

## \* 研究・技術紹介 \*

## 乳酸生成糸状菌による農産加工副産物利用技術の開発

## — 研究成果と将来の展望 —

北海道農業研究センター畑作研究部 小田 有二

## 1. はじめに

北海道では、毎年 100 万トンのバレイショがデンプンへ加工されている。その過程において残渣として排出するポテトパルプは年間発生量が 10 万トンにも達しており、処分に苦慮する場合が少なくない。そこで、乳酸を生成する能力を備えた糸状菌で発酵させることにより、ポテトパルプを安全・安心な国産飼料ならびに新規食品素材として有効活用するための研究を行った。研究体制は北海道農業研究センターが中核機関となり、北海道大学、帯広畜産大学、藤女子大学、北海道立食品加工研究センター、雪印種苗株式会社、士幌町農業協同組合が参画した。本研究は、文部科学省・科学技術振興調整費（先導的研究等の推進）の委託を受けて平成 13 年 10 月から平成 16 年 3 月まで実施したものであり、ここではその成果の概要について紹介する。なお、研究内容の詳細および評価結果については以下のサイトを参照していただきたい。

<http://www.chousei-seika.com/search/info/inforesult.aspx?sendno=1>

[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/houdou/16/12/04121501.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/16/12/04121501.htm)

## 2. 研究の目標と全体計画

研究開始時には、次のような目標を設定した。第一に乳酸生成糸状菌に関する知見の集積で、得られた成果は国際学術雑誌へ積極的に投稿する。そして、常に出口を見据えて他の参画機関に有用な菌株をすみやかに供給する。第二には実用化技術の開発である。知的

財産を重視し、開発した新規な技術については特許申請を行うとともに地域経済に貢献可能な目に見える成果を出す。第三としては、本研究の実施期間はわずか 2 年半と短いが、得られた成果をもとに研究を継続・発展させることである。そして、以下のようなサブテーマに取り組んだ。

## 1) 乳酸生成糸状菌に関する研究

最初に行ったのはポテトパルプの乳酸発酵に適した糸状菌の選抜である。*Rhizopus oryzae* 38 株をそれぞれポテトパルプに接種して発酵させ、対照株 NRRL395 よりも良好なものとして、NBRC4707 を選抜した。発酵日数に伴う乳酸量の変化を調べると、NBRC 4707 の乳酸生成量は NRRL395 の二倍であり、その差はペクチン質分解酵素活性によるものであった。そして、NBRC4707 をポテトパルプの発酵試験に使用することにした。

このような選抜をする過程において、菌株によって乳酸の生産性が大きく異なり、フマール酸を生成する菌株もあることが分かった。そこで、*Rhizopus oryzae* 56 株を液体培地で培養し、上清中の有機酸を分析した。乳酸量およびフマール酸量を菌株ごとにプロットすると、乳酸生成型とフマール酸生成型の二つのグループに分かれた。乳酸の生成に関与する酵素は乳酸デヒドロゲナーゼであり、これをコードする *Idh* 遺伝子を含む約 5 キロベースの DNA 断片を取得したところ、乳酸生成型では *IdhA* および *IdhB*、フマール酸生成型では *IdhB* が存在した。両グループの違いは

*IdhA* の有無で、乳酸生成型は *IdhA* を欠損することによりフマール酸生成型へ、フマール酸生成型は *IdhA* を獲得することにより乳酸生成型になると予想された。そこで、すべての菌株が備えている *IdhB* 遺伝子の塩基配列を解析し、それをもとに系統樹を描いた。乳酸生成型とフマール酸生成型が、単なる *IdhA* の変異によるものであれば混ざった配置になるはずであるが、両グループは異なるクラスターを形成した。また、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)法によって全ゲノム DNA を解析したところ、*IdhB* の解析結果と同様、乳酸生成型とフマール酸生成型の菌株は異なるクラスターを形成した。これらの結果から、二つのグループは単なる *IdhA* の変異によるものではなく、別の系統に由来すると考えられる。

