

麴の醸造外利用に関する研究

—特に機能性飼料および機能性食品としての利用—

日置久美子

2015 年

目次

麴の醸造外利用に関する研究 ー特に機能性飼料および機能性食品としての利用ー

| | |
|---|----|
| 第一章 緒論 | 1 |
| 第二章 黒麴・乳酸菌飼料給与によるブロイラーの生産性向上 | |
| 緒言 | 6 |
| 第一節 黒麴・乳酸菌飼料の調製ならびにブロイラーの生産性に対する効果 | |
| 2.1.1. 目的 | 7 |
| 2.1.2. 材料および方法 | 7 |
| 2.1.3. 結果および考察 | 13 |
| 第二節 黒麴給与によるブロイラーの盲腸内短鎖脂肪酸の変動 | |
| 2.2.1. 目的 | 21 |
| 2.2.2. 材料および方法 | 22 |
| 2.2.3. 結果および考察 | 23 |
| 2.3 小括 | 26 |
| 第三章 黒麴給与による肥育豚の生産性向上 | |
| 3.1. 緒言 | 33 |
| 3.2. 材料および方法 | 34 |
| 3.3. 結果および考察 | 40 |
| 3.4. 小括 | 45 |
| 第四章 黒麴給与によるラットの脂質代謝変動 ーサプリメントとしての黒麴の可能性ー | |
| 4.1. 緒言 | 55 |
| 4.2. 材料および方法 | 57 |
| 4.3. 結果および考察 | 63 |
| 4.4. 小括 | 66 |

| | | |
|--------|-------|----|
| 第五章 総括 | ----- | 77 |
| 謝辞 | ----- | 81 |
| 文献 | ----- | 82 |

第一章 緒論

1. 食糧問題と畜産

世界的に穀物需要量が増加する一方で、穀物生産は近年地球規模で発生している異常気象による干ばつ、水害による大きな被害を受け、穀類の生産量は変動を繰り返している。2003年以降、穀物の在庫量は減少に転じ、穀物の在庫は安全在庫水準である17～18%前後で低迷している(農水省, 2008)。一方、世界人口は増加の一途を辿り、2010年では69億1618万人に上った(United nations, 2015)。人口の増加は特に発展途上国で著しく、国連の予想によると2050年までに96億人に達するとされている(United nations, 2015)。

このように穀物の需要が高まる中、さらに打撃を与えているのが畜産物消費の拡大である。特に人口の多いアジア地域では経済の発展が目覚ましく、これに伴い飼料穀物の需要が急増している(FAO, 2013)。一般に畜産物1kgを生産するために必要な穀物は、とうもろこしに換算して鶏卵で3kg、鶏肉で4kg、豚肉で7kg、牛肉で11kgであると言われている(農林水産省, 2008)。2013年に生産された穀物は23億トンであるが、このうち10億トンは食用として、7億5,000万トンは家畜飼料として消費され、残りは工業用や種子用として利用された(FAO, 2013)。

また、わが国は飼料の多くを輸入に頼っており、飼料自給率は牧草等の粗飼料で76%、

濃厚飼料で 12%に過ぎない(農林水産省 2014a). 飼料費が畜産経営に占める割合は高く, 濃厚飼料中心の豚・鶏では 6~7 割であり, 農家の経営を圧迫している(農林水産省 2014b). このため, 飼料自給率を向上させ飼料効率を改善する飼料の開発が喫緊の課題となっている.

2. 飢餓と飽食の併存

全世界でほぼ 8 億 7,000 万人, 世界人口の 12.5%が栄養不良の状況にあるが, (FAO, 2013) 一方で, 肥満者の数は増加し続けている. 2013 年の世界の成人の過体重・肥満の数は 21 億人に上り, 世界人口の 30%であったことが判明した(The Institute for Health Metrics and Evaluation, 2014). 日本においても, 肥満者(BMI \geq 25)の割合は, 男性 29.1%, 女性 19.4%であり(厚生労働省, 2013), 肥満に起因する疾病が急増している. 肥満は, メタボリックシンドロームにおいて最も重要となる病態である. 特に内臓脂肪型肥満は, 門脈の遊離脂肪酸および VLDL-TAG レベルの上昇を介して肝臓での脂肪合成を促進すると言われている(Kurihara ら, 1998). また, 脂肪細胞から誘導された炎症性アディポサイトカインがインスリン抵抗性を高め, 糖尿病を引き起こすと考えられている(Nagao ら, 2008). 肥満の原因は運動不足や過栄養によるエネルギー収支のアンバランスであるが, 脂質代謝を改善する機能性成分に関する研究が活発に行われている. 茶に含まれるカテキンやトウガ

ラシに含まれるカプシノイドは、脂肪酸の β 酸化の増進や脂肪酸合成の抑制を介して血中および肝臓中の脂質濃度を下げること(Murase ら, 2002, Raederstorff ら, 2003, Tani ら, 2004)が知られている。また、不飽和脂肪酸のうち、特に n-3 系脂肪酸は、肝臓での脂質合成を抑制するため、循環器系疾患を抑制する上で重要な役割を担っている(Simopoulos, 2000, Williams, 1999)。黒麹は動物体内での飽和脂肪酸を減少させ不飽和脂肪酸を増加させるため(Saleh ら, 2011)、脂質代謝を改善し循環器系疾患を抑制する効果的なサプリメントになるのではないかと期待される。

3. 麹の利用

麹は、わが国で千年以上前から多くの発酵食品の醸造に用いられてきた。麹は米、麦などの穀類に麹菌を繁殖させたものであり、麹に含まれるアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼをはじめ多くの酵素は味噌、醤油などの伝統的な発酵食品製造の根幹をなしている。主要な麹菌は、黄麹菌である *Aspergillus oryzae* および *Aspergillus sojae*、白麹菌である *Aspergillus kawachii* および黒麹菌である *Aspergillus luchuensis* であるが、この中の白麹菌と黒麹菌はクエン酸を生成することを利用し、暖地における蒸留酒製造に用いられている。しかし、麹の用途の多くは醸造に限定され、家畜飼料やサプリメントとして麹を積極的に利用しようとする試みはほとんどなされてこなかった。

近年、家畜の生産性を改善する目的で、抗生物質に代わり生菌剤が広く用いられている。生菌剤の多くは、乳酸菌、酪酸菌、枯草菌等の消化管内の環境を整える作用のあるプロバイオティクスであるが、アジア諸国で古くから醸造に用いられている麹菌も有用な微生物であり、家畜の健康および成長に寄与すると期待される。筆者らのグループは、鹿児島大学との共同研究により、麹の醸造以外の利用に着目し家畜やヒトに対する有益な効果について研究を続けてきた。これまでに微量の黒麹給与が飼料の消化率を高め、生産性を改善することが分かってきた(Saleh ら 2011, 2012)。また、麹菌による発酵の過程で成長促進因子であるブトキシブチルアルコール(BBA)が生産される可能性があること(Saleh ら 2011)、並びに、BBA は筋肉タンパク質の分解を抑制し、ブロイラーの成長を促進すること(Kamizono ら 2014)も分かっている。さらに筋肉および肝臓での飽和脂肪酸が減少し、不飽和脂肪酸が増加することも分かっている(Saleh ら, 2011, 2012, 2013)。しかし、麹給与によりどのような機構で家畜の成長が促進されるのか未だ不明な点も多い上、これらの報告は主にブロイラーに限られており、豚についての報告はまだない。

本論文では、まず第二章でブロイラーに黒麹を固形の麹または乳酸菌との共培養液として給与し、給与形態の異なる黒麹が生産性に及ぼす影響について調査した。また、黒麹が腸内環境に与える影響を通して、黒麹の作用機序の解明を試みた。次いで、第三章で肥育豚に黒麹および黒麹を使用したリキッドフィード(LF)を給与し、生産性および肉質に及ぼす影響について調べた。最後に第四章で、黒麹がラットの脂質代謝に及ぼす影響について

調べ、サプリメントとしての可能性について検討した。

なお、主に沖縄県で製造される蒸留酒である泡盛に使用されている黒麹は、*Aspergillus awamori*, *A. luchuensis*, *A. acidus*などの総称であるが、*A. awamori*とされている種の中には、黒麹とは異なり *A. niger* の近縁種でマイコトキシンを産生する種が存在することが分かり(Hong ら 2013), 正確な分類が求められてきた。Hong ら(2013)は、著者らが用いている黒麹は分類学的に *A. luchuensis* に属することを明らかにしている。そこで本報においては、これまで誤用してきた *A. awamori* を改め、正しく、*A. luchuensis* の呼称を使用することとした。*A. luchuensis* はマイコトキシンを産生しないことが明らかにされている(Susca ら 2014, Yamada ら 2011, Hong ら 2013)。

第二章 黒麹・乳酸菌飼料によるブロイラーの生産性向上

緒言

黒麹はブロイラーの成長を促進するが(Saleh ら 2011, 2012), 乳酸菌も家畜の生産性を高めることが報告されている (Jin ら 1997, 1998, Mountzoruris ら 2007). 黒麹はその酵素により穀類からオリゴ糖やアミノ酸等の乳酸菌の生育に欠かせない成分を生成するので、乳酸菌の生育を促進すると予想される.

消化器官内には極めて多くの種類の乳酸菌が生育しており、宿主の健康に及ぼす効果は菌種により異なると考えられるが、*Lactobacillus casei* は、ブロイラーに対して優れた増体効果を有すると報告されており(Yeo ら, 1997), 胃酸(pH3.0)にも耐性を示すので(小林ら 1974, Mishra ら 2005), 黒麹とともに給与すると麹の成長促進効果が増強されると期待される.

本章では、第一節で黒麹と *L. casei* の混合液体培養法について検討した後、この方法を用いて調製した黒麹・乳酸菌飼料をブロイラーに与え生産性に対する効果を調べた. 次いで第二節で黒麹および黒麹・乳酸菌飼料が消化管内容物中の生菌数および有機酸濃度に及ぼす影響を調べた.

第一節 黒麹・乳酸菌飼料の調製ならびにブロイラーの生産性に対する効果

2.1.1. 目的

麹に含まれるアミラーゼ，プロテアーゼは，飼料の原料である穀類中のデンプンやタンパク質を分解し，乳酸菌等の他の有益な微生物の生育を促進すると考えられる．このため，黒麹と *L. casei* を混合培養することで，より多くの乳酸菌が生育し，高い成長促進効果を持つ飼料ができると期待される．本節では，まず実験 1 で黒麹と *L. casei* を共培養した飼料(黒麹・乳酸菌飼料)を調製し，pH および乳酸菌数について乳酸菌単独を培養して調製した飼料と比較した．次いで，実験 2 では，黒麹・乳酸菌飼料をブロイラーに給与し，生産性に及ぼす影響について調べた．

2.1.2. 材料および方法

実験 1 黒麹，乳酸菌飼料および黒麹乳酸菌共培養飼料(黒麹・乳酸菌飼料)の調製

1) 黒麹の調製

黒麹は、飼料米を浸漬、水切り後、60分蒸した後冷却し、黒麹菌(*A.luchuensis*, 株式会社河内源一郎商店, 鹿児島県鹿児島市)0.1%を添加して小型の自動製麹装置(株式会社河内源一郎商店, 鹿児島県鹿児島市)に入れ、33~38℃で5日間発酵して調製した。培養開始時の黒麹孢子数は、黒麹飼料調製開始時の飼料1g当り 2.0×10^6 個であった。

2) 乳酸菌飼料の調製

乳酸菌飼料は、飼料米に水分99%になるよう加水し、95℃で60分殺菌し、30℃まで冷却した後、乳酸菌(*L. casei* JCM 1134^T, 独立行政法人 理化学研究所 バイオリソースセンター, 茨城県)培養液0.1%を添加し、30℃で72時間静置培養した。培養開始時の乳酸菌数は、培養液1ml当り 1.2×10^6 cfu であった。

3) 黒麹・乳酸菌飼料の調製

黒麹・乳酸菌飼料は、上記に準じて飼料米を殺菌、冷却し、種菌として上記乳酸菌に加え、前述の黒麹菌0.1%を添加し培養した。培養開始時の乳酸菌数は培養液1ml当り 1.2×10^6 cfu, 黒麹菌孢子数は培養液1ml当り 2.0×10^6 個であった。

4) 分析

① 乳酸菌飼料および黒麹・乳酸菌飼料中の pH および乳酸菌数の測定

乳酸菌飼料および黒麹・乳酸菌飼料中の pH は、pH メーター(株式会社堀場製作所，京都府)で測定した。乳酸菌数は、乳および乳製品の成分規格等に関する省令第 52 号(厚生労働省，1951)に準じて測定した。すなわち，飼料 1ml に滅菌生理食塩水 9ml を添加し，10 倍ずつ段階的に希釈して，各希釈液につき 2 枚のシャーレを用い，1ml ずつを取り，ブロモクレゾールパープル(BCP)加プレートカウント寒天培地を加えて混合し，37℃で 72 時間好気培養した。生じたコロニーをカウントし，1 平板の乳酸菌のコロニー数が 30 個から 300 個までのものを平均して乳酸菌数とした。

② 黒麹の pH，酵素活性および孢子数の測定

pH は，黒麹に 5 倍量のイオン交換水を添加して室温(15-20℃)で 3 時間抽出したろ液を pH メーター(株式会社堀場製作所，京都府)で測定した。酸性プロテアーゼ活性は，国税庁所定分析法注解(日本醸造協会 2003)に従って測定した。すなわち，黒麹に 5 倍量の 0.1 M 酢酸緩衝液(pH5.0，塩化ナトリウム 0.5%を含む)を加え，室温(15-20℃)で 3 時間抽出して

麴抽出液を得た。次いでカゼインを基質とし、pH3.0 において 40℃で 60 分反応させ、Folin-Ciocalteu 試薬を添加して発色させ、660 nm における吸光度を測定し、60 分間に 1 μ g のチロシン相当量の呈色を示す活性を 1U とした。キシラナーゼ活性は、山本ら(山本ら 1981)の方法に準じ、上記抽出液をキシランを基質として pH5.5 において 40℃で 60 分間反応させ、生じた還元糖を Somogyi-Nelson 法にて定量し、60 分間に 1mg のキシロース相当量の還元糖を生成する活性を 1U とした。また、アミラーゼ活性は微生物遺伝資源利用マニュアル(16)(独立行政法人農業生物資源研究所 2004)に準じ、デンプンを基質とし、pH3.7 において 40℃で 60 分間反応させた後、還元糖を定量し、60 分間に 1mg のグルコース相当量の還元糖を生成する活性を 1U とした。孢子数は、麴を 0.1%Tween80 溶液で抽出し、Thoma 血球計算盤にて計測した。

③ 黒麴・乳酸菌飼料の酵素活性、生菌数および有機酸濃度の測定

黒麴・乳酸菌飼料の酵素活性は、黒麴と同様にして測定した。糸状菌数および大腸菌群は、乳酸菌数と同様に希釈して、各希釈液につき 2 枚のシャーレを用い、1ml ずつを取り、糸状菌数はポテトデキストロース寒天培地を加えて混合し、30℃で 72 時間培養し、大腸菌群はデソキシコレート寒天培地を加えて混合し、37℃で 18 時間培養した。生じた生菌のコロニーをカウントし、1 平板の生菌のコロニー数が 30 個から 300 個までのものを平均して

糸状菌数または大腸菌群数とした。有機酸含量は、動物栄養試験法(石橋晃監修 2001)に準じて測定した。飼料 10ml にイオン交換樹脂(Amberlite IR-120H)1ml を加え振とうし、上澄み液を遠心分離して上清を 0.45 μ m をフィルターでろ過した。このろ液を高速液体クロマトグラフ(株式会社島津製作所, 京都)を用いて分離, ブロモチモールブルーによりポストカラム法にて発色させ, 波長 445nm の吸光度を測定した。使用したカラムは Shodex Ionpak C-811(8 \times 300 mm, 昭和電工株式会社, 東京), 移動相は 3mM 過塩素酸溶液, 発色試薬は 0.2mM ブロモチモールブルー/8mM リン酸水素二ナトリウム/2mM 水酸化ナトリウム溶液, 流速は 1.5ml/分, カラム温度は 60 $^{\circ}$ Cとした。

実験 2 黒麹・乳酸菌飼料がブロイラーの生産性に及ぼす影響

1) 飼料分析

飼料の粗タンパク質は、セミマイクロケルダール法で定量した窒素量に 6.25 を乗じて求めた。総エネルギーは、ボンブカロリーメーター(O.S.K 150, 小川サンプリング株式会社, 埼玉県)を用いて測定した。

