

## 醗酵食品残渣を使用した乳酸醗酵

斎藤美貴<sup>1</sup>, 長沼孝多<sup>1</sup>, 小嶋匡人<sup>1</sup>, 橋本卓也<sup>1</sup>, 木村英生<sup>1</sup>, 上野良平<sup>2</sup>, 森智和<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山梨県工業技術センター, <sup>2</sup>山梨県環境科学研究所)

**要約** 醗酵食品残渣を乳酸菌の培地として利用するために、米糠を糖化して炭素源とした。甲州ブドウ搾り滓から調製した酵母エキスおよび醤油粕を窒素源とし、無機成分を加えた醗酵残渣混合培地で*Lactobacillus casei* および*Lactobacillus rhamnosus*の培養を行なったところ、MRS培地に匹敵する乳酸の生成がみとめられた。グルコース濃度を10%とした培地においても、良好な乳酸菌の生育が認められた。

## Lactic Fermentation Using the Waste from the Fermented Food industry

Miki SAITO<sup>1</sup>, Kota NAGANUMA<sup>1</sup>, Masato KOJIMA<sup>1</sup>, Takuya HASHIMOTO<sup>1</sup>, Hideo KIMURA<sup>1</sup>, Ryohei UENO<sup>2</sup> and Tomokazu MORI<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Yamanashi Prefectural Industrial Technology Center, <sup>2</sup>Yamanashi Institute of Environmental Sciences)

**Abstract** In order to produce lactic acid by using of fermentation food processing residue as medium of lactic acid bacteria, we saccharified rice bran as carbon source. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* were cultivated using yeast extract made from lee of Koshu grape and lee of soy source were used as nitrogen source, and mineral, they showed good growth comparable to the growth of MRS medium. The two strains were grown well in the medium glucose concentration of 10%.

### 1. 緒言

平成18年3月に政府が打ち出した「バイオマス・ニッポン総合戦略」を機に、バイオマス資源の利活用の重要性が意識され、「脱石油化、植物由来への転換」が政府の環境対策の新たな方向性として示された。ポリ乳酸はバイオマス(主にトウモロコシ)を原料とする代表的なバイオプラスチックで、トウモロコシなどに含まれるデンプンを酵素によって糖化してブドウ糖に分解し、乳酸菌によって乳酸発酵して、原料となる乳酸が生成される。ポリ乳酸は植物を原材料としているので、石油資源を使用しないことと、カーボンニュートラルであることが特徴である。

しかし、原材料が食糧やバイオ燃料と競合している点と乳酸菌は栄養要求性が高いため、乳酸を高収率で回収するためには栄養豊富な培地が必要となる点が製造上の問題点となっている。また、乳酸回収・精製上の問題点として、従来法の沈殿法や蒸留法はエネルギーを大量消費するため、環境負荷が大きく、生産プロセスの環境負荷低下が求められており、それに代わる方法として、電気透析装置を用いた膜分離法が開発されている<sup>1)</sup>。

以上を踏まえ、本研究は殆ど再利用されていない山梨県内の醗酵食品業で排出される醗酵食品残渣について、乳酸醗酵培地としての利用可能性を検討し、ポリ乳酸の原料となる乳酸の生産を目的とした。山梨県工業技術センターでは乳酸醗酵を担当し、山梨県環境科学研究所で乳酸の電気透析装置による分離・精製とシステム全体の環境影響評価を担当し、環境評価はライフサイクルアセスメント手法で行なった。

工業技術センターでは昨年度までに、各種醗酵食品残渣を乳酸菌の増殖培地として使用するため、その栄養成分の分析を行なった。その結果、乳酸菌培地の炭素源は米糠が有効であることがわかった。窒素源は、甲州種ワイン搾り滓で酵母を培養しエキス化により、供給出来ることが分かった<sup>2,3)</sup>。

本年度は、炭素源として清酒醸造時に排出される米糠を使用するための糖化条件について試験した。また、窒素源として醤油粕を培地に添加する場合に、醤油粕中の食塩が乳酸菌の増殖に及ぼす影響を調べた。以上の成果を基に、米糠糖化液、自己調製酵母エキス、醤油粕および無機成分からなる醗酵食品残渣混合培地を調製し、乳酸菌の培養を行なった。また、工業的な乳酸の醗酵生産を想定して、ジャーファーメンター装置を用いて、初発糖濃度が10%の醗酵食品残渣混合培地での乳酸醗酵を試み、本培地で生成される全乳酸量およびL-乳酸量を定量をしたので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2-1 米糠糖化液での乳酸菌の培養

