

# 琉球大学学術リポジトリ

## 生キャッサバの酵素による分解とアルコール発酵(農芸化学科)

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語:<br>出版者: 琉球大学農学部<br>公開日: 2008-02-14<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 石原, 昌信, 当山, 清善, 与那覇, 和雄, Ishihara, Masanobu, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3906">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3906</a>  |

## 生キャッサバの酵素による分解とアルコール発酵

石原昌信\* ・ 当山清善\* ・ 与那覇和雄\*

Masanobu ISHIHARA, Seizen TOYAMA and Kazuo YONAHA  
: Degradation of uncooked cassava tubers with enzyme  
preparations for ethanol fermentation

### Summary

Energy-saving production of ethanol from raw cassava roots was performed by using commercial enzymes, and following results were obtained. The mashed cassava tubers were macerated with 0.2% pectinase by incubating at 40°C for 6 hr. The degree of maceration was dependent on the enzyme concentration and incubation time. The reducing sugar did not increase even if the macerated mashes were incubated with  $\alpha$ -amylase and glucoamylase at pH 4.5 and 40°C. The macerated mashes were liquefied with  $\alpha$ -amylase by heating at low temperature (80°C for 10 min). The most favorable temperature for the liquefaction of mashes with  $\alpha$ -amylase was 75 – 80°C. The liquefied mashes were almost completely saccharified with glucoamylase at pH 4.5 and 40°C for 12 hr of incubation. Ethanol fermentation of saccharified mashes was carried out with baker's yeast at pH 5.5 and 30°C. The ethanol produced in 48 hr fermentation was 16.0 – 16.5% (v/v), and 65.4g of ethanol was obtained from 500g of cassava tubers.

### 緒 言

近年、石油代替燃料の開発に関心が高まり、バイオマス資源からのアルコール生産に関する研究が注目されている<sup>1, 6, 7, 8, 9)</sup>。各種バイオマス資源がアルコール発酵原料として検討されているが、アルコール発酵に要する消費エネルギーを節減することが重要な課題である。甘藷<sup>4, 10, 18)</sup>やキャッサバ<sup>2, 3)</sup>等の澱粉質物を原料としたアルコール発酵においては、澱粉の糖化を促進する目的で原料芋の蒸煮処理が行われ多量のエネルギーが消費されていることから、無蒸煮で澱粉を糖化する技術の開発に期待が寄せられている。

+ 澱粉質物を原料とするアルコール発酵に関する研究 (第4報)

\* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 34 : 21 ~ 27 (1987)

1950年、上田ら<sup>19, 23)</sup>は、黒麹菌の生産するアミラーゼが生澱粉を容易に分解・糖化することを見い出している。山本ら<sup>20, 21, 22)</sup>は、半固形の生甘藷磨砕物が *Asp. niger* 起源のペクチンデポリメラーゼによって崩壊・液状化されることを発見し、液状化物をアルコール発酵に供することで省エネルギー方式でアルコールを生産する方法を開発した。著者ら<sup>5, 12, 13, 14, 15)</sup>は、生甘藷中の澱粉粒はペクチンやセルロース性物質によって囲まれているため、磨砕処理や液状化処理だけではグルコアミラーゼによる分解を受け難いことを確認した。また、生甘藷磨砕物を酵素剤を用いて液状化・液化及び糖化を行ない、酵母によるアルコール発酵条件について検討し、省エネルギー方式によるアルコール生産条件を設定した<sup>11, 16)</sup>。本報では、キャッサバを原料とした省エネルギー型アルコール発酵条件を設定するに当り、生キャッサバ芋の酵素による分解性及び糖化物のアルコール発酵について検討した。

## 実験方法

(1) キャッサバ：キャッサバは琉球大学農学部附属農学研究施設にて栽培・収穫された新鮮芋で、剥皮したのち電動式磨砕機で半固形の粒状に磨砕して使用した。キャッサバ芋の澱粉価は平均30であり、前報<sup>11)</sup>の方法に従って測定して算出した。

(2) 酵素剤：生キャッサバ（磨砕物）の液状化、液化及び糖化には市販酵素標品〔上田化学工業(株)〕を用いた。酵素剤は *Bacillus* 属の耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ（液化型：1万 units/g）、*Rhizopus* 属のグルコアミラーゼ（糖化型：6千 units/g）および *Aspergillus* 属のペクチナーゼ（ペクチンデポリメラーゼ：1万 units/g）で、酵素粉末を直接芋磨砕物に添加して反応を行なった。

