

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580364

研究課題名(和文) 家畜飼料からの強抗酸化物質“エルゴチオネイン”の検索と赤肉内抗酸化能の検証

研究課題名(英文) Retrieval of "Ergothioneine" as strongly antioxidant matter from feed of livestock animal and verification of antioxidant ability in the lean

研究代表者

高橋 敏能 (TAKAHASHI, Toshiyoshi)

山形大学・農学部・客員教授

研究者番号：70113959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：稲ワラ発酵完全混合飼料(TMR：対照区)または抗酸化能エルゴチオネイン(ERT)を含むタモギタケの廃菌床発酵TMR(試験区)をヒツジに給与して肥育すると、乾物消化率は稲ワラが高かったため飼料要求率は対照区7.1、試験区10.2だった。背最長筋の展示後のメトミオグロビンは、試験区が低く推移する傾向だった。展示2日と3日目の肉の赤色度は、試験区が高かった。HPLCおよびUPLC-PDA-ESI-MS検出器により廃菌床および稲ワラ中のERTを明確に検出できなかった。タモギタケ廃菌床給与でヒツジの赤肉が抗酸化される傾向だったのは、廃菌床に含まれるERTまたはERT以外の未確認物質の影響が考えられた。

研究成果の概要(英文)：When fermented total mixed ration (TMR: experimental plot) containing the waste mushroom bed of golden oyster mushroom which contains ergothioneine (ERT) with anti-oxidation ability or the fermented TMR (control plot) containing rice straw was fed to sheep and fattened, the feed conversion ratios as dried matter basis were 7.1 in control plot 7.1 and 10.2 in experimental plot 10.2, since the digestibility was superior in rice straw. The metmyoglobin of longissimus dorsi muscle after exhibition tended to change low for experimental plot. The degree of red color was higher in experimental plot than control plot on 2nd and 3rd days after exhibition. ERT in waste mushroom bed and rice straw could not be clearly detected by HPLC and UPLC-PDA-ESI-MS detector. The effect of ERT containing in waste mushroom bed or an unidentified material except for ERT was considered that the lean of sheep tended to do the antioxidant by feeding the waste mushroom bed containing golden oyster mushroom.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：飼料 エルゴチオネイン タモギタケ廃菌床 抗酸化能 発酵TMR 赤肉 メトミオグロビン 赤色度

1. 研究開始当初の背景

近年、機能性成分を含む食品の需要が高くなっている。例えば、反芻家畜では飼料中の不飽和脂肪酸から第一胃内で生成される共役リノール酸の抗発ガン性や稲発酵粗飼料に含まれるビタミン E の抗酸化作用などが挙げられる。タモギタケには強抗酸化物質であるエルゴチオネイン(ERT: ビタミン E の 7,000 倍)が多く含まれており、タモギタケを栽培した廃菌床にも菌糸由来の ERT が含まれていることが十分考えられる。一方、我が国においては輸入飼料価格の高騰が畜産経営を圧迫しているため飼料自給率向上のために自給飼料の増産と地球環境保全の立場から食品副産物や農場廃棄物などの未利用資源を飼料化することが勧められている。

2. 研究の目的

反芻家畜の肉を高付加価値化するために強抗酸化物質 ERT の検索とそれらの飼料と各種未利用資源から発酵完全混合飼料(TMR)を調製して給与して肥育した場合の飼料の利用性、および血液の ERT 濃度と赤肉の鮮度保持効果について研究する。具体的には、慣行粗飼料として用いられている稲ワラを対照粗飼料としてタモギタケを栽培したタモギタケ廃菌床を試験粗飼料として両飼料からの ERT を検索する。また、両飼料を素材とした発酵 TMR をヒツジに給与して肥育し、飼料の消化率、飼料要求率、肥育に伴う赤血球の ERT 濃度およびと殺解体後の赤肉のメトミオグロビンと赤色度(a 値)を調査する。

