

## 大麦焼酎粕由来発酵大麦エキス(FBE)からのナイシン生産

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者	古田, 吉史 丸岡, 生行 中村, 彰宏 大森, 俊郎 園元, 謙二
巻/号	104巻8号
掲載ページ	p. 579-586
発行年月	2009年8月

# 大麦焼酎粕由来発酵大麦エキス (FBE) からのナイシン生産

焼酎製造の副産物である蒸留粕の有効活用は、依然として焼酎業界が抱える重要な課題の一つである。本稿では、焼酎蒸留粕の新規用途開発を目指して大麦焼酎粕から得られる上清液：発酵大麦エキス FBE を乳酸菌の増殖培地素材として乳酸菌バクテリオシンの一種である抗菌物質ナイシン A を生産し、FBE の有効物質生産への応用及び大麦焼酎粕の高付加価値化の取組みについて概説していただいた。

古田吉史・丸岡生行・中村彰宏  
大森俊郎・園元謙二<sup>\*,\*\*</sup>

## 1. はじめに

焼酎製造に伴って蒸留工程後に排出される副産物である“焼酎蒸留粕（焼酎粕）”は現在、焼酎業界全体で推定年間 80～90 万トン発生している。焼酎粕は水分 90%以上 BOD 値で数万 ppm と高濃度の有機物を含むため、その処理は極めて困難であるとされてきた。しかしながら、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、その一部は濃縮・乾燥により家畜の飼料や肥料あるいは飲料用素材などとして既に有効活用されている。しかしながら、その多くは依然として海洋投入処分あるいは産廃処理されている。そのため、焼酎粕を有効活用し、リサイクルを促進するための新しいプロセスの構築が望まれている。

焼酎粕の新規用途開発の一環として、我々は大麦焼酎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) が乳酸菌およびビフィズス菌用の特に窒素源として非常に優れた培地素材であり<sup>1)</sup>、さらに FBE のエタノール不溶性画分 (EI 画分) には乳酸菌およびビフィズス菌の増殖促進物質が存在することを先に報告している<sup>2,3)</sup>。また、FBE は大麦と水、麴菌、酵母

のみに由来する所謂天然の素材であり、食品素材としても有望であると考えられる。実際に弊社では、FBE を調味料素材や健康飲料素材として既に有効活用している。そこで我々は、FBE の乳酸菌用の優れた培地素材であるという特性と、天然の食品素材であるという特性を活かして、FBE を培地素材として乳酸菌によって有用物質を生産し、FBE を機能性素材へと高付加価値化するための取組みを行った。今回、乳酸菌がつくる有用物質として、抗菌物質（乳酸菌バクテリオシン）の一種であるナイシン A に着目し、FBE のナイシン A 生産培地としての有効性の評価と、FBE 中のエタノール溶性画分 (ES 画分) と EI 画分のナイシン A 生産に及ぼす影響について検討を行った。本稿では、それらの結果について紹介する。

## 2. ナイシンについて

乳酸菌バクテリオシンは、一般に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、標的細胞膜への孔形成によって殺菌的に作用する<sup>4)</sup>。乳酸菌バクテリオシンの多くは、リステリア菌やボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌などの食中毒菌に対して抗菌性を有する。また、乳酸菌バクテリオシンは人の消化酵素によって容易に分解されるという特長があり、

Nisin Production with Fermented Barley Extract (FBE) Derived from Barley *Shochu Kasu*  
Yoshifumi FURUTA, Naruyuki MARUOKA, Akihiro NAKAMURA, Toshiro OMORI, and Kenji SONOMOTO<sup>\*,\*\*</sup>  
(Research Laboratory, Sanwa Shurui, Co. Ltd., <sup>\*</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University; <sup>\*\*</sup>Department of Functional Metabolic Design, Bio-Architecture Center, Kyushu University.)

