

研究ノート

トウモロコシサイレージの飼料評価にむけた連続発酵装置
(人工ルーメン) 運転条件の検討小堺 浩司¹・竹下 裕樹¹・小林 泰男¹・谷川 珠子²
大坂 郁夫³・川本 哲²・原 悟志²¹北海道大学大学院農学研究科, 札幌市 060-8589²北海道立畜産試験場, 新得町 080-0038³北海道立根釧農業試験場, 中標津町 086-1100Operation of rumen-simulated continuous culture
for evaluation of corn silageKoji KOZAKI¹, Yuki TAKESHITA¹, Yasuo KOBAYASHI¹, Tamako TANIGAWA²,
Ikuko OSAKA³, Tetsu KAWAMOTO² and Satoshi HARA²¹ Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589² Hokkaido Animal Research Center, Shintoku 081-0038³ Hokkaido Prefectural Konsen Agricultural Experiment Station, Nakashibetu 086-1100

キーワード: 連続発酵装置, 希釈率, ルーメン, プロトゾア, VFA

Key words: continuous culture, dilution rate, rumen, protozoa, VFA

要 約

トウモロコシサイレージ給与時の反芻家畜第一胃(ルーメン)の発酵を近似的に再現するため, 連続発酵装置オムニカルチャープラス(VIRTIS)の運転条件を確立することを目的とした。緩衝液(McDOUGALLの人工唾液)流入に伴う希釈率を高希釈率(1.30 vol/day)と低希釈率(0.62 vol/day)に設定して168時間運転し, 人工ルーメン内のpH, VFA, アンモニア態窒素濃度, プロトゾア生息密度及びその生存率を調査した。pHは低希釈率運転時にVFAの蓄積によって低く推移したが正常値の範囲内であった。プロトゾアの生息密度は希釈率にかかわらず培養時間が進むにつれて減少し, 5日目に急減し, 7日目には 10^3 cell/ml程度の値となった。アンモニア態窒素濃度は高希釈率運転時に極めて低く推移した(0.8~3.8 mgN/dl)が, 0.2 g/lの尿素を緩衝液に添加すると適切なレベル(平均10.5 mgN/dl)に回復した。以上の結果から, いずれの希釈率で運転しても96時間程度まではpH, VFA, プロトゾア数を想定した範囲内に維持できるが, 高希釈率運転時はアンモニア不足回避のため少量の窒素源補給を行う事が必要で, このような運転条件でトウモロ

コシサイレージのルーメン内消化・発酵特性の評価に利用できることが示された。

緒 言

飼料の最終評価ではin vivo試験が行われるが, 多くの作業仮説や実験条件からより適切なものを選抜するような場合, 人工ルーメンを用いたin vitro試験がしばしば行われる。人工ルーメンの利点は, 実験の規模が小さく, 操作が簡便で運転経費が少ないことその他に, in vivoでは困難な実験処理も設定できることにある。例えば, 極端な飼養条件を設定した時, ルーメン内パラメータにどのような変化が起こるかを頻繁な試料採取をもって観察することができる。また, 実際のルーメンでは非常に複雑な要因が相互関連して発酵が成立しているため, 条件を単純化すれば, 特定の要因の影響を明らかにできる。

ルーメン内発酵を近似的に再現するためにこれまで多くの研究がなされてきた。初期の研究ではバッチ培養装置にいくらかの工夫をこらしたものであった。WARNER(1956)は人工ルーメンを作成・運転し, in vivoとの比較を行い, 微生物数, 消化率及び発酵産物を測定し, 人工ルーメンの克服すべき改良点を示した。その後, 初期のものに比べてかなり長くルーメン

