琉球大学学術リポジトリ

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(農芸化学科)

メタデータ	言語: Japanese 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, 与那覇, 和雄, 当山, 清善, Ishihara, Masanobu, Yonaha, Kazuo, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4022

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

石原昌信＊・与那覇和雄＊・当山清善＊

Masanobu ISHIHARA, Kazuo YONAHA and Seizen TOYAMA: Digestion of raw sweet potato starch and raw sweet potato tubers by microbial enzyme preparations.

Summary

Enzymatic digestion of raw sweet potato and raw sweet potato starch was investigated with α-amylase of *Bacillus amyloliquefaciens*, pectinase of *Aspergillus niger* and glucoamylase of *Rhizopus niveus*. Glucoamylase liberated a reducing sugar from raw sweet potato starch to some extent, though the material was hardly hydrolyzed by α-amylase. At high temperature, however, the enzyme liquefied the starch. The raw starch was digested completely by glucoamylase after liquefication with α-amylase at 80℃ for 10 min. The optimum pH and temperature of glucoamylase reaction were 4.5 -5.0 and 40℃, respectively.

Pectinase was found to solubilize raw sweet potato at 40℃, facilitating the hydrolysis with glucoamylase. Maximum hydrolysis of raw sweet potato was obtained with glucoamylase digestion after solubilization with pectinase followed by liquefication with α-amylase at 80℃ for 10 min.

緒　　言

近年，世界の主体をなす石油価格の高騰と石油供給の不安定が進み，有限の化石資源の代替資源としてのバイオマスのエネルギー化が期待されている[6,8]。バイオマスは再生型エネルギー源としてのみならず，一般有用物質の生産のための再生型原料として期待されるようになり，バイオマスの有効エネルギー化の研究が盛んに行われている[15]。特に，糖質及びでん粉質物質からのアルコール（エチルアルコール）の生産に関する研究が推進されつつある[1,2,5,7]。

各種バイオマス原料のうちで，アルコール発酵原料として利用できる栽培作物には砂糖きび，甘藷及びキャッサバ等があり，アルコール転換技術などから，現時点では砂糖きび等の糖質作物が有利な資源と考えられている。しかし，甘藷は，キャッサバとともにバイオマス生産性が高く代表的なでん粉質作物で，省エネルギー的糖化技術を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作物である。甘藷生でん粉及び生甘藷の省エネルギー的糖化法について，上田[9,11,13]は黒コウジ菌起源酵素により，山本[17]はクモノスカビ起源酵素による無蒸煮糖化法を設定し，糖化液が良好なアルコール発酵原料となり得ることを報告している。

本研究では，糖質およびでん粉質物を原料とする省エネルギー的アルコール生産方式を確立するため

＊琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告　29：39～45（1982）

に原料の前処理条件及びアルコール発酵条件等を設定することを目的としている。本報では甘藷生でん粉および生甘藷の微生物起源酵素剤による分解性について調べた結果を報告する。

実　験　方　法

(1) **でん粉**：でん粉は，甘藷でん粉工場で製造された製品を無処理のまま使用した。

(2) **甘藷**：甘藷（塊根）は沖縄県産（読谷村）の「照間」を皮の部分を除いたのち10㎜角に細断して用いた。供試甘藷を1N塩酸で100℃，2.5時間加水分解したのち，Somogyi-Nelson法により測定した総還元糖（グルコース量）から算出したデンプン価は28.8であった。

(3) **酵素剤**：でん粉又は甘藷の分解反応には上田化学工業（株）の微生物起源酵素標品を用いた。すなわち，*Bacillus amyloliquefaciens* のα－アミラーゼ（液化型：10,000 unit／g），*Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼ（糖化型：6,000 unit／g）および*Aspergillus niger* のペクチナーゼ（ペクチンデポリメラーゼ：10,000 unit／g）。

(4) **生でん粉及び生甘藷の酵素分解**：酵素反応混液はでん粉1g又は細断した甘藷10g，酢酸ナトリウム緩衝液（0.05M，pH 4.0）15mlおよび酵素（24～750 unit）で，反応は50ml容三角フラスコを用い40℃で3～24時間振とうして行った。酵素分解反応中，反応混液から3mlを採り遠心分離により固液分離を行ない，上澄液を10分間煮沸して反応を停止した。酵素分解反応で生成した上澄液中の還元糖はSomogyi-Nelson法により測定し，でん粉又は甘藷の加水分解度は，基質の総還元糖量に対する酵素反応で生成した還元糖量の比率（％）で示した。