##### 2-1-1 供試試料

米糠は酒造好適米(夢山水, 美山錦, ひとごち, 吟のさと, 改良雄町, 山田錦および玉栄が任意の割合で混合されたもの)をテストミル((株)サタケ社製, TM05C)を用いて精米し、精米歩合60%までのものを使用した。

##### 2-1-2 米糠の糖化

米糠に3倍量の蒸留水を加え、105°Cで5分間オートクレーブした。50°Cまで室温で放冷してから、糖化酵素グルクSG(アマノエンザイム社製)またはスミチーム(新日本化学工業社製)を用法に従い加え、55°C, 回転振とう40 rpmで24時間反応させた。沸騰水中で10分間加熱し、酵素を失活させた。一部糖化液を採取し、遠心分離(4,583g, 5分間, 4°C)して、上澄を採取し、蒸留水で40倍希釈後、グルコースCIIテストワコー(和光純薬社製)でグルコース量を測定した。

##### 2-1-3 供試菌株

(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を使用した。

#### 2-1-4 使用培地

前培養には乳酸菌用半合成培地であるMRS培地<sup>4)</sup>を使用した。本培養は米糠糖化液をグルコース濃度が2%となるように希釈し、MRS培地の構成無機成分であるクエン酸二アンモニウム、リン酸水素二カリウム、酢酸ナトリウム、硫酸マグネシウム七水和物、硫酸マンガン(II)五水和物をMRS培地での使用量で加えた培地を用いた。

#### 2-1-5 培養方法

前培養は6 mlのMRS培地に*L.casei*を保存用高層培地から1白金線撮取りし、37°Cで15~24時間静置培養した。分光光度計(日立製作所製, U1500)を用いて、波長660 nmの光学密度(以下OD<sub>660</sub>と略す)を測定し、本培養培地にOD<sub>660</sub>が0.05となるように接種して、37°Cで静置培養した。

#### 2-1-6 生育測定

培養液を遠心分離(4,583g, 5分間, 4°C)し、得られた上澄中の乳酸濃度を既報<sup>2)</sup>と同様に高速液体クロマトグラフで測定した。尚、この分析カラムでは乳酸の光学異性体は分離できない。また、グルコース濃度はグルコースCIIテストワコー(和光純薬社製)で測定した。

### 2-2 醤油粕添加培地での乳酸菌培養

#### 2-2-1 供試試料

県内醤油醸造企業から提供された醤油粕を使用した。

#### 2-2-2 供試菌株

*Lactobacillus casei* NBRC 15883を使用した。

#### 2-2-3 使用培地

前培養にはMRS培地を使用した。本培養はグルコース濃度を2%とした1/2MRS培地に醤油粕を0.5, 1, 3または5%添加し、ホモジナイザーで醤油粕を均一化した培地を使用した。

#### 2-2-4 培養方法および生育測定

2-1-5および2-1-6と同様に行なった。

### 2-3 醱酵食品残渣混合培地での乳酸菌培養

#### 2-3-1 供試菌株

*Lactobacillus casei* NBRC 15883, *Lactobacillus rhamnosus* NBRC3425および(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。

#### 2-3-2 自己調製酵母エキスの調製

培地調製および前培養は既報<sup>3)</sup>と同様に行い、本培養はジャーファーマンター(MDL-500, 丸菱バイオエンジン社製)を使用して3Lスケールで実施した。温度は30°Cに設定し、20L/minで通気しながら、200 rpmで旋回し、24時間培養した。

培養液からの菌体回収および溶菌も既報<sup>3)</sup>と同様に行なった。

#### 2-3-3 使用培地

前培養にはMRS培地を使用した。本培養にはグルコース濃度が2%となるように希釈した糖化液に自己調製酵母エキス1.5 ml, 醤油粕0.6g, MRS培地の構成無機成分であるクエン酸二

