

第3章 焼酎粕・でん粉粕を用いたきのこ培地の

臭気消失に関する研究

3-1 はじめに

鹿児島県の基幹産業である焼酎製造業では、その製造過程で、焼酎粕（図 3-1 参照）が年間 35 万 5 千トン¹⁾ 発生している。焼酎粕は、固液分離処理後、液面分についてはメタンガスやアルコールを回収し、固形面分の乾燥の熱源として利用され、固形面分については乾燥後（以下、焼酎粕乾燥固形物；図 3-2 参照）、肥料、飼料などに利用されている。また、焼酎製造業と同様に鹿児島県の基幹産業である甘藷でん粉製造業においても、でん粉粕（図 3-3 参照）が年間 4 万 7 千トン²⁾ 発生している。でん粉粕は、クエン酸原料や飼料、肥料などに利用されている³⁾。しかしながら、これらは、独特の不快感な臭い（悪臭）があり、その臭いは腐敗が進行することで更に悪化するため、製造工場内や製造工場周辺の環境に悪影響を与えている。悪臭は典型 7 公害の一つであり、その苦情件数は、公害事象の総苦情件数のうち 20%前後を占めており、騒音について 2 番目に多い公害である⁴⁾。

しかし、これら食品廃棄物は悪臭がある一方で、焼酎粕は栄養成分が豊富であり、きのこの生長に必要な栄養分を含有していること、でん粉粕は保水性が高く、繊維質が豊富で、きのこ栽培で用いられるおが屑に性質が似ている特徴がある。このことから、山内ら⁵⁾ は、焼酎粕乾燥固形物とでん粉粕をきのこ栽培用培地の原料として利用することを考案し、これまでの研究で、きのこ（エリンギ、ヒラタケ、ヤマブシタケなど）を栽培することに成功している。また、その際、栽培終了後の培地及び発生したきのこ（以下、子実体とする）に、食品廃棄物由来の臭いが消失していた。このことから培地中のきのこ菌糸により、臭気物質が処理されていることが示唆された。

したがって、焼酎粕乾燥固形物及びでん粉粕を用いたきのこ培地（以下、焼酎粕・でん粉粕培地とする）から食品廃棄物由来の臭いが消失するメカニズムを解明することで、焼



図 3-1 焼酎粕



図 3-2 焼酎粕乾燥固形物



図 3-3 でん粉粕

酎製造業やでん粉製造業、他の様々な製造業や工場から発する悪臭の問題を、きのこ菌糸を用いて解決する技術の開発が可能であると考えた。

そこで本研究では、焼酎粕・でん粉粕培地を用いて、1) 焼酎粕・でん粉粕に含まれる臭気物質の同定と定量、2) 主要臭気物質の経時的変化、3) 臭気指数とにおいの質の変化、4) 臭気分解酵素の存在について試験を行い、焼酎粕・でん粉粕由来の臭気物質がきのこ菌糸により、消失されるメカニズムの解明を試みた。

3-2 培地の作製ときのこの栽培方法

a) 供試菌株

本研究では、ヤマブシタケ（株）キノックスを用いた（図3-4参照）。ヤマブシタケは、エリンギ、ヒラタケ、ブナシメジなどより高値で販売されており、栽培期間が比較的短い特徴がある。

b) 培地の調製

本研究では、培地栄養材として焼酎粕乾燥固形物（S 協同組合産）を用いた。また、培地基材としてでん粉粕（K 会社産）を用いた。また、培地中のpHが5.0～6.0程度になるようにpH調整材として貝化石（鹿児島県吉田町産；未凝結の貝砂状のアラゴナイト系石灰）を用いた。

焼酎粕・でん粉粕培地は「焼酎粕乾燥固形物：でん粉粕：貝化石＝50%：46%：4%」の割合⁶⁾で配合し、標準培地は「ホミニフィード：広葉樹：貝化石＝33.3%：62.7%：4%」の割合⁷⁾で配合した。これらの材料をそれぞれミキサーで攪拌後、培地の含水率が64%程度になるように適宜、水道水を加え調整し、更に攪拌した。その後、ポリプロピレン製のビン容器に焼酎粕・でん粉粕培地は540g、標準培地は580g充填した（この時点の培地を「調製後培地」とする）。充填後、121℃で3時間高圧滅菌処理を行った（この時点の培地を「滅菌後培地」とする）。そして、滅菌後のビンにクリーンルーム内で供試菌をビンあたり約10g接種した。なお、各試験の供試ビンは32本とした。

c) 栽培条件

菌接種後、培地は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $75 \pm 5\%$ に制御された培養室にキャップをつけた状態で培養した。そして、きのこ菌糸が培地中に完全に蔓延（培養30日前後）後、発生処理として菌掻き（ビン口周辺についている古い菌を取り除くこと）を行い、再びキャップをつけ、温度 $13 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度85～90%に制御された発生室に移し、原基形成の兆候が見られた時点で、キャップを外し、子実体の形成を促した。



図3-4 ヤマブシタケ

3-3 試験方法

(1) 臭気物質の同定と濃度測定

本試験では、調製後培地、培養25日目（菌周り完了時）、培養45日目（子実体収穫時）の培地について、においの構成物質を同定し、その物質の定量及び閾値を測定した。臭気物質の同定、濃度測定は、(財)日本食品分析センターに依頼した。具体的な分析方法

