

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660207

研究課題名(和文) 畜産領域におけるギンナン廃棄果肉の利活用ポテンシャル

研究課題名(英文) Possible availability of ginkgo fruit as an additive for animal feed and manure

研究代表者

小林 泰男 (KOBAYASHI, YASUO)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50153648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：畜産由来温暖化ガスの削減に向け、ギンナン果肉の有用性について検討した。果肉のエタノール抽出物をルーメン液に添加し、閉鎖培養系と人工ルーメンにて発酵に対する影響を査定した。2大品種のうち、久寿は藤九郎よりもメタン削減効果が高く、添加量依存的にメタン生成を低減し、プロピオン酸増強をもたらした。これはアナカルド酸の含有率が高いことに由来した。ルーメン菌叢は劇的に変化し、メタンの基質となる水素やギ酸生成菌が減少し、プロピオン酸生成関連菌が増加した。乳牛の糞便に抽出物を添加培養しても同様にメタンを低減できたことから、ギンナン果肉はルーメンのみならず堆肥発酵調整剤としても利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ginkgo fruit was evaluated as a methane inhibitor for rumen and fecal fermentation. Ethanol extract of ginkgo fruit was incubated with rumen fluid in batch and continuous cultures to monitor fermentation changes. Of 2 major cultivars, Kyuju was more potent than Tokuro in terms of methane mitigation and propionate enhancement, showing dose dependent responses. This was caused by a higher content of anacardic acid in the fruit of Kyuju. Rumen microbiota was drastically changed toward lower abundance of hydrogen and formate producing bacteria and higher abundance of propionate and succinate producing bacteria. As ginkgo extract decreased methane production from feces of dairy cattle in batch culture, ginkgo fruit is considered useful for modulating rumen and manure fermentation.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：メタン低減 ギンナン果肉 アナカルド酸 飼料添加物 ルーメン 糞便 発酵 菌叢

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜第一胃(ルーメン)由来のメタンガス低減研究はおおよそ半世紀前より注目されていたものの、飼料エネルギーの効率的利用という発想に由来するものであった。温暖化緩和という新しい観点が生まれ、メタンガス低減研究に一大潮流が生じたのはごく最近である。すなわち、1970年代後半より米国を中心に成長促進用イオノフォア抗生物質(モネンシン他)が全世界に普及し、これら抗生物質がメタン低減効果を有することは認識されていた。しかし、欧州での成長促進用抗生物質の使用禁止(2006)以降、全世界で新しいルーメン発酵制御物質のスクリーニングが展開され、メタン低減効果を有する植物由来物質の探索が大規模化した。

国内では北海道大学と出光興産を中心としてカシュー殻液製剤が開発され、日本発のメタン低減技術として注目を浴びている。本低減効果は、カシュー殻液が含有する抗菌性フェノール成分(アナカルド酸ほか)によるルーメン微生物相および発酵様式の変化に帰することがすでに特定されている。アナカルド酸は極めて希少なフェノール成分であり、カシュー以外の植物で産業利用を考えた時、量的確保が可能なのはイチヨウのみである。イチヨウギンナン生産時の廃棄物として生じる果肉部は収穫果実重の約75%を占め、国内の果肉廃棄量は約3000トンに達する。日本のギンナン産業は、生産量で愛知、大分、福岡といった畜産振興県がトップ3を占めており、廃棄果肉の畜産領域への利活用をはかるにあたって、地理的にも至便と思われる。

以上のような背景から、ギンナン果肉を利用した新しいメタン低減剤を開発するにあたり、学術的要因(アナカルド酸の含有率)に社会的要因(産業地理)も考慮しつつ、素材選択と期待効果発現の実証を行うことがより重要と考えられる。ただし、ギンナン果肉には数種の栄養学的負成分(ビタミンB6拮抗物質など)が含まれることから、いままですべて家畜飼料として評価されたことはない。

本課題では、従来発想すらなかったイチヨウ原木品種の選択により、よりアナカルド酸含有率の高いものを特定し、効果の最大化をはかりながら、反芻家畜ルーメンおよび排泄糞便から生じるメタンガスの低減をはかろうとするものである。

