

酵素入り乳酸菌製剤の添加が 無予乾牧草サイレージの発酵品質に及ぼす影響

湊 啓子*¹ 田中 常喜*² 岸田 美月*¹
出口健三郎*² 谷口 大樹*³ 北村 亨*⁴

無予乾サイレージ調製における酵素入り乳酸菌製剤の添加効果を明らかにするために、チモシー (TY), シバムギ (QG), リードカナリーグラス (RCG) がそれぞれ優占する草地の1番草を用いてサイレージを調製した。添加効果は原料草により大きく異なり、堆肥が混入した乾物中の可溶性炭水化物 (WSC) 含量5.1%のTYや、大量の枯れ草が混入したWSC含量9.0%のQGを用いたサイレージでは、製剤添加により酪酸生成が抑制され、顕著な品質改善が見られた。一方、WSC含量4.8%のRCGでは、製剤添加により乳酸含量は顕著に増加したが、揮発性塩基態窒素/全窒素比は変わらず、十分な品質改善は見られなかった。その他のWSC含量5.8%以上のTYやQGでは無添加でも良質となり、製剤の添加効果は小さかった。原料草のWSC含量, WSC/酸緩衝能比, 溶解性蛋白質含量, 付着菌等が添加効果に影響をおよぼす可能性が示唆された。

緒 言

牧草サイレージは北海道酪農における主要な粗飼料の利用形態であり、その品質は家畜の生産性に大きな影響を及ぼす²¹⁾。良質なサイレージを調製するには、原材料に乳酸菌とその発酵基質となる可溶性炭水化物 (WSC) が十分に含まれること、また、予乾による水分活性の低下や低pH化により酪酸発酵を抑制する必要がある²⁰⁾。しかし、近年、道内の採草地では、WSC含量が低い地下茎型イネ科雑草の侵入による植生の悪化⁷⁾ や、収穫体系の大規模化により、作業効率が重視されて適切な予乾時間を確保できない状況が発生し、良質サイレージ調製に対する大きな課題となっている。

このような中、安定的に良質なサイレージを調製するために、ギ酸や乳酸菌等の添加剤が多くの場面で活用されている⁸⁾。ギ酸は、適切な量を添加することで、草種を問わず良質なサイレージが得られるが^{15, 16)}、乳酸菌の添加効果は原料草の含水率や、草種や番草によって大き

く異なる^{14, 15, 16, 29)}。この添加効果の違いは、主に原料草のWSC含量や酸緩衝能 (BC) などに起因すると考えられている^{15, 36)}。増子¹⁷⁾ は、乳酸菌の添加効果の発現に必要なWSC含量は、無予乾のチモシーでは乾物 (DM) 中7.1%以上、予乾したチモシーでは6.1%DM以上であるとして、WSC含量が低い原料草に対して、草の繊維を分解して糖を生成する酵素入りの乳酸菌製剤の利用を薦めている。

酵素入り乳酸菌製剤は、繊維分解酵素により原料草のセルロースやヘミセルロースを分解して乳酸菌に糖を供給し、乳酸発酵を促進することを狙ったものである¹²⁾。これまでに、国内ではWSC含量が1.9% DMのリードカナリーグラス³⁰⁾ や、単少糖含量が2.1% DMのギニアグラス¹⁰⁾ を用いた高水分サイレージで発酵品質の改善効果が確認されている。しかし、いずれも道外での報告であり、道内で生産される無予乾牧草サイレージでの品質改善効果はよく分かっていない。

そこで、本試験では、北海道の基幹草種であるチモシー (*Phleum pratense* L., 以下TY) の他、地下茎型イネ科草種であるリードカナリーグラス (*Phalaris arundinacea* L., 以下RCG) およびシバムギ (*Agropyron repens* (L.) Beauv., 以下QG) がそれぞれ優占する草地の1番草を用いて、酵素入り乳酸菌製剤の添加が無予乾サイレージの発酵品質におよぼす影響を調査した。

2023年10月30日受理

*¹ (地独) 北海道立総合研究機構畜産試験場, 081-0038 上川郡新得町

E-mail: minato-keiko@hro.or.jp

*² 同上 (現: 同酪農試験場, 086-1135 標津郡中標津町)

*³ 雪印種苗株式会社北海道研究農場, 069-1464 北海道夕張郡長沼町

*⁴ 同上 (現: 雪印種苗株式会社東京本社, 261-0002 千葉県千葉市)

試験方法

1. 供試材料

2017年および2018年の6月に、北海道立総合研究機構畜産試験場（北海道上川郡新得町）の採草地で収穫した1番草を原料草とした。原料草はQG, RCGおよびTY（品種：なつさかり）がそれぞれ優占する圃場から採取し、TY優占草地からは生育ステージにより2時期採取した（表1）。草地の植生は、70cm×70cmのコドラートを約300m²の収穫予定区画内の5カ所に設置し、枠内の植物を刈り取り、草種ごとに乾物重量を測定して調べた。QG優占草地の草種構成はQGが53-56%であり残りはTYまたはオーチャードグラス（OG）等、RCG優占草地の草種構成はRCGが56-70%であり残りはOG等、TY優占草地の草種構成はTYが98%以上であった（表1）。収穫はQG優占草地ではQGの穂孕期と出穂始め、RCG優占草地ではRCGの出穂期、TY草地では出穂始めと出穂揃いに実施した。刈り取りはモーアコンディショナ（DISCO 3000 AS, CLAAS, アメリカ）により行い、直ちにレーキで集草後に自走式フォレージハーベスタ（JAGUAR 890, CLAAS, アメリカ）により設定切断長14mmで細断して収穫した。なお、2017年に収穫したQG優占草地（A）は前年の2番草が未収穫であった。また、2018年に出穂始めのTYを収穫した草地（G）には、当年5月3日に約3t/10aの家畜ふん堆肥が散布されていた。

