

研究報文

醤油膜ろ過残液中多糖類のエタノール分別沈殿と清澄醤油の回収

川口友彰, 野田義治*, 植木達朗*, 脇山元気*, 野見山修治
 (福岡県工業技術センター 生物食品研究所, *福岡県醤油醸造協同組合)

(平成31年 2月13日受理)

Ethanol fractional precipitation of polysaccharides from shoyu cross-flow filtration retentate

Tomoaki Kawaguchi, Yoshiharu Noda*, Tatsuro Ueki*, Motoki Wakiyama*, Shuji Nomiyama
 (Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center,
 *Fukuoka Soy Sauce Brewing Cooperation)

醤油のクロスフロー膜ろ過残液の処理方法として、エタノール沈殿の有効性を調べた。分別沈殿法により、エタノール終濃度33% (v/v) で高分子多糖類の大部分が沈殿し、低粘度で清澄な醤油を回収できることがわかった。

緒言

醤油生揚のクロスフロー膜ろ過処理は、醤油を清澄で無菌且つその後の火入れオリ発生を低減とする一方で、高粘性・高濁度の濃縮残液(膜ろ過残液)が原料生揚の5~10%発生する¹⁾。その大部分が醤油であることから歩留り低下につながり、何らかの方法で醤油を回収・利用する方法が求められている。

これまでに膜ろ過残液の有効利用を目的に、調整・殺菌処理や、混濁成分除去を目的としたシリカゾル処理²⁾により、調味料利用が試みられ、一部は実用化されている。また、高粘性に寄与すると考えられる膜ろ過残液主成分の酸性多糖類に対し、酵素分解が試みられてきたが、高食塩濃度下で醤油多糖類に対して十分な分解活性を有する産業用酵素は見いだされていない³⁾。一方、仕込み時の諸味に膜ろ過残液を5%程度添加すると、麴由来の酵素により発酵期間中に徐々に分解されることが認められ、膜ろ過残液の処理法として実用化されている¹⁾。アルカリ条件下でのカルシウム処理は、多糖類の沈殿除去が可能であるものの、回収醤油のオフフレーバーが問題で実用化には至っていない⁴⁾。このように、実用化された技術は少なく、それらの技

術も用途・処理量に限界があることから、さらなる処理法の開発が求められている。

一般に膜ろ過残液中の酸性多糖類のような高分子電解質は、塩存在下でアルコール等の貧溶媒を加えることにより凝析沈殿し、アルコール濃度依存的に沈殿物質の重合度は低下することが知られている⁵⁾。したがって、低濃度アルコール処理により、膜ろ過残液からの高分子多糖類の分別除去と、低粘度で清澄な醤油の回収が期待できる。これまでに石川⁶⁾は、膜ろ過残液に対し種々のエタノール濃度で混合・固液分離を行い、清澄な醤油を回収できることを報告しており、エタノール処理の有効性を示唆している。しかしながら、エタノール処理により得られる清澄醤油および沈殿物の物性・成分(特に高分子多糖類)やそれらのエタノール処理濃度による変化は評価されておらず、エタノール処理の有効性を検証するにはさらなる検討が必要と思われた。

そこで本研究では、膜ろ過残液に対するエタノール処理の有効性を調べるため、高分子多糖類等の分離挙動および回収醤油の性質を指標に高分子多糖類除去条件を検討した。

実験方法

1. 試料

生揚を60℃で1時間加熱後に冷却し、有機膜ろ過装置によってろ過して得た残液(膜ろ過残液)および透過液(膜ろ過透過液)を使用した。有機膜ろ過装置は、クラレ株式会社製内圧式中空糸膜モジュールML(膜材質:ポリスルホン, ポアサイズ:0.1 μ m, ろ過面積:10m²×6本)を使用した。分子量標準物質は、プルラン(昭和電工)を使用した。

