

琉球大学学術リポジトリ

セルラーゼ標品によるバガス成分の酵素的分解(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, 与那覇, 和雄, Ishihara, Masanobu, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3939

セルラーゼ標品によるバガス成分の酵素的分解[†]

石原昌信*・当山清善*・与那覇和雄*

Masanobu ISHIHARA*, Seizen TOYAMA* and Kazuo YONAHARA* :
Enzymatic degradation of sugar cane bagasse components by
cellulase preparations

Summary

A study was conducted on the enzymatic degradation of sugar cane bagasse and its components (holocellulose, hemicellulose and cellulose) using commercial cellulase preparations, *Trichoderma* cellulase (Cellulase onozuka R-10 and Meicelase), *Aspergillus* cellulase (Cellulosin AC-40 and Acucelase) and *Sporotrichum* cellulase.

Native or untreated bagasse was hardly degraded by the enzyme preparations, whereas the pretreatment of bagasse with sodium hydroxide solution significantly increased the degradation. Alkali-treated bagasse, holocellulose, hemicellulose and cellulose were degraded by the enzyme preparations. Holocellulose and cellulose were most strongly degraded by Cellulase onozuka R-10 and Meicelase, respectively. The both components were also appreciably degraded by *Sporotrichum* cellulase. Hemicellulose was effectively degraded by Cellulosin AC-40 and Acucelase.

緒 言

著者らは、サトウキビを原料とする製糖工場で廃棄物として副成されるバガスの有効利用法を確立する目的で、バガスの微生物および酵素による分解性に関する研究を進めている。^{8,18)}バカスは微生物や酵素により極めて分解し難いリグノセルロース構造を形成している。従って、微生物や酵素を用いてバガスを効率的に分解するためにはバガスを物理的あるいは化学的手法により前処理を行ない、リグノセルロース構造を破壊する必要がある。

著者らは、これまでにNaOH及びNaClO₂溶液等で処理したバガスが微生物や酵素によって良好に分解されることを明らかにした^{19,20)}。すでにセルロース性物質の前処理と酵素的分解性に関する研究^{1,3,4,5,7,13,22)}が数多く報告されているが、未だ実用的な観点での前処理法^{2,6,11)}が確立されるに至っていない。また、最近バイオマス資源としてのセルロース性物質が重要視されるようになり、セルロース物質からエタノール及びメタンガス等のエネルギー燃料生産に関する研究が推進されている^{9,10)}。従来、好気性微生物によるセルロースの分解においては *Trichoderma reesei* が著名であり、高いセル

† 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

琉球大学農学部学術報告 32: 63~71 (1985)

ラーゼ活性を有していることが知られているが、一方では嫌気性微生物によるセルロースの有用物質への変換に関する研究も盛んに行われている¹⁶⁾。

本研究では、バガスの前処理法と酵素的分解性との関係を明らかにすることを目的として、各種微生物起源酵素剤によるバガス成分の分解性について調べた。

実験方法

(1) 供試バガス原料：無処理バガスは製糖工場で搾汁直後に採取したバガスを70°Cで乾燥し、ウィレー氏粉砕機で粉砕したのち40メッシュの篩を通したものである。アルカリ処理バガスは、無処理バガス20gに0.5%水酸化ナトリウム溶液1リットルを加え、加圧蒸煮(120°C, 20分間)したのち熱水および冷蒸留水で洗浄後乾燥して調製した。バガスホロセルロース、バガスセルロース及びバガスヘミセルロースは Chahol らの方法に従って下記のように調製した。バガスホロセルロースは、無処理バガスに80%メチルアルコールを加えて加熱処理を行ない、水洗浄後亜塩素酸ナトリウム溶液(NaClO₂:CH₃COOH, 18.8:4)を加えて湯浴(75~80°C)中にて5時間保ったのち水洗浄を行ない、乾燥して調製した。バガスセルロースは、バガスホロセルロースに10%水酸化ナトリウム溶液を加えて25°Cで4時間時々攪拌しながらアルカリ可溶性物質の抽出を行なったのち濾過により液部を除き、再度10%水酸化ナトリウム溶液を加えて湯浴中(80°C)にて3時間抽出を行ない洗浄後、乾燥して調製した。バガスヘミセルロースは、上記のバガスセルロース調製時に生成される水酸化ナトリウム抽出液に酢酸を加えてpH 4.0に調節したのち、4倍量のエチルアルコールを加えて室温に保持し、生じた沈でん物をエチルアルコールとエチルエーテルで洗浄したのち乾燥して調製した。