2. 研究の目的

畜産由来(とくにルーメン由来)温暖化ガスの削減にあたり、有用なメタン低減剤が開発されているが、多くの素材が外国産であり輸送コストが無視できないという難点がある。本課題では、国内農業廃棄物であるギンナン果肉に着目する。ギンナン果肉には抗菌性希少フェノール・アナカルド酸が含まれ、本成分はルーメンでのメタン低減をもたらすので、果肉は飼料素材と考えうる。しかし国内には異なるイチヨウ原木品種が存在し、

果肉の機能性が大きく異なる可能性も無視できない。そこで、ギンナン品種を考慮し、果肉にアナカルド酸を安定的に最大含有するものを選抜する、その素材の抽出物を飼料に混合しルーメン液に添加培養した際の反応(メタンガス発生量、その他の消化指標)をモニタリングする、ルーメン微生物組成の変化を精査する、などを通して、消化を阻害せずにメタンガスを低減できる新飼料(ギンナン産業廃棄物を初めて利用)を提示することを第一の目的とする。

一方、排泄糞便やその放置・堆肥化の過程でもメタンガスは発生することがわかっている(ルーメン由来メタン量の1/5~1/9に相当)。ルーメンでのメタン低減に有効であったギンナン果肉を糞便へ添加した際に、ルーメン同様メタン低減が可能か否かについて検討するとともに、その機構解明のための基盤情報を取得する。これを本研究の第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 果肉エキスの調製と分析

国内で栽培されるギンナンの品種は主に5つ(藤九郎、久寿、喜平、金兵衛、栄神)あり、収穫期や種子粒の大きさが異なる。このうち最も収穫量が多い、すなわち廃棄果肉が多い2品種(藤九郎および久寿)を試験素材とした。JA愛知西の提携ギンナン農家(愛知県祖父江町)にて新鮮果肉を採取し、冷凍便にて北海道大学へ送付後、適時解凍し実験に使用した。果肉はエタノールに浸漬しフェノール成分を抽出後、濃縮し、試験用エキスを得た。フェノール成分は出光興産先進技術研究所にてHPLC分析し、品種間差異について明らかにした。また果肉の一般成分を分析し、将来的に飼料としての応用に資する際に必要な化学成分値を得た。

(2) ルーメン液への添加培養

2品種の果肉エキスを各々ルーメン液(北海道大学農場のめん羊2頭よりフィステル経由で採取、等量混合後、2重ガーゼ濾過したもの)に添加後、飼料粉末とともに嫌気培養し、発酵産物(ガスおよび短鎖脂肪酸ほか)について分析することで、いずれの品種がよりメタン低減に対し効果的か、について検討した。培養にはハンゲートチューブを使用し、ルーメン液はMcDougalの緩衝液で2倍希釈したものを用いた。なお、果肉エキスの添加濃度は1.6%とした(使用するエキス量をオリジナルの果肉重量に換算し、培養液中の濃度として示した値)。

以後の実験は、より発酵指標改変効果の高かった品種の果肉エキスを限定して実施した。すなわち、果肉エキス添加量の増量に対する反応について、上記発酵産物の変化を追い、メタンガス低減が期待できる最小添加濃度を査定した。さらに連続培養系(人工ルーメンRUSITEC)を用い、より実際のルーメン

に近い環境下で果肉エキスの添加効果を査定した。この際、発酵産物のみならず、飼料消化率をナイロンバック法で、ルーメン微生物相については定量的 PCR 法で検討した。定量した微生物群は以下のとおりである。総細菌、総古細菌 (メタン生成菌) *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella* 属, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella bryantii*, *Treponema* 属, *Treponema bryantii*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Ruminobacter amylophilus*, *Slenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Streptococcus bovis*, プロトゾアおよび真菌、の計 17 群とした。これらのうち、総細菌、総プロトゾアおよび総真菌は培養液 1mL に含まれる 16S rDNA または 18S rDNA コピー数で示した。その他の菌群は、総細菌の同 DNA コピー数に対する各菌群のその相対値 (%) で表わした。

