

目 次

酵素等による食品廃棄物等有効利用技術の開発

(主査：食品総合研究所応用微生物部長)

課題名	参画機関	研究期間	頁
食品廃棄物等を用いた機能性食品素材の開発	栃木、(株)仙波糖化工業、 宇都宮大学	10～15年度	1
マンナン含有食品廃棄物からのマンノオリゴ糖 生産技術の開発	秋田	14～15年度	8
食品産業副産物の高度利用による新規食品製造 技術の開発	愛知	14～15年度	15
酵母による食品廃油からの糖脂質生産技術の開 発	広島、福山大学、 丸善製薬	14～15年度	22
酵素による難分解性水産加工廃棄物の有効利用	熊本	14～15年度	29

事業名	先端技術等地域実用化研究促進事業（バイオテクノロジー実用化型）		
大課題名	酵素等による食品廃棄物等有効利用技術の開発		
課題名	食品廃棄物等を用いた機能性食品素材の開発		
研究機関名	栃木県産業技術センター 仙波糖化工業株式会社 宇都宮大学	研究期間	平成10～15年度

印は主査県

1. 研究目的

栃木県内では、食品製造企業の山芋加工廃棄物（約300トン/年）、イチゴ加工廃棄物（20～30トン）、清酒製造企業の酒米精米工程での副産物である白ヌカ（2000トン/年）の処理に苦慮しており、その有効利用が課題となっている。また、これらの廃棄部位には、活性酸素消去能、抗酸化性等の機能性を有する成分を含有する可能性が高い。

そこで、活性酸素消去能、抗酸化性、抗アレルギー活性など数種の機能性評価法により、食品関連廃棄物の機能性を探索・評価するとともに、微生物等を用いた機能性等の強化を行い、機能性食品素材を開発する。

2. 研究内容

1) 活性酸素消去能の評価

- (1) 各種農産・食品廃棄物の消去能の評価（栃木県、平成10年度）
- (2) 動物培養細胞等を用いた活性酸素消去能の評価（宇都宮大学、平成10～12年度）

2) 酵素および微生物利用による活性酸素消去能等の強化技術の開発

- (1) 食品廃棄物中の活性酸素消去物質等の含有量の把握（平成10・11年度）
- (2) 酵素および微生物利用による食品廃棄物の活性酸素消去能の向上（平成11・12年度）

3) 活性酸素消去能等を高めた食品廃棄物の食品素材化及び利用技術の開発

- (1) 食品廃棄物の食品素材化技術の開発（仙波糖化工業株式会社、平成10～12年度）
- (2) 開発素材の各種食品への利用技術の開発（栃木県・仙波糖化工業株式会社、平成12年度）

4) 食品廃棄物等の機能性評価

- (1) 食品廃棄物等からの機能性の検索（栃木県、平成13年度）
- (2) 機能性の評価方法の確立（宇都宮大学、平成13～15年度）

5) 酵素等を利用した機能性の強化

- (1) 食品廃棄物等からの機能性成分等の含有量の把握（栃木県、平成13・14年度）
- (2) 酵素等を利用した機能性の強化（栃木県、平成14年度）

6) 食品廃棄物等の素材化及び利用技術の開発

- (1) 食品廃棄物等の素材化技術の開発（仙波糖化工業株式会社、平成13～15年度）
- (2) 開発素材の各種食品への利用技術（栃木県・仙波糖化工業株式会社、平成15年度）

3. 達成目標

1) イチゴ加工廃棄物および山芋加工廃棄物（表皮）等について、活性酸素消去能、抗酸化性、抗アレルギー活性、ピフィズス菌増殖因子などの機能性（成分）を把握し、酵素・微生物（麹菌）を用い機能性の強化技術を確立する。

2) 食品素材化技術を確立し、各種食品への利用法を確立する。

4. 研究開発結果の概要

1) 活性酸素消去能の評価

(1) 各種農産・食品廃棄物の消去能の評価(栃木県)

県内で発生する農産・食品廃棄物等約90点を収集し、ESR法によるSOD(スーパーオキシドディスムターゼ)様活性を中心とする活性酸素消去活性およびDPPHラジカル消去活性を指標として、活性の高いイチゴのへた及びオクラを選抜した。イチゴのへたはジャム等に加工する際に果梗を含んで約10%発生し、県内では数十トンになる。部位別では、へたおよび植物体のポリフェノール含量および活性が高いことが分かった(図1)。また、オクラは大きくて市場性の低いものを対象とし、部位別では未熟種子のポリフェノール含量が高いことが分かった。

(2) 動物培養細胞等を用いた活性酸素消去能の評価(宇都宮大学)

イチゴのへたDMSO抽出物、オクラ70%メタノール抽出物のポリアミドC-200カラム分画物についてヒト大腸ガン由来細胞株Caco-2、ヒト肝ガン由来細胞株Hep G2、マウス肝ガン由来細胞株Hepal1c7を用い、活性酸素消去作用を評価した。イチゴのへたはHep G2細胞でメナジオン(スーパーオキシドアニオンラジカルを発生)毒性からの回復効果を示した(図2)。また、オクラはHep G2、Hepal1c7細胞においてメナジオン毒性の抑制効果を示し、75%メタノール溶出画分の活性が強かった。また、イチゴのへた熱水抽出凍結乾燥粉末を添加したいちごワインについて消去作用を評価し、Caco-2細胞における過酸化脂質毒性およびHep G2細胞におけるメナジオン毒性の抑制効果が認められた。

2) 酵素および微生物利用による活性酸素消去能等の強化技術の開発(栃木県)

イチゴのへたの熱水抽出液を及びα-グルコシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ処理すると、α-グルコシダーゼ処理によりSOD様活性の上昇がみられた(図3)。また、市販のセルラーゼ系製剤による酵素処理により、イチゴのへたでは抽出ポリフェノール量が増加し、最も効果のあったスミチームACではSOD様活性が約12%増加した。オクラについては酵素処理の効果がほとんどみられなかった。

一方、イチゴのへたの渋味低減を図るために、熱水抽出液にタンナーゼ処理を行い、官能評価をおこなったところ9名中8名が渋味の減少を認めた。へたのポリフェノール成分としてはエピカテキンガレート、エピガロカテキンのほか数種のカテキン類が検出され、タンナーゼ処理により没食子酸の増加がみられたが、SOD様活性に変化はみられなかった。

3) 活性酸素消去能等を高めた食品廃棄物の食品素材化及び利用技術の開発

(1) 食品廃棄物の食品素材化技術の開発(仙波糖化工業株式会社)

栃木県での検索の結果、活性酸素消去能の高いオクラについて素材化の検討をおこなった。オクラは通常流通している生鮮物は80mm程度であるが、本研究では長さ130~140mmの市場性が低いものを対象とした。加熱処理による収量低下を抑え、十分な殺菌おこなうためには、100℃1分処理が有効であった。また、乾燥粉碎後に退色や風味の経時変化があったので、トレハロースを助剤として用いたところ、色・風味の変化が抑制できた。また、脱酸素剤の使用により、さらに品質変化が抑えられた。

活性酸素消去能の高いイチゴのへたについて、錠剤化など全量利用を念頭におき、凍結乾燥した果実とへたの混合による色調への影響とSOD様活性の変化を調べた。イチゴ果肉に対して消去能を5倍に強化する場合、等量の混合が必要であった。また、水、熱水(80℃)、70%エタノールによるポリフェノール成分の抽出効果について検討し、熱水抽出が色調変化も少なく、十分な抽出効果が得られることがわかったので、熱水抽出粉末を試作し(表1)果実乾燥粉末への添加をおこなったところ、色調変化が抑えられた。

(2) 開発素材の各種食品への利用技術の開発(栃木県・仙波糖化工業株式会社)

イチゴのへたの凍結乾燥粉末、熱水抽出凍結乾燥粉末およびオクラ粉末等を調製し、錠剤・いちごワイン・ジャム・そば等への利用を検討した。いちごワインにイチゴのへたの凍結乾燥粉末を添加することにより、ポリフェノール濃度の増加、活性酸素消去能、色調が向上し(表2)(+)-カテキン換算総ポリフェノールとして約300mg/100mlの添加までは香味も比較的良好であった。

オクラ粉末、イチゴのへた凍結乾燥粉末および熱水抽出粉末を調製し、打錠適性および呈味性を考慮して、イチゴのへた(イチゴのへた凍結乾燥粉末50%、イチゴパウダー10%、結晶セルロ

ース 20%,乳糖 6.7%,ステビア 0.3%,キシリトール 3%,シヨ糖脂肪酸エステル 10%)とオクラ(オクラ粉末 75%,結晶セルロース 20%,シヨ糖脂肪酸エステル 5%)打錠品およびそば等の試作をおこなった。

イチゴのへたおよびオクラ未熟種子等凍結乾燥粉末について、外部分析機関に依頼し、変異原性および単回経口投与による急性毒性試験(限度試験)を実施し、突然変異誘起性および毒性は認められず、プライマリーな安全性を確認した。

4) 食品廃棄物等の機能性評価

(1) 食品廃棄物等からの機能性の検索(栃木県)

山芋加工時に発生する表皮の、抗酸化性(α-カロチン退色法)、DPPH ラジカル消去活性 ACE 阻害活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性、抗血栓性(凝固阻害)を測定した結果、表皮部分は、可食部に比べて、抗酸化性、DPPH ラジカル消去活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性が高かった(表3, 図4)。また、山芋の皮を原料の一部としたカラメルについて、抗酸化性、DPPH ラジカル消去活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した結果、ヒアルロニダーゼ阻害活性はみられなかったが、抗酸化活性、DPPH ラジカル消去活性がみられた。

(2) 機能性の評価方法の確立(宇都宮大学)

大和芋及び長芋の表皮部および表皮を原料の一部としたカラメルについて α-グルコシダーゼ(血糖値上昇関連) α-グルクロニダーゼ(腸肝循環におけるグルクロン酸抱合体加水分解酵素)への影響を検討した結果、山芋表皮抽出物、カラメルとも阻害作用はみられなかった。また、ヒト肝培養細胞(Hep G2)におけるメナジオンによる酸化傷害軽減作用を調べた結果、大和芋及び長芋表皮抽出物で回復作用がみられ、長芋表皮を添加した砂糖系カラメルで比較的強い回復作用が見られた(図5)。

長芋および大和芋の表皮、大和芋の表皮より調製した麴の60%エタノール抽出物についてヒト腸内常在菌であるビフィズス菌の増殖作用、麴のHep G2によるキノン毒性への影響を検討した結果、表皮抽出物にビフィズス菌増殖因子の存在が認められたが、麴では増殖因子およびキノン誘導性の酸化的傷害抑制作用はみられなかった。一方、大和芋の皮シュウ酸糖化液にビフィズス菌増殖作用がみられた(図6)。

5) 酵素等を利用した機能性の強化

(1) 食品廃棄物等からの機能性成分等の含有量の把握(栃木県)

野生の山芋などに含まれ、コレステロール降下等の作用を示すジオスゲニンについて、GC-MS 分析を行ったが、大和芋及び長芋の表皮中にはほとんどなかった。また、ポリフェノール含量を調べた結果、山芋の皮は可食部に比べ、ポリフェノール量が高かった。種類別では、ジネンジョの皮が最も高かった。

山芋の皮の栄養成分等の分析を行なった結果、可食部に比べ食物繊維や α-アミノ酪酸含量が高く、ヤマトイモ皮に比べ、ナガイモ皮に糖分が多いことが分かった。また、イチゴワイン醸造残渣について機能性成分等について調べた結果、1次粕、2次粕ともに食物繊維が多く含まれており、ポリフェノール含量が高く、DPPH ラジカル消去活性が高い等抗酸化性が認められた。

(2) 酵素等を利用した機能性の強化(栃木県)

山芋の皮で焼酎用白麴菌を用い、DPPH ラジカル消去活性を指標として製麴条件を検討した結果、初期水分率45%、温度35℃、40時間が適しており(図7)、ラジカル消去活性の向上とポリフェノール、グルタミン酸含量の増加が見られた。また、麴菌の種類による DPPH ラジカル消去活性は、焼酎用黒麴菌、焼酎用白麴菌、焼酎用黄麴菌、味噌用黄麴菌の順で活性が強かったが、食品素材として利用することを考慮し、喫食経験のある味噌用黄麴菌を中心に検討することとした(表4)。

6) 食品廃棄物等の素材化技術の開発

(1) 食品廃棄物等の素材化技術の開発(仙波糖化工業株式会社)

山芋加工品を製造する際に約30%発生する山芋の表皮について、食品素材化の一つとして、酸糖化によるカラメル化の検討をおこなった結果、酸糖化工程、カラメル化工程(特にブドウ糖系カラメル)でオリの発生が問題となった。

ヤマイモの皮からの糖液調製法を検討し、シュウ酸糖化による糖液を試作した結果、中和工程で水酸化カルシウムを用いることにより、オリの除去が容易となり、カラメル製造工程でオリの

発生が少なくなった(表5)。

食品添加物であるカラメル以外に、食品素材として使用できるヤマイモ皮のシュウ酸糖化液の利用を考慮し、栄養成分等の分析を行い、噴霧乾燥により粉末を試作した。

(2) 開発素材の各種食品への利用技術(栃木県・仙波糖化工業株式会社)

大和芋の皮粉末 20% 白糖 80% をエクストルダ処理し膨化物を調製後、膨化物の 25% の水分、味噌用麹菌を添加し、湿度 95%、35、40 時間で製麹した。この麹に等量の米麹を加え、味噌を試作した。また、膨化物を 20% 添加し、食パンを試作した。この山芋麹を嫌気処理等後、28、20 時間放置し、L-アミノ酪酸(GABA)を富化した(表6)。GABA を富化した麹を 55、8 時間糖化後、アルコール・前培養した酢酸菌を添加し、食酢を試作した。