内微生物相を維持することができる連続発酵装置などもつくられた。ルーメン内微生物相の安定の指標としてプロトゾア数の維持があげられるため、1970年代以降はプロトゾアの維持に焦点をあてて研究が行われてきた。透析装置の設置 (ABE and KUMENO, 1973) や流出経路 (TEATHER and SAUER, 1988) などの工夫を凝らした結果、プロトゾアは維持できるものの、装置が大型化、複雑化してしまうものもでてきた。近年の人工ルーメンを用いた研究は、HOOVER *et al.* (1976 A) が考案したものと CZERKAWSKI and BRECKENRIDGE (1977) の考案した Rusitec (Rumen simulation technique) の二つの装置を基本とするものがほとんどである。HOOVER *et al.* (1976A) の人工ルーメンは発酵槽に二つのオーバーフロー流路がついたのが特徴である。一つはポンプによって液相部からフィルターを介してくみ出す流路であり、もうひとつは液相部及び固相部から流出する通常の流路である。

本研究では HOOVER *et al.* (1976A) の用いた人工ルーメンをモデルとしたオムニカルチャープラス (VIRTIS) を使用し、とうもろこしサイレージ給与時の運転条件の確立を目的とした。良好な人工ルーメンの指標として、pH、VFA やアンモニアの濃度が *in vivo* での正常値の範囲にあること、およびプロトゾア生息密度が過去の報告値 ($\times 10^3 \sim 4 \text{ cell/ml}$) 程度に維持されることを目標とした。

材料及び方法

連続発酵装置としてオムニカルチャープラス (VIRTIS) を用いた。イノキュラムにはとうもろこしサイレージを多給した乾乳牛のルーメンろ液を用いた。装置は発酵槽 (1.2 l) に出入り口を持ち、ペリスタポンプを介し、設定した希釈率 (0.62 及び 1.30 vol/day) で内容物が入れ替わるものであった。嫌気性を保つために N_2 ガスを発酵槽上面に導いた。緩衝液は MCDUGALL の人工唾液 (MCDUGALL, 1948) を使用した。また、両者とも発酵槽上面にサンプル供給口と採集口を有し、pH メーターを装備した。168 時間運転し、24 時間ごとにとうもろこしサイレージを 20 g 投入した。2 回目以降のサイレージ投入時には、投入前に発酵槽内のサイレージ残渣を 10 g 除去した (消化率を 50% と仮定)。試料採取は 12 時間ごとに行い、pH、アンモニア態窒素濃度、VFA 濃度と組成及びプロトゾア数を測定した。アンモニア態窒素濃度はインドフェノール青法 (WEATHERBURN, 1967) を用いて測定した。ガスクロマトグラフ装置 (GC-14B, SHIMAZU) を用いて VFA 濃度及び組成を測定した。プロトゾアはサンプル採集直後にマイクロピペットで格子入りスライドガラス上に $10 \mu\text{l}$ とり、光学顕微鏡 ($\times 100$) で運動性のないもの (死滅プロトゾア) を計数した。一

方で同じサンプルを MFS (OGIMOTO and IMAI, 1981) で 5 倍に希釈固定し、 $10 \mu\text{l}$ を同スライドガラス上にとって総数を計数した。この二つの計数結果からプロトゾアの生存率を求めた。

結果及び考察

pH の変化を図 1 に示した。高希釈率に比べて、低希釈率運転時のほうが pH が低く推移 (6.8~7.3 vs. 6.6~6.9) した。低希釈率運転時の pH の低下は、生成された VFA の蓄積によるものと考えられ、実際に総 VFA 濃度は高希釈率の 1.6~5.6 mmol/dl に対し、低希釈率では 4.4~8.5 mmol/dl と高い値が持続した (図 2)。また、VFA の A/P 比は時間の経過とともに低下する傾向 (平均 4.3 \rightarrow 3.2) にあった (図 2)。ABE and KUMENO (1973) も透析がない場合の特徴として、低希釈率 (0.5 vol/day) では高希釈率での運転時 (1.5 vol/day) に比べて pH の低下と A/P 比の低下が認められるとしている。主要なルーメン細菌の至適 pH は 6.1~6.7 であり、特にセルロース分解菌は低 pH に感受性が高いとされている (板橋, 1998)。本人工ルーメンにおける pH は、どちらの希釈率で運転した時でも適正な範囲内であった。

