

# 琉球大学学術リポジトリ

## 生甘藷の酵素による糖化とアルコール発酵(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: 当山, 清善, 石原, 昌信, 与那覇, 和雄, 大久保, 勉, Toyama, Seizen, Ishihara, Masanobu, Yonaha, Kazuo, Ohkubo, Tsutomu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3991">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3991</a>

## 生甘藷の酵素による糖化とアルコール発酵

当山清善\*・石原昌信\*・与那覇和雄\*・大久保勉\*\*

Seizen TOYAMA\*, Masanobu ISHIHARA\*, Kazuo YONAHARA\* and Tsutomu OHKUBO\*\*: Saccharification of uncooked sweet potato tubers with enzymes for ethanol fermentation.

### Summary

Process conditions of maceration, liquefaction and saccharification of uncooked sweet potato tubers by using commercial enzymes for ethanol fermentation were investigated, and the following results were obtained.

The tubers were macerated with 0.2% pectinase by incubating at 40°C for 4 to 5 hr. The degree of maceration was dependent on the enzyme concentration and incubation time. Reducing sugar did not increase when the macerated mashes were incubated with  $\alpha$ -amylase and glucoamylase at 40°C. The macerated mashes were liquefied with  $\alpha$ -amylase at pH 5.5 and 80°C for 10 min. In the presence of glucoamylase the liquefied mashes were saccharified at pH 4.5 and 40°C for 4 hr. Ethanol fermentation of the saccharified mashes was carried out with baker's yeast at pH 4.5 and 30°C. After 48 hours fermentation, the ethanol yield of 15.0% (v/v) was achieved, and 81.6g of ethanol was obtained from 500g of sweet potato tubers.

### 緒 言

近年、化石エネルギー資源の有限性が予期されて以来、その代替エネルギーとしてバイオマス資源から液体燃料の生産が注目されている。各種バイオマスのなかで糖質原料（甘蔗）や澱粉質原料（甘藷、キャッサバ）からのアルコール（エタノール）の生産についての研究が推進されつつある。<sup>2,4,6,8,11,12</sup> 甘藷は単位面積当り1年間の収量が極めて高い代表的なでん粉質作物で、省エネルギー的糖化技術確立することにより重要なアルコール発酵原料となり得る。従来、甘藷を原料とするアルコール発酵においては、芋の液化及び糖化性を高めるために芋の蒸煮が行われていたが、最近、上田<sup>5)</sup>、山本<sup>14)</sup>、田口<sup>3)</sup>らによって麹又は酵素剤を利用して無蒸煮で芋の液状化、液化及び糖化を行ない生甘藷からの無蒸煮アルコール発酵技術が開発されつつある。

+澱粉質物を原料とするアルコール発酵に関する研究（第2報）

〔第1報 琉大農学報 29 39～45（1982）〕

\* 琉球大学農学部農芸化学科

\*\* 新東交易株式会社

琉球大学農学部学術報告 30：185～192（1983）

著者らは前報<sup>1)</sup>において甘藷生でん粉及び角切り生甘藷が酵素標品によって糖化分解されることを報告した。また、無蒸煮アルコール発酵において、酵素による生甘藷の液状化(マセレーション)の程度を高めることにより糖化及び発酵が促進されることを明らかにした<sup>9)</sup>。そこで本報では、生甘藷の無蒸煮アルコール発酵法の確立を目的として、生甘藷のペクチナーゼによる液状化、澱粉の $\alpha$ -アミラーゼによる液化およびグルコアミラーゼによる糖化について調べるとともに、酵素で糖化した甘藷を用いてアルコール発酵試験を行なった。

## 実験方法

(1) 甘藷；甘藷は沖縄県産(読谷村)の「紅イモ、宮農36号」を洗浄したのち、希硫酸溶液(0.2%)に一夜浸漬して殺菌し、電動式磨砕機で粒状に磨砕して用いた。甘藷のデンプン価は所定重量の芋を1N塩酸で100℃、2.5時間酸加水分解を行ない、分解液を一定量に定容したのちSomogyi-Nelson法にて総還元糖量(グルコース量)を測定して算出した。供試甘藷のデンプン価は平均28.2であった。

(2) 酵素剤；生甘藷磨砕物の液状化(マセレーション)、デンプンの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。使用した酵素剤は細菌耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ(液化酵素；10,000units/g)、*Rhizopus*属のグルコアミラーゼ(糖化酵素；6,000units/g)および*Aspergillus*属のペクチナーゼ(ペクチンデポリメラーゼ；10,000units/g)で、酵素反応は酵素粉末を直接基質に加え、混合攪拌して行った。

