

応用研究論文

# ルーメン液による木材由来セルロースとリグニン試料の揮発性脂肪酸発酵量に関する基礎的研究

戸田守一<sup>1</sup>, 中村昇<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 所属なし

<sup>2</sup> 岡山大学大学院環境生命科学研究科社会基盤環境学専攻都市環境創成学講座

木材を家畜の飼料にする方法として家畜の体外で反芻動物のルーメン液を用いて木材セルロースを発酵し、生成した揮発性脂肪酸を取り出して飼料に加工することを試みた。本研究は微細化された木材由来セルロースであるセルロースナノファイバー(CNF)を牛のルーメン液により *in vitro* で発酵するための最適な揮発性脂肪酸(VFA)の生成条件と、木材の難消化性の原因とされるリグニンの影響を検討することを目的とした。CNF は従来のセルロース試料よりも VFA を多く生成したため、VFA 生産の基質として優れている。最適な発酵時間は 24 時間であり、ルーメン液 10ml と人工唾液 20ml に対して最適な CNF の量は、CNF 当たりでは 100mg、一度の生成量なら 200mg であった。リグニン試料のみを基質としてもルーメン発酵の VFA 製施療量が増加し、リグニン試料は分解された可能性が高かったこと、CNF と共に発酵しても VFA の生成を阻害しなかったことから、リグニン自体はルーメン発酵による木材の分解を阻害せず、木材の難消化性はセルロースの結晶構造やセルロースとリグニンの複合構造が原因だと考えられる。

**キーワード：**家畜飼料，木材セルロース，セルロースナノファイバー，ルーメン発酵，揮発性脂肪酸，リグニン

木材は再生可能かつ日本国内で自給できる資源であり、現在の主な利用法である建築用材やパルプ原料以外の新たな用途の開発のために様々な研究が行われている。その一つに家畜用の飼料とする試みがある。草食家畜である牛や羊などに与える飼料は二種類に大別され、一つは濃厚飼料と呼ばれるエネルギーやタンパク質に富んだトウモロコシやダイズなど、もう一つは粗飼料と呼ばれるエネルギーやたんぱく質は少ないが消化機能を安定させるために必要な粗繊維が多く含まれる乾草やサイレージなどである。現在の草食家畜飼育の主流は濃厚飼料を多量に与えて太らせる方法が主流だが、農林水産省によると濃厚飼料の国内自給率は 12%前後と低く、飼育のコストが高くなる原因の一つである（農林水産省、2022）。濃厚飼料自給率を上げるための努力は行われているが、不作や農業政策などによって供給量が変化するため安定しているとは言えないのが現状である。木材を原料とするメリットは国内で調達するこ

とが可能であり、トウモロコシなどとは違って人間の食料と競合しないため、国際的な需要増大に伴う穀物価格の上昇などの影響が小さい。また、木材は長期保存のコストを穀物などよりも低く抑えられる。

草食家畜の消化吸収はルーメンと呼ばれる第一胃内にて微生物や酵素などの働きによりセルロースやでんぷん等を揮発性脂肪酸（VFA）と総称される低分子の酸にまで分解し、胃壁内で吸収する方式である（小野寺と板橋、2004）。VFA の比率は与えた飼料にもよるが、基本的に酢酸が約 7 割、プロピオン酸が 2 割、酪酸が 1 割とそれ以外の酸が微量である。木材由来のセルロース、ヘミセルロース、リグニンはルーメン内で分解されることが Joblin と Naylor（1989）により明らかになっているが、木粉を飼料に家畜を生育すると穀物に比べて生育速度が遅いことが Clarke と Dyer（1973）により報告されている。木材を飼料とするために消化性を向上するための様々なアプローチが行われ、現在の加工法の主流は

蒸煮による解繊である。蒸煮されたものは粗飼料として扱われ、木材から濃厚飼料の代替になる飼料は作られていない。木材をパルプ化することにより消化率を向上する試みも行われており、飼料の一部を木材由来のセルロースに変えても総 VFA や pH に大きな変化はなく、十分に生育できることが報告されている (Kim ら, 2019) (Maeda ら, 2019)。しかし、木材由来パルプでも通常の試料より消化速度が遅いと把田, 八代, 町田, 梶川 (2016) により報告されている。パルプ中のリグニンが少ないほど消化率は高いと Baker (1973) が報告しているが、木粉の化学処理は水酸化ナトリウム、硫酸では効果がないことが Keith と Daniels (1976) に報告されており、薬品が飼料に含まれることによる家畜の健康への影響も懸念される。