アンモニウム、リン酸水素二カリウム、酢酸ナトリウム、硫酸マグネシウム七水和物、硫酸マンガン(II)五水和物をMRS培地での使用量で加えて、全量6 mlの培地を調製した。

#### 2-3-4 培養方法および生育測定

2-1-5および2-1-6と同様に行なった。

### 2-4 高糖濃度中規模スケールでの乳酸菌培養

#### 2-4-1 供試菌株

*Lactobacillus casei* NBRC 15883および*Lactobacillus rhamnosus* NBRC3425を使用した。

#### 2-4-2 使用培地

前々培養および前培養にはMRS培地を使用した。本培養にはグルコース濃度が10%になるように希釈した糖化液に、自己調製酵母エキス375 ml, 醤油粕15g, 硫酸マグネシウム七水和物0.15g, 硫酸マンガン(II)五水和物0.075gを加え、水道水で全量1.5Lとし、ホモジナイザーで均一化した培地を用い、オートクレーブ後のpHを28%アンモニア水で6.0に調整した。

#### 2-4-3 培養方法

前々培養は6 mlのMRS培地に各乳酸菌株を保存用高層培地から1白金線撮取りし、37°Cで15~24時間静置培養した。この培養液を前培養培地50 mlにOD<sub>660</sub>が0.01となるように植え継ぎ、37°Cで16~18時間培養して、本培養培地に全量接種した。本培養はジャーファーマンター(CLN-3000型, MBS社製)を使用した。温度は37°Cに設定し、50 rpmで旋回しながら、28%アンモニア水を用いてpHを6.0に保持し、72時間培養した。

#### 2-4-4 生育測定

2-1-6と同様に行なった。

#### 2-4-5 培養液の回収および清澄化

培養終了後の培養液を遠心分離(4,730g, 30分間, 4°C)し、上澄液を採取し、30分間沸騰水中で加熱した。濾紙(No.2)で吸引による減圧濾過または自然濾過して、夾雑物を取り除いた。

### 2-5 乳酸の光学異性体の分離および定量

#### 2-5-1 培養液中の全乳酸量の測定

2-1-6と同様に行なった。

#### 2-5-2 培養液中のL-乳酸量の測定

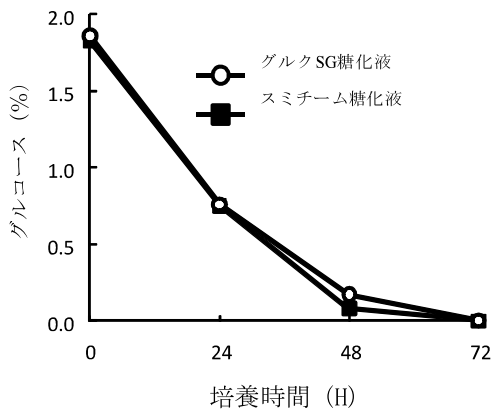
2-1-6と同様に調製した試料を光学異性体分離カラム(CHRALPAK MA(+)) 50×4.6 mm, ダイゼル化学工業社製)を使用してL体とD体を分離し、L体を定量した。移動相は2 mM硫酸銅/アセトニトリル=95/5を使用し、流速は0.5 ml/min, カラム温度は35°Cに設定し、検出はUV236 nmで行なった。

