〔農化 第 35 卷, 第 4 号, p. 360~366, 1961〕

反芻胃の消化に関する研究 (第 20 報)*

反芻胃内微生物による揮発性脂肪酸生成に影響する諸因子について

糸野文雄**, 神立 誠 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 10 月 11 日 受理

反芻胃内に於ける消化は主として微生物の作用によるもので、その結果揮発性脂肪酸 (以下 V.F.A. と略記する) とガスが生成されることは既によく知られている。我々も従来反芻胃内の V.F.A. の生成について研究して来たが^(1,2), 反芻胃内 V.F.A. 濃度は唾液、飲水による稀釈、胃壁よりの吸収、内容物の移動等の複雑な影響を受けるので、飼料と V.F.A. との定量的関係を知ることは極めて困難である。このため従来多くの研究者により人工ルーメン法による研究が行われて来た。これは反芻胃内の反応を出来るだけ正確にフラスコ内で再現しようとする試みであり、セルロース酸酵に関する研究では Marston⁽³⁾, Louw et al.⁽⁴⁾, Burroughs et al.⁽⁵⁾, 尿素の利用に関する研究では Pearson, Smith⁽⁶⁾, McNaught⁽⁷⁾ 等を始め多くの研究者により用いられてきた。

本報では反芻胃内に於ける V.F.A. の生成の研究に関連して in vitro に於ける酸酵に影響すると考えられる二、三の因子と V.F.A. 生成との関係について、また各種炭水化物と V.F.A. 生成との関係について研究した結果を報告する。

実 験 の 部

A. 実験方法

I. 実験動物の飼養管理 体重約 50 kg の第 1 胃にフィステルを設着したコルデール種緬羊牡 1 頭を使い、昼間は野乾草を自由に与え、夕方市販乳牛用完全配合飼料 (粗蛋白質 19%) 150 g を与えた。内容物を採取する前日は大体濃厚飼料を与えなかった。内容物は乾草給与前の午前 10 時にフィステルを通して採取した。

第 1 図 培 養 装 置

II. 培養装置と培養法 第 1 図に培養装置を示す。培養液としては反芻胃内容物を 2 重ガーゼで搾った液を 1 l 分液漏斗に入れ約 30 分間 39° で前培養した。この処理は酸酵により生じたガスと共に植物粉末が上に浮ぶので、これを除くためである。培養液の V.F.A. 濃度を下げるためには塩類溶液で 2 倍に稀釈した。

この塩類溶液は神立・高橋等がプロトゾアの人工培養実験に使用しているもので、その組成を第 1 表に示す。基質として小麦澱粉 1 g を使い、培養時間は原則として 4 時間とした。培地を嫌氣的に保つために流動パラフィンを培養液上に浮べた。培養によって生じたガスは三角フラスコにつけたガス溜に導き、

第 1 表 稀釈用塩類溶液の組成	
KCl	0.2 g
NaCl	6.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2.4 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
蒸 溜 水	1000 ml
pH	7.0

流動パラフィンの動きをビュレットの目盛でよみガス生成量を測定した。従って培養液に溶けているガスの量は測定しなかった。

III. 定量法 V.F.A. の定量法は前報⁽¹⁾ と同じ分配クロマトグラフィーで行なった。従来の方法を改めた点は試料採取量を 5 ml とし、水蒸気蒸溜にはマイクロケルダールの装置を使い、溜出液を 200 ml とした点である。ガス分析法は炭酸ガスは苛性カリによる吸収法、メタンはヘンペルの爆発

* Studies on the Reticulo-rumen Digestion. Part XX. Factors Influencing Volatile Fatty Acids Production by Rumen Microorganisms in Vitro.

By Fumio KUMENO and Makoto KANDATSU (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

** 現在日本配合飼料株式会社研究場

(本論文は東京大学大学院化学研究科における糸野文雄の学位論文の一部である)

第 2 表 V. F. A. 生成に対する培養時間の影響 (1)

フ ラ ス コ 号	培 養 条 件	培 養 時 間	酢 酸		プロピオン酸			酪 酸		合 計	ガ ス	メ タ ン	メ タ ン
			m. mol/ flask	%	m. mol/ flask	%	増加量 m. mol/ flask	m. mol/ flask	%	m. mol/ flask	増加量 m. mol/ flask	ml	ml
1	未稀	0	6.6	67	—	—	—	1.8	18	—	9.8	—	—
1	基質無添加	8	7.1	66	+0.5	—	2.2	20	+0.4	10.8	+1.0	2.9	—
2	未稀	4	7.8	67	+1.2	—	2.0	17	+0.2	11.6	+1.8	25.7	12.2
3	未稀	8	8.2	63	+1.6	—	2.9	22	+1.1	13.0	+3.2	54.8	26.5
4	二倍	4	7.8	64	+1.2	—	2.4	20	+0.6	12.1	+2.3	7.7	5.0
5	稀	8	8.0	61	+1.4	—	3.3	25	+1.5	13.2	+3.4	30.2	20.2

