

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業

地域水産資源の有効活用による魚病抑制効果を有する養殖魚用飼料の開発」

研究開発成果等報告書

平成25年 3月

委託者 四国経済産業局

委託先 国立大学法人愛媛大学

目 次 (例)

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
- 1－2 研究体制
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)
- 1－3 成果概要
- 1－4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

- ① 愛媛県南予地域の資源を活用した発酵処理技術の確立
- ② 魚病感染抑制効果を保持した飼料製造方法の検討
- ③ 飼料の養殖魚に対する嗜好性の向上に関する研究開発
- ④ 養殖魚に対する飼料の最適供与条件の確立

最終章 全体総括

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

[研究背景]

(十九) 発酵に係る技術

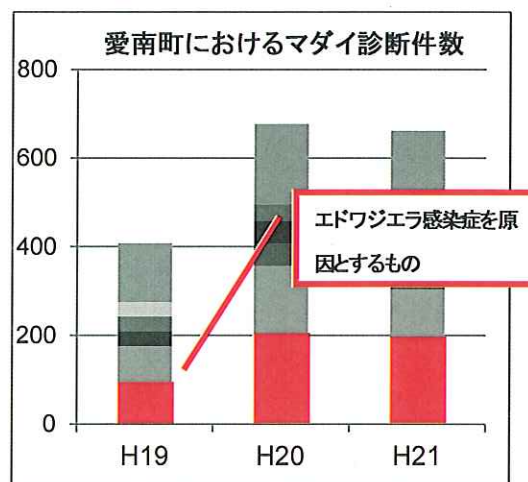
1 発酵に係る技術において達成すべき高度化目標

(1) 食料品製造業に関する事項

① 川下製造業者等の抱える課題及びニーズ

ウ. 高品質化 エ. 環境対応

養殖現場では魚病による被害が年々増加している。特に、マダイに対するエドワジエラ症の流行が問題となっている。例えば、愛媛県愛南町におけるマダイの魚病診断件数は、エドワジエラ症を原因とするものが1位であり、近年は増加傾向である。しかしながら、エドワジエラ症に対するワクチンや認可薬は存在せず、有効な対策法がない。エドワジエラ症の愛媛県内における被害総額は、年間2億円近くにも上る。



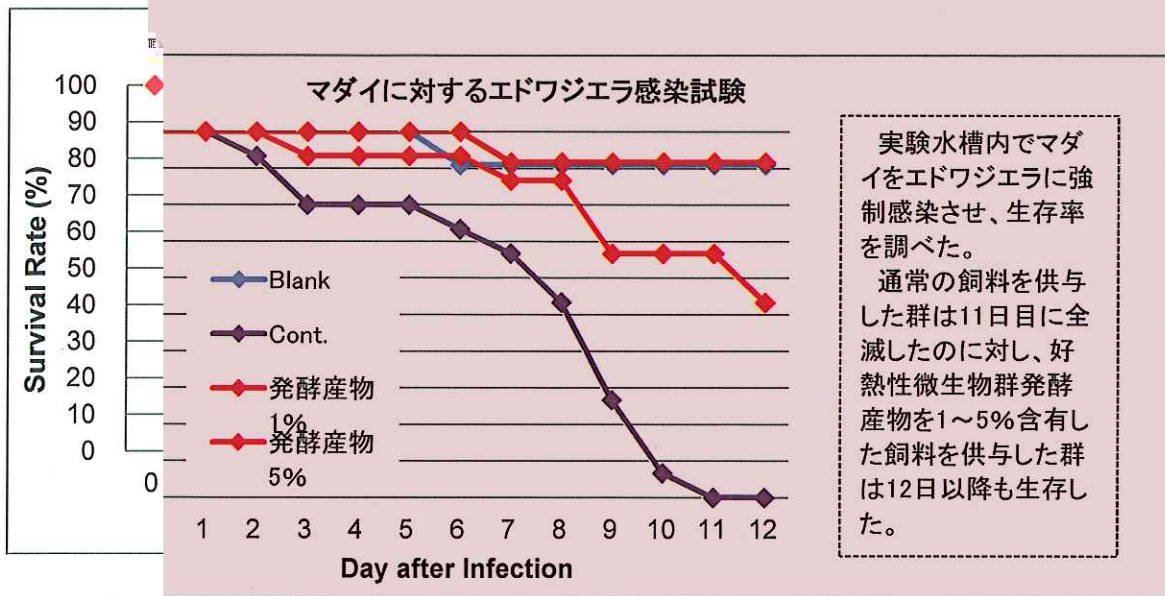
また、魚粉の価格が高騰によって飼料の値段が上がり、養殖業者の経営を圧迫している。そこで、水産加工現場で多く発生している加工残渣を有効利用し、安価で環境に優しい飼料の開発が求められている。

[研究目的及び目標]

ウ. 発酵生産物等の有効利用に係る技術の高度化

申請者らのこれまでの研究で、未利用海産資源を好熱性複合微生物群 PTA-1773 (Deposited in ATCC) により発酵した発酵産物を飼料としてマダイに供与したところ、エドワジエラに対する顕著な感染防御作用が認められた (下図)。本研究開発は、エドワジエラ感染の抑制という課題を、この発酵飼料で解決することを目的とする。

本研究開発では、魚病抑制機能を有する養殖飼料の実用化に向けて、1. 原材料に最適化された発酵プロセスの構築、2. 感染防御作用を保持可能な飼料加工方法の検討、3. 養殖魚に対する嗜好性の向上、4. 最適施用条件の確立、等の研究開発を実施し、発酵生産物の有効利用に係る技術の高度化を目指す。



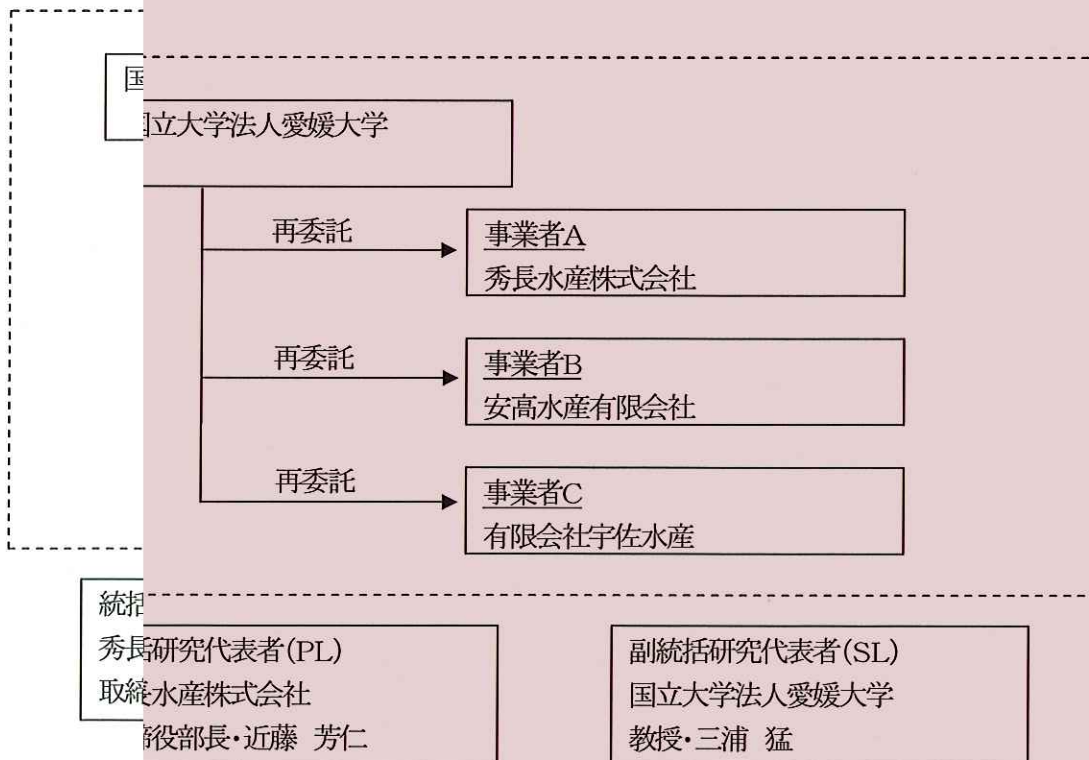
1-2 研究体制

(研究組織)

組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

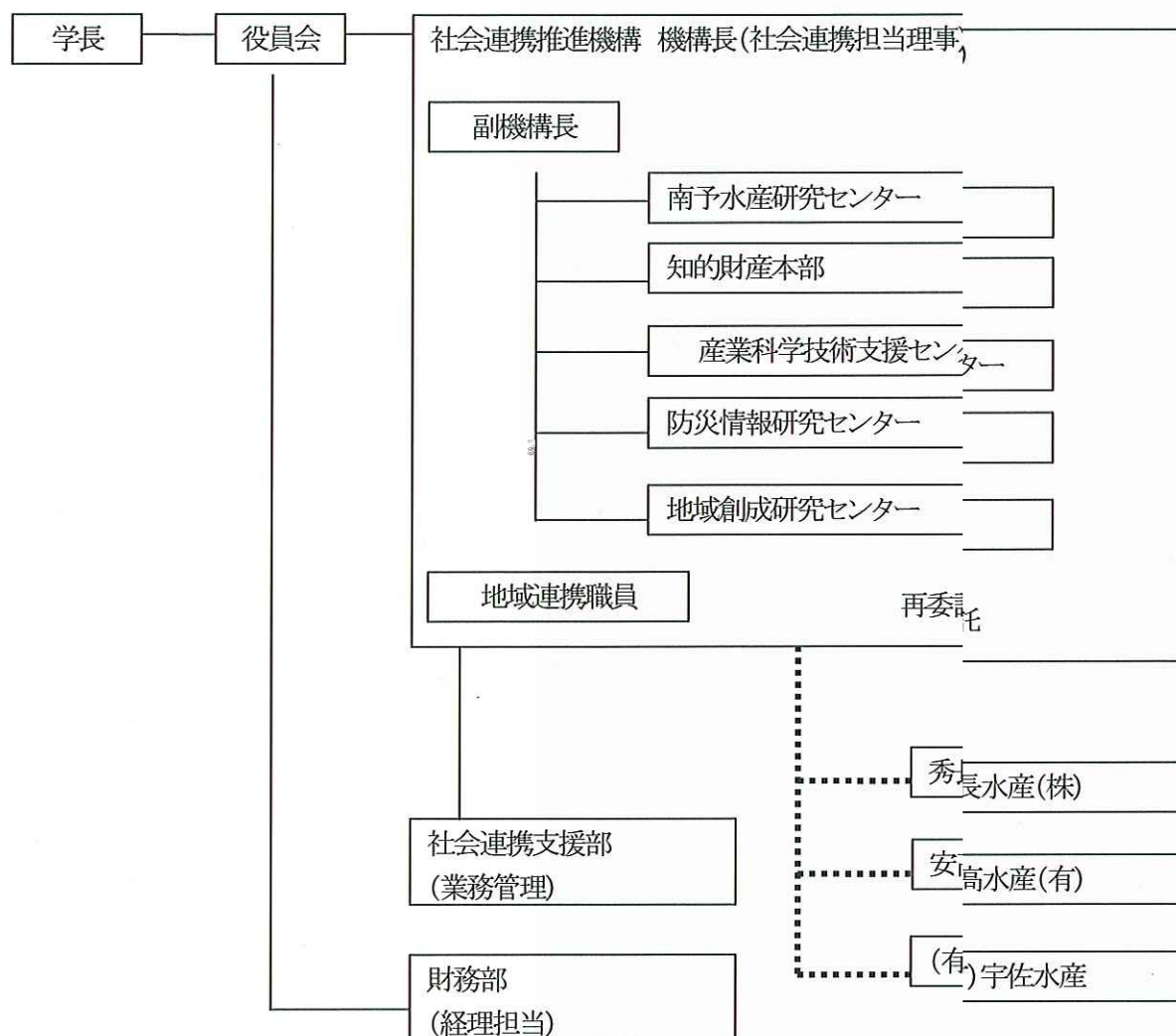
1) 研究組織

(全体)



