

学 位 論 文 要 旨

氏 名	スマジャイ ブリーノック
題 目	暖地型牧草サイレージの添加物としての付着乳酸菌発酵液に関する研究 (Studies on fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria as a tropical grass silage additive)

暖地型飼料作物は付着する乳酸菌数が少なく、可溶性炭水化物含量が低いため、高品質のサイレージ調製を確保することが困難であることが知られている。本研究では、サイレージの品質を改善する目的で、発酵添加物として暖地型牧草からの付着乳酸菌発酵液 (FJLB) が調整され、その評価がなされた。FJLB 中の乳酸菌数は2日間の嫌気培養で 10^3 - 10^5 cfu/ml から 10^8 - 10^9 cfu/ml に増加した。

FJLB の添加によって処理されたギニアグラスサイレージの pH は急減に低下し、7日目までに最も低い値に達した。処理サイレージの乳酸菌数は3日以内で最高値を示し、以後漸次低下した。発酵基質としての各種の糖類で調整された FJLB を添加したサイレージについては、乳酸生成は初期段階では高いものの、グルコース処理の FJLB 添加サイレージを除き、埋蔵期間の延長に伴い漸次低下した。無処理のサイレージの乳酸生成量は埋蔵初期から漸次低下し、35日目には認められなかった。

日本茶で処理された FJLB を添加した場合、無処理のサイレージと比較して、LAB に加え、好気性微生物の菌数も増加するが、酵母の菌数は変わらなかった。FJLB 添加サイレージは無処理サイレージと比較して、pH、酢酸含量および酪酸含量は低く、乳酸含量は高かった。好气的条件に暴露した場合、無処理サイレージの乳酸生成は7日目までに認められなかった。

脱脂米ヌカや乾燥した茶殻を混合し、凍結乾燥で得られた FJLB 粉末を添加物として用い、ローズグラスサイレージ調製を行った。その結果、無添加サイレージと比較して、pH、酢酸含量、アンモニア態窒素生成量は低く乳酸含量は高かった。このことから、粉末 FJLB の添加も液体 FJLB と同様に、サイレージの発酵品質を改善することが示された。

無予乾と予乾の材料でマメ科草チナールのサイレージ調製を行った。全処理を通じて、イネ科草の場合と同様、乳酸生成の増加と共に発酵品質を高める効果が認められた。酪酸生成は無予乾で FJLB 無添加サイレージ以外は認められなかった。V-score 値から予乾燥、FJLB の品質改善効果を評価すると、無予乾でも FJLB 添加によって、値は高くなるが、予乾した場合には、FJLB の添加効果は小さかった。

サイレージ調製に効果的な LAB を明らかにするため、FJLB を殺菌した牧草搾汁液と調整した液体培地上で培養し、株の分離を行った。得られた 10 株をそれぞれサイレージの調製時に接種した。N-11 株と N-12 株で接種されたネピアグラスとギニアグラスサイレージは乳酸生成を高め、酪酸生成を抑え、pH の低い優れた発酵品質を示した。これらの株の生育特性を選択培地を含む各手法で評価した結果、これらの株が全てホモ型の *Lactobacilli* 属に含まれることが明らかになった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Smerjai Bureenok
題 目	Studies on fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria as a tropical grass silage additive (暖地型牧草サイレージの添加物としての付着乳酸菌発酵液に関する研究)

Tropical pasture crops are generally known that it is different to ensure a high quality silage, because of low lactic acid bacteria number and water soluble carbohydrate. In this study, fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB) from tropical grass as a silage additive for improving a silage quality was prepared and estimated. Numbers of lactic acid bacteria (LAB) in FJLB increased from 10^3 - 10^5 cfu/ml to 10^8 - 10^9 cfu/ml after 2 days of anaerobic incubation.

With addition of FJLB, the pH value of the guineagrass silages treated rapidly decreased, and reached to the lowest value within 7 days of fermentation. The number of LAB in the treated silages increased for the first 3 days, thereafter the number of LAB declined gradually up to the end of the experiment. For any sugar FJLB treated silages, the lactic acid increased initially, and then slightly reduced until the end of ensiling period, except the silage treated with glucose-FJLB. Lactic acid content of the control decreased constantly from the beginning of ensiling and was not found after 35 days.

With addition of FJLB treated with green tea, addition of green tea showed high LAB and aerobic bacteria counts also except of yeast counts comparing with untreated FJLB. All the FJLB treated rhogegrass silages showed lower pH value, acetic and butyric acid content and higher lactic acid content than control silage. Lactic acid content was not detected by day 7 in the control silages during aerobic exposure.

