

乳酸菌, セルラーゼ添加牧草サイレージの発酵品質 および *in vitro* 第一胃内発酵様相

松岡 栄・Lourdes Noemi BRANDA・磯貝 和江・
須山 哲成・高橋 玲奈・中西 央乃・藤田 裕
帯広畜産大学, 帯広市 080

Fermentation quality of grass silages treated with *Lactobacillus* inoculant and cellulase preparation and *in vitro* rumen fermentation characteristics at using them as a substrate

Sakae MATSUOKA, Lourdes Noemi BRANDA, Kazue ISOGAI, Tetsunari SUYAMA,
Reina TAKAHASHI, Hisano NAKANISHI and Hiroshi FUJITA

Department of Animal Production and Agricultural Economics,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Obihiro-shi 080

キーワード：牧草サイレージ, 乳酸菌, セルラーゼ, 発酵品質, *in vitro* 第一胃内発酵

Key words : grass silage, lactic acid bacteria, cellulase, fermentation quality, *in vitro* rumen fermentation

要 約

最近, サイレージの添加剤として注目されている乳酸菌と酵素の効果を検討するため, オーチャードグラス, チモシー, アルファルファの材料草に市販の乳酸菌製剤, 酵素(セルラーゼ)製剤, 乳酸菌と酵素の混合製剤を添加してサイレージを調製し, その発酵品質を調べるとともに, サイレージを基質として用いたときの *in vitro* 第一胃内発酵様相を検討した. すべての材料草で, 乳酸菌の添加はサイレージの発酵品質を著しく改善し, 酵素の併用(混合製剤)はさらに効果を高める傾向を示した. しかし, 酵素の単独添加はまったく改善効果を示さなかった. これは材料草に乳酸菌が不足していたためと推察された. *in vitro* 第一胃内発酵様相についてみると, 乳酸菌製剤と混合製剤を添加したオーチャードグラスおよびチモシーサイレージを基質として用いた場合, 酢酸モル比は, 無添加サイレージのときより有意に低く, プロピオン酸モル比は高い傾向にあり, 酪酸モル比は有意に高かった.

緒 論

これまで, サイレージの貯蔵性や栄養価の改善などを目的として種々の添加剤の使用が試みられてきた. 最近, 酸や化学薬剤に比べ, 環境に対する影響が小さいとして, 生物製剤が注目されており, そのなかで普

及しているものに乳酸菌製剤と酵素製剤がある. 前者は, 乳酸生成能力の高い乳酸菌を添加することにより迅速に pH を低下させようとするものであり, 後者は, 酵素によりヘミセルロースやセルロースを分解して, 発酵基質として利用させようとするものである (McDONALD *et al.*, 1991). これら製剤の添加効果は, おもにでき上がったサイレージの発酵品質の面から検討されているが, 添加サイレージを給与したときの第一胃内発酵に与える影響についての報告は少なく, またその結果も一致していない (GORDON, 1989; KEADY and STEEN, 1994; MAYNE, 1990).

本実験では, 市販の乳酸菌製剤, 酵素製剤, 乳酸菌と酵素の混合製剤を添加したサイレージを調製し, その発酵品質を無添加のものと比較するとともに, 人工ルーメン法により, これら製剤添加サイレージの第一胃内発酵に与える影響を検討した.

材料および方法

サイレージの調製

軽く予乾した出穂初期のオーチャードグラスとチモシー, さらに開花初期のアルファルファを材料草として用い, それぞれについて4つの処理を施した. すなわち, 市販の乳酸菌製剤, 酵素製剤, 乳酸菌と酵素の混合製剤を添加するものと無添加のものである. 以降, これらの処理をそれぞれ乳酸菌区, 酵素区, 混合区, 対照区とよぶ. 各処理草はそれぞれ3個の500 ml 容ガラス製容器に詰め込み, 密封して, 35日間貯蔵した.

