反芻獣第 1 胃内発酵の生態的機作に関する研究 (第 4 報)*

単離菌株の大量添加による反芻獣第 1 胃内発酵菌群の
揮発性脂肪酸産生能について (その 1)

大岡忠昭⁺, 湊 一, 遠藤 明⁺⁺, 樋口允子, 村上健夫, 植村定治郎⁺⁺⁺

(東北大学農学部農業微生物研究室, ⁺ 旭化成工業株式会社技術研究所,

⁺⁺ 千葉製粉株式会社研究部, ⁺⁺⁺ 東京大学応用微生物研究所)

昭和 39 年 4 月 15 日 受 理

緒 言

さきに Warner 型人工ルーメン内で綿羊第 1 胃 (以下ルーメンと呼ぶ) の内容物に繊維素, 澱粉, カゼイン蛋白をそれぞれ与えて 4~8 時間作用させた場合に, 与えた基質に応じて特徴のある低級揮発性脂肪酸類 (以下 VFA と略) の産生パターンの得られることを認めた。

他方に樋口の単離した胃内の嫌気性繊維素分解菌の多くのものは澱粉分解性であるが, これらの澱粉分解性の繊維素分解菌が他の多種多様の菌の混在するルーメン内容物中でもよく澱粉の分解に関与するか否かを知る目的で, 上述の VFA 産生パターンを適用することを試みた。これらの澱粉分解性繊維素分解菌のうちで *Ruminococcus albus* 862-2 株はルーメン上清培地で澱粉, 繊維素から酪酸を特徴的によく産生するが, 今人工ルーメン内でこの菌をルーメン内容物に大量に与えた場合に, もしこの菌が主導的にこれらの基質の分解に関与するとすれば, この菌の特徴を発揮してこれらの基質よりの VFA

産生パターンを変動することが予想される。

得られた成績はほぼこの予想をみたしたのでここに報告する。

実 験 方 法

(1) 実験動物と飼養管理: 体重約 40kg の第 1 胃にフィスツラ (永久瘻管) を着装した去勢雄綿羊を前報⁽¹⁾ 所載の条件と同様に管理した。

(2) 大量に添加する菌の培養方法: 供試菌株を第 1 表に示す組成の培地 10 ml にて嫌氣的に 37° 12 時間前培養後, この培養液を同じ組成の培地 11 を含むナス型フラスコに移植して 48~54 時間培養後, 9,000 r. p. m. 10 分間の遠心処理により集菌し, 前報⁽¹⁾ 所載の菌希釈用塩類溶液 15 ml に懸濁して菌液を準備し 1 時間以内に使用した。

第 1 表 嫌気性菌用の培地組成

成 分	濃 度 (g/l)
トリブティカーゼ	15 g
酵母エキス	5 g
グルコース	5 g
無機塩類溶液 A*	25 ml
無機塩類溶液 B**	50 ml
炭酸ソーダ (Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O)	4 g
システイン塩酸塩	0.5 g

* 1.8% K₂HPO₄

** 0.9% KH₂PO₄, 1.8% (NH₄)₂SO₄, 1.8% NaCl
0.18% MgSO₄·7H₂O, 0.18% CaCl₂·2H₂O

(3) 人工ルーメン技法: 朝給餌前のルーメン内容のガーゼ濾液をルーメン発酵菌液として使用し, 前報⁽¹⁾ 所載の Warner 型人工ルーメンのセロファン管内にルーメン発酵菌液 45 ml をいれ, さらに菌液 5 ml と繊維素 (東洋紙製粉末紙 A) あるいは澱粉 (市販馬鈴薯澱粉)

* On the Ecological Mechanism of the Rumen Fermentation. Part IV. Effects of the Addition of a Strain of the Ruminal Cellulolytic Bacteria to Gauze Filtrate of the Rumen Contents on the Volatile Fatty acid Production. (1)

By Tadaaki OOKA⁺, Hajime MINATO, Akira ENDO⁺⁺, Masako HIGUCHI, Takeo MURAKAMI, and Teijiro UEMURA⁺⁺⁺ (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, University of Tohoku; ⁺ Technical Research Laboratory, Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo; ⁺⁺ Research Laboratory, Chiba Milling Industry Co., Ltd., Chiba-ken; ⁺⁺⁺ The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

