

種々の乳酸菌による焼酎粕の乳酸発酵*

水谷 政美*¹・山本 英樹*¹・越智 洋*¹・高山 清子*¹・工藤 哲三*¹

Fermentation of Distilled Shochu Residue by Various Kind of Lactic Acid Bacteria

Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Hiroshi OCHI, Kiyoko TAKAYAMA and Tetsuzo KUDO

焼酎粕の保存性や付加価値向上を目指して、乳酸菌で処理し、固液分離性、香気成分、有機酸、遊離アミノ酸、トコフェロールおよびD P P H消去活性について検討し、種々の新しい知見を得た。その結果、焼酎粕の固液分離性や保存性の向上、オルニチン等の有用物質の生成およびD P P Hラジカル消去活性の増加等の効果を得るためには、焼酎粕と微生物の組み合わせが重要であると考えられた。

キーワード：焼酎粕、リサイクル、乳酸菌

1 はじめに

本県の焼酎生産量は10万kLを超え、それに伴う焼酎粕の排出量も増加の傾向にある。県内の焼酎製造工場において、メタン発酵法や濃縮肥料化、焼却等による焼酎粕処理プラントが稼働しているが、より環境への負荷を低減した技術や化石燃料使用量を減らした処理方法が模索されている。そこで、焼酎粕の排出量を減らす製造方法の提言、飼料等への焼酎粕の再利用のための腐敗防止技術を探るとともに新規な廃棄物処理技術の焼酎粕処理への導入の可能性を探ることとした。

ここでは、微生物による焼酎粕の保存性や付加価値向上について検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 供試試料

焼酎粕は食品開発センターで生じた芋、麦及びソバ製を4℃で保存し、必要に応じ使用した。

用いた乳酸菌は、乳酸菌製剤（雪印種苗株）のアクレモコク (*Lb.rhamnosus*、セルラーゼ配合)、スノーラクト-L (*Lb.rhamnosus*) 及び畜草1号 (*Lb.plantarum*) と焼酎もろみから分離した *Lb.paracasei* (25, DG1)、*Lb.brevis* (24, BM3) 及び *P.acidilactici* (102, LM2) を用いた¹⁻⁴⁾。

その他、培地や分析用試薬類は市販のものを用いた。

2-2 焼酎粕の微生物処理

乳酸菌による処理は、次のように行った。芋、麦およびソバ製焼酎粕をよくかくはんして均一にした後、200mLずつ三角フラスコに分注し121℃で20minオートクレーブ滅菌した。滅菌後冷却した焼酎粕に、乳酸菌製剤を滅菌水に懸濁させたものと焼酎もろみより分離した乳酸菌をMRS培地で30℃で48時間前培養したものをそれぞれ1mL添加し、30℃で5日間静置培養した。

2-3 焼酎粕の固液分離性

微生物処理した焼酎粕40mLを50mLの遠沈管に入れ、100Gから4000Gまで遠心力を変え遠心分離した後、固液の体積から分離性を判断した。また、同様に遠沈管に入れ、10min~48hr静置しその沈降性についても測定した。

2-4 焼酎粕の成分

乳酸発酵した芋焼酎粕の香気成分分析は、ヘッドスペース中の揮発成分をSPMEファイバーに吸着させる固相抽出法により行った。4mLバイアルに遠心分離した焼酎粕の上清500μLと塩化ナトリウム0.3gを入れ、40℃で40min保温した。その後、SPMEファイバー（65m Carbowax-divinylbenzene (SUPERUCO製)）をヘッ

* 焼酎粕リサイクル技術の開発

*1 応用微生物部

ドスペースで1 min 露出させて揮発性成分を吸着させた後、ガスクロマト質量分析計 (GCMS-QP 5050A (島津製作所製)) により定性分析を行った。なお、分析カラムは ZB-WAX (0.25mm ϕ \times 60m) を用い、気化室温度 220 $^{\circ}$ C、インターフェース温度 220 $^{\circ}$ C、カラム温度を 40 $^{\circ}$ C から 3 $^{\circ}$ C / min で 220 $^{\circ}$ C まで昇温させる条件で行った。

