

# 学位論文

ヒツジにおける消化機能，血漿グルコースおよびロイシン  
代謝に及ぼすエノキタケ廃菌床給与の影響に関する研究

生物生産科学専攻

畢 雪

## 目次

第一章 緒言 .....	5
第二章 (実験 1)	
ヒツジにおける消化機能, 血漿グルコース, ロイシン代謝に及ぼす エノキタケ廃菌床給与の影響 .....	9
2 材料および方法 .....	9
2.1 実験動物および飼養条件 .....	9
2.2 分析方法 .....	11
2.3 計算方法 .....	14
2.4 統計処理 .....	15
3 結果 .....	16
4 考察 .....	21
第三章 (実験 2)	
ヒツジにおける微生物態窒素供給量, 血漿グルコース, ロイシン代 謝に及ぼすエノキタケ廃菌床サイレージ給与の影響 .....	25
3 材料および方法 .....	26
3.1 動物および飼養条件 .....	26
3.2 分析方法 .....	27
3.3 計算方法 .....	28
3.4 統計処理 .....	28
4 結果 .....	29
5 考察 .....	35
第四章	
エノキタケ廃菌床サイレージの調製 .....	38
第一節 (実験 3 の 1)	
エノキタケ廃菌床サイレージの品質に及ぼす糖蜜, ビートパルプお	

よび尿素添加の影響 .....	38
4.1.1 材料および方法 .....	38
4.1.2 分析方法 .....	39
4.1.3 統計処理 .....	39
4.1.4 結果と考察 .....	40
第二節 （実験 3 の 2）	
エノキタケ廃菌床サイレージの品質に及ぼすビートパルプ・尿素添加の影響 .....	44
4.2.1 材料および方法 .....	44
4.2.2 分析方法 .....	45
4.2.3 統計処理 .....	45
4.2.4 結果と考察 .....	45
第三節 （実験 3 の 3）	
人工第一胃法によるエノキタケ廃菌床サイレージの第一胃発酵性状に及ぼすビートパルプ・尿素添加の影響 .....	48
4.3.1 材料および方法 .....	48
4.3.2 分析方法 .....	49
4.3.3 統計処理 .....	49
4.3.4 結果 .....	49
4.3.5 考察 .....	51
第五章 （実験 4）	
エノキタケ廃菌床サイレージ給与ヒツジにおける消化機能および栄養素代謝に及ぼすビートパルプ・尿素添加の影響 .....	54
5 材料および方法 .....	54
5.1 動物および飼養条件 .....	54
5.2 分析方法 .....	55

5.3 計算方法.....	55
5.4 統計処理.....	56
6 結果.....	56
7 考察.....	62
要約.....	66
謝辞.....	69
参考文献.....	70

## 第一章

### 緒言

日本国内の食料自給率は昭和 40 年度の 73%から平成 25 年度には 39% (カロリーベース)までに低下している。その中で肉類の自給率は 55%, 牛乳・乳製品は 64%である (農林水産省, 2015)。さらに, 日本の畜産業における飼料自給率は平成 25 年度において 26%と低く, 粗飼料自給率は 77%であるが, 配合飼料自給率は, 12%であり, ほとんどを輸入に依存している。さらに, 近年, 円安によって配合飼料価格が上昇し, 畜産経営に影響を与えている。国産飼料は輸入飼料よりも安定的に供給でき, 安全, 安心な畜産経営を確立するため, 未利用資源の飼料としての利用推進など輸入飼料に依存しない経営を図る必要がある。

食品製造過程で発生する食品廃棄物は年間約 2, 000 万トンにも達する (農林水産省, 2014)。その中で食品製造業で発生した廃棄物は約 1, 700 万トンである。現在, 食品廃棄物は熱回収, 廃棄物として処分されるが, その中では約 50%が飼料として再利用されている。飼料自給率は極めて低い状態が続いているため, 資源の有効利用や飼料自給率の向上, さらには環境保全の観点から未活用資源の有効利用, いわゆる「エコフイード」の利活用推進が強く求められている。そのため, 食品廃棄物の飼料化に関する研究が行なわれている (岡田, 2005 ; 小嶋, 2010 ; Harjanti ら, 2012 ; Galmessa ら, 2013)。

キノコは食物繊維, ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, ビタミン D<sub>2</sub>, ミネラルなどの栄養素を豊富に含んでいる低カロリー食品である。近年, キノコの需要増加に伴って, 生産量が急速に増加しており, 主な生産地は長野県, 新潟県, 福岡県となっている。キノコは主に菌床栽培で生産されており (林野庁, 2013), 2012 年の年間キノコ類生産量約 45 万トンのう

ち、エノキタケの生産量が最も多い（約 13 万トン）。エノキタケの菌床栽培は一般的にコーンコブ、コメヌカを栽培の材料として使用している（柿本，1988）。特に，短期間の栽培ではエノキタケの菌糸はリグニンやセルロースを分解して栄養として利用することができないため，コメヌカが栄養源として使用されている（柿本，1988）。エノキタケを 1 回収穫した後，菌床は再利用されず，廃棄されている。そのため，エノキタケ廃菌床の処理が大きな課題となっており，飼料化や堆肥化などの再利用が検討されている（大矢ら，1998；増野ら，2000）。

反芻家畜は第一胃を有するため，飼料の消化・吸収過程は単胃動物と著しく異なっている。セルロースやデンプンなどの飼料中炭水化物は主に第一胃内微生物によって酢酸，プロピオン酸，酪酸などの揮発性脂肪酸（VFA）まで分解されるため，グルコースは消化管からほとんど吸収されない。したがって，体内で利用されるグルコースは主に肝臓における糖新生によって供給されている。体内に吸収された VFA は主にエネルギー源として利用されるが，プロピオン酸は糖新生の主要な前駆物質として利用される。また，飼料中タンパク質は微生物のはたらきによって一旦アミノ酸，アンモニアまで分解された後，それらを材料として微生物態タンパク質が合成される。このように，反芻家畜は人間が利用することのできない飼料を摂取してミルクおよび肉といった畜産物を生産できるという優れた特性を持っている。

Fazaeli と Talebian Masoodi（2006）は給与量の 10，20，30%の麦わらを麦わら主体のマッシュルーム廃菌床で代替してヒツジに給与した結果，窒素（N）保持量は 20%の代替まで影響を受けないことを報告した。エノキタケの菌床栽培では主にコーンコブミールが培養基として使用され，オカラやフスマなどもエノキタケの栄養源として添加されている。これらは反芻家畜の飼料原料としても利用されており，ヤギにおいてコ

ーンコブミールはライグラスストローとほぼ同等の飼料価値を持つことが報告されている（小柳ら，1999）。さらに，Ohら（2010）は稲わらの40%をエリンギまたはヒラタケ廃菌床で代替した飼料を去勢牛に給与しても血漿グルコース濃度に変化しないことを報告している。しかしながら，エノキタケ廃菌床給与時における反芻家畜の消化機能および栄養素代謝に関する研究成果はこれまで報告されていない。

エノキタケ廃菌床は水分含量が高く（培地の水分率 63%～65%），発熱変敗しやすい。廃菌床は乾燥させた後に飼料として利用できるが，電気代などのコストがかかるので，便利性及び経済性を考えるとコストの安い方法であるサイレージ調製が有効であると考えられる。サイレージは乳酸菌が飼料中可溶性炭水化物を利用して乳酸発酵に進むことによって酪酸菌やカビなどの腐敗菌の繁殖を抑制して安定に長期貯蔵することができ，季節にも関わらずいつでも利用できる。サイレージの品質は水分調整，切断長，密封度，貯蔵期間，材料の成分および添加物などに影響され，乳酸含量が高く，pH および全窒素に対する揮発性塩基態窒素

（VBN/TN）は低いほど優れていると考えられている。サイレージの乳酸発酵を促進するものとして乳酸菌や糖類などの添加がある。飼料中乳酸菌数が少なくても，糖を十分添加すればサイレージの品質は向上することが確認されている（農林水産技術会議，1974）。糖蜜およびビートパルプは製糖の副産物であり，主に飼料として利用されるが，サイレージ調製時の炭水化物添加剤としても多く利用されている（農林水産技術会議，1974；田中，1990）。また，尿素は安価で窒素含量が高く，代替タンパク質としても利用される。また，サイレージを長期保存する時，尿素添加はかびを抑制できることも報告されている（細谷ら，2008）。

以上のことから，エノキタケ廃菌床の有効利用のため，反芻家畜の飼料としての活用を目指し，エノキタケ廃菌床を含む飼料をヒツジに給与

し、ヒツジの嗜好性、第一胃内発酵性状、N 消化性および栄養素代謝を明らかにすることを目的とし、一連の実験を行った。

## 第二章

### 実験 1

#### ヒツジにおける消化機能，血漿グルコース，ロイシン代謝

#### に及ぼすエノキタケ廃菌床給与の影響

実験 1 ではエノキタケ廃菌床の有効利用のため，反芻家畜の飼料としての活用を目指し，エノキタケ廃菌床の成分分析を行い，さらに，エノキタケ廃菌床を含む飼料給与時におけるヒツジの嗜好性，消化機能および栄養素代謝を明らかにすることを目的とした。

## 2 材料および方法

### 2.1 実験動物および飼養条件

実験は岩手大学動物実験管理規則にしたがって立案し，岩手大学動物実験委員会の承認を得たうえで実施した。実験には去勢ヒツジ 4 頭（1 歳，平均体重  $32.7 \pm 1.6$  kg（標準誤差））を用いた。飼料区はオーチャードグラスとリードカナリーグラスの混播乾草およびトウモロコシなどの穀類を主体とする市販配合飼料（ $\alpha$  ビーフ，中部飼料）を乾物重量比 5 : 5 の割合で給与する対照区と飼料給与量の 20% の配合飼料をコメヌカ，コーンコブを主体とするエノキタケ廃菌床（MC，表 2.1）と代替した MC 給与区を設定した。対照区の飼料給与量は維持代謝エネルギー量の 120% とした。混播乾草，配合飼料および MC の飼料成分を表 2.2 に示した。

Table 2.1 Ingredients of mushroom compost (MC)

Materials	Substance (%)
Rice bran	45
Corn cob meal	31
Beat flour	9
Cottonseed hull	4
Wheat bran	4
Dried soybean curd residue	3
Fossil shell	4

Table 2.2 Chemical compositions of the diets

Chemical composition	Mixed hay (DM <sup>a</sup> )	Concentrate (DM)	MC <sup>b</sup> (DM)
Crude protein (%)	12.1	13.0	12.9
Neutral detergent fiber (%)	68.4	31.4	44.0
Crude ash (%)	8.0	3.7	14.0

<sup>a</sup> DM: dry matter.

<sup>b</sup> MC: Mushroom Compost.

使用した MC は水分含量が高かったため (44%), MC を 60°C, 48 時間通風乾燥器 (AT-S13, いすづ製, 新潟) 用いて乾燥し, 5 日間以上風乾した後ヒツジに給与した。実験は 1 期 21 日間のクロスオーバー法に従って実施した。動物は 14 日間動物飼育舎の個別ペン内で飼料に馴致した後, 生物環境制御室 (温度 23°C, 湿度 70%, 照明点灯 8:00~20:00) に移動し, 試験のため 7 日間個別の代謝ケージで実験を実施した。給餌は 1 日 2 回 (8:30 と 20:30) とし, 飲水は自由とした。週 1 回体重を測定した。

各飼料区の 16 日目から 5 日間にわたり N 出納試験を行った。糞尿は 24 時間ごとに採取し, 採取した糞は 60°C, 48 時間通風乾燥器を用いて乾燥後, 室温で 5 日間風乾し, 重量を測定した。糞の一部を粉碎器 (Cyclotec 1093, Foss, Sweden) を用いて粉碎し, 分析時まで室温で保存した。尿は 6 N 硫酸 50 mL を入れた尿入れを代謝ケージの底にセットして全量採取した。尿量を測定し, 攪拌した後, サンプル瓶に約 50 mL 採取し, 分析時まで -30°C で凍結保存した。

実験 20 日目の採食開始前，採食開始 3 および 6 時間後に胃汁採取器を用いて第一胃内容液約 50 mL を採取した。遠心分離機（RS-18IV，トミー精工，東京）を用いて第一胃内容液を遠心分離し（4℃，8,000 回転/分，10 分間），上清を分離した。第一胃内アンモニア濃度測定のため上清 1 mL に 0.1 N 塩酸 1 mL を加えて-30℃で冷凍保存した。残りの第一胃内容液上清も分析時まで-30℃で冷凍保存した。

実験 21 日目の 9:30 に注入用と採血用カテーテルをヒツジの両側頸静脈に挿入した。それぞれのカテーテルは血液凝固防止のために滅菌した 3.8%クエン酸ナトリウム溶液で満たした。注入実験開始時にプライミングインジェクションとして滅菌した 0.9%生理食塩水に溶解した[U-<sup>13</sup>C]グルコース 2.9 μmol/kg<sup>0.75</sup> および[1-<sup>13</sup>C]ロイシン 7.2 μmol/kg<sup>0.75</sup> を注入用カテーテルから注入した。その後，直ちに送液ポンプ(Bio-Minipump, AC-2120, アトー，東京)を用いて 4 時間にわたりそれぞれ 2.9, 7.2μmol/kg<sup>0.75</sup>/h で連続定速注入し，30 分ごとに注入量を記録した。血液はヘパリン処理した注射筒を用い，注入前に 12 mL，注入 2 時間後から 4 時間後まで 30 分ごとに 6 mL ずつ採血用カテーテルから採取した。採取した血液は直ちにヘパリン処理した遠沈管に移して氷冷し，サンプリング終了後に遠心分離(4℃，8,000 回転/分，10 分間)して血漿を分離し，分析時まで-30℃で冷凍保存した。カテーテルは実験終了後速やかに取り外した。

## 2.2 分析方法

試料（飼料，糞 1g，尿 2 mL）をケルダール分解瓶に入れ，分解促進剤としてケルタブ（CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: 0.5g，K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 4.5g）1 個，さらに濃硫酸 12mL を入れた。自動分解装置（Tecator Digester System, Foss Teactor, Sweden）にセットし，加熱した。温度が 420℃に達した後，さらに 1 時

間分解を続けた。分解終了後、十分に放冷やし、RO 水を加えて希釈し、これを分解液とした。分解液に 40%NaOH を 40mL 加え、さらに Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水 (0.25g/5L) を 120mL となるように調整した。自動蒸留滴定装置 (Kjeltec 2300, Foss Teactor, Sweden) を用いて分解液を熱して放出した NH<sub>3</sub> を 30mL の吸収液 (1% ほう酸, ブロムグレゾールグリーン 50mg プラスメタノール 50mL, メチルレット 35mg プラスメタノール 35mL), 0.1NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で同時滴定を行い、N 含量を測定した。

飼料の乾物含量は乾燥器を用いて温度 60°C で 48 時間乾燥した後、重量を測定して算出した。飼料中の中性デタージェント繊維 (NDF) は Van Soest ら (1991) の方法によるファイバーキャップ (Fiber Cap 2021, Foss Analytical, Sweden) を用いて測定した。

飼料中の Na および K は希酸抽出法, Cl は純水抽出法, I はアルカリ抽出法 (Fecher ら 1998 ; Radlinger と Heumann1998) によつての抽出溶液を調製した。Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn はマイクロ波分解によつて分析した。上記の飼料中ミネラル含量は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS, SPQ9400, SII ナノテクノロジー株式会社, 東京) を用いて測定した。

第一胃内容液の pH は pH メーター (F-51, 堀場製作所, 京都) を用いて測定した。第一胃内アンモニア濃度はインドフェノール反応による比色法にしたがって分光光度計 (V- 630BIO, 日本分光, 東京) を用いて測定した (Weatherburn, 1967)。第一胃内 VFA 濃度は第一胃内容液を水蒸気蒸留した後, ガスクロマトグラフィー (5890, Hewlett Packard, USA) を用いて測定した。

血漿遊離アミノ酸, アンモニアおよび尿素濃度を測定するために, 血漿を除タンパク質した。すなわち, 血漿サンプル 1mL に 3% スルホサリチル酸溶液 (SSA) 1mL を加え, 十分に攪拌した後, 冷蔵庫内に 1 時間冷

却した。その後、遠心分離（0°C，3,000rpm，15 分間）を行い，除タンパク上清を 0.45 $\mu$ m のシリンジフィルターで濾過した後，全自動アミノ酸分析器（JLC-500/V，日本電子，東京）により測定した。

血漿ロイシンおよび  $\alpha$ -ケトイソカプロン酸( $\alpha$ -KIC)濃度，血漿[1-<sup>13</sup>C]ロイシンおよび  $\alpha$ - [1-<sup>13</sup>C] KIC エンリッチメントは Rocchiccioli ら(1981)の方法および Calder と Smith（1988）の方法に従って前処理を行った。

