

琉球大学学術リポジトリ

バガスの酵素分解性とフェノール化合物(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, 石垣, 勝己, 当山, 清善, Ishihara, Masanobu, Ishigaki, Katsumi, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3876

バガスの酵素分解性とフェノール化合物

石原昌信*、石垣勝己**、当山清善*

Masanobu ISHIHARA, Katsumi ISHIGAKI, Seizen TOYAMA : Enzymatic degradation of sugar-cane bagasse and phenolic compounds

Summary

The ultraviolet absorbance of the supernatant and the water soluble phenolic compounds released were determined after treating sugar-cane bagasse with a commercial cellulase preparation, "Meicelase".

When the supernatant was treated with NaOH solution at 120°C for 30 min, the absorption value at 280 nm was increased. Ferulic acid, the only phenolic compound detected, was extracted with ethylacetate from the supernatant which was treated with NaOH. Ferulic acid which was released from bagasse during enzyme reaction could be separated from the other substances by paperchromatography.

when sugar-cane bagasse was treated with NaOH, the degradability of the residues by cellulase preparation was strongly correlated with the amount of phenolic compound released by the alkali. Gel filtration of the enzyme hydrolysate on Toyopear HW40 gave low- and high-molecular-weight fractions, both of which appeared to contain phenolic-complexes. The high-molecular-weight fraction obtained by gel filtration contained glucose, xylose and arabinose.

緒 論

バガス中のセルロースやヘミセルロースを酵素を用いて高度に分解・糖化して発酵原料に供するためには、バガスを酵素反応に用いる前に物理・化学的に脱リグニン処理を行ない、バガスの酵素分解性を高める必要がある。これまでに各種の脱リグニン法^{12,18)}が知られているが、より簡易で温和な前処理法^{1,10,11)}の開発が要請されている。著者らは前報^{6,7)}で、バガスの酵素糖化において水酸化ナトリウム溶液処理が効果的であり、微生物及び酵素分解性からみた最適なアルカリ処理条件を設定した。また、バガスのアルカリ処理で抽出された紫外外部吸収物質と処理バガスの微生物及び酵素分解性との関係について検討した。N. Shibata^{13,14)}らは、イネ胚乳細胞壁のアルカリ処理で可溶化された紫外外部吸収物質がP-クマール酸、フェルラ酸及びジフェルラ酸等のフェノール化合物^{2,4)}であることを明らかにしている。また、R. D. Hartley^{3,5)}らは牧草から調製した細胞壁をセルラーゼ標品で分解するとフェルラ酸の水溶性多糖エステルが可溶化されることをみとめ、細胞壁の酵素分解性と細胞壁中のフェノール化合物量との間には相

甘蔗バガスの微生物学的利用に関する研究 第8報

*琉球大学農学部農芸化学科

**八重山殖産株式会社

琉球大学農学部学術報告 36: 59~65 (1989)

関性があることを報告している。本報では、バガスの酵素分解性とバガス中のフェノール化合物量との関係を明らかにする目的で、セルラーゼ標品を用いてバガスの酵素分解反応を行ない、反応生成物の紫外外部吸収値及びフェノール化合物量の変化について調べた。

実験方法

(1)供試バガス:実験に用いたバガスは、製糖工場にて採取したバガスを水洗後50℃で乾燥し、前報に従って粉碎機で40メッシュになるように調製した。バガスのアルカリ処理は粉碎バガス20gに水酸化ナトリウム溶液1ℓを加え、120℃で20分間加圧蒸煮して行なった。アルカリ処理バガスは熱水及び蒸留水で充分洗浄した後乾燥して実験に供した。

(2)酵素標品:バガス成分の酵素分解反応には*Trichoderma*属起源のメイセララーゼ(明治製菓株)を用いた。酵素粉末を蒸留水に溶解し、酵素反応混液中の濃度が0.5%(v/w)になるように調節した。

(3)バガスの酵素分解:酵素反応液の組成は、100ml容三角フラスコにバガス400mgを採り、1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)1.0ml、0.2%窒化ナトリウム溶液1.0mlおよび酵素液を加え総量を10mlとした。酵素反応は40℃で3~48時間振とうして行ない、10分間煮沸して反応を止め、冷却後遠心分離により固液分離を行なった。酵素反応で生成された還元糖量はSomogyi-Nelson法で測定した。酵素反応液の280nm吸収値は日立100-10型分光光度計を用いて測定した。

