

2002 年度 修士論文

「コンニャク飛粉」有効利用法の検討
; 生物学的手法を用いた資源化

An Attempt to Utilize “Konjac TOBIKO” ; Possible Resources for Bioproducts

高知工科大学 大学院

工学研究科 基盤工学専攻
物質・環境システム工学コース

1055001

石川 香織

目次

要旨	1 頁
序論	2 頁
材料と方法 3	16 頁
結果及び考察 17	29 頁
総括	30 頁
謝辞	31 頁
参考文献	32 頁

要旨

「蒟蒻飛粉」(こんにゃくとびこ)と呼ばれる蒟蒻原料の精粉製造時に生じる副産物を、生物学的手法を用いて資源化する方法を検討した。蒟蒻製品や精粉を用いた他の練り製品は、精粉の主成分であるグルコマンナンのゲル化作用を利用している。飛粉にはこのグルコマンナンが殆ど含まれていないことから、蒟蒻・練り製品として用いることはできない。そのため肥料のような土壌改良剤に、また緑化工事での法面への種子・苗の粘着剤等として用いられている。本研究では、さらに飛粉をより付加価値を高めて利用する方法として、微生物を用いて飛粉を資源化する方法を検討した。

飛粉の組成を把握するため食品の一般成分分析法を用いて構成成分を分析した結果、糖質が最も多かった。そこで糖質の成分分析を行うと、水溶性部分にはグルコマンナンが、非水溶性部分はデンプンがその殆どを占めていた。このことから、グルコマンナン及びこれらの糖質の加水分解物であるグルコースとマンノースを炭素源として乳酸菌による発酵を試みた。

乳酸菌には数多くの種類があるが、その中でも今回の目的に役立つであろうと選定した、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactobacillus helveticus*、*Streptococcus thermophilus* の3株を用いた。その結果、全株でグルコース、マンノース、グルコマンナン全ての糖質からの乳酸の生成を確認した。最も乳酸生成効率が良かったのは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* であった。乳酸菌が作り出す酸性物質には乳酸、酢酸があるが、乳酸は食品添加物や保存料として、また生分解性素材として注目されているポリ乳酸の原料として需要が高まっている物質である。飛粉には糖質の他、蛋白質 17.0%、脂質 5.5%、無機質 8.5%が含まれており、乳酸菌の栄養源として十分な役割を果たすものと思われる。本研究で、グルコマンナンと飛粉中構成単糖であるグルコース、マンノースからの乳酸菌による乳酸の生成を確認した。また、実際に飛粉を用いた乳酸の生成にも成功した。

序論

蒟蒻製品は、学名 ; *Amorphophallus Konjac* K. Koch というサトイモ科多年草の地下球茎部分である蒟蒻芋を原料としている。蒟蒻製品を製造様式から大別すると、精粉（せいこ）と呼ばれる蒟蒻芋中の多糖質精製物コンニャクグルコマンナンから造られるものがあり、市販されている蒟蒻製品の大半はこれにあたる。他に、生芋そのもの（蒟蒻芋全体）から造られる製品がある。蒟蒻芋を細断後に乾燥させたものを荒粉といい、これから精粉を製造する過程で生じる副産物が蒟蒻飛粉（以下飛粉）である。精粉製造方法は、原料芋である蒟蒻芋を洗浄後細断し、これを機械にて火力乾燥させ、荒粉というチップ状にする。この荒粉を粉碎し微細な粉末状にして得たマンナン粒子（グルコマンナンが蒟蒻芋組織中に粒状に蓄積されたもので乾燥すると非常に硬い粒子となる）の表面を機械で磨く。磨いた後、エアーセパレーターにて分級（風力を用いて粉体を粒子径、密度、形状などによって区別する操作）する。密度が高く比重が重い精粉（グルコマンナン粒子）は包装され製品となる。それ以外の軽い微粒子粉末が飛粉である。精粉にはグルコマンナンの他、数%の蛋白質や灰分などが含まれている。

蒟蒻芋からコナ蒟蒻と呼ばれる精粉を製造する際に飛粉は産出し、精粉と飛粉の割合は6 : 4 から 5 : 5 と、飛粉は精粉とほぼ等量である。荒粉の半分近い飛粉を副産物としながらも精粉が用いられているのは、精粉を原料とすることで原料の保存性が良くなり、物流適性も改良でき、更に製造工程の規格化が容易になるなどの理由による。また、カラギーナンやキサントンの他の多糖質との混合による相乗効果などの特性が注目されるようになり、精粉グルコマンナンの用途が広がってきている。

蒟蒻製品や精粉を用いた他の練り製品は、精粉の主成分であるグルコマンナンのゲル化作用を利用している。飛粉にはこのグルコマンナンが殆ど含まれていないことから、蒟蒻・練り製品として用いることはできない。そのため、肥料のような土壌改良剤に、また緑化工事での法面への種子・苗の粘着剤等として用いられている。本研究では、飛粉をより付加価値を高めて利用する方法を開発するために、飛粉の構成成分を食品の一般成分分析法により分析し、それをもとに微生物を用いて飛粉を資源化する方法を検討した。

材料と方法

・ [飛粉の構成成分分析]

食品の一般成分の分析法によって飛粉の構成成分を分析した。食品の一般成分は水分、蛋白質（純タンパク質・遊離アミノ酸）、脂肪、炭水化物、灰分（リン・鉄・カルシウムなどの無機物）、その他各種ビタミンの6成分に大別される。この内ビタミンを除く主成分を合計するとほぼ100%となり、この主成分を特に一般成分といい一般成分の定量を食品の一般分析という。食品の成分は単一であることは無く、様々な化合物が極めて複雑に含まれているのでこれらの分析成分は「粗」成分である。（[3]、[6]、[16]、[17]、[23]参照）

分析方法

<水分>

常圧加熱乾燥法は、試料を均質化した後、一定温度・常圧下で加熱して乾燥させ加熱前後の重量差（減量）を求めることにより水分を定量する方法である。この場合水が唯一の揮発成分であること、この操作で水が完全に除かれること、加熱中に他の成分が大きく変化しないことなどが条件である。それ故乾燥は、常圧 105（常圧 105法）で行った。秤量びんに試料（飛粉）を正確に秤量し、常圧 105 で約 3 時間加熱乾燥した。その後デシケーター中で 30 分間放冷し、次いで常圧 105 1 時間加熱 30 分間放冷を、恒量に達するまで繰り返した。加熱前後の重量差（減量）を水分量とした。

<蛋白質>

飛粉から界面活性剤で抽出される成分を硫酸沈殿して分画した成分を蛋白質として定量した。1% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 100ml を飛粉 400mg と混合し、4 にて約 12 時間攪拌後、溶液を 15,600×g 10 分間遠心し、残渣から分離した。この溶出液に、80%硫酸アンモニウムを加えて塩析（硫酸分画）し、27,000×g 10 分間遠心分離によって塩析沈殿物（蛋白質）を回収した。Viskase Sales Corporation Dialysis membrane, Size20（Wako）によって 50mM 重

炭酸アンモニウムに対して透析し、硫酸アンモニウムを取り除いてその中の蛋白質量を BCA 法にて吸光度測定 (562nm) した。BSA (ウシ血清アルブミン) を標準蛋白質として換算表記した。([6] 参照)

< 脂肪 >

クロロホルム-メタノール混液抽出法による定量

飛粉約 2g をフラスコに精密に測り取り、クロロホルム : メタノール (2 : 1) 混液 50ml を加え、還流冷却器を接続して 65 の湯浴上で加温沸騰させ 1 時間可溶成分を抽出した。冷却後、抽出液をガラスろ過器にて (フィルターはガラスフィルター ; Glass micro-fiber filter 使用) 吸引ろ過し、ろ液をエバポレーターにて内容物が粘性状態になるまで濃縮した。冷却後石油エーテルにて粘性状態の内容物を溶かし、遠心分離管に移して無水硫酸ナトリウム 15g を加え十分振り混ぜた後、1000 × g で 5 分間遠心分離した。上清の一部 (一定量) を秤量びんにとり、石油エーテルを揮発させた後 105 にて 30 分間恒量になるまで乾燥し、デシケーター中で放冷後秤量した。

酸分解法による定量

飛粉約 2g をビーカーに精密に測り、95% (v/v) エタノール 2ml を加えよく混和した。HCl (HCl 25ml + 蒸留水 11ml の割合) 溶液を 10ml 加え十分混和し 70 ~ 80 の湯浴上で時々攪拌しながら 40 分間加温した。これにエタノール 10ml を加えて放冷後全量を遠心分離管に移した。エーテル 25ml を、ビーカーを洗いながらこれに加え 30 秒間激しく振り混ぜ更に、石油エーテル 25ml を加えて 30 秒間激しく振り混ぜた。上層が透明で二層が完全に分離するまで 1 時間以上放置した。上層をフラスコに移し、容器内側をエーテル + 石油エーテル (1 : 1) 10ml で洗い、洗液を完全にフラスコに移した。残量に再びエーテルと石油エーテルを順次加えて 1 回目と同様に操作して、抽出液と洗液をフラスコに移した (2 回目の抽出となる)。最後にエーテル及び石油エーテルを各々用いて 3 回目の抽出を行った。全抽出液及び洗液を合わせたフラスコからできるだけ溶媒を揮発させた後、105 にて 1 時間恒量になるまで乾燥し、デシケーター中で放冷後秤量した。

