

焼酎粕がルーメン微生物による必須アミノ酸 合成量に及ぼす影響

小野寺良次*・ナジムデイン モハマド*・ロキブル イスラム カーン*・河上雅治*・稲澤 昭**・
奥田道緒**・森下敏朗***・河野幹雄***・川村 修****・長谷川信美****・
片山英美*****・藤代 剛*****・矢野光紘*****・萩原昭英*****・
山下 實*****・甲斐孝憲*****

Effect of Shochu Distiller's By-product on the Synthesis of Essential Amino Acids by Rumen Microorganisms

Ryoji ONODERA*, Nazimuddin MOHAMMED*, Rokibul Islam KHAN*, Masaharu KAWAKAMI*,
Akira INAZAWA**, Michio OKUDA**, Toshiro MORISHITA***, Mikio KAWANO****,
Osamu KAWAMURA****, Nobumi HASEGAWA****, Hidemi KATAYAMA*****,
Tsuyoshi FUJISHIRO*****, Mitsuhiro YANO*****, Akihide OGIWARA*****,
Makoto YAMASHITA*****, and Takanori KAI*****

(平成10年9月2日 受理)

Summary

In vitro experiments were conducted to examine an effect of freeze-dried shochu distiller's by-product (SDB) on the production of some essential and semi-essential amino acids by rumen microorganisms. Since the microbial composition of the rumens of cattle, sheep and goats is thought to be almost similar, suspensions of the mixed rumen bacteria (B system) and the mixed microorganisms consisting of rumen bacteria and protozoa (BP system) were prepared from the rumen contents of fistulated goats. SDB was a freeze-dried powder of the mixture of the same weights of buckwheat shochu distiller's condensed solubles and its cake. Proximate analysis of SDB indicated that crude protein and nitrogen-free extractives were about 47 and 31% in dry matter, respectively.

The effect of SDB on the production of amino acids by rumen microorganisms was examined by determining the productions of tryptophan from indolepyruvate, phenylalanine from phenylacetate, tyrosine from *p*-hydroxyphenylpyruvate and lysine from 2, 6-diaminopimelic acid

* 宮崎大学農学部家畜機能開発学講座
** 東洋ダイナム株式会社九州支店
*** 宮崎県食品加工研究開発センター
**** 宮崎大学農学部草地生産学講座
***** 宮崎大学農学部附属農場住吉牧場
***** 宮崎県経済農業共同組合連合会
***** 雲海酒造株式会社

in the supernatant fluids of the incubations and hydrolysates of microbial protein during a 12 h incubation period of B and BP systems at 39°C with and without 1% (w/v) SDB powder. In addition, since vitamin B₆ has been known to stimulate the production of amino acids by rumen microorganisms, the effect of simultaneous addition of SDB and vitamin B₆ on the production of these amino acids was also examined.

As a result, it was revealed that the addition of SDB powder significantly ($p < 0.05$) stimulated the production of these amino acids in both systems by 10-39%. Simultaneous addition of SDB and vitamin B₆ further stimulated their production by 17-64% ($P < 0.05$). Therefore the substances in SDB which were effective seemed to be different from vitamin B₆. This is the first evidence that SDB stimulates the production of some essential and semi-essential amino acids by rumen microorganisms. The results of the present experiments strongly suggest that SDB may stimulate the growth of ruminant animals.

Key words : Shochu distiller's by-product, Rumen microorganisms, Essential amino acid production, Stimulation of amino acid production

前報^{1,2,3}に述べた観点から、本プロジェクトは、焼酎粕を大麦ヌカおよびビートパルプと組み合わせてエクストルーダー⁴)によるペレット飼料の製造技術を確認し、肉用牛等を対象とする嗜好性ならびに保存性のよいペレット飼料を製造することを主要目的としている。同時に、製造したペレット飼料に機能性があれば一層優れた飼料として評価が高まることは言うまでもない。

そこで、本研究では、特に、焼酎粕の機能性の一つとして、反芻家畜第一胃（ルーメン）内の微生物によるアミノ酸、特に、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびリジンの合成量に及ぼす焼酎粕添加の影響を検討することを具体的な研究目的とした。反芻動物が消化吸収するタンパク質（アミノ酸）は、自然状態では60~80%がルーメン微生物体タンパク質と考えられている⁵。牛が摂取した飼料タンパク質は、ほとんどがルーメン微生物の餌となり、微生物体タンパク質に変換される。その変換によって、たとえば穀類タンパク質や牧草タンパク質などのように質の低いタンパク質は、質の高い微生物体タンパク質にグレードアップされるのである。また、変換効率も、飼料条件などにより異なると考えられている。したがって、飼料中に含まれる特殊成分がルーメン微生物のアミノ酸合成能を高めることができれば、ルーメン微生物体タンパク質の生産量を高めることができる。ルーメン微生物体タンパク質の生産量の増加は、とりもなおさず反芻動物の生産性の向上につながるものである。本

