

牧草を基質とした人工第一胃のガス産生像

唐澤 豊・清水 拓司

信州大学農学部 家畜飼養飼料科学研究室

緒 論

反芻家畜による牧草の消化は種々の要因によって影響されるが、中でも牧草の生育とともに消化率が低下することはよく知られている^{1,2)}。牧草の乾物あるいは粗繊維消化率は粗蛋白質、粗繊維、リグニン含有率と密接な関係があるといわれている³⁻⁵⁾。したがって、これらの要因が牧草の発育に伴う消化率の低下や牧草の種類による消化率の差異に関与しているものと思われる。

一方第一胃内では、主として第一胃微生物叢の基質発酵による代謝性ガスと、揮発生脂肪酸類と第一胃内の重炭酸塩との緩衝作用によって生ずる CO₂ ガスを含む多量のガスを発生する。小原は一連の研究で配合飼料原料を基質として人工第一胃におけるガス産生像を調べ、ガス産生量から飼料の栄養価を評価する関係式を提唱している⁶⁾。このことは、飼料の消化率や栄養価を評価するのに、人工第一胃におけるガス産生量が有効な手段となることを示しているが、牧草の乾物あるいは主成分である粗繊維の消化率をガス産生量から推定しようという試みは未だなされていない。一般的に家畜による消化率の測定には多大の労力、経費、時間を必要とする。人工第一胃におけるガス産生量から粗繊維の消化率を評価することができるならば、これらは大いに節減されることになる。

本研究は、人工第一胃で牧草の主成分の粗繊維消化率をガス産生量から推定するための基礎的研究として、発育段階の異なる荳科あるいは禾本科の牧草とガス産生像との関係を人工第一胃で調べた。従来培養中発生するガスの測定は、注射筒法⁷⁾あるいは発酵管法⁸⁾で行っていたが、粗飼料を基質とした場合発生するガス量が少なくこれらの方法は精度の点で問題があった。そこで本研究では、少量のガス量も測定し得るピペット法を開発し、これでガスの測定を行った。

材料および方法

1) 供試材料と基質：供試草種は一番刈りの白クローバー、赤クローバー、オーチャードグラスおよびトールフェスクで、それぞれ栄養成長期、開花期、結実期に採取し、ただちに基質の調製に供した。すなわち、新鮮草を2～3cmに細切の後100g当り500mlの蒸留水を加えミキサーで磨碎して四重ガーゼで絞り、残渣をさらに400mlの蒸留水と200mlのメタノールで洗滌した。これを60°Cの通風乾燥機で12時間乾燥後ウィレー式粉碎機で2mmのスクリーンを通して粉碎しこれを培養基質とした。

2) 第一胃微生物叢と供試培養液：ヘイキューブを1.5kg、トウモロコシを主体とする濃厚飼料を約150g毎日給与して飼養した第一胃フィステル装着成雌山羊(日本ザーネン種)より、第一胃内容物を飼料給与前に39°Cの三角フラスコに採取し、ただちにこの第一胃内容物を四重ガーゼでろ過して第一胃微生物叢液を得た。人工唾液としてMcDougall⁹⁾の重炭酸塩緩衝液を用いた。39°Cのこの緩衝液にCO₂ガスを通気してpHをほぼ6.9とした後、各発酵槽当り第一胃微生物叢液15mlと緩衝液25mlを分注し発酵培養液とした。

3) 発酵槽と培養：正岡・高野¹⁰⁾の発酵槽に基づいて考案された池田¹¹⁾の発酵槽を一部改変し分析に要する労力の軽減をはかった。すなわち、市販のガラスろ過器(柴田化学器械, 1G3, 38φ)の上端に、ガラス管(29φ×80mm)の下端を三重のゴム管(25φ)を中立ちとしてしっかりとめ込み、ガラスろ過器の下端をゴム栓で密封した後、発酵培養液40mlと基質0.4gを加えて栓をした。上端のゴム栓の中心部には、ゴム管を上部に接合したガラス管(3φ)を通し、ゴム管の先はピンチコックで封じた。この発酵槽は、培養発酵槽としての機能の他に、NDF(Neutral Detergent Fiber)を測定するための煮沸器、洗滌用ろ過器およびガラス管を取りはずせばろ過器として使うことができ四種類の機能を有している。したがって、本実験で用いた発酵槽は試料の移し換えが全く不用という特徴を持っている。