については以下の通りである。

臭気物質の同定は、ヘッドスペース法及び溶媒抽出法を用いた。ヘッドスペース法は、検体から 1g を 20ml のバイアル瓶に採取し密封後、ヘッドスペースサンプラー（機種：7694（HEWLETT-PACKARD Company））で各培地をガス化し、ガスクロマトグラフ-質量分析計（6890/5973（HEWLETT-PACKARD Company））を用いて、全イオンクロマトグラムを得た。溶媒抽出法は、検体 7.5g に精製水 20ml、ジエチルエーテル 100ml を加え 10 分間振とうし、この検体を遠心分離（3000rpm、20 分間）後、ジエチルエーテル層を脱水濾過し、5ml まで濃縮後、溶液 1 μ l をガスクロマトグラフに注入し、ガスクロマトグラムを得た。また、これらの方法で得られた結果を比較し、調製後培地と差のあるピークについてマススペクトル（機種：6890N/5975B inertXL（Agilent Technologies, Inc.））を得て、物質の同定を行った。さらにこれらの物質をガスクロマトグラフ-質量分析法、ガスクロマトグラフ法で定量した。

閾値の測定は 2 点比較式臭袋法を用いた。試験方法は、3-3（3）の「臭気指数とにおいの質の変化の試験方法」に示す。

（2）主要臭気物質の経時的変化

3-3（1）の試験から得られた主要臭気物質について、培養日数に伴う主要臭気物質の残存率と濃度の変化について調査した。なお、臭気物質が自然に揮発して消失している可能性もあるため、菌を接種した培地（以下、S1 培地とする）と、菌を接種していない培地（以下、S2 培地とする）を同時に培養し、これらを比較した。

S1 培地と S2 培地は、培養開始から菌周り完了（培養 33 日目）まで、通常の栽培と同様な環境下で培養を行った。菌周り完了後、S1 培地は菌掻きを行い、発生室に移し、子実体の形成を促した。S2 培地も同様に発生室に移した。そして、培養 40 日目（子実体の原基形成頃）に、S1 培地の蓋を開けた。一方、S2 培地は雑菌（S1 培地のヤマブシタケの胞子も含む）が入る恐れがあったため、蓋を閉じたままにしておいた。しかし、S1 培地と条件を揃えるために、蓋を開けた状態で培養した S2 培地も 1 本用意し、培養 54 日目（子実体収穫時）に培地を採取した。なお、両培地とも、調製後培地、滅菌後培地、培養 8 日目、16 日目、25 日目、30 日目、33 日目（菌周り完了時）、40 日目、47 日目、54 日目（子実体収穫時）のものについて分析した。S2 培地に限り、培養 54 日目は、蓋開け培地（以下、S20 培地とする）と、蓋閉じ培地（以下、S2C 培地とする）の 2 つの培地を準備した。

主要臭気物質の分析には、高速液体クロマトグラフ法⁸⁾とイオンクロマトグラフ法を用いた。高速液体クロマトグラフ法は、まず各検体から検体 3g を採取し、乳鉢に入れ、そこに 80%メタノールを 30ml 加えた。次に乳棒で培地をすりつぶし、遠心分離（10,000rpm、15 分間）後、上澄み液を回収した。その後、再び乳鉢中の残渣に 80%メタノールを 10ml 入れ、遠心分離を同様な条件で行い、上澄み液を回収し、先ほどの上澄み液と合わせ、80%メタノールで 30ml に定容した。この上澄み液 0.5ml に反応溶液（2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを 50mg、メタノールを 70ml、塩酸 10ml、アニリン 20ml）を 0.5ml 加えて、密栓混合し、27 \pm 2 $^{\circ}$ C の条件下で 60 分間反応させた。反応後、フィルター（0.45 μ m）濾過し、10 μ l を高速液体クロマトグラフ（日本分光製 880-PU intelligent HPLC Pump）で分析した。なお、カラムは TSK gel ODS-80TM、流速は 1.0ml/min、溶媒はアセトニトリル：蒸留水を 50：50 の割合で混合したもの、カラム温度は 50 $^{\circ}$ C、波長は 365nm で測定した。イオ

ンクロマトグラフ法は、高速液体クロマトグラフ法と同様な手順で行い、各培地からの抽出は80%メタノール溶液を蒸留水に替えて行った。上澄み液はフィルター（0.45 μ m）で濾過し、その20 μ lをイオンクロマトグラフ（Metrohm製761 Compact IC）で分析した。なお、カラムはRspak KC-811、流速は1ml/min、溶離液はHClO₄（1M）、再生液はNaOH（40mM）、カラム温度は50 $^{\circ}$ Cとした。

（3）臭気指数とにおいの質の変化

一般に“におい”は様々な物質が混在しているため、主要臭気物質の減少のみでは、本当に焼酎粕・でん粉粕のにおいが消失しているとは言えない。

そこで、「焼酎粕・でん粉粕培地のにおい」がどの程度の強さであるか、人間の嗅覚に沿った指標である臭気指数の調査を行った。なお、臭気指数は、においの強さ（存在）をあらわすものであり、いいにおいや不快なにおいを判断するものではない。

臭気指数の調査には、焼酎粕・でん粉粕培地に、きのこ菌糸を接種したS1培地と発生した子実体、きのこ菌糸を接種していないS2培地を用いた。両培地とも、調製後培地、滅菌後培地、培養8日目、16日目、25日目、33日目（菌周り完了時）、40日目、47日目、54日目（子実体収穫時）について調査した。なお、S2培地に限り、培養54日目は、蓋開け培地（S20培地）と、蓋閉じ培地（S2C培地）の2つの培地を調査した。

調査方法としては、2点比較式臭袋法を用いた⁹⁾。これは臭気判定士の資格を有する者が実施し、嗅覚が正常である者をパネラーとして選定して行う試験である。筆者は、臭気判定士の資格が無いため、臭気判定士（オペレーター）の指導の下、無臭袋の作成、パネラーへの袋の受け渡し、解答用紙の回収を行った。また、筆者は嗅覚試験を受け、嗅覚が正常であると判定されたため、パネラーの1人としても試験に参加した。嗅覚試験とは、5つの濾紙のうち、におい付き濾紙が2つあり、濾紙のにおいを嗅ぎ、におい付き濾紙を2つとも当てるという試験である（図3-5参照）。5種類のにおいが嗅ぎ分けられれば、嗅覚が正常であることが認められる。

