

大麦焼酎蒸留粕に由来する発酵大麦エキスの 微生物用培地としての利用

古田 吉史^{1*}・丸岡 生行¹・中村 彰宏¹・大森 俊郎¹・園元 謙二^{2,3}

(2008年10月3日受付 2008年11月14日受理)

Utilization of Fermented Barley Extract Derived from a By-Product of Barley *Shochu* for a Microbial Medium —Note—

Yoshifumi Furuta^{1*}, Naruyuki Maruoka¹, Akihiro Nakamura¹, Toshiro Omori¹, and Kenji Sonomoto^{2,3} (*Research Laboratory, Sanwa Shurui, Co. Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa, Oita 879-0495*¹; *Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School*², *Department of Functional Metabolic Design, Bio-Architecture Center*³, *Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581*) *Seibutsu-kogaku*: **87**, 16–19, 2009.

Fermented barley extract (FBE) obtained from a barley *shochu* by-product (*shochu kasu*) was evaluated as a nitrogen source for a medium of *Lactobacillus fermentum* NBRC 3071, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Enterococcus faecalis* NCIMB 8275, and *Bifidobacterium longum* JCM 1217^T, by comparing it with a nutritionally rich laboratory-use nitrogen source (yeast extract, polypeptone, casein, and meat extract) in the basal medium at the same level of total nitrogen (TN). The FBE medium yielded higher rates and maxima of cell growth of *L. fermentum* NBRC 3071 and *B. longum* JCM 1217^T than the basal medium. On the other hand, the FBE medium yielded slightly lower rates of cell growth of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 and *E. faecalis* NCIMB 8275 than the basal medium. However, despite the inhibitory effect in the initial phase, the final cell growth level in the FBE medium was the same as that in the basal medium.

[**Key words**: barley *shochu*, fermentation by-product, lactic acid bacteria, bifidobacteria, growth medium]

焼酎製造に伴って蒸留工程後に排出される副産物“焼酎蒸留粕”は焼酎業界全体で推定年間80万トン以上にも達している。国際的な地球環境保全の高まりから、各メーカーは鋭意開発を重ね、従来行ってきた海洋投入による処理から脱却し、濃縮・乾燥による肥料や飼料化、焼却処理およびメタン発酵などの陸上処理への転換を随時図っている^{1,2)}。また近年では、食品素材や機能性食品素材としての有効活用を目指したさまざまな研究開発が盛んに行われている³⁻⁵⁾。このような焼酎蒸留粕の新規用途開発の一環として、我々は大麦焼酎蒸留粕を遠心分離やろ過処理することで得られる上清液：発酵大麦エキス

(fermented barley extract : FBE) 中に乳酸菌およびビフィズス菌の増殖促進物質が存在し^{6,7)}、さらにFBEそのものが乳酸菌によるナイシンや γ -アミノ酪酸 (GABA) などの有用物質を生産するための優れた培地素材であることを先に報告している^{8,9)}。また、焼酎蒸留粕を発酵培地として生産されるその他の有用物質として、プロテアーゼ¹⁰⁾、キトサン¹¹⁾、フェノール化合物¹²⁾ および高度不飽和脂肪酸やキサントフィル¹³⁾ などが報告されている。しかしながら、これまで焼酎蒸留粕は各種微生物用の培地としてすぐれた特性を有しているとの報告がありながら、実用培地としての力価を特定の基準を用いて通

*連絡先 ¹三和酒類株式会社研究所 (〒879-0495 大分県宇佐市山本2231-1)
TEL. 0978-33-3844 FAX. 0978-33-5811 E-mail: furuta-y@kokuzo.co.jp

