

## 異なる添加脂質が人工ルーメン培養における牧草成分の 発酵と微生物増殖に及ぼす影響

梁 云穆・藤田 裕\*

岩手大学大学院連合農学研究科, 盛岡市 020

\*帯広畜産大学, 畜産管理学科, 帯広市 080

### Effect of different source of lipids on ruminal fermentation of grass components and microbial growth *in vitro*

Un Mok YANG and Hiroshi FUJITA\*

The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University,  
Morioka-shi 020

\*Department of Animal Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,  
Obihiro-shi 080

キーワード : 牧草脂質, タロー, 大豆油, ルーメン内発酵, 微生物態N

Key words : grass lipids, tallow, soybean oil, ruminal fermentation, microbial N

#### 要 約

メン羊ルーメン液をイノキュラムとする牧草の *in vitro* 培養時に添加した脂質の種類の違いが牧草成分の発酵と微生物増殖に及ぼす影響を検討した。培養試験は、脂質を除去した乾草（オーチャードグラス）試料に牧草脂質（乾草のエーテル抽出物）、タローおよび大豆油をそれぞれ3および6%添加してルーメン液とMcDOUGALL 処方的人工唾液の混合培養液により12時間行った。微生物態窒素量は、脂質添加により低下する傾向があり、特に6%添加区ではいずれも低下割合が大きかった。バクテリア態とプロトゾア態の比率では、脂質添加によりプロトゾア態の比率が減少する傾向がみられ、特にタローおよび大豆油で顕著であった。また、アンモニア態窒素量はいずれの脂質添加においても微生物態窒素量の変化と負の対応関係を示した。NDF消失率は脂質添加により低下する傾向はみられず、大豆油添加ではむしろ高まる傾向があり、固形物消失率では脂質添加による大きな変化はみられなかった。VFA濃度は脂質添加により低下する傾向があるが有意差は認められず、VFAモル比は処理間にほとんど差異がなかった。

#### 緒 言

一般に、飼料の脂質は高濃度ではルーメン内発酵に対する抑制作用を持っていることが広く指摘されてお

り (IKWUEGBU ; 1982, PALMQUIST and JENKINS ; 1980, PALMQUIST ; 1984, SUTTON *et al.* ; 1983), また牧草中に含まれる脂質区分も牧草中繊維成分のルーメン内分解に対して抑制的に働くこと (HINO and NAGATAKE ; 1993), ならびに牧草中のエーテル可溶成分含量が牧草蛋白質のルーメン内分解性と負の部分相関をもつこと (FUJITA *et al.* ; 1991) が明らかにされている。これらの事実は、牧草脂質によってルーメン内における飼料成分の分解が制御される可能性を示唆している。

本報では、このような牧草脂質のルーメン内発酵に対する機能的特性を明らかにする研究の基礎的段階として、牧草脂質のルーメン内発酵抑制作用が飼料エネルギーの強化に用いられる一般的な動植物性油脂のそれと同様なものであるかどうかを検討する目的で人工ルーメン培養試験を行った。

#### 材料および方法

##### 1. 供試試料および供試動物

帯広畜産大学附属農場草地で収穫したオーチャードグラス単播1番刈乾草を粉碎（1mmの篩目を通させる）したものを材料として、牧草脂質区分と脂質除去区分を調製した。すなわち、材料乾草についてエチルエーテルにより脂質抽出を常温で20時間行い、抽出区分から常温でエーテルを蒸散除去して得られた区分を牧草脂質区分とし、エーテル抽出残渣を脂質除去区分として、それぞれ培養試験に用いた。供試乾草およびそのエーテル抽出残渣（カッコ内に示す）の化学組

成(水分は原物中%, それ以外は乾物中%を示す)は, 粗蛋白質 12.1 (11.5), 粗脂肪 2.7 (0.06), 粗灰分 8.1 (8.2), 粗繊維 31.4 (32.0), NDF 66.9 (66.0) および水分 12.0 (10.5) であった。

ルーメン液採取用の供試動物は, ルーメンフィスチュラを装着したサフォーク種去勢メン羊(平均体重  $72.8 \pm 10.6$  kg) 3頭を用いた。これらのメン羊には1日当たり乾物 55 g/体重  $\text{kg}^{0.75}$  を給与基準量として, オーチャードグラス乾草とアルファルファ・ヘイキューブを原物で 1:2 の割合で給与した。供試メン羊はルーメン液採取開始の7日前より代謝ケージに収容し, 飼料給与は 08:00, 17:00 の1日2回とし, 飲用水, 食塩および微量ミネラルブロックは自由摂取とした。

