

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-524911

(P2016-524911A)

(43) 公表日 平成28年8月22日 (2016. 8. 22)

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/20	(2006. 01)	C 1 2 N	1/20	A	2 B 0 0 5	
A 2 3 K	30/18	(2016. 01)	C 1 2 N	1/20	E	2 B 1 5 0	
A 2 3 K	50/10	(2016. 01)	A 2 3 K	30/18		4 B 0 6 5	
A 2 3 K	10/30	(2016. 01)	A 2 3 K	50/10			
			A 2 3 K	10/30			
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)				
(21) 出願番号	特願2016-526729 (P2016-526729)		(71) 出願人	515301144			
(86) (22) 出願日	平成26年7月3日 (2014. 7. 3)			ダンスター フェルメント アーゲー			
(85) 翻訳文提出日	平成28年3月1日 (2016. 3. 1)			スイス国. 6 3 0 0 ツーク. ポストスト			
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/062814			ラッセ 3 0			
(87) 国際公開番号	W02015/008185		(74) 代理人	100079038			
(87) 国際公開日	平成27年1月22日 (2015. 1. 22)			弁理士 渡邊 彰			
(31) 優先権主張番号	13177054. 7		(74) 代理人	100106091			
(32) 優先日	平成25年7月18日 (2013. 7. 18)			弁理士 松村 直都			
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		(74) 代理人	100060874			
				弁理士 岸本 瑛之助			
			(72) 発明者	フレイタス スワン ロザネ			
				ブラジル国 ミナスジェライス ラブラス			
				フェデラル ユニバーシティ オブ ラ			
				ブラス デパートメント オブ バイオロ			
				ジー			
				最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 サイレージ接種材料の安定性およびサイレーズの好氣的安定性を改善するための方法

(57) 【要約】

サイレーズに、サイレーズ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー (Lactobacillus hilgardii) を含むサイレーズ接種材料を添加する工程を含むサイレーズを処理する方法が提供される。好氣的変敗を防ぐか、または低減するのに有効であるサイレーズ接種材料。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)を含むサイレージ接種材料。

【請求項 2】

ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)は、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL51株および2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL52株のうち少なくとも1種またはそれらの遺伝的等価物である、請求項1に記載のサイレージ接種材料。 10

【請求項 3】

サイレージに、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)を含むサイレージ接種材料を添加する工程を含む方法であって、サイレージ接種材料は、好気的変敗を防ぐかまたは低減するのに有効である、サイレージを処理するための方法。

【請求項 4】

ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)は、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL51株および2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL52株のうち少なくとも1種またはそれらの遺伝的等価物である、請求項3に記載の方法。 20

【請求項 5】

サイレージは、伝統的な草、トウモロコシ(maize)、ムラサキウマゴヤシ、しおれた草、穀草類またはサトウキビサイレージである、請求項3または4に記載の方法。

【請求項 6】

サイレージは、バール、バッグ、バンカー、スティブサイロまたはサイロの中にある、請求項3～5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)を含むサイレージ。 30

【請求項 8】

ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)は、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL51株および2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL52株のうち少なくとも1種またはそれらの遺伝的等価物である、請求項7に記載のサイレージ。

【請求項 9】

2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL51株またはそれらの遺伝的等価物の分離株。 40

【請求項 10】

2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL52株またはそれらの遺伝的等価物の分離株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サイレージ(silage)に関する。より詳しくは、サイレージ接種材料およびサイレージの好氣的安定性を増強するためにサイレージ接種材料を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイレージとは、ウシおよびヒツジのような反芻(cud-chewing)動物などの反芻動物(ruminant)に給餌される発酵した高水分飼料である。サイレージは、保存サイロ、生牧草貯蔵法(エンシレージ:ensilage)と呼ばれるプロセスにおいて、発酵され、保存される。サイレージは、草またはドクムギ、アルファルファ、フェスク、トウモロコシ(トウモロコシ(maize))もしくはモロコシを含めた穀草類から作られることが最も多い。サイレージは、植物全体またはその一部から作られる。サイレージはまた、サトウキビを含め多数のその他の農作物から作られることもあり、これが行われる場合には、例えば、カラスムギのオートレージ、アルファルファのヘイレージなどのその他の名前が使用されることもある。カラスムギおよびエンドウマメなどの混合物が使用されることもある。

