

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05943

研究課題名(和文)ルーメン内微生物体タンパク質合成に寄与する発酵混合飼料中炭素画分の解明

研究課題名(英文)Studies on nutrients in ensiled total mixed ration contributed to microbial protein synthesis in rumen

研究代表者

近藤 誠 (Kondo, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50432175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛用の混合飼料をサイレージとして発酵貯蔵した場合、非発酵の飼料と比べて泌乳牛のルーメン内の微生物体タンパク質合成量は有意に低下せず、発酵貯蔵による影響は認められなかった。発酵混合飼料に含まれる炭素画分のうちルーメン微生物体タンパク質合成にかかわる成分としてデンプンが主要なエネルギー源であった。低分子の化合物としてはマンニトールが挙げられたが、発酵により消費されたスクロースやフルクトース、グルコースと比べてその含量は僅かであるため、微生物体タンパク質の合成への寄与は小さいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛用混合飼料のサイレージ発酵による炭素および窒素画分の変化とルーメン微生物のタンパク質合成に関する知見を得た。本研究をさらに発展させることで、発酵混合飼料を調製する酪農現場に対して、飼料原料の選択と配合割合の調節を的確に提案できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of ensiling of total mixed ration (TMR) on chemical composition and ruminal microbial protein synthesis in dairy cattle was evaluated. Microbial protein synthesis in rumen was not influenced in lactating dairy cattle fed ensiled TMR as compared to non-ensiled TMR. Among the compounds in ensiled TMR, starch was the main energy source to microbial protein synthesis in rumen. Soluble sugars (sucrose, fructose and glucose) were completely consumed during silage fermentation, thereby they did not contribute to the microbial protein synthesis. Mannitol was found in the ensiled TMR, but the contribution to the protein synthesis was less due to its low contents.

研究分野：畜産 飼料

キーワード：サイレージ 乳牛 ルーメン内微生物タンパク質合成量

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酪農現場では乳牛に必要な栄養素を満たすように牧草類に穀物などを組み合わせた「混合飼料」の形で給与されることが多い。混合飼料は栄養分と適度な水分を含むため腐敗しやすい。そのため、混合飼料の調製は毎日行う必要があり、多頭飼育や高齢化が進む今日の酪農家ではこの混合飼料の調製が労働の負担となっている。近年、この混合飼料の調製を個々の酪農家に代わり企業や組合が行う事例が増えつつあり、特に貯蔵や流通させるためにサイレージ化した「発酵混合飼料」が一部の地域で使われている。発酵混合飼料は酪農家の労働量軽減のため、今後日本の乳生産を支える飼料形態として期待されている。しかし発酵混合飼料では、本来発酵による貯蔵が必要でないトウモロコシや大豆などの穀物もサイレージとして発酵が進むため、乳牛が採食する際には飼料設計時と比べて栄養成分が変化していることが予想される。特に従来から研究の蓄積が多い牧草のサイレージと異なり、穀物に含まれる糖やデンプンなどの炭素画分やタンパク質などの窒素画分の変化が起きることで、採食する乳牛のルーメン内における微生物体タンパク質合成量に影響することが予想される。ルーメン内の微生物体タンパク質合成量は乳牛のタンパク質要求量の大半を担うため、乳牛体内でのタンパク質の利用効率や乳生産にとっても重要である。そのため、本研究では混合飼料の発酵過程で起きている炭素画分と窒素画分の変化とともに、ルーメン微生物に対する影響に着目し、以下の研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、実用規模で調製した乳牛用発酵混合飼料について、発酵貯蔵における炭素および窒素画分の変化を調査するとともに、*in vitro* でのルーメン培養系にてルーメン微生物によるタンパク質利用性に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、発酵混合飼料中の炭素および窒素画分の変化が、泌乳牛のルーメン内の微生物体タンパク質合成量に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳牛用発酵混合飼料の成分変化と *in vitro* ルーメン内発酵様相に対する季節の影響

