

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7669096号  
(P7669096)

(45)発行日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(24)登録日 令和7年4月18日(2025.4.18)

(51)国際特許分類 F I  
C 1 2 P 7/10 (2006.01) C 1 2 P 7/10  
C 1 2 N 9/42 (2006.01) C 1 2 N 9/42

請求項の数 8 (全14頁)

(21)出願番号	特願2021-28962(P2021-28962)	(73)特許権者	000227009 日清オイリオグループ株式会社 東京都中央区新川1丁目2番1号
(22)出願日	令和3年2月25日(2021.2.25)	(72)発明者	栗本 崇志 神奈川県横浜市磯子区新森町1番地 日清オイリオグループ株式会社 横浜磯子事業場内
(65)公開番号	特開2021-137001(P2021-137001 A)	(72)発明者	大西 章博 東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京農業大学内
(43)公開日	令和3年9月16日(2021.9.16)	審査官	松田 芳子
審査請求日	令和5年12月19日(2023.12.19)		
(31)優先権主張番号	特願2020-35558(P2020-35558)		
(32)優先日	令和2年3月3日(2020.3.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高蛋白質菜種ミールの製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

菜種ミールと水を混合し、得られた混合物に糖化処理とアルコール発酵処理を行い、前記糖化処理のために繊維質分解酵素を添加し、前記アルコール発酵処理のために微生物を添加する、高蛋白質菜種ミールの製造方法において、前記繊維質分解酵素としてアクレモニウム・セルロリテカス(Acremonium cellulolyticus)が産生するセルラーゼを用い、前記糖化処理及び/又はアルコール発酵処理を行う前に、菜種ミールと水の混合物を滅菌処理しないことを特徴とする、高蛋白質菜種ミールの製造方法。

【請求項2】

前記アルコール発酵処理において、菜種ミール乾燥重量100gあたりから得られるエタノール産生量が3.5g以上であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記菜種ミール40~60重量部と水60~40重量部を混合することを特徴とする、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】

前記糖化処理とアルコール発酵処理を同一工程で行うことを特徴とする、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項5】

前記同一工程を25~45で行うことを特徴とする、請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】

20

前記糖化处理とアルコール発酵処理を別々の工程で行うことを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記糖化处理を 40 ~ 60 で行い、前記アルコール発酵処理を 20 ~ 40 で行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の製造方法で製造された高蛋白質菜種ミールを含有する飼料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、高蛋白質菜種ミールの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

菜種や大豆等の油糧種子から油分を取り除いた後に残った搾り粕は、蛋白質供給源として主に飼料用に利用されている。しかし、菜種の搾り粕である菜種ミールは、大豆ミールと比べて蛋白質含量が少なく、繊維質を多く含むため家畜に対するエネルギー価が低いという欠点を有している。

【0003】

かかる欠点を解決する方法として、菜種ミール中の蛋白質含量を増加させる方法がいくつか提案されている。例えば、菜種ミールを篩で分別して蛋白質含量の多い画分と少ない画分に分画する方法が開示されているが、低蛋白質画分は飼料価値が低く、利用範囲が限られる（特許文献 1）。また、菜種を脱皮した後に搾油し菜種ミールを回収する方法が開示されているが、粒径の小さい菜種を脱皮する方法は高コストになり現実的でない（非特許文献 1）。さらに、菜種ミールと水を混合し、糖化处理および/又はアルコール発酵処理した物を固液分離、乾燥する、高蛋白質低グルコシノレート菜種ミールの製造方法も開示されているが（特許文献 2）、エタノール産生能などにおいてはさらなる改良が望まれていた。

20

【0004】

【文献】特許第 3970917 号公報

30

【文献】特許第 5601763 号公報

【文献】W. Grala, et al., Ileal apparent protein and amino acid digestibilities and endogenous nitrogen losses in pigs fed soybean and rapeseed products., Journal of Animal science, 76, p. 769 - p. 577 (1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、産業的に価値のあるエタノールを産生するとともに、栄養特性に優れた高蛋白質菜種ミールを同時に製造することのできる高蛋白質菜種ミールを製造方法において、エタノールの産生能を改善することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、糖化处理に使用する繊維質分解酵素として、アクレモニウム（Acremonium）属微生物が産生するセルラーゼを用いることにより、エタノールの産生能を高められることを見出し、本発明を完成させた。

【0007】

すなわち、具体的には、本発明は以下の態様を含み得る。

50

〔 1 〕 菜種ミールと水を混合し、得られた混合物に糖化処理とアルコール発酵処理を行い、前記糖化処理のために繊維質分解酵素を添加し、前記アルコール発酵処理のために微生物を添加する、高蛋白質菜種ミールの製造方法において、前記繊維質分解酵素としてアクレモニウム・セルロリティカス (*Acremonium cellulolyticus*) が産生するセルラーゼを用い、前記糖化処理及び/又はアルコール発酵処理を行う前に、菜種ミールと水の混合物を滅菌処理しないことを特徴とする、高蛋白質菜種ミールの製造方法。

〔 2 〕 前記アルコール発酵処理において、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりから得られるエタノール産生量が 3.5 g 以上であることを特徴とする、〔 1 〕に記載の方法。

