

平成 21～22 年度戦略的基盤技術高度化支援事業  
「固体発酵による食品廃棄物の高度再生利用に関する研究開発」

研究開発成果等報告書

平成 23 年 9 月

委託者 北海道産業経済局

委託先 株式会社新聞協同運輸

## 目 次

第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	4
1-3 成果概要	4
1-4 当該研究開発の連絡窓口	5
第2章 本論	6
2-1 バイオ・プロセスの開発	6
(1) 発酵乾燥プロセスの開発	6
① 固体発酵プロセスの開発と液状食品廃棄物の処理	6
② 発酵スタータの開発	6
(2) 非滅菌静菌技術の開発	6
(3) 微生物叢モニタリング技術の開発	8
① multi-FISH 法の検討	8
② 実際のサンプルでのモニタリング	8
2-2 発酵乾燥装置の試作開発	9
(1) 固体発酵乾燥装置の開発	9
① 密閉型固体発酵装置の開発	9
② 大型固体発酵装置の開発	10
(2) 製造原価の算定	10
2-3 再生品利用製品の開発と効果の検証	11
(1) 機能性食品の開発とヒト介入試験	11
(2) 機能性飼料の開発と豚飼育試験	14
(3) 機能性堆肥の開発と評価	16
最終章 全体総括	21

# 第1章 研究開発の概要

## 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

### (1) 研究開発の背景

豆腐製造業におけるオカラのように処理コストのかかっている食品廃棄物を再生利用したいというニーズは非常に強い。これまでの焼却や埋立てによる処理では温室効果ガスの増大を招いており、温暖化対策のうえでも食品廃棄物等の再生利用が求められている。食品廃棄物をはじめとするバイオマスの特徴は腐敗しやすいことだが、逆を言えば微生物が繁殖しやすいということであり、適切な発酵処理によって目的とする微生物の繁殖を促進することで様々な機能を付与することが可能な材料といえる。このような食品由来のバイオマス賦存量は年間約 2,000 万トンに達し、下水汚泥(約 7,500 万トン(現物量))のような廃棄物系のバイオマスを含めると、その処理に膨大な費用負担と環境負荷を抱えているのが現状である。

一方で廃棄物は何らかの価値がついた時点で商品に変わるため流通が不安定であり、そのことが廃棄物処理の事業化を困難にしている。このような状況に打ち勝っていくためには、再生処理に要するコストを最小化するとともに、より付加価値の高い再生品としての機能が求められる。

### (2) 研究の目的及び目標

本研究ではオカラに代表される食品廃棄物を、その品質に応じて食品や飼料、堆肥、燃料として再生処理し、全量を使い切ること(ゼロ・エミッション)を目的に、発酵熱を利用した固体発酵乾燥法の開発や食品廃棄物腐敗防止技術(非滅菌静菌技術)、食品廃棄物の品質判定(微生物叢モニタリング技術)、安価な発酵乾燥装置の開発、再生品利用製品の開発とその効果の検証を目標とする(図 1 参照)。

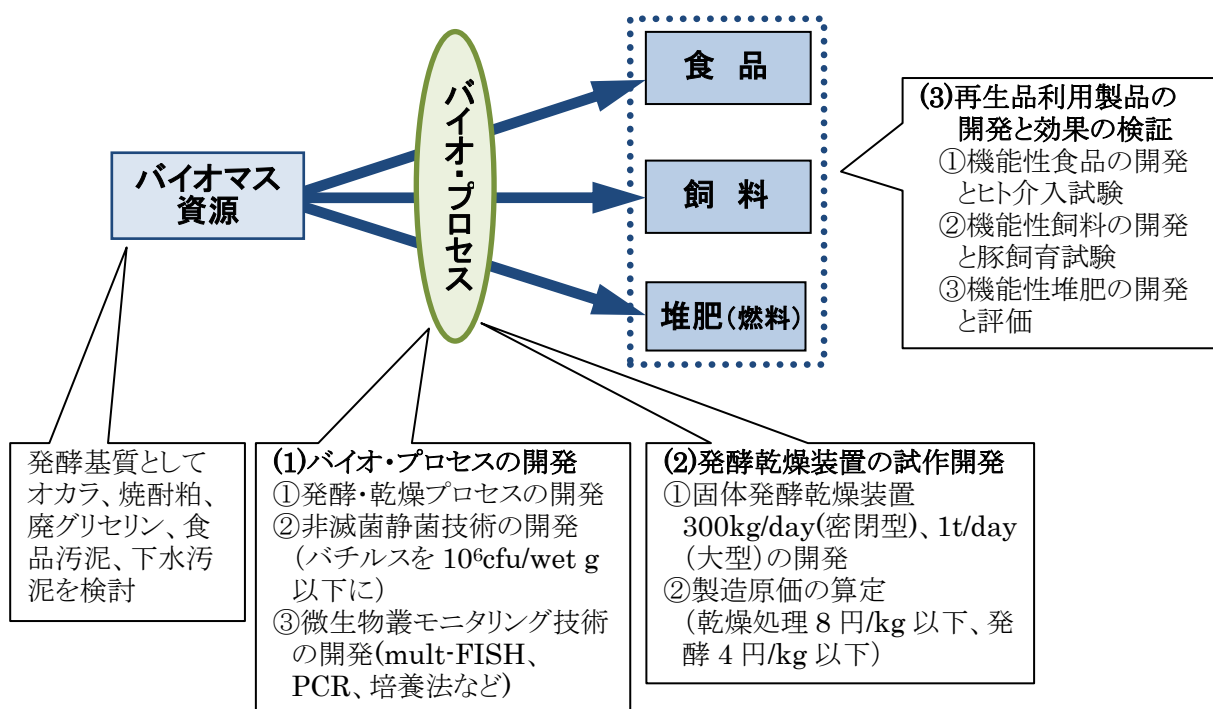


図 1 研究開発の全体スキームと目標

## 1-2 研究体制

役 割	氏 名	所 属・役 職
総括研究代表者 (PL)・管理業務	三輪 一典	(株)新聞協同運輸 代表取締役社長
副総括研究代表者 (SL)	湯本 勳	(独)産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門副部門長
研究開発業務	星野 保	(独)産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 主任研究員
研究開発業務	南田 公子	(株)新聞協同運輸 主任研究員
研究開発業務	玉木 希実	(株)新聞協同運輸 研究員
研究開発業務	征矢 秀崇	(株)新聞協同運輸 研究員
研究開発業務	中津川 進	(株)新聞協同運輸 研究員
研究開発業務	澤井 祐介	(株)新聞協同運輸 研究員
研究開発業務	辻 雅久	(有)クロモソームサイエンスラボ 代表取締役社長
研究開発業務	山田 和彦	(有)クロモソームサイエンスラボ 研究員
研究開発業務	小嶋 祐子	(有)クロモソームサイエンスラボ 研究員
研究開発業務	本多 芳彦	酪農学園大学食品流通学科 教授
研究開発業務	岡内 弘樹	(株)豆太 代表取締役社長
研究開発業務	曾根 輝雄	国立大学法人北海道大学大学院農学研究院 准教授
研究開発業務	青木 典彦	(株)丸蔵 代表取締役
管理業務	青木 進悟	(株)新聞協同運輸 取締役総務部長
管理業務	長谷川 雅子	(株)新聞協同運輸 総務部長

## 1-3 成果概要

### (1) バイオ・プロセスの開発

#### ① 発酵・乾燥プロセスの開発

含水バイオマスは多量の水分を含んでおり、オカラの場合で含水率約 75% (乾燥重量の 3 倍) に達し、これを含水率 50% に乾燥するだけで重量は 1/2 となる。乾燥の主な目的は腐敗の防止であり、水分活性  $A_w=0.85$  以下 (乾生カビでは 0.65) にすることが望ましいが、用途とコストの見合いで最終含水率を決定することになる。本プロジェクトではオカラ等の含水バイオマスを、クモノスカビやコウジカビなどの微生物による発酵熱を利用して安価に乾燥する技術開発を行った。さらに別の微生物を増殖させて、機能性を持った食品や飼料、堆肥等に再生するための基本的な技術を開発した。具体的には、目的の微生物を含む発酵スタータの開発 (5 種)、発酵基質や条件の検討等を行った。

