

1. 研究課題名：未利用食物資源を食品素材へ転換する生物機能の探索研究

テーマ コンブだし抽出残渣の有効利用

～アルギン酸分解酵素を有する海洋微生物の検索～

テーマ 大豆煮汁の堆肥への有効利用

テーマ かつおだし抽出残渣の有効利用

テーマ 殺藻効果を有する海洋微生物の検索

テーマ 酵母からの旨味調味料の製造

2. 研究機関：長工醤油味噌協同組合

3. 分担者：林田真二郎

4. 共同研究者：竹下哲史（科学技術振興事業団）

久保克巳（長崎県工業技術センター）

日高栄治、加藤秀男、福田久孝、下川和彦、米村雄二、山下三佳、

花岡陽（長工醤油味噌協同組合）

高見紀子、岩本佳子、宮西伸光、村松毅（長崎大学水産学部）

都田真奈、山口健太郎、渡邊正己（長崎大学薬学部）

5. 研究期間：平成7年～平成8年

6. 要約

テーマ コンブだし抽出残渣の有効利用

～アルギン酸分解酵素を有する海洋微生物の検索～

昆布より抽出されたアルギン酸を酵素分解するため、酵素の精製を行った。No.272 菌を培養後、遠沈により除菌した後、硫酸塩析、イオン交換（陽・陰）等を経て精製酵素を得た。酵素を用いグルロン酸ポリマー、マンヌロン酸ポリマー及びアルギン酸を分解した後、ゲルろ過により重合度別に分けた。得られた重合度の異なる分解物を、癌細胞に与えその成育の変化を観察し、それら分解物の抗腫瘍性を調べた。

テーマ 大豆煮汁の堆肥への有効利用

みそ製造中に生じる大豆煮汁は、工場全体の排水量の 5～6%の量で、全排水負荷の 75%以上を占める。この大豆煮汁を処理するには、多大の設備と人手及び経費がかかる。しかしながら大豆煮汁は、腐敗しやすく有効利用は難しいものであった。そこで、ケフィア由来の複合菌塊で、この大豆煮汁に保存性を持たせその有効利用法を検討した。前培養した種菌を 1%以上大豆煮汁に加えることで、30 日程度の保存が可能となった。液肥としての適性を試験したところ、即効性はなかったが元肥及び酸性土壌改良剤としての可能性が見いだされた。さらにこの発酵煮汁を堆肥製造時に加えたところ、堆肥製造時の悪臭の低減効果があった。

テーマ かつおだし抽出残渣の有効利用

自社工場内より発生するかつおだし抽出残渣は、現在のところ産業廃棄物として処理されているが、その残渣中には乾物換算でまだ90%ものタンパク質を含有している。このタンパク質を調味料（蛋白加水分解物）として有効利用することを考え、その分解方法の検討を試みた。塩酸分解法、微生物による酵素分解法、市販酵素剤による酵素分解法を検討した結果、それまで方法は簡便であるものの、可溶化率や官能上（苦味の生成）にやや問題が残るとされていた市販酵素剤の利用において、かつおだし抽出残渣の粒度を細かくして酵素との接触面積を増大させることによって可溶化率を上げ、エキソ型のペプチダーゼの利用によって苦味の生成を押さえることに成功し、実用化できる段階に達することが出来た。

テーマ 殺藻効果を有する海洋微生物の検索

日本沿岸海域では過去に種々の赤潮により漁業被害を受けている。大村湾は赤潮の発生しやすい海域として研究者の間でも認識されている。そこで我々は赤潮の中でも有害なシャトネラを死滅又は抑制する海洋微生物の検索を行なった。海洋微生物は長崎県内の海域より採取した細菌の一部を使用した。結果として、殺藻効果を有する可能性がある細菌として11株得た。これらの細菌はプランクトンの驚異的な増殖抑制をする重要な因子であると考えられ、沿岸海域で発生する赤潮の死滅を急速に出来うるものと考えられる。

テーマ 酵母からの旨味調味料の製造

近年、酵素分解型の酵母エキスは食品業界で特に注目されている。また、酵素分解型酵母エキスは種々の食品に利用する価値があるが、高品質のものは非常に高価であるため、我々は酵素分解型酵母エキスの製造を試みた最終的に現在市販されている標準的な酵母エキスを2種の酵素を使用する事で製造する事が出来た。しかも原価も安いものと考えられる。しかし酵母エキス業界のトップレベルの品質には劣り、この点を解決するために今後、2種の酵素の中の一つを再検討する必要がある。

テーマ コンブだし抽出残渣の有効利用 ～アルギン酸分解酵素を有する海洋微生物の検索～

7-1. 研究背景

未利用資源の有効利用と廃棄物処理のコスト削減のため、当社では醤油加工品製造時にでるコンブだし抽出残渣の有効利用を試みており、すでに抽出残渣中の成分のひとつであるアルギン酸が味噌（商品）袋裏面に析出するチロ

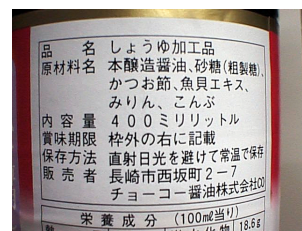


図1 昆布を利用した商品

ン針状結晶の析出防止効果を有する結果を得ている。しかしながら、コンブだし抽出残渣中のアルギン酸を効率良く、低コストでみそへ利用することは、既存の方法では困難である。そこで本研究では、コンブだし抽出残渣中のアルギン酸を高度に（高付加価値）利用するために、まずアルギン酸の生化学的分解法の開発と分解産物の活用を目指し、そのために長崎県内より採取された海洋微生物ライブラリーからアルギン酸分解酵素を産生する細菌のスクリーニングを行い、酵素の精製及びその酵素を用いた分解物の製造法の検討を行なった。昨年度の段階で、JST 長崎研究室に保存されている海洋微生物ライブラリー登録微生物のうち、1476 の細菌をスクリーニングした結果、27 菌株のアルギン酸分解酵素産生細菌が確認された。

7-2. 研究目的

見つかったアルギン酸分解細菌の中から、アルギン酸分解円の大きかった No.272（大村湾海底泥より分離）を用い、この菌の産出する酵素の精製及び性質の検討を行った。さらには、アルギン酸よりあらかじめ調製した PM（マンヌロン酸ポリマー）及び PG（グルロン酸ポリマー）を分解・分画した精製標品を得、それらのもつ生理活性（今回は、癌細胞の育成に対する影響）について検討を行い、生理活性物質の検索及びその物質の製造法を検討することを目的とした。

8.材料と方法

8.1. アルギン酸分解細菌

海洋微生物ライブラリー No.272（JST 長崎研究室）菌を用いた（表1）。

菌 No.	272	サンプリング日	1996年6月4日
		サンプリング地点	大村湾 32.53 N 裸島沖 129.49 E
選択1		選択2	
阻止円の大きさ	46mm	阻止円の大きさ	52mm
培養条件	20 7日	培養条件	18 7日
円の形状	二重円	円の形状	二重円



8.2. アルギン酸

当社で昆布より抽出したもの（コンブと表記）、及びナカライテクス株式会社製アルギン酸ナトリウム（1,000cps）を使用した。

8.3. アルギネートリアーゼ（アルギン酸分解酵素）の活性測定

基質（0.2%アルギン酸ナトリウムを含む 50mM リン酸バッファー、pH7.5）2ml を、30、10 分間プリインキュベートし、酵素溶液 0.2ml と混和した。酵素分解によって得られる二重結合の特異的吸収波長である 235nm の吸収を、酵素添加時から 45 秒後より 2 分間、30 秒毎に吸光度の上昇を測定した。その場合のブランクは水とした。1 分間に 0.100 吸光度が増加する酵素量を 1 unit とした（RAPID 法(1)）。

8.4. タンパク質の定量法

牛血清アルブミンを標準タンパク質として、Itzaki tand Gill のマイクロビュレット法(2)で行った。

8.5. 電気泳動法

8.5.1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGE は、Laemmli の方法(3)に従い、平板を用いたスラブ法で行った。濃縮ゲルは 5%、分離ゲルは 12%の濃度のものを使用した。イソプロピルアルコール 25%及、酢酸 10%、精製水 65%のものを染色液とし、脱色は 7%酢酸溶液中で行った。

8.5.2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Normal-PAGE）

泳動用緩衝液に、SDS を含まない点以外は、8.5.1. SDS-PAGE に準じて行った。

8.6. N 末端のアミノ酸配列分析

酵素溶液 30 μ l に、高純度蒸留水を加えウルトラフリーに入れ、10,000rpm で試料が 30 μ l になるまで遠心した。調製した試料を 120APTH アナライザー（Applied Biosystems 製）と連動したプロテインシーケンサー 477A（Applied Biosystems 製）に供し、各 PTH-アミノ酸を同定した。

8.7. ゲルろ過による分子量推定法

セファデックス G-100 を用いたカラムクロマトグラフィーに標準タンパク（Blue Dextran_{2,000}=Mr 2,000,000、RibonucleaseA=Mr 13,700、ChymotrypsinogenA=Mr 25,000、Ovalbumin=Mr 43,000、Bovine Serum Albumin=Mr 67,000）をかけ溶出させた。同条件で酵素タンパク質を溶出させ、標準タンパクにより作成した検量線より分子量を測定した。

8.8. 酵素消化物の細胞増殖判定法

8.8.1. 細胞

表 2 に示した正常ヒト胎児由来細胞およびヒト癌由来細胞を用いた。細胞は、10%牛胎児血清を含むイーグル MEM 培養液で培養した。

表2 使用した細胞

細胞名	由 来	細胞名	由 来
HE20	ヒト胎児由来細胞	SAOS2	ヒト骨肉腫
HE40	ヒト胎児由来細胞	H1299	ヒト肺腫瘍
HE49	ヒト胎児由来細胞	HeLa	ヒト子宮頸部
HT1090	ヒト線維肉腫		
RKO	ヒト大腸癌		

8.8.2 細胞増殖判定法

細胞の増殖度は、MTT アッセイ(ドージン WST-8)法でおこなった。この方法は、細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素がテトラゾリウムを容易に分解し、紫青色のフォルマザンを生成する活性を持ち、その活性が細胞数とよく相関することを利用した細胞増殖度判定法である(4)。各々の試験細胞を 103 細胞づつ 100ml の培養液とともに 96 ウエルプレートに植え込み 24 時間培養後、0, 50, 100 および 200mg/ml に調整したアルギン酸分解物を含む培養液 100ml を追加することによって最終処理濃度、0、25、50 および 100mg/ml で試験薬剤を処理した。48 時間処理後、ミトコンドリア脱水素酵素活性を測定するために、調整した WST-8 溶液を 10ml 追加し 37 で 2 時間培養した。反応終了後、0.1N HCl を 20ml を追加し反応を停止させた。生じた黄色フォルマザンを 600nm を対照にして 450nm の吸光度を測定し、ミトコンドリア脱水素酵素活性を測定した。

8.8.3. 酵素消化物

酵素消化物は、1mg/ml 濃度 PBS 溶液として用事調整し、使用濃度に応じて培養液で希釈して使用した。

9. 結果

9.1. 培養

今回用いた、大村湾海底泥由来の微生物 (No.272) を性質による分類を行なったところ (表 3)、アルテロモナス属 (*Alteromonas* sp.) であることが判明した。微生物の培地を検討したところ、Davis 培地 (0.2%アルギン酸、海水、pH8.0) において酵素活性の出現が顕著であった。図 2 のように、25 48 時間でその活性は最高となった。よって、培養条件を 25、48 時間とした。培地は、グルコースの代わりにアルギン酸ナトリウムを加え、海水を使用したことから硫酸マグネシウムを除いた組成を採用した (表 4)。また、前培養はもっとも菌の生育のよかった ZoBell2216E (pH7.5) をもちいた (図 3)。

表 3 . No.272菌の性質

試験項目	試験結果	試験項目	試験結果
形態	桿菌	4 での成育	+
グラム染色性	-	30 での成育	+
胞子	-	35 での成育	+
運動性	+	40 での成育	-
鞭毛	極単毛	硝酸塩の還元	-
酸素に対する態度	好気性	脱窒によるガスの生成	-
オキシダーゼ	+	デンプンの分解	+
カタラーゼ	+	資 化 性	+
		グルコース	
OF	0	ガラクトース	+
PHBの蓄積	-	フラクトース	+
-ヒドロキシ酪酸の利用能	-	シュークロース	+
Na+ 要求性	+	マルトース	+
塩 類 要 求 性	+	セロビオース	-
0%NaCl培地での成育			
1%NaCl培地での成育	-	メリビオース	+
海水培地での成育	-	コハク酸塩	-
リパーゼ	+	フマル酸塩	-
ゼラチンの液化	+	クエン酸塩	-
グルコースの資化性	+	L-スレオニン	-
メタノールの資化性	-	菌体内DNAのGC含量	41
		キノン系	Q-8

* HPLC法による

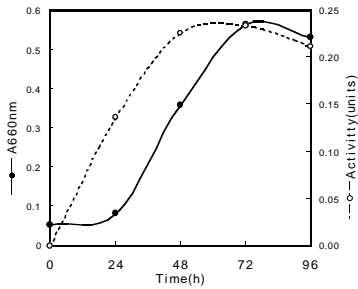


図2 Relationship between growth of *Alteromonas* sp. and alginate lyase activity. (Davis, sea water, pH8.0)

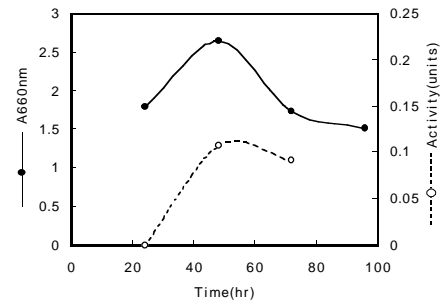


図3 Relationship between growth of *Alteromonas* sp. and alginate lyase activity. (ZoBell2216E, pH7.5)