## 3. 結果および考察

### 3-1 酵素を使用した米糠糖化液での乳酸菌の培養

培地炭素源を調製するため、糖化酵素グルクSGまたはスミ

(1) グルコースの消費



(2) 乳酸の生成

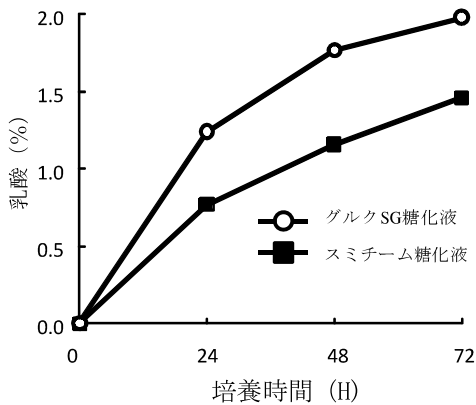


図1 異なる糖化酵素を使用した米糠糖化液での乳酸菌の培養

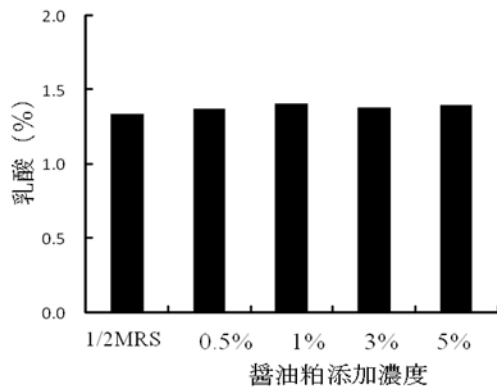
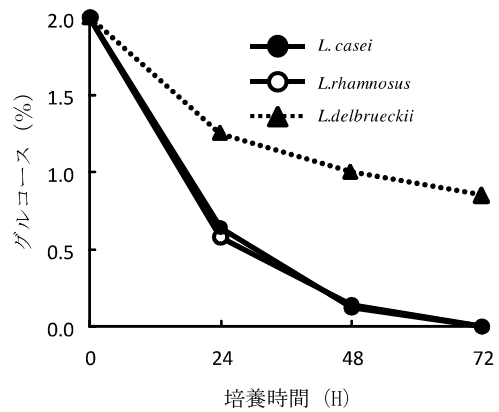


図2 醤油粕が乳酸菌の生育に及ぼす影響

チームを利用して米糠の糖化を行なった。いずれの酵素で糖化した場合も得られる糖化液中のグルコース濃度は16%程度であった。

既報<sup>2)</sup>の2-4-2と同様に、米糠糖化液を乳酸菌培地として使用した場合に不足する栄養源を調べた結果、炭素源だけではなく窒素源も供給されていることが分かり、無機成分の添加のみで乳酸菌の培養が可能であった。そこで、どちらの酵素がより培地調製に適しているかを確かめるため、それぞれの酵素を使用して調製した糖化液にMRS培地構成無機成分を加えて、

(1) グルコースの消費



(2) 乳酸の生成

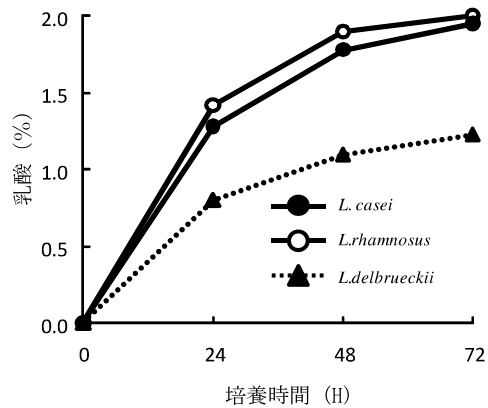


図3 醗酵食品残渣混合培地での乳酸菌の培養

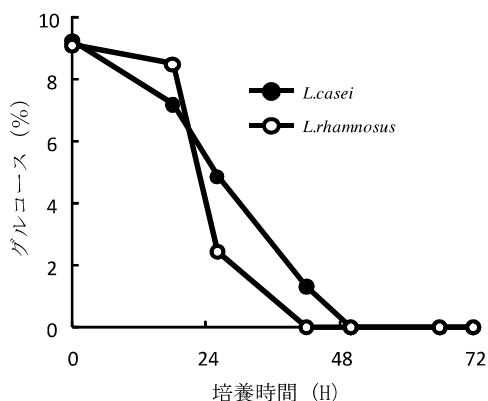
*L. casei*を培養した。グルコースはいずれも培養72時間後には消費し尽くされたが(図1-1)、乳酸の生成はスマチームよりもグルクSGを使用した糖化液の方が乳酸菌の生育が良好であった(図1-2)。

今回使用した酵素はいずれも清酒醸造において、麴の代用として使用される酵素であり、プロテアーゼも含有されるので、プロテアーゼ活性の違いが培地の窒素源成分に影響し、乳酸生成量に違いがあったものと推察される。本研究においては、培地窒素源として、自己調製酵母エキスを使用するが、より栄養豊富な培地とするために使用する酵素はグルクSGが適していることがわかった。