2. 沈殿形成および醤油回収試験

2.1. 沈殿形成エタノール濃度の評価

醤油膜ろ過残液150mlを激しく攪拌しながらエタノール(99.5%)を少量ずつ加え、室温で3時間放置後の沈殿形成を目視で調べた。エタノールは、終濃度で20, 23, 29, 33, 37, 41, 44, 47, 50, 75%(v/v)となるように加えた。沈殿が生じた条件では、デカンテーションにより固液分離し、上清回収量を調べた。減圧蒸留によりエタノールを除去した回収上清を分析試料とした。

2.2. 温度・時間の影響評価

膜ろ過残液10mlに対して5mlのエタノールを加えたのち、固液分離を行い、上清を回収した。温度、固液分離までの時間は、結果に記載する条件とした。これらの回収上清から減圧蒸留によりエタノールを除去し、分析試料とした。

2.3. pHの影響評価

膜ろ過残液の初発pHを12N HClまたは10N NaOHでpHを2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7に調整した液に、終濃度33%となるようにエタノールを加え、遠心分離により上清を回収した。減圧蒸留によりエタノールを除去した回収上清を分析試料とした。

2.4. 固液分離

遠心分離は2330×gで15分間、膜ろ過は流速400ml/minでVIVA FLOW50クロスフロー式ろ過ユニット(ザルトリウス)を使用し、デカンテーションは室温または4℃でそれぞれ3時間あるいは24時間静置することにより行った。

3. エタノール分別沈殿

膜ろ過残液10mlに対して、終濃度33%になるように5mlのエタノールを添加し均一に攪拌後、遠心分離を行った。得られた沈殿は、同濃度のエタノールで洗浄後、遠心分離により回収し、減圧乾固させてエタノール濃度0~33%沈殿画分とした。洗液と上清は混合し、さらにエタノールを37%となるように加え、以後前記操作を繰り返し、33~37%沈殿画分を得た。同様に、37~41, 41~44, 44~47, 47~50, 50~75%沈殿画分を調製した。

4. 分析

分子量分布は、0.45 μ mシリンジフィルターでろ過した試料をWaters Alliance HPLCシステムにより分析した。カラムは東ソー製TSKgel guardcolumn G3000PW_{XL}, TSKgel G6000PW_{XL}, TSKgel G3000PW_{XL}を連結して使用した。溶離液20mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0), 流速0.6ml/min, 注入量50 μ l, カラム温度25℃, 内部ヒーター30℃, 検出は示差屈折率で行った⁷⁾。粘度はTVB10形粘度計(東機産業)を用いて25℃で測定した。濁度は、試料を10倍希釈した後、紫外可視分光光度計(Thermo Fisher Scientific, Evolution 220)により660nmで測定した。ナトリウムはICP発光分光分析装置(Perkin Elmer Japan, Optima 8300)により測定した。タンパク質はBCA法、全糖量はフェノール硫酸法により定量した。官能評価はパネリスト9名で行った。

結果および考察

1. 膜ろ過残液のエタノール処理による沈殿形成と回収醤油の性質

膜ろ過残液の分子量分布をゲルろ過クロマトグラフィーにより調べた結果を図1に示す。原料生揚、膜ろ過透過液のクロマトグラムと比較し、膜ろ過残液には溶出時間22~32分に多くの成分が存在していること、標準物質の分析結果(図1, 矢印)より、これらは6~700kDa程度のみかけの分子量を有する物質からなることがわかった。野田ら¹⁾により報告された膜ろ過残液主成分の多糖類およびタンパク質からなると考えられ、膜ろ過残液の高粘性に寄与している成分群