表4 Composition of culture medium for a bacterium

Davis (sea water, pH8.0)	
K_2HPO_4	0.7%
KH_2PO_4	0.2%
$(NH_4)_2SO_4$	0.1%
$Na_3C_6H_5O_7$	0.05%
Alginate	0.2%

9.2. 酵素タンパクの精製

9.2.1. 粗酵素溶液の調製

得られた培養液を、遠心分離（6,000G, 20min）し菌体を取り除いた。除菌した培養液に100%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、4℃で1晩放置後、遠沈（6,000G, 20min）し目的タンパクを得た。透析により脱塩した後、限外ろ過濃縮し粗酵素溶液とした。

9.2.2. 陰イオン交換（バッチ法）

DEAE-セルロファインを用いた陰イオン交換を行った。粗酵素溶液は、粘度が高くカラムクロマトグラフィーが困難であったため、まず、バッチ法により行なった。50mM Tris 緩衝液（pH7.5）で平衡化しておいたイオン交換体に、試料を加え数分間攪拌後、約1時間静置し酵素タンパクを吸着させたあと、グラスフィルターに移し吸引ろ過を行った。ろ液の酵素活性が無くなるまで、NaCl 及び Tris 緩衝液の濃度を step wise にあげこの操作を繰り返し、酵素活性のある画分を集め、限外ろ過濃縮し試料とした。

9.2.3. 陰イオン交換（2nd）

得られた活性画分を透析濃縮後、DEAE-セルロファインによるカラムクロマトグラフィーを行なった。溶出は、0.1M Tris 緩衝液（pH6.5）で平衡化しておいたカラムに試料を加え吸着させた後、0.05M の NaCl 直線濃度勾配法により溶出させた（図4）。得られた活性画分を集め限外ろ過濃縮した。

9.2.4. セファデックス G-100 によるゲルろ過。

セファデックス G-100 を用いたカラムクロマトグラフィーを用い、先に DEAE-クロマトグラフィーで得た、酵素標品のゲルろ過を行なった（図5）。活性画分を集め限外ろ過濃縮した。

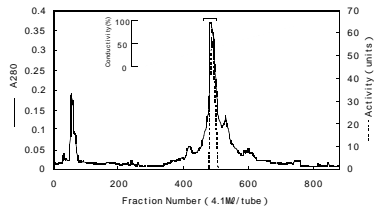


図4 2nd DEAE-Cellulofine column chromatography of the crude bacterial extracellular alginate lyase. column size: 2.5 x 52cm Lineargradient of sodiumchloride(0.05M) in 0.1M Trisbuffer(pH6.5)

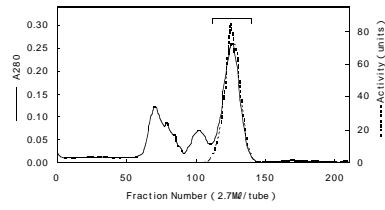


図5 Gelfiltration of the crude bacterial extracellular alginate lyase on Sephadex G-100 column. column size: 2.5 x 100cm flowrate: 5sec/drop

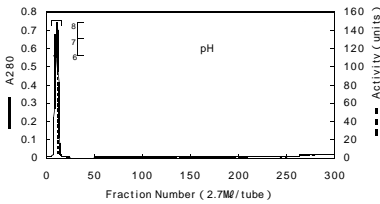


図6 CM-Cellulofine column chromatography of the crude bacterial extracellular alginate lyase. column size: 1.5 x 28cm Lineargradient of 20mM phosphatebuffer(pH6.0-8.0)

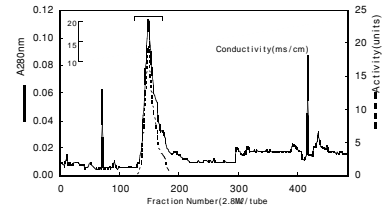


図7 3rd DEAE-Cellulofine column chromatography of the crude bacterial extracellular alginate lyase. column size: 1.5 x 41cm Lineargradient of sodiumchloride(0.1-3M) in 1.0M Trisbuffer(pH6.5)

9.2.5. 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

この活性画分をさらに、CM-セルロファインによる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにかけた。20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化しておいたカラムに、試料を加え、pH6.0-8.0 の pH 勾配をかけたが、活性は素通り画分にのみに認められた (図6)。活性画分を集め限外ろ過濃縮した。

9.2.6. 陰イオン交換 (3rd)

さらに、DEAE-セルロファインによるカラムクロマトグラフィーを行なった。溶出は 0.1-0.3 の NaCl 直線濃度勾配法により行った。活性画分を集め限外ろ過濃縮したものを酵素標品とした (図7)。

9.2.7. 精製工程要約

上記酵素精製の過程を図8に、精製時のタンパクの収率を表5に示した。総タンパク質量は、開始時の446.7mgから6.3mgとなり、最終段階での酵素の比活性は487.4units/mgであった。比活性は8.8倍となり、活性の回収率は12.4%であった。

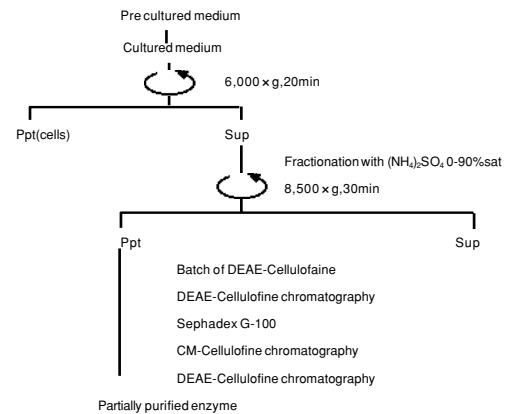


図8 Preparation of bacterial crude enzyme.

表5 Summary of purification of alginate lyase.

Step	Total vol	Total protein	protein	Specific activity	Total activity	Fold	Yield
(Ml)	(mg)	(mg/Ml)	(units/mg)	(units)	(%)		
Crude extract	Not determined						
100%(NH4)2SO4	85	446.7	5.26	55.5	24792	1	100
Batch of DEAE- Cellulofine	50	366.1	7.32	35	12801	0.63	51.6
2nd DEAE- Cellulofine	7	13.1	1.87	736.4	9660	13.27	39
Sephadex G-100	8.1	11.8	1.45	955.6	11239	17.22	45.3
CM- Cellulofine	2	10	4.98	556.6	5544	10.03	22.4
3rd DEAE- Cellulofine	3.5	6.3	1.81	487.4	3081	8.87	12.4

9.3. 酵素タンパク質の純度

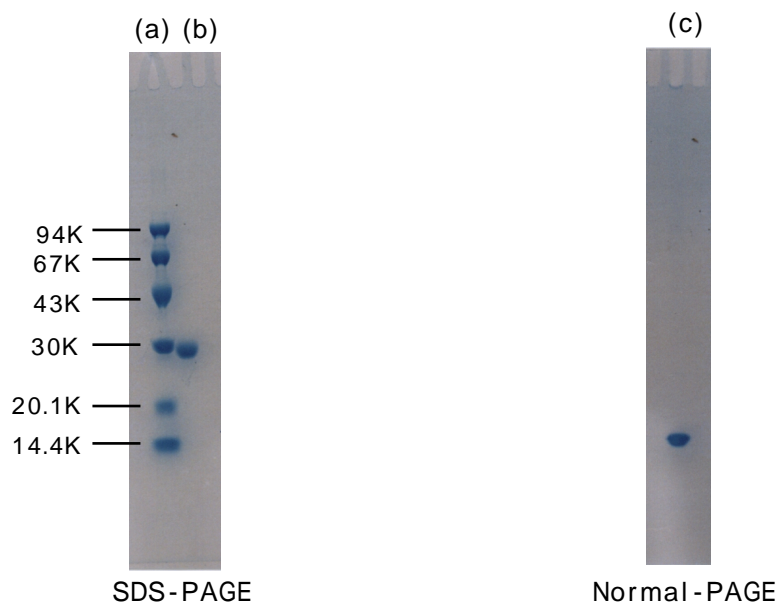


図9 Polyacrylamide gel electrophoresis of alginate lyase

SDS-PAGE (a) Standard proteins phosphorylase: 94,000
 bovine serum albumin: 67,000
 ovalbumin: 43,000
 carbonic anhydrase: 30,000
 trypsin inhibitor: 20,100
 -lactalbumin: 14,400
 (b) Alginate lyase
 Normal-PAGE (c) Alginate lyase

得られた酵素に対し、SDS 存在下並びに非存在下におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったところ、酵素のバンドはいずれの場合も1本となった(図9)。次に、酵素タンパクのアミノ酸1次配列を調べたところ、以下のN末端だけが認められた。

NGSQIPSTIT.....

よって、電気泳動的にもアミノ酸の配列からも、本酵素は高度に精製されたものであると考えられる。

9.4. 分子量

本酵素の分子量を、分子量既知のタンパク質をスタンダードとし、セファデックス G-100 を用い Whitaker の方法により測定したところ、本酵素の分子量は、溶出位置より約 25,000 と推定された(図10)。

9.5. 酵素の性質

本酵素は、30~70 の範囲で相対活性が高くなり、相対活性が最大となる60℃が至適温度であり(図11)、

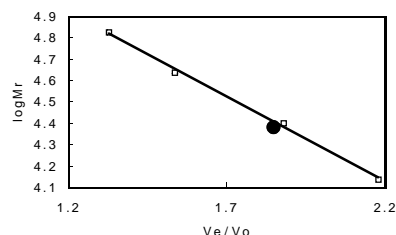


図10 Estimation of molecular weight of extracellular alginate lyase from *Alteromonas* sp.

さらに、40 付近まで安定であることから（図 12）、アルギン酸オリゴ糖の製造においては 30～40 付近で反応させるのが望ましく考えられる。また、本酵素は、pH6～9 付近で相対活性が高く、pH7.5～8 で最大となった（図 13）。よってその至適 pH は 7.5～8 であり、かつまた pH6～11 までの範囲で安定であるので（図 14）、菌の培養及び酵素の保存はその範囲の中で行なうことがよいと考えられる。

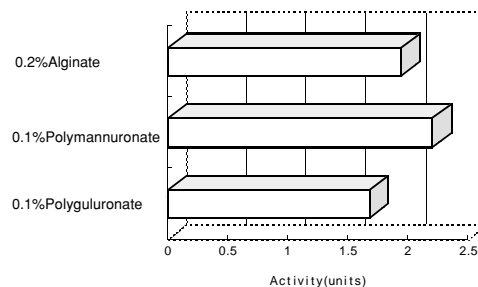


図 15 Reaction rate of extracellular alginate lyase from *Alteromonas sp.*

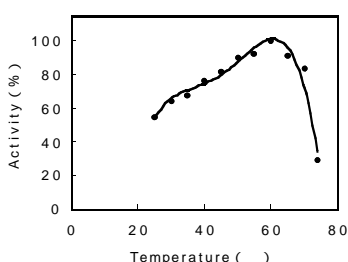


図 11 Effect of temperature on activity of extracellular alginate lyase from *Alteromonas sp.*

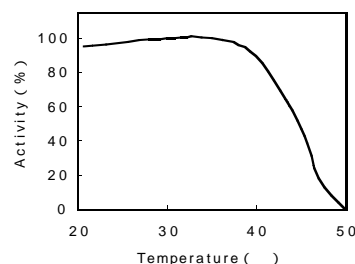


図 12 Thermal stability of extracellular alginate lyase from *Alteromonas sp.*

9.6. 酵素の基質特異性

本酵素は、図 15 のようにマンヌロン酸ポリマー及びグルロン酸ポリマーの両方にその活性を示した。また、本酵素は先にも述べたように、アミノ酸配列的にも電気泳動的にも単一のタンパク質と思われる。現在まで、アルギン酸分解酵素の基質特異性としてはマンヌロン酸またはグルロン酸のいずれかに活性があるという報告が多く、本酵素のようにマンヌロン酸ポリマー及びグルロン酸ポリマーの両方に活性を示す酵素の報告はほとんどされていない。よって本酵素は新規なアルギネートリアーゼである可能性が高い。

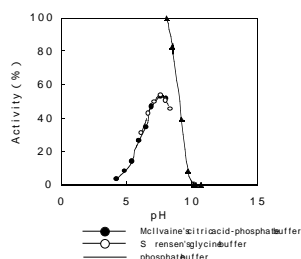


図 13 Effect of pH on activity of extracellular alginate lyase from *Alteromonas sp.*

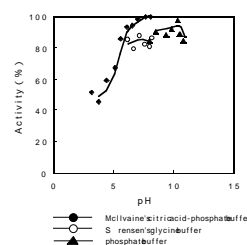


図 14 Effect of pH stability of extracellular alginate lyase from *Alteromonas sp.*

Haug らの方法 (図 1 6)
 であらかじめ調製しておいた、
 マンヌロン酸ポリマー (PM)
 及びグルロン酸ポリマー
 (PG) を以下の方法で酵素
 分解及び分画した。なおアル
 ギン酸については、今回は酵
 素分解のみ行った。

9.7.2. マンヌロン酸オリゴマ ーの調製

PM4g を溶解した 50mM
 のリン酸緩衝液 20ml に対し

12units の酵素を加え、30 で 3.5 時間反応させた後、さらに同量の酵素を加え合計で 5.5 時間反応させた。HCl を用い pH を 4.2 に調整し反応を止めた。その後中和 (pH7.0) し消化物を得た。消化物をバイオゲル P-6 を用いたカラムクロマトグラフィーにより分離した (図 1 7)。その際の移動相には、50mM リン酸緩衝液を用いた。得られた各画分のリン酸塩を除去するため純水を用いさらにバイオゲル P-6 を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。溶出パターンにおいて重なりが大きいと思われるものについては再度バイオゲル P-6 を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、マンヌロン酸オリゴマーの各画分を得た。凍結乾燥を行い標品とした。

