

3-4 グアム島における食品残渣物の農業利用

グアム大学自然科学学部・農学生活科学部門

Mari Marutani

岡山大学大学院環境生命科学研究科・資源循環学専攻

木村 幸敬

1. 研究概要

グアム島での食品残渣物の利用として、昨年度はコンポスト技術の検討およびビール酵母かすを用いた発酵飼料についての検討を行った。本年度は、発酵飼料調製についてより詳細な検討を行うことを目的として、養鶏業者が行っている腐葉土を用いた発酵飼料調製技術に着目した。発酵過程での温度変化、含水率変化、生菌数変化について観察し、発酵過程での菌の種類について遺伝学的検討も行った。これらより、発酵飼料中の中心的な菌は、腐葉土由来の糸状菌と考えられ、これらが優勢になることによって、バクテリアの生育が抑制されることが示唆された。

2. 交流報告

別項で報告したように、2012年10月にグアム大学側の Marutani 教授と動物飼料のエキスパートである Diambra-Odi 教授と今年度の研究計画についてディスカッションし、岡山周辺の養鶏および動物飼料の現状を見学した。

3. 研究報告

3-1. 緒言

グアム島では、その食料の大部分を米国本国から輸入している。当然その食料残渣は量も多く、問題となる。エネルギーの物質収支を考えると、食料輸入として持ち込まれたエネルギーを何らかの形で島外へ持ち出さねば、島内でのエネルギーが蓄積されることとなる。このエネルギー循環の一つの方法として、食糧残渣物からコンポストとして肥料を調製することが考えられる。本プロジェクトの本研究においても、このコンポスト化に焦点をあて研究を進めている。しかし、エネルギー循環のサイクルを考えると、肥料にする前に、豚や鶏の飼料として肉に変換し、観光客に食べてもらって島外にエネルギーを排出するという小さなサイクルがあればより有利となる。グアム島内での養豚および養鶏に目を向けると、それらの規模が小さく、その飼料もレストランやホテルからの食料残渣を養豚および養鶏業者が直接持ち帰って利用しているのが現状である。しかも、飼料回収は数日おきというのが現状で、時には腐敗した食料残渣を与えて家畜に病気などの問題も生じている。この現状を踏まえると、少し腐敗した食品残渣をも健康的な飼料に改変する可能性があり、数日間の保存も可能となる「発酵飼料」の調製法を確立することはかなりの利点を与える。そこで、本年度は、コンポスト化に加え、発酵飼料調製法の確立を目指した研究を行った。この研究は、日本側を中心に実施され、養鶏業者が行っている腐葉土を用いた発酵飼料調製技術に着目し、発酵過程での温度変化、含水率変化、生菌数変化について

観察し、発酵過程での菌の種類について遺伝学的検討も行った。これらの結果について報告する。

3-2. 実験方法

3-2-1. 中種の調製と温度変化と含水率変化の測定

岡山県加賀郡吉備中央町の竹林から採取した腐葉土 15 g、脱脂米ぬか(築野食品工業(株)製、和歌山県) 400 g、もみがら(岡山市産) 500 g、蒸留水 400 mL を混合し、2 日間発酵させて中種を調製した。腐葉土は、同じ植生の異なる地点の 3 種類を用いた。調製した中種のうち最も状態のよかったものを用い、中種 50 g、脱脂米ぬか 400 g、もみがら 500 g、蒸留水 500 mL を混合し植木鉢中で発酵飼料の調製を行った。植木鉢は 3 つを用いた。混合物の中央に温度記録計(おんどり TR-71Ui、(株)TandD) を差込み、飼料温度を記録した。同時に気温も測定した。また、混合直後、3, 6, 33, 58 時間後に飼料を採取し、含水率、生菌数、PCR 法による菌叢の測定に供与した。

試料の含水率は以下のように行った。採取した試料(2~3 g) の重量を測定し、105℃ で重量変化がなくなるまで乾燥させた後に重量を測定し、減じた重量を蒸発した水分の重量とし、採取した中種の重量で割った値を含水率とした。

3-2-2. 中種中の生菌数の測定

各時間で採取した中種のうち 20 g を滅菌生理食塩水 180 mL と十分に混合した。この液から、1 mL とり、滅菌生理食塩水を用いて順次 10 倍希釈を行い様々な希釈液を準備した。そのうち 10^{-4} ~ 10^{-6} 倍の希釈液を寒天培地に 100 μ L ずつ分注し、30℃ で 3 日間培養した。その後、コロニーの数を計数し、希釈倍率をかけて生菌数とした。

