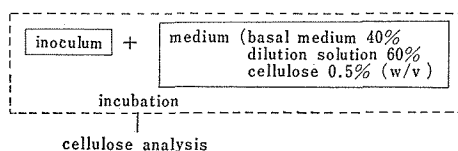


Conventional cultivation



Two-stage cultivation system

Primary cultivation

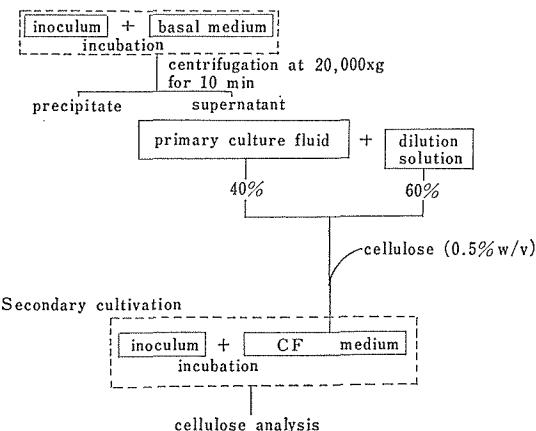


Fig. 1. Procedure for cultivation.

振盪数78往復/分とした。

混合ルーメン細菌による可溶性炭水化物の代謝がセルロース分解性に及ぼす影響は、2段階培養法 (Two-stage cultivation) によって調べた。すなわち、D-(+)-グルコース、D-(+)-セロビオース、D-(+)-マルトースあるいは可溶性デンプン1.5% (W/V) を含む基礎培地 60ml を 100ml 容三角フラスコに入れ、接種菌 3 ml を CO₂ 噴射下で加えブンゼンバルブを施した後、39°C で 0, 6, 12, 24 あるいは 48 時間振盪培養した。次にこの培養液を 20,000 × g で 10 分間遠沈し上澄を採取した。このようにして得た上澄を 40%、希釈溶液を 60%、セルロースを 0.5% 含む 2 次培地 (CF medium) を前述のようにフラット培養ビンに入れ、菌接種後 39°C で 24 時間培養しセルロースの分解率を測定した。

前記の 2 段階培養法の実験で 1 次培養液中に揮発性脂肪酸 (VFA) の著しい増加を認めただので、この増加に相当する VFA がルーメン細菌のセルロース分解活性に対する炭水化物の効果に対し付加的効果を持つかどうかを、可溶性炭水化物を含む通常培地に VFA を添加してセルロース分解率を測定した。VFA の添加量は 3 mmol/100 ml とし、その組成 (モル%) は、酢酸 77.4、プロピオン酸 21.7、酪酸 2.8、イソ吉草酸 1.2 とした。また VFA 液は、2.5N NaOH で pH6.8 に中和後培地に添加した。

なお本実験においてセルロース分解活性の測定は、いずれも 1 区 2 連で行い、すべての操作はガス噴射装置 (三紳工業製) を用い CO₂ 噴射下で行った。

Table 1. Composition of media^{a)}

Component	Dilution solution	Rumen fluid medium	Basal medium	CF medium
	Percentage in medium ^{b)}			
Mineral solution (v/v) ^{c)}	15.0	9.0	15.0	9.0
Rumen fluid (v/v) ^{d)}	0.0	40.0	0.0	0.0
Culture fluid (v/v) ^{e)}	0.0	0.0	0.0	40.0
Trypticase (BBL)	0.0	0.0	1.0	0.0
Na ₂ CO ₃	0.4	0.4	0.4	0.4
CO ₂ gas phase	100.0	100.0	100.0	100.0

a) The final pH of media was approximately 6.8. b) Weight/volume unless otherwise indicated. c) Mineral solution: K₂HPO₄, 0.3g; KH₂PO₄, 0.3; (NH₄)₂SO₄, 1.2g; NaCl, 1.2g; MgSO₄·7H₂O, 0.12g; CaCl₂, 0.12; distilled water, 100ml. d) Rumen fluid: supernatant from whole rumen fluid by centrifugation at 20,000×g for 10 min. e) Culture fluid: supernatant from primary culture by centrifugation at 20,000×g for 10 min.

