

好気的変敗が進行する発酵 TMR の嗜好性に影響を及ぼす匂い物質と アミノ酸組成の変化

服部育男, 上野大介¹, 細田謙次², 今成麻衣², 森 欣順², 河内大介²

東海大学農学部

¹佐賀大学農学部

²農研機構九州沖縄農業研究センター暖地畜産研究領域

【要約】

発酵 TMR（完全混合飼料）の好気的変敗による匂い、アミノ酸の変動と嗜好性の関係を検討した。飼料米、醤油粕等の国産飼料を主原料としている発酵 TMR について、開封後 13 日間経過した飼料（変敗区）と、試験当日の朝に開封した飼料（対照区）を用い、黒毛和種育成牛 4 頭による嗜好性試験を行った。飼料摂取量は変敗区で有意に高く、変敗区の嗜好性が高かった。発酵 TMR の匂い嗅ぎガスクロマトグラフ分析では対照区と変敗区で明らかに異なる匂いの印象が検知された。変敗区の発酵 TMR は好気性微生物の増殖、pH の上昇と酢酸の減少が認められたが、飼料成分は顕著な差は見られなかったことから、変敗進行程度は初期段階であると考えられ、匂いの違いは酢酸等の分解に由来すると推察された。嗜好性の違いに酢酸が影響している可能性は高く、味覚と嗅覚の両方に作用していると考えられるが、どちらに強く作用しているかは不明であった。嗜好性に影響する匂いの成分、あるいは特徴は匂いセンサー等により判別できる可能性が高いことが示唆された。

【背景と目的】

わが国の畜産業で使用する飼料の自給率は 25%であり、飼料の多くを輸入に依存している。輸入飼料の価格は、生産地での異常気象や新興国との需要競合、海上運賃の上昇等により上昇基調であったところに、令和 4 年のウクライナ情勢と急激な円安が追い打ちをかけて近年に無い高値を更新している。今後、前述の飼料価格に影響を与える諸要因が飼料価格を下げる方向に劇的に改善することは考えにくいため、これまでの輸入飼料に依存した不安定な畜産の生産構造から、安定的に供給され低コストでもある国内飼料資源を活用した生産構造に転換することが急務である。

国内飼料資源の有効利用に資する技術として、近年、完全混合飼料（TMR：給与される牛にとって必要な栄養成分が含まれている）を発酵させて長期保存を可能にした発酵 TMR とその製造、配布を行う TMR センターが各地で設立されている。しかし、酪農経営では発酵 TMR による給与法が長年に渡り用いられてきた一方で、和牛経営では輸入飼料が主な原料である配合飼料と粗飼料を用いることが主流であった。このような歴史から、

多くの和牛経営では発酵 TMR に馴染みがなく、和牛向けの発酵 TMR の普及が進んでいない。

和牛の経営形態は繁殖、肥育および繁殖肥育一貫経営であるが、1 戸あたりの飼養頭数は全国平均で 64.7 頭と乳牛の 103.1 頭と比較して少ない。また、頭数規模別経営体数をみると、10 頭未満の経営体が 42%を占めている（農林水産省 2022）。そのため、一般的な 500~900kg 程度に梱包された発酵 TMR を利用する場合、酪農経営と比較して1 梱包の使い切りに長い期間を要する。発酵 TMR は 50%程度の水分を含む「生もの」であることから、開封後、長期にわたって利用した場合、好气的変敗と呼ばれる腐敗が生じる。腐敗が生じた発酵 TMR は嗜好性が低下することから、廃棄することとなる。好气的変敗は発熱状況やカビの発生程度によって腐敗程度を評価しているのが現状であるが、これらは必ずしも採食性の低下と一致しない。すなわち、変敗の程度によっては、発熱しなくても1 日で採食量が減少するものもあれば、発熱が確認されても1 週間程度は採食するものもある。そのため、廃棄の判断が難しく、このことが、肉用牛経営者が発酵 TMR の導入を躊躇する要因の一つとなっている。

そこで、本課題ではウシの採食行動（給与された飼料は最初に匂いを嗅ぐ）から嗜好性に大きな影響を及ぼすと考えらえる匂いに着目し、変敗が進行した発酵 TMR の嗜好性と匂いの関係、また、変敗により分解される物質の中で匂いに影響が想定されるアミノ酸の変動との関係を明らかにする。