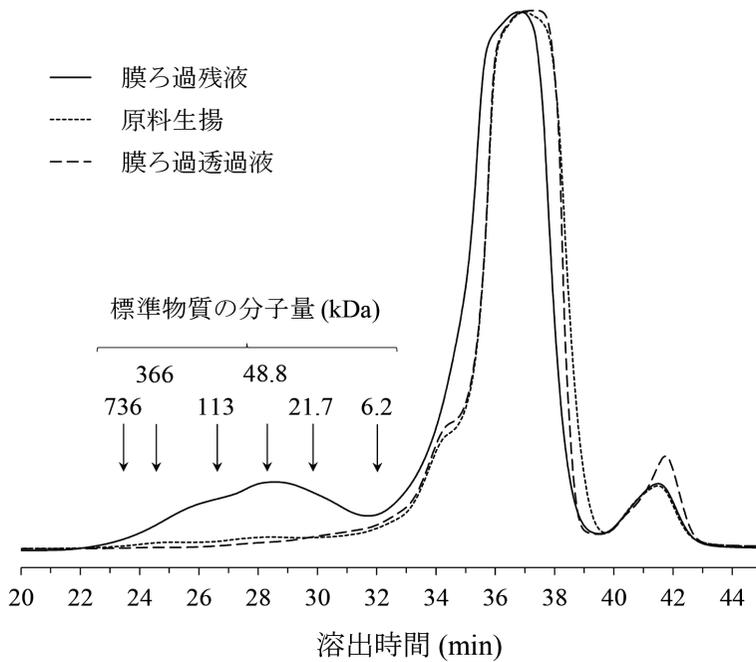


図1 原料生揚および膜ろ過液の分子量分布

であると推察された。そこで、これら溶出時間22～32分に見られる高分子量成分の分子量分布の変化と粘度・濁度を指標に、エタノール沈殿による高分子多糖類除去と清澄醤油回収の条件検討を行うこととした。

膜ろ過残液中の高分子量成分が沈殿を形成するエタノール濃度を調べた(図2)。室温3時間放置後、終濃度33%以上のエタノールで沈殿形成することがわかった。沈降速度はエタノール濃度に依存し、33%条件では沈殿が十分ではない状態であった。次に、デカンテーションにより回収した上清(醤油分)の性質を調べた結果を表1に示す。回収率は、沈殿が不十

分な33%条件において低下するものの、80%前後の醤油分を回収できることがわかった。回収上清の濁度(OD_{660nm})は、膜ろ過透過液よりも低く、濁度低減効果にはエタノール濃度依存性が認められた。これらは石川の報告⁶⁾を支持する結果であった。さらに検討を進め、粘度低減効果を調べたところ、エタノール沈殿物除去により、33～50%処理条件いずれにおいても顕著な粘度の低下が認められた。エタノール処理濃度依存的に回収上清の粘度は低下し、50%条件においては、膜ろ過透過液よりも低下することがわかった。醤油分のpHはエタノール処理前後で変化はほとんどみ

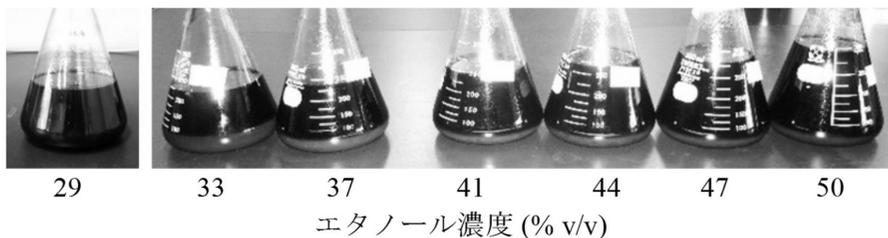


図2 エタノール添加による膜ろ過残液の沈殿形成

表1 エタノール処理前後の性質および回収率

	膜ろ過残液 (未処理)	膜ろ過透過液 (未処理)	回収上清 (エタノール処理濃度(%))					
			33	37	41	44	47	50
回収率 (%)	-	-	65	75	79	81	81	82
OD _{660 nm}	0.23	0.135	0.121	0.101	0.097	0.082	0.073	0.065
粘度 (mPa・s)	60.2	2.9	6.9	6.1	3.9	3.9	3.4	2.6
pH	4.6	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.6	4.5
Na (g/l)	70.4	69.0	65.2	60.2	60.9	60.8	60.5	59.7

られず、ナトリウム濃度はエタノール処理濃度依存的にわずかに低下することがわかった。また、官能評価の結果は、いずれの処理条件においても膜ろ過残液の特徴を保持し、良好であった(データ未掲載)。