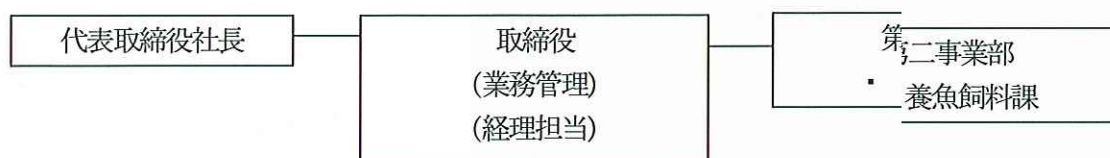
2) 管理体制

[国立大学法人愛媛大学]

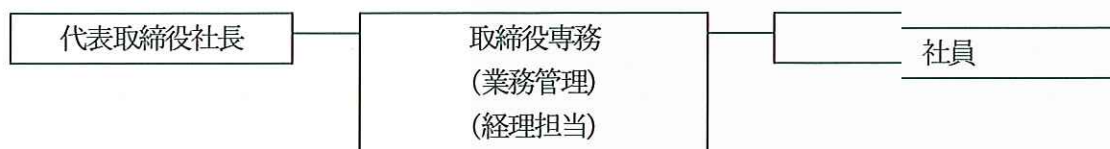


[再委託先]

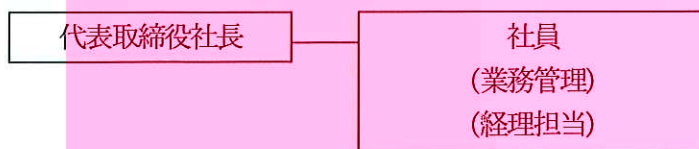
秀長水産株式会社



安高水産有限会社



有限会社宇佐水産



(2) 管理員及び研究員

【事業管理者】 国立大学法人愛媛大学

① 管理員

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
竹内 清見	社会連携支援部社会連携課長	⑤
上田 修三	社会連携支援部社会連携副課長	⑤
柳井 祐介	社会連携支援部社会連携課	⑤
河野 栄司	社会連携推進機構地域連携職員	⑤

② 研究員

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・教授	①、③、⑤
松原 孝博	南予水産研究センター・教授	③
太田 耕平	南予水産研究センター・准教授	③、④
三浦 智恵美	南予水産研究センター・助教	③、④

【再委託先】※研究員のみ

秀長水産株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
近藤 芳仁	取締役専務	①、②、③、④
吉仲 敏彦	第二事業部養魚飼料課 チームリーダー	③、④、

垣本 真大	第二事業部養魚飼料課	③、④
久保田 隆史	第二事業部養魚飼料課	①、②、③
松本 哲也	第二事業部養魚飼料課	① ②、③
田中 龍一	HACCP品質管理主任	③、④

安高水産有限会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
安岡 高身	専務取締役	②

有限会社宇佐水産

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
宇佐 和人		②
宇佐 光太郎		②

(3) 他からの指導・協力者

氏名	所属・役職	備考
太宰 啓至	財団法人えひめ産業振興財団・科学技術 コーディネータ	アドバイザー
金尾 聡志	愛媛県農林水産研究所水産研究センター・ 普及情報室長	アドバイザー

1-3 成果概要

「① 愛媛県南予地域の資源を活用した発酵処理技術の確立」では、大分県杵築市にレンタル導入した発酵プラントにおいて発酵処理技術を確立した、発酵に用いる原料について、愛媛県南予地方で発生する水産系残渣に含まれる有効成分の解析を行った。さらに、酵母等の新たな有用菌と、その評価

方法を確立した。

- 「② 魚病感染抑制効果を保持した飼料製造方法の検討」では、発酵産物を 0.5%含有するエクストルーデッドペレット(EP)、及びモイストペレット(MP)の試作を行い、海面生簀での養殖試験を実施し、魚病抑制や成長性への効果が見出された。
- 「③ 飼料の養殖魚に対する嗜好性の向上に関する研究開発」では、新たな加工方法として、過熱水蒸気による方法を確立した。また、タンパク質含量の高い魚粉を用いることで、嗜好性の高い製品を開発することができた。¹
- 「④ 養殖魚に対する飼料の最適供与条件の確立」では、南予地方での養殖業者 5 業者と協力して、発酵産物を含有する飼料の供与試験を行い、腸内細菌叢が変化していることを明らかにすることができた。
- 「⑤ 機能性飼料の市場ニーズに関する調査研究」では、愛媛県での残渣発生状況や水産残渣から魚粉や魚油を製造する企業の事業内容を調査し、事業可能性を検証した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

国立大学法人愛媛大学社会連携推進機構

河野 栄司

TEL:089-927-8827

FAX:089-927-8820

E-mail: kouno@dpc.ehime-u.ac.jp

第2章 本論

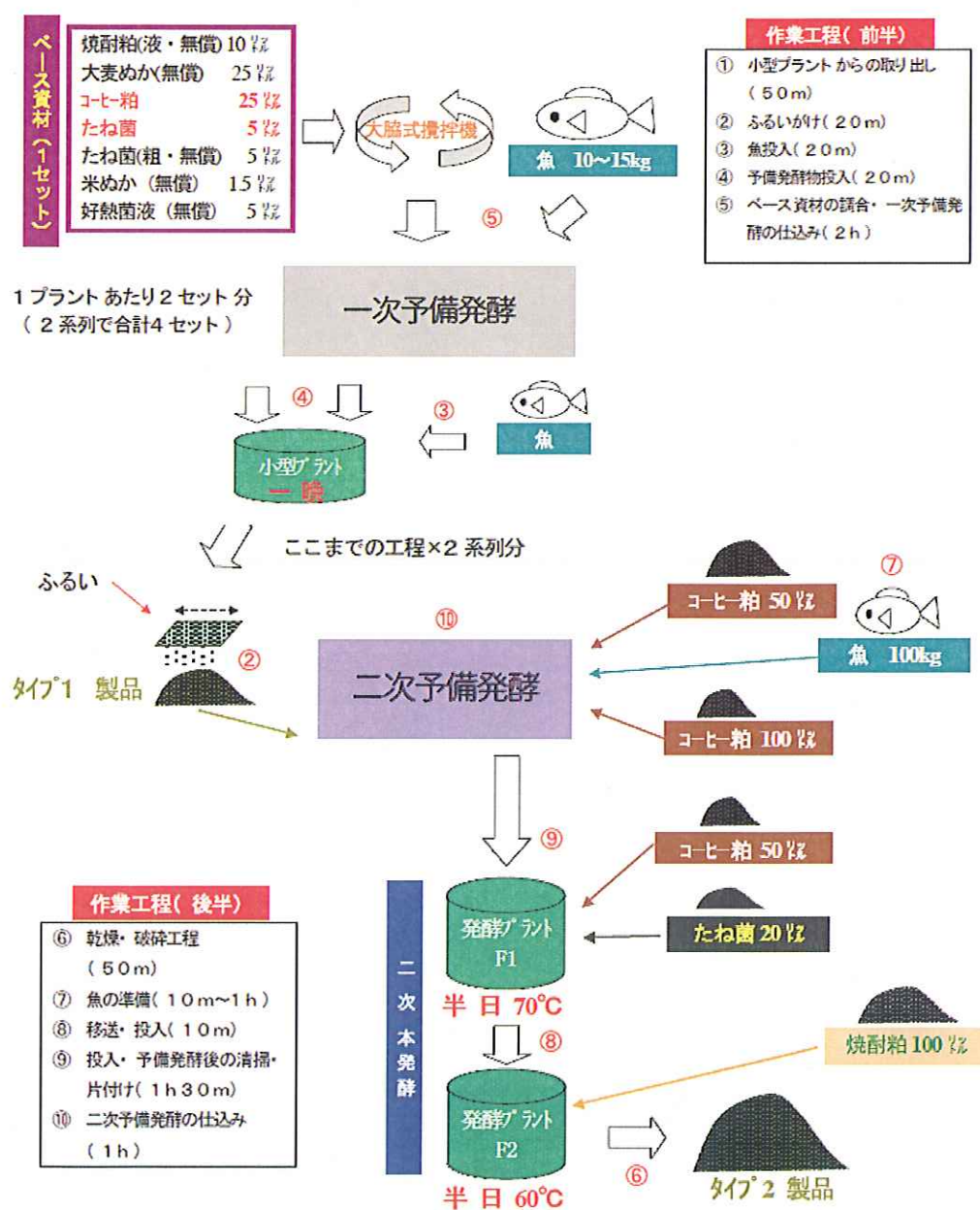
3) 実施内容

① 愛媛県南予地域の資源を活用した発酵処理技術の確立

【実施：秀長水産／愛媛大学】

1. 残渣発酵処理技術の確立

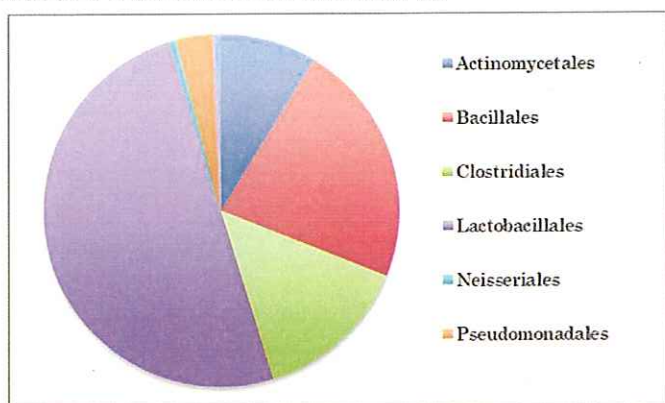
大分県杵築市にて、約 1t/日の発酵処理が可能な円筒状の好熱性複合微生物群主導型発酵槽装置を京葉プラントエンジニアリング株式会社よりレンタルで導入し、秀長水産の管理下で、秀長水産で発生するマダイ加工残渣をはじめとした各種海産物残渣についての発酵処理技術を確立した。発酵処理フローを以下に示す。



