

繊維分解酵素と蛋白質分解酵素を混合した酵素製剤が リードカナリーグラス発酵TMRの化学組成と発酵品質に及ぼす影響

田川伸一^{1,*}・堀口健一²・吉田宣夫³・高橋敏能²

¹ 清水港飼料株式会社石巻工場, 宮城県石巻市三河町 11 番地 〒 986-0846

² 山形大学農学部食料生命環境学科, 山形県鶴岡市若葉町 1-23 〒 997-8555

³ 日本草地畜産種子協会, 東京都千代田区神田紺屋町 8 番地 NCO 神田紺屋町ビル 4F 〒 101-0035

2018 年 10 月 31 日受付, 2019 年 12 月 20 日受理

要 約

繊維分解酵素 (CL) と蛋白質分解酵素 (PA) を混合した酵素製剤 (ENZ) の添加が, リードカナリーグラス (RCG) 発酵混合飼料 (TMR) の化学組成および発酵品質に及ぼす影響について検討した。RCG 発酵 TMR の材料の混合割合は, RCG を 65% と 45% の 2 段階に設定し (RCG65% 区と RCG45% 区), 飼料の構成割合を両区共にビートパルプペレットを 5%, そして, トウモロコシジスチラーズグレインソリュブルとトウモロコシを RCG65% 区はそれぞれ 23% と 7%, RCG45% 区はそれぞれ 23% と 27% とした。すべての区に炭酸カルシウムを 0.6% 添加した。試験区は, 酵素無添加区, CL2,000 IU/g と PA10,000 IU/g を含む繊維分解酵素主体の ENZ1 を 0.2% 添加した区 (ENZ1 区) と, CL500 IU/g, PA62,500 IU/g を含む蛋白質分解酵素主体の ENZ2 を 0.02% 添加した区 (ENZ2 区) を設けた。発酵 TMR はパウチ法により 3 反復で調製して 8 ヶ月間保管した。RCG65% 区と RCG45% 区の aNDFom と ADFom 含量は, ENZ の添加により有意に減少した ($P < 0.01$)。乳酸含量は, RCG65% 区の ENZ1 区が調製した RCG 発酵 TMR の中で最も高く, 9.2% だった。一方, 発酵品質を示すフリーク評点では RCG の割合と ENZ の間に交互作用が認められ, RCG65% 区で ENZ 添加区 (ENZ1 区 97, ENZ2 区 96) が無添加区 (80) よりも有意に高くなったのに対し, RCG45% 区には差は認められなかった。以上の結果から, RCG 発酵 TMR への ENZ の添加は, aNDFom と ADFom 含量を低下させるとともに, 高水分は RCG 発酵 TMR の発酵品質を改善することが明らかとなった。また, ENZ の特性では, 繊維分解酵素主体 ENZ, 蛋白質分解酵素主体 ENZ とともに発酵品質改善効果が認められた。

キーワード: 化学組成, 酵素活性, 発酵品質, 発酵混合飼料, リードカナリーグラス

東北畜産学会報 69(3): 49 ~ 55 2020

緒 言

サイレージ添加物としての繊維分解酵素は, 発酵糖の含量を増加させる手段, そして有機物の消化率を改善す

る方法として考えられた (McDonald ら, 1995)。これまで, 繊維分解酵素であるセルラーゼの添加がアルファルファサイレージ (友田ら, 1996), ギニアグラスサイレージとネピアグラスサイレージ (Khota ら, 2018), また, リードカナリーグラス (Reed canary grass, *Phalaris arundinacea* L.; RCG) サイレージ (田川ら, 2001) の発酵品質の改善に効果があることが報告された。そして, Addah ら (2016) は, 大麦サイレージの発酵品質がアマミラーゼ, アミログルコシダーゼ, セルラーゼおよびヘ

* 連絡者: 田川 伸一 (たがわ しんいち)
(清水港飼料株式会社石巻工場)
〒 986-0846 宮城県石巻市三河町 11 番地
Tel: 0225-22-9264 Fax: 0225-93-9159
E-mail: s-tagawa@shimizuko-shiryo.co.jp

