

第 9 章

DDGS 製造における抗生物質の使用

はじめに

現在燃料エタノール製造施設が直面している課題の一つは発酵時の細菌汚染の制御である。乳酸を産生する細菌 (*Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Leuconostoc* および *Weissella*) が最も一般的な汚染源である (Bischoff ら、2009 ; Leja と Broda、2009 ; Muthaiyan と Ricke、2010 ; Skinner と Leathers、2004) 。*Bacteroidesforsythus*、*Fusobacteriumnucleatum*、

Propionibacteriumgranulosum や *Clostridium aerotolerans* を含むその他の細菌もエタノール製造に有害な影響を及ぼす (Leja と Broda、2009 ; Skinner と Leathers、2004) 。乳酸菌は (エタノールを製造するための) 酵母と必須成長因子を奪い合い、酵母の増殖を阻害する乳酸や酢酸といった有機酸を産生するため、懸念対象となっている (Skinner と Leathers、2004) 。実際のところ、乳酸は 1~4% といった低濃度であっても酵母の増殖を阻害し、酢酸は 0.3% で発酵を停止させる

(Hynes ら、1997 ; Weigel ら、1996) 。乳酸菌は燃料エタノールの製造工程で用いられる高温、低 pH および高濃度エタノールにも耐えるため、とりわけやっかいである。しかも、乳酸菌は増殖速度が速く、酵母発酵が完了する前に生存細胞数が膨れ上がる (Bischoff ら、2009 ; Hynes ら、1997 ; Leja と Broda、2009) 。細菌汚染を見つけ出し、それを制御することができなければ発酵が停止する可能性があり、そうした状態ではアルコールに変換されないデンプンが残ってしまう。発酵が停止すると発酵槽を停止させる必要が生じ、製造時間のロスとなるだけでなく、汚染源を除去するために装置を洗浄し再度酵母を植菌しなければならない (Bischoff ら、2009 ; Muthaiyan と Ricke、2010) 。

細菌汚染によりエタノール収量は 1~5% 減少し (Narendranath ら、1997) 、DDGS の品質も低下する結果となる。燃料エタノール製造は滅菌状態で行われているわけではなく、純粋培養が用いられているわけでもないの、細菌はこうした工程で繁殖することができる (Bischoff ら、2009) 。汚染源となる細菌はエタノール製造のための原材料 (原材料を加熱処理してもすべての汚染源を殺すことはできない) 、ポンプおよびアジテーターのシール部に用いる水、不適切に保存された逆流分、活性乾燥酵母、植菌用として用いられる酵母スラリーを通じて粉碎工程に侵入する可能性がある (Heist、2009 ; Leja と Broda、2009 ; Mekanjuola ら、1992; Muthaiyan と Ricke、2010 ; Skinner-Nemec ら、2007) 。特に容器および移送ラインのクリーニングが不適切であると、細菌は乾燥粉碎工程で用いられる装置で繁殖し続けることになる。細菌はバイオフィルムを形成し、それを抗生物質やクリーニングにも耐えることができる細菌のコロニーとする (Rich ら、2011; Skinner-Nemec ら、2007) 。プロセスフローの障害も細菌コロニー形成の原因となることがある (Heist、2009) 。

エタノールおよび DDGS 製造における抗生物質の使用

長年エタノール製造業界では、発酵過程での細菌汚染を抑えるために抗生物質が使用されているが (Juranek と Duquette、2007) 、なかでも最も一般的に使用されているのはバージニアマイシンとペニシリンである。抗生物質が使用される場合には、発酵槽に加えられている量は動物用飼料での

使用率と比較すると非常に少ない。例えば発酵槽にバージニアマイシン（Lactrol）を加える場合、使用濃度は通常 0.25～2.0 ppm 程度で、豚用飼料にバージニアマイシン（Stafac）を加える場合は 5.5～110 ppm 程度である。燃料エタノール製造で抗生物質がどの程度まで使用されているかを示すデータは発表されていない。

燃料エタノール製造で抗生物質を用いるにあたり、主要な懸念事項が二つ存在する。一つは細菌に耐性ができる可能性のあることで、そうなる抗生物質を用いた汚染の制御効果は失われてしまう（Muthaiyan と Ricke、2010）。もう一つは動物飼料（例えば、DDGS）に抗生物質が残留し、食用動物の組織に残留する可能性に対する懸念である（Benz、2007）。抗生物質に対する耐性ができるのは抗生物質の不適切な使用の結果と考えられる。これには、効果がみられない場合の抗生物質の過剰投与や効果がみられた場合の過小投与といった状況が含まれる。従って、抗生物質が残留している DDGS を動物が摂取すると、その動物だけでなく、その動物を原材料とする食品を摂取した人間にも、燃料エタノール製造中に使用された抗生物質に対する耐性ができる可能性があるのではないかという懸念が生じている。

エタノール製造における抗生物質使用を監督する機関

米国食品医薬品局（FDA）は、動物飼料に用いられるあらゆる薬品、添加剤および原材料を規制・監督し、最終的に人間が摂取する動物性食品に関連して、飼料汚染源に対する限度値を定める機関である（Benjamin ら 2009 ; de Alwis と Heller、2012）。DDGS 製造で用いられる添加剤もこの監督機関の管轄範囲である（Benjamin、2009）。

1993 年 11 月、エタノールおよび DDGS の製造における発酵過程で 2～6 ppm 濃度のバージニアマイシンを使用することについて、FDA の動物用医薬品センター（Center for Veterinary Medicine（CVM））は異議なしとする「受理書」を発行し、DDGS 中のバージニアマイシン残留濃度が 0.2～0.5 ppm の範囲となる可能性についても異議を唱えなかった。この声明文の根拠となっているのは、エタノール製造で使用するバージニアマイシン濃度に基づいて計算された残留値であり、DDGS および DDGS 配合率が 20%以下の動物飼料の推定残留値である。これに加えて、CVM はバージニアマイシンの残留濃度が 0.5 ppm 未満の DDGS 配合飼料に対して規制措置を取る可能性が極めて低いことも記載している。バージニアマイシンの残留濃度が 0.5 ppm 未満である場合には、当該飼料を給与されたブロイラー、七面鳥、豚、牛、およびこうした動物由来の食品を摂取する人間について心配する必要がない（Benz、2007）。この「受理書」では、その他の抗生物質への言及はない。現在、燃料エタノールプラントで製造されるジスチラーズ併産物に含まれる残留抗生物質に対する FDA による規制やモニタリングはなく、最小限のガイドラインがあるのみである。