#### ② 非滅菌静菌技術の開発

有機物が腐敗しないようにするためには、121℃、15 分以上の滅菌操作が必要であるが、大量のバイオマス資源を滅菌することはコスト的に見合わないことから、非滅菌的に静菌する技術が求められる。本プロジェクトでは 2009 年に添加物指定された抗菌ペプチドであるナイシン A を生産するラクトコッカス・ラクティスによる静菌技術を開発した。

#### ③ 微生物叢モニタリング技術の開発

バイオマス資源の品質に応じて再生方法を変更したり、再生品中の微生物叢をチェックするために微生物叢モニタリング技術を開発した。具体的には multi-FISH 法によって食中毒菌や在来菌の特異的 DNA 配列を検出し、複数微生物の同時モニターができる手法を開発した。また PCR 法、培養法 (キットを含む) による迅速かつ網羅的な微生物叢モニタリング手法を比較検討した。

## (2)発酵乾燥装置の試作開発

### ①固体発酵乾燥装置の開発

含水バイオマスを微生物の発酵によって乾燥させる固体発酵乾燥装置を段階的にスケールアップしながら開発した。平成 21 年度は 100kg/day 処理(バッチ式)の減圧固体発酵装置で基本的な検討を行い、平成 22 年度には密閉型固体発酵装置の開発(300kg/day)、さらに大型固体発酵装置の開発(1t/day、H22 前倒し終了)を行った。

### ②製造原価の算定

微生物による発酵乾燥工程におけるランニングコストの試算を行った。

## (3)再生品利用製品の開発と効果の検証

### ①機能性食品の開発とヒト介入試験

クモノスカビ(リゾープス・オリゴスポラス)を用いてオカラを発酵乾燥した粉末と有孢子性乳酸菌で発酵した豆乳を用いてパンと菓子を試作し、ヒトの血中コレステロールおよび体脂肪に与える影響を評価し、機能性を明らかにすることを目的にヒト介入試験による評価を行った。

### ②機能性飼料の開発と豚飼育試験

有孢子性乳酸菌入りのオカラを配合飼料に添加して飼育した豚(試験区 5 頭、対象区 5 頭)の糞中細菌検査等を実施した。また焼酎粕をクモノスカビと有孢子性乳酸菌で発酵乾燥した飼料を作製し評価した。

### ③機能性堆肥の開発と評価

農作物の病害防除は主に化学農薬が用いられており、国内で年間約 82,000 トンもの化学農薬が用いられている。化学農薬は防除効果が高いものの、残留農薬の流出等によって生態系やヒトへの影響が問題視されている。一方堆肥は畜産業の堆肥舎整備等で活用されつつあるが、付加価値が低く流通コストを賄えるほどの収益が得られないことから、全量を使い切れないという問題がある。作物障害のうち土壌伝染性病害は、土壌消毒以外に有効な防除法がない。そこで特定の病害菌を防除する機能を堆肥に付与した機能性堆肥を作製し、その効果を検証した。

下記に示す 4 種類の機能性堆肥を開発し、その 1 種類について芝を用いて実地試験を行った。

(i) 食品汚泥+クモノスカビ+ピシウム・オリガンDRAM(芝試験の実施)

(ii) 廃グリセリン+コウジカビ+放線菌

(iii) 食品汚泥+トリコデルマ菌

(iv) 下水汚泥+クモノスカビ+枯草菌

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社新聞協同運輸 代表取締役社長 三輪 一典

電話:0166-59-3100 FAX:0166-59-3200 E-mail:miwa@arterio.co.jp

## 第2章 本論

### 2-1 バイオ・プロセスの開発

#### (1) 発酵・乾燥プロセスの開発

##### ① 固体発酵プロセスの開発と液状食品廃棄物の処理

オカラは大豆種子の貯蔵タンパク等を抽出した残りの細胞壁を主成分としており、多孔構造のため多量の水を吸蔵する(保水力が高い)ものの素材的には比較的乾燥しやすいことが吸着等温線評価から分かった(H21)。また、豆乳の製造工程において大豆を圧力鍋で蒸煮するため、土由来の芽胞菌以外は殺菌されており、オカラ中に検出される在来菌は *Bacillus* 属である *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* などであった(シーケンス解析による)。

このような保水力が高く、乾燥しやすいオカラの特性を利用して、液状の食品廃棄物等をオカラで吸収して発酵乾燥するのが本プロジェクトの基本的な戦略である。オカラ中に検出された芽胞菌についてはグラム陽性菌に対して抗菌活性を示すナイシンを生成するラクトコッカス・ラクティスを培養することによって静菌する(後述)。発酵熱の生成は主にクモノスカビ(リゾープス・オリゴスポラス)を用いた(一部コウジカビを使用)。また機能性を付与するために用いた菌種は以下の通りである。

食品、飼料用:有胞子性乳酸菌バチルス・コアグランス(独自株)

堆肥用:ピシウム・オリガンドラム(PO 菌)、放線菌、トリコデルマ菌、枯草菌

##### ② 発酵スタータの開発

発酵スタータは、NBRC 保存菌株を購入して以下の 5 種類を開発した。発酵基質はすべてオカラを用いた。

- i) クモノスカビ+ピシウム・オリガンドラム(PO 菌)
- ii) クモノスカビ+バチルス・コアグランス(BC 菌)
- iii) コウジカビ+放線菌
- iv) トリコデルマ菌
- v) クモノスカビ+枯草菌

また、BC 菌に関しては、自然界から独自に優良株を単離して、特許寄託(NITE1102)するとともに特許を申請した(特願 2011-245799)。このうち ii) と v) については、目標である発酵開始が 10 時間以内、終了が 24 時間以内を達成した。

発酵プロセスは、単独またはクモノスカビ、ラクトコッカスとの共培養条件を検討した。また、オカラを用いた好気培養および嫌気培養による在来菌と BC 菌の変化を調べた。

#### (2) 非滅菌静菌技術の開発

ナイシン A 生成株である *L. lactis* NBRC12007 を培地 NBRC804 で 28°C 18 時間嫌気培養した時の形態は直径 1.1  $\mu\text{m}$  の球菌であった。

また NBRC804 の培地に *L. lactis* を接種して 30°C 15 時間前培養し、NBRC804 の培地に前培養液を 1% 接種して 30°C で静置培養による増殖曲線と培養液の pH の変化を測定した。前培養液 ( $10^8$  cfu/ml) を 1% 量添加し、30°C で本培養をすると(初発菌数  $10^6$  cfu/ml)、5 時間後には  $10^8$  cfu/ml まで増殖し(OD は 0.8)、このとき培養液の pH は 4.2 まで低下していた。

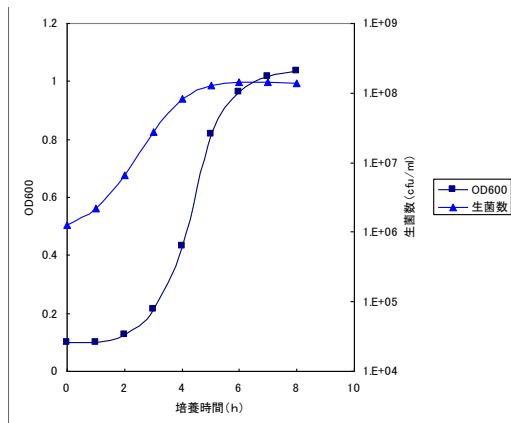


図 2-1 *L. lactis* の生菌数と濁度の関係

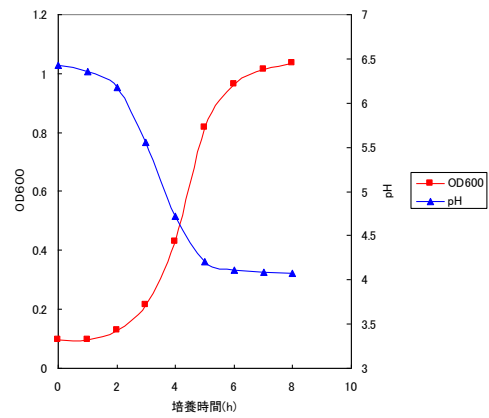


図 2-2 *L. lactis* の培養液の濁度と pH の関係

また、オカラに *L. lactis* の培養上清または滅菌水を 1% 加えて 30°C 1 晩培養したところ、*L. lactis* の培養上清を加えなかったサンプルでは桿菌(バチルス)が  $3.7 \times 10^8$  cfu/g で、上清を添加したほうはほとんど球菌(*L. lactis*,  $3.2 \times 10^8$  cfu/g)で、*L. lactis* がオカラ中で増殖して桿菌の増殖を抑えたと考えられる。

