

# 高糖分飼料イネ「たちすずか」ホールクroppサイレージの 発酵品質及び好気的変敗に対する乳酸菌添加の影響

福馬敬紘 河野幸雄 神田則昭 新出昭吾

## 要 約

高糖分飼料イネ「たちすずか」のホールクroppサイレージ(WCS)開封後の好気的変敗に及ぼす乳酸菌添加の影響を明らかにするため、乳酸菌添加処理3区(無添加区、ホモ発酵型乳酸菌添加区、ヘテロ発酵型乳酸菌添加区)のロールペールサイレージを調製し、それらの発酵品質及び開封後の品質変化について調査した。

無添加区のWCSは有機酸生成量が乳酸菌を添加した他の2処理区に比べて少なく、開封後ほぼすべてのロールで好気的変敗が発生した。ヘテロ型区では他の2処理に比べて酢酸生成量が多く、好気的変敗は発生しなかった。ホモ型区では調製後7か月目に開封したものは乳酸発酵が優勢であり、好気的変敗の発生が認められた。一方、調製後1年以上経過して開封したものは酢酸生成量が増加しており、好気的変敗の発生が抑制された。

以上のことから、高糖分飼料イネWCSの好気的変敗に対して乳酸菌製剤の添加が有効であり、特にヘテロ発酵型乳酸菌が優れた抑制効果を有することが明らかとなった。

## I 緒言

わが国において、飼料イネの栽培面積は、近年の輸入飼料価格の高騰に対する自給粗飼料の需要の高まりや飼料自給率向上・耕作放棄地解消に向けた取り組み、さらには作付面積に応じた交付金が交付される行政的な支援制度を背景に大きく拡大してきた(H18→H24: 飼料用米 104ha→34,525ha, WCS用イネ 5,182ha→25,672ha)。本県においてはWCS用イネ、とりわけ2010年に品種登録された高糖分飼料イネ「たちすずか」<sup>6)</sup>の栽培面積が急速に拡大し、平成24年度には県内のWCS用稲の9割以上(200ha以上)を占めるまでになった。「たちすずか」の大きな特徴は子実割合が従来品種と比べて1/3程度と少ない茎葉多収タイプで、茎葉中の糖含量が従来品種に比べて高いことであり、乳酸発酵主体の良質なWCS調製に適した品種である。一方でWCS中の乳酸や残存糖は、WCSが開封されて空気にさらされると酵母のエネルギー源となり、好気的変敗が生じる原因となる。そのため、糖含量の高い「たちすずか」WCSは一般的な子実多収タイプの飼料イネ品種に比べて好気的変敗が起きやすくなることが懸念される。好気的変敗が生じると栄養分の消失により飼料価値が低下するだけでなく、カビの発生によって家畜やその生産物へ悪影響を及ぼす恐れもある。県内におけるイネWCS調製はロールペールサイレージ体系が主流である。そのため、イネWCSの利用者には小規模な黒毛和種繁殖経営体も多く、開封したロールを一度に

使い切るのが困難な場合も多いことから、好気的変敗に対する何らかの方策が必要である。

そこで本試験では、「たちすずか」WCSの好気的変敗を抑制する手法として他の飼料作物において効果が認められている乳酸菌利用に着目し、WCS調製時の乳酸菌添加(ホモ発酵型、ヘテロ発酵型)が「たちすずか」WCSの発酵品質と好気的変敗に及ぼす効果について調査を行った。

## II 材料と方法

### 1 WCS調製

飼料イネWCSは、「たちすずか」を黄熟期に飼料イネ専用の細断型収穫機(株式会社タカキタ, WB1020)により切断長3cmで収穫成形後、ラッピングマシン(株式会社タカキタ, SW1110W)を用いてストレッチフィルムで8層巻きにしてロールペールサイレージを調製した。乳酸菌は収穫直前に立毛状態の稲に噴霧器を用いて添加した。

### 2 乳酸菌

乳酸菌はホモ発酵型乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (畜草1号: 雪印種苗株式会社) (ホモ型区) とヘテロ発酵型乳酸菌 *Lactobacillus buchneri*

(2)

(11A44:パイオニアハイブレッドジャパン株式会社)  
(ヘテロ型区)の2種類を用いた。添加量は製剤の使用法に従い、畜草1号は5g/L, 11A44は1g/Lとなるよう水道水に懸濁し、飼料イネ新鮮物に対し0.1%の割合で添加した。また対照として無添加のWCSも調製した(無添加区)。

