平成２６年度

環境研究総合推進費補助金　次世代事業

総合技術開発報告書

ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の開発に関する実証試験

３Ｊ１２３００２

平成２７年３月

株式会社　前田製作所

補助事業名　　環境研究総合推進費補助金次世代事業(平成２４年度～平成２６年度)

所管　　環境省

総事業費　　115,380,000 円（平成２４年度～平成２６年度の総計）

国庫補助金　　56,201,000 円（平成２４年度～平成２６年度の総計）

研究課題名　　ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の開発に関する実証試験（３Ｊ１２３００２）

研究事業期間　　平成２４年 ４月 １日～平成２７年 ３月３１日

研究代表者名　　宮本　徹（株式会社　前田製作所）

共同技術開発者氏名　　該当なし

Soft-hydrothermal processing

目　次

総合技術開発報告書概要　…… 1

本文
１．事業の目的　…… 12
1.1　廃培地の現状 …… 12

２．開発した技術の詳細 …… 14
2.1　ソフト水熱プロセスとは …… 14
2.2　装置の機構的再現性・信頼性・普遍性の立証…… 15
2.3　栽培実証による収穫量・品質の立証…… 21
2.4　化学成分分析による再生メカニズムの解明…… 28
2.4.1　ブナシメジ培地の成分分析 …… 29
2.4.1.1　ブナシメジ培地の成分分析　再生培地と廃培地…… 32
2.4.1.2　ブナシメジ培地の成分分析　未接種培地と廃培地…… 46
2.4.1.3　ブナシメジ培地の成分分析　未接種培地と再生培地…… 56
2.4.2　エノキタケ培地の成分分析 …… 59
2.4.2.1　エノキタケ培地の成分分析　再生培地と廃培地…… 62
2.4.2.2　エノキタケ培地の成分分析　未接種培地と廃培地…… 67
2.4.2.3　エノキタケ培地の成分分析　未接種培地と再生培地…… 80
2.4.3　通常培地、廃きのこ培地および再生培地の酵素学的考察…… 84
2.4.4　きのこ培地成分の概要と結論 …… 87

３．実証施設の設置場所等　…… 89
3.1　位置図 …… 89
3.2　全体図 …… 90
3.3　事業実施装置・建物の構造を明らかにする写真…… 91

４．開発した技術がもたらす効果　…… 92

５．まとめ …… 98

６．事業概要図　…… 100

７．英文概要　…… 101

８．「国民との科学・技術対話」の実施　…… 102

９．研究発表、論文発表、学会発表　…… 103

１０．知的財産権の取得状況　…… 104

Soft-hydrothermal processing

環境研究総合推進費補助金　次世代事業　総合技術開発報告書概要

研究課題名：ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の開発に関する実証試験
研究番号　：３Ｊ１２３００２

総事業費：　　115,340,000 円（平成２４年度～平成２６年度の総計）

国庫補助金：　　56,201,000 円（平成２４年度～平成２６年度の総計）

研究期間：　　平成 24 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者名：　宮本　徹（株式会社　前田製作所）

共同技術開発者：　　該当なし

事業の目的

きのこの人工（培地菌床）栽培は、消費者の健康趣向とともに、きのこの種類・生産量ともに年々増加の傾向にある。

きのこを収穫後の培地(廃菌床)は、堆肥にする等の再利用方法が広く知られているが、その方法は、事業者が異なる場合や、必要とする時期の違いがあるなどの問題があり、再利用が進んでいないのが実態である。

きのこの生産量拡大により現状の再利用だけでは飽和状態となってきている。

一方、きのこ経営においては、販売価格の低迷、燃料、資材の高騰により、経営環境の厳しさが増している。

そのため培地資材コスト低減と、廃培地の有効利用を目的に、きのこ培地資材として再利用の取り組み（肥料化、燃料化、飼料、培地として再使用）が、きのこ生産で始まっているが、有効な再利用処理方法を見出していない。

日本有数の培地栽培によるきのこ生産地である長野県中野市によると、2008 年度に同市内で排出された廃培地は約 95,000 トン（2013 年度は 130,000 トンを超えた)。近隣の飯山市、山ノ内町、木島平村を含めるとその量は約 200,000 トンと言われている。うち 66%が堆肥向けを中心に利活用されているが、品質および収量が低下するためきのこ培地としての再利用は難しく、ほとんど利活用されていない。また、培地の基材であるトウモロコシの芯を砕いたコーンコブは、現在中国から輸入されているが、中国国内でのバイオ燃料の原料として需要が急増しその価格が高騰している。また、そのコーンコブ自体の品質も遺伝子組替え作物、および重金属汚染の懸念があり、敬遠するきのこ関連業者も多い。代用として、きのこ培地の基材に、国内のオガコを使用したいが、精油成分を除去するネカシの手間が掛かり近年、エノキタケではほとんどオガコは利用されていない。

Soft-hydrothermal processing

以上より、廃きのこ培地の培地としての再利用が切望され、また、森林木材業者からも国内木材の利活用の促進のためにネカシに代わる有効な木材精油成分の除去技術が期待されている。

申請者らは, 150℃以下ないし 200℃以下の非常にマイルドな水熱プロセス（以下、ソフト水熱プロセスと記す。）を用いて廃きのこ培地の改質とリサイクルを行うことを提案している。きのこの人工栽培は、きのこの種類・生産量ともに年々増加の傾向にあり、きのこの生産量拡大により廃きのこ培地は飽和状態となってきている。一方、きのこ経営においても、販売価格の低迷、燃料、資材の高騰により、厳しさが増している。そのため培地資材コスト低減と、廃きのこ培地の有効利用を目的に、きのこ培地資材として再利用の取組み（肥料化、燃料化、飼料、培地として再利用）が、きのこ生産業者のなかで試行されているが、未だに有効なり活用技術を見出していない。

そこで、申請者らは、きのこ生産者にメリットのある、廃きのこ培地をソフト水熱プロセスにより、廃培地中の有害物質の抽出・除去、滅菌・きのこ生育阻害酵素の不活化し、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、および適宜乾燥させ、きのこ培地として再生する「廃棄物「ゼロ」の循環型きのこ栽培システム」が構築できること、さらにオガコの改質による森林資源の利活用を示唆した。すなわち, ソフト水熱プロセスは廃きのこ培地を改質および再生できるこれまでにはないシステムといえる。

開発した技術の詳細

水を反応媒体とした超臨界、あるいは亜臨界という反応領域を用いた有機物、無機物の分解、あるいは合成の研究はこれまで数多く実施されてきたが、その反応の激しさ故にあまり実用化が進んでいないのが現実である。

本研究は、基礎的研究例がほとんどないソフト水熱プロセス（150℃以下ないし 200℃以下の高温高圧の水、および水蒸気）の加圧熱水領域、乾燥水蒸気領域、飽和水蒸気領域での水の特性を明らかにし、ソフト水熱プロセスを反応媒体として、廃きのこ培地から菌子由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、阻害物質（阻害酵素）も加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の廃きのこ培地の適宜乾燥も行うことを実証した。すなわち、ソフト水熱プロセスは、添加栄養物由来の有機物、および菌子を含む高含水率の廃きのこ培地の再生処理に最も適した反応媒体であることを実証した。

申請者らは、ソフト水熱プロセスにより、生命科学研究期間の動物実験施設や繁殖生産会社から膨大な量が排出される、使用済みの床敷から糞尿由来の有害物質を抽出し、乾燥、脱臭および滅菌して再生利用する処理方法を提案している。

さらに、ソフト水熱プロセスの水の化学特性を応用して、既存のオートクレープ滅菌では不可能とされた高温耐性の蛋白質あるいは酵素、および細菌内毒素の不活化を可能にし、そのメカニズムを解明して新しい滅菌法の開発を示唆した。

本研究の新規性は反応場が水であり、その反応には特別な化学物質を用いる事は無い。すなわち、完全無害で副作用も無く、環境保全の理念に合致した技術といえる。

使用済みの床敷と同様に廃きのこ培地のリサイクルによる再生利用は、資源の節約となる事は言うまでもなく、ゼロエミッション（資源循環型社会）に基づく社会・環境・生産システムの構築に貢献でき、廃棄量、焼却処理量の減少による温室効果ガス(CO_2)削減にも寄与することができる。

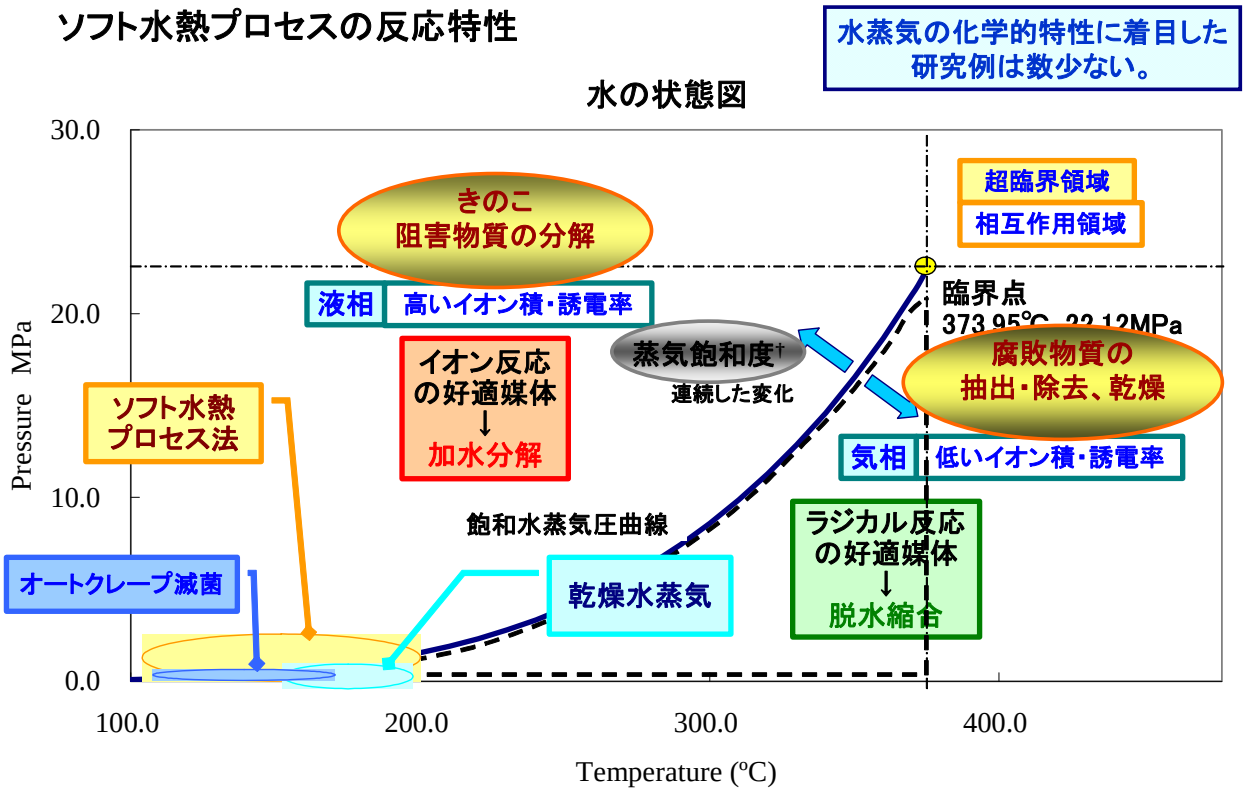
Soft-hydrothermal processing

反応媒体としての高温高圧水は、高い誘電率と高いイオン積の液相領域ではイオン反応（無機反応）の、比較的低いイオン積と低い誘電率の気相領域ではラジカル反応（有機反応）の好適場となる。

申請者らは、このような多様な化学反応を起こすソフト水熱プロセス、特に、気相領域である乾燥水蒸気に着目し、150℃以下ないし 200℃以下のソフト水熱プロセスの乾燥水蒸気を利用して、高含水バイオマスから、有機化合物の選択的分解、抽出、および脱水、乾燥、縮合、炭化ができることを示唆した。

臨界点より低い温度の乾燥水蒸気は低密度の媒体で、誘電率は 10 以下になり、イオン積も常温の水より 100 分の 1 ほどに低くなる。したがって、無極性あるいは極性の弱い有機物質の抽出に対して利点があると推察される。この性質を利用し、有機物質を分解せず、直接的に天然物質から抽出することが可能となる。本研究は、乾燥水蒸気を反応媒体として、廃きのこ培地から菌子由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、阻害物質（阻害酵素）も加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の廃きのこ培地の適宜乾燥も行う。

すなわち、申請者らはソフト水熱プロセスが、添加栄養物由来の有機物、および菌子を含む高含水率の廃きのこ培地の再生処理に最も適した反応媒体であることを実用規模のプロトタイプにより立証した。



Gas-Liquid binary phase diagram of water

† 蒸気飽和度(%) = {蒸気密度 (kg/m³) / 飽和水蒸気密度 (kg/m³)} × 100

開発した技術がもたらす効果

本研究の新規性、独創性は高温高圧水蒸気の化学的特性を適用していることにある。小型実証機（10 kg/batch）ではその有効性を立証しているが、本補助金事業の実用規模のプロトタイプ（φ1,200 ㎜×L

Soft-hydrothermal processing

2,900 ㎜（0.5 ton/1 バッチ））においても、水蒸気の温度、圧力、および流量を制御し、気相、液相および飽和水蒸気圧曲線上の有効性についても次の３つの観点から世界で初めて立証した。

- リアクター内の蒸気飽和度を制御することにより、加圧熱水、飽和水蒸気、さらに乾燥水蒸気を反応媒体として、水蒸気の最適反応場の選択的創出を可能とし、装置の機構的再現性、信頼性、および普遍性を立証した。
- きのこ（エノキタケ、ブナシメジ）の実用規模での栽培実証により収穫量、品質が通常の培地と同等、あるいは同等以上であることを立証した。
- 通常培地（未接種培地）、再生培地、および廃きのこ培地の成分分析を行い論理的手法により再生メカニズムを解明した。

本廃きのこ培地再生処理装置のメカニズムは、水蒸気の温度、圧力、および流量の作用でリアクター内の蒸気飽和度(*1)を制御することにより、加圧熱水、飽和水蒸気、さらに乾燥水蒸気を反応媒体として、廃きのこ培地から菌子・木質由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、阻害物質（阻害酵素等）も加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の廃きのこ培地の適宜乾燥を可能としたことである。すなわち、水蒸気の最適反応場の選択的創出を可能としたことにある。

また、実用規模で廃きのこ培地の再生処理を行い、その再生培地できのこの実証栽培に成功した例は他にはない。

廃きのこ培地再生処理装置の新規性、独創性、および特許性は、具体的には次の事項である。

1. ジャケット、およびリアクターの水蒸気をそれぞれ個別に圧力で制御できること。
2. ジャケット、およびリアクターの水蒸気流量をそれぞれ個別に制御できること。
3. ジャケットの圧力・流量をジャケット上流側、およびジャケット下流側でそれぞれ分離して制御できること。
4. リアクターの圧力・流量をリアクター上流側、およびリアクター下流側でそれぞれ分離して制御できること。
5. ジャケット、リアクターの水蒸気を流通式にできること。

これらが従来の高温高圧水蒸気反応装置（いわゆる「オートクレブ」）と相違している事項である。

また、廃きのこ培地の既往再生処理関連技術と本技術との相違を下記に記す。

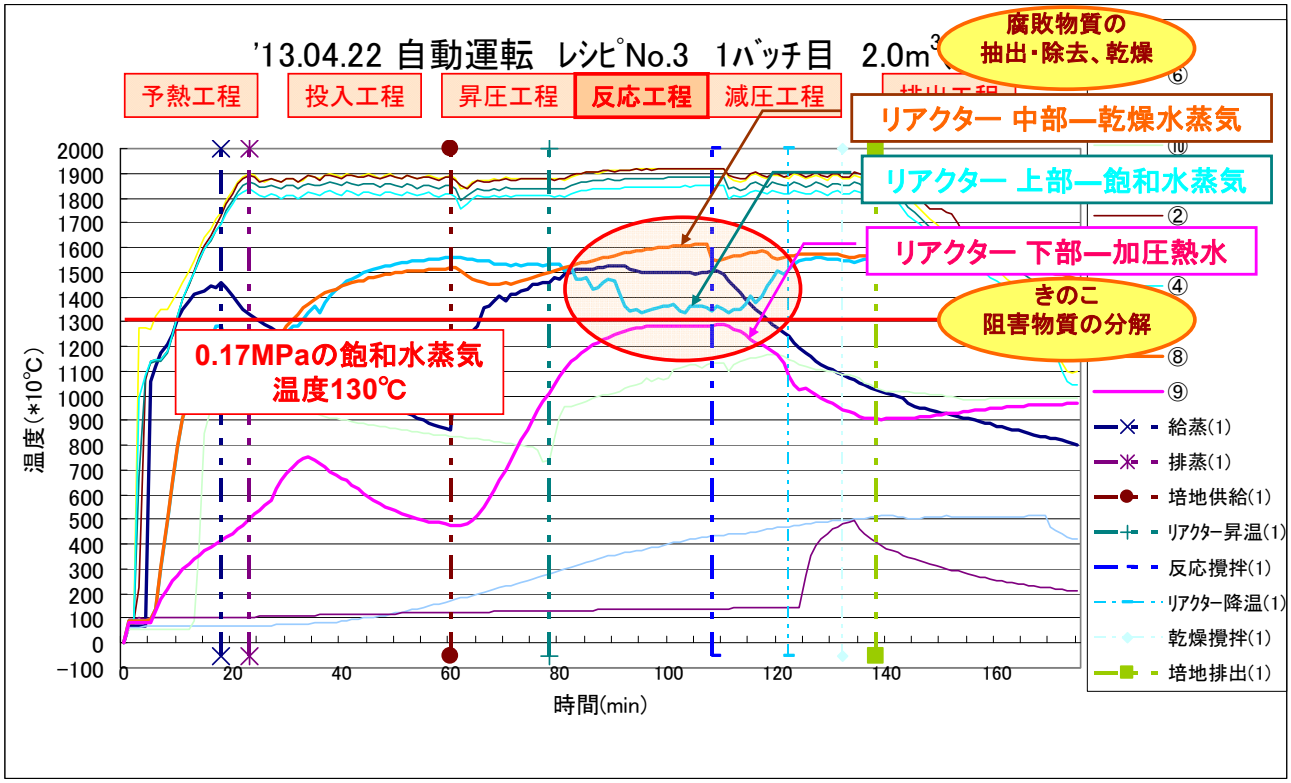
- 常圧水蒸気処理方法：水、あるいは蒸気に晒して攪拌した後に自然水切りし培地として調整し再利用する。コーンコブ代替率は 50%。（特開 2008-54510）
- ソフト水熱プロセスとの違い:60℃の温水、あるいは蒸気と記載されているが、いずれにしても 100℃以下の常圧の水蒸気であり、単に廃培地を洗浄し、一時的に菌を不活化するだけで本事業のソフト水熱プロセスの乾燥、抽出、阻害物質の不活化という化学的反応は期待できない。一定のエノキダケでの再生使用効果は、新材コーンコブを同量混合することで、廃培地を希釈するためだと推察されるが、他のきのこ（エリンギ、ブナシメジ）では収穫量、品質とも再利用はできない。
- ソフト水熱プロセスの差別化：ソフト水熱プロセスの再生処理培地は、きのこ阻害物質を不活化するため、再生処理培地で栽培したエノキダケを含むあらゆるきのこ種類の収穫量、および品質でも、新規の通常培地（未接種培地）と同等、あるいは同等以上となることを実証した。

注記：(*1) 蒸気飽和度(%) = {蒸気密度（kg/m^3） / 飽和水蒸気密度（kg/m^3)} × 100

Soft-hydrothermal processing

リアクター内の温度挙動のグラフを下記に示す。

最適条件の考察（温度挙動）



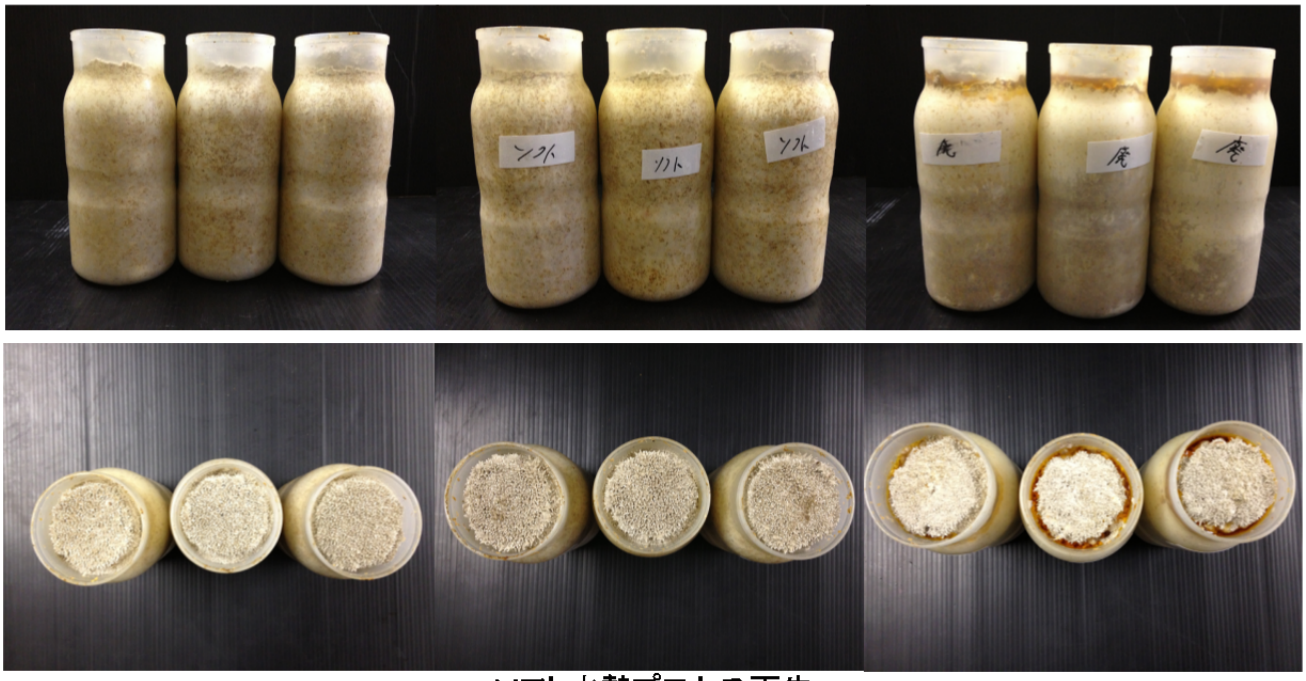
また、この本補助金事業の実用規模のプロトタイプによるソフト水熱プロセス再生処理培地の栽培実証の結果を提示する。

ブナシメジ培養状況

2013年4月23日種菌接種 2013年6月14日現在接種後52日

通常培地 control (+)	ソフト水熱プロセス再生 培地(50%代用) 実験区	廃きのこ培地 Control (-)
菌廻り良好	菌廻り良好	菌廻りにムラが出てきている

ブナシメジ培養状況
2013年4月23日種菌接種　2013年7月5日現在接種後70日（菌掻き後10日）

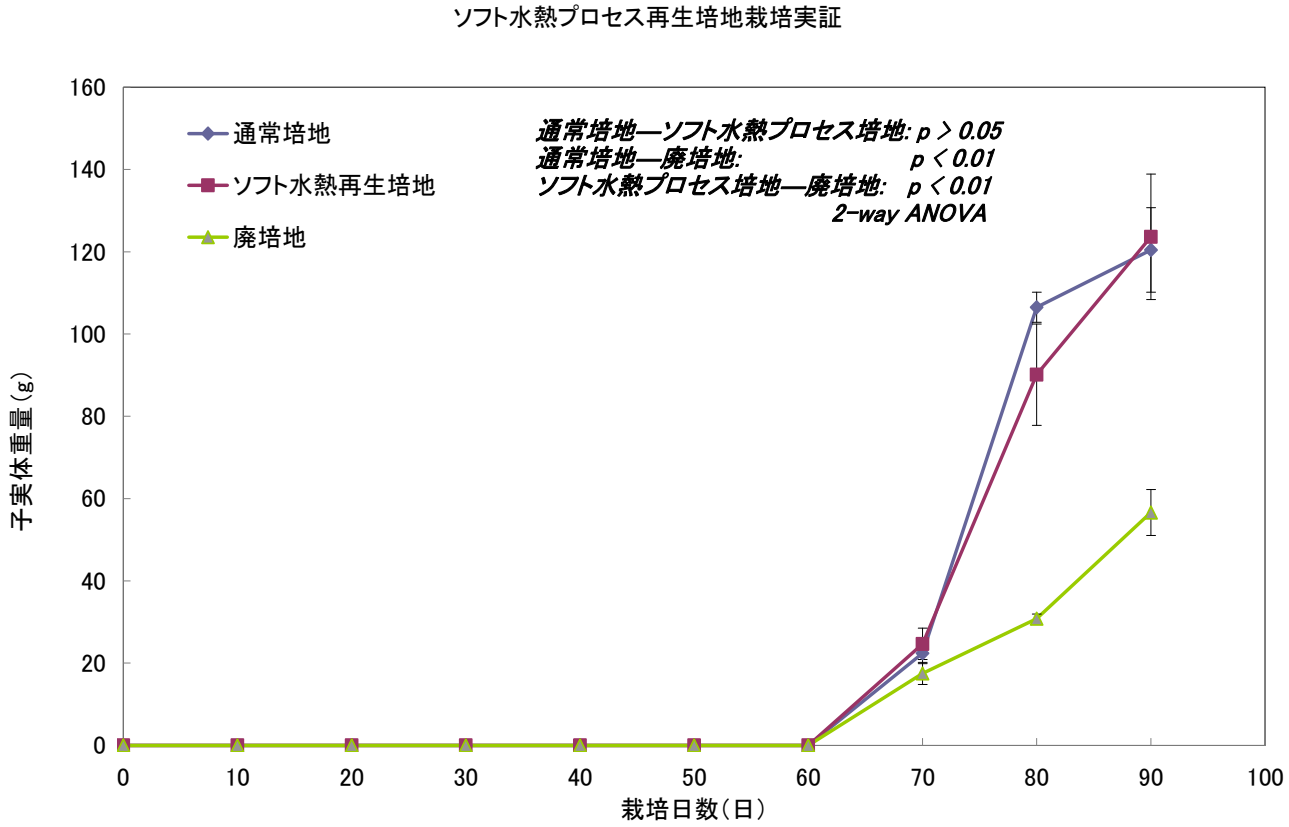


通常培地	ソフト水熱プロセス再生 培地(50%代用)	廃きのこ培地
子実体原基良好	子実体原基良好	子実体原基液体発生

ブナシメジ培養状況
2013年4月23日種菌接種　2013年7月13日現在接種後77日（菌掻き後17日）

通常培地	ソフト水熱プロセス再生 培地(50%代用)	使用済み培地
子実体良好	子実体良好	子実体生育ムラ、不良

ブナシメジ培養状況
2013年4月23日種菌接種　2013年7月26日現在接種後90日（菌掻き後30日）
通常培地、ソフト水熱プロセス再生処理培地は子実体の品質良好
廃培地は子実体の生育不良、品質不良
通常培地
子実体良好
ソフト水熱プロセス再生
培地(50%代用)
子実体良好
廃きのこ培地
子実体生育ムラ、不良


ソフト水熱プロセス再生培地栽培実証
通常培地
ソフト水熱再生培地
廃培地
通常培地—ソフト水熱プロセス培地: p > 0.05
通常培地—廃培地: p < 0.01
ソフト水熱プロセス培地—廃培地: p < 0.01
2-way ANOVA
子実体重量(g)
栽培日数(日)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Soft-hydrothermal processing

考察：通常培地、ソフト水熱プロセス再生処理培地は菌廻り、子実体原基（きのこの元となる菌糸)、および子実体の品質は良好であり、子実体重量にも有意差はないが、廃培地は菌廻りも不均質で原基および子実体の生育不良、品質不良、および子実体重量低下が明らかである。

環境政策への貢献

本事業により開発する技術がもたらす効果

- 第１に、現在 66%（中野市バイオマスタウン構想参照）しか堆肥向けに有効利用されていない廃きのこ培地を再生培地として 100%有効利用できることにある。したがって、中野市農協管内だけで数億円とも言われている廃棄処理費用の削減ができる。焼却、あるいは埋設廃棄に伴う環境負荷を低減できることは勿論である。
- 第 2 に、事業収支試算に示すように、きのこ栽培原価の低減ができる。コーンコブ新材を再生培地に代替率 50%しても 1.26 円/1 本の原価削減ができる。標準的な培養センターで年間 1.26 円/1 本×20,000,000 本=25,200 千円の原価削減となる。この金額は、実用機の初期投資 98,000 千円を 3.9 年で償却できるものである。

  実用機は、標準的な培養センターの廃きのこ培地再生処理能力 10ton/1day-4batch を目指す。
- 第 3 に、再生改質処理培地による培地自体の均質化と品質向上が期待できる。廃きのこ培地再生処理により、きのこの品質、および収穫量の向上、さらにはきのこ生産における再生培地によりきのこ培養生育期間の短縮も期待できる。
- 第 4 に、現在きのこ培地基材の主流であるコーンコブに代わって、国内産のオガコ（特にネカシの手間のかかる針葉樹）から木質由来のきのこ阻害物質（テルペン類、フェノール等精油成分）を除去改質して、オガコきのこ培地として有効活用できることである。
- 第 5 に、ソフト水熱プロセス処理した再生培地は家畜（特に反芻動物）の飼料としても利用することができ、輸入飼料高騰のために困窮する畜産農家の経営を支援できる。

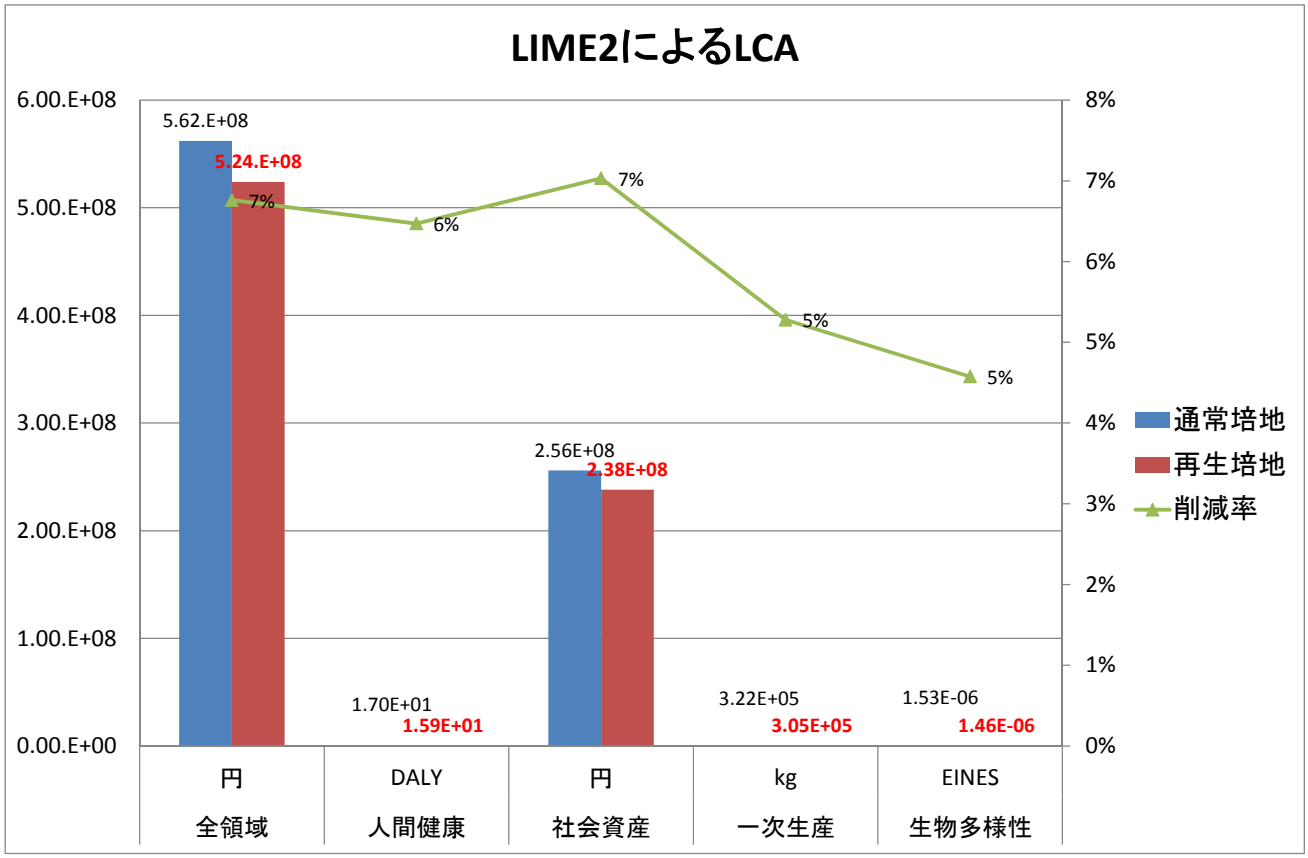
申請者らは LCA（ライフサイクルアセスメント）を基にした環境影響被害算定評価手法である LIME2（意思決定を支援する環境影響評価手法）により環境負荷を統合した評価を実施した。その結果、LIME2（まとめ）は環境負荷の全影響領域にわたって評価するため、経済指標（円）でまとめた物で比べると、ソフト水熱プロセスによる再生培地は環境影響が小さい結果となった。これは、社会資産（資源等の経済損失）に与える影響が大きく関係しており、この項目の中に「農産物」が含まれるためと考えられる。したがって、CO_2 排出量は 16%増えるが、ウォーターフットプリントが 46%と大幅に減ることにより、統合的に評価すると全体として再生処理した培地の方が環境影響の少ない結果となった。

LIME2 による LCA

		通常培地	再生培地	削減率
全領域	円	5.62.E+08	5.24.E+08	7%
人間健康	DALY	1.70E+01	1.59E+01	6%
社会資産	円	2.56E+08	2.38E+08	7%
一次生産	kg	3.22E+05	3.05E+05	5%
生物多様性	EINES	1.53E-06	1.46E-06	5%

「全領域」： 通常培地（現状）が社会全体に支払う環境負荷の金額　562,000,000 円/年間生産量

Soft-hydrothermal processing



開発した技術の事業化の可能性

（株）前田製作所では廃きのこ培地再生処理装置プロトタイプの機構的機械性能、および化学的機械性能の確認するために、性能評価、実用機製造原価低減、製造工程短縮、化学的反応特性の再現性・信頼性・普遍性およびランニングコスト、保守管理と廃きのこ培地再生処理事業収支の検証を行い、ソフト水熱プロセスによる実用規模の廃きのこ再生処理装置は世界で初めて実証栽培に成功し、平成 26 年度より受注販売を開始した。

事業化に向けての具体的展開として、中野市農協管内の有力きのこ生産業者による平成 25 年度ブナシメジ培養工場新設（第 2 工場 5,000 ton/年）および平成 26 年度ブナシメジ培養工場新設（第 3 工場 5,000 ton/年）に伴い、増大する廃培地の早期有効利活用を目的に、廃きのこ培地再生処理　30 ton(5 バッチ/日）を計画し、中野市農協、および当該事業者に「仕様書、計画図、見積書」を提出した。

さらに、「廃きのこ培地再生処理技術」は、日本一の菌床栽培のきのこ生産地である長野県中野市で社会問題化している廃きのこ培地の問題解決策として中野市が中心となり H26 年度より予算化された中野市地域バイオマス産業都市策定業務に貢献し、平成 27 年度の農林水産省当局への申請に向け「中野市バイオマス産業都市構想」策定委員として、ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術を盛り込んだ「中野市バイオマス産業都市構想」策定に寄与してきた。

また、隣接する長野市においても「長野市バイオマスタウン構想推進協議会」の協議会委員としてバイオマス産業都市推進業務技術提案書を提出し、平成 27 年度の「地域バイオマス産業化推進事業」補助金バイオマス産業都市構想作成のための構想策定支援申請、および平成 28 年度の申請に向けに策定に関与している。

Soft-hydrothermal processing

申請者らは実用化に向け、実用規模の再生処理装置にて栽培実証データ、装置性能データを蓄積し、実証機（プロトタイプ）の性能評価、実用機製造原価低減、製造工程短縮、化学的反応特性の再現性・信頼性・普遍性およびランニングコスト、保守管理と廃きのこ培地再生処理事業収支の検証を行った。

ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理　事業収支検討資料(ブナシメジ)

型式	SHTP-1X	SHTP-2	SHTP-3
寸法	φ1900×4500 l	φ1500×3750 l	φ1200×2900 l
有効容量 (m^3)	12.0	6.0	3.0
処理量(ton/batch) 見掛け比重0.3	2.52	1.26	0.63
処理量 (ton/1day/4batch)	10.0	5.0	2.0
処理量 (ton/1年/26日*9月)	2,340	1,170	468
主要機器価格 (千円)	**98,000**	**81,600**	**64,050**
土木建築附帯工事費 (千円)	(60,000)	(40,000)	(20,000)
初期投資 (千円)	(158,000)	(121,600)	(84,050)
ランニングコスト (千円/ton)	3.15	4.16	6.0
再生培地含水率 (%)	60.0	60.0	60.0
コーンコブ/オガコ削減費用 (乾物)(千円/ton)	34.9	34.9	34.9
1本当たり再生培地使用量 (50%代替)(g)	84.0	84.0	84.0
再生培地使用本数 (本/年)	20,000,000	10,000,000	4,000,000
削減培地購入費 (千円/年)	**25,291**	**11,467**	**3,725**
投資回収 (年)	**3.9**	**7.1**	**17.2**
投資回収(土木建築含む) (年)	**6.2**	**10.6**	**22.6**
年間生産量 (ton/年)	3,200	1,600	640
1本当たり削減金額 (円)	1.26	1.15	0.93

※　再生処理量　2.0 ton/1day(4バッチ)、および5.0 ton/1day(4バッチ)の主要機器価格は環境省補助金のプロトタイプ試算金額にて実証実験用の附帯装置機器を包含したものである。

Soft-hydrothermal processing

本事業収支より 10.0 ton/日の装置では主要機器価格 98,000 千円を 3.9 年で回収でき、一般的な規模の土木建築附帯工事費を含めても 6.2 年で回収できる。5.0 ton/日の装置でも主要機器価格 81,600 千円を 7.1 年で回収でき、一般的な規模の土木建築附帯工事費を含めても 10.6 年で回収できる。これらは実用化に対して充分に実現可能な数値である。

さらに、申請者らは主要機器を 10 年償却として毎年の装置導入利益も算定した。

廃培地の運搬廃棄処理表を考慮しなくても廃培地削減量 80.9%、費用削減 3,836 円/ton、15.7%、栽培瓶 1 本当たりに換算すると 1.69 円の削減となり、年間 30,000 千本栽培する標準的きのこ生産業者に対して多大に貢献することができる。

1tonのブナシメジ用きのこ培地の廃培地排出量とコスト

1.0ton

【各種単価計算】

培地原料単価　　単位：円/ton

原料種類	乾燥単価	湿重単価
オガコ	27,180	9,060
コーンコブ	40,000	
培地添加材	40,000	

各原料の水分は66.7%として湿重単価計算

廃培地運搬廃棄処理費

単価 円/ton
0

再生培地単価　　単位：円/ton

装置の減価償却	4,274	年間処理量 2,340(ton/1年−26日*9月)
電気代	171	kWh
燃料費	5,322	灯油 ℓ
水	751	上下水道代 ㎥
その他費用	0	人件費建物土地
計	10,518	

【現状（再生使用なし：シナリオ1）】

水分調整後の培地1tonの価格

原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	50.3%	4,557
コーンコブ	12.7%	5,080
培地添加材	37.0%	14,800
計	100.0%	24,437

廃培地 4.67t

廃棄量(t)	処理費(円)
0.467	0

培地に掛かる経費(円)

合計
24,437

【再生培地活用（シナリオ2）】

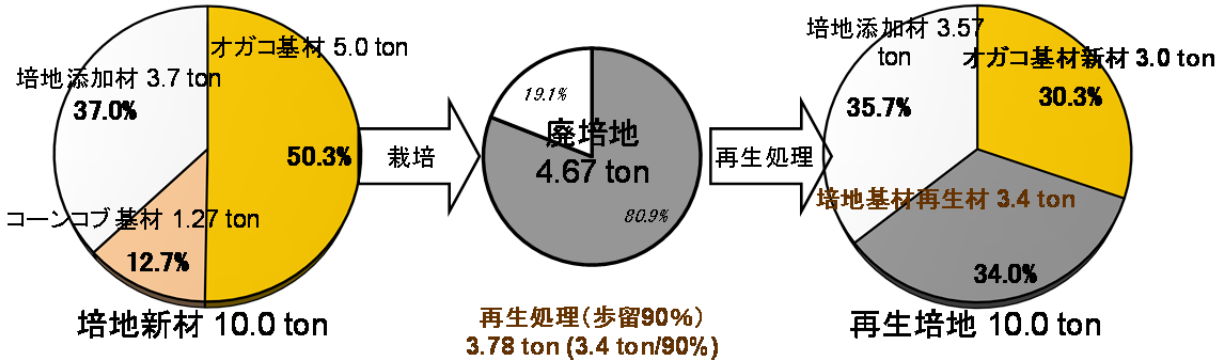
水分調整後の培地1tonの価格

原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	30.3%	2,745
再生培地	34.0%	3,576
培地添加材	35.7%	14,280
計	100.0%	20,601

廃培地 4.67t

廃棄量(t)	割合	処理費(円)	合計
0.089	19.1%	0	20,601
再生処理へ			
0.378	80.9%	0	
計 0.467	100.0%	0	

廃培地削減量(ton)
0.38
80.9%
コスト削減
3,836
15.7%
1本当たり削減金額
1.69円



廃培地排出量に対する再生材処理重量：　80.9%

廃培地と再生培地の数量関係

本文
Soft-hydrothermal processing

１．事業の目的

1.1　廃培地の現状

きのこの人工（培地菌床）栽培は、消費者の健康趣向とともに、きのこの種類・生産量ともに年々増加の傾向にある。きのこを収穫後の培地(廃菌床)は、堆肥にする等の再利用方法が広く知られているが、その方法は、事業者が異なる場合や、必要とする時期の違いがあるなどの問題があり、再利用が進んでいないのが実態である。きのこの生産量拡大により現状の再利用だけではもはや飽和状態となってきている。一方、きのこ経営においては、販売価格の低迷、燃料、資材の高騰により、経営環境の厳しさが増している。そのため培地資材コスト低減と、廃培地の有効利用を目的に、きのこ培地資材として再利用の取り組み（肥料化、燃料化、飼料、培地として再使用）が、きのこ生産で始まっているが、有効な再利用処理方法を見出していない。

図. 1 に示すように長野県は日本一のエノキタケ、ブナシメジ、エリンギ、ナメコ、およびマイタケ等の菌床栽培のきのこの生産県である。

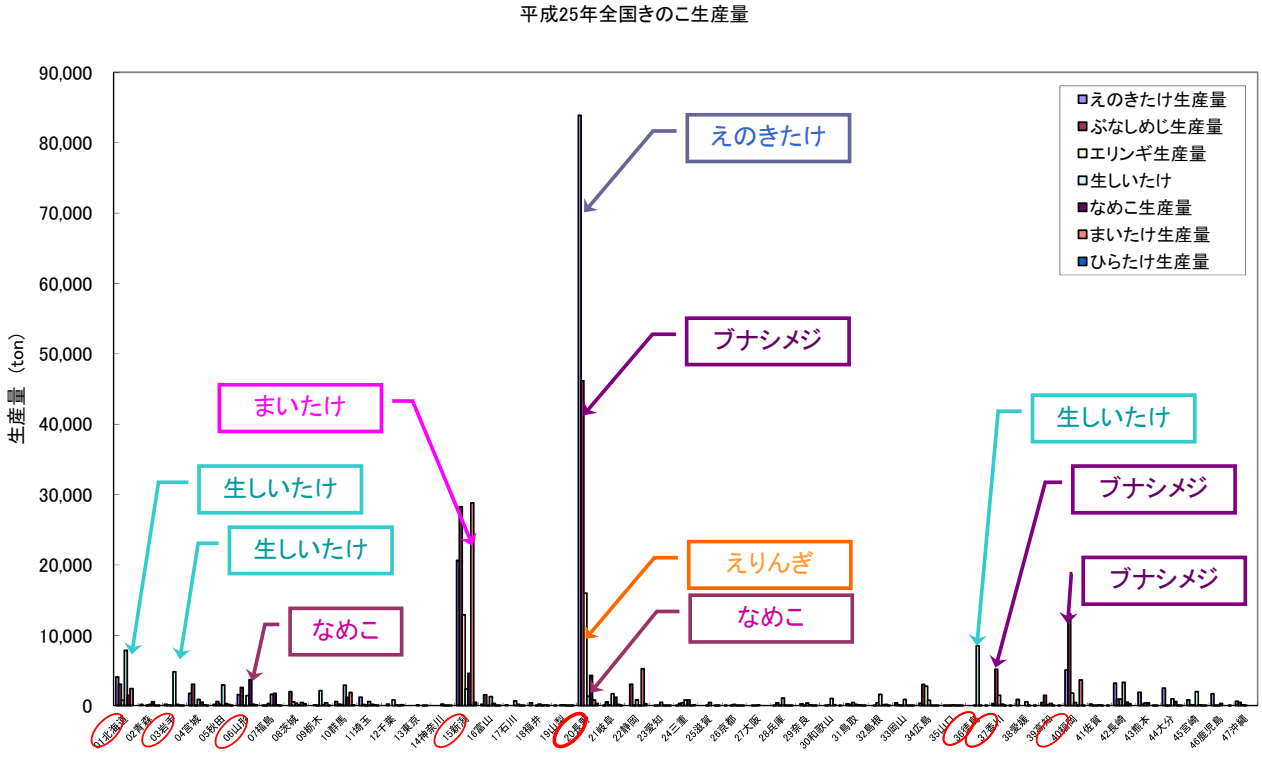


図. 1　平成 25 年　全国きのこ生産量（農林水産省農林水産省　特用林産物需給動態調査）

長野県および新潟県が突出して生産量が多いが、北海道、東北、四国、九州の各県においてもそれぞれのキノコの栽培量は合計で 10, 000 ton を超えている。すなわち、全国で隈なく、きのこが相当量生産量されている。そして、廃きのこ培地はきのこ生産量の 1. 5 - 2 倍の量が排出されている。

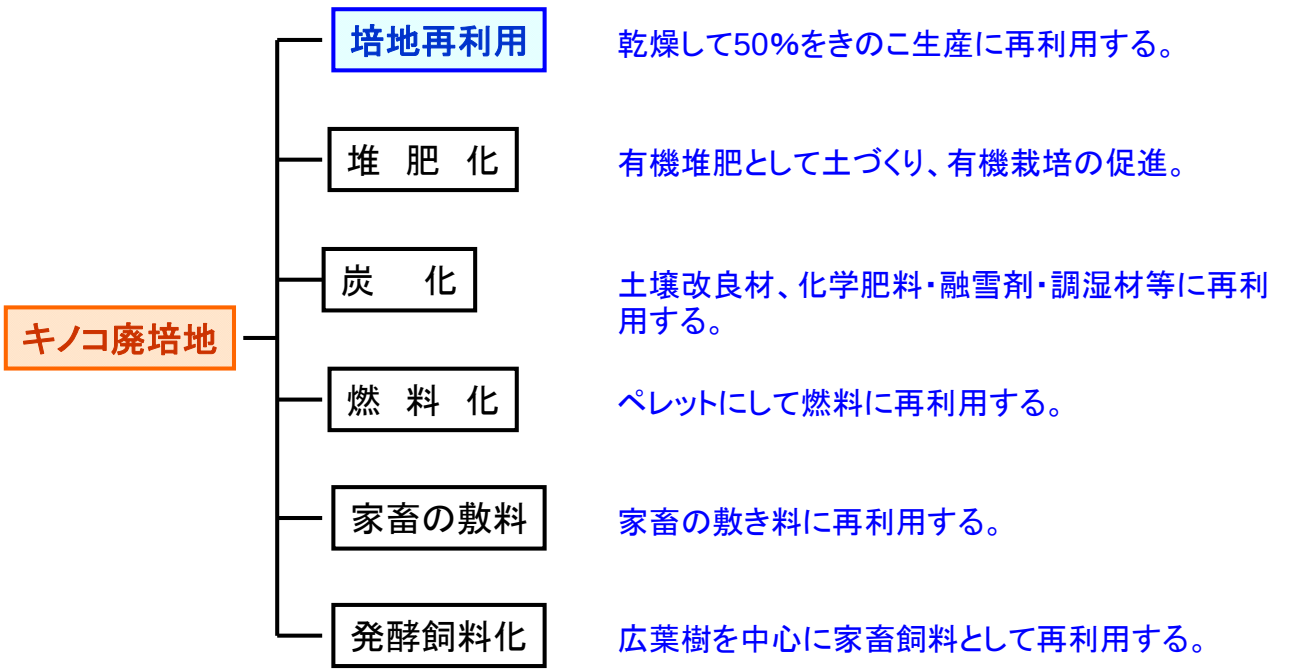
日本有数の培地栽培によるきのこ生産地である長野県中野市によると、2008 年度に同市内で排出された廃培地は約 95, 000 トン（2013 年度は 130, 000 トンを超えた）。近隣の飯山市、山ノ内町、木島平村を含めるとその量は約 200, 000 トンと言われている。うち 66%が堆肥向けを中心に利活用されているが、品質および収量が低下するためきのこ培地としての再利用は難しく、ほとんど利活用されていない。また、培地の基材であるトウモロコシの芯を砕いたコーンコブは、現在中国から輸入されているが、中国国内でのバイオ燃料の原料として需要が急増しその価格が高騰している。また、そのコーンコブ自体の品質も遺伝子組替え作物、および重金属汚染の懸念があり、敬遠するきのこ関連業者も多い。代用とし