研究は、ルーメン微生物の必須アミノ酸合成能に及ぼす焼酎粕の影響を検討することにより、焼酎粕が、そして、ひいては焼酎粕ペレット飼料が反芻家畜（牛）の生産性を向上させる機能性をもつかどうかを判定するための基礎的資料を得ようとするものである。

実験材料および方法

1. 焼酎粕凍結乾燥粉末

本実験には、ソバ焼酎粕を使用した。すなわち、1997年8月4日、雲海酒造株式会社綾工場（宮崎県綾町）から入手したソバ焼酎粕濃縮液（デカンター上清液画分濃縮物、水分74%）および同脱水ケーキ（デカンター沈殿画分、水分75%）を等重量混合し、-20°Cに凍結保存後、凍結乾燥機（FD-5, Labconco）にて乾燥し、乳鉢にて粉末にしたもの（以下、焼酎粕凍結乾燥粉末と称す）を供試用の焼酎粕とした。

2. 成分分析法

1) 一般成分

基本的には、AOACの公定法⁶)に基づき、前報²)と同様の方法により焼酎粕凍結乾燥粉末の一般成分（6成分）を分析した。なお、分析値は3試料の平均値で示した。

2) アミノ酸分析

本研究では、必須アミノ酸として、トリプトファン、フェニルアラニン、リジンを分析した。また、フェニ

ルアラニンと同じ分析法で定量できる準必須アミノ酸のチロシンについても分析した。トリプトファンはMOHAMMADら(1998)⁷⁾、フェニルアラニンおよびチロシンはKHANら(1998)⁸⁾そしてリジンはOR-RASHIDら(1998)⁹⁾の方法により分析した。

3. 焼酎粕の機能性試験法

ルーメン微生物のアミノ酸合成促進効果試験法一

1) ルーメン微生物懸濁液調製法

本プロジェクトは、牛用の焼酎粕ペレット飼料の製造を目的としてはいるが、牛のルーメン微生物種の構成は山羊や綿羊のそれらとほぼ同じと考えられているので、本研究では、実験動物として手軽に飼育できる山羊のルーメン微生物を使用した。すなわち、ルーメンフィステルを装着している山羊のルーメン内容物から常法¹⁰⁾により混合ルーメンバクテリア単独懸濁液(バクテリア単独系)および混合ルーメンバクテリア・プロトゾア共存懸濁液(バクテリア・プロトゾア共存系)を調製した。これらの調製は、すべてファーンエス(灼熱還元銅)を通過させた無酸素混合ガス(N₂+CO₂, 95:5)通気下で行った。

2) ルーメン微生物系培養法

上記のようにして調製したバクテリア単独系およびバクテリア・プロトゾア共存系の各懸濁液(20ml, ただし、リジン合成の検討時は10ml)に、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびリジンの各前駆物質であるインドールピルビン酸(Sigma)、フェニルピルビン酸(Aldrich Chemical)、*o*-ヒドロキシフェニルピルビン酸(Wako)および2,6-ジアミノピメリン酸(Sigma)をそれぞれ基質として最終濃度が1mM(ただし、2,6-ジアミノピメリン酸のみは5mM)となるように加え、さらに、エネルギー源として米デンプン(0.5mg/ml)(Sigma)を加えて、これらを対照区としてそのまま39℃(ルーメン内温度)で12時間培養した。このほか、対照区の懸濁液に焼酎粕凍結乾燥粉末(上述)を風乾物重量で培地中の最終濃度が1%(w/v)となるように添加した焼酎粕添加

区および焼酎粕(1%, w/v)+ビタミンB₆(10μg/ml)添加区を設けた。各区の基質ごとの培養フラスコ数は3本ずつとした。これらの操作も、すべてファーンエス(灼熱還元銅)を通過させた無酸素混合ガス(N₂+CO₂, 95:5)通気下で行った。

