

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580302

研究課題名（和文） 過酸化水素投与による反芻家畜からのメタン抑制技術の開発

研究課題名（英文） Establishment of method for rumen methane mitigation by hydrogen peroxide

研究代表者

西田 武弘 (NISHIDA TAKEHIRO)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：70343986

研究成果の概要(和文):ヒツジへ過酸化水素を投与したら,メタン発生量は無添加より 0.5mM, 0.75mM および 1.0mM 投与時に 22.9, 37.4 および 53.4%低かった。粒状の過炭酸ナトリウムを培養液に添加したら,無添加と比較して 0.5, 1.0 および 1.5mM 添加時に,メタンの発生量はそれぞれ 26.5, 22.4 および 32.7%低くなった。ヒツジへ過炭酸ナトリウムを給与したら,メタンの発生量は投与量に従って低くなった。

研究成果の概要(英文): Hydrogen peroxide was introduced into sheep to become 0.5mM, 0.75mM and 1.0mM in their rumen. Methane production from the rumen were 22.9, 37.4 and 53.4% lower than additive free sheep, respectively. Sodium percarbonate (granularity) were added 0.5, 1.0 and 1.5mM in rumen juice from cattle. Methane production from the culture fluid were 26.5, 22.4 and 32.7% lower than additive free culture, respectively. Sodium percarbonate were fed 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0mM in sheep and ruminal methane production were lower than additive free sheep in a dose-dependent manner.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学, 畜産学・草地学

キーワード：栄養・飼養, メタン抑制

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜のルーメン発酵に由来するメタンは,地球温暖化の約 4%の寄与率と見積もられる。乳酸菌は抗菌性物質であるナイシンを産生し,ルーメンメタン発生抑制効果を持つことが知られている。しかし,ナイシンはタンパク質であるため,ルーメン内細菌のプロテアーゼによる分解作用を受け,効果の持続性に課題があった。

我々は,これまで味の素(株)との共同研究

プロジェクトにより, *Lactobacillus Plantarum* TUA1490L 乳酸菌株がプロアーゼ耐性抗菌性物質(PRA)を産生することを明らかにした。また, PRA の 1 種に顕著なルーメンメタン抑制効果があることを認めた(阿佐ら, 日本畜産学会第 109 回大会, 2008)。

in vitro 予備実験の結果 1(味の素(株))

その後, PRA の同定を進めた結果, この物質は過酸化水素(H₂O₂)であることが判明した。H₂O₂ がルーメン中でのメタン生成抑制

物質として有望であるとする、

(1)入手が容易で、安価である

(2)抗菌剤として使用した場合、最終的に水と酸素しか残らないので、安全性が高く、環境汚染も無い

(3) H_2O_2 による嫌気性微生物の細胞へのダメージは、生命活動の根源的なものであるため、耐性菌などの出現する可能性が極めて低いという利点がある。

in vitro 予備実験の結果 2(帯広畜産大学)

そこで、 H_2O_2 によるルーメン中でのメタン生成抑制効果を *in vitro* 試験により検討した。その結果、

(1)メタン抑制効果は H_2O_2 の濃度に比例して強くなる

(2) H_2O_2 の濃度が 0.3~1.0mM の試験区ではルーメン菌叢に大きな変化が見られない

(3)1.0mM H_2O_2 投与試験区では、 H_2O_2 がルーメン内の菌叢に対して一時的に活動を抑制する制菌剤として働いていることが推察された(松本ら、日本畜産学会第 111 回大会、2009)。

これらの結果より、 H_2O_2 のメタン抑制を目的とした最適投与濃度は、1.0mM であると考えられた。

2. 研究の目的

本申請における試験によって、予備実験から求めた H_2O_2 投与濃度 1.0mM を指標として、ヒツジを用いた *in vivo* 代謝試験によって最適投与濃度を求め、その最適投与濃度でヒツジの健康、ルーメン内環境および飼料の消化性に影響はないかを確認する。また、 H_2O_2 投与による反芻家畜からのメタン発生抑制技術の実用化を目指して、植物素材由来カプセルへ H_2O_2 を封入し、投与する技術を開発する。

