

R. K.

ISSN: 0915-1184

略 号
畜 試 研 資
Mem. Nat. Inst.
Anim. Ind.

Memoirs of
National Institute of Animal Industry

No. 2

Nov. 1988

畜産試験場研究資料

第 2 号

昭和 63 年 11 月

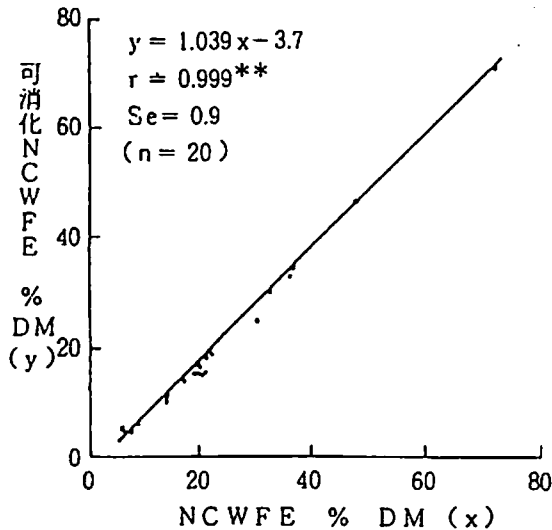
農 林 水 産 省
畜 産 試 験 場

筑波農林研究団地

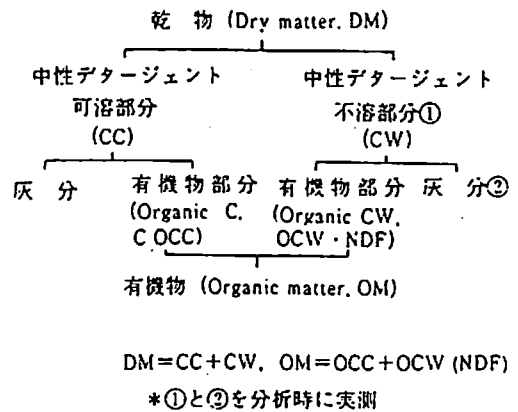
National Institute of Animal Industry

(Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries)

Tsukuba, Japan



I-2-6) - 図1. 種々の試料における NCWFE の含量で可消化量の関係 (阿部ら)



I-3-1) - 図1 中性デタージェント分析による乾物、有機物の分画様式

3. 細胞壁物質の定量

1) 中性デタージェント分析法による細胞壁物質と細胞内容物質の分離定量

(1) 原理

試料を中性の界面活性剤 (デタージェント) で処理することにより細胞内の糖類、蛋白質、脂質などを乳化溶解させ、繊維状の細胞壁物質から分離する方法をその基本としている。中性デタージェント可溶の部分を細胞内容物質 (cellular contents, CC), 不溶の部分を細胞壁物質 (cell wall, CW) とし、乾物は CC と CW から構成されるものとする。CC, CW の内容については表 1 に、また中性デタージェント分析による乾物および有機物の分画については筆者のところでは用いている様式を図 1 に示す。

I-3-1)-表1. CCとCWの化学構成

分類	化学組成
細胞内容物質 (CC)	有機物、可溶性炭水化物、デンプン、非蛋白態窒素化合物、蛋白質、色素、脂質、その他可溶物質
細胞壁物質 (CW)	ヘミセルロース、セルロース、リグニン、熱変性蛋白質

(2) 試薬等の準備

(a) α-アミラーゼ用リン酸緩衝液 ^{buffer}: リン酸 1 カリウム KH₂PO₄ 60.4 g とリン酸 2 ナトリウム Na₂H₂P₂O₇ · 12H₂O 19.9 g を水に溶かして 5 l とする。PH は 5.8 である。

(b) α-アミラーゼ: 種々のものがあるが、著者のところでは和光純薬製の α-アミラーゼ (カタログ No015-03731) を用いている。

(c) α-アミラーゼ溶液: PH 5.8 のリン酸緩衝液 20 ml に α-アミラーゼ 1 mg の割合で溶解する。この溶液は使用直前に調整する。ケンダク液である。

(d) 中性デタージェント溶液 (ND 溶液): 5 l の水に以下の試薬を溶解する。ラウリル硫酸ナトリウム 150 g, EDTA-2Na 931 g, ホウ酸ナトリウム Na₂B₄O₇ · 10H₂O 34.1 g, リン酸ナトリウム Na₂HPO₄ · 12H₂O 57.4 g, エチレングリコールモノエチルエーテル 50 ml, これらの試薬をまず 1 l のビーカーにはかりこみ、水を少量加えて、薬サジでよく練りつぶし、ラウリル硫酸ナトリウムの粒をなくした後、残りの水で 5 l のビーカーにあらひこみ (この時点で水は 5 l すべてビーカーに入れる)、ヒータ上で温めることにより透明な溶液が得られる。冬期間、室温が下がると溶液中のラウリル硫酸ナトリウムが析出し、乳白色の溶液となるので、そのときは加熱し、透明な溶液としてから用いる。

(e) デカリン: 消泡剤として用いる。デカヒドロナフタレン (デカリン) をそのまま使用。

(f) アセトン：1級のものでよい。

(g) アルミ皿+濾紙：アルミ皿に濾紙（No.5A, 径12.5cmの大きめのものがよい）を入れ、135℃にて2時間乾燥し、秤量しておく。

(h) ルツボ：磁製のカラツボを600℃の電気炉内で2時間焼き、秤量しておく。

(i) その他：粗繊維煮沸台、乾燥機、電気炉、サツカーと吸引ピン式、40℃に調整した振とう倍養器などを用意する。

(3) 方法

(a) デンプンを含む試料の場合：試料0.5～1を100mlの三角フラスコに採取し、純水20mlを加える。これをホットプレート上（またはヒータでも可）にのせて加熱し、デンプンの糊化を行う。煮沸状態になればこの操作を終了してよい。冷却後、20mlの α -アミラーゼ溶液を加え、40℃の振とう培養器中で16時間のデンプンの加水分解を行う。つまり、夕方の5時にセットし、翌朝9時に降ろす。その後、残渣をNo.5Aの濾紙に濾過し、水で3～4回洗浄し前処理を終了する。

次にポリエチレンの洗浄ピンから濾紙上の残渣にND溶液を吹きつけ、500ml容のトールピーカに洗いこみ、ND溶液の液量を約100ml（ピーカに目安の線をつけておくとよい）とし、デカリンを数滴加えて、粗繊維煮沸台上で1時間煮沸する。煮沸は内容物が静かに還流するくらいでよい。煮沸後、あらかじめ恒量を測定してある濾紙に濾過する。水で6～7回洗浄し、残存界面活性剤を洗い流した後、アセトンでさらに3～4回洗浄する（アセトン用のポリエチレン洗浄ピンを用意しておくと便利）。ロート上でアセトンを飛散させた後、濾紙と残渣をアルミ皿にもどし、135℃の乾燥器中で2時間乾燥し、冷却後、秤量する。この残渣がCWである。CCの含量は100からCWの乾物中の含量（%）を差引いて求める。

次に濾紙と残渣をあらかじめ恒量を測定してあるルツボ中に移し、ヒータ上で予備灰化後、600℃の電気炉中で2時間灰化する。CW含量からこの灰分を差引いてOCW（ここではNeutral detergent fiber, NDF）とする。OCCの含量は有機物の含量からNDFの値を差引いて求めよ。

(b) 試料中にデンプンを含まない場合

イネ科の北方系牧草（オーチャードグラス、チモシーなど）、または多くの消化試験時の糞（穀実を含む飼料を給与した牛のものは除く）など、デンプンの含量がゼロまたは無視できるほどに小さいものについては、500ml容のトールピーカに直接サンプリングし、ND溶液、デカリンを加えてa)の場合と全く同じ処理を行う。

なお、この場合にはND処理液の濾過速度が非常に遅いので、この場合には静置法を用いる。つまり、処理後ピーカ中に水を満たし、一夜放置する。次に上清液を吸引除去し、その後、残渣を濾紙にて濾別する。この場合、濾過板付ガス噴射管（例えば柴田器械カタログNo.1342-202など）をサツカーにとりつけて用いると便利である。

(4) 留意点

(a) VAN SOESTの原著⁷⁾ではND溶液、デカリンの他に0.5gの亜硫酸ナトリウムを加えているが、これはCWの構成物質であるリグニンを分離除去してしまうことを筆者らは確認している⁸⁾。そのため、CWの過少評価を防ぐ意味で亜硫酸ナトリウムの添加はしない方がよいと考えている。筆者の研究室では添加していない。同一の意味からは否かは不明であるが、他にもそのような文献⁹⁾がみられる。

(b) VAN SOESTの原著⁷⁾ではCWの灰分を補正することなく、処理残渣イコールNDFとして示している。しかし、粗繊維との比較上、筆者はNDFについては図1に示したように灰分を含まない形で表示することとしている。特殊な例ではあるが、土砂混入の試料などでは、その多くが処理残渣中に残り、これらはFiber（繊維）とはいいがたいと考えられる。またNDFとADF（酵性デタージェント繊維）の差をヘミセルロースとするという。ヘミセルロースの含量の簡易算出法があるが、CW中の灰分とADF中の灰分とではその含量が異なり、ヘミセルロース算出の基礎が灰分を含んだ形では不明瞭になる。さらに試料の分画上、乾物ベースではCC/CW、有機物ベースではOCC/OCWとしておくことが分類、整理上好ましい。

以上のような理由で、NDFについては灰分を補正した値として求めているが、表2、3には種々の試料で灰分を補正した場合としない場合との含量、消化率、可消化量の比較を示してある。

この問題に対する検討の材料としていただきたい。まず、含量についてみると、ケイ酸の含量が非常に多い稲ワラを除いては両者の間にとり分け大きな差はなく、配合原料単体、配合飼料等では一般的にいてその差は無視し得るほどであろう。しかし、消化試験の結果では、糞中の含量で差があり、その結果灰分を差引いて求めたNDFが高い消化率を示している。