一方、イチゴワイン醸造残渣からアルコール添加法により、ピンク色で色調がよく、ポリフェノールを 31mg/100ml 含有する食酢(酸度 5.5% w/v 酢酸換算)を試作した(表7)。この食酢について、市販の白ブドウ酢を対照として官能評価をおこなったところ、外観の評価がよく、他の項目についても遜色がなかった(表8)。また、イチゴワイン醸造残渣を凍結乾燥粉末化し、クッキー、シフォンケーキを試作した。

5. 成果の発表、活用

1) 学会発表

- (1) 古口久美子, 渡邊恒夫: 日本食品科学工学会第47回大会
- (2) 渡邊恒夫: 日本食品科学工学会第48回大会
- (3) 阿久津智美: 日本食品科学工学会第49回大会
- (4) 小坂忠之: 日本食品科学工学会第50回大会

2) 論文等

- (1) 渡邊恒夫・古口久美子他: 食品廃棄物を用いた機能性食品素材の開発、栃木県食品工業指導所研究報告, 13 ~ 15号(1999-2001)
- (2) 阿久津智美ら: 食品廃棄物を用いた機能性食品素材の開発、栃木県食品工業指導所研究報告, 16,1-9(2002)
- (3) 小坂忠之ら: 食品廃棄物を用いた機能性食品素材の開発、栃木県食品工業指導所研究報告, 17, 1-5 (2003)
- (4) 渡邊恒夫ら: 広域関東圏研究成果発表会予稿集, pp25-30(2003)

6. 成果の取扱い

1) これまでの研究期間中における成果の普及状況

- (1) 栃木県食品工業指導所研究成果発表会において、毎年発表。平成15年度栃木県産業技術センター研究成果セミナーで発表。当該セミナーの発表を受けて、県内企業より共同研究の申込みがあり、平成16年度から共同研究に取り組む予定。
- (2) 平成15年度広域関東圏研究成果発表会(主催:財団法人日本産業技術振興協会、平成15年12月)

2) 今後の成果の普及見込

- 1) 研究成果については、学会、研究成果セミナー、論文等で随時発表する。また、発表研究成果については、報告書を作成・配布し、企業への普及・移転に努める。

7. 残された問題点

- 1) イチゴへたのいちごワイン粕酢等への利用の検討が必要。
- 2) 食酢製造技術については、スケールアップについて検討が必要。
- 3) ビフィズス菌増殖因子となるオリゴ糖組成については、さらに検討が必要。

8. その他

- 1) 平成16~17年度で、「食品廃棄物を用いた機能性食品素材の開発」に係るフォローアップ研究を実施する。(県単)

参考図表

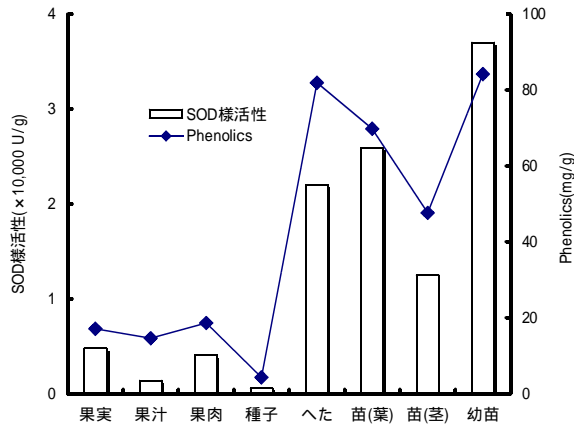


図1 イチゴ(とちおとめ)の部位別ポリフェノール含量 SOD 様活性凍結乾燥物 1 g あたり

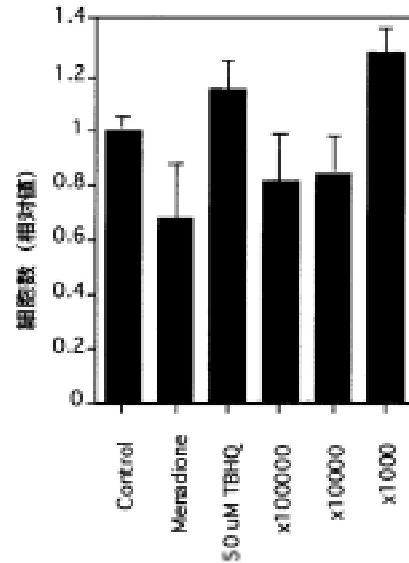


図2 Hep G2 におけるイチゴのへた抽出物のメナジオンによる酸化傷害の抑制

Menadione 処理濃度: 50 μ M
TBHQ:t-Butylhydroquinone
× 1000 ~ 100000:イチゴのへた DMSO 抽出物の希釈倍率

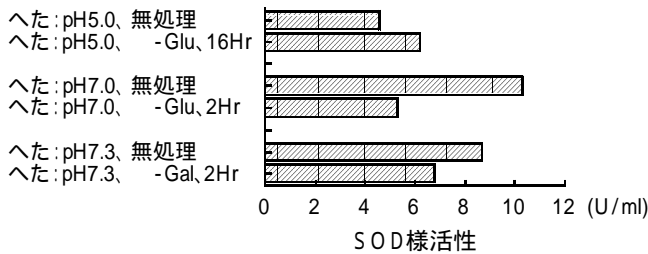


図3 イチゴのへたのグリコシダーゼ処理とSOD様活性
イチゴのへた酵素処理液中のポリフェノール濃度: 200 μg/ml
酵素処理条件: 40U/ml, 37

表1 イチゴのへた熱水抽出凍結乾燥物の収率

試料	原料 (g)	凍結乾燥物 (g)	収率 (%)	ポリフェノール*1 (mg/g)	SOD 様活性*2 (U/g)
女峰	1,090.3	67.4	6.2	101	70,000
とちおとめ	417.5	23.4	5.6	163	104,000

* 1 凍結乾燥粉末 1 g あたりの(+)-Catechin 換算量

* 2 凍結乾燥粉末 1 g あたりの SOD 様活性 (E S R 法による)

表2 イチゴのへた熱水抽出粉末のいちごワインへの添加による吸光度変化

粉末添加量 (g/100ml)	ポリフェノール* (g/100ml)	A 500 (-)
0	77.3	0.396
0.48	155	0.521
0.96	232	0.611
1.89	387	0.789
2.84	541	1.020

* (+)-Catechin として

表3 山芋のDPPH消去能

試料名	Trolox相当量 (μmol Trolox相当量/g乾物)
ヤマトイ(埼玉産)可食部	1.9
ナガイモ(岩手産)可食部	2.6
ジネンショ(栃木産)可食部	2.7
ヤマトイ(埼玉産)皮	2.7
ナガイモ(北海道産)皮	3.4
ナガイモ(岩手産)皮	5.7
ジネンショ(栃木産)皮	12.7

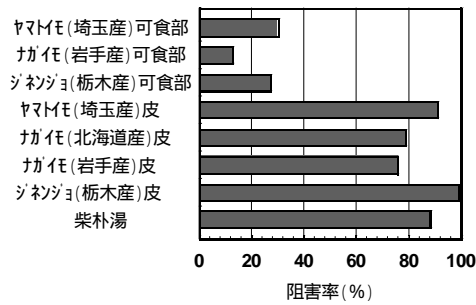


図4 山芋のヒアルロニダーゼ阻害

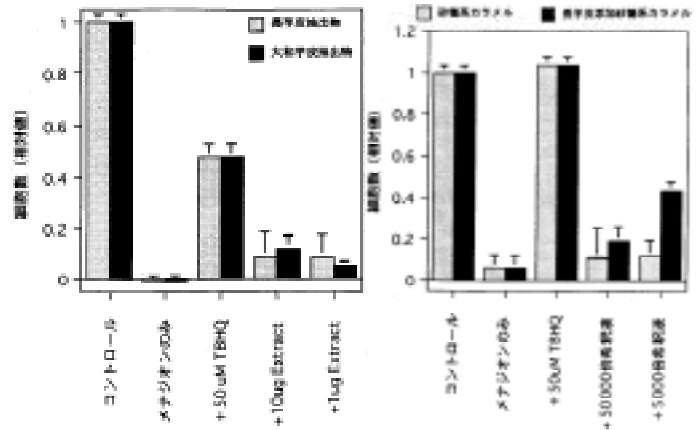


図5 山芋皮及び皮糖液添加カラムルのメナジオン誘導性細胞酸化傷害への影響(Hep G2)

表4 山芋麴のDPPHラジカル消去活性とSOD様活性

麹菌名	DPPHラジカル消去活性 ($\mu\text{mol Trolox 相当量} / \text{g 乾物}$)	SOD様活性 (%)
未処理山芋皮	2.7	18
焼耐用白麹菌	10.3	34
焼耐用黄麹菌	8.6	30
焼耐用黒麹菌	13.3	32
清酒用黄麹菌	5.1	25
味噌用黄麹菌	8.5	28
醤油用黄麹菌	6.6	27

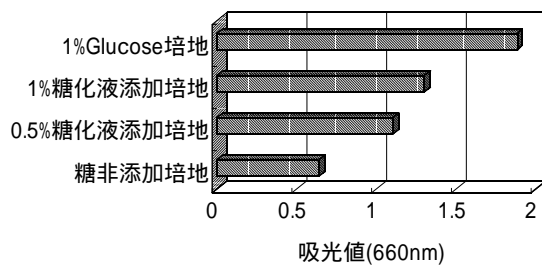


図6 山芋シュウ酸糖化液のBifidobacterium pseudocatenulatum JCM7040の増殖への影響

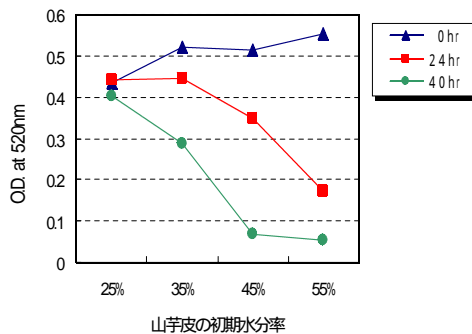


図7 白麹菌による山芋麴のDPPHラジカル消去活性

表5 カラメル試作品の成分

Sample	pH		窒素 (%)	固形分 (%)	水分 (%)	
	原液	1% w/v				
砂糖系	A	6.79	6.30	0.030	71.80	28.20
	B	6.18	5.49	0.035	81.31	18.69
ブドウ糖系	A	5.70	5.47	0.485	64.26	35.74
	B	6.65	6.59	0.410	65.05	34.95

A:標準品 B:大和芋の皮糖液添加

表6 麹の嫌気処理による - アミノ酪酸の変化

試料	Glu添加	Glu (mg/100gDry)	GABA (mg/100gDry)
原料	-	12	29
麹(未処理)	-	140	5
	5%溶液	140	7
	10%溶液	139	6
麹(脱気処理)	-	78	311
	5%溶液	110	237
	10%溶液	126	180
麹(N ₂ 処理)	-	23	131
麹(CO ₂ 処理)	-	40	138

Glu: グルタミン酸, GABA: - アミノ酪酸

表7 食酢の仕込み配合

いちごワイン醸造残渣 (1次粕)	150g
水	800g
エタノール	50g
種酢	10ml

表8 食酢(いちごワイン一次粕)の官能評価(AV ± SD)

評価項目	コントロール (市販白ワイン酢)	食酢(一次粕利用)
外観	3.33 ± 0.50	3.89 ± 0.93
味	3.56 ± 0.53	3.39 ± 0.78
香り	3.56 ± 0.73	3.50 ± 0.87
総合	3.56 ± 0.73	3.67 ± 0.43

< 補足資料 >

1 研究の役割分担

実施主体	役割分担
栃木県	<p>栃木県内の食品製造企業で山芋加工廃棄物（山芋の皮）、いちごワイン醸造残渣が発生しているため、その有効利用を目的として、食品の機能性に関する研究実績を活かして、当該廃棄物の機能性及びその成分を調べ、麹菌による機能性付加等、食品素材の開発、食品への利用を分担実施。</p> <p>1) 食品廃棄物からの機能性の検索、食品廃棄物等からの機能性成分等の含有量の把握、酵素等を利用した機能性の強化、開発素材の各種食品への利用（対象物：山芋加工廃棄物、いちごワイン醸造残渣など） 2) 食品廃棄物等を用いた機能性食品素材の開発の成果のとりまとめを実施。</p>
共同 機 関	<p>仙波糖 化工業 (株)</p> <p>1) 食品廃棄物等の素材化技術の開発、開発素材の各種食品への利用技術 仙波糖化工業株式会社の凍結乾燥技術など各種乾燥、造粒技術等を活かして、上記廃棄物からの食品素材化、食品への利用技術を分担実施。</p> <hr/> <p>宇都宮 大学</p> <p>1) 機能性の評価方法の確立 宇都宮大学の培養細胞による機能性評価技術、食品の機能性関連研究実績を活かして、培養細胞を用いた細胞酸化傷害の抑制作用の評価、ビフィズス菌増殖作用の評価を分担実施。（研究委託）</p>
食品総合 研究所	<p>1) イチゴワイン醸造残渣の有効利用技術として、イチゴのヘタに高濃度で含有されるエラグ酸に着目し、アレルギー性炎症を中心に機能性を検討した。エラグ酸は、マウス単球由来株細胞(J774A.1)を用いた腫瘍壊死因子(TNF-alpha)の産生に対し、濃度依存的に弱い抑制活性を示し、過度の炎症を抑制する可能性が認められた。また、肥満細胞からの抗原特異的なヒスタミン放出の抑制は認められなかった。 2) 試料の提供を受けるとともに、試験結果を伝達し、助言した。</p>

2 補助額の推移

年次	H10	H11	H12	H13	H14	H15	計
補助額(千円)	5,500	4,500	4,500	4,500	3,452	3,407	25,859

事業名	先端技術等地域実用化研究促進事業（バイオテクノロジー実用化型）		
大課題名	酵素等による食品廃棄物等の有効利用技術の開発		
課題名	マンナン含有食品廃棄物からのマンノオリゴ糖生産技術の開発		
研究機関名	秋田県総合食品研究所、食品総合研究所	研究期間	平成14～15年度