* When cellulose digestion was determined, 0.05g of cellulose (KC flock W-300, Sanyo-Kokusaku Pulp Co., Ltd.) was placed in a bottle containing 10ml of medium.

2 培地

本実験で使用した培地を Table 1 に示した。通常培養 (Conventional cultivation) に用いた培地は基礎培地 (Basal medium) 40%と希釈溶液 (Dilution solution) 60%から成り、2段階培養の1次培地には基礎培地を用い2次培地 (CF medium) はこの1次培養液 (40%)と希釈溶液 (60%)から調製した。またルーメン液培地 (Rumen fluid medium) は、セルロース分解率の相対活性を算出するために用いた。本実験で使用したすべての培地は、Toyo filter pad (No. 85 SB) を使用し減圧濾過滅菌した。

3 接種菌の調製

毎日午後1時に1.5kgのヘイキューブを給与して飼養したフィステル装着山羊 (10歳齡雌日本ザネン種) より朝9時に得たルーメン液は、1,000×gで5分間遠沈し上澄200mlを得た。この上澄をさらに20,000×gで10分間遠沈し、得られた沈澱物 (細菌) に上澄の2倍量の希釈溶液 (Dilution solution, Table 1) を加えよくかくはんした後再び20,000×gで10分間遠沈した。得られた沈澱物に希釈溶液を加えて100 mlとし、CO₂ 通気後接種菌とした。接種菌量は、セルロース分解活性を測定する際にもまた2段階培養の1次培養の際にも、培地10ml当り0.5mlの割合とした。

4 セルロース分解活性の表現

本実験の予備実験で、希釈溶液に種々の割合でルーメン液上澄を加え混合ルーメン細菌を接種した場合、セルロース分解の最も高い活性はルーメン液40%、接種菌量0.5ml/10ml培地の条件で得られた。したがって本実験のセルロース分解活性の測定は、通常培養では希釈液60%基礎培地40%の培地で、2段階培養では希釈液60%1次培養液上澄40%の培地で行い、得られた活性は、同時に同じ接種菌を用いてルーメン液培地 (ルーメン液40%含有) で得られる活性の百分率すなわち相対活性 (Relative activity) で表現した。

5 分析方法

セルロースは湊ら⁷⁾の方法に準じて培養液を処理し、アンスロン硫酸法⁸⁾によりで620nmで比色定量した。全糖量は、培養液により50あるいは100倍に希釈後0.5mlをアンスロン硫酸法により定量した。結果はグルコース量に換算して示した。培養液の遊離グルコースと還元糖は、それぞれムタローゼ・GOD法(和光純薬工業, Glucose C-Test Wako), Somogyi-Nelson法⁹⁾により測定した。また揮発性脂肪酸(VFA)は水蒸気蒸留法とガスクロマトグラフィー¹⁰⁾で測定した。

結 果

1 混合ルーメン細菌のセルロース分解に及ぼす可溶性炭水化物の影響

グルコースあるいはグルコースを構成単位とするセロビオース, マルトース, デンプンを0, 0.2, 0.4, 0.6% (w/v) 含む培地でのセルロース分解性を調べその結果をFig. 2に示した。0.2%添加時はすべての炭水化物添加区で, また0.4%添加時はセロビオース, マルトース, デンプン添加区で, セルロース分解活性はコントロールに比べ高くなった。これに対し, 0.4%グルコース添加区および0.6%グルコース, セロビオース, マルトース添加区のセルロース分解活性は逆に低下した。0.6%添加時のこの活性の低下は著しく, コントロールの活性が26であるのに対し, グルコース添加時には1.2, セロビオース添加時には5.8, マルトース添加時でも9.2の活性を示すにすぎなかった。一方デンプンを0.6%添加した場合の活性は24で, コントロールとほぼ等しい活性を示した。