【材料と方法】

1. 試料調製

供試した発酵 TMR は熊本県内の TMR センターで製造・販売されている製品である。本製品は飼料米、醤油粕あるいはビール粕等の国産飼料を主原料としている。成分設計値として、CP は 22%DM, TDN は 65%DM である。これを同一製造ロットであることを指定して購入し、以下の嗜好試験に用いた。

2. 嗜好性試験

開封後日数を変えた発酵 TMR を用いて、和牛による嗜好性試験を実施した。嗜好性試験には、開封後 13 日間経過した発酵 TMR を給与する変敗区と、試験当日の朝に開封する対照区を設けた。変敗区の発酵 TMR は、開封後ほぐしてから山積みにして好気条件で放置（一日一回攪拌）し、品温が 30°C以上になったことを確認してから試験に用いた。嗜好性試験は、黒毛和種育成牛 4 頭（平均月齢 8.5 ヶ月、平均体重 238.8kg）を供試し、一対比較法で行った（服部ら 2017）。一対比較法は、2 種類の発酵 TMR を左右別々の飼槽に同時に給与して 150 分間の採食量をそれぞれ測定する方法で行った。牛が片方の飼槽の飼料を好んで摂取する可能性の影響（飼料の位置の影響）を排除するため、給与開始から 30 分後に左右の飼料の位置を入れ替えた。試験終了時に残飼を個別に回収し、重量を測定す

るとともに、給与量の差から飼料摂取量を算出した。嗜好性試験における飼料摂取量の差を分散分析により統計解析を行った。嗜好性試験に用いた発酵 TMR サンプルは、嗜好性試験当日の朝に採取し、嗅覚官能評価および発酵品質等評価に用いた。

3. 嗅覚官能評価

3.1. 嗅覚官能評価

嗅覚官能評価とは、ヒトの嗅覚で捉えたにおいを言葉で表現して数値化するための手法である。ヒトの嗅覚は個人差があることから嗅覚官能評価の嗅ぎ手（パネル）の選定には十分な配慮が必要である。パネルの選定は環境省悪臭防止法（環境省, 2017）に準拠し、5 種基準臭（パネル選定用基準臭, 第一薬品産業）を嗅ぎわける嗅覚試験に合格した 20



図 1 発酵 TMR 試料を対象とした嗅覚評価の様子。嗅覚によって“匂いの印象”を言語化する。

代の女性 4 名, 男性 4 名（基礎疾患, および喫煙歴は無し）を採用した。嗅覚官能評価に際しては、嗅覚測定法安全管理マニュアル（環境省, 2002）に準じて十分に安全を期した。また実験に使用する試料は一般生活環境に存在するものであること、実験中も途中退席が可能であること、個人データが特定できるような解析は行わないこと、をパネルに説明し了解を得た後に、当研究グループの管理の下で実施した。

採取された発酵 TMR 試料の嗅覚官能評価では、“匂い強度”と“匂いの印象”を評価した（図 1）。匂い強度は、試料内容を隠した容器から匂いを直接嗅ぎ、で評価した。匂い強度表示法は、0：無臭, 1：やっと感知できる, 2：何かわかる, 3：楽に感知できる, 4：強い, 5：強烈という表記をした。匂いの印象はパネルによる自由回答とした。

3.2. 匂い物質の捕集法および GC-O 分析法

本研究では発酵 TMR 試料の匂い物質を対象とした化学分析によって、主要な匂い物質の同定を試みた。それぞれの試料をガラスフラスコ内に封入して吸着材で捕集し、匂い嗅ぎガスクロマトグラフ（GC-O）をもちいて分析する（図 2）。GC-O とは、ガスクロマトグラフによって匂い物質を分離し、溶出してくる匂い物質をヒトの嗅覚と検出器をもちいて検出するという、機器分析と官能試験を融合させたユニークな機器である。

におい物質を含む VOCs の捕集法は既報に従った（小山ら, 2021）。VOCs は MonoTrap（RGPS：ジーエルサイエンス, 東京）をもちいて捕集した。試料を採取した直後に、ガ

ラス容器のヘッドスペースに MonoTrap を投入し、1 時間捕集した。VOC を捕集した MonoTrap は、速やかに加熱脱着装置用の脱着管に移して真鍮キャップを取り付けた。試料は 4°C で保管し、3 時間以内に機器分析に供試した。

