# *In Vitro* 消化率による粗飼料の栄養価推定法に関する試験

## 第1報 *In Vitro* によるセルローズ消化率の測定法とこれによるチモシーと赤クローバーの刈り取り時期別消化率について

鳶野　保† 谷口隆一† 坪松戒三†

# STUDIES ON METHODS FOR ESTIMATION OF NUTRITIVE VALUE OF FORAGE BY *IN VITRO* DIGESTION TECHNIQUE

## I. *In Vitro* Digestion Technique and the Cellulose Digestibility of Timothy and Red Clover cut at Different Growth Stages

Tamotsu TOBINO, Ryuichi TANIGUCHI & Kaizo TSUBOMATSU

## I 緒　　言

根釧地方における酪農経営を有利に進めるための条件には種々あるが，安価にして良質な粗飼料を豊富に生産し確保することもその1つであろう。しかし，粗飼料はよく知られているように，その組成と栄養価値が刈り取り時期や栽培，調製条件によって著しく変動するものであり，また，多くの場合2，3の草種や雑草が混入しているために，その栄養価を査定する段階になると，どの消化率を用いたらよいか，その選定に困惑する場面にしばしば当面するのである。そこで既定の消化率より適当な数値を選定して算出することになるが，これによると品質が異なっていても一般に大差のない価となることが多い。しかし実際には粗飼料の栄養価は大幅に変化するものであり，一例をあげるならば REID[23)24)] による刈り取り時期の影響についての試験成績をみると表示のとおりである。

同一畑から異なる時期に刈り取った一番刈り乾草の飼養効果

| 刈取期日 | 産乳量 b) 日量 kg | 体重変化 日量 kg | TDN % | 摂取量 a) 日量 kg |
|---|---|---|---|---|
| 6月11日 | 19.4 | +0.18 | 66 | 12.7 |
| 7月9日 | 13.8 | −0.05 | 51 | 9.9 |

a) 乾物含量90%に補正
b) FCMに換算

以上の理由により，従来から栄養価を査定する方法については多数の研究がなされているが，現今行なわれている方法を分類し，特色のある代表的なものをあげると，① 一般分析値またはある種の指標物質から推定するもの[1)16)20)26)28)]，② *In Vitro* 法によるもの[5)13)16)21)25)]，③ 収穫した時期で推定するもの[23)24)]などがある。*In Vitro* 法による方が，ほかの方法よりすぐれていることについては，HERSHBERGER[16)]は *In Vitro* セルローズ消化率は，*In Vivo* 可消化エネルギーと有意な相関関係($\gamma=+0.92$)を示し，これは現在比較的広く用いられている，粗繊維と可消化粗蛋白から推定する AXELSSON-REID-SWIFT による推定値との関係($\gamma=+0.78$)よりもすぐれていることを報告した。また，POULTON らは，チモシーを生育時期別に11回刈り取り，① *In Vitro* セルローズ消化率，② 酸不溶性リグニン，③ 粗繊維と可消化粗蛋白などから DDM を推定して，これと *In Vitro* DDM との関係をみた結果，それぞれ $\gamma=0.96$，$\gamma=0.94$，$\gamma=0.88$ で *In Vitro* セルローズ消化率による場合が最良であることを報告した。また，CLUMPTON[9)10)]，DONFER[13)] らは *In Vitro* 消

† 十根室支場

化率による特色のある意義深い研究を報告している。すなわち，氏らは粗飼料の栄養価判定上家畜による摂取量の意義を強調し，相対的摂取量(Relative Intake)と，その飼料の可消化エネルギーをもって NVI (Nutritive Value Index) なるものを算出し，栄養価の基準とすべきことを提案した。そして *In Vitro* 12時間セルローズ消化率と粗飼料の NVI が高い相関関係を示すことから，*In Vitro* 法により NVI を推定しうることを報告している。

以上のように，*In Vitro* 消化率により栄養価を推定する方法は，ほかの方法よりすぐれているようであるが，まだこの種の研究が十分であるとはいわれない。根室支場においては，早くから根釧地方における粗飼料の成分や，栄養価について調査中であるが，もしも，本法による栄養価推定法が，実用的に使用できうれば乳牛飼養上参考になるところが大きいと考えて，本試験に着手した次第である。

本報告では，*In Vitro* によるセルローズ消化率の測定法と消化率におよぼす2，3の要因について試験した結果と，この方法を用いてチモシーと赤クロバーの刈り取り時期に伴うセルローズ消化率を測定した結果についてのべる。

本試験の遂行にあたり，前根室支場長平賀即稔技師の終始懇篤なご指導を頂き，根室支場長桜井允技師には本試験の方向に関するご指示とご校閲を頂き，北海道農試畜産部高野信雄技官には文献のご便宜を頂いたことを記して心から感謝の意を表します。

## II 試験方法

### 試験 A. 粗飼料中セルローズの *In Vitro* 消化率におよぼす 2，3 の要因について：

*In Vitro* セルローズ消化率におよぼす pH，試料供試量，胃液稀釈度，醱酵時間などの影響を調査し，その方法を標準化し，再現性のある結果が得られることを目的として実施した。*In Vitro* 法は試験結果で記載する。pH の測定は醱酵試験管の栓をとり，東洋濾紙 pH 試験紙 (BTB) により速かに測定した。供試した第一胃濾液（以後胃液と記す）は，フィスチュラを装着した綿羊から採取したものもあるが，主として屠場の屠殺直後の綿羊から採取したもので，その屠殺前の給与飼料や絶食時間，健康状態，年齢など一切不明である。従って本試験では終始同一の胃液を供試することができなかった。第一胃内容物を採取後醱酵開始までは，その時間や条件は可能な限り一定にするように注意した。これまでに要した時間は，屠場の場合は約30分，フィスチュラ綿羊より採取した場合は約15分であった。第一胃内容物を1 $\ell$ の広口試料瓶に取り，密栓して布で包み，温度の変化を防ぎつつ速かに実験室に持ち込みポプリン布で圧搾し，その濾液を用いた。醱酵開始後 pH の調整は $M \cdot Na_2CO_3$ の添加により行なった。セルローズの定量は CRAMPTON & MAYNARD 法の BARNETT による変法[3]に従った。

