

平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「廃水産資源および食品加工残渣を原料とする高機能性発酵飼料製造技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成22年 3月

委託者 関東経済産業局
委託先 財団法人千葉県産業振興センター

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（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者） -----	5
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（研究開発の詳細） -----	10
2-1 原材料ごとの発酵ルーティンの確立 -----	10
（1）高機能性発酵飼料の製造試験 -----	10
2-2 発酵飼料の動物に対する影響評価 -----	11
（1）現場レベルでの畜産動物(豚)・水産動物(養殖魚)への投与試験 -----	11
（2）被投与動物の腸内微生物相および腸内代謝に与える作用の定量的評価 -----	16
第3章 平成21年度研究開発のまとめと今後の予定 -----	19
第4章 全体総括 -----	20

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) 研究開発の背景と目的

畜産を取り巻く環境、とりわけ飼料の流通に関する昨今の社会情勢は、日本の食糧安全保障上、きわめて憂慮すべき状況に陥っているといても過言ではない。穀物相場のかつてない上昇と、金融危機による世界同時不況の波は、飼料原材料の国内自給率がわずか25%の我が国の畜産・食肉関連業者にとって大きな打撃となった。

このため生産者、特に輸入原料が9割を占める濃厚飼料に依存する養豚・養鶏業者は、支出が4割以上増加するという経営逼迫に直面し、廃業を余儀なくされた業者も少なくない。このような危機的状況を少しでも改善していくため、農林水産省「飼料自給率向上・生産性向上に関する合同会議」においては、平成27年度の飼料自給率目標を35%と定め、その具体的な実現手段の一つの柱として、食品加工残渣の、主として豚・鶏向けの飼料化（エコフィード）推進のための取り組みを進めている。しかしながら、これらの未飼料化残渣の飼料化には、多くの技術的な課題が立ちはだかっているのも事実である。食品系廃棄物の飼料化にあたり、その障壁となっている課題は、第一に原料の腐敗による劣化、第二に原料の非均一性による栄養成分のバラツキ、そして第三に製品の価格競争力である。原料の腐敗については一般的に飼料価値の高い、栄養価の豊富な残渣ほど腐敗の進行が早いという傾向があり、飼料としての栄養価を保持したまま腐敗の進行を抑制し、製品としての保管を可能とするための技術的解決策が要求される。実際の飼料化現場において、当該課題解決のために用いられている技術方式は、主に物理的脱水加熱処理／生物学的発酵処理の2つが主流となっている。

物理的脱水加熱処理は、残渣を細菌の死滅温度以上の高温に供する、あるいは脱水乾燥工程に供することで、その腐敗を抑制するものである。本処理法は比較的短時間で飼料化が完了するため、生産性に優れた方式であるが、その一方で乾燥・高温化のための燃料費や処理施設建造コストが大きく、また加熱によるタンパク質消化率の低下の可能性というデメリットも存在する。加えて第二の課題である原料の非均一性を改善することは困難であり、したがって本方式を適用可能な残渣は、リキッドフィーディングと同じく、比較的組成の均一である、良質のものであることが望ましい。

生物学的発酵処理は、基質となる食品残渣を栄養源とする発酵微生物の代謝作用によって飼料化を図る方式である（既存技術においては、発酵菌を明確化している場合自体が少ないが、明確化されているものについてはその殆どが乳酸発酵を利用しており、またその他においても原材料組成や発酵時間・温度等から乳酸発酵に基づくものと推測される）。本方式においては、多少の原料成分の不均一性があっても、微生物の代謝によって製品の栄養組成を一定の範囲内に保つことが可能となるため、不特定の原材料に由来する食品系廃棄物に対しても、適用できる可能性が高く、製造後の製品保管時の変質も起こりにくい。また発酵菌そのもの、もしくはその産物が給与動物に対して望ましい生理作用（プロバイオティクス作用）を有する場合も報告されており、飼料自体の付加価値性向上が期待される。しかし本処理法においても、乳酸発酵による処理に相当の時間を要すること（数週間）、また雑菌の混入や原材料の劣化等に起因する発酵菌相の変質が起こると飼料化工程全体がストップしてしまう、といったデメリットが存在する。

これらの既存方式の課題・問題点を解決すべく、本開発においては、乳酸菌とは異なる「好気性高温発酵微生物群」による高温・高速発酵プロセスを導入した、新規飼料化手法の実用化を目指す。

(2) 研究開発の目的

本研究開発の目的は、乳酸菌を中心とした既存のプロバイオティクスとは異なる機能性・作用メカニズムを有する、好熱性複合微生物群 PTA-1773 (deposited in ATCC) を主導とした発酵飼料の製造工程において、最新のオーミクス技術を活用した発酵プロセスの解析評価を実施し、原料組成ごとに最適な発酵飼料の客観的な製造ルーティンを確立すること、また当該発酵飼料の動物への投与試験を実施し、プロバイオティクスとしての動物腸内定着性を定量的に検証し、当該飼料の有効性を学術的に担保するとともに、発酵飼料製造工程へのフィードバックにより、発酵による機能微生物生産プロセスのさらなる高効率化を図ることである。

研究の具体的な数値目標として、廃魚等の水産未利用資源＋柑橘類果皮・焼酎粕等を原料とした、粗タンパク含量15～20%、脂質含量5～8%の発酵飼料を、12～16時間の発酵プロセスで日量3～4トン程度製造可能な発酵ルーティンを確立する。また当該発酵飼料が、既存飼料の5～10%代替時に従来と同等以上の生育状況を示すことを定量的に確認する。

(3) 研究開発の概要

本技術開発では、エコフィードとしての廃棄物の再利用／飼料自給率の向上効果のみならず、腸内菌相に対するプロバイオティクス様効果が期待される「高機能性発酵飼料」の生産を実現するため、水産原料をベースとしつつも、地域ごとに異なる廃資源の有効利用に対応すべく、従来手法とは異なる組成の原材料を活用した発酵飼料製造プロセスの実現を目指す。

水産原料は未活用資源としての利用用途の拡大が期待されているが、腐敗等の問題でその取り扱いが難しいため、発酵飼料化技術の商業ベースでの実用化は、申請者グループ以外ではなされていない。本研究開発では、飼料製造系の発酵プロセスにおける発酵物中微生物群のメタゲノミクス解析を実施し、発酵物中の微生物資源の遺伝子ライブラリを構築するとともに、実験動物・畜産動物への投与試験に基づく動物腸内微生物群のメタゲノミクス解析を実施し、腸内におけるプロバイオティクス作用を有する発酵飼料由来の微生物群を遺伝子レベルで検索する。これらの試験により、発酵飼料中の有用微生物群を特定するとともに、検索結果に基づく発酵プロセスの検証を行い、最適の発酵飼料製造プロセスを設計する。

本開発技術による発酵処理時間は、乳酸発酵による飼料化の約30倍以上の速度であると想定され、高い生産性と施設規模・コストの縮小を実現するものである。また発酵温度が80度に達することで魚体内の病原性微生物が殺菌され、安全性が担保されるが、その際に外部熱源は一切使用されず、エネルギーコストの問題もクリアされる。

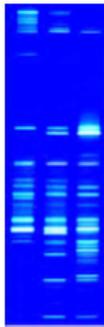
このようにコスト面での優位性を保ちながら、既存の物理的脱水加熱処理（処理の速さ・病原菌の殺菌）／生物学的発酵処理（製品の均一性・保管安定性）のメリットを併せ持ち、さらに他に類を見ないプロバイオティクス効果を有する申請者グループの技術は、国内の食品残渣の再利用促進および畜産関連業種の経営改善に際し、きわめて有望なものであると考えられる。

高機能性発酵飼料

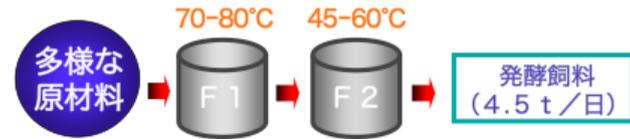
高温発酵複合微生物群による高速飼料化技術

天然由来の動植物残渣を原料として、約80°Cの高温で発酵させた産物は、少なくとも数十種類の多様な微生物種を含み、飼育現場で有効な、さまざまな機能を保有。

微生物相の遷移

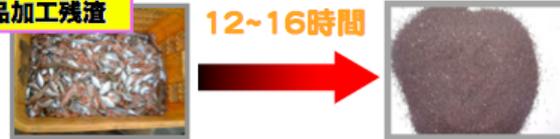


左図は発酵プロセスのDGGE法による微生物相解析の結果。発酵段階で微生物相が変化していく様子がわかる。最新の発酵モニタ技術を活用し、発酵基質に最適化された条件で運転する技術を実現する。



