

民國105年5月24日

瘤胃微生物在牛隻營養上扮演的角色

Akio TAKENAKA Ph. D

副主任

亞太糧食肥料技術中心 (FFTC)



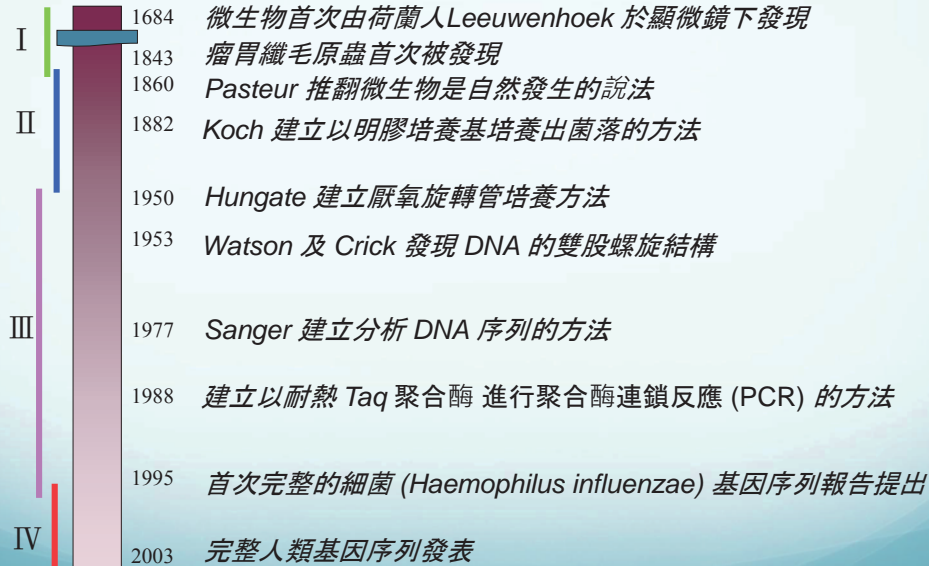
1

瘤胃微生物在牛隻營養上扮演的角色

- 反芻動物消化道及其微生物
 - 微生物研究發展史
 - 瘤胃微生物生態及其功能
- 瘤胃微生物分析方法
 - 瘤胃微生物分類
 - 環境 DNA 分析法
- 瘤胃微生物兩項主要功能
 - 分解纖維
 - 產生甲烷



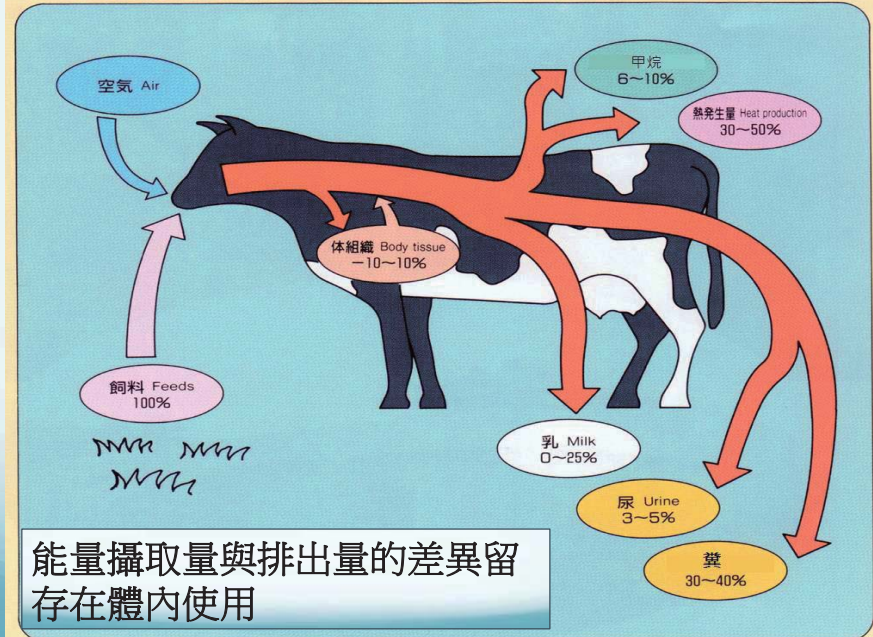
微生物研究發展史



一個新的時代已來臨 (後基因體時代)

3

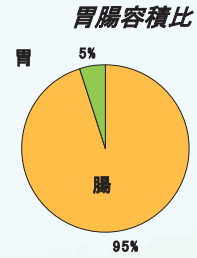
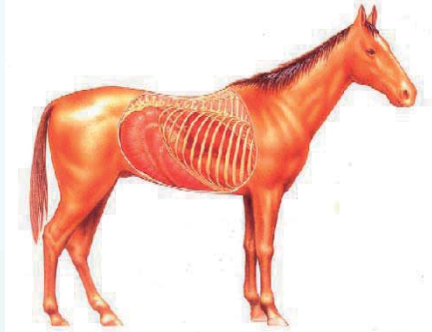
攝取食物中能量的利用



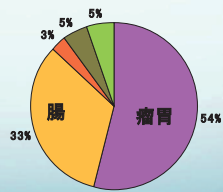
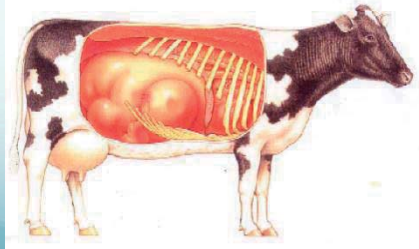
能量攝取量與排出量的差異留存在體內使用

