

平成22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23年 9月

委託者 関東経済産業局  
委託先 国立大学法人 千葉大学

## 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）	4
1-3 成果概要	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	10
第 2 章 本論	11
2-1 原材料ごとの発酵ルーティンの確立	11
①-1) 糖アルコール含有量の高い発酵原材料を用いた発酵工程の確立とその評価	11
①-1-1) ラボレベルの培養条件検討と培養装置の設計	11
②-1-2) 培養装置の開発（好熱性単離菌培養装置）	12
①-1-3) 培養装置の培養条件の評価・検証	14
-	
2-2 発酵飼料の微生物資源ライブラリの構築	16
②-1) 改良型発酵飼料の遺伝子解析と微生物資源ライブラリ構築	16
②-1-1) 生化学的性状評価と DNA-DNA ハイブリダイゼーション	16
②-1-2) <i>Oceanobacillus</i> 属近縁種の全ゲノム解析	18
2-3 発酵飼料の動物に対する影響評価	19
③-1) 改良型発酵飼料の畜産動物などへの投与試験	19
③-1-1) 菌体数依存的・糖アルコール濃度依存的な効果の検証	19
③-1-2) 腸内代謝系の解析	21
③-1-3) 腸内フローラ相互作用の検証	22
③-1-4) 現場レベルの生産性指標への影響評価	23
最終章 全体総括	24

## 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。

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。

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している。平成21年度「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」（計画認定番号：関東0908630、実施年度：平成21年度）の研究において、従来製品の製造レシピを改良し、主に海産残渣および焼酎製造残渣を原料として、原料の組成比および発酵温度帯の異なる二種類の発酵飼料を設定、それぞれの製品を製造し、その特性に関しての実験研究を行った。現場レベルでの畜産動物（豚）への投与試験においては、発酵飼料を出荷直前の肥育豚に30日間投与した結果、嗜好性が良好な発酵飼料では、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り、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。

平成21年度の開発研究と平行して進められていた日環科学と千葉大学との共同研究によって、ほ乳動物の盲腸に生着する好熱菌群を単離することに成功した。（独）製品評価技術基盤機構（NITE）に国際寄託され *Bacillus thermoamylovorans* の近縁種（NITE/BP-863）は、その標準菌株と、BP-863（N-11株）とを比較して、アラビノースやキシリトール等の難分解性の糖アルコールの分解能が高いことが明らかになった。

本研究開発では、この筋肉の増量と腸管免疫系を賦活化し、難分解性の糖アルコールの分解能を有する新規の好熱性 *Bacillus* sp.（製品評価技術基盤機構・国際寄託済／寄託番号：BP-863）の菌体数を増量した発酵飼料により、飼料効率の向上を可能とする高機能性

の発酵飼料が効率的に製造する技術を確立し、生産者の飼料コストを下げるとともに、国内の飼料自給率の向上を目指す。

## (2) 研究開発の目的

BP-863 が分解可能な糖アルコールのうち、例えば、アラビノースは柑橘類の粕や畜産飼料の主要原料であるトウモロコシの外皮に3～10%程度、含まれている。この菌の性質を利用し、現在の既実用化技術（特許第3314302号ほか）における主要原材料組成（海産物残渣＋珈琲抽出後残渣）以外の、海産物残渣と地域固有の食品廃棄物の組み合わせによる（海産物残渣＋柑橘果皮／海産物残渣＋焼酎粕など）新規の高機能性発酵飼料製造プロセスを確立し、沿岸地域の地場産業における廃棄物を有効活用可能なスキームを構築する。そのために以下のような技術を確立する。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、糖アルコール分解能の高い好熱性バチラス属菌 BP-863（deposited in NITE）の機能を増強した製造ルーティン確立する。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。

## (3) 研究開発の概要

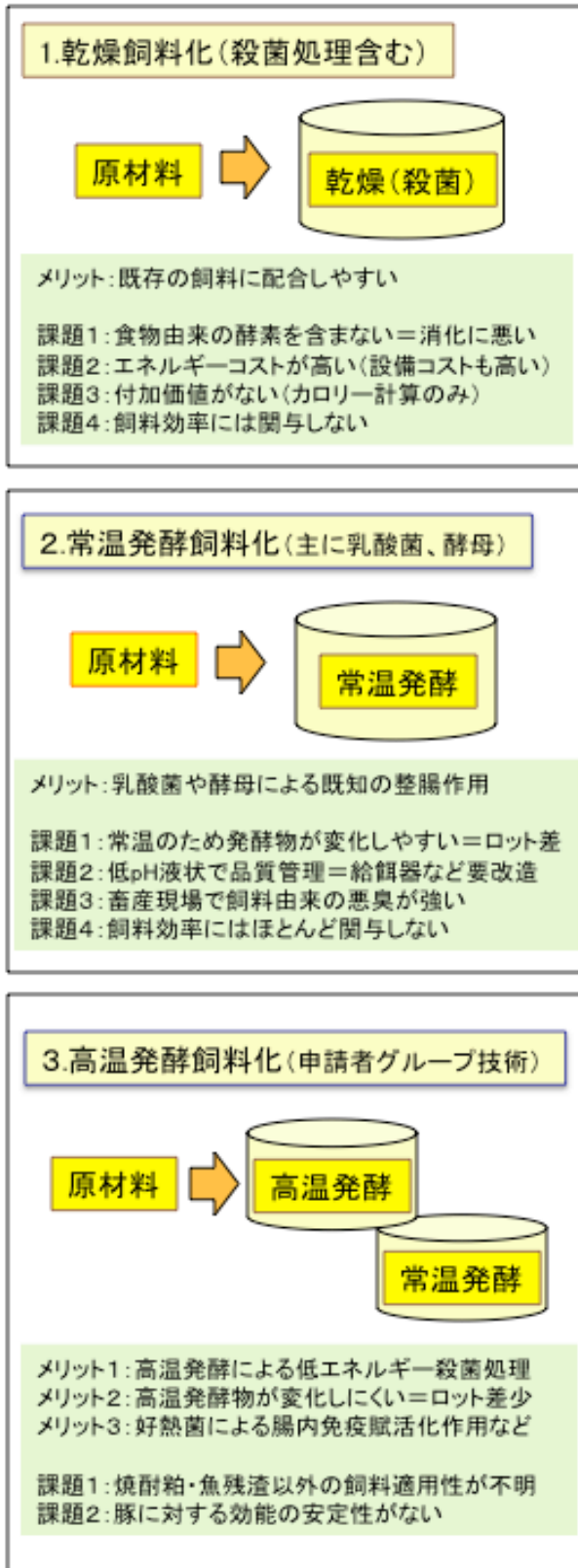
畜産用飼料原料には、通常10%以上の消化のできない栄養成分（難分解性糖アルコールや多糖類）が含まれる。そこで、好熱性複合微生物群PTA-1773（deposited in ATCC）を主導とした発酵飼料の製造工程に、糖アルコールの分解能の高い好熱性バチラス属菌 BP-863（deposited in NITE）を増量した発酵工程を確立し、これまで可消化養分とは見なされていなかった養分を効率的に利用可能とすることを目指す。また、併せて飼料価値の低かった食品廃棄物の発酵飼料化にも適用し、高付加価値の機能性飼料を開発する。そのために、BP-863を大量培養する培養タンクを開発し、二槽式高温発酵システムと連結可能なシステム化を図る。さらに、糖アルコールを豊富に含む原材料において糖アルコールの分解度合と菌体数などを指標として最適な発酵飼料を推察する。

同時に、改良した発酵飼料の微生物種のプロファイリングを実施し、機能性バクテリア候補のライブラリー化を進める。

次に、改良型発酵飼料の機能性を追究するために、マウスを用いて、好熱性BP-863の菌体数依存的な効果とともに、糖アルコールの濃度依存的な効果を生体重や食餌量、血液組成、免疫賦活化能、腸内細菌相、肉質への影響を検証する。これらの検証結果で選抜された食餌条件において、現場レベルでの畜産動物を対象として、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評価する。