### 3 サンプルング

WCSは7か月以上貯蔵して発酵させた。サンプルはフィードサンプラー(株式会社藤原製作所)を用いてロールの上・中・下部の3か所からWCSを採取し、それらを混合したものを用いた。採取したサンプルは発酵品質及び好気的変敗の調査に用いた。

### 4 発酵品質の調査

サンプル100gを採取後直ちに500mlの蒸留水に浸漬して4℃で24時間冷蔵抽出した後、抽出液をろ紙でろ過して、pH及び材料新鮮物中の各種成分(有機酸、糖類、エタノール、アンモニア態窒素)含有量を測定した。

### 5 好気的変敗の調査

Ashbell et al. (1991)<sup>1)</sup>の方法を参考にして行った。1L容ポリエチレンテレフタレート製ボトルの底面を除去してサンプルを250g詰め込み、除去した底面は中心部に直径約1cm程度の穴をあけて、ふたとして用いた。ボトルは上下逆さまにしてボトルの口の部分を20%水酸化カリウム水溶液100mlに浸けて20℃恒温器内で7日間静置した(図1)。静置中の好气的活動によって発生した二酸化炭素は比重が空気より大きく下方に沈下するため、水酸化カリウム水溶液中に捕集される。その捕集された量を好气的変敗発生の指標の1つとした。7日目のサンプルは4と同様にして抽出液を調製し、分析に用いた。

### 6 分析方法

pHはガラス電極pHメーター(株式会社堀場製作所, F-16)で、有機酸・糖類・エタノールは高速液体クロマトグラフィ(Waters, Waters 616 LC System)で、アンモニア態窒素は藤井・奥田法変法(和光純薬工業株式会社, アンモニアテストワコー)で測定した。好气的変敗に伴う二酸化炭素発生量は20%水酸化カリウム水溶液の一部を1規定塩酸で滴定してpHが8.1から3.6まで低下するのに要した滴定量を基に次式により算出した。

$$\text{二酸化炭素発生量 (g/kgDM)} = 0.044 \times T \times V / (A \times FM \times DM)$$

T: 1 規定塩酸滴定量 (ml)

V: 20%水酸化カリウム水溶液総量 (ml)

A: 滴定に使用した20%水酸化カリウム水溶液量 (ml)

FM: 調査に用いたWCSの新鮮物量 (kg)

DM: WCS乾物割合

### 7 統計解析

得られた結果は、分散分析法を用いて処理による統計的有意差の検定を行った後、有意差(p<0.05)が認められた項目について多重検定(Tukey-Kramer法)を行った。



図1 好气的変敗試験

### Ⅲ 結果および考察

#### 1 サンプルング時期

WCSのサンプルングは、調製後7～8か月目(4～5月;春開封)及び14～18か月目(11～3月;秋冬開封)の2期間に段階的に実施した。各処理のロール数は、春開封がホモ型区2個、ヘテロ型区2個、無添加区3個、秋冬開封がホモ型区5個、ヘテロ型区4個、無添加区5個であった。

#### 2 WCSの発酵品質(表1)

春開封の発酵品質について、無添加区のpHが4.61であり、乳酸菌添加の2処理(ホモ型区:4.17、ヘテロ型区:4.14)に比べて有意ではないものの、高い値であった。無添加区は乳酸含量が0.65%とホモ型区の1.01%に比べて少なく、酢酸含量が0.20%とヘテロ型区の0.63%に比べて少ないことから、有機酸の生成量に影響されたものと考えられた。ホモ型区は乳酸含量が有意ではないものの、他の2処理に比べて高く、ヘテロ型区は酢酸含量が他の2処理に比べて有意に高く( $P<0.05$ )、また1,2-プロパンジオールの含量も有意差はなかったものの高い傾向にあった。L. plantarumはグルコース1モルから2モルの乳酸のみを生成する乳酸菌であるのに対して、L. buchneriは乳酸の他にエタノールや二酸化炭素を生成し、さらに嫌気状態でかつpHが低い状況、言い換えればサイレージ発酵が進んだ状態では乳酸を分解して酢酸や1,2-プロパンジオールなどを生成する代謝経路を有している<sup>11)</sup>。これらのことを踏まえると、今回添加した2種類の乳酸菌製剤は「たちすずか」WCSにおいてそれぞれの持つ特有の生成能を発揮していたと考えられた。エタノール含量は3処理のいずれにおいても1.5%以上であり、発酵産物の中で最も多く含まれていた。Nishino et al. (2007)<sup>8)</sup>は、飼料イネWCS調製時のヘテロ発酵型乳酸菌L. buchneriの添加はアルコール発酵を抑制すると報告しているが、今回はそのような抑制効果は認められなかった。Nishino and Shinde (2007)<sup>9)</sup>によると、細断型またはフレール型の飼料イネ専用収穫機で収穫調製した飼料イネWCSにおいて、フレール型で調製したWCSでは乳酸発酵主体のものが多かったのに対して細断型ではエタノール発酵主体のものが多かったと報告している。細断型の場合、ディスクカッターによって茎を輪切りにするように切断するため、フレール型に比べて茎部分の物理的破壊が少なく中空の形状が保たれやすくなる。このため、WCS調製時にその中空部分に酸素が残存してしまうことで、発酵初期に