10

【0003】

サイレージの製造および関連する作物栽培は、ここ数年、いくつかの異なるプロセスが規定され得る程度に発達した。これらは、(i)特に低乾燥物質、例えば、25%未満を有する若い草のサイロ貯蔵、(ii)より高い乾燥物質、より成熟した草のサイロ貯蔵またはしおれ(wilting)によって達成される高乾燥物質であるが若い草のサイロ貯蔵および(iii)通常、約35%の乾燥物質濃度のトウモロコシの茎葉およびトウモロコシの穂軸を含む全トウモロコシおよび45~50%の乾燥物質の全穀草類、例えば、コムギ全体のサイロ貯蔵である。

20

【0004】

これらのプロセスは、一般に、良好な収率をもたらすが、問題がないわけではない。特に、(ii)および(iii)の場合には、1つの大きな問題が定期的に起こる。これは、好氣的変敗(spoilage)として知られる現象である。好氣的変敗のプロセスは、サイロの開放時、材料が空気に曝される場合に起こり、特定の相(phase)に分けることができる。

第1に、酵母および時には酢酸菌(acetic acid bacteria)が貯蔵有機酸を吐出し(respire)始め、サイレージpHが上昇し、温度が上がり始める最初の相がある。最初のpH上昇後、第2の相があり、この相では桿菌の活性が顕著であり温度の上昇と関連している。さらなる相は、真菌を含めた種々の微生物の活性を含む。

30

【0005】

相当な含量の乾燥物質、すなわち、30%を超えるものを含有するサイレージでは、変敗の問題は特に重大である。サイレージクランプが開けられ、サイレージが空気に曝されると、変敗は多かれ少なかれ見られる。

【0006】

サイレージプロセスを改善するために、主に、乳酸製造の程度および速度を増大し、好氣的変敗に対して保護するために、細菌接種材料などの生物学的添加物が広く使用されてきた。Mannらの特許文献1は、この状態を改善するための方法および組成物を提供している。特に、その少なくとも幾分かの記事は、好氣的変敗プロセスが、空気の侵入に対する曝露時のクランプにおける加熱と密接に関連していると認定することに基づいている。このようなサイレージのその後の試験は、高濃度の、桿菌、酵母およびカビを含めた好熱性グラム陽性菌を示した。これは、堆肥化のものと類似している二次発酵の開始を明らかに実証する(一次発酵は、サイロ貯蔵プロセスである)。この発酵段階では、酵母およびカビが優勢である。変敗を防ぐために、死滅されるか、抑制される必要がある3つの主なカテゴリーの生物として、孢子形成細菌、酵母および真菌(fungi)があると思われる。1つのカテゴリーのみを排除することは、残りのカテゴリーの増殖につながる可能性があり、その結果、変敗は防がれない。

40

【0007】

したがって、Mannは、少なくともまず第1に、好氣的変敗を開始する微生物(特に

50

、酵母および、サイレージの表面における真菌)を阻害する処理生物を使用することによる変敗防止を教示している。これを行うことができる生物はまた、その他の変敗微生物の発達を阻害し得、スクリーニングによって同定され得る。この必要条件を満たす種ラクトバチルス・ブフネリ(*Lactobacillus buchneri*)の生物は、1996年2月13日にNational Collection of Industrial and Marine Bacteriaに寄託された。受託番号は、40788である。

【0008】

ラクトバチルス・ブフネリ(*Lactobacillus buchneri*)を使用する処理は、サイレージにおける変敗を低減するが、該処理は制限された程度にだけ行われる。したがって、特に、回収される乾燥物質の量を増大しながらサイレージの好氣的安定性を改善するための改善サイレージ処理の必要性が残る。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許第6,326,037号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、上述した従来技術の問題に鑑み、サイレージ接種材料の安定性およびサイレージの好氣的安定性を改善するための方法を提供することを課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一態様では、サイレージを処理するための方法が提供される。該方法は、サイレージに、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)を含むサイレージ接種材料(inoculant)を添加する工程を含む。サイレージ接種材料は、好氣的変敗を防ぐか、または低減するのに有効である。

