

発酵おからによる家畜用飼料の変敗抑制に関する研究

近藤 誠^{*1}・原崎雅志¹・荻田修一²・後藤正和¹

¹三重大学大学院生物資源学研究科 ²三重大学大学院地域イノベーション学研究科

Aerobic Stability of Mixed Feeds with Fermented Soybean By-product

Makoto KONDO^{*1}, Masashi HARAZAKI¹, Shuichi KARITA² and Masakazu GOTO¹

¹Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu, 514-8507

²Graduate School of Regional Innovation Studies, Mie University, Tsu, 514-8507

ABSTRACT

The aim of this study is to reveal the effect of raw or ensiled okara on the aerobic stability of mixed feeds for dairy cattle. Three types of okara were prepared for this research; raw okara (RO), fermented okara without any additives (FO) and fermented okara with dried beet pulp (FO+BP) to decrease moisture level. Each types of okara was mixed with hay, grains and so on to make mixed feeds for dairy cattle. These mixed feeds were put into plastic bottles and they were incubated aerobically for 5 days at 30°C to determine their aerobic stability. As an indicator of deterioration, the temperature of the mixed feeds including RO and FO+BP increased around 1 day after incubation, while the FO treatment maintained ambient temperature for 3 days and then slowly increased, but did not show visual deterioration until day 5. During these 5 days, the amount of yeast in the mixed feed with RO and FO+BP rapidly increased within 1 day; in contrast, that in the FO slowly increased after 3 days. Only the mixed feed with FO decreased its pH and increased lactic and acetic acid content under aerobic conditions up to day 3. Even so, the level undissociated fatty acids in the FO treatment was still lower than the reported minimum inhibitory concentration for yeast growth in feed. It can be assumed that antifungal compounds other than short-chain fatty acids may be contained in fermented okara or newly produced under aerobic condition. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 135-140, 2014.

Key words : fermented okara, dairy feed, aerobic stability, yeast

*〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577

豆腐製造で発生するおからはたん白質が高く、飼料としての栄養価も高い。しかし、工場から排出されたのちに好気性細菌などの増殖により変敗しやすく、これが利用の妨げの一因となっている。おからが飼料として利用される事例として、速やかに酪農家に移送し、生のまま家畜へ給与する場合や、乾燥処理や発酵処理により保存性を高めた上で飼料として使われる。発酵処理は乾燥処理よりコストが低いめしばしば利用されており、特に水分調整材と混ぜて安定的に発酵させる事例が多い。

一方、乳牛への給与される飼料として、エネルギーやたん白質、繊維質などの栄養素が乳牛の栄養要求量を満たすように牧草や穀物など様々な原料を混合した飼料が用いられている。この混合飼料は栄養分と適度な水分を含むため、特に夏季など高温条件下では飼料混合時や給与後に変敗しやすい。給与飼料の変敗は、採食量や乳生産性の低下に繋がる可能性があるため、飼料調製から乳牛が採食する段階まで、給与飼料を変敗させずに安定させることが必要である。おからのように変敗しやすい高水分の食品産業副産物を飼料に混合する場合には、飼料の変敗の進行に注意が必要となる²⁾。そこで本研究では、おからの利用形態に着目し、生のままや発酵調製したおからを乳牛用の飼料に混合した場合に、乳牛用飼料の変敗に与える影響を検証した。

方 法

発酵おからおよび乳牛用飼料の調製

おからは豆腐工場にて排出後2時間以上経過したものを入手し、実験に供した。おから単独（無添加）、あるいはおからとビートパルプ（てん菜の絞り粕）を原物重量比で4：1の割合で混合したもの（ビートパルプ添加）をポリエチレンバッグに1 kgずつ詰め、脱気後に密封し30℃のインキュベーター内で30日間貯蔵させ、発酵おからを調製した。本試験では、生のおから、発酵おから（無添加）、発酵おから（ビートパルプ添加）の3種類を比較した。各々のおからを牧草類やトウモ

ロコシ、大豆粕、フスマなどと混合し、乳牛用飼料を調製した。おからの混合割合は原物重量比で22%、乾物重量比で9%とした。飼料全体の栄養価は泌乳牛の栄養要求量を満たすように設計し、乾物重量あたり粗たん白質15.7%、中性デタージェント繊維40.1%、粗脂肪5.3%、可消化養分総量73.2%となるように混合飼料を調製した。水分は3処理区で同程度になるように適宜加水を行い、約45%とした。