2. サイレージ調製

直径61cm、長さ1mのポリエチレン製の排水管（容積290L、トヨドレンダブル管、TDW600、無孔管、デンカ株式会社、東京）を、火山灰を敷設した地面上に垂直に固定したものをサイロとした。サイロの内側に、農業用ビニルフィルム（シーアイ農ビ、厚さ0.15mm、シーアイ化成、東京）を貼り合わせた円筒状のシートを設置した後、原料草を数kgずつ投入して踏圧をかけた。サイロ当たりの詰め込み新鮮物重量は146-222kgであった。各

原料草に対して、酵素入り乳酸菌製剤（サイマスター・AC： *Lactococcus lactis* SBS-0001, *Lacticaseibacillus paracasei* SBS-0003, アクレモニウムセルラーゼおよびメイセラゼの混合製剤、雪印種苗株式会社、札幌市、以下製剤）の添加と無添加で各1本のサイレージを調製した。製剤は粉剤3.4gを200mlの蒸留水に溶解し、原料草現物1kgに対して1mlの割合で噴霧した。詰め込み終了後、サイロ内側に設置したシートを折り返して上面を被覆し、落とし蓋と60kgの土嚢を詰めた漬物樽を載せて貯蔵した。約2ヶ月後にサイロを開封して、表層と底部の各10cm厚を除いた上段、中段および下段の中央部から試料を採取し、サイロ毎に計3点を分析に供した。貯蔵期間中の日平均気温は7-28℃（平均18±4℃）であった。

3. 化学成分および付着乳酸菌数の計測

原料草およびサイレージは、60℃で48時間乾燥させて風乾率を求めた後、カッティングミル（SM2000, レッチェ、東京）で1mmの篩を通るように粉碎し、飼料成分分析用サンプルとした。水分、粗タンパク質（CP）、溶解性タンパク質（CPs）、粗脂肪（EE）、粗灰分（CA）、中性デタージェント繊維（NDFom、耐熱性 α -アミラーゼ添加、亜硫酸ナトリウム不使用、灰分補正あり）、酸性デタージェント繊維（ADFom）、細胞壁物質（OCW）、低消化性繊維（Ob）および中性デタージェント不溶性蛋白質（NDICP）は常法で測定した¹¹⁾。高消化性繊維（Oa）、ヘミセルロース、非繊維性炭水化物（NFC）含量は以下の式で計算した。Oa=OCW-Ob、ヘミセルロース=NDFom-ADFom、NFC=100-(CP+EE+NDFom-NDICP+CA)。WSC含量は改変アンスロン法²⁸⁾により、スクロース、フルクトース、グルコースおよびフルクタン含量はAshikaga et al.³⁾の方法に従い測定した。酸緩衝能（BC）はWohlt et al.³⁷⁾の方法を改変した以下の方法で測定した。粉碎試料0.5gに蒸留水を50ml加え、マグネチックスターラーで攪拌しながらpHが3.5になるまで0.1N塩酸を200 μ Lずつ滴下してpHの変化を記録した。

Table 1 Harvest date, growth stage, and vegetation composition of herbage

Herbage lot.	Dominant grass species	Harvest date	Growth stage	Vegetation composition ²⁾
A	QG	9-Jun-2017	Boot	QG : 56 %, TY : 29 %
B	" ¹⁾	14-Jun-2018	Heading emergence	QG : 53 %, OG : 31 %
C	RCG	21-Jun-2017	Heading	RCG : 56 %, OG : 21 %
D	"	21-Jun-2018	Heading	RCG : 70 %, OG : 30 %
E	TY	16-Jun-2017	Heading emergence	TY : 99 %
F	"	28-Jun-2017	Full heading	TY : 100 %
G	"	8-Jun-2018	Heading emergence	TY : 98 %
H	"	25-Jun-2018	Full heading	TY : 99 %

¹⁾ means ditto. ²⁾ Dry matter base, QG : Quackgrass (*Agropyron repens* P. Beauv), RCG : Reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.), OG : Orchard grass (*Dactylis glomerata* L.), TY : Timothy (*Phleum pratense* L.).

これを対数回帰式 $\{y=a-b \times \ln(c+1); y=pH, x=\text{塩酸のミリ当量 (mEq/gDM)}, a \sim c \text{は変数}\}$ に当てはめて、得られた近似曲線によりpHを4.0まで低下させるのに必要な塩酸のミリ当量 (mEq/gDM) を求め、これをBCとした。

サイレージのpHと有機酸および揮発性塩基態窒素 (VBN) 含量は、常法¹¹⁾ により調製した抽出液を用いて、以下の方法で測定した。pHはガラス電極pHメーター (東亜, HM-30S, 日本)、有機酸は島津製作所製の高速液体クロマトグラフィーを用いたポストカラム法 (移動相には0.75mM の硫酸、反応液はBTB溶液 (0.1mM BTB, 7.5mM Na₂HPO₄)), VBNは水蒸気蒸留法¹¹⁾ を用いた。得られた測定値を用いてVスコアを算出した¹¹⁾。

製剤添加前の原料草に含まれる乳酸菌数は、CaCO₃を0.5%添加したLactobacilli MRS寒天培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin lakes, NJ, USA) を用いて、平板培養法により30°Cで3-5日間嫌気培養して計測した。