上記の工程で得られた発酵産物中の菌相を 16sRNA により網羅的に解析した。以下のような分布を示し

たが、エドワジエラ菌は検出されなかった。

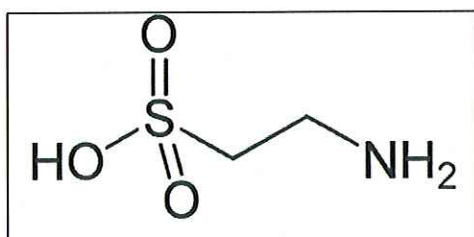
発酵物中の菌相(16s RNA網羅的解析)



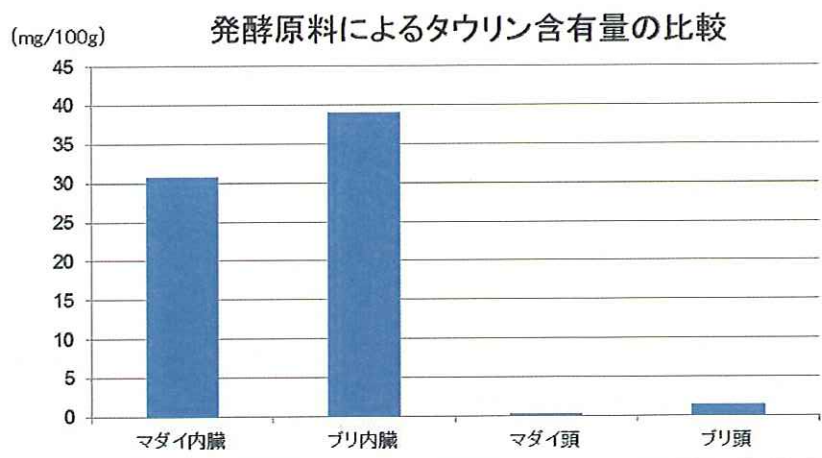
*Edwasiella tarda*は検出されず

2. 発酵原料に含まれる有効成分の解析

養殖魚に有用な物質としてタウリンが挙げられる。タウリンは、アミノエチルスルホン酸であり、海産魚の必須栄養素であることが知られている。飼料にタウリンが含まれていることは、成長だけでなく、抗病性の面でも重要であることから、各発酵産物のタウリン含有量を比較した。



その結果を以下に示す。タイ内臓やブリ内臓を原料とする発酵産物のタウリン含有量は非常に高かったが、タイ頭・ブリ頭を原料とする発酵産物のタウリン含有量は僅かであった。したがって、内臓系の残渣の方が、発酵原料として優れている可能性が見出された。



3. 発酵飼料の分析

3.1 化学組成分析・残留化学物質分析

「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」に準ずる分析

ポジティブリストに含まれている「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」に準ずる 64 項目について、いずれの発酵産物についても検出限界以下であり、問題ないレベルであった。以下に分析結果を示す。

(単位:ppm)					
No.	分析項目		分析値	定量限界	分析方法
1	1,2-ジブクロモエタン	1,2-DIBROMOETHANE	ND	0.01	GC-MS
2	2,4-D	2,4-D	ND	0.01	HPLC-MS/MS
3	BHC	BHC	ND	0.01	GC-MS
4	DDT	DDT	ND	0.01	GC-MS
5	γ-BHC	LINDANE	ND	0.01	GC-MS
6	アセフェート	ACEPHATE	ND	0.01	HPLC-MS/MS
7	アトラジン	ATRAZINE	ND	0.01	GC-MS
8	アラクロール	ALACHLOR	ND	0.01	GC-MS
9	アルジカルブ	ALDICARB	ND	0.01	HPLC-MS/MS
10	アルドリン及びディルドリンの和	ALDRIN/DIELDRIN	ND	0.01	GC-MS
11	イソフェンホス	ISOFENPHOS	ND	0.01	GC-MS
12	イミダクロプリド	IMIDACLOPRID	ND	0.01	GC-MS
13	エチオン	ETHION	ND	0.01	GC-MS
14	エンドリン	ENDRIN	ND	0.01	GC-MS
15	カルタップ、チオシクロラム及び ベンスルタップの総和	CARTAP/ BENSULTAP/THIOCYCLAM	ND	0.01	GC-MS
16	カルバリル	CARBARYL	ND	0.01	HPLC-MS/MS
17	カルベンダジム、チオファネート、チオファネー トメチル及びベノミルの総和	CARBENDAZIM/THIOPHANATE/THIOPHA NATE-METHYL/BENOMYL	ND	0.01	HPLC-MS/MS
18	カルボフラン	CARBOFURAN	ND	0.01	HPLC-MS/MS
19	キャプタン	CAPTAN	ND	0.01	GC-MS
20	グリホサート	GLYPHOSATE	ND	0.01	HPLC-MS/MS
21	グルホシネート	GLUFOSINATE	ND	0.01	HPLC-MS/MS
22	クロルピリホス	CHLORPYRIFOS	ND	0.01	GC-MS
23	クロルピリホスメチル	CHLORPYRIFOS-METHYL	ND	0.01	GC-MS
24	クロルフェンビンホス	CHLORFENVINPHOS	ND	0.01	GC-MS
25	クロルプロファム	CHLORPROPHAM	ND	0.01	GC-MS
26	クロロベンジレート	CHLOROBENZILATE	ND	0.01	GC-MS
27	シアナジン	CYANAZINE	ND	0.01	GC-MS
28	ジカンバ	DICAMBA	ND	0.01	HPLC-MS/MS
29	ジクロロボス及びナレドの和	DICHLORVOS/NALED	ND	0.01	GC-MS
30	ジクワット	DIQUAT	ND	0.01	HPLC-MS/MS
31	シハロトリン	CYHALOTHRIN	ND	0.01	GC-MS
32	シフルトリン	CYFLUTHRIN	ND	0.01	GC-MS
33	シマジン	SIMAZINE	ND	0.01	GC-MS
34	ジメトエート	DIMETHOATE	ND	0.01	GC-MS
35	ダイアジノン	DIAZINON	ND	0.01	GC-MS
36	チアベンダゾール	THIABENDAZOLE	ND	0.01	HPLC-MS/MS
37	デルタメトリン及びトラロメトリンの和	DELTAMETHRIN/TRALOMETHRIN	ND	0.01	GC-MS
38	テルブホス	TERBUFOS	ND	0.01	GC-MS
39	トリシクラゾール	TRICYCLAZOLE	ND	0.01	GC-MS
40	パラコート	PARAQUAT	ND	0.01	HPLC-MS/MS

(単位:ppm)

No.	分析項目		分析値	定量限界	分析方法
41	パラチオン	PARATHION	ND	0.01	GC-MS
42	ピペロニルブトキシド	PIPERONYL BUTOXIDE	ND	0.01	GC-MS
43	ピリミホスメチル	PIRIMIPHOS-METHYL	ND	0.01	GC-MS
44	フィプロニル	FIPRONIL	ND	0.01	GC-MS
45	フェニトロチオン	FENITROTHION	ND	0.01	GC-MS
46	フェノブカルブ	FENOBUCARB	ND	0.01	HPLC-MS/MS
47	フェンチオン	FENTHION	ND	0.01	GC-MS
48	フェントエート	PHENTHOATE	ND	0.01	GC-MS
49	フェンバレレート	FENVALERATE	ND	0.01	GC-MS
50	フェンプロパトリン	FENPROPATHRIN	ND	0.01	GC-MS
51	ブロモキシニル	BROMOXYNIL	ND	0.01	HPLC-MS/MS
52	ヘプタクロル	HEPTACHLOR	ND	0.01	GC-MS
53	ペルメトリン	PERMETHRIN	ND	0.01	GC-MS
54	ベンタゾン	BENTAZONE	ND	0.01	HPLC-MS/MS
55	ペンディメタリン	PENDIMETHALIN	ND	0.01	GC-MS
56	ホスメット	PHOSMET	ND	0.01	HPLC-MS/MS
57	ホレート	PHORATE	ND	0.01	GC-MS
58	マラチオン	MALATHION	ND	0.01	GC-MS
59	メチダチオン	METHIDATHION	ND	0.01	GC-MS
60	メトプレン	METHOPRENE	ND	0.01	GC-MS
61	エストラジオール	ESTRADIOL	ND	0.01	HPLC-MS/MS
62	PCB	PCB	ND	0.01	GC-MS/MS
63	ニトロソジエチルアミン	N-NITROSODETHYLAMINE	ND	0.1	HPLC-MS/MS
64	ニトロソジメチルアミン	N-NITROSODIMETHYLAMINE	ND	0.1	HPLC-MS/MS

単位 : ppm=mg/kg
ND : 定量限界未満

また、アフラトキシン、及びヒスタミンの分析を行った。ヒスタミンについては、既存発酵飼料 (Type2 発酵飼料) については検出限界以下であったが、ハマチ頭発酵飼料、タイ内臓発酵飼料については、1ppm 検出された。一般的にヒトの場合は、魚肉中に 500ppm 以上のヒスタミンが蓄積されると食中毒が起こるため (感受性の高いヒトの場合、50ppm で発症する場合もある)、問題視される濃度ではないと想定される。国内では規制値はないが、海外では、FDA では 50ppm 未満、EU では 100ppm 以下である。

(単位:ppm)

No.	分析項目	ハマチ頭発酵飼料	タイ内臓発酵飼料	Type 2 発酵飼料	定量限界	分析方法
1	アフラトキシン B1	ND	ND	ND	0.01	HPLC-MS/MS
2	アフラトキシン B2	ND	ND	ND	0.1	HPLC-MS/MS
3	アフラトキシン G1	ND	ND	ND	0.1	HPLC-MS/MS
4	アフラトキシン G2	ND	ND	ND	0.1	HPLC-MS/MS
5	ヒスタミン	1	1	ND	1	HPLC-MS/MS