〔 3 〕 前記菜種ミール 40 ~ 60 重量部と水 60 ~ 40 重量部を混合することを特徴とする、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の製造方法。

〔 4 〕 前記糖化処理とアルコール発酵処理を同一工程で行うことを特徴とする、〔 1 〕ないし〔 3 〕のいずれか 1 項に記載の製造方法。

〔 5 〕 前記同一工程を 25 ~ 45 で行うことを特徴とする、〔 4 〕に記載の製造方法。

〔 6 〕 前記糖化処理とアルコール発酵処理を別々の工程で行うことを特徴とする、〔 1 〕ないし〔 3 〕のいずれか 1 項に記載の製造方法。

〔 7 〕 前記糖化処理を 40 ~ 60 で行い、前記アルコール発酵処理を 20 ~ 40 で行うことを特徴とする、〔 6 〕に記載の製造方法。

〔 8 〕 前記〔 1 〕 ~ 〔 7 〕のいずれか 1 つに記載の製造方法で製造された高蛋白質菜種ミールを含有する飼料。

#### 【発明の効果】

##### 【 0008 】

本発明を実施することで、エタノールと同時に高蛋白質菜種ミールを製造することができる。これにより、家畜に対するエネルギー価を高くすることができる。さらにエタノールも高い収率で回収することができる。このようにして得られたエタノールはバイオエタノールとして様々な用途に使用される。さらに、糖化処理とアルコール発酵処理を同一行程で行ってもそれぞれ別々に行っても、高温またはアルコールによる静菌効果が働いて、これまで必要であった滅菌処理（オートクレーブ処理等）を省略できるので、従来よりも簡便な方法で高蛋白質菜種ミールを製造することができる。また、本発明で固体発酵法を用いると、廃液を出さずに済むので、環境にやさしい、高蛋白質菜種ミールの製造方法とすることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【 0009 】

【図 1】 菜種ミール乾燥重量 100 g あたりのエタノール産生量（中規模試験）を示す図（7日目ないし13日目）である。

【図 2】 菜種ミールの各成分（タンパク質、総炭水化物、セルロース）とタンパク質/炭水化物比の変化（中規模試験）を示す図（発酵前 ~ 10日目ないし13日目）である。

【図 3】 高濃度である種々の繊維質分解酵素を用いた場合における、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりのエタノール産生量（小規模試験）を示す図である。

【図 4】 糖化処理と発酵処理とを分けた場合における、糖化処理の至適温度（小規模試験）を示す図である。

【図 5】 糖化処理と発酵処理とを分けた場合における、アルコール発酵処理の至適温度（小規模試験）を示す図である。

【図 6】 種々の酵母を用いた場合における、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりのエタノール産生量（小規模試験）を示す図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【 0010 】

（菜種ミール）

菜種ミールとは、菜種を圧搾機により抽出し、続いて、圧搾粕に残された油分を n - ヘキサンなどの有機溶剤を用いて抽出する搾油工程を経た後、有機溶剤を蒸発させてできた菜種粕のことであり、水分を 8 ~ 15 質量%含むものである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 1 】

(水、その他の添加物)

本発明における水とは特に限定されるものではなく、例えば蒸留水、純水、水道水いずれであっても構わない。糖化处理又はアルコール発酵処理前に、菜種ミールと水を混合する場合、菜種ミール40～60重量部と水60～40重量部、好ましくは、菜種ミール45～55重量部と水55～45重量部、さらに好ましくは菜種ミール48～52重量部、水52～48重量部の割合で混合すればよい。このような水分量であれば、固体発酵法になるので好ましい。ここで、「固体発酵法」とは、液体発酵法よりも水分が低く設定され、発酵期間中のみならず発酵終了後も廃液がほとんど排出されない発酵方法をいう。

## 【 0 0 1 2 】

糖化处理およびアルコール発酵処理前の菜種ミールと水の混合物100重量部に対しミネラル、糖、アミノ酸、培地成分、酵素、微生物等の添加物を0～10重量部加えても良い。ミネラルの具体例としては、リン、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、鉄等が挙げられる。糖の具体例としては、ショ糖、ブドウ糖、麦芽糖、オリゴ糖等が挙げられる。アミノ酸の具体例としては、グルタミン酸、リジン等が挙げられ、蛋白質の構成アミノ酸やGABA等非構成アミノ酸、蛋白質の加水分解物でも良い。培地成分の具体例としては、酵母エキス、麦芽エキス、ペプトン等が挙げられる。

糖化处理のための酵素の具体例としては、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、グルコシダーゼ又はこれらの混合物が挙げられる。本発明の糖化处理においては、前記セルラーゼ(繊維質分解酵素)の1種として、アクレモニウム(Acremonium)属微生物が産生するセルラーゼ、特に、アクレモニウム・セルロリティカス(Acremonium cellulolyticus)が産生するセルラーゼF(製品名:明治アクレモニウムセルラーゼF、Meiji Seikaファルマ株式会社製)、アクレモニウム・セルロリティカス(Acremonium cellulolyticus)が産生するセルラーゼKM(製品名:アクレモニウムセルラーゼKM、協和化成株式会社製)が用いられる。本発明においては、アクレモニウム・セルロリティカス(Acremonium cellulolyticus)が産生するセルラーゼを用いることが好ましい。後述するように、これらアクレモニウム(Acremonium)属微生物が産生するセルラーゼを用いることにより、エタノール産生能が改善されることが本発明ではじめて見いだされた。