過去数年間に DDGS の生産量および動物飼料としての消費量が急増したため、FDA はジスチラーズ・グレインに含まれる残留抗生物質に関して、1) 残留抗生物質のジスチラーズ・グレインから動物組織への移動の可能性、2) 残留抗生物質を含む動物組織を摂取する人間に対する悪影響の可能性、および 3) ジスチラーズ・グレインに抗生物質が残留していた場合の、動物の健康に対する悪影響の可能性という 3 大懸念を明らかにした。エタノール業界における抗生物質使用の普及度、残留検出のレベルおよびジスチラーズ・グレインに含まれる残留物の生物活性の有無については不明である。

このような懸念が存在し、エタノール製造およびジスチラーズ・グレイン製造における抗生物質使用の程度および普及度についての情報が限られていたため、FDAは2007年12月に全国規模の調査を行い、バージニアマイシン、エリスロマイシンおよびタイロシンのみに対して検定された多分析法を採用した（全米穀物飼料協会、2010；Olmstead、2009）。この調査の予備結果が2009年1月に報告された。その時点までに試験された45のサンプル（複数州のエタノールプラントより入手）のうち、24のサンプルで残留抗生物質が検出された。45サンプル中の15サンプルにバージニアマイシンが、12サンプルにエリスロマイシンが、5サンプルにタイロシンが残留していた。FDAはこれまでのところこうした結果を文書として発表しておらず、健康や安全性への言及もなく、規制措置も講じていない。

2012年、FDAはde AlwisとHeller（2010）が記載した分析方法を用いて2回目の調査を実施し、13の残留抗生物質について調べた。分析した全46サンプル中3サンプルでエリスロマイシン、バージニアマイシンおよびペニシリンが検出可能な濃度で残留していた。一つのサンプルのエリスロマイシン濃度は0.58 ppm、もう一つのペニシリン濃度は0.24 ppm、バージニアマイシン濃度は0.15 ppmで、三番目のサンプルのバージニアマイシン濃度は0.16 ppmであった。エリスロマイシンの検出限界濃度は0.5 ppm、ペニシリンは1.0 ppm、バージニアマイシンは0.1 ppmである（Luther、2012）。

FDAが用いたFDA未承認の多分析残留検出法に注目することが肝要である。この方法によりジスチラーズ併産物中の残留抗生物質は0.1 ppm（乾物ベース）まで検出することができる（Hellerとde Alwis、2008）。この方法の精度は定量的範囲0.1~1.0 ppmに対し88~111%である（HellerとHemakanthi de Alwis、2008）。飼料および飼料原材料中の残留抗生物質を計測する方法としてFDAが唯一承認している方法では、バージニアマイシンのみが対象となっている。承認を受けたこの方法は、FDAが最近実施した調査の中でジスチラーズ・グレインのサンプル中に含まれる残留抗生物質の測定に用いた方法（Hellerとde Alwis、2008）とは異なる。承認を受けた方法はSmithKline Beecham社（現在PhibroChem社が所有）によって開発された生物学的検定法で、1993年にFDAが発行した「受理書」に記載された0.5 ppmレベルを大きく下回る0.1 ppmの限度まで残留バージニアマイシンを検出することができる。ジスチラーズ併産物に含まれる残留抗生物質の検出を試みる場合には、適切な分析方法を用いることが何よりも重要である。PhibroChem社は2009年7月に、独立系ラボとPhibroの技術サービスラボが11のエタノールプラントから入手した42の湿状および乾燥ジスチラーズ・グレインおよびDDGSのサンプルを調査した結果を報告した。ここではFDA承認の生物学的検定法が用いられたが、残留バージニアマイシンが検出されたサンプルはなかった。

2009年1月にジョージア州アトランタで開催されたInternational Feed Regulators Meeting（国際飼料規制会議）において、「FDAは1993年11の『受理書』の妥当性についてレビューしており、それに基づき現在の規制環境においてジスチラーズ・グレイン製品に0.5 ppmまでのバージニアマイシンの残留を認める裁量権を行使している」とFDA動物用医薬品センターのスポークスマンは述べた。

エタノール製品に使用可能とされる抗生物質の種類

抗生物質には殺菌性のものと静菌性のものがある。生体外で細菌を殺す抗生物質は殺菌剤で、細菌の増殖速度を遅くしたり増殖を停止させたりする抗生物質は静菌剤である（Merck Sharpe & Dohme、2004）。

バージニアマイシン

バージニアマイシンはマクロライド系の抗生物質で、ファクターM とファクターS の 2 要素から構成される（Vannuffel と Cocito、1996）。ファクターM とファクターS は相乗的に作用しあい、製剤の抗菌活性を増加させる。バージニアマイシンはファクターS とファクターM が関与しない場合には静菌剤であり、これらの 2 要素が関与すると殺菌性の抗生物質となる（Merck Sharpe & Dohme、2004；Hynes ら、1997；Vannuffel と Cocito、1996）。M と S との比率が 2:1 または 1:1 のときに最も活性が強まり、ファクターM は抗菌活性にとっての第 1 制限要素である（Cocito、1979）。これらのファクターが組み合わさると相乗的に作用し、細菌のコロニー形成能力を抑制するが、それぞれを個別に用いた場合には、生存能力を低減させることができる細菌の大半が非常に長い潜伏期間を経たものに限定される。事実、これら 2 要素を組み合わせ用いた場合の活性は個別使用の場合の 10~100 倍になる（Cocito、1979）。

バージニアマイシンは乳酸菌の大半を含むグラム陽性菌の制御に効果的な狭域スペクトル抗生物質である（Cocito ら、1979；Hynes ら、1997；Islam ら、1999）。*Lactobacilli* 種に対するバージニアマイシンの効果は菌株と増殖段階に依存する。現在、グラム陽性菌の中でいくつかの菌属がバージニアマイシンに対する耐性を持ち、*Lactobacilli* 種によるバージニアマイシンの分解も報告されている（Hynes ら、1997）。更に、グラム陽性菌については、マクロライド系抗生物質（例えば、タイロシンとエリスロマイシン）とバージニアマイシンとの間の交差耐性が報告されている（Cocito、1979）。しかしながら、バージニアマイシンを含むストレプトグラミン系抗生物質に対する耐性はその他のタンパク質合成阻害物質と比べて稀である（Vannuffel と Cocito、1996）。