オカラから単離した *B. subtilis* 6-2 株を培地に塗抹して、*L. lactis* の抗菌性を強化した。30°C で培養 4 時間後以降の培養上清に阻止円ができ、以前の *B. subtilis* の増殖が阻害されており、抗菌活性が確認できた。

また滅菌オカラに、NBRC804 の培地で *L. lactis* を 7 時間(30°C)培養した液を 1% の割合で加えたサンプルと、滅菌オカラのままのサンプルを、30°C で 22 時間培養した。ナイシンはアセトン抽出法で抽出した。同様に *B. subtilis* 6-2 株を使用し、芽胞液の方は培養液を 95°C 5 分加熱して、芽胞のみにしてから同様に行った。

培養初発の *L. lactis* は  $1.3 \times 10^6$  cfu/g だったが、培養後は  $8.7 \times 10^8$  cfu/g までオカラ中で増殖していた。滅菌オカラのみを培養したサンプルでは菌は検出しなかった。オカラのみでは阻止円はできず、*L. lactis* 入りのオカラでは阻止円ができたので、オカラ中でもナイシンは生成され、*B. subtilis* 6-2 株の増殖を阻止することがわかった。また、*B. subtilis* 6-2 株の栄養細胞だけでなく、芽胞液でも発芽を阻止した。

以上から *L. lactis* NBRC12007 はオカラ中でもよく増殖し、阻害物質(ナイシン)と酸(乳酸)を生成し、オカラ中の在来菌の増殖を抑えることを確認した。

オカラを用いて、クモノスカビと *L. lactis* の共培養試験を行った。

オカラで *L. lactis* もテンペ菌もよく増殖した。オカラ単独で培養すると、オカラに元々いる桿菌(*Bacillus* 属)が増殖するが、*L. lactis* を接種すると、*L. lactis* が増殖し、桿菌の増殖を抑えた。クモノ

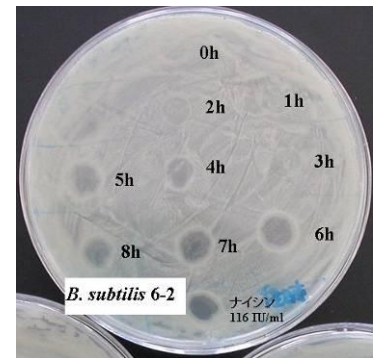


図 3 *L. lactis* 培養上清の阻止円の経時変化

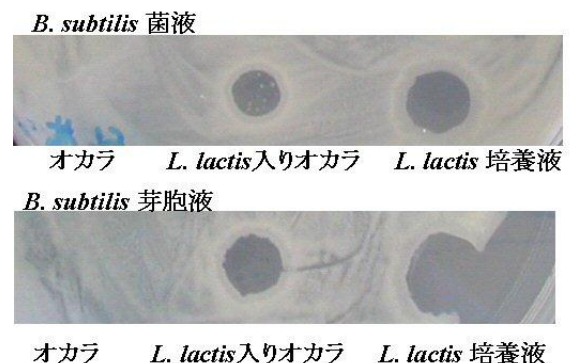


図 4 オカラと培養液の阻止円

スカビは低 pH でも増殖可能なため、*L. lactis* と共培養しても増殖し、クモノスカビ単独培養よりも、共培養のほうが生育がよかった。培養後、菌数を測定したところ  $1.6 \times 10^9 - 2.3 \times 10^9$  cfu/g (乳酸菌) だった。*Bacillus* 属のコロニーは検出されなかった。10 倍希釈液の pH は 5.5-6.0 だった。*L. lactis* を加えることによって、オカラ中に含まれる在来菌 (*Bacillus* 属) の増殖が抑えられていた。

### (3) 微生物叢モニタリング技術の開発

#### ① multi-FISH 法の検討

FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法は、特定の遺伝子部位に結合する塩基対プローブを作製して蛍光標識しておき、蛍光顕微鏡下で検出する手法で、プローブの作製次第で様々な遺伝子部位や遺伝子の異常を検出することができる。ここではそれぞれの微生物に特有のプローブを作製し、複数の微生物の同時検出を可能とするモニタリング手法の開発を行った。検出対象とした菌種は次の通りで NBRC より購入した。

*Bacillus subtilis* NBRC13719<sup>T</sup>, *Pseudomonas fluorescens* NBRC 14160<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* NBRC 100910<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* NBRC 102136 (食中毒品から分離した株 Coagulase type II), *Bacillus cereus* NBRC 15305<sup>T</sup>, *Escherichia coli* NBRC 102203<sup>T</sup>

FISH による微生物のモニタリングに使用するプローブおよび条件を、論文を参考に検討して設定した (表 1)。

表 1 プローブ名および塩基配列

プローブ名	ラベル	塩基配列	由来	文献
BCE440	FITC	GTG CCA GCT TAT TCA ACT AGC	<i>B. cereus</i> , 16S	A
BSU193	Cy3	AAG CCA CCT TTT ATG TTT GA	<i>B. subtilis</i> , 16S	B
ECO1167	FITC	GCA TAA GCG TCG CTG CCG	<i>E. coli</i> , 23S	C
LAC062	Cy5	CCA ACC TTC AGC GCT CAA	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 16S	D
KO12	Cy3	AGC GCC CGT TTC CGG ACG TTA T	<i>Pseudomonas</i> spp., 16S	G
SAU069	FITC	GAA GCA AGC TTC TCG TCC G	<i>S. aureus</i> , 16S	H

A: Simon ら(2001) B: Liu ら(2001) C: Neef ら(1995) D: Friedrich ら(2006) G: Franke-Whittle ら(2000) H: Kempf ら(2000)

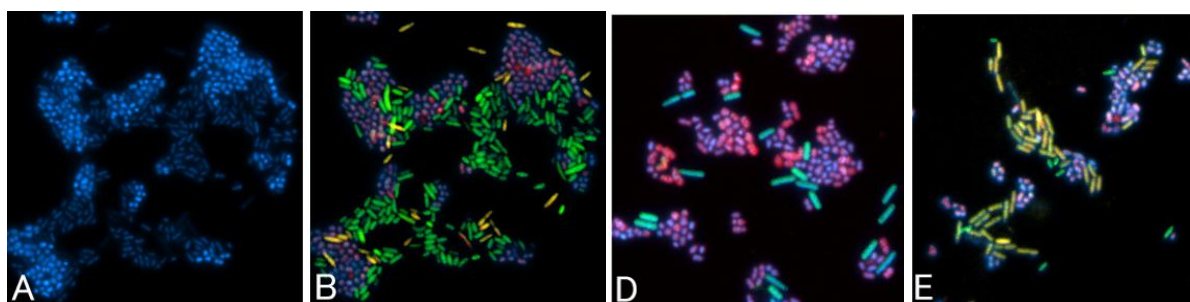


図 5 ECO1167、LAC062、KO12 プローブの組み合わせによる multi-FISH 画像

A: *E. coli*, *L. lactis*, *P. fluorescens* の 3 種を混合した菌体標本の DAPI 染色画像。

B: ECO1167 プローブ (黄緑)、LAC062 プローブ (赤)、KO12 プローブ (黄) の multi-FISH 画像。

D: *B. cereus* (緑) と *L. lactis* (赤)

E: *B. subtilis* (黄色)、*E. coli* (緑)、*L. lactis* (赤)

#### ② 実際のサンプルでのモニタリング

実際の食品廃棄物の再生処理を見立てて、瓶に①コーヒー粕②ビール粕③小豆粕④オカラ⑤茶粕



⑥焼酎粕+オカラを入れ、クモノスカビのスタータと *L. lactis* 培養液を 1%添加した検体と無添加の検体をつくり、30℃で24時間培養したものをサンプルとして、培養法、PCR法、前述の multi-FISH法の比較検討を行った。各方法の特徴を示す。