乳牛用の混合飼料(粗飼料:濃厚飼料=45:55, TDN 72%, CP 15%)を夏季(6~8月)、秋季(9月~11月)、冬季(12月~1月)に毎月1回調製した。毎回それらを細断型ロールベラーにて成型した後、ストレッチフィルムで密封してサイレージ調製を行った。密封した混合飼料は屋外にて約45日間貯蔵した。混合飼料の調製時(発酵前)と屋外にて貯蔵させた後(発酵後)にサンプルを採集し、飼料一般成分、窒素画分、可溶性糖類、発酵品質の分析に用いた。同サンプルを *in vitro* ルーメン培養内の基質として供試し、培養液中のアンモニア態窒素および短鎖脂肪酸濃度を測定した。

#### (2) 乳牛用混合飼料の発酵貯蔵による炭素および窒素画分の変化とルーメン微生物のアンモニア態窒素取り込み量の比較

(1)の調査を6か所の異なる農場にて夏季に行った。各農場にて混合飼料の調製時(発酵前)と屋外にて貯蔵させた後(発酵後)にサンプルを2~3回収集し、(1)の調査と同様に発酵前後での成分の変化を調査した。同サンプルを *in vitro* ルーメン培養内の基質として供試し、培養液中のアンモニア態窒素濃度を測定した。また微生物のタンパク質合成阻害剤を培養系に加えることでアンモニア態窒素の取り込み量を比較した。

#### (3) 混合飼料の発酵貯蔵が泌乳牛のルーメン内微生物体タンパク質合成量に対する影響

泌乳中・後期の泌乳牛6頭に対して、発酵貯蔵させていない混合飼料とサイレージとして発酵させた発酵混合飼料をそれぞれ3週間給与した。非発酵の混合飼料は給与時期(12月~2月)に調製し、発酵混合飼料は非発酵の混合飼料と同一原料を用いて10月に調製し、屋外にて2か月~3か月貯蔵したものをを用いた。給与期間の最終の5日間にて残食を回収し飼料摂取量を求めた。また同5日間の午前、午後1回ずつ尿を採取した。尿中のクレアチニン濃度および体重から尿量を推定するとともに、プリン代謝産物(アラントイン+尿酸)からルーメン内での微生物体タンパク質合成量を推定した。

#### (4) 混合飼料の発酵貯蔵による低分子化合物群の変化

夏季に調製した混合飼料についてサイレージ発酵前と発酵後にサンプルを採取し、それらの水抽出液を対象に<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、メタボロミクス解析を行った。混合飼料に含まれる飼料原料として、3種類のサイレージ(イタリアンライグラスサイレージ、トウモロコシサイレージ、ビール粕サイレージ)が乾物中で40%を占め、残りは圧ペントウモロコシやフスマ、大豆粕などの濃厚飼料で構成されている混合飼料を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 乳牛用発酵混合飼料の成分変化と *in vitro* ルーメン内発酵様相に対する季節の影響  
乳牛用の発酵混合飼料を実用規模で調製した結果、可溶性糖類含量は乾物中で 4.3~7.3%から 0.9~4.0%程度まで減少し、夏季でその減少量が高かった。一方、発酵により乳酸や酢酸が増加し、乳酸が乾物あたり 3~11%と最も多く、次いで酢酸が 1~4%程度含まれた。混合飼料中の非繊維性炭水化物の含量は平均で 35%程度であり、発酵前後での変化率は可溶性糖類と比べて小さかった。窒素画分では、全窒素あたりの可溶性窒素画分の割合は発酵前で平均 25%、発酵後で 32%であり、特に夏季には発酵により増加した割合が高かった。アンモニア態窒素はサイレージ発酵により増加したが、全窒素に占める割合としては 2~6%と少なかった。続いて、これらの混合飼料を *in vitro* のルーメン培養系に加えた結果、発酵前と比べて発酵後の混合飼料では、培養 4 時間、8 時間、24 時間後にかけてアンモニア態窒素濃度が高く維持されており、微生物体タンパク質への取り込み量が少ない可能性が示唆された。一方、短鎖脂肪酸濃度については混合飼料の発酵による影響は認められなかった。これらの結果から、発酵混合飼料中の炭素および窒素画分は調製時と比べて発酵後（家畜への給与時）に変化しており、特に窒素画分はその変化量が夏季に多く、ルーメン内におけるタンパク質の利用効率の低下が起きる可能性が示唆された。