(4)フェノール化合物の定量:酵素分解生成物からのフェノール化合物の単離は、下記の手順で行なった。即ち、酵素反応液1.0mlに水酸化ナトリウムを濃度が0.5%(w/v)になるように加え、100℃で30分間煮沸を行ない、冷却後塩酸でpH1.5~2.0に調節した。これに2倍量の酢酸エチルを混合攪拌することにより、フェノール化合物の抽出を行なった。得られた抽出液はエバポレータを用いて乾固するまで濃縮した後、所定量の95%エタノールに溶解した。エタノール可溶物からのフェノール化合物の分離は東洋濾紙NO.51を用いてペーパークロマトグラフィーにより行なった。展開はベンゼン-酢酸-蒸留水(6:7:5)の混合系の溶媒を用い、室温で12時間行なった。フェノール化合物の検出は展開後乾燥した濾紙に紫外線ランプを照射して行ない、フェノール化合物の定量は紫外線照射により蛍光発色したスポット(フェノール化合物)を切り取り、これに95%エタノールを加えて抽出した液について280nmの吸光度を測定して行なった。フェノール化合物量は同条件下で求めた標準物質の280nm値から算出し、ml/mgで表示した。

(5)酵素分解生成物の分画:酵素分解生成物のゲル濾過はトヨパールHW40(1.3×39cm)を用いて行なった。試料は、煮沸して酵素蛋白を除去するとともにエバポレータを用いて約10倍に濃縮した後カラムクロマトグラフィーに供した。各成分の溶出は蒸留水を用いて行ない、試験管当たり2mlを採取した。

実験結果

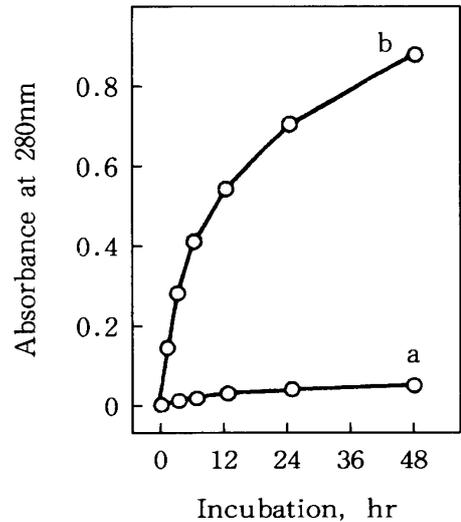
1. 酵素分解生成物のアルカリ処理と280nm値

粉碎バガスに酵素を加えて40℃で3~48時間反応を行ない、酵素分解生成物の280nmにおける吸収値の変化を調べたのがFig. 1である。酵素反応生成物をNaOH処理したものとしなないものについて分光光度計を用いて280nmにおける吸収値を比較した。その結果、酵素分解生成物を無処理のまま実験に供すると280nm値は極めて低い値であったが、酵素分解生成物に所定量のNaOHを加えて加温処理(100℃、30分間)すると280nm値が著しく増大した。各酵素反応時間で反応混液をNaOH処理した後280nm値を測定した結果、酵素反応時間の経過とともに280nm値が増大することがわかった。以下の実験で、酵素分解生成物の280nm値を測定する場合には試料はNaOHで処理した。

Fig. 1 Effect of alkali-treatment of the enzymatic degradation products on the absorbance at 280 nm

The sugar-cane bagasse used was washed throughly with water until reducing sugar was detected and then kept dried at 70°C. The bagasse was pulvelized in a whiley mill to 40 mesh. Enzymatic degradation of bagasse was carried out with a commercial cellulase preparation, Meicelase, which was produced from *Trichoderma viride*. The reaction mixture for enzyme assay contained 400 mg of substrate, 1.0 ml of 1 M acetate buffer (pH 4.5), 1.0 ml of 0.2% of sodium azid and 1.0 ml of 5.0% enzyme solution in the final volum of 10 ml. After incubation at 40°C for indicated times with shaking, the reaction was stopped by boiling for 10 min. The mixture was centrifuged to separate the supernatant from the residues. The absorbance at 280 nm of the untreated or NaOH terated supernatants was measured.