なお、乳酸菌製剤(雪印種苗株式会社製)は *Lactobacillus casei* からなるものであり、酵素製剤(雪印種苗株式会社製)は *Trichoderma* 属菌由来のセルラーゼからなるものである。これら添加剤は、処方推奨量に従い、前者は材料草 1 kg あたり 4 mg、後者は材料草 1 kg あたり 50 mg の割合で供試した。

in vitro 第一胃内発酵試験

上記 4 処理のサイレージおよび材料草を凍結乾燥後、1 mm の篩を通る大きさに粉碎して、基質として用い、人工ルーメンによる発酵試験を行なった。人工ルーメンの装置、操作方法は TILLEY and TERRY (1963) の方法に準じたが、基質は 1 g、McDOUGALL の人工唾液とイノキュラムはそれぞれ 25 ml ずつ用い、培養時間は 24 時間とした。これらの培養条件は、予備実験を行ない、24 時間培養後の培養液の pH が 6.0 以上であること、また VFA 総濃度が 7~15 mmol/100 ml (McDONALD *et al.*, 1981) の範囲内にはいることを目安に設定した。なお、イノキュラムは、低水分牧草サイレージと乾草を自由採食している牛 2 頭 (体重 515 と 445 kg) から絶食 12 時間後に第一胃内容液を採取し、2 頭分を混合した後、濾過布で濾過し、その濾液を用いた。

分析方法

原料草とサイレージの水分含量は凍結乾燥により求めた。NDF と ADF は、GOERING and VAN SOEST (1970) の方法、可溶性炭水化物 (WSC) はアンスロン法(柁木, 1971)により定量した。サイレージと *in vitro* 培養液のアンモニアは微量拡散法 (大山, 1971 B),

VFA はガスクロマトグラフィーを用いて測定した。サイレージの乳酸は BARKER and SUMMERSON (1961) の方法、全窒素は KJELDAHL 法 (倉田・林, 1971) により定量した。

結 果

材料草とサイレージの化学成分含量は表 1 のとおりである。

オーチャードグラスとチモシーサイレージの NDF と ADF 含量は、対照区に比べて乳酸菌区と酵素区は低い傾向にあり、混合区ではさらに低かった。アルファルファサイレージでは、乳酸菌区は対照区との間に有意差はなかったが、酵素区と混合区は対照区より有意に低かった。WSC 含量は、すべての草種のサイレージが材料草より著しく低かった。また、サイレージでは、乳酸菌区と混合区が対照区より有意に高く、アルファルファサイレージでは酵素区も有意に高かった。

サイレージの発酵品質は表 2 のとおりである。

すべての草種において、乳酸菌区の pH は対照区より著しく低く、混合区はさらに低い傾向にあった。酵素区の pH は、オーチャードグラスでは対照区とほぼ同じ、チモシーでは対照区より有意に高く、アルファルファでは低かった。乳酸菌区の乳酸含量は、すべての草種において、対照区より著しく高く、混合区はさらに高い傾向にあった。酵素区の乳酸含量は、オーチャードグラスとアルファルファにおいて、対照区とほぼ同じであったが、チモシーでは対照区より有意に低かった。オーチャードグラスとチモシーの乳酸菌区

Table 1 Chemical composition of grass and silages

	Grass	Silages				s.e.
		Control ¹⁾	Inoculant ²⁾	Enzyme ³⁾	Mixture ⁴⁾	
Orchard grass						
Dry matter, %	24.5	22.1 ^b	24.3 ^a	22.1 ^b	24.0 ^a	±0.31
NDF, %DM	61.4	58.2 ^a	55.7 ^b	54.8 ^b	51.1 ^c	±0.78
ADF, %DM	34.5	37.7 ^a	34.6 ^c	35.7 ^b	31.9 ^d	±0.65
WSC, %DM	8.8	0.8 ^b	1.9 ^a	0.8 ^b	1.8 ^a	±0.16
Timothy						
Dry matter, %	30.0	28.8 ^a	28.9 ^a	27.7 ^b	29.2 ^a	±0.20
NDF, %DM	65.7	63.5 ^a	64.1 ^a	62.5 ^a	59.9 ^b	±0.56
ADF, %DM	38.0	39.9 ^a	38.9 ^b	38.9 ^b	37.5 ^c	±0.29
WSC, %DM	6.9	0.8 ^b	1.2 ^a	0.8 ^b	1.3 ^a	±0.07
Alfalfa						
Dry matter, %	27.2	26.0 ^b	26.9 ^a	25.6 ^c	26.6 ^a	±0.16
NDF, %DM	48.4	43.6 ^a	45.0 ^a	40.8 ^b	40.9 ^b	±0.56
ADF, %DM	37.8	36.7 ^a	38.0 ^a	34.1 ^b	35.1 ^b	±0.46
WSC, %DM	7.1	1.9 ^c	2.0 ^b	2.0 ^b	2.2 ^a	±0.04

In this and subsequent tables,

^{1),2),3)} and ⁴⁾ are silages prepared with no additive, an inoculant of lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei*), a cellulolytic enzyme (derived from *Trichoderma* spp.) and an enzyme-inoculant mixture, respectively.