(3) キャッサバの酵素分解：キャッサバ磨砕物の液状化は、磨砕物 500 g を 5 N HCl で pH 4.5 に調節したのち、ピロ亜硫酸カリウム（防腐剤）およびペクチナーゼをそれぞれ 0.01~0.2 % (W/W) になるように加え、40℃で3~24時間インキュベートして行なった。澱粉の液化は、ペクチナーゼ処理で液状化した基質を pH 5.5 (5N NaOH) に調節したのち $\alpha$ -アミラーゼ (0.05 % , W/W) を加え、80℃で10分間攪拌しながら加温して行なった。糖化は、液状物を pH 4.5 (5N HCl) に調節したのちグルコアミラーゼ (0.1 % , W/W) を加え、40℃で3~24時間インキュベートして行なった。生キャッサバの液状化及び糖化の程度は、経時的に試料を採取し、遠心分離により固液分離を行ない、得られる上澄液について酵素反応で生成された還元糖量（グルコース）を Somogyi-Nelson 法で定量し、mg/ml で示した。

(4) アルコール発酵：発酵は酵素処理で得られた糖化物に栄養源（尿素 0.2 %、 $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$  各 0.1 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 %）とパン酵母（0.5 % , W/W）を加えて、pH 4.5 , 30℃で間欠的に攪拌して行なった。

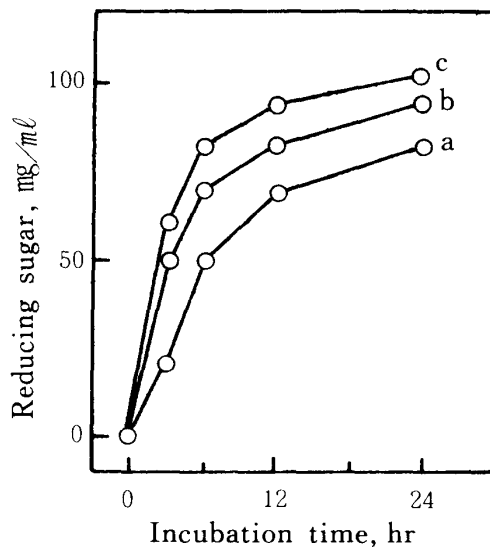
(5) 発酵液の分析：発酵中にモロミから経時的に試料 (5~10ml) を採取し、遠心分離 (12,000 rpm , 10 min) して得られる上澄液について還元糖量を Somogyi-Nelson 法で、アルコール量をガスクロマトグラフィー（島津ガスクロマトグラフ GC-4CPTF カラム：ガスクロバック 54 60/80 mesh , 3φ × 2 m ステンレス、温度；200℃ , キャリーヤガス；He 40 ml/min , 検出器；FID）を用いて測定しそれぞれ定量した。アルコール量は上記条件で求めた標準アルコールの分析値から算出し、%（容量）で示した。

## 実験結果

### 1. 酵素による生キャッサバの液状化

半固形のキャッサバ磨砕物にペクチン分解活性の高い酵素剤を加えると芋組織の崩壊に伴ない液状化されることが観察されたので、酵素量と液状化程度との関係について調べた。結果を Fig. 1. に示した。キャッサバ磨砕物の液状化反応は、磨砕物 (pH 4.5) にペクチナーゼ濃度が 0.05~0.2% (W/W) になるように加え、40℃で行ない、生成される還元糖量を測定した。本実験では、液状化程度を酵素反応で生成された還元糖量の変化で示した。半固形の磨砕物は酵素反応時間の経過に伴ない液状化され還元糖量が増加した。液状化物は攪拌可能となり、固形部と液部が分離し、澱粉粒の遊離が観察された。液状化の程度は加える酵素量の増加に伴ない増大し、磨砕物に 0.2% の酵素を加えて pH 4.5, 40℃ で反応した系では約 6 時間で液状化が終了した。また、0.1% の酵素を添加した場合には 10~12 時間で液状化された。

Fig. 1. Effect of enzyme concentration on maceration of mashed cassava tubers



Cassava roots were washed with water after peeling and steeped in 0.2% sulfuric acid overnight to sterilize them, and then mashed. The enzyme used for maceration was pectinase preparation (10,000 units /g) of *Aspergillus niger*. The mashed tubers (500g) were incubated with various concentration of pectinase at pH 4.5 and 40℃ for indicated time. The reducing sugars produced in the mashes during the incubation were determined by the somogyi's method using glucose as a standard. The maceration was followed by measuring the reducing sugars. pectinase (w/w); (a) 0.05% (b) 0.1% (c) 0.2%

