前後まで上昇を続け乳酸優勢で、その他の有機酸は検出されなかった(第2図c)。これらのことから、この乳酸菌発酵培地を飼料として利用するとき、発酵日数を調節することにより、家畜に対して生菌の効果あるいは有機酸の効果を選択的に引き出すことが可能であることが示された。

2．高密度発酵飼料調製の実証と乳牛への嗜好性試験(実験2)

*L. plantarum*を添加した条件1, 2では24時間後にMRS寒天培地上のコロニーカウント数が 10^9 cfu/gに達した(第3図a)。有機酸測定の結果、培地処理条件における乳酸と酢酸の生成比率は同様のパターンを示し、培地の原料を殺菌処理するかしないかにかかわらず乳酸発酵が優勢となることが明らかになった(第3図b)。乳酸菌無添加の条件3でも48時間後には菌数が 10^9 cfu/gに達したが、条件1, 2より乳酸の生成が少なく酢酸の生成が多く、pHも高い値を示した(第3図b)ことから、乳酸発酵が不十分であることが確認された。しかし、フリーク法による評価では、条件1・2は100点、条件3は90点で、乳酸・酢酸を除く酸はいずれの培地からも検出されず、今回使用した食品製造副産物を原料とすることによって乳酸菌を添加しなくとも良好な発酵飼料が調整できるという評価になった。今後、添加した*L. plantarum*が飼料の品質および家畜への給与効果に及ぼす影響を詳細に検討する必要がある。