(3) 糞便への添加培養

北海道大学農場のホルスタイン種乳牛 2 頭 (一般的な TMR 給与) の直腸より新鮮糞便を採取し、等量を混合後、McDougal の緩衝液で 2 倍希釈し、2 重ガーゼ濾過したものを供試した。予め果肉エキスまたはエタノールを加え、エタノールを揮発させたハンゲートチューブに上記糞液を加え (エキス添加は 1.6、3.2 および 4.8% 相当) 30 で 7 日間培養した。ガスおよび短鎖脂肪酸を測定し、果肉エキスの糞便発酵へおよぼす影響を査定した。なお糞便培養試験に使用した果肉エキスは、ルーメン液への添加培養で発酵改変効果のより高かったイチヨウ原木品種由来のものとした。

4. 研究成果

(1) 化学成分とルーメンメタン低減効果

果肉のエタノール抽出物をルーメン液に添加し、閉鎖培養系と人工ルーメンにて発酵に対する影響を査定した。2 大品種のうち、久寿は藤九郎よりもメタン低減効果が高く、添加量依存的にメタン生成を低減し、プロピオン酸増強をもたらした。酢酸および酪酸生成も添加量依存的に減少した。これは藤九郎より久寿においてアナカルド酸含有率が高い (12.2 vs. 46.2mg/g 果肉) ことに由来したと思われる。人工ルーメン試験サンプルで評価したルーメン菌叢は果肉エキス添加で劇的に変化していた。すなわち、メタンの基質となる水素やギ酸生成菌 (*R. flavefaciens*, *R. albus*, *T. bryantii*) を含む *Treponema* 属菌) が減少し、プロピオン酸生成関連菌 (*P. ruminicola*, *S. dextrinosolvens*, *s. ruminantium* および *M. elesedenii*) が増加した。

(2) 糞便メタン低減効果

ルーメンに引き続き、糞便からのメタンガス生成を低減できるかに関する検討として、乳牛の糞便に果肉エキスを添加培養したところ、添加量依存的にメタンを低減でき、同時にプロピオン酸の増加も認められた。この際、糞便菌叢の変化が生じたことを PCR-DGGE で確認しており、アナカルド酸の選択的抗菌効果による発酵様式の改変が、メタン低減をもたらしていること、またこれらの効果はルーメンへの効果と類似していることを明らかにした。

Table 1. Chemical composition of ginkgo fruit

Content	Ginkgo cultivar	
	Kyuju	Tokuro
Ingredient, % on a wet basis		
Moisture	80.0	71.6
Crude protein	1.4	1.8
Crude ash	0.8	1.6
Neutral detergent fiber	4.2	1.9
Non-structural carbohydrate	7.0	20.7
Ether extract	7.4	4.0
Total phenolic, µg/g wet fruit		
Anacardic acid (C13:0)	5.2 (9.5)	1.5 (10.3)
Anacardic acid (C15:1)	29.4 (54.1)	7.7 (55.0)
Anacardic acid (C17:1)	11.6 (21.4)	3.0 (21.5)
Cardanol (C15:1)	1.2 (2.2)	0.3 (2.3)
Cardol (C15:1)	6.9 (12.7)	1.5 (10.9)

Table 2. Effect of ginkgo extract supplementation on rumen fermentation profile in RUSITEC

Parameters	Control	Ginkgo extract	SEM	P-value
Total gas (mL/d)	1625.0	1580.0	80.86	0.797
CO ₂ (mL/d)	1387.0	1442.1	73.87	0.729
CH ₄ (mL/d)	233.0	109.2	16.55	<0.001
H ₂ (mL/d)	5.0	28.9	3.87	0.003
pH	6.67	6.62	0.007	<0.001
Total SCFA (mM)	64.9	67.5	0.89	0.143
Acetate (mM)	30.1	23.0	0.45	<0.001
Propionate (mM)	11.3	17.3	0.34	<0.001
n-Butyrate (mM)	15.8	15.9	0.24	0.625
Acetate (Molar %)	49.2	37.9	0.71	<0.001
Propionate (Molar %)	18.5	28.5	0.56	<0.001
n-Butyrate (Molar %)	25.8	26.3	0.39	0.295
Ammonia (mg of N/100 mL)	17.5	8.1	0.85	<0.001
DM digestibility (%)	59.6	60.9	0.47	0.184
NDF digestibility (%)	46.7	46.3	0.47	0.718
ADF digestibility (%)	27.9	28.5	0.45	0.546

