

自然界由来の *Lactobacillus plantarum* を用いたサイレージ製造

石井 智美¹⁾・森 ゆうこ²⁾・萩原 克郎²⁾

Silage production using *Lactobacillus plantarum* which separated from the natural world

Satomi ISHII¹⁾, Yuko MORI²⁾ and Katuru HAGIWARA²⁾
(Accepted 11 July 2016)

はじめに

サイレージは、牧草や飼料作物を乳酸菌で発酵させた家畜の貯蔵用飼料で、利用の歴史は長い^{1,2,3)}。近年、輸入サイレージの価格高騰によって、北海道における粗飼料の自給と利用促進の取り組みが報告される^{4,5)}など、自家製サイレージへの関心は高まってきている。

サイレージの製造には乳酸菌の働きが不可欠であるが、いずれの草種においても、本来付着している微生物の中にサイレージ発酵能力が高い乳酸菌数は少ないと言われている⁶⁾。サイレージ発酵に関与する乳酸菌は、*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* および *Weissella* など多数の属に分類されている⁷⁾。これまでサイレージの製造に利用されてきた乳酸菌として、*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* と言った乳酸桿菌が知られている^{8,9,10,11)}。乳酸菌は同じ菌種でも、菌によって異なる性質を持っていることから⁶⁾、筆者らはこれまで有用な乳酸菌株の探索のため、自然界から乳酸菌の分離・同定後、菌株を保存し、分離菌の培養特性、代謝産物、機能性等の検討を進めてきた。*L. plantarum* が、「*L. plantarum* 畜草1号」をはじめ、サイレージ用のスターターとして利用され、プロバイオティクス機能について報告されている^{12,13)} ことから、本研究は我々が保存している *L. plantarum* の中で、プロバイオティクス機能を持つと判定している菌株でのサイレージ製造の可能性を検討した。

材料および方法

1. 供試菌の選抜とその性質

これまで筆者らが自然界から分離・同定し、保存してきた *L. plantarum* の中から、発育温度域の広い菌として4菌株を選抜した。これらの4菌株(以下LP 1-1, LP 2-1, LP 4-5, LP 5-4と記す)は、いずれも分離源が異なるが酸、塩への耐性があるとともに、人工消化液を用いた生存試験で高い生存率を示し、プロバイオティクスとしての能力を有することを確認している。

選抜した4菌株は、長谷川¹⁴⁾、小崎ら¹⁵⁾、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁶⁾を参考に、形態観察、糖の発酵性試験等を行っており、Table 1に各種試験と糖の発酵性試験の結果を示した。さらに4菌株を、16SrRNAで相同性を検討した。アクロモペプチダーゼ(和光純薬工業)で処理し、インスタジーン(BIORAD)で精製して、PCRを行った。プライマーは27F sense primer, 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3'; 1492R antisense primer, 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'である。PCR反応は94℃、2分の後、94℃で30秒、58℃で30秒、72℃で1分を35サイクル行った。PCRの増幅産物は、QIAquick PCR purification kit(QIAGEN, USA)を用いて精製し、上記プライマーとBigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit(Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310(Applied Biosystems)にて塩基配列を決定した。得られた配列は、いずれもBasic local alignment search tool(BLAST)にて、相同性が100%であると確認し、4菌株を*L.*

¹⁾ 酪農学園大学農食環境学群食と健康学類臨床栄養管理理学研究室

Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

²⁾ 酪農学園大学獣医学群獣医学類ウイルスユニット

Veterinary Virology, Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

Table 1 The characteristic and sugar fermentation of Lactic acid bacteria

	LP 1-1	LP 2-1	LP 4-5	LP 5-4
Gram	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-
Catalase NO ₃ to NO ₂	-	-	-	-
Growth 15°C	+	+	+	+
Growth 45°C	-	-	-	-
Sugar				
L-arabinose	-	-	-	-
D-ribose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+
Gluconate (Na)	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+

plantarum と同定した。

2. 培養菌液の調製

選抜した4菌株の培養温度別の増殖性の検討と、サイレージ製造のスターター菌液として用いる培養菌液を、以下の手順で調製した。

MRS 高層培地に植菌した各菌株から1白金線量の菌を取り、MRS 液体培地 (Oxoid) 10 ml 中に加え、32°Cで24時間培養したものを前々培養菌液とした。前々培養菌液1 ml を、MRS 液体培地6 ml にそれぞれ加え、32°Cで24時間培養したものを前培養液とした。この前培養液を8000 rpm で5分間遠心後、ペレット状の湿菌体を液体培地と同量の滅菌水を加えて3回遠心して洗菌した。その後同量の滅菌水を加えたものを培養菌液とした。

