

平成26年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「発酵活用でリンゴ加工残渣のキノコ培地化と
廃培地の高機能飼料化」

研 究 開 発 成 果 等 報 告 書

平成27年 3月

委託者 関東経済産業局

委託先 公益財団法人長野県テクノ財団

— 目 次 —

第 1 章 研究開発の概要	頁
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	4
1-3 成果概要	6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	7
 第 2 章 本論(研究開発の詳細)	
2-1 リンゴ加工残渣の長期保存のための発酵技術の開発	8
2-2 リンゴ加工残渣利用によるキノコ培地性能向上の研究	10
2-3 キノコ廃培地を長期保存するための発酵技術開発	15
2-4 発酵キノコ廃培地飼料への機能性付与の研究開発	18
 第 3 章 平成 26 年度研究開発のまとめと今後の予定	23
 第 4 章 全体総括	24

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

1-1-1 背景・研究目的

< 研究背景 >

長野県を代表する特産のリンゴ生産（全国第2位）とキノコ生産（全国第1位）からは、未利用バイオマス（リンゴ加工残渣、キノコ廃培地）が多量に発生し、その処理には多額の費用が必要で経営圧迫と各産業の疲弊を招いている。リンゴ加工残渣を発酵技術で良質なキノコ培地に、更にキノコ廃培地を発酵技術で家畜の高機能飼料にすることにより多段的な有効活用を目指す。

上述のように、地域（長野県）の主力になっているリンゴ、キノコ、畜産の産業が直面する課題の早期解決が急務であり、各産業が連携して技術的な解決を図ることが求められている。

主な課題は、以下のとおりである。

- ・リンゴ加工残渣（絞り粕）を安定使用するための長期保存が困難である。
- ・キノコ培地材料や飼料穀物は、輸入依存度が高く、価格も高騰しており、原価低減が必要である。
- ・キノコ廃培地は、変質・腐敗し易く安定的な長期保存が困難である。
- ・リンゴ加工残渣・キノコ廃培地は、現状廃棄されるのが主流であるが有効活用の余地が十分ある。
- ・リンゴ加工残渣・キノコ廃培地等の未利用バイオマスの処理費用やエネルギーを低減し、リサイクルを促す必要がある

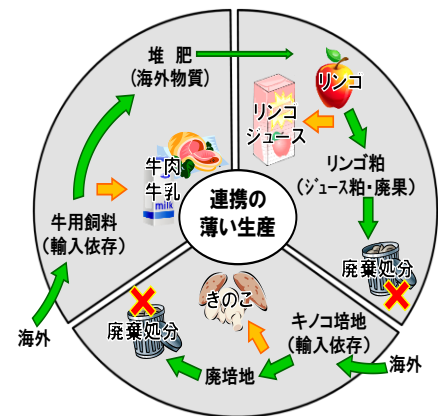


図1 産業間の連携が薄い非効率な生産体制（現状）

（キノコ栽培および培地について）

本研究開発は、キノコ栽培に用いる培地にリンゴ加工残渣を用いて調整したキノコ培地（以下「培地」という。）およびその製造方法に関するものである。従来、キノコ栽培の際に用いられる培地は、オガ粉やコーンコブを主原料として栄養剤となる米糠などを混合して調整している。しかしながら、オガ粉は、近年、国内における木材資源の減少や林業の不振、さらには木材に代わる人造建材の普及などにより、入手が非常に困難な状況になってきている。またコーンコブにおいても、輸出元におけるバイオ燃料への利用が増加していることから国内への輸入量が激減し、オガ粉と同様に入手が非常に困難な状況になってきている。このため、オガ粉やコーンコブに代わる主原料の開発が切望されていた。

本研究開発の目的は、オガ粉やコーンコブを主原料にしている培地に代わり、県内または国内で容易に調達でき、かつ品質的にもオガ粉やコーンコブを主原料にする培地に劣らない培地、およびその製造方法を提供できるようにすることにある。

上述した課題を解決するために、本研究開発に係る培地は、キノコ栽培に適する仕様に調整したリンゴ加工残渣を培地原料として代替可能にすることである。幸いなことに、リンゴはジュース製造時に破碎され、培地には好適な大きさになるため、比較的容易に培地原料として利用することができる。

本研究開発における培地は、コーンコブとリンゴ加工残渣に必要に応じて栄養剤を添加して仕上げたものである。培地原料がコーンコブ及びリンゴ加工残渣なので、オガ粉を主原料とする場合のように、前処理として相当期間の野積を実施する必要がないので、培地を短期間で製造することができる。そして、リンゴ加工残渣は、オガ粉のように菌糸阻害物質を含まないため、キノコ栽培に非常に適する培地を得ることができる。したがって、この培地でキノコを栽培することにより、栽培ビン中における菌糸の増殖が促進されて良好に子実体を育成できるので、品質の良いキノコを収穫することができ、さらに収穫量も増大できる。

また、使用するリンゴ加工残渣は、ジュースを搾った後に残る搾り粕、収穫前に落下した果実や間引かれた果実を所定の大きさに砕いたものを使用できるので、原料を安価に調達できる。さらに、リンゴは家畜の飼料として従来から利用されているものであり、キノコ栽培後の培地（以下「廃培地」という。）を家畜の飼料として利用できる。しかもリンゴは家畜の好物でもあるので、嗜好性に富んだ飼料として再利用することができる。また、リンゴは菌糸阻害物質を含まないため、従来から培地原料として利用しているコーンコブ培地基材に、リンゴ加工残渣を添加すれば、これを栄養剤(肥料)として有効に利用することができる。

以上のことから、培地は、廃棄処分に頭を悩ますリンゴ加工残渣を使用して製造することができ、かつ廃培地は家畜の飼料に利用できるため、生産コストを低減できると共に環境に優しい有益な培地となる。

（リンゴ加工残渣の問題点）

リンゴ加工残渣を利用する際に大きな問題になるのが、季節変動と年次変動である。リンゴの収穫時期は10月から12月に限られるので1月から9月までの利用期間に工夫が必要となる。つまり、リンゴ加工残渣の保管である。リンゴ加工残渣は含水率が約80%と高く、乾燥保存するには残渣利用価値以上にコストがかかる。水分率が高いということは輸送コストも高くなる。また、リンゴ加工残渣はペクチンの含有率が高いため通常の手法では乾燥が困難である。これらの理由もあり、再利用が敬遠される傾向にあった。今までの利用実態は、家畜飼料化や堆肥化が主で、一部は食品素材として利用されているが、その他は焼却されていた。飼料としての利用は年間発生量（推定3万数千トン）の数分の一に過ぎないといわれている。

< 研究目的 >

新技術の特徴と発酵を含む優位性

- ・乳酸発酵によるリンゴ加工残渣の長期保存。
- ・加工残渣の添加で良質な培地の自給を実現する。
- ・発酵による廃培地の保存と飼料化による多段的、循環的活用。
- ・乳酸発酵による廃培地の高機能飼料化を実現する
- ・発酵技術で地域の未利用バイオマスを低コスト・省エネで有効活用し、循環システムを構築して地域の活性化と雇用創出を目指す。

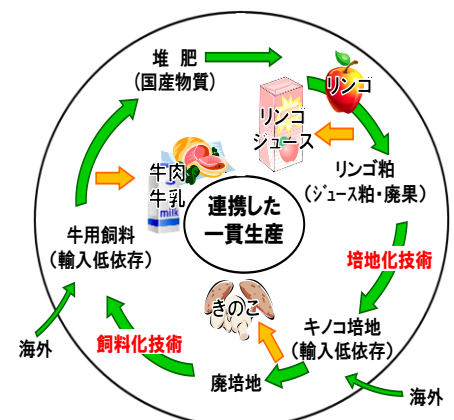


図2 畜産を含む産業間の連携で一貫生産と循環システム

1-1-2 研究概要・目標

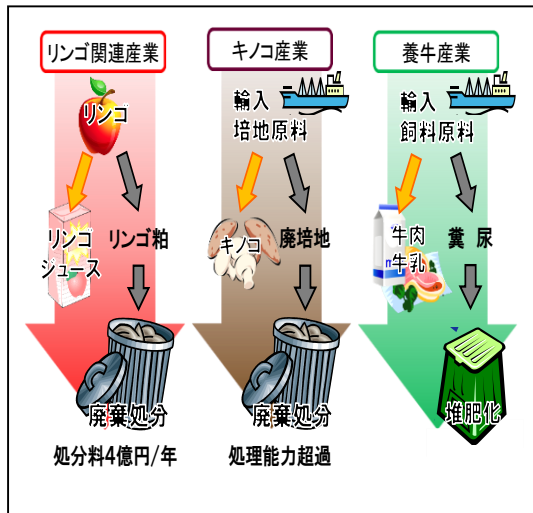


図3 廃棄・焼却又は堆肥化が主流の従来技術

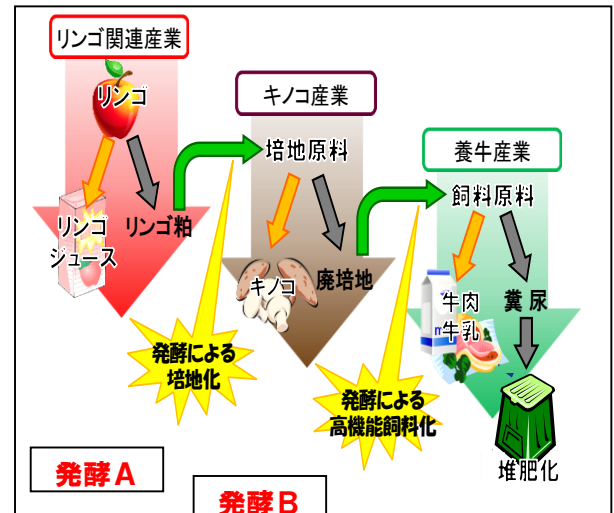


図4 発酵技術による産業間の連携システム

<課題とニーズ>

- ・**リンゴ関連産業の課題**:長野県は全国第2位のリンゴ生産県でリンゴ加工残渣の排出量が多量で、これらは未利用バイオマスとして有償廃棄処分されている。(年間8,000トン/4億円)
- ・**キノコ産業の課題**:長野県は全国第1位のキノコ生産県で培地の需要も多く、殆どが輸入に依存している。近年の原材料高騰は経営を圧迫し更には廃培地の処理に苦慮している。処理能力(堆肥等)を大幅に超過し野積で放置の例も少なくない。(原材料の輸入依存度; 約90%、年間の廃培地廃棄量; 約27万トン)
- ・**養牛産業(畜産)**:長野県は全国10位の酪農県で「信州牛」の肉牛ブランドを保有するが飼料自給率は低い。(飼料自給率; 約25%)