### 2. 酵素によるキャッサバの液状化、液化及び糖化

次に、キャッサバの液状化、液化及び糖化工程における還元糖量の変化について調べた結果を Fig. 2. に示した。液状化は生キャッサバ磨砕物にペクチナーゼ (0.1%) を加え、pH 4.5, 40℃ で保って行ない、液化は、液状化物を pH 5.5 に調節した後  $\alpha$ -アミラーゼ (0.1%) を加え、80℃ で 10 分間加温して行なった。糖化は液状化物にグルコアミラーゼを加え、pH 4.5, 40℃ に保って行なった。キャッサバ磨砕物はペクチナーゼを加えることによって液状化され、還元糖量が反応 24 時間で約 100 mg/ml に達した。液状化物に  $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼをそれぞれ加えて加温しても著しい還元糖量の増加はみられない。液状化物に  $\alpha$ -アミラーゼを加え、80℃ で加温処理すると粘性の低下に伴ない液化され還元糖量が約 1.5 倍増加した。 $\alpha$ -アミラーゼ非存在下では粘性が著しく高められ攪拌が困難であった。液化物にグルコアミラーゼを加えることにより還元糖量が著しく増大し、約 395 mg/ml の糖化液が得られた。

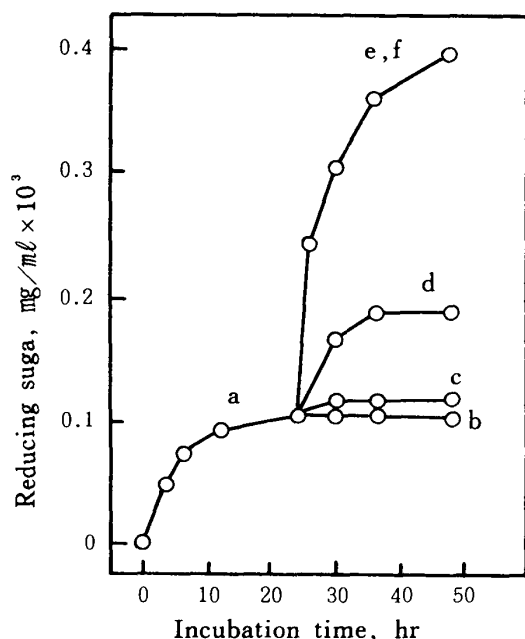


Fig. 2. Effect of enzyme and heat-treatment on hydrolysis of macerated cassava mashes

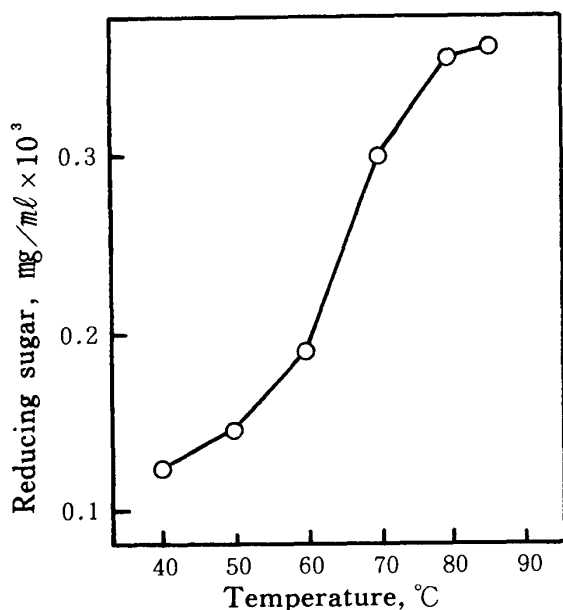
The mashed tubers (500g) were macerated with pectinase (0.1%, w/w) at pH4.5 and 40°C for 24 hr and then incubated with or without  $\alpha$ -amylase (0.05%, w/w) and glucoamylase (0.1%, w/w).

