

ヒツジにおける微生物態窒素供給量，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サイレージ給与の影響

畢 雪¹・佐藤絢美²・梁 曦¹・関口奈都美^{2a}・Dian Wahyu Harjanti^{1b}・Md. Mostafizar Rahman¹・
登丸 瑛³・佐野宏明^{2,*}

¹ 岩手大学大学院連合農学研究科，盛岡市〒 020-8550

² 岩手大学農学部，盛岡市〒 020-8550

³ 株式会社ベクセル，前橋市〒 371-0233

現所属：^a 栃木県畜産酪農研究センター，那須塩原市〒 329-2747

^b Diponegoro University, Kampus UNDIP Tembalang, Semarang, Central Java, Indonesia.

2015年4月15日受付，2015年5月15日受理

要 約

本研究はエノキタケ廃菌床サイレージ (MCS) を含む飼料を給与した反芻家畜における微生物態窒素 (N) 供給量，血漿グルコースおよびロイシン代謝を解明するために実施した。あわせて N 出納および第一胃発酵性状も評価した。ヒツジ 6 頭を供試し，対照区の飼料は混播乾草と配合飼料の乾物重量比を 5:5 とし，維持代謝エネルギーの 120% とした。MCS 給与区は混播乾草，配合飼料，MCS の乾物重量比を 5:3:2 とした。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。20 日目に採食に伴う第一胃内 pH，揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度の変化を測定した。21 日目には [U-¹³C] グルコースと [1-¹³C] 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 (GluTR, LeuTR)。MCS 給与区の N 保持量および N 消化率は対照区よりも低かったが ($P = 0.04$, $P < 0.01$)，微生物態 N 供給量は飼料間に差がなかった。第一胃内の主要な VFA (酢酸，プロピオン酸) 濃度ならびに血漿 GluTR, LeuTR は MCS 給与の影響を受けなかった。これらの結果から，エノキタケ廃菌床サイレージ給与は，N 保持量や N 消化率を低下させるものの，微生物態 N 供給，糖・タンパク質代謝を安定的に保持することができ，反芻家畜の飼料としての利用価値があることが示唆された。

キーワード：エノキタケ廃菌床サイレージ，グルコース代謝，ヒツジ，微生物態窒素供給量，ロイシン代謝

東北畜産学会報 65(1): 22 ~ 30 2015

諸 言

日本の飼料自給率は 26% と極めて低く (農林水産省，2015)，未活用資源を有効利用する自給飼料の開発，いわゆるエコフィードが推進されている。そのなかで食品廃棄物の飼料化に関する研究が多くなされている (岡田，2005；小嶋，2010；Harjanti ら，2012；Galmessa ら，2013)。

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 (林野庁，2013)。しかし，これにともなって廃菌床の処分にかかるコストが増大するなど，産業上の課題を抱えている。その解決法として廃菌床の飼料化や堆肥化などが進められている (大矢ら，1998；増野ら，2000；畢ら，2015)。畢ら (2015) は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すると，窒素 (N) 消化率は対照区よりも低かったものの (対照区 61%，実験区 47%)，N 保持量，第一胃内揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度，血漿グルコースおよびロイシン代謝に影響を与えず，給与飼料の

* 連絡者：佐野宏明 (さの ひろあき)
(岩手大学農学部)
〒 020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目 18-8
Tel: 019-621-6165 Fax: 019-621-6165
E-mail: sano@iwate-u.ac.jp

一部をエノキタケ廃菌床で代替できることを報告した。しかし、キノコ廃菌床は水分含量が高く、好気性発酵による発熱変敗が進行しやすいので、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、栄養成分を長期保存することができる (Weinberg, 2003; Harjanti ら, 2012)。そのため、エノキタケ廃菌床をサイレージ化することによって保存性、嗜好性などが向上し、エノキタケ廃菌床サイレージ (MCS) を給与したヒツジの消化性や体内の栄養素代謝動態が改善されることが期待される。

反芻家畜は第一胃発酵という独特のしくみを持っているため、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。そのため、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も利用される。また、飼料中タンパク質は第一胃内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。小腸に達する微生物態タンパク質は可消化タンパク質の約 50~80% を占め (Stern ら, 2006)、反芻家畜のタンパク質源として重要である。したがって、反芻家畜の消化管内における飼料の N 代謝や体内におけるグルコースやアミノ酸の代謝回転速度はエノキタケ廃菌床の飼料としての価値を見出すパラメータとなり得る。

そこで、本研究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、飼料の消化性および血漿グルコースおよびロイシン代謝動態を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物および飼料

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 ± 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 (a 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。これらの粗タンパク質お

