琉球大学学術リポジトリ

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(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, 保井, 美恵子, Toyama, Seizen, Yasui, Mieko
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4545

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

当山清善*・保井美恵子**

Seizen TOYAMA, Mieko YASUI: Studies on the utilization of sugarcane bagasse
I. On the decomposition of sugarcane bagasse by microorganisms

I 緒　　言

甘蔗糖の製造過程で生産される主な副産物として糖密とバガスがある。これら二つの副産物の利用化を図ることは甘蔗糖製造コストの低減となり重要な課題である。糖密については，これまで多くの利用開発研究が行なわれ，アルコールの製造原料を始め醗酵原料として多方面に利用されている。特に最近台湾において糖密を原料として酵母を大量に生産し高タンパク性の飼料を製造していることが注目される[1,2]。

一方バガスについては甘蔗糖製造工場において直接燃料として使用されるほか，人造板および紙等の製造[10]，あるいはフルフラールの製造原料としてその利用が図られてきた[5,13]。戦後台湾および琉球において，ハードボードおよびパーティクルボードの製造が開始されたが，それに利用されるバガスの量はごくわずかである。

生産されるほとんどのバガスが燃料として使用され，その他への利用の開発が遅れているのは，工場における燃料としての重要性にもよるがバガス自体の化学組成にもよることであろう。すなわち，バガスの組成はその大半がセルロースから成り，残りの大部分はヘミセルローズやリグニンである。この成分は禾本科の藁に近いとされており[10]，バガス自体を一般木材並みに加工して人造板やパルプの原料とすることはその製品の品質上困難とされている。またバガス中のセルロースを純粋に取り出してその製品化を図ろうとする試みもあったが処理工程の問題で実用化の段階に到らなかった[12]。

バガス中の炭水化物を糖化して家畜飼料としての利用，あるいは醗酵糖質原料としての利用を図ることは他の農産副産物の利用開発と共に重要なことである。バガス中の炭水化物，特にその主成分であるセルロースを薬品糖化して利用性の高い糖質原にする試みは戦前台湾においてあった[6,7]。

本研究はバガス中の炭水化物を微生物により分解させて利用性のたかい糖質成分を得ようとするものである。最近，微生物の生産するセルラーゼ（繊維素分解酵素）による天然セルロースの分解に関する研究が盛んに行なわれつつある[14]。またこのセルラーゼを農産物に作用させてその利用性をたかめるための研究も行なわれている[8,16]。バガス中のセルロースをこのセルラーゼにより分解せしめ消化性の高い飼料にしようとする試みもある[4]。従って本報においてはセルラーゼを生産する微生物がバガスを基質として生育繁殖し，バガスを分解するかどうかを調べると共に，バガスの前処理と酵素分解との関係について2，3検討したので報告する。

* 琉球大学農学部農芸化学科
** 琉球石油株式会社

II 実 験 方 法

供試バガス試料：無処理バガスは製糖工場で搾汁直後のバガスを熱風乾燥し，ウィレー氏粉砕機で微粉砕して40メッシュの篩を通したものである。熱水および薬品処理バガスは木材成分抽出処理法[17]に従い次のごとく調製した。

熱水処理バガスは無処理バガス約10gに水1Lを加え120ポンド，20分間加圧蒸煮した後吸引濾過し，温水で濾液が無色透明になるまで洗滌した。この洗滌バガスを80～90°Cで乾燥した。

アルカリ処理バガスは無処理バガス約30gに1%カセイソーダ1Lを加え，湯浴上で1時間加熱後吸引濾過し，濾液が透明になるまで熱水で洗滌，更に1%酢酸液および冷水で洗滌し，70～90°Cで乾燥後微粉砕したものである。