(2) 乳牛用混合飼料の発酵貯蔵による炭素および窒素画分の変化とルーメン微生物のアンモニア態窒素取り込み量の比較

6 か所の異なる農場にて発酵混合飼料を実用規模で調製した結果、炭素画分としてデンプンは発酵前後ともに平均 24%であり、発酵前後において含量の明確な変化は認められなかった。一方、可溶性糖類の含量は発酵前で 4.3%であったのに対して、発酵後では 1.0%となり、いずれの農場でも共通して 8 割近く減少した。また、窒素画分では、全窒素あたりの可溶性窒素画分の割合は発酵前で平均 26%、発酵後で 41%といずれの農場においても増加したが、増加量は 10 から 23%ポイントと様々であった。全窒素あたりの溶解性窒素画分が 50%程度まで高まった農場も散見された。またその他の窒素画分として、プロテアーゼによる分解性画分、酸性デタージェント不溶性画分は、発酵に伴う変化は認められなかった。これらのことから、混合飼料の発酵貯蔵過程で起こる窒素画分の変化は、アンモニアや遊離アミノ酸、ペプチドなどが含まれる低分子の画分のみが増加することが明らかとなった。続いて、これらの混合飼料を *in vitro* のルーメン培養系に加えた結果、発酵前と比べて発酵後の混合飼料では、培養液中のアンモニア態窒素濃度が高く維持されており、微生物体内へアンモニア態窒素の取り込み量が少ない可能性が示唆された。さらに、微生物のタンパク質合成阻害剤を培養系に加えることでアンモニア態窒素の取り込み量を比較した結果からも、発酵後の混合飼料では発酵前と比べて、アンモニア態窒素の取り込み量が低下していることが間接的に証明した。以上より、混合飼料を発酵貯蔵させることで、ルーメン微生物がエネルギーとして利用できる炭素画分が減少することで、微生物体内へのアンモニア態窒素の取り込み量が減少し、タンパク質合成量が低下する可能性が示唆された。

(3) 混合飼料の発酵貯蔵が泌乳牛のルーメン内微生物体タンパク質合成量におよぼす影響

泌乳牛に給与した混合飼料の成分として、発酵混合飼料では、非発酵の混合飼料と比べて可溶性糖類が乾物中で 6%から 1%程度に減少しており、デンプン含量については両者ともに 21%程度であり発酵による差は認められなかった。溶解性窒素画分は全窒素あたり 23%から 32%に増加していた。このように成分の異なる非発酵の混合飼料および発酵混合飼料を与えた場合、1 日あたりのルーメン内微生物体タンパク質合成量はそれぞれ 2325g/日と 2107g/日であり、有意な差は認められなかった。また、摂取した飼料中のタンパク質からルーメン内の微生物体タンパク質への変換効率は、それぞれ 71.9%と 62.0%であり、両者の間に有意な差は認められなかった。これらのことから、発酵混合飼料では可溶性糖類が発酵過程で消費されているが、デンプンや繊維からのエネルギー供給が行われることで、ルーメン内の微生物体タンパク質が非発酵の混合飼料と同程度に合成されたと推察された。Miyaji et al. (2018) では、サイレージ発酵により飼料米中のデンプンのルーメン内分解速度が速まることを報告している。発酵混合飼料に含まれる穀物（トウモロコシや大麦など）においてもデンプン分解速度が速まり、ルーメン微生物による炭素画分と窒素画分の同期化が進み、微生物体タンパク質合成量が低下しなかった原因としても考えられた。