当該実証研究成果に基づいて、経済的指標を明らかにし、事業化に向けた運用方法を考案する。

## 従来技術



## 新技術

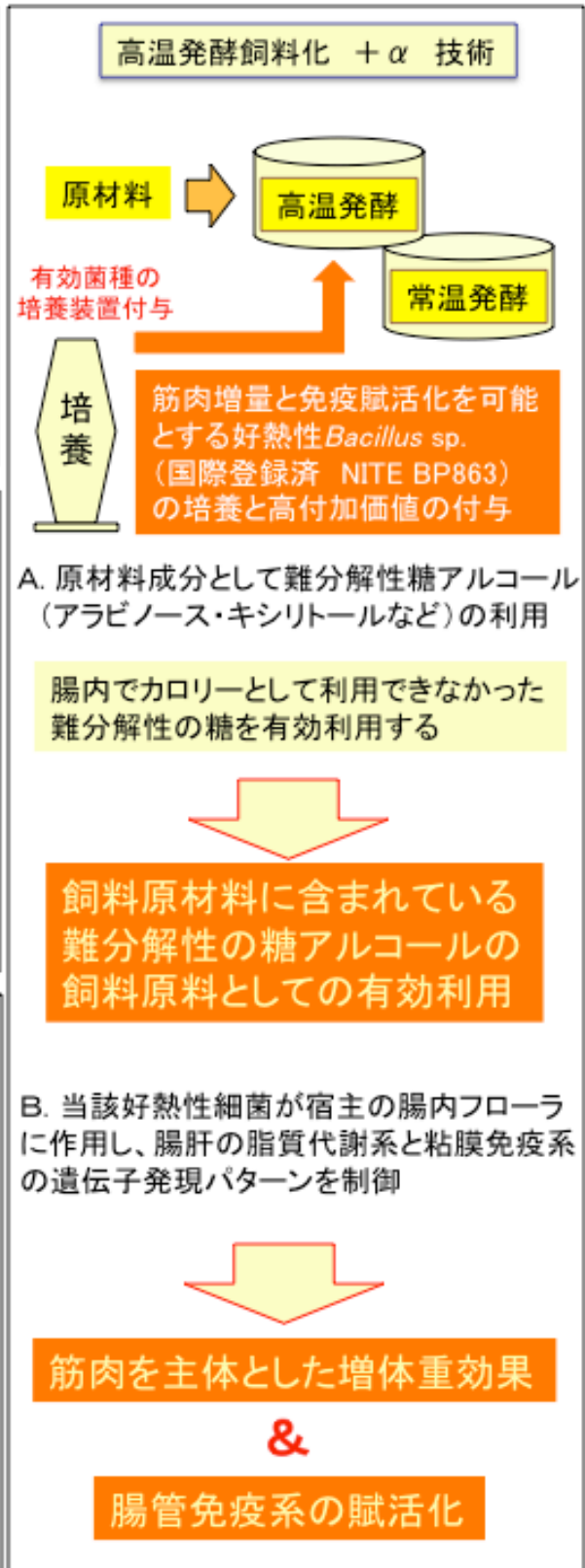
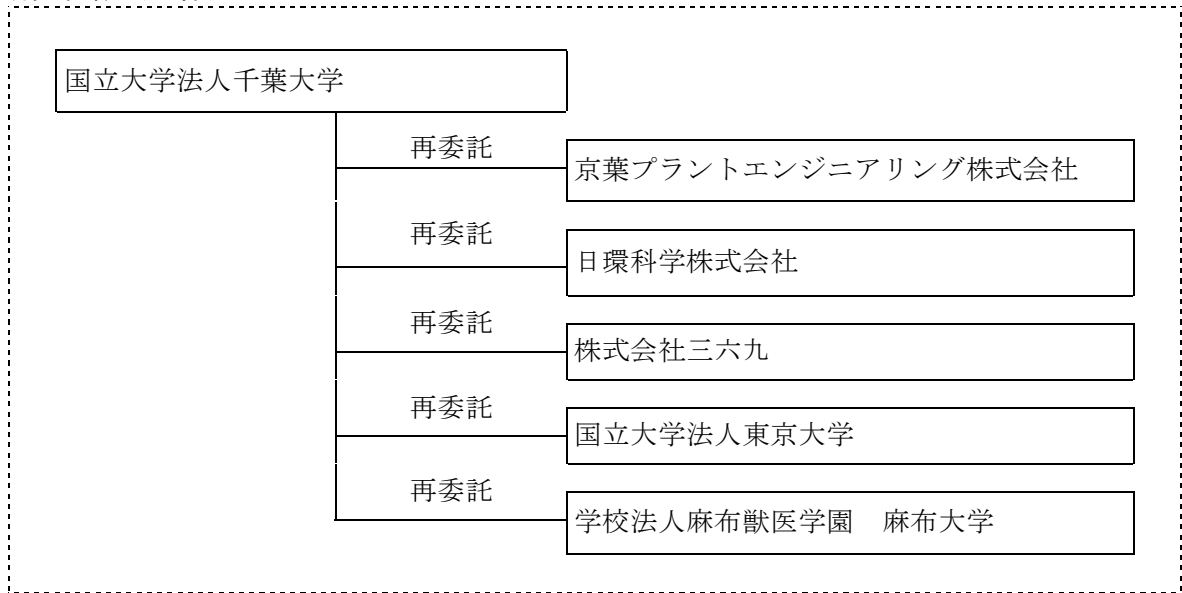


図1 発酵生産物等の有効利用と未利用バイオマス等の高度利用に係る技術の高度化

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）



総括研究代表者（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

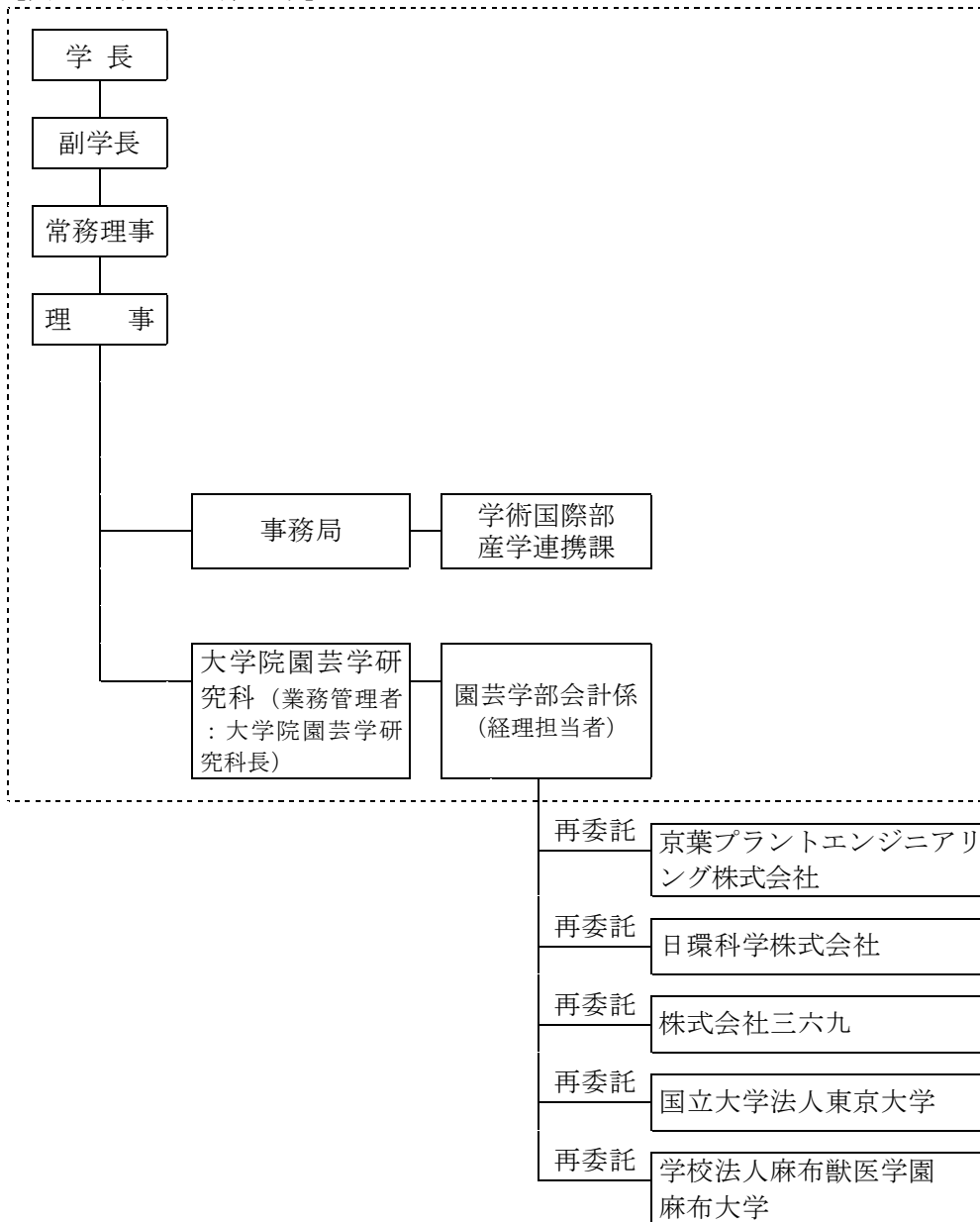
副総括研究代表者（S L）  
国立大学法人千葉大学 大学院融合科学研究科  
教授 児玉 浩明

副総括研究代表者（S L）  
日環科学株式会社  
代表取締役 宮本 浩邦

## 2) 管理体制

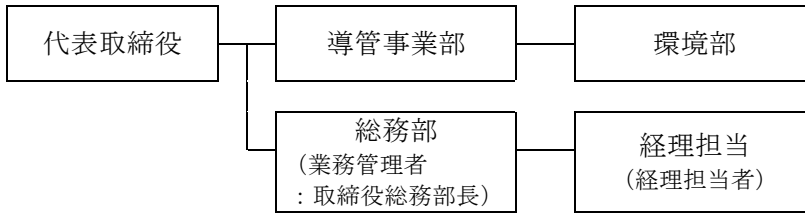
### ① 事業管理者

[国立大学法人千葉大学]

