

ササ稈の触媒添加蒸煮物の酵素糖化

津田真由美 関 一人 青山 政和

Acid - Catalyzed Steaming Treatment for the Enzymatic Hydrolysis of Bamboo Grass Culms

Mayumi TSUDA Kazuto SEKI Masakazu AOYAMA

Keywords : catalyzed steam treatment, acid catalysts, cellulase, polysaccharides, *Sasa senanensis* Rehd.

水蒸気蒸煮法, 酸触媒, セルラーゼ, 多糖類, クマイザサ

1. はじめに

ササ (*Bambusoideae*) は木化した稈をもつ多年生の草本類であり, 日本, 済州島, 千島列島, 樺太南部に広く分布している。これらササ類は蓄積量が膨大であり, 生長も速いことから, 重要な森林バイオマスの一つと考えられている。ササ稈の化学組成は広葉樹材のそれに類似しており, 経済的に有効な多糖類の分離法が確立すれば, 化成品や家畜飼料の原料として利用可能である¹⁻³⁾。

リグノセルロースの主要成分の分離には, 水蒸気蒸煮法が有効な前処理法である。この処理によって, ヘミセルロースの大部分が水に可溶となり, 蒸煮物中のセルロースはセルラーゼによって加水分解されやすくなる。最近, 蒸煮処理前に木材チップを低濃度の酸触媒に浸せきすると, ヘミセルロース中の糖の回収率が増加するとともに, 蒸煮物中のセルロースの酵素加水分解が改善されると報告されている⁴⁻¹⁰⁾。これまでに林産試験場では, クマイザサ稈を原料とした水蒸気蒸煮法によるキシロオリゴ糖の分離抽出とその抽出残さの酵素糖化について検討している。その結果, 酵素糖化率には蒸煮温度, 蒸煮時間, 蒸煮原料の初期含水率が影響を与え, 80%以上の酵素糖化率を達成させるには, 蒸煮時間10分間では200 以上の高温蒸煮が必要であることを報告し

ている³⁾。最近, 著者らはクマイザサ稈からのキシランの可溶化には触媒添加蒸煮法が有効であり, 酢酸, 塩化鉄()および塩化カルシウムを添加するとキシロースの分解, 消失が比較的少なく, キシランの可溶化および低分子化に有効であることを明らかにした¹¹⁾。本報では, クマイザサ稈を触媒添加蒸煮法により処理し, 得られたキシラン抽出残さの酵素糖化率を検討した。

2. 材料と方法

2.1 試料調製

下川町管内の国有林内にて, クマイザサ (*Sasa senanensis* Rehd.) の稈部を採取した。風乾した稈部はハンマーミルで粗砕した。なお, 1mmのふるいを通過したものは除去した。キシランの加水分解を改善させるため, ササ稈部粗砕物は定法 (JIS P 8005 - 1959) で熱水抽出後²⁾, 1週間風乾し, 蒸煮に供した。

2.2 触媒添加蒸煮処理

試料1kgに対して触媒量が5~30mmolになるように触媒水溶液または蒸留水(触媒無添加)を噴霧し, 2日間冷蔵した。なお, 用いた触媒は, 塩化アルミニウム, 硫酸アルミニウム, 塩化鉄(), 塩化カルシウム, 塩化アンモニウム, 硫酸アンモニウム, 酢

酸，無水マレイン酸，無水コハク酸，無水フタル酸であり，それぞれの蒸煮試料は含水率が40%になるように調整した。

触媒添加および無添加試料をオートクレーブ中で197（15kgf/cm²）の飽和水蒸気で，10分間処理した。蒸煮物は風乾後，ウイレーミルで1mm以下に粉碎し，分析試料とした。塩化アンモニウムと硫酸アンモニウムは中性であるが，その水溶液は温度の上昇に伴って，アンモニアの気化により強い酸性を示す⁶⁾。

2.3 酵素糖化

蒸煮試料を前述と同様に熱水抽出した。その後，熱水抽出残さを風乾後ふるいにかかけ，32mesh通過部を糖化試料とした。

市販のセルラーゼ（Meicelase - P，明治製菓，*Trichoderma viride*由来）50mg，糖化試料0.2gを0.1M酢酸緩衝液（pH4.8，10ml）中で40℃，48時間振とうした。糖化後の還元糖量をsomogyi法¹²⁾に従って定量し，糖化率を算出した。蒸煮物の熱水抽出物も同様に酵素糖化した。

