

# 醤油膜ろ過残液処理法の検討(第3報) — 醤油膜ろ過残液エタノール沈殿物からの多糖類回収 —

川口 友彰\*1 野田 義治\*2 植木 達朗\*2 脇山 元気\*2 坂田 文彦\*1 野見山 修治\*3

## Study on Processing Method of the Shoyu Cross-flow Filtration Retentate

### - Recovery of Polysaccharides from Ethanol Precipitate of the Retentate -

Tomoaki Kawaguchi, Yoshiharu Noda, Tatsuro Ueki, Motoki Wakiyama, Fumihiko Sakata and Shuji Nomiyama

醤油の清澄化および無菌化のためクロスフロー膜ろ過処理が行われているが、発生する高粘性・高濁度の濃縮残液（膜ろ過残液）による歩留り低下や処理困難性が問題となっている。これまでに我々は膜ろ過残液のエタノール処理により、粘性に寄与する高分子多糖類を除去し、低粘度の清澄醤油を回収できることを明らかにした。本研究では、膜ろ過残液エタノール処理で生じる沈殿物からの多糖類回収を試みた。エタノール沈殿物を水に溶解しクロスフロー膜ろ過を繰り返すことにより、容易に多糖類を回収・高純度化できることがわかった。一方、エタノール沈殿物中多糖類の膜透過性は生揚膜ろ過時より高く、繰り返しの膜ろ過は回収率を低下させることがわかった。得られた多糖類高含有液は濁りを有するが、プロテアーゼ製剤処理により濁度を低減することができた。

#### 1 はじめに

近年、醤油製造においてクロスフロー方式の膜ろ過が普及している。クロスフロー膜ろ過処理は、醤油もろみを圧搾して得た生揚醤油の清澄化、無菌化、火入れ処理軽減等の利点を有する。一方、膜を通過しない多糖類や菌体を含む高粘性・高濁度の難分解性濃縮残液が処理生揚醤油の5~10%程度発生し、歩留まり低下、排水処理、廃棄コスト等が問題となっている<sup>1)</sup>。特に、膜ろ過残液中には多量の醤油を含むため、何らかの醤油回収方法が求められている。

これまでに我々は、粘性に寄与する膜ろ過残液中多糖類の大部分がエタノール濃度33%(v/v)で沈殿すること、固液分離により清澄で低粘度の醤油が回収できることを報告した<sup>2)</sup>。膜ろ過残液にエタノール混合後、クロスフロー膜ろ過するのみで清澄醤油を回収でき、膜ろ過残液が生じる事業所においては、特別な技術・装置を必要としない容易で実用性の高い技術である。回収醤油は33%以上のエタノールを含んでいることから、火入れ醤油のアルコール調整用に直接利用可能である。また、エタノールを蒸留により回収して再利用、醤油分は生揚として利用することが可能である。一方で、高分子量成分は膜ろ過により再び濃縮され、高粘性・高濁度の濃縮残液として残存する。この中には、

増粘剤<sup>3)</sup>や乳化剤<sup>4)</sup>、機能性食品<sup>5)</sup>として有効利用が期待される醤油多糖類を多く含んでいることから回収が望まれる。そこで本研究では、醤油膜ろ過残液の33%エタノール沈殿物からの多糖類回収を試みた。

#### 2 研究, 実験方法

##### 2-1 試料

醤油膜ろ過残液は福岡県醤油醸造協同組合より提供されたものを使用した。エタノール沈殿物は膜ろ過残液100 mLに対して50 mLのエタノール(99.5%)を添加後、遠心分離することで調製した。プロテアーゼ製剤はオリエンターゼOP(エイチビィアイ(株))を用いた。

##### 2-2 クロスフロー膜ろ過による透析ろ過

エタノール沈殿物全量に水を加え200 mLとした。VIVAFLOW50クロスフロー式ろ過ユニット(ザルトリウス)を使用し、流速400 mL/minでろ過した。膜ろ過透過液が180 mLに達したところでろ過を停止し、さらに180 mLの水を濃縮液に加え、ろ過を繰り返した。得られた濃縮液及び透過液は凍結乾燥後保存した。