Soft-hydrothermal processing

て、きのこ培地の基材に、国内のオガコを使用したいが、精油成分を除去するネカシ（オガコを半年ないし１年間散水して野積みにする）の手間が掛かり近年、エノキタケではほとんど利用されていない。

以上より、廃きのこ培地の培地としての再利用が切望され、また、森林木材業者からも国内木材の利活用の促進のためにネカシに代わる有効な木材精油成分の除去技術が期待されている。

申請者らは，150℃以下ないし 200℃以下の非常にマイルドな水熱プロセス（以下、ソフト水熱プロセスと記す。）を用いて廃きのこ培地の改質とリサイクルの可能性を示唆した。きのこの人工栽培は、きのこの種類・生産量ともに年々増加の傾向にあり、きのこの生産量拡大により廃きのこ培地は飽和状態となってきている。一方、きのこ経営においては、販売価格の低迷、燃料、資材の高騰により、厳しさが増している。そのため、図. 2 に示すように培地資材コスト低減と、廃きのこ培地の有効利用を目的に、きのこ培地資材として再利用の取組み（肥料化、燃料化、飼料、培地として再利用）が、きのこ生産業者のなかで試行されているが、未だに有効なり活用技術を見出していない。



平成24年度長野県キノコ振興基本方針 （抜粋）

長野県キノコ生産の環境面において、**キノコ生産に伴う廃培地（使用済み培地）の利用が課題であり、バイオマス資源として燃料化、資源化等の利活用の促進が必要となっている。**このため、キノコ農家の経営安定を図るために、地域支援班と圏域支援班の体制を整備し、技術改善、財務改善、労務改善の三位一体の経営改善支援に取組むほか、低コスト生産技術、省エネ・節電対策、**廃培地（使用済み培地）の適正利用と新たな培地による地域資源循環システムの構築**、放射性物質に対応した安全な原木・培地原料の使用などの生産管理を進める。

図. 2　廃きのこ培地再利用システムの方向性
― 平成 24 年度長野県キノコ基本計画 ―

そこで、申請者らは、きのこ生産者にメリットのある、廃きのこ培地をソフト水熱プロセスにより、廃培地中の有害物質の抽出・除去、滅菌・きのこ生育阻害酵素の不活化し、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、および適宜乾燥させ、きのこ培地として再生する持続可能な「廃棄物「ゼロ」の循環型きのこ栽培システム」が構築できること、さらにオガコの改質による森林資源の利活用を示唆した。すなわち, ソフト水熱プロセスは廃きのこ培地を改質および再生できるこれまでにはないシステムといえる。

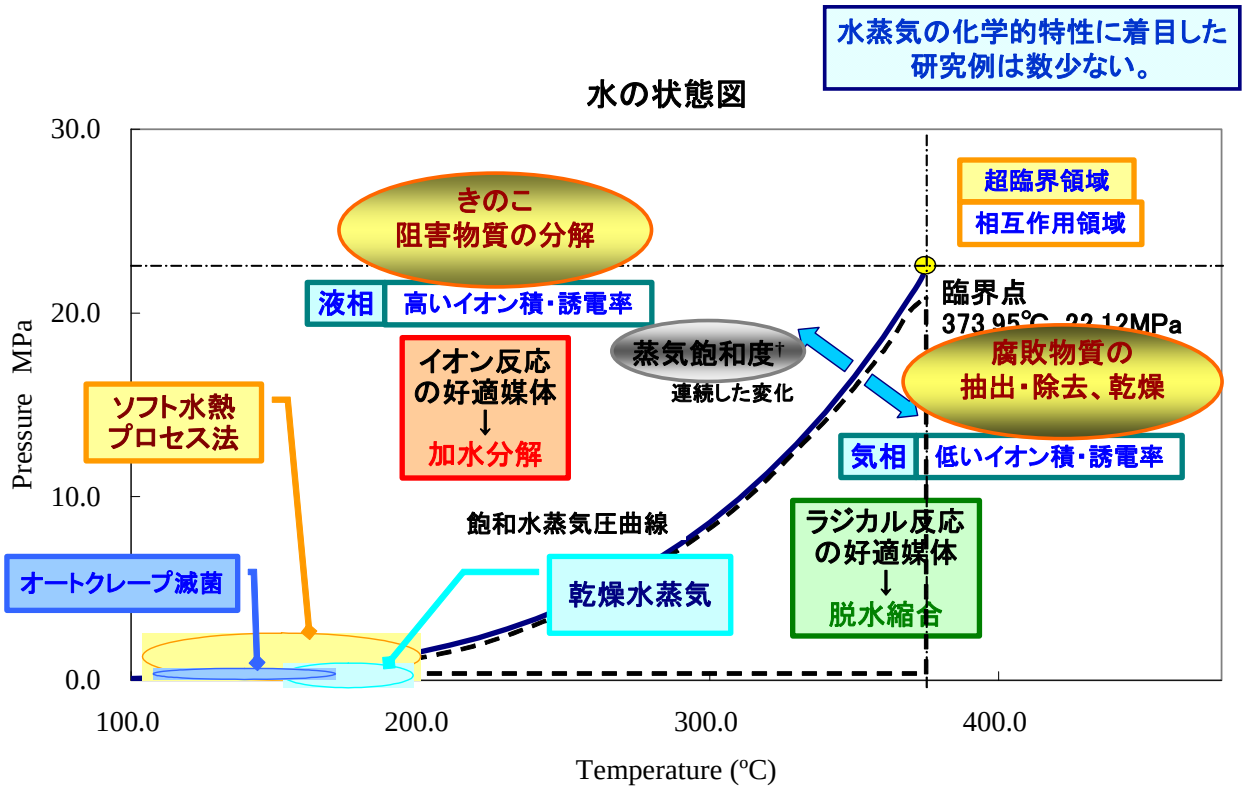
Soft-hydrothermal processing

２．開発した技術の詳細

2.1　ソフト水熱プロセスとは

水を反応媒体とした超臨界、あるいは亜臨界という反応領域を用いた有機物、無機物の分解、あるいは合成の研究はこれまで数多く実施されてきたが、その反応の激しさ故にあまり実用化が進んでいないのが現実である。

本研究は、図. 3 に示すように基礎的研究例がほとんどないソフト水熱プロセス（150℃以下ないし 200℃以下の高温高圧の水、および水蒸気）の加圧熱水領域、乾燥水蒸気領域、飽和水蒸気領域での水の特性を明らかにし、ソフト水熱プロセスを反応媒体として、廃きのこ培地から菌子由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、阻害物質（阻害酵素）も加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の廃きのこ培地の適宜乾燥も行う。すなわち、ソフト水熱プロセスは、添加栄養物由来の有機物、および菌子を含む高含水率の廃きのこ培地の再生処理に最も適した反応媒体であることを実証した。



Gas-Liquid binary phase diagram of water

† 蒸気飽和度(%) = {蒸気密度 (kg/m³) / 飽和水蒸気密度 (kg/m³)} × 100

図. 3　ソフト水熱プロセスの反応特性

申請者らは、ソフト水熱プロセスにより、生命科学研究期間の動物実験施設や繁殖生産会社から膨大な量が排出される、使用済みの床敷から糞尿由来の有害物質を抽出し、乾燥、脱臭および滅菌して再生利用する処理方法を提案している。

Soft-hydrothermal processing

さらに、ソフト水熱プロセスの水の化学特性を応用して、既存のオートクレーブ滅菌では不可能とされた高温耐性の蛋白質あるいは酵素、および細菌内毒素の不活化を可能にし、そのメカニズムを解明して新しい滅菌法の開発を示唆した。

本研究の新規性は反応場が水であり、その反応には特別な化学物質を用いる事はいっさい無い。すなわち、完全無害で副作用も無く、環境保全の理念に合致した技術といえる。

使用済みの床敷と同様に廃きのこ培地のリサイクル、再生利用は、資源の節約となる事は言うまでもなく、ゼロエミッション（資源循環型社会）に基づく社会・環境・生産システムの構築に貢献でき、廃棄量、焼却処理量の減少による温室効果ガス(CO_2)削減にも寄与することができる。

反応媒体としての高温高圧水は、高い誘電率と高いイオン積の液相領域ではイオン反応（無機反応）の好適場となり、比較的低いイオン積と低い誘電率の気相領域ではラジカル反応（有機反応）の好適場となる。

申請者らは、このような多様な化学反応を起こすソフト水熱プロセス、特に、気相領域である乾燥水蒸気に着目し、150℃以下ないし 200℃以下のソフト水熱プロセスの乾燥水蒸気を利用して、高含水バイオマスから、有機化合物の選択的分解、抽出、および脱水、乾燥、縮合、炭化ができることを示唆した。

臨界点より低い温度の乾燥水蒸気は低密度の媒体で、誘電率は 10 以下になり、イオン積も常温の水より 100 分の 1 ほどに低くなる。したがって、無極性あるいは極性の弱い有機物質の抽出に対して利点があると推察される。この性質を利用し、有機物質を分解せず、直接的に天然物質から抽出することが可能となる。本研究は、乾燥水蒸気を反応媒体として、廃きのこ培地から菌子由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、阻害物質（阻害酵素）も加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の廃きのこ培地の適宜乾燥も行う。

すなわち、ソフト水熱プロセスが、添加栄養物由来の有機物、および菌子を含む高含水率の廃きのこ培地の再生処理に最も適した反応媒体であることを実用規模のプロトタイプにより立証した。

ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術を確立するため、機能、性能を満たした装置の完成およびシステムの構築に向け、次の３項目より検証した。

1. 装置の機構的再現性・信頼性・普遍性を立証すること。
2. きのこの栽培実証により収穫量・品質を立証すること。
3. きのこ培地成分の化学成分分析により再生メカニズムを解明すること。

2.2 装置の機構的再現性・信頼性・普遍性の立証

既往の研究より、廃きのこ培地の生物由来の生育阻害物質、および腐敗性有機化合物がその再利用（使い廻し）を妨げ、また木質由来の生育阻害物質がきのこ菌床栽培の収穫量、およびその品質の安定性を妨げていると云われている。そこで、申請者らは,150℃以下ないし 200℃以下の非常にマイルドな水熱プロセス（以下、ソフト水熱プロセスと記す）を用いて廃きのこ培地の改質、および再生をまず小型実証機（10 kg/バッチ）で立証し、その再生処理条件の閾値、および最適処理条件を世界で初めて示唆した。

【方法】JA コーン培地を対照区 control（+）、JA コーン培地の使用済みの培地を対照区 control（-）として、ソフト水熱プロセスを施した再生培地を実験区とした。ソフト水熱プロセスの処理条件は、120、130、140、150 ^{o}C にてそれぞれ 30、60、90 分とした。再生培地の代替率は、乾物重量比で 50%とし、栄養材として、コメヌカ、フスマ、ビート、キノコライムを所定量添加し含水量を調整したうえで、通

Soft-hydrothermal processing

常の手順で殺菌した。供試品種SR12を接種した後は、JA中野市施設内で通常生産時と同様の手法で培養、菌掻き、発生管理を行った。ソフト水熱プロセス処理前、処理後、および殺菌前、殺菌後の pH、含水量を測定し、栽培日数（培養、発芽、生育）、栽培状況（菌周り状況、発芽状況、床ハゲ状況、抑制状況、接着程度）、および収量を調査した。

【結果および考察】control (−)で栽培した時のきのこの収量は、control (+)と統計学的有意差は認められないものの低下する傾向が見られた。また、品質は、control (+)に比較して不良である。これは、きのこ廃培地中に存在するきのこ生育阻害物質に起因するともの考えられる。ソフト水熱プロセス 120 °C −30, 60 分では生育阻害物質の不活化反応のばらつきが大きく、90 分では、不活化が安定する。さらに、control (+)の収量と同等となり、130 °C 以上では 120 °C より不活化反応は促進されている。きのこの品質は、control (+)と同等である。140、150 °C −30、60 分、および 90 分では、生育阻害物質の不活化反応が充分促進されている。すなわち、何れの反応時間でも、control (+)の収量と同等となる。きのこの品質は、control (+)に比較し優良である。以上より、きのこ廃培地のきのこ阻害物質の不活化は、120℃では何れの時間でも不十分であるが、130 °C で亢進され、130 °C −30 分以上では、control (+)と同等の収量、品質となり、さらに時間、温度を増加させることにより、control (+)以上の収量、品質となる。

以上より、申請者らは、図. 4 に示すように世界で初めて廃培地の再生処理条件の閾値を明らかにし、きのこ生産者がその処理に苦慮しているきのこ廃培地を、ソフト水熱プロセスにより廃培地中の有害物質の抽出・除去、滅菌・きのこ生育阻害物質の不活化、および適宜乾燥させ、きのこ培地として再生する「廃棄物「ゼロ」の循環型きのこ栽培システム」が構築できること、さらにオガコの改質による森林資源の利活用を示唆した。

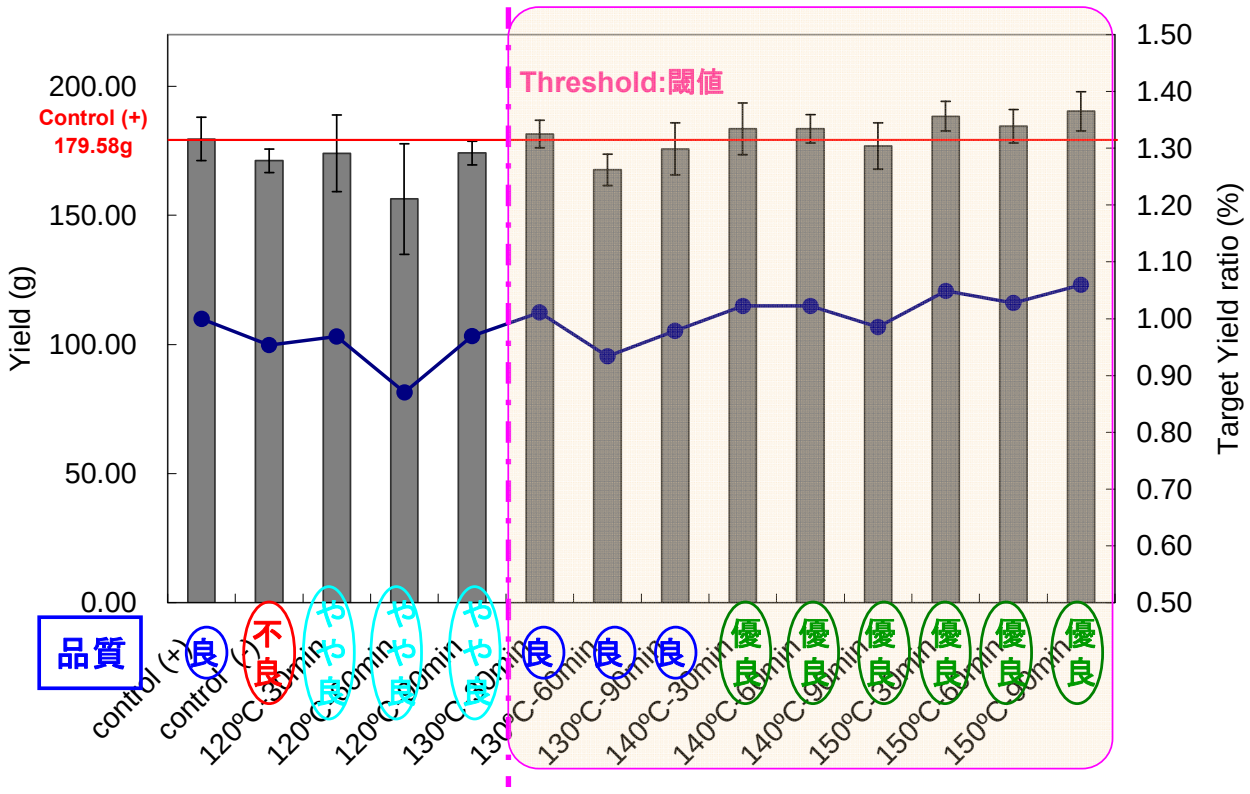


図. 4　ソフト水熱プロセスの各再生処理条件と収穫量

Soft-hydrothermal processing

本研究の新規性、独創性は高温高圧水蒸気の化学的特性を適用していることにある。申請者らは、小型実証機（φ400×L865 mm、処理能力 10 kg/バッチ）ではその有効性を立証しているが、スケールアップした本補助金事業の実用規模のプロトタイプ（φ1,200×L2,900 mm、処理能力 500 kg(2 m^3) /バッチ）においても、水蒸気の温度、圧力、および流量を制御し、気相、液相および飽和水蒸気圧曲線上の有効性について実証実験を行ってきた。

図.5 にプロトタイプの概要図および写真を示す。

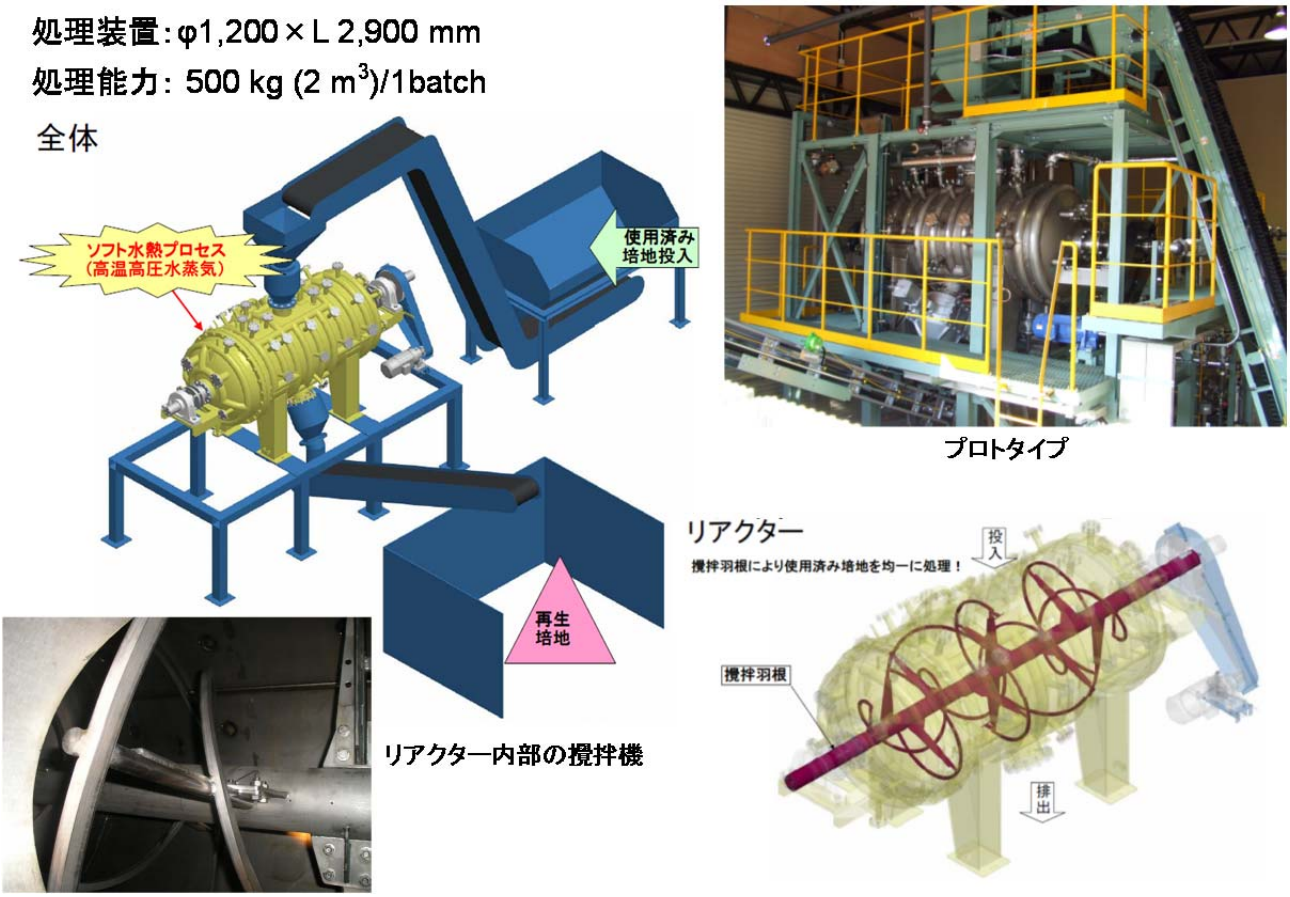


図.5　ソフト水熱プロセスのプロトタイプ外略図

具体的には、廃きのこ培地再生処理装置の新規性、独創性および特許性は、従来の高温高圧水蒸気反応装置（既存の「オートクレブ」）とは次事項で相違している。

1. ジャケット、およびリアクターの水蒸気をそれぞれ個別に圧力で制御できること。
2. ジャケット、およびリアクターの水蒸気流量をそれぞれ個別に制御できること。
3. ジャケットの圧力・流量をジャケット上流側、およびジャケット下流側でそれぞれ分離して制御できること。
4. リアクターの圧力・流量をリアクター上流側、およびリアクター下流側でそれぞれ分離して制御できること。
5. ジャケット、リアクターの水蒸気を流通式にできること。

これらは従来の高温高圧水蒸気反応装置（既存の「オートクレブ」）と相違している事項である。

また、廃きのこ培地の既往再生処理関連技術と本技術との相違を下記に記す。

Soft-hydrothermal processing

- 常圧水蒸気処理方法：水、あるいは蒸気に晒して攪拌した後に自然水切りし培地として調整し再利用する。コーンコブ代替率は 50%。（特開 2008-54510）
- ソフト水熱プロセスとの違い：60℃の温水、あるいは蒸気と記載されているが、いずれにしても100℃以下の常圧の水蒸気であり、単に廃培地を洗浄するだけで本事業のソフト水熱プロセスの乾燥、抽出、阻害物質の不活化という化学的反応は期待できない。一定のエノキダケでの再生使用効果は、新材コーンコブを同量混合することで、廃培地を希釈するためだと推察されるが、他のきのこ（エリンギ、ブナシメジ）では収穫量、品質とも再利用はできない。
- ソフト水熱プロセスの差別化：ソフト水熱プロセスの再生処理培地は、きのこ阻害物質を不活化するため、再生処理培地で栽培したエノキダケを含むあらゆるきのこ種の品質でも、新規培地（フレッシュ培地）と同等、あるいは同等以上となることを実証した。

本廃きのこ培地再生処理装置のメカニズムは、図. 6 から図. 9 に提示するように、リアクター内の蒸気飽和度(*1)を制御することにより、加圧熱水、飽和水蒸気、さらに乾燥水蒸気を反応媒体として、廃きのこ培地から菌子・木質由来の有機物質（腐敗性物質）の抽出を行い、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、および菌株の生育阻害物質（阻害酵素）を加水分解することにより不活化し、さらに高含水率の使用済みきのこ培地の適宜乾燥を可能とした。すなわち、水蒸気の化学的最適反応場を選択的に創出できることを立証とした。

注記：(*1) 蒸気飽和度(%) = {蒸気密度 (kg/m³) / 飽和水蒸気密度 (kg/m³)} × 100

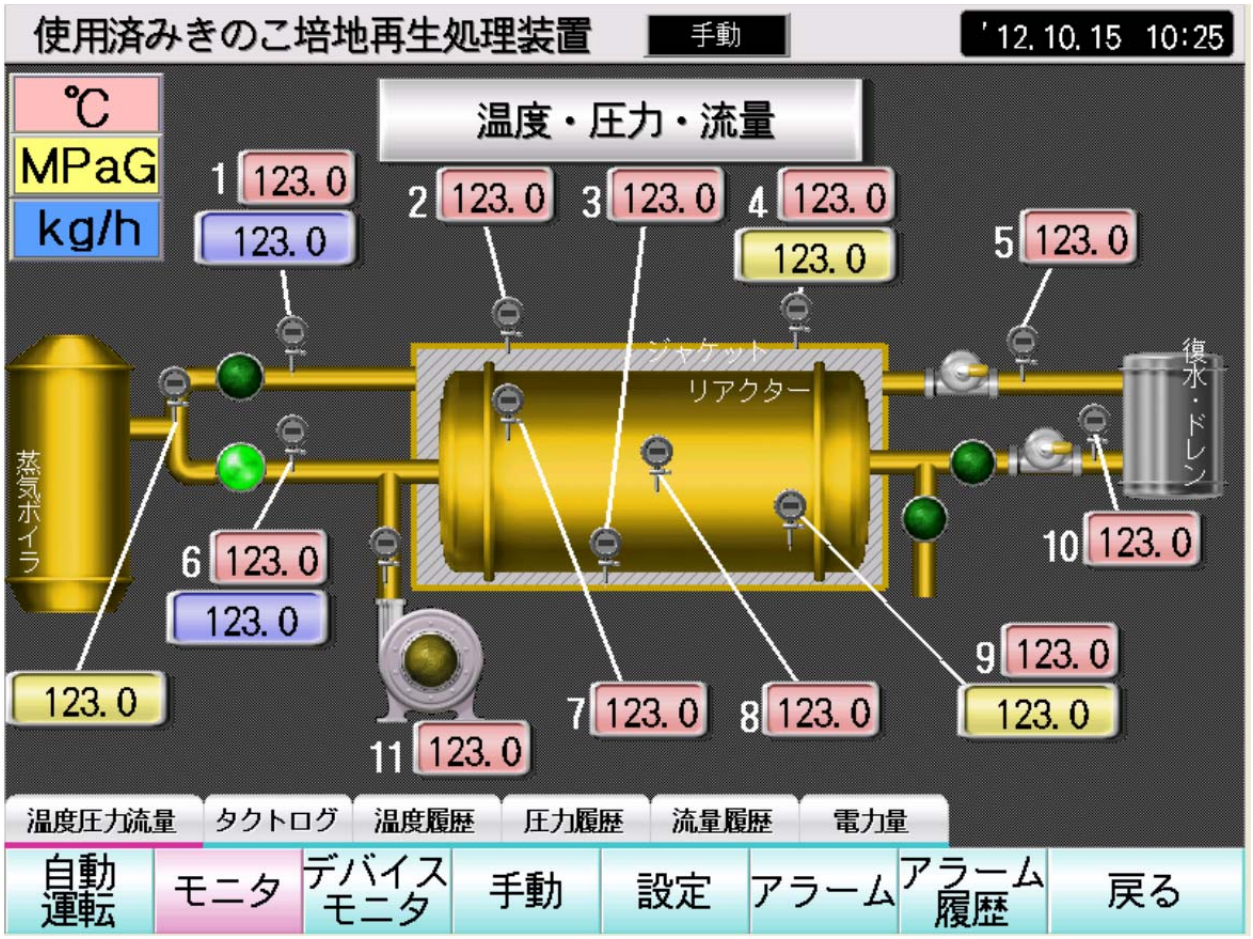


図. 6　プロトタイプの制御盤表示部

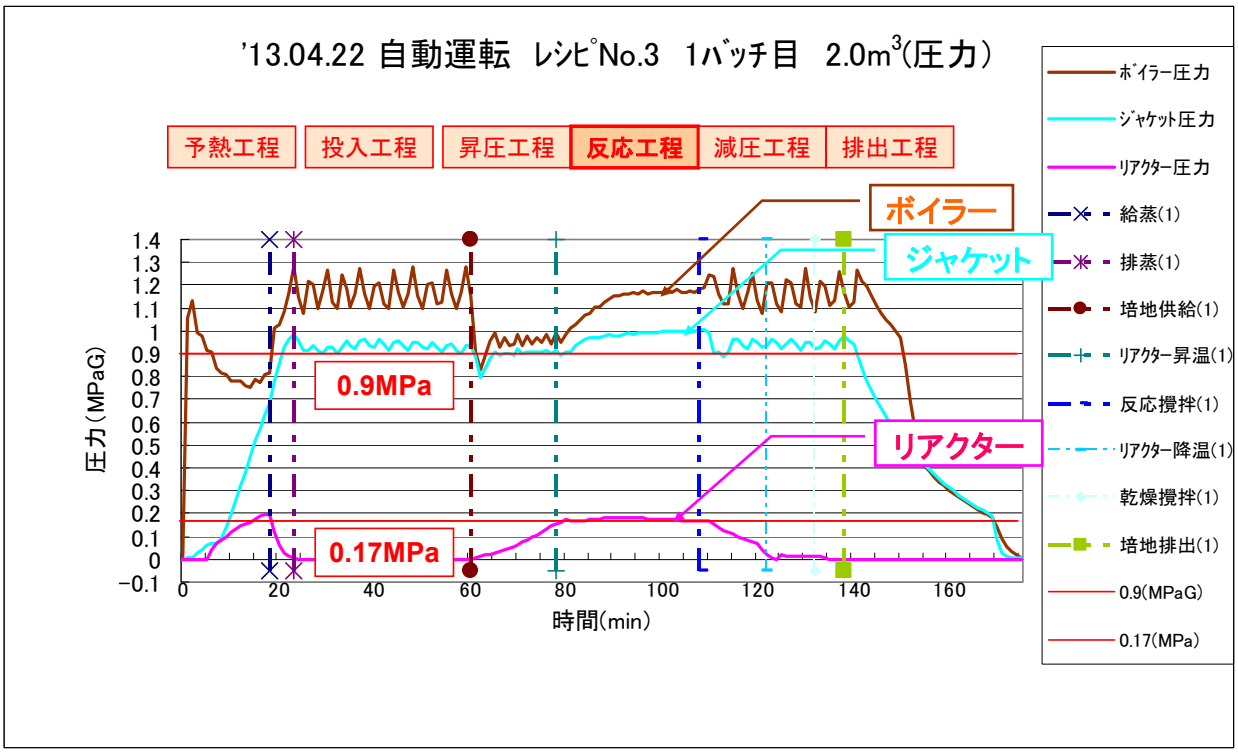


図.7　プロトタイプの圧力挙動

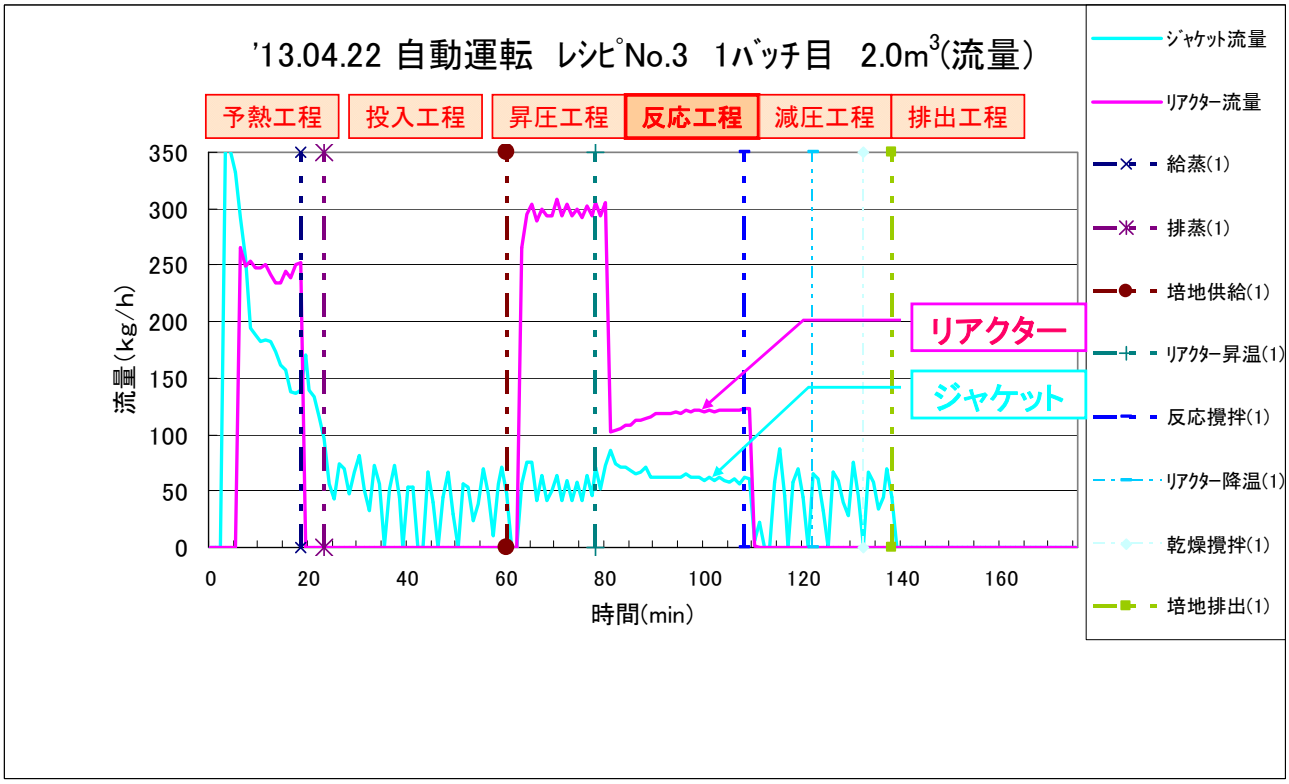


図.8　プロトタイプの流量挙動

最適条件の考察(温度挙動)

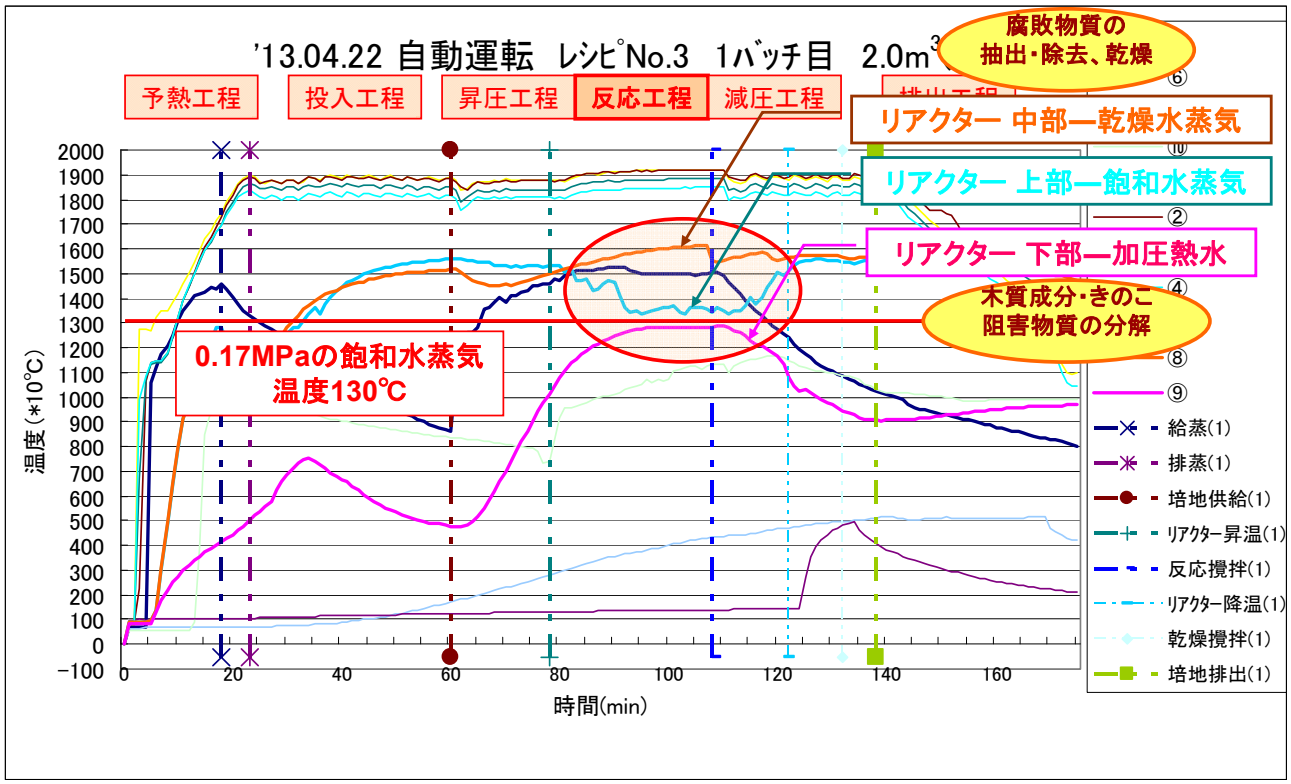


図.9　プロトタイプの温度挙動

図.6 に示すように、本プロトタイプの制御盤表示部により、蒸気供給部の温度・圧力・制御状況、ジャケット内部の温度（上部・中間部・下部）・圧力・流量、リアクター内部の温度（上部・中間部・下部）・圧力・流量、および蒸気排出部の温度・圧力・制御状況を適時表示し記録できる。

本プロトタイプの圧力挙動、流量挙動、および温度挙動をそれぞれ図.6、図.7、および図.8 に示す。

温度、圧力挙動よりジャケット内部、およびリアクター内部の水の状態が判ることは言うまでもない。

すなわち、リアクター内部の圧力制御 0.17 MPa（飽和水蒸気温度 130℃）に対して、リアクター下部はその設定圧力に対する飽和水蒸気の温度より若干低い 128℃で推移している。したがって液相である加圧熱水の状態で廃きのこ培地の腐敗物質の分解除去、および培地木質成分のリグニンを適度に分解し結果としてきのこの菌糸および子実体の基となる生育成分の吸収取り込みをしやすくしている。一方で、リアクター中間部はその設定圧力に対する飽和水蒸気の温度より高い 160℃で推移している。したがって気相である乾燥水蒸気の状態で廃きのこ培地より腐敗物質を抽出し、および乾燥している。同様に、リアクター上部はその設定圧力に対する飽和水蒸気の温度と同じ 130℃で推移している。したがって気相－液相の混在する飽和水蒸気の状態で木質成分の分解、および廃きのこ培地の腐敗物質の分解を行い同時にそれらを抽出し、および適宜乾燥している。リアクター内部の温度はリアクター内部温度より高く設定したジャケットの温度の影響を受けリアクター内部の上部の方がより温度が高くなる（昇温工程）が、反応工程においては中間部と上部の温度は逆転している。これはまさしく廃培地から水分を抽出する（乾燥する）時に発生する蒸発潜熱の影響である。このようにリアクター内部ではこれらの廃きのこ培地の腐敗成分あるいは生育阻害物質の分解、および木質成分の分解、そしてそれらの抽出除去、および乾燥脱水が一つの工程において行われていることを見事に立証している。

Soft-hydrothermal processing

2.3　栽培実証による収穫量・品質の立証

申請者らは、上述のプロトタイプにより再生処理した廃きのこ培地によりきのこの実証栽培を実施し、次の項目でその栽培実証により収穫量・品質を立証した。

実証栽培に用いたきのこの種類は菌床栽培きのこの中でも一番栽培が難しいといわれるブナシメジにおいて、最初に小ロッド（24 本入りコンテナ数コンテナ程度）で実証栽培を行い、そのきのこの収穫量、および品質を確認し、小型実証機（φ400×L865 ㎜、処理能力 10 kg/batch）の再現性を実証した上で、実用規模の 1 釜単位（16,000 本/1 釜）にて実証栽培を行った。

また、実用規模の実証栽培はエノキタケにおいても実施した。

(1) ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培（図 10-1 から 3、図 11）
- 収穫量、品質、培養日数とも通常-培地の有意差ないこと、使用済み培地では栽培できないことを確認。

(2) ブナシメジ廃培地再生培地 50%、60%、70%代用による小ロット実証栽培（図 12、図 13）
- 収穫量、品質、培養日数とも通常-培地の有意差ないこと、使用済み培地では栽培できないことを確認。

(3) ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用によるエノキタケ小ロット実証栽培（図 14）
- 収穫量、品質、培養日数とも通常-培地の有意差ないこと、使用済み培地では栽培できないことを確認。

(4) ソフト水熱プロセスオガコ改質処理
- 収穫量、品質、培養日数とも通常-培地の有意差ないこと、廃培地では栽培できないことを確認。
- ネカシの必要性は木質由来の阻害物質の存在によると考えられる。

(5) 第 1 回、第 2 回ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による）一釜単位-16,000 本実用規模の実証栽培（図 15）
-収穫量、品質、培養日数とも通常培地の有意差ないことを確認。

(6) 第 3 回、第 4 回ブナシメジ実規模実証栽培（図 16）
-収穫量 5-10%減[†]。

(7) 第 5 回ブナシメジ実規模実証栽培。新調合（コーンコブ 100%）ブナシメジ培地（図 17、図 18）
-品質良好、収量は 5%増収、培養日数過多。

(8) 新調合（コーンコブ 100%）ブナシメジ培地の小ロッド栽培
-コントロールと有意差なし。

(9) 栄養剤無添加ブナシメジ培地実証栽培
-収穫量減（参考実験）。

(10) 第 1 回エノキタケ培地実規模実証栽培
-収穫量 5-10%減[‡]。

(11) 第 2 回エノキタケ培地実規模実証栽培（図 19）
-コントロールと有意差なし。

注記[†, ‡]：小型実証機より 130℃-30 分処理条件が閾値として再生処理を行ったが、後述（2.4　化学成分分析により再生メカニズムを解明）の化学的検証より 140℃-30 分処理に変更した。また、処理条件変更に対する費用の増加もランニングコスト費用効果にて分析している。