アルコール発酵処理のための微生物の具体例としては、糸状菌、Saccharomyces cerevisiae、Shizosaccharomyces pombe、Pichia stipitis等の酵母、Zymomonas mobilis等が挙げられる。本発明のアルコール発酵処理には、Saccharomyces cerevisiae等の酵母を用いることが好ましく、特に固体発酵法に用いることができる酵母が好ましい。なお、以下、水もしくは水とこれらの添加物を併せて「水等」と言う。これら添加物のうち水溶性のものは前記水に可溶化して加えても良い。

## 【 0 0 1 3 】

(混合)

本発明における菜種ミールと水等との混合とは、菜種ミールと水等を手動もしくは装置で混ぜ合わせることを言う。混合後の固形分中の水分の分布は均一であるほど糖化处理あるいはアルコール発酵処理の効率が良いので望ましいが、固形分中の水分分布に偏りがあっても糖化あるいはアルコール発酵の目的は達成される。一般的には、菜種ミールと水等を加えた混合物は、糖化处理中又はアルコール発酵中、所望の微生物以外の微生物の繁殖を防ぐため、オートクレーブにて滅菌することが望ましいと考えてきたが、本発明により、糖化处理やアルコール発酵処理の前の滅菌処理が省略できることがわかった。

## 【 0 0 1 4 】

(糖化处理)

本発明における糖化处理とは、菜種ミールに含まれる繊維質(セルロース等)に繊維質分解酵素を、菜種ミールと水等を加えた混合物に対して0.01～1.0重量%添加し、菜種ミールに含まれる繊維質をグルコースへと分解することを指す。糖化处理に使用する繊維質分解酵素は、セルラーゼ単独若しくは、セルラーゼにヘミセルラーゼやグルコシダーゼなどの酵素を組み合わせ使用することができるが、本発明においては、アクレモニ

10

20

30

40

50

ウム (Acremonium) 属微生物が産生するセルラーゼを使用することが必須である。前記セルラーゼの使用量は、菜種ミールと水等を加えた混合物に対して 0.01 ~ 1.0 重量% 添加することが好ましい。また、0.05 ~ 1.0 重量% 添加することがより好ましく、0.1 ~ 1.0 重量% 添加することがさらに好ましい。それ以外に糖化处理に用いる酵素は繊維質を分解できるものであれば良く、市販品であっても、糸状菌を培養した培養液やそれを更に精製したものであっても、糸状菌そのものであっても良い。

#### 【0015】

(アルコール発酵処理)

本発明におけるアルコール発酵処理とは、菜種ミールと水等を加えた混合物又は菜種ミールと水等を加えた混合物の糖化处理した物に微生物を接種し、微生物によりエタノールを産生する工程のことをいう。使用する微生物については、酵母では *Saccharomyces cerevisiae* や、*Shizosaccharomyces pombe* や、*Pichia stipitis* を用いることができ、酵母以外では、アルコール発酵が可能な細菌である *Zymomonas mobilis* など、アルコール発酵が可能な微生物であれば、遺伝子組み換えをされたものも含めて、何でも使用できる。微生物は、スラントや凍結などで保存されているものを使用しても良いが、*S. cerevisiae* を用いる場合は市販のパン酵母を用いても良い。スラントや凍結などで保存されているものを用いる場合は、使用する前に液体培地で前培養し、前培養液等を使用することが望ましい。前培養に用いる液体培地は、1 質量% 酵母エキス、2 質量% ペプトン、3 質量% グルコースのような、酵母又は細菌の培養に適しているものであれば良い。

本発明において、アルコール発酵処理に用いる微生物としては、*Saccharomyces cerevisiae* 等の酵母を用いることが好ましく、特に固体発酵処理に用いることができる酵母が好ましい。また、前記酵母の使用量は、660 nm で測定したときの吸光度 (以下、OD という。) が 0.2 となるように調製した酵母懸濁液を、総反応系 (酵母 (懸濁液) + ミール + 添加水) における酵母の存在量が、 $OD = 0.05 \sim 0.15$  となるように添加することが好ましい。また、 $OD = 0.05 \sim 0.1$  となるように添加することがより好ましい。

#### 【0016】

(同一工程または別々の工程で行う場合)

糖化处理およびアルコール発酵処理は、酵素や微生物を菜種ミールと水等を加えた混合物に加え、糖化と発酵を同一の工程で行う場合 (「併行複発酵」という。)、処理温度は、25 ~ 45 で行うことが好ましく、27 ~ 43 で行うことがより好ましく、30 ~ 40 で行うことがさらに好ましい。また、糖化と発酵を別々の工程で行う場合、糖化温度は、40 ~ 60 で行うことが好ましく、42 ~ 58 で行うことがより好ましく、45 ~ 55 で行うことがさらに好ましい。一方、発酵温度は、20 ~ 40 で行うことが好ましく、22 ~ 38 で行うことがより好ましく、25 ~ 35 で行うことがさらに好ましい。

