

琉球大学学術リポジトリ

サトウキビ葉・梢頭部の化学的前処理と酵素糖化性(生物資源科学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 昌信, 有満, 和人, 当山, 清善, Ishihara, Masanobu, Arimitsu, Kazuto, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3815

サトウキビ葉・梢頭部の化学的前処理と酵素糖化性

石原昌信^{*}・有満和人^{**}・当山清善^{*}Masanobu ISHIHARA, Kazuto ARIMITSU, and Seizen TOYAMA:
Chemical pretreatment and enzymatic saccharification of
sugarcane top & leaves

Summary

The effectiveness of various chemical pretreatments of sugarcane top & leaves on enzymatic hydrolysis of fibrous components was evaluated.

The treatment with 5% sodium perchlorate, 5% sodium chlorate, 35% peroxide : acetate (1:1) and 0.5% sodium hydroxide significantly increased the degradability and resulted in loss of weight in the range from 34 to 60% of original material. Pretreatments with 0.5 to 1.0% sodium hydroxide found to be effective for increasing its susceptibility to enzymatic hydrolysis. The alkali-treated materials were almost completely degraded by cellulase preparation in 48 hr of incubation. The degree of weight loss by pretreatment with sodium hydroxide was dependent on the concentration of reagent. Susceptibility of 0.5% sodium hydroxide-treated materials to hydrolysis action of the enzyme increased in proportion to the rise in temperature of pretreatment. The rate of saccharification of 0.5% sodium hydroxide-treated materials by the enzyme decreased with an increase in concentration of substrate.

緒 言

サトウキビの収穫時に廃棄されるサトウキビ葉・梢頭部は蔗茎量の約13~15%に相当し、蔗茎の搾り粕（バガス）と同様に微生物的利用を図ることによって重要なセルロース性バイオマス資源となり得る。

著者らは前報^{3,5)}において微粉碎サトウキビ葉・梢頭部の嫌気発酵について調べ、本基質がバガスよりも嫌気分解され易いことを明らかにした。しかし、粉碎葉・梢頭部の酵素糖化性はバガスと同様に著しく低い値であることが確認され、本基質中のセルロース様物質の酵素による分解性を高めるためにはセルロースやヘミセルロースをとり囲んでいるリグニンを除去する必要があると思われる。セルロース性物質からの脱リグニン法についてはこれまで種々検討されているが、とりわけ水酸化ナトリウム溶液処理^{2,6,7)}及び爆砕処理^{1,8)}等が効果的な前処理法として知られている。

* 琉球大学農学部生物資源科学科

** 現在 キュービー株式会社

本研究では、サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性に及ぼす化学薬品処理の効果について明らかにする目的で、各種化学薬品による前処理と処理基質のセルラーゼ標品による分解性について調べた。

実験方法

- (1) サトウキビ葉・梢頭部：本実験に供したサトウキビ葉・梢頭部は前報⁴⁾に従って調製したのち、各種化学薬品を用いて前処理を行った。粉碎サトウキビ葉・梢頭部のセルロース及びヘミセルロース含量は36.6と38.1%であり、0.5%NaOH処理葉・梢頭部の同成分の含量はそれぞれ48%と29.3%であった。
- (2) 酵素標品：前処理サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解反応には*Trichoderma viride*起源セルラーゼ標品（明治製菓(株)）を用いた。酵素粉末1gを蒸留水100mlに溶解したのち、遠心分離して得られた上澄液を酵素液として用いた。
- (3) 酵素反応及び酵素分解活性の測定：酵素反応の組成は前処理基質400mg、1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）1.0ml、0.2%窒化ナトリウム1.0ml及び酵素液で総量を10mlとした。酵素反応は、50ml容三角フラスコに酵素反応混液及び基質を採り、40℃で所定時間ゆるやかに振盪して行ない、酵素反応の停止は10分間煮沸することにより行った。酵素活性は冷却後、濾過することにより固液分離を行ない、液部について全糖量、還元糖量及びグルコース量をそれぞれ測定し、mg/mlで表示した。酵素分解率は酵素反応で生成された全糖量を基質重量で除して%で表示した。