産業間の連携と循環システムの概要

- ・県内の未利用バイオマス資源の多段的(リンゴ加工残渣、キノコ廃培地)有効活用と産業間連携による循環システムの構築
- ・リンゴ(生産・加工)産業 ⇒ **発酵A**:栄養価の高いリンゴ加工残渣を発酵技術で保存とキノコ培地への添加で連携する。
- ・キノコ産業 ⇒ **発酵B**:キノコ収穫後の廃培地の堆肥化と有償廃棄処分を発酵技術で高機能飼料化で連携する。
- ・残留栄養分の高いキノコ廃培地を家畜飼料として有効活用し、自給を含む経営コストの低減を図る。
- ・有効活用システムの構築と産業間の連携及び循環システムの実証を図る。家畜飼料の給与、消化、更に排泄後は堆肥として品質確保の土壤に還元し、効率循環システムを構築する。

事業のプロセスと研究目標

<事業プロセス>

未利用バイオマス(リンゴ加工残渣) ⇒ 乳酸菌発酵による保存化 ⇒ キノコ培地(菌床)に添加活用 ⇒ 未利用バイオマス(キノコ廃培地) ⇒ 乳酸菌発酵による保存化 ⇒ 家畜の飼料に活用 ⇒ 土壤還元

< 研究目標 >

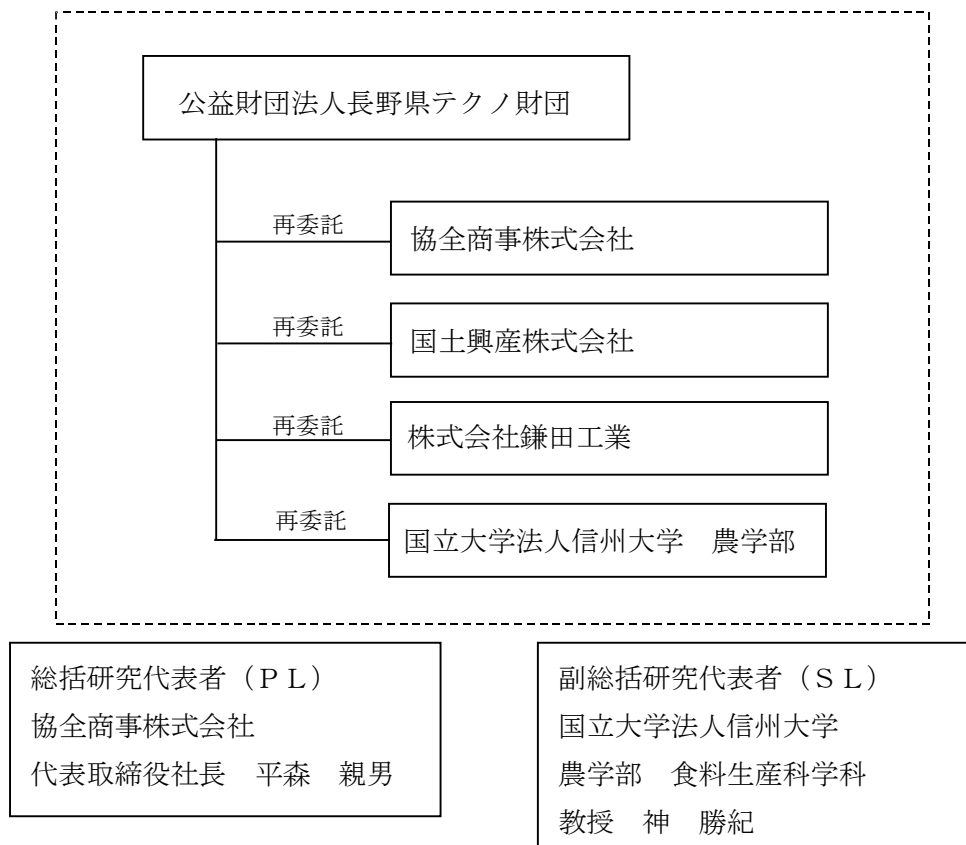
- ①乳酸発酵によるリンゴ加工残渣の長期保存（1年間）
 - ②リンゴ加工残渣添加によるキノコ培地の性能向上（栽培期間の5%短縮）
 - ③キノコ廃培地の長期保存の発酵技術の開発（保存期間3ヶ月）
 - ④リンゴ加工残渣を含むキノコ廃培地の高機能飼料（病原菌の不検出）
- ※大量の未利用バイオマスを含む、地域資源の多段的有効活用と地域産業（リンゴ、キノコ、畜産）の資材調達及び経営コストの低減による活性化、事業化を図る。

(4) 実施内容

- ①リンゴ加工残渣を長期保存するための発酵技術の開発
 - 2-1-1 リンゴ加工残渣をキノコ培地原料化するための適正乳酸菌株の研究
- ②リンゴ加工残渣利用によるキノコ培地性能向上研究
 - 2-2-1 リンゴ加工残渣を用いたブナシメジの栽培試験
 - 2-2-2 エノキタケの栽培試験
- ③キノコ廃培地を長期保存するための発酵技術開発
- ④発酵キノコ廃培地飼料への機能性付与の研究開発
 - 2-4-1 廃培地の飼料化を目的とした発酵廃培地飼料の給与試験
 - 2-4-2 廃培地飼料の嗜好性試験
 - 2-4-3 キノコ廃培地成分が黒毛和種牛の筋肉内脂肪細胞分化に及ぼす影響

1-2 研究体制

1-2-1 研究組織



1-2-2 研究員・プロジェクト管理員

【事業管理者】公益財団法人長野県テクノ財団

管理員

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
宮澤 茂	善光寺バレー地域センター 事務局長	
玉井 秀男	善光寺バレー地域センター コーディネータ	

【再委託先】

（研究員）

協全商事株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
平森 親男	代表取締役社長	①②③④
高橋 純	技術営業部 技術課 技術担当	①②③④

国土興産株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
浅川 新	代表取締役社長	③④
豊田 秀美	常務取締役	③④
澤口 豊和	環境事業部 総合リサイクルセンター長	③④

株式会社鎌田工業

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
鎌田 政人	代表取締役社長	③④
三谷 紘明	研究開発部（バイオサイエンス部）開発部長	③④

国立大学法人信州大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
神 勝紀	農学部 教授	①②③④
上野 豊	農学部 助教	①③④
米倉 真一	農学部 助教	①②
渡辺 敬文	農学部 助教	①

1-2-3 他からの指導・協力者

研究開発推進委員会 委員

氏名	所属・役職	備考
平森 親男	協全商事株式会社 代表取締役社長	P L
神 勝紀	国立大学法人信州大学 農学部食料生産科学科 教授	S L
高橋 純	協全商事株式会社 技術営業部 技術課 技術担当	
浅川 新	国土興産株式会社 代表取締役社長	
豊田 秀美	国土興産株式会社 常務取締役	
鎌田 政人	株式会社鎌田工業 代表取締役社長	
三谷 紘明	株式会社鎌田工業 研究開発部 開発部長	
中澤 雅高	JA グリーン長野 営農部営農指導課長	アドバイザー
坂田 毅彦	有限会社坂田農園 代表取締役社長	アドバイザー
宮下 裕	株式会社ミヤシタフーズ 代表取締役社長	アドバイザー

(注) ・P L (Project Leader)、S L (Sub Leader) を備考欄に記載。

・アドバイザーは備考欄に記載。

1-3 成果概要

① リンゴ加工残渣を長期保存するための発酵技術。

長期保存の方法には、エネルギー投入量が少なく安価な方法として乳酸発酵を採用した。そのために、数十種類の乳酸菌を対象とし、リンゴ加工残渣の保存試験や2次発酵試験を実施して、好成績を記録した *Lactobacillus plantarum* を選択して利用した。その結果、この乳酸菌で発酵させたリンゴ加工残渣は十分な保存性を発揮し、実用に耐えることが判明した。

② リンゴ加工残渣利用によるキノコ培地性能の研究。

リンゴ加工残渣を加えた培地はキノコ呈味成分の増加に寄与すること、収量増加に繋がることが確認出来た。また、従来の高圧殺菌法に匹敵する効果があり、しかもコストダウン可能な方法として、スチームミキサーとスチームインジェクターを併用した省エネ型培地殺菌法を開発した。

③ キノコ廃培地の長期保存の発酵技術。

キノコ廃培地に残存するキノコ菌やその他雑菌を水蒸気で殺菌し、その後に乳酸菌を添加・発酵させることで、確実に乳酸発酵できることが判明した。この方法で製造した飼料の嗜好性は悪くなく、家畜を順応させれば他の飼料と同様に摂食することを見出した。

④ 発酵廃培地飼料化への機能性付与。

乳酸発酵した廃培地飼料は、プロバイオティクス効果によって家畜の腸内細菌叢を改善することから、畜産物の生産性と安全性を向上させることが期待された。さらにこの飼料は牛の脂肪細胞分化を促進するという示唆が得られたことから、美味しい牛肉生産に繋がる可能性も考えられた。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 研究者

- ・ 所 属：協全商事株式会社
- ・ 役職・氏名：代表取締役社長・平森 親男
- ・ 連 絡 先：TEL(026)285-2216、FAX(026)283-0723、E-mail:hiramori@kyozen.co.jp