ミセルラーゼを含む酵素製剤と乳酸菌の混合物により改善することを報告した。

Rode ら (1999) は繊維分解酵素の添加によって、主にトウモロコシサイレージ、アルファルファ乾草および大麦穀実から成る混合飼料 (Total mixed ration, TMR) の消化性が改善することを報告した。このことから、RCG を供した発酵 TMR についても繊維分解酵素の添加によって消化性が改善される可能性が考えられる。また、大麦ではデンプンの消化率の低下は、デンプンの結晶化よりもむしろ蛋白質によるものであることが指摘されている (McAllister ら, 1990)。穀類を含む TMR の場合には、繊維分解酵素だけの添加より繊維分解酵素と同時に蛋白質分解酵素を添加した方が消化性を改善する効果が期待される。このことから、現在では、繊維分解酵素と蛋白質分解酵素を混合した酵素製剤 (ENZ) が販売されている。

飼料への酵素添加は、給与時に添加する場合とサイレージ調製時に添加する場合に分けられる。発酵 TMR 調製時に添加する場合には、その発酵品質に及ぼす ENZ の影響を検討する必要がある。そこで、田川ら (2011) は、ENZ が RCG 発酵 TMR の化学組成と発酵品質に及ぼす影響を検討し、その添加効果を報告した。市販されている酵素製剤はルーメン内での消化性に及ぼす効果に差があることから酵素の使用前にその活性を調べる必要がある (Colombatto と Beauchemin, 2003) といわれている。ゆえに、市販されている酵素製剤によって、その効果に差がみられることが考えられる。

そして、蛋白質分解酵素による分解速度は蛋白質の種類によって異なることが知られている (McDonald ら, 1995)。このことから、材料の混合割合が異なると ENZ が発酵品質の改善効果に及ぼす影響が異なることが考え

られる。したがって、本試験では、繊維分解酵素と蛋白質分解酵素の混合割合の異なる ENZ が RCG 発酵 TMR の化学組成と発酵品質に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1. RCG 発酵 TMR の調製

2009 年 5 月 22 日に山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センター (鶴岡市) 産の RCG の 1 番草 (平均草丈約 117 cm, 出穂期) を刈取り、即日約 2 cm に細切したものを用いた。RCG 発酵 TMR は、粗蛋白質 (Crude protein, CP) 含量を 15.4 から 16.7%, aNDFom 含量は 45.0 から 56.5%, そして可消化養分総量 (Total digestible nutrients; TDN) は 72.0 から 67.5% となるよう設定した (表 1)。すなわち、試験区は、田川ら (2011) と同じ圃場で、別の年に収穫された RCG を材料として供し、田川ら (2011) と同様に、RCG の割合を 65% と 45% の 2 段階に設定し (RCG65% 区と RCG45% 区)、両区共にビートパルプペレットを 5.0%, トウモロコシジスチラーズグレインソリュブル (Corn distiller's dried grains with solubles, DDGS) とトウモロコシを RCG45% 区ではそれぞれ 23.0% と 27.0%, RCG65% 区では 23.0% と 7.0% とした。なお、トウモロコシは粉碎して、ビートパルプペレットは粉碎しないで用いた。

本試験ではこれらの材料に、日本飼養標準乳牛 2006 年版 (農業・食品産業技術総合研究機構, 2007) のカルシウム要求量の値に適するように、炭酸カルシウムを 0.6% 添加した。ENZ の添加は、RCG65% 区、45% 区それぞれに、酵素を添加しない酵素無添加区、ENZ1 (プロセアーゼ, 明治製菓株式会社, 東京) を製品の指示通り現物あたり 0.2% 添加する ENZ1 区、ENZ 1 区とは別

表 1. リードカナリーグラス発酵 TMR の材料の混合割合, 添加物の添加割合, および化学組成と栄養価の計算値

リードカナリーグラスの割合 酵素の添加	65%			45%		
	酵素無添加	ENZ1	ENZ2	酵素無添加	ENZ1	ENZ2
配合割合 (現物中%)						
リードカナリーグラス	65.0	65.0	65.0	45.0	45.0	45.0
DDGS	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
ビートパルプペレット	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
トウモロコシ	7.0	7.0	7.0	27.0	27.0	27.0
添加物の添加割合 (現物中%)						
ENZ1		0.2			0.2	
ENZ2			0.02			0.02
炭酸カルシウム	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
化学成分・栄養価計算値 (乾物中%)						
CP	16.7	16.7	16.7	15.4	15.4	15.4
aNDFom	56.5	56.5	56.5	45.0	45.0	45.0
TDN	67.5	67.5	67.5	72.0	72.0	72.0