< 灰分（粗灰分） >

灰分（直接灰化法）

飛粉約 2g を入れたるつぼ（磁性るつぼ；重量既知のもの）を精秤した。約 200 で煙が完全に出なくなるまで加熱（予備焼き）を行った後、550 で 2 時間灼熱した。灼熱後 30 分間デシケーター中で放冷し、精秤した。次いで 500 で 1 時間灼熱後デシケーター中で 30 分間放冷を恒量に達するまで繰り返した。

< 炭水化物（糖質） >

全糖量を、フェノール-硫酸法を用いて分析した。飛粉 20mg と脱イオン水 100ml を混合したもの 0.2ml に 5% フェノールを 0.2ml 加え攪拌後、濃硫酸 1ml を速やかに滴下しよく混合した。室温にて 20 分間放冷し、490nm にて吸光度測定した。糖量はグルコースを標準物質として換算表記した。

.[飛粉中の糖質分析]

-1 . 構成単糖の分析

飛粉に含まれる全(多)糖を構成する単糖の分析を行った。また飛粉には水溶性部分と非水溶性部分があり、各々に含まれる構成単糖も分析した。([4]、 [10]参照)

飛粉全体、飛粉中の水溶性部分、非水溶性部分各々を 0.25、0.5、1、2M の塩酸溶液を加えて沸騰水中にて還流冷却を行いながら加水分解した。経時的に試料中の還元糖量を Somogyi-Nelson 法にて測定すると、0.5M で約 2 時間 30 分、1M で約 1 時間の加水分解により還元糖量の増加が終了し全糖量とほぼ等量となったので、構成単糖の分析・同定にはこの条件を用いた。

加水分解した試料はフィルター (MILLEX GS 0.22 μ m Filter) にてろ過し、HPLC 高速液体クロマトグラフィー を用いて構成単糖分析・同定を行った。糖量で 0.5nmol から 10nmol、試料量で 50 μ l となるようバイアルに入れ、窒素を吹き付けて水分と塩酸を蒸発させ乾固した。次いで試料量と等量の脱イオン水を加え乾固物を溶かし再び乾燥する工程を 2 回繰り返して塩酸を除去した。この試料に、TaKaRa の糖蛍光標識の手順に従って、ピリジン溶液 (ピリジン : メタノール : 水 = 15 : 30 : 10) を 50 μ l と無水酢酸 2 μ l を加え 15 分間室温にて静置後、溶媒を蒸発させ再度ピリジン溶液 50 μ l と無水酢酸 2 μ l を加え 30 分間室温にて静置後試料を乾固して N-アセチル化を行った。その試料に糖質蛍光標識装置 (PALSTATION model4000 TaKaRa) を用いてピリジルアミノ化キット (PALSTATION Pyridylamination Reagent Kit 単糖分析用 TaKaRa) によりピリジルアミノ化(蛍光物質 2-aminopyridine を糖に反応させる)し、試料中の単糖に蛍光標識処理を行った。処理後の試料は脱イオン水に溶解した。このように蛍光標識処理した試料中の単糖を、単糖分析用カラム (PALPAK Type A, TaKaRa) を用い HPLC にて分析した (表 1)。検出には蛍光検出器 (RF-10AXL, SHIMADZU) を用いた。検出ピークは標準物質 (PA-Monosaccharide Mixture, TaKaRa) との比較によって同定し、面積にて定量した。

表 1 構成単糖分析の HPLC 条件

Column	: PALPAK Type A (4.6 mm × 150 mm) 陰イオン交換カラム
Solvent	: CH ₃ CN : 0.7 M H ₃ BO ₃ -KOH (pH9.0) = 1 : 9
Flow rate	: 0.3 ml/min
Detection	: Fluorescence (Ex : 310 nm, Em : 380 nm)
Column Temp	: 65
Injection	: 10 pmol

-2 . 精粉の構成単糖分析

精粉 1mg/ml の割合で脱イオン水に 4 下にて約 10 時間攪拌しながら膨潤させ溶解した。これを用いて “ -1 . 構成単糖の分析 ” と同じ方法で構成単糖を分析・同定した。

-3 . 水溶性部分のグルコマンナンの構成単糖分析

水溶性部分に含まれていると考えられる多糖質グルコマンナンを、アルコール沈殿法により精製し、構成単糖を分析して精粉のそれと比較した。([8] pp.121-128、[26] 参照)

飛粉 1g に 500ml の水を加え溶解し、15,600 × g で 10 分間遠心し、水溶性部分と非水溶性部分に分けた。水溶性部分をろ紙にてろ過しロータリーエバポレーターを用いて 10 分の 1 ほどに濃縮し、その濃縮液にエタノールを終濃度 50% となるよう加えよく攪拌した。析出物を遠心分離にて回収し、これを 50ml の水に溶解後、終濃度 50% となるようエタノールを加え再度析出物を遠心分離にて回収した。これを 10 回繰り返した後、回収した析出物中の水分を 100% エタノールにて脱水後、凍結乾燥した。凍結乾燥後、乳鉢で粉末状にした試料を用いて “ -1 . 構成単糖の分析 ” と同じ方法で構成単糖を分析・同定した。

-4. 非水溶性部分中のデンプンの分析

飛粉非水溶性部分のデンプンの定量は、Total starch assay kit (総澱粉量測定キット、Megazyme 社製) を用いた。飛粉中のデンプンを α -アミラーゼにより完全に加水分解して可溶化し、アミログルコシダーゼでグルコースに完全に分解し吸光度測定によりグルコース量を求めた。(AACC 公定法 76-12)

飛粉 100mg に 80% エタノール 0.2ml を加え攪拌し、耐熱性 α -アミラーゼ¹ MOPS 緩衝液² 3.0ml を加え、沸騰水浴中で 6 分間加熱した。酢酸ナトリウム緩衝液³ 4.0ml とアミログルコシダーゼ⁴ 0.1ml を加えて攪拌し、50℃ で 30 分間インキュベーションした。100ml に定容後、その一部を 3000rpm で 10 分間遠沈した。上清 0.1ml に GOPOD 試薬⁵ 3.0ml を加え 50℃ で 20 分間インキュベーション後、510nm で吸光度を測定した。糖量はグルコースを標準物質として換算表記した。

- 1 耐熱性 α -アミラーゼ (MOPS 緩衝液 3.0ml 中に 300Units)
- 2 MOPS 緩衝液; 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (C₇H₁₅N₃O₄S); 50mM、pH7.0 に調整したもの
- 3 酢酸 Na 緩衝液 ; 200mM、pH4.5 に調整したもの
- 4 アミログルコシダーゼ (0.1ml 溶媒中に 20Units)
- 5 GOPOD 試薬 ; Glucose-oxidase peroxidase 系によるものでグルコースを定量するものである。内容は、Glucose oxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipyrine である。

-5. セルロースの分析

飛粉非水溶性部分のセルロースの定量を、セルロース分解酵素を用いて行った。飛粉を水に溶解し 15,600 × g 10 分間の遠心により非水溶性部分を分離し、それを乾燥させ粉末状にしたもの 50mg 中のデンプンをデンプン分解酵素(“2. 非水溶性部分中デンプンの分析” 参照) により分解した。分解後の試料を 15,600 × g 10 分間遠心分離し、沈殿物に 0.2M 酢酸緩衝液¹ 5 ml とセルラーゼ² 150Units (予め試料中のセルロースを十分分解するだけの量をセルロースにて求めておいた) を加え、37℃ にて 15 時間インキュベーションした。その後、デンプン定量時と同じ方法でグルコース量を定量した。インキュベーションを 15 時間としたのは、予備実験で 15 時間以上の酵素分解物の推移(糖量)に変化が見られなかったためである。また用いたセルラーゼは、

グルコース量測定、全糖量測定等に影響するので、糖量測定値から実際の分解された量を出す際にそれらを考慮した。（[18]、[27]参照）

- 1 0.2M 酢酸緩衝液（37 で pH5.0 となるように 0.2M 酢酸溶液 5.9ml と 0.2M 酢酸ナトリウム溶液 14.1ml を混合し調整したもの）
- 2 酵素 Cellulase（from *Trichoderma viride*） pH5.0 37

・ [飛粉中の糖質を利用した微生物による資源化の検討]