(a) untreated sample (b) alk ali-treated sample



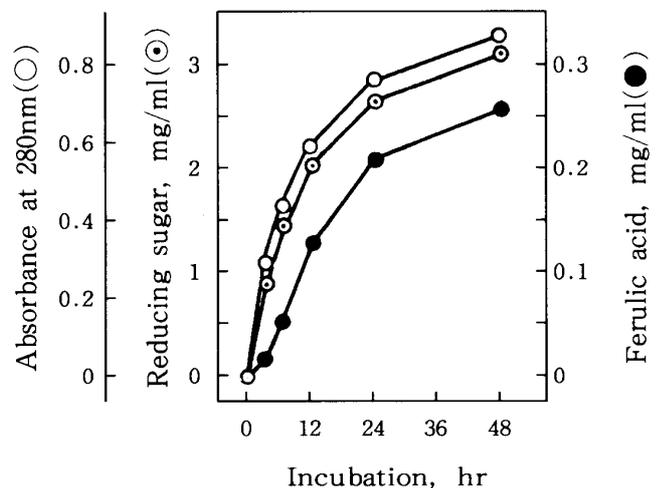
2. 酵素分解生成物の280nm値とフェルラ酸量

バガスの酵素分解性と酵素分解生成物の280nm値及び分解生成物中のフェノール化合物量との関係について調べるため、各酵素反応時間における分解生成物の280nm値、フェルラ酸量及び還元糖量を測定した。結果をFig. 2に示した。還元糖量は酵素反応時間の経過に伴ない増加し、還元糖量から算出したバガスの分解率は最終的に7.5%であった。酵素分解生成物の280nm値は、試料をアルカリ処理すると増大し、酵素反応時間とともに上昇した。酵素分解生成物をアルカリ処理した後ペーパークロマトグラフィーによりフェノール化合物の分離を行なった結果、フェルラ酸に相当するスポットが確認された。しかし、P-クマル酸等の他のフェノール化合物は検出されなかった。酵素分解生成物を無処理のままペーパークロマトを行なうとフェノール化合物は他成分と分離せず、フェルラ酸のスポットは検出されなかった。酵素分解生成物中のフェルラ酸量を測定した結果、フェルラ酸量は酵素反応時間の経過とともに増加し、還元糖量及び酵素分解生成物の280nmと酷似した増加曲線を示した。以上のことから、バガスをセルラーゼを用いて分解すると還元糖量の増加に伴ない280nmに吸収値を有する物質が生成され、この物質はフェルラ酸であることが明らかになり、フェルラ酸と糖成分の結合が示唆された。

Fig. 2 Reducing sugar, ferulic acid, and adsorbance at 280 nm during enzymatic degradation of bagasse

The bagasse was incubated with an enzyme preparation at 40°C for indicated times. Reducing sugar formed and the adsorbance at 280 nm of NaOH-treated supernatant were determined. Both untreated supernatant and NaOH-treated one were adjusted to pH 1.5-2.0 with 5 N HCl followed by extraction with two volume of ethylacetate. The extracts were evaporated until solid and added to 95% ethanol. An aliquort of the ethanol solvated fraction was chromatographed by the ascending technique on Toyo filter paper no. 51 using benzen-acetate-water (6:7:5) as a solvent. The spot of ferulic acid was detcted under UV illumilation, cut and extracted with 95% ethanol.

The amount of ferulic acid in the extract was determined by measuring the absorbance at 280 nm. Other conbitions were stated in the legend to Fig. 1.

