

# 醗酵食品残渣の有効活用に関する研究（第2報）

齋藤 美貴・長沼 孝多・橋本 卓也・小嶋 匡人・木村 英生  
上野 良平\*<sup>1</sup>・森 智和\*<sup>1</sup>

## Utilization of Fermentation Food Processing Waste

Miki SAITO, Kota NAGANUMA, Takuya HASHIMOTO, Masato KOJIMA, Hideo KIMURA,  
Ryohei UENO\*<sup>1</sup> and Tomokazu MORI\*<sup>1</sup>

### 要 約

醗酵食品残渣を乳酸菌の培地として活用し、乳酸を生成するために、甲州ブドウ搾り滓で酵母を培養し、酵母エキスを自己調製することを試みた。酵母菌体のエキス化方法として、物理的破砕方法や自己消化法を検討したところ、溶菌効率や作業性の面から自己消化法が優れていた。得られた酵母エキスで乳酸菌を培養し、乳酸菌用培地として評価をおこなったところ、窒素源の供給源として有効であることがわかった。

### 1. 緒 言

本研究は山梨県内の発酵食品業界で排出される醗酵食品残渣について乳酸菌による乳酸醗酵の培地としての利用を検討し、ポリ乳酸の原料である乳酸の低コストでの生産、回収および精製を目的としている。

昨年度は各醗酵食品残渣を微生物の培地として使用するため、その栄養成分の分析を行った。その結果、白ワイン用品種のブドウ搾り滓には約 7~8%の単糖が残存しており、微生物生育のための糖の供給源（炭素源）として有効であることがわかった<sup>1)</sup>。そこで、培地のなかで、最もコストが高い成分の1つであり、一般的な窒素要求性を満足させる各種の有機窒素化合物（窒素源）や有機増殖因子を含んでいる<sup>2)</sup>酵母エキスを自己調製することを考え、甲州ブドウ搾り滓で酵母の培養を行ったところ、*Saccharomyces cerevisiae* W3, *S.cerevisiae* OC-2 および *Pichia anomala* が良好に増殖することがわかった<sup>1)</sup>。

本年度は、甲州ブドウ搾り滓で培養した酵母のエキス化方法を検討した。さらに、自己調製した酵母エキスが、乳酸菌の窒素源や増殖因子の供給源として有効かを確かめるために、乳酸菌用半合成培地 MRS 培地<sup>3)</sup>を基にした培地を数種調製して乳酸菌を培養し、乳酸生成量および糖の消費量を測定したので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2-1 実験材料

ブドウ搾り滓（甲州）は山梨県内のワイン醸造企業 3 社および山梨県ワインセンターから入手し、使用するまで、-20℃で保存した。

#### 2-2 ブドウ搾り滓での酵母の培養

##### 2-2-1 供試菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門から分譲された *Saccharomyces cerevisiae* W3 (NBRC 106611)を使用した。

##### 2-2-2 使用培地

前培養には既報<sup>1)</sup>と同様の半合成培地を使用した。本培養にはブドウ搾り滓培地を使用した。ブドウ搾り滓培地はブドウ搾り粕濃度が 15% (w/v) となるように蒸留水を加え、家庭用ジューサーミキサーで1分間攪拌後、遠心分離 (4,730g, 20 分間, 4℃) して調製し、上澄を使用した。

##### 2-2-3 培養方法

前培養は半合成培地 5ml に菌株を保存用斜面培地から1白金耳接種し、130rpm, 25℃で 15~24 時間振盪培養した。分光光度計（株HITACHI, U-1500）を用いて、波長 660nm の光学密度（以下 OD<sub>660</sub> と略す）が 0.5 を越えたら、ブドウ搾り滓培地に OD<sub>660</sub> が 0.01 となるように接種し、130rpm, 25℃で 24 時間振盪培養した。

\*1 山梨県環境科学研究所

## 2-3 酵母のエキス化

培養液を遠心分離 (4,730g, 20 分間, 4°C) し, 上澄液を除き, 菌体濃度が湿重量で 20% (w/v) となるように蒸留水を加え, 懸濁した. この 20%菌体液を使用し, 以下の溶菌または破碎方法で酵母のエキス化を図った.

## 2-3-1 ガラスビーズ破碎

菌体液 1ml をワッセルマン試験管に採取し, ガラスビーズ (φ1mm) を 2.5g 加え, 試験管振盪装置 (東京理化器械(株), CUTE-MIXER CM-1000) で 2,000rpm, 20 分間振とうした. 破碎液をマイクロテストチューブに採取し, 遠心分離 (4583×g, 10 分間, 4°C) した. 得られた上澄画分中の可溶性タンパク質量を BCA 法 (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), Pierce® BCA Protein Assay Kit) で定量し, 酵母のエキス化方法を検討した.