まず、各検体を10g量り取り、フレックスサンプラー（固形物（A）タイプの臭気測定専用袋）へ移し、密封にした後、残存空気をフレックスポンプで吸引し、ほぼ真空状態にした。そして、活性炭で処理された無臭ガスをフレックスサンプラーに充填し、嗅覚測定用のサンプルを作成した。フレックスサンプラーから注射器でサンプルを採取し、そのサンプルの希釈を適宜行い、におい付き袋（1個）とした。また、無臭袋は活性炭処理（図3-6参照）されたものを1個準備し、におい付き袋1個と合わせ、計2袋セットを2人分用意した。そして、2人のパネラーにそれぞれ2袋の中からおい付きの袋を選んでもらい、におい



図3-5 嗅覚試験



図3-6 分配活性炭槽
（無臭ガス分配機）

付きの袋が感知できればサンプルの希釈倍率を上げ、におい付き袋を選定できなくなるまでこの作業を繰り返し行った。なお、希釈操作は3Lのにおい袋に、サンプルを10ml、3ml、1ml、300 μ l、…のようにして行った。その後、各パネル個人の閾値を検体の希釈倍率の対数値から求め、2名の対数値の平均値を各検体のパネル全体の閾値とし、次式を用いて臭気指数を算出した。

$$\begin{aligned} \text{個人の閾値} &: X_1, X_2 \\ \text{パネル全体の閾値} &: X = (X_1 + X_2) / 2 \\ \text{臭気指数} &: Z = X \times 10 \end{aligned}$$

また、同時に検体のにおいの質についての調査をした。においの質の試験は簡易なもので、培地の原臭をオペレーターに嗅いでもらい判断した。

(4) 臭気分解酵素の存在

焼酎粕・でん粉粕培地の臭いは、きのこ栽培過程で消失することから、きのこ菌糸の代謝作用により消失していると示唆される。しかし、その明確な根拠はなく、可能性として、培地中にきのこ菌糸から放出される菌体外酵素や菌体による取り込みが考えられる。そこで、きのこ菌糸の集合体である子実体と、培地中の酵素の存在について調査・分析を行い、その動態を探った。

本試験では、発生した子実体及び臭気物質の減少の兆候が見られた培地（残存率 50%程度の培地）から硫酸沈殿法で酵素液を作製した。酵素液の作製方法は、まず子実体及び培地から検体 10g を採取し、乳鉢に入れ、そこに NaCl (1%) を 25ml 加え、乳棒ですりつぶした。その後、上澄み液を取り、ガーゼでその上澄み液を濾過した。そして、再び乳鉢中の残渣に NaCl (1%) を 25ml 加え、抽出・濾過を繰り返した。これを 4 回行った。回収した上澄み液は遠心分離 (12,000rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ C) を行い、その上澄み液を回収した。回収後、上澄み液の体積を量り、上澄み液 1L あたり 700g の硫酸アンモニウムを少量ずつ、攪拌しながら上澄み液の中へ入れた。それを、冷蔵庫の中に入れ 3 時間~1 日程度放置し、沈殿させた。沈殿終了後、それを再び攪拌し、遠心分離 (12,000rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ C) した。上澄み液を除去後、遠心管に残った固体に NaCl (1%) を加え、総量が 5ml になるように調製し、この液を酵素液とした。

次に、補酵素 (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (以下、NAD $^{+}$ 及び NADH とする) (40mM)) 0.02ml、酢酸緩衝液 (250mM、pH5.0) 0.08ml、基質 (臭気物質; (160 μ g/ml)) 0.1ml をマイクロチューブに入れ、5 分間密栓混合した。その後、酵素液をマイクロチューブ内に 0.2ml 加え、22 $^{\circ}$ C の環境下で一定時間 (1 時間及び 3 時間) 反応させた後、メタノール 80% を 1.6ml 入れ、2.4.2 の試験方法で臭気物質の定量を行った。

