

# 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

誌名	日本草地学会誌
ISSN	04475933
著者名	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
発行元	日本草地学会
巻/号	42巻2号
掲載ページ	p. 155-158
発行年月	1996年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 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

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\*\*

明治製菓(株)生物科学研究所 (350-02 埼玉県坂戸市千代田 5-3-1)

\* 農林水産省草地試験場 (329-27 栃木県西那須野町千本松 768)

\*\* 明治製菓(株)新素材事業部 (210 神奈川県川崎市幸区堀川町 580)

† 現在: 農林水産省畜産試験場 (305 茨城県稲敷郡茎崎町池の台 2)

Bio Science Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd., Chiyoda, Sakado-shi, Saitama, 350-02 Japan

\* National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochigi, 329-27 Japan

\*\* New Materials Division, Meiji Seika Kaisha, LTD., Horikawa-cho,

Saiwai-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 210 Japan

† Present address: National Institute of Animal Industry, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

受付日: 1995年9月6日/受理日: 1996年3月8日

### Synopsis

Yasuyo TOMODA, Sadahiro OHMOTO, Osamu TANAKA, Hiroko KITAMOTO, Toru HAMAYA, Toshiaki KONO and Yutaka TANNO (1996): Effect of Cellulase Preparation Originated from *Acremonium cellulolyticus* Y-94 on Alfalfa Silage Fermentation. *Grassland Science* 42, 155-158.

Alfalfa was harvested (4th cutting in 1991 and 1st to 4th cutting in 1993) and wilted overnight, then chopped into 2 cm lengths. The forage mixed with cellulases (0-1.0% of the forage) or glucose (1%), and lactic acid bacteria (0.001%) was tightly packed in 1 liter experimental silos or in nylon/polyethylene bagsilos. Both the silos were kept at 26°C for 30 and 14 days, respectively. Each ensiling had three replications. Treatment of alfalfa from the 4th cutting in 1991 with cellulase preparation originated from *Acremonium cellulolyticus* Y-94 (ACS2) at 0.01% resulted in a lower pH, a higher lactic acid content, and a higher L/T value than obtained using a cellulase preparation from *Trichoderma viride* (CEP, 0.01%), or 1% glucose. Also, in the case of alfalfa from the 1st through to 4th cuttings of 1993, the addition of ACS2 and lactic acid bacteria promoted the fermentation and much improved the quality of silage. These results showed that the addition of 0.01% ACS2 and lactic acid bacteria was enough to improve the fermentation quality of alfalfa silage.

**Key words:** *Acremonium cellulolyticus* Y-94, Alfalfa, Silage additive, Cellulase, *Trichoderma viride*, Lactic acid bacteria.

### 緒 言

アルファルファ (*Medicago sativa*) はタンパク質, ミネラル類あるいはビタミン類の含量が高い牧草<sup>13)</sup>である。しかし、遊離単少糖含量は少なく緩衝能が強い, 等の理由から良

質サイレージの調製は困難とされ, 各種の添加物を利用した発酵品質の改善<sup>1,8)</sup>が試みられている。それらの添加物の一つとして *Trichoderma* 属菌由来 (CEP)<sup>2)</sup> や *Aspergillus* 属菌由来<sup>12)</sup> のセルラーゼが用いられたが, その発酵品質改善効果は不明瞭で, 安定した添加物としての地位を確立するに至っていない。

このような状況から, 最近新たに開発された *Acremonium cellulolyticus* Y-94 由来のセルラーゼ (ACS2)<sup>14,15)</sup> について, その添加によるサイレージの発酵品質改善効果を検討した。本報では, アルファルファサイレージの発酵品質改善効果を ACS2 と CEP とで比較し, さらに ACS2 の添加量と発酵品質改善効果の関係及び各番草ごとの ACS2 添加効果を調べた。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 材料草

草地試験場の圃場で栽培したアルファルファ (品種: ナツワカバ) の 1991 年 4 番草及び 1993 年 1-4 番草を開花初期に収穫して実験に供した。

#### 2. サイレージの調製

1991 年 4 番草は 1 L 容の広口瓶を用い, 1993 年 1-4 番草はパウチ法<sup>10,11)</sup> でそれぞれサイレージを調製し, 同一試験区について 3 反復の試験とした。収穫した材料草は半日から 1 日間予乾してから長さ 2 cm に切断し, グルコース, 供試セルラーゼあるいは乳酸菌製剤をそれぞれ添加してから, 広口瓶の場合は約 600 g を詰込み, 26°C で 1 ヶ月間埋蔵した。また, パウチ法の場合は 100 g をナイロン/ポリエチレン積層フィルム製パウチ (20×25 cm, 厚さ 0.1 mm, 旭化成, 飛龍 KN210) に入れ, 吸引, 密封して 26°C で 14 日間埋蔵した。