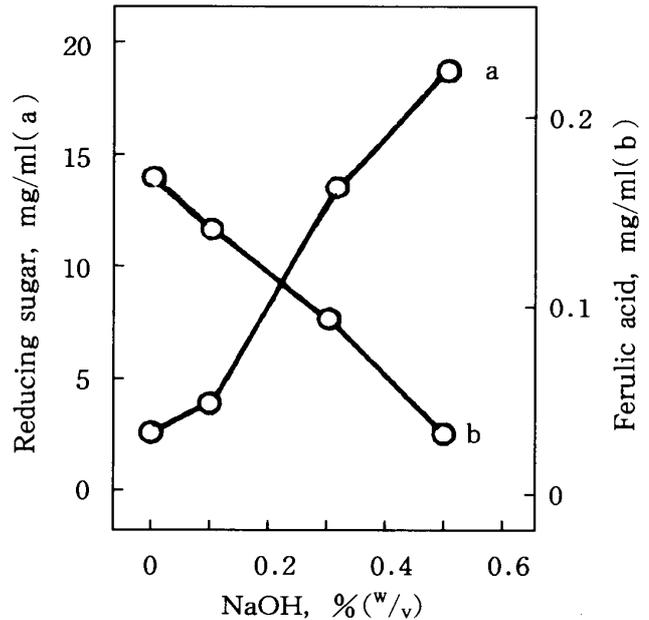


3. アルカリ処理バガスの酵素分解性とフェルラ酸量

次に、各種濃度の水酸化ナトリウム溶液で処理したバガスを基質として用い、酵素分解性と分解生成物中のフェルラ酸量について調べた結果をFig. 3に示した。結果より、バガスの酵素分解性はNaOH処理により著しく高められ、NaOH濃度に依存した。酵素反応生成物中のフェルラ酸量は、NaOH濃度の高い溶液で処理したバガスを基質とした系で低い傾向を示した。これはバガスをNaOH処理すると脱リグニンとともにヘミセルロース及びフェノール化合物が可溶化されたためである。

Fig. 3 Relationship between the enzymatic degradability of alkali-treated bagasse and ferulic acid of the enzymatic degradation products

The bagasse was treated with various concentration of NaOH solution at 120°C for 20 min. The treated bagasse was recovered by filtration, washed and dried. The NaOH treated bagasse was incubated with an enzyme preparation at 40°C, and the reducing sugar and ferulic acid formed were determined. Other conditions were stated in legend to Fig. 2.

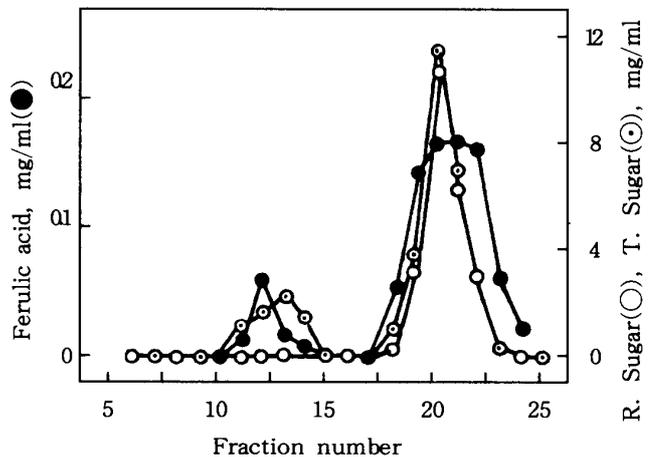


4. 酵素分解生成物のゲル濾過

バガスの酵素分解生成物を蒸留水で平衡化したトヨパールHW40(1.3×39cm)カラムを用いてゲル濾過を行ない、溶出された画分について全糖量、還元糖量及びフェルラ酸量を測定したのがFig. 4である。その結果、酵素分解物中の成分は高分子画分と低分子画に分画された。全糖量、還元糖量及びフェルラ酸量は高分子画分より低分子画分で高い値を示した。低分子画分の全糖量と還元糖量はほとんど同量であったが、高分子画分には還元糖は全く認められなかった。高分子画分には多糖成分とフェルラ酸が存

Fig. 4 Gel filtration of the enzymatic degradation products of bagasse

The bagasse was incubated with an enzyme preparation at 40°C for 24 hr. The supernatant was concentrated using an evaporator and was chromatographed on a column of Toyopearl HW40 gel and eluted with distilled water. Total sugar of the fraction was determined by phenol-sulfuric acid method, The reducing sugar and ferulic acid formed were measured. Other conditions were stated in legend to Fig. 2.