且つ生産菌である乳酸菌の食経験も長いことから、安全性の高い食品保存料として近年非常に注目されている。ナイシンは、*Lactococcus lactis* が生産するクラス I に分類される乳酸菌バクテリオシンであり<sup>5-8)</sup>、一般に菌の増殖に連動して生合成されると考えられている<sup>9,10)</sup>。ナイシンは、異常アミノ酸を含む 34 のアミノ酸残基からなる抗菌ペプチドであり、これまでのところアミノ酸残基が一部異なる 3 つの類縁体 (ナイシン A, Z, Q) が報告されている<sup>8,11,12)</sup>。その中でも、「ナイシン A」は乳酸菌バクテリオシンの中で唯一、WHO (World Health Organization) や FAO (Food and Agriculture Organization) から食品として安全であるとの承認を受けている物質であり、数十年に亘り世界 50 カ国以上で食品保存料として使用されている<sup>13-16)</sup>。なお、日本国内では、ナイシン A は本年 3 月 2 日に厚生労働省により新規食品添加物として認可されている。

### 3. 大麦焼酎粕からの FBE, ES および EI 画分の調製法

大麦焼酎粕からの FBE, ES および EI 画分の調製法を Fig. 1 に示す。減圧蒸留直後の新鮮な大麦焼酎粕を振動篩 (1 mm)、スクリープレスおよびセラミックろ過 (0.20  $\mu\text{m}$ ) に供して大麦由来の繊維質や酵母や麹菌体などの固形分を除去し、清澄なエキスである発酵大麦エキス : FBE (Brix 8) を調製した。なお、本稿の全ての試験において、FBE のエキス分の濃度 (Brix) については、屈折計 (Atago PAL-1, Tokyo) を用いて測定した。Brix 8 の FBE 原液をエバポレーター (40°C, 30 hPa) によって Brix 25 まで濃縮した。これに終濃度が 90% (v/v) となるようにエタノールを添加し、得られた ES 画分と EI 画分をろ紙ろ過 (セルロース, 保留粒子径 6  $\mu\text{m}$ ) により分け、それぞれの画分を凍結乾燥した。大麦焼酎粕

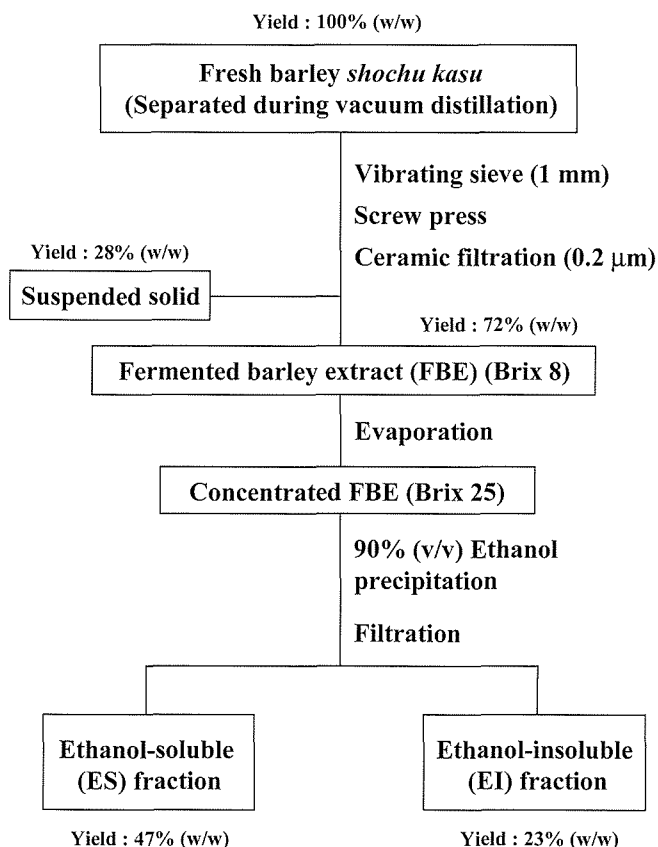


Fig. 1 Preparation of FBE, and ES and EI fractions from barley shochu kasu.