次に上記の知見をもとに、遺伝子レベルで迅速に判別する方法を検討した。両グループでは、リボソーム DNA に挟まれた ITS (Internal Transcribed Spacer)領域に差異が認められたことから、その配列をもとにしたプライマーを合成した。これでタッチダウン PCR を行うと、乳酸生成型菌株においてのみ DNA 断片が合成され、効率的な分離に応用できた。実際にインドネシアの発酵食品について調べると、乳酸生成型 *Rhizopus oryzae* の存在を示唆するバンドが認められた。しかし、分離・同定したところ、ここに生息するのは予想に反して *Amylomyces rouxii* であった。*Rhizopus oryzae* とは形態的に異なり、*Amylomyces rouxii* は胞子嚢の形成が不完全で胞子を形成せず、コロニーは白色を呈する。醸造などに使われる麹に関して、日本では蒸した米粒に *Aspergillus oryzae* を増殖させたバラ麹が利用されているが、アジアのほとんどの国々では生の穀類粉末を丸く固めた餅麹が一般的である。実は、この餅麹中の主要な微生物が *Amylomyces rouxii* なのである。本

サブテーマでは、各種の *Amylomyces rouxii* 菌株から食経験がありポテトパルプの発酵に適した CBS438.76 を選抜した。この菌株はタイの餅麹 *look-pang* (写真 1) から分離されたものである。研究当初は *Rhizopus oryzae* を使用していたが、実用化を目指した 3 年目には *Amylomyces rouxii* と交代させた。



写真 1. タイの餅麹 *look-pang*

本サブテーマでは、*Amylomyces rouxii* による乳酸の製造方法という有益な派生技術を開発することができた。乳酸は、食品・醸造用製品、化粧品、医薬・健康食品、工業用など用途の広い有機酸である。通常、乳酸菌で生産するときには酵母エキスなどのリッチな栄養源を入れなければならないが、乳酸を精製するにコストがかかる。一方、*Rhizopus oryzae* では乳酸菌よりも収率は劣るもの、副原料として必要なのは無機塩類だけなので、精製が容易である。ところが、*Rhizopus oryzae* はシュクロースで生育することができない。本サブテーマでは、*Amylomyces rouxii* がシュクロースから乳酸を生成することを見出した。北海道において甜菜は輪作体系を構成する基幹作物であるが、付加価値を高める必要性に迫られている。この派生技術によれば、甜菜から効率的に高純度の L-乳酸を生産し、これから生分解性プラスチックを合成して農業用資材などに利用することも可能である。

## 2) 飼料化に関する研究

本サブテーマは時間的な制約が大きい内容であった。その理由は、実験に数十トン単位の原料が必要となるが、採取できるのはデンプン工場が稼動する9~11月に限られていたからである。研究開始の平成13年は小規模発酵試験、翌年に大規模サイレージ調製・発酵試験、そして最終年に実用化をめざしたバッグサイレージ調製・発酵・評価試験を実施した。

平成14年はポテトパルプ30トンに*Rhizopus oryzae*を添加して発酵させたが、初年度の小規模発酵試験の結果から、品質安定化のため小麦ふすまに増殖させたスターターを使用した。二つの試験区を並べて配置し、育成牛に給与すると糸状菌添加区を有意に好んで食べることから、嗜好性が高まっていることが分かった。そこで、先のサブテーマで選抜した、食経験がありポテトパルプの乳酸発酵に適した*Amylomyces rouxii*を使って実証化試験を行った。

十勝管内にあるデンプン工場で排出されたポテトパルプから糸状菌添加および無添加パルプのバッグサイレージを調製、一ヶ月発酵後(写真2)、農家の牧場で肉牛および乳牛への給与試験を実施した。

肉牛に関しては、対照区11頭に通常の配合飼料、糸状菌添加区11頭に20%を糸状菌添加発酵パルプに置き換えた飼料、無添加区12頭に糸状菌無添加発酵パルプに置き換えた飼料を給与して6週間肥育し、その間に毎週血液成分と体重を測定した。平均日増体量を比較すると、糸状菌添加区は対照区よりも有意に高くなっていた。このような結果から、糸状菌による発酵ポテトパルプは、肥育牛の飼料として嗜好性が良好で、増体量が改善され、肉用牛飼料として有用であることが明らかになった。

乳牛に関しては、ホルスタイン種およびジ



写真2. 発酵中のバッグサイレージ

ヤージー種41頭に3種類の飼料を対照期、糸状菌添加期、無添加期、対照期の順で1ヶ月ずつ給与し、乳量および乳成分を分析した。糸状菌添加期は乳脂肪率が若干低下するものの、乳量の改善傾向が認められたことから、飼料構成を考慮することにより搾乳牛用飼料として有用であることが分かった。