3. 4菌株の温度別増殖性の検討

2.で調製した各培養菌液を、GAM 液体培地 (ニッスイ) に初期菌量を10⁶ となるように添加し、15, 25, 32°Cで96時間後まで培養した。菌液添加直後を0時間とし、24時間ごとに96時間後までGAM 液体培地中の菌液を段階希釈し、各希釈液を

BCP 加プレートカウント培地 (栄研) に加えて混積平板を作成した。32°Cで72時間培養後に、平板上に形成されたコロニー数を計測した。いずれも1希釈で4平板作成し、その平均値をとった。

4. サイレージの製造

予備実験の後、2013年8月晴天の午前中に、本学農場で生産したチモシーとアルファルファを各3 kg 刈り取った。それぞれ暗く風通しの良い室内で2時間新聞紙の上に広げてごみを除き、万能はさみで15~20 mm に細切し、0.1%量の純水を噴霧した。チモシーとアルファルファをそれぞれ4菌液別とコントロール1つの計5つに分け、ビニール袋に入れた。スターター菌液である各培養菌液を初期菌量が10⁶ となるように、各ビニール袋の中に加えてよく混和した。それらを菌液別に、透明な倒立型チューブに20本ずつ隙間が無いように詰め込んだ。培養温度は15, 25°Cで、49日後まで培養した。菌液、培養温度別の各倒立型チューブ中のサイレージは測定時に開封した。

5. 測定項目と方法

サイレージ製造の初日、チモシーとアルファルファに付着している一般細菌数を計測した。チモシーとアルファルファをそれぞれ 30 g 計り取り、滅菌生理食塩水 270 ml を加えストマッカーで均質化した希釈液を用い、段階希釈を 10^{-6} まで行った。標準寒天培地（栄研）に、各段階希釈液を加えて混積平板を作成した。32°C で 72 時間培養後、平板上に形成されたコロニー数を計測した。いずれも 1 希釈で 4 平板作成し、その平均値をとった。

菌液、培養温度別に製造したサイレージの乳酸菌数の計測を、実験開始初日、7 日後、21 日後に行った。各サイレージ 30 g を計り取り、滅菌生理食塩水 270 ml を加えストマッカーで均質化した希釈液を用い、段階希釈を 10^{-10} まで行った。BCP 加プレートカウント培地に、滅菌した炭酸カルシウムを 0.5% になるように加えた後、各段階希釈液を加えて平板を作成した。32°C で 72 時間培養後、コロニーの周縁に透明環が形成されたものを乳酸菌としてコロニー数を計測した。いずれも 1 希釈で 4 平板作成し、その平均値をとった。

有機酸量は、実験開始 7 日後、21 日後に菌液、培養温度別の各サイレージ 20 g を計り取り、40 ml の純水に 1 晩浸した上清をろ過してサイレージ抽出液とし、明治飼糧研究所（東京）にて液体クロマトグラフィーで測定した。あわせてサイレージ抽出液の pH を測定した。

6. 発酵品質の判定

サイレージの発酵品質の判定のため、様々な評価法が報告されている^{8,17,18}。本実験のサイレージ製造は牧草に乳酸菌液のみを添加し、酸や糖類等添加剤を加えてはいないため、増子らによる改訂版フリーグ氏評点算出法で評価を行った¹⁹。評点の算出には、サイレージ抽出液から液体クロマトグラフィーで測定した有機酸値を用いた。発酵品質の判定は 81~100 点を優、61~79 点を良、41~59 点を可、21~39 点を中、以下は劣である。

結果および考察

牧草には様々な微生物が付着していると報告されている^{7,8}。本実験に用いたチモシーとアルファルファから 10^3 の一般細菌を計測したが、唐澤らの報告⁸よりも少ない菌数だった。こうした一般細菌はサイレージ製造の過程で増殖した乳酸菌が産生した乳酸により、乳酸菌以外の菌は減少するのが一般的であると言われ^{6,20}、本実験のサイレージ製造の過程で、他の菌の影響は無かったと考えた。

