

**植物エキス発酵液の製造副産物における
飼料価値に関する研究**

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学科専攻
(帯広畜産大学)

平田 浩

目次

第 1 章 諸論	1
第 2 章 植物エキス発酵液 製造副産物の <i>in vitro</i> 試験による腸内発酵性の評価	
第 1 節 目的	5
第 2 節 実験方法	
1. 植物エキス発酵液の調製	6
2. 試験試料の調製	6
3. 試験群の設定	7
4. 微生物培養装置による培養方法	7
5. 培養液による各種分析	8
6. 統計解析	11
第 3 節 結果	12
第 4 節 考察	38
第 3 章 植物エキス発酵液 製造副産物がラットの腸内環境に与える影響	
第 1 節 目的	41
第 2 節 実験方法	
1. 植物エキス発酵液の調製	43
2. 試験試料の調製	43
3. 実験動物および食餌飼料	45
4. 盲腸内容物における各種分析	47
5. 統計解析	49
第 3 節 結果	50
第 4 節 考察	60
第 4 章 植物エキス発酵液 製造副産物が肥育豚の産肉性に及ぼす影響	
第 1 節 目的	66

第2節	実験方法	
1.	植物エキス発酵液の調製	68
2.	供試豚	68
3.	試験区分	68
4.	飼養管理方法	70
5.	調査項目	70
6.	食味官能検査	76
7.	経済的評価	77
8.	統計解析	77
第3節	結果	78
第4節	考察	92
第5章	総合考察	97
	要約	100
	謝辞	102
	参考文献	103

第 1 章 諸論

国産や輸入の鶏肉の半数から抗生物質（抗菌薬）が効かない薬剤耐性菌が検出されたことが、厚生労働省研究班の調査で明らかになった¹⁾。これらの食肉は健康人が摂取しても健康上の影響はないが、免疫力が低下している病人や高齢者、また乳幼児らの体内に侵入して感染した場合、抗菌薬による治療が困難になる恐れがあると警告されている。薬剤耐性菌の感染拡大を防ぐためには、人だけではなく家畜への対策も重要で、世界保健機関（WHO）は家畜向けの抗菌薬の使用を減らすよう各国に求めている²⁾。

WHO が特に問題視しているのは、家畜の成長を促進させる目的で使用される飼料添加物としての抗菌薬である。健康な家畜に抗菌薬を与えると成長が早くなることが知られており³⁾、本来の目的だった多頭飼養による感染症リスクの低減よりも、むしろ成長促進を狙った使用が拡大し、それが世界的に認められてきた歴史的事実も明らかになっている。日本でも 2015 年に販売された動物用抗菌薬のうち、約 20% が飼料添加物だった⁴⁾。

一方で、日本の農林水産省は、2017 年 1 月に、豚など家畜に使用されている抗生物質「コリスチン」に関して、将来的に薬剤耐性菌を発生させ、人の治療に影響する可能性があるとのリスク評価結果を厚生労働省に答申し、使用許可を取り消すなどの対策を始めているが、まだ使用が認められている抗菌薬も多い。欧州連合（EU）全体では、食用動物に使用される抗菌薬によって耐性菌が出現し、それによる人の健康に対する影響は明らかであると結論付けられた⁵⁾後に、成長促進目的での抗生物質の販売・使用を 2006 年 1 月から全面的に禁止している。消費者の食に対する安全志向がより一層高まる中で、食用動物に対する抗菌薬の使用制限や、その乱用で既に出現している耐性菌の感染拡大防止には、新興国を含めて世界での対策が必要である。

このような国際情勢を受けて近年、飼料添加される抗生物質の代替えとして、プレバイオティクスやプロバイオティクスを利用した、より健全な家畜生産を目的とする機能性飼料の開発が期待され、また推進されている。

プレバイオティクスは「腸内常在菌の生育や活性に影響を与えることに

より、宿主の健康を改善する難消化性食品成分」と定義される⁶⁾。その種類にはオリゴ糖，多糖類を含む食物繊維や難消化性デンプンなどが挙げられる。プレバイオティクスは消化酵素の影響をほとんど受けることなく大腸内へと到達し，ビフィズス菌や乳酸菌のような宿主に対して有用な腸内細菌の増殖に選択的に利用される。プレバイオティクスとして報告されている食品には，オリゴ糖ではラクトスクロース，フラクトオリゴ糖，大豆オリゴ糖，コーヒー豆マンノオリゴ糖，ラクツロースなどがある^{6,7)}。また天然の食品から抽出された食物繊維でプレバイオティクス活性を持つ物質には，ゴボウ，チコリおよびキクイモなどに含まれるイヌリン⁸⁾やサイリウム⁹⁾，小麦全粒粉¹⁰⁾，アラビアガム¹¹⁾，大麦由来β-グルカン¹²⁾などが報告されている。

藤井らの研究によると，コーヒー豆由来のマンノオリゴ糖をラットに投与すると，盲腸内の *Bifidobacterium* が増加し，短鎖脂肪酸の産生増加が認められたことが報告されている⁷⁾。また Han らの研究によると，チコリの根から採取されたイヌリンについて，豚の糞中微生物の混合培養による *in vitro* 試験では，*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* が増加し，短鎖脂肪酸濃度の増加やアンモニア態窒素濃度の低下が見られ，腸内細菌による発酵性を有することが示唆された⁸⁾。

さらに最近の研究により，食物繊維の発酵から生成される短鎖脂肪酸の生体に対する影響が明らかになってきた¹³⁾。大腸内で生成される短鎖脂肪酸は局所で栄養源になるほか，G 蛋白質共役受容体 (G protein-coupled receptor:GPR) を活性化させて細胞機能に作用することにより，宿主の代謝状態に重要な影響を与える¹⁴⁾。また大腸内の免疫グロブリン A (Immunoglobulin A:IgA) やムチンの分泌にも関与し，腸管粘膜バリア機能の増強に寄与することも示唆されている¹⁵⁾。

一方，プロバイオティクスは「腸内環境を整え，生体に有益な作用を及ぼす生きた微生物やその微生物を含む食品」と定義づけられている¹⁶⁾。プロバイオティクスの分野では，とくに発酵乳やヨーグルト製造に利用される *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* などの乳酸菌や，*Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *B. breve* などのビ

フィズス菌に関する報告が数多くなされており^{16,17)}，*in vitro*や動物実験のみならず，人による摂取試験なども既に行われて，アレルギー疾患やアトピーの予防・改善効果，感染症の予防効果が示唆されている¹⁷⁾。また酵母は，古くから発酵食品であるワイン，ビール，日本酒などの酒類，パン，味噌や醤油，ヨーグルトの一種であるケフィアなどの製造に用いられてきた¹⁸⁾。最近では，酵母エキスの食品への利用，菌体成分の機能性食品としての利用，家畜の飼料への添加利用等も進んでいる。とくに家畜においては，*Saccharomyces cerevisiae* 摂取による牛の泌乳量の増加¹⁹⁾や，子豚の成長促進改善効果²⁰⁾が報告されている。さらにマウスにおいては，*S. boulardii* や *S. cerevisiae* の特定菌株の経口摂取による分泌型 IgA の産生促進，血中 *E. coli* の排除促進，*Salmonella enterica* serotype Typhimurium のトランスロケーション抑制効果が報告されている²¹⁾。

このように，プレバイオティクスやプロバイオティクスには，免疫グロブリンの産生を高める免疫学的な効果や便性改善などの整腸効果に関する研究報告が数多くあり^{15,17,21)}，健康食品や医薬品への適用も進められている⁶⁾。また畜産の分野では，抗生物質に代わる家畜の成長促進剤としての用途も検討されている³⁾。近年では，動物用抗菌性物質製剤の使用規制が強化されており，抗生物質の代替としてのプレバイオティクスやプロバイオティクスには，感染症予防能力が最も強く期待されている^{22,23)}。

植物エキス発酵液 (Fermented beverage of plant extract : FPE) は，数十種類の野菜，野草，果物，キノコ類および海藻等の植物からショ糖の浸透圧を利用してエキスを抽出し，それを製造工程の環境中に定着している酵母 (*Zygosaccharomyces* spp., *Pichia* spp.) や乳酸菌 (*Leuconostoc* spp.) 等によって 37℃ で 180 日間以上発酵・熟成させて製造した褐色，粘稠性の健康飲料である。FPE の機能性として，抗酸化物質 (コーヒー酸およびクロロゲン酸など) によるアルコール性胃粘膜障害の抑制効果²⁴⁾などを報告している。また，近年では FPE 中に新規を含む十数種のオリゴ糖が検出され²⁵⁾，これまでに β -D-fructopyranosyl-(2→6)-D-glucopyranose²⁶⁾， α -D-fructofuranosyl-(2→6)-D-glucopyranose²⁶⁾， β -D-fructopyranosyl(2→6)- β -D-glucopyranosly-(1→3)-D-

glucopyranose²⁷⁾, β -D-fructopyranosyl-(2 \rightarrow 6)-D-fructofuranose²⁸⁾, β -D-fructopyranosyl-(2 \rightarrow 1)- β -D-fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopyranoside²⁸⁾を含む数種類の構造が決定されており、プレバイオティクスとして腸内環境の改善が期待されている。一方、FPE の製造工程において、発酵産物である沈殿物等の副産物（植物エキス発酵液製造副産物, Fermented beverage of plant extract by-product: FPEB）が生じるが、こちらにも難消化性多糖類等の機能性物質が蓄積している可能性が示唆されている。

そこで本研究では、FPEB に含まれている難消化性多糖類に注目し、マンノオリゴ糖やイヌリンと同様なプレバイオティクス効果について、第2章では豚の糞中微生物の混合培養による *in vitro* 試験を用い、第3章ではラットによる *in vivo* 試験を用いて検討した。また第4章では、FPEB の飼料価値について豚を用いた肥育試験を実施し、肥育豚の発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成および悪臭化合物であるインドール・スカトール含量への影響を検討した。

第2章 植物エキス発酵液 製造副産物の *in vitro* 試験による 腸内発酵性の評価

第1節 目的

植物エキス発酵液 (FPE) は、炭水化物約 58%、タンパク質 0.2%、少量の脂肪とミネラルを含んだ健康飲料として多くの人に利用されており、辨野ら²⁹⁾は、ラットの腸内フローラおよび盲腸内容物の性状に及ぼす FPE の影響を検討した結果、FPE の長期投与は腸内フローラの構成には著しい影響を及ぼさず、盲腸内容物の水分含量を増加させ、盲腸重量および盲腸内アンモニア濃度を減少させたことを報告している。また近年では、原料の植物由来と思われるコーヒン酸やクロロゲン酸等のポリフェノール²⁴⁾、酵母の細胞壁成分由来と思われる β -グルカン³⁰⁾、さらに緒言で記述した新規を含む数十種類のオリゴ糖が見出されており²⁵⁻²⁸⁾、これら生理活性物質の複合的な作用によるプレバイオティクス効果として、腸内環境の改善等が期待されている。

一方 FPE の製造過程で生じる FPEB にも機能性成分が蓄積している可能性が示唆されており、飼料等への利用も検討している。その一つとして肥育豚に FPEB を給与した先行予備試験の結果、食味においては脂身に臭みがほとんど感じられない肉になった。肉の不快感の原因となるスカトール等の悪臭成分は腸内細菌により生成されるため、その抑制には腸内フローラの改善が効果的であることが知られている³¹⁾。FPEB はプレバイオティクス効果を有する健康飼料 (補助飼料) として期待されるが、その機能性はまだ十分に検討されていない。そこで本章では、ジャーファーマンター装置を用い、*in vitro* 試験において FPEB が腸内発酵特性に及ぼす影響を検討することを目的とした。

第2節 実験方法

1. 植物エキス発酵液の調製

植物エキス発酵液 (FPE) は、50 種類の植物原料を用いている。具体的には、糖類 (精製上白糖)、果物類 (リンゴ, ナシ, バナナ, ミカン皮, イチゴ, パイン, ブドウ), 野菜・野草類 (ニンジン, ダイコン, キャベツ, セロリ, キュウリ, ゴボウ, ホウレンソウ, タマネギ, カボチャ, トマト, ピーマン, ナス, レンコン, ショウガ, レタス, ニンニク, ミツバ, クマザサ, アカクローバー, スギ葉, パセリ, カブ, ニラ, シュンギク, 青シソ, ハクサイ, サラダナ, ウド, フキノトウ, タンポポ, オオバコ, イタドリ) の若芽, セリ, ヨモギ, アサツキ, アスパラ, トドマツ葉), キノコ類 (生シイタケ, エノキタケ), 海藻類 (コンブ, ワカメ), 豆類 (緑豆モヤシ, エンドウモヤシ), 塩類 (粗塩) である。これらの原料をフードスライサーで裁断し, 原料とほぼ等量の精製上白糖をまぶしながら杉樽に入れて砂糖漬けにし, 木蓋で密封した状態で7日間の浸透圧抽出により得られたエキスを 37°C で 180 日以上, 原料植物や製造工程の環境に定着している酵母 (*Zygosaccharomyces* spp., *Pichia* spp.) や乳酸菌 (*Leuconostoc* spp.) 等により発酵熟成させる。

一方, 植物エキス発酵液製造副産物 (FPEB) は, FPE の製造過程で発生する沈殿物等の副産物を数ロット分まとめて混合した後, 常温でさらに 1 年以上静置熟成させた液体である。本試験では, FPEB (豚用大高酵素飲料, 大高酵素株式会社, 小樽, 日本) を供試した。

2. 試験試料の調製

実験に先立ち, FPEB に含まれるブドウ糖や果糖など, 小腸で吸収される単糖類の影響を可能な限り除去するため, FPEB をあらかじめ透析用チューブ (スペクトラ/ポア 3 (MWC0 : 3500), フナコシ株式会社, 東京, 日本) を用い, 分画分子量 3,500 で限外濾過し, 残留物を凍結乾燥させた。これを FPEB 透析物として供試した。

3. 試験群の設定

試験群はセルロース、イヌリン DP16 (Beneo-Orafti, Tienen, Belgium) および FPEB 透析物を試料とするセルロース群、イヌリン群および FPEB 群に無添加群を加えた 4 群とした。なお、これらの試料は腸内細菌培養時における微生物の炭素源と位置付けた。

4. 微生物培養装置による培養方法

4.1. 微生物の培養装置

微生物の培養には、ジャーファーメンター（微生物培養装置 BMJ-01NC; エイブル株式会社, 東京, 日本）を用いた。この装置は培養槽に入れた検体を一定の温度と pH に保ちながら微生物の培養を行う装置である。

4.2. 豚の糞便の採取

腸内細菌には豚の新鮮糞便を用いた。本実験では長内畜産株式会社（帯広, 北海道）で飼育されている豚から無作為に選出した 3 匹の糞便を個別に採取し、ただちに二重チャック付きのナイロン袋に入れ、酸素吸収・炭酸ガス発生剤（アネロパック, 三菱ガス株式会社, 東京）を同封して嫌気条件を保持し、使用時まで 4 °C で保存した。

4.3. 腸内細菌液の調製

採取した 3 匹の糞便を、滅菌済みの 50 mL プラスチックチューブに 2~3 g ずつ個別に採取し、滅菌生理食塩液（0.85% 塩化ナトリウム）で 10 倍に希釈した。この希釈液を濾過して固形物を除去し、3 匹分の濾液を等分に混和した調製液を腸内細菌液とした。

4.4. 培養液の調製

微生物の窒素源には、ニュートリエントブロス (Difco, Sparks, MD, USA) を用いた。まずジャーファーメンターの培養槽にニュートリエントブロスを培養液全体の 0.8% となるように 1.76 g 採取し、蒸留水 176 mL を加えて混和後、121°C 15 分間で滅菌処理した。次に炭素源の試料を全体の 3% と

なるように 6.6 g 採取し，無菌的に添加して混和した。最後に腸内細菌液を全体の 2% となるように 44 mL 加えて混和した。

4.5. 培養方法

微生物培養装置の設定条件は豚の大腸発酵を想定し，温度 37°C，pH5.5 とした。また培養中に生成する有機酸で培養液の pH が過度に低下するのを防ぐため，滅菌済みの 2 N 水酸化ナトリウムを自動添加し，pH を 5.5 に保持させた。さらに培養槽内の嫌気状態を維持するため，二酸化炭素ガスを 0.4 mL/min 封入し，回転数 160 rpm で緩やかに攪拌した。全試料の投入後，培養液の pH と温度が安定した時点を 0 時間目とし，48 時間の培養を行った。

4.6. 培養液の採取

培養液の採取は培養開始から 0 時間，12 時間，24 時間および 48 時間に行った。採取量は各 6 mL とし，そのうち 1 mL を細菌叢分析用とした。細菌叢分析用の培養液は 4°C で保存し，短鎖脂肪酸および腸内腐敗物質の分析用サンプルは 2,000×g，4°C で 10 分間遠心分離し，上清を使用時まで -30°C で保存した。

5. 培養液における各種分析

5.1. pH の測定

培養液の pH は，培養液の採取時にジャーファーマンター装置に設置されている pH 計の表示値を記録した。

5.2. 細菌数の測定

培養液中の細菌数の測定は，培養液を 0.85% 滅菌生理食塩水で適当に段階希釈した細菌液および各種選択培地を用い，Han ら³²⁾の方法を参考に実施した。各寒天培地は表示に従って調製及び滅菌処理を行った。ウエルシュ菌はウエルシュ菌寒天培地 OPSP に抗生物質パーフリンジェンス選択サプリメント A (SR76E) (スルファチジルナトリウム含有) およびパーフリ

ンジェンス選択サプリメント B(SR77E) (オランダマイシン, ポリミキシン B 含有) を添加した培地 (関東化学工業株式会社, 東京, 日本) を用いて 37°C で培養した。大腸菌群および乳酸菌はそれぞれ, EMB 寒天培地 (栄研化学株式会社, 東京, 日本) および MRS 寒天培地 (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) を用いて 37°C で培養した。一般嫌気性菌, *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* はそれぞれ, BL 寒天培地 (栄研化学株式会社), ROGOSA 寒天培地 (Oxoid Ltd) および TOS プロピオン酸寒天培地 (ヤクルト薬品工業株式会社, 東京, 日本) を用い, Mitsuoka ら³³⁾ の方法に準じて GasPak により角型ジャー (大) (三菱化学株式会社, 東京, 日本) に酸素吸収・炭酸ガス発生剤 (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学株式会社) を 3 個入れ, 37°C で嫌気培養を行った。大腸菌群, 一般嫌気性菌, *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* は 0.85% 滅菌生理食塩水で適当に希釈された細菌液 100 μ L を寒天培地に播種し, 平板塗抹法により測定した。ウエルシュ菌および大腸菌群は 24 時間, 一般嫌気性菌, 乳酸菌および *Lactobacillus* は 48 時間, *Bifidobacterium* は 72 時間後にコロニー数を計測し, 測定値の対数値を求めた。

5.3. 短鎖脂肪酸の測定

培養液中の短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, *n*-酪酸) は高速液体クロマトグラフ (High-performance liquid chromatography:HPLC) (LC-10AD, 島津製作所, 京都, 日本) を用いて測定した。HPLC 用試料は Han ら³⁴⁾ の方法に従って調製した。培養液を遠心分離 (2,000 \times g, 4°C, 20 分) して得た上清 400 μ L に 70% 過塩素酸水溶液を 60 μ L 添加し遠心分離 (2,000 \times g, 4°C, 30 分) することでタンパク質を除去し, 得られた上清をセルロースアセテート膜フィルター (0.45 μ m, 東洋濾紙(株), 東京, 日本) に通して HPLC 用試料とした。HPLC の設定条件は, カラムを RSpak KC-811 (8.0 mm \times 300 mm, Shodex, 東京, 日本), 移動相を 2 mM 過塩素酸水溶液, 流速 1.0 mL/min, カラム温度 47°C, 反応試薬を ST3-R (10 倍希釈, Shodex), 流速 0.5 mL/min, 測定波長 430 nm とした。各種短鎖脂肪酸の同定は, クロマトパック (C-R6A, 島津製作所) より得られた試料と標準溶液 (1,000 ppm) の保持時間

の比較によって行い、定量はピーク面積の比較によって行った。また、3種の短鎖脂肪酸濃度の合計を総短鎖脂肪酸濃度とした。

5.4. アンモニア態窒素濃度の測定

培養液中のアンモニア態窒素濃度は、培養液を遠心分離し（2,000×g, 4℃, 20分）得られた上清を試料として、血液検査用アンモニアキット（和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本）を用いて測定した³⁵⁾。検量線用の標準液は、アンモニア標準溶液（NH₃-N, 400 μg/dL）と標準液用希釈液を用いて0, 100, 200, 300, 400 μg/dLに調製し、試料は0.1 Mリン酸バッファー（pH5.5）で適当に希釈したものを使用した。標準液および試料それぞれ100 μLに除蛋白試液（タングステン酸ナトリウム, リン酸を含有）を400 μL添加し攪拌, 遠心分離（2,000×g, 4℃, 5分）後, 上清を200 μL採取した。そこに発色試薬A（フェノール, ペンタシアノニトロシル鉄(II)酸ナトリウム二水塩）を200 μL, 発色試薬B（水酸化カリウム）を100 μL, 発色試薬C（炭酸カリウム, 次亜塩素酸ナトリウムを含有）を200 μLの順に添加し, それぞれの添加後に攪拌した。この溶液を37℃の恒温浴槽で20分間加温し発色させ, 5分間の水冷後, 分光光度計（UV-1600, 島津製作所）で波長630 nmにおける吸光度を測定した。

5.5. スカトール濃度の測定

培養液中のスカトール濃度は、培養液を遠心分離し（2,000×g, 4℃, 20分）得られた上清190 μLに2M Tris-HClバッファー（pH7.5）を50 μL加えて調製したものを試験試料として、分光光度計（UV-1600, 島津製作所）を用いて測定した³⁶⁾。検量線用の標準液にはスカトール（和光純薬工業株式会社）10 mgを少量のエタノールで溶解し, 0.1M Tris-HClバッファー（pH7.5）100 mLに混和させたものを用い, 濃度が0, 0.195, 0.781, 1.563, 3.125, 6.250, 12.50, 25.00, 50.00 μg/mLとなるように希釈して使用した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド（和光純薬工業株式会社）0.5 gを硫酸アルコール（濃硫酸：蒸留水=1：6の割合で混ぜた希硫酸20 mLを95%エタノール30 mLに混和したもの）に溶解して発色液を調製し

た。この発色液 200 μL に試料溶液を 200 μL 加えてよく混和し、室温で 20 分間静置したのち、 $2,000\times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離後、その上清の 580 nm の吸光度を測定した。

5.6. インドール濃度の測定

培養液中のインドール濃度は、培養液を遠心分離し ($2,000\times g$, 4°C , 20 分) 得られた上清 100 μL に 0.1 M リン酸バッファー (pH5.5) を 100 μL 加えて調製したものを試験試料として、分光光度計 (UV-1600, 島津製作所) を用いて測定した³⁶⁾。検量線用の標準液は、インドール (和光純薬工業株式会社) 10 mg を 0.1M のリン酸バッファー (pH5.5) 100 mL に溶解させたものを用い、濃度が 0, 0.195, 0.781, 1.563, 3.125, 6.250, 12.50, 25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈して使用した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (和光純薬工業株式会社) 1.47 g を硫酸アルコール (濃硫酸 : 蒸留水 = 1 : 6 の割合で混ぜた希硫酸 20 mL を 95% エタノール 30 mL に混和したもの) 100 mL に溶解して発色液を調製した。この発色液 1 mL に試料溶液 200 μL を加え、よく混和し、室温で 20 分間静置したのち、 $2,000\times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離し、その上清の 568 nm の吸光度を測定した。

6. 統計解析

全てのデータを平均値 \pm 標準偏差で表した。各データ間における有意差検定は一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey の多重比較を用いた。各検定における統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

第3節 結果

1. 培養液 pH

培養液 pH の推移を Fig. 1-1 および Table 1-1 に示した。pH は 12 時間以降, FPEB およびイヌリン群で無添加およびセルロース群に対して有意な低値を維持した ($p < 0.05$)。