エタノールの発酵では、通常バージニアマイシンは 0.25~2.0 ppm の濃度で発酵槽に加えるが、FDA の「受理書」では最大使用濃度として 2~6 ppm が認められている。バージニアマイシンは乳酸菌の制御に効果を発揮し、*Lactobacilli* 種の存在による最大 11%に達するエタノール収量の低下を効率よく防ぐことができる（Hynes ら、1997）。72 時間の発酵工程での 25~35°C という温度および 3.8~4.8 の pH はバージニアマイシンの安定性に大きな影響を及ぼすことはない（Islam ら、1999）。ところが、蒸留工程（100°C で 30 分）ではバージニアマイシンの活性が大幅に低下し、こうした条件下では本来の活性の 97.4%が消失することが示されている（Hamdy ら 1996）。エタノール業界で用いられているバージニアマイシンの独占的な製造業者である PhibroChem 社によれば、800° F（426.6°C）もの高温になる一般的な乾燥工程では、DDGS ドライヤーの中で残留バージニアマイシンは急速に分解する。以上を考慮すると、DDGS 製造で蒸留および乾燥工程で十分な高温に晒された場合には、残留バージニアマイシンは容易に破壊されると結論付けることができる。

FDA はバージニアマイシンを動物用飼料に用いることを認めている。バージニアマイシンが残留している DDGS を食用動物が摂取しても、動物または人間の健康にはほとんど、または全く悪影響がない（Juraneck と Duquette、2007）。燃料エタノール製造の併産物に含まれるバージニアマイシンが動物や人間に害を及ぼすことを防いでいる要素はいくつか存在する。第 1 に、エタノール蒸留工程中のバージニアマイシンは不活性化する（Hynes ら、1997）。第 2 に、バージニアマイシンは消

化管では吸収されず、バージニアマイシンを摂取させた鶏の腎臓、肝臓、筋肉のいずれでもバージニアマイシンは検出されなかった（Butaye ら、2003 ; Juranek と Duquette、2007）。第 3 に、FDA 承認値を大幅に上回る濃度でバージニアマイシンを動物に摂取させても動物の健康には悪影響を及ぼさない。最後に、DDGS のバージニアマイシン濃度（0.2~0.5 ppm）は現在 FDA が動物飼料に使用する場合に認めている値を著しく下回る（FDA、2010 ; Juranek と Duquette、2007）。法律面および安全面から動物用飼料にバージニアマイシンを用いることを検討する承認プロセスの中で、FDA および海外の監督機関に提出した SmithKline Beecham 社の試験結果を表 1 にまとめた。こうした結果は、バージニアマイシンが法で認められたレベルを超えて動物に摂取された場合でも、動物組織に残留は検出され得ないことを示している（Juranek と Duquette、2007）。

FDA は 2004 年にバージニアマイシンと人間の健康についての定量的リスク評価も実施し、バージニアマイシンは人間の健康にとっての脅威にはならないとの結論に至った。この結論を裏付けるデータの 1 部を表 2 に示した。以上を踏まえ、バージニアマイシンは燃料エタノール業界で用いられる抗生物質として、安全で効果的であるといえることができる。

表 1. 高濃度バージニアマイシン給与が組織残留物に及ぼす動物種別影響¹

動物種	投薬量ppm	休薬期間 日数*	筋肉 ppm	肝臓 ppm	腎臓 ppm	脂肪 ppm
豚	170.5 ppm飼料 (18週間)	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
仔牛	50 mg/kg BW経口摂取	3	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.2
マス**	40 ppm飼料 (12週間)	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
ウサギ**	80 ppm飼料 (4週間)	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
ブロイラー	110 ppm飼料 (4週間)	0	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
産卵鶏 - 鶏卵**	80 ppm飼料 (6ヶ月)	0	卵白 < 0.02	卵黄 < 0.05		

* 休薬期間は屠殺前に飼料からバージニアマイシンを除去する日数。

**マス、ウサギ、産卵鶏にはバージニアマイシンの使用は認められていない。

¹Juranek と Duquette、2007.

表 2. バージニアマイシンを増加して投与した場合および承認使用レベルを超えて投与した場合の健康および毒性に及ぼす動物種別影響¹

動物種	給与量	効果
畜牛	25、75、125 または 625 g/トン 飼料 500 ppm (23 週間)	健康への悪影響および毒性 エビデンスなし
仔牛	80 ppm 飼料中 (4 ヶ月)	悪影響なし
鶏	2,000 ppm 飼料 (24 時間)、22、66 または 110 ppm 飼料中 (7 週間)	毒性エビデンスなし
豚	1,600 mg/kg BW (2 週間)、500 mg/kg BW (3 ヶ月)	悪影響なし

¹Juranek と Duquette、2007

ペニシリン

FDA はペニシリンをエタノールや DDGS の製造に用いることを認めていない。しかしながら、ペニシリンの酵素分解が誘導される可能性が知られているため、燃料エタノール製造では 1.5 mg/L を超える濃度でしばしば添加されることがある (Hynes ら、1997)。この濃度は食用動物に認められた濃度をはるかに下回り、グラム陽性菌、グラム陰性球菌の一部、および *actinomycetes* と *spirochaetes* に対して静菌活性および殺菌活性を有する。ペニシリンの安定性は温度および pH から直接影響を受ける。高温 (>35°C) および 8.0 超と 4.0 未満の pH では、ペニシリンは不安定になる (Kheirrolomoom ら、1999)。Islam ら (1999) の報告によれば、滅菌状態でのモルトグルコース酵母抽出物の発酵では、温度 35°C、pH 3.8、4.0、4.2 および 4.5 の条件下で、ペニシリン G (0.5 unit/mL) は 48 時間以内にほとんどが不活性化した。この研究者らは 25°C では 24 時間であったペニシリンの生物学的半減期が 35°C になると大幅に減少して 4 時間になることも見いだした。こうした研究結果に基づき、エタノールおよび DDGS の製造工程における温度および pH の条件次第でペニシリンは不活性化するものと考えられる。発酵は 48~72 時間にわたって継続し、その時 pH の値は 4 未満に低下し、温度は約 32°C となる。最長 30 分間 78°C の温度で行われる蒸留段階でも、マッシュに残留したペニシリンは不活性化され、300~600°C で回転ドラム式ドライヤーを使用して DDGS を乾燥する段階で、DDGS に残留したペニシリンは完全に不活性化されるものと考えられる (Bothast と Schlicher、2005)。

