

平成30年 5月25日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07272

研究課題名(和文)反芻家畜のタンパク質利用性に関わるマメ科植物のタンニンの組織・化学的特性の解明

研究課題名(英文)Chemical properties of tannins and ruminal protein degradation in legume forage

研究代表者

近藤 誠 (KONDO, MAKOTO)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50432175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：寒地型および暖地型マメ科牧草を対象にタンニンの化学的特徴と反芻動物の第一胃内タンパク質分解性との関係を調査した。16草種のマメ科植物では縮合型タンニン含量は0.0～10.3%と広く分布した。タンニンによる第一胃内におけるタンパク質分解の抑制作用は、寒地型マメ科牧草では*Lotus corniculatus*、暖地型マメ科牧草*Desmodium intortum*で顕著に認められたが、その他のマメ科植物では抑制作用が弱いあるいは抑制が認められなかった。これらの草種ではタンニン画分により葉部のタンパク質の溶解性を低下させていることで、第一胃内微生物によるタンパク質分解を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate chemical properties of tannins and their effects on ruminal protein degradation in tropical and temperate legumes for ruminant feeds. Among 16 species of legumes, condensed tannin contents varied from 0.0 to 10.3% on a dry matter base. Although most of legumes showed weak or no suppression of ruminal protein degradation, *Lotus corniculatus* from temperate legume and *Desmodium intortum* from tropical legume clearly suppressed protein degradation. The suppressed protein degradation in rumen could be due to lowered protein solubility by tannins in these species.

研究分野：草地学

キーワード：タンニン マメ科牧草 タンパク質 第一胃内分解性

### 1. 研究開始当初の背景

マメ科牧草はタンパク質含量が高く、牛や羊などの反芻家畜にとって重要な飼料である。しかし、そのタンパク質の多くは家畜の第一胃内でアンモニアまで分解されやすく、一部は第一胃壁から吸収されて、腎臓を経て尿中へ排泄されるため、家畜に利用されない。一方、マメ科植物の一部や果実の果皮などが含むタンニンタンパク質と結合する性質があり、第一胃内の過度な分解を抑え、家畜のタンパク質利用性を向上させることが報告されている。しかし、タンパク質利用性を向上させるタンニンの特徴は不明瞭であり、タンニンを含む植物素材について広く知見を集約することが望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、温帯から熱帯で生育するマメ科植物やその他の植物素材を対象に、反芻家畜の第一胃内におけるタンパク質分解を抑制させるタンニンの特徴を明らかにすることを目的とした。

(1) 熱帯地域で生育する植物からタンパク質供給源として有用な飼料資源の探索を目的として、草本および木本植物を対象に第一胃内におけるタンパク質分解性とそれに対するタンニンの影響を調査した。

(2) 今後日本国内での導入、普及が期待される亜熱帯から温帯地域で生育する暖地型マメ科牧草を対象に、タンニン含量と第一胃内でのタンパク質の分解性や第一胃内微生物へのアンモニアの取り込み量を調査した。

(3) 温帯地域で生育する寒地型マメ科牧草を対象に第一胃内におけるタンパク質分解性とそれに対するタンニンの影響を調査した。

(4) マメ科牧草のタンパク質分解を制御することを目的に、より強固にタンパク質と結合する植物素材の探索を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 熱帯地域のマメ科植物に関する調査  
草本および木本植物を対象に第一胃内におけるタンパク質分解性とそれに対するタンニンの影響を調査した。調査対象はフィリピン共和国ラグナ州にて乾季に木本 3 種類 (*Laucaena leucephala*、*Gliricidia sepium*、*Desmodium cinereum*)、草本 4 種類 (*Calopogonium mucunoides*、*Centrosema macrocarum*、*Arachis pintoi*、*Stylosanthes guyanensis*) を採取した。またワサビノキ科の木本として *Moringa oleifera* を採取した。60 度で 48 時間乾燥させた後、粉碎し、成分分析および *in vitro* 第一胃内での分解性評価に用いた。タンニンの分析として、乾燥粉末からタンニン画分を 70% アセトンで抽出し、そ

の抽出液から総フェノール含量を Folin-Ciocalteu 法により測定し、また縮合型タンニンをブタノール塩酸条件で加熱し、得られる分解産物が示す赤色物質の吸光度を指標に測定した。