3. 研究の方法

(1) 稲ワラとタモギタケ廃菌床を素材とする発酵 TMR の調製と *in vitro* 法による消化試験

発酵 TMR の調製: 稲ワラを対照粗飼料とし、タモギタケ栽培後の廃菌床を試験粗飼料とした。両発酵 TMR の調製とも粗濃比を 3:7 (乾物)とし、タモギタケ廃菌床発酵 TMR は、アシドーシスの発症を抑制するために粗飼料を稲ワラ 1: 廃菌床 2(乾物比)とした。また、粗飼料以外の素材(乾物比)に豆腐粕 22、ビートパルプ 12、米ヌカ 12、フスマ 12、玄米 11 および第二リン酸カルシウム 1 の割合とし、日本飼養標準(肉牛)の粗タンパク質含量(12%/乾物)と粗繊維(7%/乾物)を満たすように配合して 200L のドラム缶でサイレージ調製した。廃菌床発酵 TMR には 0.5%の尿素を添加し、17日、47日、89日後に開封して上・中・下の3箇所から採取して混合し、常法による分析に供した。なお、調製時の稲ワラ発酵 TMR は水分を 45%に調整し、廃菌床発酵 TMR の水分は調整しなかった。

In vitro 法による消化試験: 第一胃フィステル装着ヒツジ 2 頭から採取した第一胃内容物を二重ガーゼで濾過後 10mL と

MacDoguall の人工唾液 40mL を混合した培養液に乾燥粉碎飼料(稲ワラまたは廃菌床) 0.5g 入れて 39 °C の水温下で 6、24 および 48 時間振盪培養した。なお、反復数は 3 反復とした。

(2) 発酵 TMR 給与によるヒツジの肥育試験、赤肉の鮮度の分析、体脂肪脂肪酸の分析および食味試験方法

ヒツジの肥育試験: ヒツジ 8 頭を供試して 2012 年 7 月 13 日~同年 12 月 7 日まで実施した。その際、粗タンパク質量および可消化養分総量および乾物量が日本飼養標準を満たすように朝 1 回給与した。稲ワラ発酵 TMR 給与区(対照区) 4 頭、タモギタケ廃菌床発酵 TMR 給与区(試験区) 4 頭を設定して実施したが、3 頭が発育不全または斃死したためデータから除外して 1 頭対照区に追加し、最終的には対照区と試験区ともそれぞれ 3 頭の供試頭数とした。また、飼育は群飼飼育で実施した。

赤肉の鮮度の分析: 肥育試験終了後と殺解体後、枝肉の左半丸背最長筋からステーキ(25×25×15mm×3 反復)を作成し、分光光度計を用いて切開 60 分後を 0 日とし、明度、赤色度および黄色度を 4 日間測定した。本報告書では差があった赤色度(a 値)のみの結果を示した。また、メトミオグロビンの反射率が異なる波長である 572nm における分光反射率を用いステーキ表面のメトミオグロビン割合を求めた。

体脂肪の脂肪酸分析: 左半丸枝肉の腎周囲脂肪、皮下脂肪および背最長筋肉内脂肪を分析試料とした。その際、腎周囲と皮下脂肪はクロロホルム 2: メタノール 1(V/V)で脂質を抽出・精製、筋肉内脂肪は凍結乾燥後ジエチルエーテルによりソックスレー抽出装置で脂質を抽出し、脂肪酸メチル化キットとメチル化精製キット(ナカライテクト(株); 京都)でメチルエステル化を行った。精製した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより分離・定量を行った。

食味試験: 食肉の官能評価ガイドライン(家畜改良センター編、2005 年出版)の方法に従って行った。市販のラム肉(ニュージーランド産) 両発酵 TMR を給与して肥育したラム肉の 3 種の肩肉をフライパンで焼いて食味に供試した。大学生を中心にしたパネラー 34 人(20 歳代 85%)から「香り」、「見た目」、「食感」、「風味」、「味の濃さ」、「あじのぼさ」および「総合評価」をそれぞれ 1 から 5 までの 5 段階で評価した。なお、3 種のラム肉名は先入観が入らないようにアルファベットで表記した。