2. 培養中細菌叢

Cl. perfringens (Fig. 1-2, Table 1-2) は培養開始時から 24 時間まで, イヌリン群で他の 3 群に対して有意に多かったが, 48 時間までに減少した。Coliform (Fig. 1-3, Table 1-2) は, 培養 12 時間以降, イヌリン群で他の 3 群に対して有意な減少がみられた ($p < 0.05$)。また FPEB 群が他の 3 群に対し, 最も増加傾向を示した。一般嫌気性菌 (Fig. 1-4, Table 1-3) は, 培養 12 時間以降, FPEB 群が他の 3 群に対し有意に増加した ($p < 0.05$)。乳酸菌 (Fig. 1-5, Table 1-3) は群間で有意差はみられなかったが, FPEB 群で他の 3 群に対し増加傾向が伺えた。*Lactobacillus* (Fig. 1-6, Table 1-4) は培養 12 時間以降, FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に対して有意に増加していた。*Bifidobacterium* (Fig. 1-7, Table 1-4) は, 培養 12 時間以降, FPEB 群およびイヌリン群で増加傾向を示し, 培養 48 時間目には無添加群に対して有意な増加が認められた。

3. 培養液中の短鎖脂肪酸濃度

総短鎖脂肪酸 (Fig. 1-8, Table 1-5) および酢酸濃度 (Fig. 1-9, Table 1-5) は, 培養 48 時間に FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に対して有意な高値を示した ($p < 0.05$)。またプロピオン酸濃度 (Fig. 1-10, Table 1-6) は, 培養 12 時間以降, FPEB 群で無添加群に比べて有意な高値を示した。さらに *n*-酪酸濃度 (Fig. 1-11, Table 1-6) は, 培養 24 時間以降, イヌリン群で他の 3 群に比べて有意な高値を示した。

4. 培養液中アンモニア濃度

培養液のアンモニア態窒素濃度を Fig. 1-12 および Table 1-7 に示した。アンモニア態窒素濃度は、培養 12 時間以降、FPEB 群でセルロース群に比べて有意な低下がみられた。また培養 24 時間目以降はイヌリン群でも有意な低下がみられた ($p < 0.05$)。

5. 培養液中インドールおよびスカトール濃度

インドール濃度 (Fig. 1-13, Table 1-8) は、培養 12 時間で FPEB 群がイヌリン群に対し有意な高値を示し、24 時間で有意差は無くなったが、48 時間では FPEB 群がセルロース群およびイヌリン群に対し有意な増加を示した ($p < 0.05$)。スカトール濃度 (Fig. 1-14, Table 1-8) は、どの培養時間においても有意差は認められなかった。またインドール濃度とスカトール濃度の総量 (Fig. 1-15, Table 1-9) についても同様に有意差は認められなかった。

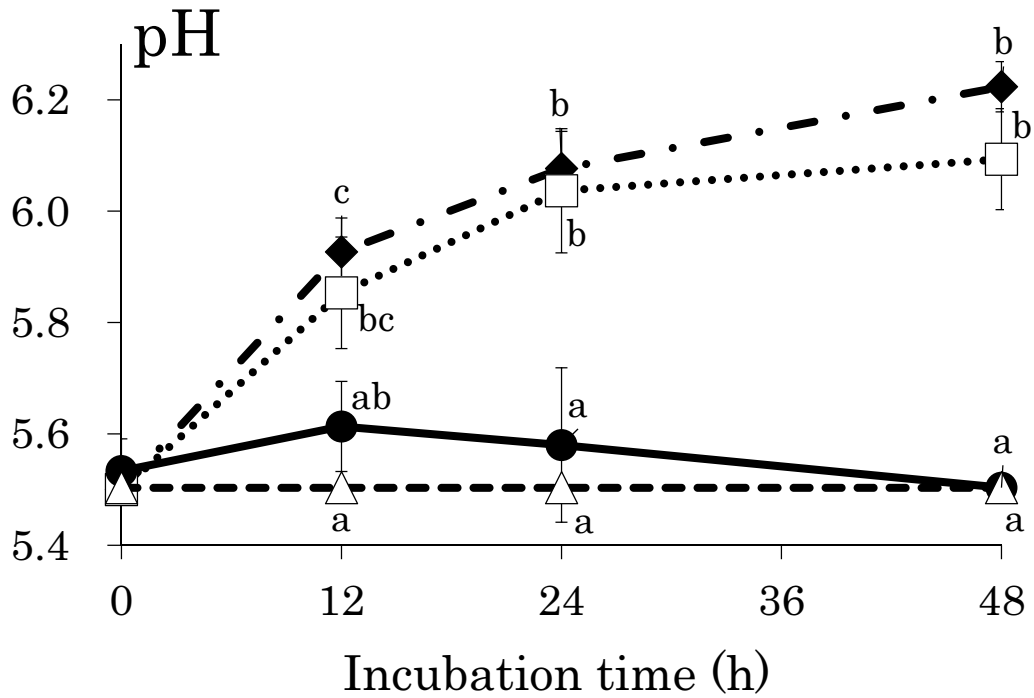


Fig.1-1 pH during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-1 pH during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.53 ± 0.06	5.50 ± 0.00
pH	12	5.93 ± 0.06 ^c	5.85 ± 0.10 ^{bc}	5.61 ± 0.08 ^{ab}	5.50 ± 0.00 ^a
	24	6.08 ± 0.07 ^b	6.04 ± 0.11 ^b	5.58 ± 0.14 ^a	5.50 ± 0.00 ^a
	48	6.22 ± 0.05 ^b	6.09 ± 0.09 ^b	5.50 ± 0.01 ^a	5.50 ± 0.00 ^a

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

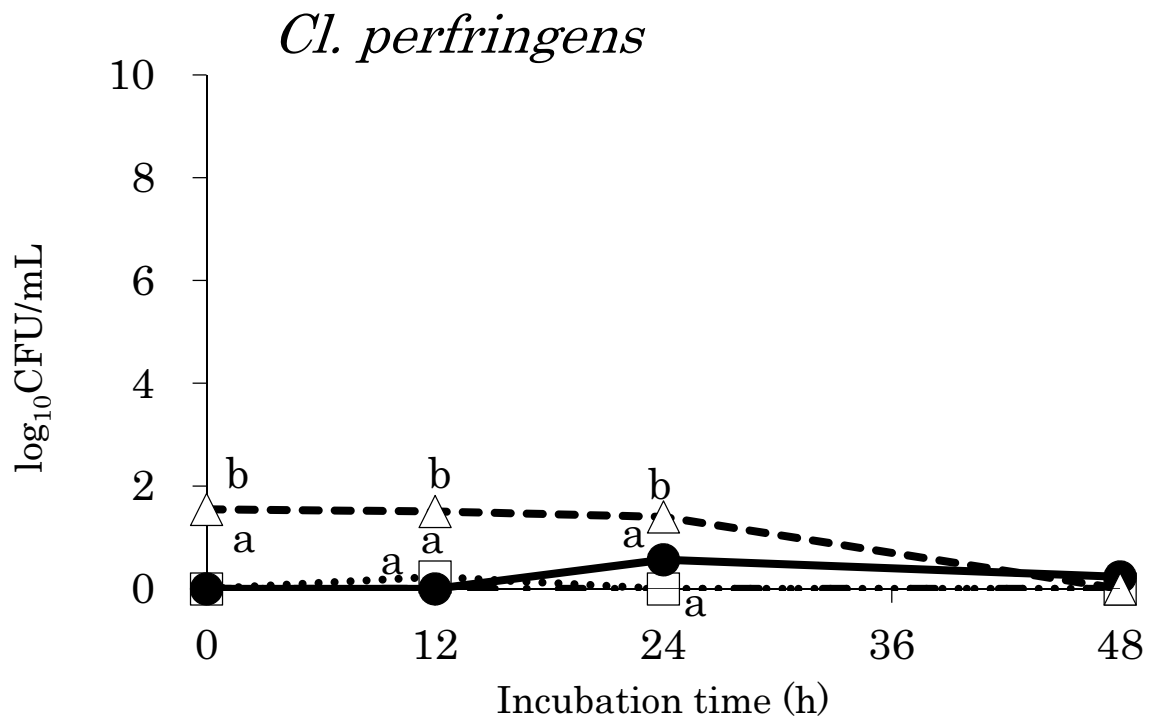


Fig.1-2 *Cl.perfringens* populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

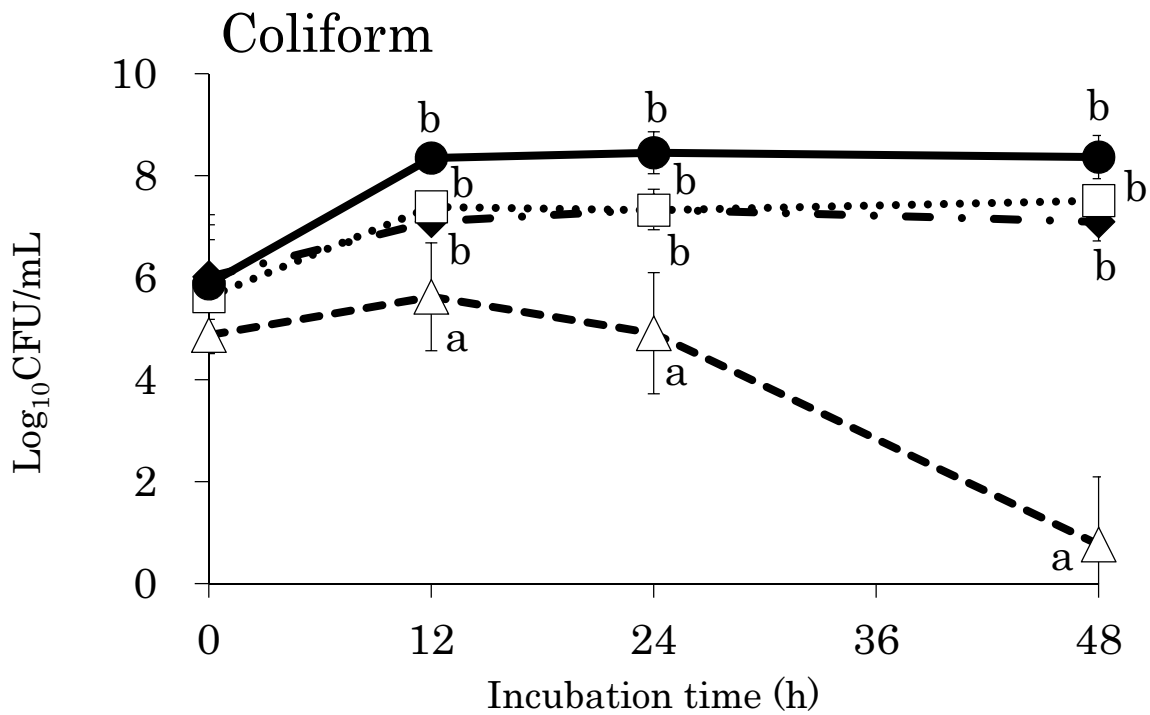


Fig.1-3 Coliform populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

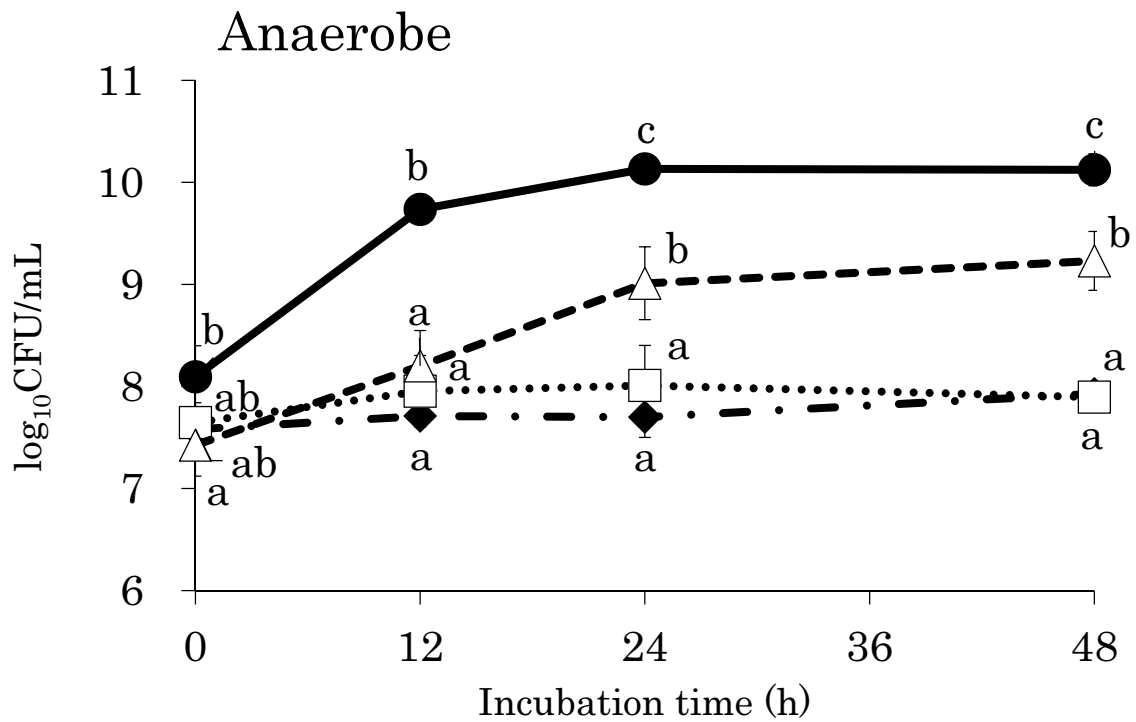


Fig.1-4 Anaerobe populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

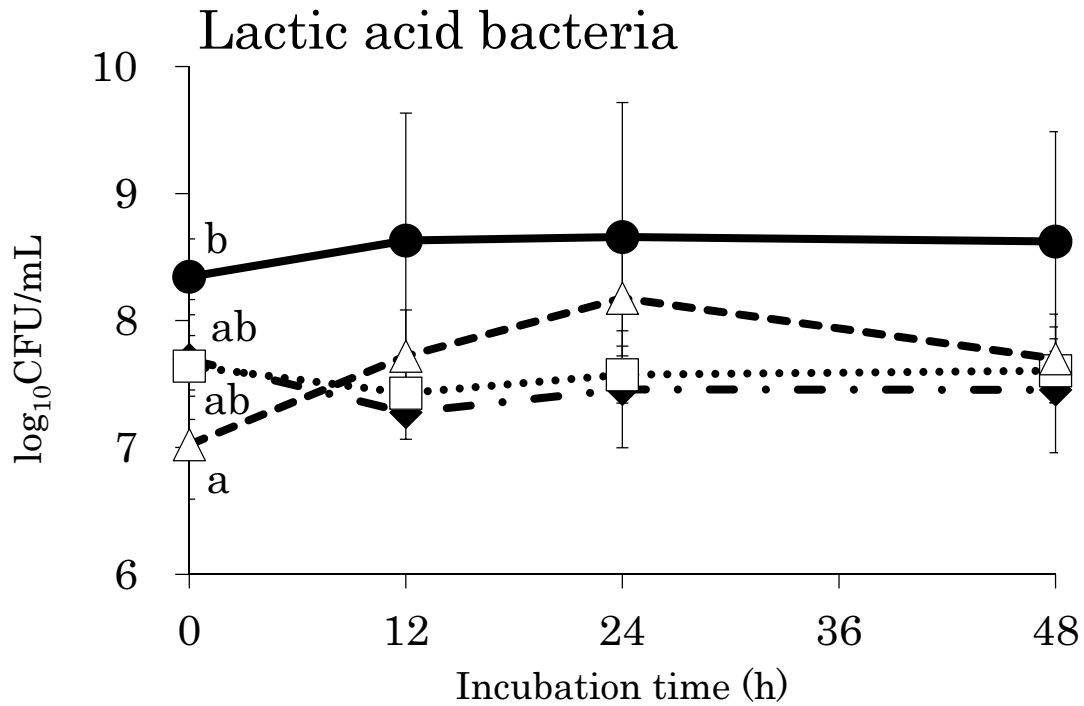


Fig.1-5 Lactic acid bacteria populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

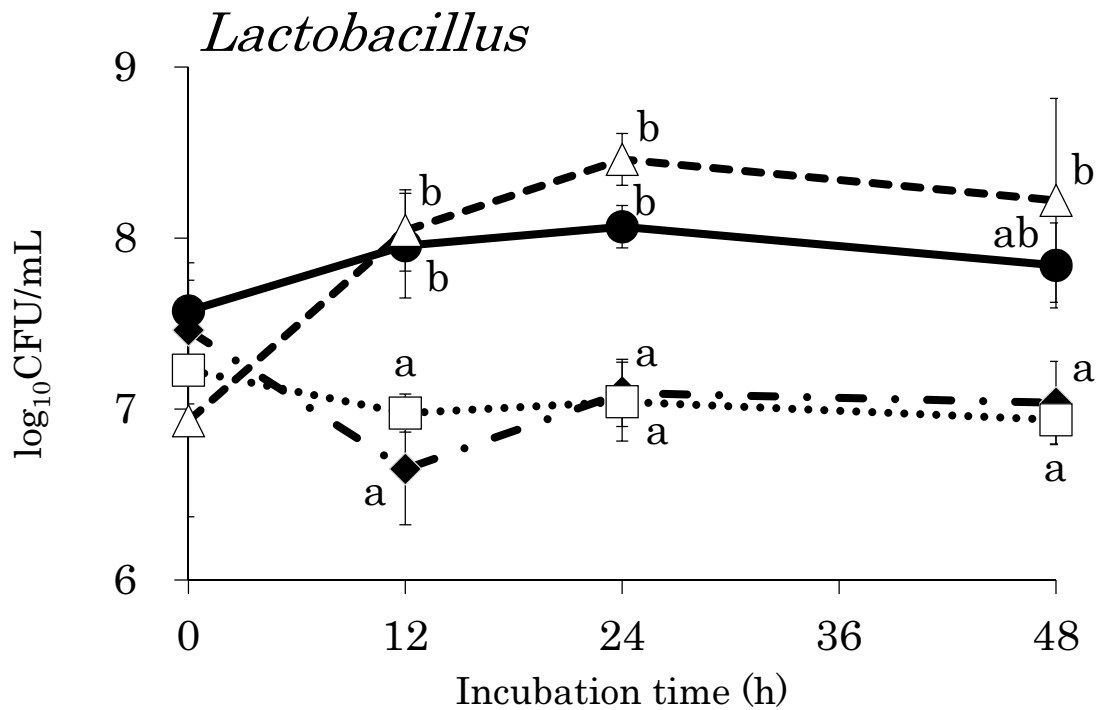


Fig.1-6 *Lactobacillus* populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

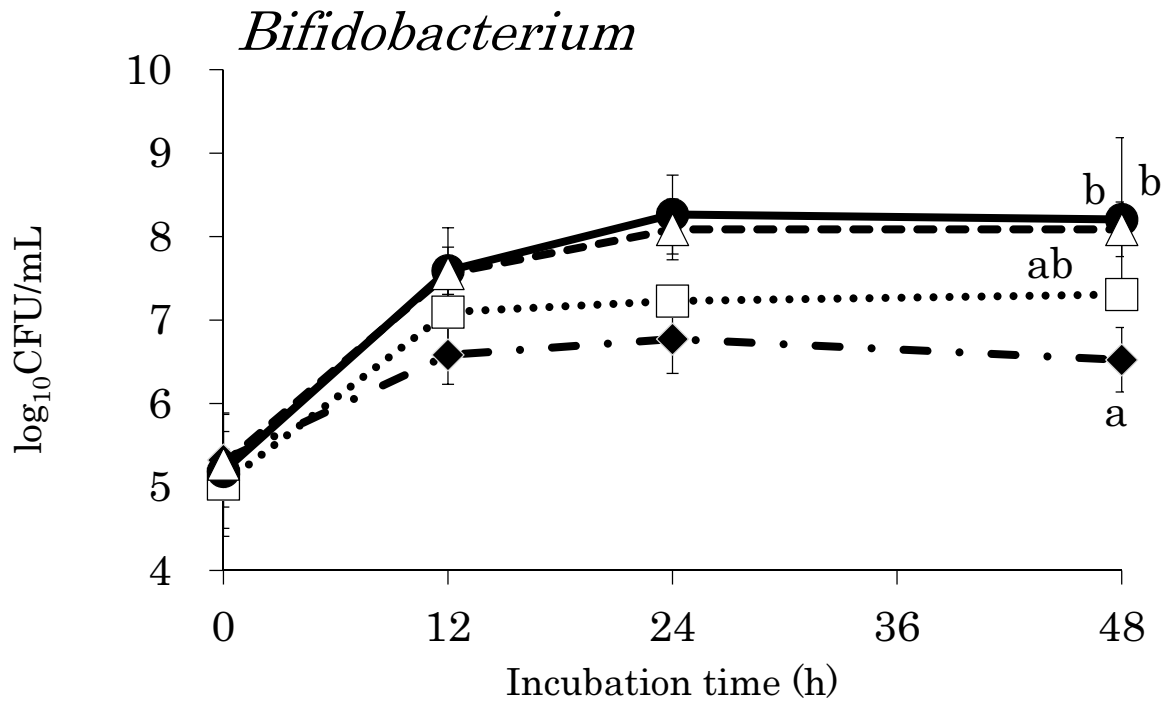


Fig.1-7 *Bifidobacterium* populations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-2 Bacteria populations (*Cl.perfringens* and Coliform) during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
<i>Cl.perfringens</i> (log ₁₀ CFU/mL)	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.55 ± 0.52
	12	0.00 ± 0.00	0.23 ± 0.40	0.00 ± 0.00	1.51 ± 0.52
	24	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.51	1.40 ± 0.35
	48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.23 ± 0.40	0.00 ± 0.00
Coliform (log ₁₀ CFU/mL)	0	6.02 ± 1.02	5.63 ± 1.12	5.88 ± 1.36	4.88 ± 0.31
	12	7.10 ± 0.12 ^b	7.39 ± 0.05 ^b	8.35 ± 0.26 ^b	5.63 ± 1.06 ^a
	24	7.34 ± 0.40 ^b	7.32 ± 0.07 ^b	8.45 ± 0.41 ^b	4.91 ± 1.19 ^a
	48	7.10 ± 0.38 ^b	7.51 ± 0.10 ^b	8.37 ± 0.42 ^b	0.77 ± 1.33 ^a

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-3 Bacteria populations (Anaerobe and Lactic acid bacteria) during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
Anaerobe (log ₁₀ CFU/mL)	0	7.58 ± 0.26 ^{ab}	7.65 ± 0.07 ^{ab}	8.09 ± 0.30 ^b	7.43 ± 0.30 ^a
	12	7.71 ± 0.09 ^a	7.95 ± 0.35 ^a	9.74 ± 0.12 ^b	8.20 ± 0.35 ^a
	24	7.70 ± 0.20 ^a	8.01 ± 0.39 ^a	10.13 ± 0.08 ^c	9.01 ± 0.36 ^b
	48	7.93 ± 0.11 ^a	7.90 ± 0.06 ^a	10.12 ± 0.16 ^c	9.23 ± 0.29 ^b
Lactic acid bacteria (log ₁₀ CFU/mL)	0	7.69 ± 0.47 ^{ab}	7.64 ± 0.24 ^{ab}	8.34 ± 0.30 ^b	7.02 ± 0.43 ^a
	12	7.28 ± 0.21	7.43 ± 0.23	8.63 ± 1.00	7.72 ± 0.36
	24	7.46 ± 0.46	7.57 ± 0.22	8.66 ± 1.06	8.18 ± 0.45
	48	7.45 ± 0.50	7.61 ± 0.25	8.62 ± 0.87	7.70 ± 0.35

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-4 Bacteria populations (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	7.46 ± 0.29	7.23 ± 0.20	7.57 ± 0.28	6.93 ± 0.56
<i>Lactobacillus</i>	12	6.65 ± 0.33 ^a	6.98 ± 0.11 ^a	7.96 ± 0.31 ^b	8.04 ± 0.24 ^b
(log ₁₀ CFU/mL)	24	7.09 ± 0.20 ^a	7.04 ± 0.23 ^a	8.07 ± 0.12 ^b	8.46 ± 0.15 ^b
	48	7.04 ± 0.24 ^a	6.94 ± 0.15 ^a	7.84 ± 0.25 ^{ab}	8.22 ± 0.60 ^b
	0	5.32 ± 0.56	5.04 ± 0.63	5.19 ± 0.68	5.28 ± 0.18
<i>Bifidobacterium</i>	12	6.58 ± 0.35	7.10 ± 0.45	7.59 ± 0.28	7.56 ± 0.55
(log ₁₀ CFU/mL)	24	6.77 ± 0.41	7.23 ± 0.17	8.26 ± 0.47	8.09 ± 0.36
	48	6.52 ± 0.39 ^a	7.31 ± 0.14 ^{ab}	8.21 ± 0.98 ^b	8.09 ± 0.33 ^b

