

B-18 *Bacillus coagulans*を用いた食品廃棄物の プロバイオティクス飼料化検討

赤尾 聡史^{1*}・〇岩崎 翔志¹・増田 貴則¹・細井 由彦¹

¹鳥取大学大学院工学研究科社会基盤工学専攻（〒680-8552鳥取県鳥取市湖山町南4-101）

* E-mail: akao@sse.tottori-u.ac.jp

1. はじめに

食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）の制定もあり、食品廃棄物の有効利用が模索されている。しかし、同廃棄物の再利用率は23.7%¹⁾と低く、その改善には一般廃棄物として焼却処分されている家庭から排出される食品廃棄物の有効利用が必要である。これら食品廃棄物を利用するためには、他のバイオマスと比べて薄く広く発生するため、回収にかかるコストを吸収できる安価な資源化プロセスと付加価値のある製品が必要である。

著者らは、生ごみの安価な資源化方法として、非滅菌条件下でも実施できる*Bacillus coagulans*によるL-乳酸発酵を提案してきた²⁾。しかし、ここで用いた*B. coagulans*は、生菌剤として豚用飼料に添加が認められている菌種³⁾でもある。そこで、同プロセスの事業採算的な効率化として、L-乳酸発酵を実施した際に廃棄物として排出される*B. coagulans*を含む発酵残渣の家畜飼料（生菌剤、プロバイオティクス飼料）化を検討した。なお、同検討はL-乳酸発酵の発酵残渣に限定されるものではなく、当初から食品廃棄物をプロバイオティクス飼料として利用する目的にも利用できる。この目的に対して、本研究では魚腸骨（魚アラ）への適用を試みた。

飼料形態について、作成した飼料を国内市場に流通させるためには、ハンドリング性から他の一般的な飼料と同様に乾燥・粉末化（またはペレット化）が必要と考えられる。ここで、上記発酵に用いる*B. coagulans*が耐熱性を有する芽胞を形成する⁴⁾ことから、同菌はある程度高温の乾燥処理にまで耐えられることが考えられる。また、乾燥条件によっては、他の有害菌を殺菌しつつ*B. coagulans*を生存させることも期待できる。

以上から、本研究では、L-乳酸発酵残渣が必要とする乾燥条件（温度、時間）、この乾燥条件での*B. coagulans*生存率（耐熱試験）および実際の食品廃棄物と魚アラを

発酵処理した対象における先の乾燥条件での*B. coagulans*生存率を求め、プロバイオティクス飼料製造に関わる基礎的な検討を実施した。

2. 実験方法

(1) 使用材料

菌株は、*B. coagulans* JCM 2257, JCM 2258, JCM 9076および*B. coagulans*を含む菓子より単離した株（以下、BK株）を用いた。次の耐熱試験あるいは食品廃棄物、魚アラへの接種に用いる際は、あらかじめLB培地に前培養（55°C, 48時間、振とう培養）したものを用いた。

家庭から排出された食品廃棄物は、鳥取市内のごみステーションで回収されたものを用いた（平成19年10月1日回収）²⁾。魚アラは、スーパーにて購入したタイ、サケおよびタラのアラをほぼ同量ずつ混合して代用した。これらは、家庭用フードプロセッサでスラリー状になるまで破碎し、使用まで冷凍（-20°C）保存した。

(2) L-乳酸発酵残渣の乾燥

L-乳酸発酵残渣は、発酵物を遠心分離（KOKUSAN, H-103n; 1300×g, 15分）した後上澄みを除去し、白磁平皿（直径8 cm）に沈殿物を20 g程度ずつ加えて強制対流式乾燥機（アズワン, OFW-450; 以下、乾燥機）にて乾燥させた。なお、発酵物は、2倍希釈した食品廃棄物と重量比で1%となる*B. coagulans*前培養液を嫌気発酵槽に入れ、55°CでpH 5.5（中和剤；アンモニア水1+2）の条件で半連続培養を行って得たものである²⁾。

