

鹿児島高専 (学) 草原大貴 (正) 山田真義 (正) 山内正仁
(学) 原口健一郎 村山陵 鹿児島大学 八木史郎
東洋ソーラー工業 (株) 是枝清上 (株) 鎌田工業 三谷紘明

1. はじめに

鹿児島県は本格焼酎の生産量が全国第一位であり、さつまいもや大麦、黒糖などを原料に年間 15 万 8 千 kl が生産されている。この生産過程で副次的に発生する焼酎粕は有機性の食品産業廃棄物であり、以前はそのほとんどが海洋投棄処分されていた。しかし、2004 年 4 月に「海洋汚染及び海上災害の防止に関する法律（海防法）」が一部改正され、2007 年 4 月から焼酎粕の海洋投棄が原則全面禁止となった。現在、焼酎粕は農地還元されたり、種々の処理プラントにより、焼酎粕に含まれる固形画分を含んだ状態でメタン発酵処理を行い、従来の 2 倍以上のバイオガスを回収後、焼酎工場内に熱源として利用したり、焼酎粕の液画分から得られるメタンガスを固形画分の乾燥熱源として利用し、飼料・肥料として利用されている。このような中で、筆者らは焼酎粕が農作物由来の安心・安全な栄養価の高い食品廃棄物であり、その成分特性が食用きのこに類似することから、培地基材におが屑、培地栄養材に焼酎粕を利用した食用きのこ培地を作製し、食品廃棄物→食品（きのこ）→飼料→家畜→堆肥へとつながる「きのこ生産を起点とした食品廃棄物の多段利用循環システム」を提案した。これまでに甘藷焼酎粕を培地栄養材に活用し一次機能（栄養特性）、二次機能（嗜好性）に加え、三次機能（機能性）を向上させた高付加価値きのこの栽培技術は確立され、一部実用化されている。このため、この高付加価値きのこの通年生産の安定化を図るために、甘藷焼酎粕について発生量が多い麦焼酎粕の培地への利用可能性を検討している。本研究では、栽培期間が短く、栽培が容易なヒラタケを用いて栽培試験を実施した。また、ヒラタケは他の食用きのこと比較して日持ちが悪いため、近年は需要が低迷し、生産量は減少傾向にあるなどの課題がある。そこでヒラタケの日持ち改善及び更なる高付加価値化の方法として、ヒラタケを培養基として乳酸発酵を試み、ヒラタケの機能性向上効果についても検討した。

2. 試験方法

2.1 ヒラタケの栽培及び成分特性

表-1 に各培地の配合条件、瓶詰め重量及び水分率を示す。各培地は 850mL のポリプロピレン製の培養瓶に充填し、121℃で 3 時間高圧滅菌処理後、瓶詰め培地を室温まで冷却し、供試菌（ヒラタケ H67 号：(株) キノックス）を約 10g 接種した。培養は培養室（温度 22±1℃、湿度 75±5%）で 35 日間行い、その後、発生処理（菌掻き、注水）を施し、発生室（温度：14±1℃、湿度 90±5%）にビンを移し、子実体形成を促した。なお培養室内の蛍光灯の点灯は作業時のみ、発生室内の蛍光灯の点灯は 8 時間とした。収穫は子実体の傘の径が 30～40mm 程度で行い、子実体の生重量、栄養材 10g あたりの収量性、発生本数、総栽培日数、菌掻きから収穫までの日数を調査した。つぎに、子実体の一般成分（水分；常圧加熱乾燥法、タンパク質；ケルダール法（窒素・タンパク質換算係数 6.25）、脂質；酸分解法、灰分；直接灰化法、炭水化物；100-（水分+タンパク質+脂質+灰分））を新食品分析法に準じて定量し、成分を比較した。また、アミノ酸含有量についても同様に新食品分析法に準じて測定した。

