

研究ノート

糸状菌の植物組織崩壊特性を利用する漬物製造

谷口 久美子¹⁾、永吉 恵美²⁾、久保 知佳²⁾、平井 啓理¹⁾、森 勝史¹⁾、
佐藤 勉³⁾、今野 宏³⁾、瀧井 幸男²⁾

¹⁾ 京つけもの西利 (〒600-8581 京都市下京区堀川通七条上ル西本願寺前)

²⁾ 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 (〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

³⁾ 株式会社 秋田今野商店 (〒019-2112 秋田県仙北郡西仙北町刈和野 248)

著者連絡先 〒600-8581 京都市下京区堀川通七条上ル西本願寺前

(受取日：2008年1月30日、受理日：2008年2月9日)

要旨：糸状菌 *Rhizopus* 属 10 菌株を 34°C で 5 日間、小麦フスマ 80% 蒸し培地で培養後、得られた培養液について、ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L.H.Bailey) の内芯可食部に対する崩壊活性を検討した。その結果、*R.oryzae* MIB347 株は、もっとも高い崩壊活性、ペクチナーゼ活性およびセルラーゼ活性を示した。本活性を利用して、根菜下漬けに於ける食塩代替の可能性を検討した。

キーワード：糸状菌、小麦フスマ、*Rhizopus oryzae*、植物組織崩壊活性、ペクチナーゼ、セルラーゼ、減塩漬物

1. はじめに

糸状菌が生産する加水分解酵素系は、清酒を始め、わが国の伝統的醗酵産業に汎用されている [1,2]。とりわけ *Aspergillus* 属や *Rhizopus* 属糸状菌のペクチナーゼやセルラーゼは、植物細胞の強固な細胞壁を効率よく分解するものが多い [3-6]。

小麦フスマは、ヒトの整腸作用をはじめとする食物繊維源 [7,8] として期待されている一方、地球の温暖化対策やエネルギーの安定供給の確保といった観点から、再生可能でクリーンなバイオマスエネルギー資源としての可能性が拡大している [9]。

本研究では、食品加工産業で副産物として著量に生じる根菜外皮および未利用バイオマス

資源である小麦フスマの有効利用に資する糸状菌を取得しようとした。

2. 実験方法

1) 糸状菌の培養

武庫川女子大学遺伝子研究室保存の *R.oligosporas* MIB343、*R.chinensis* 2 株 (MIB344、345)、*R.oligosporas* MIB346、*R.oryzae* 6 株 (MIB347-MIB352) を各々ポテト・デキストロース基本培地 [10] で、34°C で 5 日間培養して得られる外生胞子を接種源とした。培地の滅菌は、1.2 気圧、121°C で 20 分間のオートクレーブ操作で滅菌した。

蒸し操作は以下のように行なった。例えば 80% 蒸しとは、小麦フスマ (奥本製粉株式会社

製飼料A赤フスマ) 100g に水道水 80 ml を散布し、よく攪拌混合した後、蒸気を1時間通じて蒸し処理したものとした。散水蒸し条件の標準菌株として、*R.oryzae* MRRL3995 を用いた。

2) 酵素の調製

培養後のフスマ培地に5倍量の氷冷した蒸留水を加え、冷却した乳鉢内で10分間摩砕後、TOYOろ紙No.1を用いてろ過し、得られたろ液を酵素液として用いた。菌を接種しないフスマ培地を同様に処理して得られたろ液を酵素活性の盲検とした。

3) 崩壊活性の測定方法

厚さ3cmに輪切りにしたダイコン(直径6cm)を半割りにし、皮をむいた2分の1切片(半径3cm、厚さ3cm)を内芯可食部とし、同時に生じる外皮をダイコン皮部とした。内芯可食部3個あるいは外皮3片を酵素液に浸し、34°Cで2日間保温した。崩壊活性は、切片あるいは外皮について、反応前と反応後に於ける生重量の差を反応前生重量あたりで除した残存率(%)で表した[4]。蒸留水に浸した以外、同一条件で保温した3個の試料検体を盲検とした。

さらに5.0 x 1.5 cm角に切り分けた白菜の内芯部についても、同様に崩壊活性を求めると同時に、目視と手揉みにより漬け状態を評価した。

4) 他の酵素活性の測定

ペクチナーゼ反応は、酵素0.3mlと0.2%ペクチン酸を含む20mMリン酸緩衝液(pH6.8)0.5ml中で、34°Cで10、20、30、40分間保温して行なった。次いで10分間煮沸し、8,000rpmで5分間遠心後、得られる上清中の還元糖をジニトロサリチル酸法で測定して求めた[11]。酵素の1ユニット(U)は、1