培養は39±1°Cで5分間の予備培養後15時間振盪培養した(117~118往復/分)。その間1時間ごとにガス産生量を測定した。また栄養成長期の赤クローバーとトールフェスクを基質とした場合には、NDF消化率を測定した。

4) ガス産生量の測定：培養中産生されるガスの測定は、10ml容メスピペットの先端に界面活性剤をつけて発酵槽のゴム管に接続し、ピンチコックを開いた時蓄積ガスによって上昇する界面活性剤の膜が停止した時点でピンチコックを閉じ、その時の膜の目盛を読みとることによって行った。ガスの測定は1時間毎に行い、毎時発生するガス量をガス産生速度、この産生速度の経時的变化をガス産生曲線と称した。

5) NDF(Neutral Detergent Fiber)消化率の測定：培養後発酵槽の上下のゴム栓をはずし培養液をろ過してガラスフィルター上の残渣に、ND溶液¹²⁾(蒸留水100mlにラウリル酸ナトリウム3g, EDTA二ナトリウム・2H₂O 1.86g, リン酸二ナトリウム0.456g, エチルセロソルブ1ml, ホウ酸ナトリウム・10H₂O 0.681gを含む)50ml, デカリン2mlおよび亜硫酸ナトリウム0.5gを加え1時間10分煮沸した。その後吸引ろ過し、熱水50ml, アセトン15mlで交互に3回洗滌し、常法によって恒量値を求めた。その後500°Cで5時間灰化、秤量し、前後の値の差から人工消化で未消化のNDF量を求めた。この値を未培養時のNDF量から減ずることによって消化されたNDF量を求め、消化率を算出した。

結果および考察

本実験では人工第一胃での発酵によって発生するガスの測定をピペット法で行った。栄養成長期、開花期、結実期の白クローバー、赤クローバー、オーチャードグラスあるいはトールフェスクを基質とし、各区3-7槽を5分間の前培養後15時間培養しその間1時間ごとにガス産生速度(ml/時間)を測定した。その際同時にパルプを基質として培養し発酵系をチェックすると同時に、基質を含まない培養液も培養し培養液自体のガス産生速度についても

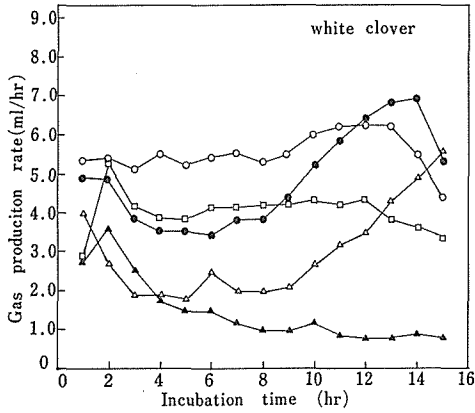


Fig. 1. Gas production curves of white clover at different stages of maturity. Each point represents mean of 7 fermentors (0-5 hrs), 5 fermentors (6-10 hrs) or 3 fermentors (11-15 hrs). vegetative : ●, bloom : ○, fruitage : □, control : △, blank : ▲.

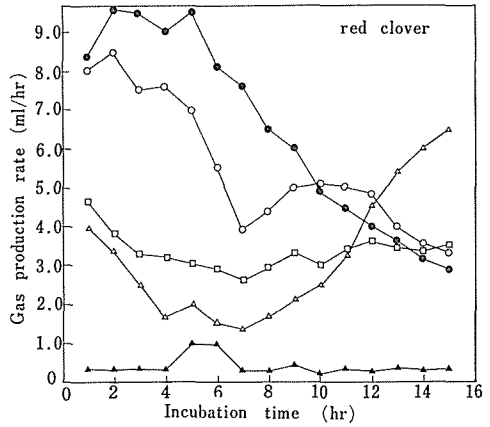


Fig. 2. Gas production curves of red clover at different stages of maturity. Each point represents mean of 7 fermentors (0-5 hrs), 5 fermentors (6-10 hrs) or 3 fermentors (11-15 hrs). vegetative : ●, bloom : ○, fruitage : □, control : △, blank : ▲.

