

落合ら：発酵分解した魚粉の給与が発育関連遺伝子と豚肉生産に及ぼす影響
発酵分解した魚粉の給与が発育関連遺伝子と豚肉生産に及ぼす影響

落合涼・谷田部隆・白波瀬歩¹⁾・齊藤隆夫²⁾・戸田尚美³⁾・宮口右二⁴⁾

1)現：茨城県畜産センター 2)現：茨城県県南家畜保健衛生所

3)現：茨城県県西家畜保健衛生所 4)茨城大学

Effects of feeding fermented fishmeal on growth-related genes and pork production

Ryo OCHIAI, Takashi YATABE, Ayumi SHIRAHASE, Takao SAITO, Naomi TODA, Yuji MIYAGUCHI

要 約

養豚経営において飼料代は生産費の約6割を占めており、飼料価格も高騰していることから、未利用資源の飼料としての活用が期待されている。近年、畜産分野では機能性成分の給与が肥育豚の健康に関する遺伝子発現に作用することが明らかとなってきた。本研究では、熱や酸に強い分解菌 *Alicyclobacillus sendaiensis* (アシドロ菌®) を用いて発酵処理した魚のアラ(発酵魚粉)を肥育豚に給与することにより、増体に関する遺伝子の働きと発育等に及ぼす効果や肉質への影響を検証した。その結果、肥育期に配合飼料中9%を発酵魚粉に代替してブタに給与すると、遺伝子レベルでは赤身肉の生産性が向上するとともに、余分な脂肪の少ない豚肉を生産できる可能性が示唆された。また、豚肉中のDHA・EPA等の機能性成分を増加させる傾向が認められた。

キーワード 豚肉、魚粉、DHA、耐熱性好酸菌

緒 言

茨城県の養豚産出額は全国6位に位置しており(農林水産省、2021)、首都圏の豚肉の供給地として基幹的な役割を果たしている。そのようななか、飼料代は生産費のおよそ6割を占め、近年はその価格も高止まりしていることから、養豚経営を圧迫する大きな要因のひとつとなっている。そのため、肥育期間が短縮され、かつ均一的に生育させることができる飼料給与技術の確立が必要である。

従来、給与飼料のブタへの効果は、発育(体重測定)、肉質(理化学値)および健康(血液性状)等の測定値を中心に評価してきた。しかし、飼養試験を実施する中で、遺伝的に近い同腹豚に養分要求量を満たす異なる成分の飼料を給与すると、発育および枝肉形質等に差がみられる。この差が飼料中のカロリー以外の微量成分の過不足による差なのか、ブタ毎の代謝等の個体差によるものか不明である。

近年、遺伝子解析技術の発展に伴い、実験動物分野を中心に飼料中の成分(脂肪酸等)によって特定の遺伝子発現が異なり、代謝や免疫等

に関係する物質の合成に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

そこで、飼料中の成分が遺伝子発現に与える影響を解明できれば、より精度の高い飼料評価が可能となり、肉豚生産に有益な遺伝子のはたらきを促すような物質を飼料に添加することで、既存飼料の価値を高め、より効果的な肉豚生産が可能となる。

機能性成分としてDHA・EPA等の ω 3脂肪酸の給与が、肥育豚の健康に関する遺伝子発現に作用するという知見がある¹⁾。また、耐熱性好酸菌のひとつである *Alicyclobacillus sendaiensis*²⁾ (アシドロ菌®) による発酵産物は保存性がよく、臭気が非常に少ないといった特性を示し、同菌のコラゲナーゼ活性により魚のアラの発酵分解が可能であることから、発酵魚粉の飼料代替による効果が期待される。

本研究では、 ω 3脂肪酸を多く含む発酵魚粉の給与が、発育関連遺伝子の発現と発育(増体量等)、肉質(脂肪酸組成等)、官能評価に及ぼす影響について検討を行った。

1 供試豚および試験区の構成

当所の三元交雑種 (LW・D) 去勢豚 10 頭を発酵魚粉区 5 頭、対照区 5 頭に分け、体重が 30kg に到達する子豚期までは両区で共通の慣行飼料のみを給与した。体重 30kg から出荷体重 110kg までを試験期間とし、対照区では慣行飼料を、発酵魚粉区では慣行飼料の重量比 9% を発酵魚粉に代替し給与した。なお、ブタの飼育は単飼で行い、飼料および飲水は自由摂取とした。