図. 10-1　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培（培養・菌廻り）

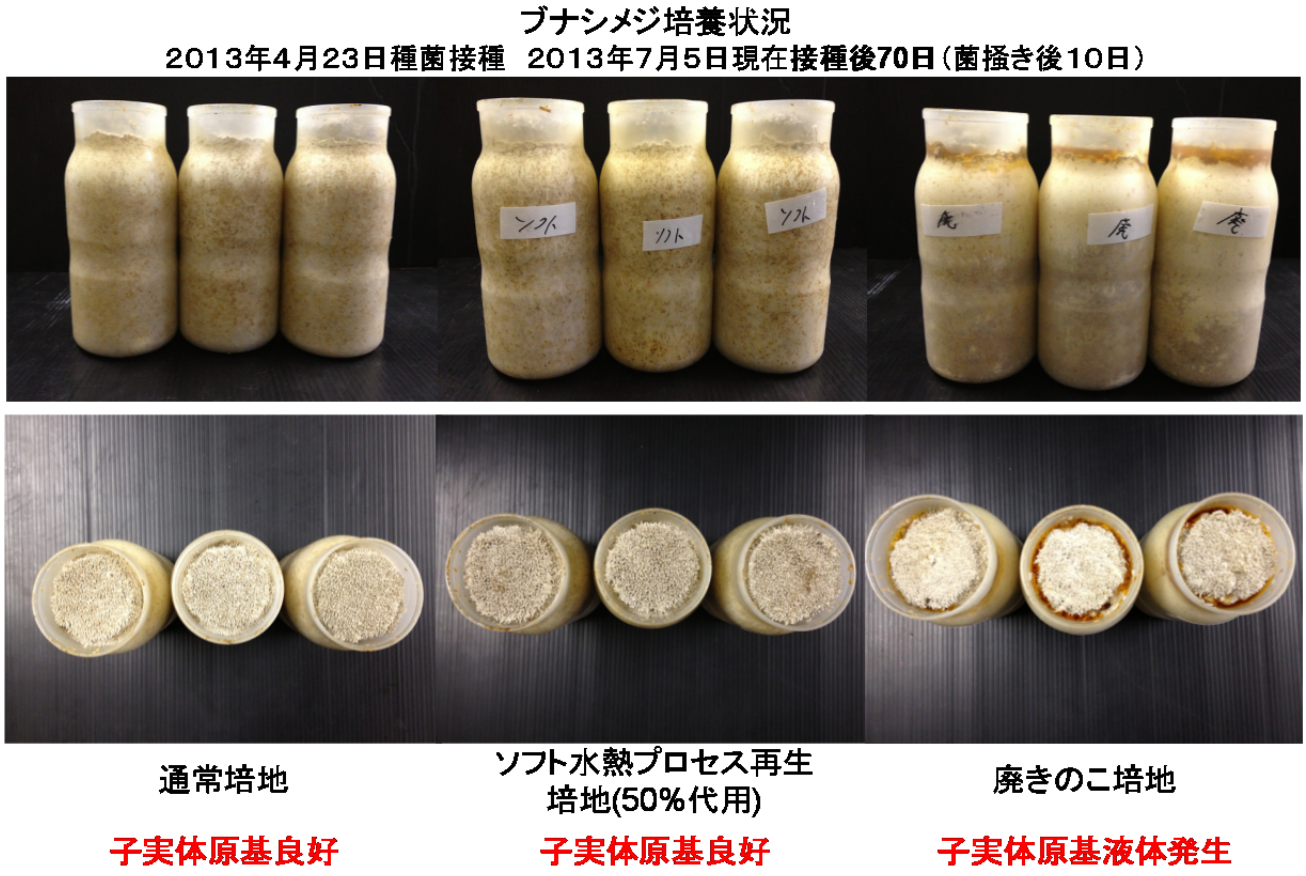


図. 10-2　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培（芽ぶき）

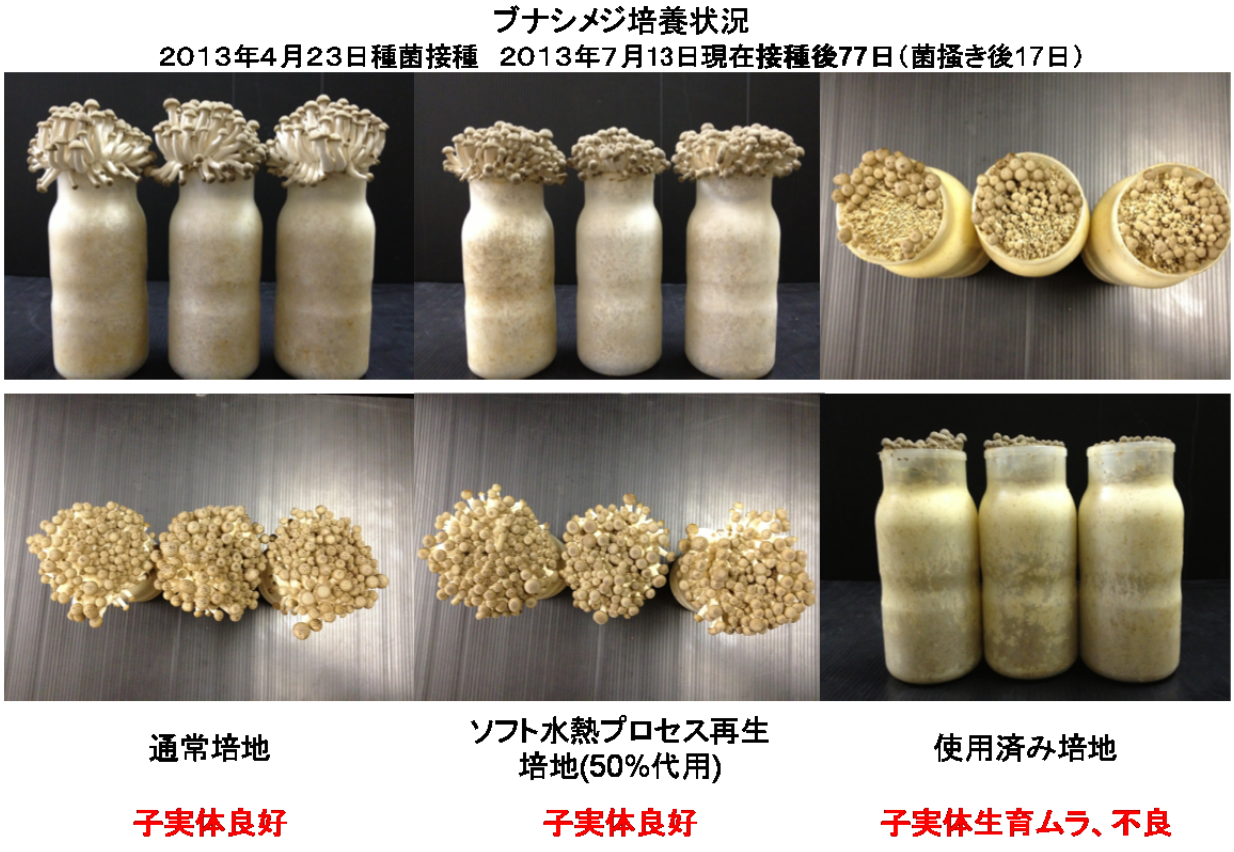


図. 10-3　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培（生育）

図. 10-4　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培（生育）

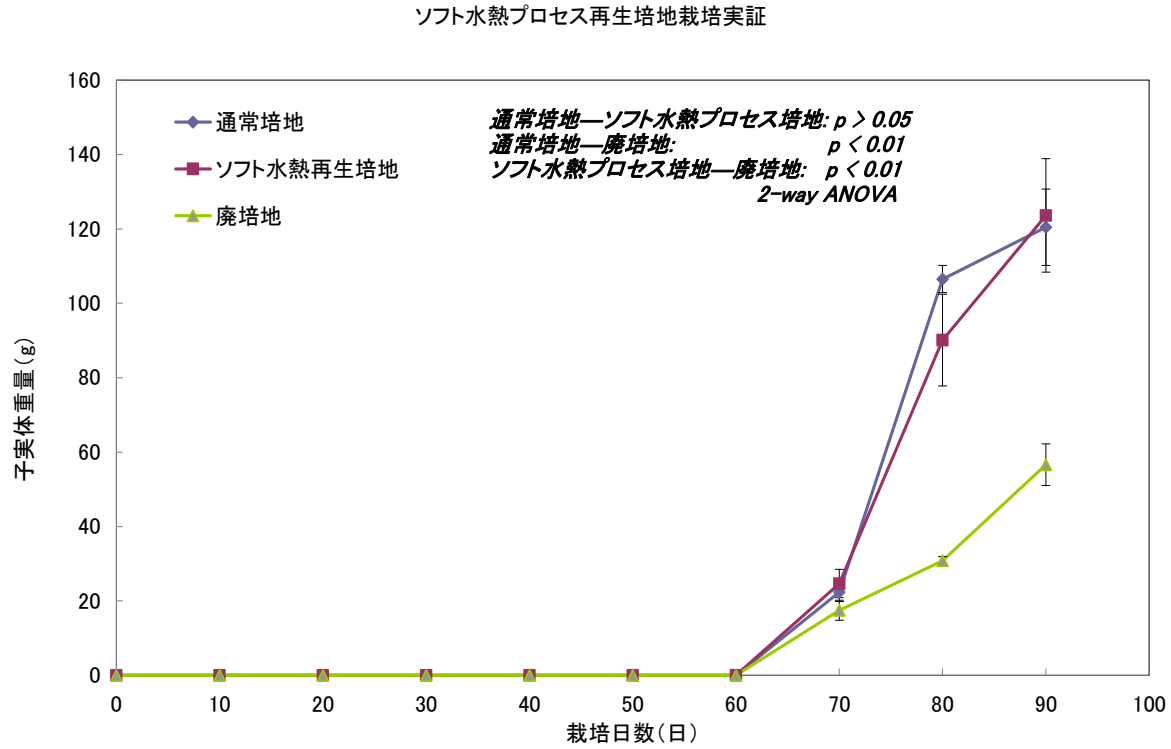


図. 11　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用による小ロット実証栽培　子実体重量推移

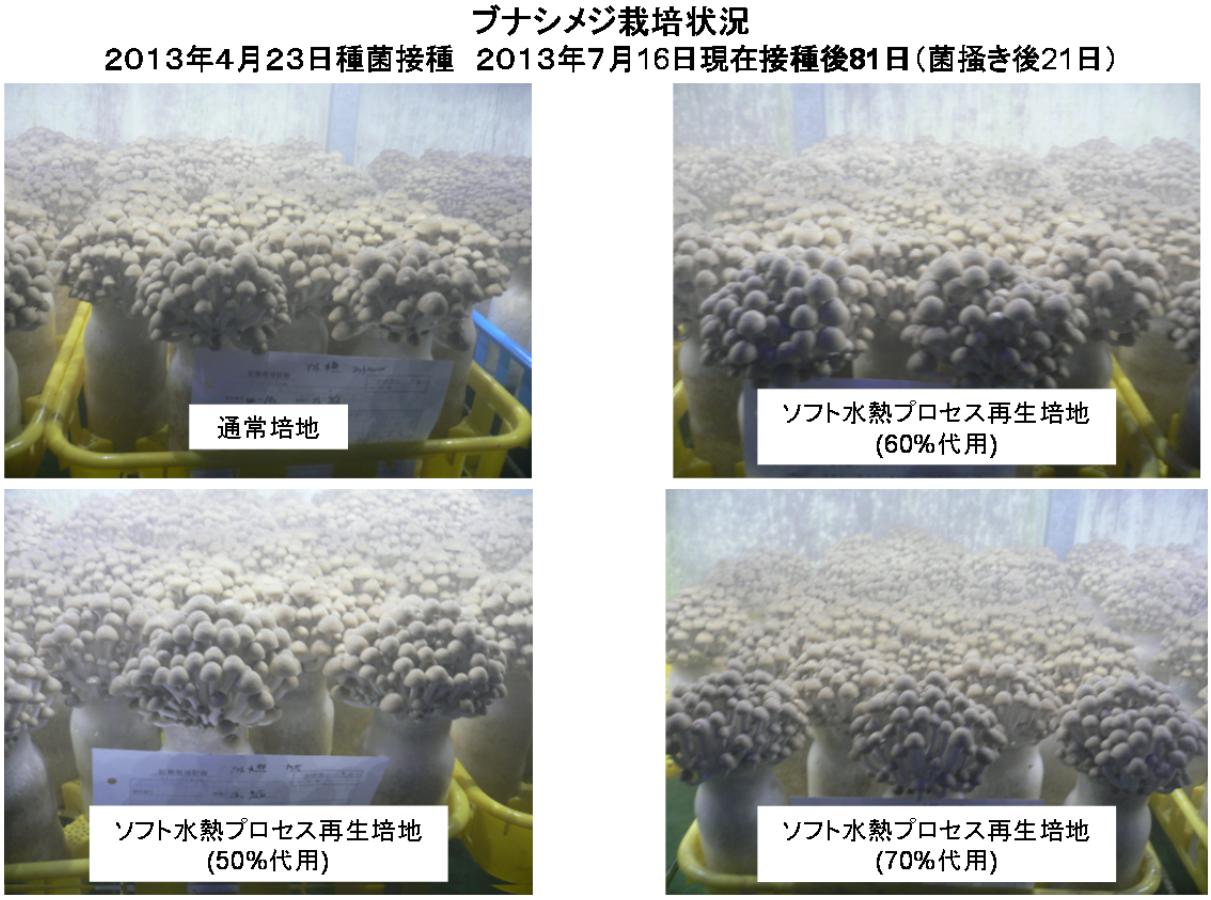


図. 12　ブナシメジ廃培地再生培地 50%、60%、70%代用による小ロット実証栽培

Soft-hydrothermal processing

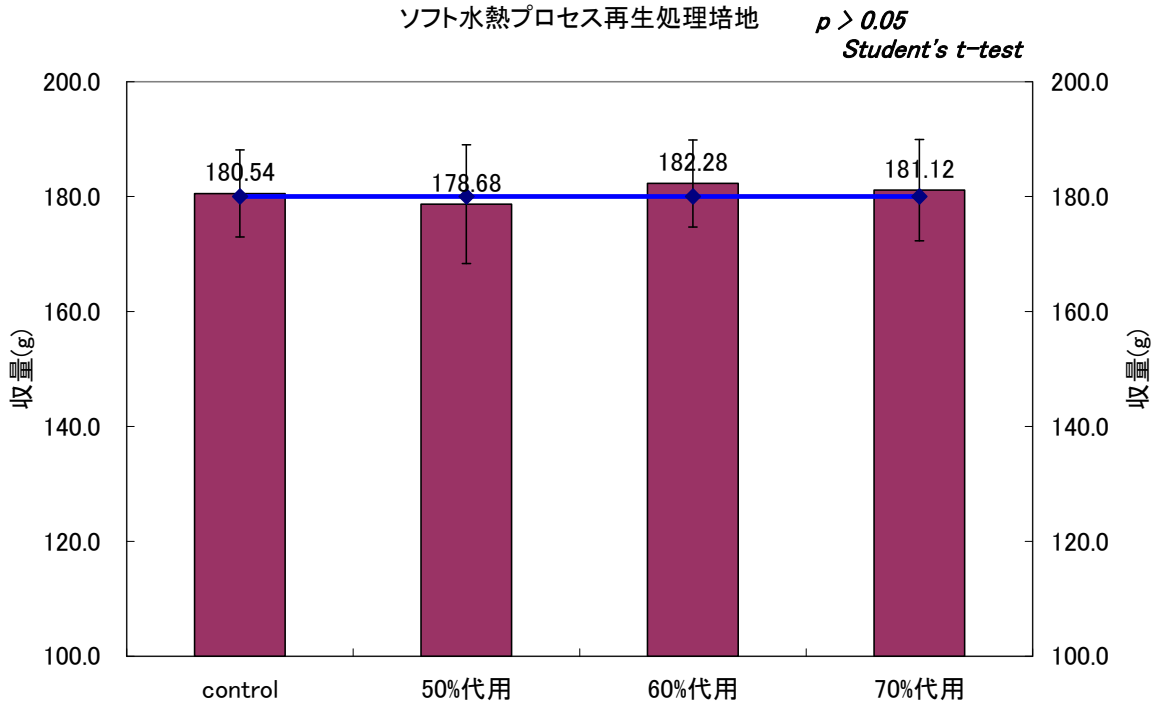


図. 13　ブナシメジ廃培地再生培地 50%、60%、70%代用による小ロット実証栽培収穫量

ソフト水熱プロセス再生処理培地 50%、60%、70%代用ともに子実体収穫量は通常培地と有意差無い。

図. 14　ブナシメジ廃培地再生培地 50%代用によるエノキタケ小ロット実証栽培

ブナシメジソフト水熱オガコ50%・コーン50%
代替試験 -実用規模:16,000本/1釜-第1、2回

菌系	ON-2G
水分	67.7%
pH	5.7
培養日数	60日
接種日	2013年7月6日
菌掻き日	2013年9月4日
収穫日	2013年9月25日・26日

シンシア試験栽培

収　量	ソフト水熱	コントロール
生育22日目	196.8	203.7
生育23日目	187.7	201.7
平　均	192.3	202.7

JA中野市種菌センター試験栽培

収　量	ソフト水熱	コントロール
生育23日目	199.9	195.1
生育24日目	204.1	204.3
平　均	202.0	199.7

図. 15　第 1 回ブナシメジ廃培地再生培地一釜単位-16, 000 本実用規模の実証栽培

	ソフト水熱	対照
培養日数	70日	67日
発生日数	23~	22~23
収量	179.1	203.1
STDEV	16.5	17.8
201g以上	8.7%	55.5%
181~200g	32.2%	36.2%
151~180g	53.9%	7.1%
150g以下	2.2%	0.4%

左:ソフト水熱　右:対照

	ソフト水熱	対照
培養日数	70日	67日
発生日数	24~	23~
収量	203.4	222.6
STDEV	17.5	19.4
201g以上	58.2%	88.5%
181~200g	34.7%	9.5%
151~180g	5.6%	1.5%
150g以下	0.8%	0.3%

左:ソフト水熱　右:対照

図. 16　第 3, 4 回ブナシメジ廃培地再生培地一釜単位-16, 000 本実用規模の実証栽培

	ソフト水熱	対照
培養日数	74日	56日
菌掻日	10月10日	10月10日
収穫日	10月31日	10月31日
発生日数	22~	22~
収量	211.3	200.9
STDEV	17.7	20.3
収穫株数	15254.0	24652.0
201g以上	75.4%	53.8%
181~200g	20.4%	31.8%
151~180g	3.5%	11.5%
150g以下	0.3%	1.7%

種菌C生育試験結果

	ソフト水熱	対照
培養日数	74日	56日
菌掻日	10月10日	10月10日
収穫日	10月31日	10月31日
発生日数	23~	23~
収量	227.6	215.1
STDEV	10.0	11.0

図. 17　第 5 回ブナシメジ実規模実証栽培–新調合（コーンコブ 100%）ブナシメジ培地–一釜単位–16, 000 本実用規模の実証栽培

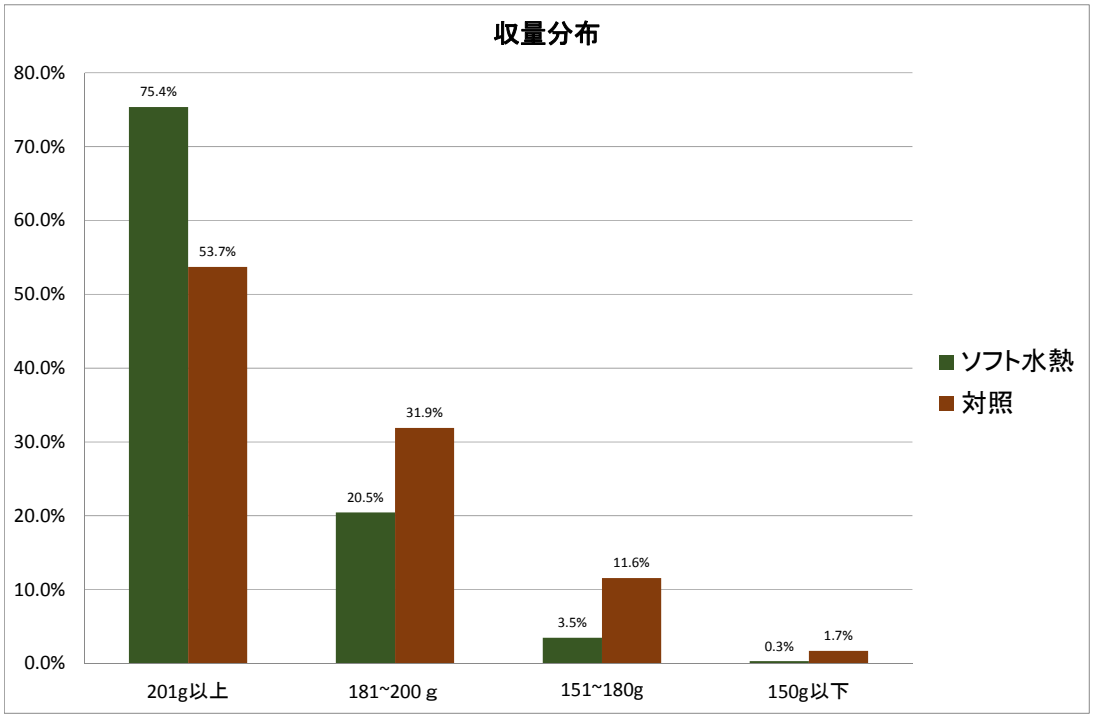


図. 18　第 5 回ブナシメジ実規模実証栽培の収穫量の分布

Soft-hydrothermal processing

収穫ラインデータ（エノキタケ）

ソフト水熱培地

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月7日	11,477	2,499	78.20%	208.8

同日収穫

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月7日	472	69	85.4%	209.2
	25,268	4,265	83.1%	211.3
	7,291	403	94.5%	215.7
		平均	87.7%	212.1

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月8日	4,726	82	98.30%	224.1

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月7日	17,478	3,609	79.4%	210
	40,567	6,468	84.1%	211.3
		平均	81.8%	210.6

研究収穫分（2コンテナ）

ソフト水熱培地

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月6日	18	0	100.00%	213.5
2014年8月7日	18	0	100.00%	220.9
2014年8月8日	12	0	100.00%	222.4
2014年8月9日	1	0	100.00%	248.0
2014年8月10日	0	0	–	–
2014年8月11日	0	0	–	–
		平均		226.2

対照

	総数	計量数	A品率	収量(g)
2014年8月6日	0	0	–	–
2014年8月7日	0	0	–	–
2014年8月8日	2	0	100.00%	209.5
2014年8月9日	21	0	100.00%	216.0
2014年8月10日	19	0	100.00%	223.2
2014年8月11日	5	0	100.00%	217.4
			平均	216.5

図. 19　第 2 回エノキタケ培地実規模実証栽培

ブナシメジ新調合培地（コーンコブ 100%）の導入、および既存培地でのブナシメジの第 3-4 回実証栽培で通常培地より 5-10%収穫量が少ないことより、次項**「2. 4　化学成分分析により再生メカニズムを解明」**の化学的裏付けに基づき再生処理条件を 130℃-30 分から 140℃-30 に改善することにより、第 5 回実証栽培で収量品質も良好なことを立証した（図. 17、図. 18）。

これらのソフト水熱プロセスきのこ廃培地再生処理技術による実用規模での実証栽培できのこの収穫量、および品質を実証したことはこれまでに研究例の類がなく、正しく世界初の実証と言える。

2. 4　化学成分分析による再生メカニズムの解明

菌床きのこ栽培のメカニズムは未だに判っていない。

これまで経験的に廃培地の使い廻しができないことは知られていた。ましてや再生培地を再利用して使うことは、これまで多くのものにより試行錯誤されてきたが誰一人として成功しなかった。そして、膨大な量の廃培地は再利用もできず、またほかの用途への利活用も進んでいない。

申請者らは菌床栽培きのこの通常培地、廃培地、および精製培地の化学成分分析により世界で初めて廃きのこ培地再生処理のメカニズムを解明した。

申請者らは、前述したように 150℃以下ないし 200℃以下の非常にマイルドな水熱プロセス（以下、ソフト水熱プロセスと記す）を用いてきのこ廃培地の再生処理に成功し、その再生培地による実用規模での祭場実証にも成功している。廃きのこ培地の再生処理、利活用が進んでいないこのような背景において、上述のソフト水熱プロセス実証機による実証栽培、すなわち実用規模で確かに廃培地が再生培地として通常品質、収穫量できのこ栽培できたことは正しくエポックメーキングである。

申請者らは長野工業技術総合センター材料技術部門（GC/MS）、同食品技術部門（HPLC）、近畿大学農学部応用生命化学科、および独立行政法人海洋研究開発機構と連携して、木質由来、あるいは栄養添加物

Soft-hydrothermal processing

由来の生育阻害物質の検証、生物由来の生育阻害物質の検証、および通常培地、廃培地および再生培地の化学成分分析により世界で初めてブナシメジ、エノキタケ廃培地の**再生**メカニズムを示唆した。

2.4.1　ブナシメジ培地の成分分析　申請者らは、ブナシメジ廃培地および条件の異なるソフト水熱プロセスによって再生させた培地、未使用培地から得られた温水可溶性画分を LC/MS 分析に供した。得られた網羅的 MS ピークデータのプロファイルを得るために多変量解析の一手法である主成分分析（PCA）およびクラスター解析を行った。LC/MS 分析では、Negative と Positive の両モードで分析・検出を行い、得られた網羅的質量分析データに対し、主成分分析およびクラスター解析によるグルーピング、各グループに特徴的なイオンピーク（マーカー）の抽出およびそれらの組成式、構造式の推定を行った。併せて上記統計解析によって抽出されたマーカーの定量解析を行った。

その結果、ソフト水熱プロセスの処理強度によって各サンプルの成分が連続的に変化していく傾向が見出された。Negative と Positive モード各 MS 測定における固有マーカー候補が検出された。また両モードに共通する分子量を持つピークも含まれていた。また、各モードで検出されたマーカー候補すべてについて処理による変化をグラフ化するとともに、Negative と Positive 両モードに共通して検出された固有マーカー候補についてその組成の解析を試みた。それぞれのマーカーについてヒットした組成式から構造を検索したところ、きのこ栽培により減少しソフト水熱処理によって再生した成分ではバニリンやフェルラ酸、シナピン酸に良く似た構造の物質が見出された。また、きのこ栽培により減少しソフト水熱処理でも再生しなかった成分の検索結果は主に脂肪酸であった。

これらのマーカー分子の変化を指標にすることにより、キノコの増殖、ソフト水熱処理によって生じるバイオマスの変化を特徴づけることができる可能性が示唆された。

測定条件：

サンプル調製

未接種培地、廃培地、およびソフト水熱処理した各サンプル（下表）を 90℃で 6 時間乾燥後パウダー状に粉砕、10 倍量の MQ 水を加えて 60℃で 3 時間静置することにより温水抽出した。これを 8000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄を固相抽出カラム（OASIS WAX: waters 社製）で前処理後、溶離液を窒素乾固し、20%のアセトニトリル水溶液に再度溶解し、下記条件で LC/MS 分析に供した。

LC/MS 条件

移動層　　A 液：2mM 酢酸アンモニウム、0.05%ギ酸　　B 液：95%アセトニトリル

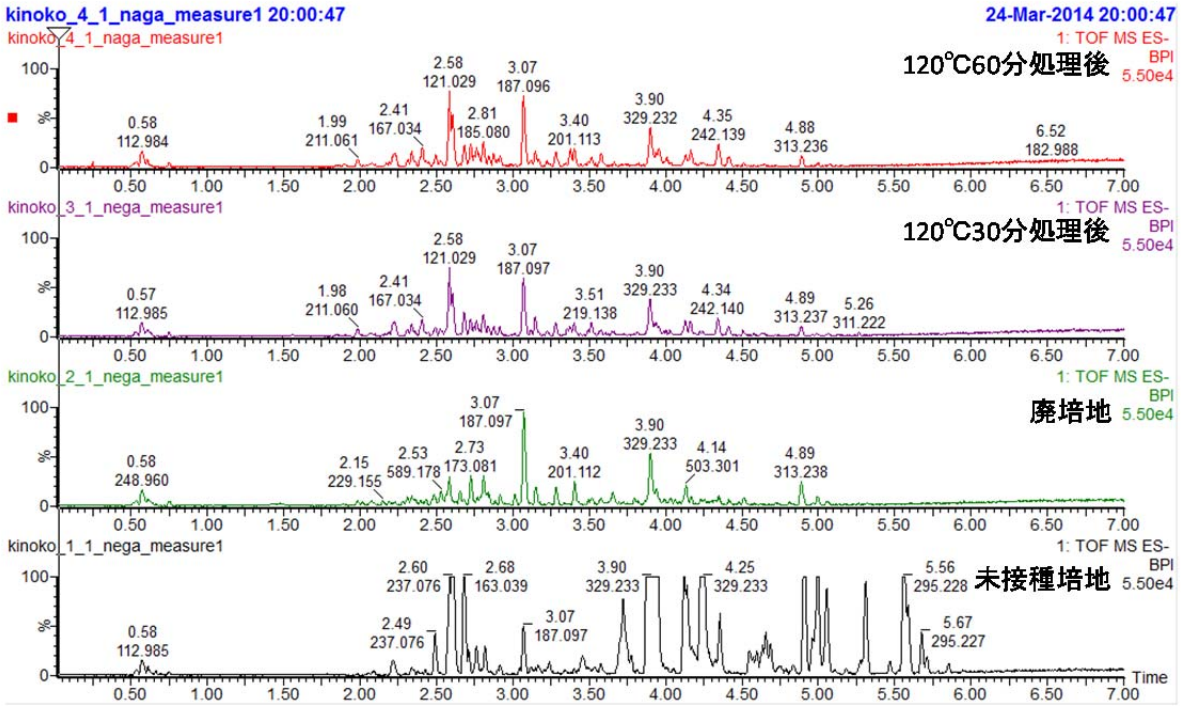
分析カラム　　逆相モード　ACQUITY UPLC C18 1.7μm

検出　　飛行型精密質量分析装置　Xevo G2 Qtof　ESI　Negative/Positive モード

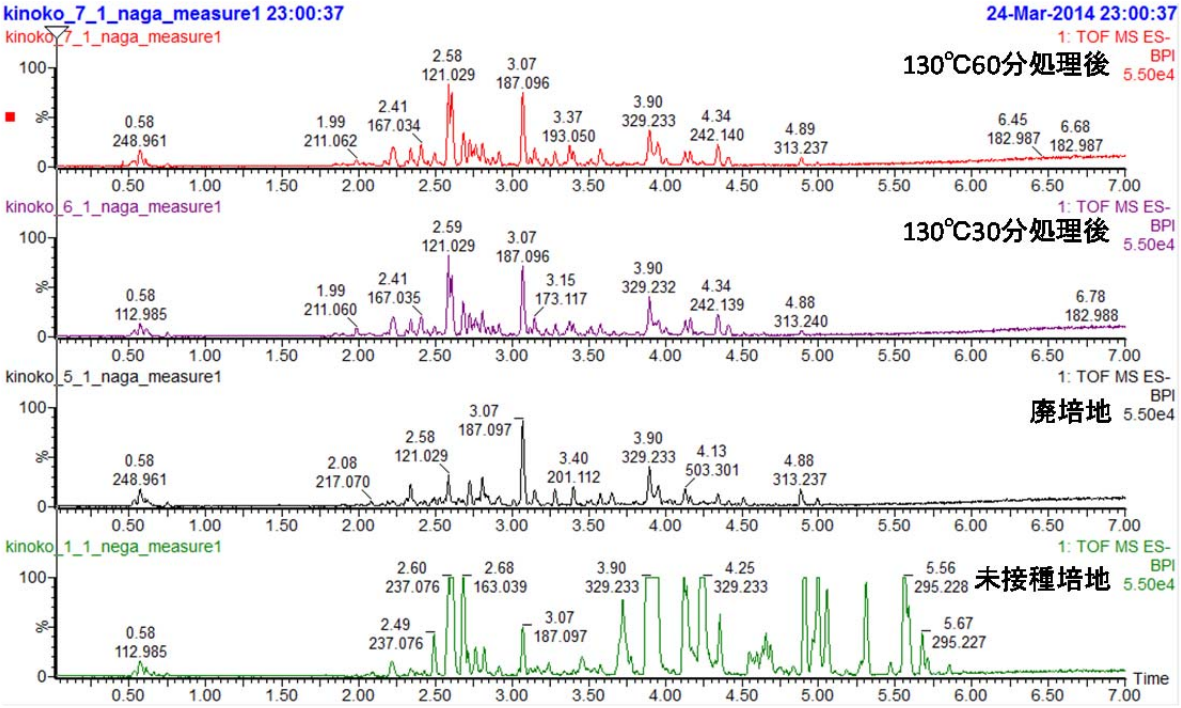
測定用サンプル名/解析用サンプル名：

	処理前(廃培地)	30分処理	60分処理
10/23付 未接種培地	1/NEW(通常培地)	-	-
10/15付 (120℃処理)	2/120-0	3/120-30	4/120-60
10/15付 (130℃処理)	5/130-0	6/130-30	7/130-60
10/15付 (140℃処理)	13/140-0	8/140-30	9/140-60
10/15付 (150℃処理)	10/150-0	11/150-30	12/150-60

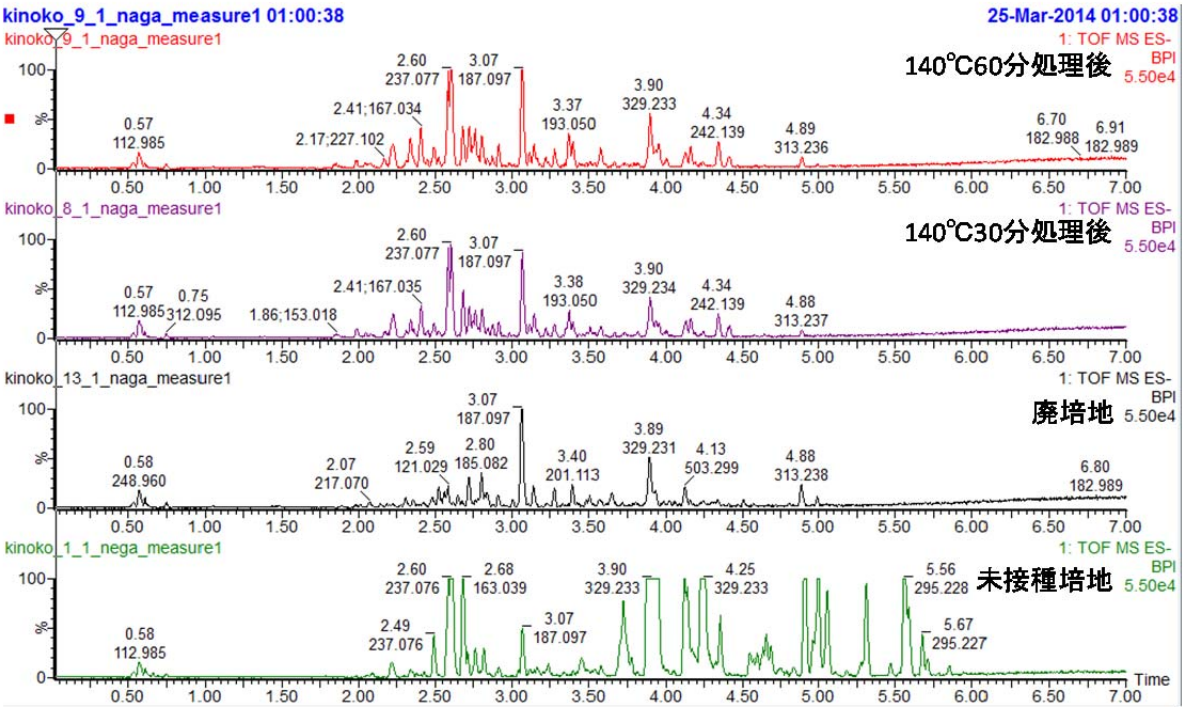
LC/MS ソフト水熱処理比較（120℃）
(Negative mode)



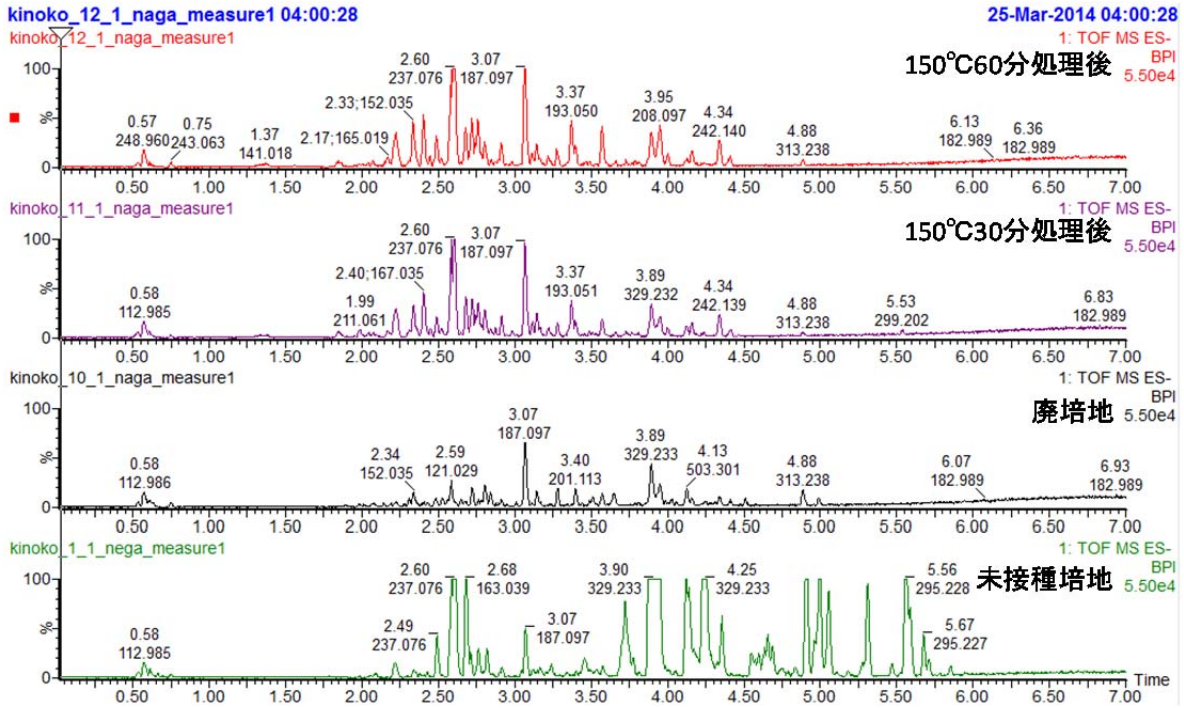
LC/MS ソフト水熱処理比較（130℃）
(Negative mode)



LC/MS ソフト水熱処理比較（140℃）
(Negative mode)



LC/MS ソフト水熱処理比較（150℃）
(Negative mode)



Soft-hydrothermal processing

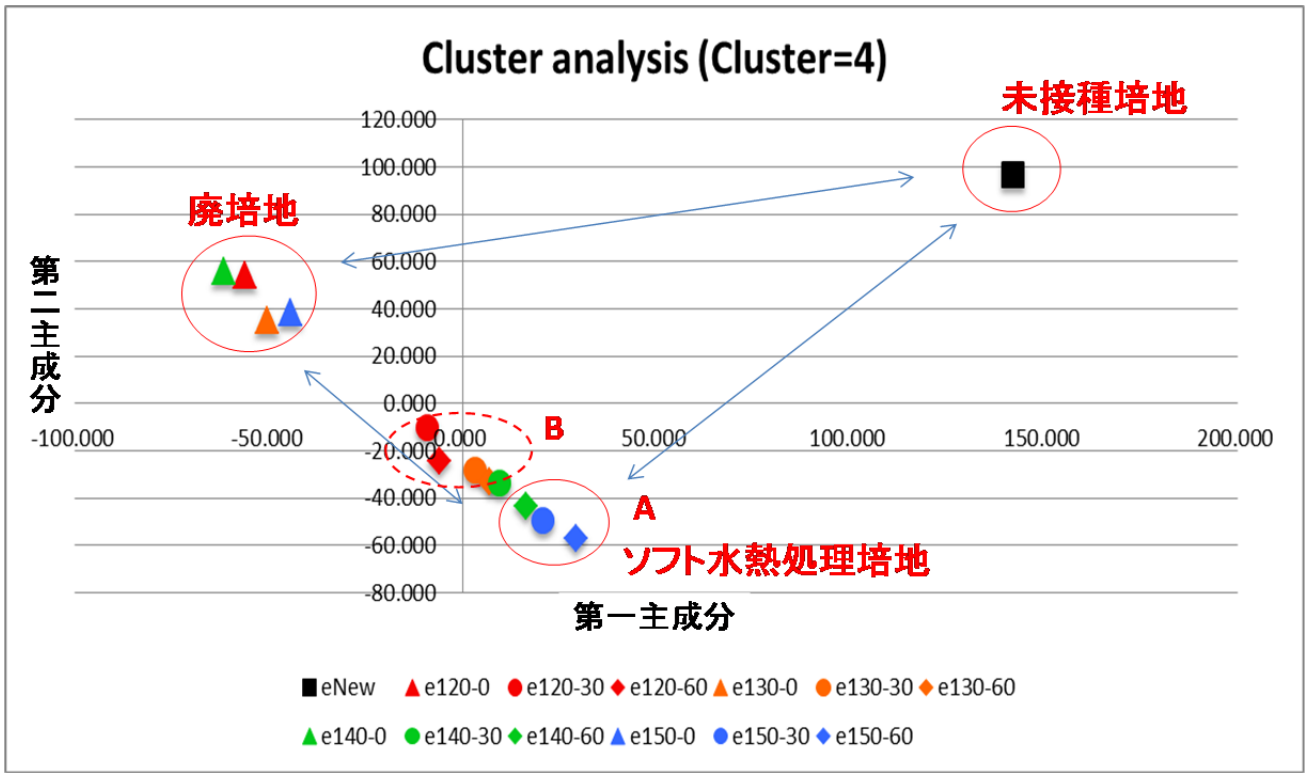


図. 20　主成分分析とクラスター解析に基づき 3 グループに分けて比較(Negative mode)

2. 4. 1. 1　ブナシメジ培地の成分分析　再生培地と廃培地

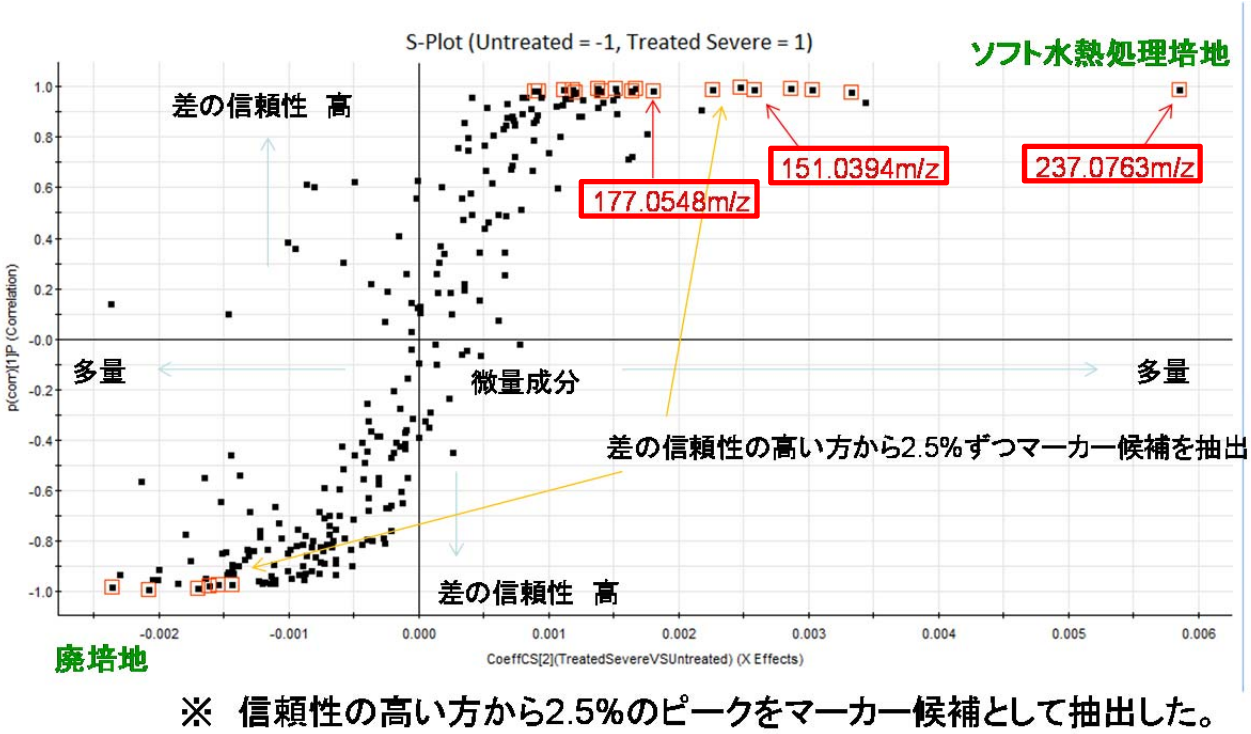


図. 21　S-plot 両端のピークを解析 (Negative mode)-ソフト水熱処理培地と廃培地の比較-

「未接種培地」「廃培地」「ソフト水熱処理培地」に属する検体をローディングプロットで比較、S-plot による可視化をした後に各グループに特徴的な固有 MS ピークを相関確率 pcorr; p>|0.975| で抽出した。

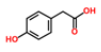
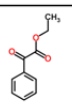
Soft-hydrothermal processing

再生培地側で抽出したマーカーについては、ネガとポジ多量成分の構造検索結果の両方で一致したピーク（赤文字）についてさらに解析を進めた（表 2(1)，(2)～表 5 参照)。また、廃培地側マーカーについては、全抽出ピーク（緑網掛け）についてさらに解析を進めた（表 6～表 13 参照)。

表. 1　マーカー候補(Negative mode)
-再生培地（ソフト水熱プロセス）と廃培地の比較-

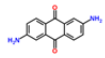
	再生培地側		廃培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	2.7458	135.0445	2.4871	281.1385
2	3.2818	163.0395	2.6786	327.1444
3	2.7632	151.0394	4.5135	521.3473
4	2.6828	163.0393	3.8089	509.3474
5	2.1717	165.0184	3.6491	537.3413
6	2.4027	167.0342	4.1308	523.3632
7	3.1175	177.0548		
8	2.8489	179.0341		
9	3.3753	193.05		
10	2.4494	197.0447		
11	2.6303	209.0451		
12	2.6512	225.04		
13	3.4029	223.0612		
14	2.493	237.0762		
15	2.6052	237.0763		
16	2.3209	261.0876		
17	2.7114	267.0866		
18	3.7327	343.0822		

表. 2(1)　再生培地マーカー候補の構造検索結果（Nega, Posi に共通の成分）

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
3	2.7632	151.0394	(1)	C8H7O3 (-0.1)	(1)	(4-Hydroxyphenyl)acetic acid	
			(2)	C6H8O3Na (2.3)	(2)	Hydroxy(phenyl)acetic acid	
			(3)	C4H3N6O (2.6)	(3)	3-Hydroxyphenyl acetate	
7	3.1175	177.0548	(1)	C10H9O3 (-0.4)	(1)	(Dimethylamino)methyl dimethylcarbamodithioate	
			(2)	C5H9N2O5 (3.7)	(2)	Diethyl fluoromalonate	
			(3)	C8H10O3Na (2.0)	(3)	Ethyl oxo(phenyl)acetate	

Soft-hydrothermal processing

表. 2(2) 再生培地マーカー候補の構造検索結果 (Nega, Posi に共通の成分)

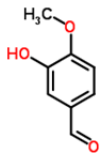
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
15	2.6052	237.0763	(1)	C12H13O5 (0.0)	(1)	1,8-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(2)	C13H9N4O (-1.3)	(2)	1,5-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(3)	C11H10N4ONa (1.1)	(3)	2,6-Diamino-9,10-anthraquinone	

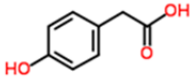
これらの解析は、抽出したピークに対し、精密分子量、同位体比を基に元素組成推定を行うとともに、ChemSpider 化合物データベースを対象とした検索を行った。またさらに、抽出した MS ピークに対し MS クロマト面積値を基に各サンプルの定量解析を行った。一部のピークを対象とした MSMS 分析を行い、標準品との MS スペクトルフラグメントパターンの比較を行った。

表. 3 再生培地マーカー候補の構造検索結果 (151.0394 m/z)

Fragment Pattern 解析 151.0394m/z

Mass differenceの小さい組成式 C8H7O3 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0439	641	152.0473	1	-3.4	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0397	8174	151.0395	1	0.2	0	1	0	C8H7O3	none
	137.0194	908	137.0239	1	-4.5	1	2	0.5	C7H5O3	CH2
	136.0159	7565	136.016	1	-0.1	1	1	0.5	C7H4O3	CH3
	135.0469	677	135.0446	1	2.3	1	1	2	C8H7O2	O

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0439	641	152.0473	1	-3.4	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0397	8174	151.0395	1	0.2	0	1	0	C8H7O3	none
	135.0469	677	135.0446	1	2.3	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0469	677	135.0446	2	2.3	1	1	2	C8H7O2	O

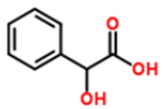
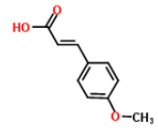
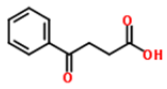
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0439	641	152.0473	1	-3.4	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0397	8174	151.0395	1	0.2	0	1	0	C8H7O3	none
	135.0469	677	135.0446	1	2.3	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0469	677	135.0446	2	2.3	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0469	677	135.0446	3	2.3	1	1	2	C8H7O2	O

表. 4 再生培地マーカー候補の構造検索結果（177.0548 m/z）

Fragment Pattern 解析 177.0548m/z

Mass differenceの小さい組成式 C10H9O3 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	177.0549	20042	177.0552	1	-0.3	0	1	0	C10H9O3	none
	162.0315	18783	162.0317	1	-0.2	1	1	0.5	C9H6O3	CH3

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	177.0549	20042	177.0552	1	-0.3	0	1	0	C10H9O3	none

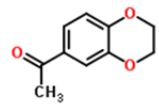
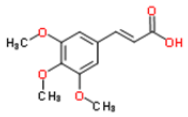
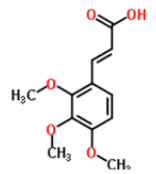
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	177.0549	20042	177.0552	1	-0.3	0	1	0	C10H9O3	none
	162.0315	18783	162.0317	1	-0.2	1	1	1	C9H6O3	CH3

表. 5 再生培地マーカー候補の構造検索結果（237.0763 m/z）

Fragment Pattern 解析 237.0763m/z

Mass differenceの小さい組成式 C12H13O5 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0791	54468	238.0841	1	-5	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	388685	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	164.0424	3996	164.0473	1	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	164.0424	3996	164.0473	2	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	163.039	39439	163.0395	1	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.039	39439	163.0395	2	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0791	54468	238.0841	1	-5	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	388685	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	164.0424	3996	164.0473	1	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	164.0424	3996	164.0473	2	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	164.0424	3996	164.0473	3	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	163.039	39439	163.0395	1	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.039	39439	163.0395	2	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.039	39439	163.0395	3	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

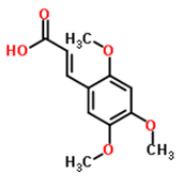
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0791	54468	238.0841	1	-5	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	388685	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	164.0424	3996	164.0473	1	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	164.0424	3996	164.0473	2	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	164.0424	3996	164.0473	3	-4.9	3	3	2	C9H8O3	C3H5O2
	163.039	39439	163.0395	1	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.039	39439	163.0395	2	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.039	39439	163.0395	3	-0.5	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

表. 6 廃培地マーカー候補の構造検索結果①

廃培地側マーカー候補の構造検索結果①

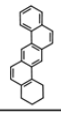
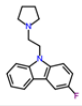
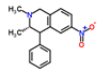
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
1	**2.4871**	**281.1385**	(1)	C12H25O5S (-3.8)	(1)	1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[k]tetraphene	
			(2)	C8H21N6O3S (-1.1)	(2)	3-Fluoro-9-[2-(1-pyrrolidinyl)ethyl]-9H-carbazole	
			(3)	C15H21O5 (-0.4)	(3)	(3S)-2,3-Dimethyl-6-nitro-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline	
2	**2.6786**	**327.1444**	(1)	C9H23N6O5S(-0.7)	(1)	3-(2-Methoxy-10H-phenothiazin-10-yl)-N,N,2-trimethyl-1-propanamine	
			(2)	C13H27O7S (-3.3)	(2)	5-[2-Hydroxy-3-[(2-methyl-2-propanyl)amino]propoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone hydrochloride (1:1)	
			(3)	C16H23O7 (0.0)	(3)	N,N'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenyldiyl)diacetamide	

表. 7 廃培地マーカー候補の構造検索結果②

廃培地側マーカー候補の構造検索結果②

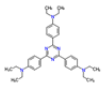
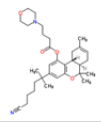
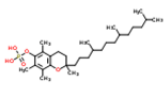
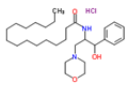
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
3	4.5135	521.3473	(1)	C30H49O7 (-0.5)	(1)	4,4',4''-(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyl)tris(N,N-diethylaniline)	
			(2)	C24H45N10OS (-2.6)	(2)	N,N'-Bis[3-(triethoxysilyl)propyl]-1,2-cyclohexanediamine	
			(3)	C26H50N4O3NaS (-2.8)	(3)	(6aR,10aR)-3-(6-Cyano-2-methyl-2-hexanyl)-6,6,9-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-yl 4-(4-morpholinyl)butanoate	
4	3.8089	509.3474	(1)	C23H45N10OS(-2.5)	(1)	2,5,7,8-Tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl dihydrogen phosphate	
			(2)	C25H50N4O3NaS (-2.7)	(2)	N-[(1-Tridecanoyl-2-piperidinyl)methyl]lysinamide dihydrochloride	No Result
			(3)	C33H49O2S (2.1)	(3)	N-[1-Hydroxy-3-(4-morpholinyl)-1-phenyl-2-propanyl]hexadecanamide hydrochloride (1:1)	

表. 8 廃培地マーカー候補の構造検索結果③

廃培地側マーカー候補の構造検索結果③

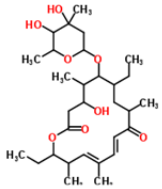
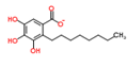
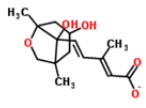
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
5	3.6491	537.3413	(1)	C25H50N6ONaS2 (2.8)	(1)	(11E,13E)-6-(4,5-dihydroxy-4,6-dimethyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-7,16-diethyl-4-hydroxy-5,9,13,15-tetramethyl-1-oxacyclohexadeca-11,13-diene-2,10-dione	
			(2)	C26H53N2O5S2 (1.7)	(2)	No Result	
			(3)	C27H49N6OS2 (0.4)	(3)	No Result	
6	4.1308	523.3632	(1)	C26H47N6O5 (2.4)	(1)	No Result	
			(2)	C28H52O7Na (2.1)	(2)	No Result	
			(3)	C29H48N4O3Na(0.8)	(3)	No Result	

