微生物酵素による食品加工廃棄物の再利用

食品加工の際に産出する食品廃棄物の再利用は、資源有効利用の面のみならず環境汚染防止の面からも急務の事項である。

著者は、食品廃棄物の再利用の困難はそれが水に不溶であることに着目した。そこで、不溶性脱脂大豆の可溶化とオカラの分解を微生物の酵素を利用することにより、従来利用のむずかしい廃棄物の再利用について解説していただいた。

河 原 秀 久

1. は じ め に

最近、様々な環境汚染が世界中で問題化されている。原油による海洋汚染や自動車の排気ガスや工場の排気による大気汚染に関しては世界的に排除する方法が模索されている。一方、産業廃棄物による環境汚染の問題は、まだまだ立ち後れているのが現状である。そのうち、紙、鉄、木くずや空き缶などは再利用（再生紙など）の方向に進んでいる。しかし、年間数百万トンにも及ぶ食品加工廃棄物による環境汚染に関する解決策は、いまだ充分に対応されていない。これら食品加工廃棄物は、現在、家畜の餌として利用するか、あるいは化学的処理による分解か、単独の酵素での処理によりわずかに分解して得られたアミノ酸やタンパク質などを利用するかのどちらかである。特に、この化学的処理を行った場合、その処理液が環境汚染物質として問題となる。この点を解決するためには、酵素などを利用した穏やかな処理を開発する必要がある。

これらの廃棄物は、特に穀類などの加工時に多く産出されている。例えば、大豆・白米・小豆・トウモロコシなどである。最近では、抽出後のコーヒー粕や紅茶粕、さらにビール生産後の大麦やホップ粕なども含まれるようになった。これまでこれら食品加工廃棄物の栄養源の豊富さに着目して、それら廃棄物を利用した合成培地で微生物を培養し、有用な酵素を生産する方法が研究されているが、それほど良い結果は得られていない。これら廃棄物のうち、大豆（豆腐・味噌・醤油など）や白米（清酒）の加工後の廃棄物は、炭水化物やタンパク質を多く含んでいるために、特に栄養価が高いと思われる。しかし、これまで食品加工廃棄物の再利用方法が困難であった理由の一つは、廃棄物がほとんど水に不溶な物質である点である。

そこで、我々の研究室では、この廃棄物を再利用するために、まずこの不溶性物質を可溶化する能力を持つ微生物をスクリーニングすることにした。本稿では、まずタンパク質をターゲットとして不溶性大豆粕を分解する微生物と多糖をターゲットとしてオカラを分解する微生物に関して解説する。

2. 不溶性脱脂大豆粕を有効に分解する微生物

日本において大豆は様々な食品や調味料の原料として広く利用されているため、加工廃棄物の中で特に多く産出されている。現在、様々なタンパク質分解酵素が食品加工時にタンパク質を修飾するために利用されている（第1表）¹⁾。これらの酵素は原材料に対して作用させており、ほとんどが可溶性タンパク質に作用する酵素ばかりであるが、唯一廃棄物の再利用として応用されているのは、家畜の飼料として生産するために利用されているだけである。これら廃棄物のうち最も多く加工製品から産生されているのは、大豆粕である。乾燥大豆中には第2表に示したように、水分を除いた場合、タンパク質は全体の約40%も占める。大豆加工後の大豆粕の多くも炭水化物とタンパク質であり、特にタンパク質中には旨味成分となるグルタミンが多く含有している。しかし、この大豆粕は、ほとんど水に不溶性であるためにこれまでに効果的な再利用する方法がなかった。水に不溶性の性質は、その粕中の主要成分であるタンパク質、グルテン・ツェインが水に不溶性となる構造を持っているためである。しかし、これらタンパク質中の構成アミノ酸のうち約50%以上はグルタミンである。もし、この大豆粕中からグルタミンを大量に生産しようとするなら、不溶性タンパク質を分解できる活性を有する有効なタンパク質分解酵素が必要となる。これまでに知られている様々なプロテアーゼによる変性大豆タンパク質の分

Recycles of Food Industry's Wastes by Using Enzymes from Bacteria

Hidehisa KAWAHARA (Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University)