#### 3. 添加物

セルラーゼとして, *Trichoderma viride* 由来の CEP (明治

製菓) 及び *Acremonium cellulolyticus* Y-94 由来の ACS2 (明治製菓) を用いた。また、乳酸菌製剤としては *Lactobacillus plantarum* を含むサイレージェス (サンエイ糖化) を用いた。

#### 4. 分析法

材料草の水分含量は 70°C で 2 日間乾燥してその重量減少から求めた。また、材料草の糖含量<sup>9)</sup> は材料草を 3 倍量の蒸留水とともにホモジナイザーで粉碎 (15,000 rpm×5 min) し、これを遠心分離 (15,000 rpm×3 min) して得られた上澄液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量した。カラムは、Shim-pack SCR 101 H を、移動層は 0.003 M 過塩素酸水溶液を、検出器は示差屈折計を用いた。

サイレージェの水抽出液は以下のように調製し、発酵品質を分析した。パウチに材料草の 6 倍量の蒸留水を入れて 5 分間激しく振とうし、4°C で一晩放置してから遠心分離 (15,000 rpm×3 min) した。また、広口瓶で調製したサイレージェは、その 100 g をビーカーにとり、400 ml の蒸留水を加えて攪拌してから 4°C で一晩放置し、同様に遠心分離した。このようにして調製した各上澄液について pH を電極法で測定するとともに、BTB ポストカラム法<sup>6)</sup> による HPLC 分析によって、有機酸を定量した。

### 結果および考察

#### 1. 供試アルファルファの性状

Table 1. Moisture and sugar contents of alfalfa used for experiments.

Cutting	Harvesting time	Moisture content (%)	Sugar content <sup>a)</sup> (%)	
			FM	DM
4th	1991.11.06.	71.3	1.59	5.55
1st	1993.05.25.	59.8	2.31	5.74
2nd	1993.07.28.	59.4	1.20	2.95
3rd	1993.09.29.	66.3	0.53	1.58
4th	1993.11.08.	81.5	1.63	8.81

<sup>a)</sup> Almost of sugar were composed of glucose and fructose ;

FM : fresh matter basis ; DM : dry matter basis.

供試アルファルファの性状を Table 1 に示した。天候との関係から十分に予乾できなかった 1993 年 4 番草を除いて、水分含量は 59~71% で、ほぼ良質サイレージェ調製のための指導目標値<sup>16,19)</sup> の範囲であった。また、遊離単少糖はほとんどがグルコース及びフルクトースであり、その合計含量は 1.58-8.81% (乾物当り) と収穫時期によって変動し、高温期に減少した。これらの結果は柁木ら<sup>3)</sup> の報告とほぼ同様であり、供試草は一般的な性状にあったと判断された。

#### 2. CEP 及び ACS2 の添加がサイレージェの発酵品質に及ぼす影響

CEP と ACS2 の 2 種のセルラーゼが発酵品質に及ぼす影響を知るために、1991 年の 4 番草にこれらの酵素を原物当たり 0.01% 添加してサイレージェを調製し、その発酵品質を Table 2 に示した。無添加区の乳酸含量及び乳酸と揮発性脂肪酸 (VFA) との合計に対する乳酸の割合 (L/T 値) は共に低く、劣悪なサイレージェであった。CEP 添加区も乳酸含量及び L/T 値は低く、無添加区と比較して明らかな発酵品質改善効果は見られなかった。一方、ACS2 添加区及びグルコース 1% 添加区は L/T 値が約 30% とやや低かったものの、対照区及び CEP 添加区と比較して、乳酸含量は増加し、明らかに発酵品質改善効果が認められた。同じセルラーゼ標品であっても、由来の異なる CEP と ACS2 とでは含まれる各種の酵素活性の特性及び量に差があり、従ってアルファルファに対する作用も異なるために遊離する単少糖量に差が生じ、その結果として CEP の添加による発酵品質の改善は十分に達成されなかったのであろう。この問題を解決するためには、両セルラーゼが持つ植物繊維分解に関する酵素活性を詳細に比較する必要がある。