### 3-2 醤油粕が乳酸菌の生育に及ぼす影響

醤油粕には食塩が5~6%含有されているので、培地に醤油粕を添加した場合に、乳酸菌の生育が阻害されないかを確認した。培地の流動性を確保するために、醤油粕使用濃度は5%以下とした。図2に0.5~5%の濃度で醤油粕を含む1/2MRS培地における培養72時間後の乳酸生成量を示した。いずれの培地でも乳酸の生成量は醤油粕を含まない対照の1/2MRS培地とはほぼ同程度で、5%以下の使用では醤油粕による生育阻害がないことがわかった。しかし、醤油粕添加量と乳酸生成量に相関がなく、乳酸生成効率を有意に向上させる効果はなかった。

(1) グルコースの消費



(2) 乳酸の生成

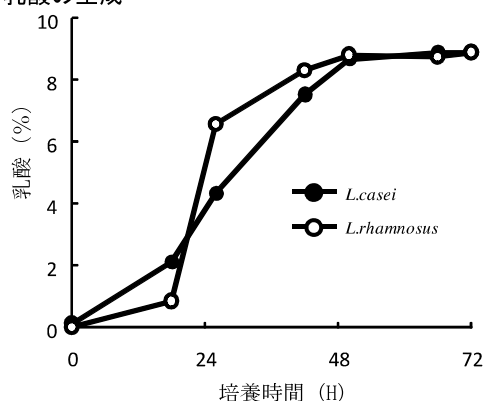


図4 高糖濃度中規模スケールでの乳酸菌の培養

表1 培養液の濁度

	OD <sub>660</sub>	目視
培養上清	1.80	濁りあり
減圧濾過	1.73	濁りあり
加熱後減圧濾過	0.85	濁りあり
加熱後自然濾過	0.29	透明

また、添加量が多いほど培地の粘度があがり、ジャーフェンターを使用した中規模スケールの培養では攪拌が困難になることが想定されたので、1%以下で添加するのが良いと判断した。

醤油粕は乳酸菌生育に必須の成分ではないが、一般的な乳酸菌半合成培地(MRS培地, GYP培地<sup>5)</sup>, WYP培地<sup>6)</sup>等)においても、窒素源は複数組み合わせで用いられるので、本培地では窒素源として主に用いるブドウ搾り滓から調製した酵母エキスと併せて醤油粕を利用することで、窒素源を增強できると考えられた。

3-3 醗酵食品残渣混合培地での乳酸菌培養

醗酵食品残渣から炭素源および窒素源を調製できたので、開発した培地で良好に生育する乳酸菌の選抜を行なった。乳酸菌はホモ乳酸醗酵を行いつつL-乳酸生成率が高い<sup>7)</sup> *Lactobacillus casei* NBRC 15883, *Lactobacillus rhamnosus*

NBRC 3425および*Lactobacillus delbrueckii subsp. JCM 1105*を用いた。培地はグルコース濃度が2%となるように希釈したグルクSGで糖化した米糠糖化液に自己調製酵母エキス1.5 ml, 醤油粕0.6g, MRS培地の構成無機成分であるクエン酸二アンモニウム, リン酸水素二カリウム, 酢酸ナトリウム, 硫酸マグネシウム七水和物, 硫酸マンガン(II)五水和物をMRS培地での使用量で加えて、全量6 mlの培地で調製した。その結果, *L.casei* および*L.rhamnosus*は糖の消費および乳酸の生成がいずれも良好であった。一方, *L.delbrueckii*は糖を消費しきれず、乳酸の生成効率も約60%と低かった(図3-1, 3-2)。栄養が十分であればホモ乳酸醗酵を行なう乳酸菌はグルコース1分子から2分子の乳酸を生成し、糖に対して90%以上の収量で乳酸を生成する<sup>6)</sup>。*L.delbrueckii*は醗酵食品残渣混合培地での培養は適さないと判断し、工業的な乳酸醗酵を想定した高糖濃度での中規模スケール培養には*L.casei*および*L.rhamnosus*を使用するのが良いと判断した。