3-2-3. 菌叢同定のための PCR-DGGE 法

各時間で採取した中種のうち 5 g を凍結した。各植木鉢からの各時間での試料を、リン酸緩衝生理塩溶液を用いてよく洗浄し、リゾチーム溶液を用いて溶菌液を調製した。DN easy Blood & Tissue Kit(50) (QIAGEN 社製) を用いて、使用法に従い、溶菌液の DNA を抽出した。微生物相の解析用プライマーとして、16S rRNA 遺伝子の V3 可変領域を標的とするプライマー GC341f、518r (それぞれベックス社製) を使用した。One Taq 2X Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs 社製)、BIOTAQ DNA Polymerase (BIOLINE 社製) を用いて、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で 175~200 bp のサイズの DNA を得た。

この DNA を尿素の濃度勾配 30%~50% の 8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。この電気泳動では DNA を構成する塩基であるグアニンとシトシンの含量 (GC 含量) の違いによって DNA を区別することができる。

3-3. 結果と考察

図 1 に中種を仕込み始めた時間に対する中種の温度および含水率の変化を示した。温度については、中種試料の温度の値から気温の値を差し引いた値で示した。開始 20 時間までは温度変化はほとんどなく、その後温度が上昇した。35 時間目に最も高い温度 35℃ に到達した。この時の気温は 15℃ であったので、試料温度は 50℃ であった。その後温度は低下し

始め、58 時間目には 10℃以下になった。含水率は温度が上昇した 33 時間目までは、0.4 程度の値で維持されていたが、温度が低下した 58 時間後には 0.25 にまで低下した。試料温度を上昇させた熱量が水分の蒸発に使われ、温度が低下したと考えられる。

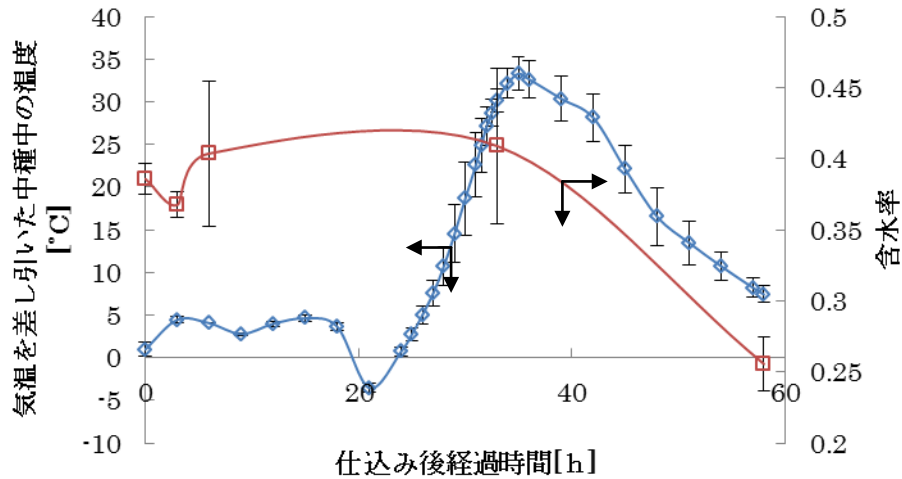


図 1 中種調製中の試料温度と含水率変化

図 1 に示される温度上昇および水分蒸発に使われた熱量の計算を試みた。様々な含水率での米ぬかの比熱 ($C_{p,RB}$) およびもみ殻の比熱 ($C_{p,C}$) は、それぞれ Sreenarayanan ら[1]および Mishra ら[2]によってそれぞれ以下のように報告されている。

$$C_{p,RB} = 0.3042 + 0.0083C_w + 0.0012T \quad \dots (1)$$

$$C_{p,C} = 0.04257 + 0.02403C_w \quad \dots (2)$$

(ここで C_w は含水率、 T は温度)

試料中の米ぬかともみ殻の重量比から試料全体の比熱を算出でき、温度変化から試料中に蓄積した熱量を算出できる。中種調製時間における蓄積熱量を図 2 に示した。図 2 には、含水率が低下した量に相当する水の蒸発潜熱を考慮した蓄積熱量も示した。温度が上昇した 33 時間目までは、試料中に蓄積された熱量も増加した。その後、試料中の蓄積熱量は減少したが、含水率低下から算出した水の蒸発潜熱を考慮すると 33 時間目とほぼ同程度の値が得られた。