1. 研究目的

秋田県内においては、納豆生産が盛んであり、その生産に伴い種々の廃棄物が発生する。特に秋田においては引き割り納豆の生産も盛んであり、大豆の引き割の際に種皮が発生し、その処理が課題となっている。また、大館地区ではつくね芋の生産が盛んであり、その加工品として冷凍とろろが生産されている。この加工の際にも、皮を含む残渣が多量に発生し、その処理が課題となっている。そこで、マンナンを含有する食品廃棄物である大豆種皮、山芋残渣を取り上げ、酵素等によりマンノオリゴ糖の生産法を開発を行う。更に、その機能性について探索を行う。

2. 研究内容

- 1) 大豆種皮および山芋残渣のマンナーゼ処理による効率的なマンノオリゴ糖生産法の検討
 - (1) 山芋残渣の前処理法とマンノオリゴ糖生産法の検討（秋田県総合食品研究所食品開発部門）
 - (2) 大豆種皮の前処理法とマンノオリゴ糖生産法の検討（秋田県総合食品研究所食品開発部門）
- 2) マンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖の構造解析
 - (1) マンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖の構造解析（秋田県総合食品研究所生物機能部門）
- 3) マンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖の機能性評価
 - (1) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖のザイモサン貪食活性（食品総合研究所）
 - (2) 骨芽細胞分化誘導試験（秋田県総合食品研究所生物機能部門）
 - (3) ガラクトマンノオリゴ糖のビフィズス菌増殖活性試験（秋田県総合食品研究所食品開発部門）

3. 達成目標

- 1) 大豆種皮のマンナーゼ処理による効率的なマンノオリゴ糖生産法の確立
- 2) 山芋残渣のマンナーゼ処理による効率的なマンノオリゴ糖生産法の確立
- 3) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の構造解析
- 4) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の機能性評価

4. 研究開発結果の概要

(平成14年度)

- 1) 大豆種皮および山芋残渣のマンナーゼ処理による効率的なマンノオリゴ糖生産法の検討
 - (1) 山芋からのマンナン抽出法を検討した結果、山芋粘質物の酵素糖化のための前処理として NaOH 処理を確立した(表1)。
 - (2) 大豆種皮からのマンナン抽出法を検討した結果、蒸煮法を確立した(図1、2)。
 - (3) 大豆種皮マンナンの酵素糖化条件の検討を行った結果、大豆種皮からのマンノース生産には市販酵素セルロシン GM5 が良好であった。一方、マンノオリゴ糖生産には *Bacillus polymyxa* KT551 マンナーゼが良好であった(表2)。
- 2) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の構造解析
 - (1) ガラクトマンノオリゴ糖スタンダードの調製
タラガムから KT551 マンナーゼ処理により、2種のガラクトマンノオリゴ糖を単離し、MLDI-TOF-MS 分析により 4糖 SP551-2、5糖 SP551-3(図3)と判明した。

(平成15年度)

- 3) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の構造解析
 - (1) タラガムから *Bacillus polymyxa* KT551 マンナーゼ処理によりガラクトマンノオリゴ糖の構造解析を行った結果、ガラクトマンノオリゴ糖(4糖)の UK1 の構造は 6²-D-Galactosyl mannotriose (GalMan4)(図4)、5糖の UK2 の構造は 6²-D-Galactosyl mannotetraose または 6³-D-Galactosyl mannotetraose (GalMan5)(図5)であった。
 - (2) ガラクトマンノオリゴ糖の生産法の開発を検討した結果、タラガムを精製 KT551 マンナーゼ処理により GalMan4 が 27.29%、GalMan5 が 12.96%生成した(図6、表3)。
- 4) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の機能性評価
 - (1) ガラクトマンノオリゴ糖のビフィズス菌増殖活性を検討した結果、GalMan4 はビフィズス菌 4種 (*B. breve* JCM 1192、*B. longum* JCM 1217、*B. infantis* JCM 1222、*B. adolescentis* JCM 7044)において大腸菌等の菌より高い増殖活性を示した。GalMan5 は GalMan4 よりはビフィズス菌増殖活性が弱かった(表4)。
 - (2) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖のザイモサン貪食活性を検討した結果、同時投与の場合、マンノピオース(M2)に濃度依存的に貪食活性を抑制する傾向が認められた。GalMan4 及び GalMan5 のいずれも濃度が高くなると貪食活性が増強されていた(図7)。
 - (3) マンノオリゴ糖およびガラクトマンノオリゴ糖の骨芽細胞分化誘導試験を行った結果、陽性対照として用いた retinoic acid 以外は、いずれの場合も、MC3T3-E1 細胞増殖ならびに分化に対する影響は認められなかった(表5)。

5. 成果の発表、活用

1) 論文等

- (1) 戸枝一喜、堀一之、保苅美佳、伊藤聖子、加藤陽治：*Bacillus polymyxa* KT551 マンナーゼによるタラガムからのガラクトマンノオリゴ糖の生成、日本農芸化学会(2004年度大会発表予定)

6. 成果の取扱い

1) 今後の成果の普及見込

- (1) 大豆種皮からのマンノースおよびマンノオリゴ糖生産技術については、民間企業等への技術移転を検討する。
- (2) ガラクトマンノオリゴ糖については、他の新規機能性の評価を進める。

7. 残された問題点

- 1) 大豆種皮温水抽出物から得られるマンノース含有素材の評価のための動物試験。
- 2) ガラクトマンノオリゴ糖の効率的な精製法の開発。

研究の流れ

マンナン含有食品廃棄物からのマンノオリゴ糖生産技術の開発

背景：納豆製造および山芋とろろ製造においてマンナン含有大豆種皮、山芋残渣が多量に発生する。

目的：マンナン含有大豆種皮、山芋残渣から酵素等によりマンノオリゴ糖の生産法を開発を行う。

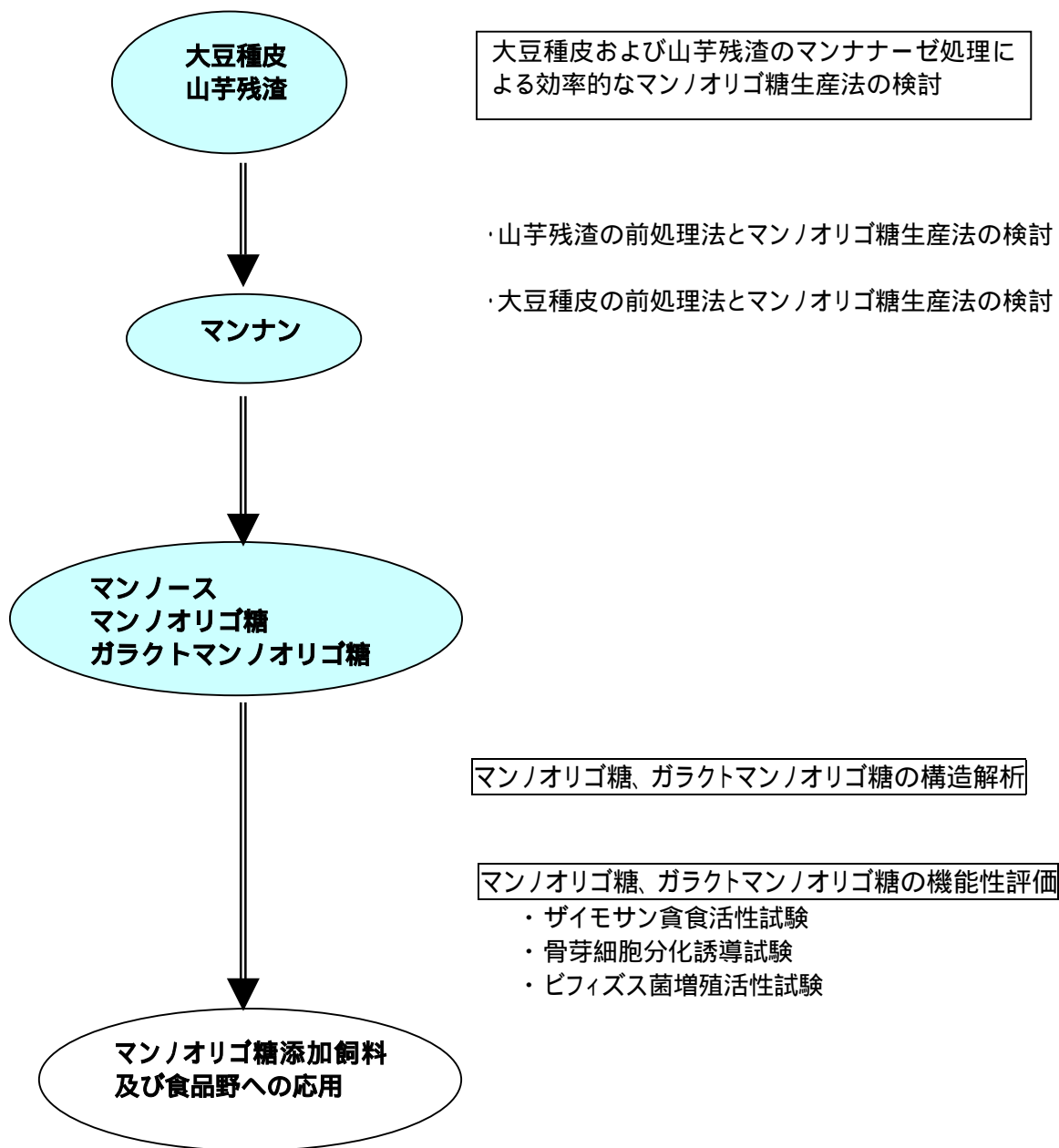


表1 ツクネイモ分画物に対するマンナーゼの作用性

分画	反応液中の生成還元糖(ug/ml)		
	ビガラゼ	セルロシンGM5	KT551
ツクネイモ粘質物	3.94	6.68	4.71
NaOH処理液	41.4	99.4	38.2
上澄	8.08	0	1.92
沈殿	17.2	90.5	28.1

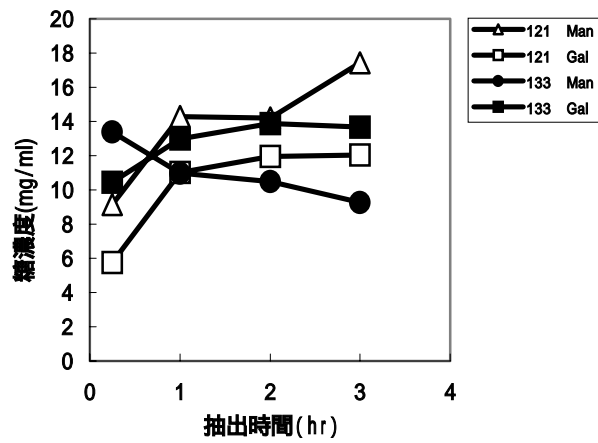
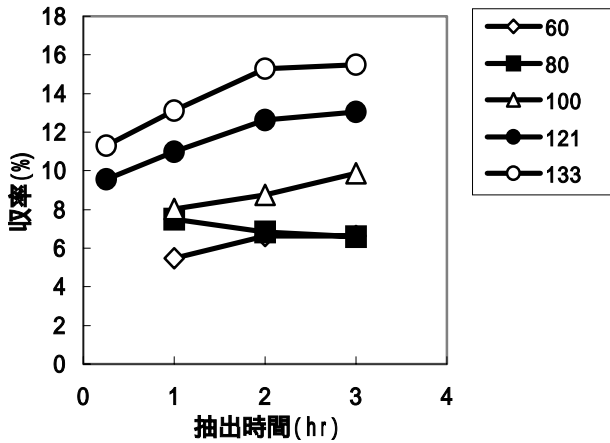


図1 蒸煮による大豆種皮からのマンナンの抽出

図2 多糖抽出液中の構成糖量

表2 大豆種皮蒸煮抽出物の酵素糖化

マンナーゼ	生成量 (%)				合計
	M1	M2	M3	Gal	
ビガラゼ	0.464	0.42	0.242	0.032	1.16
KT551	1.23	0.65	0.065	0.28	2.23
GM5	5.35	0	0.350	2.71	8.40
GODO	0	0.306	0.367	0.40	1.07
ACH	0	0.925	0	0.80	1.73