有機溶剤処理バガスはアルコールとベンゾールの混合液(33：67)で80°C，6時間抽出し，溶媒を揮散させ乾燥したものである。

供試菌株：*Trichoderma viride* (IFO 4847) および *Aspergillus niger* (IAM 2094) を使用した。

カビの培養およびその酵素液の調製：フスマ5gをペトリ皿に採り，水5mlを加えよく混合して常法通り殺菌後供試菌株を接種し，30°C，72時間培養した。このフスマコウジを100mlの蒸留水で抽出し，遠心後の上澄液をそのまま粗酵素液として用いた。バガス添加のフスマ培養はフスマ3gにバガス1gを加え，水7ml加えて以下同様に培養した。

酵素反応：大型試験管 (2.5×20cm) にバガスを入れ，0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5～5.0) を加え10分間煮沸し，冷却後酵素液を加え時々振とうしながら40°Cで反応を行なった。後10分間煮沸して反応を止め，冷却濾過した。この濾液について，Hanes 法[18]で還元糖を測定した。バガスの分解活性は酵素液添加直後煮沸したブランク値を酵素反応後の値から差引き増加したグルコースmg数で示した。なお，長時間反応を行う場合には反応液にトルエンを添加した。

供試メイセラーゼおよびセルラーゼ製剤：メイセラーゼは明治製菓K.K.のLot No. 2004，セルラーゼは東京化成工業のLot No. 261241である。

反応液のペーパークロマトグラフィー：酵素反応液0.05mlを東洋濾紙No. 51にスポットし，ブタノール：酢酸：水 (4：1：5) の溶媒で展開後，アニリンフタレートで常法通り発色させた。

III 実 験 結 果

1. バガスの還元糖

無処理バガスと熱水処理バガス中の可溶性糖分を測定した。その結果は第1表に示す通り無処理バガス中には還元糖として8.5%含まれ，加圧蒸煮するとわずかに溶出糖分が増加した。一方バガスを

Table 1. Effect of the heat-water treatment on the elution of reducing sugar from bagasse.

Bagasse		Reducing sugar (%)
untreated bagasse	A	8.50
〃 〃	B	8.86
heat-water treated bagasse	A	0
〃 〃	B	0.42

A: cold water soluble
B: boiling water soluble

熱水処理することによって可溶性糖分は完全に除かれ，それを更に加圧蒸煮しても 0.42% の糖分が溶出するだけであった。

2. バガスへの糸状菌の生育

バガスに微生物が生育するかどうかを知るため *Asp. niger* を用い生育状態を観察した。その結果は第2表に示した。無処理のバガスにはよく生育するが，熱水処理したバガスには全く生育しなかった。これはバガスを熱水処理することにより微生物が要求する養分，すなわち糖分は勿論のこと窒素源やその他の成分が除去されるためである。熱水処理したバガスに窒素源として硫安を加えると無処理バガスより遅いが生育が観察された。

Table 2. Growth of *Asp. niger* on bagasse.

Bagasse	Culture days				
	2	3	4	6	9
untreated bagasse	++++	++++	++++	++++	++++
heat-water treated bagasse	−	−	−	−	−
〃 〃 〃 + $(NH_4)_2SO_4$	−	+	++	+++	+++

* Growth, relatively observed by spore production.

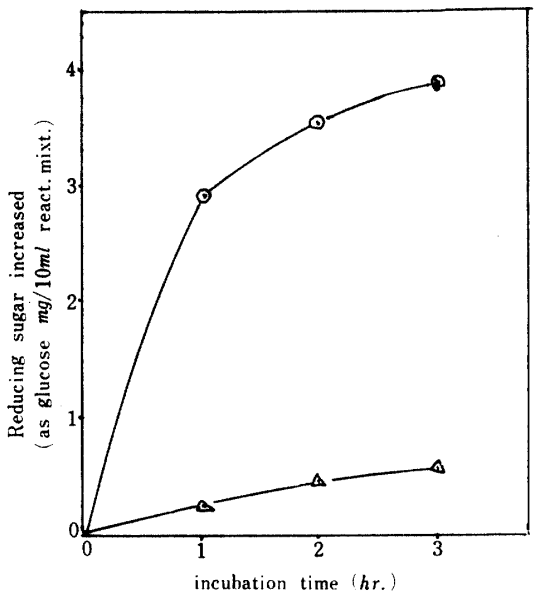

Fig. 1 Decomposition of heat water and NaOH-treated bagasse by the crude enzyme solution from *Asp. niger*.
Reaction mixture : crude enzyme solution 10*ml*, bagasse 500*mg*, acetate buffer 40*ml*.
○—○ NaOH-treated
△—△ heat water-treated