第1表 食品加工時のタンパク質分解酵素のタンパク質修飾への応用

食 品	目的または応用
パン類	パン生地軟化。きめの改善、およびパン容積の増大。 β -アミラーゼの遊離など。
ビール	発酵中にコク、フレーバー、および栄養素を引き出す。濾過、清澄化を助ける。低温混濁防止。
穀 類	タンパク質の修飾により乾燥速度を早め、製品を取り扱いやすくする。味噌、豆腐の製造。
チーズ	カゼインを凝固させる。熟成中にチーズ特有のフレーバーを引き出す。
チョコレートとココア	発酵中に豆に作用する。
卵・卵製品	乾燥性を増す。
家畜飼料	廃物の飼料化。消化剤（特にブタ用）
魚	魚タンパク質濃縮物の溶解性を高める。不可食部からの油およびタンパク質の回収。
豆 類	タンパク質水解物の製造。フレーバーの除去。プラスチック合成。
肉 類	食肉軟化作用。骨からタンパク質を回収。
ミルク	レンネット・ブディンクを凝固させる。大豆ミルクの製造。
タンパク質水解物	醤油などの調味料として。ブイヨン。乾燥スープ。粉末グレービー。プロセスミート。ダイエット・フーズ。
反栄養因子の除去	タンパク質分解酵素やアミラーゼに特異的なタンパク質インヒビターなど。
ワイン	清澄化。

第2表 大豆・豆腐・オカラの成分表 (g/100g)

	水分	タンパク質	脂質	炭水化物		灰分	無機質	ビタミン
				糖質	繊維質			
大豆（乾燥）	12.5	35.3	19.0	23.7	4.5	5.0	2.7	0.003
豆腐 木 綿	86.5	6.8	6.8	0.8	0	0.6	0.3	0.0002
絹ごし	89.4	5.0	3.3	1.7	0	0.6	0.3	0.0034
オカラ	81.1	3.6	3.6	6.4	3.3	0.8	0.4	0.0045

※食品成分表参照

第3表 各酵素の変性大豆タンパク質分解活性およびダイズタンパク質水解物を基質とした再合成反応の最適 pH

酵 素	由 来	最適 pH	
		分 解	再合成
酸性プロテアーゼ			
ペプシン	ブタ	1.6	4.5
モルシン	<i>Aspergillus saitoi</i>	2.8	5.5
ラビダーゼ	<i>Trametes sanguinea</i>	3.0	4.0
セリンプロテアーゼ			
α -キモトリプシン	ウン	7.8	5.0~6.0
トリプシン	ウン	8.0	5.5~6.5
ズブチリシン BPN'	<i>Bacillus subtilis</i>	7.5~8.5	6.0~7.0
プロナーゼ	<i>Streptomyces griseus</i>	8.0~9.0	6.0
ピオブラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	10.0~11.0	6.0
コロナーゼ	<i>Rhizopus</i> WR-35	7.0	4.0~5.0
プロチーム	<i>Streptomyces</i> No.1033	8.0~9.0	5.5~6.5
エスペラーゼ	<i>Bacillus subtilis</i>	9.0~10.0	6.5
チオールプロテアーゼ			
パパイン	<i>Papaya carica</i>	5.0~6.0	5.0~6.0
プロメライン	<i>Ananas sativus</i>	5.0~6.0	5.0~6.0
フィニン	<i>Ficus carica</i>	5.0~6.0	5.0~6.0

解活性の最適 pH について第3表に示した²⁾。これら酵素はあらかじめ変性させた大豆に作用するが、変性前の不溶性大豆粕を分解するかどうかは定かではない。

そこで、これら不溶性大豆粕を分解し、大量にグルタミンを得るためには、不溶性タンパク質を分解するプロテアーゼを自然界からスクリーニングする必要がある。

これまでに、不溶性タンパク質を分解するプロテアーゼは、Collagenase (E. C. 3. 4. 24. 3)³⁾ や Elastase, Pancreatic elastase (E. C. 3. 4. 21. 36)⁴⁾, Leukocyte elastase (E. C. 3. 4. 21. 37)⁵⁾, Keratinase⁶⁾ などである。そのうち、Collagenase は微生物由来の酵素、Elastase は、特に哺乳類由来の酵素が研究されている。Collagenase 生産菌はこれまでに *Clostridium histolyticum*⁷⁾, *Pseudomonas aeruginosa*⁸⁾, *Bacteroides melaninogenicus*⁹⁾, *Streptomyces madurans*¹⁰⁾, *Vibrio* sp.¹¹⁾, *Cytophaga* sp.¹²⁾ などが報告されているが、現在、*Bacillus* 属や *Saccharomyces* 属などの食品加工に利用されている微生物が Collagenase を生産する報告はほとんどない。最近、わずかに、納豆菌の一菌株が Elastase 生産菌として報告されているだけである¹³⁾。また、Collagenase が実際に食品加工に応用された例はまだ少ない。そこで、当研究室では、Collagenase が不溶性コラーゲンを可溶化コラーゲンにする活性を持つことに着目し、他の不溶性タンパク質も良好に可溶化できる新規な Collagenase を生産する微生物を広く自然界からスクリーニングすることにした。