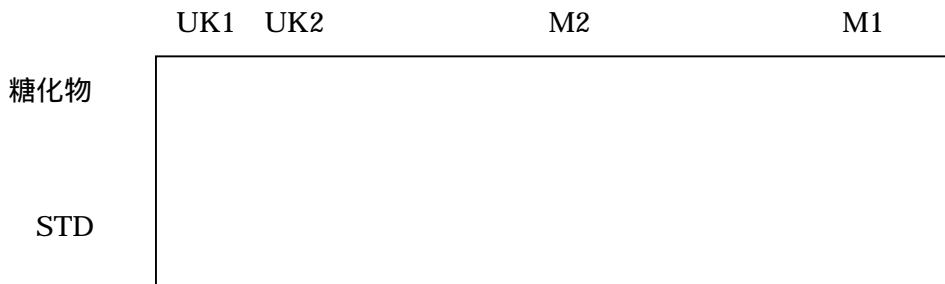


図3 タラガムのKT551マンナーゼ糖化物

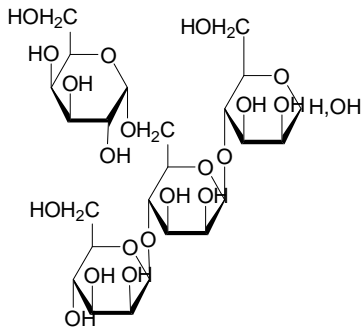


図4 UK1 (GalMan4) の構造

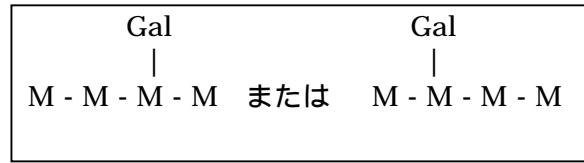


図5 UK2 (GalMan5) の構造

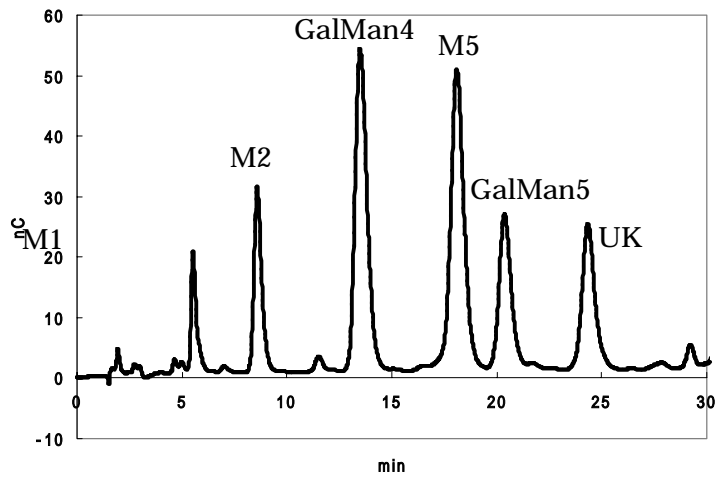


図6 タラガムからのガラクトマンノオリゴ糖

表3 ガラクトマンノオリゴ糖の生成

生成物	収率(%)	
	精製酵素	未精製酵素
M1	3.12	7.16
M2	8.19	3.06
GalMan4	27.29	28.51
M5	25.61	23.87
GalMan5	12.96	15.01

表4 ガラクトマンノオリゴ糖のビフィズス菌増殖活性

菌種	GalMan4	GalMan5
対照区	6.86	6.88
<i>B. breve</i> JCM 1192	5.76	5.78
<i>B. longum</i> JCM 1217	5.99	6.05
<i>B. infantis</i> JCM 1222	5.96	6.02
<i>B. bifidum</i> JCM 1254	6.38	6.37
<i>B. adolescentis</i> JCM 7044	5.64	5.71
<i>E.coli</i> IFO3301	6.67	6.67
<i>S.typhimurium</i> IFO12529	6.95	6.94

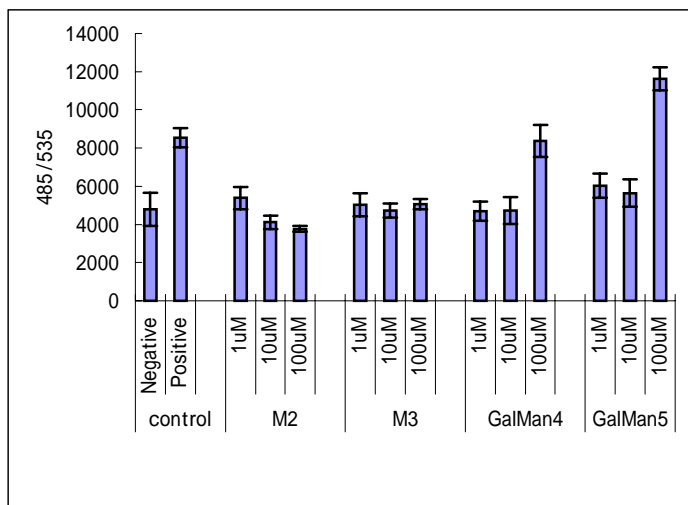


図7 マクロファージの貪食試験(同時投与)

表5 骨芽細胞分化誘導試験

Conc. (mM)	Cell growth (x 10 ⁴ cells/ml)		% of ALP-positive cells	
	0.1	1.0	0.1	1.0
None	10.8 ± 1.3	-	4.8 ± 3.3	-
GalMan4	11.4 ± 2.2	10.0 ± 0.2	6.6 ± 3.7	5.0 ± 3.3
GalMan5	10.7 ± 0.2	8.8 ± 1.3	5.3 ± 1.9	9.2 ± 1.3
M2	12.8 ± 0.2	9.8 ± 0.2	2.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2
M3	10.8 ± 0.2	10.6 ± 0.4	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2
D-Mannose	10.9 ± 0.4	9.4 ± 0.7	4.9 ± 2.6	8.7 ± 5.1
D-Glucose	11.1 ± 0.6	9.8 ± 0.3	6.1 ± 3.6	3.8 ± 4.1
D-Galactose	9.8 ± 0.7	10.8 ± 0.3	5.5 ± 4.4	5.9 ± 2.9
Retinoic acid (10 μM)	7.8 ± 0.2	-	22.3 ± 5.7	-

< 補足資料 >

1 研究の役割分担

実施主体	役割分担
秋田県総合食品研究所	<p>秋田県では、納豆及び冷凍とろろの生産が盛んであるが、生産工程で生じる大豆の種皮、つくね芋の皮等の残渣の処理が課題となっており、これらの残渣に含まれるマンナンを抽出し、酵素等によりマンノオリゴ糖を生産する技術を確立するため、以下の研究を実施。</p> <p>1) 大豆種皮及び山芋残渣のマンナーゼ処理による効率的なマンノオリゴ糖生産法の検討 (1) マンナン抽出のための山芋残渣の前処理法としては NaOH 処理、大豆種皮の前処理法としては蒸煮処理を確立した。また、大豆種皮マンナンの糖化により、マンノース及びマンノオリゴ糖生産法を開発した。</p> <p>2) マンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖の構造解析 (1) 大豆種皮マンナンから糖化によりマンノオリゴ糖 M2、M3 を同定するとともに、タラガムから2種のガラクトマンノオリゴ糖 GalMan4 および GalMan5 の構造を確認した。</p> <p>3) マンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖の機能性評価 (1) ガラクトマンノオリゴ糖 GalMan4 及び GalMan5 には骨芽細胞分化誘導が認められなかったものの、ガラクトマンノオリゴ糖 GalMan4 及び GalMan5 にビフィズス菌増殖活性が確認できた。</p>
独法 (食品総合研究所)	<p>1) 山芋及び大豆等の食品廃棄物に含有されるマンノオリゴ糖の機能性について検討した。ラット炎症性腹腔マクロファージを用いたザイモサン食食に対する影響では、-1,4-mannobiose, mannotriose などに食食を抑制する活性が認められた。同じくラット炎症性腹腔マクロファージを用いた D-mannose と 1-3,1-6-mannotriose, galactosylmannose(4糖)において、LPS 刺激による PGE2 の産生を抑制する活性が認められた。</p> <p>2) 秋田県で調製されたマンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖について試料の提供を受け、機能性の活性検定を伝達した。メールでやりとりするとともに、面談による指導も行った。</p>

2 補助額の推移

年次	H 1 4	H 1 5	計
補助額(千円)	2,760	2,960	5,720

事業名	先端技術等地域実用化研究促進事業(バイオテクノロジー実用化型)		
大課題名	酵素等による食品廃棄物等有効利用技術の開発		
課題名	食品産業副産物の高度利用による新規食品製造技術の開発		
研究機関名	愛知県産業技術研究所食品工業技術センター	研究期間	平成14～15年度

1. 研究目的

豆腐製造メーカーでは、オカラの処理が課題であり、より付加価値の高い食品素材としての利用技術の開発が要望されている。乾燥技術等の発達により、オカラ保存性は高まっているが、更に味、成分面での改良が必要とされている。

そこで、麹菌等によるオカラ麹の製造技術を確立し、その特性を明らかにするとともに、水産物を用いたオカラ麹漬を開発する。

2. 研究内容

- 1) オカラ麹調製条件の確立
- 2) 漬床に適した麹菌の選択
- 3) オカラ麹漬の開発と成分特性
- 4) オカラ麹漬の機能性成分による評価

3. 達成目標

- 1) 高品質なオカラ麹を調製する技術を確立する。
- 2) 水産物へのオカラ麹の利用技術を開発する。

4. 研究開発結果の概要

1) オカラ麹調製条件の確立(愛知県)

(1) 水分、培養温度、培養時間の検討

米味噌用種麹(*Asp. oryzae*)、泡盛用種麹(*Asp. awamori*)を使用し、麹菌体量、中性プロテアーゼ活性を指標として、水分、培養温度、培養時間を検討した結果、水分40～50%、培養温度30℃、培養時間48時間が好適条件であることが分かった(図1)。

(2) 菌株による酵素活性の特性

中性プロテアーゼ活性は、表1より、醤油用、豆味噌用、米味噌用、甘酒用の種麹使用区で、顕著に高くなった。泡盛用1、2の種麹使用区では、特に酸性プロテアーゼ活性が高くなった。なお、匂い分析により、泡盛用1、2のオカラ麹は他の試験区に比べて、匂いの強度が高く、香質も異なる特徴を持つことが示された(図2)。

(3) 副材料の検討

食品廃棄物となる、乾麺屑、パン屑、白糠を副材料として10%添加したところ、白糠の添加によりα-アミラーゼ活性が約2倍となった。α-アミラーゼ活性の増大を目的とした副材料の添加には白糠が適していることが示された(図3)。

2) 漬床に適した麹菌の選択(愛知県)

(1) 窒素成分による選択

旨味の付与が期待される菌株として、試験区の中で特に中性プロテアーゼ活性が高く、水溶性窒素、アミノ態窒素量が高い豆味噌用を選択した(表1、表2)

(2) 抗酸化性、イソフラボン量による選択

オカラ麹80%エタノール抽出液のDPPHラジカル消去能は、未発酵のオカラに比べて3～9倍高い活性を示し、泡盛用の試験区で特に高い活性が認められた(図4)。泡盛用2でイソフラボン残存量が比較的高いことから(図5)、機能性の付与が期待される菌株として、泡盛用2を選択した。

3) オカラ麹漬の開発と成分特性(愛知県)

(1) オカラ麹漬の製造方法の確立

サワラを食塩濃度10%で2時間下漬けし、塩抜き後、オカラ麹を、水分60%、食塩濃度5%に調製した漬床に5で7日間漬けることにより、オカラ麹漬を製造した。また、西京味噌との配合することにより、味噌漬風味のオカラ麹漬を製造した。

(2) オカラ麹漬の成分特性

サワラのエキス分(熱水抽出液)の水溶性窒素、アミノ態窒素は、原料魚と比較して高くなり、特に豆味噌用の試験区ではそれぞれ原料魚の3倍、7倍の高い値を示した(図6)。旨味アミノ酸である、グルタミン酸とアスパラギン酸は、原料魚にはほとんど含まれないが、オカラ麹漬では高い値を示し、旨味成分が移行することが示された(図7)。

(3) 味噌との配合による成分変動

西京味噌にオカラ麹を1割以上配合することにより、アミノ態窒素、水溶性窒素がともに増大することが示された(図8)。

4) オカラ麹漬の機能性成分による評価(愛知県)

(1) DPPHラジカル消去能

オカラ漬や味噌漬に比べて、オカラ麹漬は、約2倍の抗酸化性を示した。オカラ麹に漬けることにより、水産物に機能性成分が移行することが示された(図9)。

(2) 大豆イソフラボン含量

オカラ麹から水産物へ大豆イソフラボンが移行することが示された。オカラ麹漬中のイソフラボンはほとんどがアグリコンであった(図10)。

5. 成果の発表、活用

1) 普及に移しうる成果

(1) オカラ麹製造条件の確立(愛知県産業技術研究所成果普及講習会、平成14年度)

(2) オカラ麹と水産物を用いた新規食品の開発(愛知県産業技術研究所成果普及講習会、平成15年度)

2) 論文等

(1) オカラ麹製麹条件の検討と評価(日本食品科学工学会第50回大会発表)

(2) オカラ麹調製条件の確立(日渡美世、伊藤雅子、児島雅博、村瀬誠、2003、オカラ麹調製条件の確立、愛知県産業技術研究所研究報告、第2号)

6. 成果の取扱い

1) 今後の成果の普及見込

(1) オカラ麹の製造技術については県内味噌メーカー等、オカラ麹の利用技術については県内豆腐メーカー等にて引き続き試験を行うとともに、普及を行う。

(2) オカラの製麹技術については、平成14年度愛知県産業技術研究所成果普及講習会にて資料を配布した。水産物漬物への利用技術については、平成15年度同講習会にて、資料を配布予定。

7. 残された問題点

1) オカラ麹の製造の実用化については、より大規模な試験が必要。

2) オカラ麹のイソフラボン誘導体の分析、抗酸化性物質については更に検討が必要。

3) 他の食品製造への利用については更に検討が必要。

8. その他

残された問題点については、平成16年度以降、愛知県産業技術研究所を中心に試験を行う。

食品副産物の高度利用による新規食品製造技術の開発

オカラ



オカラ麹調製条件
の検討

- 水分
- 培養温度、時間

平成14年度
検討課題

オカラ麹



オカラ麹の
特性把握
酵素活性
匂い分析etc.

麹菌の選択
製造方法の検討

平成15年度
検討課題

オカラ麹漬



試作品の評価

- 窒素成分
- 抗酸化性 etc.