第 3 表 V. F. A. 生成に対する培養時間の影響 (2)

フ ラ ス コ 号	培 養 条 件	培 養 時 間	酢 酸		プロピオン酸			酪 酸		合 計	ガ ス	pH
			m. mol/ flask	%	m. mol/ flask	%	増加量 m. mol/ flask	m. mol/ flask	%	m. mol/ flask	増加量 m. mol/ flask	ml
1	基質無添加	0	4.4	62	—	—	—	1.2	17	—	7.1	—
1	基質無添加	11	5.1	62	+0.7	—	1.7	21	+0.2	8.2	+1.1	1.5
2	二倍	2	5.1	64	+0.7	—	1.6	20	+0.1	8.0	+0.9	2.2
3	二倍	4	5.1	61	+0.7	—	1.9	23	+0.4	8.3	+1.2	5.1
4	稀	8	6.2	63	+1.8	—	2.2	22	+0.7	9.9	+2.8	16.8
5	稀	11	6.0	57	+1.6	—	2.6	25	+1.1	10.5	+3.4	—

第 2 図 各時間に於けるガス生成量 (1)

() 番号: フラスコ番号

培養液は 100 ml, 2 倍稀釈は 200 ml を用い基質には夫々 1 g の小麦澱粉を加えた。又測定値の小数点以下 2 桁目はクロマトグラフィーの誤差範囲なので 4 捨 5 入した。この表によると 4 時間培養に比べて 8 時間培養ではプロピオン酸のモル百分率が増加し酢酸のモル百分率が減少している。このことは培養時間を延長すると生成される V. F. A. 成分組成に変化を生ずることを示している。各培養時間に於けるガス生成量は第 2 図に示す。ガス生成量は時間と共にほぼ直線的に増加する。2 倍稀釈の場合は未稀釈に比べて生成量は少なかったが、メタンの含量は多かった。第 3 表には培養時間を 2 時間から 11 時間まで変えて同じ実験をくりかえした結果を示す。pH の測定は pH 試験紙を使った。この場合にも培養時間が 8 時間から 11 時間になると実験 I と同様に酢酸の割合は 8 時間までは殆んど変化しないが 11 時間になると増加した。この場合の培養液は全部 2 倍稀釈で培養液 200 ml に澱粉 1 g を加えた。第 3 図にはガス生成量を示したが、実験 I に比べて生成量は少なく酸酵が弱かったので、培養時間の影響がおくられて現われたものと考えられる。

II. V. F. A. 濃度の影響 V. F. A. 生成に及ぼす V. F. A. 濃度の影響についての結果を第 4 表に示す。フラスコ (1) は塩類溶液で 2 倍に稀釈し酸濃度を下げた。フラスコ (2) には V. F. A. 濃度を増すためには反芻胃内

第 3 図 各時間に於けるガス生成量 (2)

() 番号: フラスコ番号

ピペットにより定量した。

B. 実験結果

I. V. F. A. 生成に対する培養時間の影響 培養時間を 4 及び 8 時間とした際生成される V. F. A. の量及び V. F. A. 各成分の変化を第 2 表に示す。未稀釈の

第4表 V.F.A. 生成に対する V.F.A. 濃度の影響 (1)

フ ラ ス コ 号	培 養 条 件	培 養 時 間	醋 酸		プロピオン酸		酪 酸		合 計		ガ ス ml	pH
			m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml		
1	酸無	0	2.7	67	—	0.7	18	—	0.6	15	4.0	—
	添加	4	3.3	70	+0.6	0.7	15	+0.0	0.7	15	+0.7	12.7 6.7
2	酸混合	0	5.3	66	—	1.5	18	—	1.3	16	8.1	—
	物添加	4	6.2	70	+0.9	1.5	17	+0.0	1.2	13	+0.8	17.9 6.9
3	酢酸	0	6.6	82	—	0.7	9	—	0.7	9	8.0	—
	添加	4	7.8	84	+1.2	0.8	9	+0.1	0.7	8	+1.3	12.5 6.8
4	酢酸	0	8.9	86	—	0.7	7	—	0.7	7	10.3	—
	添加	4	9.7	88	+0.8	0.7	6	+0.0	0.6	6	+0.7	13.0 6.7