TMR: 混合飼料; DDGS: トウモロコシジスチラーズグレインソリュブル; CP: 粗蛋白質; aNDFom: 耐熱性 α -アミラーゼ処理中性デタージェント繊維; TDN: 可消化養分総量。

の ENZ2 (試作酵素製剤, 明治製菓株式会社, 東京) を製品の指示通り現物あたり 0.02% 添加する ENZ2 区の 3 処理とした。ENZ1 と 2 の酵素活性は, ENZ1 は繊維分解酵素 (セルラーゼ) 2,000 IU/g と蛋白質分解酵素 (酸性プロテアーゼ) 10,000 IU/g, ENZ2 は繊維分解酵素 500 IU/g, 蛋白質分解酵素 62,500 IU/g 含まれ, ENZ1 は繊維分解酵素主体であり, ENZ2 は蛋白質分解酵素主体の ENZ である。RCG 発酵 TMR に含まれる酵素活性は, 材料 400 g あたり, ENZ1 区は繊維分解酵素 1,600 IU と蛋白質分解酵素 8,000 IU, ENZ2 区は繊維分解酵素 40 IU と蛋白質分解酵素 5,000 IU と計算された。

RCG 発酵 TMR の調製は, パウチ法 (田中と大桃, 1995) により行った。すなわち, 試験区ごとに材料 400 g を量り, 添加物 (炭酸カルシウムと酵素) を量り, 添加してよく混合し, プラスチックフィルムバック (飛龍 N-9, 旭化成パックス株式会社, 東京) に詰込み, 真空包装機 (SQ303, シャープ株式会社, 東京) を用いて十分に脱気を行い密封して, 室温で 8 カ月間貯蔵した。反復は 3 回行った。

2. 化学分析

材料は, 水分, CP, 粗脂肪, 粗灰分, 耐熱性 α -アミラーゼ処理中性デタージェント繊維 (Neutral detergent fiber, aNDFom), 酸性デタージェント繊維 (Acid detergent fiber, ADFom), 酸性デタージェントリグニン (Acid detergent lignin, ADL), カルシウム, リン, マグネシウム, カリウムを分析した。なお, aNDFom および ADFom は, 飼料分析基準 (農林水産消費安全技術センター, 2008) に準じて行った。分析した結果より, 非繊維性炭水化物 (Non-fibrous carbohydrate, NFC) を計算した。また, 調製した RCG 発酵 TMR は, 前項に加え, デンプン, pH, 乳酸, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, および揮発性塩基窒素 (Volatile basic nitrogen, VBN) を分析し, 分析結果から全窒素 (Total nitrogen, TN) 中の VBN の割合 (VBN/TN), V スコアおよびフリーク評点を計算した。これらは粗飼料の品質評価ガイドブック (自給飼料利用研究会, 2009) に準じて行った。分析は十勝農業協同組合連合会農産化学研究所 (帯広市) へ依頼して行った。

3. 統計処理

分析結果は, RCG65% 区および 45% 区の RCG の混合割合の効果, また, 酵素無添加区, ENZ1 区および ENZ2 区の酵素の添加効果, および, それらの相互効果について, SAS University Edition の GLM プロシジヤを使って 2 元配置の分散分析を行い, P 値を求めた (SAS, 1995)。

