埋草の生化学的研究 (第1報) 酸定量並に品質に就て

須 藤 浩 (鹿児島師範学校化学教室)

(昭和 24 年 9 月 26 日 受理)

Biochemical Studies on Silage.

Part I. On the Estimation of Organic Acids and Quality of Silage.

By Hiroshi SUTOH (The Kagoshima Normal College)

I. 緒言 埋草の利用は家畜飼養上重要であるが、本邦にはこの方面の研究が比較的少ないので、著者はこの方面の研究を企圖して來た。

埋草製造は一つの飼料貯藏法であり、かつ極めて簡易な加工法である。しかし埋草の品質の良否は家畜の嗜好に影響することは勿論、その成分、醗酵期間中の損失、延いては家畜生産物の良否にまで影響し經濟上に及ぼす影響も大きい。

埋草の品質を鑑定する方法は種々考えられるが、化學的方法によるのが妥當で便利である。優良な埋草は乳酸醗酵が多く行われ、酪酸醗酵のようなものは少ない。従つて乳酸の含量が多く酪酸が少く、酪酸は全く含まれないので、埋草の品質の良否は、その生成した有機酸の種類と含量によつて判斷される。これらの酸の定量法は WIEGNER⁽¹⁾ 氏によつて提案されたが、その後 LEPPER⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾、FLIEG⁽²⁾ 氏等によつてその變法が報告された。埋草はとり出しておくゝ變質する可能性が多いので、研究上多數を取扱うような場合には迅速にかつ簡易に定量することが大切である。著者は先ずこれらの諸法を種々の埋草を試料にして比較してみたので、その結果を記して第1報としたい。

II. 實驗材料 主として甘藷蔓埋草を使用した。その材料は本校寄宿舎周圍の空地を利用して栽培したものであつた(11月19日收穫)。これを11月22~23日に埋藏して、1月2日より順次開き2月19日に及び、分析用に供した。尚このほか、すゝめのえんどう埋草、はこべ埋草、その他數種類を使用した。

III. 酸の定量法 實驗を行つた方法を一括表示すると第1表の通りである。

Table 1. Methods of Estimation of Organic Acids in Silage.

Method	Acid	E (Acetic acid)	B (Butyric acid)	Notes
WIEGNER (1926)		3.9620 (D ₂ +D ₃) - 1.3724 D ₁ M% = 0.0225 (4 G - E - B ₁)	2.0641 D ₁ - 1.9920 (D ₂ +D ₃)	Extract 200 cc
LEPPER: (a) (1933)		Extract without H ₂ SO ₄ (added)		Extract 200 cc
	D ₃	3.84 (D ₂ +D ₃) - 1.26 D ₁	1.96 D ₁ - 1.86 (D ₂ +D ₃)	3 times 100 cc
	D ₂	7.31 D ₂ - 1.90 D ₁	2.27 D ₁ - 3.54 D ₂	Twice 100 cc
(b)		Extract with H ₂ SO ₄ (added)		
	D ₃	3.42 (D ₂ +D ₃) - 0.73 D ₁	1.63 D ₁ - 1.71 (D ₂ +D ₃)	
	D ₂	6.12 D ₂ - 1.17 D ₁	1.82 D ₁ - 3.05 D ₂	
Simplified (1938)		Extract 250 cc + 2 g Citric acid { 4.44 D ₂ - 2.16 D ₁ % E = E · 0.012	{ 2.50 D ₁ - 1.95 D ₂ % B = B · 0.0176	Continuously twice 100 cc
I _a		Ext. 200 cc + (1:1) H ₂ SO ₄ 5 cc ; D ₁ (100 cc), D ₂ (50 cc) { 6.41 D ₂ - 1.42 D ₁ { (0.0962 D ₂ - 0.0213 D ₁) %	{ 1.96 D ₁ - 3.09 D ₂ { (0.0431 D ₁ - 0.0680 D ₂) %	Distil continuously (100 cc and 50 cc)
I _b		{ 3.82 D ₂ - 3.94 D ₁ { (0.0572 D ₂ - 0.0591 D ₁) %	{ 3.62 D ₁ - 1.45 D ₂ { (0.0797 D ₁ - 0.0319 D ₂) %	Same as I _a but D ₁ (50 cc), D ₂ (100 cc)