4. 統計解析

統計解析はR ver.4.2.0²⁷⁾ を用いて実施した。製剤の添加効果は、サイレージ発酵品質の各項目について、各サイロの上段、中段および下段から採取した各試料分析値の平均値を用いて、製剤添加の有無でpairwise. t. testにより検討した。また、製剤の添加効果におよぼす化学成分の影響を解析するために、WSC含量およびWSC/BC比それぞれとVスコアとの間に折れ線回帰モデル²⁾ をあてはめた。

結 果

1. 原料草の諸性状

原料草の化学成分を表2に示した。原料草の乾物含量は13.2-24.4%の範囲にあった。CP含量は7.6-18.1%DMの範囲にあり、CPs含量との間に強い正の相関 (r=0.956) が認められた。NDFom含量は60.3-69.3%DM、ADF含量は32.0-41.2%DM、ヘミセルロース含量は27.4-29.3%の範囲にあった。Oa含量は概ね10%DM前後であったが、原料草Cでは5.7%DMと低かった。NFC含量は10.6-17.8%DMの範囲にあり、WSC含量との間に強い正の相関 (r=0.860) が認められた。

原料草のWSC含量、BC、付着乳酸菌数、異物の混入および詰め込み密度を表3に示した。糖組成に大きな違いは見られず、概ねスクロースが最も多かった。WSC含量は4.8-10.0%DMの範囲にあり、RCG主体の原料草CとDおよび出穂始めに収穫したTY (原料草E, G) では5-6%DMと、その他の原料草と比べ低かった。BCは0.222-0.353 mEq/gDMの範囲にあった。WSC/BC比は149-451 g/Eqの範囲にあり、原料草間で大きな差が見られた。乳酸菌は2017年産の原料草A, C, EおよびFでは未測定であるが、新鮮物 (FM) 1g当たり10^{4.0}-10^{6.5} CFU含まれていた。詰め込み乾物密度は105-140 kg/m³であった。なお、原料草Aには前年未収穫の2番草と推測される大量の枯れ草が混入し、集草後のウインドローから採取した原料草では、乾物中45%が枯れ草であった。また、原料草Gには肉眼で容易に確認できるほどの堆肥の混入が認められた。

Table 2 Chemical composition of herbage samples

Herbage lot.	Chemical composition of herbage							
	DM	CP	CPs	NDFom	ADFom	Hemicellulose	Oa	NFC
	% FM				% DM			
A	24.4	16.3	5.35	60.3	32.0	28.4	9.8	17.8
B	18.1	15.2	5.56	63.6	34.8	28.7	9.5	15.2
C	19.1	13.2	4.35	68.2	39.0	29.2	5.7	12.2
D	14.8	18.1	6.25	64.3	35.5	28.8	9.1	10.6
E	13.2	13.8	4.64	64.5	37.1	27.4	10.5	14.4
F	23.3	7.6	2.62	69.3	41.2	28.1	8.4	17.6
G	17.9	16.1	4.68	63.4	34.1	29.3	10.9	14.8
H	18.0	10.9	3.47	68.1	39.3	28.8	9.3	14.4

DM : Dry matter, FM : Fresh matter, CP : crude protein, CPs : soluble protein, NDFom : neutral detergent fiber, ADFom : acid detergent fiber, Hemicellulose : NDFom-ADFom, Oa (high digestible fiber) : OCW (Organic cell wall)-Ob (low digestible fiber), NFC (Non fibrous carbohydrate) : 100-(CP+Ether Extract+NDFom-NDICP (neutral detergent insoluble crude protein)+Crude ash)

Table 3 Sugar content, buffering capacity, lactic acid bacteria count, contaminants of herbage samples, and silo density

Herbage lot.	Chemical composition of herbage							Lactic acid bacteria	Contaminants	Density
	Fructose	Glucose	Sucrose	Fluctan	WSC	BC	WSC/BC			
	%DM			mE DMg ⁻¹			g Eq ⁻¹	log ₁₀ CFU FMg ⁻¹	DMkg m ⁻³	
A	1.84	1.60	2.28	2.59	8.98	0.299	300	NT	Withered grass	140
B	1.41	1.44	2.42	0.25	7.52	0.353	213	4.0	none	122
C	1.26	0.99	2.00	0.54	5.77	0.343	168	NT	none	122
D	1.17	0.73	1.41	0.74	4.77	0.321	149	6.5	none	111
E	0.95	1.43	1.63	0.15	5.82	0.279	208	NT	none	123
F	1.11	2.29	4.24	1.63	10.04	0.222	451	NT	none	125
G	0.79	1.09	2.08	0.13	5.11	0.344	149	4.9	Manure	110
H	0.97	1.42	2.56	1.50	6.63	0.256	259	5.6	none	105

WSC : water-soluble carbohydrate (by modified anthron method), BC : Buffering capacity, mE : Milli equivalent of hydrochloric acid required to reduce pH to 4.0, CFU : Colony forming unit, NT : not tested.

2. 製剤添加による発酵品質の改善効果

製剤の添加がサイレージの発酵品質および化学成分に及ぼす影響を表4に示した。製剤添加サイレージは、無添加に比べ、pHおよびVBN/TNが有意に低く ($p<0.01$)、乳酸含量およびVスコアは有意に高かった (それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$)。また、製剤添加サイレージは、無添加に比べNDFom含量がやや低く ($p<0.01$)、乾物およびWSC含量の残存量がやや高かった (それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$)。

製剤添加によるVスコアの向上幅は原料草により大きく異なった。原料草B, E, FおよびHを用いたサイレージは、無添加でもpHは4.0以下と低く、Vスコアは88点以上と高く良質であり、製剤添加によるVスコアの向上幅は小さかった。

