

食用担子菌による醤油粕の可溶化

山本 澄人*, 岩田 深也*

Sumito Yamamoto, Iwata Shinya

抄 録

醤油の製造過程で産出される醤油粕に食用担子菌のシイタケ (*Lentinus edodes*) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を作用させ、可溶化することを試みた。これらの菌は脱塩した醤油粕を単独の基質として生育が可能であり、醤油粕を部分的に可溶化していた。これらの菌の生育後の醤油粕残渣やろ液の成分を分析し、可溶化の特性について検討した。

1 はじめに

醤油製造過程で副次的に産出される醤油粕は、現状においてそのほとんどが産業廃棄物として処理されている。平成13年には食品リサイクル法が施行され、食品循環資源の再生利用が促進されており、また社会的にも環境に配慮した再利用法や処理方法の確立が求められている。一方、製造業者も新たな処理方法を見出すことで従来とは異なる製品の開発が期待できる。

本研究では醤油粕中に残存する不溶性のタンパク質や糖質等の栄養成分に着目し、これらを微生物の作用により可溶化して減量化するとともに、可溶化成分を有効利用することを究極の目的とした。本報告では、食用に供されている担子菌を応用して醤油粕の可溶化を検討した結果について述べる。

2 実験方法

2・1 使用菌株および醤油粕を用いた培養

醤油粕の可溶化試験の供試菌として食用担子菌のシイタケ (*Lentinus edodes*) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた。

醤油粕は徳島県内の醤油製造工場で産出されたものを使用し、生の醤油粕は前処理として105℃、6時間の乾燥を行った後、ブレンダーで15秒間粉碎した。この1gあたりに100mlの蒸留水を加えて懸濁して洗浄し、遠心分離 (2000G, 10分, 15℃) 後、上清液を除去して脱塩を行った。洗浄後の醤油粕は再び105℃、6時間の乾燥を行い、培養に用いた。

培養は50ml容三角フラスコを使用し、これに各々

無洗浄、3回洗浄あるいは6回洗浄した乾燥醤油粕2gと蒸留水を6ml入れてオートクレーブ後、両菌株を接種し、26℃で静置培養を行った。

培養後、15mlの0.2M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) を加えて4℃で穏やかに一晩振とうした後遠心分離 (10000G, 10分, 4℃) を行い、上清液を集めて培養ろ液として分離し、沈殿はさらに15mlの蒸留水で3回洗浄後乾燥して培養後の残渣とした。

2・2 醤油粕および培養残渣成分の分析

醤油粕と培養後の残渣の栄養成分の分析は常法により行った。ただし、タンパク質は試料を加水分解後BECKMAN(株)社製アミノ酸分析システム6300Eにてアミノ酸を定量し、それらを合計した。また、植物性の難分解性成分であるホロセルロースとリグニンの定量は各々亜塩素酸塩法¹⁾と改良アセチルブロマイド法²⁾により行った。表1に生の醤油粕の成分組成を示した。

表1 醤油粕の成分組成

成分	含有量(g/100g)
タンパク質	15.2
脂質	5.4
ホロセルロース	22.1
リグニン	6.9
食塩	10.0
水分	44.0

2・3 培養ろ液のラッカーゼ活性の測定

ラッカーゼ (フェノールオキシダーゼ) の活性測定はABTS (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) を基質とし、この酸化に伴う415

*応用生物課

nmの吸収の増加を測定した。反応は1 ml容キューベット内で室温にて行い、0.4mMABTS, 50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) および適宜希釈した酵素液を混和して全量1.0mlとした。

3 結果及び考察

3・1 食用担子菌の培養試験

醤油粕を単独の培養基質として培養を行った場合の60日後の*L.edodes*と*P.ostreatus*の生育状況に対する洗浄回数の影響を表1に示した。洗浄していない乾燥醤油粕を用いた場合には両菌株とも全く生育が観察されなかった。一方、3回洗浄、6回洗浄したものを用いた場合には生育が確認され、3回洗浄の場合は6回洗浄に比べて旺盛な生育を示した。これらのことから醤油粕には*L.edodes*と*P.ostreatus*の生育に必要な因子は十分に含まれているが、過度の洗浄により溶出していることが示唆された。また、無洗浄の場合に生育がみられなかったのは食塩の影響であると考えられる。