よび中性デタージェント繊維含量を Table 1 に示した。Table 2 にエノキタケ栽培時における菌床材料の組成を示した。試験には対照区と MCS 給与区の 2 処理区を設定した。対照区は混播乾草と配合飼料の乾物重量比を 5:5 とし、維持代謝エネルギー量の 120% とした。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。いずれの処理区においても飼料は混合して給与した。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。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°C, 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 週間ごとに体重を測定した。

2. サンプルの採取

各期の実験 16 日目から 5 日間連続して N 出納試験を行い、24 時間ごとに糞尿を全量採取した。採取した糞は通風乾燥器 (AT-S13, いすづ製, 新潟) を用いて乾燥 (60°C, 48 時間) した後、室内で 5 日間風乾し、重量を測定した。次いで、粉碎器 (Cyclotec 1093, Foss, Sweden) を用いて糞の一部を粉碎し、サンプル瓶に入れて分析まで室温で保存した。尿は 6N 硫酸 50mL を入れた尿入れを代謝ケージの底にセットして採取した。尿量を測定して十分に攪拌した後、約 50mL をサンプル瓶に採取した。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、残りの尿サンプルとともに分析まで -30°C で冷凍保存した。

実験 20 日目の採食開始前、採食開始 3 および 6 時間後に第一胃汁採取器 (ルミナー胃汁採取器, NFM90, 富士平工業, 東京) を用いて第一胃内容液約 50mL を採

Table 1. Crude protein and Neutral detergent fiber (NDF) of the diets

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

^a DM: dry matter

Table 2. Composition of mushroom compost

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

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 (4°C, 8,000 回転/分, 10 分間), 上清を得た。第一胃内アンモニア濃度を測定するため, 上清の一部を 0.1N 塩酸で 2 倍希釈し, 残りの第一胃内容液とともに分析まで -30°C で冷凍保存した。

3. 同位元素希釈法実験

実験 21 日目の 9:30 までにヒツジの両側頸静脈に注入用と採血用カテーテルを挿入した。血液凝固防止のため, 滅菌 3.8% クエン酸ナトリウム溶液でカテーテル内を満たした。12:00 に滅菌生理食塩水に溶解した [U-¹³C] グルコース 2.9 μmol/kg^{0.75} および [1-¹³C] ロイシン 7.2 μmol/kg^{0.75} をプライミングインジェクションとして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 [U-¹³C] グルコースと [1-¹³C] ロイシンをそれぞれ 2.9, 7.2 μmol/kg^{0.75}/h で 4 時間にわたり連続定速注入した。血液はヘパリン処理した注射筒を用い, アイソトープ注入前に 12mL, 注入開始 2 時間後から 4 時間後まで 30 分ごとに 6mL 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, サンプルング終了後に遠心分離 (4°C, 8,000 回転/分, 10 分間) して血漿を分離した。血漿を保存用チューブに移して分析まで -30°C で冷凍保存した。カテーテルは実験終了後に速やかに取り外した。

4. 分析方法

飼料, 糞および尿中 N はケルダール法による自動分解装置 (Tecator Digestor System, Foss Teactor, Sweden) と自動蒸留滴定装置 (Kjeltec 2300, Foss Teactor, Sweden) を用いて測定した。飼料中中性デタージェト繊維 (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。本実験で測定した尿中プリン代謝物はアラントイン, 尿酸, キサンチン, ヒポキサンチンであり, その大部分は第一胃内微生物核酸由来である。これらのプリン代謝物の尿中排泄量を Chen と Gomes (1992) の方法にしたがって測定することにより, 下部消化管への微生物態 N 供給量を推定した。

MCS 抽出液および第一胃内容液の pH は pH メーター (F-51, 堀場製作所, 京都) を用いて測定した。MCS の乳酸濃度は Taylor (1996) の方法, 揮発性塩基態窒素 (VBN) 濃度は Dhaouadi ら (2007) の方法にしたがって測定した。第一胃内アンモニア濃度はインドフェノール法を用いて測定した (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。血漿遊離アミノ酸および尿素濃度は全自動アミノ酸分析器 (JLC-500/V, 日本電子, 東京) を用いて測定した。血漿乳酸濃度は酵素法 (データミナー LA, 協和メデックス, 東京) による自動分析装置 (TBA-40FR, 東芝メディカルシステムズ, 東京) を用いて測定した。血漿 NEFA 濃度は酵素法を用いて測定した (NEFA C-テスト, 和光純薬, 大阪)。血漿 [U-¹³C] 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前処理を行い, ガスクロマトグラフィー質量分析計 (QP-2010, 島津製作所, 京都) を用いて測定した。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 α -ケトイソカプロン酸 (α -KIC) 濃度および α -[1-¹³C]KIC エンリッチメントは Rocchiccioli ら (1981) および Calder と Smith (1988) の方法にしたがって前処理を行い, ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて測定した。