からのFBE, ESおよびEI画分の収量(固形分収支)は,それぞれ72%(w/w), 47%(w/w), 23%(w/w)であった。また, FBE, ESおよびEI画分の成分組成については, 先に<sup>3)</sup>報告した通りである。

#### 4. 菌株, 培養および分析方法

菌株には, ナイシンA生産菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454株を使用した。リフレッシュおよび継代培養用の培地として, Difco社製のTGC培地(TGC medium; Difco, Detroit, MI, USA)を用いた。シード培地として, 0.50%(w/v) yeast extract, 0.50%(w/v) polypeptone, 0.50%(w/v) NaClおよび1.00%(w/v) glucoseからなる培地を使用し, 初発の培地pHをNaOHにより6.0に調整した。なお, シード培地として1.00%(w/v) glucoseを補足したBrix 4のFBE培地(pH 6.00)も使用したが, その後の本培養でどちらのシード培地を用いた場合も同じ結果が得られた。

10 mlのリフレッシュ培地(TGC培地)にて30°C・24 hで静置培養を行った培養液(リフレッシュ菌体)1 mlを, 100 mlのシード培地を張り込んだ300 ml容の三角フラスコに接種し, 30°C・4.5 h振とう(100 strokes/min)培養を行った。作製した60 mlのシード培養液を, 1200 mlの本培養培地(後述)を張り込んだ2 L容の発酵ジャー(BMJ-02; Biot, Tokyo)に接種し, 温度, 攪拌速度およびpHをそれぞれ, 30°C, 250 rpmおよび5.5 (with 5.0 N NaOH)に制御しつつ本培養を実施した。なお, それぞれの培養試験を2回ずつ実施した。

菌の増殖を乾燥菌体重量(dry cell weight: DCW)を測定することで評価した。すなわち, 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DCWを求めた。また, 発酵ジャーより抜き取った培養液を0.45 μmのメンブレンフィルター(cellulose acetate, Minisart, Sartorius K. K., Tokyo)に供し, 得られたろ液中の糖や有機酸量を, カラムにBIO RAD社(Hercules, CA, USA)製のAminex HPX-87 Hを備えたHPLC分析計(Waters 2690, Milford, MA, USA)で測定した。さらに, 得られたろ液をHClによりpHを4.0に調整し, 冷蔵室(4°C)に一晩保存した。翌日, 再

度0.45 μmのメンブレンフィルターに供して得られたろ液を, 昭和電工社(Tokyo)製のAsahipak Shodex ODP-50 6Eカラムを備えたHPLC分析計(Waters 2690)に供してナイシンA量を測定した。ナイシンAを, Sigma-Aldrich社(St. Louis, MO, USA)製のナイシンA試薬(2.5%(w/w)ナイシンA含有)を標準物質として定量し, 単位は全てIU(international unit)/mlで表記した。※1 μgのナイシンAは40 IUの抗菌活性を示す。

#### 5. FBE培地におけるナイシンA生産および菌体増殖の評価

FBEをベースとした培地におけるナイシンA生産と菌体増殖を最適化するために, FBEのエキス分の濃度(Brix)を屈折計(Atago PAL-1)によりBrix 1(固形分: 0.92%(w/v))からBrix 4(固形分: 3.68%(w/v))に調整した。また, 結果に示していないが, 初発にglucoseを補足しなかった場合, 何れのBrixのFBE培地においても, ナイシンA生産と菌体増殖は著しく低く, 培養24 h後にglucoseを補足することでナイシンA生産と菌体増殖は急激に増大した。このことから, FBEはエタノール発酵後の残液であり微生物が資化可能な炭素源はほとんど含まれていないため, 十分なナイシンA生産と菌体増殖を得るためには, FBEへのglucoseなどの炭素源の補足が必須であることが示された。

そこで, 初発に十分量の炭素源である4.50%(w/v)のglucoseを補足したBrix 1~4のFBE培地を本培養培地として作製し, 試験を行った。その際に得られた培養の経時変化をFig. 2に示す。菌体増殖についてはBrix 3又はBrix 4のFBE培地で最大に達したが, ナイシンA生産についてはBrix 2又はBrix 3のFBE培地で最大に達し, Brix 4では逆に低下する傾向が見られた。このような結果から, ナイシンA生産を目的とした場合のFBE培地の最適Brixは2~3であると思われた(Brix 2 FBE培地におけるナイシンAの最大生産量は1250 IU/ml, Brix 3.0 FBE培地では1150 IU/mlであった)。従って, Brix 2と3の中間値であるBrix 2.5を, ナイシンA生産用のFBE培地の最適Brixとして採用した。なお, 結果として示していないが, FBE培地に補足するglucose濃度に関しては, 4.50%(w/v)以上のglucoseを

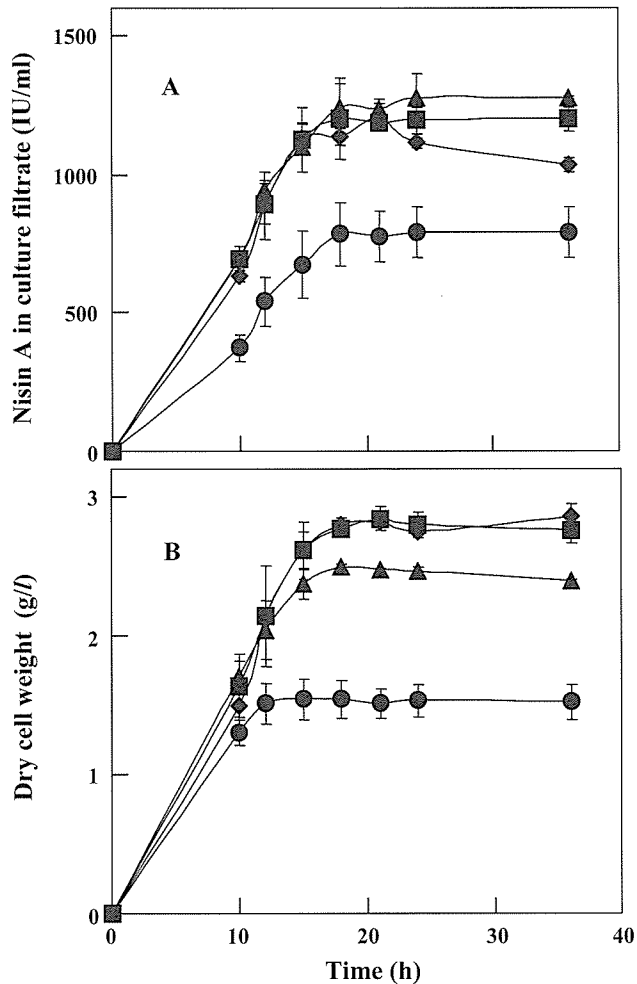


Fig. 2 Time course of nisin A production (A) and cell growth (B) of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 in Brix-varied FBE media, initially supplemented with 45 g/l of glucose. FBE media : closed circles, Brix 1 ; closed triangles, Brix 2 ; closed squares, Brix 3 ; and closed diamonds, Brix 4. FBE concentration was adjusted from Brix 1 (solid content, 0.92% (w/v)) to Brix 4 (solid content, 3.68% (w/v)). Cultivation was carried out in a 2-l jar fermentor. Temperature, pH, and agitation speed were maintained at 30°C, 5.50, and 250 rpm, respectively. Data are means calculated from two fermentations. Vertical bars represent standard deviation.

FBE 培地に添加しても培養経過は同じであった。

#### 6. FBE 培地と試薬培地 (対照) との比較 および ES, EI 画分の添加効果

FBE 培地として、ナイシン A 生産用に最適化した

4.50% (w/v) のグルコースを補足した Brix 2.5 の FBE 培地を用いた。対照として、0.50% (w/v) yeast extract, 0.50% (w/v) polypeptone, 0.50% (w/v) NaCl および 4.50% (w/v) glucose からなる試薬培地<sup>17)</sup>を使用した。また、試薬培地 (対照) に

FBE由来のESおよびEI画分をそれぞれ0.50% (w/v) 添加した区 (Basal+0.5% ES, Basal+0.5% EI) を調製し、各画分のナイシンA生産および菌体増殖に及ぼす影響を調べた。なお、本研究で利用した試薬培地とMRS培地 (Becton, Dickinson and Company 製, Sparks, MD, USA) およびM17培地 (Merck社製, Darmstadt, Germany) の3種を用いて、プラスチックレベルで振とう培養を行い、培養24h後におけるナイシンA生産量を比較したところ、本研究で利用した試薬培地でのナイシンA生産量が最も高かったため (本研究で利用した試薬培地: 600 IU/ml, MRS培地: 500 IU/ml, M17培地: 200 IU/ml), 対照として使用した。