(2) 酵素標品：バガスセルロース成分の分解反応には微生物起源市販セルラーゼ標品を用いた。使用した酵素標品は *Trichoderma* 属起源のメイセラゼ(明治製菓)、セルラーゼオノヅカ R-10(近畿ヤクルト株)、*Aspergillus* 属起源のアキュセラゼ(大阪府立大学)、セルロシン AC40(上田化学株) および *Sporotrichum* 属起源のセルラーゼ(味の素株)で、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0.1%になるように調節して用いた。

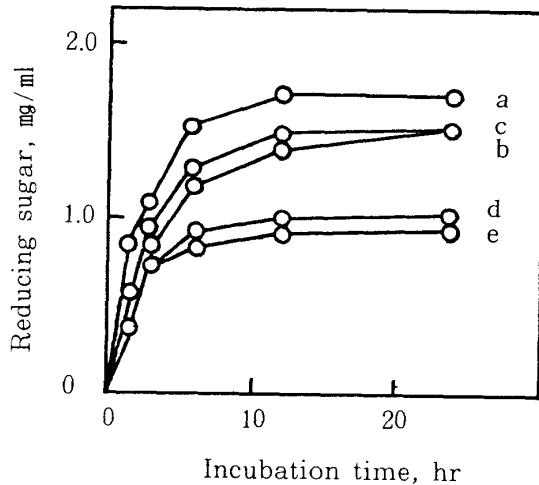
(3) 酵素反応並びに酵素分解活性の測定：酵素反応液の組成は、100 ml 容三角フラスコに基質 200 mg を採り、1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5) 1.0 ml, 0.1%チツ化ナトリウム溶液 1.0 ml および酵素液を加え総量 10 ml とした。酵素反応は40°Cで3~24時間ゆるやかに振とうして行ない、反応停止は湯浴中で10分間煮沸することにより行なった。冷却後、遠心分離により固液分離を行ない液部の還元糖量を Somogyi-Nelson 法で測定した。

実験結果

1. 各種酵素標品による無処理バガスの分解性

Fig. 1 はバガスセルロースの酵素的分解性を明らかにするために、起源の異なる各種酵素剤による無処理バガスの分解性について調べた結果である。図で明らかなように、無処理バガスの酵素による分解性は酵素の起源で異なり、*Trichoderma* 属酵素が *Aspergillus* 属酵素に比べて高い分解性を示した。また、*Sporotrichum* 酵素はメイセラゼと同程度の分解性を示した。しかし、無処理バガスの各酵素剤による分解性は極めて低く、バガスの分解性を高めるためにはバガスを物理的あるいは化学的方法により前処理する必要がある。

石原ほか：バガス成分の酵素的分解



- (a) Cellulase onozuka R-10
 (b) Meicelase
 (c) Sporotrichum cellulase
 (d) Acucelase
 (e) Cellulosin AC 40

Fig. 1 Degradation of untreated bagasse by various enzyme preparations

Fresh sugar cane bagasse was washed thoroughly with water, and then kept dried at 70°C. The dried bagasse was ground in a Wiley Mill to 40 mesh. The ground bagasse was called untreated bagasse. Enzymatic degradation of bagasse was carried out by using commercial enzyme preparations. The reaction mixture for enzyme assay contained 200 mg of substrate, 1.0 ml of 1 M sodium acetate buffer (pH 4.5), 1.0 ml of 0.1% sodium azide and 1.0 ml of 1.0% enzyme solution in a final volume of 10 ml. After incubation at 40°C for 24 hr with shaking, the reaction was terminated by boiling and centrifuged to separate the supernatant and residues. Reducing sugar in the supernatant was determined by the Somogyi-Nelsons method. The enzyme activity was shown as an increase in the amount of glucose (mg) in the supernatant.