において酵母の活動が抑制されずエタノールが多く生成される。本試験では細断型収穫機を利用してWCSを調製しており、すべての処理区でエタノール発酵が優勢になった要因と考えられた。さらに今回用いた飼料イネ「たちすずか」は茎が剛健でより中空形状が維持されやすく、かつ茎葉中糖含量が高いことから、酵母の生存に有利となりその傾向が一層強められたと推察された。

秋冬開封のWCSについては、ヘテロ型区と無添加区の発酵品質は春開封のものと同様な傾向であったが、ホモ型区では大きな違いが認められた。春開封のWCSでは生成した有機酸の中で乳酸が最も多かったのに対し、秋冬開封のものでは乳酸よりも酢酸の方が多くなっており、ヘテロ型区と同程度の生成量であった。さらに、1,2-プロパンジオールの生成量についてもヘテロ型区と同程度であり、結果としてヘテロ型区と同様な発酵品質となっていた。このことからホモ型区では春開封から秋冬開封までの約6か月の貯蔵期間にWCSの発酵様相がホモ発酵型からヘテロ発酵型に変化したものと推察された。L. plantarumはホモ発酵型乳酸菌の中でも通性ヘテロ発酵型乳酸菌に分類されており、通常の嫌気的条件下ではグルコースから乳酸のみを生成するが、好気的条件あるいはグルコースが著しく低い条件下では乳酸から酢酸を生成することが知られている<sup>13)</sup>。今回、ホモ型区のグルコースは秋冬開封のものでほとんど消失していた。また、河野ら(2013)<sup>5)</sup>によると、飼料イネロールバールサイレージにおいて保管期間が長くなるとロール内の窒素割合が増加することを報告しており、長期保管時のロール内への外気(酸素)侵入を示唆している。これらの条件から、ホモ型区において保管中にロール内の環境が変化したことに伴いL. plantarumが乳酸から酢酸を生成した可能性は十分に考えられる。一方、L. buchneriの乳酸代謝により生成される1,2-プロパンジオールも増加していたことから、今回のホモ型区における発酵様相の変化がL. plantarumの発酵様相の変化だけによるものではなく、発酵の経過に伴いWCS内の環境が変化した結果、元々「たちすずか」に付着していたL. buchneriの活動が活発になった可能性が示唆された。しかし、この仮説においては、無添加区でこのような変化は認められておらず、なぜホモ型区においてだけこのような変化が生じたのかは不明である。

(4)

表1. 乳酸菌添加と開封時期の違いによるWCSの発酵品質

	春開封 (調製後7~8ヶ月)			秋冬開封 (調製後14~18ヶ月)		
	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区
n	3	2	2	5	5	4
pH	4.61	4.17	4.14	4.29	4.24	4.34
フルクトース (%FM)	0.29	0.34	0.20	0.37 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>
グルコース (%FM)	0.21	0.14	0.02	0.41 <sup>a</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>
スクロース (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
乳酸 (%FM)	0.65	1.01	0.68	1.06 <sup>a</sup>	0.70 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>b</sup>
酢酸 (%FM)	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.63 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	1.02 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>
プロピオン酸 (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
酪酸 (%FM)	0.09	0.04	0.10	0.08	0.06	0.08
エタノール (%FM)	1.77	1.65	2.10	2.14	1.92	1.95
1,2-プロパンジオール (%FM)	0.00	0.03	0.10	0.00 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>
アンモニア態窒素 (g/kgFM)	0.15	0.10	0.13	0.18	0.19	0.19

注. ab: 異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ ), %FM: 新鮮物あたり%, nd: no detect(ed)