全体の処理時間は、好ましくは4時間 ~ 336時間であり、より好ましくは24 ~ 72時間であり、さらに好ましくは24 ~ 72時間であり、殊更好ましくは24 ~ 72時間である。

#### 【0017】

(固液分離後、乾燥および蒸留)

菜種ミールと水を混合し糖化处理とアルコール発酵処理を行った物を、必要に応じて固液分離し、乾燥する。この結果得られるものを高蛋白質菜種ミールと言う。乾燥は乾熱乾燥、真空乾燥、凍結乾燥、スプレードライ等、該混合物の糖化处理および/又はアルコール発酵処理した物の水分及びエタノールを蒸発させられるものであればよい。乾燥前に、水蒸気蒸留等によりエタノールを回収すれば、回収したエタノールは工業用又は燃料用として利用することができる。

本発明におけるエタノール産生量は、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりから得られるエタノール産生量が 3.5 g 以上となることが好ましく、3.8 g 以上となることがより好ましく、4.0 g 以上となることがさらに好ましい。

前記糖化处理とアルコール発酵処理を固体発酵法で行うことが好ましい。固体発酵法を

用いると、上記した固液分離は不要となり、廃液が出ないので好ましい。

【0018】

(高蛋白質菜種ミール)

本発明における高蛋白質菜種ミールとは、菜種ミールを糖化处理およびアルコール発酵処理して得た高蛋白質菜種粕処理物であり、乾燥重量換算で44～65質量%の蛋白質を含むものであり、好ましくは47～65量%含むものである。

なお、ここでいう蛋白質含有量は、ケルダール法で求めた全窒素に6.25を乗じた値を指す。

本発明の製造方法により製造された高蛋白質菜種ミールを使用した配合飼料は、雛の発育や健康状態に悪影響を及ぼす懸念はなく、飼料として問題なく使用することができる。

10

【0019】

(飼料)

本発明の製造により得られた高蛋白質菜種ミールは、糖分、蛋白質、アミノ酸、繊維分、ミネラル、油分、抗菌成分等を含んだ飼料原料や飼料添加物と混合して、飼料として使用することができる。

飼料原料や飼料添加物の具体例としては、とうもろこし、ソルガム、コーングルテンフィールド、コーンスターチ、米ぬか、大豆ミール、通常の菜種ミール、フスマ、エンバク、ミルクカゼイン、ホエー、魚粉、各種ビタミン、ビタミンミックス、ミネラルミックス、アミノ酸製剤、炭酸カルシウム、第一リン酸カルシウム、植物性油脂、動物性油脂、食塩等が挙げられる。

20

飼料全量を100質量%とした場合、飼料中の高蛋白質菜種ミールの含量は、0.1～30質量%であることが好ましく、0.5～20質量%であることがより好ましく、0.5～10質量%であることがさらに好ましい。

高蛋白質菜種ミールを含有する飼料は、本発明の製造方法により製造した高蛋白質菜種ミールと、上述した各種飼料原料や飼料添加物とを混合することにより製造することができる。混合は、リボンミキサー、V型混合機、W型混合機等の混合機を用いて行うことができる。

【0020】

以下に本発明をより具体的に説明するために、実施例を示すが本発明はこれに限定されるものではない。

30

【0021】

<実施例1：セルロース糖化による菜種ミールのエタノール固体発酵法(小規模試験)>

菜種ミール(商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ(株)製、以下同じ)(水分含量13.3質量%)50gに、水50gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物100gを用意した。オートクレーブ滅菌をせずに、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の懸濁液を総反応系がOD=0.1となるように添加した。また、表1に示した各種繊維質分解酵素(セルラーゼ)0.05質量%を添加して、容器のふたを閉めた状態で、35℃で1週間固体発酵を行った。なお、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)としては、東京農業大学醸造科学科醸造微生物学研究室より恵与された、焼酎酵母A30(以下、「*Saccharomyces cerevisiae* A30」という)を用いた。

40

1週間後に固体部分を採取し、重量を測定した後、固体部分に含まれているエタノール濃度を測定した。エタノール濃度の測定の仕方は、固体部分に同量の水を添加し、1,000rpmで10分間遠心分離し、その上澄みを採取した。さらに、15,000rpmで10分間遠心分離し、上澄みを採取し、それを4倍に水で希釈して、簡易アルコール分析機器(製品名：アルコメイト、株式会社ウッドソン製)でエタノール濃度を測定した。その結果を表2に示した。

【0022】

50

## 【表 1】

酵素名	由来菌種	製造元
スミチームAC	<i>Aspergillus niger</i>	新日本化学工業 (株)
セルラーゼA	<i>Aspergillus sp.</i>	天野エンザイム (株)
セルラーゼF	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Meiji Seika ファルマ (株)

## 【0023】

## 【表 2】

酵素名	Aエタノール実測値 (%)	B菜種ミール乾燥重量あたりのエタノール濃度 (%)	C菜種ミール乾燥重量 100gあたりから得られるエタノール産生量 (g)
スミチームAC	0	—	—
セルラーゼA	0	—	—
セルラーゼF	1.55 (1.45-1.65)	6.2	4.9

A は発酵終了後の発酵物に同量の純水を加えて得られた浸出液の実測値  
 B=A×4  
 C =B×0.789 (エタノールの比重)