(2) 事業管理者

- ・ 所 属：公益財団法人長野県テクノ財団 善光寺バレー地域センター
- ・ 役職・氏名：事務局長・宮澤 茂
- ・ 連 絡 先：TEL(026)225-6650、FAX(026)225-6711、E-mail:s-miyazawa@tech.or.jp

第2章 本論

2-1 リンゴ加工残渣の長期保存のための発酵技術の開発

2-1-1 リンゴ加工残渣をキノコ培地原料化するための適正乳酸菌株の研究

目 的

前年度までの2年間に於いて乳酸菌評価を行い、リンゴ加工残渣の長期保存に適した乳酸菌として *Lactobacillus plantarum* を選定しているが、より能力の高い乳酸菌が発見される可能性もある。本実験では、保存性付与を目標とした、リンゴ加工残渣の発酵によるキノコ培地原料化に適した乳酸菌を選択するため、乳酸菌種を拡大して小規模リンゴ加工残渣の保存性向上を調製し、発酵性状を評価した。

材料及び方法

パウチサイレージによる発酵実験で、pH、乳酸菌数、酵母数、有機酸組成を測定した。小規模サイレージ発酵試験に用いたリンゴ加工残渣は、長野県内の別のリンゴ加工工場から排出されたものを用いた。搾汁前にリンゴは3回水道水で洗浄し、最後の洗浄後に窒素室へ送り込んで、酸化による褐変を防ぐためにガス交換による酸素遮断を行った後搾汁した。搾汁後のリンゴ加工残渣を回収し、使用まで-20℃で保管した。

表1に示す乳酸菌を使用した。凍結乾燥菌体で分譲されたものを分譲者指定の方法により復元し、培養したものを用いた。リンゴ加工残渣サイレージの調製は、材料リンゴ加工残渣 1,500g、おが粉（水で膨潤後オートクレーブにより殺菌[90℃、30分]し、乾燥機にて60℃で乾燥）500gの割合で混合し、水分を調整した（調整後の水分量は80.0±1.0%）。このおが粉混合リンゴ加工残渣を分割し、上記種菌を重量比1%となるように接種した（無添加区はMRS液体培地を添加）後、手作業で十分に混合した。20gずつストマッカー用積層フィルム袋に入れ、バキュームシーラーで抜気して密封した。これらバッグサイロを25℃インキュベーターに静置し、経時的に開封して分析を行った。

小規模サイレージを開封し、10gを取り出してビーカーに入れ、滅菌した生理食塩水90mlを加えて5℃で保持しながらスターラー攪拌して10倍希釈液を調製した。この希釈液について、比較電極pHメーターを用いて測定し、発酵物のpHとし、遠心分離（10,000rpm、4℃、10分間）を行った後の上清を有機酸測定に用いた。また、この希釈液をリン酸緩衝食塩水により段階希釈し、MRS寒天培地およびポテトデキストロース寒天（PDA、日水製薬[株]、東京）を用いて乳酸桿菌数とカビ・酵母数をそれぞれ平板培養法により測定した。MRS平板培養条件は30℃、72時間、PDA平板培養条件は25℃、7日間とした。各微生物の菌数は2反復で計測し、新鮮試料1g当たりのコロニー形成数（cfu/g）で表示した。

有機酸測定には希釈液上清を用いて、HPLC（により次の条件で分離と検出定量を行った。カラム：Inertsil ODS-3、移動相：10%アセトニトリル-0.02%過塩素酸、流速：1ml/分、検出：210nm紫外検出、動作管理とピーク同定・定量はChromNAVソフトウェアで行った。

表 1 供試した乳酸菌

属名	種名	菌株*
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	NBRC 15891, NBRC 3070, NBRC 14711, NBRC 14712, NBRC 14713, NBRC 101975, NBRC 109604, NBRC 106468
	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	NBRC 106468
	<i>Lb. brevis</i>	NBRC 107147
	<i>Lb. pentosus</i>	NBRC 106467
	<i>Lb. buchneri</i>	NBRC 107764
	<i>Lactobacillus</i> spp.	Strain B2, Strain B3
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	NBRC 100496
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	NBRC 107768
	<i>P. acidilactici</i>	NBRC 3076
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NBRC 100933, NBRC 12007

*Strain B2 および B3 はリンゴ粕から分離した乳酸菌株、それ以外はすべて[独]製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター[NBRC、東京]から分譲を受けた乳酸菌株

結果と考察

リンゴ加工残渣発酵によるサイレージ化に適した乳酸菌株の選定を目的として、分譲菌株を用いて小規模サイレージを調製し、発酵性状を評価した。

有機酸については、すべてのサンプルについて乳酸と酢酸のみ検出され、プロピオン酸や酪酸等は検出されなかった。対照区においても乳酸菌が検出され、有機酸生成があったことから、搾汁後のリンゴ加工残渣にはある程度の乳酸菌が付着しており、外部からの乳酸菌添加がなくても発酵による長期保存は可能であると示された。

NBRC107764 株 (*Lactobacillus buchneri*) を用いた場合のみ、対照と比較して顕著な乳酸菌数増加と酵母数減少が認められ、本菌種の使用によりリンゴ加工残渣の保存性向上が期待できると考えられた。また、*Lb. buchneri* 以外の菌株については対照と比較して顕著な発酵促進や酵母数減少は認められなかった。しかしながら、乳酸菌添加により 2 週間発酵後の pH と、4 週間発酵後の乳酸桿菌数や有機酸濃度について、対照とは異なる傾向がみられたことから、添加した各菌株がリンゴ加工残渣発酵に寄与していることが示唆された。無菌に近い状態からの野生乳酸菌に依存する“自然発酵”ではロット間の違いが大きく、殺菌後材料に残存する酪酸菌、好気性細菌、糸状菌および酵母などの微生物が競合することにより乳酸菌の発酵が阻害され、サイレージ品質の劣化や発酵損失を招く可能性があるため、リンゴ加工残渣に乳酸菌を添加して安定的に発酵させることが必要であると推察された。

さらに、乳酸菌を添加して 6 週間発酵させたリンゴ加工残渣を好気条件下で保存し、品温を測定して、酵母による二次発酵の発生程度を評価した。

Lb. plantarum または *Lb. buchneri* のいずれかを加えたものでは開封後の好気発酵(品温上昇で評価)の程度が抑制されることがわかり、*Lactobacillus* 属乳酸菌を添加したリンゴ加工残渣発酵は、酵母菌数の減少にかかわらず、その活性低下に影響していると考えられた。

結 論

*Lb. buchneri*がリンゴ加工残渣の保存性向上調製に適していると考えられたが、他菌種を用いた場合でも添加した乳酸菌はリンゴ加工残渣発酵に寄与しており、安定したサイレージ調製に有効であると推察された。

2-2 リンゴ加工残渣利用によるキノコ培地性能向上の研究

2-2-1 リンゴ加工残渣を用いたブナシメジの栽培試験

目 的

本年度のキノコ栽培試験は「ブナシメジ」と、昨年度も実施した「エノキタケ」をより詳細に培地設計して栽培試験を行った。その上で品質、収量、栽培日数短縮を向上させることを目標とした。

材料及び方法

ブナシメジ培地（850cc ビン 1 本当たり）の配合割合は表 2 の通りである。リンゴ加工残渣は、長野市の寿高原食品から提供されたリンゴ加工残渣を用い、これに *Lb. plantarum* を接種して 6 ヶ月間乳酸発酵させたものを発酵リンゴ加工残渣とした。発酵リンゴ加工残渣を乾物重 7.6 g 添加した区を AS 区、16.0 g 添加した区を AM 区、23.4 g 添加した区を AL 区とし添加しない区を対照区とした。また、試験本数は各区 16 本（キノコの栽培は、ビンを 16 本収納できるプラスチックコンテナ単位）で行った。培地は含水率を 64%に調整した後に栽培ビン 1 本当たり約 500 g 充填した。

供試菌として、ブナシメジ（NN-12 菌，長野農工研・JA 中野市保有株）を用いた。

協全商事の接種室（温度 15℃）で前日ビン詰めした培地を一昼夜、無菌空調設備を完備している害菌汚染の心配のない接種室で放冷し、培地温度を 17℃まで下げた。

常法に従い、種菌ビンの外面をアルコール消毒し種菌の母菌を除去し、1 ビン当たり 15g を接種機 GS-II（オギワラ精機）で接種した。菌床面が乾燥すると芽だし不良が起こる原因になるため、菌床面の乾燥を防ぐために菌床面を完全に覆うようにした。

培養は、温度 20℃、湿度 70%の条件下で行った。

菌掻きは、菌床の中央部を饅頭型に残す方法が一般的に行われている。菌床面の接種した種菌から子実体を発生させるので中央に残す種菌の直径は 30mm、高さは 7mmとした。ブナシメジ菌掻機に取り付け菌掻きを行った。

芽出しの環境は、温度 15℃、湿度 80～95%、CO₂濃度は 1,000PPM 以下、光は生育棚から漏れる光程度の照射で行った。生育は温度 15℃、湿度 80～95%、CO₂濃度は 1,000PPM 以下、光照射は各棚に取り付けられている白色蛍光灯を一日 12 時間 30 分間隔で行った。そして傘の直径が 18～22mmの正円形、茎長 8～9 cm、傘の開きが 7 分開きをいわゆる収穫適期と考え収穫し栽培所要日数、収量等を記録した。

表 2 ブナシメジ培地組成 (乾物重 g)

	対照区	AS 区	AM 区
コーンコブ	57.4	48.8	45.8
発酵リンゴ加工残渣	0.0	26.7	50.1
コメヌカ	28.7	22.5	21.1
ワタミガラ	25.7	22.5	21.1
豆皮	25.7	22.5	14.1
特フスマ	25.7	22.5	14.1
粉ビート	9.5	7.5	7.0
タカラクリーン	1.9	1.5	1.4
総量	174.6	174.6	174.7

