

短 報

*In vitro*における褐藻添加がメタン生成およびルーメン性状に与える影響

眞田歩佳<sup>1</sup>・山中麻帆<sup>1\*</sup>・中川敏法<sup>2</sup>・林英明<sup>3</sup>・平山琢二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>石川県立大学、生物資源環境学部、石川県野々市市 921-8836

<sup>2</sup>滋賀県立大学、環境科学部、滋賀県彦根市 522-8533

<sup>3</sup>酪農学園大学、獣医学群、北海道江別市 069-8501

**要 約** 市販褐藻飼料がルーメン内ガス生成量および発酵性状に及ぼす影響について、*in vitro*法で検討した。人工ルーメン液に基礎飼料のみを供試した対照区、これに市販褐藻飼料を添加した褐藻区を設け、各区のpH、生成ガス濃度、プロトゾア数および揮発性脂肪酸（VFA）濃度の経時的变化について検討した。メタンおよび水素濃度は、培養12時間後で褐藻区が対照区に比べ有意に低かった。培養36時間後の培養液のpH、プロトゾア数およびVFA濃度は、有意な区間差はみられなかった。これらのことから、市販褐藻飼料のウシへの給与は、ルーメン内における微生物発酵を維持させながら、メタン生成を抑制できる可能性が示唆された。

キーワード : *Ascophyllum nodosum*, *in vitro*, 褐藻, メタン

受領日: 22.12.2022. 受理日: 10.02.2023.

日本畜産環境学会会誌 No.22(1) pp25-30. 2023

緒 言

ウシなどの反芻動物のルーメン内には、細菌や原生動物などからなる嫌気性微生物が多数生息し、飼料に含まれるタンパク質や糖質は微生物に栄養源として消化吸収される[1]。この過程で酢酸、プロピオン酸、酪酸などの揮発性脂肪酸および水素、二酸化炭素などのガスが生成される[2]。そのうち、水素はメタン生成菌などの微生物によって代謝されることで、メタンとして呼気中から体外に排出される[3]。メタンは温室効果ガスの一つで、二酸化炭素の約25倍もの温室効果があることが知られている[4]。人為起源による世界のメタン排出量の約3割は反芻動物に由来するものとされている[5]。

したがって、ウシの呼気中に排出されるメタンを抑制することは、持続可能な家畜生産において極めて重要な課題となる。

これまで、ルーメン内におけるメタン生成に関与する酵素活性の阻害剤として3-ニトロオキシプロパノール (3-NOP) の効果が報告されている[6]。3-NOPの乳牛への給与で、産乳量を減少させることなく、ルーメンから排出されるメタンを約30%減少させることが報告されており、その生産現場での活用が期待されている[6]。しかし、その一方で、化学物質の給与に対して、食の安心・安全性の観点から問題視される場合もあり、天然素材を活用した環境保全策が強く求められている状況にある[7]。

## ルーメン性状への褐藻添加の影響

近年、紅藻の一種であるカギケノリをウシに給与することで、呼気中のメタンを抑制できることが報告され[8]、飼料添加剤としてその実用化が進められている。カギケノリには、プロモホルムが豊富に含まれており[8]、これがルーメン内のメタン生成菌の活性を阻害することで、メタン生成を抑制することが報告されている[9]。しかし、カギケノリなどの紅藻は、その生育エリアが比較的狭いことから、資源量の確保が大きな課題となる。

一方、褐藻は、海藻の中でも世界中に広く分布しており、資源量のポテンシャルは極めて高い[10]。褐藻には、プロモホルムはほとんど含まれていないものの（臭素含量：紅藻 (*Asparagopsis taxiformis*) 45~52 mg·g<sup>-1</sup> DW、褐藻 (*Ascophyllum nodosum*) 0.36 mg·g<sup>-1</sup> DW)、ポリフェノールの一種であるフロロタンニンが含まれていることが知られている（ポリフェノール含量：9~14% (*Ascophyllum nodosum*) [11, 12, 13, 14]）。ポリフェノールもメタン生成の抑制効果が報告されていることから[15]、褐藻給与によるメタン排出抑制の可能性は高い。また、褐藻をウシに給与することで、ウシの腸管免疫が賦活することが報告されており[16]、褐藻の持つ機能性成分を活用したウシの健康増進にも貢献できる可能性がある。このようなことから、褐藻を活用した環境保全は、持続可能なウシなどの反芻家畜の生産において極めて重要と考えられる。

このようなことを背景に本研究では、ウシのルーメン内容物へ褐藻を添加して培養した場合にメタン生成およびルーメン内発酵性状に与える影響について検討した。

### 材料および方法

黒毛和種繁殖牛2頭から採取したルーメン液およびMcDougall[17]の人工唾液を1:1で調製した人工ルーメン液100 mlに基礎飼料（市販配合飼料1.2 g（乾物中：粗タンパク質約16%、粗

