

# The decreasing effect of soy sauce refuge by degradation with plant cell wall hydrolyzing enzymes and culture of filamentous fungi

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 服部, 領太, 楠本, 憲一, 鈴木, 聡, 北本, 則行, 柏木, 豊 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00002889">https://doi.org/10.24514/00002889</a>

研究ノート

醤油粕の植物細胞壁分解酵素製剤及び糸状菌培養による減量効果

服部 領太, 楠本 憲一<sup>§</sup>, 鈴木 聡, 北本 則行\*, 柏木 豊

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

\*愛知県産業技術研究所 食品工業技術センター

The decreasing effect of soy sauce refuse by degradation  
with plant cell wall hydrolyzing enzymes and culture of filamentous fungi

Ryota Hattori, Ken-Ichi Kusumoto<sup>§</sup>, Satoshi Suzuki, Noriyuki Kitamoto\*, and Yutaka Kashiwagi

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

\*Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute

Abstract

The purpose of this study was to decrease the soy sauce refuse and utilize it as microbial culture media. The insoluble fraction of the tested soy sauce refuse was decreased to around 70% of the initial weight at the maximum by the treatment of the commercial plant cell wall degrading enzymes. *Aspergillus tamarii* NFRI1618 achieved the highest mycelial amount among the tested fourteen filamentous fungus strains by static culture. This strain has a possibility that it increases the nutritious value of the soy sauce refuse as animal feed.

Keywords : 醤油粕, 酵素剤, 糸状菌

緒言

醤油は、味噌や味醂、酢と共に、調味料として我が国で伝統的に利用されてきた発酵食品である。醤油粕は醤油工場で、生醤油の濾過工程において余剰物として排出される醤油加工上の副生物である。醤油会社か

ら発生する醤油絞り粕は年間約10万トンにのぼる。醤油の製造工程は、炒って挽き割った小麦と蒸煮した大豆（脱脂大豆、あるいは丸大豆）を混合し、そこに種麴を添加混合して発酵させる。その後、食塩水を混合し、発酵タンクにて約6ヶ月間発酵させる。タンク内の醤油諸味（モロミ）は原料由来の植物繊維やタンパク質、麴菌菌体、醤油主発酵酵母、後発酵酵母や乳酸

<sup>§</sup>連絡先, kusumoto@affrc.go.jp

菌等の混合物より構成される。醤油諸味を圧搾機で搾り、生揚（キアゲ）醤油を得た残渣が醤油粕である。醤油粕の発生量は、使用原料重量の約25%、醤油生産量の約8%と推定されている。発生直後の醤油粕の水分含量は、26~34%の範囲である。発生直後の醤油粕を生粕と呼び、ほとんどの工場はこの状態で処分しているが、飼料向けには生粕を粉碎し、さらに乾燥するメーカーもある<sup>1)</sup>。一方、水分含量が約30%と高いこと、食塩含量は7~8%と比較的高いことが醤油粕処理を困難にしている理由として挙げられる。一部の醤油粕は、乳牛の飼料に利用されると共に、キノコ用培地としての利用、炭化して土壌改良剤としての利用、ボイラーの助燃剤としての利用がある<sup>2)</sup>が、ほとんどの粕は産業廃棄物として専門業者に引き取られ、処理されているのが現状であり、多くの醤油メーカーで醤油粕の廃棄コストの増加が問題となっている。

そこで、醤油粕を減量、または有効利用するための研究が進められており、醤油粕を培地とした微生物生産<sup>3,7)</sup>、醤油粕由来の生理機能成分の同定<sup>4)-6)</sup>に関する報告がある。

一方、醤油粕の酵素分解による低減化に関連しては、セルロース分解酵素の効果が認められているが、醤油粕中の非セルロース系多糖類の減少が醤油粕減量につながるとの報告もある<sup>8-11)</sup>。実際の麹菌株あるいは酵素剤の利用を考慮すると、現状の酵素活性を有する麹菌株のみで醤油粕を低減化することには限界があり、醤油諸味への酵素剤使用による低減化、あるいは排出された醤油粕の酵素剤や微生物培養等による特性変換による利用が必要とされている。