未利用海産資源 + 食品加工残渣

原材料の変化



自家発酵熱による高温下で優れた分解能を発揮する好熱性微生物群を活用。発酵期間の短縮や生成資材の質の向上、省エネルギー化、衛生面の安全性向上を同時に実現。

微生物の構成比率



- 1) *Bacillus thermocloacae* (Firmicutes)
- 2) *Bacillus thermoamylovorans* (Firmicutes)

その他、新規の好熱性乳酸菌群やキチン質分解菌群等、少なくとも6種類の微生物種から構成される複合微生物群集であることを遺伝子解析から解明。

図 1.1.1 高温発酵複合微生物群による高速飼料化技術

食品残渣の飼料化における既存技術との比較

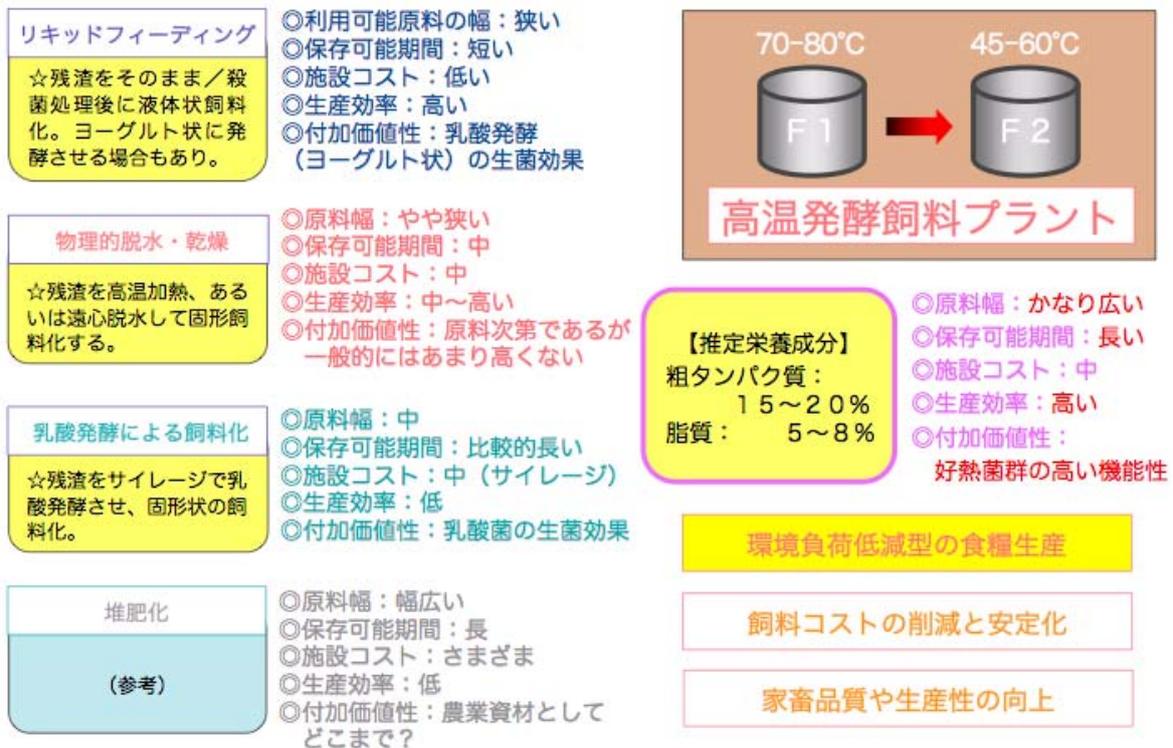


図 1.1.2 食品残渣の飼料化における既存技術との比較

(3) 実施内容

具体的実施内容を以下に示す。

① 原材料ごとの発酵ルーティンの確立

①-1：高機能性発酵飼料の製造試験（試験発酵プラント）

廃魚等の水産未利用資源＋柑橘類果皮・焼酎粕等を原料に、配合飼料・魚粉等の代替として利用可能な高機能性発酵飼料を連続的に製造可能な発酵ルーティンを確立するため、当該目的に特化した、好熱性複合微生物群主導型の２段式発酵試験プラントを設置し、現場での状況観察、発酵温度や製品の生産量等の物理的なデータ、および採取サンプルの化学組成分析（タンパク・脂質・炭水化物・ミネラル・ビタミン類等の栄養組成／有機酸・アミノ酸等の機能性・嗜好性にかかる成分）等に基づいて、プラントの運転制御条件を多角的に研究する。

①-2：周防灘・日向灘沿岸モデル地域における、未利用資源調査と事業シミュレーション

周防灘・日向灘沿岸モデル地域（愛媛・大分・宮崎）における、発酵飼料プラントの原材料としての未利用資源（海産資源・食品残渣）の地域分布や発生量および原料品質等を調査・分析し、本開発技術の各地域への適用可能性（導入に適したコミュニティの件数・市場規模／予測される原料・製品の流通体制と経済効果など）の事業シミュレーションを実施する。

② 発酵飼料の微生物資源ライブラリの構築

②-1：採取サンプルのメタゲノミクス解析と微生物資源ライブラリ構築

（高速 DNA シーケンサーほか分析関連機器）

発酵飼料製造プロセスにおいて連続的に採取されたサンプルについて、発酵過程および製品の分子遺伝学的な特性を、細菌の培養を必要としない網羅的なゲノム解析手法（メタゲノミクス解析）により解明し、遺伝情報ベースの微生物資源ライブラリの構築を図る。

③ 発酵飼料の動物に対する影響評価

③-1：研究室レベルでの実験動物系への投与試験

研究室レベルでの実験動物系への投与試験を実施し、動物の生体重や食餌量等のデータに加えて、免疫系の賦活化効果（活力を与える）や、脂肪酸・アミノ酸代謝系の変化を定量的に明らかにする。

③-2：現場レベルでの畜産動物（豚）・水産動物（養殖魚）への投与試験

現場レベルでの畜産動物（豚）・水産動物（養殖魚）への投与試験を実施し、動物の生体重や飼料要求率・肉質・等級・呈味等の生産性指標への影響を検討する。

③-3：被投与動物の腸内微生物相および腸内代謝に与える作用の定量的評価

（高速 DNA シーケンサーほか分析関連機器）

③-1 および③-2 における被投与動物の腸内微生物相および腸内代謝に与える作用を、②-1 と同様の手法において定量的に評価する。

④ 発酵飼料としての製品製造プロセスの最適化

④-1：有用微生物群の特定および発酵飼料製造プロセスの最適化研究（試験発酵プラント）

発酵飼料の製法や飼料中の微生物相の状態と、動物に対する有効性との相関性を明らかにするとともに、有用微生物群を特定し、これら情報のフィードバックに基づいたプラントの運転試験を再度実施し、発酵飼料製造プロセスの最適化研究を行う。

⑤ プラント運転管理の客観化

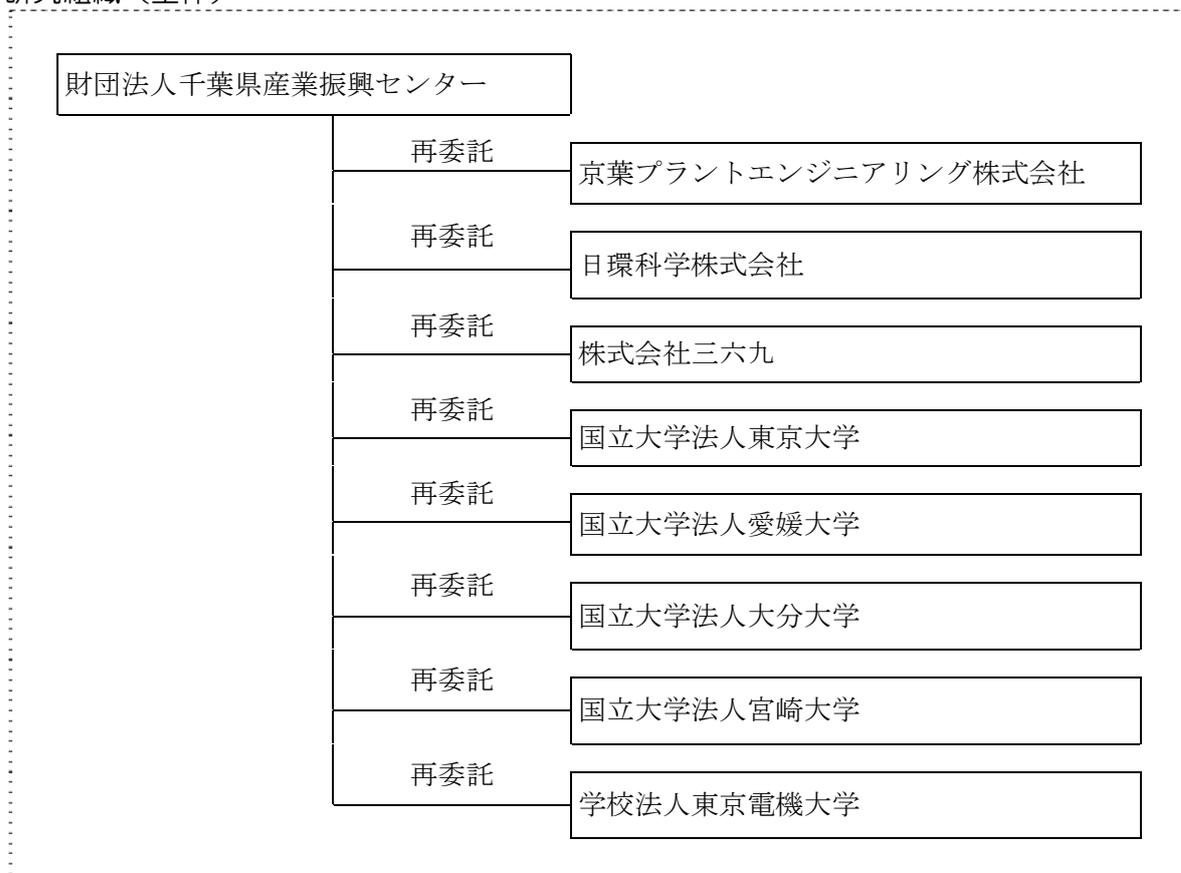
⑤-1：近赤外分光スペクトル解析（NIR）法による発酵プラントの運転管理手法の開発