2. 各種酵素標品によるアルカリ処理バガスの分解性

バガスの分解性を高めるために、バガスを0.5%アルカリ溶液(NaOH)で前処理を行ない、処理バガスの各種酵素剤による分解性について調べた結果をFig. 2に示した。*Trichoderma* 属酵素のセルラーゼオノズカ R-10やメイセラゼはアルカリ処理バガスを良好な基質とし反応時間の経過に伴ない著しく還元糖が増加した。また、*Sporotrichum* 酵素や *Aspergillus* 属酵素のアキュセラゼでも反応時間とともに直線的に還元糖量の増大が認められ、アルカリ処理によりバガスの酵素的分解性が高められることが確認された。

3. 各種酵素標品によるバガスホロセルロースの分解性

次に、バガス成分の酵素的分解性について調べるために、バガスから調製されたバガスホロセルロースの各種酵素剤による分解性について調べた結果がFig. 3である。セルラーゼオノズカ R-10はバガスホロセルロースをアルカリ処理バガスとはほぼ同じ程度まで分解したが、メイセラゼによる分解性はアルカリ処理バガスより低い値であった。また、ホロセルロースはアキュセラゼや *Sporotrichum* 酵素によっても分解され反応時間とともに直線的に還元糖量の増加がみられたが、アルカリ処理バガスの分解性より低い値であった。*Aspergillus* 属起源酵素であるセルロシン AC 40による分解性は低く、反応6時間以上ではほとんど還元糖量の増加は認められなかった。

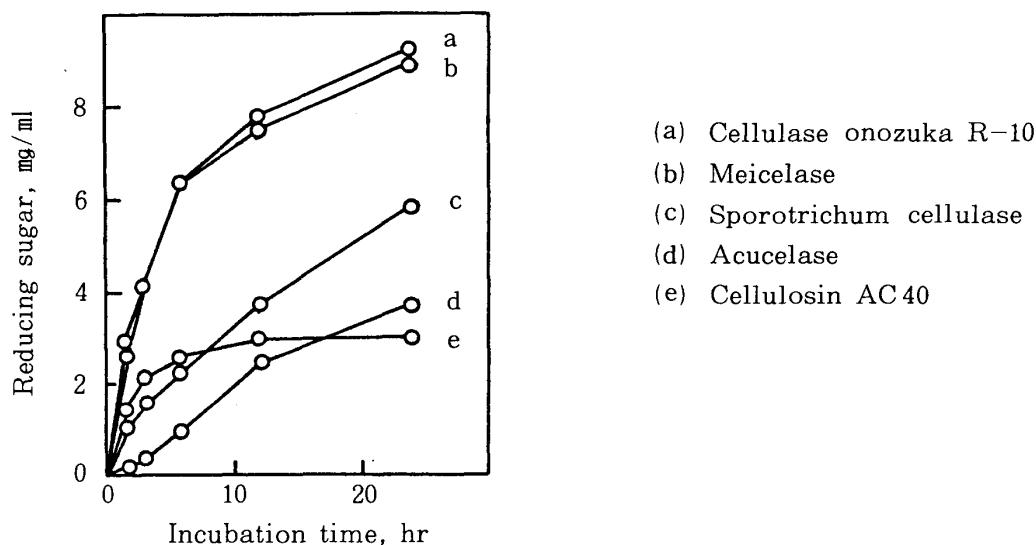


Fig. 2 Degradation of alkali treated bagasse by various enzyme preparations

The untreated bagasse was treated with 0.5% sodium hydroxide solution (20:1, liquid:bagasse) at 120°C for 20 min. The treated bagasse was recovered by filtration, washed and dried (0.5% NaOH-treated bagasse). The NaOH-treated bagasse was incubated with various enzyme preparations at 40°C, and the reducing sugar formed was determined. Other conditions were stated in the legend to Fig. 1.