脂肪約2%、粗繊維約10%、粗灰分約10%）、スーダングラス0.8 g（乾物中：粗タンパク質約5%、粗脂肪約2%、粗繊維約32%、粗灰分約13%[18]）のみを供試した対照区および基礎飼料に1.5%の市販褐藻飼料 (*Ascophyllum nodosum* 0.03 g（乾物中：タンパク質約7%、脂肪約4%、粗繊維約4%、灰分約20%）：アルギット、神協産業）を添加した褐藻区を設け、200ml容量の三角フラスコに各区の培養液を調製した。培養液調製後、培養液に窒素ガスを通気し、0、3、6、12、24および36時間、39°Cで嫌気培養した。なお、試験は3反復で行った。

調査項目は、pH、生成ガス（メタン、水素、二酸化炭素）量および濃度、プロトゾア数および揮発性脂肪酸（以下、VFA：酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸）濃度とした。生成ガス量は、培養開始から36時間後までにシリンジ内に流入した量として計測した。また、生成ガス濃度は、各培養時間に一部採取したガスを用いてガスクロマトグラフィー（GC-8A、島津製作所）で測定した。分析カラムにはパックドカラム（Shincarbon ST）を、検出器には熱伝導度検出器（TCD）を用い、注入口および検出器の温度は100°Cとした。また、キャリアガスには窒素を用いた。プロトゾア数は、36時間の培養終了後に既報[19, 20]に準じて処理した後、顕微鏡下で計測し、生息数を推定した。VFA濃度は、36時間の培養終了後に、既報[20]に準じて処理し、ガスクロマトグラフィー（GC-1700、島津製作所）を用いて測定した。分析には、キャピラリーカラムのDB-WAX（0.53 mm×30 m×1 μm, Agilent, USA）を用い、注入口および検出器（FID）の温度はそれぞれ250°Cおよび280°Cとした。キャリアガスにはヘリウムを用い、カラム流量は4.74 ml/minとした。得られた結果について、区間の比較をLeveneの等分散性の検定後、Studentのt検定、またはWelchのt検定を用いて有意性を解析した。なお、統計解析は、SPSS Statistics ver. 25（IBM, USA）を用いて行った。

結果と考察

培養36時間後のガス生成量は、区間による有意な差はみられなかった(図1)。メタン濃度は、培養12時間後において対照区に比べ褐藻区で有意に低く ( $P<0.05$ )、培養36時間後においても対照区に比べ褐藻区が低い傾向にあった ( $P<0.10$ ) (図2)。水素濃度は、培養12時間後において対照区に比べ褐藻区で有意な低下が認められた ( $P<0.05$ )。二酸化炭素濃度は、培養36時間後において対照区に比べ褐藻区で有意な低下が認められた ( $P<0.05$ )。表1に培養36時間後のpH、プロトゾア数、VFA (酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸) 生成量について示した。いずれの項目においても、区間に有意な差はみられなかった。プロピオン酸生成量の増加はメタンの排出抑制に有効であることが報告されている[21]。しかし、本研究では有意差はみられなかったものの褐藻区のプロピオン酸濃度は対照区に比べて低い値を示していることから、ルーメン微生物叢や乳酸など他の脂肪酸の変化についても今後詳細に検討する必要がある。

ルーメン内におけるメタンは、メタン生成菌がルーメン内の水素を利用することで生成される[22]。また、ルーメン内の水素は、ルーメン内に生息する嫌気性菌によって生成される[23]。一般的に水素が多量に生成されると、ルーメン内での水素分圧が高くなり、結果として嫌気性菌の活性が低下することが報告されている[24]。したがって、メタン生成菌の活性を低下させた場合、ルーメン内の水素が消費されず水素分圧が高くなることで、結果として嫌気性菌の活性を低下させることが考えられる。このようなことから、ルーメン内でのメタン生成を抑制するためには、飼料消化性を低下させることなく、ルーメン内における水素生成を抑制することが重要となる。今回の試験において、メタンおよび水素濃度が、褐藻を添加することで培養12