【0012】

別の態様では、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)を含むサイレージ接種材料が提供される。

【0013】

30

サイレージ接種材料の一態様では、サイレージ接種材料は、担体(carrier)をさらに含む。

【0014】

さらなる態様では、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)を含むサイレージが提供される。

【0015】

本方法の一態様では、サイレージ接種材料およびサイレージ中の、ラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)は、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)SIL51株および2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)SIL52株のうち少なくとも1種またはそれらの遺伝的等価物である。前記の株は、Lallemand SAS 19 rue des Briquetiers、31702 Blagnac Cedex、Franceによって寄託されている。

40

【0016】

本方法の一態様では、サイレージ接種材料は、担体をさらに含む。

【0017】

なおさらなる態様では、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4784を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)SIL51株の分離株またはその遺伝的等価物が提供される。

【0018】

50

別の態様では、2013年6月26日に提出された受託番号CNCM I-4785を有するラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)SIL52株の分離株またはその遺伝的等価物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書によれば、サイロ貯蔵された飼料の好氣的安定性を改善する乳酸菌を単離し、精製した。より詳しくは、ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)が、サイレージの好氣的安定性を増強することが示された。さらに、ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)株は、サイレージに接種された場合に、良好に保存されるサイレージを製造し、該サイレージ中では、好氣的変敗および加熱を伴う二次発酵の発生が低減されるか、または防がれる。

10

【0020】

本発明の株は、サトウキビ(サトウキビ属(Saccharum)の種)サイレージから単離された。株の精製および単離後、分類学的研究を行い、株を同定した。それらのうち2種を、ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)と同定し、プロトタイプ番号SIL51株およびSIL52株を与えた。

【0021】

したがって、本発明は、サイレージ接種材料およびサイレージの好氣的安定性を増強するためのサイレージ接種材料の使用を提供する。

【0022】

20

用語「サイレージ保存有効量」とは、本明細書および特許請求の範囲において、サイレージを保存するのに少なくとも十分である量を指すと理解されよう。したがって、この量は、サイレージの安定性を改善するのに少なくとも十分であり、好ましくは、回収される乾燥物質の量を増大しながらサイレージの安定性を改善するのに十分な量である。

【0023】

用語「好氣的安定性」とは、本明細書および特許請求の範囲において、周囲温度よりも2℃超上がる前にサイレージの温度が安定のままであった時間数を指すと理解される。

【0024】

ここで、本明細書に記載される実施形態に言及する。本開示の範囲の制限は、それによって何ら意図されないということが理解される。本開示が関連する技術分野の当業者に通常起こるように、本開示は、例示される実施形態の任意の変法および改変を含み、本開示の原理のさらなる適用を含むということはさらに理解される。

30

【0025】

一実施形態では、サイレージを処理する方法が提供される。該方法は、サイレージに、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)を含むサイレージ接種材料を添加する工程を含む。有効であるサイレージ接種材料は、好氣的変敗を防ぐか、または低減する。

【0026】

また、ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)の少なくとも1種の株を含むサイレージ接種材料も提供される。より詳しくは、サイレージ接種材料は、サイレージ保存有効量のラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)種を含む。

40

【0027】

上記の方法およびサイレージ接種材料の一実施形態では、ラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)の株は、2013年6月26日に提出されたラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)の分離株CNCM I-4784(SIL51)、2013年6月26日に提出されたCNCM I-4785(SIL52)またはそれらの遺伝的等価物であり得る。本明細書に記載されるような飼料の好氣的安定性を改善する機能活性を保持する、2013年6月26日に提出された株CNCM I-4784(SIL51)および2013年6月26日に提出されたCNCM I-478

50

5 (S I L 5 2) の突然変異体または遺伝的等価物も考慮されるということは理解される。

【0028】

突然変異体または遺伝的等価物については、これらが誘導される方法に関わらず、重要な点は、親の種および／または株について述べられるように、それらがサイレージの好氣的安定性を改善するよう機能するということである。言い換えれば、本発明は、例えば、微小な分類学上の変更のような微小変化をもたらす突然変異体を含む。