3-4 結果と考察

(1) 臭気物質の同定と濃度測定

図3-7に全イオンクロマトグラム（ヘッドスペース法）及び、ガスクロマトグラム（溶媒抽出法）の結果を示す。

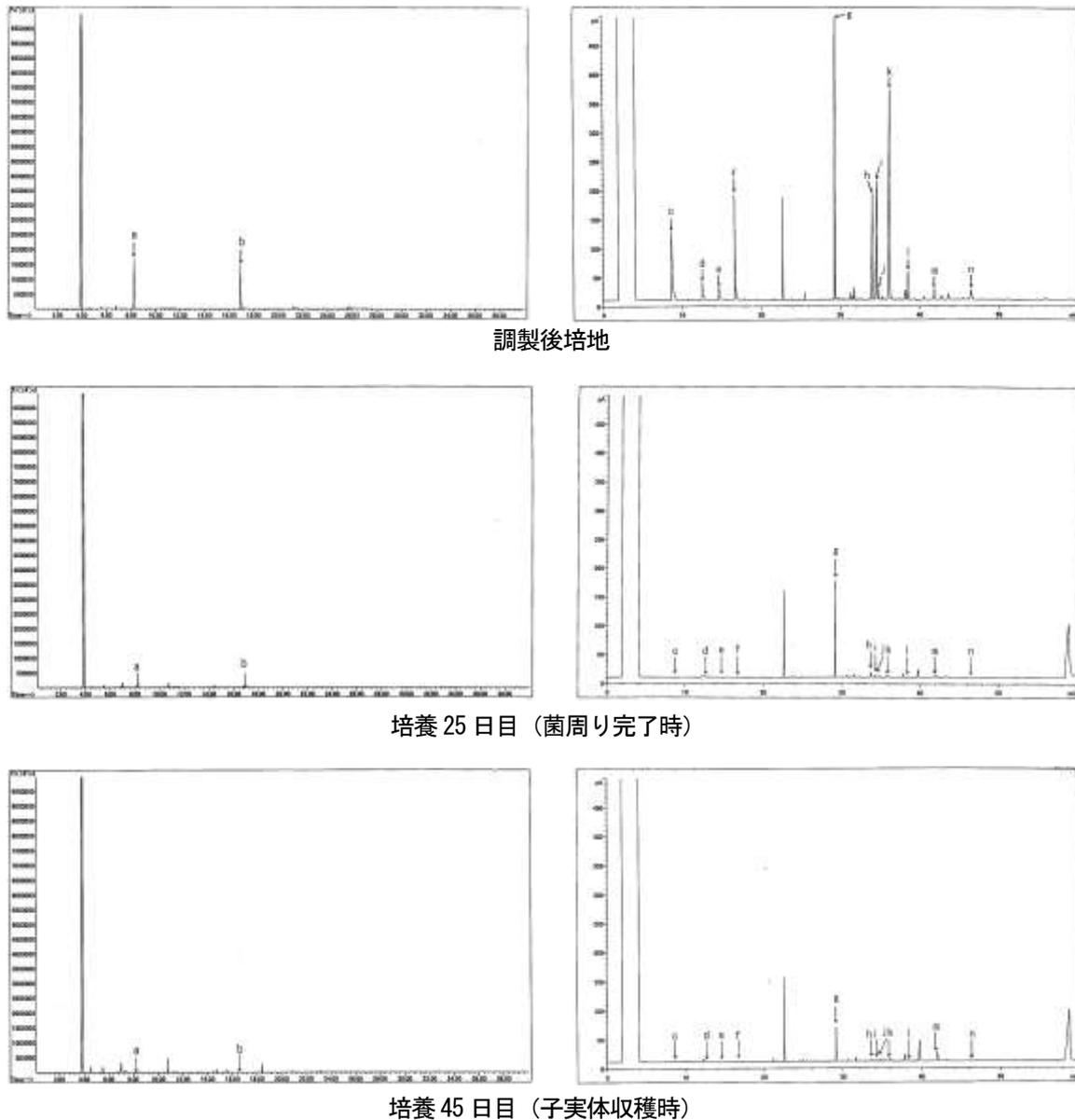


図3-7 全イオンクロマトグラム（ヘッドスペース法）とガスクロマトグラム（溶媒抽出法）の結果

（左：ヘッドスペース法、右：溶媒抽出法）

全イオンクロマトグラム上で、調製後培地と、培養 25 日目及び培養 45 日目の比較を行ったところ、調製後培地にピーク (a、b) が認められた。また、ガスクロマトグラム上で同様な比較を行ったところ、調製後培地にピーク (c ~ n) が認められた。次にこれらの物質の推定と濃度を測定した。その結果を表-1 に示す。焼酎粕・でん粉粕培地には、ジアセチル (27ppm) や、アセトイン (580ppm)、酪酸 (300ppm) のように単独でも強烈な臭気を持つ物質や、酢酸 (600ppm) やプロピオン酸 (200ppm) 等の揮発性脂肪酸や、脂肪酸エステルが含まれていることが明らかになった。そこで、これらの物質の閾値を測定した。その結果を表-2 に示す。これらの閾値は、ジアセチル<アセトイン<酪酸<オレイン酸エチル、リノール酸エチル<プロピオン酸<酢酸<ステアリン酸エチル<パルミチン酸エチルの順だった。濃度と閾値の結果を比較したところ、閾値に対する濃度が、アセトイン>酪酸>ジアセチル>リノール酸エチル>酢酸>オレイン酸エチル>プロピオン酸>ステアリン酸エチル>パルミチン酸エチルの順で高かった。このことから、アセトイン、酪酸、ジアセチルが臭いの核であると考えられ、更にその他の物質が混ざり合うことで、独特の不快感を生じさせていることが明らかになった。しかしながら、これらの物質はきのこ菌糸が培地に蔓延するに伴い減少し、菌周り完了時(培養 25 日目)で殆どが消失していた。このことから、きのこ菌糸が臭気物質を栄養基質として取り込み消失している、またはきのこ菌糸から放出される菌体外酵素によって臭気物質が分解・消失していると考えられた。

表 3-1 推定物質と濃度

ピーク	物質	濃度
a	ジアセチル	27 ppm
b	不明	-
c	アセトイン	580 ppm
d	酢酸	600 ppm
e	プロピオン酸	200 ppm
f	酪酸	300 ppm
g	パルミチン酸エチル	400 ppm
h	ステアリン酸エチル	400 ppm
i	オレイン酸エチル	200 ppm
j	ラウリン酸	検出限界以下
k	リノール酸エチル	500 ppm
l	リノレン酸エチル*	検出限界以下
m	アラキジン酸エチル	検出限界以下
n	不明	-

※ ライブラリーサーチによる

表 3-2 臭気物質の閾値

物質	閾値
ジアセチル*	0.00005 ppm
アセトイン	0.00006 ppm
酢酸*	0.006 ppm
プロピオン酸*	0.0057 ppm
酪酸*	0.00019 ppm
パルミチン酸エチル	0.08 ppm
ステアリン酸エチル	0.07 ppm
オレイン酸エチル	0.003 ppm
リノール酸エチル	0.003 ppm

※永田氏らによる三点比較式嗅袋法の閾値*

(2) 主要臭気物質の経時的变化

表 3-3 焼酎粕・でん粉粕培地中の主要臭気物質の経時的变化 (きのこ菌糸接種あり)