2.4 リグニンの定量

Klasonリグニン量はEffland¹³⁾の方法で定量した。

3. 結果と考察

3.1 蒸煮収率におよぼす触媒添加効果

蒸煮収率への各触媒の影響を第1表に示す。触媒無添加の場合，蒸煮収率は絶乾原料の85.4%であり，蒸煮物の約25%がキシロースおよびキシロースオリゴマーとして回収された。酸触媒を添加すると添加量の増加にともない蒸煮収率は減少した。ルイス酸である塩化アルミニウム，硫酸アルミニウム，塩化鉄を添加した蒸煮物の熱水抽出残さにはキシロースは検出されず，ヘミセルロースが完全に分解溶出していることを示唆している。蒸煮収率の減少はおもに触媒添加蒸煮処理によって生成した可溶性キシランフラグメントの熱分解によるものと考えられる。

3.2 蒸煮物熱水抽出残さ繊維の酵素糖化率

ササ蒸煮物の熱水抽出残さを市販のセルラーゼに

より酵素分解した。197℃で蒸煮後熱水抽出した残さ繊維の酵素糖化率を第1表に示す。触媒無添加の蒸煮物を熱水抽出することにより，キシロースとキシロースオリゴマーの混合物としてヘミセルロースの21.5%が回収されたが，酵素糖化後も残さ繊維には40%の糖が残っていた。

触媒添加蒸煮処理では，蒸煮物の酵素糖化率は著しく改善した。塩化カルシウム，酢酸，無水マレイン酸，無水コハク酸を除いて，5mmolの触媒添加によって，酵素糖化率は85%以上に達した。塩化鉄と硫酸アンモニウムでは5mmolの添加により，残さ繊維中の多糖類がほぼ完全に加水分解された。しかし，これらの触媒の中には添加濃度が増加すると，糖化率が減少するものがあった。これは，より高濃度の触媒の添加によって，蒸煮処理の間に糖の2次変化が起こったためと考えられる。また，糖化率が高かった熱水抽出残さのリグニン含有量は，触媒無添加で蒸煮したものとほぼ同じであり，リグニン含有量と酵素糖化率との関連は認められなかった。

有機酸を添加した場合は，触媒添加効果は認められたが，ルイス酸と比較するとその効果は小さかった。Rughaniら⁹⁾が報告したように，有機酸の中では無水マレイン酸と無水フタル酸が効果的であった。しかし，これらの触媒では30mmol添加しなければ，90%以上の糖化率が得られなかった。

最近，著者らは，触媒添加蒸煮法によるササキシランの可溶化を検討し，塩化カルシウムを添加すると，蒸煮温度191℃，蒸煮時間10分間でキシランが高収率で回収されることを報告した¹¹⁾。しかし，この条件で蒸煮した残さ繊維の糖化率は42～48%の範囲であり，十分な糖化は得られなかった。

3.3 蒸煮物熱水抽出物の酵素糖化率

触媒添加蒸煮物の熱水抽出物をセルラーゼにより酵素分解した。熱水抽出物の糖化率を第1表に示す。熱水抽出物は，残さ繊維と比較して酵素糖化率が低かった。Mes - HartreeとSaddler¹⁴⁾は，爆砕処理した麦稈とアスペンチップには - グルコシダーゼ活性阻害物が存在するが，簡単な水抽出により除去できると報告している。したがって，水抽出物の酵素糖化率が低いのは糖の熱分解生成物や蒸煮処理によ

第1表 ササ稈部蒸煮物の蒸煮収率と酵素糖化率への触媒添加効果

Table 1. Effect of asid catalysts on the recovery yield and enzymatic hydrolysis of steamed bamboo grass (Sasa senanensis Rehd.) culms.