有機酸は、遠心分離した焼酎粕の上清を 10 倍希釈した後、0.45 μ m のフィルターでろ過後、有機酸分析システム (LC-10A (島津製作所製)) を用いて測定した。分析条件は次のとおりである。カラム: Shim-pack SCR-102H (ϕ 8mm \times 300mm、2 本直列)、移動相: 5mM p-トルエンスルホン酸、反応液: 20mM Bis-tris (100 μ M EDTA を含む)、流速: 0.8mL/min、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、検出器: 電気伝導度検出計

アミノ酸は、遠心分離した焼酎粕の上清を 0.02 N HCl で 10 又は 20 倍に希釈し 0.45 μ m のフィルターでろ過後、高速アミノ酸分析計 (L-8800 (日製産業製)) を用いてニンヒドリン発色法により測定した。

トコフェロールは、均一化した焼酎粕 10 g を食品の機能性評価マニュアル集⁵⁾ に従い抽出を行った。なお、分析は高速液体クロマトグラフィー (PU-980 (日本分光製)) により、流速 1.0 mL、カラム温度 50 $^{\circ}$ C で行い、検出には蛍光検出器 (Ex: 296 nm、Em: 323 nm) を用いた。

2-5 焼酎粕の DPPH ラジカル消去活性

遠心分離した焼酎粕の上清を 0.45 μ m のフィルターでろ過後、DPPH ラジカル消去活性を測定した。DPPH (1,1-diphenyl- 1-2-picrylhydrazyl、和光純薬製) 溶液の 520 nm における吸光度を 96 穴マイクロプレート法 (マイクロプレートリーダー: Immuno Mini NJ-2300) にて測定した。DPPH ラジカル消去活性は、試料溶液 1 mL 当たりの Trolox 相当量として求めた。

3 結果および考察

3-1 焼酎粕の微生物処理

乳酸菌は、焼酎粕の pH を調整しなくとも順調

に増殖した。乳酸菌の増殖に伴い、焼酎粕の pH は低下する傾向を示した (表 1)。ただし、焼酎粕と乳酸菌の組み合わせによっては、pH が横ばいもしくは上昇していた。これは、発酵により生成した有機酸の種類により酸の強さが異なるためと推定された。

表 1 乳酸発酵後の pH

	芋	麦	ソバ
発酵前 pH	4.72	4.34	4.68
アクレモコク	3.73	3.78	4.04
スノーラクト-L	4.28	4.06	4.55
畜草 1 号	4.50	3.90	4.57
<i>Lb. paracasei</i>	4.34	4.02	4.62
<i>Lb. brevis</i>	4.73	4.14	5.23
<i>P. acidilactici</i>	4.54	4.15	5.12

3-2 焼酎粕の固液分離性

乳酸菌処理した焼酎粕を遠心力を変えて分離した。その結果を、図 1、2、3 に示した。

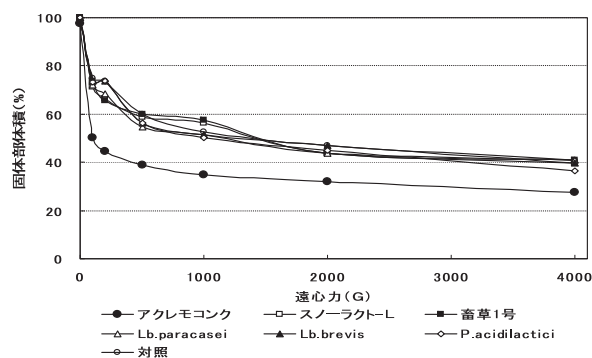


図 1 芋焼酎粕の遠心分離機による固液分離

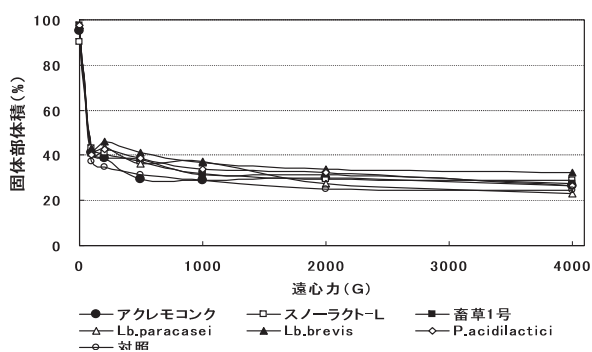


図 2 麦焼酎粕の遠心分離機による固液分離

芋製では、アクレモコクにより固液分離性が非常に良くなるが、他の乳酸菌では対照と差は大きく効果が認められなかった。これは、アクレモコクに含まれるセルラーゼが働き繊維分を分解することにより粘性が低下することにより生じたも