培養日数 (日)	アセトイン		酪酸		ジアセチル	
	残存率 (%)	濃度 (ppm)	残存率 (%)	濃度 (ppm)	残存率 (%)	濃度 (ppm)
調製後	100	374	100	780	100	12.4
減菌後	70	263	85	664	98	12.2
8	72	270	84	653	67	8.3
16	51	192	58	449	27	3.3
25	42	157	61	476	18	2.3
30	0	0	0	0	10	1.2
33	0	0	0	0	5	0.6
40	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0

主要臭気物質（アセトイン、酪酸、ジアセチル）の経時的変化の結果を、きのこ菌糸接種ありと接種なしについて、それぞれ表 3-3 と表 3-4 に示す。

表 3-4 焼酎粕・でん粉粕培地中の主要臭気物質の経時的変化（きのこ菌糸接種なし）

培養日数 (日)	アセトイン		酪酸		ジアセチル	
	残存率 (%)	濃度 (ppm)	残存率 (%)	濃度 (ppm)	残存率 (%)	濃度 (ppm)
調製後	100	374	100	780	100	12.4
滅菌後	70	263	85	664	98	12.2
8	71	267	81	632	87	10.8
16	65	244	82	639	65	8.1
25	70	263	79	615	63	7.9
30	73	274	88	686	63	7.9
33	74	276	88	689	46	5.7
40	73	272	96	748	58	7.1
47	66	247	87	677	55	6.8
54 (蓋閉じ)	68	254	88	689	55	6.8
54 (蓋開け)	73	272	79	704	59	7.3

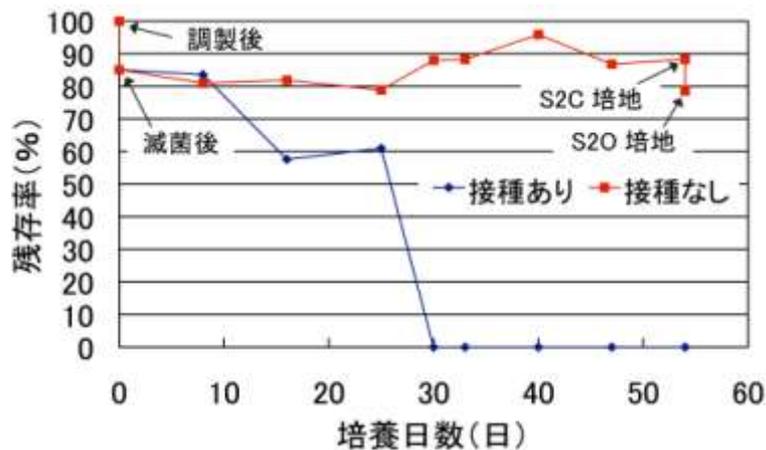


図 3-9 焼酎粕・でん粉粕培地中の酪酸の経時的変化

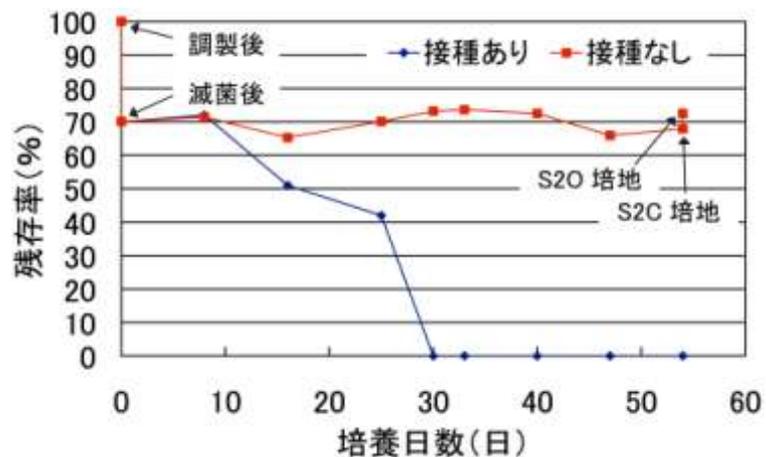


図 3-8 焼酎粕・でん粉粕培地中のアセトインの経時的変化

図 3-8 に、焼酎粕・でん粉粕培地中のアセトインの経時的変化を示す。アセトインは滅菌処理をすることで、培地中から 30%減少した。その後、S1 培地は培養 8 日目から徐々に減少する傾向を示した。そして、培養 30 日目にアセトインは S1 培地から消失し、その後もアセトインは検出されなかった。したがって、菌周りを完了までに培地中からアセトインは消失していることが明らかになった。一方、S2 培地では、アセトインの残存率は 70%前後を示し、培養 54 日目まで殆ど変化なく培地中に存在していた。なお、蓋の開閉によるアセトインの変化は殆どなかった。このことから、アセトインは培養期間中に揮発などをし自然に消失する可能性は少なく、培地中に殆ど変化なく存在していると考えられた。

図 3-9 に、焼酎粕・でん粉粕培地中の酪酸の経時的変化を示す。酪酸は、滅菌処理で、15%減少した。その後、S1 培地では、培養するに伴い酪酸は減少し、培養 30 日目で、培地中から消失した。そして、それ以後も酪酸は検出されなかった。したがって、酪酸も菌周りを完了までに培地中から消失していた。S2 培地では、残存率に増減はあったが、傾向としては滅菌処理後の残存率と殆ど変わらなかった。このことから、培地中の酪酸についても、アセトインと同様、培地中に殆ど変化なく存在していることが示唆された。

