

琉球大学学術リポジトリ

バガスの化学的前処理と酵素分解性(農芸化学科)

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, 当山, 清善 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3856

バガスの化学的前処理と酵素分解性

石原昌信*、当山清善*

Masanobu ISHIHARA, Seizen TOYAMA: Enzymatic degradability of chemically pretreated bagasse

Summary

The effect of chemical pretreatments on the degradability of bagasse cellulose by microbial cellulase preparation has been studied.

When sugarcane bagasse was pretreated at 120°C for 20 min with 0.5% NaOH, 20% Ethylendiamine, 5% NaClO, 5% NaClO₂, and 35% H₂O₂-CH₃COOH (1:1), the lignin contents greatly decreased and marked increases in cellulose. The favorable NaOH and NaClO₂ concentrations for removal of lignin were nearly 0.5% (W_v) and 3.0% (W_v), respectively. Pretreatments with 0.5% NaOH, 20% Ethylendiamine, 5% NaClO, 5% NaClO₂ and 35% H₂O₂-CH₃COOH considerably enhanced in degradability of bagasse by *Sporotrichum* cellulase. The susceptibility of the pretreated bagasse for enzyme attack was dependent upon the lignin content. It was found that the degradability of 2.0% NaClO₂-treated bagasse by the enzyme was the same as that of 0.5% NaOH-treated bagasse, indicating about 82% degradation of cellulose.

緒 言

バガス等のセルロース性物質を微生物及び酵素を用いて分解・糖化するには前処理工程が不可欠であるため、効果的な前処理法の開発が重要な課題となっている。前処理法^{2,5,8)}として微粉末化、 γ -線照射及び爆砕等の物理的処理、アルカリ溶液等による化学的処理及び微生物処理が開発されているが、化学的処理においてはリグニンとともに他の有用成分が可溶化され、重量減少率が高いこと、物理的処理においては多大のエネルギーを必要とすること、微生物処理では長期間を要する等種々の問題点が指摘されている。前処理を行なう目的は、植物組織中のリグニンを除去あるいは分解すると同時にセルロースの結晶構造を破壊することにあるわけだが、植物組織中のリグノセルロース構造を迅速に破壊するためには極めて過激な処理が必須であると考えられる。

著者ら^{7,9)}はバガスの微生物による資化分解性、酵素分解性及びメタン発酵法によるバイオガス生産

甘蔗バガスの微生物学的利用に関する研究 第9報

*琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 37: 27~33 (1990)

と各種前処理条件との関係について検討中であり、前報⁶⁾ではバガスの化学薬品処理と酵素分解性について調べ、アルカリ溶液処理等によりバガスの酵素分解性が著しく高められたことを述べた。本実験では、バガスを酵素糖化することにより発酵原料に供することを目的としてバガスセルロースの酵素糖化に及ぼす各種化学薬品処理の効果及び前処理に伴うリグニン及びセルロース含量の変化について調べた。

実験方法

- (1) **バガスの調製**：本実験では、製糖工場で副生したバガスを採取し、50℃で乾燥したのちウィレー氏粉碎機で40メッシュになるように粉碎したものを無処理バガスと称した。バガスの化学薬品処理は前報⁶⁾に従って粉碎バガスにバガス重量の20倍量の処理液を加え、所定の温度で保持することにより行ない、処理後50℃で乾燥して実験に供した。
- (2) **セルロース及びリグニンの定量**：バガスセルロース量は前報⁶⁾のとおりupdegraff¹¹⁾の方法に準じて測定した。リグニンの調製は、バガス30mgに72%硫酸溶液を0.25ml加え、20℃で4時間放置した後、蒸留水8.0mlを加えて2時間煮沸して行なった。リグニン含量の測定は当研究室で考案した比色定量法により行なった。即ち、調製リグニンを蒸留水で充分洗浄したのち80%酢酸-硝酸(1:1)溶液3.0mlを加え、湯浴中で30分間煮沸してリグニンを溶解した。次に水酸化ナトリウム添加で中和したのち、0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で適度に希釈し、300nmにおける吸光度を測定した。リグニン含量は、同様な操作で得られた標準リグニンの吸光度値から比例式により求めた。
- (3) **酵素標品**：前処理バガスの酵素分解には*Sporotrichum*属起源セルラーゼ標品(味の素株)を用いた。酵素粉末を所定量の蒸留水に溶解し、酵素反応混液中の濃度が0.5%になるように調節した。
- (4) **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バガス30mg、1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)0.3ml、0.1%窒化ナトリウム0.3ml及び酵素液で総量3.0mlとした。酵素反応は、スピッチグラスに酵素反応液及び基質を採り、40℃で24時間ゆるやかに攪拌して行ない、酵素反応の停止は10分間煮沸することにより行なった。冷却後、遠心分離により固液分離を行ない、得られた液部について還元糖量をSomogyi-Nelson法により測定した。酵素糖化率は酵素反応で生成された全還元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バガスのセルロース及びリグニン含量に及ぼす影響