表. 9 廃培地マーカー候補の構造検索結果（281.1385 m/z）

Fragment Pattern 解析 281.1385m/z

Mass differenceの小さい組成式 C15H21O5について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	281.1391	33162	281.1389	1	0.2	0	2	0	C15H21O5	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	281.1391	33162	281.1389	1	0.2	0	2	0	C15H21O5	none
	163.1128	1895	163.1123	1	0.5	3	2	2	C11H15O1	C4H5O4

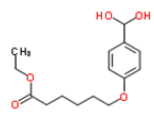
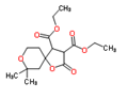
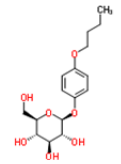
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	282.1412	5296	282.1467	1	-5.5	0	2	0	C15H22O5	none
	281.1391	33162	281.1389	1	0.2	0	1	0	C15H21O5	none

表. 10 廃培地マーカー候補の構造検索結果（327. 1444 m/z）

Fragment Pattern 解析 327.1444m/z

Mass differenceの小さい組成式 C16H23O7 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	327.1454	6051	327.1444	1	1	0	1	0	C16H23O7	none
	241.1088	5678	241.1076	1	1.2	2	3	2	C12H17O5	C4H6O2
	241.1088	5678	241.1076	2	1.2	2	3	2	C12H17O5	C4H6O2
	241.1088	5678	241.1076	3	1.2	2	3	2	C12H17O5	C4H6O2
	241.1088	5678	241.1076	4	1.2	2	3	2	C12H17O5	C4H6O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	327.1454	6051	327.1444	1	1	0	1	0	C16H23O7	none
	281.1391	6628	281.1389	1	0.2	2	3	1.5	C15H21O5	CH2O2
	281.1391	6628	281.1389	2	0.2	2	3	1.5	C15H21O5	CH2O2
	281.1391	6628	281.1389	3	0.2	2	3	1.5	C15H21O5	CH2O2
	263.1288	3036	263.1283	1	0.5	3	2	2	C15H19O4	CH4O3
	263.1288	3036	263.1283	2	0.5	3	2	2	C15H19O4	CH4O3
	263.1288	3036	263.1283	3	0.5	3	2	2	C15H19O4	CH4O3

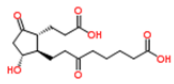
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	327.1454	6051	327.1444	1	1	0	1	0	C16H23O7	none
	281.1391	6628	281.1389	1	0.2	1	0	1	C15H21O5	CH2O2
	281.1391	6628	281.1389	2	0.2	1	0	1	C15H21O5	CH2O2
	263.1288	3036	263.1283	1	0.5	2	-1	1.5	C15H19O4	CH4O3
	263.1288	3036	263.1283	2	0.5	2	-1	1.5	C15H19O4	CH4O3
	263.1288	3036	263.1283	3	0.5	2	-1	1.5	C15H19O4	CH4O3
	263.1288	3036	263.1283	4	0.5	2	-1	1.5	C15H19O4	CH4O3
	241.1088	5678	241.1076	1	1.2	1	2	1	C12H17O5	C4H6O2

表. 11 廃培地マーカー候補の構造検索結果（521. 3473 m/z）

Fragment Pattern 解析 521.3473m/z

Mass differenceの小さい組成式 C30H49O7 について

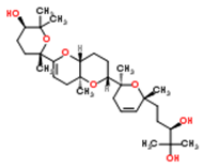
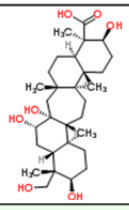
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	522.3509	3860	522.3557	1	-4.8	0	2	0	C30H50O7	none
	521.3469	10295	521.3478	1	-0.9	0	1	0	C30H49O7	none
	475.3434	905	475.3423	1	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	2	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	3	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	4	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	5	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	6	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	7	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	8	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	9	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	10	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	11	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	12	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	13	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2

表. 11 廃培地マーカー候補の構造検索結果（521.3473 m/z）（つづき）

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	522.3509	3860	522.3557	1	-4.8	0	2	0	C30H50O7	none
	521.3469	10295	521.3478	1	-0.9	0	1	0	C30H49O7	none
	475.3434	905	475.3423	1	1.1	1	0	1	C29H47O5	CH2O2

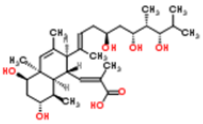
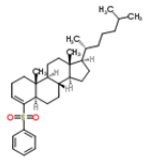
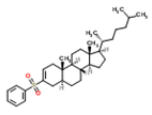
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	522.3509	3860	522.3557	1	-4.8	0	2	0	C30H50O7	none
	521.3469	10295	521.3478	1	-0.9	0	1	0	C30H49O7	none
	475.3434	905	475.3423	1	1.1	1	0	1	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	24	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	35	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	40	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	46	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	58	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2
	475.3434	905	475.3423	82	1.1	3	4	2	C29H47O5	CH2O2

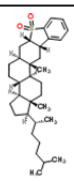
表. 12 廃培地マーカー候補の構造検索結果（509.3474 m/z）

Fragment Pattern 解析 509.3474m/z

組成式 C33H49O2S について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	510.3517	2245	510.3532	1	-1.5	0	2	0	C33H50O2S1	none
	509.3503	7346	509.3453	1	5	0	1	0	C33H49O2S1	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	510.3517	2245	510.3532	1	-1.5	0	2	0	C33H50O2S1	none
	509.3503	7346	509.3453	1	5	0	1	0	C33H49O2S1	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	510.3517	2245	510.3532	1	-1.5	0	2	0	C33H50O2S1	none
	509.3503	7346	509.3453	1	5	0	1	0	C33H49O2S1	none

Soft-hydrothermal processing

表.13 廃培地マーカー候補の構造検索結果（537.3413 m/z, 523.3632 m/z）

Fragment Pattern 解析 537.3413m/z

No Result

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
データベース上に推定組成式に適合する化合物無										

Fragment Pattern 解析 523.3632m/z

No Result

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
データベース上に推定組成式に適合する化合物無										

237.0763m/z の LC/MS 分析を例として図.22(1), (2)に示すように、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により再生培地側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた（図.23～図.25 参照）。また、廃培地側マーカーについても、同様に解析を進めた（図.26～図.31 参照）。

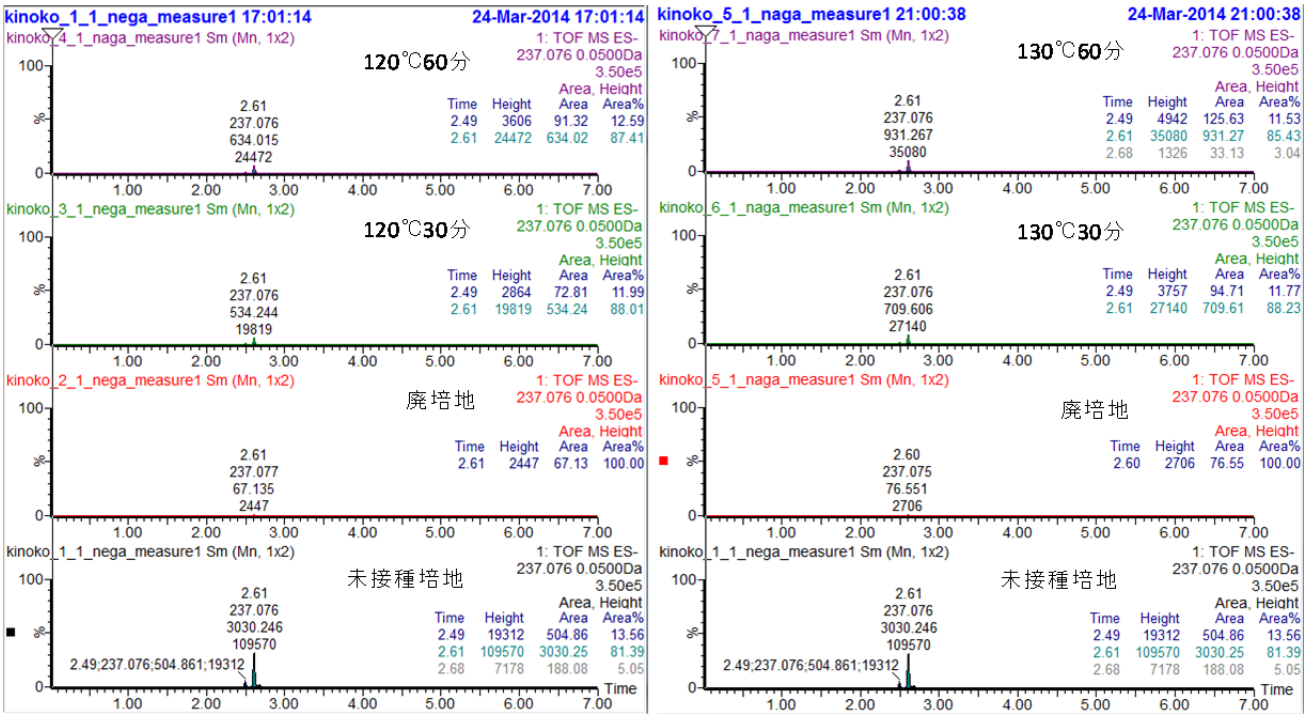


図.22(1)　ソフト水熱処理により変化した成分（237.0763m/z）の比較　(Negative mode)

Soft-hydrothermal processing

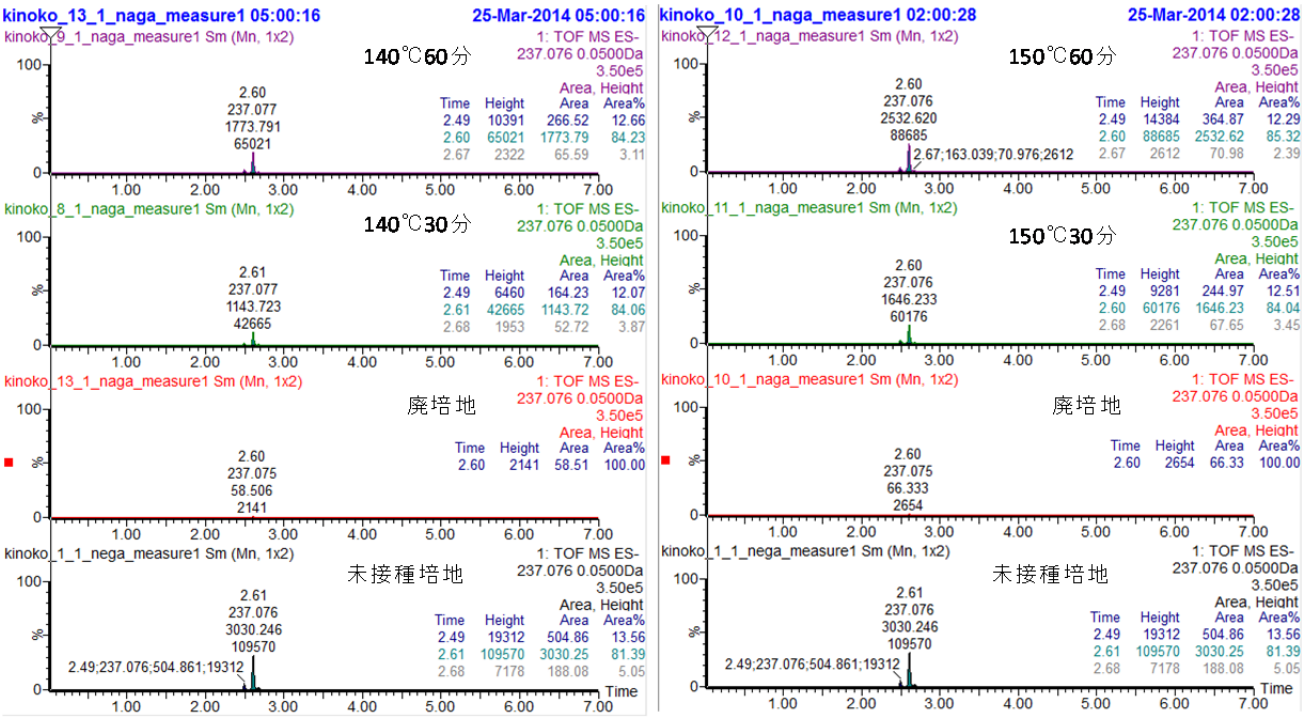


図.22(2)　ソフト水熱処理により変化した成分（237.0763m/z）の比較　(Negative mode)

再生培地側で抽出したネガとポジ多量成分の一致ピークをマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により図.23 から図.25 において提示する。これらはきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群を提示する。（以下、未接種培地は「通常培地であり、処理時間 0 分は「廃培地」である。）

➢　再生培地（ソフト水熱プロセス）特有の物質（ネガとポジ多量成分の一致ピーク）

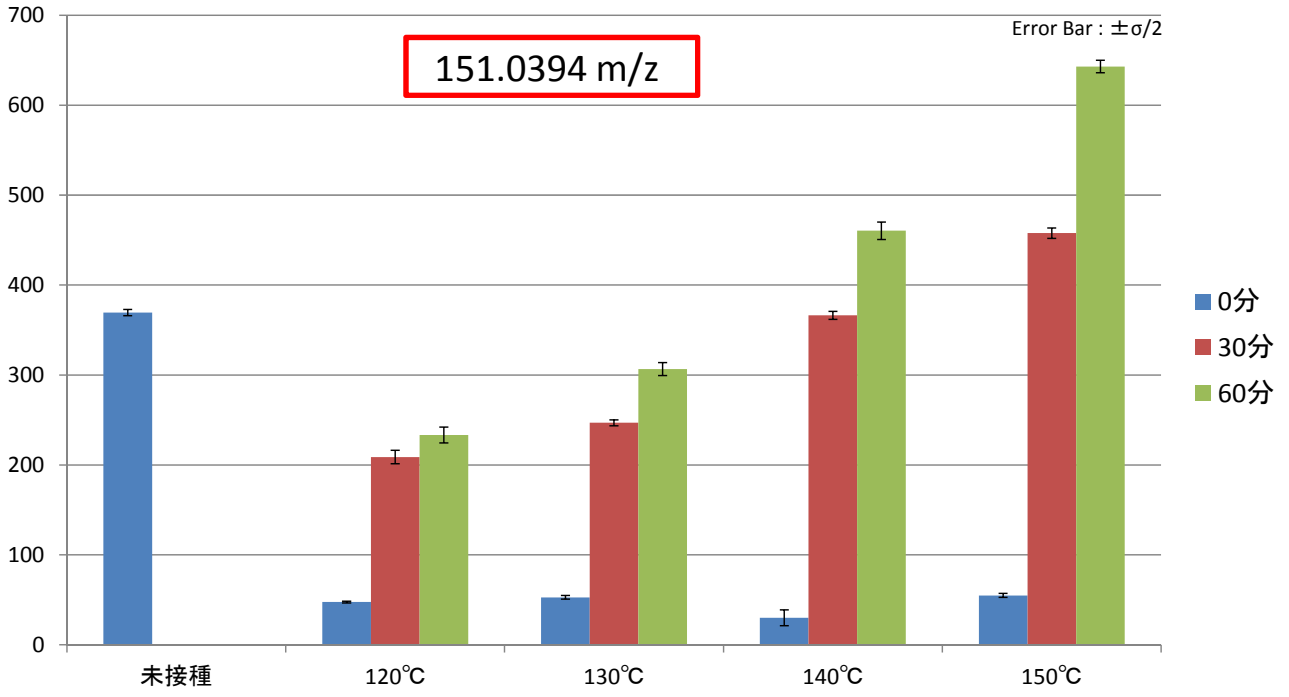


図.23　151.0394 m/z*のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により増加する成分）(Negative mode)
（注記：*151.0394 m/z はバニリンと同定済み）

Soft-hydrothermal processing

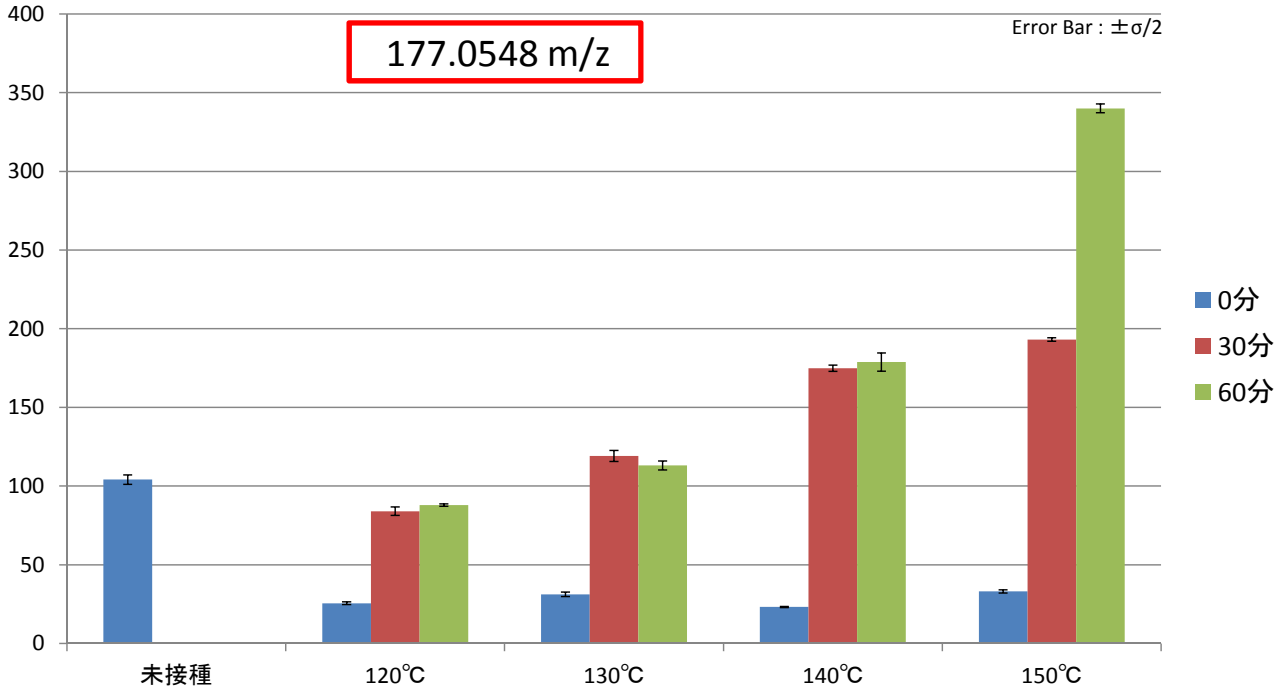


図. 24　177. 0548 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により増加する成分）(Negative mode)

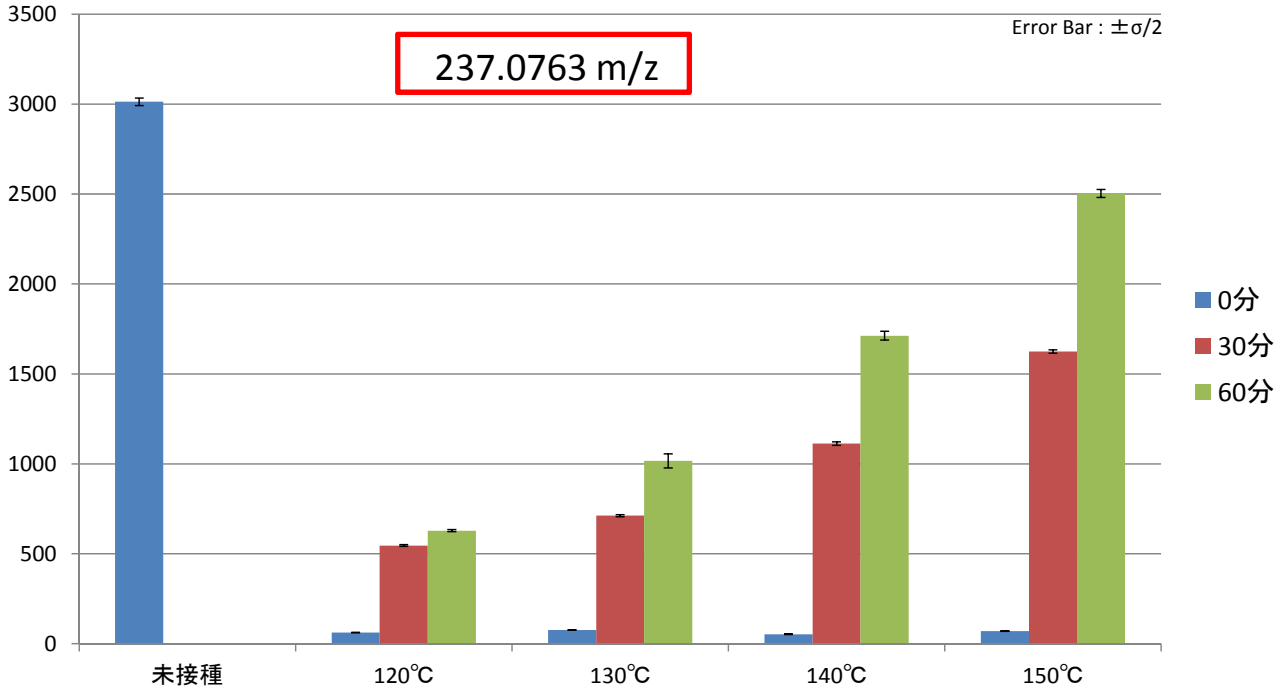


図. 25　237. 0763 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により増加する成分）(Negative mode)

同様に再生培地側で抽出された特徴的な成分(Negative mode)135. 0445 m/z, 163. 0393 m/z†, 163. 0395 m/z, 165. 0184 m/z, 167. 0342 m/z, 193. 05 m/z‡, 179. 0341 m/z, 197. 0447 m/z, 209. 0451 m/z, 223. 0612 m/z, 255. 04 m/z, 237. 0762 m/z, 261. 0876 m/z, 342. 0822 m/z, 267. 0866 m/z についても同様に、未接種培地にはもともと存在するが、しかしきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生された生成可能な物質群の結果が得られた。（グラフ省略）

（注記：†163. 0393 m/z はクマル酸と同定済み、および‡193. 05 m/z はフェルラ酸と同定済み）

Soft-hydrothermal processing

廃培地側特徴的成分のマーカーとしてソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により図. 26 から図. 31 に提示する。これらは本来未接種培地には存在しない、しかしきのこ栽培で増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で除去可能な物質である。

➢ 廃培地特有の物質

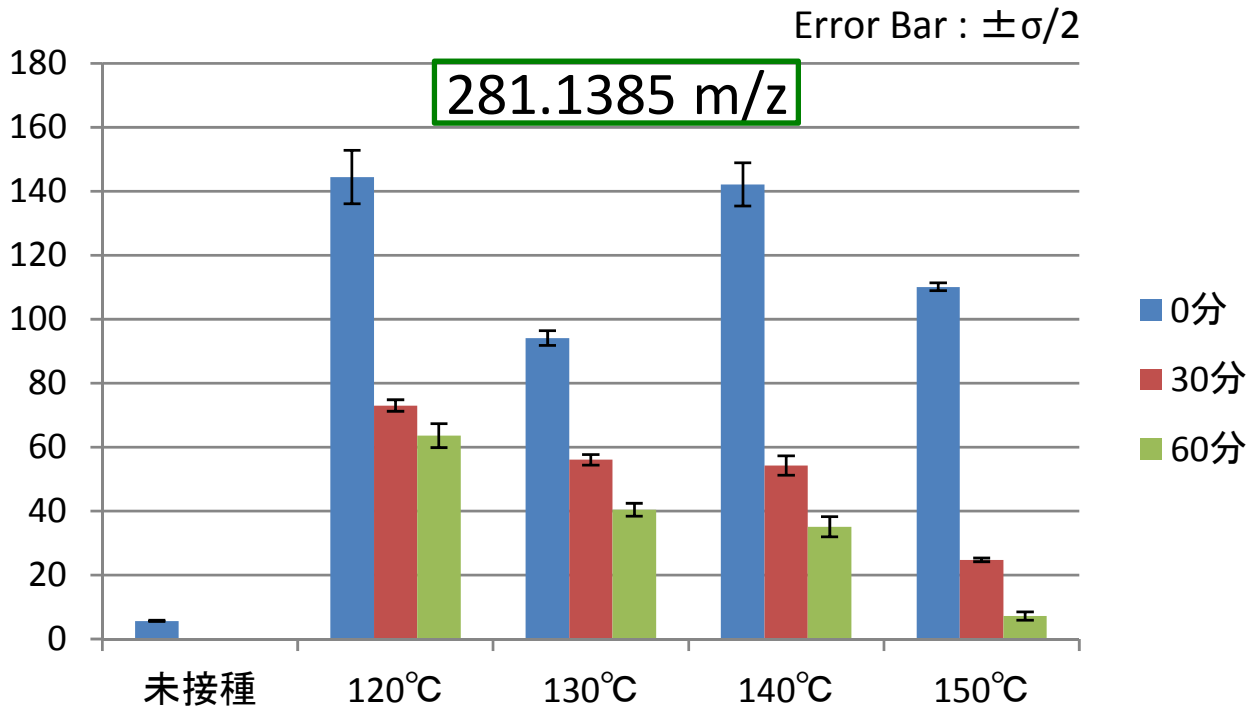


図. 26　281. 1385 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）（Negative mode）

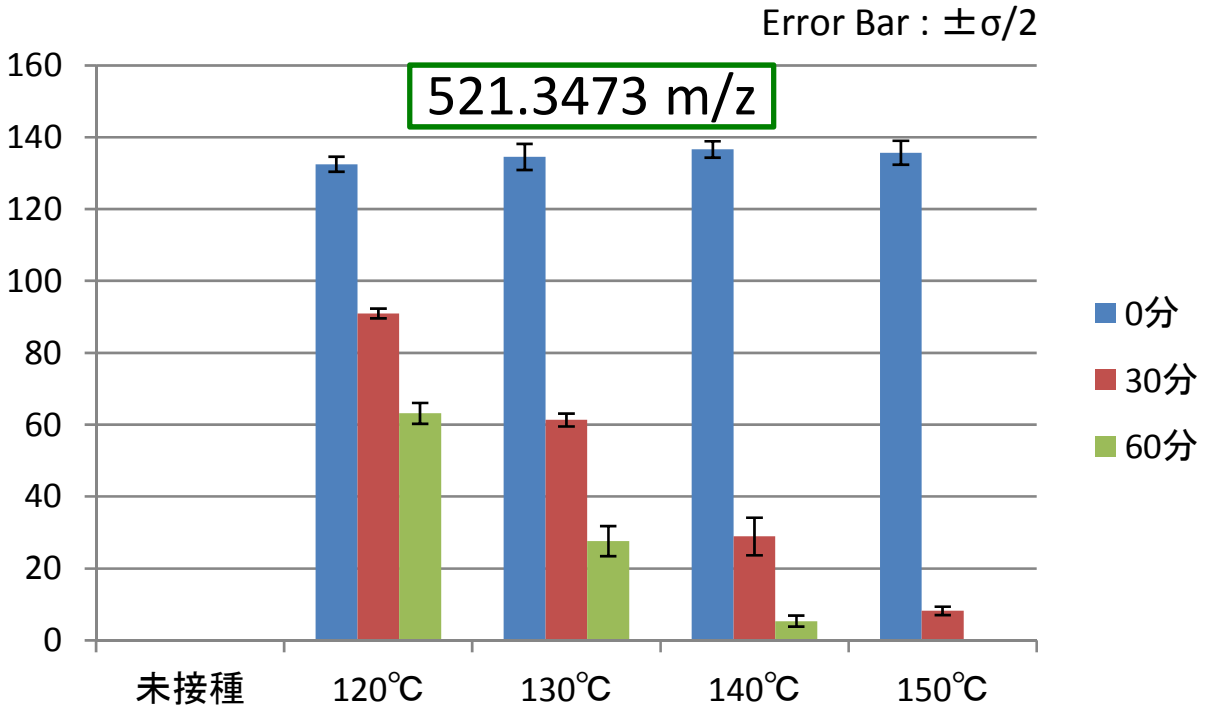


図. 27　521. 3473 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）（Negative mode）

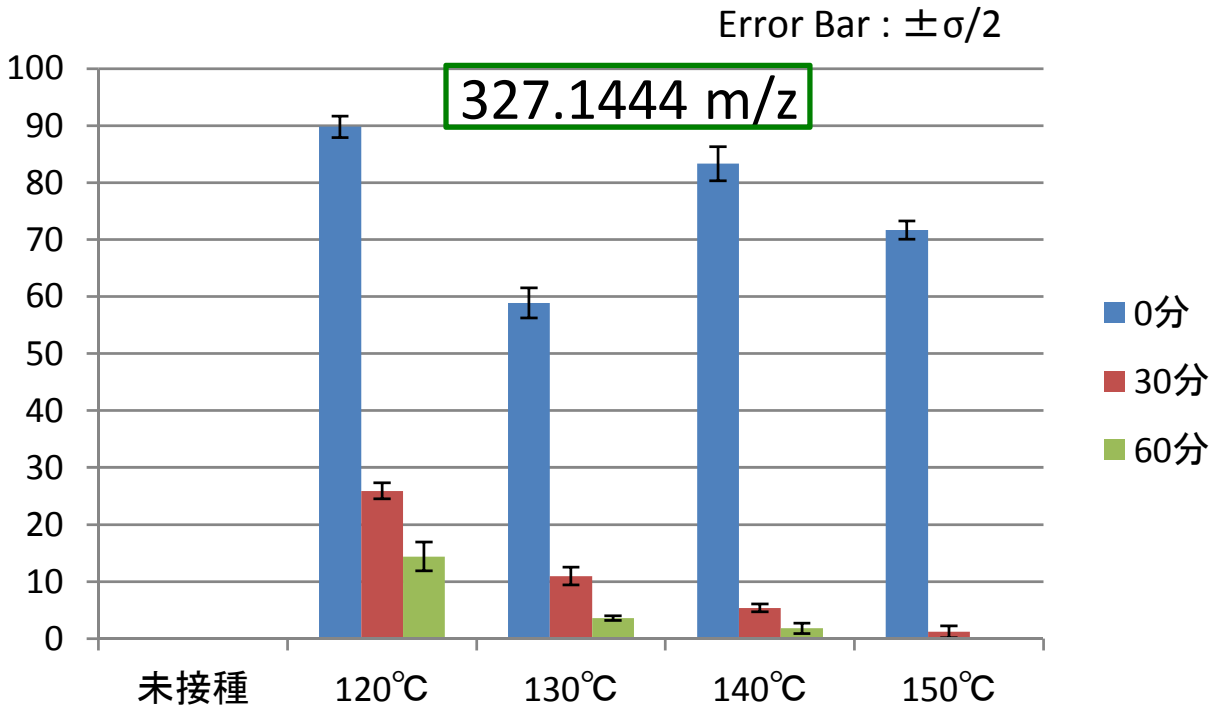


図. 28　327.1444 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）(Negative mode)

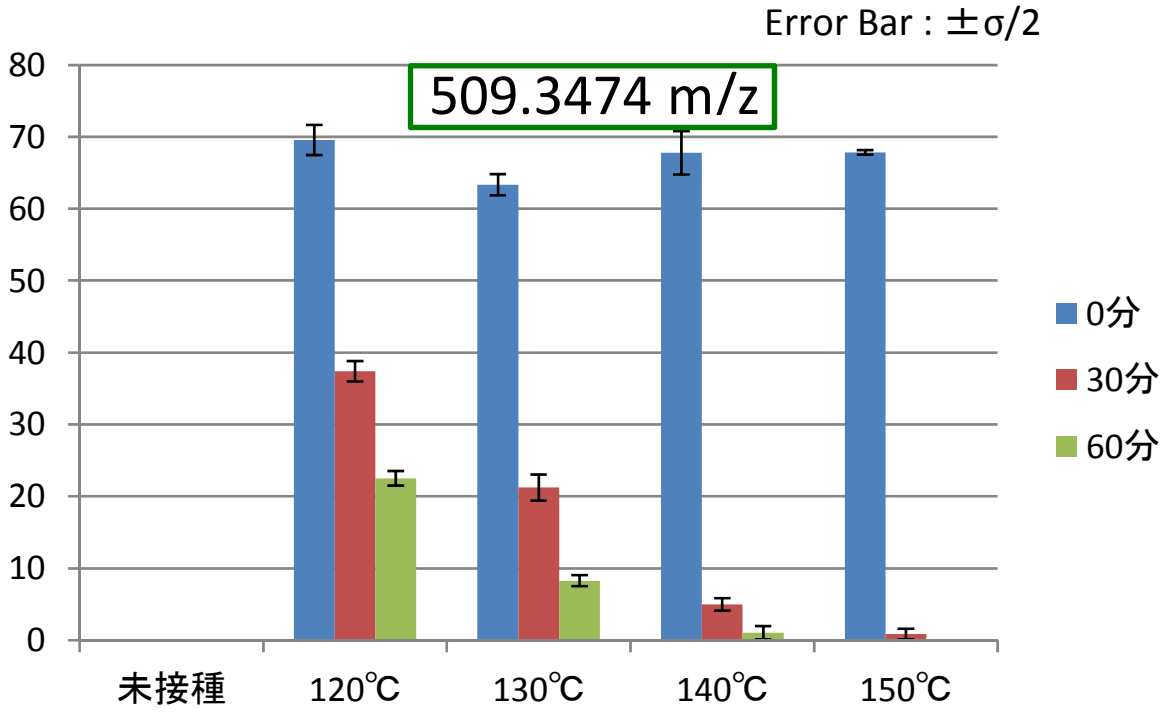


図. 29　509.3474 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）(Negative mode)

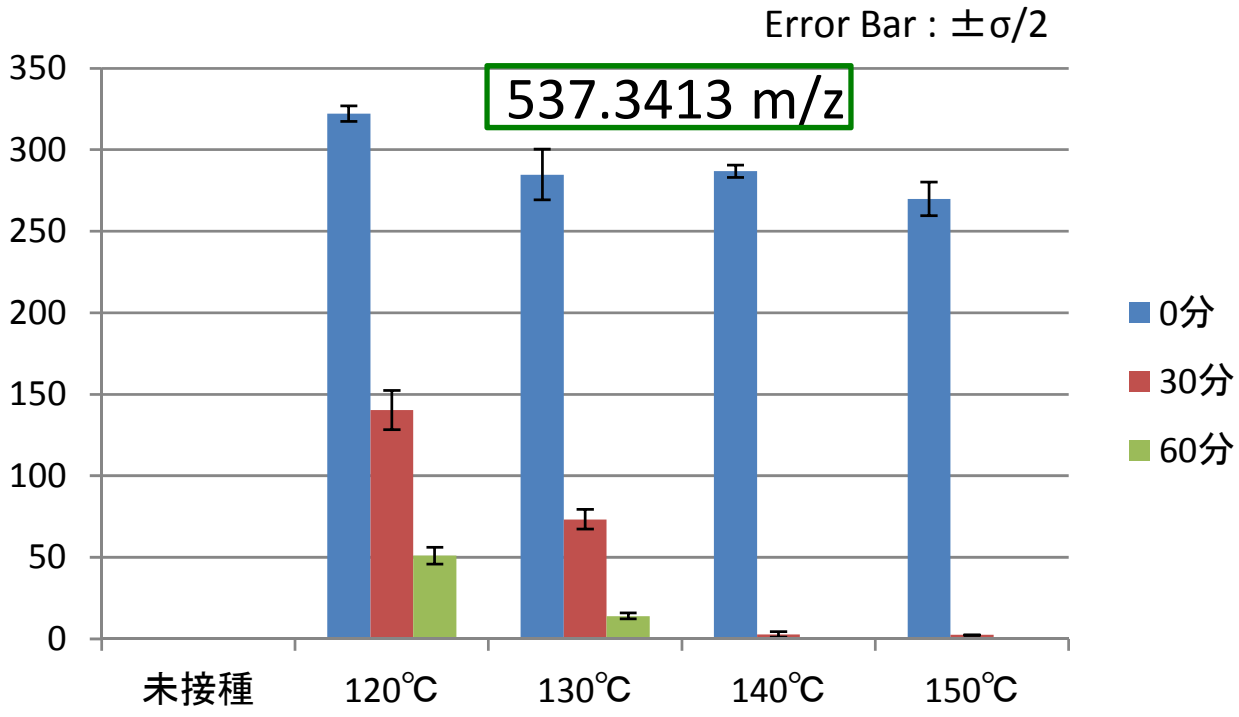


図. 30　537. 3413 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）(Negative mode)

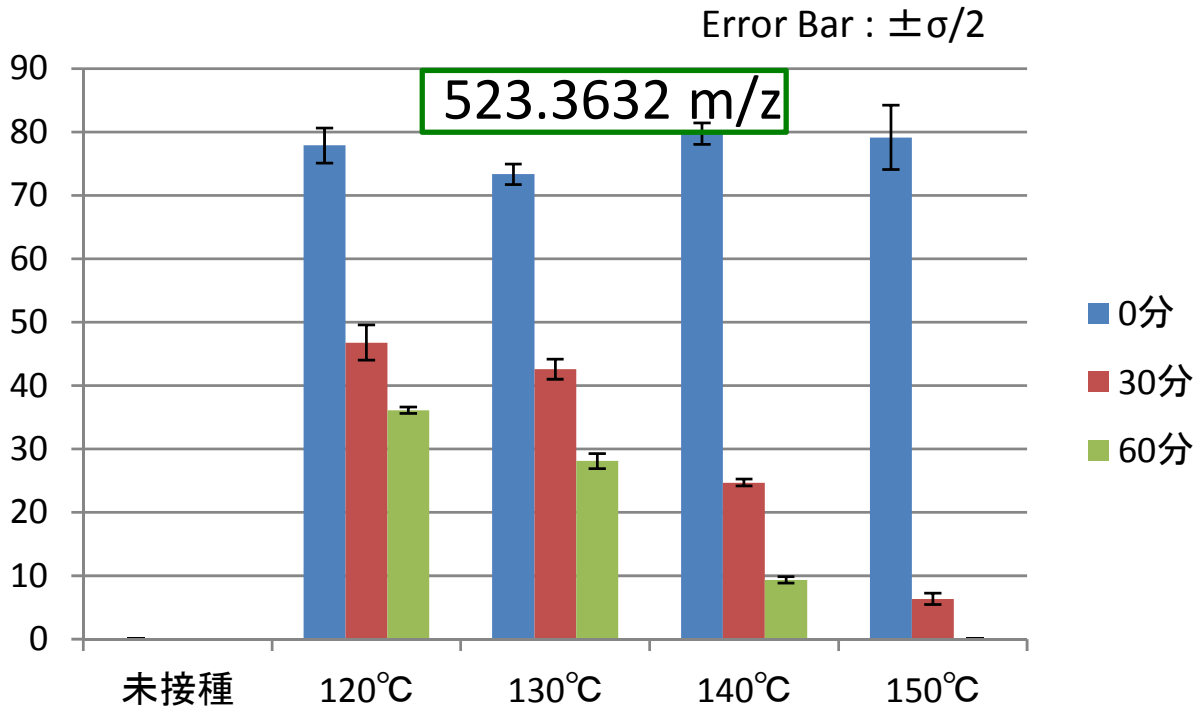


図. 31　523. 3632 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により減少する成分）(Negative mode)

ソフト水熱処理により変化した成分の処理強度（温度・時間）による解析において、ソフト水熱プロセスの加水分解作用によりリグニンを穏やかに分解し、きのこの生育に必要なリグニン系香族モノマーが生成されること（図. 23-25）、およびソフト水熱プロセスの抽出除去作用により老廃物質、腐敗物質と考えられる有機物質が処理強度（温度、時間）に比例して除去されたこと（図. 26-31）が実証された。

Soft-hydrothermal processing

2.4.1.2　ブナシメジ培地の成分分析　未接種培地と廃培地

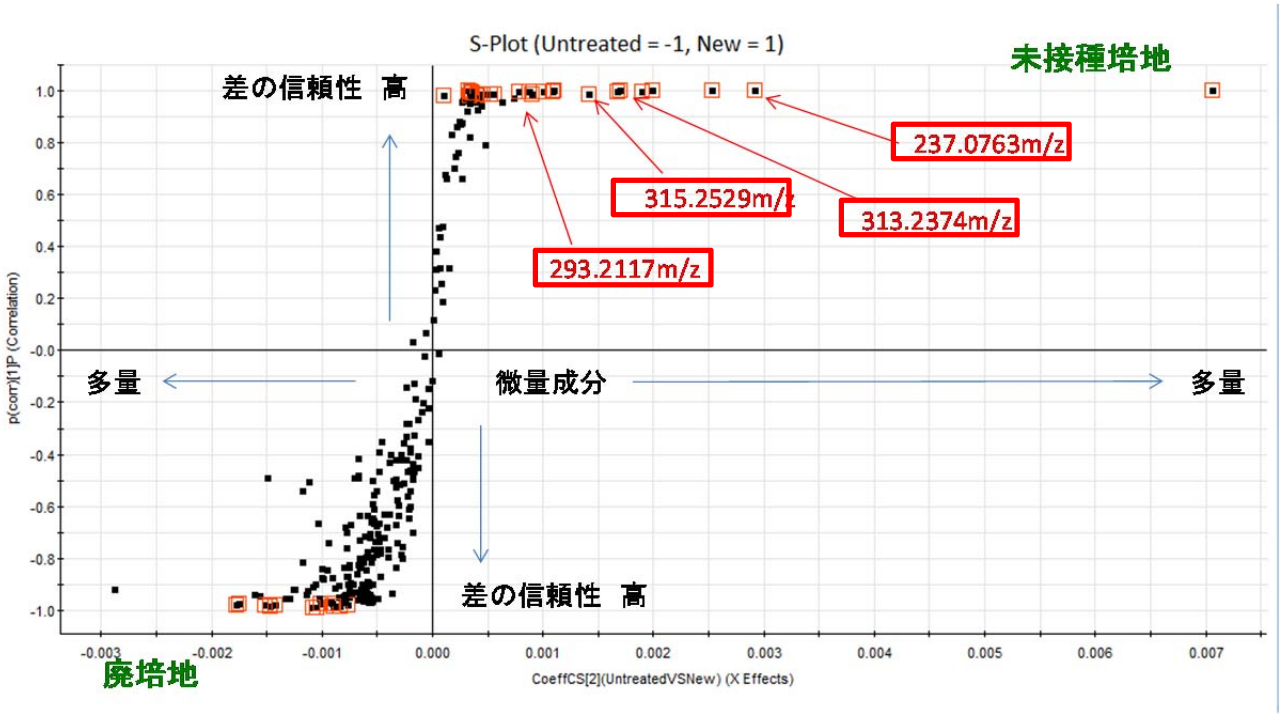


図.32　S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）-未接種培地（通常培地）と廃培地の比較-

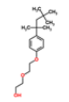
表.14　マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地（通常培地）と廃培地の比較-

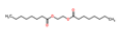
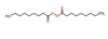
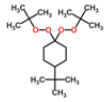
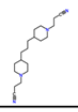
	未接種培地側		廃培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	2.6809	119.0499	3.1475	173.1175
2	2.6828	163.0393	2.3121	171.0658
3	4.0449	207.1033	2.8068	185.0812
4	2.493	237.0762	3.4936	187.1329
5	2.6052	237.0763	3.2824	199.0967
6	2.7114	267.0866	3.4011	201.1125
7	4.6616	287.2227	2.4301	239.092
8	3.2017	279.0859	2.7658	263.1283
9	2.9262	293.1031	0.7535	312.0945
10	5.8499	293.2114	4.5135	521.3473
11	5.7118	293.2117	4.1322	503.3002
12	5.6732	295.2267	4.1308	523.3632
13	5.054	311.222		
14	4.9546	313.2374		
15	5.3131	315.2529		
16	3.7234	327.2169		
17	2.3429	319.1178		
18	4.3525	329.2326		
19	4.2421	329.2323		
20	3.9012	329.2328		
21	3.7008	439.244		
22	3.6995	403.2688		
23	3.6995	449.2744		
24	3.9249	793.4361		

Soft-hydrothermal processing

未接種培地側で抽出したマーカーにおける、ネガとポジモードの両方で一致したピーク（赤文字）についてさらに解析を進めた（表 15～表 22 参照）。また、多量成分（MS イオンの強度に基づく）が高かった 4 成分（**黒文字背景ハイライト**）についても同様に解析を進めた（表 19(1)～(2) 参照）。

表. 15 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（Negative, Positive に共通の成分）

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
5	2.6052	237.0763	(1)	C12H13O5 (0.0)	(1)	1,8-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(2)	C13H9N4O (-1.3)	(2)	1,5-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(3)	C11H10N4ONa (1.1)	(3)	2,6-Diamino-9,10-anthraquinone	
11	5.7118	293.2117	(1)	C18H29O3 (0.0)	(1)	2-[2-[4-(2,4,4-Trimethyl-2-pentanyl)phenoxy]ethoxy]ethanol	
			(2)	C16H30O3Na (2.4)	(2)	N,N-Dimethyl-3-(2-methyl-1-phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-yl)-1-propanamine	
			(3)	C14H25N6O (2.7)	(3)	N,N-Dimethyl-3-(1-methyl-3-phenyl-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)-1-propanamine	

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
14	4.9546	313.2374	(1)	C7H29N12S (1.5)	(1)	1,2-Ethanediyl dioctanoate	
			(2)	C4H25N16O (-2.3)	(2)	Dioctylperoxyanhydride	
			(3)	C11H33N6O2S (-1.2)	(3)	N,N-Dimethyl-2-[2-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-benzimidazol-1-yl]-1-propanamine	
15	5.3131	315.2529	(1)	C18H35O4 (-0.6)	(1)	4-(2-Methyl-2-propanyl)-1,1-bis[(2-methyl-2-propanyl)peroxy]cyclohexane	
			(2)	C19H31N4 (-2.0)	(2)	3,3'-(1,3-Propanediyldi-4,1-piperidinediyl)dipropanenitrile	
			(3)	C17H32N4Na (0.4)	(3)	9,10-Dihydroxyoctadecanoic acid	

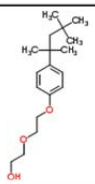
Soft-hydrothermal processing

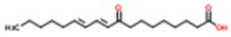
※　未接種培地側の 237.0763 m/z は前述の再生培地側のピーク 15 と同様（表 1、表 2(2)、表 5 参照）

表.16 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（293.2117 m/z）

Fragment Pattern 解析　293.2117m/z

Mass differenceの小さい組成式 C18H29O3 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	294.2136	8205	294.2195	1	−5.9	0	2	0	C18H30O3	none
	293.2112	42652	293.2117	1	−0.5	0	1	0	C18H29O3	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	294.2136	8205	294.2195	1	−5.9	0	2	0	C18H30O3	none
	293.2112	42652	293.2117	1	−0.5	0	1	0	C18H29O3	none

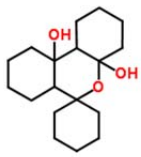
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	294.2136	8205	294.2195	1	−5.9	0	2	0	C18H30O3	none
	293.2112	42652	293.2117	1	−0.5	0	1	0	C18H29O3	none

表.17 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（313.2374 m/z）

Fragment Pattern 解析　313.2374m/z

No Result

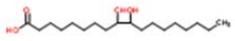
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
データベース上に推定組成式に適合する化合物無										

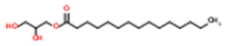
「Hit compound searched by measuredmass」においては、315.2529m/z と類似性のある化合物がヒットしていることから、表 18 のように類縁化合物であることも考えられる。

表. 18 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（315.2529 m/z）

Fragment Pattern 解析 315.2529m/z

Mass differenceの小さい組成式 C18H35O4 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2562	55989	316.2614	1	−5.2	0	2	0	C18H36O4	none
	315.2529	273837	315.2535	1	−0.6	0	1	0	C18H35O4	none
	297.2415	2155	297.243	1	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O
	297.2415	2155	297.243	2	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O
	297.2415	2155	297.243	3	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2562	55989	316.2614	1	−5.2	0	2	0	C18H36O4	none
	315.2529	273837	315.2535	1	−0.6	0	1	0	C18H35O4	none
	297.2415	2155	297.243	1	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O
	297.2415	2155	297.243	2	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O

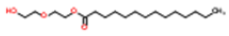
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2562	55989	316.2614	1	−5.2	0	2	0	C18H36O4	none
	315.2529	273837	315.2535	1	−0.6	0	1	0	C18H35O4	none
	297.2415	2155	297.243	1	−1.5	1	0	0.5	C18H33O3	H2O