嗜好性試験の結果、小麦ふすまに対して、乳酸菌発酵飼料は先に摂食される傾向にあり、嗜好性が高いと判定された。市販の配合飼料と比較した場合、観察時間内に

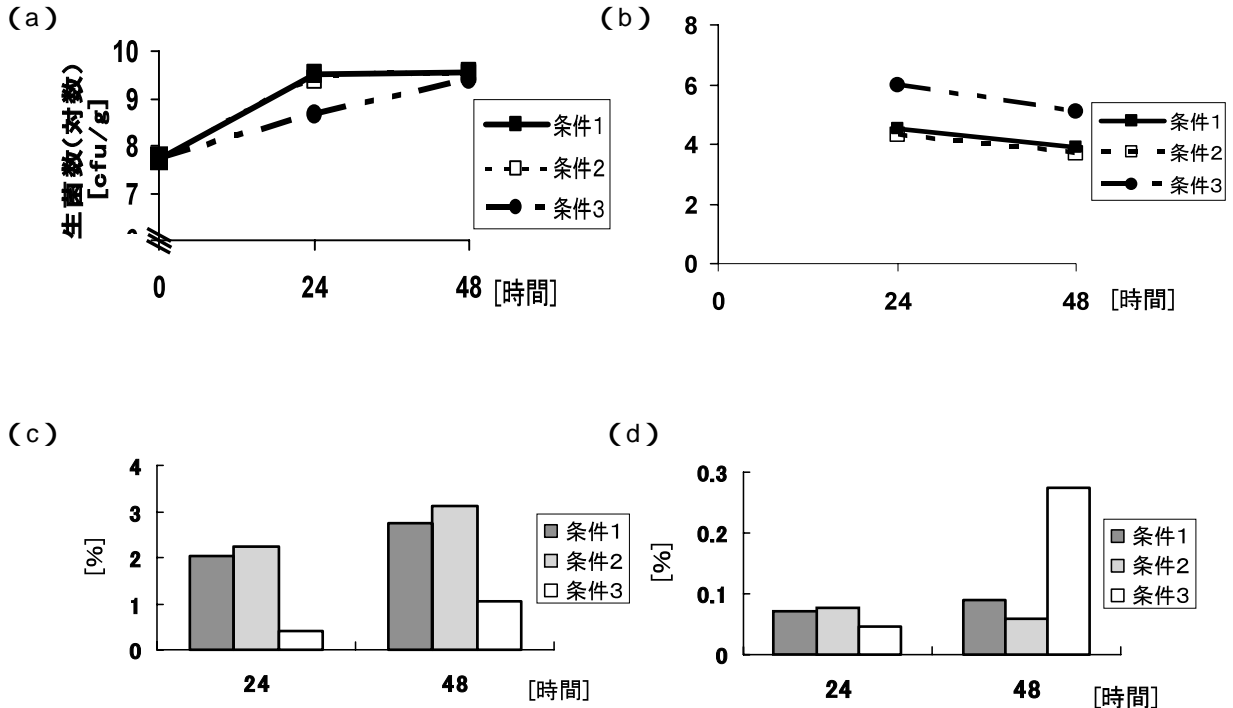


第2図．乳酸菌の長期間培養における培地中の
(a)菌数、(b)pH、(c)有機酸濃度の変化

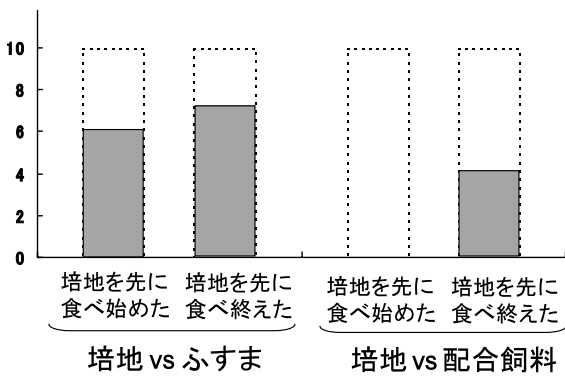
40%が完食し、飼料原料としての嗜好性は問題ないと判断できた(第4図)。

3．泌乳牛に対する高密度乳酸菌の給与効果(実験3)

農林水産省の定める乳牛の乳房炎検査項目には乳汁中体細胞数、塩素量等があるが⁹⁾、本研究では乳汁中体細胞数を測定した。乳酸菌給与終了後も91日目まで乳房炎の診断基50万個/mlを超えた個体はなかった。試験期間が暑熱ストレスのかかる梅雨~夏季(6月~9月初旬)であったにもかかわらず、体細胞数の増加抑制に効果があったことが期待されるが、乳酸菌給与の前後における変化は顕著でなく、今回の結果からは乳酸菌給与が乳房炎発症予防に直接関与したかは明らかにならなかった(第5図a)。また強い炎症や組織の壊死によって上昇する急性炎症性タンパク質CRP¹⁰⁾も高値を示さなかった(第6図a)。今回の研究では、各種の炎症によって増加し、CRPに先んじて上昇する炎症性サイトカインIL-1b,