実　験　結　果

1. α－アミラーゼおよびグルコアミラーゼによる甘藷生でん粉の分解

アミラーゼ標品による甘藷生でん粉の分解性を調べるために，甘藷生でん粉（1g）に緩衝液（pH4.0，20ml）およびα－アミラーゼ（40 units）またはグルコアミラーゼ（24 units）を加えて40℃で振とうし，反応で生成する還元糖を測定した。Fig.1は，生でん粉中の総還元糖量に対する生成還元糖量を加水分解率（％）で示した結果である。図から明らかなように，甘藷生でん粉はグルコアミラーゼによってよく分解され，反応24時間では80％以上の分解率を示した。一方，生でん粉はα－アミラーゼによっては分解され難く，反応75時間後でも15％の分解率であった。

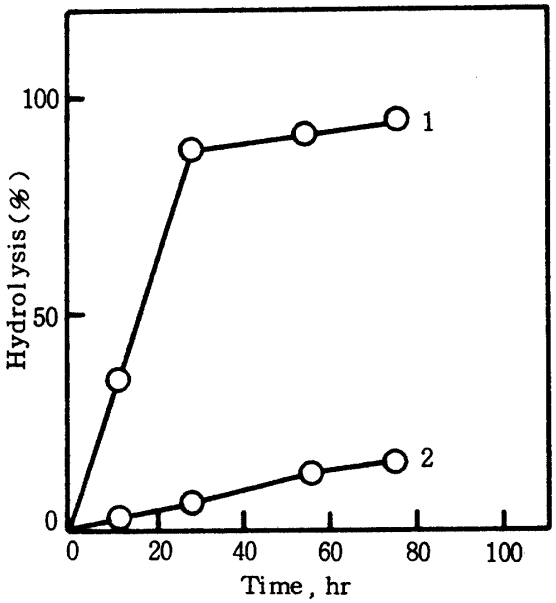

Fig.1　Digestion of raw sweet potato starch by glucoamylase (1) and α-amylase(2).

The reaction mixture contained 20ml of 0.05M sodium acetate buffer(pH 4.0), 1.0g of raw sweet potato starch and enzyme(24 units of glucoamylase and 40 units of α-amylase). Digestion was measured by determing reducing sugar with Somogyi-Nelson method. The value was given by the reference to total sugar.

2. グルコアミラーゼによる液化でん粉の分解

グルコアミラーゼ標品によって甘藷生でん粉が分解され得ることが明らかになったが，次に生でん粉にα－アミラーゼ（40 units）を加え，80℃で10分間加温処理した液化でん粉に対するグルコアミラーゼ（24 units）の作用を調べた。Fig. 2には，分解反応3時間におけるグルコアミラーゼによる液化でん粉の分解率とともに生でん粉の分解率を示した。なお，甘藷生でん粉はα－アミラーゼとともに80℃で10分間加温処理しても還元糖の増大はほとんどみられなかった。α－アミラーゼとともに加温処理して液化したでん粉は，グルコアミラーゼによって容易に分解され，反応3時間ではほぼ完全に分解（95%）されることがわかった。一方，反応3時間におけるグルコアミラーゼによる生でん粉の分解率は20%であった。

3. α－アミラーゼ，グルコアミラーゼおよびペクチナーゼによる甘藷の分解

甘藷生でん粉がグルコアミラーゼ標品によって分解されることがわかったので，次にアミラーゼ及びペクチナーゼ標品による生甘藷（塊根）の分解性について調べた。酵素反応は，甘藷（10 g）に緩衝液（pH 4.0，15 ml）および酵素標品（α－アミラーゼ750 units，グルコアミラーゼ450 units，ペクチナーゼ750 units）を加えて40℃で振とうして行った。分解率は反応3時間で生成する還元糖量を測定して算出した。Fig.3で明らかなように，生甘藷はα－アミラーゼではほとんど分解されないが，グルコ