そこで、本研究では、さらなる醤油粕の低減化と利用拡大を図るため、市販の植物細胞壁分解酵素剤を用いた醤油粕の分解試験及び、醤油粕使用培地による保存糸状菌株の培養を行い、菌体生育量と分解による醤油粕残渣の減少の比較を行った。その結果、醤油粕培地上で生育量が高い菌株を見出したこと、またその菌株の培養後の醤油粕残渣が供試酵素剤分解における減量割合の最高値と同等に減少することを見出したので、報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 供試菌株

供試菌株として、*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus awamori*, *Monascus anka* の計5種14株を使用した(表1)。

表1. 供試菌株

種名	NFRI 番号
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1133
<i>Aspergillus sojae</i>	NFRI1147
<i>Aspergillus sojae</i>	NFRI1148
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1572
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1575
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1577
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1599
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1600
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1601
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1603
<i>Aspergillus oryzae</i>	NFRI1607
<i>Aspergillus awamori</i>	NFRI1617
<i>Aspergillus tamarii</i>	NFRI1618
<i>Monascus anka</i>	NFRI1067

表2. 供試酵素剤

酵素剤名	由来	主要酵素活性
セルロシン T 2	<i>Trichoderma</i>	セルラーゼ
セルロシン A C 40	<i>A. niger</i>	セルラーゼ
セルロシン T P 25	<i>Trichoderma</i>	キシラナーゼ
セルロシン G M 5	<i>A. niger</i>	マンナーゼ
セルロシン P E 60	<i>A. niger</i>	ペクチナーゼ
セルロシン H C	<i>A. niger</i>	キシラナーゼ
セルロシン H C 100	<i>A. niger</i>	キシラナーゼ
セルロシン P C 5	<i>A. niger</i>	ペクチナーゼ
セルロシン B	<i>A. niger</i>	キシラナーゼ
ドリセラージェ	<i>Irpex</i>	セルラーゼ

### 2. 酵素剤による醤油粕分解試験

市販植物細胞壁分解酵素剤として、9種類の阪急バイオインダストリー(株)製剤と、ドリセラージェ(協和発酵製)を使用した(表2)。500ml容の三角フラスコ中で醤油粕(株イチビキ、水分27-28% (w/w)) 3.0gと60mlのイオン交換水を混合してオートクレーブ滅菌(121℃, 15分間)後、酵素剤を0.3g添加し、30℃で80rpmで振とうしながら、分解反応を18時間行った。その後、ろ過助剤として珪藻土を1.5g添加して、吸引ろ過を行った。残渣を60mlの脱イオン水で2回洗浄し、90℃で恒量まで乾燥後、秤量した。残渣の重量は珪藻土重量を差し引いて表記した。