²九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座

³九州大学バイオアーキテクチャーセンター機能デザイン部門食品機能デザイン分野

常の試薬培地などと比較した例はほとんど報告されていない。FBEには主要な構成成分としてタンパク質（アミノ酸やペプチドなど）が約45%（w/dry weight）、糖類（単糖やオリゴ糖など）が約37%（w/dry weight）程度含まれている⁷⁾。しかしながら糖類については、前報⁸⁾にて報告したように、FBEはエタノール発酵後の残液であるため微生物が資化可能な糖類はほとんど含まれていない。そこで本報では、主にFBE中に豊富に含まれる窒素源（タンパク質）に着目し、試薬培地に含まれる窒素源を等しい全窒素（TN）量のFBEで置換した場合の培地力価について評価を行った。

減圧蒸留後の新鮮な大麦焼酎蒸留粕からガーゼろ過、遠心分離（12,000 × g, 10 min）により酵母、麹菌体、繊維質などの不溶性物を取り除き、清澄な上清液であるFBEを得た。培地として使用する際のFBEのエキス分の濃度（Brix）については屈折計（Atago PAL-1）を用いて調整した。各培地のTNについては窒素分析計（LECO ジャパン FP-2000型）を用いて測定した。

今回菌株には、乳酸菌として *Lactobacillus fermentum* NBRC 3071, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 および *Enterococcus faecalis* NCIMB 8275 の3株を、ビフィズス菌として *Bifidobacterium longum* JCM 1217^T を使用した。培養温度とpHを、*L. fermentum* NBRC 3071 については37°C・pH 6.0に、*E. faecalis* NCIMB 8275 については37°C・pH 7.0に、*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 については30°C・pH 6.0に制御しつつ発酵ジャー（2 l 容発酵槽、培地張り込み量：1200 ml）を使用した攪拌（250 rpm）培養を行った。*B. longum* JCM 1217^T については培地の初発pHを7.0に調整し、37°Cで嫌気ガスパック内での三角フラスコ（300 ml 容フラスコ、培地張り込み量：100 ml）を用いた静置培養を実施した。各菌体の乾燥菌体重量（Dry cell weight）については、抜き出した培養液を遠心分離（10,000 × g, 10 min）して集菌し、その菌体を培養液と等量の脱イオン水で3回洗浄後、乾熱器（121°C）で一晩乾燥して求めた。

本培養には以下に示した組成の培地を用いた。乳酸菌の対照培地として、TN量が0.23%（w/w）のTN 0.23%（w/w）CMG培地（1.00%（w/v）yeast extract, 1.00%（w/v）polypeptone, 0.50%（w/v）NaCl, 5.00%（w/v）glucose）と、窒素源のみをその半分にしたTN 0.12%（w/w）CMG培地（0.50%（w/v）yeast extract, 0.50%（w/v）polypeptone, その他成分はTN 0.23% CMG培地と同量）および窒素源のみをさらにその半分にしたTN 0.06%（w/w）CMG培地（0.25%（w/v）yeast extract, 0.25%（w/v）polypeptone, その他成分はTN 0.23% CMG培地と同量）の3種類を用いた。次に、ビフィズス菌の対照培地

として、TNが0.23%（w/w）のTN 0.23%（w/w）Bifizus培地（1.00%（w/v）casein, 0.50%（w/v）meat extract, 0.50%（w/v）yeast extract, 1.00%（w/v）ascorbic acid, 0.30%（w/v）K₂HPO₄, 0.05%（w/v）cysteine hydrochloride, 0.10%（w/v）Tween 80, 1.00%（w/v）glucose）と、窒素源のみをその半分にしたTN 0.12%（w/w）Bifizus培地（0.50%（w/v）casein, 0.25%（w/v）meat extract, 0.25%（w/v）yeast extract, その他成分はTN 0.23% Bifizus培地と同量）および窒素源のみをさらにその半分にしたTN 0.06%（w/w）Bifizus培地（0.25%（w/v）casein, 0.13%（w/v）meat extract, 0.13%（w/v）yeast extract, その他成分はTN 0.23% Bifizus培地と同量）の3種類を用いた。

