平成２６年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「鶏舎内の無臭化及びハエ発生防止効果を持たせた新規乳酸菌による発酵飼料添加物の開発」

研究開発成果等報告書

平成２７年３月

委託者　九州経済産業局

委託先　公益財団法人佐賀県地域産業支援センター

目　次

第１章　研究開発の概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１
１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・１
１－２　研究体制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３
１－３　成果概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・８
１－４　当該研究開発の連絡窓口・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９

第２章　本論－（１）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０
２－１　新規乳酸菌株の大量発酵技術の確立　・・・・・・・・・・・・・・１０
２－２　目的と目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０
２－３　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０
２－４　実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０
２－５　研究成果と今後の課題　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１

第３章　本論－（２）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１３
３－１　畜産環境の改善および養鶏に関する肥育試験など有効性の評価・・・１３
３－２　目的と目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１３
３－３　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１３
３－４　実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４
３－５　研究成果と今後の課題　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１５

第４章　本論－（３）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
４－１　家畜に対する発酵飼料添加物の安全性評価と有効性のメカニズム解析　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
４－２　目的と目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
４－３　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
４－４　実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１８
４－５　研究成果と今後の課題　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１９

第５章　本論－（４）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２０
５－１　プロジェクトの管理運営・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２０
５－２　実施概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２０
５－３　今後の課題と取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２０

第６章　全体総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２１
６－１　研究成果の全体総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２１
６－２　サブテーマの総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２１
６－３　今後の事業化に向けての取り組み・・・・・・・・・・・・・・・・・・２２

第１章　研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

（１）　研究の背景及び目的

現在ブロイラーや鶏卵などの養鶏場の課題として、悪臭対策とハエ発生などの害虫対策が挙げられる。平成 24 年における畜産経営に起因する苦情発生戸数の割合は、悪臭関連が 60.2%と半数以上となっており、害虫発生については、22.7%となっている（農林水産省、畜産環境・経営安定対策室、平成 24 年 10 月公表）。

悪臭は、騒音や振動とともに感覚公害と呼ばれる公害の一種であり、また、環境基本法第 2 条で定める「公害」（いわゆる典型七公害）の中の一つである。悪臭による公害は、その不快なにおいにより、生活環境を損ない、主に感覚的・心理的な被害を与えるものである。感覚公害という特性から、住民の苦情や陳情と言う形で顕在化し、汚染物質等の蓄積はないものの、意外なほど広範囲に被害が広がることも少なくない。更に、鶏卵の養鶏場では、大量にハエが発生すると、ハエによる卵のシミを洗浄するために余分な時間がかかり、卵の品質等級が格下げになる。また、ハエの幼虫は、鶏糞の質を液状化させ、アンモニアの発生を助長して、これが慢性呼吸器病(CRD)の増加、金属の腐食や換気コストの増加の原因ともなっている。このような状況の下、悪臭やハエの対策として、未だ有効な方法はなく、養鶏事業者の喫緊の課題として、安価な技術開発が強く求められている。

㈱クリエイトでは、これまで養鶏に使用されている飼料に、発酵飼料添加物を数%添加することにより、悪臭とニオイの問題を同時に解決する可能性を見出している。本事業では、この発酵飼料添加物を大量製造する技術を確立し、この飼料添加物を事業化するための環境評価や安全性のデータ取得を研究の目的とする。

（２）研究の概要

本事業では、これまでの知見を基にして養鶏場の悪臭防止と、ハエ発生の低減を達成することが出来る発酵飼料添加物を開発するための研究を行う。具体的には、新規に見出した乳酸菌株とその株の増殖方法を用いて、当該乳酸菌及び乳酸菌生産物の大量生産（工業化）のための発酵増殖技術を確立する。次に、粉末状に加工した発酵飼料添加物を市販飼料に添加してブロイラー鶏に給餌して肥育試験を行い、乳酸発酵添加物を安定して生産するための製造工程を構築する。同時に、乳酸発酵飼料添加物を給餌した後の鶏舎内の臭気、ハエの発生量、鶏舎内の環境を測定し、これらのデータを数値化する。併せて、今回の事業では、乳酸菌、及びその発酵生産物の効果と飼料添加物としての安全性についても評価する。

（３）実施内容

【１】新規乳酸菌株の大量発酵技術の確立（㈱クリエイト、(国法)佐賀大学、㈱本村製作所）

本事業の最終目標は、発酵飼料添加物を比較的小規模の養鶏場に対する直接販売することを想定し、週 3 トンの規模で量産可能な生産工程を組み立てることである。そのために必要な要件は、常に一定の乳酸菌が得られるような培養条件を設定することである。飼料添加物は、培養した乳酸菌を脱脂米ぬかなどと混合し、粉末状にしたものを製品とする。

【1-1】培養条件の検討（㈱クリエイト、(国法)佐賀大学）

常に一定の乳酸菌が得られるような培養条件を確立するため、腐植物質の添加量、培地成分の選定及びスケールアップのための培養条件を検討する。乳酸菌の培養について、１×10^{11}個/mL 以上を安定的に増殖させることを目標とする。

【1-2】量産化装置の導入による生産工程の検討（㈱本村製作所、(国法)佐賀大学、㈱クリエイト）

安定的に大量の乳酸菌が得られる乳酸菌培養発酵装置と周辺装置の設計と製作を行う。また、試作機より得られた培養液を用いて飼料添加物を生産する。実働実験の結果により、必要な箇所を改造する。

【２】畜産環境の改善および養鶏に関する肥育試験など有効性の評価（㈱クリエイト、佐賀県畜産試験場）

畜産分野において臭気とハエの発生は環境問題の主な原因となっており、その適切な対策が望まれている。試作した飼料添加物を鶏に給与して、鶏舎内の臭気やハエへの効果や生産性向上への効果を実証試験により明らかにする。

【2-1】肥育試験（佐賀県畜産試験場、㈱クリエイト）

ブロイラーを対象として、試作した乳酸菌発酵飼料添加物の給与による鶏の生育に対する影響評価を行い、育成成績から最適な添加割合、添加開始時期の検討を行う。50 日齢での体重測定により評価する。

【2-2】鶏舎内の環境評価（佐賀県畜産試験場、㈱クリエイト）

鶏舎内の臭気やハエへの効果を検証するため、臭いセンサー及びアンモニア検知器を用いた鶏舎内及び鶏糞の臭気の測定、臭気強度表示法による評価、鶏糞の pH 及び尿酸態窒素量について測定し、環境評価をブロイラー及び採卵鶏についても行う。

【３】家畜に対する発酵飼料添加物の安全性評価と有効性のメカニズム解析（㈱クリエイト、(国法)佐賀大学）

事業化に向けては飼料添加物の有効性と安全性を裏付ける科学的データを取得する必要がある。有効性に関しては、開発する飼料添加物の抗菌活性・生理活性試験を行い、これらの活性成分を検索する。また、安全性の面では、急性毒性試験、変異原性試験及び有害金属の含有量などを分析委託し、安全性を確認する。

【3-1】抗菌活性・生理活性の分析（(国法)佐賀大学、㈱クリエイト）

飼料添加物の有効性を科学的に立証するために、用いた乳酸菌が生産するバクテリオシンなどの抗菌性のペプチド及び生理活性成分の分析行う。また、新たな菌株の探索も検討し、探索した菌株に有用な成分の生産が見られれば、発酵飼料添加物に添加することで製品の価値向上を目指す。

【3-2】発酵飼料添加物の安全性評価

開発・試作した飼料添加物の安全性評価として、ラットを用いた急性経口毒性試験、変異原性試験及び飼料安全法による鉛、カドミウムなどの有害重金属の分析を外部機関に委託して行う。