大量の枯れ草が混入した原料草Aを用いたサイレージは、無添加ではpHが4.08と低かったが、酪酸が0.19%FM検出され、Vスコアは72.5点となった。製剤添加サイレージでは酪酸は検出されず、VBN/TN比は無添加よりも低く、Vスコアは94.2点と高く良質となった。

堆肥が混入した原料草Gを用いたサイレージは、無添加では酪酸含量が0.85%FM, pHは5.14と高く、Vスコアは4点と劣質なものとなった。一方、製剤添加サイレージでは、酪酸含量は0.05%FM, pHは4.37となり、Vスコアは73.4点と無添加よりも顕著に高かった。

原料草Cを用いたサイレージは、無添加では酪酸が0.05%FMと微量に検出されたが、pHは4.24と低く、Vス

コアは74.1点であった。製剤添加サイレージでは無添加に比べ、乳酸含量が高く、酪酸は検出されず、VBN/TNは低く、Vスコアは87.1点と高く良質となった。

原料草Dを用いたサイレージは、無添加では、酪酸は検出されなかったが、乳酸含量が0.56%FMと低く、pHは4.65と高く、Vスコアは62.6点となった。一方、添加サイレージでは、乳酸含量が1.41%FMと無添加の2.5倍高く、pHは4.22と低かったが、VBN/TNは無添加と同程度で、Vスコアは65.4点となり、無添加との差は小さかった。

3. 原料草のWSC含量およびWSC/BC比とサイレージ発酵品質の関係

原料草のWSC含量およびWSC/BC比、それぞれとサイレージのVスコアの関係を図1に示した。WSC含量およびWSC/BC比が一定値以下になるとVスコアは急減する傾向が見られた。そこで、枯れ草や堆肥の混入の影響が示唆される原料草AとGを除き、それらの関係に折れ線回帰モデルをあてはめたところ、無添加、製剤添加サイレージ、それぞれに良好な当てはまりを示した (WSC ; R^2 =無添加0.816, 添加0.954, WSC/BC ; R^2 =無添加0.970, 添加0.988)。それらの回帰式の折曲点は、WSC含量については、無添加では5.87%DM, 製剤添加サイレージでは5.50%DM, WSC/BC比については、無添加では197g/Eq, 添加サイレージでは174g/Eqであり、それぞれ製剤添加サイレージの方がやや低かった。

Table 4 Effect of adding enzyme-containing lactic acid bacterial inoculant on fermentation quality and chemical composition of silage

Herbage lot.	Treat ¹	pH	Organic acid				VBN/TN	V-SCORE ²	Chemical composition of silage		
			Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid			DM	NDFom	WSC
			----- %FM -----				%		%FM	%DM	%DM
A	Control	4.08	2.23	0.47	nd	0.19	10.0	72.5	21.8	59.2	0.79
	Inoculant	3.87	2.52	0.29	nd	nd	7.5	94.2	22.3	57.3	0.88
B	Control	3.93	2.44	0.56	nd	nd	8.0	91.3	18.6	62.5	1.15
	Inoculant	3.79	2.79	0.46	nd	nd	7.2	93.6	18.9	61.9	1.29
C	Control	4.24	1.47	0.43	nd	0.05	12.6	74.1	18.2	66.5	0.48
	Inoculant	4.01	2.03	0.47	nd	nd	10.2	87.1	18.6	65.9	0.54
D	Control	4.65	0.56	0.74	0.13	nd	15.5	62.6	17.2	65.4	0.59
	Inoculant	4.22	1.41	0.70	0.09	nd	15.0	65.4	17.9	63.4	0.69
E	Control	3.79	1.72	0.42	nd	nd	7.3	93.7	16.1	65.3	0.38
	Inoculant	3.74	2.02	0.30	nd	nd	6.9	95.4	16.5	63.8	0.57
F	Control	3.76	1.99	0.20	nd	nd	5.2	99.4	21.8	69.5	1.52
	Inoculant	3.61	2.48	0.22	nd	nd	4.8	99.9	21.8	69.0	1.36
G	Control	5.14	0.06	0.77	0.16	0.85	29.9	4.4	16.5	63.8	0.97
	Inoculant	4.37	1.32	0.92	0.12	0.05	11.5	73.4	17.3	61.0	1.12
H	Control	3.93	1.55	0.36	nd	0.01	9.9	88.0	17.7	69.3	0.37
	Inoculant	3.72	2.05	0.34	nd	nd	8.3	92.4	17.9	67.3	0.51
<i>p</i> -value ³		0.006	0.001	0.199	-	-	0.006	0.034	0.001	0.001	0.029

¹ Control : non-inoculation, Inoculant : Enzyme-containing lactic acid bacterial inoculant, ² <60 : bad, 60-80 : acceptable, 81-100 : excellent. ³ Analysed by pairwise. t. test, FM : Fresh matter, DM : Dry matter, VBN : Volatile basic nitrogen, TN : Total Nitrogen, NDFom : neutral detergent fiber, WSC : water-soluble carbohydrate, nd : below detectable limit