3-4 高糖濃度中規模スケールでの乳酸菌培養

工業的な乳酸醗酵を想定して、初発グルコース濃度が10%の醗酵食品残渣混合培地で培養を行なった。グルコース濃度が10%になるように希釈した糖化液に、自己調製酵母エキス375 ml, 醤油粕15g, 硫酸マグネシウム七水和物0.15g, 硫酸マンガン(II)五水和物0.075gを加え、水道水で全量1.5Lとし、ジャーフェンター装置のpH自動調整機能を利用し、培地pHはアンモニア水で6に維持した。

*L.casei*および*L.rhamnosus*の培養結果を図4に示した。両乳酸菌とも糖を消費し尽くし、良好な生育を示した(図4-1, 4-2)。糖に対する乳酸の生成率は平均で*L.casei*が92%, *L.rhamnosus*が94%であり、生育における高糖濃度ストレスはなく、工業的な乳酸醗酵にも適応できることが分かった。また、ジャーフェンターでpHを制御しながら培養する場合は、多くの乳酸の生育に必須である2価のマンガンとマグネシウム<sup>8)</sup>のみで十分であり、クエン酸二アンモニウム, リン酸水素二カリウムおよび酢酸ナトリウムは必要ないことがわかった。

3-5 培養液の清澄化

培養液中の乳酸を電気透析装置で膜分離をする際に、透析膜の性能を維持するため、培養液中の不溶物を取り除く必要がある。培養液を遠心分離して、乳酸菌や培地固形物を取り除いた遠心上清の濁度(OD<sub>660</sub>)は1.80で、遠心分離だけでは清澄化できなかった(表1)。上清を減圧濾過しても濁度は殆ど変わらず、濁りは除けなかった。そこで、加熱処理を行ない、タンパク質を凝集させ、濾別した。その結果、上清を加熱後、自然濾過すると濁度は0.29となり、この濁度は植菌前のMRS培地の濁度(0.20)に近く、目視でも濁りは認められなかった。このことは、上清を加熱することでタンパク質が凝集し、濾過で取り除きやすくなるが、減圧濾過では凝集したタンパク質も濾別されずに濾液に混入すると考えられた。従って培養液の清澄化は、培養液を遠心分離(4,730g, 30分間, 4°C)し、採取した上

澄液を30分間沸騰水中で加熱後、濾紙(No.2)で自然濾過する方法を採択した。

### 3-6 培養液中のL-乳酸の定量

乳酸には光学異性体のL体とD体が存在するが、ポリ乳酸を製造する場合、結晶化を進行させ、加工性を向上させるために、L体またはD体どちらか一方が96%以上の高い光学純度であることが求められる<sup>9)</sup>。L体とD体どちらが生産されるか、あるいは両方生産されるかは、乳酸菌の種類と培養条件による<sup>10)</sup>。現在、発酵で生産されている乳酸の殆どがL-乳酸であるので<sup>11)</sup>、本研究では、L-乳酸を主に生産する乳酸菌を選択し、初発グルコース濃度が10%の発酵食品残渣混合培地で生産される乳酸のうち、L-乳酸の占める割合を調べた。

すなわち、予め全乳酸量を定量した試料を光学異性体分離カラムを用いて別途L-乳酸を定量し、全乳酸中に占めるL-乳酸量を測定した。その結果、培養液中の全乳酸に占めるL-乳酸の割合は*L.casei*の場合92.5%で、*L.rhannosus*の場合97.8%であった。乳酸の生成効率やL-乳酸の占める割合から判断して、醗酵食品残渣混合培地で培養する乳酸菌は*L.casei*よりも*L.rhannosus*が適していることが分かった。

### 3-7 乳酸生成に必要な醗酵残渣量の推定

本研究結果から、グルコース濃度10%の醗酵食品残渣混合培地から乳酸が9%以上得られることがわかった。同様の条件で乳酸醗酵を行ない、乳酸が9%得られたと仮定して、1 kgの乳酸を生成するのに必要な醗酵食品残渣量を算出した。尚、ブドウ搾り滓100gから調製できる自己調製酵母エキス量は27.4 mlとして計算した。また、糖化液のグルコース濃度は16%と仮定した。