(3) 生甘藷の酵素分解；生甘藷の液状化は、生甘藷500gをビーカー(1000ml容)に採り、5NHClでpH4.5に調節したのち防腐剤としてピロ亜硫酸ナトリウム(0.01%)を添加し、ペクチナーゼ(0.05~0.2%)を加えて40℃で3~24時間保って行なった。液化は、ペクチナーゼ処理した液状化物をpH5.5(5N NaOH)に調節したのち $\alpha$ -アミラーゼ(0.05%)を加え、80℃で15分間ゆっくり攪拌しながら加温して行った。糖化は液化物にグルコアミラーゼ(0.1%)を添加し、pH4.5、40℃で3~24時間加温して行った。生甘藷の酵素分解程度は酵素反応中、試料5~10gを採取し、遠心分離により固液分離を行ない、上澄液について還元糖量(グルコース)をSomogyi-Nelson法で定量し、酵素反応で生成した還元糖量の増大(mg/ml)で示した。

(4) アルコール発酵；発酵は前述のように酵素剤により生甘藷を液状化、液化および糖化した糖化物に栄養源(尿素0.2%、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム各0.1%、硫酸マグネシウム0.01%)とパン酵母(0.5%)を加えて、pH4.5、30℃でゆるやかに攪拌して行った。

(5) 発酵液の分析；発酵液5~10mlを遠心チューブに採り遠心分離して得られる上澄液について還元糖量(グルコース)をSomogyi-Nelson法で、アルコール量をガスクロマトグラフ(島津ガスクロマトグラフGC-4CPTF、カラム；ガスクロパック54<sup>60/80</sup> mesh 3 $\phi$ ×2mステンレス、温度；200~230℃、キャリアーガス；He 40 ml/min、検出器；FID)を用いて測定しそれぞれ定量した。アルコール量は同条件下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. ペクチナーゼによる生甘藷の液状化

Fig.1は、生甘藷磨砕物のペクチナーゼによる分解程度(液状化)を調べるため、甘藷磨砕物を5N HClでpH4.5に調節したのち各種濃度のペクチナーゼ(0.05~0.2%)を加え、40℃で酵素反応を行ない生成する還元糖量の変化について調べた結果である。図より、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、液状化物は攪拌が可能となり還元糖量が増大した。液状化の程度は加える酵素量に依存し、生甘藷に0.2% (重量当り)の酵素を加えてpH4.5、40℃で2~5時間保つことにより完全

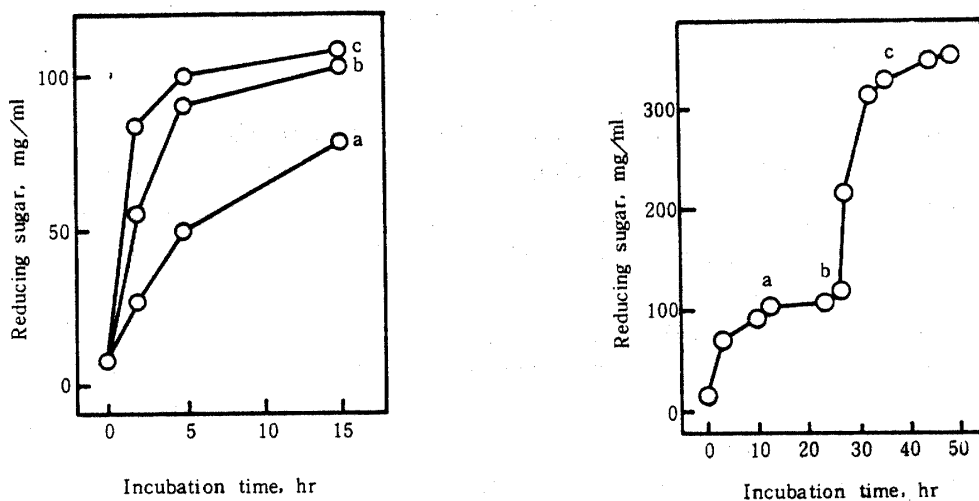


Fig. 1. Time course of maceration process of mashed sweet potato tubers with pectinase

Sweet potato tubers were washed with water and steeped in 0.2% sulfuric acid overnight to sterilize them, and 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°C. The reducing sugars produced in the mashes during the incubation were determined by the Somogyi's method using glucose as a standard. The maceration process was followed by measuring the reducing sugars. Pectinase (w/w): (a) 0.05%, (b) 0.1%, (c) 0.2%

Fig. 2. Reducing sugars concentration during the course of maceration, liquefaction and saccharification of mashed sweet potato tubers

The enzymes used for liquefaction and saccharification were  $\alpha$ -amylase (10,000 units/g) of *Bacillus amyloliquefaciens* and glucoamylase (6,000 units/g) of *Rhizopus niveus*, respectively. The mashed tubers (500g) were macerated with pectinase (0.1%, w/w) at pH 4.5 and 40°C for 24 hr (a). The macerated mashes were liquefied with  $\alpha$ -amylase (0.05%, w/w) at pH 5.5 and 80°C for 15 min (b), and then saccharified with glucoamylase (0.1%, w/w) at pH 4.5 and 40°C (c). Amount of reducing sugars produced during the process was determined. Other conditions are the same as Fig. 1.