2 飼料

子豚期までは当所慣行の飼養管理に沿って、慣行飼料を給与した。

発酵魚粉は、東京都葛西臨海水族園由来の魚のアラをアシドロ菌®および発酵処理装置 (BC-50、スターエンジニアリング株式会社、茨城県) で乳酸発酵処理 (60℃、24 時間以上) し、粉末状にしたものを用いた。肥育前・後期の慣行飼料、発酵魚粉代替飼料および発酵魚粉の成分を表 1 に示した。

表 1 飼料の一般成分 (%、kcal/kg)

種類	粗蛋白	粗脂肪	水分	灰分	GE
慣行前期	15.9	4.9	13.2	4.6	4606.8
慣行後期	13.2	3.8	14.2	3.5	4223.0
代替前期	18.5	6.2	11.4	4.5	4490.2
代替後期	15.7	4.9	12.4	3.9	4371.3
発酵魚粉	50.3	22.8	9.30	9.1	5454.4

3 豚肉サンプルの採材

肥育終了後、所内で屠畜し、肝臓、右側ロース芯(第 6-7 胸椎間)、左側ロース(背脂肪付き)の採材を行った。肝臓と右側ロース芯は、試験実施まで-80℃で凍結保存した。

4 調査項目

1) 発育関連遺伝子の発現および発育等に及ぼす効果の研究

(1) 発育調査

供試豚について、試験開始から 1 週間ごとに体重を測定し、一日平均増体量(DG、g/日)等を調査した。また、2 週間ごとに飼料摂取量を測定し、飼料要求率(1 kg の増体を得るのに必要な飼料量、kg/kg)を調査した。

(2) 遺伝子発現動態調査

ブタの肝臓において、脂肪の分化および脂肪酸合成に関連する遺伝子や脂肪酸の不飽和化に関連する遺伝子、筋肉において筋萎縮の促進に関連する遺伝子の発現量に及ぼす発酵魚粉の効果を検証した。

① プライマー設計

GenBank(National Center for Biotechnology Information)が提供している塩基配列データより、今回使用する遺伝子の情報を取得し、Primer 3 Plus(Steve Rozen and Helen Skaletsky)を用いてプライマー設計を行った(表 2)。プライマー設計の条件として、増幅サイズを 80~150b、プライマーサイズを 17~25b、GC 含量(%)を 45~55、Tm 値の最大の差を 3 と定めた。

表 2 プライマーの情報

プライマー	配列 (5'→3')
18S rRNA	FW : TTT TCG GAA CTG AGG CCA TG
	RV : TGG CAA ATG CTT TCG CTC TG
PPAR γ	FW : TGT GAA GTT CAA CGC ACT GG
	RV : CCA AGG CTT GCA AAT TG
SREBP1	FW : ACA ATG CCA TCG AGA AAC GC
	RV : AGA CGG CGG ATT TAT TCA GC
NF- κ B	FW : ATC CAC AGC TTC CAG AAC CTG
	RV : TTG TTG TTG GTC TGG ATG CG
SCD	FW : TCC CGA CGT GGC TTT TTC TTC TC
	RV : CTT CAC CCC AGC AAT ACC AG

② リアルタイム RT-PCR

試料 100mg に TRIzol®(インビトロジェン) 1.0 mL を添加し、超音波粉碎機(BRANSON SONIFIER 250)を用いて粉碎した。クロロホルム(富士フィルム和光純薬 試薬特級) 0.2mL を添加し、微量高速冷却遠心機(TOMY MX-105)を用いて遠心分離(19,800×g、15分、4℃)し、水層部のみを採取した。この液に 0.83 容量のイソプロパノール(富士フィルム和光純薬 分子生物学用)を添加した後、-20℃で一晩静置した。

エタノール沈殿の操作を繰り返し、RNA 抽出溶液を濃度 1.0 μ g/ μ L となるよう希釈した。

逆転写反応には Rever Tra Ace® qPCR RT

Kit (TOYOBO FSQ-101) を使用し、付属のマニュアルに沿って行った。

プライマー濃度が 100pmol/ μ L、スタンダードサンプルが 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍になるよう調整し、Thunderbird™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO QPS-201) を用いたインターカレーター法に準じて実施した。