3) 試料採取および分析法

培養前後に、培養液ができるだけ均一になるようにフラスコをよく攪拌しながら分析試料として培養液1mlをスクリー管に採取し、フェニルアラニン、チロシンおよびリジンの定量用試料の場合は、これに11.5M HCl 1mlを、また、トリプトファンの定量用試料の場合は、Lucas and Sotelo(1980)の方法¹¹⁾に従い、これに1mlの8M LiOHを加えて、110℃で20時間加水分解した。加水分解液は濃縮乾固し、1mlの超純水(Milli Q Labo, Nihon Millipore)に再溶解し、メンブレンフィルター(0.45μm)により濾過して、濾液を凍結保存(-20℃)した。分析時にはこれを溶解して分析試料とした。各アミノ酸の定量法は、上述したHPLC法⁷⁻⁹⁾である。

結果と考察

1. 焼酎粕の一般成分

目的とするペレット飼料製造時の主原料となる焼酎粕の一般成分分析値をTable 1に示した。乾物当たりの一般成分はほぼどの成分も前報²⁾に報告した焼酎粕濃縮液および脱水ケーキの中間の値になっている。そして、その特徴は、粗タンパク質が乾物当たりで約47%と高いこと、また、可溶無窒素物も31%も含まれること、粗灰分も適量含まれることである。

2. 焼酎粕凍結乾燥粉末がルーメン微生物によるアミノ酸合成量に及ぼす影響

次に、焼酎粕凍結乾燥粉末がルーメン微生物によるアミノ酸合成量に及ぼす影響を検討した。すでに前報³⁾に示したように、焼酎粕ペレット飼料にはビタミンB₆が含まれ、また、一般にアルコール発酵粕には

Table 1. Proximate components of buckwheat shochu distiller's by-product (%)^a

Sample	Moisture	Crude protein	Ether extract	Nitrogen-free extractives	Crude fibre	Crude ash
SDB ^b	77.65±0.29	10.48±0.12 (46.89)	0.74±0.08 (3.31)	7.02 (31.41)	2.79±0.14 (12.48)	1.32±0.03 (5.91)

^aValues are shown as means of three determinations with standard deviations and values in parentheses are those in dry matter.

^bSDB stands for shochu distiller's by-product and is consisted of equal weights of buckwheat shochu distiller's solubles and its cake (grains).

ビタミンB₆が含まれていることが分かっており¹²⁾、他方、ビタミンB₆がルーメン微生物によるフェニルアラニン¹³⁾やリジン¹⁴⁾の合成を促進することがすでに報告されているので、本研究では、焼酎粕単独添加の影響とともに焼酎粕とビタミンB₆を同時に添加した場合の影響についても検討した。

実験結果をTable 2に示した。これらの値は、微生物体窒素 (mg) あたりの各アミノ酸の合成量 (nmol) を示している。まず、トリプトファンの合成量に注目すると、ルーメン環境温度 (39℃) で12時間培養した場合、バクテリア単独系の対照区では、微生物体窒素 (mg) あたり正味316nmolのトリプトファンが添加基質 (インドールピルビン酸) から合成されたことが分かる。ところが、これに焼酎粕を1%レベルで添加するとトリプトファン合成量は439.3nmolとなり、対照区よりも39%も有意 (P<0.05) に増加した。これにさらにビタミンB₆を添加すると、合成量は64%も有意 (P<0.05) に増加した。バクテリア・プロトゾア共存系では、対照区の値が微生物体窒素 (mg) あたり274.5nmolであり、バクテリア単独系よりも約13%程低い値となっているが、これは、一般にプロトゾアがバクテリアを捕食するために起こる低下と考えられている。この系に焼酎粕を添加すると、約28%も有意 (P<0.05) に増加した。これにさらにビタミンB₆を添加すると、48.7%も有意 (P<0.05) に増加した。フェニルアラニン、チロシンおよびリジンの

の合成についてもほぼ同様のことが言える。

本実験におけるビタミンB₆の添加濃度は10 μg/ml であるが、過去のフェニルアラニンに関する我々の研究結果¹³⁾によれば、ビタミンB₆の添加濃度は10~100 μg/mlの範囲までの促進効果はあまり変わらないことが分かっている。したがって、焼酎粕が単にビタミンB₆の濃度を高めたことによる促進効果であるとは考えにくい。これらの点を考えれば、焼酎粕に含まれるルーメン微生物のアミノ酸合成促進物質は、ビタミンB₆とは異なる化合物である可能性が高いと言える。なお、今回の分析値は微生物体加水分解物と培養液中の遊離のアミノ酸の両者を含む培養液中の当該アミノ酸の全量の増加量を示しているが、実際は、これらのアミノ酸の多くは微生物体タンパク質成分として蓄積されていると考えられる。したがって、アミノ酸合成量の増加は即ルーメン微生物体の増加を意味すると言える。序論でも述べたように、反芻動物の場合は、通常、動物自身が消化吸収するタンパク質の多くはルーメン微生物体タンパク質であること、しかも、ルーメン微生物体タンパク質の栄養価がカゼインや魚粉並に高いことを考えれば、ルーメン微生物によるアミノ酸合成量の増加、すなわちルーメン微生物体タンパク質の増加は、反芻動物への良質のタンパク質供給量の増加を意味し、動物の成長促進にきわめて有効と考えられる。本研究により、世界で初めて、焼酎粕がルーメン微生物の必須アミノ酸および準必須アミノ酸の合成を