2) 動物実験

供試動物として、鹿児島くみあいチキンフーズ株式会社より供与されたチャンキー種初生雛 50羽(雄 25羽, 雌 25羽)を用いた。基礎飼料(ブロイラー前期用標準飼料, 日本科学飼料協会, CP 21.8%, ME 3.10Mcal/kg)で1週間予備飼育した後, 体重の近い雌雄各 18羽を選抜し, 平均体重および標準偏差が出来るだけ等しくなるように3区に分けた。

黒麹飼料区には, 基礎飼料に 0.04%の黒麹を添加したものを, 黒麹・乳酸菌飼料区には, 基礎飼料に基礎飼料の 1.2倍量(乾物換算 1%)の黒麹・乳酸菌飼料を添加したものを与えた。

雌雄各 1羽ずつを組にしてケージに入れ, 飼料および水は自由摂取とし, 反復を 6として 16日間飼育した。体重は 4日毎に飼料摂取量は毎日測定し, 乾物摂取量基準飼料要求率を算出した。

3) 統計処理

各区のデータは, 平均値±標準偏差で表示した。統計解析は, 一元配置分散分析後に Tukeyの多重比較検定を行い, 5%水準の差を有意とした。

2.1.3. 結果および考察

実験 1

飼料米を原料として黒麹菌と乳酸菌を共培養し多量の乳酸菌を含有する試料(黒麹・乳酸菌飼料)の調製を試みた。乳酸菌飼料および黒麹・乳酸菌飼料の pH および乳酸菌数を表 2-1 に示した。pH は、乳酸菌飼料が 4.44 であり、黒麹乳酸菌飼料が 3.70 であった。また、飼料 1ml 当たりの乳酸菌数は、乳酸菌飼料が 2.9×10^7 cfu であり、黒麹・乳酸菌飼料が 2.6×10^9 cfu であった。以上のことから、黒麹は乳酸菌の生育を促進することが示された。一方、乳酸菌のみの培養では、pH が十分低下せず、乳酸菌数も黒麹・乳酸菌飼料より劣ることが分かった。

実験 2

表 2-2 に供試黒麹の pH, 酵素活性および孢子数を、表 2-3 に黒麹・乳酸菌飼料の酵素活性、生菌数および有機酸濃度を示した。黒麹は、酸性プロテアーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼを含み、1g 当たりの孢子数は 9.2×10^8 個であった。黒麹・乳酸菌飼料からは 1ml 当たり 6,000 個の糸状菌が検出された。乳酸菌は 1ml 中に 2.6×10^9 個検出され、大腸菌群

は検出されなかった。また、酵素力価はほとんど検出されなかった。

表 2-4 に実験 2 における供試飼料の組成と成分を示した。各飼料の乾物当たりの粗タンパク含量および総エネルギーはほぼ同等であった。

表 2-5 に黒麹および黒麹・乳酸菌飼料給与がブロイラーの体重、増体量、乾物飼料摂取量および乾物摂取量基準飼料要求率に及ぼす影響を示した。増体量は、有意ではないが対照区に対し黒麹・乳酸菌飼料で 16%向上した($p=0.064$)。乾物飼料摂取量は、黒麹・乳酸菌飼料区で対照区および黒麹飼料区に比べ有意に増加した。乾物摂取量基準飼料要求率は、各区で差はなかった。

黒麹は、アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼやキシラナーゼ活性を持ち、飼料中のタンパク質およびエネルギーの消化を促進する(Hajati ら 2010)。また、著者らは、ブロイラー($n=6$)に黒麹 0.04%を添加した飼料を与え、配合飼料を給与した区(対照区)と盲腸内容物の BBA 濃度を比較したところ、対照区の盲腸内容物からは BBA は検出されず、黒麹区からは 4.53 の BBA が検出され、この差は有意であったことを確認している(未発表)。

すでに述べた通り黒麹・乳酸菌飼料により増体が 16%促進されたが、この増体効果は、麹により消化が促進され、BBA が作られ、また、黒麹の酵素によりオリゴ糖やアミノ酸等の乳酸菌の生育に欠かせない成分が生成され、乳酸菌の生育が一層促進され腸内環境が改善されて宿主の健康増進に寄与したことなど、複数の要因によるものと考えられる。

以上のことから、黒麹と乳酸菌の共発酵により pH が低く、ブロイラーの生産性を向上さ

せる飼料の調製ができることが示された.

表 2-1. 乳酸菌飼料および黒麹・乳酸菌飼料の pH および乳酸菌数

| | pH | 乳酸菌数(cfu/ml) |
|----------|------|-------------------|
| 乳酸菌飼料 | 4.44 | 2.9×10^7 |
| 黒麹・乳酸菌飼料 | 3.70 | 2.6×10^9 |

(日置ら 2015, 表 1 を改変)

表 2-2. 供試黒麹の pH と酵素活性

| pH | 酵素活性 (U/g) | | | 胞子数 (個/g) |
|------|------------|--------|-------|-------------------|
| | 酸性プロテアーゼ | キシラナーゼ | アミラーゼ | |
| 3.14 | 12966 | 6.11 | 299 | 9.2×10^8 |

(日置ら 2015, 表 2 を改変)

表 2-3. 供試黒麹・乳酸菌飼料の酵素活性，生菌数および有機酸濃度

| pH | 酵素活性(U/g) | | | 生菌数(cfu/g) | | | 有機酸濃度(μmol/ml) | | |
|-----|-----------|--------|-------|-------------------|------|-------------------|----------------|-------|----|
| | 酸性プロテアーゼ | キシラナーゼ | アミラーゼ | 糸状菌数 | 大腸菌群 | 乳酸菌 | クエン酸 | 乳酸 | 酢酸 |
| 3.7 | 0.62 | - | 0.01 | 6.0×10^3 | <10 | 2.6×10^9 | 0.54 | 30.75 | - |

(日置ら 2015, 表 3 を改変)

表 2-4.飼料の組成と成分

| | 対照区 | 黒麹区 | 黒麹・乳酸菌飼料区 |
|-------------------------|-------|---------|-----------|
| 配合飼料(g) | 1000 | 1000 | 1000 |
| 黒麹(g) | - | 0.04 | - |
| 黒麹・乳酸菌飼料(g) | - | - | 1200 |
| 合計(g) | 1000 | 1000.04 | 2200 |
| 乾物(g) | 885 | 885 | 892.2 |
| 粗タンパク(乾物当り%) | 24.63 | 24.63 | 24.43 |
| 総エネルギー(乾物 1kg 当たり Mcal) | 5.49 | 5.49 | 5.47 |

(日置ら 2015, 表 4 を改変)

表 2-5.黒麹および黒麹・乳酸菌飼料給与がブロイラーの生産性に及ぼす影響

| | 対照区 | 黒麹区 | 黒麹・乳酸菌飼料区 |
|----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 初体重(g) | 148.2 ± 10.1 | 148.6 ± 9.9 | 147.9 ± 10.1 |
| 終体重(g) | 882.8 ± 80.4 | 908.9 ± 84.3 | 1000.3 ± 87.3 |
| 増体量(g) | 734.7 ± 82.2 | 758.3 ± 81.9 | 852.4 ± 82.5 |
| 乾物飼料摂取量(g/16日) | 940.1 ± 87.2 ^a | 971.2 ± 80.1 ^a | 1091.9 ± 57.8 ^b |
| 乾物摂取量基準飼料要求率 | 1.282 ± 0.029 | 1.284 ± 0.034 | 1.286 ± 0.063 |

異符号間に有意差(p<0.05)あり.

数値は平均値±標準偏差で表した(n=6).

(日置ら 2015, 表 5 を改変)

第二節 黒麹給与によるプロイラーの盲腸内短鎖脂肪酸の変動

2.2.1. 目的

乳酸菌や酪酸菌等の生菌剤は，腸内細菌叢を変化させ，ヒトの健康や家畜の生産性を改善することはよく知られている(Ljungh と Wadstrom 2006, Fuller 1989, Jin ら 1997, 1998, Yang ら 2012). 著者らは，黒麹も生きて下部消化管に到達し，腸内細菌叢を変えエネルギーの代謝に影響を及ぼすのではないかと考えている．乳酸菌や酪酸菌は消化器官内の乳酸，酢酸，酪酸等の有機酸の生成に寄与しており，近年これら短鎖脂肪酸(SCFA)の生成や作用機序に対する関心が高まっている．SCFA は，大腸での上皮細胞の増殖を促進し，消化管の炎症や癌を抑制することや，水やミネラルの吸収を促進することが分かっている(Henningsson ら 2001). さらに近年，SCFA が肝臓でのコレステロール代謝(Chen ら 1984, Hara ら 1999)や，腸内免疫細胞分化(Furusawa ら 2013), 筋肉や肝臓でのエネルギー代謝(Kimura ら 2011, 2013)に関与していることが分かってきた．SCFA は，食物繊維が大腸内で腸内細菌によって発酵されることにより生じる(Henningsson ら 2001). 黒麹はセルラーゼ，キシラナーゼ活性を持つことから，消化管内で食物繊維を分解してオリゴ糖を生成し，その結果，乳酸菌等の増殖を助けて腸内細菌叢を変え，消化管内での SCFA の合成を促進すると期待される．

前節で、黒麹と乳酸菌の共発酵による黒麹・乳酸菌飼料がブロイラーの生産性を向上させることが示されたが、本節では、黒麹・乳酸菌飼料をブロイラーに与え、腸内容物中の生菌数、腸内容物中の有機酸濃度および生産性に対する影響を調べることを目的とした。

2.2.2. 材料および方法

1) 動物実験

前節 - 実験 2 の 2) に準じて行い、試験最終日に解剖し、肝臓および内容物を含む盲腸重量を測定した後、小腸(メッケル憩室から空回腸末端まで)および盲腸は Mathlouthi ら(2002)の方法に準じて -20°C で冷凍保存し、内容物の pH、乳酸菌数、麹菌数および有機酸の測定に供した。

2) 分析

① 盲腸および小腸内容物中の乳酸菌数および糸状菌(黒麹菌)数の測定

麹菌数の指標としての糸状菌数は、腸内容物 1g に滅菌生理食塩水 9ml を添加し、前節 -

実験 1 に準じて測定した。乳酸菌数は、Jin ら(1996)の方法に従い、腸内容物 1g に滅菌生理食塩水 9ml を添加し、前節 - 実験 1 に準じて測定した。

② 盲腸および小腸内容物中の有機酸濃度

盲腸および小腸内容物中の有機酸濃度は、イオン交換水で抽出した抽出液 10ml を黒麹・乳酸菌飼料と同様に処理、ろ液を得た。このろ液を前節 - 実験 1 に準じて測定した。

3) 統計処理

各区のデータは、前節 - 実験 1 の 3) に準じて統計処理を行い、5%水準の差を有意とした。

2.2.3. 結果及び考察

図 2-1 に小腸内容物中の生菌数を示した。乳酸菌数は、対照区に比べ黒麹・乳酸菌飼料区において増加する傾向にあった($p=0.098$)。糸状菌数は、黒麹飼料区で黒麹・乳酸菌飼料区に比べ増加する傾向を示した($p=0.053$)。

図 2-2 に盲腸内容物中の生菌数を示した。乳酸菌数は、黒麹飼料区でやや増加したが、黒

麴・乳酸菌飼料区ではさらにその数が増加し、対照区に比べ有意な差となった。糸状菌数は、対照区に比べ黒麴・乳酸菌飼料区および黒麴区で有意に増加した。消化管内容物から検出された糸状菌は、すべて黒い分生子を形成しており、形態から黒麴菌であると類推された。このことから、麴菌はブロイラーの下部消化管内で生存できることが示された。しかし、小腸における麴菌数および乳酸菌数に対する効果は明瞭でなかった。これは、小腸が消化と吸収を行なう場である上、内容物の滞留時間が短いためであると考えられる。

鶏回腸内細菌叢の構成は、*Lactobacillus* が圧倒的に優勢であり、*Bifidobacterium*、*Clostridium* などは通常検出されない(光岡ら 1991)。一方、盲腸では偏性嫌気性菌が最優勢となり、総菌数も最大となる。本実験においても、乳酸菌数は全ての区で小腸よりも盲腸内で増加した。本実験では、乳酸菌の培地として、*Bifidobacterium* 属が生育できない BCP 加プレートカウント寒天培地を用いた。したがって、ここで検出された乳酸菌の大半は、この培地で良好に生育するとされる *Lactobacillus* 属や *Streptococcus* 属(荻原ら 1983)であった可能性が高い。

小腸内容物中の有機酸濃度を図 2-3 に示した。プロピオン酸および酪酸は検出されなかったものの、クエン酸、乳酸および酢酸を合わせた総有機酸の濃度は、黒麴区で対照区よりも高くなる傾向にあり($p=0.066$)、黒麴・乳酸菌飼料区で有意に高くなった。

図 2-4 に盲腸内容物中のクエン酸、乳酸および SCFA 濃度を示した。黒麴飼料区で盲腸内容物中の有機酸はわずかに増加した。クエン酸、乳酸、酢酸およびプロピオン酸濃度は、

黒麹・乳酸菌飼料区で対照区に比べ有意に上昇し、酪酸濃度は、上昇する傾向にあった (p=0.079)。総有機酸濃度は、黒麹・乳酸菌飼料区で有意に上昇した。

小腸内容物中の総有機酸濃度は黒麹・乳酸菌飼料により有意に上昇したが、プロピオン酸および酪酸は検出されなかった。このことは、小腸で生育する細菌が主に SCFA を生成しない通性嫌気性菌であるとの報告(光岡ら 1991)と符合する。一方、黒麹・乳酸菌飼料給与により盲腸内容物中のクエン酸、乳酸、酢酸およびプロピオン酸濃度は有意に上昇し、酪酸濃度は増加する傾向を示し、総有機酸濃度も有意に上昇した。ヒトにおいて、乳酸は腸内細菌により発酵され主に酪酸になると言われているが(Bourriaud ら 2005)、ブロイラーの腸内でも同様のことが起こっている可能性が高い。麹は乳酸菌を増加させる可能性があることから、盲腸内で乳酸の生成が促進され、その結果、乳酸利用性細菌が増加し、盲腸内での SCFA 合成が促進される可能性が考えられる。

消化管内で生産された SCFA の 90%以上が吸収されると言われている(Henningsson ら 2001,坂田ら 1994)ので、前節で認められた麹・乳酸菌飼料による増体効果は、麹による消化促進および BBA の合成に加え、麹が下部消化管においてオリゴ糖から SCFA 生成を促進し免疫機能を亢進するなど健康増進効果を示した可能性がある。また、食物繊維由来の SCFA 自身がエネルギー源となったことも一因であると考えられる。

黒麹飼料区においても増体をはじめ消化管内容物の有機酸濃度などほとんど全ての項目において黒麹・乳酸菌飼料区と同様の効果が認められたが、黒麹・乳酸菌飼料に比べ効果

が劣った。これは、乳酸菌数の違いに加え、黒麹区と黒麹・乳酸菌飼料区とでは消化管内の乳酸菌の構成が異なったことによるものと推測される。

以上のことから、黒麹・乳酸菌飼料は腸内容物中の乳酸菌数および有機酸濃度を高めることが示唆された。

2.3 小括

本章では、まず飼料米を原料として黒麹菌と乳酸菌を共培養し多量の乳酸菌を含有する試料(黒麹・乳酸菌飼料)の調製を試みた。その結果、乳酸菌のみの培養に比べ pH が低く、乳酸菌が十分生育した良好な飼料を調製できた。

次いで、黒麹・乳酸菌飼料が、ブロイラーの生産性および消化管内容物中の生菌数、消化管内容物中の有機酸濃度に及ぼす影響を調べた。チャンキー種雌雄各 18 羽を用い、雌雄各 1 羽を 1 組とし、各区 6 組となるよう 3 区に分けた。対照区には基礎飼料(ブロイラー前期用飼料, 社団法人日本科学飼料協会, 東京都)を、黒麹区には基礎飼料に黒麹 0.04% を添加したものを、黒麹・乳酸菌飼料区には基礎飼料に黒麹・乳酸菌飼料を乾物換算で 1% 添加したものを与えた。その結果、増体量は対照区に対し黒麹・乳酸菌飼料区で 16% 向上した($p=0.064$)。小腸内容物中の乳酸菌数は、対照区に比べ黒麹・乳酸菌飼料区において増加

する傾向にあった($p=0.098$). 盲腸内容物中の乳酸菌数は, 対照区に比べ黒麴・乳酸菌飼料区で有意に増加, 麹菌数は黒麴・乳酸菌飼料区および黒麴区で有意に増加した. 小腸内容物中の有機酸濃度は, プロピオン酸および酪酸は検出されなかったものの, クエン酸, 乳酸および酢酸を合わせた総酸の濃度は, 黒麴区で対照区よりも高くなる傾向にあり($p=0.066$), 黒麴・乳酸菌飼料区で有意に高くなった. 盲腸内容物中のクエン酸, 乳酸, 酢酸およびプロピオン酸濃度は, 黒麴・乳酸菌飼料区が対照区に比べ有意に高く, 酪酸濃度も上昇する傾向にあった($p=0.079$). 総有機酸濃度は, 黒麴・乳酸菌飼料区で有意に上昇した. 以上の結果より, 黒麴・乳酸菌飼料は消化管内容物中の乳酸菌数を増加させて有機酸濃度を高めることで, ブロイラーの生産性向上につながることを示唆された.

