

1994年度（平成6年度）

# 第88回日本畜産学会大会

## 講演要旨

1994年3月29日～30日

ステビア（甘葉植物）のルーメン内細菌に及ぼす影響について

○安藤太助・稲元民夫・中井 裕・扇元敬司（東北大農）

目的：ステビアは砂糖の300倍の甘味度を有する中南米原産の植物で、高甘味料であるが、ノンカロリーに近いため、ダイエット食品等に用いられている。近年日本国内においても栽培が行なわれるようになってきており、主に葉の部分が乾燥後利用されているが、それ以外の葉の一部および茎の部分は利用されず捨てられてきた。最近、それら残渣ステビアを給与された家畜の増体が良くなることが知られてきている。

今回、演者らは牛のルーメン内微生物叢における残渣ステビア給与の影響を調べる目的の一つとして *in vitro* での残渣ステビア添加時のルーメン内細菌の変化を調べたので報告する。

方法：牛のルーメン液を採取後、CO<sub>2</sub>ガス噴射下で残渣ステビア粉末を0.2%添加して24時間培養した。なお、基質として0.4%にセロピオースを合わせて添加した。培養終了後、M2培地を用いたハンゲートのロールチューブ法により全生嫌気性菌数

を測定、選択培地を用いてガスバック法で各嫌気性菌数の測定を行なった。また、好気性菌数の測定も行なった。培養終了後のルーメン液中のVFAをガスクロマトグラフィーで分析した。

結果：ステビア粉末を添加した場合、基質添加のみとの間に総生嫌気性菌数に差は認められなかったが、*Selenomonas*種および*Eubacterium*種の菌数は20倍以上増加していることが認められた。さらに、*Lactobacillus*種も増加する傾向がみられた。その他の嫌気性菌の菌数には大きな違いは認められなかった。一方、好気性菌において全生菌および*Streptococcus*種の菌数が増加していた。現在、ステビア粉末がこれらの菌種の増殖を促進するかどうか *in vitro* で試験中である。

## 1. 試験目的

ステビアのウシに対する効能を検討するため、そのルーメン醗酵に及ぼす影響を調べた。

## 2. 試験の概略

採集した牛第一胃液および試料をワクチン瓶に入れ、直ちにと37℃のふ卵器に24時間放置した後に、生成したVFA産生量およびルーメン内菌叢の変化を調べた。

## 3. 実施法

1) 採取した第一胃液を二重ガーゼで濾過し、乾草などの破片を除き4つに分け、対照区および試験区とし、試験区には試料を0.2%づつ添加した。また各区にはセルロース基質としてセロビオースを0.4%加えた区を設けた。

### 試験区

- |        |        |
|--------|--------|
| 1. 対照区 | 基質無添加区 |
| 2. "   | 基質添加区  |
| 3. 試験区 | 基質無添加区 |
| 4. "   | 基質添加区  |

2) サンプルはワクチン瓶に100ml入れ、気相を高純度の炭酸ガスで置換して密封した。

3) VFA測定用試料は約3ml採取し、直ちに-70℃に凍結し、分析時にメタリン酸による除タンパク、クロロフォルム抽出を行い、ガスクロで分析した。

4) ルーメン内細菌叢の変化は当教室の腸内細菌叢分析の常法により調べた。

ガスクロによるVFAの分析は以下の手順により行った。

- 1) 第一胃液1mlを試験管に入れ、0.2mlの3N  $H_2SO_4$ （12%メタリン酸）を加え遠心し上清を取る。
- 2) 上清にクロマト用クロロフォルムを1:1に入れ抽出する。
- 3) クロロフォルム層を採取し、ガスクロでVFAの分析をする。

(分析条件)

1. 島津 GC-12A、FID
2. 内径 2.6 mm、長さ 2 m ガラスカラム
3. 充填剤 Chromosorb 101
4. 注入口 検出器温度 240℃、カラム温度 200℃
5. キャリアーガス N
6. FID 水素 6 kg/cm<sup>2</sup>、空気 5 kg/cm<sup>2</sup>
7. 定量 Chromatopac C-R5A

腸内細菌叢の分析法は以下の通りである。

- 1) 検体をハンゲートの方法により炭酸ガスを噴射しながら希釈液 B で希釈する。
- 2) 適当な希釈の検体を以下の培地に摂取し、培養する。

全菌数	R G C A ロールチューブ	
セルロース分解菌数	セルロース培地 (Whatman CC 31 cellulose powder)	
全好気性菌数	T S 培地	好気培養
Enterobacteriaceae	D H L 培地	好気培養
Streptococcus	T A T A C 培地	好気培養
Staphylococcus	P E E S 培地	好気培養
Yeasts, Molds	P 培地	好気培養
全嫌気性菌数	E G 培地	嫌気培養
Lactobacillus	L B S 培地	嫌気培養
Bifidobacterium	B S 培地	嫌気培養
Eubacterium	E S 培地	嫌気培養
Veillonella	V S 培地	嫌気培養
C. perfringens	N N 培地	嫌気培養
Bacteroidaceae	バクテロイデス培地	嫌気培養
Selenomonas	M 培地	嫌気培養

