

琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌のバガス分解酵素について(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, 与那覇, 和雄, 池間, 洋一郎, 上原, 初枝, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo, Ikema, Yoichiro, Uehara, Hatsue メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4299

泡盛麹菌のバガス分解酵素について†

当 山 清 善*・与那覇 和 雄*・池 間 洋一郎*
上 原 初 枝*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHARA, Yoichiro IKEMA and
Hatsue UEHARA: A bagasse-hydrolyzing enzyme of
Aspergillus awamori

I 緒 言

セルロース、ヘミセルロースおよびリグニン等から成る甘蔗バガスは、その物理化学的特性により酵素的分解を受け難く、また微生物による資化利用も極めて困難である。従って、バガスの微生物学的利用を図るためには、天然のバガスは前処理を行なう必要がある。前処理したバガスは微生物起源酵素によって分解されやすくなり¹⁻³⁾、また微生物の培養基質として利用できることが明らかにされつつある^{4,5)}。

筆者ら^{11,12)}は、バガス培地における微生物の生育ならびにバガスの前処理条件と酵素分解との関係を調べ、バガスをアルカリ処理することにより酵素的分解が著しく高められ、アルカリ処理バガスが微生物培養の良好な基質となり得ることを明らかにした。本報においては、泡盛麹菌をバガス含有培地に培養し、バガスの前処理条件とバガス分解酵素の生産との関係を検討したので報告する。

II 実 験 方 法

- (1) バガス原料：麹菌の培養ならびに酵素反応基質に供したバガス原料は前報¹²⁾に準じて調製し、40メッシュになるように粉碎した。
- (2) アルカリ処理バガス：酵素反応の基質に用いたアルカリ処理バガスは前報¹²⁾に準じ、粉碎バガスを0.5%水酸化ナトリウム溶液で120°C、20分間処理した後、洗浄乾燥して調製した。
- (3) 供試菌株と培地組成：研究室保存泡盛麹菌株および泡盛種麹等から分離した泡盛麹菌株を実験に供した。培地に使用したバガスは0.5%水酸化ナトリウム溶液で処理(120°C、20分間)を行ない、塩酸で中和した。前培養には本中和溶液を濾過しバガス残渣を除いたバガスのアルカリ抽出液を用いた。培地中のバガス濃度は粉碎バガス原料1.5%である。培地組成はアルカリ処理バガス溶液(あるいはバガスのアルカリ抽出液)、硫酸アンモニウム0.3%、リン酸第二カリウム0.3%、塩化カリウム0.05%、および硫酸マグネシウム0.02%で、pH 5.4に調整して用いた。
- (4) 麹菌の培養および酵素液：麹菌の前培養は、バガスのアルカリ抽出液培地(5 ml)を試験管に採り麹菌胞子を接種し30°Cで48時間振とうして行なった。本培養は、アルカリ処理バガス培地(100 ml)を

†甘蔗バガスの利用に関する研究(第3報)

*琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 23: 195~203 (1976)

500 ml容振とうフラスコに採り、前培養液 (5 ml) を接種し30°Cで72時間振とうして行なった。培養後の菌糸体およびバガス残渣を濾過により除き、その濾液を酵素液として用いた。

(5) 麹菌生育度の測定：菌体量は Haung ら⁶⁾の方法を改変して次のように行なった。十分水洗したバガス残渣含有菌糸を80°Cで一夜乾燥後、粉末試料一定量に0.2 N水酸化ナトリウム溶液を加えて15分間煮沸して菌糸体中の蛋白質を抽出した。抽出濾液一定量にフォーリン試薬を加えて常法通り発色させた後610 m μ における吸光度を測定した。グルコース-ペプトン培地を用いて培養した供試泡盛麹菌株の乾燥菌体粉末試料についても同様に行なって検量線を作成し、それからバガス残渣含有菌糸体乾燥粉末中の菌糸体量を求めた。麹菌の生育度は、培養液 (100 ml) 当りの乾燥菌体mg数で示した。