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

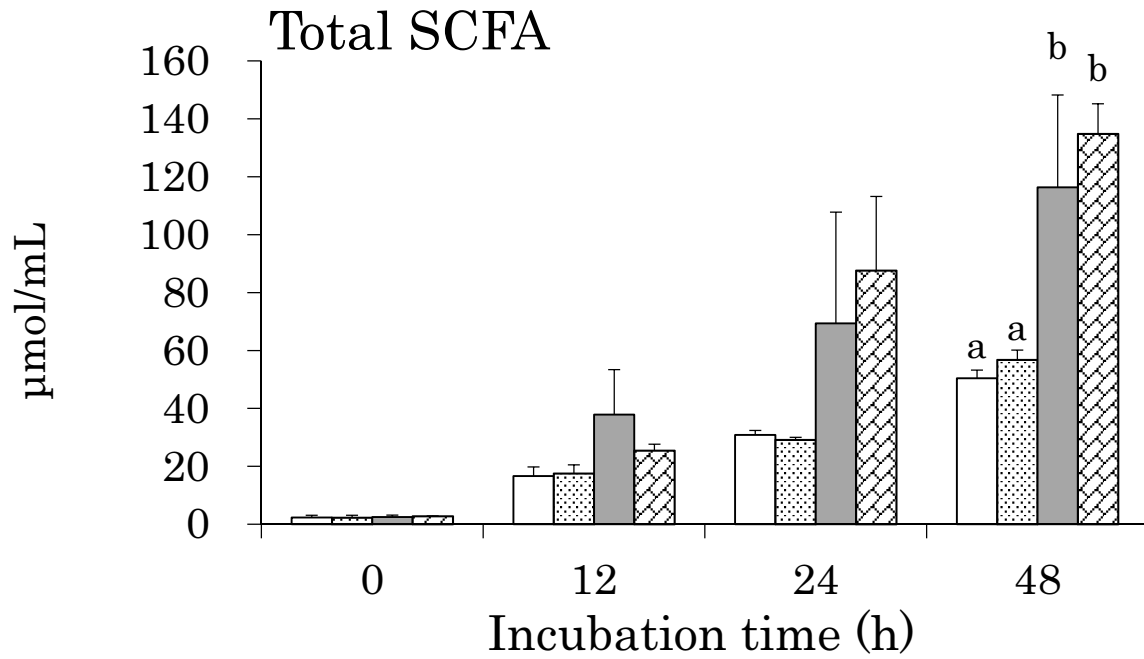


Fig.1-8 Total short-chain fatty acid concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (□), cellulose (▤), FPEB (■) and inulin (▨). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

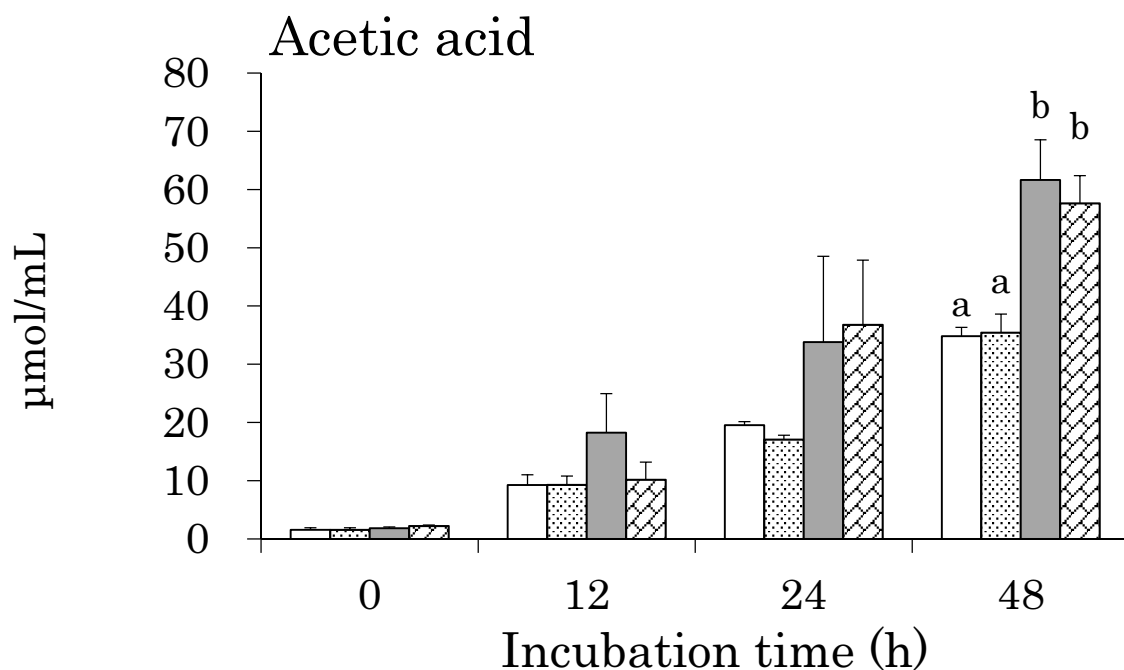


Fig.1-9 Acetic acid concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (□), cellulose (▤), FPEB (■) and inulin (▨). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

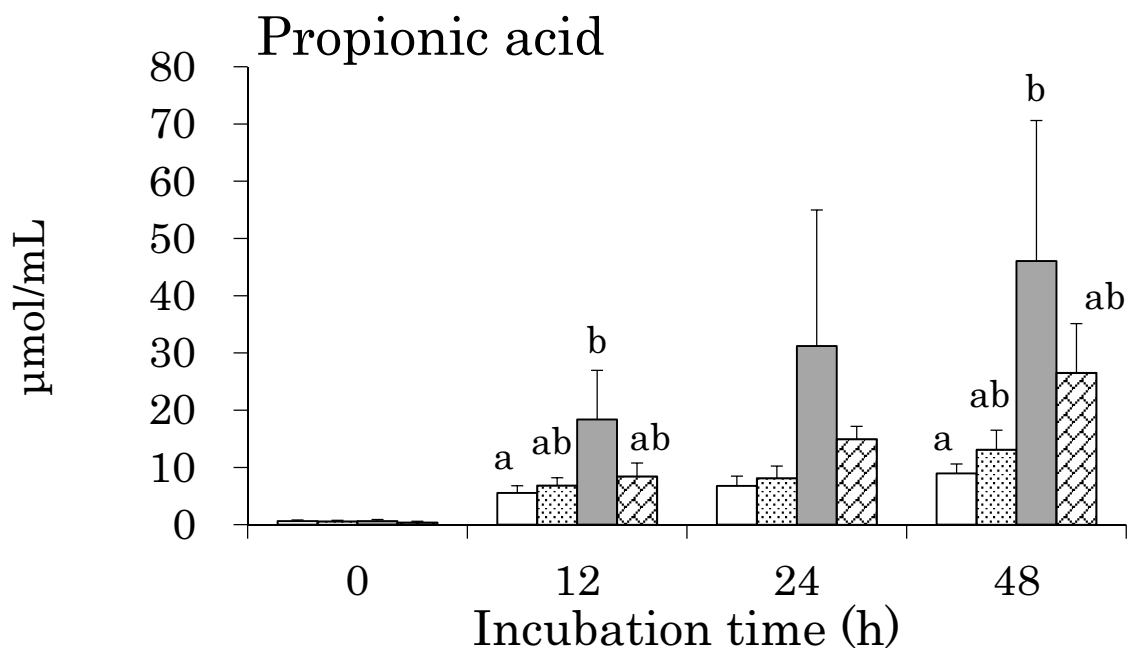


Fig.1-10 Propionic acid concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (□), cellulose (▤), FPEB (■) and inulin (▨). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

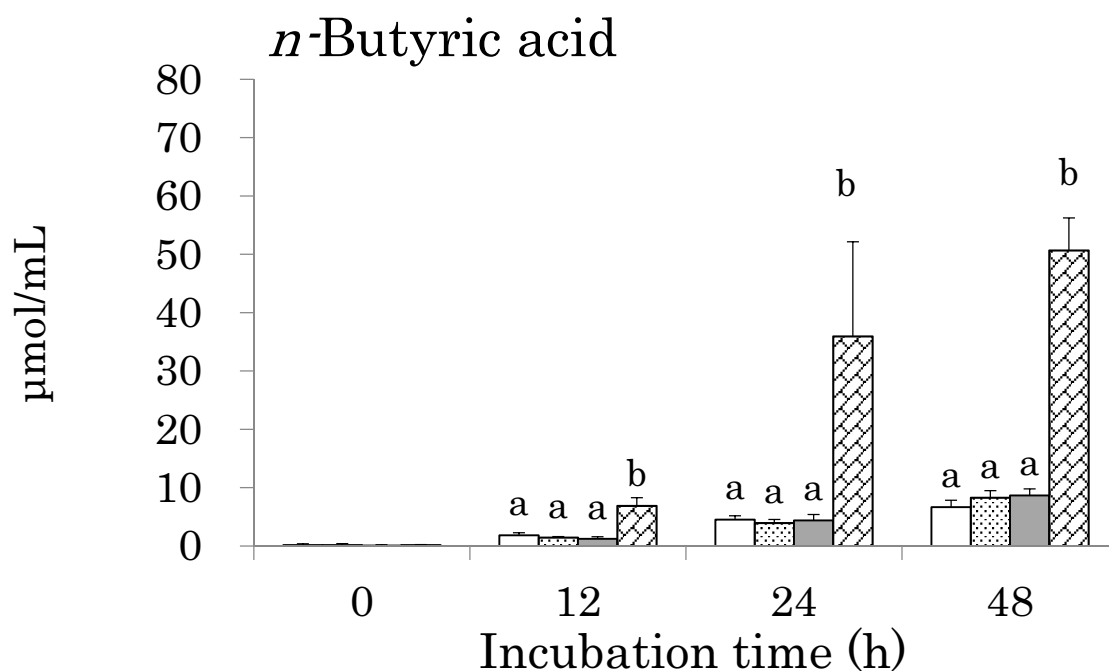


Fig.1-11 *n*-Butyric acid concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (□), cellulose (▤), FPEB (■) and inulin (▨). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-5 Short-chain fatty acid concentration during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	2.33 ± 0.76	2.28 ± 0.80	2.51 ± 0.65	2.75 ± 0.14
Total short-chain	12	16.64 ± 3.15	17.53 ± 2.97	37.85 ± 15.53	25.45 ± 2.20
fatty acid	24	30.83 ± 1.59	29.11 ± 0.90	69.37 ± 38.42	87.64 ± 25.57
(µmol/mL)	48	50.40 ± 2.83 ^a	56.78 ± 3.35 ^a	116.34 ± 31.88 ^b	134.83 ± 10.39 ^b
	0	1.55 ± 0.36	1.56 ± 0.37	1.82 ± 0.23	2.21 ± 0.18
Acetic acid	12	9.26 ± 1.73	9.27 ± 1.53	18.25 ± 6.70	10.16 ± 3.03
(µmol/mL)	24	19.53 ± 0.60	17.06 ± 0.75	33.79 ± 14.73	36.77 ± 11.11
	48	34.80 ± 1.52 ^a	35.41 ± 3.19 ^a	61.63 ± 6.92 ^b	57.63 ± 4.75 ^b

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-6 Short-chain fatty acid concentration during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	0.62 ± 0.19	0.58 ± 0.19	0.62 ± 0.29	0.38 ± 0.22
Propionic acid	12	5.54 ± 1.25 ^a	6.83 ± 1.38 ^{ab}	18.38 ± 8.60 ^b	8.42 ± 2.34 ^{ab}
(µmol/mL)	24	6.78 ± 1.70	8.12 ± 2.12	31.22 ± 23.77	14.93 ± 2.24
	48	8.96 ± 1.65 ^a	13.11 ± 3.40 ^{ab}	46.05 ± 24.55 ^b	26.52 ± 8.61 ^{ab}
	0	0.16 ± 0.22	0.15 ± 0.25	0.08 ± 0.13	0.15 ± 0.07
<i>n</i> -Butyric acid	12	1.84 ± 0.43 ^a	1.44 ± 0.16 ^a	1.23 ± 0.36 ^a	6.86 ± 1.40 ^b
(µmol/mL)	24	4.52 ± 0.65 ^a	3.93 ± 0.60 ^a	4.37 ± 1.03 ^a	35.94 ± 16.20 ^b
	48	6.65 ± 1.18 ^a	8.27 ± 1.21 ^a	8.66 ± 1.13 ^a	50.68 ± 5.56 ^b

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

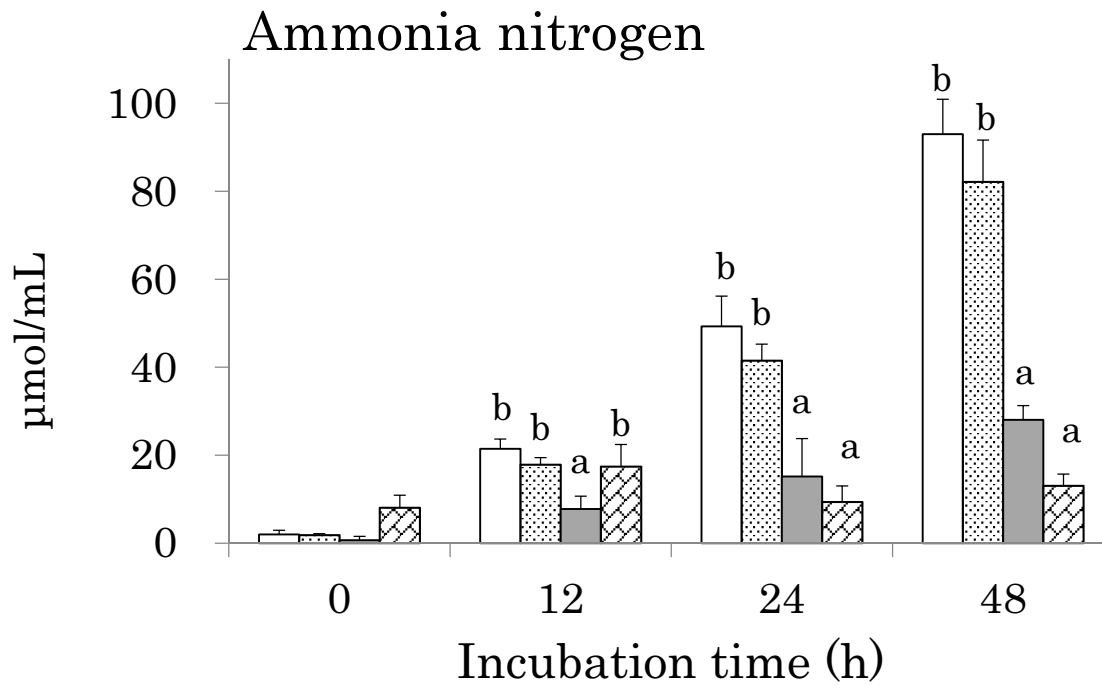


Fig.1-12 Ammonia nitrogen concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (□), cellulose (▤), FPEB (■) and inulin (▨). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-7 Ammonia nitrogen concentration during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	1.99 ± 0.93 ^a	1.86 ± 0.33 ^a	0.69 ± 0.85 ^a	8.08 ± 2.83 ^b
Ammonia nitrogen	12	21.47 ± 2.20 ^b	17.85 ± 1.58 ^b	7.79 ± 2.89 ^a	17.43 ± 4.99 ^b
(mg/dL)	24	49.31 ± 6.85 ^b	41.49 ± 3.78 ^b	15.16 ± 8.62 ^a	9.38 ± 3.64 ^a
	48	92.98 ± 7.95 ^b	82.14 ± 9.49 ^b	28.04 ± 3.23 ^a	13.03 ± 2.66 ^a

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

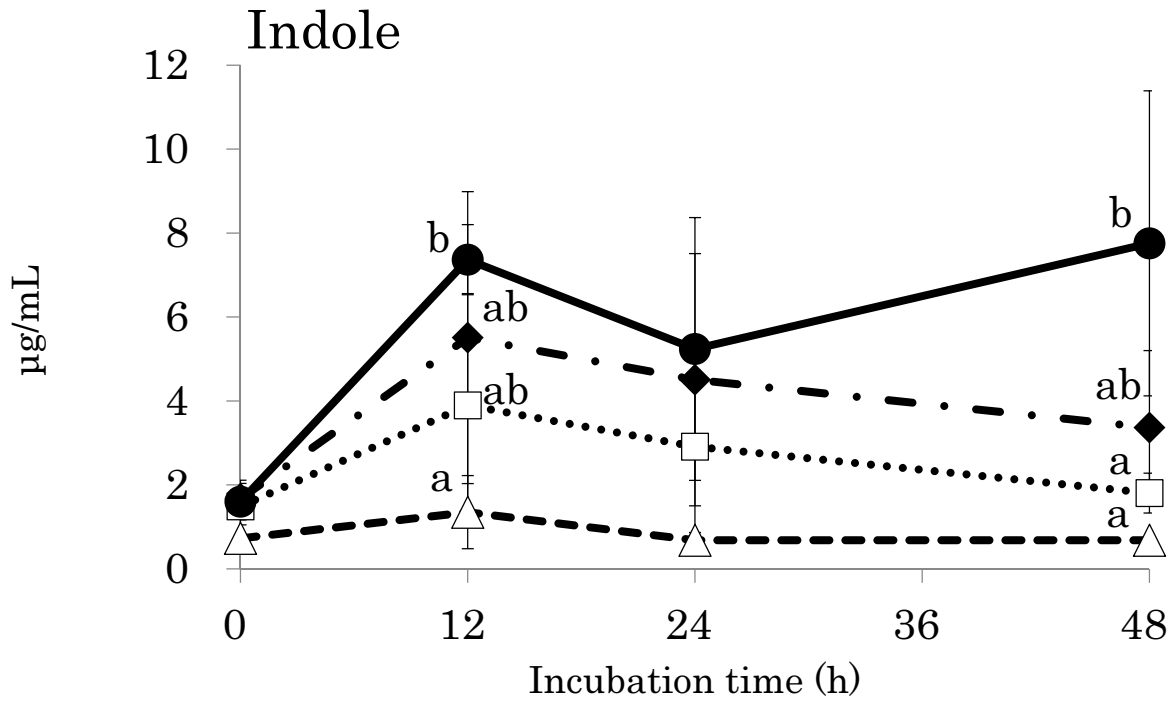


Fig.1-13 Indole concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

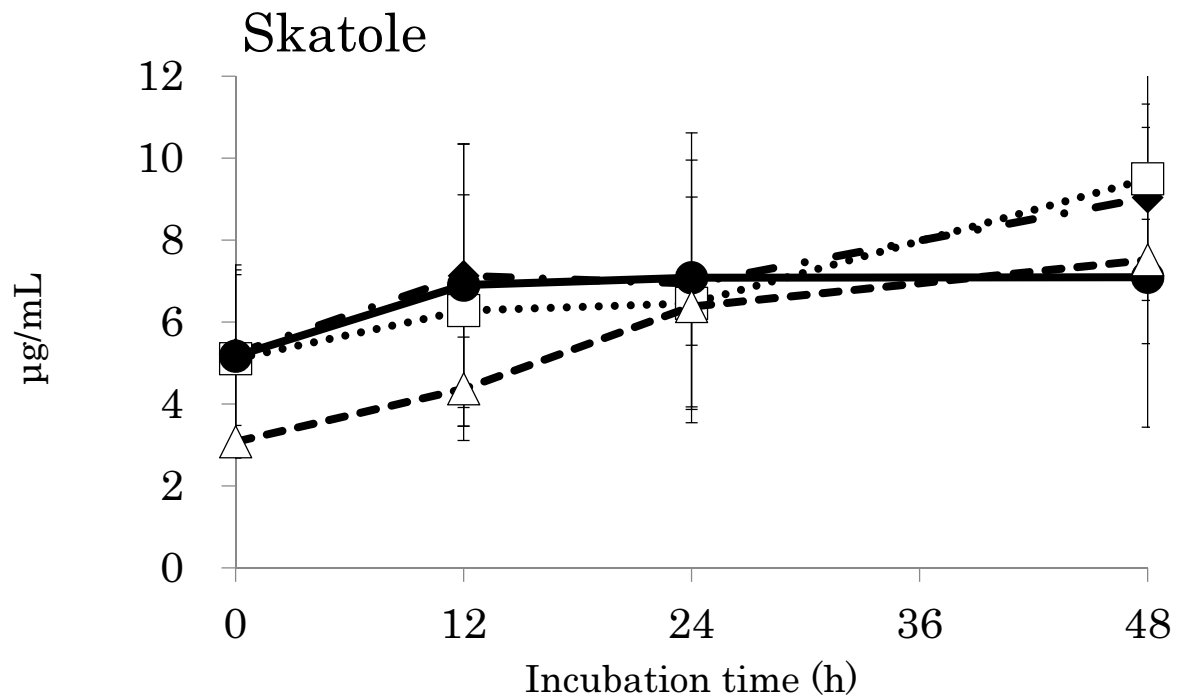


Fig.1-14 Skatole concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

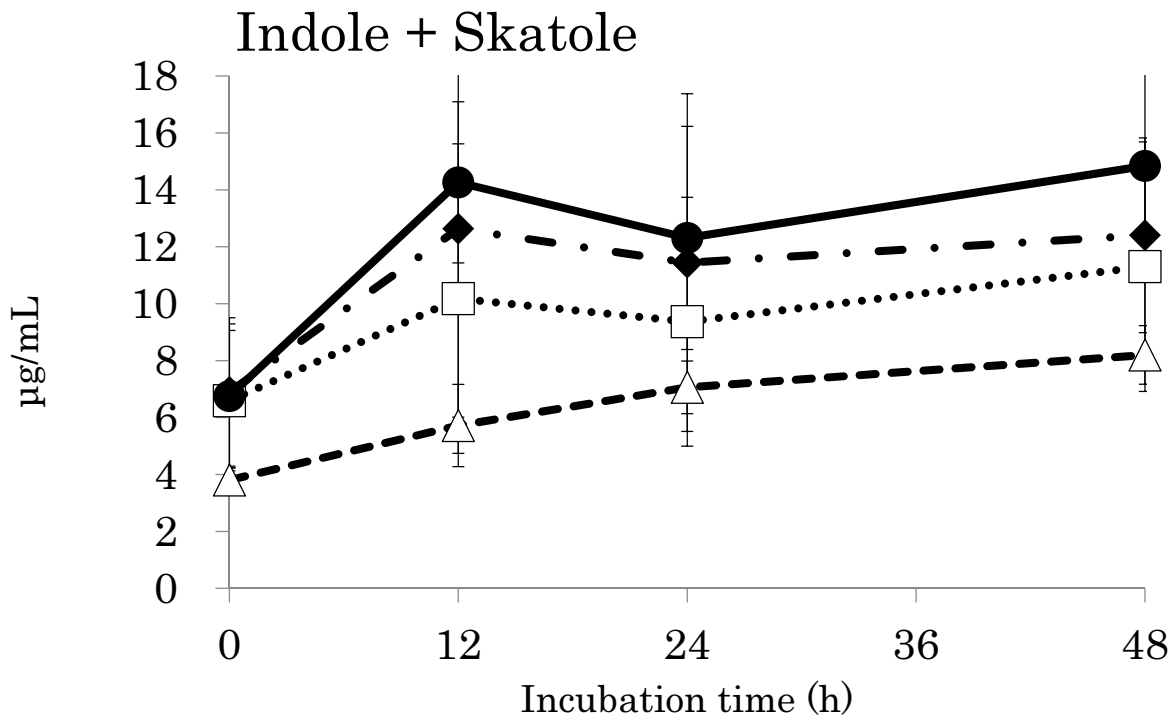


Fig.1-15 Total amount of indole and skatole concentrations during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control (◆), cellulose (□), FPEB (●) and inulin (△). Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test. FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-8 Indole and skatole concentration during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	1.67 ± 0.44	1.49 ± 0.44	1.60 ± 0.43	0.73 ± 0.04
Indole	12	5.51 ± 3.48 ^{ab}	3.90 ± 2.66 ^{ab}	7.37 ± 0.84 ^b	1.35 ± 0.87 ^a
(µg/mL)	24	4.51 ± 3.01	2.91 ± 2.05	5.24 ± 3.13	0.68 ± 0.02
	48	3.37 ± 1.84 ^{ab}	1.81 ± 0.47 ^a	7.76 ± 3.64 ^b	0.68 ± 0.05 ^a
	0	5.23 ± 2.17	5.10 ± 2.05	5.17 ± 2.11	3.08 ± 0.40
Skatole	12	7.13 ± 3.21	6.28 ± 2.82	6.90 ± 3.45	4.37 ± 1.26
(µg/mL)	24	6.94 ± 3.01	6.46 ± 2.59	7.08 ± 3.54	6.38 ± 0.95
	48	9.04 ± 2.28	9.50 ± 4.03	7.09 ± 3.66	7.52 ± 0.99

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 1-9 Total amount of indole and skatole during *in vitro* fermentation at 0, 12, 24 and 48 h using control, cellulose, FPEB and inulin.

