

学 位 論 文 題 名

ルーメン内飼料片への微生物付着および
微生物由来の繊維質分解酵素活性に影響する要因

学位論文内容の要旨

反芻家畜は、咀嚼、反芻活動およびルーメンに共生している微生物の発酵をとおりして粗飼料（主に繊維質）を分解利用している。しかし、反芻家畜によって摂取された繊維質へのルーメン微生物の付着、その微生物のもっている繊維質分解酵素の発現がどのような要因の影響を受けているかに関しては十分に解明されていない。それで本論文では、飼料片へのルーメン微生物の付着とそれに由来する繊維質分解酵素の活性との関連、これらが飼料片の物理的性状および栄養素（特に、窒素源）供給によってどのような影響を受けるかを検討したものであり、その内容の要旨は以下のとおりである。

1. 飼料片に付着する微生物量と繊維質分解酵素活性の動態

種々の粒度の飼料片における付着細菌およびプロトゾアの量とそれに由来する繊維質分解酵素活性の経時的変化を検討し、飼料片に付着する細菌量はプロトゾア量より多く、また、飼料給与後の早い時間では、飼料片に付着する細菌およびプロトゾアの量は増加するが、微生物由来の繊維質分解酵素の全活性（飼料片重量あたり）および比活性（微生物タンパク質あたり）は低く、活性の最大値は遅い時間に観察され、微生物量と酵素活性の発現とは同調していないことを見出した。粒度別飼料片に付着する微生物由来の繊維質分解酵素の活性は、飼料給与後の早い時間帯では小さい粒度の方に、遅い時間帯では分解可能な NDF を多く含有している大飼料片の方に高い値が観察され、繊維質分解酵素活性は飼料片の物理的および化学的な特性、ルーメン内 pH、付着する微生物の増殖ステージなどが影響することが示唆された。

2. 飼料片に付着する微生物量および繊維質分解酵素活性に及ぼす咀嚼の影響

微生物付着および繊維質分解酵素活性は給与する飼料片の粒度によって影響を受けることが観察され、飼料片粒度に影響する反芻家畜の咀嚼が飼料片への繊維質分解菌の付着および繊維質分解酵素の活性に与える影響を検討するために二つの *in situ* 実験を行った。実験1では、オーチャードグラス乾草の茎を 10cm と 2cm の長さに切断および粗粉碎した後、食道カニューレを装着した去勢牛に給与し、採食時の食塊を採取した。咀嚼されたこれらの3種類の食塊と 2cm に切断した

茎(対照区)をメン羊のルーメン内で *in situ* 培養し、咀嚼を受けた茎、特に、10cm 長に切断後咀嚼を受けた食塊に付着する微生物由来の繊維質分解酵素活性が高く、NDF 分解速度が速く、また、lag time が短く、NDF 消失率が高かった。また、採食時に咀嚼された乾草の茎を再粉碎し、反芻時の食塊を模擬した結果、反芻時の咀嚼も繊維質分解を促進することが観察された。食塊の粒度分布、表面積、結晶度の分析および *in situ* 培養した結果から、採食時および反芻時の咀嚼は飼料片の粒度を減少し、表面積を拡大し、それによって、真菌およびルーメン内の主要な繊維質分解菌である *F. succinogenes* の付着が多くなり、繊維質分解、特に、キシラナーゼ活性が高くなり、繊維質分解を促進することを示唆した。実験2では、粗粉碎した茎、咀嚼した茎、咀嚼後再粉碎した食塊およびアルカリ処理した茎を *in situ* 培養し、繊維質分解に対する咀嚼とアルカリ処理の効果を比較し、咀嚼した茎、特に、再粉碎した茎は、飼料片の表面積の拡大によって真菌および *F. succinogenes* の付着を促し、繊維質分解酵素の活性(特に、xylanase)を促進させ、一方、アルカリ処理は脱リグニン化をとおして飼料片への繊維質分解菌の付着を促進し、繊維質分解率を向上させた。これらの結果から、咀嚼やアルカリ処理などによる飼料片の破壊はルーメン内微生物に付着空間を作り、植物細胞内への微生物の侵入、付着を容易にし、また、繊維質構成成分によって、付着する微生物相および発現酵素を調節することによって繊維質分解を促進させることが示唆された。

3. 微生物量および微生物由来の繊維質分解酵素活性に及ぼす窒素供給の影響

飼料片中の繊維質分解は飼料片の特性と微生物の分解活動によって影響を受けることが示唆された。そのため微生物の分解活動を最大限に発揮させるために必要である栄養素のひとつである窒素源として尿素をルーメンカニニューレ装着去勢牛に注入(140g/day)し、ルーメン背囊および腹囊部の内容物を採取し、飼料片に付着および液相に浮遊する微生物に由来する繊維質分解酵素の活性を検討した。ルーメン内容液中の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度は尿素注入によって 4.8 から 13.7mg/dl に増加し、飼料採食後の pH の低下は緩和された。対照期では飼料給与後の繊維質分解酵素の活性は 12 時間まで低下したが、尿素注入期には低下が観察されなかった。また、液相浮遊微生物は飼料片に付着する微生物よりアンモニア-N に対する反応は早く、酵素活性の増加程度も大きく、一方、飼料片に付着する微生物の反応は鈍く、酵素活性の増加程度も小さかった。この結果から、液相浮遊微生物は飼料片に付着する微生物より、窒素源として、ルーメン内アンモニアに依存することが明らかとなり、窒素不足が繊維質分解を制限する要因のひとつであることが示唆された。