(1) 新規な Collagenase 生産菌の同定¹⁴⁾とその酵素について

まず、Collagenase 生産菌をスクリーニングするために、コラーゲン (Type I, Insoluble from Bovine Achilles Tendon, SIGMA) を唯一の炭素源、窒素源とした培地を使用した。培地組成は 0.1% Na₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7 H₂O, 0.05% CaCl₂, 0.01% Yeast extract, 0.1% コラーゲン (pH 7.0) で行った。なお、コラーゲンは蒸気滅菌して、クリーンベンチ内で培地に添加した。一般に、単一の化合物でスクリーニングする際に、より効率的にスクリーニングするためには栄養素を添加する必要がある。この培地の場合、酵母エキ스는栄養素として添加している。広く、大阪府下の土壌サンプル (1 g) を集めて、滅菌水 (5 ml) に懸濁し、1 時間放置した後、上記スクリーニング培地 (10 ml) に 100 μ l 植菌し、30°C で 7 日間培養した。その結果、数個のサンプルでは、不溶性コラーゲンがすべて消失した。さらに、単一コロニーとなるまで、上記液体培地と平板培地 (0.3% Nutrient broth, 0.5% Yeast extract, 1.5% agar, pH 7.0) を使用して集積培養を行った。スクリーニング培地で生育が認められた菌株の培養上澄み液のコラーゲン分解活性を測定したところ、生育が良好で、活性が高い菌株が 3 株得られた。それらはグラム陽性 2 株、グラム陰性 1 株であった。なお、酵素活性は、不溶性コラーゲンを基質にして、37°C で 18 時間反応させた後、遊離したアミノ基量をニンヒ

ドリン発色により定量した (Mandle 法)¹⁴⁾。その 3 株のうち、グラム陽性細菌である DC-1 株が生育に比例して最も高い酵素活性が得られた。

この DC-1 株を Bergey's manual¹⁵⁾ に従って、分類学的諸性質を調べることによって同定を行った。第 4 表に示したように、本菌株は、グラム陽性、桿菌、孢子形成、通性嫌気性、非運動性、カタラーゼ、オキシダーゼ、ウレアーゼ陽性、G+C 含量 (45 mol%) などから *Bacillus* 属細菌であることが判明した。さらに、種の決定のために他の性質について種々検討したところ、O-F テスト・発酵、グルコースからの酸の生成、インドール・ジヒドロキシアセトン生成などから、DC-1 株は *Bacillus alvei* DC-1 と同定できた。この菌株を透過型電子顕微鏡で観察したところ、0.6~0.65 $\times$ 1.1~1.2 μ m の大きさであることが明らかとなった。

次に、先に述べたスクリーニング培地を使用して、2 日間、37°C で、DC-1 株を好気培養した。培養後、培地

第 4 表 DC-1 株の分類学的諸性質

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. alvei</i>	DC-1
Gram stain	+	+	+
Form	rods	short rods	short rods
Cell size (μ m)			0.6~0.65 $\times$ 1.1~1.2
Motility	-	-	-
Sporulation	-	-	-
Sporangium swollen	-	+	+
Anaerobic growth	-	+	+
Enzyme activity of			
catalase	+	+	+
oxidase	+	+	+
urease	+	+	+
O-F test	-	F	F
V-P test	+	+	+
Acid from			
D-Glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	-	-
D-Xylose	+	-	-
D-Mannitol	+	-	-
Nitrate reduction	+	-	-
Formation of			
indole	-	+	+
dihydroxyacetone	-	+	+
Hydrolysis of			
starch	-	+	+
casein	+	+	+
gelatin	+	+	+
Growth at			
pH 6.8 nutrient broth	+	+	+
pH 5.7	+	-	-
G+C content of DNA (mol%)	42.9	44.6	45.0