高分子量成分の分子量分布変化を調べた結果を図3に示す。エタノール濃度33%処理により得られた回収上清の分子量分布は、膜ろ過により蓄積した高分子量成分(溶出時間22~32分)のうち、溶出時間24分までの特に大きな分子量を有する成分が除去され、24分以降の成分も顕著に減少していた。高分子量成分はエタノール濃度依存的に除去され、50%処理条件では

蓄積成分のほとんどが検出されなくなり、粘度測定の結果と一致した。

これらの結果より膜ろ過残液へのエタノール添加は、エタノール濃度に応じた膜ろ過残液中の高分子量成分を凝析沈殿させ、固液分離により清澄で低粘度な上清(醤油分)を回収可能とするものであった。

2. エタノール分別沈殿による沈殿成分の解析

膜ろ過残液中の成分が各エタノール濃度条件下でどのように沈殿するのかをエタノール分別沈殿法により調べた(表2)。0~33%エタノール沈殿画分の収量は

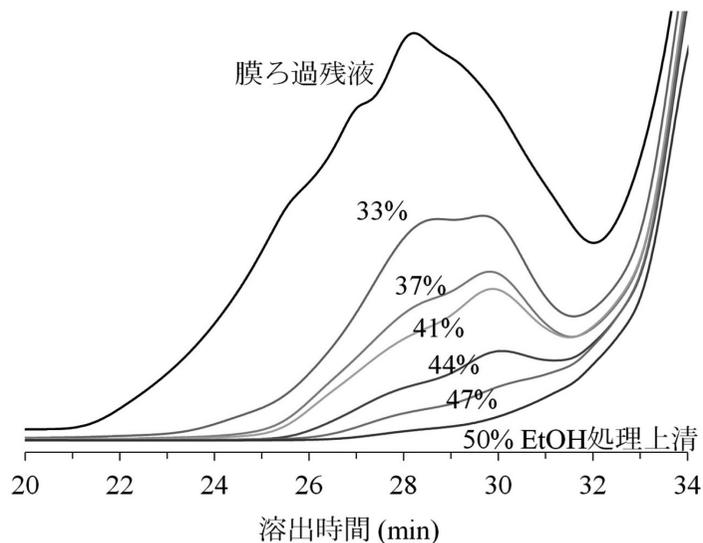


図3 回収醤油の分子量分布

表 2 エタノール沈殿画分の分析結果

	収量* (g)	組成			
		糖 (%)	タンパク (%)	水 (%)	食塩相当量 (%)
Fr. 0-33% ppt	0.569 (53%)	43.6	5.5	8.4	24.9
Fr. 33-37% ppt	0.092 (8%)	52.6	4.6	N.E.	N.E.
Fr. 37-41% ppt	0.023 (2%)	47.4	5.4	N.E.	N.E.
Fr. 41-44% ppt	0.039 (4%)	43.3	3.4	N.E.	N.E.
Fr. 44-47% ppt	0.015 (1%)	35.2	9.9	N.E.	N.E.
Fr. 47-50% ppt	0.035 (3%)	46.7	5.6	N.E.	N.E.
Fr. 50-75% ppt	0.310 (29%)	28.3	16.5	N.E.	N.E.

*膜ろ過残液処理量: 10mL, 括弧内は全沈殿量に対する割合

全沈殿の53%を占め, その組成は糖 (43.6%), 食塩相当量(24.9%), 水分(8.4%), タンパク質(5.5%)であり, 沈殿画分中の主な高分子成分は多糖類であることがわかった。33~37%沈殿画分は全沈殿の8%で, 以降47~50%沈殿画分まで少量の沈殿が得られ, それらの組成は0~33%エタノール沈殿画分と同様であった(44~47%沈殿画分でわずかに異なった)。50~75%沈殿画分では全沈殿の29%が生じ, 他の沈殿画分と比較して糖が少なくタンパク質が多かった。高濃度でのエタノール沈殿においては低分子量の多糖類と多くの随伴物質が沈殿することが知られており, 得られた結果と一致するものであった。以上の結果より, 高分子多糖類の大部分がエタノール濃度33%で沈殿し, 比較的分子量の小さな多糖類が50~75%で沈殿することを示唆する結果であった。