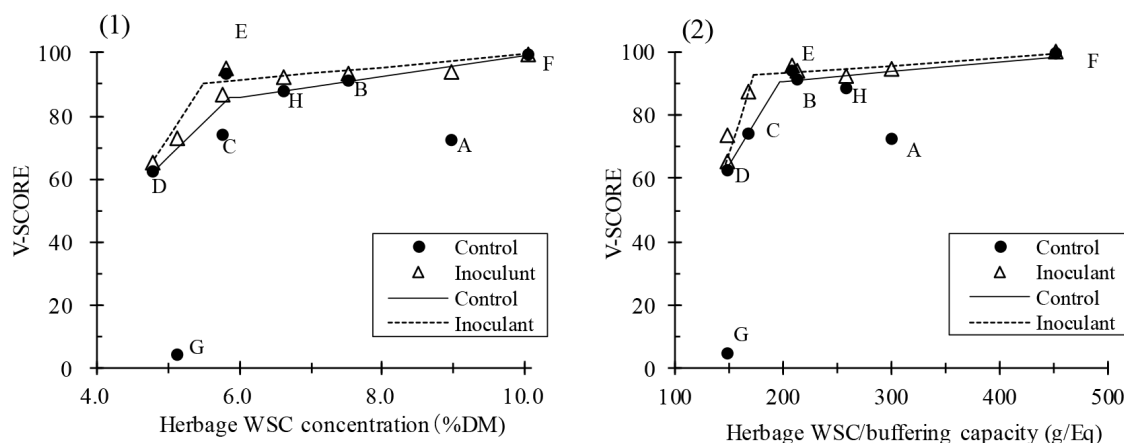


Fig. 1 Relationship between (1) WSC concentration and (2) WSC/BC of herbage and V-SCORE of silage. A-G indicates herbage lots in Table1-4. Except for A and G, a segmented regression model was fitted to the relationship between the WSC content of herbage and the V-SCORE of silage. The regression equations are as follows:

- (1) Control; $Y=21.4X-40.1 (X \leq 5.87), Y=3.30X+66.3 (X > 5.87)$, RMSE=5.40, $R^2= 0.816$. Inoculant; $Y=34.3X-98.5 (X \leq 5.50), Y=2.03X+79.1 (X > 5.50)$, RMSE=2.39, $R^2= 0.954$.
- (2) Control; $Y=0.58X-22.8 (X \leq 197), Y=0.03X+84.0 (X > 197)$, RMSE=2.18, $R^2= 0.970$. Inoculant; $Y=1.09X-96.7 (X \leq 174), Y=0.02X+88.5 (X > 174)$, RMSE=1.24, $R^2= 0.988$.

考 察

1. 無予乾サイレージにおける製剤の添加が発酵品質に及ぼす影響

製剤添加サイレージでは、無添加に比べ乳酸含量が高く、pHおよびVBN/TNが低く、酪酸生成は抑制され、品質改善効果が認められた(表4)。また、製剤添加サイレージは無添加に比べ、NDFom含量がやや低く、残存WSC含量がやや高かった(表4)。これらの結果は、セルラーゼおよびセルラーゼと乳酸菌の混合剤の添加の影響を調べた多くの報告^{4, 13, 14, 38)}で確認されている傾向と一致した。本試験でも、原料草に添加した酵素によりセルロースやヘミセルロースが分解されて発酵基質として利用され、乳酸生成に伴うpH低下により酪酸菌等の活性が抑制されたと考えられる。WSC含量とVスコア間の回帰式における折曲点のWSC含量が、製剤添加サイレージの方が無添加よりもやや低かったのは、その現れと考えられる。ただし、その添加効果は原料草により大きく異なった。

2. 異物が混入した原料草に対する製剤の添加効果

枯れ草や堆肥が混入した原料草AやGでは、製剤の添加により酪酸とVBNの生成が顕著に抑制されてVスコアは大きく向上した(表4)。土壌や堆肥にはサイレージの品質低下の原因となる酪酸菌、腸内細菌やバチルス属菌が含まれている^{24, 25)}。本試験では、乳酸菌以外の原料草の付着菌叢は調べていないが、原料草Aは無添加でも高い発酵品質が期待できるWSC含量であったが、乾物中の45%が枯れ草であった。一方、原料草Gでは肉眼で容易に確認できるほどの堆肥が混入していた。これらのことから、枯れ草に付着する土壌や、堆肥に由来する不良発酵の原因となる微生物が多量に含まれていた可能性がある。それらの活性により無添加では酪酸発酵が生じたが、製剤の添加により乳酸発酵が促進され、速やかにpHが低下したことにより、酪酸菌等の活性が抑制されたと推測される。

堆肥の混入によりサイレージの発酵品質が顕著に低下する現象は、Rammer et al.^{25, 26)}や田村ら³²⁾の報告と一致するものであった。一方、乳酸菌製剤の添加による品質改善効果は、堆肥が混入した原料草では見られなかったとする、本試験とは異なる結果が報告されている^{25, 26)}。この違いの原因は、原料草の性状や、堆肥の質や混入量、また、酵素や乳酸菌製剤の性能等に起因する可能性が考えられる。今後、堆肥等の混入の有無を処理とした検証が必要であるが、製剤の添加により、堆肥等の混入により生じる不良発酵を抑制し、発酵品質を改善させ得る可能性が示された。

3. WSC含量と製剤添加効果の関係

乳酸菌の添加によりサイレージの発酵品質の向上を図るには、材料に一定量以上のWSCが含まれる必要がある。その必要量は無予乾のTYでは7.1%DM以上、無予乾のオーチャードグラスでは6.6%DM以上と報告されている¹⁷⁾。酵素入りの乳酸菌製剤を用いた本試験では、WSC含量9.0%DMのQG(原料草A)およびWSC含量5.1%DMのTY(原料草G)を原料草としたサイレージにおいて、明瞭な品質改善が見られた(表4, 図1)。乳酸菌を単独で添加した処理を設けていないため、酵素の良質化への寄与度は不明であるが、TY(原料草G)のWSC含量は、乳酸菌単独の製剤で、その効果の発現に必要とされるWSC含量と比べ2ポイント低かった。