（血漿の前処理および血漿  $\alpha$ -KIC の誘導体化）

4%SSA1mL と血漿 1mL をポリ遠沈管に採取し，血漿を除タンパクした。その後，上清全量を陽イオン交換樹脂 Dowex 50 $\times$ 8(H<sup>+</sup>form, 200-400mesh)0.5mL を充填したカラムに適用した。さらに水 1mL で洗い出し，溶出液全量をポリ遠沈管に採取して血漿  $\alpha$ -KIC の誘導体化に用いた。次に，4N アンモニア水と水で洗い出し，溶出液全量をポリ遠沈管に採取した。その溶出液 0.5mL をねじ口試験管に採取し，真空デシケーター内で 1 晩乾固した。血漿ロイシンを誘導体化するために，アセトニトリル，MTBSTFA（N-methi-N-(tertbutyldimetylsi-lyl)-trifluoroace-tamide, ジーエルサイエンス株式会社）を 25  $\mu$ L ずつ入れ，キャップをして 80°C で 20 分加温し，そのまま乾燥器内で放冷した。

溶出液 1mL をねじ口試験管に採取し，1% *o*-フェニレンジアシン 4mmol/L 塩酸溶液を加え，次に，酢酸エチルを加え， $\alpha$ -KIC を抽出した。その後，溶液全量をパスツールピペットでねじ口試験管に採取し，N ガスを吹き付けて乾固させた。血漿  $\alpha$ -KIC を誘導体化するために，アセトニトリル，MTBSTFA を 25  $\mu$ L ずつ加え，キャップをして 80°C で 20 分加温し，室温で放冷した。

$\alpha$ -KIC を誘導体化したサンプルとロイシンを誘導体化したサンプルを混合し，バイアル瓶に移した。これをガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS，QP-2010，島津製作所，京都）を用い，条件は 175°C で 6

分間保持, 35°C/min300°Cで5分間保持で測定した。

血漿[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメントは Fujita ら (2006) が Tserng と Kalhan (1983)の方法を修正した方法に従って測定した。

(血漿の前処理および血漿グルコースの誘導体化)

血漿 1mL と 4%SSA1mL をポリ遠沈管に採取し, 血漿を除タンパクした。次に, 除タンパクした上清全量を陽イオン交換樹脂 Dowex 50×8(H<sup>+</sup>form, 200-400mesh)0.5mL 充填したカラムと陰イオン交換樹脂 Dowex1×8 (CH<sub>3</sub>COOH<sup>-</sup>form, 200-400 mesh) 1mL を充填したカラムに適用し, 溶出液のうち 0.1mL をねじ口試験管に採取し, 真空デシケータ内で乾固した。

乾固したサンプルに塩酸ヒドロキシルアミン-ピリジン溶液 (2.1g/100mL)を加え, キャップをして加熱した後, 無水酢酸を加えて加熱した。水とクロロホルムを添加して振盪し, 水層を吸引除去した。さらに水を加えて振盪し, 水層を吸引除去する操作を2回繰り返した後, クロロホルム層をパスツールピペットにてガラス小試験管に移し, 30°Cに設定したドライブロックバス (EYELA, MG-2100, 東京) を使用し, 窒素 (N<sub>2</sub>) ガスを吹き付けて乾固した。乾固したサンプルは 100 μL のクロロホルムで溶解した後, バイアル瓶に移し, GC/MS に注入してグルコースエンリッチメントを測定した。

血漿グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ法 (Huggett と Nixon 1957) を用いて測定した。

血漿 NEFA 濃度は酵素法による測定キット (NEFA C-テスト, 和光純薬, 大阪) を用いて測定した。

### 2.3 計算方法

窒素出納(g/kg<sup>0.75</sup>/d)

N 保持量 = 飼料中 N 量 - ( 糞中 N 量 + 尿中 N 量 )

飼料中 N 量 : 飼料中 N 含量 × 飼料給与量 (g/kg<sup>0.75</sup> /d)

糞中 N 量 : 糞中 N 含量 × 糞量 (g/kg<sup>0.75</sup> /d)

尿中 N 量 : 尿中 N 含量 × 尿量 (g/kg<sup>0.75</sup> /d)

血漿ロイシンおよびグルコース代謝回転速度(TR)は次式により算出した (Wolfe, 1984)。

$$TR \text{ (mmol/kg}^{0.75}\text{/h)} = I \times (1/E - 1)$$

ここで, I は [1-<sup>13</sup>C]ロイシンあるいは[U-<sup>13</sup>C]グルコース注入速度 (mmol/kg<sup>0.75</sup>/h), E は血漿 α-[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメント (atom% excess) あるいは血漿[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメント (atom% excess) である。

## 2.4 統計処理

統計処理は SAS の MIXED procedure により実施した (SAS, 1996)。飼料区および実験の順序を要因とする二元配置の分散分析を行い,  $P < 0.05$  のときは有意差があるとみなした。また, 経時的変化のあるデータは飼料区および時間を要因とする反復測定 of 二元配置の分散分析を行った。交互作用が有意な場合 ( $P < 0.05$ ), 採食に伴う変化が飼料間で異なることを示すため, それぞれの飼料区において Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。 $P < 0.05$  のとき有意差がありとみなした。

### 3 結果

飼料中ミネラル含量を表 2.3 に示した。MC の Ca 含量は乾草および配合飼料よりも著しく高く，Mg，Fe，Zn および Mn 含量は高かった。反対に，Na および Cl 含量は低かった。

Table 2.3 Mineral content of the diets

Chemical composition	Mixed hay	Concentrate	MC <sup>b</sup>
Na (DM <sup>a</sup> %)	0.20	0.13	0.09
K (DM%)	1.57	0.80	1.09
Mg (DM%)	0.24	0.24	0.56
Ca DM(%)	0.36	0.29	2.54
Cl (DM%)	0.95	0.15	0.09
Fe (mg/kgDM)	131	101	208
Zn (mg/kgDM)	23	44	64
Cu (mg/kgDM)	19	67	47
Mn (mg/kgDM)	109	77	160
I (mg/kgDM)	0.48	0.19	0.26

<sup>a</sup> DM: dry matter.

<sup>b</sup> MC: Mushroom Compost.

両飼料区においてヒツジは全期間を通じて給与した飼料の全量を採食し，採食速度も差がなかった。ヒツジの体重変化，N 出納および N 消化率の結果を表 2.4 に示した。体重は両飼料区ともほとんど変化しなかった。N 摂取量は対照区と比較して MC 給与区が低かったが ( $P = 0.02$ )，差はわずかであった。糞中 N 排泄量は MC 給与区が高く ( $P < 0.01$ )，尿中 N 排泄量は低く ( $P = 0.03$ )，N 保持量は飼料間に差がなかった。N 消化率は MC 給与区が低かった ( $P < 0.01$ )。

Table 2.4 Effects of feeding mushroom compost (MC) on body weight change, nitrogen (N) balance in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MC diet		
Sheep	4	4		
Body weight change(kg/day)	0.03	0.01	0.28	0.76
N intake (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.97	0.96	0.003	0.02
N in feces (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.38	0.51	0.03	<0.01
N in urine (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.41	0.32	0.04	0.03
N retention (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.19	0.13	0.03	0.24
N digestibility (%)	61	47	3	<0.01

<sup>a</sup> Values represent means for n=4 and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MC diet, mixed hay, concentrate and MC (at ratio of 5:3:2).

採食に伴う第一胃発酵性状の経時的変化を図 2.1 に示した。第一胃内 pH は MC 給与区が対照区よりも高く ( $P = 0.04$ )、採食に伴って低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内アンモニア濃度には交互作用が認められ ( $P < 0.05$ )、MC 給与区では採食開始 3 時間後に増加し、採食 6 時間後に採食前の値まで低下した ( $P < 0.05$ )。一方、対照区は徐々に低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内総 VFA、酢酸、プロピオン酸および酪酸濃度は飼料間に差がなく、採食に伴う変化にも有意差は認められなかった。

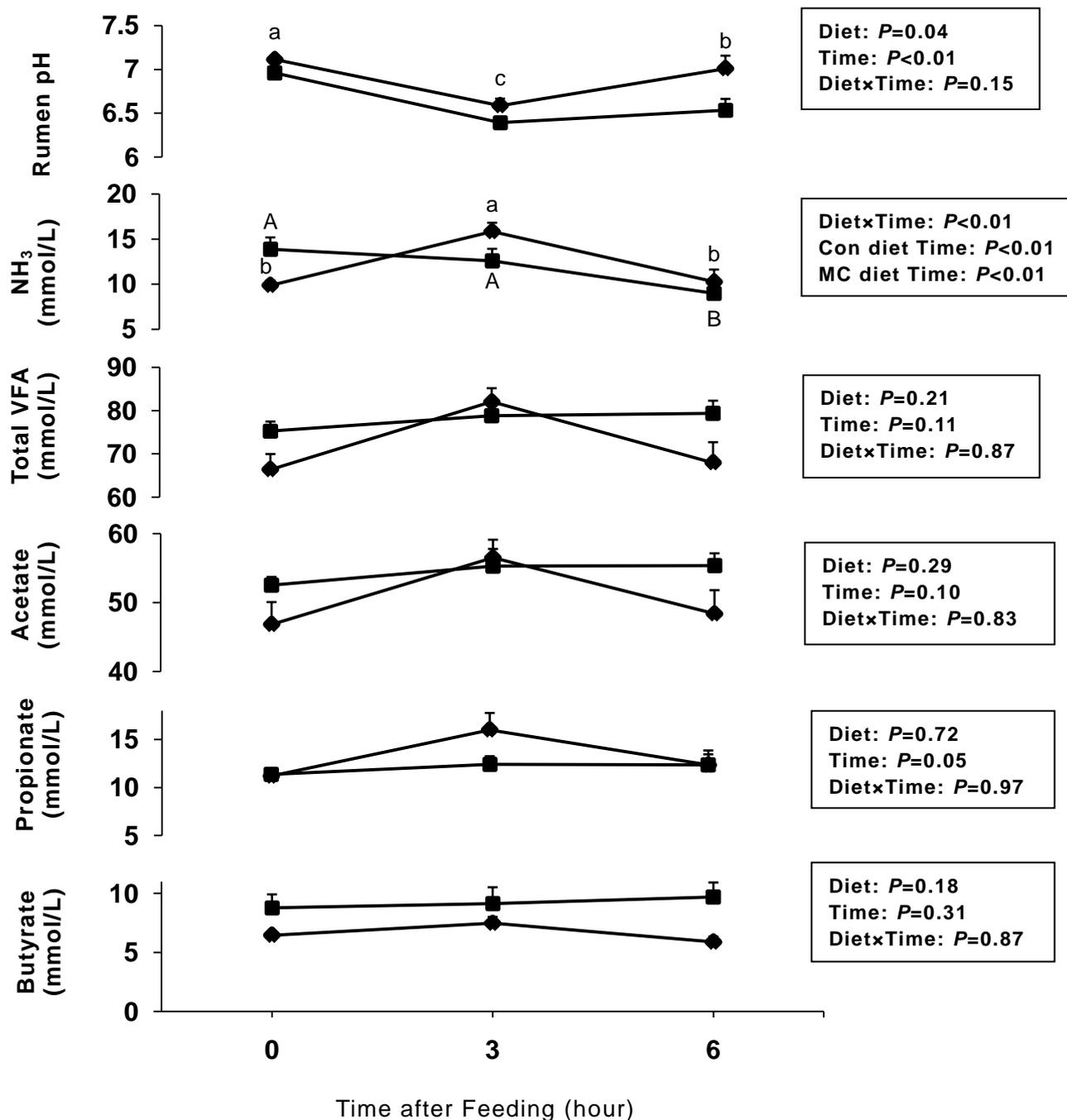


Figure 2.1: Time-course changes of ruminal characteristics in sheep fed the Con diet (■) and the MC diet(◆). Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5)and MC diet, mixed hay, concentrate and mushroom compost (at ratio of 5:3:2).Values are expressed as mean±SEM for n=4. Different letters (A,B and a,b,c) indicate significant difference ( $P<0.05$ ) at times before and after feeding.

同位元素希釈法の実験開始前における血漿遊離アミノ酸，乳酸，アンモニア，尿素および NEFA 濃度を表 2.5 に示した。血漿スレオニン，バ

リン, トリプトファン濃度は MC 給与区が対照区に比べて低く ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 血漿セリン, アルギニン濃度は MC 給与区が対照区より高かった ( $P = 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。他の血漿アミノ酸, 乳酸, アンモニア, 尿素および NEFA 濃度は飼料間に差が認められなかった。

Table 2.5 Effects of feeding mushroom compost (MC) on plasma free amino acids, lactic acid, ammonia, urea and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations at the pre-infusion period in sheep<sup>a</sup>

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MC diet		
Seep	4	4		
Amino acids (μmol/L)				
Threonine	87	75	8	<0.01
Valine	136	131	8	<0.01
Methionine	20	21	3	0.30
Isoleucine	63	65	3	0.54
Leucine	82	76	5	0.13
Phenylalanine	34	33	3	0.32
Histidine	53	49	10	0.17
Lysine	70	71	7	0.84
Tryptophan	33	31	2	0.046
Serine	79	103	6	0.01
Asparagine	36	37	4	0.80
Glutamic acid	51	52	4	0.82
Glutamine	321	357	20	0.23
Glycine	460	491	47	0.10
Alanine	154	151	9	0.49
Tyrosine	33	35	3	0.43
Arginine	109	123	5	0.045
Proline	74	73	3	0.78
Lactic acid (mmol/L)	0.92	1.03	0.12	0.19
Ammonia(μmol/L)	103	107	10	0.57
Urea (mmol/L)	3.7	3.3	0.2	0.53
NEFA <sup>c</sup> (mEq/L)	0.16	0.17	0.03	0.67

<sup>a</sup> Values represent means for n=4 and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MC diet, mixed hay, concentrate and MC (at ratio of 5:3:2).

同位元素希釈法実施時における血漿グルコース, ロイシンおよび  $\alpha$ -KIC 濃度, 血漿[U-<sup>13</sup>C]グルコース, [1-<sup>13</sup>C]ロイシンおよび  $\alpha$ -[1-<sup>13</sup>C]KIC

エンリッチメントの経時的変化を図 2.2 に示した。血漿グルコース濃度および[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメントとともにほぼ一定の値で推移した。また、血漿ロイシン， $\alpha$ -KIC 濃度，血漿[1-<sup>13</sup>C]ロイシン， $\alpha$ -[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメントもほぼ一定の値で推移した。

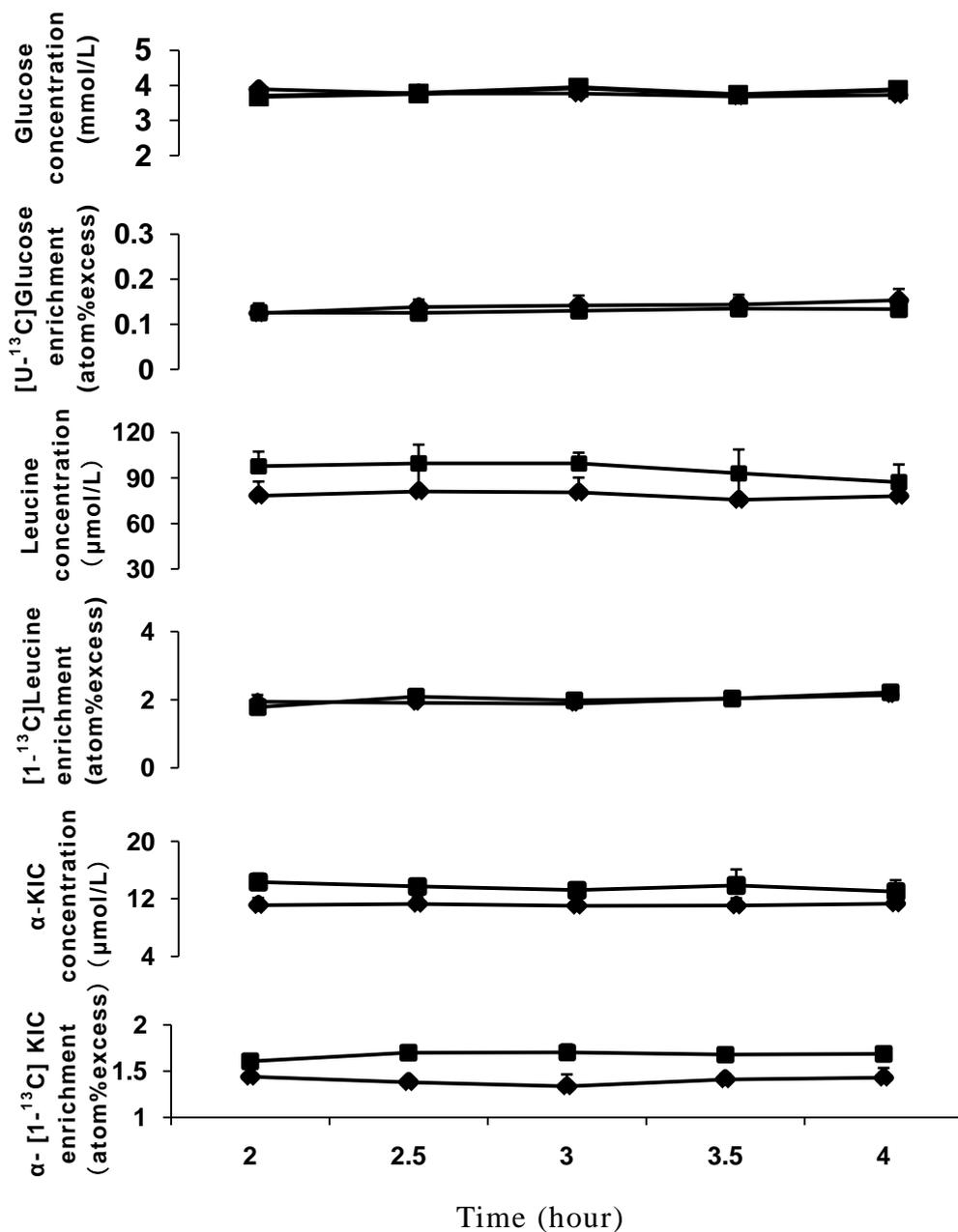


Fig 2.2 Time course of changes in plasma glucose, leucine  $\alpha$ -kic concentration and enrichment during 2-4 hour of primed continuous infusion of [U-<sup>13</sup>C]glucose and [1-<sup>13</sup>C]leucine in sheep fed Con diet and MC diet.