2.2 乳酸菌による子実体の発酵特性および子実体に含まれるアルギニンのオルニチン変換

収穫したヒラタケ子実体を-80℃で 24 時間冷凍後、凍結乾燥機で凍結乾燥させ、粉碎機（DM-6：佑崎機械製）を用い粉碎した。つぎに粉碎した試料 5.0g を三角フラスコに蒸留水 45mL と加え、オートクレーブ（121℃、20 分）処理を行った。その後、室温まで冷却し、クリーンベンチ内で乳酸菌（*Pediococcus pentosaceus kirishima 1C*）株を 10⁶cfu/mL になるように播種し、35℃で 20 時間培養した。培養後の試料は乳酸菌測定後、再度凍結乾燥を行い、粉碎した。その試料 2.5g を蒸留水 500mL に混合し、ホモジナイザー（HG-200：アズワン製）約 10,000rpm、5min）処理を行った。その後過塩素酸 70%溶液で pH を 2.2 に調整し、遠心分離（4,000rpm、8min）を行い、上清液を 0.45μm のメンブランフィルターでろ過した。最後にそのろ液を高速液体クロマトグラフ LC-VP（島津製作所製）でアミノ酸を測定した。

2.2 乳酸菌による子実体の発酵特性および子実体に含まれるアルギニンのオルニチン変換

収穫したヒラタケ子実体を-80℃で 24 時間冷凍後、凍結乾燥機で凍結乾燥させ、粉碎機（DM-6：佑崎機械製）を用い粉碎した。つぎに粉碎した試料 5.0g を三角フラスコに蒸留水 45mL と加え、オートクレーブ（121℃、20 分）処理を行った。その後、室温まで冷却し、クリーンベンチ内で乳酸菌（*Pediococcus pentosaceus kirishima 1C*）株を 10⁶cfu/mL になるように播種し、35℃で 20 時間培養した。培養後の試料は乳酸菌測定後、再度凍結乾燥を行い、粉碎した。その試料 2.5g を蒸留水 500mL に混合し、ホモジナイザー（HG-200：アズワン製）約 10,000rpm、5min）処理を行った。その後過塩素酸 70%溶液で pH を 2.2 に調整し、遠心分離（4,000rpm、8min）を行い、上清液を 0.45μm のメンブランフィルターでろ過した。最後にそのろ液を高速液体クロマトグラフ LC-VP（島津製作所製）でアミノ酸を測定した。

3. 結果と考察

3.1 各種栄養材によるヒラタケの栽培試験結果及び成分特性

表-2 にヒラタケの栽培試験結果を示す。総栽培日数は、標準培地と比較して麦焼酎粕培地でやや短くなる傾向にあった。収量は麦焼酎粕培地で 107.1±3.5g と最も多く、ついで甘藷焼酎粕培地、標準培地の順であった。栄養材 10g あたりの収量性も同様な傾向を示した。表-3 にヒラタケの一般成分の分析結果を示す。タンパク質量は麦焼酎粕培地で栽培した子実体で 50.4%と最も高く、ついで甘藷焼酎粕培地、標準培地の順であった。ヒラタケ栽培では培地栄養材に高タンパク質の栄養材を使用すると子実体中のタンパク質量が増加することが報告されている。麦焼酎粕乾燥固形物、甘藷焼酎粕乾燥固形物に含まれるタンパク質の割合はそれぞれ 35.2%、23.4%であり、米糠（16.8%）と比較して高タンパク質であることから、これらの培地では、菌糸から生産されるプロテアーゼによりタンパク質がアミノ酸に分解され、その後子実体に過剰に吸収されたため、相対的に炭水化物量が減少した

表-1 培地条件

試験区	培地組成（乾物重量%）				瓶詰め重量（g）	水分率*（%）
	針葉樹おが屑	甘藷焼酎粕乾燥固形物	麦焼酎粕乾燥固形物	米糠　　貝化石		
甘藷焼酎粕培地	46	50		4	600	65.3
麦焼酎粕培地	46		50	4	600	65.8
標準培地（BL）	46			50　　4	600	65.2

