

醗酵食品残渣の成分分析とブドウ搾り滓による酵母の培養

山梨県工業技術センター

斎藤 美貴・橋本 卓也・小嶋 匡人・長沼 孝多・木村 英生

山梨県環境科学研究所

吾郷 健一・森 智和

Component Analysis of Utilization of Fermentation Food Processing Waste and Fermentation of Yeast on Lees of Grape

Yamanashi Prefectural Industrial Technology Center

Miki SAITO, Takuya HASHIMOTO, Masato KOJIMA, Kota NAGANUMA and Hideo KIMURA

Yamanashi Institute of Environmental Sciences

Ken-ichi AGO and Tomokazu MORI

要 約

醗酵食品残渣の活用による乳酸を生成するために、醗酵食品残渣の成分分析を行った。ブドウ搾り滓は炭水化物が多く、タンパク質と脂質は少なかった。赤ワイン用品種より白ワイン用品種の搾り滓の方がブドウ糖および果糖を多く含み、酵母の生育に必要な糖の供給源として有効であった。醤油粕、酒粕はタンパク質の量が多く、培地に使用した場合に乳酸菌の窒素源として有効であると推察された。米糠は炭水化物が多く、乳酸菌の炭素源として有効であると推察された。

乳酸菌培地に使用する酵母エキス調製を目的に、甲州種ブドウ搾り滓で6種類の酵母の培養を行ったところ、*S. cerevisiae* W3と*S. cerevisiae* OC-2の増殖速度が速く、培養時の作業性も良かった。

Abstract

To obtain Lactic acid by utilizing of fermentation food processing wastes, the component of the wastes were analyzed. Lees of grape contained high carbohydrate and there were little protein and lipid. White wine lees contained glucose and fructose more than Red wine lees. White wine lees were effective resource of carbon of yeast culture medium. Lees of Soy sauce and Sake contained much protein. These wastes were effective resource of nitrogen for lactic acid bacteria. Rice bran contained so high carbohydrate that has possibility to use as resource of carbon for lactic acid bacteria.

Six varieties of yeast were cultivated in lees of grape to produce yeast extract used as media to lactic acid bacteria. *Saccharomyces cerevisiae* W3 and *S. cerevisiae* OC-2 were suitable for cultivation because these yeasts growth speed was fast and workability was agreeable.

1. 緒 言

山梨県の主要地場産業であるワイン業界では、年間約3,000tに及ぶブドウ搾り滓が排出されている。また、清酒業界では米糠、酒粕が約300t、醤油業界では醤油粕が約800t排出されている。これら、醗酵食品の残渣は栄養成分を多く含むため、有効活用が求められているが、飼料として一部利用されている他は、大部分が廃棄されている。

一方、植物に含まれる糖を乳酸醗酵することにより得られる乳酸の重合体であるポリ乳酸は、環境に配慮した

プラスチックとして注目を集め、その本格的な供給・製品化の重要性が急速に認知されてきている。しかし、原材料が食品やバイオ燃料と競合しており、原材料の確保が問題化すると考えられる。

また、乳酸菌は栄養要求性が高く、酵母エキスなどの培地の栄養源の質と添加量が生産量に大きく影響する¹⁾ため、安価で栄養源豊富な培地の開発が求められている。

そこで、本研究は醗酵食品残渣の乳酸菌による乳酸醗酵の培地および基質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

を目標とした。

本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、その成分を明らかにするとともに、ブドウ搾り滓で酵母を培養し、エキス化するための酵母の選択を行ったので、報告する。

2. 実験方法

2-1 実験材料

ブドウ搾り滓（アジロン、甲斐ノワール、カベルネーヴィニオン、ケルナー、甲州、シェーンブルガー、シャルドネ、シラー、ソーヴィニオンブランおよびマスカットベリーA）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た。醤油粕は県内醤油製造企業1社から入手した。酒粕は県内清酒醸造企業1社から購入した。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TM05C（㈱サタケ社製）を用いて、精米歩合70%までの糠を採集した。すべての試料は使用するまで、 -20°C で保存した。