## 2. 試験処理区分と培養試験

エチルエーテルにより脂質区分を抽出した残渣 2.5 g を対照区(脂質無添加)として用い, 牧草からの抽出脂質, タロー(牛脂, 関東化学, 東京)および大豆油(関東化学, 東京)を対照区に対して原物当たり 3% および 6% 添加して全量を 2.5 g にし, それぞれの試験区とした。

培養試験は, *in vitro* 人工ルーメン法によって行った。培養容器としては 300 ml 容三口丸底フラスコを用い, 培養液は, McDOUGALL (1948) 人工唾液にルーメン液を加えた混合培養液を用いた。ルーメン液はメン羊 3頭から, 午前の給餌前にナイロン濾過布装着の吸引器により採取したものを個体別に使用した。採取したルーメン液は 30~40°C に保温した保温瓶内に貯留し, 採取後 1 時間以内に培養試験に供するようにした。

培養方法: 培養容器中に上記した試験試料を入れ, これに予め  $\text{CO}_2$  を 60 分間通気させた McDOUGALL の人工唾液 100 ml と, 上記の方法で採取したルーメン液 100 ml とを混合して加え, 39°C に設定した恒温槽で  $\text{CO}_2$  を通気しながら 12 時間培養した。

## 3. 培養物の処理および測定項目

培養物は培養終了後ただちに氷冷し, 微生物の活動を停止させた。その後培養物は氷冷しながら全体を 250 ml にメスアップし, 遠心分離を行った。遠心分離によるルーメン内容物の分別法はいくつか報告されているが (HINO *et al.*; 1973, HINO and NAGATAKE; 1993, MEYER *et al.*; 1967, SMITH and McALLAN; 1974, 菅原ら; 1958), 本試験においては微生物態窒素総量と同時に, バクテリア態区分とプロトゾア態区分の比率を測定するため, プロトゾア態区分は HINO *et al.* (1973) の方法に準じて, バクテリア態区分は MEYER *et al.* (1967), SMITH and McALLAN (1974), 菅原ら (1958) の方法にもとづいて次の通りに行った。まず, 250 ml の培養液を  $400 \times \text{g}$  (4°C・5分) で遠心分離し, 上澄液を分別しておく。次に沈澱物について蒸留水で飼料片をよく洗浄し,  $400 \times \text{g}$  で再び遠心分離

を行い上澄液と沈澱物を分別する。この沈澱物区分を飼料片およびプロトゾア態区分とする。上澄液は全量を  $18,000 \times \text{g}$  (4°C) で 30 分間遠心分離し, 沈澱物をバクテリア態区分とする。得られたそれぞれの試料をプラスチックビーカーに移し, 凍結乾燥機(東洋サービスセンター; VD-60)により乾燥処理し, 固形物と NDF 量を測定して, それぞれ培養前後における差から消失率を算定した。また, 同試料について微生物態窒素量およびバクテリア態区分とプロトゾア態区分の比率を測定した。上澄液については, アンモニア態窒素量および VFA 濃度を測定した。

## 5. 分析方法

供試試料の一般成分は常法によって分析した。中性ディタージェント繊維 (NDF) については, VAN SOEST の方法 (1971) によって定量した。微生物態窒素の定量は, プリン塩基をマーカーとする ZINN and OWENS の方法 (1986) に従って測定した。培養液中の揮発性脂肪酸 (VFA) についてはガスクロマトグラフィー(島津 GC-3 BF)により, アンモニア態窒素は微量拡散法によって測定した。

## 結果および考察

培養後の 1 培養器あたりの微生物態窒素総量ならびにそのプロトゾア態区分とバクテリア態区分の比率およびアンモニア態窒素量を表 1 に示した。微生物態窒素総量は, 対照区(脂質無添加)に対していずれの種類の脂質添加によっても低下傾向があり, 特に 6% 添加区では低下割合が大きく, 対照区との差は有意であった ( $P < 0.05$ )。また, バクテリア態区分とプロトゾア態区分の比率では, 脂質添加によりプロトゾア態区分の比率が減少する傾向があった。その傾向は, 大豆油添加では 3 および 6% 添加において, それ以外では 6% 添加において, それぞれ著しく, 牧草脂質はタローおよび大豆油に比べてその減少が少ない傾向がみられた。一方, 培養物中のアンモニア態窒素量は, 牧草脂質の添加で増加傾向がみられ, 特に 6% 添加の場合, 高くなる傾向があった。また, 各試験区を通して脂質添加 3% に比べて 6% 添加で高くなった。

培養後の固形物と NDF の消失率を図 1 に示した。培養後の固形物消失率はいずれの脂質添加によってもあまり大きな変化はみられなかった。また, NDF 消失率も, 牧草脂質およびタロー添加においてあまり大きな変化はみられなかったが, 大豆油 3% と 6% 添加区ではむしろ増加する傾向にあった。

