

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：57701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510096

研究課題名（和文）焼酎粕きのご廃培地からの高付加価値有用物質の回収による家畜飼料添加剤の開発

研究課題名（英文）Development of animal feeding additives by recovery of useful materials from mushroom waste media of shochu-lees

研究代表者 山内正仁（YAMAUCHI MASAHITO）

鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授

研究者番号：40239843

研究成果の概要（和文）：各種きのこ栽培に焼酎粕をもちい、それらの廃培地に抗酸化作用、加水分解酵素活性が高いものを見いだした。酵素活性は、標準培地と比較すると焼酎粕を含む培地で高い活性を示す傾向が認められた。廃培地から酵素製剤を得て、それらで飼料となる3種の材料を処理するとNDF含量が低下し飼料の有効性を高める可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Shochu lees was used for cultivating several mushrooms, and high antioxidative activity and hydrolase activities were found in the waste culture media. Enzyme activities were rather higher in shochu media than in standard media. Enzyme preparations obtained from the waste media reduced the NDF content in 3 materials for animal feeding. The results showed the enzyme preparation would make the quality of feedings.

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：子実体、家畜飼料、廃培地、焼酎粕乾燥固形物

1. 研究開始当初の背景

これまでに、焼酎粕を食用きのこ栽培用の栄養材として利用し、高付加価値きのこの安定生産可能な栽培技術を開発した。また、その過程で発生する廃培地（使用済み培地）は発酵TMRの粗飼料、濃厚飼料の代替として活用し、乳用牛による給餌試験を実施してきた。しかし、廃培地では、きのこ菌糸によるおが屑由来の繊維質の分解が弱く、嗜好性は良いものの、消化性、採食性に課題が残された。一方、酪農経営での大きな問題に夏場の暑熱ストレスによる乳量の低下と乳房炎の発生があり、乳房炎乳は廃棄乳として処分され、環境に対し負荷をかける汚染

源となりうるため、乳房炎予防と同時に排乳処理問題を解決する必要がある。これらの酪農現場の抱える課題の解決順位としては、飼料・燃料費高騰で圧迫されている現在の酪農現場の体力では、廃棄乳処理整備に多大な経費をかけることは難しいので、先に乳房炎抑制効果のある抗酸化作用物質の給与を優先し、次に廃棄乳の効果的な利用方法の確立を目指すべきであろう。

2. 研究の目的

本研究では、これらの課題を解決するために、各種きのこ廃培地から、直接、きのこ菌糸由来の有用成分（酵素・タンパク質など）

を抽出し、各種きのこ廃培地のリグニン、セルロース分解酵素活性や抗酸化作用物質の効果を調査する。その結果を踏まえて、酵素活性の高い廃培地や抗酸化作用物質を多く含む廃培地から家畜飼料用添加剤を開発し、その効果を培養細胞等で確認する。また、おが屑の代替として、でん粉粕等の未利用資源を活用した焼酎粕きのこ培地を作製し、培地基材の違いによる家畜の消化性、採食性の向上、飼料利用効率を調査すると同時に、今回開発する飼料添加剤の効果を確認する。

3. 研究の方法

(1)きのこの培養と廃培地について

a. シイタケ培地

焼酎粕培地では、培地の pH を 5.0 前後に調整するために、貝化石（鹿児島県吉田町産；未凝結の貝砂状のアラゴナイト系石灰）を培地乾重量の 4% 添加し、これらの材料をミキサーで 30 分攪拌した。さらに、培地の水分率が 66% 程度になるように水道水を加えて攪拌し、調整した。最後に ST バッグ（菌床袋）に 2.5kg 充填した。一方、標準培地（BL）は広葉樹（ブナ）と栄養材（米糠）の乾燥重量比が 4:1 になるように混合し、水道水を加えて水分率を 66% 程度に調整したものを ST バッグ（菌床袋）に 2.5kg 充填した。なお、標準培地においても焼酎粕培地と同様、貝化石を添加した。充填後、121°C で 3 時間高圧滅菌処理を行った後、供試菌をクリーンルーム内で約 10g 各試験区 8 菌床ずつ接種した。