エリスロマイシン

FDA はエタノールおよび DDGS の製造でのエリスロマイシンの使用を認めていない。エリスロマイシンは 14 員ラクトン環マクロライド系抗生物質で、燃料エタノールの製造に用いられている (Petropoulos ら、2008) が、これは大半のグラム陰性菌およびグラム陽性菌に対しての有効性が高いためである (Chittum と Champney、1995)。マクロライド系抗生物質は静菌性であり、1 リボソームにつき 1 分子の割合でリボソーム 50S サブユニットに結合する (Merck Sharpe & Dohme、2004 ; Petropoulos ら、2008 ; Vannuffel と Cocito ら、1996)。エリスロマイシンの安定性は pH と温度に依存し、低温かつ pH 値 7.0~8.0 の範囲内でより安定する (Brisaert ら、1996)。アルコールに溶解し、水には溶解しないが、アルコール濃度が上昇するとより不安定になる。ペニシリン同様に、エリスロマイシンもエタノールの発酵および蒸留工程中の高温と低 pH によって不活性化されるものと考えられる。エリスロマイシンが体内に取り込まれると、体液中に容易に拡散するが、食物摂取によってエリスロマイシンの吸収が低下する (Merck Sharpe & Dohme、2004)。現在食用動物への使用が認められているが、バージニアマイシンまたはペニシリンとの組み合わせではエリスロマイシンは拮抗作用を呈し、モネンシンと同時に給与するとその排泄が遅れるかあるいは生体内構造変換が変化することにより、モネンシン中毒が引き起こされることがあるので注意が必要である (Basaraba ら、1999 ; Cocito、1979 ; Hof ら、1997)。

タイロシン

FDA はエタノールおよび DDGS の製造ではタイロシンの使用を認めていない。タイロシンはグラム陽性菌やグラム陰性菌の一部にも効果を発揮する 16 員マクロライド系抗生物質で、細菌のタンパク質合成を抑制する (Omura ら、1983 ; Petropoulos ら、2008)。タイロシンはタイロシン A、タイロシン B、タイロシン C およびタイロシン D から成り、これらすべてが抗菌力に貢献している。

割合としてはタイロシン A が圧倒的に多い（通常約 90%で、80%を下回ることはない）。タイロシン液は pH 約 7、温度 60~90°C で安定する。タイロシンの分解速度は主として pH、緩衝剤の種類と濃度、温度、イオン強度に依存する（Paesen ら、1995）。タイロシンは pH が約 3.5 または約 9.0 で最も安定し、これらの範囲外では抗菌作用が大幅に不活性化される。加えて、温度および曝露時間の増加は不活性化につながる可能性がある（Aksenova ら、1984）。従って、タイロシンは燃料エタノール製造工程の pH および高温によって安定性が低下するため、DDGS にタイロシンが残留したとしても不活性化されていると考えられる。現在、家畜類へのタイロシンの給与が認められている。

テトラサイクリン

低 pH (pH < 2) で不安定になるテトラサイクリンは静菌性の抗生物質で、強酸性の条件下での水分損失およびプロトン移動を経てアンヒドロテトラサイクリンとなる（Wang ら、2008）。加えて、pH 値が低く温度が高い場合にはテトラサイクリンの分解が促進され、金属カチオン（Al、Ca、Mg、Fe）と併用するとテトラサイクリンは吸収されにくくなり、ペニシリンとの同時投与では拮抗作用を示す（Merck Sharpe & Dohme、2004）。現在、テトラサイクリンは家畜への給与が認められている。体内ではほとんどの組織および体液に浸透する。これまでに、残留テトラサイクリンの活性レベルを引き下げる目的で、動物用飼料成分の加熱滅菌の効果を調べる試験が行われており、Hassani ら（2008）は低温下で時間をかけた従来型の滅菌処理（121 °C で 20 分間）を施すことが、活性残留分を 1 パーセント未満に低減するための最も効果的な方法であると報告している。

抗生物質代替品

エタノールプラントの中には細菌汚染管理に用いることのできる抗生物質代替品について調査を行っているところがある。最も一般的な 2 種類の代替品は安定化二酸化塩素とホップ由来の酵素である。二酸化塩素は抗菌性を有する緩衝化された亜塩素酸ナトリウムで、酸を産生する細菌によって亜塩素酸ナトリウムが活性化して二酸化塩素となる。亜塩素酸ナトリウムは分解して非毒性塩素とナトリウムイオンになる。ホップ抽出物には抗菌性があり、細菌を抑制するだけでなく、デンプンをエタノールに変換させる酵母の能力を強化する働きのある酵素を含んでいる。こうした製品に関する入手可能な公開科学的データは限られているが、何件かの現場試験の結果は、これらがエタノール製造で使用される発酵槽の細菌汚染を抑制するため費用効果の高い抗生物質代替品となり得る事を示唆している。

DDGS に残留する抗生物質の存在および生物活性についての近年の研究結果

Paulus-Compart（2012）はミネソタ大学において、抗生物質が湿状および乾燥ジスチラーズ・グレイン・ウィズ・ソリュブルに残留しているか否かを見極め、残留している場合には生物活性を有するか否かを明らかにするための試験を先ごろ完了した。この試験の目的は 1) バージニアマイシン、ペニシリン、エリスロマイシン、テトラサイクリンおよびタイロシンの残留について調べるため、

米国内の様々な地域や乾燥粉碎エタノールプラントから湿状および乾燥ジスチラーズ併産物サンプルを入手・評価すること、および 2) *Escherichia coli* (ATCC 8739) および *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) のセンチネル細菌株を用いてサンプルの抗菌活性の程度を見極めることにあった。