2 混合ルーメン細菌と可溶性炭水化物との培養液がセルロース分解性に及ぼす影響

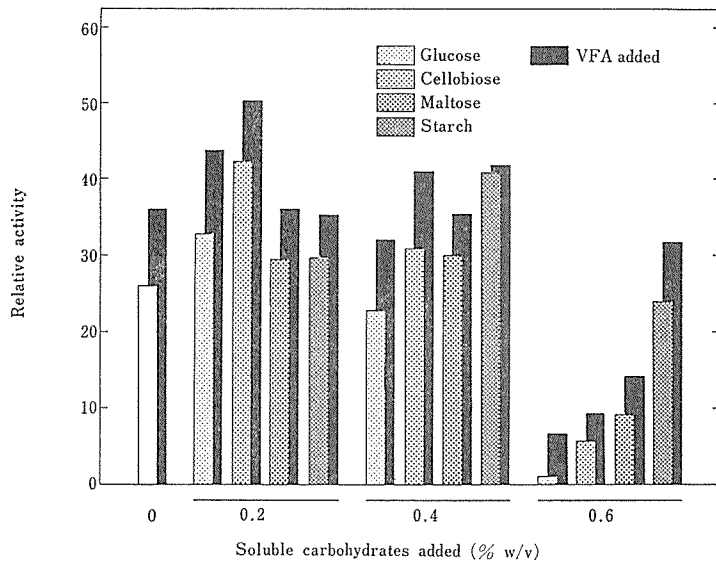


Fig. 2. Effect of different levels of soluble carbohydrates on cellulose digestion and additive effect of VFA on cellulose digestion. Data represent averages of duplicate bottles.

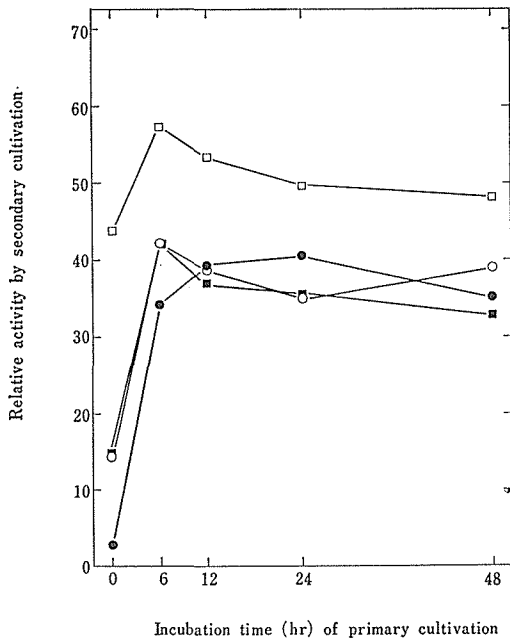


Fig. 3. Comparative effects of various soluble carbohydrates on cellulose digestion in two-stage cultivation system. Data represent averages of duplicate bottles. ●: glucose, ○: cellobiose, ■: maltose, □: starch.

この実験は2段階培養法によって行った。この際1次培養液を2次培地の成分として40%加えたので、1次培地にはグルコース、セロビオース、マルトースあるいはデンプンを1.5%(w/v)加え、1次培養0時間の1次培養液から2次培地に移行する可溶性炭水化物量を前記実験1の最高添加量0.6%に一致させた。1次培養時間は0, 6, 12, 24および48時間、セルロース分解率を測定する2次培養時間は24時間としセルロース分解率を測定した。同時に1次培養液中の全糖量、遊離グルコース、還元糖およびVFAを測定した。

セルロース分解活性をFig.3に示した。グルコース、セロビオース、マルトースおよびデンプン添加区のいずれも、6時間の1次培養によってセルロース分解活性は急激に増加し、それ以上に1次培養時間を延長しても活性に大きな変化は認められなかった。セルロース分解活性の最高値は、デンプン、セロビオースおよびマルトース添加区では1次培養6時間に、グルコース添加区では24時間に認められ、それぞれの活性は57.3, 42.1, 42.1および40.4であった。したがって、セルロース分解活性は、すべての1次培養時間においてデンプン添加区で最も高く、他の可溶性炭水化物添加区ではほぼ同じ活性を示した。しかしながら、

Table 2. Time course changes in total sugar, glucose and reducing sugar in primary cultures grown on various soluble carbohydrates.