(6) バガス分解酵素の活性測定：酵素反応液の組成はアルカリ処理バガス100mg, 0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 5 mlおよび酵素液 (10倍希釈した麹菌培養濾液) で総量10mlとした。反応は50ml容三角フラスコを用い、37°Cで1時間あるいは5時間ゆるやかに振とうして行なった後5分間煮沸して反応を止めた。反応混液中の還元糖量はSomogyi-Nelson法⁷⁾によって測定した。バガス分解酵素活性は、酵素反応で増加した還元糖量を反応混液1 ml中のグルコースmg数で示した。

III 結 果

1. 各種泡盛麹菌のバガス分解酵素活性

バガス含有培地における泡盛麹菌の生育度を調べた結果、泡盛麹菌株のなかにはアルカリで前処理したバガスを唯一炭素源とする液体培地で良好に生育し、培養液中にアルカリ処理バガスを分解する酵素を生産する。Table 1は、各種泡盛麹菌株を0.5%水酸化ナトリウム溶液で前処理したバガス培地で72時間振とう培養を行ない、培養濾液を用いてアルカリ処理バガス分解酵素活性を調べた結果である。アルカリ処理バガス含有培地における泡盛麹菌の生育は供試菌株で異なるが、生育良好な菌株が高い酵素生産を示した。生育が良好で、比較的高い酵素活性を示した菌株はIFO 4033, RUA 101およびRUA 110菌株である。以下の実験では酵素活性が最も高いIFO 4033菌株 (*Aspergillus awamori* NAKAZAWA)を用いた。

2. アルカリ処理バガスの泡盛麹菌酵素による分解

無処理バガスよりもアルカリ処理バガスが泡盛麹菌酵素の良好な基質となる。アルカリ処理バガスは酵素によって分解され還元糖が生成される。泡盛麹菌を0.5%水酸化ナトリウム溶液で処理したバガスを含む培地で96時間振とう培養して得た酵素を用いて、酵素反応時間とアルカリ処理バガス分解との関係を調べたのがFig. 1である。酵素反応時間とともにバガスが分解されて還元糖が増大した。酵素反応5時間までは、バガス分解がほぼ直線的に進行した。本直線性は酵素反応混液中における酵素濃度が高いと得られない。従って、本実験では、培養濾液を1%量含む反応混液で酵素反応を行なった。

3. 各種濃度アルカリ処理バガス培地における酵素生産

泡盛麹菌によるバガス分解酵素の生産と培養基質に用いるバガスの前処理条件、すなわちバガスを前処理するアルカリ濃度との関係を調べるため、各種濃度のアルカリ溶液で処理したバガス培地で供試麹菌を72時間培養した。培地には各種濃度の水酸化ナトリウム (アルカリ) 溶液で120°C, 20分間前処理したバガスを用いた。Fig. 2は各培養液を用いてアルカリ処理バガス分解酵素活性を調べた結果である。図から明らかなように、供試麹菌による酵素生産はバガスを前処理するため培地に加えるアルカリ濃度によって著しく異なり、無処理バガスでは酵素は全く生産されない。バガスを処理するアルカリ濃度が0.5%までは、酵素活性が急激に増加した。1%以上のアルカリ溶液で前処理したバガスを含む培地で

Table 1. Bagasse-hydrolyzing enzyme activity in various strains of *Aspergillus awamori*

Strains	Enzyme activity	Strains	Enzyme activity
IAM 2112	0.11	RUA 100	0.03
2391	0.06	101	0.14
2101	0.01	102	0.10
2088	0.08	103	0.01
2087	0.07	106	0.11
IFO 4033	0.16	110	0.15
4119	0.06	114	0.02
4125	0.09	118	0.05
4314	0.11	119	0.09
RUA 3140	0.07	123	0.02
3141	0.02	127	0.12

The growth medium contained 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3% K_2HPO_4 , 0.05% KCl , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 1.5% bagasse treated with 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min and then neutralized with HCl . The pH of the medium was adjusted to 5.4. The culture was carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of medium, with vigorous shaking on a reciprocating shaker, at 30°C for 72 hr.

The reaction mixture for the enzyme assay contained 5 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0), 100 mg of 0.5% NaOH -treated bagasse and culture filtrate in a final volume of 10 ml. After incubation with gentle agitation at 37°C for 1 hr, the reaction mixture was terminated by boiling for 5 min and then filtrated. An increase in soluble reducing sugar of the filtrate was measured by the method of Nelson, with glucose as the reducing sugar standard. The enzyme activity was shown as an increase in the amount of glucose (mg) in the reaction mixture (ml).