（フーリエ変換近赤外分光スペクトル解析装置：既設の機器を流用／ハダド分光光度計（可視光線、NIR 領域））
上記試験の分析データをベースに、発酵プラントにおいて最適な発酵飼料製造ルーティンを維持管理するため、近赤外分光スペクトル解析（NIR）法による客観的な発酵物分析手法を確立し、安定かつ再現性の高い発酵プラントの運転管理を実現する。

1-2 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）



統括研究代表者（P L）
京葉プラントエンジニアリング株式会社
常務取締役 小川 和男

副統括研究代表者（S L）
国立大学法人東京大学大学院新領域創成科学研究科
教授 服部 正平

副統括研究代表者（S L）
日環科学株式会社
取締役 森 健一

(2) 研究員・プロジェクト管理員（役職、実施内容別担当：実施内容(番号)は1-1(3)項参照)

【事業管理者】財団法人千葉県産業振興センター
管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
大野 政浩	企業振興部新事業取引支援室主査	
金田 欣亮	企業振興部新事業取引支援室プロジェクトコーディネータ	

【再委託先】

研究員

a. 京葉プラントエンジニアリング株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
小川 和男	導管事業部 事業部長・常務取締役	③-2
宇田川 元章	導管事業部 環境部・課長	①-1, ④-1
新名 俊仁	導管事業部 環境部・係長	③-2
井藤 俊行	導管事業部 環境部・係長	②-1, ③-2, ③-3, ⑤-1

b. 日環科学株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
宮本 浩邦	代表取締役	①-1, ③-1, ④-1
森 健一	取締役	①-2, ③-3, ⑤-1
佐藤 玄太	総合事業部 IT事業部門・研究員	①-1, ①-2, ③-2, ⑤-1

c. 株式会社三六九

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
上原 俊信	製造部・工場長	①-1, ④-1
宮川 文生	製造部・主任	①-1, ④-1
広沢 新二	製造部・技術員	①-1, ④-1
堀 正幸	製造部・技術員	①-1, ④-1
中野 武志	製造部・技術員	①-1, ④-1

d. 国立大学法人東京大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
服部 正平	大学院新領域創成科学研究科・教授	②-1, ③-3

e. 国立大学法人愛媛大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
三浦 猛	南予水産研究センター生命科学研究部門・教授	①-2, ③-2
三浦 智恵美	南予水産研究センター生命科学研究部門・助教	①-2, ③-2
山口 園子	南予水産研究センター生命科学研究部門・博士研究員	①-2, ③-2

f. 国立大学法人大分大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
平田 誠	工学部応用化学科・准教授	①-1, ①-2

g. 国立大学法人宮崎大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
杉本 安寛	農学部地域農業システム学科・教授	①-2

h. 学校法人東京電機大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
中村 尚五	情報環境学部情報環境学科・教授	⑤-1

(3) 他からの指導・協力者

表 1.2.1 に示す委員、アドバイザーが参加した委員会を適宜開催した。

表 1.2.1 研究開発推進委員会 委員

氏名	所属・役職	備考
小川 和男	京葉プラントエンジニアリング株式会社 常務取締役	P L 委
服部 正平	国立大学法人東京大学 大学院新領域創成科学研究科教授	S L 委
森 健一	日環科学株式会社 取締役	S L 委
杉本 安寛	国立大学法人宮崎大学 農学部 教授	委
中村 尚五	学校法人東京電機大学 環境情報学部 教授	委
宇田川元章	京葉プラントエンジニアリング株式会社 課長	委
井上 貢	千葉県畜産総合研究センター 生産技術部長	アドバイザー
矢部 正彦	矢部農場（養豚業）専務	アドバイザー
山本 敏	株式会社ニチレイ CSR本部シニアプロフェッショナル	アドバイザー
松本 二郎	京葉瓦斯株式会社 技術研修センター 技術開発グループ 課長	アドバイザー

(注) ・ 研究員(労務費を委託対象にする)には、委と備考欄に記載。

・ P L (Project Leader)、S L (Sub Leader)を備考欄に記載。

・ アドバイザーは備考欄に記載、オブザーバーは記載しない。

1-3 成果概要

H21年度の研究開発成果の概要を以下に列記する。

1) 高機能性発酵飼料の製造試験においては、従来製品の製造レシピを踏襲した、焼酎粕ベース発酵飼料2 (type2) / 柑橘残渣ベース飼料 (type3) および、新製法をベースとした発酵飼料: 焼酎粕ベース飼料1 (type1) を設定し、それぞれの製品の特性に関する実験研究を行った。type1・type2の各発酵飼料については、プロトタイプを試作品を製造し、製造過程、もしくは製品の化学的特性・微生物学的特性を明らかにするとともに、それらを投与試験に供することができた。一方type3発酵飼料については、期間内にテスト発酵を行ったものの、水準の試作品の生産には至らなかった。

2) モデル地域における未利用資源調査と事業シミュレーションにおいては、愛媛・大分・宮崎の各地域において、発酵飼料原材料としての未利用資源を調査・分析し、本開発技術の適用可能性(導入に適したコミュニティの件数・市場規模/予測される原料・製品の流通体制と経済効果など)の事業実施案を策定した。その結果、各地域において、本技術に基づく発酵飼料製造のための原材料調達が可能であり、また販売価格にも依存するが、十分な事業採算性が認められた。

3) 発酵飼料の微生物資源ライブラリの構築においては、type1およびtype2発酵飼料について、発酵物中の細菌群を対象とした16sレベルでのゲノム解析を実施し、それぞれの飼料中の優占菌を精査した。

4) 研究室レベルでの実験動物系への投与試験においては、ラットへのtype0抽出液の投与試験を行った結果、宿主の小腸および肝臓において、対照群と比較して、一部の脂質関連遺伝子・免疫関連遺伝子の発現レベルの変化が認められた。なおラット腸内の菌相解析はスケジュールの問題から、期間内に実施できなかった。

5) 現場レベルでの畜産動物(豚)への投与試験においては、type1発酵飼料を出荷直前の肥育豚に30日間投与した結果、豚の嗜好性は良好であり、結果として、実施2農場両方で増体重量が対照区と比べて増加傾向にあった。一方、type2発酵飼料を出荷直前の肥育豚に21日間投与した結果、豚の嗜好性に問題があったが、増体重量については実施2農場のうち、1農場で非投与豚と比べて増加し、1農場でやや減少傾向であった。腸内の化学組成変化に関してはtype1/2双方で、非投与豚に対するリン酸値の減少を確認したほか、試験豚-非投与豚間でのいくつかの特徴の違いが見られた。肉質については、type2投与豚-非投与豚間で分析結果の複数の項目において有意差が認められ、また食味試験では投与豚の評価が若干優位であった。なお、type1投与試験の肉質分析はサンプル入手時のトラブルにより、実施できなかった。