- ・培養法: 検出感度が高い(10 cfu/g 以上検出可能)ので、菌数が少ない場合から多い場合でも有効である。菌種を知りたいときは簡易培地ではなく従来の培地を用いて、検鏡や塩基配列を読むことができる。菌数のみを調べるときは簡易培地(フィルム)が手軽である。
- ・PCR法: テンプレートとして 1 μlしか使用しないため、10<sup>4</sup> cells/ml (10 cells)が検出限界で、それ以下の菌数の場合、PCR法では検出しない。過去の食中毒菌の増殖の履歴(死菌)や対象とする菌種の有無、食中毒菌の毒素遺伝子の有無を知りたい場合に適している。多サンプルを同時に処理することが可能である。
- ・FISH法: 検出感度は培養法に劣るが、多数の菌の中で対象とする菌種の生菌数を調べることが可能である。

表2 培養法、PCR法、FISH法の比較

	培養法		PCR	FISH
	培地	簡易培地		
時間	×	×	○	△
手間	△	○	○	△
コスト	○	△	△	×
設備	○	○	△	×
検出範囲	属・種 生菌 定量	属・種 生菌 定量	属・種 死菌も可 定性	属・種 生菌 定量
その他	-	検鏡できない	毒素遺伝子も検出 <sup>可</sup>	-

培養法・PCR法・FISH法を検討した結果を用いて、実際のサンプルで比較した結果、以下のように決定した。

菌数が少ないと想定される検体(発酵前のもの、10<sup>5</sup> cells/g 以下のもの)は培養法で調べ、菌数の多いと想定される検体(発酵後のもの、10<sup>5</sup> cells/g 以上のもの)は培養法単独か、PCRを併用する。検査した結果、一般生菌数の多い検体と食中毒菌が検出された検体は食用以外に用いる。PCRは菌数を計測できないが、種特異性のプライマーを使用することにより、増殖した菌種まで決定できる。また、発酵後に殺菌工程の入る場合、PCRでは毒素を生成する菌(黄色ブドウ球菌など)の増殖履歴がわかるので、検体に応じて、併用することが必要と考えられた。

## 2-2 発酵乾燥装置の試作開発

### (1) 固体発酵乾燥装置の開発

#### ① 密閉型固体発酵装置の開発

##### 1) 食品廃棄物の初発菌数の低減

食品廃棄物に発酵スタータを接種して目的とする菌の増殖を図る場合、植菌の菌数を 10<sup>6</sup>cfu/g とすると在来菌は 10<sup>3</sup>cfu/g 以下にしておく必要がある。特に食中毒菌などの毒素を生成する菌は、限りなく 0 に近づけておく必要がある。在来菌を大まかに区分すると、グ



図6 密閉型固体発酵(加熱発酵)装置

ラム陽性細菌、グラム陰性細菌、カビ等の菌類となるが、乳酸菌ラクトコッカス・ラクティスが生成するナイシンはグラム陽性菌全般に抗菌作用を示す。ヒトの病原菌の多くはグラム陰性菌であり、ウイルスを含めて中心温度 85℃、1 分以上の加熱で殺菌することができる。カビや枯草菌等の芽胞は耐熱性が高いが、カビの胞子は 95℃でほぼ死滅する。枯草菌などの芽胞菌(グラム陽性)はナイシンによる静菌で対策することとし、本装置では加熱殺菌性能を重視した仕様とした。

## 2) 発酵菌種の問題

本事業で扱う菌種は多種に及び、それぞれ培養条件や培養時間が異なる。本装置で培養する菌種は加熱殺菌工程と相性がよく耐熱性の高いバチルス・コアグラルス等とし、その他の菌種の培養は大型固体発酵装置で行うこととした。

## 3) 方式及び機種を選定

本装置は食品対応のサニタリー性を持たせ、食品廃棄物を均一に加熱殺菌する必要からニーダー(混練機)をベースに改造を施すこととした。仕様の検討のため、(地独)北海道立総合研究機構食品加工研究センターで真空式ニーダーと簡易な温風乾燥機を取り付けた通常のニーダーで比較試験および過熱蒸気による殺菌法の検討(ヘルシオ(シャープ)および DC オープン NF-5020(直本工業製))を行った。この結果、通常のニーダーに温風乾燥機を取り付け、さらにサイクロン方式の回収装置と培養用温水循環装置、ニーダーを昇降する装置を取り付けることを決定した。

## ②大型固体発酵装置の開発

### 1) 多様な発酵菌種と処理量に対する対応

本事業では、クモノスカビ(テンペ菌)などの糸状菌(カビ)、枯草菌などの細菌、放線菌など多種に及ぶため、2 種類の恒温槽(クリーン恒湿恒温槽及び高温対応の恒温槽)を用意した。

### 2) 発酵前後の工程への対応

本装置は、本培養に入るためのスタータ用培養器(液体培養及び固体培養)、機器類を滅菌するための滅菌器、作業エリアの在来菌レベルを低減するクリーンブース、食品廃棄物等を移動するための電動リフターや投入するためのスクルーコンベア、食品廃棄物を破碎して発酵しやすくするための破碎機、発酵後の仕上げ乾燥を行う箱型乾燥機、機器を洗浄するスチーム洗浄機で構成する。



図 7 大型固体発酵装置外観

## (2) 製造原価の算定

本プロジェクトで開発した密閉型固体発酵装置および大型固体発酵装置でのランニングコストは、テスト稼働の段階で、BC菌の製造工程:3.9円/kg、クモノスカビの発酵乾燥工程:22.4円/kgとなった。

これらのランニングコストは、試運転の状況での試算であり、運転条件の改善等によってさらに低コスト化が可能と考えられる。

(BC菌の製造工程のコスト試算)

100kg 生産時  
(WB)

電力	機器名	電圧[V]	定格消費電力 [kW]	実測値 [kW]	使用時間 [h]	kWh	100kg	1kg あたり
	ニーダー	200	8.13	3.5	2	7	¥102.69	¥1.03
	シーラー	200	1.05	1.05	0.83	0.8715	¥12.78	¥0.13
	ボイラー	200	1.92	1.85	2	3.7	¥54.28	¥0.54
合計電気代						11.5715	¥169.75	¥1.70

重油	機器名	容量 [kg/h]	最大消費量[l]	実測値 [l]	使用時間 [h]	ℓh	100kg	1kg あたり
	ボイラー	168	13.6	1.32	2	2.64	¥224.14	¥2.24
合計燃料費						2.64	¥224.14	¥2.24

総計 ¥394 ¥3.94

電気(1kWh) ¥14.67 重油(ℓ) ¥84.9 (2011年7月現在)

(クモノスカビの発酵乾燥工程のコスト試算)

100kg 生産時  
(WB)

電力	機器名	電圧[V]	定格消費電力 [kW]	実測値 [kW]	使用時間 [h]	kWh	100kg	1kg あたり
	ニーダー	200	8.13	3.5	2	7	¥102.69	¥1.03
	破砕機	200	1.5	1.5	0.2	0.3	¥4.40	¥0.04
	シーラー	200	1.05	1.05	0.17	0.1785	¥2.62	¥0.03
	ボイラー	200	1.92	1.6	2	3.2	¥46.94	¥0.47
	培養室 2	200	8	1.85	15	27.75	¥407.09	¥4.07
合計電気代						38.4285	¥563.75	¥5.64

重油	機器名	容量 [kg/h]	最大消費量[l]	実測値 [l]	使用時間 [h]	ℓh	100kg	1kg あたり
	ボイラー	168	13.6	9.88	2	19.76	¥1,677.62	¥16.78
合計燃料費						19.76	¥1,677.62	¥16.78

総計 ¥2,241 ¥22.41

電気(1kWh) ¥14.67 重油(ℓ) ¥84.9 (2011年7月現在)

## 2-3 再生品利用製品の開発と効果の検証

### (1) 機能性食品の開発とヒト介入試験

#### ① 機能性食品の開発

食品への再生を目指す場合には、食品廃棄物自体が相応の品質を持ち、再生品の機能性や嗜好性も一定のレベルが要求される一方で、コスト面では多少の余裕が生まれることになる。ここではオカラと豆乳を用いて、クモノスカビと有孢子性乳酸菌を単独で用いて発酵させた場合のアプリケーションとしてパンと焼き菓子を取り上げた。