5. 計算方法

微生物態 N 供給量は尿中に排泄されたプリン代謝物から Chen ら (1990) および Chen と Gomes (1992) の算定式から推定した。

血漿グルコースおよびロイシン代謝回転速度 (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 [U-¹³C] グルコースあるいは [1-¹³C] ロイシン注入速度 [mmol/kg^{0.75}/h], E は血漿 [U-¹³C] グルコースエンリッチメント [atom%excess] あるいは α -[1-¹³C]KIC エンリッチメント (atom%excess) である。

6. 統計処理

統計処理は SAS の MIXED procedure により実施した (SAS, 1996)。処理区および実験順を要因とする二元配置分散分析を行い, $P < 0.05$ のときに有意差ありとみなした。また, 経時的変化のあるデータは処理区および時間を要因とする反復測定の二元配置分散分析を行った。有意差があったものはさらに Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ のときに有意差ありとみなした。

結 果

MCS の発酵品質, フリークおよび V スコア法による評価を Table 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スコア法による評点は71点であった。実験に供試したヒツジ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が, 残りの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の結果を削除した。

ヒツジの日増体量, N出納およびN消化率の結果をTable 4に示した。体重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

Table 3. Fermentation characteristics of mushroom compost silage (MCS)

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

^a FM: fresh matter

^b VBN: volatile basic nitrogen

^c nd: not detected

Table 4. Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on body weight change, nitrogen (N) balance in sheep^a.

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

^a Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

^b Treatment: Control diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

Table 5. Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on urinary purine derivative, excretion and microbial nitrogen (N) supply in sheep^a

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

^a Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

^b Treatment: Control diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

^c PD: purine derivative

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。

採食に伴う第一胃発酵性状の経時変化をFig. 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

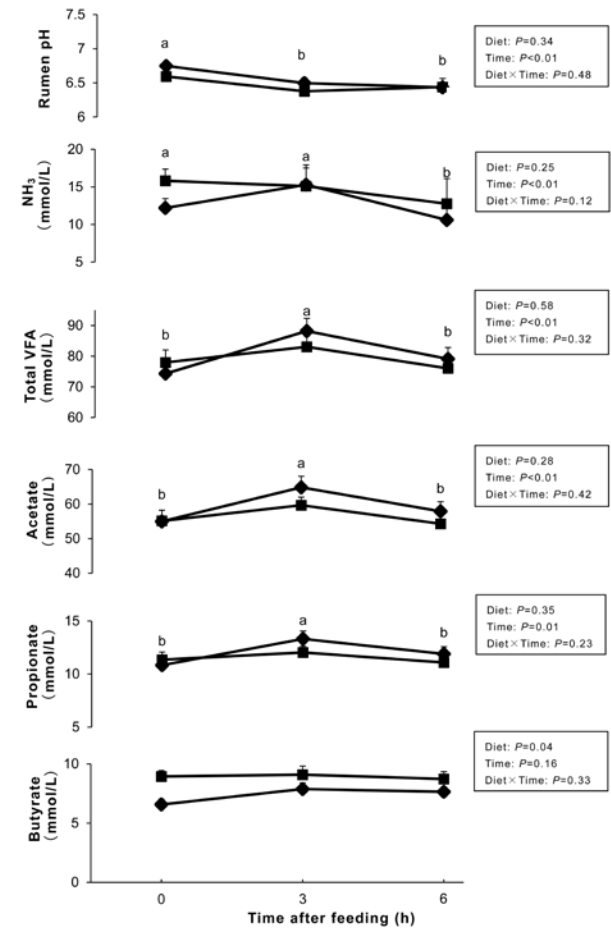


Fig. 1: Time course changes of ruminal characteristics in sheep fed the Control diet (■) and the MCS diet (◆). Control diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and mushroom compost silage (at ratio of 5:3:2). Values are expressed as mean±SEM for n=6. Different letters (a, b) indicate significant difference ($P < 0.05$) among times before and after feeding.

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。

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Table 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 ($P = 0.02$)。

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Table 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 ($P = 0.02$)。血漿グルコース、 α -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Table 7に示した。血漿グルコース、 α -KIC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 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^a.

Items	Treatment ^b		SEM	P-value
	Control diet	MCS diet		
Sheep	5	6		
Amino acids ($\mu\text{mol/L}$)				
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 ($\mu\text{mol/L}$)	93.8	106.7	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

^a Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

^b Treatment: Control diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2).

考 察

本実験で用いた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報告の結果(47%; 畢ら, 2015)と比較して高い値を示した。

本実験では第一胃内総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が高くなると、第一胃総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)。本実験で使用した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

Table 7. Effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on plasma glucose and leucine kinetics in sheep^a.