接種した菌床は、温度 22±2°C、湿度 75±5% の条件の下で 94 日間培養し、作業時のみ蛍光灯を点灯した。培養期間終了後、発生処理を施し、温度 17±2°C、湿度 90% 以上の発生室に菌床を移し、子実体の形成を促した。なお、発生室内では毎日 9 時間蛍光灯を点灯した。また、栽培期間の約 180 日間に 2 回の発生処理（12 時間の浸水発生）を行い、一次発生から三次発生までの計 3 回の収穫を行った。各発生期間は 1 週間とし、その後 2 週間、温度 20±2°C、湿度 75% の発生室で菌床を休ませ、次の発生に備えた。この間、菌床が乾かないように毎日散水を行った。

b. ヤマブシタケ培地及びヒラタケ培地

ヤマブシタケ培地及びヒラタケ培地では、焼酎粕培地（焼酎粕；60%、おが屑；36%、貝化石 4%）、おが屑の代替としてでん粉粕を利用した焼酎粕・でん粉粕培地（焼酎粕；60%、でん粉粕；36%、貝化石 4%）と標準培地（米糠；60%、おが屑；36%、貝化石 4%）を水分率 64% 程度に調製し、850mL の培養瓶に充填した。充填後、シイタケ栽培と同様、121°C で 3 時間滅菌処理を施し、菌を接種後、温度 22±2°C、湿度 75±5% の条件の下でヤマブシタケについては 30 日間、ヒラタケについては 35 日間培養した。その後、ヤマブシタケは、菌掻き操作を行い、温度 13±1°C、湿度

90±5% に制御した発生室にビンを移し、子実体の形成を促した。一方、ヒラタケは、菌掻き・注水（2 時間）後に温度 14±1°C、湿度 90±5% に制御した発生室にビンを移し、子実体の形成を促した。なお、発生室内は 100 ルクス（lux）程度の光を 1 日 8 時間照射することとした。

(2) 廃培地からの酵素製剤の調製

シイタケ菌床の一次発生後の培地（廃培地）とヤマブシタケ栽培に利用した焼酎粕・でん粉粕廃培地各 50g に 5mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 を 500mL 加え、水中において 2 時間攪拌後、遠心およびろ過により上清を得て、それらを凍結乾燥し、きのこ廃培地の酵素製剤として使用した。

(3) 酵素活性測定法

Megazyme 社の AZCL 化多糖（不溶性基質）2mg をマイクロチューブに秤量し、pH5.0 の 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液に酵素製剤を加え、全量 1mL、30°C でインキュベーター中 1 分間 2 回の攪拌で酵素反応を行った。攪拌を停止後ただちに 10,000rpm で遠心し、上清の吸光度 660nm を測定した。活性は分解された基質 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{培地重量 g}$ （現物）で表した。PNP-glycoside の分解活性は最終基質濃度 5mM（Xyloside は 2mM）で全量 0.2ml または 0.4ml で AZCL 基質と同様の加水分解条件で測定した。

(4) 酵素製剤による飼料の分解特性評価

イタリアンライグラス、稲ワラ、イモズルの凍結乾燥標品を酵素製剤（比率は酵素製剤 0.5mg/標品 g）で 25°C、24 時間処理後、各標品の NDF、糖組成を分析した。NDF はまず標品を 0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 を含む 3% ラウリル硫酸ナトリウム液中で 1 時間煮沸し、その後熱水、アセトンで洗浄した残渣を乾燥秤量し、NDF+灰分量で算出した。つぎにそれを 560°C で灰化し、灰分量を差し引いた重量を NDF 量とした。糖組成は 2MTFA、120°C 1 時間分解後、乾固し、ABEE 化後、ホーネンパック C18 カラムを用い 256nm で分析した。全グルコース量は硫酸分解後、グルコース測定キット（GluNeo）で定量した。

(5) 抗酸化活性

DPPH 消去活性能は、各試料から 50% エタノール抽出液を得て、その抽出液 0.6ml に濃度 282.1 μM の DPPH 溶液（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）0.6ml を加え、30°C の保温機に 30 分間静置し、十分に反応させた後、分光光度計を用いて 517nm で測定した。同様にして標準 trolox（50% EtOH：0.6ml+反応液：0.6ml）の吸光度を測定し、trolox 換算量（ $\mu\text{g Trolox/g}$ 試料）として消去能を算出した。

SOD 消去活性能は、各試料から、1% NaCl 溶液で抽出液を得て、それを DOJINDO 社の SOD Assay Kit-WST を用いて測定した。

4. 研究成果

乳房炎抑制効果が高いとされる抗酸化作用(SOD)物質を焼酎粕培地、焼酎粕・でん粉粕培地、標準培地で栽培したシイタケ、ヤマブシタケ子実体で定量した。また、これらのきのこではSOD 活性は高いが培地には低い活性しか認められなかった。