第1図 DC-1 株の培養液中の酵素の最適 pH
pH 4.0~6.0 酢酸緩衝液
pH 6.0~8.5 トリス-マレイン酸緩衝液

第5表 *B. alvei* DC-1 株の培養液中の酵素の基質特異性

基 質	活 性*
不溶性コラーゲン	3.81×10^7 Mandle unit/mg
コーングルテン	0.82×10^7 Mandle unit/mg
CBZ-Gly·Pro·Gly·Gly·Pro·Ala* (Fluka Chemie. AG)	49 unit/mg
カゼイン	0.5 unit/mg

* コラゲナーゼ活性測定用基質。活性単位は、遊離した Gly·Pro·Ala 量をニンヒドリン法で定量して行った。

中に残ったコラーゲンを濾過することにより除き、遠心分離により、菌体を遠沈し、その上澄み液の酵素活性を測定した。第5表に示したように不溶性コラーゲンに対する分解活性は、 3.81×10^7 (Mandle unit/mg) であった。さらに、コーングルテンを基質にした場合、活性値は、 0.82×10^7 (Mandle unit/mg) となり、コラーゲン分解の約 22% となった。さらに、コラゲナーゼ活性測定用合成基質に対する活性は、49 unit/mg であることが明らかとなった。この比活性は、*C. histolyticum* の培養液中の酵素活性の約 1.8 倍であった。また、非特異的プロテアーゼのカゼイン分解活性は、0.5 unit/mg であった。この値は、コラゲナーゼ活性の 1% であった。さらに、培養液中の酵素活性の最適 pH について検討を行った。その結果、第1図に示したように、コラーゲン分解に対する最適 pH (a) は、pH 4.5, 6.0, 7.0 の3つのピークが得られた。一方、コーングルテンミール分解に対する最適 pH は、6.0, 7.5 の2つのピークが得られた。以上の結果から、本菌株は、少なくとも3種のコラゲナーゼを生産していることが明らかとなった。特に、最適 pH 4.5 であるコラゲナーゼはコラーゲンに対して特異性が高いと予測できた。さらに、これまでに最適 pH が酸性側に持つコラゲナーゼは、今までにほとん

ど報告がなく、酵素の性質の面においても興味がある。また、コラーゲン以外の不溶性タンパク質も分解できるコラゲナーゼを生産していることから、これら酵素を用いての応用開発が期待できる。

(2) DC-1 株の培養液中の酵素を用いての不溶性物質からのアミノ酸生産¹⁶⁾

先ほど述べたように、コラーゲン資化性菌である *B. alvei* DC-1 株は培地中に不溶性タンパク質を分解できる酵素群を生産していることが明らかになった。そこで、まず、他の不溶性タンパク質を炭素源、窒素源として培養を行った。その結果(データは示していない)、コラーゲンの場合に比べて、コーングルテンミール培地の場合、本菌株の生育は 3.3 倍となり、培養後の菌体外タンパク質量は、3.6 倍となった。さらに、乾燥大豆粉末の場合、生育は 2.2 倍、タンパク質量は 2.9 倍となった。さらに、オカラについても検討を行ったが、コラーゲンの場合と差異が認められなかった。この結果からも、本菌株が不溶性タンパク質を分解できる酵素群を生産していることが明らかになった。

この点に着目し、本菌株を用いて種々の不溶性タンパク質からのアミノ酸、ペプチド生産の基礎的研究を試みた。第6表に示したように、コラーゲンを誘導基質にした場合、すべての基質を平均的に分解した。なお、コラーゲンを誘導基質にした場合のコラーゲン分解活性値を 100 として相対活性で表示した。コーングルテンミールと乾燥大豆粉末で誘導した場合、コラーゲンと乾燥大豆粉末分解活性が比較的高い値を示した。また、オカラを誘導基質とした場合、オカラ分解活性がコラーゲンを誘導基質にした場合の約 2.2 倍であった。この高活性が得られた要因としては、乾燥オカラの主成分が炭水化物(第2表)であるために、不溶性多糖分解酵素も誘導されているためである。この結果から、DC-1 株はオカラ可

第6表 各種誘導基質で培養した後の培養上澄み液中の分泌酵素による
各基質分解活性の相対活性（コラーゲン／コラーゲン，100）

誘導基質	相対活性（％）			
	コラーゲン*	グルテンミール*	乾燥大豆粉末*	オカラ*
コラーゲン	100	95.2	133	71.5
グルテンミール	95.6	35.9	59	57.3
乾燥大豆粉末	136	47.9	85.5	N.T.
オカラ	71.5	0	N.T.	156