GC-O 分析法の詳細は既報に従った (小山ら, 2021)。機器構成は、においかぎ装置 (スニッフィングポート, OP275: ジーエルサイエンス, 東京) を GC-FID (GC2010Plus: 島津製作所, 京都) に装備したものである (以後, 本システムを GC-O/FID)。捕集済み MonoTrap は加熱脱着装置 (ポータブルサーマルディソルバー, HandyTD TD265: ジーエルサイエンス, 東京: ハンディ TD) をもちいて注入した。GC キャピラリカラムは, DB-5MS (長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.5 μm : Agilent J&W, CA, USA: DB5), および異なる液相をもつ InertCap Pure-WAX (長さ 60 m, 内径 0.32

mm, 膜厚 0.5 μm : ジーエルサイエンス, 東京: WAX) を用いた。本研究では一つの試料を, DB-5MS をもちいた分析 (GC-O/FID (DB5)), および InertCap Pure-WAX カラムを用いた分析 (GC-O/FID (WAX)) に供試した。GC-O/FID 分析前には, 混合アルカン溶液 (C6~C20: ジーエルサイエンス, 東京) を測定することで保持指標 (Retention Index: RI) を算出した。

GC-O/FID 分析を実施するパネルは, 事前トレーニングとして同一の模擬試料を複数回分析し, 良好な再現性が得られた 3 名 (20 代の女性パネル 1 名, 男性パネル 2 名) を採用した。GC-O/FID 分析でパネルが感知した, においに関する 3 つの情報 (においを感知した RI, においの印象, においの強度) は, 音声認識ソフトウェア (Olfactory Voicegram: ジーエルサイエンス, 東京) をもちいて記録した。それらの GC-O 分析で感知された情報は “におい活性 (Odor activity: OA) と表記した。試料の GC-O/FID 分析の結果は, パネル 3 名が 3 回ずつ GC-O/FID 分析を実施し, 得られた全員の結果の中で 2/3 以上の割合で保持時間とにおいの印象が一致したものを OA として採用した。

3.3. GC-MS ノンターゲット分析法

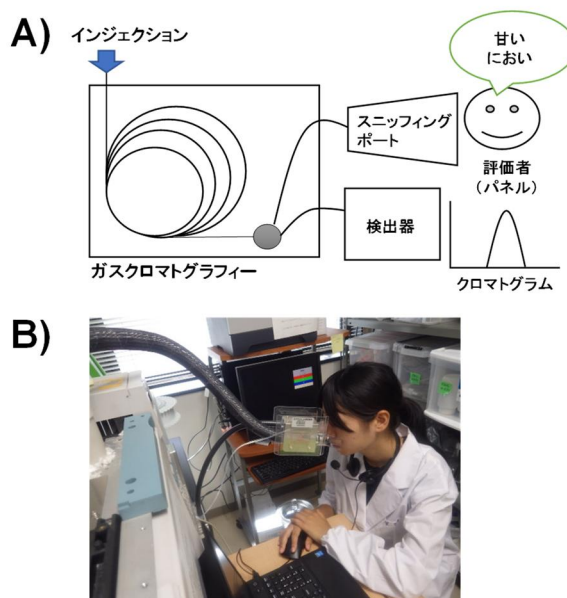


図 2 におい嗅ぎガスクロマトグラフ (GC-O)。A) 概念図, B) パネルによる GC-O 分析の様子。

におい物質を含む幅広い VOCs を検出するため、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (TQ8040: 島津製作所, 京都; 以後, GC-MS) をもちいた GC-MS ノンターゲット分析に着手した。分析には GC-O と同じ WAX カラムをもちい、分析条件は既報 (笹川ら, 2022) に従った。検出には Electron Impact (EI) スキャンモード (m/z 40-250) をもちいた。分析前に混合アルカン溶液 (C6~C30) を測定し、RI を算出した。捕集済み MonoTrap に内部標準物質 (シクロヘキサノン: 1 ng 相当) を添加し、HandyTD をもちいて注入した。物質の仮同定には、におい物質に特化したデータベースである AromaOffice (西川計測, 東京) をもちいた。AromaOffice アロマサーチをもちい、マスキロマトグラムをデコンボリューションすると共に、RI データベースおよびマススペクトルライブラリ (NIST14) を同時検索することで物質を特定した。検索結果において、ライブラリ検索の一致率が 70% 以上、かつ RI の差異が ± 30 以内の物質をリストアップした。仮同定物質リストは多変量解析で利用した。