(3) *B. coagulans*の耐熱試験

B. coagulans 4株に対して、70°Cおよび80°Cの耐熱試験を行った。前培養液を滅菌済みの1.5 mLチューブに1 mLずつ添加し、70°C試験では*Bacillus*属全菌中の芽胞数を計

数する方法⁹⁾を参考に30分×2回の湯浴を行った。80℃試験では、先のチューブを遠心分離（日立工機、CF15RX II；5000×g、5分）した後上澄みを除去し、乾燥機にて2時間加熱した。なお、ここでの遠心分離条件により菌体が回収できることも併せて確認した。

(4) *B. coagulans*による発酵および乾燥

食品廃棄物のL-乳酸発酵は、(2)と同様である。ただし、3日間の回分培養とした。魚アラの発酵は、魚アラと重量比で1%となる*B. coagulans*前培養液を三角フラスコに入れ、窒素パージの後、嫌気状態を保ちつつ恒温培養器（ADVANTEC、CI-410）にて55℃で所定時間の回分培養を行った。なお、魚アラの発酵では、L-乳酸発酵が主目的ではないため中和剤の供給は行っていない。

生菌数を求めるための食品廃棄物および魚アラの発酵乾燥物は、滅菌済みの1.5 mLチューブに発酵物を0.2～0.5 g（湿重量）採取し、乾燥機で80℃で2時間乾燥させたものとした。

(5) 分析方法

表1に成分分析方法と魚アラの成分を示した（食品廃棄物の組成は文献²⁾参照）。また、全糖（フェノール硫酸法）とD,L-乳酸（HPLC、SUMICHIRAL OA-5000）により*B. coagulans*による発酵処理の進捗確認を行った。

*B. coagulans*の生菌数は、Dextrose Tryptone Agar（Difco）により求めた。55℃、24時間後に生成する黄色のコロニー数をカウントし、生菌数（CFU）とした。耐熱試験における80℃試料や食品廃棄物および魚アラの発酵乾燥物から生菌を分散化させる際は、試験管ミキサー（アズワン、TM-1F）を用いて試料を1時間攪拌した。乾燥後の生菌数は、チューブに採取した試料重量（湿重量）あたりで求めた。なお、乾燥物の分散および菌液（発酵液）の希釈は、0.85%滅菌食塩水により行った。

3. 結果および考察

(1) L-乳酸発酵残渣の乾燥条件

家庭から排出された食品廃棄物を*B. coagulans*によるL-乳酸発酵した後の固形物（残渣）について、乾燥条件の検討を行った。実施した乾燥条件およびその結果を表2に示す。家畜飼料における乾燥は、腐敗あるいはカビの繁殖を防ぐ目的で行われるが、概ね10%前後⁹⁾の含水率まで低下させることが求められる。表2からこの条件に適合するものは、90℃で2時間と80℃で3時間と定まった。

(2) *B. coagulans*の耐熱試験結果

先に実施した発酵残渣の乾燥は、乾燥機内に静置し行

った。この場合、乾燥に必要な熱は対象物表面からの伝達のために掘るため乾燥効率が悪い。実際は、乾燥対象物に機械的な攪拌を施すことで、乾燥時間の短縮が期待できる。一方、食品中の殺菌を目的に指標生物として*B. coagulans*の耐熱性を求めた既研究⁹⁾では、80℃で1時間の熱処理により芽胞生存率が50%前後となる報告がある。80℃においても長時間の乾燥は*B. coagulans*生存率に大きな影響を与えることから、ここでは80℃で2時間の乾燥条件を耐熱試験として試みた。

B. coagulans 4株について、LB培地による48時間の前培養後、70℃で30分×2回の湯浴後および80℃で2時間の乾燥後の生菌数を図1に示す。JCM 2258およびJCM 9076は、耐熱試験前（前培養後）から見て比較的高い生存率（10⁷）であった。また、JCM 2258は、芽胞数（70℃湯浴）から見た乾燥試料（80℃、2時間）の生存率が約25%であり、既研究⁹⁾の傾向と一致した。JCM 9076は前