#### ヒト介入試験被験食の作製:

有孢子乳酸菌入り豆乳(生菌数、芽胞数 共に  $10^8$  cfu/ml)を5倍希釈して、(有)フーズアンドブレッドで通常通りに被験食のパンを作製した。

焼いた後、パンの中央も、熱がよりかかっている端の部分も、生菌数、芽胞数共に  $10^6$  cfu/g だったので、整腸作用が期待される被験食ができた。

表 3 発酵パン中の有孢子乳酸菌数(cfu/g)

	有孢子乳酸菌数	
	生菌数	芽胞数
焼いた後(上の端)	7.4×10 <sup>6</sup>	2.7×10 <sup>6</sup>
焼いた後(中心)	8.1×10 <sup>6</sup>	2.2×10 <sup>6</sup>
焼いた後(横の端)	3.3×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>

### 焼き菓子の作製

(有)キャセロールで通常のレシピ通りに焼き菓子を作製した。それぞれ重量比に対して、2-3%の割合で有孢子乳酸菌入り豆乳を(生菌数 7.6×10<sup>8</sup>、芽胞数 6.0×10<sup>8</sup> cfu/ml)を使用した。

表 4 焼き菓子中の有孢子乳酸菌数(cfu/g)

	焼成条件	焼成時の大きさ	有孢子乳酸菌数	
			生菌数	芽胞数
パウンドケーキ	オレンジ	155°C30分	3.3×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>
	フルーツ	155°C30分	1.4×10 <sup>6</sup>	9.9×10 <sup>5</sup>
クッキー	バター*1	156°C16分	8.8×10 <sup>6</sup>	4.9×10 <sup>6</sup>
	チョコ	160°C27分	7.5×10 <sup>5</sup>	1.9×10 <sup>5</sup>
	ヘーゼルナッツ	160°C27分	2.3×10 <sup>3</sup>	2.3×10 <sup>3</sup>

\*1:冷凍庫で、50時間保存後、焼成した。

155°C30分焼いたスポンジケーキでは、10<sup>6</sup> cfu/g、156°C16分焼いた長方形のクッキー(6×3×1 cm)では10<sup>5</sup> cfu/g、160°C27分焼いた小型円形のクッキー(φ3×1 cm)では10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> cfu/gの有孢子乳酸菌が生存していた。クッキーは、大きく焼成時間が短いほうが、菌数が多かった。バタークッキーは、焼成前に50時間ほど冷凍したが、有孢子乳酸菌の生存には影響がなかった。

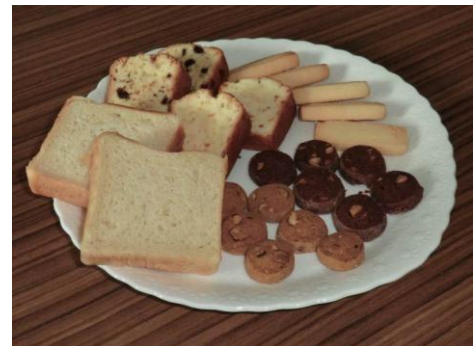


図 8 有孢子乳酸菌入りの被験食のパンと焼き菓子

### ②ヒト介入試験の計画

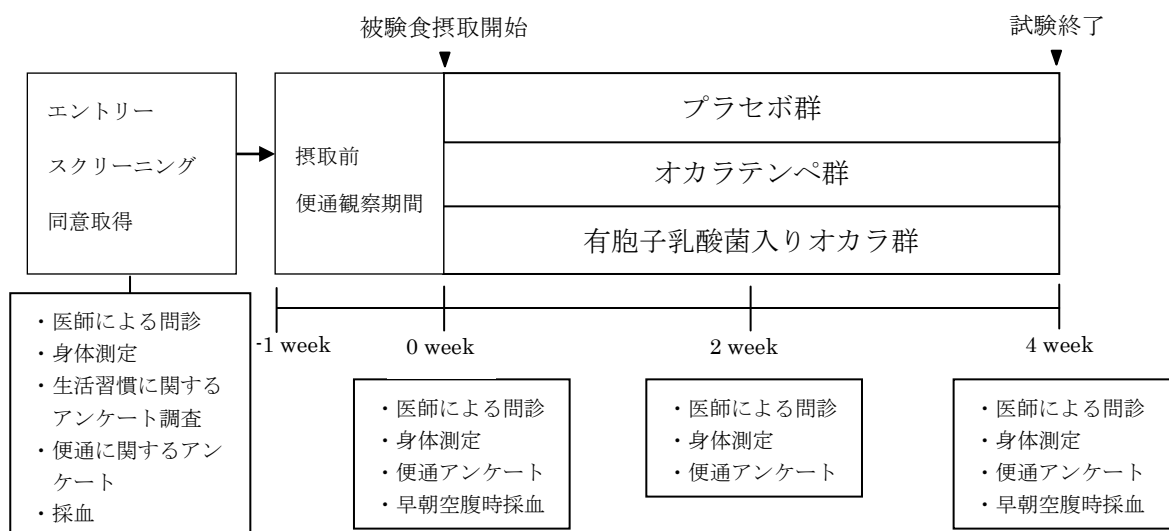
#### 本臨床試験の目的

本臨床試験では、オカラテンペと有孢子乳酸菌入り豆乳の継続摂取によるヒトの血中コレステロールおよび体脂肪に与える影響を評価し、機能性を明らかにすることを目的とする。また、生理活性成分である食物繊維による便秘改善作用のほか、プロバイオティクス効果による便秘改善も期待し、副次項目として評価した。

#### 被験食品の安全性

本試験で使用する「豆乳パン」は、すでに市販されている食品(パン)の材料の一部を、オカラ、オカラをクモノスカビで発酵させた粉、豆乳を有孢子乳酸菌で発酵させた豆乳に置き換えて製造したパンを本試験では使用する。オカラテンペ粉に使用するカビと乳酸菌、有孢子乳酸菌入り豆乳に使用する乳酸菌は、すべて食経験の長い微生物であるため、有害事象発生の可能性は低いと考えられた。

## [臨床試験スケジュール]



## 被験者の選定

試験責任医師が適格と認めた被験者 42 名(最終目標症例 30 名)を選定する。その後、選定された被験者に臨床試験実施日、時間および場所等を伝えた。

## 臨床試験実施

本試験では、血中総コレステロール濃度、体脂肪率の変化率を主要評価項目とした。便通改善を副次評価項目とした。

## 被験食の栄養分析結果

通常よりも食物繊維が多く含まれたパン(4%、約 2 倍)だった。

表 5 被験食の栄養分析結果

分析項目	おから豆乳 パン	おからテンペ 豆乳パン	おから乳酸菌 豆乳パン	単位	注	方法
水分	35.9	36.5	35.7	g/100g		常圧加熱乾燥法
タンパク質	9.9	10.5	11.0	g/100g	1	ケルダール法
脂質	6.9	6.4	6.5	g/100g		酸分解法
灰分	1.6	2.4	1.6	g/100g		直接灰化法
糖質	41.7	40.5	40.9	g/100g	2	
食物繊維	4.0	3.7	4.3	g/100g		酵素 - 重量法
エネルギー	277	269	275	kcal/100g	3	

注1:タンパク質換算係数:6.25

注 2:100-(水分+タンパク質+脂質+灰分+食物繊維)

注 3:エネルギー換算係数:タンパク質, 4, 脂質, 9, 糖質, 4, 食物繊維, 2

## ヒト介入試験の分析結果

有孢子性乳酸菌摂取群の脂質(LDL)代謝が有意に改善した( $P<0.05$ )。同じく有孢子性乳酸菌摂取群の脂質(HDL および総コレステロール)代謝が改善傾向にあった。その他の項目については分析中につき未集計である。