本研究が成功すれば、味の素(株)とともに実用新案を申請し、温室効果ガスの削減を補完する京都メカニズムである、共同実施(JI)やクリーン開発メカニズム(CDM)への応用の可能性が開ける。

3. 研究の方法

(1)ルーメンフィステル装着去勢綿羊 1 頭(体重 40.0kg)を用い、十勝産チモシー乾草を、55g 乾物/kg^{0.75}/日給与した。水とミネラルは自由摂取とした。過酸化水素投与量は、体重 50kg の羊のルーメン容積を 20L とし、その 90%を内容物が占めると仮定してルーメン内容積を算出した。これをもとに、過酸化水素終濃度が目的の濃度(0mM, 0.5mM, 0.75mM および 1.0mM)となるよう調製した過酸化水素水 50ml を、フィステルより投与した。馴致期間は 7 日間とし、その後、メタン発生量の測定を 3 日間、およびルーメン液採取 1 日を各試験期で連続して行い、pH および ORP

を測定した。

(2) $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ *in vitro* 投与試験では、0mM, 0.5mM, 1.0mM および 1.5mM 添加区を設定して試験を行った。牛から採取した胃液 160mL と緩衝液(人工唾液)640mL を混合し、チモシー乾草 5g および濃厚飼料 5g を投入し、嫌気条件下 39°C 24 時間培養する実験を行った。pH, ORP, メタンおよび炭酸ガスは、それぞれの分析計でデータを連続的に測定・記録した。ルーメン液の採取は、培養開始 0, 2, 4, 8 および 24 時間後に行った。

(3) $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 投与試験では、0mM, 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM および 2.0mM 添加区を設定して試験を行った。ヒツジは 4 頭供試し、粉状の配合飼料とよく混合して給与した。基礎飼料はクレイグラス乾草とした。実験は、予備期 2 週間、本試験 2 日間で呼吸試験を行った。

4. 研究成果

(1)過酸化水素を 0.5, 0.75 および 1.0mM 投与したとき、それぞれの投与時でメタンの代謝体重 1kg あたりの発生量は、対照区(0mM)と比較して、22.9, 37.4 および 53.4%低い値を示した。対照区と 0.5 および 0.75mM 投与区の二酸化炭素発生量に差は認められなかったが、1.0mM 投与区では、対照区と比較して 26.7%低い値を示した。試験区では一時的に ORP が上昇したが、8 時間後では全ての試験区で対照区と同様の ORP を示した。過酸化水素投与後 1 時間で、各試験区において pH に変化が観察されたが、投与量による影響の差はみられなかった。

(2)過酸化水素を 0.5, 1.0 および 1.5mM 投与したとき、それぞれの投与時でメタンの発生量は、対照区(0mM, 100%)と比較して、26.5, 22.4 および 32.7%と有意に低い値を示した。投与区間では差はみられなかった。pH は対照区と試験区ではおよそ 6.8 とほぼ同じ値であり、1.0 および 1.5mM 投与区は、7.02 および 7.07 と高くなった。総 VFA 濃度は、投与区の方が有意(P=0.006)に低かった。酢酸-プロピオン酸比は、投与区の方が有意に増加した(P=0.016)。ルーメンプロトゾア数には違いはみられなかった。対照区の ORP は実験開始から大きく負の値を示していた(-380 mV)が、炭酸水素でコーティングした過酸化水素投与区では、正の値を示すなど、高い値であった。これらの結果から、 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 粉末は、反芻家畜からのメタン発生を抑制する可能性が高いといえる。

(3) $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ を 0mM, 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM および 2.0mM 添加投与したとき、それぞれの投与時でメタンの発生量は、2071, 1967, 1708, 1689 および 1649mL/日/代謝体重(体重の 0.75 乗)と用量依存的に

低くなった。実際に動物に給与する場合には、*in vitro* 実験時よりも高濃度の $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ が必要であろうことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Senevirathne N. D., Okamoto T., Takahashi J., Umetsu K., Nishida T., Effect of mixed microbial culture treatment on the nutritive value of coffee, green tea and oolong tea residues and the effect of the fermented residues on *in vitro* rumen fermentation., International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2, 2012, 349-353, DOI: 10.7763/IJBBB.2012.V2.130.