表 2-6.黒麹および黒麹・乳酸菌飼料給与がブロイラーの内容物を含む消化管重量および内容物の pH に及ぼす影響

| | 対照区 | | | 黒麹区 | | | 黒麹・乳酸菌飼料区 | | | | | |
|----------------------|------|---|------|--------------|------|------|-----------|--------------|------|---|------|---------------|
| 内容物を含む盲腸重量(g/100gBW) | 8.00 | ± | 1.21 | 7.94 | ± | 2.84 | 8.38 | ± | 1.82 | | | |
| 盲腸内容物 pH | 6.12 | ± | 0.20 | 6.20 | ± | 0.22 | 5.94 | ± | 0.39 | | | |
| 小腸内容物 pH | 7.11 | ± | 0.21 | ^a | 6.55 | ± | 0.24 | ^b | 6.83 | ± | 0.41 | ^{ab} |

(日置ら 2015, 表 5 を改変)

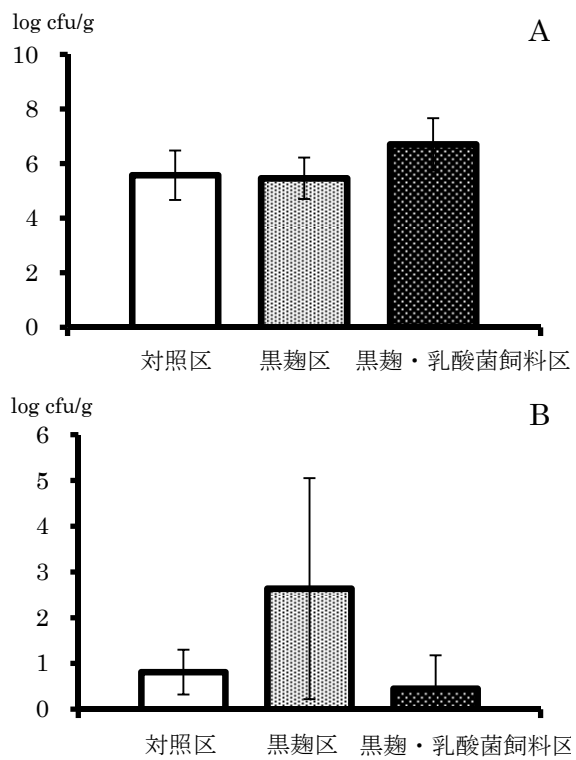


図 2-1.小腸内容物中の生菌数

A: 乳酸菌数, B: 糸状菌数

誤差バーは標準偏差を示す.

(日置ら 2015, 図 1 を転載)

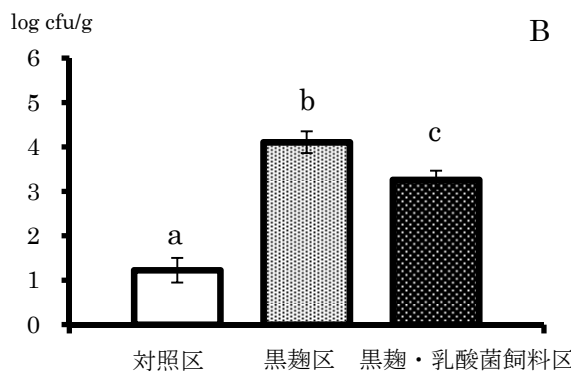
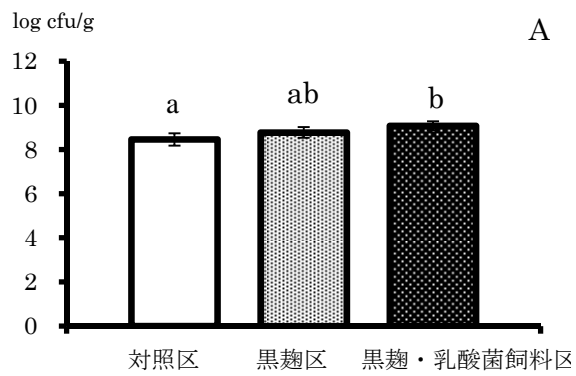


図 2-2.盲腸内容物中の生菌数

A:乳酸菌数, B:麹菌数

異符号間に有意差($p < 0.05$)あり.

誤差バーは標準偏差を示す.

(日置ら 2015, 図 2 を転載)

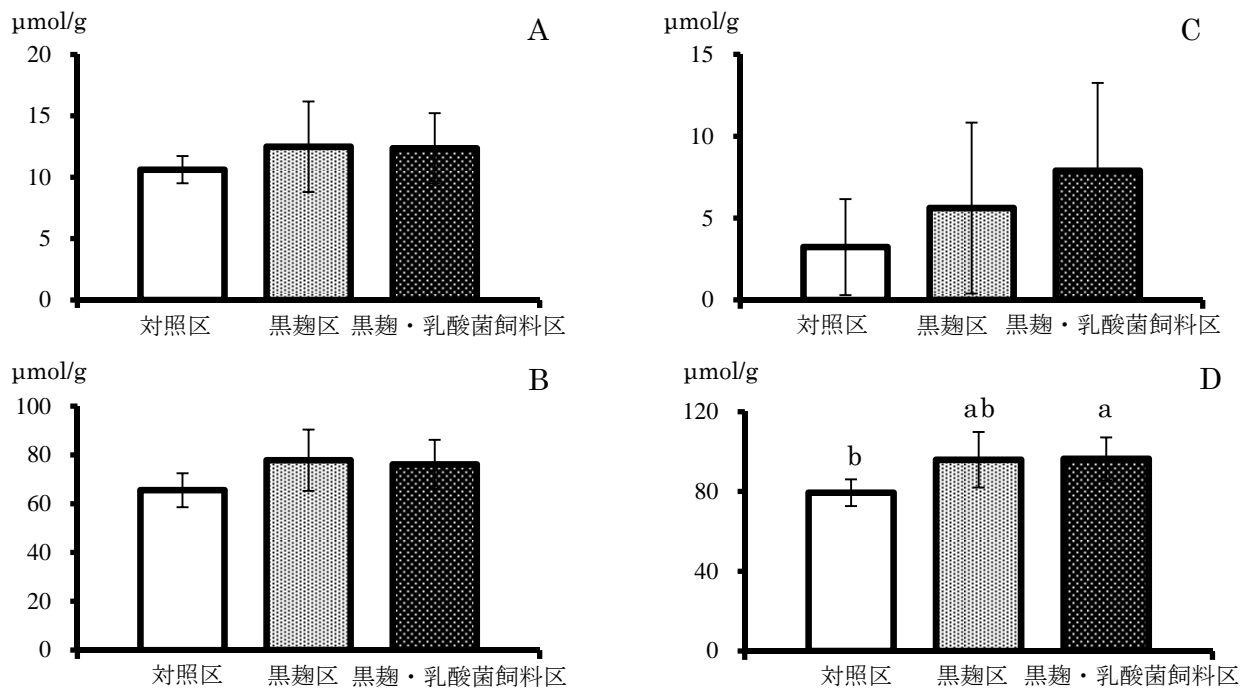


図 2-3.小腸内容物中の有機酸濃度

A:クエン酸, B:乳酸, C:酢酸, D:総有機酸(クエン酸, 乳酸および酢酸の合計)

異符号間に有意差($p < 0.05$)あり.

誤差バーは標準偏差を示す.

(日置ら 2015, 図 3 を転載)

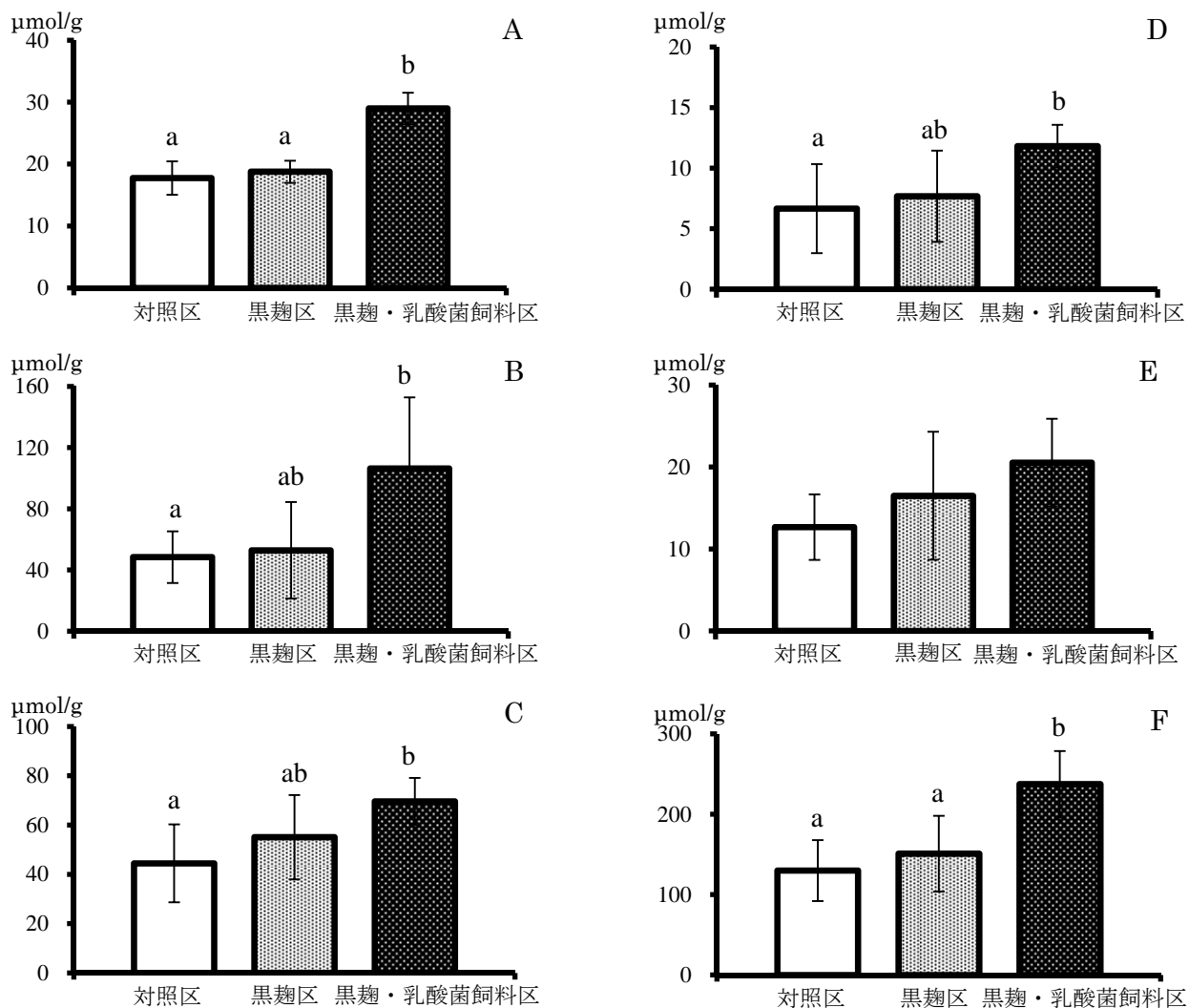


図 2-4.盲腸内容物中の有機酸濃度

A:クエン酸, B:乳酸, C:酢酸, D:プロピオン酸, E:酪酸,

F:総有機酸(クエン酸, 乳酸, 酢酸, プロピオン酸および酪酸の合計)

異符号間に有意差(p<0.05)あり.

誤差バーは標準偏差を示す.

(日置ら 2015, 図 4 より転載)

第三章 黒麹給与による肥育豚の生産性向上

3.1. 緒言

前章で、黒麹はブロイラーの生産性を向上させ、黒麹と乳酸菌の共発酵飼料である液体培養飼料はさらに高い効果を発揮することを述べた。養豚において欧州諸国では生産性を向上させるため、リキッドフィード(LF)の使用が一般的になっている。LFは、肥育効果の向上、パイプラインでの給与による省力化、粉じんによる呼吸器病の低減などを通じて生産性の高い養豚生産を実現することを可能にする技術である(社団法人畜産技術協会 2003)。また、この技術により高水分含量の食品残さ等の利用が容易になり、飼料自給率の向上に寄与することが期待されている(社団法人畜産技術協会 2003)。黒麹はデンプンやタンパク質など各種栄養素を分解し、さらにクエン酸を作り発酵産物のpHを低下させるためLF調製に応用できるのではないかと期待される。また、飼料用黒麹の原料として飼料米を用いることで、飼料米の有効利用にもつながる。本章では、黒麹を利用して栄養価の高いLFを作り、また、黒麹および黒麹LF給与により肥育豚の生産性向上を図ることを目的とした。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 飼料調製

実験 1

基礎飼料として、市販肉豚肥育用配合飼料(西日本くみあい飼料株式会社, 鹿児島県鹿児島市)を用い, 試験区の飼料には黒麹を 0.05%あるいは 0.1%を添加した。黒麹は, 前章, 第一節に準じて調製した。表 3-1 に供試黒麹の品質を示した。黒麹添加後の飼料中の孢子数は, 黒麹 0.05%区で 1.05×10^6 個/g, 黒麹 0.1%区で 2.1×10^6 個/g であった。

実験 2

基礎飼料としては市販肉豚肥育用配合飼料(日清丸紅飼料株式会社, 鹿児島県鹿児島市)を用い, 試験区の飼料は乾物に換算して基礎飼料の 20%あるいは 40%を LF で代替し, 総エネルギーおよび粗タンパク質給与量が基礎飼料と同等になるよう, 圧ぺんとうもろこし, アルファルファミールおよび大豆粕を用いて調整した。LF の調製法は以下の通りである。鹿児島県霧島市内のレストランから排出された食品残さ 1,200 kg を 4,500 L 容のタンク内で水分 85%となるよう加水し, 95°C で 60 分殺菌し, 30°C まで冷却した後, 黒麹菌 0.1%を添加し, 30°C で 24 時間通気培養した。試験期間中の飼料摂取量を表 3-3 に, 完成した LF

の品質を表 3-2 に示した.

実験 3

基礎飼料としては市販肉豚肥育用配合飼料(西日本くみあい飼料株式会社, 鹿児島県鹿児島市)を用い, 試験区の飼料は乾物として基礎飼料の 20%を LF-*Lactobacillus casei*あるいは LF-*Lactobacillus fermentum* で代替し, 実験 2 と同様に総エネルギーおよび粗タンパク質給与量が基礎飼料と同等になるよう調整した. LF の調製法は以下の通りである. 実験 2 と同様にレストラン残さ 600 kg をタンク内で水分 85%となるよう加水し, 糖質を補う目的で LF 全量の 2%の脱脂米ぬかを添加し, 95°Cで 60 分間殺菌した. 30°Cまで冷却し, LF-*L. casei* の場合は黒麹菌 0.1%と乳酸菌培養液(*L. casei*) 0.1%, また LF-*L. fermentum* の場合は黒麹菌 0.1%と乳酸菌培養液(*L. fermentum*)0.1%を添加して, 30°Cで 16 時間通気培養した後, 乳酸発酵を促進する目的で 9 時間静置培養した. 飼料摂取量を表 3-4 に, 完成した LF の品質を表 3-2 に示した.