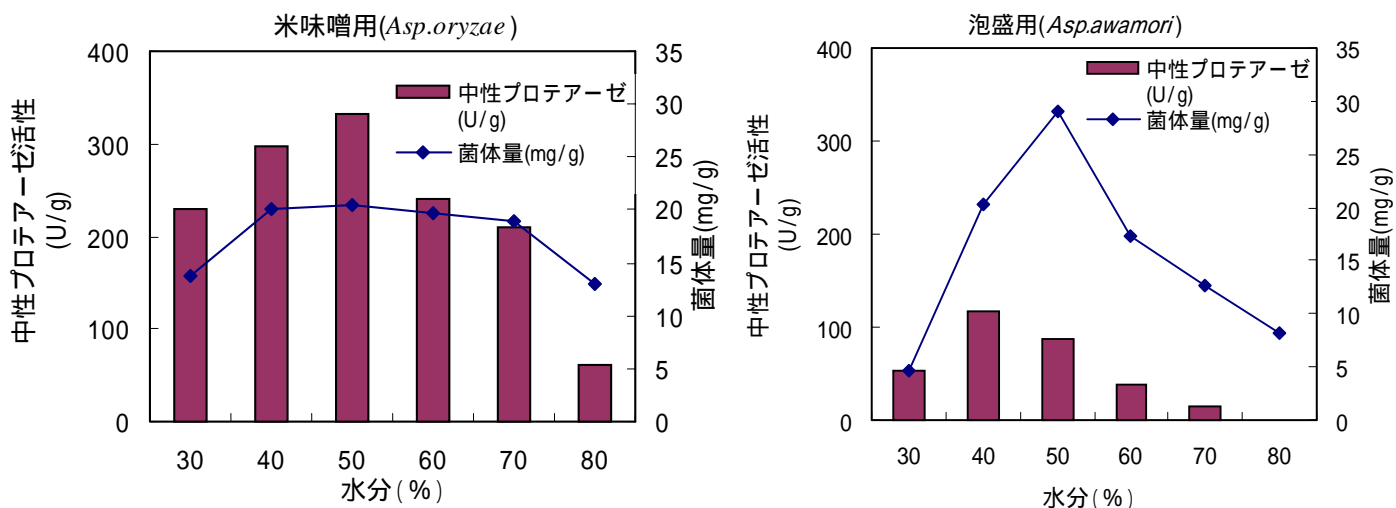


図1 オカラ麴の菌体量と中性プロテアーゼ活性

表1 オカラ麴の酵素活性

	アミラーゼ (U/g)	プロテアーゼ(pH3) (U/g)	プロテアーゼ(pH6) (U/g)
米麴	68	85	75
大豆麴	102	35	150
オカラ麴(醤油用)	17	145	333
オカラ麴(豆味噌用)	87	56	342
オカラ麴(米味噌用)	103	202	377
オカラ麴(甘酒用)	99	68	226
オカラ麴(泡盛用1)	46	272	107
オカラ麴(泡盛用2)	5	156	64

表2 オカラ麴の窒素成分

試験区名	水分(%)	全窒素(g/100g)	水溶性窒素 (g/100g)	アミノ態窒素 (g/100g)	グルタミン酸 (g/100g)
醤油用	40.1	3.29	1.93	0.74	1.14
豆味噌用	44.0	3.10	1.59	0.71	1.17
米味噌用	45.9	3.05	1.19	0.28	0.48
甘酒用	45.8	2.78	1.02	0.30	0.18
泡盛用1	40.0	3.24	1.04	0.42	0.47
泡盛用2	39.0	3.39	1.25	0.31	0.40
オカラ	39.5	3.11	0.23	0.03	0.00

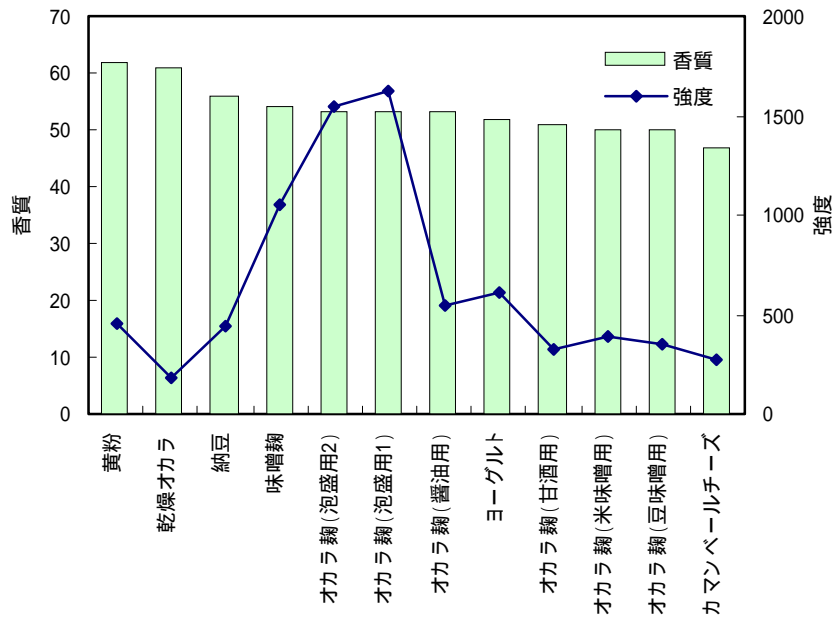


図2 オカラ麹の匂い分析
(株)双葉エレクトロニクス製 FPO-II使用

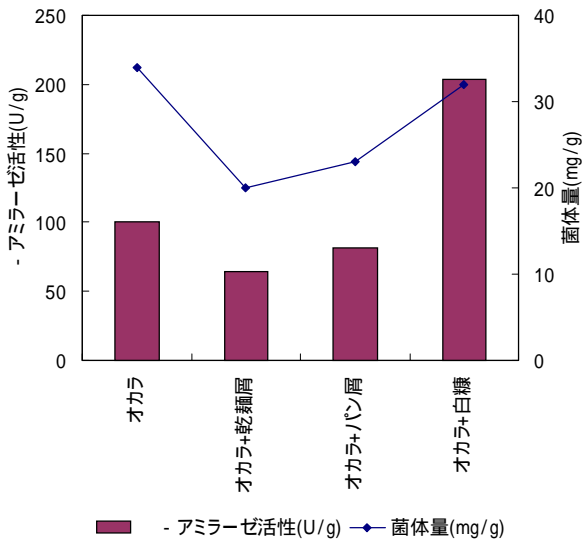


図3 副材料の添加による -アミラーゼ活性の変化
豆味噌用(*Asp. oryzae*)を使用し、活性は無添加のものを100とした。

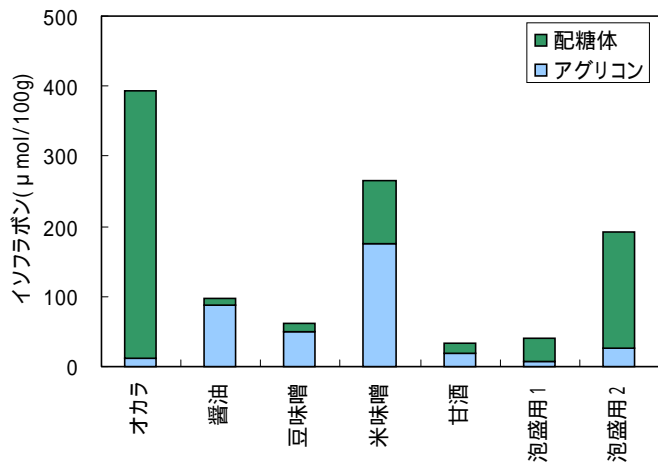


図5 オカラ麹の大豆イソフラボン量

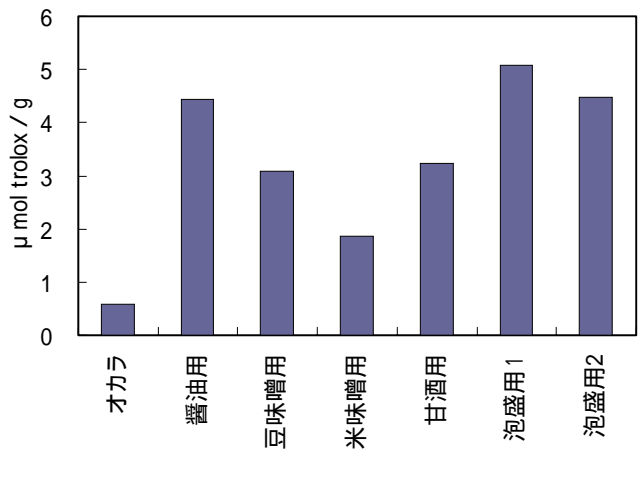


図4 オカラ麹のDPPHラジカル消去能

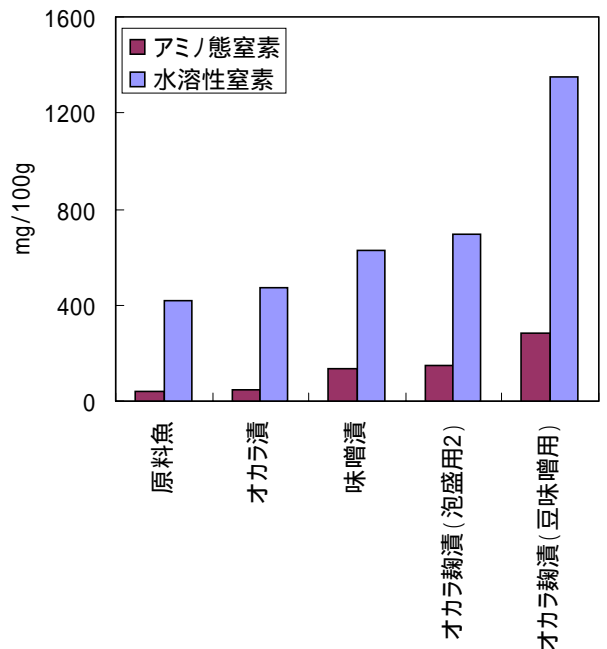


図6 サワラエキス分中の窒素成分

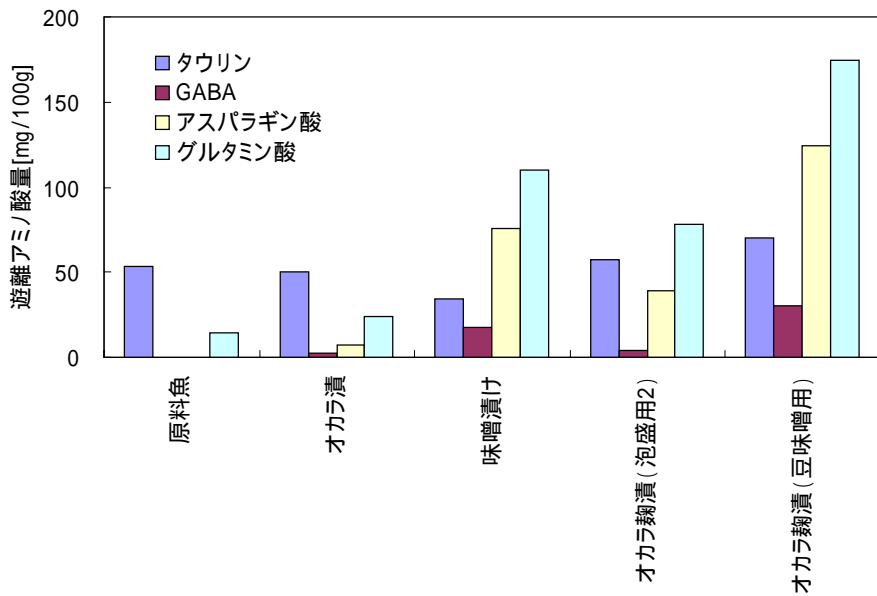


図7 サワラエキス分の遊離アミノ酸量

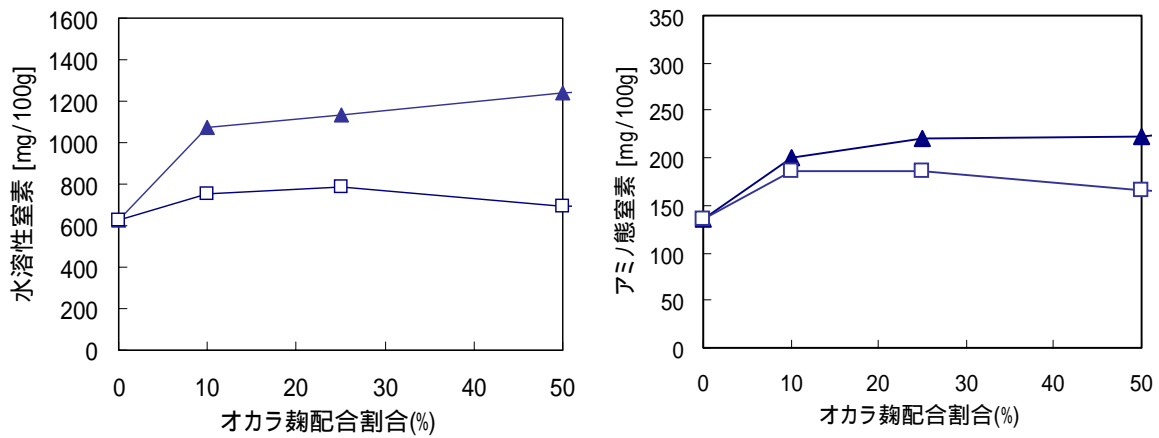


図8 オカラ麹配合割合とサワラエキス分の窒素成分
(▲: 豆味噌用、□: 泡盛用2)