##### 2-3 酵素反応

濃縮液の凍結乾燥物を2%, オリエンターゼOPを終濃度0.01~0.1%となるように水に溶解し、45℃で2時間反応させた。

\*1 生物食品研究所

\*2 福岡県醤油醸造協同組合

\*3 福岡県商工部

## 2-4 分析

HPLC (Waters Alliance HPLCシステム) により分子量分布を測定した。カラムは東ソー(株)製TSKgel guardcolumn G3000PW<sub>XL</sub>, G6000PW<sub>XL</sub>, G3000PW<sub>XL</sub>を連結して使用した。溶離液20 mM Na-acetate (pH 5.0), 流速0.6 mL/min, 注入量50 μL, カラム温度25 °C, 内部ヒーター30 °C, 検出は示差屈折率で行った。水分含量は加熱乾燥式水分計MS-70 ((株)エー・アンド・デイ)で測定した。タンパク質はBCA法, 全糖量はフェノール硫酸法, 灰分は直接灰化法により測定した。

## 3 結果と考察

### 3-1 透析ろ過過程の解析

多糖類の回収方法として, エタノール沈殿, アルカリ条件下におけるカルシウム処理<sup>6)</sup>, カラムクロマトグラフィ等が考えられるが, 本研究では, 低コストで簡便かつ膜ろ過残液処理を課題とする事業所が既に保有する技術・装置であるクロスフロー膜ろ過による多糖類回収を検討することとした。

これまでに我々は, 生揚膜ろ過の際, 精密ろ過膜が醤油多糖類を含む高分子量成分の大部分を阻止することを明らかにしており<sup>2)</sup>, 精密ろ過膜を用いた透析ろ過による多糖類回収・高純度化が可能と考えた。そこで, 醤油膜ろ過残液の33 %エタノール処理で得た沈殿を水に溶解後クロスフロー膜ろ過(精密ろ過膜)に供した。10倍濃縮後, 透過分と同量の水を加え, さらに膜ろ過し, この操作を5回繰り返し, 脱塩及び多糖類濃縮を試みた(透析ろ過法)。得られた透過液および濃縮液の外観を図1に示す。膜ろ過1回目の透過液(図1上段)で見られた醤油の色は, 膜ろ過を重ねるごとに無色に近づき, 膜ろ過4, 5回目では淡く黄色がかかる程度となった。膜ろ過3回目以降の透過液および濃縮液の凍結乾燥物(図1下段)については, 類似の外観を有しており, 多糖類の存在を示唆するものであった。

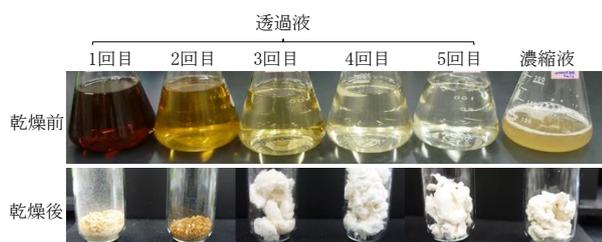


図1 透析ろ過(繰り返し数5回)物の外観

組成を調べた結果を表1に示す。膜ろ過1回目と2回目の透過液は, 総収量の81 %を占め, 灰分30 %程度であり, 低分子の夾雑物の大部分が透過したと考えられた。一方, 糖含有量も26~27 %程度あり, 33 %エタノール沈殿物中の糖類は高分子多糖類がほとんどであることから, 多糖類の膜透過を示唆する結果であった。膜ろ過3回目以降の透過液および濃縮液は, 糖含有量が55~60 %程度と高く, 図1でみられた多糖類存在可能性を支持するものであった。また, 全糖量, タンパク質および灰分について4, 5回目で透過量に違いがみられないことから, 濃縮液中に残存する膜透過性が類似した成分(多糖類含む)が徐々に透過しているものと推察され, 多糖類回収の観点からは, 繰り返しの膜ろ過は回収率低下をまねくと考えられた。以上の結果から, 膜ろ過2回目までに夾雑物質の大部分が透過し, 3回目以降では多糖類が主成分として透過することが推察された。

表1 透析ろ過(繰り返し数5回)物の組成分析結果

	収量 (g)	水分含量 (%)	全糖 (%)	タンパク質 (%)	灰分 (%)
透過液(1回目)	6.40 (68 %)	12.4	26.0	6.7	33.4
透過液(2回目)	1.25 (13 %)	11.4	27.6	6.0	30.6
透過液(3回目)	0.51 (5 %)	15.0	59.8	4.7	15.6
透過液(4回目)	0.34 (4 %)	13.3	57.6	2.2	9.3
透過液(5回目)	0.25 (3 %)	13.4	55.5	1.9	8.8
濃縮液	0.71 (8 %)	12.9	54.6	8.5	8.1