栽培成績：表 5 に菌廻り日数、収量を示す。菌廻り日数では、対照区は AS 区と AM 区に比べ 1 日遅く 45 日であった。熟成の度合いを知り、菌掻き適期を判定する基準は明確にされておらず日数を頼りに菌掻きを行っているのが一般的である。きのこ栽培指標には培養と熟成日数は 87 日前後が望ましい結果として報告があったので熟成日数を 41 日として菌掻きを行った。菌掻きから収穫までの発生日数は各区 19 日であった。AL 区は培養初期に接種面から下へ 3cm 位菌廻りしたがそれ以降菌廻りしなかったので AL 区の実験は中止した。

発酵リンゴ加工残渣による収量の影響を検討するため、各区 16 本の標本について平均値の差の検定を行ったが、分析の結果は各区に差はなかった。(p<0.05)

ブナシメジの収量と廃培地：各区ビン毎のキノコ収量に違いがあるように廃培地の重さにも違いがあった。培地成分とキノコ成分と味については、過去に研究報告はあるがキノコ収量と廃培地については見当たらない。収量と廃培地の分析を行ったところ各区キノコ収量と廃培地の間には相関関係が認められた。(p<0.01)

呈味成分に及ぼす影響：キノコの遊離アミノ酸は、対照区と AS 区ではシスチンを除いてすべて AS 区は増加した。対照区と AM 区は甘味成分のグルタミン酸、プロリンは増加傾向であったが他の甘味成分アミノ酸

は減少傾向にあり、また、苦味成分はすべて減少傾向であった。ブナシメジは苦味成分が多いことで知られており、苦味成分の抽出にブナシメジが候補に挙がることからもうなずける。

対照区、AS 区、AM 区について呈味成分の差を検討するため、一元配置分散分析を行い、差の検定は Tukey の方法を用いて行ったところ、各区に有意差が見られなかったが対照区に比べ AM 区は苦み成分が減少する傾向は見られた。つまり、ブナシメジはヒラタケ、エノキタケに比べ発酵リンゴ加工残渣添加の影響を受けないが苦み成分が減少する傾向にあることは示唆された。イノシン酸、5'-グアニル酸はウスヒラタケ、エノキタケ同様発酵リンゴ加工残渣添加の影響がなかったので分析を行わなかった。

表 3 発酵リンゴ加工残渣がブナシメジの栽培成績に及ぼす影響

試験区	期 間 (日)					品質
	培養 ¹⁾	熟成 ²⁾	発生 ³⁾	栽培 ⁴⁾	収量(g)±SE	
対照区	45	41	19	105	190.8±3.0	良
AS区	44	41	19	104	188.9±2.1	良
AM区	44	41	19	104	189.4±1.6	良
¹⁾ 菌が瓶全体に蔓延するまでに要した日数, ²⁾ 培養終了から菌掻きまでの日数, ³⁾ 菌掻きしてから収穫までの日数, ⁴⁾ 接種してから収穫までの日数						
日数						

ブナシメジの収量と廃培地：各区ビン毎のキノコ収量に違いがあるように廃培地の重さにも違いがある。培地成分とキノコ成分と味については、過去に研究報告はあるがキノコ収量と廃培地については見当たらない。収量と廃培地の分析を行ったところ各区キノコ収量と廃培地の間には相関関係が認められた。(p<0.01)

2-2-2 エノキタケの栽培試験

材料及び方法

エノキタケ培地（850cc ビン 1 本当たり）の配合割合は表 4 の通りである。リンゴ加工残渣は、長野市の寿高原食品から提供されたリンゴ加工残渣を用い、これに *Lbto bacillus plantarum* NBRC15891 を接種して 6 ヶ月間乳酸発酵させたものを発酵リンゴ加工残渣とした。発酵リンゴ加工残渣を乾物重 9.0 g 添加した区を AS 区、19.0 g 添加した区を AM 区、30.2 g 添加した区を AL 区とし添加しない区を対照区とした。また、試験本数は各区 16 本（キノコの栽培は、ビン を 16 本収納できるプラスチックコンテナ単位）で行った。培地は含水率を 64% に調整した後 に栽培ビン 1 本当たり約 560 g 充填した。

供試菌として、エノキタケ（G-5、長野農工研保有株）を用いた。

協全商事の接種室（温度 15℃）で前日ビン詰めした培地を一昼夜、無菌空調設備を完備している害菌汚染の心配のない接種室で放冷し、培地温度を 17℃まで下げた。（放冷室と接種室は理想的にはそれぞれを独立して設けることが望ましい。）接種室内は放冷時、フィルターを通して除菌した外気を導入し培地温度を下げるが、接種時は風の流れを断ちファンクーラーだけを作動させ接種を行った。これは一般的に行っている方法であるのでそれに倣った。

常法に従い、種菌ビンの外面をアルコール消毒し種菌の母菌を除去し、1 ビン当たり 10g を接種機で接種した。菌床面が乾燥すると芽だし不良が起こる原因になるため、菌床面の乾燥を防ぐために菌床面を完全に覆うようにした。

培養は、温度 17℃、湿度 70% の条件下で行った。

菌掻きは、菌床面の老化した種菌を取り除き活力のある菌糸から子実体を発生させるために行う。菌掻専用機に取り付け表面の培養中に乾燥した菌床面の一部も掻き取り、害菌汚染のない水を噴霧して芽だしを促した。

芽出しの環境は温度 15℃、湿度 80～95%、CO₂ 濃度は 1,000PPM 以下、抑制は温度 5℃、湿度 80～90%、CO₂ 濃度は 1,000PPM 以下、生育は温度 4℃、湿度 75～80%、CO₂ 濃度は 1,000PPM 以下、光照射は各棚に取り付けられている白色蛍光灯を一日 60 分間行った。そして傘の直径が 10～12 mm の正円形、饅頭型、茎長 14～15 cm をいわゆる収穫適期と考え収穫し栽培所要日数、収量

等を記録した。

なお、エノキタケは成長するにしたがって外側に広がってしまい商業生産では商品価値が下がるため、外への広がりを防ぐ目的でキノコを丸い筒状のケースで包む。（この作業を紙巻きと呼んでいる）実験においてもこれに倣って紙巻を行った。紙巻を行う時期は、子実体の成長に影響を与えるのでビン口から 2～3cm 程度成長した時期に行った。早過ぎると茎が不揃いや奇形となったり、キノコが柔らかくなる。また、遅すぎると紙巻がしにくくなったりカサが乾燥したりするので常法に従った。

表 4 エノキタケ培地組成（乾物重 g）

	対照区	AS 区	AM 区	AL 区
コーンコブ	95.4	75.6	58.6	39.7
発酵リンゴ加工残渣	0.0	9.0	19.1	30.3
コメヌカ	52.2	50.4	53.6	56.9
ワタミガラ	18.9	20.0	21.2	22.5
一般フスマ	14.4	18.1	19.2	20.4
粉ビート	9.9	13.3	14.1	15.0
オカラ	9.9	13.3	14.1	15.0
カキガラ	1.4	1.6	1.7	1.8
石灰	1.4	1.6	1.7	1.8
総量	203.5	202.9	203.4	203.4

結 果

菌廻り日数、収量への影響：表 5 に菌廻り日数、芽出し日数、生育日数、栽培日数及び収量を示す。菌廻り日数はリンゴ加工残渣の添加により、対照区に比べ AS 区、AM 区、AL 区は 1～4 日遅れた。しかし、芽出し日数は各区 11 日であったので生育日数は 1～4 日の違いがあった。

また、収量は対照区に比べ AS 区、AM 区、AL 区すべての区の収量が少なかった。菌掻き時期つまり接種から菌掻きまでの日数には幅があり種菌の種類によっては収量、品質に大きく左右すると言われている。本実験では菌掻き時期が遅すぎ適切でなかったことが原因と考えられる。

菌廻りの定義、つまり菌掻き適期を判定する基準は明確にされておらず日数を頼りに菌掻きを行っているのが一般的である。事実、キノコ栽培工場では日数による管理をすることが多い。

そこで本実験を参考に、菌廻り日数つまり接種から菌掻き日までの培養日数を対照区 29 日、AS 区 30 日、AM 区 32 日、AL 区 32 日、また、芽出し日数、生育日数をそれぞれ 12 日と 16 日として栽培実験を行った。この日数の根拠は前回の試験で 1 ビンずつ調べた際の平均日数である。この結果が表 6 である。

収量について発酵リンゴ加工残渣による影響を分析するために有意差検定を一元配置分散分析によって行った。また、有意差 ($p < 0.05$) が認められた場合には Tukey 法で多重比較を行った。その結果、すべての区において有意差 ($p < 0.01$) が認められた。前述の様に菌掻き適期

を判定する基準は明確になっていないが、商業生産においては適期を間違えると経営に大きく影響することが示唆された。

表 5 発酵リンゴ加工残渣がエノキタケの栽培成績に及ぼす影響

試験区	菌廻り日数 ⁽¹⁾	芽出し日数 ⁽²⁾	生育日数 ⁽³⁾	栽培日数 ⁽⁴⁾	収量
	日				g /ビン
対照区	29.2±1.7	11.8±1.8	14.9±0.8	55.9±2.5	207.0±8.8
AS区	30.9±2.2	11.1±1.8	14.7±0.7	56.8±2.3	186.3±11.0
AM区	32.8±2.9	11.0±1.5	14.0±0.8	57.8±2.1	195.1±16.3
AL区	33.4±2.5	11.3±1.7	14.2±1.0	58.9±2.1	191.4±14.3
平均値±標準偏差					
(1) 菌がビン全体に蔓延するまでに要した日数					
(2) 菌搔きを行ってから発芽までに要した日数					
(3) 発芽から収穫までに要した日数					
(4) 接種してから収穫までに要した日数					