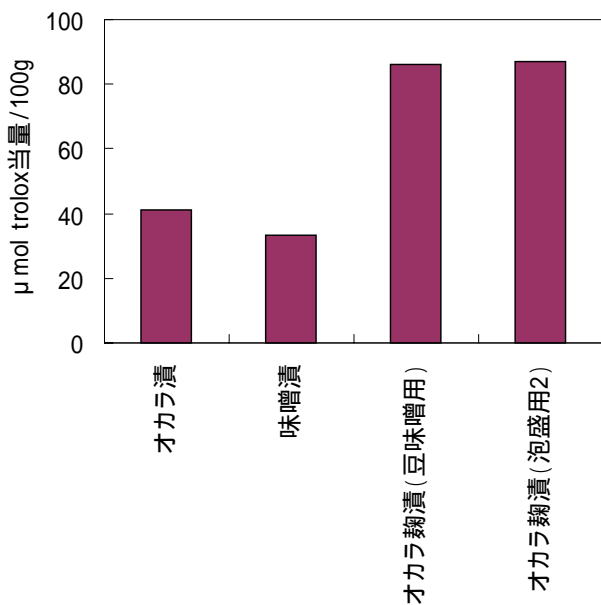


図9 サワラのDPPHラジカル消去能

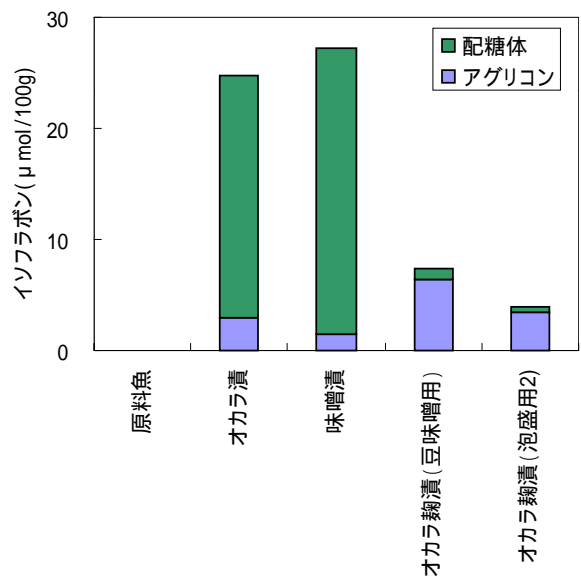


図10 サワラの大豆イソフラボン含量

< 補足資料 >

1 研究の役割分担

実施主体	役 割 分 担
愛知県	<p>豆腐製造メーカーにおいてオカラの処理が課題となっていることから、より付加価値の高い食品素材として活用するため、以下の研究を実施。</p> <p>1) オカラ麹調製条件の確立 (1) オカラ麹を製造するための好適培養条件(水分、培養温度、培養時間)を確立した。 (2) 麹菌菌株によるオカラ麹の酵素活性、成分特性等の違いを明らかにした。</p> <p>2) オカラ麹漬の開発 (1) 漬床に適した菌株を二種類選択し、サワラのオカラ麹漬を開発した。 (2) オカラ麹漬は、味噌漬に比べて、エキス分の旨味アミノ酸が多いことを確認した。</p> <p>3) オカラ麹漬の機能性成分による評価 (1) オカラ麹漬は、抗酸化性(DPPH ラジカル消去能)がオカラ漬や味噌漬に比べて高いことを確認した。 (2) オカラ麹漬に、大豆由来のイソフラボンが移行することを確認した。</p>
食品総合研究所	<p>1) 麹菌の特性を解明する試験を行った。その結果、高温培養時における醸造用麹菌の遺伝子発現を解析し、高温時特異的に誘導される熱ショック蛋白質 AoHSP30 遺伝子を取得した。この AoHsp30 のプロモータ領域を -グルクロニダーゼ遺伝子に連結し、麹菌における本遺伝子の発現を検討し、高温誘導による遺伝子発現を確認した。</p> <p>2) 食品工業技術センターとは日常的な連携があることから、研究室担当者及び主査が県の担当者と適宜面談し、指導と助言を行った。</p>

2 補助額の推移

年 次	H 1 4	H 1 5	計
補助額(千円)	1,840	1,974	3,814

事業名	先端技術等地域実用化研究促進事業（バイオテクノロジー実用化型）		
大課題名	酵素等による食品廃棄物等有効利用技術の開発		
課題名	酵母による食用廃油からの糖脂質生産技術の開発		
研究機関名	広島県立食品工業技術センター 福山大学, 丸善製薬(株), (株)サタケ	研究期間	平成14年～平成15年

1. 研究目的

廃油は、全国で年間 2,828,000t(平成 10 年度：環境省)が産業廃棄物として排出され、うち 15%程度が食用廃油である。食用廃油に関しては、食品リサイクル法の中でも発生の抑制、減量、再生利用が義務づけられている。広島県においては、産業廃棄物回収業者が食用廃油処理を有料(約 12 円/kg)で請け負い、簡易処理した油を飼料用、塗料用として販売している(約 8 円/kg)。また、一部地域では食用廃油を用いてバイオディーゼル燃料の合成を行っているところもあるが、それらを含めても再生利用率は低率にとどまっております、食用廃油の再生利用率を向上させるような、より実用的な技術の開発が望まれている。

そこで、本研究では、油を唯一の炭素源として生育し、バイオサーファクタントの一種であるマンノシルエリスリトールリピッド(以下MELと表記)を生産することのできる酵母(*Kurtzmanomyces* sp. I-11 株)を用いて、食用廃油を用いた MEL 生産技術の開発を行う。

具体的には、現在までに、廃油を原料にして MEL を大量に生産する技術は確立されていないことから、本研究では、天ぷら油などの食用廃油を原料として、種々の有用な機能を有すると報告されている MEL を安価かつ大量に生産する技術の開発を行うこととし、そのため、種々の精製油を用いた MEL 生産手法の確立、廃油を用いた MEL 生産手法の確立、MEL の構造解析及び機能の調査を行う。

2. 研究内容

1) 廃油を用いた糖脂質の生産

- (1) 精製油を用いたMELの生産(広島県立食品工業技術センター)
- (2) 廃油を用いたMEL生産技術の開発(広島県立食品工業技術センター)

2) 糖脂質の構造解析

- (1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの構造解析(広島県立食品工業技術センター, 福山大学生物工学科)

3) 糖脂質の機能評価

- (1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの機能評価(広島県立食品工業技術センター, (株)サタケ, 丸善製薬(株))

3. 達成目標

1) 廃油を用いた糖脂質の生産(広島県立食品工業技術センター)

- (1) 廃油を用いた, 安価かつ簡便なMEL生産技術の確立を行う。

2) 糖脂質の構造解析(広島県立食品工業技術センター, 福山大学生物工学科)

- (1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの構造に違いが生じるかどうか検証する。

3) 糖脂質の機能評価(広島県立食品工業技術センター, (株)サタケ, 丸善製薬(株))

- (1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの乳化能に違いが生じるかどうか検証する。

4. 研究開発結果の概要

1) 廃油を用いた糖脂質の生産

(1) 精製油を用いたMELの生産(広島県立食品工業技術センター)

(a) 種々の油を用いてMELの生産実験を行った。その結果、大豆油を用いた時が最も良好にMELを生産し、生産濃度は37(g/l)であった。

(2) 廃油を用いたMEL生産技術の開発(広島県立食品工業技術センター)

(a) 大豆油を用いたMEL生産条件と同様の条件で廃油を用いたMEL生産を行った。その結果、生産濃度は30(g/l)であった。

(b) 安価かつ簡便な方法として、休止菌体によるMEL生産法を検討し、培養条件を決定した。その条件を用い、小スケール(100ml)の半連続培養実験を行った。その結果を図1に示す。培養条件は、炭素源として8% 廃油、初期投入湿菌体量が8g、培養温度が30℃であった。図1には、1回目の培養経過と、2回目以降の培養終了時点でのデータを示す。4回繰り返して培養した場合、油の分解自体は進むものの、MEL濃度は徐々に低下した。また、リパーゼ活性の低下が顕著に見られることから、休止菌体を用いたMELの生産を行う場合は、リパーゼの生産を維持できる最低限のNが必要であると考えられた。

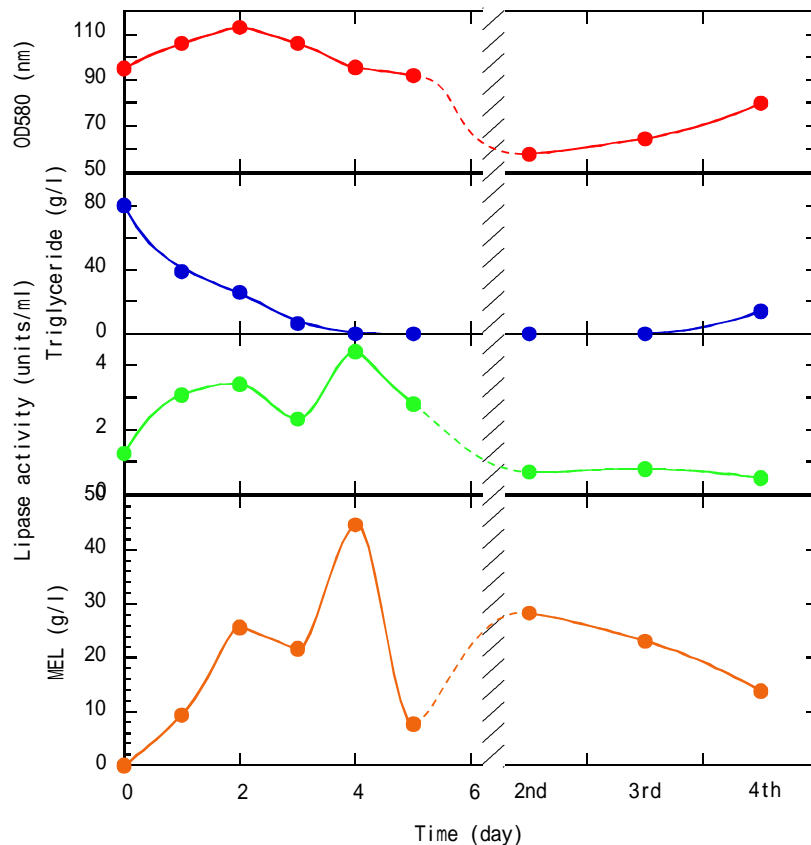


図1 休止菌体を用いた小スケール半連続培養実験

(c) 休止菌体と油、水を用いた培養では長期間の半連続培養は不可能であることが判明したため、培養液中から培養上清の抜き取りが容易な凝集性酵母の育種を行うこととした。その結果、2種類の酵母(I-11a株、I-11b株)を取得することが出来た。取得した2酵母の性質は以下のとおりである。

(i) I-11a株: I-11株よりも細胞表層の疎水性が強く、候補株の中で最も沈降性に優れていた。しかし、培養速度が低い傾向がある。

(ii) I-11b株: I-11株とほぼ同じ細胞表層の性質を持つが、I-11株よりも沈降性に優れていた。I-11a株よりも、培養上清中にMELが残る傾向がある。

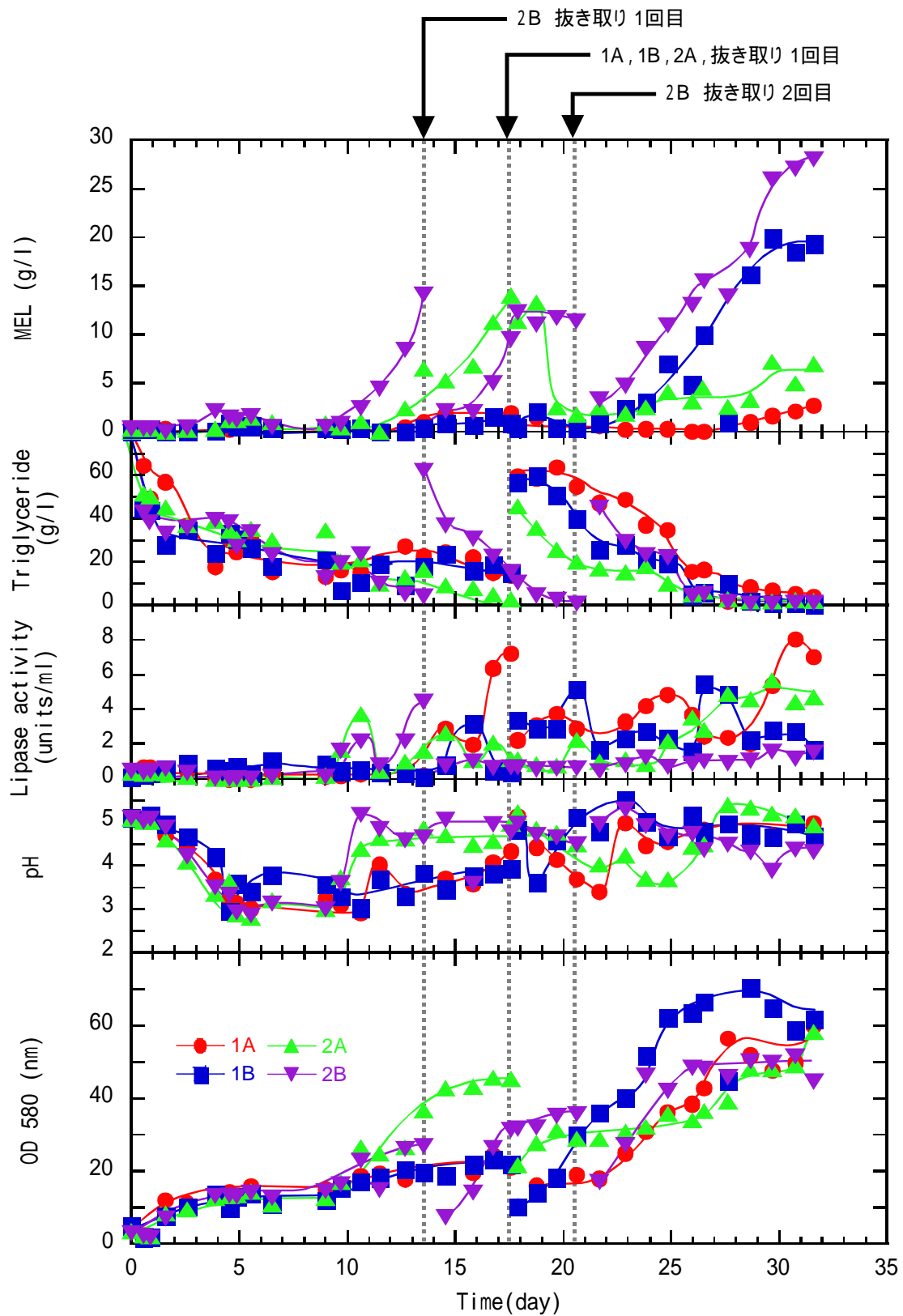


図2 凝集性酵母を用いた半連続培養実験

(d) (c)で取得した酵母を用いて半連続培養実験を行った。本実験では、安価かつ簡便なMEL生産法を確立するというコンセプトのもと、高価なジャーフェーマンターを用いるのではなく、セパラルフラスコを恒温槽で保温し、マグネティックスターラーで培養液を攪