括弧内は全収量に対する割合

透過物と濃縮物の分子量分布を調べた結果を図2に示す。膜ろ過2回目(図2A)までは, 溶出時間32分以降の低分子成分(6.2 kDa以下)が主に透過するとともに, 溶出時間22分~30分の高分子量成分(21.7 kDa以上)も透過した。膜ろ過3回目(図2B, 実線)では主な透過成分が高分子量成分となり, 4, 5回目の透過液(図2B, 破線, 点線)においては低分子成分の透過はほとんどみられず高分子量成分が透過した。濃縮物は低分子成分が除去され高純度化していることがわかった(図2C)。また, 濃縮物と4, 5回目の透過液(図2B, 破線, 点線)のクロマトグラムは類似しており, 濃縮物中の多糖類が徐々に透過(損失)している状態であると考えられた。これらは表1の結果と一致するものであった。以上の結果より, 膜ろ過残液のエタノ

ール沈殿物を水に溶解し膜ろ過することにより、低分子共雑物を除去し多糖類高含有液を回収できること、33 %エタノール沈殿物中多糖類は精密ろ過膜透過性を有することがわかった。

生揚膜ろ過と比べ、33 %エタノール沈殿物膜ろ過で多糖類の膜透過性が高まった原因としては、詳細な検討が必要であるが、エタノール沈殿により生揚膜ろ過時の膜ファウリングが解消された可能性が考えられる。すなわち、生揚膜ろ過時には低分子成分と高分子量成分の相互作用で形成されていたファウラントが、エタノール沈殿による生揚中の低分子成分除去によって解消され、ろ過膜孔径に対し本来透過すべき分子量を有する成分が透過したものと推察できる。

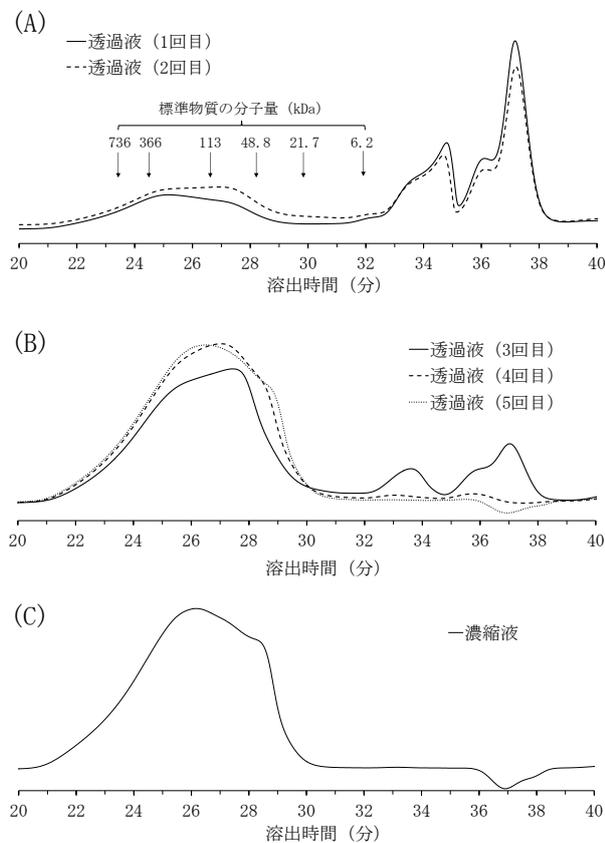


図2 透析ろ過物（繰り返し数5回）の分子量分布

### 3-2 透析ろ過による多糖類高含有液の回収

多糖類高含有化のため、膜ろ過を2回繰り返し、透過液・濃縮液を得た。これらを凍結乾燥後、分子量分布を分析した結果を図3に示す。低分子量の夾雑物が透過し、高分子量の多糖類の高純度化をしめすもので、表1、図2の結果と一致した。

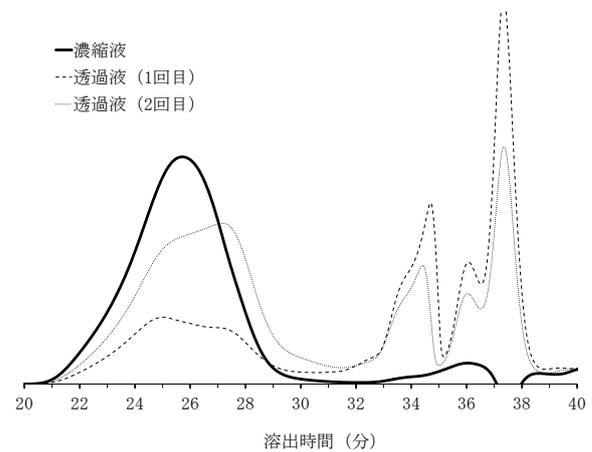


図3 透析ろ過物（繰り返し数2回）の分子量分布

表2に組成を分析した結果を示す。表1と同様、総収量の83 %がろ過膜を透過し除去されることがわかった。回収した濃縮液中には、糖類が57.3 %（乾燥重量換算69 %）存在することがわかった。以上の結果より、膜ろ過残液のエタノール沈殿物に水を加え、膜ろ過を2回繰り返すのみで、多糖類高含有液を回収できることがわかった。膜ろ過残液100 mLから得られる多糖類高含有物は1.64 gであった。