飛粉中の構成単糖はグルコースとマンノースのみである。多糖質としては、水溶性部分にはグルコマンナンが、非水溶性部分にはデンプンとセルロースがその殆どを占めていた。デンプンとセルロースはグルコースのみから、グルコマンナンはグルコースとマンノースから成る。工業的な乳酸生成（例えばポリ乳酸の原料としての乳酸生成）では、デンプンをグルコースにまで酵素分解し、これを炭素源として乳酸発酵を行い、乳酸を生成している。同じ形式をとって飛粉中の多糖をまず単糖にまで分解し、これを利用して乳酸発酵による乳酸生成を行うことを検討した。その前実験として、グルコース、マンノース各々を炭素源として上記3株による資化、酸生成の確認を行った。また水溶性多糖質であるグルコマンナンを炭素源にする可能性も検討した（表2）（[1]、[2]、[5]、[7]、[9]、[11]、[15]、[21]、[22]、[25]、[28]参照）

-1. グルコマンナン及びグルコース、マンノース各々の乳酸菌による資化、酸生成

水溶性多糖質グルコマンナン及びグルコース、マンノースを炭素源とし、資化、酸生成を確認した。乳酸菌には *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactobacillus helveticus*、*Streptococcus thermophilus* の3株を選定した。乳酸菌によるラクトースやヘキソースの発酵は、主にホモ型乳酸発酵、ヘテロ型乳酸発酵の2種類の経路で進行する。ホモ型乳酸発酵は単糖 1 mol より 2 mol の ATP を生成し、消費された糖を乳酸のみに変換する。ヘテロ型乳酸発酵は、消費された糖を乳酸と酢酸、エタノールなどに変換する。今回用いた3株は全てホモ型乳酸発酵菌である。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と *Streptococcus thermophilus* は L-型乳酸を生成する。また *Lactobacillus helveticus* は D-型乳酸を生成する。

表 2 乳酸菌について ([22]参照)

(Organism name)	(NRIC No.)	(Medium)	(Temp.)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	No.1149 Type strain	GYP-CaCO ₃	30
<i>Lactobacillus helveticus</i>	No.1545 Type strain	MRS-CaCO ₃	37
<i>Streptococcus thermophilus</i>	No.0256 Type strain	BHI-CaCO ₃	37

東京農業大学応用生物科学部 菌株保存室(NRIC)より入手

GYP-CaCO₃

glucose	1.0 g
yeast extract	0.5 g
peptone	0.5 g
Na-acetate	0.1 g
salts solution	0.5 ml
water	100ml
CaCO ₃	1.0 g
agar	1.2 g

Salts solution (per 1 ml)

MgSO ₄ · 7H ₂ O	40 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg
NaCl	2 mg

• Add a drop of 12N HCl to 500ml of the salts solution.

MRS-CaCO₃

Lactobacilli MRS broth (Difco)	5.5 g
water	100 ml
CaCO ₃	1.0 g
agar	1.2 g

BHI-CaCO₃

Brain heart infusion broth (Eiken)	3.7 g
water	100 ml
CaCO ₃	1.0 g
agar	1.2 g

Procedure : add to

Sterilization : 121 , 15min

Agar medium : Stab

-1-1 . 平板培養

平板培養にて乳酸菌のコロニーを形成させ、炭素源を資化しているか、また酸の生成が行われているかを目視にて確認した。確認には培地中の炭素源量の増減によって変化を観察する方法を用いた。炭素源の増減が調節できること、さらに菌によつての炭素源以外の培地成分による違いや影響を無くするため、培地組成を全株において統一した。用いた培地は BCP 加プレートカウント寒天培地(以下 BCP 加培地)を参考とし、炭素源には必要に応じてグルコース、マンノース、グルコマンナン各々を用いた(表 3)。これは発酵乳や乳酸菌飲料中の乳酸菌測定用の公定培地である。この培地は、pH 指示薬である BCP (プロモクレゾールパープル)を加えることにより、発生したコロニーで黄変しているものを乳酸菌として確認するというものであり、培地色の変化やコロニーの黄変によりプレート上の変化が目視で容易に確認できる。BCP による培地色の変化は、pH が 6.8 以上では紫(赤紫)になり、5.2 以下になると黄色に変化する(図 1)。またこの培地には酵母エキス(yeast extract)が含まれており、これには糖質が含まれているので、培地中炭素源である糖質の添加量を培地 100ml 中 0、0.5、1.0、2.0g と変え各々の変化をみることにより、添加した糖質の資化を確認した。炭素源がグルコマンナンのものはそれ自身に粘性があるためプレート調製を行うことができる培地 100ml 中 1.0g を最大量として 0、0.25、0.5、1.0g とした。

糖添加量を変えた BCP 加培地を 121 で 15 分間オートクレーブにかけ滅菌し、平板寒天培地を調製した。これに至適液体培地で前培養しておいた菌懸濁液から白金耳にて菌を採取し、プレートに塗布した。前培養とプレートの菌培養時間は、各々の至適液体培地を用い、至適温度下にて 3 日から 4 日間行った(表 2)。両者の培養時間を 3 日から 4 日間としたのは、ほぼ 3 日間で液体培養下での菌増殖が静止期(定常期) stationary phase に移行するからである。

表 3 BCP 加プレートカウント寒天培地の組成 ([25]pp.378 参照)

組成	per 1000 ml
Yeast extract	2.5 g
Peptone	5 g
Glucose	1 g
Tween 80	1 g
L-cystein	0.1 g
BCP(Bromocresol purple)	0.04 g
Agar	15 g

pH 6.9 ±

pH > 6.8 紫 (赤紫)



pH < 5.2 黄



図 1 BCP 加培地の pH による色の変化

-1-2 . 液体培養

液体培地を用いて乳酸菌の代謝物である有機酸（乳酸、酢酸など）を分析、定量することにより、炭素源の資化並びに酸生成を確認した。液体培養の培地は、平板培養時の培地から寒天とBCPを取り除いたものを用い、平板培養同様に各々の糖質の添加量を変化（グルコマンナンに関しては培地が攪拌できる量100ml中0.5gを最大量とした）させて培養した。この液体培地を121℃で15分間オートクレーブにかけ滅菌し、調製した。これに至適液体培地で前培養しておいた菌懸濁液を1mlずつ採取し、各液体培地に添加した。前培養と液体培養の菌培養時間は、平板培養同様各々の至適温度下にて3から4日間とし、攪拌しながら培養した。代謝物である乳酸等の有機酸の分析には、PEGASIL ODS カラム（SENSHUPAK SSC 株式会社センシュー科学）を用いHPLCにて分析した（表4）。分析試料はフィルター（Minisart RC4 0.20µm Filter）でろ過したものを用いた。ピークの確認方法は、乳酸生成（菌を接種する）前の培地をコントロールとして有機酸分析を行い、その検出ピークを乳酸生成後の試料の検出ピークと対照して、標準物質（乳酸、酢酸）による同定とあわせて各種有機酸の生成を推定した。また0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて、試料中の酸量を滴定した。pH指示薬にはプロモチモールブルー0.1%エタノール溶液を用いた。酸量は生酸度で表し、培地の酸量を差し引いた値とした。サンプリング・定量は24時間毎に行った。（[14]pp.384-663、[24]pp.133-136 参照）

表4 有機酸分析のHPLC条件

Column	: PEGASIL ODS カラム (3mm × 200 mm) (SENSHUPAK SSC 株式会社センシュー科学)
Solvent	: CH ₃ CN : 0.1% H ₃ PO ₄ = 2 : 98
Flow rate	: 0.5 ml/min
Detection	: UV 210nm
Column Temp	: room temp.
Injection	: 3 µl

-2. 飛粉からの乳酸菌による資化、酸生成

飛粉からの乳酸生成を検討した。グルコース、マンノース、グルコマンナン各々を用いた乳酸生成の実験結果から、試験を行った 3 種の乳酸菌のうち、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を用いることとした。飛粉を脱イオン水と混合し液体培地（不溶物を含む）として“ -1-2. 液体培養 ”と同様に培地を滅菌後、菌を接種し、培養して有機酸の分析を行ったが、飛粉中の糖質の加水分解を行わなかったものでは、乳酸の生成が確認されなかった。このことから、飛粉を加水分解した後に乳酸生成に用いることとし、酵素、あるいは酸による加水分解を行った。（[18]、[27]参照）

前実験として行った平板培養と液体培養の結果からグルコマンナンによる乳酸生成が確認できた（0.5g/培地 100ml から約 7.1%）ことから、糖質中最も多いデンプンを酵素で加水分解することで、乳酸の生成効率を向上させようのではと考え、デンプン分解酵素 amyloglucosidase と α -amylase を用いた。飛粉 1.0g を脱イオン水 100ml と混合し、飛粉中のデンプンを分解するのに充分量の酵素を添加して約 10 時間 40℃ にて沈殿が生じない程度に振盪しながら反応させた。また、飛粉中の全糖質を加水分解するために、0.25、0.5、1.0M 各濃度の塩酸を用いた。飛粉 1.0g を各濃度の塩酸 50ml と混合し、100℃ ウォーターバスにて温浴加熱後、等濃度の水酸化ナトリウム 50ml を加え中和し、更に pH 調整を行った。0.25M では約 4 時間、0.5M では約 2 時間 30 分、1 M で約 1 時間の加水分解により還元糖量の増加が終了し全糖とほぼ等量となった。酵素、酸加水分解終了後、“ -1-2. 液体培養 ”と同じ方法で植菌し乳酸の生成を行わせ、生じた乳酸を経時的にサンプリングし分析した。