	Incubation time (h)	Control	Cellulose	FPEB	Inulin
	0	6.90 ± 2.60	6.59 ± 2.46	6.76 ± 2.53	3.81 ± 0.44
Indole+skatole	12	12.64 ± 6.62	10.18 ± 5.44	14.26 ± 2.83	5.72 ± 1.45
(µg/mL)	24	11.45 ± 5.93	9.37 ± 4.37	12.31 ± 3.92	7.06 ± 0.93
	48	12.41 ± 3.42	11.30 ± 4.38	14.84 ± 3.53	8.20 ± 1.03

Each value represents the mean and standard deviation (n=5). Mean values (a, b, c) with unlike letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

第4節 考察

本章では、植物エキス発酵液 (FPE) の製造工程で発生する副産物 (FPEB) について、腸内環境に与える影響を *in vitro* 試験を用いて検討した。

FPEB は、炭水化物を主成分とするが、タンパク質、脂質および灰分も含まれている (第4章 Table 3-3)。本章では FPEB の大腸発酵性を検討するため、FPEB に含まれるブドウ糖や果糖等の小腸で吸収される単糖類をあらかじめ除去した透析物を調製し、FPEB 透析物として試験に供した。

注目すべき結果は、FPEB 透析物において *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* や一般嫌気性菌数および短鎖脂肪酸の生成量が有意に増加して培養液の pH が有意に低下し、さらに腐敗物質であるアンモニア態窒素濃度の上昇が抑制されたことである。

まず、細菌叢で見られた *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* などの有用菌を含む一般嫌気性菌数の増加は、FPEB 透析物が培養液の発酵を促進させた可能性を示唆している。大腸に到達する発酵基質で、食品由来物質の多くは非デンプン性多糖類、難消化性デンプンや難消化性オリゴ糖などの難消化性多糖類であることが知られている³⁷⁾。FPE には、原料植物を由来とするポリフェノール²⁴⁾、酵母の細胞壁由来と考えられる β -グルカン³⁰⁾、新規を含む数十種類のオリゴ糖²⁵⁻²⁸⁾が検出されることから、FPEB にもこれらを含む多数の物質の蓄積が考えられている。分析は行っていないが、FPEB 透析物には難消化性多糖類が多く含まれていると推測される。このことから、細菌叢における有用菌の増加は、FPEB 透析物中の難消化性多糖類が栄養源として利用された可能性が示唆された。

次に短鎖脂肪酸生成量の増加や pH の低下は、前述の有用菌が FPEB 透析物中の難消化性成分を資化した結果と考えられる。酢酸、プロピオン酸や *n*-酪酸などの短鎖脂肪酸は、食物繊維や難消化性成分の大腸内発酵産物であることが知られている³⁷⁾。とくに腸内最優勢の *Bacteroides* は難消化性多糖類を代謝して、主にコハク酸、プロピオン酸、酢酸を生成する³⁸⁾。また *Eubacterium* や *Clostridium* は酢酸や *n*-酪酸を生成し、*Bifidobacterium* は乳酸と酢酸を生成する。さらに乳酸は *Clostridium* や

*Bacteroides*等に利用され、プロピオン酸や *n*-酪酸に転換される³⁸⁾。今回、乳酸やコハク酸濃度を分析していないため、各短鎖脂肪酸生成量の増加と細菌叢で有意に増加した *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* および一般嫌気性菌との関連性を究明することはできなかったが、短鎖脂肪酸の増加や pH の低下が見られていることより、FPEB 透析物が発酵性を有することは明らかであり、生体内でも同様の作用を及ぼす可能性が示唆された。

総短鎖脂肪酸、酢酸、プロピオン酸濃度においては、FPEB 透析物で培養 12 時間の早い段階から増加傾向が見られ、とくにプロピオン酸においては有意な増加を示した。また培養液の pH およびアンモニア態窒素濃度は培養 12 時間以降、FPEB 透析物およびイヌリン群で有意な低値を維持した。これらの結果は FPEB 透析物の発酵速度がイヌリンよりも早いことを示しており、各短鎖脂肪酸濃度の推移からも、FPEB 透析物は発酵性の良い基質であることが伺える。*Clostridium perfringens* は腐敗菌の一つで、タンパク質を腐敗させてアンモニア、アミン、フェノール、インドールなどの有害物質を生成する一方、酸性環境下では増殖が抑制され、結果として乳酸菌等の有用菌が数的に凌駕することが知られている³⁹⁾。今回見られたアンモニア態窒素濃度の有意な低値は、FPEB 透析物が速やかに資化されて増産した短鎖脂肪酸の pH 低下作用により、腐敗菌の増殖が抑制されたことによるものと考えられた。

一方、大腸菌群数においては、短鎖脂肪酸による pH の低下や有用菌の増加が見られたにもかかわらず抑制されなかった。さらに悪臭化合物であるインドール濃度は、FPEB 透析物において培養 48 時間目で有意に増加した。インドールは大腸において、L-トリプトファンや難消化性蛋白質から大腸菌等により生成される^{40,41,42)}。また食餌成分によって大きく変動し、例えば大豆タンパク質を与えたラットの盲腸内では、とくにインドール濃度の増加が確認されている⁴³⁾。FPEB 透析物の分析は行っていないが、FPEB はわずかながらタンパク質を含有している (1.0g/100g 乾物)。FPE には、酵母の細胞壁由来の β -(1,3)-D-グルカンが可溶性の状態に含まれている³⁰⁾ ことから、FPEB 中のタンパク質は、酵母由来の β -グルカンやマンノースが主体の糖タンパク質マンナンと推測される。このことより、本研究で一

過的に見られたインドール濃度の増加は、FPEB 透析物中のタンパク質が大腸菌等に資化された可能性が考えられたが、詳しい説明には至らなかった。

Han らの研究によると、チコリの根から採取したイヌリンについて実施した豚の糞中微生物の混合培養による *in vitro* 試験では、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* が増加し、短鎖脂肪酸濃度の増加やアンモニア態窒素濃度の低下が見られ、腸内細菌による発酵性を有することが示唆されている⁴⁴⁾。本研究では、同様の実験により、FPEB 透析物においてイヌリンと同等の腸内発酵性が認められた。そして、生体内においても有用菌を活性化し、短鎖脂肪酸の生成を促す可能性が見出された。近年の研究では、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸等の代謝物質を介して宿主に及ぼす影響が明らかになりつつある^{45, 46)}。例えば、ビフィズス菌が産生する酢酸が腸管のバリア機能を高めて病原菌の感染を防ぐことや⁴⁵⁾、クロストリジウム目細菌が産生する *n*-酪酸が過剰な免疫反応を抑制する制御性 T 細胞を誘導することで腸炎を予防することが報告されている⁴⁶⁾。これらのことから、FPEB 透析物には、生体内において有用菌の活性化や短鎖脂肪酸の生成促進により、腸管粘膜バリア機能や免疫反応を向上させる可能性が示唆された。

結論として、FPEB 透析物は、*in vitro* 条件において *Bifidobacterium* や一般嫌気性菌を活性化し、短鎖脂肪酸の生成量を増加させたことから、腸内発酵性を有していることが判明した。その作用性は、プレバイオティクス効果が知られているイヌリンと同程度と評価された。

第3章 植物エキス発酵液 製造副産物がラットの腸内環境に与える影響

第1節 目的

難消化性オリゴ糖や植物および微生物の細胞壁を構成している多糖類は、分解酵素を持っていない人にとっては吸収、代謝することができない非栄養素とされてきた⁴⁷⁾。その一方で、これらの難消化性多糖類は人の健康維持に重要な役割を果たすことが次第に知られるようになり、一部のものについては体の生理学的機能に影響を与える保健機能成分として認められている⁴⁸⁾。それらの摂取による整腸作用はよく知られているが、それ以外にもアレルギーの予防・改善や病原体に対する抵抗性の向上など、全身の免疫系に対して有益な作用をもたらすことが期待されている。

難消化性多糖類が摂取された時に、間接あるいは直接影響を受けるものの一つが腸管免疫系である。腸管免疫系は、経口的に侵入した病原体や異物を排除し、共生する腸内細菌から大きな影響を受けてその機能を維持して恒常性を保っている^{6, 15)}。摂取された難消化性多糖類は、いわゆるプレバイオティクスとして消化や吸収を受けずに腸管まで達し、特にオリゴ糖はエネルギー源となりやすく、生息する腸内細菌の総数や構成、代謝に大きく関与すると考えられる^{13, 15)}。

植物エキス発酵液 (FPE) は、数十種類の植物原料からショ糖の浸透圧を利用してエキスを抽出し、それを製造工程の環境中に定着している酵母 (*Zygosaccharomyces* spp., *Pichia* spp.) や乳酸菌 (*Leuconostoc* spp.) 等によって 37°C で 180 日間以上発酵・熟成させて製造した褐色・粘稠性の健康飲料である。その製造工程で生じる沈殿物等の副産物 (FPEB) には、原料植物に由来するポリフェノール²⁴⁾ や難消化性糖類、また第1章緒論で示した新規を含むオリゴ糖²⁵⁻²⁸⁾、そして長期間の発酵熟成中に蓄積した乳酸菌や酵母等の死菌体由来の難消化性多糖類³⁰⁾ を含むものと考えられている。

第2章において、FPEB 透析物は、*in vitro* 条件で *Bifidobacterium* や

一般嫌気性菌を活性化して短鎖脂肪酸の生成量を増加させたことから、腸内発酵性を有しており、その作用はプレバイオティクス効果が知られているイヌリンに匹敵すると評価された。そして生体内でも腸内環境を改善する可能性が示唆された。

そこで本章では、FPEBに含まれている難消化性多糖類に注目し、生体での影響を確認するため、ラットに FPEB 透析物を 4 週間給与して、盲腸内の腸内細菌叢、短鎖脂肪酸含量、免疫関連物質および腐敗物質に及ぼす影響について検討することを目的とした。

第2節 実験方法

1. 植物エキス発酵液の調製

植物エキス発酵液（FPE）および副産物（FPEB）の調製については前章で記した。

2. 試験試料の調製

本研究では、FPEB をクロスフロー式ろ過ユニット（ビバフロー—200，ザルトリウス・ジャパン株式会社，東京，日本）を用いて分画分子量 10,000 で限外濾過し，残留物を凍結乾燥させ，これを FPEB 透析物として供試した。試料の成分および分子量分布を Table 2-1 および Fig.2-1 に示した。試料の成分については，タンパク質はケルダール法，水分は常圧加熱乾燥法，灰分は直接灰化法を用いて分析し，これらの総量以外を炭水化物として算出した。分子量分布については，透析物 1 mg を 1 mL の蒸留水に懸濁した液（未処理液）を，0.45 μm フィルターでろ過した後，遠心濾過フィルター（VIVASPIN 500, Sartorius, 100K-30K）で遠心処理し，各処理液をアンスロン硫酸法で反応させ，未処理液の値から算出した。

Table 2-1 Composition of FPEB dialysate.

Component	Composition (%)
Carbohydrate	75.0
Protein	17.0
Lipid	Trace
Ash	3.0
Water	5.0

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

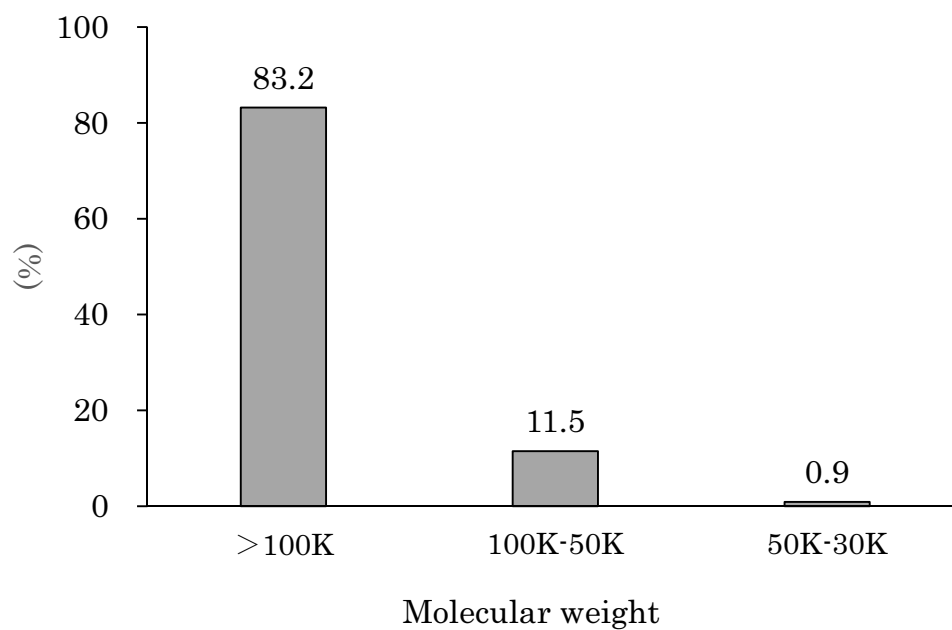


Fig.2-1 Molecular weight distribution of FPEB dialysate.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

3. 実験動物および食餌飼料

動物実験は7週齢のFischer系雄ラット（日本チャールス・リバー社，横浜，日本）を15匹用い，室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $60\pm 5\%$ ，12時間明暗周期（明期7:00~19:00）の条件下で飼育した。7日間市販の粉末飼料（MF，オリエンタル酵母工業株式会社，東京，日本）による馴致後，試験群間で体重差が出ないように3群に分けた。ラットの取り扱いにはGuide for the Care and Use of Laboratory Animals⁴⁹⁾に準じて行った。また，動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会より承認（承認番号：第28-87号）を得て行った。

食餌飼料は，AIN-93Gにセルロース，FPEB透析物およびイヌリンDP16を全体の5%の割合となるようにそれぞれ調合した。試験群は，これらを給与するセルロース群，FPEB群およびイヌリン群の3群とした。各試験飼料の組成をTable 2-2に示した。

投与期間は4週間とし，飼料および水は自由摂取とした。飼料摂取量は毎日測定し，体重測定と採血は毎週1回実施した。糞重量は，投与期間終了前3日間の乾燥重量を測定した。投与期間終了後，ラットはネンブタール腹腔内注射によって麻酔下で放血して安楽死させ，盲腸，肝臓，腎臓・精巣周囲脂肪を摘出し重量を測定した。また盲腸内容物を採取し，滅菌蒸留水で10倍に希釈した懸濁液とした。懸濁液はpHおよび細菌数の測定に供し，残りは各種分析まで -30°C で保存した。採取した血液は血清生化学について分析した。

Table 2-2 Compositions of experimental diets.

Ingredients (%)	Cellulose	FPEB ¹⁾	Inulin
Casein	20	20	20
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Soybean oil	7	7	7
Mineral Mix (AIN-93G-M)	3.5	3.5	3.5
Vitamin Mix (AIN-93-VX)	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
t-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Sucrose	10	10	10
Cellulose	5	0	0
FPEB dialysate	0	5	0
Inulin DP16	0	0	5
Cornstarch	30	30	30
α -Cornstarch	22.95	22.95	22.95

1) Fermented beverage of plant extract by-product

4. 盲腸内容物における各種分析

4.1 pH および短鎖脂肪酸濃度の測定

pHは盲腸内容物約1 gを滅菌生理食塩水で希釈して10 mLとし、pHメーター（SevenCompacy, メトラー・トレド株式会社, 東京, 日本）により測定した。

短鎖脂肪酸濃度は高速液体クロマトグラフ（High-performance liquid chromatography: HPLC）（LC-10AD, 島津製作所, 京都, 日本）を用いて測定した。HPLC用試料はHanら³⁴⁾の方法を参考に調製した。盲腸内容物懸濁液の上清400 μ Lに70%過塩素酸水溶液を60 μ L添加し遠心分離（2,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C, 30分）することでタンパク質を除去し, 得られた上清をセルロースアセテート膜フィルター（0.45 μ m, 東洋濾紙株, 東京, 日本）に通してHPLC用試料とした。HPLCの設定条件はHanら⁵⁰⁾の方法に従った。また酢酸, プロピオン酸, *n*-酪酸濃度の総和を総短鎖脂肪酸とした。

4.2 微生物叢の分析

盲腸内細菌数の測定は, 各種選択培地を用い, Hanら⁵⁰⁾の方法を参考にして行った。大腸菌群および乳酸菌はそれぞれEMB寒天培地(栄研化学株, 東京, 日本), MRS寒天培地 (Oxioid, Hampshire, UK) を用いて37 $^{\circ}$ Cで培養した。一般嫌気性菌, *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* はそれぞれBL寒天培地 (栄研化学株), ROGOSA寒天培地 (Oxioid), TOSプロピオン酸寒天培地 (ヤクルト薬品工業株, 東京, 日本) を用いて, Mitsuokaら⁵¹⁾の方法に準じてGasPakにより37 $^{\circ}$ Cで培養した。コロニー数は内容物1 gあたりの常用対数で表した。

4.3 ムチン濃度の測定

盲腸内ムチン濃度は, 盲腸内容物懸濁液を用いて Bovee-Oudenhoven らの方法で抽出し⁵²⁾, 蛍光アッセイにより測定した⁵³⁾。

4.4 IgA濃度の測定

盲腸内IgA濃度は, 盲腸内容物懸濁液を遠心分離し（2,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C, 20

分) 得られた上清を試料として Rat IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) により測定した。サンプルおよび試薬は全て室温で使用した。Coating Antibody (Goat anti-Rat IgA-affinity purified, A110-102A: 1 mg/mL) 1 μ L に対して Coating Buffer (0.05M Carbonate-bicarbonate pH9.6) を 100 μ L 加え必要量調製したものを 96 ウエルプレートのそれぞれのウエルに 100 μ L ずつ添加して室温で 1 時間放置後, ELISA 用マイクロプレートウォッシャー (Wellwash, サーモフィシャーサイエンティフィック株式会社, 横浜, 日本) を用いて Wash Solution (50 mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween20, pH8.0) で 5 回洗浄した。洗浄後はウエル内の水分を十分に除いた。洗浄後それぞれのウエルに Blocking Solution (50 mM Tris, 0.14M NaCl, 1% Bovine Serum Albumin, pH8.0) を 200 μ L ずつ添加して室温で 30 分放置後, フィルムでフタをして 4°C で 1 晩保存した。翌日, 96 ウエルプレートを室温に戻してからマイクロプレートウォッシャーで 5 回洗浄した。あらかじめ標準溶液と試料を調製しておき, それぞれ 100 μ L ずつ添加し 1 時間放置後, 同様に 5 回洗浄した。標準溶液は Rat Reference Serum (RS10-102: 0.2 mg/mL) を希釈液 (Blocking Buffer: 10% Tween20=200:1) で 1000 ng/mL に調製し, 希釈液で 2 倍段階希釈を行い 15.6 ng/mL まで調製した。希釈液のみを 0 ng/mL とした。試料は盲腸内容物懸濁液から得られた上清を希釈液で適当に希釈したものをを用いた。洗浄後, 希釈液で適当に希釈した Horseradish Peroxidase (HRP) Detection Antibody (Goat anti-Rat IgA-HRP conjugate, A110-102P: 1 mg/mL) を 100 μ L ずつ添加し 1 時間放置後, 同様に 5 回洗浄した。TMB (TMB One Component HRP Microwell Substrate) を 100 μ L ずつ添加し, 室温・暗所で 15~30 分放置後, Stop Solution (0.18M H₂SO₄) を 100 μ L ずつ添加し, マイクロプレートミキサー (MPX-96, 株式会社サイニクス, 東京, 日本) で攪拌した。マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で波長 450 nm における吸光度を測定し, 標準溶液から作成した検量線より IgA 濃度を算出した。

4.5 アンモニア態窒素濃度の測定

盲腸内アンモニア態窒素濃度は、盲腸内容物懸濁液を遠心分離し(2,000×*g*, 4°C, 30分)得られた上清を用いて血液検査用アンモニアキット(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)により測定した⁵⁴⁾。

4.6 血清中の生化学分析

総コレステロール, HDLコレステロールの測定は酵素法(TDXシステム; Abbott Laboratories, IL, USA)により行った。総コレステロールとHDLコレステロール濃度の差をVLDL+IDL+LDLコレステロール濃度とした。トリグリセライド, 遊離脂肪酸, リン脂質, グルコース, GOT, GPT, ALP, 総タンパク質, アルブミンの測定は, 酵素分析キット(Fuji Dri-Chem system; 富士フイルム株式会社, 東京, 日本)を用い, FUJI Dri-Chem7000(富士フイルム株式会社)で行った。

5. 統計解析

全てのデータを平均値±標準誤差で表した。各データにおける群間の有意差検定は一元配置分散分析(ANOVA)後, Tukeyの多重比較を用いた。2変数間の相関関係にはPearsonの積率相関分析を用いて行った。各検定における統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

第 3 節 結果

1. 体重，飼料摂取量，糞重量

体重，飼料摂取量および糞重量を Table 2-3 に示した。投与 4 週間の総飼料摂取量は，イヌリン群でセルロース群と比較して有意に減少した ($p < 0.05$)。それに伴い，体重増加量もイヌリン群で有意に減少した ($p < 0.05$)。また投与期間終了前 3 日間の糞乾燥重量は，セルロース群に対してイヌリン群で有意に減少し，FPEB 群で減少傾向を示した。

2. 各種臓器および周囲脂肪重量，盲腸内

各種臓器および周囲脂肪重量，盲腸内 pH を Table 2-4 に示した。肝臓重量は FPEB 群でイヌリン群よりも有意に増加した。腎臓と精巣周囲の脂肪重量は群間で有意差は見られなかった。盲腸壁重量は，イヌリン群でセルロース群および FPEB 群よりも有意に増加した。盲腸内容物重量は，FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に対して有意に増加した。盲腸内 pH は，FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$)。

3. 盲腸内の短鎖脂肪酸濃度

盲腸内の短鎖脂肪酸濃度を Table 2-5 および Fig. 2-2 に示した。酢酸，プロピオン酸，*n*-酪酸および総短鎖脂肪酸濃度は，FPEB およびイヌリン群でセルロース群と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。プロピオン酸濃度においては，FPEB 群が最も増加し，イヌリン群に対して有意差を示した。また *n*-酪酸濃度では，イヌリン群が最も増加し，FPEB 群に対して有意差が認められた。

4. 盲腸内のムチン濃度および IgA 濃度

盲腸内のムチン濃度および IgA 濃度を Table 2-6 および Fig. 2-3 に示した。盲腸内ムチン濃度は，FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に比べ有意に増加した。また盲腸内ムチン濃度は，盲腸内 pH と有意な負の相関を示し ($r = -0.732$, $p < 0.01$)，盲腸内酢酸，*n*-酪酸および総短鎖脂肪酸濃度

と有意な正の相関を示した（酢酸： $r=0.637$, $p<0.01$, n -酪酸： $r=0.472$, $p<0.02$, 総短鎖脂肪酸： $r=0.750$, $p<0.01$ ）。