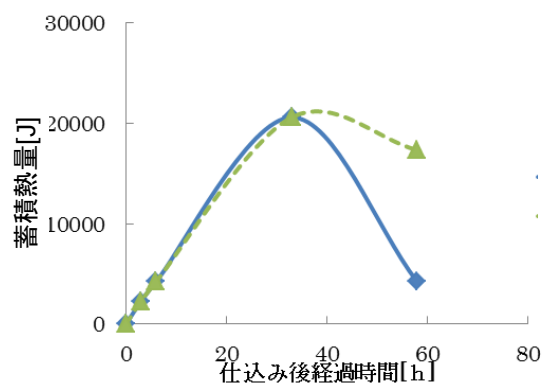


図 2 中種調製中の試料中の蓄積熱量
水の蒸発分を考慮せず (◆)、水の蒸発分を加算した
計算値 (▲)

発熱の要因を探るために、まず生菌数を測定した（図3）。33 時間目に生菌数は増加していたが、58 時間目の生菌数は 33 時間目の値と同程度であった。生菌数と蓄積熱量（水の蒸発分を考慮）との関係を図4に示す。両者は非常によく相関しており、中種の発熱量が菌の増加によることが明らかとなった。

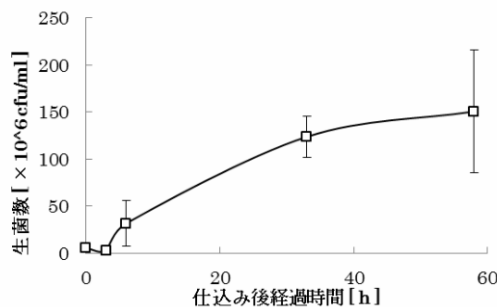


図3 中種中の生菌数の経時変化

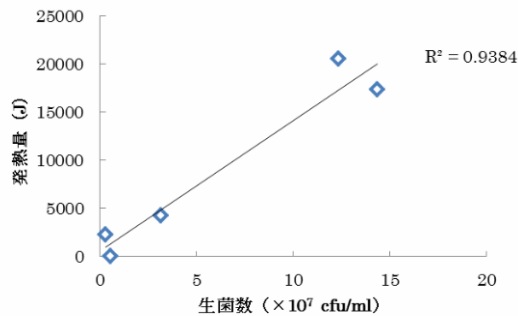


図4 生菌数と発熱量の相関

次に、中種中の菌について遺伝子工学的な手法で検討を行った。図5 a)に腐葉土と培養3 時間目の試料から抽出増幅させた DNA のバンドを示す。中種中には、腐葉土由来のバンドが現れていた。主に6つのバンドが観察された電気泳動の結果は、ゲルの上が GC 含量が少なく下のバンドほど GC 含量が多い。GC 含量と菌の種類の関係は表1に示すとおりである。バンドの位置から、band1 がバクテリア、他の band2~6 は糸状菌であると考えた。図5 b)には、この6つのバンドの強度を読み取り積分光学濃度として培養時間に対してプロットした。この植木鉢の試料中では band4 が温度変化とよく相関した。band1 は、温度と共に増加したが、58 時間目には消失していた。すなわち、この植木鉢では、バクテリアが成育しにくい環境が作られていることが示唆された。

