

自己調製酵母エキスでの乳酸菌培養

斎藤美貴, 長沼孝多, 橋本卓也, 小嶋匡人, 木村英生
(山梨県工業技術センター)

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、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、物理的破碎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の有用性を調査したところ、自己調製酵母エキスは窒素源として有効であることがわかった。

Cultivation of Lactic Acid Bacteria by Self-making Yeast Extract

Miki SAITO, Kota NAGANUMA, Takuya HASHIMOTO, Masato KOJIMA and Hideo KIMURA (Yamanashi Industrial Technology Center).

Abstract To produce lactic acid by using of fermentation food processing residue as medium of lactic acid bacteria, we cultivated yeast on lees of Koshu grape and tried making yeast extract. The yeast extract was made by physical fracturing methods or autolysis method. From bacteriolysis rate and working efficiency, autolysis method was adequate. Utility as the lactic acid bacteria medium was investigated by culturing the lactic acid bacteria by the self-making yeast extract. And self-making yeast extract was effective as nitrogen source.

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。

昨年度は各種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、甲州種に代表される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、酵母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。そこで、乳酸菌培地成分のなかで、最もコストが高い成分のひとつである酵母エキスを自己調製するために、甲州種のブドウ搾り滓で酵母の培養を行ったところ、*Saccharomyces cerevisiae* W3, *Saccharomyces cerevisiae* OC-2および*Pichia anomala*が良好に増殖することがわかった¹⁾。即ち、ブドウ搾り滓が、酵母の増殖培地として活用できることを明らかにした。

そこで、本年度は、甲州種の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、乳酸菌の窒素供給源になっているか調査した。

2. 実験方法

2-1 実験材料

ブドウ搾り粕(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°Cで保存した。

2-2 ブドウ搾り粕での酵母の培養

2-2-1 酵母菌株

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 酵母増殖培地

前培養には既報²⁾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滓濃度が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°C)して調製し、上澄を使用した。

2-2-3 酵母の培養方法

前培養は半合成培地5mlに各菌株を保存用斜面培地から1白金耳接種し、130rpm, 25°Cで15~24時間振盪培養した。分光光度計(U-1500, HITACHI社製)を用いて、波長660nmの光学密度(以下OD₆₆₀と略す)が0.5を越えたら、ブドウ搾り滓培地にOD₆₆₀が0.01となるように接種し、130rpm, 25°Cで24時間振とう培養した。

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%菌体液を使用して、以下の溶菌または破碎方法で酵母をエキス化した。

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(CUTE-MIXER CM-1000, 東京理化学器械株式会社製)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。得られた上澄液分の可溶性タンパク質量をBCA法(PierceR BCA Protein Assay Kit, サーマフィッシュャーサイエンティフィック株式会社製)で定量し、酵母のエキス化程度を調べた。

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℃、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（UD-201, 株式会社トミー精工社製）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²⁾, 酢酸エチルを菌体液中の菌体湿重量に対して2%加え, 45℃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 乳酸菌株

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³⁾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 sub-sp.* (JCM1105)を使用した。

2-4-2 自己調製酵母エキス培地の調整

前培養にはMRS培地⁴⁾を使用した。本培養は, 自己調製酵母エキスが, 乳酸菌の窒素源や増殖因子の供給源として有効であるかを確かめるために表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 乳酸菌の培養方法

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℃で15~24時間静置して前培養した。分光光度を用いてOD₆₆₀を測定し, 本培養用培地にOD₆₆₀が0.05となるように植えつき, 37℃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℃)し, 得られた上澄中の乳酸濃度を既報²⁾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(グルコースCIIテストワコー, 和光純薬株式会社製)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*が甲州種の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³⁾ので, 20%菌体液中に溶出されたタンパク質量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

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

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、発熱するため水冷する必要あり、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、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。

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)で乳酸菌*L. casei* および*L. delbrueckii*の培養を行い、自己調製酵母エキスの乳酸菌増殖培地の窒素源としての有効性について調査した。

1/4MRS培地において、自己調製酵母エキスから窒素源が供給されなかった場合、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、糖の消費が増加する。しかしながら、*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なかった。一方、無機成分を増強した培地では乳酸生成量が向上し、グルコースの消費量も多くなった。このことから、自己調製酵母エキスから窒素源は十分供給されていたものと考えられた。Tween80培地においても1/4MRS培地との間に有意な差は認められず、自己調製酵母エキスを使用した場合は、Tween80は不要であると考えられた(図1-1, 1-2)。

*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。一方、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されていると考えられた。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、

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	8.7
オートクレーブ	2.8
超音波破碎	2.8
自己消化	5.6

表3 培地グルコース量投入量と*L. casei* 培養72時間後の残グルコース量および乳酸生成量

培地	グルコース		生成乳酸量	乳酸生成率
	投入量	残量		
無機100%	20g	0.0g	19.6g	98.0%
無機75%	20g	0.5g	18.9g	94.5%
無機50%	20g	3.0g	15.7g	78.5%

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)。

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った(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ものと考えられた。