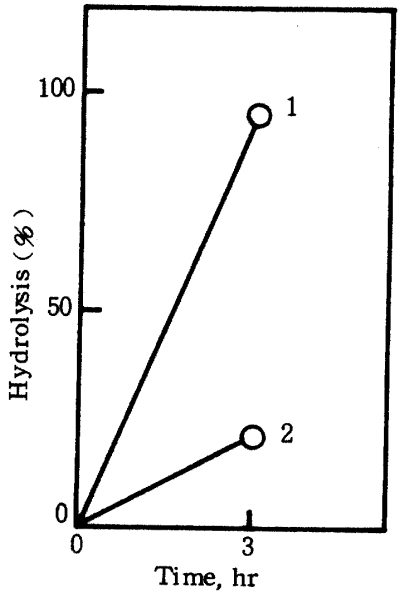

Fig.2　Digestion of gelatinized raw sweet potato starch by amylases.

1; The sweet potato starch was incubated with α-amylase at 80℃ for 10 min, and then glucoamylase was added. The reaction was carried out at 40℃.
2; The digestion was performed at 40℃ as mentioned above, where the incubation at 80℃ was omitted.

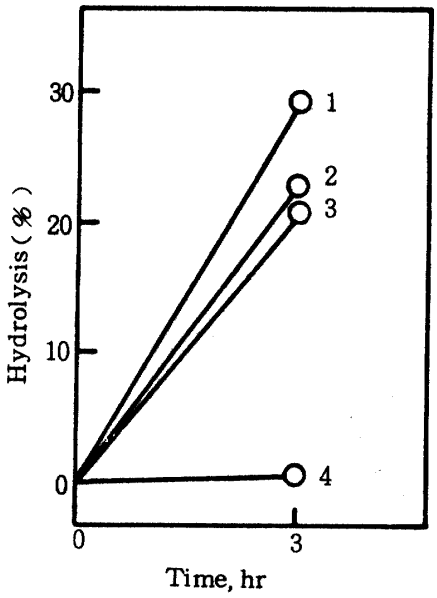

Fig.3　Hydrolysis of cubic sweet potato tubers by glucoamylase, pectinase and α-amylase.

The reaction mixture contained 15 ml of 0.05M sodium acetate buffer (pH 4.0), 10g of cubic sweet potato tubers and enzyme (450 units of glucoamylase and 750 units of pectinase). The other conditions are described in Fig.1. 1. glucoamylase+pectinase; 2. pectinase; 3. glucoamylase; 4. α-amylase.

アミラーゼおよびペクチナーゼによって分解され，反応3時間の分解率はそれぞれ21％および23％で，甘藷塊が粉状になった。グルコアミラーゼにペクチナーゼを加えて反応を行なうと分解が高められ，反応3時間における分解率が29％になった。なお，グルコアミラーゼにα－アミラーゼを加えても分解率は高められなかった。

4. グルコアミラーゼおよびペクチナーゼによる生甘藷の分解

生甘藷がグルコアミラーゼ及びペクチナーゼ標品によって分解され，反応3時間で21～29％の分解率に達することが明らかとなったので，次に両酵素標品による生甘藷の分解限度について調べた。Fig. 4は，グルコアミラーゼ，ペクチナーゼ及び両酵素存在下〔酵素量は(3)と同じ〕で反応を行い，経時的に分解率を算出した結果である。図で明らかなように，生甘藷は反応時間の経過とともにグルコアミラーゼ及びペクチナーゼによって分解をうけ，反応24時間で約60％分解された。一方，グルコアミラーゼとともにペクチナーゼを添加することにより生甘藷の分解が促進され，反応12時間目での分解率が73％に達したが，さらに反応を続けても分解率の増大はみられなかった。

5. ペクチナーゼ処理甘藷のグルコアミラーゼによる分解

生甘藷はペクチナーゼとともにグルコアミラーゼ標品によって73％まで分解されることがわかったので，次にペクチナーゼ処理甘藷のアミラーゼ標品による分解性について調べた。ペクチナーゼ処理は生甘藷（10 g）にペクチナーゼ（750 units）を加えて40℃に3時間保って行った。