3.4. 匂いセンサー分析

匂いセンサーとして、におい識別装置 (FF-2, 島津製作所) をもちいた。試料は、発酵 TMR を 3g 分取してサンプリングバッグ (3L) に封入し、高純度窒素ガス約 2L を注入したものを 40 °C の乾燥庫内で 1 時間静置した。乾燥庫内からバッグを取り出して室温になじませたのち、新しいサンプリングバッグ (3L) の口と口とをテフロンチューブで接続し、ヘッドスペースガスのみを新しいバッグに移したものをサンプルガスとした。

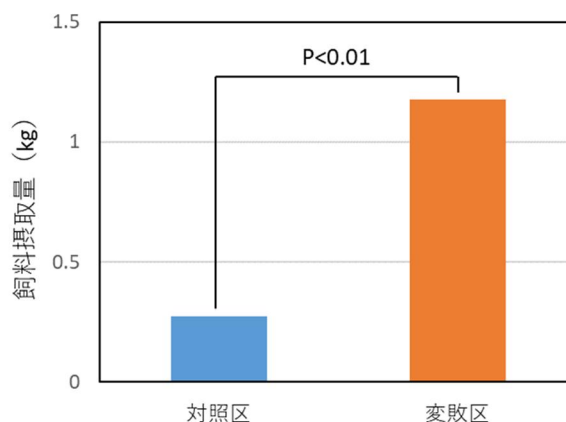
4. 発酵品質、飼料成分およびアミノ酸組成分析

発酵 TMR サンプルについて、変敗の指標として、発酵品質、飼料成分、微生物生菌数およびアミノ酸組成を測定した。発酵品質では、pH、揮発性塩基態窒素 (VBN) / 全窒素 (T-N) および有機酸を測定した。pH はガラス電極 pH メーター (D-53 型, 堀場エステック) により測定した。VBN は微量拡散法 (自給飼料利用研究会編 2009)、T-N は燃焼法 (改良デュマ法) 窒素・タンパク質測定装置 (デュマサーム, ゲルハルト・ジャパン) で測定した。有機酸含量の測定は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法 (自給飼料利用研究会編 2009) で行った。飼料成分は粗脂肪 (EE)、粗タンパク質 (CP)、粗灰分、中性デタージェント繊維 (NDFom)、酸性デタージェント繊維 (ADFom) および酸性デタージェントリグニン (ADL) を常法 (自給飼料利用研究会編 2009) により定量した。微生物相は平板培養法を用いて行った (自給飼料利用研究会編 2009)。サンプリングおよび分注したコンパクトドライ (YM および TC, ニッスイ) を 25°C で 3~5 日間培養し、一般細菌、カビおよび酵母の生菌数をカウントした。生菌数 (CFU/gFM) はカウント数 \times 希釈率を用いて行った。アミノ酸の分析では、飼料を 6N 塩酸で 110°C、24 時間の酸加水分解後、高速アミノ酸分析計 (L-8900, 日立ハイテクノロジーズ) により測定した。

【結果】

1. 嗜好性試験

図 3 に嗜好性試験における飼料摂取量を示した。変敗区の飼料摂取量は、対照区のそれと比べて有意に高い値であった。この結果、本試験においては変敗区の嗜好性が高いことが明らかとなった。



2. 嗅覚官能評価

(ア) 嗅覚官能評価

本研究では、発酵 TMR の変敗を匂いで判別する技術の開発に向け、開封直後と給餌試験後の試料を採取し、その匂いの違いを嗅覚官能評価に供試した。これまでの発酵 TMR の品質に関する既報を網羅的に調査したところ、匂いを利用した品質評価法に関するものは皆無であった。

発酵 TMR の嗅覚官能評価の結果を表 1 にまとめた。臭気強度を比較すると、対照区は 4 (強い匂い)、変敗区は 3 (はっきりわかる匂い) であった。この結果は、発酵 TMR は変敗が進むと匂いが弱くなることを示している。また匂いの印象を比較すると、対照区からは「フルーティーな、甘酒のような」という印象が、変敗区からは「ワラのような、酢酸様」という印象がみられた。このように両試験区は匂いの印象が明確に異なることが明らかとなった。

図 3 嗜好性試験における飼料摂取量

表 1 嗅覚官能評価で得られた新鮮 (対照区) および変敗 (変敗区) した発酵 TMR の匂いの印象

新鮮		
パネル	においの印象	臭気強度
A	すっぱい、酢エチ、ブドウのような、エステル様、甘酒、フルーティー	4
B	フルーティー、あますっぱい、木材、少し刺激臭、酢エチ	4
C	すっぱい、お酒っぽい、少し甘い	4
D	お酒、すっぱい、刺激様、甘い	4