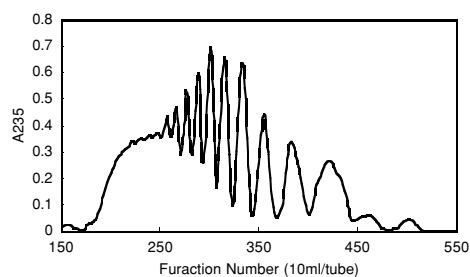
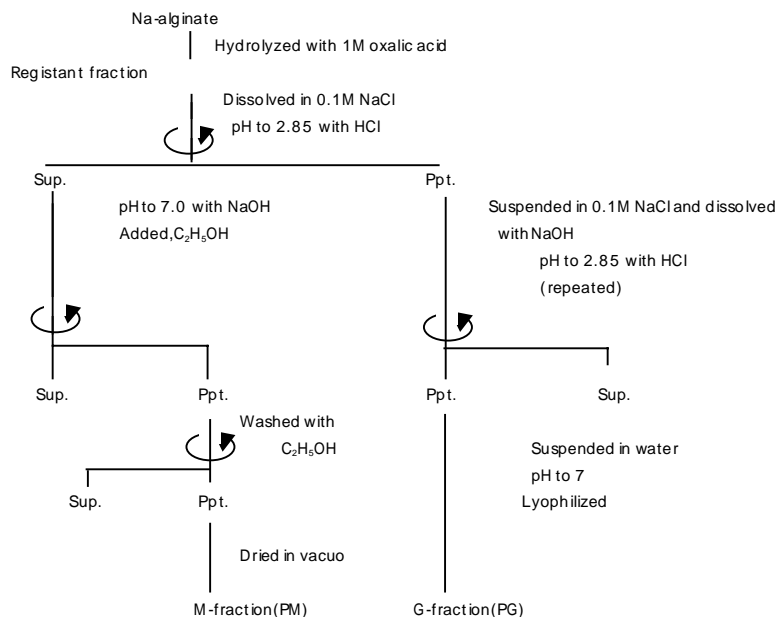


図 1 7 Gel filtration of enzymatic digests of PM on a Bio-Gel P-6 column.

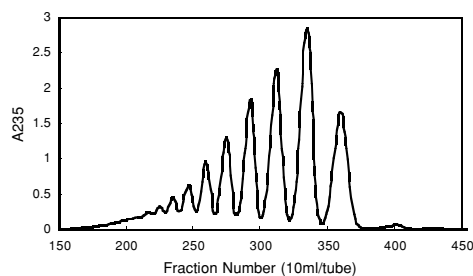


図 1 8 Gel filtration of enzymatic digests of PG on a Bio-Gel P-6 column.

9.7.3. グルロン酸オリゴマーの調製

PG4g を溶解した 50mM のリン酸緩衝液 20ml に対し 100units の酵素を加え、30 で 3 時間反応させた後、さらに同量の酵素を加え合計で 5 時間反応させた。HCl で中和後、上記操作によりグルロン酸オリゴマーを得た (図 1 8)。凍結乾燥を行い標品とした。

9.7.4. アルギン酸分解物の調製

コンブ中より抽出したアルギン酸 0.4g を溶解した 50mM のリン酸緩衝液 2ml に対し 27units の酵素を加え、30 で 2.5 時間反応させた後、さらに同量の酵素を加え合計で 5 時間反応させた。リン酸を除いた後、凍結乾燥を行った。

9.8. 各画分の分子量推定

9.7.で得られた、各画分の重合度を求めた。バイオゲル P-6 によるカラムクロマトグラフィーの溶出位置より、ガラクトン酸 (M1、G1 の溶出位置と一致) を基準として Whitaker の方法により分子量を測定し、各画分の重合度を決定した。表 6 に示すのは 4g の PM 及び PG より得られた、酵素消化物の収量である。

表6 Yields of enzymatic digests of alginate

DP	Mannuronate (mg)	Guluronate (mg)
1	0	0
2	0	6
3	29.6	65
4	7.8	81
5	5.8	51
6	23.4	88
7	43.7	73
8	53.9	76
9	163.7	61
10	123.4	243
11	421.6	

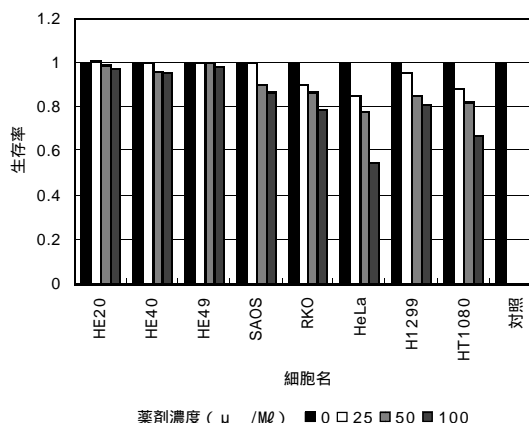


図 1 9 PM分解物 (混合物) の細胞増殖に与える影響

9.9. 分解物の生理活性の検索

次にアルギン酸分解物の生理活性の検索の一つとしてガン細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。正常ヒト細胞 3 種 ; HE20(ヒト正常胎児), HE40(ヒト正常胎児), HE49(ヒト正常胎児) および、ヒト癌細胞 6 種 ; SAOS2(ヒト骨肉腫), H1299(ヒト肺腫瘍), HeLa(ヒト子宮頸部), HT1090(ヒト線維肉腫), RKO(ヒト大腸癌)を用い MTT アッセイ(ドージン WST-8)法でその増殖度を見た。

PM 混合物の影響をを、図 1 9 に示した。

その結果、G4、G5、G6 および昆布抽出液に僅かながら(6-10%)、正常細胞に対する増殖促進作用が認められた。一方、アルギン酸、マンヌロン酸オリゴマーのデカマー以上の混合物、およびグルロン酸オリゴマー混合物には、癌細胞の増殖を 10-20%程度 (PM 混合物においては、HeLa 細胞に対して 100 μg/ml で 55%) 抑制する効果があることがわかった。同じ処理で正常細胞の増殖には、ほとんど影響しなかった。当初は、アルギン酸がヒト体内で非常に安定な物質であることから、高分子成分より比較的小さなユニットに生理活性成分が存在するのではないかと予想したが、驚くべきことにアルギン酸自体も、細胞の増殖を抑制する能力が備わっているようである。また、細胞増殖に対する影響という観点では、マンヌロン酸オリゴマーのほうがグルロン酸オリゴマーより生理活性が強い傾向が認められる。このことは、単球細胞における増殖因子 TNF、IL-1 あるいは IL-6 の活性化は、マンヌロン酸オリゴマーで処理された場合にのみ顕著に見られ、グルロン酸オリゴマーで処理された場合には、全く見られないという Espevik らの結果と一致する。本研究では、アルギン酸分解物の量が限られてたため、彼らの使用した濃度(0.5-1mg/ml)の 1/10 程度の濃度(0.025-0.1mg/ml)を使用した。48 時間処理で 10-25%以上の増殖抑制が見られたことから、処理条件を詳細に検討することによって制癌剤としての利用が十分に期待できるものと思われる。

10. 考察

以上のように、海洋微生物の産出する、アルギン酸分解酵素を精製し、酵素を用いたアルギン酸及び PM,PG の消化、分画及びアルギン酸の消化を試み、各重合度の消化物（オリゴマー）を得た。

得られたオリゴマーを用い、ヒト正常細胞及び癌細胞の成育に対する影響を調べたところ、一部にガン細胞の増殖を特異的に抑制する傾向が見られた。

現在の酵素精製過程は、実験的なものであり、その性質及び酵素タンパクを調べることを目的とした手法である。よって、実際の運用上（工業的）は現在の精製酵素ではなくとも十分に使用できることも考えられる。目的酵素の性質の決定作業とともに、実用酵素の開発（精製法）を検討していかなければならないであろう。

さらには、生理作用の検討を行い、目的生理作用物質（各オリゴマーの混在による相互作用も考えられる）が判明次第、その実用的な作成法を検討したい。

11. 今後の展開

今回行った実験では、癌細胞における増殖抑制の傾向が見られた。しかしながら、目的物質の分取が少量であったため、完全な実験が行えたわけではない。そこで今後は、酵素分解物をさらに調製し、その生理作用についての検証を行い、生理活性原因物質の特定を目標としたい。目的物質が特定できればその製造法についての検討を行いたい。（現在の方法は、均等にそれぞれの物質を得るために工程が複雑である）

また、酵素の精製についても、工業的には今回のようピュアな形でなくてもよいため、その精製度等について検討を行い、より実用的な酵素の製造法確立を目指したい。

12. 参考文献

- (1) T.Muramatsu, *Bull.Fac.Nagasaki Univ.*,40,35-38(1975)
- (2) R.F.Itazaki and D.M.Gill,;*Anal.Biochem.*,9,401(1964)
- (3) U.K.Laemmli, *Nature(London)*,227,685(1970)
- (4) M.Ishiyama, H.Tominaga, M.Shiga, K.Sakamoto,Y.Ohkura, K.Ueno, and M.Watanabe: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In Vitro Toxicology*, 8, 187-189, 1995.

テーマ 大豆煮汁の堆肥への有効利用

7-1. 研究背景

味噌は、麴原料（麦・米）を蒸して種麴をつけ麴にしたものと、煮てつぶした大豆、及び食塩を混合して発酵させた食品である。赤みそ（信州みそ等色の赤い味噌）では製品の特性上、大豆処理は「蒸し」工程で行われるが、淡色味噌（関西以西で製造されることが多い色が比較的白い味噌）では「煮る」工程で処理される。大豆を煮ることにより色の白い味噌ができるが、その蒸煮液は着色原因物質の糖及びタンパク等を含む濃厚な廃液となる。当社味噌工場においては、大豆煮汁は排水流入量としては、全体の 6～7%に過ぎないが、負荷量では全体の 75%以上を占める。よって他産業に比べ、水量の割に負荷が大きい特異な排水処理体系となり、その処理に関する設備及び費用も大きな負担となる。（水量に比べ負荷が大きいため、ばっき槽 MLSS を高くしなければならず、そのため酸素要求量が高いのでブローワーのための電気代がかかり、負荷量が多いのでそれにともない余剰汚泥が多くなり、廃棄物としての処理費用もかかる。また、これらの管理を行う人員も配置しなければならない。）

現在までこの大豆煮汁を処理する方法として、味噌用有用微生物の培地に使用する方法・嫌気発酵にて処理しメタンを生成する方法などが考案されてきた。しかしながら培地に使用する方法では使用量が発生量に対しかなり少なく、嫌気発酵は、初期投資にかなりの費用がかかり、臭気の管理、溶解無機物によるパイプ類への障害、分解しにくい成分が残ること、管理の不便による障害は回復にかなりの期間がかかる等問題が多くあった。

7-2. 研究目的

大豆煮汁には、未利用の糖及びたんぱく質が含まれており、このため腐敗しやすくなっている。今回は、酵母・乳酸菌の複合発酵法により、普通なら常温で 1 2 時間程度で腐敗し臭気が発生してしまう大豆煮汁を保存性を有する品質的に安定したものに換え、保存・運搬・散布に耐えるものとするを試み、さらにこれら（大豆煮汁には窒素 0.085%、リン 0.072%、カリ 0.25%が含まれる）の有効利用法として、液肥及び堆肥発酵時の消臭及び発酵補助剤としての可能性を模索した。

8. 材料と方法：

【試料】

大豆煮汁：当社でみそ製造中に発生する、大豆煮汁。

種菌：現在一般に流通しているケフィアから酵母乳酸菌を含む複合菌塊を分離し、YPG 培地で培養し、種菌とした。

金魚草：園芸店で市販されている、茎丈 20cm の苗を使用した。

小松菜：園芸店で市販されている、種子を使用した。

堆肥製造材料：本試験協力農家より入手した、豚糞及びもみ殻を使用した。【方法】

発酵試験：

オートクレイブで殺菌した大豆煮汁に種菌を 0.1%接種し 30 で培養を行い、発酵中の乳酸菌・酵母・一般細菌数及び pH の変化を測定した。

5 ・ 20 ・ 30 の温度で大豆煮汁を発酵させた。使用した煮汁は無殺菌のもので、種菌添加量は 0.1%であった。

無殺菌の煮汁に種菌を 1%及び 10%添加し室温 (20 ~ 30) にて発酵させた。

施肥試験：

大豆煮汁の NPK 比に良く似た NPK 比を持つ代表的な市販粉末肥料ハイポネックスを対照とし (それぞれの成分・施肥量は表 1 及び 2 に示す)、市販園芸用土を用い、茎ものの代表として金魚草を、葉ものの代表として小松菜をプランターに植え、定植後 2 週間目から 5 回に分けて 1 週間毎に大豆煮汁を与え、それぞれの土壌 pH の測定と金魚草の地表部全長の測定及び小松菜の地表露出部の重量を測定した。

表 1:成分比較

	N(%)	P2O5(%)	K2O(%)
ハイポネックス	6.5	6.0	19.0
大豆煮汁	0.0085	0.072	0.025

表 2:施肥量 (10 アールあたり)

N(kg)	P2O5(kg)	K2O(kg)	1 ポット
15	12.7	44.1	29.9 g
15	13.8	43.8	2.29 リッター

*プランター面積:65(cm) × 20(cm)=0.13(cm²)