材料および方法

独立系栄養コンサルタントが、12 ヶ月間にわたって 3 か月ごとに米国中西部 9 州の 43 の乾式粉碎エタノールプラントから、ウエット・ジスチラーズ・グレインのサンプルとドライド・ジスチラーズ・グレインのサンプルをそれぞれ約 20 点入手し、サンプルはミネソタ大学の畜産学部に送り、すぐに冷凍した (-21° C)。元のサンプルを小分けし、栄養成分の近似分析および de Alwis と Heller (2010) による手順を用いたペニシリン、エリスロマイシン、テトラサイクリンおよびタイロシン残留検出のために SGS North America (Brookings, SD, U.S.A.) へ送った。抽出プロセス中の残留抗生物質損傷を最小限に抑えるために、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた追加的な抽出を行った。PBS 抽出により回収された残留物質は、*Escherichia coli* (ATCC 8739) と *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) のセンチネル細菌株を用いて試験を行い、生物活性を明らかにした。また、濃度 10^4 、 10^5 、 10^6 および 10^7 のセンチネル細菌培養液を抽出抗生物質に加え、37°C で 18~24 時間培養後のサンプルの細菌増殖を調べることによって、残留抗生物質についての細菌生育の閾値を決定した。細菌増殖の疎外は、各培養液から 10mL を血液寒天平板培地に塗布して決定した。37°C で 18~14 時間後、細菌コロニー数を計測し、1mL 当たりのコロニー形成単位 (CFU) として記録した。Phibro EPG Laboratory (ミネソタ州セントポール) が独自に開発し、FDA の承認を受けた生物学的検定法を用いて残留バージニアマイシンの検出を行うため、同研究所には 3 か月ごとに別のサブサンプルを 1 セット送付した。

データは、ランダム効果としてサンプリング期間とサンプル入手先のエタノールプラント、固定効果としてジスチラーズの種類 (湿状または乾燥) 等、ジスチラーズの種類 × エタノールプラント、および相互作用としてジスチラーズの種類 × サンプリング期間をとり、それらについて SAS の Mixed プロシジャを使用して分析した。P 値 ≤ 0.05 の場合に効果に有意差があるとみなし、 $0.05 > P$ 値 ≤ 0.10 の場合に傾向が認められるとした。

結果

159 サンプル (湿状 79、乾燥 80) についてテトラサイクリン、タイロシン、エリスロマイシンおよびペニシリンの残留を分析した。図 1 に示すように、1 サンプルに検出可能な濃度でテトラサイクリンが、別の 1 サンプルに検出可能な濃度でペニシリンが含まれていたが、残留タイロシンが検出されたサンプルは存在しなかった。エリスロマイシンは全サンプル中 16 (10.1%) のサンプルで検出された。FDA の承認を受けた Phibro の生物学的検定法 (図 2) を用いて検出可能な濃度 (> 0.3 ppm) でバージニアマイシンが含まれていたのはわずか 2 サンプルであった。それらのバージニアマイシン濃度は 0.6 $\mu\text{g/g}$ と 0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。

その他の試験対象となった抗生物質の平均残留濃度 (乾物ベース) は乾燥状態のサンプルではいずれも極端に低く、エリスロマイシンは 0.8 $\mu\text{g/g}$ 未満、テトラサイクリンは 1.2 $\mu\text{g/g}$ 未満、ペニシリ

ンは 0.12 $\mu\text{g/g}$ 未満となった。バージニアマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシンおよびペニシリンのサンプル残留濃度分布をそれぞれ図 2、3、4 および 5 に示した。

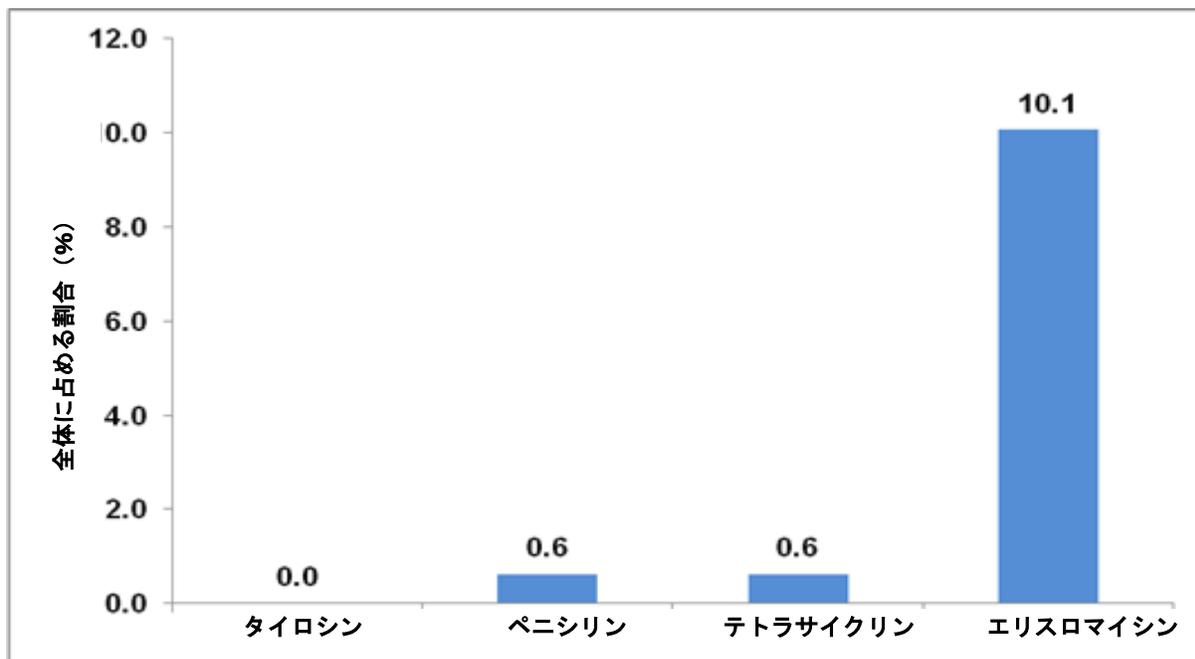


図 1. 残留抗生物質が含まれているサンプルの割合 (%)