表. 19(1) 未接種培地マーカー候補の多量成分の構造検索結果 ①

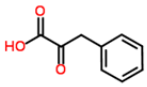
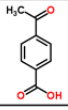
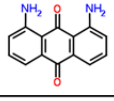
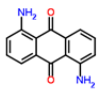
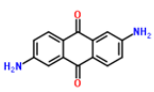
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
2	2.6828	163.0393	(1)	C9H7O3 (-0.2)	(1)	2-Oxo-3-phenylpropanoic acid	
			(2)	C7H8O3Na (2.2)	(2)	4-Acetylbenzoic acid	
			(3)	C4H7N2O5 (3.8)	(3)	4-Oxatricyclo[5.2.1.0~2,6~]dec-8-ene-3,5-dione	
4	2.493	237.0762	(1)	C13H9N4O (-1.4)	(1)	1,8-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(2)	C12H13O5 (-0.1)	(2)	1,5-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(3)	C11H10N4ONa (1.0)	(3)	2,6-Diamino-9,10-anthraquinone	

表. 19(2) 未接種培地マーカー候補の多量成分の構造検索結果 ②

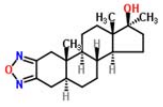
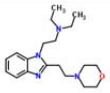
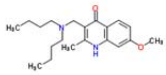
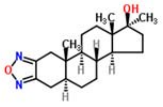
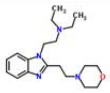
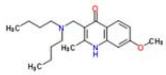
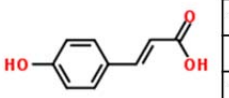
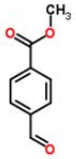
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
20	3.9012	329.2328	(1)	C18H33O5 (0.0)	(1)	(1S,3aS,3bR,5aS,10aS,10bS,12aS)-1,10a,12a-Trimethyl-2,3,3a,3b,4,5,5a,6,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahydro-1H-cyclopenta[7,8]phenanthro[2,3-c][1,2,5]oxadiazol-1-ol	
			(2)	C16H34O5Na(2.4)	(2)	N,N-Diethyl-2-[2-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-benzimidazol-1-yl]ethanamine	
			(3)	C17H30N4ONa (1.1)	(3)	3-[(Dibutylamino)methyl]-7-methoxy-2-methyl-4-quinolinol	
19	4.2421	329.2323	(1)	C18H33O5 (-0.5)	(1)	(1S,3aS,3bR,5aS,10aS,10bS,12aS)-1,10a,12a-Trimethyl-2,3,3a,3b,4,5,5a,6,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahydro-1H-cyclopenta[7,8]phenanthro[2,3-c][1,2,5]oxadiazol-1-ol	
			(2)	C17H30N4ONa (0.6)	(2)	N,N-Diethyl-2-[2-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-benzimidazol-1-yl]ethanamine	
			(3)	C16H34O5Na (1.9)	(3)	3-[(Dibutylamino)methyl]-7-methoxy-2-methyl-4-quinolinol	

表. 20 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（163.0393 m/z）

Fragment Pattern 解析 163.0393m/z

Mass differenceの小さい組成式 C9H7O3 について

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0429	14908	164.0473	1	-4.4	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0395	154116	163.0395	1	0	0	1	0	C9H7O3	none
	145.029	3797	145.029	1	0	1	0	0.5	C9H5O2	H2O
	120.0531	10815	120.0575	1	-4.4	1	3	1	C8H8O1	CO2
	119.0496	132946	119.0497	1	-0.1	1	2	1	C8H7O1	CO2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0429	14908	164.0473	1	-4.4	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0395	154116	163.0395	1	0	0	1	0	C9H7O3	none

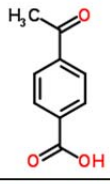
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0429	14908	164.0473	1	-4.4	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0395	154116	163.0395	1	0	0	1	0	C9H7O3	none
	145.029	3797	145.029	1	0	1	0	0.5	C9H5O2	H2O

表.21 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（237.0763 m/z）
－Mass difference の小さい組成式 C12H13O5 について－

補足；

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)
4	2.493	237.0762	(1)	C13H9N4O (-1.4)
			(2)	C12H13O5 (-0.1)

表2(2) 記載の推定組成式

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)
15	2.6052	237.0763	(1)	C12H13O5 (0.0)

RetentionTimeが近く、両マーカー候補のMSスペクトルフラグメントパターンに類似性が見られたため、互いに位置異性体の関係と推定された。

表.22(1) 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（329.2328 m/z および 329.2323 m/z）

Fragment Pattern 解析 329.2328m/z および 329.2323m/z
Mass differenceの小さい組成式 C18H33O5 について

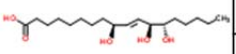
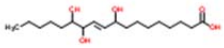
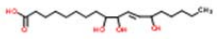
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	330.2361	996762	330.2406	1	-4.5	0	2	0	C18H34O5	none
	329.2327	5137665	329.2328	1	-0.1	0	1	0	C18H33O5	none
	229.1434	91713	229.144	1	-0.6	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1331	80559	211.1334	1	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	2	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	3	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	4	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	5	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	6	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	7	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	171.1018	31041	171.1021	1	-0.3	1	0	1	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	2	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	3	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	4	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	5	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	6	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2

表.22(2) 未接種培地マーカー候補の構造検索結果（329.2328 m/z および 329.2323 m/z）

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	330.2361	996762	330.2406	1	-4.5	0	2	0	C18H34O5	none
	329.2327	5137665	329.2328	1	-0.1	0	1	0	C18H33O5	none
	229.1434	91713	229.144	1	-0.6	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1331	80559	211.1334	1	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	2	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	3	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	4	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	5	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	6	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	7	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	171.1018	31041	171.1021	1	-0.3	1	0	1	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	2	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	3	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	4	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	5	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	6	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	329.2327	5137665	329.2328	1	-0.1	0	1	0	C18H33O5	none
	229.1434	91713	229.144	1	-0.6	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1331	80559	211.1334	1	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	2	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	3	-0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	4	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	5	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	6	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	7	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1331	80559	211.1334	8	-0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	171.1018	31041	171.1021	1	-0.3	1	0	1	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	2	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	3	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	4	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	5	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2
	171.1018	31041	171.1021	6	-0.3	2	1	2	C9H15O3	C9H18O2

Soft-hydrothermal processing

前述の図. 22(1), (2)に示すように、ネガとポジ多量成分の一致ピークをマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により未接種培地（通常培地）側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた（図. 33～図. 35。237. 0763 m/z は再生培地マーカーピーク 15 と同様、図 25 参照)。これらはきのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で変化しない物質の群である。

➢ 未接種培地（通常培地）特有の物質

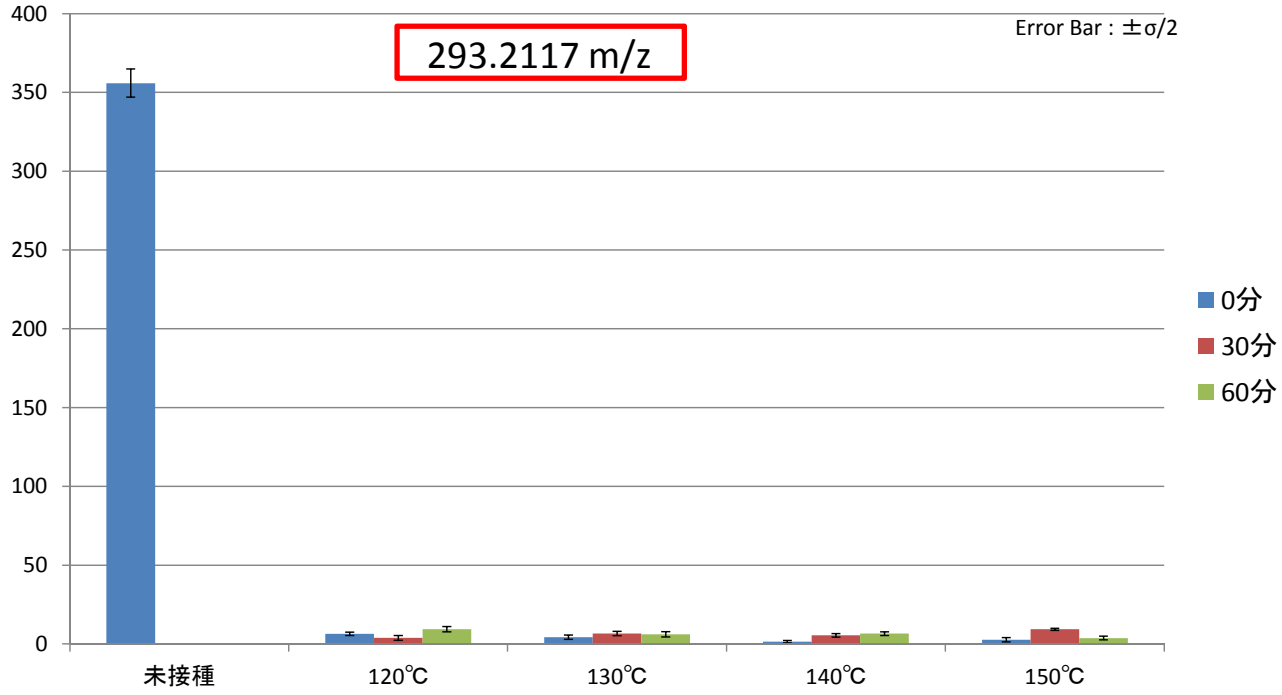


図. 33　293. 2117 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により減少しソフト水熱処理で変化しない成分）(Negative mode)

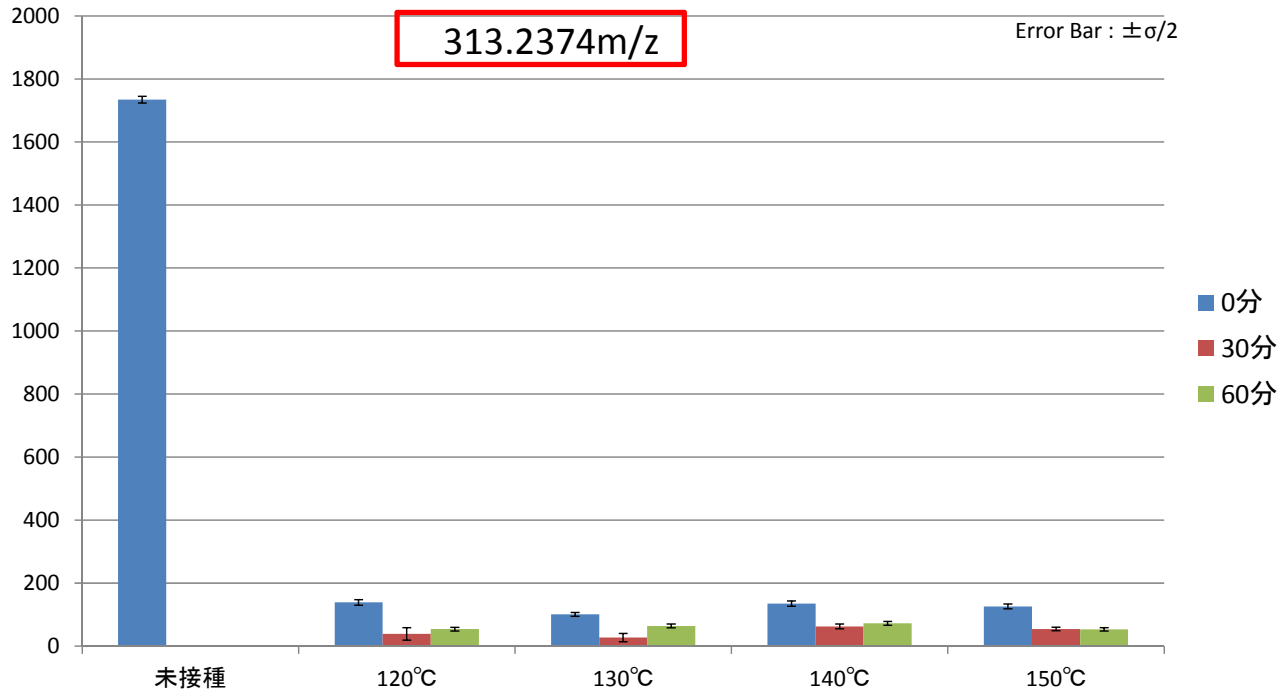


図. 34　313. 2374 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により増加する成分）(Negative mode)

Soft-hydrothermal processing

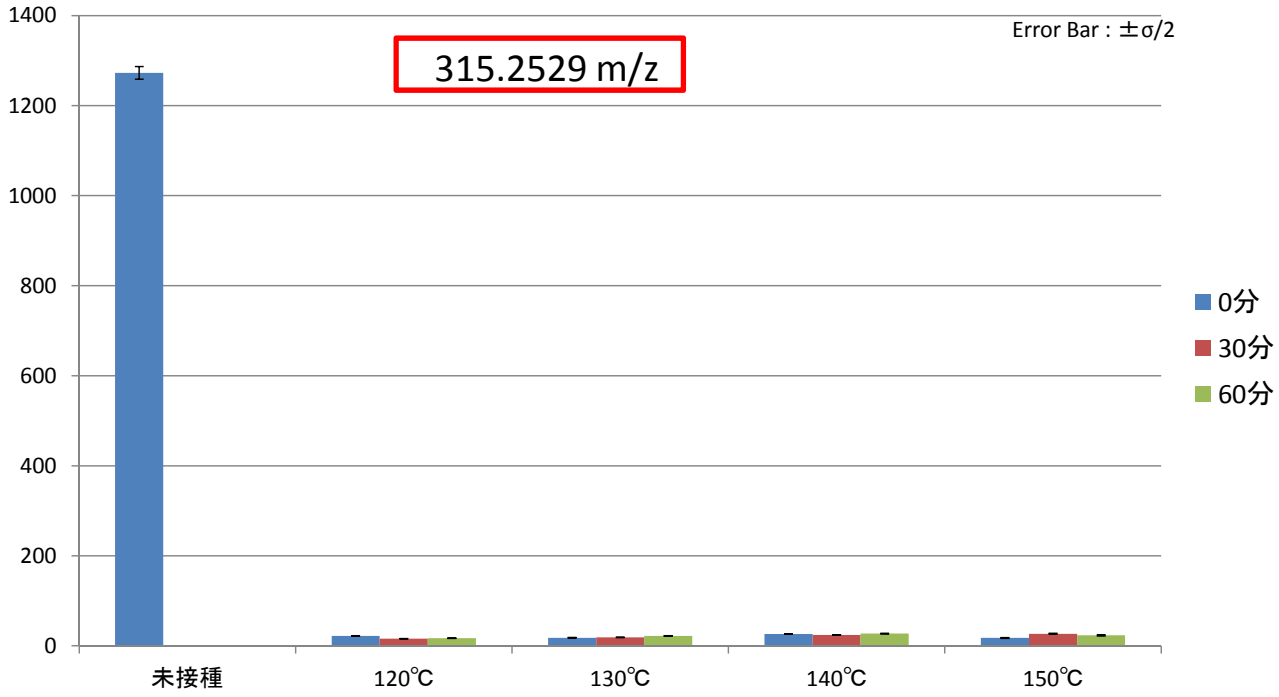


図. 35　313. 2529 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により減少しソフト水熱処理で変化しない成分）(Negative mode)

これらの成分は未接種培地にきのこのエネルギー源として混合したコメヌカ、フスマ等の油分、すなわち脂肪酸と考えられる。これらの成分はきのこ生育により消費されるがソフト水熱プロセスにより再生されることはない。しかし再生培地には未接種培地同様にこれらのコメヌカ、フスマ等の栄養源を混合するので再生培地の中にこれらの成分が取り入れられることになる。207. 1033 m/z, 287. 2227 m/z, 293. 114 m/z, 311. 222 m/z, 295. 2267 m/z, 327. 2169 m/z, 329. 2323 m/z, 329. 2326 m/z, 329. 2328 m/z, 493. 244 m/z, 449. 2744 m/z, 403. 2688 m/z, 793. 4361 m/z についても同様である（グラフ省略）。

未接種培地（通常培地）側で抽出したマーカーについて同様に解析を進めた。図. 36 にきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で部分的に再生可能な物質の群を提示する。これらはきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群を提示する。

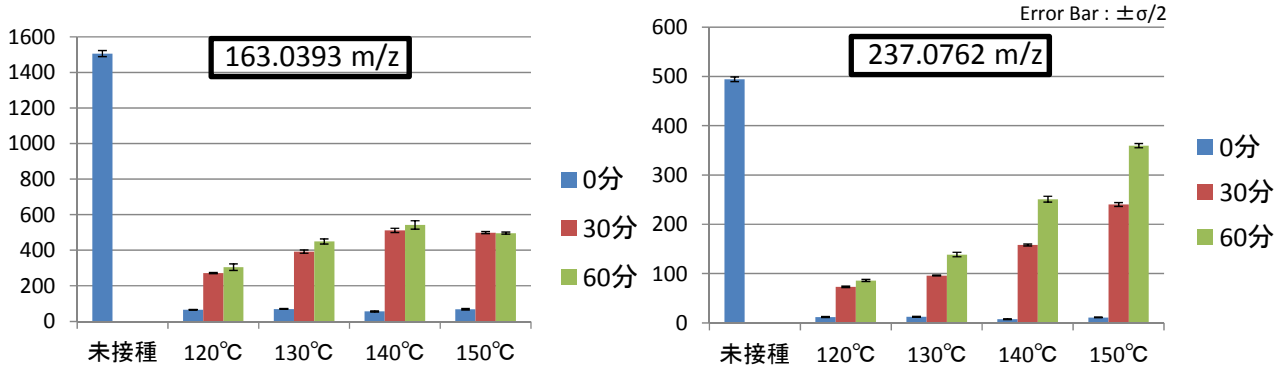


図. 36　163. 0393 m/z, 237. 0762 m/z のピーク面積グラフ　（きのこ栽培により減少するがソフト水熱処理により増加成分）(Negative mode)

Soft-hydrothermal processing

これらはリグニン系香族モノマーの 237.0763 m/z と類似するが芳香環置換基の少ないきのこ培地に使用されるものに「草本系植物（ムギやイネに由来するコメヌカ、ワラ、フスマ等のいわゆる培地添加物）」系芳香族モノマーと考えられる。これらは添加材として通常培地と同様に再生培地においても適宜添加している。119.0499 m/z, 267.0866 m/z, 279.0859 m/z, 293.1031 m/z, 319.1178 m/z についても同様の群と考えられる。（グラフ省略）

また、廃培地側マーカーについても、同様に解析を進めた（図.37 参照）。

➢ 廃培地特有の物質

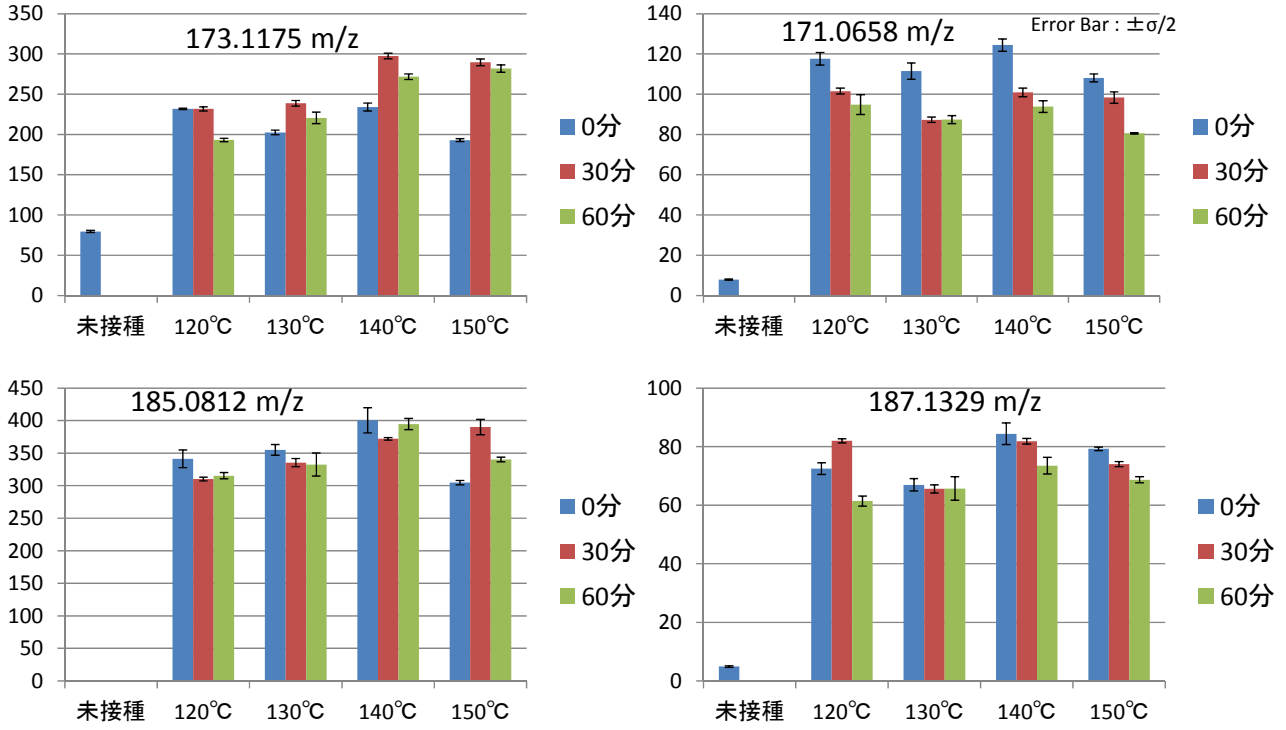


図.37　173.1175 m/z, 185.0812 m/z, 171.0658 m/z, 187.1329 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により増加しソフト水熱処理で変化しない成分）(Negative mode)

これら成分は、きのこ栽培で増加した物質であり、ソフト水熱処理で変化しないあるいは更に増加する物質の群である。多成分が少量ずつ混在している。これらは実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。199.0967 m/z, 239.092 m/z, 201.1125 m/z, 263.1283 m/z, 312.0945 m/z, 503.3002 m/z についても同様の傾向が提示されたため、同様の成分の特徴を提示する群あると考えられる（グラフ省略）。

また 521.3473 m/z, 523.3632 m/z の成分については、前述のソフト水熱プロセスの再生培地と廃培地を比較したときの図.26 から図.31 と同様に本来未接種培地には存在しないが、しかしきのこ栽培で増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で除去可能な物質と同様であった。（グラフ省略）

Soft-hydrothermal processing

2.4.1.3　ブナシメジ培地の成分分析　未接種培地と再生培地

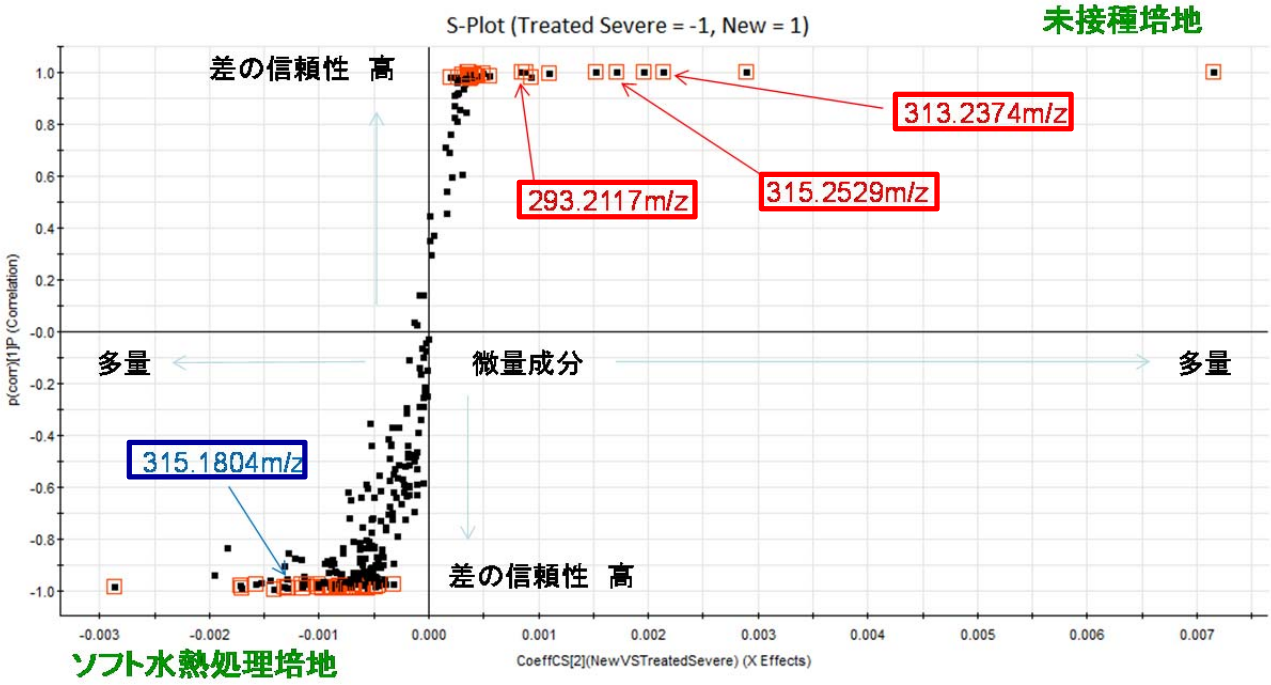


図.38　S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）
-未接種培地と再生培地（ソフト水熱プロセス）の比較-

表.23(1)　マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地と再生培地（ソフト水熱プロセス）の比較-

	未接種培地側		再生培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	1.9826	203.0811	2.7458	135.0445
2	4.0449	207.1033	3.2818	163.0395
3	3.2382	259.0969	2.7847	159.1021
4	3.1701	263.1288	2.3584	159.0656
5	4.6616	287.2227	0.5431	158.9782
6	4.8988	307.1898	2.5481	158.0818
7	5.8499	293.2114	2.4027	167.0342
8	5.7118	293.2117	2.7233	173.0812
9	5.6732	295.2267	3.1475	173.1175
10	4.8352	311.2214	3.1175	177.0548
11	5.054	311.222	3.0698	187.0969
12	4.9546	313.2374	3.3753	193.05
13	5.3131	315.2529	2.4494	197.0447
14	3.7234	327.2169	2.5282	189.1127
15	4.3525	329.2326	3.4936	187.1329
16	4.2421	329.2323	4.3413	198.1486

Soft-hydrothermal processing

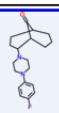
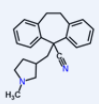
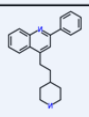
表.23(2)　マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地と再生培地（ソフト水熱プロセス）の比較-

	未接種培地側		再生培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
17	3.9012	329.2328	3.2824	199.0967
18	0.6305	341.1085	2.7752	205.0501
19	4.5624	357.2273	2.4812	203.0919
20	3.7008	439.244	2.8031	217.1074
21	3.6995	403.2688	2.6512	225.04
22	3.6995	449.2744	3.4029	223.0612
23	2.61	399.9146	4.3423	242.1389
24	3.9249	793.4361	2.918	261.1335
25			2.3209	261.0876
26			2.622	247.1181
27			2.8849	257.1497
28			2.7658	263.1283
29			3.6626	287.1495
30			3.8777	293.1509
31			4.1654	315.1804
32			3.7327	343.0822

未接種培地側で抽出したマーカーにおける、ネガとポジモードの両方で一致したピーク（赤文字）について、293.2117 m/z は、前述の表.14 の「マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地（通常培地）と廃培地の比較-」ピーク 11 と共通である（表.14、表.15、表.16 参照)。同様に 313.2374 m/z は、表.14 の「マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地（通常培地）と廃培地の比較-」のピーク 14 と共通である（表.14、表.15、表.17 参照)。また、315.2529 m/z は、同様に表.14 の「マーカー候補(Negative mode)　-未接種培地（通常培地）と廃培地の比較-」のピーク 15 と共通である（表.14、表.15、表.18 参照)。

ソフト水熱処理培地側で抽出したマーカーにおける、ネガとポジモードの両方で一致したピーク（青文字）315.1804 m/z について、さらに解析を進めた。

表.24 ソフト水熱処理培地マーカー候補の構造検索結果（315.1804 m/z）

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
31	4.1654	315.1804	(1)	C15H24N4O2Na (0.7)	(1)	2-[4-(4-Fluorophenyl)-1-piperazinyl]bicyclo[3.3.1]nonan-9-one	
			(2)	C13H19N10 (1.0)	(2)	5-[(1-Methyl-3-pyrrolidinyl)methyl]-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7]annulene-5-carbonitrile	
			(3)	C17H23N4O2 (-1.7)	(3)	2-Phenyl-4-[2-(4-piperidinyl)ethyl]quinoline	

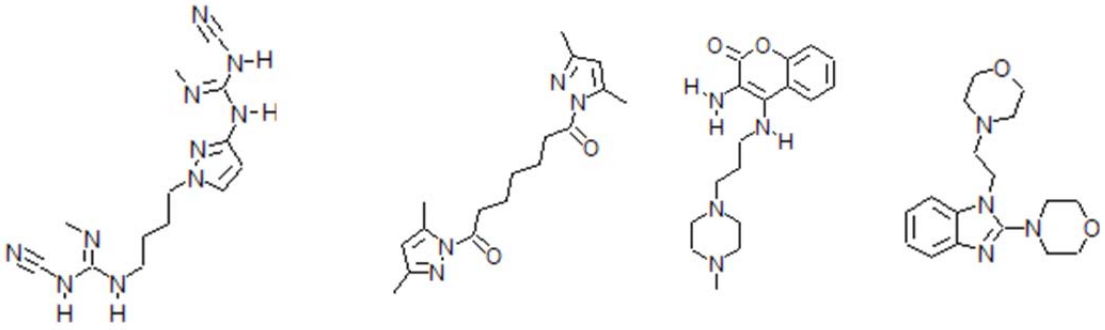
Soft-hydrothermal processing

表.24 の推定組成式から、315.1804 m/z を次のように考察した。

(1) C15HU24N4O2Na はデータベース上に本組成式に適合する化合物はなかった。

(2) C13H19N10 は酸素を全く含まない化合物であり、生物由来でない可能性が高い。

(3) C17H23N4O2 は、次のような化合物がデータベース上でヒットした。



前述の図.22(1), (2)に示すように、ネガとポジ多量成分の一致ピークをマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により未接種培地（通常培地）側で抽出したマーカーについて解析を進めた。

- 未接種培地（通常培地）特有の物質

293.2117 m/z、313.2374 m/z、および 315.2529 m/z は、前述の未接種培地（通常培地）特有の物質と同様である。(図.33～図.35 参照）これらはきのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で変化しない物質の群である。同様に、263.1288 m/z, 259.0969 m/z, 307.1898 m/z, 311.2214 m/z, 357.2273m/z、439.244 m/z, 403.2688 m/z、399.9146 m/z もきのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で変化しない物質の群である（グラフ省略)。

未接種培地（通常培地）側で抽出したマーカーについて同様に解析を進めた。203.0811 m/z ピーク成分はきのこの生育により増加しソフト水熱処理で減少する成分あり、341.1085 m/z ピーク成分はきのこ栽培により増加するがソフト水熱処理で減少する成分である。これらの成分は、多成分が少量ずつ混在している。これらは実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。

- 再生培地（ソフト水熱プロセス）特有の物質

ネガとポジ多量成分の一致ピークをマーカーとして 315.1804 m/z について、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により再生培地（ソフト水熱プロセス）側で抽出したマーカーについて解析を進めた(図.39 参照)。またほかのソフト水熱プロセス処理による再生培地側のマーカーも、同様に解析を進めた。

315.1804 m/z のピーク成分はきのこの生育に伴い増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない、あるいは、更に増加する物質である。ほかの再生培地（ソフト水熱プロセス）の成分である 159.1021 m/z, 158.9782 m/z, 159.065 m/z, 158.0818 m/z, 173.0812 m/z, 189.1127 m/z, 187.0969 m/z, 198.1486 m/z, 205.0501 m/z、217.1074 m/z、203.0919 m/z、242.1389 m/z, 261.1335 m/z、257.1497 m/z、247.1181 m/z、287.1495 m/z、293.1509 m/z もきのこ栽培で増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない、あるいは、更に増加す

る物質である。（グラフ省略）これらの成分は、多成分が少量ずつ混在している。これらは実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。

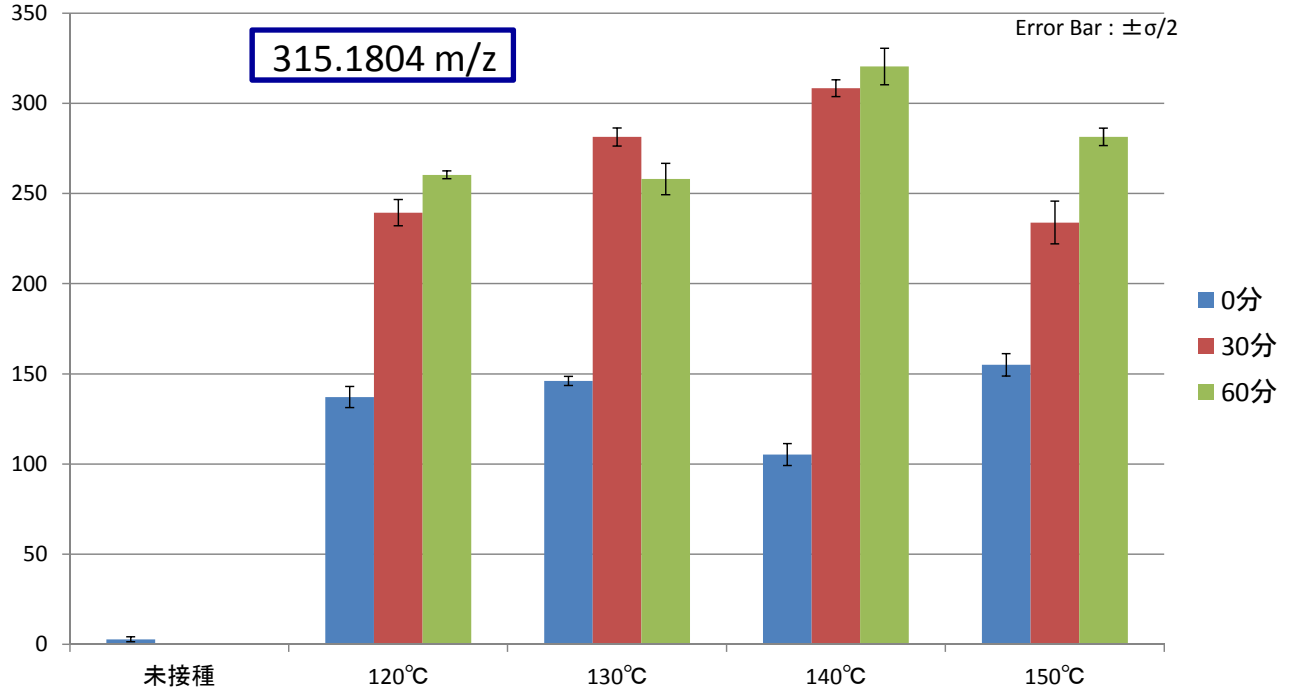


図. 39　315. 1804 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により増加しソフト水熱処理でも増加する成分）(Negative mode)

2. 4. 2　エノキタケ培地の成分分析　申請者らは、エノキタケにおいても同様にエノキタケ廃培地および条件の異なるソフト水熱プロセスによって再生させた培地、未使用培地から得られた温水可溶性画分を LC/MS 分析に供した。 LC/MS 分析では、Negative と Positive の両モードで分析・検出を行い、得られた網羅的質量分析データに対し、主成分分析およびクラスター解析によるグルーピング、各グループに特徴的なピーク（マーカー）の抽出を行った。

その結果、ブナシメジ廃培地とほぼ同様の傾向を示す主成分分析、クラスター解析結果が得られ、ソフト水熱プロセスによるバイオマス改質を特徴付けるマーカー分子の存在が示唆された。

測定条件：

サンプル調製

未接種培地、廃培地、およびソフト水熱処理した各サンプル（下表）を 90℃で 6 時間乾燥後パウダー状に粉砕、10 倍量の MQ 水を加えて 60℃で 3 時間静置することにより温水抽出した。これを 8000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄を固相抽出カラム（OASIS WAX: waters 社製）で前処理後、溶離液を窒素乾固し、20%のアセトニトリル水溶液に再度溶解し、下記条件で LC/MS 分析に供した。

LC/MS 条件

移動層　　A 液：2mM 酢酸アンモニウム、0.05%ギ酸　　B 液：95%アセトニトリル

分析カラム　　逆相モード　ACQUITY UPLC C18 1.7μm

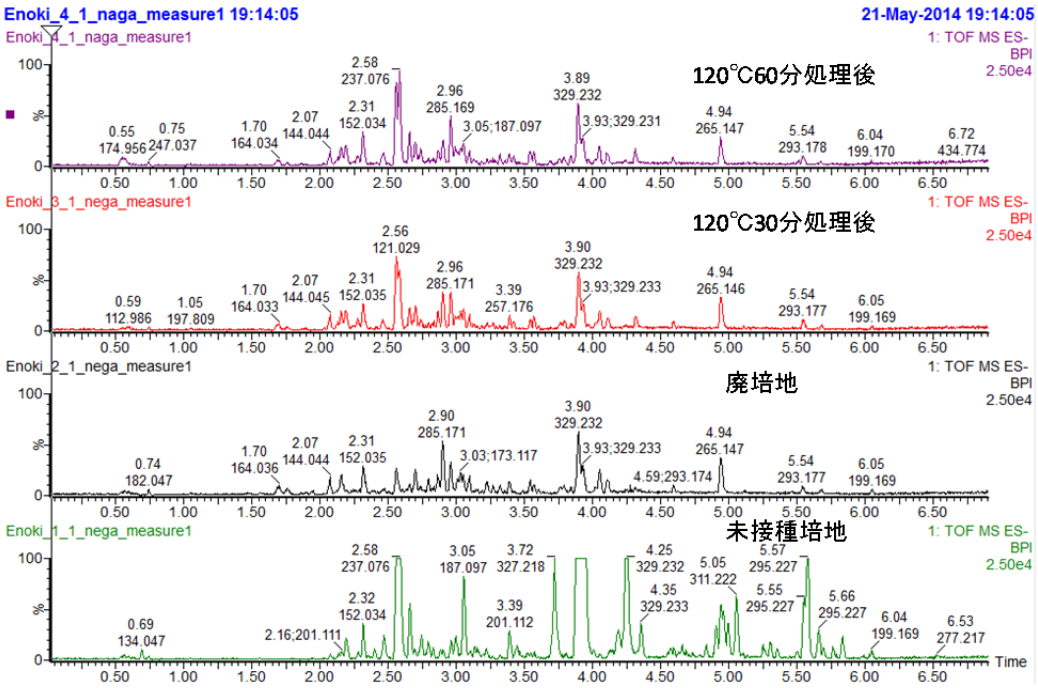
検出　　飛行型精密質量分析装置　Xevo G2 Qtof　ESI　Negative/Positive モード

測定用サンプル名/解析用サンプル名：

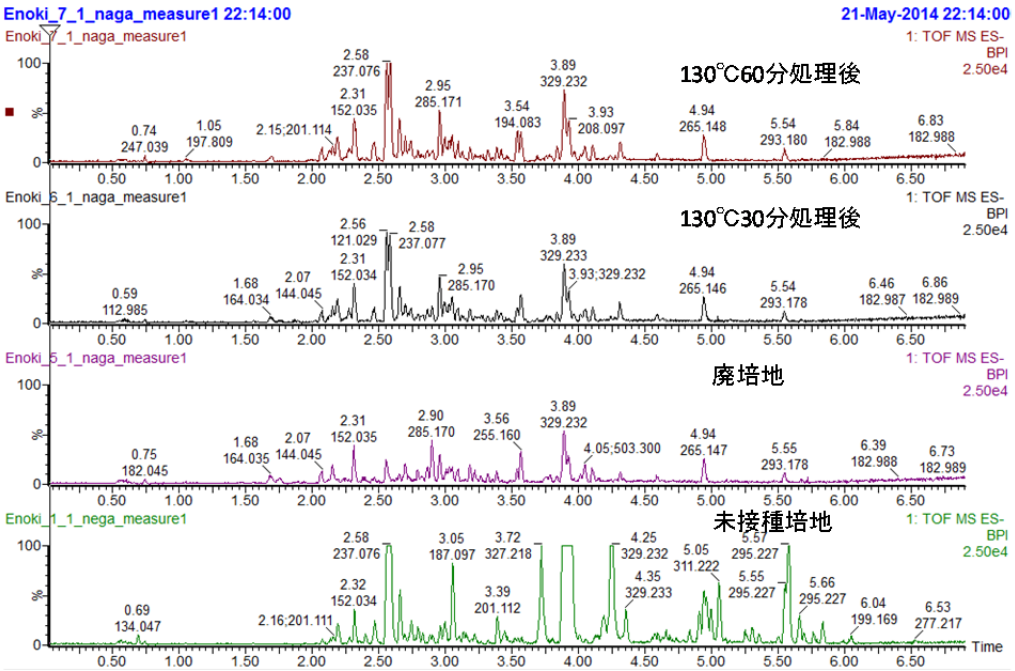
Soft-hydrothermal processing

	処理前（廃培地）	30分処理	60分処理
4/21付 未接種培地	1/eNEW（通常培地）	-	-
4/21付 (120℃処理)	2/e120-0	3/e120-30	4/e120-60
4/22付 (130℃処理)	5/e130-0	6/e130-30	7/e130-60
4/23付 (140℃処理)	8/e140-0	9/e140-30	10/e140-60
4/24付 (150℃処理)	11/e150-0	12/e150-30	13/e150-60

LC/MS ソフト水熱処理比較（120℃）(Negative mode)

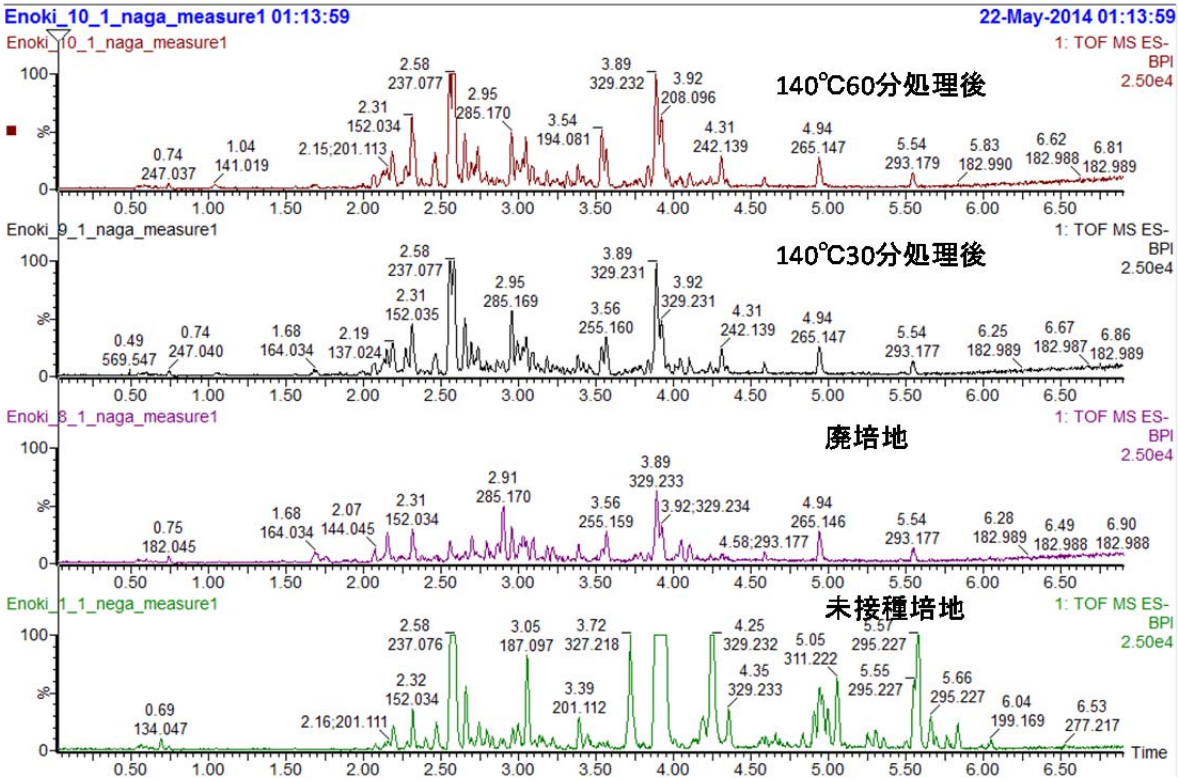


LC/MS ソフト水熱処理比較（130℃）(Negative mode)

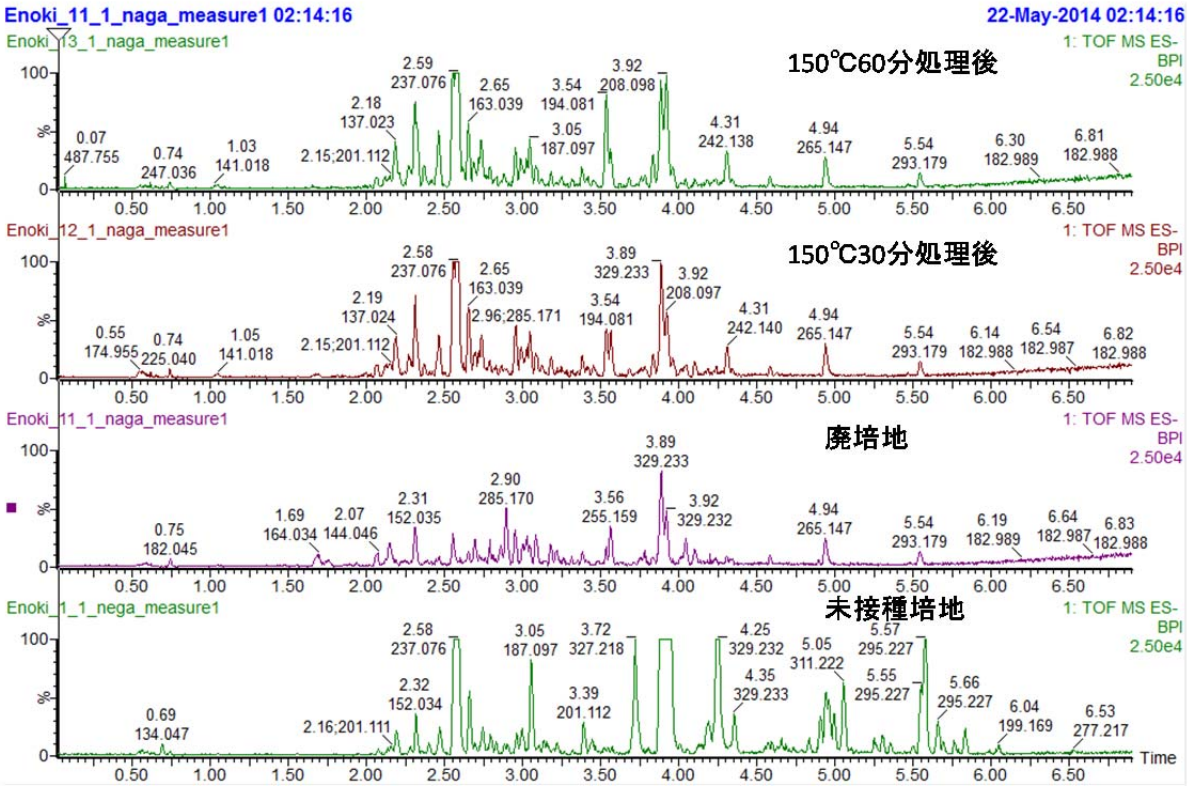


Soft-hydrothermal processing

LC/MS ソフト水熱処理比較（140℃）(Negative mode)



LC/MS ソフト水熱処理比較（150℃）(Negative mode)