表1 魚アラの成分分析結果

項目(分析方法) ¹⁾	割合(%)
水分(加熱乾燥)	72.2
乾燥分	27.8
粗脂肪(ソックスレー抽出)	17.4(乾燥分中)
粗タンパク質(CNコーダー)	69.2(乾燥分中) ²⁾
灰分(乾式灰化)	15.1(乾燥分中)
リン(IPC-AES)	3.4(乾燥分中) ³⁾
カルシウム(IPC-AES)	5.7(乾燥分中) ³⁾
ナトリウム(IPC-AES)	1.3(乾燥分中) ³⁾
カリウム(IPC-AES)	1(乾燥分中) ³⁾

1) 粗脂肪n=2, 以外n=3; 平均

2) 換算係数; 6.25

3) 灰分中の成分であるが、乾燥分に対する割合で示す。

表2 L-乳酸発酵残渣の乾燥条件検討結果 (%)

	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr
55℃					17.4		13.7
65℃			17.0	15.4	11.0	12.6	
80℃		16.4	9.1				
90℃	61.0	9.4					n=3; 平均

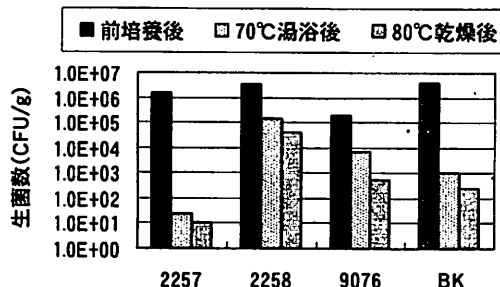


図1 70℃湯浴および80℃乾燥処理による*B. coagulans*生菌数の変化

培養後の生菌数が少ないことから、乾燥後の生菌数が比較した4株中で最も多いものはJCM 2258となった。そこで、以降の試験ではJCM 2258を用いることとした。なお、同耐熱試験を各株について2回以上再実施したが、生存率に関してはいずれも同様の結果となった。

(3) 食品廃棄物および魚アラ発酵物の乾燥

*B. coagulans*による食品廃棄物のL-乳酸発酵および魚アラの発酵過程における全糖およびL-乳酸の変化を表3に示す。いずれにおいてもD-乳酸の生成は起こらなかった。

表4に各発酵物および80℃で2時間の乾燥後の生菌数を示す。乾燥後は、生菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/g-発酵物となり、生存率も発酵物中と比べて 10^4 未満に留まった。この生存率は、先の耐熱試験（LB培地）の結果と比べると著しく低い。原因としては、菌体以外の固体乾物のある発酵乾燥物では、生菌数測定における希釈列作成において菌体を含む乾燥物の分散化が不十分であったこと、あるいは、食品廃棄物などを使った培地では生菌の大部分が栄養型細胞として存在し芽胞数が少なかったことも考えられる。ただし、犬養⁹⁾は、有機酸ナトリウム塩（特にクエン酸ナトリウム）の存在により*B. coagulans*芽胞の耐熱性が低下することを指摘している。また、*Bacillus*属芽胞について、乾燥状態では耐熱性が上がる報告もある⁷⁾。各発酵物中では、有機酸ナトリウム塩が耐熱試験（LB培地）より高いこと、菌体以外の固形物が水分を保持し易いことが考えられ、これらの効果により生存率に著しい差が生じた可能性もある。なお、*B. coagulans*の耐熱性は株間で差が大きく、110℃で1時間の処理でも生存する株も存在する⁶⁾。今後、高温耐性の強い株を探索