を 4% に加えて培養した。また菌液の代りに塩液 5 ml を添加したものを対照として炭酸ガス気流中で 38°, 4 時間ないし 8 時間培養した。

(4) 嫌気性の全生菌数計測法: 前報⁽¹⁾所載の方法に従い, 逐次 10 倍希釈法により準備した菌希釈液の 1 ml を RGCA 培地⁽²⁾ 5 ml に接種して, ワインベルグ管に充填して 37°, 1 ないし 2 週間培養後に出現する集落数から計数した。

(5) VFA の定量法: 全 VFA 量は前報⁽¹⁾と同様に Conway の微量拡散分析法に準じて定量した。各個 VFA の分画定量法も前報⁽³⁾と同様であり, ルーメン汁の遠心・上清 0.5~0.8 ml をアルカリで中和後, 湯浴上で蒸発乾燥して, シリカゲルによる分配クロマトグラフィーを行い, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 高級脂肪酸類を分別定量した。

(6) 澱粉の定量: 還流冷却器を付した丸底フラスコに培養後の発酵菌液 2 ml (基質を含む) と純水 200 ml とを入れ, さらに 25% 塩酸 20 ml を加えて沸騰湯煎中で 2 時間 30 分間加水分解を行い, ついで濾紙で濾過して残渣を除き, 熱湯で残渣を数回洗浄して冷却後正確に 500 ml にした。その 5 ml を用いて Somogyi 法⁽⁴⁾により含有する還元糖量を求めた。あらかじめ一定の澱粉量とそれを水解してえられる還元糖量との関係曲線を求めておき, 還元糖量から逆に残存する澱粉量を算出して消費された澱粉量を求めた。

(7) 人工ルーメン内における単離菌株の基質よりの VFA 産生能: Warner 型人工ルーメンを用い, セロファン管中に繊維素あるいは澱粉を 4% に加え, さらに給餌前のルーメンガーゼ濾液の 10,000 r. p. m. 15 分間の遠心上清 35 ml と, 別に単離菌株を大量培養して集菌して塩類溶液 30 ml に懸濁して用意した菌液の 15 ml とを加え全量を 50 ml として人工唾液⁽¹⁾ 250 ml 中に懸垂して炭酸ガス気流中で 38°, 4 時間培養した。

(8) 供試菌株: 綿羊ルーメン内容物より単離した嫌気性繊維素分解菌で, *Ruminococcus albus* 862-2 株である。

実験結果

Warner 型人工ルーメンの基質に諸種の飼料成分を用い, 4 時間培養時におけるそれぞれの基質よりの VFA 産生能について調べてきたが, 難分解性基質としての繊維素からはその産生量が少ないので, 菌添加による影響をより量的に増幅された形でとらえるために 4 時間培養

の他に 8 時間培養をも採用した。また実験を重ねたが同様の傾向を認めたので, 以下には 1 例を提出することにした。

(1) *Ruminococcus albus* 862-2 株による VFA 産生能

この菌株の生理的諸性質については別に報告の予定であるが, まずこの菌株のルーメン上清培地で 4 時間培養による繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生状況について検討した。供試の Warner 型人工ルーメンを使用し, こ

第 1 図 862-2 株の繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生型

[注] C₅<: C₅以上の酸 B: 酪酸
P: プロピオン酸 A: 酢酸
の略

の際産生された各個 VFA を前報⁽⁵⁾と同様に反応前の各個 VFA の濃度と比較したときの相対値で示したが, かくして得られる VFA 産生型は第 1 図に示した。

基質として繊維素を用い, 4 時間培養時には反応前に比べ高級脂肪酸類が 3 倍, 酪酸が 3.1 倍, プロピオン酸あるいは酢酸はむしろ減少する。また澱粉を基質にすると高級脂肪酸類が 3 倍, 酪酸が 2.8 倍, プロピオン酸が 2.5 倍, 酢酸が 1.4 倍まで濃度を増加した。すなわち, この菌株の

VFA 産生パターンとしては酪酸及び高級脂肪酸類の生成比の増大が特徴的である。

(2) 嫌気性全生菌数の変動

ついで供試のルーメン内容物について, 人工ルーメン内で繊維素あるいは澱粉を与えた場合にみられる嫌気性全菌数の変動を RGCA 培地を用いて調べた。その結果は第 2 図に示した。RGCA 培地生育菌数は反応前に 5×10^7 /ml を数えたものが, 澱粉添加 8 時間培養後に 1.7

