Mycelia sterilia M1株の廃糖蜜脱色過程における 糖蜜色素とポリフェノール類の消長

波多野和樹^{*1}・大西章博^{*2}・藤本尚志^{*2}

中西載慶^{*3}・鈴木昌治^{*2}

Transitions of molasses pigment and polyphenol in the decolorization process of molasses by *Mycelia sterilia* M1

HATANO Masaki^{*1}, OHNISHI Akihiro^{*2}, FUJIMOTO Naoshi^{*2}

NAKANISHI Kotoyoshi^{*3} and SUZUKI Masaharu^{*2}

* 1 Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 2 Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 3 Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The transitions of a molasses pigment and polyphenol during the decolorization of molasses during the cultivation of *Mycelia sterilia* M1 were investigated by gel filtration chromatography. In the chromatogram of the molasses pigment, two peaks were confirmed, corresponding to molecular weights of approximately 11,800 and 5,900. The molecular weight distribution of the molasses pigment corresponded to that of polyphenol. When *M. sterilia* M1 was cultured in 100 g/ℓ molasses at 30°C for 10 days under an aerobic condition, approximately 80% of the molasses pigment and 95% of polyphenol were removed. With increases in decolorization efficiency and polyphenol removal efficiency during *M. sterilia* M1 cultivation, the two peaks observed in the molecular weight distributions of both, the molasses pigment and polyphenol decreased in area. The cultivation of *M. sterilia* M1 decreased the molecular weights of the molasses pigment (approximately 13,700 and 5,700) and polyphenol during the decolorization of molasses.

(Received Dec. 17, 2004 ; Accepted Sep. 16, 2005)

前報¹⁾までに、難分解性物質である糖蜜色素に対して脱色活性を発現する無孢子不完全菌の*Mycelia sterilia* M1株を適用した廃糖蜜の脱色処理と脱色処理過程で副生される粘質物の諸性質について調べた。本菌は廃糖蜜の脱色反応過程において単糖類のグルコースを優先的に資化するため、脱色処理液中には初発時のスクロースが資化されないままほぼすべて残存することや、脱色処理液中に副生された粘質物は六炭糖を主鎖とする多糖類であることを明らかにした。

廃糖蜜の着色に関与する糖蜜色素の主要な構成着色物質は、糖とアミノ酸のアミノカルボニル反応により生成

するメラノイジン、熱処理された糖が脱水縮合することにより生成するカラメル、ポリフェノール類の酵素および非酵素的褐変反応により生成するポリフェノール酸化着色物質の3種が知られている^{2),3)}。これまで、糖蜜色素の微生物学的脱色は主に担子菌類の*Coriolus*属の菌種による合成メラノイジンの脱色を中心に研究されてきた^{4),5)}。玉城ら⁶⁾は担子菌による廃糖蜜の脱色処理について検討し、Polyvinylpyrrolidone (PVPP)を用いて廃糖蜜中のポリフェノール類を吸着除去し、ポリフェノール類に由来するポリフェノール酸化着色物質の生成を阻止することにより、脱色率が著しく向上することを明

* 1 東京農業大学大学院農学研究科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

E-mail: 60020002@nodai.ac.jp

* 2 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

E-mail: 大西章博; a1ohnish@nodai.ac.jp, 藤本尚志; nfujimo@nodai.ac.jp, 鈴木昌治; senbei@nodai.ac.jp

* 3 東京農業大学短期大学部醸造学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

E-mail: nakanisi@nodai.ac.jp

らかにしている。このように、ポリフェノール類の酸化着色物質は微生物脱色が困難であるとの指摘はあるが、廃糖蜜に含まれるポリフェノール類の酸化着色物質の微生物脱色やポリフェノール類の消長に関する報告はほとんどみられない。

本報では *Mycelia sterilia* M1 株による廃糖蜜の脱色反応過程における糖蜜色素とポリフェノール酸化着色物質の前駆物質となるポリフェノール類の除去能を調べるとともに、その消長をゲルクロマトグラフィーにより調べた結果について報告する。