6) 現場レベルでの畜産動物(養殖魚)への投与試験においては、type1発酵飼料を投与したマダイ稚魚について、投与魚は非投与魚と成長量に関する差異は認められなかったが、エドワジエラ症原因菌の感染実験を行った結果、対照群と比較してマダイ稚魚の生残率が著しく高く、明らかなエドワジエラ症発症に対する抑制効果が認められた。またマダイ幼魚の海面生簀での養殖実験の結果、投与群は非投与群と比べ、肥満度および増肉係数の良化が認められた。

7) 被投与動物の腸内微生物相および腸内代謝に与える作用の定量的評価においては、type1発酵飼料投与による豚糞便中の細菌構成の変動について、16SrRNA配列法による解析を行った結果、ストレプトコッカス属細菌の組成比は投与群が非投与群の約0.4倍、またラクトバチラス属細菌の組成比は投与群が非投与群の約1.4倍、といった明確な差異が認められた。このように発酵飼料の投与によって、腸内微生物の優占種が、腸内資化・代謝能の異なる微生物群へと変化することが解析データから示唆された。なおtype2発酵飼料投与による豚糞便中の細菌構成の変動解析については、本試験研究期間中に実施することができなかった。

8) 有用微生物群の特定および発酵飼料製造プロセスの最適化研究においては、一部の分析結果、現場での発酵物の状況（臭い・粘度）および発酵槽温度の24時間モニタリングデータ等から、焼酎粕や柑橘残渣等の新規原料投入時の発酵状態の推移についての状況、およびその要因を把握し、プラント運転条件の改良案を策定した。

9) 近赤外分光スペクトル解析(NIR)法による発酵プラントの運転管理手法の開発においては、発酵飼料に含有される各種栄養成分の定量を行うための検量線作成の前段階として、原材料候補サンプルの近赤外分光光度計による拡散反射光の測定、およびデータ解析を実施した。まずサンプルノイズを低減するためのフィルタ設計を行い、スペクトル情報抽出の精度向上を実現した。フィルタ処理後のスペクトル波形の変曲点データについて主成分分析を実施し、各サンプルの化学成分組成の差異に由来する、定性的な分類が可能であることが示唆された。また変曲点データから、最小二乗法(PLS)により乾物率、および全窒素比についての予測式を導出し、それぞれ実測値との比較を行った結果、高精度の予測を行うことができた。なお発酵物中の成分の推定については、本試験研究期間中に実施することはできなかった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 研究者

- ・所 属：京葉プラントエンジニアリング株式会社
- ・役職・氏名：常務取締役・小川 和男
- ・連絡先：TEL 047-325-3383、FAX 047-321-0973、E-mail k-ogawa@kpeng.co.jp

(2) 事業管理者

- ・所 属：財団法人千葉県産業振興センター
- ・役職・氏名：主幹・大野 政浩
- ・連絡先：TEL 043-299-2653、FAX 043-299-3411、E-mail m-oono@ccjc-net.or.jp

第2章 本論（研究開発の詳細）【抜粋】

2-1 原材料ごとの発酵ルーティンの確立（①）

（1）高機能性発酵飼料の製造試験（①-1）

-----【担当：(株)京葉プラントエンジニアリング、(株)三六九、日環科学(株)】

1) 目的

好熱性複合微生物群 PTA-1773 (deposited in ATCC) を主導とし、水産未利用資源＋柑橘類果皮・焼酎粕等を原料とした発酵飼料の製造に最適な発酵ルーティンを確認するための運転制御条件を検討する。

2) 実施内容

(株)三六九（大分県杵築市）に図 2.1.1 に示す発酵飼料製造試験設備（設計・製作：京葉プラントエンジニアリング(株)）を設置し、好熱性複合微生物群 PTA-1773 (deposited in ATCC) を主導とした発酵飼料製造試験を実施した。

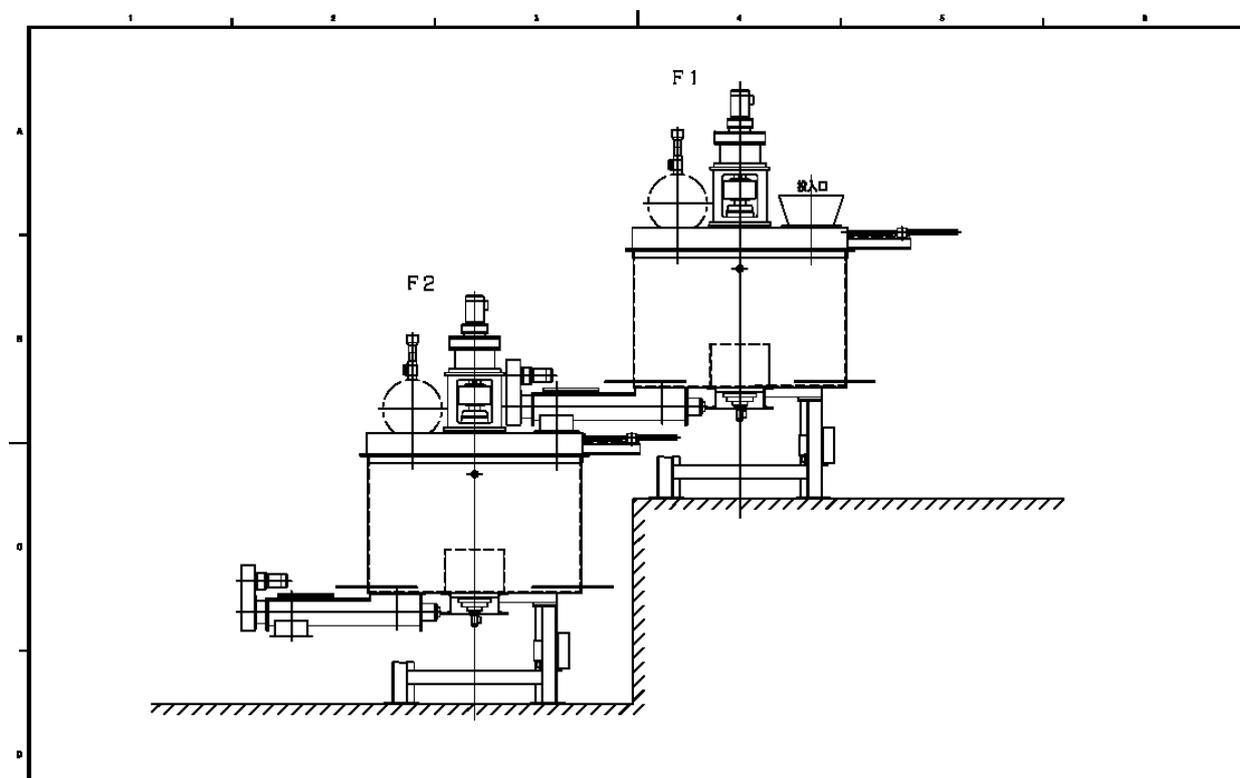


図 2.1.1 高機能性発酵飼料の製造試験設備

本研究開発においては、(株)三六九、京葉プラントエンジニアリング(株)が製造／販売している既製品（日本国特許第 3314302 号、以下 type0 と記す）の製造レシピを踏襲しつつ、原材料の組成を変更し、発酵飼料としての栄養価と既製品に準じた機能性の両立を目指した、焼酎粕ベース発酵飼料 2 (type2) / 柑橘残渣ベース飼料 (type3) に加え、もう一つのテーマとして、既製品の発酵物に含まれる多様な微生物群の機能性を活かしつつ、高温発酵に依らない新製法をベースとした発酵飼料：焼酎粕ベース飼料 1 (type1) を設定し、それぞれの製品の特性に関する実験研究を行った。

2-2 発酵飼料の動物に対する影響評価 (③)

(1) 現場レベルでの畜産動物(豚)・水産動物(養殖魚)への投与試験 (③-2)

----- 【担当：京葉プラントエンジニアリング(株)、愛媛大学】

現場レベルでの畜産動物(豚)・水産動物(養殖魚)への投与試験を実施し、動物の生体重や飼料要求率・肉質・等級・呈味等の生産性指標への影響を検討した。

1) 畜産動物(豚)への投与試験結果 ----- 【担当：京葉プラントエンジニアリング(株)】

a. 目的

本サブテーマにおいては、サブテーマ1-1で製造された2種類の発酵飼料について、現場投与を行い、飼料としてのパフォーマンスを各種検査・分析により検証し、将来の事業化に向けての基礎データや技術課題を集積することを主な目的とする。

b. 実施内容

サブテーマ1-1において製造された、type1発酵飼料、およびtype2発酵飼料の畜産動物(肥育豚)への投与試験を実施した。試験は、母豚150頭の千葉県の中規模養豚農家、および母豚240頭の茨城県の中規模養豚農家において、2009年11月(type1発酵飼料)、2010年2月(type2発酵飼料)にそれぞれの農場で実施した。発酵飼料の投与期間はそれぞれ、肥育後期の出荷前の135日齢から30日間(type1)、および145日齢から21日間(type2)とした。