第2図 862-2 株の大量添加による全嫌気性菌数の変動

[注] S+B: 澱粉+菌液添加区
C+B: 繊維素+菌液添加区
S: 澱粉, 菌無添加区
C: 繊維素, 菌無添加区

$\times 10^7/\text{ml}$ に減少し, また繊維素基質時でもその反応前のレベルより減少した。しかしこのルーメン内容物に供試の 862-2 株と澱粉とを添加し 8 時間培養をつづけた場合には RGCA 培地生育菌数には増減がみられず, 繊維素添加時に幾分減少の傾向を示した。

(3) 単離菌株大量添加によるルーメン発酵菌液の VFA 産生

ルーメン内容物のガーゼ汙液に供試の 862-2 株を大量に (ルーメン発酵菌液の全生菌数の約 6 倍量) 添加し繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生状況をみたが, これを菌無添加のものを対照としてまとめて示したのが第 3 図である。ルーメン発酵菌液の澱粉よりの VFA 産生は直線的に増加を示すが, 菌を添加した系では 4 時間以後は産生量が低下する。また繊維素基質では 4 時間培養以後に対照のルーメン発酵菌液の VFA 産生量は低下するが, さらに菌を添加した系でも同様の傾向である。いずれの基質に対しても菌添加の影響が 4 時間目ですでに現われ, 対照に比べて VFA 産生量の高まりが観察された。

また各個 VFA の濃度の変化を第 2 表に示した。前報⁽⁶⁾にならって反応前の個々の VFA 濃度に対する基質添加培養時のそれについての濃度比を算出して VFA 産生型として第 4 図に示した。繊維素あるいは澱粉よりの

第3図 862-2 株の大量添加によるルーメンガーゼ汙液の繊維素あるいは澱粉よりの全 VFA 産生状況

[注] C, C+B, S, S+B は第 2 図の注を参照。

第2表 862-2 株の大量添加によるルーメンガーゼ汙液の繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生 (単位: mmol/dl ルーメンガーゼ汙液)

培養時間	実験区	全 VFA	各個 VFA			
			C ₆ 以上	酪酸	プロピオン酸	酢酸
0	ルーメンガーゼ汙液	8.46	0.127	1.09	1.68	5.57
4	4% 澱粉	12.67	0.178	1.59	3.23	5.10
	4% 澱粉+菌液	16.93	0.380	2.97	3.30	10.60
	4% 繊維素	10.23	0.317	1.31	1.85	6.73
	4% 繊維素+菌液	11.45	0.973	1.64	2.08	6.86
8	4% 澱粉	16.38	0.544	1.59	4.69	9.67
	4% 澱粉+菌液	18.11	0.814	2.52	4.63	10.12
	4% 繊維素	10.57	0.592	0.94	1.95	7.08
	4% 繊維素+菌液	12.25	0.685	1.49	2.73	7.30

各個 VFA 産生状況は対照に比べて, 菌添加時に C₆ 以上及び酪酸の増加率が大きく, 前に指摘した単菌での性質があらわれている。すなわち菌添加 4 時間培養により澱粉よりの VFA 産生の増大が認められ, 反応前の濃度に比べ C₆ 以上の酸は 3 倍, 酪酸は 2.7 倍, プロピオン酸は 2 倍, 酢酸は 1.9 倍まで増加したが, 単菌培養時における酪酸及び C₆ 以上の脂酸類の増大の特徴をそのままあらわしている。また 4 時間あるいは 8 時間培養時にもプロピオン酸の増大が認められないのが注目値する。繊維素を基質とするときは 4 時間培養から 8 時間培養になるにつれ, 徐々にパターンを強化する形で単菌培

第 4 図 862-2 株の大量添加によるルーメンガーゼ汙液の繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生型の変動

〔注〕 C₆⁻, B, P, A は第 1 図の注を参照。

□ : 基質添加系 ▨ : 基質+菌液添加系

養時の性質も具現し, C₆ 以上の脂酸の比率が増大した。

(4) 澱粉の消費率

上述のようにルーメン発酵菌液に供試 862-2 株を大量に添加した場合には繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生量が対照に比べて増大するが, この VFA 産生量の高まりが, 添加した菌の影響にもとづくか否かを知る一端として基質の分解量を測定した。ただし繊維素の場合には短時間の培養時にその分解量が極めて少ないので, とくに澱粉についてのみ調べその成績を第 3 表に示した。その結果, 澱粉の消費は第 3 図に示した VFA 濃度の増加の傾向と一致しており, これよりみても大量に添加した菌は実際に澱粉の分解に関係したと考えられる。