3.2.2. 動物実験

実験 1

供試豚として, 種豚改良協会(鹿児島県霧島市)で生産された鹿児島バークシャーの去勢雄

18 頭を用いた。1 週間の予備飼育の後，平均体重および標準偏差ができるだけ等しくなるように 6 頭ずつ対照区，黒麹 0.05%区および黒麹 0.1%区に分け，単飼にて 34 日間飼育した。試験開始時の平均日齢は 167 日，平均体重は 83.4 kg であった。飼料は制限給餌とし，水は自由飲水とした。

体重は毎週 1 回測定し，増体量，飼料摂取量および飼料要求率(FCR)を算出した。また，試験最終日に体長として両耳間中央から体上線に沿って尾根までの長さを測定した。屠殺は体重 110 kg を目安として食肉センターで行い，翌日に枝肉重量，背脂肪厚を測定した。ロースは重量および長さを測定した後，第 5，6 胸椎間の肉をビタミン E(α -トコフェロール)含量測定に供した。

実験 2

供試豚として，インターファーム株式会社(宮崎県都城市)で生産された三元交雑種(LW・D)去勢雄 18 頭を用いた。実験 1 に準じて，1 週間の予備飼育の後，6 頭ずつ対照区，黒麹 LF20%区および黒麹 LF40%区に分け 37 日間飼育した。試験開始時の平均日齢は 139 日，平均体重は 71.1 kg であった。また，実験 2 ではロース芯面積および筋肉中チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)含量を測定し，このロースを用いて後述の要領で食味試験を行った。

実験 3

供試豚として、種豚改良協会(鹿児島県霧島市)で生産された鹿児島パークシャーの去勢雄 18頭を用い、実験 2 に準じて、1 週間の予備飼育の後、6 頭ずつ対照区、黒麹 LF(*L. casei*)20% 区および黒麹 LF(*L. fermentum*)20%区に分け、41 日間飼育した。試験開始時の平均日齢は 157 日、平均体重は 74.3 kg であった。

3.2.3. 食味試験

実験 2 の対照区と最も LF の影響が強いと考えられる LF40%区の 2 区について、食味試験を行った。ロース 200 g をフードプロセッサーでミンチ状にし、食塩 1%を添加した後、約 5 g の団子を作り、沸騰水中で 3 分間ボイルした。室温まで冷却した後、24~65 歳の男女 13 人をパネルとし、2 点比較法にて、順序を逆にして 2 回の官能検査(評価数 26)を行った。評価は、香りの良し悪し、食感、多汁性、旨味、風味の好ましさ、脂っぽさ、総合評価の 7 項目について 5 段階(-2, -1, 0, +1, +2)で行った。

3.2.4. 分析

- 1) 黒麹の pH, 酵素活性および孢子数測定

pH は、前章、第二節に準じて測定した。酵素活性は、第一章、第二節と同様にして測定した。胞子数は、黒麹を 0.1% Tween80 溶液で抽出し、Thoma 血球計算盤にて計測した。

2) 黒麹 LF の理化学分析および生菌数

酸度および揮発酸度は、国税庁所定分析法注解(日本醸造協会 2003)に準じて分析した。

すなわち、酸度は、LF ろ液 10 ml を中和するのに必要な 0.1N-NaOH の容量とし、揮発酸度は、ろ液 10 ml を水蒸気蒸留した留液を中和するのに必要な 0.1N-NaOH の容量とした。

生菌数は、黒麹 LF1 ml に滅菌生理食塩水 9ml を添加し、10 倍ずつ段階的に希釈して、1 ml を培地に混釈し、黒麹菌は 30°C で 72 時間、乳酸菌は 37°C で 72 時間、大腸菌群は 37°C で 24 時間培養した後、生じたコロニーをカウントした。黒麹菌はポテトデキストロース寒天培地、乳酸菌は BCP 加プレートカウント寒天培地、大腸菌群はデソキシコレート寒天培地を用いて培養した。

3) 筋肉中 α -トコフェロール含量

ロース肉 0.1 g にトリス塩酸緩衝液 1.0 ml を添加し、ホモジナイズ(5,000 回転, 15 秒)

した。ホモジネート 0.5 ml にヘキサン/2-プロパノール混合液(60:40)を 1.0 ml 加え攪拌して α -トコフェロールを抽出した。上層をロータリーエバポレーターにて減圧乾固し、ブチルヒドロキシトルエンを含むメタノール 0.5 ml に溶解し、高速液体クロマトグラフ(日本分光株式会社, 東京都八王子市)にて励起波長 292 nm, 蛍光波長 330 nm で蛍光強度を測定, α -トコフェロールを分離定量した。使用したカラムは Inertsil ODS 3 (6.0×150mm), 移動相はメタノール/ブタノール/酢酸緩衝液(800:200:10), 流速は 1 ml/min とした。

4) 筋肉中 TBARS 含量

筋肉中 TBARS 含量は Ohkawa らの方法(Ohkawa ら 1979)に準じて測定した。すなわち, ロース 0.2 g に 1.15%KCl 溶液 1 ml を添加し, ホモジナイズ(5,000 回転, 30 秒)し, ホモジネート 40 μ l に 8.1%SDS 溶液 40 μ l, 20%酢酸緩衝液(pH:3.5)0.3 ml, 0.8%チオバルビツール酸溶液 0.3 ml を順次加え, 95°Cで 60 分間反応させた。冷却後イオン交換水 0.2 ml およびブタノール/ピリジン溶液(15:1)0.8 ml を加え, TBARS を抽出し, 上層の 535 nm における吸光度を測定した。標準物質としてテトラエトキシプロパンを用い, マロンジアルデヒド(MDA)当量として算出した。

5) 統計処理

各区のデータは、前章に準じて統計処理を行い、5%水準の差を有意とした。

3.3. 結果および考察

表 3-1 に供試黒麹の品質、表 3-2 に、LF の pH、酸度、揮発酸度および生菌数をまとめた。供試黒麹は pH が低く、酵素活性が高く、孢子数が多いことより良質の飼料麹であると判定した。また、試験に用いた LF は pH が低く、揮発性酸含量は少なく黒麹菌数および乳酸菌数は多く、大腸菌数は少ないことより良質と判断された。しかし、LF-*L. fermentum* は LF-*L. casei* に比べ著しく黒麹菌数が少ないことより嫌気発酵が進み過ぎたと判断した。なお、実験 2 で用いた LF にはスターターとして乳酸菌は添加しなかったが、発酵後の LF からは 1ml 当たり 1.0×10^8 個の乳酸菌のコロニーが検出された。材料やタンクに付着していた乳酸菌が殺菌されずに残り、発酵中に増加したと考えられる。配合飼料に水を加え、タンクで発酵させて LF を調製すると、乳酸菌が優勢に生育するとの報告がある(Canibe ら, 2003; Ferrer ら, 2009)ことから、この現象は LF 製造の際に頻繁に起こりうると思われる。

表 3-3 に実験 2 における飼料摂取量を、表 3-4 に実験 3 における飼料摂取量を示した。

実験 2, 3 ともに対照区と試験区で 1 日 1 頭当たりの粗タンパクおよび総エネルギーの摂取

量は同等であった。

図 3-1 に増体量に及ぼす黒麹飼料の影響をまとめた。黒麹 0.05% 給与により有意差ではなかったものの($P=0.083$)約 13%の増体が促進される傾向にあった。リキッド飼料はさらに大きな増体効果を示し、LF20%区および LF・*L. casei* 区では 20%以上の有意な増体効果を示した。LF・*L. fermentum* 区でも有意ではないものの($p=0.053$)、増体が 12%改善される傾向にあった。しかし、その効果は給与量により異なり、LF40%区では有意な差は認められなかった。ブロイラーを用いた実験においても黒麹給与による増体効果が認められており(Saleh ら 2011,2012)、乳酸発酵した LF は肥育豚に対する増体効果を示さないこと(Canibe ら、2003)が報告されているので、本実験で示された増体効果は黒麹に起因すると考えられる。黒麹の増体効果は、含有されるアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼやキシラナーゼにより消化が促進されること(Gracia ら 2003, Hajati ら 2010)や、黒麹により生成される成長促進因子であるブトキシブチルアルコール(BBA)が筋肉タンパク質の分解を抑制し、ブロイラーの成長を促進すること(Kamizono ら 2013)に起因すると考えられる。また、固形麴を給与した場合(実験 1)に比べ LF を給与したとき(実験 2, 3)で増体量がより大きくなったが、これは LF 発酵の過程で、原材料中の繊維質、デンプン、タンパク質などが分解され、消化率の良い飼料になったことによる可能性が考えられる。また、LF はそれ自体に含まれる酵素や BBA の濃度は固形麴ほど高くないが、固形麴に比べ給与量のはるかに多いため、これらにより増体効果が増大された可能性がある。なお、実験 2 を例に飼料

費について試算したところ、対照区に比べ LF20%区では約 30%、LF40%区では約 40%の飼料費が節約されると計算された。

なお、LF-*L. fermentum* には LF-*L. casei* ほどの増体効果が認められなかったが、すでに述べた通り嫌気発酵が進みすぎ、好気生菌である黒麹菌が発酵後期で死滅し、黒麹の効果が十分に発揮されなかったと推測される。LF 製造時の通気培養と静置培養との時間配分に関しては、さらに検討する必要がある。また、実験 3 において糞の pH を測定したところ、対照区 7.4 に対し、LF-*L. casei* 区で 5.7、LF-*L. fermentum* 区で 5.4 と両 LF 区で有意に低下した。このことは腸内で短鎖脂肪酸(SCFA)が増加したことを示している。SCFA は、食物繊維が大腸内で腸内細菌によって発酵されることにより生じ、大腸での上皮細胞の増殖やミネラル吸収のエネルギーとして利用される(Henningsson ら 2001)。また、消化管内で生産された SCFA の 90%以上が吸収されると言われている(Henningsson ら 2001,坂田ら 1994)ことより、LF が消化管内での食物繊維からの SCFA の生成を通して健全な腸内環境を形成し、また SCFA 自身もエネルギー源となり、増体に影響を与えたのではないかと考えられる。

表 3-5, 3-6, 3-7 にそれぞれ実験 1, , 実験 2, , 実験 3 の初体重, 試験期間中の増体量, 飼料摂取量(実験 2 および 3 については乾物換算), 飼料要求率(実験 2 および 3 については乾物摂取量基準), 体長, 枝肉重量, 背脂肪厚, ロース重量, ロース長ならびにロースの α -トコフェロール含量に及ぼす影響をまとめた。また、実験 2 においては過酸化脂質の指標

として TBARS を測定した。

試験期間中の増体量は図 1(1 日増体量)で示したように黒麹および LF 給与により増加し、実験 3 の LF-*L. casei* 区では対照区に比べ 24% も高い値を示した。乾物摂取量には区間にわずかの差が生じたが、飼料要求率(LF の場合は乾物摂取量基準)は実験 1 の黒麹 0.05% 区、実験 2 の両 LF 区および実験 3 の LF-*L. casei* 区で対照区に比べ有意に低下した。LF-*L. casei* 区では対照区よりも 24% 低い値であった。

体長は黒麹 0.1% 給与区で 0.05% 給与区に比べ、LF-*L. casei* 区で対照区に比べ有意に長くなった。枝肉重量には増体量ほどの差は見られなかったが、LF-*L. casei* 区で対照区に比べ有意に増加した。背脂肪厚には一定の効果は見られなかった。ブロイラーにおいて黒麹給与は筋肉タンパク質の分解を抑制し筋肉量を増やすことが明らかにされている(Saleh ら 2011, 2012)。豚においても黒麹は同様のメカニズムで筋肉を増加させる可能性が考えられた。実験 2 および実験 3 においてはロース芯面積を測定したが、実験 2 の LF40% 区においては増加する傾向、実験 3 の LF-*L. fermentum* 区では減少する傾向を示し、一定の傾向が見られなかった。

実験 1 および実験 2 では α -トコフェロール含量を測定した。ブロイラーでは、通常、約 2 週間の黒麹給与により筋肉中の α -トコフェロール含量は 2 倍以上増加する(Saleh ら 2011)。黒麹給与による筋肉中の α -トコフェロール含量の増加は黒麹の抗酸化性により α -トコフェロールの消費が節約されることによるものだと考えられている。しかし、実験 1

の黒麹 0.05%区で対照区より低い値を示した以外は試験区で高い値を示し、プロイラーで認められたような顕著な α -トコフェロール増加効果は認められなかった。 α -トコフェロール含量に対する黒麹および LF の効果が明瞭でなかったが、TBARS に対する影響には即効性があると予想し、実験 2 では TBARS を測定した。その結果、LF40%区において対照区に比べ低下する傾向にあった($p=0.08$)。これは LF が抗酸化性を有している可能性を示している。

実験 2 の LF40%区のローズを用いて食味試験を行った(図 3-2)。香り、食感、多汁性、旨味、風味、脂っぽさおよび総合評価の 7 項目について評価した。評価は 5 段階で行ったが集計後、良い、差なし、悪い、の 3 段階評価に改めた。食感と脂っぽさを除けばいずれの項目についても大半の人が LF 給与豚肉の方が好ましいと回答した。食感については、対照区が好ましいとする人と両区に差がないとする人が同数であったが、脂っぽさについては差がないとする人が最も多く、食感の好ましさを判定するのは困難であった。なお、総合評価においては 15:7 で LF 給与豚肉が好ましいと評価された。以上の結果は、黒麹ならびに黒麹リキッドフィードにより良質の豚肉が生産できることを示している。食味の点においても、食品残さを 40%も給与した豚肉が対照区より優れると回答した人が多かったのは特筆に値する。

以上のことから、黒麹を利用して栄養価の高い LF を作ることができ、黒麹および黒麹 LF を給与することにより肥育豚の生産性が向上することが示された。

3.4. 小括

本章では黒麹および黒麹 LF 給与が肥育豚の生産性に与える影響を調べた。実験 1 では鹿児島パークシャーを用い、市販配合飼料に黒麹 0.05%および 0.1%を配合して給与した。その結果、無添加対照区に比べ黒麹 0.05%区において増体量は改善傾向にあり飼料要求率 (FCR)は有意に低下した。実験 2 では三元交雑種(LW・D)去勢雄に乾物として配合飼料の 20%および 40%を LF(食品残さを黒麹で発酵させた)で代替して与えた。その結果、対照区(配合飼料区)に比べ 20%給与区で増体量は改善され FCR は低下した。実験 3 では、実験 2 に準じ、配合飼料の 20%を 2 種の LF(黒麹と 2 種の乳酸菌で調製した)で代替して与えた。その結果、*Lactobacillus casei*で調製した LF 給与区において、増体量および FCR が顕著に改善された。以上のことから、黒麹を利用して栄養価の高い LF を作ることができ、黒麹給与により肥育豚の生産性が向上することが示され、さらに黒麹を利用して栄養価の高い LF を作ることができることが分かった。

表 3-1. 供試黒麹の酵素力価と孢子数

| pH | 酵素活性(U/g) | | | 孢子数 (個/g) |
|------|-----------|--------|-------|-------------------|
| | 酸性プロテアーゼ | キシラナーゼ | アミラーゼ | |
| 3.38 | 33198 | 6.87 | 244 | 2.1×10^9 |

表 3-2. 黒麹 LF の理化学分析および生菌数測定

| | pH | 酸度 (ml) | 揮発酸度 (ml) | 生菌数(cfu/ml) | | |
|---------------------------------|------|------------|--------------|-------------------|-------------------|------|
| | | | | 黒麹菌 | 乳酸菌 | 大腸菌群 |
| LF(実験 2) | 3.94 | 13.29 | 0.92 | 2.3×10^5 | 1.0×10^8 | < 10 |
| LF(<i>L. casei</i> , 実験 3) | 3.51 | 13.28 | 1.68 | 4.0×10^3 | 1.5×10^9 | < 10 |
| LF(<i>L. fermentum</i> , 実験 3) | 3.61 | 16.32 | 1.54 | < 10 | 4.0×10^8 | < 10 |

表 3-3. 黒麹 LF 給与試験(実験 2)における飼料摂取量

| | 対照区 | LF20%区 | LF40%区 |
|------------------|-------|--------|--------|
| 飼料摂取量(kg/頭) | | | |
| 基礎飼料 | 123.9 | 8.4 | 8.4 |
| 食品残さリキッドフィード | — | 147.2 | 259.5 |
| 圧ぺんとうもろこし | — | 79.6 | 53.5 |
| アルファルファミール | — | 4.2 | 2.8 |
| 大豆粕 | — | 18.0 | 13.7 |
| 試験期間(日) | 38 | 38 | 38 |
| 総エネルギー(Mcal/頭/日) | 14.9 | 14.9 | 14.1 |
| 粗タンパク(g/頭/日) | 471.1 | 475.9 | 468.3 |
| 乾物量(kg/頭/日) | 2.9 | 3.1 | 2.9 |