II	Extract 200 cc+2 N-H ₂ SO ₄ 10 cc; D ₁ (100 cc), D ₂ (100 cc) $\left\{ \begin{array}{l} 7.15 D_2 - 1.82 D_1 \\ (0.1073 D_2 - 0.0273 D_1) \% \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} 2.20 D_1 - 3.35 D_2 \\ (0.0484 D_1 - 0.0737 D_2) \% \end{array} \right.$	
III _A	Extract 200 cc+20 % Tartaric acid 5 cc; D ₁ (100 cc) D ₂ (50 cc) $\left\{ \begin{array}{l} 7.21 D_2 - 1.75 D_1 \\ (0.1082 D_2 - 0.0263 D_1) \% \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} 2.16 D_1 - 3.43 D_2 \\ (0.0475 D_1 - 0.0756 D_2) \% \end{array} \right.$	Distil continuously
III _B	$\left\{ \begin{array}{l} 4.32 D_2 - 4.77 D_1 \\ (0.0648 D_2 - 0.0715 D_1) \% \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} 4.08 D_1 - 1.66 D_2 \\ (0.0898 D_1 - 0.0366 D_2) \% \end{array} \right.$	D ₁ (50 cc) D ₂ (100 cc)
IV	Extract 200 cc+(1:1) H ₂ SO ₄ 5 cc; D ₁ (100 cc), D ₂ (50 cc) $\left\{ \begin{array}{l} 6.41 D_2 - 1.42 D_1 \\ (0.0962 D_2 - 0.0213 D_1) \% \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} 1.96 D_1 - 3.09 D_2 \\ (0.0431 D_1 - 0.0680 D_2) \% \end{array} \right.$ Remaining solution 55cc+2.5 cc conc. H ₂ SO ₄ +2.5 g CrO ₃ ; boil for 5 minutes, add 100 cc H ₂ O through reflux condenser and distil 50 cc (D ₃) within 5 min. $\left\{ \begin{array}{l} M = 5.47 D_3 - (0.38 E + 0.13 B) \\ \% \text{ of } M = 0.123 D_3 - (0.0086 E + 0.0029 B) \end{array} \right.$	Distil continuously
FLIEG (1937)	Extract 200 cc+5 cc conc. H ₂ SO ₄ ; D ₁ , D ₂ , D ₃ (100 cc) 3.729 (D ₂ +D ₃) - 1.001 D ₁ ; 1.84 D ₁ - 2.076 (D ₂ +D ₃) Remaining solution+(1:1) chromic acid; boil for 15 min., add 100 cc H ₂ O and distil 100 cc (D ₄). M = 2.434 D ₄ - 0.18 E.	

IV. 實驗結果及考察 定量用の浸出液を、處定の時間で定量した場合と、他は試料を5日後に濾過して分析した場合とを比較した。液の色や香など外觀は5日後においても變らなかつた。

Table 2. Change of Acid Content of the Silage Extract after 5 Days.

	Lactic acid	Acetic acid		Butyric acid		Total acid	Ratio			pH
		free	comb.	free	comb.		L.	A.	B.	
Control	0.154	0.104	0.241	0.063	0.092	0.654	23	53	24	4.8
After 5 days	0.102	0.078	0.202	0.027	0.110	0.519	20	54	26	5.3

Table 3. Change of pH-Values.

No.	Days	1	2	3	4	5	6	7	8
(1) pH	5.4	5.5	6.8				7.2		
(2) pH	5.5	5.6	6.8				7.1		
(3) pH	5.2	5.5	6.9	6.9	7.3			7.7	
(4) pH	5.1	6.2	6.5						

放置により pH が大になり、乳酸が減じ、酪酸を増加し、品質が悪くなることが知られる。

蒸溜装置の 500 cc 丸底フラスコの頸の長さは蒸溜時間、從つて溜出係數に關係すると思われるので 9.5 cm, 18 cm のフラスコを比較した(分析試料れんげそう埋草)。規定時間内に蒸溜を終るための(調節容易な)限界は 9~10 cm の間にあると推定された。

甘藷蔓埋草を材料として WIEGNER, LEPPER 氏の方法で遊離酸を定量した結果は第4表の通りである。

こゝに乳酸は D₂ 法によつて得たデータから計算したものである(WIEGNER の式 M %).