実験方法

1. 供試廃糖蜜

供試廃糖蜜は、新三井製糖㈱より恵与されたさとうきび由来の廃糖蜜を用いた。

2. 供試菌株

東京農業大学醸造科学科醸造環境科学研究室で分離、保存している廃糖蜜色素脱色能を有する *Mycelia sterilia* M1 株を用いた⁷⁾。

3. 供試培地

M. sterilia M1 株の保存用培地には GYP 寒天培地（グルコース 10 g，酵母エキス 5 g，ポリペプトン 5 g，寒天末 23 g/蒸留水 1,000 ml，pH5.0）を用いた。また、本菌の前培養培地には上記の培地より寒天末を除いた GYP 液体培地を用いた。

4. 菌体懸濁液の調製法

GYP 寒天培地上で増殖した *M. sterilia* M1 株の気生菌糸を培地とともに白金線で 1 cm 程度に 2 枚切り取り、前培養培地に接種し、30℃ で 5 日間振盪培養（35 mm width, 130 oscillation/min.）した。得られたペレット状菌体を滅菌水で洗浄しながら吸引ろ過により集菌し、湿菌体 1 g に対して滅菌水を 10 ml 加えてテフロンホモジナイザー（井内盛栄堂，デジタルホモジナイザー）を用いて 2,000 r.p.m. で 5 分間均質化した菌体懸濁液を接種用菌体とした。

5. 脱色試験法

廃糖蜜の濃度が 10%（w/v）となるように超純水で溶解したものを脱色試験用培地とした。試験用培地 150 ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注し、オートクレーブ処理（121℃，1.2 atm，15 分間）した。なお、オートクレーブ処理により色度は 4,700 の増色が認められたものの、ポリフェノール類への影響は認められなかった。本処理液に、*M. sterilia* M1 株の接種用菌体を 4 ml 接種し、30℃ で振盪培養（35 mm width, 130 oscillation/min.）を行った。なお、*M. sterilia* M1 株を脱色試験用培地に接種していないものを対照区として同様に振盪培養を行った。培養終了後、遠心分離（2,250 × g，15 min.）により得られた液部を分析用試料とした。

6. 分析方法

（1）脱色率の測定 培養液の色度の測定方法は、吸

光光度計（日本分光株式会社製 V-560 型）を用いて波長 475 nm⁴⁾ における吸光度を測定することにより求めた。すなわち培養液を波長 475 nm における吸光度の値が 1.0 以下となるように pH5.0 の McIlvaine Buffer⁸⁾ で適宜希釈し、吸光度を測定した。得られた吸光度の値を上水試験法の白金・コバルト法⁹⁾に基づいて色度に換算し、これに希釈倍率を乗じて試料の色度とした。脱色率は培養前と培養後における色度の減少率として示した。

（2）ポリフェノール類の定量 ポリフェノール類は、FOLIN-DENIS 法^{3),10)}により定量した。すなわち、培養液を超純水により適宜希釈し、0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した試料 100 μl に同量のフェノール試薬（和光純薬工業社製）を加え 3 分間反応後、10% Na₂CO₃ 溶液 100 μl を加えて振盪した。1 時間室温で反応させ、モリブデン酸が還元されることにより生じた青色を、750 nm の干渉フィルターが装着されたマイクロプレートリーダー（BIO-TEK Instruments, Inc. 社製）により吸光度を測定した。得られた吸光度はあらかじめ L-DOPA（和光純薬工業社製）で作成した検量線によりポリフェノール量に換算し、希釈率を乗じてポリフェノール量（mg/ml）とした。ポリフェノール除去率（%）は培養前と培養後におけるポリフェノール量の減少率として示した。