【0029】

本発明のサイレージ接種材料は、液体または固体形態のいずれかであり得、さらなる細菌株を含み得る。本発明のサイレージ接種材料は、適した担体を含んでもよく、そのまま使用されてもよい。サイレージ接種材料は、固体形態では、固体担体を含み得る。適した担体は、水性もしくは非水性液体形態であっても、固体形態であってもよい。水性または非水性液体形態担体の例として、水、オイルおよびパラフィンが挙げられる。固体形態担体の例として、有機または無機担体、例えば、マルトデキストリン、デンプン、炭酸カルシウム、セルロース、ホエイ、粉碎トウモロコシ穂軸および二酸化ケイ素などが挙げられる。固体組成物は、軽い粉末散布の形態で飼料に直接適用されてもよく、または、液体担体中に分配される場合には、飼料上に上手く噴霧され得る。本発明の目的上、任意のその他の適した担体が使用され得るということは理解される。

【0030】

該阻害物質は、二次代謝産物であり得ようである。したがって、これをサイレージに使用した場合に、サイロを開くのが早過ぎると、その十分な効果が見られない場合がある。サイレージは、少なくとも30日間、より好ましくは、少なくとも45日間、閉じて維持されることが好ましい。最適期間は、とりわけ、サイレージ塊の大きさおよびサイロ貯蔵された材料の性質に応じて変わり得る。。

【0031】

本発明に一致するサイロ貯蔵に適した材料とは、好氣的変敗に感受性 (susceptible) のものである。該材料は、通常、少なくとも20重量%の乾燥物質を含有する。このような材料として、例えば、ライムギまたは伝統的な草、高水分トウモロコシ、トウモロコシ全植物体を含めたトウモロコシ (maize)、ムラサキウマゴヤシ、しおれた草、コムギ、マメ科植物、モロコシ、ヒマワリ、オオムギ、その他の全穀草類およびサトウキビなどのその他の農作物が挙げられる。サイレージは、ベール (好氣的変敗に対して特に感受性の形態)、酸素制限バッグ、バンカー、縦型スティブサイロ、酸素制限サイロ、バッグ、パイルの中、または好氣的変敗に対して感受性であり得る任意のその他の適した保存形態であり得る。一実施形態では、本発明のサイレージ接種材料は、例えば、ブタ、家禽類または反芻動物などの動物に給餌する目的の、固体であれ液体であれ、任意の適した動物飼料とともに使用してもよい。

【0032】

以下の実施例は、本発明をさらに説明および定義するのに役立ち、決して本発明を制限しようとするものではない。

【実施例】

【0033】

【実施例1】

【0034】

約12ヶ月齢である植物体から得た新鮮な切断サトウキビを用いてサイレージを製造した。サトウキビは、手作業で収穫し、実験室型チョッパー (Pinheiro、モデル: PP-47) を使用して切り刻んで、約30mmの長さとした。3kgの切り刻んだ材料を接種材料と混合し、複数のPVCプラスチックバケツ (ミニサイロ、直径10cmおよび長さ60cm) 中で適当な状態にし、これらを、ガス放出のためのブンセンバルブを有するタイトにしまった蓋で密閉した。サイロ中の材料は、約 $630 \pm 19.9 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ の密度にぎっしりと詰めた。ミニサイロを室温で保存し、61日保存した後に分析し、

10

20

30

40

50

各サイロについて 3 個の複製物を調製した。

【0035】

接種材料としてラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*) S I L 3 4 株 (L. プランタルム(*plantarum*)は、サイレージ接種材料としてよく使用される)ならびにラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*) S I L 5 1 株 (2013 年 6 月 26 日に提出された C N C M I - 4 7 8 4) および S I L 5 2 株 (2013 年 6 月 26 日に提出された C N C M I - 4 7 8 5) を使用してサイレージを製造した。ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)およびラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*)株は、サトウキビサイレージから単離され、98%の配列同一性を有すると同定された。接種材料を何ら含まないサイレージをコントロールとして使用した。接種材料は、A v i l a ら (Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage, Grass Forage Sci 6:384-394, 2009) に従って培養した。最終培養後、De Man Rogosa Sharpe agar (Oxoid CM361, Basingstoke, Hampshire, England) 上で細胞数を計数し、培養物の濃度を 9 ログ (log) c f u · m l ⁻¹ に調整した。培養物を 80 mL の滅菌蒸留水と混合し、6 ログ (log) c f u · g ⁻¹ 牧草の最終濃度まで切り刻んだサトウキビの上に噴霧した。コントロールには、細菌を何ら含まない同量の水を与えた。相互汚染を避けるために、各処理のために別個の噴霧器を使用した。