| 触媒 Catalyst | 蒸煮収率 Yield (%) ^{a)} | | リグニン Lignin (%) ^{b)} | 還元糖の収率 Yield of reducing sugars (%) ^{c)} | 酵素糖化率 Enzymatic hydrolysis (%) | | |
|---|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---|--|---|-------|
| | 蒸煮物 steamed solid | 熱水 抽出物 Water extract | | | 熱水抽出 残さ Extracted residue ^{d)} | 熱水抽出物 Water extract ^{e)} | |
| 無 添 加 uncatalyzed | | 85.4 | 27.5 | 33.2 | 78.1 | 60.7 | 56.7 |
| | 5 ^{f)} | 74.0 | 21.6 | 28.1 | 80.9 | 86.7 | 61.9 |
| 塩化アルミニウム AlCl ₃ | 10 | 69.0 | 19.0 | 29.9 | 76.7 | 92.2 | 71.3 |
| | 20 | 66.1 | 17.9 | 29.6 | 66.2 | 100.0 | 53.8 |
| | 30 | 57.3 | 11.6 | 28.7 | 59.2 | 99.3 | 56.6 |
| | | 5 | 74.1 | 19.5 | 26.8 | 80.0 | 85.9 |
| 硫酸アルミニウム Al ₂ (SO ₄) ₃ | 10 | 66.5 | 14.3 | 27.9 | 69.9 | 97.5 | 63.4 |
| | 20 | 64.6 | 13.1 | 26.4 | 57.8 | 69.9 | 48.7 |
| | 30 | 59.8 | 11.9 | 28.1 | 44.3 | 75.3 | 60.6 |
| | | 5 | 76.3 | 20.3 | 27.4 | 71.3 | 100.0 |
| 塩 化 鉄 (III) FeCl ₃ | 10 | 70.9 | 19.0 | 28.0 | 72.0 | 93.9 | 63.9 |
| | 20 | 67.7 | 20.4 | 29.6 | 73.6 | 94.2 | 62.6 |
| | 30 | 66.3 | 15.1 | 29.3 | 71.4 | 71.6 | 74.5 |
| | | 5 | 77.0 | 23.5 | 29.3 | 78.1 | 81.8 |
| 塩化カルシウム CaCl ₂ | 10 | 75.4 | 22.6 | 29.1 | 75.1 | 90.9 | 60.8 |
| | 20 | 76.0 | 23.3 | 30.1 | 76.8 | 95.6 | 62.9 |
| | 30 | 73.8 | 21.4 | 30.7 | 78.2 | 86.3 | 68.5 |
| | | 5 | 75.0 | 23.7 | 30.8 | 76.1 | 88.0 |
| 塩化アンモニウム NH ₄ Cl | 10 | 74.3 | 24.5 | 31.0 | 78.9 | 89.0 | 73.2 |
| | 20 | 74.6 | 23.4 | 30.2 | 80.9 | 99.8 | 72.6 |
| | 30 | 73.2 | 22.7 | 30.7 | 85.4 | 91.8 | 73.1 |
| | | 5 | 73.8 | 21.4 | 29.3 | 77.8 | 97.9 |
| 硫酸アンモニウム (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 | 73.4 | 22.4 | 28.9 | 80.2 | 100.0 | 74.3 |
| | 20 | 73.0 | 21.9 | 28.0 | 78.6 | 95.3 | 80.6 |
| | 30 | 72.3 | 23.1 | 29.5 | 79.6 | 92.9 | 83.7 |
| | | 5 | 76.0 | 25.9 | 29.6 | 79.6 | 76.7 |
| 酢 酸 Acetic acid | 10 | 75.3 | 25.4 | 29.6 | 75.3 | 78.1 | 60.3 |
| | 20 | 75.5 | 25.7 | 31.1 | 70.1 | 86.8 | 68.0 |
| | 30 | 74.0 | 24.8 | 30.6 | 73.0 | 89.9 | 71.3 |
| | | 5 | 79.6 | 24.2 | 29.9 | 86.0 | 66.2 |
| 無水マレイン酸 Maleic anhydride | 10 | 78.4 | 23.2 | 29.2 | 76.5 | 83.5 | 62.8 |
| | 20 | 79.1 | 23.0 | 29.9 | 74.1 | 72.9 | 71.5 |
| | 30 | 76.8 | 22.0 | 28.3 | 72.1 | 93.2 | 81.7 |
| | | 5 | 77.6 | 23.6 | 30.4 | 75.1 | 64.7 |
| 無水コハク酸 Succinic anhydride | 10 | 76.0 | 23.6 | 29.3 | 75.3 | 74.3 | 56.8 |
| | 20 | 76.2 | 24.0 | 28.8 | 71.2 | 67.8 | 72.5 |
| | 30 | 74.6 | 23.0 | 28.2 | 75.9 | 65.9 | 57.2 |
| | | 5 | 78.9 | 23.4 | 29.0 | 79.1 | 87.4 |
| 無水フタル酸 Phthalic anhydride | 10 | 76.6 | 25.4 | 31.0 | 79.5 | 85.9 | 68.8 |
| | 20 | 75.8 | 25.1 | 31.2 | 71.6 | 92.3 | 78.4 |
| | 30 | 75.2 | 24.2 | 29.8 | 74.4 | 97.0 | 78.5 |