(3) 結論と課題

以上の結果より、ギンナン果肉はルーメンではもちろんのこと、堆肥発酵調整剤としても活用できる可能性が示唆された。今後は実際の家畜への給与試験による評価が必須である。

本研究では果肉に含有される栄養学的負成分の分解・除去方法の検討まで至らなかった。ギンナン果肉に含まれる毒素のひとつアミダグリンはシアン化水素を生成するが、長期保存で減退することが知られているので、

完熟状態で収穫し、サイレージなどの乳酸発酵にさらし、毒素の減退を加速するのが有効な戦略と考えられる。またサイレージ化の過程で増殖する乳酸菌は、ビタミン B6 を産生し、果肉が含有するもうひとつの毒素でビタミン B6 拮抗物質である 4-メトキシピリドキシンの作用を緩衝できる可能性がある。サイレージ添加剤として、とくにビタミン B6 生成に秀でた乳酸菌を含めるなども今後のオプションになるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Fukuma, N., S. Koike and Y. Kobayashi. Monitoring of gene expression in *Fibrobacter succinogenes* S85 under the co-culture with non-fibrolytic ruminal bacteria. *Archives of Microbiology*, 197:269-276. 2015. 査読有.

真貝 拓三・永西 修・三森・眞琴・長嶋 協・小林 泰男 カシューナッツ殻液を利用した乳用牛からのメタン低減技術 栄養生理研究会報. 58: 45-51. 2014. 査読有.

Koike, S., Y. Yabuki, and Y. Kobayashi. Interaction of rumen bacteria as assumed by colonization patterns on untreated and alkali-treated rice straw. *Animal Science Journal*, 85: 524-531. 2014. 査読有.

Shinkai, T., T. Ueki, S. Koike and Y. Kobayashi. Determination of bacteria constituting ruminal fibrolytic consortia developed on orchard grass hay stem. *Animal Science Journal*, 85: 254-261. 2014. 査読有.

Mitsumori, M., O. Enishi, T. Shinkai, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, K. Nagashima, M. Mochizuki and Y. Kobayashi. Effect of cashew nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. *Animal Science Journal*, 85: 227-232. 2014. 査読有.

〔学会発表〕(計 17 件)

川西 由希子・橋本 拓弥・河内 博貴・遠藤 哲代・糟谷 広高・庄司 則章・小池 聡・小林 泰男 黒毛和種牛ルーメン細菌叢の網羅的解析と重要細菌群の特定. 日本畜産学会第 121 回大会. 日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市). 2016 年 3 月 27-30 日(講演要旨 P157).
Konda, S., R. Onodera, E. Kanchanasatit, P. Boonsaen, S. Sawanon, K. Nagashima, S. Koike, Y. Kobayashi. Cashew nut shell liquid feeding for mitigating methane

production in Thai local ruminants. 6th Greenhouse Gas and Animal Agriculture Conference, Melbourne, Australia, Feb 14-18, 2015.

今川 達也・小池 聡・島本 周・中村 敏和・小林 泰男 酢酸セルロース添加がルーメン発酵および菌叢におよぼす影響. 北海道畜産草地学会第 4 回大会. 酪農学園大学(北海道・江別市). 2015 年 9 月 12 日-15 日(北海道畜産学会報.4:92).
Oh, S., S. Koike and Y. Kobayashi. Ginkgo fruit extract as a rumen modifier for ruminant animals. 10th Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Sunchon National University, Suncheon, Korea. Aug 3-6, 2015.

Ueno, M., S. Koike, M. Sato, M. Takahashi, T. Yokoya, H. Kono, N. Ashida, Y. Kobayashi, and T. Imabayashi. Exploration of rumen microbiota in Japanese Black calves from birth to weaning. 10th Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Sunchon National University, Suncheon, Korea. Aug 3-6, 2015.