以上の結果から、液相浮遊微生物より飼料片に付着する微生物の量および酵素活性が高く、特に、プロトゾアより細菌量が多く、飼料片に付着する細菌は繊維質分解に重要な役割を担うことが示唆された。粗飼料の特性、咀嚼活動、窒素補給が飼料、動物および微生物の観点から繊維質消化に影響する大きな要因として存在し、これらの要因は飼料側、微生物側あるいは双方に働きかけ、飼料片への微生物付着および酵素活性に影響することにより繊維質消化を左右することが明確にされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 桂 一

副 査 教 授 大久保 正 彦

副 査 助教授 小 林 泰 男

学 位 論 文 題 名

ルーメン内飼料片への微生物付着および

微生物由来の繊維質分解酵素活性に影響する要因

本論文は、図 15、表 13、引用文献 174 を含み、5章からなる総頁数 107 の和文論文である。別に参考論文6編が添えられている。

反芻家畜は、咀嚼、反芻活動およびルーメンに共生している微生物の発酵をとおりして粗飼料(主に繊維質)を分解利用している。しかし、反芻家畜によって摂取された繊維質へのルーメン微生物の付着、その微生物のもっている繊維質分解酵素の発現がどのような要因の影響を受けているかに関しては十分に解明されていない。それで本論文では、飼料片へのルーメン微生物の付着とそれに由来する繊維質分解酵素の活性との関連、これらが飼料片の物理的性状および栄養素(特に、窒素源)供給によってどのような影響を受けるかを検討したものであり、その研究成果は以下のとおりである。

1. 飼料片に付着する微生物量は細菌の方がプロトゾアより多く、また、飼料給与後の早い時間に飼料片に付着する微生物量は増加するが、微生物由来の繊維質分解酵素の全活性(飼料片重量あたり)および比活性(微生物タンパク質あたり)は低く、活性の最大値は遅い時間に観察され、微生物量と酵素活性の発現とは同調していないとことを見出した。
2. 粒度別飼料片に付着する微生物由来の繊維質分解酵素の活性は、飼料給与後の早い時間では小さい粒度の方に、遅い時間では分解可能な NDF を多く含有している大飼料片の方に高い値が観察され、繊維質分解酵素活性は飼料片の物理的および化学的な特性、ルーメン内 pH、付着する微生物の増殖ステージなどが影響することが示唆された。
3. オーチャードグラス乾草の茎を 10cm と 2cm の長さに切断および粗粉碎した後、食道カニユーレを装着した去勢牛に給与し、採食時の食塊をカニユーレから採取し、咀嚼されたこれらの3種類の食塊と 2cm に切断した茎(対照区)をメン羊のル

ルーメン内で *in situ* 培養すると、咀嚼を受けた茎、特に、10cm 長に切断後咀嚼を受けた食塊に付着する微生物由来の繊維質分解酵素活性が高く、NDF 分解速度が速く、その結果 NDF 消失率が高かった。また、採食時に咀嚼された乾草の茎を再粉碎し、反芻時の食塊を模擬した結果、反芻時の咀嚼も繊維質分解を促進することが観察され、採食時および反芻時の咀嚼は飼料片の粒度を減少し、表面積を拡大し、それによって、真菌およびルーメン内の主要な繊維質分解菌である *F. succinogenes* の付着が増加し、繊維質分解、特に、キシラナーゼ活性が高くなり、繊維質分解を促進することを示唆した。

4. 粗粉碎した茎、咀嚼した茎、咀嚼後再粉碎した食塊およびアルカリ処理した茎を *in situ* 培養し、繊維質分解に対する咀嚼とアルカリ処理の効果を比較し、咀嚼した茎、特に、再粉碎した茎は、飼料片の表面積の拡大によって真菌および *F. succinogenes* の付着を促し、繊維質分解酵素の活性(特に、*xylanase*)を促進させた。一方、アルカリ処理は脱リグニン化をとおして飼料片への繊維質分解菌の付着を促進し、繊維質分解率を向上させた。これらの結果から、咀嚼やアルカリ処理などによる飼料片の破損はルーメン内微生物に付着空間を作り、植物細胞内への微生物の侵入、付着を容易にし、また、繊維質構成成分によって、付着する微生物相および発現酵素を調節することによって繊維質分解を促進させることが示唆された。
5. 微生物の繊維質分解活動を最大限に発揮させるために必要である栄養素のひとつである窒素源として尿素をルーメンカニューレ装着去勢牛に注入(140g/day)すると、ルーメン内容液中の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が増加し、飼料採食後の pH の低下は緩和され、飼料給与後の繊維質分解酵素の活性の低下が観察されなかった。また、液相浮遊微生物は飼料片に付着する微生物よりアンモニア-N に対する反応は早く、酵素活性の増加程度も大きかった。一方、飼料片に付着する微生物の反応は鈍く、酵素活性の増加程度も小さかった。この結果から、液相浮遊微生物は飼料片に付着する微生物より、窒素源として、ルーメン内アンモニアに依存することが明らかとなり、窒素不足が繊維質分解を制限する要因のひとつであることが示唆された。

以上のように、本論文は反芻家畜のルーメン内では液相浮遊微生物より飼料片に付着する微生物の量および酵素活性が高く、特に、プロトゾアより細菌量が多く、飼料片に付着する細菌は繊維質分解に重要な役割を担うことが示唆され、粗飼料の特性、咀嚼活動、窒素補給がルーメン内微生物による繊維質消化に大きな影響を与えている要因であることを明らかにした。この成果は、反芻家畜の主要な飼料成分である繊維質の消化の改善に寄与する基礎的な知見を提供するものであり、学術的にも高く評価される。

よって審査員一同は、潘 軍が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。