Items	Treatment ^b		SEM	P-value
	Control diet	MCS diet		
Sheep	6	5		
Glucose Concentration (mmol/L)	3.53	3.44	0.03	0.28
GluTR (mmol/kg ^{0.75} /h)	1.36	1.35	0.14	0.93
α -KIC ^c Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	17.8	18.7	0.64	0.49
LeuTR ($\mu\text{mol/kg}^{0.75}$ /h)	423	353	22	0.14

^a Values represent the means and standard error of the mean (SEM).

^b Treatment: Control diet, mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5) and MCS diet, mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2)

^c α -KIC= α -Ketoisocaproate

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。本研究では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。第一胃内容液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低かったものの、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）。サイレージ発酵産物である乳酸が第一胃内で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）、本研究の結果は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陥っていなかったと考えられる。

畢らは（2015）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報告し、MCSを用いた本実験におい

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、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。

本実験ではエノキタケ廃菌床をサイレージ化することによって、比較的良質な状態で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、本実験で使用したエノキタケ廃菌床サイレージは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。

引用文献

- 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. Agr. 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.
- 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.
- Charmley E. Towards improved silage quality-A review. *Can. J. Anim. Sci.*, 81: 157-168. 2001.
- 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.
- Chen XB, Gomes MJ. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives-an overview of the technical details. International Feed Resources Unit, Rowett Research Institute, Buchsburn Aberdeen AB2 9SB, UK. 1992.
- 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.
- 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.
- 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. Agr. 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.
- 畢雪, 関口奈都美, 梁曦, Md.Kamruzzaman, 佐々木茂子, 登丸瑛, 佐野宏明. 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. *東畜会報*, 64: 32-40. 2015.
- Huggett AG, Nixon DA. Enzymatic determination of blood glucose. *J. Biochem.*, 66: 12. 1957.
- 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 洩, 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.
- 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.
- 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 rusitec 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. きのか廃菌床等の畜産の利用に関する調査. *長野県林総七研報*, 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ルーメン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.
- 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_siryo/index.html. 2015
- 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.
- 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.
- 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. *長野県林総七研報*, 13: 105-117. 1998.
- 林野庁. 特用林産物の生産動向きのご類(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.
- 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.
- Taylor KACC. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56: 49-58. 1996.
- Tserng KY, Kalhan SC. Estimation of glucose carbon recycling and glucose turnover with [U-¹³C]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.
- 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.

Effects of feeding mushroom compost silage on microbial nitrogen supply, plasma of glucose and leucine metabolism in sheep

Xue BI¹, Ayami SATO², Xi LIANG¹, Natsumi SEKIGUCHI^{2a}, Dian Wahyu HARJANTI^{1b},
Md. Mostafizar RAHMAN¹, Akira TOMARU³, Hiroaki SANO²

¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

²Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

³Vaxer Company, Maebashi 371-0233, Japan

Present address: ^aTochigi Prefectural Livestock and Dairy Experiment Center, Nasushiobara 329-2747, Japan

^bDiponegoro University, Kampus UNDIP Tembalang, Semarang, Central Java, Indonesia.

Corresponding : Hiroaki SANO (tel and fax: +81(0) 19-621-6165, e-mail: sano@iwate-u.ac.jp)

Abstract: An experiment was carried out to investigate the effects of feeding mushroom compost silage (MCS) on microbial nitrogen (N) supply, plasma glucose and leucine metabolism in sheep. N balance and rumen fermentation characteristics were also determined. Six sheep were assigned to two dietary treatments. The control diet consisted of mixed hay and concentrate (at ratio of 5:5 on dry matter basis; Control diet). Feed allowance was formulated on the basis at 1.2 times of the maintenance metabolizable energy. The experimental diet was mixed hay, concentrate and MCS (at ratio of 5:3:2 on dry matter basis; MCS diet). N balance test was conducted from day 16 for 5 days, and N digestibility and microbial N supply were analyzed. On day 20, postprandial changes in rumen pH, volatile fatty acids (VFA) and ammonia concentration were determined. The isotope dilution method using [U-¹³C]glucose and [1-¹³C]leucine was performed on day 21 of each dietary treatment for measuring turnover rates of plasma glucose and leucine (GluTR and LeuTR, respectively). N retention and N digestibility were lower in MCS diet than in Control diet ($P = 0.04$, $P < 0.01$, respectively), but microbial N supply was comparable between diets. The concentrations of total VFA, acetate and propionate; plasma GluTR and LeuTR did not differ between the diets. These results showed that although N retention and N digestibility were reduced, the microbial N supply, carbohydrate and protein metabolism were maintained by feeding MCS. So, it can be concluded that MCS might have potential as ruminant feed.

Keyword: glucose metabolism, leucine metabolism, mushroom compost silage, microbial nitrogen supply, sheep