図 2.2.1 type1 発酵飼料



図 2.2.2 type2 発酵飼料

供試豚はLWDの肥育豚を用いた。群構成は投与群が5～17頭、非投与群が5～15頭とした。飼料給与は千葉農場は自由飲水、不断給餌、茨城農場は自由飲水、1頭当り3kgの制限給餌で飼育した。

発酵飼料は、餌に対し0.3% (type1、重量比)、0.7～2.1% (type2、重量比) 量をそれぞれ添加した。千葉の農場での飼料給与は肉豚肥育配合飼料(CP 13%、TDN 78%、粗脂肪1%)、茨城の農場の飼料給与は肉豚肥育配合飼料(CP 15%、TDN 80%粗脂肪3.5%)であった。

type1発酵飼料投与試験においては、千葉の農場で糞便のサンプリングを実施した(試験区/対照区各5頭)。またtype2発酵飼料投与試験においては、茨城の農場で糞便のサンプリングを実施するとともに、ロース肉を採取し、肉質分析および食味官能試験に供した(試験区/対照区各5頭)。また全試験群について、試験前後の体重を測定した。茨城のtype2投与試験のみ、耳標識による個体管理を実施したが、残りの試験群については個体管理を実施していない。

c. 結 果

各試験群における発酵飼料投与試験の前後で、試験対象となる豚の体重測定を実施した結果を以下の表に示す。type1 発酵飼料の投与試験においては、概ね豚の嗜好性（餌食い）は良好であり、データからも増体への好影響が伺える。一方で type2 発酵飼料投与試験においては全般的に豚の餌食いが低下し、茨城の農場においては試験期間内の平均で、試験区：2kg／頭・日に対し、対照区：3kg／頭・日であった。にもかかわらず、増体重幅は試験区の方が有意に大きかった（データからは飼料要求率に換算すると、試験区の方が約 1.7 倍、高効率であったことが示された）。一方で、同様に餌食いが低下した千葉の農場では、試験区の増体重は対照区を若干下回った結果となった。今後、type2 飼料については、増体への生理的な効果を維持しつつ、嗜好性向上のための技術改良を図っていく必要があると考えられる。

表 2.2.1 発酵飼料投与試験における試験前後の増体重変化

試験農場	試験期間	開始時体重kg	出荷時体重kg	増体重kg	試験/対照	増体重/日
茨城農場 type1 11/18~12/17 (注1)						
試験区		88.6	116.6	28.0	1.34	0.93
対照区		95.5	116.4	20.9	1.00	0.70
茨城農場 type2 2/2~2/22						
試験区		82.0	100.4	18.4	1.23	0.88
対照区		88.8	103.8	15.0	1.00	0.71
千葉農場 type1 11/13~12/2 (注1)						
試験区		81.1	109.7	28.6	1.28	0.95
対照区		77.6	99.9	22.3	1.00	0.74
千葉農場 type2 2/3~2/23						
試験区		87.4	104.6	17.2	0.95	0.82
対照区		84.0	102.2	18.2	1.00	0.87

[* : p<0.05]

※注1：試験開始時と終了時の体重測定個体数が異なり、また個体識別を行っておらず統計処理が不可能なため、参考データ扱いとする。）

次に、腸内環境の指標として、試験前後に採取した糞便サンプルの有機酸組成についてのデータを図 2.2.3、図 2.2.4 に示す。

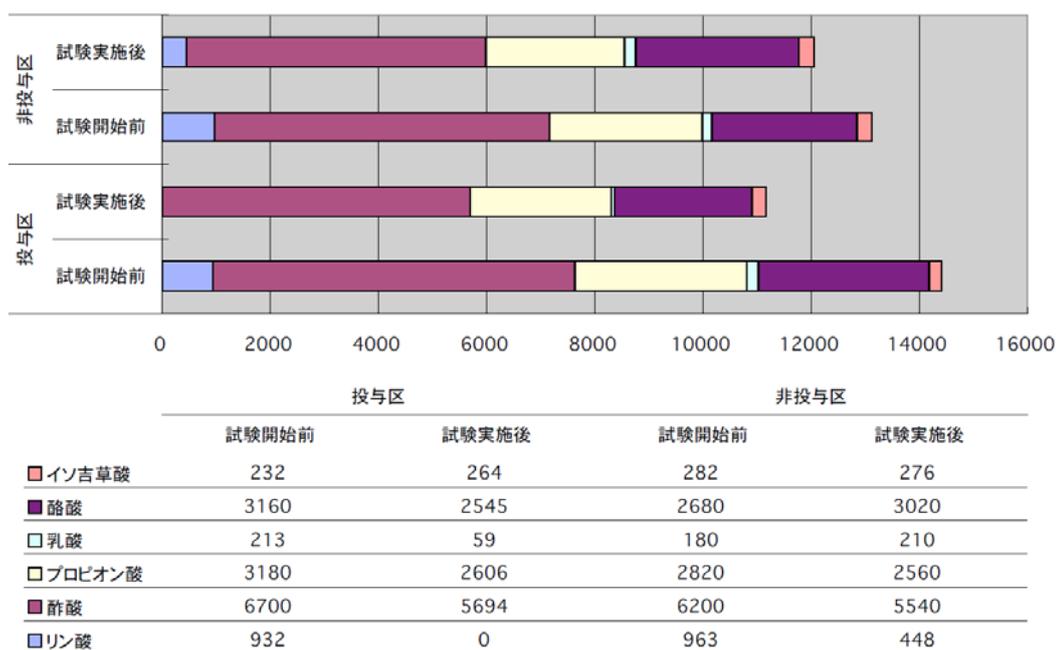


図 2.2.3 type1 発酵飼料投与試験前後の糞便中有機酸組成の平均値
[千葉/単位は ppm、各区とも n=5]

type1 については、今回ターゲットとした有機酸について、試験区と対照区で有意な差は見られなかったが、傾向として、1) リン酸の減少、2) 乳酸の減少、3) 全体の有機酸量の減少が窺えた。

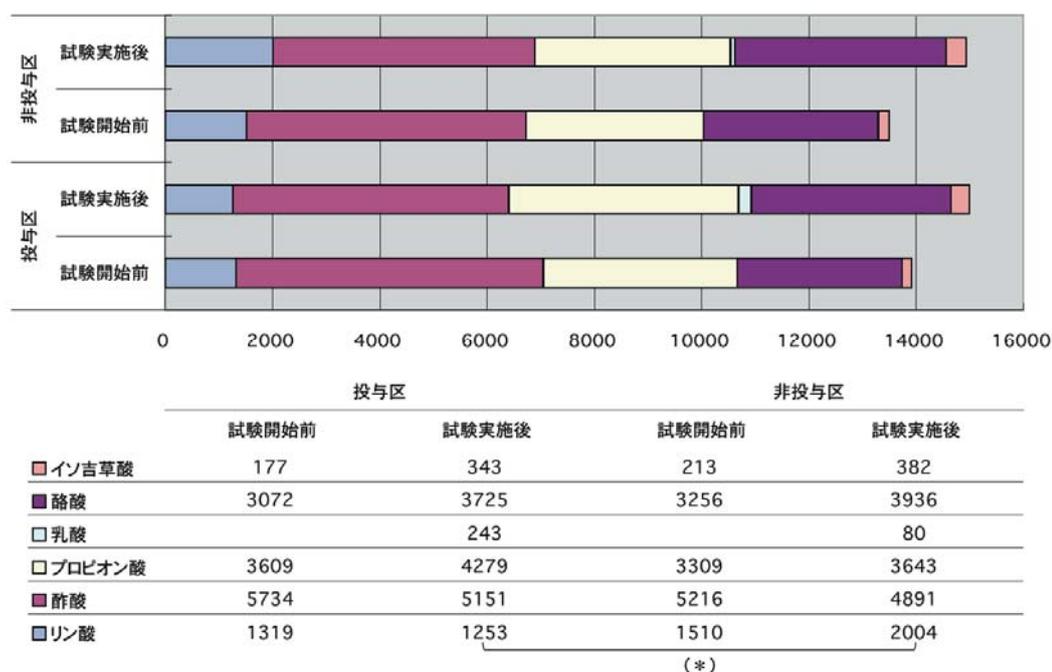


図 2.2.4 type2 発酵飼料投与試験前後の糞便中有機酸組成の平均値
[茨城/単位は ppm、各区とも n=5]

type2 については、今回ターゲットとした有機酸のうち、試験終了後の糞便中のリン酸濃度について試験区と対照区で有意な差が見られた。また type1 と異なり、乳酸の増加傾向が窺えた。

type2 発酵飼料投与豚の肉質に関する分析（茨城／各区とも n=5）の結果について、試験区－対照区間で差が認められた項目は、1) Lab 値 [L 値、b 値ともに試験区が有意に高い]、2) 柔軟性 [対照区が有意に高い]、3) 脂肪酸含量 [ステアリン酸は対照区が有意に高い、イコサジエン酸は試験区が有意に高い]。また有意水準には達していなかったものの、ミリスチン酸・パルミチン酸等の飽和脂肪酸は対照区が高く、オレイン酸・γリノレン酸等の不飽和脂肪酸は試験区の方が高い傾向がみられたであった。なお遊離アミノ酸については、特に両区の間には顕著な傾向の差異は見られなかった。