-3 . 乳酸生成時の塩濃度による影響

酸加水分解した飛粉による乳酸生成では、塩酸の使用量濃度によって乳酸生成量に違いがみられた。これは pH 調整(水酸化ナトリウムによる中和)の際にできる塩による影響ではないかと考えられたので、グルコース、マンノース各々を炭素源として塩濃度の影響を調べた。酸加水分解後の中和の際に生じた塩と同じ量を培地に添加し、菌を接種し酸生成量を比較した。培地には“ -1-2 . 液体培養 ” 時と同じ BCP 加培地を用い、培地中に塩化ナトリウムを、0.25、0.5、1M 相当量加えた。菌は飛粉からの乳酸生成時と同じ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を用いた。“ -1-2 . 液体培養 ” と同じ方法にて乳酸生成を行い、経時的にサンプリングして生成酸量を定量した。

結果及び考察

． [構成成分分析について]

- 1 . 飛粉全体の一般成分

飛粉全体の一般成分分析結果を表5に示す。水分4.7%、蛋白質17.0%、脂質はクロロホルム-メタノール混液抽出法では2.5%、酸分解法では5.5%、灰分8.5%、糖質60~65%であった。糖質に関して水溶性部分中では20~23%、非水溶性部分中では40~42%であった。

表5 飛粉全体の一般成分

水分	4.0 %
蛋白質	17.0 %
脂質	
クロロホルム-メタノール混液抽出法	2.5 %
酸分解法	5.5 %
灰分（無機質）	8.5 %
糖質	60.0 ~ 65.0 %
水溶性部分	20.0 ~ 23.0 %
非水溶性部分	40.0 ~ 42.0 %
部分	計 100 %

-2. 飛粉成分の構成単糖

HPLC を用いた構成単糖分析の結果は、主な構成単糖がグルコースとマンノースであった。飛粉全体では、グルコース：マンノースが 4 : 1、水溶性部分中糖質では 3 : 2、非水溶性部分中では 30 : 1 であった (図 2)。

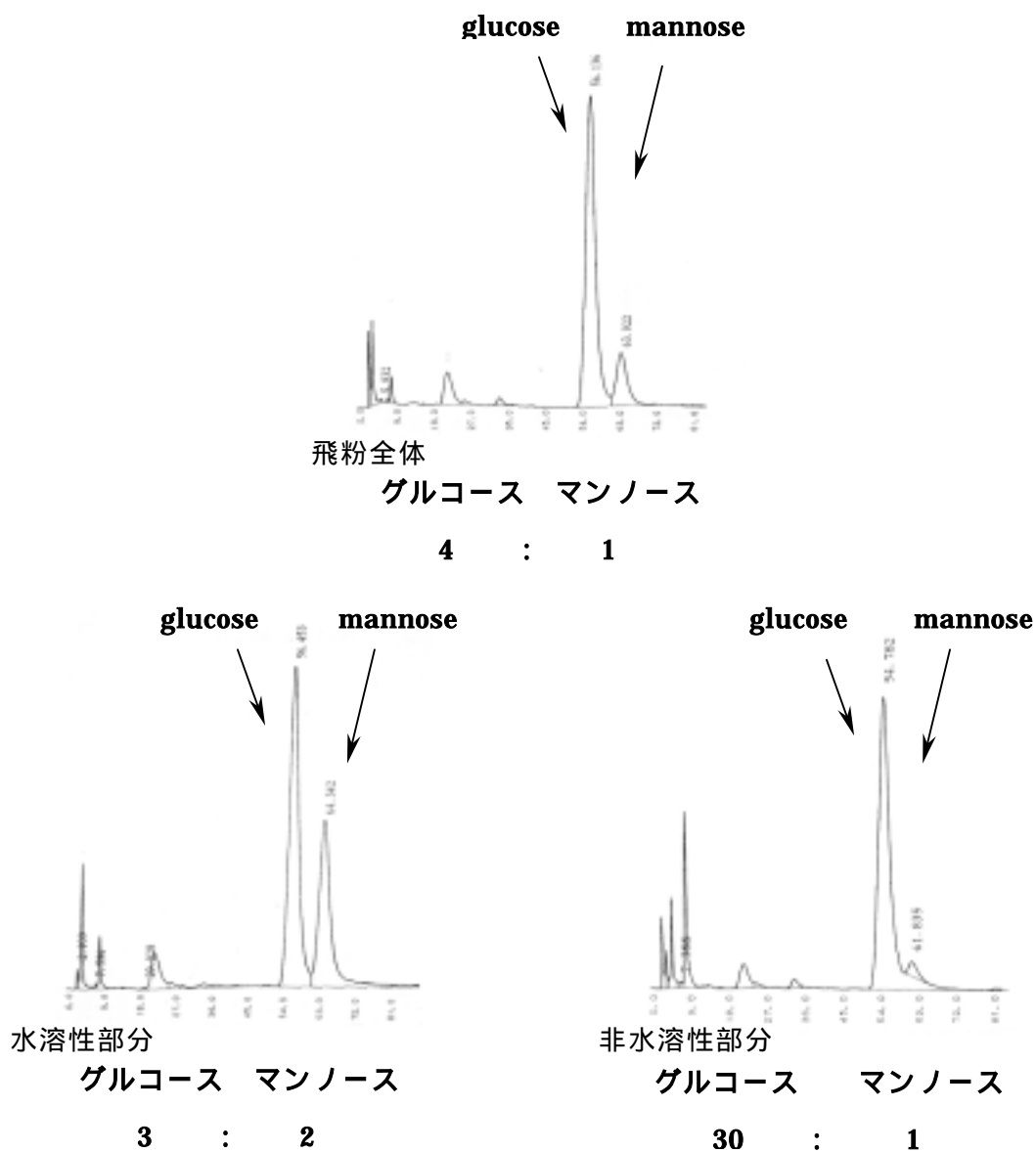


図 2 HPLC による構成単糖分析；飛粉中の糖質

水溶性部分に含まれていると考えられる多糖質グルコマンナンを、アルコール沈殿法により精製し、構成単糖を分析して精粉のそれと比較した。飛粉水溶性部分のグルコマンナンを精製したものを、常温常圧下で乾燥させると非常に固い顆粒状になったが、凍結乾燥させると微粒子の粉末状にすることができ、より溶け易くなった。分析の際はこれを一旦水に溶かしてから 1 M 塩酸にて酸加水分解し、中和をせず HPLC での単糖分析を行った。

精粉はグルコースとマンノースから成り、その比が 1 : 1 であった。アルコール沈殿法により飛粉中水溶性部分から精製した多糖質もグルコースとマンノースから成り、その比は 1 : 1 であった (図 3)。この結果から水溶性部分にはグルコマンナンが含まれていると考えられる。

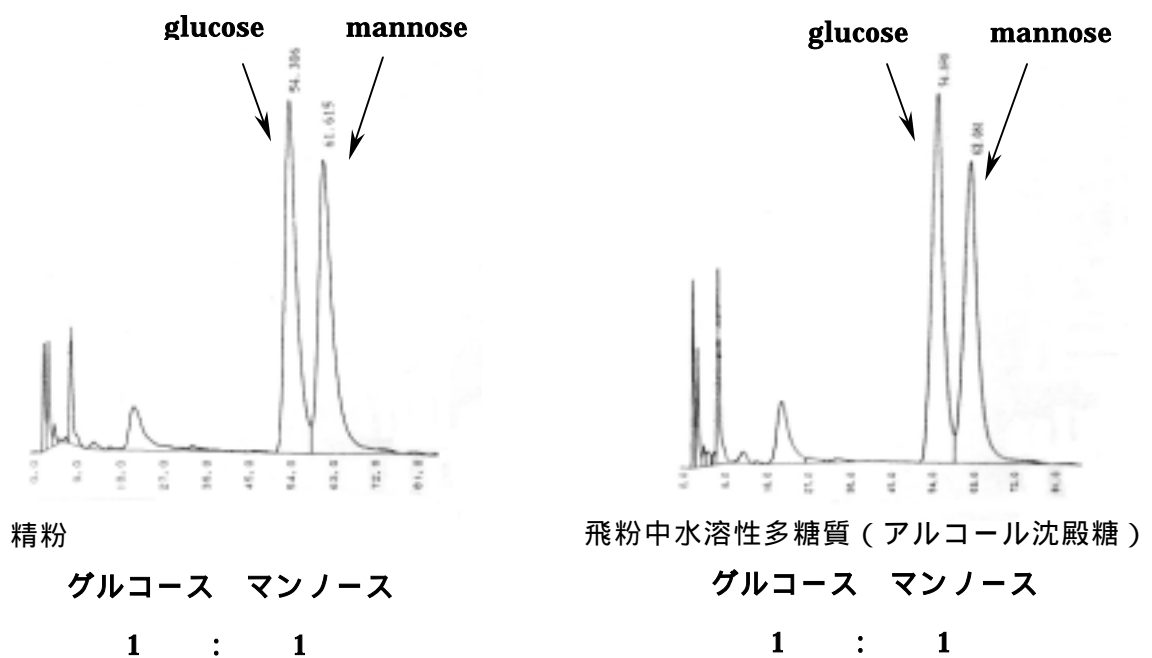


図 3 HPLC による構成単糖分析；精粉と飛粉中のアルコール沈殿法による精製糖

-3. 飛粉の非水溶性部分の糖質分析

非水溶性部分の糖質について分析した。構成単糖の分析の結果、非水溶性部分にはグルコースがその殆どを占めていた。この結果からデンプンとセルロースが考えられ、これらの定量分析を行った。