一方、ACS2 を乳酸菌と併用した場合には ACS2 の単独添加と比較して、乳酸含量は約 4 倍に増加して、L/T 値は約 86% となった (Table 2)。このような発酵品質の改善は、試験に用いた材料草の糖含量及び付着乳酸菌数の不足を、ACS2 と乳酸菌の添加によって補給できたためと考えられた。また、試験に用いた材料草は 11 月に収穫したものであり、この時期には牧草類に付着する乳酸菌数が顕著に減少<sup>7)</sup> する事からも支持されよう。このような材料草の場合、酵素を用いても単少糖を補っても発酵は進まない。従って、以下の実験では

Table 2. Effect of additives on fermentative qualities of alfalfa silage.

Additives <sup>a)</sup>	Moisture content (%)	pH	Organic acid (%FM)			L/T value <sup>b)</sup> (%)
			Lactic acid	Acetic acid	Other organic acid	
None	75.37	6.03	0.128	0.144	0.789	12.31
G	72.55	6.06	0.375	0.103	0.765	30.17
CEP	73.88	5.73	0.084	0.082	0.997	7.22
ACS2	73.33	5.51	0.426	0.280	0.991	30.80
ACS2+L	71.49	4.45	1.628	0.251	0.022	85.64

Each silage was prepared from 4th cut alfalfa harvested at November 6, 1991, in the 1 liter glass bottle silo.

<sup>a)</sup> G : 1% Glucose, CEP : 0.01% Cellulase originated from *Trichoderma viride*, ACS2 : 0.01% Cellulase originated from *Acremonium cellulolyticus* Y-94, L : Lactic acid bacteria inoculant.

<sup>b)</sup> Ratio of lactic acid content against lactic acid content plus total volatile fatty acid content.

酵素の効果を明確にするためにすべての試験区に乳酸菌を添加することとした。

### 3. ACS2 添加量とサイレージの発酵品質の関係

ACS2 の添加量とサイレージの発酵品質との関係を明らかにするために、1993 年 3 番草を用いて原物当たり 0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、あるいは 1.0% 添加してサイレージを調製した (Fig. 1)。セルラーゼ添加区と無添加区とでは、発酵品質 (pH, 乳酸生成量, L/T 値) は明らかに区別できる差を示したが、添加量 0.01% (原物当り) 以上では大きく変化することはなかった。サイレージ発酵品質評価基準から、高・中水分サイレージでは一般的にイネ科材料では pH 4.2 以下が、マメ科材料では pH 4.5 以下が良質品の範囲<sup>4)</sup>とされている。また、VFA 含量の合計に対する乳酸、酢酸、酪酸の割合から出されるフリーク評点<sup>18)</sup>でも ACS2 を 0.01% 添加したサイレージでは 95 点と高得点を得ていることから、0.01% の添加で十分な発酵品質改善効果が期待できると判断された。なお、0.1% 以上の過剰量を添加した場合には強すぎる酵素作用によって材料草の組織が崩れ、サイレージの感触<sup>17)</sup>が粘性を帯び、むしろ官能評価では低く評価されるので避けなければならない。このことは、セルラーゼの添加によって排汁が増加<sup>9)</sup>することとも関係があると考えられる。

### 4. ACS2 を添加したサイレージの番草別発酵品質

1993 年に収穫したアルファルファ 1-4 番草を材料とし、ACS2 を原物当たり 0.01%、乳酸菌を原物当り 0.001% 併用添加したサイレージを調製して、番草の違いが酵素添加による発酵品質の改善に及ぼす影響を検討した (Fig. 2)。

無添加区ではすべての番草で、pH 5.0 以上の劣悪サイレージであった。しかし、ACS2 と乳酸菌の併用添加区では、2 番草において若干発酵品質改善効果が弱かったものの、すべての番草で pH は無添加区よりも 1.1-1.6 ユニット低下し、乳酸生成量と L/T 値の顕著な改善がみられた。材料草のすべ