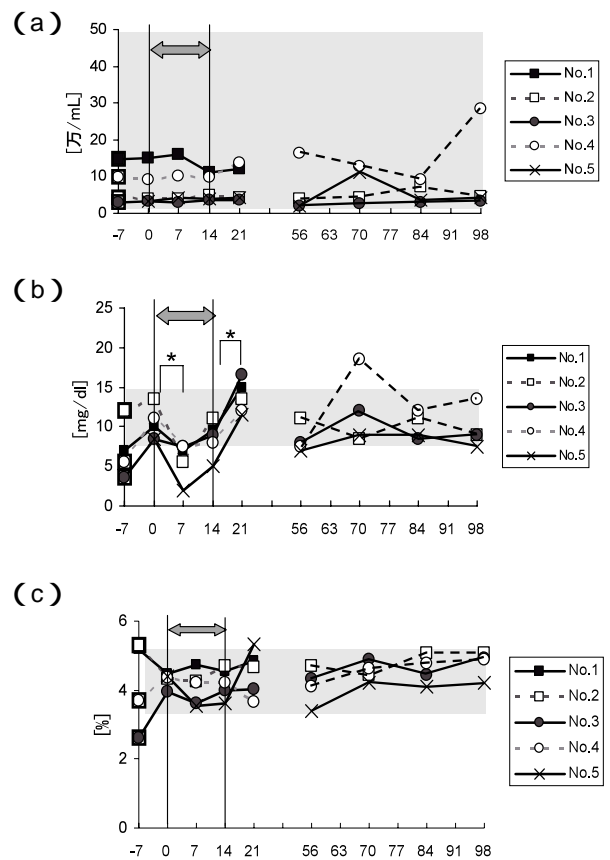


第3図．発酵飼料中の (a)生菌数，(b)pH，(c)乳酸，(d)酢酸



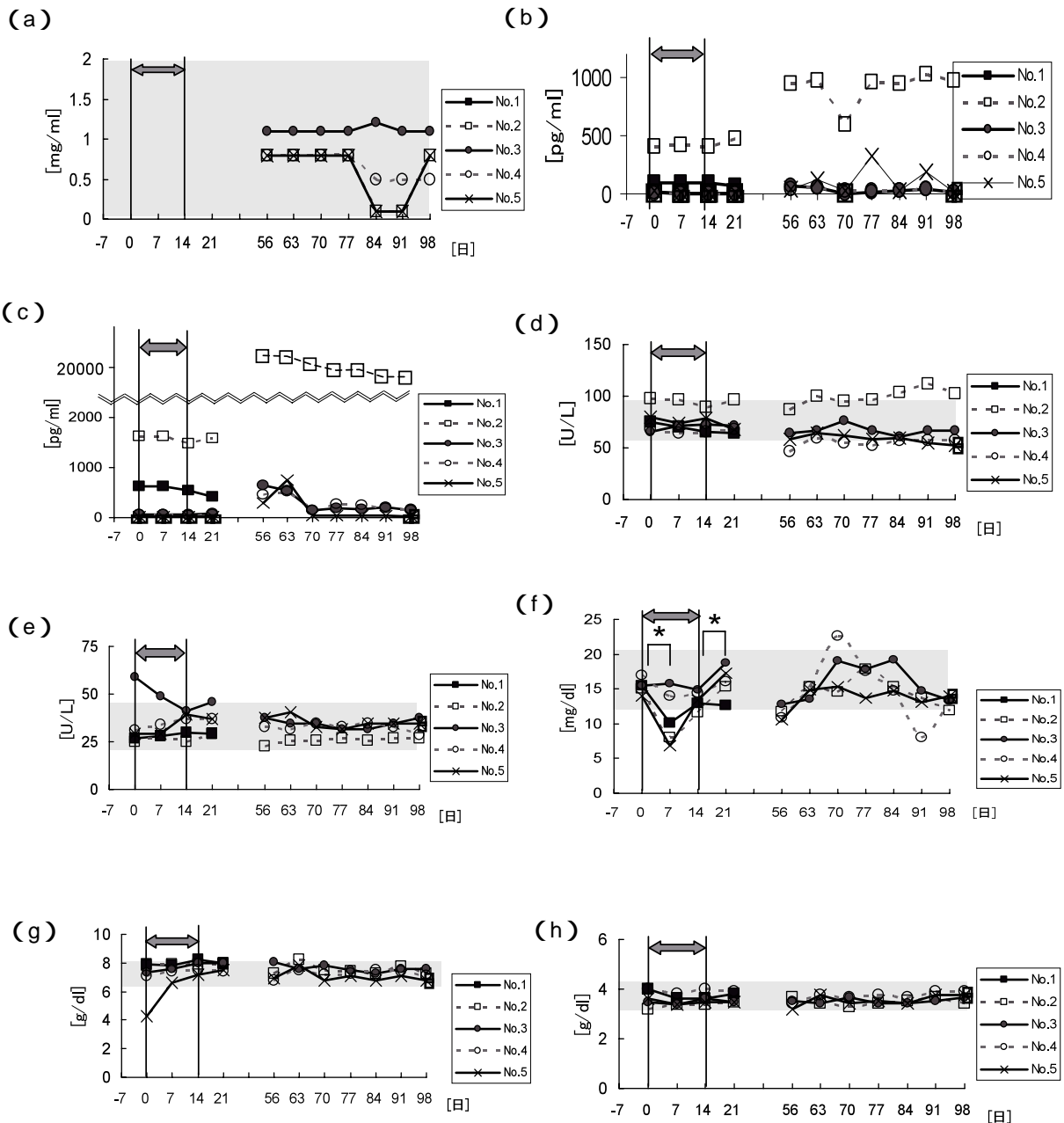
第4図．乳酸菌発酵飼料(培地)の嗜好性試験

IL-610)についても測定した．これらは給与期間中低位で推移したが，56日目以降に牛群の一部の個体で上昇するなど変動がみられ(第6図b, c)，特にIL-6は56-70日のNo.3やNo.5にみられるように乳汁中体細胞数が上昇するよりも1週間程度先んじて上昇する動きを示すことがあった．このことから，IL-1，IL-6は乳房炎等の臨床症状としては表れない軽度の炎症・ストレスの指標としての可能性が期待された．個体NO.2は試験期間を通じて，IL-1，IL-6が他の個体よりも高い値を取っていた．NO.2は肝臓の炎症や損傷によって上昇するGOT¹¹⁾の値もやや高値を示しており(第6図d)，何らかの炎症・ストレスによる負荷があったと考えられた．この個体は試験期間中，乳房炎や外傷による感染症の症状



第5図．泌乳牛の乳生産性に対する乳酸菌給与の影響

(a) 乳汁中体細胞数，(b) MUN，(c) 乳脂率
No.は個体番号，両矢印は乳酸菌給与期間，編掛け部は生理的範囲の目安を示す．



第6図．泌乳牛の血中成分に対する乳酸菌給与の影響。

(a)CRP, (b)IL-6, (c)IL-1, (d)GOT, (e)GGT, (f)BUN, (g)総タンパク質, (h)アルブミン。
No.は個体番号, 両矢印は乳酸菌給与期間, 編掛け部は生理的範囲の目安を示す。

は見られなかったが、最終分娩後（試験開始7ヶ月前）に子宮内膜炎および子宮蓄膿症を発症しており、その影響が残っていた可能性がある。乳酸菌給与以前のIL-1、IL-6は測定していないが、No.2のIL-1、IL-6が乳酸菌給与終了後の観察期間に高い値を示したことから、乳酸菌給与が抗炎症作用やストレス緩和作用を示しIL-1、IL-6の上昇を抑えていたことが考えられる。GOTと同じく肝臓の炎症で上昇するGGT¹¹⁾が乳酸菌給与前にNo.3

で高かったが、給与後正常範囲に移行した（第6図e）ことから、*L. plantarum*が乳房炎等の臨床症状には表れない軽度の炎症・ストレス負荷の軽減効果をもつことが期待できる。