10

20

## 【0024】

表 2 では、繊維質分解酵素としてセルラーゼFを用いた場合にのみ、十分なエタノール濃度を検出した。すなわち、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりから得られるエタノール産生量が 4.9 g となるようにエタノールを産生していた。セルラーゼFは、アクレモニウム (*Acremonium*) 属微生物が産生するエンドグルカナーゼであり、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が高いことがこのような良い結果に影響していると考えられる。なお、他の繊維質分解酵素は、菜種ミールの繊維質をほとんど分解することができなかったと推察する。

30

そこで、繊維質分解酵素をアクレモニウム (*Acremonium*) 属微生物が産生する、セルラーゼFに絞って、次の実験を行った。

## 【0025】

< 実施例 2：中規模試験による菜種ミールのエタノール固体発酵物の評価 >

実施例 1 と同じ菜種ミール 2500 g に、水 2500 g を加えて、菜種ミールと水を加えた混合物 5000 g を用意した。オートクレーブ滅菌をせずに、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* A30) の懸濁液を総反応系が OD=0.1 となるように添加した。また、表 2 に示したセルラーゼFを 0.1 質量% 添加して、容器のふたを閉めた状態で、35℃ で 13 日間固体発酵を行った。なお、容器は 8 リットル容の樹脂ケースを使用した。

中規模試験における菜種ミール乾燥重量 100 g あたりから得られるエタノール産生量を図 1 に、中規模試験における菜種ミールの各成分 (タンパク質、総炭水化物、セルロース) と蛋白質 / 炭水化物比の変化を図 2 に示した。

40

なお、蛋白質はケルダール法、粗脂肪はソックスレー法、水分は常圧加熱乾燥法、粗灰分は直接灰化法を用いて測定した (重量)。炭水化物はそれらの合計値を 100 から引いた値として算出した。

## 【0026】

図 1 で明らかであるように、菜種ミール乾燥重量 100 g あたりから得られるエタノール産生量が、4.3 ~ 4.6 g となるようにエタノールを産生した。この結果は、小規模試験とさほど変わりはないが、従来の方法 (約 2.7 g : 特許文献 2 の表 1 参照) と比較して、約 2 倍量のエタノールが産生したことを意味する。すなわち、セルラーゼFを用いるこ

50

とで、エタノール産生能が改善されることがわかった。

また、図2で明らかであるように、発酵前と発酵後の菜種ミールの蛋白質含量は、44.8%から47.1%に向上した。これは、発酵により菜種ミールの繊維分がエタノールに変換されたことで、相対的に、菜種ミールに含まれる蛋白質含量が向上したことを示している。

一方、発酵前と発酵後の総炭水化物含量は、44.3%から40.0%に低下した。また、発酵前と発酵後のセルロース含量は、11.4%から9.4%に低下した。これは、発酵により菜種ミールの繊維分がエタノールに変換されたことを示している。

また、発酵10日目の蛋白質/炭水化物比を発酵前のものと比較すると、1.01から1.20に向上している。これは、セルラーゼFを用いることで、繊維分が低下した結果、蛋白質/炭水化物比が改善されたことがわかった。

【0027】

<実施例3：高濃度の繊維質分解酵素による菜種ミールのエタノール固体発酵法（小規模試験）>

菜種ミール（商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ（株）製、以下同じ）（水分含量 13.3質量%）10gに、水10gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物20gを用意した。オートクレーブ滅菌をせずに、酵母（*Saccharomyces cerevisiae* A30）の懸濁液を総反応系がOD=0.1となるように添加した。また、表3に示した各種セルラーゼを1.0質量%（実施例1の10倍量）添加して、容器のふたを閉めた状態で、30で3日間固体発酵を行った。

エタノール濃度は実施例1と同様にして測定した。その結果を図3に示した。

【0028】

【表3】

表3：供試繊維質分解酵素一覧		
酵素名	由来菌種	製造元
Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	Sigma aldrich, Inc.
セルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	東京化成工業（株）
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	MP Biomedicals, Inc.
セルラーゼF	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Meiji Seika ファルマ（株）

【0029】

図3によると、種々の繊維質分解酵素を高濃度（1.0質量%）で添加した場合、アクレモニウム（*Acremonium*）属微生物が産生するセルラーゼFでは、菜種ミール乾燥重量100gあたりから得られるエタノール産生量が6.5gとなっているため、エタノールの収率が他のセルラーゼに比べて高くなることがわかった。しかし、繊維質分解酵素濃度を0.1質量%から10倍量の1.0質量%に変えても、エタノールの収率が1.3倍程度（なお、0.1質量%である場合、菜種ミール乾燥重量100gあたりから得られるエタノール産生量は5.2gである。）にしか上がらないため、酵素の使用量は0.1質量%で十分であることが確認された。

【0030】

<実施例4：糖化处理とアルコール発酵処理を別々に行う際の糖化处理の至適温度（小規模試験）>

菜種ミール（商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ（株）製、以下同じ）（水分含量 13.3質量%）10gに、水10gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物20gを用意した。オートクレーブ滅菌をせずに、表4に示した各種繊維質分解酵素0.1質量%を添加して45 または50 で3日間糖化处理を行った。その後、酵母（*Saccharomyces cerevisiae* A30）の懸濁液を総反応系がOD=0.1となるように添加し、容器の