草食動物胃腸容積比例

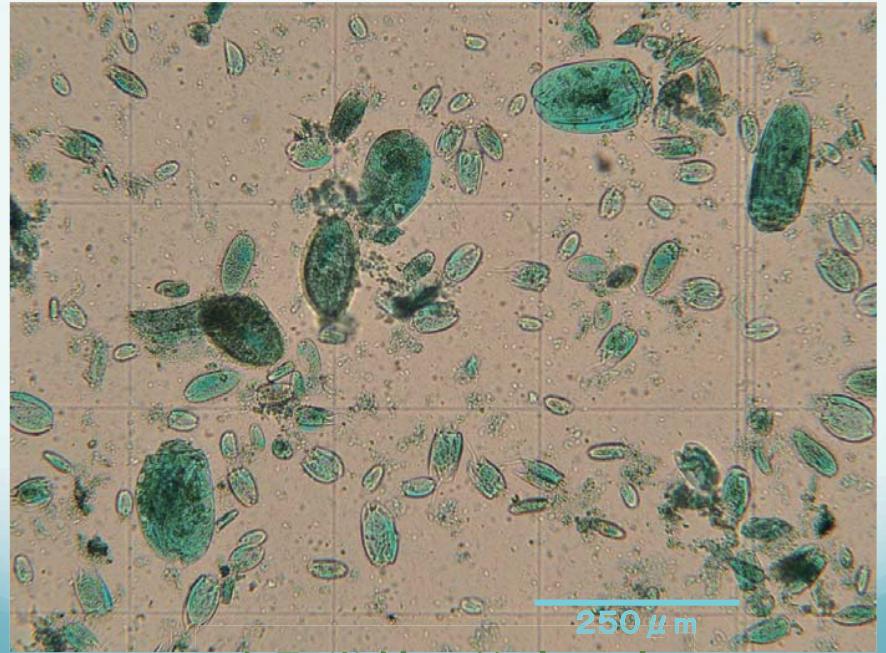
馬



牛

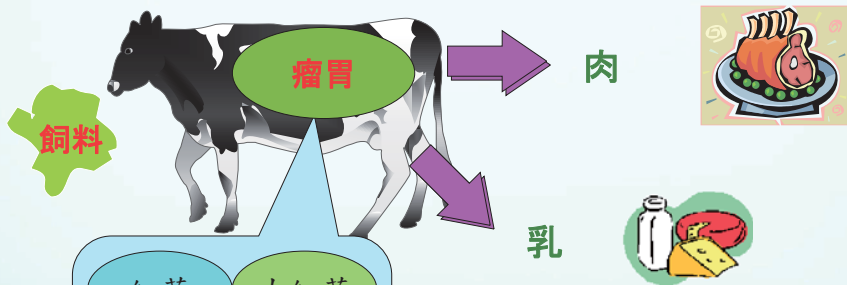


5



在顯微鏡下的瘤胃液

瘤胃微生物的功能

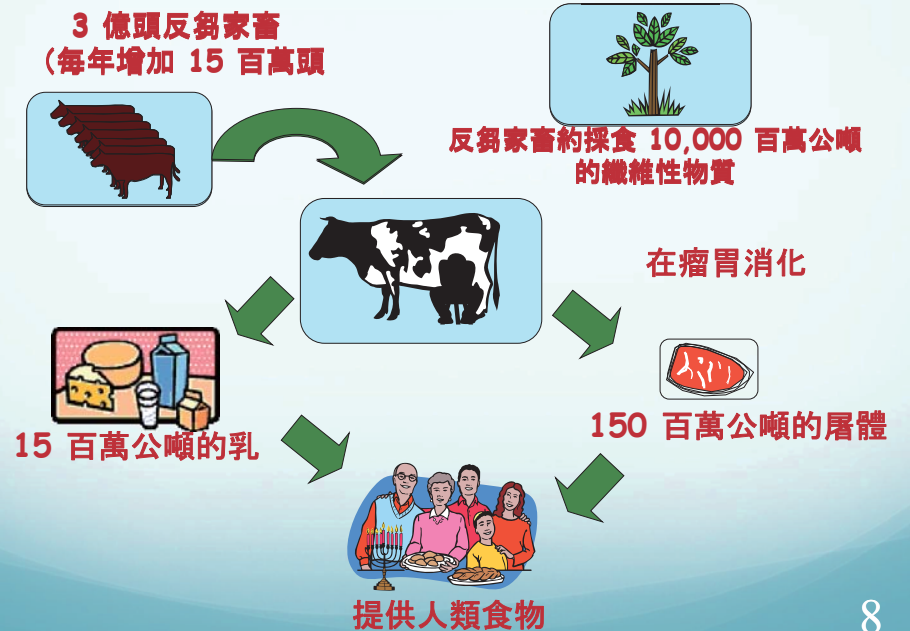


瘤胃微生物扮演的角色

- 分解纖維
- 產生蛋白質
- 產生揮發性脂肪酸
- 分解營養分
- 產生甲烷

瘤胃微生物

全球瘤胃微生物的轉換效率 (每年)



8

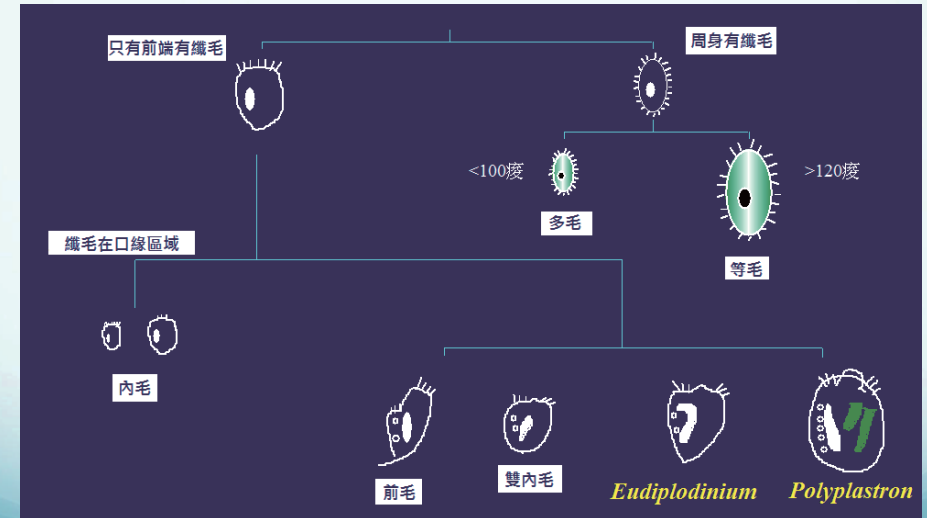
主要的瘤胃細菌

- 纖維素分解菌
 - *Fibrobacter succinogenes*: 格蘭氏陰性菌, 桿菌
 - *Ruminococcus albus*: 格蘭氏陽性菌, 球菌
 - *Ruminococcus flavefaciens*: 格蘭氏陽性菌, 球菌
- 半纖維素與果膠利用菌
 - *Prevotella ruminicola*: 格蘭氏陰性菌, 桿菌
 - *Butyrivibrio fibrisolvens*: 格蘭氏陽性菌, 桿菌
- 澱粉發酵菌
 - *Ruminobacter amylophilus*: 格蘭氏陰性菌, 桿菌
 - *Streptococcus bovis**: 格蘭氏陽性菌, 桿菌
- 有機酸利用菌
 - *Megasphaera elsdenii*: 格蘭氏陰性菌, 球菌
 - *Selenomonas ruminantium*: 格蘭氏陰性菌, 桿菌

*: *Streptococcus bovis* 是兼性厭氧菌, 其他為嚴格的厭氧菌。

9

瘤胃纖毛原蟲的型態分類



10

瘤胃纖毛原蟲的分析方法

瘤胃纖毛原蟲在實驗室不易培養, 但若要造成反芻動物瘤胃內沒有原蟲, 必須將之隔離, 因為瘤胃原蟲的接種必須依賴與其他動物間的直接接觸。

- ◆ 原蟲接種的:
 - 正常反芻動物, 有一種以上的瘤胃原蟲。
- ◆ 沒有原蟲接種的:
 - 一出生即馬上隔離, 瘤胃中沒有任何原蟲存在。
- ◆ 去原蟲的:
 - 瘤胃原蟲被去除, 如洗掉、洗劑處理、中鏈脂肪酸處理等。
- ◆ 單一原蟲接種的:
 - 反芻動物瘤胃中只有一種原蟲存在。

11

乾物質、能量、粗蛋白質、中洗纖維及酸洗纖維的表面消化率

	未接種 (n=5)	單一接種 (n=6)	多項接種 (n=6)
乾物質	67.86 ± 0.98	70.78 ± 1.09	73.15 ± 0.81**
能量	66.02 ± 0.92	68.63 ± 1.24	71.40 ± 1.06*
粗蛋白質	56.56 ± 1.24	59.60 ± 1.68	64.20 ± 1.84*
中洗纖維	57.26 ± 1.23	58.90 ± 1.71	63.28 ± 1.29**
酸洗纖維	54.02 ± 0.85	50.38 ± 2.65	62.53 ± 1.11**