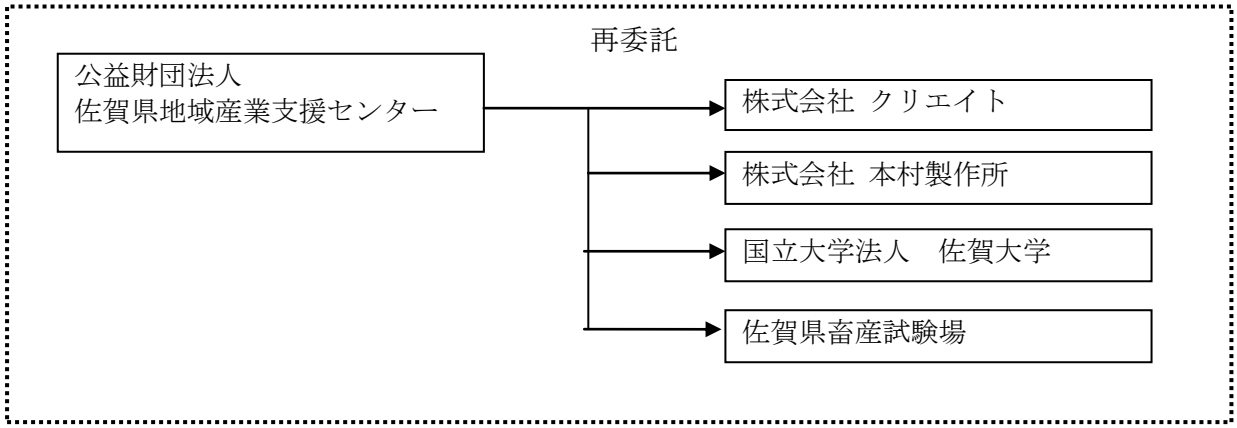
【４】プロジェクトの管理・運営（公益財団法人佐賀県地域産業支援センター）

推進委員会の開催、プロジェクト会議の開催等、当該プロジェクトが円滑に運営され、かつ目標が確実に達成できるように、参加研究機関と事業管理機関との連携を密に図るとともに、プロジェクト全体の運営と進捗管理を行い、事業化へ向けた支援を行う。また、研究開発の実施内容を整理し、実績報告書や成果報告書の取りまとめを行う。

１－２　研究体制

（１）　研究組織及び管理体制

１）研究組織（全体）



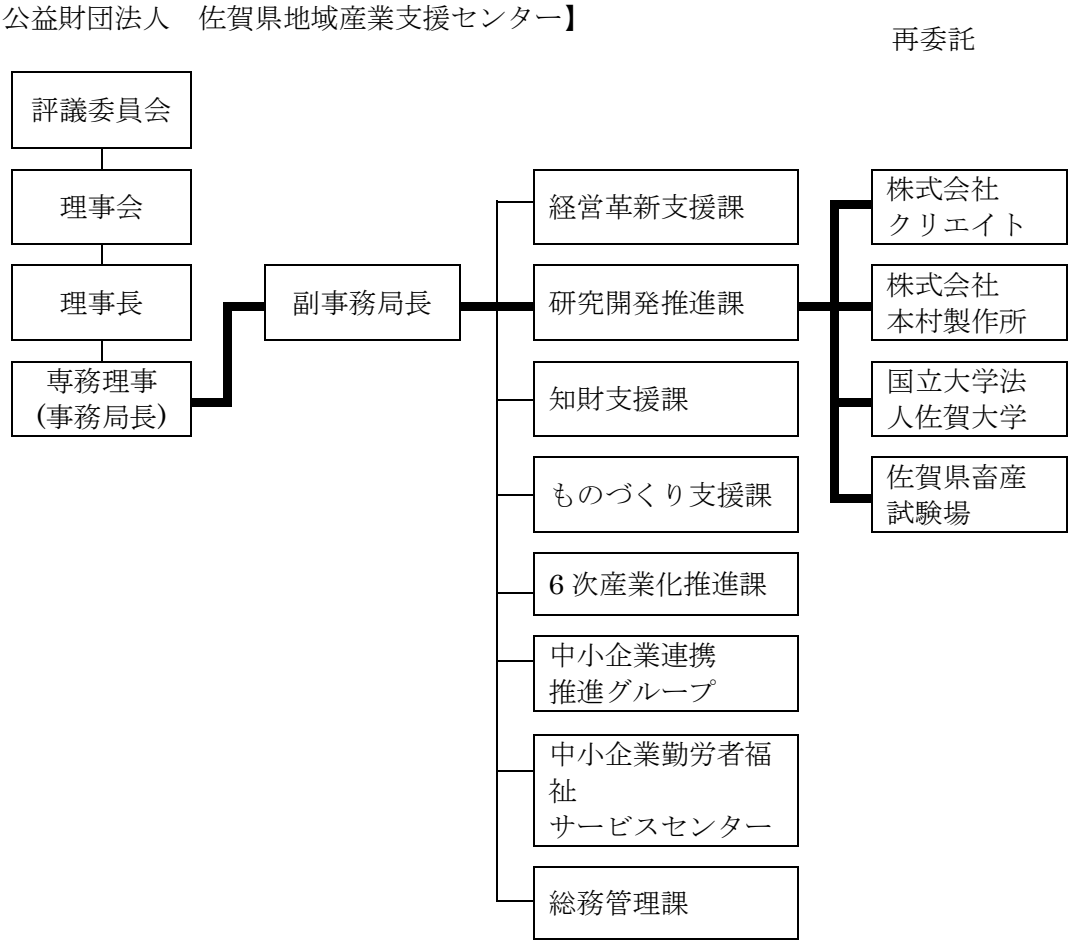
総括研究代表者（PL）
株式会社クリエイト
研究員　石川　千洋

副総括研究代表者（SL）
国立大学法人佐賀大学
農学部　教授　小林　元太

２）管理体制

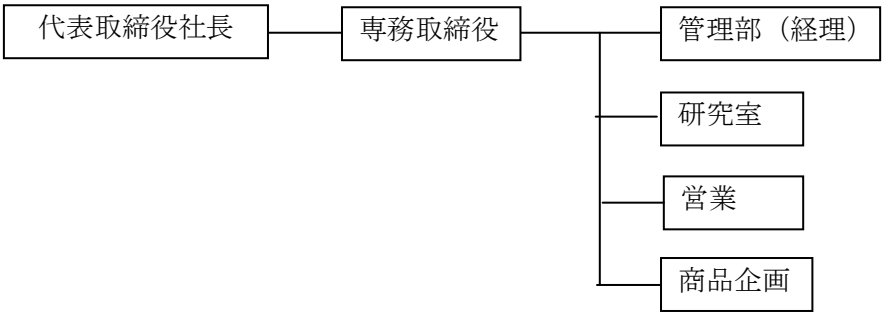
①事業管理者

【公益財団法人　佐賀県地域産業支援センター】



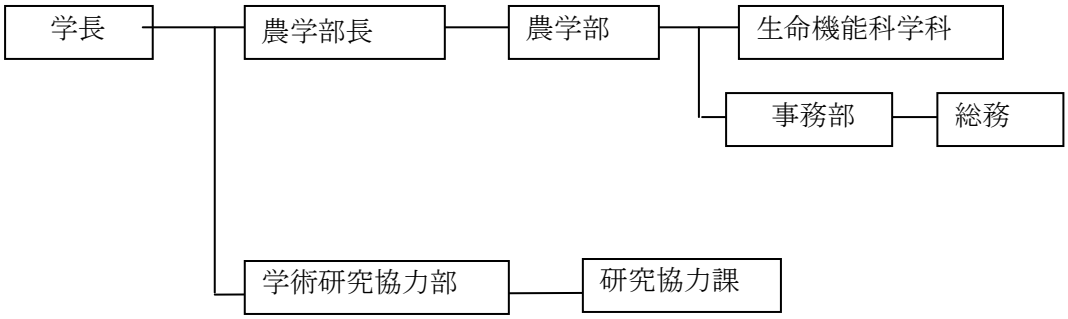
②（再委託先）

株式会社　クリエイト

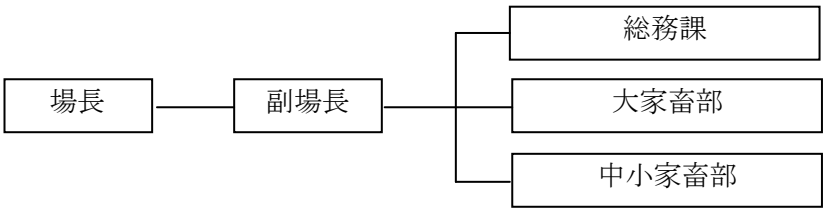


株式会社　本村製作所

国立大学法人　佐賀大学



佐賀県畜産試験場



（2）　管理員及び研究員

【事業管理機関】　公益財団法人佐賀県地域産業支援センター

①管理員

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
坂井　亨	副事務局長（研究開発推進課長兼務）	【４】
安田　誠二	研究開発推進課　科学技術コーディネータ	【４】
石川　真	研究開発推進課　主査	【４】
川原　美砂	研究開発推進課　嘱託	【４】