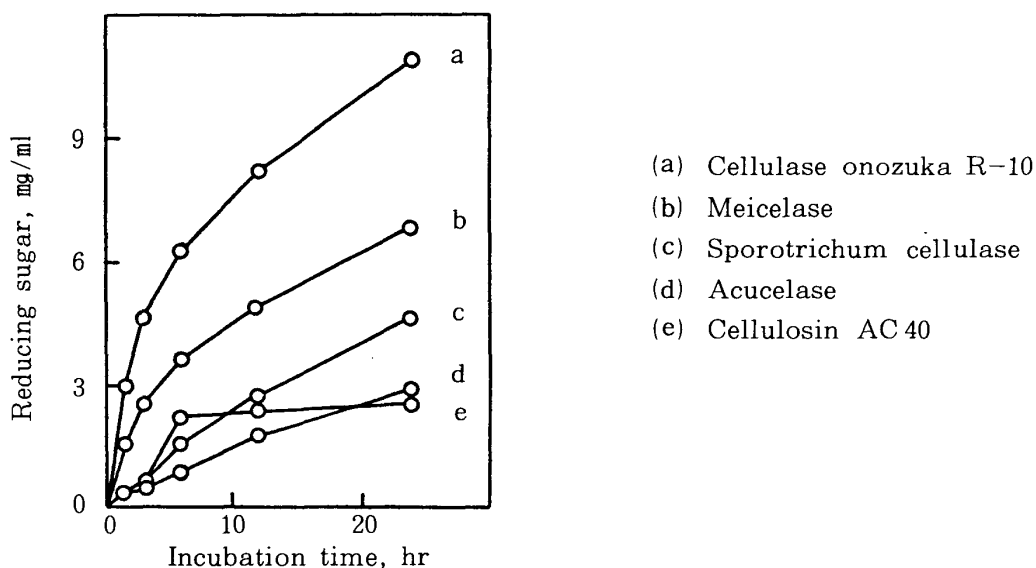


Fig. 3 Degradation of bagasse holocellulose by various enzyme preparations

The untreated bagasse was treated with hot aqueous 80% methanol for 2 hr and the residue was washed with distilled water. The wet residue was added to sodium chlorite solution (20:1, liquid:bagasse) and heated at 75°C for 5 hr to remove the lignin. The residue was washed with distilled water and dried. This fraction was called bagasse holocellulose. The bagasse holocellulose was incubated with various enzyme preparations at 40°C, and the reducing sugar formed was determined. Other conditions stated in the legend to Fig. 1.

石原ほか：バガス成分の酵素的分解

4. 各種酵素標品によるバガスセルロースの分解性

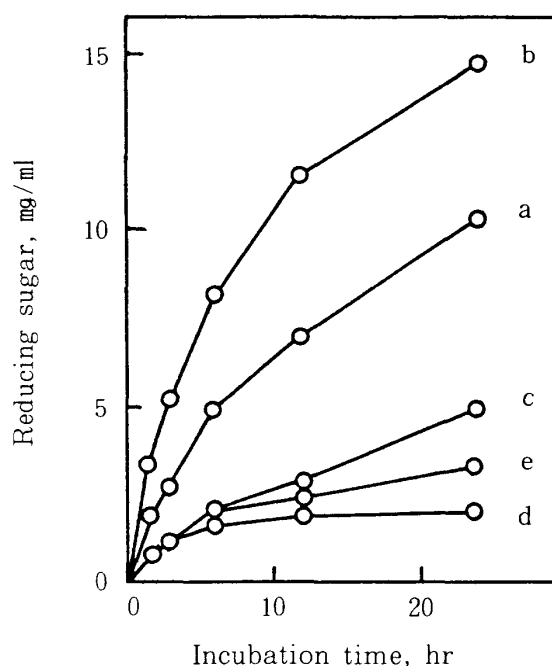
バガスから調製されたバガスセルロースの酵素剤による分解性について調べた結果を Fig. 4 に示した。バガスセルロースはメイセラゼによって良好に分解され著しい還元糖量の増加がみられた。また、セルラーゼオノズカ R-10 によるセルロースの分解性はアルカリ処理バガスやバガスホロセルロースと同程度の分解率を示した。同様に、*Sporotrichum* 酵素やセルロシン AC40 による分解系においても反応時間とともに還元糖量が増加したが、アキュセラゼでは反応6時間以上ではほとんど還元糖量の増加はみられなかった。

5. 各種酵素標品によるバガスヘミセルロースの分解性

Fig. 5 は、バガスヘミセルロースの各種酵素剤による分解性について調べた結果である。各酵素剤はバガスヘミセルロースを良好に分解し反応時間の経過に伴ない還元糖量が増加した。供試酵素剤で、セルロシン AC40 が最も高い分解性を示すことから本酵素剤は極めて高いヘミセルラーゼ活性を有していることが示唆された。また、*Trichoderma* 属酵素ではセルラーゼオノズカ R-10 が高い分解性を示し、本酵素剤はバガス成分の分解に関与する酵素群がバランスよく含まれていることが明らかとなった。