バガスの微生物及び酵素分解性を高めるためには物理化学的前処理が必須であることから、効果的な前処理法を開発する目的で、各種化学薬品によるバガスの前処理とセルロース及びリグニン含量の変化について調べたのがTable 1である。バガスの前処理は、粉碎バガスにバガス重量の20倍量の各薬品を加えて表中に示した条件下で行なった。処理残渣は蒸留水で洗浄を行ない、乾燥したのちセルロース及びリグニン含量を測定した。粉碎バガスのセルロース及びリグニン含量は42.2%と22.4%であったが、5%次亜塩素酸ナトリウム及び35%過酸化水素水-酢酸(1:1)溶液で処理すると完全に脱リグニンされ、セルロース含量は81.3~83.9%に増加した。5%亜塩素酸ナトリウム処理でも比較的良好に脱リグニンされ、セルロース含量は69.5%であった。次いで0.5%水酸化ナトリウム及び20%エチレンジアミンの順にリグニンの除去率が高く、脱リグニンに伴ないセルロース含量が増加した。5%硫酸、50%エチレングリコール及び1%亜硫酸ナトリウム処理等ではリグニン含量は増加の傾向にあり、脱リグニンの程度は極めて小さいことがわかった。

Table. 1 Effect of chemical pretreatments on cellulose and lignin contents of bagasse

Treatment condition	cellulose (%)	lignin (%)
Untreated	42.2	22.4
Distilled water, 120°C, 20 min	47	25
50% Butanol-HCl (10:0.1), 120°C, 20min	49.4	23.4
4.5% (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ , 120°C, 20 min	49.1	26.3
1% Na ₂ SO ₃ , 120°C, 20 min	51.1	22
5% NH ₄ OH, 50°C, 12hr	49.2	24.6
0.5% NaOH, 120°C, 20 min	58	11
20% Ethylendiamine, 120°C, 20 min	57.2	14.6
5% H ₂ SO ₄ , 120°C, 20 min	65.9	34
50% Ethylenglycol-HCl (10:0.1), 120°C, 20 min	67.4	27.4
5% NaClO ₂ , 120°C, 20 min	69.5	3
5% NaClO, 120°C, 20 min	81.3	0
35% H ₂ O ₂ -CH ₃ COOH (1:1), 120°C, 20 min	83.9	0

The sugarcane bagasse was ground in a whiley mill to 40 mesh. The bagasse was treated with 20 volume of various chemical agents at indicated conditions, and the residues were recovered by filtration, washed and dried. Tirty mg of pretreated bagasse was treated again with 0.25 ml of 72% sulfuric acid at 20°C for 4 hr to prepare the lignin. After treatment, 8 ml of distilled water was added to the mixture and it was heated for 24 hr in boiling water. The residues (lignin) was recovered by filtration, washed with distilled water. The lignin was hydrolyzed with 3.0ml of 80% acetate-nitrate(1:1) solution by heating for 30 min. After hydrolysis, the hydrolysate was measured the absorbance at 300 nm by using spectrophotometer. The lignin was quantified from calibration curve obtained with authentic lignin. The amount of cellulose was determined by the method of Updegraff¹¹⁾.