③ 統計処理

得られたデータの統計処理は、*t* 検定により行った。

2) 肉質等に及ぼす効果の研究

(1) 肉質検査

供試豚の背脂肪のついた左側ロース部位から、肉質検査を以下の方法に準じて行った。

① 保水力

ロース芯を細切にし、挽肉 40g と 3M の KCL10ml と混ぜ、4℃で 20 分放置した後、10g をソーセージ結着計に入れ、70℃に設定したウォーターバスに浸漬し、20 分間の湯浴を行った。そして遠心分離 (1000rpm、10 分) を行い、結着計の目盛りから保水力 (%) を求めた。

② 加熱損失

ロース芯から 2 × 2 × 6 cm に切り出し、重量を測定した。その後密閉し、70℃に設定したウォーターバスに浸漬し、60 分間の湯浴を行った。そして、サンプル表面のドリップをペーパータオルで除去し、湯浴後の重量を測定した。湯浴前後の重量の差から加熱損失 (%) を求めた。

③ 脂肪融点

食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル (家畜改良センター) に準じて実施した。

④ 肉色および脂肪色

ロース芯および背脂肪内層を切開後 60 分後に、色差計を用いて、3 ヲ所において L* 値、a* 値、b* 値を測定した。

(2) 一般成分分析

① 水分

乾燥法により豚肉の水分を定量した。

② 粗蛋白

ケルダール法により豚肉の粗蛋白を定量した。

③ 粗脂肪

ソックスレー法により豚肉の粗脂肪を定量した。

④ 灰分

直接灰分法により豚肉の灰分を定量した。

(3) 脂肪酸分析

脂肪酸組成は、Folch 法を用いて脂質を抽出し、メチルエステル化処理を行ったものを試料とした。分析にはカラムには Stabilwax®-DA (30nm、0.32mm、0.25 μ m) を装着したガスクロマトグラフ (島津製作所、GC-2014) を用いた。分析条件は、注入口温度を 250℃、検出器温度を 250℃、カラム温度を 100℃から 240℃の昇温とした。

(4) 嗜好型官能評価

厚さ 5mm にスライスしたロース肉を 3cm × 3cm に切り分け、官能検査用のサンプルとした。サンプルを 1.5% 食塩水に 4℃で 10 分間浸漬した後、170℃に温度設定したデジタルホットプレート (AS ONE、ND-3L) を用いて、サンプルの表面を 25 秒、裏面を 20 秒加熱調理した。調理された豚肉を 2 分割し、金属のタッパーに入れて喫食直前まで 50℃で保温した。官能検査は消費者型で行い、実施は食肉の官能評価ガイドライン (日本食肉消費総合センター、2005) に準じた。

パネリストは茨城大学農学部の学生 35 人 (男性 12 人、女性 23 人) で行った。評価方法は初めに対照区の豚肉の品質評価を基準 (0) とした。その後、パネリストはランダムにサンプルを評価し、香りの良さ、香りの強さ、食感、多汁性、線維感、うま味、コク、風味の強さ、風味の好ましさ、脂っぽさ、総合評価をそれぞれ -2、-1、0、+1、+2 の 5 段階で評価した (シェッフエの一対比較法)。

結果

1 発育関連遺伝子の発現および発育等に及ぼす効果の研究

1) 発育調査

平均体重は両区とも同様に推移し、一日平均増体量および飼料摂取量、飼料要求率について、両区間に有意差は見られなかった。発酵魚粉の給与による影響はなく、対照区と遜色のない発育を示した。(図1～3)。