## 3) 食品素材化に関する研究

ここでは、まずラットを使って発酵ポテトパルプの機能性について検討した。7週齢のラットに、食物繊維として10%含む飼料を給与し、体重、飼料摂取量、血液成分、臓器重量および代謝関連酵素の発現について調べた。飼育期間にともなう血清コレステロール濃度は発酵、未発酵のポテトパルプとともに上昇が抑制され、その効果は発酵ポテトパルプのほうが顕著であった。このように、発酵ポテトパルプには、生体の内因性コレステロール代謝を改善する効果が認められた。

次に人為的な肝障害を誘発したときの効果について検討した。解熱鎮静剤として使用されているアセトアミノフェンを飼料中0.5%になるように添加して調べた。肝臓疾患のマーカーであるアルカリホスファターゼの活性は、発酵ポテトパルプで低くなっていた。また同時に、解毒に関わるグルタチオン濃度が有意に高くなっていた。これらのことから、発酵ポテトパルプはアセトアミノフェンで誘

発される肝障害を抑制すると考えられた。

発酵パルプには上記のような効果があるものの、そのまま食べるのには適さない。そこで、現代人が不足しがちな纖維源としてパンへ添加した。発酵および未発酵パルプを小麦粉当たり 20% 添加したパンの外観を比較すると、未発酵パルプ添加では黒ずんで斑点が発生したが、発酵パルプ添加では対照に近くなっていた。未発酵パルプ添加では、パルプが水分を吸収するためにパン容積が小さいが、発酵させると纖維質が適度に分解されるために対照と同程度の膨らみになった。さらに、ポテトパルプ以外の農産加工副産物であるオカラ、小豆粕、カンショ粕、ビートファイバーについても調べたところ、いずれも発酵によって製パン性の向上が確認された。

本サブテーマでは、将来性のある派生技術として、穀物加工食品用ほぐれ剤を開発することができた。近年、スーパーとコンビニエンスストアの普及によって調理麺類や米飯類の消費が伸びており、これらの商品ではほぐれ易さが非常に重要とされている。多くの場合、油脂、タンパク質、増粘多糖類、水溶性食物纖維、脂肪酸エステルなどを麺に練り込むか、あるいは麺表面に塗布する方法がとられているが、ほぐれ効果が不十分であり、風味や食感に悪影響を与えることがある。そこで、業界では優れたほぐれ剤に対するニーズが大きくなっている。本サブテーマでは、発酵ポテトパルプの熱水抽出物にすぐれたほぐれ効果のあることを見出した。ゆでた中華麺をそのまま冷蔵保存すると塊になるが（写真 3 左）、麺に抽出物の水溶液に塗布しておくと簡単にほぐれる（写真 3 右）。このポテトパルプ由来のほぐれ剤は、北海道の農作物と組み合わせることで地産地消に大きく貢献すると期待されている。

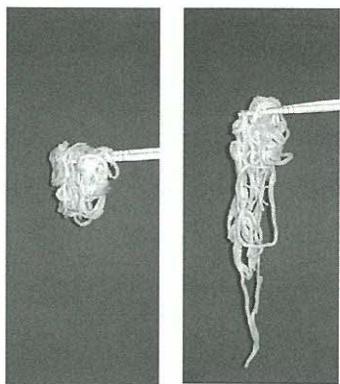


写真 3. 発酵ポテトパルプ抽出物の効果

### 3. 研究の総括および将来の展望

以上のように、基礎研究では乳酸生成糸状菌に関する知見を集積し、応用研究ではポテトパルプ飼料化プロセスを完成させ、実証化試験まで行った。食品素材用途としては、発酵パルプに機能性のあることを見出し、食物纖維源としてパン類へ添加する方法を考案した。また、将来性のある有望な派生技術を開発し、特許申請は国内 11 件（うち実施許諾 1 件）に達した。研究成果の発表は、査読のある原著論文 19 件（うち英文 18 件）、その他の誌上発表 5 件（うち英文 1 件）、口頭発表 60 件（うち国際学会 11 件）となり、数多くの情報を発信することができた。

平成 16 年からは農林水産省の委託事業・農林水産バイオリサイクル研究プロジェクトに参画し、「乳酸生成糸状菌による畑作物多段階利用技術の開発」という課題で研究を継続している。今後も大学および企業と連携し、できるだけ早く本研究の成果を結実させたいと考えている。

## 乳酸生成糸状菌による農産加工副産物利用技術の開発

