

## *Acremonium* 由来のセルラーゼの添加がサイレージの細胞壁成分 および *in vitro* 乾物消化率におよぼす影響

庄 益 芬\*・艾尼瓦尔艾山\*\*・野 英 二\*\*\*・照 井 英 樹  
植 崎 昇・安 宅 一 夫

### *Acremonium* Cellulase Effect on Cell Wall Constituents and on *In Vitro* Digestibility of Silage Dry Matter

Yifen ZHUANG\*, Aisan ANIWARU\*\*, Eiji NO\*\*\*, Hideki TERUI,  
Noboru NARASAKI and Kazuo ATAKU  
(October 2001)

#### 緒 言

サイレージの発酵を改善し、良質のサイレージを調製するために多くの添加物が使用されており<sup>7,11,14,16</sup>、近年では乳酸菌やセルラーゼなどの生物的添加物に対する関心が高まっている<sup>6,7</sup>。艾尼瓦尔ら<sup>5</sup>はサイレージ調製においてセルラーゼの添加は牧草の細胞壁成分を分解して糖を生成し、乳酸発酵を促進すると報告した。また、セルラーゼ添加はサイレージの細胞壁成分を減少させ、乾物消化率を向上させることが期待される<sup>6,9</sup>が、その効果は明らかではない<sup>5</sup>。本研究では艾尼瓦尔ら<sup>5</sup>が報告したサイレージと同様のサイレージを用いて、*Acremonium cellulyticus* Y-94 株由来セルラーゼ (CEL) の添加水準がサイレージの細胞壁成分、とくに繊維の消化性の難易に基づく区分および *in vitro* 乾物消化率 (IVDMD) におよぼす影響を検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 材料草およびサイレージ調製

材料草には酪農学園大学附属農場で栽培されたチモシー (*Phleum pratense* L., 品種: ホクセン, 出穂期) とアルファルファ (*Medicago sativa* L., 品種: ユーバ, 開花期) の一番草を用い、1994年6月21日に刈取り、無予乾でサイレージを調製した。材料草の化学成分および IVDMD を Table 1 に示した。材料草は 1 cm の長さに切断し、CEL (明治製菓株式会

社) とよく混合し、1 リットルの実験用サイロに詰め込み、これを 2 反復した。CEL の添加量は新鮮材料に対して、チモシーでは 0, 0.006, 0.012 および 0.024%, アルファルファでは 0, 0.005, 0.01 および 0.02% とした。サイロは室温で 50 日間放置した後、後に開封した。

##### 2. 成分分析

細胞壁成分の総繊維 (OCW) と低消化繊維 (Ob) の定量は阿部<sup>3</sup>による酵素分析法に基づき実施し、高消化繊維 (Oa) は OCW と Ob の差として算出した<sup>3</sup>。

IVDMD は阿部<sup>3</sup>の方法に準じて以下のように測定した。ルーメン液はルーメンフィステルを装着したホルスタイン種泌乳牛より採取し、遠心せずに二重ガーゼで二回ろ過して培養に供した。供試ルーメン液中に飼料片などが混入しているため、38°C で 72 時間培養した後、残渣重量からブランクの重量を差し引いて IVDMD を求めた。

##### 3. 統計処理

同一原料草におけるサイレージの細胞壁成分および IVDMD におよぼすセルラーゼ添加量の影響は一元配置法により、草種、セルラーゼ添加量およびそれらの相互作用は二元配置法により分散分析を行った。また、細胞壁成分と IVDMD との間の相関を単相関分析により解析した<sup>13</sup>。

酪農学園大学短期大学部 酪農学科 家畜飼料学研究室

Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

\* 内蒙古民族大学, 中華人民共和国 内蒙古 通遼

Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028042 People's Republic of China

\*\* 新疆農業大学, 中華人民共和国 新疆 烏魯木齊

Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, 830052 People's Republic of China

\*\*\* 酪農学園大学 附属農場 乳牛飼養学研究室

Research Farm, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

**Table 1** Chemical composition and *in vitro* dry matter digestibility of ensiled forage before additives.

	Moisture (%)	WSC	OCW	Oa	Ob	IVDMD (%)
		(%DM)				
Timothy	79.5	8.4	59.9	8.1	51.8	79.1
Alfalfa	79.7	8.0	45.1	9.2	35.9	59.9

WSC: Water-soluble carbohydrate

OCW: Organic Cell Wall

Oa: Organic a fraction

Ob: Organic b fraction

IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility

**Table 2** Cell wall constituents and *in vitro* dry matter digestibility of the silage, compared by analysis of variance.