【再委託先】※研究員のみ
株式会社　クリエイト

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
石川　千洋	研究室・研究員	【1-1】、【1-2】、【2-1】、【2-2】、【3-1】、【3-2】
藤丸　譲二	研究室・研究室長	【1-1】、【1-2】、【2-1】、【2-2】、【3-1】
柴田　智子	商品企画・担当	【1-1】、【2-1】、【2-2】、【3-1】

株式会社　本村製作所

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
田仁　祥信	技術開発部・部長	【1-2】
山口　三郎	技術開発部　設計課・主任	【1-2】

国立大学法人　佐賀大学

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
小林　元太	農学部生命機能科学科・教授	【1-1】、【1-2】、【3-1】、【3-2】

佐賀県畜産試験場

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
永渕　成樹	中小家畜部・部長	【2-1】、【2-2】
山口　妃鶴	中小家畜部　中小家畜研究担当・特別研究員	【2-1】、【2-2】

（4）他からの指導・協力者氏名及び指導・協力事項

推進委員会委員

（外部推進委員）

氏名	所属・役職	備考
黒木　望	鶏３株式会社　会長	アドバイザー
藤原　澄久	丸紅株式会社　無機・農業化学品部　農業化学品課長	アドバイザー
久間　康弘	和食の卵本舗株式会社　代表取締役社長	アドバイザー

（内部推進委員）

氏名	所属・役職	備考
豊増　康生	株式会社クリエイト　代表取締役社長	委員長
石川　千洋	株式会社クリエイト　研究室・研究員	PL　委
藤丸　譲二	株式会社クリエイト　研究室・研究室長	委
柴田　智子	株式会社クリエイト　商品企画・担当	委
田仁　祥信	株式会社本村製作所　技術開発部・部長	
山口　三郎	株式会社本村製作所　技術開発部　設計課・主任	委
小林　元太	国立大学法人　佐賀大学 農学部生命機能科学科・教授	SL　委
永渕　成樹	佐賀県畜産試験場　中小家畜部長	
山口　妃鶴	佐賀県畜産試験場　中小家畜研究担当　特別研究員	委
山口　誠悟	公益財団法人　佐賀県地域産業支援センター 専務理事	

１－３　成果概要

【１】新規乳酸菌株の大量発酵技術の確立（㈱クリエイト、(国法)佐賀大学、㈱本村製作所）

【1-1】培養条件の検討（㈱クリエイト、(国法)佐賀大学）

乳酸菌培養発酵装置の仕様を決定するために乳酸菌の培養条件を検討した。乳酸発酵時に添加する腐植物質からの腐植酸をアルカリ、酸及び界面活性剤添加による抽出方法を検討し、より効率的な抽出技術を確立した。本乳酸菌の発酵至適条件を培養温度 38℃、開放・静置培養とし、培地原料が沈殿しない程度に攪拌を行うと決定した。

乳酸菌数に関して、目標とする 10^{11} 個/mL 以上増殖させるための最適な抽出物の添加量の検討を行った。腐植酸抽出液の添加量に関しては、添加による乳酸菌数の多少の増減が見られたが、目標値達成には至っておらず補完研究の中でさらなる検証を進める。

農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）を原料とした培地は炭素/窒素(C/N)比 16 で培養することと決定した。得られた発酵至適条件を量産化に向けて発酵槽を設計・製造を担当する(株)本村製作所に提供した。

【1-2】量産化装置の導入による生産工程の検討（㈱本村製作所、(国法)佐賀大学、㈱クリエイト）

安定的に大量の乳酸菌が得られる乳酸菌培養発酵装置を設計・製作し、pH 調整などの追加機能について検討を行った。

農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）を原料とし、乳酸菌培養発酵装置にて乳酸菌の培養を行った。試験培養の結果、種菌として必要な量は培地量の 0.1%で十分であり、高温で殺菌処理を行う事で製造工程が 1 週間以内で可能であった。また、得られた培養液を用いて飼料添加物を試作した。

【２】畜産環境の改善および養鶏に関する肥育試験など有効性の評価（㈱クリエイト、佐賀県畜産試験場）

【2-1】肥育試験（佐賀県畜産試験場、㈱クリエイト）

乳酸菌発酵飼料添加物の製品化のためには、添加物使用による鶏の成育に対する影響評価を行う必要がある。そこで、ブロイラーを対象に乳酸菌の種類及び乳酸菌の増殖方法を変えて作成された乳酸菌発酵飼料添加物を用い、肥育試験を 3 回実施した。生育に関しては、他の文献と同様に影響なく、暑熱期の第 2 回試験以外の春と秋に実施した試験では生育目標値の 3.495kg を上回る良好な発育成績であった。

【2-2】鶏舎内の環境評価（佐賀県畜産試験場、㈱クリエイト）

採卵鶏及びブロイラーを対象に鶏糞の臭気やハエの発生量などを測定・データ化し、開発した飼料添加物の効果を検討した。悪臭やハエ類に対する生育抑制効果、殺虫効果に関しては、当場で得られたデータではその顕著な効果が確認できなかった。しかし、微生物資材を飼料に添加すると腸内環境に変化を及ぼすことから、その 2 次的影響として、敷料の微生物環境に影響することも考えられ、戻し堆肥を敷料利用するような環境では、長年再利用していくことで、その敷料環境に変化をもたらし悪臭の減少効果の面では可能性があると考えられた。

【３】家畜に対する発酵飼料添加物の安全性評価と有効性のメカニズム解析
(㈱クリエイト、(国法)佐賀大学)

【3-1】抗菌活性・生理活性の分析 ((国法)佐賀大学、㈱クリエイト)

今回使用する乳酸菌の同定を行った結果、乳酸菌ラクトバチルス属であることが確認できた。生理活性成分としてγ-アミノ酪酸(GABA)の生産を検討したが、使用する乳酸菌に GABA 生産能は確認できなかった。有明海底泥より、*Lc. garvieae* に強く抗菌活性を有する菌を 2 株選抜し、T1 株、R1 株とし、それぞれ、*Lc. lactis* subsp. *lactis* T1、*Lc.* subsp. lactis R1 と同定した。T1 株が生産する抗菌性物質は抗菌スペクトルの結果より R1 が生産する抗菌性物質ともナイシン A とも異なる抗菌性物質である可能性が示唆された。T1 は、薄層クロマトグラフィー(TLC)により GABA の生産能を有する事が確認できたため、培養し飼料添加物として試験に使用し、評価を行った。

【3-2】発酵飼料添加物の安全性評価

安全性評価として、乳酸菌発酵飼料添加物（検体）の急性経口毒性試験（単回投与毒性試験)、変異原性試験及び飼料安全法による有害重金属の分析を外部機関に委託して行った。単回投与毒性試験において、検体の半数致死量(LD50)値は、雌では 2000mg/kg を超えるものと評価され、復帰突然変異試験の結果、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は、陰性と結論した。飼料安全法で基準値が定められている有害重金属(鉛、カドミウム、ヒ素、水銀）の分析を行った結果、基準値以内の結果が得られた。これらの結果から、今回開発・試作した飼料添加物は安全に使用できると考えられる。