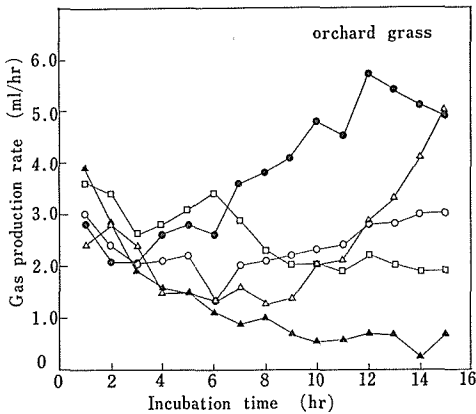


Fig. 3. Gas production curves of orchard grass at different stages of maturity. Each point represents mean of 7 fermentors (0-5 hrs), 5 fermentors (6-10 hrs) or 3 fermentors (11-15 hrs). vegetative : ●, bloom : ○, fruitage : □, control : △, blank : ▲.

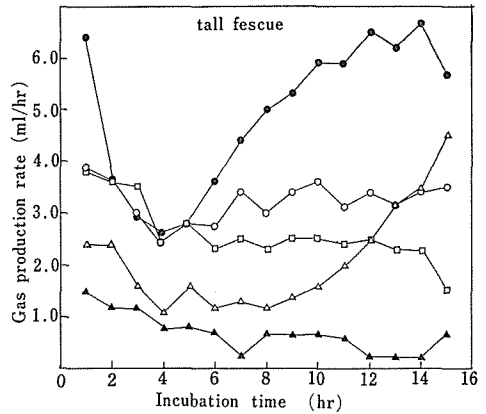


Fig. 4. Gas production curves of tall fescue at different stages of maturity. Each point represents mean of 7 fermentors (0-5 hrs), 5 fermentors (6-10 hrs) or 3 fermentors (11-15 hrs). vegetative : ●, bloom : ○, fruitage : □, control : △, blank : ▲.

調べた。

1 ガス産生速度の発酵槽間における変動

本実験法におけるガス測定値の発酵槽間の変動を知るため、各成育期の白クローバーを基質として前述のように培養し、1時間ごとの実測値から変動係数を求めた。その結果各基質の培養をとおして、ガス産生速度の変動係数は高いもので28.1%、低いもので2.3%であった。これらの変動係数の全平均と標準偏差は、 $12.6 \pm 6.9\%$ となり発酵槽間のガス産生量にばらつきがみられた。しかし、培養7時間から15時間までの培養中期以後のガス産生速度の変動係数は、どの基質の場合にもそれ以前と比べ小さくなる傾向が認められた(8.46 ± 3.90)。これらの値は、トウモロコシと牛の第一胃微生物叢を培養し注射筒法でガスを測定した小原・杉橋⁷⁾の結果と比べいづれも高いものであった。しかし本実験と彼らの実験では、基質や微生物叢が異なるため単純に比較することはできない。変動要因を除き、変動幅を小さくすることは、本法の有用性を増すことになる。したがってこの点についての研究が、さらに必要である。

2 ガス産生曲線と再現性

1) 基質を含まない場合: Figs. 1, 2, 3, 4に示した他、ここに示さなかった8例も加えて計12回の実験を行った。その結果、ガス産生曲線は次の3型に分類することができた。すなわち、Fig. 1の例のように培養2時間目に一旦上昇した後急減あるいは漸減し定常水準に達するもの(5例)、Fig. 3のように培養開始直後にガス産生速度が高くその後5~6時間頃までに急減し定常レベルに近づくもの(4例)、あるいはFig. 2のように最初からガス産生速度の低い場合(3例)である。柴田ら⁸⁾は第一胃内容液の培養によって発生するガスは、第一胃内容液を採取する時間、給与した飼料の種類、および培養する内容液の調製法によって変動することを示した。本実験ではこれらのガス産生能の変動要因を除去するよう処置したにもかかわらず、培養液自体のガス産生速度が安定するまで最長6時間を要する例が観察された。したがってガス産生速度は、柴田らの指摘した要因以外によっても影響されるものと推定される。この変動要因を明らかにし除去すること、あるいは5~6時間の前培養後本培養を行うことにより、培養液自体に由来するガス産生速度の培養初期の変動は小さくなることが期待される。