各培地におけるナイシンA生産と菌体増殖の経時変化をFig. 3に示す。培養初期においてBrix 2.5 FBE培地では、ナイシンA生産と菌体増殖が共に試薬培地 (対照) と比べて遅延する傾向が見られたが、最終的には試薬培地 (対照) を若干上回った。Table 1に、各培養にて得られたナイシンAの最大生産量、収量などをまとめて示す ( $Y_{P/X}$  と  $Y_{P/S}$  はそれぞれ、ナイシンAの生産が最大に達した時点における、菌体当たりのナイシンA収量と、消費基質 (glucose) 当たりのナイシンA収量を表す)。Brix 2.5 FBE培地において生産されたナイシンAの最大値は1233 IU/ml (培養23h後)、試薬培地 (対照) については1109 IU/ml (培養15h後) であった。Brix 2.5 FBE培地と対照との間で、 $Y_{P/X}$  と  $Y_{P/S}$  に大きな差異は見られなかった。

試薬培地 (対照) へのESとEI画分の添加効果については、試薬培地 (対照) への0.50% (w/v) のEI画分添加により、ナイシンA生産および菌体増殖が共に著しく増大した (Fig. 3)。EI画分を添加した場合のナイシンAの最大生産量は1488 IU/mlであり、試薬培地 (対照) の1.34倍であった (Table 1)。また、 $Y_{P/X}$  と  $Y_{P/S}$  も試薬培地 (対照) と比べて高かった (Table 1)。なお、結果に示していないが、ナイシンA生産に及ぼすEI画分の促進効果は、0.50% (w/v) の添加量で最大であった。一方、試薬培地 (対照) へのES画分の添加により、菌体増殖は培養初期において僅かに遅延し、ナイシンA生産は試薬培地 (対照) と比べて大きく低下した (その要因は現在のところ不明)。その結果、 $Y_{P/X}$  と  $Y_{P/S}$  は共に試

薬培地 (対照) と比べて低かった。

以上の結果のように、最適化されたFBE培地を使用することで、栄養豊富で且つ高価な試薬培地 (対照) とほぼ同レベルのナイシンを生産することが可能であった。焼酎粕のような食品製造上の副産物からのナイシン生産に関しては、これまでにチーズ製造工程で副産物として排出される乳清ホエーを培地として利用したナイシン生産がいくつか報告されている<sup>10,18-20)</sup>。しかしながら、何れの報告においても、MRS培地やM17培地あるいはCM複合培地<sup>9,21)</sup>のような栄養豊富な試薬培地に比べると、乳清ホエーにおけるナイシンの生産性は極めて低く、十分なナイシン生産性を得るためには乳清ホエーに酵母エキスやカゼイン分解物などの高価な窒素源を補足する必要があった<sup>18-20)</sup> (乳清ホエーへの酵母エキスやカゼイン分解物などの補足により、ナイシン生産性は2~4倍に増大した)。これに対して、本研究で最適化したFBE培地、つまりBrixを2.5に調整したFBEに安価な炭素源 (glucose) のみを補足した培地で試薬培地 (対照) と同等のナイシン生産が可能であることが示されており、この結果からFBEはナイシン生産用の廉価で且つ効果的な培地素材であることが示された。

また、試薬培地 (対照) へのEI画分の添加によりナイシン生産量が顕著に増大したが、これは恐らくEI画分添加によって菌の増殖が促進されたことに起因しているものと考えられた。EI画分に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進に関与する成分として、低分子 (分子量3000以下) のペプチドあるいはオリゴ糖である可能性が高いことを先に報告している<sup>3)</sup>。また、焼酎蒸留粕と同様な発酵物として、酒粕の水抽出物<sup>22)</sup> および米糠麴<sup>23)</sup> などにも、乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進物質が存在することが報告されている。しかしながら、何れの報告でも具体的な活性成分は同定されていないため、今後さらにEI画分中の成分の特定に努めたいと考えている。

## 7. おわりに

以上のように、大麦焼酎粕より得られるFBEのBrixを最適化し (Brix 2.5)、glucoseのみを補足したシンプルな培地で、栄養豊富で且つ高価な試薬培地 (対照) と同等量のナイシンAを生産することが可能であった。この結果から、FBEはナイシンA生産用