酵素反応は、pH 7.4，18 時間，37°C で行った。

* 酵素基質

第7表 各種基質分解反応後（18 時間・66 時間）の遊離ペプチド，遊離アミノ酸量

酵素基質	コラーゲン		グルテンミール		乾燥大豆粉末		オカラ	
	18hr	66hr	18hr	66hr	18hr	66hr	18hr	66hr
比活性 (Mandle u/mg)×10 ⁵	25.5	57.6	0.45	18.5	35.1	112.0	28.4	24.6
ペプチド (nmol/l)	2,182	5,116	N.D.	1,623	3,205	10,440	3,175	3,722
アミノ酸 (nmol/l)	194	336	134	172	310	1468	149	83

第8表 培養上澄み液あるいは硫酸画分による各基質の重量分解率

基 質	重量分解率 [% (w/v)]		
	pH 7.4 (上澄み液)	pH 7.4 (硫酸画分)	酸性 (上澄み液)
コラーゲン	10.0	34.7	2.4
グルテンミール	8.0	17.9	11.9
乾燥大豆	N.T.	34.7	N.T.
オカラ	23.6	N.T.	8.2

酵素反応は、18 時間，37°C で、pH 7.4 と各基質の最適酸性 pH で行った。コラーゲン，pH 4.5，グルテンミール，pH 6.0，オカラ，pH 5.5。

反応に使用したタンパク質濃度は，上澄み液・26.1μg/ml，硫酸画分・642μg/ml である。

溶化にも利用できる可能性を持っている。

次に，コラーゲンを誘導基質にして培養した時の培養液中の酵素群による各不溶性物質からのアミノ酸とペプチド生産量について検討した。第7表に示したように，オカラ以外の不溶性物質を分解した時に時間に比例して，遊離のアミノ酸とペプチド量が增大していることが明らかとなった。特に，乾燥大豆粉末を 66 時間反応した時に，ペプチド・アミノ酸量ともに最大となり，ペプチド量がアミノ酸の7倍量も生産することが明らかとなった。なお，データには示していないが，どの基質に対しても 66 時間以上反応した場合，ペプチド・アミノ酸量はさらに生産できた。以上の結果から，DC-1 株の培養液を用いることによって，様々な不溶性タンパク質を可溶化し，アミノ酸・ペプチドを得ることができる可能性がある。次に，培養上澄み液と 80% 硫酸画分を用い

て，実際に不溶性タンパク質を分解し，可能化できるかどうか各基質に対する重量分解率を測定した。第8表に示したように，硫酸画分後の酵素液によって 18 時間処理によって，コラーゲンと乾燥大豆粉末に対して34.7%も重量分解した。コーングルテンミールに対しては17.9%であった。この結果からも，本菌株の培養上澄み液を用いると乾燥大豆粉末とコーングルテンミールを可溶化できることが明らかになった。

そこで，不溶性大豆タンパク質からのアミノ酸の生産についての基礎実験について検討を行った。まず，本菌株の菌体内酵素活性について種々分析を行ったところ，高活性のアミノペプチダーゼ¹⁷⁾とグルタミナーゼとエンドプロテアーゼを有することが明らかとなった。そこで，本菌株を培養した後，培養液のまま超音波破碎させて，不溶性大豆タンパク質の分解を試みた。データには示されていないが，約1週間の反応によって，タンパク質中の全窒素含量当りに換算すると生産されたグルタミン酸量は，醤油中のグルタミン酸に匹敵する量に相当することが明らかとなった¹⁸⁾。

以上，今回コラーゲナーゼ生産菌として分離した *Bacillus alvei* DC-1 株の培養後の培養液と菌体を超音波破碎処理した粗酵素液を用いると，種々の不溶性タンパク質を分解することができた。さらに，不溶性大豆タンパク質などから効率的にグルタミン酸などの各種アミノ酸あるいはペプチドを生産することができた。今後，より生産性を高めるためには，さらなる検討が必要であると思われる。

3. オカラ分解菌とその酵素による オカラ分解条件について

オカラは大豆から非発酵食品である豆腐を製造する際に必ず産生する副産物である。大豆から豆腐を製造する際の収率は、乾物にして、約 46% である。つまり、残りの 54% のうち、わずかに豆乳・湯葉・オカラなどの食品として利用されているだけである。特に、オカラは不溶性であるために食品として利用される量はほんのわずかであるが、大豆 1 kg から約 1.4 kg (水分 85%) のオカラが製造されている。第 2 表に示したように、オカラは、水分を除くと約 51% が炭水化物であり、そのうち 34% は繊維質であるために、不溶性の性質を持っている。その繊維質の大部分は、ポリガラクトuron酸で構成されたペクチン質であり、その他若干の多糖が含まれている。これまでに、オカラの利用性を高めるために、市販の酵素での処理によって可溶化できるかどうか試みられているが、結果として実用化できるまでの可溶化率は得られていない。その要因として考えられることは、単独の酵素では、充分には可溶化できないし、オカラ成分全体を特異的に可溶化する酵素が未だ見いだされていないからであると思われる。