（3）糖蜜色素およびポリフェノール類の分子量分布の測定 糖蜜色素とポリフェノール類の分子量分布は Sephadex G-75（Pharmacia 社製）ゲルによるゲルクロマトグラフィーにより調べた。0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した培養液 1 ml を流速 0.2 ml/min. でカラム（1.5 × 90 cm）に流入した。超純水を溶離液とし、フラクションコレクター（ADVANTEC 社製 SF-2120）で各画分を 5 ml ずつ分画分取した。各画分を試料とし、糖蜜色素は波長 475 nm の吸光度を、ポリフェノール類は FOLIN-DENIS 法を用い、波長 750 nm の吸光度を測定することによりそれぞれのゲルクロマトグラムを作成し、分子量分布を調べた。なお、ピーク面積の測定には半値幅法¹¹⁾を用い、分子量標準物質には分子量標準ブルラン（Shodex 社製，Shodex standard P-82）を用い、フェノール-硫酸法¹²⁾により検出した。

実験結果および考察

1. 供試廃糖蜜の性状と糖蜜色素およびポリフェノール類の分子量分布

本試験に供した廃糖蜜の性状を Table 1 に示した。廃糖蜜原液は濃い黒褐色を呈し、その色度は 249,500 を示し、高度に着色していた。また、ポリフェノール類の含有量は 12,900 mg/l であった。

供試廃糖蜜に含まれる糖蜜色素とポリフェノール類の分子量分布を Fig. 1 に示した。糖蜜色素は主に分子量 11,800 以上と分子量 5,900 以下の 2 つのピークに分けられた（以降は、分子量 11,800 以上のピークを高分子区分、分子量 5,900 以下のピークを低分子区分と表記する）。ま

Table 1 Molasses quality

pH	5.58
Color unit	249,500
Total sugar (%)	56.6
Reducing sugar (%)	19.5
Total nitrogen (%)	0.5
Protein (%)	3.2
Ash content (%)	10.4
Polyphenol (mg/ℓ)	12,900
Brix (%)	80.4

Fig. 1 Gel chromatogram of molasses

Molasses diluted to 10% (w/v) with extrapure water was used as sample for gel filtration chromatography.

Fraction of authentic pullulan (Shodex standard P-82), the molecular weight of which has already been studied and is shown at the top of this figure.

た、ポリフェノール類においても糖蜜色素の分子量分布と同様に分子量11,800以上と分子量5,900以下の2つのピークに分けられ、特に低分子区分に高いピークが確認された。糖蜜色素とポリフェノール類の高分子区分および低分子区分のピークがそれぞれ一致していることから、ポリフェノール類およびその着色物質は糖蜜色素の構成成分の1つとして高分子区分から低分子区分まで広く存在しているものと推察された。

2. 廃糖蜜脱色反応過程における糖蜜色素およびポリフェノール類の消長

M. sterilia M1株による廃糖蜜の脱色反応過程におけるpHの変化と、脱色率およびポリフェノール類の除去率の経日的変化をFig. 2に示した。培養開始前における初発時のpHは5.1であり、培養1日目にpHは5.9まで上昇し、培養2日目に急速に4.7まで低下した。その後、培養4日目まで5以下で安定し、培養5日目から緩やかに上昇した。脱色率は培養1日目から2日目までは20%以下であったが、3日目に65%まで上昇し、5日目に80%の最大脱色率を示した。その後、脱色率は培養10日目まで80%付近で安定した。また、*M. sterilia* M1株を接種

Fig. 2 Time courses of pH, decolorization efficiency and polyphenol removal efficiency during culture of *Mycelia sterilia* M1

Symbols ○ : with *Mycelia sterilia* M1

△ : without *Mycelia sterilia* M1

The strain was cultured at 30°C for 10 days using molasses solution (10% w/v).