Sugar in primary culture	Carbohydrate in primary medium	Incubation time (hr.)				
		0	6	12	24	48
Total sugar (g as glucose / 100ml)	Glucose	1.46	0.61	0.26	0.26	0.27
	Cellobiose	1.54	1.12	0.37	0.35	0.35
	Maltose	1.46	0.70	0.27	0.27	0.28
	Starch	1.38	0.76	0.17	0.15	0.15
Glucose (mg/100 ml) Reducing sugar (mg as glucose /100ml)	Cellobiose	2.1	11.5	0.4	1.7	3.8
	Maltose	4.3	44.0	1.3	0.4	2.6
	Starch	8.6	34.2	0.4	0.9	0
	Starch	14.0	217.3	43.9	47.0	46.9

1次培養0時間の活性と1次培養によって増加する活性がほぼ定常値になる12時間の活性との比較によって得られるセルロース分解活性の増加は、グルコース36.5、セロビオース24.5、マルトース22.0、デンプン9.7となり、1次培養の影響はデンプンで最も小さかった。

1次培養液中の全糖量、遊離グルコースおよび還元糖を Table 2 に示した。全糖量測定の結果は、1次培地に添加した炭水化物は培養12時間まで直線的に急激に低下してその後は低下したその水準が維持されることを示した。グルコース、マルトースおよびデンプン添加区では、培養6時間で添加量のほぼ半量が消失したのに対し、セロビオース添加区における消失量は添加量の約1/4であった。また12-48時間の培養時に残存する可溶性炭水化物量は、セロビオース添加区で最も多く、次いでほぼ等しいグルコース添加区とマルトース添加区、最も少なかったのはデンプン添加区であった。

1次培養液中の遊離グルコースは、培養6時間にすべての添加区でピークを示し、その量はマルトース、デンプン添加区で多くセロビオース添加区では比較的少なかった。遊離グルコースは培養12時間で消失し、それ以上の培養によってもその状態は持続した。デンプン添加区で測定した還元糖も遊離グルコースと同様培養6時間でピークを示し、培養12時間では

Table 3. Production of individual VEAs in primary cultures grown on various soluble carbohydrates

Production of VFAs mmoles/100ml culture	Carbohydrate in primary medium	Incubation time (hr.)				
		0	6	12	24	48
Total VFA	Glucose	Trace	5.36	7.64	6.16	4.22
	Cellobiose	Trace	3.85	4.16	4.32	4.79
	Maltose	Trace	3.58	4.43	3.22	3.11
	Starch	Trace	3.16	7.58	6.32	4.53
Acetic acid	Glucose	—*	3.86	5.51	4.56	3.14
	Cellobiose	—	2.95	3.19	3.15	3.59
	Maltose	—	2.71	3.44	2.51	2.41
	Starch	—	2.33	5.37	4.48	3.26
Propionic acid	Glucose	—	1.30	1.85	1.38	0.93
	Cellobiose	—	0.75	0.82	0.99	1.02
	Maltose	—	0.71	0.79	0.58	0.57
	Starch	—	0.70	1.88	1.58	1.11
Butyric acid	Glucose	—	0.14	0.19	0.16	0.10
	Cellobiose	—	0.10	0.11	0.13	0.12
	Maltose	—	0.12	0.14	0.09	0.09
	Starch	—	0.09	0.24	0.19	0.11
Isovaleric acid	Glucose	—	0.06	0.09	0.06	0.05
	Cellobiose	—	0.05	0.04	0.05	0.06
	Maltose	—	0.04	0.06	0.04	0.04
	Starch	—	0.04	0.09	0.07	0.05

* The value is below the limitation of determination

急激に低下して0時間時の約3倍のレベルになり以後ほとんど変化しなかった。

グルコース、セロビオース、マルトースおよびデンプン添加区の1次培養液中に蓄積するVFA量をTable 3に示した。各炭水化物添加区のVFA総量、酪酸、プロピオン酸、酢酸およびイソ酪酸は、すべて同様の蓄積パターンを示した。しかしこれら脂肪酸の蓄積パターンは、添加した可溶性炭水化物によって2型に分類することができた。すなわちその1つは、培養時間の増加とともに12時間まで直線的に急激に増加しその後直線的に48時間まで減少するグルコース添加区とデンプン添加区であり、もう1つは6時間まで急激に増加するがその後12時間では若干の増加をしそれ以後は漸増あるいは漸減を示すセロビオース添加区、マルトース添加区であった。前群の最高値は後群のその約2倍であったが、48時間の値は両群でほとんど差がなかった。なお、イソ酪酸はすべての炭水化物添加区でどの培養期間においても微量しか存在せず、また正吉草酸以上の脂肪酸は検出されなかった。