培養後の VFA 総濃度と各 VFA それぞれのモル比を表 2 に示した。脂質 6% 添加により VFA 濃度が低下する傾向がみられたが, 各処理間に有意差はなかった。また, VFA モル比においても各処理間にほとんど差異はみられなかった。

本試験に用いた牧草脂質または一般動植物油脂はい

Table 1 Changes in microbial and ammoniacal nitrogen

Treatment	Microbial N (mg/vessel)	Proportion (%)	NH <sub>3</sub> -N (mg/vessel)
		bacterial : protozoal	
Control	28.9 ± 7.7 <sup>a</sup>	53.9 : 46.1 <sup>ab</sup>	12.5 ± 2.2 <sup>ab</sup>
Grass lipids			
3%	28.5 ± 8.3 <sup>ab</sup>	51.9 : 48.1 <sup>a</sup>	12.7 ± 2.0 <sup>ab</sup>
6%	23.1 ± 11.1 <sup>c</sup>	58.4 : 41.6 <sup>abc</sup>	13.7 ± 2.4 <sup>a</sup>
Tallow			
3%	27.7 ± 9.7 <sup>ad</sup>	55.1 : 44.9 <sup>ad</sup>	11.2 ± 2.2 <sup>bc</sup>
6%	22.6 ± 6.5 <sup>c</sup>	63.8 : 36.2 <sup>c</sup>	12.6 ± 1.3 <sup>ab</sup>
Soybean oil			
3%	26.2 ± 6.6 <sup>abc</sup>	61.1 : 38.9 <sup>bcd</sup>	10.3 ± 0.7 <sup>cd</sup>
6%	23.8 ± 7.2 <sup>cd</sup>	60.7 : 39.3 <sup>bcd</sup>	11.3 ± 2.5 <sup>bc</sup>

Each value represents mean ± SD.

a—d: Means in the same column with different superscripts differ significantly (p < 0.05).

Table 2 Changes in VFA concentration

Treatment	Total (mmol/100ml)	Mollar percent (%)			
		Acetic	Propionic	Butyric	Others
Control	6.2 ± 2.0	71.0	22.8	6.2	0.0
Grass lipids					
3%	6.4 ± 1.5	70.3	22.6	6.6	0.5
6%	4.8 ± 0.4	70.8	22.6	6.6	0.0
Tallow					
3%	5.8 ± 1.2	70.0	23.5	6.4	0.0
6%	5.7 ± 1.8	70.2	22.4	6.9	0.5
Soybean oil					
3%	6.5 ± 0.5	70.5	23.0	6.5	0.0
6%	5.8 ± 1.4	70.0	23.5	6.6	0.0

Each value represents the mean ± SD.

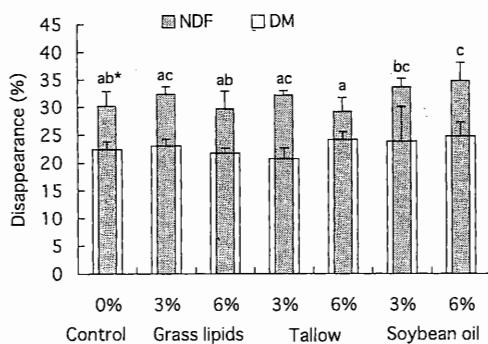


Fig. 1 Disappearance of DM and NDF.

Each value indicates a mean with SD as vertical bars.

\* Means with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

いずれもルーメン内の微生物増殖に対して抑制作用をもつことを示していると考えられた。SUTTON *et al.*

(1983) は、乾草 (200 g) と濃厚飼料 (400 g) を給与している去勢羊に 1 日 40 g のアマニ油またはココヤシ油を添加給与した結果、プロトゾアの数が増加したことを示した。また、濃厚飼料 (油脂を含む) 800 g と乾草 100 g を給与している去勢羊に高水準 (一日 60 g または 90 g) のアマニ油の投与によってルーメン内のプロトゾア数が減少すること (CZERKAWSKI ; 1975), また、1 日当たり 39 g および 60 g (飼料 kg 当たり) のアマニ油添加によってプロトゾアがほとんど消失 (IKWUEGBU ; 1982) することも報告されている。これらのことは本試験でプロトゾア態の比率が減少する傾向にあったことと一致しており、脂質の添加によってルーメン内微生物の中でもプロトゾアの増殖が優先的に抑制されると考えられた。

培養後の固形物および NDF 消失率が脂質添加によって抑制されなかったことは予期に反するが、その理由の 1 つとして培養する最初の牧草試料量 (全量 2.5 g, 脂質添加区では 3 および 6 % の脂質を含む) が

脂質によって置きかえられた分だけ対照区に比べて少なくなっていること、第2の理由として培養時間を12時間とした場合には脂質添加区と対照区の間には差がみられず、24時間培養の場合に脂質添加の影響があらわれること(梁ら;1993,未発表)から培養時間の長さに関係していると考えられる。