Means on the same line with different superscripts are significantly different (P<0.05).

s.e.:standard error

Table 2 Fermentation quality of silages

	Silages				s.e.
	Control	Inoculant	Enzyme	Mixture	
Orchard grass					
pH	5.82 ^a	3.86 ^b	5.81 ^a	3.70 ^c	±0.31
Lactic acid, %DM	0.1 ^c	8.0 ^b	0.1 ^c	10.0 ^a	±1.36
Acetic acid, %DM	1.9 ^a	0.4 ^b	1.7 ^a	0.6 ^b	±0.20
Butyric acid, %DM	2.4 ^a	0.0 ^b	3.0 ^a	0.0 ^b	±0.42
Ammonia-N, % total N	27.1 ^a	4.8 ^b	26.6 ^a	4.3 ^b	±3.38
Timothy					
pH	4.94 ^b	3.86 ^c	5.38 ^a	3.75 ^c	±0.21
Lactic acid, %DM	2.7 ^c	5.8 ^b	1.3 ^d	7.2 ^a	±0.73
Acetic acid, %DM	0.4 ^b	0.6 ^a	0.3 ^b	0.4 ^b	±0.03
Butyric acid, %DM	0.7 ^b	0.0 ^b	2.2 ^a	0.0 ^b	±0.28
Ammonia-N, % total N	11.6 ^b	3.3 ^c	16.7 ^a	3.3 ^c	±1.74
Alfalfa					
pH	6.93 ^a	4.76 ^c	6.67 ^b	4.67 ^c	±0.32
Lactic acid, %DM	0.6 ^b	8.0 ^a	0.5 ^b	8.5 ^a	±1.17
Acetic acid, %DM	0.8 ^{bc}	1.2 ^{ab}	0.5 ^c	1.4 ^a	±0.12
Butyric acid, %DM	6.2 ^a	0.4 ^b	6.1 ^a	0.4 ^b	±0.89
Ammonia-N, % total N	20.3 ^a	8.6 ^b	19.8 ^a	9.1 ^b	±1.69

と混合区では酪酸が検出されなかったが、アルファルファの対照区と酵素区の酪酸含量は6%以上に達していた。アンモニア態Nの全Nに対する割合は、すべての草種において、乳酸菌区と混合区は対照区より著しく低かったが、酵素区は対照区とほぼ同じか、それよ

り高かった。

サイレージを基質として培養した場合の *in vitro* 第一胃内発酵様相は表3のとおりである。

オーチャードグラスサイレージにおいて、乳酸菌区と混合区のpHは対照区より低い傾向にあった。総

Table 3 *In vitro* rumen fermentation characteristics at using silages as a substrate

	Grass	Silages				s.e.
		Control	Inoculant	Enzyme	Mixture	
Orchard grass						
pH	6.51	6.62 ^a	6.53 ^b	6.63 ^a	6.57 ^{ab}	±0.014
Total VFA, mmol/100ml	10.6	10.6 ^c	11.8 ^a	11.0 ^{bc}	11.2 ^b	±0.15
Acetic acid, molar %	70.2	68.5 ^a	65.2 ^b	68.8 ^a	63.1 ^c	±0.73
Propionic acid, molar %	22.6	22.2 ^c	23.8 ^b	21.8 ^c	25.7 ^a	±0.49
Butyric acid, molar %	7.2	7.8 ^c	9.4 ^b	7.9 ^c	10.6 ^a	±0.36
Valeric acid, molar %	0.0	1.5	1.5	1.5	0.5	±0.30
Ammonia, N mg/100ml	2.5	13.3 ^{ab}	11.9 ^b	13.8 ^a	9.3 ^c	±0.56
Timothy						
pH	6.54	6.57 ^b	6.51 ^c	6.62 ^a	6.53 ^c	±0.013
Total VFA, mmol/100ml	10.8	11.4 ^{ab}	11.6 ^a	10.9 ^b	11.0 ^b	±0.11
Acetic acid, molar %	70.4	69.1 ^a	67.7 ^b	69.5 ^a	66.9 ^b	±0.33
Propionic acid, molar %	21.6	21.2 ^b	22.7 ^{ab}	21.3 ^b	23.5 ^a	±0.40
Butyric acid, molar %	7.2	7.6 ^d	8.3 ^b	7.9 ^c	8.6 ^a	±0.13
Valeric acid, molar %	0.8	2.2	1.4	1.4	0.9	±0.24
Ammonia, N mg/100ml	2.8	13.8 ^a	10.0 ^c	13.0 ^b	10.5 ^c	±0.49
Alfalfa						
pH	6.64	6.74	6.74	6.73	6.78	±0.009
Total VFA, mmol/100ml	11.7	10.2	10.9	11.6	12.4	±0.44
Acetic acid, molar %	71.0	65.3 ^{ab}	66.1 ^a	63.4 ^c	64.9 ^b	±1.16
Propionic acid, molar %	22.7	20.3	20.2	19.3	20.5	±0.77
Butyric acid, molar %	6.3	11.9 ^b	10.5 ^c	14.1 ^a	11.1 ^{bc}	±1.49
Valeric acid, molar %	0.0	2.5	3.2	3.0	3.4	±0.61
Ammonia, N mg/100ml	9.0	26.8 ^b	26.7 ^b	28.5 ^a	27.1 ^{ab}	±0.31