* 新鮮腐敗ともに、①②③の違い無し

(変敗区)

変敗		
パネル	においの印象	臭気強度
A	比較的弱い、ワラ様、酸が多い、甘酸っぱさ無し	3
B	黒糖 (フルーティーではない)、苦甘い、酢酸様	3
C	黒糖、ワラ様、酸味が少ない	3
D	甘い感じ、牛小屋、酸っぱさ無し	3

(イ) GC-O 分析法

本研究では、匂い物質を高感度で検出できる GC-O/FID を利用した GC-O/FID とは、ガスクロマトグラフによって匂い物質を分離し、溶出してくる匂い物質をヒトの嗅覚をもちいて検出するという機器である。GC-O の嗅覚検出によって、物質によっては GC-MS の約 1000 倍の感度を得ることができると期待される。GC-O/FID 分析の結果を図 4 にまとめた。分析の結果、対照区は保持時間が

(a) GC-O/FID (WAX)

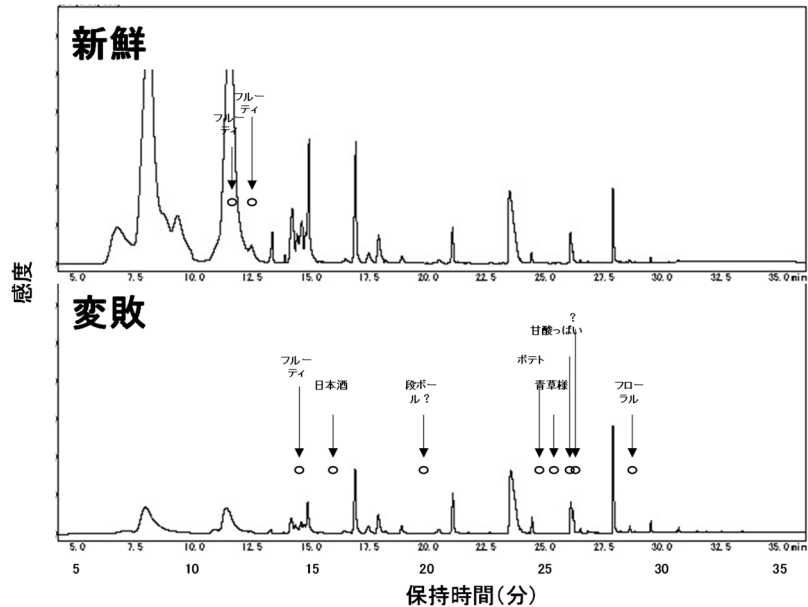


図 4 変敗した発酵 TMR の嗅覚官能評価で得られた匂いの印象

5~12 分に「フルーティー」という匂いの印象が感知された。一方で、変敗区の場合、対照区でみられた「フルーティー」という匂いの印象は感知されず、「青草様、ポテト様、甘酸っぱい」という匂いの印象が感知された。これら GC-O 分析で感知された匂いの印象の違いは、嗅覚官能評価で感知された匂いの印象と同様のものであった。

(ウ) GC-MS ノンターゲット分析

上述した GC-O 分析によって対照区および変敗区から放散される匂い物質は明確に異なることが明らかとなった。そこで、これらの匂い物質を特定するため、発酵 TMR の匂い物質を GC-MS 分析に供試した。分析の結果、約 50 のピークが検出され、それらピークを保持指標およびマススペクトルをもちいて仮同定（アノテーション）した。それら物質を表 2 と表 3 にまとめた。検出された物質のなかでは、エステル類が多く、続いてアルコール類が多く検出された。また一部でアルデヒド類、ケトン類、酸類が検出された。エステル類は一般的に「甘い、フルーティー」な、アルコールは酒様の匂いの印象をもつものが多いことから、発酵 TMR の匂い物質として妥当であると考えられる。それらの中で、対照区と比較して変敗区でピーク高さが低減したものを表 2 に、上昇したものを表 3 にまとめた。結果として、変敗することで高さが低減する匂い物質が 21 物質、上昇する物質が 12 物質検出された。変敗により低減する物質は主にエステル類であり、変敗は嗅覚官

能評価によって「フルーティー」という匂いの印象が低減することと一致した。また新鮮と比較して変敗で上昇する物質として、アルデヒド類やケトン類があげられ、これらは「生ぐさ様、油様」という匂いの印象がある。変敗試料の嗅覚官能評価で、「青草様、ポテト様」という匂いの印象が感知されたことと一致した。