拌する方式の培養装置を組み立てた。培地組成は表 1 のとおりである。

表 1 培地組成及び供試菌株

	1 A	1 B	2 A	2 B
菌株	I-11a	I-11a	I-11b	I-11b
廃油	8%	8%	8%	8%
NH ₄ NO ₃	0.05%	0.025%	0.05%	0.025%
KH ₂ PO ₄	0.01%	0.005%	0.01%	0.005%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%	0.005%	0.01%	0.005%
Yeast Extract	0.05%	0.025%	0.05%	0.025%

また培養条件は、全容量が 2000ml、実容量が 1500ml、通気量が 1vvm、攪拌速度が 900rpm、培養温度が 30 とした。これらの条件で培養した結果を図 2 に示す。

なお、本実験では (b) に示したような理由により、炭素源以外の培地成分も通常培地の 1/2量(1A, 2A), 1/4量(1B, 2B)添加している。今回の実験では、初期菌体量の少ない条件から培養を開始し、培養を繰り返すことによって菌体濃度を上げていくこととした。最も良好な結果を示したのは 2B の試験区であり、OD580(nm)が 70、MEL 濃度が 30(g/l)まで上昇した。この様に、汎用器具を用い、通気、攪拌、保温をするだけで廃油の分解並びに MEL の生産は可能であった。また、育種した凝集性酵母を用いることにより、遠心分離器等を用いることなく培養上清の抜き取りが可能となった。これらの点では、安価かつ簡便な MEL 生産手法の確立はほぼ出来たのではないかと考える。

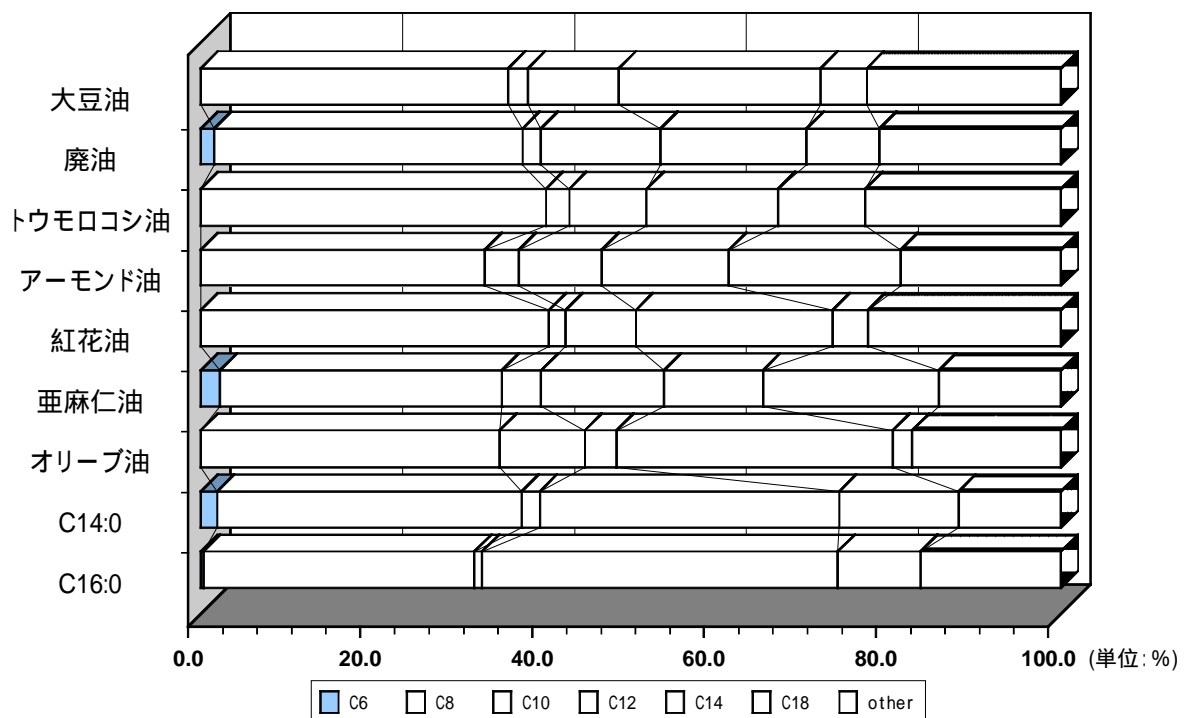


図 3 MEL の脂肪酸組成

2) 糖脂質の構造解析

(1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの構造解析 (広島県立食品工業技術センター, 福山大学生物工学科)

(a) 種々の油及び脂肪酸を用いて生産したMELの糖構造, 脂肪酸組成の解析を行った。糖構造には違いがなかったが, 脂肪酸組成には違いが見られた。その結果を図3に示す。図3に示したとおり, 鎖長のそろった脂肪酸で培養しても脂肪酸鎖長が統一されたMELを生産することは出来なかった。

3) 糖脂質の機能評価

(1) 種々の油(精製油, 廃油)を用いて生産したMELの機能評価 (広島県立食品工業技術センター, (株)サタケ, 丸善製薬(株))

(a) 種々の油(精製油, 廃油)及び脂肪酸を用いて生産したMELの乳化能(BS法)を測定した。その結果を図4に示す。

最も乳化力の強かったのは廃油で生産したMELであり, 最も乳化力の弱かったのはオリーブ油で生産したMELであった。図3に示したとおり, この二つのMELの脂肪酸組成は異なっており, 鎖長の長い脂肪酸を多く持っているオリーブ油で生産したMELの乳化力が弱くなったと考えられた。

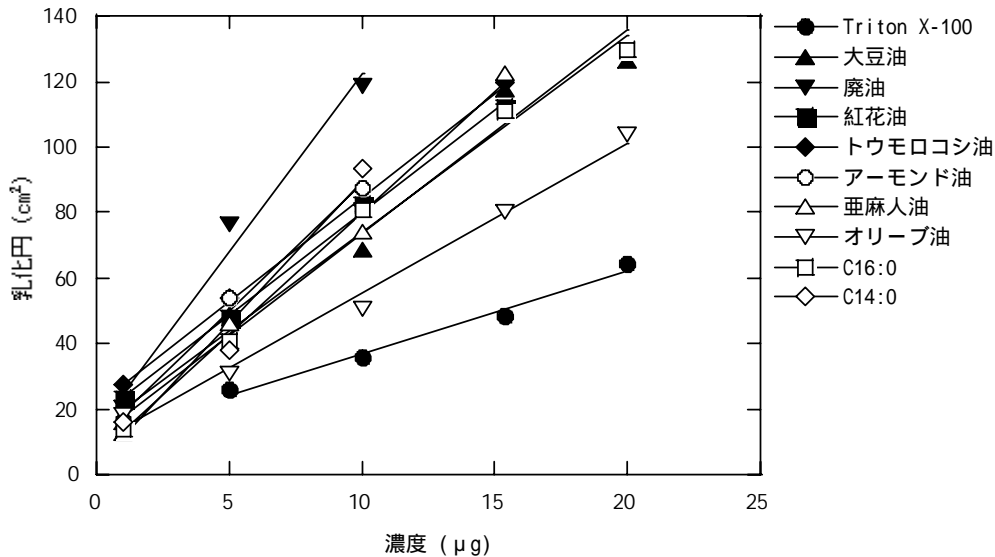


図4 種々の油で生産した MEL の乳化能



培養液添加前

培養液添加後 0.5日経過

図5 MEL 含有培養液の生ゴミ処理機投入実験

(b) 油脂を多く含む生ゴミ処理機の処理助剤として、MELを含んだ培養液が利用できるかどうか実験を行った。その結果を図5に示す。図5の写真ではわかりにくいですが、右写真の添加区の方が黒ずんだ油脂分が減っているのが分かる。成分分析の結果、油脂含量は13.6(g/l)から7.4(g/l)にまで減っていた。よって、MELを含んだ培養液を、生ゴミ処理機の処理助剤として利用できる可能性があると考えられる。

5. 成果の発表、活用

1) 普及に移しうる成果

(1) 日本農芸化学会中四国支部第6回講演会(2003年5月31日)
「新規に取得した酵母が生産する糖脂質及び耐熱性リパーゼ」

2) 論文等

(1) 食用廃油を用いた糖脂質生産技術の開発(日本食品科学工学会誌, 投稿準備中)

6. 成果の取扱い

1) これまでの研究期間中における成果の普及状況

(1) 廃油を用いた糖脂質生産技術については、報告書にも示したとおり、(株)サタケと共に生ゴミ処理機の処理助剤としての利用を検討中である。

2) 今後の成果の普及見込み

(1) 食用廃油を用いた糖脂質生産技術に関しては、広島県が実施する成果普及講習会等にて発表し、技術の移転を希望する企業に対して技術支援を行っていく予定である。

7. 残された問題点

1) 4-1)(2)(d)に示した半連続培養については、菌体濃度とMEL濃度をどの程度まで高濃度にすることが出来るか明らかにするために、引き続き培養を行っていく予定である。

2) 生産した糖脂質培養液の生ゴミ処理機への利用に関しては、処理助剤としての汎用性を持たせるため、I-11株とは異なる基質特異性を有するリパーゼを生産する菌株の培養液又はリパーゼ製剤の組み合わせを検討する必要がある。

8. その他

用語説明・解説

(1) バイオサーファクタント

サーファクタント(界面活性剤)とは、液体に溶けて表面張力を著しく低下させる作用をもつ物質である。分子内に親水性部分と疎水性部分とが分れて存在し、このため界面に吸着しやすく、また一定の濃度(臨界ミセル濃度)以上ではミセルとよばれる分子集合体を形成する。サーファクタントのうち、微生物等の生物によって生産されるサーファクタントをバイオサーファクタントという。

(2) 糖脂質

糖と脂質を構成成分とする物質群。分子内に親水性部分と疎水性部分をあわせもつ脂質2分子膜の主要構成成分として細胞膜などを形成し、生命活動にとって本質的な機能を示す。脂質部分の種類によりスフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質、その他の糖脂質に分けられる。

(3) マンノシルエリスリトールリピッド

酵母が生産する糖脂質((2)参照)の一種であり、抗菌作用、アポトーシス抑制作用、ベシクル形成能など種々の機能が報告されている。(2)の分類でいえば、「その他の糖脂質」に分類される。

(4) 食用廃油

本研究で用いた食用廃油は、(株)イワミ食品から提供された揚げ豆腐用の使用済み油である。組成は大豆油100%であり、酸化度が1.3程度の廃油である。

(5) BS法

特開平5-211892に示されるバイオサーファクタント活性測定法。非常に簡便な方法でバイオサーファクタントの活性(乳化能)を測定することが出来る。

< 補足資料 >

1 研究の役割分担

実施主体		役割分担
広島県		1) 廃油を用いた糖脂質(MEL)生産技術の開発 広島県が、旧科学技術庁地域先導研究(平成 10 年度～平成 12 年度)等を通じて培ってきた糖脂質生産酵母の利用技術を生かし、廃油を用いた糖脂質(MEL)生産技術の開発を分担実施。 2) 研究成果のとりまとめを実施
共同 機 関	福山大学	1) 糖脂質(MEL)の構造解析 福山大学の構造解析に関する豊富な知識を生かし、種々の油で培養した糖脂質の構造解析を分担実施。
	丸善製薬(株)	1) 糖脂質(MEL)の機能評価 界面活性剤に関する知識を生かし、種々の油で培養した糖脂質の乳化能の分析を分担実施。
	(株)サタケ	1) 糖脂質(MEL)の生ゴミ処理機助剤としての評価試験 (株)サタケが販売している生ゴミ処理機の処理助剤としての評価試験を実機で分担実施。
食品総合研究所		1) 食用廃油代謝機構の基盤的知見を得るために、酵母の食用廃油代謝関連遺伝子を網羅的に検索した。 約 3 0 0 0 株の遺伝子破壊株を用いた検索により、約 6 0 のオレイン酸(廃油モデル)の代謝関連遺伝子を取得できた。 検索されたオレイン酸代謝遺伝子には、呼吸、エネルギー代謝に関連する遺伝子が多数含まれていた。 検索された遺伝子の中には、約 2 0 の機能未知の新規遺伝子も含まれていた。

2 補助額の推移

年次	H 1 4	H 1 5	計
補助額(千円)	2,760	2,724	5,484

事業名	先端技術等地域実用化研究促進事業（バイオテクノロジー実用化型）		
大課題名	酵素等による食品廃棄物等の有効利用技術の開発		
課題名	酵素による難分解性水産加工廃棄物の有効利用		
研究機関名	熊本県工業技術センター	研究期間	平成14 - 15年度

1. 研究目的

熊本県では、伝統的な産業である真珠加工業において、真珠除核後の工程でアコヤ貝肉が排出される。この貝肉は保存性がなく、食料素材としての利用価値がないため廃棄されているのが現状である。これまで企業からの技術相談で、この貝肉を利用して調味料を製造することを検討しているが、通常の麹菌酵素では分解が遅く、粘性を有するためにろ過性も良くないことが課題となっている。