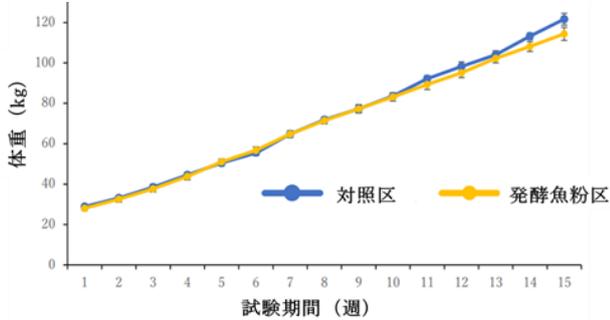


図1 発酵魚粉の給与がブタの平均体重の推移に及ぼす影響

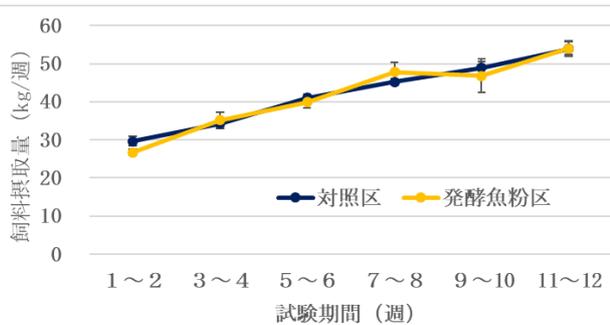


図2 発酵魚粉の給与がブタの飼料摂取量に及ぼす影響
 平均値±標準誤差

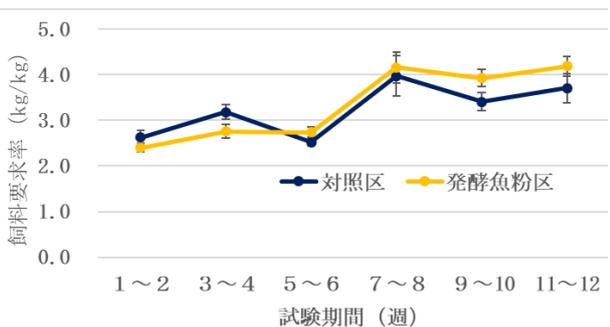


図3 発酵魚粉の給与がブタの飼料要求率に及ぼす影響
 平均値±標準誤差

2) 遺伝子発現動態調査

肥育期に配合飼料重量比9%量の発酵魚粉代替飼料を給与すると、肝臓における脂肪酸合成系の遺伝子(PPAR γ 、SREBP1)や脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子(SCD)の発現量が有意に減少したこと

から、発酵魚粉がブタの脂質代謝関連遺伝子の発現に影響を及ぼすことが確認された。また筋肉において、筋委縮を促進する遺伝子(NF- κ B)の発現量が有意に減少した(図4)。

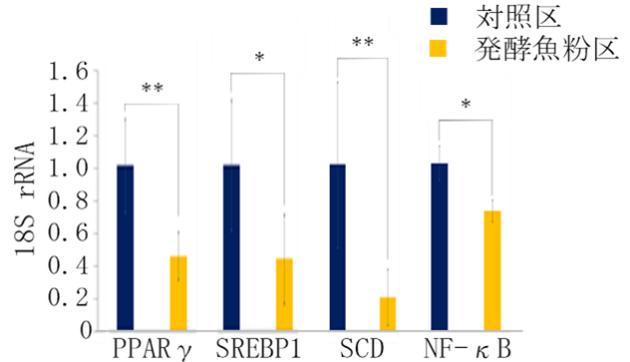


図4 発酵魚粉の給与が肝臓中の PPAR γ 、SREBP1、SCD 遺伝子および筋肉中の NF- κ B 遺伝子の発現量に及ぼす影響

発酵魚粉区の遺伝子発現量は、対照区の発現量1とした相対値で示した(平均値±標準誤差)。

** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

2 肉質等に及ぼす効果の研究

1) 肉質検査

対照区と比較して、加熱損失は発酵魚粉区で有意に増加し、各背脂肪層の脂肪融点が有意に低下していた。なお、保水力や肉色、脂肪色には影響がみられなかった(表3)。

表3 発酵魚粉の給与が肉質に及ぼす影響

	対照区	発酵魚粉区
保水力 (%)	69.7±4.6	67.3±6.9
加熱損失 (%)	25.3±2.9 B	31.4±1.3 A
脂肪 内層(°C)	45.3±3.7 a	39.5±3.7 b
融点 外層(°C)	41.8±0.6 A	35.0±4.2 B
	L*	51.3±1.9
	ローズ a*	5.5±0.6
	b*	5.0±0.6
色差	L*	79.1±1.0
	L*	78.5±1.2
脂肪	a*	3.0±0.8
	b*	5.3±1.0
	b*	5.4±0.5