*滅菌後の水分率

と考えられる。表-4に各培地で栽培した子実体のアミノ酸分析結果を示す。総アミノ酸量、遊離アミノ酸量についてもタンパクと同様、麦焼酎粕培地、甘藷焼酎粕培地、標準培地の順であった。特に遊離アミノ酸量は麦焼酎粕培地、甘藷焼酎粕培地で標準培地よりそれぞれ 2.1 倍、1.3 倍になった。次に各遊離アミノ酸量を比較すると、各子実体ともアルギニン (Arg)、アラニン (Ala)、グルタミン酸 (Glu) が他のアミノ酸と比較して多く、これらの成分は分析した遊離アミノ酸量の 56.1~60.3%を占めた。またこれらの遊離アミノ酸は培地栄養材に両焼酎粕を利用することで、標準培地で栽培した子実体と比較して顕著に増加した。特に麦焼酎粕乾燥固形物で栽培した子実体には Arg が標準培地の 3.0 倍含まれていた。Arg は、マクロファージの活性化、免疫機能を高める作用があり、食品の機能性向上に関与するものである。Arg の含有量は、麦焼酎粕乾燥固形物で 23.5mg/100g 乾物、甘藷焼酎粕乾燥固形物で 13mg/100g 乾物であることから、きのこの代謝によりその量は大幅に増加したものと考えられる。

表-2 ヒラタケの栽培試験結果

試験区	総栽培 日数	菌搔きから 収穫までの 日数	発生本数*	収量（生）	栄養材10g あたりの 収量性
	(平均値±標準偏差)				
	(日)		(本)	(g/瓶)	(g)
甘藷焼酎粕培地	49.7±1.1	14.7±1.1	57.1±8.8	94.3±4.1	9.1
麦焼酎粕培地	48.8±0.4	13.8±0.4	49.5±7.4	107.1±3.5	10.4
標準培地（BL）	51.3±1.1	15.3±1.1	48.5±11.3	89.6±5.6	8.6

*傘径10mm以上の子実体について調査

表-3 ヒラタケの一般成分分析結果

試験区	タンパク質	脂質	炭水化物	灰分
	(g/100g乾物)			
甘藷焼酎粕培地	40.7	3.1	47.8	8.4
麦焼酎粕培地	50.4	4.2	37.8	7.6
標準培地 (BL)	35.9	3.1	54.5	6.5

の含有量は、麦焼酎粕乾燥固形物で 23.5mg/100g 乾物、甘藷焼酎粕乾燥固形物で 13mg/100g 乾物であることから、きのこの代謝によりその量は大幅に増加したものと考えられる。

表-4 ヒラタケのアミノ酸分析結果

試験区		必須						準必須		非必須								総量
		Leu	Ile	Val	Thr	Phe	Lys	His	Arg	Gly	Ser	Glu	Pro	Tyr	Ala	Asp		
		(mg/100g乾物)																
甘藷焼酎粕培地	総アミノ酸	1,973	1,156	1,491	1,393	1,210	1,749	762	2,246	1,382	1,423	4,420	1,228	990	2,278	2,557	26,256	
	遊離アミノ酸	174	91	134	142	168	133	208	851	133	213	854	91	260	882	55	4,389	
麦焼酎粕培地	総アミノ酸	2,336	1,420	1,882	1,756	1,521	2,202	941	3,067	1,714	1,714	5,412	1,471	1,227	3,034	3,084	32,782	
	遊離アミノ酸	244	135	210	261	303	193	286	1,610	210	294	1,311	160	345	1,370	92	7,022	
標準培地 (BL)	総アミノ酸	1,944	1,186	1,504	1,452	1,255	1,741	632	1,886	1,359	1,398	3,858	1,222	942	2,076	2,571	25,026	
	遊離アミノ酸	141	78	118	148	177	89	92	493	111	169	699	78	213	672	41	3,319	