Cellulase Addition (%)	OCW	Oa	Ob	Oa/OCW	Ob/OCW	IVDMD
	(%DM)			(%)		
Timothy						
0	70.1 <sup>A</sup>	13.9 <sup>Aa</sup>	56.2 <sup>Aa</sup>	19.9 <sup>A</sup>	80.1 <sup>B</sup>	78.3 <sup>B</sup>
0.006	62.0 <sup>B</sup>	11.4 <sup>Ab</sup>	50.6 <sup>Bb</sup>	18.4 <sup>A</sup>	81.6 <sup>B</sup>	80.1 <sup>A</sup>
0.012	58.3 <sup>C</sup>	11.1 <sup>Ab</sup>	47.1 <sup>Bc</sup>	19.1 <sup>A</sup>	80.9 <sup>B</sup>	79.2 <sup>AB</sup>
0.024	57.8 <sup>D</sup>	6.8 <sup>Bc</sup>	51.0 <sup>ABb</sup>	11.8 <sup>B</sup>	88.2 <sup>A</sup>	73.1 <sup>C</sup>
Alfalfa						
0	50.3 <sup>Aa</sup>	9.1 <sup>a</sup>	41.2 <sup>a</sup>	18.1 <sup>a</sup>	81.9 <sup>b</sup>	57.8 <sup>Aa</sup>
0.005	47.0 <sup>ABb</sup>	8.3 <sup>a</sup>	38.7 <sup>b</sup>	17.6 <sup>a</sup>	82.4 <sup>b</sup>	54.2 <sup>Bbc</sup>
0.01	47.0 <sup>ABb</sup>	8.5 <sup>a</sup>	38.5 <sup>b</sup>	18.0 <sup>a</sup>	82.0 <sup>b</sup>	54.8 <sup>ABb</sup>
0.02	46.0 <sup>Bb</sup>	6.0 <sup>b</sup>	40.1 <sup>ab</sup>	12.9 <sup>b</sup>	87.1 <sup>a</sup>	52.2 <sup>Bc</sup>
Material (M)	**	**	**			**
Cellulase (C)	**	**	**	**	**	**
MxC	**	*	**			**

OCW, Oa, Ob and IVDMD: See Table 1.

<sup>A,B,C</sup> Means within the same row and material with different superscripts differ ( $P < 0.01$ ).

<sup>a,b,c</sup> Means within the same row and material with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ .

## 結 果

### 1. サイレージの細胞壁成分および IVDMD

チモシーとアルファルファサイレージの細胞壁成分および IVDMD をそれぞれ Table 2 に示した。

OCW, Oa, Ob 含量および IVDMD において、草種の影響は有意であり、CEL の添加は全ての項目に有意な影響を示した ( $P < 0.01$ )。また、草種とセルラーゼの添加量との交互作用は OCW, Oa, Ob 含量および IVDMD ( $P < 0.01$ ) において有意であった。

草種の影響は OCW, Oa, Ob 含量および IVDMD に対しチモシーがアルファルファより高かったが、Oa/OCW および Ob/OCW 比は草種間に大きな差が無かった。