## 2-3-2 オートクレーブ

菌体液を高圧蒸気滅菌器 (オートクレーブ) で 121°C, 20 分間の条件で処理した. 以下はガラスビーズ方と同様に可溶性タンパク質を定量した.

## 2-3-3 超音波破碎

プラスチック容器に菌体液を入れ, 氷冷しながら, 超音波発生機 (株トミー精工, UD-201) で出力:3, インターバルタイマー:50 の条件で 20 分間処理した. 以下はガラスビーズ方と同様に可溶性タンパク質を定量した.

## 2-3-4 自己消化

公知の方法に基づき<sup>4)</sup>, 酢酸エチルを菌体液中の菌体湿重量に対して 2%加え, 45°Cで 40 時間保温した. 以下はガラスビーズ方と同様に可溶性タンパク質を定量した.

## 2-4 自己調製酵母エキスの乳酸菌用培地としての評価

## 2-4-1 供試菌株

乳酸菌はホモ乳酸発酵を行い, 生成される乳酸のうち, L-乳酸生成率が 98%以上<sup>5)</sup> の (独) 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門から分譲された *Lactobacillus casei* (NBRC 15883) と (独) 理化学研究所微生物系統保存施設から分譲された *Lactobacillus delbrueckii subsp.* (JCM1105) を使用した.

## 2-4-2 培地の調製

前培養には MRS 培地を使用した. 本培養は表 1 に示した 1/4MRS, ペプトン, 肉エキス, 酵母エキス, Tween 80, 無機成分 (無機 50%), 無機 75%および無機 100%の 8 種類の培地で行った. 1/4MRS 培地は溶媒に蒸留水-自己調製酵母エキス液 (1:1, v/v) 混液を使用し, グルコース濃度を 2%として, その他の MRS 成分は通常使用量の 1/4 とした培地である. ペプトン, 肉エキス, 酵母エキス, Tween80 および無機成分培地は, 1/4MRS 培地に各成分のみを 1/4MRS 培地の 2 倍量 (通常使用濃度の 1/2 量) になるように増強した培地である. また, 無機 75%および無機 100%は無機成分のみ 1/4MRS 培地の 3 倍量および 4 倍量 (通常使用濃度の 3/4 量または等量) にした培地である.

## 2-4-3 培養方法

高層培地で保存しておいた *L.casei* および *L. delbrueckii* を MRS 培地に 1 白金線接種し, 37°Cで 15~24 時間静置して前培養した. 分光光度計を用いて OD<sub>660</sub> を測定し, 本培養用培地に OD<sub>660</sub> が 0.05 となるように植えつぎ, 37°Cで静置培養した.

## 2-4-4 培養液中の乳酸およびグルコースの測定

培養液を遠心分離 (4,583g, 10 分間, 4°C) し, 得ら

表 1 培地組成

	MRS	1/4MRS	ペプトン	肉エキス	酵母エキス	Tween80	無機成分 (無機50%)	無機75%	無機100%
グルコース	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g
ペプトン	10g	2.5g	5g	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g
肉エキス	10g	2.5g	2.5g	5g	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g
酵母エキス	5g	1.25g	1.25g	1.25g	2.5g	1.25g	1.25g	1.25g	1.25g
Tween80	1g	0.25g	0.25g	0.25g	0.25g	0.5g	0.25g	0.25g	0.25g
クエン酸二アンモニウム	2g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	1.0g	1.5g	2g
酢酸ナトリウム	5g	1.25g	1.25g	1.25g	1.25g	1.25g	2.5g	3.75g	5g
硫酸マグネシウム7水和物	0.1g	0.025g	0.025g	0.025g	0.025g	0.025g	0.05g	0.075g	0.1g
リン酸水素二カリウム	2g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	1.0g	1.5g	2.0g
硫酸マンガン(II)5水和物	50mg	12.5mg	12.5mg	12.5mg	12.5mg	12.5mg	25mg	37.5mg	50mg
自己調製酵母エキス液		0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L
蒸留水	1.0L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L	0.5L

注) 1/4MRS培地に比べ, 増量した部分を□で囲んだ

れた上澄中の乳酸濃度を既報<sup>1)</sup>と同様に高速液体クロマトグラフで測定した。また、グルコース濃度を臨床検査用グルコース測定キット(和光純薬㈱, グルコース CII テストワコー)で測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1 酵母エキス化方法の比較

これまでに、*S.cerevisiae* および *P.anomala* が甲州ブドウ搾り滓で良好に増殖することを確認したが、産膜酵母である *P.anomala* は食品製造現場では変敗菌の1つで、培養時に腐敗臭があり、難点が多いため本実験では白ワイン用酵母 *S.cerevisiae* W3 を使用した。