盲腸内 IgA 濃度も、FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に対して有意に増加した。また盲腸内 IgA 濃度は、盲腸内 pH と有意な負の相関を示し（ $r=-0.806$, $p<0.01$ ）、盲腸内酢酸、 n -酪酸および総短鎖脂肪酸濃度と有意な正の相関を示した（酢酸： $r=0.671$, $p<0.01$, n -酪酸： $r=0.645$, $p<0.01$, 総短鎖脂肪酸： $r=0.608$, $p<0.01$ ）。

5. 盲腸内のアンモニア態窒素濃度

盲腸内のアンモニア態窒素濃度を Table 2-7 および Fig.2-4 に示した。盲腸内のアンモニア態窒素濃度は、FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群と比較して有意に増加した。しかしながら、盲腸 1 g 当たりに換算すると有意差は見られなかった。

6. 盲腸内の細菌数

盲腸内の細菌数を Table 2-8 に示した。Coliform は群間で有意差はみられなかった。一般嫌気性菌は、FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に対して有意な増加を示した。乳酸菌および *Lactobacillus* は群間で有意差はみられなかった。*Bifidobacterium* はイヌリン群でセルロース群に対して有意に増加し、さらに FPEB 群ではイヌリン群よりも有意な増加を示した。

7. 血清生化学分析

血清生化学分析結果を Table 2-9 に示した。血中総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸およびリン脂質値に群間で有意差は見られず、脂質代謝への影響は見られなかった。血糖や総蛋白、アルブミンおよび ALP においても群間で有意差は見られなかった。GOT および GPT は FPEB 群でセルロース群およびイヌリン群よりも有意に低下した。アテローム性動脈硬化指数はセルロース群に比べ FPEB 群で有意に低下し、さらにイヌリン群で FPEB 群よりも有意に低下した。

Table 2-3 Total food intake, body weight gain and fecal weight in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

	Cellulose	FPEB	Inulin
Total food intake (g/4wk)	356±6 ^a	340±5 ^{ab}	326±6 ^b
Body weight gain (g/4wk)	70.5±1.3 ^a	67.4±3.6 ^{ab}	58.9±3.3 ^b
Fecal weight (g/3d)	2.54±0.32 ^a	2.03±0.13 ^a	1.24±0.10 ^b

Values are expressed as mean ± SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 2-4 Organ, organ fat weight and cecal pH in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

	Cellulose	FPEB	Inulin
Liver weight (g)	8.14±0.10 ^{ab}	8.47±0.19 ^a	7.68±0.11 ^b
Epididymal fat (g)	4.34±0.21	4.31±0.18	3.87±0.18
Kidney envelope fat (g)	4.56±0.18	4.41±0.24	3.85±0.29
Cecum wall (g)	0.55±0.07 ^b	0.66±0.02 ^b	0.96±0.05 ^a
Cecum contents weight (g)	2.15±0.18 ^b	2.99±0.23 ^a	3.38±0.21 ^a
Cecal pH	7.24±0.09 ^a	6.25±0.09 ^b	6.08±0.13 ^b

Values are expressed as mean ± SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 2-5 Cecal short-chain fatty acids concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

SCFA ($\mu\text{mol/g}$ content)	Cellulose	FPEB	Inulin
Acetate	228 \pm 38 ^b	389 \pm 49 ^a	394 \pm 20 ^a
Propionic acid	35.1 \pm 3.5 ^c	111 \pm 8 ^a	71.6 \pm 8.1 ^b
<i>n</i> -Butyric acid	5.49 \pm 1.98 ^c	42.8 \pm 9.83 ^b	85.4 \pm 1.11 ^a
Total SCFA	269 \pm 43 ^b	543 \pm 60 ^a	551 \pm 29 ^a

Values are expressed as mean \pm SE, n=5. ^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

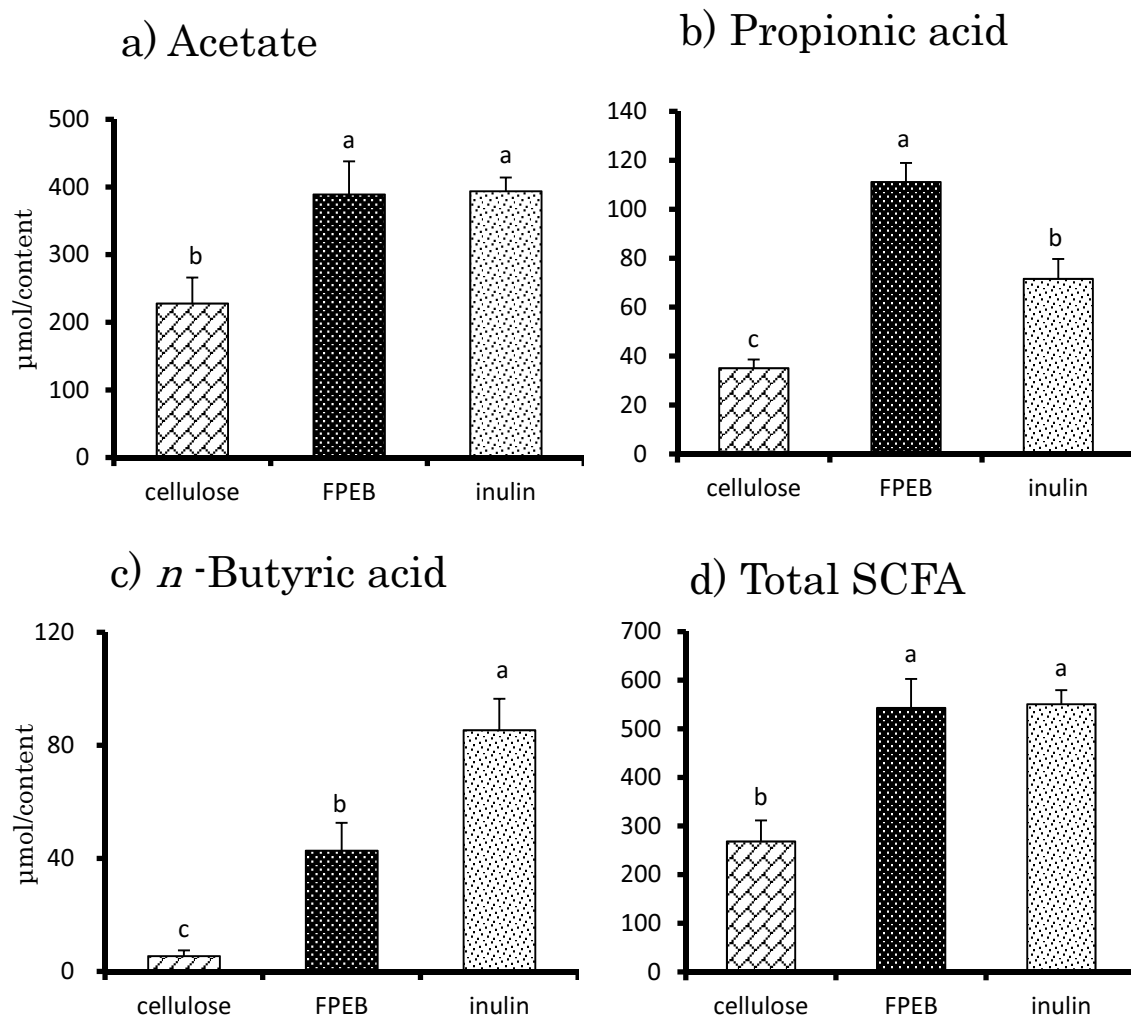


Fig.2-2 Cecal acetic acids, propionic acid, *n*-butyric acid and total SCFA concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 2-6 Cecal mucin and IgA concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

	Cellulose	FPEB	Inulin
Mucin (mg/g content)	15.6±1.6 ^b	20.8±1.5 ^a	25.3±0.8 ^a
IgA (mg/g content)	0.39±0.14 ^b	1.22±0.06 ^a	1.28±0.15 ^a

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

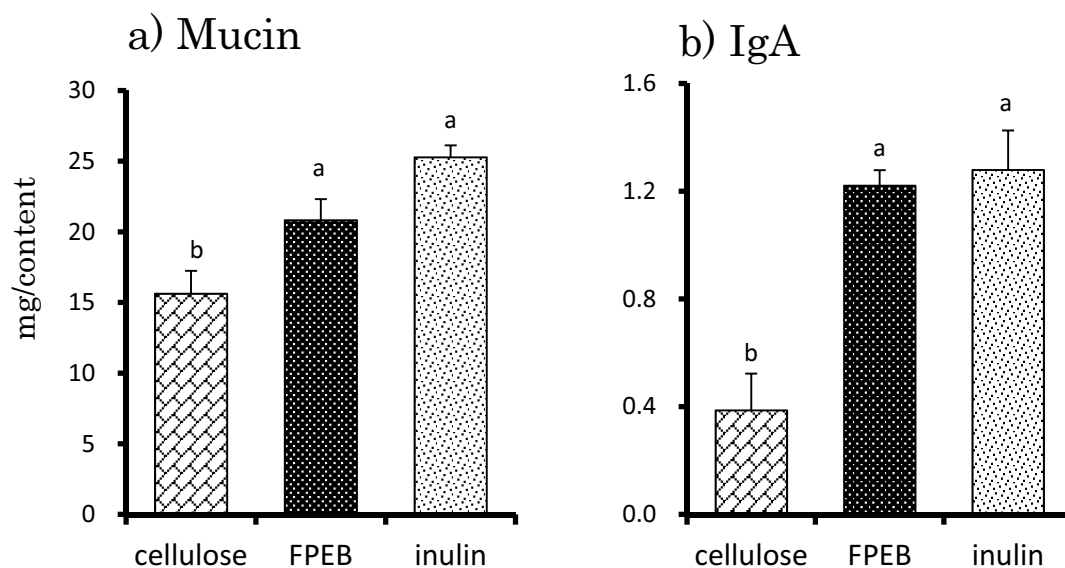


Fig.2-3 Cecal mucin and IgA concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 2-7 Cecal NH₄-N concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

	Cellulose	FPEB	Inulin
NH ₄ -N (mg/g content)	1.89±0.26 ^b	3.61±0.22 ^a	3.82±0.25 ^a
NH ₄ -N (mg/g cecum)	0.89±0.11	1.22±0.08	1.14±0.09

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

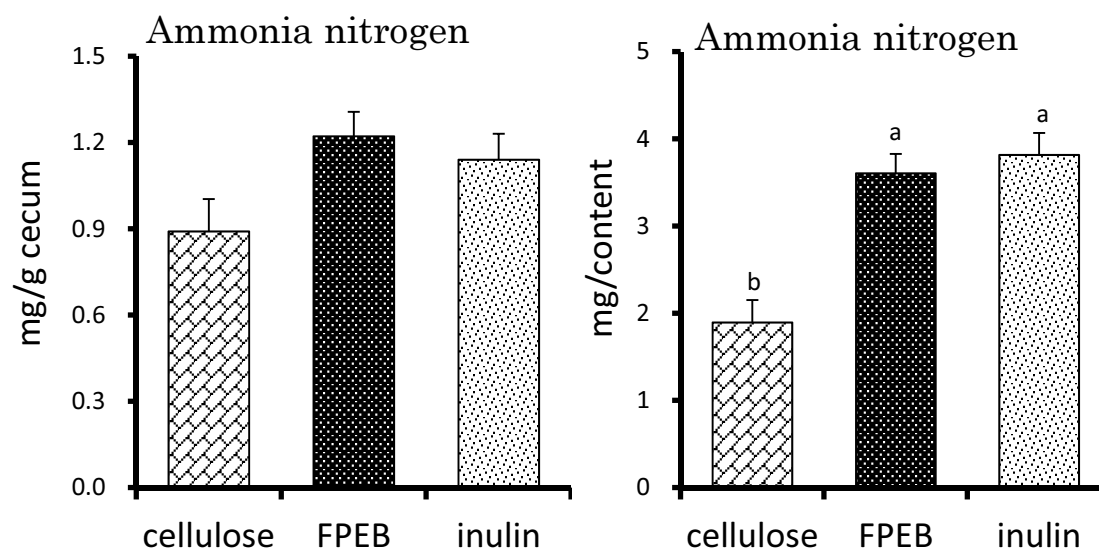


Fig.2-4 Cecal NH₄-N concentrations in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product.

Table 2-8 Cecal bacteria levels in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

(log ₁₀ CFU/g content)	Cellulose	FPEB	Inulin
Coliform	8.44±0.23	8.68±0.25	8.30±0.35
Anaerobe	9.53±0.06 ^c	10.0±0.1 ^b	10.6±0.1 ^a
Lactic acid bacteria	9.79±0.19	10.2±0.1	10.0±0.1
<i>Lactobacillus</i>	8.09±0.37	8.38±0.39	8.90±0.24
<i>Bifidobacterium</i>	7.82±0.18 ^c	8.94±0.07 ^a	8.38±0.15 ^b

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 2-9 Blood biochemistry in rats fed the control diet or a FPEB diet or a inulin diet for 28 days.

	Cellulose	FPEB	Inulin
Total cholesterol (mmol/l)	1.67±0.04	1.61±0.07	1.57±0.03
HDL cholesterol (mmol/l)	0.41±0.01	0.42±0.02	0.42±0.01
Non HDL cholesterol (mmol/l)	1.25±0.03	1.19±0.12	1.15±0.05
Triglyceride (mmol/l)	1.11±0.08	1.16±0.14	0.91±0.08
Free fatty acid (mmol/l)	1.07±0.07	0.93±0.03	0.95±0.07
Phosphorus lipid (mmol/l)	1.12±0.03	1.25±0.05	1.16±0.02
AI	3.02±0.03 ^a	2.87±0.5 ^b	2.72±0.03 ^c
Glucose (mmol/l)	4.47±0.40	4.46±0.34	4.04±0.48
GOT (IU/l)	210±6 ^a	164±13 ^b	196±3 ^a
GPT (IU/l)	36.0±0.9 ^a	32.0±0.3 ^b	36.2±1.2 ^a
ALP (IU/l)	725±31	695±11	723±17
Total protein (g/dL)	7.2±0.1	7.1±0.1	7.2±0.1
Albumine (g/dL)	3.88±0.01	3.90±0.3	3.96±0.03

Values are expressed as mean±SE, n=5. ^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters are significantly different ($p < 0.05$), as determined by ANOVA with Tukey's test.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

AI: atherogenic index

第4節 考察

本章では、植物エキス発酵液 (FPE) の製造工程で発生する副産物 (FPEB) について、腸内環境に与える影響を *in vivo* 試験を用いて検討した。なお本研究においても FPEB の大腸発酵性を明らかにするため、FPEB に含まれる単糖類をあらかじめ除去した透析物を調製し、FPEB 透析物として試験に供した。

本研究において注目すべき結果は、FPEB 透析物がラットの盲腸内においても、*Bifidobacterium* や一般嫌気性菌数および短鎖脂肪酸の生成量を有意に増加させ、pH を有意に低下させたことであり、*in vitro* 試験の結果と一致したことである。

大腸に到達する発酵基質には、食品由来のものと同因性のあることが知られている³⁷⁾。食品中の難消化性成分の大部分は糖質であり、非デンプン性多糖 (食物繊維) や難消化性デンプン (レジスタントスターチ)、難消化性のオリゴ糖がある³⁷⁾。供試した FPEB 透析物の 75% が炭水化物であり、その分子量分布において 100 kDa 以上の高分子化合物が 83% を占めていた。その高分子化合物中の難消化性成分については検討していないが、FPEB の製造工程を考えると、水溶性糖類の大部分は FPE 中へ移行している可能性があり、FPEB 透析物中の炭水化物のほとんどが難消化性多糖類と推測される。事実、本研究において *Bifidobacterium* と短鎖脂肪酸の有意な増加は、FPEB 透析物が難消化性多糖類としてのプレバイオティクス作用を有する可能性を示唆している。なお供試した FPEB 透析物に含まれる難消化性多糖類は、上記した炭水化物含量および分子量分布から 62.3% と推定した。

一方で、発酵基質としては難消化性タンパク質などの窒素化合物もあり、腸内細菌の窒素や硫黄の供給源の一部になっている。FPEB 透析物は、発酵微生物の菌体由来と思われるタンパク質を 17% 含有しており、それが発酵基質として大腸菌等により利用された可能性が考えられる^{40, 41, 42)}。アンモニア態窒素濃度は、*in vitro* 試験において FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群に比べて有意に低下した。一方、*in vivo* 試験では各群で有意

差は見られなかったが、FPEB 群とイヌリン群でセルロース群に比べ増加傾向を示した。両試験でアンモニア態窒素濃度の結果が一致しなかった要因として、*in vivo* 試験では新陳代謝で常時剥がれ落ちる盲腸上皮細胞の内因性のタンパク質が原因になっている可能性が考えられる³⁸⁾。アンモニア態窒素は腸内細菌が難消化性タンパク質等の窒素化合物を資化することにより産生されることも報告されている⁵⁵⁾。本研究で見られた FPEB 群およびイヌリン群におけるアンモニア態窒素濃度の増加傾向は、盲腸壁重量の増加とそれに伴う脱落した盲腸上皮細胞由来のタンパク質による可能性が一部考えられる³⁸⁾。しかしながら、菌体由来タンパク質の可能性が大きいと推測される^{40, 41, 42)}。

短鎖脂肪酸濃度において、プロピオン酸濃度は FPEB 群でイヌリン群よりも有意な増加を示した。また *n*-酪酸濃度はイヌリン群で FPEB 群よりも有意に増加した。これらの結果は *in vitro* 試験と一致していた。プロピオン酸の産生には、腸内最優勢の *Bacteroides* が糖を代謝する経路、また *Bifidobacterium* や他の *Bacteroides* および *Clostridium* が産生した乳酸から生成する経路^{37, 38)}があるほかに、*Bacteroides* が産生したコハク酸から生成されることが知られている^{37, 38)}。本研究では、乳酸やコハク酸濃度の測定および細菌叢分析を実施していないため、FPEB 透析物によるプロピオン酸濃度の有意な増加が、どのような機序で誘因されたのかを究明することはできなかった。

腸内発酵で産生されるプロピオン酸が生体に及ぼす有用性については、近年多数報告されている⁵⁶⁾。まず短鎖脂肪酸をリガンドとする G 蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPR) である GPR41 は、交感神経節に特異的に発現しており、短鎖脂肪酸のうち、とくにプロピオン酸により最も活性化され、交感神経系を亢進することによりエネルギー消費を高める⁵⁷⁾。さらにプロピオン酸は、肝臓がん細胞に存在する短鎖脂肪酸受容体に作用して肝臓がん細胞の増殖を抑えるという研究報告もある⁵⁸⁾。本研究から、FPEB 透析物には腸内でプロピオン酸の生成量を増加させる特異性が示唆されている。プロピオン酸の生体内での有用性が多数報告されている¹³⁻¹⁵⁾ ことから、FPEB 透析物によるプロピオン酸の生成機序を細菌叢

分析等で明らかにする必要がある。

一方、肥満マウスにリンゴ由来の高分子ポリフェノールであるプロシアニジン類を摂食させ、体重増加に与える影響を検討した実験では、高脂肪・高ショ糖食の摂取によって悪化した腸内細菌叢の *Firmicutes* 門/*Bacteroidetes* 門の比率を、普通食を摂食させたマウスと同等にまで改善させたことが報告されている⁵⁹⁾。FPEBは数十種類の野菜、果物、野草、キノコや海藻などの植物を原料としている。FPE（スーパーオータカ、大高酵素株式会社、小樽、日本）からは、これまでにコーヒー酸（6.4 mg/100g）やクロロゲン酸（3.4 mg/100g）²⁴⁾が検出されているが、それ以外にも原料植物由来のポリフェノールを多く含むと推測されている。このことから、分析は実施していないが、FPEBにもポリフェノールを含有している可能性は高いと考えられる。近年、植物性のポリフェノールが腸内細菌叢の構成を変化させることが知られてきている^{59,60)}。とくに *in vitro* 試験において、クロロゲン酸が *Bifidobacterium* の生育を促進すること⁶¹⁾や、ブルーベリー由来のポリフェノールがヒト腸内の *Bifidobacterium* を増加させることが報告されている⁶²⁾。さらに食事性ポリフェノールが腸内細菌叢の短鎖脂肪酸生成を刺激する可能性も示されている⁶⁰⁾。これらの研究報告からも、FPEB群における *Bifidobacterium* や短鎖脂肪酸の有意な増加には、原料植物由来のポリフェノールも一部関わっている可能性が示唆された。

本研究において、試験期間中の総飼料摂取量は、イヌリン群でセルロース群と比較して有意に低下した。それに伴い、増体量や糞重量も有意に低下した。またFPEB群では、同様に低下傾向が見られた。イヌリンをマウスに与えると、腸内細菌の発酵により生成された短鎖脂肪酸の酢酸塩が、脳の血液関門を通過して視床下部に到達し、プロピオメラノコルチン神経細胞を刺激して食欲を抑制していることが報告されている⁶³⁾。また腸内細菌が生成する *n*-酪酸やプロピオン酸は、腸管のL細胞を刺激して、GLP-1やPYYのような腸管ホルモンの分泌を促進させる⁶⁴⁾。GLP-1やPYYは、脳に作用して食欲を抑える働きが知られている⁶⁵⁾。本研究におけるイヌリン群およびFPEB群の総摂餌量の低下は、腸内発酵の促進で増産された短鎖脂肪酸の食欲抑制効果と推測される。盲腸壁や盲腸内容物の重量は、イヌリ

ン群および FPEB 群で、セルロース群と比較して有意な増加もしくは増加傾向が見られた。難消化性多糖類をラットに与えると、盲腸が肥大化することが報告されている⁶⁶⁾。腸内発酵で生成された *n*-酪酸は、腸管上皮細胞のエネルギー源になることが知られており⁶⁷⁾、本研究においても *n*-酪酸による腸管上皮細胞への栄養効果が現れたと考えられる。

盲腸内 IgA 濃度は、FPEB 群およびイヌリン群でセルロース群よりも有意に増加した。また盲腸内 pH と有意な負の相関を示し ($r=-0.732$, $p<0.01$)、さらに盲腸内酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸および総短鎖脂肪酸濃度とも有意な正の相関が見られた (酢酸: $r=0.637$, $p<0.01$, *n*-酪酸: $r=0.472$, $p<0.02$, 総短鎖脂肪酸: $r=0.750$, $p<0.01$)。これは Ebihara らのヒドロキシプロピル化デンプンを用いたラットの試験報告と一致していた⁶⁸⁾。盲腸内 pH が低下すると、腸管透過性の亢進により炎症が誘導され、粘液のムチンと IgA、さらに IgA が結合する腸上皮細胞の基底側に発現する特異受容体 (polymeric immunoglobulin receptor: pIgR) の産生が一過的に増加することが知られている⁶⁹⁾。本研究においても、盲腸内短鎖脂肪酸濃度の増加やそれに伴う pH の低下により、IgA 分泌が促進された可能性が考えられる。

一方、腸管粘膜での IgA の産生には、腸内常在菌による恒常的な刺激が必要とされており、腸内共生菌のうち *Bacteroides* は *Lactobacillus* に比べて腸管免疫系の IgA 産生の誘導に強く関与している可能性が報告されている⁷⁰⁾。また特定の乳酸菌が、樹状細胞の IL-6 産生を誘導し、IgA 産生を増強することも示されている^{71,72)}。さらに IgA の産生誘導に腸内共生菌が関わるだけでなく、IgA が腸内共生菌を制御することも明らかにされている⁷³⁾。本研究では、FPEB 群とイヌリン群で一般嫌気性菌および *Bifidobacterium* が有意な増加を示したが、乳酸菌に有意差はみられなかった。IgA の有意な増加には、FPEB 透析物やイヌリンのプレバイオティクス効果で増加した *Bacteroidetes* が関わっている可能性があるかもしれない。

また最近の研究では、フラクトオリゴ糖を投与したラットの盲腸内 IgA 濃度の増加機序として、投与初期のみ一過的に発現する盲腸粘膜の炎症が

起因しており，その現象が腸管免疫システムの亢進に寄与している可能性が示唆されている⁷⁴⁾。FPEB 透析物やイヌリンにおいても同様の現象が発現している可能性も考えられる。