### 3. 醤油粕培地による糸状菌の培養と醤油粕分解試験

500ml容の三角フラスコに醤油粕10g(乾燥重量)を入れ、イオン交換水100mlを加えた後、121℃で15分間オートクレーブ滅菌したものを醤油粕液体培地と

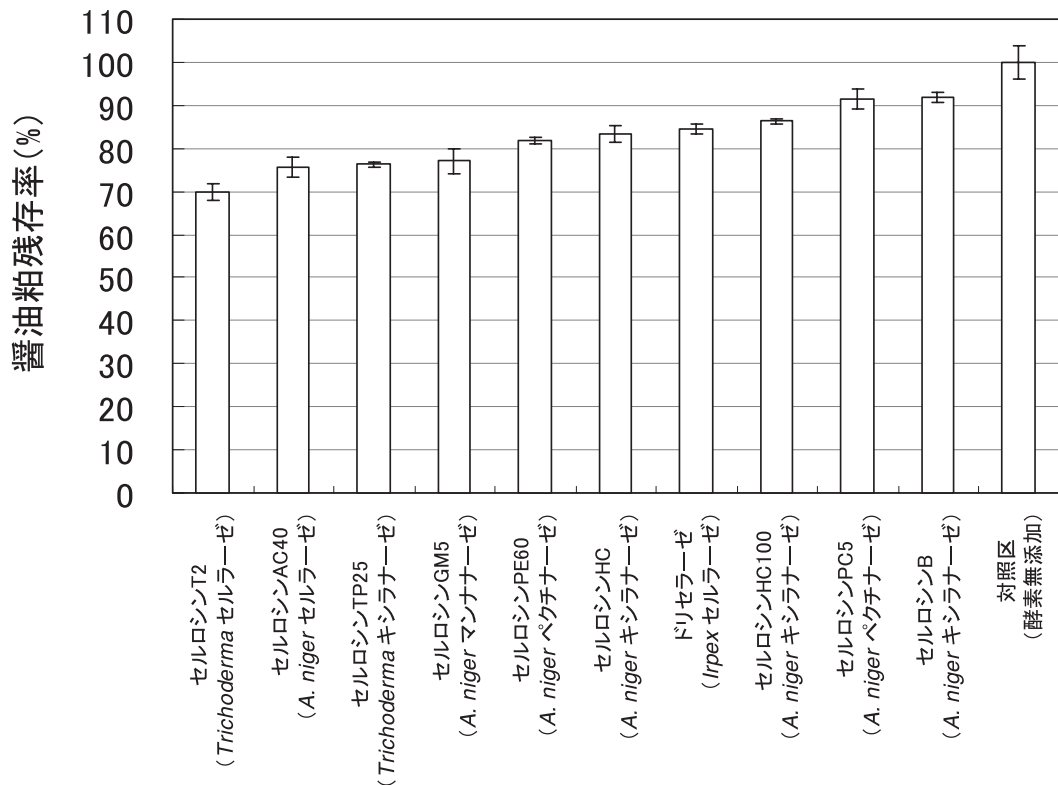


図1. 各種市販酵素剤処理による醤油粕固形分の残存率

各データは、3回の反復試験の平均値。また、各データの標準偏差を誤差線で示した。以下も同様。

した。麹菌として、*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarii*, *A. awamori*, *M. anka* の計5種14株(表1)を用い、これらの孢子懸濁液を $5 \times 10^6$ 孢子数となるよう植菌した。その後、30℃で約2週間、静置培養を行った。培養後、まず菌蓋となっている菌体を醤油粕が混在しないように注意深く取り出し、菌体を90℃で乾燥後、秤量した。また、菌体除去後の醤油粕残渣を別途、ろ過助剤として珪藻土を2.5g添加して、ろ紙(アドバンテック, No.2)を用いて吸引ろ過を行った。ろ過残渣をイオン交換水で2回洗浄し、90℃で恒量まで乾燥後、秤量した。

## 実験結果および考察

### 1. 酵素製剤による醤油粕の加水分解

酵素製剤で処理しない対照区における醤油粕不溶性固形分は、 $0.90 \pm 0.03$  g (3回の独立した試験の平均値 $\pm$ 標準偏差)であり、これは、供試した醤油粕の42% (乾燥重量換算)であった。これに市販植物細胞壁分解酵素製剤処理を施した場合は、セルラーゼ製剤、特に *Trichoderma* 由来セルラーゼ製剤(セルロシンT2)

処理により、不溶性固形分が対照区の約70%に減少した(図1)。*Trichoderma* は、結晶性及び非結晶性セルロース分解に関与するセロビオハイドrolラーゼとCMC液化酵素活性が高いとされる。菊池らは、醤油粕に含まれる多糖類と圧搾性すなわち濾過抵抗性への寄与率について、非セルロース系多糖類の寄与が70%以上、そのうち酸性多糖類のそれは40%以上と報告している<sup>8)</sup>。また、醤油粕中の不溶性固形分(洗浄粕)は、約10%の微生物菌体、30%のタンパク質、20%の大豆由来非タンパク質、30%の非タンパク質と推計した。そのうち、大豆由来の非セルロース系酸性多糖類は7%であった。また、洗浄粕中の多糖類は、セルロース、大豆由来の酸性多糖類、小麦由来のアラビノキシラン、デンプンであった<sup>8)</sup>。これらの結果から、菊池は、醤油粕を水洗浄した後に得られる不溶性固形分の約55%が醤油原料の大豆と小麦に由来する多糖類であり、セルロースは不溶性固形分の約35%、大豆由来ペクチンが約7%、小麦由来アラビノキシランが約10%であると報告している<sup>9)</sup>。このことから、菊池らの使用した醤油粕と組成の違いはあると考えられるが、セルロシンT2により、供試醤油粕中の不溶性固形分中のセル

