

N-1 きのか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

○石神 宏朗¹・八木 史郎²・村山 陵¹・山田 真義¹・

山口 隆司³・山内 正仁^{1*}

¹鹿児島工業高等専門学校 都市環境デザイン工学科 (〒899-5193 鹿児島県霧島市隼人町真考 1460-1)

²鹿児島大学農学部 生物資源科学科 (〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24)

³長岡技術科学大学大学院 環境・建設系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

*E-Mail:yamauti@kagoshima-ct.ac.jp

1. はじめに

これまでに、焼酎粕を食用きのか栽培用の栄養材として利用し、高付加価値きのか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、きのか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課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泄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ため、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ると考えられる。

そこで、本研究では、各種きのか廃培地から、直接、きのか菌糸由来の有用成分（酵素・タンパク質など）を抽出し、各種きのか廃培地のリグニン、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か培地を作製し、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。

2. 研究方法

(1) 培養方法

a) シイタケ

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が 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℃ 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℃、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℃、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℃、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

ヤマブシタケ培地では、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℃で3時間滅菌処理を施し,菌を接種後,温度22±2℃,湿度75±5%の条件の下で30日間培養した。その後菌掻き操作を行い,温度13±1℃,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)廃培地から酵素製剤の調整

シイタケ菌床の一〜三次発生後の培地(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,氷中において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℃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,上清を波長660nmで測定した。活性は分解された基質 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{培地重量g}$ (新鮮時)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,イモヅ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℃,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℃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℃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℃で30分間静置し,十分に反応させた後,分光光度計を用いて波長517nmで測定した。同様にして標準物質trolox(50%EtOH:0.6ml+反応液:0.6ml)の吸光度を測定し,trolox換算量(mgTrolox/g 試料)として消去能を算出した。

3.試験結果

シイタケ培地のラジカル消去活性をDPPHを用いて測定した。表-1にシイタケ培地のDPPH消去能を示す。表-1から,シイタケの培地においては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,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。表-2,表-3にヤマブシタケ製剤の酵素活性を,表-4にシイタケ製剤の酵素活性をそれぞれ示す。

表-2 ヤマブシタケ製剤の酵素活性(1)

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-2,表-3から,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などあげられる。

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ものを使用した。表-2,表-4より,シイタケの培地はヤマブシタケに比較すると活性は相対的に低い結果であった。しかし,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-3 ヤマブシタケ製剤の酵素活性

PNP-基質および多糖類	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 -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

表-4 シイタケ製剤の酵素活性

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

つぎに、シイタケ三次廃培地及びヤマブシ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、イモヅルに加え、NDF 量の変化を調査した。表-5 にその結果を示す。

表-5 家畜飼料のイタリアンライグラス、稲ワラ、イモヅルの NDF 量

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

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-6 に示した。

表-6 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	213.6
	稲ワラ(mg/g)			
	Gal	Glc	Ara	Xyl
未処理	16.2	1.1	427.1	242.1
シイタケ三次培地(廃培地)	14.2	1.2	452.9	216
ヤマブシタケ廃培地	12.3	1.3	430.4	175.3
	イモヅル(mg/g)			
	Gal	Glc	Ara	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

イタリアンライグラスにおいて酵素製剤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。

4. おわりに

以上の結果から、各種きのこの廃培地には抗酸化作用、加水分解酵素活性が高いことが明らかになった。また、抗酸化作用において、焼酎粕を含む培地は、標準培地よりも高い活性を示した。酵素活性については、ヤマブシタケとシイタケのどちらの廃培地でも高い活性を示した。さらに、それぞれの廃培地から作製した酵素製剤を用いて家畜飼料となる3種の材料を処理すると NDF 含量が低下したことから、飼料の改善に対しても有効な効果が期待できると考えられる。