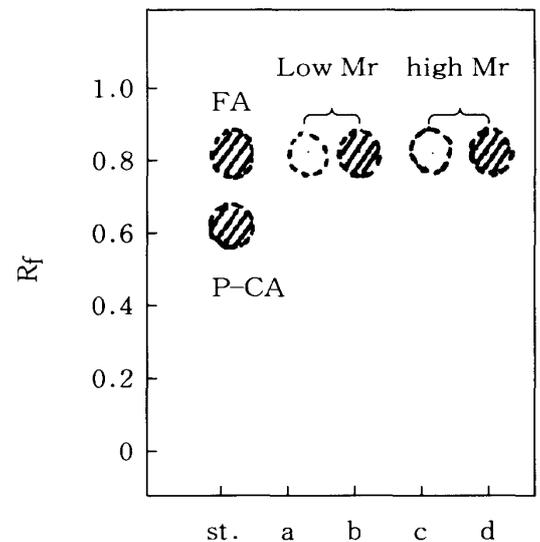
在し、多糖の組成は酸で加水分解後ペーパークロマトグラフィーによりグルコース、キシロース及びアラビノースであることが判明した。

5. フェルラ酸と糖成分の結合

前述の酵素分解生成物をゲル濾過して得られた各画分に遊離フェルラ酸が存在するかどうかを調べるため、無処理及びNaOH処理した画分についてペーパークロマトグラフィーを行なった (Fig. 5)。図に示したように、高分子及び低分子画分をNaOHで前処理するとフェルラ酸のスポットが確認された。しかし、無処理のものではフェルラ酸は全く検出されないことがわかった。これらのことから、酵素分解反応によって遊離したフェルラ酸は各種分子量の異なる糖成分と結合していることが明らかになった。

Fig. 5 Paper chromatography of phenolic acid obtained by the enzymatic degradation

The low and high molecular weight fractions obtained by filtration of degradation products were chromatographed on Toyo filter paper no. 51 with the same manners stated in Fig. 2. (a), (c): untreated fraction (b), (d): NaOH treated fraction
FA: ferulic acid, p-CA: p-coumaric acid
Other conditions were stated in legend to Fig. 2.



考 察

著者らは前報^{15,16)}で、バガスをNaOH溶液で処理するとバガス中のヘミセルロース、リグニン及び紫外部吸収物質が可溶化されるに伴ない、バガスの酵素分解性が著しく増大することを述べた。本報では、粉碎バガスのセルラーゼ標品による分解性と分解生成物の280nm値及びフェノール化合物との関係について調べた。

バガスにセルラーゼを加えて酵素反応を行ない、酵素分解生成物の280nm値を測定した結果、酵素分解生成物を無処理のまま測定に供した場合には280nm値は低い値であった。しかし、酵素分解生成物をNaOHで処理すると280nm値が著しく高められ、酵素反応時間に依存して増加した。牧草細胞壁をセルラーゼ処理した場合には水溶性の、フェルラ酸多糖エステルが生成されることが知られている³⁾。このエステル結合はNaOH処理で切断され、フェルラ酸が遊離してくることから、バガスの酵素分解生成物中にはフェノール化合物が糖成分と結合とているものと推測された。そこで、酵素分解生成物中のフェノール化合物について調べた結果、酵素分解生成物をNaOH処理した場合にはフェルラ酸が検出されたが、無処理のものには遊離フェルラ酸は認められなかった。フェルラ酸量は酵素反応時間とともに増大し、280nm値の増加曲線と酷似していた。以上の結果から、酵素分解生成物の280nm値は、フェルラ酸に由来する吸収値であることが明らかとなり、フェルラ酸は糖成分と結合しているものと推察された。R.D. Hartley⁵⁾らは、牧草の葉細胞壁にセルラーゼを作用させると主にトランス、シス-P-クマル酸の多糖エステルが遊離することを報告した。また、Katoら^{8,9,17)}は、フェノール化合物を含む *Bagasse-Lignin Carbohydrate Complex* (LCC) の酵素分解物から各種フェノール性多糖を分離している。