【0036】

空サイロおよび最大に満たしたサイロの重量を記録した。密閉後、サイロを室温 (平均 25 °C) で維持し、日光および雨から保護した。61 日のサイロ貯蔵後、最大に満たしたサイロを秤量し、その後これを開いた。乾燥物質 (DM) のロス、新鮮な飼料およびサイレージの重量および DM 含量を使用して算出した。

【0037】

ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*) (S I L 3 4) の接種は、その他の株およびコントロールと比較して、より低い DM 含量、より高い DM ロスおよびより高い中性洗剤繊維 N D F を有するサイレージをもたらした。ラクトバチルス・ヒルガンディー(*Lactobacillus hilgardii*) S I L 5 1 株および S I L 5 2 株を接種されたサイレージでは、S I L 3 4 株およびコントロールと比較して、より低い DM ロスが見られた (表 1)。これらの同一株を用いる接種はまた、より高い DM 含量およびより低い中性洗剤繊維 N D F を有するサイレージをもたらした。接種材料は、サイレージの pH 値および可溶性炭水化物含量には影響を及ぼさなかった。

【0038】

表 1 接種材料を伴わない、および種々の接種材料を伴う 61 日のサイロ貯蔵でのサトウキビサイレージの化学組成

【0039】

【表 1】

サイレージ処理	DM ^b (g・kg ⁻¹ FM ^c)	DM ロ ス (%)	NDFd WSCe		pH	LABf	酵母
			(g・kg ⁻¹ DM)			Log cfu・g ⁻¹	
コントロール	246.2b	22.61a	617.9b	25.3	3.60	8.16a	5.38b
SIL 34	241.3b	26.49a	676.9a	24.6	3.64	6.93b	5.08a
SIL 51 CNCM I-4784 2 0 1 3 年 6 月 2 6 日提出	264.8a	14.90b	598.0b	23.4	3.61	8.36a	4.61b
SIL 52 ^P CNCM I-4785 2 0 1 3 年 6 月 2 6 日提出	259.6a	15.39b	616.7b	21.1	3.66	8.40a	4.83b

10

20

【0040】

b－乾燥物質含量；c－新鮮物質；d－中性洗剤繊維；e－水溶性炭水化物；f：乳酸菌。

【0041】

1つの欄中の種々の文字を伴う平均値は、有意に異なっている（ $p < 0.05$ ）。

30

【0042】

分析手順

ミニサイロを開く日に、各ミニサイロから2個のサンプルを回収し、ミニサイロの内容物のすべてを均質化した。サンプルのうち一方を秤量し、55℃でファン付きオープン中で96時間乾燥させた。もう一方のサンプルを使用して水抽出物を作製し、pH値を決定し、微生物集団を評価し、発酵最終生成物を検出した。

【0043】

30メッシュの篩を使用してWiley型粉碎機で乾燥サンプルを粉碎し、ラベルを付けたプラスチックポット中に保存した。サンプルを、DM含量(AOAC(1990) Official methods of analyses.15th edition. Washington, DC, USA:Association of Official Analytical Chemists)、フェノール法(Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28:350-356)によって水溶性炭水化物(WSC)、およびHolden(Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten 565 feeds. J Dairy Sci 82:1791-1794;1999)によって記載されるようにAnkom繊維分析器(ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA)を使用して中性洗剤繊維(NDF)について分析し、DMベースで表した。

40

【0044】

エタノール、1，2－プロパンジオールおよび乳酸、酢酸、プロピオン酸および酪酸の

50

レベルを、C a r v a l h o ら(Effects of propionic acid and Lactobacillus buchneri (SIL72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with or without calcium oxide. Grass Forage Sci doi:10.1111/j.1365-2494.2012.00863.x)に従ってH P L Cによって測定した。酸、エタノールおよび1, 2-プロパンジオールを、その保持時間を既知標準の保持時間と比較することによって同定した。同定した化合物の濃度を外部較正法によって決定した。H P L C装置(S h i m a d z uモデルLC-10Ai; 島津製作所、日本、東京)は、紫外検出器(U V - V i s S P D-10Ai)および屈折率検出器(R I D 10A)からなるデュアル検出システムを備えていた。クロマトグラフィー分離には、50℃で操作される島津製作所製のイオン排除カラム(Shim-pack SCR-101H; 7.9mm×30cm)を使用した。移動相は、100mM過塩素酸溶液からなり、0.6mL・min⁻¹の流速を有していた。酸はUV吸光度(210nm)によって検出した。エタノールおよび1, 2-プロパンジオールは、屈折率検出器を使用して同定した。pH値は、電位差計(Expandomatic Beckman SS-2)を用いて測定した。