### 試験 B. チモシーと赤クロバーの刈り取り時期に伴う繊維質含量と *In Vitro* セルローズ消化率の変化について：

試験Aの方法を適用して，チモシーと赤クロバーの刈り取り時期別 *In Vitro* セルローズ消化率を調査し，また，繊維質含量を調査してこれらの関係について考察することを目的とした。供試試料は試験結果で示す。分析方法は，① 全繊維素は標白粉溶液法[19]。② セルローズは CRAMPTON & MAYNARD 法の BARNETT による変法[3]。③ $\alpha$-セルローズ，ペントーザン，メトキシルは農芸化学分析書[19]。④ $\beta$-$\gamma$ セルローズは ELLY ら[15]に従って全繊維素から $\alpha$-セルローズ，ペントーザンを引いて算出した。⑤リグニンは THACKER 法[29]に従った。

## III 試験結果および考察

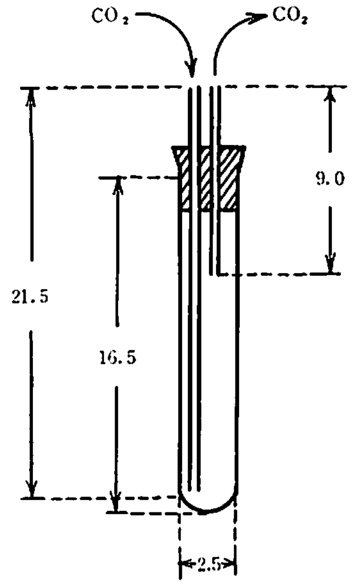
### 試験 A. 粗飼料中セルローズの *In Vitro* 消化率におよぼす 2，3 の要因について：

#### 1. 方　　法

本試験で採用した方法は，試験管を用い，胃液を Mineral Solution で稀釈し，$CO_2$ を通す方法で BARNETT[3] に準じている。醱酵試験管は第1図に示すとおりで，ゴム栓を付し，ガラス管2本を通してこれをゴム管により12本接続できる装置

とし，900ℓの小型ボンベにより $CO_2$ を送入できるようにした。試料と Mineral Sol. を添加後，約12時間39℃の恒温水槽に定置してのち，胃液を速かに添加し $CO_2$ を送入して嫌気性とし醗酵を開始した。

第1図　醗酵試験管（単位：cm）




$CO_2$ は1分間約140気泡程度に調節して送入したが，この場合は圧力が次第に高まり急激に排気される状態となるので攪拌作用も行なわれる。pH の測定とその調整は速かに行ない嫌気性を保つようにした。醗酵終了後は遠心分離し，上透液を吸引除去してのち85℃の通風乾燥器で乾燥後，セルローズの定量を行なった。なお Blank を設けて全く同じように処理してのち，セルローズの定量を行ない，その数値を引いて消化されたセルローズの量を算出した。処理の比較を行なう場合には，醗酵試験管が12本あるので2～3反復で行なった。

供試試料はチモシーで，その組成は第1表に示す。根室支場畑地より採取し，85℃の通風乾燥器で乾燥後，粉砕して40 mesh の分析用篩を通して供試した。Mineral Sol. は BURROUGH[6)] (1950) に従い，第2表に示すとおりである。

第1表　供試試料

| 区分 | 水分 | 粗蛋白質 | 粗脂肪 | 粗繊維 | NFE | 粗灰分 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| チモシー | 5.91 | 12.26 | 6.53 | 27.09 | 43.60 | 4.61 | 出穂前6月23日刈取 |

第2表　Mineral Solution

| | g | | g |
|---|---|---|---|
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | 52.50 | $NaHCO_3$ | 52.50 |
| KCl | 7.50 | NaCl | 7.50 |
| $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.75 | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2.25 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.15 | $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 0.08 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.08 | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.04 |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.02 | $(NH_4)_2SO_4$ | 37.50 |

備考：これを2ℓの純水に溶かし Stock Solution として使用するときには5.5倍に稀釈する。

## 2. 結　果

### イ　消化率におよぼす pH の影響

醗酵開始後は，次第に揮発性脂肪酸（VFA）が増量して pH が低下してくる。この VFA の増量と pH の低下は試料の種類や供試量，胃液，Mineral Sol. の種類や量で種々異なる。この装置を用いた場合の pH の変動と，その調整方法を種々変えた場合の消化率におよぼす影響を知るべく第3表および第4表に示すような実験を行なった。第3表の実験では，供試量 0.5 g，Mineral Sol. 20 c.c.，胃液 5 c.c. とした。pH の調整をしない場合（処理A）は，24時間後には5.4まで低下し，消化率は36.1％であった。処理Bの pH は平均6.4となり消化率は71.5％で，処理Cの pH は平均6.8となり消化率は78.5％で最高値を示した。M・$Na_2CO_3$ を最も多く添加した処理Eは，消化率が最低となった。この装置を用いて供試量0.5g とした場合，M・$Na_2CO_3$ 1～2 c.c. の添加が必要と考えられる。

pH の変化は試料供試量によって異なるので，供試量0.25g と0.50g について比較したのが第4表である。供試量0.25g で pH の調整をしない場合（処理A）は，pH 6.6以下に低下せず消化率も60.7％であるが，供試量0.50g で pH の調整をしない場合（処理C）は，pH 6.2に低下し消化率は39.6％に止まった。供試量0.25g で M・$Na_2CO_3$ 1.0 c.c. 添加の場合（処理B）と，供試量0.50g で

M・$Na_2CO_3$ 2.0c.c. 添加の場合（処理E）は，それぞれ66.3%，66.0%で最も高い消化率を示した。なお，この場合同一試料を供試したにもかかわらず，第3表における結果と消化率やpHの低下に差が大きい。これは前述したように屠場より採取したため採取前の条件が異なっているためと考えられる。しかし，第4表の結果から，供試量が少ないとpHの低下が少なくM・$Na_2CO_3$による調整も容易であり，また，適切な調整を行なえば，0.25gでも0.50gでも消化率には差がないことがわかる。

**ロ　消化率におよぼす供試量の影響**

供試量を0.25g，0.50g，0.75gとして消化率の比較をした結果が第5表である。第4表の結果と同様に0.25gと0.50gとの間には有意差がなかった。しかし，0.25g，0.50gと0.75gとの間には5%水準で有意差が認められる。以上の結果から本実験に用いた装置では，供試量は0.25g～0.50gの範囲で0.75gは無理である。

**ハ　消化率におよぼす胃液稀釈度の影響**

第6表は，胃液とMineral Sol. の添加割合を種々変えた場合の消化率を比較した結果である。胃液5c.c.とMineral Sol. 20c.c.（処理B）が最高の消化率を示した。また，胃液の添加割合が多い