表 6 発酵リンゴ加工残渣がエノキタケの栽培成績に及ぼす影響

試験区	菌廻り日数 ⁽¹⁾	芽出し日数 ⁽²⁾	生育日数 ⁽³⁾	栽培日数 ⁽⁴⁾	収量
	日				g /ビン
対照区	29	12	16	57	183.4±8.4
AS区	30	12	16	58	198.9±6.8
AM区	32	12	16	60	200.3±6.9
AL区	32	12	16	60	200.0±9.0
平均値±標準偏差					
(1) 菌がビン全体に蔓延するまでに要した日数					
(2) 菌搔きを行ってから発芽までに要した日数					
(3) 発芽から収穫までに要した日数					
(4) 接種してから収穫までに要した日数					

遊離アミノ酸について発酵リンゴ加工残渣による影響を分析するために有意差検定を一元配置分散分析によって行った。また、有意差 ($p<0.05$) が認められた場合には Tukey 法で多重比較を行った。その結果、対照区と比べ AM 区はアスパラギン酸 ($p<0.01$)、グルタミン ($p<0.01$)、アラニン ($p<0.05$) で有意差が有った。また他の酸味・旨味、甘味成分はすべて増加の傾向を、反面苦味成分のチロシン ($p<0.01$)、フェニルアラニン ($p<0.01$)、ヒスチジン ($p<0.01$) も増加示した。対照区と比べ AL 区は、グルタミン ($p<0.01$)、アラニン ($p<0.05$)、チロシン ($p<0.05$)、フェニルアラニンで有意性があつた。 ($p<0.05$)

AS 区は AM 区、AL 区に比べ変化が少なかった。AL 区については甘味・旨味成分のグルタミンに有意性 ($p<0.01$) があつたが、その他の甘味・旨味成分に有意性は見られなかった。苦み成分についてはチロシン、フェニルアラニン、アルギニンが増加した。

エノキタケは発酵リンゴ加工残渣の添加量によるアミノ酸増減の影響を受けやすいことが分かった。また、培地への添加量は AM 区相当量、つまり 17% (乾物重) が適当と思われる。

AS 区では添加効果が発揮されず、AL 区でも同様の結果が見られた。イノシン酸はウスヒラタケ、ブナシメジ同様量的に乏しかったが 5'-グアニル酸の増加は確認されたが有意差は認められなかった。

官能評価による食味試験：図 5 は官能評価の結果表である。AL 区のキノコは、食感、うま味濃度、うま味好ましさ、苦味濃度、甘味濃度すべてのポイントが高いことから当然総合評価も高く、次いで AM 区、AS 区、対照区の順であったが各区に有意差は認められなかった。このようにリンゴ加工残渣の添加量が多い培地で栽培したエノキタケは食味が改善することが示唆されたことから、リンゴ加工残渣の培地原料としての優位性は高く評価できる。

下記の要領で評価した。

被験者：20 名（20 代 18 人、30 代 2 名、男性 7 名、女性 13 名）

調理法：沸騰水中にて 2 分間加熱した後に食味。サンプルごとに水で口を漱いだ。

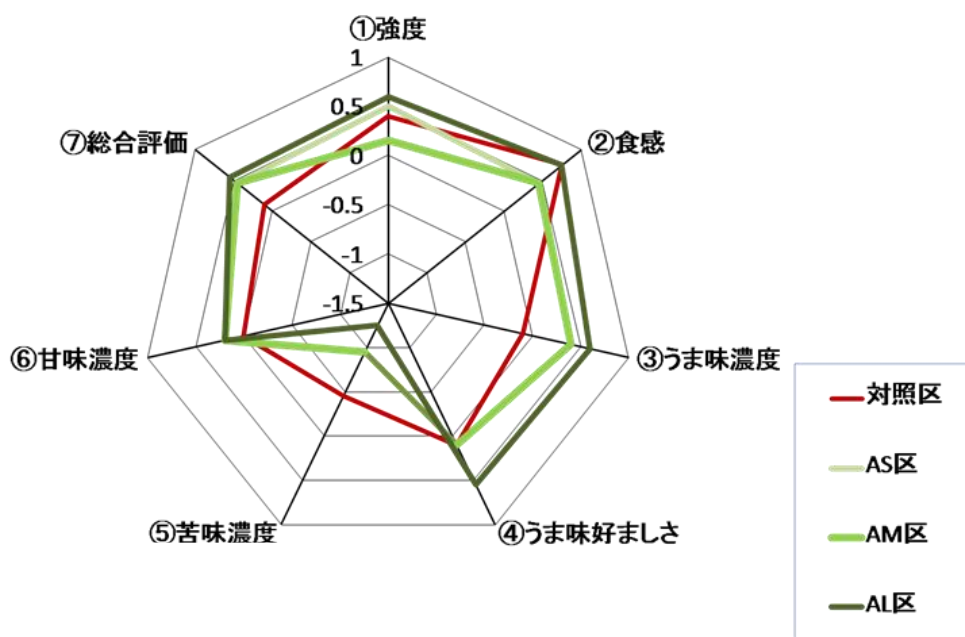


図 5 エノキタケ 食味の官能評価結果

エノキタケ収量と廃培地：前述のブナシメジでキノコ収量と廃培地の関係について分析を行ったように、エノキタケについても行ったところ各区キノコ収量と廃培地の間には相関関係が認められた。(p<0.05)

エノキタケの含水率は 88.6%（日本食品成分表 2010）と高く実に子実体の 9 割近くが水分である。培地から水分をより多く吸収したキノコが高収量と考えられるので廃培地の含水率と水分の関係について分析をした。その結果、総ての区でキノコ収量と培地含水率、廃培地と培地含水率の間に相関関係が認められた。(p<0.05)

2-3 キノコ廃培地を長期保存するための発酵技術開発

目 的

本研究では発酵リンゴ加工残渣含有廃培地の粗飼料としての可能性について探った。長野県のキノコ生産高から推測した廃培地は 27 万トンと言われている。キノコ生産時の使用培地材料によってすべての廃培地が飼料化出来るわけではないが相当量があるものと推察される

本研究の廃培地を牛飼料（A 飼料）用を利用することを前提とした。廃培地を牛用飼料として利用する場合には重要な栄養成分である粗蛋白質が高いといったメリットがある反面、低

コスト化やハンドリングの改善をはじめとして多くの課題がある。廃培地は含水率が極めて高く水を運んでいるようなものであるため仮に原物当たりでは低コストであったとしても乾物当たりあるいはTDNのような栄養量当たりのコストをみれば非常に高くなってしまう。貯蔵性からみても高水分では水を貯蔵していることになり乾物あるいは栄養量当たりの貯蔵コストが高くなる。高水分貯蔵の問題はそれだけではなく、変敗のリスクが高くなる。

そこで、廃培地の飼料化の為に限りなく低コストで保存性を向上させるためにエネルギー投入量の多い乾燥でなく、極めて少ない発酵による保存性向上を試みた。この目的の為に発酵機で廃培地の加熱殺菌、冷却、乳酸菌の投入、発酵を一貫して行うことにより、乳酸発酵飼料を短時間で製造することができるようにして、牛、豚などの家畜を健康的に肥育でき、かつ、肉質の等級向上にも効果がある乳酸発酵飼料を毎日安定して給餌することができる乳酸発酵飼料の製造方法を提供できるようにした。

材料及び方法

エノキタケ廃培地の発酵：対照区及び AM 区廃培地を用い、これに市販の乳酸菌「雪印サイマスター」(*Lactococcus lactis* SBS0001+*L. paracasei* SBS0003+繊維分解酵素)を廃培地 1kg あたり 0.5 g 添加した。蒸気ボイラーで発生させた蒸気で殺菌を行い、廃培地の冷却にはフィルターによって塵埃、雑菌を除去したクールエアーをクリーンスポットエアコンで発生させ、高性能フィルターユニットを通して発酵機へ送った。

発酵機は、攪拌手段が回転軸と、この回転軸の周囲に同軸の遠心方向に突設した攪拌羽根より構成されており、廃培地の害菌を死滅させるための高温蒸気を回転軸より噴射できるように構成されたものである。廃培地の乳酸発酵の手順は図 6 に示した通りである。

即ち、AM 区廃培地 50kg を発酵機に入れ、廃培地を均一化させるために 30 分間攪拌を行った。

なお、滅菌前の廃培地の水分は 56.5%、pH は 6.62 であった。水分は加熱乾燥式水分計、pH はガラス電極メーターを用いて測定した。廃培地が均一になったことを確認後、発酵機に蒸気を注入し培地温度が 90℃に上がったことを確認し 10 分間維持した。これは、(社)配合飼料供給安定機構の「食品残渣の飼料化（エコフィード）をめざして」の飼料化マニュアル（平成 21 年度版）に沿ったためである。なお、マニュアルには 80℃、3 分間となっている。

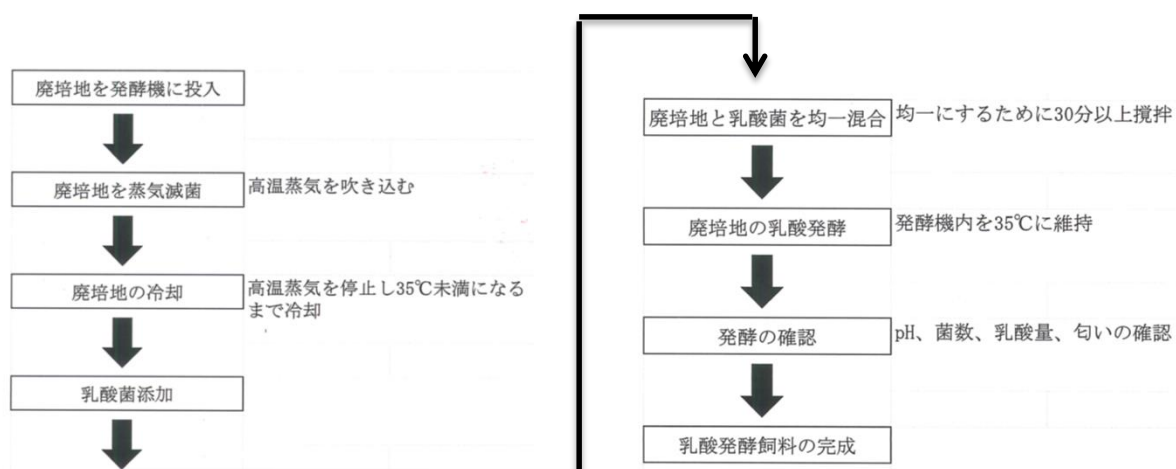


図 6 廃培地の乳酸発酵方法

次に、培地を冷却するためにクリーンクールエアーを注入し培地温度を 35℃まで冷却し、培地全体が 35℃になっていることを確認した後に雪印サイマスターのマニュアルに従って 25g 添加した。その後、廃培地に乳酸菌が均一にミキシングするように 20 分間攪拌し外気侵入を防ぐとともに発酵機槽内を 35℃に保った。1 日、2 日、3 日、6 日、14 日後に pH、乳酸量、乳酸菌数、匂いを記録し発酵の確認とした。対照区についても同様に行った。