次に總酸の定量について比較した結果は次表の通りである(試料甘藷蔓埋草)。

Table 4. The Results Obtained by Means of Various Estimations.

Method Added	Moisture	Lactic acid	Acetic acid			Butyric acid			A + B		
			WIEGNER	LEPPER		WIEGNER	LEPPER		WIEGNER	LEPPER	
				D ₂ -	D ₃ -		D ₂ -	D ₃ -		D ₂ -	D ₃ -
(1) Rice Bran	85.0	0.783	0.381	0.375	0.379	0.004	0.005	0.011	0.385	0.380	0.390
(2) Alfasil	84.1	0.615	0.289	0.268	0.286	-0.063	-0.043	-0.055	0.226	0.225	0.231
(3) HCl+S.P. Meal	84.9	0.708	0.305	0.298	0.303	-0.034	-0.023	-0.027	0.271	0.275	0.276
(4) Formalin+Acid	85.7	0.654	0.377	0.361	0.371	-0.075	-0.058	-0.066	0.302	0.303	0.305
(5) Acid+S.P. Meal	84.5	0.736	0.239	0.228	0.237	-0.027	-0.015	-0.002	0.212	0.213	0.235
(6) None	85.6	0.801	0.360	0.343	0.357	-0.030	-0.012	-0.022	0.330	0.331	0.335

Table 5. Comparison of the Results of Various Estimations

No. and Samples	Methods	N/20 NaOH	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid
1. Added acid	LEPPER (Simplified)	D ₁ 5.19, D ₂ 7.08	0.243	-0.015	
2. " Lower layer Moisture 85.6%	WIEGNER LEPPER D ₃ - D ₂ - FLIEG	D ₁ 6.11 D ₂ 3.89 D ₃ 2.41 D ₄ 24.95	0.249 0.252 0.250 0.261	0.001 -0.009 -0.016 -0.040	1.294
3. Added Rice Bran (Crude) Lower layer Moisture 83.8%	LEPPER (S.) I _a	D ₁ 5.38, D ₂ 7.38 D ₁ 4.42, D ₂ 7.36	0.249 0.322	-0.008 -0.040	
4. Acid solution+ Grated sweet potato Lower layer Moisture 85.7%	LEPPER WIEGNER LEPPER D ₃ - D ₂ - FLIEG	5.42, 27.36 D ₁ 6.71 D ₂ 4.38 D ₃ 2.72 D ₄ 23.64	0.252 0.285 0.287 0.284 0.296	-0.014 -0.007 -0.027 -0.025 -0.054	1.212
5. Acid solution +Grated sweet potato Lower layer Moisture 85.7%	LEPPER II III _a III _b	5.50, 24.11 5.68, 3.84 2.56, 6.50	0.291 0.266 0.238	-0.055 -0.021 -0.008	
6. No acid soln. Lower layer Moisture 85.4%	FLIEG WIEGNER LEPPER D ₂ - D ₃ - I _a II III _a III _b	D ₁ 10.37 D ₂ 4.62 D ₃ 2.82 D ₄ 21.25 7.01, 4.44 6.48, 4.28 6.62, 4.03 2.94, 7.24	0.261 0.229 0.242 0.260 0.278 0.277 0.262 0.259	0.080 0.145 0.105 0.092 0.000 0.002 0.010 -0.001	1.091
7. Grated sweet potato Inferior quality Moisture 87.7%	FLIEG WIEGNER LEPPER D ₃ - D ₂ -	{ D ₁ 5.09 D ₂ 2.37 D ₃ 1.47 D ₄ 2.15	0.135 0.123 0.137 0.128	0.031 0.063 0.040 0.045	0.081
8. Grated sweet potato Medium quality	FLIEG WIEGNER	{ D ₁ 6.56 D ₂ 3.31	0.191 0.171	0.029 0.071	0.205