単位 : ppm=mg/kg
ND : 定量限界未満

さらに、飼料組成及び有害金属の分析を行った。また、魚粉における基準値を以下に示す (参考データ 1)。Type 2 発酵飼料は、いずれの成分についても配合飼料の基準値以下になったが、ハマチ頭とタイ内臓はヒ素において基準値を若干上回っているが、魚粉の基準値よりも低く、魚粉代替としての問題はない。

分析項目	ハマチ頭発酵物	タイ内臓発酵物	Type 2 発酵飼料
水分(%)	11.6	8.6	11.7
粗たん白質(%)	28.6	28.1	28.1
粗脂肪(%)	8.8	11.1	4.5
粗繊維(%)	17.4	15.3	17.8
粗灰分(%)	6.4	5.8	9.7
可溶無窒素物(%)	27.2	31.1	28.2
ひ素(As)	3.3mg/kg	3.3mg/kg	1.7mg/kg
カドミウム(Cd)	0.13mg/kg	0.11mg/kg	0.14mg/kg
水銀(Hg)	0.06mg/kg	0.04mg/kg	0.02mg/kg
鉛(Pb)	ND	ND	ND

定量限界 : 0.1mg/kg
ND : 定量限界未満

【参考】

単位：ppm

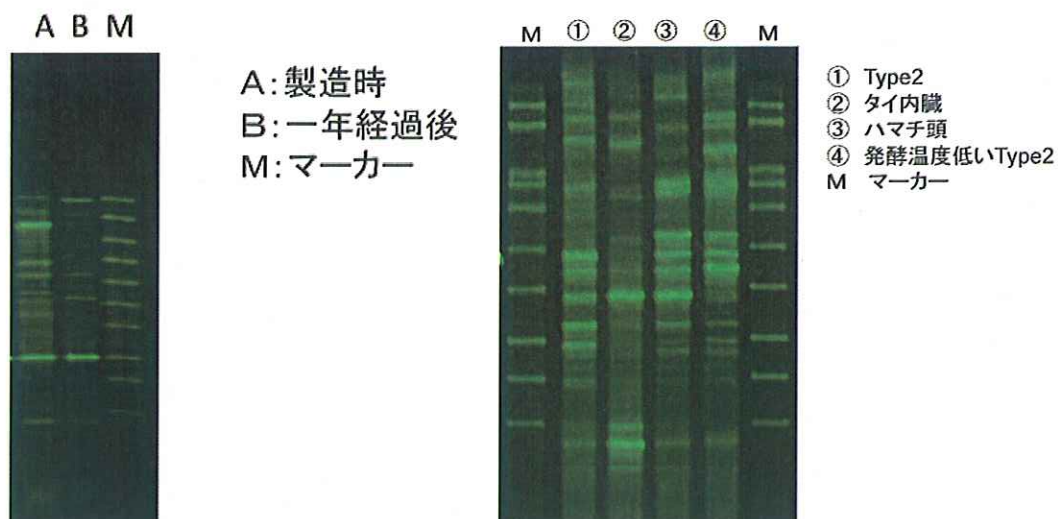
分類	配合飼料	魚粉
ヒ素(As)	2.0	7
カドミウム(Cd)	1.0	2.5
水銀(Hg)	0.1	1.4
鉛(Pb)	3.0	7.5

参考文献：農林水産省の個別危害要因への対応（有害化学物質）に基づく資料より抜粋

3.2 メタゲノム複合微生物相解析

発酵飼料サンプルについて微生物相を分析するため、DGGE 解析を実施した。結果を以下に示す。左図は、先行研究実施時に抽出・保管した発酵飼料の DNA サンプルと、ストック飼料からの抽出 DNA との菌相比較である。昨年度からの大きな劣化が示唆されたため、使用期限の設定が必要である。

また、発酵飼料サンプルは、いずれも Type 2 発酵飼料と類似の菌相パターンを示したが、タイ内臓、ハマチ頭、発酵温度の低い Type2 とはそれぞれ異なるバンドパターンが確認された。特に、タイ内臓は、菌相パターンの差が認められた。



3.3 新たな発酵産物の有効性の評価

さらに、上記の発酵産物に加えて、新たな効果を見出すための菌種の検討を行った。酵母は、容易に培養が可能であると同時に、細胞壁に他の細菌の吸着能を有するため、エドワジエラ感染防御に有効であると考えられる。そこで、酵母細胞壁の細菌への吸着能の評価系を確立した。

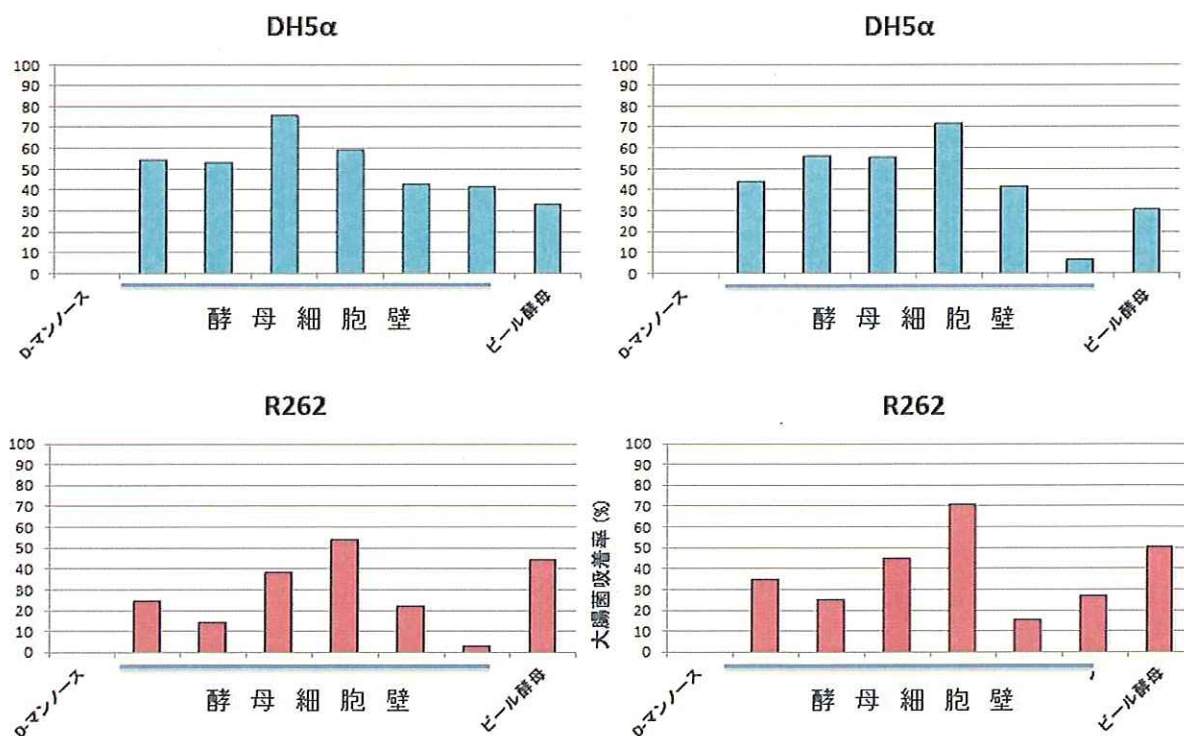
酵母細胞壁と、ネガティブコントロールにD-マンノースを用いて、大腸菌(DH5 α 、R262)に対する吸着能を調べた。大腸菌と酵母細胞壁を撈拌し、5分間静置したあとの上澄みを回収し、96 well プレートで吸光度(OD 600 nm)を測定した。吸着率は、以下の式により計算した。

$$100 - \left[\frac{\text{試験区(各素材) OD600} - \text{対照区(各素材) OD600}}{\text{試験区(D-マンノース) OD600} - \text{対照区(D-マンノース) OD600}} \times 100 \right]$$

=大腸菌吸着率(%)

その結果、酵母細胞壁に顕著な吸着能が確認された。そこで、本方法により吸着能が確認された酵母の利用を検討することとし、飼育試験により養殖魚に対する効果を確認した。

図2:酵母細胞壁の吸着能



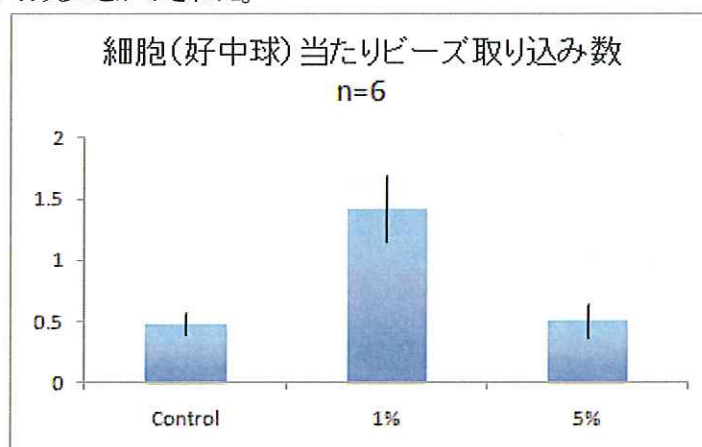
② 魚病感染抑制効果を保持した飼料製造方法の検討

【実施:秀長水産/安高水産/宇佐水産】

1. 海面長期生簀での飼育による免疫活性化の確認

海面生簀での免疫活性化能を、フローサイトメータを用いて測定した。市販EP(エクストルーデッド・ペレット)に発酵飼料を1重量%添着させた飼料を供与した群(1重量%)、5重量%添着させた飼料を供与した群(5重量%)、添着させなかった飼料を供与した群(Cont.)の3群のマダイの白血球貪食能を評価した。市販EP1kgに対して3gの添着剤(アピファック社製)を3gを用いて機能性飼料を添着させた。魚体重約100gのマダイ300匹に対して、2日に1回、各飼料を1kgずつ供与し、飼育開始後169日目のマダイについて白血球の貪食能を評価した。

マダイから血液を採取し、全血を50%モノ・ポリ分離溶液で分離して白血球を濃縮した。粒径 $3\mu\text{m}$ のラテックスビーズを貪食させ、ビーズ取り込み細胞数及び全細胞数をフローサイトメリーを用いて測定した。ビーズ取り込み細胞数が全細胞数に占める割合を以下に示す。海面生簀における免疫活性化が実証され、1%が含有量として適当であることが示された。