(3) 肥育に伴う赤血中の ERT の分析方法と粗飼料からの ERT の検索方法

赤血球の ERT の分析方法: 肥育試験開始から終了まで 1~2 ヶ月間隔で 4 日間採食前と採食 4 時間後採血して血漿を遠心分離した後の赤血球分画の重量を計測したのち蒸留水を添加して定容希釈(25ml)し、その一定

量(4.0ml)を取りわけて2-メルカプトエタノール(ME)0.5mlを加えた。この溶液から1.0mlをSep-Pak plus C18カートリッジに通過させ、得られた通過液をメンブレンフィルター-HLCDISC25(水系、0.45 μm)で濾過後、HPLC (Develosil C30-UG-5, H₂O, UV (258nm))でERTを定量し、赤血球分画重量1g当たりのERT量を算出した。

粗飼料(稲ワラとタモギタケ廃菌床)からのERTの検索:タモギタケ廃菌床を乾燥し細粉にしたもの1kgおよび稲ワラの乾燥微粉末1kgを、それぞれについてヘキサ、酢酸エチル、アセトン、メタノール(MeOH)および水を用いて連続的に溶媒抽出を行った。ERTを含むことが期待される水抽出画分についてERT検出のための予備的な精製手段としてシリカゲルのカラムクロマトグラフィーでMeOH-水系による溶出を行った。ついでERTを含む画分に相当する30%MeOH区について、さらに精製段階を高めるべくDevelosil C-30カラムを用いたHPLC分取を行った。HPLCカラムで溶出されたERTに対応する保持時間に相当する画分を分取した。ERT画分の溶出液をフリーズドライさせた後、NMR、HPLCおよびUPLC-ESI-MS分析を行った。

実験データは、JMP® 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて平均標準誤差(SEM)を算出しt検定により有意性を評価した。

4. 研究成果

(1) 発酵TMRの発酵品質と*in vitro*法による乾物消化率

発酵TMRの発酵品質:開封時の水分含量は、稲ワラ発酵TMR44.7%、廃菌床発酵TMR32.4%だった。廃菌床発酵TMRは稲ワラ発酵TMRよりpH、酪酸およびVBN/T-Nが高く、乳酸が低かったことからフリーク評点が有意に低かったが、評価基準では「可」であり、廃菌床発酵TMRの発酵品質は特に問題はないと思われた。また、両発酵TMRとも開封時の季節による発酵品質に差はなく良好な品質だった(表1)。

表1. 発酵TMRの発酵品質

	pH	乳酸 (新鮮物%)	酪酸	VBN/T-N (%)	フリーク評点
稲ワラ発酵TMR	4.4	3.1 ^a	0.4	3.8	100 ^a
廃菌床発酵TMR	4.5	2.3 ^b	0.8	5.1	48 ^b
SEM	0.2	0.5	0.3	1.4	29

VBN/T-N:揮発性塩基態窒素/総窒素, SEM: Standard error of means, 異符号間に5%水準で有意差あり。

*In vitro*法による乾物消化率:6時間培養で両粗飼の乾物消化率に差はなかったが、培養24時間と48時間培養ではモギタケ廃菌床は稲ワラより有意に低く推移した(表2)。この原因として、タモギタケ廃菌床は難消化性成分である酸性デタージェント繊維(ADF:乾物%)が58.3であり、稲ワラより13.8高かったためと考えられた。

表2. *In vitro*法による培養に伴う乾物消化率(%)

	6時間	24時間	48時間
稲ワラ	22.6	38.1 ^a	47.4 ^a
タモギタケ廃菌床	23.6	30.2 ^b	33.6 ^b
SEM	1.4	4.7	7.6

