

低リン・低エネルギー飼料に対する大腸菌由来フィターゼの添加が ブロイラー雛におけるリンの利用率および栄養価に及ぼす影響

橋元康司¹・飯田真希¹・藤崎浩和¹・青木 健¹・花積三千人¹・
米持千里¹・Yingjun Ru²・三ツ矢展明³

¹ 日本科学飼料協会, 東京都中央区新川 104-0033

² Danisco Animal Nutrition, Singapore Science Park II Singapore 117525

³ ダネスコジャパン, 東京都千代田区霞ヶ関 100-0013

低非フィチンリン (npP)・低代謝エネルギー (AMEn) 飼料に大腸菌由来フィターゼを添加した場合のブロイラー雛におけるリン (P) の利用率および AMEn 値の改善効果について検討した。試験区は、トウモロコシおよび大豆粕を主体とした正の対照飼料 (粗たん白質 (CP); 21.5%, AMEn; 3,000 kcal/kg, カルシウム (Ca); 0.95%, npP; 0.45%), CP は同一で、正の対照飼料より P および Ca をそれぞれ 0.12%, AMEn を 150 kcal/kg 低下させた負の対照飼料 (CP; 21.5%, AMEn; 2,850 kcal/kg, Ca 0.83%, npP 0.33%) および負の対照飼料に大腸菌由来のフィターゼを 500 フィターゼ単位 (FTU) /kg 添加した飼料を給与する計 3 区を設定した。供試雛は、ブロイラー専用種初生雄雛 240 羽を用い、各区に 80 羽 (10 羽×8 群) ずつ割り付けて餌付け時より 3 週間連続給与により飼育した。試験開始時および試験終了時の体重、ならびに毎週の飼料摂取量を調査するとともに、試験終了前 4 日間の排泄物を採取して各供試飼料の AMEn, 乾物, 窒素 (N), P および Ca の排泄率を調査した。さらに、試験終了日に各区の 16 羽ずつから脛骨を採材して灰分含量を測定した。

その結果、負の対照区の発育および飼料要求率は正の対照区より有意に劣ったが、大腸菌由来フィターゼの添加により改善される傾向を示した。また、負の対照区の実測 AMEn は正の対照区に比べて 190 kcal/kg 低かったが、大腸菌由来フィターゼの添加により実測 AMEn は 270 kcal/kg 高まった。さらに、負の対照区の乾物, P および Ca の見かけの蓄積率は正の対照区に比べて有意に低く、脛骨灰分含量も有意に低かったが、大腸菌由来フィターゼの添加により乾物, N, P および Ca の蓄積率は有意に高まり、脛骨灰分含量も有意に増加した。

キーワード: 大腸菌由来フィターゼ, ブロイラー, リン利用率, 代謝エネルギー

緒 言

わが国のブロイラー用飼料ではトウモロコシ, マイロ等の穀類が約 65%, 大豆粕等の植物性油かす類が約 30% 配合されているが (新編飼料原料図鑑編集委員会, 2006), これらの植物性飼料原料に含まれているリン (P) の大部分はブロイラーにおける利用性が極めて低いフィチン P (pP) の形で存在している (農業・生物系特定産業技術研究機構, 2004)。このため、ブロイラーにおける非フィチンリン (npP) 要求量を充足させるためにリン酸カルシウム等の鉱物性 P 源が利用されてきた。しかし、鉱物性 P 源は世界的に減少傾向にあること、また、環境保全の観点からも P 排泄量の低減が求められていることから、植物性飼料原料中の pP

を利用可能な無機 P に変換する飼料用酵素であるフィターゼの利用が進んでいる。わが国では、1996 年に最初のフィターゼ (非遺伝子組換え *Aspergillus niger* 由来) が飼料添加物として指定され、また 1997 年および 2000 年には遺伝子組換え *A. oryzae* および *A. niger* 由来のフィターゼが飼料添加物として指定されている (日本科学飼料協会, 2004)。一方、フィターゼの利用を積極的に進めている EU 諸国では、わが国で飼料添加物として指定されている *A. niger* や *A. oryzae* 等の麹カビ由来のフィターゼの他にも、糸状真菌 (*Trichoderma reesei*) や酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*) 等に由来する微生物由来のフィターゼも飼料添加物として承認されている (EU, 2011)。

これら微生物由来のフィターゼをブロイラー用飼料に 500~1,000 フィターゼ単位 (FTU) /kg 添加することによりほぼ 0.1% の無機 P に相当する効果があることが知られているが (農業・生物系特定産業技術研究機構, 2004), この他にも、フィチン酸と結合したたん白質を加水分解することによるたん白質の利用性の改善や、エネルギー代謝率の改善効果が報告されている (Yi ら, 1996; Sevastian ら, 1997; Yonemochi ら, 2000)。