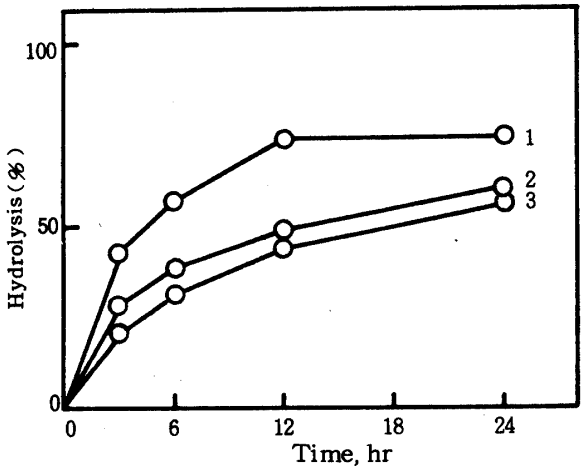

Fig. 4. Hydrolysis of cubic sweet potato tubers by glucoamylase and pectinase.

Cubic sweet potato tubers were incubated with glucoamylase (450 units, 3) pectinase (750 units, 2) and the combination of glucoamylase and pectinase (1) at 40℃ for indicated time.
Other conditions are described in Fig. 1.

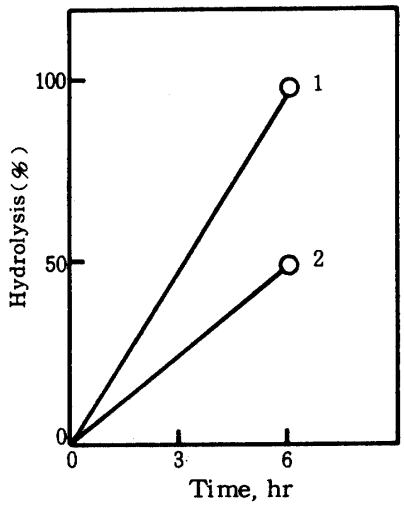

Fig. 5. Hydrolysis of macerated sweet potato tubers by the combination of glucoamylase, α－amylase and pectinase.

1. After maceration with pectinase (750 units), the potato tubers were incubated with α-amylase (750 units) at 80℃ for 10 min, and then glucoamylase (450units) was added.
2. Glucoamylase and α-amylase reactions were carried out at 40℃.

ペクチナーゼ処理により溶解された甘藷にグルコアミラーゼを加えて，またはα－アミラーゼを加えて80℃，10分間加温処理したのちグルコアミラーゼを加えて40℃で3時間分解反応を行って生甘藷の分解率を算出したのがFig. 5である。生甘藷はペクチナーゼ処理（マセレーション）することにより，グルコアミラーゼによる分解が促進されるが，ペクチナーゼ処理甘藷にα－アミラーゼを加えて加温処理することによりグルコアミラーゼによる分解がさらに促進され，反応6時間でほぼ完全に分解（98%）された。

6. グルコアミラーゼによる甘藷生でん粉の分解性とpH及び温度

グルコアミラーゼが甘藷生でん粉及び生甘藷の分解の主役を担っており，本酵素標品を用いて各pH及び各温度における生でん粉の分解性を調べた。各pHで酵素分解反応を行ない，分解活性とpHとの関係を調べた結果をFig. 6に示した。図より，本酵素の分解反応の至適pHは4.5～5.0付近にあり，pH3以下あるいはpH 8以上では分解活性は低かった。Fig. 7は甘藷生でん粉を基質として用い，各温度で酵素反応を行ない，分解活性と温度の関係を調べた結果である。図より，本酵素による至適分解反応の温度は40℃にあり，50℃以上では活性が急激に低下した。

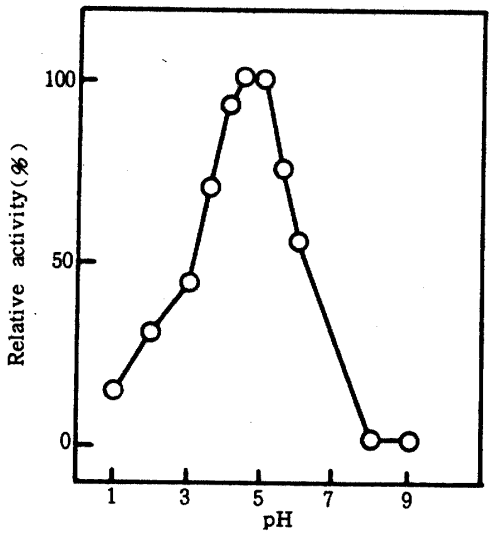

Fig. 6. Effect of pH on the digestion of raw sweet potato starch by glucoamylase.