結果および考察

1. 材料の化学組成

材料の化学組成を表 2 に示した。RCG の水分含量は 85.6% で, ビートパルプペレット, トウモロコシ, および DDGS の水分含量より高かった。CP 含量は, 乾物中 17.2% で, 日本標準飼料成分表 (農業・食品産業技術研究機構, 2010) の 14.3% や Tosi と Wittenberg (1993) の 10.8 から 12.2%, 田川ら (2011) の 14.8% より高かったが, Duynisveld と Wittenberg (1993) の 18.8 から 20.3% より低かった。RCG の aNDFom 含量は 69.5% で, Chernry ら (1993) の出穂期の RCG の aNDFom 含量の 68.1% と田川ら (2011) の 59.5% より高かった。ADFom 含量は 35.6% で, Chernry ら (1993) の出穂期の RCG の ADFom 含量の 40.5% より低かったが, 田川ら (2011) の 30.5% より高かった。本試験結果と, 本試験と同じ圃場で, また, 本試験とは別の年に採取した RCG を用いて発酵 TMR を調製した田川ら (2011) の違いは, 田川ら (2011) の RCG は草丈 90 cm 出穂前であったのに対し, 本試験の RCG は草丈 117 cm 出穂期であったためと考えられた。ビートパルプペレットの CP 含量は 10.4% で, 日本標準飼料成分表 (農業・食品産業技術研究機構, 2010) の 9.6% より高かった。トウモロコシは, 日本標準飼料成分表 2009 年版 (農業・食品産業技術研究機構, 2010) の水分含量 14.5%, CP 含量 8.8%, 粗脂肪含量 4.4%, および NFC 含量 83.4% より, 水分含量は 16.2% で高かったが, CP 含量, 粗脂肪含量および NFC 含量は, それぞれ 8.2%, 3.1% および 77.8% で低かった。DDGS の CP 含量は 27.2% で, 日本

表 2. リードカナリーグラス発酵 TMR の調製に供した原料の化学組成

		リード カナリー グラス	ビート パルプ ペレット	トウモ ロコシ	DDGS
水分	現物中%	85.6	15.4	16.2	17.3
CP	乾物中%	17.2	10.4	8.2	27.2
粗脂肪	乾物中%	3.0	0.7	3.1	13.1
粗灰分	乾物中%	10.6	4.3	1.4	4.4
aNDFom	乾物中%	69.5	55.5	10.8	52.0
ADFom	乾物中%	35.6	29.1	3.1	22.5
ADL	乾物中%	2.8	3.1	0.2	0.7
カルシウム	乾物中%	0.42	0.79	0.26	0.26
リン	乾物中%	0.48	0.09	0.29	0.86
マグネシウム	乾物中%	0.19	0.30	0.12	0.35
カリウム	乾物中%	3.62	0.30	0.38	0.92

TMR: 混合飼料; DDGS: トウモロコシジスチラーズグレイ
ンソリュブル; CP: 粗蛋白質; aNDFom: 耐熱性 α -アミラー
ゼ処理中性デタージェント繊維; ADFom: 酸性デタージェン
ト繊維; ADL: 酸性デタージェントリグニン。

標準飼料成分表（農業・食品産業技術研究機構，2010）の28.9%より低かった。

2. RCG 発酵 TMR の化学組成

RCG 発酵 TMR の化学組成を表3に示した。RCG65% 区の CP 含量の23.0 から23.5%は、45% 区の18.5 から19.7%より有意に高かった（ $P < 0.01$ ）。また、RCG65% 区および45% 区共に、計画した CP 含量のそれぞれ16.7%、15.4%より高かった。これは RCG の CP 含量が日本標準飼料成分表2009年版（農業・食品産業技術研究機構，2010）の14.3%より高かったためと考えられた。ENZ1 区およびENZ2 区の蛋白質分解酵素の酵素活性は、それぞれ8,000IU と5,000IU だった。しかし、CP 含量にENZ の添加効果は見られなかった。これは、CP の定量にあたり、窒素を定量したため CP 含量は変わらなかったかもしれない。蛋白質分解酵素の添加によって、溶解性蛋白質、結合蛋白質、分解性蛋白質等の蛋白質画分の割合には差が出ていたことが予想される。今後、ENZ の添加が飼料中の蛋白質画分の割合に及ぼす影響について検討する必要がある。また、蛋白質画分の割合は消化性に影響する可能性が考えられるため、RCG 発酵 TMR の消化性に及ぼすENZ の影響についても検討する必要がある。

aNDFom, ADFom, ADL, カルシウム, リン, マグネシウムおよびカリウムのそれぞれの含量は、RCG 45% 区より65% 区が高く、これらは原料の化学組成に起因するものと考えられた。RCG65% 区と45% 区の aNDFom 含量は、酵素無添加区のそれぞれ44.6% と31.9%、ENZ2 区はそれぞれ38.2% と28.0%、ENZ1 区はそれぞれ34.9% と24.6% の順であった。そして、RCG65% 区と45% 区の ADFom 含量は、酵素無添加区、