Table 2. Effects of buckwheat shochu distiller's by-product and vitamin B₆ on the production of essential and semi-essential amino acids by rumen microorganism^a

(Incubated at 39°C for 12 h)

Amino acids ^b	Mixed rumen bacteria			Mixed rumen bacteria and protozoa		
	Control ^c	+SDB ^c	+B ₆ +SDB ^c	Control ^c	+SDB ^c	+B ₆ +SDB ^c
Tryptophan	316.0±17.9	439.3±20.4 (39.0%)	518.5±37.2 (64.0%)	274.5±13.9	352.5±12.4 (28.4%)	368.0±22.7 (48.7%)
Phenylalanine	427.0±12.2	504.0±22.4 (18.0%)	574.0±17.1 (34.4%)	250.3±16.1	301.0±23.4 (20.3%)	320.0±14.9 (27.8%)
Tyrosine	395.0±15.1	529.0±17.1 (33.9%)	542.0±19.6 (37.2%)	270.0±19.3	297.0±9.2 (10.0%)	316.0±14.5 (17.0%)
Lysine	244.0±37.0	298.0±14.0 (22.1%)	307.0±36.0 (25.8%)	—	—	—

^aValues are shown as means of four determinations with standard deviations and the unit of these values is nmol/mg of microbial nitrogen. Values in parentheses are percentages of increases to control values.

Significant differences (P<0.05) were observed in each amino acid production between incubations of control and with additives in each microbial suspension.

^bSubstrate for each amino acid production: Indolepyruvate for tryptophan; phenylpyruvate for phenylalanine; *p*-hydroxyphenylpyruvate for tyrosine; 2, 6-diaminopimelate for lysine.

^cControl, no addition; +SDB, addition of buckwheat shochu distiller's by-product (1%, w/v); +B₆, addition of vitamin B₆ (10 μg/ml). SDB stands for shochu distiller's by-product and is consisted of equal weights of buckwheat shochu distiller's solubles and its cake (grains).

促進する機能性をもつことが明らかにされた。また、このことは、焼酎粕が反芻動物の成長促進機能を有することを強く示唆するものである。

要 約

ソバ焼酎粕凍結乾燥粉末を用いて焼酎粕がルーメン微生物による必須アミノ酸および準必須アミノ酸の合成に及ぼす影響を検討した。牛、山羊、綿羊では第一胃（ルーメン）内微生物の構成がほぼ同じと考えられているので、本実験に用いた混合ルーメンバクテリア単独懸濁液（バクテリア単独系）および混合ルーメンバクテリア・プロトゾア共存懸濁液（バクテリア・プロトゾア共存系）は、実験動物として飼育しているフィステルを装着した山羊のルーメン内容物から調製した。焼酎粕凍結乾燥粉末は、ソバ焼酎粕濃縮液および同脱水ケーキの等重量混合物を凍結乾燥して、乳鉢で粉末状にしたものを用いた。焼酎粕の一般成分の特徴は、粗タンパク質が乾物あたりで約47%と高いこと、可溶無窒素物も約31%も含まれることであった。

ルーメン微生物によるアミノ酸合成に及ぼす焼酎粕の影響は、バクテリア単独系およびバクテリア・プロトゾア共存系によるインドールピルビン酸を基質とした場合のトリプトファン合成量、フェニルピルビン酸を基質とした場合のフェニアラニン合成量、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質とした場合のチロシン合成量および2,6-ジアミノピメリン酸を基質とした場合のリジン合成量を焼酎粕凍結乾燥粉末（1%, w/v）存否の条件で検討した。また、ビタミンB₆がルーメン微生物のアミノ酸合成を促進することが知られているので、焼酎粕凍結乾燥粉末とビタミンB₆を同時に添加した場合の合成量についても検討した。その結果、上記のいずれのアミノ酸も焼酎粕凍結乾燥粉末添加により有意（ $P < 0.05$ ）に10~39%も合成が促進されることが明らかになった。焼酎粕凍結乾燥粉末とビタミンB₆を同時に添加するとさらに17~64%も有意（ $P < 0.05$ ）にアミノ酸合成が促進された。したがって、焼酎粕凍結乾燥粉末に含まれていたアミノ酸合成促進物質はビタミンB₆以外の化合物であると考えられた。本研究により、世界で初めて、焼酎粕がルーメン微生物の必須アミノ酸および準必須アミノ酸の合成を促進する機能性をもつことが明らかにされた。また、このことは、焼酎粕が反芻動物の成長促進機能を有することを強く示唆している。