チモシーサイレージの OCW 含量は CEL 添加量の増加に伴い低下した。Oa 含量は 0.024% 区が極め

て低く、無添加区の半分以下であった ( $P < 0.01$ )。Ob 含量は CEL 添加により低下し ( $P < 0.01$ )、0.012% 区で最も低い値を示した。また、0.024% 区では他区より Oa/OCW 比が低く ( $P < 0.01$ )、Ob/OCW 比が高かった ( $P < 0.05$ )。アルファルファサイレージでも、チモシーサイレージと同様の傾向にあり、OCW 含量は CEL の添加によって低下したが ( $P < 0.05$ )、添加量による差は認められなかった。Ob 含量は 0.005% と 0.01% 区で無添加区より低かった ( $P < 0.05$ )。また、0.02% 区は他区より Oa 含量および Oa/OCW 比が低く、Ob/OCW 比は高かった ( $P < 0.05$ )。

チモシーサイレージの IVDMD は、0.006% 区では無添加区より高く ( $P < 0.01$ )、0.024% 区で低下した ( $P < 0.01$ )。アルファルファサイレージでは、CEL 添加により IVDMD は低下する傾向にあり、0.02%

**Table 3** Relationships among the cell wall constituents and *in vitro* dry matter digestibility of the timothy silage.

	OCW	Oa	Ob	Oa/OCW	Ob/OCW	IVDMD
OCW						
Oa	0.7830*					
Ob	0.8727**	0.3796				
Oa/OCW	0.5483	0.9494**	0.0704			
Ob/OCW	-0.5483	-0.9494**	-0.0704	-1.0000**		
IVDMD	0.3382	0.7826	-0.1113	0.8899**	-0.8899**	

OCW, Oa, Ob and IVDMD: See Table 1.

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ **Table 4** Relationships among the cell wall constituents and *in vitro* dry matter digestibility of the alfalfa silage.

	OCW	Oa	Ob	Oa/OCW	Ob/OCW	IVDMD
OCW						
Oa	0.7276*					
Ob	0.6654	-0.0280				
Oa/OCW	0.5845	0.9816**	-0.2166			
Ob/OCW	-0.5840	-0.9815**	0.2171	-1.0000**		
IVDMD	0.9319**	0.7752*	0.5150	0.6595	-0.6591	

OCW, Oa, Ob and IVDMD: See Table 1.

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ 

区で最も低い値であった ( $P < 0.01$ )。

## 2. サイレージの細胞壁成分および IVDMD との相関

チモシーおよびアルファルファサイレージにおける細胞壁成分および IVDMD との間の相関をそれぞれ表 3 と 4 に示した。

サイレージの IVDMD は、チモシーで Oa および Oa/OCW との間には正、Ob/OCW との間には負の相関があり ( $P < 0.01$ )、アルファルファでは OCW および Oa との間に正の相関が認められた ( $P < 0.05$ )。

## 考 察

### 1. サイレージの細胞壁成分および IVDMD

サイレージの細胞壁成分含量および IVDMD は草種、CEL 添加量および草種と CEL 添加量の交互作用による影響を受けており、Oa/OCW および Ob/OCW 比も CEL 添加量によって影響された。

一般に、リグニンおよびケイ酸の含量が多い飼料ほど構造的炭水化物の消化率は低くなる傾向にある<sup>9,10,17</sup>。また、阿部ら<sup>11</sup>は粗飼料のセルラーゼ反応に関して、細胞壁の構造あるいは消化性から、アルファルファにおける反応速度はイネ科乾草より遅いことを認めている。さらに、アルファルファの Ob の

消化率はイネ科牧草より低いことも報告されている。本研究では、チモシーサイレージはアルファルファサイレージより OCW, Ob および Oa 含量が高く、IVDMD も高かった。このことは、繊維成分の消化性が IVDMD に影響することを示唆するものであった。