(5) 栄養的な性質と応用

(a) CCの栄養的均一性

表1にみられるようにCCは糖、蛋白質、脂肪などから成り、繊維であるCWよりも高い消化性を持つとい

I-3-1) 一表2. 灰分補正の有無と NDF 含量

試料	NDF %		試料	NDF %	
	灰分無補正	灰分補正		灰分無補正	灰分補正
単体飼料			牧乾草・サイレージ		
トウモロコシ	13.7	13.6	トウモロコシサイレージ	42.3	41.7
大麦	21.4	21.0	ソルガムサイレージ	50.3	49.7
脱脂米ヌカ	36.0	35.6	チモシー出穂期	65.1	63.7
フスマ	43.4	43.0	チモシー開花期	66.9	65.5
大豆粕	15.1	14.7	オーチャードグラス出穂期	58.3	57.4
配合試料			アルファルファ乾草	46.9	46.1
幼すう用	17.5	15.9	稲ワラ	76.6	67.5
中すう用	21.1	20.7			
成鶏用	10.7	10.3			
肉豚用	21.1	20.7			
乳牛用	28.5	28.0			

(阿部ら)

I-3-1) 一表3. 灰分を差引いて求めた NDF と灰分を含む NDF の消化率, 可消化量

飼料	家畜	飼料中含量		糞中含量		消化率		可消化量	
		A	B	A	B	A	B	A	B
オーチャードグラス乾草	めん羊	64.2	65.8	60.9	65.0	56.6	54.8 N S	36.3	36.1
乳熟期とうもろこしサイレージ	めん羊	52.4	54.5	63.2	71.0	53.3	49.5*	27.9	27.0
輸入アルファルファヘイキューブ	ヤギ	50.0	52.7	60.9	68.4	47.1	43.6**	23.6	23.0
アルファルファヘイキューブ乳配混合飼料	ヤギ	40.7	42.7	57.9	64.0	49.7	46.9**	20.3	20.0

A : 灰分を差引いて求めた NDF, B : 灰分を含む NDF

* : 糞中含量, 消化率, 可消化量は 3 ~ 6 頭の家畜の平均値

(阿部ら)

うことはまず一般的なこととしていえる。VAN SOEST¹⁰⁾ は 22 点の消化試験実施済みの試料を用い, CC の含量とその可消化量との間に以下の式を導いている。

$$\text{可消化 CC} = 0.98 \text{ CC} - 12.9$$

$$(r = 0.99)$$

このように含量と可消化量との間に高い有意な相関が存在するところから, CC は栄養的に均一な分画であるということができ, VAN SOEST は, CC の真の消化率は 98% とほぼ 100% であり, 代謝性の物質が 12.9% であるとしている。

(b) NDF の組成と消化性

NDF は後述するように従来の粗繊維, ADF とは異なり, 試料中の繊維の総量を表現する分画として, 日常的な分析手法で得られるべく提案された画期的な繊維成分の表現型である。その組成, 消化性等について, 筆者らのデータで少し触れてみよう。

総繊維の組成であるが, 表 4 には, リグニン, ペントザン, ヘキソザンおよび粗蛋白質で示してある。

この場合, おおまかではあるが, ヘキソザンをセルロース, ペントザンをヘミセルロースと考えてみても, 大き

I-3-1) 表4. 各種試料のNDFの組成およびNDF含量・消化率(山羊)

試料	NDF中%				乾物中 NDF%	NDF 消化率
	リグニン	ペントザン	ヘキソザン	粗蛋白質		
稲わら	14.8	29.5	53.0	2.7	64.5	51.8
イタリアンライグラス A	14.3	29.9	52.4	3.4	58.6	72.0
〃 B	9.7	28.7	51.1	10.5	36.0	92.8
〃 C	17.1	31.8	48.5	2.6	59.6	60.1
早刈ライ麦	8.0	29.3	52.8	9.9	31.4	92.2
早刈チモシー	13.0	30.9	51.9	4.2	60.0	73.5
遅刈チモシー	15.5	32.5	48.9	3.1	63.0	66.0
サイレージ A	13.7	32.4	50.0	3.9	55.6	75.6
〃 B	16.0	31.7	48.3	4.0	55.3	77.0
アルファルファ	20.0	22.5	53.8	3.7	39.6	43.6
アルカリわら	10.8	40.4	48.8	1.8	-	-

な間違いは無いであろう。

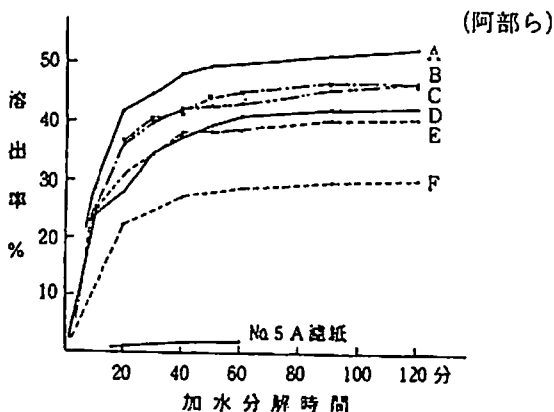
草本類のヘミセルロースは主としてキシランから成り、これはペントースのキシロースとアラビノースを主要な成分とするからである。イネ科牧草の場合、ヘキソザンとペントザンの比率はほぼ一定であることがわかる。またアルファルファはペントザンの含量が低く、リグニンの含量が多い。

また、稲わらを除いた牧草についてNDF消化率とNDF中のリグニンの相関係数を求めると、 -0.94 という高い値が得られ、NDF中の1%のリグニンの増加は約4%のNDF消化率の減少をもたらすということが計算できる。

総繊維の消化性に及ぼす飼料化学的な因子としては、リグニンの他に構造性炭水化物自体の結晶性の程度が上げられる。図2と図3にはNDFを希酸(5% H_2SO_4)で処理しその後、ペントザンとヘキソザンを定量してその分解性をみた結果を示してある。多くの牧草は60分から90分ではほぼ一定の分解率に達するが、No.5A 沓紙はその分解率が非常に小さいことがわかる。

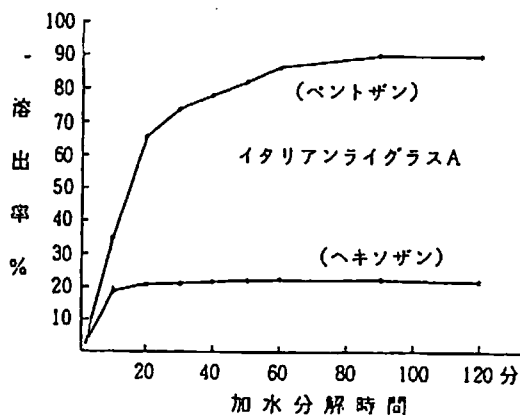
そして、イタリアンライグラス(A)を例にとって、ペントザンとヘキソザンの溶出をみると、ペントザンは分解率が高く、それに比してヘキソザンは非常に低い分解率にとどまっている。

表5には図2に示すように溶出曲線が明瞭な屈折点に達し、それ以降加水分解を行っても溶出しなない点におけるペントザンとヘキソザンの残存率を非接触度として示してある。



I-3-1)-図2. 構造炭水化物の5% H_2SO_4 加水分解反応

A: 遅刈チモシー, B: 早刈チモシー, C: イタリアンライグラスA, D: 稲わら, E: 早刈ライ麦, F: アルカリわら

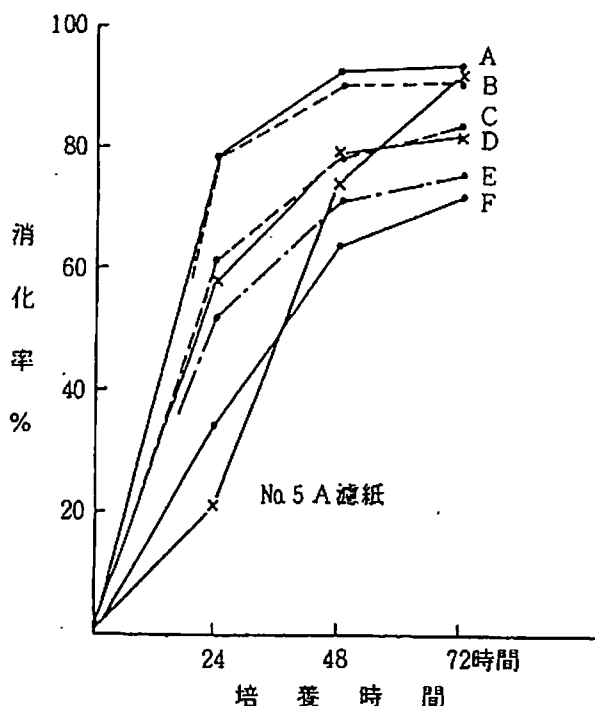


I-3-1)-図3. ペントザン・ヘキソザンの5% H_2SO_4 加水分解における溶出曲線(阿部ら)

I-3-1) 一表5. 希酸加水分解法によるヘキソザン、
ペントザンの非接触度

試料	ヘキソザン		ペントザン	
	%		%	
稲わら	77.4	20.2		
アルカリわら	84.2	56.3		
イタリアンライグラスA	78.0	10.0		
早刈りライ麦	77.3	29.0		
早刈チモシー	77.5	15.1		
遅刈チモシー	74.0	8.7		
濾紙 (No.5A)	97.8	-		

(阿部ら)



I-3-1) 一図4. NDFの*in vitro*の消化率 (阿部ら)
A: アルカリわら, B: 早刈ライ麦, C: イタリアンライグラス, D: 早刈チモシー, E: 遅刈チモシー, F: 稲わら