難消化性と残留薬品の問題点を解決する方法として、木材由来のセルロースを反芻動物から採取したルーメン液を用いて体外にて発酵させ、VFA などの栄養分のみを取り出して与える方法を考案した。

本研究では木材由来のセルロースを *in vitro* にてルーメン発酵させた際に VFA 生成量が最適となる発酵条件を検討した。木材由来セルロースにはセルロースナノファイバー (CNF) を主に用いた。CNF はパルプをさらに微細化してあるため、普通のパルプなどよりも発酵されやすいと考えられる。また、木材の難消化性の原因の一つにリグニン存在があるが、成分そのものが生分解を阻害しているのか否かを検討するため、木材由来のリグニン試料を単独あるいはセルロースと共にルーメン発酵に供し、リグニンが VFA 生成量に与える影響についても検討した。本研究でリグニンとして用いた試料は木材中に存在する状態から変質しているため「リグニン」とは書かず、「リグニン試料」と表記する。

## 実験

### 試料採集及び調製

ルーメン液は秋田県立大学大湯キャンパスにて短角牛から経口吸引によりルーメン液を採集し、CO<sub>2</sub> 環境下で 4 層のガーゼで粗く濾過し、39℃で保温した。人工唾液は K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 292mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 240mg, NaCl

480mg, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 64mg, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 100mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 480mg, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4000mg, システイン塩酸塩・一水和物 670mg を 1 L に調製し、塩酸にて pH6.5 (40℃) となるように調整した (Russel, Martin. 1984)。セルロースナノファイバーは BiNF-i-s (Sugino Machine Limited) (CNFB) とセリッシュ (DAICEL FINECHEM LTD.) (CNFC) をそれぞれスプレードライヤーにより粉末化し、100μm 通過区分を試料として用いた。CNF 以外のセルロース試料としてセルロース粉末 (和光富士フィルム, 38μm (400mesh) 通過) (CP)、微結晶セルロース (Alfa Aester, 250μm (60mesh) 通過:92%, 75μm (200mesh) 通過:30-55%) (CM)、粉末ろ紙 (ADVANTEC, 150μm (100mesh) 通過) (PP) の 3 種類を用意した。いずれの試料も市販されている。リグニン試料はリグニンスルホン酸ナトリウム、リグニン(脱アルカリ)を東京化成工業より購入し、クラーソンリグニンをブナ木粉から調製した。

### ルーメン発酵

蓋つき試験管に基質を秤量し、人工唾液 20mL とルーメン液 10mL を加え、39℃、CO<sub>2</sub> による嫌気環境下で軽く攪拌しながら醗酵させた。発酵時間は特に言及しない限り 24 時間である。各実験に対照として基質を何も加えないルーメン液を同条件で発酵した。各試料につき 5 検体ずつ実験を行った。

## 分析

### 揮発性脂肪酸 (VFA) 量の測定.

ルーメン液を冷蔵庫で 10 分間冷却し、pH メーターにて pH を測定した。1.8 mL のルーメン液を 2mL 容のエッペンチューブに移し、10,000rpm で 10 分間遠心分離した。1mL の上清を別の 2mL 容エッペンチューブに移し 100μL の内部標準と 200μL のメタリン酸-ギ酸溶液を加えてよく攪拌し、冷蔵庫で 30 分間冷却した。10,000rpm で 10 分間、遠心分離し、約 1mL 程度の上清を GC 用バイアルに移した。GC で分析し、VFA 濃度を算出した。(Hamano, 2017)