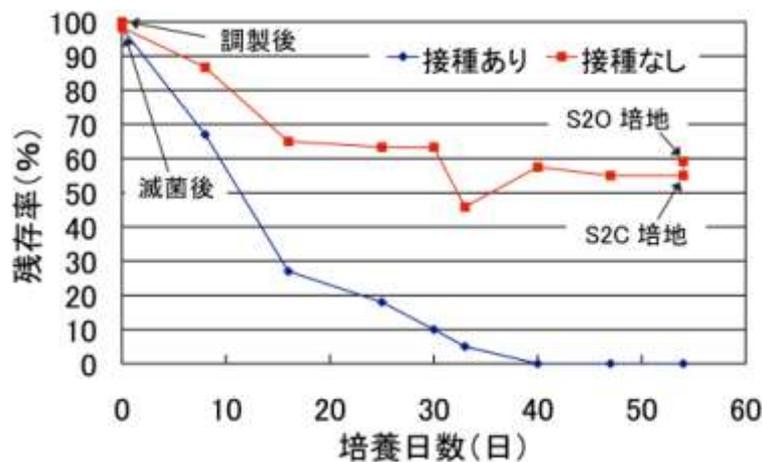


図 3-10 焼酎粕・でん粉粕培地中のジアセチルの経時的変化

図 3-10 に、焼酎粕・でん粉粕培地中のジアセチルの経時的変化を示す。ジアセチルは、滅菌処理による残存率の変化は殆どなかった。S1 培地では、培養開始から培養 16 日目までにジアセチルは大きく減少し、アセトイン、酪酸と比較すると、早い段階で減少した。それ以後も、ジアセチルは減少し、培養 40 日目で培地中から消失した。アセトイン、酪酸と比較するとジアセチルの消失は遅かった。また、S2 培地中のジアセチルは、アセトイン、酪酸の S2 培地と比較すると、培養が進むにつれて、明らかに減少していた。このことから、ジアセチルの一部は揮発して消失している可能性があることが示唆された。

以上の結果より、焼酎粕・でん粉粕培地の主要臭気物質であるアセトイン、酪酸、ジアセチルは、それぞれ S1 培地と S2 培地で残存率の経時的変化に差が認められたため、これら主要臭気物質の消失は、一部は揮発によって消失する可能性はあるが、消失のほとんどはきのこ菌糸の働きによるものであると考えられた。また、アセトイン、酪酸については、菌周りが完了する頃には培地内から消失し、ジアセチルは培養 40 日目で消失しており、3-4

(1) の結果と同様な結果が得られた。

(3) 臭気指数とにおいの質の変化

表 3-5 焼酎粕・でん粉粕培地の臭気指数とにおいの質の変化

(上：接種ありと子実体、下：接種なし)

培養日数		調整後	滅菌後	8日目	16日目	25日目	33日目	40日目	47日目	54日目	子実体
パネラー	1	5.24	5.24	4.74	4.74	4.24	3.74	5.24	3.74	3.24	4.74
	2	5.24	5.24	4.74	4.74	4.24	3.74	5.24	3.74	3.24	4.74
合計		10.48	10.48	9.48	9.48	8.48	7.48	10.48	7.48	6.48	9.48
平均(全体の関値)		5.24	5.24	4.74	4.74	4.24	3.74	5.24	3.74	3.24	4.74
臭気指数		52	52	47	47	42	37	52	37	32	47
においの種類		酸っぱい臭い	酸っぱい臭い	酸っぱい臭い	酸っぱい臭い	酸っぱい臭い(若干弱い)	きのこの匂い	きのこの匂い	きのこの匂い	きのこの匂い	きのこの匂い

培養日数		調整後	滅菌後	8日目	16日目	25日目	33日目	40日目	47日目	54日目(蓋閉め)	54日目(蓋開け)
パネラー	1	5.24	5.24	4.74	4.74	4.74	4.74	5.24	5.24	4.74	4.74
	2	5.24	5.24	4.74	4.74	5.24	4.74	5.24	5.24	4.74	4.74
合計		10.48	10.48	9.48	9.48	9.98	9.48	10.48	10.48	9.48	9.48
平均(全体の関値)		5.24	5.24	4.74	4.74	4.99	4.74	5.24	5.24	4.74	4.74
臭気指数		52	52	47	47	50	47	52	52	47	47
においの種類		酸っぱい臭い	酸っぱい臭い								

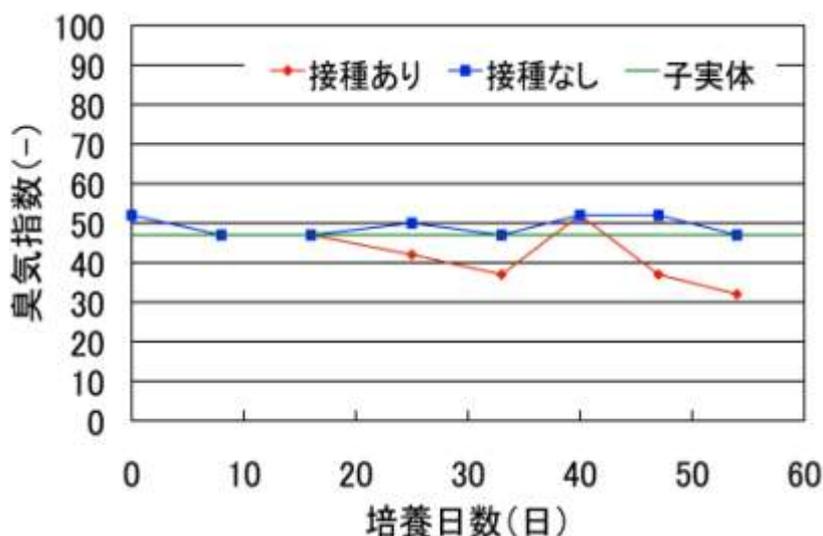


図 3-11 焼酎粕・でん粉粕培地 (S1 培地、S2 培地) 及び子実体の臭気指数

表 3-5 に、焼酎粕・でん粉粕培地の臭気指数とにおいの質の変化の結果を示す(上：接種ありと子実体、下：接種なし)。また、図 3-11 に、臭気指数の結果をグラフ化したものを示す。