第3表　消化率に及ぼすpHの影響（その1）

| 区分 | 醗酵開始後 3hr. $Na_2CO_3$ | 3hr. pH | 6hr. $Na_2CO_3$ | 6hr. pH | 12hr. $Na_2CO_3$ | 12hr. pH | 24hr. $Na_2CO_3$ | 24hr. pH | 36hr. $Na_2CO_3$ | 36hr. pH | 48hr. $Na_2CO_3$ | 48hr. pH | 72hr. $Na_2CO_3$ | 72hr. pH | $Na_2CO_3$ 合計 | セルローズ消化率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | — | 6.6 | — | 6.3 | — | 5.8 | — | 5.4 | — | 5.4 | — | 5.4 | — | 5.4 | — | 36.1 |
| B | — | 6.6 | — | 6.3 | 0.50 | 6.4 | 0.25 | 6.4 | — | 6.4 | — | 6.4 | — | 6.4 | 0.75 | 71.5 |
| C | 0.25 | 6.8 | 0.25 | 6.8 | 0.25 | 6.8 | 0.25 | 6.8 | 0.25 | 6.8 | — | 6.8 | — | 6.6 | 1.25 | 78.5 |
| D | 0.50 | 7.2 | 0.50 | 7.4 | 0.50 | 7.4 | 0.50 | 7.4 | 0.50 | 7.4 | — | 7.4 | — | 7.4 | 2.50 | 64.6 |
| E | 0.75 | 7.4 | 0.75 | 8.1 | 0.75 | 8.1 | 0.75 | 8.1 | 0.75 | 8.1 | — | 7.8 | — | 7.8 | 3.75 | 16.0 |

L.S.D.　(0.05)＝10.8
　　　　(0.01)＝17.9

備考：1）M・$Na_2CO_3$を添加した場合は添加後のpHを示す。
　　　2）供試胃液は屠場より採取。
　　　3）供試量0.5g Mineral Sol. 20c.c. 胃液5c.c.

第4表　消化率に及ぼすpHの影響（その2）

| 区分 | 試料供試量 | 醗酵開始後 6hr. $Na_2CO_3$ | 6hr. pH | 12hr. $Na_2CO_3$ | 12hr. pH | 24hr. $Na_2CO_3$ | 24hr. pH | 36hr. $Na_2CO_3$ | 36hr. pH | 48hr. $Na_2CO_3$ | 48hr. pH | $Na_2CO_3$ 合計 | セルローズ消化率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0.25 | — | 6.8 | — | 6.6 | — | 6.6 | — | 6.6 | — | 6.6 | — | 60.7 |
| B | 0.25 | 0.25 | 7.0 | 0.25 | 7.0 | 0.25 | 7.0 | 0.25 | 7.0 | — | 6.8 | 1.0 | 66.3 |
| C | 0.50 | — | 6.7 | — | 6.4 | — | 6.3 | — | 6.2 | — | 6.2 | — | 39.6 |
| D | 0.50 | 0.25 | 6.8 | 0.25 | 7.0 | 0.25 | 7.0 | 0.25 | 7.0 | — | 6.6 | 1.0 | 64.7 |
| E | 0.50 | 0.50 | 7.0 | 0.50 | 7.4 | 0.50 | 7.4 | 0.50 | 7.4 | — | 6.8 | 2.0 | 66.0 |

L.S.D.　(0.05)＝2.6
　　　　(0.01)＝4.4

備考：1）M・$Na_2CO_3$を添加した場合は添加後のpHを示す。
　　　2）Mineral Sol. 20c.c. 胃液5c.c.
　　　3）胃液は屠場より採取。

と，醗酵速度が早く，醗酵開始後4時間における pH の低下が大きく，M・$Na_2CO_3$ 添加量も多く要した。

**二　醗酵時間と消化率関係**

醗酵時間と消化率の関係をみた結果が第7表である。醗酵開始後24時間以内に可消化セルローズの72.9％消化し，その後48時間までに残りの27.1％消化し，48時間以後は消化しない結果となった。

第5表　消化率に及ぼす供試量の影響

| 供試量 (g) | 供試試料中セルローズ (g) | 消化されたセルローズ (g) | 消化率 (%) |
|---|---|---|---|
| 0.25 | 0.072 | 0.053±0.001 | 73.0 |
| 0.50 | 0.144 | 0.101±0.002 | 72.4 |
| 0.75 | 0.216 | 0.150±0.001 | 69.3 |

L.S.D.　(0.05)＝2.7
(0.01)＝4.4

備考：1)　胃液は屠場より採取。
2)　Mineral Sol. 20 c.c. 胃液 5 c.c.
3)　醗酵時間72時間。

第6表　消化率に及ぼす胃液稀釈度の影響

| 区分 | 胃液添加量 | Mineral Sol. 添加量 | 醗酵開始後の pH の変化とM・$Na_2CO_3$ 添加量 | | | | | | セルローズの消化率 % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4 hr. | 12 hr. | 24 hr. | 40 hr. | 48 hr. | 64 hr. | |
| | | | pH ($Na_2CO_3$) | pH ($Na_2CO_3$) | pH ($Na_2CO_3$) | pH ($Na_2CO_3$) | pH ($Na_2CO_3$) | pH ($Na_2CO_3$) | |
| A | 1 | 24 | 6.8(0.5 ) | 6.7(0.25) | 6.9 (−) | 6.8 (−) | 6.7 (−) | 6.7 (−) | 61.5 |
| B | 5 | 20 | 6.7(0.5 ) | 6.8(0.5 ) | 7.3 (−) | 6.7 (−) | 6.7 (−) | 6.7 (−) | 67.0 |
| C | 10 | 15 | 6.7(0.75) | 6.7(0.5 ) | 6.9 (−) | 6.8 (−) | 6.8 (−) | 6.7 (−) | 56.2 |
| D | 15 | 20 | 6.5(1.0 ) | 6.7(0.5 ) | 6.9 (−) | 6.8 (−) | 6.7 (−) | 6.7 (−) | 37.0 |
| E | 20 | 5 | 6.2(1.0 ) | 6.7(0.5 ) | 6.8 (−) | 6.8 (−) | 6.7 (−) | 6.7 (−) | 40.4 |

L.S.D.　(0.05)＝ 7.7
(0.01)＝12.8

備考：1)　胃液は屠場より採取。
2)　供試量 0.25 g。
3)　醗酵時間 72時間。
4)　pH は M・$Na_2$ $CO_3$ 添加前の値を示す。

第7表　醗酵時間と消化率

| 醗酵時間 | 供試試料中セルローズ (g) | 消化されたセルローズ (g) | 消化率 (%) |
|---|---|---|---|
| 24 時間 | 0.072 | 0.035±0.001 | 48.6 |
| 48 時間 | 0.072 | 0.048±0.001 | 66.7 |
| 72 時間 | 0.072 | 0.048±0.002 | 66.7 |

L.S.D.　(0.05)＝4.5
(0.01)＝7.4

備考：1)　供試量 0.25 g
2)　胃液屠場より採取。
3)　Mineral Sol. 20 c.c. 胃液 5 c.c.

