

# 飼料配合を目的とした乳酸菌凍結乾燥粉末の調製

長沼 孝多<sup>1</sup>・古屋 元宏<sup>2</sup>・佐藤 憲亮<sup>1</sup>・長坂 克彦<sup>3</sup>・柳田 藤寿<sup>4</sup>・乙黒 美彩<sup>4</sup>・小西 啓太<sup>4</sup>・木村 英生<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>工業技術センター・<sup>2</sup>畜産試験場・<sup>3</sup>総合農業技術センター・<sup>4</sup>山梨大学ワイン科学研究センター)

## Study of a Method for Making Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria Powder to Blend with Pig Feed.

Kota NAGANUMA<sup>1</sup>, Motohiro FURUYA<sup>2</sup>, Kensuke SATO<sup>1</sup>, Katsuhiko NAGASAKA<sup>3</sup>,  
Fujitoshi YANAGIDA<sup>4</sup>, Misa OTOGURO<sup>4</sup>, Keita KONISHI<sup>4</sup>, Hideo KIMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yamanashi Industrial Technology Center, <sup>2</sup>Yamanashi Prefectural Livestock Experiment Station,

<sup>3</sup>Yamanashi Prefectural Agritechology Center, <sup>4</sup>The Institute of Enology and Viticulture in Yamanashi University

**要約**：養豚用飼料に乳酸菌を配合するため、乳酸菌の培養条件および凍結乾燥条件を検討した。試験菌として *Lactobacillus plantarum* NBRC3070株を使用した。菌数は、培養後24時間で定常期となった。乳酸菌を凍結乾燥する際の賦形剤として、乳糖粉末を用いることで常温保存時の菌数減少を抑えることができた。以上の条件を参考に、山梨大学が分離した乳酸菌6S35M311株を培養し凍結乾燥粉末を調製した。凍結乾燥粉末の菌数は $3.7 \times 10^8$ 個/gで、豚への給与試験に使用可能であった。

**Abstract** : We consider a method for making freeze-dried lactic acid bacteria powder to blend with pig feed. On trial, we use *Lactobacillus plantarum* NBRC3070 for preparation the powder experimentally. It arrives at stationary phase after 24 hour of cultivation on Jar fermenter. Lactose powder is best for diluent base of freeze dehydration. Freeze-dried powder made from 6S35M311 that was lactic acid bacteria strain isolated from silage by Yamanashi University, is usable in examination of feeding.

### 1. 緒言

山梨県の養豚は、昭和34年の台風災害時に米国アイオワ州から贈られた種豚および飼育技術から発展したものである。例えば本県の代表的なブランド豚として発展が期待される、「甲州富士桜ポーク」は、同州から導入された種豚の系統豚「フジザクラ」に、本県畜産試験場が開発した合成系統豚を交配して生産されたものであり、きめ細やかな肉質と良質な脂肪などが特徴である。

しかし、全国的に、養豚を担う畜産農家は、家畜排せつ物の管理・処理で発生する悪臭<sup>1)</sup>や、窒素・重金属等の環境への排出および飼料への抗菌性物質添加による薬剤耐性菌の出現などの環境負荷問題を抱えている。特に本県は平地が少ないことから、養豚場が住環境に近く、その解決は喫緊といえる。

一般に、排せつ物の臭気低減には農場内の施設配置の改善や敷料利用<sup>1)</sup>などの手法が挙げられるほか、長谷川ら<sup>2)</sup>がブドウ搾り滓による堆肥化時の臭気低減を認めている。一方、飼料に着目した手法<sup>3)</sup>として、飼料への乳酸菌製剤の添加による臭気低減<sup>4)</sup>などが報告されている。

本研究では、養豚農家がコストや労力をかけず、豚排

せつ物の環境負荷を低減する方法として、豚飼料への乳酸菌製剤添加を検討する。本報では、ブドウ滓サイレージから分離された乳酸菌(山梨大学で実施)を、粉末状の乳酸菌製剤へと加工する方法について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 供試菌株

標準乳酸菌として *Lactobacillus plantarum* NBRC3070株を用いた。なお *L. plantarum* は、サイレージ等から検出<sup>5)</sup>事例がある乳酸菌である。本試験で供試した分離乳酸菌は、乳酸桿菌と推察される6S35M311株を用いた。

#### 2-2 使用培地

*L. plantarum* NBRC3070株および6S35M311株の前培養および大量培養の培地は、MRS液体培地(Becton Dickinson Microbiology Systems社製)を用いた。

#### 2-3 分析法

乳酸菌数の計測は、BCP加プレートカウントアガール(日水製薬社製)を用い、嫌気ジャーおよび酸素吸収・炭酸ガス発生剤(アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学

