

培養液の pH の違いが α -リノレン酸の 反芻胃内で異性化や水素添加に及ぼす影響

Maimaijiang Zunong

連合農学研究科生物環境科学専攻地域環境管理学講座（博士課程2年）

1. 目 的

乳中の共役リノール酸（CLA）は生牧草に含まれる α -リノレン酸（C18：3）から乳牛内で合成され、乳牛を放牧することにより増加することが知られている。さらに、放牧された牛の乳中 CLA 含量は季節により変化することも知られている。これは C18：3の摂取量の変動だけではなく放牧草の栄養成分の季節変動に伴う反芻胃内環境（pH など）変化によって反芻胃内における C18：3異性化や水素添加（BH）の程度が変化するためと考えられる。反芻胃内で飼料中に含まる不飽和脂肪酸（UFA）の BH に関する微生物は、UFA をバクセン酸（VA）まで BH させる A グループと UFA を C18：0まで BH させるグループ B に分かれている。これまでは培養液の pH が低下した場合、グループ B の微生物が抑制され C18：2由来の VA が増加するといわれている。しかし、乳牛を放牧した場合、反芻胃内で合成される VA は主に C18：3の異性化や BH よるものである。そこで、反芻胃内の pH が低下した場合、C18：3から VA まで BH や異性化が抑制され、高い場合は VA から C18:0までの BH が進むと考える。反芻胃内の pH の変化が C18：3の BH に及ぼす影響に関する知見はない。本試験では C18：3の反芻胃内での BH に及ぼす pH の影響をについて検討する。

2. 方 法

1) 供試家畜：

帯広畜産大学フィールド科学センターのフィステルを装着したホルスタイン種乾乳（体重：605 ±15 kg）2頭を用い、2008年6月に行った。乾乳は朝5:00から夕方19:00の間にフィールド科学センターの草地で放牧され、夕方19:00か次の朝5:00の間に牧草サイレージとコーンサイレージを原物で1：1の割合で給与した。

2) 培養方法：

乳牛を放牧した場合反芻胃内の pH が5.5から6.8の間に変動することが知られている。それで試薬 KH_2PO_4 と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を用い人工唾液の pH を5.5から7.0まで調製した後 CO_2 で飽和し 39°C で保存した。

フィステルを装着したホルスタイン種乾乳2頭のフィステルからそれぞれ1000ml ずつ反芻胃液を採取し39°Cの状態の研究室に持って来た。反芻胃液を4層のガーゼから通過した後、更に1000rpm で10分遠心分離を掛け、上清みを採取した。50ml の反芻胃液と人工唾液50ml を100ml の三角フラスコに入れ、培養液の pH が5.5, 6.1, 6.6, 7.0（P5区, P6区, P65区, P7区）なる

様に KH_2PO_4 と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を用いて調整した。凍結乾燥したペレニアルライグラス 2g とリノレン酸 200mg (Linolenic acid, Kanto chemical Co., INS, Japan) をそれぞれの三角フラスコに加え CO_2 で飽和された後 0 時間と 8 時間かけて培養した。培養終了後三角フラスコを速やかに氷に入れ培養液の pH を測った後凍結乾燥した。サンプルは -30°C で分析まで保存した。

3) 化学分析:

試料の脂肪酸分析にはクロロホルム (C) : メタノール (M) (C : M = 2 : 1, vol/vol) の溶媒液を使い脂質を抽出され、この中で 2 ml に内部標試料として $300 \mu\text{l}$ nonadecanoic acid (C19 : 0) を加えメチルエステル化に用いた。メチルエステル化は無水メタノール性 5 % 塩酸と共に 95°C で 3 時間行った。得られた脂肪酸メチルエステルはガスクロマトグラフィー (GC) 分析に用いた。GC 分析はフナコシ株式会社の GLC-85 をスタンダードとして用い試料の脂肪酸種類、保持時間を確認した。

4) 計算および統計分析方法

培養中 C18 の不飽和脂肪酸 BH 率は (Beam et al., 2000) の方法により計算した。統計処理は SAS2002 を用い、P 値が 0.05 の以下の場合有意差があると判断した。

3. 結 果

1) C18 不飽和脂肪酸の水素添加

8 時間培養後の凍結乾燥した培養物の脂肪酸含量を表 1 に示した。C14 : 0 から C20 : 0 までの脂肪酸が検出された。培養液 pH の違いが C14 : 1, C15 : 0, C16 : 0 と C17 : 0 脂肪酸の合成に影響はなかった ($P > 0.10$)。

表 1 8 時間培養後における培養物の脂肪酸組成 (mg DM)

	P5	P6	P65	P7	SEM	有意差
C14 : 0	0.35 ^b	0.37 ^b	0.63 ^a	0.35 ^b	0.07	***
C14 : 1	0.12	0.21	0.26	0.33	0.18	NS
C15 : 0	0.15	0.15	0.18	0.12	0.05	NS
C15 : 1	0.22 ^{bc}	0.29 ^b	0.47 ^a	0.17 ^c	0.07	**
C16 : 0	4.08	4.05	4.78	4.81	0.57	NS
C16 : 1	0.15 ^{ab}	0.20 ^a	0.20 ^a	0.13 ^b	0.04	†
C17 : 0	0.1	0.12	0.16	0.13	0.04	NS
C18 : 0	2.39 ^c	2.51 ^c	4.25 ^b	8.19 ^a	0.28	***
t11C18 : 1	1.27 ^d	4.88 ^c	12.49 ^a	12.03 ^b	0.59	***
c9C18 : 1	12.34 ^c	13.34 ^b	12.96 ^a	12.92 ^{ab}	0.35	**
c9, c12C18 : 2	40.35 ^b	40.43 ^b	41.54 ^a	38.60 ^c	0.68	*
c9, c12c, 15C18 : 3	141.07 ^a	137.20 ^{ab}	119.19 ^c	122.60 ^{bc}	1.54	**
c9, t11CLA	0.39 ^b	1.68 ^a	1.71 ^a	0.46 ^b	0.2	***
t10, c12CLA	0.24 ^b	0.99 ^b	1.44 ^a	1.22 ^a	0.6	†
unknown	0.47	0.61	0.78	0.74	0.19	*

a, b, c 異なる肩文字間に有意差があり ($P < 0.10$)。有意差 : † $p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS = 有意差なし。

