

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00616

研究課題名(和文) 飲料抽出残渣からのファインケミカル発酵生産技術の開発

研究課題名(英文) Fine chemical production from coffee grounds

研究代表者

原 清敬 (HARA, Kiyotaka)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40434378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌は糖化酵素を産生し、コーヒー抽出残渣中の多糖類を分解することができる。このような性質から、黄麹菌は、味噌や醤油に、黒麹菌は、焼酎や有機酸などの生産に利用されている。本研究では、麹菌の糖化やカフェイン分解活性などの性質を利用して、コーヒー抽出残渣の低分子化、酵母発酵阻害物質の分解を行い、その分解液を酵母の培養に利用することで、高付加価値品を生産することを目的とした。今回は、具体的な高付加価値物質として、抗酸化作用を有するアスタキサンチンを赤色酵母を用いて生産させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では、コーヒー飲料製造工場やカフェ、近年ではコンビニエンスストアなどから大量のコーヒー抽出残渣(コーヒー粕)が排出されている。コーヒー抽出残渣の多くは廃棄物として処分されているので、廃棄量を削減するため、燃料化や堆肥化などの取り組みが行われている。本研究では、コーヒー抽出残渣からより付加価値の高い抗酸化物質であるアスタキサンチンを生産することに成功しており、環境負荷低減および健康増進という社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Coffee grounds are very attractive biomass for fine chemical production. Fungi can utilize coffee grounds using their hydrolyzing enzymes. In this study, Coffee grounds were used to produce an antioxidant, astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* after pretreatment by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオリファイナリー 麹菌 酵母 コーヒー粕 アスタキサンチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、コーヒー飲料製造工場やカフェ、近年ではコンビニエンスストアなどから大量のコーヒー抽出残渣(コーヒー抽出残渣)が排出されている。コーヒー抽出残渣の多くは廃棄物として処分されているので、廃棄量を削減するため、燃料化や堆肥化などの取り組みが行われている。また、その他のコーヒー抽出残渣の有効利用法として、麹菌を用いた有機酸や酵素等の生産に関する研究が報告されている(Regalado et al. 2000; Ramachandra et al. 2013)。

現在のコーヒーの全生産量は、アラビカ種とロブスタ種(カネフォアラ種)が大半を占めており、その内訳は、前者が6~7割、後者が3~4割となっている。我々が普段飲むコーヒーのほとんどは、アラビカ種のみか、アラビカ種をメインにロブスタ種をブレンドしたものである。アラビカ種は、ロブスタ種と比べ、香味に優れた高品質のコーヒーとして評価されている。反対に、ロブスタ種は、アラビカ種と比べ、生豆のショ糖や油脂分の含有量が少なく、酸味や香りでは劣ると言われている。また、苦みの元となるクロロゲン酸やカフェインが多く、アラビカ種にブレンドすると苦みやコクが増強するという特徴もある。

コーヒー抽出残渣には、難分解性であるセルロースやヘミセルロースをはじめとする多糖類が多量に含まれている。コーヒー抽出残渣のセルロース含量は、一般的な生ごみ(例として給食センター調理残渣)のセルロース含量の17.5倍、ヘミセルロース含量はそれの約2倍である。また、同じ飲料抽出残渣であるお茶抽出粕と比較して、ヘミセルロースの含量は、同程度であるのに対し、セルロースの含量は、2倍以上である。コーヒー抽出残渣の一部は肥料化や燃料化が行われているが、製造コストに見合わず、大半は廃棄されているのが現状である。

2. 研究の目的

麹菌は多糖類を分解する酵素(糖化酵素)を産生し、コーヒー抽出残渣中の多糖類を分解することができる。また、麹菌はフェノール分解活性も持つことが知られている(Ercilia et al. 2012)。このような性質から、黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)は、味噌や醤油に、黒麹菌(*Aspergillus niger*)は、焼酎や有機酸などの生産に利用されている。本研究では、麹菌の糖化やフェノール分解活性などの性質を利用して、コーヒー抽出残渣の低分子化、酵母発酵阻害物質の分解を行い、その分解液を酵母の培養に利用することで、高付加価値品を生産することを目的とした。本研究の概略を図1に示す。今回は、具体的な高付加価値物質として、抗酸化作用を有するアスタキサンチンを赤色酵母(*Xanthophyllomyces dendrorhous*)を用いて生産させることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* IFO 30113
黒麹菌 *Aspergillus niger* KCC F0086
赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* NBRC10129

(2) 使用培地

コーヒー抽出残渣を Czapek-Dox 培地(CD 培地)に加えたコーヒー抽出残渣培地を 300 mL 三角フラスコに 200 mL 調製した。コーヒー抽出残渣培地の組成は、右表の通りである。コーヒー豆は、アラビカ種(ブラジル No.2 #18 極細挽き)および(ロブスタ種 ベトナムロブスタ 極細挽き)を用いた。

KH ₂ PO ₄	1.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/L
KCl	0.5 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
NaNO ₃	3.0 g/L
コーヒー粕	25 g/L