いずれの希釈率で運転しても初めの 12 時間でプロトゾアは半減し、168 時間まで運転を行うと、培養開始時の 15 分の 1 から 20 分の 1 程度まで減少 ($3 \sim 12 \times 10^4 \rightarrow 2 \sim 6 \times 10^3 \text{ cell/ml}$) した (図 3)。WELLER and PILGRIM (1974) は *in vivo* 試験において、ルーメン内のプロトゾア生息密度よりもルーメンからの流出物中の生息密度のほうが低いと報告している。本実験においては流出物中のプロトゾア数を計測しなかったため、密度の差は分からない。しかし *in vivo* のような選択的貯留を人工ルーメンで再現できれば、プロトゾアの長期維持が可能とおもわれる。

プロトゾア生存率は、高希釈率で運転した場合に 108 時間培養時の 53% から 120 時間培養時の 20% へと大きく減少した (図 3)。このようにプロトゾアの生存率が下がったのは、発酵槽内がプロトゾアの生存・増殖には適さない状態になったためであろう。ただし、pH や VFA 濃度は正常の範囲内にある (板橋, 1998) ので、その他の要因、例えばプロトゾアの窒素源である飼料たんばく質の不足などが生存率低下の要因と考えられる。HOOVER *et al.* (1976 B) は培養前期 (1~5 日)、中期 (6~9 日) 及び後期 (11~14 日) のプロトゾア数を調べ、中期と後期で有意差はなく、プロトゾア数は $5 \times 10^4/\text{ml}$ 程度であったと報告している。また、ABE and KUMENO (1973) はプロトゾア数の減少が最も少ないのは透析装置を用いて低希釈率 (0.5 vol/day) で運転した時であり、アンモニア、pH、VFA 濃度は *in vivo* と同レベルであったと報告している。

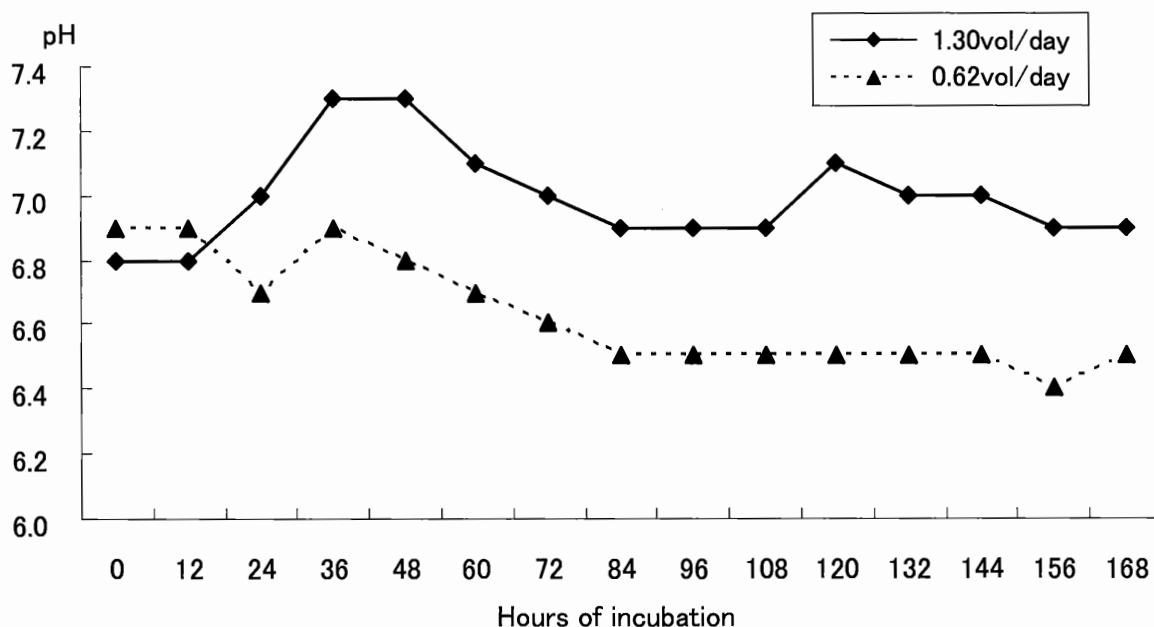


Figure 1 Changes with time of pH in continuous culture. Continuous culture was operated at high (1.30 vol/day) or low (0.62 vol/day) dilution rate with daily feeding of corn silage (20g).