血漿グルコースおよびロイシン代謝動態の結果を表 2.6 に示した。血漿ロイシンおよび  $\alpha$ -KIC 濃度は MC 給与区が対照区より低かったが ( $P = 0.02$ ,  $P < 0.01$ )、血漿グルコース濃度、グルコースおよびロイシン代謝回転速度は飼料間に差がなかった。

Table 2.6 Effects of feeding mushroom compost (MC) on plasma glucose and leucine kinetics in sheep<sup>a</sup>

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MC diet		
Seep	4	4		
Glucose concentration (mmol/L)	3.87	3.81	0.08	0.77
GluTR (mmol/kg <sup>0.75</sup> /h)	2.11	2.33	0.23	0.36
Leucine concentration ( $\mu$ mol/L)	95.7	75.7	2.8	0.02
$\alpha$ -KIC <sup>c</sup> concentration ( $\mu$ mol/L)	13.6	11.2	0.4	<0.01
LeuTR ( $\mu$ mol/kg <sup>0.75</sup> /h)	516	416	37	0.11

<sup>a</sup> Values represent means for n=4 and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MC diet, mixed hay, concentrate and MC (at ratio of 5:3:2).

<sup>c</sup>  $\alpha$ -KIC= $\alpha$ -Ketoisocaproate.

#### 4 考察

本実験で得られた混播乾草のミネラル(Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn)含量は NRC 飼養標準 (1985) のオーチャードグラスおよびリードカナリーグラスと類似した値であった (表 2.3)。一方, MC には 4% の貝化石が含まれており, Ca 含量は混播乾草や配合飼料よりも著しく高かった。貝化石は Ca を比較的多く含み, ほかの無機化合物も含んでいる (森本ら, 1985)。したがって, 本研究で用いた分析法による飼料のミネラル含量は妥当な値であり, MC に貝化石が含まれていたため Ca はじめ, Mg, Fe, Zn, Mn などの含量が高かったと考えられる。

総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を MC と代替することによって N 消化率は低下した。Kholif ら (2014) は飼料給与量の 25 および 45% のクローバーを稲わら主体のヒラタケ廃菌床と代替してヤギに給

与すると、N 消化率は低下することを報告し、稲わら主体の廃菌床は可溶性タンパク質含量がクローバーより低く、ミネラル含量が高いため、微生物による繊維質の分解が進まず、有機物の消化率が低下したと述べている。本実験で使用した MC もミネラル含量が高く、MC が N 消化率に影響を与えたと考えられる。したがって、MC 給与によって N 消化率は低下したものの、第一胃内 N の再循環が活発になったため、N の利用効率が高まり、N 保持量は変化しなかったと考えられる。

MC 給与によって第一胃内アンモニア濃度の経時的変化は飼料間に差が認められた ( $P < 0.01$ )。第一胃内アンモニアの大部分は第一胃内微生物が飼料タンパク質を分解して生成される。Agle ら (2010) は粗濃比 4.8 : 5.2 および 2.8 : 7.2 の飼料をウシに給与すると、第一胃内粗タンパク質の分解速度は配合飼料が粗飼料よりも速く、第一胃内アンモニア濃度は両飼料区とも 2 時間以内に最高値に達することを報告した。また、Oh ら (2010) は去勢牛に配合飼料および稲わらを給与すると、第一胃内アンモニア濃度は採食開始 1 時間後に最高値に達することを観察した。これらの実験結果を考慮すると、本実験における乾草と配合飼料を 1 : 1 で給与した対照区のアンモニア濃度は採食開始 3 時間以前に最高値に達し、その後に低下した可能性が考えられる。

去勢牛において粗繊維の給与割合が高くなるに伴って乾物摂取量および総 VFA 濃度は低下することが報告されている (Tjardes ら, 2002)。この時、第一胃内の酢酸比率が増加し、プロピオン酸割合は低下することも観察されている。したがって、粗繊維含量は第一胃内 VFA 濃度に影響を与えたと考えられるが (Wang ら, 2010)、本実験で使用した MC は NDF 含量が配合飼料より高かったものの、嗜好性にすぐれ、給与量全量を採食したため、第一胃内各 VFA 濃度は飼料間に差がなかったと考えられる。また、ウシにおいて飼料に Ca として 0.60% の  $\text{CaCO}_3$  を添

加しても第一胃内酢酸およびプロピオン酸濃度は影響を受けないことが報告されている (Fellner と Spears, 2004-2005)。したがって、総乾物給与量の 20%に相当する配合飼料を MC で代替してヒツジに給与しても第一胃内 VFA 濃度は影響を受けず、通常の第一胃発酵が維持されることが示唆された。

第一胃内容液 pH は第一胃発酵の影響を受けるが (Calsamiglia ら, 2008)、通常は 6.0~7.0 に維持されている (Astuti ら, 2014)。両飼料区の pH はこの範囲内であったが、MC 給与区が高く推移した。この結果には各飼料区の第一胃内におけるアンモニアと VFA の産生比率が関与している可能性が考えられる。また、飼料の摂取にともなって第一胃内に唾液が流入するが、粗繊維給与量が多くなると、反芻および咀嚼回数が多くなり、第一胃内容液 pH が上昇することが報告されている (Wang ら, 2010)。MC は配合飼料より NDF 含量が高く、咀嚼回数の増加による唾液分泌の増加が第一胃内容液 pH に影響を及ぼしたかもしれない (Allen, 1997)。さらに、本実験では MC に含まれている貝化石に Ca 含量が高く、このことも第一胃内容液の pH が高かった要因の 1 つであると考えられる (James と Wohlt, 1985)。

血漿遊離アミノ酸濃度は粗タンパク質給与量および飼料中の N 源に影響される (Bergen ら, 1973)。MC 給与区において血漿スレオニン、バリンとトリプトファン濃度が対照区より低かったものの、血漿セリン、アルギニン濃度は MC 給与区が対照区より高かった。また、他の遊離血漿アミノ酸濃度は飼料間に差がなかった。したがって、ヒツジに総乾物給与量の 20%に相当する配合飼料を MC で代替しても血漿遊離アミノ酸濃度は大きな影響を受けなかったと考えられる。血漿 NEFA 濃度は、体脂肪分解の程度を表す指標の 1 つと考えられており、エネルギー供給不足の場合に上昇する (Chilliard ら, 2000)。血漿 NEFA 濃度は MC 給

与区と対照区の違いに差がなく、少なくとも MC 区はエネルギー不足による脂肪分解の促進は起こらなかったと考えられる。

VFA を主要なエネルギー源とする反芻家畜においても、グルコースは体内に必要な栄養素である(Khan と Ludri, 2002; Ndlovu ら, 2007)。エネルギー給与量が血漿グルコース代謝回転速度に影響を及ぼすことが報告されている (Sano ら, 2007)。また、反芻家畜は主に肝臓の糖新生によってグルコースが体内に供給されているため、プロピオン酸、糖原性アミノ酸、乳酸などの糖新生の前駆物質の供給量がグルコース代謝に影響を及ぼす (Ortigue-Mary ら, 2003)。本実験では第一胃内のプロピオン酸、大部分の血漿糖原性アミノ酸および乳酸濃度は飼料間に差がなかった。したがって、体内で利用されるエネルギー供給量および糖新生の前駆物質が十分に供給されているため、血漿グルコース代謝回転速度は影響を受けなかったと考えられる。

これまで、MC をヒツジに給与した際のタンパク質代謝に関する研究は報告されていないが、代謝エネルギー給与量が血漿ロイシン代謝回転速度に影響を及ぼすことが報告されている (Sano ら, 2009)。本実験では、総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を MC と代替しても MC 給与区と対照区のエネルギー給与量に大きな差がなかったため、血漿ロイシン代謝回転速度は飼料間に差がなかったと考えられる。

MC は豊富なミネラルを含んでおり、嗜好性も良好であった。さらに、ヒツジに MC 添加飼料を給与しても第一胃発酵性状、血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は変化しなかった。以上のことから、MC はヒツジの第一胃発酵性状および栄養素代謝に影響を与えないことが示された。

## 第三章

### 実験 2

#### ヒツジにおける微生物態窒素供給量，血漿グルコース，ロイシン代謝に 及ぼすエノキタケ廃菌床サイレージ給与の影響

実験 1 においてヒツジにおいて総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料をコメヌカ，コーンコブミールを主体とするエノキタケ廃菌床と代替しても第一胃内発酵性状および栄養素代謝に影響を与えないことが示された。しかし，キノコ廃菌床は水分含量が高く，好気性発熱変敗しやすいので，保存性に課題がある（Kwak ら，2009；小柳ら，1999）。サイレージは水分が高い飼料を保存する飼料調製法の一つであり，嫌気性発酵によって乳酸が産生されて腐敗菌の活動を抑え，栄養成分も保つことができる（Weinberg，2003）。

また，反芻家畜では飼料中炭水化物およびタンパク質は第一胃内の微生物のはたらきによって VFA およびアンモニアに分解され，それらを材料として微生物態タンパク質が合成される。小腸から吸収される微生物態タンパク質は総タンパク質吸収量の約 50～80% を占め（Stern ら，2006），反芻家畜にとって重要なタンパク質源となる。

そこで，実験 2 ではエノキタケ廃菌床サイレージ（MCS）を含む飼料をヒツジに給与し，消化管における飼料の消化および栄養素代謝を明らかにすることを目的とした。

### 3 材料および方法

#### 3.1 動物および飼養条件

実験は岩手大学動物実験管理規則にしたがって計画し，岩手大学動物実験委員会の承認を得たうえで実施した。実験には交雑種ヒツジ 6 頭（2 才，雄 1 頭，去勢 5 頭，体重  $46.9 \pm 1.6$ kg）を供試した。飼料としてオーチャードグラスとリードカナリーグラスの混播乾草，トウモロコシなどの穀類を主体とする配合飼料（ $\alpha$  ビーフ，中部飼料）および市販製品の MCS（キノコ君サイレージ，ベクセル）を用いた。表 3.1 にエノキタケ栽培時における菌床材料の組成を示した。乾草，配合飼料，MCS の粗タンパク質および NDF 含量を表 3.2 に示した。

Table 3.1 Composition of mushroom compost

Materials	(%)
Corn cob meal	31
Race bran	30
Beat flour	9
Cottonseed hull	4
Wheat bran	19
Dried soybean curd residue	3
Fossil shell	4

Table 3.2 Crude protein and neutral detergent fiber (NDF) of the diets

	Crude protein (%DM <sup>a</sup> )	NDF (%DM <sup>a</sup> )
Mixed hay	12.4	62.4
Concentrate feed	15.2	30.6
Mushroom compost silage	9.7	52.2

<sup>a</sup> DM: dry matter

実験には対照区と MCS 給与区の 2 処理区を設定した。対照区は実験 1 と同様にした。MCS 給与区は対照区の総乾物給与量の 20%に相当する配

合飼料を MCS と代替した。実験は 1 期 21 日間のクロスオーバー法にしたがって実施した。14 日間動物飼育舎内の個別ペンで動物を飼料に馴致した後，生物環境制御室（温度 23℃，湿度 70%，照明点灯 8：00～22：00）に移動し，7 日間代謝ケージで実験を実施した。給餌は 1 日 2 回（8：30 と 20：30）とし，飲水は自由とした。1 週間毎に体重を測定した。

実験 16 日～20 日目に 5 日間の N 出納試験を行った。さらに，尿中プリン代謝物を測定するため，採取した尿サンプルの一部を脱イオン水で 5 倍希釈し，分析時まで残りの尿サンプルとともに -30℃ で冷凍保存した。

実験 20 日目の採食前，採食開始 3 時間および 6 時間後に胃汁採取器を用いて第一胃内容液を採取した。サンプルの処理方法および保存条件は実験 1 と同様に実施した。

同位元素希釈法実験は実験 1 と同様に実施した。

### 3.2 分析方法

サイレージ成分を測定するため，サイレージサンプル 15g（乾物）に脱イオン水 140mL 加え，時々振盪しながら，冷蔵庫内で 24 時間抽出した。抽出後，ガーゼでろ過し，抽出液を得た。サイレージの pH は pH メーターを用いて測定した。サイレージの VFA 濃度は第一胃内容液の VFA 濃度と同様に測定した。乳酸濃度は Taylor（1996）の方法によって分析した。

第一胃内容液 pH，VFA 濃度およびアンモニア濃度は実験 1 と同様に測定した。尿中プリン代謝物は Chen と Gomes(1995)の方法にしたがい分析した。血漿アミノ酸濃度，ロイシンおよび  $\alpha$ -KIC 濃度，血漿 [1-<sup>13</sup>C]ロイシンおよび  $\alpha$ -[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメントは実験 1 と同様に測定した。血漿グルコース濃度および [U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメントは実験 1 と同様に測定した。

### 3.3 計算方法

サイレージの揮発性塩基態窒素 (VBN) は次式により算出した。

$$\text{VBN}(\%) = 14 \times F \times B \times 0.1 \times \frac{1}{10} \times \frac{140 + (A \times W) / 100}{A} \times \frac{100}{1000}$$

F は 0.1N 塩酸のファクター, B は 0.1N 塩酸の滴定量(mL), A はサイレージサンプル量(g), W はサイレージ水分(%)である。

体内に吸収されたプリン代謝物 (X) と尿中に排泄されたプリン代謝物 (Y) の関係は次式により算出した (Chen ら, 1990)。

$$Y = 0.84X + (0.150\text{kg}^{0.75}e^{-0.25X})$$

ここで, 0.84 は尿中にプリン代謝物として吸収したプリンの回収率,  $0.150\text{kg}^{0.75}$  は内因性プリン代謝物排出量である。

微生物態 N 供給量は次式により計算した (Chen と Gomes, 1992)。

$$\text{微生物態 N 供給量 (g/day)} = 70 \times X \text{ (mmol/day)} / 0.83 \times 0.116 \times 1000$$

ここで, 70 はプリン 1mol あたりの窒素量(mg/mmol), 0.83 は微生物態プリンの消化率, 0.116 は第一胃内微生物の総 N 量のうちプリンの N 割合である。

N 出納, 血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は実験 1 と同様の計算方法により算出した。

### 3.4 統計処理

統計処理は実験 1 と同様に検定した。

## 4 結果

MCS の発酵品質，フリーク法および V スコアによる評点を表 3.3 に示した。MCS の pH は 5.52 であり，乳酸および酢酸濃度は 1.55%，1.05%，VBN/TN は 13% であった。フリーク法による評点は 80 点，V スコアによる評点は 71 点であった。供試したヒツジ 6 頭のうち 1 頭は給与した MCS の 50%～72% を採食し，他の 1 頭は MCS をほとんど採食しなかった。他の 4 頭は実験期間を通じて給与量全量を採食した。そこで，本実験では MCS をほとんど採食しなかった動物 1 頭の結果を削除した。

Table 3.3 Fermentative characteristics of mushroom compost silage (MCS)

Item	Value
Moisture (%)	59.9
pH	5.52
Lactic acid (% FM <sup>a</sup> )	1.55
Acetate (% FM)	1.05
Propionate (% FM)	0.02
Butyrate (% FM)	nd <sup>c</sup>
VBN <sup>b</sup> (% total N)	13
Flieg point	80
V-SCORE	71

<sup>a</sup> FM: fresh matter

<sup>b</sup> VBN: volatile basic nitrogen

<sup>c</sup> nd: not detected

ヒツジの日増体量，N 出納および N 消化率の結果を表 3.4 に示した。日増体量は両処理区ともほとんど変化しなかった。N 摂取量，可消化 N 量，N 保持量および N 消化率は MCS 給与区が低かった（それぞれ， $P < 0.01$ ， $P < 0.01$ ， $P = 0.04$ ， $P < 0.01$ ）。糞中 N 排泄量および尿中 N 排泄量は飼料間に差がなかった。