第4図 各時間に於けるガス生成量
() 番号: フラスコ番号

液を水蒸気蒸溜して集めた V.F.A. 混合物を添加した。フラスコ (3) 及び (4) には酢酸のみを加えた。pH は 10% 苛性ソーダで 7.0 に調節した。この実験から酸増加量に特定の傾向は認められず、V.F.A. 濃度 4.0~10.3 m. mol/100 ml の範囲では酸の蓄積は V.F.A. 生成に影響しないことがわかる。但しフラスコ (3) では酢酸の増加量が他に比べて大きい有意の差とは考えられない。ガスの生成量は第 4 図に示したが、V.F.A. 濃度増加の影響はみられない。この実験では生成された酸が殆んど酢酸だけでプロピオン酸、酪酸の生成は誤差範囲であったことから、微生物群の構成が酢酸生成に関与する種類に偏っていたと推定される。第 5 表には同様の実験を培養時間を 8 時間に行なった結果を示す。酸の濃度を増すためにフラスコ (3), (4), (5) には反芻胃内液から蒸溜によって得た V.F.A. 混合物を加え、フラスコ (6), (7), (8) には酢酸、プロピオン酸、酪酸の混合物を加えた。前者の V.F.A. モル百分率は酢酸 58.8%, プロピオン酸 17.8%, 酪酸

(但し更に高級酸も含む) 23.4% であり、後者の場合は酢酸 65.9%, プロピオン酸 21.3%, 酪酸 12.8% であった。増加酸濃度の変動はかなり大きい、酸濃度増加との間に特定の関連は認められない。増加酸濃度の変動が大きいのはこの値が培養前後の濃度差で表されており、培養液の酸濃度が大きくなると増加量の割合が相対的に少なくなり、クロマトグラフィーの誤差が大きく影響するためである。第 5 図には各時間に於けるガス生成量

第5表 V.F.A. 生成に対する V.F.A. 濃度の影響 (2)

フ ラ ス コ 号	培 養 条 件	培 養 時 間	酢 酸		プロピオン酸		酪 酸		合 計		ガ ス ml	pH
			m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml		
1	酸無	0	2.0	71	—	0.4	14	—	0.4	14	2.8	—
	添加	8	3.2	62	+1.2	0.9	17	+0.5	1.1	21	+2.4	77.2 6.1
2	酸混合	0	2.0	71	—	0.6	15	—	0.5	14	3.1	—
	物添加	8	3.3	64	+1.3	0.9	18	+0.3	0.9	18	+2.0	67.5 6.1
3	反芻胃内液	0	3.3	60	—	1.0	18	—	1.2	22	5.5	—
	混合物添加	8	4.8	60	+1.5	1.5	19	+0.5	1.7	21	+2.5	77.6 6.2
4	反芻胃内液	0	4.6	58	—	1.4	18	—	1.9	24	7.9	—
	混合物添加	8	6.4	58	+1.8	2.1	19	+0.7	2.6	23	+3.2	75.1 6.2
5	酢酸	0	5.9	53	—	2.3	20	—	3.0	27	11.2	—
	添加	8	7.8	56	+1.9	2.6	19	+0.3	3.4	25	+2.6	74.2 6.3
6	純粋酢酸	0	4.5	67	—	1.3	19	—	0.9	14	6.7	—
	混合物添加	8	5.7	64	+1.2	1.7	19	+0.4	1.5	17	+2.2	60.9 6.2
7	純粋酢酸	0	7.0	67	—	2.0	19	—	1.4	13	10.4	—
	混合物添加	8	8.0	67	+1.0	2.2	19	+0.2	1.7	14	+1.5	66.1 6.2
8	純粋酢酸	0	9.6	68	—	2.6	19	—	1.7	13	13.5	—
	混合物添加	8	10.6	67	+1.4	3.2	20	+0.6	2.1	13	+2.4	67.4 6.2

第 6 表 V. F. A. 生成に対する V. F. A. 濃度の影響

フ ラ ス コ 号	培 養 時 間	酢 酸		プロピオン酸		酪 酸		合 計		ガ ス	pH
		m. mol/ 100ml	%	増加量 m. mol/ 100ml	%	m. mol/ 100ml	%	m. mol/ 100ml	増加量 m. mol/ 100ml		
培 養 前		3.5	72	—	—	0.8	16	—	—	—	7.0
1	4	4.3	70	+0.8	—	0.9	15	+0.1	—	37.0	6.2
2	4	4.3	72	+0.8	—	0.9	15	+0.1	—	35.9	6.2
培 養 前		6.6	68	—	—	1.8	19	—	—	—	7.0
3	4	7.2	67	+0.6	—	2.1	19	+0.3	—	36.1	6.2
4	4	7.8	68	+1.2	—	2.1	19	+0.3	—	39.4	6.2
培 養 前		8.9	69	—	—	2.3	18	—	—	—	7.0
5	4	9.6	68	+0.7	—	2.6	18	+0.3	—	34.5	6.3
6	4	9.5	68	+0.6	—	2.5	18	+0.2	—	37.9	6.3
培 養 前		11.0	65	—	—	3.5	21	—	—	—	7.0
7	4	13.1	66	+2.1	—	3.7	19	+0.2	—	36.4	6.2
8	4	11.7	66	+0.7	—	3.4	19	+0.1	—	37.3	6.2