乳酸菌数については蔡が、乳酸菌が素早く増殖して不良微生物の増殖を圧倒的に抑えるためには、材料草 1g あたり 10^6 個以上の乳酸菌が必要と報告している。添加した 25g は蔡の報告とも相違ない。殺菌後の廃培地に付着している乳酸菌数を調査するため 3Mペトリフィルム培地でコロニー数を計測したが乳酸菌は確認されなかった。殺菌後の廃菌床には付着乳酸菌がないことが確認されたので、50kg の廃培地を発酵させるには 2×10^9 /g 個以上の乳酸菌が必要になる。

また、殺菌前の廃培地に付着する微生物は乳酸菌の発酵を競合的に阻害し、サイレージ品質の劣化や発酵損失を招く原因となると報告がある。このことは著者らが行っている培地蒸気殺菌の有効性の証である。

本実験では、乳酸菌「雪印サイマスター」(*Lactococcus lactis* SBS0001+*L. paracasei* SBS0003+繊維分解酵素)を用いたが、理由として廃培地は乳酸菌の餌となる糖は少ないが雪印サイマスターの中には繊維分解酵素が含まれており、この働きで繊維を分解して糖を作るためである。また、予め行った培地発酵試験でも発酵が確認出来た。

エノキタケ廃培地の発酵結果：表 7 は廃培地の時間経過後の pH、乳酸量、乳酸菌数である。乳酸量は乳酸計で測定した。

表 7 廃培地の pH、乳酸量、乳酸菌数の変化

経過日数	pH		乳酸量(現物中%)		乳酸菌数	
	対照区	AM区	対照区	AM区	対照区	AM区
発酵前	6.17±0.02	6.36±0.03				
1日後	5.74±0.06	5.45±0.04	0.17±0.11	0.03±0.01		
2日後	4.66±0.12	4.53±0.04	0.14±0.06	1.10±0.07		
3日後	4.52±0.04	4.20±0.00	1.19±0.09	1.12±0.07		
6日後	4.37±0.04	4.19±0.00	1.58±0.02	1.60±0.05	$1.04 \times 10^8 \pm 7.32 \times 10^7$	$3.00 \times 10^8 \pm 2.52 \times 10^7$
14日後	4.23±0.03	4.17±0.01	1.71±0.01	1.73±0.01	$9.34 \times 10^8 \pm 2.52 \times 10^7$	$1.04 \times 10^8 \pm 6.79 \times 10^7$

pH は 2 日後には対照区、AM 区ともに 5 以下となった。AM 区は 3 日後には 4.2 になったが対照区は 14 日後でも 4.2 にはならなかった。また、乳酸量は、対照区は 3 日後、AM 区は 2 日後に 1%を超え、そして 14 日後には両区とも 1.7%以上になった。乳酸菌数は最小菌数と最大菌数で 10 倍までの違いはなかったが菌数に差が出た。

コーンコブを主原料としたエノキタケ廃培地の成分分析値は當眞 (2005) や小柳 (2001) らによって報告されているが、その値は粗灰分が 13.1%と高く、可溶性無窒素物が 48.5%と低い値であるがその他はほぼ同程度である。これはキノコ培地組成の栄養成分による違いによるものと考えられる。

結 論

廃培地を発酵させるための条件

1. 乳酸菌の増殖を競合的に阻害する微生物の除去（蒸気殺菌）
2. 適量の糖分（単少糖で 5%以上）
3. 適量の乳酸菌（蔡¹⁾の報告に材料草 1g あたり 10^6 以上の乳酸菌が必要）

例 蒸気殺菌後の廃培地 50kg (0 CFU/g FM)

必要菌数： $50000\text{g} \times 10^6 \text{ CFU/g} = 5 \times 10^{10} \text{ CFU}$

必要菌量： $2 \times 10^9 \text{ CFU/g}$ の乳酸菌は 25g

4. 早期密封処理(カビ対策のため)

5. pH を 4.2 以下にする²⁾

1) 蔡義民. (2001). サイレージ乳酸菌の役割と高品質化の調製（特集 サイレージの飼料価値を高める調製と利用システム）. 日本草地学会誌, 47(5), 527-533.

2) 粗飼料の品質評価ガイドブック 社団法人日本草地畜産種子協会

2-4 発酵キノコ廃培地飼料への機能性付与の研究開発

2-4-1 廃培地の飼料化を目的とした発酵廃培地飼料の給与試験

目 的

キノコ発育後の廃培地には、適度に分解された繊維質が含まれ、消化管微生物にとって格好のエサとなる（プレバイオティクス）。さらに、乳酸菌を使用して発酵させることで、保存性が高まるだけでなく、増殖した乳酸菌によるプロバイオティクスの効果も期待できる。したがって、発酵廃培地飼料を給与することで、シンバイオティクスが期待できる。

含有するプロバイオティクス乳酸菌の効果で発酵キノコ培地が高い機能性を有していることを定量的に示すため、「下痢発生状況の改善・免疫状態の改善」を目標として、発酵キノコ廃培地を成熟ヒツジに給与し、下部消化管における病原菌数変化に及ぼす効果を検証した。

材料及び方法

信州大学農学部で飼養している雌成熟ヒツジ4頭を使用した。試験飼料はヘイキューブと発酵キノコ廃培地とを 65:35 の割合で混合したものとし、7日間にわたり 1日2回（8:30 および 16:00）、毎回 1kg ずつ給与した。試験飼料を給与する前の期間と、給与期間の終了後（復元期間）では、ヘイキューブのみを毎回 850g ずつ給与した。飼料摂取量は個体ごとに毎日記録した。試験開始前と開始1週間後、復元期間1週間目の自然排泄糞を採取し、培養法により腸内細菌数を測定した。

結 果

表 8 発酵廃培地飼料給与による成熟ヒツジ糞便細菌叢の変化

	試験飼料給与前	試験飼料給与 7 日目	復元後 7 日目
乳酸桿菌	6.25 ± 0.58	7.17 ± 0.21	6.30 ± 0.89
腸球菌	5.27 ± 0.16	5.30 ± 0.37	5.80 ± 0.87
大腸菌群	5.82 ± 0.53^a	4.67 ± 1.16^b	4.11 ± 0.62^b
サルモネラ	検出限界以下*	検出限界以下	検出限界以下
黄色ブドウ球菌	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下

*検出限界は糞便 1g あたり 1000 個。

各項目は糞便 1g あたり生菌数の対数値±標準偏差、各行の異符号間で有意差あり ($p<0.05$)。大腸菌群について、試験飼料給与 7 日後、復元 7 日経過後において給与前の菌数より有意に少なかった。試験飼料の給与により糞便中大腸菌群数が減少し、給与を止めてもその効果は一定期間持続したことを示している。また、有意ではなかったものの、乳酸桿菌数について、試験飼料給与 7 日後において給与前の菌数より多くなる傾向にあり ($p=0.09$)、発酵キノコ廃培地飼料に含まれる乳酸菌が腸内まで到達したか、あるいは試験飼料の摂取によりヒツジ腸管内の乳酸菌が活性化されたかのどちらかが起こっている可能性が推察された。

結 論

反芻動物への発酵キノコ廃培地飼料の給与により、下部消化管において有害菌減少といった形で機能性を発揮しうる。

2-4-2 廃培地飼料の嗜好性試験

目 的

廃培地のような未利用資源の飼料化では、保存性と家畜の嗜好性が重要となる。飼料の嗜好性は、家畜にその餌を選択する動機を起こさせるような餌の性質、状態と言われ、味、臭い、外観（形状）、温度、触感によって決定される。そこで本実験では、家畜の嗜好性試験の定法として用いられるカフテリア方式により、開発された廃培地飼料の嗜好性を調べるとともに給餌試験を行い、廃培地飼料の実用性を評価した。

方 法

嗜好試験：廃培地飼料を摂食した経験が無いサフォーク種成雌ヒツジ 5 頭を供試した。そして、提示飼料として、開発された廃培地飼料、嗜好性が比較的高いチモシー乾草、日常的な餌として用いられてきたヘイキューブを用いた。はじめに、提示する飼料を現物あたり 250g ずつ餌箱（37 cm×53 cm）に入れ、それらを同時に提示した。そして供試ヒツジを 1 頭ずつ実験ペン入口に誘導、待機させ、同時提示された 3 つの飼料を 15 秒間視認させた後、実験ペンに放した。供試ヒツジが提示飼料のうちのどれか 1 つを摂食したとき、供試ヒツジを一旦、提示飼料から引き離し、最初に摂食した提示飼料を除去した。そして再び、実験ペン入口から残された 2 つの提示飼料を 15 秒間、視認させ、実験ペンに放し、2 つの提示飼料を選択させた。このような実験を 1 頭あたり 1 日 1 回とし、3 日間連続で行った。また提示飼料の配置は、実験の都度、ランダムに変更し、1 つの飼料が同じ位置に 3 回連続で配置されないようにした。最初に摂食した提示飼料を順位 1 位（評価点 1）とし、次に摂食された提示飼料を順位 2 位（評価点 2）、最後に残った提示飼料を順位 3 位（評価点 3）として、その嗜好性を評価した。