表2 培養60日後の食用担子菌の生育に及ぼす洗浄回数の影響

菌株	無洗浄	3回洗浄	6回洗浄
<i>L.edodes</i>	—	++	+
<i>P.ostreatus</i>	—	++	+

—：全く生育がみられない，＋：やや生育がみられる，
++：旺盛な生育がみられる

3・2 醤油粕不溶性成分の変化

3回洗浄した醤油粕を基質にして*L.edodes*と*P.ostreatus*を生育させた培養残査の乾燥重量の培養時間に伴う変化を図1に示した。

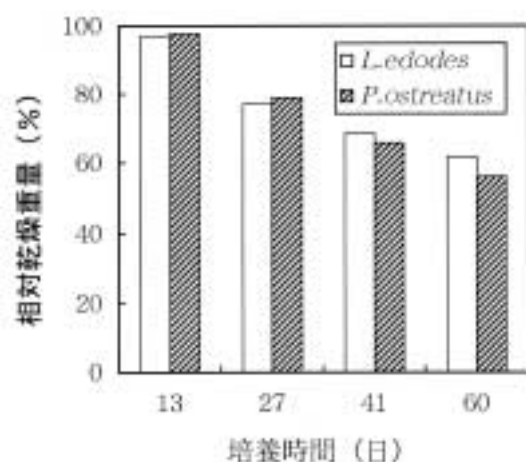


図1 培養残査の乾燥重量の変化

両菌株とも培養時間の経過に伴い、醤油粕の培養残査が減少しており可溶化していると考えられた。培養60日後には*L.edodes*の残査は62%に減少しており、醤油粕の不溶性成分のうち38%が可溶化したと考えられる。また、*P.ostreatus*はさらに高い可溶化性を示し、残査重量は56%にまで減少しており、44%の可溶化率であった。

表1に示したようにタンパク質、ホロセスロース、リグニンは醤油粕の主要な不溶性の成分であったが、両担子菌を培養後に、これらの含有量が残査中でどのように変化しているかを検討した。3回洗浄後乾燥した醤油粕に菌を接種していないもの、*L.edodes*を接種して60日間培養したものおよび*P.ostreatus*を60日間培養したもののタンパク質、ホロセルロースおよびリグニンの含有量を表3に示した。

表3 乾燥醤油粕成分組成の食用担子菌培養後の変化

成分	含有量 (g/100g)		
	培養なし	<i>L.e</i> 培養*	<i>P.o</i> 培養*
タンパク質	30.1	42.5	32.3
ホロセルロース	54.5	54.8	55.6
リグニン	12.5	22.5	24.3

*培養時間は60日間

*L.edodes*を培養した残査はタンパク質含量が60日後には42.5g/100gに変化しているが、図1に示したように培養残査の全体量が62%に減少しているので培養前の洗浄醤油粕100gあたりに換算すると26.4gになっており、30.1gから26.4g（タンパク質の可溶化率は12.3%）になっている。同様にホロセルロースは54.5gから34.0g（ホロセルロース可溶化率37.6%）に、変化した。またリグニンは12.5gから14.0gとむしろ増加している。一方*P.ostreatus*の残査は全体が56%に減少しているので、タンパク質が30.1gから18.1g（可溶化率39.9%）、ホロセルロースは54.5gから31.1g（可溶化率42.6%）、リグニンは12.5gから13.6gになっている。これらの結果から*P.ostreatus*は*L.edodes*に比べて、醤油粕のタンパク質とホロセルロースの高い可溶化能を有するが、特に不溶性タンパク質の可溶化に顕著な差があることが認められた。また、リグニンはいずれの菌株によっても可溶化が確認されなかった。

3・3 培養ろ液の分析

3回洗浄した乾燥醤油粕を基質とした*P.ostreatus*と*L.edodes*の培養時の抽出ろ液中のラッカーゼ活性の経時変化を調べた。図2に乾燥醤油粕2gを用いて培養したフラスコ1本あたりのろ液中に生産されたラッカーゼの消長を示した。