本研究では、npP および代謝エネルギー (AMEn) がブロイ

2011 年 6 月 1 日受付, 2011 年 8 月 15 日受理

連絡者: 橋元康司

〒104-0033 東京都中央区新川 2-6-16

日本科学飼料協会

Tel: 03-3297-5631

Fax: 03-3297-5633

E-mail: hashimoto@kashikyo.or.jp

ラー雛の要求量より低い飼料に大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来フィターゼを添加した場合の、発育成績、P の利用性ならびに AMEn の改善効果等について検討した。

材料および方法

1. 試験実施基準

本研究は、社団法人日本科学飼料協会動物実験指針 (日本科学飼料協会, 2005) に基づいて実施した。

2. 供試フィターゼ

ダニスコジャパン株式会社より入手した大腸菌由来フィターゼ (Phyzyme™ XP 5000G) を用いた。このフィターゼ製剤は大腸菌 *E. coli* のフィターゼをコードする遺伝子を導入した遺伝子組換え分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (ATCC5233) 由来で、製剤 1g 中に 5,000 FTU を含んでおり (EFSA, 2006), EU において 2007 年 7 月に飼料添加物として承認を受けている (EC 3.1.3.26, EU, 2011) が、現在、わが国では飼料添加物としては指定されていない。なお、1FTU は pH5.5, 37°C でフィチン酸に作用する時、反応初期の 1 分間に 1 μmol のリン酸を遊離させる量に相当する。

3. 試験区の設定および供試飼料

トウモロコシと大豆粕を主体として設計した粗たん白質 (CP) 21.5%, AMEn 3,000 kcal/kg, カルシウム (Ca) 0.95%, npP 0.45% で、アミノ酸等はブロイラー前期の養分要求量 (農業・生物系特定産業技術研究機構, 2004) を充足する正の対照飼料を給与する正の対照区、CP および必須アミノ酸含量は正の対照飼料と同一で、AMEn, Ca および npP を正の対照飼料より低くした負の対照飼料 (AMEn ; 2,850 kcal/kg, npP ; 0.33%, Ca ; 0.83%) を給与する負の対照区および負の対照飼料に大腸菌由来フィターゼを 500 FTU/kg 添加した飼料を給与するフィターゼ添加区の計 3 区を設定した。

正の対照飼料および負の対照飼料の配合割合は表 1 に示したとおりであり、使用するトウモロコシ、マイロ、大豆粕、魚粉、脱脂米ヌカおよびコーングルテンミールについてはあらかじめ必要量を準備し、CP, 総エネルギー (GE), Ca, P および pP (武政, 1992) を分析するとともに、GE の実測値に代謝率 (農業・食品産業技術総合研究機構, 2010) を乗じて AMEn を推定し (表 2), これらに基づいて配合設計を行った。また、すべての飼料に指示物質として酸不溶性灰分 (AIA) を 1% 均一に配合した。

表 1. 供試飼料の配合割合 (%)

原料	正の対照飼料	負の対照飼料
トウモロコシ	41.09	55.905
マイロ	20.00	—
大豆粕	30.40	29.20
魚粉 (CP65%)	2.50	2.50
脱脂米ヌカ	—	8.00
コーングルテンミール	1.00	1.00
大豆油	0.85	—
炭酸カルシウム	1.09	1.37
リン酸二石灰	1.32	0.30
食塩	0.20	0.20
ビタミン B 群 ¹	0.10	0.10
ビタミン ADE ²	0.10	0.10
微量ミネラル ³	0.10	0.10
DL-メチオニン	0.17	0.165
塩酸 L-リジン	0.05	0.03
L-トレオニン	0.03	0.03
酸不溶性灰分	1.00	1.00
合計	100	100
CP (%)	21.5 (21.2)	21.5 (21.4)
ME (kcal/kg)	3,000	2,850
Ca (%)	0.95 (1.05)	0.83 (0.83)
P (%)	0.64 (0.68)	0.68 (0.66)
npP (%)	0.45	0.33
有効 Lys	1.08	1.08
有効 Met	0.45	0.45
有効 Thr	0.72	0.72
Trp	0.27	0.27

¹ 1kg 中 ; 硝酸チアミン 2.0g, リボフラビン 10.0g, 塩酸ピリドキシン 2.0g, ニコチン酸アミド 2.0g, D パントテン酸カルシウム 4.35g, 塩化コリン 138.0g, 葉酸 1.0g