この値が大きいほど結晶化度も高いと考えてよいであろう。

ヘキソザンの非接触度は牧草ではほぼ一定であるのに対し、ペントザンでは低いところでのバラツキが目立つ。

このような性質を持つNDFを*in vitro*の消化試験で24.48そして72時間培養したときの消化率の変化を図4に示してある。

結晶化率の高い濾紙にラグタイムがあるということが注目される。24時間では稲ワラよりも低く、20%程度の

消化性しか示さない。

しかし、これ以降急速な分解率を示して早刈り牧草の値にまで達している。

結晶性の高いものは、この構造がある程度弛緩(微生物が結晶領域の中に入り込むまで)するまで、分解が押えられ、その結晶消化速度が遅くなるという考え方ができよう。

結晶性の低いヘミセルロースの含量、またその接触化度とリグニン化との関係、あるいはヘキソザンの接触化度等がNDFの消化率、特に消化速度と重要な関わりを持っているものと考えられよう。

2) 酵素分析法による細胞壁物質と細胞内容物質の分離定量

(1) 原理

細胞壁(CW)の分離定量の場合、糖類、非蛋白態窒素化合物などはどのような処理でも簡単に可溶化除去でき、また脂質、色素類も適当な有機溶媒で洗浄することにより除去できる。問題は蛋白質であり、これをより多く除去する方法が過去に種々検討され、先に記したデタージェントを用いる方法がその代表的なものとして採用されている。

ここでは蛋白質を分解除去する手段として蛋白質分解酵素(アクチナーゼ)を用いる方法を紹介する。

まず、デンプンを除去するためにアミラーゼの処理を行うが、この際の糊化(加熱)の過程で糖類などの可溶物が液相に移行し、さらにアミラーゼの加水分解作用でデンプンも除去される。この操作を終えて得られた処理残渣はCWと蛋白質および脂肪とから主に構成される。

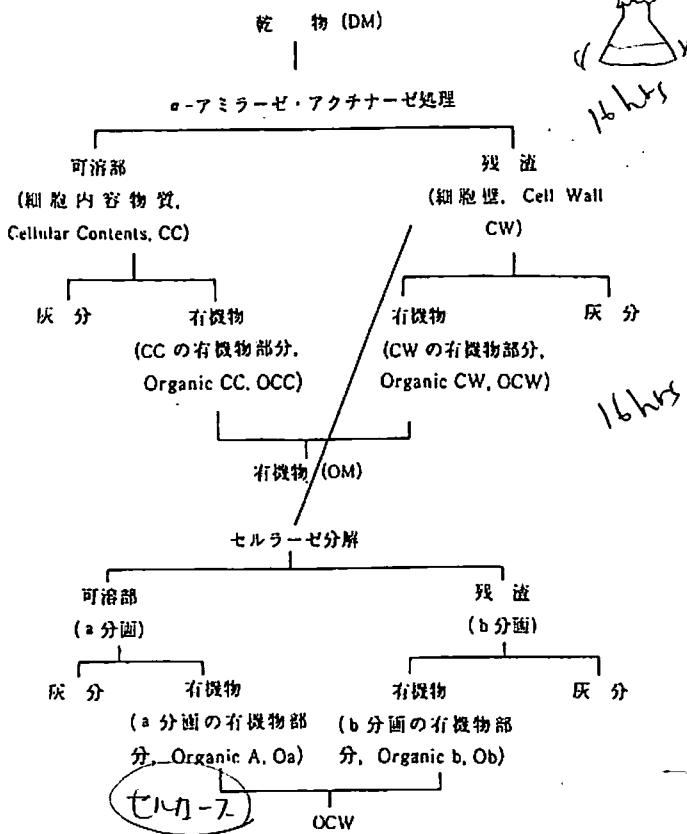
これを次にアクチナーゼの処理に付すことにより蛋白質が分解除去され、その残渣をアセトンで洗浄することにより、脂質、色素類も除去され、最終的にはCWが残渣として得られる。後述するが、CWのセルラーゼが分解を含めた図1に示すような一連のシステムを酵素分析と呼んでいる。

(2) 試薬等の準備

(a) α -アミラーゼ溶液: 緩衝液, α -アミラーゼおよび酵素液の調製はNDF定量の項で述べたものと全く同様にする。(P16) 14-7911 20ml

(b) pH 7.4のリン酸緩衝液: リン酸1カリウム(KH_2PO_4) 9.0gとリン2ナトリウム($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 95.4gを5lの水に溶解する。使用に当たり、この溶液1l当り、酢酸カルシウムCa(CH_3COO) $_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.04g加える。これはアクチナーゼの活性化のためである。

(c) アクチナーゼ: 科研化学製のアクチナーゼ(アク



I-3-2)-図1. 酵素分析による乾物, 有機物の分画

チナーゼE)を用いる。

(d) アクチナーゼ溶液：上記 pH 7.4 のリン酸緩衝液に 0.02% (W/V) の割合でアクチナーゼを溶解 (1 l の緩衝液に 200mg のアクチナーゼ) する。この溶液は使用直前に調製する。1 試料の処理につき、約 50ml が必要である。

(e) アセトン：1 級のものでよい。

(f) アルミ皿+濾紙：アルミ皿に濾紙 (No.5A, 12.5cm の径のものでよい) を入れ、135℃ で 2 時間乾燥し、秤量しておく。

(g) ルツボ：カラシルツボを 600℃ で 2 時間焼き、秤量しておく。

(h) 50ml 容の透明のポリスチロールサンプルビン、幅広のゴムバンド (自転車の古チューブを 7-8mm の幅に切ったものでよい)、サッカーと吸引びんの一式、乾燥機、電気炉、振とう培養器 (40℃ にセット)、ホットプレートなども準備しておく。

(3) 方法

(a) デンブンを含む試料についての処理

試料 0.5g を 100ml 寛容の三角フラスコに採取し、水 20ml を加える。ホットプレート上でデンブンの糊化を行う。煮沸状態になればこの操作を終了してよい。冷却後、20ml 容の α-アミラーゼ溶液を加え、アルミ皿でシールした後、40℃ の振とう培養器中で 16 時間のデンブ加水分解を行う (夕方 5 時にセットすると翌朝 9 時に次の操作に移れる)。残渣は No.5A の濾紙にて濾過し、2-3 回水洗した後、夕方まで放置する。

次に洗浄ビンからアクチナーゼ溶液を残渣に吹きつけて、それを 50ml のポリスチロールサンプルビンに洗い込み、ビンの栓をする余裕を残してアクチナーゼ溶液を滴した後、栓をし、さらにゴムバンドでおさえ (十字にたすきがけをすると安全)、40℃ の振とう培養器中で 16 時間、今度は蛋白質の分解を行う。

分解後、今度はあらかじめ恒量を測定してある濾紙に残渣を濾過し、水で 3-4 回洗浄し、更にアセトンで 2-3 回洗浄する。

ロート上でアセトンを飛散させた後、濾紙と残渣をアルミ皿に戻し、135℃ の乾燥器中で 2 時間乾燥し、秤量する。ここで得られた残渣量が CW の含量であるが、次に濾紙と残渣をあらかじめ恒量を測定してあるルツボに入れ、ヒータ上で予備灰化した後、600℃ の電気炉で 2 時間灰化し、秤量して CW 中の灰分含量を測定する。CW の含量から CW 中の灰分含量を差引いて得られるのが OCW の含量である。

OCC の含量は有機物の含量から OCW の含量を差引くことによって求められる。

(b) デンブンを含まない試料についての OCW の定量

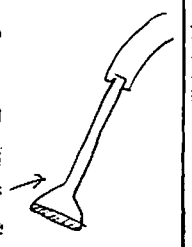
牧草、牧草サイレージ、油粕類、また多くの消化試験の糞など (穀実を含む飼料を給与したときの牛糞は除く) のデンブンを含まない試料では 0.5g の試料を直接 50ml 容のポリスチロールサンプルビンに採取し、アクチナーゼ溶液を加えるところからスタートする。その後操作は a) の場合と全く同様であるが糞の場合、また、油粕類の場合には処理後の濾過が非常に困難であるので、これらの場合には攪拌器を用いるとよい。

すなわち、処理後のポリスチロールサンプルビンの内容物を 200ml 容のビーカに水であけ、ビーカを水で満たして、翌朝まで放置する。次に濾過板付きのガス噴射管で上清液を吸引除去し、その残部を濾紙に濾過するとよい。

(4) 留意点

(a) 分析点数：デタージェット分析のように繊維の煮

1 回目
アミラーゼ
デンプン
糊化除去
水
2 回目
アクチナーゼ
蛋白質
除去
3 回目
洗浄
脂肪除去
4 回目
Cell Wall
秤量
5 回目
灰化
Cell Wall の
灰分秤量



沸台の敷しか処理できないということはなく、一度に多数のサンプルが処理できる。

(b) 酵素類はいずれも冷蔵庫に保存する。

(c) 穀類を原料とした製造粕類（フスマ、コーングルテンフィールド、ビール粕等々）、配合飼料、ホールクロシツサイレージは必ず α -アミラーゼ前処理を施さねばならない。この操作を除くと、汙過操作が困難（多くは不能）であるばかりでなく、CW量を過大評価してしまう。NDF定量の場合も全く同じである。

(d) デンプン含有試料への混合酵素利用：デンプンを含む試料について、 α -アミラーゼとアクチナーゼの両酵素を混合処理し、1回の処理で済ませてしまおうとする試みが古賀ら¹¹⁾によって検討されている。

表1には緩衝液の種類、pHとアミラーゼ、アクチナーゼのデンプン、蛋白分解能を示してある。

デンプン（ジャガイモ）と大豆粕の1：1の混合物に対してはpH5.8の酢酸緩衝液（1l中に酢酸0.42g、酢酸ナトリウム $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 12.64gを溶解、さらに酢酸カルシウムを0.004g加える）が最も高い乾物分解率と、蛋白質の除去率を示している。

このときの酵素の濃度（添加量）は、1サンプル(40ml)あたり、 α -アミラーゼが1mg、アクチナーゼが10mgである。糊化後に加える20mlの酵素液にさらにアクチナーゼを10mg加えることになる。