に液状化された。また、酵素を0.1%加えても生甘藷は液状化され、10~12時間ではほぼ完全に液状化されることがわかった。

## 2. 生甘藷の液状化、液化及び糖化处理と還元糖量

生甘藷磨砕物はペクチナーゼにより液状化されることが判明したので、次に生甘藷の液状化、液化および糖化工程における還元糖量の変化について調べた (Fig. 2)。液状化は生甘藷磨砕物にペクチナーゼ (0.1%) を加え pH 4.5, 40°C で保って行ない、液化は液状化物に  $\alpha$ -アミラーゼ (0.05%) を加えて pH 5.5, 80°C で15分間加温して行った。糖化は上記液化物にグルコアミラーゼ (0.1%) を加え pH 4.5, 40°C で保って行った。生甘藷はペクチナーゼにより液状化され、反応24時間で還元糖量は約 100 mg/ml に達した。さらに反応時間を長くしても還元糖の増加はみられない。液状化物に  $\alpha$ -アミラーゼを加えて加温 (80°C, 15分間) することにより約 1.5 倍還元糖が増加した。液状化物は加温することにより粘性が高くなるが  $\alpha$ -アミラーゼを加えることにより急激に粘性は低下した。液化物にグルコアミラ

ーゼを加えて2～5時間加温(40°C)することにより還元糖量が著しく増加した。反応24時間目における還元糖は約350 mg/mlに達した。

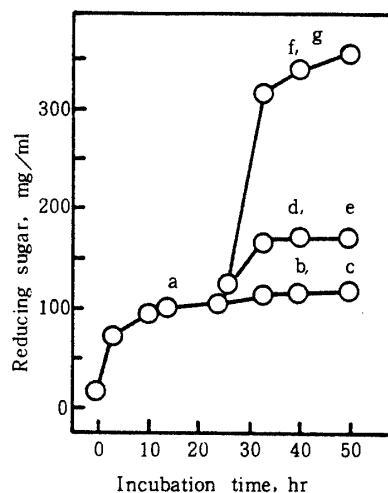
### 3. 液状化生甘藷の $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ処理と還元糖量

生甘藷をペクチナーゼ処理して得られる液状化物に $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを加え、還元糖量の変化を調べた結果をFig. 3に示した。図より、ペクチナーゼで液状化した生甘藷に $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼを加えて加温処理(40°C)しても還元糖の増加はほとんどみられなかった。

Fig. 3. Reducing sugars concentration during the various types of process of mashed sweet potato tubers

The mashed tubers (500g) were macerated with pectinase (0.1%, w/w) at pH 4.5 and 40°C for 24 hr (a), and then incubated with or without  $\alpha$ -amylase (0.01%, w/w) and glucoamylase (0.1%, w/w). Other conditions are the same as Fig. 2.

(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), incubated at 80°C for 15 min, and then at 40°C; (e), incubated (80°C, 15 min), and then with  $\alpha$ -amylase (pH 5.5, 40°C); (f), incubated (80°C, 15 min), and then with glucoamylase (pH 4.5, 40°C); (g), incubated with  $\alpha$ -amylase (pH 5.5, 80°C, 15 min), and then with glucoamylase (pH 4.5, 40°C)



液状化物を80°Cで加温処理することにより1.5倍の還元糖量の増大がみられるが、粘性が著しく高くなり攪拌が困難であった。しかし $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理を行なうことにより還元糖量の増加がみられ、粘性も急激に低下することがわかった。 $\alpha$ -アミラーゼの存在下で加温処理したのちグルコアミラーゼを加えることにより還元糖が著しく増大し、約350 mg/mlに達した。これらの結果から、生甘藷の糖化においては、液状化物に $\alpha$ -アミラーゼを加えて加温処理(80°C)を行なうことによりグルコアミラーゼによる澱粉の糖化分解が促進され、還元糖量が著しく増大することが明らかとなった。また、生甘藷の液状化や液化工程においてペクチナーゼ及び $\alpha$ -アミラーゼの添加は、攪拌等の操作を容易にし、加温処理や糖化工程における粘性の低下を促進するとともに酵素作用を高めることが明らかとなった。