謝 辞

本プロジェクトを遂行するにあたり、研究費の御援助を頂いた日本酒造組合中央会、宮崎県酒造組合連合会、宮崎県経済農業協同組合連合会ならびに(財)伊藤記念財団に対して深甚の謝意を表す。また、こころよくソバ焼酎粕（濃縮液および脱水ケーキ）を御提供いただいた雲海酒造株式会社（宮崎県綾町）に対し深謝する。

なお、共著者のうちナジムディン・モハマドおよびロキブル・イスラム・カーンは、文部省の国費外国人留学生として1996年から宮崎大学農学部において鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程学生として研究を続けており、文部省に対して心から感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 小野寺良次・川村 修・稲澤 昭・泉 俊雄・奥田道緒・片山英美・横山三千男：麦焼酎粕，ミカンおよびニジンのジュース粕を材料とするサイレージの調製。宮崎大学農学部研究報告，43，145-150（1997）
- 2) 小野寺良次・稲澤 昭・奥田道緒・森下敏朗・河野幹雄・長谷川信美・片山英美・横山三千男・増田慶信・郡 義博：エクストルーダ-による焼酎粕ペレット飼料（牛用）の製造に関する研究。宮崎大学農学部研究報告，44，45-53（1997）
- 3) 小野寺良次・稲澤 昭・奥田道緒・森下敏朗・河野幹雄・川村 修・長谷川信美・片山英美・藤代剛・矢野光紘・萩原昭英・山下 實・甲斐孝憲：エクストルーダ-による実用的焼酎粕ペレット飼料（牛用）の製造技術と飼料成分および嗜好性。宮崎大学農学部研究報告，45，77-85（1998）
- 4) 土井悦四郎：エクストルーダ-による食品の加工，「食品工業における科学・技術の進歩（Ⅱ）」81-97，(社)日本食品工業学会編集，(株)光琳，(1986)
- 5) WELLER, R. A., GRAY, F. V. and PILGRIM, A. F.: The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of the sheep. *Brit. J. Nutr.*, 12, 421-429 (1958)
- 6) 'Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists' ed. by K. HELRICH, 15th edition, AOAC Inc., Arlington, Virginia (1990).

- 7) MOHAMMAD, N., KHAN, R. I. and ONODERA, R.: A new determination method of tryptophan and its related compounds by high-performance liquid chromatography and its application to rumen fluid. *Anim. Sci. Technol. (Jpn)*, **69**, 1020-1028 (1998)
- 8) KHAN, R. I., AMIN, M. R., MOHAMMED, N. and ONODERA, R.: Quantitative determination of aromatic amino acids and related compounds in rumen fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **710**, 17-25 (1998)
- 9) OR-RASHID, M. MAMUN, ONODERA, R., NASSER, M. E. A., WADUD, S. and AMIN, M. R.: A rapid determination method of lysine in Biological samples by isocratic HPLC. *Journal. A. O. A. C. Internatl.*, submitted (1998)
- 10) ONODERA, R., UEDA, H., NAGASAWA, T., OKUUCHI, K. CHAEN S., MIENO M. and KUDO, H.: *In vitro* metabolism of tryptophan by ruminal protozoa and bacteria: the production of indole and skatole and their effects on protozoal survival and VFA production. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **63**, 3-31 (1992)
- 11) LUCAS, B. and SOTELO A.: Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Anal. Biochem.*, **109**, 192-197 (1980)
- 12) 日本標準飼料成分表, 農林水産省農林水産技術会議事務局編, p.240-243, 中央畜産会, 東京 (1995)
- 13) AMIN, M. Ruhul and ONODERA, R.: Effects of salinomycin and vitamin B₆ on in vitro metabolism of phenylalanine and its related compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 1-9 (1998)
- 14) EL-WAZIRY, A. M. and ONODERA, R.: Effects of salinomycin and vitamin B₆ on the in vitro synthesis of lysine from the stereoisomers of 2, 6-diaminopimelic acid by mixed rumen protozoa, bacteria and their mixture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 109-114 (1997)