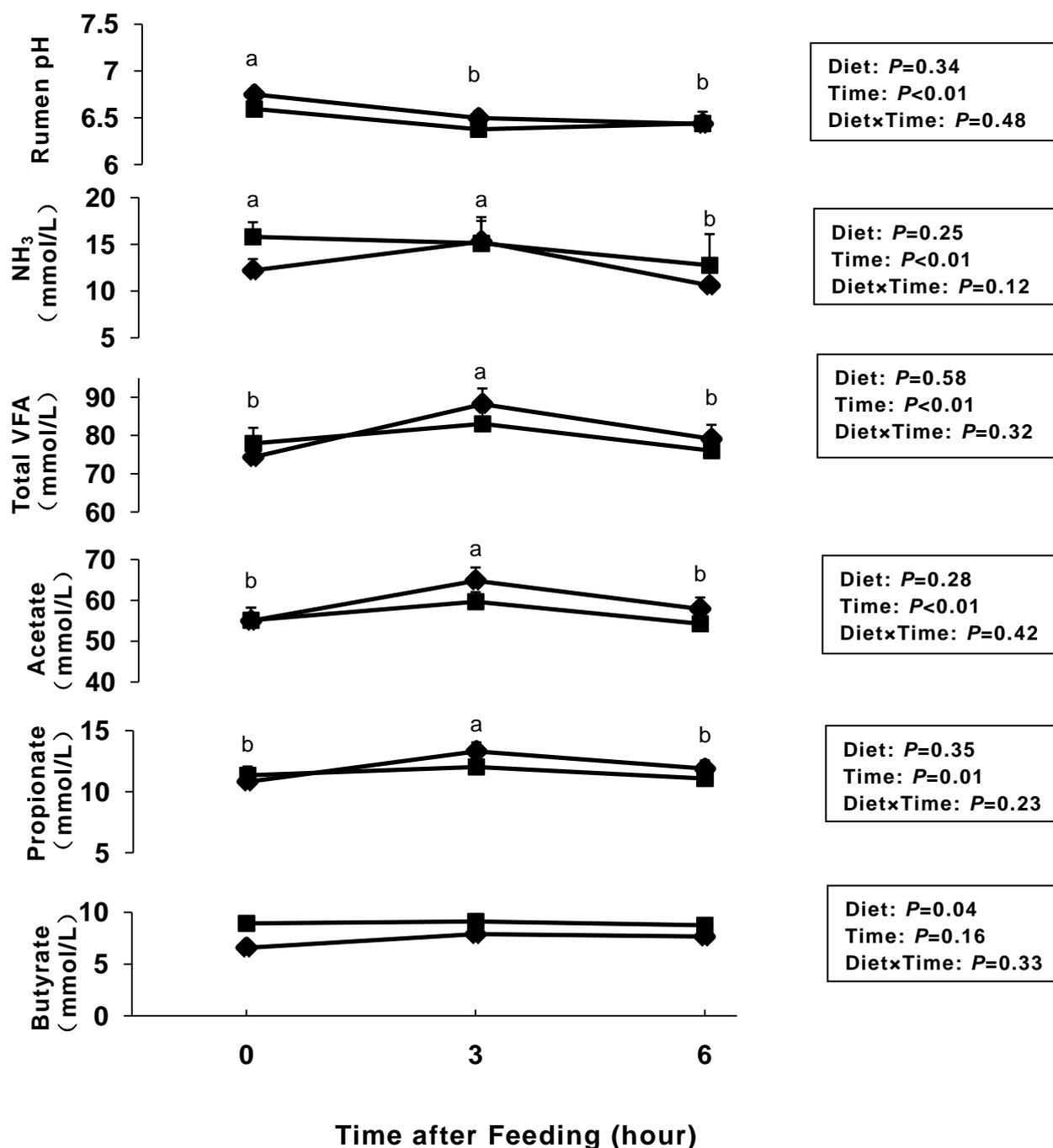
Table 3.4 Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on body weight change, nitrogen (N) balance in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MCS diet		
Sheep	6	5		
Body weight change (kg/day)	0.04	0.03	0.04	0.17
N intake (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	1.09	0.99	0.02	<0.01
N in feces (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.32	0.36	0.01	0.08
N in urine (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.42	0.41	0.01	0.92
Digestible N (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.78	0.62	0.03	<0.01
N retention (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.34	0.22	0.02	0.04
N digestibility (%)	71	64	1	<0.01

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

採食に伴う第一胃発酵性状の経時的変化を図 3.1 に示した。第一胃内 pH は飼料間に差がなく、採食に伴って低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内アンモニア濃度は飼料間に差がなく、採食 6 時間後に低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内総 VFA, 酢酸, プロピオン酸濃度は飼料間に差がなく、採食開始 3 時間後に増加し、採食 6 時間後に採食前の値にまで低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内酪酸濃度は MCS 給与区が対照区より低く ( $P = 0.04$ )、両処理区とも採食に伴って変化しなかった。



**Fig 3.1:** Time-course changes of ruminal characteristics in sheep fed the Con diet (■) and the MCS diet (◆). Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and mushroom compost silage (at ratio of 5:3:2). Values are expressed as mean ± SEM for n=6. Different letters (a,b) indicate significant difference (P < 0.05) at times before and after feeding.

尿中プリン代謝物排泄量，微生物態 N 供給量および可消化 N 量に対する微生物態 N 供給量の割合の結果を表 3.5 に示した。尿中アラントイン，尿酸，キサンチン+ヒポキサンチン，総プリン代謝物排泄量および微生物態 N 供給量は飼料間に差がなかった。可消化 N 量に対する微生物態 N 供給量の割合は MCS 給与区が高かった ( $P = 0.02$ )。

Table 3.5 Effects of feeding mushroom compost silage feeding (MCS) on urinary purine derivative, excretion and microbial nitrogen (N) supply in sheep<sup>a</sup>

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MCS diet		
Sheep	6	5		
Allantoin (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.39	0.36	0.02	0.35
Uric acid (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.06	0.05	0.005	0.10
Xanthine+Hypoxanthine (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.07	0.08	0.005	0.23
Total PD <sup>c</sup> excretion (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.52	0.49	0.02	0.49
microbial N supply (g/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.45	0.42	0.02	0.50
The ratio of microbial N supply to digestible N (%)	58	67	3	0.02

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

<sup>c</sup> PD: purine derivative

同位元素希釈法実験開始前における血漿遊離アミノ酸，乳酸，アンモニア，尿素および NEFA 濃度を表 3.6 に示した。測定したすべての血漿遊離アミノ酸，乳酸，アンモニアおよび尿素濃度は飼料間に差がなかった。血漿 NEFA 濃度は対照区より MCS 給与区が高かった ( $P = 0.02$ )。

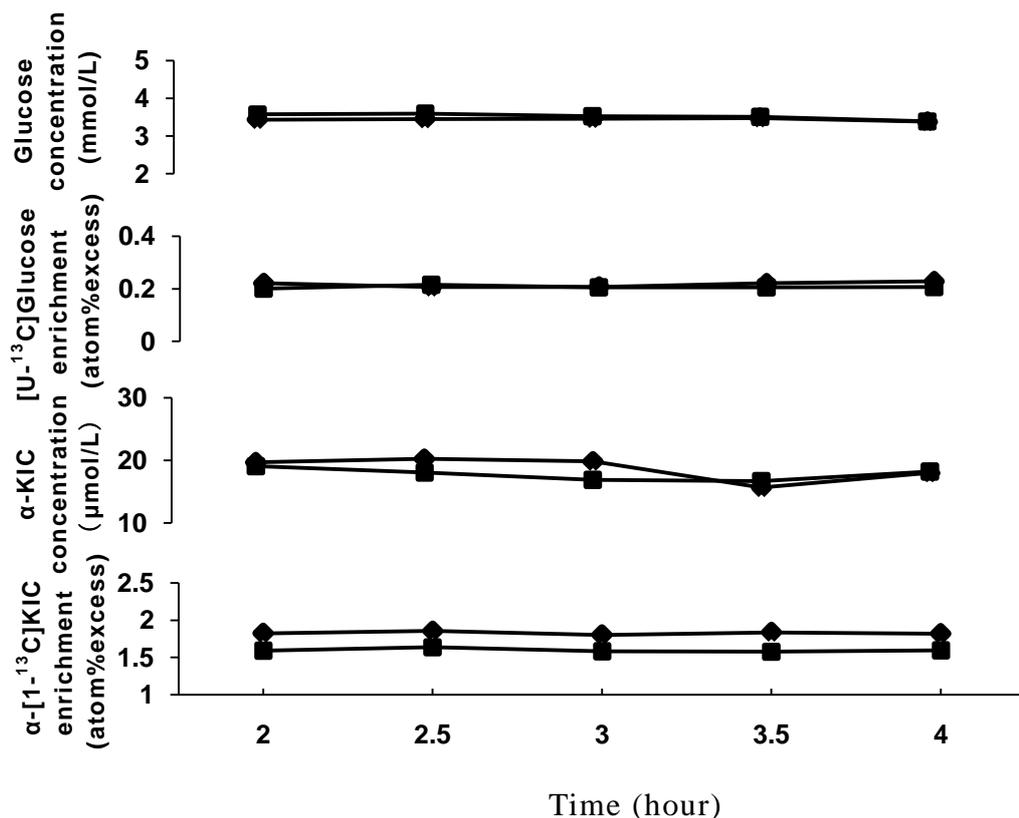
Table 3.6 Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on plasma free amino acids, lactic acid, ammonia, urea and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations at the pre-infusion period in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MCS diet		
Sheep	6	5		
Amino acids (μmol/L)				
Threonine	183	134	22	0.06
Valine	188	176	19	0.17
Methionine	16	16	2	0.98
Isoleucine	74	70	7	0.24
Leucine	100	91	10	0.12
Phenylalanine	44	39	4	0.18
Histidine	78	67	8	0.34
Lysine	93	92	15	0.46
Serine	123	125	14	0.73
Asparagine	44	38	5	0.06
Glutamic acid	57	56	5	0.87
Glutamine	366	376	36	0.86
Glycine	622	637	61	0.92
Alanine	217	213	24	0.76
Tyrosine	61	51	6	0.10
Tryptophan	23	26	3	0.56
Arginine	137	144	14	0.88
Proline	68	91	17	0.54
Lactic acid (mmol/L)	0.79	0.96	0.1	0.57
Ammonia (μmol/L)	94	107	3.5	0.14
Urea (mmol/L)	5.4	5.5	0.1	0.81
NEFA (mEq/L)	0.09	0.13	0.01	0.02

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2).

同位元素希釈法実施時における血漿グルコース濃度および[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメント、血漿α-KIC濃度およびα-[1-<sup>13</sup>C]KICエンリッチメントの経時的変化を図3.2に示した。血漿グルコース濃度および[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメントとともにほぼ一定の値で推移した。血漿α-KIC濃度、血漿α-[1-<sup>13</sup>C]KICエンリッチメントもほぼ一定の値で推移した。



**Fig 3.2:** Time course of changes in plasma glucose, leucine  $\alpha$ -KIC concentration and enrichment during 2-4 hour of primed continuous infusion of  $[U-^{13}C]$ glucose and  $[1-^{13}C]$ leucine in sheep fed Con diet and MCS diet.

血漿グルコースおよび $\alpha$ -KIC濃度，グルコースおよびロイシン代謝回転速度の結果を表 3.7 に示した。血漿グルコース， $\alpha$ -KIC濃度，グルコースおよびロイシン代謝回転速度はいずれも飼料間に差がなかった。

**Table 3.7** Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on plasma glucose and leucine kinetics in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	MCS diet		
Sheep	6	5		
Glucose concentration (mmol/L)	3.53	3.44	0.03	0.28
GluTR (mmol/kg <sup>0.75</sup> /h)	1.36	1.35	0.14	0.93
$\alpha$ -KIC <sup>c</sup> concentration ( $\mu$ mol/L)	17.8	18.7	0.64	0.49
LeuTR ( $\mu$ mol/kg <sup>0.75</sup> /h)	423	353	22	0.14

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

<sup>c</sup>  $\alpha$ -KIC= $\alpha$ -Ketoisocaproate

## 5 考察

実験 2 で用いた MCS に酪酸は検出されなかったが、酸味臭が認められた。そのため、2 頭に MCS の残食があったのかもしれない。しかし、他の 4 頭は実験期間を通じて残食が認められなかったため、嗜好性は比較的良好であったと考えられる。

総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を MCS で代替した MCS 給与区では N 消化率が低かった。N 消化率は N 摂取量が増加するに伴い高くなることが報告されている (Sano ら, 2004)。MCS は配合飼料と比較して粗タンパク質含量が低く、MCS 給与区の N 摂取量が対照区より低かったことが N 消化率に影響を及ぼしたと考えられる。また、MCS 給与区の N 消化率 (64%) は未処理のエノキタケ廃菌床を給与した実験 1 の結果 (47%) と比較して高い値を示した。第一胃内総 VFA、酢酸およびプロピオン酸濃度は飼料間に差がなかったが、MCS 給与区の第一胃内酪酸濃度は対照区より低かった。ヒツジにおいて飼料中の粗繊維含量を高くすると、第一胃内総 VFA 濃度に影響を与えないが、酢酸の割合が増加し、酪酸の割合は低下することが報告されている (Martinez ら, 2010)。実験 2 で使用した MCS の NDF 含量は配合飼料より高かったため、第一胃内酪酸濃度が低かった可能性が考えられる。飼料中タンパク質の大部分は第一胃内微生物によってアンモニアまで分解されるため、粗タンパク質給与量は第一胃内アンモニア濃度に影響を及ぼす。Chen ら (2010) はウシにおいて粗タンパク質給与量が増加すると第一胃内アンモニア濃度が増加することを報告した。MCS 給与区の N 摂取量は対照区より少なかったが、第一胃内アンモニア濃度は飼料間に差がなかった。MCS の粗タンパク質の一部がサイレージの発酵過程でペプチドなどに分解され、採食に伴ってこれらが第一胃内に流入してアミノ酸やアンモニアまで

分解されたため、飼料間に差がなかった可能性が考えられる。第一胃内 pH は通常 6.0~7.0 の範囲であり (Astuti ら, 2014), 第一胃内 VFA 濃度およびアンモニア濃度は飼料間に差がなかったことから, MCS は 20% の代替率であれば対照区と同等の第一胃内発酵性状を有するものと考えられた。

MCS 給与区の可消化 N 量は対照区と比較して少なかったものの, 下部消化管への微生物態 N 供給量は飼料間に差がなく, 可消化 N に対する下部消化管微生物態 N 供給量の割合は MCS 給与区が高かった。第一胃内微生物態タンパク質合成は微生物のエネルギー源としての易発酵性炭水化物と N 源となる第一胃内分解性粗タンパク質の量に影響される (松本ら, 1990 ; Bach ら, 2005)。第一胃内でサイレージ発酵産物である乳酸がプロピオン酸に変換されるとともに (Charmley, 2001), MCS 由来の N 化合物が微生物態 N 合成に効率的に利用された可能性がある。これらのことから, 飼料給与量の 20% を MCS で代替しても第一胃に十分にエネルギーおよび N 源が供給されて微生物態タンパク質が合成されるため, 可消化 N 量は少なかったものの, 下部消化管への微生物態 N 供給量が維持されたと考えられる。

ヒツジに総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を MCS で代替しても血漿遊離アミノ酸濃度はほとんど影響を受けなかった。ヒツジにおいて血漿遊離アミノ酸濃度は粗タンパク質給与量にほとんど影響されないことが報告されており (Sano ら, 2004), この報告の結果と一致している。血漿 NEFA 濃度は MCS 給与区が対照区より高かったが, いずれも正常の範囲内であった。したがって, 本実験で設定した処理区においてヒツジのエネルギー摂取量は脂肪酸の動員が亢進する程度のエネルギー供給不足には陥っていなかったと考えられる。

実験 1 の結果は総乾物給与量の 20% の配合飼料を未処理のエノキタケ

廃菌床で代替した飼料をヒツジに給与しても血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は変化しないことを明らかにし、MCSを用いた実験2においてもほぼ同様の結果が得られた。反芻家畜における血漿グルコース代謝回転速度は主に肝臓における糖新生の前駆物質（プロピオン酸、糖原性アミノ酸、乳酸）供給量の影響を受ける（Ortigue-Maryら、2003）。血液グルコースの前駆物質となる第一胃内のプロピオン酸、大部分の血漿糖原性アミノ酸および乳酸濃度が飼料間に差がなかったことから、MCS給与区におけるこれらの糖新生の前駆物質の供給量は対照区と差がなかったと考えられる。また、Sanoら（2004）はヒツジにおいて代謝エネルギー給与量が一定の時、血漿ロイシン代謝回転速度は粗タンパク質給与量の影響を受けないことを報告した。したがって、MCS給与区と対照区のエネルギー給与量には大きな差がなかったため、MCSの給与は血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度に影響を及ぼさず安定していたと考えられる。

実験2ではエノキタケ廃菌床をサイレージ調製することによって、比較的良質の状態での保存することができた。また、MCS給与区は可消化N量が対照区と比較して少ないにもかかわらず、下部消化管微生物態N供給量は飼料間に差がなかった。さらに、第一胃内総VFAおよびアンモニア濃度も差がなく、血漿成分、血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度にも影響を与えなかった。これらのことから、MCSはサイレージ化することによって飼料としてのエノキタケ廃菌床の品質が改善されることが示唆された。しかし、実験2で使用したMCSはpHが高く、独特の酸味臭を呈し、飼料を摂取できないヒツジも認められた。したがって、サイレージ発酵品質の改善に向けた調製方法の改良が今後の課題であると考えられる。