そこで、当研究室では、オカラを唯一の炭素源、窒素源として利用し、生育できる微生物を分離し、その分離菌が生産する酵素群を用いて、オカラの可溶化条件について検討を行った。

(1) オカラ分解菌の分離および性質とその培養条件について¹⁹⁾

オカラを有効に利用する微生物を分離するために第 9 表に示した培地を用いて、大阪府下の土壌サンプルから広くスクリーニングを試みた。なお、オカラは水分を除き、乾燥粉末 (14 メッシュ以下) として使用し、培地に添加する場合には、蒸気殺菌 (20 分間, 3 日間) した後クリーンベンチ内で添加した。その結果、スクリーニング培地 (pH 7.0) (第 9 表) で、24 時間培養により良好な生育を示した菌株を集積培養した結果、約 50 株が得られた。そのうち、培養菌体を超音波破碎した酵素溶液により、1% オカラ分解活性の高い菌株をスクリーニングした。指標として、反応後 (pH 5.0, 7.0, 9.0) オカラから遊離した還元糖量を用いた。その結果、第 10 表に示した BCRD-1 株が 3 種の pH で平均的に最も多量の還元糖を遊離し、生育度も良好であった。

そこで、BCRD-1 株について、Bergey's Manual に従って同定を行った。その結果、本菌株はグラム陰性、通性嫌気性、オキシダーゼ・ウレアーゼ陰性、カタラーゼ陽性、O-F テスト・発酵、V-P テスト陰性、各糖から

第 9 表 オカラ分解菌スクリーニング培地

MgSO ₄ ·7 H ₂ O	5.0 g
KCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
乾燥オカラ	10.0 g
蒸留水	1,000 ml

pH 7.0

乾燥オカラ (14 メッシュ以下) は蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で添加する。

第 10 表 BCRD-1 株の分類学的諸性質

	BCRD-1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
Shape	rods	rods
Cell diameter, μ m	0.2~0.3	0.6~1.0
Cell length, μ m	1.2~1.3	1.2~3.0
Gram stain	—	—
Motility	—	d
Flagella	—	d
Endospore	—	—
Anaerobic growth	+	+
Aerobic growth	+	+
Growth factor required	—	—
Temperature for growth	18~37°C	N. T.
Initial pH for growth	pH 5~11	N. T.
Oxidase	—	—
Catalase	+	+
Urease	—	—
Gelatin liquefaction	—	d
Starch hydrolysis	+	N. T.
Casein hydrolysis	—	—
Esculine hydrolysis	+	d
Lipase	—	—
Nitrate reduction	+	+
O-F test	F	F
Methyl red test	—	d
V-P test	—	d
Simmons' citrate	—	d
ONPG test	+	+
DNase test	—	—
Indole production	—	d
Yellow pigment	+	+
Acid from		
Sorbitol	—	—
Sucrose	+	d
Raffinose	+	d
Xylose	+	+
Mannitol	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	d
Arabinose	+	+
myo-Inositol	+	—
α -Methylglucoside	+	—
G+C content of DNA (mol%)	56.9	53~58

d : 一般に 11~89% が陽性である。

第2図 オカラ分解菌の生育に対する培養温度と pH
スクリーニング培地を用い、30°C、24 時間、培養した後波長、660 nm で生育度を測定した。

第3図 最適培地でのオカラ分解菌の生育と各酵素活性
(A) 生育 ●, 生育 ○, pH
(B) 酵素活性 ●, 可溶性酵素 ○, 還元糖遊離酵素
可溶性酵素活性は、酵素反応させた後、残存したオカラの乾燥重量を測定して算出した。還元糖遊離酵素は、酵素反応後、上澄み液の還元糖量を測定した。