表 2 発酵 TMR の GC-MS 分析でアノテーションされた、対照区と比較して変敗区でピーク高さが減少した匂い物質

ピークID	保持時間(min)	物質名	実測RI	文献RI	cas
1	6.47	Ethyl Acetate	<900	887	141-78-6
4	7.45	Ethanol	920	931	64-17-5
7	8.47	Propanoic acid, ethyl ester	958	953	105-37-3
8	8.73	n-Propyl acetate	967	971	109-60-4
11	10.08	Acetic acid, 2-methylpropyl ester	1015	1012	110-19-0
12	10.25	2-Butanol	1021	1024	78-92-2
13	10.65	1-Propanol	1034	1036	71-23-8
14	10.83	Butanoic acid, ethyl ester	1041	1050	105-54-4
15	11.09	Propanoic acid, propyl ester	1049	1044	106-36-5
16	11.37	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	1058	1052	7452-79-1
18	11.89	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	1074	1070	108-64-5
19	12.00	Acetic acid, butyl ester	1078	1088	123-86-4
20	12.29	Propanoic acid, 2-methylpropyl ester	1088	1079	540-42-1
22	12.88	3-pentanol	1106	1110	584-02-1
23	13.02	2-propen-1-ol	1110	1120	107-18-6
24	13.59	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1127	1123	123-92-2
27	14.05	1-Butanol	1141	1141	71-36-3
45	23.34	Acetic acid	1446	1450	64-19-7
47	23.82	furfural	1463	1461	98-01-1
48	25.59	benzaldehyde	1530	1520	100-52-7
53	27.65	butanoic acid	1623	1627	107-92-6

二群間比較はWelch検定を用いた

表 3 発酵 TMR の GC-MS 分析でアノテーションされた, 対照区と比較して変敗区でピーク高さが上昇した匂い物質

ピークID	保持時間(min)	物質名	実測RI	文献RI	cas
3	6.99	2-butanone	902	907	78-93-3
6	8.10	1,3-dioxolane, 2,4,5-trimethyl-	944	1020	3299-32-9
17	11.71	1,3-dioxane, 2-methyl-	1069	1044	626-68-6
21	12.35	1-Propanol, 2-methyl-	1090	1093	78-83-1
34	17.20	Furan, 2-pentyl-	1238	1232	3777-69-3
36	17.48	1-pentanol	1248	1250	71-41-0
37	17.85	3-octanone	1260	1253	106-68-3
39	18.67	Acetoin	1287	1284	513-86-0
41	20.44	propanoic acid, 2-hydroxy-2-methyl-	1346		
43	20.88	2-hydroxy-3-pentanone	1360	1368	5704-20-1
52	26.47	propanoic acid, 2-methyl-	1566	1570	79-31-2
55	28.36	butanoic acid, 3-methyl-	1666	1673	503-74-2

二群間比較はWelch検定を用いた

(ア) 匂いセンサー分析

上述した嗅覚官能評価および化学物質によって、匂いおよび匂い物質を利用して発酵 TMR の変敗程度の評価が可能であることが示された。しかし嗅覚官能評価は個人によって感じ方がことなることから、生産現場における定量的な評価が難しい。また化学分析では定量的な判定ができるが、分析に手間も費用もかかることから、現実的な判定法とは言い難い。そのような中、本研究では匂いセンサーを利用した判別法に着手した。匂いセンサーによる分析結果を図 5 に示した。分析の結果、対照区と変敗区では、匂いセンサーの応答に明確な差がみられた。

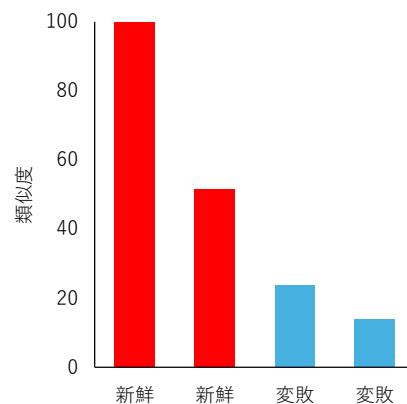


図 5 発酵 TMR の匂いセンサー分析による新鮮および変敗試料の判別

3. 発酵品質, 飼料成分およびアミノ酸組成分析

微生物の生菌数を表 4 に示した。対照区の発酵 TMR は一般細菌では 2.1×10^5 CFU/gFM, カビは 4×10^1 CFU/gFM, 酵母は $10 >$ となった。変敗区の発酵 TMR は一般細菌では 3.5×10^5 CFU/gFM, カビは 3.1×10^5 CFU/gFM, 酵母は

1.7×10⁷CFU/gFM であった.