2-2 分析方法

2-2-1 一般成分

醗酵残渣の一般成分（水分、タンパク質、脂質、および灰分）の分析は食品の一般成分分析に準じて行った²⁾。

2-2-2 無機成分

リン以外の無機成分については、2-2-1によって得られた灰分を0.1Nの塩酸に溶解し、セイコー電子工

表1 糖分析条件

ポンプ	: LC-10AD (㈱島津製作所社製)
検出器	: 示差屈折計検出器 RID-10A (㈱島津製作所社製)
カラム	: Shin-pack SCR-101C ϕ 7.9×300mm
カラム温度	: 80°C
溶離液	: 蒸留水
溶離液流速	: 0.8ml/min

表2 有機酸分析条件

ポンプ	: LC-10AD (㈱島津製作所社製) 2台
検出器	: 電気伝導度検出器 CCD-10A (㈱島津製作所社製)
カラム	: Shin-pack SCR-102C ϕ 8.0×300mm
溶離液	: 5mM p-トルエンスルホン酸
溶離液流速	: 0.6ml/min
反応液	: 5mM p-トルエンスルホン酸 20mM Bis-Tris 100mM EDTA
反応液流速	: 0.6ml/min

業㈱社製原子吸光分光光度計SAS7500で分析した。リンについては、バナドモリブデン酸法²⁾により分析した。

2-2-3 糖、有機酸および遊離アミノ酸

各試料約10gをエタノールの終濃度が80%となるように加えた10倍量のエタノール溶液中でホモジナイズし、15分間加熱還流抽出を行なった。冷却後濾紙（No.2）で濾過後、濾液を 40°C 以下で減圧濃縮した。糖および有機酸は、これを蒸留水で定容後、蒸留水で適当に希釈して、0.20mのメンブランフィルタで濾過したものを高速液体クロマトグラフで分析した。糖分析の分析条件を表1に示した。また、有機酸のポストカラムpH緩衝法³⁾による分析条件を表2に示した。

遊離アミノ酸は蒸留水で定容後の試料を0.01Nの塩酸で適当に希釈し、日本電子㈱社製のアミノ酸分析機（JLC-500/V2）で分析した。

2-3 ブドウ搾り滓での酵母の培養

2-3-1 供試菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NBRC）から譲られた子囊菌酵母*Saccharomyces cerevisiae* W3（NBRC 106611）、*Saccharomyces cerevisiae* OC-2（NBRC 2260）、*Pichia anomala*（NBRC 10213^T）、*Debaryomyces hansenii*（NBRC 0015^T）、不完全酵母*Cryptococcus aerius*（NBRC 0377^T）および担子菌酵母*Rhodsporidium toruloides*（NBRC 8766^T）を使用した。

なお、*S.cerevisiae* W3は白ワイン醸造用、*S.cerevisiae* OC-2は赤ワイン醸造用酵母である。*P.anomala*と*D.hansenii*は産膜酵母で、*P.anomala*はワインやビールに認められ、*D.hansenii*は漬物などに認められる。*C.aerius*は糖の醗酵性がないこと、*R.toruloides*は菌体内に脂肪を蓄積することが特徴である。

2-3-2 使用培地

前培養にはブドウ糖10.0g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0g、 KH_2PO_4 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 NaCl 0.1g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、酵母エキス1gを1Lの蒸留水に溶解した菌体増殖用の半合成培地⁴⁾を使用した。本培養にはブドウ搾り滓を培地として使用した。4醸造所から提供を受けた甲州ブドウ搾り滓を同量ずつ混合し、甲州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（4,730×g、20分間、 4°C ）して調製し、上澄とした。

2-3-3 培養方法

YM寒天培地⁵⁾上で保存しておいた菌を上述の半合成培地5mlに各菌を1白金耳で接種し、 25°C で往復振盪培養（130rpm、振幅幅2.5cm）を15～24時間おこなっ

た. 分光光度計 (U1500, 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、甲州ブドウ搾り滓培地 (100ml) にODが0.01となるように植継ぎ、前培養と同じ条件の往復振盪培養で本培養をおこなった。

2-3-4 生育測定

培養液のOD₆₆₀値を測定した。また、培養液を遠心分離 (4,583×g, 10分間, 4℃) し、得られた上澄中の糖濃度を表1に示した条件で測定した。

3. 結果および考察

3-1 醱酵食品残渣の一般成分

醱酵食品残渣の一般成分について分析した結果を表3に示した。ブドウ搾り滓は水分の次に炭水化物が多く、タンパク質と脂質は少なかった。白ワイン用品種の搾り滓 (甲州およびシェンブルガー) と赤ワイン用品種の搾り滓 (アジロンおよびマスカットベリーA) に大きな成分の違いは認められないが、赤ワイン用品種の搾り滓は酵母によるアルコール醱酵後に排出されるので、炭水化物に占める糖質の割合は低いと考えられた。