一方、FBEを用いた乳酸菌およびビフィズス菌の培地については、対照培地とTN量が等しくなるようにFBEのエキス分濃度を調整したBrix 4.6のFBE培地（TN：0.23%（w/w））、Brix 2.3のFBE培地（TN：0.12%（w/w））およびBrix 1.2のFBE培地（TN：0.06%（w/w））の3種を作製した。なお、乳酸菌用のすべてのFBE培地についてはTN 0.23% CMG培地と同量の0.50%（w/v）NaCl, 5.00%（w/v）glucoseを補足し、ビフィズス菌用のすべてのFBE培地にはTN 0.23% Bifizus培地と同量の1.00%（w/v）ascorbic acid, 0.30%（w/v）K₂HPO₄, 0.05%（w/v）cysteine hydrochloride, 0.10%（w/v）Tween 80, 1.00%（w/v）glucoseを補足した。

Fig. 1 Aに *L. fermentum* NBRC 3071 の増殖曲線を、Bに *B. longum* JCM 1217^T の増殖曲線を示した。等しいTN量の対照培地とFBE培地とを比較した場合、*L. fermentum* NBRC 3071 と *B. longum* JCM 1217^T のどちらについても、いずれのTN量においても明らかに対照培地と比べてFBE培地での増殖が速く、得られた最大菌体量もFBE培地の方が高かった。FBEのエタノール不溶性画分（EI画分）を本報と同じ対照培地に添加した場合に、*L. fermentum* NBRC 3071 と *B. longum* JCM 1217^T の増殖が顕著に促進されたことを先に報告している⁷⁾。また、これら2菌株に対してはFBEのエタノール溶性画分（ES画分）にも若干の促進効果が見られている⁷⁾。今回等しいTN量で比較したにも関わらず、*L. fermentum* NBRC 3071 と *B. longum* JCM 1217^T の増殖が対照培地と比べてFBE培地で顕著にすぐれていたのは、FBEに含まれるこれら2菌株に対する増殖促進因子によるものと考えられた。

次に、Fig. 2 Aに *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 の増殖曲線を、Bに *E. faecalis* NCIMB 8275 の増殖曲線を示した。等しい3点のTN量（TN：0.23, 0.12, 0.06%（w/w））で対照培地とFBE培地を比較した場合、*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 と *E. faecalis* NCIMB 8275 のどちらの菌についてもほぼ同様の傾向が見られた。すなわち、FBE