友田ら<sup>15</sup>はアルファルファの NDF をセルラーゼで処理すると、NDF 重量の 16.7% の糖類が遊離することを認めている。また、艾尼瓦尔ら<sup>5</sup>は、本研究で供試した CEL 添加サイレージの WSC 含量は無添加のものより高くなることを報告している。本研究では、二草種のサイレージとも CEL の添加により OCW, Ob および Oa 含量は低下する傾向にあった。これはサイレージの Oa および Ob は部分的に CEL によって糖へ転換したものと考えられる。また、チモシー 0.024% 区およびアルファルファ 0.02% 区の Oa 含量および Oa/OCW 比率は無添加区および他の添加区よりも顕著に低く、Ob/OCW 比率は高くなった。これは、セルラーゼの大量添加は Oa の分解を促進するが、Ob に対する分解作用は相対的に弱いことを示している。

野中ら<sup>12</sup>はアルファルファサイレージの乾物回収率および IVDMD に対する CEL 添加の影響について検討し、いずれも CEL の添加によって低下することを認めている。本研究ではサイレージの

IVDMD は、チモシー0.006%区および0.012%区では向上する傾向があったが、アルファルファサイレージは CEL 添加により有意に低下し、後者は野中ら<sup>12)</sup>の結果と一致した。チモシー0.024%区およびアルファルファ0.02%区のように、CEL の大量添加は、IVDMD の低下をもたらすことが示された。これらの結果は、チモシーに対する CEL の適量添加は無添加区よりも高い乾物回収率を示し、アルファルファに対する CEL 添加で無添加区と比較して低い乾物回収率を示した艾尼瓦尔ら<sup>5)</sup>の報告によって一部説明できる。

CEL のペクチナーゼ活性は高く<sup>5)</sup>、マメ科牧草中のペクチン含量は比較的高い<sup>18)</sup>ことから、アルファルファサイレージのペクチンが CEL による分解作用を受けて減少し、分解性の低い繊維成分の比率が高くなったことでサイレージの IVDMD が低下した可能性も考えられる。

艾尼瓦尔ら<sup>5)</sup>の報告において、アルファルファおよびチモシーサイレージの発酵品質に対する CEL 添加水準の適量が示されたが、本研究の結果では CEL 添加量が増加すると Oa 含量が低下していることから、CEL を過剰に添加すると Oa が減少し、IVDMD の改善効果は期待できないと考えられる。

## 2. サイレージの細胞壁成分および IVDMD との相関

サイレージの細胞壁成分の消化性による区分と IVDMD との相関については両草種でほぼ一致し、一般に認められているものと同様であった。

二草種のサイレージの IVDMD は、Oa 含量との間に有意な正の相関があったが、Ob 含量との間の相関係数は低かった。牧草の *in vivo* 乾物消化率と Oa 含量との間には有意な正の相関があることが既に報告されており<sup>2)</sup>、本研究でも同様の結果を得た。

以上、アルファルファサイレージでは CEL の添加によって IVDMD は低下した。チモシーサイレージでも CEL の過剰添加によって IVDMD は低下したが、適量添加では向上した。これらの結果から、IVDMD に対する CEL の添加効果は草種および細胞壁成分の分画によって酵素の添加量に対する反応が異なり、草種あるいは牧草の細胞壁成分とセルラーゼの適合性と添加量については今後の検討が必要であると考えられる。

## 要 旨

1 番草のチモシー(出穂期)とアルファルファ(開花期)を用い、*Acermonium* 由来のセルラーゼをチ

モシーに、0, 0.006, 0.012, および 0.024%, アルファルファに 0, 0.005, 0.01 および 0.02% 添加し、サイレージの細胞壁成分および *in vitro* 乾物消化率 (IVDMD) におよぼす影響を検討した。セルラーゼ添加はサイレージの細胞壁成分含量を減少させ、とくに 0.02% 以上の添加では Oa の消失を著しく大きくした。サイレージの IVDMD は、チモシーではセルラーゼ 0.006% で有意に向上した。0.024% 添加では有意に低下した。アルファルファではセルラーゼ添加により有意に低下した。両草種とも IVDMD と Oa 含量とに正の相関が見られた。