VFA 濃度では, 乳酸菌区が最も高く, 酵素区と混合区はそれより有意に低かった。酢酸モル比とアンモニア濃度では, 乳酸菌区は対照区より低く, 混合区はさらに低かった。プロピオン酸と酪酸モル比では, 乳酸菌区は対照区より高く, 混合区はさらに高かった。酵素区はすべての測定値について対照区との間に有意差はなかった。

チモシーサイレージにおける添加剤による *in vitro* 第一胃内発酵様相の変化は, 全体としてオーチャードグラスとほぼ同様な傾向を示した。しかし, アルファルファサイレージでは異なり, pH, 総 VFA 濃度, プロピオン酸モル比には処理間に有意差はなかった。また, 酢酸モル比, アンモニア濃度において, 乳酸菌区および混合区と対照区との間に有意差はなかった。

考 察

サイレージ発酵の基本は材料に付着している乳酸菌が WSC を基質として乳酸発酵を行なうところにあり (大山, 1971 A), 乳酸菌の数と WSC 含量はサイレージの発酵品質を左右する主要な要因である。本実験のすべての草種の無添加サイレージは劣質なものであったが, 乳酸菌を添加することにより, 乳酸含量の著しい増加がみられ, オーチャードグラスとチモシーでは pH が 3.86 まで達しており (表 2), 乳酸菌添加サイレージは高品質なものであったと評価された。これらのことは, 本実験に用いた材料草では, WSC は十分存在していたが, 乳酸菌が不足していたことを示唆している。

酵素区と混合区の NDF と ADF 含量は対照区より低く (表 1), 添加した酵素によるヘミセルロースとセルロースの分解が示された。また, 混合区の乳酸含量は乳酸菌区より多く, pH は低かった (表 2)。このように, 本実験では, 乳酸菌と酵素の併用により相乗効果がみられた。しかし, 酵素区の発酵品質は, オーチャードグラスとアルファルファでは, 対照区とほとんど差はなく, チモシーでは, pH は対照区より有意に高く, 乳酸含量は低く, 酪酸とアンモニアは多かった (表 2)。これらのことは, 材料草に乳酸菌の少ない場合は酵素の単独添加はまったく効果はなく, ときには悪影響を与えることを示している。

MCKEE *et al.* (1996) は, サイレージ給与時の牛の第一胃内性状について, 生草給与時に比較して, 酢酸濃度は低く, プロピオン酸とアンモニア濃度は高かったと報告している。本実験の *in vitro* 第一胃内発酵様相では, すべての草種のサイレージのすべての処理区で, 材料草に比べて, 酢酸モル比が低く, アンモニア濃度は高かった (表 3)。また, オーチャードグラスとチモシーの乳酸菌区と混合区でプロピオン酸モル比が材料草より高かった (表 3)。MCKEE *et al.* (1996) は, プロピオン酸濃度が高かったことは, 易発酵性炭水化