さらに食品中に含まれるカビ，酵母などに由来する分泌多糖や細胞壁多糖（ β -グルカンやマンナン）が病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular patterns：PAMPs）として腸管粘膜下に存在するマクロファージや樹状細胞にリガンドとして作用することで自然免疫や獲得免疫に影響を及ぼすことが知られている⁷⁵⁾。また PAMPs の認識により自然免疫系が活性化されると，遊走してきた好中球や分泌された抗菌ペプチド，IgA 産生の増加により腸内細菌が制御されることも報告されている^{76,77)}。FPE には酵母の細胞壁由来の β -(1,3)-D-グルカンが可溶性の状態に含まれている³⁰⁾。また分析は行っていないが，製法から FPEB にも β -(1,3)-D-グルカンを含む細胞壁多糖が蓄積されている可能性は高いと考えられる。このことより，本研究で見られた FPEB 透析物による IgA の有意な増加には，酵母由来多糖類をリガンドとする自然免疫系を介したイヌリンとは異なる機序も作用している可能性が示唆された。

腸管バリア機能に寄与する盲腸内ムチン濃度において，FPEB 群およびイヌリン群は，セルロース群よりも有意な増加を示した。盲腸内ムチンの分泌は，短鎖脂肪酸の増加に伴い刺激されることが示されている^{78,79)}。本研究においても，盲腸内ムチン濃度と短鎖脂肪酸濃度の間には正の相関が見られた（酢酸： $r=0.671$ ， $p<0.01$ ， n -酪酸： $r=0.645$ ， $p<0.01$ ，総短鎖脂肪酸： $r=0.608$ ， $p<0.01$ ）。したがって，盲腸内短鎖脂肪酸濃度の増加やそれに伴う pH の低下により，ムチン分泌が促進された可能性が考えられた。Sonoyama らの研究では，生の精米粉をマウスに投与すると，*Akkermansia* 菌の増加が抑制され，ムチン濃度の低下が抑制されたことが示されている⁸⁰⁾。一方で，高繊維食をマウスに投与すると *Akkermansia* 菌が増殖することや⁸¹⁾，*Akkermansia* 菌が宿主の代謝機能の改善に関与していることも報告されている⁸²⁾。したがって，FPEB 透析物やイヌリンのプレバイオティクス効果が *Akkermansia* 菌に及ぼす影響についても，今後明らかにする必要があると考える。

血清生化学分析では、血中総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸およびリン脂質値に有意差は見られず、脂質代謝への影響は認められなかった。短鎖脂肪酸は吸収されて宿主のエネルギー源として利用されるのみならず、水やミネラルの吸収促進、脂質代謝改善、消化管ホルモンの分泌など様々な作用をもたらすことが明らかになっている⁸³⁾。本研究では、血中脂質の各値に有意差はみられなかったが、動脈硬化の起こりやすさを表現したアテローム性動脈硬化指数 (Atherogenic index: AI) は、FPEB 群がセルロース群よりも有意に低下し、さらにイヌリン群では FPEB 群よりも有意に低下していた。このことより、FPEB 透析物やイヌリンには、動脈硬化の予防に効果的な脂質代謝の改善作用が示唆されるが、その機序については解明できなかった。また GOT や GPT においては、FPEB 群がセルロース群やイヌリン群と比べ有意に低下しており、FPEB 透析物質に肝機能の改善効果が伺えるが、こちらの機序も解明できなかった。

結論として、FPEB 透析物は、盲腸内の有用菌を活性化して短鎖脂肪酸の生成量を増やし、盲腸内の pH を低下させたことから、腸内環境の改善作用が認められた。また腸管免疫関連物質のムチンや IgA の濃度も増加したことから、腸管粘膜バリア機能の向上作用も認められた。短鎖脂肪酸においては、とくにプロピオン酸の生成を促進させる特異性が示唆された。

第4章 植物エキス発酵液 製造副産物が肥育豚の産肉性に及ぼす影響

第1節 目的

食品製造時に発生する副産物は、従前から原料利用率の低下や処理コストの負担が懸案事項であり、その発生を低減する製造方法と発生物の有効利用が様々に検討されてきた。平成13年に施行された食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）により、食品製造工程で発生する不可食部分を中心とする副産物のリサイクル（資源循環）は順調に推進されている。とくに食品製造業においては、食品廃棄物等の発生量が減少する一方、有価物を除いた再生利用率においても近年80%程度で推移しており、再生利用率は着実に向上している。平成22年度の食品リサイクル実績を手法別にみると、①飼料（51%）、②肥料（12%）、③メタン化（3%）、④油脂・油脂製品（2%）となっている。また再生利用実施量の推移をみると、有価物を除いた飼料化やメタン化及び油脂・油脂製品は増加傾向にあるが、飼料化全体や肥料化は減少傾向にあることが示されている⁸⁴⁾。

畜産業における飼料費は経営コストの約50~70%を占めているが、その飼料の原料は約70%を海外からの輸入に依存している。主要消費国の米国や中国の需要が増加傾向にある昨今、穀物相場に翻弄されない足腰の強い畜産経営を実現させるためには、飼料自給率の向上が急務とされており、新たな食料・農業・農村基本計画では、平成32年度の飼料自給率目標が38%に設定された。

エコフィードは食品製造副産物、余剰食品および調理残渣等を利用して製造される家畜用飼料であり、食品循環資源を原料にして加工処理されたリサイクル飼料と同義とされる⁸⁴⁾。エコフィードは、食料の無駄をなくすとともに、トウモロコシや大豆粕などの濃厚飼料の代替として飼料自給率を向上させる有効策であり、その生産や利用量は年々増加傾向にある。この十数年で食品製造副産物等の飼料利用が格段に進んできたとはいえ、利

用可能な資源はまだ数多く存在するに相違ない。新たな素材に対しても積極的に対応して技術開発と普及を進めることで、購入飼料だけではない、あらゆる状況変化に対応可能な飼料利用の選択肢を拡げておくことが、畜産用飼料の安定確保に繋がるであろう。

一方、近年では、畜産物としての食肉を消費者に安定に提供するために、抗菌性物質などの薬剤に頼らない安全・安心を付加価値とした生産技術も求められている。その代替としてチーズホエイを利用した乳酸菌によるプロバイオティクス機能⁸⁵⁾や、納豆残渣⁸⁶⁾、フラクトオリゴ糖等によるプレバイオティクス機能⁸⁷⁾に注目した飼料への利用に関する研究が数多くあり、数々の効果を示している。飼料に含まれる抗生物質は、低濃度ながら長期に渡って投与されることから、消費者の中には薬剤耐性菌の出現や畜産物への残留等を危惧する人も多く、消費者が求める安全・安心な畜産物の供給に向けた、抗生物質を可能な限り使用しない飼養管理技術の開発が期待されている。

第3章では、植物エキス発酵液 製造副産物 (FPEB) の透析物をラットに28日間摂取させた結果、腸内発酵が促進され、腸内環境や腸管粘膜バリア機能に対する改善作用が示唆された。この結果から、FPEBを家畜に長期給与することで、腸内環境改善や腸管粘膜バリア機能の向上による免疫力強化が期待され、抗生物質に依存しない感染症予防に効果的な飼養管理の実現と、腸内での腐敗物質産生を抑えた不快臭の少ない食肉の生産に繋がる可能性を考えた。

そこで本章では、肥育豚にFPEBを給与して、発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成および悪臭化合物濃度に及ぼす影響を検討することを目的とした。

第 2 節 実験方法

1. 植物エキス発酵液の調製

植物エキス発酵液（FPE）および供試した植物エキス発酵液製造副産物（FPEB）の調製については、第 2 章に示した。

2. 供試豚

供試豚は三元交雑種（LWD，ランドレース種×大ヨークシャー種×デュロック種）12 頭（去勢）を用いた。導入時の体重は 74.5 ± 1.72 kg であった。7 日間の馴致期間の体重を考慮して 6 頭を 1 群とし，対照区と試験区の 2 群を設定した。

3. 試験区分

給与した飼料の成分および組成を Table 3-1 および 3-2 に示した。対照区及び試験区に用いた飼料はとうもろこしや小麦が主体で，日本飼養標準・豚（2013 年版）を満たすように設計された飼料を使用した。また試験区に用いた FPEB の成分を Table 3-3 に示した。供試した FPEB は，TDN 含量が 89.6%，DE が 3.95 Mcal/kg とエネルギー含量が高い試料だった。

試験区分として，通常の水を飲水させた対照区と，FPEB を 10% に希釈して飲水させた試験区の 2 区を設定した。試験期間は試験区及び対照区で 46 および 47 日間だった。

Table 3-1 Chemical composition of mixed feed

Component	Composition
Dry matter (%)	86.9
TDN ¹ (%DM)	83.5
Crude protein (%DM)	14.2
Starch (%DM)	40.9
Crude fat (%DM)	3.2
Crude ash (%DM)	4.2
Ca (%DM)	0.84
OCC ² (%DM)	83.1
DE (Mcal/kg)	3.68

¹TDN : Total digestible nutrients

²OCC : Organic cell contents

Table 3-2 Material composition and ratio of mixed feed.

Items	ratio (%)	Ingredients
Grains	84	corn, wheat, milo, brown rice, polished rice, barley, flour
Grainy residue from the lees of vegetable oil	13	rapeseed oil cake, soybean oil cake
Otherwise	3	Molasses, calcium carbonate, calcium phosphate, salt

Table 3-3 Chemical composition of FPEB

	Composition
Dry matter (%)	48.3
TDN ¹ (%DM)	89.6
Crude protein (%DM)	0.8
Starch (%DM)	0.0
Crude fat (%DM)	2.1
Crude ash (%DM)	1.7
Ca (%DM)	0.28
DE (Mcal/kg)	3.95

¹TDN: Total digestible nutrients

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

4. 飼養管理方法

試験豚舎は開放式豚舎で、各区とも6頭をさらに3頭ずつ2群に分けて計4つの豚房で飼養した。飼料は朝夕の1日に2回給与し、水は試験処理した水を水槽に入れて自由飲水できるようにした。

5. 調査項目

5.1. 肥育成績

肥育成績は、体重を2週間毎、飼料摂取量および飲水量を毎日調査し、1日平均増体量 (Average daily gain, ADG), 1日平均飼料摂取量 (Average daily feed intake, ADFI), FPEB 摂取量および飼料要求量を算出した。枝肉の評価は、と畜解体後、公益社団法人日本食肉格付協会に依頼して格付成績を得た。

5.2. 肉質分析

肉質分析は水分含量，粗脂肪含量，肉色並びに脂肪色（L*， a*， b*値），加熱損失率，剪断値，筋肉中・皮下並びに筋間脂肪における脂肪酸組成，筋肉と各脂肪中におけるインドールとスカトール濃度について実施した。分析には屠畜解体後 4℃で 14 日間熟成させた後に，胸最長筋と第 9 胸椎ロースの皮下脂肪および筋間脂肪を用いた。胸最長筋は体軸に垂直となる方向で，第 5 胸椎部から第 9 胸椎部にかけて前から順に 4.0， 2.5， 2.5 cm 厚で切り出した。4.0 cm 厚の 1 枚は挽肉にして水分含量，粗脂肪含量分析用の試料として用いた。2.5 cm 厚の 2 枚は肉色並びに脂肪色を測定後，加熱損失率，剪断値測定用の試料とした。脂肪酸組成の分析には胸最長筋周辺の皮下並びに筋間脂肪を用いた。測定方法を以下に示した。

5.2.1. 水分含量

- (1)アルミ秤量缶にアルミ箔を敷き，その上に海砂 5 g とガラス棒を入れた。
- (2)アルミ秤量缶を低温乾燥機(DRM620DA, アドバンテック東洋株式会社，東京，日本)に入れ，100℃で 3 時間乾燥させた。
- (3)乾燥させたアルミ秤量缶をデシケータ内で 30 分間放冷後，アルミ秤量缶+海砂+ガラス棒の恒量を求めた(A)。
- (4)恒量を求めたアルミ秤量缶に挽肉サンプルを約 5 g とり精秤した(B)。
- (5)80℃のホットプレート上でガラス棒を用いてサンプルを攪拌させつつ大部分の水分を蒸発させた。
- (6)定温乾燥機に入れ 100℃で 3 時間乾燥させた。
- (7)乾燥後，デシケータ内で 30 分間放冷した。
- (8)乾燥後の恒量(C)を測定し水分含量を以下の式で求めた。

$$\text{水分含量 (\%)} = \frac{(A+B-C)}{B} \times 100$$

A：秤量缶恒量， B：サンプル重量， C：乾燥後恒量

5.2.2. 粗脂肪含量

- (1) 定量ビンを定温乾燥機に入れて 100℃で 3 時間乾燥させた。
- (2) 乾燥させた定量ビンをデシケータ内で 30 分間放冷後，定量ビンの恒量を求めた (A)。
- (3) 水分含量測定後のサンプルを海砂ごと円筒濾紙に詰めた。アルミ箔にこびりついたものについては，アルミ箔をハサミで 8 等分にした後，アルミ箔ごと濾紙に詰めた。秤量缶，ガラス棒やハサミについたものは脱脂綿で拭き取り，その脱脂綿を円筒濾紙の栓とした。
- (4) ジエチルエーテルは定量ビンの 7 分目ぐらいまで入れ，ソレックスレー抽出機 (直熱式脂肪抽出装置 SF-8, 三紳工業株式会社, 横浜, 日本) を用いて 16 時間抽出した。
- (5) 16 時間抽出後，ジエチルエーテルを回収して定量ビン中に残ったジエチルエーテルを蒸発させた。
- (6) ジエチルエーテルを蒸発させた後に定量ビンを定温乾燥機に入れ，100℃で 3 時間乾燥させた。
- (7) 乾燥後定量ビンをデシケータ内で 30 分間放冷させた。
- (8) 30 分間の放冷後，定量ビンの恒量を行った。粗脂肪含量は，以下の式に従い算出した。

$$\text{粗脂肪含量 (\%)} = \frac{C-A}{B} \times 100$$

A : 定量ビン恒量, B : サンプル重量 (水分含量測定前),

C : 乾燥後重量

5.2.3. 肉色

- (1) 2.5 cm 厚に切断された胸最長筋 2 枚からそれぞれロース芯をくり抜き，4℃の冷蔵庫中で 1 時間空気に晒してブルーミングを行った。
- (2) 空気に晒したロース芯をビニールの袋に密着するように入れた後，空気に晒した面の色を測定した。
- (3) 分光測色計 (CM-1000, コニカミノルタジャパン株式会社, 東京, 日本) で 1 つのサンプルにつき 5 回測定し，その平均値を肉色とした。

5.2.4. 脂肪色

- (1)脂肪色を測定する直前にラップをかけ、ロース部の皮下脂肪で測定した。
- (2)分光測色計 (CM-1000, コニカミノルタジャパン株式会社, 東京, 日本) で1つのサンプルにつき5回測定し, その平均値を肉色とした。

5.2.5. 加熱損失率

- (1)胸最長筋のサンプルを1頭から2.5 cm厚で2つ採取し, 付着していた水分を拭き取り重量を測定した(A)。
- (2)その後, ビニール袋に入れて空気を抜きながら70℃のウオーターバスで1時間加熱した。
- (3)生じた滲出液を捨て, 肉に付着した水分を拭き取り重量を測定した(B)。ここで用いたサンプルは, 剪断値の測定にも用いた。

$$\text{加熱損失率 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

5.2.6. pH

- (1)挽肉5 gを精秤し, 100 mLのビーカーに入れた後に蒸留水45 mLを注入した。
- (2)ホモジナイザー (ヒスコトロン, 株日音医理科器械製作所, 船橋, 日本) で1分間ホモジナイズした。
- (3)アドバンテックNo.1濾紙で濾過して脂肪を除去した。
- (4)pHメーターを用いて測定した。

5.2.7. 剪断値 (Warner-Bratzler Shear Force, WBSF)

- (1)加熱損失率の測定に用いたサンプル2つを4℃の冷蔵庫で一晩保管した。
- (2)0.5インチのコアラで筋線維束に沿って平行にコアを抜いた。

- (3) 抜いたコアを Warner-Bratzler Shear Force Value 測定器(model#235, G-R Manufacturing Co. Manhattan, KANSAS) を用いて剪断値を測定した。
- (4) 1つのサンプルから約6個のコアを抜き出し、各コアについて2~3回測定した。本実験では2つのサンプルについて、それぞれ12回の測定値から最小と最大値を除いた10個の値の平均を算出し、その平均値を剪断値とした。

5.2.8. 脂肪酸組成

5.2.8.1. 筋肉内脂肪の脂肪酸組成

- (1) 挽肉サンプル約1gを精秤し、ネジ付き試験管に入れた。
- (2) クロロホルム・メタノール混液4mLを入れ、テフロンライナー付キャップで栓をした。
- (3) 時々混和しながら24時間以上かけて脂質を抽出した。
- (4) 挽肉サンプルの層を除去し、クロロホルム層を窒素気流下で乾固させた。
- (5) 5%塩酸を含むメタノール4mLを加えた後、アルミヒートブロックを用いて100℃で3時間メチルエステル化反応を行った。
- (6) 冷却後、ヘキサン4mLを加え、1分間混和した。
- (7) 上層のヘキサンをガスクロマトグラフ自動分析ビンに移し、ガスクロマトグラフィー(GC-2010, 島津製作所株式会社, 京都, 日本)で分析した。カラムはULBON HR-SS-10(30m×0.32mm id, 信和化工株式会社, 京都, 日本)を用いた。分析条件はインジェクター温度250℃, 検出器(FID)温度250℃, 初期温度150℃および昇温最終温度220℃とした。キャリアガスはヘリウムを用いた。各脂肪酸の定量は、ガスクロマトグラフィー用脂肪酸メチルエステル標準品混合物(GLC85, NUCHEKPREP, Inc, USA)の保持時間を基準とした。本実験ではミリスチン酸(C14:0), パルミチン酸(C16:0), パルミトレイン酸(C16:1), ステアリン酸(C18:0), オレイン酸(C18:1)およびリノール酸(C18:2)

を定量した。またミリストレイン酸，パルミトレイン酸，オレイン酸，リノール酸およびリノレン酸の合計を総不飽和脂肪酸として算出した。

5.2.8.2. 皮下脂肪および筋間脂肪の脂肪酸組成

- (1) 試料（皮下脂肪および筋間脂肪）約 20 mg をネジ付き試験管に入れ，5%塩酸を含むメタノール 4 mL を注入し，アルミヒートブロックを用いて 100°C で 3 時間メチル化させた。
- (2) 以降は 5.2.8.1. (6)(7) と同手順で実施した。

5.3. スカトールおよびインドール含量

5.3.1. 筋肉における試料調製

- (1) 挽肉サンプル 0.4 g を 1.5 mL チューブにとり，メタノール 1 mL を加えて 2 分間ボルテックス混合を行った。
- (2) 15,000 rpm 4°C 10 分間で遠心分離（CF16RX，日立工機株式会社，東京，日本）した。
- (3) 上清をチューブにとり -20°C で 60 分間凍結させた。
- (4) 凍結させたサンプルを 12,300 rpm，5 分間で遠心分離した。
- (5) 上清をチューブに採取し，これを試料とした。

5.3.2. 皮下脂肪並びに筋間脂肪における試料調製

- (1) 皮下脂肪並びに筋間脂肪サンプル約 1 g を試験管に採取した。
- (2) 通風乾燥機に入れ 100°C，60 分で脂肪を融解させた。
- (3) 融解した脂肪サンプルを 1.5 mL チューブに移し，15,000 rpm，室温，1 分間で遠心分離した。
- (4) 上清をチューブに移した後，150 μ L の脂肪サンプルと 750 μ L のメタノールを混合した。
- (5) 混合後のサンプルを超音波バスで 32°C，10 分間処理した。
- (6) -20°C で 15 分間冷凍後，15,000 rpm，4°C，5 分間で遠心分離した。
- (7) 上清をチューブに採取し，これを試料とした。

5.3.3. スカトール含量の測定

- (1) スカトール 2 mg を少量の 99% エタノールで溶解し、0.1M Tris-HCl バッファー (pH7.5) 20 mL に溶解させて標準液を調製した。
- (2) 調製した標準液を 0, 0.195, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように 0.1M Tris-HCl バッファー (pH7.5) で 2 倍段階希釈した。
- (3) 試料 380 μL に 0.1M Tris-HCl バッファー (pH7.5) を 20 μL 加えた。
- (4) 試料と標準液 400 μL に発色液 400 μL を加えてボルテックス混合し、室温で 20 分間静置した。
- (5) 3,000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心分離後に上清を採取し、吸光光度計で 580 nm の吸光度を測定した。

5.3.4. インドール含量の測定

- (1) インドール 2 mg を少量の 99% エタノールで溶解させ、0.1M リン酸バッファー (pH5.5) 20 mL に溶解させて標準液を調製した。
- (2) 調製した標準液を 0, 0.195, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように 0.1 M リン酸バッファー (pH5.5) で 2 倍段階希釈した。
- (3) 試料と標準液 200 μL に発色液 1 mL を加えてボルテックス混合し、室温で 20 分間静置した。
- (4) 3,000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心分離後に上清を採取し、吸光光度計で 568 nm の吸光度を測定した。

6. 食味官能検査

食味官能検査は対照区および試験区のバラ部とロース部を用い、焼肉により、風味、柔らかさ、多汁性、うま味および総合評価の各項目について 1～7 の 7 段階評価（1：評価が低い，4：中間の評価，7：評価が高い）による評点法で実施した。試験者にはバラ部 166 名，ロース部 188 名の協力を得た。

7. 経済的評価

本実験期間の飼料コストについて、配合飼料：68 円/kg，FPEB：210 円/L として算出した。豚枝肉価格は、出荷日における下記の東京豚枝肉加重平均価格（日本食肉市場卸売協会，2016）を参照した。

試験区：上 502 円/kg，中 470 円/kg，並 443 円/kg

対照区：上 494 円/kg，中 467 円/kg，並 437 円/kg

8. 統計解析

得られたデータは SAS 9.3（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）の GLM プロシジャを用いて飼料を要因とした一元配置による分散分析を行った。 $p < 0.05$ の場合は差があると判定し，Tukey の多重比較検定を行った。

第3節 結果

1. 肥育成績

肥育成績を Table 3-4 に示した。1日平均飼料摂取量（ADFI）は試験区で有意に低かった。また飲水摂取量は試験区で有意に多かった。1日平均増体重（ADG）に有意差は見られなかったが、飼料要求率（FCR）は試験区で低い傾向を示した。なお試験区において、飲水量から算出した FPEB 摂取量は 0.89 L/日/頭だった。この値をもとに算出した各群の日乾物摂取量，日 TDN 摂取量，日粗脂肪摂取量および日粗蛋白質摂取量を Table 3-4 に示した。

2. 枝肉成績

枝肉成績を Table 3-5 に示した。枝肉歩留は試験区で有意に低かった。と畜時体重，枝肉重量，背脂肪厚および格付成績に有意差は見られなかった。

3. 肉質成績

肉質成績を Table 3-6 に示した。pH は試験区で有意に低かった。水分含量では有意差は見られなかったが，試験区で低い傾向を示した。粗脂肪含量，加熱損失，剪断値，肉色および脂肪色については，いずれも有意な差は見られなかった。

4. 脂肪酸組成

4.1. 筋肉内脂肪の脂肪酸組成

筋肉内脂肪の脂肪酸組成を Table 3-7 に示した。オレイン酸（C18:1）は試験区で有意に多かった。その他のミリスチン酸（C14:0），パルミチン酸（C16:0），パルミトレイン酸（C16:1），ステアリン酸（C18:0），リノール酸（C18:2）および総不飽和脂肪酸（Total unsaturated fatty acid: TUFA）に有意差は見られなかった。

4.2. 皮下脂肪の脂肪酸組成

皮下脂肪の脂肪酸組成を Table 3-8 に示した。オレイン酸は試験区で多い傾向を示した。またリノール酸は試験区で少ない傾向を示した。その他のミリスチン酸，パルミチン酸，パルミトレイン酸，ステアリン酸および総不飽和脂肪酸に有意差は見られなかった。

4.3. 筋間脂肪の脂肪酸組成

筋間脂肪の脂肪酸組成を Table 3-9 に示した。オレイン酸は試験区で有意に高く，リノール酸は試験区で有意に低かった。またパルミトレイン酸は試験区で高い傾向を示した。その他のミリスチン酸，ミリストレイン酸，パルミチン酸，ステアリン酸，リノレン酸および総不飽和脂肪酸に有意差は見られなかった。

5. スカトールおよびインドール含量

5.1. スカトール含量

胸最長筋，皮下脂肪および筋間脂肪のスカトール含量を Table 3-10 に示した。皮下脂肪においては，試験区が有意に低かった。胸最長筋と筋間脂肪に有意差は見られなかった。

5.2. インドール含量

胸最長筋，皮下脂肪および筋間脂肪のスカトール含量を Table 3-11 に示した。皮下脂肪においては，試験区が有意に低かった。筋間脂肪に有意差は見られなかった。なお胸最長筋は検出限界以下であった。

6. 食味官能検査成績

6.1. バラ肉

バラ肉の評価結果を Table 3-12 に示した。柔らかさは試験区が有意に低かった。また多汁性も試験区で有意に低かった。風味と総合評価に有意差は見られなかった。

6.2. ロース肉

ロース肉の評価結果を Table 3-13 に示した。柔らかさ，風味，多汁性および総合評価とも，試験区が有意に低かった。

7. 経済的評価

各区の枝肉価格と試験期間の飼料費，FPEB 費および合計費を Table 3-14 に示した。枝肉価格は試験区が対照区よりも低かった。飼料費は配合飼料を 68 円/kg，FPEB を 210 円/L として算出した。飼料費は試験区で少なかったが，試験期間に給与した飼料と FPEB の総費用は，試験区が約 1.6 倍多くなった。

Table 3-4 Effects of control diet and fermented beverage of plant extract by-product (FPEB) diet on growth performance in growing-finishing pigs.