### 紫外吸光度の測定.

リグニンスルホン酸ナトリウムを添加して発酵したルーメン液を 4,800rpm で 10 分間、遠心分離し、上澄みを希釈して 280nm の吸光度を測定した。比較

のために基質を加えずに発酵したルーメン液に上記と等量のリグニンスルホン酸ナトリウムを加え、同様に吸光度を測定した。

### 統計分析.

統計分析は、EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用した。

## 結果と考察

### セルロースナノファイバーと他のセルロース試料の VFA 生成量の比較.

5 種類のセルロース試料 (セルロースナノファイバーより BiNF-s (CNFB) とセリッシュ (CNFC)、セルロース粉末 (CP)、微結晶セルロース (CM)、粉末ろ紙 (PP)) 200mg をそれぞれ基質として 24 時間発酵したルーメン液の VFA 含有量を調べた。

表 1 に、様々なセルロース試料を基質として発酵したルーメン液の VFA 含有量を示した。CM と PP を除くすべてのセルロース試料は、対照よりも高い VFA 含有量を示した。CNFB と CNFC の両方の CNF 試料が CP と CM よりも高い総 VFA 量を示し、CNF は他のセルロースよりもルーメンによる発酵が進みやすいことが示された。CNFC と CNFB で発酵させたルーメン液の総 VFA 量は対照よりそれぞれ 27.12mmol/L と 11.85mmol/L 高く、同じ CNF の間でも VFA 生成量に差が出ることが示された。CM と PP の総 VFA 量は対照と有意差はなく、CM と PP はルーメン発酵の基質には適さない。セルロースの粒子サイズが小さいほど VFA 生成量が多い傾向がみられた。CNF は他のセルロースよりも粒子サイズが大きい、セルロースの解繊が進んでいるため VFA 生成量が多かったと考えられる。

サンプル間の変動係数が小さいため、以降の実験では CNFB を CNF サンプルとして用いた。

### 発酵時間の変化に対する VFA 量の変化.

CNF をルーメン発酵する最適な発酵時間を検討するため、CNFB を基質としてルーメン液を発酵し、時間ごとに取り出して VFA 量を測定した。発酵時間に対する VFA 含有量の変化を図 1 に示す。対照として CNFB を加えなかったルーメン液の VFA 含有量の変化を図 2 に、図 1 と図 2 の差を図 3 に示す。

図 2 のように VFA が生産されないと時間と共に揮発して減少した。CNFB を含むルーメン液の総 VFA 量は約 18 時間でピークに達し、その後時間とともに減少した。CNFB と対照のルーメン液中の総 VFA 量の差では 24 時間でピークに達し、CNF からの VFA 生成は 24 時間付近で最大になると考えられる。24 時間時点では酢酸の比率が大きくなり、これは基質がセルロースのみであるためだと考えられる。

ルーメン液中の VFA 含有量と CNF からの VFA 生成量のピーク時間が異なるが、対照の VFA 含有量が時間とともに減少していることから、発酵環境を改善することでルーメン液中の VFA 含有量のピーク時間も 24 時間に近づくと考えられる。

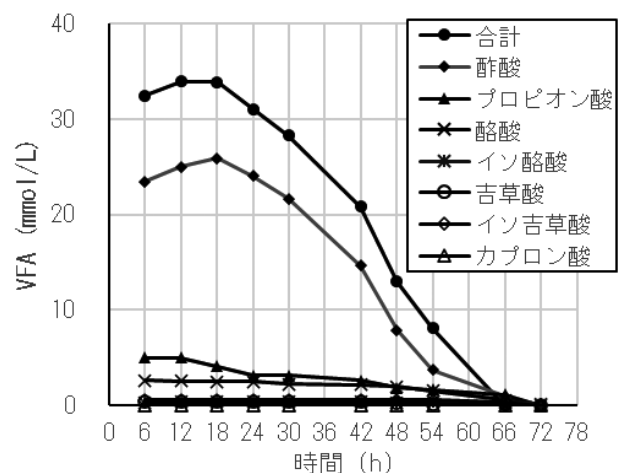


図 1 CNFB を発酵したルーメン液の VFA 含有量

表 1 各種セルロース試料を発酵したルーメン液の揮発性脂肪酸含有量

試料	粒子サイズ (mm)	揮発性脂肪酸含有量 (mmol/L)							合計 のSD
		酢酸	プロピオン酸	酪酸	イソ酪酸	吉草酸	イソ吉草酸	カブロン酸	
対照	-	19.71	5.02	4.02	0.62	0.30	0.75	0.06	30.50 3.88
CNFC	100	33.73	14.87	7.85	0.42	0.29	0.44	0.02	57.62 3.06
CNFB	100	27.61	8.26	4.78	0.48	0.26	0.95	0.00	42.35 2.07
CP	38	22.40	7.42	4.68	0.61	0.24	0.85	0.02	36.22 0.47
CM	250/75	21.22	6.51	4.22	0.54	0.28	0.68	0.06	33.51 1.62
PP	150	18.69	4.71	4.14	0.48	0.30	0.68	0.06	29.06 0.75