ハイポネックスは、水を加えて煮汁と同容量とする。

堆肥化試験：表 3 の配合にて豚糞及びもみ殻を発酵させ堆肥とし、品温・水分・pH・揮発 NH₃ 量を測定した。品温は堆積堆肥頂上部より 30cm の深さの部位をアルコール温度計で、水分は keet 水分計で、pH は挿入式土壌 pH 計で、揮発アンモニアは堆肥 180 g を 4.2 リッターの容器 (底面積 200 cm²) の容器に入れ密閉し 10 分間 25 で放置後ヘッドスペースガスを北川式ガス検知管を用い測定した。

表 3：堆肥製造配合

	豚糞	もみがら	発酵大豆煮汁	水	総重量
対照堆肥区	22.5%	67.5%	0%	10.0%	0.67t
テスト堆肥区	22.5%	67.5%	10.0%	0%	0.67t

堆肥中の菌数測定は、細菌には YG 培地を、糸状菌にはローズベンガル培地を、放線菌には HV 寒天培地をそれぞれ使用した。

また、もみがらには発芽阻害するフェノール油が含まれるため、製造した堆肥の熟成度の判定法の一つとして発芽試験も同時に行った。試料を 10 倍希釈後ろ過し 60 3 時間殺菌を行い、ろ紙をしいたシャーレに 10 ml 入れその上に小松菜の種をまき、室温で 24 時間後の発芽率を測定した。

堆肥施肥試験

協力農家の畑より入手した土に、 で製造した堆肥を窒素が 15.6 kg/アールとなるように加えた。(堆肥・市販肥料の成分値及びそれぞれの施肥量は表 4 及び表 5 に示す。) 対照として市販化成肥料を用いた。堆肥と市販肥料は窒素量が同じとなるようにした他は、無調整で加えた。これをプランター (65×20×13cm) に入れ、小松菜の種をまいた。種は、1プランターあたり10ヶ所(2×5)になるようにし、1ヶ所あたり2粒の種をまき2週間後成育の良いほうを残し間引いた。全試験区の小松菜の平均丈が20cm以上になったところで収穫し、その重量を測定した。

表 4：堆肥及び市販肥料の成分

	N(%)	P2O5(%)	K2O(%)
市販化成肥料	8	8	8
対照堆肥	1	2.39	1.04
テスト堆肥	1	2.66	1.28

表 5：施肥量 (10 アールあたり)

	N(kg)	P2O5(kg)	K2O(kg)
市販化成肥料	15	15	15
対照堆肥	15	35.9	15.6
テスト堆肥	15	39.9	19.2

9.結果：

発酵試験

図 1 及び 2 の様に、培養液は菌接種とともに pH が減少し、27日経過時においても低く安定しており、腐敗による pH の上昇などは見受けられない。官能による評価においても、煮汁特有の豆臭と発酵による酸臭以外は感じられなかった。

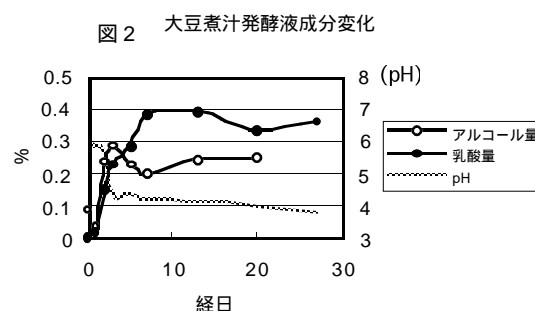
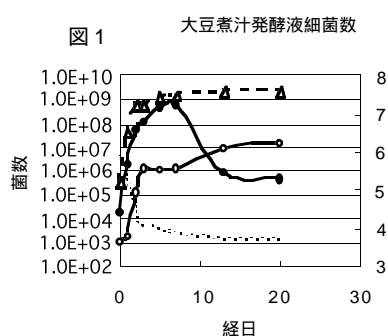


図 3 のように、5 区を除いて、pH が下降し発酵をしているのが解る。5 区は盛んな発酵は行われていないが、腐敗はないものと思われた。15日までは全区とも腐敗は見られない。官能による評価においても、各区とも異臭は感じられず、腐敗はなかった。しかしながら15日を過ぎた時点で30 区において急激な pH の上昇が見られ、官能による評価においても腐敗臭が感じられた。同様に20 区においても腐敗臭が感じられた。原因としては、初発菌添加量が少なかったためその他雑菌による汚染が早期に生じたものと思われる。

)無殺菌という条件で、種菌の添加量を増やした区分を設け発酵させた結果、図4の様に、1%区においても33日の時点でpHの上昇及び腐敗臭がない正常な発酵大豆煮汁液が得られ

図3 大豆煮汁pH変化 (温度による違い)

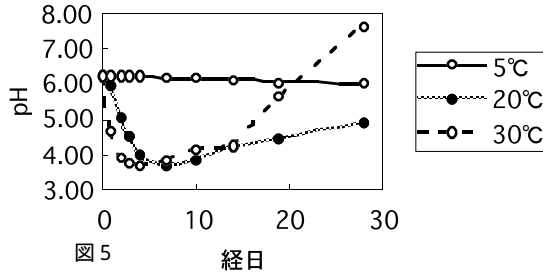


図5

図4 初発添加菌数の違いによるpHの変化

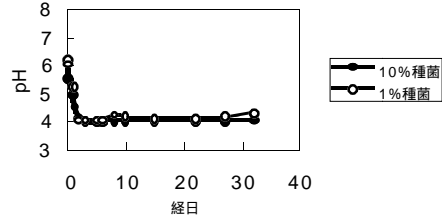
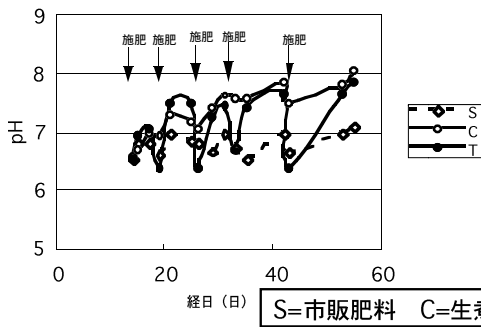
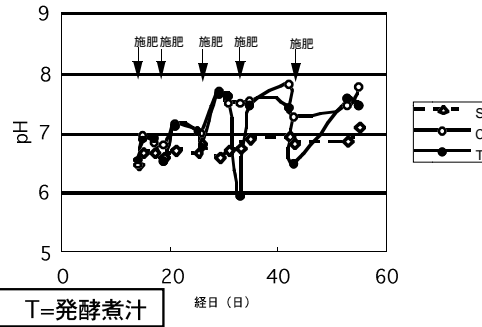


図6

金魚草土壌pHの変化



小松菜土壌pHの変化



た。以上の方法で通常1晩ほどで腐ってしまう大豆煮汁が、1カ月ほど保存可能となり、従来即日処理を行わなければならなかった大豆煮汁が貯蔵可能となり、また腐敗による異臭の心配もなくなった。

施肥試験：発酵大豆煮汁はそれ自体のpHが4前後と低いものであるが、図5及び6の様に土壌のpHは、施肥後一時的にpHが下がるものの、すぐに上昇し逆に市販粉末肥料区よりも高いものとなった。

図7の様に、金魚草の丈にておいては、市販肥料・生煮汁・発酵煮汁それぞれに目立った差はなかったものの葉の繁り方においては市販肥料区の方が優位であった。小松菜においては、市販肥料が圧倒的に大きくなり次いで発酵煮汁、生煮汁の順であった。(表7)

表7：小松菜収穫量調査

	市販肥料区	大豆煮汁(生)	発酵大豆煮汁
平均一株重量(g)	63	12	15

図7 金魚草の丈の変化

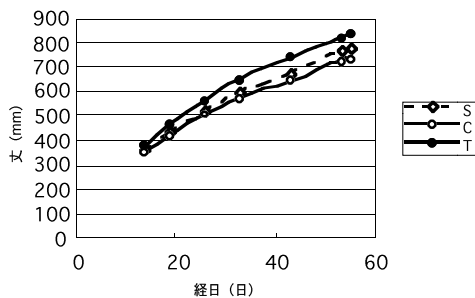
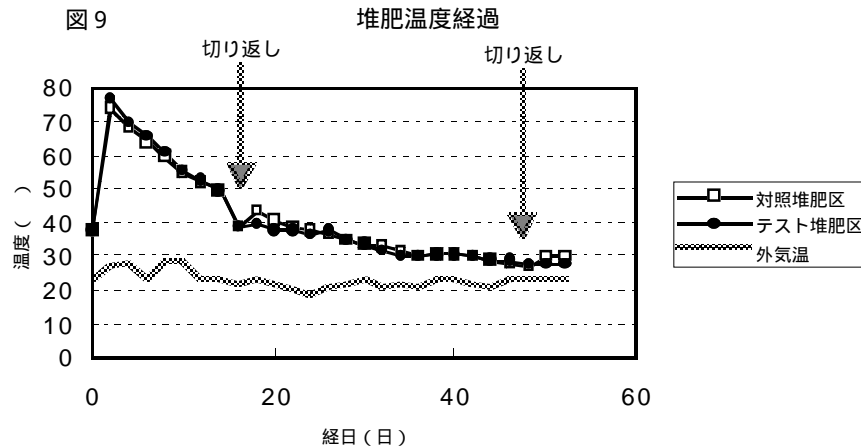


図8 小松菜栽培試験2 4週目

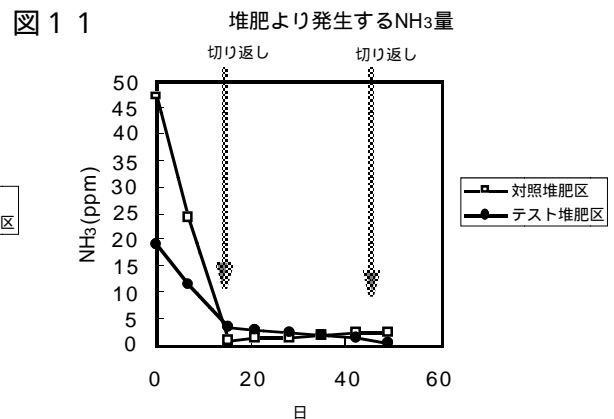
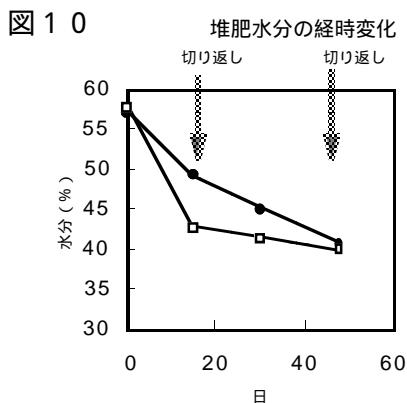


*平均一株重量は、30株(3プランター×10株)の平均値

発酵煮汁は、即効性の肥料ではないことから、収穫後再度小松菜の種を蒔き、試験を続行した。4週目の写真(図8)を見て分かるように種まき後の成育は大豆煮汁区の方が良かった事から、元肥としての可能性が示唆された。



堆肥化試験：堆肥の品温経過(図9)を見ると2~10日経過時においてテスト区が対象区よりもやや高い値を示している。また水分は、図10のように熟成初期においてテスト区が対



照区よりかなり低い値を示しており熟成初期の段階において発酵が活発であったことが伺われる。さらには、図11に示すように発酵初期のアンモニア揮発量もテスト区の方が少なく、15日目の官能においてもテスト区の方が悪臭がかなり少なかった。

表8の様に堆肥中の微生物は、高温・中温ともテスト堆肥の方が、細菌数が多かった。これは発酵大豆煮汁由来のものと思われ、この傾向は発酵終了時(51日目)においても変わらなかった。糸状菌・放線菌については、対照堆肥とテスト堆肥において、目立った差はなかった。堆肥原料に発酵大豆煮汁を加えることで、発酵大豆煮汁由来の有機酸等によるアンモニアの中和が行われ、発酵大豆煮汁由来の乳酸菌・酵母の働きにより高温消化に至るまでの期間に堆肥原料の腐敗を防ぐ効果があったため、堆肥製造中の臭いの低下作用があったものと推察される。

表 8：堆肥中の微生物

		初発		51日目	
		中温 (30 培養)	高温 (60 培養)	中温 (30 培養)	高温 (60 培養)
対照堆肥	細菌	3.5×10^7	3.8×10^5	2.0×10^7	4.5×10^5
	糸状菌	1.6×10^4	$< 10^2$	1.4×10^4	1.2×10^3
	放線菌	9.7×10^4	2.6×10^2	1.8×10^7	$< 10^2$
テスト堆肥	細菌	1.2×10^8	3.3×10^7	6.0×10^6	3.8×10^7
	糸状菌	2.3×10^5	$< 10^2$	9.0×10^5	$< 10^2$
	放線菌	1.3×10^4	1.8×10^3	8.7×10^6	$< 10^2$

また、堆肥が使用可能までに分解されているかを見るため、小松菜種子を用いた発芽試験を行ったところ、表9に示すようにテスト堆肥においては100%であり、対照堆肥の96%よりも良い結果を示しており、テスト堆肥の方が分解がやや進んでいると推察され、実際の使用に際し問題がないレベルまで分解が行われていると考えられる。

表 9：小松菜種子発芽試験

	対照区 (水)	対照堆肥		試験堆肥	
		発酵日数 0日	発酵日数 51日	発酵日数 0日	発酵日数 51日
発芽率(%)	100	29	96	57	100

堆肥施肥試験

小松菜栽培試験を行ったところ、試験区は市販肥料区に比べ成長が劣っていたものの、元来堆肥は元肥として使用されるため市販化成肥料のような即効性はないので、繰り返しの試験を行う必要がある。(図12及び表10)