表2には、トウモロコシサイレージについて、2段階法と混合酵素系でのOCW定量値の比較を示してある。

両方の差は平均で1%程度であり、混合酵素法が少し高い値を示す傾向にある。多くの試料について検討されねばならないが、利用可能な方法であると考えたい。

(5) 栄養的な性質

(a) OCCの組成とその栄養的均一性

OCWの栄養的な性質については、後述するので、こ

I-3-2) 表2・トウモロコシサイレージにおける2段階法と混合酵素処理法との比較 %DM

試料	混合酵素法	2段階法
A	48.4	46.1
B	42.6	42.6
C	51.3	50.0
D	45.6	45.1
E	52.7	51.8
F	56.6	54.8
平均	49.5	48.4

(古賀ら)

こではOCCの性質の一部を紹介する。

表3には多くに飼料（乾草、サイレージ、混合飼料）の種・山羊における消化試験で得られた成分含量と可消化量の関係を示す。

OCCの成分はOCC中の粗蛋白質（CP）と粗脂肪及びNCWFEの3つであるが、ともに含量と可消化量の間には高い相関関係がみられる。つまり、栄養的に均一な性質を持つということができ、OCCの場合には、その真の消化率が104%、つまり100%であることを示している。

OCC中CP、粗脂肪そしてNCWFEも、真の消化率は100%に近い値であり、その回帰定数はそれぞれ2.8、1.1そして2.4である。この式における回帰定数はその成分の代謝性物質の量を表わす。つまり、OCC中のCPの場合、100gの乾物摂取量あたり、2.8gの代謝性OCC中CPが排泄されるという意味である。

表4には、実際に測定された各成分の排泄量を示す。

これは、オーチャードグラス・赤クローバの混ばん乾草に種々の飼料を混合して、種羊に給与した時のデータ

I-3-2) 表1. 緩衝液、pHの相違と α -アミラーゼ、アクチナーゼ及び α -アミラーゼ、アクチナーゼ混合酵素のデンプン、蛋白質分解能

酵素対象	リン酸緩衝液				酢酸緩衝液				
	7.4	7.0	6.4	5.8	5.4	5.8	5.4	5.0	4.4
デンプン									
α -アミラーゼ	99.5	99.7	99.9	99.9	100.0	99.1	100.0	100.0	100.0
デンプン・大豆粕混合（1：1）									
α -アミラーゼ	85.2 [※]	85.2	85.0	83.6	84.3	87.9	87.7	86.0	82.7
アクチナーゼ	(36) [※]	(35)	(35)	(41)	(40)	(14)	(18)	(26)	(58)

※乾物の分解率 () : 残存粗蛋白質 mg/tube

(古賀ら)

I-3-2) 一表3. OCCおよびOCC中成分の含量と可消化量との関係(緬山羊)

成分	n	r	回帰式
OCC	63	0.992	$y = 1.044x - 8.3$
OCC中CP*	12	0.998	$y = 1.001x - 2.8$
粗脂肪*	12	0.991	$y = 1.020x - 1.1$
NCWFE*	12	0.999	$y = 0.978x - 2.4$

*: 表4の試料 x: 成分%DM
y: 可消化量%DM (阿部ら)

I-3-2) 一表4. OCC, CPおよびOCC中成分の緬山羊による乾物100g摂取量当りの糞中への排泄量

試料	粗蛋白質(CP)	OCC	OCC中成分		
			粗蛋白質	粗脂肪	NCWFE
乾草単飼(A)	4.6	6.2	2.4	1.3	2.7
(A)+大豆粕	4.4	5.9	2.4	1.0	2.4
(A)+綿実粕	6.4	6.4	2.7	0.9	2.9
(A)+アマニ粕	5.6	6.9	2.9	1.1	2.9
(A)+フスマ	4.0	5.9	2.2	0.8	2.9
(A)+コーングルテンフィード	4.6	6.3	2.6	0.8	2.9
(A)+大麦DGS	5.9	7.7	3.3	1.0	3.5
(A)+大麦コーンDGS	5.6	7.4	3.2	1.0	3.2
(A)+デンブ(8%)	4.9	7.1	2.9	1.3	3.0
(A)+デンブ(16%)	5.1	7.7	2.9	1.4	3.3
(A)+デンブ(24%)	5.1	7.5	2.9	1.5	3.0
(A)+デンブ(32%)	4.6	7.3	2.7	1.2	3.2
平均値	5.1	6.9	2.8	1.1	3.0
(SD)	(0.7)	(0.7)	(0.3)	(0.2)	(0.3)

DGS: ジスチラーズ・グレイン・ソルブル (阿部ら)

である。

蛋白質のレベルが増加しても、又、デンブンを添加してそのレベルを低くしても、OCC中のCPの排泄量には変動が少なく、回帰式で得られた値と近似している。

3) 酸性デタージェント繊維とリグニン定量

(1) 原理

1Nの硫酸溶液に界面活性剤を溶解した処理液と試料を煮沸することにより、まず界面活性剤の作用で前項の

CW定量でみられたと同様にCC成分(蛋白質、単少糖、デンプン、有機酸、脂質等)の溶液中への分散が起こり、ついで、それが酸で分解されると同時にCW中のヘミセルロース、セルロースも加水分解を受ける。このとき、ヘミセルロースのかなりの部分は加水分解を受け流出するが、セルロースの結晶領域は抵抗性を示す。リグニンの一部も除去される。従って、この処理での残渣として得られるものの主成分は有機物ではリグニンとセルロースであり、無機物ではケイ酸が残っている。この処理残渣の有機物部分を酸性デタージェント繊維(Acid detergent Fiber, ADF)とする。

酸性デタージェント処理残渣の内容につき牧草を供試して得られたCOLBURNとEVANSのデータ¹²⁾を表1に示した。

セルロースとリグニンを主体とするところからADFを別名リグノセルロースと呼ぶこともある。

次にリグニンを定量する場合には上で得られた残渣を72%の硫酸で処理する。この操作で、セルロースは完全に加水分解除去され、リグニンが残渣として得られるので、これを定量する。これを一般的にADFリグニンと呼んでいる。

(2) 試薬等の準備

(a) 酸性デタージェント溶液(Acid detergent 溶液, AD溶液): 1lの1N硫酸(濃硫酸, 98%, 51gを水で1lとする)に20gの臭化セチトリメチルアンモニウム(Cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)を加え、ヒータ上で加温しながら溶解する。

(b) デカリン: デカヒドロナフタレン(デカリン)をそのまま使用する。消泡剤である。

(c) 72%硫酸: 1lのピーカに水を333ml入れ、水中で冷却しながら濃硫酸667mlを静かに加える。冷却後、比重計を用い、比重が1.6338になるように水、または濃硫酸で調整する。

(d) アセトン: 1級のものでよい。

(e) アルミ皿+濾紙: アルミ皿にNo.5Aの濾紙(径12.5cmのもの)を入れ、135℃で2時間乾燥し秤量しておく。

(f) ルツボ: カラルツボを600℃で2時間焼き、秤量しておく。

(g) グラスフィルター: 1G-2を用いる。135℃で2時間乾燥し、秤量しておく。使用に際しては、自転車チューブをかぶせた適当なホルダー(吸引ピンに装着)にさしこんで用いる。

(h) ゲーチルツボ+ガラス濾紙: ゲーチルツボにガラス濾紙を入れ、500℃で2時間焼き、秤量しておく。

I-3-3) 一表1. 酸性デタージェント処理残渣の内容

試料	セルロース	リグニン	灰分	N×6.25	その他
オーチャードグラス	80.6	9.2	2.2	2.9	5.1
チモシー	76.1	6.9	2.9	1.8	12.3
アルファルファ	79.2	14.4	6.9	4.0	1.5
混ばん草	83.1	14.9	1.0	3.3	-

(COLBURN ら)

(i) その他：粗繊維煮沸台、乾燥器、電気炉、サツカーおよび吸引ピンなどを用意しておく。

(3) 方法

(a) ADFのみを定量する場合

試料 1 g を 500ml 容のトールピーカに採取し、AD 溶液 100ml とデカリン数滴を加える。粗繊維煮沸台上で 1 時間煮沸し静かに還流する程度に加熱し、あらかじめ恒量を測定してある濾紙にて濾過する。水で 6~7 回よく洗った後、さらにアセトンで 3~4 回洗浄する。ロート上でアセトンを飛散させた後、135℃の乾燥器中にて 2 時間乾燥し、秤量する。ここで得られる残渣は ADF とケイ酸である。次に残渣と濾紙をあらかじめ恒量を測定してあるルツボに入れ、ヒータ上で予備灰化した後、600℃の電気炉内で 2 時間灰化し、秤量して灰分(ケイ酸)の量を求める。先に測定した値からこの灰分の量を差し引き、AD 溶液による処理残渣有機物を ADF とする。

(b) ADF、リグニン、ケイ酸を連続して定量する場合

a) の場合と全く同様にして 1 時間煮沸した後、残渣を軽く吸引しながらガラスフィルターで濾過する。

水で 6~7 回よく洗浄してからさらにアセトンで 3~4 回洗浄し、135℃の乾燥器内で 2 時間乾燥し、秤量する (A)。次に、ガラスフィルターを 100ml 容のピーカ中に入れ、フィルターの残渣に 72% 硫酸を 20ml 加える。ガラス棒 (10cm 位の細いものを用意し、各フィルターの中に 1 本ずつ入れておく) にて固まりをつぶして硫酸とよく混和させ、その後も 30 分に 1 回程度の割合で攪拌しながら室温にて 4 時間放置する。この際フィルターの底部から硫酸がピーカ中に浸出するが、気をつけて見おき、その量が多い場合にはフィルター中にもどしておく。

次に、ガラスフィルターおよびピーカの内容物を 500ml 容のトールピーカに水で洗いこみ (フィルター内の濾過板には強く水を吹きつけ残渣を落とす)、液量を約 400ml とした後、粗繊維煮沸台上で 10 分間静かに煮沸してセルロースの加水分解を終了する。このとき、煮沸台上のクーラは不要である。