その結果、ブドウ搾り滓は10.1 kg、米糠は1.7 kg、醤油粕は0.1 kg必要であることがわかった。

ホモ型乳酸醗酵では、グルコース1分子から2分子の乳酸が生成される<sup>12)</sup>。グルコースの供給源である米糠量から、得られる乳酸量を算出すると、本県で1年間に排出される米糠240tから得られる乳酸量は約141tと推定される。ポリ乳酸は原料乳酸の約80%の生産収率で得られるので<sup>13)</sup>、本県で製造できるポリ乳酸量は約112tと推定される。

## 5. 結 言

醗酵食品残渣を活用し、ポリ乳酸の原料となる乳酸を乳酸菌の乳酸醗酵によって得る一連の手法を検討した。

米糠を培地炭素源として使用するために、米糠の糖化酵素の検討を行なったところ、グルクSG(天野エンザイム社製)が適しており、米糠糖化液が乳酸菌培地の炭素源として利用できた。

また、窒素源としての利用を考えた醤油粕は食塩を含むため、乳酸菌の生育を阻害しない濃度での使用が求められた。培地中に占める醤油粕の割合が5%以下であれば、醤油粕に

よる乳酸菌の生育を阻害はなかったが、培地の流動性を考慮して、1%以下で使用することとした。

米糠糖化液(グルコース濃度2%)、自己調製酵母エキス、醤油粕に乳酸菌試験研究用培地であるMRS培地の構成無機成分を加えた培地において乳酸菌*L.casei*、*L.rhannosus*および*L.delbrueckii*培養した。*L.casei*および*L.rhannosus*はMRS培地に匹敵する乳酸の生成を示したが、*L.delbrueckii*は糖を消費しきれず、乳酸生成量が低かった。

工業的な乳酸製造を想定して、米糠糖化液の使用量をグルコース濃度で10%とし、自己調製酵母エキス、醤油粕および微量のマンガン、マグネシウムからなる培地でpHをアンモニア水で調整しながら*L.casei*および*L.rhannosus*を培養した。その結果、いずれも良好な生育を示し、糖に対する乳酸の生成率は90%以上であったが、*L.rhannosus*の方が乳酸の生成効率やL-乳酸の占める割合が高く、醗酵食品残渣での培養に適していると結論した。

## 6. 謝 辞

醗酵食品残渣を提供頂いた関係各位に、厚く御礼申し上げます。

また、研究を進めるにあたり多くのご助言を頂きました山梨県工業技術センター客員研究員の飯村穰先生に深謝いたします。

最後に、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に際し、適切なご助言を頂いた、総合理工学研究機構の市川和規特別研究員に厚く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Madzingaidzo, L., H. Dannar, and R. Braun: *J. Biotechnology*, 96, p.223-239 (2002)
- 2) 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: 山梨県総合理工学研究機構研究報告, **5**, p.97-102 (2010)
- 3) 斎藤美貴, 長沼孝多, 橋本卓也, 小嶋匡人, 木村英生: 山梨県総合理工学研究機構研究報告, **6**, p.47-50 (2011)
- 4) Ronald M. Atlas: *HANDBOOK OF Microbiological Media*, CRC PRESS, p.892 (2004)
- 5) Ronald M. Atlas: *HANDBOOK OF Microbiological Media*, CRC PRESS, p.754 (2004)
- 6) 西山隆造: 図解応用微生物の基礎知識, オーム社, p.153 (1981)
- 7) 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)
- 8) 乳酸菌研究集談会編: 乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター, p.121 (1996)
- 9) 小原仁美: 生分解性ケミカルとプラスチックの開発,

シーエムシー出版, p.91-99 (2000)

- 10) 辻秀人:ポリ乳酸 植物由来プラスチックの基礎と応用, 米田出版, p.34 (2008)
- 11) 小崎道雄・佐藤英一編著, 雪印乳業健康生活研究所編: 乳酸発酵の新しい系譜, 中央法規, p.13 (2004)
- 12) 村尾澤夫, 荒井基夫共編:応用微生物学改訂版, 培風館, p.170 (1993)
- 13) 川島信之:包装技術, 34, p.654-664(1996)

## 成果発表状況

### 学会発表

- 1) 斎藤美貴, 長沼孝多, 小嶋匡人, 橋本卓也, 木村英生:ワインから排出される澱の乳酸菌培地としての利用, (社)日本食品科学工学会第58回大会, 宮城県, 2011.