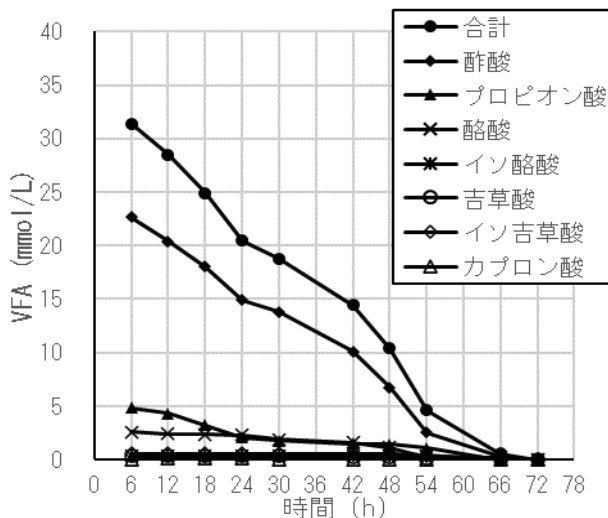


図2 対照のルーメン液のVFA含有量

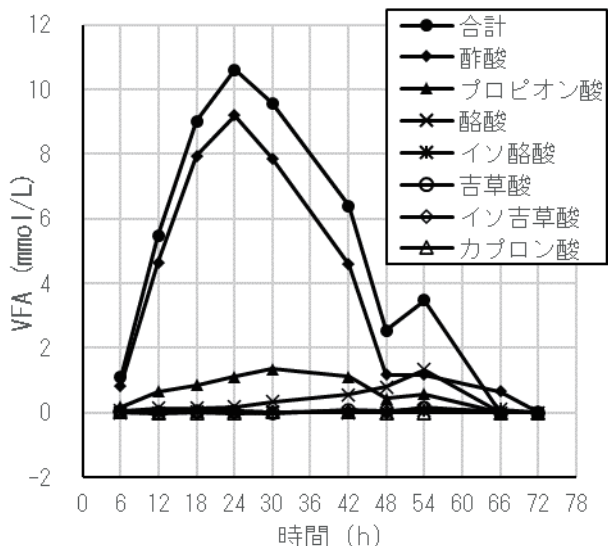


図3 CNFBを加えたルーメン液と対照の差

#### CNF 量の変化に対する VFA 量の変化.

ルーメン発酵に供する CNF の最も効果的な量を検討するため、異なる量の CNFB を基質として発酵したルーメン液の VFA 含有量を調べた。

図4に、50～600mgのCNFBを基質として発酵したルーメン液のVFA含有量を示す。CNFB量が200mgまではCNFBの増加につれてVFA含有量が増加したが、200mgを超えるとVFA含有量に大きな変化は見られなくなった。