のと考えられた。

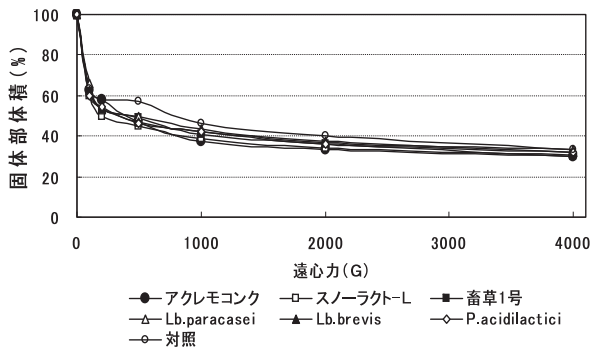


図3 ソバ焼酎粕の遠心分離機による固液分離
 麦製では、芋製ほどアクレモコクの効果は認められなかった。また、ソバ製でも、アクレモコクの効果は認められなかったが、乳酸菌処理することにより固液分離性が向上する傾向が多少認められた。

3-3 焼酎粕の成分

乳酸発酵した芋焼酎粕の香気成分を定性分析した結果、発酵前に比べて、アセトイン、乳酸エチルおよび酢酸が増加していた(表2)。特に、畜草1号ではアセトインの生成量が顕著であった。

表2 乳酸発酵後の芋焼酎粕の香気成分

	ピーク高さ (× 10 ⁴)		
	アセトイン	乳酸エチル	酢酸
発酵前	tr	tr	68
アクレモコク	48	29	257
スノーラクト-L	14	5	157
畜草1号	293	5	366
<i>Lb. paracasei</i>	15	4	370
<i>Lb. brevis</i>	tr	3	327
<i>P. acidilactici</i>	3	6	400