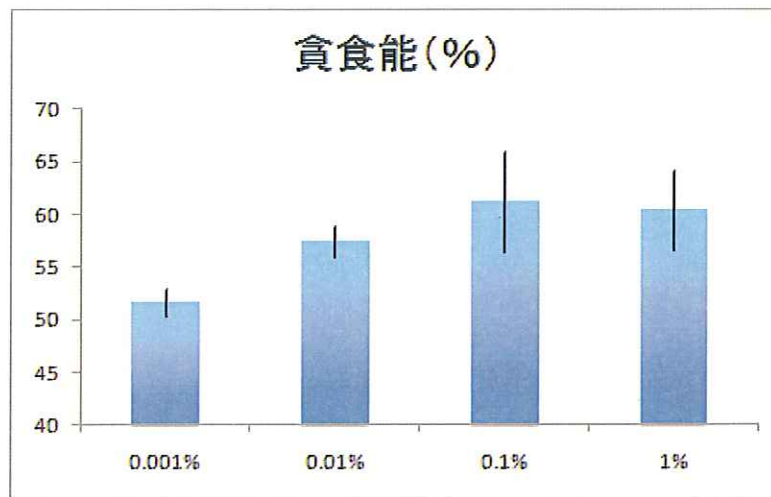


2. 発酵産物の最適含有量の検討

さらに、発酵産物の最適含有量を0.001%~1%で検討した。飼料の組成を以下に示す。また、マダイ5尾ずつを水槽に入れ、各群2水槽用意した。自然水温かけ流しで飼育し、飼育期間中の水温は25-27℃であった。毎日飽食給餌を行った。

	control	0.001%	0.01%	0.1%	1%
魚粉	50	50	50	50	50
大豆	24	24	24	24	24
小麦	23.9	23.9	23.9	23.9	23.9
ビタミン	1	1	1	1	1
CMC	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
好熱細菌	0	0.001	0.01	0.1	1
水	50	50	50	50	50
魚油	5	5	5	5	5

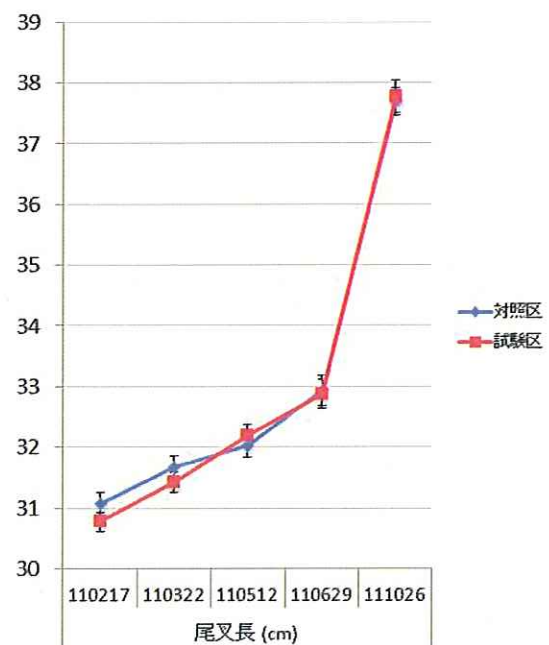
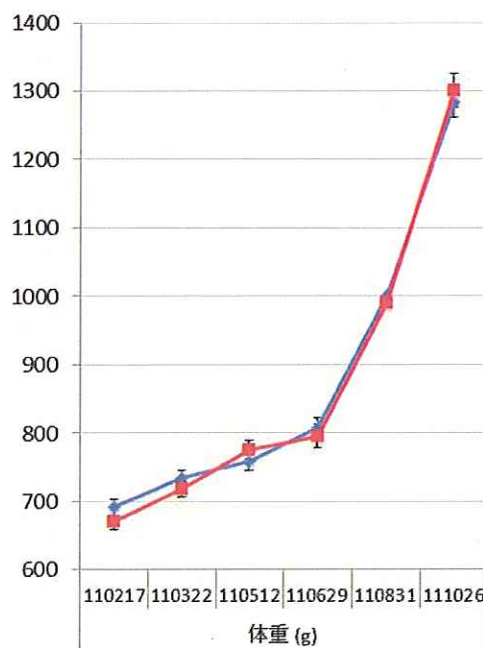
フローサイトメリーで測定した貪食活性を以下に示す。0.1%~1%で白血球の貪食能が向上する傾向がみられた。

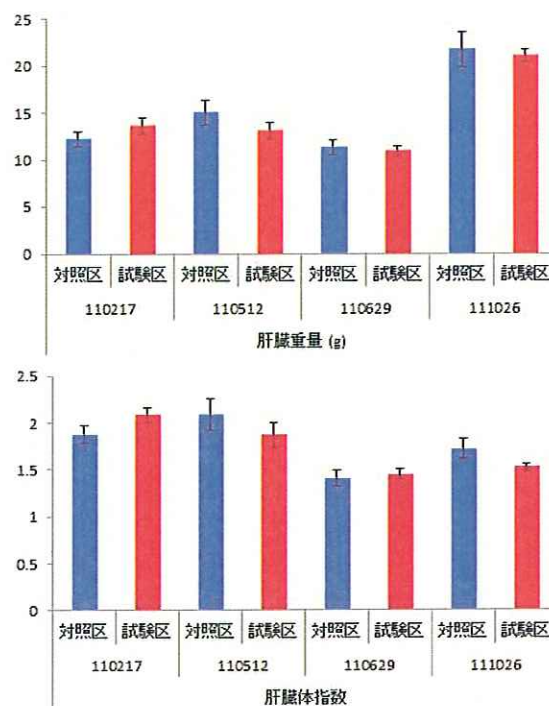
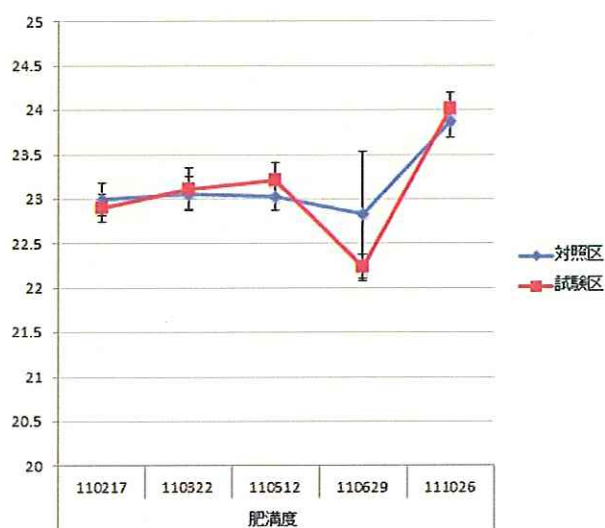


2. エクストルーデッドペレットの製造と海面生簀での実証試験

安高水産にて、発酵産物を含むエクストルーデッドペレット(EP)の試作を行い、海面生簀での実証試験を行った。

成長に関する指標は、対照区と試験区との間にほとんど差はなく、発酵産物は成長に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。