ENZ2 区、ENZ1 区の順であった。これらの結果は、繊維分解酵素の酵素活性がENZ2 区の40IU よりENZ1 区の1,600IU が大きかったことから、ENZ に含まれる繊維分解酵素の酵素活性の差を示していると考えられた。ENZ の添加によって、aNDFom 含量はRCG65% 区では酵素無添加区に対し、ENZ1 区で77% まで、そしてENZ2 区では86% まで減少し、RCG45% 区でも酵素無添加区に対し、ENZ1 区で77% まで、ENZ2 区では88% まで減少した。また、aNDFom 含量とADFom 含量の差をヘミセルロース含量として計算すると、RCG65% 区と45% 区では酵素無添加区でそれぞれ21.1% と14.5% であったのに対し、ENZ1 区でそれぞれ17.3% と12.0%、また、ENZ2 区でそれぞれ18.1% と12.7% であった。すなわち、ENZ の添加によって aNDFom 中の易消化性区分が減ることにより飼料としてはマイナスなることが憂慮された。今後、RCG 発酵 TMR の消化性に及ぼすENZ の効果について検討する必要がある。

NFC 含量は、RCG65% 区の19.3 から25.1% よりRCG45% 区の41.5 から45.3% は有意に高かった。これは、NFC を77.8% 含むトウモロコシがRCG45% 区に多かったためと考えられた。NFC 含量もENZ の添加効果が認められた（ $P < 0.05$ ）。これは、ENZ によって RCG 発酵 TMR が分解されたため相対的に増加したものと考えられた。NFC 含量の増加割合は、RCG65% 区では酵素無添加区に対しENZ1 区で130%、ENZ2 区で119%、RCG45% 区では、RCG45% 区では酵素無添加区に対しENZ1 区で109%、ENZ2 区で101% だった。すなわち、RCG65% 区と45% 区が同じ様にENZ の効果によって aNDFom 含量が少なくなったにもかかわらず、NFC 含量はRCG45% 区では65% 区ほど増えなかった。したがって、材料の混合割合によりENZ の添加効果に差が認

表3. リードカナリーグラス発酵 TMR の化学組成

		RCG65%			RCG45%			SEM	P 値		
		酵素無添加	ENZ1	ENZ2	酵素無添加	ENZ1	ENZ2		M	E	M×E
CP	乾物中%	23.0	23.5	23.5	18.5	19.7	18.5	0.58	<0.01	0.20	0.54
NFC	乾物中%	19.3	25.1	23.1	41.5	45.3	42.1	2.58	<0.01	0.02	0.53
粗脂肪	乾物中%	11.9	12.8	12.7	8.3	10.1	10.7	0.43	<0.01	0.02	0.33
粗灰分	乾物中%	6.7	6.8	6.9	4.8	4.8	4.9	0.24	<0.01	0.40	0.43
aNDFom	乾物中%	44.6	34.9	38.2	31.9	24.6	28.0	1.65	<0.01	<0.01	0.52
ADFom	乾物中%	23.5	17.6	20.1	17.4	12.6	15.3	0.84	<0.01	<0.01	0.11
ADL	乾物中%	1.8	2.1	1.5	1.0	1.3	1.2	0.11	<0.01	0.05	0.18
カルシウム	乾物中%	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.03	<0.01	0.93	0.63
リン	乾物中%	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.01	<0.01	0.07	0.50
マグネシウム	乾物中%	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.01	<0.01	0.05	0.64
カリウム	乾物中%	1.6	1.7	1.6	1.2	1.2	1.1	0.06	<0.01	0.40	0.29
デンプン	乾物中%	8.9	9.7	8.9	29.2	27.1	28.1	2.34	<0.01	0.85	0.52

TMR：混合飼料；RCG：リードカナリーグラス；SEM：標準誤差（n=3）；P：確率，M：RCG の割合；E：酵素，M×E：RCG の割合と酵素の相互作用；CP：粗蛋白質；NFC：非繊維性炭水化物；aNDFom：耐熱性 α -アミラーゼ処理中性デタージェント繊維；ADFom：酸性デタージェント繊維；ADL：酸性デタージェントリグニン。