異符号間で有意差あり

a, b: $p < 0.05$, A, B: $p < 0.01$

平均値±標準誤差

2) 一般成分分析

いずれの項目においても有意差は見られなかった。発酵魚粉の給与による影響は見られなかった(表4)。

表4 発酵魚粉の給与が豚肉の一般成分に及ぼす影響(%)

	対照区	発酵魚粉区
水分	72.2±0.2	72.2±0.3
粗タンパク質	23.8±0.9	22.8±1.1
粗脂肪	3.8±0.4	3.8±0.6
灰分	1.2±0.0	1.1±0.0

3) 脂肪酸分析

豚肉のDHA・EPA等の ω 3脂肪酸は、対照区と比較して発酵魚粉区の方が高い傾向にあった(表5)。

表5 発酵魚粉の給与が豚肉の背脂肪の脂肪酸組成に及ぼす影響(%)

脂肪酸の種類	対照区	発酵魚粉区
ミリスチン酸	1.2±0.0	1.4±0.1
パルミチン酸	27.6±0.3	27.1±0.4
パルミトリン酸	2.8±0.1	2.9±0.3
ステアリン酸	14.5±0.4	14.9±0.7
オレイン酸	46.8±0.7	a 43.3±0.4
リノール酸	5.4±0.4	b 6.8±0.3
α -リノレン酸	検出限界以下	0.3±0.0
エイコセン酸	1.0±0.0	0.8±0.1
エイコサジエン酸	0.1±0.0	b 0.4±0.0
エイコサトリエン酸	0.7±0.0	0.7±0.0
EPA	検出限界以下	0.5±0.1
リグノセリン酸	検出限界以下	0.5±0.0
DHA	検出限界以下	0.5±0.0
飽和脂肪酸	49.2±0.7	49.7±0.2
一価不飽和脂肪酸	41.1±0.7	a 39.1±0.2
多価不飽和脂肪酸	9.7±0.2	11.1±0.2

異符号間で有意差あり $p < 0.05$

平均値±標準誤差

4) 官能評価

表6に嗜好型官能評価の各項目の平均値を表記した。香り(鼻先香における良さ、強さ)お

よび総合評価は、発酵魚粉区の方が有意に高かった。

表6 豚肉の官能評価結果

	対照区		発酵魚粉区	
香り(良さ)	0.34	b	1.00	a
香り(強さ)	-0.14	b	0.91	a
食感	-0.17		-0.46	
多汁性	0.34		0.11	
繊維感	0.11		0.17	
うま味	0.43		0.91	
肉の味	0.46		1.00	
風味の程度	0.37		0.83	
風味の好ましさ	0.51		0.74	
脂っぽさ	-0.57		-0.43	
総合評価	0.37	b	0.94	a

異符号間で有意差あり $p < 0.05$

考察

本研究では、調査項目1)において、配合飼料の9%を発酵魚粉に置き換えると、肝臓では脂肪酸を合成する遺伝子(PPAR γ 等)の発現が、筋肉内では筋萎縮を促進する遺伝子(NF- κ B)の発現がそれぞれ有意に減少した。このことから、発酵魚粉の給与により、肝臓における過剰な脂肪の蓄積を抑えるとともに、筋肉における筋萎縮を阻害することで骨格筋生成を活性化させる可能性が示唆された³⁾⁴⁾。すなわち、遺伝子レベルでは筋萎縮が阻害されることで赤身肉の生産性が向上するとともに、脂肪酸合成を阻害することで余分な脂肪を減らし、ブタの枝肉格付けにおける厚脂(背脂肪が厚すぎるために等級が落ちること)を防ぐことができる可能性が示唆された。

一方で、肥育成績については発酵魚粉の給与は増体や飼料摂取量、飼料効率に影響せず、対照区と遜色のない発育となることが明らかとなったため、今後効率的な豚肉生産に適した飼料設計及び飼養技術を確立するためには、遺伝子発現と形質との関連性等の検討が必要である。

調査項目2)における肉質については、配合飼料の9%を発酵魚粉に置き換えても一般成分や保水力、肉色、脂肪色に影響を及ぼさず、豚肉中のDHA・EPA等の機能性成分を増加させる傾向が