4 菌株の培養温度別の菌数の推移を Fig. 1 に示した。4 菌株の培養 24 時間後の菌数はすべて 15°C 培養で、25°C、32°C 培養に比べ増殖が遅かったが、LP 1-1 を除き 48 時間後以降は 25°C、32°C 培養とほぼ同様の菌数に増えた。LP 1-1 も 72 時間以降は 25°C、32°C とほぼ同様の菌数になった。4 菌株は全て、中温域のみならず 15°C という低温域で増殖出来る性質を持っていた。こうした低温で増殖出来る性

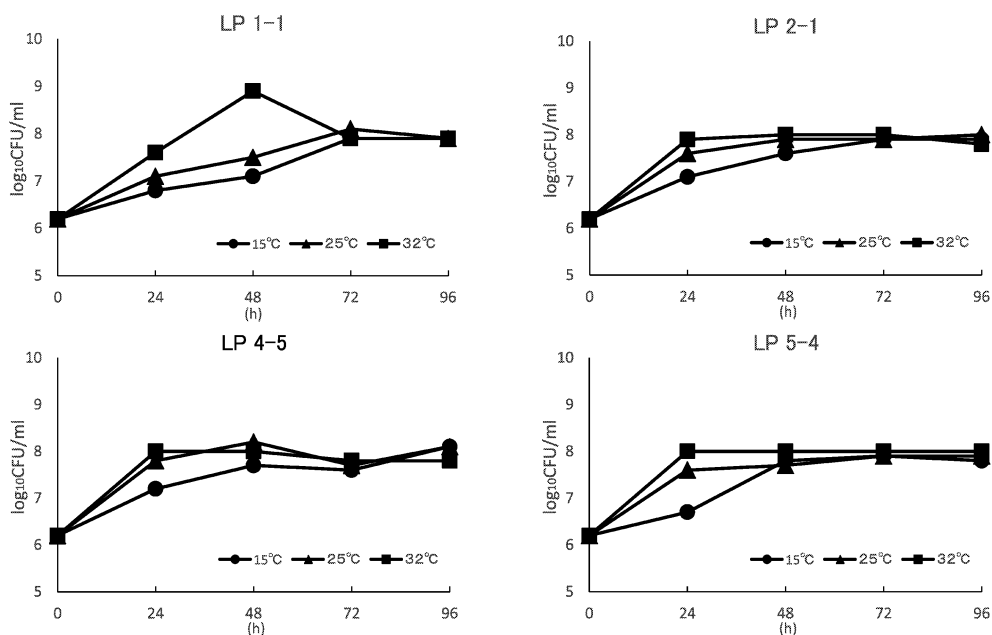


Fig. 1 The growth of the lactic acid bacterium according to the culture temperature

Table 2 Change the number of the bacteria according to the culture and temperature

NO	day	チモシー		アルファルファ	
		15°C	25°C	15°C	25°C
LP 1-1	oday	$10^6 \times 4$	$10^6 \times 4$	$10^6 \times 8$	$10^6 \times 8$
	7day	$10^6 \times 3$	$10^8 \times 5$	$10^8 \times 4$	$10^9 \times 2$
	21day	$10^8 \times 3$	×	$10^8 \times 8$	$10^7 \times 5$
LP 2-1	oday	$10^6 \times 3$	$10^6 \times 3$	$10^6 \times 3$	$10^6 \times 3$
	7day	$10^8 \times 3$	$10^8 \times 3$	$10^8 \times 6$	$10^8 \times 6$
	21day	$10^8 \times 4$	×	$10^8 \times 6$	$10^7 \times 5$
LP 4-5	oday	$10^6 \times 7$	$10^6 \times 7$	$10^6 \times 7$	$10^6 \times 7$
	7day	$10^8 \times 4$	$10^8 \times 3$	$10^9 \times 5$	$10^8 \times 6$
	21day	$10^8 \times 4$	×	$10^9 \times 5$	×
LP 5-4	oday	$10^6 \times 4$	$10^6 \times 4$	$10^6 \times 4$	$10^6 \times 4$
	7day	$10^8 \times 4$	$10^8 \times 6$	$10^6 \times 3$	$10^9 \times 2$
	21day	$10^7 \times 8$	$10^8 \times 1$	$10^6 \times 3$	$10^7 \times 4$

質については、これまでの *L. plantarum* に関する報告等^{7,9,10,11,12)} では言及されていない。予備実験で 32°C で培養したチモシー、アルファルファのサイレージでは、7 日後以降にすべてカビが生えて菌数計測が出来なかった。そこで、本実験の培養温度を 15°C、25°C に設定し、培養温度別のサイレージの菌数を Table 2 にまとめた。なおチモシー、アルファルファともに、菌液無添加のコントロールでは、15°C、25°C で 7 日後、21 日後も菌数は増えてはいなかった。