社製)で嫌気培養したものを使用した。

乳酸量の定量は、高速液体クロマトグラフを使用した。クロマトグラフの条件を表1に示した。

表1 乳酸の定量条件 (高速液体クロマトグラフ)

方式	ポストカラムpH緩衝法
ポンプ	LC-10AD (島津製作所社製) × 2
検出器	CDD-6A 電気伝導度検出器 (島津製作所社製)
カラム	Shim-pack SCR-102H φ8.0×300mm
溶離液	5mM ρ-トルエンスルホン酸
反応液	5mM ρ-トルエンスルホン酸 20mM Bis-Tris 100mM EDTA
カラム温度	40℃
流速	0.6ml/min

### 2-4 供試乳酸菌の大量培養および回収

供試乳酸菌の大量培養は、ジャーファメンター (MDL-6C, 丸菱バイオエンジニアリング社製) を用いた。MRS液体培地を用い、4Lスケール、培養温度35℃、pH5.8、回転75rpmに設定して最長74時間培養した。なお、培養液から適宜菌液を採取し、乳酸菌数の計測および乳酸の定量に用いた。

培養液からの乳酸菌の回収は、高速冷却遠心機 (CR-22G III, 日立工機社製) を使用し、培養液を8,000rpm、10℃、15分遠心して沈殿を回収した。沈殿の回収が不十分な場合は、容器を変更しさらに14,000rpm、5℃、20分遠心した。

### 2-5 供試乳酸菌の凍結乾燥粉末の調製

供試乳酸菌の凍結乾燥粉末の調製法は、回収した乳酸菌と賦形剤を混合し、凍結乾燥する方法とした。

賦形剤は、乳糖(ラクトース一水和物, 和光純薬製)を使用し、粉末あるいは10%水溶液として使用した。凍結乾燥は、乳酸菌と賦形剤を混合した後、-80℃で一晩凍結し、凍結乾燥機 (FDU-2200, 東京理化社製) で実施した。なお、凍結乾燥後の試料に塊が認められる場合は、振動式破砕機 (TI-100, アルミナ製容器, CMT社製) で5分間処理し、粉砕した。

## 3. 結果

### 3-1 *L. plantarum* NBRC3070株の大量培養

分離乳酸菌に先立ち、標準乳酸菌とした*L. plantarum* NBRC3070株を使用して、大量培養および凍結乾燥粉末調製の条件を検討した。

図1に、ジャーファメンターにおける*L. plantarum* NBRC3070株の増殖曲線を示した。*L. plantarum* NBRC3070株の菌数は、培養開始24時間後に $6.3 \times 10^9$ 個/ml、28時間後に $6.7 \times 10^9$ 個/mlとなり、以後58時

間後まで大きく変化しなかったことから、定常期に達したと考えられた。

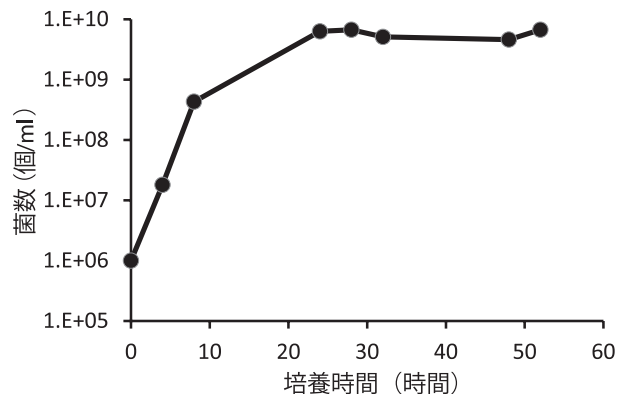


図1 *L. plantarum* NBRC3070株の増殖曲線

また、最大菌数の増加を目的として、培養開始25時間後と48時間後に培地成分の追加を行ったが、増加は特に認められなかった(データ省略)。

以上の結果から、ジャーファメンターを使用した乳酸菌の大量培養は、培養開始24時間後に定常期に達するものと仮定し、24時間後に乳酸菌を回収して凍結乾燥粉末の調製に用いた。

### 3-2 *L. plantarum* NBRC3070株の凍結乾燥粉末の調製

*L. plantarum* NBRC3070株の凍結乾燥粉末について、賦形剤を乳糖粉末で調製した結果を図2に、乳糖10%水溶液で調製した結果を図3に示した。

凍結乾燥粉末は、賦形剤が乳糖粉末の場合はやや硬質の塊になる傾向が認められ、豚飼料に混合する際には粉砕処理が必要と考えられた。



図2 乳糖粉末を賦形剤とした場合の*L. plantarum* NBRC3070株の凍結乾燥粉末 (矢印: 硬質の塊)