表 3-4. 黒麹 LF 給与試験(実験 3)における飼料摂取量

| | 対照区 | LF - <i>L. casei</i> 区 | LF - <i>L. fermentum</i> 区 |
|---------------------------------|-------|---------------------------|-------------------------------|
| 飼料摂取量(kg/頭) | | | |
| 基礎飼料 | 122.3 | — | — |
| 食品残さリキッドフィード(<i>L. casei</i>) | — | 154.6 | — |
| 食品残さリキッドフィード | — | — | 155.3 |
| 圧ぺんとうもろこし | — | 98.3 | 96.3 |
| アルファルファミール | — | 5.2 | 5.1 |
| 大豆粕 | — | 5.8 | 6.2 |
| 試験期間(日) | 41 | 41 | 41 |
| 総エネルギー(Mcal/頭/日) | 13.8 | 13.9 | 14.1 |
| 粗タンパク(g/頭/日) | 372.1 | 369.4 | 366.2 |
| 乾物量(kg/頭/日) | 2.7 | 2.9 | 2.9 |

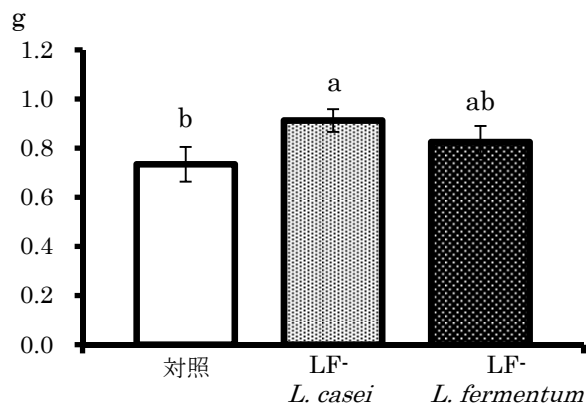
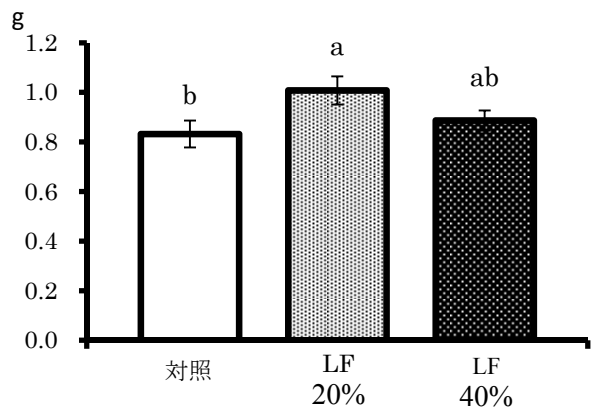
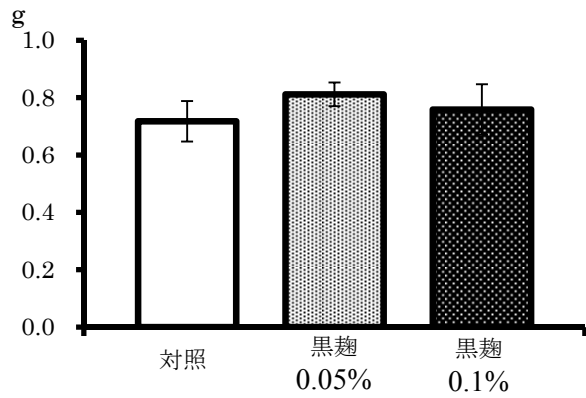


図 3-1. 1 日当りの増体量

A:黒麹飼料, B:黒麹 LF, C:乳酸菌・黒麹 LF

誤差バーは標準偏差を示す.

異符号間に有意差($p < 0.05$)あり

表 3-5. 黒麹給与が肥育豚の生産性および枝肉性状に及ぼす影響(実験 1)

| | 対照区 | | 黒麹 0.05%区 | | 黒麹 0.1%区 | |
|-------------------------------|-------|---------------------|-----------|---------------------|----------|----------------------|
| | 値 | 誤差 | 値 | 誤差 | 値 | 誤差 |
| 初体重(kg) | 83.9 | ± 3.5 | 83.1 | ± 2.8 | 83.3 | ± 3.6 |
| 終体重(kg) | 108.3 | ± 4.2 | 110.7 | ± 3.4 | 109.1 | ± 6.0 |
| 増体量(kg/34 日) | 24.4 | ± 2.4 | 27.6 | ± 1.4 | 25.8 | ± 3.0 |
| 飼料摂取量(kg/34 日) | 94.3 | ± 4.1 | 95.3 | ± 1.4 | 94.4 | ± 3.8 |
| 飼料要求率 | 3.88 | ± 0.26 ^a | 3.46 | ± 0.15 ^b | 3.69 | ± 0.34 ^{ab} |
| 体長(cm) | 120.3 | ± 2.5 ^{ab} | 117.2 | ± 2.5 ^a | 123.2 | ± 2.8 ^b |
| 枝肉重量(kg) | 70.7 | ± 3.9 | 72.5 | ± 2.7 | 72.0 | ± 4.0 |
| 背脂肪厚(cm) | 1.9 | ± 0.3 | 2.3 | ± 0.4 | 1.8 | ± 0.5 |
| ロース重量(kg) | 4.00 | ± 0.22 | 4.36 | ± 0.14 | 4.20 | ± 0.40 |
| ロース長(cm) | 55.1 | ± 1.4 | 55.2 | ± 1.6 | 54.5 | ± 2.9 |
| α-トコフェロール (mg/100g muscle) | 0.181 | ± 0.082 | 0.175 | ± 0.049 | 0.198 | ± 0.033 |

異符号間に有意差(p<0.05)あり

表 3-6. 黒麴リキッドフィード給与が肥育豚の生産性および枝肉性状に及ぼす影響 (実験 2)

| | 対照区 | | LF20%区 | | LF40%区 | |
|-------------------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|
| 初体重(kg) | 71.2 ± | 6.5 | 70.9 ± | 6.7 | 71.2 ± | 6.0 |
| 終体重(kg) | 102.0 ± | 6.4 | 108.2 ± | 7.2 | 104.0 ± | 6.8 |
| 増体量(kg/37 日) | 30.8 ± | 2.0 ^a | 37.3 ± | 2.1 ^b | 32.8 ± | 1.5 ^a |
| 乾物飼料摂取量(kg/37 日) | 110.9 ± | 0.0 | 118.8 ± | 0.2 | 108.5 ± | 0.4 |
| 乾物摂取量基準飼料要求率 | 3.61 ± | 0.23 ^a | 3.20 ± | 0.18 ^b | 3.31 ± | 0.16 ^b |
| 体長(cm) | 111.3 ± | 4.3 | 115.2 ± | 3.8 | 112.8 ± | 4.7 |
| 枝肉重量(kg) | 68.2 ± | 3.1 | 69.3 ± | 3.8 | 68.9 ± | 3.9 |
| 背脂肪厚(cm) | 1.7 ± | 0.5 | 1.7 ± | 0.4 | 1.3 ± | 0.4 |
| ロース重量(kg) | 4.03 ± | 0.67 | 4.03 ± | 0.31 | 4.25 ± | 0.44 |
| ロース長(cm) | 50.8 ± | 3.2 | 52.7 ± | 3.8 | 52.8 ± | 2.5 |
| ロース芯面積(cm ²) | 30.60 ± | 5.86 | 30.60 ± | 3.28 | 35.50 ± | 9.88 |
| α-トコフェロール (mg/100g muscle) | 0.31 ± | 0.03 | 0.33 ± | 0.04 | 0.36 ± | 0.03 |
| TBARS(nmolMDA/g) | 52.60 ± | 10.43 | 39.30 ± | 11.41 | 35.40 ± | 8.25 |

異符号間に有意差(p<0.05)あり

表 3-7. 黒麹リキッドフィード給与が肥育豚の生産性および枝肉性状に及ぼす影響 (実験 3)

| | 対照区 | | LF- <i>L.casei</i> 区 | | LF- <i>L.fermentum</i> 区 | |
|--------------------------|-------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|
| 初体重(kg) | 74.2 | ± 1.7 | 74.6 | ± 2.5 | 74.2 | ± 0.9 |
| 終体重(kg) | 104.3 | ± 3.6 ^a | 112.0 | ± 1.8 ^b | 108.0 | ± 3.2 ^{ab} |
| 増体量(kg/41 日) | 30.1 | ± 2.9 ^a | 37.4 | ± 1.9 ^b | 33.8 | ± 2.7 ^{ab} |
| 乾物飼料摂取量(kg/41 日) | 109.0 | ± 0.9 | 117.1 | ± 0.0 | 118.0 | ± 2.4 |
| 乾物摂取量基準飼料要求率 | 3.65 | ± 0.36 ^a | 3.14 | ± 0.17 ^b | 3.50 | ± 0.24 ^{ab} |
| 体長(cm) | 114.8 | ± 3.1 ^a | 119.3 | ± 2.1 ^b | 118.2 | ± 1.5 ^{ab} |
| 枝肉重量(kg) | 68.4 | ± 2.4 ^a | 73.2 | ± 1.3 ^b | 70.5 | ± 2.7 ^{ab} |
| 背脂肪厚(cm) | 1.8 | ± 0.2 ^a | 2.3 | ± 0.3 ^b | 2.0 | ± 0.4 ^{ab} |
| ロース重量(kg) | 4.10 | ± 0.26 | 4.35 | ± 0.29 | 4.25 | ± 0.29 |
| ロース長(cm) | 54.3 | ± 1.0 | 54.8 | ± 1.0 | 55.3 | ± 0.8 |
| ロース芯面積(cm ²) | 27.40 | ± 4.50 | 25.70 | ± 1.70 | 23.30 | ± 5.90 |

異符号間に有意差(p<0.05)あり

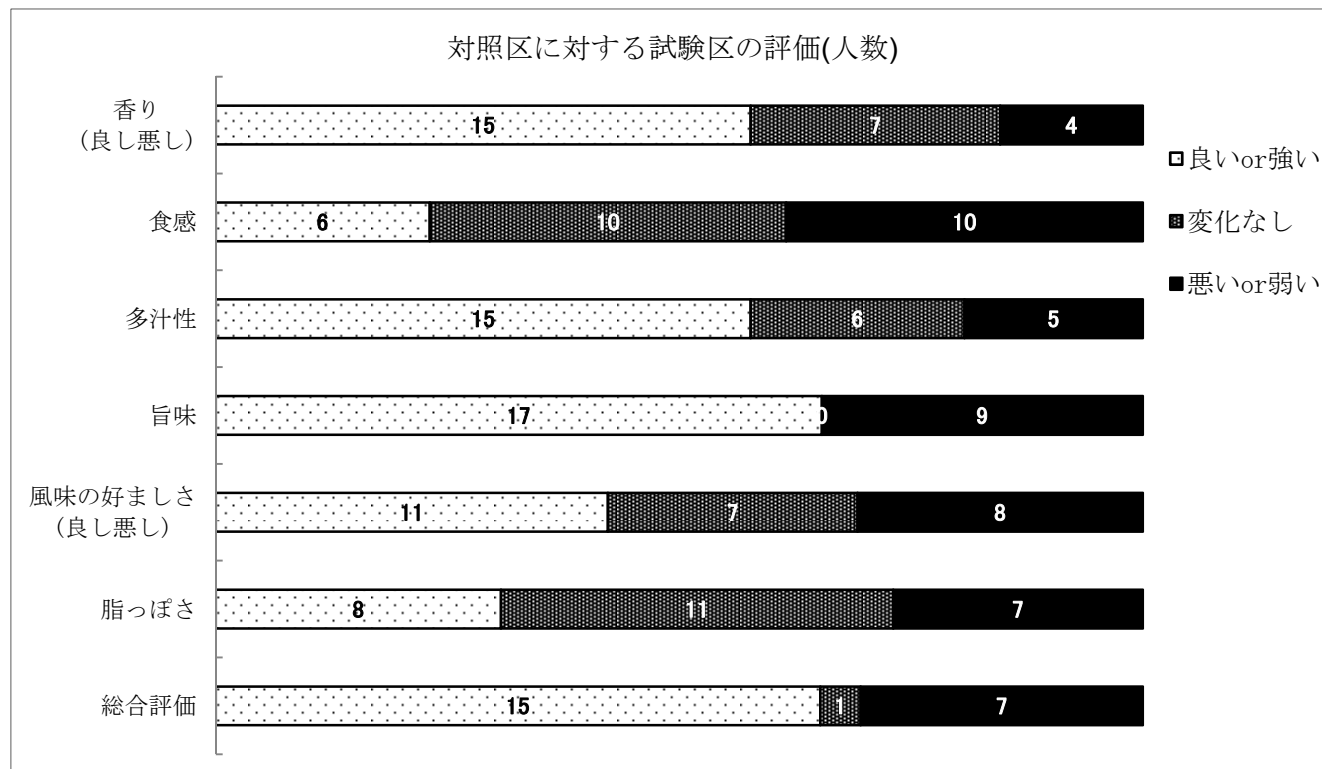


図 3-2. 黒麴 LF(LF40%区)給与豚肉の食味試験

第四章 サプリメントとしての黒麹の可能性

4.1. 緒言

近年、先進諸国では、ライフスタイルの変化によるエネルギーの過剰摂取、運動不足に起因するメタボリックシンドロームの患者が増加している。日本における肥満者(BMI \geq 25)の割合は、男性 28.6%、女性 20.3%であり(厚生労働省, 2013)、メタボリックシンドロームの予備群と考えられる者または強く疑われる者は、男性で 49.4%、女性では 17.2%に上っている(厚生労働省, 2007)。筆者らは、ブロイラーにおいて、微量の黒麹給与により血漿中の TAG およびコレステロール濃度が低下することを明らかにしている(Saleh ら, 2012)。また、高脂肪食を与えたラットにおいて、黒麹給与が血漿 TAG, コレステロールおよび HDL コレステロール濃度を低下させることが報告されている(Saleh ら, 2013)。さらに、ブロイラーおよびラットにおいて、黒麹給与により筋肉および肝臓中の飽和脂肪酸が減少し、不飽和脂肪酸が増加することが分かっており(Saleh ら, 2011, 2012, 2013)、黒麹は動物体内での不飽和脂肪酸を増やすことで宿主の脂質代謝を改善することが期待される。不飽和脂肪酸のうち、特に n-3 系脂肪酸は、循環器系疾患を抑制する上で重要な役割を担っている(Simopoulos, 2000, Williams, 1999)。一方で、筆者らはブロイラーにおいて麹給与が消化管内容物中の短鎖脂肪酸(SCFA)濃度を上昇させることを明らかにしている。SCFA は肝

臓でのコレステロール代謝(Chen ら 1984, Hara ら 1999)や、筋肉や肝臓でのエネルギー代謝(Kimura ら 2011, 2013)に関与していることが分かっている。しかし血液および肝臓脂質濃度、糞への排泄および肝臓における脂質代謝を一連の流れとして麴給与の影響を見た試験はまだ行われていない。一方、脂質異常症や糖尿病の症状を改善する目的で、多くの機能性を有する食品が研究されている。緑茶には、カテキン、テアニン、カテキンなどの機能性物質が含まれ、血中コレステロールおよびグルコース濃度を低下させることが報告されている(Muramatsu ら, 1986, Matsumoto ら, 1992)。したがって、緑茶を麴で発酵させることでより効果の高い健康食品が調製できると期待される。

ところで、黒麴菌の近縁種として、白麴菌(*Aspergillus kawachii*)が知られているが、この菌株は黒麴菌の突然変異株であり、黒麴同様クエン酸生成能を有し、脂肪組織を減少させ血漿グルコース濃度を低下させることが報告されており(Yoshizaki ら, 2014)、主に九州南部で焼酎製造に用いられている。白麴は黒麴ほど分生子が着色しないため、発酵食品を製造する上で有用性が高い。

本実験では、麴給与が体内での脂質代謝に及ぼす影響を詳しく調査し、そのメカニズムを解明すると共に、緑茶と白麴を組み合わせた新たな健康食品を開発することを目的とした。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 飼料調製

供試黒麹は，第二章，第一節と同様に調製した．緑茶麹は，煎茶に水分 45%になるよう加水し，60 分蒸気殺菌した後冷却し，白麹菌(*A. kawachii*, 株式会社河内源一郎商店，鹿児島県鹿児島市)0.1%を添加して小型の自動製麹装置(株式会社河内源一郎商店，鹿児島県鹿児島市)に入れ，33~38°Cで 5 日間発酵して調製した．培養開始時の白麹胞子数は，緑茶麹調製開始時の飼料 1g 当り 2.0×10^6 個であった．