#### (2) 暖地型マメ科牧草に関する調査

対象植物は、草本 6 草種で、*Aeschynomene americana*、*Macroptilium lathyroides*、*Desmodium intortum*、*Macroptilium bracteatum*、*Centrosema pascuorum*、*Macroptilium atropurpureum* を用いた。凍結乾燥後に粉碎し、上述の(1)と同様にタンニン含量を測定した。また、*in vitro* 第一胃内でのタンパク質の分解性や第一胃内微生物へのアンモニアの取り込み量を調査した。

#### (3) 寒地型マメ科牧草に関する調査

対象植物は、*Lotus corniculatus* (バースフットトレフォイル) で、比較対象として同属異種の *Lotus janonicus* (ミヤコグサ) および寒地型マメ科牧草の代表である *Medicago sativa* (アルファルファ) を用いた。地上部を凍結乾燥後に、それぞれの葉部と茎部を分け、部位ごとにタンニン含量を測定した。第一胃内におけるタンパク質の溶解性およびアンモニアの残存量に対するタンニンの活性を測定した。

#### (4) 様々な植物素材に含まれるタンニンのタンパク質結合活性

食品製造や農林業から発生する副産物を対象に含有するタンニン画分を上述の方法により分析した。またタンパク質結合活性を水溶性タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) への結合量を指標に測定した。対象試料は、農林業や食品産業で発生する 15 種類の副産物とした。

### 4. 研究成果

(1) 熱帯地域のマメ科植物に関する調査  
採取した植物の粗タンパク質含量は 16 ~ 28% であり、特に木本類が草本類と比べて高く、*Leucaena leucephala* や *Moringa oleifera* が比較的高い値を示した。一方、タンニンを含む総フェノール性化合物は *Leucaena leucephala* や *Desmodium cinereum* で 4% 程度含まれており、その他の植物は 2% 以下と低かった。一方、縮合型タンニンは 0 ~ 1% 程度であり、調査した植物の中では *Arachis pintoi* に含まれていた。各植物の *in vitro* 第一胃内におけるタンパク質分解性として、培養液中のアンモニア濃度を測定した結果、*Desmodium cinereum* や *Moringa oleifera* で高く、これらが第一胃内で分解されやすいタンパク質を多く含むことが示唆された。そこで、タンパク質分解性に対するタンニンの効果をタンニンと親和性が高いポリエチレングリコールの

添加により検証した結果、いずれの植物種でもアンモニア濃度の有意な増加は認められず、タンニンによるタンパク質分解抑制は認められないことが確認された。

また、今回調査した 8 種類の植物の中では、ワサビノキ科の *Moringa oleifera* は、全糖量が乾物当たり 7~9% 程度と、乾季と雨季の両季節ともに最も高いことが特徴として挙げられた。*Moringa oleifera* は *in vitro* 第一胃培養にて 24 時間以内に発生するガス量が、他の植物種と比べて有意に高かったことから、糖含量が高いために第一胃内にて速やかに発酵されやすいことが示された。*Moringa oleifera* はタンパク質含量も乾季と雨季ともに約 30% と高く、これに関連して、試料中に含まれる全糖量は、9% 程度と他種と比べて高かったことから、第一胃内微生物へのアンモニアと糖の供給という面において優れていることが明らかとなった。今後、第一胃内微生物によるアンモニアの取り込み（微生物体タンパク質合成）への影響を明らかにする必要がある。

#### (2) 暖地型マメ科牧草に関する調査

縮合型タンニンは *Desmodium intortum* で高く検出され、8.3% (8 月)、9.5% (9 月) であった。葉部の縮合型タンニン含量は茎部よりも約 2.5 倍高く、葉部で 13.4%、茎部で 5.8% であり、葉部のみならず、茎部でも多くタンニンを含むことが明らかとなった。また、植物の生育に伴う変化は認められなかった。*Aeschynomene americana* も 1% 程度縮合型タンニンを含有したが、その他の草種では検出されなかった。続いて、*in vitro* の第一胃培養系にてタンパク質分解率を測定した結果、6 種類の暖地型マメ科牧草の間では、*Desmodium intortum* が最も低い値を示した。さらに、タンニンの吸着剤としてポリエチレングリコールを培養系に添加した結果、タンパク質の分解率が向上したことから、*Desmodium intortum* の低いタンパク質分解性はタンニンによる抑制であることが確認できた。また、第一胃内で分解されたタンパク質のうち、第一胃内に残存するアンモニアを指標に微生物によって取り込まれたアンモニア量を算出し、微生物によるアンモニアの取り込み効率を推定した。第一胃内で残存するアンモニア量が低かった草種は *Macroptilium lathyroides* と *Desmodium intortum* であった。*Desmodium intortum* にはタンパク質の分解がタンニンにより抑制されていたために、培養系に残存するアンモニアが低い値を示したと考えられた。*Macroptilium lathyroides* は他の草種と比べ微生物によるアンモニアの取り込み効率が高かったことで残存するアンモニア量を低く抑えており、その要因として、茎葉に含まれる可溶性糖類が第一胃微生物によるアンモニアの取り込みを促進している可能性が示唆された。