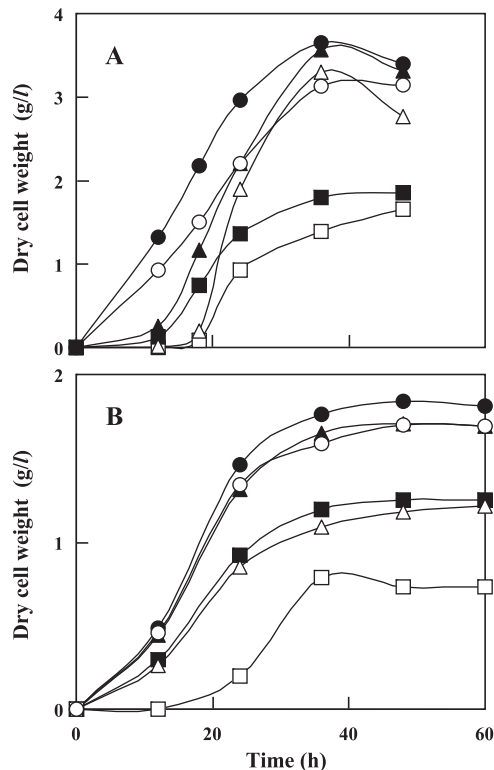


Fig. 1. Time course of cell growth of *L. fermentum* NBRC 3071 (A) and *B. longum* JCM 1217^T (B). Symbols (A): ○, TN 0.23% (w/w) CMG medium (1.00% (w/v) yeast extract, 1.00% (w/v) polypeptone); △, TN 0.12% (w/w) CMG medium (0.50% (w/v) yeast extract, 0.50% (w/v) polypeptone); □, TN 0.06% (w/w) CMG medium (0.25% (w/v) yeast extract, 0.25% (w/v) polypeptone); ●, Brix 4.6 FBE medium (TN 0.23% (w/w)); ▲, Brix 2.3 FBE medium (TN 0.12% (w/w)); ■, Brix 1.2 FBE medium (TN 0.06% (w/w)). Each medium was supplemented with 0.50% (w/v) sodium chloride and 5.00% (w/v) glucose. Symbols (B): ○, TN 0.23% (w/w) Bifizus medium (1.00% (w/v) casein, 0.50% (w/v) meat extract, 0.50% (w/v) yeast extract); △, TN 0.12% (w/w) Bifizus medium (0.50% (w/v) casein, 0.25% (w/v) meat extract, 0.25% (w/v) yeast extract); □, TN 0.06% (w/w) Bifizus medium (0.25% (w/v) casein, 0.13% (w/v) meat extract, 0.13% (w/v) yeast extract); ●, Brix 4.6 FBE medium (TN 0.23% (w/w)); ▲, Brix 2.3 FBE medium (TN 0.12% (w/w)); ■, Brix 1.2 FBE medium (TN 0.06% (w/w)). Each medium was supplemented with 1.00% (w/v) ascorbic acid, 0.30% (w/v) K₂HPO₄, 0.05% (w/v) cysteine hydrochloride, 0.10% (w/v) Tween 80, and 1.00% (w/v) glucose. *L. fermentum* NBRC 3071 was cultivated in a 2-l jar fermentor with the temperature, pH, and agitation speed maintained at 37°C, 6.0, and 250 rpm, respectively. *B. longum* JCM 1217^T was cultivated statically in a 300-ml conical flask at 37°C in an anaerobic jar.

培地では対照培地と比べて培養初期に増殖が立ち遅れたが、培養後期には対照培地とほぼ等しい菌体量に達した。先の報文⁷⁾ではFBEのEI画分は*L. lactis* subsp. *lactis*に対しても同様な増殖促進効果があることを報告している。この増殖の遅延については、EI画分の増殖促進効果が他の菌種に比べて小さいこと⁷⁾、ならびにFBEに共存しているES画分には逆に増殖を阻害する効果があること⁷⁾に