數字 平均值 ± 標準變異

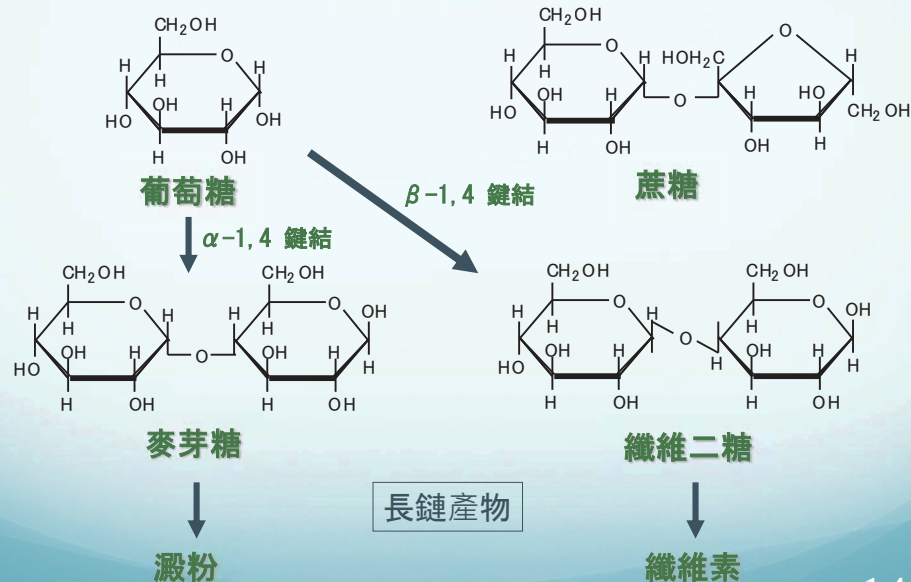
*: P < 0.05, **: P < 0.01.

飼料: 精料 = 1 : 1.

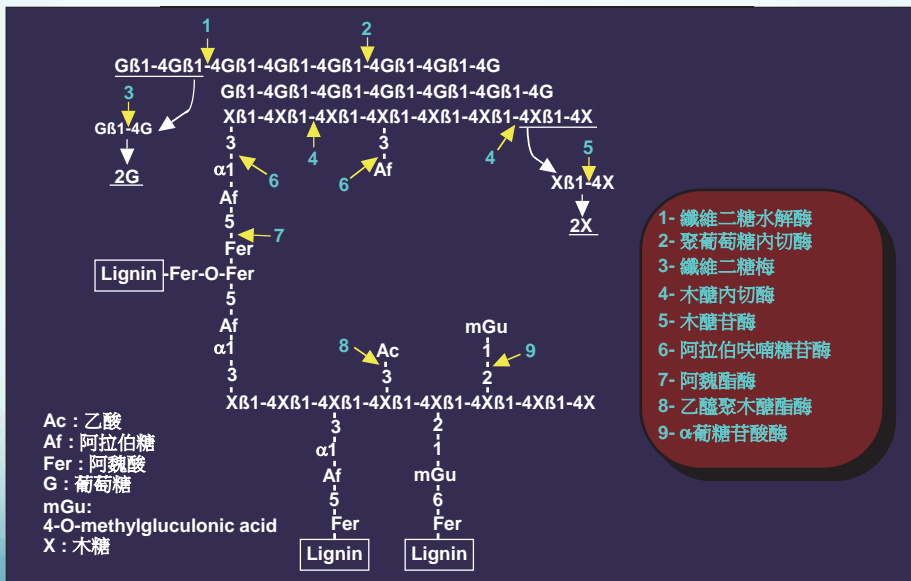
生命是 A T G C 的數位組合



糖的結構



分解木質纖維需要很多酵素的共同參與



在各族群中與β-葡聚醣酶(纖維素酶、纖維二糖水分解酶、木糖酶、β-葡萄糖苷酶)及相似者有關的基因數量

族群編號	總數	自 古細菌	自 細菌	自 真核生物	自 病毒	未分類的	自 細菌	自 微菌	自 原蟲
1	9559 (1001)	109	8459	949	-	41	18(-)	5(5)	-
3	9732 (939)	89	8760	770	-	113	56(6)	3(1)	-
4	3903 (174)	34	3867	-	-	2	3(-)	-	-
5	6833 (910)	57	4860	1799	-	114	82(21)	20(11)	14(5)
6	698 (123)	-	519	175	-	4	-	42(22)	-
7	5078 (142)	-	10	5064	-	-	10(-)	-	-
8	1727 (137)	-	1702	4	-	21	36(12)	-	-
9	1937 (307)	4	856	866	-	211	39(29)	4(2)	-
10	2282 (309)	14	1566	351	-	351	22(12)	2(2)	7(2)
11	1150 (256)	5	582	459	-	104	-	31(21)	4(2)
12	551 (114)	66	354	130	-	1	22(4)	-	-
16	4272 (649)	18	1920	2276	49	11	34(2)	8(1)	-
26	940 (105)	5	888	33	-	14	67(5)	5(5)	-
43	5139 (364)	17	4766	329	-	27	5(2)	1(-)	-
44	108 (19)	-	104	3	-	1	4(-)	-	-
45	350 (81)	-	18	325	-	7	22(1)	1(1)	-
48	748 (28)	-	723	22	1	2	15(1)	3(2)	-
51	1450 (137)	20	1256	134	20	20	-	-	-
74	246 (27)	-	222	21	-	3	5(-)	-	-
	56703 (5887)	438	41432	13710	70	1047	440(95)	125(73)	25(9)

酶學委員會的酵素編號, EC number: 3.2.1.4 (纖維素酶), 3.2.1.6, 3.2.1.8, 3.2.1.21, 3.2.1.1.

資料來自 CAZY 網站 (<http://www.cazy.org/>), 2016年2月2日。

括號內數字來自2007年2月16日統計。

在完整基因序列中，屬於 GH 族群的基因數量 (部分)

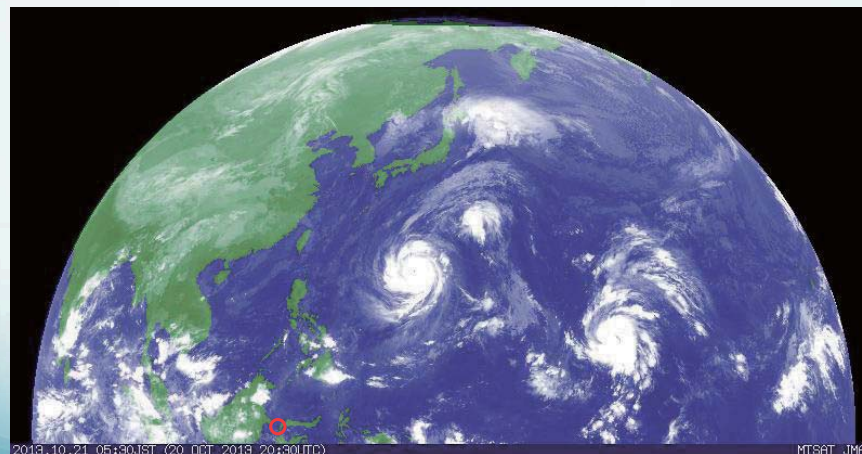
GH 族群編號	1	2	3	5	8	9	10	11	13	16	18	25	26	28	31	35	36	38	43	47	92	94	95	97	總數
<i>Butyrivivrio fibrisolvens</i> 16/4	3	3	6	4	1	2	2		9	2	1	5			2	1	2		15				3		75
<i>Butyrivivrio proteoclasticus</i> B316	1	9	10	4	1	3	6		14	2	1	5		2	5	2	3		11				2	1	111
<i>Clostridium thermoCELLUM</i> ATCC27405	2	1	2	10	1	16	5	1	2	2	4			3					6				3		74
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85		2	3	12	6	9	8	4	3	5	2		5						14				1	1	100
<i>Prevotella ruminicola</i> 23	10	12	4	1	1	4			5	2	1	3	1	5	6	2	1	1	20		8	1	2	6	135
<i>Ruminococcus albus</i> 7	3	5	13	1	8	5	5	2		5	8	1	1				6		7				2	1	100
<i>Selenomonas ruminantium</i> TAM6421	6	1	2		1				5	1	1	1	1												36
<i>Homo sapiens</i>	9	2			1				7	8				10	5		5		7						98