時間に1mgの還元糖を生成する量と定義した。セルラーゼ活性の測定は、上記反応液中のペクチン酸をカルボキシメチルセルロースで置換した以外はペクチナーゼと同様に行ない、酵素量の定義も同一とした。数値はすべて3個の平均値で表した。 β -グルコシダーゼ反応は、ペクチン酸を1mMの

-nitrophenyl- β -D-gluco-pyranosideに換えて同様に行なった。10%Na₂CO₃を3ml加えて反応を停止後、上清を540nmで測定した。酵素の1Uは、1時間に1 μ molの基質を分解する量とした。

3. 結果と考察

1) 酵素生産性の評価

R.oryzae MIB347は、検討した糸状菌10菌株のうちで唯一のセルラーゼ生産菌であると同時に、最も高い崩壊活性とペクチナーゼ活性を有していた(表1)。*R.oryzae* MIB349、350は、MIB347と同様の酵素生産性を示したが、セルラーゼ活性は認められなかった。一方、セルロース分解系の最終酵素である β -グルコシダーゼは、10菌株すべてにおいて認められた。

表1 *Rhizopus* 属糸状菌の各種酵素生産性

MIB No	崩壊活性(%)	Pectinase (U)	Cellulase (U)	β -gluco-sidase (U)
343	nd	2.20	nd	0.83
344	nd	nd	nd	0.82
345	nd	0.66	nd	2.19
346	nd	1.94	nd	0.45
347	21.1	4.07	1.64	0.54
348	nd	1.52	nd	0.52
349	33.6	3.28	nd	0.62
350	30.9	2.95	nd	0.18
351	nd	1.06	nd	0.43
352	nd	1.52	nd	0.56

nd: 基本条件下での検出限界値以下を示す。

R. oryzae MIB347 のセルラーゼが、エンドグルカナーゼ (EC 3.2.1.4)、エキソグルカナーゼ (セロビオヒドロラーゼ: EC 3.2.1.91) のいずれに属するタイプかは、今後の検討課題である [4,6,12]。糸状菌では、ペクチナーゼ活性が崩壊活性と関連性を有することが報告されている [4]。

根菜類漬物製造時の下漬け過程では通常、食塩の浸透性と殺菌力を利用して、野菜を 3-10% 濃度の食塩水に浸漬することが行なわれている。しかし近年、生活様式の多様化とともに、嗜好性の高い一夜漬けや浅漬けの漬物の消費が増大する一方、食塩の過剰摂取の害が懸念され、漬物は保存型から減塩、健康志向型食品へと転換する傾向にある。

食塩水 (3.3% NaCl) を *R. oryzae* MIB347 由来酵素 (ペクチナーゼ換算: 1-10 U/ml) に置き換えて、白菜の内芯部を 10°C で 4 日間保存し、目視と手揉みにより漬け状態を評価した。10.0U/ml~5.0U/ml 酵素中では「やや浅いものの漬かっている」で、1.0U/ml では「生の状態と変わらない」となった。この結果、糸状菌由来酵素 (5.0U/ml 以上) を用いて 10°C で下漬けすることにより、低分子の旨味成分が浸透しやすくなる「漬かり」状態が示された。MIB 347 崩壊酵素を凍結乾燥後、4°C で保存した場合、57 日目で 51% の活性を保持していたことから、凍結乾燥標品は、種々の根菜下漬け用基材として 1-2 ヶ月間使用可能であると考えられる。

2) 蒸気蒸しの効果

平成 19 年度の農水省集計で、余剰農業廃棄物としての未利用小麦フスマは、年間 190 万トンに達している。小麦フスマには、アミノ酸、ミネラル、ビタミン類などの栄養成分が含まれるため、崩壊活性の高い糸状菌の培養基として

の用途が考えられる。さらに、フスマ自身が有する可溶性食物繊維は、ガン予防や血圧上昇抑制作用があることが報告されている [13-15]。

醸造業では蒸し過程により米麦素材が膨潤し、種々の基質が吸収されやすくなるとともに、アミラーゼ、プロテアーゼなどの加水分解酵素生産が亢進されることが知られている。*R. oryzae* MIB347 について、50-100% の散水条件下で調製した小麦フスマを用いて培養した結果、80% 蒸しにおいて培養基容積が蒸し過程なしに比べ、2 倍に増加するとともに、崩壊活性が 10 倍以上に上昇することが示された (表 2)。