（肉質分析結果については、2月下旬に飼育試験が終了したため、スケジュール的に詳細なデータ検討が間に合わなかった。よって本報告書では、試験区／対照区間の差異についての検討のみを記載した）

また、Type2 発酵飼料投与豚（茨城）のロース部位を薄切りし、16人によるブラインド盲検での試食（しゃぶしゃぶ）を実施した結果、味付けなしでは試験区を上位にした者が11名、対照区を上位にした者が5名であった。また、塩こしょうによる味付けを行った場合については、同様に10名対6名で試験区を上位にした者が多かった。当該試験は、本試験研究の関係者の参加のもと、推進委員会の一環として実施されたものであり、本試験が直接、正確な呈味の評価につながるわけではないが、少なくとも一般消費者の味覚からは、本発酵飼料投与豚の投与によって食味が低下することはなかったものと考えられる。

2) 水産動物(養殖魚)への投与試験結果 ----- 【担当：愛媛大学】

a. 目的

養殖マダイを用いて、水槽および生け簀でサブテーマ1-1で製造した発酵飼料等の投与実験を行い、発酵飼料が養殖マダイの成長および耐病性に及ぼす影響を解析することを目的として行われた。

b. 材料と方法

室内水槽にて養殖マダイ稚魚への投与実験を行った。養殖マダイ稚魚（体重約20g）を15匹ずつ4群に分け、それぞれ固形のtype1発酵飼料1%添加群、同5%添加群、1%type0発酵物抽出液添加群および対照群とした。type1発酵飼料はハンマーミルで微粉碎後添着剤によりEP飼料に添着、type0発酵物抽出液はEP飼料に浸漬することにより添加した。対照群にも、他の実験群と同量の添着剤を添着した。このようにして作製した飼料を実験魚に対し、1日1回飽食の条件で与えて飼育した。飼育開始31日後、尾叉体長および体重を測定し、発酵飼料の成長へ与える影響を解析した後、エドワジエラ症原因菌の感染実験を行い、発酵飼料の給餌がタイ養殖で最も被害をもたらすエドワジエラ症に対し有効であるか否かを解析した。

また実際の養殖条件での発酵飼料の効果を解析するために、海面生簀での投与実験を行った。EP飼料に1%または5%のtype1発酵飼料を添加し、生け簀で飼育している養殖マダイ（体重約130g）へ1日1回飽食量投与した。2ヶ月間投与し、養殖マダイの成長に及ぼす影響を解析した。

c. 結果

水槽でマダイ稚魚に発酵飼料等を添加した飼料を与えた結果、1%または5%のtype1発酵飼料添加群では、対照群と比較して尾叉長・体重の成長量共に有意な差は認められなかった。

一方、1%type0抽出液添加群で、尾叉長・体重の成長量共に各群と比較して有意に低い値を示したことから、養殖マダイ稚魚の成長に関しては抽出液よりも固形の発酵飼料の方が有効であることが示された。図 2.2.5 にその結果を示す。

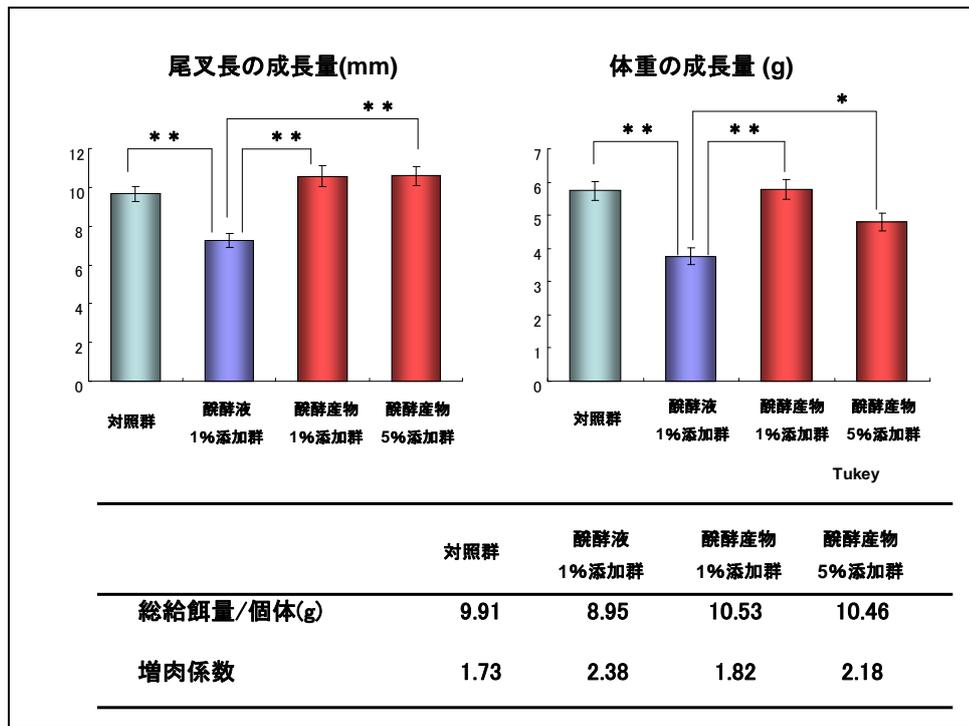


図 2.2.5 水槽内マダイ稚魚への発酵飼料投与試験結果

当該水槽にて、続けてエドワジエラ症原因菌の感染実験を行った結果、type0 抽出液添加群及び type1 発酵飼料添加群共に、対照群と比較してマダイ稚魚の生残率が著しく高く、明らかなエドワジエラ症発症に対する抑制効果が認められた。このことから、type1 発酵飼料の利用がマダイ養殖で現在最も深刻な被害をもたらしているエドワジエラ症に対し有効であることが示された。図 2.2.6 にその結果を示す。

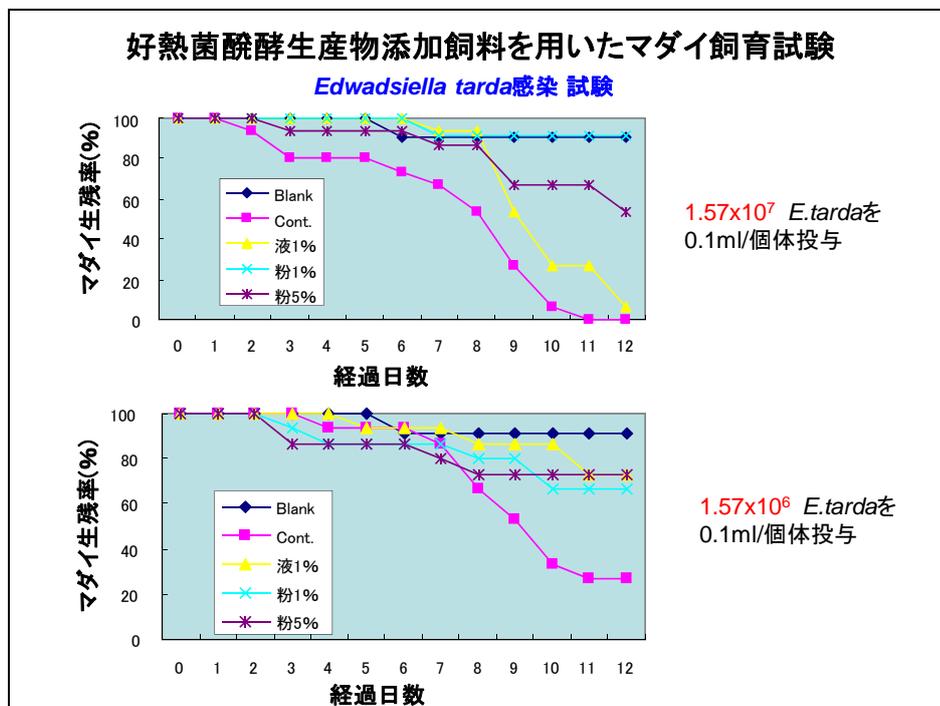


図 2.2.6 マダイへのエドワジエラ症原因菌の感染実験結果

一方、海面生簀での養殖実験の結果、水槽での試験と同様に1%または5%の type1 発酵飼料添加群で尾叉長・体重共に対照群と比較して有意な差は認められなかった。しかし肥満度に関しては、投与後1ヶ月目には1%発酵飼料添加群で有意に増加し、投与2ヶ月目には5%発酵飼料添加群で対照群と比較して有意に高い値を示した。魚の体重1kgを増やすのに必要な餌の量を示す“増肉係数”を調べた結果、対照群と比較して発酵飼料添加群で濃度依存的に増肉係数が減少していた。このことから、養殖環境では、飼料への type1 発酵飼料の添加は、餌料効率の向上に貢献する可能性が示された。図 2.2.7 にその結果を示す。