給餌試験：以上の試験の結果から、開発された廃培地飼料の家畜嗜好性の悪いことが示された。そこで、供試ヒツジの嗜好性が最も高かったヘイキューブと廃培地飼料を混合し、給餌試験を行った。嗜好試験で供試した成雌ヒツジから無作為に 4 頭を選び、供試した。給餌試験では、実験畜舎内に単飼用ペンを 4 つ設置した。各単飼用ペンには 5cm に裁断した稲わらを敷料として十分量入れ、そこで供試ヒツジを 1 頭ずつ飼養した。供試ヒツジへの給餌は、1 日 2 回とし、以下に示す混合飼料を 7 日間連続して給餌した。なお、給餌飼料は、1 日の乾物摂食量が供試ヒツジの平均体重（80kg）の 2%になるように、1 回分の給餌量を 800g になるように設計した。

給餌飼料の内容：ヘイキューブ 650 g（現物）＋廃培地飼料 500 g（現物）

（ヘイキューブ 650g + 廃培地飼料 500g × 0.35 水分 = 825 g DM/回

そして、給餌ごとに残滓量（現物 g）を測定した。

結果および考察

嗜好試験：提示飼料に対する供試ヒツジの嗜好性の順位評点は、日常的に給餌飼料として用いられていたヘイキューブが 1.3 となり、チモシー乾草、廃培地飼料よりも有意に高かった（表 1、 $p < 0.05$ ）。次いで、チモシー乾草（2.0）、廃培地飼料（2.8）の順であった。実験 1 日目、2 日目において、2 頭の供試ヒツジが廃培地飼料を 2 番目に摂食したものの、その後は 1 回も摂食しなかった。家畜は新規な飼料に対して探査的摂食を試みることがある（竹田・近藤、2011）。3 回目以降に廃培地飼料の摂食が認められなかったことから、この時の摂食は探査だったと考えられた。実験 3 日目における摂食順位は、ヘイキューブ、チモシー乾草、廃培地飼料の順となり、廃培地飼料の供試ヒツジに対する嗜好性は極めて悪かった。蔡（2006）は、サイレージの品質評価における課題として、発酵品質と家畜における採食性が必ずしも一致しないことを指摘している。今後、廃培地飼料を実用化する場合は、廃培地飼料を単独で与えるのではなく、他の家畜嗜好性が良い飼料と混合することで、現実的な飼料価値が高まると考えられた。

給餌試験：試験開始直後は、供試ヒツジ 4 頭中、3 頭で認められ、その内容はすべて廃培地飼料だった。しかし、給餌試験の経過に伴って残滓量は減少し、給餌試験 5 日目には食べ残した個体は認められなかった。試験 1、試験 2 の結果から、廃培地飼料の嗜好性の悪さは、供試家畜の馴れが影響したと考えられた。また一般的に、新規飼料は母親や摂食経験個体などの同一群個体を介して、早期に学習することが報告されている。本研究では試験 1 において廃培地飼料の提示は受けていたものの、ほとんど摂食されることはなかった。しかし、隣接する単飼ペンは供試ヒツジ同士が視認できる構造となっており、供試ヒツジのうちのどれか 1 頭が給餌飼料を摂食すると、それを視覚的に学習できる環境でたつた。したがって、給餌飼料の残滓量が減少した理由は、供試ヒツジ自身の馴れの他に、隣接する供試ヒツジの摂食行動を視覚的に学習した結果とも考えられた。

以上、農場レベルでの実用性を考えたとき、完全な単飼はほとんどなく、群飼、もしくは単飼であっても隣接するペンが視認でき、隣接牛の摂食行動等を学習できる環境にある。更なる廃培地飼料の活用に向けて今後は、廃培地飼料の混合割合等を詳細に検討する必要があるが、本研究において、嗜好性が良い飼料と混合給餌することで、開発された廃培地飼料は家畜の餌として、実用できる飼料であることが明らかとなった。

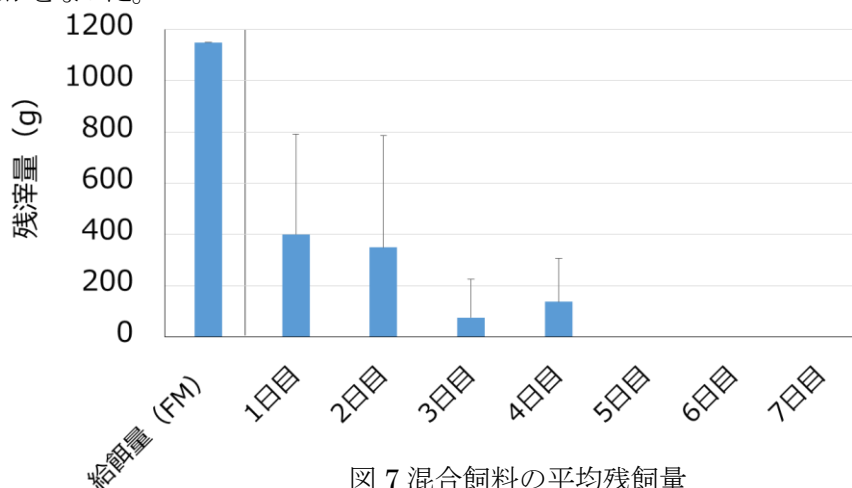


図 7 混合飼料の平均残飼量

2-4-3 キノコ廃培地成分が黒毛和種牛の筋肉内脂肪細胞分化に及ぼす影響

目 的

黒毛和種はホルスタインを始めとする他品種に比べ、マーブリング（脂肪交雑）が高く、脂肪融点の低い肉を産出することから、我が国を代表する優れた肉用品種として知られている。このため黒毛和種から生産される霜降り肉もまた、そのマーブリングの高さから日本国内のみならず、海外でも評価が高い。海外産輸入牛肉との差別化を図るためにも、国内において黒毛和種の家畜改良は専らマーブリング向上に重点をおいて行われてきた歴史がある。マーブリング向上のためには、筋肉内に脂肪組織をキメ細かに形成する必要があることから、筋肉内脂肪細胞の数を増やすことが大事である。よってキノコ廃培地中に筋肉内の脂肪前駆細胞の分化を促進する効果が明らかにするべく検討を行った。

材料および方法

黒毛和種牛の胸最長筋内の脂肪組織から樹立されたウシ筋肉内脂肪前駆細胞を用いて検討した。まずキノコ廃培地より熱水抽出物（可溶性画分）を抽出した。その後、各種濃度の熱水抽出物を添加した分化培地で脂肪細胞を培養し、以下の検討を行った。

1. 分化度合いの検討（オイルレッドO染色）
2. 脂肪細胞分化関連遺伝子発現に及ぼす影響（qRT-PCR 解析）
3. PPAR γ 2 タンパク質発現に及ぼす影響（Western blot 解析）

結 果

分化度合いの検討：キノコ廃培地飼料の熱水抽出物（水溶性画分）を、各種濃度でウシ筋肉内脂肪細胞に添加し分化刺激後 8 日間培養した細胞をオイルレッドO染色した。オイルレッドOは、アゾ色素の1種で、無極性・脂溶性であるため、脂肪細胞に触れると細胞内脂質（トリグリセリド）の溶媒に溶け込む。その結果、キノコ廃培地飼料由来の熱水抽出物を添加することにより、脂肪細胞の分化度合いに違いが認められなかった（図8）。

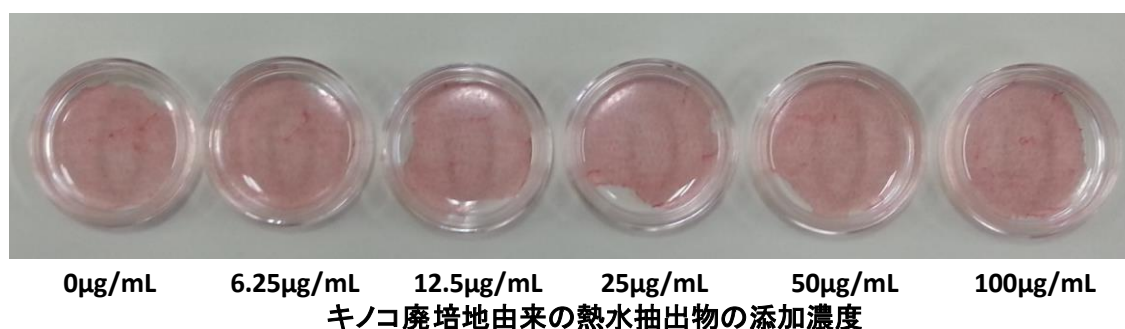


図8 キノコ廃培地飼料成分が脂肪細胞分化に及ぼす影響

脂肪細胞分化関連遺伝子の発現量に及ぼす影響：キノコ廃培地飼料の熱水抽出物（水溶性画分）を、各種濃度でウシ筋肉内脂肪細胞に添加し分化刺激後 8 日間培養した細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて代表的な脂肪細胞分化関連遺伝子である PPAR γ 2, FABP4, C/EBP β , C/EBP γ の発現量を検討した。その結果、6.25 μ g/ml 添加において全ての遺伝子発現量は有意に上昇することが明らかとなった。また脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られている PPAR γ 2 発現量においては、全ての濃度添加において有意に上昇することが確認された（図9）。