乳牛用飼料の変敗試験

混合した乳牛用飼料を500 mL容のプラスチックボトルに約150 g詰め込み、ボトルの上部は蓋をせずに飼料が空気に曝されるようにした。また飼料の中心部には温度センサーを設置した。ボトルは30℃のインキュベーター内に0, 1, 3, 5日間静置し、変敗過程を観察した。なおボトルは各処理区、各日で3反復用意した。0, 1, 3, 5日目にそれぞれのボトル内部の飼料を全量採取し、生菌数（乳酸菌、好気性細菌、酵母・カビ）の測定と有機酸の測定に用いた。有機酸測定はHPLCを用い、イオン排除モードで分離し、電気伝導度検出器により定量を行った。

結果と考察

各種おからのpH、乳酸および酢酸含量、付着微生物数をTable 1に示した。生のおからはpHが約7であり、有機酸はほとんど含まれていなかったが、細菌、酵母・カビともに多数付着していた。おからは工場からの排出後に速やかに好気性細菌や酵母が増殖するため、変敗しやすい材料であることは先行研究でも指摘されている¹⁾。一方、これらを密封状態で発酵させた場合、無添加、ビートパルプ添加いずれも乳酸や酢酸が含まれ、pHが4付近に低下した。発酵おからでは、乳酸菌、好気性細菌数は生おからと同程度であったが、酵母・カビの数は検出限界以下まで低下していた。

Fig. 1に各種おからを混合して調製した乳牛用飼料の好気条件下における温度変化を示した。生のおからを用いた場合、乳牛用の飼料は1日以内に発熱し始め、変敗が進み始めた。一方、発酵おから（無添加）では、

Table 1. Characteristics of raw and fermented okara

	pH	Lactic acid	Acetic acid	Lactic acid bacteria	Aerobic bacteria	Yeast and mold
		----- % -----		----- log ₁₀ cfu/g -----		
Raw okara	6.99	<0.01	0.02	5.04	6.05	3.36
Fermented okara (no additive)	3.99	0.57	0.10	6.40	6.81	<2.00
Fermented okara (beet pulp added)	4.28	0.44	0.07	5.49	6.32	<2.00

cfu: colony-forming unit

3日目までは環境温度である30℃を維持しており、その後緩やかに発熱し始めた。しかし、ビートパルプを添加した発酵おから（ビートパルプ添加）では、生おから同様に1日目付近で発熱が開始し、その後40℃以上まで上昇した。Fig. 2に変敗試験5日目の様子を示した。発熱した生おからあるいは発酵おから（ビートパルプ添加）を混合した飼料では著しいカビの増殖が認められ、強い腐敗臭がしていた。それらに対して、発酵おから（無添加）を混合した飼料では、好気条件下で5日間は状態が安定しており、腐敗の進行は目視では認められなかった。以上のことから、発酵おからでも調製の仕方での後の混合飼料の安定性が顕著に異なることが示された。

次に、飼料の変敗過程における微生物叢の変化をFig. 3に示した。いずれの処理区も乳酸菌や好気性細菌は飼料混合時から3日目までに増加しており、おからの利用形態による明確な違いは認められなかった。こ

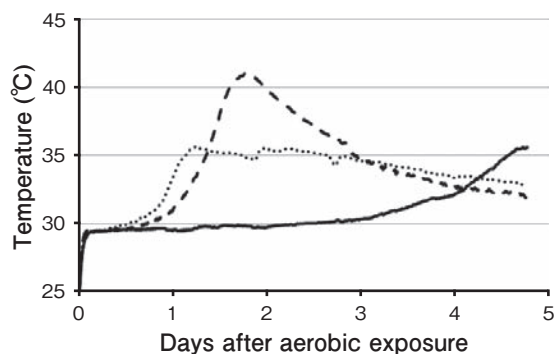


Fig. 1. Changes in temperature of dairy feeds including raw or fermented okara with or without beet pulp.; dairy feeds with raw okara, —; dairy feeds with fermented okara (no additive), ---; dairy feeds with fermented okara (beet pulp added).