2) 粗繊維が基質の場合: 12例の実験でいづれもガス産生曲線は一定のU字型パターンを示した。すなわち、ガス産生速度は培養開始後(4.36 ± 0.30)時間まで低下し、その後(9.75 ± 0.46)時間まで一定の水準で推移した後15時間まで増加し続けた(平均値土標準偏差)。この結果は、in vitro 条件下での粗繊維の分解は培養開始後4~6時間目に急速に進むとのMcBee¹³⁾の報告およびこれと類似した小原・杉橋¹⁴⁾の結果と必ずしも一致するものではない。基質を含まない場合前述のようにガス産生速度の安定値は5~6時間後に得られることから、粗繊維を基質とした場合にこの時点から起算するとガス産生速度の急増開始に要する時間は、McBeeと小原・杉橋の結果と類似した結果となる。したがって、本実験条件下でのセルロースからのガス産生像は異常なものではなく再現性はかなり高いものと判断される。

3) 荳科牧草を基質とした場合: 栄養成長期、開花期、結実期と成育段階の異なる白ク

ローバーを基質とした時のガス産生速度の経時的变化を Fig. 1 に示した、栄養成長期と開花期では、ガス産生速度のピークが培養期間の後半に認められたが、結実期のガス産生速度は15時間の培養期間を通じて大きな変化を示さなかった。したがって、白クローバーの発育段階によるガス産生速度の明らかな差は、培養13時間以降に認められ、この時ガス産生速度は高い順に栄養成長期、開花期、結実期であった。

Fig. 2 に示したように、赤クローバーを基質とした場合、白クローバーと対比的にガス産生速度のピークは培養中期以前に認められた。この場合にもガス産生速度は、栄養成長期に最も高く、次いで開花期、結実期の順であった。この成育期の違いによるガス産生速度の差は、白クローバーより大きかった。以上のように本実験の結果から、成分的に類似したクローバーであっても、ガス産生像は異なることが明らかになった。

4) 禾本科牧草を基質とした場合： 禾本科牧草の試料として、栄養成長期、開花期、結実期のオーチャードグラスとトールフェスクを用いた。得られたガス産生曲線は、Fig. 3 と Fig. 4 に示したとおりである。オーチャードグラスを基質とした場合、栄養成長期には(3.33±0.27) 時間から直線的に急増し、(10.66±0.27) 時間にピークとなったが(平均値±標準偏差)、開花期、結実期にはそのような増加を示さず経時的变化は小さかった。一方トールフェスクの場合オーチャードグラスと同様、ガス産生速度は培養後(3.66±0.72) 時間から直線的に急増し(10.33±0.72) 時間でピークとなった(平均値±標準偏差)。これに対し、開花期と結実期にはそのような増加を示さず経時的にほとんど変化がみられなかった。両牧草でガス産生速度は、遅くとも8時間以後に栄養成長期で他期と比べ高くなり、11時間以後に開花期が結実期より高くなった。このようにオーチャードグラスとトールフェスクのガス産生曲線はほとんど等しく、またこれはクローバーのそれと類似するものであることが判明した。また禾本科牧草のガス産生速度は、荳科牧草のそれと比べ全体的に低い傾向が認められた。