## 3. 考　察

反芻胃内微生物を *In Vitro* に培養する方法は人工反芻胃 Artifitial Rumen とも呼ばれ，初めは反芻胃の特徴ある栄養生理を明らかにする目的で行なわれ，細菌学的方法や生化学的方法によって数々の業績が報告されている。また，最近ではきわめて精巧な人工反芻胃が完成され，実験室においてほとんど生体の反芻胃が再現されている[1)11)]。しかし，一方ではこの装置を可能な限り単純化して粗飼料の消化率を測定して栄養価の推定を行なうべく発展してきた。今日ではボンベによる $CO_2$ の送入を行なわず，恒温水槽でなく，孵卵器中で培養するきわめて単純化された方法も考案されている。

*In Vitro* 法を栄養価の推定に用いるためには，供用する胃液の条件を一定にしなければならない。フィスチュラを装着する家畜については，年齢や健康状態を吟味することはもちろんであるが，反芻胃内微生物相は短時間に変動することが

認められているので，給与する飼料の種類や量，ならびに時間を正確にする必要がある。個体差をなくするためには，BARNETT[4] は数頭の胃液を混合して用いている。

pH については，実験結果にも示すとおり試料の供試量が多すぎるとその調整が困難である。消化率におよぼす pH の影響は著しいので，その調整には細心の注意をする必要がある。CHENG[7] は洗滌細菌法による *In Vitro* 法で，反芻胃内微生物の繊維素分解能を示す最適 pH は 6.8〜7.6 の範囲で，pH 6.4 以下ならびに 8.0 以上では消化率が著しく減少することを報告した。CHURCH[8] は最適 pH は，試料や胃液によって異なると考えている。現在，多くの *In Vitro* 法では pH 6.9 に調整されているが，本試験の結果もそれに近い価となっているので，pH 6.9 を目標にして調整するのが適切であろう。

試料の供試量の影響については，CHURCH[8] は供試量を増加させれば消化率が減少すると報告している。しかし HUHTANEN[17] はルーサン乾草で供試量にかかわらず消化率は一定であると報告している。また，CHENG[7] は純粋セルローズを用い，供試量を増加させれば消化率が減少することを報告しているが，KAMSTRA[18] は植物セルローズを用い，供試量を増加させれば消化する量も増加し，消化率はほぼ一定になることを報告している。本試験の結果では，供試量 0.25〜0.50g の範囲では消化率が一定であった。以上のように種々成績が異なっているが，これは *In Vitro* 法や実験方法が異なっているためであろう。とにかく，栄養価推定のために本装置を用いる場合には，供試量 0.25g 〜0.50g，セルローズ含量にして 0.072〜0.144g の範囲であれば一定の再現性ある価が得られるであろう。

試料の細切程度が問題となるが，CHURCH[8] はルーサンを用いて，細切するほど消化率が高くなることを報告したが，BAKER[2] は木材セルローズを用いて細切程度では差異がなかったことを報告している。本試験ではこの点を明らかにしていないが，一定の成績をうるためには一定の細切程度にする必要がある。しかし，実際的には粉砕器で粉砕後一定の mesh（本試験では 40 mesh）を通して供試すれば十分であろう。

醗酵時間については，BARNETT[3] は各種のサイレージを用い，48 時間以後もわずかに消化するので醗酵時間を 70 時間とし，この価と *In Vitro* の粗繊維消化率と高い相関関係を示すことを報告している。しかし，多くの *In Vitro* 法では，48 時間以後は消化しないので醗酵時間を 48 時間としているが，HERSHBERGER[16] は醗酵時間が長くなると，微生物相が *In Vitro* と違ってくるので，短時間の方が *In Vitro* と良好な関係になるとし，24 時間 *In Vitro* セルローズ消化率と，*In Vitro* セルローズ消化率ならびに可消化エネルギーときわめて高い相関関係（$r=0.97$ $r=0.92$）が得られたことを報告している。また，DONEFER[13] は 12 時間消化率で NVI を推定しているので，醗酵時間についてはその目的に応じて採用すべきであり，この点については *In Vivo* 試験を通して明らかにしたいと考えている。

### 4. 要　　約

a. M・$Na_2CO_3$ 添加量により pH を種々調整した場合，その消化率におよぼす影響は大きかった。pH 平均 6.8 に調整した場合に最も高い消化率を示した。

b. 試料供試量は多すぎると消化率は減少するが，ある範囲までは一定である。すなわち供試量 0.25g，0.50g，0.75g とした場合，消化率は 73.0, 72.4, 69.3% で 0.25g と 0.50g との間に有意差はない。

c. 胃液稀釈度が消化率におよぼす影響も大きかった。胃液 5c.c., Mineral Sol. 20c.c. とした場合に最も高い消化率を示した。

d. 醗酵開始後 24 時間以後は消化しない。

## 試験 B. チモシーと赤クロバーの刈り取り時期に伴う繊維質含量と *In Vitro* セルローズ消化率の変化について：

### 1. 供試試料

根室支場畑地より採取し，85℃の通風乾燥器中で乾燥し，粉砕して 40 mesh の篩を通して分析ならびに醗酵に供した。刈り取り期日その他は第8表に示すとおりである。

第8表　供　試　試　料

| 区分 | 試料番号 | 刈取期日 | 草丈 cm | 水分 | 生育時期 |
|---|---|---|---|---|---|
| チモシー | 1 | 1960年6月10日 | 67 | 82.6 | —— |
| | 2 | 〃　6　20 | 92 | 77.6 | 出穂前 |
| | 3 | 〃　7　1 | 102 | 78.3 | 出穂期 |
| | 4 | 〃　7　10 | 106 | 69.7 | 開花始 |
| | 5 | 〃　7　20 | 103 | 68.0 | 開花期 |
| | 6 | 〃　8　1 | 103 | 65.4 | 開花終 |
| アカクロバー | 1 | 1961年6　13 | 45 | 86.7 | —— |
| | 2 | 〃　6　22 | 63 | 82.7 | —— |
| | 3 | 〃　7　2 | 72 | 81.9 | 開花期 |
| | 4 | 〃　7　12 | 93 | 79.6 | 開花終 |
| | 5 | 〃　7　22 | 93 | 78.5 | —— |