調製後培地と滅菌後培地を比較すると、臭気指数及びにおいの質に違いは見られなかった。このことから、滅菌処理による、においの低減や質の変化は殆どないと考えられた。

次に、S1 培地では、培養開始から培養 33 日目(菌周り完了時)まで、臭気指数は減少傾向を示した。この期間の培地のにおいは、培養 25 日目で“若干酸っぱい臭い”、培養 33 日目で“きのこの匂い”に変わった。このことから、培養が進むにつれて、“酸っぱい臭い”は減少することが明らかになった。培養 33 日目から、臭気指数は増加傾向を示し、培地のにおいは“きのこの匂い”だった。この期間は、臭気指数が増加しているが、これは培養

33 日目（菌周り完了時）に培地の菌搔きを行い菌糸に刺激を与えたことで、子実体の原基形成が促され、培地でもきのこの匂いが一段と強まったためであると考えられた。培養 40 日目以降は、再び臭気指数が減少し、培養 54 日目（子実体収穫時）で臭気指数は 32 であった。その一方で、発生した子実体の臭気指数は 47 で、臭気指数が高かった培養 40 日目の臭気指数に匹敵する程だった。このことから、培養 40 日目以降の臭気指数の減少は、培地中のきのこの匂いが子実体に移行したためと考えられた。

次に、S2 培地では、調製後培地から培養 54 日目まで、臭気指数は増減を繰り返したが、においの種類は“酸っぱい臭い”のまま変化はなかった。しかしながら、3.2 の結果で、S2 培地の主要臭気物質の経時的変化は殆どなかった。そこで、S2 培地の各臭気指数の範囲を見ると、47 から 52 であり、これは 2 点比較式臭袋法で検体を希釈する操作の 1 段階の違いだった。また、S2 培地の培養 40 日目、47 日目で臭気指数が再び調製後培地と同じ 52 を示したことから、S2 培地の臭気指数 47 と臭気指数 52 は測定誤差の範囲であると考えられ、S2 培地の臭気指数は培養日数に関係なく殆ど変化しないと考えられた。

一方、S1 培地の試験結果は、調製後培地と培養 54 日目の臭気指数を比較すると、臭気指数が 20 低下していることと、3.1、3.2 の試験結果で、臭気物質はきのこ菌糸を培養することで減少していたことから、S1 培地の臭気指数は培養が進むにつれて減少していることは明らかだと考えられた。

以上のことから、焼酎粕・でん粉粕培地の独特の“酸っぱい臭い（不快な臭い）”は、きのこ菌糸を培養することで“きのこの匂い（いい匂い）”へと、においの質が変わると同時に、臭気指数の結果から、臭いが低減することが明らかになった。

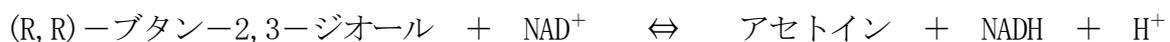
(4) 臭気分解酵素の存在

本試験において、 NAD^+ または NADH の存在下で、検出が考えられる酵素は、アセトインデヒドロゲナーゼ及びブタンジオールデヒドロゲナーゼで、これらの酵素反応を以下に示す。

アセトインデヒドロゲナーゼ



ブタンジオールデヒドロゲナーゼ



アセトインデヒドロゲナーゼは NAD^+ の存在下で、アセトインを基質として、ジアセチルを生成する酵素、または NADH の存在下で、ジアセチルを基質として、アセトインを生成する酵素である。また、ブタンジオールデヒドロゲナーゼは NAD^+ の存在下で、(R, R)-ブタン-2, 3-ジオールを基質として、アセトインを生成する酵素、または NADH の存在下で、アセトインを基質として、(R, R)-ブタン-2, 3-ジオールを生成する酵素である。

表 3-6 に、子実体酵素液におけるアセトインデヒドロゲナーゼの存在に関する酵素反応の結果を示す。また、表 3-7 に子実体酵素液におけるブタンジオールデヒドロゲナーゼの存在に関する酵素反応の結果を示す。

表 3-6 アセトインデヒドロゲナーゼの存在に関する酵素反応 (子実体)

補酵素 (NAD ⁺) + 基質 (アセトイン)		反応時間 (h)	濃度 (mM)	
基質	アセトイン		アセトイン	ジアセチル
		0	0.433	0.031
		1	0.364	0.020
3	0.343	0.016		

補酵素 (NADH) + 基質 (ジアセチル)		反応時間 (h)	濃度 (mM)	
基質	ジアセチル		アセトイン	ジアセチル
		0	0.016	0.558
		1	0.048	0.406
3	0.060	0.422		

表-7 ブタンジオンデヒドロゲナーゼの存在に関する酵素反応 (子実体)

補酵素 (NADH) + 基質 (アセトイン)		反応時間 (h)	濃度 (mM)	
基質	アセトイン		アセトイン	ジアセチル
		0	0.445	0.024
		1	0.385	0.011
3	0.340	0.011		

まず、アセトインデヒドロゲナーゼの存在について考察する。NAD⁺の存在下でアセトインを反応させた場合 (表 3-6 : 左参照)、アセトインの濃度は減少したが、ジアセチルの生成は見られず、むしろジアセチルの濃度は減少した。一方、NADH の存在下でジアセチルを反応させた場合 (表 3-6 : 右参照)、ジアセチルの濃度は減少し、アセトインの濃度は増加した。このことから、子実体にアセトインデヒドロゲナーゼが存在する可能性があると考えられた。しかし、「アセトイン+NAD⁺ → ジアセチル+NADH+H⁺」で、ジアセチルの生成が見られなかったため、現時点ではアセトインデヒドロゲナーゼの存在について明確な根拠が得られなかった。