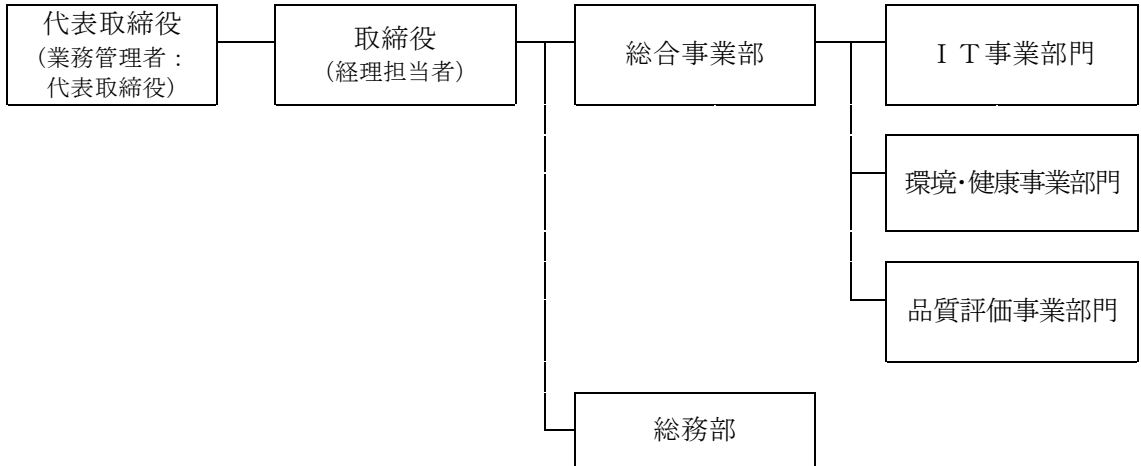


② 再委託先

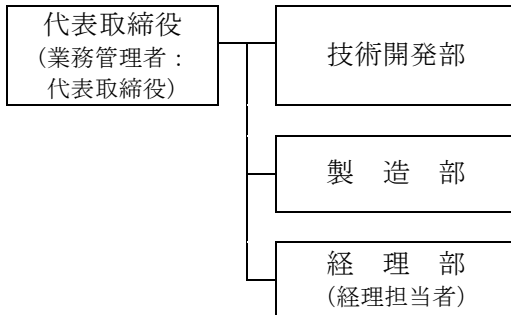
[京葉プラントエンジニアリング株式会社]



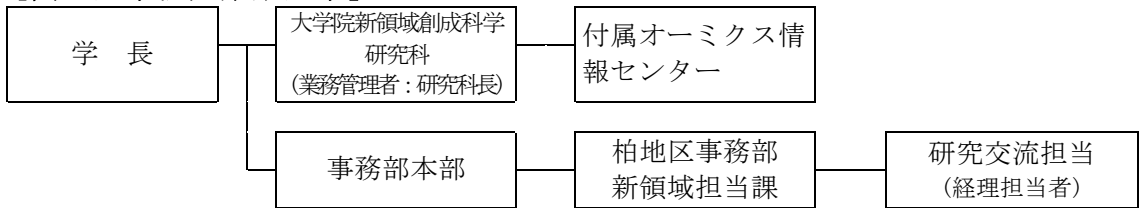
[日環科学株式会社]



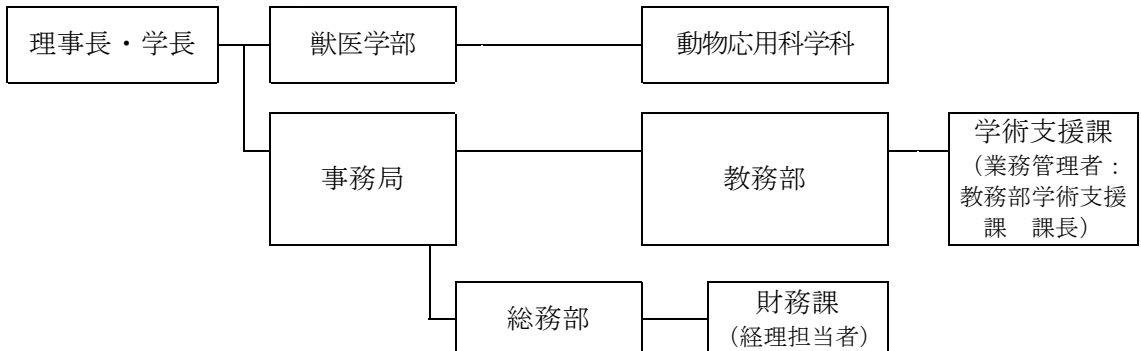
[株式会社三六九]



[国立大学法人東京大学]



[学校法人麻布獣医学園 麻布大学]





(2) 研究員及び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

① 研究員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
児玉 浩明 (再)	大学院融合科学研究科 教授	①, ②, ③

② 管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
石和 剛	園芸学部会計係長	④
児玉 浩明	大学院融合科学研究科 教授	④

【再委託先】

① 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	常務取締役 導管事業部 事業部長	③
宇田川 元章	導管事業部 環境部 次長	①, ③
新名 俊仁	導管事業部 環境部 係長	①, ③
井藤 俊行	導管事業部 環境部 係長	①, ②, ③
加藤 千寿子	導管事業部 環境部 係員	③
板垣 昭馬	導管事業部 環境部 顧問	③

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, ②, ③
森 健一	取締役	①, ②, ③
佐藤 玄太	総合事業部 研究員	①, ②, ③
松浦 真紀子	総合事業部 研究員	①, ②, ③
本堂 朋子	総合事業部 研究員	③

c. 株式会社三六九

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
宮川 文生	製造部 工場長	①
中野 武志	製造部 主任	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, ③

e. 学校法人麻布獣医学園 麻布大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
森田 英利	獣医学部動物応用科学科 教授	②, ③
中野 章代	獣医学部動物応用科学科 特任助教	②, ③

(3) 他からの指導・協力者

表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 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 導管事業部 事業部長 常務取締役	委 PL
児玉 浩明	国立大学法人千葉大学 大学院融合科学研究科 教授	SL
宮本 浩邦	日環科学株式会社 代表取締役	委 SL
宇田川 元章	京葉プラントエンジニアリング株式会社 導管事業部 環境部次長	委
森 健一	日環科学株式会社 取締役	
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	
森田 英利	学校法人麻布獣医学園 麻布大学獣医学部動物応用科学科 教授	
飯田 文子	学校法人日本女子大学 家政学部食物学科 准教授	アドバイザー
金田 欣亮	財団法人千葉県産業振興センター 研究開発コーディネーター	アドバイザー
矢部 正彦	矢部農場 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
中村 尚五	学校法人東京電機大学 環境情報学部 教授	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Gr 参与	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。

・PL (Project Leader)、SL (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

具体的な成果概要を以下に示す。

- ① 原材料ごとの発酵ルーティンの確立
  - ①-1：糖アルコール含有量の高い発酵原材料を用いた発酵工程の確立とその評価  
2 段式発酵試験プラントに、好熱性 BP-863 を主体として培養するオプション培養装置を設置し、難分解性糖アルコールを含む原料について発酵飼料製造試験を実施した。
    - ①-1-1) ラボレベルの培養条件検討と胚葉装置の設計  
好熱菌好塩菌連続培養装置を使用し基本的な BP-863 菌株の培養条件の確立を進め、現場レベルの単離菌培養装置の仕様に関する設計を行った。
    - ①-1-2) 培養装置の開発  
単離菌培養搬送システムは、2 段式発酵試験プラントに連結可能なものとして開発する。
    - ①-1-3) 培養装置の培養条件の評価・検証  
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（栄養組成や機能性・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。特に、発酵工程において、飼料原料中の栄養成分組成、BP-863 の菌体数などの経時変化を調査し、飼料力価として最適な製品品質を追究した。
- ② 発酵飼料の微生物資源ライブラリの構築
  - ②-1：改良型発酵飼料の遺伝子的解析と微生物資源ライブラリ構築  
発酵飼料に含まれる好熱性細菌の中から、マウスの腸内で生着する可能性のある細菌として、*Bacillus coagulans* に近縁の菌種（N-16 株）を単離し、その生化学的性状を明らかにした。
    - ②-1-1) 生化学的性状評価と DNA-DNA ハイブリダイゼーション  
BP-863 株と N-16 株について、分類学的同定に必要な DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行った。BP-863 株は、*B. thermoamylovorans* を最近縁種とする新菌種候補であり、N-16 株は *B. coagulans* として同定された。
    - ②-1-2) *Oceanobacillus* 属近縁種の全ゲノム解析  
発酵飼料に含まれる細菌群の中から *Oceanobacillus* 属に含まれると考えられる株を単離した。この株の 16S rRNA 配列から *Oceanobacillus profundus* に近縁な株であることを明らかにし、さらに生化学的性状についても解析した。全ゲノム解析にまでは至らなかった。
- ③ 発酵飼料の動物に対する影響評価
  - ③-1：改良型発酵飼料の畜産動物などへの投与試験  
実験用の仔豚及びマウスなどを用いて、実験動物系への投与試験を実施し、その基礎データに基づいて現場への導入効果を検証した。
    - ③-1-1) 菌体数依存的・糖アルコール濃度依存的な効果の検証  
モデル動物としてマウスを用いて、好熱菌 BP-863 の菌体数依存的な効果（遺伝子レベル・タンパク質レベル）を検証し、その結果に基づいて選抜された食餌条件において、仔豚の生理的な影響の解析に繋げるができた。糖アルコール濃度依存的効果は検証できなかった。
    - ③-1-2) 腸内代謝系の解析  
消化の度合いを検証するために、糞中の代謝物を解析し、腸内代謝系の変化を定量的に解析し、肝臓の遺伝子発現を指標として成長に与える影響の一端を明らかにした。
    - ③-1-3) 腸内フローラ相互作用の検証  
*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* や *Clostridium* などの有効微生物群の腸内における増減傾向などを確認し、菌相の差異による有効性を検証した。
    - ③-1-4) 現場レベルの生産性指標への影響評価  
上記の試験結果を踏まえ、既存飼料の代替時に、従来と同等以上の生育状況を示すことを現場レベルの畜産動物（豚）を対象として定量的に検証した。特に、動物の増体重変化・肉質・呈味等の生産性指標への影響を検証し、一定の評価を得た。