(a) with pectinase (pH 4.5, 40°C, 24 hr); (b) with glucoamylase (pH 4.5, 40°C); (c) with  $\alpha$ -amylase and glucoamylase (pH 4.5, 40°C); (d) heat-treatment (80°C, 10min), and then with  $\alpha$ -amylase (pH 5.5, 40°C); (e) heat-treatment (80°C, 10min), and then with glucoamylase (pH 4.5, 40°C); (f) heat-treatment with  $\alpha$  amylase (pH 5.5, 80°C, 10min), and then with glucoamylase (pH 4.5, 40°C).

### 3. 液状化物の糖化に及ぼす加温処理の影響

グルコアミラーゼによる液状化物の糖化に及ぼす前処理温度の影響について調べた。液状化物に $\alpha$ -アミラーゼを加えて各温度で10分間加温処理した後、グルコアミラーゼを所定量加え、pH 4.5, 40°Cで酵素反応を行ない生成する還元糖量を測定した。結果をFig. 3.に示した。液状化物は75°C以上の温度処理で良好に液化され攪拌等の操作も可能であった。液状化物はグルコアミラーゼによって容易に分解・糖化され著しく還元糖量の増大が認められた。60°C以下での温度処理では澱粉の糊化・液化程度は低く、グルコアミラーゼによる分解性も低い値であった。結果から、 $\alpha$ -アミラーゼ存在下での最適処理温度は80°C付近であることが明らかとなった。

Fig. 3. Effect of temperature on liquefaction of macerated mashes

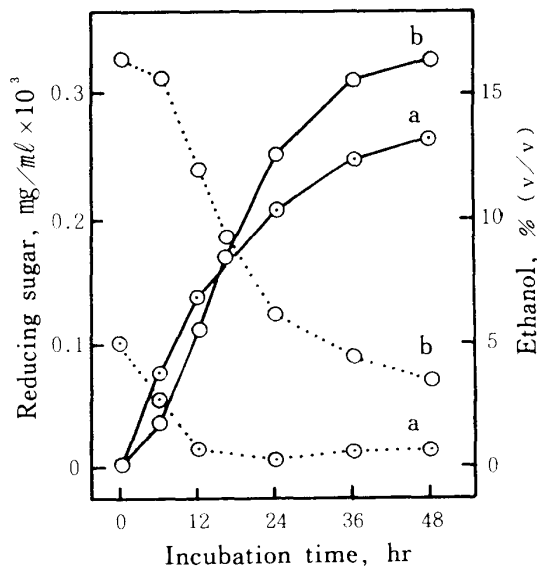


The mashed tubers were macerated with pectinase at pH 4.5 and 40°C for 24hr, and then incubated with  $\alpha$ -amylase (0.05%, w/w) at pH 5.5 and different temperatures for 10 min. The incubated tubers were saccharified with glucoamylase (0.1%, w/w) at pH 4.5 and 40°C. The reducing sugar was determined by somogyi's method.

#### 4. キャッサバ液状化物の加熱処理とアルコール生産との関係

キャッサバ磨砕物の液状化及び液化はグルコアミラーゼによる澱粉の糖化を促進することがわかったので、液状化物の加熱処理とアルコール生産との関係について調べた結果を Fig. 4. に示した。磨砕物（500 g）にペクチナーゼ（0.2%）を加えて pH 4.5，40℃に保って液状化物を調製した。液化は液状化物に  $\alpha$ -アミラーゼ（0.05%）を加えて pH 5.5，80℃で10分間加熱処理して行なった。糖化は液状化物にグルコアミラーゼを添加し、pH 4.5で4時間保って行なった。発酵は、上述のようにして得られた糖化液について栄養源とパン酵母を加えて30℃で行なった。比較のため、液状化物を加熱処理しないでグルコアミラーゼを添加して40℃で24時間酵素反応を行ない得られた糖化液についても発酵を行なった。発酵途中で所定量の試料を採取し、遠心分離後の上澄液について還元糖量、pH及びアルコール生成量を測定した。結果より、加熱処理して調製した糖化液の発酵においては発酵時間の経過に伴ない発酵液中の還元糖量は減少し、順調にアルコールへ変換された。発酵48時間目でアルコール濃度が約16.5%の発酵液が得られ、発酵歩合は76.8%であった。一方、磨砕物を加熱処理せずにグルコアミラーゼを添加して得られる糖化液の発酵では、澱粉のグルコアミラーゼによる分解・糖化性が低いため、生成アルコール量も加熱処理した糖液の発酵に比べて低い値であった。発酵48時間目のアルコール濃度は13.0%で加熱処理した場合の約79%であった。