麹菌を培養しても、酵素活性の増加はほとんどみられなかった。また、供試麹菌は0.5%アルカリ溶液で処理したバガス培地で最も良好な生育を示した。以上の結果から、酵素生産にあたって培地に加えるバガスの前処理に必要なアルカリ濃度は0.5%で充分であることが明らかになった。

4. バガスのアルカリ処理温度と酵素生産

麹菌によるバガス分解酵素の生産は、培地に加えるバガス処理するアルカリ濃度によって異なることが明らかになったので、次に酵素生産とバガスのアルカリ処理温度との関係を調べた。麹菌の培養は、0.5%アルカリ溶液を用いて 30°C 、 100°C および 120°C で20分間処理したバガスを含む培地で72時間振とうして行なった。各培養液を用いて酵素反応を行ないバガス分解酵素活性を測定したのがFig. 3である。麹菌の活性は、培地に加えるバガスのアルカリ処理温度によって異なり、処理温度が高くなると酵素活性も増大する。培養液中に高い酵素生産を得るためには、 120°C でアルカリ処理を行なったバガスを含む培地で麹菌を培養する必要がある。また供試菌株は 120°C でアルカリ処理したバガス培地で良好な生育を示した。

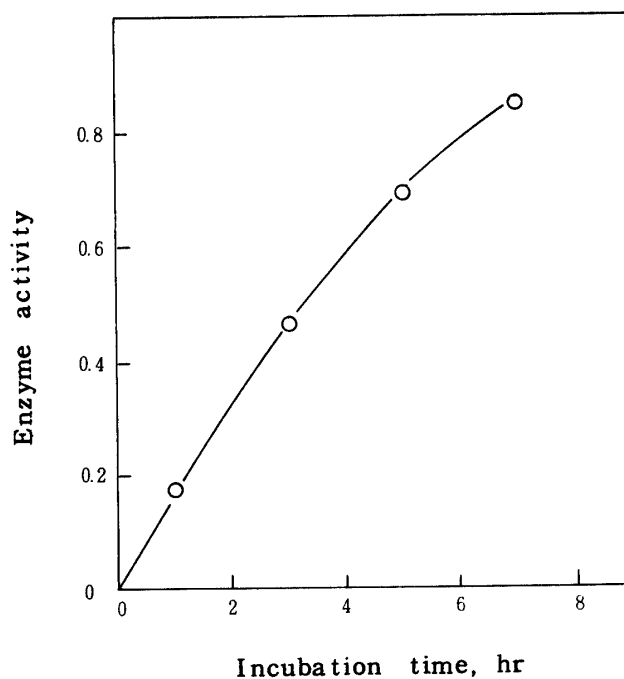


Fig. 1. Time course of hydrolytic degradation of alkali-treated bagasse by the enzyme produced by *Aspergillus awamori*

Asp. awamori (IFO 4033) was used as the enzyme source. Other conditions were the same as shown in Table 1.

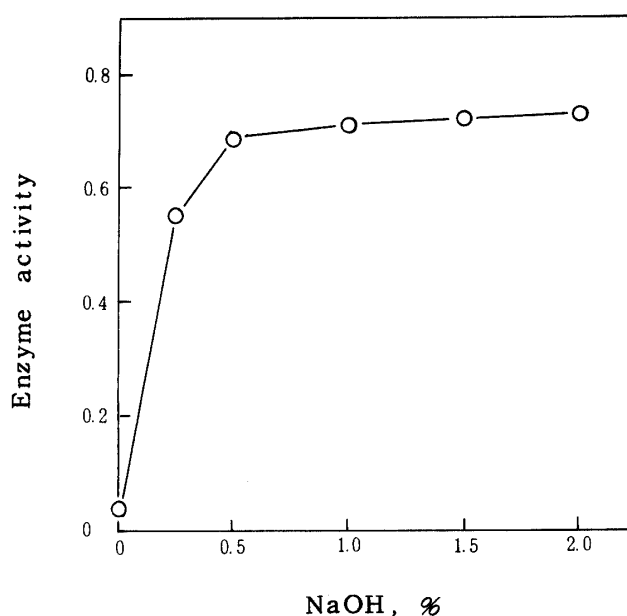


Fig. 2. Relationship between alkali treatment of bagasse and bagasse-hydrolyzing enzyme production

Asp. awamori (IFO 4033) was grown in a medium containing the bagasse treated in different concentrations of NaOH solution at 120°C for 20 min. The enzyme reaction was carried out for 5 hr. Other conditions were the same as shown in Table 1.