培養液 pH の違いが C16:1 と t10, c12CLA の合成に影響する傾向があった ($P < 0.10$)。培養液 pH の違いが C14:0 と C15:1 脂肪酸の合成に影響をあたえ、C14:0 と C15:1 は P6 区において他の処理区に比べ有意 ($P < 0.05$) に多かった。

C18:2 と C18:3 の BH 率は図 1 で示した。C18:2 の BH は培養液 pH の違いにより有意に変動したが ($P < 0.05$)、この変動の幅は 5% 以内であった。C18:3 の BH は P5 区、P6 区、P65 区、P7 区においてそれぞれ 1.10、4.38、11.02、13.44 であり培養液 pH の増加により増加した。

2) 水素添加や異性化により C18 不飽和脂肪酸の中間代謝物

試料中に含まる C18 不飽和脂肪酸は反芻胃内で反芻胃内微生物により異性化や水素添加を受けるといわれている。C18 不飽和脂肪酸は反芻胃内で完全に水素添加された場合、C18:0 を合成し、その中間代謝物として C18:1, CLA と C18:2 isomers を合成する。本試験においては VA, c9t11CLA, t10c12CLA が検出されたが、non-conjugated C18:2 の 3 つの種類は検出されなかった。培養液 pH の違いが VA の代謝に影響を与え、VA 含量は P65 区と P7 区において多かったが P5 区では最も低くなった。C18:2 の中間代謝物である c9t11CLA と t10c12CLA の変動は処理区の間で 4 倍の違いがあった (表 1)。

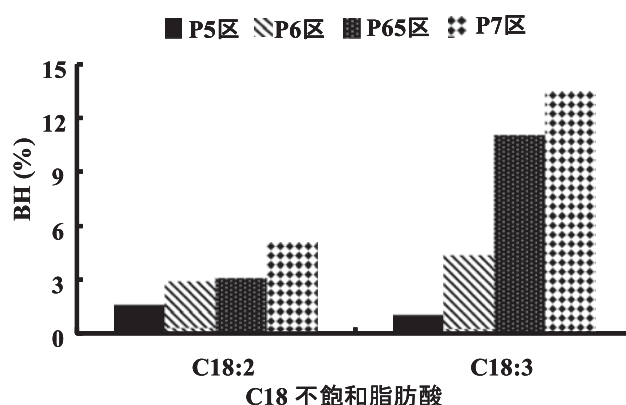


図 1 培養液 pH の違いが C18 不飽和脂肪酸の水素添加の影響

4. 考 察

1) C18 脂肪酸の水素添加

本試験においては反芻胃内微生物により BH が多かったのは C18:3 であり培養液 pH の違いによる影響は多かった。C18:3 の BH 率が P5 区で低く P65 区と P7 区高くなったのは培養液の pH の違いにより微生物の増殖が影響を受けたためと考える。反芻胃内で不飽和脂肪酸の BH 関する微生物 (*Butyrivibrio fibrisolvens* を含む) は繊維分解微生物であり反芻胃内環境が酸性 (反芻胃液 pH が 5.5 <) 場合増殖が抑制し、反芻胃環境が中性の場合増殖が増加するといわれている。または飼料中の配合飼料:粗飼料の割合が変動した場合反芻胃内での C18:2 と C18:3 の BH が変動したことを in vivo 実験により明らかにしている (Lee et al., 2006)。このことから培養液の pH が低い場合 C18:3 異性化や BH の最初ステップが抑制されると考えた。一方、pH が高い場合 C18:3 の BH が最後の C18:0 まで進みやすいと考えた。

2) 水素添加や異性化により C18 不飽和脂肪酸の中間代謝物

反芻胃内でみられる VA は飼料中に含まる C18:3 と C18:2 が反芻胃内微生物より異性化や水素されたものといわれている。C18:2 への水素添加率は 5% 以下であったことから VA の合成は主に C18:3 から合成したものと考えた。本試験においては VA の合成は P65 区と P7 区において多かった。C18:0 の含量は P7 区において P6 区に比べ 2 倍近く増加したこれらをまとめますと反芻胃内の pH が 6.65 の時 C18:3 から VA の転換率が高くなると考えた。

放牧の場合乳中に含まれる CLA は主に放牧草に含まる C18：3に由来し，反芻胃内の pH により変動すると考えた。C18：2に含まるトウモロコシや大豆粕を給与により乳中の CLA 含量を増加させることができないと考えた。

5. 参考文献

Beam, T. M., T. C. Jenkins, P. J. Moate and D. L. Palmquis. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci* 83 : 2564-2573.

Lee, M. R. F., J. K. S. Tweed, R. J. Dewhurst and N. D. Scollan. 2006. Effect of forage : concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. *Brit. J. Anim. Sci.* 82 : 31-40.

6. 謝 辞

この研究成果は2009年日本畜産学会で発表することになりました。この論本の作成にあたり，後援会には，終始おしめないご支援を頂きました，心より感謝致します。

キーワード：水素添加，pH， α -リノレン酸，バクセン酸