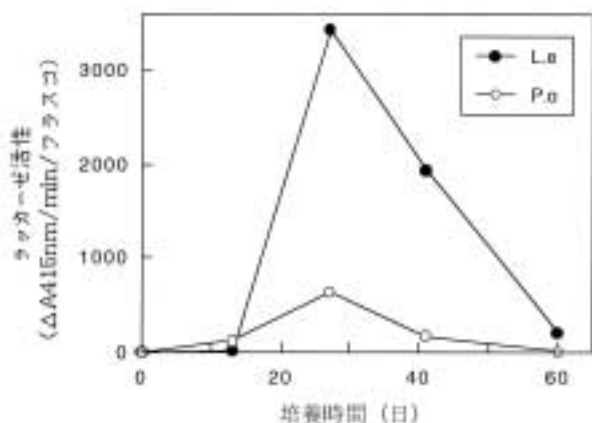


図2 培養ろ液中のラッカーゼ活性の経時変化

培養13日後のろ液を比較すると*P.ostreatus*のものが*L.edodes*に比べて高い活性を示しているが、培養27日目のものでは逆に*L.edodes*が5倍以上の高い活性を示し、それ以降も同様の傾向であり、この条件で著量のラッカーゼを生産していることが確認された。*L.edodes*が菌体外に生産するラッカーゼはフェノール性β-O-4リグニンモデル化合物を分解することが報告されている³⁾が本研究では表3に示したようにリグニンの可溶化は確認されなかった。これはこの酵素が醤油粕中のリグニンには作用しないためか、あるいは部分分解はするが可溶化には至らないため、もしくは分解と同時に合成反応が起こっているため等の理由が考えられる。

3回洗浄した乾燥醤油粕で60日間*L.edodes*と*P.ostreatus*の培養後の抽出ろ液の遊離アミノ酸の組成と濃度を図3に示した。醤油粕中のタンパク質の可溶化能の高い*P.ostreatus*の培養ろ液のアミノ酸の遊離量の合計は1617.2μg/mlで、*L.edodes*の450.4μg/mlに比べて4倍近いアミノ酸が遊離していた。培養フラスコあたりで比較すると、培養に用いた乾燥醤油粕2g中のタンパク質は表3の含有量より602mgであるから、抽出ろ液15ml中には*P.ostreatus*が24.3mg、*L.edodes*が6.8mgのアミノ酸を遊離したことになり、タンパク質からのアミノ酸の遊離率は各々4.0%、1.1%ということになる。従ってタンパク質のうち可溶化した成分は、いずれの菌株の場合も可

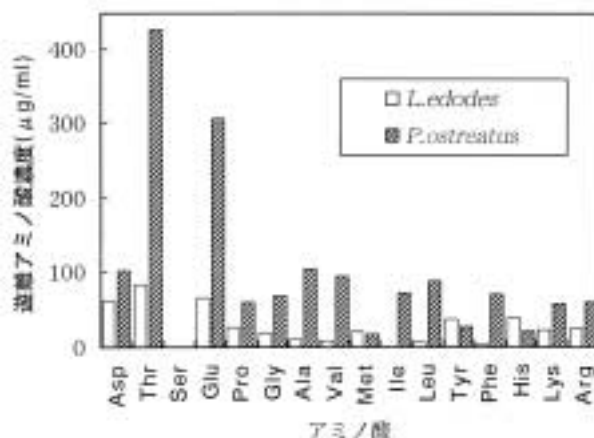


図3 培養ろ液の遊離アミノ酸組成

溶性のタンパク質あるいはペプチドであると考えられる。

4 まとめ

醤油粕に食用担子菌のシイタケ (*Lentinus edodes*) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を作用させ、可溶化することを試み、幾つかの検討を行い、以下のような結果が得られた。

(1) *Lentinus edodes* と *Pleurotus ostreatus* の両菌株とも水洗して脱塩した醤油粕を単独の基質として生育したが、過度の洗浄により生育度は低下した。

(2) *L.edodes* を60日間生育した後の醤油粕は乾燥重量が62%に減少し、*P.ostreatus* の場合は同様に56%に減少しており、可溶化が認められた。また、*P.ostreatus* は *L.edodes* に比べてタンパク質の可溶化能が高く、可溶化成分中の遊離アミノ酸含量も高かった。一方、両菌株ともリグニンの可溶化は認められなかった。

(3) 水洗した醤油粕を基質とする固体培養において *L.edodes* は *P.ostreatus* に比べて著量のラッカーゼを抽出ろ液中に生産した。

謝 辞

本研究の遂行するにあたり、食用担子菌のシイタケ (*Lentinus edodes*) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を快くご分与頂き、またその培養方法や酵素活性の測定方法などに関して適切なご助言を賜りました香川大学農学部麻田恭彦教授に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Wise, L. E., Murphy, M., D'Addieco, A. A.: Paper Trade J. , 122, 35 (1946).
- 2) Iiyama, K., Wallis, A. F. A: Wood Sci. Technol. , 22, 271–280 (1988).
- 3) Kofujita, H., Ohta, T., Asada, Y., Kuwahara, M.,: Mokuzai Gakkaishi, 37, 562–569 (1991).