められることが明らかとなった。

3. RCG 発酵 TMR の発酵品質に及ぼす酵素の影響

表 4 に RCG 発酵 TMR の発酵品質を示した。水分含量は、RCG45% 区の 44.4 から 45.6% より、RCG65% 区の 59.3 から 60.4% は高かった ($P < 0.01$)。一般的な TMR の水分含量は 50% 程度といわれる (塩谷ら, 2007) ことから、RCG65% 区の水分含量はやや多いと考えられた。水分含量は、田川ら (2011) の RCG45% 区は平均 47.1%, RCG65% 区は 60.4% であったことから、田川ら (2011) と同程度と考えられた。RCG65% 区の pH は、酵素無添加の 4.3, ENZ2 区の 4.0, ENZ1 区の 3.9 の順で、これらの平均値の差の検定では、酵素無添加区より ENZ1 区と ENZ2 区は有意に低く、ENZ1 区は ENZ2 区より低い傾向がみられた。一方、RCG45% 区の pH は 4.1 から 4.2 で、酵素無添加区, ENZ1 区, および ENZ2 区に差はみられず、RCG の割合と ENZ に相互作用が認められた ($P < 0.05$)。田川ら (2011) の RCG45% 区は酵素無添加区で 4.6, ENZ1 区で 4.3 であり本試験の結果の方が低かった。RCG65% 区の乳酸含量は、酵素無添加区の 6.2% (乾物中), ENZ2 区の 6.9%, ENZ1 区の 9.2% の順に高かった。これらの平均値の差の検定では、乳酸含量は酵素無添加区より ENZ1 区は有意に高くなった ($P < 0.05$)。この理由として、RCG 65% 区では ENZ1 区は ENZ2 区より繊維分解酵素の酵素活性が高かったため、aNDFom と ADFom が分解され乳酸菌に資化され、乳酸が多く産生され、その結果、pH は 3.9 まで低くなり、乳酸含量は 9.2% まで生成されたと考えられた。しかし、RCG45% 区の乳酸含量は、4.4 から 4.9% でほぼ同じだった。予乾された材料を用いたサイレージでは、水分含量が低いために発酵が抑えられ乳酸含量は低くなるが、同時に酪酸菌の活性を低下させるためサイレージの発酵品質が向上するといわれている (McDonald ら, 1995)。本研究において RCG45% 区では 65% 区よりも乳酸含量が低く、pH は高いにもか

かわらず、V スコアおよびフリーク評点が良好な発酵品質を示したのも、RCG45% 区の水分含量 (44.4 から 45.6%) が RCG65% 区 (59.3 から 60.4%) よりも低いためと考えられた。

酢酸含量は、RCG65% 区の 2.0 から 2.4% より、45% 区の 1.1 から 1.2% は低かった。このことから、RCG 45% 区より 65% 区の発酵が盛んだったことが示された。酪酸含量は、RCG65% 区の酵素無添加区と ENZ2 区で 0.1% みられたが、RCG45% 区ではいずれの区も検出されなかった。田川ら (2011) では RCG45% 区では酵素無添加区で 0.09%, ENZ1 区は 0.04% 認められており、今回の試験結果と異なるものであった。

VBN/TN の割合は、ENZ の添加効果は認められず、P 値が 1.00 だった。これは、RCG65% 区と 45% 区それぞれの酵素無添加区, ENZ1 区および ENZ2 区の平均値が 4.98% で全く同じ値だったためだった。VBN/TN 割合は、田川ら (2011) の RCG65% 区は酵素無添加区および ENZ1 区ともに 2.8%, RCG45% 区は酵素無添加区で 2.0% および ENZ1 区で 2.2% であった。本試験の RCG 発酵 TMR は酪酸が RCG65% 区の酵素無添加区と ENZ2 区を除いて見られなかったにもかかわらず、VBN/TN 割合は田川ら (2011) より高かった。この原因は、原料にした RCG 中の CP 含量が 17.2% で田川ら (2011) の CP 含量の 14.2% より高かったことから、原料由来であると考えられるが本試験結果からは明らかにできなかった。

これらの結果から計算された V スコアは、RCG65% 区の平均 91 は 45% 区の平均 96 より有意に低く ($P < 0.01$)、ENZ の添加効果は認められなかった。そして、フリーク評点は、RCG65% 区は 45% 区より有意に低かった ($P < 0.05$) が、ENZ の添加によって有意に高く ($P < 0.05$)、RCG の割合と ENZ の相互作用が認められた ($P < 0.05$)。