の酸の生成、GC 含量などから腸内細菌の一種である *Enterobacter* 属細菌に属していることが明らかとなった。さらに、デンプン、ゼラチン、カゼイン加水分解能、色素生成などから *Enterobacter agglomerans* に最も近い菌種であると予測でき、種々比較を行った結果、すべて一致しなかったため、新種であると考えられ、*Enterobacter* sp. BCRD-1 と同定した。

そこで、次に BCRD-1 株のオカラ培地（第9表）における最適培養条件について検討を行った。まず、最適温度と最適 pH について検討を行った。その結果、最適温度 30°C、最適 pH 7.0 であることが明らかとなった（第2図）。さらにデータとして示してはいないが、補助窒素源として種々の無機窒素について検討を行ったところ、NaNO₃ (1%) 添加で最も良好な生育が得られた。さらに、補助炭素源としてグルコース濃度の影響について検討を行ったところ、0.5% グルコース添加で最も良好な生育と高いオカラ分解活性が得られた。以

上の結果から、第 11 表に示した培地をオカラ分解菌の最適培地と決定した。次に最適培地におけるオカラ分解菌、BCRD-1 株の生育と培養時間とオカラ分解酵素活性について検討を行った。その結果、第3図（A）に示したように、約 12 時間の誘導期の後、対数期を経て、約 20 時間後に定常期に入ることが明らかになった。この時の BCRD-1 株の世代時間は 4.2 時間であった。オカラ分解酵素活性は、乾燥オカラを基質として、36°C、pH 7.0 における 18 時間反応させた。なお、オカラから遊離した還元糖量とオカラ可溶化率を酵素活性として測定した。還元糖は 3, 4-ジニトロサリチル酸法で、可溶化率は、反応後の溶液中のオカラ残査を濾紙（No. 2）で濾過し、凍結乾燥により乾燥後、重量を測定することにより算出した。第3図（B）に示したように、還元糖遊離酵素活性は培養開始後、12 時間に活性ピークが認められ、可溶性酵素活性は、20 時間に活性ピークが認められた。以上の結果から、BCRD-1 株は複数の酵素を

第 11 表 オカラ分解菌の最適培地

MgSO ₄ ·7 H ₂ O	5.0 g
KCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaNO ₃	10.0 g
グルコース	5.0 g
乾燥オカラ	10.0 g
蒸留水	1,000ml
pH 7.0	

生産することによって、オカラを分解することが明らかとなった。

(2) BCRD-1 株が生産する酵素群によるオカラ分解反応条件について¹⁹⁾

先に述べたように 2 種の酵素はそれぞれ 12, 20 時間培養した培養液を粗酵素液として使用した。反応条件について、まず反応液中のオカラ量と反応に使用する酵素

タンパク質量の影響について検討を行った。その結果、第 4 図に示したように、反応液中のオカラ量を増大させるに伴い、両活性とも急激に低下することが明らかになった。これは反応液に 1.0% (w/v) 以上のオカラを添加すると、オカラが水分を含むため反応液がほとんど固体状になるためである。次に、2% (w/v) のオカラ量の反応液に添加するタンパク質量の影響について検討を行ったところ、可溶性酵素活性は、36 μ g のタンパク量で活性ピークが認められた。一方、還元糖遊離酵素の活性はタンパク質量に比例して、活性が増大することが明らかとなった。オカラの可溶性酵素と還元糖遊離酵素は全く異なった酵素であることが予測できた。また、オカラの可溶性酵素が酵素量を増大した時に、活性値が低下した。この要因として考えられるのは、酵素と基質との相互関係のためであると考えられた。

次に、オカラ分解における反応最適温度と最適 pH について検討を行った。その結果、第 5 図に示したよう

第 4 図 酵素反応条件 (1)

(A)(B)とも ●, 可溶性酵素 ○, 還元糖遊離酵素
オカラの重量を 0.2 g としてタンパク量の影響について検討した。
可溶性酵素は、1 分間に 1 mg のオカラを可溶化できる酵素活性を 1 U とした。

第 5 図 酵素反応条件 (2)

(A) (B)とも ●, 可溶性酵素 ○, 還元糖遊離酵素
両条件とも、オカラを 0.2 g/10 ml で 18 時間反応させた。

に、両酵素活性は最適温度 37°C であったが、最適 pH は両酵素活性で異なり、オカラの可溶性酵素活性は pH 7.5、還元糖遊離酵素活性は pH 7.0 であることが明らかとなった。可溶化率を重視する点から、反応 pH は 7.5 で以後の反応実験を行うことにした。次に、この両酵素活性の熱安定性について検討を行ったところ、40°C 以上、30 分間の熱処理によって著しく低下した（データ未表示）。また、最適反応条件でオカラの可溶化を試みたところ、反応開始後、48 時間で反応は平衡化し、その時の可溶化率は約 40% であることが明らかとなった。