していない対照区の脱色率は培養10日目で12.5%であった。ポリフェノール類の除去率は培養1日目に50%を示し、3日目に88%に達し、その後もポリフェノール類の除去率は緩やかに上昇し、培養10日目に95%の除去率を示した。また、対照区のポリフェノール類の除去率は培養10日目で13.8%であった。玉城ら⁶⁾は担子菌類の中から廃糖蜜に対して脱色活性を発現する菌種のスクリーニング中に廃糖蜜を増色して着色度合を高める菌株の存在を確認している。この原因は生菌体によるポリフェノール類の酸化増色反応に起因するものと推察し、廃糖蜜をPVPP処理することにより増色反応を伴わずに廃糖蜜の脱色が可能であると報告している。しかしながら、*M. sterilia* M1株は、PVPP未処理の廃糖蜜に対して見掛け上、増色反応を示すことはなく、培養初期より脱色反応を示し、ポリフェノール類を除去する傾向を示した。

3. 廃糖蜜脱色反応過程における糖蜜色素とポリフェノール類の分子量分布の変化

M. sterilia M1株による廃糖蜜の脱色反応過程における糖蜜色素およびポリフェノール類のゲルクロマトグラフィーによる分子量分布の変化をFig. 3に示した。脱色反応に伴う糖蜜色素の分子量分布の変化は、培養開始から3日目に低分子区分のピーク面積は約半分以下まで減少し、高分子区分のピークもわずかに減少した。次いで、培養5日目には高分子区分のピーク面積も半分程度まで減少した。ポリフェノール類の分子量分布も糖蜜色素の分子量分布と同様に高分子区分および低分子区分の両ピ

Fig. 3 Gel chromatograms of filtrates of the treatment solution with *Mycelia sterilia* M 1 on day 3 and 5

Symbols ○ : before cultivation, △ : 3 days, □ : 5 days
The strain was cultured at 30°C using the molasses solution (10% w/v).

Fig. 4 Gel chromatograms of filtrates of treatment solution with *Mycelia sterilia* M 1 on days 5 and 10

Symbols □ : 5 days, × : 10 days
The strain was cultured at 30°C using molasses solution (10% w/v).

ークで減少が確認された。培養を開始した初発時に存在した低分子区分のピークは培養3日目にピーク面積として約3分の1まで減少し、高分子区分のピーク面積も約半分程度まで減少した。培養5日目にはそれぞれのピーク面積がわずかに減少し続けた。高分子区分および低分子区分のピーク面積の減少を比較すると、低分子区分に比べ、高分子区分の減少はわずかであった。これより、高分子区分の糖蜜色素は本菌による脱色作用を受けにくいものと推察した。また、初発時および5日目の対照区についてゲルクロマトグラフィーを行ったところ、糖蜜色素およびポリフェノール類のいずれのピークも初発時に比べてほとんど変化は認められなかった。ポリフェノールを酸化着色させる酵素としてポリフェノールオキシダーゼ (PPO) があげられる¹³⁾。培養基として用いている廃糖蜜にはPPOは存在しないため、*M. sterilia* M 1 株の非存在下における5日間の振盪操作では、糖蜜色素とポリフェノール類は安定した状態で培地中に存在しているものと推察した (特にデータとして示していない)。また、培養5日目と10日目の培養液を用いてゲルクロマトグラフィーを行ったところ糖蜜色素、ポリフェノール類共にほぼ同様の位置にピークが確認され、その溶出位置はほぼ等しいものの、わずかに増色するフラクションが高分子および低分子区分の双方に認められた (Fig. 4)。*M. sterilia* M 1 株はペルオキシダーゼ活性を有し、本酵素が酸化触媒として脱色反応に関与していると確認されている¹⁴⁾。本酵素の酸化作用により還元された糖蜜色素が培養期間中における振盪処理により再び酸化され、そ

の結果わずかに増色反応が進行したものと推察した。以上より、*M. sterilia* M 1 株は培養を開始してから5日目までに廃糖蜜に含まれる糖蜜色素とポリフェノール類のうち、脱色あるいは除去可能なすべての物質との反応を終了していることが推察された。

以上より、*M. sterilia* M 1 株は廃糖蜜中の糖蜜色素およびポリフェノール類の高分子画分から低分子画分に対して脱色および除去能を有していることが明らかになった。これは、*M. sterilia* M 1 株が糖蜜色素中に存在するポリフェノール類の低分子から高分子の物質まで、広く除去する能力をもつ有用菌であることを示唆するものである。今後は、糖蜜色素を構成する代表的な着色物質であるメラノイジン、カラメル、ポリフェノール酸化着色物質およびポリフェノール類の構成成分などを明らかにし、廃糖蜜の脱色反応過程におけるそれらの消長を明らかにする必要がある。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり、廃糖蜜を恵与して頂き、貴重なご助言を頂きました江橋正氏 (現、新三井製糖茅ヶ崎研究所所長) に感謝いたします。