2. バガスのセルロース及びリグニン含量に及ぼすアルカリ濃度の影響

粉碎バガスを0.5%水酸化ナトリウム溶液で処理するとリグニンが除去されることがわかったので、次に水酸化ナトリウム濃度を変えて処理したバガス中のセルロース及びリグニン含量について調べた (Fig. 1)。図に示したように、水酸化ナトリウム濃度が0.25%になるように加えて処理した場合にはリグニンの除去率は低い値であったが、0.5%以上の濃度で処理した系では62~70%のリグニンが除去された。脱リグニンに伴ないセルロース含量は72%まで増加し、1.0%以上の水酸化ナトリウムを加えた系ではほぼ一定となった。この結果から、水酸化ナトリウム溶液によるバガスの処理においては0.5%付近の濃度が最適であることがわかった。

3. バガスのセルロース及びリグニン含量に及ぼす亜塩素酸ナトリウム濃度の影響

次に、亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度と処理バガスのセルロース及びリグニン含量について調べたのがFig. 2である。亜塩素酸ナトリウム濃度が3%までは処理液の濃度の増加に伴ないバガスのリグニン含量は直線的に減少した。リグニンの減少に伴ないセルロース含量は増加し、5%亜塩素酸ナトリウムで処理した場合にはセルロース及びリグニン含量はそれぞれ68%と15%であった。この結果から、亜塩素酸ナトリウム処理では水酸化ナトリウム処理よりもリグニン除去率が高い値を示したが、高濃度で処理する必要があることがわかった。

4. 各種化学薬品処理がバガスの酵素分解性に及ぼす影響

各種化学薬品処理バガスの酵素分解性を比較する目的で、処理バガスに *Sporotrichum* セルラーゼを混合し、40°Cで24時間酵素反応を行ない、酵素糖化率とバガスセルロース分解率について調べた

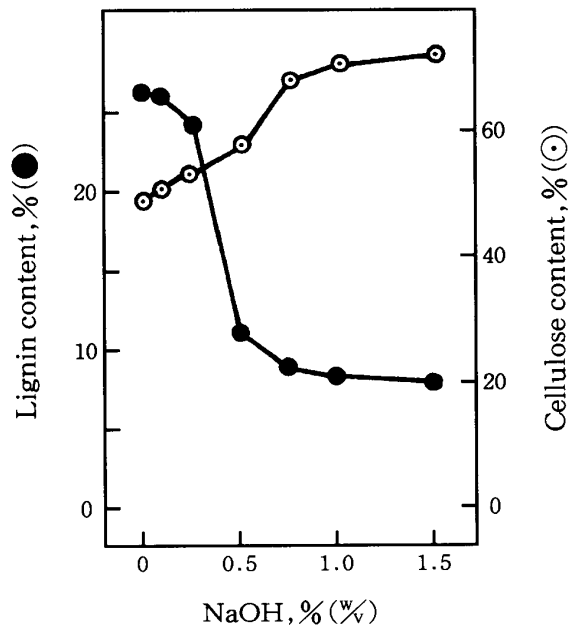


Fig. 1 Effect of alkali concentration on cellulose and lignin contents of bagasse

The bagasse was treated with various concentration of sodium hydroxide at 120°C for 20 min. The residues was recovered by filtration, washed and dried. Other conditions are stated in the legend to Table 1.

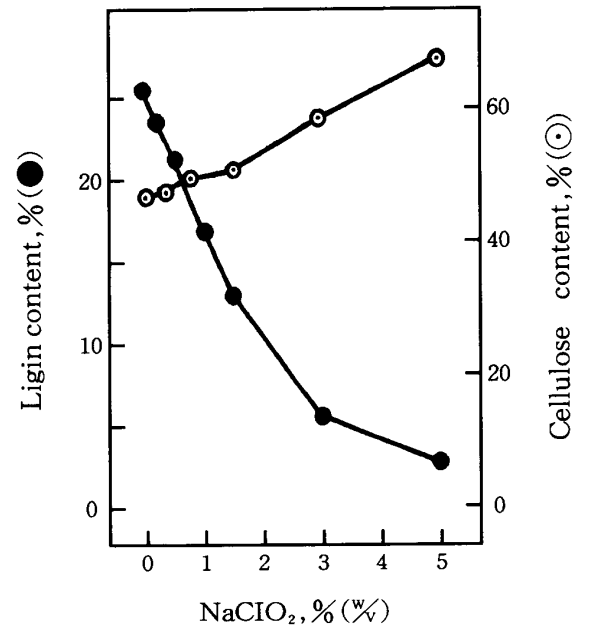


Fig. 2 Effect of sodium chlorite concentration on cellulose and lignin contents of bagasse

The bagasse was treated with various concentration of sodium chlorite at 120°C for 20 min. The residues was recovered by filtration, washed and dried. Other conditions are stated in the legend to Table 1.