第 5 図 各時間に於けるガス生成量
() 番号: フラスコ番号 第 6 図 各時間に於けるガス生成量
() 番号: フラスコ番号

を示したが、酸濃度の増加とガスの発生量との間に特定の関連は認められない。第 6 表には更に同一実験をくりかえした結果を示す。酸濃度は反芻胃内液より得た V. F. A. 混合物 (酢酸 66.9%, プロピオン酸 20.7%, 酪酸 12.4%) を添加して増した。酸増加量の変動は前回と同様大きい特定の傾向は認められない。又第 6 図には各時間に於けるガス生成量を示したが、培養液の酸濃度が 4.9~16.9 m. mol/100 ml と著しく異なっているに拘らず、ガス生成量はほぼ等しく、両者の間に特定の関係は認められない。以上 3 回の実験を通じて認められることは、pH を 7 附近に調節しておけば、酸濃度の増加は反芻胃内微生物の酸酵に特に影響を及ぼさないことである。

III. 内容物採取時刻による影響 反芻胃内の微生物群は飼料の摂取によって影響をうけることが考えられるが、微生物群の構成に変化が起るか否かは生成される V. F. A. 各成分組成、ガスの種類の変化によって間接的に知ることが出来る。そこで前報⁽²⁾で使った実験飼料 (野乾草 100 g, 澱粉 200 g, 大豆粕 120 g) を使い、給飼直前と食後 5 時間の 2 回反芻胃内容物を採取し、前回までと同様な方法で澱粉 1 g を加え 4 時間培養し、生成さ

第7表 V.F.A. 生成と内容物採取時との関係 (1)

4時間培養

培養条件	内採取物時	フラスコ番号	酢酸		プロピオン酸		酪酸		酸		合計		ガス ml	pH
			m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask		
2倍稀釈	給直銅前	培養前	4.2	71 —	1.2	20 —	0.5	9 —	5.9	—	5.9	—	—	—
		1	5.1	72 +0.9	1.3	18 +0.1	0.7	10 +0.2	7.1	+1.2	7.1	+1.2	9.3	6.6
	食5時後間	培養前	5.1	72 +0.9	1.3	18 +0.1	0.7	10 +0.2	7.1	+1.2	7.1	+1.2	9.8	6.6
		2	5.1	72 +0.9	1.3	18 +0.1	0.7	10 +0.2	7.1	+1.2	7.1	+1.2	9.8	6.6
未稀釈	給直銅前	培養前	4.8	72 —	1.4	21 —	0.5	7 —	6.7	—	6.7	—	—	—
		3	5.3	71 +0.5	1.6	21 +0.2	0.6	8 +0.1	7.5	+0.8	7.5	+0.8	4.0	6.4
		4	5.1	71 +0.3	1.6	22 +0.2	0.5	7 +0.0	7.2	+0.5	7.2	+0.5	4.0	6.4
		5	4.2	71 —	1.2	20 —	0.5	9 —	5.9	—	5.9	—	—	—
	食5時後間	培養前	5.0	71 +0.8	1.3	19 +0.1	0.7	10 +0.2	7.0	+1.1	7.0	+1.1	22.1	6.4
		6	5.1	73 +0.9	1.3	19 +0.1	0.6	9 +0.1	7.0	+1.1	7.0	+1.1	24.3	6.4
		7	4.8	72 —	1.4	21 —	0.5	7 —	6.7	—	6.7	—	—	—
		8	5.1	70 +0.3	1.7	23 +0.3	0.5	7 +0.0	7.3	+0.6	7.3	+0.6	16.8	6.2
			5.3	71 +0.5	1.8	24 +0.4	0.4	5 -0.1	7.5	+0.8	7.5	+0.8	14.8	6.2

第8表 V.F.A. 生成と内容物採取時との関係 (2)