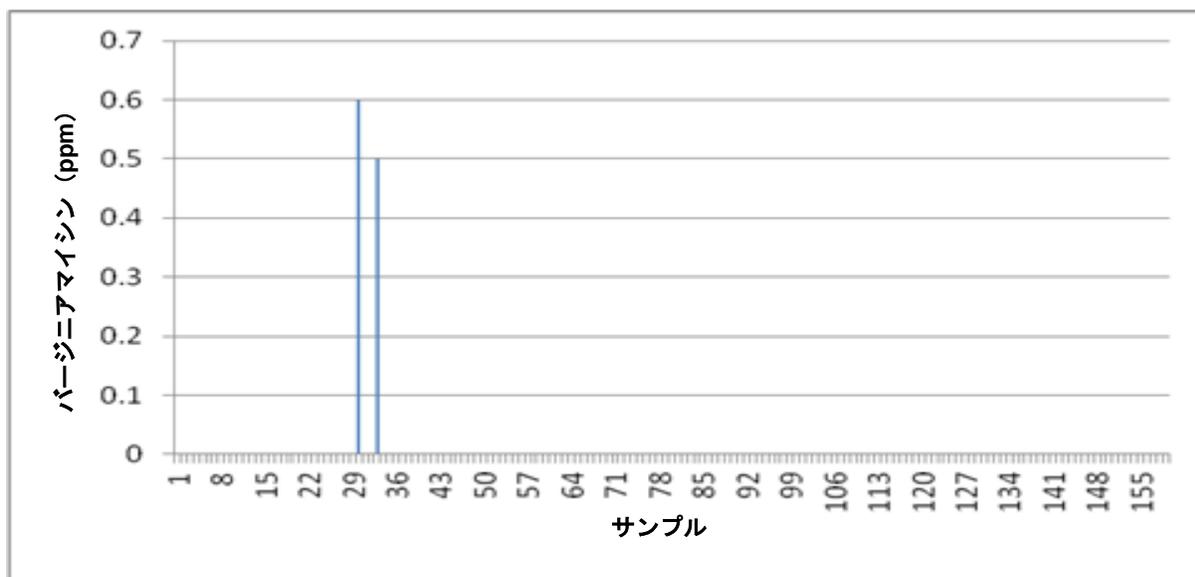


図 2. 湿状および乾燥ジスチラーズ・グレイン・ウィズ・ソリュブルのバージニアマイシン残留濃度 (乾物ベース)

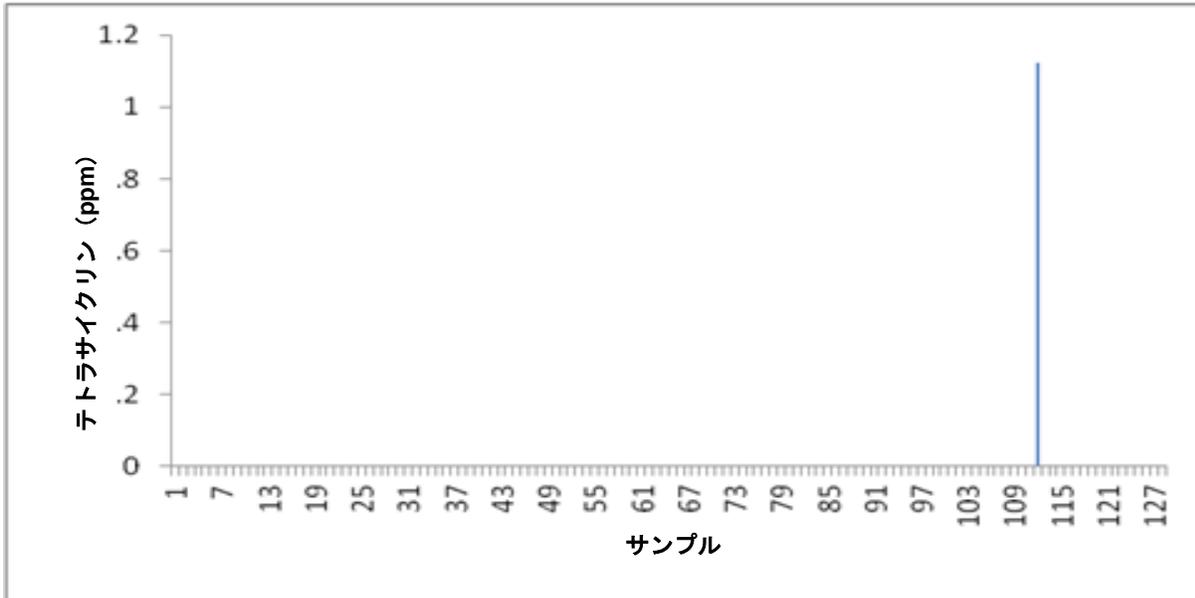


図 3. 湿状および乾燥ジスチラーズ・グレイン・ウィズ・ソリュブルのテトラサイクリン残留濃度 (乾物ベース)

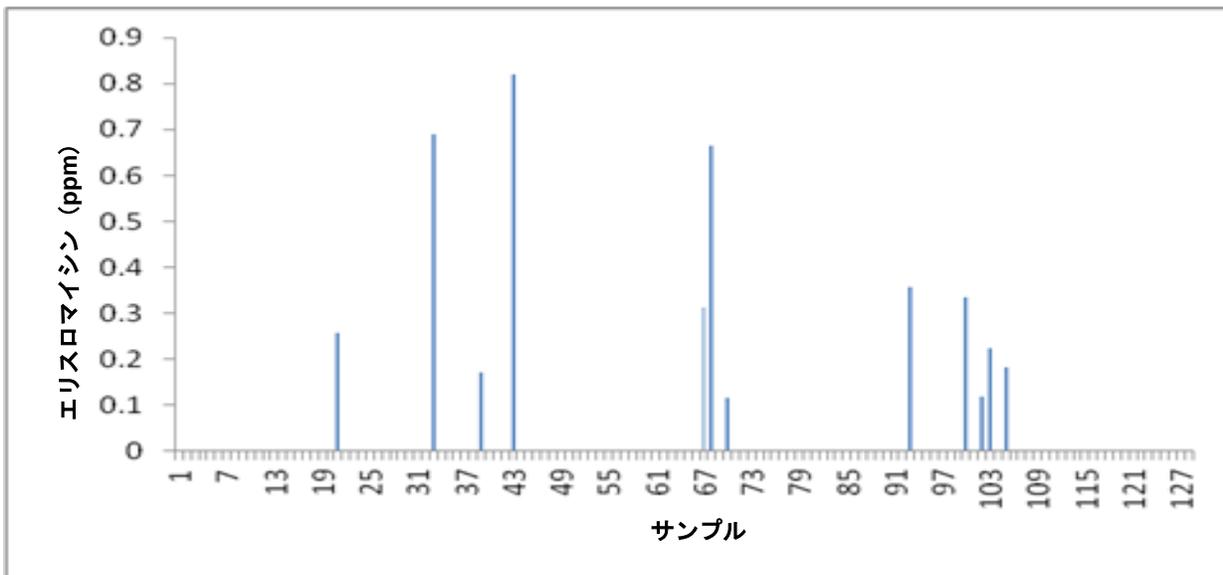


図 4. 湿状および乾燥ジスチラーズ・グレイン・ウィズ・ソリュブルのエリスロマイシン残留濃度 (乾物ベース)