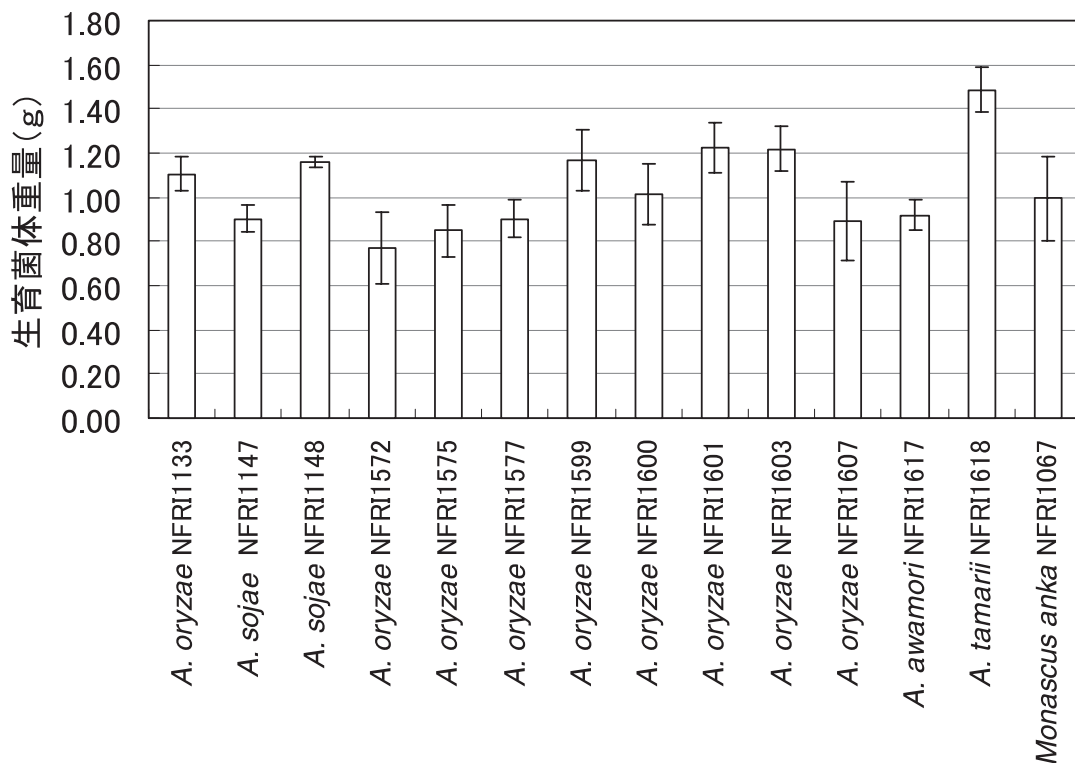


図 2. 各種糸状菌株の醤油粕培地での培養菌糸重量

ロースがほぼ加水分解により可溶性となり、除去されたと考えられる。セルラーゼ製剤は、反応産物であるグルコースによる反応阻害効果が高い。そこで、麹菌等の微生物培養により反応産物を炭素源として消費しながら、反応産物による阻害を回避することで、さらに効率的な醤油粕分解の可能性が考えられる。また、*Trichoderma* キシラナーゼ剤（セルロシン T P 25）や、*A. niger* マンナナーゼ製剤（セルロシン GM 5）処理においても、約76-77%に醤油粕固形分が減少した。また、*A. niger* ペクチナーゼ製剤（セルロシン P E 60）処理では、約82%と、セルラーゼ製剤ほどではないが、やはり醤油粕固形分が減少した。北本によれば、醤油中ではペクチンがゲル化しており、このことが醤油諸味の難圧搾性の原因であるとされる<sup>10)</sup>。また、中台によれば、醤油粕減量につながる麹菌株として、ペクチナーゼ活性の強い株を推奨している<sup>11)</sup>。*A. niger* ペクチナーゼ製剤にもセルラーゼ活性が混在している可能性はある。一方、菊池<sup>9)</sup>は大豆由来ペクチンが約7%と報告している。そこで、これに相当する量のペクチンがペクチナーゼ製剤により加水分解を受け、不溶性固形分のペクチン含量以上の減少につながったと考え