## (2)機能性飼料の開発と豚飼育試験

### ①試験方法

- i) 試験実施養豚場:個人農場(夕張郡長沼町)
- ii) 試験期間:平成 23 年 7 月 21 日~8 月 3 日(2 週間)
- iii) 供試豚:三元交雑種の離乳子豚1腹 10 頭(4 週齢~6 週齢)  
(母豚:ランドレース×ダイヨークシャー、父豚:パークシャー)
- iv) 供試物:有孢子乳酸菌オカラ粉(生菌数  $1.5 \times 10^8$  cfu/g、芽胞数  $2.9 \times 10^7$  cfu/g)
- v) 試験区の設定(表 6)
- vi) 検査項目と方法:
  - ①体重(試験開始時と終了時に測定した)
  - ②下痢発生状況と糞便の臭い・色(毎日観察し、糞便スコアと臭い・色を表に記入した)
  - ③糞中細菌検査(試験終了時に糞をサンプリングし、培養法にて細菌数を計測した)
- vii)有孢子乳酸菌入りオカラ粉の分析  
飼料としての項目(水分、粗タンパク質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、可溶無機窒素物)を(財)日本食品分析センターに分析依頼した。

表 6 試験区の設定

区分	投与条件	匹
対照区	無添加	5
試験区	有孢子乳酸菌オカラ粉を飼料の 1%添加して自由摂食させる。 (一日 1 kg 摂取するとして、1日 10 g。生菌数で $10^9$ cfu/日、 芽胞数で $10^8$ cfu/日摂取の予定)	5

飼料:協同飼料 ママ7リフト EX ほ乳期子豚育成用配合飼料(苦小牧飼料)  
粗タンパク質 20.5%以上、粗脂肪 3.0%以上、粗繊維 3.0%以下、粗灰分 8.5%以下、カルシウム 0.70%以上、リン 0.60%以上、TDN 84.0%以上、アピラマイシン(グラム陽性細菌用) 40 g 力価/トン、硫酸コリスチン(グラム陰性細菌用) 40 g 力価/トン、パチルスセレウス

### ②結果と考察

#### i) リラ株の投与菌数

試験期間中の餌の摂取量は、対照・試験区ともに、1 匹あたり 0.3kg/日だった。試験区には、飼料の 1%の割合で、有孢子乳酸菌オカラ粉を添加したので、1 匹あたり、リラ株を生菌数で  $4.5 \times 10^8$  cfu/日、芽胞数で  $8.7 \times 10^7$  cfu/日摂取していた。

#### ii) 試験豚糞中でのリラ株の検出

55°Cで1日培養し、糞中のリラ株を計測した。コロニーは *B. coagulans* の特異的 PCR をして、確認を行った\*1。対照区の豚糞中には、リラ株のコロニーは検出されなかった。試験終了時の試験豚の糞中のリラ株は、普通便で、生菌数  $4.8 \times 10^5$  cfu/g、芽胞数  $4.1 \times 10^5$  cfu/g、軟便で  $1.9 \times 10^5$  cfu/g、芽胞数  $1.7 \times 10^5$  cfu/g だった。この時期の豚が、一日約 40 g の糞をしたとして、 $8 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  cfu だったので、リラ株は生きて豚の腸管に届き、増殖せずに、糞中に排出されたと考えられた。生菌数と芽胞数がほぼ同じだったので、糞中では栄養細胞ではなく、芽胞で存在していると考えられる。ヒトの場合は、芽胞より生菌数のほうが約 2 倍多く、摂取量より約 10 倍多かったので、リラ株は生きて届き、腸管で増殖したと考えられた。この差は、飼料にグラム陽性菌用の抗生物質が入っていたためと考えられる。

### iii) 体重

開始時の対照区は 5.1kg、試験区は 5.2kg、終了時の対照区は 8.0 kg、試験区は 8.0kg と差がみられなかった。

表 7 糞中の細菌数(cfu/g wet feces)

菌種	対照区		試験区	
	普通便	軟便	普通便	軟便
大腸菌・大腸菌群	3.6×10 <sup>7</sup> (大腸菌)	3.3×10 <sup>7</sup> (大腸菌)	4.6×10 <sup>7</sup> (大腸菌)	1.5×10 <sup>7</sup> (大腸菌)
<i>Clostridium</i> 属	9.3×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
<i>Lactobacillus</i> 属	2.8×10 <sup>8</sup>	2.8×10 <sup>9</sup>	2.6×10 <sup>9</sup>	2.4×10 <sup>9</sup>

### iv) 有孢子乳酸菌入りオカラ(ドライタイプ)の分析結果

今回飼料に添加した有孢子乳酸菌入りオカラ粉は、豆腐粕(乾物)とほぼ同じ TDN だった。オカラと有孢子乳酸菌入りオカラ(今回のドライタイプと別のウエットタイプ)を乾物の値で比較すると、粗脂肪の割合が減少していて、可溶性無窒素物の割合が増加していた。粗脂肪が減少したのは、リラ株がオカラ中で増殖した際に利用したためと考えられる。

表 8 飼料としての分析の比較

分析試験項目	有孢子乳酸菌入りオカラ(ドライタイプ)	オカラ(分析値)	豆腐粕(乾)*6	単位	注	方法
水分	5.1	77.2	8.9	%		常圧加熱乾燥法
粗タンパク質	22.1	5.8	26.4	%	1	ケルダール法
粗脂肪	6.7	2.9	11.6	%		ジエチルエーテル法
粗繊維	11.7	2.5	14.0	%		静置法
粗灰分	3.8	0.9	4.0	%		直接灰分法
可溶性無窒素物	50.6	10.7	35.1	%	2	
TDN(可消化養分総量)	64.8	16.6	65.2	%	3	
DE(可消化エネルギー)	2857	732	2880	kcal/kg		
ME(代謝エネルギー)	2614	694	-	kcal/kg	4	

1: 窒素・タンパク質換算係数: 6.25

2: 計算式: 100 - (水分 + 粗タンパク質 + 粗脂肪 + 粗繊維 + 粗灰分)

3: 豚の豆腐粕の消化率を使用して算出した\*2。

TDN = 粗タンパク質 × 0.69 + 粗脂肪 × 0.63 × 2.25 + 粗繊維 × 0.48 + 可溶性無窒素物 × 0.68

4: DE(可消化エネルギー) = TDN × 44.09 ME = (0.96 - 0.00202 × CP(粗タンパク質)) × DE\*3

### v) まとめ:

三元交雑種の離乳子豚1腹 10 頭(4 週齢)を、2 グループに分け、試験区の飼料に 1%の割合で、有孢子乳酸菌入りオカラ粉を添加し、2 週間自由摂食させた。

(1)有孢子乳酸菌リラ株は生きて腸管に届き、糞に排出されたが、腸管で増殖しなかった。その理由は飼料に、グラム陽性菌用の抗生物質がはいっていたためと考えられた。

(2)対照区と試験区では、体重、摂食量、下痢発生状況と糞便の臭い・色、糞中の細菌数(大腸菌、*Clostridium* 属、*Lactobacillus* 属)共に変化がみられなかった。これは、飼料に抗生物質が含まれていて、リラ株摂取での差がみられなかっただけでなく、両試験区の豚が、健康的に飼育されているためと考えられる。敷き糞を食べていたので、ワラに付着している *Bacillus* 属(枯草菌等)もプロバ

イオティックスとして摂取していたと考えられた。

- (3) 出生早期に納豆菌を投与すると、有害菌の定着防止や体重増加の可能性があるので、同様にリラ株の菌液を新生子豚から投与し、飼料に混ぜることによって、現状の抗生物質入りの飼料でも投与の効果が得られると考えられる。

表 9 オカラと有孢子乳酸菌入りオカラの比較(乾物としての計算値)(%)

分析項目	オカラ	有孢子乳酸菌入りオカラ (ドライタイプ)	有孢子乳酸菌入りオカラ (ウエットタイプ)
水分	0.0	0.0	0.0
粗タンパク質	25.4	23.3	22.9
粗脂肪	12.7	7.1	9.1
粗繊維	11.0	12.3	13.4
粗灰分	3.9	4.0	3.6
可溶性無窒素物	46.9	53.3	51.0

### ③焼酎粕おからテンペ飼料の作製

滅菌したオカラでつくった *B. coagulans* リラ株のスタータ 280g と麦焼酎粕(篠崎) 700g と *Rhizopus oligosporus* のスタータ(テンペ単一菌、秋田今野商店) 2g を混ぜてから、造粒した。ドライエアを流しながら、品温 30℃を目標して 28 時間培養し、軽く温風乾燥した。