## 2. 結　　果

### イ　一般成分ならびに繊維質含量

第9表は一般成分ならびに繊維質含量を示す。粗蛋白は成熟度が進むとともに直線的に減少し，粗脂肪，粗灰分も減少するが，NFE は著しい変動がなく，粗繊維は増加することについてはほかの試験成績と一致するところである。

全繊維素含量は，チモシーと赤クロバーで著しく異なっており，また，チモシーでは粗繊維含量より著しく高い価を示しているのに反し，赤クロバーはほぼ同様であり，試料5ではむしろ少ない価を示している。また，チモシーは出穂期(試料3)まで増加するが，その後はむしろ減少の傾向を示しているのに反し，赤クロバーは成熟度とともに漸増している。

全繊維素の組成をみると，α-セルローズは赤クロバーの方が多く，71～77%の範囲であるが，チモシーは61%前後で一定の価を示している。β-γセルローズは成熟するに従い減少し，ペントーザンは逆に増加している。以上のように全繊維素として定量される成分の組成は，刈り取り時期によって異なっている。本試験でセルローズ消化率の測定の際に用いた CRAMPTON & MAYNARD セルローズについては，その組成について検討しなかったが，やはり成熟度や草種によって変化しているものであろう。

セルローズ，α-セルローズ，ペントーザンは，いずれもチモシーの方が高く，出穂期（試料3）で最高となり，その後はむしろ減少の傾向を示しているのに反し，赤クロバーは漸増している。チモシーのβ-γセルローズは出穂期以後減少しているが，赤クロバーは含量が少なく，刈り取り時期で大差がみられない。

リグニン含量は，いずれも直線的に増加しており，また赤クロバーの方がチモシーより高い価を

第 9 表　一般成分ならびに繊維質含量　　　無水物中%

| 区分 | チモシー 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 赤クロバー 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 粗蛋白 | 16.52 | 13.39 | 11.62 | 9.86 | 9.40 | 7.78 | 22.94 | 19.33 | 16.91 | 16.51 | 14.41 |
| 粗繊維 | 25.19 | 28.13 | 30.70 | 33.04 | 30.79 | 33.55 | 15.73 | 19.43 | 23.95 | 26.43 | 29.72 |
| NFE | 47.22 | 48.77 | 49.40 | 49.27 | 52.15 | 50.83 | 50.74 | 52.51 | 51.54 | 49.19 | 50.01 |
| 粗脂肪 | 4.14 | 4.90 | 3.09 | 2.63 | 2.57 | 2.65 | 7.08 | 5.77 | 5.41 | 5.08 | 3.46 |
| 灰分 | 6.94 | 4.83 | 5.21 | 5.20 | 5.12 | 5.21 | 7.18 | 6.57 | 6.01 | 7.10 | 6.90 |
| 全繊維素 | 34.94 | 36.61 | 44.55 | 43.59 | 39.28 | 40.05 | 17.47 | 22.97 | 24.67 | 26.58 | 27.84 |
| 全繊維素中 α-セルローズ | 61.82 | 61.84 | 61.93 | 61.98 | 59.16 | 62.42 | 70.89 | 72.39 | 76.54 | 75.55 | 74.44 |
| 全繊維素中 β-γ セルローズ | 14.99 | 12.80 | 10.14 | 8.24 | 9.04 | 5.58 | 16.05 | 14.80 | 9.21 | 9.62 | 9.46 |
| 全繊維素中 ペントーザン | 23.19 | 25.36 | 27.93 | 29.78 | 31.80 | 32.00 | 13.06 | 12.81 | 14.25 | 14.83 | 16.10 |
| セルローズ | 28.96 | 30.86 | 34.96 | 35.99 | 33.16 | 34.48 | 18.96 | 22.56 | 28.07 | 29.25 | 30.04 |
| α-セルローズ | 21.60 | 22.64 | 27.59 | 27.02 | 23.24 | 25.00 | 12.38 | 16.63 | 18.88 | 20.08 | 20.73 |
| β-γセルローズ | 5.24 | 4.69 | 5.53 | 3.59 | 3.55 | 2.23 | 2.80 | 3.40 | 2.27 | 2.56 | 2.64 |
| ペントーザン | 14.28 | 16.35 | 22.45 | 21.93 | 19.05 | 20.48 | 8.70 | 9.59 | 10.58 | 11.83 | 13.22 |
| リグニン | 4.74 | 5.56 | 7.61 | 9.16 | 10.01 | 10.79 | 8.53 | 9.27 | 11.15 | 13.42 | 14.40 |
| メトキシル | 1.30 | 1.61 | 1.95 | 2.41 | 2.50 | 2.60 | 1.46 | 1.83 | 1.92 | 2.15 | 2.49 |

示していることが，ほかの繊維質と比較して著しい差異である。メトキシルも漸増しているが，その含量は両種間に大差がみられない。

第10表と第11表はチモシーと赤クロバーの消化率を示す。チモシーの試料6は実験装置の都合により除いた。

これによると，チモシーも赤クロバーも成熟度が進むとともに消化率が減少しているが，赤クロバーはチモシーよりも若草時期の消化率が著しく低いことが目立っている。

第12表および第13表は，それぞれ試料3，試料5について醗酵開始後の時間と消化率の関係についてみたものである。この場合は試験管の反覆を行なわず，チモシーと赤クロバーを計10点ランダムに配置して醗酵開始後6，12，20，24，48時間ごとに，おのおの1本ずつ取り出してその消化率を測定したものである。供試した胃液は同一のフィスチュラ綿羊1頭から飼養条件を一定にして採取したものであるが，醗酵開始後20時間までの消化率は同一草種でも各試験ごとに変動が大きい。綿羊の飼養条件，胃液の採取方法などをできるだけ一定になるように注意したつもりであるが，何かの原因で初期の細菌の活動に影響しているものと思われる。恐らく，給水ならびに胃内容物の採取方法などに起因するものと思われるが，短時間の消化率は重要な意味があるので，安定した価を得るべく今後も実験する予定である。しかし，48時間消化率は同一草種では同一の価が得られている。

各試験ごとについてみると，一例を除いては(第12表の Exp. 1 の12時間消化率)，醗酵開始後24時間まではいずれも赤クロバーの方が高い消化率を示している。

DONFER[13] HERSHBERGER[16]はイネ科牧草は醗酵開始後6時間までは消化しないが，マメ科牧草は開始直後から消化するので，醗酵初期の消化率は

第10表 チモシーのセルローズ消化率

| 試料 | 供試量 (g) | 試料中のセルローズ (g) | 消化されたセルローズ (g) | 消化率 (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.25 | 0.0662 | 0.0568 | 85.81 |
| 2 | 0.25 | 0.0726 | 0.0570 | 78.45 |
| 3 | 0.25 | 0.0786 | 0.0595 | 75.64 |
| 4 | 0.25 | 0.0800 | 0.0532 | 66.50 |
| 5 | 0.25 | 0.0751 | 0.0428 | 56.99 |