6. 各種酵素標品によるバガス成分の分解性

Table 1 は無処理バガス、アルカリ処理バガスおよびバガスから調製された各バガス成分の酵素剤による分解性を酵素反応24時間で生成される還元糖量で示した結果である。*Trichoderma* 属酵素であるセルラーゼオノズカ R-10 やメイセラゼおよび *Sporotrichum* 酵素は無処理バガスを除く各バガス成分に対して比較的高い分解活性を示し、バガス成分の分解・糖化に関与する酵素系の活性が特に高いことがわかった。一方、*Aspergillus* 属酵素はバガスヘミセルロースを良好な基質としたが、バガスホロセルロースやバガスセルロース等の分解性は *Trichoderma* 属酵素より低い値であった。また、各酵



- (a) Cellulase onozuka R-10
- (b) Meicelase
- (c) *Sporotrichum* cellulase
- (d) Acucelase
- (e) Cellulosin AC 40

Fig. 4 Degradation of bagasse cellulose by various enzyme preparations

The bagasse holocellulose was treated with 10% NaOH solution at 25°C for 4 hr, and filtered. The residue was again treated with 10% NaOH solution at 80 to 90°C for 3 hr, and filtered, washed and dried. This fraction was called bagasse cellulose. The bagasse cellulose was incubated with various enzyme preparations at 40°C, and the reducing sugar formed was determined. Other conditions stated in the legend to Fig. 1.

素剤は無処理バカスをほとんど分解しないことが明らかとなった。

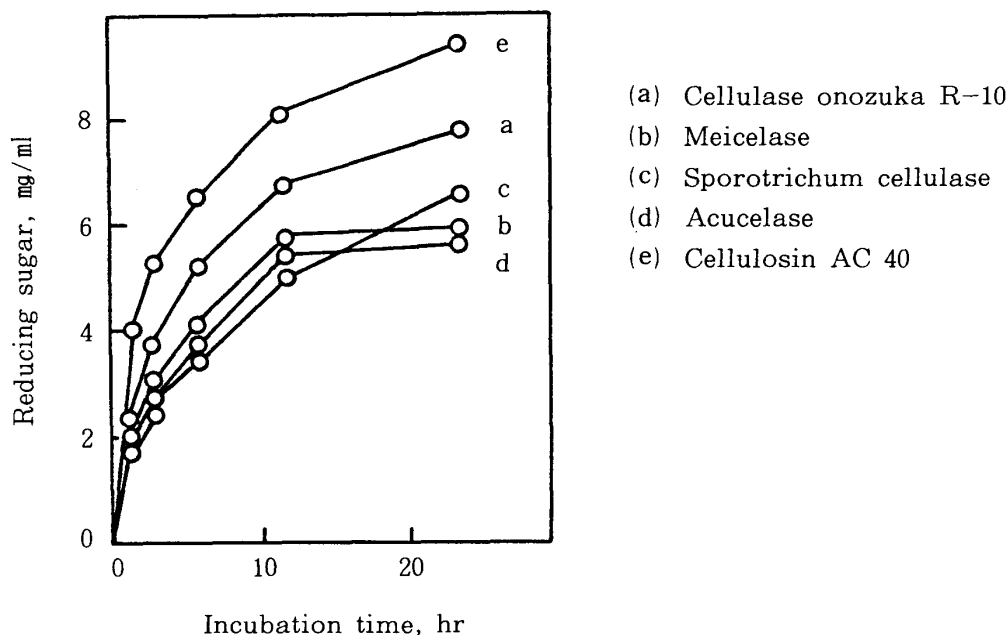


Fig. 5 Degradation of bagasse hemicellulose by various enzyme preparations

The both alkali-extracts obtained in the preparation of cellulose from holocellulose were combined and acidified to pH 4.0. To this, 4 volume of 99% ethyl alcohol was added to precipitate the soluble hemicellulose. The precipitate was washed with ethyl alcohol and diethylether, and dried. This fraction was called bagasse hemicellulose. The bagasse hemicellulose was incubated with various enzyme preparations at 40°C, and the reducing sugar formed was determined. Other conditions stated in the legend to Fig. 1.