## 第四章

### エノキタケ廃菌床サイレージの調製

エノキタケ廃菌床をサイレージ化することによって長期保存ができ、飼料としてのエノキタケ廃菌床の品質が改善された。しかし、エノキタケ廃菌床サイレージは pH が高く、独特の酸味臭があったため、ヒツジの嗜好性は個体差が見られたため、嗜好性の面を含め、サイレージの品質を改善する必要がある。

そこで、エノキタケ廃菌床に炭水化物源として糖蜜およびビートパルプ、N 源として尿素を添加してサイレージを調製した。さらに、サイレージの pH、乳酸、VFA 濃度、N 含量、VBN 比率を測定し、V-スコアおよびフリーク法によって品質を評価し、エノキタケ廃菌床をサイレージ調製する際、最適な N 源と炭水化物および飼料への添加割合を明らかにすることを目的とした。

## 第一節

### 実験 3 の 1

エノキタケ廃菌床サイレージの品質に及ぼす糖蜜、ビートパルプおよび尿素添加の影響

#### 4.1.1 材料および方法

サイレージの材料として使用済みコーンコブ培地（エノキタケ廃菌床）を使用した（表 4.1）。糖類として糖蜜およびビートパルプ、N 源としては尿素を用いた。

Table 4.1 Percent composition of mushroom compost

Materials	(%)
Corn cob meal	31
Race bran	30
Beat flour	9
Cottonseed hull	4
Wheat bran	19
Dried soybean curd residue	3
Fossil shell	4

## サイレージの調製

糖蜜を添加する糖蜜区，ビートパルプを添加するビート区を設定し，添加割合は乾物重量比 3，6，9%とした。尿素の添加割合は，配合飼料の粗タンパク質量と同等になるよう乾物重量比 1.2%に設定し，尿素無添加と 2 水準とした。エノキタケ廃菌床 200g を高品質ポリ袋(0.06mm×260mm×380mm, HEIKO)に入れ，エノキタケ廃菌床に糖蜜またはビートパルプを添加し，尿素は脱イオン水に溶解した後添加した。それぞれの添加物を添加した後，脱イオン水を加えて水分含量を 70%に調整し，エアポンプ(HIBLOW AIRPUMP SPP-25GA, TECHNO TAKATSUKI)で脱気し，ポリシーラー(卓上型インパルスシーラー, P-300, 富士インパルス株式会社, 高知)を用いて密封した。密封後，直射日光を避け，室温にて 14 日間および 28 日間貯蔵した。ビート区については 28 日間貯蔵した。

### 4.1.2 分析方法

サイレージの分析は実験 2 と同様に行った。

### 4.1.3 統計処理

統計処理は SAS(1996)の MIXED procedure を用いて尿素添加，糖蜜またはビートパルプの添加割合，貯蔵期間について三元配置の分散分析を

行った。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。添加割合に有意差があったものについては Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

#### 4.1.4 結果と考察

調製したエノキタケ廃菌床の発酵品質を表 4.2 に示した。サイレージの pH は尿素添加によって増加した( $P < 0.05$ )。貯蔵期間による差が認められ( $P < 0.01$ )、ビート区が最も低く、次いで 14 日糖蜜区、28 日糖蜜区の順であった( $P < 0.05$ )。また、糖類添加と尿素添加の交互作用は認められなかった。VBN/TN は尿素添加による差が認められなかった。貯蔵期間による差が認められ、28 日ビート区および 28 日糖蜜区が低かった ( $P < 0.05$ )。糖蜜とビートパルプの添加割合、糖類添加と尿素添加の交互作用は認められなかった。乳酸濃度は尿素添加による差は認められなかった。貯蔵期間に差が認められ( $P < 0.01$ )、ビート区が最も高く、次いで 14 日糖蜜区、28 日糖蜜区の順であった( $P < 0.05$ )。また、糖類の添加割合が増加するに伴って乳酸濃度は高くなり ( $P < 0.05$ )、糖類添加と尿素添加の交互作用は認められなかった。酢酸濃度は尿素添加によって低下した( $P < 0.05$ )。貯蔵期間、糖類の添加割合による差は認められなかった。糖類添加と尿素添加の交互作用は認められなかった。プロピオン酸濃度は尿素添加の有無による差は認められなかった。貯蔵期間に差が認められた ( $P < 0.01$ )。また、糖類の添加割合、糖類添加と尿素添加の交互作用は認められなかった。酪酸濃度は 28 日間貯蔵、糖蜜 6% および尿素添加区に検出された。

発酵品質の評価結果を表 4.3 に示した。V-スコアによる評価では尿素、糖類添加および貯蔵期間に差は認められなかった。フリーク法による評価では尿素添加の有無による差は認められず、糖類添加と尿素添加の交互作用も認められなかった。貯蔵期間に差が認められ( $P < 0.01$ )、ビート

区が最も高く次いで 14 日糖蜜区, 28 日糖蜜区の順であった ( $P < 0.05$ )。

また, 糖類の添加割合が増加するにしたがって点数は高かった。

Table 4.2 Fermentation characteristics of mushroom compost silage

	Treatment	pH	VBN/TN	Organic acids (FM%)			
				Lactic acid	Acetate	propionate	butyrate
ensiling 14days	M 3%	5.02	14.0	0.59	0.68	0.03	0.00
	M 6%	5.05	36.4	0.80	0.59	0.03	0.00
	M 9%	4.98	21.9	0.97	0.61	0.04	0.00
	MU 3%	5.06	18.8	0.64	0.62	0.02	0.00
	MU 6%	5.05	25.1	0.84	0.56	0.04	0.00
	MU 9%	4.98	33.9	1.22	0.58	0.04	0.00
ensiling 28days	M 3%	5.24	18.2	0.01	0.81	0.03	0.00
	M 6%	5.24	19.0	0.06	0.81	0.04	0.00
	M 9%	5.22	25.4	0.42	0.86	0.05	0.00
	MU 3%	5.33	23.3	0.10	0.87	0.03	0.00
	MU 6%	5.25	15.1	0.05	0.78	0.04	0.17
	MU 9%	5.15	12.0	0.40	0.81	0.05	0.00
ensiling 28days	B 3%	5.02	25.0	1.23	0.83	0.06	0.00
	B 6%	4.93	11.8	1.38	0.89	0.07	0.00
	B 9%	4.81	12.6	1.44	0.91	0.06	0.00
	BU 3%	4.77	19.5	1.28	0.81	0.06	0.00
	BU 6%	4.72	15.5	1.33	0.76	0.06	0.00
	BU 9%	4.63	12.6	1.37	0.72	0.05	0.00

*P* value

urea	0.02	0.82	0.24	<0.01	0.37	0.22
carbohydrate	<0.01	0.45	<0.01	0.83	0.18	0.14
	M14 <sup>b</sup> M28 <sup>a</sup> U28 <sup>c</sup>		M14 <sup>b</sup> M28 <sup>c</sup> U28 <sup>a</sup>			
Ensiling day	<0.01	<0.01	<0.01	0.21	<0.01	0.14
Urea × carbohydrate	0.71	0.98	0.68	0.13	0.30	0.24

B: beet pulp

BU: urea + beet pulp

M: molasses supplement

MU: urea + molasses supplement

Different letters (A, B, C and a, b, c) indicate significant ( $P < 0.05$ )

Table 4.3 Fermentative quality of mushroom compost silage

	Treatment	Silage quality (point)	
		V-SCORE	Flieg point
ensiling 14days	M 3%	96	70
	M 6%	82	80
	M 9%	92	89
	MU 3%	95	77
	MU 6%	91	91
	MU 9%	83	97
ensiling 28days	M 3%	94	50
	M 6%	92	50
	M 9%	90	58
	MU 3%	91	52
	MU 6%	82	25
	MU 9%	95	58
ensiling 28days	B 3%	71	86
	B 6%	77	97
	B 9%	74	91
	BU 3%	71	93
	BU 6%	69	97
	BU 9%	75	97
<i>P</i> value			
urea		0.91	0.90
carbohydrate		0.59	<0.01
			M14 <sup>b</sup> M28 <sup>c</sup> U28 <sup>a</sup>
Ensiling days		0.71	<0.01
Urea × carbohydrate		0.98	0.35

B: beet pulp

BU: urea + beet pulp

M: molasses supplement

MU: urea + molasses supplement

Different letters (A, B and a, b) indicate significant ( $P < 0.05$ )

本実験 3 の 1 において、エノキタケ廃菌床サイレージは 28 日糖蜜区が 14 日糖蜜区より pH が高く、フリーク法によるサイレージの品質評価が低いことから糖蜜添加のみでは長期間貯蔵できないことが示唆された。また、ビート区のフリーク法による評価が実験区間で最も高かったこと、pH が実験区間で最も低かったこと、pH は尿素添加によって低下する傾向があったことから、エノキタケ廃菌床サイレージの調製には糖質源としてのビートパルプは糖蜜よりも優れていた。また、尿素添加に

よって、エノキタケ廃菌床サイレージの粗タンパク質含量が高くなり、配合飼料と同等になった。しかし、サイレージの pH は十分に低下しかなかった。飼料中の乳酸菌が少なくても、炭水化物を十分に添加することによって乳酸発酵が進むことによる pH が低下すると考えられる。

## 第二節

### 実験 3 の 2

#### エノキタケ廃菌床サイレージの品質に及ぼすビートパルプ・尿素添加 の影響

実験 3 の 2 ではエノキタケ廃菌床サイレージの調製には糖質源としてのビートパルプは糖蜜よりも優れていたが、サイレージの pH は十分に低下しなかった。飼料中の乳酸菌が少なくても、炭水化物を十分に添加することによって乳酸発酵が進むことによる pH が低下すると考えられる。

そこで、ビートパルプの添加割合を段階的に変え、サイレージの品質を評価することにより、ビートパルプの最適な添加割合を検討するため、実験 3 の 2 を行った。

#### 4.2.1 材料および方法

サイレージの材料として使用済みコーンコブ培地のエノキタケ廃菌床を使用した（成分は実験 3 の 1 と同様）。炭水化物源としてビートパルプ、N 源として尿素をエノキタケ廃菌床に添加した。

#### サイレージの調製

ビートパルプの添加割合は乾物重量比 0, 10, 20, 30%とした。尿素の添加割合は、配合飼料の粗タンパク質量と同等になるよう乾物重量比 1.2%に設定した。エノキタケ廃菌床 200g を高品質ポリ袋(0.06mm×260mm×380mm, HEIKO)に入れ、エノキタケ廃菌床にビートパルプを添加し、尿素は脱イオン水に溶解した後添加した。それぞれの添加物を添加した後、脱イオン水を加えて水分含量を 70%に調整し、エアポンプで

脱気し、ポリシーラーを用いて密封した。密封後、直射日光を避け、室温にて 14 日間および 28 日間貯蔵した。

サイレージの調製方法は実験 3 の 1 と同様に行った。

#### 4.2.2 分析方法

サイレージの分析は実験 2 と同様に行った。

#### 4.2.3 統計処理

統計処理は SAS(1996)の MIXED procedure を用いてビートパルプの添加割合、貯蔵期間について二元配置の分散分析を行った。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。添加割合に有意差があったものについては Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

#### 4.2.4 結果と考察

エノキタケ廃菌床サイレージの pH, VBN/TN, 有機酸組成の結果を表 4.4 に示した。pH はビートパルプの添加によって低下し ( $P < 0.01$ ), ビートパルプ 20%, 30% 添加区はビートパルプ 10% 添加区よりも低かった ( $P < 0.05$ )。乳酸濃度はビートパルプの添加割合の増加に伴って上昇し ( $P < 0.01$ ), ビートパルプ 20%, 30% 添加区は 0 および 10% 添加区より高かった ( $P < 0.05$ )。VBN/TN はビートパルプ添加区が低かった ( $P < 0.01$ )。エノキタケ廃菌床サイレージの pH, 乳酸, 全 N 中 VBN の割合は貯蔵期間に差がなかった。酢酸濃度はビートパルプの添加割合による差がなかったが, 28 日間が 14 日間より高かった ( $P < 0.05$ )。プロピオン酸濃度はビートパルプ 20%, 30% 添加区が 0 および 10% 添加区より低く ( $P < 0.05$ ), 28 日間が 14 日間より高かった ( $P < 0.05$ )。

エノキタケ廃菌床サイレージの発酵品質評点を表 4.5 に示した。V スコアによる評点はビートパルプの添加割合によって差がみとめられ ( $P = 0.01$ ), 20% および 30% ビートパルプ添加区が高く ( $P < 0.05$ ), 貯蔵期間による差がなかった。フリークによる評点は 14 日間で 28 日間より高かった ( $P < 0.01$ )。

Table 4.4 Fermentation characteristics of mushroom compost silage

	pH	VBN/TN	Organic acid (FM%)			
			Lactic acid	Acetate	Propionate	Butyrate
ensiling						
14days						
Urea	4.76 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a</sup>	1.09 <sup>c</sup>	0.68	0.02 <sup>a</sup>	0.00
BU10%	4.37 <sup>b</sup>	9.1 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	0.76	0.01 <sup>b</sup>	0.00
BU20%	4.15 <sup>c</sup>	6.5 <sup>b</sup>	1.20 <sup>a</sup>	0.65	0.00 <sup>c</sup>	0.00
BU30%	4.06 <sup>c</sup>	5.8 <sup>b</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.79	0.00 <sup>c</sup>	0.00
Ensiling 28days						
Urea	4.64 <sup>a</sup>	12.3 <sup>a</sup>	1.07 <sup>c</sup>	0.84	0.04 <sup>a</sup>	0.00
BU10%	4.28 <sup>b</sup>	8.6 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	0.81	0.02 <sup>b</sup>	0.00
BU20%	4.18 <sup>c</sup>	7.8 <sup>b</sup>	1.23 <sup>a</sup>	0.81	0.01 <sup>c</sup>	0.00
BU30%	4.13 <sup>c</sup>	7.4 <sup>b</sup>	1.23 <sup>a</sup>	0.82	0.00 <sup>c</sup>	0.00
<i>P</i> value						
carbohydrate	<0.01	<0.01	<0.01	0.12	<0.01	
Ensiling day	0.14	0.14	0.44	<0.01	<0.01	

B: beet pulp

BU: urea + beet pulp

Different letters (a, b, c) indicate significant ( $P < 0.05$ )

実験 3 の 2 では、エノキタケ廃菌床サイレージはビートパルプの添加によって pH, VBN/TN が低下し、乳酸濃度が増加した。フリーク法による評点は 14 日間で 28 日間より高く、V スコアはビートパルプ添加区が高かったことから、ビートパルプの添加はエノキタケ廃菌床サイレージの品質を改善することが示された。

Table 4.5 Fermentative quality of mushroom compost silage

	Silage quality (point)	
	V-SCORE	Flieg point
ensiling 14days		
Urea	85 <sup>b</sup>	97
BU10%	86 <sup>b</sup>	97
BU20%	94 <sup>a</sup>	97
BU30%	94 <sup>a</sup>	91
ensiling 28days		
Urea	75 <sup>b</sup>	80
BU10%	88 <sup>b</sup>	91
BU20%	90 <sup>a</sup>	91
BU30%	90 <sup>a</sup>	86
<i>P</i> value		
carbohydrate	0.01	0.29
Ensiling day	0.14	<0.01

B: beet pulp

BU: urea + beet pulp

Different letters (a, b) indicate significant ( $P < 0.05$ )

### 第三節

#### 実験 3 の 3

##### 人工第一胃法によるエノキタケ廃菌床サイレージの第一胃発酵性状に 及ぼすビートパルプ・尿素添加の影響

エノキタケ廃菌床サイレージの品質はビートパルプ添加によって改善された。人工第一胃装置はインビトロでの飼料消化試験を行う装置である。各飼料や添加剤等の消化試験は反芻家畜を飼養することなく、精密に測定ができる方法である。

そこで、第一胃発酵性状を調べるため、20%ビートパルプ添加区を用い、人工第一胃装置によってガス生産量、第一胃発酵（VFA、アンモニア濃度）を測定した。

#### 4.3.1 材料および方法

人工第一胃法に用いた飼料は混播乾草および配合飼料を乾物重量比 1:1 で培養したものを対照区とし、実験区は総飼料の乾物の 5, 10, 20% に相当する配合飼料を実験 3 の 2 で調製したビートパルプ 20% と尿素添加のエノキタケ廃菌床サイレージで代替した。

実験に使用した第一胃内容液は第一胃フィステル装着ヒツジ 2 頭（体重  $40.2 \pm 9.3$ kg）から採取した。飼料給与条件はオーチャードグラスとリードカナリーグラスの混播乾草およびトウモロコシなどの穀類を主体とする市販配合飼料を乾物重量比 8:2 の割合で給与した。飼料給与量は維持代謝エネルギー量の 120% とした。給餌は 1 日 1 回、朝 9:00 に

給与し、ヒツジを 14 日間を馴致した。内容液を採食前に採取し、二重ガーゼで濾過し、飼料残渣を取り除いた。

乾物 1g の飼料を人工第一胃装置に入れた。直前にヒツジから採取した第一胃内容液 40mL，人工唾液 80mL を加え，恒温水槽内で温度 40℃ で 48 時間培養した（写真 1）。ガス生産量を経時的に記録し，培養終了後，一部を採取し，メタン生産量を測定した。



写真 1

#### 4.3.2 分析方法

培養した後，培養液全量を遠心分離し（4℃，3,000 回転/分，10 分間），上清を分離した。第一胃内容液 pH，アンモニアおよび VFA 濃度を実験 1 と同様に分析した。さらに，残りの培養後の飼料は 60℃，48 時間通風乾燥器を用いて乾燥後，重量を秤量し，飼料の消失率を測定した。

#### 4.3.3 統計処理

統計処理は SAS( 1996 )の MIXED procedure を用いて配合飼料の代替割合について一元配置の分散分析を行った。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。代替割合に有意差があったものについては Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

#### 4.3.4 結果

人工第一胃装置で培養した第一胃内容液 pH, VFA 濃度, アンモニア濃度, ガス生産量および乾物消失率の結果を表 4.6 に示した。乾物の消失率, pH, ガス生産量, VFA 濃度およびアンモニア濃度はエノキタケ廃菌床代替の割合によって飼料間に差がなかった。

Table 4.6 Effects of mushroom compost silage replaced concentrate on rumen fermentation in vitro

Items	Treatment <sup>b</sup>				SEM <sup>c</sup>	P-value
	0	5%	10%	20%		
DM disappearance (%)	18.0	19.1	13.9	11.9	3.4	0.61
pH	6.82	6.85	6.90	6.89	0.03	0.07
Ammonia (mmol/L)	24.2	23.2	24.8	27.1	1.6	0.32
VFA <sup>a</sup> (mmol/L)						
Total	78.0	79.6	82.1	77.5	2.1	0.74
Acetate	50.5	51.6	54.1	51.3	1.6	0.64
Propionate	14.0	14.4	14.4	13.8	0.3	0.88
Isobutyrate	1.1	1.2	1.3	1.1	0.06	0.15
Butyrate	9.1	9.1	8.8	8.0	0.5	0.29
Isovalerate	2.1	2.1	2.3	2.1	0.1	0.32
Valerate	1.2	1.2	1.3	1.2	0.04	0.59

<sup>a</sup> VFA: Volatile fatty acid concentration.