醤油粕、米糠および酒粕はブドウ搾り滓に比べ、タンパク質量が多く、培地に使用した場合に窒素源として、有効であると推察された。また、本研究で使用した酒造

表3 醱酵食品残渣の一般成分

醱酵残渣	水分 タンパク質 脂質 炭水化物 灰分 (g/100g)				
	ブドウ搾り滓				
甲州	75.0	2.9	0.8	19.2	2.1
シェンブルガー	75.9	1.8	0.8	19.7	1.8
アジロン	67.0	5.0	1.4	23.1	3.5
マスカットベリーA	73.2	3.3	1.4	20.1	2.1
醤油粕	37.6	7.8	7.2	38.9	8.5
米糠	13.2	9.2	7.5	66.4	3.7
酒粕	56.5	10.5	1.7	30.8	0.5

表4 醱酵食品残渣中の無機成分

醱酵残渣	Na Mg K Ca Mn Fe Cu Zn P (mg/100g)									
	ブドウ搾り滓									
甲州	0.6	14.6	342.0	55.1	0.2	0.8	0.2	0.2	0.2	35.4
シェンブルガー	1.5	22.0	608.6	92.8	1.0	1.6	1.1	0.5	0.5	72.8
アジロン	12.0	19.1	1174.8	154.3	0.4	2.6	0.8	0.5	0.5	88.3
マスカットベリーA	2.8	13.7	345.0	56.7	0.3	1.5	0.8	0.4	0.4	77.8
醤油粕	3911.0	31.7	168.1	460.6	1.0	5.4	3.3	4.2	4.2	98.1
米糠	3.0	45.7	359.7	18.1	6.0	2.5	0.5	3.5	3.5	1001.1
酒粕	1.2	6.7	21.5	4.0	0.2	0.1	0.4	1.6	1.6	52.1

米から排出される米糠は4訂日本食品標準成分表に記載される米糠と比べ、脂質が約1/2と少なく、炭水化物が1.4倍程度多かったので、炭素源として有効に利用できるものと考えられた。

3-2 醱酵食品残渣の無機成分含量

醱酵食品残渣の無機成分について分析した結果を表4に示した。ブドウ搾り滓の中で最も多い無機成分はカリウム (K) で、全体の約75%を占めていた。醤油粕はナトリウム (Na) が、米糠はカリウム (K) とリン (P) が豊富に含まれる特長が認められた。

3-3 醱酵食品残渣の遊離アミノ酸量

醱酵食品残渣に含まれる遊離アミノ酸について、主要7成分を表5に示した。ブドウ搾り滓は白ワイン用品種の搾り滓 (甲州) の方が、赤ワイン用品種の搾り滓 (アジロン) より遊離アミノ酸が約4倍多かった。乳酸菌は殆どの菌種でグルタミン酸 (Glu) とバリン (Val) を生育に要求する⁶⁾。醤油粕と酒粕は両方を豊富に含み、遊離アミノ酸量が最も多かったため、乳酸菌用培地に添加すると有効に働くと考えられた。

3-4 ブドウ搾り滓の糖含量

白ワイン用品種の搾り滓 (甲州, シェンブルガー, ケルナー, シャルドネおよびソーヴィニヨンブラン) と赤ワイン用品種のブドウ搾り滓 (アジロン, マスカットベリーA, 甲斐ノワール, カベルネソーヴィニヨンおよびシラー) 中の糖濃度を測定した結果を表6に示した。搾り滓に含まれる糖は主にブドウ糖および果糖で、スクロース量は僅かであった。炭水化物量は白ワイン用品種と赤ワイン用品種で大きな違いが認められなかったが (表3), 糖濃度は20倍以上白ワイン用品種の方が高く、白ワイン用品種の搾り滓が酵母生育の糖類の供給源として適していると判断した。