## 引用文献

- 1) 阿部亮, 堀井聡, 亀岡暄一. 1972. セルラーゼによる粗飼料の乾物消化率推定法に関する研究. II. 試料の前処理が酵素反応におよぼす影響. 日畜会報 43: 146-154.
- 2) 阿部亮, 堀井聡. 1974. セルラーゼによる牧草細胞膜物質の分画とその応用. 日草誌 20: 16-21.
- 3) 阿部亮. 1988. 炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用. 畜産試験場研究資料 2: 34-46.
- 4) 阿部亮. 1996. 乳牛用飼料データ集. p. 18-21. デーリィ・ジャパン. 41.
- 5) 艾尼瓦尔艾山, 安宅一夫, 植崎昇, 野英二. 1998. *Acremonium Cellulyticus* Y-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およぼす影響. 日草誌 43: 406-412.
- 6) 安宅一夫. 1993. 90 年代の酪農技術. p. 117-126. 酪農学園大学エクステンションセンター. 江別.
- 7) Henderson, N. 1992. Feed Additives and Supplements. p. 41-46. SAC. Edinburgh.
- 8) 堀井聡, 阿部亮. 1972. 粗飼料の細胞膜構成物質に関する研究. 4. 構造的炭水化物の各種成分間の相互関係. 畜試研報 25: 69-74.
- 9) McDonald, P., A. R. Henderson and S. J. E. Heron. 1991. The Biochemistry of Silage (2nd Ed.). p. 194-196. Chalcombe Pulication. Bucks.
- 10) Mowat, D. N., M. L. Kwein and J. E. Winch. 1969. Lignification of *in vitro* cell wall digestibility of plant parts. Ca. J. Plant. Sci. 49: 499-504.
- 11) Muck, R. E. 1993. Silage production. p. 106-116. NRAES. New York.

- 12) 野中和久, 名久井忠, 原愼一郎. 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およぼす影響. 北畜会報 37: 24-27.
- 13) パピルス株式会社編集. 1995. エクセル統計. p. 78. 社会情報サービス株式会社. 東京.
- 14) Ridla, M. and S. Uchida. 1998. Effects of combined treatments of lactic acid bacteria and cell wall degrading enzymes on fermentation and composition of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) silage. AJAS. 11: 277-284.
- 15) 友田裕代, 徳田宏晴, 中西載慶, 大桃定洋, 河野敏明, 丹野裕. 1996. *Acremonium Cellulyticus* Y-94 由来のセルラーゼ処理によってアルファルファ乾燥粉末から遊離する糖類. 日草誌 42: 159-162.
- 16) 内田仙二, 大島光昭 監修 1995. サイレージの生化学. p. 216-278. デーリィ・ジャパン. 東京.
- 17) Van Soest, P. J. and L. H. Jones. 1968. Effect of silica in forages upon digestibility. J. Dairy Sci. 51: 1644-1648.
- 18) Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. 1st Ed. pp.95-117. Cornell University Press. New York.

### Summary

This study was made on timothy and alfalfa silages supplemented with *Acremonium* cellulase to determine the effect of the cellulase on cell wall constituents and on *in vitro* digestibility of the silage dry matter. Silage using first-cutting timothy (*Phleum Pratense* L., heading) was prepared with supplementation of *Acremonium* cellulase at the rates of 0, 0.006, 0.012, and 0.024%; and alfalfa silage (*Medicago sativa* L., blooming) with *Acremonium* cellulase at 0, 0.005, 0.01, and 0.02%. The cell wall constituents broke down in both the timothy and alfalfa silages. In timothy, the greatest disruption in the highly digestible organic cell wall (Oa) was elicited by 0.024% cellulase supplementation, and in alfalfa by 0.02%. In timothy silage, *in vitro* dry matter digestibility was enhanced significantly by 0.006 supplementation of cellulase but was lowered significantly by addition at 0.024%. In alfalfa silage, *in vitro* dry matter digestibility was reduced significantly by the cellulase at all three rates tested. A positive relationship was found between the Oa and *in vitro* dry matter digestibility in both timothy and alfalfa silage treated with *Acremonium* cellulase, i.e., as cell wall constituents decreased, *in vitro* dry matter digestibility increased.