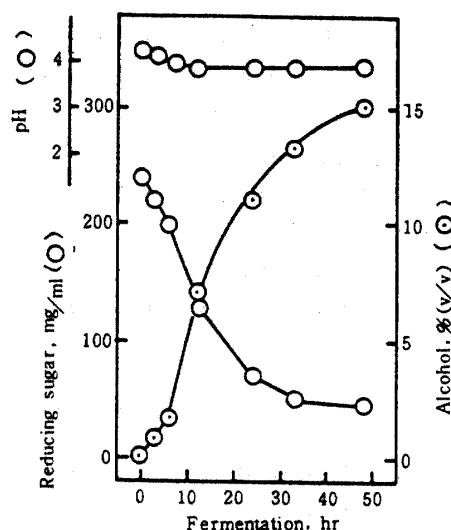
### 4. 生甘藷のエタノール発酵

前述のように、液状化した生甘藷を $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理(80°C)することにより生甘藷中の澱粉が容易に糖化されることがわかったので糖化液に酵母を添加してエタノール発酵試験を次の如く行った。

生甘藷重量当り0.1%になるようにペクチナーゼ標品を加え加温処理(pH 4.5, 40°C, 15時間)して液状化を行ったのち、さらに $\alpha$ -アミラーゼ(0.05%)存在下で加温処理(pH 5.5, 80°C, 15分間)を行って液化物を調製した。糖化は液化物にグルコアミラーゼ(0.1%)を加え、pH 4.5, 40°C, 3時間保って行った。発酵は糖化液に栄養源(尿素0.2%, リン酸第一カリウム, リン酸第二カリウム各0.1

Fig. 4. Ethanol fermentation of mashed sweet potato tubers

The mashed tubers (500g) were macerated, liquefied and saccharified as described under Fig. 3 except that the liquefied mashes were incubated with glucoamylase for 5 hr. The saccharified mashes were used for ethanol fermentation (pH 5.0) conducted at 30°C after supplementation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.1%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (100 ppm). The medium was inoculated (5%, w/w) with dry baker's yeast. Ethanol concentrations during the fermentation were determined using gas chromatography. Other conditions are the same as Fig. 2.



%, 硫酸マグネシウム 0.01%) およびパン酵母 (0.5%) を加えて 30°C で 48 時間行った。発酵の経過は Fig. 4 の通りである。発酵の進行とともに、発酵液中の還元糖量は減少し、エタノールが生成蓄積された。発酵 48 時間ではエタノール濃度 15% の発酵液が得られ、供試甘藷の澱粉価及び発酵液量から算出した発酵歩合は 74% である。発酵液の pH は発酵時間の経過で pH 3.9 まで低下し、一定の値となった。

## 考 察

石油代替エネルギーとしてバイオマス資源からの燃料用アルコールの生産が推進されているが、特に糖質およびでん粉質物質からの省エネルギー的アルコール生産方式技術の確立が望まれている。従来、生甘藷を原料とするアルコール発酵では芋を蒸煮したのち、酵素や麹を加えて液化及び糖化を行っていた。黒麹菌のグルコアミラーゼが各種生澱粉を糖化分解することが見い出されて以来、同酵素を用いた生澱粉からの無蒸煮アルコール発酵についての研究が行われている。<sup>2, 6, 11, 12)</sup> 一方、*Asp. niger* のペクチナーゼ標品が種々の植物組織細胞を容易に液状化 (マセレーション) することが見い出され、本酵素を用いて生甘藷の液状化を行ない、無蒸煮でアルコール発酵を実施するための研究が行われつつある。<sup>3, 5, 7, 8, 14)</sup>

著者ら<sup>1, 9)</sup> は、甘藷及びキャッサバ等を原料とした省エネルギーによるアルコール生産方式を確立するための研究を行っているが、本報では生甘藷を無蒸煮で、直接アルコール発酵に供するため、酵素標品による生甘藷の処理条件について検討した。