チモシーのサイレージでは 7 日後、15°C では LP 2-1 で $10^8 \times 3$ cfu/ml、LP 4-5 と LP 5-4 で $10^8 \times 4$ cfu/ml と菌数が増えた。21 日後は LP 1-1 で $10^8 \times 3$ cfu/ml、LP 2-1、LP 4-5 で $10^8 \times 4$ cfu/ml と高い菌数が維持されていた。同じく 7 日後、25°C では、LP 1-1 で $10^8 \times 5$ cfu/ml、LP 2-1 と LP 4-5 で $10^8 \times 3$ cfu/ml、LP 5-4 で $10^8 \times 6$ cfu/ml と顕著に菌数が増えた。しかし 21 日後には、LP 5-4 を除いてカビが生え、菌数計測は出来なかった。

アルファルファのサイレージでは 7 日後、15°C では LP 1-1 で $10^8 \times 4$ cfu/ml、LP 2-1 は $10^8 \times 6$ cfu/ml、LP 4-5 は $10^9 \times 5$ cfu/ml と菌数は増えたが、LP 5-4 は $10^7 \times 3$ cfu/ml と増殖は緩やかだった。同じく 7 日後、25°C では LP 1-1 で $10^9 \times 2$ cfu/ml、LP 2-1、LP 4-5 で $10^8 \times 6$ cfu/ml、LP 5-4 で $10^9 \times 2$ cfu/ml と高い菌数になった。しかし 21 日後には LP 1-1、LP 2-1、LP 5-4 で菌数が 10^7 に下がり、LP 4-5 ではカビが生え菌数計測は出来なかった。これらの結果から、4 菌株をスターターとしたサイレージ製造には 15°C 培養が適していると考えた。

品質の良いサイレージは、発酵の過程で乳酸が大量に生成されることで、色調が鮮やかな黄緑色とな

り、不快感の無い甘酸臭がすると言われている^{17,18)}。Table 3 に、サイレージの品質に関する有機酸量を示したが、チモシーのサイレージでは、LP 1-1 の 15°C 培養で 7 日後、21 日後、LP 4-5 は 7 日後、LP 5-4 は 7 日後、21 日後で乳酸生成量が多かった。酪酸はウシのケトーシスの原因となる物質であり^{17,18)}、酪酸を含まないサイレージが良いとされ、酪酸が 0 もしくは低値だったサイレージの色調は黄緑色だった。15°C 培養では、チモシー、アルファルファのサイレージは 7 日後に色調は黄緑色となり、サイレージ特有の好ましい発酵臭があることを確認した。25°C で 21 日後にカビが生え、良いサイレージにならなかったのは、チモシーで 3 つ、アルファルファで 1 つだった。

サイレージの品質を評価するフリーグ氏評点評価法の結果を、Table 4 に示した。チモシーのサイレージは、15°C、7 日後で LP 1-1 と LP 5-4 が優、21 日後で LP 1-1、LP 4-5、LP 5-4 が優だった。

アルファルファのサイレージは、15°C、7 日後で LP 2-1、LP 4-5、LP 5-4 が優、21 日後で LP 4-5 が優だった。25°C ではチモシー、アルファルファともに優の判定は無かった。これら優の判定にはチモシーで、15°C で LP 1-1、LP 5-4 の乳酸生成量が多いことが関わっていると考えた。

用いた 4 菌株は同じ *L. plantarum* でも、増殖速度、有機酸生成量に差が見られ、さらにチモシーとアルファルファでは、イネ科とマメ科という種の違いにより組成も異なるため、同じ培養菌液量、培養温度でサイレージ製造でも、フリーグ氏評点評価法による評価は異なった。