#### 1-4 本研究の連絡窓口

京葉プラントエンジニアリング株式会社

住所 〒272-0033 千葉県市川市市川南2-8-8 京葉ガス㈱本社西館

環境部 宇田川元章

TEL 047-325-3383 FAX 047-321-0973 e-mail アドレス : m-udagawa@kpeng.co.jp

国立大学法人千葉大学

住所 〒271-8510 千葉県松戸市松戸6-4-8 千葉大学大学院園芸学研究科

会計係 石和 剛

TEL 047-308-8739 FAX 047-308-8720 e-mail アドレス : zad8739@office.chiba-u.jp

## 第2章 本論（研究開発の詳細）

### 2-1 原材料ごとの発酵ルーティンの確立

#### ①-1：糖アルコール含有量の高い発酵原材料を用いた発酵工程の確立とその評価

-----【担当：京葉プラントエンジニアリング株式会社、日環科学株式会社、株式会社三六九、  
国立大学法人千葉大学】

2 段式発酵試験プラントに、好熱性 BP-863 を主体として培養するオプション培養装置を設置し、難分解性糖アルコールを含む原料について発酵飼料製造試験を実施する。

#### ①-1-1) ラボレベルの培養条件検討と培養装置の設計

##### 1) 目的

好熱菌好塩菌連続培養装置を使用し基本的な BP-863 菌株の培養条件の確立を進め、現場レベルの単離菌培養装置の仕様に関する設計を行う。

##### 2) 実施内容

#### a. BP-863 菌の芽胞化処理条件の検討

BP-863 株を安定に家畜へ投与するために、BP-863 株の安定性について検討した。BP-863 菌を nutrient Broth 液体培地に植菌し、一晚、37℃で培養した。その培養液を以下の温度で 30 分間処理した後、プレートにまいて翌日、得られたコロニー数を計測した（表 1.1.1）。

この結果、栄養繁殖細胞（vegetative cell）は、65℃30 分の処理には耐えられないことがわかる。以降の実験では 75℃30 分の熱処理によって生菌を死滅させ、芽胞を残すこととした。芽胞そのものも 85℃30 分の処理では 1/10 以下に減少する。vegetative cell は、グリセロール中で凍結保存したり、液体中で 4℃で静置したりすると、生菌数がおおきく減少することがわかり、安定した保存のために、芽胞を用いることとした。したがって、BP-863 株の培養によってより多くの芽胞を得て、保存し、動物への投与実験に用いることが望ましい、と考えられた。

表 1.1.1 芽胞が生存できる温度の検討

処理温度	コロニー数
55℃	16384
65℃	700
75℃	358
85℃	44
95℃	2

#### b. 好熱菌好塩菌連続培養装置の作成

第1培養槽から第2培養槽へ移送し、2種類の異なる培養条件を設定できる培養槽を設計した。さらに生菌を殺菌し、芽胞のみが生存できる条件を組み込んだ培養槽を開発した。培養槽全体を 75℃に加温できるように、補助ヒーターを培養槽へ取り付けられるようにし、加熱による危険性を減らすために、一定温度以上になるとヒーターが OFF になるようにした。材質はすべてガラスもしくはステンレスとして、塩濃度が高い培地を用いることも可能としている。

### c. 基礎培養条件の設定

BP-863 株の基本的な培養条件の設定をおこなった。BP-863 株は *Bacillus* 属バクテリアであるので、*Bacillus* 属バクテリアで用いられることが多い TSA 培地と HA 培地を用いて好熱菌好塩菌連続培養装置にて培養を行った。培養過程において、pH と OD を連続的に測定した。また 1 日に一度サンプリングを行い、生菌数と芽胞数を測定した。

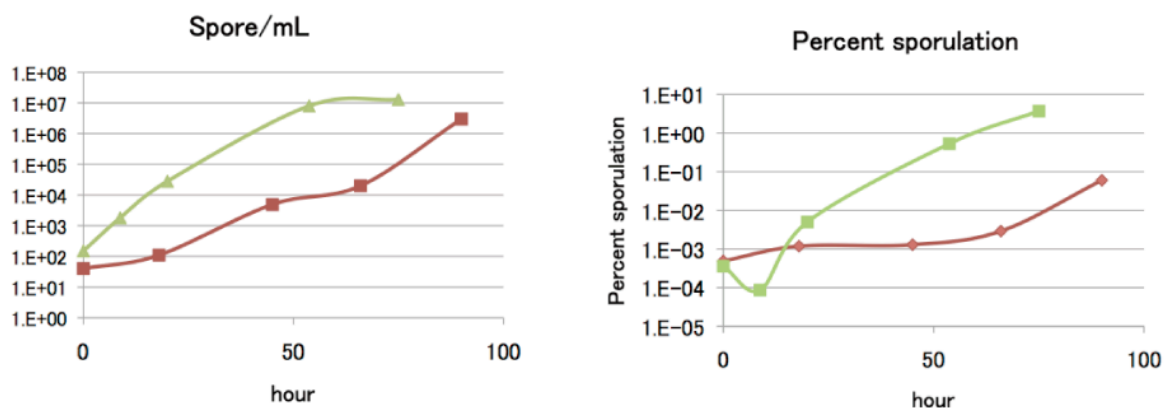


図 1.1.1 好熱菌好塩菌連続培養装置による BP-863 株の培養

左図は、芽胞濃度

右図は、全細胞数に占める芽胞の割合

赤線：TSA 培地のデータ

緑線：1/2HA 培地のデータ

その結果、図 1.1.1 に示したように、芽胞形成においても培養開始 24 時間後から、HA 培地では芽胞数が増加し、形成率、芽胞数のどちらの指標でも TSA 培地を大きく超えることがわかった

(図 1.1.1)。さらに、細胞の増殖と芽胞誘導のバランスが良い組成としても HA 培地が最適であった。以上の結果により、BP-863 株の培養には好熱菌好塩菌連続培養装置を用いて 72 時間の培養により、 $1 \times 10^7$  spore/mL の濃度の芽胞を含む培養溶液を作成することができた。

### d 芽胞を含む BP-863 菌の粉末化の検討

養豚場での BP-863 株の投与試験を見据えて、BP-863 株の扱いが容易になるように、BP-863 菌の粉末化を検討した。BP-863 培養液を、75°C、30 分間の加熱処理を行って生菌を殺菌し、続いて遠心により菌体を回収し、3 回、生理食塩水により菌体を洗浄した。その後、菌体をスキムミルク溶液に懸濁し、50mL の遠心チューブに集めた。遠心チューブを液体窒素で凍結したのち、凍結乾燥機により、凍結乾燥させた。その結果、粉末化された BP-863 株を得ることができた。

#### ①-1-2) 培養装置の開発 (好熱性単離菌培養装置)

##### 1) 開発の目的

単離菌培養搬送システムは、平成 2 年に株式会社三六九に設置された 2 段式発酵試験プラントに連結可能なものとして開発する。システムの前段には、単離菌の液体培養を行う小型培養槽を設置する。システム後段には、発酵・噴霧・乾燥機能を持たせた混合槽を配置する。混合槽では、前段で液体培養した単離菌を発酵飼料に噴霧することで、発酵飼料中の単離菌濃度を向上させ、さらに高温下で乾燥させることで発酵を停止させると同時に、好熱菌以外の細菌を死滅させ、発酵飼料としての品質の安定化を図る。