ふたを閉めた状態で、40 で3日間固体発酵を行った。エタノール濃度の測定は、上記実施例1と同じ方法で行った。その結果を図4に示した。

【0031】

【表4】

表4：供試繊維質分解酵素一覧		
酵素名	由来菌種	製造元
セルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	東京化成工業(株)
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	MP Biomedicals, Inc.
セルラーゼF	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Meiji Seika ファルマ(株)
セルラーゼKM	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	協和化成(株)

10

【0032】

図4によると、種々の繊維質分解酵素を0.1質量%で添加した場合、アクレモニウム(*Acremonium*)属微生物が産生するセルラーゼでは、50 で糖化处理を行ったものが、45 で糖化处理を行ったものに比べて、発酵効率が高かった。したがって、アクレモニウム(*Acremonium*)属微生物が産生するセルラーゼを用いる場合は、雑菌等の汚染による酵母の発酵不足を防ぐために、50 で糖化处理を行えることがわかった。

【0033】

<実施例5：糖化处理とアルコール発酵処理を別々に行う際のアルコール発酵の至適温度(小規模試験)>

菜種ミール(商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ(株)製、以下同じ)(水分含量13.3質量%)10gに、水10gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物20gを用意した。実施例5では、糖化处理とアルコール発酵を別々に行う。オートクレーブ滅菌をせずに、表5に示した各種繊維質分解酵素0.1質量%を添加して50 で3日間糖化处理を行った。その後、酵母(*Saccharomyces cerevisiae* A30)の懸濁液を総反応系がOD=0.1となるように添加し、容器のふたを閉めた状態で、30 または40 で3日間固体発酵を行った。エタノール濃度の測定は、上記実施例1と同じ方法で行った。その結果を図5に示した。

20

30

【0034】

【表5】

表5：供試繊維質分解酵素一覧		
酵素名	由来菌種	製造元
セルラーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	東京化成工業(株)
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	MP Biomedicals, Inc.
セルラーゼF	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Meiji Seika ファルマ(株)
セルラーゼKM	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	協和化成(株)

40

【0035】

図5によると、種々の繊維質分解酵素を50 で糖化处理を行った場合、40 よりも30 にアルコール発酵処理の温度を下げることで、エタノールの収率を上げることができた。また、アクレモニウム(*Acremonium*)属微生物が産生するセルラーゼでは、アクレモニウムセルラーゼFよりもセルラーゼKMの方がエタノールの収率が高いことがわかった。しかしながら、糖化处理とアルコール発酵を別々に行う場合は、最大でも菜種ミール乾燥重量100gあたり、4.4gしか、エタノールが産生されないため、併行複発酵で行う場合よりも、エタノールの収率がそれほど高くない。したがって、糖化处理とアルコール発酵を別々に行うよりも、併行複発酵で行う方が望ましいことも確認できた。

50

【 0 0 3 6 】

<実施例 6：種々の酵母による菜種ミールのエタノール固体発酵法（小規模試験）>  
 菜種ミール（商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ（株）製、以下同じ）（水分含量 13.3質量%）10gに、水10gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物20gを用意した。オートクレーブ滅菌をせずに、表5に示した各種酵母の懸濁液を総反応系がOD=0.1となるように添加し、アクレモニウムセルラーゼF0.1質量%を添加して、容器のふたを閉めた状態で、37℃で3日間固体発酵を行った。その後、エタノール濃度の測定は、上記実施例3と同じ方法で行った。その結果を図6に示した。

【 0 0 3 7 】

【表 6】

表 6：供試酵母一覧		
酵母名	種類	入手先
A30	焼酎酵母	東京農業大学保有株
IFO0203	パン酵母	NBRC
協会6号	清酒酵母	日本醸造協会
IFO2000	ビール酵母	NBRC

10

【 0 0 3 8 】

図6によると、種々の酵母を用いた場合であっても、Saccharomyces cerevisiae A30を用いた場合と同様、アクレモニウム（Acremonium）属微生物が産生するセルラーゼを用いたときは、どれも同程度に十分な量のエタノールを産生した。したがって、酵母は任意のものでよく、酵母の種類によって産生するエタノールの産生量は大きく変わらないと思われる。

20

【 0 0 3 9 】

<高蛋白質菜種ミールを配合した配合飼料の給与試験>

・飼料の安全性確認試験

菜種ミール4000gに、水4000gを加えて、菜種ミールと水を加えた混合物8000gとした以外は、実施例2と同様の方法により、発酵菜種ミールを製造した。得られた発酵菜種ミールを、8時間、減圧加熱処理（72℃、-0.1MPa）した。その後、乾燥した発酵菜種ミールを粉砕機（大阪ケミカル株式会社製、装置「Absolute mill ABS-W」）で飼料原料に適したサイズに粉砕し、高蛋白質菜種ミール（タンパク質含量：49.4%（乾物換算））を製造した。

30

得られた高蛋白質菜種ミールを配合した配合飼料について、「飼料の安全性評価基準及び評価手続の制定について（平成20年5月19日付け20消安第597号、農林水産省消費・安全局長通知）」による「鶏ひなの成長試験」に準じて安全性を確認することで、本発明の高蛋白質菜種ミールが、飼料に問題なく使用できることを確認した。