(Table. 2)。表に示したように、熱水、ブタノール、シュウ酸アンモニウム、亜硫酸ナトリウム及び硫酸溶液で処理したバガスの酵素糖化率及びセルロース分解率は無処理バガスと同程度であり、処理効果は認められなかった。また、アンモニア水及び、エチレングリコール処理バガスの酵素糖化率及びセルロース分解率は無処理バガスに比べて約2～3倍高い値を示した。エチレンジアミン、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム及び過酸化水素水-酢酸溶液等で処理すると酵素糖化率及びセルロース分解率が著しく高められ、無処理バガスの約4～5.5倍の値を示した。その中でも次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム及び過酸化水素水-酢酸溶液処理バガスの分解率は90%以上に達した。

5. 水酸化ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム処理バガスの酵素分解性

水酸化ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム処理バガスの酵素分解性を比較するため、両試薬の濃度を変えて処理したバガスについて酵素分解性を調べたのがFig. 3である。図より、処理溶液濃度が低い系では明らかに両試薬処理バガスの酵素分解性に差が認められ、0.5%水酸化ナトリウム処理バガスのセルロース分解率が82.9%であったのに対し、亜塩素酸ナトリウム処理バガスでは15.9%であった。1%濃度の水酸化ナトリウム溶液で処理した場合、バガスセルロースの酵素分解率は92%に達した。亜塩素酸ナトリウム処理において0.5%水酸化ナトリウム処理バガスと同程度の酵素分解率を得るには2%以上の濃度を必要とした。

Table. 2 Effect of pretreatment on the degradability of the bagasse by *Sprotrichum* enzyme

Treatment condition	cellulose degraded (%)	saccharification (%)
Untreated	16.5	16.2
Distilled water, 120°C, 20 min	17.5	17.7
50% Butanol-HCl (10:0.1), 120°C, 20 min	17	17.4
4.5% (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ , 120°C, 20 min	18.5	16.5
1% Na ₂ SO ₃ , 120°C, 20 min	28.2	29.8
5% NH ₄ OH, 50°C, 12hr	38	33.8
0.5% NaOH, 120°C, 20 min	82.9	71.5
20% Ethylendiamine, 120°C, 20 min	78.5	68.5
5% H ₂ SO ₄ , 120°C, 20 min	26.2	20.5
50% Ethylenglycol-HCl (10:0.1), 120°C, 20 min	51	45.5
5% NaClO ₂ , 120°C, 20 min	99	89
5% NaClO, 120°C, 20 min	93	90
35% H ₂ O ₂ -CH ₃ COOH (1:1), 120°C, 20 min	90.5	86

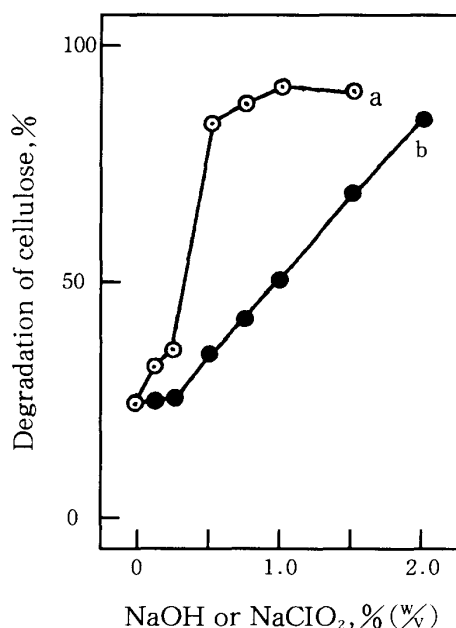
$$\text{Saccharification (\%)} = \text{Reducing sugar} \times 3.0 \text{ ml} / \text{Dry bagasse} \times 100$$