表5 醱酵食品残渣中の遊離アミノ酸

ブドウ搾り滓 (甲州)	ブドウ搾り滓 (アジロン)	醤油粕	米糠	酒粕
(mg/100g)				
Pro 50.8	Pro 5.4	Tyr 800.0	Glu 35.3	Ala 177.7
Arg 24.5	Ala 3.9	Glu 366.0	Asn 21.9	Glu 144.0
GABA 6.1	P-Ser 3.2	Phe 297.1	Asp 18.4	Asp 123.4
Ala 5.8	Glu 2.5	Leu 272.3	Ala 8.8	Leu 95.4
Glu 3.4	Asp 1.4	Asp 203.0	Ser 5.8	Lys 82.9
Ser 3.2	Leu 1.4	Ile 171.8	Gln 3.3	Val 81.9
Gln 2.5	Arg 1.3	Val 160.5	Arg 2.5	Arg 78.7
Others 11.9	Others 8.2	Others 1014.2	Others 20.6	Others 606.3
合計 108.2	27.3	3284.9	116.6	1390.3

表6 ブドウ搾り滓の糖量

ブドウ搾り滓	ショ糖	ブドウ糖	果糖	合計
	(g/100g)			
白ワイン用品種				
甲州	—	3.63	3.55	7.18
シェンブルガー	—	2.68	1.26	3.94
ケルナー	0.44	5.76	6.25	12.45
シャルドネ	0.43	3.64	5.54	9.61
ソーヴィニヨンブラン	0.23	2.75	2.44	5.41
赤ワイン用品種				
アジロン	—	0.42	0.4	0.82
マスカットベリーA	0.04	0.01	0.03	0.09
甲斐ノワール	0.06	0.27	0.31	0.64
カベルネソーヴィニヨン	0.13	0.02	0.05	0.19
シラー	0.03	—	0.05	0.08

3-5 ブドウ搾り滓の有機酸量

糖と同様に白ワイン用品種と赤ワイン用品種のブドウ搾り滓中の有機酸濃度を測定した結果を表7に示した。ブドウ搾り滓に主に含まれる有機酸は酒石酸とリンゴ酸で、生果の組成を反映したものと考えられた。白ワイン用品種と赤ワイン用品種のブドウ搾り滓の間に糖のような特筆すべき差異は認められなかった。

3-6 甲州搾り粕の成分比較

糖の含有量からブドウ搾り滓で酵母を培養するには、白ワイン用品種の搾り滓の利用が有効であることがわかった。また、山梨県内で醸造されるワインのうち約50%を甲州種が占めることから、甲州搾り粕を基本に酵母の培養を検討することとした。そこで、圃場や醸造所での圧搾方法などの違いによる成分の違いを確かめるために、異なる醸造所(A, B, C, D)から排出された甲州の搾り粕について成分分析した(Aは3-1~5で使

表7 ブドウ搾り滓の有機酸量

ブドウ搾り滓	クエン酸	酒石酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	合計
	(g/100g)					
白ワイン用品種						
甲州	—	0.28	0.12	—	—	0.40
シェンブルガー	—	0.24	0.03	0.06	0.11	0.44
ケルナー	—	0.16	0.59	—	—	0.32
シャルドネ	0.07	0.06	0.13	0.17	0.05	0.47
ソーヴィニヨンブラン	—	0.12	0.09	0.20	0.08	0.48
赤ワイン用品種						
アジロン	0.45	—	0.05	0.01	—	0.52
マスカットベリーA	0.03	0.01	0.04	0.16	—	0.33
甲斐ノワール	0.05	0.12	0.30	0.05	—	0.52
カベルネソーヴィニヨン	0.06	0.09	0.30	—	0.03	0.48
シラー	—	0.12	0.14	—	—	0.26

用した甲州である)。結果を表8, 9および10に示した。甲州搾り粕には100gあたりの平均として、水分76.0g, タンパク質1.9g, 脂質0.7g, 炭水化物18.5g, 灰分3.0gが含まれ、試料間のばらつきが大きかったのは灰分であった。

糖は100gあたり、ブドウ糖が4.19g, 果糖が4.45gで、ブドウ糖と果糖が合計で8.64g含まれており、醸造所間では大きな違いは認められなかった。

酵母の天然培地としてよく用いられるYM培地⁵⁾は、糖濃度が1%であるので、甲州ブドウ搾り滓の酵母培養用培地への使用は13% (w/v) 以上の使用で、必要な糖濃度を満たすことがわかった。