4時間培養

培養条件	内採取物時	フラスコ番号	酢酸		プロピオン酸		酪酸		酸		合計		ガス ml	pH
			m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask		
2倍稀釈	給直銅前	培養前	3.3	72 —	0.8	17 —	0.5	11 —	4.6	—	4.6	—	—	—
		1	3.7	68 +0.4	0.9	17 +0.1	0.8	15 +0.3	5.4	+0.8	5.4	+0.8	9.8	6.8
	食5時後間	培養前	3.8	73 +0.5	0.8	15 +0.0	0.6	12 +0.1	5.2	+0.6	5.2	+0.6	9.6	6.8
		2	5.4	71 —	1.5	20 —	0.7	9 —	7.6	—	7.6	—	—	—
未稀釈	給直銅前	培養前	6.1	68 +0.7	1.9	21 +0.4	1.0	11 +0.3	9.0	+1.4	9.0	+1.4	5.8	6.2
		3	5.9	70 +0.5	1.8	21 +0.3	0.8	9 +0.1	8.5	+0.9	8.5	+0.9	2.9	6.2
		4	3.3	72 —	0.8	17 —	0.5	11 —	4.6	—	4.6	—	—	—
		5	3.7	70 +0.4	0.9	17 +0.1	0.7	13 +0.2	5.3	+0.7	5.3	+0.7	22.3	6.6
	食5時後間	培養前	3.7	69 +0.4	1.0	18 +0.2	0.7	13 +0.2	5.4	+0.8	5.4	+0.8	21.8	6.6
		6	5.4	71 —	1.5	20 —	0.7	9 —	7.6	—	7.6	—	—	—
		7	6.0	69 +0.6	1.8	21 +0.3	0.9	10 +0.2	8.7	+1.1	8.7	+1.1	16.7	6.0
		8	5.5	68 +0.1	1.7	21 +0.2	0.9	11 +0.2	8.1	+0.5	8.1	+0.5	15.0	6.0

第9表 炭水化物と V.F.A. 生成との関係 (1)

4時間培養

基質	培養条件	フラスコ番号	酢酸		プロピオン酸		酪酸		酸		合計		ガス ml	メタン ml	メタン %
			m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask			
キシラン	A	培養前	5.9	68 —	1.5	17 —	1.3	15 —	8.7	—	8.7	—	—	—	—
		1	5.9	66 +0.0	1.6	18 +0.1	1.4	16 +0.1	8.9	+0.2	8.9	+0.2	11.4	6.0	52.5
キシロース	B	培養前	6.4	69 +0.5	1.6	17 +0.1	1.3	14 +0.0	9.3	+0.6	9.3	+0.6	4.7	3.4	72.3
		2	6.9	66 +1.0	2.2	21 +0.7	1.3	13 +0.0	10.4	+1.7	10.4	+1.7	70.2	19.7	28.0
セルロース	A	培養前	7.4	65 +1.5	2.6	23 +1.1	1.3	12 +0.0	11.3	+2.6	11.3	+2.6	15.6	12.0	77.0
		3	6.1	66 +0.2	1.7	19 +0.2	1.4	15 +0.1	9.2	+0.5	9.2	+0.5	53.7	15.0	37.9
基質無	B	培養前	6.1	66 +0.2	1.7	19 +0.2	1.4	15 +0.1	9.2	+0.5	9.2	+0.5	53.7	15.0	37.9
		4	6.1	68 +0.2	1.6	18 +0.1	1.3	14 +0.0	9.0	+0.3	9.0	+0.3	3.1	—	—

A: 未稀釈 B: 2倍稀釈

第10表 炭水化物と V.F.A. 生成との関係 (2)

12時間培養

基質	培養条件	フラスコ番号	酢酸		プロピオン酸		酪酸		酸		合計		ガス ml	メタン ml	メタン %
			m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask %	m. mol/flask	増加量 m. mol/flask			
キシラン	A	培養前	5.9	68 —	1.5	17 —	1.3	15 —	8.7	—	8.7	—	—	—	—
		1	6.7	69 +0.8	1.6	17 +0.1	1.4	14 +0.1	9.7	+1.0	9.7	+1.0	24.0	12.7	53.0
キシロース	B	培養前	6.7	67 +0.8	1.8	18 +0.3	1.6	15 +0.3	10.1	+1.4	10.1	+1.4	12.7	9.1	71.6
		2	7.2	63 +1.3	2.9	25 +1.4	1.4	12 +0.1	11.5	+2.8	11.5	+2.8	125.2	35.1	28.0
セルロース	A	培養前	7.9	61 +2.0	3.5	27 +2.0	1.6	12 +0.3	13.0	+4.3	13.0	+4.3	59.5	45.8	72.0
		3	6.1	67 +0.2	1.7	19 +0.2	1.3	14 +0.0	9.1	+0.4	9.1	+0.4	87.5	24.5	28.0
基質無	B	培養前	5.9	67 +0.0	1.5	17 +0.0	1.4	16 +0.1	8.8	+0.1	8.8	+0.1	5.6	—	—
		4	5.9	67 +0.0	1.5	17 +0.0	1.4	16 +0.1	8.8	+0.1	8.8	+0.1	5.6	—	—

A: 未稀釈 B: 2倍稀釈

第 7 図 炭水化物とガス生成との関係

- (1) キシラン(未稀釈) (4) キシロース(2倍稀釈)
 (2) キシラン(2倍稀釈) (5) セルロース(未稀釈)
 (3) キシロブ(未稀釈) (6) 基質無(2倍稀釈)