資料來自 CAZy 網站 (<http://www.cazy.org/>), 2016年2月2日。

非常可能的，人類的影響是造成20世紀中期以來地球暖化的主因

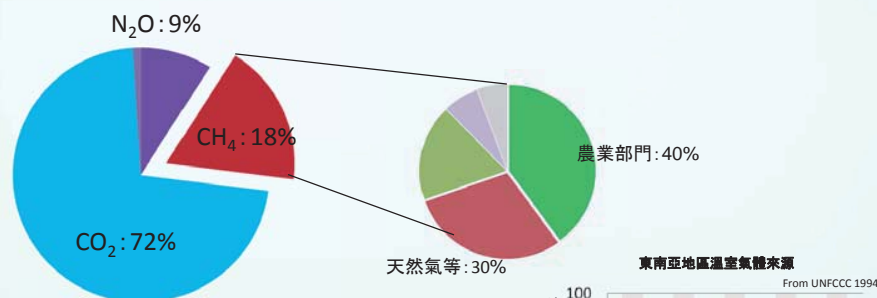
(2014年WGI SPM 標題)

2014



於2013年秋季，西太平洋上生成很多颱風

溫室氣體排放來源 (CO₂ 當量)



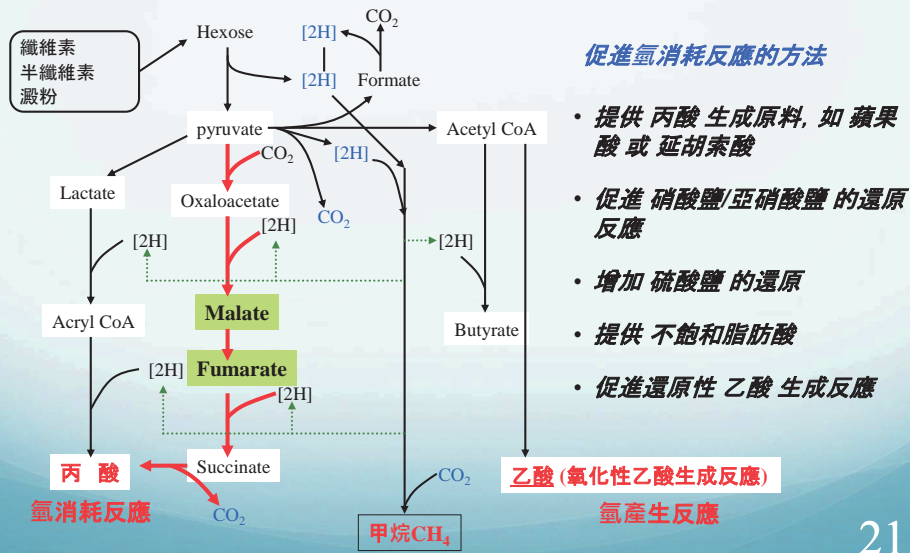
- 甲烷約占溫室氣體排放的 20%
- 約 40% 的甲烷源自農業
- 東南亞國家農業部門有較高的甲烷排放比例，主要因為水稻種植及家畜的胃腸發酵

胃腸發酵的甲烷排放推估 (2005)

	印尼	泰國*	菲律賓*	馬來西亞*	澳洲	紐西蘭	日本	全球
人口, 百萬	238.4	64.8	87.8	26.9	21.1	4.2	127.8	6449
甲烷(總量), 百萬公噸/年	6.4	3.2	1.5	2.2	4.3	1.2	1.1	92
甲烷(胃腸)/甲烷(農業)	23%	22%	27%	15%	87%	97%	46%	59%
甲烷(農業)/甲烷(總量)	51%	91%	66%	15%	60%	91%	64%	51%
甲烷(總量)/溫室氣體(總量)	15%	23%	31%	32%	20%	35%	1.9%	18%
溫室氣體(農業)/溫室氣體(總量)	9.4%	8.0%	33%	4.8%	16%	48%	2.2%	

* : 1994年清冊資料
溫室氣體資料來自聯合國氣候變化綱要公約

瘤胃內氫產生與消耗的平衡反應



促進氫消耗反應的方法

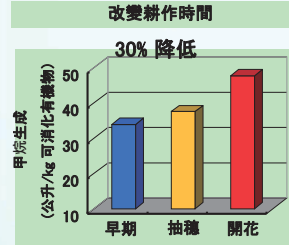
- 提供 丙酸 生成原料, 如 蘋果酸 或 延胡索酸
- 促進 硝酸鹽/亞硝酸鹽 的還原反應
- 增加 硫酸鹽 的還原
- 提供 不飽和脂肪酸
- 促進還原性 乙酸 生成反應

21

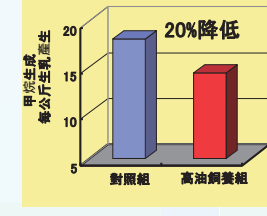
對環境及家畜友善的動物產品

降低環境衝擊的技術

自飼養減低甲烷排放

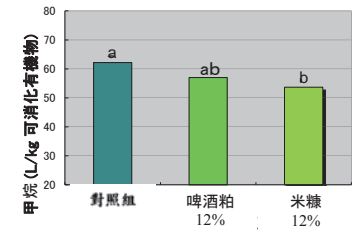


高油脂飼養

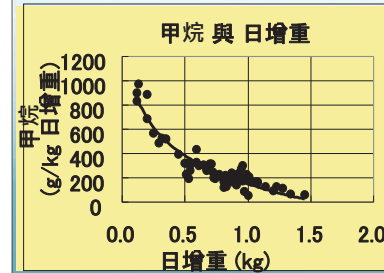


甲烷減量

使用副產物為飼糧



提高生產力, 降低甲烷單位生成量



自動物面與植物面考慮

- 育種
- 繁殖
- 耕作
- 飼養等

需要整合性與全面性的技術

Ruminant microbiology in cow nutrition

Akio TAKENAKA Ph. D
Deputy Director
Food & Fertilizer Technology Center (FFTC)



ルーメン微生物と乳牛の栄養

- 反すう家畜の消化管とそこに生息する微生物
 - 微生物学の歴史
 - ルーメン微生物の生態とその機能
- ルーメン微生物の解析手法
 - ルーメン微生物の分類
 - 環境DNA (eDNA) の解析手法
- ルーメン微生物のふたつの主な機能について
 - 繊維分解
 - メタン生成