表 2 *R. oryzae* MIB347 および NRRL3995 が生産する崩壊活性に対する散水蒸し条件の検討

散水 (%)	崩壊活性 (%)	
MIB347	可食部	外皮部
	50	3.27 17.0
	80	1.60 2.96
100	9.03	10.46
NRRL3995	可食部	外皮部
	50	5.70 15.57
	80	3.82 5.97
100	5.42	8.08

可溶性食物繊維成分、ビタミン類、アミノ酸などが培養基に溶出して、*R. oryzae* MIB347 による崩壊酵素 (ペクチナーゼ) 生産が顕著に賦活された可能性が考えられる [16]。

本研究で示された蒸気蒸しフスマ培地は、小麦フスマと水道水のみで作製でき、安価で大量調製が可能な培養基材である。本培養基で *R. oryzae* MIB347 を培養後、生産される崩壊酵素を活用すれば、漬物製造産業などで著量に生じる根菜外皮の低減化が図られる。キャベツ、

日野菜についてもダイコンと同様の崩壊効果が得られており、食塩添加なしに根菜類の下漬けを行なうことが可能となった。将来、旨味と歯ざわりに富む健康食品として、減塩漬物の登場が期待される。

厚生労働省の「健康日本21」で奨励されている野菜の一日摂取量は、350g以上とされているが、現状はこれをはるかに下回る。将来の国勢を担う若年世代にあつては、緑黄色野菜摂取を避ける傾向がみられ、学童期からの食育を通じて、適正な栄養指導を行なっていくことが必要である。

漬物は、季節感を味わいながら、日々三度の食事でアミノ酸、ミネラル、ビタミン、食物繊維をバランスよく摂取できる機能性食品 (physiologically functional food) と考えられる。これを減塩条件下で製造できれば、健康食品としての機能が一層増すのではないだろうか。

4. 文献

1. 長尾精一：小麦とその加工、262-264 建帛社 (1989)
2. Introduction to food-borne fungi (ed.R.A. Samson and E.S.Hoekstra) Centraalbureau voor Schimmelcultures 4th ed. Ponsen & Looyen, Wageningen (1995)
3. Yukio Takii, Kimiko Ikeda, Chihiro Sato, Megumu Yano, Tsutomu Sato and Hiroshi Konno. Production and characterization of beta-glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348 *J.Biol. Macromol.* 5:11-16 (2005)
4. 植野典子、口西裕子、瀧井幸男、松本正、戸田隆：土壌分離菌によるバレイショ組織のマセレーション 日本食品化学学会誌 5 38-43 (1998)
5. Moriya T, Murashima K, Nakane A, Yanai K, Sumida N, Murakami T, Kono T.: Molecular cloning of eno-beta-D-1,4-glucanase genes, rce1, rde2, and rce3, from *Rhizopus oryzae*. *J. Bacteriol.* 185 1749-1756 (2003)
6. Park EY, Anh PN, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to L(+)-Lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol.* 93 77-83 (2004)
7. Sasaki, T. et al.: Comparison of physical properties of wheat starch gels with different amylose content. *Cereal Chem.*, 79, 861-866 (2002)
8. Ou, S. et al.: In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1026 - 1029 (2001)
9. Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., and Fukuda, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem, Engin, Journal* 34, 273-278 (2007).
10. Handbook of microbial media *In:* R.M. Atlas and L.C. Parks (eds.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo (1993)
11. Dubois, M. et al.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356 (1956)
12. Yukio Takii, Naohiro Kuriyama: Purification and characterization of two cellulases from *Thermomonospora curvata* KP1246. *J. Biol. Macromol.* 6,

- 17-20 (2000)
- 13.児玉俊明：高血圧自然発症ラットにおける小麦フスマヘミセルロースの血圧上昇抑制効果 日栄食誌, **49**, 101-105 (1996)
- 14.石川秀樹：癌の化学予防 小麦フスマによる予防, *Mol. Med.*, **33**, 400-406 (1996)
- 15.ShiiBa, K. et al.: Preparation and characterization of water-soluble hemicellulose (arabinoxylan) from wheat bran. 日食工誌, **39**, 1147-1155 (1992)
- 16.笠井八重子：市販漬物のペクチン質について岡山大学教育学部研究集録 **72** 55- 56 (1986)

責任編集者：土井裕司