基礎飼料は，AIN93G 組成(Reeves ら 1993)に準じて調製した．黒麹区用の飼料は基礎飼料に黒麹 0.05%を添加し，緑茶区および緑茶麹区用の飼料はそれぞれ基礎飼料に緑茶または緑茶麹を 1%添加した．黒麹区および緑茶麹区の飼料中の麹胞子数は，飼料 1g 当り黒麹区が 1.55×10^5 個，緑茶麹区が 2.3×10^6 個であった．

4.2.2. 動物実験

5 週齢 Sprague-Dawley(SD)ラット雄 32 匹を日本エスエルシー株式会社(静岡県)から購入して試験に用いた．ラットは個別にステンレスケージに入れ，室温 $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，明暗サイ

クル 12 時間(6:00–18:00)の飼育室で飼育した。1 週間市販の飼育用固形飼料(日本エスエルシー株式会社)を自由摂食させて予備飼育した後、6 週齢時に各区の平均体重がほぼ等しくなるよう対照区、黒麹区、緑茶区および緑茶麹区の 4 区に分けた。対照区には基礎飼料を、試験区には各試験飼料を与えた。給与方法は自由飲水自由摂食とした。体重は 1 日おきに、飼料摂取量は毎日測定し、FCR を算出した。解剖前 3 日間糞を採取し、-20℃で冷凍保存した。9 週齢時に解剖し、血液を採取した。同時に肝臓、心臓、腎臓、脾臓、小腸(空腸および回腸)、盲腸および結腸重量(内容物を含む)を測定した後、肝臓、小腸、盲腸および結腸は-80℃で冷凍保存した。

4.2.3 分析

4.2.3.1 血漿生化学性状

血液はヘパリン処理したファルコンチューブに採取し、4℃で 3,500rpm で 15 分遠心分離して血漿を得、-40℃で保存した。血漿グルコース濃度、トリアシルグリセライド(TAG)濃度、総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度、AST および ALT 活性を富士ドライケム(富士写真フィルム株式会社、東京都)を用いて測定した。

4.2.3.2 血漿中 α -トコフェロール濃度

血漿 0.2ml にブチルヒドロキシルエンを含むエタノール 0.2ml を添加した後、ヘキサン 1ml を加え攪拌して α -トコフェロールを抽出した。上層をロータリーエバポレーターにて減圧乾固し、ブチルヒドロキシルエンを含むメタノール 0.5 ml に溶解し、高速液体クロマトグラフ(日本分光株式会社, 東京都八王子市)にて励起波長 292 nm, 蛍光波長 330 nm で蛍光強度を測定, α -トコフェロールを分離定量した。使用したカラムは Inertsil ODS 3 (6.0×150mm), 移動相はメタノール/ブタノール/酢酸緩衝液(800:200:10), 流速は 1 ml/min とした。

4.2.3.3 血漿中 TBARS 濃度

血漿 30 μ l に 1/12N H₂SO₄ 0.8ml および 10%リンタングステン酸 100 μ l を加え混合した後, 15,000rpm, 5 分間遠心分離し, 上層を吸引除去した。再びこの操作を繰り返した後, 沈殿にイオン交換水 200 μ l および 0.8%チオバルビツール酸溶液 200 μ l を順次加え, 95°Cで 60 分間反応させた。冷却後 n-ブタノール 1ml を加え, TBARS を抽出し, 上層の 535 nm における吸光度を測定した。標準物質としてテトラエトキシプロパンを用い, マロンジアルデヒド(MDA)当量として算出した。

4.2.3.4 肝臓総脂質，コレステロールおよびトリグリセライド濃度

肝臓脂質は，Blight および Dyer の方法(Bligh ら，1959)に準じて抽出した．すなわち，肝臓 1g に 0.1M 酢酸緩衝液(pH3.6)3ml を添加してホモジナイズした後，メタノール 10ml およびクロロホルム 5ml で抽出し，クロロホルム層をエバポレーターで蒸発乾固(40℃，160hp)し，乾燥後の重量から総脂質濃度を算出した．

抽出した脂質を 10%TritonX-100 含有 2-プロパノール 2ml に溶解し，コレステロール濃度をコレステロール E-テストワコー，トリグリセライド濃度をトリグリセライド E-テストワコー(共に和光純薬工業株式会社，大阪府)にて測定した．

4.2.3.5 肝臓 m-RNA 発現量

ジルコニアビーズ入り 2ml 容ビーズホモジナイズ用チューブ(スクリュウキャップ付クライオチューブ)に ISOGEN II (株式会社ニッポンジーン，東京都)1ml を分注し，肝臓 100mg を加えて，ホモジナイザー(Micro Smash™ MS-100，株式会社トミー精工，東京都)にて 5,000rpm，15 秒間ホモジナイズした．精製水 0.4ml を加え，15 秒間激しく攪拌混合した後 15,000rpm，5 分間遠心分離し，得られた上清をマイクロチューブに 1ml 分取した．次

いで *p*-プロモアニソール 5 μ l を添加し, 15 秒間攪拌した. 15,000rpm, 5 分間遠心分離して上清 0.75ml をマイクロチューブに取り, 2-プロパノール 0.75ml を添加し転倒混和した. 15,000rpm で 1 分間遠心分離し上清を吸引除去し, 得られた沈殿を 75%エタノール 0.5ml で洗浄して RNA を得た. これを精製水 0.2ml に溶解したのち, RNA の濃度と純度を決定するため 260nm および 280nm における吸光度を測定し, 総 RNA 濃度が 60 μ g/ml となるよう精製水で希釈した. A260/A280 の比は全検体において 1.8~2.0 の間であった.

RNA からの cDNA の合成は, 抽出した RNA に RNase free water 3 μ l, PrimeScript RT Master Kit(タカラバイオ株式会社, 滋賀県)2 μ l を順次添加し, プログラムテンプレートコントロールシステム PC320(株式会社アステック, 福岡県)にて反応させて行った. 温度条件は, 逆転写反応 37 $^{\circ}$ C, 15 分, 逆転写酵素失活 85 $^{\circ}$ C, 5 秒, 冷却 4 $^{\circ}$ C, 5 分とした.

m-RNA 発現量は, 合成した cDNA 2 μ l に SYBR Select Master Mix 10 μ l, 精製水 6.4ml, 目的とする RNA のセンスプライマー0.8 μ l およびアンチセンスプライマー0.8 μ l を添加し, 7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems, USA)にて解析した. 温度サイクルは, 初期変性反応として 50 $^{\circ}$ C, 2 分, 95 $^{\circ}$ C, 2 分各 1 サイクル, 次いで増幅反応として 95 $^{\circ}$ C, 15 秒, 55 $^{\circ}$ C, 15 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分各 50 サイクル, 融解曲線分析として 95 $^{\circ}$ C, 15 秒, 60 $^{\circ}$ C, 1 分, 95 $^{\circ}$ C, 15 秒, 60 $^{\circ}$ C, 15 秒各 1 サイクルとした. 内部標準として, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素発現量(GAPDH)を用いたが, この発現量に区間で差はなかった. 対照区の発現量に対する比率(%)を遺伝子発現量とした.

4.2.3.6 糞水分、糞中総脂質および総胆汁酸濃度

糞の水分は、135℃で2時間乾燥して乾燥減量として求めた。糞の一部は凍結乾燥した後粉砕し、総脂質および総胆汁酸分析に供した。

糞の脂質は糞 0.5g にメタノール 10ml、クロロホルム 5ml を順次加えて攪拌し、次にクロロホルム 5ml、精製水 9ml を添加して抽出し、遠心分離して下層を集め、上層を再びクロロホルムで抽出し、先の抽出液に合わせ、No.2 ろ紙でろ過し、エバポレーターで蒸発乾燥(40℃, 160hp)し、乾燥後の重量から総脂質濃度を算出した。

胆汁酸は、糞 10mg にエタノール 500 μ l を添加して 70℃で1時間抽出し、3,000rpm, 10分遠心分離して上清を回収しこの操作を3回繰り返して上清を回収、総胆汁酸テストワコー(和光純薬工業株式会社、大阪府)にて総胆汁酸濃度を測定した。

4.2.3.7 盲腸内容物有機酸濃度

第二章と同様にして測定した。

4.2.3.8 統計処理

第二章と同様にして統計処理を行った。

4.3 結果および考察

供試黒麹および緑茶麹の pH および酵素活性を表 4-1 に示した。黒麹の pH は 2.76 と低く、酵素活性は高く、孢子数は 1g 当り 3.1×10^8 個と高いことから、良質の飼料麹であると判定された。緑茶麹は黒麹よりもさらに高い酵素活性を示したが、緑茶は米に比べタンパク質および繊維質を多く含み、この基質の特性が酸性プロテアーゼおよびキシラナーゼ活性を高めたと考えられた。pH は 4.83 と黒麹よりも低くなったが、緑茶は米に比べてデンプン質が少なく、クエン酸の生成が少なかったと推測された。

試験飼料の組成を表 4-2 に、成長および臓器重量を表 4-3 に示した。増体量、飼料摂取量、FCR、臓器重量および腎周囲脂肪組織重量に区間で差はなかった。Saleh らはバターを 10% および 30% 含む飼料をラットに給与し、それぞれについて黒麹給与の増体効果を調べ、黒麹給与が両脂肪レベルにおいて増体を促進し、脂肪組織重量を減少させることを報告している(Saleh ら, 2013)。本試験では Saleh らと同じ系統、同じ週齢のラットを用いたが、Saleh らの試験の普通脂肪対照区は本試験の対照区に比べ、増体量が約 18%、飼料摂取量が約 7%

低く、FCRが10%高かった。この差は飼料に含まれる脂質の量と種類の差によるものと考えられるが、麩の増体効果は飼料効率が良好であるときには発揮されにくい可能性がある。

血漿グルコース、TAG、コレステロールおよびHDLコレステロール濃度、血漿ASTおよびALT活性、血漿TBARSおよび α -トコフェロール濃度を表4-4に示した。これらの項目に区間で差はなく、Salehらの報告と相反する結果となった。Salehらが用いた飼料には10%および30%のバターが使用されている一方で、本実験に用いたAIN93G飼料は7%の大豆油を含んでおり、飼料に用いた油脂の脂肪酸組成と量の違いがこのような差異の原因になったと考えられる。

通常、麩給与により血液および筋肉中のTBARS濃度は減少し、 α -トコフェロール濃度は増加するが、本試験では麩の抗酸化能においても差はなかった。試験に用いたAIN93G飼料はn-3およびn-6脂肪酸に富む大豆油を含むため、酸化防止剤として0.0014%のTert-ブチルヒドロキノンが添加されているが、この抗酸化物質が体内での脂質の酸化を抑制し、対照区と試験区での差が出にくかった可能性がある。

肝臓脂質濃度および糞中脂質排泄量を表4-5に示した。肝臓中脂質濃度、TAG濃度およびコレステロール濃度は区間で差はなかった。また、糞脂質排泄量および胆汁酸排泄量にも区間で差はなかった。

図4-1に肝臓脂肪酸合成酵素(FAS)、アセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)、カルニチンパルミトイル転移酵素(CPT2)、MHGCoA還元酵素およびLDL受容体の遺伝子発現量を示

した。FAS および CPT2 の遺伝子発現量に区間で差はなかったが、ACC は対照区に比べ緑茶区及び緑茶麴区で低下する傾向にあり(それぞれ $p=0.091$, 0.071)、黒麴区で有意に低下した。ACC はアセチル CoA をカルボキシル化し、マロニル CoA を生成する酵素であり、脂肪酸生合成の律速反応である。緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)は *in vitro* で ACC を抑制することが知られているが(Watanabe ら, 1997)、本試験の結果も同様の結果となった。黒麴はさらに強い脂肪酸合成抑制効果を発揮した。本試験では正常ラットに標準食を給与したため、ラットに病態は発生しなかったと考えられる。麴の血漿および肝臓脂質濃度に及ぼす効果は、脂質濃度を正常に近づけるものであり、健康な動物には影響を与えないことが示唆された。また、黒麴は、病態が生じる前の早い段階から肝臓での脂肪酸合成を抑制する可能性が考えられた。

糞の重量および水分を図 4-2 に示した。糞の重量は区間で差はなかったが、水分は緑茶区及び緑茶麴区で対照区に比べ有意に上昇した。図 4-3 に内容物を含む盲腸重量、小腸(十二指腸、空腸および回腸)重量、結腸重量を示した。盲腸重量は緑茶麴区で対照区に比べ有意に大きくなったことから、腸内細菌が増加し盲腸の機能が増進したと考えられた。

図 4-4 に盲腸内容物中の有機酸濃度を示した。クエン酸濃度に区間で差はなかった。乳酸濃度は緑茶麴区で対照区および黒麴区に比べ高い傾向にあった(それぞれ $p=0.115$, $p=0.088$)。酢酸およびプロピオン酸濃度は区間で差はなく、酪酸濃度は、緑茶麴区において対照区および緑茶区に比べ有意に上昇した。総有機酸濃度は、緑茶麴区において対照区

に比べ上昇する傾向にあった($p=0.089$)。緑茶麴と黒麴区で盲腸内容物中の有機酸濃度に及ぼす効果に差があったが、これは飼料中に含まれる麴胞子数および酵素活性の差に起因する可能性がある。

本実験では Saleh ら(2013)の報告に比べ、黒麴給与の増体および脂質代謝改善に対する効果ははっきりしなかった。また、血漿および肝臓脂質に及ぼす影響も顕著ではなかった。本試験に用いた大豆油中には 7.9%の α -リノレン酸が含まれている(女子栄養大学出版社, 2001)が、Saleh らの用いたバター中の α -リノレン酸含量は 0.7%である。n-3 系の脂肪酸は血中の TAG を低下させ HDL コレステロールを増加させることが明らかになっている(Nagao ら, 2008)ことから、油脂に含まれる脂肪酸組成の差が、今回の結果の差に起因したと考えられた。

黒麴が肝臓における ACC 遺伝子発現量を低下させたことから、肝臓での脂肪酸合成の抑制を通じて脂質代謝を改善する可能性があることが示された。また、緑茶を麴菌で発酵させることにより、腸内環境の改善を通じてさらに機能性の高いサプリメントの開発が可能となることが示された。

4.4. 小括

本章では黒麴および緑茶を白麴で発酵させた緑茶麴のラット脂質代謝に及ぼす影響につ

いて調べた。5週齢 Sprague-Dawley (SD)ラット雄 32 匹を 8 匹ずつ 4 区に分け、対照区には基礎飼料を、黒麹区には基礎飼料に黒麹 0.05%を添加したものを、緑茶区および緑茶麹区にはそれぞれ基礎飼料に緑茶または緑茶麹を 1%添加したものを与えた。その結果、増体量、飼料摂取量、FCR、臓器重量および腎周囲脂肪組織重量に区間で差はなかった。また、血液性状、血中脂質濃度、肝臓脂質濃度、糞脂質排泄量および胆汁酸排泄量にも区間で差はなかった。肝臓における脂質代謝関連の遺伝子発現量を調べたところ、ACC の遺伝子発現量は対照区に比べ緑茶区及び緑茶麹区で低下する傾向にあり(それぞれ $p=0.091$, 0.071)、黒麹区で有意に低下した。黒麹は、病態が生じる前の早い段階から肝臓での脂肪酸合成を抑制する可能性が示された。盲腸内容物中の酪酸濃度は、緑茶麹区において対照区および緑茶区に比べ有意に上昇した。総有機酸濃度は緑茶麹区において対照区に比べ上昇する傾向にあった($p=0.089$)。以上のことから、黒麹は肝臓での脂肪酸合成の抑制を通じて脂質代謝を改善する可能性があることが示された。また、緑茶を麹菌で発酵させることにより、腸内環境の改善を通じてさらに機能性の高いサプリメントの開発が可能となることが示された。

表 4-1. 供試黒麹および緑茶麹の酵素力価と pH

| | pH | 酵素活性(U/g) | | | 孢子数 (個/g) |
|-----|------|-----------|--------|--------|-------------------|
| | | 酸性プロテアーゼ | キシラナーゼ | アミラーゼ | |
| 黒麹 | 2.76 | 8397 | 5.06 | 410 | 3.1×10^8 |
| 緑茶麹 | 4.83 | 34,782.9 | 39.28 | 582.95 | 2.3×10^8 |