The activity was assayed as described in Fig. 1.
Buffer used : sodium acetate－HCl, pH 1－3 ; sodium acetate acetate, pH 4－5 ; potasium phosphate, pH 6－8; glycine－KCl－KOH, pH 9.

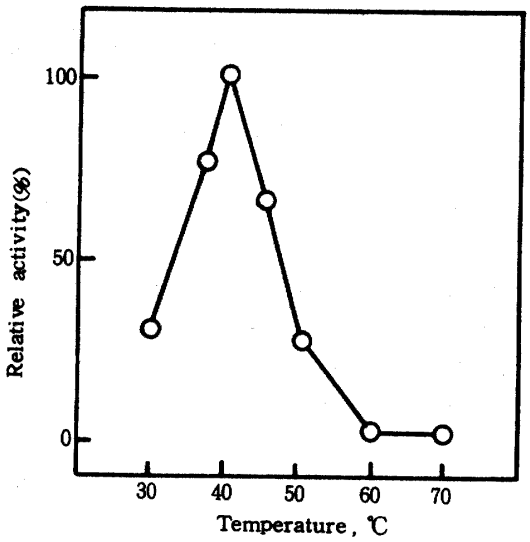

Fig. 7. Effect of temperature on the digestion of raw sweet potato starch by glucoamylase.

The activity was determined by changing temperature.
The other conditions are described in Fig. 1.

考　　察

糖質及びでん粉質等のバイオマス資源から燃料用アルコール（エチルアルコール）の生産が期待されているが，アルコール変換工程における省エネルギー化技術の開発が重要な課題となっている[3,4,14]。特に，でん粉質原料からのアルコール生産に当っては，無蒸煮糖化法によるアルコール発酵法の技術開

発が望まれている。従来，甘藷を原料とするアルコール発酵においては，でん粉のα－アミラーゼによる液化性とグルコアミラーゼによる糖化性を高めるために，原料の蒸煮が行われている。原料の無蒸煮糖化法についての研究が行われ，上田ら[10,12]は黒麹菌（*Asp. awamori*）の生産するグルコアミラーゼが生でん粉を糖化することを見い出し，同菌の麹又は酵素を用いた各種の生でん粉及び生いも類の糖化法を報告している。また，Svendsby ら[16]と山本[17]は，生甘藷の磨砕物が *Asp. niger* のふすまこうじから調製したペクチンデポリメラーゼ（ペクチナーゼ標品）によって液状化され，*Rhizopus niveus* が生産するグルコアミラーゼによって容易に分解されることを報告している。

本研究では，生甘藷の無蒸煮糖化法を設定するに当っての基礎的知見を得るために，酵素標品による甘藷生でん粉及び生甘藷の糖化分解性を還元糖の増大で調べた。生でん粉及び生甘藷ともに *Bacillus amyloliquefaciens* のα－アミラーゼ標品によってはほとんど分解されないが，*Rhizopus niveus*のグルコアミラーゼ及び *Asp. niger* のペクチナーゼ標品によって分解された。ペクチナーゼ標品による生でん粉の分解は標品中に混在する糖化酵素によるものと考えられる。反応温度40℃におけるグルコアミラーゼによる生でん粉の分解率は86%（反応24時間）であった。しかし，α－アミラーゼ存在下で加熱処理（80℃，10分間）して糊化及び液化を行ったでん粉のグルコアミラーゼによる分解率は95%（40℃，3時間）となり，加熱処理により分解が著しく促進される。

生甘藷はグルコアミラーゼ及びペクチナーゼ両酵素標品によって分解され，40℃，24時間における分解率はほぼ同じの約60%で，両酵素標品存在における最高分解率は73%であった。生甘藷の分解を促進するためにペクチナーゼ処理（40℃，3時間）及びα－アミラーゼ・加熱処理（80℃，10分間）を行った結果，グルコアミラーゼによる分解率が98%（40℃，6時間）に上昇した。生甘藷の糖化分解に当ってはペクチナーゼ標品等によりいも組織の液状化を図る必要があり，またα－アミラーゼ存在下で加熱処理することによりグルコアミラーゼによる分解が著しく促進される。いも組織の崩壊活性を有するペクチナーゼ標品の効果については，キャッサバ及び甘藷で認められている[10,11,14]。本研究では角切り生甘藷を用いて分解試験を行ったのであるが，さらに細く粉砕することによりペクチナーゼ標品によるいも組織の液状化が促進されるものと考えられる。生甘藷を原料とするアルコール製造においては，いも組織中のでん粉を完全に，しかも短時間で分解する必要があり，今後さらに省エネルギー化を図るための糖化条件を設定するとともに，アルコール発酵工程との関係について検討する予定である。