【４】プロジェクトの管理運営（公益財団法人佐賀県地域産業支援センター）

事業推進委員会の開催、プロジェクト会議の開催等、当該プロジェクトが円滑に運営され、 かつ目標が確実に達成できるように、参加研究機関と事業管理機関との連携を密に図るとともに、プロジェクト全体の運営と進捗管理を行い、事業化へ向けた支援を行った。また、研究開発の実施内容を整理し、実績報告書や成果報告書の取りまとめを行った。

当初、乳酸発酵装置の開発を担当する予定であった企業が経済状況、経営環境の変化により、協力者の変更をおこなった。研究開発の遂行能力を有すると認められる株式会社本村製作所に変更することにした。

１－４　当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人　佐賀県地域産業支援センター
副事務局長/研究開発推進課　課長　坂井　亨
・住所；〒849-0932　佐賀市鍋島町八戸溝 114
・電話；0952-34-4413
・FAX；0952-34-4412
・E-mail；sakai@mb.infosaga.or.jp

第２章　本論－（１）

２－１　新規乳酸菌株の大量発酵技術の確立

目標は、発酵飼料添加物を比較的小規模の養鶏場に対する直接販売することを想定し、**週３トンの規模で量産可能な生産工程を組み立てる**ことである。そのために必要な要件は、常に一定の乳酸菌が得られるような培養条件を設定し、乳酸菌を培養するための乳酸菌培養発酵装置の開発を行うことである。飼料添加物は、培養した乳酸菌を脱脂米ぬかなど未利用資源と混合し、粉末状にしたものを製品とする。

２－２　目的と目標

乳酸菌の数については、予備試験として試作した飼料添加物を農家で試した結果、糞（鶏舎）の臭いの減少、ハエ発生数の減少などの効果を確認しており、その飼料添加物を製造する際の菌数測定の結果は、1×10^{10}～10^{12}個/mL であったことから、今回の事業においては、乳酸菌の培養について、1×10^{11}個/mL 以上を安定的に増殖させることを目標とした。

乳酸菌の培養条件を一定にするにあたって、培養温度、ｐH、培地の種類と添加量、及び増殖因子である腐植物質の添加量を具体的に決定する。併せて、㈱本村製作所においては、㈱クリエイトと（国法）佐賀大学からの仕様情報を基に乳酸菌培養発酵装置を製作する。製作した試作機は、㈱クリエイトに設置し、乳酸菌の大量培養を行うための培養条件を詳細に検討する。

２－３　実験方法

（１）培養条件の検討

常に一定の乳酸菌が得られるような培養条件とするためには、腐植物質の添加量、培地成分の選定及びスケールアップのための培養条件の設定が必要である。乳酸発酵時に添加する腐植物質からの腐植酸をアルカリ、酸及び界面活性剤添加による抽出方法を検討し、腐植物質を培地に添加した場合の乳酸菌数の増減について検討する。

農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）について炭素と窒素含量を調査し、それらの混合比率（C/N 比）などを検討する。

（２）量産化装置の導入による生産工程の検討

量産化に向けて常に一定の乳酸菌が得られる乳酸菌培養発酵装置と周辺装置の設計と製作を行う。農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）を原料とし、乳酸菌の大量培養を行うための培養条件を詳細に検討する。また、得られた培養液を用いて飼料添加物を試作する。

２－４　実験結果

（１）培養条件の検討

乳酸発酵時に添加する腐植物質からの腐植酸をアルカリ、酸及び界面活性剤添加による抽出方法を検討した。アルカリ成分の培地への影響を考え、中和を行う事も検討したが必要なく、腐植酸抽出液はアルカリ抽出で使用することを確認した。乳酸菌を培養した結果、菌数は1×10^{7}～10^{8}個/mL の増殖率であった。

農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）について炭素と窒素含量を調査し、それらの混合比率（C/N 比）などを検討した。これらの結果は表 2-1 に示す。

乳酸菌を培養する際の培地の C/N 比は約 13～30 程度であるが、固形分を 5%(w/w)、

種菌を培地の 1%（w/w）として培養すると十分に培養する事が確認できたため、培地原料の割合を決定した。

表 2-1　未利用資源に含まれる炭素量、窒素量、C/N 比

	米糠[1)]	大豆プロテイン[2)]	竹粉末[1)]	乳糖[2)]	廃糖蜜[3)]
炭素量（C）	48	47.25	43.1	42.07	14.10
窒素量（N）	2.7	15	0.4	―	―
C/N 比	17.78	3.15	107.75	―	―

（2）量産化装置の導入による生産工程の検討

安定的に大量の乳酸菌が得られる乳酸菌培養発酵装置とするために設計製作し、pH 調整のための追加機能について検討を行った（図 2-1）。

農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）を原料とし、乳酸菌培養発酵装置にて乳酸菌の培養を行った。試験培養の結果（図 2-2）、種菌として必要な量は培地量の 0.1%で十分であり、高温で殺菌処理を行う事で製造工程が 1 週間以内で可能であった。また、得られた培養液を用いて飼料添加物を試作した。

図 2-1　乳酸菌培養発酵装置
及び pH 制御機能装置

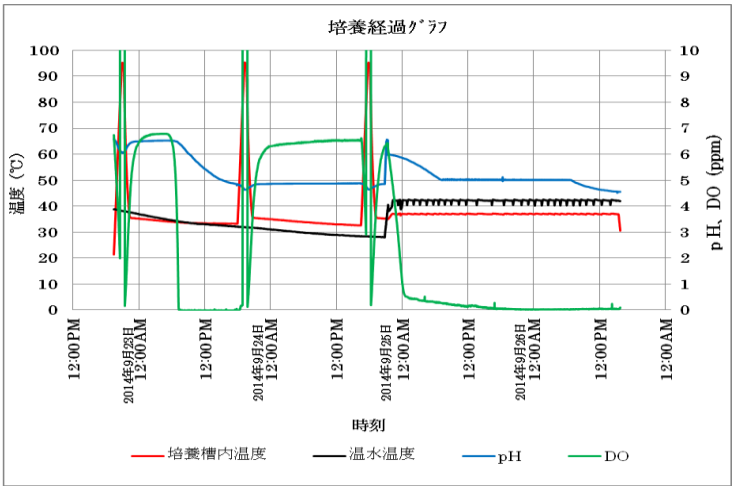


図 2-2　殺菌工程および乳酸菌の培養

２－５　研究成果と今後の課題

（1）培養条件の検討

乳酸菌培養発酵装置の仕様を決定するために乳酸菌の培養条件を検討した。乳酸発酵時に添加する腐植物質からの腐植酸をアルカリ、酸及び界面活性剤添加による抽出方法を検討し、より効率的な抽出技術を確立した。本乳酸菌の発酵至適条件を培養温度 38℃、開放・静置培養とし、培地原料が沈殿しない程度に攪拌を行うと決定した。

乳酸菌数に関して、目標とする 10^{11} 個/mL 以上増殖させるための最適な抽出物の添加量の検討を行った。腐植酸抽出液の添加量に関しては、添加による乳酸菌数の多少の増減が見られたが、目標の菌数を達成するためにはさらなる検討が必要である。農産廃棄物や食品加工残渣（米糠、糖蜜および竹粉砕物など）を原料とした培地は C/N 比 16 で培養することとした。

乳酸菌数に関して農産廃棄物や食品加工残渣を減量した培地でも 10^{7}～10^{8} 個/mL の増殖率で十分使用可能との判断を行ったが、最終目標とする 10^{11} 個/mL 以上増殖までは至っていない。さらに条件を精査し、今後の補完研究の中で増殖率の上昇を検討する。