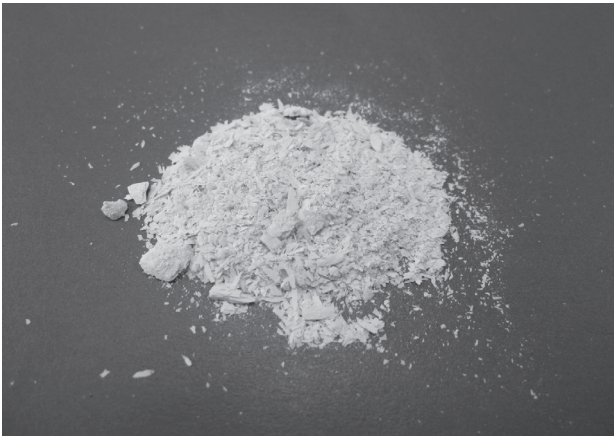


図3 乳糖10%水溶液を賦形剤とした場合の *L. plantarum* NBRC3070株の凍結乾燥粉末

また、凍結乾燥粉末およびその常温1ヶ月保存後の菌数を表2に示した。凍結乾燥粉末の菌数は、どちらも調製後は $10^{11}$  個/gオーダーあったが、常温1ヶ月保存後は減少した。減少は、賦形剤に乳糖10%水溶液を使用したものと比較し、乳糖粉末を使用したものは顕著に抑えられていた。

以上の結果から、乳酸菌の凍結乾燥粉末の調製には、賦形剤として乳糖粉末を使用した。

表2 賦形剤の違いによる凍結乾燥粉末の菌数の違い (*L. plantarum* NBRC3070株, 調製後および常温1ヶ月後)

<i>L. plantarum</i> NBRC3070 凍結乾燥粉末	調製後	常温1ヶ月保存後
	菌数 (個/g)	
賦形剤: 乳糖粉末	$1.2 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^9$
賦形剤: 乳糖10%水溶液	$7.5 \times 10^{11}$	$3.2 \times 10^5$

### 3-3 6S35M311株の大量培養および凍結乾燥粉末の調製

図4に、ジャーファメンターにおける6S35M311株の培養曲線および乳酸量を示した。6S35M311株は、培養開始24時間後に最大菌数 $4.9 \times 10^{10}$  個/mlとなり、以後74時間後まで $10^{10}$  個/ml近い菌数を維持した。乳酸量は、菌数と同様に増加し、最大で1.2 g/100mlであった。

凍結乾燥粉末の調製のため、培養後24時間の菌液を遠心分離で回収した。8,000rpm, 10℃, 15分の遠心は沈殿形成に不十分であったため、滅菌生理食塩水を加えて再懸濁後、14,000rpm, 5℃, 20分遠心した。本処理を2回繰り返し、上清を破棄して149.8gの沈殿を得た。

沈殿と混合する乳糖粉末は、沈殿と当重量(150g)では流動性が高くややゆるい状態であったことから200gとした。混合物は生地様(図5)となり、凍結乾燥したところ、*L. plantarum* NBRC3070株の場合と同様に塊と

なったことから、振動式破砕機で処理し粉末状とした(図6)。凍結乾燥粉末の菌数は $3.7 \times 10^8$  個/gで、給与試験に使用可能な菌数であった。