1) 供試雛

表7に示す基本飼料（菜種ミール（商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ（株）製）20.00質量%配合）、を、餌付時に1羽あたり10gを3日分として給与し、4日目以後は1日1羽あたり3.5gを給与して育成した8日齢の産卵鶏（ジュリアライト）雄雛から体重が42~46gの個体を選抜して供試した。

40

なお、使用した基本飼料は、代謝エネルギーや、タンパク質等の一般成分、各種ミネラル、アミノ酸等の含量が、日本飼養標準・家禽（2011年版）における卵用鶏幼雛の養分要求量を充足するように設計をした。

2) 試験区の設定

表7に示す配合飼料1（菜種ミール（商品名：菜種油粕、日清オイリオグループ（株）製）10.00質量%、及び高蛋白質菜種ミール10.00質量%配合）、及び配合飼料2（高蛋白質菜種ミール20.00質量%配合）を給与する2試験区を設定した。

なお、配合飼料1及び2は、代謝エネルギーや、タンパク質等の一般成分、各種ミネラ

50

ル、アミノ酸等の含量が、日本飼養標準・家禽（2011年版）における卵用鶏幼雛の養分要求量を充足するように設計をした。

なお、配合飼料に使用したビタミンB群プレミックス中の各成分の含量は、硝酸チアミン2.0g/kg、リボフラビン10.0g/kg、塩酸ピリドキシン2.0g/kg、ニコチン酸アミド2.0g/kg、D-パントテン酸カルシウム4.35g/kg、塩化コリン138.0g/kg、葉酸1.0g/kg、シアノコバラミン10mg/kgである。

また、ビタミンADEプレミックス中の各成分の含量は、ビタミンA油10000IU/kg、ビタミンD<sub>3</sub>油2000IU/kg、酢酸d1- -トコフェロール20mg/kgである。

また、ミネラルプレミックス中の各成分の含量は、Mn80g/kg、Zn50g/kg、Fe6g/kg、I1g/kg、Cu0.6g/kgである。

【0040】

【表7】

原 料	基本飼料	配合飼料1	配合飼料2
菜種ミール	20.00	10.00	0
高蛋白質菜種ミール	0	10.00	20.00
圧ペントウモロコシ	59.62	59.62	59.62
大豆粕	12.00	12.00	12.00
魚粉(CP65%)	3.00	3.00	3.00
炭酸カルシウム	0.95	0.95	0.95
第一リン酸カルシウム	0.85	0.85	0.85
植物性油脂	3.00	3.00	3.00
食塩	0.30	0.30	0.30
ビタミンB群プレミックス	0.15	0.15	0.15
ビタミンADEプレミックス	0.02	0.02	0.02
ミネラルプレミックス	0.10	0.10	0.10
ビタミンK <sub>3</sub> (5%製剤)	0.01	0.01	0.01
合 計	100.00	100.00	100.00

【0041】

### 3) 試験区の設定及び飼養管理

供試雛を体重の分布がほぼ均等となるように6羽ずつ割り付けた6群に区分し、各区に3反復群ずつ割り付けて6日間飼育した。

供試雛は、電熱給温式の育雛器で群毎に飼育し、各種配合飼料および飲水は不断給与した。また、環境条件による影響を防ぐため、各群の収容位置を毎日移動した。

### 4) 供試雛の増体量、飼料摂取量及び飼料要求率

参考データとして、試験開始時および試験終了時に、供試雛個体別体重を測定し、試験期間中の増体量(g/羽)を算出した。

また、参考データとして、試験期間中の飼料摂取量を群毎に測定し、1羽あたりの飼料摂取量(g/羽)および飼料要求率を算出した。

これらの測定結果(各3群の平均値±標準偏差)を表8に示す。

【0042】

【表8】

試験区	増体量(g/羽)	飼料摂取量(g/羽)	飼料要求率
配合飼料1給与区	59.6±1.7	96.0±1.9	1.61±0.01
配合飼料2給与区	57.7±1.3	95.1±1.4	1.65±0.02