注) : a) 絶乾原料に対する割合, b) : 蒸煮物の熱水抽出残さに対する割合, c) : 蒸煮物の熱水抽出物に対する割合, d) : 蒸煮物の熱水抽出残さ中の糖に対する割合, e) : 熱水抽出物中の糖に対する割合, f) : 試料1kgに対する触媒添加量 (mmol)
 Notes : a) : Based on oven - dried original material ; b) : Based on steamed, extracted residue ; c) : Based on water extract ; d) : Based on polysaccharides in steamed, extracted residue ; e) : Based on polysaccharides in water extract ; f) : Added amount (mmol)

て生成した低分子フェノールの影響と考えられる¹⁵⁾。

4. まとめ

クマイザサ稈を触媒添加蒸煮し、その熱水抽出物と熱水抽出残さの酵素糖化率を検討した。触媒添加蒸煮処理後の酵素糖化により、ササ原料中の多糖類の60～70%（対絶乾重量）が可溶性糖として回収された。この結果、触媒添加蒸煮処理はササ稈の糖類を利用するための優れた前処理方法であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 石井 忠, 田中治郎: 木材学会誌, **30**(3), 230-236 (1984).
- 2) Aoyama, M. ; Seki, K. ; Saito, N. : *Holzforschung* , **49**, 193-196 (1995).
- 3) Aoyama, M. : *Cellulose Chem. Technol.* , **30**, 385-393 (1996).
- 4) Mackie, K. ; Brownell, H. H.; West, K. L. ; Saddler, J. N.: *J. Wood Chem. Technol.* , **5**, 405-425 (1985).
- 5) Brownell, H. H. ; Yu, E. K. C. ; Saddler, J. N.: *Biotechnol. Bioeng.* , **28**, 792-801 (1986).
- 6) Sudo, K. ; Shimizu, K. ; Ishii, T. ; Fujii, T. ; Nagasawa, S. : *Holzforschung*, **40**, 339-345 (1986).
- 7) Clark, T. A. ; Mackie, K. L. : *J. Wood Chem. Technol.* , **7**, 373-403 (1987).
- 8) Rughani, J. ; Wasson, L. ; McGinnis, G. : *J. Wood Chem. Technol.* , **10**, 515-530 (1990).
- 9) Rughani, J. ; Wasson, L. ; Prewitt, L. ; McGinnis, G. : *J. Wood Chem. Technol.* , **12**, 79-90 (1992).
- 10) Ramos, L. P. ; Breuil, C. ; Kushner, D. J. ; Saddler, J. N. : *Holzforschung* : **46**, 149-154 (1992).
- 11) 関 一人ほか4名: 林産試験場報, **11**(5), 13-17 (1997).
- 12) Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.* , **195**, 19-23 (1952).
- 13) Effland, M. J. : *Tappi*, **60**, 143-144 (1977).
- 14) Mes-Hartree, M. ; Saddler, J. M. : *Biotechnol. Lett.* , **5**, 531-536 (1983).
- 15) Buchert, J. ; Puls, J. ; Poutanen, K. : *Appl. Biochem. Biotechnol.* , **20**, 309-318 (1989).

- 利用部 成分利用科 -

(原稿受理 : 98.4.9)