L.S.D. (0.05) = 8.25
(0.01) = 13.68

備考：1) 試料6は実験装置の都合により除外。
2) 醗酵時間72時間 Mineral Sol. 20 c.c. 胃液 5 c.c.
3) 胃液は屠場より採取。

第11表 赤クロバーのセルローズ消化率

| 試料 | 供試量 (g) | 試料中のセルローズ (g) | 消化されたセルローズ (g) | 消化率 (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.25 | 0.0457 | 0.0296 | 64.66 |
| 2 | 0.25 | 0.0544 | 0.0340 | 62.50 |
| 3 | 0.25 | 0.0676 | 0.0414 | 61.17 |
| 4 | 0.25 | 0.0701 | 0.0403 | 57.42 |
| 5 | 0.25 | 0.0718 | 0.0376 | 52.37 |

L.S.D. (0.05) = 5.54
(0.01) = 9.20

備考：1) 醗酵時間48時間 Mineral Sol. 20 c.c. 胃液 5 c.c.
2) 胃液はフイスチュラ綿羊より採取。

第12表 醗酵時間と消化率(その1)試料3の場合

| 区分 | | 醗酵開始後 6hr. | 12hr. | 20hr. | 24hr. | 48hr. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Exp. 1 | チモシー | — | 15.90 | 36.90 | 59.92 | 77.99 |
| | 赤クロバー | 2.66 | 12.28 | 44.67 | 60.36 | 67.31 |
| Exp. 2 | チモシー | 0.6 | 10.94 | 42.75 | 58.14 | 76.21 |
| | 赤クロバー | 14.20 | 26.18 | 52.37 | 59.47 | 66.12 |

備考：1) 胃液はフイスチュラ綿羊1頭より採取。
2) 飼料給与 乾草800g，濃厚飼料300g．
3) 供試量 0.25g Mineral Sol. 20 c.c. 胃液 5 c.c.

第13表 醗酵時間と消化率(その2)試料5の場合

| 区分 | | 醗酵開始後 6hr. | 12hr. | 20hr. | 24hr. | 48hr. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Exp. 1 | チモシー | — | 1.07 | 23.04 | 35.55 | 56.59 |
| | 赤クロバー | 2.51 | 20.33 | 34.54 | 43.87 | 55.01 |
| Exp. 2 | チモシー | — | 19.31 | 35.29 | 40.21 | 55.66 |
| | 赤クロバー | 11.56 | 32.59 | 42.76 | 50.42 | 56.13 |

備考：1)測定条件は第12表と同じ。

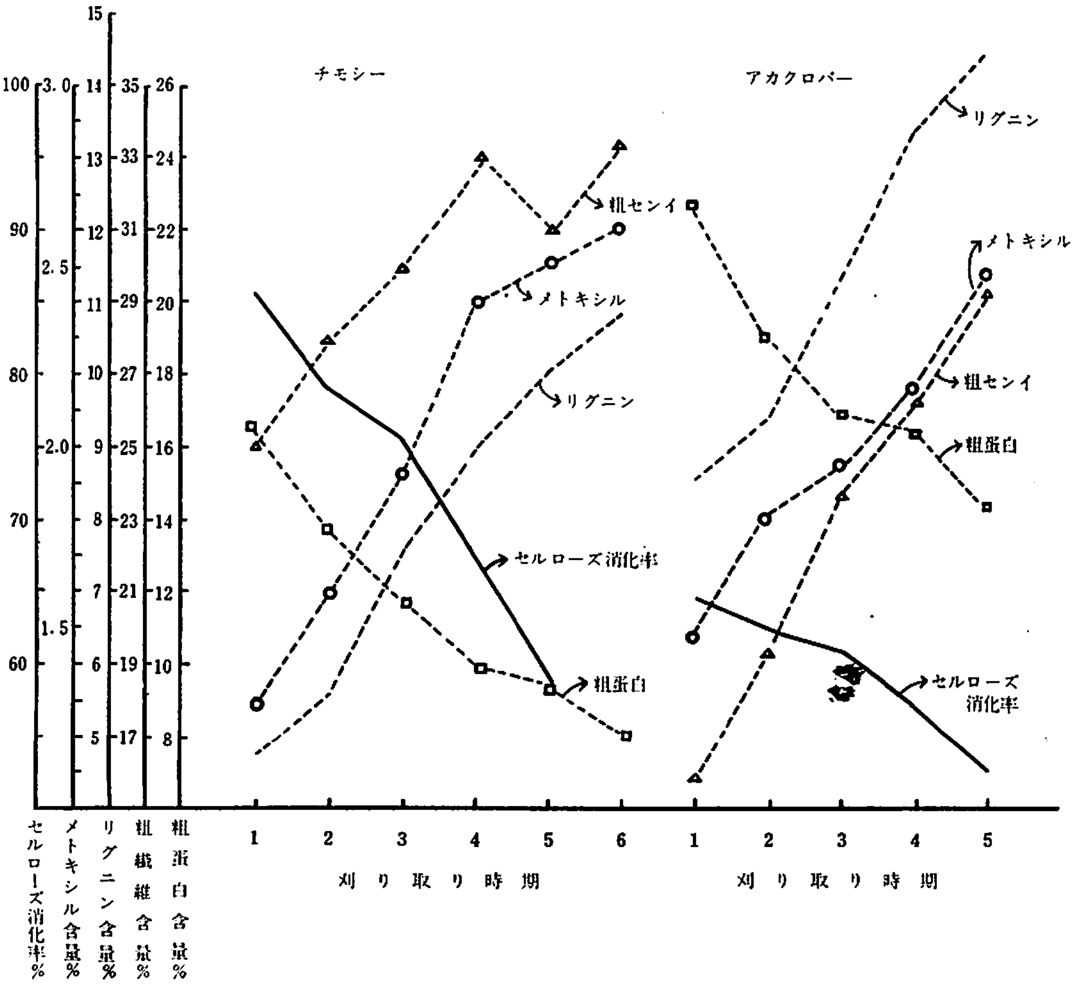
マメ科の方が高いことを報告しているが，本試験の結果もこれと同様であった。マメ科の方が醱酵初期の消化率が高い理由については，同氏らは明らかにしていないが，DONFER[13] によれば醱酵初期の消化率の高い草種は NVI が高いことになるので，醱酵初期の消化率は栄養価値査定上重要な Index になるものと思われる。