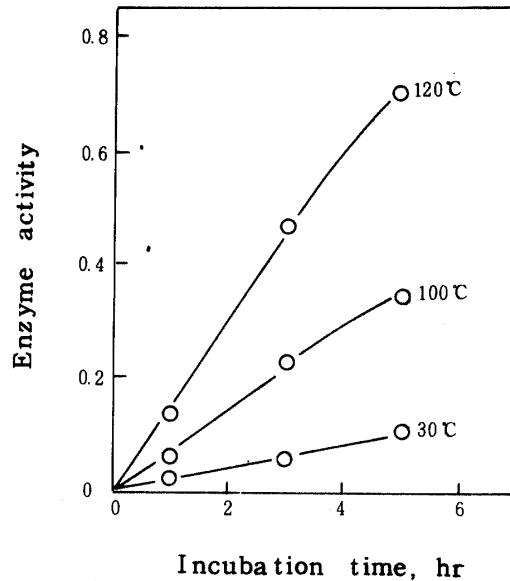


Fig. 3. Effect of the temperature in alkali treatment of bagasse on the production of bagasse-hydrolyzing enzyme

Asp. awamori (IFO 4033) was grown in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution at the indicated temperature for 20 min. Other conditions were the same as shown in Table 1.

5. バガス濃度と酵素生産

培地に加えるバガス濃度と麹菌の生育ならびに酵素生産との関係を調べた結果が Fig. 4 である。麹菌の培養は、各種濃度のバガスを 0.5% アルカリ溶液で 120°C、20 分間処理したバガス培地を用いて 72 時間振とうして行なった。麹菌の生育度は麹菌菌体およびバガス残渣乾物中の菌糸体量で示し、酵素活性は各培養液を用いて 5 時間酵素反応を行なって測定した。図で明らかなように、培地中のバガス濃度が増加するに伴って麹菌の生育が増大し、バガス濃度 2.0% で最高の生育がみられる。一方、バガス濃度が低い培地でも麹菌による酵素生産はかなりあり、バガス濃度 1.0~2.0% の範囲ではほぼ同じ酵素活性値が得られている。バガス濃度 2.5% 以上の培地では、酵素活性が急激に低下する。以上の結果から、麹菌によるアルカリ処理バガスを分解する酵素の生産において培地に加えるバガス濃度は 1.5~2.0% が適当である。

6. 麹菌の生育と酵素生産

泡盛麹菌の生育と酵素生産との関係を調べるため、0.5% アルカリ溶液を用い 120°C で 20 分間処理したバガス (バガス濃度 1.5%) を含む培地で供試菌株の培養を行なった。麹菌培養過程における生育度、酵素活性および pH の変化について調べたのが Fig. 5 である。酵素活性は各時間の培養液を用いて 1 時間酵素反応を行なって測定した。図で示されるように、供試麹菌は培養 24 時間目から急速に増殖し始め、培養 72 時間目ではほぼ最高の生育を示した。一方、バガス分解酵素の生産は麹菌の増殖とともに増大し生育曲線と平行関係にある。生育が停止する培養 96 時間目以後では酵素活性の増加もみられない。培養液の pH は培養 48 時間目まで上昇するが、最高の生育を示す培養 72 時間には急激に低下し酸性となる。麹菌の生育がみられなくなる培養 96 時間目から培養液の pH が再び上昇する。以上の結果から、バガス分解酵素の生産を行なうための泡盛麹菌の培養は 72 時間で充分であることが明らかになった。