られる。このことから、醤油粕中の不溶性多糖類はそれぞれ複雑に相互作用しながら、圧搾の阻害要因となるが、その多糖類の一部を部分的に分解するだけでも、酵素剤の標的多糖類の減少以上の効果が期待されると考えられた。また、同じ *A. niger* ペクチナーゼ製剤でも、セルロシン P E 60とセルロシン P C 5では、不溶性固形分残渣量が10%近く異なり、酵素剤の調製法により効果が大きく異なることが明らかになった。また、酵素製剤は酵素群の混合物であり、主要な酵素と共にセルラーゼ等その他の酵素が含まれていることも、その原因と考えられる。同様に、*A. niger* キシラナーゼ製剤であるセルロシン H C、セルロシン H C 100とセルロシン Bでも、その固形分残渣減量効果に違いが見られた。また、これらの試験結果から、複数の酵素を組み合わせることにより、醤油粕不溶性固形分の分解に、相乗・相加効果が期待されるため、今後の検討事項とした。

## 2. 醤油粕使用培地上における糸状菌供試株の生育

糸状菌保存株による醤油粕培地上の静置培養後の菌体重量と醤油粕残渣重量の比較を行った。供試菌株14

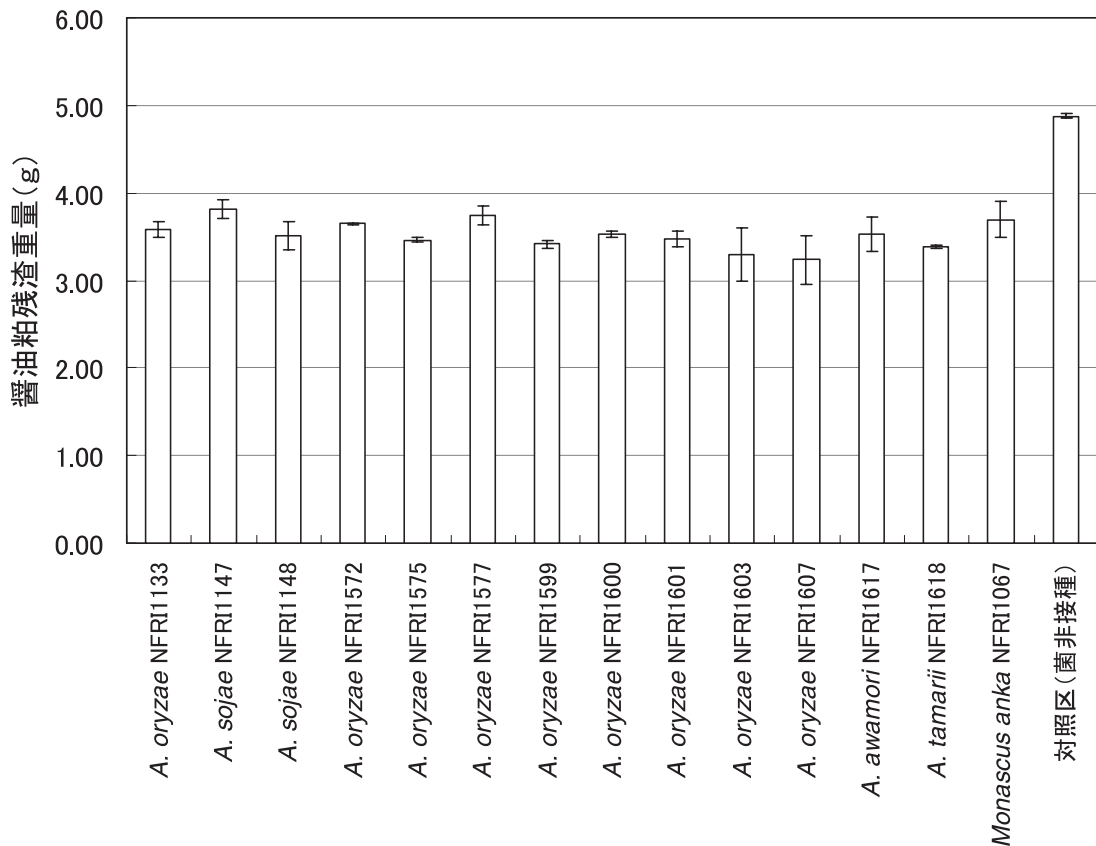


図3. 各種糸状菌株の醤油粕培地培養後における醤油粕残渣重量

株中では、*A. tamarii* NFRI1618の生育菌体量が平均で他株の約20%程度高かった(図2)。ここでは*A. tamarii*の1株のみの供試であるため、この特徴が*A. tamarii*全体の特徴であるかは不明である。しかし、醤油粕液体培地上で生育量の高い株が見出されたことで、今後、本株が生産する酵素群の特徴の解明により、醤油粕を培地として利用して*A. tamarii*の酵素生産に利用できることが考えられた。なお、これらの糸状菌を生育させた後の醤油粕残渣重量は、*A. tamarii* NFRI1618で対照区の69%、他の供試菌株では66%~78%であった(図3)。一方、この試験における固形分残渣の減量の程度(66%~78%)は、図1の酵素製剤処理における残渣量減少に匹敵し、特に最大値を示したセルロシンT2処理における残渣量減少率と同等の減少率を示す株も見られた。このことから、醤油粕を培地として用いた*A. tamarii* NFRI1618の培養によって、醤油粕を利用しながら醤油粕の減量と菌体生産が可能であることが、実験結果から示唆された。