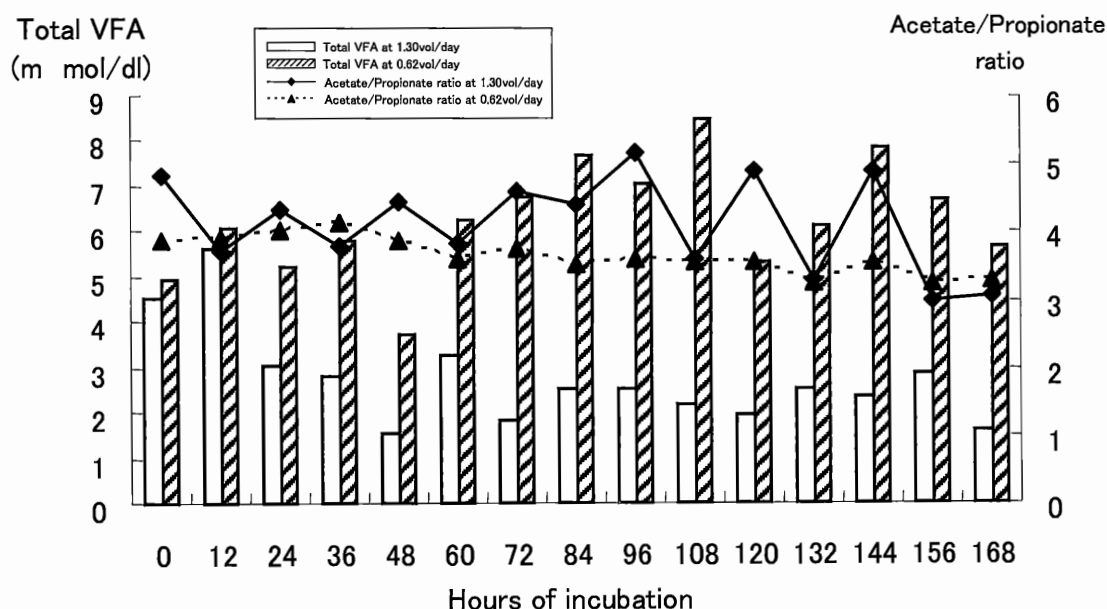


Figure 2 Changes with time of total VFA concentration (m mol/dl) and acetate/propionate ratio in continuous culture. Continuous culture was operated at high (1.30 vol/day) or low (0.62 vol/day) dilution rate with daily feeding of corn silage (20g).

プロトゾア数の減少を抑えるためには、発酵槽内がルーメン内と近似するようになり、プロトゾアの選択的貯留をある程度はかり、かつ発酵槽内での増殖を保証する栄養条件を満たすことが必要であると考えられる。

ルーメン内のアンモニアは多くの細菌の主要窒素源となるため、適正なレベルに維持されねばならず、5~10 mgN/dl前後が至適濃度とされている(板橋, 1998)。アンモニア態窒素濃度は低希釈率運転時には4.0~19.8 mgN/dlの範囲で推移し、高希釈率運

転時には0.8~3.8 mgN/dlの範囲でかなり低く推移した(図4)。高希釈率運転時にアンモニア態窒素濃度が大きく低下してしまうのは、基質たんぱく質やたんぱく質分解性微生物の流出が考えられる。しかし、最大の要因は飼料中のたんぱく質量の不足である。すなわち Hoover *et al.* (1976 A) は発酵槽 11 に対して 4.2~5.6 g の粗たんぱく質を給与しているのに対し、本試験ではその約 10 分の 1 の粗たんぱく質を給与しているにすぎない。アンモニア態窒素濃度を上げるために、給与量を増やすことも考えられたが、大量の