Soft-hydrothermal processing

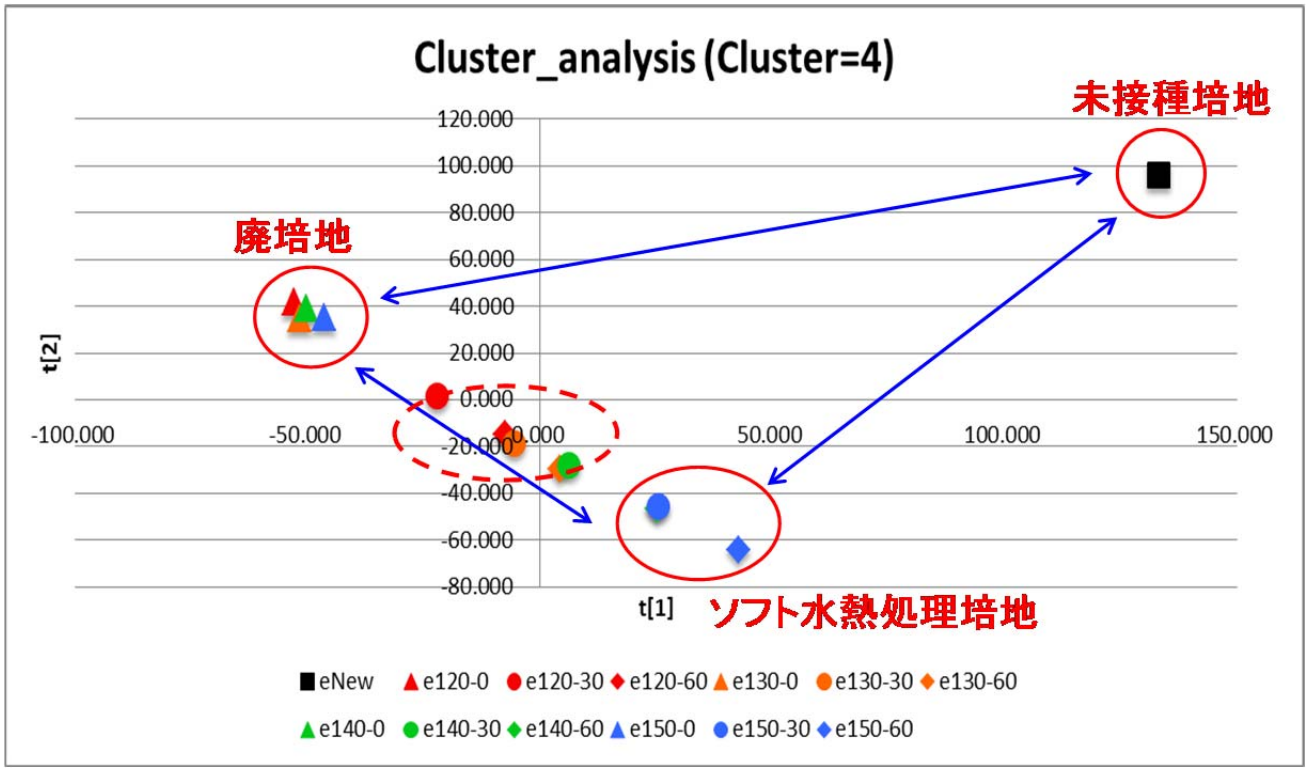


図. 40　主成分分析とクラスター解析に基づき 3 グループに分けて比較(Negative mode)
－ エノキタケ －

2.4.2.1　エノキタケ培地の成分分析　再生培地と廃培地

以下、エノキタケの S-plot 両端のピークを解析（Negative mode)の再生培地（ソフト水熱プロセス）と廃培地との比較を図. 41 に提示する。また、表. 25 にそれぞれのマーカー候補をブナシメジとの共通成分と対照して提示する。

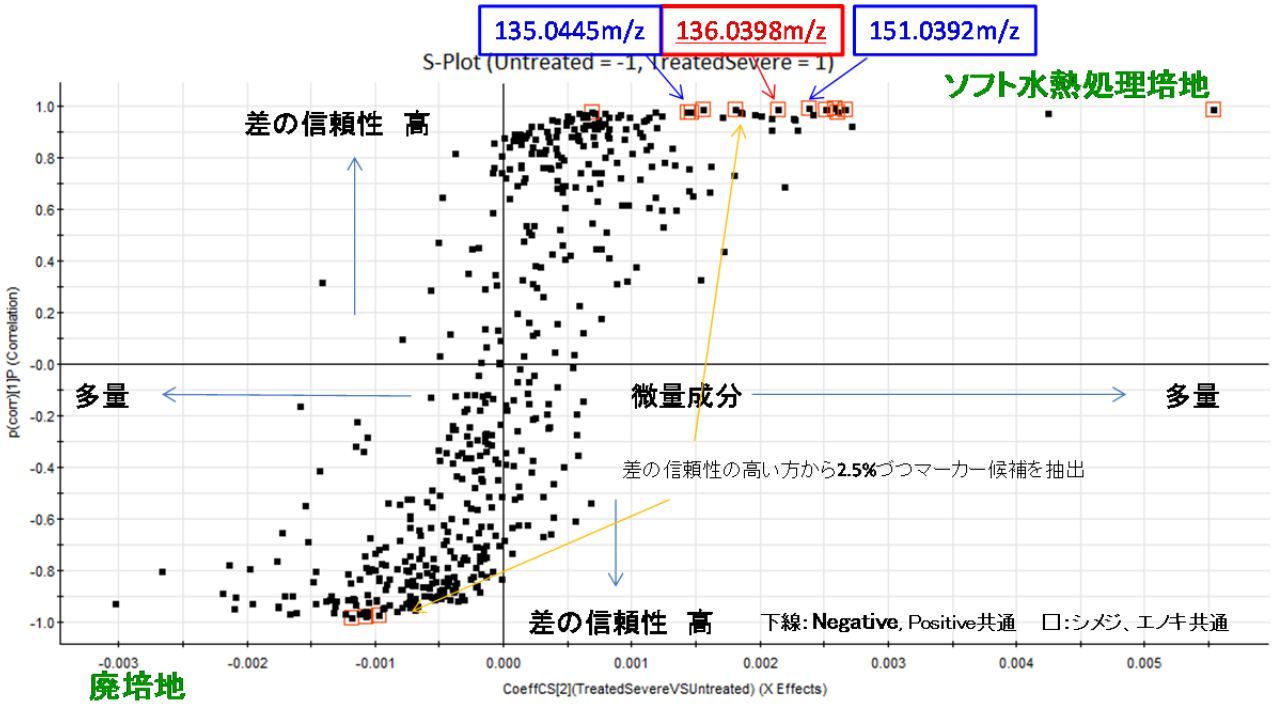


図. 41　S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）
-エノキタケ　再生培地（ソフト水熱プロセス）と廃培地の比較-

Soft-hydrothermal processing

表.25　マーカー候補(Negative mode)-エノキタケ　再生培地（ソフト水熱プロセス）と廃培地の比較-

	再生培地(ソフト水熱プロセス)側		廃培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	2.5566	121.0289	2.4182	168.0295
2	2.3127	**136.0398**	2.7628	283.1284
3	2.9933	137.0238	3.5074	426.2075
4	2.1853	137.0237		
5	2.7187	**135.0445**		
6	2.736	**151.0392**		
7	2.2727	195.0293		
8	3.5408	214.108		
9	3.462	243.1597		
10	2.504	515.1911	赤字:Negative, Positive共通	青:シメジ、エノキ共通

表.26 に選択したピーク（ネガティブ、ポジティブ共通-赤字）の構造検査の結果を提示する。また表.27 にそのフラグメントパターン解析（136.0398 m/z）を提示する。

同様に、表.28 に選択したピーク（ブナシメジ、エノキタケ共通）の構造検査の結果を提示する。また表.29、表.30 にそのフラグメントパターン解析（それぞれ 135.0445 m/z および 151.0392 m/z）を提示する。

表.26　構造検索結果(136.0398 m/z)-エノキタケ　ネガティブ、ポジティブ共通-

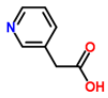
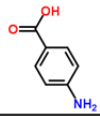
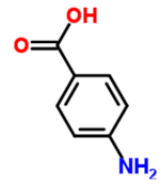
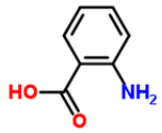
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
2	2.3127	136.0398	(1)	C5H7NO2Na (2.4)	(1)	3-Pyridinylacetic acid	
			(2)	C7H6NO2 (-0.1)	(2)	4-Aminobenzoic acid	
			(3)	C3H2N7 (2.6)	(3)	1-Methyl-2-pyridiniumcarboxylate	

表. 27　Fragment Pattern 解析(136.0398 m/z)-mass difference の小さい組成式 C7H6NO2-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0394	37719	136.0399	1	-0.5	0	1	0	C7H6N1O2	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0394	37719	136.0399	1	-0.5	0	1	0	C7H6N1O2	none

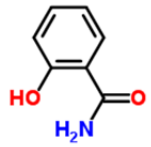
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0394	37719	136.0399	1	-0.5	0	1	0	C7H6N1O2	none

表. 28　構造検索結果-エノキタケ　ブナシメジ、エノキタケ共通-

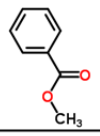
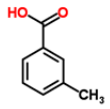
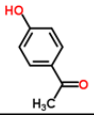
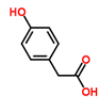
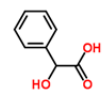
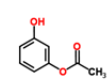
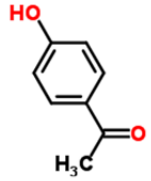
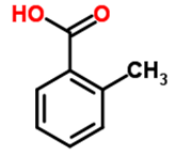
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
5	2.7187	135.0445	(1)	C3H7N2O4 (3.9)	(1)	Methyl benzoate	
			(2)	C6H8O2Na (2.3)	(2)	3-Methylbenzoic acid	
			(3)	C8H7O2 (-0.1)	(3)	1-(4-Hydroxyphenyl)ethanone	
6	2.736	151.0392	(1)	C8H7O3 (-0.3)	(1)	(4-Hydroxyphenyl)acetic acid	
			(2)	C6H8O3Na (2.1)	(2)	Hydroxy(phenyl)acetic acid	
			(3)	C4H3N6O (2.4)	(3)	3-Hydroxyphenyl acetate	

表.29　Fragment Pattern 解析(135.0445 m/z)-mass difference の小さい組成式 C8H7O2-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0479	2615	136.0524	1	-4.5	0	2	0	C8H8O2	none
	135.0443	29208	135.0446	1	-0.3	0	1	0	C8H7O2	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0479	2615	136.0524	1	-4.5	0	2	0	C8H8O2	none
	135.0443	29208	135.0446	1	-0.3	0	1	0	C8H7O2	none

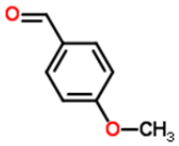
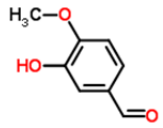
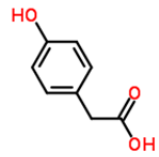
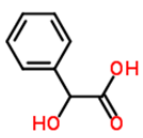
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	136.0479	2615	136.0524	1	-4.5	0	2	0	C8H8O2	none
	135.0443	29208	135.0446	1	-0.3	0	1	0	C8H7O2	none

表.30　Fragment Pattern 解析(151.0392 m/z)-mass difference の小さい組成式 C8H7O3-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0425	2649	152.0473	1	-4.8	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0394	29352	151.0395	1	-0.1	0	1	0	C8H7O3	none
	137.0209	2433	137.0239	1	-3	1	2	0.5	C7H5O3	CH2
	136.0159	28429	136.016	1	-0.1	1	1	0.5	C7H4O3	CH3
	135.0444	10695	135.0446	1	-0.2	1	1	2	C8H7O2	O

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0425	2649	152.0473	1	-4.8	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0394	29352	151.0395	1	-0.1	0	1	0	C8H7O3	none
	135.0444	10695	135.0446	1	-0.2	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0444	10695	135.0446	2	-0.2	1	1	2	C8H7O2	O

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	152.0425	2649	152.0473	1	-4.8	0	2	0	C8H8O3	none
	151.0394	29352	151.0395	1	-0.1	0	1	0	C8H7O3	none
	135.0444	10695	135.0446	1	-0.2	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0444	10695	135.0446	2	-0.2	1	2	0.5	C8H7O2	O
	135.0444	10695	135.0446	3	-0.2	1	1	2	C8H7O2	O

Soft-hydrothermal processing

ブナシメジの西武の解析と同様に、237.0763m/z を例として図.22(1), (2)に示すように、再生培地側、廃培地側および未設置培地側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた。

ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により再生培地側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた（図.42)。また廃培地側マーカーについても、同様に解析を進めた。

➢ 再生培地（ソフト水熱プロセス）特有の物質

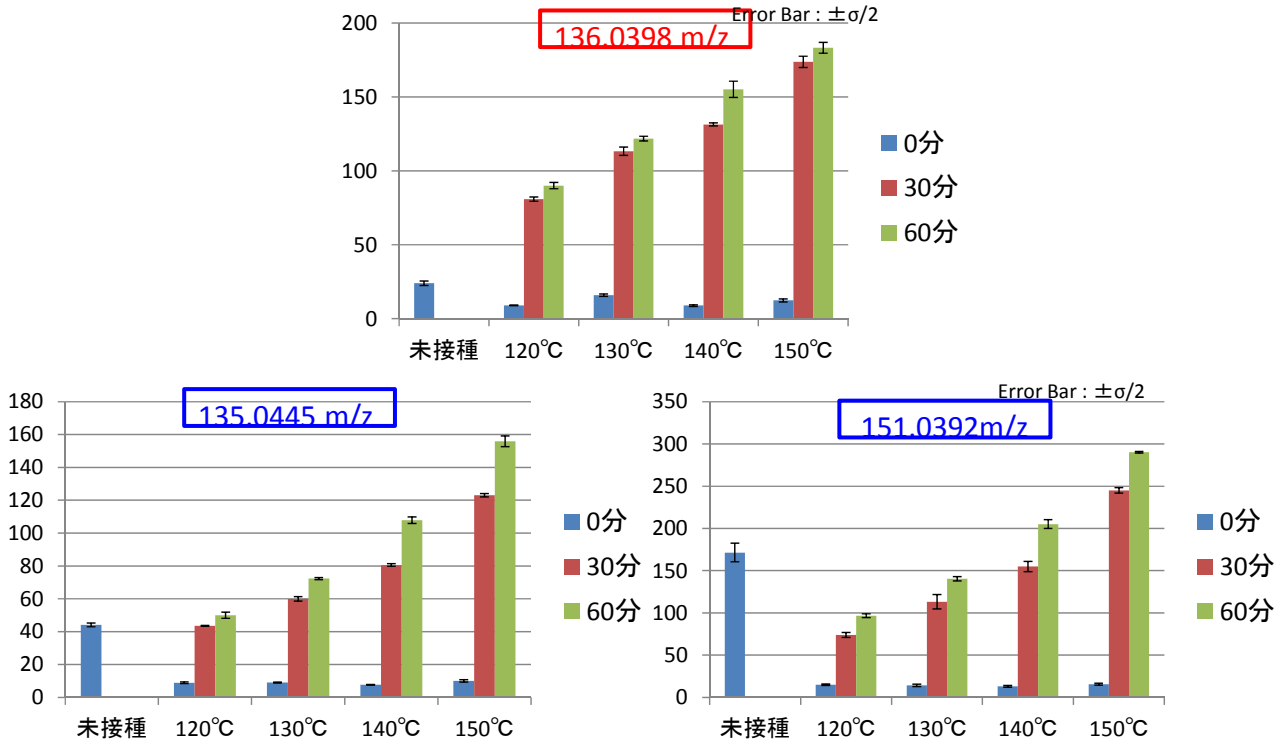


図.42　243.1597 m/z、515.1911 m/z のピーク面積グラフ（ソフト水熱処理により増加する成分）(Negative mode)

再生培地側で抽出したネガとポジ多量成分の一致成分ピーク（赤字)、およびエノキタケとブナシメジの共通成分（青字）をマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により図.42 において提示する。これらはきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群を提示する。同様に、ソフト水熱プロセスによる再生培地側の 121.0289 m/z, 137.0238 m/z, 137.0237 m/z, 195.0293 m/z, 214.108 m/z, , 243.1597 m/z, 515.1911 m/z のピーク成分についても、きのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群である。(グラフ省略)

➢ 廃培地特有の物質（グラフ省略）

168.295 m/z、283.1284 m/z、426.2075 m/z のピーク成分は、前述のブナシメジの廃培地と同様に廃培地側特徴的成分のマーカーとしてソフト水熱処理により変化した成分であり、これらは本来未接種培地には存在しない、あるいは少量しか存在しない成分であり、しかしきのこの生育に伴って増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で除去可能な物質である。エノキタケにおいてもソフト水熱プロセスの加水分解作用によりリグニンを穏やかに分解しきのこの生育に必要なリグニン系香族モノマーが生成され、ソフト水熱プロセスの抽出除去作用により老廃物質、腐敗物質と考えられる有機物質が処理強度（温度、時間）に比例して除去されたことが実証された。

Soft-hydrothermal processing

2.4.2.2　エノキタケ培地の成分分析　未接種培地と廃培地

同様に、エノキタケの S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）の未接種培地と廃培地との比較を図. 43 に提示する。表. 31 にそれぞれのマーカー候補をブナシメジとの共通成分と対照して提示する。

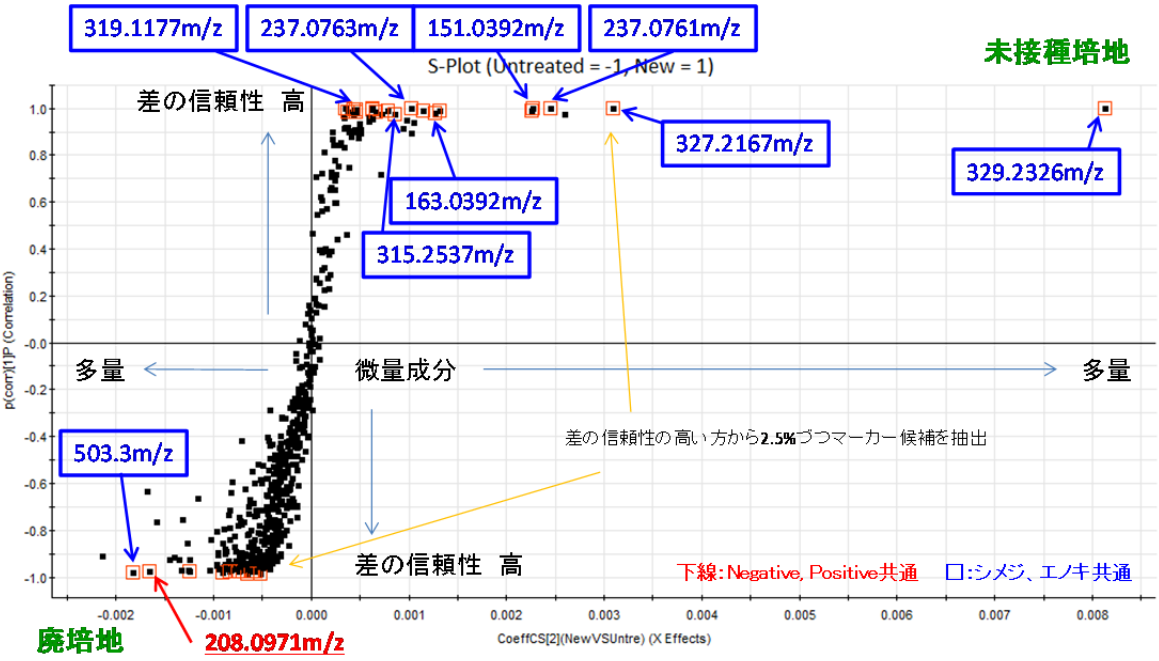


図. 43　S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）-エノキタケ　未接種培地と廃培地の比較-

表. 31　マーカー候補（Negative mode）-エノキタケ　未接種培地と廃培地の比較-

	未接種培地側		廃培地側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	2.5566	121.0289	1.6893	164.0346
2	2.9933	137.0238	2.4182	168.0295
3	2.1853	137.0237	2.3095	178.0501
4	2.736	**151.0392**	2.6485	195.1011
5	2.4849	153.0183	2.63	192.0657
6	2.6536	**163.0392**	3.9224	**208.0971**
7	0.7424	222.0408	2.6021	224.093
8	2.4648	**237.0763**	2.4636	253.1077
9	2.5859	**237.0761**	3.6428	269.1755
10	1.9929	243.044	3.6739	279.1338
11	4.889	309.2073	3.492	333.167
12	5.2988	**315.2537**	3.9879	331.1907
13	2.3137	**319.1177**	4.0657	**503.3**
14	3.7176	**327.2167**		
15	3.8966	**329.2326**		
16	2.5882	397.9181		
17	4.9434	631.3837		
18	2.504	515.1911		
19	3.8985	659.4729	赤字：Negative, Positive共通	青：シメジ、エノキ共通

Soft-hydrothermal processing

表. 32 に選択したピーク（ネガティブ、ポジティブ共通（赤字））の構造検査の結果を提示する。また表. 33 にそのフラグメントパターン解析（208. 0971 m/z）を提示する。

同様に、表. 34 に選択したピーク（ブナシメジ、エノキタケ共通（青字））の構造検査の結果を提示する。また表. 35 から表. 42 にそのフラグメントパターン解析（それぞれ 163. 0392 m/z、237. 0763 m/z 、237. 0761 m/z、315. 2537 m/z、319. 1177 m/z、327. 2167 m/z、329. 2326 m/z、503. 3 m/z）を提示する。

表. 32　構造検索結果（208. 0971 m/z）-エノキタケ　ネガティブ、ポジティブ共通-

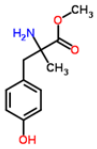
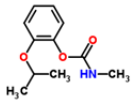
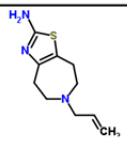
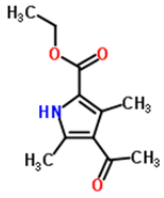
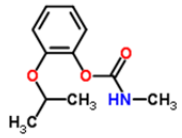
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
6	3.9224	208.0971	(1)	C11H14NO3 (-0.3)	(1)	Methyl alpha-methyltyrosinate	
			(2)	C9H15NO3Na (2.1)	(2)	2-Isopropoxyphenyl methylcarbamate	
			(3)	C7H10N7O (2.4)	(3)	6-Allyl-5,6,7,8-tetrahydro-4H-[1,3]thiazolo[4,5-d]azepin-2-amine	

表. 33　Fragment Pattern 解析（208. 0971 m/z）-mass difference の小さい組成式 C11H14NO3-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	209.1011	8605	209.1052	1	-4.1	0	2	0	C11H15N1O3	none
	208.098	68968	208.0974	1	0.6	0	1	0	C11H14N1O3	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	209.1011	8605	209.1052	1	-4.1	0	2	0	C11H15N1O3	none
	208.098	68968	208.0974	1	0.6	0	1	0	C11H14N1O3	none

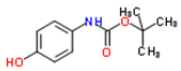
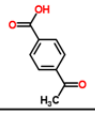
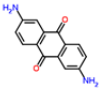
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	209.1011	8605	209.1052	1	-4.1	0	2	0	C11H15N1O3	none
	208.098	68968	208.0974	1	0.6	0	1	0	C11H14N1O3	none

表. 34　構造検索結果-エノキタケ　ブナシメジ、エノキタケ共通-

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
6	2.6536	163.0392	(1)	C5H3N6O (2.4)	(1)	2-Oxo-3-phenylpropanoic acid	
			(2)	C7H8O3Na (2.1)	(2)	4-Acetylbenzoic acid	
			(3)	C9H7O3 (-0.3)	(3)	4-Oxatricyclo[5.2.1.0˜2,6˜]dec-8-ene-3,5-dione	
8	2.4648	237.0763	(1)	C12H13O5 (0.0)	(1)	1,8-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(2)	C11H10N4ONa (1.1)	(2)	1,5-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(3)	C13H9N4O (-1.3)	(3)	2,6-Diamino-9,10-anthraquinone	

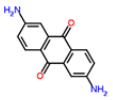
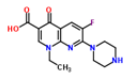
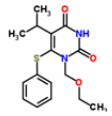
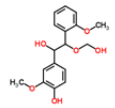
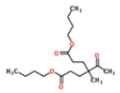
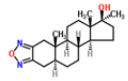
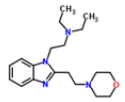
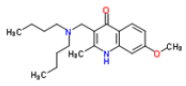
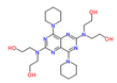
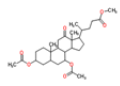
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
9	2.5859	237.0761	(1)	C12H13O5 (-0.2)	(1)	1,8-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(2)	C10H14O5Na (2.2)	(2)	1,5-Diamino-9,10-anthraquinone	
			(3)	C11H10N4ONa (0.9)	(3)	2,6-Diamino-9,10-anthraquinone	
12	5.2988	315.2537	(1)	C14H31N6O2 (2.9)	(1)	4-(2-Methyl-2-propanyl)-1,1-bis[(2-methyl-2-propanyl)peroxy]cyclohexane	No Result
			(2)	C17H32N4Na (1.2)	(2)	3,3'-(1,3-Propanediyldi-4,1-piperidinediyl)dipropanenitrile	No Result
			(3)	C4H27N16O (-1.7)	(3)	9,10-Dihydroxyoctadecanoic acid	

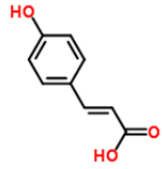
表. 34　構造検索結果-エノキタケ　ブナシメジ、エノキタケ共通-（つづき）

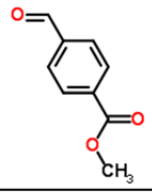
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
13	2.3137	319.1177	(1)	C21H19OS (2.0)	(1)	1-Ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	
			(2)	C18H23OS2 (-1.3)	(2)	1-(Ethoxymethyl)-5-isopropyl-6-(phenylsulfanyl)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione	
			(3)	C21H16N2Na (-3.4)	(3)	4-[1-Hydroxy-2-(hydroxymethoxy)-2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-2-methoxyphenol	
14	3.7176	327.2167	(1)	C18H31O5 (-0.4)	(1)	2,2'-[(2,2-Dimethyl-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinane)	No Result
			(2)	C19H27N4O (-1.8)	(2)	1,1',1''-(5-Methyl-1,3,5-hexanetriyl)tribenzene	No Result
			(3)	C17H28N4ONa (0.6)	(3)	Dibutyl 4-acetyl-4-methylheptanedioate	

Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
15	3.8966	329.2326	(1)	C18H33O5 (-0.2)	(1)	(1S,3aS,3bR,5aS,10aS,10bS,12aS)-1,10a,12a-Trimethyl-2,3,3a,3b,4,5,5a,6,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahydro-1H-cyclopenta[7,8]phenanthro[2,3-c][1,2,5]oxadiazol-1-ol	
			(2)	C17H30N4ONa (0.9)	(2)	N,N-Diethyl-2-[2-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-benzimidazol-1-yl]ethanamine	
			(3)	C16H34O5Na (2.2)	(3)	3-[(Dibutylamino)methyl]-7-methoxy-2-methyl-4-quinolinol	
13	4.0657	503.3	(1)	C24H48O7NaS (-1.8)	(1)	2,2',2'',2'''-{[4,8-Di(1-piperidinyl)pyrimido[5,4-d]pyrimidine-2,6-diyl]dinitrilo}tetraethanol	
			(2)	C22H43N6O5S (-1.6)	(2)	Methyl 3,7-diacetoxy-12-oxocholan-24-oate	
			(3)	C26H47O7S (-4.2)	(3)	2,2'-[[4,8-Di(4-morpholinyl)pyrimido[5,4-d]pyrimidine-2,6-diyl]bis(propylimino)]diethanol	No Result

Soft-hydrothermal processing

表.35　Fragment Pattern 解析(163.0392 m/z)-mass difference の小さい組成式 C9H7O3-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0421	3091	164.0473	1	-5.2	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0394	34589	163.0395	1	-0.1	0	1	0	C9H7O3	none
	145.0284	2944	145.029	1	-0.6	1	0	0.5	C9H5O2	H2O
	120.0537	3072	120.0575	1	-3.8	1	3	1	C8H8O1	CO2
	119.0497	28501	119.0497	1	0	1	2	1	C8H7O1	CO2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0421	3091	164.0473	1	-5.2	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0394	34589	163.0395	1	-0.1	0	1	0	C9H7O3	none

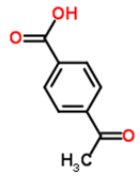
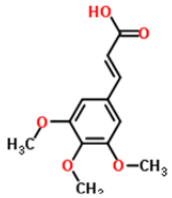
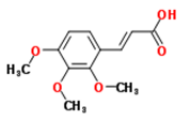
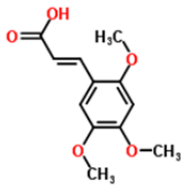
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	164.0421	3091	164.0473	1	-5.2	0	2	0	C9H8O3	none
	163.0394	34589	163.0395	1	-0.1	0	1	0	C9H7O3	none
	145.0284	2944	145.029	1	-0.6	1	0	0.5	C9H5O2	H2O

表.36　Fragment Pattern 解析(237.0763 m/z)-mass difference の小さい組成式 C12H13O5-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0798	4635	238.0841	1	-4.3	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	37728	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	163.0404	2060	163.0395	1	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.0404	2060	163.0395	2	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0798	4635	238.0841	1	-4.3	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	37728	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	163.0404	2060	163.0395	1	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.0404	2060	163.0395	2	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.0404	2060	163.0395	3	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0798	4635	238.0841	1	-4.3	0	2	0	C12H14O5	none
	237.0759	37728	237.0763	1	-0.4	0	1	0	C12H13O5	none
	163.0404	2060	163.0395	1	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.0404	2060	163.0395	2	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2
	163.0404	2060	163.0395	3	0.9	3	2	2	C9H7O3	C3H6O2

Soft-hydrothermal processing

表.37　Fragment Pattern 解析(237.0761 m/z)-mass difference の小さい組成式 C12H13O5-

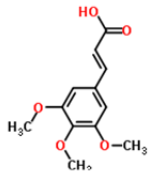
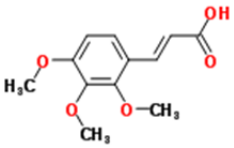
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0789	17344	238.0841	1	-5.2	0	0	0	C12H14O5	H
	223.0972	1015	223.097	1	0.2	1	2	0.5	C12H15O4	O
	223.0972	1015	223.097	2	0.2	1	1	2	C12H15O4	O
	210.0589	765	210.0528	1	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	210.0589	765	210.0528	2	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	209.0449	2701	209.045	1	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	209.0449	2701	209.045	2	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	181.0531	629	181.0501	1	3	4	5	2	C9H9O4	C3H6O
	180.0739	407	180.0786	1	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	180.0739	407	180.0786	2	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	167.0684	201	167.0708	1	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	167.0684	201	167.0708	2	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	165.0545	3434	165.0552	1	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	165.0545	3434	165.0552	2	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	164.0427	1303	164.0473	1	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	164.0427	1303	164.0473	2	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	163.0389	11622	163.0395	1	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2
	163.0389	11622	163.0395	2	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2

表.37　Fragment Pattern 解析(237.0761 m/z)-mass difference の小さい組成式 C12H13O5-（つづき）

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0789	17344	238.0841	1	-5.2	0	0	0	C12H14O5	H
	223.0972	1015	223.097	1	0.2	1	2	0.5	C12H15O4	O
	223.0972	1015	223.097	2	0.2	1	1	2	C12H15O4	O
	210.0589	765	210.0528	1	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	210.0589	765	210.0528	2	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	210.0589	765	210.0528	3	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	209.0449	2701	209.045	1	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	209.0449	2701	209.045	2	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	209.0449	2701	209.045	3	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	181.0531	629	181.0501	1	3	4	5	2	C9H9O4	C3H6O
	180.0739	407	180.0786	1	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	180.0739	407	180.0786	2	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	180.0739	407	180.0786	3	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	167.0684	201	167.0708	1	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	167.0684	201	167.0708	2	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	167.0684	201	167.0708	3	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	165.0545	3434	165.0552	1	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	165.0545	3434	165.0552	2	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	165.0545	3434	165.0552	3	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	164.0427	1303	164.0473	1	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	164.0427	1303	164.0473	2	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	164.0427	1303	164.0473	3	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	163.0389	11622	163.0395	1	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2
	163.0389	11622	163.0395	2	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2
	163.0389	11622	163.0395	3	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2

Soft-hydrothermal processing

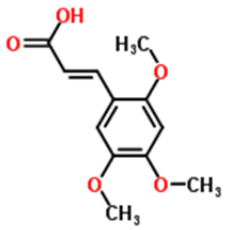
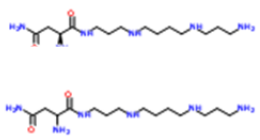
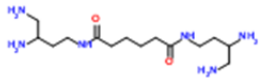
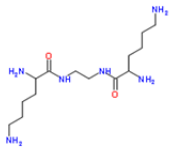
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	238.0789	17344	238.0841	1	-5.2	0	0	0	C12H14O5	H
	223.0972	1015	223.097	1	0.2	1	2	0.5	C12H15O4	O
	223.0972	1015	223.097	2	0.2	1	1	2	C12H15O4	O
	210.0589	765	210.0528	1	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	210.0589	765	210.0528	2	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	210.0589	765	210.0528	3	6.1	2	2	1	C10H10O5	C2H5
	209.0449	2701	209.045	1	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	209.0449	2701	209.045	2	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	209.0449	2701	209.045	3	-0.1	2	1	1	C10H9O5	C2H6
	181.0531	629	181.0501	1	3	4	5	2	C9H9O4	C3H6O
	180.0739	407	180.0786	1	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	180.0739	407	180.0786	2	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	180.0739	407	180.0786	3	-4.7	2	2	1.5	C10H12O3	C2H3O2
	167.0684	201	167.0708	1	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	167.0684	201	167.0708	2	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	167.0684	201	167.0708	3	-2.4	3	4	2	C9H11O3	C3H4O2
	165.0545	3434	165.0552	1	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	165.0545	3434	165.0552	2	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	165.0545	3434	165.0552	3	-0.7	3	2	2	C9H9O3	C3H6O2
	164.0427	1303	164.0473	1	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	164.0427	1303	164.0473	2	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	164.0427	1303	164.0473	3	-4.6	3	1	2	C9H8O3	C3H7O2
	163.0389	11622	163.0395	1	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2
	163.0389	11622	163.0395	2	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2
	163.0389	11622	163.0395	3	-0.6	3	0	2	C9H7O3	C3H8O2

表.38　Fragment Pattern 解析(315.2537 m/z)-mass difference の小さい組成式 C14H31N6O2-

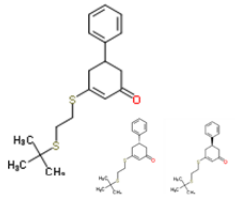
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2603	580	316.2587	1	1.6	0	2	0	C14H32N6O2	none
	315.2534	2089	315.2508	1	2.6	0	1	0	C14H31N6O2	none

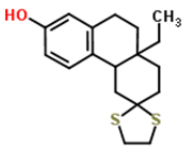
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2603	580	316.2587	1	1.6	0	2	0	C14H32N6O2	none
	315.2534	2089	315.2508	1	2.6	0	1	0	C14H31N6O2	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	316.2603	580	316.2587	1	1.6	0	2	0	C14H32N6O2	none
	315.2534	2089	315.2508	1	2.6	0	1	0	C14H31N6O2	none

Soft-hydrothermal processing

表. 39　Fragment Pattern 解析(319.1177 m/z)-mass difference の小さい組成式 C18H23OS2-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	319.119	9026	319.119	1	0	0	1	0	C18H23O1S2	none
	136.0403	31591	136.038	1	2.3	2	4	1.5	C5H12S2	C13H11O

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	319.119	9026	319.119	1	0	0	1	0	C18H23O1S2	none

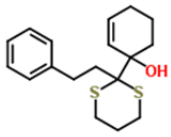
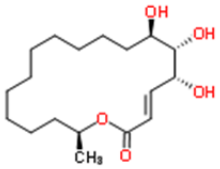
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	319.119	9026	319.119	1	0	0	1	0	C18H23O1S2	none

表. 40　Fragment Pattern 解析(327.2167 m/z)-mass difference の小さい組成式 C18H31O5-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	328.2209	30481	328.225	1	-4.1	0	2	0	C18H32O5	none
	327.2175	155341	327.2171	1	0.4	0	1	0	C18H31O5	none

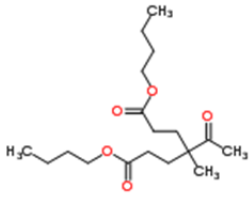
Possible structure	Daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	328.2209	30481	328.225	1	-4.1	0	2	0	C18H32O5	none
	327.2175	155341	327.2171	1	0.4	0	1	0	C18H31O5	none
	229.1435	3195	229.144	1	-0.5	2	3	1.5	C12H21O4	C6H10O
	211.1329	2802	211.1334	1	-0.5	1	0	1	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	2	-0.5	2	1	1.5	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	3	-0.5	2	1	2	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	4	-0.5	2	1	2	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	5	-0.5	2	1	2	C12H19O3	C6H12O2
	171.1016	2684	171.1021	1	-0.5	2	3	1.5	C9H15O3	C9H16O2
	171.1016	2684	171.1021	2	-0.5	2	3	2	C9H15O3	C9H16O2
	171.1016	2684	171.1021	3	-0.5	2	3	2	C9H15O3	C9H16O2

表.40　Fragment Pattern 解析(327.2167 m/z)-mass difference の小さい組成式 C18H3105-（つづき）

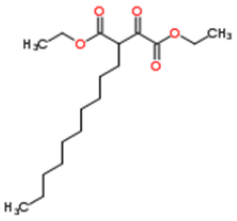
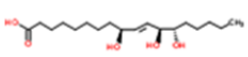
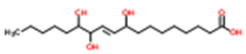
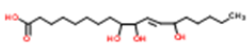
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	328.2209	30481	328.225	1	-4.1	0	2	0	C18H32O5	none
	327.2175	155341	327.2171	1	0.4	0	1	0	C18H31O5	none
	211.1329	2802	211.1334	1	-0.5	2	1	2	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	2	-0.5	3	4	2	C12H19O3	C6H12O2
	211.1329	2802	211.1334	3	-0.5	2	1	2	C12H19O3	C6H12O2
	171.1016	2684	171.1021	1	-0.5	2	3	2	C9H15O3	C9H16O2
	171.1016	2684	171.1021	2	-0.5	2	3	2	C9H15O3	C9H16O2

表.41　Fragment Pattern 解析(329.2326 m/z)-mass difference の小さい組成式 C18H3305-

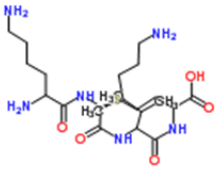
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	330.237	339477	330.2406	1	-3.6	0	2	0	C18H34O5	none
	329.2334	1718865	329.2328	1	0.6	0	1	0	C18H33O5	none
	229.144	33103	229.144	1	0	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1337	28180	211.1334	1	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	2	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	3	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	4	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	5	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	6	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	7	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2

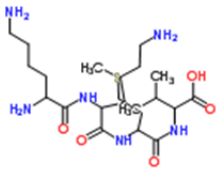
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	330.237	339477	330.2406	1	-3.6	0	2	0	C18H34O5	none
	329.2334	1718865	329.2328	1	0.6	0	1	0	C18H33O5	none
	229.144	33103	229.144	1	0	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1337	28180	211.1334	1	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	2	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	3	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	4	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	5	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	6	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	7	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	330.237	339477	330.2406	1	-3.6	0	2	0	C18H34O5	none
	329.2334	1718865	329.2328	1	0.6	0	1	0	C18H33O5	none
	229.144	33103	229.144	1	0	1	2	1	C12H21O4	C6H12O
	211.1337	28180	211.1334	1	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	2	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	3	0.3	2	1	1.5	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	4	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	5	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	6	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	7	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2
	211.1337	28180	211.1334	8	0.3	2	-1	2	C12H19O3	C6H14O2

Soft-hydrothermal processing

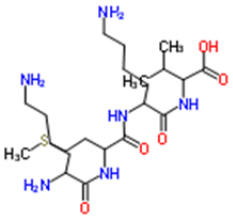
表.42　Fragment Pattern 解析(503.3 m/z)-mass difference の小さい組成式 C22H43N6O5S-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	504.3015	4872	504.3094	1	-7.9	0	2	0	C22H44N6O5S1	none
	503.2999	14926	503.3016	1	-1.7	0	1	0	C22H43N6O5S1	none
	487.3036	1535	487.3066	1	-3	1	2	0.5	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	2	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	3	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	4	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	5	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	457.2948	2446	457.2961	1	-1.3	1	0	1	C21H41N6O3S1	CH2O2
	457.2948	2446	457.2849	1	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	2	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	3	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	437.2201	974	437.2223	1	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	2	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	3	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	4	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	5	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	6	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	7	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	436.2193	4849	436.2144	1	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	2	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	3	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.227	1	-7.7	4	-1	2	C22H34N3O4S1	H9N3O
	403.2659	925	403.2617	1	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	403.2659	925	403.2617	2	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	257.1493	2112	257.1501	1	-0.8	3	4	2	C12H21N2O4	C10H22N4OS

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	504.3015	4872	504.3094	1	-7.9	0	2	0	C22H44N6O5S1	none
	503.2999	14926	503.3016	1	-1.7	0	1	0	C22H43N6O5S1	none
	487.3036	1535	487.3066	1	-3	1	2	0.5	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	2	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	3	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	4	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	5	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	457.2948	2446	457.2961	1	-1.3	1	0	1	C21H41N6O3S1	CH2O2
	457.2948	2446	457.2849	1	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	2	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	3	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	437.2201	974	437.2223	1	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	2	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	3	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	4	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	5	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	6	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	7	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	436.2193	4849	436.2144	1	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	2	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	3	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.227	1	-7.7	4	-1	2	C22H34N3O4S1	H9N3O
	403.2659	925	403.2617	1	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	403.2659	925	403.2617	2	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	257.1493	2112	257.1501	1	-0.8	3	4	2	C12H21N2O4	C10H22N4OS

Soft-hydrothermal processing

表.42　Fragment Pattern 解析(503.3 m/z)-mass difference の小さい組成式 C22H43N6O5S-（つづき）

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	504.3015	4872	504.3094	1	-7.9	0	2	0	C22H44N6O5S1	none
	503.2999	14926	503.3016	1	-1.7	0	1	0	C22H43N6O5S1	none
	487.3036	1535	487.3066	1	-3	1	2	0.5	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	2	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	3	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	4	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	487.3036	1535	487.3066	5	-3	1	1	2	C22H43N6O4S1	O
	457.2948	2446	457.2961	1	-1.3	1	0	1	C21H41N6O3S1	CH2O2
	457.2948	2446	457.2849	1	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	2	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	457.2948	2446	457.2849	3	9.9	3	4	1.5	C22H41N4O4S1	H2N2O
	437.2201	974	437.2223	1	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	2	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	3	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	4	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	5	-2.2	3	-2	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	6	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	437.2201	974	437.2223	7	-2.2	4	-1	2	C21H33N4O4S1	CH10N2O
	436.2193	4849	436.2144	1	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	2	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.2144	3	4.9	4	-2	2	C21H32N4O4S1	CH11N2O
	436.2193	4849	436.227	1	-7.7	4	-1	2	C22H34N3O4S1	H9N3O
	403.2659	925	403.2617	1	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	403.2659	925	403.2617	2	4.2	2	4	2	C18H37N5O3S1	C4H6NO2
	257.1493	2112	257.1501	1	-0.8	2	3	1.5	C12H21N2O4	C10H22N4OS
	257.1493	2112	257.1501	2	-0.8	3	4	2	C12H21N2O4	C10H22N4OS

ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により未接種培地（通常培地）側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた（図.44、図.45 参照）。また、廃培地側マーカーについても、同様に解析を進めた（図.46 参照）。

➢　未接種培地（通常培地）特有の物質

再生培地側で抽出したエノキタケとブナシメジの共通成分（青字）をマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により図.44 および図.45 において提示する。図.44 はきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群である。同様に、未接種培地側の 243.044 m/z のピーク成分についても、きのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群である。

なお、151.392 m/z は図.42 に示しているように、典型的なきのこ栽培により減少しソフト水熱処理で増加する成分である。

図.45 にきのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない物質の群、およびきのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で未接種培地と同等といかないまでも再生可能な物質の群を提示する。これらはリグニン系香族モノマーの 237.0763 m/z と類似するが芳香環置換基の少ないきのこ培地に使用されるものに「草本系植物（ムギやイネに由来するコメヌカ、ワラ、フスマ等のいわゆる培地添加物）」系芳香族モノマーと考えられる。これらは添加材として通常培地と同様に再生培地においても適宜添加している。153.0183 m/z, 222.0408 m/z, 309.2073 m/z, 397.9181 m/z, 631.3837 m/z, 659.4729 m/z についても同様の群と考えられる。（グラフ省略）

Soft-hydrothermal processing

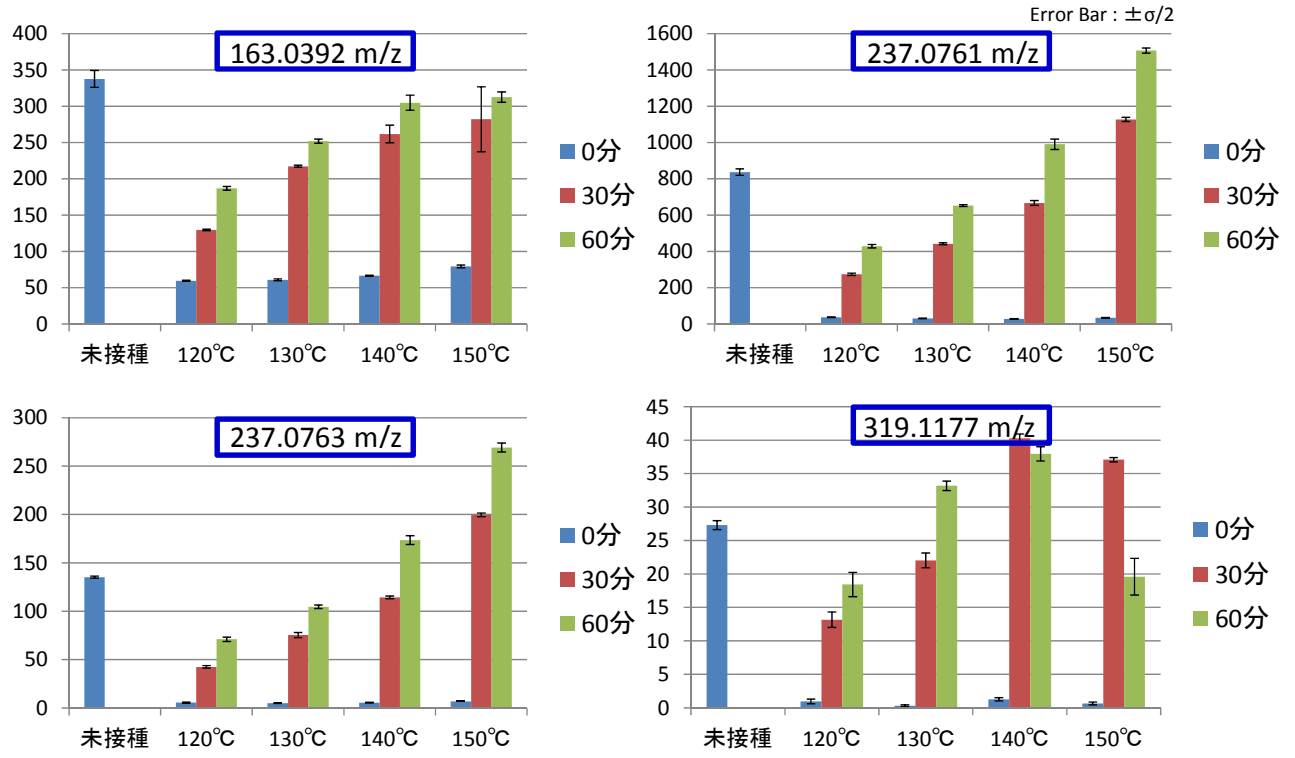


図. 44　163.0392 m/z、237.0763 m/z、237.0761 m/z、319.1177 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により減少しソフト水熱処理で増加する成分）(Negative mode)