要 約

Mycelia sterilia M 1 株による廃糖蜜の脱色反応過程における糖蜜色素とポリフェノール類の消長をゲルクロマトグラフィーにより調べた。その結果、糖蜜色素とポリフェノール類のゲルクロマトグラム上のピークはよく一致し、両者とも分子量11,800以上の高分子画分と5,900

以下の低分子画分に主要ピークが確認された。*M. sterilia* M1株を10%濃度の廃糖蜜溶液で10日間培養した場合、糖蜜色素の80%が脱色され、またポリフェノール類は95%除去された。ゲルクロマトグラフィーにより脱色処理前後の糖蜜色素とポリフェノール類の変化を調べた結果、脱色率およびポリフェノール除去率の上昇に伴って糖蜜色素およびポリフェノール類のゲルクロマトグラム

のピーク面積は低分子画分と高分子画分とも減少することが確認された。

文 献

- 1) 波多野和樹・大西章博・藤本尚志・中西載慶・鈴木昌治: *Mycelia sterilia* M1株による廃糖蜜の脱色と副生多糖の諸性質, 日食保蔵誌, **30** (5), 235~241 (2004)
- 2) 早瀬文孝: メラノイジンの化学, 日本農芸化学会誌, **61** (8), 970~973 (1987)
- 3) 木村 進・中林敏郎・加藤博通: 光琳テクノブックス18 食品の変色の化学 (光琳, 東京), p.328 (1995)
- 4) OHMOMO, S., AOSHIMA, I., TOZAWA, Y., SAKURADA, N. and UEDA, K.: Purification and some properties of melanoidin decolorizing enzymes, P-III and P-IV, from *Mycelia* of *Coriolus versicolor* Ps 4 a, *Agric. Biol. Chem.*, **49** (7), 2047~2053 (1985)
- 5) MIYATA, N., MORI, T., IWAHORI, K. and FUJITA, M.: Microbial decolorization of melanoidin-containing wastewaters : combined use of activated sludge and the fungus *Coriolus hirsutes*, *J. Biosci. Bioeng.*, **89** (2), 145~150 (2000)
- 6) 玉城 一・岸原士郎・藤井 聡・河本正彦・有田郁夫・平塚直秀: ポリビニルポリピロリドン処理廃糖蜜に対する各種担子菌の脱色性ならびに糖資化性の検討, 日食工誌, **33** (4), 270~273 (1986)
- 7) NAGANO, A. and SUZUKI, M.: Decolorization characteristics of polyphenolic compounds in the treatment of wastewater from a molasses alcohol distillery using *Mycelia sterilia* M1, *Food Sci. Res.*, **5** (4), 331~336 (1999)
- 8) PERRIN, D. D. and DEMPSEY, B.: 緩衝液の選択と応用 (講談社, 東京), p.152 (1981)
- 9) 日本水道協会: 上水試験方法 (日本水道協会, 東京), p.191 (1985)
- 10) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, p.703 (1990)
- 11) 荒木 峻・武藤義一編: 機器分析学 (日刊工業新聞社, 東京), p.221 (1994)
- 12) 福井作蔵: 生化学実験法1 還元糖の定量法 第2版 (学会出版センター, 東京), pp.49~52 (1990)
- 13) 化学大辞典編集委員会編: 化学大辞典8 (共立出版, 東京), p.770 (1975)
- 14) 波多野和樹: *Mycelia sterilia* M1株の廃糖蜜脱色メカニズムと脱色処理液の有効利用に関する研究, 東京農業大学博士論文, pp.104~116 (2005)
(平成16年12月17日受付, 平成17年9月16日受理)