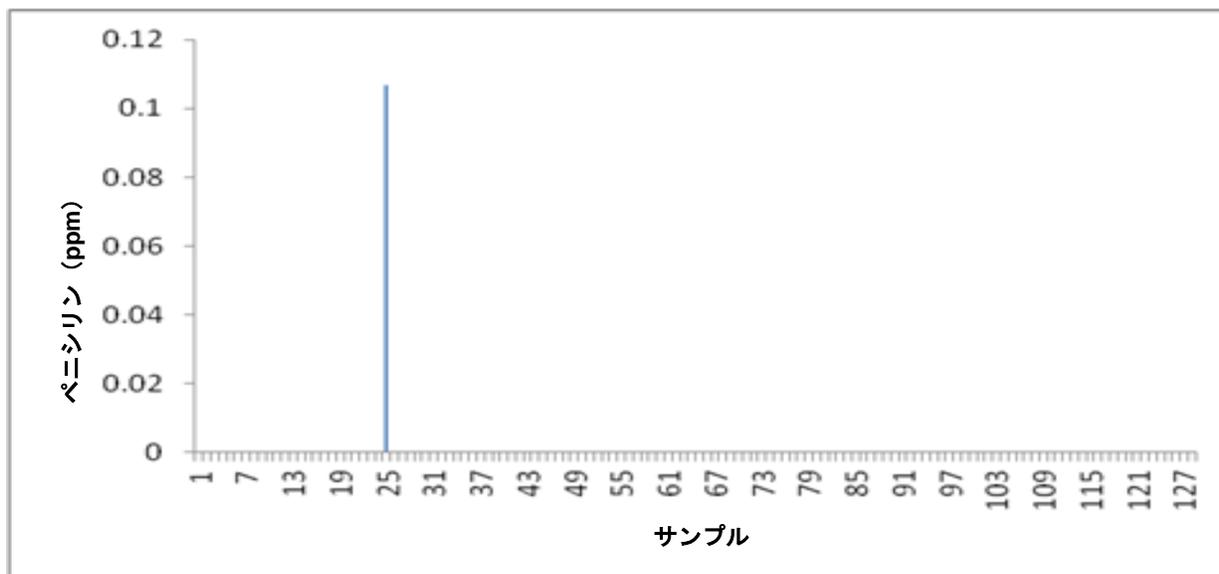


図 5. 湿状および乾燥ジスチラーズ・グレイン・ウィズ・ソリュブルのペニシリン残留濃度（乾物ベース）

わずか 1 サンプルに限り、その抽出物が *E. coli* に対する阻害能力を有することが認められたが、*L. monocytogenes* の増殖に対する阻害能力は認められなかった。この抽出物は濃度が $10^4 \sim 10^5$ の間で *E. coli* (ATCC 8739) を阻害した。ところが、この同じサンプルで検査対象の 5 種類の残留抗生物質はいずれも検出可能濃度を下回っていた。従って、このサンプルで認められた細菌阻害能力の要因は不明である。残留抗生物質の活性を調べるために試験をおこなったこの他のサンプルはすべて抑菌性が認められず、*E. coli* と *L. monocytogenes* (ATCC 19115) のいずれについても平板培地のコロニーは計測不能なまでの数に増加した。本試験の結果から、試験対象の 159 サンプル中 20 サンプル (12.6%) に検出可能な濃度で抗生物質が残留していることが分かる。また、湿状および乾燥ジスチラーズ併産物中で検出された残留濃度は極端なまでに低く、残留タイロシンは検出されなかった。FDA の承認を受けた生物学的検定法を用いた場合、低濃度 ($0.5 \sim 0.6 \mu\text{g/g}$) ながら、試験対象サンプルの 1.3% 未満にバージニアマイシンが検出可能な濃度で含まれていた。ただし、*E. coli* と *L. monocytogenes* の感受性株をセンチネル細菌として用いた場合、残留が細菌阻害能力を有する心配はないものと考えられる。こうした結果はジスチラーズ・グレインに含まれる残留抗生物質がジスチラーズ・グレイン製造工程中に不活性化され、検出可能な残留抗生物質には抗菌活性を試験するために選択したセンチネル細菌に影響を及ぼさないことを示している。

まとめ

乾式粉碎燃料エタノール製造工程中の細菌感染を制御し、エタノール収量を増加させ、ジスチラーズ併産物の栄養成分の品質を向上させるために、抗生物質を用いることが多い。最も研究や理解が進んでいるのが、エタノール製造で最も広く用いられているバージニアマイシンである。これまでに得られたすべての科学的根拠が、エタノール製造にバージニアマイシンを用いても残留や、動物および人間の健康に対するリスクについて心配する必要のないことを示している。低濃度 ($0.5 \sim 0.6 \mu\text{g/g}$) ながらバージニアマイシンが検出可能な濃度で含まれていたのは試験対象サンプルの

1.3%未満であった。1 サンプルのみにペニシリンが、別の 1 サンプルにテトラサイクロンが残留していたが、いずれのサンプルでも残留タイロシンは検出されなかった。湿状および乾燥ジスチラーズ併産物では非常に低い濃度のペニシリン、エリスロマイシンおよびテトラサイクリンが検出された。しかしながら、*E. coli* (ATCC 8739) と *L. monocytogenes* (ATCC 19115) の株をセンチネル細菌として用いた場合の結果から、残留抗生物質が細菌阻害能力を有する心配はないものと考えられる。