<sup>b</sup> Treatment: replacement of mushroom compost silage at 0, 5, 10, 20%.

<sup>c</sup> SEM: Standard error of the mean.

0 時間から 48 時間まで 12 時間ごとにガスの生産量および培養 48 時間後の乾物あたりメタンの生産量を図 4.1 に示した。ガスは 12 時間までにほぼ生産され, サイレージの代替割合および培養時間による差は認められなかった。乾物あたりのメタン生産量は代替割合による差は認められなかった。

Time course of gas production (mL)

Methane production (mL/gDM)

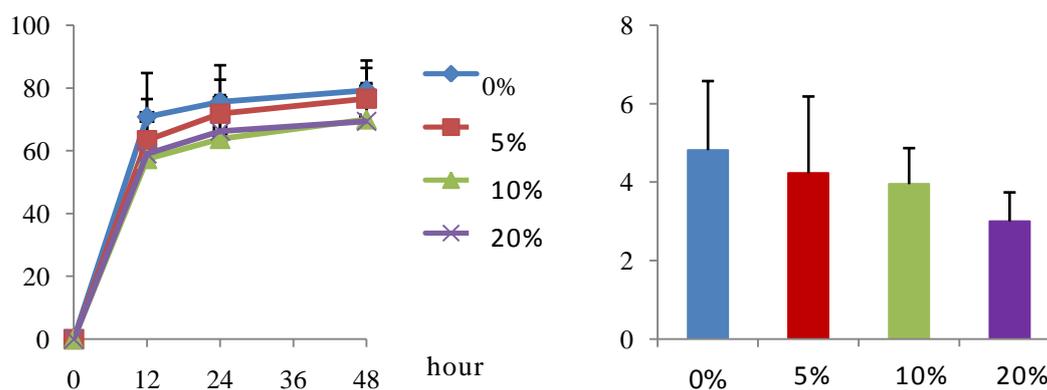


Fig 4.1 : time course of gas production at the replacement of mushroom compost silage at 0, 5, 10, 20%. And the production of menthane at 48 hour.

#### 4.3.5 考察

サイレージの pH は 4.2 以下が良質なサイレージであるが（龍前ら，2010），実験 3 の 1 のサイレージの pH は 4.63 が最も低い値であった。また，28 日間貯蔵した結果，サイレージの pH はビート区が糖蜜区より低くなった。さらに，ビートパルプの添加割合を 20% および 30% に増加した結果，サイレージの pH は 4.2 以下まで低下した。サイレージ発酵中に産生される有機酸は主に乳酸，そのほかには酢酸および酪酸である。また，飼料中タンパク質は微生物によって VBN に分解され，それらはサイレージの pH に影響される。サイレージの pH は嫌気条件で乳酸菌が飼料中の糖分を利用して乳酸発酵が進むため低下する（三浦，2001）。すなわち，飼料中の糖分不足の場合，乳酸発酵は十分に進まず，酢酸や酪酸などが産生されたり，タンパク質は VBN に分解したりする。したがって，糖類の添加割合の増加に伴って pH が低下していることから，実験 3 の 1 と実験 3 の 2 は糖分添加含量が少なかったと考えられる。ビート区は糖蜜区よりサイレージの pH が低かった。本実験はビートパルプを粉碎して添加し廃菌床とよく混合できたと考えられる。糖蜜は粘性

が高く、サイレージ調製時によく混合できなかったため、pHが低下できなかったと考えられる。

サイレージの pH の低下が不十分なときは酪酸が生成される。サイレージの酪酸が多くなるとサイレージは臭いを発生し、品質および嗜好性も低下する（三浦，2001）。本実験では 28 日間貯蔵，糖蜜 6%および尿素添加区で酪酸が検出された。これはサイレージ調製の時にポリ袋の脱気密封が不十分であり，また，貯蔵中にポリ袋に穴があき，空気が混入したため，酪酸発酵が起こったと考えられる。

フリーク法の評点は有機酸組成で評価するが，V スコアは有機酸および VBN/TN で評価する。実験 3 において，糖蜜区の乳酸含量は低かったため，エノキタケ廃菌床サイレージの発酵品質はフリーク法による評点が過小評価された。糖蜜区では，貯蔵日数が長くなることによって乳酸濃度が低下し，フリーク法による品質評価は低くなった。このことから，糖蜜添加の場合は長期間貯蔵には適さないと推察される。一方，ビートパルプの添加は 28 日間貯蔵しても品質の評点が 75 点以上であることから，エノキタケ廃菌床サイレージを長期貯蔵できたと認められ，ビートパルプ 20%添加はサイレージの pH が 4.2 以下まで低下し，フリーク法および V スコアによる評点も高かった。

人工第一胃装置による第一胃発酵性状はビートパルプおよび尿素を添加して調製したエノキタケ廃菌床サイレージが総飼料の乾物の 20%に相当する配合飼料を代替しても乾物消失率，第一胃内 pH，アンモニアおよび各 VFA 濃度は飼料間に差がなかった。第一胃内アンモニアの大部分は飼料中粗タンパク質が第一胃内微生物によって分解され生じるため，第一胃内アンモニア濃度は粗タンパク質給与量に影響される。エノキタケ廃菌床サイレージは尿素添加によって配合飼料の粗タンパク質含量は同等であったため，20%まで代替しても第一胃内アンモニア濃度

は影響されなかった。飼料中炭水化物は第一胃内に微生物によって VFA に変換され、反芻家畜にとって重要なエネルギー源として利用される。エノキタケ廃菌床サイレージは総飼料の乾物の 20% に相当する配合飼料の 20% まで代替しても第一胃内各 VFA 濃度は飼料間に差がなかったことから、ビートパルプ添加によってエノキタケ廃菌床サイレージは対照区と同等の第一胃内発酵性状を有することが示唆された。

以上のことから、エノキタケ廃菌床サイレージは総飼料の乾物の 20% に相当する配合飼料を代替できることが示された。

## 第五章

### 実験 4

#### エノキタケ廃菌床サイレージ給与ヒツジにおける消化機能および栄養素代謝に及ぼすビートパルプ・尿素添加の影響

実験 4 ではビートパルプおよび尿素添加して調製したエノキタケ廃菌床サイレージをヒツジに給与し、その時の嗜好性、消化性および栄養素代謝を測定した。

### 5 材料および実験方法

#### 5.1 動物および飼養条件

岩手大学動物実験管理規則にしたがって、実験計画を立て、岩手大学動物委員会の承認を得たうえで実施した。実験にはヒツジ 6 頭（4 才，雄 2 頭，去勢 4 頭，体重  $51.9 \pm 2.8$ kg）を供試した。飼料はオーチャードグラスとリードカナリーグラスの混播乾草，トウモロコシなどの穀類を主体とする配合飼料（ $\alpha$ ビーフ，中部飼料）およびビートパルプ・尿素添加エノキタケ廃菌床サイレージ（ビートパルプ 20% 添加，尿素 1.2%，14 日間貯蔵，BU-MCS）を用いた。対照区は混播乾草，配合飼料を乾物重量比 5:5 とし，維持代謝エネルギー量の 120% となるように設定した。実験区は総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を BU-MCS と代替した。乾草，配合飼料，BU-MCS の粗タンパク質および NDF 含量を表 5.1 に示した。

Table 5.1 Crude protein and Neutral detergent fiber (NDF) of the diets

	Crude protein (%DM <sup>a</sup> )	NDF (%DM <sup>a</sup> )
Mixed hay	14.0	64.0
Concentrate feed	16.4	28.1
Mushroom compost Silage(BU-MCS)	16.5	42.1

<sup>a</sup> DM: dry matter

実験は 1 期 21 日間のクロスオーバー法にしたがって実施した。ヒツジは 2 週間動物飼育舎の個別ペンで飼料に馴致した後，生物環境制御室（温度 23℃，湿度 70%，照明点灯 8：00～22：00）に移動し，7 日間代謝ケージで試験を行った。給餌は 1 日 2 回（8:30 と 20:30）とし，飲水は自由とした。1 週間毎に体重を測定し，飼料給与量を変更した。実験 16 日～20 日目に 5 日間の N 出納実験を行い，N 消化率，尿中プリン代謝物を測定し，微生物態 N 供給量を算出した。サンプルの処理方法，保存条件は実験 2 と同様に実施した。実験 20 日目の採食前，採食開始 1.5 時間，3 時間および 6 時間後に胃汁採取器を用いて第一胃内容液を採取した。サンプルの保存条件は実験 1 と同様に実施した。

同位元素希釈法実験は実験 1 と同様に実施した。

## 5.2 分析方法

飼料成分，N 出納，尿中プリン代謝物は実験 2 と同様に測定した。第一胃内容液 pH，アンモニア濃度，VFA 濃度は実験 1 と同様に測定した。血漿アミノ酸濃度，血漿グルコース，ロイシン， $\alpha$ -KIC 濃度，血漿[U-<sup>13</sup>C]グルコース， $\alpha$ -[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメントは実験 1 と同様に測定した。

## 5.3 計算方法

N 出納，微生物態 N 供給量，血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は実験 2 と同様の計算法により算出した。

## 5.4 統計処理

統計処理は実験 1 と同様に実施した。

## 6 結果

ビートパルプおよび尿素を添加して調製したエノキタケ廃菌床サイレージの発酵品質および評価を表 5.2 に示した。サイレージの pH は 4.39 であり、乳酸、酢酸、プロピオン酸含量はそれぞれ 0.89%、0.55%、0.01% であった。酪酸は検出されなかった。サイレージの品質はフリーク法による点数が 89 点であり、V スコアによる点数は 93 点であった。

Table 5.2 Fermentation characteristics of mushroom compost silage (BU-MCS)

Item	Value
Moisture (%)	70.3
pH	4.39
Lactic acid (% FM <sup>a</sup> )	0.89
Acetate (% FM)	0.55
Propionate (% FM)	0.01
Butyrate (% FM)	nd <sup>c</sup>
VBN <sup>b</sup> (% total N)	7.2
Flieg point	89
V-SCORE	93

<sup>a</sup> FM: fresh matter

<sup>b</sup> VBN: volatile basic nitrogen

<sup>c</sup> nd: not detected

ヒツジの日増体量、N 摂取量、N 保持量および N 消化率の結果を表 5.3 に示した。日増体量は BU-MCS 給与区が対照区より多かった ( $P = 0.02$ )。N 摂取量は飼料間に差がなく、糞中 N 排出量と尿中 N 排出量はほぼ同じであり、可消化 N 量は BU-MCS 給与区が少なかったが ( $P = 0.04$ )、N 保持量および N 消化率は飼料間に差が認められなかった。

Table 5.3 Effects of feeding mushroom compost silage (BU-MCS) on body weight change, nitrogen (N) balance in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	BU-MCS diet		
Seep	6	6		
Body weight change (kg/day)	0.06	0.12	0.03	0.02
N intake (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	1.18	1.20	0.01	0.35
N in feces (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.33	0.38	0.01	0.11
N in urine (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.47	0.51	0.02	0.13
Digestible N (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.85	0.82	0.01	0.04
N retention (g/kg <sup>0.75</sup> /day)	0.38	0.31	0.02	0.55
N digestibility (%)	72	68	1	0.11

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and BU-MCS diet, mixed hay, concentrate and BU-MCS (at ratio of 5:3:2)

採食に伴う第一胃発酵性状の経時的変化を図 5.1 に示した。第一胃内 pH は飼料間に差がなく、採食に伴って低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内アンモニア濃度は飼料間に差がなく、採食 1.5 時間に増加し、採食 3 時間、6 時間後に低下した ( $P < 0.05$ )。第一胃内総 VFA、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度は飼料間に差がなく、採食 1.5 時間に増加し、採食 3 時間、6 時間に採食前の値にまで低下した ( $P < 0.05$ )。

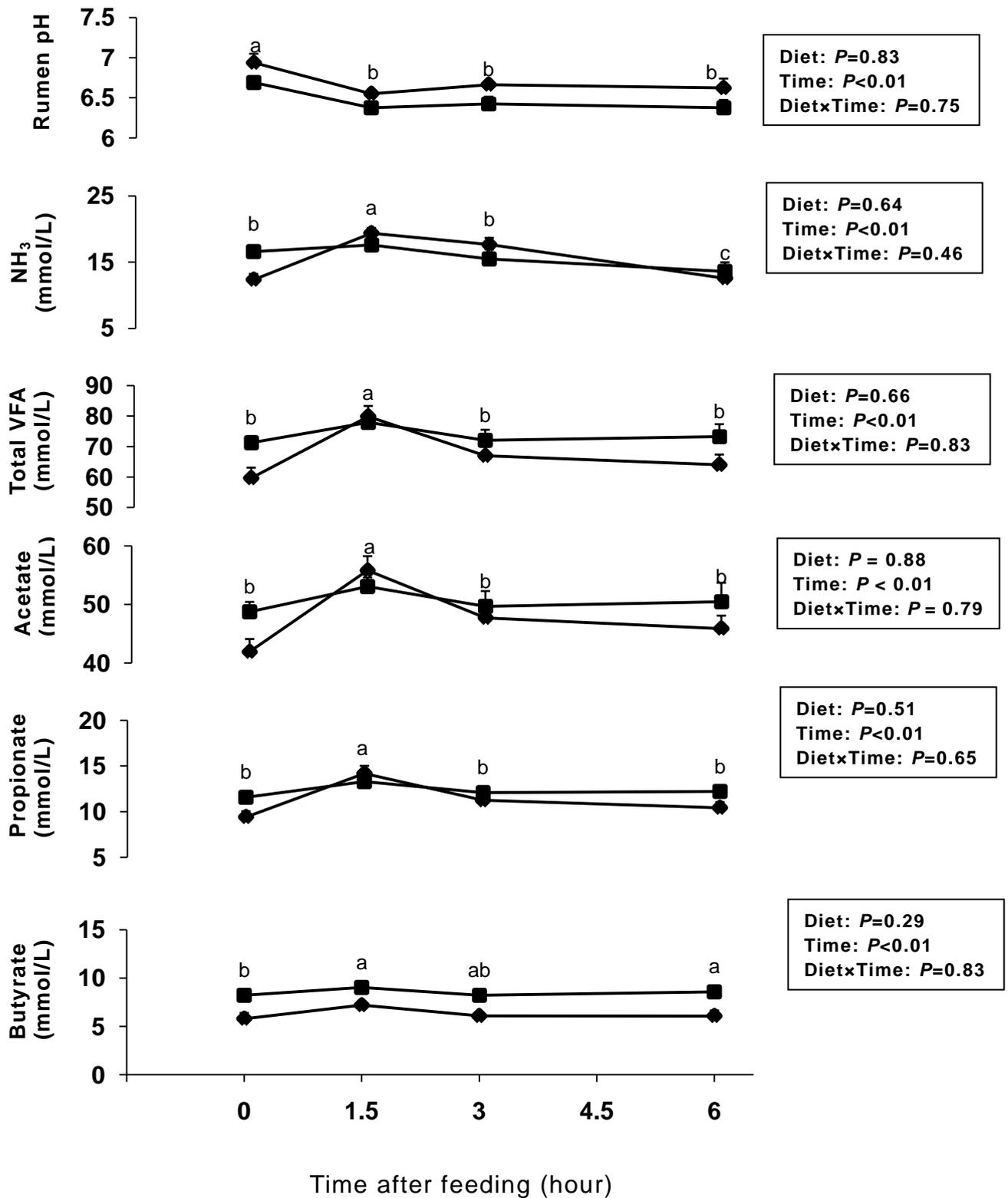


Fig 5.1 Time-course changes of ruminal characteristics in sheep fed the Con diet (■) and the BU-MCS diet (◆). Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and BU-MCS diet, mixed hay, concentrate and BU-MCS (at ratio of 5:3:2). Different letters (a,b,c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) at times before and after feeding.