今回の実験条件においてVFAを得るための最適なCNFの量は、加えるCNF当たりで考えるなら約100mgであり、一度の発酵での最大量を考えるなら

約200mgになると考えられる。

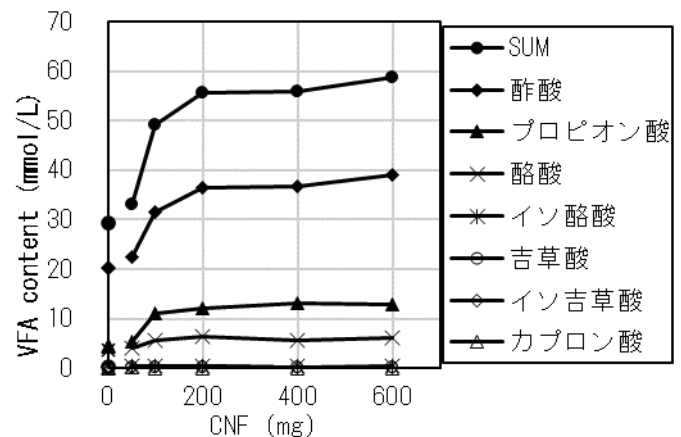


図4 CNFBの量を変えたルーメン液のVFA含有量

#### リグニン試料を加えて発酵したルーメン液のVFA量.

ルーメン発酵におけるリグニンの影響を調べるため、リグニンスルホン酸ナトリウム (LS)、リグニン (脱アルカリ) (LD)、ブナ材のクラークソン残渣 (KR) の3種類のリグニン試料を基質として発酵したルーメン液のVFA含有量をそれぞれ調べた。比較のため同じルーメン液にCNFBのみを加えて発酵させたルーメン液のVFA含有量も調べた。リグニン試料とCNFBの量は、一般的な木材中の割合に応じて、それぞれ100mgと200mgとした。

表2に、各試料を基質として発酵したルーメン液のVFA含有量を示す。すべてのリグニン試料を加えたルーメン液は、対照よりも高い総VFA量を示したが、CNFBを加えたものよりは低かった。図5にLSを加えて発酵したルーメン液と発酵後に同量のLSを加えたルーメン液をそれぞれ40倍に薄めた試料の280nmにおけるUV吸光度を示した。LSの発酵によりリグニン由来の吸光度が減少し、ルーメン発酵にてLSがある程度分解されたことが示唆された。LS以外のリグニン試料は発酵前は水に溶解しなかったため、吸光度の比較ができなかった。

これらの結果より、ルーメン発酵ではリグニンを基質にしてVFAを生成している可能性が示唆された。また、LDはルーメン発酵により水可溶化したことが観察されたことは、リグニンが分解された可能性を支持するものである。



表2 リグニン試料を加えて発酵したルーメン液のVFA含有量

試料	揮発性脂肪酸含有量 (mmol/L)							合計 のSD
	酢酸	プロピオン酸	酪酸	イソ酪酸	吉草酸	イソ吉草酸	カプロン酸	
対照 <sup>a</sup>	19.89	3.94	1.72	0.21	0.17	0.32	—	26.24 1.22
CNFB <sup>a</sup>	29.73	7.43	2.67	0.29	0.18	0.34	—	40.65 8.22
LS <sup>b</sup>	26.02	4.53	2.43	0.23	0.28	0.33	—	33.82 0.86
LD <sup>b</sup>	28.25	5.27	2.26	0.26	0.19	0.51	—	36.73 3.62
KR <sup>b</sup>	26.07	4.67	2.08	0.26	0.18	0.50	—	33.77 1.34