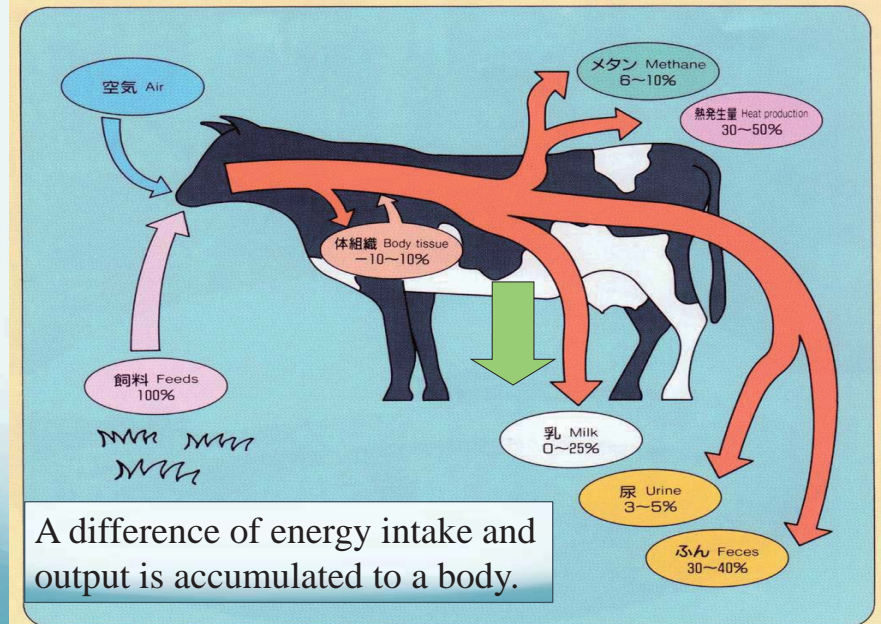


微生物学と分子生物学の簡単な歴史

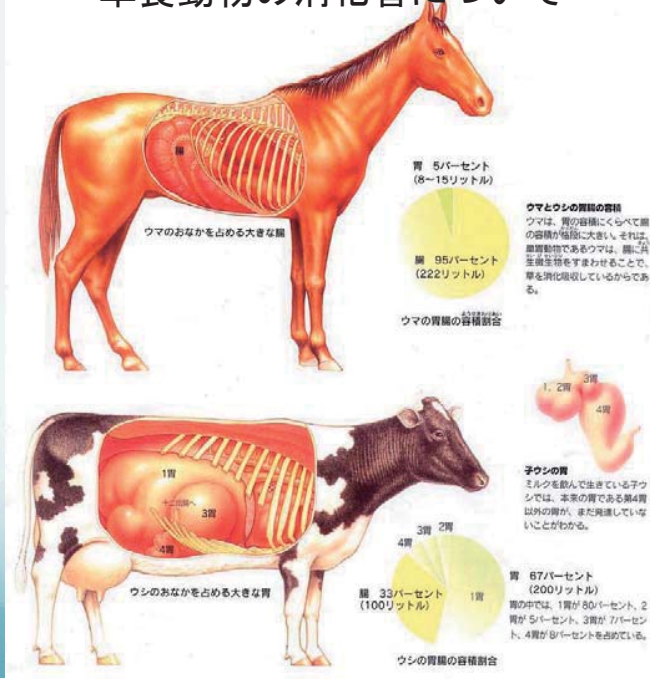
- 1674 Leeuwenhoekによる細菌の発見
- 1843 ルーメン内に原生動物が生息していることが報告
- 1860 Pasteurによる自然発生説の否定
- 1882 Kochがゼラチン培地を用いて細菌の純粋培養法考案
- 1950 Hungateによる嫌気性Roll tube法の開発
- 1953 WatsonとCrickがDNAの二重らせん構造を発見
- 1977 SangerらによるDNA塩基配列決定法
- 1988 耐熱性DNAポリメラーゼによるPCR法が発表
- 1995 細菌ゲノムの完全配列の決定(*Haemophilus influenzae*)
- 2003 ヒトゲノムの完全解読

ポストゲノムの一環としての難培養性微生物研究の進展

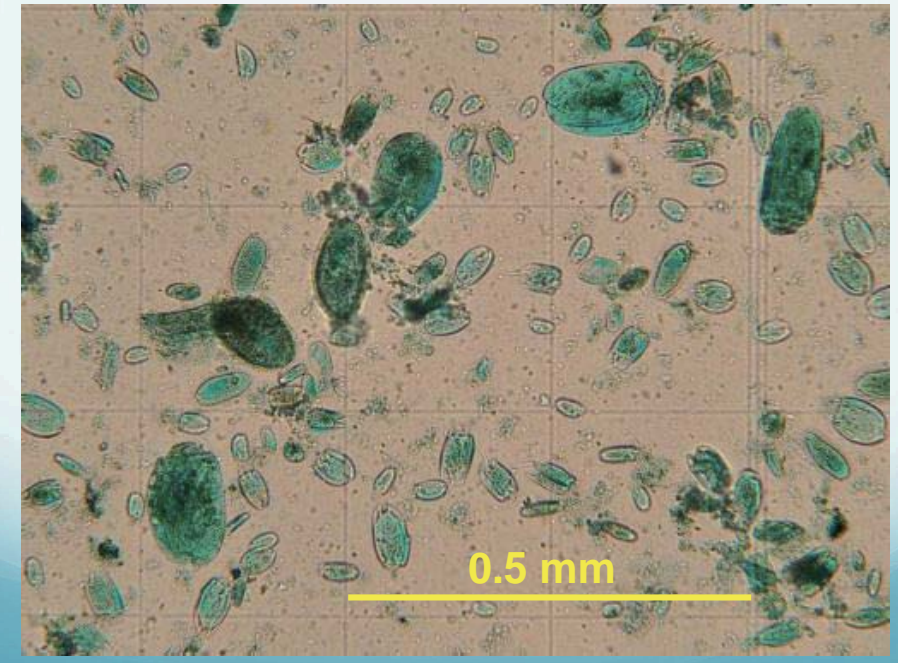
エネルギー出納 Distribution of gross energy consumed



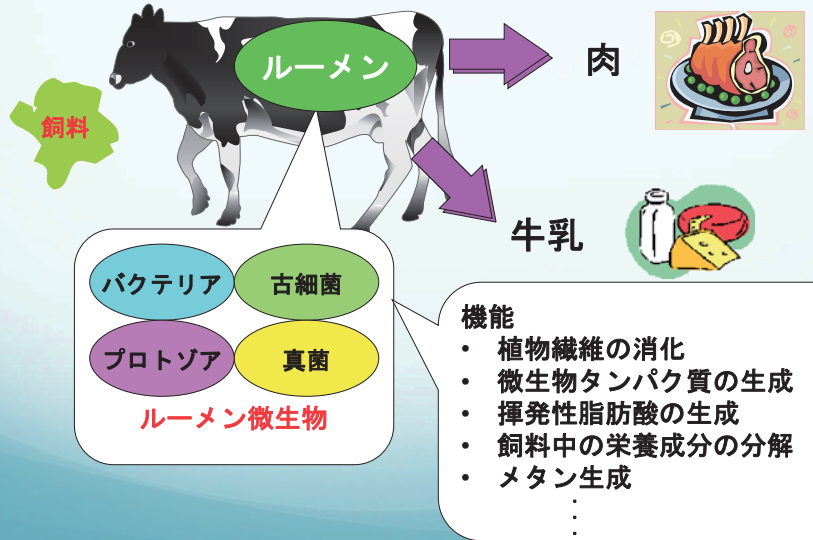
草食動物の消化管について



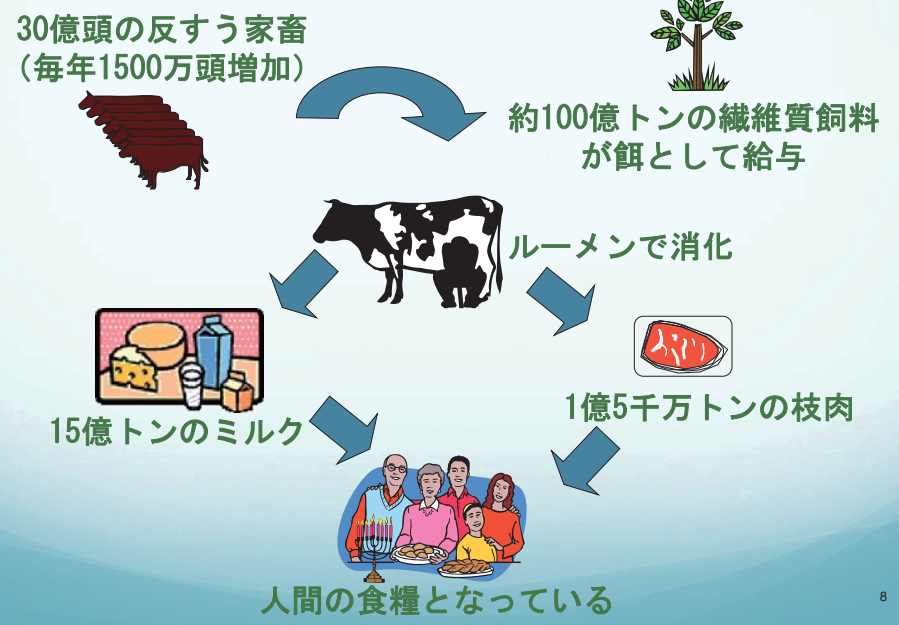
ルーメン内容液を顕微鏡でのぞいて見ると



ルーメン微生物の機能



世界的な規模での反すう家畜の役割 (1年で)