醤油粕の有効利用に関する研究として、河原らは、醤油粕を培地とした*A. awamori*株培養によるグルコースの生産について、報告している<sup>3)</sup>。また、梅川

らは、たまり醤油粕投与で高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制効果が認められ、たまり醤油粕由来のACE阻害画分が、高血圧予防機能性食品として利用の可能性について言及している<sup>4)</sup>。また、梅川らは上記のACE阻害画分がペプチドであり、それらのラット投与により、有意な血圧低下が認められたことを報告している<sup>5)</sup>。一方、江崎らは、醤油粕より調製したイソフラボン分画物の抗酸化素材としての有用性を報告している<sup>6)</sup>。また、牧野らは、醤油粕を脱塩した後に排出される脱塩液を醤油酵母の前培養液として利用の可能性を報告した<sup>7)</sup>。これらの、醤油粕に含まれる生理機能成分に着目した研究成果と、醤油粕の培地利用についての研究成果を、本研究で見出された醤油粕培地上で生育菌体量の高かった*A. tamarii* NFRI1618の培養と組み合わせることにより、醤油粕利用についての新たな知見が得られることが期待される。

北本ら<sup>12)</sup>は、麹菌の遺伝子組み換え株として、エンド-1、4-β-グルカナナーゼB遺伝子高発現株を作製し、本株を用いた醤油麹作製と醤油諸味小仕込み試験を行った。本株はCMC液化酵素活性が親株の50倍以上上昇しており、諸味小仕込み試験では仕込み6か月目の

諸味濾過残渣重量は、組み換え株で親株の20%低下したと報告している。現状では、遺伝子組換え麹菌を食品製造に使用することは、社会的に受け入れられていないため、本研究のような実用株の利用が重要となる。