4. 結 言

甲州種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。

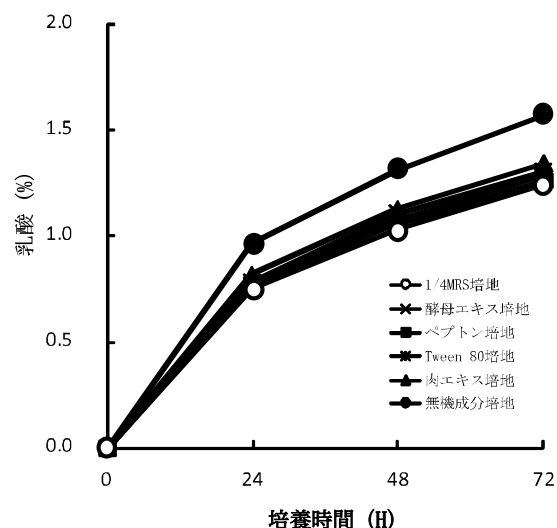


図1-1 *L. casei*の乳酸生成と培地成分

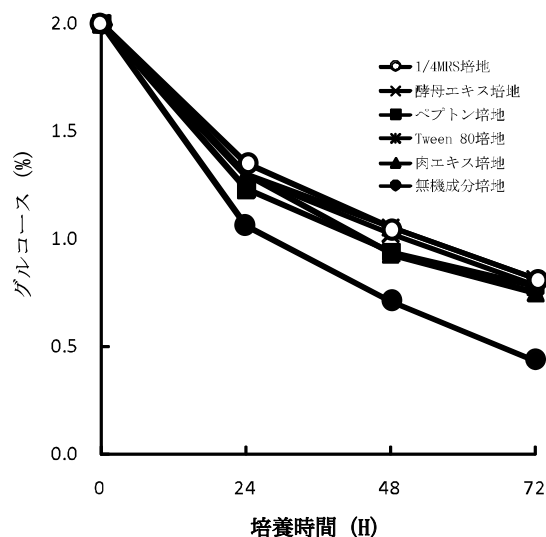


図1-2 *L. casei*のグルコース消費と培地成分

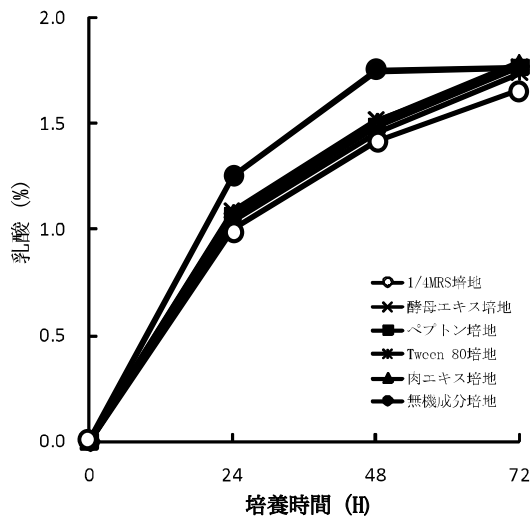


図2-1 *L. delbrueckii* の乳酸生成と培地成分

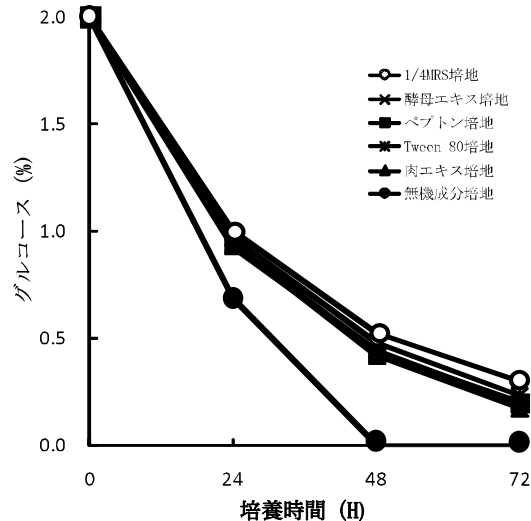


図2-2 *L. delbrueckii* のグルコース消費と培地成分

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、自己調製酵母エキスは乳酸菌の窒素源として利用可能であることがわかった。

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の際に適切なご助言を頂いた、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: 山梨県総合理工学研究機構研究報告, **5**, p.97-102 (2010)

- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) Ronald M. Atlas: HANDBOOK OF Microbiological Media, CRC PRESS, p892 (2004)
- 5) Takafumi Naganuma, Yasuyuki Uzuka, and Kentaro Tanaka: *Anal. Biochem.*, **141**, p.74-78 (1984)

成果発表状況

- 1) 斎藤美貴, 橋本卓也, 小嶋匡人, 長沼孝多, 吾郷健一, 森智和: 発酵食品残渣の有効活用に関する研究. 平成22年度食品関係技術研究会ポスターセッション (茨城)
- 2) 斎藤美貴, 長沼孝多, 橋本卓也, 小嶋匡人, 木村英生, 上野良平, 森智和: 発酵食品残渣の有効活用に関する研究 (第2報). 第25回山梨県工業技術センター研究発表会 (2011)