10

【0045】

表2に示されるように、S I L 5 1株およびS I L 5 2株を接種した、最低のDMのロスをもつサイレージは、S I L 3 4株およびコントロールよりも低いエタノール濃度を有していた。DMの最大のロスをもつサイレージをもたらし、S I L 3 4株は、最高量の乳酸を製造した。S I L 5 1株およびS I L 5 2株を接種したサイレージでは、S I L 3 4株およびコントロールと比較して、より高い濃度の酢酸および1, 2-プロパンジオールも記された。プロピオン酸レベルは同様に低く、S I L 3 4株およびコントロールサイレージと一致していた。

20

表2 接種材料を伴わない、およびラクトバチルス・ヒルガンディー(Lactobacillus hilgardii)接種材料を伴う61日のサイロ貯蔵での、サトウキビサイレージの乳酸、酢酸、プロピオン酸および酪酸およびエタノールおよび1, 2-プロパンジオール

【0046】

【表 2】

サイレー ジ処理	乳酸 (g・kg ⁻¹ DM)	酢酸 (g・kg ⁻¹ DM)	プロピオン 酸(g・kg ⁻¹ DM)	酪酸 (g・kg ⁻¹ DM)	エタノ ール(g・kg ⁻¹ DM)	1,2-プロパンジ オール(g・kg ⁻¹ DM)
コントロール	46.6a	9.7b	3.1b	0.0b	137.0a	1.7b
SIL 34	43.7a	3.3c	6.4a	3.5a	185.8a	0.6c
SIL 51 CNCM I-4784 2013 年6月2 6日提出	34.6b	19.7a	4.0b	1.2b	39.9c	3.27 ^a
SIL 52 CNCM I-4785 2013 年6月2 6日提出	31.4b	22.5a	4.1b	1.3b	44.4c	3.98 ^a

10

20

【0047】

微生物学的分析

新鮮飼料および、61日インキュベートした後のサトウキビサイレージのサンプル（70g）を630mLの0.1%滅菌ペプトン水と混合し、オービタルミキサー中、120rpmで20分間攪拌した。その後、10倍希釈物を調製して、種々の微生物群を定量した。乳酸菌（LAB）は、嫌気性インキュベーション(AnaeroGen;Oxoid、Basingstoke、UK)後、0.1%システインHCl(Merck、Darmstadt、Germany)および0.4%シクロヘキシミド（0.4%）（Sigma）を含有するMRS寒天(De Man Rogosa Sharpe、Difco、Detroit、MI、USA)を使用して数えた。プレートを30℃で48時間インキュベートした。酵母および糸状菌は、プレートを28℃で72時間インキュベートした後、ジクロランローズベンガルクロラムフェニコール培地(DRBC、Difco;Becton Dickinson、Sparks、MD、USA)上で数えた。すべての微生物について、30から300cfuの間を含有するプレートのみを数えた。

サイレージの好氣的安定性の評価

90日のサイロ貯蔵後、ミニサイロを開き、各ミニサイロから約3kgの3個(triplicate)のサンプルを回収し、5kgのプラスチックバケツに入れ、その好氣的安定性を評価した。サイレージ塊に温度計を10cmの深さに7日間挿入した。容器は室内に維持し、26℃（±1.5℃）で温度制御した。サイレージ温度は、8時間毎に記録した。周囲温度は、バケツに近接して置いた温度計を使用して測定した。好氣的安定性は、周囲温度よりも2℃を超えて上がる前にサイレージが安定のままであった時間数と定義した。