	LEPPER	D ₃ - D ₂ -	{ D ₃ 1.86 D ₄ 4.72	0.189 0.189	0.041 0.040	
9 Ditto Middle Layer	LEPPER	(S.)	D ₁ 6.32 D ₂ 6.95	0.207	0.040	
10. Grated sweet potato +Crude rice bran ; Middle layer Moisture 85.2%	FLIEG WIEGNER LEPPER	D ₃ - D ₂ - (Simpld.)	{ D ₁ 14.58 D ₂ 6.57 D ₃ 3.46 D ₄ 8.90	0.342 0.296 0.344 0.347 0.345	0.132 0.223 0.112 0.143 0.155	0.392
11. Grated sweet potato +Crude rice bran	LEPPER	III _a (Simpld.)	6.77, 4.11 7.24, 8.87	0.267 0.285	0.011 0.014	
12. Common (Kamoiike A. B. E.) Moisture 84.7%	FLIEG WIEGNER LEPPER	D ₃ - D ₂ - (Simpld.)	{ D ₁ 23.82 D ₂ 10.80 D ₃ 5.71 D ₄ 25.50	0.566 0.491 0.568 0.573 0.508	0.210 0.358 0.233 0.229 0.231	1.220
13. Grated sweet potato +Rice bran ; Middle layer Moisture 85.2%	LEPPER	(Simpld.)	11.61, 10.90 11.25, 5.19	0.280 0.266	0.137 0.142	

次に野草すゝめのえんどう，はこべ埋草で實驗した結果は次の表のとおりである。

Table 6. Comparison of the Results of Various Estimations.

No. and Samples	Methods	N/20 NaOH	Acetic acid	Butysic acid	Lactic acid
14. Hairy Vetch silage; Lower Layer Moisture 70.0%	FLIEG LEPPER I _a	{ D ₁ 12.11, D ₂ 7.66 D ₃ 5.04, D ₄ 1.73 14.57, 9.55	0.529 0.608	-0.090 -0.021	2.138
15. Chickweed silage ; Moisture 82.6%	FLIEG LEPPER I _a	{ D ₁ 15.81, D ₂ 9.69 D ₃ 6.12, D ₄ 40.01 15.26, 10.23	0.647 0.659	-0.087 -0.037	2.003
16. Hairy Vetch silage; Moisture 70.2%	FLIEG LEPPER IV	{ D ₁ 14.49, D ₂ 9.59 D ₃ 5.67, D ₄ 44.11 D ₁ 14.04, D ₂ 9.09 D ₃ 25.93	0.636 0.555	-0.110 -0.003	2.238 2.864
17. Chickweed silage ; Moisture 81.6%	LEPPER IV III _a	{ D ₁ 15.50, D ₂ 9.96 D ₃ 19.85	0.630 0.640	-0.009 -0.010	2.083
18. Hairy Vetch silage; Moisture 85.8%	FLIEG LEPPER IV	{ D ₁ 20.08, D ₂ 12.58 D ₃ 7.72, D ₄ 44.59 D ₁ 17.07, D ₂ 11.41 D ₃ 20.15,	0.834 0.733	-0.114 -0.040	2.029 2.062
19. Ditto Moisture 71.7%	FLIEG LEPPER IV	{ D ₁ 18.72, D ₂ 11.30 D ₃ 7.36, D ₄ 45.86 D ₁ 12.62, D ₂ 8.59 D ₃ 22.80,	0.762 0.557	-0.094 -0.040	2.298 2.489

以上の結果より，埋草の品質の良否如何によつても多少その傾向を異にするようであるが，これらの諸法は埋草の醗酵状態，品質鑑定等の實用的目的に對しては，結果は大差がないものと認められる。従つて品質鑑定乃至種々の埋草の比較研究等には，遊離酸のみを定量しようとする場合には LEPPER 氏の 2 回蒸溜法を應用し，總酸（乳酸を含む，遊離+結合）定量には第 1 表Ⅳによるのが便利である。