一方、醤油粕の飼料利用の際に、糸状菌が生育することにより栄養的に有利となる可能性が考えられる。特に、本研究で *A. tamarii* NFRI1618 の菌体生育量は供試菌株中で最大であった。しかし、本株の培養による醤油粕の不溶性固形分減量は、他の菌株と比較して特段に高いということはなく、固形分分解に寄与する酵素の菌体当たりの生産量はかえって他の株よりも低いことが考えられた。そのため、*A. tamarii* NFRI1618 の利用としては、醤油粕培地で生育量の高い菌株として、醤油粕の飼料としての栄養価値を上昇させる可能性が考えられる。また、飼料用酵素製剤として酵素メーカーが糸状菌酵素を生産していることを考慮すると、当該菌株が生産する各種加水分解酵素群が、飼料の消化性向上に寄与する可能性も考えられる。今後、*A. tamarii* NFRI1618 の酵素生産性と醤油粕減量の詳細について、検討する予定である。

## 謝 辞

研究に使用した醤油粕を提供いただいたイチビキ株式会社、セルロシンシリーズの酵素剤をご提供いただいた阪急バイオインダストリー株式会社に感謝致します。本研究の一部は、農林水産省委託プロジェクト「農林水産バイオリサイクル研究」により実施された。

## 要 約

醤油加工副産物である醤油粕の低減化と微生物培養基への利用を目的とした。市販植物細胞壁分解酵素製剤により、供試した醤油粕の不溶性固形分は、最高で対照区の約70%に減少した。また、醤油粕培地における糸状菌14株の静置培養を行ったところ、*A. tamarii* NFRI1618 は生育菌体量が高く、不溶性固形分の減量も対照区の69%と、酵素製剤使用時の固形分減量率に匹敵した。そのため、*A. tamarii* NFRI1618 は醤油粕培地で生育量の高い菌株として、醤油粕の飼料としての栄養的価値を上昇させる可能性が考えられる。

## 参考文献

- 1) 新潟県醤油協同組合連合会, 醤油工場が排出する産業廃棄物の適正処理に関するビジョン (平成十年度中小企業活路開拓調査・実現化事業実施報告書)
- 2) 松田茂樹, 湯乃上雅子, 醤油粕等の有効利用に関する研究(3) - 醤油粕食物繊維の製造法とその性質, 醬研, **26**, 89-94 (2000)
- 3) 河原秀久, 和泉自泰, 清水知香, 小幡斉, *Aspergillus awamori* No.3由来複合酵素を用いた醤油粕からのグルコース生産, 醬研, **33**, 95-99 (2007)
- 4) 梅川逸人, 中井伸行, 吉田沙織, 古市幸生, 松永正好, たまり醤油粕の投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響, 食科工, **53**, 655-658 (2006)
- 5) 梅川逸人, 藤原稔弘, 吉田沙織, 沖村幸司, 内山裕介, 西尾昌洋, 勝崎裕隆, 今井邦雄, 松永正好, たまり醤油粕由来のACE阻害ペプチドの高血圧自然発症ラットに対する血圧降下作用, 食科工, **57**, 361-365 (2010)
- 6) 江崎秀男, 渡部綾子, 菱川進弘, 大澤俊彦, 川岸瞬朗, 醤油粕より調製したイソフラボン分画物の抗酸化素材としての有用性, 食科工, **51**, 47-53 (2004)
- 7) 牧野義雄, 竹上伊津子, 松下茂善, 松尾祐一郎, 徳田昭光, 白川武志, 醤油粕脱塩液で培養した酵母添加による醤油醸造, 食科工, **46**, 664-668 (1999)
- 8) 菊池忠昭, 杉本洋, 横塚保, 醤油粕中の多糖類とその圧搾困難性におよぼす影響, 農化, **50**, 279-286 (1976)
- 9) 菊池忠昭, 醤油醸造における大豆多糖類の挙動と役割, 醬研, **3**, 154-159 (1977)
- 10) 北本則行, 醤油麹菌のキシラン分解酵素とペクチン分解酵素の分子生物学的解析, 醸協, **95**, 811-816 (2000)
- 11) 中台忠信, 醤油諸味の圧搾における粕転化糖に関与する麹菌酵素系の統計的解析, 醬研, **10**, 97-99 (1984)
- 12) 北本則行, 吉野庄子, 和久豊, セルラーゼ高生産組換え麹菌の利用による醤油粕の低減化, 醬研, **25**, 55-60 (1999)