Fig. 4. Ethanol fermentation of mashed cassava tubers



The mashed tubers were macerated with pectinase at pH 4.5 and 40°C for 24 hr. The liquefaction of macerated mashes were carried out by heating with  $\alpha$ -amylase (0.05%, w/w) at pH 5.5 and 80°C for 10 min. The macerated and liquefied mashes were incubated with glucoamylase (0.1%, w/w) at pH 4.5 and 40°C for 24 hr (a) and 4 hr (b), respectively. These saccharified mashes were used for the ethanol fermentation which was conducted at 30°C after supplement with  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (0.5g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.5g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05g) and  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (0.05g). Reducing sugar was determined by the somogyi's method using glucose as a standard. Ethanol concentration was determined using gas chromatography.

#### 考 察

甘藷等の澱粉質物を酵素を用いて無蒸煮でアルコール発酵の原料に供するためには、芋磨砕物に酵素を加えて液状化することにより澱粉を遊離させ糖化を促進することが重要である。本実験では、生キャッサバ磨砕物の酵素による液化及び糖化条件を調べ、糖化液のアルコール発酵条件について検討した。

半固形の粒状態に磨砕されたキャッサバ芋組織はペクチナーゼの作用をうけ易く、容易に液状化された。液状化程度は酵素量に依存して増加した。液状化物にグルコアミラーゼを添加しても還元糖量の増加は認められない。これは、キャッサバ磨砕物をペクチナーゼで液状化したのみでは組織細胞からの澱粉粒の分離が不十分なためグルコアミラーゼによって糖化され難いものと考えられる。液状化物は80℃

での加温処理で澱粉が糊化することによって粘性が著しく高められた。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼ存在下では粘性が低下し、液化（デキストリン化）され、グルコアミラーゼによって急速に糖化が進行した。液状化物を短時間で完全に糖化するためには、 $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理して液化する工程が必要であった。

キャッサバ磨砕物を酵素を用いて液状化、液化及び糖化して得られた糖化液に酵母を加えてアルコール発酵を行なった結果、発酵48時間でアルコール濃度16.5%の発酵液が得られ、発酵歩合も76.8%と高い値を示した。発酵開始時の初発還元糖量は20～30%付近が最適であり、糖化と発酵を同時に行なう並行複発酵法で良い結果が得られた。初発還元糖量が350 mg/ml以上では、アルコール生成量は低下した。液状化物を加温処理しないでアルコール発酵に供することが可能かどうかを調べた結果、発酵48時間目のアルコール生成量は加温処理した場合の約79%に相当した。しかし、発酵液中には未分解の澱粉の残存量が高いため、蒸留工程で粘性が高くなる傾向がみられた。これらの結果から、キャッサバ磨砕物から短期間で高濃度のアルコールを効率よく生産するためには、磨砕物を $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理する工程が不可欠であると思われる。

## 要 約

キャッサバ磨砕物の酵素による液状化、液化及び糖化条件を設定するとともに糖化液の酵母によるアルコール発酵条件について検討した。

磨砕物はベクチナーゼを添加して加温（40℃）することにより液状化された。液状化程度は酵素量と処理時間に依存した。液状化物に $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼを加えて加温（40℃）しても還元糖量の増加はみられなかった。液状化物は $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理（80℃，10分間）することにより液化された。液化物はグルコアミラーゼによって分解・糖化され、還元糖量が増加した。液化の最適処理温度は80℃付近であった。キャッサバの酵素糖化物に酵母を加えてアルコール発酵を行なった結果、発酵48時間でアルコール濃度16.5%の発酵液が得られた。キャッサバ500gから生成されるアルコール量は64.5gであった。

本研究の実施に協力された好土崎真一君に感謝します。本研究の一部は昭和61年度文部省科学研究費補助金、エネルギー特別研究によったもので謝意を表します。

## 引 用 文 献

1. Chua, J. W., Fukui, N., Wakabayashi, Y., Yoshida, T., Taguch, H. 1984 Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy-saving production of ethanol. *J. Ferment. Technol.* **62**: 123-130
2. Doin, P. A., Olivo, J. E., Varella, V. L., Corcone, B. R., Pinto, A. G. 1984 The effects of initial cell concentration on the alcoholic fermentation of cassava. *J. Ferment. Technol.* **62**; 195-199
3. Greenfield, P. F., Lucia, st., Brooks, R. B. 1982 Processing of cassava to produce ethanol effect of raw material preparation. *Starch.* **34**; 192-197
4. 石原昌信, 与那覇和雄, 当山清善 1982 微生物起源酵素剤による甘藷生澱粉および生甘藷の分解について 琉大農学報 **29**; 39-45
5. 石原昌信, 大久保勉, 与那覇和雄, 当山清善 1986 甘藷アルコール蒸留廃液のメタン発酵 第2報 大型発酵槽を用いた発酵 琉大農学報 **33**; 95-102