非水溶性部分を 100%とした場合の糖質の割合は、全糖量が 66~70%、デンプンが 50~52%、セルロースが 10~12%、不明な糖質 6%であった(図4)。

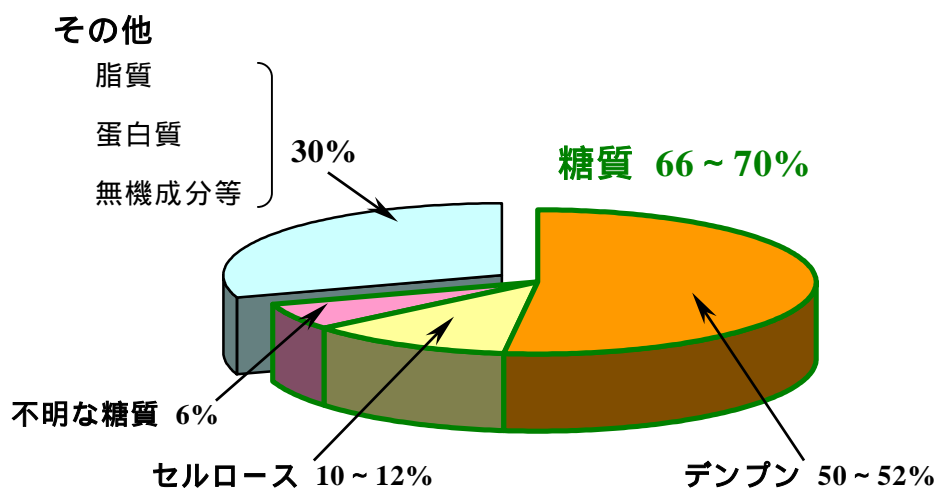


図4 非水溶性部分を 100%とした場合の糖質の割合

-4. 飛粉の構成

飛粉全体での糖質の割合は、水溶性部分と非水溶性部分が飛粉全体中、各々60%と40%であり、水溶性部分中の全糖量が 23%、そのうちグルコマンナンは、“ -3. 水溶性部分のグルコマンナンの構成単糖分析 ” で用いたアルコール沈殿法により精製したものの乾燥重量からが 12~15%で、この場合の水溶性部分中の不明な糖質は 8~11%であった。また、HPLC 分析結果の比から計算した値は、18.6%であった。また不明な糖質が 4.6%であった。非水溶性部分中では全糖量が 39.6~42%、そのうちデンプンが 30~31.2%、セルロースが 6~7.2%、その他の不明な糖質が 3.6%であった(図5)。このような飛粉中の最も多い糖質に着目し、飛粉の資源化を検討した。

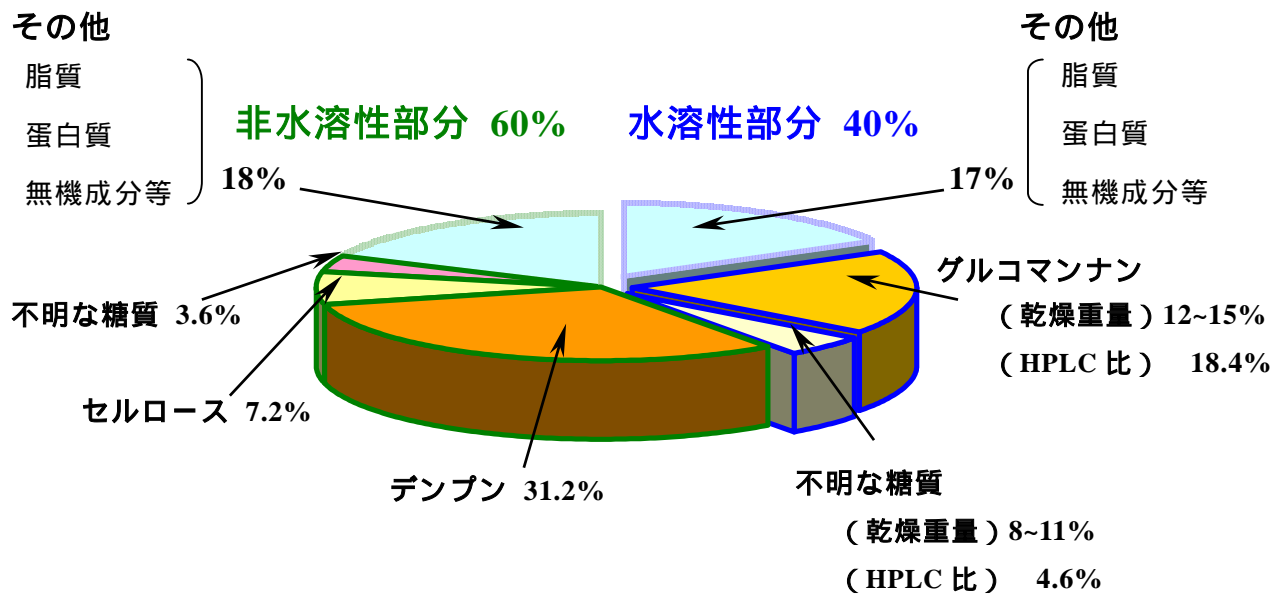


図5 飛粉全体での糖質の割合

・ [飛粉中の糖質を利用した微生物による資源化の検討]

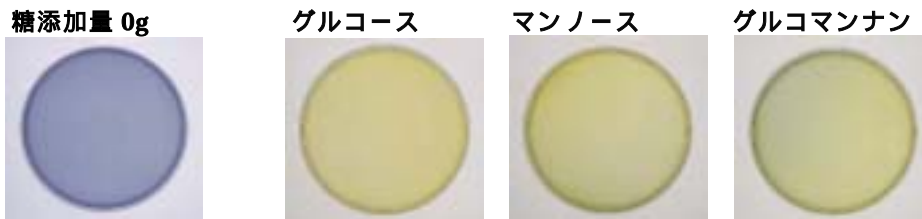
-1. グルコース、マンノース、グルコマンナン各々の乳酸菌による資化、酸生成

-1-1. 平板培養

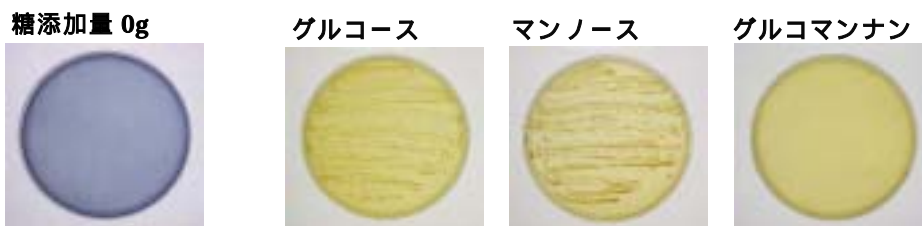
飛粉中糖質は全体で 65%、構成単糖はグルコースとマンノースであった。平板培地での乳酸菌によるグルコース、マンノース、グルコマンナンの資化並びに酸生成の結果、全菌株において全ての糖質の糖添加プレートに色の変化（紫色から黄色）がみられ、酸の生成を確認した（図6）。24 時間毎にプレートの色とコロニー形成状態の変化を確認すると、3 日目で完全に黄色に変化した。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と *Streptococcus thermophilus* では全プレートにコロニーの形成が確認でき、糖添加プレートに色の変化がみられた。また、糖無添加培地のプレートと糖の添加量を変えた培地のプレートとの間での差もみられ、糖質の資化を確認することができた。*Lactobacillus helveticus* による糖無添加培地のプレートの色も黄色く変化した。これは高酸生成乳酸桿菌というこの菌の特徴によるものではないかと考えられ、この

菌に関しては、プレートを用いた目視による酸生成確認は適当な方法とはいえない。
また *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を接種したものは、コロニー形成の状態が他の菌株と比べ大きかった。

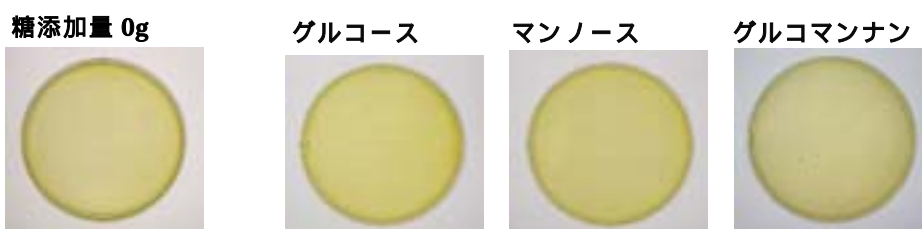
Streptococcus thermophilus



Lactococcus lactis* subsp. *lactis



Lactobacillus helveticus



糖質量1.0g/100ml

図 6 平板培養によるグルコース、マンノース、グルコマンナンの資化、酸生成

-1-2 . 液体培養

液体培養による生成有機酸の分析と生成酸量を滴定の結果、グルコース、マンノース、グルコマンナンの全糖質において乳酸生成を確認した。糖量の増減による生成酸量の比較の結果、糖質の資化を確認した。HPLC による有機酸分析の結果で乳酸のみが検出されたことから、生成される酸は乳酸のみであると考えられる(図7)。96時間後の乳酸量はグルコース 1.0g 中、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* では約 25%、*Lactobacillus helveticus* では 14%、*Streptococcus thermophilus* では約 7%、マンノース 1.0g では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* で約 25%、*Lactobacillus helveticus* では約 10%、*Streptococcus thermophilus* では約 2%、グルコマンナン 0.5g では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* では約 7.1%、*Lactobacillus helveticus* では約 7.2%、*Streptococcus thermophilus* では約 5%であった(表4、図8)。グルコマンナンの結果では *Lactobacillus helveticus* の乳酸量が最も多かったが3株とも殆ど差はみられなかった。グルコース、マンノースを用いた乳酸生成で、酸滴定の結果から *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* による乳酸生成が最も多いことが分かった。平板培養並びに液体培養の結果、グルコース、マンノース、グルコマンナンの全糖質において全菌株による資化並びに乳酸生成を確認した。

表4 BCP 加培地による乳酸生成量(w/v%)

糖質	乳酸生成量(w/v%)		
	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. helve</i>	<i>Sc. thermo</i>
グルコース 1.0g	25 (0.250g)	14 (0.140g)	7 (0.070g)
マンノース 1.0g	25 (0.250g)	10 (0.100g)	2 (0.020g)
グルコマンナン 0.5g	7.1 (0.035g)	7.2 (0.036g)	5 (0.025g)

Lc. lactis ; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lb. helve ; *Lactobacillus helveticus*

Sc. thermo ; *Streptococcus thermophilus*

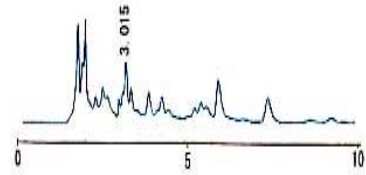
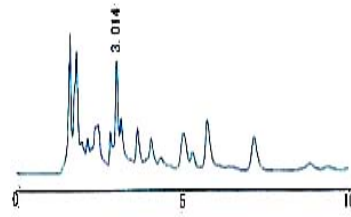
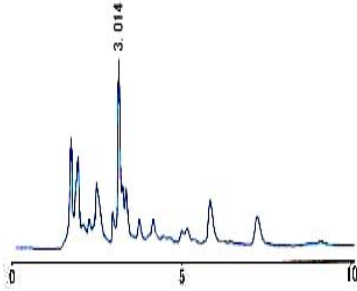
乳酸生成量(w/v%)はグルコース、マンノース各々1.0g/100ml (グルコマンナンは0.5g/100ml) に対しての量

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

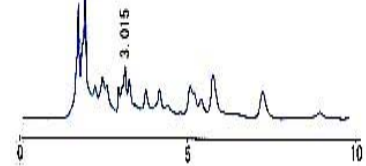
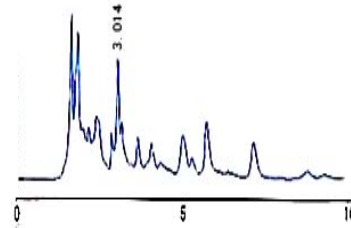
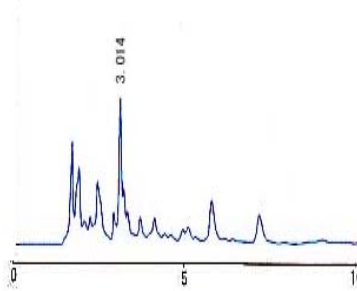
Lactobacillus helveticus

Streptococcus thermophilus

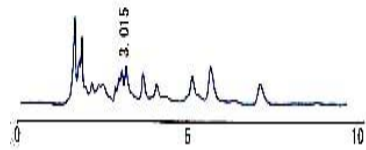
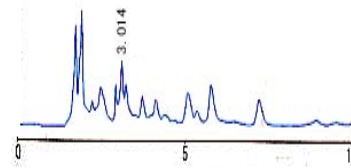
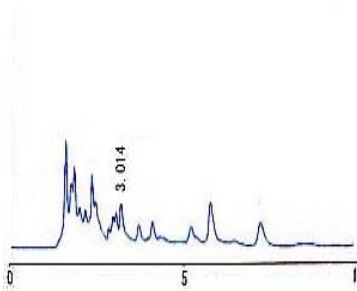
グルコース 1.0g/100ml



マンノース 1.0g/100ml



グルコマンナン 0.5g/100ml

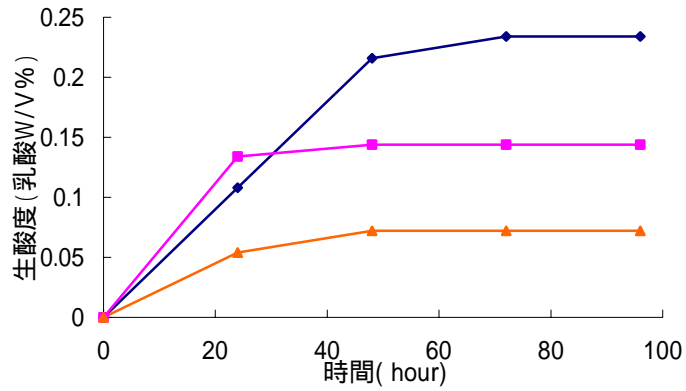


3分付近の検出ピークが乳酸のピークになる

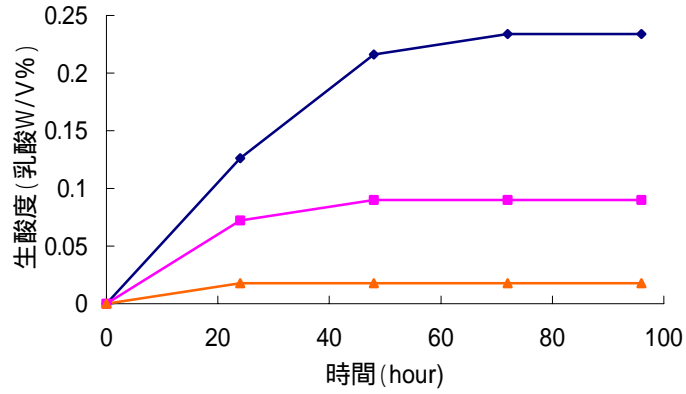
その他は夾雑物ピーク

図7 液体培養によるグルコース、マンノース、グルコマンナンの資化、酸生成
; HPLC による有機酸分析

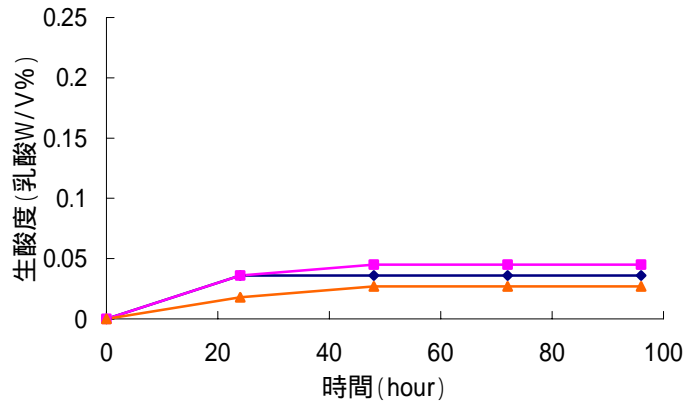
グルコース 1.0g/100ml



マンノース 1.0g/100ml



グルコマンナン 0.5g/100ml



—◆— *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
—■— *Lactobacillus helveticus*
—▲— *Streptococcus thermophilus*