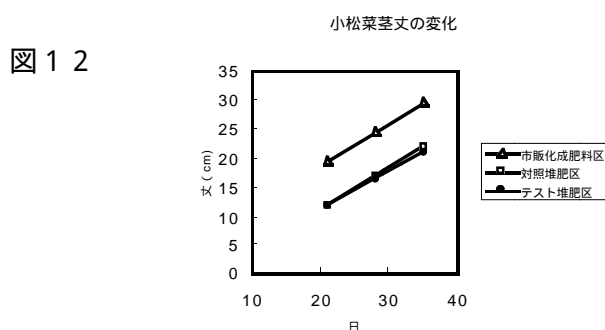


表 10：小松菜栽培 35 日後 1 株重量 (30 株の平均値)

市販	対照堆肥区	テスト堆肥区	化成肥料区
重量 (g)	25.7	11.4	11.5

10.考察

以上のように、味噌工場における排水負荷の最大の原因と言える大豆煮汁について、その有効利用を検討した。ケフィア由来の複合菌体により、通常1晩程度で腐敗してしまい多くの手間と経費をかけ処理を行っている大豆煮汁の常温における1カ月間の長期保存を可能とした。この発酵大豆煮汁は腐敗による臭気の恐れもなくなったことで、開放系である畑等への散布も可能となった。またこの方法は、発酵用のタンクのみで攪拌機も不要な状況で行えることから、設備費も低く、また発酵管理にもほとんど手間がかからないので、現在の工場にそのまま応用できることから経済的かつ有効な方法と言える。

また、発酵大豆煮汁自体を肥料として使用した試験からは、発酵大豆煮汁には即効性はないものの土壌の酸性解消、元肥としての効果などが本試験から示唆された。

さらに、この発酵大豆煮汁を発酵補助剤として堆肥製造時に加えた試験においては、発酵初期の減臭・発酵初期の水分発散の促進が認められた。これらの効果及びフェノール油などの分解を見る発芽試験の結果より、通常の製法に比べ、堆肥の製造期間を短く出来る可能性があると考えられる。今回の試験では堆肥の堆積量が0.67tと少ないため蓄熱が少なく、1回目の繰り返し直後には蓄熱の少なさから再度の温度上昇も少なく、水分・揮発性アンモニア等の成分的にも差が無くなってしまったものと思われる。また今回用いた堆肥原料には、すでに1日ほどたった豚糞を用いたため、すでにかかなりの量のアンモニアが発生してた。新鮮な原料には、アンモニアの量が今回用いたものに比べ少ないため、発酵大豆煮汁に含まれる酵母・乳酸菌による防腐効果も期待でき、更なる減臭効果も期待できるものと考えられる。

11.今後の展開

本研究で、発酵大豆煮汁の製造法はほぼ確立した。この大豆煮汁の安定的な需要を創造することで、大豆煮汁の処理かけていたエネルギー・人手・経費の節約ができ、さらには、大豆煮汁中に含まれる有機物のリサイクルも可能となるであろう。今後は、大豆煮汁の需要を創造するため、肥料としての効果及び堆肥化の試験を進めていくものとし、堆肥化については新鮮な原料段階からの散布の試験を行いたいと考える。

かつおだし抽出残渣の有効利用

7-1. 研究背景

近年、消費者の多用なニーズに答えるべく、「めんつゆ」に代表されるだしりの簡便調味料が非常に多く市場にでており、製造メーカーにおいては、それに伴うだし（かつお、こんぶ、しいたけ等）の使用量も著しく増加している。

これらのだし原料は主に煮出し法や抽出法によってほんの一部の成分しか利用されていないため、発生する産業廃棄物としての残渣の量もかなり多くなっている。また、産業廃棄物の処理についても、単にコストがかかるだけでなく、処理場不足等の深刻な問題を有しており、メーカーとしても何らかの対策を立てる必要があり、有効な利用法の開発が求められている。

7-2. 研究目的

だしを抽出した後のかつお節は、必要とされる旨味成分が溶出した後であるためにだし原料としての価値はなく、産業廃棄物として処理されているが、その残渣中には乾物換算でまだ90%ものタンパク質を含有しており、そのタンパク質を分子量の小さいペプチドあるいはアミノ酸にまで分解することができればアミノ酸系調味料として十分に利用できるものと考え研究を行った。

過去の研究において、分解方法として塩酸分解法、微生物を利用した分解法、市販酵素剤を用いた分解法の3通りの方法で試験を試みたが、塩酸分解法では高分解率を得ることができたものの、発がん性物質といわれるMCP（モノクロロプロパンジオール）等の副産物の発生が問題となるため対象外とした。また、微生物を利用した分解法では *Asp. Sojiae* を用いて、抽出酵素での分解あるいは直接菌体を接種・培養して分解を試みた結果、良好な結果を得たものの、その方法の煩雑さと設備の問題から実用化（プラント化）が困難なものであった。市販酵素剤を用いた分解では、方法や設備の面では一番実用化に適したものであったが、分解率がやや低いことと、最終製品が苦味を帯びるという欠点が残った。そこで今回は実用化を念頭におき、市販酵素剤での分解における2つの欠点を克服し、実用可能な方法の確立を目指した。

8. 材料と方法

供試原料となるかつおだし抽出残渣の成分の確認

かつお節とそのだし抽出残渣（以後かつお残渣）との成分の比較を行い、溶出成分とかつお残渣が含有する成分の確認を行った。

四訂日本食品標準成分表を参考に、かつお節の成分を確認したうえで、かつお節とのかつお節を熱水抽出処理したあとの残渣の両方について重量、タンパク質量を測定した。

なお、タンパク質量はセミマイクロケルダール法にて求めたTN量に6.25を乗して求め、乾物換算は105、24時間の乾燥により水分を求め算出した。

かつお残渣の前処理の検討

市販酵素剤での反応において、高可溶化率を得るために酵素との接触面積を増大させることを考え、かつお残渣の微粉碎化を行い、酵素反応後の可溶化率の比較を行った。また、同時にかつお残渣付着塩分の影響についても検討を行った。かつお残渣そのままのものと、水洗により付着塩分を除去したものを用意し、各々を乾燥後に、ミキサーに10秒程度かけて得られたものを荒粉碎物とし、40メッシュのふるいを通すまで何度もミキサーにかけて得られたものを微粉碎物とした。

酵素剤は、食品加工に用いられるプロテアーゼより、プロチンFN（大和化成社製）とフレーバーザイム（ノボノルディスク社製）を用いた。試験は各5g₁の原料にpH調製等含めて最終150mlになる水を加え、酵素剤をタンパク質g₁当たり2%になるよう添加し、50で振盪（130rpm）しながら3時間の酵素反応を行った。可溶化率は、供試かつお残渣の含有TN量に対して、得られた反応液中の総TN量から酵素剤持ち込みのTN量を差し引いたものの比（%）で表した。

苦味の官能評価

プロチンFNとフレーバーザイムを用いて分解を行った反応液について、TN濃度を0.5%に、塩分を1.0%にそろえた上で苦味の官能評価を行った。

（4）中規模試験（実用化の確認）

反応容器に5L容のジャーファメンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）を用いて中規模の分解試験を行った。

未洗浄・微粉碎のかつお残渣300g₁に対して3Lの水を加えて加熱処理（オートクレーブ121℃、5分）し、苛性ソーダにてpH7.0に調製した後、アルカラゼ2.4L（ノボノルディスク社製）を7.4g₁添加して50で2時間、再度pH7.0に調製後、フレーバーザイムを9.0g₁添加して50で40時間の反応を行った。

反応終了後、80で30分の加熱処理にて酵素を失活させ、遠心分離（8500rpm、5min）と濾紙濾過（No2、30cm）により反応液を回収し分析を行った。また、分解後の残渣は遠沈管と濾紙上より回収し乾燥後に重量を測定した。

9. 結果と考察

かつお残渣の成分

四訂日本食品標準成分表からわかるように、かつお節は乾燥品で水分が少ないこともあり100g₁中に77.1%のタンパク質を含有しており、乾物換算すると90.9%にもなる（表1）。このかつお節を熱水抽出に供すると、重量及び含有タンパク質ともに減少はするものの、まだその残渣中に乾物で90.7%ものタンパク質を含有していることがわかる（表2）。この含有量であれば分解手法に少々ロスが生じても十分な量のタンパク質を回収することが見込まれ、有効利用の価値があるものと判断できる。

表1 かつお節成分分析

食品名	水分 (g)	蛋白質	脂肪	炭水化物 糖質	繊維	灰分
かつお節	15.2	77.1	2.9	0.8	0	4

日本食品標準成分表より

表2 だし抽出による成分変化

	重量(乾物)	蛋白質
未使用かつお節	100.0 g	88.1 g
だし抽出後	83.6 g [-16.4 g]	75.8 g (90.7 g / 100 g) [-12.3 g]

かつお残渣前処理の検討

通常の弊社使用かつお節は 3cm×4cm 程度の大きさであるが(図1)、ミキサーでの荒粉砕によって 1 mm×3 mm程度の大きさになり、さらに微粉砕と設定したものは0.4 mm×0.4 mm程度にまでなり(図2)、重量あたりの表面積はかなり増大する。付着塩分の問題は、弊社のだし抽出工程において醤油中に浸漬するために生じる問題であるが、未洗浄の段階で約5%の付着であり、水洗によって約0.5%にまで減少していることがわかった。可溶化率については、荒粉砕と微粉砕の場合で明らかに差が生じており、微粉砕を行うことにより30%~60%も可溶化率がアップしており、しかもかつお残渣の洗浄の違いによる差はあっても、酵素間でのアップ率に差がないことから、微粉砕の前処理がタンパク質への酵素のアタックに好結果をもたらしていることがわかる。



図1 だし抽出残渣



図2 残渣粉砕物

この結果により、酵素剤利用における1つの欠点であった溶解率の低さをある程度カバーできたものと判断できる。

また、洗浄・未洗浄の違いについては、わずかであるが酵素間で差が確認され、フレーバライムがやや耐塩性に優れていると思われ、微粉砕物を使用した試験では未洗浄の場合でも洗浄の場合に比較して同等以上の可溶化率を示していることがわかる(表3)(表4)。

この結果は、酵素分解に供与するかつお残渣を洗浄せずに利用できるということであり、実用化を考えた場合に1工程減らすことが可能となったこの結果の意義は大きい。

表3 前処理別の可溶化率

	洗浄済		未洗浄	
	荒粉碎	微粉碎	荒粉碎	微粉碎
プロチン FN	63.5%	83.8%	50.2%	77.3%
フレーバーザイム	62.6%	80.6%	53.0%	83.5%

表4 可溶化率対比表

	微粉碎 / 荒粉碎		未洗浄 / 洗浄済	
	洗浄済	未洗浄	荒粉碎	微粉碎
プロチン FN	132%	154%	79%	92%
フレーバーザイム	129%	158%	85%	104%

苦味の官能評価

2種類の酵素剤での分解物を官能評価に供した結果、プロチンFNの分解物には苦味を感じたものの、フレーバーザイムの分解物にはほとんど苦味を感じることはなかった。この結果は使用した酵素剤の性質によるものと思われる。

そもそも本研究に使用したプロチンFNは、過去の研究の際に7種類の食品加工用プロテアーゼ剤で試験した中で一番結果が良かったことより使用したが、その際の選択基準はあくまでも高溶解率を目標に置いたために、エンド型プロテアーゼのみの試験となっており、プロチンFNもエンド型であった。

エンド型プロテアーゼの場合には、鎖状につながるポリペプチド内部のペプチド結合を切る作用を示し、たんぱく質を可溶化させるが、この場合に末端に疎水性のアミノ酸残基が存在する、ある大きさのペプチドが生成すると苦味を生じるといわれている。

一方、今回初めて使用したフレーバーザイムは、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼの複合酵素であり、エキソ型ペプチダーゼの場合にはポリペプチドの端からアミノ酸を切り取っていく作用を示すため、苦味ペプチドがN末端またはC末端から順次切断されて苦味発現に参与している疎水性アミノ酸が遊離し、苦味が減少しているものと考えられる。この結果より、エキソ型ペプチダーゼを含有するフレーバーザイムの利用によって酵素製剤使用時のもう一つの欠点である、苦味の生成を抑制することができるものと判断された。

中規模試験（実用化の確認）

試験結果は良好で、酵素分解が順調に進んでいる状況は、色調とかつお残渣の残存量から見た目にも判断できた（図3）。

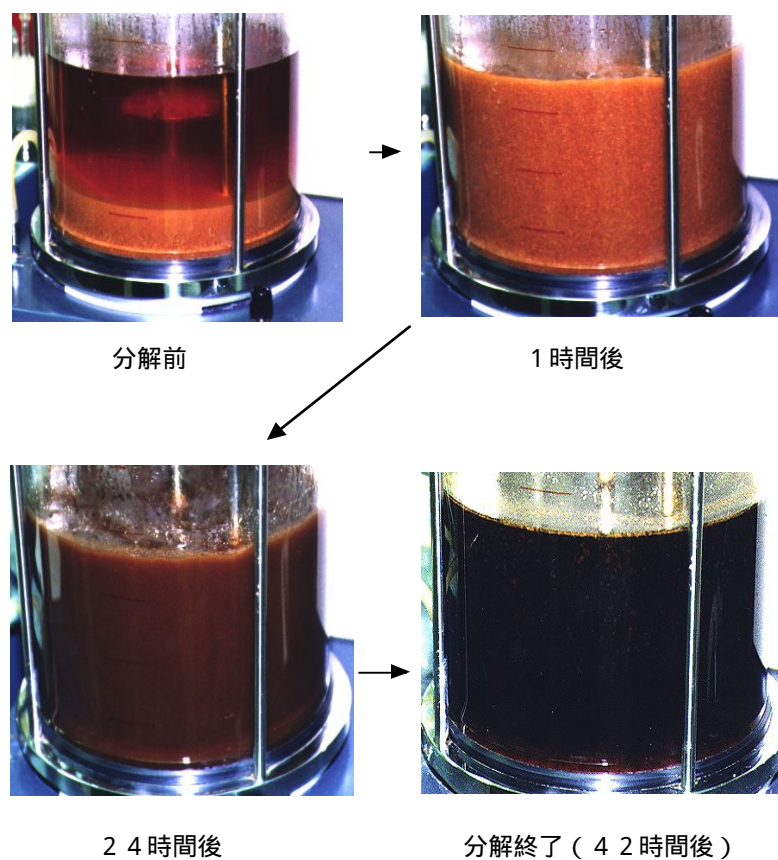


図3 かつお節の酵素分解

分析値的には、供試かつお残渣中のTN量 25.74 g_gから反応液中に 23.606 g_gを回収し、実に 90.3%もの可溶化率を得ることが出来た。さらに残渣量も乾物値で初発の 217.95 g_gが 42.20 g_gへと減少しており、その残存率はわずかに 19.4%であった。（表5）（表6）