3. 酵素によるバガスの分解

第2表で熱水処理したバガスに窒素源を加えると糸状菌が生育することが明らかになった。このことは微生物の分泌する酵素によってバガス中の成分が分解され，糸状菌の生育に利用されたことを示している。バガスの成分は前にも記したとおりセルロースがその大半を占めているので，このセルロースの分解が一応考えられる。従ってセルロースの分解活性が強いとされている[15] *T. viride* および *Asp. niger* の粗酵素液を用いてバガスを基質とした場合の還元糖の増加を調べた。

(1) 粗酵素液による熱水処理バガスとアルカリ処理バガスの分解

Asp. niger を固体培養し水抽出した粗酵素液を用いてバガスに作用させた場合の還元糖の増加を調べた結果が第1図である。図から明らかのように，熱水処理バガスは還元糖の増加がわずかながら見られるが，バガスを1%カセイソーダで処理することにより還元糖の増加が著しくたかくなることが明らかになった。

(2) バガスの各種抽出処理と酵素分解との関係

第1図でバガスをアルカリ処理することにより *Asp. niger* の粗酵素液で還元糖の増加が著しいことが判った。次に一般に木材成分抽出処理に適用されている冷水，熱水，有機溶剤およびアルカリ処

Table 3. Decomposition of treated bagasses by the crude enzyme solution from *Asp. niger*.

Bagasse	Reducing sugar increased (glucose *mg*/25 *ml* react. mixt.*)
cold water treated bag.	1.1
heat-water treated bag.	1.3
organic solvent treated bag.	1.9
NaOH-treated bag.	27.1

* Reaction mixture: crude enzyme solution 5 *ml*, bagasse 100 *mg*, acetate buffer (pH 4.5) 20 *ml*. The reactions were carried out at 40°C for 3 hours.

理等の各処理をしたバガスの *Asp. niger* の粗酵素液による還元糖の増加を調べた。その結果は第3表に示すとおりである。表から明らかのように，冷水，熱水および有機溶剤処理したバガスの還元糖の増加はごくわずかであるが，アルカリ処理したバガスではその増加が著しくたかい。

(3) *Asp. niger* および *T. viride* の粗酵素液によるアルカリ処理バガスの分解

Asp. niger および *T. viride* を固体培養して得た粗酵素液を用いてアルカリ処理したバガスを基質とした場合の還元糖の増加を調べた。その結果は第2図に示した。粗酵素液を用いているので両菌株の酵素活性を厳密に比較することは出来ないが，本実験条件下では *Asp. niger* の方が *T. viride* より高い還元糖の増加を示した。