Sakanaka, Y., Y. Kobayashi, S. Koike, O. Enishi, T. Shinkai, M. Mitsumori, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, and K. Nagashima. Effect of cashew nut shell liquid feeding on rumen fermentation in lactating Holstein cows. 10th Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Sunchon National University, Suncheon, Korea. Aug 3-6, 2015.

Kishi, H., Y. Iwahashi, H. Myint, S. Koike and Y. Kobayashi. Influence of bean husk feeding on hindgut fermentation and microbes in rats. 10th Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Sunchon National University, Suncheon, Korea. Aug 3-6, 2015.

Fukuma, N., S. Koike, and Y. Kobayashi. Transcriptome analysis of *Fibrobacter succinogenes* S85 in co-culture with nonfibrolytic ruminal bacteria. 2015 Congress on Gastrointestinal function. Chicago, USA. Apr 13-15, 2015.

秋山 瑤子・小池 聡・小林 泰男 黒毛和種牛ルーメンからの新規細菌の分離培養. 日本畜産学会第 119 回大会. 宇都宮大学(栃木県・宇都宮市). 2015 年 3 月 28 日-30 日.(講演要旨 P135. 28-01).

上野 真知帆・小池 聡・佐藤 光美・高橋 政俊・横谷 俊英・河野 晴子・

芦田 延久・小林 泰男・今林 寛和・
黒毛和種新生子牛の哺乳期におけるルー
メン細菌叢変化．日本畜産学会第 119 回
大会．宇都宮大学（栃木県・宇都宮市）.
2015 年 3 月 28 日 30 日．（講演要旨
P135. 28-02）

小池 聡・上野 真知帆・佐藤 光美・
高橋 政俊・横谷 俊英・河野 晴子・
芦田 延久・小林 泰男・今林 寛和・
枯草菌の給与が黒毛和種新生子牛のルー
メン細菌叢形成に与える影響．日本畜産
学会第 119 回大会．宇都宮大学（栃木県・
宇都宮市）.2015 年 3 月 28 日-30 日（講
演要旨 P135. 28-03）.

田森 航也・松永 文吾・小林 泰男・
小池 聡・Somporn Poonko・
Phoompong Boonsaen・Suriya
Sawanon・長嶋 協．カシューナッツ殻
液給与がタイ在来牛および沼沢水牛の糞
便発酵および菌叢に及ぼす影響．第 46
回ルーメン研究会．明治大学（東京都・
千代田区）. 2014 年 9 月 27 日．（講演要
旨 P25）

岩橋 悠・Htun Myint・小池 聡・小林
泰男．マメ外皮給与がラットの腸管発酵
と菌叢に及ぼす影響．第 46 回ルーメン研
究会．明治大学（東京都・千代田区）.2014
年 9 月 27 日．（講演要旨 P41）

河内 博貴・川西 由希子・小池 聡・
小林 泰男．次世代シーケンサーを用い
た黒毛和種ルーメン細菌叢の網羅的解析
第 46 回ルーメン研究会．明治大学（東京
都・千代田区）. 2014 年 9 月 27 日．（講
演要旨 P63）

武田 晴香・福間 直希・小池 聡・小
林 泰男．ルーメン内繊維分解コンソー
シヤムにおける非繊維分解菌の相互作用
検証．第 46 回ルーメン研究会．明治大学
（東京都・千代田区）. 2014 年 9 月 27
日．（講演要旨 P63）

Iwahashi, Y., H. Myint, S. Koike and Y.
Kobayashi. Effect of bean husk feeding
on microbes and fermentation in
gastro-intestinal tract of rats. Joint
ISNH/ISRP International Conference
2014. Canberra, Australia. September
8-12. 2014.

Kawanishi, Y., H. Kawauchi, S. Koike
and Y. Kobayashi. Exploration of
rumen bacterial flora in Japanese
Black cattle. Rowett-INRA 2014 Gut
Microbiology, Aberdeen, UK. June
16-19. 2014.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

（本研究課題成果を国際学会で発表した博
士課程学生が優秀発表賞を受賞）

[http://www.agr.hokudai.ac.jp/news/2015/
08/post-626.html](http://www.agr.hokudai.ac.jp/news/2015/08/post-626.html)

6．研究組織

(1) 研究代表者

小林 泰男（KOBAYASHI YASUO）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50153648

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし