

## 乳酸菌を利用した食品廃棄物のリサイクルに関する研究\*

森永 樹\*<sup>1</sup>・水谷 政美\*<sup>2</sup>・高山 清子\*<sup>2</sup>・山本 英樹\*<sup>2</sup>・越智 洋\*<sup>2</sup>・工藤 哲三\*<sup>3</sup>

### Research on Recycling of Food Waste Using Lactic Acid Bacteria

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

おから等の腐敗しやすい食品廃棄物を乳酸菌により保存性を高め飼料としてリサイクルするための乳酸発酵試験を行った。乳酸菌は、当センターで焼酎もろみから分離した<sup>1)</sup> *Lb. plantarum* DM1 と *P. acidilactici* LM2, また市販のサイレージ用乳酸菌製剤のスノーラクト L の 3 菌種を用いた。その結果、おからは乳酸菌にとってよい発酵素材であることがわかり、さらにおからと焼酎粕を混合乳酸発酵させることにより有機酸生成量が増加した。

キーワード：乳酸菌，リサイクル，焼酎粕，おから

### 1 はじめに

焼酎粕は水分が 90-95% と多く腐敗しやすいためその利用が困難であり、また、その処理技術の開発は現在も重要な課題となっている。我々は、これまでに簡単にかつ低コストで実施できる焼酎粕利用法として、乳酸発酵法による長期保存性の向上と飼料化について報告した<sup>2,3)</sup>。また、畜産試験場、農業改良普及センター、畜産農家、焼酎工場等と協力して乳酸発酵焼酎粕の牛への給餌を 2009 年より実用化している。今回、これまでに開発してきた乳酸菌を利用した技術をおから等の食品廃棄物に応用し乳酸発酵による保存性向上や成分変化について検討を行ったので報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 食品開発センター保有乳酸菌の実用化

##### 2-1-1 供試試料

焼酎粕は食品開発センターで生じた芋製、県内企業より提供を受けた麦、ソバ製を-20℃で保存

し、必要に応じ使用した。

乳酸菌は、焼酎もろみから分離した 2 種 *Lb. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2 と市販サイレージ用乳酸菌製剤のスノーラクト L (雪印種苗(株)) の 3 菌種を用いた。なお、これらを前培養後、米ぬかを基材として乳酸菌製剤化<sup>4)</sup>した。

おからは県内企業より提供を受けたものを使用した。

その他の培地や分析用試薬は市販のものを用いた。

#### 2-1-2 焼酎粕の乳酸発酵

芋、麦およびソバ製焼酎粕 100ml (121℃で 20min 滅菌)中に、乳酸菌 (米ぬか/乳酸菌) 3 種をそれぞれ 0.1g, ブドウ糖 0.9g, セルラーゼ Y-NC (*Aspergillus niger* 由来, ヤクルト薬品工業(株)) 0.02g を添加した。30℃で静置培養を行い、1 日, 2 日, 5 日, 14 日, 30 日, 60 日, 90 日経過後に、それぞれ pH, 有機酸, 乳酸菌数を測定した。

pH の測定は、試験管に 2~3ml 無菌的に試料を採取し、測定した。

有機酸の測定は、試料 2ml をエッペンドルフチューブに取り、1000G, 3min 遠心分離し、上清を 20 倍希釈後、0.45 μm 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) を用いて測定

\* 食品廃棄物のリサイクルに関する研究

\*1 宮崎県産業支援財団

\*2 応用微生物

\*3 現 食品開発センター所長兼食品開発部部長

した。分析条件は次のとおりである。カラム：Shim-packSCR-102H(φ8mm×300mm, 2本直列), 移動相：5mM p-トルエンスルホン酸, 緩衝液：5mM p-トルエンスルホン酸, 20mM Bis-tris, 100 μM EDTA, 流速 0.8mL/min, カラム温度：40℃, 検出機：電気伝導度検出計

乳酸菌数は, 無菌的に試料 1ml を生理食塩水で適宜希釈したものを MRS 寒天培地 (炭酸カルシウム添加) に 0.1ml を塗抹し, 嫌気状態で 30℃, 2日間培養後のハローを伴ったコロニー数より求めた。

### 2-1-3 乳酸菌添加時期と成分の検討

凍結保存した芋製の焼酎粕を解凍し, 焼酎粕 100ml (121℃で20min滅菌) 中にブドウ糖 0.9g を添加した培地に, あらかじめ MRS 培地で 30℃で 48時間前培養した乳酸菌 *P. acidilactici* LM2 とスノーラクト L をそれぞれ 0.5ml 添加し, 三角フラスコに入れ 30℃で静置培養を行った。乳酸菌の添加は①*P. acidilactici* LM2 のみ添加, ②乳酸菌 2 種同時添加, ③スノーラクト L 添加後, 3 日目 *P. acidilactici* LM2 添加, ④スノーラクト L のみ添加, の 4 試験区で行った。サンプリングは 1 日, 2 日, 3 日, 7 日, 30 日経過後に行い, pH, 有機酸, アミノ酸を測定した。

アミノ酸は, 遠心分離した焼酎粕上清を 0.02N HCl で 20 倍希釈し 0.45 μm のフィルターでろ過後, 高速アミノ酸分析 (L-8900: 日立製作所) を用いてニンヒドリン発色法により測定した。

### 2-2 おからの乳酸発酵

比較的発酵力の強い乳酸菌 *Lb. plantarum* DM1 を用いて, おからの乳酸発酵について検討した。おから 10g に, 蒸留水 20ml を加えたものに, MRS 培地で 30℃で 48 時間前培養した乳酸菌を 0.4ml 添加した試験区と, 無添加の試験区をそれぞれ 10 組用意し, 30℃で 1 週間静置培養を行い pH と有機酸を測定した。

次に, 300ml 容の三角フラスコにおから 50g と蒸留水 100ml を入れ, MRS 培地で 30℃で 48 時間前培養した乳酸菌 3 種 (*Lb. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2, スノーラクト L) をそれぞれ 2ml 添加し, 30℃で静置培養を行った。一週間後にサンプリングを行い pH および有機酸を

測定した。

また, 300ml 容の三角フラスコにおから 50g と芋焼酎粕 100ml 入れ, MRS 培地で 30℃で 48 時間前培養した乳酸菌 3 種 (*Lb. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2, スノーラクト L) をそれぞれ 2ml 添加し, 30℃で静置培養を行った。一週間後にサンプリングを行い pH と有機酸を測定した。

## 3 結果および考察

### 3-1 焼酎粕の乳酸発酵

芋焼酎粕中の乳酸菌数, 乳酸生成量, 酢酸生成量の経時的变化を表 1, 図 1, 2 に示した。

表 1 芋焼酎粕乳酸発酵後の乳酸菌数の変化

日数	0	5	60
<i>L. plantarum</i> のみ	$2.2 \times 10^9$	$6.3 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> +ブドウ糖	$2.2 \times 10^9$	$3.4 \times 10^{12}$	0
<i>L. plantarum</i> +セルラーゼ	$2.2 \times 10^9$	$5.6 \times 10^{10}$	0
<i>P. acidilactici</i> のみ	$9.7 \times 10^7$	$4.3 \times 10^{12}$	$2.6 \times 10^9$
<i>P. acidilactici</i> +ブドウ糖	$9.7 \times 10^7$	$1.6 \times 10^{13}$	0
<i>P. acidilactici</i> +セルラーゼ	$9.7 \times 10^7$	$8.7 \times 10^{10}$	0
スノーラクトのみ	$3.2 \times 10^7$	$4.5 \times 10^9$	$2.8 \times 10^7$
スノーラクト+ブドウ糖	$3.2 \times 10^7$	$1.4 \times 10^{12}$	$3.7 \times 10^4$
スノーラクト+セルラーゼ	$3.2 \times 10^7$	$3.4 \times 10^{12}$	$3.5 \times 10^4$

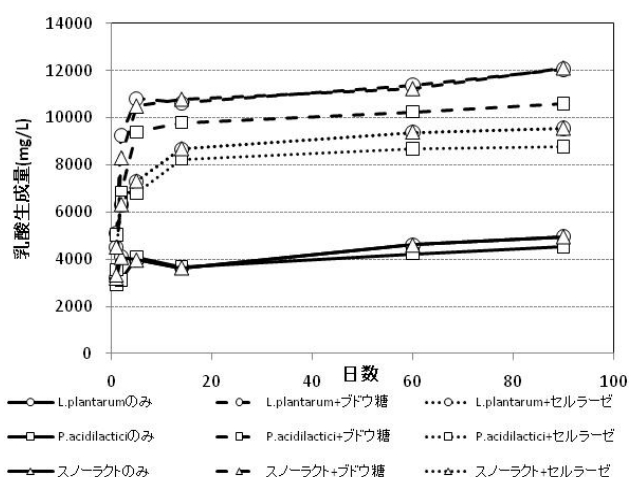


図 1 芋焼酎粕乳酸発酵後の乳酸生成量の変化

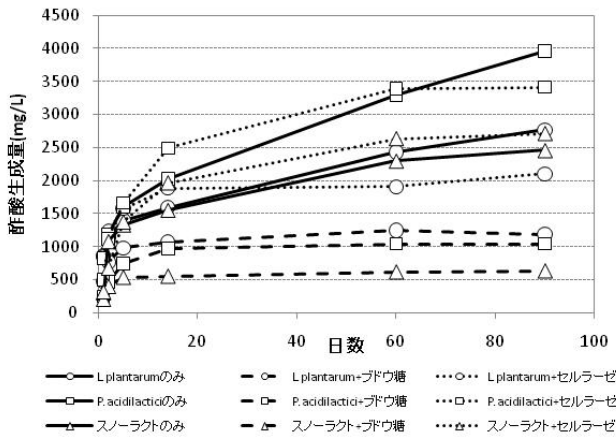


図2 芋焼酎粕乳酸発酵後の酢酸生成量の変化

芋焼酎粕中で、*Lb. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2 のみを添加した試験区は、60日後まで  $10^4$ CFU/g 以上の生菌数を維持したが、ブドウ糖、セルラーゼを添加した試験区では死滅していた。これは、セルラーゼの働きにより粕中にブドウ糖が生成され、乳酸生成量が増加し粕中のpHが低下したため、乳酸菌が死滅したと考えられる。乳酸菌3種共に乳酸菌のみ添加した試験区に比べ、ブドウ糖を添加した試験区では明らかに乳酸生成量が多く、逆に酢酸の生成量が少なくなっていた。また、セルラーゼ添加区でも乳酸生成量が多くなっていたが、乳酸生成速度が穏やかであると共に酢酸生成量は乳酸菌のみの試験区と同じであった。なお、焼酎粕の保存性を高めるためには乳酸が1%以上でpH4.0以下が望ましいと考えられることから芋焼酎粕を乳酸発酵させる時にはブドウ糖またはセルラーゼを添加物する必要があると考えられた。

次に、麦焼酎粕中の乳酸菌数、乳酸生成量、酢酸生成量の経時的变化を表2、図3、4示した。

表2 麦焼酎粕乳酸発酵後の乳酸菌数の変化

日数	0	5	14	30	60
Lplantarumのみ	$4.3 \times 10^9$	$1.1 \times 10^6$	$4.5 \times 10^5$	0	0
Lplantarum+ブドウ糖	$4.3 \times 10^9$	$2.2 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$	0	0
Lplantarum+セルラーゼ	$4.3 \times 10^9$	$2.3 \times 10^6$	0	0	0
Pacidilacticiのみ	$1.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^9$	$7.2 \times 10^7$	$3.8 \times 10^5$	0
Pacidilactici+ブドウ糖	$1.9 \times 10^8$	$3.8 \times 10^9$	$6.8 \times 10^8$	$4.0 \times 10^5$	0
Pacidilactici+セルラーゼ	$1.9 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$4.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^5$	0
スノーラクトのみ	$6.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^9$	$1.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^5$	$8.4 \times 10^4$
スノーラクト+ブドウ糖	$6.3 \times 10^7$	$2.6 \times 10^9$	$9.8 \times 10^7$	$1.5 \times 10^4$	0
スノーラクト+セルラーゼ	$6.3 \times 10^7$	$3.8 \times 10^9$	$2.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^5$	0