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
First body weight (kg)	77.4	75.1	0.65	–
Final body weight (kg)	126.67	128.25	1.72	0.70
ADG (kg/head/day)	1.11	1.17	0.04	0.72
ADFI (kg/head/day)	3.23 ^a	3.05 ^b	0.04	0.02
Water intake (L/head/day)	6.46 ^a	8.97 ^b	0.17	0.00
FPEB intake (L/head/day)	–	0.89	–	–
Feed conversion ratio ²	3.12	2.66	0.12	0.07
Dry matter intake (kg/head/day)	3.23	3.53	–	–
TDN intake (kg/head/day)	2.70	3.44	–	–
Crude fat intake (kg/head/day)	0.09	0.09	–	–
Crude Protein intake (kg/head/day)	0.40	0.38	–	–

¹Standard error of the mean

²DM basis

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3-5 Effects of control diet and fermented beverage of plant extract by-product (FPEB) diet on dressed carcass in growing-finishing pigs.

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Final body weight (kg)	126.67	128.25	1.72	0.70
Dressed carcass weight (kg)	82.42	80.75	1.11	0.50
Dressing percentage (%)	65.06 ^a	62.98 ^b	0.41	<0.01
Thickness of backfat (cm)	2.30	2.70	0.13	0.15
Grading of carcass	2.00	1.50	0.24	0.34

¹Standard error of the mean

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Grading of carcass was calculated as awesome=4, excellent=3, great=2, good=1 and not good=0.

Table 3-6 Effects of control diet and fermented beverage of plant extract by-product (FPEB) diet on pork quality in growing-finishing pigs.

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Moisture (%)	71.93	71.02	0.24	0.07
Crude fat (%)	4.03	4.38	0.24	0.50
Cooking loss (%)	24.66	23.32	0.49	0.20
pH	5.57 ^a	5.47 ^b	0.02	0.03
WBSF (kg/cm ²)	2.02	1.76	0.12	0.30
Meat color ²				
Lightness (L*)	47.34	46.81	0.51	0.64
Redness (a*)	7.56	6.89	0.43	0.49
Yellowness (b*)	5.58	5.30	0.19	0.52
Fat color ³				
Lightness (L*)	73.09	72.76	0.84	0.86
Redness (a*)	3.91	3.28	0.26	0.26
Yellowness (b*)	4.87	4.90	0.15	0.95

¹Standard error of the mean

²Meat color show the color parameters in longissimus thoracis muscle.

³Fat color show the color parameters in subcutaneous backfat.

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3-7 Fatty acid composition in intramuscular fat (%)

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
C14:0	1.64	1.62	0.19	0.76
C14:1	0.03	0.03	0.00	0.95
C16:0	25.37	26.03	0.46	0.52
C16:1	4.14	4.20	0.08	0.76
C18:0	10.03	9.70	0.13	0.26
C18:1	49.84 ^a	51.00 ^b	0.28	0.04
C18:2	7.71	6.94	0.23	0.11
TUFA ²	61.72	62.17	0.47	0.78

¹Standard error of the mean

²TUFA indicates the sum of C14:1, C16:1, C18:1 and C18:2.

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 3-8 Fatty acid composition in subcutaneous backfat (%)

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
C14:0	1.28	1.21	0.06	0.58
C16:0	25.31	25.27	0.30	0.95
C16:1	2.22	2.34	0.08	0.52
C18:0	12.11	12.07	0.26	0.94
C18:1	46.24	47.76	0.41	0.07
C18:2	12.84	11.37	0.40	0.08
TUFA ²	61.30	61.47	0.48	0.88

¹Standard error of the mean

²TUFA indicates the sum of C16:1, C18:1 and C18:2.

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 3-9 Fatty acid composition in intermuscular fat (%)

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
C14:0	1.41	1.51	0.04	0.19
C16:0	25.70	25.75	0.25	0.93
C16:1	2.65	3.10	0.12	0.08
C18:0	11.40	10.96	0.31	0.52
C18:1	46.42 ^a	48.93 ^b	0.55	0.04
C18:2	12.21 ^a	9.75 ^b	0.47	<0.01
TUFA ²	61.28	61.78	0.33	0.71

¹Standard error of the mean

²TUFA indicates the sum of C16:1, C18:1 and C18:2.

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 3-10 Effect of control diet and fermented beverage of plant extract by-product (FPEB) diet on skatole concentrations in longissimus dorsi muscle, subcutaneous backfat and intermuscular fat ($\mu\text{g/g}$).

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Longissimus dorsi muscle	0.005	0.005	0.00	0.21
Subcutaneous backfat	0.166 ^a	0.118 ^b	0.01	<0.01
Intermuscular fat	0.137	0.123	0.00	0.52

¹Standard error of the mean ^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3-11 Effects of control diet and fermented beverage of plant extract by-product (FPEB) diet on indole concentrations in longissimus dorsi muscle, subcutaneous backfat and intermuscular fat ($\mu\text{g/g}$).

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Longissimus dorsi muscle	ND	ND	-	-
Subcutaneous backfat	0.020 ^a	0.018 ^b	0.01	0.03
Intermuscular fat	0.020	0.020	0.00	0.91

ND : Not Detected. ¹Standard error of the mean

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3-12 Sensory evaluation of back ribs

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Tenderness	5.71 ^a	5.18 ^b	0.06	<.0001
Flavor and taste	5.14	5.12	0.05	0.77
Juiciness	5.67 ^a	5.36 ^b	0.05	0.02
Total score	5.49	5.28	0.05	0.11

¹Standard error of the mean

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 3-13 Sensory evaluation of pork loin.

Items	Control	FPEB	SEM ¹	<i>P</i> value
Tenderness	5.25 ^a	4.52 ^b	0.06	<.0001
Flavor and taste	5.14 ^a	4.88 ^b	0.06	0.02
Juiciness	5.26 ^a	4.69 ^b	0.06	<.0001
Total score	5.41 ^a	4.86 ^b	0.05	<.0001

¹Standard error of the mean

^{a, b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

Table 3-14 Price of carcass, feed costs, FPEB cost and total costs.

Items	Price of carcass (¥/head)	Feed costs (¥/head)	FPEB costs (¥/head)	Total costs (¥/head)
Control	38,263	11,863	0	11,863
FPEB	36,832	9,433	8,666	18,100

Calculated as mixed feed: 68 ¥/kg, FPEB : 210 円/L.

FPEB: Fermented beverage of plant extract by-product

第4節 考察

本章では、植物エキス発酵液 製造副産物 (FPEB) おける肥育豚の産肉性に及ぼす影響を検討した。

給与飼料および FPEB の成分割合から算出した試験期間の日乾物摂取量と日 TDN 摂取量は、試験区が対照区に比べ、それぞれ 0.32 kg および 0.74 kg 多かった。また FPEB は給与飼料に比べて粗蛋白質と粗脂肪含量が少ないが、試験期間の両区の粗蛋白質および粗脂肪の日乾物摂取量の差は、ほとんど認められなかった。

肥育成績では、1 日平均増体重 (ADG) に有意差は見られなかったが、1 日平均飼料摂取量 (ADFI) は試験区で有意な低値を示した。これは飲料水に 10% 混合して給与した FPEB は、ブドウ糖や果糖等の糖質を多く含むため嗜好性が高く、それを自由飲水させたために日飲水量が対照群 6.46 L に対し、試験群 8.97 L と約 40% 増えたことで、水を含めた摂取飼料の総容量が大きくなり、胃を膨張させ、それが迷走神経を介して満腹中枢を刺激した可能性が考えられる⁸⁸⁾。また日飲水量から算出した FPEB の日摂取量は 0.89 L/頭で、TDN は 89.6% と高く、しかも主成分はブドウ糖や果糖などの糖質であることから、豚の体内でエネルギー過剰気味となり食欲抑制中枢が刺激されて摂餌量が抑制された可能性も考えられた。飼料要求率 (FCR) に有意差は見られなかったものの、試験区で低い傾向を示した。また 1 日平均増体重 (ADG) に有意差が見られなかったことから、FPEB には肥育豚の肥育成績に影響を及ぼさずに飼料要求率を低下させる可能性が示唆された。

枝肉成績では、枝肉歩留が試験区で有意に低かった。これは有意な差ではなかったが、対照区に比べ、と畜時体重 (生体重) が多く枝肉重量が少なかったことに起因している。設楽ら⁸⁹⁾によると、飼料中の粗蛋白質含量を下げると飼料要求率が低下することや、背脂肪の厚脂肪化など、脂肪蓄積の割合が高くなることが報告されている。また枝肉格付も、飼料中の粗蛋白質含量を下げると低下することが示されている⁸⁹⁾。本研究では、FPEB 給与により ADFI で有意差は見られたものの、両区の日蛋白質摂取量と日粗

脂肪摂取量は同等であった。また試験区で多かった日 TDN 摂取量 0.74 kg は、FPEB の主成分であるブドウ糖や果糖であることから、試験区は対照区に比べると、余剰なエネルギーが脂肪蓄積にまわりやすい飼養条件と考えられるが、背脂肪厚に有意な差は認めらず、格付成績も同等であった。

肉質成績は、試験区において pH が有意に低く、水分含量が低い傾向を示した以外は、加熱損失、剪断値、肉色および脂肪色に有意な差は見られなかった。屠殺後の肉の pH 低下は、筋肉内に貯蔵されたグリコーゲンが嫌気的条件下で解糖により生成される乳酸によって惹起される⁹⁰⁾。しかし多くの場合、死後筋肉の最低値を示す極限 pH は 5.4 付近とされており、グリコーゲンが残存する場合にも 5.4 付近で留まると報告されている⁹⁰⁾。本研究では、試験区において有意な低値を示したが、両区とも極限 pH 値付近の変動であり、剪断値、肉色および脂肪色に有意差は見られなかったことから、肉質に影響を及ぼす変動ではないと考えられた。

脂肪酸組成は、筋肉内、皮下および筋間脂肪の全測定部位において、オレイン酸含量 (C18:1) が試験区で有意に多いか、あるいは多い傾向を示した。またリノール酸含量 (C18:2) は試験区で有意に少ないか、あるいは少ない傾向を示した。豚肉中の脂肪質は、給与飼料の脂肪量や脂肪酸組成に影響を受けることが知られている⁹¹⁾。まず給与飼料中の脂肪量について、試験区および対照区の日粗脂肪摂取量は、ともに 0.09 kg/日/頭と同量であったことから、摂取した脂肪量の影響はないと考えられた。次に脂肪酸組成について、給与飼料はトウモロコシ主体であり、トウモロコシの脂肪酸組成はリノール酸割合が高く、パルミチン酸・オレイン酸割合が低いことが知られている⁹²⁾。一方、FPEB は植物を原料にしているため、FPEB に含まれる粗脂肪は植物性脂肪であり、分析は実施していないが、リノール酸が主体と考えられる。したがって、試験区と対照区で摂取した脂肪酸組成もほぼ同等と推測されることから、本実験で示されたオレイン酸やリノール酸の変動要因を、両区が摂取した脂肪量や脂肪酸組成から解明することはできなかった。また、腸内で生成された短鎖脂肪酸は、吸収されて宿主のエネルギー源として利用されるのみならず、水やミネラルの吸収促進、脂質代謝改善、消化管ホルモンの分泌など様々な作用をもたらすことが明

らかになっている⁸³⁾。第3章のラット *in vivo* 試験では、FPEB 透析物摂取により、アテローム性動脈硬化指数 (Atherogenic index:AI) が低下し、何らかの脂質代謝改善作用が示されている。しかしながら、これらと今回のオレイン酸やリノール酸との関連性についても明らかにすることはできなかった。

一方、*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a は、不飽和結合への水和反応とそれに引き続く脱水を伴う二重結合の転移反応を誘発することにより、リノール酸を共役型リノール酸へと変換させるが^{93,94)}、岸野らの研究によると、この共役異性化酵素系に関わるタンパク質の共存下において、リノール酸がオレイン酸ならびに *trans*-10-18:1 へと飽和化されることが見い出されている⁹⁵⁾。FPEB やその製造工程において、*Lactobacillus plantarum* を分析していないが、FPEB は原料植物や製造環境に由来する酵母、乳酸菌等による自然発酵を利用して製造されているため、*Lactobacillus plantarum* が関与している可能性は高い。乳酸菌の新たなプロバイオティクスとして、不飽和脂肪酸飽和化代謝が解明されている⁹⁵⁾ ことから、FPEB と *Lactobacillus plantarum* との関連性については、今後明らかにする必要があると思われる。

スカトールおよびインドール含量は、皮下脂肪において試験区で有意な低値を示した。スカトールやインドールは、消化管で生産される雄臭の原因物質の一つである。また雌雄および去勢豚の性別に関係なく、飼料や内因性のタンパク質由来のアミノ酸の一種であるトリプトファンが、微生物により大腸で分解される過程で生成される⁹⁶⁾。Doran らによると、腸内で微生物によって産生されたスカトールは、腸管から吸収され肝臓で代謝されるが、一部は脂肪組織に蓄積されることが示されている⁹⁷⁾。また Wesoly や Weiler⁹⁸⁾によると、スカトールの脂肪への蓄積量は飼料や飼育環境などの影響を受け、イヌリンやキクイモ、生ポテトデンプン、シュガービートパルプ、チョコリ根の給与は、脂肪組織や血液および糞便中のスカトール含量を低下させることが報告されている。一方、雄豚に乾燥キクイモをと殺前1週間給与すると、後腸内や脂肪組織中のスカトール濃度の低下が見られるが、この現象には腸内細菌叢の変化による *Clostridium perfringens*

の減少や短鎖脂肪酸の増加に伴う pH 低下との関連性が示唆されている³¹⁾。さらに育成豚にインスリンを 3% 添加した飼料を 3~6 週間給与すると、腸内細菌叢が変化し、後腸の短鎖脂肪酸濃度が増加したことが報告されている⁹⁹⁾。第 3 章で実施した FPEB 透析物による *in vivo* 試験では、FPEB 透析物はラット盲腸内で *Bifidobacterium* や一般嫌気性菌数を増やし、酢酸・プロピオン酸および *n*-酪酸等の短鎖脂肪酸の生成を促進させることや、ムチンおよび IgA 生成量を増やすなど、腸内環境の改善や腸管粘膜バリア機能を向上させるプレバイオティクス効果が認められた。そして FPEB のプレバイオティクス効果は、インスリン同等と評価された。本章では、糞便中の細菌叢分析や短鎖脂肪酸濃度の測定を実施していないため、スカトールやインドール濃度の有意な低下が、どのような機序で誘導されたのか究明できなかった。しかしながら、これら悪臭成分の低減に、第 2 および 3 章で見出された FPEB のプレバイオティクス作用との関連性が示唆された。このことより、FPEB は豚でもプレバイオティクスとして作用し、第 3 章で見られたラット盲腸内所見と同様に、*Bifidobacterium* や一般嫌気性菌を活性化して短鎖脂肪酸の生成量を増加させる可能性が考えられた。さらに腸管免疫関連物質のムチンや IgA の生成促進を誘導することで、腸管粘膜バリア機能を向上させる可能性が示された。また糞便中の悪臭成分低減による畜舎の環境衛生改善効果も示唆された。

食味官能検査ではロース肉において、対照区は試験区よりも柔らかく、ジューシーで、うま味が強く、総合しておいしいと評価された。またバラ肉においては、対照区は試験区よりも柔らかく、ジューシーだが、うま味は変わらず総合評価はほぼ同等と評価された。これまで、筋肉内脂肪含量が増加すると、食味官能検査における柔らかさ、風味、多汁性等の肉の食味が向上するといわれている¹⁰⁰⁾。本研究において、胸最長筋の粗脂肪含量に有意な差は見られなかったが、柔らかさや多汁性において好ましい効果を及ぼさなかった。風味についてはパルミチン酸、パルミトレイル酸およびオレイン酸と正の相関があり、ステアリン酸やリノール酸と負の相関があることが示されている¹⁰¹⁾。本研究では、試験区においてオレイン酸組成が高く、リノール酸組成が低かったにもかかわらず、好ましい効果を及ぼ

さなかった。豚肉のおいしさの総合評価に影響を及ぼす化学的成分には、本研究で分析した脂肪酸組成の他にイノシン酸やグアニル酸等の遊離アミノ酸も深く関わっていることが知られている¹⁰²⁾。ロース肉では風味に有意な差が見られているので、今後は遊離アミノ酸の分析も必要かもしれない。また食味試験において、肉の焼き具合や提供時の温度の均一性に問題が生じていた可能性もあり、今後の検討課題になると考えられた。

経済的評価については、本試験条件による FPEB 給与では、格付成績に好ましい効果が見られなかったことや、FPEB 単価を 210 円/L に設定した場合、摂餌量の抑制効果から推定される飼料削減費よりも FPEB の費用が上回るため、生産現場で利用するには、FPEB 単価の適正化が必要と思われる。第 2 章の目的で記述した先行予備試験では、離乳直後から出荷までの約 120～130 日間、約 100 mL/頭/日の給与で発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成に対して、ほぼ同等の効果が示されている¹⁰³⁾。この給与方法から算出した肥育豚 1 頭当たりの FPEB 生涯経費は 2,520 円で、本試験 8,666 円の約 7 割減と試算される。この飼養方法で豚に対するプレバイオティクス効果が明らかとなり、感染症予防効果が実証されれば、抗生物質等による治療費抑制効果に加え、より健全な飼養管理や食肉生産が可能になり、FPEB の費用対効果は高くなると考えられた。

結論として、FPEB は、肥育豚の増体成績に悪影響を及ぼすことなく、豚肉の旨み成分の一つであるオレイン酸を増加させる効果が示されたが、その機序は不明であった。また皮下脂肪において、肉の臭みの原因となるスカトールやインドール含量を低下させる効果が認められ、この現象に FPEB のプレバイオティクス効果との関連性が示唆された。

第5章 総合考察

植物エキス発酵液 (FPE) は、数十種類の植物原料からショ糖の浸透圧を利用してエキスを抽出し、それを製造工程の環境中に定着している酵母 (*Zygosaccharomyces* spp., *Pichia* spp.) や乳酸菌 (*Leuconostoc* spp.) 等によって 37°C で 180 日間以上発酵熟成させて製造した褐色、粘稠性の健康飲料である。FPE の機能性として、抗酸化物質 (コーヒー酸やクロロゲン酸等) によるアルコール性胃粘膜障害の抑制効果等を報告している。近年では、新規を含む十数種類のオリゴ糖が見出され、そのうち数種類の構造が決定されており、プレバイオティクスとして腸内環境の改善が期待されている。

一方、その製造工程で生じる沈殿物等の副産物 (FPEB) にも、FPE 同様に原料植物由来のポリフェノールやペクチン等の難消化性多糖類、前述の新規を含むオリゴ糖、そして長期間の発酵熟成中に蓄積する菌体由来の難消化性多糖類を含むことが示唆されている。FPEB は、プレバイオティクス効果を有する健康飼料 (補助飼料) として期待されているが、その機能性はまだ十分に検討されていない。

そこで本研究では、FPEB に含まれる難消化性多糖類に注目し、FPEB のプレバイオティクス効果を明らかにする目的で、豚の糞中微生物の混合培養による *in vitro* 試験およびラットの 28 日間投与による *in vivo* 試験を実施した。さらに FPEB の飼料価値を評価する目的で、FPEB を肥育豚に給与し、発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成および悪臭化合物のインドールやスカトール含量に対する影響を検討した。

第2章では、まず FPEB の大腸発酵性を明らかにした。FPEB を分画分子量 3,500 で限外濾過・分離した FPEB 透析物について、豚の糞中微生物との混合により 48 時間培養した結果、一般嫌気性菌、*Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の増加がみられ、腸内発酵、とくに有用菌の発酵に適していることが確認された。また生体内で有効利用が報告されている短鎖脂肪酸量が増加しており、さらに pH の変動とも一致していた。このことから、FPEB 透析物は生体内でも腸内環境を改善する可能性が見出された。さ

らに、有害物質のアンモニア産生が有意に低下していることから、有害菌であるアンモニア生成菌等の生育が抑制されている可能性も示された。

第3章では、FPEBに含まれている難消化性多糖類に注目し、ラットの盲腸における発酵性を明らかにするとともに、腸管免疫関連物質に及ぼす影響についても検討した。FPEBを分画分子量10,000で限外濾過・分離したFPEB透析物を5%添加した試験食を調製し、ラットに28日間投与した。その結果、ラット盲腸内の *Bifidobacterium*、一般嫌気性菌数および短鎖脂肪酸濃度が増加して盲腸内pHを低下させたことから、FPEB透析物にラットの腸内環境を改善する効果が認められた。また腸管免疫関連物質であるムチンやIgA濃度も増加したことから、腸管粘膜バリア機能を向上させる作用も示された。盲腸内における有用菌や短鎖脂肪酸濃度の増加およびpHの低下は、第2章の *in vitro* 試験結果と一致していることから、FPEB透析物はプレバイオティクスとして作用し、その程度はインスリン同等であることが判明した。またFPEB透析物には、盲腸内でプロピオン酸の生成を促す特異性が示された。

第4章では、FPEBの飼料価値を評価する目的で、FPEBを給与した肥育豚の発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成および悪臭化合物であるインドール・スカトール含量への影響を明らかにした。その結果、FPEBは肥育豚の増体成績に悪影響を及ぼすことなく、豚肉の旨み成分の一つであるオレイン酸を増加させる効果が示された。また皮下脂肪においては、肉の臭みの原因となるスカトールやインドール含量を低下させる効果が認められた。これら悪臭成分の低減に、FPEBのプレバイオティクス作用との関連性が示唆された。このことより、FPEBは豚においてもプレバイオティクスとして作用し、第3章で見られたラット盲腸内所見と同様に、*Bifidobacterium*等の有用菌を活性化して短鎖脂肪酸の生成を促す可能性が考えられた。それによって、腸管免疫関連物質であるムチンやIgA産生を誘導し、腸管粘膜バリア機能を向上させる可能性も示された。

以上の結果より、FPEBの飼料価値は、本研究で見出せたプレバイオティクスによる感染症予防効果が最も高いと評価した。ただし、今後の課題として、豚に対するプレバイオティクス効果を明確に示す必要がある。第3

章のラット *in vivo* 試験で実施した盲腸内細菌叢や短鎖脂肪酸濃度，そして腸管免疫物質であるムチンや IgA 濃度への影響を追加検証することで明らかになるであろう。また FPEB の液単価と給与量を第 4 章の試験と同等に設定すると，生産段階での経費負担が過大で非現実的になるため，液単価と給与期間の見直しも必要になる。FPEB のプレバイオティクスによる感染症予防効果を最大限に引き出すためには，消化や免疫機能が未熟な離乳直後からの長期間給与が理想的と考える。