## 2) 実施内容

### a. 培養装置の設計

図 1.2.1 にあるような単離菌培養搬送システムの設計を行った。

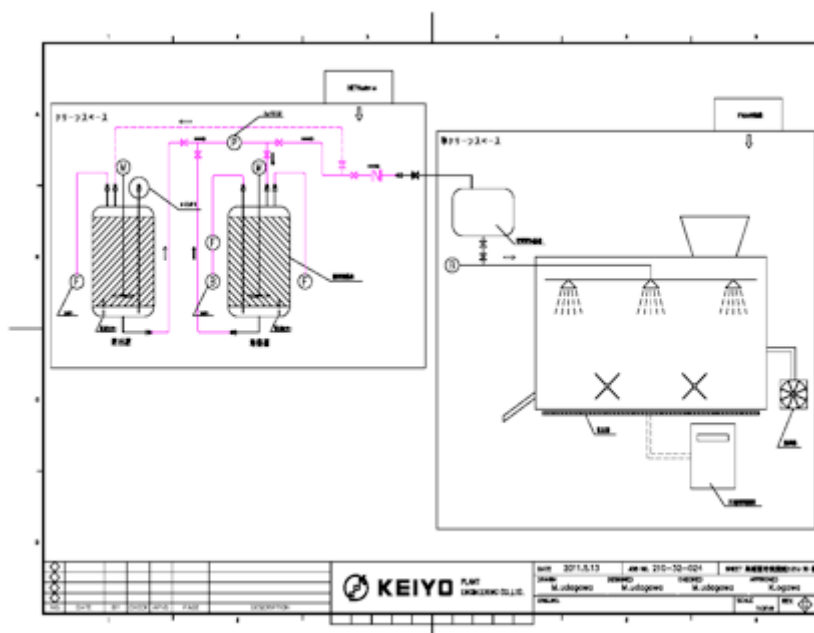


図 1.2.1 好熱菌単離菌培養搬送システムの設計図

このシステムは大きくわけて2つのシステム（好熱性単離菌小型培養システムと混合槽）からなっている。

好熱性単離菌小型培養システムは、好熱菌などの単離菌を培養する2つの培養槽からなり、第1培養槽から第2培養槽へチューブポンプを利用して培養液を搬送できるようにしている。培養槽には面状発熱体を装備し、培養温度を40℃以上に保持でき、好熱菌の培養を可能としている。速度可変式の攪拌槽とブローを装備し、培養液の攪拌および通気も可能である。また、2つの培養槽を設置しているスペース全体をクリーンルームとして雑菌の混入がないようにしている。

混合槽では、培養によって得られた好熱菌や単離菌を発酵飼料と混ぜることができる。培養液は好熱性単離菌小型培養システムから、チューブポンプを介して混合槽におくられ、混合槽上部から噴霧できるようになっている。混合槽へはホッパーにより発酵産物が搬入できるようになっており、好熱性単離菌を混合したのち、排出できるように工夫されている。また混合槽は、電気ヒータに加えガス熱源機とガス乾燥機によって、高温下で発酵産物を乾燥できるようになっている。高温下での乾燥により好熱菌は芽胞として生存できるが、その他のバクテリアは死滅する。結果、得られる発酵飼料の品質の安定化が期待できる。

### c. 設置

設計に基づき、システムを開発し、株式会社三六九に好熱菌単離菌培養搬送システムを設置した。



図 1.2.2 好熱性単離菌小型培養システム

好熱性単離菌小型培養システム（図 1.2.2）では、発酵槽上部からモーターにより培養液を攪拌できるようになっている。発酵槽本体の周りの赤い部分は面上発熱体である。中央の緑色の部分がチューブポンプで、培養液の搬送を行う。



図 1.2.3 混合槽

好熱性単離菌小型培養システムから搬送された培養液は、写真左型のタンクを經由して混合槽へとおくられ、ホッパーから搬入された発酵産物と混合される（図 1.2.3）。混合槽では、電気ヒータとガス給湯加熱により高温下で発酵産物を乾燥させることができる。混合槽設置場所には、ガス乾燥機を通過した空気が送り込まれている。

#### ①－１－３） 培養装置の培養条件の評価・検証

##### 1) 目的

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（栄養組成や機能性・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。特に、発酵工程において、飼料原料中の糖アルコールの含有量やカロリー数、BP-863 の菌体数などの経時的变化を調査し、飼料力価として最適な製品品質を追究する。

##### 2) 評価・検証結果



#### a. 難分解性糖を用いた BP-863 株のラボレベルでの培養の検討

糖類を含まない HA 培地に、難分解性糖としてキシリトール、D-アラビノース、L-アラビノースを加え、BP-863 株を好熱菌好塩菌連続培養装置にて培養した。糖の資化性については、酸産生能を指標とすることが多いため、培養期間中に pH の変動をモニターし、最も pH が低下した時点の pH を調べた。その結果、BP-863 株の糖からの酸産生能は D-および L-アラビノースにおいて高く、アラビノースに比べるとキシリトールは低いことが明らかになった。また、L-アラビノースは、培養液の pH が pH5.4 より低下すると、BP-863 株の溶菌が生じたため、効率良くアラビノースを分解するためには、培地の pH の制御が重要であることが考えられた。そこで、好熱菌好塩菌連続培養装置を用いて、BP-863 の培養期間中の pH を pH5.5 から pH7.0 程度までの間に制御した。その結果、連続的に L-アラビノースが分解されることがわかった。培養期間中、継時的に培養液のサンプリングを行い、L-アラビノースと酢酸、およびギ酸について定量を行い、これらの物質の濃度の相関について調べた。その結果、L-アラビノースの減少と酢酸の生成の間には相関が認められ、BP-863 株による L-アラビノースの資化により、1M の L-アラビノースから 0.88M の酢酸が生じることが明らかになった。さらに、L-アラビノースの減少とギ酸の生成の間には相関が認められ、BP-863 株による L-アラビノースの資化により、1M の L-アラビノースから 0.74M のギ酸が生じることが明らかになった。

以上のことから、BP-863 株は、難分解性糖とくに、L-アラビノースを発酵によって活発に分解し、酢酸とギ酸に変換していることが明らかになった。酢酸は動物の腸内で吸収され、エネルギー源として利用されることから、動物の成長を促進することにつながることを予想される。一方、ギ酸は、発酵飼料の pH を低下させるとともに、牧草などのサイレージでの発酵ではアンモニア態窒素含量を低下させ、発酵品質を改善させる働きがあるとされ、0.5%程度、添加されて使用されている。したがって、低濃度のギ酸が発酵飼料に含まれることは発酵飼料の品質の改善につながると思われる。

#### b. 糖アルコール含有量の高い発酵原材料を用いた発酵飼料製造試験

L-アラビノースは、ヘミセルロースの構成成分であり、コーンコブ等に多く含まれている。そこで、コーンコブを発酵原材料に用い、難分解性糖含有量の高い発酵原材料からの発酵飼料の製造を行った。また、試験後半では豚用餌であるブリード S を原材料としてコーンコブとともに投入し、発酵飼料を製造した。その結果、発酵原材料にコーンコブを加えると、F1、F2 ともに発酵温度が上昇することから、難分解性糖の持続的な分解が生じていると考えられる。一方、ブリード S を添加すると、F1 での発酵温度が低下し、F2 での発酵温度が上昇する。ブリード S は繊維質が多いことから、繊維質を分解可能な低分子多糖類にまで分解するのに時間がかかる、と推定された。F2 で低分子多糖類の分解が生じて、その分、発酵温度が上がるものと考えられる。

#### c. 発酵過程における BP-863 株の含有量について

コーンコブを含む原材料をもとに発酵させた飼料について、異なる製造ロットに含まれる BP-863 株を遺伝子的に検出した。各製造ロットの発酵飼料から全 DNA を抽出し、BP-863 株の 16S rRNA 配列を特異的に増幅するプライマーを用いて、PCR 法により BP-863 株を検出し、発酵飼料中に検出されることを確認した。

## 2-2 発酵飼料の微生物資源ライブラリの構築

### ②-1：改良型発酵飼料の遺伝子的解析と微生物資源ライブラリ構築

-----【担当：国立大学法人東京大学、学校法人麻布獣医学園 麻布大学、京葉プラントエンジニアリング株式会社、日環科学株式会社、国立大学法人千葉大学】

#### ②-1-1) 生化学的性状評価と DNA-DNA ハイブリダイゼーション

##### 1) 目的

BP-863 を含む改良型発酵飼料に含まれる発酵微生物群の中から、BP-863 以外に有効性が高いと思われるバクテリアを単離し、その生化学的性状評価や DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定を行う。さらに BP-863 株の分類上の同定を行う。

##### 2) 実施内容

###### a. 発酵飼料に含まれる好熱菌

これまでの試験において、無菌マウスに発酵飼料作成に用いている好熱菌群を 3 週間投与し、その後、盲腸便から好熱性細菌を単離している。単離された株には、BP-863 菌株に加えて N-16 株が含まれている。N-16 株の 16S rDNA 塩基配列は、*Bacillus coagulans* NBRC12583<sup>T</sup> の 16S rDNA 配列と 99.5% の相同性を示した。このことから N-16 株は *B. coagulans* と同種あるいは近縁の菌種であると考えられる。*B. coagulans* は、すでに家畜などの動物用 probiotics としての研究が行われている (Cavazzoni et al., 1998; Adami and Cavazzoni, 1999)。*B. coagulans* の type strain (NBRC12583<sup>T</sup>) は、腐敗し凝固した牛乳から単離された経緯がある。一方、N-16 株は、海産物を原材料として発酵させた発酵産物から単離されている。両者の生育環境は大きく異なるので、N-16 株の生化学的性質として糖の資化性およびいくつかの酵素活性について検討した。

表 2.1.1 発酵飼料から単離された N-16 株と *B. coagulans* type strain との生化学的性状比較 (酵素活性、V は株間で差異があることを示している)

酵素活性	<i>B. coagulans</i>	N-16
Lysine decarboxylase	-	+
Arginine dihydrolase	V	-
ornithine decarboxylase	-	+
ONPG	V	+
nitrate reduction	V	-
urease	-	-
hydrogen sulphide production	-	-
indole production	-	-