References

- Aksenova, I. A., E. M. Ter-Sarkisian, R. D. Soifer, G. Florova, and L. S. Iustratova. 1984. [Effect of the pH of the medium and of temperature on tylosin stability]. *Antibiotiki* 29:179-182.
- Basaraba, R. J., F. W. Oehme, M. W. Vorhies, and G. L. Stokka. 1999. Toxicosis in cattle from concurrent feeding of monensin and dried distiller's grains contaminated with macrolide antibiotics. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 79-86.
- Benjamin, L. 2009. Biofuel co-products opportunities & challenges. U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD, p.2.
- Benz, S. A. 2007. In: J. A. Miller (ed.). Department of Health & Human Services, Rockville, MD, p.2.
- Bischoff, K.M., S. Liu, T.D. Leathers, R.E. Worthington, and J.O. Rich. 2009. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 103:117-122.
- Bothast, R.J., and M.A. Schlicher. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 19-25.
- Brisaert, M., M. Heylen and J. Plaizier-Vercammen. 1996. Investigation on the chemical stability of erythromycin solution using an optimizing system. *Pharm. World Sci.* 18:182-186.
- Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 175-188.
- Butler, M.N. and W. Weber, Jr. 2005. Accelerated transformation and deactivation of erythromycin in superheated water. 1. temperature effects, transformation rates, and the impacts of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 39:2294-2300.
- Chittum, H. S., and W. S. Champney. 1995. Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.* 30: 273-279.
- Cocito, C. 1979. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol. Rev.* 43: 145-192.
- Cocito, C., M. Di Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannuffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:7-13 (Suppl A).
- de Alwis, H., and Heller, D.M., 2010. Multiclass, multiresidue method for the detection of antibiotic residues in distillers grains by liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A* 1217:3076-3084.
- FDA. 2010. Animal drugs @FDA.gov.
- Hamdy, M.K. R.T. Tolew, C.J. Shieh, M.A. Fpannenstiel and R. Wang. 1996. Effects of virginiamycin on fermentation rate by yeast. *Biomass and Bioenergy* 11:1-9.
- Hassani, M., R. Lazaro, C. Perez, S. Condon, and R. Pagan. 2008. Thermostability of oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline at ultrahigh temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 56:2676-2680.
- Heist, P. 2009. Identifying, controlling the most common microbial contaminants Ethanol Producer Magazine. BBI International Media, Grand Forks, ND, p. 2.
- Heller, D.N. and G.K. Hemakanthi de Alwis. 2008. Analysis of antibiotics in distiller's grains using liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/.../UCM182280.pdf (accessed 10/8/09).
- Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol. Rev.* 10: 345-357.

- Hynes, S. H., D. M. Kjarsgaard, K. C. Thomas, and W. M. Ingledew. 1997. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 284-291.
- Islam, M., R. Toledo, and M.K. Hamdy. 1999. Stability of virginiamycin and penicillin during alcoholfermentation. *Biomass and Bioenergy* 17 :369-376.
- Juranek, P. and P. Duquette. 2007. Antibiotic regulatory considerations for distiller's grains. *Distillers Grains Quarterly*, 4th Quarter.
- Kheiriloomoo, A., A. Kazemi-Vaysri, M. Ardjmand, A. Baradar-Khoshfetrat. 1999. The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling. *Process Biochemistry* 35:205-211.
- Leja, K., and M. Broda. 2009. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. *ACTA Scientiarum Polonorum* 8:6.
- Luther, M. 2012. Report of FY 2010 nationwide survey of distillers products for antibiotic residues, Center for Veterinary Medicine, FDA, Silver Springs, MD.
- Makanjuola, D. B., A. Tymon, and D. G. Springham. 1992. Some effects of lactic-acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 350-357.
- Merck Sharp & Dohme Corp. 2004. The Merck Manuals online medical library. In R. S Porter (ed.), Whitehouse Station, NJ.
- Muthaiyan, A., and S. C. Ricke. 2010. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. *Bioresour Technol* 101: 5033-5042.
- Narendranath, N.V., S.H. Hynes, K.C. Thomas, and M.W. Ingledew. 1997. *Applied Environmental Microbiology* 63:4158-4163.
- National Grain and Feed Association. 2010. FDA sampling distillers grains for presence of antibiotic residues. National Grain and Feed Association, Washington D. C., p.2.
- Olmstead, J. 2009. Fueling resistance? Antibiotics in ethanol production. Institute for Agricultural and Trade Policy, Minneapolis, MN, p.8.
- Omura, S., J. Inokoshi, H. Matsubara, and H. Tanaka. 1983. Ribosome-binding activities and antimicrobial activities of tylosin and its related compounds. *J. Antibiotics (Tokyo)* 36:1709-1712.
- Paesen, J., W. Cypers, K. Pauwels, E. Roets, and J. Hoogmartens. 1995. Study of the stability of tylosin a in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 13: 1153-1159.
- Paulus-Compart, D. 2012. Fate and Biological Activity of Antibiotics Used in Fuel Ethanol Production. M.S. Thesis, University of Minnesota.
- Petropoulos, A. D., E. C. Kouvela, G. P. Dinos, and D. L. Kalpaxis. 2008. Stepwise binding of tylosin and erythromycin to escherichia coli ribosomes, characterized by kinetic and footprinting analysis. *J. Biol. Chem.* 283: 4756-4765.
- Rich, J. O., T. D. Leathers, M. S. Nunnally, and K. M. Bischoff. 2011. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology* 102: 1124-1130.
- Skinner, K. A., and T. D. Leathers. 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 401-408.
- Skinner-Nemec, K. A., N. N. Nichols, and T. D. Leathers. 2007. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnol Lett* 29: 379-383.
- Susan, A.T. and K. Isadore. 1994. Stability of erythromycin and some of its esters in methanol and acetonitrile. *Int. J. Pharm.* 115:123-128.
- Vannuffel, P., and C. Cocito. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 51: 20-30 (Suppl. 1).
- Van Egmond, H.J., J.F.M. Nouws, R. Schilt, W.D.M. van Lankveld-Driessen, E.P.M. Streutjens-van Neer, F.G.H. Simons. 2000. Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process. (http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions%20A-H/Egmond%20van%20430-437.pdf)
- Wang, L., H. Yang, C. Zhang, Y. Mo, and X. Lu. 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 619: 54-58.

Weigel, J. C., D. Loy, and L. Kilmer. 1996. Feed co-products of the dry corn milling process. p 16. Iowa State University.