このことを直接確かめるために, 沈殿画分の分子量分布を調べた結果を図4に示す。0~33%沈殿画分では広範囲の分子量(溶出時間22分~32分, 33分以降)を有する成分が沈殿していることがわかった。溶出時間22分~32分で多糖類およびタンパク質, 33分以降にナトリウムと他成分が溶出しているものと思われ, 表2の結果と一致するものであった。33~37%沈殿画分において, 33%条件下で沈殿しなかった高分子成分の選択的な沈殿がみられた。以降47~50%沈殿画分まで, 沈殿する成分の分子量が低分子にシフトしながら, わずかに沈殿していることがわかった。50~75%沈殿画分

では, 分子量20kDa(溶出時間30分)付近の高分子成分とともに, 低分子成分(溶出時間34分)の沈殿が多くみられ, これらの結果も表2とよく一致するものであった。

以上の結果から, エタノール濃度33%で, 膜ろ過残液に存在する多糖類のうち高分子多糖類の大部分が凝析沈殿することがわかった。

3. エタノール沈殿に影響する因子

膜ろ過残液のエタノール沈殿と清澄醤油回収に影響を及ぼす可能性のある因子として温度, 時間, 固液分離方法, pHについて検討を行った。まず, 33%エタノール条件下(4℃, 室温)で3時間あるいは24時間静置後にデカンテーションによって固液分離し, 温度と時間の影響を調べた(図5A, 黒棒)。その結果, 室温, 4℃ともに静置時間3時間に比べ24時間で回収率が高くなり, 回収率は同等となったが, 静置3時間後の回収率は4℃条件下で室温下より低かった。この結果は, 沈殿形成が遅い33%エタノール処理条件でも, 十分な静置時間を確保することで他条件と同等に上清回収できることを示す。また, 多糖類の凝析速度, 沈降速度が温度により異なる可能性が考えられたため, 室温および4℃でエタノール添加後速やかに遠心分離し, 回収率を比較した。その結果, 回収率(図5A, 白棒)および図5Bに示す分子量分布に差は見られず, エタノールによる凝析は添加後速やかに起こり, 自然沈降時は環境条件により沈降速度に差が出るということがわかつ

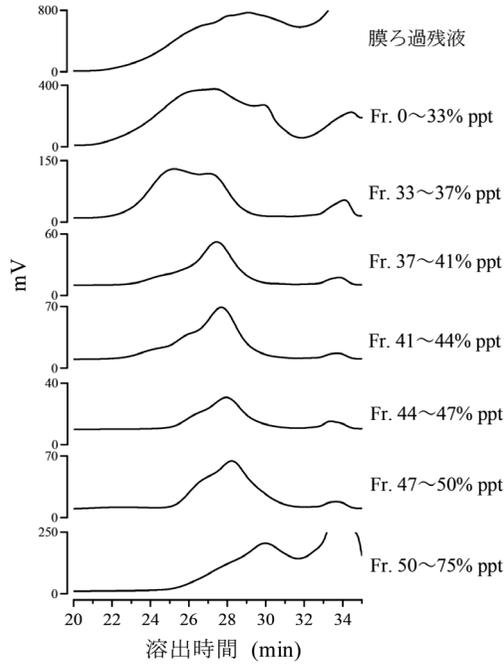
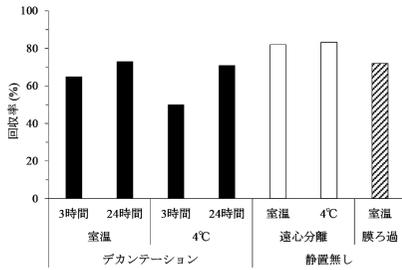
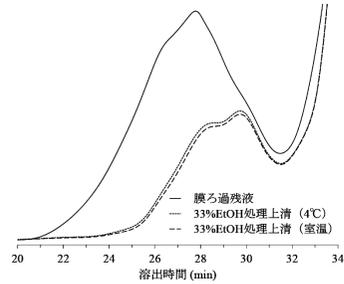