Table 1 Degradation of bagasse components by various enzyme preparations

Enzyme	(reducing sugar formed, mg/ml)				
	Untreated bagasse	Alkali-treated bagasse	Bagasse holocellulose	Bagasse cellulose	Bagasse hemicellulose
Cellulase onozuka R-10	1.7	9.2	11.0	10.1	7.9
Meicelase	1.5	8.8	6.8	14.6	5.9
Acucelase	1.0	4.4	3.3	2.1	6.4
Cellulosin AC 40	0.9	3.0	2.7	3.4	9.4
Sporotrichum cellulase	1.5	6.0	4.7	5.1	7.2

Substrates were incubated with various enzyme at 40°C for 24 hr and the reducing sugar formed was determined. Other conditions stated in the legend to Fig. 1. The numbers indicate the average values of triplicate measurements.

石原ほか：バガス成分の酵素的分解

考 察

一般に、セルロースの酵素的分解反応は、結晶性セルロースに作用するアビセラゼ (C_1 -酵素)、非結晶性セルロースに作用する CMCase (C_x -酵素) および両酵素によるセルロースの分解過程で生成されたセロビオースに作用してグルコースにまで分解する β -グルコシダーゼの三種類の酵素が協奏的に作用することによって終了するものと考えられている²¹⁾。これらの酵素の微生物における分布は微生物の起源で異なり、セルロースの分解においては *Trichoderma* 属が最も優れたセルロース分解活性を有していることが知られている¹²⁾。本報では、バガスの前処理とバガスセルロースの酵素的分解性との関係を明らかにする目的で各種微生物起源酵素 (セルラーゼ) 剤によるバガス成分の分解性について調べた。

各種酵素剤を用いて無処理バガスの分解性について調べた結果、無処理バガスは各酵素剤でほとんど分解されないことが確認された。これはバガスを構成しているセルロースやヘミセルロースがリグニンと強固に結合し、リグノセルロース構造を形成しているためだと考えられる。佐々木¹⁵⁾らは凍結粉碎法で微粉化したセルロースは結晶性が低下し、 C_1 -酵素を必要とせずに C_x -酵素だけで糖化されるが稲ワラ等のセルロースはリグニンやヘミセルロースと結合しリグノセルロース構造を形成していることから、本処理だけでは不十分であることを報告している。従って、バガスの酵素糖化においてもリグニンを除く操作が要求され、効果的な前処理法を確立することが望まれている。アルカリ溶液で前処理したバガスの各酵素剤による分解性を調べた結果、*Trichoderma* 属酵素のメイセラゼおよびセルラーゼオノヅカ R-10 がアルカリ処理バガスを良好に分解することがわかった。また、*Sporotrichum* 酵素や *Aspergillus* 属酵素のアキュセラゼにおいても良い分解性が認められた。村尾らは^{10, 14)}アルカリ処理バガスの酵素糖化においてアキュセラゼをメイセラゼと混合すると相乗効果が認められることを報告している。次に、バガスから調製されたバガスホロセルロース、セルロースおよびヘミセルロースの各酵素剤による分解性について調べた結果、セルラーゼオノヅカ R-10 は何れの基質も良好に分解したが、特にバガスホロセルロースの分解性が最も高い値を示した。また、メイセラゼはバガスセルロースを最も効率的に分解したが、バガスヘミセルロースの分解性はセルラーゼオノヅカ R-10 より低い値であった。同様に、*Aspergillus* 属酵素によるバガスセルロース、ホロセルロースの分解性は *Trichoderma* 属酵素に比べて低い分解率であったが、バガスヘミセルロースに対して強い分解活性を示した。これらの結果から、アルカリ処理バガス、バガスホロセルロースおよびバガスセルロースの酵素的分解においてはセルロースの結晶部位に作用する C_1 -酵素が必須であることが示唆された。また、著者らはメイセラゼおよびセルラーゼオノヅカ R-10 がアビセル、CMC、濾紙およびキシラン分解活性が高く、*Sporotrichum* 酵素や *Aspergillus* 属酵素は CMC およびキシラン分解活性が高いことを明らかにしており、*Trichoderma* 属酵素を用いて効率的にバガスを分解するためには、リグニンだけを除く前処理法が要求され、*Aspergillus* 属酵素においては脱リグニンとともにセルロースの結晶性を破壊する必要があると思われる。