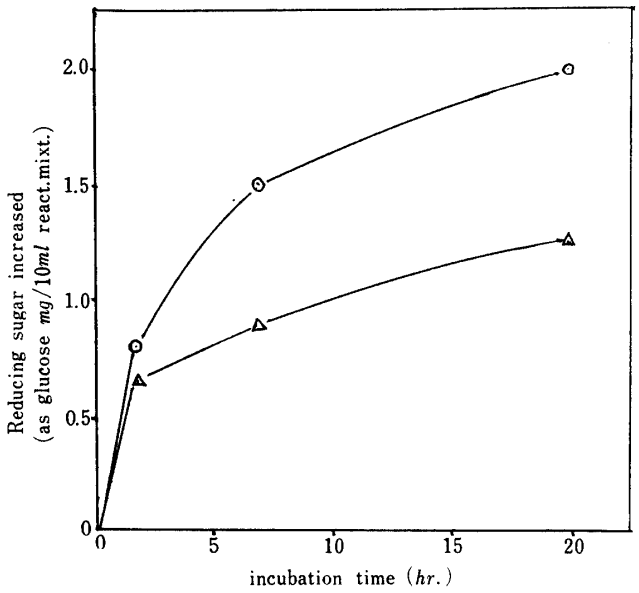

Fig. 2 Reducing sugar increased by the crude enzyme solution from *Asp. niger* and *T. viride*.

Reaction mixture : crude enzyme solution 15 *ml*, NaOH-treated bagasse 300 *mg*, acetate buffer 45 *ml*.

○—○ *Asp. niger* △—△ *T. viride*

4. メイセラーゼによるアルカリ処理バガスの分解

アルカリ処理バガスに *Asp. niger* および *T. viride* の粗酵素液を作用させると還元糖が著しく増加することが判ったので市販されているセルラーゼ標品メイセラーゼによる還元糖の増加を調べた。

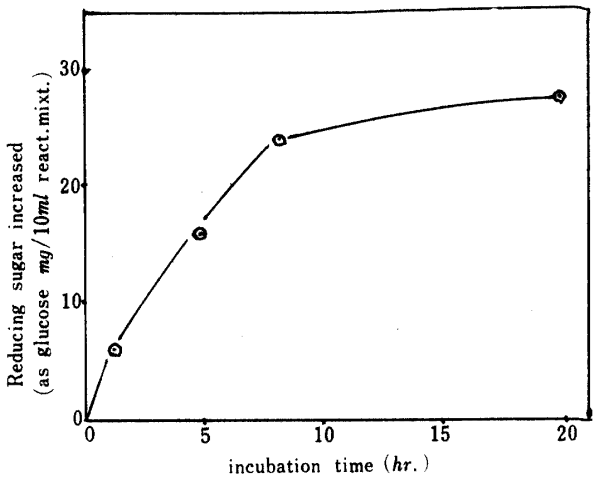

Fig. 3 Decomposition of NaOH-treated bagasse by Meiselase.
Reaction mixture : 2% Meicelase solution 25*ml* bagasse 50 *mg*, acetate buffer 7.5 *ml*.

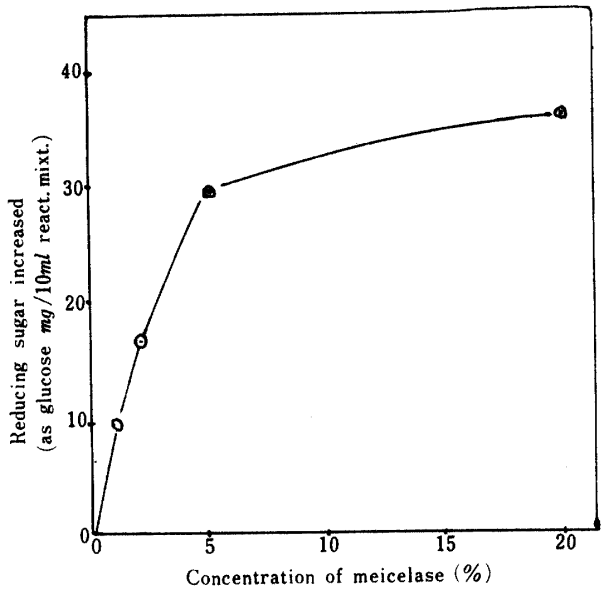

Fig. 4 Effect of Meicelase concentration on the reducing Sugar increased.
Reaction mixture : Meicelase 2.5 *ml*, NaOH-treated bagasse 50mg, acetate buffer (pH 4.5) 7.5 *ml*.
The reaction was carried out at 40°C for 4 *hrs*.