その後、水でピーカを満たし、1 夜静置して残渣を沈降させる。次に NDF のところで述べた濾過板付きのガス噴射管にて上清液を吸引除去し、ピーカ底部の残渣をあらかじめ恒量を測定してあるグーテルツボにて吸引濾過する。この際、ルツボ中のガラス濾紙は吸引しながら水でよくルツボに密着させ (指でおしつけながらやるとよい)、その後、濾過を開始する。残渣は水で 4~5 回洗浄した後、135℃の乾燥器中で 2 時間乾燥し、秤量する (B)。ここで得られた残渣の量 (B) はリグニンとケイ酸の含量である。次に、ルツボと残渣は予備灰化することなしに直接 500℃の電気炉に入れ (煙が出るので電気炉は最初すこしあけておく)、2 時間灰化して秤量しケイ酸の含量 (C) を求める。(A) より (C) を差し引いて ADF の含量を求め、(B) より (C) を差し引いてリグニンの含量を求める。

(4) 留意点

(a) 灰分の補正について

VAN SOEST の原著においては、AD 溶液中での処理残渣をそのまま ADF としている。従ってこの中には灰分が含まれている。しかし、著者は NDF のところで述べたと全く同じ理由で灰分を差し引いた形で ADF の含量を示している。ここでは、灰分の補正の有無とその定量値および消化率などについての比較を表 2~4 に示した。この問題における検討の材料としていただきたい。

AD 溶液処理残渣中の成分は先に述べたように、ケイ酸であるから、飼料中のケイ酸含量がゼロかまたは極く少ない場合には、灰分補正の有無によって、その定量値は大きな相異を示さない。そして、それは表 2 において観察される。

しかしながら、表 3 にみられるように、モミガラ、大麦サイレージ、稲ワラ、暖地型牧草のようにケイ酸の含量が多いものでは、灰分の補正の有無についてその定量値が大きく異なってくる。

また、消化試験の結果を表 4 についてみると、ケイ酸は不消化であるところから、それがほぼ全量 (後述) 糞中に排泄され、その結果、灰分無補正の ADF 定量値は

I-3-3) 一表2. 灰分補正の有無と ADF の定量値

(配合飼料原料, 配合飼料)

%DM

試料	補正せず	補正	灰分	試料	補正せず	補正	灰分
大豆粕	9.1	9.2	0.1	中すう用	7.7	7.6	0.1
やし粕	30.2	30.0	0.2	成鶏用	4.9	4.8	0.1
綿実粕	28.7	28.5	0.2	肉豚用	8.5	8.1	0.4
サフラワー粕	39.9	39.4	0.5	子豚用	5.0	4.9	0.1
フスマ	14.4	14.4	0.0	種豚用	8.0	7.8	0.2
脱脂米ヌカ	13.4	13.1	0.3	乳牛用	15.0	14.3	0.7
配合飼料							
幼すう用	6.0	5.8	0.2				

(阿部ら)

I-3-3) 一表3. 灰分補正の有無と ADF の定量値

(農産廃棄物, 牧草, 飼料作物, サイレージ)

%DM

試料	補正せず	補正	灰分	試料	補正せず	補正	灰分
				クレインソルガムサイレージ			
バガス	55.4	54.5	0.9	糊熟期	36.0	31.3	4.7
コーンコブ	48.8	46.4	2.4				
モミガラ	76.9	53.4	23.5				
スィートソルガム				オーチャードグラス			
乳熟期	46.9	44.3	2.6	出穂前	27.5	26.6	0.9
糊熟期	41.1	38.1	3.0	出穂期	30.1	29.3	0.8
とうもろこしサイレージ							
				ローズグラス			
糊熟期	25.7	24.6	1.1	1番草	39.3	36.9	2.4
黄熟期	23.6	22.4	1.2	2番草	42.4	39.6	2.8
				3番草	40.4	35.5	4.9
大麦サイレージ				稲ワラ	56.5	39.8	16.7
開花期	39.7	34.9	4.8	アルファルファ			
糊熟期	31.5	27.8	3.7	開花期	39.0	38.9	0.1

(阿部ら)

補正值に比して大きな値を示す。そのために灰分無補正の ADF の消化率はより低い消化率を示すという結果になり、これは NDF のところでみた傾向と同様である。

しかしながら、可消化量については両者間でほとんど差はみられない。

I-3-3) 表4. 灰分補正の有無とADFの消化率・可消化量

%DM or %

試料	家畜	飼料中の含量		糞中の含量		消化率		可消化量	
		A	B	A	B	A	B	A	B
オーチャード グラス乾燥	めん羊	34.9	37.8	32.0	40.5	65.6	59.8*	22.9	22.6
とうもろこし サイレージ	めん羊	28.9	31.3	35.5	41.3	58.8	55.6 N S	17.0	17.4
稲ワラ・乳配 混合飼料	ヤギ	21.8	28.0	31.2	47.4	41.4	30.8**	9.1	8.6

A: 灰分を差引いて求めた ADF, B: 灰分を含む ADF, *糞中含量, 消化率, 可消化量は 3~4 頭の家畜の
 平均値 (阿部ら)

(5) ADF リグニンの学養学的性質

リグニンはフェニルプロパン骨格の 3 位または 5 位 (あるいは両方) にメトキシル基の結合した構成単位が複雑に結合した無定形の高分子物質である。植物体中でリグニンはセルロース, ヘミセルロースとともに細胞壁中に沈着し, これらを相互に膠着して植物の骨格を強固にするという役割を果している。

植物の生長が進むにつれてリグニンの含量も増大し, 組織全体が物理的に固くなって来るが, これを一般に木化現象と呼んでいる。

木化現象が進むと, 細胞壁の構造も密になり, 反芻胃微生物によるセルロース, ヘミセルロースの分解能が低下し, CW の消化率も次第に低くなって来る。

表 5 には, 同一圃場で生育時期, 番草を違えて調整したオーチャードグラス乾草の CW 消化率とリグニン, ケイ酸の含量を示してある。

ここで, CW 消化率と乾物中のリグニン含量 (ADF リグニン) 含量との間には -0.91 の, そして CW 消化率と CW 中のリグニン含量との間には -0.93 のともに有意 ($P < 0.01$) な相関係数が得られる。

今, CW 中のリグニン含量を $x\%$, CW 消化率を $y\%$ とすると, 両者の間には

$$y = 99.7 - 4.8x$$

という回帰式が得られる。すなわち, オーチャードグラスの乾草の例では, CW 中のリグニン含量が 1% 増加するたびに CW の消化率が 4.8% 低下するということが示されている。このようにリグニンの含量は CW の消化率を規制する大きな要因である。

また, リグニンそれ自体は (表 5 ではリグニン+ケイ酸の形で示した), 消化試験における糞中への回収率が平均して 97% とほぼ 100% に近く, ほとんど消化されない物質と考えてよい。

表 6 には油粕類のリグニン含量と CW のインビトロ (第一胃内容液での試験) 消化率を示したが, この場合にもリグニン含量の増加とともに CW の消化率が低下し, CW 消化率と CW 中のリグニン含量の間には $-0.93CP < 0.01$ の相関係数が計算される。

(6) ADF リグニンの問題点

リグニンの定量法として最も一般的に用いられているのが 72% 硫酸法であるが, この方法は元来, 木材化学の

I-3-3) 表5. オーチャードグラスの CW 消化率, リグニン, ケイ酸の含量と消化試験における回収率

試料	リグニン含量	ケイ酸含量	CW 消化率	リグニン+ケイ酸の回収率
1 番草 早刈	2.9	1.7	69.4	116
〃 中 刈	3.5	2.3	71.5	92
〃 遅 刈	6.0	3.4	54.8	89
2 番草 早刈	4.4	3.3	65.1	101
〃 中 刈	4.3	2.9	63.7	95
〃 遅 刈	5.4	3.6	60.4	102
3 番草 中刈	4.2	2.5	69.9	86

(阿部ら)

1-3-3) 一表6. 油粕類のCW消化率 (In vitro) とリグニン含量

試料	リグニン含量	CW消化率
大豆粕	0.3	88.1
ヤシ粕	5.6	84.1
サフラワー粕	14.8	25.2
綿実粕	11.5	34.3
カボック粕	24.8	12.1
ラッカセイ粕	3.8	41.9
アマニ粕	6.6	49.3

(阿部ら)

分野で開発された手法であり、その場合には試料中の蛋白質含量は一般的に問題にならないくらい低い。

しかし、リグニン測定の対象となる飼料ではその蛋白質含量が5~20%程度である。

蛋白質は72%硫酸処理の過程で、変性し処理残渣として定量され、リグニン定量値を過大にするといわれている。

そのために、72%硫酸法を飼料分析に応用する段階で、これをあらかじめ除く処理としてペプシン消化が採用された。

しかし、VAN SOEST¹³⁾は、AD溶液での前処理が試料窒素の除去に有用であり、かつまた、短時間での処理、ADFとの連続定量が可能である等の理由から、AD溶液処理、72%硫酸処理の連続定量法を提案し、ADFリグニンはそれ以来、世界的に広く用いられてきている。

しかし、PORTER¹⁴⁾によって、AD溶液のリグニンに対する影響が検討され始めて以来、我が国でも近藤ら^{15,16)}が一連の研究を展開して、ADFリグニンの性質を見極めている。

ここでは、近藤らのデータを紹介しながらリグニン含量に対するAD溶液の影響をみることにしよう。

表7には72%硫酸リグニンの収率及びリグニン標品に対するAD溶液の影響を示してある。実験は以下のように行われている。つまり、アクチナーゼ処理で試料の細胞壁(CW)を抽出し、それに対して72%硫酸処理を施して定量したリグニンとCWをAD溶液で処理後、その残渣を72%硫酸処理に付してリグニンを定量した場合の比較である。

酸可溶リグニンは72%硫酸処理液の紫外部吸収により求められたものである。

表に示される通り、CW中のリグニン含量は無処理(アクチナーゼ・72%硫酸法)に比してAD溶液区はすべての試料で低く、特にイネ科牧草でそれが顕著であることがわかる。