次に、ブタンジオールデヒドロゲナーゼの存在について考察する。NADH の存在下でアセトインを反応させた場合 (表 3-7 参照)、アセトインの濃度は減少した。NADH の存在下で基質 (アセトイン) が減少していたことから、ブタンジオールデヒドロゲナーゼが存在する可能性はあると考えられた。しかし、(R,R)-ブタン-2,3-ジオールの定量をまだ行っていないため、現時点ではブタンジオールデヒドロゲナーゼの存在は確認できていない。今後、(R,R)-ブタン-2,3-ジオールの定量を行う予定である。なお、上記の結果について、補酵素なしで同様な試験も行ったが、基質の濃度変化は見られなかった。また、培地酵素液では、全く反応は認められず、菌体外酵素による消失の可能性は低いことが示唆された。

これらのことから、菌糸の集合体である子実体は、補酵素の存在下で臭気物質を分解したため、きのこ菌糸そのものが臭気物質を分解している可能性が高いことが示唆された。今後はきのこ菌糸そのものによる臭気物質消失の検討を行う。

3-5 おわりに

本研究で得られた知見を以下に示す。

- 1) 焼酎粕・でん粉粕培地の臭いは、アセトイン、酪酸、ジアセチルを核として、これらに

加え、酢酸やプロピオン酸、脂肪酸エステルなどの物質が混ざり合うことで、独特の不快感な臭いを発することが明らかになった。

2) 焼酎粕・でん粉粕培地中の臭気物質は、培養が進むにつれて減少し、菌周り完了（培養30日目）頃には、ほぼ消失しており、きのこ収穫時までには主要臭気物質（アセトイン、酪酸、ジアセチル）は消失していることが明らかになった。

3) 焼酎粕・でん粉粕培地の臭いは、きのこ菌糸を培養することで、“酸っぱい臭い（不快な臭い）”から“きのこの匂い（いい匂い）”へ、においの質が変わり、培地本来の不快感な臭いはきのこ菌糸を培養することで、低減することが明らかになった。

4) 臭気物質の消失は、菌体外酵素の働きによる消失の可能性は低く、きのこ菌糸そのものに臭気物質が取り込まれた後、分解されると考えられた。

以上の結果から、きのこ菌糸は悪臭物質を分解、除去することが明らかになった。このことから、きのこ菌糸あるいはきのこ収穫後に発生する使用済み培地は悪臭対策技術の開発に利用できると考えられた（図3-12参照）。

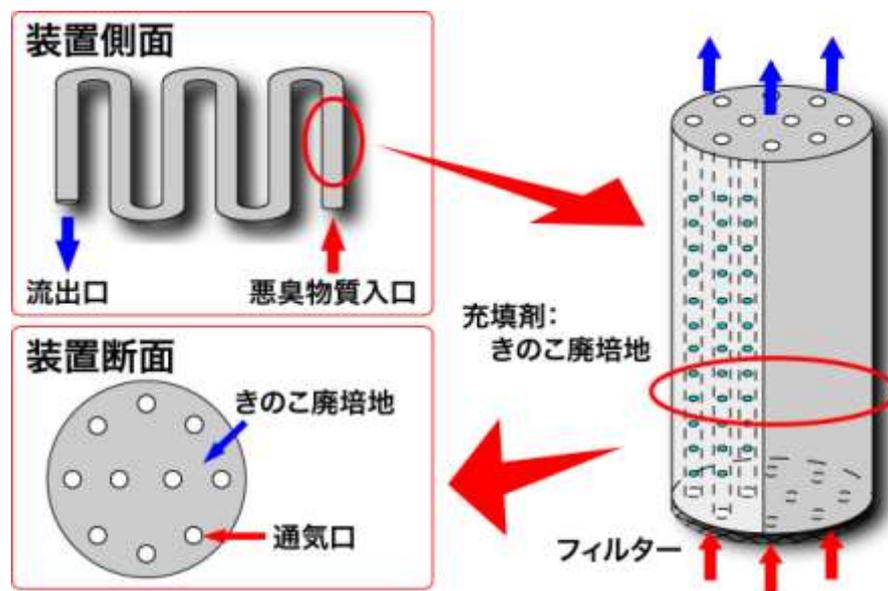


図3-12 脱臭装置の例

参考文献

- 1) 鹿児島県酒造組合連合会：平成 21 酒造年度本格焼酎原料別製成数量と蒸留粕の処理別・月別数量(2010).
- 2) 田之上隼雄:かんしょでん粉工場合理化への取り組み状況、でん粉情報、6月号、No. 14、pp. 7-21(2008).
- 3) 鹿児島県：鹿児島県バイオマス利活用指針
<http://www.pref.kagoshima.jp/sangyo-rodo/nogyo/gizyutu/kankyo/biomass/houritu.html> (2010).
- 4) 石黒辰吉：臭気の測定と対策技術、オーム社(2002).

- 5) 山内正仁、今屋竜一、増田純雄、山田真義、木原正人、米山兼二郎、原田秀樹：甘藷焼酎粕乾燥固形物を利用したきこの栽培技術の開発に関する研究、土木学会環境工学論文集、Vol. 42 pp. 545-553(2002).
- 6) 山内正仁、大田智也、野元雄介、山田真義、増田純雄：甘藷焼酎粕・でん粉粕利用による高機能性きこの栽培条件の確立、土木学会西部支部研究発表会後援概要集、pp. 1013-1014(2009).
- 7) 全国食用きこの種菌協会：平成15・16年度種苗特性分類調査報告書-きこのこ（やまぶしたけ） -, pp. 1-14(2005).
- 8) 松浦弘明、藤山勝二、皆川憲夫、澤潤一：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のアセトイン、ジアセチル及びアセトアルデヒドの定量、分析化学、Vol. 39 (7)、pp. 405-409(1990).
- 9) 永田好男、竹内教文：三点比較式臭袋法による臭気物質の閾値測定結果、日本環境衛生センター所報、Vol. 17、pp. 77-89(1990).