このメイセラーゼは *T. viride*, 又は *T. Koningi* の培養で得られた強力な植物繊維分解作用のあるものだとされている[11]。第3図に示すとおり，アルカリ処理バガスはメイセラーゼによっても還元糖の増加がある。また還元糖の増加とメイセラーゼ濃度との関係を示したのが第4図である。第4図から明らかのようにメイセラーゼ濃度5%までは還元糖の増加は直線的であり，それ以上の濃度ではその増加はゆるやかであった。

5. メイセラーゼおよびセルラーゼ製剤によるアルカリ処理バガスの分解

植物繊維分解活性の強いとされているメイセラーゼによってアルカリ処理バガスは分解されることが判ったのであるが，セルラーゼ（繊維素分解酵素）単一を含む製剤で還元糖の増加があるかどうかを調べてみた。その結果は第4表に示すとおり，セルラーゼ製剤によるアルカリ処理バガスと熱水処理バガスの還元糖の増加はほとんど差がみられなかった。

Table 4. Decomposition of heat water- and NaoH-treated bagasse by meicelase and cellulase.

Bagasse	Reducing sugar increased (glucose mg/10 ml react. mixt.)	
	meicelase*	cellulase**
heat water treated bag.	7.2	6.6
NaOH-treated bag.	17.1	7.6

*** Reaction mixture; 2% meicelase 2.5 *ml*, bagasse 50 *mg*, acetate buffer 7.5 *ml*. Cellulase 10 *mg*, bagasse 50 *mg*, acetate buffer 10 *ml*.
The reactions were carried out at 40°C for 4 hours.

6. アルカリ処理バガスの酵素分解物のペーパークロマトグラフィー

供試糸状菌の粗酵素液およびメイセラーゼをアルカリ処理バガスに作用させた場合還元糖が増加することが明らかになかったので，生成した糖を定性的に知るため，反応液のペーパークロマトグラフィーを行なった。酵素反応に *T. viride* の粗酵素液を用いて行なった結果は第5図に示すとおりである。図から明らかのように，反応時間と共にグルコースのスポットの発色が著しく強くなった。こ

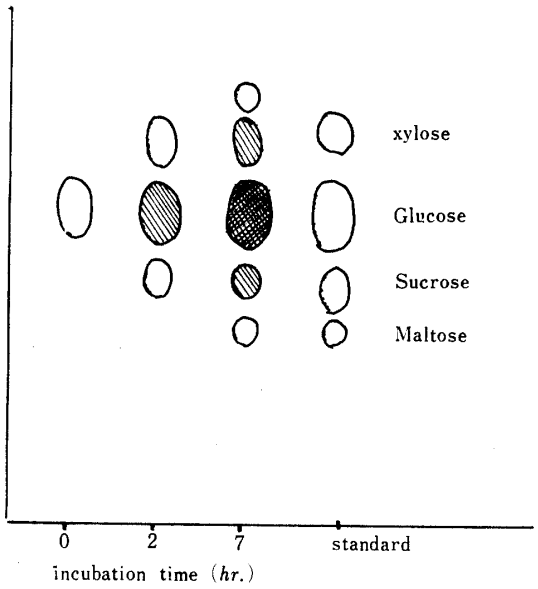

Fig. 5 Paper chromatography of reaction mixture.
Reaction mixture : crude enzyme sclution of *T. viride* 15*ml*, NaOH-treated bagasse 300 *mg*, acetate buffer 45 *ml*.
The reaction was carried out at 30°C.