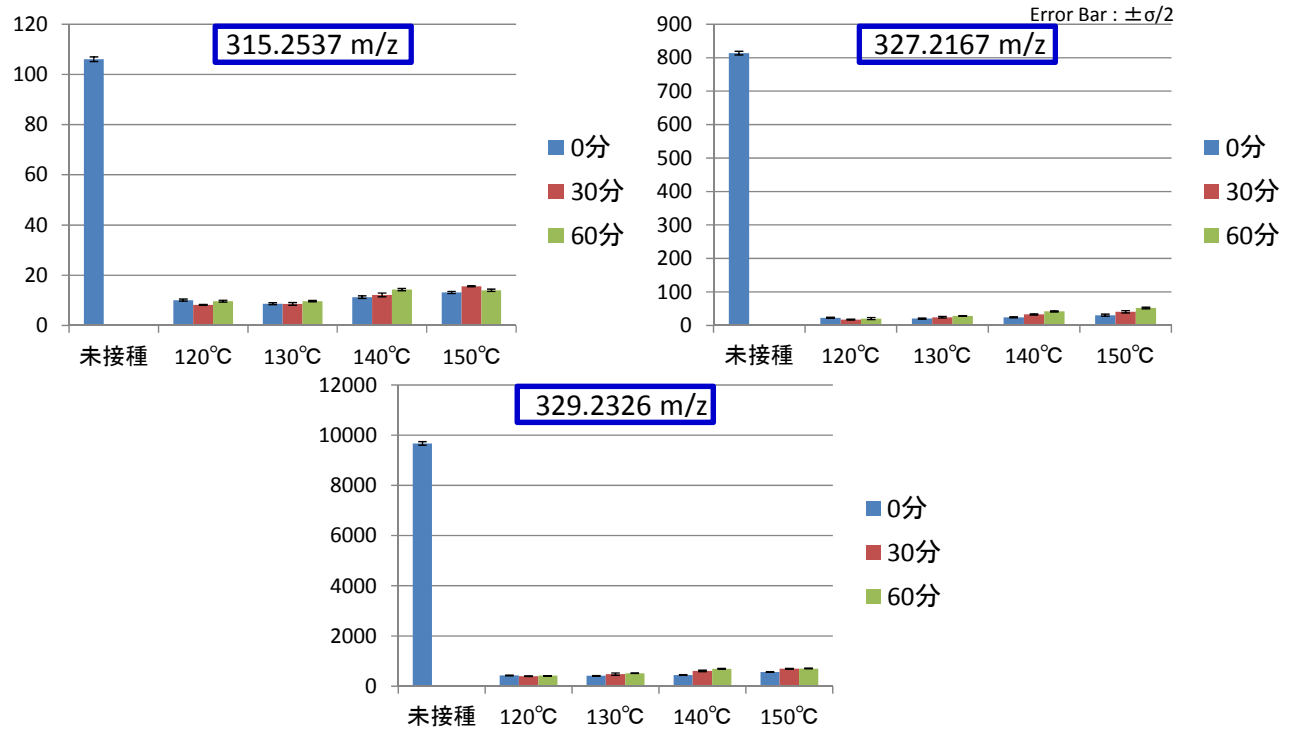


図. 45　315.2537 m/z、327.2167 m/z、329.2326 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により減少しソフト水熱処理で変化しない、あるいはソフト水熱処理で増加する成分）(Negative mode)

Soft-hydrothermal processing

図. 46 にきのこ栽培で増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない、あるいは増加する物質の群、および除去可能な物質の群を提示する。

➢ 廃培地特有の物質

廃培地側で抽出したネガとポジ多量成分の一致成分ピーク（赤字）、およびエノキタケとブナシメジの共通成分（青字）をマーカーとして、ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により図. 46 において提示する。208. 0971 m/z のピーク成分は、きのこ栽培で増加した物質であり、ソフト水熱処理で変化しないあるいは更に増加する物質の群である。多成分が少量ずつ混在している。これらは実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。503. 3 m/z のピーク成分は、本来未接種培地には存在しない、あるいは少量しか存在しない成分であり、しかしきのこの生育に伴って増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で除去可能な物質である。同様に、ソフト水熱プロセスによる廃培地側の 164. 0346 m/z, 178. 0501 m/z, 195. 1011 m/z, 192. 0657 m/z, 224. 093 m/z, 253. 1077 m/z, 269. 1755 m/z, 279. 1338 m/z, 333. 167 m/z, 331. 1907 m/z のピーク成分についても、きのこの生育に伴って増加しソフト水熱処理で減少する成分物質の群である。（グラフ省略）

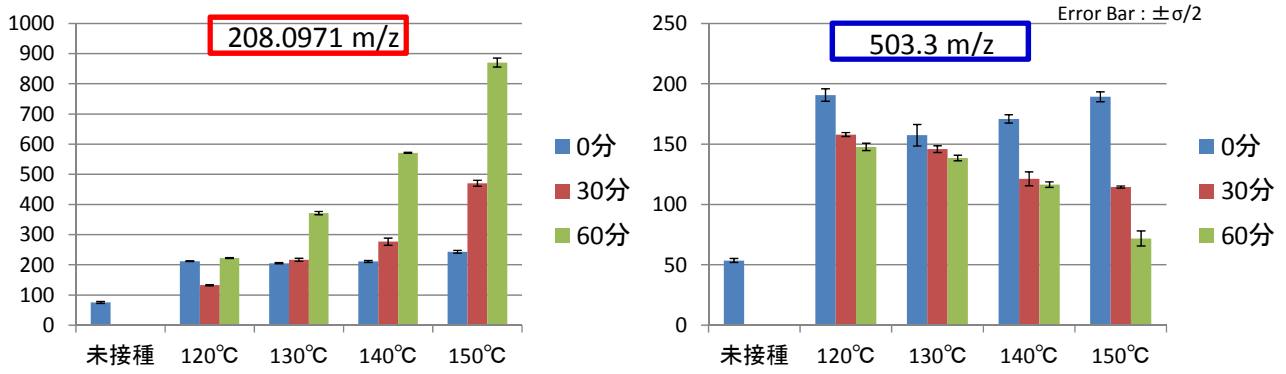


図. 46　208. 0971 m/z, 503. 3 m/z のピーク面積グラフ（きのこ栽培により増加しソフト水熱処理で増加する成分、およびきのこ栽培により増加しソフト水熱処理で減少する成分）(Negative mode)

Soft-hydrothermal processing

2.4.2.3　エノキタケ培地の成分分析　未接種培地と再生培地

同様に、エノキタケの S-plot 両端のピークを解析（Negative mode)の未接種培地と再生培地（ソフト水熱プロセス）との比較を図. 74 に提示する。また、表. 43 にそれぞれのマーカー候補をブナシメジとの共通成分と対照して提示する。

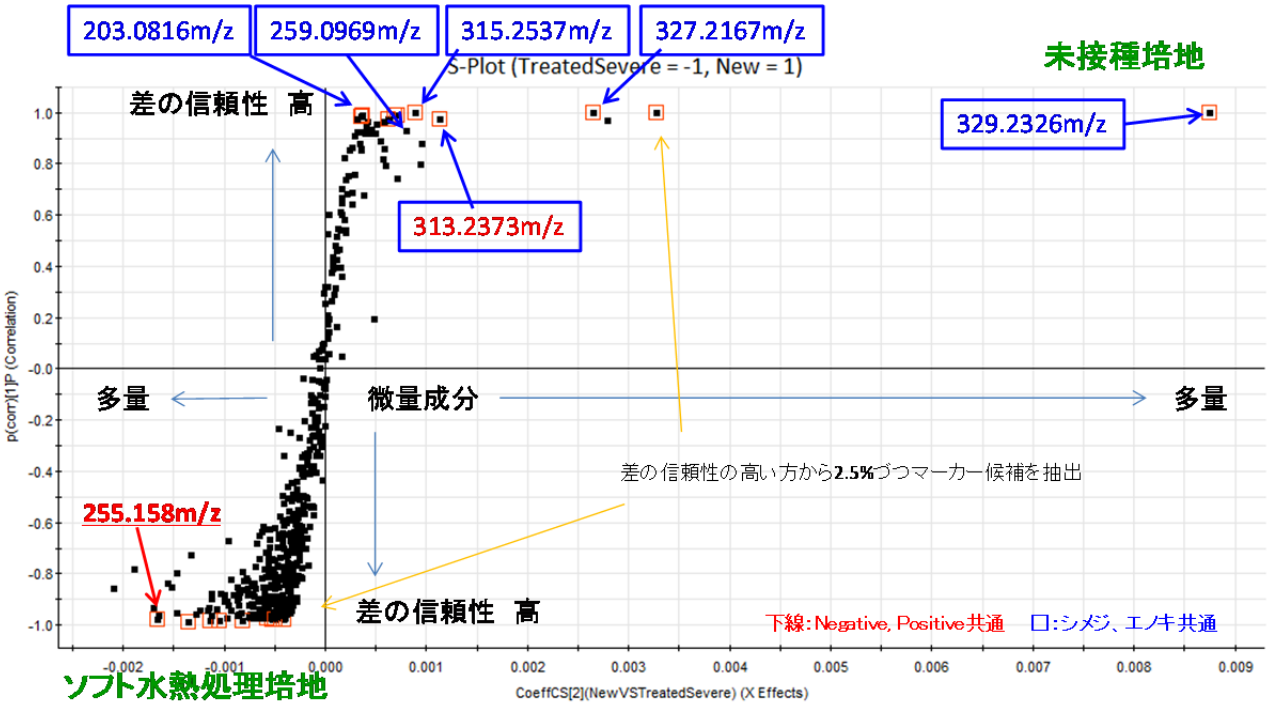


図. 47　S-plot 両端のピークを解析（Negative mode）
-エノキタケ　未接種培地と再生培地（ソフト水熱プロセス）の比較-

表. 43　マーカー候補(Negative mode)-エノキタケ　未接種と再生培地（ソフト水熱プロセス）の比較-

	未接種培地側		再生培地(ソフト水熱プロセス)側	
Selected Peak	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)	Retention Time (min)	Measured MW (m/z)
1	2.4849	153.0183	2.3127	136.0398
2	1.9439	203.0816	3.1214	200.0922
3	2.3986	210.0762	2.4065	209.0461
4	0.7424	222.0408	3.5408	214.108
5	3.2144	259.0969	3.4153	247.1003
6	4.954	313.2373	0.742	247.0394
7	5.2988	315.2537	3.5697	255.158
8	3.7176	327.2167	3.8551	282.1139
9	3.8966	329.2326	4.67	355.2233
10	3.8985	659.4729	赤字:Negative, Positive共通	青:シメジ、エノキ共通

Soft-hydrothermal processing

表. 44 に選択したピーク（ネガティブ、ポジティブ共通(赤字)）の構造検査の結果を提示する。また表. 45 にそのフラグメントパターン解析（313. 2373 m/z、255. 158 m/z）を提示する。

同様に、表. 46 に選択したピーク（ブナシメジ、エノキタケ共通(青字)）の構造検査の結果を提示する。また表. 47 および表. 48 にそのフラグメントパターン解析（203. 0816 m/z、259. 0969 m/z）を提示する。

表. 44　構造検索結果(313. 2373 m/z, 255. 158 m/z)-エノキタケ　ネガティブ、ポジティブ共通-

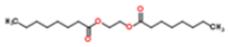
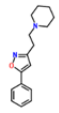
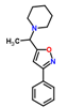
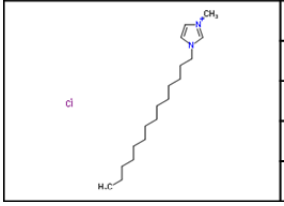
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
6	4.954	313.2373	(1)	C18H34N2Cl (-3.8)	(1)	1,2-Ethanediyl dioctanoate	
			(2)	C16H35N2NaCl (-1.3)	(2)	Dioctylperoxyanhydride	No Result
			(3)	C13H34N4O2Cl (0.3)	(3)	N,N-Dimethyl-2-[2-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-benzimidazol-1-yl]-1-propanamine	
7	3.5697	255.158	(1)	H15N16O (-3.5)	(1)	1-[2-(5-Phenyl-1,2-oxazol-3-yl)ethyl]piperidine	
			(2)	C9H23N2O6 (2.4)	(2)	1-[1-(3-Phenyl-1,2-oxazol-5-yl)ethyl]piperidine	
			(3)	C8H20N6O2Na (3.5)	(3)	N,N-Dimethyl-N'-(2-pyridinyl)-N'-(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine	

表. 45　Fragment Pattern 解析(313. 2373 m/z)-mass difference の小さい組成式 C18H34N2Cl-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
										

なお、Fragment Pattern 解析において、255. 158m/z は 3 組成（(1) H15N16O (-3. 5), (2) C9H23N2O6 (2. 4), (3) C8H20N6O2Na (3. 5)）ともヒットする化学物質の成分構造はなかった。

未接種培地側のブナシメジ、エノキタケ共通の 315. 2537m/z, 327. 2167m/z, および 329. 2326m/z は、前述の「表. 31　マーカー候補(Negative mode)-エノキタケ　未接種培地と廃培地の比較」および表. 35、表. 40、表. 41 と同様である。

表. 46　構造検索結果-エノキタケ　ブナシメジ、エノキタケ共通-

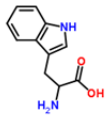
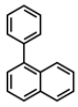
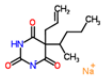
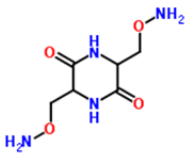
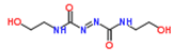
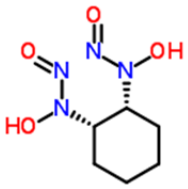
Selected Peak	Retention Time(min)	Measured m/z		Possible Elemental Composition (Mass difference/mDa)		Hit compound searched by measuredmass	Possible structure
2	1.9439	203.0816	(1)	C6H11N4O4 (3.6)	(1)	Tryptophan	
			(2)	C4H11N8S (-1.1)	(2)	1-Phenylnaphthalene	
			(3)	C5H15O8 (4.9)	(3)	2-Phenylnaphthalene	
5	3.2144	259.0969	(1)	C13H16O4Na (2.3)	(1)	Sodium decyl sulfate	
			(2)	C10H15N2O6 (3.9)	(2)	Sodium 5-allyl-2,4,6-trioxo-5-(2-pentanyl)tetrahydro-2H-pyrimidin-1-ide	
			(3)	C11H11N6O2 (2.6)	(3)	1-Benzoyl-1,2-dihydro-2-quinolinecarbonitrile	

表. 47　Fragment Pattern 解析(203.0816 m/z)-mass difference の小さい組成式 C6H11N4O4-

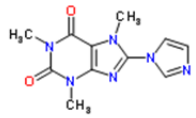
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	204.0842	851	204.0859	1	-1.7	0	2	0	C6H12N4O4	none
	203.0812	5211	203.078	1	3.2	0	1	0	C6H11N4O4	none
	116.0512	717	116.046	1	5.2	2	1	2	C3H6N3O2	C3H5NO2

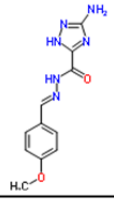
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	204.0842	851	204.0859	1	-1.7	0	2	0	C6H12N4O4	none
	203.0812	5211	203.078	1	3.2	0	1	0	C6H11N4O4	none
	129.056	597	129.0538	1	2.2	2	4	1	C4H7N3O2	C2H4NO2
	116.0512	717	116.046	1	5.2	1	2	0.5	C3H6N3O2	C3H5NO2

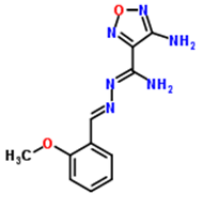
Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	204.0842	851	204.0859	1	-1.7	0	2	0	C6H12N4O4	none
	203.0812	5211	203.078	1	3.2	0	1	0	C6H11N4O4	none

Soft-hydrothermal processing

表.48　Fragment Pattern 解析(259.0969 m/z)-mass difference の小さい組成式 C11H11N6O2-

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	260.1005	1906	260.1022	1	-1.7	0	2	0	C11H12N6O2	none
	259.0963	9531	259.0943	1	2	0	1	0	C11H11N6O2	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	260.1005	1906	260.1022	1	-1.7	0	2	0	C11H12N6O2	none
	259.0963	9531	259.0943	1	2	0	1	0	C11H11N6O2	none

Possible structure	daughter	intensity	mass	rank	mass error	bonds	h	score	formula	formula diff
	260.1005	1906	260.1022	1	-1.7	0	2	0	C11H12N6O2	none
	259.0963	9531	259.0943	1	2	0	1	0	C11H11N6O2	none

ソフト水熱処理により変化した成分を処理強度（温度・時間）により未接種地側で抽出したマーカーについてさらに解析を進めた。また、再生培地側マーカーについても、同様に解析を進めた図.48 参照)。

図.48 の未接種培地側 203.0811 m/z はきのこ栽培で増加、あるいは減少した物質であって、ソフト水熱処理で減少する物質である。未接種培地側の 210.0762 m/z も同様の物質の群である。図.48 の未接種側 259.0969 m/z、および 313.2373 m/z は、きのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で変化しない物質、すなわち、きのこ栽培で消費された物質（栄養素等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない物質の群、およびきのこ栽培で消費された物質であって、ソフト水熱処理で未接種培地と同等といかないまでも再生可能な物質の群である。図.48 のソフト水熱処理培地（再生培地）側の 255.158 m/z のピーク成分はきのこの生育に伴い増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない、あるいは、更に増加する物質である。ほかの再生培地（ソフト水熱プロセス）側の成分である 200.0922 m/z, 209.0461 m/z, 247.1003 m/z, 247.0394 m/z, 282.1139 m/z, 355.2233 m/z もきのこ栽培で増加した物質（老廃物、代謝物等の可能性あり）であって、ソフト水熱処理で変化しない、あるいは、更に増加する物質である。（グラフ省略）これらの成分は、多成分が少量ずつ混在している。これらは実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。

Soft-hydrothermal processing

➢ 未接種培地（通常培地）特有の物質および生培地（ソフト水熱プロセス）特有の物質（255.158 m/z）

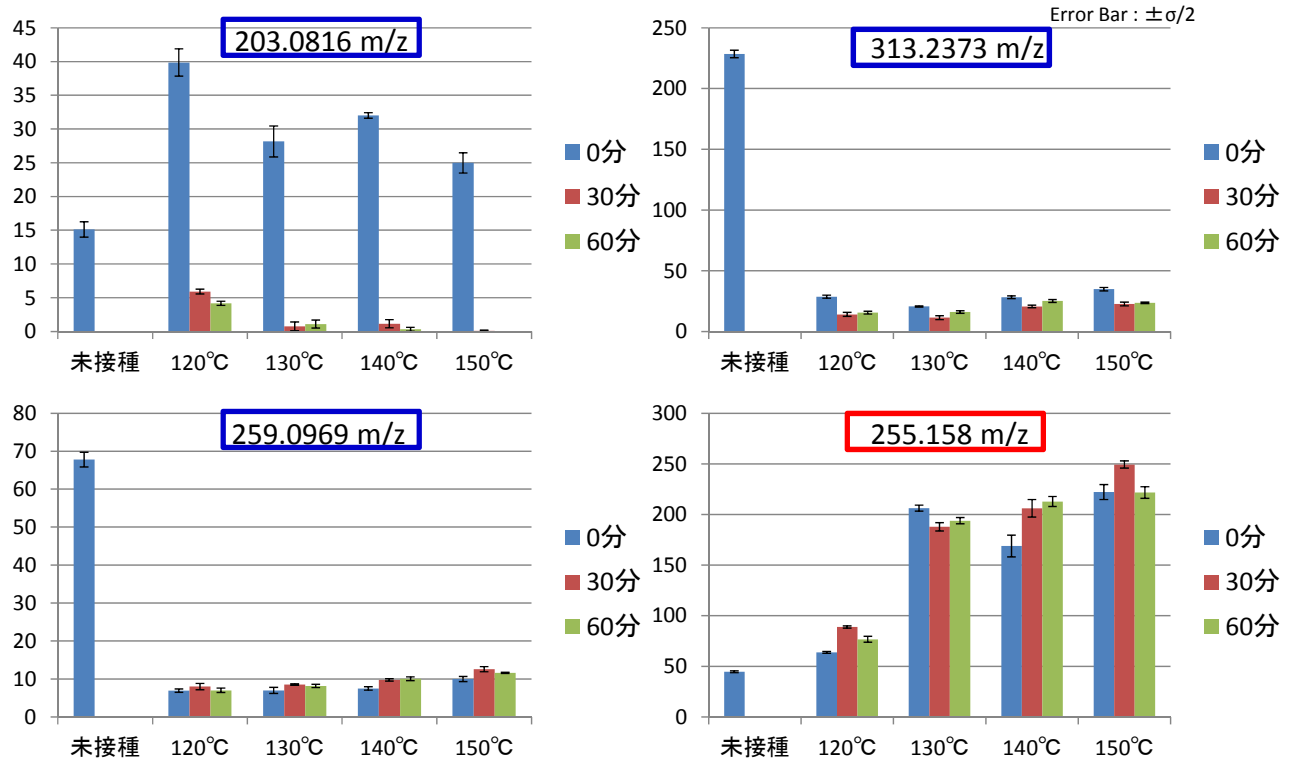


図. 48　203.0811 m/z、259.0969 m/z、313.2373 m/z、255.158 m/z のピーク面積グラフ（Negative mode）

2.4.3　通常培地、廃きのこ培地および再生培地の酵素学的考察

申請者らは、これまで研究例のないソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理の生物由来生育阻害物質不活化の評価を行うため、きのこ類微生物の子実体発生メカニズムの解明、およびきのこ子実体形成時に菌床内で活性化する菌体内メタルプロテーアーゼの性質決定の研究で実績ある近畿大学農学部応用生命化学科白坂憲章准教授のグループと実施し、その研究成果を学術的に取り纏めた。

きのこ子実体形成には酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼ活性の拮抗が非常に深く関わると考えられている、すなわち、子実体形成から成長期に、中性プロテアーゼ活性が活発になると子実体が良好に形成され、酸性プロテアーゼが活発になると子実体形成が阻害されると考えられている。図. 78 から図. 81 にソフト水熱処理によるプロテアーゼ活性の影響を提示する。

通常培地による栽培とソフト水熱処理による再生培地栽培では、ともに子実体形成が良好であり、中性プロテアーゼ活性はそれに伴って活性化された。一方、廃培地による栽培では中性プロテアーゼ活性は通常培地および精製培地の実験区に比べておよそ半分の活性値を示した。これはソフト水熱プロセス処理により中性プロテアーゼの酵素活性を促進する効果があると推察さける。一方で子実体生育を阻害すると考えられている酸性プロテアーゼの活性は、通常培地による栽培、ソフト水熱処理による再生倍による栽培、および廃培地による栽培の 3 つの実験区いずれにおいても大きな活性の変動は見られなかった。もともと、ブナシメジの酸性プロテアーゼの活性は低いため、大きな差が見られなかったと推察される。以上より、ソフト水熱プロセス処理培地で生育させたブナシメジにおける中性プロテアーゼ活性は、通常栽培と同等の活性値を示し、廃培地に比べて 2 倍高い酵素活性値を示した。しかしながら、阻害活性を示すと考えられる酸性プロテアーゼの活性は、通常培地による栽培、ソフト水熱処理による再生倍による栽培、および廃培地による栽培の 3 つの実験区における有意差は確認できなかった。

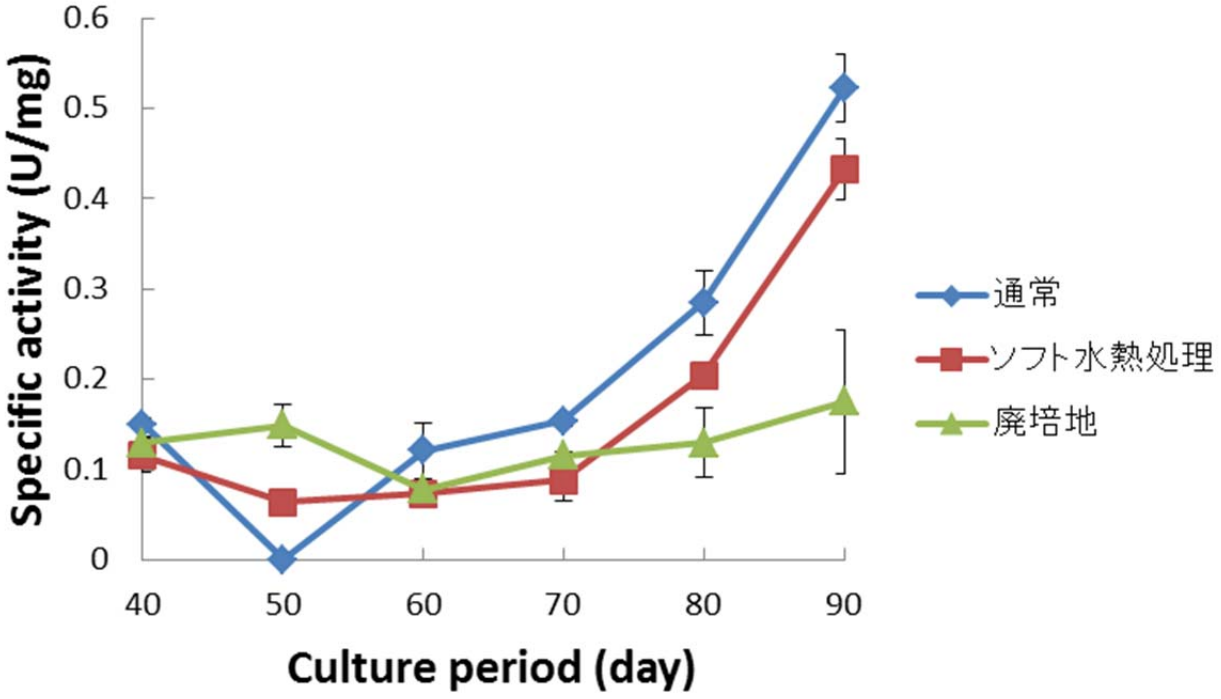


図. 49　菌糸体内中性プロテアーゼ活性

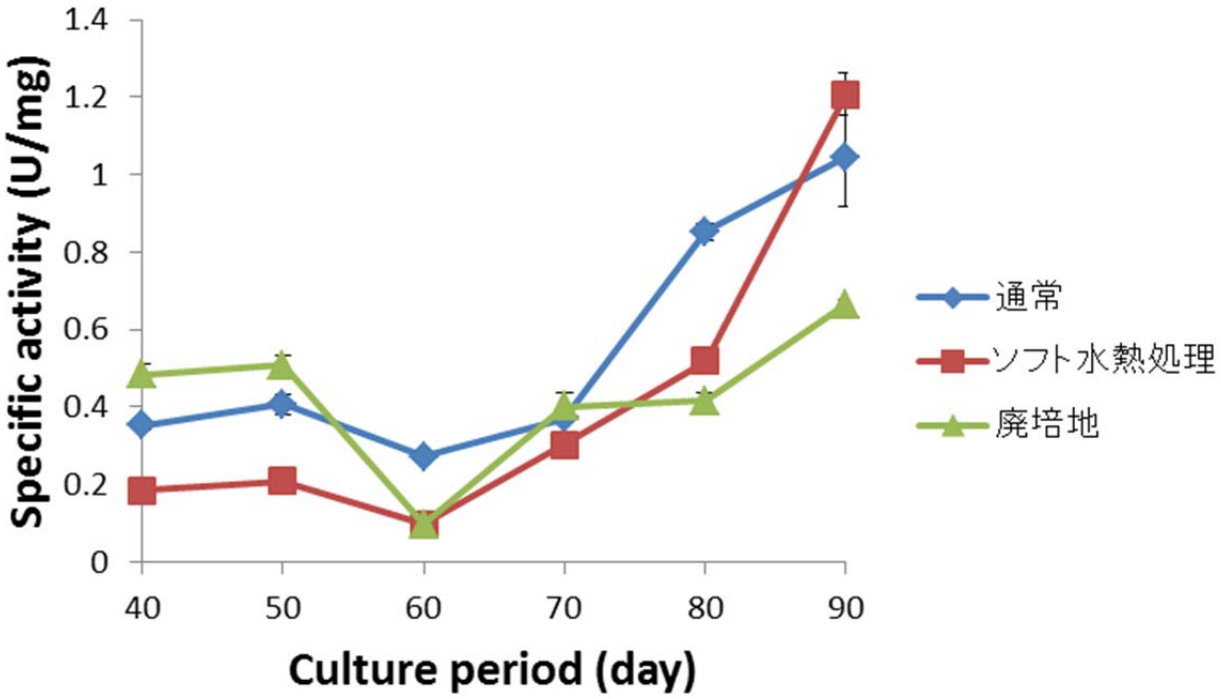


図. 50　菌糸体内中性プロテアーゼ活性

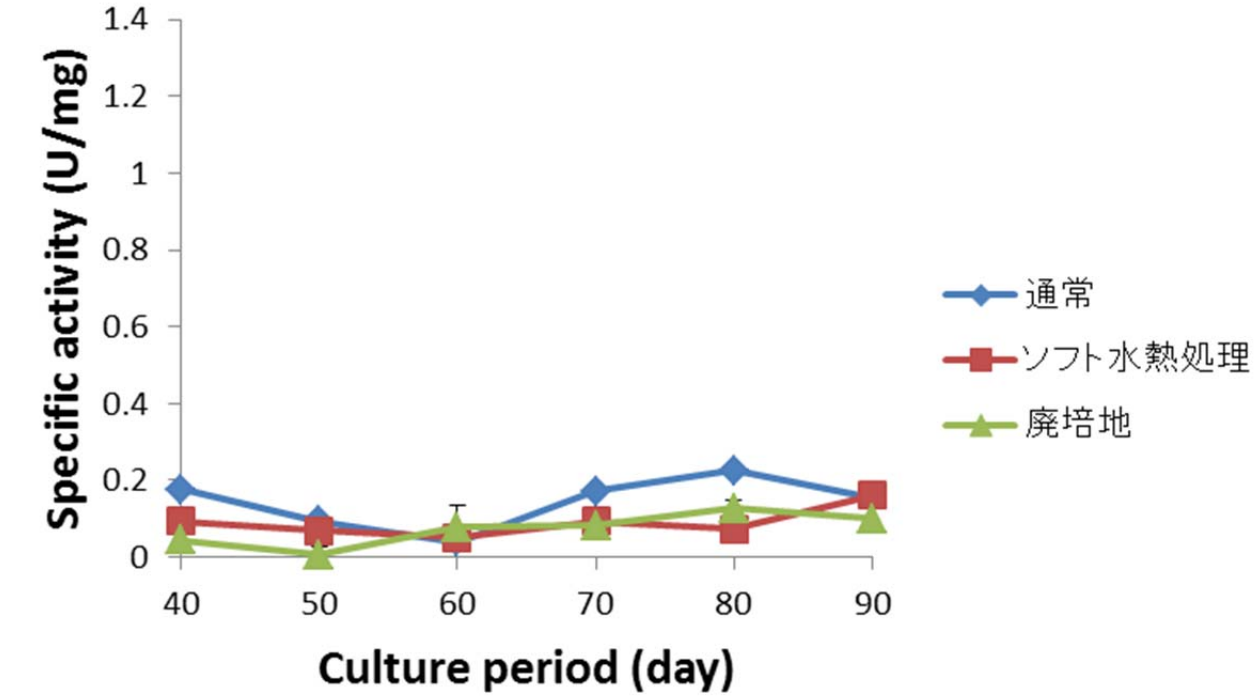


図. 51　菌糸体内酸性プロテアーゼ活性

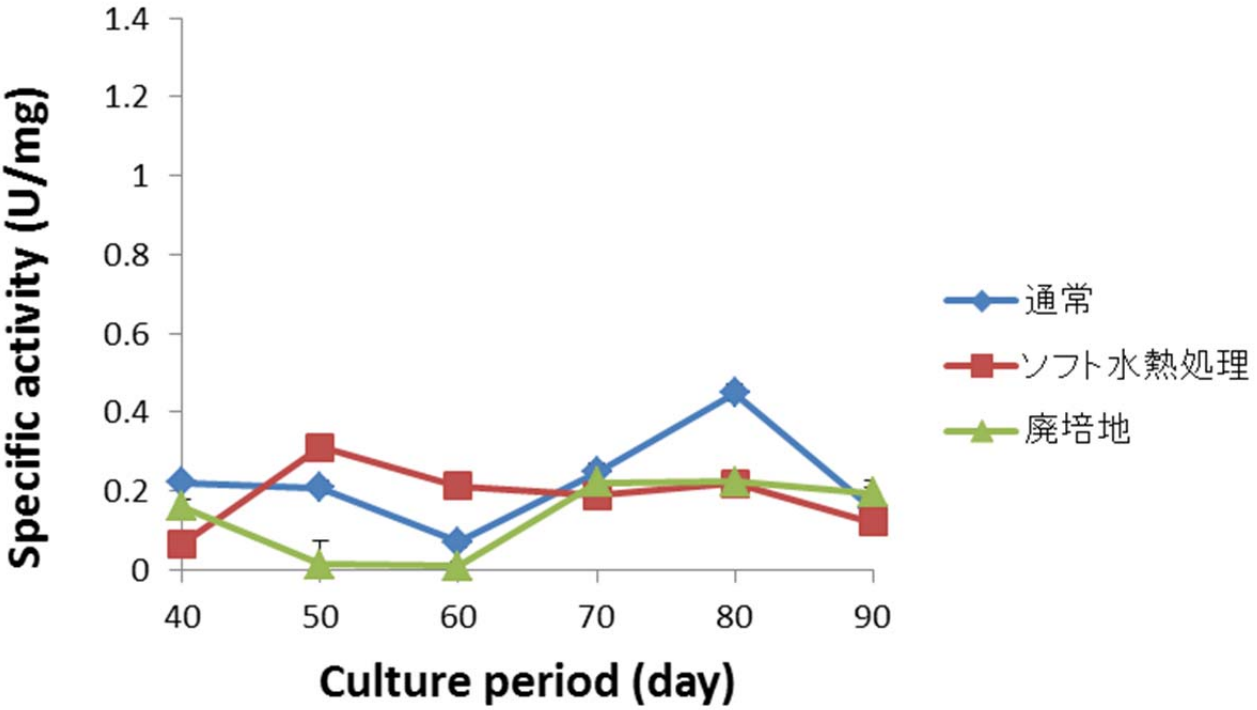


図. 52　菌体外酸性プロテアーゼ活性

Soft-hydrothermal processing

2.4.4　きのこ培地成分の概要と結論

上述のように、ブナシメジ、およびエノキタケの廃培地および条件の異なるソフト水熱プロセスによって処理させた再生培地、未接種培地から得られた温水可溶性画分を LC/MS 分析に供した。 主成分分析とクラスター解析、各サンプルに特徴的なマーカーの S-plot による抽出、定量、分子組成推定、データベース検索、MS フラグメント解析を行い、その結果、次に提示する 5 つのトレンドを持つマーカーをリストアップすることが出来た（上述の各「ピーク面積グラフ」参照)。

I.　きのこ栽培で消費された物質（栄養素、あるいは子実体形成物質）であり、ソフト水熱処理で再生可能な物質の群

―　主に「芳香族モノマー（バニリンやシナピン酸に類縁の化合物）様化合物」であると推定される。本物質は、リグニンに由来する可能性が高い。リグニン由来の芳香族モノマーはきのこ子実体形成のトリガーとして機能すること、バクテリア（雑菌）への抗菌作用を持つことが知られている。主としてメトキシ置換基を持つ芳香族モノマー様化合物は、廃培地のソフト水熱処理強度に依存して増加する低分子成分であると推定された。また、培地中の遊離芳香族化合物群はブナシメジ増殖時に消費されるが、廃培地にソフト水熱処理を施すことによって、残存成分から再遊離させることが可能であることも明らかにした。

II.　きのこ栽培で消費された物質（栄養素、あるいは子実体形成物質）であり、ソフト水熱処理で部分的に再生可能な物質の群

―　「芳香環置換基の少ない芳香族モノマー（クマル酸や安息香酸などに類縁の化合物)」であると推定された。本物質は、栽培前後の量変化も大きいため、再生培地の使用に際し、添加補充することが好ましいと考えられる。 上記を多く含む物質のうち、きのこ培地に使用されるものに「草本系植物（ムギやイネに由来するコメヌカ、ワラ、フスマ等のいわゆる培地添加物)」が挙げられる。これらは添加材として通常培地と同様に再生培地においても適宜添加している。

III.　きのこ栽培で消費された物質であり、ソフト水熱処で変化しない物質の群

―　「脂肪酸様の化合物」であると推定された。本物質は、栽培前後の減少量も大きいため、再生培地の使用に際し、添加補充することが好ましいと考えられる。遊離脂肪酸を多く含む物質のうち、きのこ培地に使用されるものに「コメヌカ、フスマ、ビート、豆皮」等のいわゆる培地添加物が挙げられる。これらは添加材として通常培地と同様に再生培地においても添加している。

IV.　きのこ栽培で増加した物質（老廃物、あるいは代謝物）であり、ソフト水熱処理で除去可能な物質の群

―　多成分が少量ずつ混在している。本分析条件および解析では構造的特徴の共通性を見出すことは困難であったが、実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していること、および別途行った抽出成分の GC/MS の分析結果に基づいて次のように推測される。すなわち、ソフト水熱処理は、汚れた車を洗う洗車、あるいは角質化した皮膚を軽石で除去するように、きのこの生育によりコーンコブやおがくずに付着した汚れや劣化部分をソフト水熱処理により、洗浄（クリーニング）し、除去することにより再生している。

V.　きのこ栽培で増加した物質であり、ソフト水熱処理で変化しないあるいは更に増加する物質の群

―　多成分が少量ずつ混在している。本分析条件および解析では構造的特徴の共通性を見出すことは困難であったため、MS スペクトルデータ（m/z）情報と定量データの提供に留める。これらは

Soft-hydrothermal processing

実際に再生培地で通常の培地と同等、あるいは同等以上の収穫量及び品質を実証していることより、きのこの生育らは関与しないものと推察される。

培地中の遊離芳香族化合物群はブナシメジ増殖時に消費されるが、申請者らは、廃培地にソフト水熱処理を施すことによって、残存成分から再遊離させることが可能であることを明らかにした。今回報告したブナシメジ（おが粉とコーンコブミールが主原料）と並行して、エノキタケ培地（コーンコブミールが主原料）を用いて同試験でも同様の結果を得ている。ソフト水熱処理によって加水分解される結合としてエステル結合等が挙げられる。原料をソフト水熱処理で前処理することにより、図. 23 から図. 29、および図. 37 に示した芳香族モノマー（バニリン、クマル酸、フェルラ酸は同定）が増大しきのこの菌糸より分泌されるリグニン分解酵素の活性を補填することによりきのこの生育成分を増加することが推察される。今回検出された芳香族モノマーの遊離が、同じ反応機構に起因するかは現時点では明らかではないものの、β-O-4 結合を含むリグニンオリゴマーの遊離が同時に促進されている可能性も示唆される。

廃培地の使い廻しは収穫量の低下、品質の低下によりできないとされているが、そのメカニズムは下記の 3 つ観点から研究されているが未だに解明されていない。

(1) 培地に添加した栄養素（コメヌカ、フスマ、マメ皮、コットンハル、ビートなど）のきのこ生育に伴う低下、劣化あるいは変質。

(2) 生物由来のきのこ生育阻害物質

・ ラッカーゼ、ベルオキシターゼ、チアミン分解因子、分解酵素チアミナーゼ、チアミン分解耐熱性因子、プロテアーゼ等。

(3) 木質由来のきのこ生育阻害物質

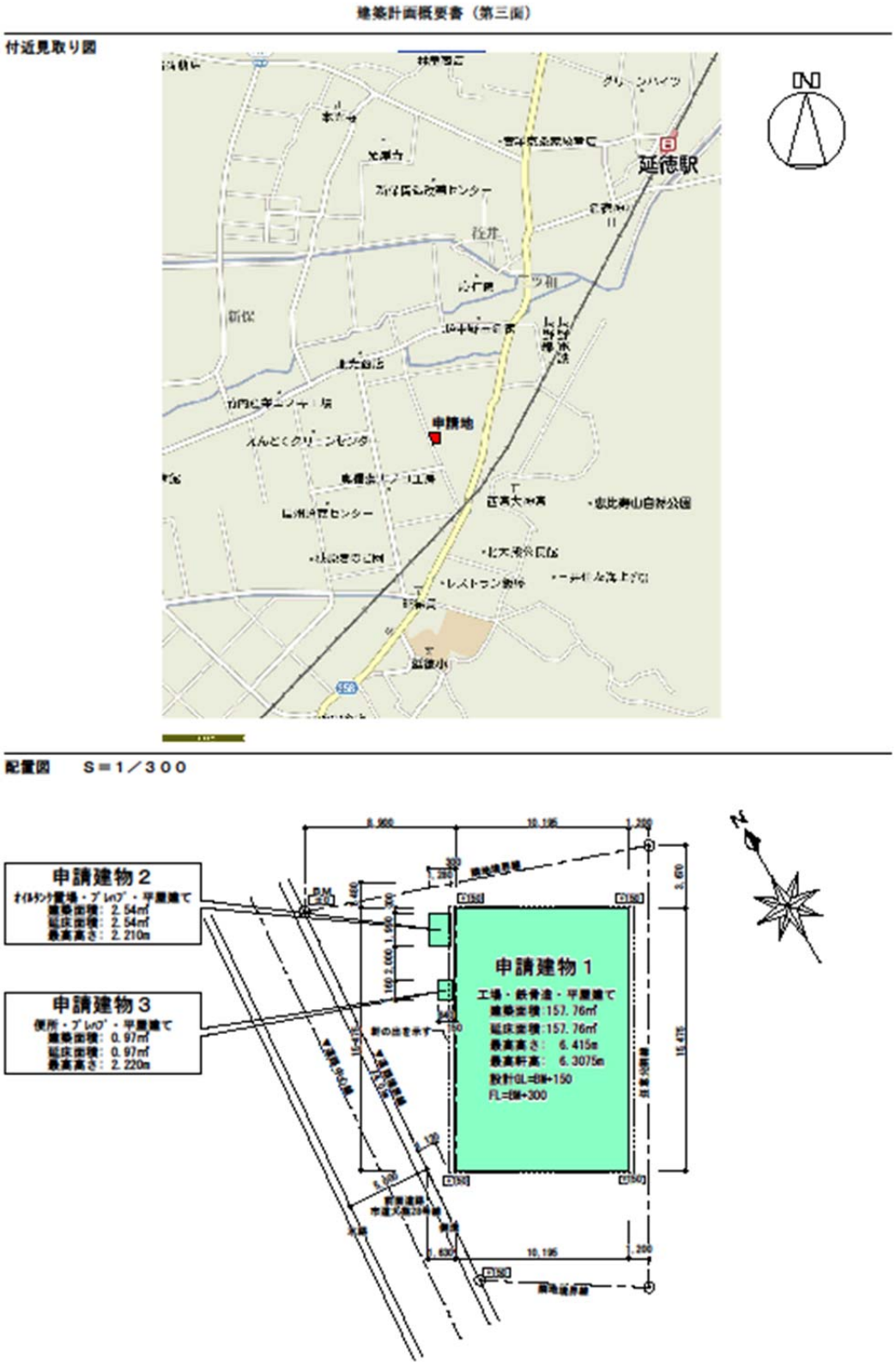
・ (+)-ジュバビオン（セスキテルペン）、モノ・セスキテルペン、ジ・トリテルペン等の木質由来の精油成分。

申請者らは、上記の観点とは別に世界で初めて培地の化学成分分析により再生メカニズムを解明した。すなわち、きのこ生育に必要なリグニン由来のきのこ生育促進物質が廃培地においては欠乏し、もはやきのこ自体が分泌するリグニン分解酵素では生成できなくなることを示唆した。また、その一方で申請者らは 200℃以下では分解しない分子構造の強固な結合のリグニンがソフト水熱プロセスにより、比較的穏やかな分解活性しか持たないきのこの酵素でも分解できる程度にリグニンを部分的に分解し、および未接種培地と同様にきのこのリグニン分解酵素でも分解できるようにすること、およびソフト水熱プロセスによりきのこの生育に伴い発生するきのこ生育阻害物質（老廃物、あるいは代謝物）も抽出除去することにより再生培地として再利用できることを化学的データより明らかにした。

再生メカニズムを要約すると「主成分分析とクラスター解析（図.20、図 40）」に示すように、未接種培地（通常培地）はきのこ生育により化学成分的に全く異なる廃培地となる。そしてその廃培地はソフト水熱処理を施すことによりその処理強度（温度、時間）にしたがって、培地基材（オガコ、コーンコブ）、および草本系植物（ムギやイネに由来するコメヌカ、ワラ、フスマ等のいわゆる培地添加物）のリグニンをきのこ分解酵素でも分解できる程度に穏やかに分解し再生培地として化学成分的に同様の未接種培地（通常培地）に再生成される。その再生培地はソフト水熱処理により生成されない栄養素（コメヌカ、フスマ、マメ皮、コットンハル、ビートなど）を添加することにより未接種培地（通常培地）と同様に菌床栽培のきのこ培地として使用することができるのである。

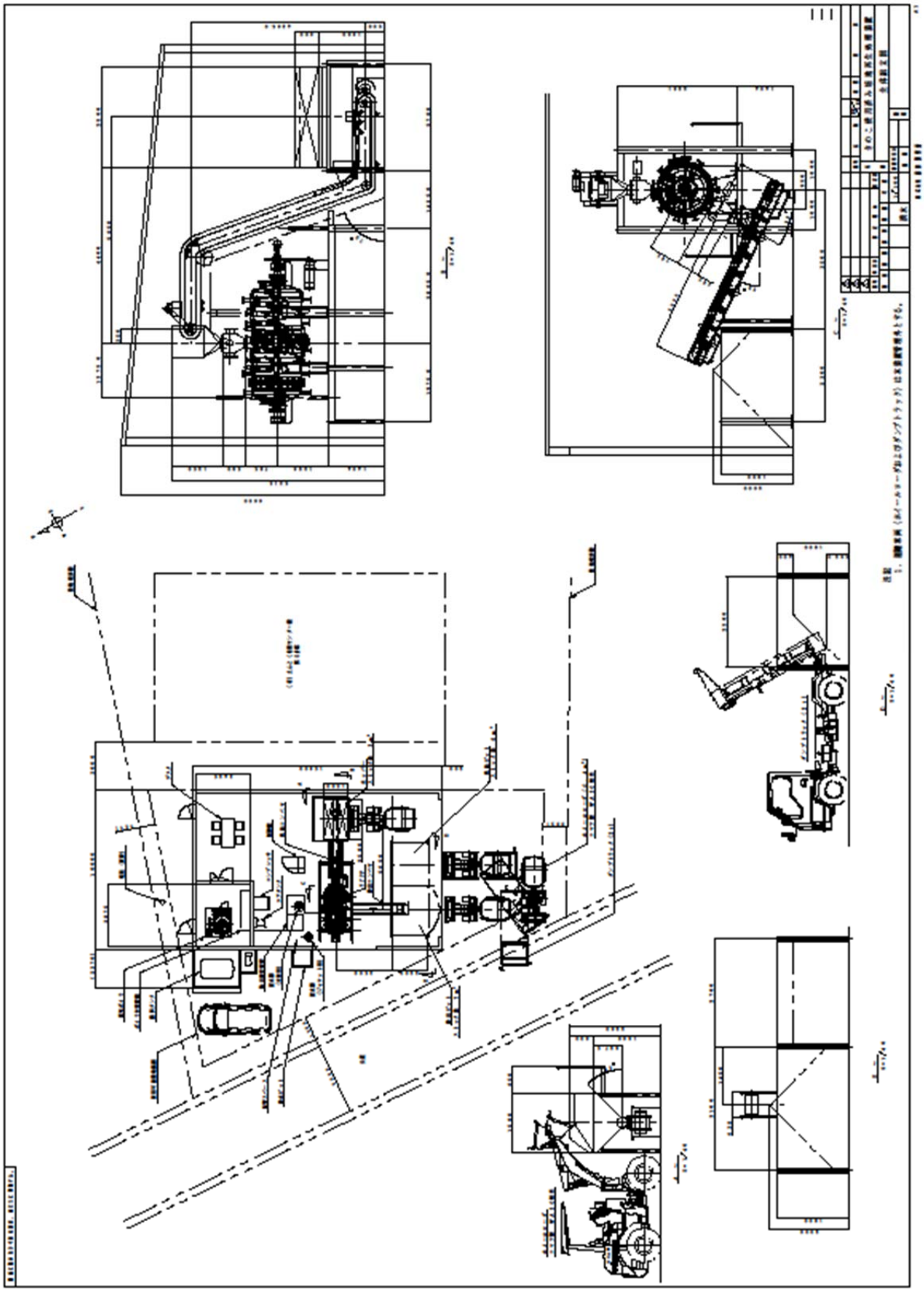
３．実証施設の設置場所等

3.1　位置図

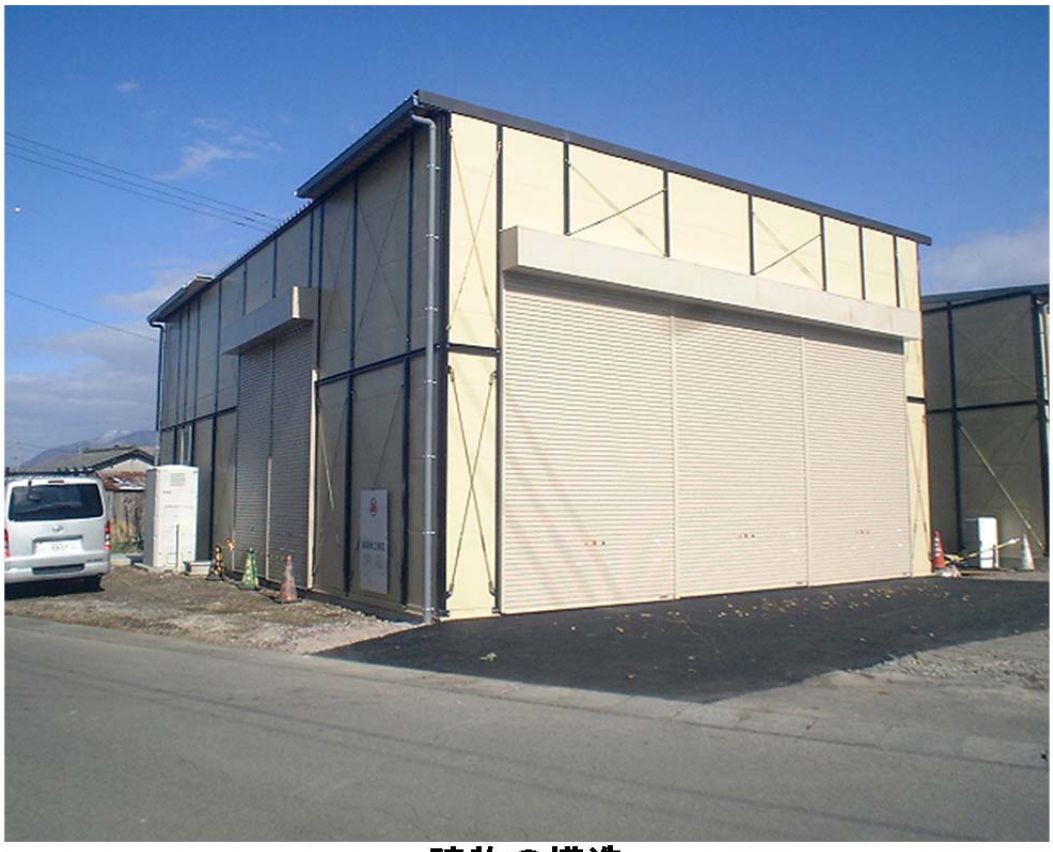


Soft-hydrothermal processing

3.2　全体図



3.3　事業実施装置・建物の構造を明らかにする写真



建物の構造

事業実施装置

Soft-hydrothermal processing

４．開発した技術がもたらす効果

本事業により開発する技術がもたらす効果

- 第１に、現在 66%（中野市バイオマスタウン構想参照）しか堆肥向けに有効利用されていない廃きのこ培地を再生培地として 100%有効利用できることにある。したがって、中野市農協管内だけで数億円とも言われている廃棄処理費用の削減ができる。また焼却、あるいは埋設廃棄に伴う環境負荷を低減できることは勿論である。