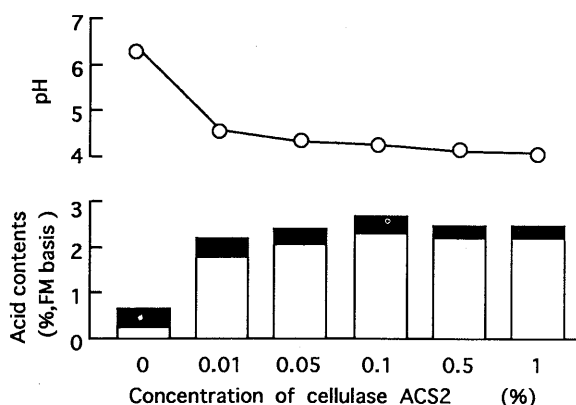


Fig. 1 Effect of cellulase ACS2 originated from *Acremonium cellulolyticus* Y-94 on pH value (—○—) and lactic (□) and acetic (■) acid contents in alfalfa 3rd cut silage.

Each silage was prepared from 3rd cut alfalfa with certain amounts of cellulase ACS2 by the Pouch method at 26°C. Acid contents were analyzed by HPLC.

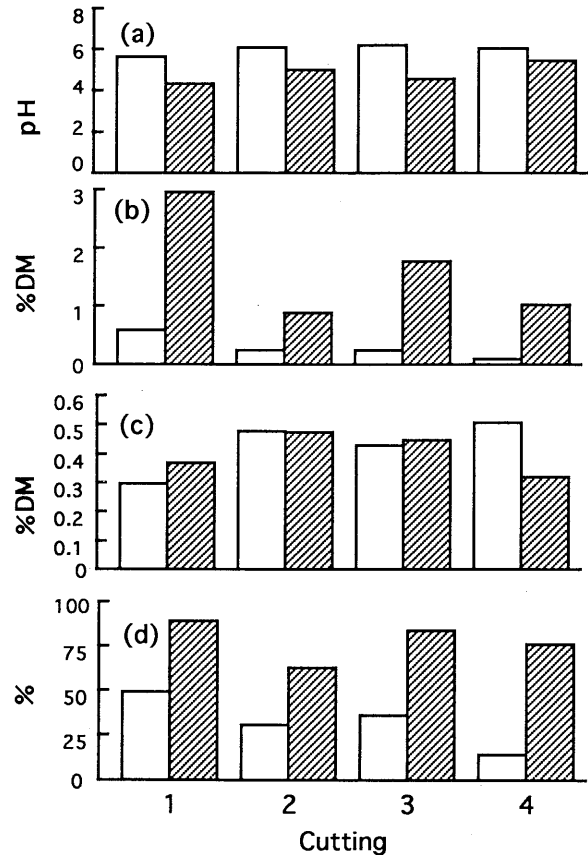


Fig. 2 Effect of harvesting time on fermentative quality of alfalfa silage.

Each silage was prepared from alfalfa with or without cellulase ACS2 by the Pouch method at 26°C: (a), pH; (b), lactic acid content; (c), acetic acid content; (d), L/T value.

Symbols: □, no additive; ▨, cellulase ACS2 (0.01%) and lactic acid bacteria inoculant (0.001%) were added.

ては原物当たり 0.53-2.31% の範囲で糖を含んでいたが、緩衝能の強いマメ科牧草としては糖が不足しており、酵素の添加によって不足した糖を補って、十分な乳酸発酵が達せられたと考えられる。これらの結果から、アルファルファを原料草とする場合には ACS2 (原物当たり 0.01%) を乳酸菌製剤とともに添加すれば、どの収穫期においても良質サイレージの調製が可能であると言えよう。

### 謝 辞

本研究を進めるに当たり、乳酸菌製剤 (サイレージェース) を賜ったサンエイ糖化株式会社に感謝申し上げる。

### 引用文献

- 1) ALLI, I. and B. E. BAKER (1981) Effects of Additives on Lactic Acid Production and Water Soluble Carbohydrates in Chopping Corn and Alfalfa. *J. Dairy Sci.* **65**, 1472-1478.
- 2) HENDERSON, A. R., P. McDONALD and D. ANDERSON (1982) The Effect of a Cellulase Preparation Derived from *Trichoderma*