また、反芻胃内のタンパク質の代謝状態を示すMUN¹¹⁾が乳酸菌給与7日で有意に減少（One-way repeated ANOVA, Tukey法, [P<0.05], 以下同じ）した。給与7日目から14日目にかけては若干上昇したが有意な変

化ではなく、給与終了後1週間経過した21日目には14日目に比べて有意に上昇した(第5図b)。BUNもMUNと同様に推移し、給与1週間で有意に減少し、給与終了後に有意に上昇した。また観察期間を通じて大きく変動した(第6図f)。このことから、ルーメン内の微生物活性の変動は大きく、その変動は比較的短い間隔であると考えられる。本試験では給与後に乳酸菌の働きによりルーメン中の窒素化合物が分解吸収されて一時的にMUNが下がったと考えられる¹²⁾。したがって、ルーメン内の消化・発酵のバランスが崩れて尿素態窒素濃度が高まっているとき、本実験のように高濃度の乳酸菌を給与することで瞬時にタンパク質代謝を改善できる可能性が見込めた。全身の短期的なタンパク質代謝状態を示す血中の総タンパク質は個体No.5で給与開始時に低かったが、給与1週間後から正常値に近づき、供試牛群におけるばらつきも有意(等分散のF検定, [P<0.05], 以下同じ)に減少した(第6図g)。このことから、*L. plantarum*給与が、ルーメン内微生物活性と窒素代謝のバランスを調節して、タンパク質代謝を改善することが期待できることが示唆された。長期的なタンパク質代謝の状態を示すアルブミンは変動しなかった(第6図-h)。

乳脂率については、乳酸給与前に低値であったNo.3の値が上昇し、給与期間の2週間にわたり、供試牛群において乳脂率のばらつきが給与前に比べて有意に小さくなった。給与終了後は、供試牛群において乳脂率のばらつきが再び有意に大きくなった。(第5図c)。このことから、*L. plantarum*がルーメン内の微生物活性を調整して、乳脂率を高位正常域に安定させたことが考えられる。乳量、乳中無脂固形分、乳タンパク質率、乳糖、また血中の電解質、血糖値、総コレステロール、カルシウム、リンの値は試験期間中、泌乳生理範囲内の値で推移し、大きく変動しなかった(Data not shown)。