焼酎粕には、焼酎のコウジカビ(*Aspergillus kawachi*)がつくった体にいいクエン酸や、良質の蛋白源やビタミン源になる酵母も含まれている。減圧蒸留を行った焼酎粕では、その酵母も生きている。前回分析したオカラテンペでは、クモノスカビによって、ビタミン B 群が増加し、フィチン酸が減少していた。今回は分析しなかったが、同様な成分の変化があったと考えられる。

以上より、焼酎粕オカラテンペ飼料は、リラ株の整腸作用と発酵によってオカラに付加価値がついたよりよい飼料と期待される。

### (3)機能性堆肥の開発と評価

#### ①ピシウム・オリガンドラムを用いた機能性堆肥【食品汚泥+クモノスカビ+PO 菌】

##### i) 機能性堆肥の作製

ピシウム・オリガンドラム(PO 菌)は多くの土壌病原菌に寄生する菌寄生菌であることから、PO 菌を食品廃棄物中で大量培養して機能性堆肥を作製し、実際の芝にピシウム病菌(ピシウム属菌はほとんどが病害性)とともに接種してその効果を検証した。

(独)製品評価技術基盤機構(NBRC)から *P. oligandrum* NBRC 32559 の保存菌株を購入し、培養条件等を検討した。

*P. oligandrum* と *Rhizopus oligosporus* を PDA(ポテトデキストロースアガー)培地上に接種した。28℃2 日後には、菌同士が、プレート中央で接したが、その後変化しなかったため、*P. oligandrum* は *R. oligosporus* に寄生しないと考えられた。

*P. oligandrum* を YPSS 培地に接種して、25℃で 5 日間培養した。野菜残渣モデル(野菜ジュース(デルモンテ)) 50g、缶詰のホールコー

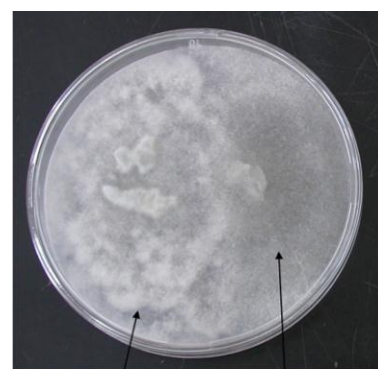


図 9 PDA 上の *P. oligandrum* (左) と *Rhizopus oligosporus* (右) (28℃ 3 日後)



図 10 PO 菌が生えた後



ン(アヲハタ十勝コーン、キューピー)を液状にしたもの 20g、水 50gを混ぜ、pH を 6.0 にしてから、造粒したドライオカラ 50g に混ぜ、滅菌した。YPSS 培地に生えた *P. oligandrum* を液体培地ごと接種して、25°C で、1 か月間培養した。その後、テンペ単一菌(秋田今野商店)0.4g を接種して 30°C で 2 日間培養し、分析に出した。



図 11 クモノスカビが生えた後

結果:卵孢子形成にいいといわれているコーンをいれたが、卵孢子は形成されていなかった。しかし、新しいおから培地にいれたところ、菌が増殖したので、スタータとして利用できることがわかった。堆肥の分析値を表 10 に示した。

表 10 PO 堆肥の分析値

分析試験項目	(%)	方法
窒素全量	0.90	硫酸法
リン酸全量	0.24	バナドモリブデン酸アンモニウム法
カリ全量	0.52	原子吸光測光法
石灰全量	0.05	原子吸光測光法
苦土全量	0.06	原子吸光測光法

## ii) ポット試験

ターゲットにした病原菌; *Pythium aphanidermatum* NBRC32440 はコヌカグサ (*Agrostis palustris*、イネ科ヌカボ属)の葉しょうから単離された菌で、芝(クリーピングベントグラス、*Agrostis palustris* (*A. stolonifera*))のピシウム病(赤焼病)の原因菌である。

*P. oligandrum* を YPSS 培地に接種して、25°C で 3 日培養した。その後、野菜残渣モデル(野菜ジュース(カゴメ))100gと水 150gを混ぜ、pH を 6.0 にしてから、造粒したドライオカラ 200g を混ぜ滅菌したものに、前培養液を全量加えて、25°C で培養した。10 日後にクモノスカビスタータを接種して、28°C で 6 日間培養した。

病原菌の *P. aphanidermatum* NBRC32440 も YPSS 培地に接種して、25°C で 2 日培養した。

PO タイプの堆肥を土にいれて、芝の種を植えた。

4 日後、ベントグラスの芽がでたので、病原菌ピシウムを接種した。1 日後、2 の病原性ピシウムを加えたポットは芝が褐変したが、4 の PO タイプの堆肥を加えたポットでは芝が褐変しなかった。

1 2 3 4



図 12 発芽した様子(4 日後)



図 13 病原性ピシウムを接種後の様子(1 日後)

表 11 ポット試験の条件

	POたい肥	病原菌 (PA)
1 (対照)	×	×
2	×	○
3	○	×
4	○	○

## ②放線菌を用いた機能性堆肥【廃グリセリン+コウジカビ+放線菌】

### i) 試料の調製

放線菌は抗生物質を生産して特定の菌種を殺菌するほか、キトサン分解酵素を出してキトサンを細胞壁に持つ糸状菌の成長を阻害する。放線菌 *Streptomyces griseus* はストレプトマイシンを生産するほか内生菌としての効果も研究されている。

発酵基質である廃棄物として BDF (バイオディーゼル燃料) 生産時に発生する廃グリセリンを処理対象とした。またクモスカビに変えてコウジカビ (河内菌) を使用することによってクエン酸を生成して廃グリセリンの pH 調整に用いた。

乾燥おから 50 g に廃グリセリンモデル液 (グリセリン 50%、メタノール 6%、水 44%、pH 9.3) 100 ml と水 50 ml をいれて、水分活性  $A_w$  を測定したところ、0.82 だった。乾燥おから 50 g に廃グリセリンモデル液 50 ml と水 100 ml で、 $A_w$  は 0.91、乾燥おから 50 g に廃グリセリンモデル液 50 ml と水 150 ml で、 $A_w$  は 0.93 だった。グリセリンは  $A_w$  を低下させる作用があるので、廃グリセリンモデル液の添加量を、目的の微生物の増殖可能  $A_w$  にしなければならぬことがわかった。また、pH は 7.0 だったので、おからには pH 緩衝能があると考えられた。

おから 15g に PDA 寒天培地で前培養したコウジカビの孢子 ( $10^7$  cfu/ml) を接種して 1 週間、30°C で培養したところ、菌糸がよく増殖し、孢子も大量に生成したので、おからで、コウジカビがよく生育することを確認した。このときの pH (10 倍希釈液) は 6.3 だった。これをコウジカビのスタータとして、次に、おから 15g に廃グリセリンモデル液 (1, 2, 3, 5, 10 ml) とコウジカビのスタータ 1g を混ぜて培養した。1-5 ml の廃グリセリンモデル液を加えたものでは、1 週間で十分に孢子ができ、10ml 加えたものは、孢子はできなかったが、菌糸は十分に生えた。おからに廃グリセリンモデル液を加え、10 倍希釈液の pH は、一番添加量の多い 10 ml でも pH7 以下になったので、この範囲の廃グリセリンモデル液の添加では、コウジカビの増殖に pH の面では影響を与えなかったと考えられた。

ストレプトマイシン生成株 NBRC3357, 12875, 102592 を NBRC より購入した。

乾燥おから 5 g に水 15 g を入れたものでは、*S. griseus* は増殖したが、乾燥おから 5 g に廃グリセリンモデル液 10 ml と水 5 ml ( $A_w$ 0.82) では放線菌は増殖しなかった。液体培地 (静置培養) では、液体中に粒状になって増殖した。



図 14 *Streptomyces griseus*

左図 左: 増殖しなかった、右: 増殖した (褐変したところ)

右図 位相差顕微鏡写真 (400 倍)

### ii) 植物病原菌 *Ralstonia solanacearum* について

微生物遺伝資源利用マニュアル(12) 農業生物資源研究所 を参考にした。

使用した株： トマトから単離した MAFF211270、MAFF211267 をジーンバンクより購入した。

培地：TZC 培地(ペプトン 10 g、カゼミノ酸 1 g、ブドウ糖 5 g、寒天 17 g、テトラゾリウムクロライド 50 mg、蒸留水 1L pH7.0)を使用した。水保存法で保存した。