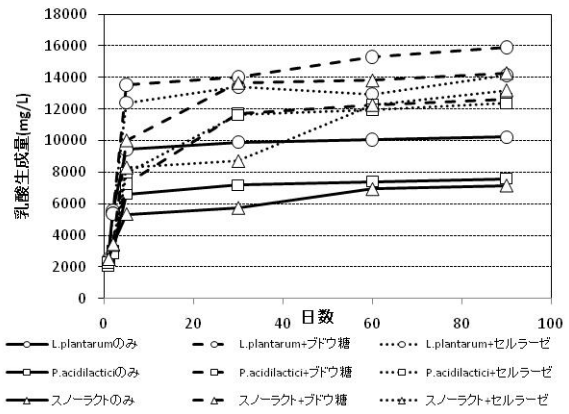


図3 麦焼酎粕乳酸発酵後の乳酸生成量の変化

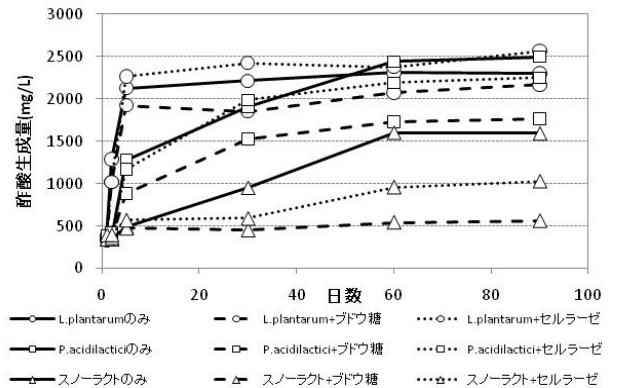


図4 麦焼酎粕乳酸発酵後の酢酸生成量の変化

麦焼酎粕では乳酸菌3種共にブドウ糖、セルラーゼ添加で明らかに乳酸生成量は多くなったが、ブドウ糖添加とセルラーゼ添加の差は認められなかった。乳酸菌数では、*Lb. plantarum* DM1+ブドウ糖添加では14日後に死滅し、乳酸菌のみ、セルラーゼ添加では30日後に死滅していた。*P. acidilactici* LM2ではどの試験区でも同じ傾向を示し、1ヶ月後までは生存したが60日後には死滅していた。スノーラクトLでは60日後にブドウ糖、セルラーゼ添加で死滅していたが、乳酸菌のみでは生存が確認された。これらのことから、麦焼酎粕の乳酸発酵においては *P. acidilactici* LM2, スノーラクトでは、ブドウ糖またはセルラーゼを添加する必要性があり、*Lb. plantarum* DM1では添加する必要が無いと考えられた。また、*P. acidilactici* LM2, スノーラクトでは、麦焼酎粕中で30日後に  $10^4$ CFU/g 以上生存しており、プロバイオティクス効果も期待された。

次に、ソバ焼酎粕中の乳酸菌数、乳酸生成量、

酢酸生成量の経時的変化を表 3, 図 5, 6 に示した.

表 3 ソバ焼酎粕乳酸発酵後の乳酸菌数の変化

日数	0	14	30	60
L.plantarum のみ	$2.2 \times 10^9$	$5.5 \times 10^7$	$9.8 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$
L.plantarum+ブドウ糖	$2.2 \times 10^9$	$2.0 \times 10^7$	0	0
L.plantarum+セルラーゼ	$2.2 \times 10^9$	$2.6 \times 10^9$	$6.6 \times 10^6$	0
P.acidilactici のみ	$9.7 \times 10^7$	$1.1 \times 10^9$	$8.3 \times 10^7$	$6.1 \times 10^8$
P.acidilactici+ブドウ糖	$9.7 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$2.8 \times 10^7$	0
P.acidilactici+セルラーゼ	$9.7 \times 10^7$	$8.0 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^9$	$7.6 \times 10^7$
スノーラクトのみ	$3.2 \times 10^7$	$1.1 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^{10}$
スノーラクト+ブドウ糖	$3.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$	$8.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^9$
スノーラクト+セルラーゼ	$3.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$