結論として，FPEB は，腸内環境の改善や腸管粘膜バリア機能を向上させるプレバイオティクス効果を有することから，家畜の感染症予防を目的とする機能性補助飼料としての価値が見出され，抗菌性物質の代替えとなる可能性が示唆された。

要 約

植物エキス発酵液 (Fermented beverage of plant extract:FPE) は、50 種類の野菜、果物、野草、茸および海藻等の植物からショ糖の浸透圧を利用して抽出したエキスを、乳酸菌や酵母によって 180 日以上発酵熟成させた健康飲料である。一方、FPE の製造過程で沈殿物等の製造副産物 (Fermented beverage of plant extract by-product:FPEB) が産生するが、FPEB にも難消化性多糖類を含む機能性物質の蓄積が示唆されている。

本研究では、まず FPEB の機能性を明らかにするため、FPEB の透析物を調製し、大腸発酵モデル装置を用いた 48 時間培養による *in vitro* 試験およびラットへの 28 日間投与による *in vivo* 試験を実施した。そして FPEB 透析物の腸内環境に及ぼす影響について、腸内細菌叢の変動、短鎖脂肪酸濃度、腸管免疫関連物質濃度を分析し、セルロースやイヌリンとの比較により調査した。

次に、FPEB の飼料価値を評価するため、FPEB を肥育豚に給与し、肥育豚の発育、産肉性、脂肪組織の脂肪酸組成および悪臭化合物であるインドール・スカトール含量への影響を検討した。

その結果、FPEB 透析物は盲腸内において、セルロースと比較して *Bifidobacterium* および一般嫌気性菌数の有意な増加、pH の有意な低下、酢酸・プロピオン酸・*n*-酪酸および総短鎖脂肪酸濃度の有意な増加、ムチン濃度および IgA 濃度の有意な増加を示した。これらのことから、FPEB は腸内発酵を促進させ、腸内環境および腸管粘膜バリア機能を改善することが示唆された。

また FPEB は肥育豚の増体成績に悪影響を及ぼすことなく、豚肉の旨み成分の一つであるオレイン酸を増加させる効果が示された。さらに皮下脂肪において、肉の臭みの原因となるスカトールやインドール含量を低下させる効果が認められた。

Summary

Fermented plant extract (FPE) beverages are considered to be healthy drinks which are produced from extracts of around 50 plant origins such as vegetables, fruits, wild grasses, mushrooms and seaweeds obtained from sucrose-osmotic pressure. FPE is obtained via fermentation of plant extracts by lactic acid bacteria and yeast for more than 180 days. The by-product of FPE (FPEB) beverage production, is suggested to possess a wide array of functional compounds such as indigestible polysaccharides. Initially, the present study was focused to examine the effects of FPEB on colonic fermentation under *in vitro* and *in vivo*, using a laboratory scale simulator fermentor of porcine colon for a 48 hour incubation period and using F344 rats for a period of 28 days, respectively. Secondly, we aimed to evaluate the effects of feeding pigs with FPEB, on the growth performance, meat quality, dipose tissue fatty acid composition and skatole and indole concentrations as a parameter of malodour in meat. Cellulose and inulin were used as the negative and positive controls respectively, and the effects of FPEB on intestinal flora composition, short chain fatty acid (SCFA) production and levels of intestinal immune related biomarkers were evaluated. Significant alterations in the cecum and cecal contents were reported upon FPEB supplementation in comparison to cellulose, for example, increase in *Bifidobacterium* and anaerobe counts, decrease in cecal pH, increase in acetic, propionic and butyric acids and total SCFA production, increase in immunoglobulin (IgA) and mucin production. Thus, the results of this study suggest that, FPEB accelerated intestinal fermentation, improved intestinal environment and influenced intestinal mucosal barrier function. Moreover, FPEB influenced higher oleic acid content in pork which is responsible for good flavor characteristics, without any negative effect on growth performance and caused a reduction in intra-muscular skatole and indole concentrations, which are responsible for malordour in pork.

謝 辞

本論文は、筆者が岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。帯広畜産大学生命・食料科学研究部門教授 福島道広先生には、指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。とくに福島先生には、先行予備試験結果から本論文作成に結び付ける重大な可能性を見出して戴き、筆者や筆者所属の大高酵素株式会社関係者に対し、新たな見地を示して戴いた。ここに深謝の意を表す。帯広畜産大学生命・食料科学研究部門教授 日高智先生、島田謙一郎先生並びに、岩手大学農学部応用生物化学科教授 長澤孝志先生には、副指導教官としてご助言やご指導を戴いた。とくに日高先生には、先行予備試験より長期に渡り、公私ともども手厚いご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。帯広畜産大学生命・食料科学研究部門の韓圭鎬先生をはじめ、各位には研究遂行にあたり多大なご協力を戴いた。ここに深謝の意を表す。大高酵素株式会社代表取締役社長 今井政一氏には、筆者を社会人学生として入学・在学を許可して戴いた。しかも五十路を越えた老兵に、時間という貴重な経営資源を惜しみなく投資して戴いた。ここに深謝の意を表す。大高酵素株式会社総合研究所長 岡田秀紀氏には、業務多忙な中、試験試料を調製して戴くとともに、本論文の作成に有益なご助言を戴いた。ここに同氏に対して感謝の意を表す。大高酵素株式会社総合研究所研究顧問 平田陸正先生には、筆者が堂々巡りで迷い悩んでいた時期、心に灯りをともして戴いた。ここに平田先生に対して感謝の意を表す。北海道日高郡新ひだか町三石の猪野毛哲次氏には、本研究の発端になった肥育豚の先行予備試験を、同氏養豚場において長期に渡り実施して戴いた。そして本研究で供試した FPEB の潜在力を、持ち前の鋭い観察力と洞察力で引き出して戴いた。ここに同氏に対して感謝の意を表す。同氏は帯広畜産大学の同窓生でもある。

最後に、本論文で供試した植物エキス発酵液をこの世に送り出して戴いた、大高酵素株式会社の創業者である故・大高登先生に深謝の意を表す。有難う御座いました。 感謝

参考文献

- 1) 日本経済新聞 (2018/3/31)
- 2) 田村 豊 (2015) わが国の食用動物由来耐性菌対策と耐性菌の現状, モダンメ
ディア 61 : 161-168.
- 3) 亀上知世子, 牛田一成 (2014) 畜産領域におけるプロバイオティクスの現状
と問題点, 腸内細菌学雑誌 28 : 147-154.
- 4) 農林水産省動物医薬品検査所 (2015) 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・
抗原虫剤の販売高と販売量
- 5) FAO/OIE/WHO (2003) Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human
antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment,
Geneva, December 1-5.
- 6) 清水健太郎, 小島将裕, 小倉裕司, 嶋津岳士 (2016) プロバイオティクス・
プレバイオティクス. 日本静脈経腸栄養学会雑誌 31 : 797-802.
- 7) 藤井繁佳, 浅野一朗, 尾崎和人, 熊王俊男 (2007) コーヒー豆由来のマンノ
オリゴ糖の食品への高度応用. 日本食品工学会誌 8 : 231-238.
- 8) Han KH, Kobayashi Y, Nakamura Y, Shimada K, Aritsuka T, Ohba K,
Morita T, Fukushima M (2014) Comparison of the effects of longer chain
inulins with different degrees of polymerization on colonic fermentation
in a mixed culture of swine fecal bacteria. J Nutr Sci Vitaminol 60 : 206-
212.
- 9) Elli M, Cattivelli D, Soldi S, Bonatti M, Morelli L (2008) Evaluation of
prebiotic potential of refined psyllium (*Plantago ovata*) fiber in healthy
women. J Clin Gastroenterol 42 : S174-S176.
- 10) Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C,
Gibson GR, Tuohy KM (2008) Whole-grain wheat breakfast cereal has a
prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-
controlled, crossover study. Br J Nutr 99 : 110-120.
- 11) Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD (2008) Gum
arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers

- in a dose-dependent manner. *Br J Nutr* 100 : 1269-1275.
- 12) Turunen K, Tsouvelakidou E, Nomikos T, Mountzouris KC, Karamanolis D, Triantafillidis J, Kyriacou A (2011) Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: a pilot study. *Anaerobe* 17 : 403-406.
 - 13) 木村郁夫, 長谷川沙恵, 粕渕真由 (2015) 食事由来腸内細菌代謝産物, 短鎖脂肪酸と宿主代謝制御. *J. Lipid Nutr* 24 : 33-40.
 - 14) Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH (2013) Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 145 : 396-406.
 - 15) Komura M, Fukuta T, Genda T, Hino S, Aoe S, Kawagishi H, Morita T (2014) A short-term ingestion of fructo-oligosaccharides increases immunoglobulin A and mucin concentrations in the rat cecum, but the effects are attenuated with the prolonged ingestion. *Biosci Biotechnol Biochem* 78 : 1592-1602.
 - 16) Fuller R (1989) Probiotics in man and animals, *J Appl Bacteriol* 66 : 365-378.
 - 17) 梅崎良則 (2011) プロバイオティクス製品登場の歴史的背景と期待される今後の展開, *腸内細菌学雑誌* 25 : 157-164。
 - 18) 古川壮一, 平山 悟, 森永 康 (2014) 微生物の共存・共生と伝統的発酵, *日本醸造協会誌* 109 : 228-239.
 - 19) Piva G, Belladonna S, Fusconi G, Sicbaldi F (1993) Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *J Dairy Sci* 76 : 2717-2722.
 - 20) van Heugten E, Funderburke DW, Dorton KL (2003) Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J Anim Sci* 81 : 1004-1012.
 - 21) Rodrigues AC, Cara DC, Fretez SH, Cunha FQ, Vieira EC, Nicoli JR, Vieira LQ (2000) *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production

- and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol* 89 : 404-414.
- 22) 蔡 義民 (2005) プロバイオテック乳酸菌を利用した飼料調製加工技術. 畜産の研究 59 : 241-246.
- 23) 蔡 義民 (2006) サイレージ調製における微生物研究利用. 畜産の研究 60 : 369-375.
- 24) 岡田秀紀, 工藤雄博, 福士江里, 小野寺秀一, 川端 潤, 塩見徳夫 (2005) 植物エキス発酵液の抗酸化活性とアルコール性胃粘膜障害の抑制効果. 日本栄養・食糧学会誌 58 : 209-215.
- 25) Okada H, Fukushi E, Yamamori A, Kawazoe N, Onodera S, Kawabata J, Shiomi N (2010) Novel fructopyranose oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract. *Carbohydr Res* 345 : 414-418.
- 26) Okada H, Fukushi E, Yamamori A, Kawazoe N, Onodera S, Kawabata J, Shiomi N (2011) Isolation and structural confirmation of the oligosaccharides containing α -D-fructofuranoside linkage isolated from fermented beverage of plant extracts. *Carbohydr Res* 346 : 2633-2637.
- 27) Kawazoe N, Okada H, Fukushi E, Yamamori A, Onodera S, Kawabata J, Shiomi N (2008) Two novel saccharides isolated from fermented beverage of plant extract. *Carbohydr Res* 343 : 549-554.
- 28) Okada H, Fukushi E, Yamamori A, Kawazoe N, Onodera S, Kawabata J, Shiomi N (2010) Novel fructopyranose oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract. *Carbohydr Res* 345 : 414-418.
- 29) 辨野義己, 遠藤希三子, 光岡知足 (1989) ラットの腸内フローラおよび盲腸内容物の性状に及ぼす大高酵素の影響, *ビフィズス* 2 : 137-141.
- 30) 山森 昭, 川添直樹, 岡田秀紀, 荒井 淳, 岡 哲生, 平田陸正 (2004) 植物エキス発酵液と β -グルカン, 日本補完代替医療学会学術集会 (第 6 回).
- 31) While SG, Kjos NP, Sorum H, Overland M (2012) Feeding Jerusalem artichoke reduced skatole level and changed intestinal microbiota in the gut of entire male pigs. *Animal* 6 : 807-814.
- 32) Han KH, Azuma S, Fukushima M (2014) In vitro fermentation of

- spent turmeric powder with a mixed culture of pig faecal bacteria. *Food Funct* 5 : 2446-2452.
- 33) Mitsuoka T, Segal T, Yamamoto S (1965) Improved methodology of qualitative and quantitative analysis of the intestinal flora of man and animals (in German). *Zentralbl Bakteriolog Orig* 195 : 455-469.
- 34) Han KH, Lee C, Kinoshita M, Oh C, Shimada K, Fukushima M (2016) Spent turmeric reduces fat mass in rats fed a high-fat diet. *Food Funct* 7 : 1814-1824.
- 35) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966) 血中アンモニア直接比色定量法. *最新医学* 21 : 622-627.
- 36) Fouad N. Boctor, Hemmat H. Ragher, Mamdouh Y. Kamel, R.R. Hamed (1978) A colorimetric method for the determination of indole, and its application to assay of tryptophanase. *Anal Biochem* 86 : 457-462.
- 37) 原 博 (2002) プレバイオティクスから大腸で産生される短鎖脂肪酸の生理効果. *腸内細菌学雑誌* 16 : 35-42.
- 38) 渡部 恂子 (2005) 腸内糖代謝と腸内細菌, *腸内細菌学雑誌* 19 : 169-177.
- 39) 安藤 朗, 藤本剛英, 高橋憲一郎 (2013) 腸疾患における腸内細菌のかわり, *日本内科学会雑誌* 102 : 2983-2989.
- 40) Wesoly, R., & Weiler, U (2012) Nutritional influences on skatole formation and skatole metabolism in the pig. *Animals* 2 : 221-242.
- 41) 光岡知足 (1986) 腸内細菌叢の分類と生態, *財団法人食生活研究会* : 304-317.
- 42) 光岡知足 (1987) 腸内フローラと代謝, *学会出版センター* : 8
- 43) 久田 孝 (2014) 腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響, *大豆たん白質研究会 Vol.17* : 52-57.
- 44) Han KH, Kobayashi Y, Nakamura Y, Shimada K, Aritsuka T, Ohba K, Morita T, Fukushima M (2014) Comparison of the effects of longer chain inulins with different degrees of polymerization on colonic fermentation in a mixed culture of swine fecal bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol* 60 : 206-212.

- 45) Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469 : 543-547.
- 46) 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, Ohno H (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504 : 446-450.
- 47) 辻 啓介 (1990) 食物繊維, 繊維と工業, Vo.46 : 453-457.
- 48) 消費者庁 (2015) 特定保健用食品 (規格基準型) 制度における規格基準, 消食表第 259 号・別添 3
- 49) National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, <http://nap.edu/html/labrats/>
- 50) Han KH, Azuma S, Fukushima M (2014) *In vitro* fermentation of spent turmeric powder with a mixed culture of pig faecal bacteria. *Food Funct* 5 : 2446-2452.
- 51) Mitsuoka T, Segal T, Yamamoto S (1965) Improved methodology of qualitative and quantitative analysis of the intestinal flora of man and animals (in German) . *Zentralbl Bakteriolog Orig* 195 : 455-469.
- 52) Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Heidt PJ, Van der Meer R (1997) Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis*: additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut* 40 : 497-504.
- 53) Crowther RS, Wetmore RF (1987) Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 163 : 170-174.

- 54) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966) 血中アンモニア直接比色定量法最新医学, 21 : 622-627.
- 55) Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132 : 1647-1656.
- 56) Correa RO, Vieira A, Sernaglia EM, Lancellotti M, Vieira AT, Avila-Campos MJ, Rodrigues HG, Vinolo MAR (2017) Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. *Cell Microbiol* 19.doi:10.1111/cmi.12720.
- 57) Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G (2011) Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41) . *Proc Natl Acad Sci USA* 108 : 8030-8035.
- 58) Bindels LB, Porporato P, Dewulf EM, Verrax J, Neyrinck AM, Martin JC, Scott KP, Buc Calderon P, Feron O, Muccioli GG, Sonveaux P, Cani PD, Delzenne NM (2012) Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br J Cancer* 107 : 1337-1344.
- 59) Masumoto S, Terao A, Yamamoto Y, Mukai T, Miura T, Shoji T (2016) Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomics changes. *Scientific Reports* 6, Article number : 31208.
- 60) Parkar SG, Trower TM, Stevenson DE (2013) Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe* 23 : 12-19.
- 61) Mills CE, Tzounis X, Oruna-Concha MJ, Mottram DS, Gibson GR, Spencer JP (2015) In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth. *Br J Nutr* 113 : 1220-1227.
- 62) Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M (2011) Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases *Bifidobacteria* in the human gut. *J Agric Food Chem* 59 : 12815-12820.

- 63) Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD (2014) The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 5 : 3611.
- 64) 中野雄二郎, 坊内良太郎, 小川佳宏 (2016) 糖尿病と腸内細菌. *モダンメディア* 62 : 159-165.
- 65) Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G (2015) The short-chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes (Lond)* 39 : 424-429.
- 66) 奥 恒行, 小西史子, 細谷憲政 (1981) ラットの生理機能に及ぼす難消化性多糖類の性状ならびに飼育期間の影響. *栄養と食糧* 34 : 437-443.
- 67) 坂田 隆, 市川宏文 (1997) 短鎖脂肪酸の生理活性. *日本油化学会誌* 46 : 1205-1212.
- 68) Ebihara K, Tachibe M, Kaneko N, Kishida T (2013) Hydroxypropylation of high-amylose maize starch changes digestion and fermentation-dependent parameters in rats. *J Nutr Sci* 2 : 1-10.
- 69) Genda T, Sasaki Y, Kondo T, Hino S, Nishimura N, Tsukahara T, Sonoyama K, Morita T (2017) Fructo-oligosaccharide-Induced transient increases in cecal immunoglobulin A concentrations in rats are associated with mucosal inflammation in response to increased gut permeability. *J Nutr* 147 : 1900-1908.
- 70) Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S, Takahashi Y, Itoh K, Hirayama K, Takahashi K, Kaminogawa S (2009) *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 : 372-377.
- 71) Kotani Y, Kunisawa J, Suzuku Y, Sato I, Saito T, Toba M, Kohda N, Kiyono H (2014) Role of *Lactobacillus pentosus* Strain b240 and the Toll-

- like receptor 2 axis in Peyer's patch dendritic cell-mediated immunoglobulin A enhancement. *PloS One*.9 : e91857.
- 72) 八村敏志 (2007) 乳酸菌の免疫調節機能. 日本乳酸菌学会誌 18 : 54-57.
- 73) Kawamoto S, Maruya M, Kato Lucia M, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S (2014) Foxp3⁺ T cells regulate immunoglobulin A selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41 : 152-165.
- 74) Genda T, Sasaki Y, Kondo T, Hino S, Nishimura N, Tsukahara T, Sonoyama K, Morita T (2017) Fructo-oligosaccharide-induced transient increases in cecal immunoglobulin A concentrations in rats are associated with mucosal inflammation in response to increased gut permeability. *J Nutr* 147 : 1900-1908.
- 75) Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ (2006) Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin Microbiol Infect* 12 : 404-409.
- 76) Froy O (2005) Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signaling pathways. *Cell Microbiol* 7 : 1387-1397.
- 77) Macpherson AJ, Uhr T (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303 : 1662-1665.
- 78) Ito H, Wada T, Ohguchi M, Sugiyama K, Kiriya S, Morita T (2008) The degree of polymerization of inulin-like fructans affects cecal mucin and immunoglobulin A in rats. *J Food Sci* 72 : 36-41.
- 79) Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T (2000) Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125 : 525-531.
- 80) Sonoyama K, Ogasawara T, Goto H, Yoshida T, Takemura N, Fujiwara R,

- Watanabe J, Ito H, Morita T, Tokunaga Y, Yanagihara T (2010) Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice. *Br J Nutr* 103 : 218-226.
- 81) Morowitz MJ, Di Caro V, Pang D, Cummings JH, Firek B, Rogers MB, Ranganathan S, Clark RSB, Aneja RK (2017) Dietary supplementation with nonfermentable fiber alters the gut microbiota and confers protection in murine models of sepsis. *Crit Care Med* 45 : e516-e523.
- 82) Derrien M, Belzer C, de Vos WM (2017) *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 106 : 171-181.
- 83) Cani PD, Everard A, Duparc T (2013) Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 13 : 935-940.
- 84) 農林水産省・環境省 (2013) 食品リサイクル法の施行状況 (データ版)
Available from URL:<https://www.env.go.jp/council/03recycle/y031-01/mat02-1.pdf>.
- 85) 高萩陽一, 岩渕 修, 助川 慎, 中胡 隆, 越田雄三, 若松純一, 藤村達也, 石黒智子, 村上 博, 飯村裕二, 小林泰男, 森松文毅, 川島知之, 菱沼 毅 (2011) 豚生産農場における液状ストレートホエイ給与が繁殖性, 生産性および枝肉形質に及ぼす影響, *日本畜産学会報* 82 : 325-331.
- 86) 森田幹夫, 坂 代江, 清宮恵美, 津田和之, 真原隆治 (2010) 納豆残さの添加が豚の健康に及ぼす影響
- 87) 本多昭幸, 中里 敏 (2008) DL-リンゴ酸およびフラクトオリゴ糖の飼料添加が肥育豚の発育と腸内細菌叢に及ぼす影響, *九州農業研究発表会専門部会発表要旨集* 71 : 88.
- 88) 真島英信 (1979) *生理学 改定 17 版*, 文栄堂 : 429-430.
- 89) 設楽 修, 岩本英治 (1998) アミノ酸添加低蛋白質飼料の給与が肥育豚の発育と窒素排泄量に及ぼす影響, *兵庫農技研報 (畜産) Bull.Hyogo Pre.Agri.Inst.*34 : 36-41.
- 90) 荒川信彦 (1979) 肉の熟成について, *日本調理科学会誌* 12 : 194-202.
- 91) 入江正和, 西村和彦 (1986) 豚の脂肪の性状に及ぼす残飯給与と屠殺月齢, 蓄積部位の影響, *日畜会報* 57 : 642-648.

- 92) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (2016) 飼料用米の生産・給与技術マニュアル 2016. (データ版). Available from URL : http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/files/ricm2016.pdf.
- 93) Ogawa.J, Matumura.K, Kishino.S, Omura.Y, Shimizu.S (2001) Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 67 : 1246-1252.
- 94) Kishino.S, Ogawa.J, Ando.A, Iwashita.T, Fujita.T, Kawashima.H, Shimizu.S (2003) Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by *Lactobacillus plantarum*, and factors affecting isomer production. *Biosci Biotechnol Biochem* 67 : 179-182.
- 95) 岸野重信, 小川 順 (2013) 乳酸菌の新たな脂肪酸代謝 機能性脂肪酸生産と腸管内脂質代謝制御への展開, *化学と生物* Vol.51 : 738-744.
- 96) 中根 崇, 山口倫子, 木下智秀, 沼尾真人 (2012) 雄豚における免疫学的去勢製剤の効果と精巣機能, *All about SWINE* 41 : 12-29.
- 97) Doran E, Whittington FW, Wood JD, McGivan JD (2002) The relationship between adipose tissue skatole levels, rates of hepatic microsomal skatole metabolism and hepatic cytochrome P4502E1 expression in two breeds of pigs. *Animal Science* 74 : 461-468.
- 98) Wesoly R, Weiler U (2012) Nutritional influences on skatole formation and skatole metabolism in the pig. *Animals* 2 : 221-242.
- 99) Loh G, Eberhard M, Brunner RM, Hennig U, Kuhla S, Kleessen B, Metges CC (2006) Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *J Nutr* 136 : 1198-1202.
- 100) 嶋澤光一, 本多昭幸, 竹野大志, 西川 徹, 尾野喜孝 (2007) バレイショ混合サイレージ給与が肥育豚の発育および肉質に及ぼす影響. *日畜会報* 78 : 355-362.
- 101) 木全 誠, 石橋 晃, 鎌田寿彦 (2001) 豚肉の理化学的成分と官能検査との

関係，日豚会誌 38：45-51.

102) 藤巻正生，板倉弘重，上野川修一，喜田 宏，柴田 博，高田明和，松川 正，
吉川泰弘（2011）豚肉のチカラ，財団法人日本食肉消費総合センター

103) 平田 浩，日高 智（2011）植物エキス醗酵液製造副産物の給与が豚の肉質
に及ぼす影響．平成 23 年度 大高酵素株式会社共同研究報告書，帯広畜産大
学