有機酸は酒石酸とリンゴ酸がそれぞれ0.17gと0.06g含まれていたが、試料間での差が大きかった。本研究では乳酸醗酵によって得た乳酸を精製することを目的としているので、乳酸以外の僅かな有機酸も除く必要がある。有機酸は酵母によって資化されないもので、酵母エキスとするブドウ搾り滓酵母培養液中の有機酸を取り除く方を検討する必要がある。

表8 甲州ブドウ搾り滓の一般成分

醸造所	水分	タンパク質	脂質	炭水化物	灰分
	(g/100g)				
A	75.0	2.9	0.8	19.2	2.1
B	76.6	1.5	0.6	17.5	3.8
C	72.6	2.0	0.7	19.7	5.0
D	79.6	1.3	0.7	17.4	1.0
平均±標準偏差	76.0±2.5	1.9±0.6	0.7±0.1	18.5±1.0	3.0±1.5

表9 甲州ブドウ搾り滓の糖含量

醸造所	ブドウ糖	果糖	合計
	(g/100g)		
A	3.63	3.55	7.18
B	4.41	4.59	9.00
C	3.73	4.29	8.02
D	4.98	5.38	10.36
平均±標準偏差	4.19±0.5	4.45±0.7	8.64±1.2

表10 甲州ブドウ搾り滓の有機酸含量

醸造所	酒石酸	リンゴ酸	合計
	(g/100g)		
A	0.28	0.12	0.40
B	0.09	0.01	0.10
C	0.08	0.01	0.09
D	0.21	0.10	0.31
平均±標準偏差	0.17±0.1	0.06±0.1	0.23±0.1

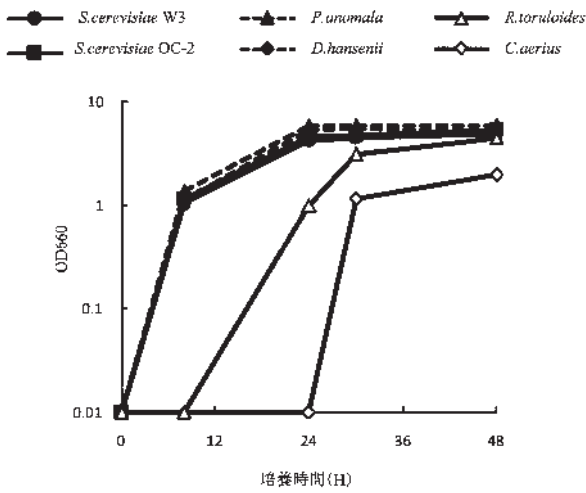


図1 酵母の増殖曲線

3-7 培養酵母の選択

甲州ブドウ搾り滓15% (w/v) で6種類の酵母を培養した増殖曲線を図1に示した。S.cerevisiae W3, S.cerevisiae OC-2, P.anomalaおよびD.hanseniiは培養24時間後にはほぼ定常期に達した。C.aeriusとR.toruloidesの増殖は他の酵母に比べると遅かった。

各酵母の培養液中のブドウ糖と果糖の濃度を測定した結果を図2-1および図2-2に示した。S.cerevisiae W3, S.cerevisiae OC-2およびP.anomalaは培養24時間後にはブドウ糖および果糖を消費し尽くしていることが確認できた。産膜酵母であるD.hanseniiは培養48時間後もブドウ糖、果糖ともに残存し、OD₆₆₀の増加は産膜成分の分泌によるものと推察された。C.aeriusは若干ブドウ糖を消費するものの、果糖は全く消費しなかった。R.toruloidesは50%程度のブドウ糖を消費するが、果糖の消費は認められなかった。YM培地⁵⁾でD.hansenii, C.aeriusおよびR.toruloidesを培養した場合、培養48時間後には培地中のブドウ糖は全て消費し尽くされることから、甲州ブドウ搾り滓由来の成分が影響して培養を阻害しているものと考えられた。

S.cerevisiae W3, S.cerevisiae OC-2およびP.anomalaの増殖速度はほぼ同じであったが、P.anomalaは培養液が腐敗臭を帯び、実験作業上問題があることから、甲州ブドウ搾り滓で培養する酵母はワイン醸造用酵母のS.cerevisiae W3およびS.cerevisiae OC-2が適していると判断した。