When FJLB powder combined with defatted rice bran or dried green tea waste were used as an additive, all treated silages were well preserved, with lower pH, acetic acid and NH_3 -N content and higher lactic acid content than that of the control. It shows that the powder form of FJLB was as effective in improving the fermentative quality of silage as the liquid form.

Addition of FJLB on direct cut and wilted tinaroo was studied and found that addition of FJLB improved the fermentative quality of silages by increasing lactic acid content. The butyric acid content was not found in all the treated silages except in the direct cut control silage. The V-score was higher in the direct cut treated silages than that of the control silage, whereas not in the wilted silages.

LAB which suitable for silage making was screened from FJLB based on the growth in medium liquid and sterilized plant juice. 10 isolated stains (N-2, N-11, N-12, N-16, N-20, G-2, G-18, R-9, SS-5 and SL-1) were selected to use as silage inoculant. In napiergrass and guineagrass silages, inoculation with strains N-11 and N-12 that belonging to homofermentative Lactobacilli showed good silages by low pH, high lactic acid content and not produced butyric acid.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Smerjai Bureenok
審査委員	主査 琉球 大学 教授 仲田 正
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 宮崎 大学 教授 川村 修
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島大学 教授 中西 良孝
審査協力者	
題目	Studies on fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria as a tropical grass silage additive (暖地型牧草サイレージの添加物としての付着乳酸菌発酵液に関する研究)
<p>暖地型牧草は付着する乳酸菌数が少なく、可溶性炭水化物含量が比較的低いいため、高品質のサイレージ調製を確保することが困難であることが知られている。</p> <p>本研究では、最初に、サイレージの品質を改善する目的で、暖地型牧草に付着する乳酸菌を各種調製方法により得られた付着乳酸発酵液 (FJLB) を作製し、その評価を行った。次に、FJLB をサイレージ乳酸発酵促進のために添加し、発酵品質を評価した。また、付着する乳酸菌群のうちで、最も効率的に乳酸発酵を行う菌株を探索・検定した。</p> <p>得られた結果は以下の通りである。</p> <p>1) 暖地型牧草7草種から調製されたそれぞれの FJLB 中の乳酸菌数は2日間の嫌気培養で、いずれも 10^3-10^5 cfu/ml から 10^8-10^9 cfu/ml に増加した。</p> <p>2) FJLB の添加によって処理されたギニアグラスサイレージの pH は急激に低下し、7日目までに最も低い値に達した。処理サイレージの乳酸菌数は3日以内で最高値を示し、以後漸次低下した。発酵基質としての各種の糖類で調製された FJLB を添加したサイレージについては、乳酸生成は初期段階では高いものの、グルコース処理の FJLB 添加サイレージを除き、埋蔵期間の延長に伴い漸次低下した。無処理のサイレージの乳酸生成量は埋蔵初期から漸次低下し、35日目には認められなかった。</p>	

3) 日本茶で処理された FJLB を添加した場合、無処理のサイレージと比較して、乳酸菌 (LAB) に加え、好気性微生物の菌数も増加するが、酵母の菌数は変わらなかった。FJLB 添加サイレージは無処理サイレージと比較して、pH、酢酸含量および酪酸含量は低く、乳酸含量は高かった。好气的条件に暴露した場合、無処理サイレージの乳酸生成は7日目には認められなかった。

4) 脱脂米ヌカあるいは乾燥した茶殻を混合し、凍結乾燥で得られた各 FJLB 粉末を添加物として用い、ローズグラスサイレージ調製を行った結果、無添加サイレージと比較して、pH、酢酸含量、アンモニア態窒素生成量は低く、乳酸含量は高かった。このことから、粉末 FJLB の添加も液体 FJLB と同様に、サイレージの発酵品質を改善することが示された。

5) 無予乾と予乾のマメ科草チナールグライシンのサイレージ調製を行った。全処理を通じて、イネ科草の場合と同様、乳酸生成の増加と共に発酵品質を高める効果が認められた。酪酸生成は無予乾の FJLB 無添加サイレージ以外には認められなかった。FJLB の品質改善効果を評価すると、無予乾でも FJLB 添加によって、V-score 値は高くなるが、予乾した場合には、FJLB の添加効果は小さかった。

6) サイレージ調製に効果的な LAB を明らかにするため、FJLB を殺菌した牧草搾汁液と混合した液体培地上で培養し、株の分離を行った。得られた 10 株をそれぞれサイレージの調製時に接種した。N-11 株と N-12 株を接種したネピアグラスとギニアグラスサイレージは乳酸生成を高め、酪酸生成を抑え、pH の低い優れた発酵品質を示した。これらの株の生育特性について、選択培地を含む各手法で評価した結果、これらの株が全てホモ型発酵の *Lactobacillus* 属に含まれることが明らかになった。