そしてチモシーのサイレージ製造には、15°C 培養で LP 1-1 と LP 4-5、LP 5-4 が、アルファルファの

Table 3 Organic acid production according to the culture temperature

Strain	牧草	温度	day	酢酸	プロピオン酸	酪酸	D-乳酸	L-乳酸
				mmol/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
LP 1-1	チモシー	15°C	7day	13.8	0	0.07	2.18	1.29
			21day	18.4	0	0	1.14	2.45
		25°C	7day	29.3	0	0	0.58	0.74
			21day	31.2	4.9	18.2	0.16	0.18
	アルファルファ	15°C	7day	26.5	0.2	0	0.96	0.96
			21day	29.3	0	0	1.1	1.52
LP 2-1	チモシー	15°C	7day	32.5	0.3	0.2	0.09	0.07
			21day	34.7	2.1	2.5	0.2	0.31
		25°C	7day	1.5	0	0	0.3	0.05
			21day	45.0	3.4	8.5	0.73	0.87
	アルファルファ	15°C	7day	17.5	0.07	0.05	1.32	0.96
			21day	26.7	0	0.1	1.30	1.13
LP 4-5	チモシー	15°C	7day	3.6	0	0	0.05	0.02
			21day	13.0	0	0	2.47	1.62
		25°C	7day	16.2	0.2	0.1	0.08	0.05
			21day	53.1	0.5	0	0.03	0.06
	アルファルファ	15°C	7day	15.4	0	0	1.66	1.04
			21day	18.6	0	0	1.58	1.09
LP 5-4	チモシー	15°C	7day	15.0	0.1	0	1.81	1.3
			21day	14.7	0	0	1.34	2.14
		25°C	7day	18.4	0.2	0	0.51	0.48
			21day	53.0	0.5	0.4	0.17	0.23
	アルファルファ	15°C	7day	14.0	0	0	1.78	1.06
			21day	23.4	0.1	0	1.26	1.07
		25°C	7day	30.8	0.4	0.2	1.27	1.26
			21day	35.4	0.3	0.6	0.91	1.06

Table 4 Mr. freak rating judgment evaluation of the silage prepared

Strain	day	チモシー				day	アルファルファ			
		15°C		25°C			15°C		25°C	
		PH	フリーグ判定	PH	フリーグ判定		PH	フリーグ判定	PH	フリーグ判定
LP 1-1	7day	4.5	優	5.2	良	7day	4.2	良	4.8	良
	21day	4.4	優	5.0	劣	21day	4.4	良	6.0	劣
LP 2-1	7day	4.2	可	4.5	良	7day	4.4	優	4.5	良
	21day	5.8	劣	5.0	劣	21day	5.0	良	5.9	劣
LP 4-5	7day	4.5	可	4.7	良	7day	4.6	優	6.0	可
	21day	4.4	優	4.8	可	21day	4.3	優	6.2	中
LP 5-4	7day	3.9	優	4.8	良	7day	4.0	優	6.0	良
	21day	4.4	優	5.0	劣	21day	4.0	良	6.6	良

サイレージ製造も同様に15℃培養でLP 2-1, LP 4-5, LP 5-4が適していると考えられ, 4菌株それぞれのサイレージ製造における増殖特性を把握出来た。発酵乳製品から分離したLP 4-5, LP 5-4が, チモシー, アルファルファ両方でのサイレージ製造の可能性を持つことが示唆された。今後, 実験のスケールを大きくして検討を進めたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 終始貴重なご助言, ご指導を賜りました酪農学園大学名誉教授菊地政則氏に, 心から感謝申し上げます。選抜菌の16SrRNA同定に御協力いただいた, 本学獣医学類教授岩野英知氏に感謝いたします。牧草を提供して下さいました本学農場の皆様感謝いたします。VFA分析にご協力をいただきました明治飼糧中央研究所様に感謝いたします。