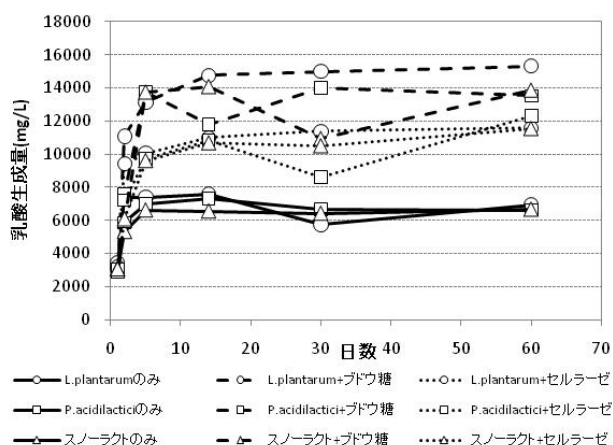


図 5 ソバ焼酎粕乳酸発酵後の乳酸生成量の変化

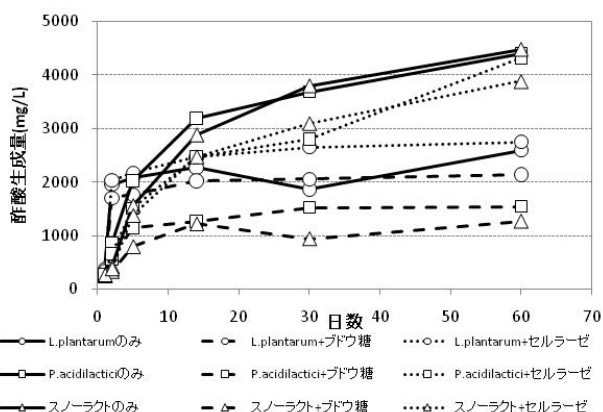


図 6 ソバ焼酎粕乳酸発酵後の酢酸生成量の変化

ソバ焼酎粕では乳酸菌 3 種共に乳酸菌のみ添加したものに比べ、ブドウ糖添加で明らかに乳酸生成量が多く、次いでセルラーゼ添加となっていた。酢酸に関しては、スノーラクト L, *P. acidilactici*

LM2 ではブドウ糖添加で生成量が少なく、乳酸菌のみとセルラーゼ添加では同程度増加していた。*Lb. plantarum* DM1 ではどの試験区においても酢酸の生成量が 2000~3000mg/L であり差はなかった。これらの結果から、乳酸菌のみ添加ではほとんど乳酸が生成されないことから、ブドウ糖またはセルラーゼを添加する必要性があると考えられた。

### 3-2 乳酸菌添加時期の検討

飼料化する上で野生の乳酸菌の混入は避けられないため、芋焼酎粕へ *P. acidilactici* LM2, スノーラクト L の 2 つの乳酸菌種を添加する時期を検討した。