微生物菌体は菌体が壊れると、菌体内にあったタンパク質などが溶出される<sup>6)</sup>ので、20%菌体液中に溶出されたタンパク質を測定することにより、酵母のエキス化方法の比較を行った。表2に示すように、最もタンパク質溶出量が多かったのはガラスビーズ破碎であった。しかしながら、ガラスビーズ破碎は実験室レベルでは有効な方法であるが、一度に少量(1ml程度)の試料しか処理できず、実用化には不向きであった。次にタンパク質溶出量が多かった自己消化は時間を要するものの、酢酸エチルを添加するのみであるので、作業は簡便であった。オートクレーブも作業は簡便ではあるものの、溶出されるタンパク質量は自己消化時の1/2程度で少なかった。超音波破碎は大腸菌などの破碎に一般的に用いられる方法であるが、発熱するため氷冷する必要あり、また処理時間が長くなるとタンパク質が変性して不溶化したので(データは示さない)、酵母の破碎には適さないと判断した。以上の結果から、自己消化によって酵母エキスを調製することにした。

表2 エキス化方法の比較

エキス化方法	タンパク質濃度 (g/100ml)
ガラスビーズ破碎	0.87
オートクレーブ	0.28
超音波破碎	0.28
自己消化	0.56

#### 3-2 自己調製酵母エキスでの乳酸菌の培養

自己消化法によって得られた酵母エキスを用いた表1に示した培地(1/4MRS, ペプトン, 肉エキス, 酵母エキス, Tween80および無機成分)で実際に乳酸菌の培養を行い、自己調製酵母エキスで培地窒素源等が供給可能かを確かめた。

低栄養状態にある1/4MRS培地において、窒素源が不足していた場合、ペプトン, 肉エキスまたは酵母エキス

が増強されると、乳酸の生成量が向上し、糖の消費も良好になるはずだが、*L.casei*の場合、それらを増強しても1/4MRS培地での乳酸生成量やグルコースの消費量との間に大きな違いは認められず、無機成分を増強した培地でのみ乳酸生成量が向上し、グルコースの消化量も高くなった。このことから、自己調製酵母エキスから窒素源が供給されていることが確認された。同様にTween80についても有意な差は認められず、自己調製酵母エキスから界面活性剤成分も供給されているものと推察された(図1-1, 1-2)。

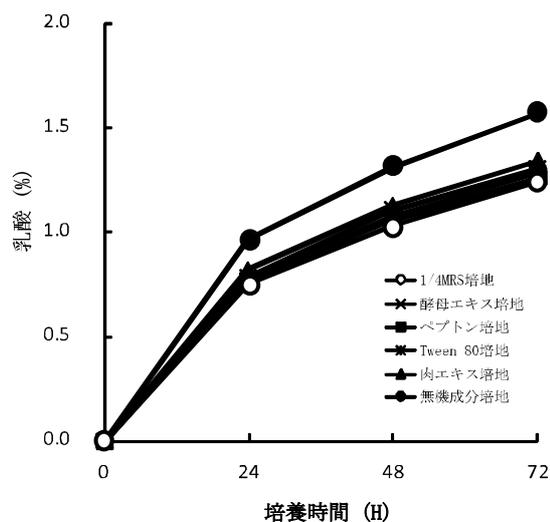


図1-1 *L.casei*の乳酸生成と培地成分

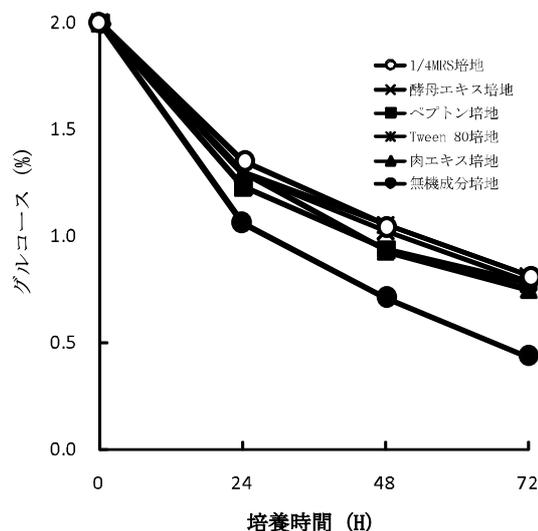


図1-2 *L.casei*のグルコース消費と培地成分

*L.delbrueckii* においても、ペプトン, 肉エキス, 酵母エキスまたは Tween80 を増強した培地では、乳酸生成量および、糖の消費量に有意な差はなかったが、無機成分培地では、培養 48 時間後にはグルコースを消費し尽くし、乳酸の生成もピークに達したことから、自己調製

酵母エキスから窒素源が供給できていることが確認できた。また、*L.delbrueckii* は乳酸発酵で広く工業的に用いられている乳酸菌の 1 つであり、*L.casei* に比べ、全体的に乳酸の生成および糖の消費速度が速く、培養 72 時間後には、その他の培地でも無機成分培地と匹敵する乳酸の生成が認められた (図 2-1, 2-2)。