#### 4. 結果

ルーメン内細菌叢の分析結果は別表1に示したが、対照区では嫌気性菌には大きな変化は認められず、好気性菌で全菌数の増加、およびYeasts, Moldsの増加が見られた。基質にセロビオースを加えた区では好気性菌数が増加した。これに対し、ステビアを添加した区ではEnterobacteriaceaeの菌数が減少し、基質添加区では嫌気性の繊維分解菌かつ乳酸利用菌であるSelenomonas菌と通性嫌気性の乳酸生成菌であるStreptococcus菌が増加した。また、全区を通じてプロピオン酸産生菌であるVeillonellaの増加がみられた。これらのことから、ステビアはEnterobacteriaceaeを減少させ、ルーメン内のStreptococcusの減少を基質（セロビオース）の添加と相互して増加させる作用をもつこと。同時に基質の添加と相互してSelenomonasの増加も促す作用をもつものと思われる。これによりStreptococcusの増加に伴う乳酸の増加は、同時に増加したSelenomonasにより利用され、濃厚飼料添加時にみられる乳酸の一時的な増加による乳酸中毒は、Selenomonasの増加促進作用により回避されるのではないかと思われる。このステビアの、Selenomonasの増殖作用については、他の繊維分解菌に対する増殖作用と同時にさらに確認が必要と思われる。繊維分解菌増加の直接的な証明は今回用いたセルロース粉末が、適当ではなかったため明らかにすることは出来なかった。この点はステビアの繊維分解菌の増殖支持能の検討により、明らかとなるであろうと思われる。

VFAの分析結果を別表2に示したが、VFA総量は対照区基質無添加区、ステビア区基質無添加区、対照区基質添加区、ステビア区基質添加区の順に増加し、ステビアのVFA産生促進作用が認められ、ルーメン内細菌叢の変化を反映するものであった。

今回の試験は単独の試験ではあったが、ステビアのもつルーメン酸酵促進作用が微生物学的にも、VFAの分析によっても確認された。現在これらをさらに確認するため、乳酸の分析およびステビアに含まれる糖、ステビオサイドの標準品を用いた繊維分解菌の増殖支持能の検討を行っている。

別表 1 ステビア投与後24時間目のルーメン内菌数の変化

項目	培養前	対照区		ステビア区	
		基質無添加	基質添加	基質無添加	基質添加
全菌数	$3.7 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$3.4 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$
セルロース分解菌数	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
全好気性菌数	$1.6 \times 10^6$	$9.2 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$7.8 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$
Enterobacteriaceae	$2.0 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$7.2 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$
Streptococcus	$2.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^5$	$8.4 \times 10^6$	$9.8 \times 10^5$	$2.0 \times 10^7$
Staphylococcus	$7.0 \times 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
Yeasts, Molds	$5.4 \times 10^3$	$3.0 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$
全嫌気性菌数	$1.3 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$
Bacteroidaceae	$2.6 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$
Lactobacillus	$1.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$
Bifidobacterium	$9.6 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$
Selenomonas	$4.2 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$9.6 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6$	$1.9 \times 10^7$
Eubacterium	$4.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$8.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
Veillonella	$< 10^5$	$7.2 \times 10^5$	$4.4 \times 10^5$	$8.4 \times 10^5$	$5.6 \times 10^5$
C. perfringens	$3.2 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6$	$8.0 \times 10^5$	$2.3 \times 10^6$

注) ^ はべき乗を表す。

セルロース分解菌数については、使用したセルロース粉末では測定できなかった。

別表 2 VFA分析結果

単位 mmol

VFA	培養前	ステビア無添加区		ステビア添加区	
		セロビオ-ス(-)	セロビオ-ス(+)	セロビオ-ス(-)	セロビオ-ス(+)
総量	40.4743	56.5894	107.5897	70.3148	118.3360
酢酸	29.8474	41.2069	79.1018	51.8992	86.8999
プロピオン酸	5.2386	7.1298	16.3376	8.8456	18.5639
イソ酪酸	0.9863	1.4169	1.5799	1.6020	1.6141
酪酸	1.8804	3.0284	6.0309	3.6100	6.6159
イソ吉草酸	1.9318	2.9119	3.0377	3.2318	3.0153
吉草酸	0.5898	0.8955	1.5018	1.1261	1.6269

(各区の測定は培養24時間後)