供試原料草の中でWSC含量が4.8%DMと最も低かったRCG(原料草D)を用いたサイレージでは、製剤の添加により顕著なpHの低下と乳酸含量の増加が見られ、酵素製剤の影響を調べた既往の報告^{1, 23, 30, 33)}と同様の結果が得られた(表4)。しかし、製剤添加サイレージのVBN/TN比は無添加と同程度であり、十分な品質改善が見られなかった。このサイレージから酪酸は検出されていないため、VBNの生成は蛋白分解性の酪酸菌によるものではなく、McDonald et al.¹⁹⁾が指摘するように、腸内細菌等による脱アミノ反応によって生じたものであることが推測される。原料草Dは、WSC含量が低かったことから、pHの低下速度が遅く、埋蔵初期において腸内細菌等の活性が十分に抑制されなかった可能性が推測される。また、CPs含量が6.25%DMと供試原料草中で最も高く、VBNが生成されやすい条件にあったことも影響した可能性が示唆された。

枯れ草や堆肥の混入の影響が示唆される原料草を除くと、WSC含量とVスコアの関係は、WSC含量が一定値未満になるとVスコアが急減する折れ線回帰式により表された(図1)。回帰直線の折曲点以上の原料草を用いたサイレージは無添加でも概ね良質となり、製剤の添加効果は小さかった。また、回帰式の折曲点のWSC含量は無添加よりも製剤添加サイレージの方がやや低く、無添加では良質化が困難なWSC含量が低い原料草において、製剤添加により良質化が図られる可能性が示された。以上より、WSC含量は製剤の添加効果の発現に影響を及ぼす重要な因子であることが推測された。

4. WSC/BC比と製剤添加効果の関係

良質なサイレージを調製するために必要なWSC量はBCの影響を受けて異なると考えられており、WSC/BC比は原料草の発酵適性を示す指標として多くの研究で活用されている^{6, 9, 34, 35)}。しかし、乳酸菌製剤の添加効果との関係は明らかになっていない。本試験で得られた原

料草のBCは0.222-0.353 mEq/gDMの範囲にあり、McDonald et al.¹⁸⁾ や岡元ら²²⁾ の報告のチモシーと同様の値であった。WSC/BC比は149-451g/Eqの範囲で大きな差が見られ、WSC含量と同様、Vスコアとの間に強い関連が見られた(図1)。WSC/BC比の回帰モデルへの当てはまりはWSC含量よりも良好であり、発酵品質や製剤の添加効果をよりよく説明できる可能性が推測された。今後、アルファルファなどの高い緩衝能を有するマメ科牧草を含むものなど、多様な原料草を用いた検証が必要である。

5. その他化学成分の影響

セルラーゼの添加効果は草種によって異なることが知られている。田川ら³¹⁾ は、RCGにセルラーゼを添加してサイレージ中のNDFやADF含量を調べた結果、それらの分解率はTYを用いた艾尼瓦尔ら¹⁾ の報告よりも小さく、RCGはTYよりも多くの難消化性の繊維画分を含むことを示唆している。本試験の供試原料草の中でNDFom含量が高く、かつ68-69%で近似していた原料草C、FおよびHについて、セルラーゼにより分解される繊維画分であるOa含量を比べると、TY主体の原料草FやHに比べRCG主体の原料草Cが低く(表2)、田川ら³¹⁾ の考察を支持するものであった。Oa含量が高い草の方が、繊維分解により供給される糖含量は多く、WSC含量がより低い原料草でも製剤の添加により品質改善が図られる可能性がある。しかし、WSC含量やCPs含量など複数の要因が関与するため、本結果ではOa含量の影響は判然としなかった。

サイレージ発酵の基質としては、WSCとともにNFC画分に含まれるペクチンの一部も利用される⁵⁾。NFCからWSCを差し引いた画分(NFC-WSC)含量は原料草Dが最も低かった(データ省略)。このことは、WSC含量が低く、CPs含量が高かったこととともに、原料草Dで品質改善効果が十分に得られなかった一因となっている可能性が示唆された。一方、原料草GのNFC-WSC画分とOa含量は、それぞれ供試原料草中で最も高かった。このことは、WSC含量が低く、かつ堆肥が混入していたにもかかわらず原料草Gで品質改善効果が大きかった一因となっている可能性が示唆された。

6. まとめ

酵素入り乳酸菌製剤の添加による発酵品質改善効果は、堆肥や大量の枯れ草が混入したTYやQGを用いたサイレージで顕著に認められた。それら原料草のWSC含量は、TYは5.1%DM、QGでは9.0%DMであり、TYのWSC含量は乳酸菌単独の製剤でその効果の発現に必要とされるWSC含量に比べ2ポイント低かった。一方、WSC含量