以上の結果から、本実験条件下でのガス産生曲線の再現性はかなり高く、とりわけ禾本科牧草の場合この傾向が強かった。また本実験で、牧草は個有のガス産生像を持っていることが示された。小原、杉橋⁷⁾は配合飼料原料のガス産生像を牛の第一胃微生物叢を使って *in vitro* で検討し、ガス産生曲線に基質特異性があることを示した。例えば、トウモロコシは8時間前後に、大豆カスは3時間に、ガス産生曲線のピークを認めた。本実験の結果とこの事実を考え合わせると、飼料は一般に個有のガス産生像を持つと言えよう。扇元¹⁵⁾らは、第一胃内容物のガス生成能は禾本科の乾草よりクローバーの生草を給与した時活発になると報告している。本実験においても、クローバーを基質とした場合の方が禾本科牧草を基質とするよりはガス産生速度が高くなる傾向が示された。

3 ガス産生と消化率

牧草基質からのガス産生は、栄養成長期に最も多く、開花期に至ると急激に低下し、結実期で更に低下することを、本実験で用いたすべての牧草について認めた。岡本と広瀬¹⁶⁾によれば、オーチャードとアルファルファの消化率は、最も高い栄養成長期以後急速に低下するという。したがって、牧草基質の発酵産物であるガス産生量は、牧草の消化率と密接な関係を持っているものと思われる。

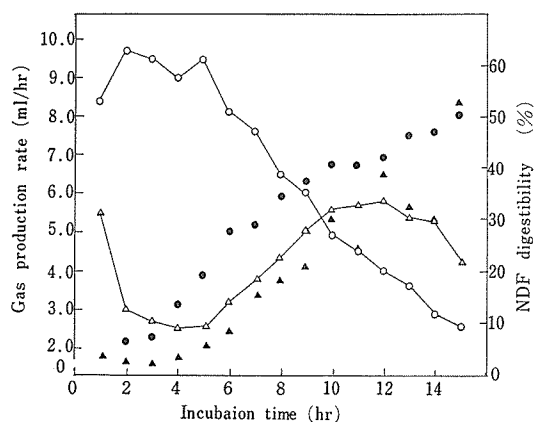


Fig. 5. NDF digestion and gas production rates of red clover and of tall fescue during incubation. Each point represents mean of duplicate fermentors. gas production rate : red clover (○) and tall fescue (△), NDF digestibility : red clover (●) and tall fescue (▲).

よって説明される。したがって、本実験の結果からもガス産生量による粗繊維消化率の推定は可能であり、その際ガス産生曲線より累積ガス量の方が適しているように思われる。

要 約

人工第一胃で牧草の消化率をガス産生量から推定するための基礎的研究として、栄養成長期、開花期、結実期の赤クローバー、白クローバー、オーチャードグラス、あるいはトールフェスクを基質とし、各区3～7槽を5分間の前培養後15時間培養し1時間ごとにガス産生速度を測定した。

ガス産生速度の発酵槽間の変動係数は、高いもので28.1%、低いもので2.3%であった。培養液自体のガス産生は、培養開始後6時間までは変動幅が大きかったがその後安定した。粗繊維を基質とした場合、ガス産生速度は培養開始後4.36時間まで低下し、その後9.75時間まで一定水準を保った後15時間まで増加し続けた。牧草を基質としたいずれの場合にも、ガス産生速度は栄養成長期に最も高く、次いで開花期、結実期の順であった。栄養成長期の白クローバーのガス産生速度は、赤クローバーのそれが培養中期以後にピークを示したのに対し、培養中期以前にピークを示した。オーチャードグラスとトールフェスクの場合非常に類似したガス産生曲線を示し、それぞれ培養後3.33, 3.66時間から直線的に急増し、10.66, 10.33時間にピークとなった。

以上の結果から、本実験条件下でのガス産生曲線の再現性は高く、また牧草は個有のガス産生像を持っていることが明らかになった。さらに、赤クローバーとオーチャードグラスに