れらに対して、酵母・カビの菌数は、速やかに発熱した生おからおよび発酵おから（ビートパルプ添加）を混合した飼料では、1日以内に速やかな増殖が認めら

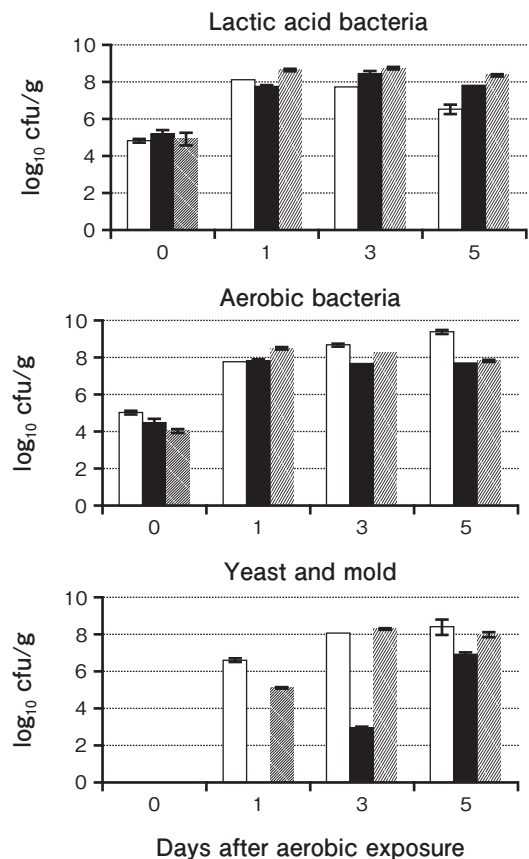


Fig. 3. Changes in microbial numbers in dairy feeds including raw or fermented okara (Day 0, 1, 3 and 5). White; dairy feeds with raw okara, Black; dairy feeds with fermented okara (no additive), Slash; dairy feeds with fermented okara (beet pulp added).



Fig. 2. Dairy feeds including raw or fermented okara at 5 days after aerobic condition. (left; dairy feeds with raw okara, center; dairy feeds with fermented okara (no additive), right; dairy feeds with fermented okara (beet pulp added).

れた。一方、飼料の発熱が抑えられていた発酵おから（無添加）を混合した飼料では、1日後までは酵母・カビは検出されず、3日目以後に緩やかに増殖した。これら酵母・カビの増殖は温度の変化と一致していたことから、発酵おから（無添加）は酵母やカビの増殖を抑えることで、飼料の発熱を抑えていたと考えられた。

続いて、Table 2に飼料混合時（変敗試験開始時）のpH、有機酸含量、微生物菌数を示した。先に示したように2種類の発酵おから自体はpHが低かったが（Table 1）、実際に給与飼料として他の原料と混合することで、それらのpHは5～6の範囲に含まれた。酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸は、飼料の変敗を抑制する有機酸であるが^{2,3)}、本試験で調製した混合した飼料中の酢酸濃度は、容易に発熱した生のおからおよび発酵おから（ビートパルプ添加）を混合した飼料や発熱が遅延した発酵おから（無添加）を混合した飼料においていずれも0.1%以下と低値を示した。本研究と同程度の水分を含む乳牛用の混合飼料では、その発熱を抑制するために必要な酢酸濃度は単独で1%以上（非解離型として0.6%以上）、酢酸+プロピオン酸で0.5%以上と報告されている^{4,5)}。本研究では酢酸以外の短鎖脂肪酸として、プロピオン酸や酪酸をごくわずかに検出したが、いずれの混合飼料中で0.04%未満であった（データ略）。以上のことから、発酵おから（無添加）の混合で飼料の変敗が抑制された原因としては、飼料混合時に含まれる短鎖脂肪酸による影響は小さいことが示唆された。

また、飼料の混合後から変敗過程におけるpHおよび有機酸含量の変化をFig. 4に示した。発熱した生のおから、または発酵おから（ビートパルプ添加）を混合した飼料では、変敗開始1日目以降にpHが上昇し、乳酸や酢酸は減少した。一方、発熱が抑えられた発酵おから（無添加）を混合した飼料では、変敗試験開始後から3日目までpHが低下していた。その間の