3 1次培養液中に蓄積したVFAのセルロース分解に及ぼす効果

過去の報告からVFAは混合ルーメン細菌によるセルロース分解を促進すると考えられ、本実験においても1次培養液中にVFAの著しい増加を観察したので、その増加量に相当するVFAを通常培養用の培地に可溶性炭水化物と共に添加しセルロース分解性及び可溶性炭水化物の効果を調べた。得られた結果をFig. 2に示した。添加したVFAは、可溶性炭水化物の添加量にかかわらず、すべての添加区でセルロースの分解を高めることを示し、1次培養液中に蓄積したVFAは混合ルーメン細菌によるセルロース分解に対し促進効果を持っていることが確認された。

考 察

一般的に可溶性炭水化物の少量添加は混合ルーメン細菌のセルロース分解性を高め、多量の添加は逆にその分解を低下させるといわれている^{4,5,11}。セルロース分解活性の測定培地への糖添加の影響を調べた本実験の結果もほぼこの見解を裏付けるものであった。本実験はさらに、グルコースはそれほど多量の添加でなくともセルロース分解性を抑制し、デンプンは相当多く添加しても抑制はなく、マルトース、セロビオースはこの両者のほぼ中間的性質を持っており、グルコースを構成単位とする糖であってもセルロース分解性に対する効果に差があることを明らかにした。

単糖、少糖類はセルロース分解菌にとって易利用性であるため、難分解性のセルロースに先行して単糖、少糖類が利用され、そのためにセルロースの分解がおろそかになる可能性がある。事実、ルーメン内の主要なセルロース分解菌である *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes* は純粋培養時に単糖、少糖類を利用することが知られている^{12,13,14}。また Smith ら⁶)は *Ruminococcus albus* のセルラーゼ活性をセロビオースとグルコースが阻害することを証明している。一方これらのセルロース分解菌のほとんどは、純粋培養時にデンプンを利用することができない^{12,13,15}。したがって、セルロース分解菌にとって易利用性でありセルラーゼ活性を阻害し得るグルコース、マルトース、セロビオースの多量の存在はセルロース分解を妨げるのに対し、デンプンは難利用性のため前記三糖と同量であってもセルロース分解を抑制できなかったものと思われる。しかしデンプ

ンの効果については、デンプン質飼料を20~30%粗飼料に添加して給与すると粗繊維の消化率が低下することから^{11,15)}、本実験条件下でもさらにデンプンの添加量を増せば、セルロース分解率は低下する可能性がある。

少量の可溶性炭水化物の添加がセルロース分解を促進する過程には、混合ルーメン細菌による可溶性炭水化物の資化が関与していると考えられる。少量の可溶性炭水化物によるセルロース分解菌の賦活の可能性と共に、可溶性炭水化物の代謝産物のセルロース分解促進効果が理由としてあげられる。B群ビタミン¹⁶⁾、プリン化合物¹⁶⁾、VFA¹⁷⁾それにバリン、プロリン、ロイシン等のアミノ酸¹⁸⁾にセルロース分解促進効果があるといわれ、また少量のデンプン添加はデンプン利用細菌を増殖させ自己消化により遊離したアミノ酸は、アミノ酸利用細菌の脱アミノ作用により側鎖脂肪酸となり、これをセルロース分解菌が利用すること¹⁹⁾が確認されている。

可溶性炭水化物の1次培養によるセルロース分解活性の増加は、活性がほぼ定常になる12時間の1次培養でそれぞれの糖添加時に、グルコース：36.5、セロビオース：24.5、マルトース：22.0、デンプン：9.7であった。一方1次培養液中に残存する添加糖の測定結果から、セルロース分解性測定の2次培地に移行する添加糖は、2次培地の濃度で1次培養0時間の場合0.6%、12時間の場合平均0.1%以上と推定することができる。この2次培地における可溶性炭水化物量の0.6%から0.2%への減少は、前述の〔可溶性炭水化物の少量添加は混合ルーメン細菌のセルロース分解を促進するが多量添加は抑制する〕との結果から、セルロース分解活性の増加をもたらすものと考えられる。そこでFig. 2からこの増加量を算出すると、グルコース：31.6、セロビオース：36.6、マルトース：20.3、デンプン：5.7となり、1次培養によるセルロース分解活性の上昇の大部分を添加糖の濃度の減少によって説明し得る。したがって、1次培養によるセルロース分解活性の上昇の大部分は、添加した可溶性炭水化物が1次培養によって減少したために、添加糖のセルロース分解に対する抑制が働かなくなった結果と考えられる。