(4) 混合飼料の発酵貯蔵による低分子化合物群の変化

発酵混合飼料に含まれる混合飼料に含まれる低分子化合物のうち、ルーメン微生物のタンパク質合成に関与するエネルギー源としての候補化合物をメタボロミクス解析により探索した。発酵前の混合飼料に含まれる化合物として、含量が多い順にフルクトース、グルコース、エタノール、乳酸、酢酸、1,2-プロパンジオール、スクロース、*n*-プロパノールが検出された。一方で、発酵後の混合飼料に含まれる成分としては、同様に乳酸、酢酸、エタノール、マンニトール、グリシン、アラニン、コハク酸、*n*-アラニンが検出された。これらのうち、混合飼料のサイレージ発酵により顕著に増加した化合物として乳酸、酢酸、エタノール、マンニトールであった。Ahmed et al. (2013) では、マンニトールからはグルコースと同程度に短鎖脂肪酸が産生されることや発酵によるガスが発生することを報告している。そのため、発酵混合飼料に含まれる低分子の炭素

画分としては、マンニトールからもルーメン微生物が増殖に必要なエネルギーを得ていることが推察された。ただし、本研究で調査した発酵混合飼料中のマンニトール含量は1%程度と少なく、発酵により消費したスクロースやフルクトース、グルコースと比べて僅かであるため、微生物体タンパク質の合成への寄与は小さいと考えられた。

#### <まとめ>

本研究では、実用規模で調製した乳牛用の発酵混合飼料を対象に、炭素画分と窒素画分の成分変化を中心に調査を行った。その結果、混合飼料の発酵により可溶性糖類が顕著に低下するが、デンプンは発酵前の段階と同程度に残存することを示した。窒素画分については、発酵により低分子の溶解性画分が高まり、特に夏季に顕著に増加することを示した。またこの増加量は混合飼料を調製する農場間でも異なることを示した。発酵混合飼料を乳牛に給与した結果、非発酵の混合飼料と比べてルーメン内の微生物体タンパク質合成量は有意に低下せず、発酵貯蔵による影響は認められなかった。この原因としては、可溶性糖類の消費に対して、デンプンの残存量が多く、ルーメン微生物に対してデンプンから十分にエネルギーが供給されているためと推察された。また発酵混合飼料に含まれる低分子の炭素画分として、マンニトールは微生物が利用可能なエネルギー源として挙げられたが、発酵により消費されたスクロースやフルクトース、グルコースと比べてその含量は僅かであるため、微生物体タンパク質の合成への寄与は小さいと考えられた。なお本研究では泌乳牛のルーメン内微生物体タンパク質合成量に対する検証を秋季から冬季にかけて行っており、発酵混合飼料の溶解性窒素画分の割合は全窒素中で30%程度と低かった。他の農場では夏季には溶解性窒素画分の割合が50%程度と高値を示す事例も確認していることから、今後夏季に泌乳牛のルーメン内微生物体タンパク質合成量が低下しないか検証を行うことが必要である。また、混合飼料の発酵による成分変化を6か所の農場間で比較した結果、溶解性窒素画分の増加程度は農場により違いが認められたが、その要因については不明のままとなっている。今後、混合飼料に組み込む飼料原料の特性や発酵に関与する微生物叢の面からも発酵混合飼料中の炭素および窒素画分の変化を明らかにすることが必要であると考えられた。

#### <引用文献>

- Ahmed S. et al. (2013) In vitro rumen fermentation characteristics of some naturally occurring and synthetic sugars. *Italian Journal of Animal Science*, 12:e57. doi: 10.4081/ijas.2013.e57
- Miyaji M. et al. (2018) Effect of different methods for conserving rice grain on in situ ruminal degradation and in vivo nutrient digestion and rumen fermentation in steers. *Animal Science Journal*, 89:972-978. doi: 10.1111/asj.13026.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jayanegara A, Sujarnoko T.U, Ridla M, Kondo M, Kreuzer M	4. 巻 103
2. 論文標題 Silage quality as influenced by concentration and type of tannins present in the material ensiled: A meta-analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition	6. 最初と最後の頁 456 - 465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jpn.13050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kondo Makoto, Mulianda Randi, Matamura Masaya, Shibata Toshiyuki, Mishima Takashi, Jayanegara Anuraga, Isono Naoto	4. 巻 92
2. 論文標題 Validation of a phenol sulfuric acid method in a microplate format for the quantification of soluble sugars in ruminant feeds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------