表5 供試かつお残渣成分

水分	27.35 %
TN (タンパク質)	8.58 % (53.6 %)
塩分	4.91 %

表6 反応液分析

TN	0.74%
塩分	0.65%
pH	5.22
回収液量	3.19
TN可溶化率	90.3%
回収残渣(乾物)	42.2 g _g
残渣残存率	19.4%

官能的にも、苦味はなく旨味の強い調味料として良好なものであった。反応液をアミノ酸分析（PICO TAG 法）に供与し、その全アミノ酸と遊離アミノ酸の測定を行った結果、全アミノ酸量に対する遊離アミノ酸量の割合がかなり高く、ペプチドからアミノ酸への分解もかなり起こっており、エキソ型のペプチダーゼの効果が顕著に現れている。（表 7）特に疎水性アミノ酸であるロイシン・イソロイシン・フェニルアラニン等はかなりの遊離率を示しており、この点からも苦味の生成が抑制されていることが伺える結果であった。

表 7 反応液アミノ酸分析

A.A	全 AAmg%	遊離 AAmg%	遊離 / 全
ASP	302.19	118.50	0.39
GLU	299.85	252.63	0.84
SER	119.12	84.07	0.71
GLY	103.31	44.96	0.44
HIS	151.83	69.54	0.46
ARG	239.22	156.50	0.65
THR	165.51	122.45	0.74
ALA	183.72	102.51	0.56
PRO	119.11	38.11	0.32
NH3	60.38	459.15	7.60
TYR	350.12	235.01	0.67
VAL	140.16	79.30	0.57
MET	60.21	0	0
CYS	359.69	240.68	0.67
ILE	284.63	214.88	0.75
LEU	283.47	242.63	0.86
PHE	212.50	258.91	1.22
LYS	287.12	184.72	0.64
Total	3722.24	2904.55	0.78
(NH3 除去)	3661.86	2445.40	0.67

10. 考察

今回の研究で、かつお残渣のたんぱく質を高溶解率で利用でき、残渣量を減少させ、しかも官能上良好な風味を有する調味料として回収できるための前処理と使用酵素及びその反応条件等のある程度確立することができた。

11. 今後の展開

本方法はスケールアップが十分に可能なシステムであるので、分解についての詳細な条件設定と最終製品の評価を検討した上で小規模プラント化へ移行する予定である。

12. 参考文献

- 1) 杉山圭吉、江川 真、恩塚 博、大場健吉：日水誌、57(3),475-479(1991)
- 2) 下戸秀聡：食品と開発、31(2),20-22(1996)

殺藻効果を有する海洋微生物の検索

7-1. 研究背景

日本沿岸海域では過去に種々の赤潮の増殖により漁業生産は多大な被害を受けている。長崎県の大村湾でも 1965 年に赤潮によって 7 億 5 千万円の漁業被害を受けた報告がある。特に大村湾の赤潮原因プランクトンはギムノデイニウムが大半を占めている。しかしシャトネラによる漁業被害は 10 億単位の大きな被害であり、長崎県海域でも年間で数件の発生報告がなされている。

このように長崎県の大村湾は日本の海域でも特に閉鎖的な海域であり、赤潮が発生しやすい代表的な海域であることは赤潮を研究するものにとって周知の事実である。

一方、長崎県は全国的に観光都市であることをアピールし ” 観光都市・長崎 ” を目指している。特にハウステンボスやオランダ村などはテーマパークとして既に長崎の観光コースの一部に必ず入っているのが現状である。そのハウステンボスやオランダ村は大村湾に隣接しており大村湾の状態が観光客に与える長崎県の印象を左右する大きな要因の一つと言っても過言ではないものと思われる。また、実際に大村湾の水質基準が厳しくなったのも事実であり、イメージダウンにつながりかねない大村湾に発生する赤潮については充分検討するに値するものと判断される。

7-2. 研究目的

もともと海洋に生存している細菌を用いることにより海中での適応性は高いものと考えられ、海中での細菌の増殖による赤潮生育海域の環境変化、又は細菌が生成する酵素の赤潮へのアタックなどの生物的な方法で赤潮を死滅させることができないかと言う事を考え、赤潮を死滅又は抑制する微生物の検索を目的として試験を行なう事にした。

8. 材料と方法

材料 1) 使用した赤潮は長崎大学水産学部保有株であるシャトネラ (Chattonella) を株分けしてもらい保有することとした。シャトネラの特徴はラフィド藻綱 (緑色鞭毛藻類) に属し、日本近海で発生する赤潮原因プランクトンとして知られている。春から夏にかけて瀬戸内海から九州沿岸域を中心に大量発生し、秋から冬季に水温の低下とともに自然消滅するといわれている。

材料 2) 培養は弊社にて木製で内部に 60W の蛍光灯を 4 つ設置し外部にタイマーをつけて明暗サイクル可能な簡易赤潮培養装置を作成した。(図 1 及び図 2)

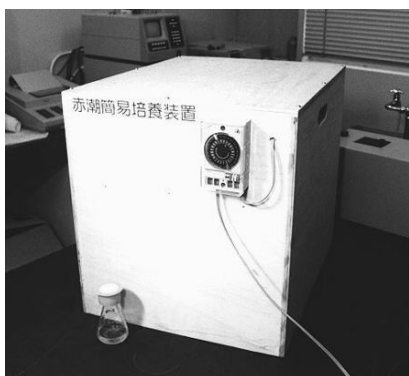


図 1

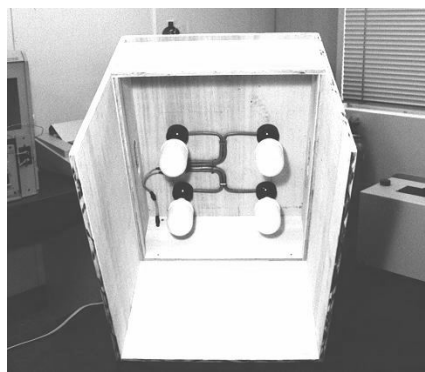


図 2

材料 3) 海洋微生物として使用した細菌は、9 月に長崎県下の沿岸海域においてポーラ化成 (株)、三菱長崎機工 (株) 及び弊社、の共同海洋サンプリングによって得た約 2000 種の細菌の一部を使用した。

方法 1) シャトネラの培養法

ESM 培地			
NaNO ₃	1 2 0 mg	K ₂ HPO ₄	5 mg
VitaminB ₁	1 0 0 mg	VitaminB ₁₂	1 0 μ g
Biotin	1 μ g	EDTA-Fe()	2 6 0 μ g
EDTA-Mn()	3 3 0 μ g	TRIS	1 g
seawater	1 0 0 0 Mℓ		PH 8.2

1 0 0 Mℓの三角フラスコに ESM 培地を約 60 Mℓ入れ、そこに 10³cells/Mℓ程度のシャトネラを継代し弊社作成の簡易赤潮培養装置で 25 ℃、照度約 1000Lux 以上、D:L=12h:12h の明暗サイクルで培養を行なうこととした。

方法 2) 細菌の 25 ℃での生育性選択法

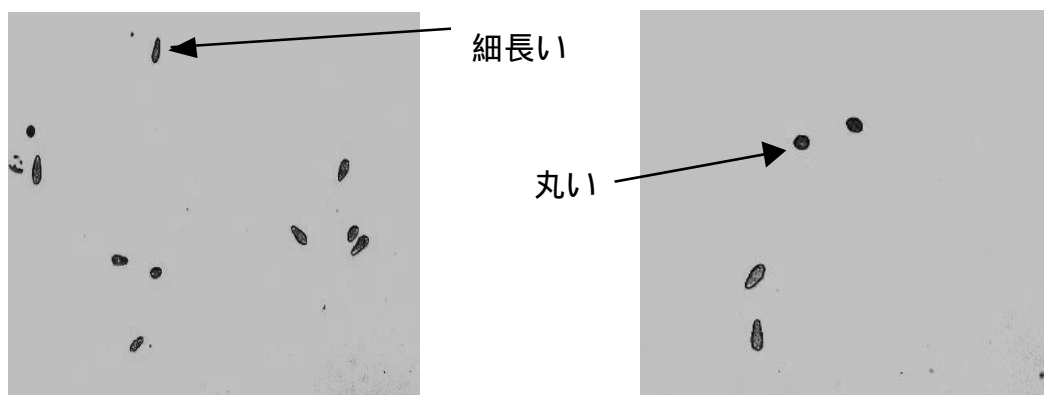
入手した細菌 1 白金耳を 2%グルコースを含む ESM 培地 4 Mℓが入った試験管に入れて 25 ℃で培養 5 日間行ない培養液の外観判定及び培養液の 1.8 倍希釈液の吸光度 660nm 値を測定し生育性を調べた。

方法 3) 細菌の殺藻性の確認法

方法 2.) で生育可能と判断した細菌について試験管に ESM 培地 3 Mℓに前培養したシャトネラ 1 Mℓと前培養した細菌 50 μ ℓを接種しシャトネラの培養条件下で 6 日間培養を行なった。培養終了後顕微鏡によるシャトネラの運動性、形態の観察、及び培養液の外観判定で殺藻性の有無を判断した。OD660nm 値も測定する。

9. 結果

結果 1.) 顕微鏡観察によりシャトネラ培養状態を観察した結果、図 3 及び図 4 に示すように培養前期の増殖期のものは細長い形状を示し、運動性は非常に良いものであった。培養後期の死滅期のものは形状が丸みを帯びてきて運動性が無くなっていた。



申 3 培予前期シャトネラ

申 4 培予後期シャトネラ

結果 2.) 25 培養後の培養希釈液の OD660nm 値で 0.020 を生育判定基準値とした。(グラフ 1 参照) さらに培養試験管の外観判定を行ない、これらの条件を満たすものとして最終的に 25 生育可能細菌を 28 株得た。(表 1 参照)

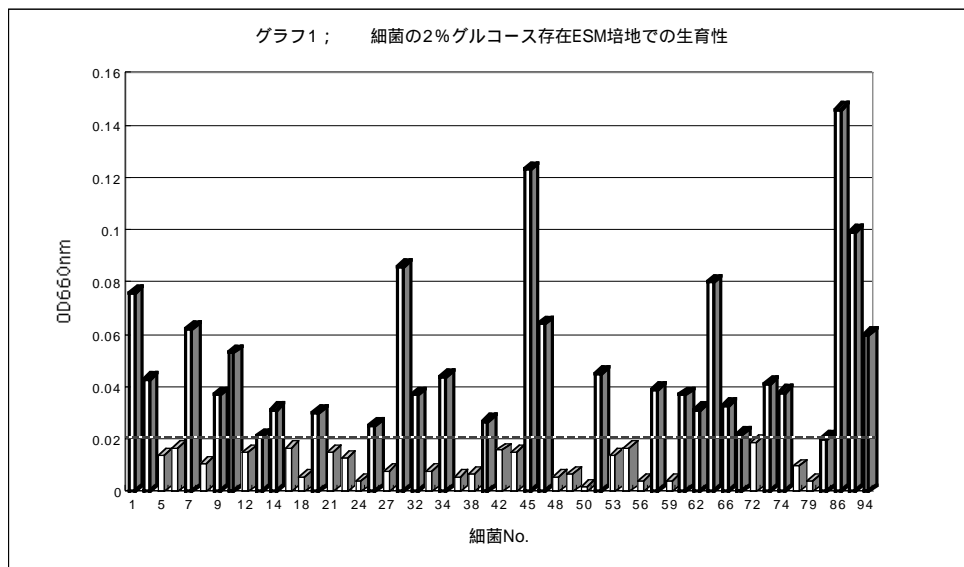


表 1 ; 細菌の 25 での生育性

; 生育可能 x ; 生育不可能							
	外観判定結果	OD660nm 値	25 での生育		外観判定結果	OD660nm 値	25 での生育
1		0.076		52		0.045	
3		0.043		53	x	0.014	x
5	x	0.014	x	54		0.017	x
6	x	0.017	x	56	x	0.004	x
7		0.062		57		0.039	
8	x	0.011	x	59	x	0.004	x
9		0.037		60		0.037	
11		0.053		62		0.031	
12	x	0.015	x	65		0.08	
13		0.021		66		0.033	
14		0.031		67	x	0.022	
15		0.017	x	72	x	0.019	x
18	x	0.006	x	73		0.041	
20		0.03		74		0.038	
21	x	0.015	x	77	x	0.01	x
23		0.013	x	79	x	0.004	x
24	x	0.004	x	84		0.02	
25		0.025		86		0.146	
27		0.008	x	88		0.099	
31		0.086		94		0.06	
32		0.037					
33	x	0.008	x				
34		0.044					
35	x	0.006	x				
38	x	0.007	x				
40		0.027					
42	x	0.016	x				
43		0.015	x				
45		0.123					
47		0.064					
48	x	0.006	x				
49	x	0.007	x				
50	x	0.002	x				