SEM: Standard error of means, 異符号間に5%水準で有意差あり。

(2) 発酵TMR給与によるヒツジの肥育試験結果、赤肉の鮮度、体脂肪脂肪酸組成および食味成績

ヒツジの肥育試験結果:開始時体重(kg)と終了時体重(kg)はそれぞれ、対照区25.4、40.2、試験区26.0、38.2と有意差はなかったが、飼料消費量と増体重から算出した飼料要求率は対照区7.1、試験区10.2と試験区が劣っていた(表3)。この結果は、タモギタケ廃菌床の*in vitro*法による乾物消化率が稲ワラより低かったことが原因であると思われた。

表3. 飼料の利用性

	開始時体重	終了時体重	飼料消費量(乾物)	増体重	FCR
	(kg)			(kg)	
対照区	25.4	40.2	104.6	14.8	7.1
試験区	26.0	38.3	126.2	12.3	10.2
SEM	2.0	8.7	—	—	—

FCR: 飼料要求率(乾物), SEM: Standard error of means.

赤肉の鮮度:試験区の展示後4日後までの背最長筋のメトミオグロビン割合(%)は対照区より低く推移し、特に展示1日目では試験区21.6、対照区41.6と試験区が有意に低かった(表4)。また、展示後の赤色度(a値)も試験区が高く推移し、展示2日と3日後に有意差がみられた(表5)。表に記載しなかったが、展示後4日までの明度(L値)と黄色度(b値)は区間に差がなかった。

以上の結果、試験区の赤肉(背最長筋)は鮮度保持効果があることが示された。

表4. 背最長筋の展示後のメトミオグロビン濃度(%)

展示日数	対照区	試験区	SEM
0	8.4	4.5	3.9
1	41.7 ^a	21.6 ^b	13.1
2	55.6	33.8	15.5
3	61.0	38.1	16.9
4	63.5	41.6	17.5

異符号間に5%水準で有意差あり。

表5. 背最長筋の赤色度(a値)

展示日数	対照区	試験区	SEM
0	14.3	16.4	1.9
1	11.4	15.7	3.1
2	10.7 ^b	14.4 ^a	2.3
3	10.1 ^b	14.0 ^a	2.5
4	10.1	13.4	2.2

異符号間に5%水準で有意差あり。

体脂肪脂肪酸組成：主要な脂肪酸であるパルミチン酸(C16:0)とステアリン酸(C18:0)は、対照区と試験区間に差がなかったが、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18:1)は背脂肪で試験区が有意に低く、腎周囲脂肪で有意に高かった(表6)。このように部位により脂肪酸組成が異なる原因は明らかにできなかった。また、バクセン酸(t11C18:1)は、1.6%~10.2%と比較的高かったが、個体差があり区間に有意差は認められなかった。さらに、共役リノール酸(CLA)であるc9・t11C18:2脂肪酸は背脂肪で対照区が試験区より有意に高かった。今後、両飼料を給与した場合の第一胃内容液の不飽和脂肪酸への水素添加の推移を調査する必要があると思われる。

表6. 体脂肪の主な脂肪酸組成(%)

部位	区	C16:0	C18:0	C18:1	t11C18:1	c9・t11C18:2
背脂肪	対照区	19.9	27.0	39.1 ^a	3.7	0.7 ^a
	試験区	21.4	33.1	30.1 ^b	6.3	0.4 ^b
	SEM	0.8	2.1	2.1	1.7	0.1
腎周囲脂肪	対照区	19.6	36.3	22.1 ^b	10.2	0.7
	試験区	16.1	37.7	29.8 ^a	7.2	0.4
	SEM	0.9	3.3	1.3	3.3	0.2
背最長筋	対照区	20.1	23.0	44.2	1.6	0.6
	試験区	18.4	23.6	42.5	2.2	0.6
	SEM	0.7	2.3	1.8	0.7	0.1

SEM: Standard error of means, 異符号間に5%水準で有意差あり。

食味成績：「見た目」では市販のラム肉が高く評価されたが、風味、香りおよび総合評価で発酵 TMR を給与して肥育すると高く評価されることが示された(図1)。対照区と試験区間の食味の違いでは、試験区が対照区より「あぶらっこさ」で劣り、「見た目」と「食感」で優れた評価だった。