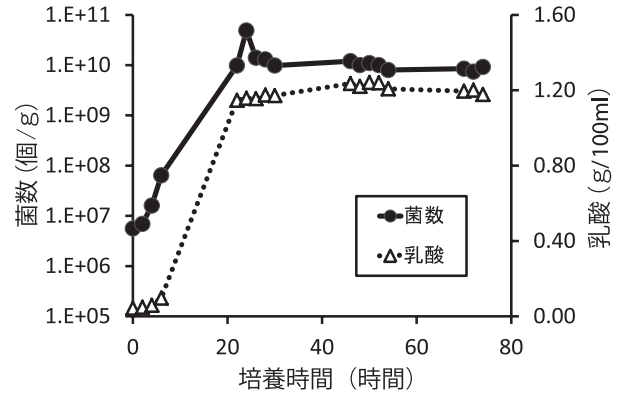


図4 6S35M311株の増殖曲線および乳酸量の推移

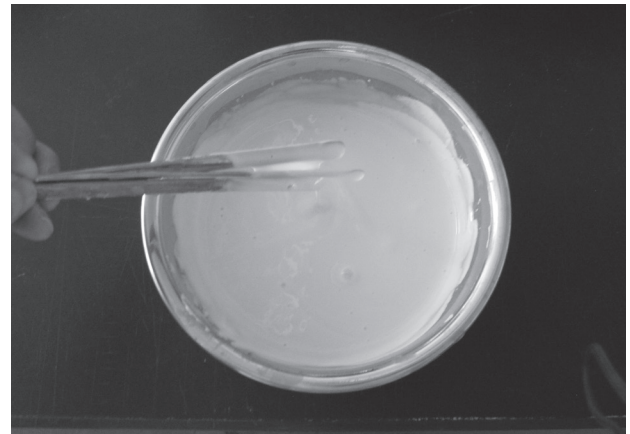


図5 6S35M311株と乳糖粉末の混合の様子



図6 6S35M311株の凍結乾燥粉末

## 4. 考察

本研究の目的は、養豚用試料に乳酸菌を配合するため、乳酸菌の大量培養条件および乳酸菌の粉末化条件を明らかにすることである。標準乳酸菌として使用した*L.*



*plantarum* は、スイートソルガムサイレージからの検出事例<sup>5)</sup>もある乳酸菌であり、ブドウ滓サイレージからの乳酸菌分離が行われるまでの指標とした。

乳酸菌の大量培養は、ジャーファメンターを使用して pH5.8 に制御し、35℃ で培養することで実施可能であった。本条件は一般的な乳酸菌の培養条件とほぼ等しく、*L. plantarum* NBRC3070 株および 6S35M311 株のどちらにも適用できることが確認された。

一方、培養時の最大菌数は、*L. plantarum* NBRC3070 株は  $10^9$  個/ml オーダーであったが、6S30M311 株は  $10^{10}$  個/ml オーダーであり違いが認められた。3-1 で示したとおり、*L. plantarum* NBRC3070 株の菌数には流加培養の効果が認められなかったことから、培地成分の欠乏が原因の可能性は低いものと考えられた。他方、遠心分離において *L. plantarum* NBRC3070 株が沈殿となった条件においても 6S35M311 株は沈殿になりにくかった (図5 参考) ことから、最大菌数の違いは菌体の大きさあるいは密度によるものと推察された。なお、今回は記載しなかったが、6S35M311 株と同じくブドウ滓サイレージ分離乳酸菌である 6S35M314 株は、最大菌数が  $10^9$  個/ml オーダーであり、遠心分離において *L. plantarum* NBRC3070 株と近い挙動を示すと考えられた。

市販の乳酸菌製剤には乳糖<sup>6)</sup> やデキストリン<sup>7)</sup> が含まれ、その多くが凍結乾燥により調製されていると推察された。乳糖やデキストリンは、微生物を粉末状とする賦形剤であるが、乳糖は凍結乾燥時の分散媒<sup>8)</sup> としての働きもあることに加え、菌液に混合する乳糖としての量により保存時の菌数減少が抑えられた (表2) ことから、保護剤としての働きも期待できると考えられた。ただし、通常は 10% 程度の水溶液で使用するものであり、凍結乾燥の容易さや粉末の細かさは 10% 水溶液で調製したものの方がより良好であった。

以上の方法により、乳酸菌凍結乾燥粉末の調製が可能であることがわかった。一方で、本法は培養機や凍結乾燥機が必要である点が難点である。飼料への乳酸菌混合を普及のためには、より簡易的な手法の検討が必要と考えられた。

## 5. 結 言

1. 養豚用飼料に乳酸菌を配合するため、乳酸菌の培養条件および凍結乾燥条件を明らかにした。
2. 培養は、ジャーファメンターを使用し、35℃、pH5.8 に制御して攪拌することで、 $10^9 \sim 10^{10}$  個/ml の菌数が得られた。
3. 凍結乾燥の保護剤は、乳糖粉末が適当であった。

## 参考文献

- 1) (一社)日本家畜輸出入協議会 畜産臭気問題の現状と対策 ([http://www.jlta.or.jp/news/image/seminar2012/jltaseminar2012\\_msyamamoto.pdf](http://www.jlta.or.jp/news/image/seminar2012/jltaseminar2012_msyamamoto.pdf) (2015/3/31 アクセス))
- 2) 長谷川達也, 森智和, 吾郷健一, 菊嶋敬子, 山崎修平, 上垣良信, 寺澤章裕, 御園生拓, 金子秀廣, 早川正幸: 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 5, P.1-19 (2010)
- 3) 中江利孝: 日本畜産学会報, 57(4), P.279-287 (1986)
- 4) 古川陽一: 岡山県総合畜産センター研究報告, 10, P.23-32 (1999)
- 5) 木内幹, 森江京子: 食品総合研究所報告, 55, P.19-23 (1991)
- 6) 柏崎守, 三谷賢治, 波岡茂郎: 日本養豚研究会誌, 8(2), P.67-70 (1971)
- 7) カルピス株式会社 「ファインラクト (子豚用)」商品説明 (<http://www.calpis.co.jp/feed/pig/pig00202.html> (2015/3/31 アクセス))
- 8) 根井外喜男: 微生物の保存法, 東京大学出版会 (1977)