10

20

30

40

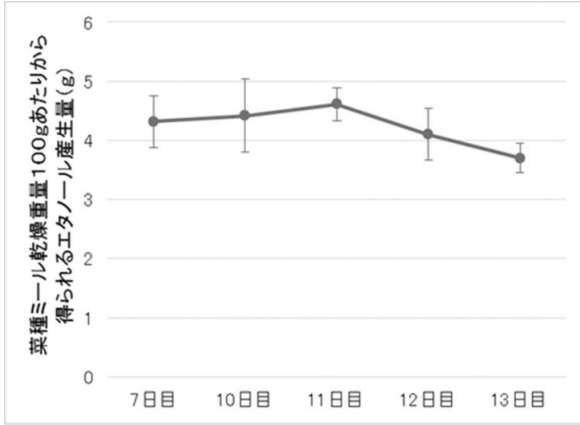
50

【 0 0 4 3 】

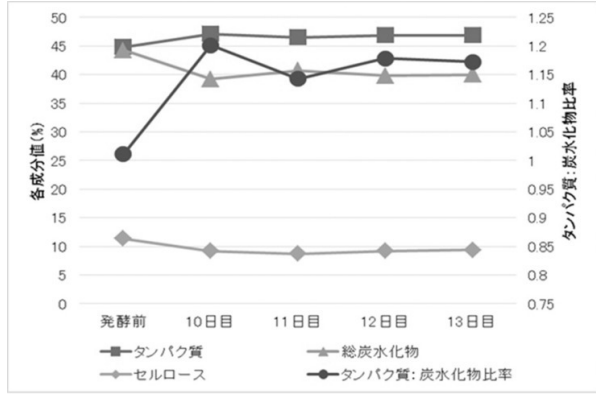
給与試験の結果、両試験区のいずれの個体においても健康状態には異常が観察されなかった。このことから、本発明の高蛋白質菜種ミールを配合した配合飼料は、雛の発育や健康状態に悪影響を及ぼす懸念はなく、飼料として問題なく使用できるということが確認された。

【 図 面 】

【 図 1 】



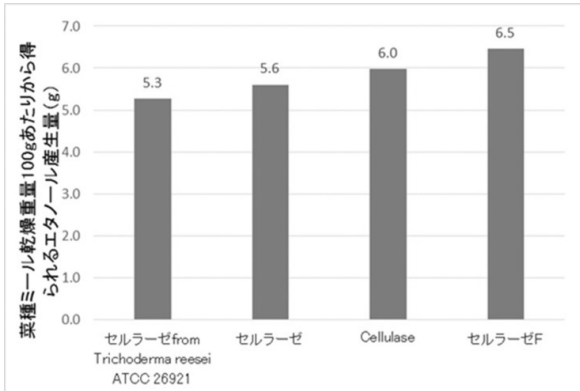
【 図 2 】



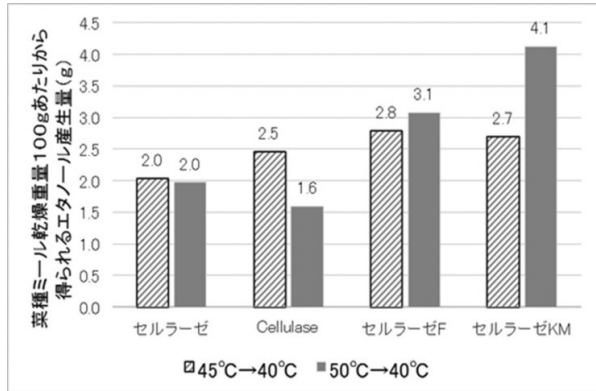
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

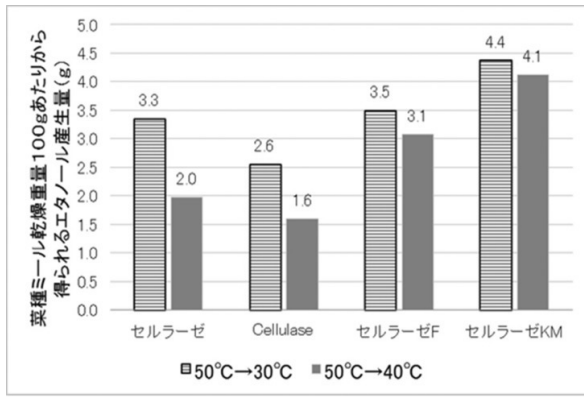


30

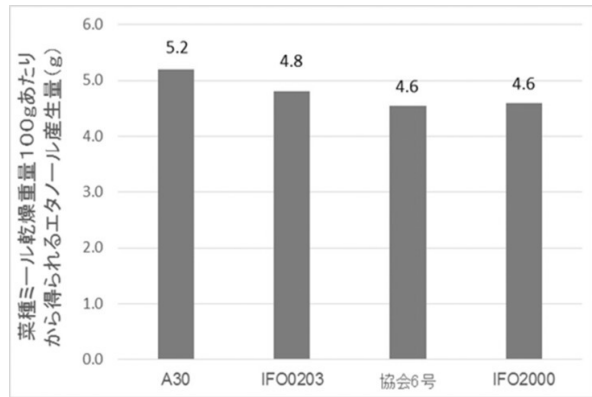
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2010-011760(JP,A)  
特開2014-003915(JP,A)  
特開2008-271927(JP,A)  
'Meijiアクレモニウムセルラーゼ', Meiji Seikaファルマ, 2022, online,[検索日:2024年11月21日], インターネット [https://bio-net.jp/images/Meiji\\_%E3%82%A2%E3%82%AF%E3%83%AC%E3%83%A2%E3%83%8B%E3%82%A6%E3%83%A0%E3%82%BB%E3%83%AB%E3%83%A9%E3%83%BC%E3%82%BC\\_PS.pdf](https://bio-net.jp/images/Meiji_%E3%82%A2%E3%82%AF%E3%83%AC%E3%83%A2%E3%83%8B%E3%82%A6%E3%83%A0%E3%82%BB%E3%83%AB%E3%83%A9%E3%83%BC%E3%82%BC_PS.pdf)  
日本食品科学工学会誌, 2020年, vol.67, p.451-457
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12P 7/00  
C12N 9/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)