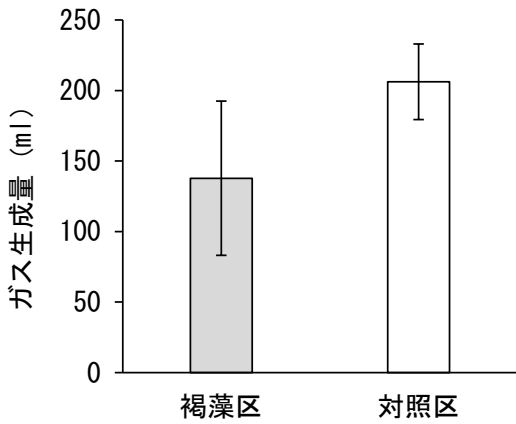


図1. 培養36時間後のガス生成量

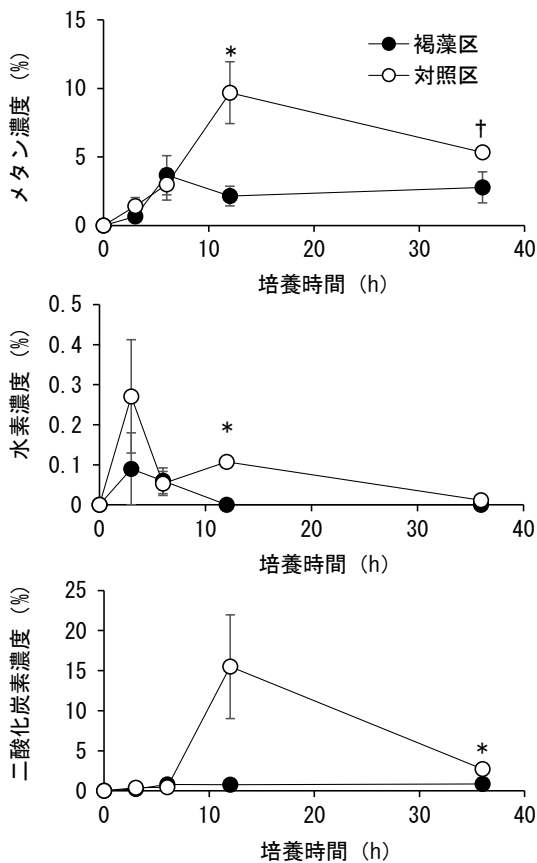


図2. *In vitro*培養によるメタン、水素および二酸化炭素濃度の経時的変化.

\* :  $P<0.05$ , † :  $P<0.10$ .

## ルーメン性状への褐藻添加の影響

表1. 培養36時間後のpH、プロトゾア数および揮発性脂肪酸生成量

	海藻区	対照区
pH	6.33±0.03	6.44±0.05
プロトゾア数 (1ml中)	36200±6437	37600±5632
揮発性脂肪酸生成量 (mM)		
酢酸	49.48±7.21	53.93±6.16
プロピオン酸	17.73±2.75	19.13±1.52
酪酸	11.09±2.10	13.16±2.06
イソ吉草酸	1.69±0.38	1.17±0.18

時間後に有意に抑制された。さらに、今回の試験では、プロトゾア数やVFA生成量に区間での差がなかったことから、ルーメン内における飼料消化性は、褐藻添加の影響を受ける可能性は低いと考えられた。このようなことから、ウシなどの反芻動物への褐藻給与は、ルーメン内における飼料消化性に影響することなく、メタン生成を約52%抑制できる可能性がある。その一方で、ルーメン内におけるメタン生成の抑制は、飼料のエネルギー効率を上昇させると報告があることから[24]、今回の試験において認められたルーメン内の水素生成量の減少も含め、飼料のエネルギー効率についても調査し、飼料利用性とメタン生成の関連性も含め詳細に検討する必要がある。また、今回の試験では、ルーメン内における飼料消化性について、生成ガス量、プロトゾア数およびVFA生成量から評価した。ルーメン内における飼料消化を詳細に評価しようとする場合、基質の消失率や有効分解率などについても調査する必要があることから、今後、培養残渣の成分等も含め詳細に検討する必要がある。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、供試牛を提供していただいた杉本信夫獣医師、供試飼料を提供していただいた神協産業株式会社に深謝する。

### 文 献

[1] 浅野桂吾 (2022) 栄養: 平山琢二、須田義

人(編) 新家畜生産学入門: 42-49頁、サンライズ出版、滋賀。

[2] 佐々木啓 (2001) ヒツジの第一胃内における脂質代謝に及ぼす濃厚飼料と粗飼料の給与比率の影響とその機構の解明: 栄養生理研究会報: 45(1): 15-30.

[3] Itabashi H, Kobayashi T, Matsumoto M (1984) The effects of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats: Japanese Journal of Zootechnical Science: 55: 248-256.

[4] IPCC (2007) Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: International Panel on Climate Change (IPCC), Geneva, Switzerland.

[5] Eckard RJ, Grainger C, De Klein CAM (2010) Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. Livestock science: 130(1-3): 47-56.

[6] Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, Branco AF, Moate PJ, Deighton MH, Williams SRO, Kindermann M, Duval S (2015) An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production: Proceedings of the national academy of sciences: 112(34): 10663-10668.

[7] 小林泰男 (2020) 環境調和をみずえる家畜栄養学の展開 温暖化ガスの低減に向けて: 日本畜産学会報: 91(3): 304-306.