SOD を除く抗酸化酵素や作用について、シイタケ、ヤマブシタケ子実体及びそれらの培地を用いて測定した。カタラーゼ活性は両きのこの場合、子実体では認められるが廃培地には認められなかった。しかし、ヤマブシタケでは標準培地で栽培のものが焼酎粕培地で栽培のものより4~5 倍高いのに対し、シイタケでは焼酎粕培地で栽培したものが標準培地より2 倍の活性を示した。またグルタチオンペルオキシダーゼは子実体、廃培地ともに活性は認められるが弱く、この酵素については他の培地や子実体で強いものが存在するかどうか、さらに種菌、培地材料を変えて検討する必要がある。ラジカル消去活性は DPPH を用いて測定した。シイタケ培地においては、表-1 に示すように培養中に培地の活性は著しく減少するが、二次発生後の培地において著しい活性の上昇が認められ、焼酎粕培地が標準培地より高い活性を示した。

表-1 シイタケ培地(廃培地)のDPPH 消去能

培地	Trolox (mg/g)	
	焼酎粕培地	標準培地
発生前	2	13
一次発生後	14	10
二次発生後	90	65
三次発生後	41	7

糖分解活性については、ヤマブシタケの焼酎粕・でん粉粕廃培地とシイタケの各廃培地における多糖類分解活性を以下に示す。測定した酵素活性は、プロテアーゼ活性(カゼイン)を除いて、いずれも最適 pH は酸性領域

表-2 ヤマブシタケ製剤の酵素活性(1)
(培地は焼酎粕・でん粉粕廃培地)

AZCL-基質	活性 (分解された基質 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ 培地)	
	廃培地	子実体
α -Amylase	0	0
Arabinanase	7.3	0
Cellulase	174.7	0
Chitosanase	6.2	0
Galactanase	42.4	19.8
β 1,3-Glucanase	191	0
β -Mannanase	272.4	4.7
Rhamnogalacturonanase	71.1	17.5
Xylanase(arabinoxylan)	82.5	4.4
Xylanase(oat-xylan)	102.2	-
Casein(pH 5.0)	0	0

表-3 ヤマブシタケ製剤の酵素活性(2)
(培地は焼酎粕・でん粉粕廃培地)

PNP-基質および多糖類	活性 (分解された基質 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 培地)	
	廃培地	子実体
α -L-Arabinosidase	0.049	0
α -L-Fucosidase	0.092	0.035
α -Glucosidase	0.031	0.044
β -Galactosidase	0.136	0
β -Glucosidase	0.421	0.032
β -Glucuronidase	0.045	0.062
α -Mannosidase	0.285	0
β -Mannosidase	0.275	0.066
β -GlcNAcase	0.274	0.242
β -Xylosidase	0.049	0.012
CMCase	0.445	0.181
Pectinase	0.411	0.179

にあり、ここでは最適 pH の微妙な違いは無視して pH5.0 で酵素活性を測定した。

このように相対的にヤマブシタケ廃培地において高い酵素活性が認められたが子実体では低い活性しか認められず、子実体は製剤としては不適であると判断された。子実体でも高い活性を示すものは β -N-acetylglucosaminidase、CMCase、Pectinase などがあげられる(表-2、表-3 参照)。

シイタケ製剤の酵素活性は一次~三次発生後廃培地から調製したのものを使用した。ヤマブシタケと比較すると活性は相対的に低い結果であった。また繰返し使用することで活性が上昇するので三次培地ではかなり活性が上昇していた。廃培地の絶対量を考えると、有望な資源と判断し得る(表-4 参照)。

表-4 シイタケ製剤の酵素活性
(培地は焼酎粕廃培地)

AZCL-基質	活性(分解された基質 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ 培地)		
	一次培地	二次培地	三次培地
α -Amylase	5.3	0	10.9
Arabinanase	5.9	0	9.7
Cellulase	6.2	26	48.2
Chitosanase	0	0	5.4
Galactanase	0	17	41.2
β 1,3-Glucanase	2.9	7.3	14.7
β -Mannanase	7.2	14.4	16.5
Xylanase(arabinoxylan)	2.9	51	66.2
Xylanase(oat-xylan)	4.9	46.9	65.9
Casein(pH 7.0)	1.3	1.9	0

表-5、表-6 にヒラタケ子実体及び収穫後の焼酎粕・でん粉粕廃培地の酵素活性を示す。このようにヒラタケにおいても、ヤマブシタケと同様、廃培地において酵素活性は高く、特に CMCase 活性はヤマブシタケ廃培地以上の活性があり、Pectinase もヤマブシタケ廃培地に匹敵するぐらいの高さであった。

つぎに、シイタケ三次廃培地及びヤマブシ

表-5 ヒラタケの酵素活性 (1)
(培地は焼酎粕・でん粉粕廃培地)