のことは反応中における還元糖の増加はグルコースを主体としたその他の成分の増加であることを示している。グルコース以外のスポットのRf値はわずかながら違い，また供試標準糖の種類が少ないため，どれに相当するか判然としないので今後検討したい。

IV 考　　察

甘蔗糖製造工場より廃出したバガスをそのまま放置しておくと短期間(3日目位)で糸状菌を始めとする一般の微生物の繁殖するのが観察されるのは常に経験することである。このバガスにはまだ蔗糖として2〜6%位残っており微生物の生育に必要なその他の成分も豊富に存在するので，何も添加しなくても微生物はよく生育する（第2表)。しかしこれら栄養分，特に糖分が消費しつくされると最早微生物の生育繁殖は進行しなくなる。このことはバガスを長期間放置しても完全には腐敗しないことを意味している。もし遊離の糖以外のバガス成分を分解利用し得る微生物があればバガスの腐敗は進行するであろう。バガスに含まれる遊離の糖分は熱水処理することによりほとんど完全に除去出来る(第1表)。この熱水処理バガスを基質としてセルラーゼ力の強いといわれている糸状菌の粗酵素液を作用させた場合，還元糖の増加は微少であった。一方，アルカリ処理したバガスを基質とすると還元糖の増加が著しくたかめられた(第1図)。木材成分抽出処理に適用されているその他の方法で処理した場合は還元糖の増加はみられなかった（第3表)。一般に冷水，熱水およびアルカリ処理することにより木材の場合と同じく[17]バガス中のでんぷん，マンナンおよびガラクタン等の炭水化物，色素，タンニン，アルカロイド，油脂，ろう質物，精油およびリグニンの一部が抽出除去される。アルカリ処理バガスにおける還元糖の増大はバガス中のこれらの諸成分を除去することによって酵素作用を容易にしたためと考えられる。このことは低濃度のアリカリで処理すると還元糖の増加は相対的に低くなることからも言える。更に酵素反応の時間と共に還元糖の増加がみられるので（第1〜3図）基質であるバガスの分解であることは明らかであるが，バガス中のどの成分が分解されたかは明らかではない。反応液のペークロによる定性ではグルコースが主体をなし，その他の成分（たぶんペントース類）も検出された（第5図)。供試したメイセラーゼ粉末はセルラーゼの他に各種の酵素を含有している[11]。従ってどの酵素がバガスに作用したかどうかは明らかでないので今後検討るす必要がある。事実メイセラーゼではアルカリ処理バガスが熱水処理バガスに比較して還元糖の増加は著しいが，市販セルラーゼ製剤ではほとんどその差はみられなかった（第4表)。一般に天然セルロースの酵素分解は各種酵素の相乗作用で促進されると考えられているので[19,20]セルラーゼ単一酵素で還元糖の増加がみられないということはこのことを示しているかも知れない。バガスの前処理と酵素分解との関係を更に検討すると共に，どの酵素が作用するかについて今後検討したい。本実験でバガスを前処理することにより酵素分解を受けることが明らかになったのであるが，用いたバガスに対する増加した還元糖の比率は低い。今後更に天然植物繊維素分解力の強い菌株を検索する必要がある。

本実験は1966年から1967年始めにかけて行なわれたものであるが，最近HAN等(1968)[8]は本実験結果と同じくアルカリ及び熱処理したバガスが細菌セルラーゼにより分解性がたかめられることを報告している。またKATZ等(1968)[9]は木材セルロースが粉砕及び熱処理することによりセルラーゼにより分解性がたかめられブドウ糖の生産が可能であることを報告している。このようなことから天然セルロースを微生物酵素により分解せしめようとする場合には酵素作用をさせる前に化学的或は物理的手段による前処理が必要であろうと考えられる。

V 要　　約

糸状菌がバガスを基質として繁殖(生育)し，バガスを分解するかどうかを調べ，バガスの前処理と酵素分解との関係について検討した結果以下のことが明らかになった。

1) 糸状菌は無処理のバガスによく生育繁殖するが，バガスを熱水処理して可溶性成分を除去するとその生育はなかった。

2) 熱水処理バガスに *Asp. niger* および *T. viride* の粗酵素液を作用させると分解（還元糖の増加）はわずかであるが，アルカリ処理したバカスはその分解が著しくたかめられた。酵素反応で生成された糖として，グルコースを主体としたその他の糖類が定性的に確認された。