表 4 発酵 TMR の微生物相(CFU/gFM)

	一般細菌	カビ	酵母
対照区	2.1×10 ⁵	4.0×10 ¹	10>
変敗区	3.5×10 ⁵	3.1×10 ⁵	1.7×10 ⁷

発酵品質の結果を表 5 に示した. pH は対照区の 4.0 に対して, 変敗区は 4.3 と高かった. 乳酸含量は対照区が 5.63%FM, 変敗区が 6.37%FM で同程度であった. 酢酸含量は対照区が 1.10%FM であるのに対し変敗区は 0.15%と明らかな減少が認められた. 他の VFA はプロピオン酸が 0.2%FM 水準、N-酪酸が 0.05%水準で、両区に差はなかった. I-酪酸および吉草酸は両区ともにほとんど認められなかった. VBN/T-N では, 対照区は 6.0%, 変敗区は 6.4%で差はなかった. その結果, V スコアでは対照区が 83 点, 変敗区は 89 点とともに良の評価となった.

表 5 発酵 TMR の発酵品質

	pH	有機酸組成 (%FM)						VBN/TN (%)	V-score	
		乳酸	酢酸	プロピオン酸	N-酪酸	I-酪酸	N-吉草酸			I-吉草酸
対照区	4.0	5.63	1.10	0.26	0.05	0	tr.	tr.	6.0	83
変敗区	4.3	6.37	0.15	0.17	0.06	tr.	tr.	tr.	6.4	89

tr.: trace

飼料成分の結果を表 6 に示した. 飼料成分はどの項目にも顕著な差は見られなかった.

表 6 発酵 TMR の飼料成分 (%DM)

	粗タンパク質	粗脂肪	粗灰分	NDFom	ADFom	ADL
対照区	24.9	8.5	9.7	41.9	17.7	9.2
変敗区	24.7	8.6	9.3	42.7	18.9	10.9

アミノ酸組成については現在分析中である.

微生物の増殖状況や有機酸組成の変動から, 変敗区では牧草類と同様の好気的変敗が生起したと考えられた. しかし, 変敗区の飼料成分や VBN/TN は対照区とほとんど変動していないことから, 変敗の進行程度は初期段階と考えられた.

【考察】

本試験では変敗した発酵 TMR は嗜好性が低下するとの仮定の下, 試験を実施したが,

嗜好性試験では変敗区の嗜好性が高い結果となった。好気的変敗の進行程度は発酵 TMR の品温を目安とし、品温の変動は嗜好性試験実施の 4 日前が 19°C、3 日前が 25°C、2 日前が 43°C、前日が 35°C で当日は 37°C であった。このように 2 日前で温度上昇が一度ピークに達したことから変敗が十分に進行したと判断し、嗜好性試験を開始した。しかし、発酵品質や飼料成分の分析結果で示されるように、変敗区の変敗進行程度は初期段階であると考えられた。すなわち、一般的なサイレージの好気的変敗の進行は、第一段階として酵母が増殖し、サイレージ中の糖や有機酸を利用する。これにより発熱と pH の上昇が生じる。第二段階として増殖速度が遅く、耐酸性の劣るカビの増殖が始まることにより再び発熱が生じる。カビは有機酸の他、タンパク質や細胞壁物質を分解する（内田編 1999）、というステップを踏む。本試験における変敗区はこの第一段階であったと考えられ、カビや酵母によりタンパク質が分解され、悪臭を発生される過程（大山 1971）にまで進行していなかったと考えられた。そのため、変敗区の嗜好性が悪影響を及ぼさなかったと考えられた。一方、匂い関連分析結果からは両区に明らかな違いが認められた。官能評価における「刺激臭」や「すっぱい」、あるいは GC-O 分析における「フルーティ」な匂いの消失は有機酸分析の結果から変敗の初期段階として酢酸やプロピオン酸等の分解に由来する匂いの変化と推察された。