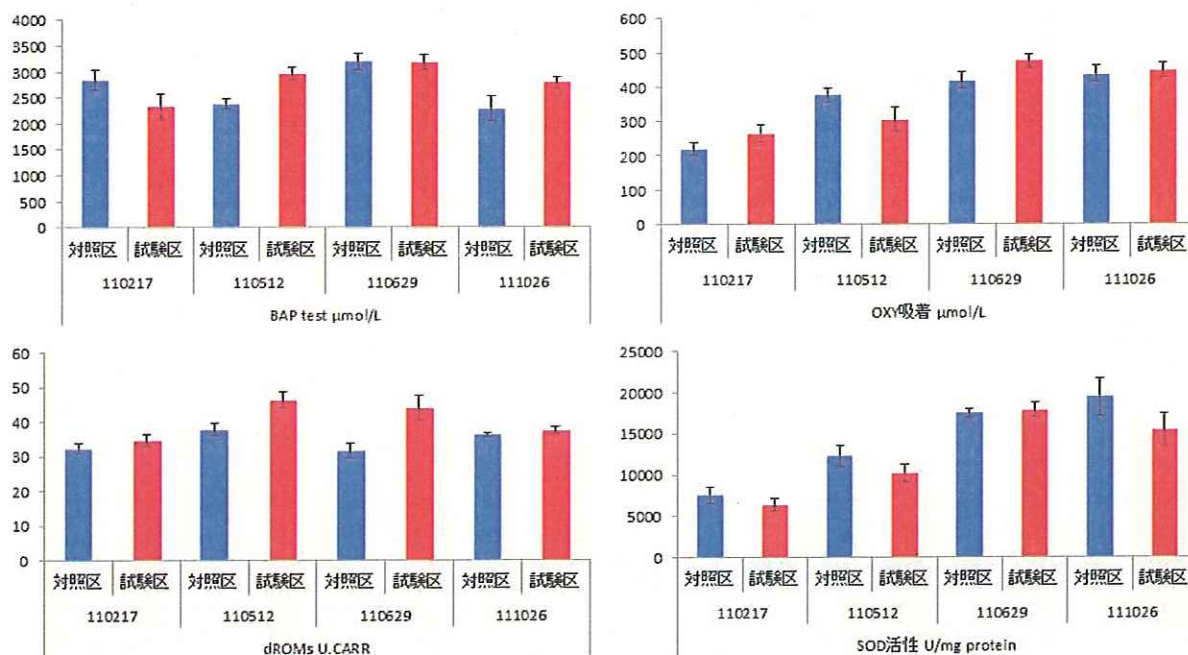


また、マダイの斃死数及びエドワジエラ罹患数についても大きな差はみられなかった。

	試験区	対照区
斃死数	41	40
出荷時エドワジエラ罹患数	1	1

各区 1,500尾

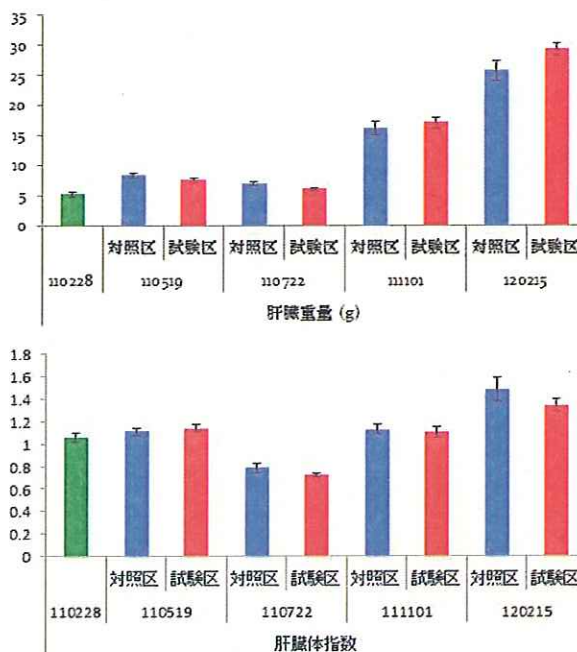
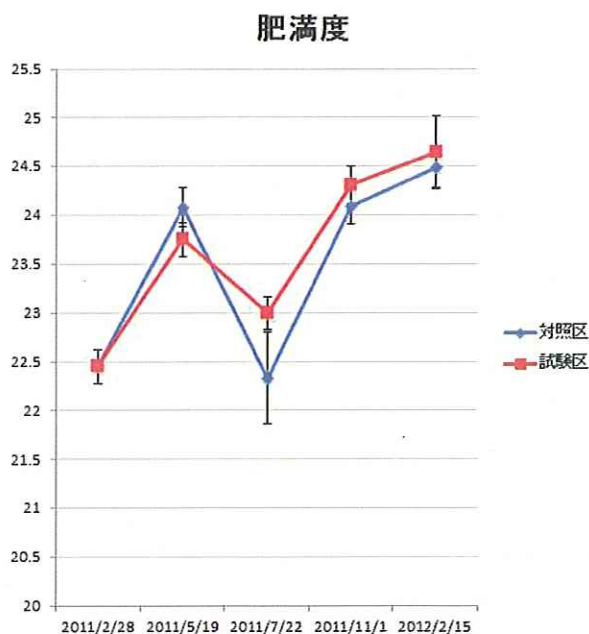
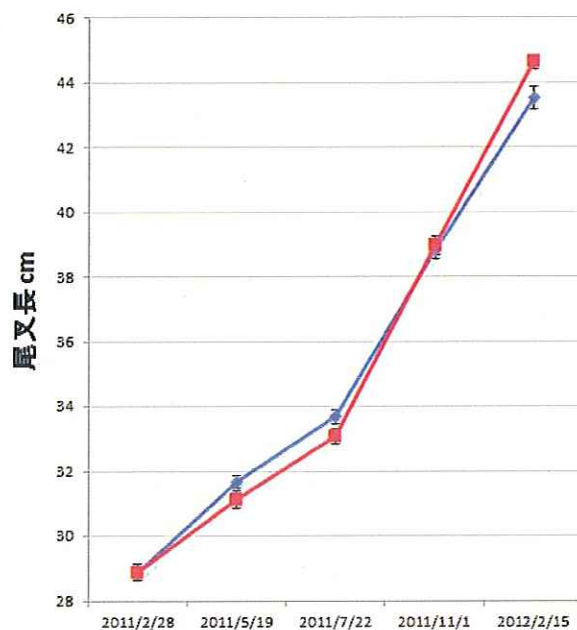
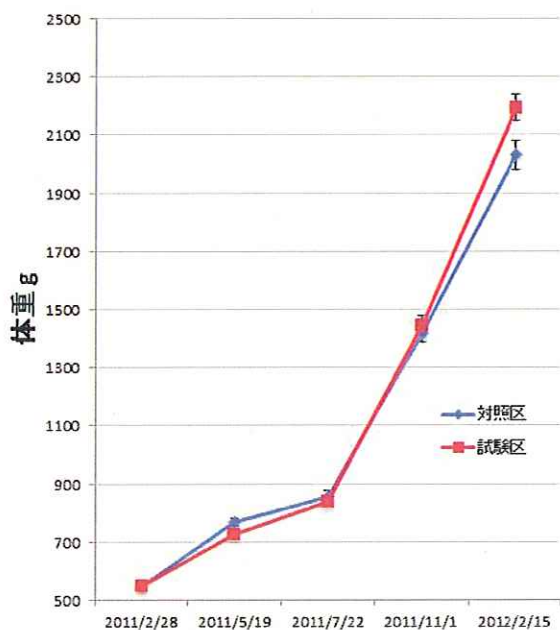
また、酸化ストレスの指標についても、試験区と対照区とで、大きな差はみられなかった。



3. モイストペレットの製造と海面生簀での実証試験

宇佐水産にて、発酵産物を含むエクストルーデッドペレット(EP)の試作を行い、海面生簀での実証試験を行った。

成長に関しては、試験区の体重及び尾叉長は、対照区のものより大きくなった。

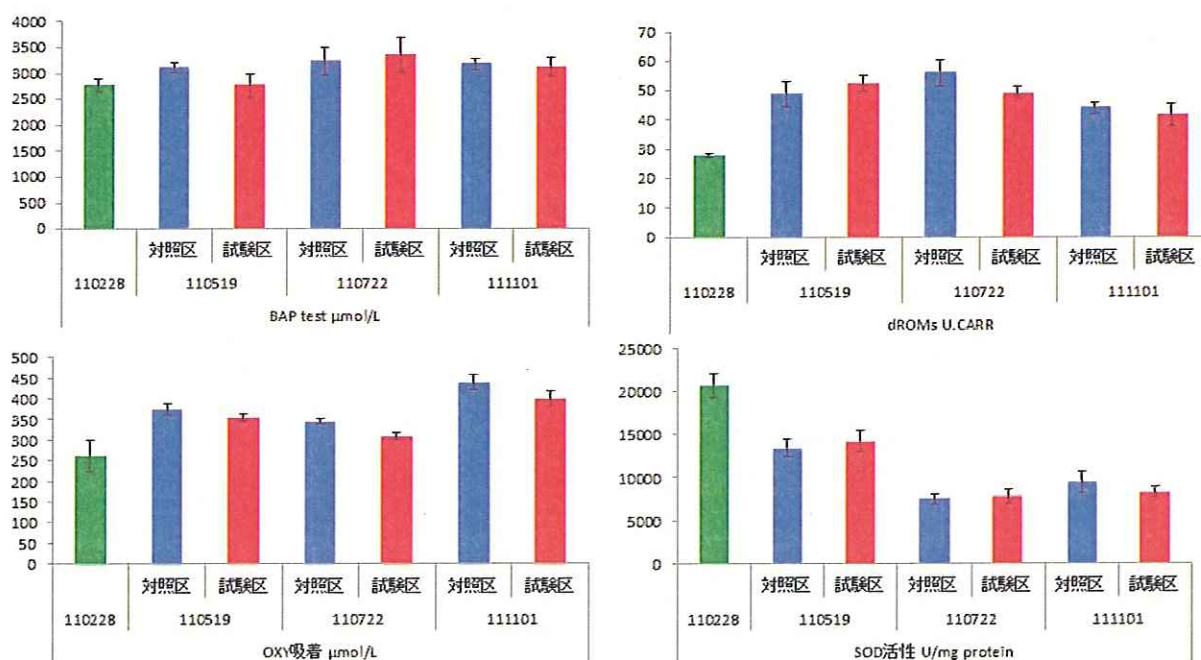


また、飼料の効率を示す増肉係数は試験区が対照区よりも 1.7 小さかった。これは、試験区の飼料の効率が低いことを示す。

増肉係数: 魚を1kg太らせるのに必要な飼料の量。
増肉係数が少ない飼料は、消化吸収の効率性が高い。

試験区	対照区
5.42	7.11

酸化ストレスの指標では、酸化度を示す dROM が試験区で低いにも関わらず、Superoxide dismutase (SOD)の活性が低かったことから、試験区の養殖魚は酸化ストレスが軽減されていると考えられた。



斃死数及びエドワジェラ罹患数については、試験区と対照区とで大きな差はなかったが、若干試験区が少ない傾向がみられた。

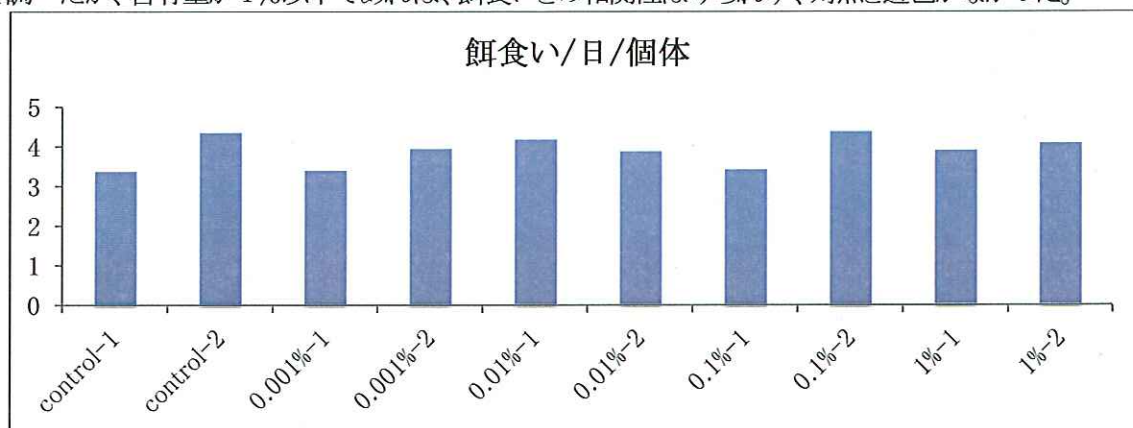
	試験区	対照区
斃死数	13	14
出荷時エドワジェラ罹患数	4	5

各区 800尾

③ 飼料の養殖魚に対する嗜好性の向上に関する研究開発

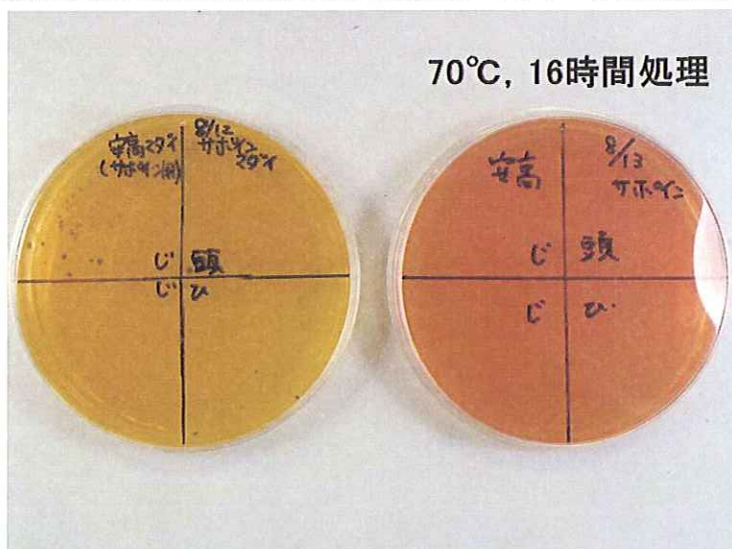
【実施: 秀長水産/愛媛大学】

発酵産物を含有する飼料について、愛媛大学が実験水槽で嗜好性を評価した。含有量と嗜好性の関係を調べたが、含有量が1%以下であれば、餌食いととの相関性はみられず、対照と遜色がなかった。