（２）量産化装置の導入による生産工程の検討

試験培養の結果、種菌として必要な量は培地量の 0.1％で十分であった。

培養タンクの改良で培養時に酸性側での pH のコントロールができるようにした。殺菌時間を短縮する目的で、培地の殺菌工程で殺菌温度を 95℃に上昇させ、菌の増殖が抑えられた結果をみると培地の殺菌は 2 回で十分であると考える。

本培養に 24～48 時間と乳酸菌培養に 4 日で生産が可能となる。粉末化する場合に脱脂米糠等と配合するが、水分率を低下させるために乾燥が必要あるが、数回切返しを行うことで飼料添加物の目標値である週 3 トンの製造は十分可能である。今回開発・試作した飼料添加物の写真を図 2-3 に示す。

図 2-3　乳酸菌発酵飼料添加物試作品

【参考文献】

１）中村真人・柚山義人,各種バイオマス成分のデータベース整備,
農業工学研究所技報、　第 203 号（2005）
２）大豆プロテイン、乳糖は各メーカーの品質企画書より算出
３）松永一彦ら,食品加工副産物の発酵特性に関する研究,鹿児島県工業技術センター
No.25(2011)

第３章　本論－（２）

３－１　畜産環境の改善および養鶏に関する肥育試験など有効性の評価

肥育試験についてはブロイラーを対象とし、試作した乳酸菌発酵飼料添加物を給与した鶏の生育に対する影響評価を行い、育成成績等から最適な添加割合を検討する。また、畜産環境の評価については、採卵鶏およびブロイラーを対象に鶏糞の臭気やハエの発生量などを測定・データ化し、開発する飼料添加物の効果を評価する。

３－２　目的と目標

試作した飼料添加物を用いて、ブロイラーの肥育試験を実施し、飼料効率などのデータを作成する。また、添加物使用による鶏の成育に対する影響評価を行う。飼料販売店が持つ配合飼料での育成の目標値(50 日飼育で鶏体重 3.495kg 以上)との比較を行い、添加量の検討を行う。その際、目標値より下回らないことを目標とする。

鶏舎内の環境評価については、鶏舎でのアンモニア濃度の測定、ハエの発生状況、鶏糞の臭気の要素となる成分の測定を実施する。臭いについては、官能評価で行われている認知閾値濃度である臭気強度 2.5 以下、ハエの発生については、発生ゼロを目指す。

３－３　実験方法

（１） 肥育試験

乳酸菌発酵飼料添加物の製品化のためには、添加物使用による鶏の成育に対する影響評価を行う必要がある。そこで、ブロイラーを対象に乳酸菌の種類及び乳酸菌の増殖方法を変えて作成された乳酸菌発酵飼料添加物を用い、肥育試験（図 3-1）を 3 回実施した。

調査項目は育成率、体重、飼料消費量、飼料要求率、生産指数、鶏のストレス指標の１つである血漿中チオバルビ酸反応物(TBARS)濃度とした。

図 3-1　飼育試験環境

（２）鶏舎内の環境評価

畜産環境の評価については、採卵鶏及びブロイラーを対象に鶏糞の臭気やハエの発生量などを測定・データ化し、開発する飼料添加物の効果を検討した。環境評価は採卵鶏及びブロイラーを対象に、鶏舎内のアンモニア濃度、飛来してきたハエ類の採取調査、鶏糞の pH、全窒素率及び尿酸態窒素量、鶏糞からのハエの発生状況調査を実施した。環境評価についても肥育試験同様、乳酸菌の種類及び乳酸菌の増殖方法を変えて作成した乳酸菌発酵飼料添加物を用い、3 回実施した。

（３）その他

飼料添加物の製品化のためには、実際に給与して得られた生産物(鶏肉)への味覚評価も重要な要素となるため、鶏肉の官能評価を実施した。

また、畜産試験場では実際の養鶏場の飼養環境の再現が困難な部分もあることから、実際の農家（アドバイザーの 2 社）での現場試験を追加して行った。その際に臭気の評価については客観的な評価を行う為、分析をクリタ分析センター株式会社に外部委託した。

３－４　実験結果

（１） 肥育試験

全ての試験で、育成率、生体重、飼料消費量、飼料要求率及び生産指数のいずれの項目も試験区間で顕著な有意差は認められなかった。暑熱期の実施した第 2 回試験ではいずれの区も 3.2kg 前後であったのに対し、5 月及び 10 月に開始した第 1 回試験、第 3 回試験では 50 日齢での体重はいずれの区も 3.5kg を上回る良好な成績であり、飼料添加物の要因よりも実施時期による要因が大きいことが分かった。

また、鶏のストレス指標の 1 つである血漿中 TBARS 濃度の推移を測定したところ、いずれの試験でも日齢が進むごとに血漿中 TBARS 濃度はやや高くなる傾向となった。また、夏場に行った 2 回目の試験では第 1、3 回目の試験に比べ、血漿中 TBARS 濃度は高くなった。3 回目試験の 5 週齢で対照区と B 資材添加区において 5%水準で有意差が認められた。その他は有意な差は認められないものの全ての試験で対照区に対して試験区が低い傾向となった。

（２） 鶏舎内の環境評価

１）鶏舎内の臭気測定

ブロイラー、採卵鶏の 3 回の試験では試験で検知管による測定でもドジチューブによる測定（図 3-2）でも飼料添加物の添加の有無による差は認められなかった。いずれも試験回数を重ねるごとにアンモニア濃度は減少する傾向が見られた。

図 3-2　ドジチューブによるアンモニア測定の様子

２）鶏糞の pH、全窒素率及び尿酸態窒素量

ブロイラー及び採卵鶏の全ての試験で有意差は認められず、ブロイラー鶏糞の pH は 6 前後、採卵鶏は 7.5～8 前後で推移した。

全窒素率は試験区による大きな差は認められず、尿酸態窒素量においても対照区がやや低い傾向となったものの有意な差は認められなかった。

３）ハエ類成虫に対する忌避調査

飼料添加物を与えた試験区と対照区では、大きな差は認められず、4 月の気温上昇とともに増えたハエの飛来は梅雨時期まで続き、暑熱期になると激減した。

４）ハエ類幼虫に対する発育抑制調査

採卵鶏糞でハエ幼虫の発育を調査したところ、ハエの飛来状況と同様試験区による大きな差は認められず、いずれの区でも梅雨時期までは見られたハエの羽化は猛暑期により糞表面が乾燥し、寄生ダニ及び寄生甲虫（エンマムシ科）が発生したことからほとんど羽化できなかった。ブロイラー糞でも、試験区による大きな差は認められず、いずれの区でも猛暑期は、寄生ダニの発生でほとんど羽化できず、暑さが和らいだ 9 月以降、ハエが羽化した。増殖させた乳酸菌液を直接糞に混ぜた試験では試験区間で堆肥 pH の経時変化に差はなく、羽化数も差は認められなかった。

（３）その他

１）官能評価

鶏肉の官能評価の結果、乳酸菌の添加により味に差がでて、いずれの試験でも乳酸菌

を給与した鶏の肉が好まれた。

２）採卵鶏農家

採卵鶏農家で実施した飼料添加物の卵に対する影響評価として、卵の平均重量を測定した結果、卵の重量に関して、飼料添加物の有無による差がほとんど見られなかった。

採卵数に関しては、鶏舎の採卵のシステム上、区別が困難であったために今回は、計測をおこなっていない。ニオイセンサを用いて鶏糞から発生する臭気指数の計測の結果、臭気指数は 23～24 とかなり高く、湿度などが影響していると考えられる。鶏種による差は無かった。

３）肥育農場

肥育成績のうち、飼料消費量の項目では、飼料添加物（A 飼料、B 飼料）を給与することで、飼料の消費量が少なくなっていた（$p<0.01$、$p<0.05$）が、その結果として飼料要求率、出荷体重への影響はなく、生産指数への影響は認められなかった。また、試験時期が 10 月中旬以降のためハエの姿はほとんどなかった。臭気についても有意な差は認められなかった。