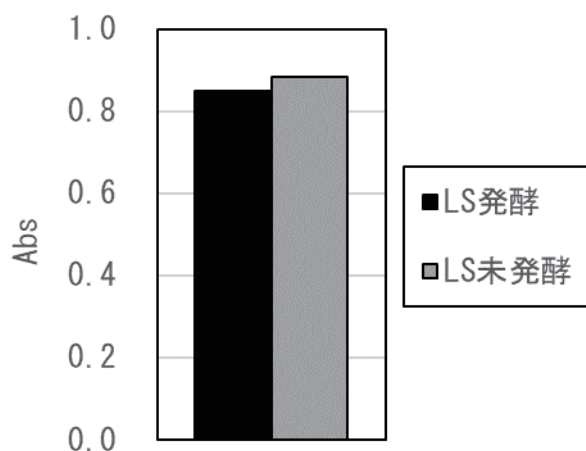
<sup>a</sup> n=5<sup>b</sup> n=3

図5 LSを加えたルーメン液の280nmの吸光度

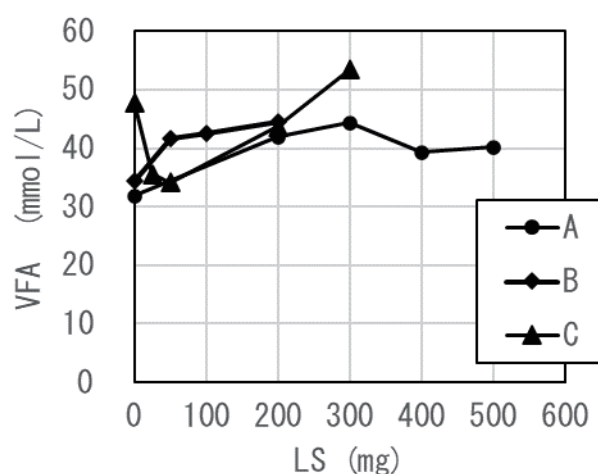


図6 異なる量のLSを発酵したルーメン液のVFA量

### リグニンスルホン酸ナトリウム量の変化に対するVFA量の変化.

リグニンの量がルーメン発酵におけるVFA生成量に与える影響を検討するため、様々な量のLSを加えて発酵したルーメン液のVFA含有量を測定した。図6に収集日の異なる3種類のルーメン液A、B、Cにそれぞれ異なる量のLSを基質として発酵した際のVFA含有量を示す。A、BともにLSの添加によりVFA含有量が増加したが、LSの添加量を増加させても、VFA含有量が約42mmol/L前後から大きな変化は見られなかった。一方で、Cでは、LS添加が50mgと少量なら対照よりも総VFA量が低くなったが、300mgでは42mmol/Lを超えて増加した。以上の結果はルーメン液の状態次第で、LSによるルーメン液のVFA生成挙動が異なることを示している。

### セルロースナノファイバーのルーメン発酵へのリグニンスルホン酸ナトリウムの影響.

ルーメン発酵におけるセルロースからのVFA生成にリグニンが与える影響を検討するために、200mgのCNFBと100mgのLSを共に基質として発酵したルーメン液と、CNFBとLSをそれぞれ単独で基質として発酵したルーメン液のVFA含有量をそれぞれ測定した。表3に結果を示す。

CNFBとLSを共に発酵したルーメン液とCNFBのみを発酵したルーメン液の総VFA量に有意な差はなかった。これは、リグニンの存在自体はルーメン発酵におけるセルロース分解を阻害または促進するものではないことを示唆する結果である。

表3 CNFBとLSを共に、あるいはそれぞれ別に発酵したルーメン液のVFA量

試料	揮発性脂肪酸含有量 (mmol/L)								合計のSD
	酢酸	プロピオン酸	酪酸	イソ酪酸	吉草酸	イソ吉草酸	カプロン酸	合計	
対照	31.16	6.35	6.93	0.57	0.53	0.70	0.10	46.34	2.50
CNFB+LS	45.04	11.26	9.76	0.56	0.56	0.61	0.12	67.90	6.11
CNFB	39.84	11.91	10.35	0.72	0.69	0.80	0.16	64.47	0.97
LS	26.93	5.78	5.30	0.58	0.53	0.64	0.23	39.99	1.60

## 結論

セルロースの粒子は小さいほどルーメン発酵による揮発性脂肪酸（VFA）の生成量が増加し、高度に解繊された木質セルロースであるセルロースナノファイバー（CNF）は通常のセルロースよりも多くのVFAを生成した。

CNFを基質としたルーメン発酵にてVFAの生成に最適な時間は24時間だった。10mLのルーメン液と20mLの人工唾液に対して添加するCNFの最も効果的な量は、加えるCNF当たりで考えるなら約100mgであり、一度の発酵での最大量を考えるなら約200mgになると考えられる。

リグニンスルホン酸ナトリウム（LS）を加えて発酵させたルーメン液は、総VFA含有量が増加し、リグニンが分解されたことから、リグニンはルーメン発酵においてVFAを生成する基質となることが示唆された。セルロースから分離した状態のリグニンはルーメン発酵でのCNFからのVFA生産を阻害しなかった。

これらの結果は、反芻動物における木材の難消化性はリグニンの存在そのものによるものではなく、セルロースマイクロフィブリルの結晶化とリグニンとの複合構造によって生じたことを示唆している。

本研究に用いたリグニン試料は天然の状態から変質しているため、より天然な状態に近いMWLなどで改めて実験を行うことが望ましい。

木材由来セルロースからVFAを生成できることが明らかになった。VFAは揮発性の液体であるためそのままでは保存や供与が難しい。そのため、固形に加工する方法としてミネラルや塩基性アミノ酸との塩を生成させることを試みている。