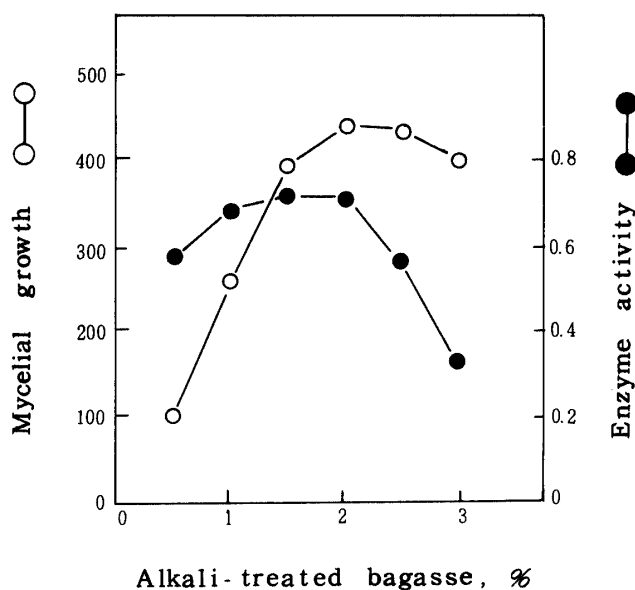


Fig. 4. Effect of the concentration of alkali-treated bagasse on the mycelial growth and the production of bagasse-hydrolyzing enzyme

Asp. awamori (IFO 4033) was grown in a medium containing various concentrations of the bagasse treated with 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min. The enzyme reaction was carried out for 5 hr. Growth was represented by dry weight of mycelia (mg) in the culture broth (100 ml). Other conditions were the same as shown in Table 1.

IV 考 察

稲わらやバガス等のセルロース物質を微生物学的に利用する方法が検討され、微生物培養基質として利用できる可能性が明らかにされつつある^{4, 5, 9, 10})。しかし、天然(無処理)のバガスは微生物の栄養源となり難く、また酵素による分解も受けにくい。筆者等¹³)は、バガスを唯一の炭素源とした培地における泡盛麹菌の生育が培地に加えるバガスの処理条件で著しく異なることを明らかにした。アルカリ処理バガスが泡盛麹の培養基質として有効で、特にバガスのアルカリ抽出液を含む培地で麹菌の良好な生育がみられる。

アルカリ処理バガス含有液体培地で培養した泡盛麹菌は培養液中にバガス分解酵素を生産し、本酵素はアルカリ処理バガスを分解して還元糖を生成する。筆者ら¹²)が報告した *Trichoderma* 酵素および *Garcia* ら²)の *Penicillium* 起源の酵素と同様に本酵素は無処理バガスよりもアルカリ処理バガスを良好な基質とした。また、泡盛麹菌による分解酵素の生産はバガスのアルカリ処理条件で異なり、アルカリ濃度 0.5% および温度 120°C がそれぞれ最適であった。これは酵素分解におけるバガスの最適アルカリ処理条件¹²)と一致している。この最適アルカリ処理条件で処理したバガスが培養および酵素基質として有効で、その結果泡盛麹菌の生育ならびに酵素生産が促進されることになる。培地に加えるバガス濃度が 2.0% 以上になると酵素生産の低下がみられるのは、液体培養における振とう操作が困難となり麹菌が生育不良となるためである。泡盛麹菌の生育と培地に加えるバガスの前処理との関係ならびに泡盛麹菌

酵素によるバガスの分解性およびその分解産物等については次報で報告する予定である。

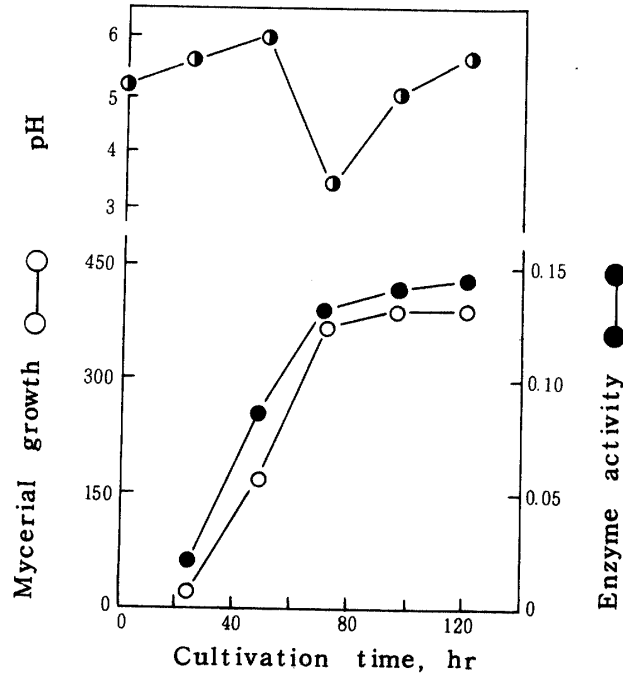


Fig. 5. Time courses of the mycelial growth and the production of bagasse-hydrolyzing enzyme

Asp. awamori (IFO 4033) was cultivated in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min. The enzyme reaction was carried out for 1 hr. Growth was shown by dry weight of mycelia (mg). Other conditions were the same as shown in Table 1.