また、ニオイセンサを用いて鶏糞から発生する臭気指数の計測を行った結果、臭気指数は 18～19 と高かったが、畜産試験場や採卵鶏の鶏糞(表 3-1 参照)と比較すると臭気指数は減少傾向であった。

４）現場試験の臭気分析

分析結果を表 3-1 に示す。いずれも 6 人のパネラーが臭いを嗅ぎ、最大値と最小値になったパネラーの値を除き 4 人の結果より算出した。

現場試験の臭気分析の結果より、アンモニア濃度においては、佐賀県畜産試験場では、全ての測定値について対照区（No.2、6、及び 8 区画）に比べ試験区 A（No.3、5 及び 10 区画）の方が高かった。また、鶏３株式会社の佐世保農場と前原農場の比較では、臭気指数とアンモニア濃度について前原農場の方が高い値を示した。また、佐世保農場ではアンモニアが検出されていないが臭気指数が高い。これはアンモニア以外の悪臭物質による影響と考えられる。

表 3-1　アンモニア濃度、臭気指数及び臭気強度の測定結果

試験項目	アンモニア	臭気指数	臭気強度
佐賀県畜産試験場（No.2,6,8 区画）	2.8	29	4.5
佐賀県畜産試験場（No.3,5,10 区画）	10.1	32	5.0
佐世保農場	0.05 未満	24	5.0
前原農場	1.1	30	4.5
定量下限値※	0.05	12	0.0
測定方法	昭和 47 年環境庁告示第 9 号別表第 1	環境庁告示 63 号	6 段階臭気強度表示法

※単位：ppm、　但し、臭気指数及び臭気強度は無単位。

３－５　研究成果と今後の課題

微生物等を原料とする各種資材は多数の会社から販売されており、効能として悪臭防止、害虫発生防止を記載しているものも多い。その成分については、企業秘密に属することから、微生物の名称や混合物の組成等を明確にしたものは少ない。その効果についても、微生物が対象であるため、利用環境のちょっとした違いで異なった結果が得られており、その評価は一定していないのが現状のようである。

佐賀県畜産試験場での評価では、血漿中 TBARS 濃度及び食味の改善の項目以外にはいずれの項目でも効果が確認できなかった。生育に関しては、他の文献と同様に影響なく、暑熱期の第２回試験以外の春と秋に実施した試験では生育目標値の 3.495kg を上回る良好な発育成績であった。

悪臭に関しては、効果があると感じている農家もあるが、佐賀県畜産試験場で得られたデータではその効果が確認できなかった。鶏糞を採取し、においセンサーで測定した結果、臭気指数 18～24 で臭気強度としては 3.5 以上であった。また、ハエ類に対する生育抑制効果も佐賀県畜産試験場では認められなかったし、文献・特許関係を調べても、乳酸菌の機能として殺虫効果は見つからなかった。

微生物資材を飼料に添加すると腸内環境に変化を及ぼすことから、悪臭の減少効果の面では可能性があると考えられる。その２次的影響として、敷料の微生物環境に影響することも考えられる。このため、戻し堆肥を敷料利用するような環境では、長年再利用していくことで、その敷料環境に変化をもたらすこともありうる。実際に協力していただいた鶏３株式会社は、一年以上、微生物資材の使用しているため、畜産試験場と比較した場合、臭気指数が減少している。微生物の相互変化のために容易に検証はできないが、可能性として残されていると考えられる。

【参考文献】

1)坂口勝規ら：肥育後期のブロイラーへの生菌剤およびガラクトオリゴ糖添加の効果, 和歌山農林水技セ研報,5,87-96,2003.
2)松田誠一ら：ヘルシー鶏肉生産技術,京都畜研成績,38,99-106,1998.
3)細國一忠ら：竹の肉用鶏飼料としての特性評価,佐賀畜試試験研究報告書 47,59-64,2011.辨野義美:プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能, モダンメディア 57,10,277-287,2011.
4)農文協編：畜産環境対策大辞典,2004.
5)（財）畜産環境整備機構編：家畜糞尿処理・利用の手引き,1998.
6)厚生省編：薬事法に基づく殺虫剤指針　別紙殺虫剤効力試験法解説,1965.
7)平岡啓司:ロール発酵 TMR は未発酵 TMR に比べてハエ類の飛来数が少ない, 農業技術短報,65,12,2009.
8)日本土壌協会:堆肥等有機物分析法,(2001).

【用語の解説】

1)%v/w：重量（weight）に対する容積（volume）の比率（%）
2)孵化：卵から幼態になること（ハエでも鶏でも使用される用語）
3)羽化：蛹から成虫になること（昆虫特有の用語）
4)強制換羽：採卵鶏の産卵数が低下すると飼料と水を絶ち、羽を強制的に生え替わらせると産卵数が増加する技術。
5)前期飼料：ブロイラーの飼料は、成長に合わせて４つの飼料が利用される。
えつけ飼料、前期飼料、後期飼料、仕上げ飼料

第４章　本論－（３）

４－１　家畜に対する発酵飼料添加物の安全性評価と有効性のメカニズム解析

乳酸菌およびその生産物（約 300 以上の物質）は多くの商品があり、その生理的な効果については、免疫賦活作用などが期待されている。今回は新規乳酸菌株の効果について、科学的な試験で有効性を明確にするとともに、事業化に向けては可能な限りその生理活性物質を探索・分析し、エビデンスを明らかにする必要がある。また、飼料添加物の安全性評価及び本研究に用いる乳酸菌の同定を行って安全性の確認を行い、飼料添加物の機能性を向上させ付加価値を高めるために必要に応じて乳酸菌の分離を行う。

４－２　目的と目標

ニワトリの感染菌であるヘモフィルス、大腸菌などに対する抗菌性評価を行い、飼料添加物が抗菌性を有することを明らかにする。また、既知物資を対照にして乳酸菌生産物質を分析し、新規物質を同定して新規乳酸菌が独自に生産する物質を確認する。

飼料添加物の安全性の評価としては、急性経口毒性試験(単回投与毒性試験)、Ames 試験による変異原物質の抑制効果（復帰突然変異試験)、及び飼料安全法で基準値が定められている有害重金属（鉛、カドミウム、ヒ素、水銀）の分析を外部機関に委託して行う。

４－３　実験方法

（１）抗菌活性・生理活性の分析

飼料添加物の安全性評価のために乳酸菌の同定を 16S rRNA 解析法により行った。DNA 断片のシーケンス解析を行い、その塩基配列に基づき、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)の BLAST（http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html）を用いて相同性検索を行い、菌株の同定を行った。

有明海底泥より、分離した *Lc. lactis* subsp. *lactis* T1、*Lc. lactis* subsp. *lactis* R1 が生産する抗菌性物質の性状解析を試みた。

Lc. lactis が生産するバクテリオシンはペプチドであるため、プロテアーゼ感受性である。T1 株と R1 株が生産する抗菌性物質もペプチドの可能性があると考えたので、プロテアーゼ感受性試験を行った。さらに、ナイシン A と T1 株、R1 株が生産する抗菌性物質の抗菌スペクトル、安定性、各 pH での抗菌活性、熱安定性について実験を行い、比較することで本菌の生産する抗菌性物質を詳細について検討した。そして、硫酸アンモニウムによる分画で精製を行い、粗精製物を限外濾過することでそれぞれの抗菌性物質の分子量推定を試みた。また、T1 株については培養温度の検討を行った。GABA 生産能に関しては、すでに GABA 生産菌株として報告がある *Lactobacillus brevis* IFO12005 を対照区として用い、Yokoyama らの方法[1)]に従い、薄層クロマトグラフィー（TLC）法によってグルタミン酸と GABA を簡便に検出した。