表 4-2. 飼料組成

| | 対照区 | 黒麹区 | 緑茶区 | 緑茶麹区 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| コーンスターチ(g) | 393.5 | 393.5 | 393.4 | 393.4 |
| カゼイン(g) | 198.0 | 198.0 | 198.0 | 198.0 |
| α-コーンスターチ(g) | 130.7 | 130.7 | 130.7 | 130.7 |
| スクロース(g) | 99.0 | 99.0 | 99.0 | 99.0 |
| 大豆油(g) | 69.3 | 69.3 | 69.3 | 69.3 |
| セルロース(g) | 59.4 | 58.9 | 49.5 | 49.5 |
| ミネラルミックス(g) | 34.7 | 34.7 | 34.7 | 34.7 |
| ビタミンミックス(g) | 9.9 | 9.9 | 9.9 | 9.9 |
| L-シスチン(g) | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 重酒石酸コリン(g) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Tert-ブチルヒドロキノン(g) | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 |
| 黒麹(g) | | 0.5 | | |
| 緑茶粉末(g) | | | 10 | |
| 緑茶麹(g) | | | | 10 |
| 合計(g) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

表 4-3 成長および臓器重量

| | 対照区 | | | 黒麹区 | | | 緑茶区 | | | 緑茶麹区 | | |
|------------------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|
| 初体重(g) | 175.9 | ± | 8.8 | 176.0 | ± | 8.0 | 175.3 | ± | 9.4 | 175.9 | ± | 8.2 |
| 終体重(g) | 341.4 | ± | 24.3 | 343.6 | ± | 26.5 | 348.5 | ± | 22.4 | 345.9 | ± | 22.2 |
| 増体量(g) | 165.5 | ± | 20.3 | 167.6 | ± | 22.2 | 173.2 | ± | 14.8 | 170.0 | ± | 16.1 |
| 飼料摂取量(g) | 456.2 | ± | 43.9 | 459.5 | ± | 52.1 | 482.0 | ± | 30.1 | 461.3 | ± | 31.4 |
| FCR | 2.77 | ± | 0.12 | 2.75 | ± | 0.12 | 2.79 | ± | 0.16 | 2.72 | ± | 0.11 |
| 肝臓重量(g/100gBW) | 4.29 | ± | 0.47 | 4.27 | ± | 0.21 | 4.16 | ± | 0.17 | 4.12 | ± | 0.33 |
| 心臓重量(g/100gBW) | 0.32 | ± | 0.02 | 0.33 | ± | 0.03 | 0.33 | ± | 0.02 | 0.32 | ± | 0.03 |
| 腎臓重量(g/100gBW) | 0.74 | ± | 0.03 | 0.73 | ± | 0.06 | 0.74 | ± | 0.02 | 0.77 | ± | 0.07 |
| 脾臓重量(g/100gBW) | 0.19 | ± | 0.01 | 0.19 | ± | 0.02 | 0.18 | ± | 0.02 | 0.20 | ± | 0.02 |
| 腎周囲 | | | | | | | | | | | | |
| 脂肪組織重量(g/100gBW) | 2.09 | ± | 0.32 | 2.21 | ± | 0.34 | 2.30 | ± | 0.19 | 2.10 | ± | 0.49 |

表 4-4.血漿 AST および SLT 活性, TBARS および α -トコフェロール濃度

| | 対照区 | | 黒麹区 | | 緑茶区 | | 緑茶麹区 | |
|----------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 血漿グルコース濃度(mg/dl) | 163 | ± 16 | 150 | ± 14 | 165 | ± 21 | 156 | ± 18 |
| 血漿 TAG 濃度(mg/dl) | 235 | ± 111 | 192 | ± 77 | 184 | ± 51 | 174 | ± 66 |
| 血漿コレステロール濃度(mg/dl) | 82 | ± 13 | 77 | ± 21 | 75 | ± 28 | 69 | ± 13 |
| HDL コレステロール濃度(mg/dl) | 55 | ± 12 | 52 | ± 12 | 57 | ± 15 | 50 | ± 10 |
| AST 活性(U/L) | 98 | ± 29 | 74 | ± 14 | 83 | ± 18 | 86 | ± 22 |
| ALT 活性(U/L) | 24 | ± 7 | 20 | ± 5 | 26 | ± 4 | 23 | ± 4 |
| TBARS 濃度(nmolMDA/ml) | 3.71 | ± 0.30 | 4.25 | ± 0.68 | 4.00 | ± 0.47 | 4.23 | ± 0.60 |
| α -トコフェロール濃度(μ g/ml) | 11.48 | ± 2.01 | 12.66 | ± 2.12 | 11.96 | ± 1.41 | 12.38 | ± 1.95 |

表 4-5. 肝臓脂質濃度および糞中脂質排泄量

| | 対照区 | | 黒麹区 | | 緑茶区 | | 緑茶麹区 | |
|--------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| 肝臓中脂質濃度(mg/g liver) | 62.7 | ± 8.9 | 67.2 | ± 12.9 | 71.4 | ± 6.2 | 65.5 | ± 2.5 |
| 肝臓中 TAG 濃度(mg/g liver) | 29.6 | ± 7.2 | 28.7 | ± 4.1 | 26.5 | ± 5.7 | 27.6 | ± 6.1 |
| 肝臓中コレステロール濃度(mg/g liver) | 4.0 | ± 0.5 | 4.0 | ± 0.6 | 3.7 | ± 0.4 | 3.9 | ± 0.3 |
| 糞中脂質排泄量(mg/day) | 75.3 | ± 21.3 | 77.7 | ± 23.9 | 69.4 | ± 12.5 | 81.9 | ± 26.9 |
| 糞中胆汁酸排泄量(μmol/day) | 11.3 | ± 4.8 | 8.1 | ± 1.5 | 14.1 | ± 6.0 | 14.1 | ± 5.1 |

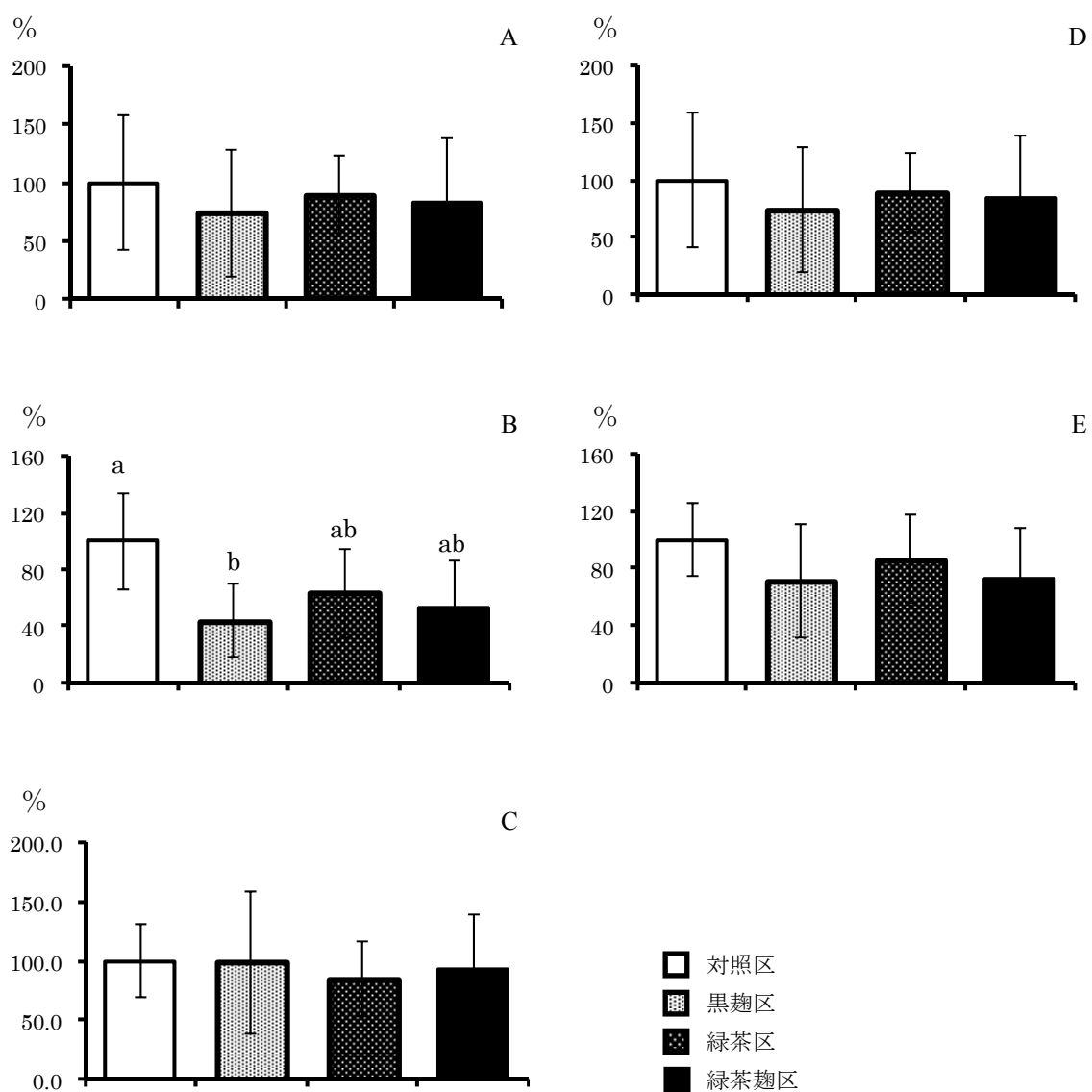


図 4-1. 肝臓遺伝子発現量

A:FAS, B:ACC, C:CPT2, D:HMG-CoA 還元酵素, E:LDL 受容体

遺伝子発現量は、対照区が発現量に対する比率(%)で示した。

誤差バーは標準偏差を示す。

異符号間で有意差(P<0.05)あり。

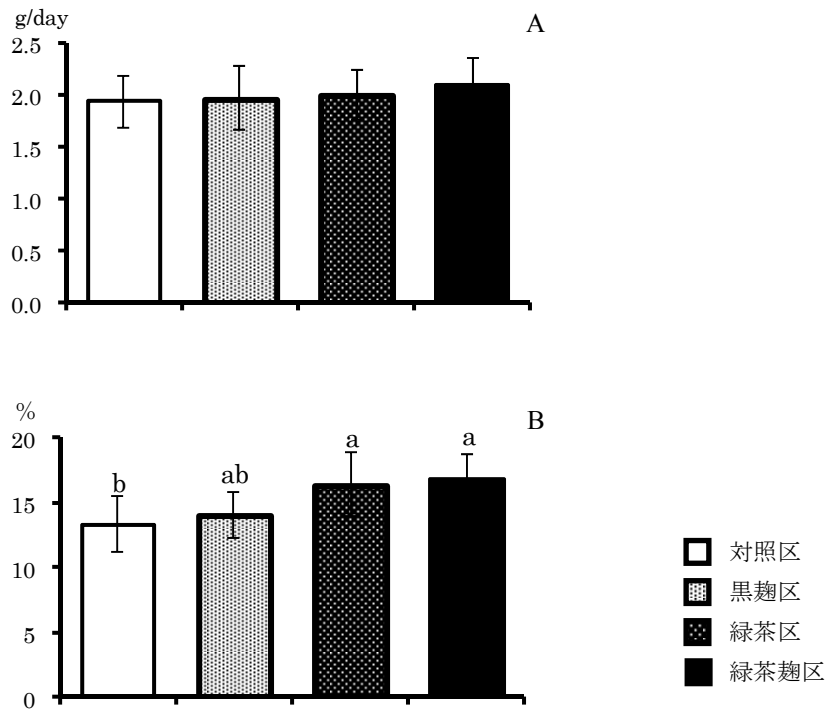


図 4-2.糞の重量および水分

A:重量, B:水分

誤差バーは標準偏差を示す.

異符号間で有意差(P<0.05)あり.

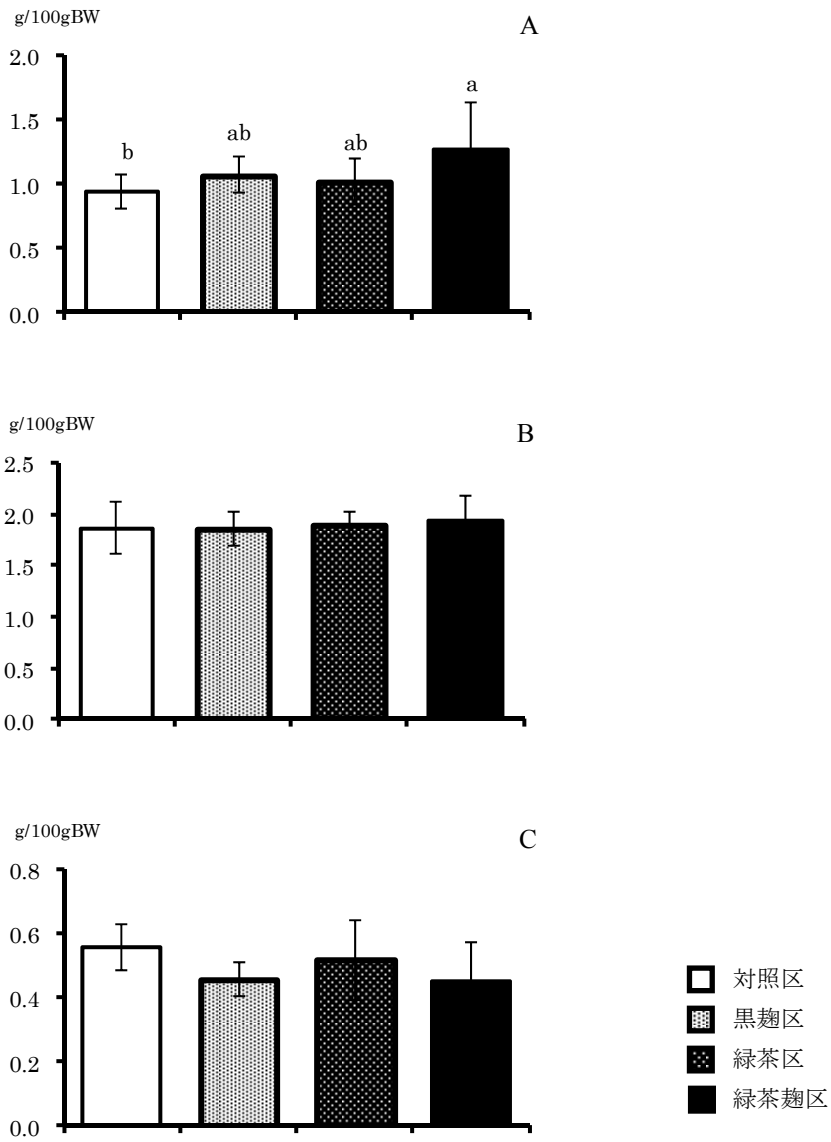


図 4-3. 内容物を含む消化管重量

A:盲腸重量, B:小腸(十二指腸, 空腸および回腸)重量, C:結腸重量

誤差バーは標準偏差を示す.

異符号間で有意差(P<0.05)あり.