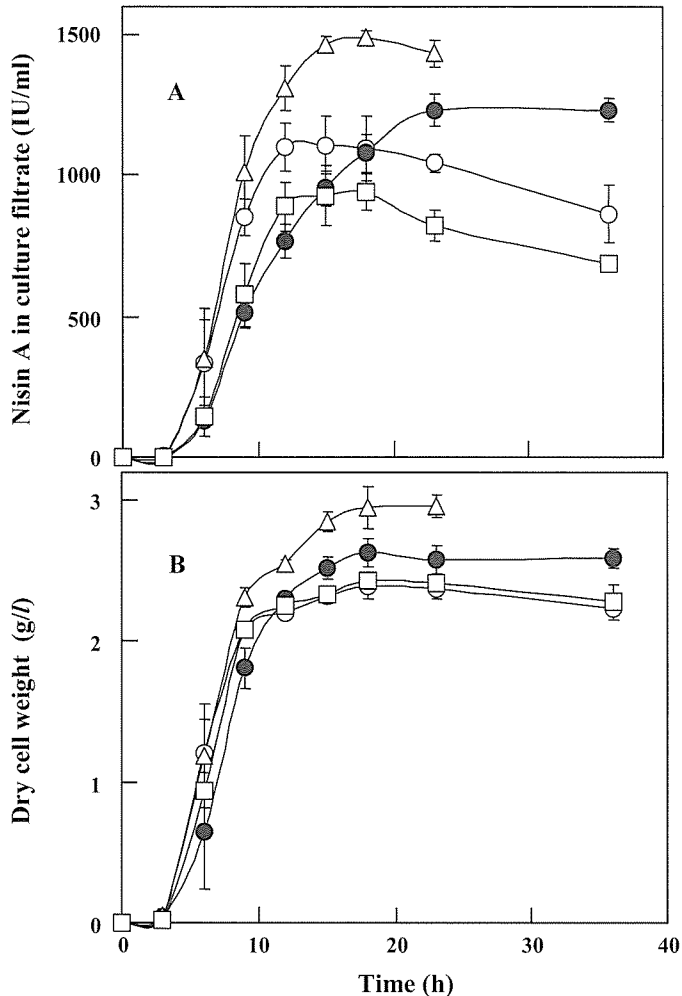


Fig. 3 Comparison of nisin A production (A) and cell growth (B) of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 in different media. Closed circles, Brix 2.5 FBE medium supplemented with 45 g/l of glucose ; open circles, basal medium composed of 5 g/l yeast extract, 5 g/l polypeptone, 5 g/l sodium chloride, and 45 g/l glucose ; open triangles, basal medium supplemented with a 0.50% (w/v) EI fraction ; and open squares, basal medium supplemented with a 0.50% (w/v) ES fraction. Cultivation was carried out in a 2-l jar fermentor until the glucose substrate was completely consumed. Temperature, pH, and agitation speed were maintained at 30°C, 5.50, and 250 rpm, respectively. Data are means calculated from two fermentations. Vertical bars represent standard deviation.

の廉価で優れた培地素材として利用可能であり、かつ FBE を抗菌活性を有する付加価値の高い食品素材に転換できる可能性が示唆された。FBE を培地として

利用した有用物質生産の実例として、弊社では FBE をベースに作製した高濃度  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を含有する「大麦乳酸発酵液 GABA」を開発し上市

**Table 1** Comparison of maximum production and yield of nisin A in different media.

Medium	Maximum soluble nisin A (IU/ml)	Time (h)	Yield of nisin A (IU/g)	
			$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$
Brix 2.5 FBE	1233	23	$4.77 \times 10^5$	$3.33 \times 10^4$
Basal	1109	15	$4.78 \times 10^5$	$3.58 \times 10^4$
Basal + 0.50% EI	1488	18	$5.04 \times 10^5$	$3.91 \times 10^4$
Basal + 0.50% ES	942	18	$3.87 \times 10^5$	$2.66 \times 10^4$

Time, time (h) when nisin A production reached a maximum;  $Y_{P/X}$ , yield (IU/g) of nisin based on cell mass when nisin A production reached a maximum;  $Y_{P/S}$ , yield (IU/g) of nisin based on consumed glucose when nisin A production reached a maximum. Data are means calculated from two fermentations.