4.8%DMのRCGでは、製剤添加によりサイレージの乳酸含量は顕著に増加したが、揮発性塩基態窒素/全窒素比は変わらず、十分な品質改善効果はみられなかった。その他のWSC含量5.8%DM以上のTYやQGは無添加でも良質となり、製剤の添加効果は小さかった。原料草性状と発酵品質の関係から、WSC含量やWSC/BC比が低く、無添加では良質化が困難な原料草において、製剤添加により良質化が図られる可能性が示された。また、その添加効果の発現には、WSC含量やWSC/BC比の他、CPs含量、NFC含量、付着菌等が影響をおよぼす可能性が示唆された。生産現場には草種や肥培管理条件の異なる多様な原料草が存在する。今後、より多様な材料を用いて各種添加剤の効果的な発現条件を明らかにし、良質サイレージの安定生産を支える技術開発に繋げたい。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、畜産試験場・飼料生産技術グループの職員・契約職員諸氏には多大なるご支援を頂いた。また、北海道立総合研究機構北見農業試験場の飯田憲司氏には糖含量の分析にご協力を頂いた。ここに記して、深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 艾尼瓦尔艾山, 安宅一夫, 楢崎昇, 野英二. *Acetivibrio cellulolyticus* Y2014-94 由来の細胞壁分解酵素の添加がサイレージの発酵品質, 乾物回収率および細胞壁成分に及ぼす影響. 日草誌. 43, 406-412 (1998)
- 2) 青木繁伸. Rによる統計処理. 折れ線回帰. [参照 2022年5月5日] <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/R/oresen.html> (2009)
- 3) Ashikaga, K., Tanaka, T., Fujii, H., Deguchi, K., and Iida, K. Evaluating the genotype × nitrogen fertilization interaction on the nutritive value of the first crop in timothy (*Phleum pratense* L.) clones. Grassl. Sci. 58, 37-41 (2012)
- 4) Bayorbor, T. B., Kumai, S., Fukumi, R., Hattori, I. Effects of acetivibrio cellulase and lactic acid bacteria inoculant on the fermentation quality and digestibility of guineagrass silages. Grassl. Sci. 39, 317-325 (1993)
- 5) ブランダ ロールデス ノエミ, 藤田裕, 松岡栄. 牧草のサイレージ化にともなう構造的炭水化物の分解と消化率の変化およびそれに与える添加剤の影響. 北畜会報. 38, 50-54 (1996)
- 6) Bolsen, K. K., LIN, C., Brent, B. E., Feyerherm, A. M., UrBAN, J. E., Aimutis, W. R. Effect of silage additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. J. Dairy Sci. 75, 3066-3083 (1992)

- 7) 出口健三郎. 北海道の採草地における草種構成悪化の現状とその要因. 日草誌. 62, 153-157 (2016)
- 8) 道立農業試験場, 畜産試験場. 北海道におけるTMR供給センターの運営実態. 北海道立根釧農業試験場, [参照2022年6月10日]. <https://www.hro.or.jp/list/agricultural/research/konsen/TopDL/TMR%20in%20Hokkaido.PDF>. (2006)
- 9) Heinritz, S. N., Martens, S. D., Avila, P. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 201-210 (2012)
- 10) 服部育男, 佐藤健次, 小林良次, 宮川竜二, 只野克紀, 上村慶治, 小原信孝, 伊藤尚勝. 高水分材料のフレール型ローラー収穫時における添加剤を利用したサイレージ品質改善. 日草誌九州支報. 34, 17-21 (2004)
- 11) 自給飼料利用研究会. 粗飼料の品質評価ガイドブック. 3訂版, 日本草地畜産種子協会, 東京, 2009, p.4-78
- 12) 北村亨. 新酵素入りサイレージ調製用乳酸菌「アクレモ」の開発. 牧草と園芸. 45, 9-12 (1997)
- 13) Khota, W., Pholsen, S. Higgs, D., Cai, Y. Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. *J. Dairy Sci.* 99, 9768-9781 (2016)
- 14) Masuko T, Kodama, I., Ohta, N. Effects of addition of formic acid or mixture of bacterial inoculant and enzyme on fermentation of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), Timothy (*Phleum pratense* L.) and Alfalfa (*Medicago sativa* L.) silages. *Grassl. Sci.* 42, 13-19 (1996)
- 15) 増子孝義, 藤田希, 円井更織, 嶋田秀庸. ギ酸, 乳酸菌製剤および乳酸菌製剤と酵素剤の混合物の添加が無予乾グラスサイレージの発酵品質に及ぼす影響. 日草誌. 43, 278-287 (1997)
- 16) 増子孝義. サイレージ科学の進歩. デーリィ・ジャパン社, 東京, 1999, p.97
- 17) 増子孝義. 酪農家およびTMRセンターにおける牧草サイレージの発酵品質向上に向けた診断の提案. 東京農大農学集報. 61, 117-125 (2017)
- 18) McDonald, P., Henderson, N., Heron, S. The biochemistry of silage, Second edition, Bucks, Chalcombe Publications, 1991, (岡本明治 (訳). サイレージの生化学, 第2版, デーリィ・ジャパン社, 東京, 1995, p.38-39)
- 19) McDonald, P., Henderson, N., Heron, S. The biochemistry of silage, Second edition, Bucks, Chalcombe Publications, 1991, (内村泰, 増子孝義, 原慎一郎 (訳). サイレージの生化学, 第2版, デーリィ・ジャパン社, 東京, 1995, p.125-126)
- 20) 西野直樹. 最新サイレージバイブル. 酪農学園大学エクステンションセンター, 江別, 2012, p.16-23
- 21) 野英二, 安宅一夫. サイレージ科学の進歩, デーリィ・ジャパン社, 東京, 1999, p.224-225
- 22) 岡元英樹, 古館明洋, 増子孝義. ペレニアルライグラスとチモシーの窒素およびカリ施肥量が酸緩衝能に及ぼす影響. 北草研報. 41, 44 (2007)
- 23) Olsen, S., Henderson, A. R., Robertson, S., McGinn, R. Cell wall degrading enzymes for silage. 1. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. *Grass Forage Sci.* 48, 45-54 (1993)
- 24) Östling, C. E., Lindgren, S. E. Bacteria in manure and on manured and NPK-fertilized silage crops. *J. Sci. Food Agric.* 55, 579-588 (1991)
- 25) Rammer, C., Östling, C., Lingvall, P., Lindgren, S. Ensiling of manured crops-effects on fermentation. *Grass Forage Sci.* 49, 343-351 (1994)
- 26) Rammer, C., Lingvall, P. Influence of farmyard manure on the quality of grass silage. *J. Sci. Food Agric.* 75, 133-140 (1997)
- 27) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. [cited.12.May 2022] URL <https://www.R-project.org/> (2022).
- 28) 篠田英史, 出口健三郎, 飯田憲司, 足利和紀, 増子孝義. 牧草中の可溶性炭水化物含量測定におけるアンスロン法の改変. 日草誌. 62, 1-7 (2016)
- 29) 相馬幸作, 増子孝義, 王鵬, 堤裕江, 原裕子, 花田正明, 岡元明治. ギ酸, 乳酸菌製剤および乳酸菌製剤と酵素剤の混合添加グラスサイレージの給与がヒツジにおける栄養価および養分摂取量に及ぼす影響. 日草誌. 53, 270-276 (2008)
- 30) 田川伸一, 岡島毅, 伊藤陸泰. リードカナリーグラス (*Phalaris arundinacea* L.) サイレージの発酵品質に及ぼす酵素製剤の影響. 日草誌. 47, 157-162 (2001)
- 31) 田川伸一, 岡島毅, 伊藤陸泰. リードカナリーグラス (*Phalaris arundinacea* L.) サイレージの細胞壁構成成分に及ぼす酵素製剤の影響. 日草誌. 56, 199-202 (2010)
- 32) 田村忠, 小倉紀美, 前田善夫. 牧草サイレージ発酵品質に対する堆肥混入の影響および牧草収穫時の堆肥混入量の推定. 日草誌. 47, 68-71 (2001)