酵素活性では、lysine decarboxylase 活性と ornithine decarboxylase 活性において、*B. coagulans* type strain の特徴とは異なる性質を N-16 株が示すことが明らかになった (表 2.1.1)。比較している *B. coagulans* type strain は、15 菌株の *B. coagulans* を対象に調べて得られた *B. coagulans* に共通して認められる特徴を示している (De Clerck et al., 2004)。

また糖の資化性においても、De Clerck らの報告 (2004) では、D-lyxose と D-tagatose は、*B. coagulans* type strain は資化しないとしているが、N-16 株ではこれら

の糖から酸を生成するのに対し、逆に maltose と starch といったグルコースの  $\alpha$  1-4 ポリマーから酸を産生できないことが特徴となっている。

以上の結果から、*B. coagulans* NBRC 12583<sup>T</sup> と N-16 株は 16S rDNA 配列では高い相同性を示しても、いくつかの生化学的性状が異なることから、N-16 株は *B. coagulans* type strain とは生化学性状の一部が異なる *B. coagulans* であることが考えられる。そして、N-16 株は、分離源が海産物を原材料として発酵させた発酵産物から単離されているため、N-16 株の生化学的性質は特異的であった。

#### b. DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験 (BP-863 株)

本開発では BP-863 株の有用性に着目し、難分解性糖を含む原材料から有用な発酵飼料を作成することが目的である。BP-863 株の 16S rRNA 配列は、*Bacillus thermoamylovorans* LMG18084<sup>T</sup> の 16S rRNA とは 99.4% の相同性であり、16S rRNA 配列のみを基準とした簡易分類法では *B. thermoamylovorans* の可能性もある。しかし、糖からの酸産生能において、*B. thermoamylovorans* LMG18084<sup>T</sup> が酸を産生しない糖 (D-アラビノース、キシリトール、ズルシトール、エリスリトール、ソルビトール、D-タガトース、リビトール、D-フコース、D-リキソース、L-ソルボース、L-アラビトールなど) から酸を産生できることから、BP-863 株は *B. thermoamylovorans* LMG18084<sup>T</sup> 株とは大きく異なる生化学的性状を示す。

そこで、菌種を同定する上において、最も重要な指標となる DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による解析を行うこととした。

DNA-DNA ハイブリダイゼーション法とは、2 株のゲノム全体の相同性 (%) から菌種を同定する方法である。細菌と酵母において、DNA-DNA ハイブリダイゼーションに基づく相同性試験は菌種を決定する最も重要な情報となっている。DNA 相同性の数値は “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” 初版に記載されたものが判別基準となっている (Johnson, 1984)。解析にあたっては、系統樹解析からいくつかの近縁な菌種の type strain と DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行うことが必要とされている。図 2.1.1 に BP-863 株の系統樹を示す。BP-863 株の解析にあたっては、*B. thermoamylovorans* LMG18084<sup>T</sup> と次に近縁な *B. thermolactis* LMG25569<sup>T</sup> を DNA-DNA ハイブリダイゼーションの対象菌株とした。

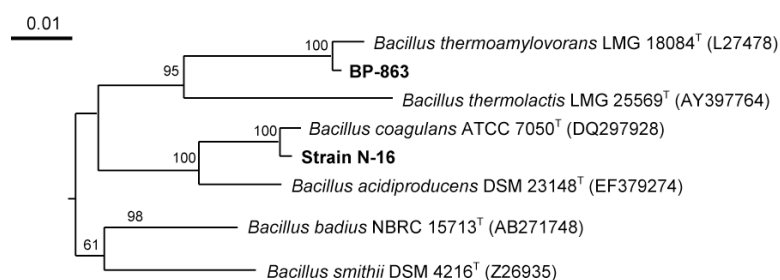


図 2.1.1 BP-863 株および N-16 株に関する系統樹

まず、DNA-DNA ハイブリダイゼーションに必要な情報であり、菌種同定の 1 つの指標である GC 含量について測定した。GC 含量は、BP-863 株と *B. thermoamylovorans* LMG18084<sup>T</sup> ではほぼ同じであった。次に DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるゲノム相同性解析の結果、BP-863 株は、*B. thermoamylovorans* を最近縁とする新菌種候補であることが判明した。

## ②-1-2) *Oceanobacillus* 属近縁種の全ゲノム解析

### 1) 目的

16S rRNA 遺伝子のゲノム解析においては、高度耐塩性・好アルカリ性の海洋微生物である *Oceanobacillus* 属が発酵産物から複数種検出されている。これらの細菌は極限環境下で酵素反応が可能であり、飼料中に含有することによる消化力増強効果が期待される。そこで、これらの微生物を解析し、ライブラリーを構築する。

### 2) 実施内容

#### a. 高度耐塩性細菌の単離

発酵飼料作成に用いた好熱菌群を、45°Cで nutrient agar medium 上で培養し、菌種について 16S rDNA 配列を調べることで、同定した。その結果、*Oceanobacillus* 属に近縁の細菌を一株単離した。この菌株は、1.5M NaCl を含む培地で生育できることから高度耐塩性を有している。

#### b. 全ゲノム解析に向けた 16S rDNA 配列の決定と系統樹解析

全ゲノム解析を行う前提として、16S rDNA の全長配列の決定を行った。1458 塩基長の断片を増幅し、その塩基配列を決定した。その配列をもとに、*Oceanobacillus* 属内の進化的位置について、UPG 法（有根系統樹）により系統樹を作成した。系統樹作成の結果、単離株は深海から単離された細菌を意味する学名をもつ、*Oceanobacillus profundus* と最も近縁であることがわかった。16S rDNA 配列の相同性は 99.1%であった。

#### c. 単離された高度耐塩性細菌株の生化学性状解析

単離株と最も近縁な *O. profundus* (Kim et al., 2007) との生化学性状について、*O. profundus* を単離した論文と比較した。その結果 amygdalin、rhamnose、lactose といった糖において酸産生能が、*O. profundus* には認められるが、単離株では認められず、16S rRNA 配列では高度に相同性が認められるが、生化学的には若干異なると考えられた（表 2.2.1）。今後、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験等を行い、新菌として認められた場合には全ゲノム解析等を進めていくとともに、極限環境下での酵素活性などについても解析を進めていく必要があると思われる。

表 2.2.1 発酵飼料から単離された *Oceanobacillus* 属単離菌株と *O. profundus* との生化学的性状比較

Sugar	<i>O. profundus</i>	単離株
aesculin	+	+
D-galactose	-	-
D-fructose	+	+
D-glucose	+	+
maltose	+	+
melibiose	-	-
N-acetylglucosamine	+	+
D-trehalose	+	+
amygdalin	+	-
lactose	+	-
meso-inositol	-	-
rhamnose	+	-
D-turanose	+	+
L-fucose	-	-
glycogen	-	-

## 2-3 発酵飼料の動物に対する影響評価

### ③-1: 改良型発酵飼料の畜産動物などへの投与試験【実施: 京葉プラントエンジニアリング株式会社、日環科学株式会社、国立大学法人東京大学、学校法人麻布大学、国立大学法人千葉大学】

実験用のマウス、及び仔豚を用いて、実験動物系への投与試験を実施し、各種生理反応を解析した上で、畜産現場レベルにおける導入効果を検証する。

#### ③-1-1) 菌体数依存的・糖アルコール濃度依存的な効果の検証

----- 【担当: 京葉プラントエンジニアリング・日環科学・千葉大学】

##### 1) 目的

モデル動物としてマウスを用いて、好熱性 BP-863 の菌体数依存的・糖アルコール濃度依存的な効果（遺伝子レベル・タンパク質レベル）を検証し、その結果に基づいて選抜された食餌条件において、仔豚の生理的な影響を調べる。

##### 2) 実施内容

###### a. マウスの体重、飼料要求率、並びに生体成分に与える影響

発酵飼料、および BP-863 菌体を飲水添加してマウスを飼育し、体重の変化、並びに飼料要求率、生体成分に与える影響を評価した。3 週令のマウス (Balb/c ♂) を 5 日飼育し、馴化処理後に実験に供した。短期試験 (18 日間) の飼育期間中の初期体重に対して試験終了直前の体重は、大きな差異が認められなかった。

一方、飼育期間内の飼料要求率を算出したところ、表 3.1.1 に示したように、発酵飼料溶液投与群において約 1 % 程度の改善が認められた。BP-863 投与群では、低濃度試験群において、約 10 % 程度の顕著な改善効果が確認された。尚、糖アルコール濃度依存的な効果については、予備試験によって、HPLC による糞中の糖アルコール分析感度が極めて低いことが判明したため、断念せざるを得なかった。

表 3.1.1 マウスの飼料要求率に与える影響 (短期投与試験)

サンプル名	飼料要求率	飼料要求率の差 (%)
1 群 (コントロール群)	5.58	0.00
2 群 (発酵飼料溶液投与群)	5.51	1.27
3 群 (低濃度 BP-863 溶液投与群)	5.00	10.53
4 群 (中濃度 BP-863 溶液投与群)	5.32	4.72
5 群 (高濃度 BP-863 溶液投与群)	5.67	-1.63