前報で<sup>1)</sup>、角切り生甘藷がペクチナーゼにより除々に溶解し、液状化されることを明らかにしたが、生甘藷を磨砕することによりペクチナーゼの作用が受けやすくなり、液状化が促進される。液状化の程度は酵素濃度、処理温度によって異なる。液状化物を 80°C で加温処理すると粘性が著しく高くなるが、 $\alpha$ -アミラーゼ存在下では粘性が低下する。加温処理によって糊化した液状化物中の澱粉が  $\alpha$ -アミラーゼの作用により液化 (デキストリン化) され、粘性の低下がみられる。また、液状化物にグルコアミラーゼ単独、またはグルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -アミラーゼを加えて 40°C で加温しても還元糖の増大、すなわち糖化は高められない。生甘藷をペクチナーゼ処理により液状化してもいも組織細胞からの澱粉粒の分離が完全には行われていないため、グルコアミラーゼによる糖化分解が行われ得ないものと考えられる。液状化物を 80°C で加温処理、または  $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理することにより澱粉の分離が行われ、グルコアミラーゼによる糖化分解が促進される。従って、生甘藷の液状化物を短時間で、完全に糖化を行なうためには、 $\alpha$ -アミラーゼ存在で加温処理 (80°C) して液化したのちグルコアミラー

ぜによる糖化を行なう必要がある。

生甘藷を酵素剤により液状化、液化及び糖化を行ない、得られた糖化液に酵母を加えて生甘藷からのエタノール発酵を行った結果、エタノール濃度15%の発酵液が得られた。生甘藷（澱粉価28.2）500gから、発酵48時間で81.6gのアルコールが生成され、発酵歩合は74%であった。発酵液のアルコール濃度は供試原料の澱粉含量によって異なり、また原料の各処理工程の管理及び供試酵母の種類によっても異なる。発酵歩合が低いのは、原料の処理に困難を伴う小規模による発酵に基因するものと考えられる。今回、甘藷を無蒸煮で、直接アルコール発酵に供するための原料の処理条件が明らかとなり、得られた発酵条件に基づき原料100kgを用いた大型発酵試験を実施中である。<sup>9, 10, 13)</sup>

## 要 約

生甘藷を無蒸煮で直接アルコール発酵の原料として使用するために、酵素標品による生甘藷の液状化、液化及び糖化条件を検討した。

磨砕した生甘藷は0.2%ペクチナーゼとともに加温処理（30°C、4～5時間）することにより液状化した。液状化の程度は酵素濃度及び処理温度に依存した。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処理（40°C）しても還元糖量の増加はみられなかった。液状化物中の澱粉は $\alpha$ -アミラーゼ存在下で加温処理（80°C、15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存在下で加温処理（40°C）することにより糖化され、還元糖量が増加した。磨砕した生甘藷の糖化液に酵母を加えてエタノール発酵を行った結果、発酵48時間でエタノール濃度15%の発酵液が得られた。生甘藷500gから81.6gのエタノールが生産された。

本研究を実施するに当りご指導下さった大阪市立大学理学部山本武彦教授及び九州大学農学部上田誠之助教授、また実験に協力された本学卒業生片山功君に感謝します。

なお、本研究の費用の一部は昭和56年度及び57年度文部省科学研究費補助金エネルギー特別研究によるもので謝意を表します。

## 引用文献

1. 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 No. 29 : 39~45
2. Carr, M. E., Black, L. T., Bagby, M. O. 1982 Continuous enzymatic liquefaction of starch for saccharification, *Biotechnol. Bioeng.*, 24 : 2441-2449
3. Chua, J. W., 若林譲, 吉田敏臣, 田口久治 1982 酵素剤による省エネルギーアルコール発酵の速度論的研究, 日本醗酵工学会昭和57年度大会要旨集 p. 152-153
4. Green field, P. F., Brooks, R. B. 1982 Processing of cassava to produce ethanol Effect of raw material preparation, *Starch* 34 : 192-197
5. Matsuoka, H., Koba, Y., Ueda, S. 1982 Alcohol fermentation of sweet potato without cooking, *J. Ferment. Technol.*, 60 : 599-602
6. Park, Y. K., Rivera, B. C. 1982 Alcohol production from various enzyme converted starches with or without cooking, *Biotechnol. Bioeng.*, 24 : 495-500
7. 嶋谷幸雄, 松元信也 1983 無蒸煮デン粉のエタノール発酵, 日本農芸化学会・昭和58年度大会要旨集 p. 679

8. 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
9. 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 p. 44
10. 当山清善, 宮里清松 1983 甘藷いもの無蒸煮仕込みアルコール発酵, 甘藷茎葉のメタン発酵及びメタン発酵汚泥の肥効試験, 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 171-174
11. Ueda, S., Koba, Y. 1980 Alcoholic fermentation of raw starch without cooking by using black-koji amylase, *J. Ferment. Technol.*, **58**: 237-242
12. Ueda, S., Zenin, C. T., Monterio, D. A., Park, Y. 1981 Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method, *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 291-299
13. 上中居和男, 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時の条件について, 日本農芸化学会 昭和58年度大会要旨集 p. 44
14. 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