## 3. 考　　察

第2図は第9，10，11表の結果を図示したものである。これによると両種ともリグニン，粗繊維，メトキシル含量とセルローズ消化率とは負の相関関係があり，粗蛋白含量とは正の相関関係のあることが明らかである。ただし，チモシーの粗繊維は，試料4（開花始）以後は増量していない。これは多くの成績と一致するもので，POULTON[21]は粗繊維含量と可消化粗蛋白含量から栄養価を推定する方法によると，*In Vivo* では栄養価が減少しているにもかかわらず，成熟したチモシーでは類似した価となることを報告し，この方式を適用する場合，チモシーの粗繊維が成熟すると増量しないことはこの草種の欠点であるとのべている。

同一草種ではリグニン，メトキシル，粗繊維，粗蛋白含量とセルローズ消化率とは相関関係があるが，草種が異なればあまり相関関係のないことが明らかである。たとえば，リグニンはセルローズの消化率を減少させる主因であることはよく知

第 2 図　セルローズ消化率とメトキシル，リグニン，粗繊維，粗蛋白含量との関係



られているが，赤クロバーとチモシーではその含量が著しく異なっており，リグニン含量とセルローズ消化率の間に一定の関係がみられない。もしも，HERSHBERGER[16)]やPOULTON[21)]のいうように，セルローズ消化率が栄養価と最も高い相関関係があるとすれば，リグニンその他の Index によって栄養価を推定する場合，草種が異なればその適用範囲が著しくせばめられることになるであろう。

牧草中セルローズの消化率を減少させる主因はリグニン化であることについては，KAMSTRA[16)]，SALSBURY[27)]は，牧草中からホロセルローズや $\alpha$-セルローズを isolate して，その *In Vitro* 消化率をみると植物全体の場合よりも著しく向上することから，リグニン化が消化率を減少させる主因であるとのべている。DEHORITY[12)]はボールミルで植物組織を磨砕すると *In Vitro* セルローズ消化率が著しく向上することを認め，リグニンがセルローズを被覆して物理的に消化を阻害しているのであると主張している。しかし，セルローズ消化率はリグニン含量にのみ左右されるものではなく，リグニン自体の性質に影響されることを QUICK[22)]は明らかにし，全リグニンに対する比率で表わされた Acid insoluble lignin 含量の増大と，セルローズ消化率の減少とが一致した関係のあることを報告している。

セルローズ自体の性質と消化性との関係については，BAKER[2)]は *In Vitro* 法で綿繊維と木材繊維について，$\alpha$-$\beta$-$\gamma$ 比率などの化学的性質と消化率との間には一定の関係がみられないが，X線試験による物理的性質と消化率との間には一定の関係があることを認めている。しかし，飼料中からホロセルローズを分離して，X線試験を試みても差が認められないので，飼料中のセルローズは一様に消化されやすい状態にあるとのべている。

セルローズの消化速度は，前述のように栄養価査定上重要な意味がある。CLUMPTON[9)]は反芻胃内におけるセルローズ，ヘミセルローズの消化速度がおそければ長く反芻胃内に滞留することになり，食欲がおきないので摂取量が少なくなるのであろうと考察している。

反芻家畜は粗飼料中大量に含まれる繊維質を，主として反芻胃内で消化吸収し，主なエネルギー源としているが，その利用度は前述のように，リグニンその他の指標物質からある程度推定しうるが，草種や品質が異なればその適用範囲がせばめられ，また，確定的な Index はないようである。結局家畜を通してはじめて消化率が明らかとなるが，*In Vitro* 法はこの意味でもより合理的であり，本試験の結果でも，チモシーと赤クロバーでは著しい特徴のある消化性を示していることから，本法は栄養価推定上重要な手段としうるものと思われる。また，*In Vitro* 法によって，粗飼料のエネルギー価とともに摂取量も加味した NVI の推定が可能であれば，乳牛飼養上参考になるところが大きいので，ほかの栄養価推定法と比較しつつ試験する予定である。

### 4. 要　　約

a. リグニンを除いた繊維質は，いずれもチモシーの方が赤クロバーよりも著しく高い価を示し，また，チモシーは出穂期以後増量しないのに反し，赤クロバーは開花終わりまで直線的に増量する。

b. 全繊維素の組成は，$\alpha$-セルローズは赤クロバーの方が高く，71〜77％であるが，チモシーは61％前後で一定であった。成熟度が進むとともに両種とも $\beta$-$\gamma$ セルローズは減少し，ペントーザンは増加した。また，ペントーザンは赤クロバーの方が低い。

c. リグニンならびにメトキシルは，両種とも成熟度が進むとともに直線的に増量した。また，リグニン含量は赤クロバーの方が若草時期からかなり高い価であった。メトキシルは大差がみられない。

d. セルローズの *In Vitro* 消化率は成熟度が進むとともにいずれも減少したが，赤クロバーはチモシーよりも若草時期ではかなり低い価であった。醱酵開始後短時間の消化率は赤クロバーの方が高かった。

## IV 摘　　要

粗飼料の栄養価を推定する適切な方法についてその必要性をしばしば痛感するところであるが，

近年 *In Vitro* セルローズ消化率による栄養価推定法が発展してきたので，著者らもこの方法について試験することを目的とし下記の2試験を行なった。

**試験 A.** *In Vitro* セルローズ消化率により栄養価の推定を行なう場合，その条件と方法を一定にして，実験室や研究者のいかんにかかわらず，一定の再現性のある価が得られねばならない。著者らは試験管を用い，第一胃内容物の搾汁液を Mineral Solution で稀釈し，$CO_2$ を通し39℃の恒温水槽で繊維素醱酵を行ない，セルローズ消化率を測定した。この場合におけるセルローズ消化率におよぼす要因を明らかにし，一定の価が得られるべき方法について考察した結果，試料供試量は0.25〜0.50g，セルローズ含量にして0.072〜0.144gとし，胃液 5c.c., Mineral Solution 20c.c. とし，供試胃液の個体差を少なくすること，pH の調整は6.9を目標にして正確にすることなどに注意すべきであることが明らかとなった。

**試験 B.** 赤クロバーとチモシーを生育時期別に刈り取り，試験Aの *In Vitro* 法を適用してセルローズ消化率を測定した結果，草種間ならびに生育時期で著しい特徴ある価が示された。すなわち，両種とも成熟度が進むとともに消化率は減少するが，特にチモシーは著しかった。また，赤クロバーの若草時期の消化率は，チモシーよりかなり低い価であった。しかし醱酵初期（24時間まで）の消化率は赤クロバーの方が高かった。以上の結果から，本法によるセルローズ消化率の測定値は栄養価推定上の重要な Index になりうるものと思われる。

セルローズの消化率と，リグニン，粗繊維，粗蛋白，メトキシル含量との関係をみた結果，同一草種内では相関関係があるが，草種が異なれば一定でない。

なお，チモシーと赤クロバーの繊維質を調査した結果，その含量や組成ならびに増加の傾向には著しい差異が認められた。

## 文　献


1) ANTHONY, W. B., and J. T. REID, 1958; Methoxyl as an indication of the nutritive value of forage Jour. of Dairy Sci., 41: 12: 1715.