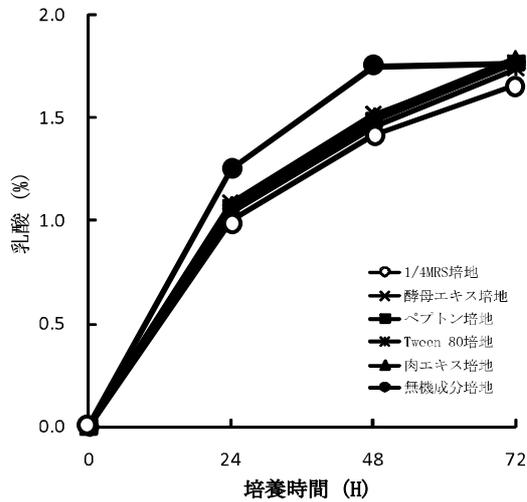


図 2-1 *L.delbrueckii* の乳酸生成と培地成分

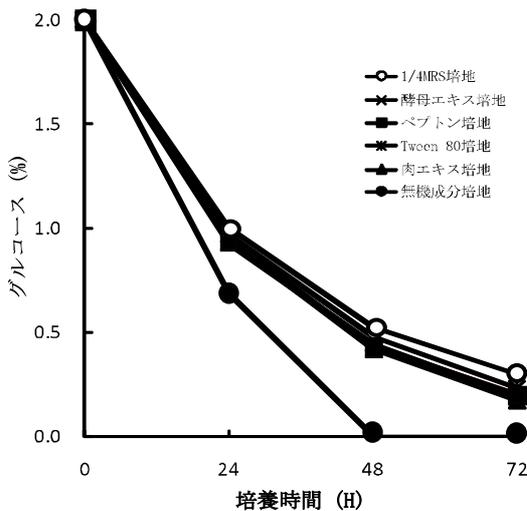


図 2-2 *L.delbrueckii* のグルコース消費と培地成分

さらに、*L.casei* について、無機成分添加量を MRS 通常使用濃度の 75%または等量 (100%) にした培地を用いて培養を行ったところ、無機成分濃度に依存して乳酸生成量が向上し、培養 72 時間後において、培地の初発グルコース量に対する乳酸の生成比率は 90%以上となり、乳酸菌の生育が非常に良好であることが確認できた (表 3)。このことから、自己調製酵母エキスから培地窒素源の供給が十分行われていることが確認できた。

今後は自己調製酵母エキス、糖化した米糠および醤油

表 3 培養 72 時間後の乳酸生成量と残グルコース量

培地	初発	残	生成乳酸	乳酸生成率
	グルコース	グルコース		
%				
無機100%	2.00	0.00	1.96	98.0
無機75%	2.00	0.05	1.89	94.5
無機50%	2.00	0.30	1.57	78.5

粕を加えた天然培地に無機成分を加えて、乳酸菌培地を調製し、乳酸生成量を向上させるための検討を実施する予定である。

#### 4. 結 言

甲州ブドウ搾り滓で酵母を培養し、酵母のエキス化方法を検討した。ガラスビーズ破碎、オートクレーブ、超音波破碎および自己消化のなかでは、作業の簡便さやエキス化効率から自己消化法が適していると判断した。

自己消化によって調製した酵母エキス液を使用して、乳酸菌を培養した結果、窒素源として利用可能で、さらに無機成分を添加することにより、乳酸の生成量が向上した。

#### 5. 謝 辞

ブドウ搾り滓をご提供いただいた関係各位に、厚く御礼申し上げます。また、本研究のコーディネーターとして、試験の進行や取りまとめ際し、適切なご助言を頂いた、山梨県総合理工学研究機構の市川和規研究管理幹に厚く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 斎藤 美貴, 橋本 卓也, 小嶋 匡人, 長沼 孝多, 木村 英生, 吾郷 健一, 森 智和: 山梨県工業技術センター研究報告, No.24, p.143-147 (2010)
- 2) R.Y.スタニエ, J.L.イングラム, M.L.ウーリス, P.R.ペインター共著/高橋 甫, 斎藤 日向, 手塚 泰彦, 水島 昭二, 山口 英世共訳: 微生物学入門編, 培風館, p.27 (1980)
- 3) Ronald M. Atlas: HANDBOOK OF Microbiological Media, CRC PRESS, p.892 (2004)
- 4) 秋山 裕一監修: 酵母のニューバイオテクノロジー, 医学出版センター, p.16-17 (1990)
- 5) 高分子学会編集: 天然素材プラスチック, 共立出版, p.18-20 (2006)
- 6) Takafumi Naganuma, Yasuyuki Uzuka, and Kentaro Tanaka: *Anal. Biochem.*, 141, p.74-78 (1984)