3.2 乳酸菌による子実体に含まれるアルギニン(Arg)のオルニチン(Orn)変換

麦焼酎粕培地で栽培したヒラタケには特に有用成分の Arg が他培地で栽培したものと比較して多く含まれることが明らかになった。しかし、ヒラタケは日持ちが悪く、市場に安定的に流通させるにはこの問題を解決する必要がある。そこで、本研究では、麦焼酎粕培地で栽培したヒラタケ子実体を基質として乳酸発酵を試み、新奇機能性食品の開発の可能性を調査した。表-5 に乳酸発酵前後の菌数および子実体中の Arg、Orn の分析結果を示す。菌数は 20 時間の培養で 10^6 から 10^9 のオーダーまで増加した。また、20 時間の乳酸発酵を経て Arg は速やかに消失し、100%、Orn に変換された。これは *P. pentosaceus kirishima 1C* 由来のアルギニン・デヒドロゲナーゼ酵素活性が非常に高いことを意味している。特に、本乳酸菌を利用することで麦焼酎粕培地で栽培した子実体から 2,000mg/100g 乾物の高濃度のオルニチンを産生することができた。オルニチンには肝臓疾患患者の血中アンモニア濃度を顕著に減少させる報告がされている。さらに肝機能低下による脳疾患の改善、肌質改善効果等が報告されている。一般的にオルニチンはブレヴィバクテリウム属、バチルス属、アースロバクター属等の微生物によって産生される。しかしこれらの微生物は安全性が確認されていないため、産生するオルニチンは高純度に精製することが求められている。一方、本試験で用いた乳酸菌は子実体 (きのこ) のみを基質とし、乳酸菌培養にてアルギニンをオルニチンに変換することから、精製することなくきのこ栄養成分も同時に摂取することが可能である。以上のことから、ヒラタケを乳酸発酵させることで日持ちを改善させると同時に新たな機能性食品の開発が可能と考えられる。

表-5 乳酸発酵前後の菌数及び子実体中の Arg、Orn 量

試験区		Arg	Orn	菌数
		(mg/100g乾物)		(cfu/mL)
麦焼酎粕培地	子実体発酵前	1610.1	1189.7	3.4×10^6
	子実体発酵後	0	2051.5	1.5×10^9
標準培地	子実体発酵前	492.9	216.5	3.4×10^6
	子実体発酵後	0	608.4	2.2×10^9

これは *P. pentosaceus kirishima 1C* 由来のアルギニン・デヒドロゲナーゼ酵素活性が非常に高いことを意味している。特に、本乳酸菌を利用することで麦焼酎粕培地で栽培した子実体から 2,000mg/100g 乾物の高濃度のオルニチンを産生することができた。オルニチンには肝臓疾患患者の血中アンモニア濃度を顕著に減少させる報告がされている。さらに肝機能低下による脳疾患の改善、肌質改善効果等が報告されている。一般的にオルニチンはブレヴィバクテリウム属、バチルス属、アースロバクター属等の微生物によって産生される。しかしこれらの微生物は安全性が確認されていないため、産生するオルニチンは高純度に精製することが求められている。一方、本試験で用いた乳酸菌は子実体 (きのこ) のみを基質とし、乳酸菌培養にてアルギニンをオルニチンに変換することから、精製することなくきのこ栄養成分も同時に摂取することが可能である。以上のことから、ヒラタケを乳酸発酵させることで日持ちを改善させると同時に新たな機能性食品の開発が可能と考えられる。

4. おわりに

本研究では、以下のような知見を得た。

- 1) ヒラタケを麦焼酎粕培地で栽培すると、甘藷焼酎粕培地、標準培地よりも、高タンパク質で遊離アミノ酸を多く含む高付加価値きのこを栽培できることが明らかになった。また、異なる培地栄養材を利用することで、子実体成分を大きく変化させることが可能になることが明らかになった。
- 2) 乳酸菌 (*P. pentosaceus kirishima 1C*) を利用し、ヒラタケ子実体を発酵させると、子実体中のアルギニンをオルニチンに 100%変換すると同時に、子実体から 2,000mg/100g 乾物のオルニチンを得ることが可能なことがわかった。このことから、ヒラタケを乳酸発酵させることで日持ちを改善させると同時に新たなヒラタケを用いた機能性食品の開発が可能と考えられる。