VFAは混合ルーメン細菌によるセルロース分解を促進することが報告されており^{17,20,21)}、本実験の1次培養液中にもVFAの著しい増加を認めたので、その増加量に相当するVFAを通常培養用の培地に可溶性炭水化物と共に添加したところ、セルロース分解活性は0.2~0.6%の添加水準のすべての糖でVFAの添加により増加し、VFAの有効性が確認された。したがって0.2%の糖添加時に認められたVFAの効果は、12時間の1次培養によるセルロース分解活性の上昇に関与している可能性がある。しかしその効果は、Fig. 2から0.2%のそれぞれの糖の添加時にグルコース：11.0、セロビオース：8.0、マルトース：6.5、デンプン：5.5となり、前述の添加糖の減少によるセルロース分解活性の上昇効果と比べ小さいものであった。したがって、1次培養によるセルロース分解活性の上昇に添加糖の代謝の結果発生するVFAも1部関与しているものと思われる。

要 約

グルコースとグルコースを構成単位とするセロビオース、マルトースおよびデンプンが混合ルーメン細菌のセルロース分解に及ぼす影響を調べるとともに、これらの糖をあらかじめ

混合ルーメン細菌と0—48時間培養しこの1次培養液を含む2次培地でセルロース分解性を測定してこの1次培養がセルロース分解に及ぼす影響を調べた。

セルロース分解活性は、0.2%の可溶性炭水化物添加時はすべての添加区で、0.4%添加時はセロビオース、マルトース、デンプン添加区で、コントロールに比べ高くなった。これに対し、0.4%グルコース添加区および0.6%グルコース、セロビオース、マルトース添加区のセルロース分解活性は逆に低下した。しかし0.6%のデンプン添加区の活性はコントロールとほぼ等しい活性を示した。

6時間の1次培養によってセルロース分解活性はどの糖を添加した場合にも急激に増加し、それ以上に1次培養時間を延長しても活性に大きな変化は認められず定常値を示した。1次培養0時間と12時間の活性の差すなわち1次培養によるセルロース分解活性の増加は、グルコース：36.5、セロビオース：24.5、マルトース：22.0、デンプン：9.7となり、1次培養の影響はグルコース添加で最も大きくデンプン添加で最も小さいことが明らかになった。1次培養液中の全糖量は、1次培養12時間まで直線的に減少しその後は48時間までその水準が維持された。したがって、セルロース分解活性を測定した2次培地の糖の濃度は、1次培養0時間の0.6%が12時間には0.2%以下となった。1次培養による2次培地の糖濃度の低下が、セルロース分解活性の抑制の解除となり、1次培養によるセルロース分解活性の上昇になったものと考えられる。また1次培養液中にはVFAの蓄積がみられ、この量に相当するVFAはセルロース分解の促進効果を持っていることが確認された。

以上の結果から、グルコース、セロビオース、マルトース、デンプン量の増減は、混合ルーメン細菌のセルロース分解を調節する重要な因子であること、またこれらの糖の中でセルロース分解を抑制する効果はグルコースが最も強くデンプンは最も弱いことが明らかになった。