要 約

各種微生物起源酵素剤 (セルラーゼ標品) による無処理、アルカリ処理バガスおよびバガス構成成分の分解性について調べた。

各種酵素剤による無処理バガスの分解性は極めて低く、アルカリ処理することによって分解性が高められた。セルラーゼオノヅカ R-10 やメイセラゼは、アルカリ処理バガス、バガスホロセルロース、バガスセルロースおよびバガスヘミセルロースを比較的良好に分解した。とりわけセルラーゼオノヅカ R-10 はバガスホロセルロースに強く作用し、メイセラゼはバガスセルロースの分解活性が最も高い

ことがわかった。また、*Sporotrichum* 酵素も両基質に対して高い分解活性がみられた。一方、*Aspergillus* 属酵素であるセルロシン AC 40 やアキュセラゼは、相対的にバガスヘミセルロースを効率良く分解した。

本研究の実施に協力された北迫博志君に感謝します。酵素剤を恵与下さった大阪府立大学農学部村尾沢夫教授及び味の素(株)に感謝します。

なお、本研究の費用の一部は昭和59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. Ben-Ghedalia, D., Miron, J. 1981 The effect of combined chemical and enzyme treatments on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 823~831
2. Ben-Ghedalia, D., Miron, J. 1981 Effect of sodium hydroxide, ozone and sulphur dioxide on the composition and in vitro digestion of wheat straw, *J. Sci. Food. Agric.*, **32**: 224~228
3. Carbello. A., Conde, J., Otero. M. A. 1981 Prediction of the degradability of sugar cane cellulosic residues by indirect methods, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 2737~2745
4. Detroy, R. W., Lindenfelser, L. A., Julian, G. st., Orton, JR. W. L. 1980 Saccharification of wheat-straw-cellulose by enzymatic hydrolysis following fermentative and chemical pretreatment, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **10**, 135~148
5. Fan, L. T., Ghapuray, M. M., Lee, Yong-Ityuu. 1981 Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **11**: 29~45
6. 樋口隆昌, 1983 木材の酵素糖化に及ぼす爆砕処理の効果, 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57年度研究成果報告 p. 161~166
7. Henri. Durang. 1984 Comparative study of cellulase and hemicellulases from four fungi: methophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme. Microb. Technol.* **6**: 175~180
8. 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
9. 三石 安, 山辺 倫, 高崎義幸 1981 セルロース資源の酵素糖化に関する研究, 日本農芸化学会, 昭和56年度大会要旨集 p.443
10. 村尾沢夫 1983 セルロース, ヘミセルロース類(稲ワラ, 木材, みかん果皮類)糖化分解とその利用, 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57年度研究成果報告, 157~160
11. Nesse, N., Wallick, T., Harper, J. M. 1977 Pretreatment of cellulosic wastes to increase enzymatic reactivity, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 323~336
12. 西澤一俊著 1972 セルラーゼ 化学の領域選書 南江堂
13. Saddler, J. N., Brownell, H. H., Clemout, L. P., Levitiu, N. 1982 Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**:

石原ほか：バガス成分の酵素的分解

1389～1402

14. 阪本禮一郎, 林谷 隆, 森山康司, 荒井基夫, 村尾沢夫 1982 *Aspergillus aculeatus* の粗酵素によるセルロース性物資の分解, 醸工 60: 333～341
15. 佐々木堯, 佐藤陽子, 小林登史夫, 貝沼圭二 1980 酵素による木質系廃セルロースのグルコースへの転換 Nippon Shokuhin Kogyo. Gakkaishi 27: p. 270～274
16. 清水祥一, 田谷正仁 1981 嫌気性微生物を用いるセルロースの分解 p. 301～312, フジテクノシステム
17. Tanaka, T., Yamanaka, S., Takinami, K. 1978 Saccharification of cellulose by acetolysis, J. Ferment. Technol. 56: 410～415
18. 当山清善, 宮里興信, 金城 均 1972 甘蔗バガスの利用に関する研究, 琉大農学報 19: 279～290
19. Toyama, s., Yonaha, K., Ishihara, M. 1981 Degradation of bagasse cellulose by *Acremonium sp.*
20. 当山清善 1983 バガスのアルカリ処理で抽出される成分と微生物による資化分解, 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57年度研究成果報告 167～170
21. 当山清善 1983 セルロース物質からのエタノール生産, 「微生物による環境制御・管理技術マニュアル」 p. 355～362 環境技術研究会
22. 外山信男, 小川喜八郎, 外山英男 1981 セルロース資源の酵素糖化とアルコール発酵, 発酵と工業 39: 812～826