² 1g 中 ; ビタミン A 油 10,000IU, ビタミン D₃ 油 2,000IU, 酢酸 dl-α-トコフェロール 10mg

³ 1kg 中 ; マンガン 80g, 銅 0.6g, 亜鉛 50g, ヨウ素 1g

⁴ () 内は分析値

表 2. 供試原料の分析値等

原料名	CP (%)	GE (kcal/kg)	AMEn (kcal/kg)	Ca (%)	P (%)	pP (%)
トウモロコシ	6.5	3,980	3,383	0.0047	0.218	0.151
マイロ	9.3	3,980	3,311	0.0084	0.222	0.172
大豆粕	47.3	4,260	2,403	0.2750	0.651	0.299
魚粉	65.8	4,540	3,037	5.7000	3.150	0.019
脱脂米ヌカ	18.4	3,770	1,700	0.0622	2.920	2.170
コーングルテンミール	68.8	5,340	3,850	0.0025	0.531	0.396

AMEn = GE × 代謝率

4. 供試雛および管理

ブロイラー専用種初生雄雛を約 400 羽導入したのち、体重の近似した個体を 240 羽選抜し、体重分布がほぼ均等となるように 10 羽ずつ配した 24 群に区分して各試験区に 8 反復群ずつ無作為に割付けた。

供試雛は、群毎に電熱給温式の育雛用バッテリーに収容して 21 日間飼育した。飼料および飲水は自由摂取させた。

5. 調査項目および方法

試験開始時および試験終了時に個体別体重を測定するとともに、毎週の飼料摂取量を群毎に調査して、飼料要求率を算出した。また、試験開始後 17～21 日の 4 日間に排泄された排泄物を群毎に採材して、60℃で 2 日間通風乾燥を行ったのち、水分、窒素 (N) および AIA (農林水産省, 1981), P および Ca (飼料分析基準研究会, 2010) を測定して、AIA を指示物質としたインデックス法により乾物, N, P および Ca の見かけの蓄積率を算出するとともに、ボンブカロリメーターにより排泄物の GE を測定して、AIA を指示物質としたインデックス法により各供試飼料の AMEn を算出した (農林水産省, 1981)。

さらに、試験終了時に各群から平均体重に近い個体を 2 羽 (各区合計 16 羽) 抽出して放血屠殺したのち脛骨を採材し、脱脂処理を行ったのち灰分含量を分析した (AOAC, 1990)。

6. 結果の解析

全てのデータについて一元配置法 (吉田, 1998) により分散分析を行った。さらに、危険率 5% 未満で有意差が認められた項目については Tukey の多重検定 (吉田, 1998) により平均値間の差の有意性を検討した。

結 果

1. 発育成績

増体量、飼料摂取量および飼料要求率を表 3 に示した。

表 3. 増体量、飼料摂取量および飼料要求率

項目	区			Pooled SE	P
	正の対照	負の対照	フィターゼ添加		
増体量 (g/羽)	715 a	656 b	678 ab	30.1	0.003
飼料摂取量 (g/羽)	1006	978	969	19.1	0.276
飼料要求率	1.41 a	1.49 b	1.43 a	0.044	<0.001

平均値 (n=8), ab 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表 4. 乾物, N, P および Ca の見かけの蓄積率 (%)

項目	区			Pooled SE	P
	正の対照	負の対照	フィターゼ添加		
乾物	72.7 b	67.9 c	75.8 a	4.0	<0.001
N	57.6 b	56.1 b	69.1 a	7.1	<0.001
P	48.2 a	25.5 c	42.4 b	11.7	<0.001
Ca	44.6 b	34.5 c	50.7 a	8.1	<0.001

平均値 (n=8), a-c 異符号間に有意差あり (p<0.05)

負の対照区の増体量は正の対照区より有意に低く、飼料要求率も有意に劣った。フィターゼ添加区の増体量は負の対照区と正の対照区とのほぼ中間的な成績を示し、両区との間に有意差は認められなかった。また、飼料要求率は正の対照区と差のない程度まで有意に改善された。各区の育成率はすべて 100% であった。

2. 乾物, N, P および Ca の見かけの蓄積率

乾物, N, P および Ca の見かけの蓄積率を表 4 に示した。

負の対照区の乾物, P および Ca の見かけの蓄積率は正の対照区に比べていずれも有意に劣ったが、N の見かけの蓄積率は差がなかった。フィターゼ添加区の乾物, N, P および Ca の見かけの蓄積率は、いずれも負の対照区より有意に高まり、さらに、乾物, N および Ca の見かけの蓄積率は正の対照区より有意に高かった。