認められた。一方で、発酵魚粉区の方が加熱損失は増加し、脂肪融点は低下した。

Guo ら⁵⁾は、基礎飼料に 8%魚油を添加し給与するとブタは脂肪が黄色く着色し、1 日平均増体量、飼料摂取量等の発育成績が低下したと報告している。本試験においては、配合飼料の 9%を発酵魚粉に代替しても、脂肪は黄色く変色せず、さらに増体や飼料摂取量に影響なく対照区と遜色のない発育を示した。 ω 3 脂肪酸を豊富に含む乾燥魚粉や魚油はたいへん酸化しやすく、酸化すると不快な酸化臭を発する⁶⁾が、アシドロ菌により発酵処理された魚粉は、ブタに対しストレスを与えることのないたんぱく源となった。このことから、発酵魚粉は ω 3 脂肪酸を豊富に含み、且つアシドロ菌には抗酸化能を保持している可能性が示唆されることから、魚のアラという水産未利用資源の飼料としての活用が期待される。

調査項目 2) における肉質について、一般的には加熱損失が少ないと食味が良く、やわらかさ、多汁性、風味の良さの評価が高くなる。また、脂肪酸組成や融点は脂肪の硬軟に関係し、 ω 3 脂肪酸をはじめとする多価不飽和脂肪酸含量が高いと融点が低くなるため軟脂となり、風味が劣化しやすくなるとされる⁶⁾。よって、発酵魚粉区の脂肪融点の低下は発酵魚粉の給与による豚肉中の多価不飽和脂肪酸含量の増加に起因すると考えられる。

しかし、脂肪質の理化学的分類⁶⁾によると、発酵魚粉区における背脂肪内層の脂肪融点 $39.5 \pm 3.7^\circ\text{C}$ 、飽和脂肪酸含量 49.7%および多価不飽和脂肪酸含量 11.1%は、機器で計測した物理的な硬度 (N) において 10 以上を示し、触感評価としては「硬い」に分類される。

さらに、豚肉の嗜好型官能評価において発酵魚粉区は、対照区と比較して食感(柔らかさ)や多汁性、風味等について、食肉としての欠点は見られず、香りの良さ、強さ、および総合評価が高い結果となったことから、加熱損失の増加や融点の低下による食味への影響はないと思料される。

現在、発酵魚粉の生産量は少なく限定的である。飼料の安定生産と安定供給を図るためには、環境保護の観点から駆除した外来魚の活用等も含め、新たな魚のアラの入手先を検討する必要がある。今後、原料の入手と発酵魚粉の生

産拡大が可能になれば、利活用が促進されるとともに、機能性成分が強化された特徴的な豚肉生産に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) Ionelia Taranu, Mihail Gras, Gina Cecilia Pistol, Monica Motiu, Daniela E. Marin, Nicoleta Lefter, Mariana Ropota, Mihaela Habeanu. 2014. ω -3 PUFA Rich Camelina Oil By-Products Improve the Systemic Metabolism and Spleen Cell Functions in Fattening Pigs. PLOS ONE(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110186>)
- 2) Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H, Oyama H, Oda K, Nishino T. 2003. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1 : Purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Applied and environmental Microbiology*, Volume 69, 162-169
- 3) 白木琢磨、2007、核内受容体 PPAR γ の機能と内在性リガンドによる活性調節、生化学 第 79 巻 第 10 号、960-964
- 4) 大野善隆、山田純生、後藤勝正、2009、温熱刺激による NF- κ B シグナルの阻害と骨格筋増量、第 45 回日本理学療法学会抄録集 Vol. 37 Suppl. No. 2
- 5) Qiuping Guo, Fengna Li lifengna@isa.ac.cn, Chaoyue Wen, Lingyu Zhang, Yehui Duan, Wenlong Wang, Ruilin Huang, Yulong Yin. 2019. The changes in growth performance and lipid metabolism of pigs with yellow fat induced by high dietary fish oil. *Canadian Journal of Animal Science*, Volume 100, Number 1
- 6) 入江正和、2023、豚肉品質の科学と向上技術、緑書房、52-58、66-76