図 8 液体培養によるグルコース、マンノース、グルコマンナンの資化、酸生成 ; 生成酸量

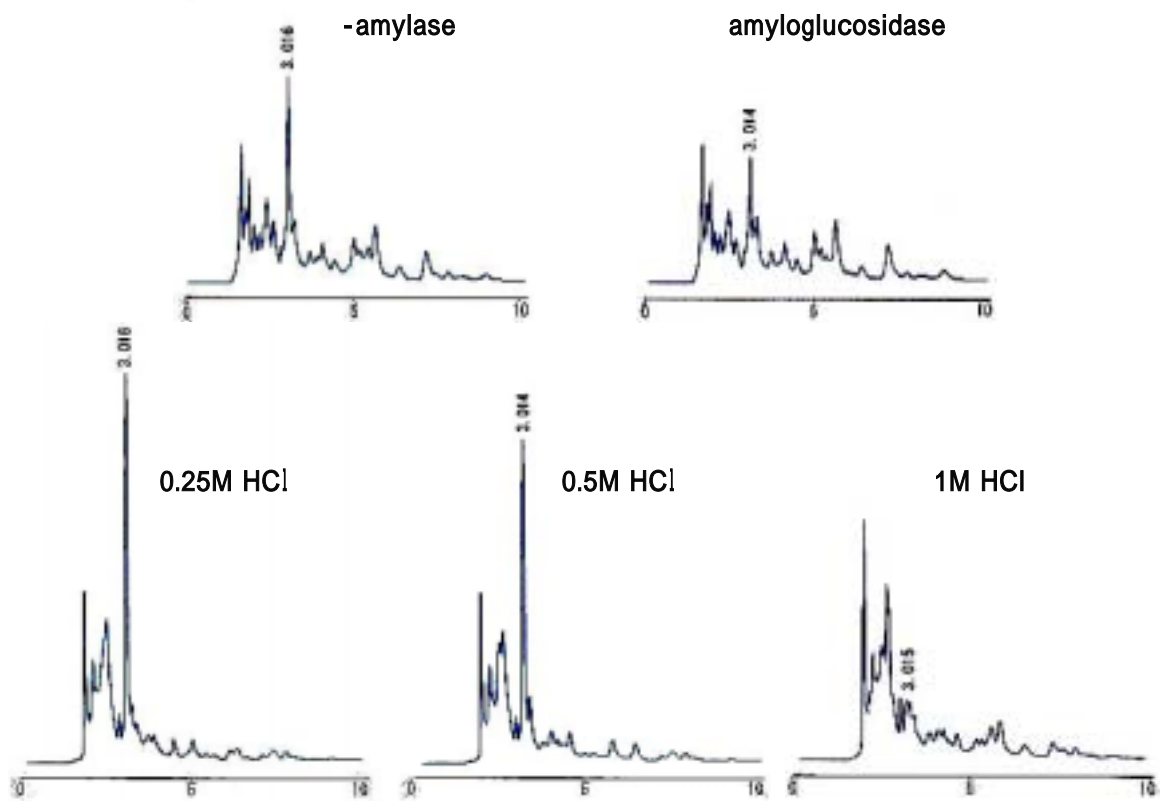
-2-1. 飛粉中の糖質からの乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* による乳酸生成

液体培養による生成酸量の滴定の結果、最も生成酸量が多かった *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を用いて、飛粉からの乳酸生成を検討した。飛粉中の糖質を加水分解せずに乳酸生成を試みたものでは酸の生成が確認できなかったため、糖質を2種類の酵素と、塩酸の各々を用いて加水分解して乳酸生成を試みた。結果、酵素、酸加水分解物すべてにおいて乳酸の生成を確認した。HPLC による有機酸分析の結果で乳酸のみが検出された（図9）。96時間後の乳酸量は飛粉1.0g（全糖量約650mg）中 amyloglucosidase による酵素分解（還元糖量47mg）では約6%、 α -amylase（還元糖量115mg）では約12.5%、0.25M塩酸による酸加水分解（還元糖量650mg）では約33%、0.5Mでは約25%、1Mでは約3.5%という結果であった（表5、図10）。

表5 飛粉からの *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* による乳酸生成量(w/v%)

加水分解条件	還元糖量(mg)	乳酸生成量(w/v%)
amyloglucosidase	47	6 (0.060g)
α -amylase	115	12.5 (0.125g)
0.25 M HCl	650	33 (0.330g)
0.5 M HCl	650	25 (0.250g)
1.0 M HCl	650	3.5 (0.035g)

乳酸生成量 (w/v%) は飛粉 1.0g (全糖量 650mg) /100ml に対しての量



3分付近の検出ピークが乳酸のピークになる
 その他は夾雑物ピーク

図9 飛粉からの乳酸生成；HPLCによる有機酸分析

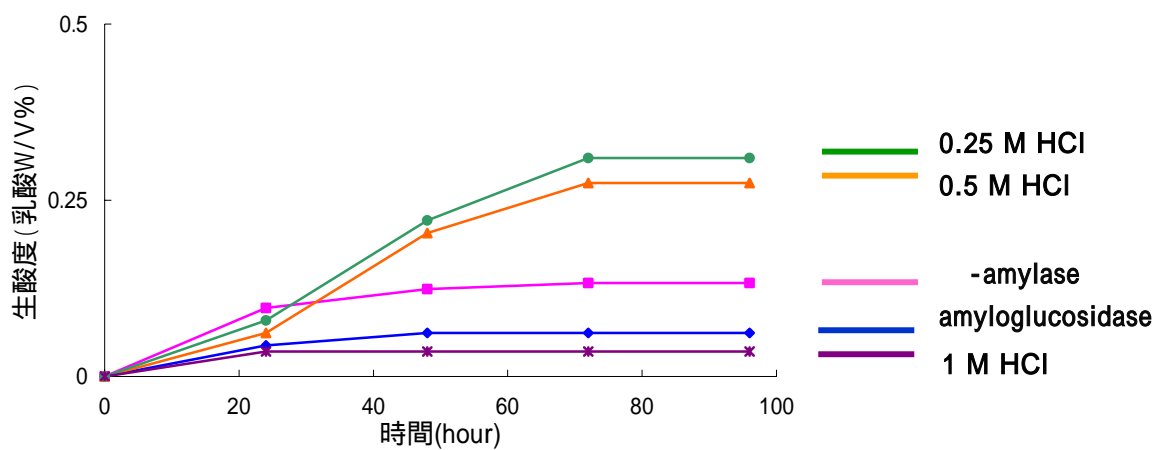


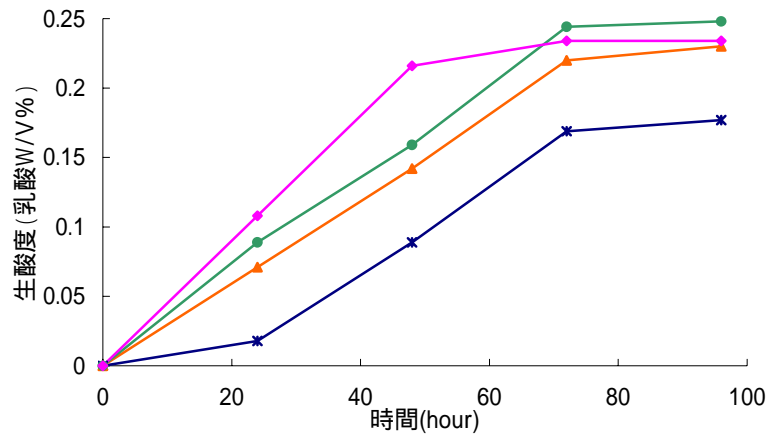
図10 飛粉からの乳酸生成；生成酸量

-2-2 . *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*による飛粉中の糖質の酸加水分解での乳酸生成に及ぼす塩の影響

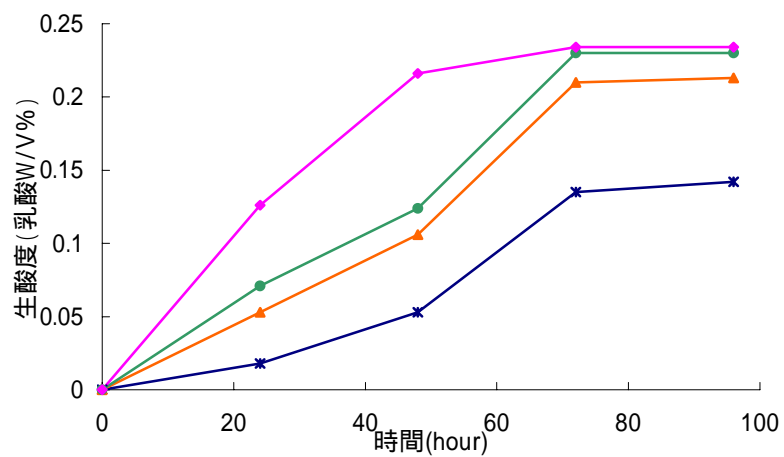
飛粉中の糖質の塩酸加水分解物を基質としたものの乳酸生成量に塩酸濃度に依存した差違がみられたのが、水酸化ナトリウムによる中和でできた塩による影響ではないかと考え、グルコース、マンノース各々を炭素源として塩濃度の影響を調べた。