バガスを各種濃度のNaOH溶液で処理した後、酵素反応に供した時の酵素分解性と酵素分解生成物中のフェノール化合物について調べた結果、酵素分解率は濃いNaOH溶液で処理したバガス程高い値を示したが、酵素分解生成物中のフェルラ酸量はNaOH濃度と反比例の関係にあった。またバガスのNaOH処理液にはフェルラ酸とP-クマル酸が認められたが、酵素分解生成物中にはフェルラ酸以外のフェノール化合物は検出されなかった。このことは、セルラーゼ処理ではバガスに含まれているP-クマル酸は遊離されないことを示している。次に、酵素分解生成物をトヨパールHW40カラムを用いてゲル濾過した結果、成分は高分子画分と低分子画分に分画された。高分子画分にはフェルラ酸と多糖成分が存在しており、糖成分はグルコース、キシロース及びアラビノースから成り、これらの糖とフェルラ酸との結合が考えられた。両画分中のフェルラ酸は画分をNaOH処理することによって遊離されることから、フェルラ酸は各種分子量の糖類と結合しているものと考えられた。

要 約

粉碎バガスの酵素分解反応を行ない、酵素分解生成物の紫外部吸収値とフェノール化合物について調べた。

酵素分解生成物をNaOH溶液で前処理すると280nm吸収値が著しく増加した。NaOH処理した酵素分解生成物にはフェルラ酸以外のフェノール化合物は認められなかった。酵素分解生成物中のフェルラ酸をペーパークロマトグラフィーにより他成分と分離するには試料をNaOHで前処理する必要がある。バガス中のフェノール化合物量とバガスの酵素分解性との間には相関性が認められた。酵素分解生成物はゲル濾過により高分子及び低分子画分に分画され、両画分にはフェルラ酸と糖が存在した。高分子画分の糖成分はグルコース、キシロース及びアラビノースであった。

引用文献

1. Al-Ari. F., Smith. J.E. 1988 Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by *phanerochaete chrysosporium*. J.Sci. Food Agric. 42:19-28
2. Gubler. F., Ashford. A. E. 1985 Release of ferulic acid esters from barley alurone. I. Time course of gibberellic-acid-induced release from isolated layers. Aust. J. plant physiol. 12:297-305
3. Hartley. R.D. 1973 Carbohydrate esters of ferulic acid as components of cell-walls of *Lolium Multiflorum*. Phytochemistry. 12:661-665
4. Hartley. R.D., Jones. E. C. 1976 Diferulic acid as a component of cell walls of *Lolium Multiflorum*. phytochemistry. 15:1157-1160
5. Hartley. R.D., Jones. E. C. 1977 phenolic components and degradability of cell walls of grass and Legume speices. Phytochemistry. 16:1531-1534
6. 石原昌信、当山清善、与那覇和雄 1985セルラーゼ標品によるバガス成分の酵素的分解 琉大農学報 32:63~71
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のバイオガス生産 琉大農学報 35:45~51
8. Kato. A., Azuma. J., Koshijima. T. 1987 Isolation and identification of a new feruloylated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid. Agric. Biol. Chem. 51:1691-1693
9. 越島哲夫 1982 ヘミセルロース・リグニンconjugate 化学と生物 20:23~32

10. Manonmani. H.K., Sreekantiah. K. R. 1987 Saccharification of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. *Enzyme. Microb. Technol.* **9**:484-488
11. Martinez. D.V.G., Ogawa. T., Shinmyo. A., Enatsu. T. 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzymes produced by *Penicillium variable*. *J. Ferment. Technol.* **52**:378-387
12. Morjanoff. P.T., Gray. P.P. 1987 Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* **29**:733-741
13. 渋谷直人 1983 植物細胞壁多糖間の架橋構造—ジフェルラ酸架橋仮説をめぐって—*化学と生物* **21**:143~145
14. Shibuya. N. 1984 Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry.* **23**:2233-2237
15. 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
16. 当山清善、与那覇和雄、石原昌信 1981 Degradation of Bgasse Cellulose by *Acremonium* SP. (英文) *琉大農学報* **28**:89~100
17. Watanabe. T., Kosijima. T. 1988 Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agric. Biol. Chem.* **52**:2953-2955
18. Waugh. W.T., Purchase. B.S. 1987 The influence of glucose and ethanol on enzymic hydrolysis of steam exploded bagasse. *Biotechnol. Letters* **9**:151-156