引用文献

- 1) LENG, R. A., In chemistry and biochemistry of herbage. vol. 3 (BUTLER, G. W. and R. W. BAILEY, ed.) 81-129. Academic Press, N. Y. 1973.
- 2) 湊 一, 乳牛の科学 (梅津元昌編), 185-203. 農文協, 東京, 1966.
- 3) 湊 一, 遠藤 明, 郡山寿旻, 植村定治郎, 日本農化会誌, 36: 106-110. 1962.
- 4) ARIAS, C., W. BURROUGHS, P. GERLAUGH and R. M. BETNKE, J. Anim. Sci. 10: 683-692. 1951.
- 5) BELASCO, I. J. J. Anim. Sci. 15: 496-508. 1956.
- 6) SMITH, W. R., I. YU and R. E. HUNGATE, J. Bacteriol. 114: 729-737. 1973.
- 7) 湊 一, 遠藤 明, 郡山寿旻, 植村定治郎, 日本農化誌 36: 101-106. 1962.
- 8) 掘越弘毅, 生化学領域における光電比色法各論2 (関根, 笹川, 森田, 木村, 倉富編), 36-39. 南江堂, 東京, 1962.
- 9) 北村元佐, 柴田 進, 日常臨床生化学定量法〈現代診断・検査法大系別巻〉, 中山書店, 東京, 1963.
- 10) 榎木茂彦, 動物栄養試験法 (森本監修), 416-418, 養賢堂, 東京, 1971.
- 11) HOFSLUND, S., J. I. QUIN and R. CLARK, J. Vet. Sci. 23: 395-409. 1948.

- 12) BRYANT, M. P., J. Anim. Sci. 22 : 801-813. 1963.
- 13) HUNGATE, R. E., The rumen and its microbes. 1-533. Academic press N. Y. 1966.
- 14) HOLDEMAN, L. A., E. P. CATO and W. E. C. MOORE, Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed., 1-152. Virginia Polytech. Inst. Stat. Univ. Virginia 1977.
- 15) HAMILTON, T. S., J. Nutr. 23 : 101-110. 1942.
- 16) BENTLEY, O. G., R. R. JOHNSON, S. VANECKO and C. H. HUNT, J. Anim. Sci. 13 : 581-593. 1954.
- 17) BENTLEY, O. G., R. R. JOHNSON, T. V. HERSHBERGER, J. H. CLINE and A. L. MOXON, J. Nutr. 57 : 389-400. 1955.
- 18) DEHORITY, B. A., O. G. BENTLEY, R. R. JOHNSON and A. L. MOXON, J. Anim. Sci. 16 : 502-514. 1957.
- 19) MIURA, H., M. HORIGUCHI and T. MATSUMOTO, Appl. Environ. Microbiol. 40 : 294-300. 1980.
- 20) BENTLEY, O. G., A. LEHMKUHL, R. R. JOHNSON, T. V. HERSHBERGER and A. L. MOXON, J. Am. Chem. Soc. 76 : 5000-5001. 1954.
- 21) JOHNSON, R. R., B. A. DEHORITY and O. G. BENTLEY J. Anim. Sci. 17 : 841-850. 1958.

Effects of Carbohydrates on Cellulolytic Activity of Rumen Microorganisms *in vitro*

By Yutaka KARASAWA, Yasuhiko TOSHIMA and Kyuei KIBE

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

Summary

Cellulose digestion by rumen microorganisms *in vitro* was dependent on the amount and type of carbohydrate. The cellulose digestion was increased by the addition to medium of 0.2% glucose, 0.2 and 0.4% cellobiose, 0.2 and 0.4% maltose and 0.2 and 0.4% starch in final concentration but was decreased by the addition of 0.4 and 0.6% glucose, 0.6% cellobiose and 0.6% maltose, although starch addition of 0.6% caused neither increase nor decrease in cellulolytic activity.

Preincubation of glucose, cellobiose, maltose or starch with rumen microorganisms for 6 hours considerably enhanced cellulolytic activity of rumen microorganisms in medium containing culture of the preincubation as a component, but no further appreciable increase in the activity was produced by longer period of the preincubation in all carbohydrate additions. The increase in cellulolytic activity on each carbohydrate addition with preincubation period of 12 hours was as follows: glucose: 36.5, cellobiose: 24.5, maltose: 22.0, starch: 9.7. The determination of total sugar in preincubation cultures grown on these carbohydrates showed remarkable decreases in added carbohydrates in the cultures to fully explain the increases in cellulolytic activity caused by the preincubation of carbohydrates and rumen microorganisms.

The addition of VFAs, corresponding to the amount and type of VFA produced in preincubation cultures, to carbohydrate-containing medium for determination of cellulolytic activity produced higher cellulolytic activity than carbohydrate alone did at all levels of carbohydrate addition. The stimulatory effect of VFA on cellulose digestion appears to be partly involved in augmentation in cellulolytic activity by the preincubation of carbohydrate with rumen microorganisms.