表3 接種材料を有するサトウキビサイレージの好氣的安定性

【0048】

30

40

50

【表 3】

サイレージ処理	好氣的安定性 (時間)	最高温度 (°C)	最高温度に達する時 間 (時間)
コントロール	21.3±4.6	43.7±0.6	45.3±12.2
SIL 34	24.0±0.0	43.7±1.4	37.3±9.2
SIL 51 CNCM I-4784 2 013年6月26 日提出	26.7±4.6	44.0±1.0	50.7±9.2
SIL 52 CNCM I-4785 2 013年6月26 日提出	21.3±4.6	44.3±1.5	48.0±16

10

20

【0049】

表 3 に示されるように、コントロールサイレージの温度は、サイロを開いた後、約 21.3 時間の間安定であったが、SIL 51 株および SIL 52 株を接種したサイレージのものは、それぞれ 26.7 および 21.3 時間後に温度安定性を失った。最高温度に達する時間は、SIL 51 株および SIL 52 株両方において長かった。したがって、SIL 51 株および SIL 52 株は、SIL 34 株およびコントロールサイレージよりも優れた温度安定性を有するサイレージをもたらした。

30

【0050】

乳酸を製造したラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) SIL 34 株を接種したサイレージは、24 時間後に温度安定性を失った。しかし、SIL 34 株は、より高い含量のエタノール、より高い酵母数およびより多い DM ロスを有するサイレージをもたらした。SIL 51 株および SIL 52 株は、より少ない酵母集団、より低いエタノール含量およびより少ない DM ロスなどのサイレージにとってより良好な特徴を提供した。

【実施例 2】

【0051】

トウモロコシサイレージの好氣的安定性

40

トウモロコシサイレージを、接種材料としてラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、NCIMB 40788 (Mann らの米国特許第 6,326,037 号)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) SIL 34 株およびラクトバチルス・ヒルガンディー (*Lactobacillus hilgardii*) SIL 51 株 (2013 年 6 月 26 日に提出された CNCM I-4784) および SIL 52 株 (2013 年 6 月 26 日に提出された CNCM I-4785) を使用して実施例 1 に記載したようにマイクロサイロで製造した。接種材料を何ら伴わないサイレージをコントロールとして使用した。接種材料は実施例 1 に記載されるように培養した。

【0052】

90 日のサイロ貯蔵後、ミニサイロを開き、各ミニサイロから約 3 kg のサンプルを回

50

収し、5 kg のプラスチックバケツに入れて、好氣的安定性を評価した。データロガーを、サイレージ塊中、10 cm の深さに7日間挿入した。周囲温度は、バケツに近接して置いたデータロガーを使用して測定した。サイレージの好氣的安定性に関するデータを表4に示す。

表4 接種材料を用いたトウモロコシサイレージの好氣的安定性

【0053】

【表4】

10

処理	用量 cfu/g	最高温度 (°C)		最高温度に達する 時間 (時間)		好氣的安定性 (時間)	
		平均		平均		平均	
コントロール		34.2	34.2	72.3	72.3	42.7	42.7
SIL 34	1	38.0	38	37.2	37.4	21.8	17.4
	2	38.8		37.7		13.0	
SIL 51	1	31.0	30.9	133.1	138.3	73.8	73.05
CNCM I-4784	2	30.8		143.5		72.3	
2013年 6月26日 提出							
SIL 52	1	30.8	32.05	132.2	112.3	49.0	53.35
CNCM I-4785	2	33.3		92.5		57.7	
2013年 6月26日 提出							
NCIMB 40788	1	33.7	33.1	85.5	101.1	42.8	60.5
	2	32.5		116.7		77.7	

20

30

【0054】

用量：1 = 10^5 cfu/g、2 = 10^6 cfu/g。

40

【0055】

表4に示されるように、コントロールサイレージの温度は、サイロを開いた後、約42.7時間安定であったが、SIL 51株およびSIL 52株を接種したサイレージのものは、それぞれ、73.05および53.35時間後に温度安定性を失った。SIL 34株を接種したサイレージは、17.4時間安定であった。ラクトバチルス・ブフネリ(Lactobacillus buchneri) NCIMB 40788を接種したサイレージは、60.5時間安定であった。SIL 51株およびSIL 52株は、SIL 34株を接種したサイレージおよびコントロールサイレージよりも優れた温度安定性を有するサイレージをもたらした。SIL 51株およびSIL 52株はまた、NCIMB 40788サイレージよりも優れた温度安定性を有するサイレージをもたらした。