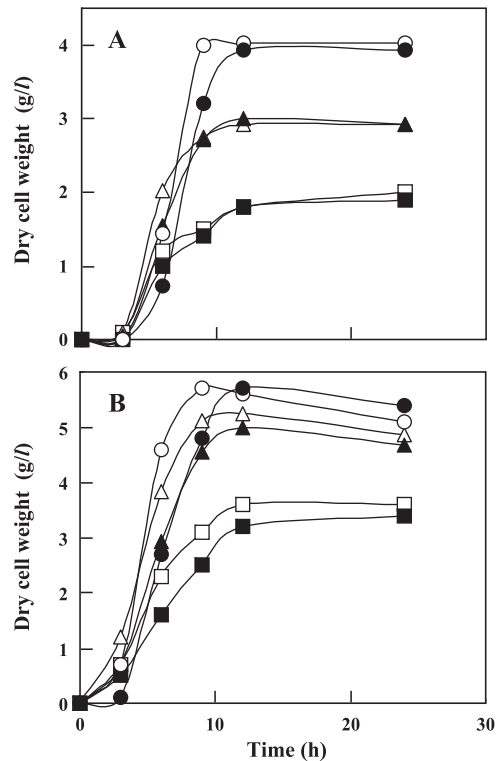


Fig. 2. Time course of cell growth of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (A) and *E. faecalis* NCIMB 8275 (B). Symbols: ○, TN 0.23% (w/w) CMG medium (1.00% (w/v) yeast extract, 1.00% (w/v) polypeptone); △, TN 0.12% (w/w) CMG medium (0.50% (w/v) yeast extract, 0.50% (w/v) polypeptone); □, TN 0.06% (w/w) CMG medium (0.25% (w/v) yeast extract, 0.25% (w/v) polypeptone); ●, Brix 4.6 FBE medium (TN 0.23% (w/w)); ▲, Brix 2.3 FBE medium (TN 0.12% (w/w)); ■, Brix 1.2 FBE medium (TN 0.06% (w/w)). Each medium was supplemented with 0.50% (w/v) sodium chloride and 5.00% (w/v) glucose. Cells were cultivated in a 2-l jar fermentor. The temperature, pH, and agitation speed were maintained at 30°C, 6.0, and 250 rpm for *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 and 37°C, 7.0, and 250 rpm for *E. faecalis* NCIMB 827, respectively.

由来すると推察された。また、FBE中に含まれる有機酸による増殖阻害も考えられたため、対照培地(1×CMG培地)にBrix 4.6のFBE培地と同量の有機酸(0.20% (w/v) citric acid, 0.10% (w/v) lactic acid)を添加して培養を行った。しかしながら、Fig. 3に示すように、これらの濃度における有機酸による阻害効果は非常に小さかった。

FBE培地の特徴の一つとして、対照培地であるCMG培地やBifizus培地と比べて窒素源中に占めるペプチドの割合が高いことが挙げられる。遊離アミノ酸量に対するペプチド量の比率は、FBE培地で2.5、CMG培地で1.6、ピフィズス培地で2.0であった。乳酸菌増殖におけるペプチドの取り込みの重要性についてはしばしば論じられており¹⁴⁻¹⁶⁾、ミルク培地中では窒素源として遊離のアミノ酸に比べてオリゴペプチドの方が菌体増殖への寄与率が高いという報告もある¹⁷⁾。しかしながら、本研究

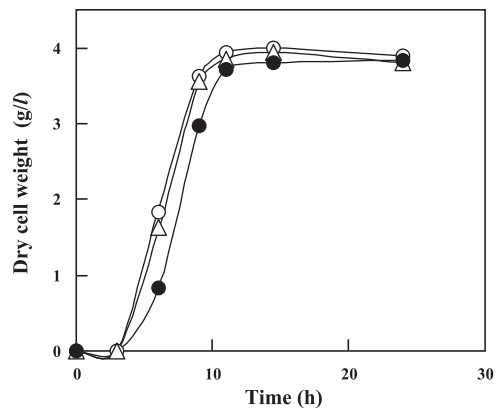


Fig. 3. Time course of cell growth of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Symbols: ○, TN 0.23% (w/w) CMG medium; △, TN 0.23% (w/w) CMG medium contained 0.20% (w/v) citric acid and 0.10% (w/v) lactic acid; ●, Brix 4.6 FBE medium (TN 0.23% (w/w)). Each medium was supplemented with 0.50% (w/v) sodium chloride and 5.00% (w/v) glucose. Cells were cultivated in a 2-l jar fermentor. The temperature, pH, and agitation speed were maintained at 30°C, 6.0, and 250 rpm, respectively.

結果のように、乳酸菌やビフィズス菌の栄養要求性は菌株によって異なり、かつ複雑であるため一概には言えないと思われる。これに関しては、これまでに合成吸着樹脂などを使ってFBEのペプチド/アミノ酸比率を変化させる試験などを実施しているが、培地力価が顕著に変わるような知見は今のところ得られていない(データ未発表)。今後、酵素処理や酸分解等で培地力価に変化が生じないか調べることにより、さらに詳細な検討を行いたいと考えている。