要　　約

Bacillus amyloliquefaciens のα－アミラーゼ，*Aspergillus niger*のペクチナーゼ及び*Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼによる甘藷生でん粉及び生甘藷の分解について調べた。

生でん粉はグルコアミラーゼにより分解されたが，α－アミラーゼでは分解されなかった。α－アミラーゼ存在下で80℃，10分間加熱処理したのちの液化でん粉はグルコアミラーゼによってほぼ完全に分解された。

ペクチナーゼは生甘藷を溶解し，グルコアミラーゼによる分解を促進した。ペクチナーゼで溶解した甘藷をα－アミラーゼ存在下で80℃，10分間加熱処理すると，甘藷中のでん粉はグルコアミラーゼによってほぼ完全に分解された。

グルコアミラーゼによる生でん粉分解の至適pH及び温度はそれぞれ4.5～5.0及び40℃であった。

本研究の実施に協力された片山寿雄君及び平良昭君に感謝します。

なお，本研究の費用の一部は昭和56年度文部省科学研究費補助金エネルギー特別研究（課題番号5604501）によったもので謝意を表します。

引　用　文　献

1. 原嘉夫　1980　期待される農産物からの燃料アルコール生産，糖業安定事業団月報　No. 166，6月号 p. 30～36
2. 貝沼圭二　1981　澱粉質原料，発酵と工業　**39**：730～738
3. 唐木功　1982　生甘しょからのアルコール製造における無蒸煮糖化法の工業化試験について，日本能率協会　2月号
4. 木下敏昭　1981　アルコール発酵，バイオマス一生産と変換（下）p.55～63，学会出版センター
5. Scheller, W. A. 1981 Grain alcohol as renewable energy and automotive fuel, Stärke **33**：1～4
6. 須之部淑男　1981　バイオマスの総合利用，p.17～26，フジテクノシステム
7. 当山清善　1982　砂糖きびを原料とする燃料アルコールの生産，エネルギー特別研究〝生物エネルギーの利用と開発〟沖縄シンポジウム講演要旨集　p. 39～44
8. 浦尾秀雄　1982　バイオマス政策の推進，貴伝　**36**：No. 4，4～9
9. Ueda, S. 1980 Raw starch digestion by mold glucoamylases and debranching enzymes, Academic Press, New York p. 55～72
10. Ueda, S., Koba, Y. 1980 Alcoholic fermentation of raw starch without cooking by using black-koji amylase, J. Ferment. Technol., **58**：237～242
11. 上田誠之助　1981　無蒸煮糖化，発酵と工業　**39**：804～811
12. Ueda, S., Zenin, C. T., Monterio, D. A., Park, Y. K. 1981 Production of ethanol from raw cassava starch by a non-conventional fermentation method, Biotechrnol, Bioeng., **23**：291～299
13. 上田誠之助　1982　省エネルギーアルコール醗酵について，エネルギー特別研究〝生物エネルギーの利用と開発〟沖縄シンポジウム，講演要旨集　p. 45～50
14. 山本武彦　1981　バイオマスエネルギーの転換技術を探る，化学と生物　**19**：679～686
15. 山本武彦　1981　生物資源と微生物によるアルコールその他燃料化合物の生産およびその展望，化学工学　**45**：285～291
16. Svendsby. O., Kakutani, K., Matsumura, Y., Iizuka, M., Yamamoto, T. 1981 J. Ferment. Technol., **59**：485～487
17. 山本武彦　1982　いもの無蒸煮アルコール発酵といもの茎葉を原料とするメタン発酵の意義，エネルギー特別研究〝生物エネルギーの利用と開発〟　沖縄シンポジウム講演要旨集　p.51～61