次に、長期投与試験に供したマウスの血清成分を解析した結果を表 3.1.4 に示す。結果として、発酵飼料溶液投与群、並びに BP-863 投与群において、トリグリセリド (TG) 濃度の低下が確認された。尚、血液採取は、サーカディアンリズムを考慮して、午前 10 時から午後 14 時を目安として実施した。次に、腸内免疫系の賦活化度合いを検証するために、大腸糞における分泌型 IgA 濃度を ELISA によって解析した。その結果、発酵飼料溶液投与群、並びに BP-863 投与群、いずれについても糞中の濃度の増加傾向が確認された。また、IgA を産生するパイエル板における発現遺伝子群についても差異が確認された。

###### b. 試験用仔豚の体重、飼料要求率、並びに生体成分に与える影響

表 3.1.2 に示した条件の離乳仔豚を用いて飼育試験を実施した。

表 3.1.2 仔豚の実験条件

サンプル名	内容	母豚	同腹	性別	日齢	試験前平均体重 (kg)
pC	通常食 + 菌体なし (対照群) (菌体なしスキムミルク投与)	A	3	♂	33	7.7
		B	2	♀	32	7.9
pBP	通常食 + 菌体あり (BP-863 添加スキムミルク等よ)	A	3	♂	33	7.4
		B	2	♀	32	7.5
pGF	$\gamma$ 線滅菌発酵飼料添加 (配合率 0.2%)	B	2	♂	32	7.2
		C	3	♀	31	7.9
pTF	滅菌なし発酵飼料添加 (配合率 0.2%)	B	2	♂	32	9.3
		C	3	♀	31	8.1

結果として、BP-863 の投与群は、飼育期間中の 3 週の間、対照群よりも微増する傾向が確認された。飼料要求率を比較すると、表 3.1.3 に示したように、BP-863 投与群で、飼料効率が改善する傾向が確認された。

表 3.1.3 BP-863 が仔豚の飼料要求率に与える影響

サンプル名	0d-7d	15-21d	0-21d
pC (菌なしスキムミルク投与群) (対照群)	1.17	2.27	1.61
pBP (BP-863 添加スキムミルク投与群)	0.96	1.72	1.49



図 3.1.1 発酵飼料の性状条件 (各 1 週間)

そこで、図 3.1.1 のように、三つの条件で詳細に飼料要求率を解析した。これらの条件のうち、条件 1 は、従来の発酵飼料の乾燥工程を示している。また、条件 2 は、本サポイン研究で提案している加熱滅菌処理工程を示している。さらに、条件 3 は、条件 2 で製造された発酵飼料に BP-863 を添加した飼料製造条件を示している。

これらの 3 つの条件の発酵飼料を投与した期間を解析した結果、表 3.1.4 のように飼料要求率に差異が確認された。すなわち、条件 3 において約 6% の改善効果が確認されていた。このことは、発酵飼料の製造工程における加熱処理と BP-863 の添加が有効であることを示唆している。

表 3.1.4 発酵飼料の性状条件別の飼料要求率の比較

サンプル名	条件1	条件2	条件3
pGF(γ線滅菌発酵飼料投与群)	1.07	1.45	2.53
pTF(発酵飼料投与群)	1.50	1.43	2.37

次に、上記の表 3.1.2 の条件下で飼育した豚の血清を分析した結果、マウスの結果とは異なり顕著な差は確認されなかったが、トリグリセリド (TG) 濃度は、BP-863 投与群において、減少する傾向が確認された (中性脂肪値の減少効果)。

他の項目については、AST の値が低減化する傾向が BP-863 投与群、並びに非滅菌発酵飼料投与群で確認された。AST 値は、肝臓の細胞破壊が進んでいる時に上昇する血液成分であることから、低値であることが好ましいと想定される。次に、糞中の IgA 濃度を解析した結果、pBP 投与群、並びに pTF 群において分泌型 IgA の増加傾向が認められた。このことから、BP-863 の添加、並びに発酵飼料中の BP-863 の存在によって、仔豚の腸管免疫系が賦活化すると言えた。

### c. 脂肪蓄積に与える影響 (モデル動物としてマウスを用いた解析)

脂肪の蓄積効果についてモデル動物としてマウスを用いて検証した。約 3 ヶ月間の飼育試験の結果、発酵飼料溶液投与群のみ増体重の変化が異なる傾向が確認された。次に、血清成分を解析した結果、発酵飼料溶液投与群、BP 投与群において、トリグリセリド (TG) の減少効果が確認された。このような条件下で、マウスの脂肪蓄積の度合いを CT スキャン解析した。その結果、脂肪蓄積の軽減効果が、発酵飼料溶液投与群、並びに、BP 投与群において確認された (n=3-4)。このような状況下で肋骨周辺の筋肉重量の割合 (体重比) に差異はなかった。このことから、BP-863 投与群では、体重変化が認められないことから、蓄積した脂肪以外の発達 (内臓の臓器の重量差がないため、筋肉と想定) が認められたことになる。

## ③-1-2) 腸内代謝系の解析

----- 【担当：京葉プラントエンジニアリング・日環科学・千葉大学】

### 1) 目的

消化の度合いを検証するために、糞中の代謝物を解析し、腸内代謝系の変化を定量的に明らかにするとともに、肝臓の遺伝子発現を指標として代謝機能の一端を明らかにする。

### 2) 実施内容

#### a. 代謝ケージによる解析

代謝ケージを用いて、マウスの代謝解析を実施した。解析対象としては、通常食飼育の各群のマウスを用いて、一定時間における摂取餌量、飲水量、糞重量、尿重量を測定するとともに、採取された糞、並びに尿中の全窒素濃度の挙動を解析した。合計 3 日間の飼育期間において、増体重は、発酵飼料溶液投与群、並びに BP 投与群において増加傾向が確認され、飼料要求率については、顕著な差異が確認された。さらに、糞中、並びに尿中の全窒素濃度は、発酵飼料溶液投与群、並びに BP-863 投与群において低下する傾向が確認された。タンパク濃度に差があることから、タンパク質の分解も進んでいることが期待された。

#### b. 脂質代謝関連因子の解析

糞中の有機酸分析のデータからも飼料効率の改善を決定づける因子について仮説を立てることができなかった。また、昨年迄に実施したラットを用いた実験において、飼料効率を改善する腸管側の遺伝子群を想定することはできなかった。そこで、対照臓器を脂質代謝に寄与する肝臓側に焦点を移し、代謝エネルギーの有効利用に関する作用機序の一端を見いだすこととした。昨年のデータとして発酵飼料を投与したラット肝臓では、中性脂肪合成の律速酵素である *stearoyl-*

Coenzyme A desaturase 1 (SCD1) の発現量が減少する可能性が想定されていた。本研究でもマウスにおいても、中性脂肪値の減少効果が確認されたため、前述の各種条件のマウス肝臓における SCD1 の発現量を qPCR によって解析した。

その結果、短期飼育試験におけるサンプルにおいても、長期飼育試験の高脂肪食条件下におけるサンプルにおいても、発酵飼料溶液投与群、並びに BP-863 投与群で、コントロール群よりも発現量が低値であることが判明した。

この傾向は、仔豚の肝臓においても軽減程度は低いものの確認することができた。一般に、SCD1 の発現は、高糖食で誘導されるため、ラード 20% 分の糖が少ない高脂肪食では、SCD-1 の発現量が全般的に低い。そのような条件下において、SCD1 の発現は発酵飼料溶液、並びに BP-863 投与群において抑えられていた。しかしながら、中性脂肪値の低下の挙動とは必ずしも一致しない（発酵飼料溶液投与群の TG 値の方が低い）ことから、SCD1 以外にも血清中性脂肪の濃度を制御する因子があることが想定された。

### ③-1-3) 腸内フローラ相互作用の検証

----- 【担当：東京大学、麻布大学、日環科学】

#### 1) 目的

*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* や *Clostridium* などの有効微生物群の腸内における増減傾向などを確認し、腸内細菌相の変化から推察できる効果を検証する。

#### 2) 実施内容

##### a. 16SrDNA による糞便の網羅的解析

マウス糞、並びに豚糞の解析においても、全般的に好熱菌投与群および BP-863 投与群において菌相のバラつきがロット間で少なくなっていた。

最新の腸内細菌学の研究結果から、単純な有用菌の増減のみならず、その機能が重要であることが明らかになっており、また、菌種の多様性とそのバラつき度合いも重要な因子であると言える。そのため、ロット間のバラつきが少ない好熱菌投与群の傾向は重要な知見と言えた。図 3.3.4 は、飼育 3 週間目の糞サンプル、並びに pTF 群に供与した発酵飼料中の菌相解析結果を示している。各群間で特徴的な菌相を示しており、特に、BP-863 を添加した群 (pBP) では、ロット間のバラつきが少なかった。