### 3 好気的変敗の発生 (表2)

開封後7日目におけるWCSの品質は、無添加区では春開封・秋冬開封のいずれにおいても糖類・乳酸・酢酸含量が著しく低下し、pHの上昇や多量の二酸化炭素生成が確認された。さらに外見的に酵母の発生や変敗臭も確認され、好気的変敗の発生を認めた。一方ヘテロ型区では、乳酸含量の低下はあったもののpH変化や二酸化炭素発生量は小さく、好気的変敗が抑制されていた。開封時期によって発酵品質が大きく変わっていたホモ型区は、ヘテロ型区と同様な発酵品質であった秋冬開封において糖類・乳酸・酢酸含量やpHの変化はほとんど認められず、二酸化炭素発生量も少なく好気的変敗は抑制されていた。一方、春開封のホモ型区では2ロール中1ロールで好気的変敗が発生した。好気的変敗はサイレージが空気にさらされ、酵母が活動し始めて乳酸や糖類を代謝することでその進行が始まることから、好気的変敗を抑制するためには酵母の働きを抑えることが重要になる。L. buchneriが生成する酢酸は酵母やカビといった真菌類に対して抗菌作用を有する<sup>7)</sup>。今回の試験において、好気的変敗の抑制効果が春開封、秋冬開封ともに顕著であったヘテロ型区は

L. buchneriにより酢酸の生成量が多くなり、このことが好気的変敗の抑制に有効であったと考えられる。酢酸と同時に生成される1,2-プロパンジオールについては酢酸を上回る抗菌作用を有するプロピオン酸に分解される場合があるが、今回の試験ではプロピオン酸の生成は確認されなかった。一方L. plantarumなどのホモ発酵型乳酸菌は好気的変敗の抑制に対してほとんど効果がないことが報告されている<sup>3)</sup>。これはその発酵産物の主体である乳酸に真菌類に対する抗菌作用がほとんどないこと<sup>7)</sup>が要因として挙げられる。今回の試験でもホモ型区の春開封では、乳酸生成割合が高く、酢酸生成割合が低いL. plantarumに特徴的な発酵品質であり、好気的変敗の発生を十分に抑制することはできなかった。ところが秋冬開封のものはヘテロ型区と同様な発酵品質となり、酢酸の生成量が春開封のものに比べて大きく増加しており、このことが好気的変敗の抑制に有効であったと考えられた。ただ蔡ら(2003)<sup>2)</sup>の報告では「畜草1号」を添加して調製した飼料イネWCSの発酵様相は貯蔵期間が60日と370日のもので変化しておらず、この発酵様相の変化が必ずしも生じるとは言えず、L. plantarumが好気的変敗に有効であるとは一概には言えないであろう。

表 2. 好気的変敗試験における乳酸菌添加と開封時期の違いによるWCS開封後7日目の発酵品質

	春開封 (調製後7~8ヶ月)			秋冬開封 (調製後14~18ヶ月)		
	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区
n	3	2	2	5	5	4
pH	5.49	4.44	4.41	6.27 <sup>a</sup>	4.16 <sup>b</sup>	4.24 <sup>b</sup>
フルクトース (%FM)	nd	0.13	0.14	nd <sup>a</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>
グルコース (%FM)	0.02	0.04	0.02	0.00	0.01	0.01
スクロース (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
乳酸 (%FM)	0.53	1.01	0.38	0.22	0.63	0.29
酢酸 (%FM)	0.17	0.14	0.83	0.05	1.29	1.69
プロピオン酸 (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
酪酸 (%FM)	0.07	0.05	0.08	0.07	0.05	0.05
エタノール (%FM)	0.57	1.23	1.21	0.00 <sup>a</sup>	1.18 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>
1,2-プロパンジオール (%FM)	0.00 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>
アンモニア態窒素 (g/kgFM)	0.09	0.07	0.10	0.03 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>
二酸化炭素発生量 (g/kgDM)	28.61	17.12	10.31	69.32 <sup>a</sup>	10.49 <sup>b</sup>	7.99 <sup>b</sup>

注. ab: 異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ ), %FM: 新鮮物あたり%, nd: no detect(ed)

#### 4 乳酸菌製剤の活用

飼料イネは、茎が中空状で WCS 調製時に空気が残存しやすく、他の飼料作物に比べて糖含量や付着乳酸菌数が少ないことから乳酸発酵が進みにくく品質の悪い WCS になりやすいことが知られている<sup>12)</sup>。これは、嫌気状態の確保や酸生成による pH の低下が進まず、WCS の劣化に関わる酪酸菌などの微生物を十分抑制することができないためとされている。こうしたことからイネ WCS の乳酸生成促進を目的とした飼料イネ専用の乳酸菌製剤「畜草 1 号」が開発・製品化され、その品質改善効果も明らかにされている<sup>2)</sup>。今回の試験においても、「畜草 1 号」を添加したホモ型区では乳酸生成量が増加しており、乳酸優勢の発酵品質であった。このように乳酸発酵を促進させることが WCS の品質を向上させるうえで重要であることは間違いないことであるが、逆に酵母などの真菌類をほとんど抑制できない乳酸が優勢の発酵品質となることは好気的変敗の起こるリスクを高めることにもつながる。好気的変敗の生じた WCS は栄養価の損失やカビ毒の生成が懸念されるため、牛への給与は避けるべきであり、結果として WCS の廃棄やその代替飼料の使用による飼料費の増大につながる。本試験の「たちすずか」WCS においても無添加区やホモ型区の一部で好気的変敗の発生が確認されており、小規模農家でのロール開封後の長期間利用、開封後に空気に暴露されやすいバンカーサイロ調製などの利用に対しては好気的変敗に対する方策を講じ