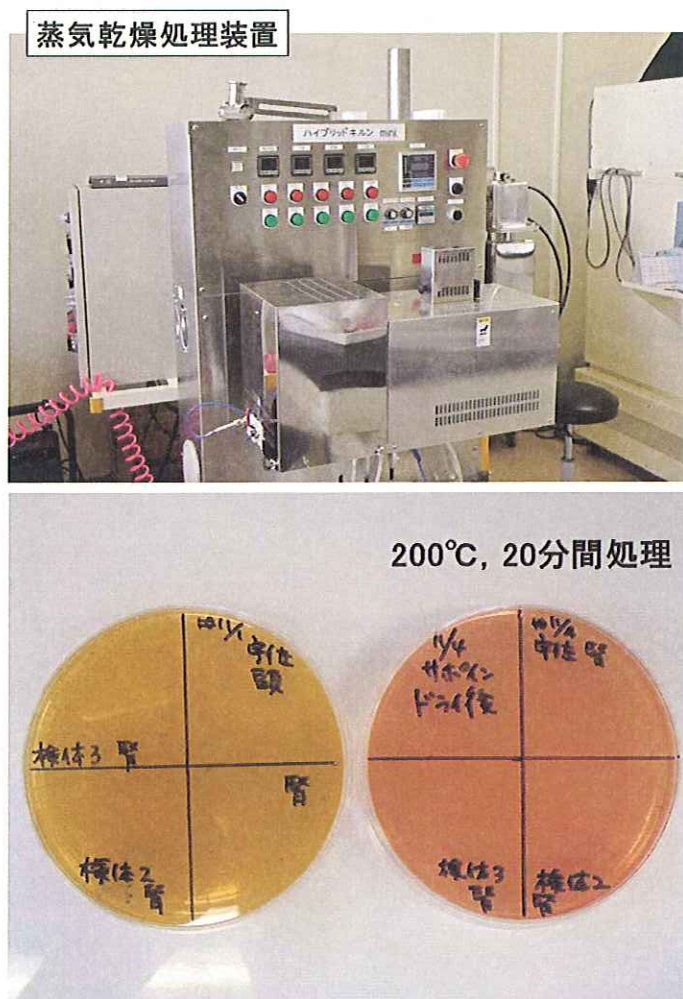


さらに、水産残渣中に存在する病原菌が発酵産物に混入する可能性があるため、熱処理により病原菌の状態がどう変化するかを調べた。

まず、通常の発酵処理である 70℃・16 時間の熱処理を行った。エドワジエラ菌は安高水産のサンプリングで得られたエドワジエラ罹患マダイから取得した。生菌分離によりエドワジエラの存在が確認された残渣を 70℃・16 時間の環境に置き、再度生菌分離を行ったところ、エドワジエラ菌は検出されなかった。



また、魚粉製造等で通常用いられる蒸気乾燥による熱処理も併せて検討した。以下にしめす、蒸気乾燥処理装置を用いて、エドワジエラ菌を保菌する残渣を 200℃・20 分の条件で加熱したところ、エドワジエラ菌の死滅が確認された。したがって、これら熱処理の有効性が示された。



④ 養殖魚に対する飼料の最適供与条件の確立

【実施: 秀長水産／愛媛大学】

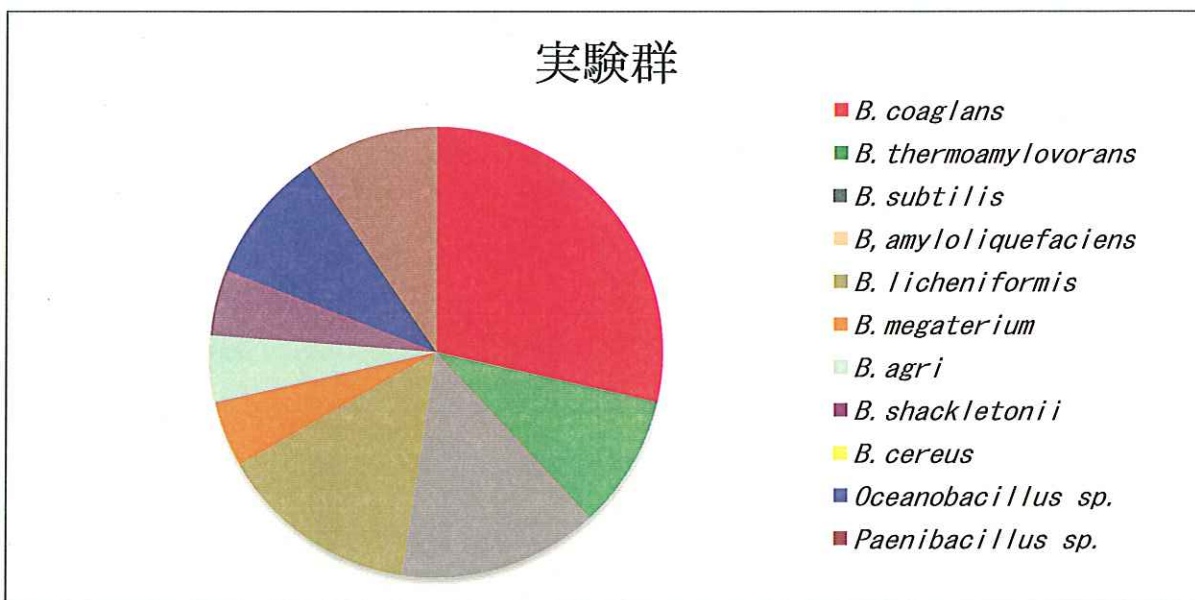
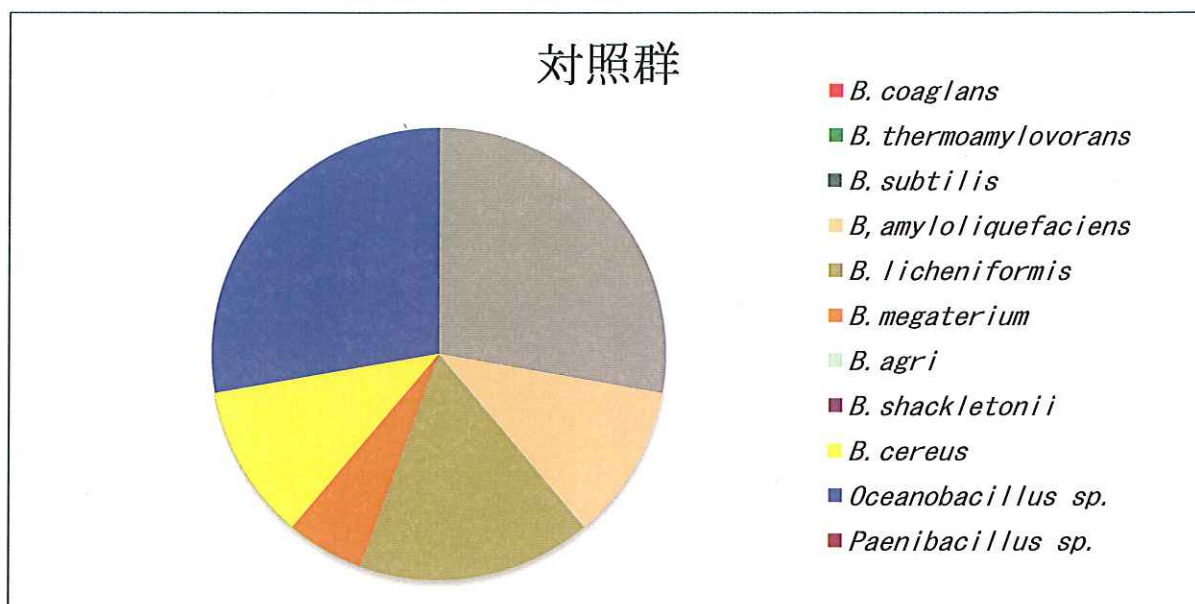
1. 発酵飼料を供与したマダイ糞中の菌相解析

発酵飼料を供与したマダイ糞中の菌相解析を実施した。発行飼料を供与したマダイの魚糞（グリセロールストック分）を NA 培地において 45°C で好気培養し、検出されたコロニーについて網羅的に 341F と 907R にて増幅し、シーケンス解析した。その結果を次頁に示す。

円グラフに示したように、対照群では検出されない *Bacillus coagulans* の近縁種が、対照群では糞中の培養可能な好熱菌の約 30% を占めて全体の優先菌種であった。また、投与群においては、*B. thermoamylovorans*、*B. agri*、*B. shackletonii*、*Paenibacillus sp.* も検出された。

一方、対照群では、*B. subtilis* と *Oceanobacillus sp.* が優先菌種であり、*B. amyloliquefaciens* や *B. cereus* も検出された。