3. 供試飼料の AMEn

各供試飼料の AMEn は表 5 に示したとおりであって、正の対照飼料では 2,830 kcal/kg、負の対照飼料では 2,640 kcal/kg であって、設計値 (3,000 kcal/kg および 2,850 kcal/kg) に比べて 170 kcal/kg および 210 kcal/kg 低かった。一方、フィターゼ添加飼料の AMEn は 2,910 kcal/kg であって、負の対照飼料および正の対照飼料のいずれからも有意に改善された。

4. 脛骨灰分

脛骨灰分含量は表 6 に示したとおりであって、負の対照区の脛骨灰分含量は正の対照区に比べて有意に低かった。

フィターゼ添加区の脛骨灰分含量は負の対照区より有意に増加したが、正の対照区の脛骨灰分含量より有意に低かった。

考 察

本試験において、正の対照飼料と負の対照飼料の AMEn, npP および Ca の差をそれぞれ 150 kcal/kg, 0.12% および 0.12% に設定したが、負の対照飼料では増体量および飼料要求率が正の対

表 5. 供試飼料の AMEn 価 (kcal/kg)

区			Pooled SE	P
正の対照	負の対照	フィターゼ添加		
2830 b	2640 c	2910 a	140	<0.001

平均値 (n=8), a-c 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表 6. 脛骨灰分含量 (%)

区			Pooled SE	P
正の対照	負の対照	フィターゼ添加		
42.7 a	38.6 c	40.6 b	2.1	<0.001

平均値 (n=8), a-c 異符号間に有意差あり (p<0.05)

照飼料に比べて有意に劣り、脛骨灰分含量も有意に低下した。さらに、負の対照飼料では、正の対照飼料に比べて植物性飼料原料由来の pP を多く含んでいることから、P の蓄積率も有意に劣った。

これに対して、負の対照飼料に大腸菌由来フィターゼを 500 FTU/kg 添加することにより、増体量および飼料要求率は正の対照飼料と有意差が認められない程度まで改善された。また、P の蓄積率も有意に改善され、それに伴って脛骨灰分含量も有意に増加しており、大腸菌由来フィターゼの添加により、ブロイラー雛において pP の利用性が明らかに改善されたことが確認された。さらに、Yi ら (1996), Sevastian ら (1997), Yonemochi ら (2000), Santos ら (2008) は、様々な微生物フィターゼの利用により、pP の利用性改善のみならず、たん白質の利用性やエネルギー代謝率も改善されたと報告しているが、本試験においても同様に、N 蓄積率および AMEn の有意な改善効果が認められた。これらのことは、ブロイラー用飼料への大腸菌由来フィターゼの添加は、ブロイラー等の単胃動物では利用することが難しいとされる植物性飼料原料由来の pP の利用性を高めるだけでなく、飼料全体の利用率を高めることで、飼料原料の無駄を削減するとともに、排泄量の減少による環境負荷の低減が可能であることを示している。

なお、微生物フィターゼの効力比、すなわち飼料に無機 P を 0.1% 添加した場合に相当するフィターゼの添加量については多くの研究者が推定を行っているが、増体量を指標とした場合の効力比は、361 FTU/kg (Yonemochi ら, 2000), 570 FTU/kg (Schorner ら, 1993), 785 FTU/kg (Yi ら, 1996), 821 FTU/kg (Denbow ら, 1995), 1,146 FTU/kg (Yi ら, 1996) と、微生物フィターゼの種類、飼料中の pP 含量、供試飼料の組成等により大きな差が認められる。本試験では、大腸菌由来フィターゼの添加水準を 500 FTU/kg のみとしているため、効力比を求めることは出来ないが、発育成績の増加傾向から考えて、本試験条件下における 21 日齢での大腸菌由来フィターゼの無機 P 0.1% に相当する添加量は、500 FTU/kg 前後であるものと推察される。しかし、出荷日齢まで飼育した場合の効力比については更なる検討が必要である