表2 透析ろ過物（繰り返し数2回）の組成分析結果

	収量 (g)	水分含量 (%)	全糖 (%)	タンパク質 (%)	灰分 (%)
透過液 (1回目)	6.65 (71 %)	7.7	23.4	5.8	34.3
透過液 (2回目)	1.13 (12 %)	9.1	47.6	4.8	20.2
濃縮液	1.64 (17 %)	16.5	57.3	4.2	8.7

括弧内は全収量に対する割合

今回検討した精密ろ過膜では、膜ろ過2回で多糖類の透過（損失）も生じたが、膜を限外ろ過膜へ変更すればより高収率を得ることが期待できる。

### 3-3 酵素剤処理による濁度低減

生揚の膜ろ過は清澄化を目的としており、膜ろ過残液には混濁成分が濃縮されている。そのエタノール沈殿物や、エタノール沈殿物から回収した多糖類高含有物についても混濁成分は濃縮されたまま存在し続けている。そのため多糖類高含有物は濁りを有しており（図1上段）、用途によっては濁度低減が望まれる。濁りの原因成分としては珪タンパク質<sup>7)</sup>が考えられたため、プロテアーゼ製剤処理による濁度低減を試みた。

その結果、図4に示すように、オリエンターゼOP処理により、濁度が低下することがわかった。

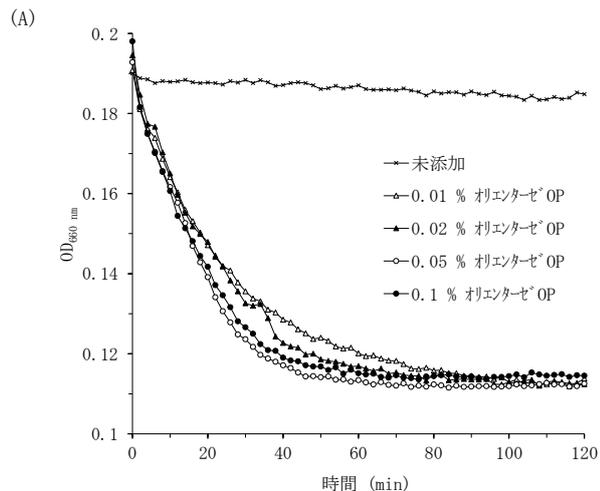


図4 多糖類高含有物の酵素処理による濁度変化  
(A) 経時変化, (B) 処理前後の外観

#### 4 まとめ

膜ろ過残液エタノール処理で生じる沈殿物からの多糖類回収を試みた。その結果、エタノール沈殿物を水に溶解しクロスフロー膜ろ過を2回繰り返すことにより、容易に多糖類高含有物を得られること、また、多糖類高含有物中の濁りをプロテアーゼ製剤により低減できることがわかった。本技術により、醤油膜ろ過残液のエタノール処理物から多糖類の回収が可能となり、エタノール処理による清澄醤油回収<sup>2)</sup>とあわせ、膜ろ過残液の有効な処理方法であると思われる。

#### 5 参考文献

- 1) 野田義治, 植木達朗, 大場和徳, 脇山元気: 醤油の研究と技術, 37巻(6号), pp. 365-369(2011)
- 2) 川口友彰, 野田義治, 植木達朗, 脇山元気, 野見山修治: 醤油の研究と技術, 45巻(2号), pp. 103-109(2019)
- 3) 富士甚醤油株式会社: 特許第4087529号(2008)

- 4) 松田康: 日本醸造協会誌, 91巻(3号), pp. 167-171(1996)
- 5) 古林万木夫, 松下裕昭, 真岸範浩: 日本醸造協会誌, 104巻(9号), pp. 647-651(2009)
- 6) 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号, pp. 24-26 (2018)
- 7) 足鹿利幸, 若山守: 醤油の研究と技術, 39巻(1号), pp. 37-41(2013)