している<sup>24)</sup>。併せて、高価な試薬培地と比べて遜色のない力価を有する大麦焼酎粕由来の廉価な培地素材「バーレックス」も実用化している。さらに、メナキノン-7の生産を目的とした *Bacillus subtilis* の培養<sup>25)</sup> や、微生物がつくる界面活性剤の一種であるソホロリピッドやセロビオースリピッドの生産を目的とした *Starmerella bombicola* や *Ustilago esculenta* の培養<sup>26,27)</sup> にも、FBEは非常に有効な培地素材であることを報告している。今後、大麦焼酎粕由来FBEからの有用物質生産の応用例がさらに広がり、焼酎粕の有効活用ならびに高付加価値化が促進されることを期待している。

<三和酒類(株)研究所 \*九州大学大学院農学研究院 \*\*九州大学バイオアーキテクチャーセンター>

## 文 献

- 古田吉史, 丸岡生行, 中村彰宏, 大森俊郎, 園元謙二: 生物工学, **87**, 16-19 (2009)
- Furuta, Y., Takashita, H., Omori, T., Sonomoto, K., Shimoda, M., and Wada, H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **864**, 276-279 (1998)
- 古田吉史, 外菌理佐, 高下秀春, 大森俊郎, 石崎文彬, 園元謙二: 生物工学, **85**, 161-166 (2007)
- 園元謙二, 指原紀宏: 蛋白質 核酸 酵素, **46**, 323-333 (2001)
- 園元謙二, 松崎弘美, 石崎文彬: バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 26-30 (1996)
- 松崎弘美, 園元謙二, 石崎文彬: 生物工学, **75**, 125-133 (1997)
- 指原紀宏, 園元謙二, 石崎文彬: 化学と生物, **38**, 439-446 (2000)
- 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二: バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 597-602 (2003)
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: J. Gen. Microbiol., **138**, 571-578 (1992)
- Guerra, N. P., Rua, M. L., and Pastrana, L.: Int. J. Food Microbiol., **70**, 267-281 (2001)
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakyama, J., and Sonomoto, K.: Biosci. Biotechnol. Biochem., **67**, 1616-1619 (2003)
- Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 2232-2235 (2008)
- Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G. C., Thomas, L. V., and Delves-Broughton, J.: J. Food Prot., **62**, 1004-1010 (1999)
- Budu-Amoak, E., Harris, J., Ablett, R. F., and Delves-Broughton, J.: J. Food Prot., **62**, 46-50 (1999)
- Thomas, L. V., Ingram, R. E., Bevis, H. E., Davies, E. A., Milne, C. F., and Delves-Broughton, J.: J. Food Prot., **65**, 1580-1585 (2002)
- Turtell, A. and Delves-Broughton, J.: Bull. Int. Dairy Fed., **329**, 20-23 (1998)
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **45**, 36-40 (1996)
- Amiali, M. N., Lacroix, C., and Simard, R. E.: World J. Microbiol. Biotechnol., **14**, 887-894 (1998)



- 19) Liu, X., Chung, Y. K., Yang, S. T., and Yousef, A. E. : *Process Biochem.*, **40**, 13-24 (2005)
  - 20) Desjardins, P., Meghrou, J., and Lacroix, C. : *Int. Dairy J.*, **11**, 943-951 (2001)
  - 21) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 17-22 (1993)
  - 22) 島村誠一, 石橋憲雄, 宮川博, 阿部文明, 桐原郁子 : 特願 3-197001 (1991)
  - 23) 細山 浩, 大沢 学, 浜野光年 : *日食工誌*, **38**, 940-944 (1991)
  - 24) 古田吉史, 大森俊郎 : *食品と科学*, **48**, 77-80 (2006)
  - 25) 林 圭, 高下秀春, 大森俊郎 : 特許 3431573 (2003)
  - 26) 古田吉史, 丸岡生行, 大森俊郎, 小西正朗, 森田友岳, 福岡徳馬, 井村知弘, 北本 大 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.103 (2009)
  - 27) 丸岡生行, 古田吉史, 大森俊郎, 小西正朗, 森田友岳, 福岡徳馬, 井村知弘, 北本 大 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.103 (2009)
-