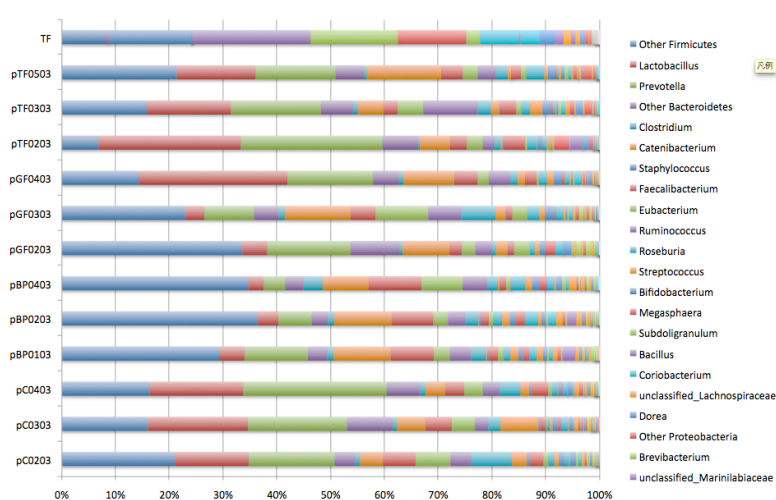


図 3.3.4 実験用仔豚の糞中の細菌属群

以上の結果から、各処理群で腸内細菌相のポピュレーションが異なることが明らかになった。既に、各条件下の生理反応は明らかであるため、腸内細菌相の差異と生理反応との関係を明確に



するデータを得ることができたと言える。今後、菌属レベルの解析から焦点を絞り、菌種の解析をするとともに、さらにそれらの機能性の解析について実施する必要があるため、今後の課題となった。

### ③-1-4) 現場レベルの生産性指標への影響評価

----- 【担当：京葉プラントエンジニアリング、日環科学】

現場レベルでの畜産動物(豚)への投与試験を実施し、動物の生体重の影響を検討した。

#### 1) 目的

上記の試験結果を踏まえ、既存飼料の代替時に、従来と同等以上の生育状況を示すことを現場レベルの畜産動物(豚)を対象として定量的に検証する。特に、動物の増体重変化・肉質・呈味等の生産性指標への影響を評価する。

#### 2) 実施内容

##### a. 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)】

サブテーマ①において製造された、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1,700頭の千葉県の企業養豚、および母豚150頭の千葉県の中規模養豚農家において、平成23年年7月14日～8月26日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、離乳前期の子豚(29,27日齢)、肥育後期152～169日齢から30日間とした。

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。離乳豚の発酵飼料の投与試験においては、豚舎内が高温であったが、結果は表3.4.1、表3.4.2のようになった。すなわち、離乳豚の発酵飼料平均投与期間での増体率は対照区に対して試験区で増加した。1日当たりの増体重は試験区;0.241kg/日・頭、対照区;0.183kg/日・頭であり、試験区は対照区に比べて131%改善する傾向があった。

表 3.4.1 BP-863 配合飼料における離乳豚の増体重に与える影響 (S農場)

区分	試験期間	開始体重 (kg)	終了時体重 (kg)	増体率	増体重/匹 (kg)	増体重/日 (kg/日・頭)	試験/対照
対照区	7/14～ 8/12	8.2	13.7	1.67	5.5	0.18	-
試験区		8.4	15.6	1.86	7.2	0.24	1.31

表 3.4.2 試験期間中の増体重に与える影響 (S農場)

区分	投与前 (%)	投与後 (%)
対照区	100	166.7
試験区	100	182.3

##### b. 官能評価試験と肉質評価

----- 【担当：京葉プラントエンジニアリング(株)、日環科学(株)】

専門的な見地で評価するために、アドバイザーである日本女子大学の飯田先生の協力を得た上で、官能評価試験が実施された。すべての官能試験は、いずれも官能評価の訓練を受けた20代の女性をパネラーとした。また、対照群と試験群の豚肉についてはブラインドテストとして官能評価を実施した。その結果、BP-863投与群、並びに発酵飼料投与群の豚肉において、統計的に有意差のある官能評価を得ることができた。

## 最終章 全体総括

世界的な情勢として、天候不順により農作物の生産環境が悪化しており、その一方で新興国における食肉消費量の急激な増加や投機マネーの影響などに伴って、特に穀物の需要が逼迫している。そのため、トウモロコシをはじめとした飼料原料となる穀物類の価格は高騰し続けていると言える。

このような中で、畜産分野の潜在的ニーズとして、食品廃棄物を活用した、いわゆるエコフィードへの期待は大きい。エコフィードの取り組みには大きくわけて二通りのタイプ、すなわち、乾燥飼料化と発酵飼料化の取り組みがあるが、前者では多大な燃料が必要であることが問題となっている。後者では燃料費が必要なく、微生物の発酵を利用しているため、環境に優しい技術と言える。しかしながら、従来型の発酵飼料を生産者に導入する上での問題点は、生産者側の経済的な側面としては、畜舎全体の改造を伴う発酵飼料特有の給餌機器が必要となる点であった。また、技術的な側面としては、発酵物の不安定さゆえ、安定した品質の飼料が得られにくく、併せて学術的な根拠にも乏しかった点が挙げられる。そのため、生産者は発酵飼料自体に興味は持ちつつも飼料として利用する上での信頼感を獲得するまでには至っていなかった。先進的な畜産家では発酵飼料の導入の動きも見受けられるものの、発酵物の不安定さから一定の効果が得られず、逆に病気の蔓延を招く例もあり、発酵飼料の全国的な普及は難しかったと言える。したがって、多くの生産者は、既存の施設を使用しつつ、栄養学的な見地で十分な実績を有する従来型の飼料に固執せざるを得ず、結果として消化しやすい飼料原料を用いて現場に利用していたと言える。

このような畜産分野を取り巻く情勢を鑑み、本研究グループでは、動物にとって消化の悪い繊維質や糖アルコールなどを含む焼酎粕やトウモロコシの芯（コーンコブ）などの食品系廃棄物や非食用の水産物を原料として、高機能性の発酵飼料を開発することを目的とした。この開発のベースとなった技術は好熱性微生物を活用した高温発酵処理技術である。

本研究の成果として、高品質の発酵飼料を高温発酵工程により製造する技術的な基盤は確立したと言える。

高温発酵工程を利用した飼料化の技術は、発酵飼料の原料中の雑菌の殺菌処理に繋がるのみならず、発酵物の菌相を安定化することが菌相の網羅的解析からも明らかとなった。さらに、発酵飼料中に含有している好熱菌 BP-863（国際寄託番号）は、従来にない機能を有する新菌種であることも判明し、少なくとも畜産分野の動物の成長促進や品質向上に明らかに有効であった。高温発酵飼料の作用機序の一端についても、多くの共同研究者の方々のご助力により明らかになりつつあり、従来の発酵飼料とは一線を画する技術開発ができたと関係者一同が捉えている。

これらの研究成果を生み出す契機となった経済産業省のサポイン事業関係者に感謝申し上げるとともに、今後は当該技術を国内外へ発信し、学術報告のみならず、事業展開に大いに活かし、発展させていく所存である。

## 【参考文献】

- Adami, A., Cavazzoni, V. (1999) Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. J. Basic Microbiol. **39**: 3-9.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Genghong Chen, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. and Honda, K. (2011) Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species, Science **331**: 337-341
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 979-984.
- Cavazzoni V, Adami A & Castrovilli C (1998) Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. Br. Poult. Sci. **39**: 526-529.
- Chin, N.W., Trela, J.M. (1973) Comparison of acetohydroxy-acid synthetases from two extreme thermophilic bacteria. J. Bacteriol. **114**: 674-678.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., De Vos, P. (2004) Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. System. Appl. Microbiol. **27**: 50-60.
- DiDonato, L.N., Sullivan, S.A., Methé, B.A., Nevin, K.P., England, R., Loveley, D.R. (2006) Role of Rel<sub>Gsu</sub> in stress response and Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. J. Bacteriol. **188**: 8469-8478.
- Flores-Morales, A., Greenhalgh, C.J., Norstedt, G., Rico-Bautista, E. (2006) Negative regulation of growth hormone receptor signaling. Mol. Endocrinol. **20**: 241-253
- Greenhalgh, C.J., Bertolino, P., Asa, S.L., Metcalf, D., Corbin, J.E., Adams, T.E., Davy, H.W., Nicola, N.A., Hilton, D.J., Alexander, W.S. (2002) Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). Mol. Endocrinol. **16**: 1394-1406
- Grossman, A.D., Losick, R. (1988) Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 4369-4373.
- Johnson, J.L. (1984) Nucleic acids in bacterial classification. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. **1**: 8-11.
- Kim, Y.G., Choi, D.H., Hyun, S., Cho, B.C. (2007) *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 409-413.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoehr, J.P., Lan, H., Kendzierski, C.M., Yandell, B.S., Yang Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M., Attie, A.D. (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase function protects mice against adiposity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 11482-11486.

Purohit, M., Sassi-Gaha, S., Rest, R.F. (2010) Rapid sporulation of *Bacillus anthracis* in a high iron, glucose-free medium. *J. Microbiol. Methods* **82**: 282-287.

Rico-Bautista, E., Greenhalgh, C.J., Tollet-Egnell, P., Hilton, D.J., Alexander, W.S., Norstedt, G., Flores-Morales, A. (2005) Suppressor of cytokine signaling-2 deficiency induces molecular and metabolic changes that partially overlap with growth hormone-dependent effects. *Mol. Endocrinol.* **19**: 781-793.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Luis G. Bermúdez-Humarán, Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 16731-16736.

Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Calvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., Gewirtz, A.T. (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* **328**: 228-231.

完全版 マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック 羊土社

食の官能評価入門 大越ひろ・神宮英夫編著 光生館