することも重要であると考えられる。

ところで、乾燥物重量あたりの生菌数は、乾燥前の発酵物含水率が食品廃棄物；84.4%および魚アラ；72.7%であったことから、乾燥後の含水率を10%と仮定するとそれぞれ 1.6×10^4 CFU/g-乾燥物（5.8倍）および 1.8×10^4 CFU/g-乾燥物（3.3倍）と試算された。なお、別途魚アラ発酵物を白磁平皿を用いて80℃で2時間乾燥させた場合の含水率は7.6%（ $n=2$ ；平均）であった。

4. まとめ

食品廃棄物の資源化率向上を目指し、*B. coagulans*による非滅菌高温L-乳酸発酵物を、生菌剤を含む飼料（プロバイオティクス飼料）として利用するプロセスの検討を行った。食品廃棄物の発酵物乾燥条件検討から、静置乾燥において含水率10%以下となる条件（90℃で2時間、80℃で3時間）が求まった。LB培地に培養した*B. coagulans* 4株を用いて80℃で2時間の耐熱試験を行い、*B. coagulans* JCM 2258が最も生存菌数が多いこと（生存率； 10^2 ）を確認した。食品廃棄物および魚アラの*B. coagulans* JCM 2258による発酵・乾燥（80℃、2時間）後の生菌数を求めたところ、生存率が 10^4 に留まった（生菌数； 10^4 CFU/g-乾燥物）。今後は、発酵乾燥物での*B. coagulans*の生存率向上を図るとともに、乾燥物中の*B. coagulans*以外の生存菌の有無を含めた同定を進める。

謝辞：本研究は、平成19年度財団法人東和食品研究振興会学術奨励金を受けて実施されたものである。

表3 *B. coagulans*による発酵処理後の成分変化（g/L）

	全糖		L-乳酸 ¹⁾	
	発酵前	発酵後	発酵前	発酵後
食品廃棄物				
55℃, pH5.5, 72時間 ²⁾	26.7	15.1	0.4	20.4
魚アラ				
55℃, 24時間 ²⁾	4.3	2.1	2.4	3.0
55℃, 48時間 ²⁾	4.6	3.9	2.7	3.2

1) D-乳酸は、発酵前後で変化せず。 2) 発酵時間（食品廃棄物；0.2, 魚アラ；<0.1）

表4 *B. coagulans*の発酵後および乾燥後の生菌数（CFU/g）

	発酵後 ¹⁾	80℃, 2時間乾燥 ²⁾
食品廃棄物		
55℃, pH5.5, 72時間 ³⁾	1.1×10^7	2.8×10^3
魚アラ		
55℃, 24時間 ³⁾	2.6×10^7	3.3×10^2
55℃, 48時間 ³⁾	1.7×10^7	5.6×10^3

1) 前培養液は 1.0×10^7 (CFU/g)前後

2) 乾燥前重量あたり、 3) 発酵時間

参考文献

- 1) 環境省：平成19年度版 環境循環型社会白書, pp. 188, ぎょうせい, 2007.
- 2) 赤尾聡史, 榮祐介, 岩崎翔志, 門木秀幸：家庭系生ごみの組成分析と非滅菌高温L-乳酸発酵での利用. 環境工学論文集, Vol. 45, 印刷中.
- 3) 押田敏雄：機能性飼料とプロバイオティクス, 畜産コンサルタント, Vol. 8, pp. 28-32, 2005.
- 4) 高村一知, 星野浩子：*Bacillus*属細菌の芽胞数測定条件に関する研究 加熱温度の影響について, 聖徳栄養短期大学紀要, Vol. 18, pp. 14-19, 1987.
- 5) 唐澤豊：動物の飼料, pp. 145-150, 文永堂出版, 2004.
- 6) 犬飼進, 菊池順子, 渡辺忠雄：*Bacillus*属芽胞の発芽及び耐熱性に及ぼす有機酸ナトリウム塩の影響, 食品衛生学雑誌, Vol. 25, No. 2, pp. 125-131, 1984.
- 7) 高村一知, 星野浩子：*Bacillus*属細菌芽胞の油脂中での耐熱性について, 聖徳栄養短期大学紀要, Vol. 18, pp. 9-13, 1987.