また、リグニン標品というのは、ジネキサンによって抽出されたリグニン単体であるが、AD溶液によって、イタリアンライグラスでは52%、そしてアルファルファでは34%のリグニンがAD溶液処理で流出することが示されている。

その事実、つまりADリグニンは全リグニンを示すものではなく、過少評価している性質のものであることを多くの試料によって確認したものを表8に示してある。

ここでもやはり、イネ科で過少評価の程度が大きく、アルファルファではその程度が小さいといえることができる。

1-3-3) 一表7. 72%硫酸リグニンの収率およびリグニン標品に対するAD溶液(酵性デタージェント溶液)の影響

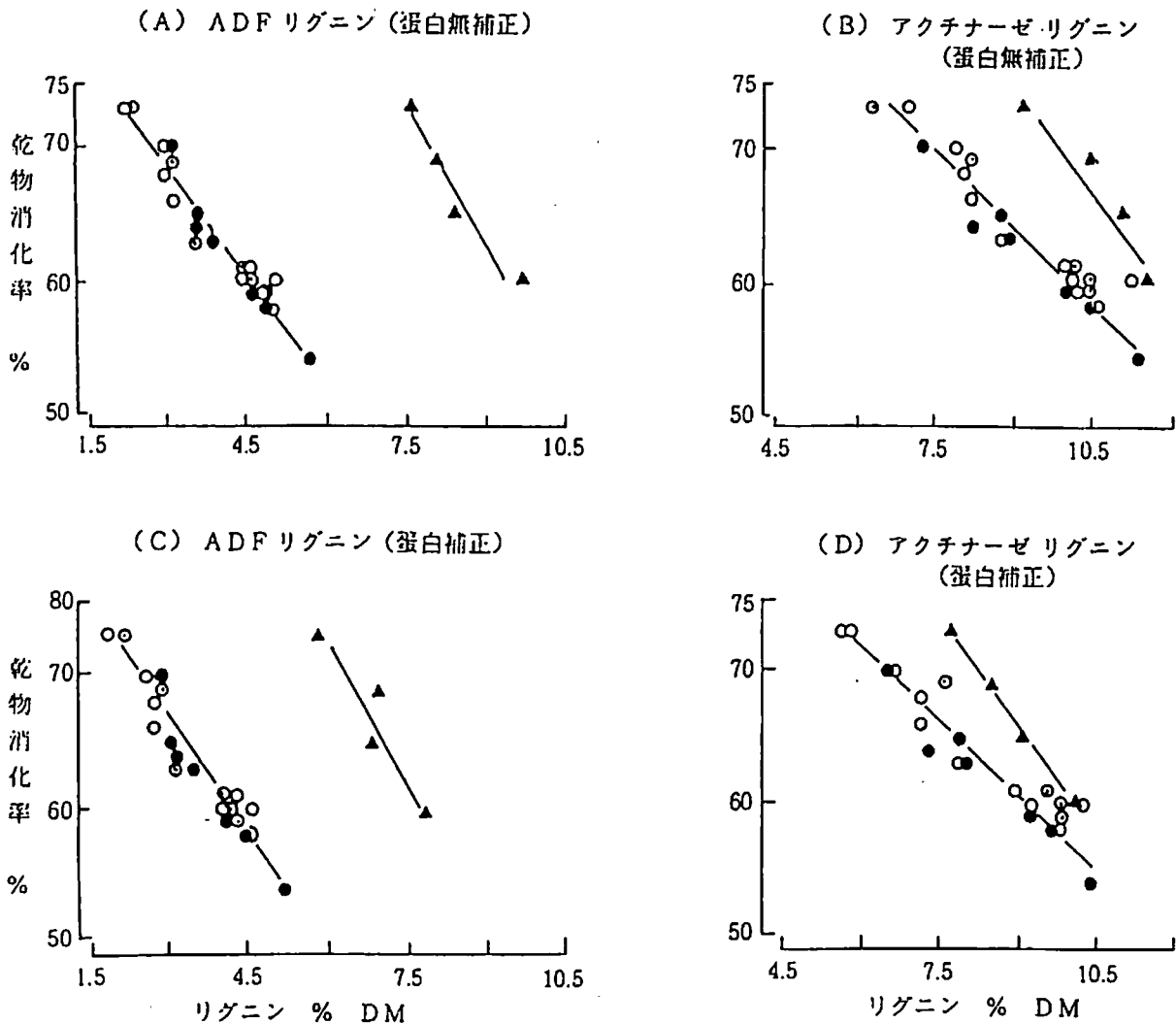
試料	AD溶液処理				無処理		
	72%硫酸リグニン	酸可溶リグニン	全リグニン	リグニン損失	72%硫酸リグニン	酸可溶リグニン	全リグニン
細胞壁物質 (CW に対する%)							
イタリアンライグラス	7.8	0.5	8.3	52	15.4	1.8	17.2
オーチャードグラス	5.3	0.3	5.6	61	12.1	2.3	14.4
アルファルファ	15.6	0.6	16.2	15	17.5	1.5	19.0
赤クローバ	9.9	0.4	10.3	23	11.6	1.7	13.3
リグニン標品							
イタリアンライグラス				52			
アルファルファ				34			

(近藤ら)

I-3-3) 表8. AD 溶液およびアクチナーゼ前処理とリグニン含量及びリグニン中の窒素含量

試料	n	%DM or リグニン											
		ADF リグニン			アクチナーゼリグニン			N・ADF リグニン		N・アクチナー ゼリグニン			
		平均	最大	最小	平均	最大	最小	平均	SD	平均	SD		
イタリアンライグラス	8	4.3	5.7	3.2	9.5	11.4	7.3	1.8	0.3	1.5	0.3		
オーチャードグラス	8	3.8	5.1	2.2	9.1	11.2	7.1	2.0	0.6	1.8	0.6		
ベレニアルライグラス	6	3.8	4.8	2.3	9.1	10.5	6.2	1.5	0.2	1.1	0.2		
イネ科草	22	4.0	5.7	2.2	9.3	11.4	6.2	1.8	0.5	1.5	0.5		
アルファルファ	4	8.5	9.7	7.6	10.6	11.7	9.2	3.0	0.6	2.7	0.3		
全草種	26	4.7	9.7	2.2	9.5	11.7	6.2	2.0	0.7	1.7	0.6		

(近藤ら)



I-3-3) 図1. AD 溶液及びアクチナーゼ溶液前処理によって定量 1 / リグニン含量と乾物消化率 (緬羊) との関係 (近藤ら)

●イタリアンライグラス, ○オーチャードグラス, ◎ベレニアルライグラス, ▲アルファルファ

NDFは Nが多、構造性炭水化物は低付

表8に用いられた試料はすべて綿羊による消化試験が実施されているところから、アクチナーゼ前処理とAD溶液前処理の2つの方法によって定量されたリグニンと乾物消化率の関係を図1に示してある。

ここでは、リグニン中の蛋白質を補正した場合としない場合の2つに分けてある。

イネ科牧草およびアルファルファでそれぞれにリグニン含量と乾物消化率には負の有意な相関係数($r > 0.95$)が得られるが、図にみられるようにAD溶液処理は同じ乾物消化率で比較したときのイネ科牧草とアルファルファ間のリグニン含有率の差を過大に評価する結果を持たずという形になっている。つまり、ADFリグニンの含量から全ての草種で一律に乾物消化率を規定することは不可能であることを示している。

しかし、イネ科牧草、アルファルファと区分した場合には、消化率の規制要因の指標としてのADFリグニンの価値は十分に評価できる。

リグニンの総量を測定する場合にはアクチナーゼ、72%硫酸の連続処理が有用であろう。

4. 細胞壁物質の相互関係

1) 総繊維表現形としてのOCWとNDFとの比較

試料中の総繊維含量を表現するOCWとNDFの関係はどのようなものであろうか。表1には乾草、サイレージ、配合飼料等のNDFとOCWの含量、両分画中の粗蛋白質と構造性炭水化物の含量および綿羊での消化率を示してある。

総繊維分画上、重要なことはCC成分である粗蛋白質を分析処理によってより多く除去すること、そして、逆

に構造性炭水化物、リグニンの回収率を高く維持することである。

乾草およびサイレージの場合、総繊維含量では両者に大きな差はないものの、中性デタージェント法では試料窒素の除去率が酵素法よりも低く、逆に、構造性炭水化物の含量ではOCWが高い値を示している。そして、この傾向はビートパルプの場合にさらに顕著に示されている。

総繊維定量の基本視点からみた場合、酵素法が中性デタージェント法よりも優っているといえることができる。

消化率の比較ではNDFがOCWよりも高い傾向を示す。

表2には稲ワラについて、中性デタージェント法と酵素法のより詳しい比較を行ったときの結果を示してある。CW含量では酵素法が中性デタージェント法に比較して8.8%高い値を示している。その差はケイ酸(3.0%)、リグニン(2.1%)そしてヘミセルロース(3.0%)に求められる。

中性デタージェントの処理により、細胞壁中のリグニン、ヘミセルロースの一部、そして細胞壁と近接するケイ酸の一部が溶脱しているという結果である。

さらに、CWをセルラーゼで分解すると、中性デタージェント法で抽出されたCWの消化率、可消化量が、酵素法に比較して高い値である。中性デタージェントによって、細胞壁の構造が一部、破壊されたと考えるのが妥当であろう。

2) NDF, ADF, 粗繊維(CF)の比較

非常に長い期間、飼料中の繊維は粗繊維(CF)の形で示されてきた。

しかし、表3に示すように、CFは総繊維たるNDF

I-4-表1. NDFとOCWの組成と消化率の比較

%DM or %

試料	総繊維含量		総繊維中CP		総繊維中StC		総繊維消化率	
	NDF	OCW	NDF	OCW	NDF	OCW	NDF	OCW
チモシー乾草	63.4	65.6	3.3	1.7	55.2	59.0	70.2 ^A	66.5 ^B
オーチャードグラス乾草	57.4	57.0	7.2	2.4	46.1	50.5	66.4 ^A	59.0 ^B
アルファルファキューブ	50.0	49.3	6.9	2.5	34.7	38.4	47.1 ^A	37.6 ^B
トウモロコシサイレージ	47.4	48.6	1.3	1.1	43.2	44.6	58.9 ^a	53.1 ^b
混合飼料	36.2	39.6	1.5	1.4	31.2	34.8	38.6	33.7
配合飼料	21.5	22.4	4.6	2.5	13.7	16.7	62.2 ^a	50.1 ^b
ビートパルプ	55.4	67.1	9.1	2.7	44.4	61.7	86.0	88.2