間は第 9 表では 4 時間, 第 10 表では 12 時間である。

培養によって生成された V.F.A. の成分組成をキシランの場合について計算すると, 酢酸の増加は夫々 0.5, 0.8, 0.8 m.mol/100 ml であり, プロピオン酸の増加量は 0.1, 0.1, 0.3 m.mol/100 ml, 酪酸の増加量は 0.0, 0.1, 0.3 m.mol/100 ml となる。その百分率の平均は酢酸 70.0%, プロピオン酸 16.6%, 酪酸 13.3% となる。但し第 9 表フラスコ (1) は酢酸増加量が零であり例外として計算から除いた。同様にしてキシロースの場合は酢酸 50.9%, プロピオン酸 45.6%, 酪酸 3.5% の割合で酸が生成された。キシランに比べるとプロピオン酸の割合が大きく, 酢酸と酪酸の割合が小さい。セルロースの場合は酢酸 52.4%, プロピオン酸 28.6%, 酪酸 19.0% であり, キシランに比べて酢酸の割合で小さくプロピオン酸の割合が大きい。第 7 図にガスの生成量を示す。キシロースのガス生成量が最も多く, 次にセルロース, キシランの順である。12 時間培養後ガス生成量ではキシラ

れる V.F.A. 各成分組成とガスの量を測定した結果を第 7, 8 表に示す。

酸の増加量を食前と食後と比較すると第 7 表では食後は食前に比べて酢酸の増加量が減り, プロピオン酸の増加量が増えている。第 8 表では酢酸の増加量は両者共大差ないが, プロピオン酸の増加量は食後の方が増えている。酪酸の増加量については変りない。結局食後 5 時間になるとプロピオン酸の生成割合が相対的にも絶対的にも増えている。ガスの生成量では食前に比し食後がかなり減少している。

IV. 炭水化物の種類と V.F.A. 生成の関係 基質としてキシラン, キシロース, セルロースを使い, 生成される V.F.A. 各成分組成との関係を実験した結果を第 9, 10 表に示す。キシランは稲藁より抽出したもので前報⁽⁸⁾に用いたものである。キシロースは市販の D-キシロースであり, キシランの主成分であるからキシランとの比較のために使い, セルロースは濾紙粉末を使った。基質は夫々 1 g 使い培養液は未稀釈の場合 100 ml, 2 倍稀釈の場合は 200 ml である。培養時

第 11 表 炭水化物の種類と V.F.A. 生成との関係 培養時間 6 時間

基質	フラスコ号	酢酸			プロピオン酸			酪酸			合計		ガス ml	pH
		m.mol/100ml	%	増加量 m.mol/100ml	m.mol/100ml	%	増加量 m.mol/100ml	m.mol/100ml	%	増加量 m.mol/100ml	m.mol/100ml	増加量 m.mol/100ml		
培養前		4.5	73	—	1.1	17	—	0.6	10	—	6.2	—	—	—
野乾草	1	5.1	69	+0.6	1.5	20	+0.4	0.8	11	+0.2	7.4	+1.2	20.3	6.0
	2	5.7	70	+1.2	1.5	19	+0.4	0.9	11	+0.3	8.1	+1.9	27.5	6.0
セルロース	3	4.9	69	+0.4	1.4	20	+0.3	0.8	11	+0.2	7.1	+0.9	12.0	6.4
	4	4.8	70	+0.3	1.2	18	+0.1	0.8	12	+0.2	6.8	+0.6	9.0	6.2
キシラン	5	5.0	68	+0.5	1.4	19	+0.3	1.0	13	+0.4	7.4	+1.2	20.4	6.2
	6	5.1	69	+0.6	1.5	20	+0.4	0.8	11	+0.2	7.4	+1.2	22.3	6.0
澱粉	7	5.5	66	+1.0	1.9	23	+0.8	0.9	11	+0.3	8.3	+2.1	89.4	5.6
	8	6.2	67	+1.7	2.1	23	+1.0	0.9	10	+0.3	9.2	+3.0	107.1	5.8

第 12 表 炭水化物の種類と生成した V.F.A. モル百分率の関係

炭水化物	キシロース			野乾草粉末			セルロース			キシラン			澱粉		
	平均	範	囲	平均	範	囲	平均	範	囲	平均	範	囲	平均	範	囲
酢酸	51.9	46.9	57.2	54.8	46.0	63.7	43.3	37.7	53.2	61.0	39.4	79.4	59.6	41.5	81.4
プロピオン酸	45.0	42.0	49.6	28.1	22.0	34.1	37.7	30.2	44.7	24.0	15.7	33.0	22.3	6.6	47.6
酪酸	3.1	0.8	6.8	17.1	14.3	19.8	18.9	2.1	27.0	14.9	3.1	31.1	18.1	-0.9	35.7
分析回数	4			2			4			5			52		