物の給与が多いときに第一胃内プロピオン酸モル比が高まるという一般的な傾向と矛盾するが, これにはサイレージ中の乳酸が関係しているのではないかと指摘している。また, アンモニア濃度が高かった原因として, 第一胃内アンモニア濃度はアンモニア摂取量と正の相関があること, 易発酵性炭水化物が不足しているときはアンモニアの菌体蛋白質への取り込みが遅滞することなどを挙げている。

in vitro 第一胃内発酵様相のサイレージ処理区の違いについてみると, オーチャードグラスとチモシーでは, いずれも乳酸菌区と混合区の酢酸モル比は対照区より有意に低く, プロピオン酸モル比は高い傾向にあり, 酪酸モル比は有意に高かった (表 3)。KEADY and STEEN (1994) も乳酸菌添加ペレニアルライグラスサイレージについて本実験とほぼ同様な結果を報告している。第一胃内のプロピオン酸生成経路には乳酸からの経路 (星野, 1985) があること, 乳酸菌区と混合区のサイレージの乳酸含量は対照区より高かった (表 2) ことから, プロピオン酸モル比には乳酸が影響したものである。また, 乳酸菌区と混合区のサイレージの WSC 含量がわずかではあるが対照区より多かった (表 1) ことが影響している可能性も否定できない。松岡ら (1969) は, *in vitro* 第一胃内発酵において, 培養液の pH を低く設定したときのほうが酢酸モル比は低く, 酪酸モル比は高かったこと, そしてその原因として, 酢酸 2 分子の縮合反応からの酪酸生成の可能性を報告している。乳酸菌区と混合区のサイレージの pH は対照区より著しく低く (表 2), また発酵終了時の培養液の pH も両区で低かった (表 3) ことから, 乳酸菌区と混合区において酢酸の縮合反応 (星野, 1985) がより進んだものと推察される。

アルファルファサイレージを基質としたときの *in vitro* 第一胃内発酵における処理の影響はオーチャードグラス, チモシーと異なっていた。これが草種の違いによるものかどうかについてはさらにデータを集積してから考察したい。

以上, 本実験では, 乳酸菌製剤と乳酸菌と酵素の混合製剤の添加処理はサイレージの発酵品質を改善し, *in vitro* 第一胃内発酵様相を変化させた。

文 献

- BARKER, S.B. and W.H. SUMMERSON, (1961) The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **138**: 535-554.
- GOERING, H.K. and P.J. Van SOEST, (1970) Forage fiber analyses. United States Department of Agriculture. Agriculture Handbook No.379. Washington, DC.
- GORDON, F.J. (1989) A further study on the evaluation through lactating cattle of a bacterial

- inoculant as an additive for grass silage. *Grass and Forage Sci.*, **44**: 353-357.
- 星野貞夫 (1985) ルーメンの世界. 糖質の代謝の項執筆. 神立 誠・須藤恒二 監修. 第1版. 366-406. 農山漁村文化協会. 東京.
- KEADY, T.W.J. and R.W.J. STEEN (1994) Effects of treating low dry-matter grass with a bacterial inoculant on the intake and performance of beef cattle and studies on its mode of action. *Grass and Forage Sci.*, **49**: 438-446.
- 倉田陽平・林弥太郎 (1971) 動物栄養試験法. 粗蛋白質の項執筆. 森本 宏 監修. 第1版. 286-292. 養賢堂. 東京.
- 榎木茂彦 (1971) 動物栄養試験法. 材料(牧草)中の可溶性炭水化物の定量の項執筆. 森本 宏 監修. 第1版. 422-424. 養賢堂. 東京.
- 松岡 栄・上山英一・広瀬可恒 (1969) 人工ルーメン法による第1胃内発酵に関する研究II, pHと揮発性脂肪酸(VFA)添加がVFA生成に及ぼす影響. *日畜会報*, **40**: 200-204.
- MAYNE, C.S. (1990) An evaluation of an inoculant of *Lactobacillus plantarum* as an additive for grass silage for dairy cattle. *Anim. Prod.*, **51**: 1-13.
- McDONALD, P., R.A. EDWARDS and J.F.D. GREENHALGH (1981) *Animal Nutrition*. 3rd ed. 132-144. Longman Group Ltd. London.
- McDONALD, P., A.R. HENDERSON and S.J.E. HERON (1991) *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. 184-236. Chalcombe Publications. Marlow.
- MCKEE C. A., A. CUSHNAHAN, C.S. MAYNE and E.F. UNSWORTH (1996) The effect of partial replacement of grass silage with fresh grass on rumen fermentation characteristics and rumen outflow rates in cattle. *Grass and Forage Sci.*, **51**: 32-41.
- 大山嘉信 (1971A) サイレージ発酵に関連する諸問題. *日畜会報*, **42**: 301-317.
- 大山嘉信 (1971B) 動物栄養試験法. 微量拡散法の項執筆. 森本 宏 監修. 第1版. 320-322. 養賢堂. 東京.
- TILLEY, J.M.A. and R.A. TERRY (1963) A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc.*, **18**: 104-111.