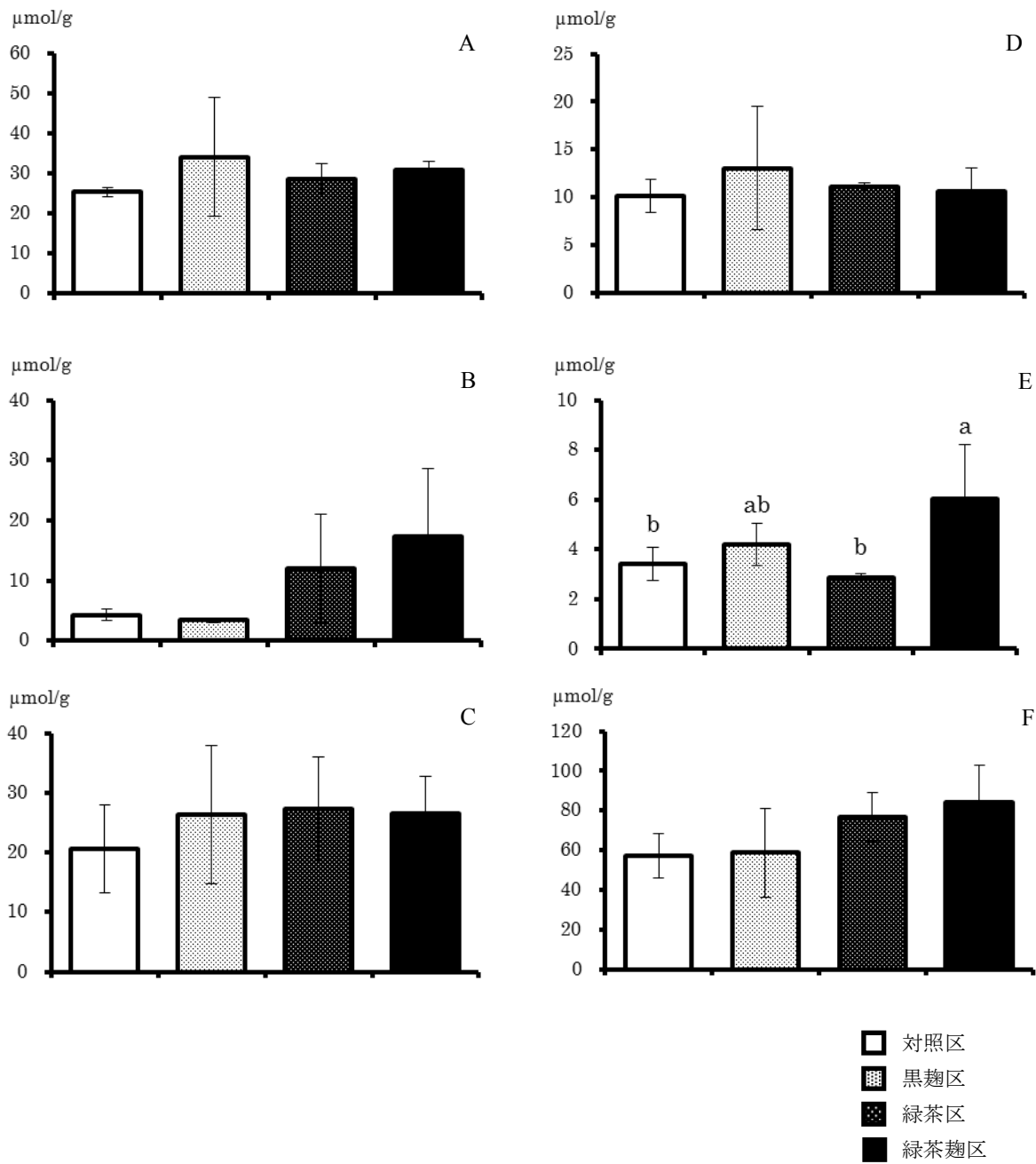


図 4-4.盲腸内容物中の有機酸濃度

A:クエン酸, B:乳酸, C:酢酸, D:プロピオン酸, E:酪酸, F:総有機酸

誤差バーは標準偏差を示す.

異符号間で有意差(P<0.05)あり

第五章 総括

著者らはすでに微量の黒麴(*A. luchuensis*)給与により、ブロイラーの消化率が改善され生産性が向上することならびにブロイラーおよびラットにおいて黒麴給与により血漿グルコースおよび脂質濃度が低下することを明らかにしている(Saleh ら, 2012, 2013). しかし、家畜の生産性に対する黒麴の効果に関する研究はブロイラーに限られており、豚についての研究はなされておらず、麴給与によりどのような機構で家畜の成長が促進され、また、脂質代謝が変化するのか不明な点が多い.

本研究は、これまでの研究を発展させ、さらに効果的な黒麴の利用法ならびに新規利用法の開発を目指して、第二章として、黒麴と乳酸菌を混合培養して黒麴・乳酸菌飼料を調製し、ブロイラーの生産性に及ぼす効果を検討した. 次いで、第三章として、肥育豚に対する応用ならびに食品残さの有効利用に資する目的で黒麴および食品残さを黒麴で発酵した黒麴リキッドフィード(黒麴 LF)を肥育豚に給与し、生産性に及ぼす影響を調べた. さらに、第四章として、麴に脂質代謝改善作用があることを利用してサプリメントの開発ができればと考え、黒麴および緑茶を白麴で発酵させた緑茶麴をラットに与え、脂質代謝および消化管内容物の有機酸濃度に及ぼす影響について調べた.

第二章では、黒麴と乳酸菌との混合液体培養法について検討した後、この方法を用いて調製した黒麴・乳酸菌飼料をブロイラーに与え、生産性に対する効果を調べ、さらに、黒

麩・乳酸菌飼料が消化管内容物中の生菌数および有機酸濃度に及ぼす影響について調べた。その結果、黒麩・乳酸菌飼料給与によりブロイラーの増体量は 16%改善され($p=0.064$)、盲腸内容物中の糸状菌数および乳酸菌数は有意に増加した。また、盲腸内容物中のクエン酸、乳酸、酢酸およびプロピオン酸濃度は黒麩・乳酸菌飼料給与により有意に上昇し、酪酸濃度は、上昇する傾向にあった($p=0.079$)。総有機酸濃度は、黒麩・乳酸菌飼料区で有意に上昇した。以上のことから、黒麩・乳酸菌飼料はブロイラーの生産性を向上させ、消化管内容物中の菌叢を変え、短鎖脂肪酸をはじめとする有機酸濃度を高め、宿主の健康に寄与することが示された。以上の知見は著者らのこれまでの知見と基本的に一致しておりさらにそれを発展させ、メカニズムの一端を明らかにしたものである。

次いで、第三章では、黒麩および黒麩 LF 給与が肥育豚の生産性に与える影響を調べた。その結果、黒麩給与により肥育豚の増体量が改善する傾向にあり、飼料要求率は有意に低下した。また、配合飼料の乾物として 20%および 40%を LF(食品残さを黒麩で発酵させた)で代替して給与したところ、配合飼料区に比べ 20%給与区で増体量は有意に改善され FCR は有意に低下した。さらに配合飼料の 20%を 2 種の LF(黒麩と 2 種の乳酸菌で調製した)で代替して与えたところ、黒麩および *L. casei* で調製した LF 給与区において、増体量および FCR が顕著に改善された。以上のことから、黒麩を利用して栄養価の高い LF を作ることができ、黒麩給与により肥育豚の生産性が向上することが示され、さらに黒麩を利用して栄養価の高い LF を作ることができることが分かった。これらの知見は養豚産業にすぐに

も応用可能なものであり実用的価値が極めて高いと考える。

最後に、第四章では、黒麹および緑茶を白麹で発酵させた緑茶麹のラット脂質代謝に及ぼす影響について調べた。その結果、血液性状、血中脂質濃度、肝臓脂質濃度、糞脂質排泄量および胆汁酸排泄量に区間で差はなかったが、肝臓における ACC の遺伝子発現量は対照区に比べ緑茶区及び緑茶麹区で低下する傾向にあり(それぞれ $p=0.091$, 0.071)、黒麹区で有意に低下した。緑茶麹区において、盲腸内容物中の酪酸濃度は対照区および緑茶区に比べ有意に上昇し、総有機酸濃度は対照区に比べ上昇する傾向にあった($p=0.089$)。このことから、黒麹は、病態が生じる前の早い段階から肝臓での脂肪酸合成を抑制すること、緑茶を麹菌で発酵させることにより、腸内環境の改善を通じてさらに機能性の高いサプリメントの開発が可能となることが示された。以上の知見は顕著な脂質代謝改善効果の見られた著者らのこれまでの知見(Saleh ら, 2013)とかなり異なっている。本研究では正常ラットに通常食を与えて黒麹の効果を調べたが、以前の研究では多量のバターを含む高脂肪食を給与した。さらに本研究では抗酸化物質を添加した植物油を飼料に配合した。本研究で用いた条件は一般的なヒトの状況により近いものである。主として植物油を摂取し、さらに、抗酸化物質を大量に摂取しているヒトでは黒麹の効果は表れにくいと思われる。しかし、肥満、脂質代謝異常や糖尿病の患者などでは黒麹の効果が期待できる。

黒麹は、抗酸化作用、多種多様な酵素活性、成長促進作用など高い機能性を有する。さらに黒麹菌は生きて後部消化管に届き、そこで繊維性物質を分解しオリゴ糖を生産する結

果、乳酸菌が増加し、短鎖脂肪酸が大量に生成されるのではないかと考えられる。黒麹
0.04%を含む飼料を与えたラットの盲腸内容物から BBA が検出されたことから、成長促進
物質である BBA も後部消化管内で作られることが示された。さらに重要な事実、黒麹が
筋肉および肝臓中の飽和脂肪酸を減らし不飽和脂肪酸を増やす現象である。黒麹は家畜飼
料として極めて有効に利用できるだけでなくヒトの健康維持にも応用可能である。

以上の知見は、これまで醸造以外の目的ではほとんど使用されることのなかった麹，特
に黒麹が生産性を向上させ肉質を改善させる飼料およびヒトの健康増進を目的としたサブ
リメントとして有効に利用できることを示している。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、始終ご指導とご助言を賜りました琉球大学熱帯生物圏研究センター屋宏典教授に甚大なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり、始終ご指導を賜りました琉球大学農学部和田浩二教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するに当たり、研究技術など丁寧にご指導いただいた鹿児島大学農学部大塚彰教授に甚大なる謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、助言、ご指導を頂いた鹿児島大学農学部井尻大地助教授および栄養生化学研究室の皆様方に謹んで謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、助言、サポート頂いた株式会社源麴山元正博社長、顧問林国興先生および研究室の皆様方に深く感謝します。

参考文献

- Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, Kozlowski F, Tenailleau E, Cherbut C and Michel C. 2005. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter - individual variation is evident. *Journal of Applied Microbiology*, 99:201-212
- Chen WJ, Anderson JW and Jennings D. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Experimental Biology and Medicine*. 175:215-218
- 独立行政法人農業生物資源研究所. 2004. 微生物遺伝資源利用マニュアル(16). 1-4. 独立行政法人農業生物資源研究所. 茨城.
- FAO. 2013. *FAO Statistical yearbook 2013*. [引用 2015 年 5 月 11 日]
- URL: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en/#.VWFqB9Iw8ic>
- Fuller R. Probiotics in man and animals. 1989. *Journal of Applied Bacteriology*, 66:365-378
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K and Hiroshi Ohno

- H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450
- Hajati H. 2010. Effects of enzyme supplementation on performance, carcass characteristics, carcass composition and some blood parameters of broiler chicken. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 5(3):221-227.
- Hara H, Haga S, Aoyama Y and Kiriya S. 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and Intestine. *The Journal of Nutrition*, 129: 942–948
- Henningson Å, Björck I, Nyman M. 2001. Short-chain fatty acid formation at fermentation of indigestible carbohydrates. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 45:165-168
- 日置 久美子, 川崎 千穂子, 山元 正博, 林 国興, 屋 宏典. 2015. 黒麹・乳酸菌飼料によるブロイラーの盲腸内短鎖脂肪酸の変動. *日本家禽学会誌*, 52:J48-J55, 印刷中
- Jin, LZ, Ho YW, Abdullah N and Jalaludin S. 1996. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 9:397-404.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Kudo H and Jalaludin S. 1997. Studies on the intestinal microflora of chicken under tropical condition. *Asian-Australasian Journal of Animal*

Sciences, 10:495-504

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N and Jalaludin S. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 77:1259-1265

Kamizono T, Ohtsuka A, Hashimoto F, Hayashi K. 2013. Dibutoxybutane suppresses protein degradation and promotes growth in cultured chicken muscle cells. *Journal of Poultry Science*, 50:37-43

Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Tkahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H and Tsujimoto 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications*, 4:1829

小林 洋一, 遠山 清, 寺島 経男. 1974. 乳酸桿菌の生物学的特性について. *日本細菌学会誌*, 29:691-697

厚生労働省. 2013. 平成 25 年 国民健康・栄養調査結果[引用 2015 年 5 月 11 日]

URL: <http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku->

Kuriyama H, Yamashita S, Shimomura I, Funahashi T, Ishigami M, Aragane K, Miyaoka K, Nakamura T, Takemura K, Man Z, Toide K, Makayama N, Fukuda Y, Lin MCL, Wetterau JR and Matsuzawa Y. 1998. Enhanced expression of hepatic acyl -

coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. *Hepatology* 27:557-562

Ljungh Å and Wadström T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7:73-90

Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigaki A, Iwashina H and Hara Y. 1992. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57: 525-527.

Mathlouthi N, Mallet S, Saulnier L, Quemener B, and Larbier M. 2002. Effects of xylanase and β -glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and physico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of broiler chickens fed a wheat and barley-based diet. *Animal Research*, 51:395-406

Mishra V and Presad DN. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103:109-115

光岡 知足. 1991. 家畜生産における生菌剤の利用. *ビフィズス*, 5:1-18

Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara, Nitsch S, Schatzmayr G and Fegeros K. 2007. *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler

performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities.

Poultry Science 86:309-317

Muramatsu K, Fukuyo M and Hara Y. 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. Journal of nutritional science and vitaminology, 32: 613-622

Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T and Tokimitsu I. 2002. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. International Journal of Obesity, 26:1459–1464

Nagao K and Yanagita T. 2008. Bioactive lipids in metabolic syndrome. Progress in Lipid Research, 47:127-146

日本醸造協会. 2003. 第四回改正国税庁所定分析法注解. 221-222, 181-183. 日本醸造協会. 東京

農水省. 2008. 世界の食糧事情[引用 2015 年 5 月 11 日]

URL: www.maff.go.jp/j/study/syoku_mirai/pdf/data2-1.pdf

農林水産省 生産局畜産部.2014a, 飼料をめぐる情勢(データ版)[引用 2014 年 8 月 5 日].

URL:http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/shi_d7.pdf

農林水産省 生産局畜産部.2014b, 飼料をめぐる情勢[引用 2014 年 8 月 13 日]

URL:http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/pdf/shiryu_illust_2607.pdf

荻原 博和, 佐藤 啓子, 春田 三佐夫. 1983 乳酸菌数測定用公定培地"BCP加プレートカウント寒天"の検出測定能の検討. 食品衛生学雑誌, 24:230-233

Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V and Weber P. 2003. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. Journal of Nutritional Biochemistry, 14:326-332

坂田 隆. 1994. 腸内細菌からのメッセージ. 科学と生物, Vol.32, No.1, 23-31.

Saleh AA , Eid YZ , Ebeid TA ,Kamizono T ,Ohtsuka A, Hayashi K. 2011. Effects of feeding *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* on growth performance and meat quality in broiler chickens. Journal of Poultry Science, 48:201-206

Saleh AA, Eid YZ, Ebeid TA, Ohtsuka A, Hioki K, Yamamoto M, Hayashi K. 2012. The modification of the muscle fatty acid profile by dietary supplementation with *Aspergillus awamori* in broiler chickens. British Journal of Nutrition, 108:1546-1602

Saleh AA, Ohtsuka A, Yamamoto M and Hayashi K. 2013. *Aspergillus awamori* feeding modifies lipid metabolism in rats. BioMed research international, 2013:1-7

社団法人畜産技術協会.2003, リキッドフィーディング実用化[引用 2014年8月5日]

http://jlta.lin.gr.jp/report/detail/pdf/kokunai_h008-14.pdf

Simopoulos A. 2000. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA.

Poultry Science, 79:961–970.

Susca A, Proctor RH, Butchko RAE, Haidukowski M, Stea G, Logrieco A and Moretti A.

2014. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. *Fungal Genetics and Biology*, 73:39-52

The Institute for Health Metrics and Evaluation. 2014. Global, regional, and national

prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013, *The Lancet*, 384:766–81

Tani Y, Fujioka T, Sumioka M, Furuichi Y, Hamada H and Watanabe T. 2004. Effects of

capsinoid on serum and liver lipids in hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50:351-355

United Nations. 2012. *World Population Prospects: The 2012 Revision*[引用 2015 年 5 月

11 日]

URL: http://esa.un.org/wpp/unpp/panel_population.htm

Williams CM. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49:

165–180

Yamada O, Takara R, Hamada R, Hayashi R, Tsukahara M and Mikami S. 2011.

Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112:233-237

山本 泰, 東 和男, 好井 久雄. 1981. 麹菌のキシラナーゼ活性について. 日本食品工業学会誌, 28:496-501.

Yang CM, Cao GT, Ferket PR, Liu TT, Zhou L, Zhang L, Xiao YP and Chen AG. 2012. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. Poultry Science, 91 :2121–2129. 2012.

Yeo J and Kim KI. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poultry Science, 76:381–385

Yoshizaki Y, Kawasaki C, Cheng KC, Ushikai M, Amitani H, Okutsu K, Sameshima Y, Takamine K and Inui A. Rice koji reduced body weight gain, fat accumulation, and blood glucose level in high-fat diet-induced obese mice. 2014.