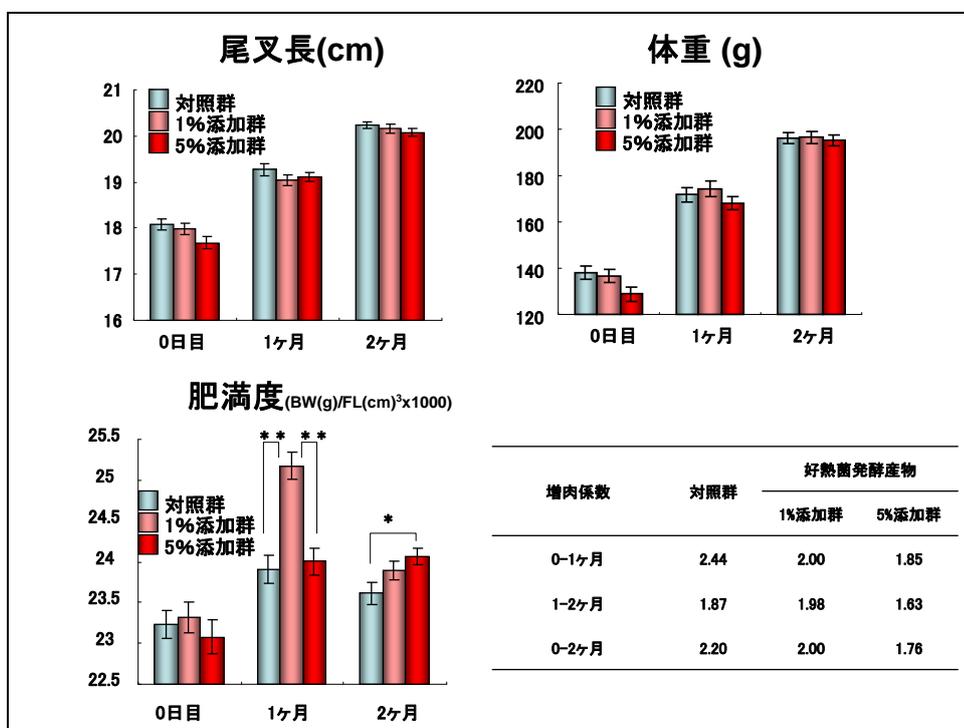


図 2.2.7 海面生簀マダイ稚魚への発酵飼料投与試験結果

(2) 被投与動物の腸内微生物相および腸内代謝に与える作用の定量的評価 (③-3)

--- 【東京大学、京葉プラントエンジニアリング(株)、日環科学(株)】

type1/type2 発酵飼料投与による豚糞便中の細菌構成の変動について、16S rRNA 配列法を使用して解析を行った（このうち type2 投与試験については、発酵飼料の製造が2月上旬であったため、本試験研究期間内で、サンプル採取および DNA 抽出までの操作を終了した。以降は type1 投与試験について記述する）。

解析対象とする豚を試験区（発酵飼料投与群：5匹）、対照区（非投与群：5匹）にわけ、試験開始前（type1 投与試験：試験区 PY0101～0105、対照区 PY0106～0110）および試験開始後4週間目（同：試験区 PY0301～0305、対照区 PY0306～0310）の糞便を採取して、それぞれから細菌叢 DNA の抽出をおこなった。抽出した DNA を精製後、細菌の 16S rRNA 配列に特異的に結合できるプライマーである Bact-27F (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3') と Bact-1492R (5'-GGYTACCTGTGTACGACT-3') を使用して PCR 増幅をおこなった。PCR 産物はプラスミドベクターにクローニングし、16S ライブラリーとした。各試料のライブラリーより 192 クローンずつ単離をおこなって、それぞれにクローニングされた 16S rRNA 配列を、DNA シークエンサーを用いて配列決定した。決定した 16S 配列は NCBI BLAST による相同性検索を使って、その配列の由来である細菌の菌種を帰属した。またデータベースとして Ribosomal Database Project II (RDP) を使用した。

その結果、16S rRNA 配列の帰属により多種多様な細菌が帰属された。属レベルでは帰属のつかない細菌も多かったため、まず分類学上で科レベルによる組成比を計算し、細菌の組成比を図 2.2.8 に示した。

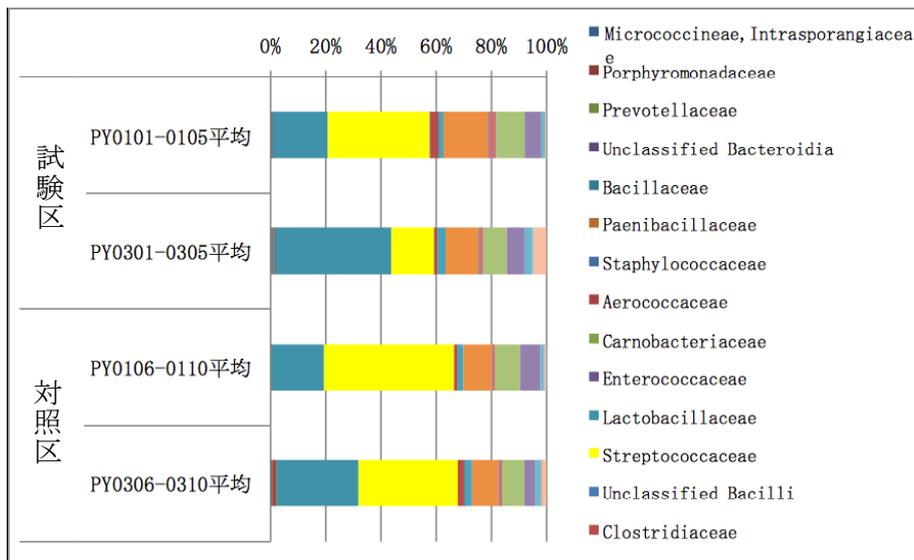


図 2.2.8 試験区および対照区の豚糞便の細菌組成比

試験区(試験開始前:PY0101-0105)と対照区(試験開始前:PY0106-0110)では *Streptococcaceae* 科細菌と *Lachnospiraceae* 科細菌に多少の差がみられたが、ほかには有意な差はみられなかった。一方、試験区(試験開始4週間後:PY0301-0305)と対照区(試験開始4週間後:PY0306-0310)では、各科の細菌の組成比が変化しており、*Lactobacillaceae* 科細菌が47.11%と29.71%(試験区と対照区、以下同)、*Streptococcaceae* 科細菌が19.14%と35.93%、*Clostridiaceae* 科細菌が1.26%と2.26%、*Veillonellaceae* 科細菌が7.38%と3.90%などに顕著な違いが見られた。

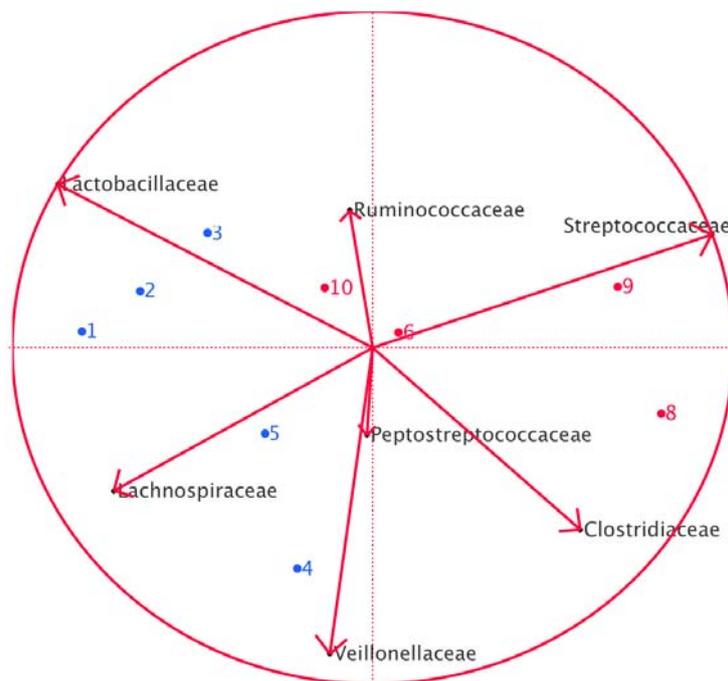


図 2.2.9 試験開始4週後の試験区(01-05)と対照区(06-10)の優占細菌組成(科レベル)の特性比較(共分散行列に基づく主成分分析。横軸：第1／縦軸：第2主成分、矢印は各細菌科の負荷量を示す)