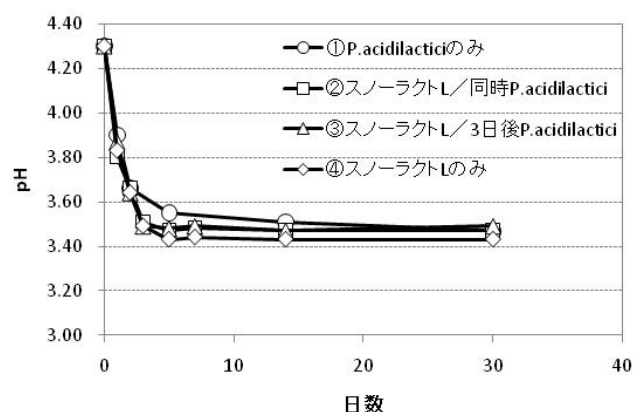


図 7 芋焼酎粕乳酸発酵後の pH の変化

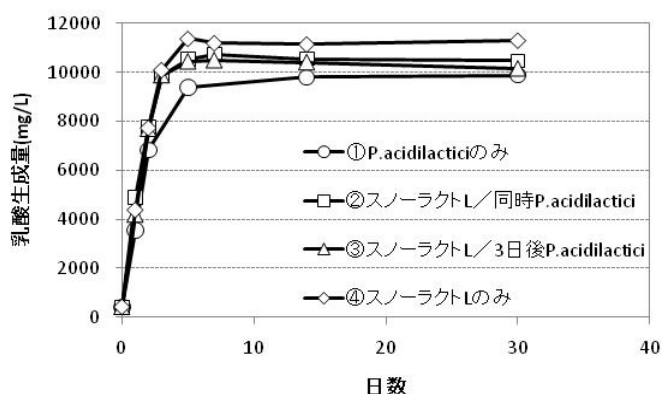


図 8 芋焼酎粕乳酸発酵後の乳酸生成量の変化

焼酎粕中の pH (図 7) と乳酸生成量 (図 8) は、*P. acidilactici* LM2, スノーラクト L それぞれ 1 種添加時と 2 種添加した時での大きな差はなかった。

次に、芋焼酎粕中のアミノ酸量 (表 4) を調べ

たところ *P. acidilactici* LM2 を添加した①, ②では機能性アミノ酸であるオルニチン(Orn)が増加しているのに対し, スノーラクトLを先に添加した③ではオルニチンの増加は確認できなかった. 3日後に *P. acidilactici* LM2 を添加した③の場合はすでに pH が 3.42 と低下しているため, *P. acidilactici* LM2 は増殖できなかつたと考えられる. *P. acidilactici* LM2 がオルニチンを生成するためには, 初めから焼酎粕へ添加する必要があると考えられた.

表 4 芋焼酎粕乳酸発酵後のアミノ酸含量 (mg/100ml)

	芋焼酎粕	①	②	③	④
オルニチン	5.0	14.4	13.2	4.9	4.6
アルギニン	14.0	0.2	0.3	13.4	13.1

① *P. acidilactici* LM2 のみ添加, ② スノーラクト L と *P. acidilactici* LM2 同時添加, ③ スノーラクト L を添加し, 3日後に *P. acidilactici* LM2 添加, ④ スノーラクト L のみ添加

### 3-3 おからの乳酸発酵

比較的発酵力の強い乳酸菌 *Lb. plantarum* DM1 を用いて, おからの乳酸発酵について検討した. その結果, 乳酸菌無添加の場合 pH が上昇し 10 個中 8 個で腐敗臭がしたが, 乳酸菌を添加すると pH の低下がみられ腐敗臭がしなかつた (表 5). そこで乳酸菌無添加の pH が一番高い No1 と乳酸菌添加の pH が一番低い No10 の有機酸量を調べたところ, 乳酸菌の添加により乳酸発酵が進み乳酸が生成されていることが確認でき, それにより pH が低下したと考えられた (図 9).

表 5 おから乳酸発酵 1 週間後の pH

	乳酸菌無添加	乳酸菌添加
No1	7.58*	5.88
No2	7.07*	5.37
No3	7.07*	5.52
No4	6.72*	4.83
No5	6.07	4.87
No6	7.12*	5.92
No7	6.92*	5.62
No8	6.54*	4.74
No9	4.82	4.70
No10	6.61*	4.69

\*: 腐敗臭のするもの

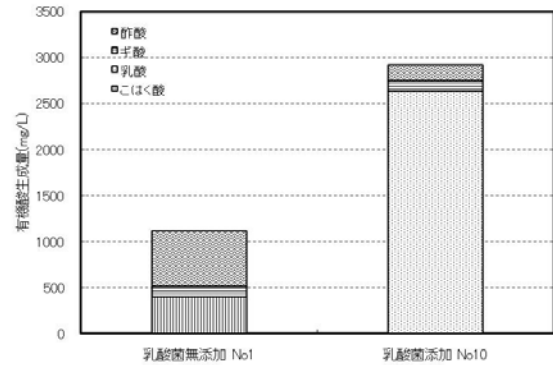


図 9 おから乳酸発酵後の有機酸生成量

このことからおから中で乳酸菌が増殖可能であり, 乳酸発酵により保存性を向上させることができると考えられた. そこで, 乳酸菌 3 種 (*L. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2, スノーラクト L) を用いたおからの乳酸発酵について検討した.