  申請者らは LCA（ライフサイクルアセスメント）を基にした環境影響被害算定評価手法である LIME2（意思決定を支援する環境影響評価手法）により環境負荷を統合した評価を実施した。その結果、LIME2 は環境負荷の全影響領域にわたって評価するため、経済指標（円）でまとめた数値で比較すると、ソフト水熱プロセスによる再生培地のほうが環境影響の小さい結果となった。これは、社会資産（資源等の経済損失）に与える影響が大きく関係しており、この項目の中に「農産物」が含まれるためと考えられる。したがって、CO_2 排出量は 16%増えるが、ウォーターフットプリントが 46%と大幅に減ることにより、統合的に評価すると全体として再生処理した培地の方が環境影響の少ない結果となった。

LIME2 による LCA

		通常培地	再生培地	削減率
全領域	円	5.62.E+08	5.24.E+08	7%
人間健康	DALY	1.70E+01	1.59E+01	6%
社会資産	円	2.56E+08	2.38E+08	7%
一次生産	kg	3.22E+05	3.05E+05	5%
生物多様性	EINES	1.53E−06	1.46E−06	5%

「全領域」： 通常培地（現状）が社会全体に支払う環境負荷の金額　562,000,000 円/年間生産量

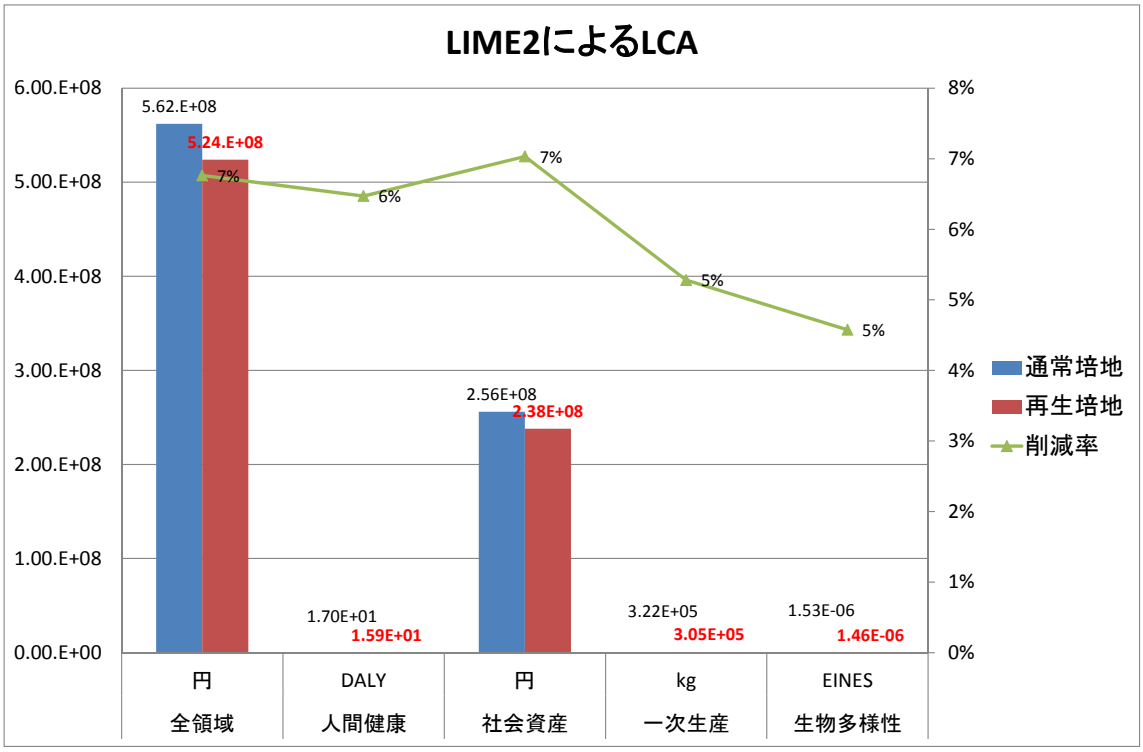


図. 53　LIME2 による通常培地および再生培地の LSA

Soft-hydrothermal processing

- 第 2 に、事業収支試算に示すように、きのこ栽培原価の低減ができる。コーンコブ新材を再生培地に代替率 50%しても 1.26 円/1 本の原価削減ができる。標準的な培養センターで年間 1.26 円/1 本×20,000,000 本=25,200 千円の原価削減となる。この金額は、実用機の初期投資 98,000 千円を 3.9 年で償却できるものである。(当初実施計画書策定時は年間 1.67 円/1 本×19,408,896 本=32,400 千円の原価削減、実用機の初期投資 150,000 千円を数年で回収すると試算していた。)実用機は、標準的な培養センターの廃きのこ培地再生処理能力 10ton/1 日-4 バッチを目指す。また、申請者らはブナシメジの廃培地 1 ton 当たりの再生処理を行わない現状と再生処理の費用対効果も比較した。初期投資を 10 年償却で廃棄処理費用を加味した場合で 8,370 円/ton、27.9%の削減、廃棄処理費用を加味しない場合で 3,836 円/ton、15.7%の削減となり、この場合の削減は 1.69 円/本となり当初の試算とほぼ一致した。

  「2.3　栽培実証により収穫量・品質の立証」のブナシメジ新調合培地（コーンコブ 100%）の導入、および既存培地でのブナシメジの第 3-4 回実証栽培で通常培地より 5-10%収穫量少ない結果となったことより、化学的裏付けに基づいて再生処理条件を 130℃-30 分から 140℃-30 に改善した。その結果、ブナシメジの第 5 回実証栽培で収量・品質とも良好なことを立証した(図. 17、図. 18）が、その処理条件改善に伴うランニングコストについても検証した。図. 83 に示すように 130℃および 140℃の処理条件ではランニングコストに影響しないことが分かった。これはボイラーで発生させる水蒸気のエキストラ-マージンにより、130℃および 140℃の発生水蒸気ではその許容範囲内にあり、燃料消費すなわちランニングコストには影響しないと考えられる。

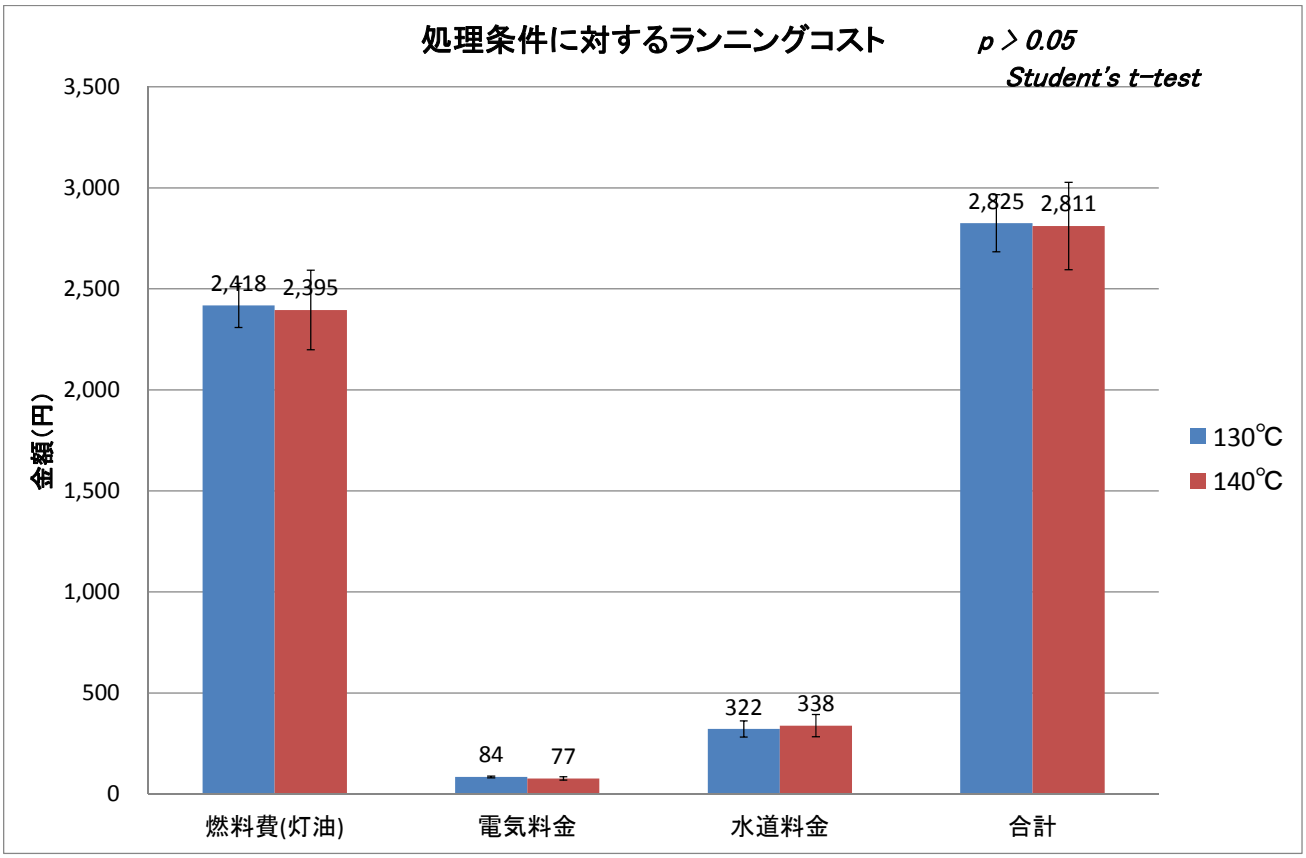


図. 54　130℃および 140℃の処理条件によるランニングコストの比較

コスト削減効果および事業収支の試算

ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理　事業収支検討資料(ブナシメジ)

型式	SHTP-1X	SHTP-2	SHTP-3
寸法	φ1900×4500 l	φ1500×3750 l	φ1200×2900 l
有効容量 (m^3)	12.0	6.0	3.0
処理量(ton/batch) 見掛け比重0.3	2.52	1.26	0.63
処理量 (ton/1day/4batch)	10.0	5.0	2.0
処理量 (ton/1年/26日*9月)	2,340	1,170	468
主要機器価格 (千円)	**98,000**	**81,600**	**64,050**
土木建築附帯工事費 (千円)	(60,000)	(40,000)	(20,000)
初期投資 (千円)	(158,000)	(121,600)	(84,050)
ランニングコスト (千円/ton)	3.15	4.16	6.0
再生培地含水率 (%)	60.0	60.0	60.0
コーンコブ/オガコ削減費用 (乾物)(千円/ton)	34.9	34.9	34.9
1本当たり再生培地使用量 (50%代替)(g)	84.0	84.0	84.0
再生培地使用本数 (本/年)	20,000,000	10,000,000	4,000,000
削減培地購入費 (千円/年)	**25,291**	**11,467**	**3,725**
投資回収 (年)	**3.9**	**7.1**	**17.2**
投資回収(土木建築含む) (年)	**6.2**	**10.6**	**22.6**
年間生産量 (ton/年)	3,200	1,600	640
1本当たり削減金額 (円)	1.26	1.15	0.93

※　処理量　2.0、および5.0 ton/1day/4batchの主要機器価格は環境省補助金のプロトタイプ試算金額にて実証実験用・データ検出記録用附帯機器を包含したものです。

1tonのブナシメジ廃培地の再生処理による費用削減効果（廃培地処理運搬廃棄処理費用不含）

1.0ton

【各種単価計算】

培地原料単価　　単位：円/ton

原料種類	乾燥単価	湿重単価
オガコ	27,180	9,060
コーンコブ	40,000	
培地添加材	40,000	

各原料の水分は66.7%として湿重単価計算

廃培地運搬廃棄処理費

単価 円/ton
0

再生培地単価　　単位：円/ton

装置の減価償却	4,274	年間処理量 2,340(ton/1年-26日*9月)
電気代	171	kWh
燃料費	5,322	灯油 ℓ
水	751	上下水道代 ㎥
その他費用	0	人件費建物土地
計	10,518	

【現状（再生使用なし：シナリオ1）】

水分調整後の培地1tonの価格

原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	50.3%	4,557
コーンコブ	12.7%	5,080
培地添加材	37.0%	14,800
計	100.0%	24,437

廃培地 4.67t

廃棄量(t)	処理費(円)
0.467	0

培地に掛かる経費(円)

合計
24,437

【再生培地活用（シナリオ2）】

水分調整後の培地1tonの価格

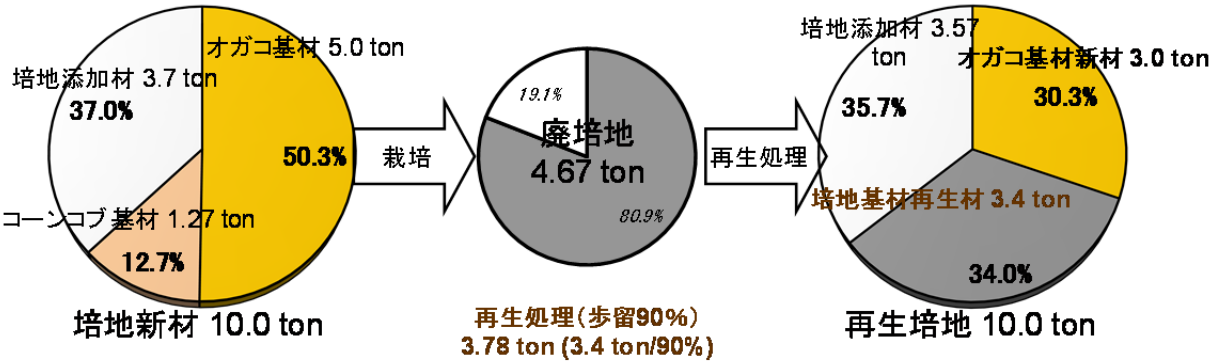
原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	30.3%	2,745
再生培地	34.0%	3,576
培地添加材	35.7%	14,280
計	100.0%	20,601

廃培地 4.67t

廃棄量(t)	割合	処理費(円)	合計
0.089	19.1%	0	20,601
再生処理へ			
0.378	80.9%	0	
計 0.467	100.0%	0	

廃培地削減量(ton)
0.38
80.9%
コスト削減
3,836
15.7%

1本当たり削減金額 1.69円



廃培地と再生培地の数量関係

1tonのブナシメジ廃培地の再生処理による費用削減効果（廃培地処理運搬廃棄処理費用含入）

1.0ton

【各種単価計算】

培地原料単価　　単位：円/ton

原料種類	乾燥単価	湿重単価
オガコ	27,180	9,060
コーンコブ	40,000	
培地添加材	40,000	

各原料の水分は66.7%として湿重単価計算

廃培地運搬廃棄処理費

単価 円/ton
12,000

再生培地単価　　単位：円/ton

装置の減価償却	4,274	年間処理量 2,340(ton/1年−26日*9月)
電気代	171	kWh
燃料費	5,322	灯油 ℓ
水	751	上下水道代 ㎥
その他費用	0	人件費建物土地
計	10,518	

【現状（再生使用なし：シナリオ1）】

水分調整後の培地1tonの価格

原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	50.3%	4,557
コーンコブ	12.7%	5,080
培地添加材	37.0%	14,800
計	100.0%	24,437

廃培地 4.67t

廃棄量(t)	処理費(円)
0.467	5,604

培地に掛かる経費(円)

合計
30,041

【再生培地活用（シナリオ2）】

水分調整後の培地1tonの価格

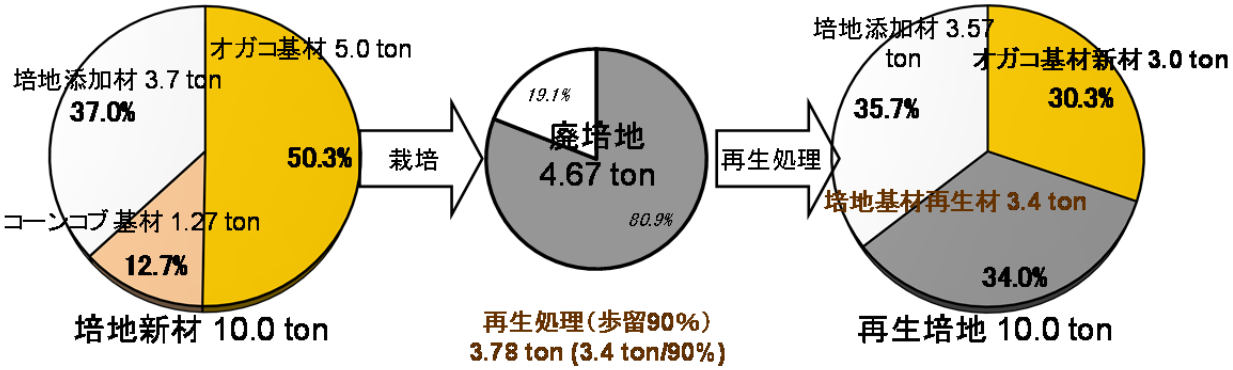
原料種類	割合	価格(円)
オガコ新材	30.3%	2,745
再生培地	34.0%	3,576
培地添加材	35.7%	14,280
計	100.0%	20,601

廃培地 4.67t

	廃棄量(t)	割合	処理費(円)	合計
	0.089	19.1%	1,070	21,671
再生処理へ				
	0.378	80.9%	0	
計	0.467	100.0%	1,070	

廃培地削減量(ton)
0.38
80.9%
コスト削減
8,370
27.9%

1本当たり削減金額 3.68円



再生処理（歩留90%）
3.78 ton (3.4 ton/90%)
廃培地排出量に対する再生材処理重量：80.9%

廃培地と再生培地の数量関係

Soft-hydrothermal processing

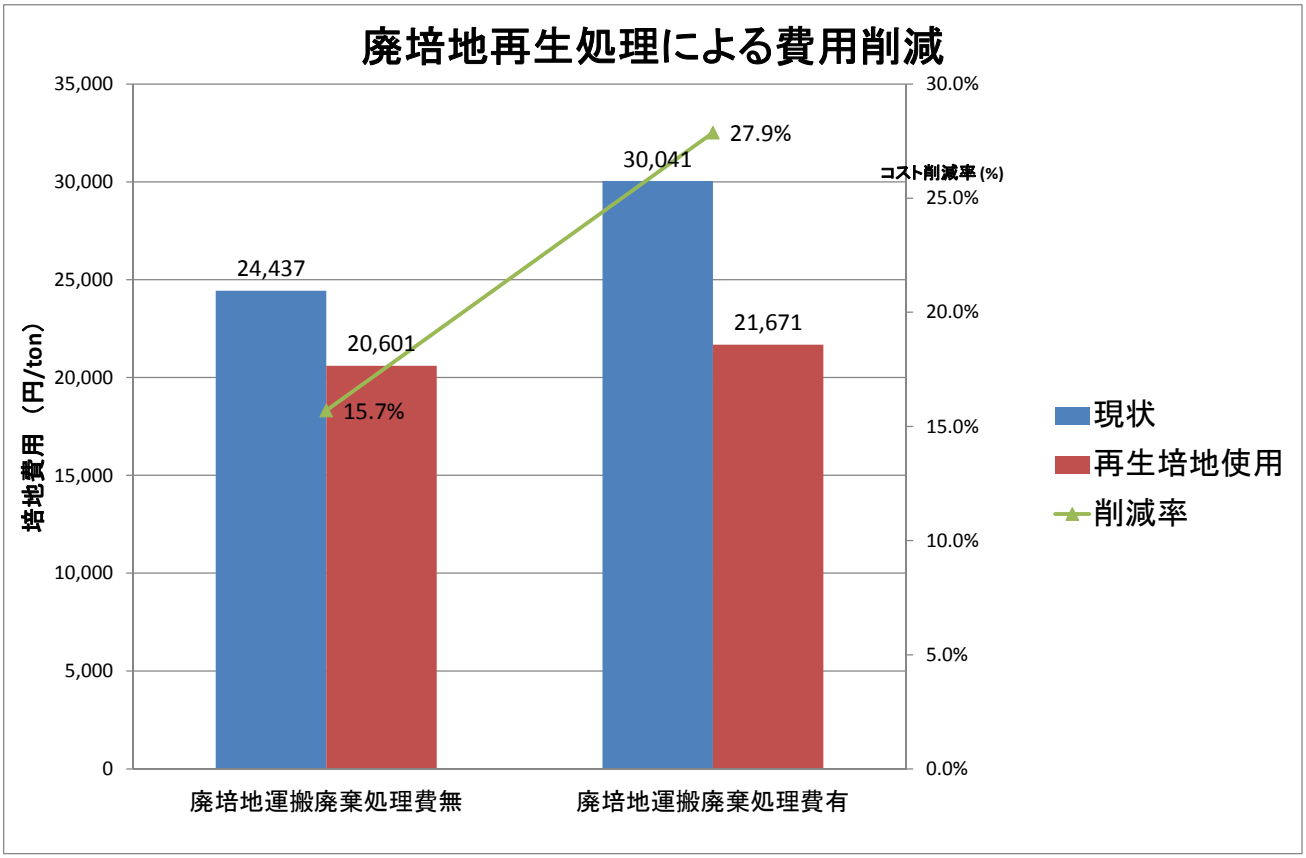


図. 55　廃培地の再生処理による費用削減効果

同様に、次の事項も本事業により開発する技術がもたらす効果として挙げられる。

- 第 3 に、再生改質処理培地による培地自体の均質化と品質向上が期待できる。廃きのこ培地再生処理により、きのこの品質、および収穫量の向上、さらにはきのこ生産における再生培地によりきのこ培養生育期間の短縮も期待できる。
- 第 4 に、現在きのこ培地基材の主流であるコーンコブに代わって、国内産のオガコ（特にネカシの手間のかかる針葉樹）から木質由来のきのこ阻害物質（テルペン類、フェノール等精油成分）を除去改質して、オガコきのこ培地として有効活用できることである。
- 第 5 に、ソフト水熱プロセス処理した再生培地は家畜（特に反芻動物）の飼料としても利用することができ、輸入飼料高騰のために困窮する畜産農家の経営を支援できる。

Soft-hydrothermal processing

５．まとめ

これらの実証実験によりソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の平成 27 年度内の実用化、およびモデル機導入に向け、逐次中野市農協、およびきのこ生産業者と協議している。

申請者らは廃きのこ培地再生処理装置プロトタイプの機械性能を機構的に、および物理的・化学的に確認するために、性能評価、実用機製造原価低減、製造工程短縮、化学的反応特性の再現性・信頼性・普遍性およびランニングコスト、保守管理と廃きのこ培地再生処理事業収支の検証を行ってきた。そして本補助金事業のソフト水熱プロセスによる実用規模の廃きのこ再生処理装置により申請者らは世界で初めてきのこの実証栽培に成功し、平成 26 年度より実用機の受注販売を開始した。

事業化に向けての具体的展開として、中野市農協管内の有力きのこ生産業者の平成 25 年度ブナシメジ培養工場新設（第２工場 5,000 ton/年）および平成 26 年度ブナシメジ培養工場新設（第３工場 5,000 ton/年）に伴い、増大する廃培地の早期有効利活用を目的に、廃きのこ培地再生処理　30 ton(5 バッチ/日）を計画し、中野市農協、および当該事業者に「仕様書、計画図、見積書」を提出した。

中野市農協においてはエノキタケの生産量 70,000 ton/年に加え、2015 年度にはかねてからの念願であったブナシメジ20,000 ton/年構想を達成した。したがってその 1.5 倍から２倍の廃培地が排出される。一般的には排出者責任にて、きのこ生産者の責任で廃培地の処理を行うが、中野市農協管内は廃きのこ培地の処理は中野市農協の責任で行っている。中野市農協はその営農方針「持続可能な循環型農業」を目指している。申請者らの廃きのこ培地再生処理はこの理念に適っていることより早期導入が期待されている。

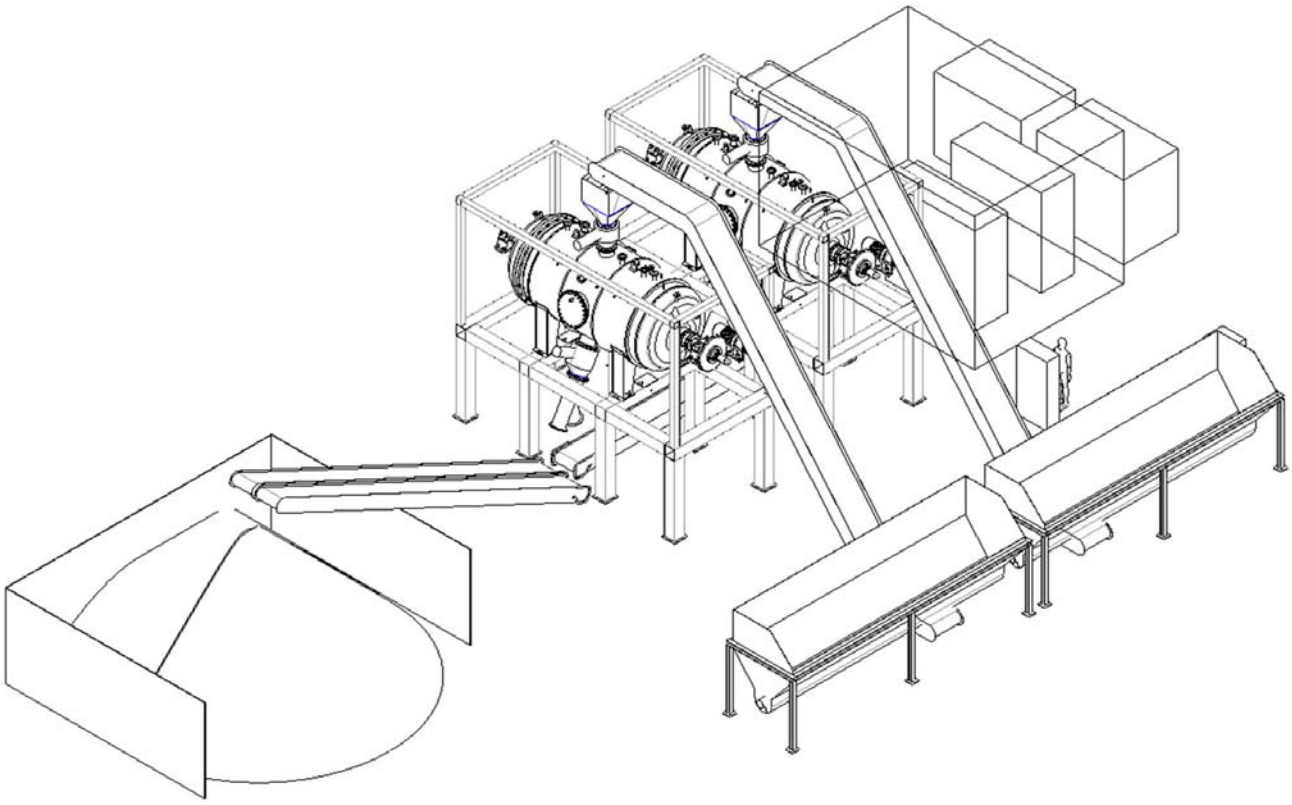


図. 56　30ton/day　実用機のイラスト

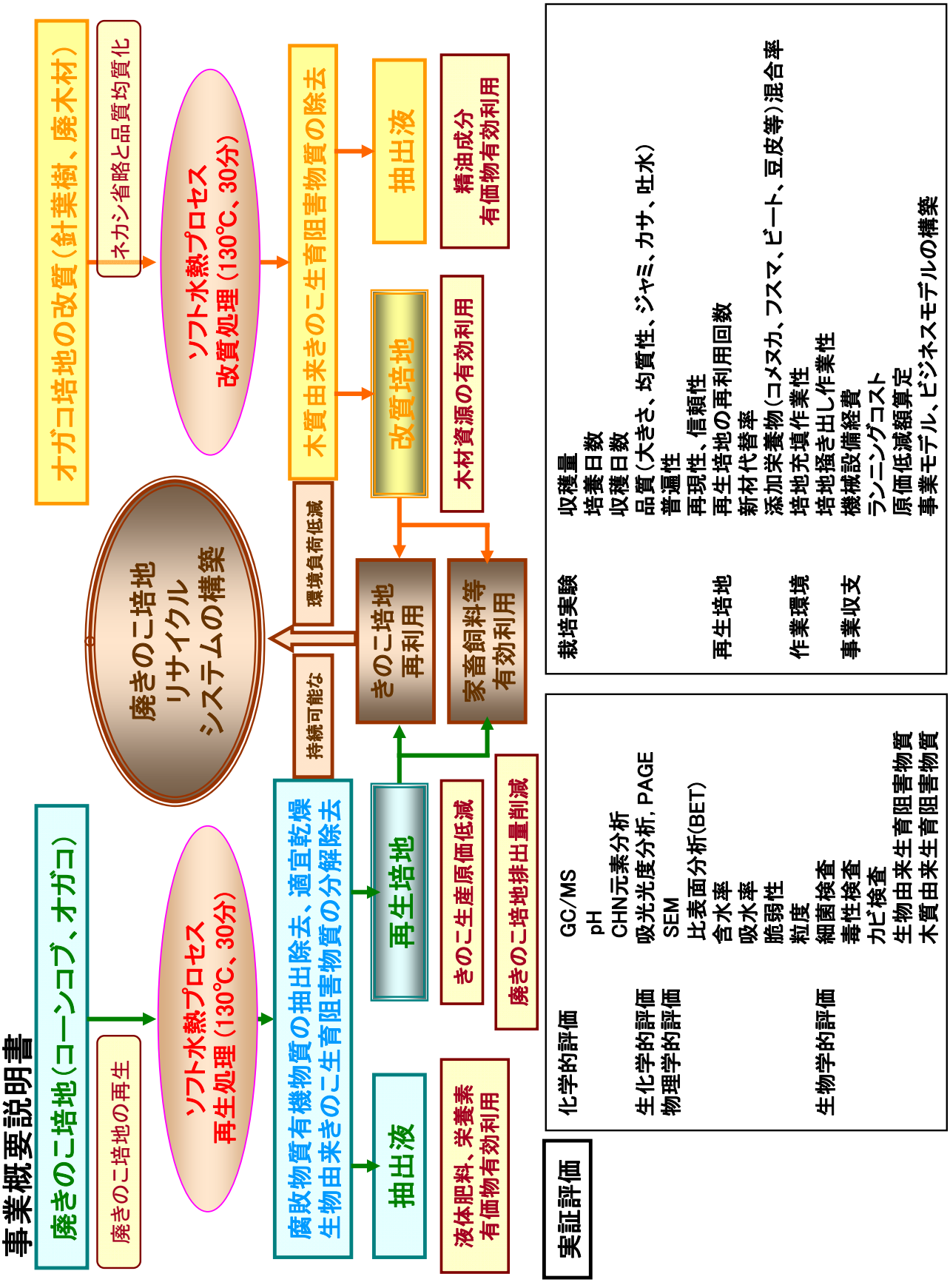
さらに、申請者らは、「廃きのこ培地再生処理技術」により、日本一の菌床栽培のきのこ生産地である長野県中野市で社会問題化している廃きのこ培地の問題解決策として中野市が中心となり H26 年度より予算化された中野市地域バイオマス産業都市策定業務に貢献し、平成 27 年度の「中野市バイオマス産業都市構想」申請に向けその策定委員として、ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術を盛り込んだ「中野市バイオマス産業都市構想」の策定に寄与してきた。

また、申請者らは隣接する長野市においても「長野市バイオマスタウン構想推進協議会」の協議会委員としてバイオマス産業都市推進業務技術提案書を提出し、平成 27 年度の「地域バイオマス産業化推進事業」補助金バイオマス産業都市構想作成のための構想策定支援申請、および平成 28 年度の「長野市バイオマス産業都市構想」申請に向けその策定に関与している。

以上のように申請者らは、廃きのこ培地をソフト水熱プロセスで処理することにより、廃培地中の有害物質の抽出・除去を行い、滅菌・きのこ生育阻害酵素を不活化し、同時に、菌株の構成物質となるリグニンを適宜分解し、および廃きのこ培地を適宜乾燥させ、きのこ培地として再生する「廃棄物「ゼロ」の循環型きのこ栽培システム」が構築できること、さらにオガコの改質による森林資源の利活用を示唆した。すなわち, ソフト水熱プロセスは廃きのこ培地を改質および再生できるこれまでにはない理想的なシステムといえる。

Soft-hydrothermal processing

６．事業概要図



Soft-hydrothermal processing

７．英文概要

Subject: Use of Soft-Hydrothermal Processing to improve and Recycle Waste Mushroom Substrate for Sawdust and/or Corn-Cob Substrate Cultivation Media. (Project No. 3J123002)

Representing Research Fellow: Toru Miyamoto, Ph.D, belonging to Maeda Seisakusho Co. Ltd.

Abstract: Recently a lifestyle of fitness is becoming more important in Japan, consequently mushroom production has increased substantially. Therefore, district in which large quantities of mushroom are produced and consumed, such as Nakano city and north region of Nagano prefecture, substantial amount of used and waste culture medium of edible mushroom are recognized as social problem. *Hypsizygus marmoreus* (peck) bigelow (Tricholomataceae) is a mushroom that is cultivated and commercially available in throughout Japan as well as *Lentinula edodes* and *Flammulina velutypes*. Commercial strains and various culture techniques for high productivity have been developed, for example the contents of the medium, temperature of cultivation, and selection of strains, but there no effective methods and useful techniques have been developed for recycling and utilizing the used (spent) culture medium of edible mushroom. As a result, the used (spent) culture medium is disposed as an organic waste without any effective use and application (e.g. utilization, reuse, recycle, etc).

We have developed a groundbreaking method to effectively regenerate used waste culture medium of edible mushroom by means of the soft-hydrothermal processing, which can control the steam saturation ratio. The steam saturation ratio was calculated as follows:

Steam saturation ratio (%) = {Steam density (kg/m^3) / Saturated steam density (kg/m^3)} × 100.

The success of this process lies in the high steam saturation ratio area of the liquid phase of water and is characterized by a higher ionic product (kw) than that of ordinary water. The ionic product is a key parameter to promote ionic reactions and can be related to hydrolysis. The ionic product of water is 1.0×10^{-14} $(mol/l)^2$ at room temperature and increases with increasing temperature and pressure. A high ionic product favors the solubility of highly polar and ionic compounds, which creates the possibility of accelerating the hydrolysis reactions of organic compounds.

We have demonstrated that the culture process of *hypsizygus marmoreus* has been to be adequately mycelial growth and maturation, and a high yield of fruit-bodies and appreciate quality of fruit-bodies have been achieved.

And we have suggested the mechanism of regeneration of the waste culture medium. The waste culture media of the edible mushroom are the plausible candidates as raw materials containing partially degraded lignin. Recently, we succeeded the microbial production of the aromatic monomer of phenyl-propane structure from the waste culture media of the edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. The yield was elevated after the pretreatment by the soft-hydrothermal processing of the starting raw materials. In this study, we traced the water/acetonitrile-soluble low-molecular weight compounds during the pretreatment using the LCMS analysis. Multivariate statistical analysis revealed the behavior of aromatic monomers which were consumed along with the growth of *H. marmoreus* and regenerated by the soft-hydrothermal processing. The LCMS analysis coupled with the chemometrics procedures was a robust tool to summarize and visualize the complex components of the bio-resources. We believe the hydro-thermal processing contribute “the sustainable sound material-cycle Society”.

Key words; Corn-cob based Cultivation, Improving and Recycling, Soft-hydrothermal Processing, Sawdust Substrate Cultivation, Waste Culture Medium of Edible Mushroom.

Soft-hydrothermal processing

８．「国民との科学・技術対話」の実施

1)　平成 27 年 2 月 23 日に長野県工業技術総合センターと共同で長野県庁においてプレス発表を行い多くのマスメディアに掲載され広く国民に向けて発表した。

平成 27 年(2015 年)2 月 16 日

持続可能な循環型農業に貢献できる「使用済みきのこ培地再生処理装置」について発表します

株式会社 前田製作所が、持続可能な循環型農業に貢献できる「使用済みきのこ培地再生処理装置」について発表します。

１　日　時　　平成２７年　２月２３日（月）　午後１時３０分から

２　会　場　　長野県庁３階会見場（長野市大字南長野字幅下 692-2）

３　内　容　　（詳細については別添の資料もご覧ください）

長野県は菌床栽培* によるきのこの日本一の生産県です。近年の消費者の健康志向とともに、きのこの認知度はさらに高くなってきています。一方、きのこ経営においては、販売価格の低迷、燃料、資材の高騰により、厳しさが増しており、コスト削減が課題となっています。当社は環境省の支援を受け、これらの課題を使用済みきのこ培地の再生利用技術に求め、中野市農業協同組合と共同で研究開発を行い、実証機を設置して有効性を確認しているところです。また、この使用済みきのこ培地の再生メカニズムについては、県工業技術総合センターの分析により明らかにしました。本技術は「持続可能な循環型農業」に貢献できる技術と考えます。

会見では「使用済みきのこ培地」、「再生培地」を実際に展示し、開発の経過や本技術の特徴を説明します。

*菌床栽培：きのこを生育、成長させるための栄養源を含む粉状の固形分(培地)を用いた人工的な栽培法のこと

使用済みきのこ培地再生処理装置
（実証機）

４　説明者

株式会社 前田製作所	代表取締役社長	塩入　正章
株式会社 前田製作所	新規事業部　部長	宮本　徹
長野県工業技術総合センター	材料技術部門　部長	工藤　誠一
長野県工業技術総合センター	材料技術部門　主任研究員	藤沢　健

５　問合せ先

〒388-8522　長野市篠ノ井御幣川 10959
TEL：026-292-2220　FAX：026-293-5590
E-mail：tooru_miyamoto@dbmed.komatsu.co.jp
担当　新規事業部部長　　宮本　徹

MAEDA

Soft-hydrothermal processing

９．研究発表、論文発表、学会発表、マスメディア報道

➢ 論文発表および学会発表

○ 2014 年度

1. 宮本　徹、大田ゆかり、秦田勇二、黒澤佳奈子、市村昌紀、篠田清嗣、ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理メカニズムの解明、日本きのこ学会 25 周年記念大会　講演要旨集、72-72、2014.

2. 大田ゆかり、宮本徹、黒澤佳奈子、坪内泰志、佐藤玲央奈、秦田勇二、ソフト水熱プロセスによるきのこ廃培地中の水／アセトニトリル可溶性低分子の挙動、日本木材学会，紙パルプ技術協会，高分子学会，繊維学会，日本化学会，日本農芸化学会共催第 59 回リグニン討論会、109、2014.

3. 黒澤佳奈子，大田ゆかり，長谷川良一，飯田加賀美，丸山　正，秦田勇二，笠井憲雪，宮本　徹、深海由来 Novosphingobium 属細菌を用いたバイオマスからの芳香族モノマー生産、第 64 回日本木材学会大会（松山）研究発表要旨集、L13-P-08、2014.

○ 2013 年度

4. 宮本　徹、笠井憲雪、市村昌紀、篠田清嗣、土屋洋介、ソソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の開発、日本きのこ学第 17 回大会　講演要旨集、49、2013.

○ 2012 年度

5. 宮本　徹、笠井憲雪、市村昌紀、篠田清嗣、ソソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理技術の開発、日本きのこ学第 16 回大会　講演要旨集、73、2012.

➢ 研究発表

○ 2013 年度

1. イノベーション・ジャパン 2014 - 大学見本市（東京ビッグサイト　2014 年 9/11-12）出展「ソフト水熱プロセスによる使用済みきのこ培地再生処理装置開発」.宮本　徹.

○ 2013 年度

2. イノベーション・ジャパン 2013 - 大学見本市（東京ビッグサイト　2013 年 8/29-30）出展「ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理に関する新技術」.宮本　徹.

3. 最先端・次世代研究開発支援プログラム ; NEXT 研究紹介、「極限環境に適応した深海微生物生存戦略のグリーンバイオケミストリーへの展開」、大田ゆかり、宮本　徹 他、ベルサール新宿グランド 2014 年 2/28-3/1.

➢ マスメディア報道

1. 誌上発表（信濃毎日新聞 2012 年 10 月 19 日、北信タイムス　2012 年 9 月 7 日掲載)、信濃毎日新聞 2013 年 10 月 12 日、信濃毎日新聞 2013 年 10 月 17 日、日本経済新聞紙 2014 年 2 月 4 日、中日新聞 2015 年 2 月 24 日、信濃毎日新聞 2015 年 2 月 28 日、長野市民新聞 2015 年 3 月 3 日、農業新聞 2015 年 3 月 20 日
2. テレビ放映（長野朝日放送「冬の信州 2013　エコ大作戦」2013 年 1 月 19 日放送

Soft-hydrothermal processing

１０．知的財産権の取得状況

➢ 知的財産権の取得状況

1- 発明名称： きのこ栽培用培地の評価方法およびきのこ栽培方法
出願人　　： 株式会社前田製作所、独立行政法人海洋研究開発機構
発明者（所属機関）： 宮本　徹（株式会社前田製作所）、大田　ゆかり、秦田　勇二、坪内　泰志（海洋研究開発機構）
出願番号： 特願 2014-159088　　（出願日 平成 26 年 8 月 4 日）

2- 発明名称： 使用済みキノコ培地の再生処理装置および再生処理方法
出願人　　： 株式会社前田製作所
発明者（所属機関）： 宮本　徹、渡辺伸洋、林 志成（株式会社前田製作所）
出願番号： 特願 2013-138787　　（出願日 平成 25 年 7 月 2 日）

3- 発明名称： ソフト水熱プロセスによる廃きのこ培地再生処理方法と新しいバイオマス活用方法
出願人　　： 国立大学法人東北大学、株式会社前田製作所、中野市農業協同組合、株式会社高見澤
発明者（所属機関）： 宮本　徹（株式会社前田製作所）、岡野　伸哉、笠井　憲雪（東北大学大学院医学研究科）、篠田　清嗣、市村　昌紀（中野市農業協同組合）
出願番号： 特願 2009-236873　　（出願日 平成 21 年 10 月 14 日）
出願公開番号： 特開 2011-83206　　（公開日 平成 23 年 4 月 28 日）
平成 26 年 5 月 9 日 特許査定： **特許第 5534309 号**

➢ 知的財産権の取得状況（関連特許）

1- 発明名称： ソフト水熱プロセスによる滅菌乾燥方法および医療用滅菌装置
出願人　　： 株式会社前田製作所、国立大学法人信州大学
発明者（所属機関）: 宮本　徹、竹元哲也、渡辺伸洋、林 志成（株式会社前田製作所）、古畑貞彦（信州大学）
出願番号： 特願 2014-100656　　（出願日 平成 26 年 5 月 14 日）

2- 発明名称： 藻油抽出方法および藻油抽出装置
出願人　　： 株式会社前田製作所
発明者（所属機関）： 宮本　徹、竹元哲也、渡辺伸洋、林 志成（株式会社前田製作所）
出願番号： 特願 2013-106424　　（出願日 平成 26 年 5 月 22 日）

3- 発明名称： エンドトキシンの不活化方法および不活化処理装置
出願人　　： 国立大学法人東北大学（80%→50%）、株式会社前田製作所（20%→50%）
発明者（所属機関）： 宮本　徹、岡野　伸哉、笠井　憲雪（東北大学大学院医学研究科）
出願番号： 特願 2008-250264　　（出願日 平成 20 年 9 月 29 日）
出願公開番号： 特開 2010-75619　　（公開日 平成 22 年 4 月 8 日）
平成 26 年 7 月 25 日 特許査定： **特許第 5583335 号**

4- 発明名称： タンパク質の不活化方法および不活化処理装置
出願人　　： 国立大学法人東北大学（80%）、株式会社前田製作所　（20%）
発明者（所属機関）： 宮本　徹、岡野　伸哉、笠井　憲雪（東北大学大学院医学研究科）

Soft-hydrothermal processing

出願番号： 特願 2008-089825　　(出願日 平成 20 年 3 月 31 日)

出願公開番号： 特開 2009-240206　　(公開日 平成 2 1 年 10 月 22 日)

5- 発明名称： 床敷き材料の処理システムおよび処理方法

出願人　　： 山崎 仲道、(株)前田製作所

発明者（所属機関）： 山崎 仲道（東北大学大学院環境科学研究科）、宮本 徹

出願公開番号： 特開 2005-87053　　(公開日 平成 1 7 年 4 月 7 日)

6- 発明名称： 未使用床敷き材料の処理方法および処理装置

出願人　　： 山崎 仲道、笠井　憲雪、(株)前田製作所

発明者（所属機関）： 山崎 仲道（東北大学大学院環境科学研究科）、笠井　憲雪（東北大学大学院医学系研究科）、宮本 徹

出願公開番号： 特開 2005-87054　　(公開日 平成 17 年 4 月 7 日)

特開 2005-87053 と特開 2005-87054 を纏め、平成 21 年 3 月 6 日 特許査定： **特許第 4272022 号**

7- 発明名称： 使用済みの動物用床敷き材料の処理方法および処理装置

出願人　　： 山崎 仲道、(株)前田製作所

発明者（所属機関）： 山崎 仲道（東北大学大学院環境科学研究科）、宮本 徹

出願公開番号： 特開 2004-298110　　(公開日 平成 16 年 10 月 26 日)

平成 21 年 7 月 17 日 特許査定： **特許第 4344157 号**

謝　辞

本技術の研究開発を遂行するにあたり、多大なる御支援、御指導、御協力、および御助言を賜った中野市農業協同組合 望月 隆 常務理事様、海谷 栄治 部長様、市村 昌紀 課長様、篠田 清嗣 課長代理様、土屋 洋介 係長様、および中野市農業協同組合の関係職員のかたがたに厚く御礼を申し上げます。

また、本技術の研究開発を実証するにあたり、多大なる御支援、御指導、御協力、および御助言を賜った有限会社えんとく培養センター 荻原 勉 代表取締役様、株式会社 信ナカビーエスセンター 荻原 大輔 代表取締役様、および関係従業員のかたがたに厚く御礼を申し上げます。

最後に、私に本研究開発の機会を与え、いつも暖かい御支援を頂いた株式会社前田製作所 土屋 俊一 代表取締役会長、塩入 正章 代表取締役社長、石田 賢一 副社長、および各役員の皆様に心より感謝致します。

そして、本研究開発を遂行するにあたり、多大なる御協力、および貴重な御意見および御討論を頂きました新規事業部の皆様に深く感謝致します。

平成２７年 ３月３１日

研究代表者　宮本　徹