尿中プリン代謝物排出量, 微生物態 N 供給量および可消化 N 量に対する微生物態 N 供給量の割合の結果を表 5.4 に示した。尿中アラントイン, 尿酸, キサンチン+ヒポキサンチン, 総プリン代謝物排出量および微生物態 N 供給量および可消化 N 量に対する微生物態 N 供給量の割合は飼料間に差がなかった。

Table 5.4 Effects of feeding mushroom compost silage (BU-MCS) on urinary purine derivative, excretion and microbial nitrogen (N) supply in sheep<sup>a</sup>

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	BU-MCS diet		
Sheep	6	6		
Allantoin (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.30	0.36	0.03	0.13
Uric acid (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.09	0.08	0.004	0.44
Xanthine +Hypoxanthine (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.04	0.04	0.002	0.28
Total PD <sup>c</sup> excretion (mmol/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.43	0.48	0.03	0.26
Microbial N supply (g/kg <sup>0.75</sup> /d)	0.36	0.40	0.03	0.27
The ratio of microbial N supply to digestible N (%)	50	54	3	0.18

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and BU-MCS diet, mixed hay, concentrate and BU-MCS (at ratio of 5:3:2)

<sup>c</sup> PD: purine derivative

同位元素希釈法実験開始前における血漿遊離アミノ酸，乳酸，アンモニアおよび尿素濃度を表 5.5 に示した。血漿乳酸濃度は対照区より BU-MCS 給与区が高く ( $P = 0.01$ )，血漿遊離アミノ酸，アンモニアおよび尿素濃度は飼料間に差がなかった。

Table 5.5 Effects of feeding mushroom compost silage (BU-MCS) on plasma free amino acids, lactic acid, ammonia, urea and at the pre-infusion period in sheep<sup>a</sup>.

Items	Treatment <sup>c</sup>		SEM	P-value
	Con diet	BU-MCS diet		
Sheep	6	6		
Amino acids( $\mu\text{mol/L}$ )				
Threonine	80	72	12	0.42
Valine	165	147	16	0.31
Methionine	24	18	3	0.37
Isoleucine	88	63	12	0.36
Leucine	100	92	6	0.38
Phenylalanine	49	46	5	0.78
Histidine	70	59	12	0.66
Lysine	78	87	12	0.62
Tryptophan	19	30	7	0.46
Serine	127	156	16	0.42
Asparagine	49	36	4	0.29
Glutamic acid	33	41	5	0.47
Glutamine	211	276	65	0.62
Glycine	675	649	83	0.11
Alanine	386	339	67	0.34
Tyrosine	78	77	12	0.99
Arginine	135	92	18	0.25
Proline	56	45	16	0.98
Lactic acid (mmol/L)	0.72	0.83	0.04	0.01
Ammonia ( $\mu\text{mol/L}$ )	105	111	11	0.76
Urea (mmol/L)	6.2	8.5	1.0	0.24

<sup>a</sup> Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and BU-MCS diet, mixed hay, concentrate and BU-MCS (at ratio of 5:3:2)

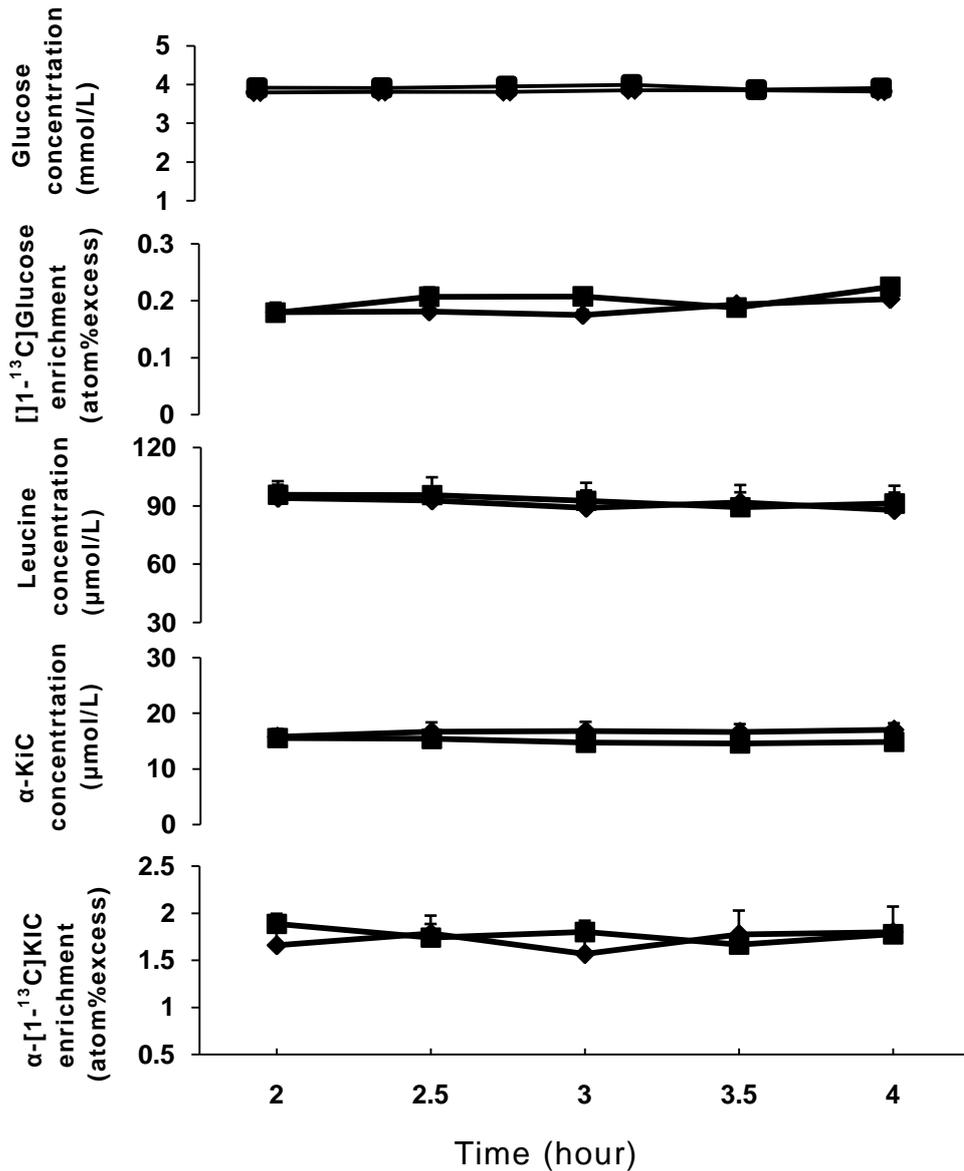


Fig 5.2: Time course of changes in plasma glucose, leucine, α-KIC concentration and enrichment during 2-4 hour of primed continuous infusion of [U-<sup>13</sup>C]glucose and α-[1-<sup>13</sup>C]KIC in sheep fed Con diet and BU-MCS diet.

同位元素希釈法実施時における血漿グルコース濃度および血漿 [U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメント, 血漿ロイシンおよび α-KIC 濃度, 血漿 α-[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメントの経時的変化を図 5.2 に示した。血漿グルコース濃度および血漿[U-<sup>13</sup>C]グルコースエンリッチメントともにほぼ一定の値で推移した。血漿ロイシンおよび α-KIC 濃度, 血漿 α-[1-<sup>13</sup>C]KIC エンリッチメントもほぼ一定の値で推移した。

血漿グルコース， $\alpha$ -KIC 濃度および血漿グルコース，ロイシン代謝動態の結果を表 5.6 に示した。血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は飼料間に差がなかった。

Table 5.6 Effects of feeding mushroom compost silage (BU-MCS) on plasma glucose and leucine kinetics in sheep<sup>a</sup>

Items	Treatment <sup>b</sup>		SEM	P-value
	Con diet	BU-MCS diet		
Sheep	6	6		
Glu concentration (mmol/L)	3.93	3.82	0.07	0.22
GluTR (mmol/kg <sup>0.75</sup> /h)	1.52	1.35	0.05	0.11
Leucine concentration ( $\mu$ mol/L)	92.9	91.1	5.3	0.81
$\alpha$ -KIC <sup>c</sup> concentration ( $\mu$ mol/L)	15.0	16.6	0.92	0.20
LeuTR ( $\mu$ mol/kg <sup>0.75</sup> /h)	400	402	30	0.93

<sup>a</sup> Values represent means for n=6 and standard error of the mean (SEM).

<sup>b</sup> Treatment: Con diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MC diet, mixed hay, concentrate and BU-MCS (at ratio of 5:3:2).

<sup>c</sup>  $\alpha$ -KIC= $\alpha$ -Ketoisocaproate.

## 7 考察

BU-MCS の品質評価はフリーク法および V スコアによる評点は 89 点，93 点であり，同様に調製した実験 3 の 2 のエノキタケ廃菌床サイレージよりも多少低かった。実験 3 の 2 はビートパルプを粉砕器を用いて粉砕した後，サイレージに添加した。一方，実験 4 ではビートパルプをハンマーで細かくした後，添加してサイレージを調製した。したがって，実験 4 の方が実験 3 の 2 より粒が大きく，サイレージ調製の際に混合が充分でなかったため，サイレージの評点が低かったと考えられる。また，実験 2 では MCS 酸味臭が認められ，6 頭のうち，1 頭のヒツジは MCS をほとんど採食しなかった。実験 4 では，BU-MCS に酸味臭が認められず，6 頭のヒツジは給与量全量を採食し，嗜好性は良好であったと考えられる。

総乾物給与量の 20%に相当する配合飼料を BU-MCS で代替しても N 消化率は飼料間に差がなかった。N 消化率は N 摂取量に影響され、N 摂取量が増加するに伴って高くなることが報告されている (Sano ら, 2004)。配合飼料の粗タンパク質は同等になるように BU-MCS に尿素を添加したため、N 摂取量は両飼料区が差がなく、ほぼ類似した値であった。そのため、N 消化率は影響されなかったと考えられる。また、BU-MCS 給与区の N 消化率は市販のエノキタケ廃菌床サイレージを給与した実験 2 の結果 64%と比較して高い値を示した。以上のことから、BU-MCS に尿素を添加したことによって N 消化率は改善されることが示された。

アンモニア濃度は飼料間に差がなく、採食開始 1.5 時間後に最高値に達した。飼料中タンパク質の大部分は第一胃内微生物によってアンモニアまで分解され、粗タンパク質給与量は第一胃内アンモニア濃度に影響を及ぼす。N 摂取量は両飼料区でほぼ同等であったため、第一胃内アンモニア濃度は飼料間に差がなかったと考えられる。また、尿素は第一胃内微生物によって迅速にアンモニアに分解されるため (Alves ら, 2014)、BU-MCS 給与区のアンモニア濃度は採食開始 1.5 時間後に最高値に達したと考えられる。

サイレージの発酵品質、水分含量は乾物採食量に影響を及ぼすことが報告されている (増子, 2000 ; Charmley, 2001 ; Kirkland と Patterson, 2006)。泉ら (2001) はウシに 37.5% (低水分) と 52.7% (適水分) のサイレージを給与した結果、乾物採食量は適水分サイレージが低水分サイレージより少ないことを報告した。また、去勢牛において粗繊維の給与割合が高くなるに伴い乾物摂取量が低下し、その結果、総 VFA 濃度も低下することが報告されている (Tjardes ら, 2002)。実験 4 では BU-MCS の水分割合および NDF 含量が配合飼料より高かったが、サイレージの品質がよく、嗜好性にすぐれていたため、総乾物給与量の 20%に相当す

る配合飼料を BU-MCS で代替してヒツジに給与しても、給与した飼料の全量を採食した。その結果、第一胃内総 VFA、酢酸、プロピオン酸および酪酸濃度に飼料間に差がなかったと考えられる。

BU-MCS 給与区の可消化 N 量は対照区より少なかったが、下部消化管への微生物態 N 供給量は飼料間に差がなく、可消化 N に対する下部消化管微生物態 N 供給量の割合も差が認められなかった。第一内微生物態タンパク質合成量は微生物のエネルギー源としての易発酵性炭水化物と N 源となる第一胃内分解性粗タンパク質の量に影響される（松本ら，1990；Bach ら，2005）。また、第一胃内微生物合成には飼料中タンパク質が微生物によってアンモニアに分解されると同時に、炭水化物も分解されて微生物合成に必要なエネルギーが供給されると、N 損失が減少することが報告されている（Alves ら，2014）。尿素は第一胃内で迅速に分解されるが、BU-MCS 給与区は対照区とのアンモニアと VFA が同様に産生されるため、微生物態 N 供給量に差がなかったと考えられる。また、微生物態 N 供給量が実験 2 とほぼ同等であったが、実験 4 の可消化 N 量が実験 2 より多かったため、可消化 N に対する下部消化管微生物態 N 供給量の割合は実験 2（67%）より低かった。

血漿乳酸濃度は BU-MCS 給与区が対照区と比較して高かったが、血漿遊離アミノ酸、アンモニア、尿素濃度は飼料間に差がなかった。血漿アミノ酸濃度は粗タンパク質給与量および飼料中の N 源に影響されるが、実験 4 において両飼料区の N 摂取量はほぼ同等であったため、ヒツジに総乾物給与量の 20%に相当する配合飼料を BU-MCS で代替して給与しても血漿遊離アミノ酸濃度は大きな影響を受けなかったと考えられる。

実験 1 および実験 2 では総乾物給与の 20%に相当する配合飼料をそれぞれ未処理の MC、サイレージにした MCS で代替してヒツジに給与しても血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度は変化しなかった。実験

4においてもほぼ同様の結果が得られた。エネルギー給与量が血漿グルコース，ロイシン代謝回転速度に影響を及ぼす（Sanoら，2007；Sanoら，2009）。実験1および実験2においてMCまたはMCSの給与は血漿グルコース，ロイシン代謝回転速度に飼料間に影響を与えなかったことから，MCまたはMCS給与区と対照区のエネルギー給与量には大きな差がなかったと推定した。実験4においても，BU-MCS給与区は対照区とのエネルギー給与量に大きな差がなかったため，血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度に影響を及ぼさなかったと考えられる。以上のことから，実験4ではエノキタケ廃菌床サイレージ調製時にビートパルプおよび尿素添加によってサイレージの発酵品質が良好であり，また，尿素的添加はN源を補助し，ビートパルプの添加は嗜好性が向上できたため，N消化性が飼料間に差が認められなかった。さらに，第一胃発酵性状および栄養素代謝に影響を与えず，BU-MCSは給与飼料の一部と代替できることが示唆された。

## 要約

日本の飼料自給率は極めて低く、自給率向上のために未活用資源を飼料として有効利用することが推進されている。一方、エノキタケの出荷量はキノコ生産類の中で最も多く、菌床栽培が急速に増加している。そのため、エノキタケ廃菌床（MC）の処理が大きな問題となっている。そこで、本研究では MC の有効利用のため、反芻家畜の飼料としての活用を目指し、MC を含む飼料をヒツジに給与し、その際の消化機能および栄養素代謝を明らかにするため、以下の実験を行った。

（実験 1）MC 給与ヒツジにおける消化機能、血漿グルコースおよびロイシン代謝を測定した。ヒツジ 4 頭を供試し、処理区は対照区と MC 給与区とした。対照区は混播乾草と配合飼料の給与割合を 5 : 5 とし、維持代謝エネルギーの 120% を給与した。MC 給与区は総乾物給与量の 20% に相当する配合飼料を MC と代替した。実験は 1 期 21 日間のクロスオーバー法に従って実施した。実験開始 16 日目から 5 日間にわたり N 出納試験を行った。実験 20 日目に採食に伴って第一胃内容液を採取し、pH、揮発性脂肪酸（VFA）およびアンモニア濃度を測定した。21 日目には [U-<sup>13</sup>C] グルコースと [1-<sup>13</sup>C] ロイシンの同位元素希釈法を用いて血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度を測定した（それぞれ GluTR, LeuTR）。MC 給与区の N 消化率は対照区より低かったが ( $P < 0.01$ )、N 保持量、第一胃内 VFA 濃度、血漿 GluTR, LeuTR は飼料間に差がなかった。以上の結果から、MC をヒツジに給与しても第一胃発酵性状および栄養素代謝は影響を受けないことが示された。しかし、MC は水分割合が高いため、保存性の改善が課題となった。