このように、対照群の腸内細菌相と、実験群の腸内細菌相が異なっている可能性が示唆された。

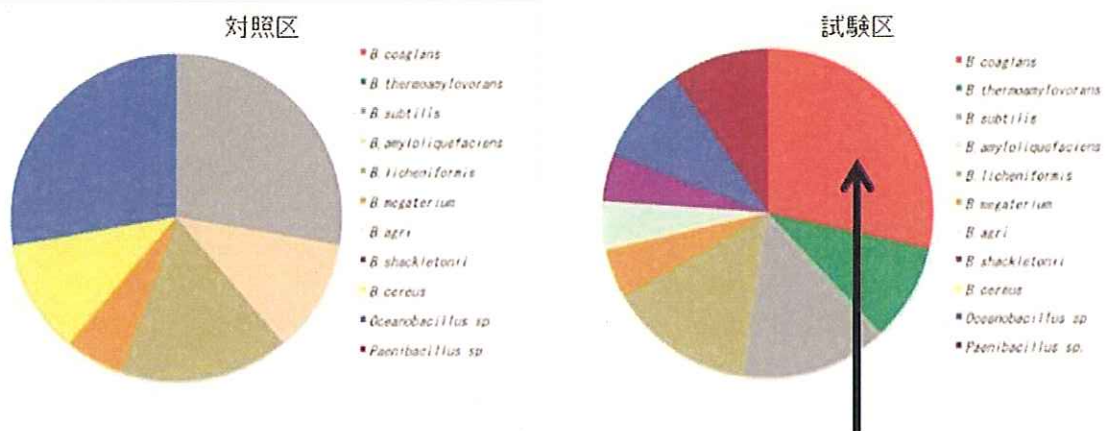


2. 発酵飼料を供与したマダイ腸内細菌叢の変化

試験区の養殖魚の腸に滞留した糞を採取し、生菌分離を行い、16sRNA を解析した。発酵飼料の供与により腸内細菌叢は大きく変化していることが明らかとなった。

発酵飼料を供与したマダイの腸内細菌叢の変化

腸に滞留した糞を採取→生菌分離→16sRNAの解析



発酵試料の供与により腸内細菌叢が大きく変化していることが示された。

Bacillus coagulans

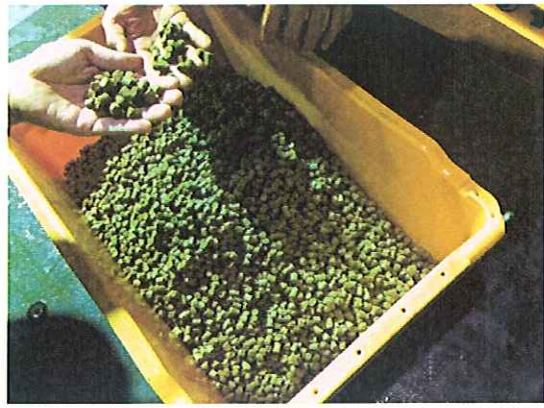
上記の発酵産物の効果を最大限に活かすため、粗タンパク質含量の高い魚粉を用いることで、養殖マダイの嗜好性・成長性を高める飼料の開発を行った。

今回の試作飼料に用いた魚粉の成分分析の結果を表1に示す。粗タンパク質含量は 60%以上であった。さらに、この魚粉を用いて、発酵産物を 0.5%含有する飼料を試作した。

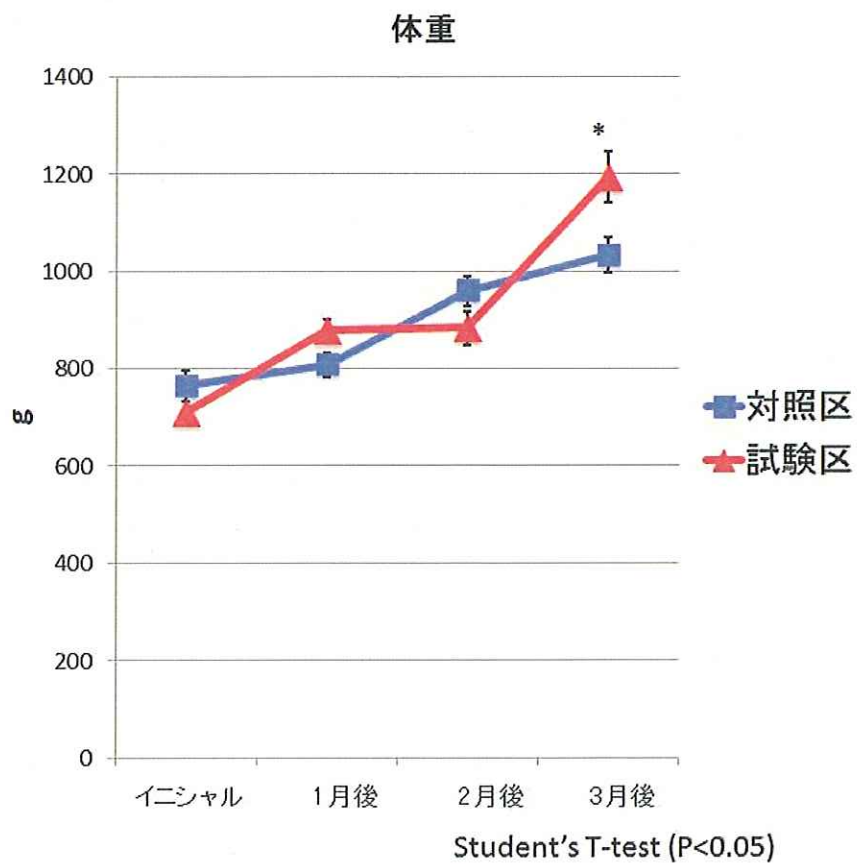
表1: 飼料に用いた魚粉の分析結果

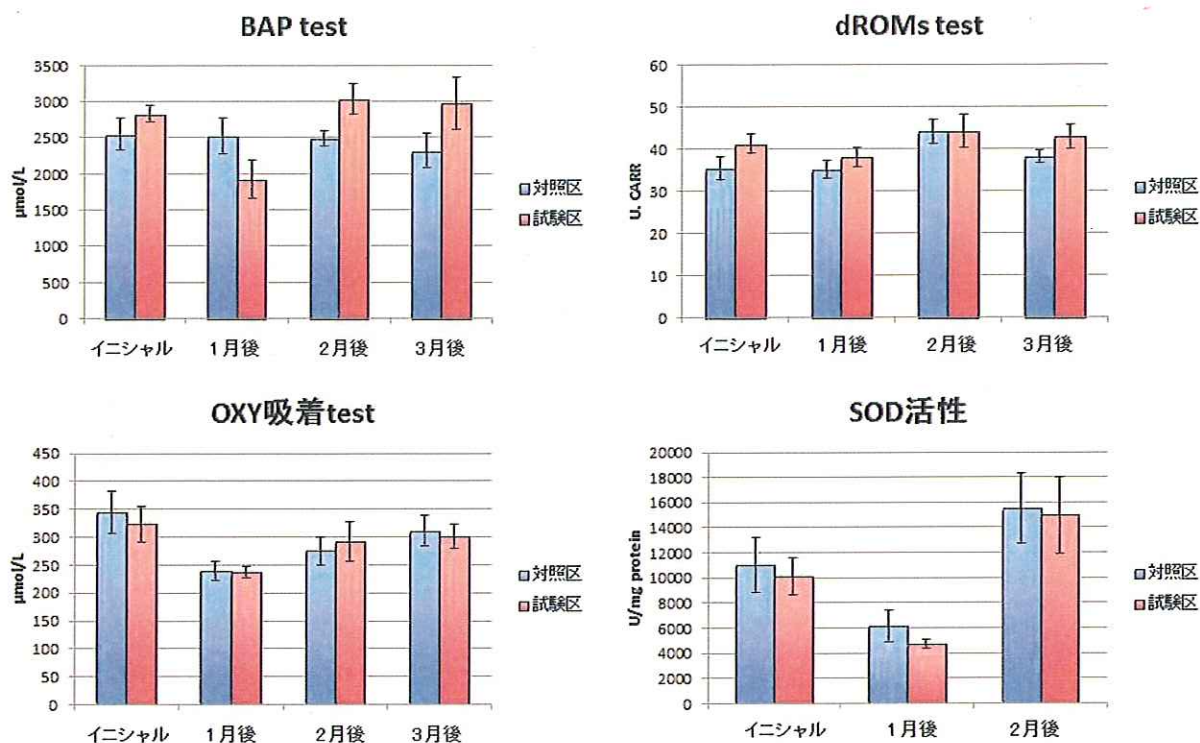
粗タンパク質	61.8 %
粗脂肪	16.2 %
粗灰分	16.1 %
水分	5.2 %
遊離脂肪酸	4.9 %
揮発性塩基性窒素	56.0 mgN/100g
ヒスタミン	26 ppm

さらに麹菌発酵物を 0.5%



この飼料を用いて、養殖現場での実証試験を行った。3ヶ月の飼育で、斃死数や酸化ストレスに大きな差はみられなかったが、魚体重では試験区が対照区を大きく上回っており、実用化に期待が持てる結果となった。





⑤ 機能性飼料の市場ニーズに関する調査研究

既に養殖における死魚を焼却する処理する設備を保有している漁協でも、採算が取れていないところが多い。本事業の好熱菌による発酵により死魚処理が可能であれば、大きなビジネスチャンスであると考えられる。死魚は、乾燥処理され、焼却死魚・オガクズ混合物は、肥料として販売されているが、有機廃棄物の有効利用には課題が多い。

また、同様の問題を抱える漁業協同組合も多いことが予想され(例えば、愛南町には死魚処理施設はない)、本事業における発酵処理により死魚処理が可能であれば、自然発熱で死魚処理を行うことができるため従来設備よりも低コストで死魚リサイクルが実現する。したがって、ニーズは非常に高いと考えられる。

また、愛媛県での残渣発生状況については、宇和島市を中心とする水産加工場でも、残渣の処理自体のニーズは低い、水産分野に再利用を望んでいた。

また、残渣回収による魚粉・魚油生産を事業として行なっている企業では、残渣発生者と直接取引を行うことで、原料としての水産残渣の品質管理が徹底されていた。その結果、高品質の魚粉・魚油を製造することができる。

また、残渣からの魚粉製造の機械は、連続式とバッチ式の2種類があるが、魚油が精製できるのは連続式のみであり、バッチ式は魚油を分離することができない。したがって、バッチ式ではオガクズ等を残渣に混ぜ込まないといけなくなり質が落ちることが問題となる。

最終章 全体総括

本研究では、未利用海産資源を好熱性複合微生物群 PTA-1773 (Deposited in ATCC) の魚病抑制効果を利用して、新たなマダイ養殖用飼料を開発することを目的とした。

本研究の成果として、大分県杵築市にレンタル導入した発酵プラントにおいて、発酵原料や、過熱水蒸気による加工方法等を兼とすることで、発酵処理技術を確立することができた。また、好熱菌以外にも、酵母等の細菌吸着能を利用した飼料の試作を行った。

レンタル導入された発酵プラントで製造された発酵産物は、エクストルーデッドペレット(EP)、及びモイストペレット(MP)としてマダイ養殖の実証試験を実施した。実証試験を行った年は、エドワジエラの発症自体が少なく、魚病抑制効果が有意な差としては現れなかったが、成長性の点で優れている可能性が見出された。また、実証試験でマダイの腸内細菌叢が変化していることが明らかになったことから、発酵産物が養殖マダイに何らかの影響を与えていることは確実であると考えられる。

最終年度では、これまでの発酵産物に加えて、嗜好性を高めるためにタンパク質含量の高い魚粉を用いた新しい飼料の試作を行った。養殖現場での実証試験では、成長性に関して、3ヶ月の飼育で顕著な結果が得られた。今後の補完研究において、製品となる養殖マダイの身質の評価等を行なっていく必要はあるが、本飼料の実用化の可能性は非常に高い。

図: 試作した飼料と、実証試験