(3) 培養

コーヒー抽出残渣培地を高圧蒸気滅菌後、黄麹菌は OD₆₀₀ = 0.1、黒麹菌は OD₆₀₀ = 0.5 の孢子懸濁液を培地に 1.0 mL 添加し、30、120 rpm で 15 日間、回転振盪培養した。赤色酵母の菌液を OD₆₀₀ = 0.15 となるよう植菌した。22、250 rpm で 72 時間培養した。

(4) 分析方法

細胞濃度の測定は 600 nm の吸収を用いた。全有機炭素(TOC)は TOC 計(TOC-L, SHIMAZU)を用いた。全糖はフェノール硫酸法を用いた。グルコースは、グルコース計(GF-501-H, TANITA)を用いた。フェノール類の測定は、フェノール測定キット(LR-PNL, 共立理化学研究所)を用いた。カフェインは、分光光度計(GeneQuant 1300, GEヘルスケア・ジャパン)を用いた。アスタキサンチンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いた。

4. 研究成果

(1) 赤色酵母のカフェイン耐性試験

カフェイン濃度 100、200 mg/L の細胞濃度は、カフェインを添加しない場合の細胞濃度と同等であり、赤色酵母の生育阻害は見られなかった。これに対しカフェイン濃度 300 mg/L 以上の 24 時間での細胞濃度は、カフェインを添加しない場合の細胞濃度より低く、生育阻害が起きた。しかし、カフェイン濃度 300~500 mg/L の最終細胞濃度は、カフェインを添加しない場合のそれと同等かそれ以上であった。カフェイン濃度 600、700 mg/L では、細胞濃度が全時間でカフェインを添加しない場合より低く、生育阻害が起きた(右図)。赤色酵母は、フェノール類濃度 1000 mg/L で生育阻害が見られたが、コーヒー抽出残渣培地には、100 mg/L 以下しかフェノールが含まれていないため、現状のコーヒー抽出残渣濃度で培養する場合において影響はないと考えられる。一方で、赤色酵母はカフェイン濃度 300 mg/L 以上において生育阻害が見られ、現状のコーヒー抽出残渣濃度で培養する場合のカフェイン濃度はそれらに値する。そのため、カフェイン濃度を 200 mg/L 以下まで低減することが望ましい。黒麹菌はカフェイン分解活性を示し、 $OD_{600} = 0.5$ の植菌で約 200 mg/L のカフェインを分解した。

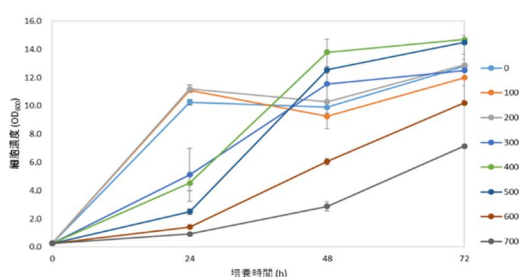


図1 赤色酵母の増加に与えるカフェインの影響

(2) 麹菌によるコーヒー抽出残渣中のカフェインの分解

アラビカ培地を用いた場合、培養開始から培養 1 日目までは、いずれの株においてもカフェイン濃度が増加した(図2)。培養 1 日目以降は、いずれの株においてもカフェイン濃度は減少し続けた。ロブスタ培地を用いた場合は、黄麹菌においては、カフェイン濃度の大きな増減は見られなかった。黒麹菌においては、培養開始から培養 1 日目にカフェイン濃度が増加後、それ以降は減少し続けた。黄麹菌と黒麹菌を同一の割合で添加した「両株」においては、培養 3 日目にカフェイン濃度が最低値を示し、その後は増加した。培養 5 日目のカフェイン濃度は、両培地で黒麹菌を用いた場合が最も低かった。しかし、その値は約 300 mg/L に留まり、赤色酵母の増殖低下を招かない 200 mg/L 以下には減少しなかった。