V. 摘 要 (1) 埋草の品質に關係する有機酸の定量法を比較した。即ち WIEGNER, LEPPER, FLIEG 氏

の法を、甘藷蔓埋草(種々の方法で製造したもの)、すゝめのえんどう、はこべ、れんげそう等の埋草に適用し、その結果を比較した。

(2) 鑑定等の實際上の目的には何れの法を採用しても大差ないものと認めることができ、従つて遊離酸定量の場合は LEPPER 氏の 2 回蒸溜による法、總乳酸定量する場合には 3 回蒸溜法(第 1 表 IV)を應用するのが便利と思われる。

(3) 定量用浸出液調製の際、數日放置すると乳酸量を減じ、酪酸量を増加し、pH も大になつてくる。とり出した埋草、供試用浸出液は迅速に處理する要がある。

(4) 蒸溜の際使用する 500 cc フラスコの頸の長さについても實驗した。

特殊の埋草への應用、蟻酸含量、蟻酸誤差、pH との関係等については更に研究を要する。

本報の一部は昭和 18 年 4 月、日本農藝化學會大會で講演した。研究費の一部は文部省科學研究獎勵金(1943)によつた。記して感謝の意をあらわす

- (1) O. FLIEG *Biedermanns Ztb. B. Tierern.*, 9, 2, 178-183 (1937)
- (2) " : *Z. f. Tierernährung u. Futtermittelkunde*, 3, 1, 53-66 (1939)
- (3) W. KIRSCH, u. H. HILDEBRANDT : *Die Silofutterbereitung nach dem Kaltgärverfahren*, S. 28 (1930)
- (4) W. LEPPER : *L. V. S.*, 117, 113 (1933)
- (5) " : *Z. f. Tierernährung u. Futtermittelkunde*, 1, 147-154 (1938)
- (6) " : *ibid.*, 187-190 (1938)
- (7) G. WIEGNER : *Anl. z. quant. Agrikulturchem. Praktikum*, 254 (1926)
- (8) H. SUTOH, *Nippon-Tikusan-Gakkwaihō*, 14, 4, 272-274 (1942)

Summary

The author has applied WIEGNER's original method, different kinds of LEPPER'S modified methods and FLIEG'S method in estimating organic acids of silages prepared from *Ipomaea batatas* L. var. *edulis*, *Vicia hirsuta* KOCH. and *Stellaria media* CYR. As a result of his experiment, he has regarded LEPPER'S simplified method as the most practical and convenient one. Some other data of studies on silage were also reported.

生物物質中に於けるオキシム定量法に就て

近 藤 弘・秋 田 利 彦 (九州大學農學部農産製造學研究室)

昭和 24 年 9 月 20 日 受 理

On the Colorimetric Determination of Oximes in Biological Materials.

By Hiroshi KONDO and Toshihiko AKITA

(The Agricultural Chemistry Institute, Kyushu University)

緒言 最近細菌による窒素固定の中間産物としてオキシムの出現する事が報ぜられ⁽¹⁾、吾等の研究室に於てはヒドロキシルアミン誘導體のバイラス病發現效果に關する實驗⁽²⁾に關連して、是等の物質が動植物界に相當廣く分布する事も明瞭となつたが、茲には其の定量法に關する部分のみを記述する。生物組織中に於ける此の種含窒素物の含量は僅微のものであり、材料、目的等に應じて測定法に種種改良を要するのであるが、何れも亞硝酸の微量檢定法に基礎を置くものであり、之をヒドロキシルアミン及びオキシムに適用するものであるから、初め前二者に關するものを記載して後、後者に就て記述する。

I. 亞硝酸、ヒドロキシルアミンの定量 微生物體に對する亞硝酸定量法の應用等に就て比較的精密な検討をした BLOM 氏の報告⁽³⁾に基いて ENDREŠ⁽⁴⁾、VIRTANEN⁽⁵⁾ 氏其の他は之を用いて根瘤菌、アゾトバクターなどの窒素代謝に關する研究を施行したが、著者等は是等の方法を逡巡し追試した處、2, 3 の點に於て補足すべ