次に試験区(試験開始4週間後:PY0301-0305)と対照区(試験開始4週間後:PY0306-0310)の属レベルで変動を解析し、**図 2.2.10**に示した。顕著な違いとしてはストレプトコッカス属細菌が15.32%と35.93%、アエロコッカス属細菌が0.11%と1.08%、ラクトバチラス属細菌が41.44%と29.71%、メガスフェラ属細菌が0.22%と1.85%、ファスコラルクトバクテリウム属細菌が4.58%と1.08%、セレノモナス属細菌が1.46%と0.00%であった。

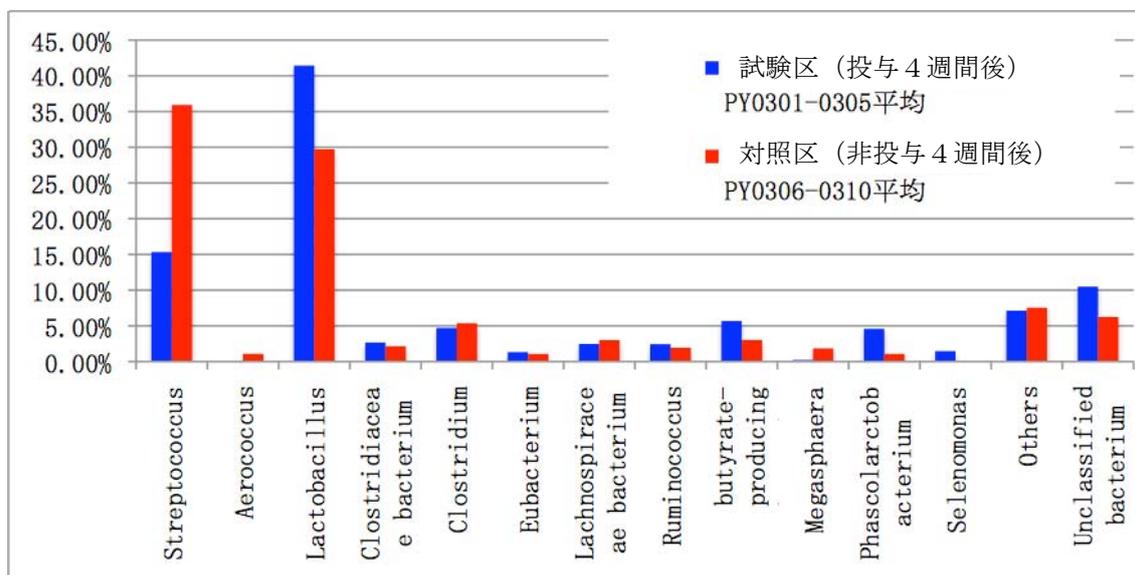


図 2.2.10 試験区(試験開始4週間後:PY0301-0305)と対照区(試験開始4週間後:PY0306-0310)の細菌組成比の比較(属レベル)

このように発酵飼料の投与によって、腸内微生物の優占種が、腸内資化・代謝能の異なる微生物群へと変化することが解析データから示唆された。これらの結果を受け、今後の展開として、腸内環境における微生物の代謝に関連する機能遺伝子の探索を実施し、発酵飼料がもたらす各種生理的効果と動物腸内の代謝のダイナミズムとの関連性を探っていきたいと考えている。

なお、type2 発酵飼料の豚への投与試験、および type1 発酵飼料の水産魚(マダイ)への投与試験の各サンプルについては、試験終了が2月下旬であったため、今後、解析を行なっていく予定である。

第3章 平成21年度研究開発のまとめと今後の予定

(1) 平成21年度研究開発のまとめ

今年度の成果を以下に列記する。

- 2種の焼酎粕ベース発酵飼料（type1/type2）および柑橘残渣ベース飼料（type3）のプロトタイプを製造し、製造過程、もしくは製品の化学的特性・微生物学的特性を明らかにした。
- 現場レベルでの畜産動物(豚)への投与試験を実施し、増体および肉質に対する好影響が認められた。また投与群/被投与群間で、糞便中の細菌組成の傾向が明確に異なっていた。
- 現場レベルでの畜産動物(養殖魚)への投与試験を実施し、type1発酵飼料を投与したマダイ稚魚について、明らかなエドワジエラ症発症に対する抑制効果が認められた。またマダイ幼魚の海面生簀での養殖実験の結果、肥満度および増肉係数の良化が認められた。
- ラットへの type0 抽出液の投与試験を実施し、小腸・肝臓で脂質関連遺伝子 Angpt14 の発現抑制が認められた。また免疫関連遺伝子である granzyme B は、小腸において発現レベル/産物レベルとも増加傾向、IL-18 については、肝臓において発現レベルで増加傾向がみられた。
- 近赤外分光スペクトル解析(NIR)法について、変曲点データから、最小二乗法(PLS)により乾物率、および全窒素比についての予測式を導出し、それぞれ実測値との比較を行った結果、高精度の予測を行うことができた。
- 愛媛・宮崎・大分地域の発酵飼料原材料としての未利用資源を調査・分析し、本開発技術の適用可能性を検討した。その結果、各地域において、本技術に基づく発酵飼料製造のための原材料調達が可能であり、十分な事業採算性が認められた。

(2) 今後の予定

今年度の研究成果を反映し、今後次のような研究開発を継続する予定である。

- 平成21年度の試験において得られたデータを多角的に検証し、それらの知見をフィードバックすることで、発酵飼料プラントの飼料製造ルーティンを改良する。
- 改良ルーティンに基づく飼料製造試験、および畜産/水産動物への投与試験を実施する。発酵飼料および投与動物の腸内環境について、メタゲノミクス・メタボロミクス両面からの解析を行い、発酵飼料が動物の生理機能に与える作用を科学的に解明する。
- 発酵飼料中、および被投与動物の腸内容物もしくは糞便中の細菌群の生菌分離を実施し、個々の微生物の機能性を明らかにする。
- 近赤外分光法に基づく、発酵物の成分分析法を確立し、実際にプラント稼働現場での発酵物の品質管理に活用する。
- 発酵飼料プラントをモデル地域に移設し、地域特有の廃棄物を活用した飼料製造試験を実施する。製造された飼料については、現地の自治体・企業と連携しつつ、地域内でのモデル流通経路を構築し、併せて現場での施用試験データを集積する。

第4章 全体総括

一昨年一昨年の飼料高騰の折に、配合飼料の半値前後の低コストで流通されるエコフィードのニーズは一気に高まったかに見えた。しかしその一方で、エコフィードは組成の不均一性や原料の不透明性から、品質重視の生産者には敬遠されている向きもあり、全国的な普及の促進にはまだまだ課題も多いと感じられる。

このようなエコフィードのウィークポイントを払拭すべく、本技術開発では、廃棄物の再利用／飼料自給率の向上効果のみならず、腸内菌相に対するプロバイオティクス様効果が期待される「高機能性発酵飼料」の生産を実現するため、水産原料をベースとしつつも、地域ごとに異なる廃資源の有効利用に対応すべく、従来手法とは異なる組成の原材料を活用した発酵飼料製造プロセスの実現を目指した。

中でも水産系廃棄物については未活用資源としての利用用途の拡大が期待されているが、腐敗等の問題でその取り扱いが難しいため、発酵飼料化技術の商業ベースでの実用化はほとんど進んでいないのが実情である。今回の技術開発によって、水産資源を地域コミュニティ特有の廃棄物残渣と組み合わせることで「地産地消リサイクルチェーン」の全国的な実現に向けての第一歩を踏み出せたことを意義深く感じている。

今後は、本発酵飼料製造技術に対する科学的な裏付けを一つひとつ積み重ねながら、高機能・高品質な発酵飼料の製造ルーティンを確立するとともに、製品および製造技術全般に対する信頼性の向上を図っていきたい。

最後に、タイトなスケジュールの中でご尽力下さった、各参画研究機関の研究者の皆様、委員会へ精力的にご参加いただいたアドバイザーの皆様、および研究への多大なご協力をいただいた飼料投与試験実施農場の皆様、資源ヒアリング調査先機関の皆様、技術指導を頂戴した皆様へ、この場をお借りし深く感謝申し上げます。ありがとうございました。