混合飼料：稲ワラ37%、配合飼料63%、StC：構造性炭水化物

A, B: $P < 0.01$ a, b: $P < 0.05$

(阿部ら)

I-4-表2. 稲ワラの中性デタージェントとアクチナーゼ(酵素法)で分離したCWの含量、組成、セルラーゼ消化率の比較

	%DM or %	
	中性デタージェント	酵素
CW 含量	74.5	83.3
セルロース	37.6	38.4 +0.8
ヘミセルロース	15.8	18.8 +3.0
リグニン	11.3	13.4 +2.1
ケイ酸	7.7	10.7 +3.0
粗蛋白質	2.1	2.0 -0.1
セルラーゼ可消化量(消化率)		
15分	4.5(6)	2.1(3)
30分	6.3(8)	1.3(2)
60分	7.4(10)	2.1(3)
120分	8.8(12)	2.7(3)

(芹沢ら)

の一部の構成成分にしか過ぎない。

繊維についての議論をする場合、やはり、試料中の繊維の総量を先ず把握し、それについて化学特性、消化特性の評価が行われるべきである。

歴史的にみると、CFに代わるものとしてADFがまず開発された。繊維の指標としてはCFよりも定量が簡易であり、TDN、乾物消化率との相関も高いということで、急速に世界中に浸透した。

現在はNRC、日本の飼料成分表にも取り上げられている。

牧草、飼料作物類の場合、ADFとCFの差はみかけ上、リグニンの含量に等しい。

ADFは結晶性のセルロースとリグニンを主体とし、CFは結晶性のセルロースを主体とするからである。それは表3のデータをみると理解できる。

NDF、ADF、CFの消化率の比較を表3に示してある。

イネ科牧草、トウモロコシサイレージではNDFとADFの消化率はほぼ等しく、両者に比してCFが高い値である。

I-4-表3. NDF, ADF, CFの含量と消化率の比較(緬羊)

%DM or %

試料	含 量				消 化 率			
	NDF	ADF	CF	リグニン	NDF	ADF	CF	リグニン
チモシー牧草	63.4	37.5	32.4(51)	4.9	70.2	67.9	72.1	13.2
オーチャードグラス乾草	57.4	34.9	29.7(52)	4.1	66.4	65.6	70.7	-4.0
アルファルファキューブ	50.0	37.1	30.4(61)	8.4	47.1	44.5	40.7	7.0
トウモロコシサイレージ	47.4	28.9	23.9(50)	2.9	58.9	58.8	63.4	3.9
混合飼料	36.2	21.8	17.5(48)	3.4	38.6	41.4	44.5	-1.2
配合飼料	21.5	10.0	6.0(28)	3.2	62.2	48.0	47.7	2.8
ビートバルブ	55.4	28.6	20.8(38)	2.7	86.0	80.6	82.9	-3.9

混合飼料：稲ワラ37%、配合飼料：63%、()：CF/NDF×100

(阿部ら)

しかし、アスファルファではCFが最も低い値で、イネ科牧草とは異なった性質である。

ビートバルブの各繊維の消化率が非常に高いということも同時に注目される。

3) 種々の試料における各種繊維分画含量

表4～表11には、各種試料のOCW、NDF、ADF、CFの含量を示す。多くの粗飼料と呼ばれるグループの場合、

先に述べたような組成に相異があるものの、総繊維の見かけ上の値としては、OCWとNDFは近似しているが、製造粕類等の中には、その値が異なるものも散見される。

さらに表12～13には相互換算の際に利用すべきものとして、ADFとOCW、CFとADFの含量間の回帰式を示してある。

I-4-表4. イネ科牧草の各種繊維含量
(乾草)

試 料	%DM			
	OCW	NDF	ADF	CF
イタリアンライグラス・出穂前	51.7	52.7	29.7	25.8
〃 ・ 出穂期	57.5	56.6	34.2	28.6
〃 ・ 開花期	67.9	67.9	42.9	33.0
チモシー・伸長期	49.4	53.0	26.0	22.3
・ 出穂	63.4	63.7	37.2	32.5
・ 開花	66.1	65.5	38.9	34.1
オーチャードグラス・出穂前	47.2	49.0	26.6	23.5
・ 出穂始	56.2	57.4	33.0	29.7
・ 出穂後～開花	65.3	64.2	39.3	33.6
トールフェスク・出穂	61.5	62.8	37.0	31.7
ローズグラス・出穂前	58.2	59.0	34.9	30.5
・ 出穂期	63.2	63.6	37.7	33.8
スーダングラス・出穂後	73.4	69.1	44.7	35.9

(阿部ら)

I-4-表5. アルファルファの各種繊維含量

試 料	%DM			
	OCW	NDF	ADF	CF
アルファルファ乾草				
開花前	47.6	42.4	32.2	24.3
開花期	52.3	46.1	37.3	31.5
開花後	54.5	48.4	38.3	31.9
アルファルファキューブ A	60.2	52.5	41.0	33.3
B	51.5	42.0	31.9	27.8
C	46.6	36.4	30.2	24.6
アルファルファベレット	48.5	45.6	31.3	24.3

(阿部ら)

I-4-表6. ワラ・稗類の各種繊維含量

試 料	%DM			
	OCW	NDF	ADF	CF
稲 ワラ A	70.6	69.8	42.3	35.6
B	68.8	67.5	42.4	34.6
小麦 ワラ	77.3	73.4	44.2	33.6
大麦 ワラ	83.6	—	54.5	—
エン麦 ワラ	87.7	—	56.6	—
大豆 カラ	69.1	64.1	51.7	43.2
アズキ カラ	64.6	63.2	53.6	43.6

(阿部ら)

I-4-表7. トウモロコシサイレージの各種繊維含量 %DM

試料	OCW	NDF	ADF	CF
早生種				
乳熟初期	57.3	55.7	35.9	29.5
乳熟期	51.3	50.5	32.0	25.0
糊熟初期	51.5	49.8	31.9	26.0
糊熟後期	41.8	39.9	24.7	19.9
黄熟初期	40.0	40.8	24.4	19.6
黄熟期	38.4	38.7	22.9	18.1
晩生種				
乳熟期	58.3	55.0	32.0	28.3
糊熟期	49.0	47.7	26.8	23.2

(阿部ら)

I-4-表8. 各種ホールクロップサイレージの繊維含量

試料	OCW	NDF	ADF	CF
ソルガムサイレージ				
開花期	69.4	67.9	46.9	39.0
乳熟期	69.7	69.3	47.4	38.4
糊熟期	63.4	63.5	41.7	32.6
黄熟期	61.0	58.4	38.7	31.2
過熟期	56.2	56.9	38.0	31.5
大麦サイレージ				
出穂期	57.6	59.2	36.9	31.8
〃	52.6	52.6	33.7	27.9
乳熟期	60.6	62.1	41.7	34.0
〃	55.4	56.3	34.9	30.5
糊熟期	40.4	38.8	25.3	24.1
〃	46.1	46.5	28.8	24.1
稲サイレージ				
糊熟期	49.1	48.8	31.1	26.4
黄熟期	42.7	42.9	28.4	23.2
完熟期	43.8	44.3	28.4	22.8

(阿部ら)

I-4-表9. 穀類, 全粒綿実の各種繊維含量 %DM

試料	OCW	NDF	ADF	CF
トウモロコシ A	10.6	8.6	4.1	2.5
B	13.0	13.6	2.9	1.6
C	11.3	12.1	3.1	—
マイロ A	11.8	8.0	5.4	1.9
B	12.2	13.2	4.8	1.3
大麦 A	17.5	16.3	7.3	5.3
B	20.4	21.0	6.7	4.3
小麦	12.9	11.5	3.8	3.0
エン麦	31.7	30.6	14.2	11.3
キャッサバ	9.3	7.3	5.6	3.6
全粒綿実	52.7	53.6	41.1	25.2

(阿部ら)

I-4-表10. 油粕類の各種繊維含量 %DM

試料	OCW	NDF	ADF	CF
大豆粕 A	24.4	13.2	8.5	6.2
B	20.3	12.6	8.7	6.0
ナタネ粕	34.8	35.4	22.7	10.7
カボック粕	53.9	48.0	39.8	24.6
ヤシ粕 A	54.9	62.7	32.4	12.4
B	47.6	59.6	30.0	11.3
綿実粕	45.5	39.2	28.5	16.9
サフラワー粕	58.1	55.2	42.6	35.3
アマニ粕	33.3	24.2	17.8	9.1
ラッカセイ粕	24.4	16.5	13.4	10.1

(阿部ら)

I-4-表11. 製造粕類の各種繊維含量

%DM

試料	OCW	NDF	ADF	CF
フスマ A	40.8	40.3	13.9	10.2
B	43.1	43.0	14.4	9.5
正油粕 A	56.3	46.6	35.9	23.1
B	45.3	38.4	26.6	16.2
脱脂米ヌカ A	30.9	29.5	14.0	11.1
B	28.7	35.6	13.1	8.6
コーングルテンフィード A	35.2	35.9	11.6	9.0
B	53.5	51.3	30.5	10.4
コーングルテンミール	19.1	4.4	1.7	0.4
ビートバルブ A	72.1	56.7	29.1	22.0
B	62.1	49.0	24.4	18.6
ビール粕	63.9	62.3	23.2	12.8
トーフ粕	45.6	47.2	21.0	15.5

(阿部ら)