結果 3.) 培養終了後の顕微鏡写真及び外観写真は、図 5~9 の通りである。
 明らかにシャトネラの状態が違う事がわかる。



図5細菌中で生存しているシャトネラ

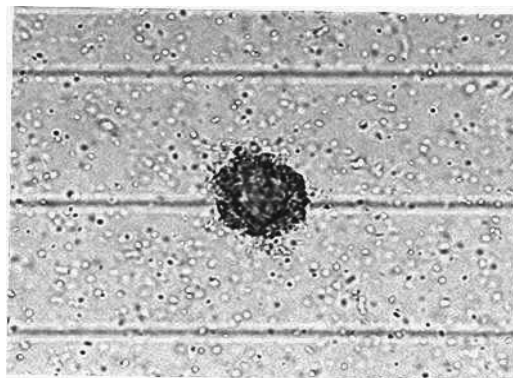


図6 細菌中で死滅しているシャトネラ

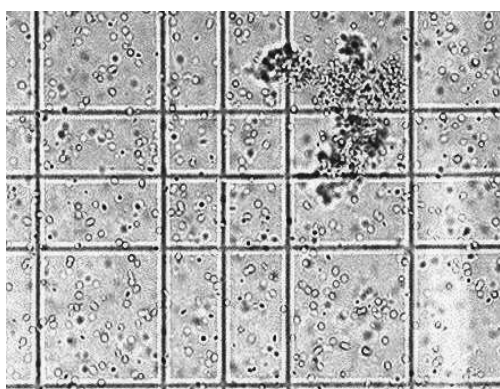


図7死滅して沈降しているシャトネラ

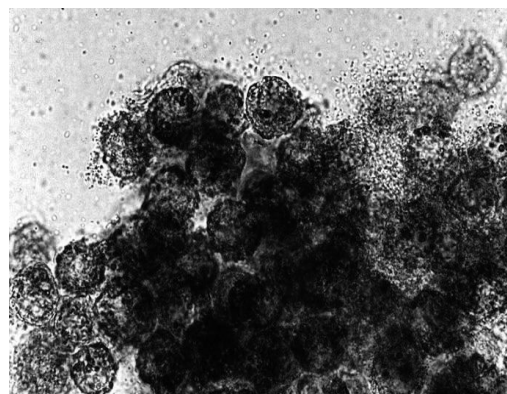
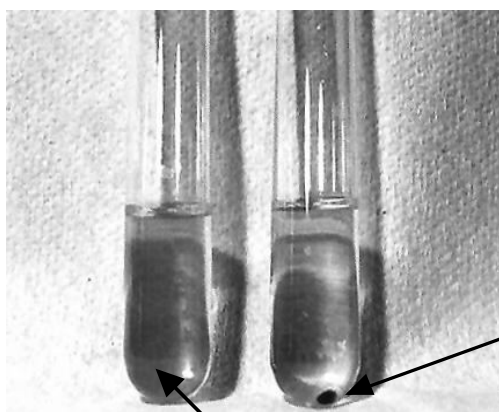


図8細菌のみが生育している状態
 (顕微鏡観察倍率400倍)

図9 試験管外観判定法



培養中で細菌により死滅沈降したシャトネラ

培養液中で生育しているシャトネラ

このように細菌混在下のシャトネラは外観判定及び顕微鏡観察により明確に生存の有無が確認される。また、培養希釈液の吸光度 660nm 値を測定したがこの濁度屠殺藻性の相関は得

られなかった。(グラフ 2) 結果としてこの条件下でシャトネラを死滅させる可能性のある細菌は 11 株であると判断した。(表 2)

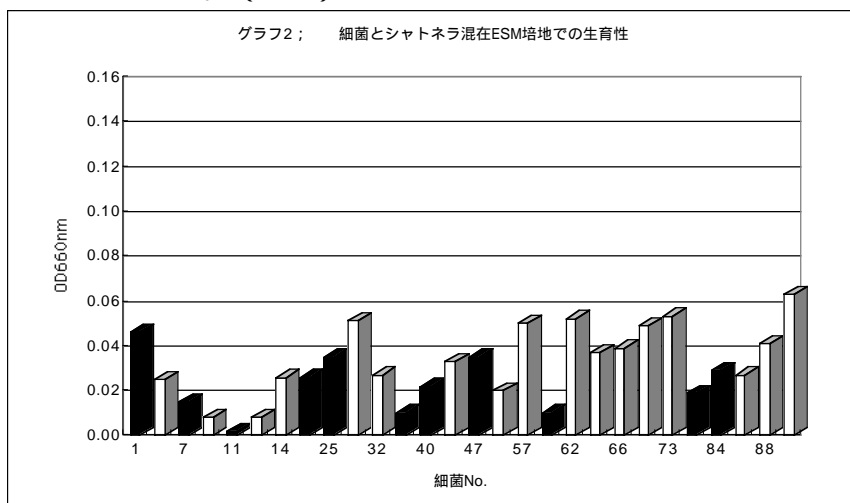


表 2 ; 細菌の 25 での生育性-2

; 生育可能 x ; 生育不可能

	(マリンアガー)	外観判定結果	Abs660nm 値	25 での生育
51	x	x	x	x
52			0.045	
53		x	0.014	x
54			0.017	x
55	x	x	x	x
56		x	0.004	x
57			0.039	
58	x	x	x	x
59		x	0.004	x
60			0.037	
61	x	x	x	x
62			0.031	
63	x	x	x	x
64	x		0.009	x
65			0.08	
66			0.033	
67		x	0.022	
68	x	x	x	x
69	x	x	x	x
70	x	x	x	x
71	x	x	x	x
72		x	0.019	x
73			0.041	
74			0.038	
75	x	x	x	x
76	x	x	x	x
77		x	0.01	x
78	x	x	x	x
79		x	0.004	x
80	x	x	x	x
81	x	x	x	x
82	x	x	x	x
83	x	x	x	x
84			0.02	
85	x	x	x	x
86			0.146	
87	x	x	x	x
88			0.099	
89	x	x	x	x
90	x	x	x	x
91	x	x	x	x
92	x	x	x	x
93	x	x	x	x
94			0.06	
95	x	x	x	x
96	x	x	x	x
97	x	x	x	x
98	x	x	x	x
99	x	x	x	x
100	x	x	x	x

10. 考察

本研究においてあくまでも試験管レベルでの殺藻性細菌を得ることに成功した。

特に今回対象としたシャトネラは一度発生した場合、ハマチを中心とした漁業被害が大きいことからこのような形で殺藻効果を有する細菌を検索出来たことは将来日本海域での赤潮による漁業被害や環境破壊を最小限に留める一つの生物的手法として非常に意義有るものと考えられる。

11. 今後の展開

この方法により今回他で構築した海洋微生物ライブラリーの全ての細菌について検索するとなかなりの殺藻性細菌が得られるものと考えられさらなる期待が持てる。しかしながら、自然海域では逆に藻類発育促進物質などが存在するという報告もなされており、この点をクリアして実際に赤潮発生海域での殺藻効果を得る為にも本方法での細菌の殺藻機構の解明が今後の検討検討課題である。

12. 参考文献

I.Imai (1993) killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp,isolated from the coastal sea of Japan. *Marine Biology* 116,527-532.

酵母からの旨味調味料の製造

6. 研究背景

分解型天然調味料には分解法によって大きく塩酸分解型と酵素分解型に分けられる。天然調味料の中の酵母エキスは肉様フレーバーや呈味バランスが評価されスープ類やレトルト食品といったものみに使用されていたように使用範囲が限定されていた。しかし塩酸分解型の調味料は約20年前に発ガン性物質である MCP (モノクロロプロパンジオール) が副生されることが分かり、近年になって深刻な問題に発展し新聞にも掲載された。そこで食品としての安全性が消費者の間で大問題となった。これを機に酵素分解型の調味料が見直され酵母エキスや魚醤といったものがクローズアップされている。酵母エキスは以前は自己消化型が中心であったが、現在は菌体内に含まれない酵素を使用することで自己消化型では作り出せない新しい味、フレーバーを持った酵母エキスの製造が可能になった。しかも酵素分解では完全分解ではなくペプチドが残った状態であるため深味とコク味のある味が引き出せるのが特徴であり、不快臭をマスキングする効果も期待できる。酵母エキスの市場は大手ビール会社の新規参入などでまだ伸びが期待できるものである。しかも高旨味成分含有の酵母エキスや不快臭を低減させた酵母エキスが既に市販されている。しかし酵素分解型酵母エキスは評価の高いものは1kg当たり約4000円と高価であり、かなり原料コストの増加につながる為、自社での開発検討の余地があると考えられる。

7. 研究目的

原料コストを抑える事と培養のしやすさを考慮に入れ、過去に報告がない醤油酵母を使用した旨み成分高含有の酵素分解型酵母エキスの製造を目的とする。

8. 材料と方法

材料 1.) 使用した酵母は弊社保存の耐塩性酵母を弊社酵母培養用培地にて 250 の規模で 3 日間培養しその培養液を超遠心分離装置に供与し 12000RPM の条件下で集菌しそこで得た約 6 kg の耐塩性酵母を以後の試験に用いた。

材料 2.) 酵素剤は下記のものを使用した。

酵素剤 A;ヌクレアーゼ製剤(天野製薬株式会社)

酵素剤 B;プロテアーゼ製剤(大和化成株式会社)

酵素剤 C;溶菌酵素製剤(ケイ・アイ化成株式会社)

酵素剤 D;ヘミセルラーゼ製剤(新日本化学工業株式会社)

酵素剤 E;グルタミンナーゼ製剤(大和化成株式会社)

方法 1.) 各酵素剤の単品効果確認及び反応順番の検討

方法 2.) 酵素剤 A と酵素剤 B の効果再検討

方法 3.) 規模拡大及び酵素剤 B の使用量と反応時間の検討

方法 4.) 規模拡大における反応の再現性確認及び最終酵母エキスの分析

尚、核酸分析は HPLC にて SAX カラム、流量 2.0 ml/min、移動相 0.025M の KH₂PO₄ 溶液 PH3.18、検出は UV254nm で測定した。

一般成分は醤油試験法に準じて分析した。

【スキーム】

方法 1)

- * 酵母 10 g_に水 30 Mℓを加える
- * オートクレーブ処理
(121、20分)
- * 酵素処理
- * 加熱
- * 冷却
- * 酵素処理
- * 冷却
- * 遠心分離
(7500RPM、5分間、20)
- * 冷却
- * 水 10 Mℓ
- * 上澄液

方法 2)

- * 酵母 10 g_に水 30 Mℓを加える
- * オートクレーブ処理
(121、10分)
- * 酵素剤 A 処理 (70、2時間)
- * 加熱 (沸騰水中 5分間)
- * 冷却
- * 酵素剤 B 処理
(50・2時間、60・30分)
- * 加熱処理 (沸騰水中 5分間)
- * 遠心分離 (8500RPM、10分)
(流し込みに 5 Mℓの水)
- * 上澄をろ紙ろ過 (5 Mℓの水)

方法 3)

- * 醤油酵母 1.2 kgに水 3 加える。
- * オートクレーブ
(121、20分)
サンプル
- * 酵素剤 A 処理 (5 g_/500 Mℓ)
(70、17時間) サンプル
- * 加熱 (90、30分)
- * 冷却
- * 酵素剤 B 処理 (5 g_/500 Mℓ)
(45)
0時間・サンプル
3時間・サンプル
7時間・サンプル
24時間・サンプル
- * 加熱 (90、30分)
- * 冷却
- * 遠心分離 (8500RPM、10分)
- * 上澄液

方法 4)

- * 醤油酵母 1.5 kgに水 5 加える。
- * オートクレーブ処理
(121、20分)
- * 酵素剤 A 処理
(5 g_添加、70、16.5時間)
- * 加熱 (90、30分)
- * 冷却
- * 酵素剤 B 処理
(5 g_添加、45、任意時間)
- * 加熱 (90、30分)
- * 冷却
- * 遠心分離 (8500RPM、10分)
- * 上澄液

方法 1) の試験区分

試験区分	酵素処理	酵素処理
T-1	酵素剤 A	なし
T-2	酵素剤 B	なし
T-3	酵素剤 D	なし
T-4	酵素剤 B	酵素剤 A
T-5	酵素剤 C	酵素剤 A
T-6	酵素剤 A	酵素剤 B
T-7	酵素剤 A	酵素剤 E

方法 2) の試験区分

- ; 水抽出のみ
- ; オートクレーブ処理
- ; 加水後酵素剤 A 処理
- ; オートクレーブ処理後酵素剤 A 処理
- ; オートクレーブ処理後酵素剤 A 処理と酵素剤 B 処理

9.結果

結果 1) の 1

区分	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7
グルタミン酸	341.6	320.3	325.9	325.9	285.6	330.4	357.3
CMP	10.5	81.8	45.9	75.6	106.2	93.9	124.9
AMP	15.92	38.6	26.6	25.3	96.2	34.0	95.2
UMP	25.1	30.9	19.4	40.0	86.5	85.1	52.0
IMP	21.3	10.3	-	26.6	5.2	76.3	-
GMP	22.4	61.5	33.8	31.3	73.8	82.0	74.2
総核酸量	95.2	223.1	125.7	198.8	367.9	371.3	346.3

単位 : mg%

この結果より総核酸量が多い事より T-6 の反応が核酸収率が高い酵素剤の組み合わせと判断し以後酵素剤 A と酵素剤 B を以後の試験に供与した。尚、グルタミナーゼ製剤は効果がないと判断し以後、核酸成分中心に試験を行なう。