The bagasse was treated with various chemical agents at indicated conditions. The residues was recovered by filtration, washed and dried. The reaction mixture for enzyme assay contained 30mg of substrate, 0.3ml of 1M sodium acetate buffer (pH4.5), 0.3ml of sodium azid and 0.3ml of 0.5% enzyme solution in a final volume of 3.0ml. After incubation at 40°C for 24hr with shaking, the reaction was stopped by boiling for 10 min. The mixture was centrifuged to separate the supernatant from the residues. The reducing sugar was determined by the method of Somogyi-Nelson. The enzymic saccharification of treated bagasse was expressed as reducing sugar x 3.0 ml / bagasse, g x 100

Other condition are stated in the legend to Table 1 .

Fig. 3 Enzymatic degradation of cellulose in the bagasse treated with sodium hydroxide and sodium chlorite

The bagasse was treated with various concentration of sodium hydroxide and sodium chlorite at 120°C for 20 min. The residues was recovered by filtration, washed and dried. (a) Sodium hydroxide (b) Sodium chlorite Other conditions are stated in the legend to Table 1.



考 察

バガスの付加価値を高めるため飼料化、肥料化及び発酵原料化等が試みられているが、バガスの微生物及び酵素分解性を高めるには原料の前処理が必須であると考えられている。現在までに、各種の前処理法が開発され、前処理条件と微生物及び酵素分解性が検討されている^{1,4,10)}。著者らは前報⁶⁾にて、バガスの化学薬品処理と酵素分解性について調べ、アルカリ処理及び亜塩素酸ナトリウム処理等により酵素分解性が著しく高められることを述べた。本研究では、各種化学薬品処理と脱リグニンの程度を明らかにするとともに処理バガスの酵素分解性について調べた。

バガスを各種化学薬品を用いて表1に示した条件で処理したのち、処理バガス中のセルロース及びリグニン含量について調べた結果、5%次亜塩素酸ナトリウム及び35%過酸化水素水-酢酸(1:1)溶液処理では完全に脱リグニンされ、セルロース含量は81.3~83.9%に達した。5%亜塩素酸ナトリウム処理バガスのセルロース及びリグニン含量は69.5%と6%であり、その他にヘミセルロースが存在した。次いで0.5%水酸化ナトリウム及び20%エチレンジアミン処理の順に良好な脱リグニン作用がみられ、リグニンの減少に伴ないセルロース含量が増大した。しかし、5%硫酸、50%エチレングリコール及び1%亜硫酸ナトリウム処理等では脱リグニンの程度は小さく、セルロース含量はほぼ一定であった。水酸化ナトリウム及びエチレンジアミン処理の他に0.12M炭酸カルシウムを含む0.14M水酸化カルシウム溶液処理でもリグニン含量が著しく減少し、セルロース及びヘミセルロース含量が高くなることが認められている¹⁾。次に、水酸化ナトリウムの濃度とセルロース及びリグニン含量の変化について調べた結果、0.25%水酸化ナトリウム処理においてはセルロース及びリグニン含量に大きな差異はみられないが、0.5%以上の濃度処理ではリグニン含量は著しく減少し、セルロース量は増加した。しかし、0.75%以上の濃度処理ではセルロース及びリグニン含量はほぼ一定となり、最終的に約70%のリグニン除去率を示した。これらの結果から、バガスの前処理における最適水酸化ナトリウム濃度は0.5%付近であることがわかった。また、亜塩素酸ナトリウム濃度を変えて処理したバガスのセルロース及びリグニン含量について調べた結果、リグニン含量は亜塩素酸ナトリウム濃度が3%までは溶液濃度の増加に伴い減少し、セルロース含量が増加した。5%亜塩素酸ナトリウム溶液で処理したバガスのセルロース含量は68%に達した。バガスセルロースの酵素分解性は、20%エチレンジアミン、0.5%水酸化ナトリウム、5%次亜塩素酸ナトリウム、5%亜塩素酸ナトリウム及び35%過酸化水素水-酢酸(1:1)溶液で処理すると無処理バガスの約4~5倍高い値を示した。その中でも後者三種の薬品で処理した時には90%以上の分解率を示した。しかし、次亜塩素酸ナトリウム及び過酸化水素水-酢酸溶液処理ではリグニンとともにヘミセルロースが完全に除去されることより、原料の有効利用の面から不適であることが判った。水酸化ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム処理バガスの酵素分解性を比較した結果、処理濃度が0.5%以下では前者が後者の約2倍高い値を示した。しかし、水酸化ナトリウム処理においては、これ以上濃度を増大しても酵素分解性の著しい増加は認められず、1.0%以上の濃度処理ではほぼ一定値を示した。この結果はGarciaら³⁾の報告と良く一致していた。一方、亜塩素酸ナトリウム処理においては、処理バガスの酵素分解性は処理濃度の増加とともに比例的に増大し、1.5%濃度処理バガスの酵素分解性は水酸化ナトリウム処理バガスの約70%に相当した。0.5%水酸化ナトリウム処理バガスと同程度の酵素分解率を得るには2%以上の濃度を要することが明らかになったが、室温処理における脱リグニンの程度及び処理バガスの酵素分解性についても比較する必要があると思われる。