う。

引用文献

- 飼料分析基準研究会. 飼料分析法・解説 2009. 日本科学飼料協会. 東京. 2010.
- 新編飼料原料図鑑編集委員会. 新編飼料原料図鑑. 日本科学飼料協会. 東京. 2006.
- 武政正明; リン酸カリ試薬による酸化クロム定量法の改良, 畜産試験場研究報告 52 (1992).
- 日本科学飼料協会. 社団法人 日本科学飼料協会 科学飼料研究センター動物実験指針. 2005.
- 農業・食品産業技術総合研究機構. 日本標準飼料成分表 (2009 年版). 中央畜産会. 東京. 2010.
- 農業・生物系特定産業技術研究機構. 日本飼養標準・家禽 (2004 年版). 中央畜産会. 東京. 2004.
- 農林水産省. 飼料および飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について. 別記 3, 飼料の品質表示に係る可消化養分総量又は代謝エネルギーの取扱い. 昭和 56 年 7 月 27 日付. 56 畜 B1594 号, 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知 (最終改正: 平成 20 年 3 月 28 日付. 19 消安第 14272 号). 1981.
- 農林水産省消費・安全局衛生管理課監修. 飼料添加物の成分規格等取載書 (第 11 版). 日本科学飼料協会. 東京. 2004.
- 吉田 実. 畜産を中心とする実験計画法. 養賢堂. 東京. 1998.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Method of Analysis 14th ed.. Association Analytical Chemists. Washington D.C. 1990.
- European Union (EU). European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003 (Edition 114, Released March 30, 2011). http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03_annex3a.pdf. Accessed on April 11, 2011.
- Denbow, D.M., V. Ravincdran, E.T. Kornegay, Z. Yi and R.M. Hulet. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. Poultry Science, 74: 1831-1842. 1995.
- Santos, F. R., M. Hrubby, E. E. M. Pierson, J. C. Remus and N. K. Sakomura. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks,

- Journal of Applied Poultry Research. 17 : 191-201. 2008.
- Sevastian, S., S.P. Touchburn, E.R. Chavez and P.C. Lagur. Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. Poultry Science. 76 : 1760-1769. 1997.
- Schorner, .J., P.P. Hoppe and G. Schwarz. Effects of microbial phytase and inorganic phosphate in broiler chickens : performance and mineral retention at various calcium levels. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 69 : 235-244. 1993.
- The European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed and the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safety and efficacy of the enzymatic preparation Phyzyme XP (6-Phytase) for use as feed additive for chickens for fattening. The EFSA Journal (2006) 350, 1-14. [http : //www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/350.pdf](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/350.pdf). Accessed on April 11, 2011.
- Yi, Z., E.T. Kornegay, V. Ravindran and D.M. Denbow. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency value for phytase. Poultry Science. 75 : 240-249. 1996.
- Yonemochi C., H. Takagi, M. Hanazumi, S. Hijikuro, K. Koide, T. Ina and T. Okada. Improvement of Phosphorus Availability by Dietary Supplement of Phytase in Broiler Chicks. Jpn. Poult. Sci. 37 : 154-161. 2000.

The Effect of Supplementation of Phytase Derived from *Escherichia coli* in Low Phosphorus and Low Energy Diets on the Utilization Rate and Nutrient Values in Broiler Chicks

Yasushi Hashimoto¹, Maki Iida¹, Hirokazu Fujisaki¹, Takeshi Aoki¹,
Michito Hanazumi¹, Chisato Yonemochi¹, Yingjun Ru² and Nobuaki Mitsuya³

¹ Japan Scientific Feeds Association, Shinkawa, Chuo-ku, Tokyo, 104-0033

² Danisco Animal Nutrition, Singapore Science Park II Singapore 117525

³ Danisco Japan Ltd., Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-0013

The effects of phytase derived from *Escherichia coli* added to a diet containing low non phytate phosphorus (npP) and low apparent metabolizable energy (AMEn) on the phosphorus (P) utilization and AMEn improvement in broiler chicks were studied. The positive control diet consisted mainly of corn and soybean meal and contained 21.5% crude protein (CP), 3,000 kcal/kg AMEn, 0.95% calcium (Ca), 0.45% npP. The negative control diet contained 21.5% CP, 2,850 kcal/kg AMEn, 0.83% Ca and 0.33% npP. To the negative control diet, 500 units of *E. coli* phytase were added. In total, 240 male broiler chicks were allocated to 3 groups with 80 chicks, and each pen contained 10 chicks and allowed free access to the diets for 0 to 3 weeks. At the start and end of the experiment, body weight was recorded and every week feed intake was recorded. During 4 days before the end of experiment, the excreta were collected for determination of AMEn, dry matter, nitrogen (N), P and Ca. At the end of the experiment, the ash contents of the tibia of 6 chicks from each dietary group were determined. As a result, body weight gain and feed conversion ratio in the negative control group were significantly inferior to the positive control group, but these values were improved by addition of phytase. Although AMEn of the negative control diet contained 190 kcal/kg less than the positive control diet, the AMEn value was elevated to 270 kcal/kg by the addition of *E. coli* phytase. The apparent retention ratios of dry matter, N, P and Ca and tibia ash contents of the negative control diet were significantly inferior to those of the positive control diet, but these values significantly improved by the addition of phytase.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 48 : J69-J74, 2011)

Key words : broilers, *E. coli* phytase, metabolizable energy, phosphorus utilization