## 石原ほか：生キャッサバの酵素分解とアルコール発酵

6. Kunhi, A. A. M., Ghildyal, N. P., Lonsane, B. K., Ahmed, S. Y., Natarajan, C. P. 1981 Studies on production of alcohol from saccharified waste residue from cassava starch processing industries. *Starch*. **33**; 275 – 279
7. Matsuoka, H., Koba, Y., Ueda, S. 1982 Alcohol fermentation of sweet potato without cooking. *J. Ferment Technol.* **60**; 599–602
8. Saha, B. C., Ueda, S. 1982 Alcohol fermentation of raw sweet potato by a nonconventional method using *Endomycopsis fibulgera* glucoamylase preparation. *Biotechnol. Bioeng.* **25**; 1181–1186
9. Svendsby, O., Kakutani, K., Matsumura, Y., Iizuka, M., Yamamoto, T. 1981 Ethanol fermentation of uncooked sweet potato with the application of enzymes. *J. Ferment. Technol.* **59**; 485–487
10. 当山清善, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷を原料とするアルコール生産; 酵素によるいも組織の液状化と糖化について, 日本農芸化学会昭和58年度大会要旨集 p44
11. 当山清善, 石原昌信, 与那覇和雄, 大久保勉 1983 生甘藷の酵素による糖化とアルコール発酵 琉大農学報 **30**; 185–192
12. 当山清善, 大久保勉, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷茎葉のメタン発酵 第1報 小型容器を用いた発酵 琉大農学報 **30**; 177–184
13. 当山清善, 大久保勉, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷いもアルコール蒸留廃液のメタン発酵; 発酵条件の検討, 日本醸酵工学会昭和58年度大会要旨集 p278
14. Toyama, S., Yonaha, K., Ishihara, M. 1984 Enzymatic production of raw sweet potato tubers for ethanol fermentation, "Research on energy from biomass" SPEY 7. p 163–165
15. 当山清善, 大久保勉, 石原昌信, 与那覇和雄 1984 甘藷茎葉のメタン発酵 第2報 大型発酵槽を用いた発酵 琉大農学報 **31**; 29–34
16. 当山清善, 石原昌信, 大久保勉, 与那覇和雄 1985 甘藷芋アルコール蒸留廃液のメタン発酵 第1報 小型容器を用いた発酵 琉大農学報 **32**; 55–62
17. 当山清善 1984 甘藷いもを原料としたアルコール蒸留廃液のメタン発酵—発酵条件の検討, 文部省科学研究費, エネルギー特別研究 "生物エネルギーの利用と開発" 昭和59年度研究成果報告 p175–180
18. 上中居和雄, 弘津幹夫, 野尻導彦, 与那覇和雄, 当山清善, 山本武彦 1983 甘藷の無蒸煮アルコール発酵—酵素液状化物の処理とアルコール発酵の条件, 日本農芸化学会昭和58年度大会要旨集 p44
19. Ueda, S., Koba, Y. 1980 Alcohol fermentation of raw starch without cooking by using black-Koji amylase. *J. Ferment. Technol.* **58**; 237–242
20. 山本武彦, 松村芳一, 角谷和生, 上中居和雄 1982 イモの酵素によるマセレーションとアルコール発酵 澱粉科学 **29**; 117–122
21. Yamamoto, T., Oi, S., Toyama, S. 1982 Methane fermentation of leaf and stem of sweet potato to supply energy for production of ethanol and fertilizer for cultivation of the crops. EC 2nd confence on energy from biomass, Berlin
22. Yamamoto, T., Oi, S., Toyama, S., Miyazato, K. 1984 The anaerobic digestion of leaf and stem of sweet potato to use save energy for production of ethanol from the potato "Reseach on energy from biomass" SPEY 7. p 197–199
23. 山崎何恵, 上田誠之助 1950 生澱粉に対する黒麹アミラーゼ作用の研究 (第1報) 農化 **24**; 181–185