- viride on the Chemical Changes During the Ensilage of Grass, Lucerne and Clover. *J. Sci. Food Agric.* **33**, 16-20.
- 3) 榎木茂彦・井澤弘一・大山嘉信 (1978) 環境温度がアルファルファ 2 番草の非構造性炭水化物組織に及ぼす影響. *日草誌* **24**, 216-221.
- 4) McDONALD, P. and R. WHITTENBURY (1973) The ensilage process, Butter, G.W. and R.W. Bailey eds. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. (3), Academic Press. London. pp. 33-60.
- 5) 野中和久・名久井忠・原慎一郎 (1995) セルラーゼ添加が水分含量の異なるアルファルファ 2 番草サイレージの発酵品質と消化性に及ぼす影響. *北農会報* **37**, 24-27.
- 6) 大桃定洋・田中 治・北本宏子 (1993) 高速液体クロマトグラフィーによるサイレージ中の有機酸の定量. *草地試研報* **48**, 51-56.
- 7) 蔡 義民・大桃定洋・熊井清雄 (1994) 飼料作物・牧草に付着する乳酸菌の分布とその乳酸発酵特性. *日草誌* **39**, 420-428.
- 8) STOKES, M.R. (1992) Effects of an Enzyme Mixture, an Inoculant, and Their Interaction on Silage Fermentation and Dairy Production. *J. Dairy Sci.* **75**, 764-773.
- 9) TANAKA, O. and S. OHMOMO (1994) A Repeatable Model System for Silage Fermentation in Culture Tubes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1407-1411.
- 10) TANAKA, O., H. KIMURA, E. TAKAHASHI, S. OGATA and S. OHMOMO (1994) Screening of Lactic Acid Bacteria for Silage Inoculants by Using a Model System of Silage Fermentation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1412-1415.
- 11) 田中 治・大桃定洋 (1995) 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. *Grassl. Sci.* **41**, 55-59.
- 12) TENDERDY, R.P., Z.G. WEINBERG, G. SZAKACS, M. WU, J.C. LINDEN, L.L. HENK and D.E. JOHNSON (1991) Ensiling Alfalfa with Additives of Lactic Acid Bacteria and Enzymes. *J. Sci. Food Agric.* **55**, 215-228.
- 13) 鷲野 保 (1975) アルファルファの飼料成分と飼料特性. *北農試研資*. (6), 151-180.
- 14) YAMANOE, T., Y. MITSUISHI, Y. TAKASAKI (1987) Isolation of a Cellulolytic Enzyme Producing Microorganism, Culture Conditions and Some Properties of the Enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 65-74.
- 15) 山辺 倫・三石 安・高崎義幸 (1984) セルラーゼの製造法. *公開特許公報* 昭 59-16608.
- 16) 増子孝義 (1994) サイレージの科学. *デーリィ・ジャパン*. 東京. pp. 39-63.
- 17) 北海道農業試験会議編 (1989) 牧草サイレージ品質判定基準-改訂版-. pp. 1-20.
- 18) 森本 宏編 (1984) 改著飼料学. 養賢堂. 東京. pp. 404-406.
- 19) 吉田則人・高野信雄監修 (1989) 最新サイレージ-調製と給与の決め手-. *デーリィマン社*. 東京. pp. 59-62.

## 要 旨

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 (1996) : アクレモニウム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. *Grassland Science* **42**, 155-158.

アクレモニウム属菌 (*Acremonium cellulolyticum* Y-94) に由来するセルラーゼ (アクレモニウムセルラーゼ, 以下 ACS2 と略) またはトリコデルマ属菌 (*Trichoderma viride*) に由来するセルラーゼ (トリコデルマセルラーゼ, 以下 CEP と略) を添加してアルファルファサイレージを調製し, 両者の発酵品質改善効果を比較して以下の結果を得た。

1. ACS2 を添加して調製したサイレージは, 無添加区, 1% グルコース添加区及び CEP 添加区と比較して明らかに乳酸含量が多く, L/T 値も高かった。また, これらの品質改善効果は乳酸菌製剤との併用によってさらに確実なものとなった。

2. ACS2 の添加量は 0.01% で十分な発酵品質改善効果を示し, それ以上添加しても発酵品質が大きく変化することはなかった。

3. ACS2 を乳酸菌製剤と併用添加したアルファルファの番草別発酵品質は, 2 番草でやや乳酸含量及び L/T 値が低かったものの概ね良好で, 収穫時期を考慮せずに良質発酵品の調製を可能とした。

以上の結果, ACS2 の 0.01% 添加はアルファルファサイレージの発酵品質を改善し, 乳酸菌製剤との併用によって, その効果をより確実にできることが明らかとなった。

キーワード : *Acremonium cellulolyticum* Y-94, アルファルファ, サイレージ添加物, セルラーゼ, *Trichoderma viride*, 乳酸菌。