V 要 約

バガスを唯一炭素源とした無機塩培地で培養した泡盛麹菌によるバガス分解酵素の生産について調べ、次の結果を得た。

泡盛麹菌22株をアルカリ処理バガス含有培地で培養したところ、そのほとんどが培養液中にアルカリ処理バガスを分解する酵素を生産した。供試菌株で酵素生産が高かった *Asp. awamori* IFO 4033 を用い、酵素生産を向上させるための培養条件の検討を行なった。本菌株を0.5%アルカリ溶液を用いて120°C、20分間処理したバガスを含む培地で培養した場合に最高の酵素生産が得られた。培地に加えるバガスの濃度は1.5～2.0%が適当であった。

本研究の一部は昭和50年度科学研究費補助金によったもので、謝意を表します。

参 考 文 献

1. Gupta, J.K., Gupta, Y.P. and Das, N.B. 1973 Degradation of cellulosic materials by *Trichoderma viride* cellulase, Agr. Biol. Chem. **37**:2657~2662.
2. Garcia Martinez, D.V., Ogawa, T., Shinmyo, A. and Enatsu, T. 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzymes produced by *Penicillium variable*, J. Ferment. Technol., **52**:378~387.
3. Han, Y.W. and Srinivasan, V.R. 1968 Isolation and characterization of a cellulose utilizing bacteria, Appl. Microbiol., **16**:1140~1145.
4. Han, Y.W. and Callihan, C.D. 1974 Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth, Appl. Microbiol., **27**:159~165.
5. Han, Y.W. 1975 Microbial fermentation of rice straw: Nutritive composition and *in vitro* digestibility of the fermentation product, Appl. Microbiol., **29**:510~514.
6. Huang, T.L., Woo Han, Y. and Callihan, C.D. 1971 Application of the Lowry method for determination of cell concentration in fermentation of waste cellulotics, J. Ferment. Technol., **49**:574~576.
7. Nelson, N. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem., **153**:375~380.
8. 西沢一俊 1974 セルラーゼ、化学の領域選書 **8** 南江堂
9. Romanelli, R. A., Houston, C.W. and Barnett, S.M., 1975 Studies on thermophilic cellulolytic fungi, Appl. Microbiol., **30**:276~281.
10. Toyama, N. and Ogawa, K. 1972 Utilization of cellulosic wastes by *Trichoderma viride*, Proc. IV IFS: Ferment. Today p. 743~757.
11. 当山清善、保井美恵子 1969 甘蔗バガスの利用に関する研究、第1報 甘蔗バガスの微生物による分解について、琉大農学報、**16**:147~155.
12. 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、第2報 バガス分解カビの分離ならびに酵素的性質、琉大農学報、**19**:279~290.
13. 当山清善、名嘉真昇、与那覇和雄 1975 バガスを炭素源とする糸状菌の培養について、日本農芸化学会西日本支部大会講演(昭和50年10月)、農化 **50**:N10.

Summary

This paper reports the production of a bagasse hydrolyzing enzyme by *Aspergillus awamori* grown on a mineral medium containing sugarcane bagasse as the sole carbon source. The results obtained were as follows:

The enzyme production was investigated with 22 strains of *Asp. awamori*. All of them produced the enzyme in the culture broth of a medium containing alkali-treated bagasse. Among them, *Asp. awamori* IFO 4033 showed the highest production of the

enzyme. In order to find the medium conditions required for the improvement of the enzyme production by this strain, the organism was grown in a medium containing the bagasse treated in various conditions. The best enzyme production was obtained when the organism was grown in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min. A medium containing 1.5–2.0% of the above alkali-treated bagasse gave the best result for the enzyme production.