要 約

バガスの酵素分解性に及ぼす化学薬品処理の影響について明らかにする目的で、粉碎バガスを各種化学薬品で処理を行ない、処理バガス中のセルロース及びリグニン含量と酵素分解性について調べた。

粉碎バガスに0.5%水酸化ナトリウム、20%エチレンジアミン、5%次亜塩素酸ナトリウム、5%亜塩素酸ナトリウム及び35%過酸化水素水-酢酸(1:1)溶液を加え、120℃で20分間処理を行うと処理バガス中のリグニン含量が著しく減少し、セルロース含量は増大した。脱リグニンの程度からみた最適水酸化ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム溶液濃度はそれぞれ0.5%(Wv)と、3.0%(Wv)であった。粉碎バガスを0.5%水酸化ナトリウム、20%エチレンジアミン、5%次亜塩素酸ナトリウム5%亜塩素酸ナトリウム及び35%過酸化水素水-酢酸溶液で処理すると*Sporotrichum*セルラーゼによる分解性が著しく高められた。前処理バガスの酵素分解性はリグニン含量に依存して増大した。2.0%亜塩素酸ナトリウム処理バガスセルロースの酵素分解性は約82%を示し、0.5%水酸化ナトリウム処理バガスの酵素分解性と同程度であることがわかった。

本研究の実施に協力された天野仁了君に感謝します。

引用文献

1. Al-ani, F., Smith, J,E 1988 Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate degradability of bagasse by *Phanerochaete chrysosporium* J. Sci. Food Agric. 42:19~28
2. Cabello, A., Conde, J., Otero, M,A 1981 Prediction of the degradability of sugarcane cellulosic residues by indirect methods Biotechnology and Bioengineering 23:2737~2747
3. Garcia, D,V., Ogawa, T., Shinmyo, A., Enatsu, T 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzymes produced by *Penicillium variable* J. Ferment. Technol. 52:378~387
4. Kawamori, M., Moriakawa, Y., Ado, Y., Takasawa, S 1986 Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei* Appl. Microbial Biotechnol 24:454~458
5. Han, Y, W., Catalano, E, A., Ciegler, A 1983 Chemical and physical properties of sugarcane bagasse irradiated with γ rays J. Agric. Food Chem 31:34~38
6. 石原昌信、与那覇和雄、当山清善 1983 バガスの前処理とバガスセルロースの酵素的分解 琉大農学報 30:193~200
7. 石原昌信、当山清善、与那覇和雄 1988 メタン発酵によるバガスからバイオガスの生産 琉大農学報 35:45~51
8. Puri, V, P., Pearce, G,R 1985 Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymic hydrolysis Biotechnology and Bioengineering 28:480~485
9. 当山清善、与那覇和雄、石原昌信 1980 甘蔗バガスのアルカリ処理条件とアルカリ抽出液の紫外部吸収値との関係 琉大農学報 27:79~87
10. Toyama, S., Yonaha, K., Ishihara, M 1981 Degradation of bagasse cellulose by *Acremonium* sp. 琉大農学報 28:89~100
11. Updegraff, D, M 1969 Semimicro determination of cellulose in biological materials Anal. Biochem 32:420~424