アンモニア態窒素量の変化は微生物態窒素量の変化と対応するもので、特に脂質添加6%の場合、微生物態窒素量が少なくなりアンモニア態窒素量が高くなるという傾向がみられた。JENKINS and FOTOUHI(1990)は去勢羊に飼料乾物あたり大豆レシチン5.2%またはトウモロコシ油2.4%を添加給与した場合、ルーメン内アンモニア態窒素濃度が減少したことを報告している。In vitro 培養の場合、アンモニア態窒素濃度の低下は、飼料蛋白質分解の進行と分解産物の微生物体への取込みという2つの要因が強く関連する。本試験の結果のみでは飼料蛋白質の分解が脂質添加によって抑制されたか否かは明確ではないが、いずれの場合でも脂質6%添加でアンモニア態窒素量が対照区または脂質3%区に比べて増加したことは、微生物への取込み量が低下したことの反映と考えられる。

以上の結果から、微生物態窒素量は脂質添加により低下する傾向があり、特に6%添加区でいずれも低下割合が大きかった。また、バクテリア態とプロトゾア態の比率では、脂質添加によりプロトゾア態の比率が減少する傾向がみられ、特にタローと大豆油で顕著であった。すなわち、脂質を添加して牧草飼料をin vitro 培養した場合、微生物量が低下する傾向を示しており、なかでもプロトゾア態窒素の比率は、牧草脂質添加の場合よりも油脂剤添加の場合の方がより大きく低下することが認められた。また、アンモニア態窒素量はいずれの脂質添加においても微生物態窒素量の変化と負の対応関係を示した。一方、NDF消失率は脂質添加により低下する傾向はみられず、大豆油添加ではむしろ高まる傾向があり、固形物消失率では脂質添加により大きな変化はみられなかった。また、VFA濃度は脂質添加により低下する傾向があるが有意差は認められず、VFAモル比にもほとんど差異がなかった。これらについては、培養時間の長さ、培養基質量ならびに各脂質の培養過程における成分分画の変化との関係をさらに検討する必要がある。

## 文 献

- 阿部 亮, (1971) 動物栄養試験法(炭水化物の項執筆, 森本 宏監修). 第1版. 350-351. 養賢堂. 東京.
- CZERKAWSKI, J. W., W. W. CHRISTIE, G. BRECKENRIDGE and M. L. HUNTER, (1975) Changes in the rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. Br. J. Nutr., **34**: 25-44.
- FUJITA, H., S. MATSUOKA, J. TAKAHASHI and N. KUMASE, (1991) Relationship between chemical composition and ruminal protein degradability of conserved forages. Anim. Sci. Technol. (Jpn.), **62**: 947-954.
- HINO, T., M. KAMETAKA and M. KANDATSU, (1973) The cultivation of rumen oligotrich protozoa 1. Factors influencing the life of entodinia. J. Gen. Appl. Microbiol., **19**: 305-315.
- HINO, T. and Y. NAGATAKE, (1993) The effect of grass lipids on fiber digestion by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Anim. Sci. Technol. (Jpn.), **64**: 121-128.
- IKWUEGBU, O. A. and J. D. SUTTON, (1982) The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. Br. J. Nutr., **48**: 365-375.
- JENKINS, T. C. and N. FOTOUHI, (1990) Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. J. Anim. Sci., **68**: 460-466.
- McDOUGALL, E. I., (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J., **43**: 99-109.
- MEYER, R. M., E. E. BARTLEY, C. W. DEYOE and V. F. COLENBRANDER, (1967) Feed processing. 1. Ration effects on rumen microbial protein synthesis and amino acid composition. J. Dairy Sci., **50**: 1327-1332.
- PALMQUIST, D. L., T. C. JENKINS, (1980) Fat in lactation rations: Review. J. Dairy Sci., **63**: 1-14.
- PALMQUIST, D. L., (1984) Use of fats in diets for lactating dairy cows. in Fats in Animal Nutrition. (WISEMAN, J., ed.) 357-381. Butterworths. London.
- SMITH, R. H. and A. B. McALLAN, (1974) Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. Br. J. Nutr., **31**: 27-34.
- 菅原 潔・副島正美・匂坂勝之助・志村憲助, (1958) 反芻動物による尿素利用の機作に関する研究(第3報)—N<sup>15</sup>を含む尿素を用いての利用経路の検索. 農化, **32**: 921-924.
- SUTTON, J. D., R. KNIGHT, A. B. McALLAN and R. H. SMITH, (1983) Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. Br. J. Nutr., **49**: 419-432.
- ZINN, R. A. and F. N. OWENS, (1986) A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci., **66**: 157-166.