実験結果

1. 各種化学薬品処理がサトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性に及ぼす影響

サトウキビ葉・梢頭部10gに200mlの各種化学薬品を加え、120℃で20分間加圧蒸煮処理を行ったのち、蒸留水で残渣を十分に洗浄した。尚、エチレンジアミンによる処理は50℃で20分間加温して行った。前処理基質の酵素分解反応は方法に述べた手順で反応混液を調製したのち、40℃で48時間ゆるやかに振盪して行ない、酵素分解性は酵素反応によって生成された糖量をフェノール硫酸法により測定し、mg/mlで表示した。Fig.1に示したように、粉碎葉・梢頭部を5%NaClO、5%NaClO₂、35%H₂O₂:CH₃COOH(1:1)及び0.5%NaOH溶液で処理した場合には酵素分解性が葉・梢頭部の酵素分解性に対して効果的であることがわかった。熱水処理、硫酸及びエチレンジアミン溶液処理では酵素分解性に著しい増大は認められず、水酸化ナトリウム処理した場合の約半分以下の分解率であった。35%H₂O₂:CH₃COOH(1:1)は0.5%NaOH処理の時と近似した値を示したが、Table 1に示したように前処理に伴う重量減少量が

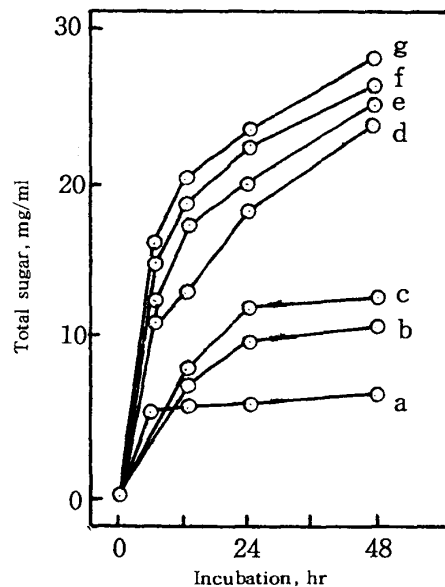


Fig. 1 Enzymatic degradation of chemically pretreated sugarcane top & leaves by cellulase preparation

The pulverized sugarcane top & leaves were prepared as shown in previous paper. Ten grams of materials were pretreated with 200ml of chemical reagents at 120°C for 20 min except the treatment with ethylenediamine was carried out at 50°C for 20 min. The residues were separated from liquid by filtration and dried. The weight of residues was measured by analytical balance. Enzymatic degradation of pretreated materials was carried out with a commercial enzyme preparation, Meicelase, which was prepared from *Trichoderma viride*. The enzymatic reaction mixture contained 400 mg of substrate, 1.0 ml of 1 M acetate buffer (pH 4.5), 1.0 ml of 0.2% sodium azide and 1.0 ml of 1.0% enzyme solution in a final volume of 10 ml. After incubation at 40°C for indicated times with shaking, the reaction was stopped by boiling for 10 min. Total sugar formed was determined by the method of phenol-sulfuric acid. (a) H₂O (b) 5% H₂SO₄ (c) 20% Ethylenediamine (d) 35% H₂O₂:CH₃COOH(1:1) (e) 0.5% NaOH (f) 5% NaClO₂ (g) 5% NaClO

原料の約60%に達した。化学薬品処理に伴う重量減少量について調べた結果をTable 1にまとめた。熱水処理においても16.3%の重量減少が認められたが、化学薬品処理すると更に高くなり、特に35% H_2O_2 : CH_3COOH (1:1)及び5%硫酸溶液処理では約50~60%に達した。5% $NaClO$ 及び5% $NaClO_2$ 溶液処理では34.5~37.5%の重量減少量がみられたが、0.5% $NaOH$ 溶液処理における値より低い。以上の結果から、サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性を高めるためにはアルカリ処理等の前処理を要することがわかった。

2. サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性に及ぼすアルカリ濃度の影響

各種濃度のアルカリ溶液による前処理と処理基質の酵素分解性及び重量減少量について調べた結果をFig. 2に示した。各種アルカリ濃度で前処理した葉・梢頭部に酵素を加え、40℃で24時間酵素反応を行なった後、反応混液中の全糖量、還元糖量及びグルコース量を測定した。

葉・梢頭部の酵素分解性は1%アルカリ溶液で前処理した場合に最高値を示し、これ以上の濃度で処理しても分解率の増大は認められなかった。0.5%アルカリ溶液で前処理した基質の酵素分解における全糖量と還元糖量の値は近似していたが、1.0%以上の濃度で処理した基質を用いた場合には全糖量が比較的高くなり、酵素反応液中に著量の高糖類が含まれることがわかった。一方、前処理に伴う重量減少量は水酸化ナトリウム濃度の増加とともにほぼ直線的に増大することがわかった。

3. サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性に及ぼす処理温度の影響

葉・梢頭部に0.5% $NaOH$ 溶液を所定量加え、各温度で20分間加温処理を行なった後、処理基質の酵素分解性及び前処理に伴う重量減少量を測定した。尚、120℃における処理はオートクレーブを用いて加圧蒸煮した。Fig. 3は酵素反応によって生成された全糖量、還元糖量及びグルコース量について調べた結果である。基質の酵素分解性は処理温度の上昇に伴って直線

Table 1 Relationship between chemical pretreatments of sugarcane top & leaves and the degree of weight loss

Chemicals	Degree of weight loss (%)
35% H_2O_2 : CH_3COOH (1:1)	58.5
5% H_2SO_4	46.6
0.5% $NaOH$	41.7
5% $NaClO$	37.5
5% $NaClO_2$	34.5
20% Ethylenediamine	21.9
H_2O	16.3

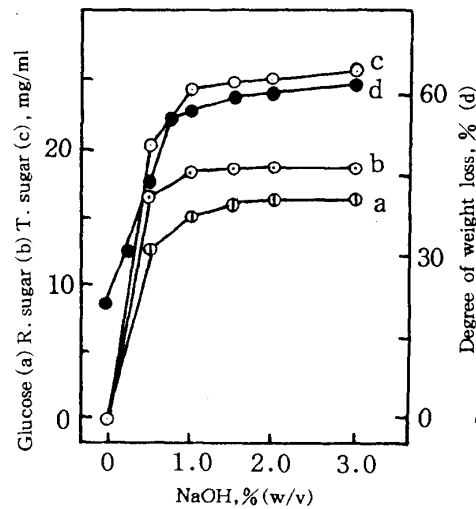


Fig. 2 Effect of alkali-treatment on the degradation of sugarcane top & leaves by cellulase preparation

The pulverized materials were pretreated with various concentration of sodium hydroxide at 120℃ for 20 min. The treated residues were recovered by filtration, washed and dried. The residues are incubated with an enzyme preparation at 40℃ for 24 hours, and total sugar, reducing sugar and glucose were measured by the method of somogyi-nelson and Glucose oxidase kit, respectively.

(a) Glucose (b) Reducing sugar (c) Total sugar (d) Degree of weight loss
Other conditions are stated in the legend to Fig. 1.

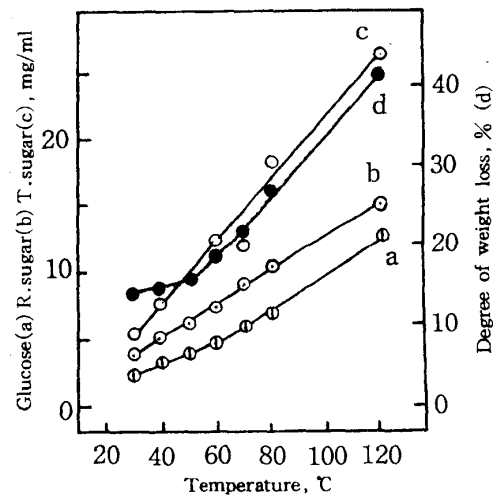


Fig. 3 Effect of alkali-treatment at various temperature on the degradation of sugarcane top & leaves by cellulase preparation