本研究は2014年度「酪農学園大学学内共同研究」の助成を受けて行った研究の一部であることを記して, 関係各位の皆様にご心からお礼申し上げます。また本研究に用いた菌株の「菌株ライブラリー」も, 2008年度「酪農学園大学学内共同研究」を受けてつくれたものであることを, 改めて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 菊地政則, 安宅一夫, 小坂進一, 野 英二, 1996. ふん尿発酵産物の試料的利用2. サイレージ発酵過程の微生物叢の動態におよぼす各種添加物の影響. 酪農学園大学紀要(人文・社会科学編), 20(2): 367-372.
- 2) 安宅一夫, 2006. 最近の牧草サイレージ品質を検証する. 酪農ジャーナル, 59(5): 25-27.
- 3) 蔡 義民, 2009. サイレージ発酵品質の分析・評価法(1). 畜産の研究, 63(2): 273-276.
- 4) 増子義高, 岡元英樹, 王 鵬, 相馬幸作, 2009. 高品質牧草サイレージ調製の取り組み. 日草誌, 55(1): 56-68.
- 5) 王 鵬, 相馬幸作, 石井伸枝, 岡田早苗, 内村泰, 大島光昭, 増子孝義, 2009. 付着乳酸菌発酵液の添加が牧草サイレージの発酵品質および乳酸菌種に及ぼす影響. 日草誌, 55(2): 141-147.
- 6) 日本乳酸菌学会編, 2010. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス サイレージ発酵に関する乳酸菌と利用. 411, 京都大学学術出版会, 京都.
- 7) 森地敏樹, 松田敏生編著, 1999. バイオプリアベーション乳酸菌による食品微生物制御. 1, 幸書房, 東京.
- 8) 唐澤 豊(編), 2014. 動物の飼料, 3. サイレージ. 124-126, 131, 文英堂出版, 東京.
- 9) 王 鵬, 相馬幸作, 石井伸枝, 山田雅憲, 岡田早苗, 内村 泰, 増子孝義, 2008. ギ酸, 乳酸菌製剤および乳酸菌と酵素の混合材添加が牧草サイレージの発酵品質および乳酸菌種に及ぼす影響. 日草誌, 54(3): 205-210.
- 10) Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, M. Gobetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4084-4090.
- 11) Diep, D. B., L. S. Havarstein, I. F. Nes. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, **178**, 4472-4483.
- 12) 中川良治, 藪内裕子, 八十川大輔, 長嶋浩二, 2005. *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDOを用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性. 日本食品科学工学会誌, 52: 140-143.
- 13) 長田裕子, 上村祐也, 坂 智秀, 吉田睦子, 西塔正孝, 工藤秀機, 國崎直道, 五明紀春, 2008. *Lactobacillus plantarum* NO14株の抗アレルギー効果. 日本食品科学工学会誌, 55: 625-631.
- 14) 長谷川武治(編), 1984. 微生物の分類と同定(上). 153-193, 学会出版センター, 東京.
- 15) 小崎道雄, 内田 泰, 岡田早苗, 1992. 乳酸菌実験マニュアル. 58-68, 朝倉書店, 東京.
- 16) Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman Editors. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, Volume Three, The Firmicutes, 487, 506, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- 17) デイリーマン, 1990. 酪農大百科, サイレージの品質と評価. 436-437, デイリーマン社, 東京.
- 18) Grazia L. and G. Suzzi, 1984. A survey of Lactic acid bacteria in Italian silage, *J. Appl. Bacteriol.*, **56**: 373-379.
- 19) 北海道根室振興局, 1997. 平成9年度営農改善資料集第26集, 特集 The サイレージ. 42-55.

- 北海道根室振興局, 根室.
20) 清水 友, 2008. サイレージ発酵品質を左右する要因について. 牧草と園芸, 56(5):5-7.

要 約

北海道におけるサイレーシ製造の可能性を検討するため, 自然界由来の *Lactobacillus plantarum* を4菌株選抜した。4菌株は15°Cでの発酵能を持っていた。イネ科牧草のチモシー, マメ科牧草のアルファ

ルファにそれぞれ単独添加し実験を行った。初期菌量 10^6 を添加した15°C培養の7日後で, 乳酸生成量が多くなり, フリーグ氏評点評価法で優判定のサイレーシが製造された。チモシーのサイレーシ製造には, LP 1-1 と LP 5-4 が。アルファルファのサイレーシ製造には LP 2-1, LP 4-5, LP 5-4 が適していた。チモシー, アルファルファは種が違い組成も異なるが, 4菌株の中で LP 4-5 と LP 5-4 が両方のサイレーシ製造に利用出来る可能性が示唆された。

Summary

We considered how to make timothy and alfalfa make good quality silage by the fermentation of the *Lactobacillus plantarum* in cool temperature. Hokkaido is a good area for the production of timothy and alfalfa although timothy and alfalfa composition is different. We stored many Lactic acid strains in a laboratory in Rakuno Gakuen University. For this study we divided into an experiment from the natural world and used preservation by *L. plantarum*. 15 degrees Celsius fermented four *L. plantarum* strains (LP1-1, LP2-1, LP4-5, LP5-4). We added a number of the initial bacteria 10^6 to timothy and alfalfa with four bacteria of liquid each. The culture temperature of the silage reached 15 and 25 degrees Celsius. There was much lactic acid production in the silage that cultured for seven days of the 15 degrees Celsius culture. The quality of the silage that was produced experimentally reached by a Mr. freak rating system. It was the evaluation that using LP1-1 and LP5-4 of the *L. plantarum* was enough for the silage that it made with timothy. The evaluation was that using the LP4-5 and LP5-4 of the *L. plantarum* were enough for the silage made with alfalfa. In four strains, LP4-5 and LP5-4 were superior and might be available for both silage preparations.