注) tr : 微量検出

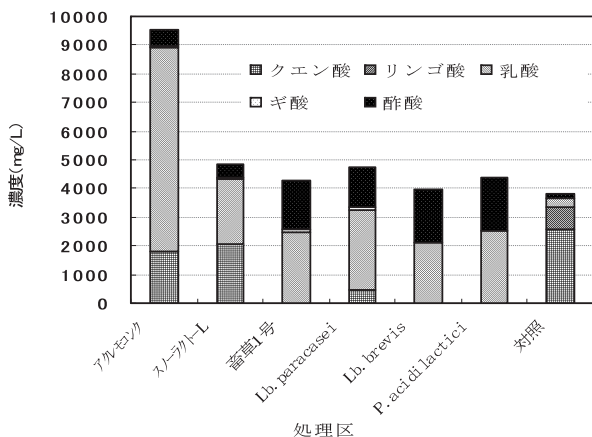


図4 芋焼酎粕の乳酸菌処理と有機酸

乳酸菌で処理した焼酎粕の有機酸量を測定した結果を図4, 5, 6に示した。

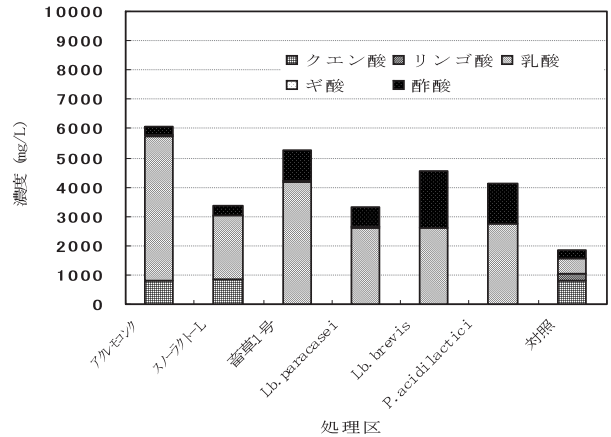


図5 麦焼酎粕の乳酸菌処理と有機酸

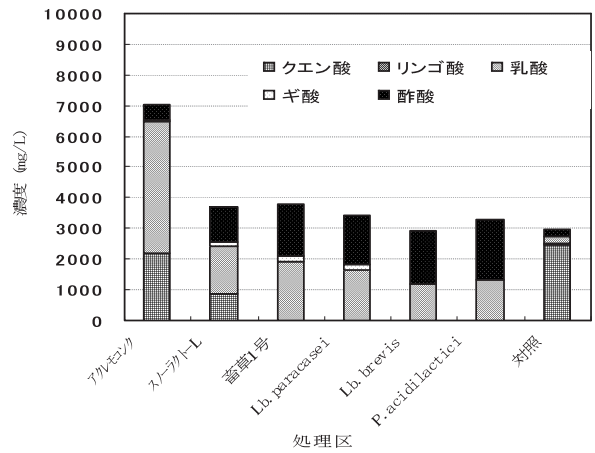


図6 ソバ焼酎粕の乳酸菌処理と有機酸

アクレモコクとスノーラクトでは、どの焼酎粕でもクエン酸が残存したが、他の乳酸菌ではクエン酸がほとんど消費されていた。これは、乳酸菌のクエン酸資化性によるものと考えられた。また、アクレモコクを用いるとセルラーゼにより生成したグルコースが利用されることにより乳酸量が大幅に増加した。焼酎粕原料で見ると、ソバ、芋、麦の順で酢酸の比率が高くなる傾向が見られた。これらのことから、乳酸発酵焼酎粕の有機酸はクエン酸、乳酸および酢酸で構成されており、用いた乳酸菌の種類や焼酎粕原料により生成する有機酸の生成比が異なってくると考えられた。

乳酸菌で処理した焼酎粕の遊離アミノ酸量を測定した結果を表3, 4, 5に示した。

乳酸菌処理前の焼酎粕の遊離アミノ酸の総量は、麦が最も多く736 mg/100 mL、ついでソバ597.7 mg/100 mL、芋は最も少なく

表3 芋焼酎粕の乳酸発酵後の遊離アミノ酸 (mg / 100 mL)

	—	アクレモコク	スノーラクト-L	畜草1号	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
A s p	17.0	28.0	28.0	27.2	26.7	21.9	31.5
T h r	7.7	9.4	9.5	11.6	8.9	10.8	1.8
S e r	8.9	10.1	11.7	2.7	8.2	14.6	5.0
G l u	18.3	21.6	23.8	21.7	22.9	18.4	28.6
G l y	14.0	15.2	16.8	19.2	15.4	16.6	19.8
A l a	26.3	27.6	31.3	31.4	29.8	29.2	45.2
V a l	14.7	19.0	19.0	20.8	19.1	19.7	28.9
M e t	6.6	6.4	7.1	7.4	6.7	6.9	7.5
I l e	7.0	11.5	10.6	13.8	9.9	13.0	19.3
L e u	20.9	22.0	25.3	26.9	23.3	25.5	27.6
T y r	11.2	13.9	14.4	16.6	13.7	0.8	13.9
P h e	15.6	16.8	18.9	19.4	18.6	18.3	16.7
O r n	4.8	4.7	4.8	4.8	4.7	28.3	31.4
L y s	24.1	19.2	23.9	24.8	21.5	24.1	26.2
H i s	9.0	8.2	9.0	9.3	8.5	8.9	9.2
A r g	32.6	31.8	33.0	33.3	31.2	0	0
P r o	24.5	26.1	25.3	25.0	25.6	22.6	26.1
計	263.2	291.5	312.4	315.9	294.7	279.6	338.7

表4 麦焼酎粕の乳酸発酵後の遊離アミノ酸 (mg / 100 mL)