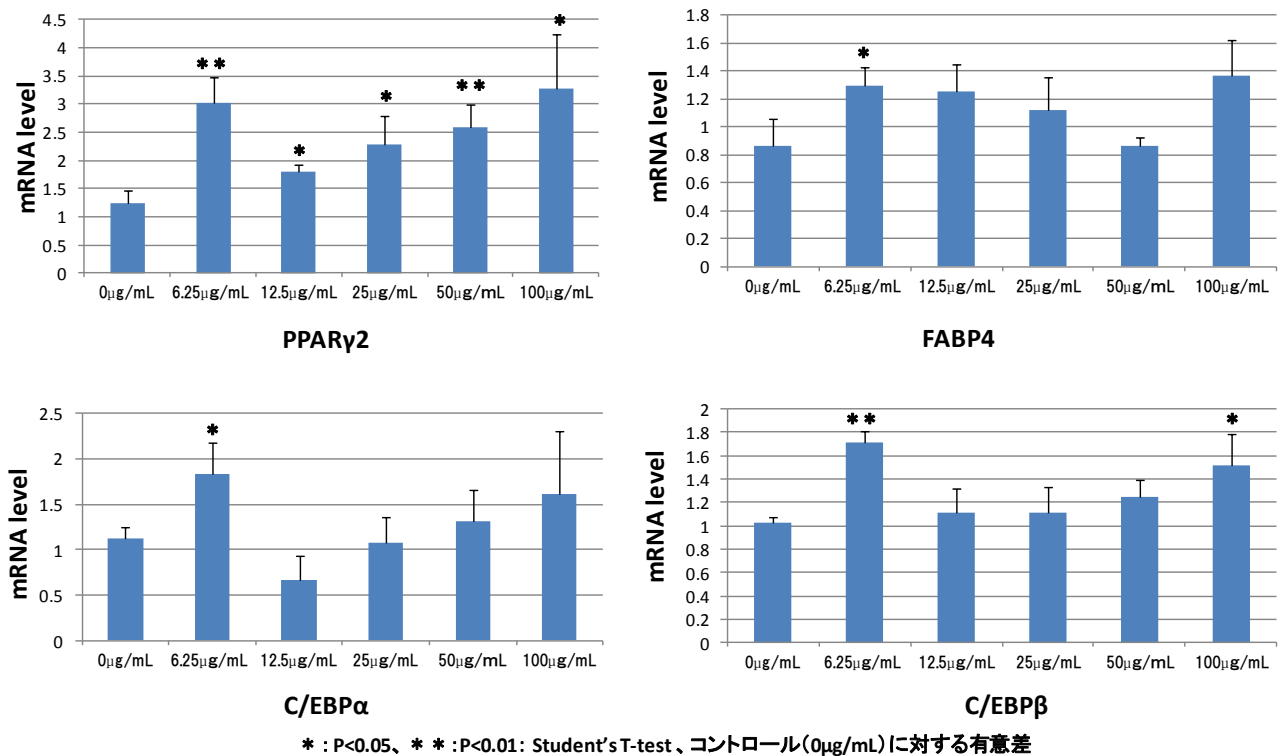


図 9 キノコ廃培地飼料成分が脂肪細胞分化関連遺伝子発現量に及ぼす影響

PPAR γ 2 タンパク質発現量に及ぼす影響: 遺伝子発現量の検討からキノコ廃培地飼料に PPAR γ 2 発現量を上昇させる成分が含まれていることが示唆された。続いて、実際にタンパク質発現量も上昇しているのか明らかにするためウエスタンブロット解析を行った。キノコ廃培地飼料の熱水抽出物（水溶性画分）を、各種濃度でウシ筋肉内脂肪細胞に添加し分化刺激後 8 日間培養した細胞を解析に用いた。その結果、濃度依存的に PPAR γ 2 発現量が上昇していることが明らかとなった（図 10）。

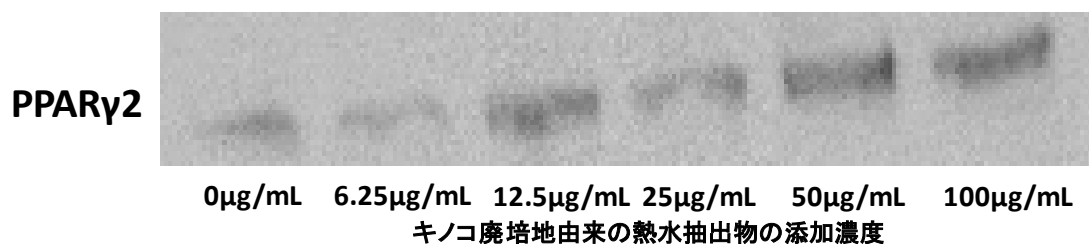


図 10 キノコ廃培地飼料成分が PPAR γ 2 タンパク質発現量に及ぼす影響

考 察

キノコ廃培地飼料中に PPAR γ 2 発現量を上昇させる成分が含まれていることが明らかとなった。PPAR γ 2 は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られている。また PPAR γ 2 は FABP4 の転写調節に関わっていることが明らかとなっており、今回の結果から、FABP4 発現もキノコ廃培地飼料の熱水抽出物を添加することで有意に上昇することが明らかとなった。すなわち一連のカスケードがキノコ廃培地飼料由来の成分により活性化することを意味している。今後、更なる検討が必要であるが、キノコ廃培地を黒毛和種牛の飼料として用いることにより、筋肉内脂肪を増加させる効果が期待出来ると考える。すなわち霜降りの度合いを高める効果があることが期待される。

第3章 平成26年度研究開発のまとめと今後の予定

3-1-1 平成26年度研究開発のまとめ

①リンゴ加工残渣を長期保存するための発酵技術の開発

数十種類の乳酸菌を対象とし、リンゴ加工残渣の保存試験や2次発酵試験を実施して、好成績を記録した *Lactobacillus plantarum* を選択して利用した。その結果、この乳酸菌で発酵させたリンゴ加工残渣は十分な保存性を発揮し、実用に耐えることが判明した。

②リンゴ加工残渣利用によるキノコ培地性能の研究

リンゴ加工残渣を加えたブナシメジとエノキタケ培地はキノコ呈味成分の増加に寄与すること、収量増加に繋がることが判明した。

③キノコ廃培地の長期保存するための発酵技術開発

キノコ廃培地に残存するキノコ菌やその他雑菌を水蒸気で殺菌し、その後に乳酸菌を添加・発酵させることで、確実に乳酸発酵できることが判明した。

④発酵キノコ廃培地飼料への機能性付与の研究開発

本研究の方法で製造した飼料の嗜好性は悪くなく、家畜を順応させれば他の飼料と同様に摂食することを見出した。

3-1-2 今後の予定

本事業で研究データ及びノウハウを多く蓄積出来た。リンゴ加工残渣の長期保存(1年間)技術に目途がついたので、今年度以降は5〜8トンのリンゴ加工残渣を貯蔵し補完研究に備える。また、キノコ培地へのリンゴ加工残渣添加の効果については、キノコの品質向上が確認できたので商品化に近づきたい。更に、昨年度と今年度実施した新培地の設計(培地殺菌方法の確立)は、エネルギーの節約に寄与しキノコ生産者に注目されており、早急に実用化に結び付けたい。キノコ廃培地の発酵飼料化は、実験レベルで好結果を得ており、今後は国土興産(株)に設置した大型発酵機で研究を進め、実用化へと結び付けたい。発酵飼料については、信州大学、(株)鎌田工業を中心に高付加価値化を目指し補完研究を続けて行きたい。本研究の成果であるリンゴ加工残渣の保存に適した乳酸菌を使い、簡易な設備での保存技術も確立でき普及に近づけた。また、現在畜産現場で稼働している給餌システムでは、発酵飼料の給餌が難しい(搬送・給与)課題があるので、今後も研究開発を続け給餌システムの実用化も進めたい。

研究実施機関の(株)鎌田工業は、本事業で得られたノウハウで製造した発酵廃培地飼料を地元(鹿児島県内)の畜産農家に試験的に提供しており、問題がなければ数か月以内に事業化はスタート可能である。同じく、国土興産(株)は、産業廃棄物及び一般廃棄物における発酵の許可を今年度取得したので、体制が整い次第(半年以内)事業化を予定している。

協全商事(株)は、リンゴ発酵槽、廃培地発酵槽の製造、発酵ノウハウが蓄積できたので事業化の体制は整った。今後は補完研究を行いつつ事業化を目指したい。

第4章 全体総括

日本で生産されている エノキタケ、ブナシメジ、ナメコ、エリンギ等のキノコの国内生産高は年間 35 万トン（平成 24 年度、林野庁）を超え、更に増加の傾向にある。反面、販売価格は下落傾向が続き、追い打ちをかけるように生産資材等の高騰が続き生産者を苦しめている。全国に誇る地場産業を発展する為にも技術開発とランニングコストの引き下げが課題でこの解決が事業継続のカギとなる。また、長野県は全国 2 位のリンゴ生産県であり、リンゴは果実のまま消費者に届けられるほか、ジュースに加工されて届けられるものも 3 割くらいあると推測される。この加工残渣は産業廃棄物であり処理には苦慮しているのが現状である。そこでこのリンゴ加工残渣をキノコ培地に利用することによりキノコの品質向上、収量アップ、生産資材のコストダウンを研究の目標にした。そして、キノコ収穫後の廃培地は長野県内で一年間に 27 万トン排出されると推察されており処理に際しては適正な処理が義務つけられている。しかし、適正に処理されていないケースも多くあるのが現実である。この廃培地を飼料化することにより廃培地の処理問題の解消、畜産農家の飼料コストの引き下げの解決を目指した。

新技術による高付加価値の培地は低コスト化に大きく寄与し省力、省エネの期待度は高い新技術の確立で「リンゴ加工残渣入り培地」のライン構想が整った。本来は堆肥・廃棄・焼却であった廃培地に着目して用途を模索し「リンゴ加工残渣入り培地」と同様に研究を重ねた結果、飼料としての有効性を実験で確認した。今後の普及が期待されている。

最後に、今回の研究開発について、各参画研究機関の研究者の皆様、研究開発推進委員会にご参加いただき有益な意見をいただいたアドバイザーの皆様にこの場をお借りし深く感謝申し上げます。ありがとうございました。