（２）発酵飼料添加物の安全性評価

飼料の安全性評価として、試験飼料添加物（バイオすくすく）を「飼料の安全性評価基準及び評価手続の制定について」(平成 20 年 5 月 19 日　20 消安第 597 号)の別添「飼料の安全性評価基準及び評価手続」に従い、雌ラットを用いる「単回投与毒性試験」及び突然変異誘起性を調べる目的で *Escherichia coli* WP2*uvrA* 及び *Salmonella typhimurium* TA 系 4 菌株を用いて「復帰突然変異試験」を実施した。具体的な試験方法は、「飼料添加物の安全性評価基準の制定について」（平成 4 年 3 月 16 日　4 畜 A 第 201 号）の別添「飼料添加物の評価基準」に従った。さらに飼料安全法（飼料の安全性

の確保及び品質の改善に関する法律、昭和 28 年 4 月 11 日・法律第 35 号）にある「飼料の有害物質の指導基準の制定について」（昭和 63 年 10 月 14 日 63 畜 B 第 2050 号）に定めた飼料の有害物質の指導基準により評価した。具体的な分析法は、「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）に従った。

４－４　実験結果

（１）抗菌活性・生理活性の分析

T1 株が生産する抗菌性物質は抗菌スペクトルの結果（表 4-1）より R1 が生産する抗菌性物質ともナイシン A とも異なる抗菌性物質である可能性が示唆された。長期間の活性を維持し（図 4-1）、ナイシン A より pH の変化に安定（図 4-2）であり、さらに熱にも強い抗菌性物質であることが明らかとなり、分子量は 5,000 以上であると考えた。以上のことより、ナイシン A とは異なる抗菌性物質であると考えた。

また、TLC 法で GABA 生産能の確認を行った結果、GABA の生産を確認したため、飼料添加物の添加し、畜産試験場での試験に使用した。クリエイトで分離した乳酸菌株に GABA 生産能は確認できなった。

表 4-1　抗菌性スペクトル

検定菌株	生育阻止円 mm		
	T1	R1	ナイシン A
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NBRC 100676^T	＋	＋	＋
Lactococcus lactis subsp. *hordniae* NBRC100931^T	＋	＋	＋
Lactococcus lactis subsp. *lactis* NBRC 100933^T	＋	＋	＋
Lactococcus lactis subsp. *lactis* NBRC 12007(ナイシン A 生産菌)	＋	＋	－
Lactococcus lactis subsp. *lactis* T1	－	＋	＋
Lactococcus lactis subsp. *lactis* R1	＋	－	＋
Lactococcus raffinolactis NBRC100932^T	－	－	＋
Lactococcus plantarum NBRC100936^T	－	－	＋
Listeria innocua ATCC33090^T	＋	－	＋
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* NBRC12732	＋	－	＋
*Escherichia coli NBRC*3301	－	－	－

－ は阻止円が確認出来なかったことを示している。

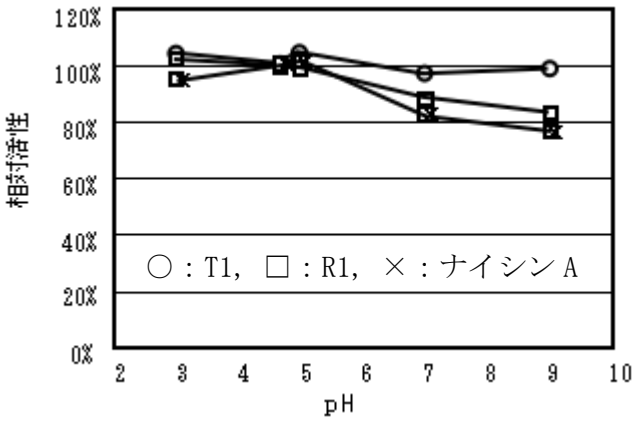


図 4-1　日後の T1 株、R1 株の生産する抗菌性物質、ナイシン A の pH 変化による抗菌活性の変化

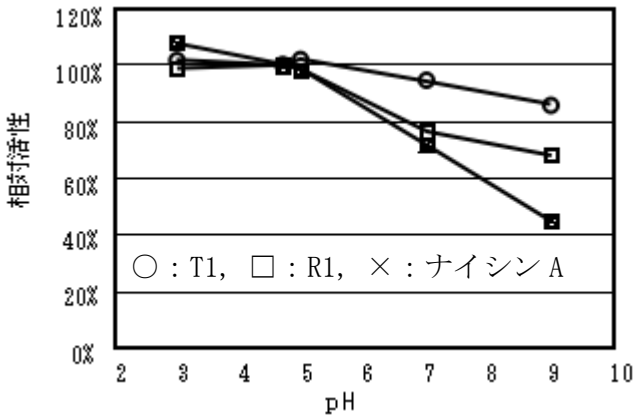


図 4-2　T1 株、R1 株の生産する抗菌性物質、ナイシン A の熱安定性

（２）発酵飼料添加物の安全性評価

試作飼料添加物を試験検体に用いた単回投与毒性試験を行った結果、いずれの投与群においても、観察期間中に死亡例は認められず、一般状態においても、観察期間中に異常は認められなかった。投与後 7 及び 14 日の体重測定において、各群の体重値に差は見られず、観察期間終了時の剖検でも、すべての試験動物に異常は見られなかった。

また、復帰突然変異試験を行った結果、検体は、陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。菌の生育阻害は、いずれの試験用量においても認められなかった。陽性対照では、著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。さらに、分析を行った重金属について、鉛、カドミウム、水銀に関して検出しなかった。総ヒ素は検出されたが、基準値以内であった。

４－５　研究成果と今後の課題

（１）抗菌活性・生理活性の分析

クリエイト資材から分離した乳酸菌の同定を行った結果、乳酸菌ラクトバチルス属であることが確認できた。生理活性成分として GABA の生産を検討したが、使用する乳酸菌に GABA 生産能は確認できなかった。また、有明海底泥より、*Lc. garvieae* に強く抗菌活性を有する菌を 2 株（T1 株、R1）株選抜し、それぞれ、*Lc. lactis* subsp. *lactis* T1、*Lc.* subsp. lactis R1 と同定した。

T1 株が生産する抗菌性物質は抗菌スペクトルの結果より多くの検定菌に対して抗菌作用があることが確認できた。さらに T1 は、TLC により GABA の生産能を有する事が確認できたため、飼料添加物に添加し試験に使用した。また、R1 が生産する抗菌性物質ともナイシン A とも異なる抗菌性物質である可能性が示唆された。

T1 株は、TLC により GABA の生産能を有する事が確認できたため、培養し飼料添加物として試験に使用し、評価を行った。T1 株が生産する抗菌性物質の構造解析が明らかになり、新奇のバクテリオシンであることを期待したい。

（２）発酵飼料添加物の安全性評価

試作飼料添加物の安全性評価のため雌ラットを用いる単回投与毒性試験を実施した。その結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。以上のことからラットを用いる単回経口投与において、検体の LD50 値は、雌では 2000mg/kg を超えるものと評価された。

また、復帰突然変異試験を実施した結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかったため、本試験条件下における検体の遺伝子突然変異誘発性は、「陰性」と結論した。さらに重金属の分析を行った結果、鉛、カドミウム、水銀は検出しなかった。総ヒ素は検出されたが、飼料分析基準の基準値であった。

今回は、安全性の高い資材を使用したことで安全性の評価として最低限の試験しか行っていない。今後、販売していく際に、随時試験を行っていく必要がある。

【参考文献】

1) Yokoyama, S., *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 93, 95-97, 2002.