ンはセルロースの約 1/4 であるが, V.F.A. 生成量は約 2 倍である。第 11 表の実験は従来と多少異なる実験条件下で行なった。即ち反芻胃内の微生物活性を高めて短時間に多くの V.F.A. が生成されるようにするため、実験の前日濃厚飼料を朝夕 2 回 200 g ずつ与えた。内容物採取は翌日食前に行ない、反芻胃内液 200 g に基質 2 g を加えて 6 時間培養した。基質として実験 1 と同様にキシラン、セルロースを使い、比較のため野乾草粉末（前報⁽²⁾の実験に使用したもの）と小麦澱粉を使った。ガスの生成量は澱粉、野乾草、キシラン、セルロースの順に多くなっており、V.F.A. 生成量もこれと同じ順序で多い。しかしガスの生成量は V.F.A. 生成量と定量的関係は認められない。第 12 表には炭水化物の種類と V.F.A. 成分組成の関係をまとめて示した。実験条件により同一物質から生成される V.F.A. もその成分組成がかなり大きく変動するが、その平均値をとって比較すると野乾草、キシラン、澱粉より生成される V.F.A. 組成はほぼ反芻胃内に於ける組成に近い値を示したが、セルロースとキシロースではプロピオン酸の割合が反芻胃内より大きい値を示した。

V. ガスの生成量について ガス生成量を未稀釈と 2 倍稀釈の場合とで比較すると 12 例中 1 例を除いて他はすべて未稀釈の場合の方が多い。またそのメタン含量を比較するとすべて倍稀釈した場合が大きくなっている。しかし、この原因については不明であり今後の研究に待たねばならない。ガス生成量と V.F.A. 生成量の間に比例関係はないが、同一基質で同一培養条件ではガス生成量の大きい方が V.F.A. 生成量も大きい傾向はある。しかし基質が異なる場合は必ずしもこの関係があるとは限らない。

考 察

Hershberger⁽⁹⁾ 等は醗酵の初期にセルロースより生成される酸は酢酸の割合が大きい、培養 15 時間以後ではプロピオン酸の方が多く生成され、48 時間に生成される酢酸とプロピオン酸はほぼ等量に達すると報告している。また Marston⁽³⁾, Louw⁽⁴⁾ 等は培養時間が 24~48 時間でセルロースより生成される酸は酢酸とプロピオン酸が等量であるか乃至はプロピオン酸の方が多いことを報告している。Elsden⁽¹⁰⁾ もまたグルコース、セルロース、乳酸等からはプロピオン酸が最も多く生成されたと報告しているが、その培養時間は 90~141 時間であった。著者等の場合も培養時間が長くなるとプロピオン酸の割合が増える傾向は認められたが、上述の研究者等の実験結果と比較して酢酸の割合が大きくプロピオン酸の割合が小さかったのは、培養時間が 4~12 時間で比較的短かったためと考えられる。

従来醗酵が進み V.F.A. が蓄積されるとセルロースの消化が阻げられ、半透膜を使って透析して酸を除くとよい結果が得られることが知られている⁽⁴⁾。しかし澱粉を基質とした短時間培養では、酸の濃度増加そのものは醗酵を阻げないことが明らかになった。従って半透膜の効果は酸の除去以外の他の要因によると考えられる。

V.F.A. 及びガス生成能が食前と食後で異なっているのは興味ある事実である。前報⁽²⁾で澱粉を与えた後 5~7 時間後には反芻胃内のプロピオン酸の割合が増えることを報告したが、本報の結果から考察するとこの場合、プロピオン酸生成に関与する微生物群の割合が増えているものと考えられる。同じ小麦澱粉より生成される V.F.A. 成分組成が第 4 表と第 11 表の場合では著しく異なっていることから、場合によっては微生物群の構成が大きく変り同じ基質から異なった V.F.A. 成分組成が生成される可能性も認められる。

また本報の結果ではガス生成能と V.F.A. 生成能が必ずしも単純な比例関係にない。従って反芻胃内微生物の活性を知るためにガス生成能のみを測定するのは不充分であると考えられる。

要 約

反芻胃内微生物による澱粉よりの V.F.A. 生成に影響すると考えられる二、三の因子について in vitro で検討した。

(1) 培養時間が長くなるにつれて酢酸の割合が減って、プロピオン酸の割合が増える傾向がある。酪酸は特に変化しない。

(2) 培養液の酸濃度を反芻胃内液を蒸溜して得た V.F.A. 混合物を加えて増加させた場合には 4~10.3 m. mol/100 ml の範囲内では V.F.A. 生成及びガスの生成に影響を与えない。

(3) 反芻胃内容物の採取時期が給飼直前の場合と、飼料給与後 5 時間の場合とでは、前者に比し後者の方が生成される V.F.A. 成分のうち酢酸の割合が小さく、プロピオン酸の割合が大きかった。又、ガス生成量も前者に比し後者の方が少なかった。