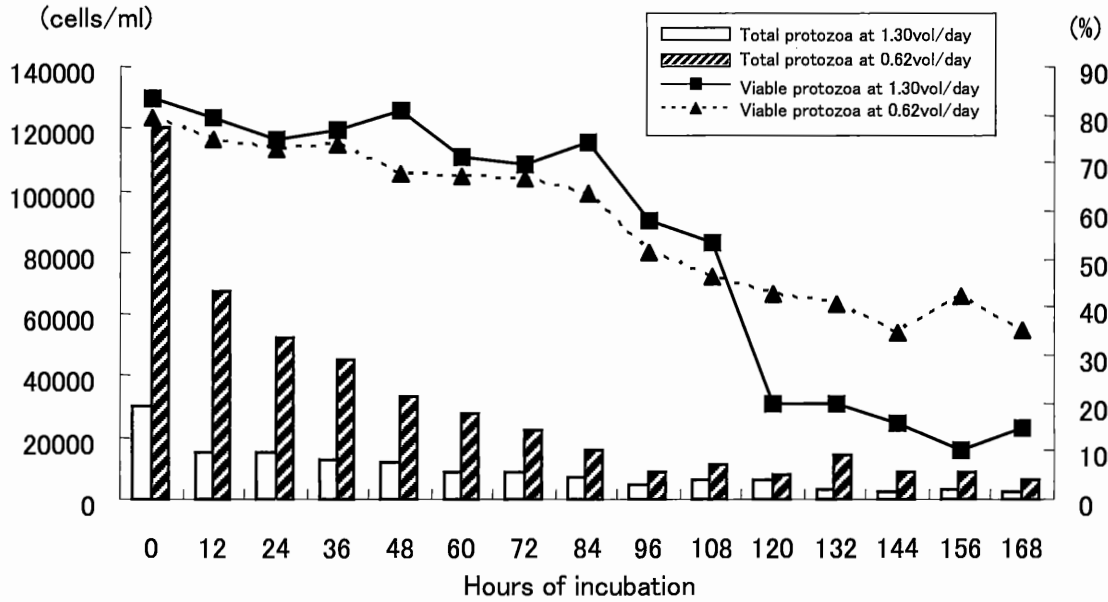


Figure 3 Changes with time of total number (cells/ml) and viability (%) of protozoa in continuous culture. Continuous culture was operated at high (1.30 vol/day) or low (0.62 vol/day) dilution rate with daily feeding of corn silage (20g).

飼料が十分に発酵槽内で混和されないことや、発酵による pH の急激な低下が懸念されたので、代わりに窒素源として 0.2 g/l の尿素を緩衝液に添加した。尿素無添加で高希釈率運転をした時には、アンモニア態窒素濃度は 5 mgN/dl 未満であり、ルーメン細菌の増殖に必要な窒素の不足が明らかであったが、尿素添加時には 96 時間までこの値よりも高く推移していた (図 4) ことから、本尿素添加量で窒素不足の回避はできたと考えられた。

以上の結果から、いずれの希釈率で運転しても 96 時

間程度までは pH, VFA, プロトゾア数を想定した範囲内に維持できるが、高希釈率運転時はアンモニア不足回避のため少量の窒素源補給が必要ことがわかった。このような条件で人工ルーメンを運転・利用することで、トウモロコシサイレージのルーメン内消化・発酵特性のおおよその評価が可能であると思われる。

ただし、梶川らの総説 (2003) によると、人工ルーメンの応用に際しては予備期の設定が通常必要である。本装置と同タイプの HOOPER 型では 5~7 日の適応期間が推奨されている (CALSAMIGLIA *et al.* 1996;