（実験 2）サイレージは水分が高い飼料を保存する調製法の一つであり、乳酸発酵によって腐敗菌を抑え、栄養成分を保存することができる。そこで、エノキタケ廃菌床サイレージ (MCS) の嗜好性、消化性および栄

養素代謝を測定した。ヒツジ 6 頭を供試し、対照区は実験 1 と同様とし、MCS 給与区は混播乾草，配合飼料，市販 MCS の給与割合を 5 : 3 : 2 とした。実験は実験 1 と同様に実施した。MCS 給与区の N 摂取量は対照区より低く ( $P < 0.01$ )，N 保持量および N 消化率も低かったが ( $P = 0.04$ ， $P < 0.01$ )，微生物態 N 供給量，第一胃内 VFA 濃度，血漿 GluTR，LeuTR は飼料間に差がなかった。以上の結果から，MC のサイレージ化によって保存性が改善されたが，使用した MCS は pH が高く，独特の酸味臭があったため，MCS の品質改善が課題となった。

(実験 3) 実験 3 の 1 では MCS の品質を改善するため，炭水化物源として糖蜜，ビートパルプ，N 源として尿素を MC に添加してサイレージを調製した。糖蜜，ビートパルプの添加割合は 3，6，9%とした。さらに，粗タンパク質含量が配合飼料と同等になるように尿素を添加し，14 日間および 28 日間貯蔵した。MCS の pH はビートパルプ区が糖蜜区より低かった ( $P < 0.05$ )。糖類の添加割合が増加するに伴って乳酸濃度は上昇したが ( $P < 0.05$ )，VBN/TN は両飼料区とも添加割合による差がなかった。V-スコアは飼料間に差がなく，フリーク評点ではビートパルプ区が高かった ( $P < 0.05$ )。以上の結果より，MCS の炭水化物源としてビートパルプ添加が適当であると判断された。

実験 3 の 2 では MCS へのビートパルプの最適な添加割合を検討するため，MCS にビートパルプをそれぞれ 0，10，20，30%添加し，サイレージの品質を評価した。尿素の添加割合および貯蔵期間は実験 3 の 1 と同様とした。BU-MCS の pH はビートパルプの添加によって低下し ( $P < 0.05$ )，乳酸濃度は上昇した ( $P < 0.05$ )。VBN/TN はビートパルプ区が低かった ( $P < 0.05$ )。V スコアはビートパルプ添加によって上昇した ( $P < 0.05$ )。

実験 3 の 3 では飼料への BU-MCS の最適な添加割合を検討するため，人工第一胃法を用いてガス生産量，第一胃発酵性状 (pH，VFA，アンモ

ニア濃度)を測定した。配合飼料の 0, 10, 20, 40%を MCS で代替して培養した。その結果, 配合飼料の 40%まで BU-MCS で代替しても乾物消失率, pH, ガス生産量, VFA およびアンモニア濃度は影響を受けなかった。

(実験 4) 実験 3 で開発した BU-MCS をヒツジに給与し, 嗜好性, 消化性および栄養素代謝を測定した。ヒツジ 6 頭を供試した。対照区は実験 1 と同様とし, 実験区は総乾物給与量の 20%に相当する配合飼料をエノキタケ廃菌床サイレージ (BU-MCS; 尿素, ビートパルプ 20%添加, 14 日間貯蔵) と代替した。実験は実験 2 と同様に実施した。サイレージ品質はフリーク評点が 89 点, V スコアは 93 点であった。ヒツジは実験期間中 BU-MCS 給与量全量を摂取し, BU-MCS の嗜好性は良好であった。N 摂取量, N 保持量, N 消化率, 第一胃発酵性状, 血漿 GluTR および LeuTR は飼料間に差がなかった。

本研究では, ビートパルプと尿素を添加したエノキタケ廃菌床サイレージを調製すると, 品質, 嗜好性に優れ, ヒツジの消化機能や栄養素代謝は対照飼料給与時と差がないことを明らかにした。以上のことから, エノキタケ廃菌床は反芻家畜の飼料の一部として有効利用できることが示された。

## 謝辞

本研究の遂行，その後の公表論文および学位論文の作成にあたり，終始ご指導頂きました岩手大学農学部，佐野宏明教授に厚く御礼申し上げます。また，ご指導，ご鞭撻を頂きました岩手大学農学部，喜多一美教授，山形大学農学部，堀口健一教授，弘前大学農学生命科学部，松崎正敏教授に深謝いたします。

また，本研究に用いたエノキタケ廃菌床を提供してくださった株式会社ベクセルの皆様に深謝いたします。

そして，本研究を実施する上でご協力頂きました本研究室の諸氏，特に梁 曦，関口奈都美，佐藤絢美，滝田万里子，Vinitchaikul Paramintra, Panthee Arvinda, Harjanti Dian Wahyu, Kamruzzaman Md., Rahman Md Mostafizar に深謝いたします。

## 参考文献

- Agle M, Hristov AN, Zaman S, Schneider C, Ndegwa P, Vaddella VK. The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 93: 1625-1637. 2010.
- Allen MS. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.*, 80:1447-1462. 1997.
- Alves EM, Magalhaes DR, Freitas MA, Santos EJ, Pereira MLA, Pedreira MS. Nitrogen metabolism and microbial synthesis in sheep fed diets containing slow release urea to replace the conventional urea. *Acta Scientiarum. Anim. Sci.*, 36: 55-62. 2014.
- Astuti T, Amir YS, Yelni G, Isyaturriyadhah. The result of biotechnology by local microorganisms to banana peel on rumen fluid characteristics as ruminant feed. *J. Adv. Agric. Technol.*, 1: 28-31. 2014.
- Bach A, Calsamiglia S, Sren MD. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 88 (Suppl 1): E9-21. 2005.
- Bergen WG, Henneman HA, Magee WT. Effect of dietary protein level and protein source on plasma and tissue free amino acid in growing sheep. *J. Nutr.*, 103: 575-585. 1973.
- Calder AG, Smith A. Stable isotope ratio analysis of leucine and ketoisocaproic acid in blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Use of tertiary butyldimethylsilyl derivatives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2: 14-16. 1988.
- Calsamiglia S, Cardozo PW, Ferret A, Bach A. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim.*

- Sci., 86: 702-711. 2008.
- Charmley E. Towards improved silage quality-A review. Can. J. Anim. Sci., 81: 157-168. 2001.
- Chen SC, Paengkoum P, Xia XL, Na-Lumpang PC. Effects of dietary protein on ruminal fermentation, nitrogen utilization and crude protein maintenance in growing Thai-indigenous beef cattle fed rice straw as roughage. J. Anim. Vet. Adv., 9: 2396-2400. 2010.
- Chen XB, Gomes MJ. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purinederivatives-an overview of the technical details. International Feed Resources Unit, Rowett Reseach Institute, UK. 1992.
- Chen XB, Hovell FDD, Ørskov ER, Brown DS. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. Br. J. Nutr., 63: 131-142. 1990.
- Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. Proc. Nutr. Soc., 59: 127-134. 2000.
- Dhaouadi A, Monser L, Sadok S, Adhoum N. Validation of a flow-injection-gas diffusion method for total volatile basic nitrogen determination in seafood products. Food Chem., 103: 1049-1053. 2007.
- Fazaeli H, Talebian Masoodi AR. Spent wheat straw compost of Agaricus Bisporus mushroom as ruminant feed. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 19: 845-851. 2006.
- Fecher PA, Goldmann I, Nagengast A. Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. J. Anal. Atomic Spectrom., 13:977-982. 1998.

Fellner V, Spears WJ. Effect of calcium propionate on ruminal soluble calcium and microbial fermentation. North Carolina State University Animal Science Departmental Report. MD; [cited 16 October]. Available from URL:  
[http://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/swinereports/2004-2005/contents.htm](http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/swinereports/2004-2005/contents.htm). 2004-2005.

Fujita T, Kajita M, Sano H. Responses of whole body protein synthesis, nitrogen retention and glucose kinetics to supplemental starch in goats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114B: 180-187. 2006.

Galmessa U, Abera H, Dessalegn J, Merera C. Utilization of brewer's waste as replacement for maize in the ration of calves. *Webpub J. Agric. Res.*, 1: 8-11. 2013.

Harjanti DW, Sugawara Y, Al-Mamun M, Sano H. Effects of replacing concentrate with soybean curd residue silage on ruminal characteristics, plasma leucine and glucose turnover rates in sheep. *J. Anim. Sci. Adv.*, 2: 361-374. 2012.

Huggett AG, Nixon DA. Enzymatic determination of blood glucose. *J. Biochem.*, 66: 12.1957.

泉 賢一，桜井綾子，村上今日，野 英二．水分含量の異なる乳酸菌添加サイレージを給与した育成牛の採食量，採食行動および反芻活動．*酪農学園大学*, 25: 285-292. 2001.

小嶋禎夫．食品残さの飼料利用による産卵鶏の生産性に関する研究．*東京農総研研報*, 5: 1-37. 2010.

小柳 洪，本間暁子，今井明夫，石崎和彦．キノコ廃菌床の飼料利用に関する研究．*日本畜産学会北陸支部会報*, 79: 19-21. 1999.

James LG, Wohlt JE. Effect of supplementing equivalent cation amounts from

NaCl, MgO, NaHCO<sub>3</sub> and CaCO<sub>3</sub> on nutrient utilization and acid-base status of growing Dorset lambs fed high concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, 60: 307-315. 1985.

柿本陽一. エノキタケの栽培技術. キノコ栽培の新技術. pp55-64. 誠文堂新光社. 東京. 1988.

Khan JR, Ludri RS. Changes in maternal blood glucose and plasma non-esterified fatty acid during pregnancy and around parturition in twin and single fetus bearing crossbred goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 15: 504-508. 2002.

Kholif AE, Khattab HM, El-Shewy AA, Salem AZM, Kholif AM, EL-Sayed MM, Gado HM, Mariezcurrena MD. Nutrient digestibility, Ruminant fermentation activities, Serum parameters and milk production and composition of lactating goats fed diets containing rice straw treated with *Pleurotus Ostreatus*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 27: 357-364. 2014.

Kirkland PM, Patterson DC. The effect of quality of grass and maize silage on the intake and performance of beef cattle. *Livestock Sci.*, 100: 179-188. 2006.

Kwak WS, Kim YI, Seok JS, Oh YK, Lee SM. Molasses and microbial inoculants improve fermentability and silage quality of cotton waste-based spent mushroom substrate. *Bioresour. Technol.*, 100: 1471-1473. 2009.

Liang X, Yamazaki K, Kamruzzaman M, Bi X, Panthee A, Sano H. Effects of Chinese herbal medicine on plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 1-8. 2013.

Magni F, Arnoldi L, Galati G, GalliKienle M. Simultaneous determination of plasma levels of  $\alpha$ -ketoisocaproic acid and leucine and evaluation of  $\alpha$ -[1-<sup>13</sup>C]ketoisocaproic acid and [1-<sup>13</sup>C]leucine enrichment by gas

chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 200: 308-314.

1994.

増子孝義. サイレージの品質と乾物摂取量との関係. *牧草と園芸*, 48 : 9-12. 2000.

Martinez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos S, Carro MD. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and ruminant fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J. Dairy Sci.*, 93: 3684-3698. 2010.

増野和彦, 小出博志, 大矢信次郎. きのご糞菌床等の畜産的利用に関する調査. *長野県林総セ研報*, 14:52-62. 2000.

松本光人, 小林 剛, 板橋久雄. 飼料蛋白質の給与水準と第一胃での分解率がヤギの尿中アラントイン排出量に及ぼす影響. *日畜会報*, 61 : 505-511. 1990.

三浦俊治. サイレージ発酵の過程と乳酸菌の役割. *牧草と園芸*, 49: 14-16. 2001.

森本 宏, 吉田 実, 大山嘉信. 飼料学. 第1版. pp229. 養賢堂. 東京. 1985.

Motil KJ, Davis TA, Montandon CM, Wong WW, Klein PD, Reeds PJ.

Whole-body protein turnover in the fed state is reduced in response to dietary protein restriction in lactating women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64: 32-39. 1996.

National Research Council. Nutrient requirements of sheep. 6<sup>th</sup> Ed. 1985.

Ndlovu T, Chimonyo M, Okon AI, Muchenje V, Dzama K, Raats JG.

Assessing the nutritional status of beef cattle: current practices and future prospects. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 2727-2734. 2007.

- 農林水産省統計部統計情報．平成 22 年度食品循環資源の再生利用等実態調査報告．農林水産省．東京．MD; [cited 16 October 2014]. Available from URL:  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyunkan\\_sigen/index.html](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyunkan_sigen/index.html). 2012
- 農林水産省大臣官房食料自給率．平成 25 年度食料自給率について．農林水産省．東京．MD; [cited 16 October 2014]. Available from URL:  
<http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/index.html>. 2014
- 農林水産省．飼料をめぐる情勢．農林水産省生産局飼料．東京．MD; [cited 1 February 2015]. Available from URL:  
[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryu/index.html](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/index.html). 2015
- 農林生産技術会議事務局．サイレージの成果と展望．農林生産技術会議事務局．東京．1974.
- 岡田卓士．食品製造副産物の特性・利用について．牧草と園芸，53: 6-8. 2005.
- Oh YK, Lee WM, Choi CW, Kim KH, Hong SK, Lee SC, Seol YJ, Kwak WS, Choi NJ. Effects of spent mushroom substrates supplementation on rumen fermentation and blood metabolism in Hanwoo steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23: 1608-1613. 2010.
- 大矢信次郎，一ノ瀬幸久，馬渡栄達．木炭及びその炭化過程で得られる各種成分の高度利用に関する研究．長野県林総セ研報，13:105-117. 1998.
- Ortigue-Mary I, Verent J, Majdoub L. Whole body glucose turnover in growing and non-productive adult ruminants: meta-analysis and review. *Reprod. Nutr. Dev.*, 43: 371-383. 2003.
- 細谷 肇，斉藤健一，反町 裕，米本貞男．乳酸菌と尿素添加が梱包密度の低い飼料イネサイレージの長期貯蔵性に及ぼす影響．千葉畜セ

研報, 8 : 71-76. 2008.

Radlinger G, Heumann KG. Iodine determination in food samples using inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 70: 2221-2224. 1998.

林野庁. 特用林産物の生産動向きのこ類 (えのきたけ). 林野庁分野別情報. 東京. MD; [cited 16 October 2014]. Available from URL: <http://www.rinya.maff.go.jp/j/tokuyou/tokusan/1.html>. 2013.

Rocchiccioli F, Leroux JP, Cartier P. Quantitation of 2-ketoacids in biological fluids by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry *o*-trimethylsilyl-quinoxalinol derivatives. *Biomed. Mass Spectrom.*, 8: 160-164. 1981.

Sano H, Kajita M, Fujita T. Effect of dietary protein intake on plasma leucine flux, protein synthesis, and degradation in sheep. *Comp. Biochem. Physiol.*, 139B: 163-168. 2004.

Sano H, Sawada H, Takanami A, Oda S, Al-Mamun M. Effects of dietary energy intake and cold exposure on kinetics of plasma glucose metabolism in sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 91: 1-5. 2007.

Sano H, Sawada H, Takenami A, Al-Mamun M. Effects of diet and cold exposure on rates of plasma leucine turnover and protein synthesis in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, 147: 91-97. 2009.

SAS, SAS/STAT Software: Change and enhancements through Release 6.11.423 SAS Inst Inc, Cary. 1996.

Stern MD, Bach A, Calsamiglia S. New concepts in protein nutrition of ruminants. *Proc.:21st Annual Southwest Nutrition & Management Conference. Temp AZ*, 45-66. 2006.

田中勝三郎. てん菜製糖副産物 (ビートパルプ) の高度利用. 日本畜産

- 学会北海道支部会報, 32 : 13-22. 1990.
- 龍前直紀, 北村 亨, 谷津英樹, 萱岐修一, 篠田英史, 三輪哲哉, 高山光男. 草地管理技術の改善によるグラスサイレージ品質の向上に関する調査研究と普及推進. 北草研報, 44:6 – 11. 2010.
- Taylor KACC. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56: 49-58. 1996.
- Tjardes KE, Buskirk DD, Allen MS, Ames NK, Bourquin LD, Rust SR. Neutral detergent fiber concentration of corn silage and rumen inert bulk influences dry matter intake and ruminal digesta kinetics of growing steers. *J. Anim. Sci.*, 80: 833-840. 2002.
- Tserng KY, Kalhan SC. Estimation of glucose carbon recycling and glucose turnover with [U-<sup>13</sup>C]glucose. *Am. J. Physiol.*, 245: E476-E482. 1983.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597. 1991.
- Wang M, Zhao XG, Tan ZL, Tang SX, Zhou CS, Sun ZH, Han XF, Wang CW. Effects of increasing level of dietary rice straw on chewing activity, ruminal fermentation and fibrolytic enzyme activity in growing goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23: 1022-1027. 2010.
- Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39:971-974. 1967.
- Weinberg ZG. Effect of lactic acid bacteria on animal performance. *Indian J. Biotechnol.*, 2: 378-381. 2003.
- Wolfe RR. Tracers in metabolic research: radioisotope and stable isotope/mass spectrometry methods. Alan R. Liss, Inc, New York. 1984.