その結果、コントロール（塩無添加）との比較から 1.0M の塩濃度下での酸生成量の減少がみられた（図 11）。0.25、0.5、1M 全てにおいて 72 時間までの酸生成量の増加がコントロールのものよりも低かったが、0.25、0.5M では、96 時間後にはコントロールとほぼ変わらない量の乳酸が生成されていた。このことから、0.25、0.5M の塩濃度では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* による乳酸生成には影響はないものと考えられる。しかし、0.25M の塩酸による加水分解では約 4 時間温浴加熱しなければならない。0.5M では約 2 時間 30 分で糖質の全分解が可能であることから、今回の結果からは 0.5M の塩酸による加水分解が有用であると思われる。

グルコース1.0g/100ml



マンノース1.0g/100ml



(NaCl)

- コントロール(塩が含まれていない)
- 0.25 M
- 0.5 M
- 1.0 M

図 11 塩濃度の違いによる生酸度への影響

総括

蒟蒻産業における副産物である飛粉を資源化する方法を検討するために、飛粉の構成成分を分析して、その約 65% を占める糖質を有効利用する方法の開発を試みた。本研究では、飛粉中に含まれる水溶性、非水溶性の全糖質を酸加水分解し、乳酸菌によって乳酸生成を行わせる方法を見出した。

飛粉からの乳酸生成を行った今回の結果では、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を用いた乳酸生成量が飛粉 1.0 g から多いものでは約 33% であった。0.25M 塩酸にて飛粉中糖質を全分解した試料から乳酸生成を行うとこの値になった。0.5M では、乳酸生成量が約 25% と 0.25M に比べ若干値が低くなる。1M では約 3.5% と極端に低くなる。これは、酸加水分解後の pH 調整により生じた塩の影響と考えられる。塩による生成量への影響を確認すると、1M では 0.25, 0.5M と比べて生成量が低くなるという同様の結果が得られた。0.25 と 0.5M NaCl では塩が含まれていないコントロールと殆ど変わらない値を示したが、0.5M は若干コントロールより低くなる。僅かではあるが影響があるものと思われる。飛粉中糖質を全分解するのに 0.25M 塩酸では約 4 時間、0.5M では約 2 時間 30 分かかることから、0.25 から 0.5M の間での加水分解が最適であると考えられる。

飛粉の乳酸生成量を糖量と比較すると、0.25M 塩酸では飛粉 1.0g 中糖量 650mg で乳酸生成量が約 51.2% と、“ -1-2. 液体培養 ” で行った調整培地を用いた乳酸生成よりも多いという結果になった。これは、飛粉には窒素や無機質など糖質以外の成分も多く含まれていることから、これらが影響していると考えられる。

飛粉は、肥料としての土壌改良や緑化工事の法面への種子や苗木の粘着剤などに、そのままの形で用いられている。本研究では、乳酸という需要の高まっている物質を飛粉の特徴を利用して微生物により生産するという、飛粉の新たな利用法を示唆できたと考えている。また、飛粉のような食品副産物で糖質や窒素源などが多く含まれているものを利用しての微生物による乳酸の生産も可能ではないかと思われる。

謝辞

本研究において、御指導を賜りました向畑恭男教授をはじめ、榎本恵一教授、大濱武教授、有賀修助教授、佐塚正樹講師 同講座の教員の皆様には、様々な御助力を頂きました。また、本原稿の推敲及び校正にも多くの助言を頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1]. 天児和暢 南嶋洋一 編 1997 .“ 戸田新細菌学 ” 南山堂 東京 pp.487-489
- [2]. R.T.スタニエ、E.A.エーデルバーグ、J.L.イングラム、M.L.ウィ-リス、高橋甫、
斎藤日向 原著 1999 .“ 微生物学 入門編 ” 培風館 東京 pp.93-103, 288-417
- [3]. 安藤達彦、吉田宗弘 編著 2001 .“ 身のまわりの食品化学実験 ” 三共出版 東京
- [4]. 阿武喜美子、瀬野信子 著 1995 .“ 糖化学の基礎 ” 講談社 東京
- [5]. A.N.Glazer、H.Nikaido、斎藤秀夫 原著 1996 .“ 微生物バイオテクノロジー ” 培
風館 東京 pp.46-49
- [6]. 岡田雅人、宮崎香 1996 .“ 無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノ
ート 上 抽出と分離精製 ” 羊土社 東京
- [7]. 岡田淳、橋本雅一、坂井千三、伊藤武、藪内清、奥脇義行、一言廣 著 1997 .“ 新
編 臨床検査講座 22 微生物学・臨床微生物学 ” 医歯薬出版 東京
pp.25-47,188-277
- [8]. 沖増哲 編著 1993 .“ こんにゃくの科学 ” 溪水社 広島
- [9]. 小崎道雄 1992 .“ 乳酸菌実験マニュアル - 分離から同定まで - ” 朝倉書店 東京
- [10]. 川崎敏祐 1995 .“ 糖質分析の実験マニュアル ” 廣川書店 東京
- [11]. 児玉徹、熊谷英彦 編 1997 .“ 食品の科学 5 食品微生物学 ” 文永堂出
pp.60-201 .

- [12]. 齋藤忠夫 2001 .“ -CONTEMPORARY- HEALTH DIGEST Vol.16 No5 Oct.2001 ” 雪印乳業(株) 健康生活研究所 東京
- [13]. 桜井直樹、山本良一、加藤陽治 著 1991 .“ 植物細胞壁と多糖類 ” 培風館 東京
- [14]. (社)日本分析化学会関東支部 編 2000 .“ 高速液体クロマトグラフィーハンドブック 改訂2版 ” 丸善 東京 pp.384-663
- [15]. (社)日本生化学会 1992 .“ 微生物実験法 ” 東京化学同人 東京 pp.120-129
- [16]. (社)日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会 1996 .“ 新・食品分析法 ” 光琳 東京
- [17]. (財)日本食品分析センター 編 2001 .“ 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説 ” 中央法規出版 東京
- [18]. 鈴木智雄 1990 .“ 微生物工学技術ハンドブック ” 朝倉書店 東京 pp.254-263
- [19]. 辻秀人、筏義人 1997 .“ ポリ乳酸 - 医療・製剤・環境のために - ” 高分子刊行会 京都
- [20]. 土肥義治 編 1995 .“ 生分解性プラスチックハンドブック ” エヌ・ティー・エス pp.576-664
- [21]. 東京大学医科学研究所学友会 編 1996 .“ 微生物学実習提要 ” 丸善 東京 pp.58-69
- [22]. 東京農業大学応用生物科学部菌株保存室 岡田早苗・澁谷美佳 編著 2000 .“ 東京農業大学菌株カタログ 第三版・2000 ” 財団法人東京農業大学出版 東京

- [23]. 中村カホル、滝田聖親、渡部俊弘 編 1995 .“ 基礎食品学実験書 ” 三共出版 東京 pp.81-83
- [24]. 西山隆造 著 1994 .“ 図解 応用微生物の基礎知識 ” オーム社 東京
- [25]. 乳酸菌集談会 編 1996 .“ 乳酸菌の科学と技術 ” 学会出版センター 東京
- [26]. 松田和雄 編著 1995 .“ 多糖の分離・精製法 ” 学会出版センター 東京
- [27]. 山根恒夫 1995 .“ 生物反応工学 (第 2 版) ” 産業図書 pp.7-25
- [28]. John, G. H., et al., 1994. “ Bergey’s manual of determinative bacteriology ninth edition ” Williams & Willkins USA, p.528-566.
- Cirilo, Nolasco-Hipolito., et al., 2002. “ Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)-lactic acid priduction using *Lactococcus lactis* I0-1 in hydrolysed sago starch ” *J.Biosci. Bioeng.*, 93(3), 281-287.
- Elvira, M. H., et al., 2001. “ Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis ” *Appl. Environ. Microbiol.*, p.1846-1850.
- Fredrik, L., et al., 2001. “ Physiological role of -phosphoglucomutase in *Lactococcus lactis* ” *Appl. Environ. Microbiol.*, p.4546-4553.
- Giorgio,G., et al., 2000. “ Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization ” *Appl. Environ. Microbiol.*, p.1259-1265.

Hassan, K. S., et al., 2001. " Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber " *J. Biosci. Bioeng.*, 92(6), 518-523.

J., K. Thompson., et al., 1999. " Potential of conjugal transfer as a strategy for the introduction of recombinant genetic material into strains of *Lactobacillus helveticus* " *Appl. Environ. Microbiol.*, p.1910-1914.

Kari, K., et al., 2000. " Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid " *Appl. Environ. Microbiol.*, p.3835-3841.

Kenji, S., et al., 2001. " Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization " *J. Biosci. Bioeng.*, 92(3), 298-300.

Patrick, T. C. B., et al., 2000. " Control of lactose transport, β -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus* : evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar " *J. Bacteriol.*, p.5982-5989.