以上の結果から、豆腐粕、キャベツ屑、廃シラップを含む培地で乳酸菌*L. plantarum*を高濃度に増殖させ、良質なサイレージとして利用できること、また、この乳酸菌は乳牛の健康維持に対する効果が期待できることが明らかになった。本研究では乳酸菌は食品製造副産物中で 1.0×10^9 cfu/gのオーダーまで増殖したが、MRS液体培地による乳酸菌培養では乳酸菌は 1×10^{10} cfu/g以上に増殖する¹³⁾。そのため食品廃棄物を用いた固体培地においてさらに高密度に増殖させるため、原料の配合比率、微量栄養素、pH調整等^{8,14)}今後条件検討の余地がある。乳酸菌の給与試験に関しては、今回は元々良好な飼育管理の下、試験期間中乳房炎等感染症の発症の可能性が低い牛群での試験であった。今後、供試牛を増やした大規模試験や乳房炎等感染症発生リスクの高い牛群での試験等を

行うことで乳酸菌の感染症に対する効果が解明できることが期待される。

本研究はJST産学共同シーズイノベーション事業顕在化ステージ、事業名「乳酸菌等による牛の乳房炎等防疫効果発現の解明」の一部として行ったものである。

．摘要

合成培地に比べて安価な食品廃棄物を用いて、乳酸菌*L. plantarum*を 1×10^9 cfu/g以上含み乳牛の嗜好性の良いサイレージを安定的に調製できる技術を開発した。これは現在良質とされているサイレージ中の乳酸菌数 1.0×10^7 cfu/g ~ 1.0×10^8 cfu/gを上回るものである。また*L. plantarum*の泌乳牛への給与によってMUN, BUNが有意に低下し、血中総タンパク質量や肝臓のGGT値が改善した個体が見られたことから、この乳酸菌がタンパク質代謝の調整等の効果を持つことが期待できる。

．引用文献

- 1) 農林水産省(2007). 食料, 農業, 農村基本計画.
- 2) 食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律.
- 3) 光岡知足(2001). 乳酸菌, 腸内フローラと健康 - 海外における最近の研究成果と今後の展望. 食品工業. 44: 17~45.
- 4) 宿前利郎.(2000). 真菌 -1,3-グルカンの構造と生物活性. 薬学雑誌. 120: 413~431.
- 5) Yoshizawa M, Yokoyama K, Nakano Y, Nakamura H. Protective effects of barley and its hydrolysates on gastric stress ulcer in rats. Yakugaku Zasshi. 2004 Aug;124(8):571-5.
- 6) 西村和彦・奥村寿章・崎元道男・亀岡俊則(2002). 豆腐粕へのワイン酵母と糖の散布による飼料化. 大阪府立農林技術センター研究報告. 38: 42~49.
- 7) 金子勉・森田英利・阿部敬悦・内田金治・山本直之・森下隆(1996). 乳酸菌の科学と技術. 学会出版センター. 89~132.
- 8) 高橋治男(2004). 食品のストレス環境と微生物 その挙動と検出. サイエンスフォーラム. 161~171.
- 9) 農林水産省経済局(2005). 家畜共済における臨床病理検査要領. 全国農業共済協会. 329.
- 10) Simon, L., Gauvin, F., Amre, D.K., Saint-Louis, P., Lacroix, J. (2004). Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systemic review and meta-analysis. Clin. Infect. Dis.

- 39:206-17.
- 11) 岡田啓司(2001). 生産獣医療システム 乳牛編3 . 農村漁村文化協会 . 25~65.
- 12) Sannes, R.A., Messman, M.A., Vagnoni, D.B. (2002). Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. *J.Dairy.Sci.*85:900-908.
- 13) Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Env.Microb.*66:4084-4090.
- 14) Ohara, H., Hiyama, K. and Yoshida, T. (1992) Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*36:773-776.