#### (3) 寒地型マメ科牧草に関する調査

タンニン含量はバズフットトレフォイルの葉部で 1.3%、茎部で 0.2% であった。一方、ミヤコグサやアルファルファでは、いずれの部位も 0.02% 以下でほとんど含まれていなかった。また、各草種の葉部に含まれるタンパク質の溶解性を測定した結果、バズフットトレフォイルでは粗タンパク質中で 33% 程度でミヤコグサやアルファルファは 45% 程度であり、バズフットトレフォイルのタンパク質溶解性は有意に低かった。タンパク質溶解性が低い原因の検証として、ポリエチレングリコールを反応系内に添加した結果、溶解性画分のタンパク質量が増加したため、タンニンが溶解性を低下させていることが確認された。続いて、第一胃微生物の培養系を用いて各植物体の葉部についてタンパク質の分解性をアンモニア濃度を指標に調査した。その結果アンモニア濃度は、バズフットトレフォイル < ミヤコグサ < アルファルファの順であった。ここで、第一胃微生物の培養系にポリエチレングリコールを添加した結果、バズフットトレフォイルのみアンモニア濃度の増加が確認されたことから、第一胃微生物による葉部タンパク質の分解をタンニンが抑制していることが示された。以上の結果より、バズフットトレフォイルに含まれるタンパク質は、第一胃内における分解性がアルファルファと比べると低く、その原因としてタンパク質の溶解性がタンニンにより抑えられていることで、第一胃微生物のプロテアーゼによる分解を抑制している可能性が推察された。

#### (4) 様々な植物素材に含まれるタンニンのタンパク質結合活性

食品製造や農林業から発生する副産物では、総フェノール含量はオレンジやレモンなど柑橘系の皮で 2~3% 程度、スギやヒノキの樹皮で 1~2% 程度、バナナ皮で 3% 程度、ブドウ皮やワイン粕で 6~7%、クリ皮や茶殻で 8~10% と種類により様々であった。一方、縮合型タンニン含量はブドウ皮、ワイン粕、クリ皮においてそれぞれ 10~13% 程度と高かったがそれら以外では 1% 以下であった。総フェノール 1g あたりに結合した BSA 量は 0~700mg と様々であり、全く結合しない素材（柑橘類の皮やコーヒー粕）、弱く結合する素材（200mg 程度：バナナ皮、緑茶粕）、中程度に結合する素材（400~500mg：ウーロン茶粕、ブドウ皮、ワイン粕、クリ皮、ピーナッツ皮、カカオ皮）、強く結合する素材（600~700mg：紅茶粕、スギ樹皮、ヒノキ樹皮）と植物素材によって各々のフェノール化合物が有するタンパク質結合活性が大きく異なることが明らかとなった。これらの素材は、今回調査したマメ科牧草よりもタンニン含量やタンパク質結合活性が高いため、第一胃内でタンパク質の分解が進みやすいマメ科牧草に素材そのもの、あるいはタンニンを抽

出した画分を添加してすることで、マメ科牧草のタンパク質利用性を向上させることが期待される。

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(4)研究協力者 ( )

〔雑誌論文〕(計1件)

Kondo M, Jayanegara A, Uyeno Y, Matsui H (2016). Variation of tannin contents in selected agro-industrial by-products and their biological activity in precipitating protein. Adv. Anim. Vet. Sci. 4(2): 66-70. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計1件)

近藤 誠.(2017)第4章7節 草本飼料資源. 294 (p 94 - 103)「動物の飼料 第2版」唐澤豊, 菅原邦生, 神勝紀(編)文英堂出版

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 誠 (KONDO, Makoto)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：5 0 4 3 2 1 7 5

(2)研究分担者

( )

研究者番号：