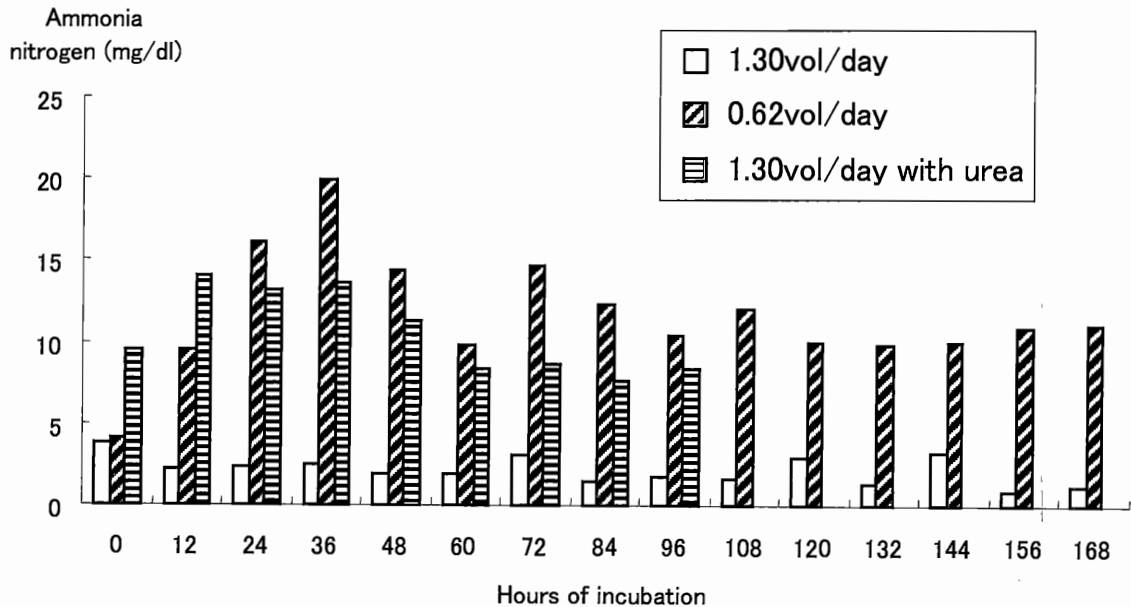


Figure 4 Changes with time of ammonia nitrogen concentration (mg/dl) in continuous culture. Continuous culture was operated at high (1.30 vol/day) or low (0.62 vol/day) dilution rate with daily feeding of corn silage (20g). Urea supplementation to buffer (0.2g/l) was tested to optimize ammonia level in operation at high dilution rate.

GRISWOLD *et al.* 2003). これら過去の報告はおしなべてルーメンプロトゾア生息密度の長期維持がなされ、ルーメン発酵の良好な長期維持を示唆している。つまり本装置を本運転条件で使用した場合は長期の微生物適応を経た実験には適さず、まだ改良の余地が多いと考えられる。例えばプロトゾアの選択的貯留をはかるための方策（飼料の投入方式や流出口の改変など）を考慮しなければならない。

文 献

- ABE, M. and F. KUMENO (1973) In vitro simulation of rumen fermentation: Apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. *J. Anim. Sci.*, **36**: 941-948.
- CALSAMIGLIA, S., M. D. STERN and J. L. FIRKINS (1996) Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, **74**: 1375-1381.
- CZERKAWSKI, J. W. and G. BRECKENRIDGE (1977) Design and development of a long-term rumen simulation technique(Rusitec). *Br. J. Nutr.*, **38**: 371-384.
- GRISWOLD, K. E., G. A. APGAR, J. BOUTON and J. L. FIRKINS (2003) Effect of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestability, and fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, **81**: 329-336.
- HOOVER, W. H., B. A. CROOKER and C. J. SNIFFEN (1976A) Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, **43**: 528-534.
- HOOVER, W. H., P. H. KNOWLTON, M. D. STERN and C. J. SNIFFEN (1976B) Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, **43**: 535-542.
- 板橋久雄 (1998). 反芻動物の栄養生理学. "ルーメンにおける消化の項執筆" (佐々木康之監修・小原嘉昭編). 農文協. 東京.
- 梶川 博・金 海・寺田文典・須賀庸行 (2003) 新たに改良された汎用型人工ルーメン (ルシテック) の操作と特性. 畜産草地研究所研究資料, **2**: 33-49.
- MCDUGALL, E. I (1948) Studies on ruminant saliva. *Biochem. J.*, **43**: 99-109.
- OGIMOTO, K and S. IMAI (1981) Atlas of rumen microbiology. 9-66, 161. Japan Scientific Press. Tokyo.
- TEATHER, R. M. and F. D. SAUER (1988) A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy. Sci.*, **71**: 666-673.
- WARNER, A. C. I (1956) Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.*, **14**: 733-748.
- WEATHERBURN, M. W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, **39**: 971-974.
- WELLER, R. A. and A. F. PILGRIM (1974) Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.*, **32**: 341-351.