考 察

反芻獣第 1 胃内で行われるルーメン発酵については, その菌群の構成の複雑さから, 実際にいかなる菌がこれ

第 3 表 862-2 株の大量添加によるルーメンガーゼ汙液の澱粉消費率の変化

実験区	培養時間	
	4	8
4 % 澱粉添加	18	33
4 % 澱粉+菌液添加	22	39

〔注〕 数字は澱粉の消費率を示し, 単位はパーセントである。

に関係しているかは現在最も重要な問題となっている。すでに述べたように, われわれは Warner 型人工ルーメン内でルーメン発酵菌群が与えられる基質に応じて特徴的な VFA 産生パターンを示すことを認めているが, この VFA 産生パターンは一定の飼養条件にある綿羊では盛夏時をのぞいて十分な再現性がみられるので, かなり安定したものであるといえる。このことはまたいわゆるルーメン発酵そのものがかなり安定した定常状態にあることを裏がきするものである。

この安定した VFA 産生パターンは供試の *Ruminococcus albus* 862-2 株の大量投与によって既述のように明らかに変動した。このことからこの菌が他の同性格の菌の混在時にも与えた澱粉や繊維素によく作用することが認められた。したがってこのような菌株については少なくともその菌が多数に存在する場合には, 実際の胃内でも繊維素あるいは澱粉の分解に対してその優位性を保持すると推定される。換言すると, このことは胃内に多数に存在している菌の飼料成分の分解に対する有用性が Hungate⁽⁶⁾ の指摘するように主導性を決定する面でかなり重要であることを裏がきしている。したがってまた, 供試の 862-2 株のような澱粉分解性繊維素分解菌は一般にルーメン内に多数に存在しているので, 胃内での澱粉の分解にこの種の菌が関与することの可能性も十分に大であるといえよう。

しかし, その反面, 供試の 862-2 株が単菌時に澱粉に対して示したプロピオン酸のかなりな産生が, 添加時には十分にこれを認め得なかったことはなお今後の問題として留意されねばならない。ルーメン内で産生される VFA 組成のうち, プロピオン酸は 2 次的に琥珀酸または乳酸より導かれるのに反して, 酢酸あるいは酪酸はむしろ与えられる飼料組成から直接的に生成されるとされ

ているが, 上述の成績はこのことをある程度裏がきしているかもしれない。なお, 他の繊維素分解菌の投与試験の成績は次報で報告する。

要 約

Warner 型人工ルーメンを用いて, ルーメン発酵菌液 (ルーメンガーゼ液) に *Ruminococcus albus* 862-2 株を大量に添加し, 38°, 4 あるいは 8 時間培養時における繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生作用について検討した。その結果次の成績を得た。

(1) ルーメン上清培地中における 862-2 株の繊維あるいは澱粉よりの VFA 産生型を調べると, いずれの基質に対しても酪酸及び C₆ 以上の脂酸類の産生比が大きかった。

(2) ルーメン発酵菌液に 862-2 株を大量 (ルーメン発酵菌液の約 6 倍量) に添加し繊維素あるいは澱粉よりの VFA 全産生量を調べると, 菌添加による全 VFA 産生量の高まりが認められた。

(3) ルーメン発酵菌液に 862-2 株を大量に添加し繊維素あるいは澱粉よりの VFA 産生パターンを調べると, 菌に特徴的なパターンを示した。すなわち繊維素に対し

て 8 時間培養時に, 澱粉に対して 4 時間培養時に 862-2 株の特性である酪酸及び C₆ 以上の脂酸類の生成比の増大を認めた。

(4) ルーメン発酵菌液に 862-2 株を大量に添加すると澱粉の分解率がルーメン発酵菌液そのものによるよりも高められた。

この研究をすすめるにあたり種々ご協力をいただいた東北大学農学部梅津元昌教授及び家畜生理学研究室の諸氏に深く感謝いたします。なおこの研究費の一部は農林水産技術会議の応用研究費によってまかなわれた。

(1) 湊 一, 遠藤 明, 郡山寿旻, 植村定治郎: 本誌, **36**, 101 (1962)。

(2) M. P. Bryant, L. A. Burkey: *J. Dairy Sci.*, **36**, 218 (1953)。

(3) 湊 一, 斎 敏行, 遠藤 明, 村上健夫, 植村定治郎: 本誌, **37**, 379 (1963)。

(4) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **194**, 19 (1952)。

(5) 湊 一, 遠藤 明, 郡山寿旻, 植村定治郎: 本誌, **36**, 106 (1962)。

(6) P. E. Hungate: *Bacteriol. Revs.*, **24**, 353 (1960)。