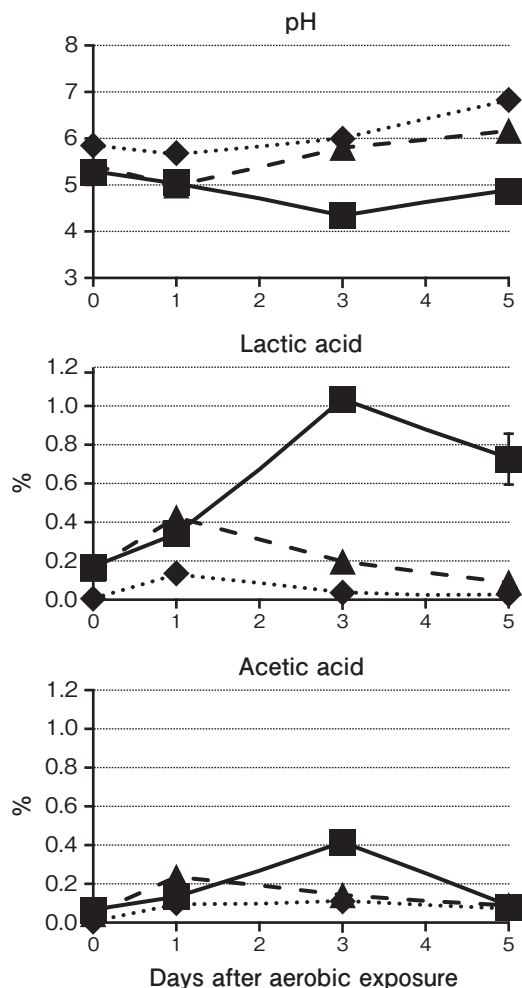


Fig. 4. Changes in pH, lactic acid and acetic acid contents in dairy feeds including raw or fermented okara (Day 0, 1, 3 and 5). ◆; dairy feeds with raw okara, ■; dairy feeds with fermented okara (no additive), ▲; dairy feeds with fermented okara (beet pulp added).

Table 2. Characteristics of dairy feeds including raw or fermented okara (Day 0)

	pH	Lactic acid	Acetic acid	Lactic acid bacteria	Aerobic bacteria	Yeast and mold
		----- % -----		----- log ₁₀ cfu/g -----		-----
Dairy feeds with raw okara	5.83a	<0.01b	0.03c	4.84	4.99a	<2.00
Dairy feeds with fermented okara (no additive)	5.27c	0.17a	0.06a	5.20	4.50ab	<2.00
Dairy feeds with fermented okara (beet pulp added)	5.41b	0.17a	0.05b	4.92	4.01b	<2.00

a,b,c; Means with different letters in a line are significantly different ($p < 0.05$).

有機酸の変化としては、乳酸が1%程度まで、酢酸が0.4%程度まで増加しており、発熱した飼料とは明らかに異なる挙動を示した。プロピオン酸や酪酸はそれぞれ0.02%, 0.03 ~ 0.04%と一定して含まれ、期間中に乳酸や酢酸のような変化は認められなかった（データ略）。発酵おから（無添加）を混合した飼料では、pHの低下や酢酸の増加により抗菌作用を有する非解離型の酢酸濃度は1 ~ 3日目まで約0.3%まで増加したが、酢酸単独では酵母の増殖を抑える濃度には至っていない。また酢酸は3日目が最高値を示したが、酵母やカビの増殖が抑制されていたのは0 ~ 1日目であり、3日目の時点では酵母が増殖し始めていたことから、酸生成と酵母・カビの生育が抑制されていた期間と差が生じている。これらのことから、発酵おから（無添加）を混合した飼料に含まれる短鎖脂肪酸が酵母やカビの増殖を抑えた可能性は低く、それら以外の化合物の関与が示唆された。発酵食品や発酵飼料に含まれる短鎖脂肪酸以外の抗真菌作用のある化合物としては、牧草のサイレージやサワードゥに生息する乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* など）がcyclic dipeptideやphenyl lactic acidを産生することが報告されている