- 33) 友田裕代, 大桃定洋, 田中治, 北本宏子, 浜谷徹, 河野敏明, 丹野裕. *Acremonium cellulolyticus* Y-94 由来のセルラーゼの添加がアルファルファサイレージの発酵品質に及ぼす影響. 日草誌. 42, 155-158 (1996)
- 34) Tremblay, G. F., Bélanger, G., Drapeai, R. Nitrogen fertilizer application and developmental stage affect silage quality timothy (*Phleum pratense* L.). Grass Forage Sci. 60(4), 337-355 (2005)
- 35) Wang, J., Chen, L., Yuan, X., Guo, G., LI, J., Bay, Y., Shao, T. Effects of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage prepared with rice straw, local vegetable by-products and alfalfa in Southeast China. J. Integr. Agric. 16(3), 664-670 (2017)
- 36) 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. ギ酸, 乳酸菌製剤および乳酸菌と酵素の混合剤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, 205-210 (2008)
- 37) Wohlt, J. E., Jastis, D. K., Evans, J. L. Use of acid and base titrations to evaluate the buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro. J. Dairy Sci. 70, 1465-1470 (1987)
- 38) 庄益芬, 安宅一夫, 野英二. 乳酸菌およびセルラーゼ添加アルファルファサイレージの発酵品質, 細胞壁成分およびin vitro乾物消化率に及ぼす貯蔵温度の影響. 日草誌. 45, 181-186 (1999)

Effect of the Addition of Enzyme-containing Lactic Acid Bacterial Inoculant on the Fermentation Quality of Unwilted Grass Silage

Keiko MINATO^{*1}, Tsuneki TANAKA^{*2}, Mizuki KISHIDA^{*1},
Kenzaburo DEGUCHI^{*2}, Hiroki TANIGUCHI^{*3}, and Toru KITAMURA^{*4}

Summary

The objective of this study was to evaluate the effect of adding a commercial enzyme-containing lactic acid bacterial inoculant (a mixture of *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Acremonium cellulase* and *Meicelase*, Snow Brand Seed Co. Sapporo, Japan) in the preparation of unwilted grass silages. The silages were prepared in 290 L silos, both with and without the inoculant, using, first-cut grasses, primarily composed of timothy (*Phleum pratense* L., TY), reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L., RCG), and quack grass (*Agropyron repens* (L.) Beauv., QG). The dry matter (DM) content of the herbage materials ranged from 13.2 to 24.4% and the water soluble carbohydrate (WSC) content ranged from 4.8 to 10.0% of DM. The addition of the inoculant had a significant effect on QG and TY when they contained substantial amounts of withered grass and manure. The WSC content of these herbage materials was 9.0% of DM for QG and 5.1% of DM for TY. In the case of TY, the WSC content was 2 percentage points below the minimum required for the desired effect with the lactic acid bacterial inoculant alone. On the other hand, in RCG with a WSC content of 4.8% of DM, the addition of inoculant significantly increased the lactic acid content of the silage, but the volatile basic nitrogen/total nitrogen ratio was similar, and the quality improvement effect was limited. For other TY and QG samples with a WSC content of 5.8% of DM or higher, the effect of inoculant addition was small due to the good quality without inoculant. The relationship between herbage characteristics and fermentation quality suggests that inoculant addition may improve the quality of the herbage materials that are difficult to improve without inoculant addition due to their low WSC content and WSC/BC ratio. In addition to WSC content and WSC/BC ratio, it was also suggested that crude protein soluble (CPs) content, non-fibrous carbohydrate (NFC) content and bacterial contamination may have an effect on inoculant effectiveness. Herbage material characteristics vary according to grass species, fertilizer management, and harvest time. In the future, the conditions for effective expression of different additives should be clarified using a greater variety of materials.

*1 Hokkaido Research Organization Animal Research Center, Shintoku, Hokkaido, 081-0038 Japan
E-mail: minato-keiko@hro.or.jp

*2 ditto. (Present; Hokkaido Research Organization Dairy Research Center, Nakashibetsu, Hokkaido, 086-1135 Japan)

*3 Snow Brand Seed CO., LTD, Hokkaido Research Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1464 Japan

*4 ditto. (Present; Snow Brand Seed CO., LTD, Tokyo headquarters, Chiba, 261-0002 Japan)