(4) 炭水化物として澱粉、セルロース、キシラン、キシロース、乾草粉末を使い生成される V.F.A. 成分組

成を比較した結果、澱粉、キシラン、乾草粉末から生成された酸の割合は反芻胃内に存在する酸の割合に近い値であったが、セルロースとキシロースでは反芻胃における組成よりプロピオン酸の割合が大きく、醋酸の割合が小さかった。

本研究の概要は昭和 34 年 4 月、日本農芸化学会大会にて講演した。

(1) 神立 誠, 糸野文雄 : 本誌, 33, 255(1959).	J., 37, 148 (1943).
(2) 糸野文雄, 神立 誠 : 本誌, 33, 740(1959).	(7) M. L. McNaught : <i>ibid.</i> , 49, 325 (1951).
(3) H. R. Marston : <i>Biochem. J.</i> , 42, 564 (1948).	(8) 糸野文雄, 神立 誠 : 本誌, 33, 737(1959).
(4) J. G. Louw et al. : <i>Science</i> , 110, 478(1948).	(9) T. V. Hershberger, O. G. Bentley : <i>Agr. and Food Chem.</i> , 4, 952 (1956).
(5) W. Burroughs et al. : <i>J. Animal Sci.</i> , 9, 513 (1950).	(10) S. R. Elsdon : <i>J. Exptl. Biol.</i> , 22, 51 (1945).
(6) R. M. Pearson, J. A. B. Smith : <i>Biochem.</i>	

[農化 第 35 巻, 第 4 号, p. 367~371, 1961]

脂質のクロマトグラフィーとその生化学的応用 (第 4 報)*

ペーパークロマトグラフィーによるトリグリセリドの簡易分析

平 山 修 (京都府立大学農学部), 井 上 吉 之 (東京農工大学)

昭和 35 年 10 月 11 日 受 理

グリセリドの分別には臭化法, 低温分別結晶法, 酸化法等の諸方法があるが, これらはいずれも分離性及び操作の簡易性等の諸点に欠点をもっており, 油脂の鑑別, グリセリド組成の検索あるいはグリセリドに関連する生化学的研究等に利用するにはなお困難な方法である。この分野にクロマトグラフィー法が期待されるところは大きい, 天然油脂を構成するグリセリドが複雑かつ構造が類似しているため種々の難点があり, これに関する報告も少い。最近に至り小数の研究者⁽¹⁻⁶⁾によってこの面の研究が開拓され, トリグリセリドの相互分離がある程度可能な方法が発表されている。

著者らはさきに酢酸水銀付加法によるトリグリセリドのペーパークロマトグラフィー⁽⁷⁾およびカラムクロマトグラフィー⁽⁸⁾を発表したが, これらの方法では高度不飽和トリグリセリドの分離が不完全であり, またジフェニルカルバゾン呈色が不安定であるため定量化が困難である。本報ではトリグリセリドを直接試料とし, シリコーン・オイルを固定相とするペーパークロマトグラフィーを新しく試み, 高度不飽和トリグリセリドの分離に好結果を得ると同時に, 安定な過マンガン酸カリウム呈色を利用することによって, 近似定量をも可能にしたのでその結果を報告する。

実験および結果

1. トリグリセリドの合成 トリオレイン, トリリノレイン及びトリリノレニン⁽⁹⁾は Wheeler らの方法⁽⁹⁾にほぼ従ってそれぞれオレイン酸, リノール酸, リノレン酸をグリセリンと反応させて合成した。即ちグリセリン

第 1 表 合成グリセリドの性状

グリセリド	I. V.		A. V.
	実測値	理論値	
トリオレイン	86.5	86.0	0.1
トリリノレイン	171.3	173.3	0.3
トリリノレニン	259.5	261.6	0.2

と計算量より 6% 過剰の脂肪酸とをカトルエンスルホン酸触媒 (グリセリン, 脂肪酸合計量の 1%) の存在の下に, 窒素気流中減圧下 110° で 2 時間加熱した。反応生成物をエーテル抽出し, 抽出液を水洗, 乾燥, エーテルを溜去の後, ベンゼン溶液として珪酸カラム⁽¹⁰⁾によるクロマト精製を行い第 1 表の如き純粋なトリグリセリドを得た。

* Chromatography of Lipids and its Biochemical Applications. Part IV. A Simple Method for Analysis of triglycerids by Paper Chromatography.

By Osamu HIRAYAMA (College of Agriculture, Kyoto Prefectural University) and Yoshiyuki INOUE (Tokyo University of Agriculture and Technology)

第 3 報 (牛脂脂質成分の分別と構成脂肪酸分布) 平山 修 : 京都府立大学学術報告・農学, 12, 139 (1960).