以上のように、乳酸菌 (*L. fermentum* NBRC 3071, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *E. faecalis* NCIMB 8275) およびビフィズス菌 (*B. longum* JCM 1217^T) に対するFBEの培地窒素源としての力価を、既存の高価な対照培地の窒素源(酵母エキス, ポリペプトン, カゼインおよび肉エキス)と等しいTN量で比較したところ、いずれの菌に関してもFBEは遜色のない(菌種によっては対照培地以上の)力価があることが示された。また、今回示していないが、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)¹⁸⁾ やコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) (データ未発表) およびメナキノン-7の生産を目的としたバチルス (*Bacillus subtilis*)¹⁹⁾ の培養においても、FBEは十分な培地力価がある。今後、大麦焼酎蒸留粕に由来するFBEの安価な培地素材としての利用用途がさらに広がり、焼酎粕の有効活用が促進されることが期待される。

要 約

大麦焼酎蒸留粕に由来するFBE (fermented barley

extract)の乳酸菌(*L. fermentum* NBRC 3071, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *E. faecalis* NCIMB 8275) およびビフィズス菌 (*B. longum* JCM 1217^T) に対する培地窒素源としての力価を、等しい全窒素 (TN) 量で対照培地 (CMG培地およびBifizus培地) の窒素源 (酵母エキス, ポリペプトン, カゼインおよび肉エキス) と比較した。*L. fermentum* NBRC 3071と*B. longum* JCM 1217^Tについては、培養初期の段階から対照培地と比べてFBE培地での増殖が速く、最大菌体量もFBE培地の方が高かった。*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454と*E. faecalis* NCIMB 8275については、対照培地と比べてFBE培地では培養初期に増殖は立ち遅れたものの培養後期にはほぼ等しい菌体量に達した。

文 献

- 1) 下田雅彦, 長野壮一, 和田久継: 醸協, **90**, 897-901 (1995).
- 2) 飯島吉広: 醸協, **98**, 481-490 (2003).
- 3) 望月 聡, 宮本安紀子, 萩原美和子, 竹嶋直樹, 大森俊郎: 醸協, **96**, 559-563 (2001).
- 4) 外園英樹, 猫垣加奈子, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人, 大森俊郎: 醸協, **100**, 877-881 (2005).
- 5) 関 孝弘, 森村 茂, 重松 亨, 前田 浩, 木田建次: 醸協, **98**, 869-874 (2003).
- 6) Furuta, Y., Takashita, H., Omori, T., Sonomoto, K., Shimoda, M., and Wada, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 276-279 (1998).
- 7) 古田吉史, 外園理佐, 高下秀春, 大森俊郎, 石崎文彬, 園元謙二: 生物工学, **85**, 161-166 (2007).
- 8) Furuta, Y., Maruoka, N., Nakamura, A., Omori, T., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 393-397 (2008).
- 9) 古田吉史, 大森俊郎: 食品と科学, **48**, 77-80 (2006).
- 10) Morimura, S., Kida, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 183-187 (1994).
- 11) Yokoi, H., Aratake, T., Nishio, S., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 246-249 (1998).
- 12) Yoshimoto, M., Kurata-Azuma, R., Fujii, M., Hou, D. X., Ikeda, K., Yoshidome, T., and Osako, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2477-2483 (2004).
- 13) Yamasaki, T., Aki, T., Shinozaki, M., Taguchi, M., Kawamoto, S., and Ono, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 323-327 (2006).
- 14) Smid, E. J., Plapp, R., and Konings, W. N.: *J. Bacteriol.*, **171**, 6135-6140 (1989).
- 15) Kunji, E. R. S., Smid, E. J., Plapp, R., Poolman, B., and Konings, W. N.: *J. Bacteriol.*, **175**, 2052-2059 (1993).
- 16) Rosen, B. P.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3653-3662 (1971).
- 17) Juillard, V., Bars, D. L., Kunji, E. R. S., Konings, W. N., Gripon, J. C., and Richard, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3024-3030 (1995).
- 18) 後藤理佐, 古田吉史, 高下秀春, 大森俊郎, 下田雅彦, 和田久継: 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, p.14 (1998).
- 19) 林 圭, 高下秀春, 大森俊郎: 特許3431573 (2003).