	—	アクレモコク	スノーラクト-L	畜草1号	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
A s p	27.0	31.9	32.1	28.2	31.8	30.1	34.8
T h r	15.5	16.5	17.2	16.1	18.0	19.0	2.8
S e r	20.8	22.0	23.3	0.7	21.5	30.7	6.9
G l u	54.5	66.7	63.4	56.2	66.6	61.3	84.3
G l y	22.4	22.8	23.7	22.9	23.8	29.6	33.7
A l a	101.2	101.3	104.9	100.4	105.0	107.7	142.4
V a l	35.8	39.8	39.6	38.7	39.6	41.3	55.0
M e t	16.6	17.2	17.2	17.4	17.3	18.9	19.8
I l e	22.0	24.5	25.7	25.4	24.3	29.0	38.7
L e u	75.3	79.2	81.6	82.2	78.9	93.4	95.8
T y r	38.8	38.7	39.5	39.3	39.2	1.7	43.6
P h e	45.7	49.2	50.4	49.6	49.7	54.5	51.0
O r n	5.2	5.2	5.3	5.2	5.3	71.4	71.6
L y s	45.3	43.0	45.0	45.1	43.6	54.0	55.3
H i s	19.0	19.0	19.6	18.4	19.0	22.6	22.3
A r g	68.8	68.7	70.2	70.3	69.0	0	0
P r o	122.1	126.1	127.4	126.4	125.7	130.7	129.0
計	736.0	771.8	786.1	742.5	778.3	795.9	887.0

表5 ソバ焼酎粕の乳酸発酵後の遊離アミノ酸 (mg / 100 mL)

	—	アクレモコク	スノーラクト-L	畜草1号	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
A s p	31.2	46.3	43.0	45.0	42.0	42.3	54.3
T h r	8.7	13.0	12.4	16.1	13.4	18.0	1.1
S e r	16.6	21.1	20.2	2.2	17.0	30.3	1.9
G l u	84.4	101.5	98.9	104.3	96.7	96.1	132.3
G l y	26.8	32.5	31.0	36.2	31.5	39.7	53.1
A l a	55.7	62.5	62.9	64.0	63.5	68.0	110.5
V a l	20.1	26.9	27.0	30.5	27.3	35.0	51.0
M e t	9.1	11.2	11.0	11.4	11.4	12.7	14.1
I l e	10.7	17.1	16.6	20.9	14.3	24.2	35.7
L e u	34.9	42.9	42.6	47.0	39.2	50.6	55.9
T y r	13.4	17.8	16.8	21.1	16.0	2.5	26.4
P h e	22.1	28.6	28.2	30.4	27.1	33.9	35.1
O r n	18.6	18.5	18.7	18.3	18.4	126.3	130.3
L y s	61.6	60.2	61.8	61.3	60.5	71.5	75.2
H i s	25.0	25.3	25.4	25.6	25.1	27.9	30.4
A r g	123.0	126.9	126.3	127.4	124.9	0	0
P r o	35.8	39.3	38.4	38.4	37.5	40.3	45.5
計	597.7	691.6	681.2	700.1	665.8	719.3	852.8

263. 2 mg/100 mL であった。乳酸菌処理により、遊離アミノ酸は増加する傾向を示し、ソバと芋焼酎粕で増加する割合が高くなっていた。また、焼酎粕の種類に拘わらず、畜草1号ではS e r が減少、*Lb. brevis*ではT y r とA r g が減少するとともにO r nが増加、*P. acidilactici*ではT h r、S e r 及びA r g が減少するとともにA l a とO r nが増加する現象が認められた。特に、*Lb. brevis* および *P. acidilactici* 処理でのA r g が消滅しO r nとデータを掲載していないがNH₃が顕著に増加していたのは、これらの乳酸菌が生産するアルギナーゼによりA r g がO r nに変換されたため生じたと推定された。オルニチンは、尿素サイクル⁶⁾の構成成分であり、体内のアンモニア解毒に寄与することが知られ、さらに新機能的成分として注目を浴びているシトルリンの前駆体であることから、これらの乳酸菌によるO r nの生成は重要であると考えられた。このように乳酸菌によりアミノ酸の組成比等を変化させることは他の分野にも応用が可能であると考えられた。