## 謝辞

研究遂行にあたり様々な助言をいただいた濱野美夫教授に感謝の意を表する。

本実験に用いたルーメン液の採集に協力してくださった秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科の佐藤勝祥助教と同学部附属フィールド教育研センターの小沢聡恵様に感謝の意を表する。

本研究の一部は秋田県立大学の平成30年度新任教員スタートアップ支援研究の助成を受けたものである。

## 文献

- Baker AJ (1973) Effect of Lignin on the In Vitro Digestibility of Wood Pulp. *J Animal Sci* 36:768-771.
- Clarke SD, Dyer IA. (1973). Chemically Degraded Wood in Finishing Beef Cattle Rations, *Journal of Animal Science*, 37(4), 1022–1026.
- Hamano Y, Takahashi T, Agematu H (2017) In vitro and in vivo ruminal fermentation of micronised wood powder for volatile fatty acid production in beef. *Anim Husb Dairy Vet Scicattle* Volume 1 (2)
- Joblin KN, Naylor GE (1989) Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 65:119-122.
- Keith EA, Daniels LB (1976) Acid or Alkali-Treated Hardwood Sawdust as a Feed for Cattle. *J Animal Sci* 42:888–892
- Keith N. Joblin, Graham E. Naylor (1989). Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 65 (1-2), 119-122.
- Kim YH, Takahashi C, Kurosu K, Kushibiki S, Ikuta K,

Kizaki K, Sato S (2019) Wood kraft pulp supplementation alters the rumen fermentation characteristics and epithelial transcriptomes in Holstein cattle during the high-grain diet challenge. *Animal Feed Sci Tech* 257:114292.

Maeda Y, Nishimura K, Kurosu K, Mizuguchi H, Sato S, Terada F, Kushibiki S (2019) Effect of feeding wood kraft pulp on the growth performance, feed digestibility, blood components, and rumen fermentation in Japanese Black fattening steers. *Animal Sci J* 90:523-532

農林水産省（2022）「飼料をめぐる情勢」  
[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryo/](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/)  
日本製紙株式会社, 学校法人日本大学. 把田雅彦, 八代洵, 町田誠, 梶川博. 反芻動物用飼料. 特許 5994964B2. 2016-9-21

小野寺良次（監修）板橋久雄（編）（2004）.『新ルーメンの世界』. 農山漁村文化協会.

Russell JB, Martin SA (1984) Effects of Various Methane Inhibitors on the Fermentation of Amino Acids by Mixed Rumen Microorganisms in Vitro. *J Animal Sci* 59:1329-1338.

〔 令和 4 年 6 月 29 日受付  
令和 4 年 8 月 22 日受理 〕

## Basic Study of Volatile Fatty Acid Production in Rumen Fermentation from Wood-origin Cellulose and Lignin

Morikazu Toda<sup>1</sup> and Noboru Nakamura<sup>2</sup>

<sup>1</sup> No affiliation

<sup>2</sup> Department of Urban Environment Development, Division of Social Engineering and Environmental Management, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

Fermenting wood cellulose outside the body of livestock using rumen fluid of ruminant animals, extracting the produced volatile fatty acid (VFA), and converting it into feed have been proposed as a method for using wood as feed for livestock. In this study, we investigated the optimum conditions to produce VFA by *in vitro* fermentation of cellulose nanofiber (CNF), a finely divided wood-derived cellulose, with cattle rumen solution, and examined the effect of lignin, which is one of the causes of wood indigestibility, on rumen fermentation. CNF produces more VFA than usual cellulose samples, considered a good substrate for VFA production. Additionally, the optimum fermentation time was 24 h. Furthermore, the optimum amount of CNF in 10 ml of rumen solution and 20 ml of artificial saliva was 100 mg per CNF amount and 200 mg for one production. This study showed that fermenting the rumen solution by adding only the lignin sample increased VFA concentration; the lignin sample in the solution may have been degraded; and fermentation with CNF did not inhibit VFA production. Therefore, it is considered that lignin does not inhibit wood decomposition by rumen fermentation, and that wood indigestibility is caused by the crystal structure of cellulose or the composite of cellulose and lignin.

**Keywords:** livestock feed, wood-origin cellulose, cellulose nanofiber, rumen fermentation, volatile fatty acid, lignin