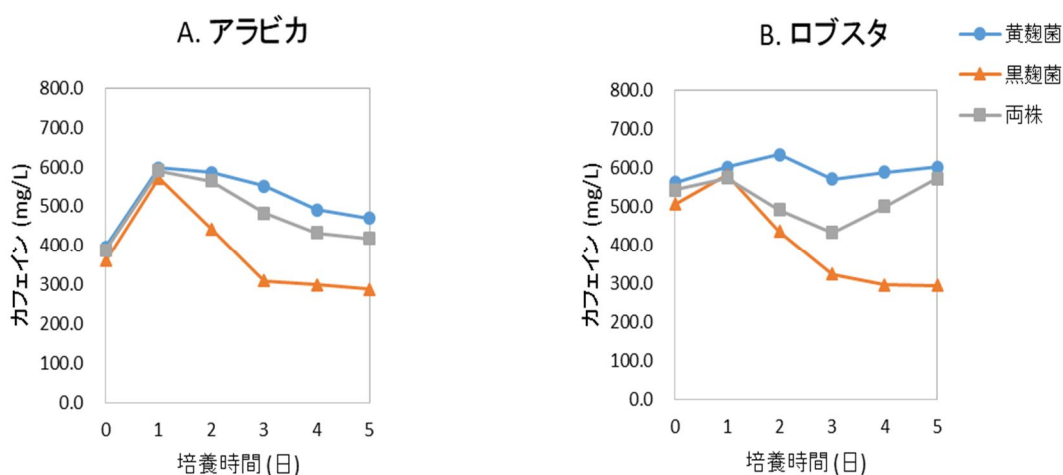


図2 麹菌によるコーヒー粕中のカフェインの分解

(3) コーヒー抽出残渣分解液を用いた赤色酵母の発酵

ロブスタ培地よりアラビカ培地の方が、全体的に酵母が増殖した。アラビカ培地では、黄麹菌分解液において、培養 24 時間まで赤色酵母は増殖し、その後 48 時間までは減少、72 時間までは再び増殖した。黒麹菌分解液においては、培養 48 時間まで増殖後、72 時間まではほとんど変化しなかった。両株分解液においては、培養 48 時間まで増殖し、その後減少した。ロ

ブスタ培地においては、いずれの菌株分解液で培養 24 時間まで赤色酵母は増殖し、それ以降は、黄麹菌分解液では緩やかに増加、黒麹菌分解液および両株分解液では減少した。培養 72 時間のアスタキサンチン生産性を比較したところ、ロブスタ種のコーヒー抽出残渣抽出液を黒麹菌にて分解した場合が最もアスタキサンチンを生産した。

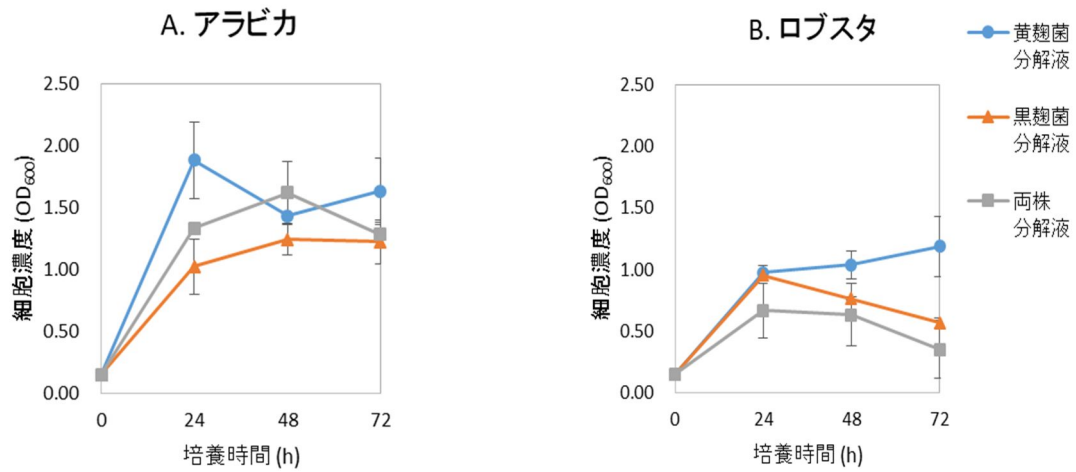


図 3 コーヒー粕麹菌分解液を用いた赤色酵母の培養

以上の結果から、コーヒー抽出残渣は、麹菌を用いてカフェインを分解させることで、赤色酵母によるアスタキサンチン生産に利用できることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto K, Hara KY, Morita T, Nishimura A, Sasaki D, Ishii J, Ogino C, Kizaki N, Kondo A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Enhancement of astaxanthin production in <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> by efficient method for the complete deletion of genes.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Microb CellFact.	6. 最初と最後の頁 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12934-016-0556-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishii J, Okazaki F, Djohan AC, Hara KY, Asai-Nakashima N, Teramura H, Andriani A, Tominaga M, Wakai S, Kahar P, Yopi, Prasetya B, Ogino C, Kondo A.	4. 巻 9
2. 論文標題 From mannan to bioethanol: cell surface co-display of -mannanase and -mannosidase on yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biotechnol Biofuels.	6. 最初と最後の頁 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13068-016-0600-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原清敬
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原清敬
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
3. 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤愛理, 関川貴寛, 原清敬, 櫻川智史
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣分解微生物の探索と特性評価
3. 学会等名 第26回環境化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤愛理, 関川貴寛, 原清敬, 櫻川智史
2. 発表標題 コーヒーかす分解微生物の探索
3. 学会等名 富士山麓サイエンス&アカデミー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関川貴寛 加藤愛理 原清敬
2. 発表標題 麹菌におけるコーヒー抽出残渣の分解特性
3. 学会等名 第51回日本水環境学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤愛理, 関川貴寛, 原清敬, 櫻川智史
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣分解微生物の探索と特性評価
3. 学会等名 第25回環境化学討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~env-bioeng/research.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関川 貴寛 (Sekikawa Takahiro) (20511728)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	