トコフェロール(ビタミンE)には、 α 、 β 、 γ 及び δ の4種の異性体があるが、処理前後の焼酎粕から抽出分析した結果を表6、7、8に示した。処理前のトコフェロール総量で比較すると、芋製が227.9 μ g/100gと最も多く、麦とソバ製は芋製の1/10以下であり、それぞれ21.3 μ g/100gと13.4 μ g/100gであった。食品成分表では、芋(生)で1,300 μ g/100g、ソバで500 μ g/100g、麦で200 μ g/100gと報告されていることから、かなりのトコフェロールが焼酎製造工程中に減少していると考えられた。これら焼酎粕を乳酸菌処理しても、トコフェロールは乳酸菌により消費されずほとんど変化しないと考えられた。なお、アクレモコク処理区で芋製354.5 μ g/100g、ソバ製で439.5 μ g/100gと増加しているが、アクレモコクと同じ菌種でセルラーゼを含まないスノーラクト-L処理区では増加していないことから、セルラーゼにより繊維分が分解されトコフェロールが抽出されやすくなったためと推定された。

表6 芋焼酎粕のトコフェロール

処理区	トコフェロール(μg/100g)				計
	α	β	γ	δ	
—	221	1.3	5.6	0	227.9
アクレモコク	328	5.1	21.4	0	354.5
スノーラクトール	224	1.7	5.8	0	231.5
畜草1号	225	1.3	4.4	0	230.7
<i>Lb. paracasei</i>	226	2.0	6.2	0	234.2
<i>Lb. brevis</i>	226	12.4	7.0	0	245.4
<i>P. acidilactici</i>	228	1.6	6.7	0	236.3

表7 麦焼酎粕のトコフェロール

処理区	トコフェロール(μg/100g)				計
	α	β	γ	δ	
—	9.2	0	12.1	0	21.3
アクレモコク	7.9	0	13.2	0	21.1
スノーラクトール	5.5	0	10.1	0	15.6
畜草1号	3.4	0	5.6	0	9.0
<i>Lb. paracasei</i>	3.7	0	6.7	0	10.4
<i>Lb. brevis</i>	4.5	0	8.5	0	13.0
<i>P. acidilactici</i>	8.8	0	9.8	0	18.6

表8 ソバ芋焼酎粕のトコフェロール

処理区	トコフェロール(μg/100g)				計
	α	β	γ	δ	
—	6.1	0.1	7.2	0	13.4
アクレモコク	25.5	0.3	390.1	23.6	439.5
スノーラクトール	0.4	0	11.1	0	11.5
畜草1号	11.0	0	22.3	0	33.3
<i>Lb. paracasei</i>	11.7	0	12.8	0	24.5
<i>Lb. brevis</i>	12.4	0	38.2	0	50.6
<i>P. acidilactici</i>	6.1	0	29.9	0	36.0

3-4 焼酎粕のDPPH消去活性

焼酎粕の乳酸菌処理前後のDPPHラジカル消去活性を測定し、検討を行った(図7, 8, 9)。処理前の焼酎粕のDPPHラジカル消去活性の強さは、ソバ、芋、麦の順であり、それぞれ1.66 μmol/mL、1.2 μmol/mL、0.9 μmol/mLであった。

乳酸菌処理を行うことにより、芋ではDPPHラジカル消去活性が増加し、特に畜草1号では1.8 μmol/mLと1.5倍に増加した。しかし、ソバではDPPHラジカル消去活性は乳酸菌処理により変化しなかったが、麦では乳酸菌処理