主なルーメン細菌

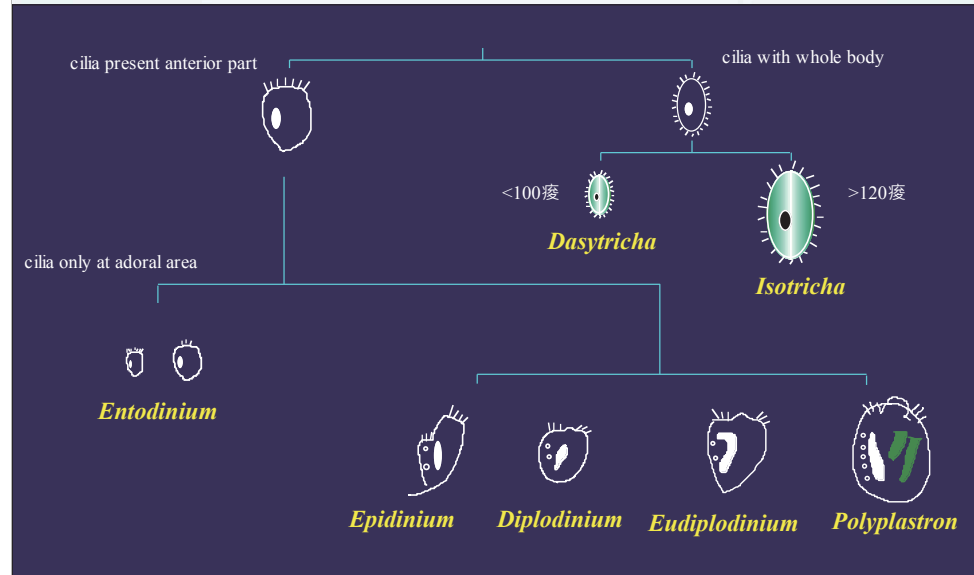
表1 利用栄養素別に分類した代表的なルーメン細菌とその特性

細菌種	分類 ¹⁾
セルロース分解菌	
ファイロバクター・サクシノジェネス (<i>Fibrobacter succinogenes</i>)	G ⁻ 、桿菌
ルミノコッカス・アルプス (<i>Ruminococcus albus</i>)	G ⁺ 、球菌
ルミノコッカス・フラベフェーション (<i>Ruminococcus flavefaciens</i>)	G ⁺ 、球菌
ヘミセルロース・ペクチン利用菌	
プロボテッラ・ルミニコーラ (<i>Prevotella ruminicola</i>)	G ⁻ 、桿菌
ビューチリビブリオ・ファイブリソルベンス (<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>)	G ⁺ 、桿菌
デンプン分解菌	
ルミノバクター・アミロフィラス (<i>Ruminobacter amylophilus</i>)	G ⁻ 、桿菌
ストレプトコッカス・ボビス (<i>Streptococcus bovis</i>)	G ⁺ 、球菌、通嫌
有機酸利用菌	
メガスフェラー・エルスデニアイ (<i>Megasphaera elsdenii</i>)	G ⁻ 、球菌
セレンオナス・ルミナンティウム (<i>Selenomonas ruminantium</i>)	G ⁻ 、桿菌

¹⁾ G⁺: グラム陽性、G⁻: グラム陰性、通嫌: 通性嫌気性菌 (=酸素存在下では酸素呼吸を行う)。記載のないものは偏性嫌気性菌。
²⁾ Cl: セルロース、Xy: キシラン、Pc: ペクチン、Fr: フラクタン、St: デンプン、Pr: 蛋白質・アミノ酸、Lc: 乳酸、この他に多くの細菌で、種々の単・少糖類が利用可能。

³⁾ Fm: ギ酸、Ac: エタノール。
⁴⁾ ラッセルとボーン
⁵⁾ ラッセルとドン

ルーメンプロトゾアの形態による分類



ルーメンプロトゾアの解析手法

ルーメンプロトゾアはin vitroでの培養が困難である。しかし、プロトゾアは接触によってのみ感染することから、他の動物から隔離することによってプロトゾアのいない動物を作成することが可能である。

- ◆ Faunated:
 - ・ 通常の動物には複数種のプロトゾアが棲息している。
- ◆ Unfaunated:
 - ・ 分娩後すぐに親牛から隔離することによって、プロトゾアのいない子牛を作ることができる。
- ◆ Defaunated:
 - ・ 特定の手法によってルーメンプロトゾアを除去することができる。(洗浄法、界面活性剤や中鎖脂肪酸の投与などによる)
- ◆ Monofaunated:
 - ・ プロトゾアのいない動物に一種類のプロトゾアだけを感染させることが可能。

プロトゾア相の違いが乾物、エネルギー、粗蛋白質、NDFおよびADF消化率に与える影響

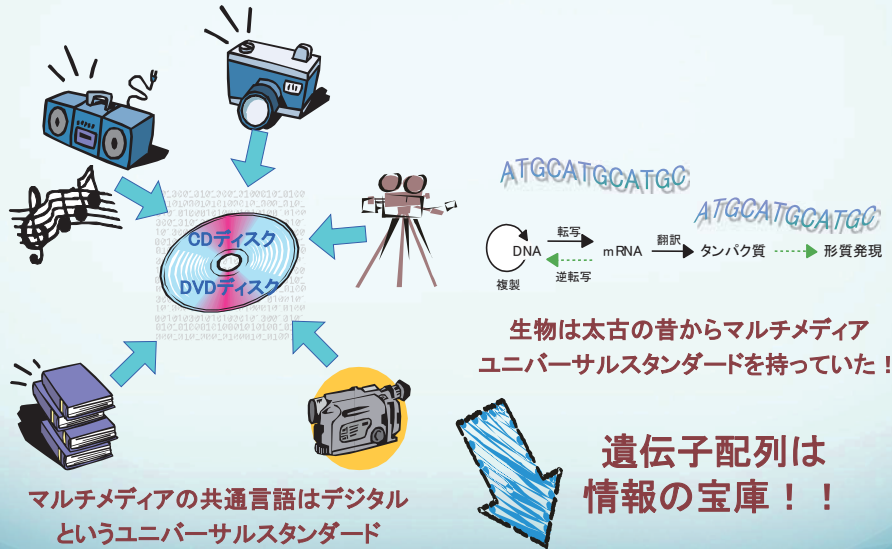
	Unf (n=5)	Mono-fau (n=6)	Poly-fau (n=6)
乾物	67.86±0.98	70.78±1.09	73.15±0.81**
エネルギー	66.02±0.92	68.63±1.24	71.40±1.06*
粗蛋白質	56.56±1.24	59.60±1.68	64.20±1.84*
NDF	57.26±1.23	58.90±1.71	63.28±1.29**
ADF	54.02±0.85	50.38±2.65	62.53±1.11**