Santoso, B., Asa, R., Nishida, T., Takahashi, J., Effect of secondary metabolites in beverage industry residues on rumen methane emission, Greenhouse gases and sustainable animal agriculture for developing countries, 79, 2012, 29-34, ISSN 1341-710X.

Reina Asa, A. Tanaka, A. Uehara, I. Shinzato, Y. Toride, N. Usui, K. Hirakawa, J. Takahashi, Effects of Protease-resistant Antimicrobial Substances Produced by Lactic Acid Bacteria on Rumen Methanogenesis, Asian-Aust. J. Anim. Sci., 23, 2010, 700-707.

[学会発表] (計 11 件)

O'Brien Martin, 橋本哲平, 西田武弘, 田中尚人, 岡田早苗, 高橋潤一, 乳酸菌の生成する抗菌性物質のルーメンメタン抑制効果, 第 113 回日本畜産学会, 2012 年 3 月 29 日, 名古屋大学.

O'Brien Martin, Shoda M., Nishida T., Takahashi J., The effectiveness of *Alcaligenes faecalis* and nitrate to suppress *in vitro* rumen methanogenesis, 第 113 回日本畜産学会, 2012 年 3 月 29 日, 名古屋大学.

Senevirathne N., Okamoto T., Nishida T., Takahashi J., Effect of residual of coffee, green tea, and oolong tea treated with mixed microbes on rumen fermentation, 第 113 回日本畜産学会, 2012 年 3 月 29 日, 名古屋大学.

O'Brien, M., M. Shoda, T. Nishida, J. Takahashi, The effectiveness of *Alcaligenes faecalis* to reduce nitrite accumulation when nitrate is used to suppress *in vitro* rumen methanogenesis, The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on

Rumen Metabolism and Physiology, 2011 年 10 月 17 日, 札幌, 北海道.

Santoso, B., R. Asa, T. Nishida and J. Takahashi, Effects of secondary metabolites in the residues from beverage industries on rumen methane emission, The third conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), 2011 年 7 月 26 日, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Chaokaur, A., S. Kempaka, T. Matsumoto, T. Okamoto, J. Takahashi and T. Nishida, Effects of ruminal dosing of mechanical stimulating brush on methane emission from rumen in dry cows, The third conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), 2011 年 7 月 28 日, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Moriya, Y., T. Yamashiro, C. Ying, A. Fetra, W. Rui, Z. Shasha, M. Iwasaki, J. Takahashi, T. Nishida, M. Saito, A. Hirata, S. Ogura, I. Ihara and K. Umetsu, Thermophilic anaerobic co-digestion of synthetic waste and dairy cattle manure, The third conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), 2011 年 7 月 29 日, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Senevirathne, N. D., Jayawardana, V. P., Nishida, T., Takahashi, J., Effect of PEG and KMnO_4 on *In-vitro* fermentation and rumen degradation characteristics of tannin rich tree fodders, The third conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), 2011 年 7 月 26 日, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Nishida, T., H. Mori, A. Tanaka, K. Umetsu, T. F. Hung, H. Itoh, I. Sakaida, J. Takahashi, Effect of blended microbial feed additives on nutritive value of sugar beet tops with stem and stub of adzuki beans after long-term preservation, The third conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), 2011 年 7 月 26 日, Nakhon Ratchasima, Thailand.

K. Hirakawa, T. Matsumoto, R. Asa-Morikawa, H. Nishigaki, Y. Mihara, J. Takahashi, Effect of Hydrogen Peroxide on *In Vitro* Ruminant Fermentations, 4th International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, 5th Oct. 2010 Banff, Alberta, Canada.

K. Hirakawa, T. Matsumoto, H. Nishigaki, R.

Asa-Morikawa, Y. Mihara, T. Nishida, J. Takahashi, Effect of Hydrogen Peroxide Administration on Rumen Fermentations of Sheep, 4th International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture 5th Oct. 2010 Banff, Alberta, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 武弘 (NISHIDA TAKEHIRO)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号：70343986

(2) 研究分担者

高橋 潤一 (TAKAHASHI JUNICHI)
帯広畜産大学・その他部局等・名誉教授
研究者番号：20111198

(3) 連携研究者

()

研究者番号：