2) BAKER, T. I., et al 1955; The influence of certain physical properties of purified cellulose and forage cellulose on their digestibility by rumen microorganisms *in vitro*. Jour. of animal Sci., 18: 2: 655.

3) BARNETT, A. J. G., 1957; Studies on the digestibility of the cellulose fraction of grassland products. I. The relation between the digestibility of silage cellulose as determined *in vitro* and silage crude fiber digestibility determined by feeding trial. Jour. of Agri. Sci., 49: 4: 467.

4) BARNETT, A. J. G. ,and R. L. REID, 1957; Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in artifitial rumen I. The volatile acid production from fresh grass. Jour. of Agri. Sci., 48: 3: 315.

5) BAUMGARDT, B. R., et al 1959; A simplified artificial rumen procedure for estimating the digestible energy content of hays. Jour. of Animal Sci., 18: 4:1538.

6) BURROGH, 1950; 4) より引用.

7) CHENG, E. W., et al. 1955; A method for the study of cellulose digestion by washed suspension of rumen microorganisms. Jour. of Dairy Sci., 38: 11: 1225.

8) CHURCH, D. C., and R. G. PETERSEN, 1960; Effect of several variable on *in vitro* rumen fermentation. Jour. of Dairy Sci., 43: 1: 81.

9) CRAMPTON, E. W., 1957; Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and the overall feeding value of forages. Jour. of Animal Sci., 16: 3: 546.

10) CRAMPTON, E. W., E. DONEFER, 1960; A nutritive value index for forages. Jour. of Animal Sci., 19: 2: 538.

11) DAVEY, L. A., et al. 1960; Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. Jour. of Agri. Sci., 55: 2: 155.

12) DEHORITY, B. A., and R. R. JOHNSON, 1961; Effect of particle size upon the *in vitro* cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. Jour. of Dairy Sci., 44: 12: 2242.

13) DONEFER, E., et al. 1960; Prediction of the nutritive value index of a forage from *in vitro* rumen fermentation data. Jour. of Animal Sci., 19: 2: 545.

14) ELSHAZLY, K., et al. 1960; A comparison of the all-glass, semi-permeable membrance and continuous flow types of apparatus for *in vitro*

rumen fermentation. Jour. of Dairy Sci., 43: 10: 1445.
15) ELY, R. E., et al. 1953; A study of the crude fiber and nitrogen free extract fractions of orchard grass hay and the digestibility of some of the constituent by milking cows. Jour. of Dairy Sci., 36: 4: 334.
16) HERSHBERGER, T. V., 1959 ; Use of the artificial rumen technique to estimate the nutritive value of forages. Jour. of Animal Sci., 18: 2: 770.
17) HUHTANEN, C. N. and R. F. ELLIOTT. 1956; Factors influencing *in vitro* rumen cellulose digestion. Jour. of Animal Sci., 15: 4: 1180.
18) KAMSTRA, L. D., et al. 1958 ; The effect of stage of maturity and lignification on the digestion of cellulose in forage plant by rumen microorganisms *in vitro*. Jour. of Animal Sci., 17: 1: 199.
19) 京大農学部, 1959; 農芸化学実験書, 第3巻:1219
20) MEYER, J. H., and G. P. LOFGREEN., 1959 ; Evaluation of alfalfa hay by chemical analysis. Jour. of Animal Sci., 18: 4: 1233.
21) POULTON, B. R., et al. A comparison of result of several *in vitro* forage evaluation techniques with *in vivo* value. 未発表.
22) QUICKE, G. V., O. G. BENTLEY, 1955; Lignin and methoxyl group as related to the decreased digestibility of mature forage. Jour. of Animal Sci., 18: 1: 365.
23) REID, J. T., 1959; What is forage guality from the animal standpoint? Agronomy Jour., 51: 213-216.
24) REID, J. T., 1959 ; Effect of growth stage, chemical composition and physical properties upon the nutritive value of forage. Jour. of Dairy Sci., 42: 3: 567.
25) PEID, R. L. et al. 1959 ; Pasture quality as determined by *in vitro* and *in vivo* techniques. Jour. of Animal Sci., 18: 4: 1537.
26) RICHARD, C. R., et al. 1958 ; Comparison of methoxyl, lignin, crude fiber, and crude protein content of forage and feces as indirect indicators of dry matter digestibility. Jour. of Dairy Sci., 41: 7: 956.
27) SALSBURY, R. L., et al. 1958; The rate of digestion of the cellulose of some plant fractions by rumen microorganisms *in vitro*. Jour. of Animal Sci., 17: 2: 293.
28) SULLIVAN, J. T., 1959; A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forage and its relation to digestibility. Jour. of Animal Sci., 18: 4: 1292.
29) THACKAR, E. J., 1954; A modified lignin procedure. Jour. of Animal Sci., 13: 501.

## Summary

The object of this experiment was to estimate the nutritive value of forage by *in vitro* digestion technique and this report is the result of the following two experiments.

Experiment A. Several factors affecting *in vitro* cellulose digestibility.

1. *In vitro* digestion technique was described.
2. Great influence upon cellulose digestibility was observed when pH and the ratio of rumen juice-mineral solution was changed.
3. The digestibility was decreased when too much substitute was fermented but in the level between 0.25 to 0.50 gm. constant digestibility was observed.
4. Cellulose was not digested after 48 hr. fermentation time.
5. In the use of this *in vitro* technique to estimate nutritive value of forage it is necessary to keep in mind the following: to ferment with 0.25-0.50 gm. substrate level, rumen juice 5 c.c., mineral solution 20 c.c. and diminish individual difference of rumen juice and correct pH precisely during the fermentation.

Experiment B. Change of *in vitro* cellulose digestibility and cellulose fraction according to the growth stage of timothy and red clover.

1. The *in vitro* cellulose digestibility showed large and characteristic change according to the growth stage and between the two grasses. So, it is supposed that we can use the cellulose digestibility according to this technique as an index of nutritive value of forage.
2. Great difference of cellulose fraction was observed between the two grasses.