3) アルカリ処理バガスは市販の植物繊維分解活性の強いメイセラーゼによって分解されたが，セルラーゼ製剤ではその分解は低かった。

最後に供試菌株を御分与して下さった武田醱酵研究所，メイセラーゼを御恵与下さった京都大学化学研究所左右田健次助教授に感謝致します。バガス原料を提供して下さった中部製糖 K.K.，本実験に御便宜を図って下さった琉大農化鎮西忠茂教授，宮里興信助教授に深謝します。

参　考　文　献

1) Chien, H. C. 1960. Free china's big protein project. Food Eng. **32** : No. 12.
2) Chien, H. C. 1960. A food yeast plant in formosa. Food Manuf. **35** : No2.
3) Han, Y. W. and Srinivasan, V. R. 1968. Isolation and charecterization of a cellulose-utilizing bacterium. Applied Microbiol. **16** : 1140.
4) 七字三郎 1965. 微生物利用の将来. 化学と生物. **3** : 638.
5) 市野一磨 1941. 溶剤によるフルフロールの抽出に就いて. 醸造 **19** : 453.
6) 市川信敏，山下武夫，葉煩賢，加野充彦 1941. 塩酸によるバガス中のペントザン除去に就いて. 工化 **44** : 797.
7) 市川信敏，山下武夫，加野元彦，蔀節雄，内田貞二 1944. バガスより酒精製造に関する研究. 工化 **47** : 27.
8) 今井豊彦，黒田彰夫 1966. Cellulase による植物細胞の分解. 発工 44 : 854.
9) Katz N. and Reese E. T. 1968. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. Applied Microbiol. **16** : 419.
10) 加藤晴治 1950. バガス繊維及其利用 碩学書房.
11) 明治製菓 KK 繊維分解酵素メイセラーゼ.
12) 大島康義，原毅，小林克己 1945. バガスよりフルフロール製造に関する研究. 第 2 報 溶出液よりフルフロール製造並に残渣より製造せるパルプの二，三の性質 農化 **20** : 43.
13) 大島康義，原毅，小林克己 1944. バガスよりフルフロール製造に関する研究. 第 1 報 塩化物水溶液特に苦汁によるペントザンの溶出並其の残渣の性質 農化 **19** : 897.
14) 小川喜八郎，外山信男 1963. 市販セルレース製剤による天然セルロースの分解について 発工 41 : 282.
15) 小川喜八郎，外山信男 1965. *Trichoderma viride* cellulolytic complex について 第 2 報 各種 Cellulase 成分とそれらの植物細胞壁分解性 発工 **43** : 661.
16) 高喬礼治，小島隆寿，吉村健吉 1966. セルレースを用いる殻類澱粉の製造 発工 **44** : 842.
17) 東京大学農学部編 1965. 林産化学実験書 95 産業図書.
18) 当山清善，宮里興信 1967. Studies on Asp. awamori (II). On some of the properties of amylase and protease of *Asp. awamori* isolated from awamori breweries. 琉球大学農学部学術報告. **14** : 161.
19) 丹羽富造，西沢一俊 1965. Cellulase 研究の最近の動向. 発協 **23** : 485.
20) Wood, T. M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma Koningii*. Separation of components attacking native cotton. Biochem. J. **109** : 217.

Summary

The experimental work reported here was carried out to investigate the growth of molds on sugar-cane bagasse and the decomposition of the bagasse with the crude enzyme solution derived from the molds *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*, and a cellulase preparation. The results obtained were as follows;

1) *Asp. niger* grew well on untreated-bagasse, but did not on heat water treated bagasse which was not contained reducing sugar.

2) With the crude enzyme solutions from *Asp. niger* and *T. viride*, NaOH treated-bagasse was highly decomposed compared with heat water-treated bagasse was. The substances produced after the enzyme reaction was done were detected as glucose and other sugar compounds.

3) NaOH treated-bagasse was also decomposed with a cellulase preparation, Meicelase, but was not with a purified cellulase preparation.