数値は平均±標準誤差。

*: p<0.05, **: p<0.01

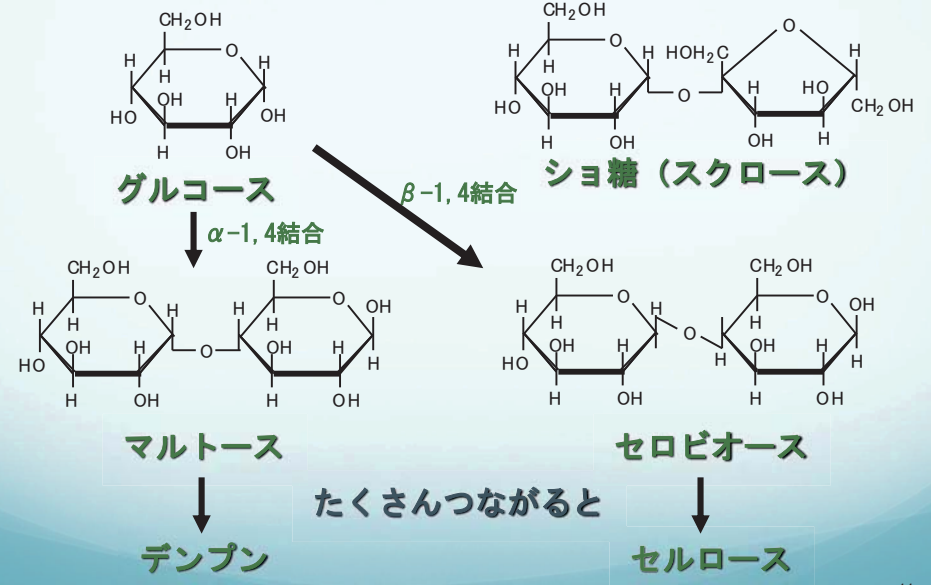
粗飼料:濃厚飼料=1:1

遺伝子ってずっと前からマルチメディア

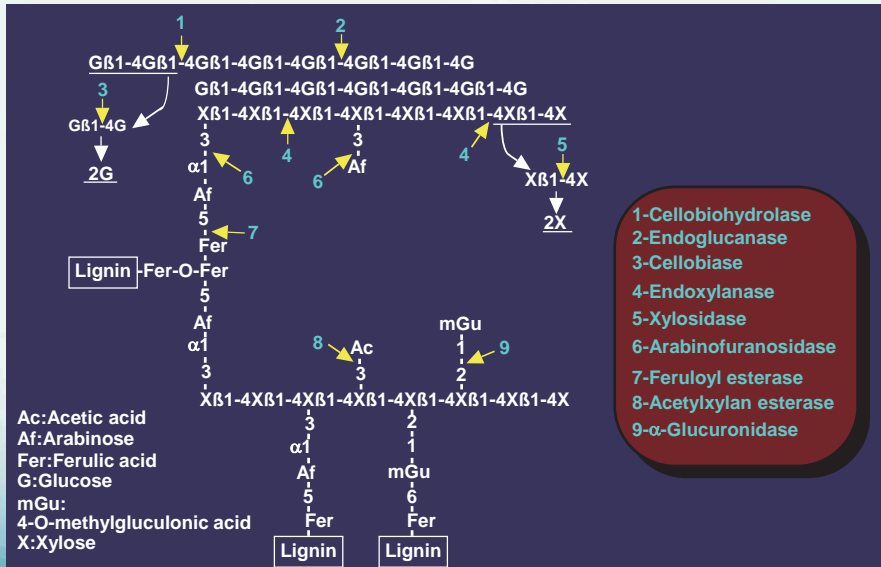


さて、どのように活用しましょうか？

糖の構造



繊維分解酵素の分解部位



β-グルカンナーゼに関連するファミリーとルーメン細菌、共生真核生物由来遺伝子の分布

Family Number	Total Number	From Archaea	From Bacteria	From Eukaryota	From Virus	Unclassified	From Rumen Bacteria	From Rumen Fungi	From Rumen Protozoa	
1	9559	(1001)	109	8459	949	-	41	18(-)	5(5)	-
3	9732	(939)	89	8760	770	-	113	56(6)	3(1)	-
4	3903	(174)	34	3867	-	-	2	3(-)	-	-
5	6833	(910)	57	4860	1799	-	114	82(21)	20(11)	14(5)
6	698	(123)	-	519	175	-	4	-	42(22)	-
7	5078	(142)	-	10	5064	-	-	10(-)	-	-
8	1727	(137)	-	1702	4	-	21	36(12)	-	-
9	1937	(307)	4	856	866	-	211	39(29)	4(2)	-
10	2282	(309)	14	1566	351	-	351	22(12)	2(2)	7(2)
11	1150	(256)	5	582	459	-	104	-	31(21)	4(2)
12	551	(114)	66	354	130	-	1	22(4)	-	-
16	4272	(649)	18	1920	2276	49	11	34(2)	8(1)	-
26	940	(105)	5	888	33	-	14	67(5)	5(5)	-
43	5139	(364)	17	4766	329	-	27	5(2)	1(-)	-
44	108	(19)	-	104	3	-	1	4(-)	-	-
45	350	(81)	-	18	325	-	7	22(1)	1(1)	-
48	748	(28)	-	723	22	1	2	15(1)	3(2)	-
51	1450	(137)	20	1256	134	20	20	-	-	-
74	246	(27)	-	222	21	-	3	5(-)	-	-
	56703	(5887)	438	41432	13710	70	1047	440(95)	125(73)	25(9)

EC number: 3.2.1.4, 3.2.1.6, 3.2.1.8, 3.2.1.21, 3.2.1.1
 これらのデータはCAZyホームページ (<http://www.cazy.org/>)より集計(2016. 2. 2)
 括弧内のデータは2007. 2. 16に集計したもの

全ゲノム配列に存在するGHファミリー遺伝子分布(一部)

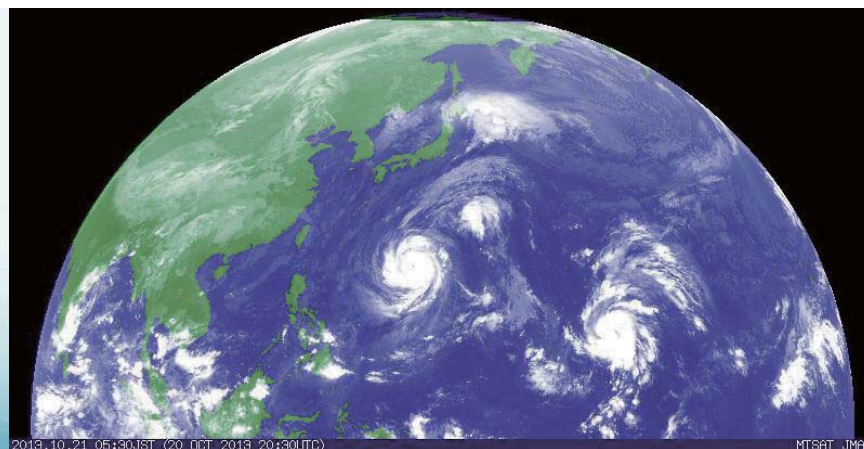
GH family No.	1	2	3	5	8	9	10	11	13	16	18	25	26	28	31	35	36	38	43	47	92	94	95	97	Total	
<i>Butyrvivrio fibrisolvans</i> 16/4	3	3	6	4	1	2	2		9	2	1	5			2	1	2		15						75	
<i>Butyrvivrio proteoclasticus</i> B316	1	9	10	4	1	3	6		14	2	1	5		2	5	2	3	1	11					2	1	111
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC27405	2	1	2	10	1	16	5	1	2	2	4		3						6						3	74
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85		2	3	12	6	9	8	4	3	5	2		5						14						1	100
<i>Prevotella ruminicola</i> 23		10	12	4	1	1	4		5	2	1	3	1	5	6	2	1	1	20		8				1	135
<i>Ruminococcus albus</i> 7		3	5	13	1	8	5	5	5	2		5	8	1	1			6		7				2	1	100
<i>Selenomonas ruminantium</i> TAM6421		6	1	2		1			5	1	1		1	1					1							36
<i>Homo sapiens</i>		9	2			1			7		8				10	5		5		7						98

これらのデータはCAZyホームページ(<http://www.cazy.org/>)より集計(2016. 2. 2)

It is *extremely likely* that human influence has been the dominant cause of the observed warming since the mid-20th century.