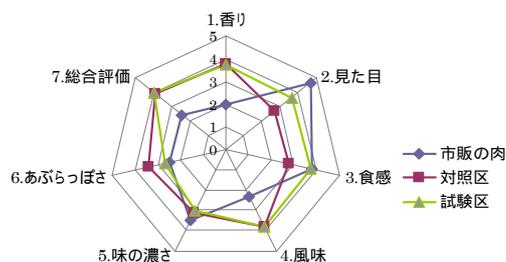


図1. 食味試験

(3) 肥育に伴う赤血中の ERT の濃度と粗飼料からの ERT の検索結果

肥育に伴う赤血中の ERT の濃度：ERT 含有量は個体間の差が大きく、肥育に伴い増加するなどの一定の傾向や区間に ERT 濃度の違いはみられなかった。また、採食前と採食後の ERT 含有量の違いについても、対照区と試験区の間には明確な傾向はみられなかった。

表7-1. 肥育に伴う赤血球中ERT濃度(採食前:µg/g)

	7月12日	8月13日	10月12日	12月6日
対照区	20.8	30.0	24.2	36.9
試験区	13.1	16.9	16.6	23.2
SEM	3.4	5.0	3.5	7.2

SEM: Standard error of means.

表7-2. 肥育に伴う赤血球中ERT濃度(採食後:µg/g)

	7月12日	8月13日	10月12日	12月6日
対照区	17.1	34.2	29.3	39.7
試験区	12.9	18.5	15.6	18.8
SEM	2.9	5.5	4.6	7.7

SEM: Standard error of means.

粗飼料(廃菌床と稲ワラ)からの ERT の検索結果：廃菌床中の ERT の検出実験については、抽出特性の異なる抽出溶媒を連続的に用いて廃菌床中に存在する夾雑物を除去し、さらにシリカゲルおよび C-30 の逆相カラムを用いて HPLC 分取カラムで ERT の精製操作を進め、生成した画分の NMR 分析、HPLC 分析、UPLC-ESI-MS 分析で ERT の検出を試みたが、ERT を明確に検出することには成功しなかった。稲ワラについても同様であった。今回の分析は水抽出区について行ったが、結果的に MeOH 抽出区に存在する可能性も考えられ、また分離操作中での ERT の夾雑物などとの反応による変化についても考えられ、より直接的な検出方法の検討が必要と思われる。

結論：タモギタケ廃菌床を含む発酵 TMR を調製すると発酵品質は良質で安定しており家畜用飼料として問題なく、ヒツジに給与して肥育すると稲ワラ発酵 TMR より飼料の利用性は若干劣るが、肥育可能なことが示された。また、タモギタケ廃菌床を給与すると赤肉の鮮度保持効果が上昇する傾向があり、付加価値があることが分かった。しかし、タモギタケ廃菌床を給与しても赤血球の ERT 濃度の上昇効果はなく、今後タモギタケ廃菌床からの ERT の検索技術の開発など、さらなる実験の実施が必要であると思われる。

以上の結果から、試験頭数を増加して肥育した赤肉の鮮度保持効果の確認実験などが必要と思われるが、タモギタケ廃菌床発酵 TMR 給与により赤肉の鮮度保持効果が上昇したのは、タモギタケ廃菌床に含まれる ERT の存在、または ERT 以外の未確認物質の存在が考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

高橋敏能・貫名 学・他 6 名・ヒツジへのタモギタケ廃菌床給与が飼料の利用性と赤肉の鮮度保持効果に及ぼす影響．東北畜産学会．2013 年 8 月 30 日．山形市双葉町 山形テルサ(3階アプローチ)．

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

高橋 敏能(TAKAHASHI, Toshiyoshi)

山形大学・農学部・客員教授

研究者番号：70113959

(2)研究分担者

貫名 学(NUKINA, Manabu)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：20113970

(3)連携研究者 なし

研究者番号：