第５章　本論－（４）

５－１　プロジェクトの管理運営

総括研究代表者は副総括研究代表者や事業管理機関と連携を取りながら、全体の研究進捗状況の把握や研究計画等の見直しを研究者と討議しながら進めた。特に、進捗が遅れているサブテーマについては、原因を調べるとともに今後の進め方について助言を行った。

事業管理機関である公益財団法人佐賀県地域産業支援センターは本プロジェクトの円滑な推進と研究の進捗管理のため、研究推進委員会及びプロジェクト会議を主催し、必要に応じて技術情報の調査収集、研究実施機関間の連絡調整、予算等の事務管理を行った。また、実績報告書や確定検査のための資料を作成し、検査に対応するとともに、研究成果報告書のとりまとめを行った。

５－２　実施概要

（１）研究推進委員会

本委員会は各年度２回開催し、研究の進捗状況や今後の方針について研究分担者から詳細に説明し、各委員から今後の研究開発を進めるに当たっての助言を頂いた。また、オブザーバーから実証試験の協力の発言もあった。必要に応じて本事業の委託者である九州経済産業局からもオブザーバーとして出席頂いた。

（２）研究プロジェクト会議

研究分担者及び事務局から構成する本会議を年２回開催し、研究の進捗状況や今後の進め方について討議を行って意思統一を図った。討議結果を基に、次年度の研究計画を作成し、中間評価ヒヤリングや研究推進委員会等に臨んだ。

（３）その他の管理運営

事業管理機関は毎年度ごとの実施計画を作成し、機械設備等の調達・管理を行った。また、中間検査や確定検査に向けて予算管理業務を遂行し、適正な予算運営のための指導・助言を行った。さらに、各年度ごとの研究成果報告書の取りまとめを行い、必要に応じて研究分担機関を相互に訪問して研究開発の詳細を打ち合わせた。

乳酸発酵装置の開発を担当する予定であった企業が経済状況、経営環境の変化により、協力者の変更をおこなった。研究開発の遂行能力を有すると認められる株式会社本村製作所に変更することにした。

環境評価に関しては、実際の農家の養鶏場の条件（試験羽数、給餌場までの移動距離、糞の堆積期間など）を佐賀県畜産試験場で全く同じ環境に再現することは不可能なので、実際の農家（アドバイザー）に協力していただき、実証試験を行った。

５－３　　今後の課題と取り組み

本事業は、25 年度～26 年度の２年計画の事業であり、研究の進め方や経理処理に関してある程度の相互理解の下に進めることができた。環境評価に関しては残された課題も多く、事業終了後の補完研究でさらに検討を続けることにした。また、事業化に向けも補完研究の中で取り組みを加速していくことを確認した。

第６章　全体総括

６－１　　研究成果の全体総括

乳酸菌数に関して、目標とする 10^{11} 個/mL 以上増殖させるための最適な抽出物の添加量の検討を行ったが、培養の結果は 10^{7}～10^{8} 個/mL であり、まだ目標値まで達成できていない。未利用資源の培地は十分培養に用いる事が可能であり、今回製造した培養タンクで乳酸菌を１トン培養すれば、飼料添加物の週３トンの製造は十分可能である。

養鶏における肥育および環境評価に関して、佐賀県畜産試験場では、肥育の結果は良好であったが、臭気ははっきりした差が出なかった。そこで追加試験として、養鶏農家の協力を仰ぎ試験を行った結果、あくまで鶏糞から直接発せられる臭気である為、鶏舎周囲の環境の臭い数値を反映しているわけではないが、ブロイラー農家では、アンモニア濃度に関して資材を使う事で臭気の減少が見られ、臭気指数・臭気強度は、基準値より少し高いという結果であった。

抗菌活性の評価で T1 株が生産する抗菌性物質は抗菌スペクトルの結果より多くの検定菌に対して抗菌作用があることが確認できた。単回投与毒性試験・復帰突然変異試験及び有害重金属の分析の結果より試作飼料添加物は安全であると確認できた。

６－２　　サブテーマの総括

(1)新規乳酸菌株の大量発酵技術の確立

乳酸菌数に関して、目標とする 10^{11} 個/mL 以上増殖させるための最適な抽出物の添加量の検討を行ったが、培養の結果は 10^{7}～10^{8} 個/mL であり、今後の補完研究の中で菌増殖の検討を続ける。開発した未利用資源を用いた培地は、使用可能であった。乳酸菌培養装置で大量に生産を行う場合、培地の殺菌効果は 95℃で加熱すれば十分であり、飼料添加物の生産にあたっては、資材の水分率を低下させるために乾燥が必要あるが、目標とした週 3 トンの製造は十分可能であった。

(2)畜産環境の改善および養鶏に関する肥育試験など有効性の評価

微生物等を原料とする各種資材は多数の会社から販売されており、効能として悪臭防止、害虫発生防止を記載しているものも多い。その成分については、企業秘密に属することから、微生物の名称や混合物の組成等を明確にしたものは少ない。その効果についても、微生物が対象であるため、利用環境のちょっとした違いで異なった結果が得られており、その評価は一定していない。

生育に関しては、春と秋に実施した試験では生育目標値の 3.495kg を上回る良好な発育成績であったが、悪臭及びハエ類に対する生育抑制効果に関しては、農家の実感では効果があると評価してもらっているが、測定データではその効果が確認できなかった。

微生物資材を飼料に添加すると腸内環境に変化を及ぼすことから、悪臭の減少効果の面では可能性があると考えられる。また、戻し堆肥を敷料として利用するような環境では、長年再利用していくことで、敷料の微生物環境に変化をもたらすこともありうる。

(3)家畜に対する発酵飼料添加物の安全性評価と有効性のメカニズム解析

有明海底泥より、*Lc. garvieae* に強く抗菌活性を有する菌を選抜し、同定した結果から T1 株と R1 株をそれぞれ、*Lc. lactis* subsp. *lactis* T1、*Lc.* subsp. lactis R1 とした。さらに T1 は、TLC により GABA の生産能を有する事が確認できたため、飼料添加物に添加し試験に使用した。T1 株が生産する抗菌性物質は抗菌スペクトルの結果より多くの検定菌に対して抗菌作用があることが確認できた。また、R1 が生産する抗菌性物質ともナイシン A とも異なる抗菌性物質である可能性が示唆された。

試作飼料添加物の安全性評価のため雌ラットを用いる単回投与毒性試験及び復帰突然変異試験を実施した。その結果、試作飼料添加物の LD50 値は、雌では 2000mg/kg を超えるものと評価され、遺伝子突然変異誘発性は「陰性」と結論した。

さらに有害重金属の分析を行った結果、鉛、カドミウム、水銀は検出しなかった。総ヒ素は検出されたが、飼料分析基準の基準値以内であるので、飼料の安全性は、問題ないと考えられた。これらの結果より、試作した飼料添加物は安全であることが確認できた。

６－３　　今後の事業化に向けての取り組み

今後、飼料添加物を丸紅株式会社(アドバイザー)など大手企業に販売していくには、公的機関の試験結果だけでなく、現場でのデータの積み重ねが必要になると考えている。そのため鶏舎内の環境評価について、補完研究の中で農家の協力を仰ぎ、実際の現場で長期間（少なくとも１年間）の試験を行い、評価を行っていく。

本事業のアドバイザーである鶏３株式会社及び和食のたまご本舗には、今後の協力の了解を得ているため、鶏３株式会社には、ブロイラーとして、飼育成績・臭気評価・給仕方法など、また、和食のたまご本舗には、雛の時期の餌に添加してその後の成長評価及び卵に関しての評価に協力を依頼する。丸紅株式会社の販売先の農家にも試験協力について検討中である。また、乳酸菌数に関しては、10^{11} 個/mL という目標菌数を実現するために補完研究により引き続き検証していく。

サポイン事業による研究開発の実施は、当該認定企業のような小規模企業にとっては初めての経験で有り、企業単独では不可能であった量産化技術の開発や実証評価に関して研究共同体の連携で取り組む事が出来た。本事業で得られた研究成果や研究実施機関・アドバイザーとのネットワークを今後とも活用しながら、国内外で求められている養鶏場の悪臭対策やハエ発生抑制に資する鶏の飼料添加物の事業化に向けて、補完研究の中で未達の目標値を達成するため取り組みを強めていく。