AZCL-基質	活性 (分解された基質 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ 培地)	
	廃培地	子実体
α -Amylase	647.7	774.5
Arabinanase	193.8	6.4
Cellulase	69	6
Galactanase	78.6	6.6
β 1,3-Glucanase	194.5	8.2
β -Mannanase	3.1	-
Xylanase (arabinoxylan)	30.3	6.1
Casein(pH 5.0)	15.7	3.1

表-6 ヒラタケの酵素活性 (2)
(培地は焼酎粕・でん粉粕廃培地)

PNP-基質および多糖類	活性 (分解された基質 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 培地)	
	廃培地	子実体
α -L-Arabinosidase	0.003	0.001
α -Glucosidase	0.135	0.014
β -Galactosidase	0.117	0.009
β -Glucosidase	0.258	0.107
β -Glucuronidase	0.085	0.013
α -Mannosidase	0.06	0
β -Mannosidase	0.094	0.004
β -GlcNAcase	0.072	0.113
CMCase	0.677	0.074
Pectinase	0.358	0.025

タケ廃培地から作製した酵素製剤を家畜飼料のイタリアンライグラス、稲ワラ、イモズルに加え、NDF 量の変化を調査した。表-7、にその結果を示す。飼料から NDF が減少することは家畜の飼料として好ましいことであり、これらの製剤を用いることで飼料の改善効果が期待できる。さらに NDF 中の糖組成を分析した。その結果を表-8 に示した。

イタリアンライグラスにおいて酵素製剤

表-7 家畜飼料のイタリアンライグラス、稲ワラ、イモズルの NDF 量

イタリアンライグラス NDF量 (mg/g)	
未処理	351
シイタケ三次培地 (廃培地)	340
ヤマブシタケ廃培地	337
稲ワラ NDF量 (mg/g)	
未処理	493
シイタケ三次培地 (廃培地)	477
ヤマブシタケ廃培地	440
イモズル NDF量 (mg/g)	
未処理	324
シイタケ三次培地 (廃培地)	313
ヤマブシタケ廃培地	285

表-8 各飼料原料の NDF の糖組成

イタリアンライグラス (mg/g)				
	Gal	Glc	Ara	Xyl
未処理	10.4	339.4	1.3	207.9
シイタケ三次培地 (廃培地)	12.2	398.9	1.6	240.5
ヤマブシタケ廃培地	11.8	384.2	1.0	213.6
稲ワラ (mg/g)				
	Gal	Man	Glc	Xyl
未処理	16.2	1.1	472.1	242.1
シイタケ三次培地 (廃培地)	14.2	1.2	452.9	216.0
ヤマブシタケ廃培地	12.3	1.3	430.4	175.3
イモズル (mg/g)				
	Gal	Man	Glc	Xyl
未処理	9.6	6.5	493.3	113.8
シイタケ三次培地 (廃培地)	12.8	7.4	384.6	101.1
ヤマブシタケ廃培地	7.8	3.8	272.2	87.0

で処理することにより糖含量が増加する結果が得られているが、これはリグニンの分解による NDF の減少で見かけ上、糖が増えていることによると考えられる。他の飼料材料では、シイタケ三次培地 (廃培地) 由来の製剤よりもヤマブシタケ廃培地由来の製剤処理でグルコースもキシロースもかなりの減少を示すことが分かる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 山内正仁、八木史郎、山田真義、山口昭弘、増田純雄、山口隆司；食品廃棄物を培地材料に利用することによるきのこ (ヤマブシタケ) の機能性向上効果、査読有、土木学会環境工学研究論文集、47 巻、pp. 603-608、2010

[学会発表] (計3件)

- ① 野元雄介、福彩乃、山田真義、木原正人、山内正仁；甘藷焼酎粕を利用したシイタケの菌床栽培、土木学会第 65 回年次学術講演会、2010 年 9 月 1 日、北海道大学 (札幌)
- ② 山内正仁、山田真義、八木史郎、大六野洋、松野愛子、小村洋美；きのこ生産による食品廃棄物 (焼酎粕・でん粉粕) の資源循環システムの構築、日本きのこ学会第 14 回大会、2010 年 9 月 16 日、東京大学 (東京)
- ③ Yamaguchi, A., Watanabe, A., Satoyama, T., Watai, M., Togawa, N., Fukushima, T., Yagi, F., Yamada, M., Yamauchi, M.；Effects of medium condition cultivating *Hericium erinaseum* on macrophage activation, International Society for Nutraceuticals & Functional Foods, 2011. 11. 15, ロイトン札幌 (札幌)

市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

山内正仁;日本きのこ学会第 14 回大会、「優秀ポスター発表賞受賞」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内正仁 (YAMAUCHI MASAHIRO)

鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授

研究者番号：40239843

(2) 研究分担者

八木史郎 (YAGI FUMIO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：90112432