一般に飼料中の繊維成分含量は、飼料の堅さや摂取後の第一胃の膨満度に関連し、採食量に影響を及ぼすと考えられている（Allen 2000）。本試験では、対照区と変敗区で同一製造ロットの発酵 TMR を用いるとともに、分析によりすべての飼料成分に両区で差がないことを確認している。加えて、嗜好性試験における第一胃の膨満度への影響を少なくするため、試験期間を短く（150 分間）設定した。これらのことから、本試験では飼料成分が嗜好性に及ぼす影響はほとんどなかったと考えられた。一方、飼料の嗜好性に影響を及ぼす化学因子としては味覚あるいは嗅覚を刺激する化学物質が挙げられる（土肥 1996）。萬田ら（1994）は酸味物質として酢酸を濃度 0.02%~1.25% で段階的に飼料に添加してウシの嗜好性試験を実施したところ、0.08% 以上で強い拒絶反応を示したことを報告している。本試験において、変敗区の酢酸含量は 0.15% FM で対照区の 1.1% FM より少なかった。しかし、萬田らの試験（1994）と比較すると変敗区においても拒絶反応を示す高濃度の酢酸を含有しており、酸味が嗜好性の違いに影響しているかは不明である。一方、嗅覚への作用として、変敗区は酢酸の減少に由来すると考えられる「刺激臭」、「すっぱい」および「フルーティな匂い」が消失しており、これらは一般的に嗜好性に負に作用すると考えられることから嗜好性の改善に寄与したと考えられた。したがって、本嗜好性試験における嗜好性の違いに酢酸が影響している可能性は高く、味覚と嗅覚の両方に作用していると考えられるが、どちらに強く作用しているかは不明であった。一方、本試験における対照区と変敗区における匂いと嗜好性の明確な違いから、匂いが嗜好性に影響を及ぼし、その成分、あるいは匂いの特徴は味覚センサー等により判別できる可能性が高いことが示唆された。したがって、発酵 TMR の変敗に伴う、匂いの変化を測定・評価することにより、嗜

好性の変化に基づく給与限界の判断が可能となると考えられた。今後はさらに変敗が進行し、嗜好性が低下した状況下での匂い成分、あるいは匂いのもととなる原料の構成が異なる発酵 TMR での匂い成分と嗜好性の関係について検討する必要がある。

【引用文献】

Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short - term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 1598–1624.

土肥宏志 1996. 草食家畜の嗜好性と化学因子. *日本畜産学会報*, 67 (3) : 314-321.

服部育男, 神谷 充, 塔野岡卓司, 加藤直樹, 林 義朗, 細田謙次. 2017. 飼料用大麦の穂形状の違いが黒毛和種育成牛における嗜好性に及ぼす影響. *日本暖地畜産学会報*, 60 : 47-50.

自給飼料利用研究会編. 2009. 粗飼料の品質評価ガイドブック. pp. 68-67. 社団法人日本草地畜産種子協会. 東京都.

環境省 (2017) 三点比較式フラスコ法について.
https://www.env.go.jp/air/akushu/olf_manual.html.

環境省 (2002) 嗅覚測定法安全管理マニュアル.
<https://www.env.go.jp/air/akushu/safety/index.html>.

萬田正治・浦田克博・野日鉄也・渡邊昭三. 1994. 牛の味覚に関する行動学的研究. *日本畜産学会報*, 65 (4) : 362-367.

MS-DIAL (2023) <http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html>. Accessed in January 2023.

NIST (AMDIS) <http://www.amdis.net/index.html>, Accessed in January, 2023.

小山玲音, 出村幹英, 野間誠司, 林信行, 原口智和, 宮本英揮, 笹川智史, 龍田典子, 上野大介 (2021) スミレモ *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) Martius のにおい嗅ぎガスクロマトグラフィによるにおい物質の同定. *におい・かおり環境学会誌*, 52, 226-232.

大山 嘉信. 1971. サイレージ発酵に関連する諸問題. *日畜会報*, 42 : 301-317.

笹川智史, 古藤田信博, 田中義樹, 池田繁成, 松元篤史, 佐藤克久, 上村智子, 小山玲音, 上野大介 (2022) 貯蔵臭をもつウンシュウミカンの選別法開発 (第 1 報) -可食部における貯蔵臭物質の同定-. *におい・かおり環境学会誌*, 53, 357-365.

Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., Arita, M. (2015) MS-DIAL: data-independent MS/MS

deconvolution for comprehensive metabolome analysis. Nat. Methods, 12, 523-526.

内田仙二編. 1999. サイレーズ科学の進歩. Pp106-109. デイリージャパン, 東京