前述のように、本実験および小原の研究で基質は個有のガス産生像を持っている。これは換言すると、基質は個有の発酵経過を辿るということである。本実験で、ガス産生速度のピークは赤クローバーでは培養初期に、オーチャードグラスでは培養後期にみられ、対象的なガス産生像を示した。そこで、このように対象的な発酵経過を辿ると推定される2基質について、NDF消化率の経時的变化を調べFig. 5に示した。両基質とも消化率は、培養時間の経過とともに増加した。しかし両基質間で消化率の経時的变化は、若干の差異が認められた。赤クローバーの消化率はオーチャードグラスと比べ立上りが早く、その後培養期間を通して高く推移した。この両基質間における差は、ガス産生曲線のピークの位置と高さによ

ついて調べた経時的な NDF 消化率の変化は、本法でのガス産生量の測定によって粗繊維消化率を推定することが可能であることを示すものであった。

引用文献

- 1) Balwani, T.L., R.R. Johnson and B.A. Dehority, J. Dairy Sci. 52 : 1290-1294, 1969.
- 2) Barnett, A. J. G. and R. L. Reid, J. Agric. Sci. 49 : 180-183, 1957.
- 3) Miller, T. B., Herbage Abstr. 31 : 81-85 and 163-167, 1961.
- 4) Sullivan, J. T., Agron. J., 54 : 511-515, 1962.
- 5) Tomlin, D. C., R. R. Jonson and B. A. Dehority, J. Anim. Sci. 24 : 161-165, 1965.
- 6) 小原正哉・山本勝夫・大木加津子. 日畜会報 45 : 477-487. 1974.
- 7) 小原正哉・杉橋孝夫. 日畜会報 43 : 567-573. 1972.
- 8) 柴田章夫・扇元啓司・古坂澄石. 日畜会報 32 : 159-163. 1961.
- 9) McDougall, E. I., Biochem. J. 43 : 99-109, 1948.
- 10) 正岡淑邦・高野信雄. 日草誌 27 : 303-307. 1981.
- 11) 池田茂樹 信州大学修士論文 1982.
- 12) 堀井聡・阿部 亮. 畜試研究報告 23 : 83-87. 1970.
- 13) McBee, R. H., Appl. Microbiol. 1 : 106-110, 1953.
- 14) 小原正哉・杉橋孝夫・日畜会報 44 : 159-164. 1973.
- 15) 扇元敬司・柴田章夫・古坂澄石. 日畜会報 32 : 330-333. 1963.
- 16) 岡本全弘・広瀬可恒. 日畜会報 43 : 499-505. 1972.

Gas Production Pattern During Fermentation of an Artificial Rumen Containing Legumes or Grass as Substrate

By Yutaka KARASAWA and Takuji SHIMIZU

Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

This experiment was carried out to examine the mode of gas production from legumes or grass at different stages of maturity in an artificial rumen. The forages used as substrate of the artificial rumen were red clover, white clover, orchard grass and tall fescue at the vegetative, blooming and fruitage stages, and CO₂-treated incubation medium (pH 6.9) consisted of goat rumen juice and McDougall's synthetic saliva other than forage substrate. Gas production was measured with pipett method at intervals of 1 hour during 15-hour period of incubation of the artificial rumen at 39°C.

The results obtained are as follows:

- 1) Coefficient of variation of gas production per hour obtained from different fermentors with same substrate in an experiment ranged from 2.3 to 28.1%
- 2) Gas production per hour (GPR) from incubation medium without substrate was steady state 6 hours or later after the start of incubation.
- 3) GPR of pulp cellulose decreased until 4.36 hours, then remained unchanged up to 9.75 hours and thereafter increased until the end of incubation.
- 4) GPR of all the forages tested was the highest when the maturity of the forage was vegetative, and followed by the blooming and fruitage stages, in order of decreasing rate.
- 5) Peak of GPR was observed in the first half of incubation period with white clover, while in the latter half of incubation period with red clover.
- 6) GPR when orchardgrass or tall fescue was used as substrate began to increase linearly at 3.33 and 3.66 hours and reached peaks at 10.66 and 10.33 hours, respectively, after the start of incubation.
- 7) NDF digestibility of red clover and orchard grass increased in an approximately linear manner during 15-hour incubation period.

These results suggest that forages such as legumes and grass have characteristic patterns of gas production under the present experimental conditions and also that the evaluation of cellulose digestion in roughages by gas production is possible.