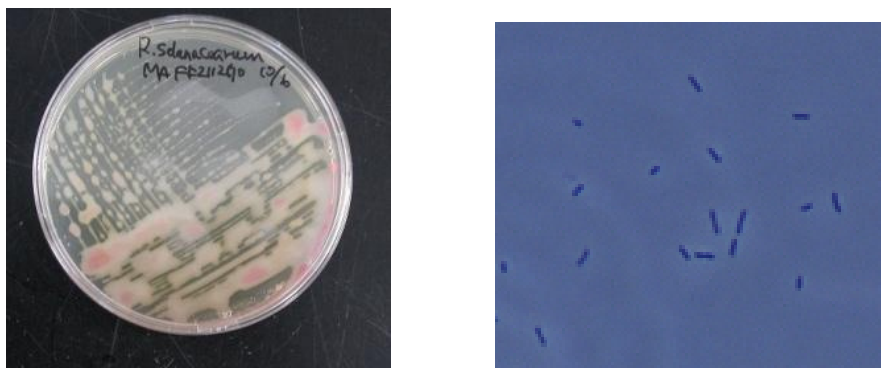


図 15 *R. solanacearum*

左：TZC 培地(乳白色で流動性のあるコロニーが病原性のあるコロニー、病原力が低下すると、赤色のコロニーになる)

右：位相差顕微鏡写真(400 倍)

抗生物質感受性の測定：ペーパーディスク法により、*R. solanacearum* の抗生物質感受性を測定した。その結果、Ampicillin, Chloramphenicol, Rifampicin, Spectinomycin, Streptomycin, Kanamycin, Tetracyclin に感受性であることがわかった。抗生物質間の感受性の違いは大きくなかったが、特に tetracyclin の阻止円が大きかった。Streptomycin の感受性が見られたことで、*Streptomyces griseus* を使って阻害できる可能性が示された。

### iii) 機能性堆肥の作製と分析

- ① 蓋付き瓶の中に、造粒したドライオカラ 50g と 50%グリセロール 40ml と水 120ml を混ぜて(水分活性 0.97)、121°C 30 分滅菌した。
- ② 1 か月間オカラに放線菌 (*Streptomyces griseus* NBRC12875) を増殖させたオカラを放線菌のスタータとして、20g 接種して、25°C で 5 日間培養した。
- ③ 5 倍希釈して滅菌した廃糖蜜(林商会) 4 ml とコウジカビ (*Aspergillus kawachii*) のスタータ(ヒグチモヤシ) 0.13g をいれて、25°C で 2 日間培養した。

放線菌は、オカラ上では増殖が遅かったが、放線菌のスタータを接種することによって、効率的に増殖し、放線菌の土臭い臭いがして、オカラが少し褐変した。オカラにあった糖は先に接種した放線菌によって資化されたので、廃糖蜜を加えることによって、コウジカビはよく増殖して、白い胞子をつくった。表 3 に堆肥成分の分析結果を示す(日本食品分析センター)。

表 12 放線菌堆肥の分析値

分析試験項目	(%)	方法
窒素全量	0.84	硫酸法
リン酸全量	0.19	バナドモリブデン酸アンモニウム法
カリ全量	0.40	原子吸光測光法
石灰全量	0.06	原子吸光測光法
苦土全量	0.05	原子吸光測光法

### ③トリコデルマ菌を用いた機能性堆肥【食品汚泥+トリコデルマ菌】

トリコデルマ菌は有用菌として古くから知られている糸状菌で、多くの糸状菌に寄生する。厚膜胞子を形成すると乾燥にも強いので製品化も容易と考えられる。

*Trichoderma harzianum* をNBRC から3株購入し、一番増殖のいいNBRC33016を使用した。野菜残渣モデル(野菜ジュース(カゴメ))100gと水150gを混ぜ、pHを6.0にしてから、造粒したドライオカラ100gを混ぜ滅菌したものに、PDAにはえた *T. harzianum* NBRC33016を混ぜ、25℃で培養した。

*T. harzianum* NBRC33016 は、食品残渣モデル入りのオカラによく増殖し、胞子形成もよかった。日本食品分析センターで堆肥の分析を行った。

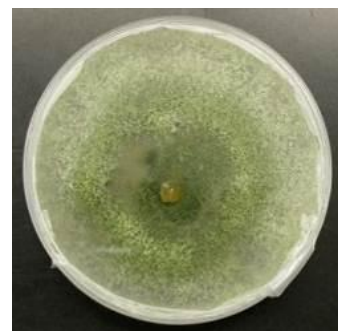


図 16 *T. harzianum* NBRC33016



図 17 4日後の様子

表 13 トリコデルマ堆肥の分析値

分析試験項目	(%)	方法
窒素全量	0.94	硫酸法
リン酸全量	0.21	バナドモリブデン酸アンモニウム法
カリ全量	0.52	原子吸光測光法
石灰全量	0.06	原子吸光測光法
苦土全量	0.06	原子吸光測光法

### ④下水汚泥を用いた堆肥(固形燃料)【下水汚泥+クモノスカビ+枯草菌】

下水汚泥脱水ケーキ(高分子凝集剤タイプ2kg)を札幌市東部水再生プラザより提供を受けて機能性堆肥(固形燃料)としての可能性を検討した。

下水汚泥を4つに分けて、3つにはオカラを10%添加し、枯草菌(納豆菌液)、クモノスカビを添加したサンプルを作製して、ドラフト内(約20℃)で放置して培養した。

すべてのサンプルに白いフェルト状カビが生じて乾燥が進んだ。枯草菌を接種したサンプルは最終的には底部がドロドロの状態になり、乾燥が進まなかった。また、クモノスカビを接種したサンプル等に繁殖したフワフワしたカビは培養温度が低かったためか、途中で繁殖が進まなくなった。

「白いフェルト状のカビ」の同定を行った結果、*Galactomyces geotrichum* (307/309 (99%))だった。*Galactomyces geotrichum* は、牛乳、チーズ、植物、果物、土、昆虫、ヒト、動物、様々なところに存在するカビである。日本食品分析センターで堆肥の分析を行った。

表 14 枯草菌堆肥の分析値

分析試験項目	(%)	方法
窒素全量	4.79	硫酸法
リン酸全量	2.07	バナドモリブデン酸アンモニウム法
カリ全量	0.52	原子吸光測光法
石灰全量	0.81	原子吸光測光法
苦土全量	0.26	原子吸光測光法

## 最終章 全体総括

本プロジェクトでは、最新のバイオ技術を適用することによって、生ゴミ等のバイオマス資源を機能性食品素材や機能性飼料、機能性堆肥、固形燃料などに高度再生する基本技術と、それを実現する装置、および事業化可能な製品群の開発を行った。この分野の技術を「環境バイオテクノロジー」と呼称するならば、従来のこの分野は旧世代のバイオテクノロジーをベースにしており、安全性や確実性に欠けるきらいがあった。微生物を扱う以上、100%安全といえるわけではないものの、最新の技術を取り入れることで、より信頼性の高い手法を目指すことができたと考えている。また、再生品の機能性については、プロバイオティクス効果を持つ飼料や植物病原菌に対して拮抗作用(耐病性)を持つ堆肥など、付加価値の高い再生手法についても検討を加えた。また、本プロジェクトではプロバイオティクス効果の高い有孢子性乳酸菌や、より低温で発酵乾燥できる酵母様カビなどの独自の微生物を取得することができた。これらは新世代のバイオテクノロジーによってはじめて可能となる成果であり、今後この分野を加速して新しい事業展開に結びつくことが期待できる。

### 参考文献:

- 1) 遠田昌人, 田口憲人: *Bacillus coagulans* の 16S-23S rDNA ITS 領域の多型解析. 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, 27, 77-83 (2009).
- 2) 日本標準飼料成分表(1980年度版)
- 3) 大成清: 養豚飼料と配合設計, 文永堂出版 (1985).
- 4) 坂代江: 納豆が子豚の健康に及ぼす影響, 日本 SPF 豚研究会, 33, 15-19 (2008).
- 5) 柏岡静ら: 乾燥オカラ納豆菌の豚に対する投与効果, 徳島畜研報, 5, 14-17 (2005).
- 6) 八谷純一: 乳酸菌製剤の早期投与による子豚の下痢抑制, 日本 SPF 豚研究会, 17, 6-9 (2000).