50

【0056】

本発明を、その特定の実施形態に関連して記載してきたが、概して、本発明の原理に従って、本発明が関連する技術分野内で公知のまたは日常的な実施内に入る本開示からのこのような逸脱を含めて、本明細書において上記で示される本質的な特徴に当てはまり得るように、また添付の特許請求の範囲に従うように、さらなる改変が可能であることおよび本明細書および特許請求の範囲は本発明の任意の変法、使用または適応を対象とするものであることは理解されよう。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2014/062814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23K1/00 A23K3/03 C12R1/225 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12R A23K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/080783 A1 (WATSON JAMES B [US]) 1 April 2010 (2010-04-01) paragraphs [0006], [0015] claims	1,7
X	US 2008/095890 A1 (WATSON JAMES B [US]) 24 April 2008 (2008-04-24) paragraphs [0006], [0015] claims	1,7
X	US 2003/175307 A1 (GARNER BRYAN E [US] ET AL) 18 September 2003 (2003-09-18) claims 1,2	1,7
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 September 2014		08/10/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Popa, Marian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/062814

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOSSON K ET AL: "Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from <i>Lactobacillus hilgardii</i> ", PLASMID, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 1, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 9-20, XP024799449, ISSN: 0147-619X, DOI: 10.1016/0147-619X(89)90082-6 [retrieved on 1989-01-01]	1,3,7
A	abstract; tables page 12, left-hand column, line 42 - page 13, left-hand column, last line DISCUSSION	9,10
X	EP 0 311 469 A2 (PLANT GENETIC SYSTEMS NV [BE]; UNIV LOUVAIN [BE]) 12 April 1989 (1989-04-12) page 2, line 25 - page 3, line 35 page 4, line 5 - line 29 page 6, line 54 - line 58 page 7, line 49 - line 64 claims; examples 3,8	1,3,7
A	US 2009/028993 A1 (CHAN RUSSELL K [US] ET AL) 29 January 2009 (2009-01-29) paragraphs [0002], [0008] - [0010]	1,3,7
A	Stefan Heintl ET AL: "Insights into the completely annotated genome of <i>Lactobacillus buchneri</i> CD034, a strain isolated from stable grass silage", Journal of Biotechnology, vol. 161, no. 2, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 153-166, XP055081357, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.007 abstract	9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/062814

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010080783 A1	01-04-2010	NONE	
US 2008095890 A1	24-04-2008	NONE	
US 2003175307 A1	18-09-2003	US 2003175306 A1	18-09-2003
		US 2003175307 A1	18-09-2003
		US 2004028665 A1	12-02-2004
		US 2005238630 A1	27-10-2005
		US 2005244390 A1	03-11-2005
		US 2005244391 A1	03-11-2005
		US 2006110367 A1	25-05-2006
		US 2008057045 A1	06-03-2008
		US 2012107288 A1	03-05-2012
		US 2014255350 A1	11-09-2014
EP 0311469 A2	12-04-1989	EP 0311469 A2	12-04-1989
		FI 892065 A	28-04-1989
		JP H02501266 A	10-05-1990
		WO 8901970 A2	09-03-1989
US 2009028993 A1	29-01-2009	EP 2091354 A1	26-08-2009
		US 2009028993 A1	29-01-2009
		WO 2008073844 A1	19-06-2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 シルバ アビラ カーラ ルイーザ
ブラジル国 ミナスジェライス ラブラス フェデラル ユニバーシティ オブ ラブラス デパートメント オブ バイオロジ

(72)発明者 カルドーゾ ピント ホセ
ブラジル国 ミナスジェライス ラブラス フェデラル ユニバーシティ オブ ラブラス デパートメント オブ バイオロジ

(72)発明者 シュヴォ エリック
フランス国 ブラニャック リュ デ ブリックティエ 19

(72)発明者 シュミット レナト
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ミルウォーキー ウェスト ダグラス アベニュー 6120

Fターム(参考) 2B005 BA01 BA05 BA07

2B150 AA02 AC06 CE05 CE20 CE30

4B065 AA30X AC20 BA22 BB26 CA55 CA60