結果 1) の 2

酵素剤 A と B を使用するに当たって、それぞれの試験区分での核酸濃度、核酸抽出量、核酸抽出量増減を調べた結果を下に示す。

『濃度』

区分					
グルタミン酸 (mg%)	284.0	326.0	302.0	293.0	267.0
CMP (mg%)	62.6	89.3	195.9	244.7	185.2
AMP (mg%)	3.3	41.2	69.8	115.1	77.8
UMP (mg%)	11.6	15.0	24.4	35.1	45.5
IMP (mg%)	5.3	9.1	未測定	14.4	59.7
GMP (mg%)	5.6	16.0	62.8	96.2	92.0
回収液量 (Mℓ)	25.0	33.5	29.5	33.5	39.5

この結果より、回収液量が多い が有効であると判断する。

『抽出量』

区分	A	B	C	D	E
グルタミン酸 (mg)	71.0	109.2	89.1	98.2	105.5
CMP (mg)	15.6	29.9	57.8	82.0	73.2
AMP (mg)	0.8	13.8	20.6	38.6	30.7
UMP (mg)	2.9	5.0	7.2	11.8	18.0
IMP (mg)	1.3	3.0	0.0	4.8	23.6
GMP (mg)	1.4	5.4	18.5	32.2	36.3
総核酸量 (mg)	22.1	57.2	104.1	169.3	181.8

この結果より、総核酸量が多い E 区を以後の反応順番とする。

『抽出量増減』

反応	B D	D E
CMP (mg)	52.0	-8.8
AMP (mg)	24.8	-7.8
UMP (mg)	6.7	6.2
IMP (mg)	1.8	18.8
GMP (mg)	26.9	4.1
総核酸量 (mg)	112.2	12.4

試験区 B と D の比較で D 区は B 区の約 3 倍量の 5' 核酸を溶出し、オートクレーブ処理後のヌクレアーゼ処理が有効に作用していることが確認できた。試験区 D と E の比較で CMP、AMP の減少又 UMP、GMP、IMP の増加が確認される酵素反応的にはデアミナーゼによる作用であると考えられる。

また、この D から E 反応は旨みを呈する 5'IMP と 5'GMP を増加することから非常に有効な反応と判断する。

結果 3)

時間	0	1.5	2.5	4	5	7	10
CMP	370.8	313.5	265.5	220.6	202.4	146.8	131.3
AMP	420	238.9	163.8	98.3	72.8	34.7	22.7
UMP	417.6	425.2	416.7	410.3	409.6	381.9	352.5
IMP	15	154.8	179.2	204.9	208.2	187.7	168.1
GMP	363.7	305.2	246.1	200.9	171.3	118.8	86.4
総核酸量	1587.1	1437.6	1271.3	1135.0	1064.3	869.9	761
IMP+GMP	378.7	460	425.3	405.8	379.5	306.5	254.5

単位 : mg%

CMP は時間と共に減少。AMP は時間と共に激減。UMP は 5 時間までほぼ一定でその後減少するという事、IMP は時間と共に増加 (5 時間でほぼ max, 以後減少) GMP は時間と共に減少する事が確認された。この点については結果 2 と大幅に違う。これは試験規模を大きくした事で酵素剤 B 中に何らかのマイナスの作用をする物質の存在がクローズアップしたものである。

したがって、酵素剤 B 処理の時間は短時間 (最大 1.5 時間程度) が良いという判断がなされた。

結果 4)

時間	0	16.5	22.5	23.0	24.0	40.5
CMP	33.9	96.5	102.9	103.3	104.0	114.1
AMP	19.8	132.7	137.5	110.9	91.7	89.6
UMP	10.6	77.9	85.8	104.4	116.2	126.6
IMP	10.3	14.9	18.3	31.2	48.6	59.7
GMP	10.1	133.0	136.0	130.3	113.4	115.7

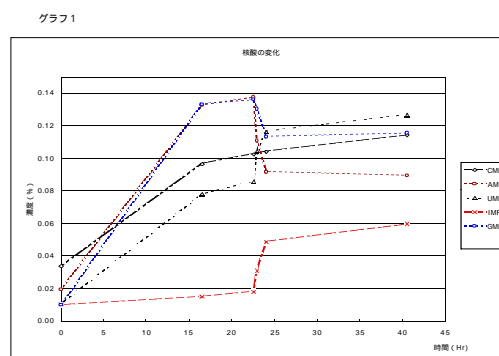
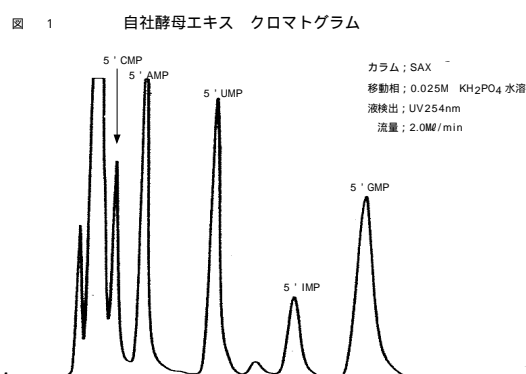
単位 : mg%

酵母エキス一般分析値

塩分	TN	エキス	IMP	GMP
1.04	0.45	7.28	0.047	0.082

単位 : %

試験 3) での酵素剤 B 反応時で GMP が減少するという現象は非常に再現性が高かった。また、この一連の反応系での各核酸の変化と最終的に得た酵母エキスのクロマトグラムをグラフ 1 とクロマトグラム 2 として別に添付する。

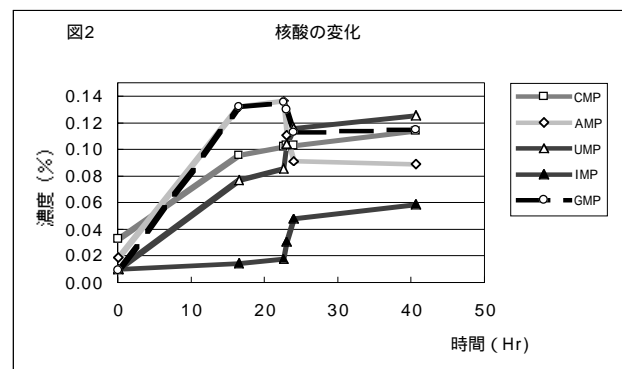
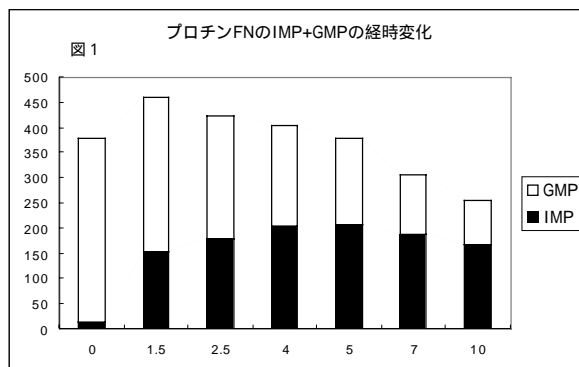


10.考察

本研究において2種の酵素剤を使用する事によって RNA を IMP、GMP、UMP、AMP、CMP といった5'系の各核酸に分解することが確認された。さらに IMP、GMP の含有量から判断して旨味調味料として酵母エキスを製造することができた。

特に今回製造した酵母エキスは醤油製造時に用いる耐塩性酵母を使用しているため 弊社において酵母エキスをプラント化にするにあたって原料としての酵母を培養する段階で空気中からの雑菌汚染の可能性が非常に低いものと考えられる。また、培養液作成段階で培養液の為に原料などを購入する必要も無く、弊社で酵母培養時に用いる生醤油を使用した培養液を使用することで原料原価が抑えられるメリットがある。

このように一般的には RNA 含有量がパン酵母やビール酵母と比較して醤油用耐塩性酵母は低いということで敬遠されがちであるが醤油製造業者がこの耐塩性酵母を使用して酵母エキスを製造することは原価的に非常にメリットがあるものと考えられる。一方内容成分は今回製造した酵母エキスは現在市場に出回っている標準的な酵母エキスと比較しても旨味成分の IMP、GMP の総和で勝っており評価としては全く遜色ない結果であると判断される。しかしながら現在市場の中で最も評価が高い酵母エキスはkg単価が高いが異常なまでの IMP、GMP の総和を示しており、この内容成分には現時点では劣る結果であることは認めざるを得ない。ところが価格を比較すると今回製造した酵母エキスは概算でkg当たり約 200 円台で、標準的な酵母エキスは平均してkg当たり約 500 円台の為、味の力価と価格を考慮しても充分安価で旨味成分を通常より多く含んだ酵母エキスの製造が目的通り可能であったという結果が得られた。今後トップレベルまで品質を向上させる為の検討策として考えられる点は次のように考えられる。



まず、今回製造した酵母エキスの図1と図2から未だ AMP の含量が多いという事である。これは有効な反応である AMP から旨味成分である IMP への変換が酵素的に行なわれて無いということである。(デアミナーゼ反応が行なわれていない)また、この反応が行なわれる酵素剤 B 処理では GMP の減少も確認されている。すなわち酵素剤 B 処理ではデアミナーゼ反応が完全に行なわれて無く、また GMP を分解するホスファターゼなどの存在が疑われる。したがってこの酵素剤 B に代わる酵素剤の収集及び検討が今後の課題と考えられる。

11.今後の展開

今回の実験により、酵母よりうま味成分が抽出できることがある程度わかった。今後実用化（自社製品への応用も含め）のための、原材料・手段・価格を詰めていくことにより、かなり良好なものの生産が可能と考えられる。自社内での資源の有効利用及び安全な製品の生産ということが今後企業にとって大切な課題となって行くと思われ、更なる実用化に向け、研究を行いたい。

Inquisition and research of biological function which convert unusable food-resource into food-material

Theme Utilization of sea tangle grounds

~Detection from sea-microorganism which have alginate-degrading enzyme~

Theme Utilization of soybean cooking drain for compost

Theme Effective use of extract refuse from dried bonito

Theme Screening of Marine Bacterium That have Algicidal effect

Theme Making Umami-Flavoring From Yeast.

(4) Shinjiro Hayashida¹, Eiji Hidaka¹, Hideo Katou,¹Hisataka Fukuda¹, Kazuhiko Shimokawa¹, Yuji Yonemura¹, Mika Yamashita¹, Yo Hanaoka¹, Satoshi Takeshita², Yoshiko Iwamoto³, Nobumitsu Miyanishi³, Tsuyoshi Muramatsu³, Katsumi Kubo⁴, Mana Miyakoda⁵, Kentarou Yamaguchi⁵ and Masami Watanabe⁵.

1;Choko-Shoyu-Miso-Coop,815,mizoriku-machi,Omura,Nagasaki856,Japan,

2;Laboratory of Cell and Stress Biology, JST at Nagasaki,2-1303-8, Ikeda, Omura, Nagasaki856, Japan

3;Division of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki852, Japan,

4;Materials Section, Technology Center of Nagasaki,2-1303-8, Ikeda, Omura, Nagasaki856, Japan,

5;長大薬放射

(5) 1995 ~ 1996

(6) Abstract

Theme

An enzyme was searched for degradation of alginate from *Laminaria* sp. The enzyme was purified from the cultured supernatant (No.272 strain) by ammonium sulfate precipitation, followed by anion-exchange chromatography, cation-exchange chromatography, and gel-filtration. Degradated products from polyguluronate ,

polymannuronate and alginate were fractionated by gel-filtration. Some cancer cells were treated with those products in vitro.

Theme

Soybean cooking drain amount to 5~6% of total drain from miso factories, but it is over 75% of whole drain-burden. The soybean cooking drain necessitate managing many facilities, hands and money. Utilization of soybean cooking drain is difficult for the character which soybean cooking drain tends to go bad. The microorganisms have which detection from Kfiel, have make the soybean cooking drain preservable, and then we research utilization of soybean cooking drain. The microorganisms were found to be make the soybean cooking drain preservative by adding over 1%. The result of our liquid fertilizer test, it is found that the character which fermentied soybean cooking drain are manure and acidity soil-improver. Bad smell fell by adding compost the fermentied soybean cooking drain.

Theme

Our factory produces a great deal of extract refuse from dried bonito. Now we have been disposing of them for a factory waste, but the refuse contains a protein of 90% (per dry weight). So we planned effective use as a hydrolysates prepared, and examined by various methods. In an ordinary way using commercial enzyme is indicative of low solubility and bitterness. Problem of low solubility was improved by micro smash refuse. Problem of bitterness was improved by using the exo peptidase.

As the result of these examination, we have acquired the enzymatic hydrolysis of bonito refuse, which had not bitterness.

Theme

We have been caught fishery damages in the Japanese coastal sea. Red tide researcher recognize Oumura Bay with sea area that is easy to occur red tide. Then, we investigated marine bacteria that kill or restrain the noxious red tide *Chattonella antiqua*. Marine bacteria were screened from Nagasaki coastal sea. Some of them may have a algicidal activity. Resultry we screened that of eleven kinds. We suggest that this characteristic bacterium may be a significant factor influencing the population dynamics of phytoplankton, and potentially might accout for rapid termination of red tides in the coastal sea.

Theme

Recently, we pay attention to yeast flavoring resolved enzyme of natural flavorings in foods industry. That is worth while use for any foods. But, that is very expensive to use for normal foods. Then we examined the making yeast flavoring resolved

enzyme .we proved that standard yeast flavoring resolved enzyme made by two enzymes and cheaper than that of same quality. That have good taste contained high concentration of some nucleic acids. So,we think much of this ingredient and cost merit.But this yeast flavoring is made room for improvement to get up to high quality.After this , we need to improve one of two enzymes.