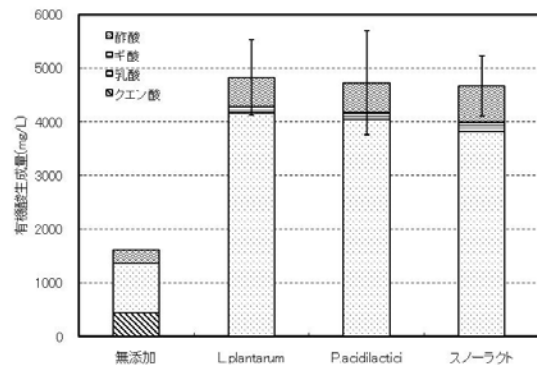


図 10 おからへ乳酸菌 3 種添加時の有機酸生成量

おからに乳酸菌 3 種を添加し、30°C で 1 週間培養した後の pH と有機酸生成量を図 10 に示した。すべての乳酸菌において乳酸の生成が認められたが、乳酸の生成量は 4000mg/L 前後と少なく、pH も 4 以下となることはなく、おからだけでの乳酸発酵では保存性に不安が残ることから、焼酎粕等の栄養分を添加して乳酸生成促進を図る必要があると考えられた。

次に、蒸留水を芋焼酎粕に置き換え、おからと焼酎粕混合の乳酸発酵試験を行った。図 11 におから焼酎粕混合乳酸発酵の有機酸生成量を示した。

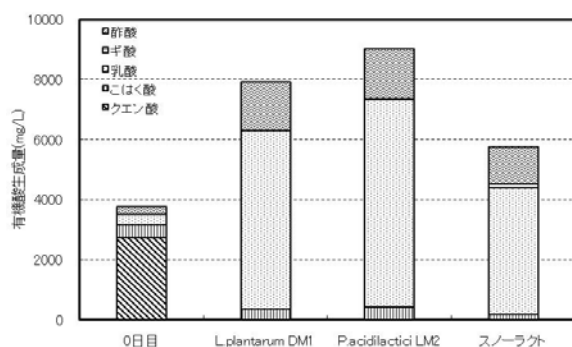


図 11 おからと焼酎粕混合乳酸発酵後の有機酸生成量

おからのみで乳酸発酵した場合は乳酸量が 4000mg/L だったのに対して、おからと焼酎粕を混合して乳酸発酵させた場合の有機酸量は、6000~8000mg/L に増加し、pH も 4.34~4.69 と低下していた。このことから、おからと焼酎粕の混合乳酸発酵は両者の保存性を向上させる方法として適切であると考えられた。

#### 4 まとめ

乳酸菌を利用した食品廃棄物のリサイクルに関する研究において、当センターで焼酎もろみから分離した *Lb. plantarum* DM1, *P. acidilactici* LM2 と雪印種苗製スノーラクト L を用いて実験を行ったところ、

- 1) 芋焼酎粕, ソバ焼酎粕乳酸発酵において、ブドウ糖またはセルラーゼを添加する必要があると考えられた。
- 2) 麦焼酎粕の乳酸発酵においては、ブドウ糖またはセルラーゼを添加しなくてもよいと考えられた。
- 3) *P. acidilactici* LM2 とスノーラクト L は、麦及びソバ焼酎粕中で 30 日後も生存していることが確認され、プロバイオティクス効果が期待された。
- 4) 焼酎粕への乳酸菌添加時期と成分について検討したところ、乳酸生成量等に大きな差は無かったが、*P. acidilactici* LM2 が機能性アミノ酸であるオルニチンを生成するためには、初めから焼酎粕へ添加する必要があると考えられた。
- 5) おからの乳酸発酵による保存性向上にはおからと焼酎粕を混合して乳酸発酵させることが有効であると考えられた。

#### 5 参考文献

- 1) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 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) 水谷政美, 山本英樹, 越智洋, 高山清子, 工藤哲三: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **52**, 95(2007)
- 3) 高山清子, 水谷政美, 山本英樹, 越智洋, 明石秀人, 工藤寛, 工藤哲三: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **52**, 103(2007)
- 4) 水谷政美, 森永樹, 高山清子, 山本英樹, 越智洋, 工藤哲三: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **54**, 97(2009)