RCG 発酵 TMR の発酵品質 (V スコアとフリーク評点) と NFC 含量は、RCG65% 区では ENZ の添加によって高くなり、酢酸含量は ENZ の添加によって低くな

表 4. リードカナリーグラス発酵 TMR の発酵品質

		RCG65%			RCG45%			SEM	P 値		
		酵素無添加	ENZ1	ENZ2	酵素無添加	ENZ1	ENZ2		M	E	M×E
水分	現物中%	59.5	60.4	59.3	45.6	44.4	45.3	1.81	<0.01	0.96	0.49
pH		4.3	3.9	4.0	4.2	4.2	4.1	0.03	0.02	<0.01	0.01
乳酸	乾物中%	6.2	9.2	6.9	4.5	4.4	4.9	0.45	<0.01	0.05	0.02
酢酸	乾物中%	2.2	2.4	2.0	1.1	1.1	1.2	0.14	<0.01	0.67	0.20
酪酸	乾物中%	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.01	<0.01	0.02	0.02
VBN/TN		5.7	6.1	5.7	4.3	3.9	4.2	0.25	<0.01	1.00	0.58
V スコア		89	92	92	96	96	96	0.74	<0.01	0.21	0.19
フリーク評点		80	97	96	98	98	98	1.98	0.03	0.04	0.04

TMR: 混合飼料; RCG: リードカナリーグラス; SEM: 標準誤差 (n=3); P: 確率, M: RCG の割合; E: 酵素; M×E: RCG の割合と酵素の相互作用; VBN/TN: 全窒素中のアンモニア態窒素含有率 (%)。

った。しかし、RCG45%区では65%区ほどは変化がみられず、発酵品質と乳酸含量および酪酸含量には、RCGの割合とENZの相互作用が認められた($P < 0.05$)。一方、RCG発酵TMRのaNDFomとADFom含量はENZの添加によってRCG45%区と65%区では同じように減少した。このことから、ENZの添加は、RCG発酵TMRのaNDFomとADFom含量を減少させるものの、発酵品質の改善効果ではRCGの混合割合の影響を受け、RCG65%区で発酵品質改善効果があるが、45%区では改善効果は認められないことが明らかとなった。

以上のことから、RCG発酵TMRへのENZの添加は、繊維成分の減少をもたらすとともに、RCGの水分含量によって発酵品質の改善効果を示し、低品質になりやすい高水分RCG発酵TMRでENZの発酵品質の改善が顕著であることが示された。加えて、ENZの種類では、繊維分解酵素主体のENZ(ENZ1)だけでなく、蛋白質分解酵素主体のENZ(ENZ2)でも、発酵品質改善効果があることが明らかとなった。

謝 辞

本試験を遂行するにあたり、酵素を提供いただいた明治製菓株式会社(現Meiji Seikaファルマ株式会社)に感謝申し上げます。

引用文献

Addah W, Baah J, McAllister TA. Effects of an exogenous enzyme-containing inoculant on fermentation characteristics of barley silage and on growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.*, 96: 1-10. 2016.

Cherney DJR, Siciliano-Jones J, Pell AN. Forage *in vitro* dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. *J. Anim. Sci.*, 71:1335-1338. 1993.

Colombatto D, Beauchemin KA. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.*, 83: 559-568. 2003.

Duynisveld GW, Wittenberg KM. Evaluation of Rival, Venture and Frontier reed canarygrass as pasture forage. *Can. J. Anim. Sci.*, 73: 89-100. 1993.

自給飼料利用研究会編. 三訂版 粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地畜産種子協会. 東京. 2009.

Khota W, Pholsen S, Higgs D, Cai Y. Comparative analysis of silage fermentation and *in vitro* digestibility of tropical grass prepared with *Acremonium* and *Trichoderma* species

producing cellulases. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 31: 1913-1922. 2018.

McAllister TA, Cheng K-J, Rode LM, Buchanan-Smith. Use of formaldehyde to regulate digestion of barley starch. *Can. J. Anim. Sci.*, 70: 581-589. 1990.

McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. 内田仙二, 大島光昭監修. サイレージの生化学第2版. デーリィ・ジャパン社. 東京. 1995.

農業・食品産業技術総合研究機構(編). 日本飼養標準乳牛2006年版. 中央畜産会. 東京. 2007.