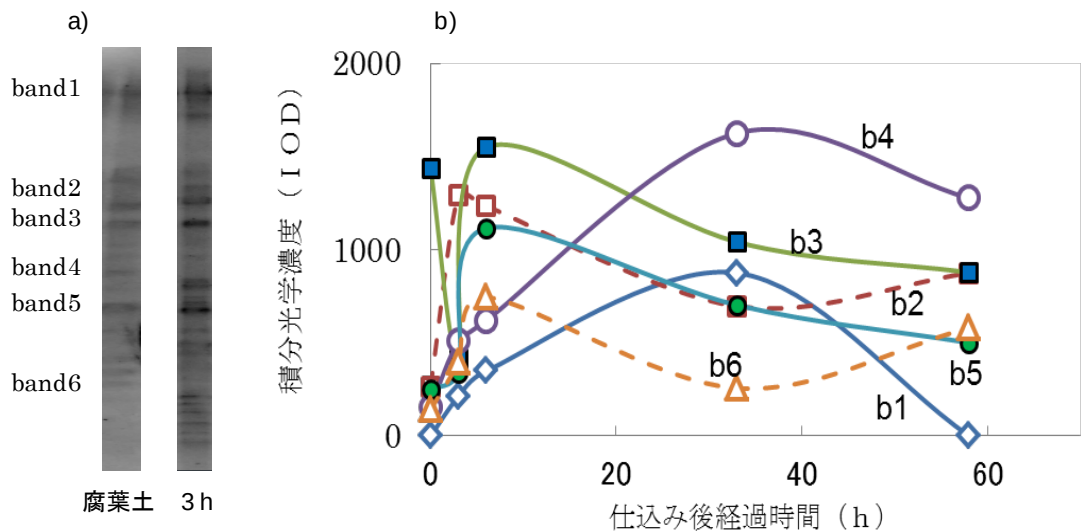


図5 DNA 電気泳動 (a) と各 band の積分光学濃度の経時変化 (b)

表1. 一般的な菌の GC 含量 [3]

	バクテリア	糸状菌	放線菌
GC 含量	約 25%	約 50%	約 75%

どの種類の菌が中種の発熱に寄与しているのかを知るために、初期温度からの温度差と積分光学濃度とのプロットを行った（図 6）。band1, band2, band4, band5 には弱い相関がみられた。これらの菌は中種調製中の発熱に寄与している可能性が示唆された。今後は、これらの band についてより詳細な DNA 配列の検討を行う必要がある。

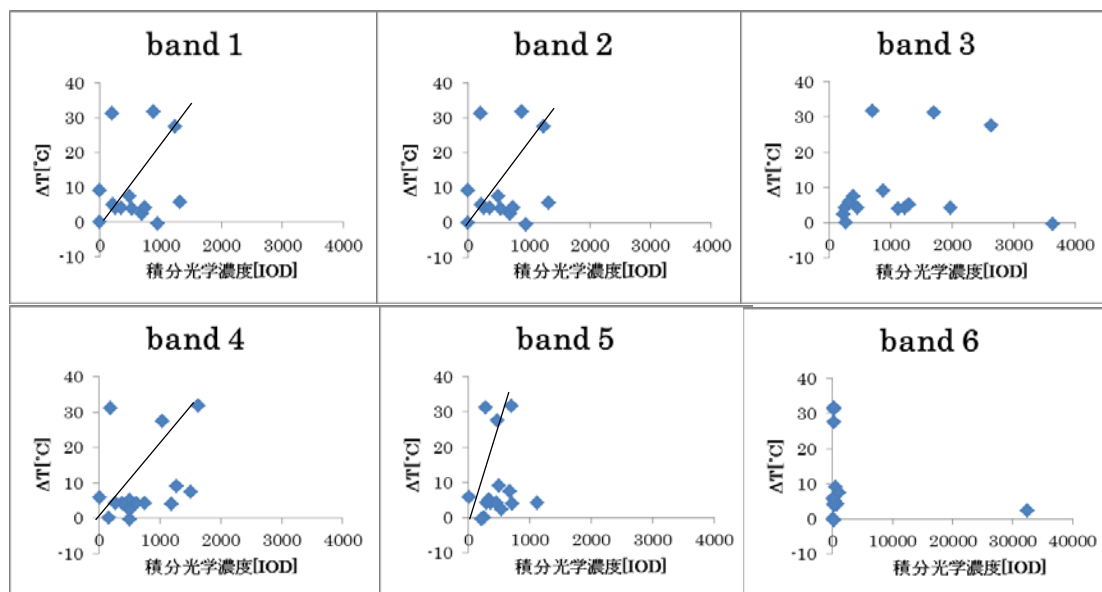


図 6 各 band の積分光学濃度と温度差との関係

3-4. 結言

腐葉土を用いた発酵飼料調製技術に着目し、発酵過程での温度変化、含水率変化、生菌数変化について観察し、発酵過程での菌の種類について遺伝学的検討も行った。これらより、発酵飼料中の中心的な菌は、腐葉土由来の糸状菌と考えられ、これらが優勢になることによって、バクテリアの生育が抑制されることが示唆された。

3-5. 参考文献

- 1) V. V. Sreenarayanan *et al.*, *Agricultural wastes*, **16**, 217(1986)
- 2) P. Mishra *et al.*, *Journal of materials science*, **21**, 2129(1986)
- 3) J. R. Lobry, *Gene*, **205**, 309(1997)

4. 今後の計画

遺伝学的研究をさらに進め、菌を特定する。実際に食品残渣を混合し、本研究と同様の検討を行い、発酵飼料調製法について多くの情報をえる予定である。

5. 活動資料

なし。