る必要性が示された。L. buchneri の好気的変敗に対する抑制効果はトウモロコシサイレージなどでは明らかとされていた<sup>4), 10)</sup>が、本試験の結果から「たちすずか」WCS の好気的変敗に対しても有効であることが明らかとなった。こうしたことから「たちすずか」WCS の調製においては、開封後直ちに使い切ることができるのであれば乳酸菌を使用しないか、あるいはホモ発酵型乳酸菌を使用して発酵品質を高める方向とし、逆に開封後すぐに使い切ることができない場合にはヘテロ発酵型乳酸菌を使用して好気的変敗を抑制するといった使い分けが必要と考えられる。

#### IV 摘要

高糖分飼料イネ「たちすずか」の WCS への乳酸菌添加において、ホモ発酵型乳酸菌では乳酸生成量が、ヘテロ発酵型乳酸菌では酢酸生成量が増加した。ただ、ホモ発酵型乳酸菌を添加して 1 年以上貯蔵していたものではヘテロ発酵型と同様な発酵品質となっており、長期貯蔵で発酵様相がヘテロ発酵型になったと考えられた。好気的変敗はヘテロ発酵型乳酸菌を添加することで、開封時期に関わらず抑制することが可能であった。「たちすずか」WCS に対する乳酸菌の利用は、WCS の調製や開封後の利用条件を考慮したうえで添加の有無やその種類を検討する必要がある。

(6)

### 参考文献

- 1) Ashbell G., Weinberg Z. G., Azrieli A., Hen Y. and Horev B. : A simple system to study the aerobic determination of silages. *Can. Agric. Eng.*, 33 : 391-393P, 1991
- 2) 蔡義民, 藤田泰仁, 村井勝, 小川増弘, 吉田宣夫, 北村亨, 三浦俊治 : 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* 畜草1号) の利用, 日草誌 49, 477-485P, 2003
- 3) Danner H., Holzer M., Mayrhuber E. and Braun R. : Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 562-567P, 2003
- 4) Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H. and Spoelstra S. F. : Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.*, 87 : 583-594P, 1999
- 5) 河野幸雄, 福馬敬紘, 城田圭子, 神田則昭, 新出昭吾 : 飼料イネロールベールラップサイロ内ガス組成の推移, 関西畜産学会第63回大会講演要旨集 : 10P, 2013
- 6) 松下景, 飯田修一, 出田収, 春原嘉弘, 前田英郎, 田村泰章 : 茎葉多収で消化性に優れた高糖分含量の飼料用水稲品種「たちすずか」の育成, 近中四農研報 11, 1-13P, 2012
- 7) 西野直樹 : サイレージ発酵の原理 (安宅一夫監修 : 最新サイレージバイブルサイレージとTMRの調製と給与-), 21-22P, 酪農学園大学エクステンションセンター, 北海道, 2012
- 8) Nishino N., Hattori H. and Kishida Y. : Alcoholic fermentation and its prevention by *Lactobacillus buchneri* in whole crop rice silage. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44 : 538-543P, 2007
- 9) Nishino N. and Shinde S. : Ethanol and 2,3-butanediol production in whole-crop rice silage. *Grassl. Sci.*, 53 : 196-198P, 2007
- 10) Nishino N., Yoshida M., Shiota H. and Sakaguchi E. : Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.*, 94 : 800-807P, 2003
- 11) Oude Elferink S. J. W. H., Krooneman J., Gottschal J. C., Spoelstra S. F., Faber F. and Driehuis F. : Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 : 125-132P, 2001
- 12) 社団法人日本草地畜産種子協会 : 稲発酵粗飼料生産・給与技術マニュアル平成23年度版, 58P, 社団法人日本草地畜産種子協会, 東京, 2012
- 13) 内田仙二, 大島光昭監修 : サイレージの生化学第2版, 118-119P, デーリィ・ジャパン社, 東京, 1995