さらに、BCRD-1 株が生産するオカラ分解酵素が既存のどの多糖分解酵素に相当するかどうか検討した。デンプン、セルロース、ペクチン分解活性について検討を行ったところ、デンプンとペクチンから還元糖を遊離することが明らかとなった（データ未表示）。この結果から、本菌株はオカラ培地での生育時に培地中にペクチナーゼとアミラーゼを生産することによってオカラを分解することが明らかになった。さらに、オカラ分解反応後の反応液中の還元糖を分析したところ、還元糖（グルコース、キシロース、マンノース、ガラクトース）とオリゴ糖であることが明らかになった。以上、BCRD-1 株の培養液を酵素液として利用した時、オカラを有効に可溶化し、オリゴ糖や単糖などの還元糖を生産することが可能となった。さらに、反応条件については、さらに使用する酵素量を増大させると、より多量のオカラの可溶性反応が可能となる。

4. ま と め

今回、穀物類の食品加工時に多量に生産される副産物である不溶性タンパク質・不溶性多糖を有効に分解する微生物を分離することができた。さらに、それら分離菌株が生産する酵素群を利用すれば、より効率的にそれら不溶性物質を分解し、アミノ酸（ペプチド）やオリゴ糖（還元糖）を生産することが可能となった。今回、試験的レベルではあるが不溶性物質を可溶化し、再利用系の確立において若干ではあるが成功した要因としては、各不溶性物質を栄養源として特異的に利用できる微生物を広く自然界からスクリーニングを行い、その分離菌株が生産するすべての酵素群を利用したからであると思われる。しかし、この成功には、分離菌株が病原性を持つ微

生物ではなかったことである。今後の研究課題としては、さらに別の基質（酒粕やビール加工粕など）を用いて新しい微生物をスクリーニングし、今回分離した菌株をさらに変異処理することにより、より有効な微生物を分離し、さらなる応用研究を行う予定である。

〈関西大学工学部生物工学科〉

文 献

- 1) 藤巻正昌, 荒井綜一監, R.E. フィニー, J.R. ウィテーカー編, “食品蛋白質 化学的・酵素学的修飾による改良”, p. 92 (1979)
- 2) 藤巻正昌, 荒井綜一監, R.E. フィニー, J.R. ウィテーカー編, “食品蛋白質 化学的・酵素学的修飾による改良”, p. 156 (1979)
- 3) S. SEFTER and E. HARPER: *The Enzymes*, 3, 649 (1971)
- 4) D. M. SHOTTON: *Meth. Enzymol.*, 19, 113 (1970)
- 5) A. J. BARRETT: *Meth. Enzymol.*, 80, 581 (1981)
- 6) H. MATSUBARA and J. FEDER: *The Enzymes*, 3, 323 (1971)
- 7) S. SEIFTER, P. M. GALLOP, L. KLEIN and E. MEILMAN, *J. Biol. Chem.*, 234, 285 (1959)
- 8) G. SCHOELLMANN and E. FISHER, Jr.: *Biochim. Biophys. Acta*, 122, 557 (1966)
- 9) R. G. GIBBONS and J. B. MACDONALD: *J. Bacteriol.*, 81, 614 (1980)
- 10) J. W. RIPPON: *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 147 (1968)
- 11) G. C. REID, D. R. WOODS and F. T. ROBB: *J. Bacteriol.*, 142, 447 (1980)
- 12) Y. SASAGAWA, Y. KAMIO, Y. MATSUBARA, Y. MATSUBARA, K. SUZUKI, H. KOJIMA and K. IZAKI: *Biosci. Biotech. Biochim.*, 57, 1894 (1993)
- 13) 村松芳多子, 金井幸子, 三浦紀子, 木村典代, 吉田桂子, 木内 幹: 1993 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 110 (1993)
- 14) H. KAWAHARA, M. KUSUMOTO and H. OBATA: *Biosci. Biotech. Biochim.*, 57, 1372 (1993)
- 15) N. R. KRIEG and J. G. HOLT: “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”, 1 (1984)
- 16) 特許申請中
- 17) 河原秀久, 楠本 護, 高木博史, 小幡 斉, 平成 5 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p. 97 (1993)
- 18), 19) 特許申請中