農業・食品産業技術総合研究機構(編). 日本標準飼料成分表. 2009年版. 中央畜産会. 東京. 2010.

農林水産消費安全技術センター. 飼料分析基準(平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知). 2018. [http://www.famic.go.jp/ffis/feed/bunseki/bunsekikijun/01_01\(general\)-04\(inorganic\).pdf#page=5](http://www.famic.go.jp/ffis/feed/bunseki/bunsekikijun/01_01(general)-04(inorganic).pdf#page=5). [2018年10月20日参照]

Rode LM, Yang WZ, Beauchemin KA. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 82: 2121-2126. 1999.

SAS institute Japan. SAS/STAT ソフトウェアユーザーズガイド. SAS 出版局. 東京. 1995.

塩谷 繁, 細田謙次, 松山裕城. 発酵TMRの飼料特性と利用の展望. 栄養生理研究会報, 51: 1-5. 2007.

田川伸一, 岡島 毅, 伊東睦泰. 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.

田川伸一, 堀口健一, 吉田宣夫, 高橋敏能. リードカナリーグラス(*Phalaris arundinacea* L.)発酵TMRの発酵品質に及ぼすミカンジュース粕, トウフ粕, トウモロコシシスチラーズグレイソリュブルおよび酵素の利用の影響. 日草誌., 57: 7-12. 2011.

田中 治, 大桃定洋. プラスチックフィルムを用いた小規模サイレージ発酵試験法(パウチ法)の開発. 日草誌., 41: 55-59. 1995.

友田裕代, 大友定洋, 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.

Tosi HR, Wittenberg KM. Harvest alternatives to reduce the alkaloid content of reed canarygrass forage. *Can. J. Anim. Sci.*, 73: 373-380. 1993.

Effect of a mixture of cellulase and protease on the chemical composition and fermentation of reed canary grass total mixed ration

Shin-ichi TAGAWA¹, Ken-ichi HORIGUCHI², Norio YOSHIDA³, Toshiyoshi TAKAHASHI²

¹ Shimizuko Shiryo Co., Ltd., Ishinomaki 986-0846, Japan

² Department of Food, Life, and Environment Sciences, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan

³ Japan Grassland Agriculture and forage seed association, Chiyoda 101-0035, Japan

Corresponding: Shin-ichi TAGAWA

(Tel: 0225-22-9264, Fax: 0225-93-9159, E-mail: s-tagawa@shimizuko-shiryo.co.jp)

We studied the effects of the proportions of mixed materials and addition of cellulase and protease on the chemical composition and fermentation quality of reed canary grass (RCG; *Phalaris arundinacea* L.) fermented total mixed ration (TMR). The fermented TMR contained 65% (RCG65%) or 45% (RCG45%) RCG. Both RCG65% and RCG45% contained 5% beet pulp pellets and 0.6% calcium carbonate. In addition, RCG65% contained 23% corn distiller's dried grains with solubles (DDGS) and 7% corn flour, while RCG45% contained 23% DDGS and 27% corn flour. The enzyme mixtures were added in proportions of 0% (control), 0.2% (enzyme 1; 2,000 IU/g cellulase and 10,000 IU/g protease), or 0.02% (enzyme 2; 500 IU/g cellulase and 62,500 IU/g protease). RCG fermented TMR was prepared in triplicate using the pouch method and stored for 8 months at room temperature. The ash-free neutral detergent fiber organic matter (aNDFom) and ash-free acid detergent fiber (ADFom) contents of the TMR decreased with enzyme addition. The highest lactic acid content (9.2%) was observed in the TMR with enzyme 1 at RCG65%. Flieg's score of the TMR depended on the interaction of the materials ratio and enzyme mixture. Although Flieg's score for the TMR with added enzymes was higher than that without enzymes when prepared with RCG65%, the enzyme mixture had no effect on the Flieg's score of the TMR prepared with RCG45%. Therefore, the effect of the enzyme mixture on the fermentation quality was excellent, decreasing the aNDFom and ADFom contents of TMR with a high water content. With the enzyme mixtures, both cellulase and protease improved the fermentation quality of RCG fermented TMR.

Key words; Chemical composition, Enzyme activity, Fermentation quality, Fermented total mixed ration, Reed canary grass