^{6,7)}。またその他にも乳酸菌が生産する抗真菌物質としては3-hydroxypropionaldehyde (reuterin) やペプチド性の化合物も広い抗菌スペクトルを有することが知られている⁷⁾。Wang and Nishinoはおから単独で発酵させたとおからを複数の飼料原料と混合させて発酵させた場合では、発酵過程で優先する乳酸菌種が異なることを報告している⁸⁾。本研究では、無添加で高水分のまま調製した発酵おからとビートパルプを添加して水分を低下させて調製した発酵おからでは、原物あたりの乳酸や酢酸濃度に顕著な違いは認められなかったが、異なる水分環境により発酵過程で生育した乳酸菌の種類に影響していた可能性が考えられる。2種類の発酵おからの細菌叢をPCR-DGGE法により確認したところ、細菌叢のパターンに違いが認められた（データ略）。これらのことから発酵おから（無添加）に特徴的に生育した細菌が酵母やカビの増殖を抑える化合物の生産に関与していた可能性が考えられるが、未解明となっている。今後は乳酸菌を中心に菌叢の解析を進めるとともに、抗真菌活性のある化合物の探索を行うことで、発酵おからの飼料変敗抑制機構を明らかにする必要がある。

要 約

おからは飼料として栄養価が高いが、工場から排出された後に好気性細菌や酵母が増殖しやすく変敗しやすい。おからは乳牛の飼料として利用する場合には牧草や穀物などと混合して給与されるが、おからの利用形態がこの混合飼料の変敗に影響することが予想される。本研究では生のおからや発酵おからを用いて混合飼料を調製し、それらの変敗特性を明らかにすることを目的とした。発酵おからは、水分調整と糖添加の目的でビートパルプを添加したおからと無添加のおからをそれぞれプラスチックバッグに密封し30日間30℃のインキュベーター内で発酵させて調製した。供試した生おからのpHは7程度で、発酵おからはいずれも4程度まで低下し乳酸や酢酸を含んでいた。乳牛用の飼料に生のおから、発酵おから（無添加）、発酵おから（ビートパルプ添加）をそれぞれ混合し、5日間好気条件下で静置し、変敗試験を行った。生のおから、あるいは発酵おから（ビートパルプ添加）を用いた混合飼料では1日目付近で発熱し変敗が速やかに進行した。一方、発酵おから（無添加）を用いた場合のみ、混合飼料が3日目まで発熱せず変敗が抑制されていた。飼料中の微生物叢の変化として、乳酸菌および好気性細菌の生菌数はいずれのおからでも同程度で推移した。一方、酵母・カビの生菌数は生おからと発酵おから（ビートパルプ添加）を用いた混合飼料では1日目から3日目にかけて速やかに増加したが、発酵おから（無添加）を用いた混合飼料では酵母・カビの初期の増殖が抑えられていた。飼料の変敗を抑えた発酵おから（無添加）に特徴的な細菌が生育していたことが予想されたが、現時点での解析では見出されていない。発酵おから（無添加）が飼料の変敗を抑制した原因として酢酸などの短鎖脂肪酸の影響が考えられたが、それらの濃度は先行研究における最小抑制濃度より低く推移しており、短鎖脂肪酸以外の化合物が変敗抑制に関与していた可能性が示唆された。

文 献

- 1) 今井明夫 (2001) : 高水分粕類のサイレージ化と利用. 日本草地学会誌, **47**, 307-310.
- 2) Seppala A, Heikkila T, Mäki M, Miettinen H and Rinne M (2013): Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations. *Anim Feed Sci Technol*, **179**, 54-60.
- 3) Danner H, Holzer M, Mayrhuber E and Braun R (2003): Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl Environl Microbiol*, **69**, 562-567.
- 4) 近藤誠, 柳沢淳二, 西野直樹, 喜多一美, 横田浩臣 (2006) : 酸およびアルコール添加による牛用混合飼料 (TMR) の変敗抑制の検討. 日本草地学会誌. **52** (別), 368-369.
- 5) 水流正裕, 井出忠彦, 後藤和美, 清沢敦志, 大久保吉啓 (2011) : 高消化性ソルガム「葉月」を主原料に調製した発酵TMRの好氣的安定性. 長野県畜産試験場研究報告. **32**, 63-68.
- 6) Strom K, Sjogren J, Broberg A and Schnurer J (2002): *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environl Microbiol*, **68**, 4322-4327.
- 7) Schnurer J and Magnusson J (2005): Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci*, **16**, 70-78.
- 8) Wang F and Nishino N (2008): Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. *J Dairy Sci*, **91**, 2380-2387.