- [8] Roque BM, Brooke CG, Ladau J, Polley T, Marsh LJ, Najafi N, Pandey P, Singh L, Kinley R, Salwen JK, Eloë-Fadrosch E, Kebreab E, Hess M. (2019) Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage: *Animal Microbiome*: 1(1): 1-14.
- [9] Muñoz-Tamayo R, Chagas JC, Ramin M, Krizsan SJ (2021) Modelling the impact of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on rumen microbial fermentation and methane production: *Peer Community Journal*: 1.
- [10] Kraan S (2013) Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production: *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*: 18(1): 27-46.
- [11] Min BR, Parker D, Brauer D, Waldrip H, Lockard C, Hales K, Akbay A, Augyte S (2021). The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: *Challenges and opportunities*: *Animal Nutrition*: 7(4): 1371-1387.
- [12] Afonso C, Julião DR, Pinto E, Almeida A, Ferreira IMPLVO, Bandarra NM, Cardoso C (2022) The effect of drying process on undervalued brown and red seaweed species: elemental composition: *Journal of Applied Phycology*: 34(3): 1749-1761.
- [13] Küpper FC, Leblanc C, Meyer Klaucke W, Potin P, Feiters MC (2014) Different speciation for bromine in brown and red algae, revealed by in vivo X-ray absorption spectroscopic studies: *Journal of phycology*: 50(4): 652-664.
- [14] Ragan MA, Jensen A (1978) Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.): *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*: 34(3): 245-258.
- [15] Goel G, Makkar HP (2012) Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins: *Tropical animal health and production*: 44(4): 729-739.
- [16] 山中麻帆, 浅野桂吾, 林英明, 河井重幸, 平山琢二 (2020) 市販海藻飼料の添加給与が黒毛和種繁殖牛の糞中 IgA および VFA 濃度ならびに糞便性状に与える影響: *日本畜産学会報*: 91(4): 375-379.
- [17] McDougall EI (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva: *Biochemical journal*: 43(1): 99-109.
- [18] 中央畜産会 (2001) 2章飼料成分表 (I) 組成、消化率、栄養価 日本標準飼料成分表 (2001年版): 独立行政法人農業技術研究機構 (編): 56頁、社団法人中央畜産会、東京.
- [19] 栗原 康、武智辰夫 (1973) ルーメンの検査 牛の臨床検査法: 中村良一、米村寿男、須藤恒二 (編): 14-39頁、農山漁村文化協会、東京.
- [20] 小野寺良次、日野常男、甘利雅弘、板橋久雄 (2001) 第18章ルーメン機能解析法: 石橋晃 (監修)、新編動物栄養試験法: 407-441頁、養賢堂、東京.
- [21] 浅沼成人、日野常男 (2004) 乳酸利用の増強によるルーメンアシドーシスおよび

- メタン生成の抑制：日本畜産学会報：75(4)：543-550.
- [22] Machado L, Tomkins N, Magnusson M, Midgley DJ, de Nys R, Rosewarne CP (2018) In vitro response of rumen microbiota to the antimethanogenic red macroalga *Asparagopsis taxiformis*: Microbial ecology: 75(3): 811-818.
- [23] 浅沼成人 (2001) ルーメン微生物の代謝制御によるメタンの生成の抑制: 日本比較内分泌学会ニュース: 103: 31-38.
- [24] Goel G, Makkar HP (2012) Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins: Tropical animal health and production: 44(4): 729-739.

### Short communication

## **Effect of brown seaweed on methane production and rumen properties *in vitro***

Ayuka Sanada<sup>1</sup>, Maho Yamanaka<sup>1\*</sup>, Toshinori Nakagawa<sup>2</sup>, Hideaki HAYASHI<sup>3</sup>,  
Takuji Hirayama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University, Nonouchi, Ishikawa 921-8836, Japan

<sup>2</sup>School of Environmental Science, University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

<sup>3</sup>School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu Hokkaido 069-8501, Japan

**Summary:** We studied the effects of the commercial brown seaweed feed on rumen *in vitro* gas production and fermentation properties. We measured the pH, gas concentrations, protozoa number and volatile fatty acid (VFA) concentrations of the incubation medium on control group (adding basal feed) and brown seaweed group (adding basal feed and *Ascophyllum nodosum*). Methane and hydrogen concentrations were significantly lower in the brown seaweed group than in the control group after 12 hours of incubation. There was no significant difference between the groups in the pH value, protozoa number and VFA concentration of after 36 hours of incubation. These results suggest that the feeding of the brown seaweed feed could suppress methane production while maintaining microbial fermentation in the rumen.

**Key words:** *Ascophyllum nodosum*, *in vitro*, brown seaweed, methane

**Corresponding:** Maho YAMANAKA maho0320yamanaka@gmail.com

Receipt of Ms.: 22.12.2022. Accepted: 10.02.2022.

Journal of Animal Production Environment Science No.22(1) pp25-30. 2023