I-4-表12. アルファルファ, イネ科・混ばん牧草およびトウモロコシサイレージにおける OCW と ADF との関係

試料	n	r	回帰式	Se
アルファルファ	16	0.95	$ADF = 0.930 OCW - 11.0$	1.7
イネ科・混ばん牧草	65	0.95	$ADF = 0.641 OCW - 3.5$	1.9
トウモロコシサイレージ	20	0.91	$ADF = 0.601 OCW - 1.1$	1.8

(阿部ら)

I-4-表13. 乾草, サイレージ, ワラ等の ADF と CF との関係

試料	n	r	回帰式	Se
アルファルファ(キューブ・乾草)	11	0.97 (A)	$ADF = 1.061 CF + 5.0$	1.4
イネ科・混ばん牧草	61	0.98 (B)	$ADF = 1.209 CF - 1.0$	1.3
採豆カラ	8	0.95 (C)	$ADF = 1.266 CF - 0.5$	1.4
大豆カラ	4	0.99 (D)	$ADF = 1.417 CF - 10.3$	2.0
稲ワラ	8	0.98 (E)	$ADF = 1.359 CF - 4.8$	0.6
トウモロコシサイレージ	112	0.97 (F)	$ADF = 1.227 CF + 1.3$	1.0
ソルガムサイレージ	15	0.96 (G)	$ADF = 1.073 CF + 6.0$	1.1
大麦サイレージ	9	0.98 (H)	$ADF = 1.071 CF + 3.5$	1.1

(阿部ら)

I-4-表14. 設定回帰式 (表13) による未知試料のCF値からのADF推定結果

試料	n	使用した回帰式	\bar{D}	r	Se
アルファルファ乾草	10	Ⓐ	1.2	0.97	1.7
小麦ワラ	2	Ⓔ	0.3		
稲ワラ	14	Ⓑ	0.9	0.96	0.7
スーダングラス	1	Ⓑ	0.6		
チモシー乾草	5	Ⓑ	1.0	0.95	1.4
トールフェスク	2	Ⓑ	1.7		
オーチャードグラス	15	Ⓑ	1.3	0.89	1.3
ローズグラス	8	Ⓑ	0.9	0.94	1.2
リードカナリーグラス	10	Ⓑ	1.8	0.74	2.0
イタリアンライグラス	30	Ⓑ	0.9	0.99	1.1
トウモロコシサイレージ	75	Ⓕ	0.9	0.96	1.1
ソルガムサイレージ	16	Ⓒ	1.0	0.87	1.5
大麦サイレージ	13	Ⓖ	1.2	0.54	0.8
メドフェスク	16	Ⓑ	0.9	0.98	1.0
ベレニアルライグラス	12	Ⓑ	1.0	0.97	1.3

\bar{D} : 実測定と推定値の差の平均値

(阿部ら)

5・人工消化試験法

1) 細胞壁物質 (総繊維) のセルラーゼによる分画とその応用

(1) 原理

牧草、飼料作物等の細胞壁を繊維素分解酵素であるセルラーゼを用いて分解し、その分解性の難易によって細胞壁の消化性をみる。

(2) 試薬等の準備

(a) pH 4.0の酢酸緩衝液: 酢酸 (氷酢酸) 24.3g と酢酸ナトリウム $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 12.9g を5 lの水に溶解する。

(b) ヤクルト製のセルラーゼ (セルラーゼオノズカ P-1500, 飼料分析用) を用いる。

この酵素の2倍の力価を持つ同社のセルラーゼ・FAでもよい。

(c) セルラーゼ溶液: pH 4.0の酢酸緩衝液に1.0% (W/V) の割合で飼料分析用セルラーゼを溶解 (1 lの緩衝液に10gのセルラーゼ) する。また、FAを用いるときはその半分の濃度 (0.5%) でよい。1試料の処理につき、約50mlを必要とする。この溶液は使用直前に調製する。

(d) アセトン: 1級のものでよい。

(e) アルミ皿+濾紙: アルミ皿に濾紙 (No.5A, 12.5cm

の径のものがよい) を入れ、135℃で2時間乾燥し、秤量しておく。

(f) ルツボ: カラシルツボを600℃で2時間焼き秤量しておく。

(g) その他: 50ml容の透明ポリスチロールサンプルビン、幅広のゴムバンド (自転車の古チューブを7~8mmの幅に切ったものでよい)、乾燥器、電気炉、振とう培養機 (振とう培養水槽でも可) なども準備しておく。なお、この場合、ガラス製のバイアルビンを用いると便利である。

(3) 方法

Cell wallの定量を終えた後、全く別の実験として、CWの含量が約0.3gに相当する試料量を100ml容三角フラスコ、バイアルビンまたはポリスチロールサンプルビンに採取し、 α -アミラーゼ・アクチナーゼ処理またはアクチナーゼ単独の処理を先に述べた酵素分析の方法により行い、濾紙上にCWを得る。残渣CWは水で3~4回洗浄した後、これをセルラーゼの処理に供試する。

すなわち、洗浄びんからセルラーゼ溶液を濾紙上の残渣に吹きつけ、これを50ml容のポリスチロールサンプルビン (またはバイアルビン) に洗い込み、栓をする余裕を残してセルラーゼ溶液を満たす。アクチナーゼ処理の場合と全く同じようにして栓とゴムバンド (ポリスチロールサンプルビンの場合) を施し、40℃の振とう培養

器中で4時間のセルラーゼ加水分解を行う。その後、あらかじめ秤量してある濾紙に残渣を濾過し、水で3~4回洗浄後、さらにアセトンで2~3回洗浄する。ロート上でアセトンを飛散させた後、濾紙と残渣をアルミ皿に戻し、135℃の乾燥器中で2時間乾燥後、秤量する。ここで得られた分画がI-5-1)の図1のb分画に相当する。次に濾紙と残渣をあらかじめ秤量してあるルツボ中に入れ、ヒータ上で予備灰化した後、600℃の電気炉で2時間灰化し、秤量する。b分画の含量から、この灰分を差し引いてOb分画の含量が求められる。また、Oa分画含量を求めるにはOCW含量からOb分画の含量を差し引いてやればよい。

(4) 留意点

(a) 酵素は冷蔵庫に保存する。

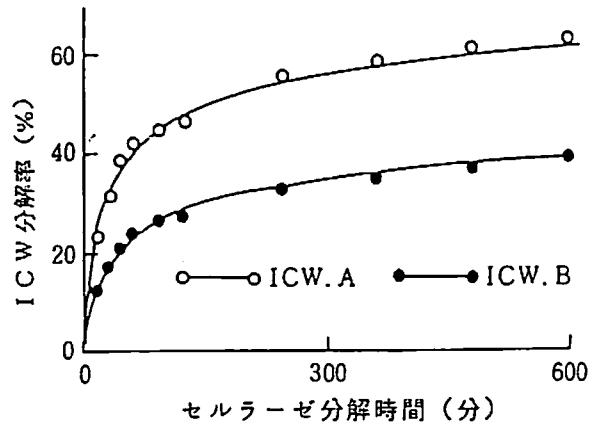
(b) CWのセルラーゼ分解で反応容器のCW量を0.3gとしたのは基質量の差に基づくセルラーゼ分解率に差を生じさせないためである。

(c) セルラーゼオノズカFAの利用

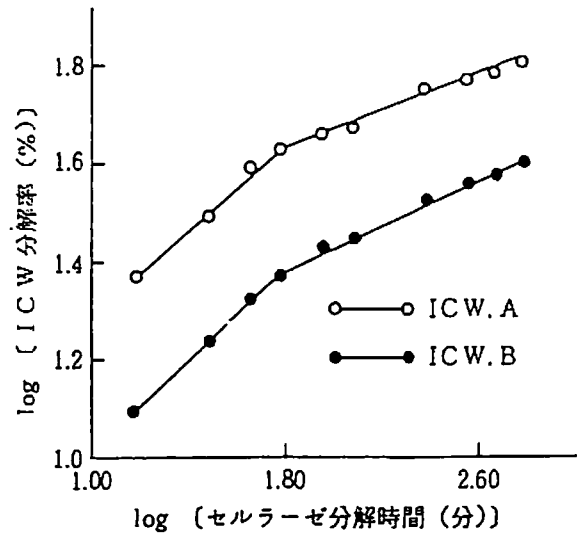
方法のところでも述べたセルラーゼはヤクルト製飼料分析用セルラーゼ(P-1500, 1,500 u/g)であるが、最近、その力価が2倍(3,000 u/g)のFA酵素も市販されている。

表1にはFA酵素の濃度と各種試料のOCW消化率(4時間)およびOa含量を示してある。

P-1,500と比較して1/2の0.5%濃度でほとんど差はなく、この酵素を利用する場合には0.5%濃度を採用するのが適当であろう。



I-5-1)-図1. イタリアンライグラスとICWのセルラーゼ分解における分解率と分解時間との関係 (阿部ら)



I-5-1)-図2. イタリアンライグラスICWのセルラーゼ分解におけるlog(分解率)とlog(分解時間)との関係 (阿部ら)

I-5-1)-表1. セルラーゼオノズカFAとP-1500(飼料分析用)との比較-OCW消化率(Oa含量)

試料	FA*				P-1,500
	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%	
トウモロコシサイレージ	19.1 (8.0)	21.5 (9.0)	22.0 (9.2)	21.8 (9.1)	22.4 (9.4)
チモシ-乾草	22.7 (14.4)	30.8 (19.5)	31.7 (20.1)	32.2 (20.4)	31.1 (19.7)
アルファルファキューブ				28.4±1.5 (12.7)	26.8±1.7 (12.8)
稲ワラ				15.4±0.4 (9.0)	14.3±0.3 (8.4)
ビートバルブ	19.7±1.3	22.8±0.2	25.5±1.3	27.3±0.5	22.1±1.2
ト-フ柏	12.2±0.7	17.5±0.4	20.1±1.1	22.4±1.2	17.8±0.9

*酵素濃度 (w/v)

(阿部・島田)