4. 結言

醗酵食品残渣を微生物培養の天然培地と基質とすることを目的として、成分分析を行った。

ブドウ搾り滓には炭水化物が多く、タンパク質と脂質は少なかった。赤ワイン用品種より白ワイン用品種の搾

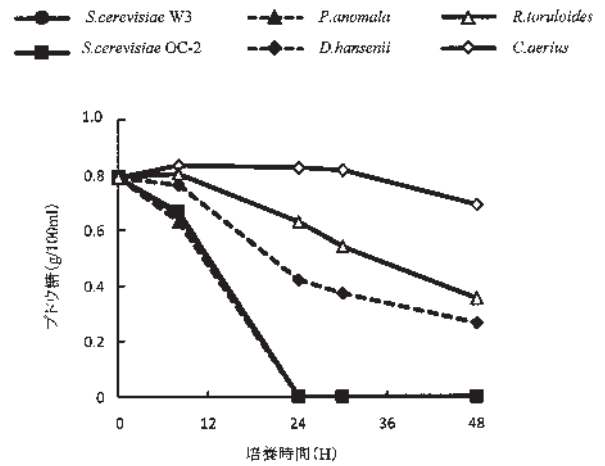


図2-1 ブドウ糖の培養液中の濃度

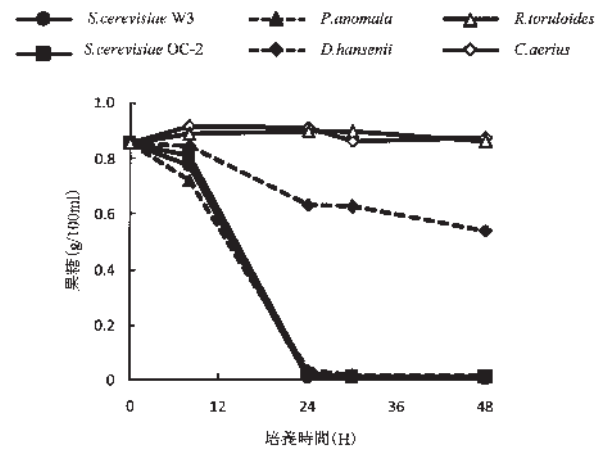


図2-2 果糖の培養液中の濃度

の方がブドウ糖および果糖を多く含み、酵母の生育に必要な糖の供給源として有効であった。

醤油粕は遊離アミノ酸が豊富に含まれ、窒素源として有効であると推察された。米糠は炭水化物が多く、炭素源としても有効であると推察された。酒粕は醤油粕と同様に遊離アミノ酸が多く、窒素源としての使用が見込まれた。

甲州ブドウ搾り滓で酵母を培養し、菌体のエキス化を検討するため、6種類の酵母を培養した。S.cerevisiae W3, S.cerevisiae OC-2およびP.anomalaが旺盛に増殖したが、作業性の良さからS.cerevisiae W3およびS.cerevisiae OC-2が適していると判断した。

今後はブドウ搾り滓で培養した酵母のエキス化について検討し、自作酵母エキスを用いた乳酸菌の培養を行う。また、醤油粕、米糠および酒粕を培地に利用した乳酸菌の培養についても検討する。

さらに、得られた乳酸醗酵液からの効率的な乳酸の分離・精製方法についても検討する。

謝 辞

醗酵食品残渣をご提供頂いた関係者各位に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 平田誠：生物工学, 86, p.337-339 (2008)
- 2) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編：新・食品分析法, 光琳, p.6-9, 39-40, 46-48, 100-101, 879 (1996)
- 3) 株式会社島津製作所 分析機器事業部：島津製作所液体クロマトグラフ 食品分析応用データ集, p.14-15 (1996)
- 4) 長沼孝文, 兎東保之, 田中健太郎, 古賀哲郎：農化, 49, p.335-340 (1975)
- 5) 飯塚廣, 後藤昭二：酵母の分類同定法 [第三版], 東京大学出版会, p.138 (1980)
- 6) 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.118 (1996)

成果発表状況

- 1) 斎藤美貴, 橋本卓也, 小嶋匡人, 木村英生, 長沼孝多, 吾郷健一, 森智和：醗酵食品残渣の有効活用に関する研究. 山梨県工業技術センター研究成果発表会 (2010)