以上のように、本研究は牧草に付着する乳酸菌を用いて最も効果的な発酵液を作製し、この発酵液を用いて良質サイレージ調製を行う基礎的技術を明らかにすると共に、乳酸菌群のうちで、簡易で最も効率的に乳酸発酵を促進する菌株を探索・検定した。このように、本論文は熱帯・亜熱帯のサイレージ調製技術に関して貴重な新知見を提示したものであり、審査員一同は本論文が学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Smerjai Bureenok
審査委員	主査 琉球大学 教授 仲田 正
	副査 琉球大学 教授 川本 康博
	副査 宮崎大学 教授 川村 修
	副査 佐賀大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島大学 教授 中西 良孝
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査、副査の5名は、平成18年1月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、学位申請者が鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資質を有するものと判定した。</p>	

学位申請者
氏名

Smerjai Bureenok

質問1：本研究では、サイレージの発酵品質を評価する基準として、V-スコアが用いられていますが、これまで世界的にも用いられたフリーク評点での評価と比較しましたか？比較したとしても、この評価法を用いなかったのはお考えがあつてのことですか？

回答1：暖地型牧草、特にイネ科草種の発酵様式は酢酸発酵型になりやすい傾向にあります。これは寒地型草種が乳酸発酵型になりやすい特徴と異なる点です。寒地型草種を対象に考え出されたフリーク評点では、この酢酸生成を比較的高く評価する傾向にあります。そのため、V-スコアによる評価がより適正と考え、本研究ではこちらを用いました。

質問2：本研究では、暖地型牧草の乳酸発酵あるいは高い発酵品質をもたらすために、最も効果的な FJLB を作製することが一つのテーマですが、一連の実験のなかで、あなたが考える最も重要なポイントとは何ですか？

回答2：牧草によって付着する乳酸菌群フローラが異なるため、乳酸発酵に繋がる菌群の増殖とそれを支える糖基質の種類が重要です。一連の実験でも、*Lactobacillus* 属が多く付着する草種で、グルコースを糖基質とすることが高い発酵品質をもたらすことが明らかになりました。

質問3：ネピアグラスから採取・分離した N-11 株や N-12 株は、ホモ型発酵の *Lactobacillus* 属であり、FJLB でもサイレージでも最も優れた乳酸発酵をもたらす乳酸菌株であることが明らかにされましたが、これらの株をギニアグラスに接種し、調製されたサイレージでもネピアグラスの場合と同様、高い発酵品質を示しました。この辺のメカニズムをどのようにお考えですか？

回答3：ギニアグラスの各部位から採取・分離した乳酸菌群の多くが *Streptococcus* 属でした。そこで、異なる草種に付着する *Lactobacillus* 属でも、接種によって優先的に発酵に関与したものと考えます。

質問4：茶葉と茶殻ではどちらが乳酸発酵に効果的な添加物と考えますか？

回答4：同時に比較していませんが、一般に知られる茶葉の抗菌効果は認められず、むしろ、いずれも乳酸発酵には効果的と考えています。

質問5：本研究の成果は母国タイや他の熱帯の牧草にも適用できますか？

回答5：付着乳酸菌のフローラは地域、草種、環境条件によって変動するものと考えられます。したがって、本研究の成果の基本的な考え方は適用できますが、事前に付着乳酸菌の種類と数、FJLB の菌群のフローラを確認しておく必要があります。

質問6：本研究は多くの試験データ、それもそれぞれの目的に合致したデータと成果が得られていますが、圃場での実用規模での試験は行いませんでしたか？

回答6：実用規模では、県畜産試験場圃場、農家圃場で、刈取り後、デッダーレイキで揃えたウインドローに FJLB を散布し、ラッピングロールベールサイレージを調製したところ、官能評価ではありますが、良質発酵品質であることを確認しました。散布方法やそのサイレージの評価については、今後一層明らかにしたいと思います。

質問7：本研究で対象とした暖地型牧草の簡易で効率的なサイレージ調製技術は、熱帯・亜熱帯の乾季の粗飼料確保のための一手段と考えられますが、熱帯・亜熱帯地域では、サイレージの普及の程度はどれくらいでしょうか？

回答7：熱帯・亜熱帯地域の粗飼料生産に関する報告、あるいは母国タイの状況を考慮しても、現在の普及の程度は低いと思います。が、サイレージの研究者も何名かいらっしゃいますから、今後、畜産の振興と共に、普及すると思います。その際、本研究がその一助となれば幸いです。