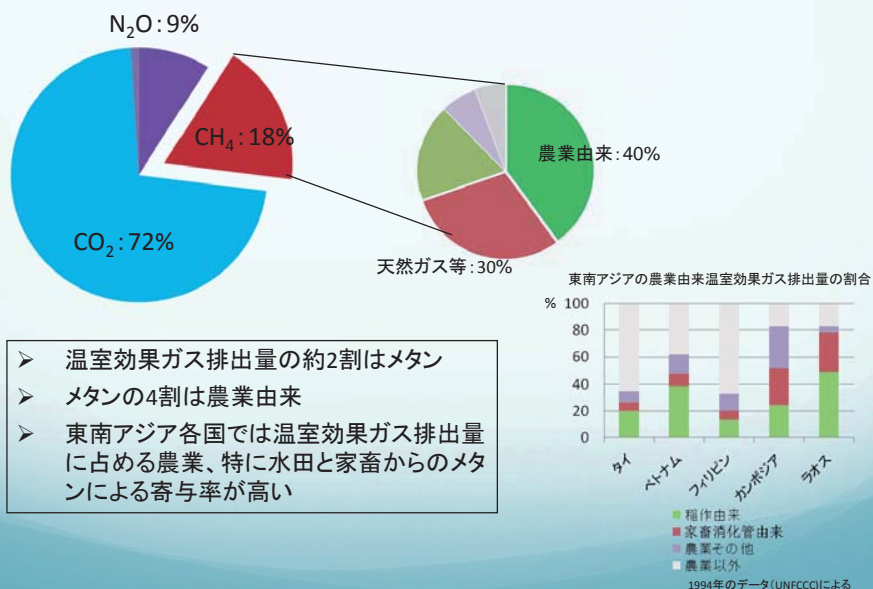
20世紀半ば以降観測された温暖化の主な原因は人類が及ぼしている可能性が非常に高い。

From the HEADLINE STATEMENTS of the WGI SPM



写真は2013年秋、日本近海に多くの台風が発生している様子

温室効果ガス排出源(CO₂換算値)

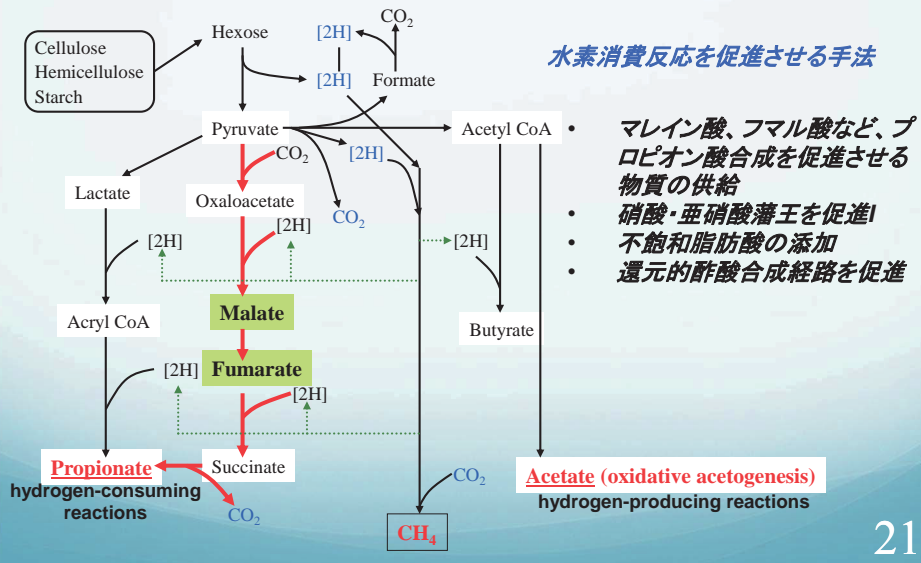


消化管由来メタンの概要(2005)

	インドネシア*	タイ*	フィリピン*	マレーシア*	オーストラリア	ニュージーランド	日本	全世界
人口、百万人	238.4	64.8	87.8	26.9	21.1	4.2	127.8	6449
メタン(全体), Tg/yr	6.4	3.2	1.5	2.2	4.3	1.2	1.1	92
消化管/農業	23%	22%	27%	15%	87%	97%	46%	59%
農業/全体	51%	91%	66%	15%	60%	91%	64%	51%
メタン/温室効果ガス	15%	23%	31%	32%	20%	35%	1.9%	18%
農業/温室効果ガス	9.4%	8.0%	33%	4.8%	16%	48%	2.2%	

*: 1994年のインベントリデータ GHG データはUNFCCCより

ルーメン内における水素生成と水素消費反応のバランス



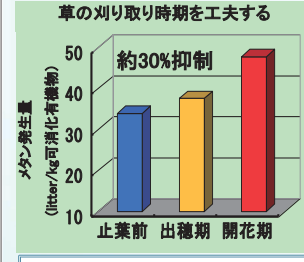
水素消費反応を促進させる手法

- マレイン酸、フマル酸など、プロピオン酸合成を促進させる物質の供給
- 硝酸・亜硝酸薄層を促進!
- 不飽和脂肪酸の添加
- 還元的酢酸合成経路を促進

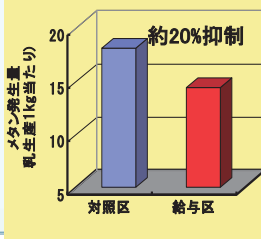
家畜にも環境にも優しい畜産物を目指して

3-②環境負荷を低減する飼養技術

飼料を工夫してメタンを減らす

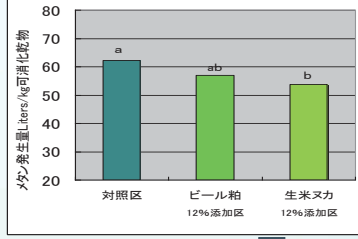


高脂肪飼料を上手に利用する

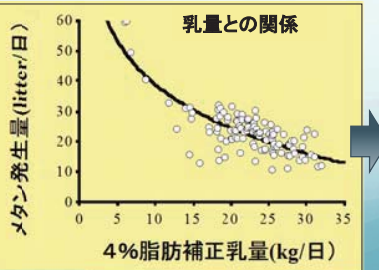
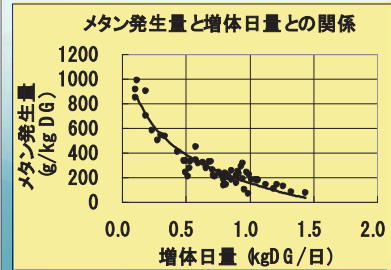


家畜からのメタンを減らす

食品製造副産物を上手に利用する



生産性を高めて、メタンを減らす



動物、植物両面から
 ・育種
 ・繁殖
 ・栽培・飼養
 など
 総合的な研究が重要