そこで、貝肉に含まれる粘性物質を分解して呈味性や作業性を向上させるために、分解活性の高い酵素を検索し、これを利用する技術を開発することを目的とする。

2. 研究内容

1) 酵素を用いた調味料製造技術の開発

(1) 現在、未利用のまま廃棄されているアコヤ貝の加工廃棄物を酵素を用いて調味料などへの再利用するための技術開発を行う。（熊本県）

（研究方法については別紙）

3. 達成目標

1) 酵素を用いて真珠加工廃棄貝肉を原料とする調味料の製造技術を確立する。

4. 研究開発結果の概要

1) 酵素を用いた調味料製造技術の開発

(1) 酵素を用いた調味料製造技術の開発（熊本県）

市販酵素剤24種類を用いてアコヤ貝肉を分解する試験を行ったところ、3種類の酵素について貝肉の分解性が優れていることを見出した。これらの酵素について分解温度や時間を検討したところ1種類の酵素について60～65℃、5～6時間の条件で貝肉を分解する方法を確立した。

(2) 貝肉の酵素分解液の評価

酵素分解液について成分分析を行ったところ、ホルモール窒素の増加が認められ、アミノ酸分析の結果からアコヤ貝を原料とした調味料のアミノ酸組成は魚醤油に比べてタウリン（Tau）が多く、ヒスチジン（His）が少ないという特徴を有することが明らかとなった。以上の試験結果から、酵素を用いるこの方法によれば廃棄されている水産加工廃棄物を調味料として利用できることが明らかになった。

（研究成果に関する図表は別紙）

5. 成果の発表、活用

1) 普及に移しうる成果

- (1) 水産加工廃棄物を原料とする酵素を用いた調味料の製造に関する技術
(平成16年度 水産利用加工会議都道府県部会(中央水研主催)において発表予定)

6. 成果の取扱い

1) これまでの研究期間中における成果の普及状況

- (1) 水産加工廃棄物を原料とする酵素を用いた調味料の製造に関する技術については熊本県内の民間企業において、本研究成果を基に製造マニュアルを策定し試作品を製造することを計画中である。さらに、試作品について、食品加工業や流通関係者などの食味に関する意見交換を行うこととしている。

2) 今後の成果の普及見込み

- (1) 水産加工廃棄物を原料とする酵素を用いた調味料の製造に関する技術については県内の魚醤油製造企業において活用され、製品化を行う見込みである。

7. 残された問題点

- 1) 製品化に向けて原料となるアコヤ貝の貝肉の集荷方法や貯蔵方法などを検討する必要がある。
- 2) アコヤ貝の貝肉を原料とする調味料の加工食品への応用についてさらに検討が必要。

8. その他

(添付資料：研究の流れ)

酵素等による食品廃棄物等の有効利用技術の開発

酵素による難分解性水産加工廃棄物の有効利用

(熊本県工業技術センター)

真珠除核後のアコヤ貝肉の酵素などによる分解試験の流れ

アコヤ貝は真珠の採取方法により廃棄される形態が2種類ある。

- 1) 貝肉が丸ごとそのままの形状で排出されるもの
- 2) アルカリ(貝灰)処理される場合のミンチ状のもの

これらの貝肉を分解するために醤油麹あるいはタンパク分解酵素による方法を検討した。

- 1) タンパク分解酵素の種類と処理条件(温度、時間の測定)
- 2) 酵素分解液の分解性評価(ろ過性の測定、窒素成分の分析)

アコヤ貝肉を原料とする調味料のパイロットプラントによる試作試験

- 1) 100kg規模の試作品を製造するためのマニュアルを策定
- 2) 魚醤油メーカーに製造委託した試作品の評価(成分分析、官能評価)



(添付資料：研究成果の概要)

酵素等による食品廃棄物等の有効利用技術の開発

酵素による難分解性水産加工廃棄物の有効利用

(熊本県工業技術センター)

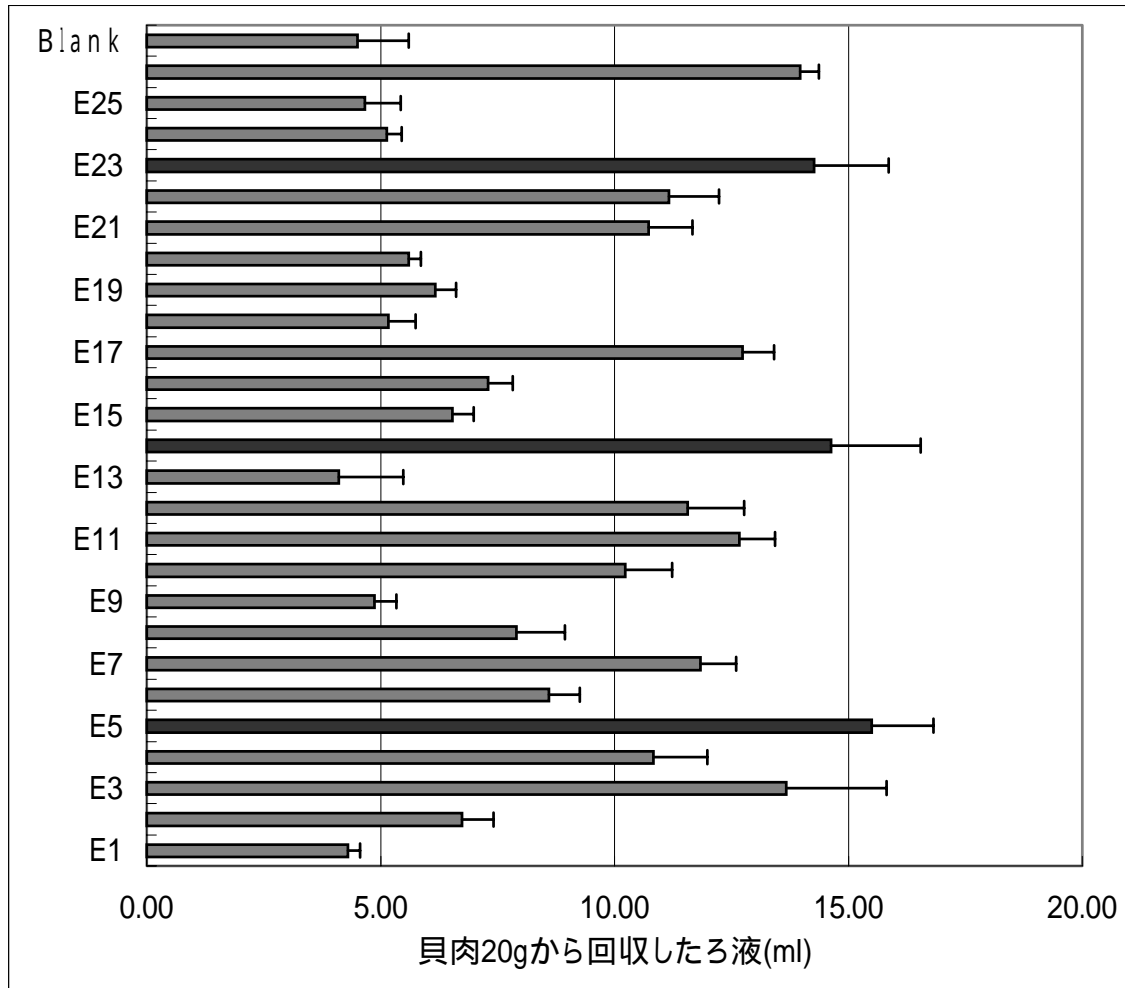


図1 真珠除核後の貝肉の各種酵素による貝肉の分解試験

この結果から、貝肉の分解性は酵素によって異なり、No.5, No.14, No.23 などが高い分解性を示すことが分かった。

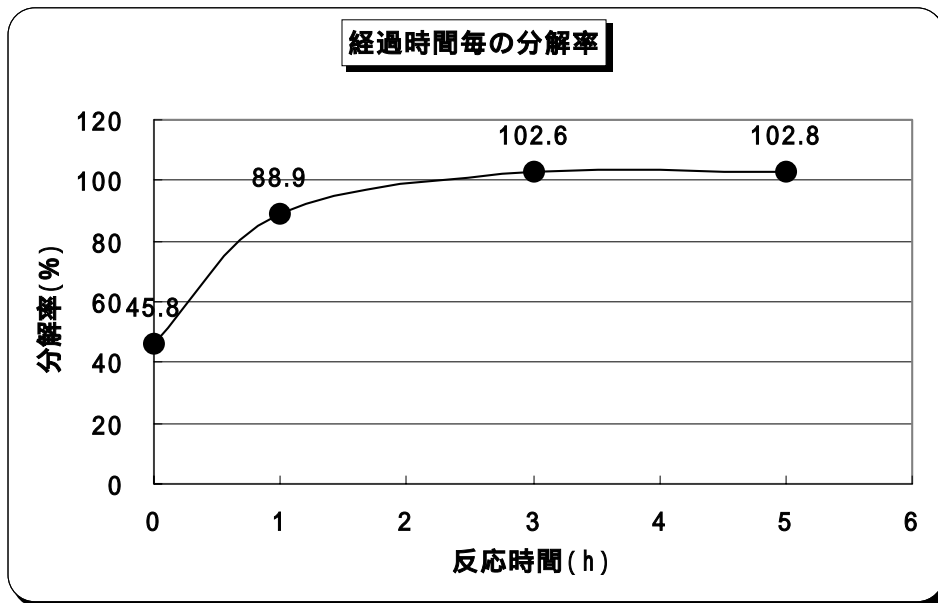


図2 貝肉の加熱時間が酵素分解に及ぼす影響

加熱処理：50 0～5時間

原料：貝肉100g + 飽和食塩水100ml

この結果から、貝肉の分解には3時間以上の加熱が必要ながかった。

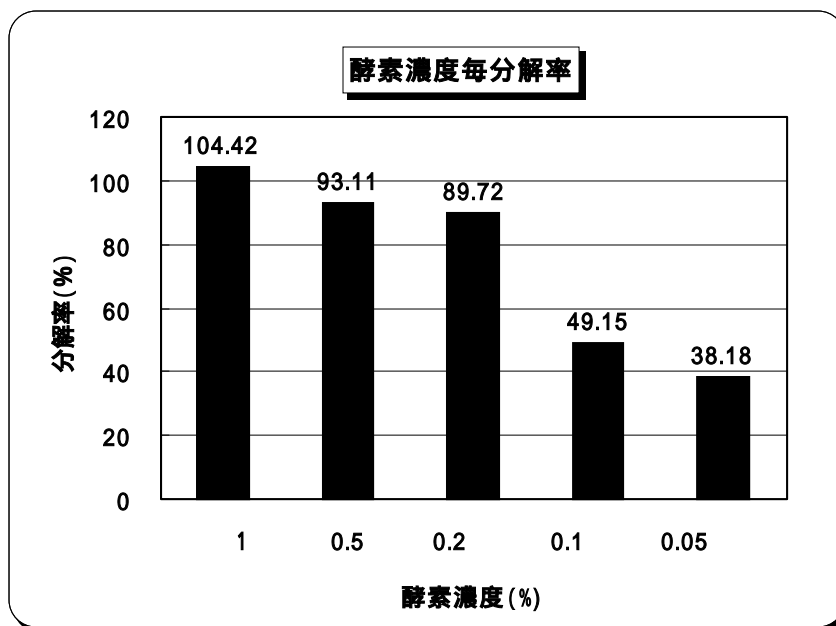


図3 酵素濃度が貝肉の分解率に及ぼす影響

加熱処理：50 5時間

原料：貝肉100g + 飽和食塩水100ml

これらの結果から、貝肉を効率良く分解するには酵素濃度が0.2%以上必要ながかった。

表 アコヤ貝の酵素処理液のアミノ酸組成
(mg/100g)

	アコヤ貝醤油	魚醤油(サバ)
Tau	447.5	153.1
Asp	37.5	532.3
Thr	40.7	277.9
Ser	41.8	345.4
Glu	110.2	686.31
Gly	86.5	303.4
Ala	91.4	414.6
Cit	0	205.2
Val	60.4	354.2
Cys	0	0
Met	27.2	107.4
Ile	39.5	359.1
Leu	105.2	606
Tyr	48.8	45.5
Phe	61.7	901.2
Orn	28.2	321.6
Lys	67.5	486.5
His	11.4	199.7
Arg	68.4	277.7
Total	1373.9	6577.11

これらの結果からアコヤ貝を原料とした調味料のアミノ酸組成は魚醤油に比べてタウリン(Tau)が多く、ヒスチジン(His)が少ないという特徴を有することが明らかとなった。

< 補足資料 >

1 研究の役割分担

実施主体	役割分担
熊本県	<p>熊本県では、伝統的な産業である真珠加工業において、真珠除核後の工程でアコヤ貝肉が排出される。この貝肉は保存性がなく、食料素材としての利用価値がないため廃棄されているのが現状である。これまで企業からの技術相談で、この貝肉を利用して調味料を製造することを検討しているが、通常の麹菌酵素では分解が遅く、粘性を有するためにろ過性も良くないことが課題となっている。</p> <p>そこで、貝肉に含まれる粘性物質を分解して呈味性や作業性を向上させるために、分解活性の高い 酵素を検索し、これを利用する技術を開発した。</p> <p>具体的には、分解の困難な魚介類廃棄物、特に真珠貝（アコヤ貝）の廃棄貝肉部の酵素分解に関して良好な分解性を示す酵素を選抜し、調味料として再利用する技術開発の成果のとりまとめを実施。</p>
共同機関	（本課題では、本プロジェクトの枠外であるが、県内魚醤メーカーと緊密に連携して実施されている：主査補足）
食品総合研究所	<p>1) プロテアーゼに関する知見を得るために、アイカワタケの酵素を精製し、酵素の安定性について検討を加えた。また、精製プロテアーゼの種々カゼインに対する基質特異性を検討し、切断点を同定した。</p> <p>2) 研究室担当者はプロテアーゼによる貝肉の分解について助言・指導を実施した。また主査も数回面談し、魚醤を実用化するための方策を指導・助言した。「パール醤」という名称も主査の示唆による。</p>

2 補助額の推移

年 次	H 1 4	H 1 5	計
補助額(千円)	2,760	2,433	5,193