図4 エタノール沈殿画分の分子量分布

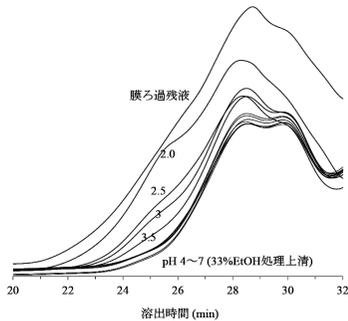
A (処理温度と時間および固液分離方法による回収率の変化)



B (処理後速やかに遠心分離して得た回収上清の分子量分布)



C (処理pHが回収上清の分子量分布に及ぼす影響)



D (処理pHが回収上清の粘度に及ぼす影響)

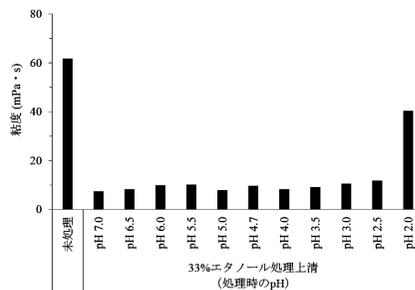


図5 エタノール処理条件および固液分離条件の検討

た。この結果に基づいて、室温でエタノール添加後速やかに直接膜ろ過を試みたところ、デカンテーション24時間と同等の回収率が得られることがわかった(図5 A, 斜線棒)。

高分子電解質のエタノール沈殿において、高分子の荷電状態が重要であることが知られている⁸⁾。そこで、膜ろ過残液エタノール処理(33%)におけるpHの影響を調べた。検討したpHにおける回収上清の分子量分布を図5 Cに示す。pH 4~7で顕著な分子量分布の差は見られなかったが、pH 2~3.5ではpHの低下に伴い高分子量成分の残存がみられた。回収上清の粘度(図5 D)は、未処理の膜ろ過残液と比較し、pH 2.5~7では粘度が著しく低下するものの、pH 2において粘度低減があまり見られなかった。したがって、詳細な検討は必要であるが、膜ろ過残液のエタノール処理においてpH 3.5より低い条件では、高分子の荷電状態が正に偏り、高分子鎖間の反発力が生じ凝析が進みにくくなること、pH 2付近ではさらに偏りが進むため、粘度低下をもたらす程度の凝析が起きなくなると考えられる。

以上の結果から、膜ろ過残液のエタノール処理は、添加時の溶液調製・温度管理不要で、追加の設備も要しないことから実用性が高く、醤油回収技術として簡便で有効な方法と思われる。また、エタノール添加量は高分子多糖類の大部分が凝析沈殿する33%が適当と思われる。

要 約

1. 膜ろ過残液にエタノールを33% (v/v) 以上添加すると沈殿が生じ、高分子量成分が除去された低粘度、低濁度の醤油を回収できることがしめされた。
2. 膜ろ過残液中の高分子多糖類の大部分は33%エタノール条件下で沈殿することがしめされた。
3. 凝析沈殿のための温度・溶液条件制御不要で、直接凝析液を膜ろ過可能であるため、既存の製造設備で適用可能であることがしめされた。

本報告は平成30年10月25日に開催された第87回醤油研究発表会(佐賀大会)において発表したものである。

文 献

- 1) 野田義治, 植木達朗, 大場和徳, 脇山元気: 本誌, 37, 6, 365 (2011)
- 2) 足鹿利幸, 若山守: 本誌, 39, 1, 37 (2013)
- 3) 川口友彰, 植木達朗, 野田義治: 福岡県工業技術センター研究報告, 28, 20 (2018)
- 4) 川口友彰, 植木達朗, 野田義治: 福岡県工業技術センター研究報告, 28, 24 (2018)
- 5) 広田致: 工業化学雑誌, 63, 12, 2194 (1960)
- 6) 石川章一: 増粘剤の製造方法及び食品の製造方法, 特許第4087529号(2008)
- 7) A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, Y. Nagamatsu, A. Yoshimoto: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (10) 2249 (2001)
- 8) X. Guo, H. Meng, Q. Tang, R. Pan, S. Zhu, S. Yu.: *Food Hydrocoll.*, 52, 431 (2016)