することによりDPPHラジカル消去活性が低下する傾向が認められた。

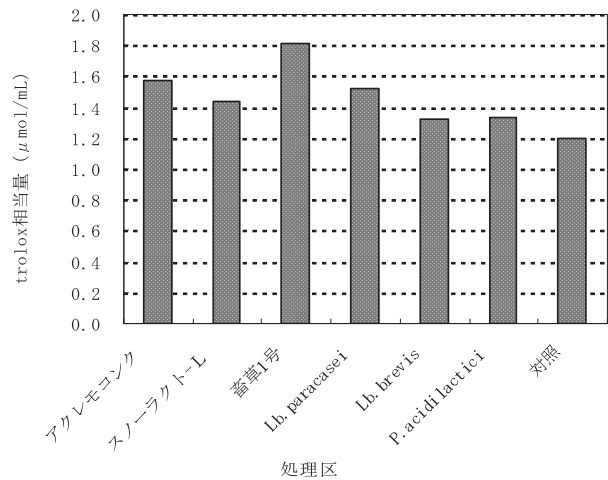


図7 芋焼酎粕のDPPHラジカル消去活性

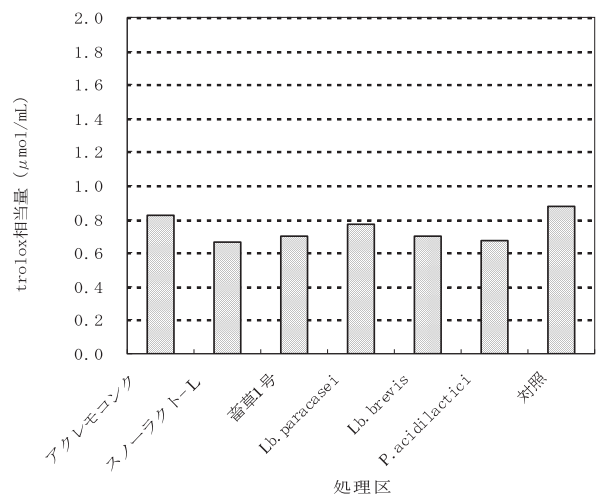


図8 麦焼酎粕のDPPHラジカル消去活性

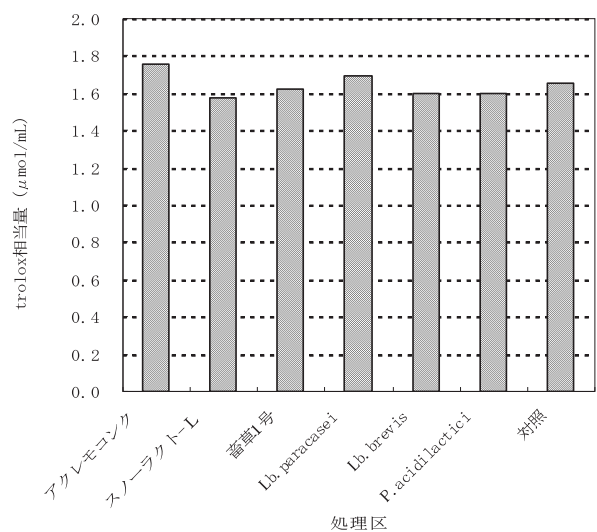


図9 ソバ焼酎粕のDPPHラジカル消去活性

4 まとめ

焼酎粕の保存性や付加価値向上を目指して、焼酎粕を乳酸菌で処理し、物性や成分等を分析検討したところ、以下のことが判った。

- ①焼酎粕のpHを調整しなくとも、乳酸発酵が進み、焼酎粕の保存性が向上した。
- ②乳酸菌処理により芋製とソバ製で固液分離性が向上したが、セルラーゼ添加により芋製では特に良くなった。
- ③乳酸発酵した芋焼酎粕に新たにアセトインと乳酸エチルの香気成分が生成され、特に畜草1号ではアセトインの生成量が顕著であった。
- ④乳酸菌処理により乳酸と酢酸が生成し、特にアクレモコクにより生成量が増大した。
- ⑤乳酸菌処理により、遊離アミノ酸量が増加した。特に、*Lb.brevis* と *P.acidilactici* は、アルギニンを含めてオルニチンに変換していると推定された。
- ⑥乳酸菌処理によりトコフェロールは減少しないが、セルラーゼ添加によりトコフェロールの抽出性が向上することが考えられた。
- ⑦芋焼酎粕の乳酸菌処理によりDPHラジカル消去活性が増加した。

5 参考文献

- 1) 竹下淳子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 119(2004)
- 2) 竹下淳子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 127(2004)
- 3) 高山清子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 50, 117(2005)
- 4) 高山清子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 51, 107(2006)
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局・農林水産省食品総合研究所, 食品の機能性評価マニュアル集, 3(1999)
- 6) 西塚泰美編集, 代謝マップ, 33(1982)