The pulverized materials were pretreated with 0.5% sodium hydroxide at various temperatures for 20 min. The residues were recovered by filtration, washed and dried. The residues are incubated with an enzyme preparation at 40℃, and the total sugar, reducing sugar and glucose formed were determined. (a) Glucose (b) Reducing sugar (c) Total sugar (d) Degree of weight loss
Other conditions are stated in the legend to Fig. 1.

的に増大し、120℃処理で最も高い値が得られた。この時の酵素分解率は30℃で処理した場合の約5.4倍に相当した。低温より高温側で処理した基質を酵素反応に供した系で全糖量と還元糖量に著しい差異が認められた。他方、80℃までの加温処理では原料成分の可溶化程度は26.7%以内であったが、120℃における処理では41.7%に達した。

4. 0.5%水酸化ナトリウム処理葉・梢頭部の酵素分解性に及ぼす基質濃度の影響

基質添加量と酵素分解性との関係を知る目的で、酵素反応液に加える基質量を変えて反応を行なったのち、酵素反応液中の各生成糖量を測定した。酵素反応は、0.1%の酵素量を含む反応液混液に基質量が2~10%になるように加え、40℃で96時間インキュベーションして行なった。Fig. 4.に示したように、反応混液中の各生成糖量は基質添加量の増加とともに増大したが、全糖量を基質量で除して求めた糖化率は基質添加量の増加に伴ない直線に減少し、10%基質濃度における値は約60%であった。

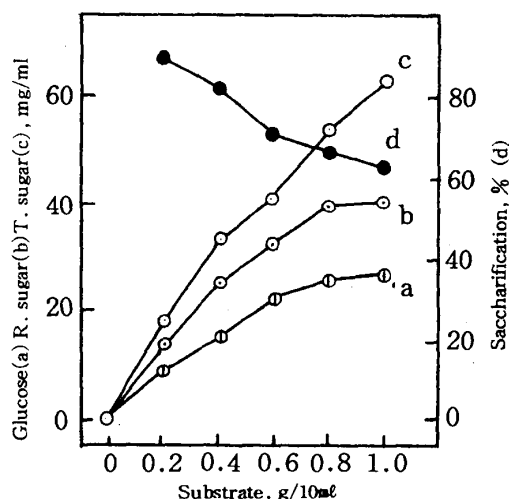


Fig. 4 Effect of substrate concentration in the reaction mixture on the degradation of 0.5% NaOH-treated sugarcane top & leaves by cellulase preparation.

The various concentrations of 0.5% NaOH treated materials are incubated with an enzyme preparation at 40℃ for 96 hours, and the total sugar, reducing sugar and glucose formed were determined. (a) Glucose (b) Reducing sugar (c) Total sugar (d) degree of saccharification

Other condition are stated in the legend to Fig. 1.

考 察

一般に、セルロース性物質の酵素糖化率は無処理のままだと著しく低い値であるため、酵素分解性を高めるためには前処理を構じる必要がある。著者ら^{4,9)}はこれまでにバガスの前処理条件と酵素分解性あるいは微生物による資化性等について明らかにした。一方、サトウキビ葉・梢頭部の酵素分解性については全く検討されていないことから、同基質のセルラーゼによる分解程度を調べた。その結果、同基質はバガスと同様に無処理の状態では酵素作用を受け難いことがわかった。そこで前処理条件と酵素分解性について調べた結果、5%NaClO, 5%NaClO₂, 35%H₂O, : CH₃COOH (1:1) 及び0.5%NaOH処理が効果的な処理法であることがわかった。同試薬処理後には原料の34.5~37.5%に相当する成分が可溶化され、重量減少がみられた。著者ら^{4,6)}はバガスの酵素糖化に際してもこれら化学薬品処理が極めて効果的であることを報告した。アルカリ処理葉・梢頭部の酵素分解性は1.0%アルカリ溶液処理において最高値を示し、これ以上の濃度で処理を行なっても分解率の増大は認められない。また、アルカリ溶液処理による重量減少率はアルカリ濃度の増加とともに増大した。0.5%アルカリ溶液処理基質の酵素分解性は処理温度の上昇に伴ない直線的に増大したが、酵素糖化率が比較的高かった反応系では糖化液中の多糖の含量が増加した。これは、セルラーゼ標品に混在するβ-グルコシダーゼの活性が酵素反応生成物によって抑制されたためだと考えられる。処理温度が80℃まではアルカリ処理に伴ない重量減少量は26.7%程度に留まったが、120℃処理では41.7%に達した。酵素分解性及び重量減少量からみた場合、0.5%NaOHで120℃、20分間処理が最適であると判断されるわけだが、低温において効果的な前処理法の開発が望まれる。酵素反応液中の基質濃度を徐々に変えて、反応を行なると基質添加量の増加とともに全糖量は増大したが、基質量当たりの糖化率は減少する傾向を示し、10%基質濃度では約60%であった。以上の結果より、葉・梢頭部から効率よく高濃度の酵素糖化液を得るには所定量の基質を

段階的に加えて酵素反応に供する方法を確立するとともに酵素糖化とアルコール発酵等を組み合わせた反応系について検討する必要があると考えられる。

要 約

サトウキビ葉・梢頭部を酵素糖化したのち糖化液を発酵原料に供することを目的として、サトウキビ葉・梢頭部の化学的前処理と酵素糖化性等について調べた。

サトウキビ葉・梢頭部を5%NaClO、5%NaClO₂、35%H₂O₂：CH₃COOH(1:1)及び0.5%NaOH溶液を用いて120℃で20分間前処理を行なうと酵素分解性が著しく高められた。また、これら化学薬品処理は原料の34～60%に相当する成分を可溶化した。酵素分解性からみた最適アルカリ濃度は0.5～1.0%であり、本NaOH処理基質はセルラーゼを用いた48時間の酵素作用ではほぼ完全に糖化された。アルカリ処理に伴う重量減少量はアルカリ濃度に依存して増加した。0.5%NaOH処理葉・梢頭部の酵素糖化性は処理温度の上昇に伴ない増大した。また同基質の酵素化率は添加量の増加に伴ない急激に減少し、10%の基質濃度では約60%程度であった。

引用文献

1. Excoffier, G., Toussaint, B., and Vignon, M. R. 1991 Saccharification of steam-exploded poplar wood. *Biotechnol. Bioeng.* 38 : 1308 - 1317
2. Furusaki, S., Asai, N., and Hoshikawa, K. 1985 Saccharification of sweet sorghum bagasse by cellulase. *J. Ferment. Technol.* 63(6) : 523 - 528
3. 石原昌信、当山清善 1988 メタン発酵によるバガスからのバイオガスの生産 琉大農学報 35 : 45～51
4. 石原昌信、当山清善 1990 バガスの化学的前処理と酵素分解性 琉大農学報 37 : 27～33
5. 石原昌信、当山清善 1991 半固形メタン発酵法によるサトウキビ葉・梢頭部からのバイオガス生産 琉大農学報 38 : 243～248
6. Koullas, D. P., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., and Koukios, E. G. 1991 Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnol. Bioeng.* 39 : 113 - 116
7. Martinez, D. V. G., Ogawa, T., Shinmyo, A., and Enatsu, T. 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzymes produced by *penicillium variable*. *J. Ferment. Technol.* 52 (6) : 378 - 387
8. Morjanoff, P. J., and Gray, P. P. 1986 Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 29 : 733 - 741
9. Toyama, S., Yonaha, K., and Ishihara, M. 1981 Degradation of bagasse cellulose by *Acremonium* sp. *Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus.* 28 : 89 - 100