

再資源化材料としての稲わらの有効利用に関する検討

— 稲わらの酵素糖化 —

南 直樹・平野 譲・大野 勝之*

Keywords: 稲わら; 酵素糖化; アルカリ処理; 脱リグニン; グルコース.

1 はじめに

稲わらは、新潟県の代表的な農産廃棄物であるが、セルロースやヘミセルロースなどの有用物質が多く含まれていて、廃棄物の再資源化材として有効な価値があると言える。しかし、現状はほとんど利用されていない。新潟県では、有機物施用による「土づくり」の観点などから、すき込みによる土壌還元を指導、奨励¹⁾しているが、その煩わしさなどから、積極的には行われていない。そこで、稲わらを未利用資源の再資源化材料と位置づけ、稲わらに含まれるセルロースやヘミセルロースなどの多糖から、グルコースやキシロースなどの単糖を生成するための基礎的な検討を行った。

稲わらはセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどから構成されており、セルロースからはグルコース、ヘミセルロースからはキシロースを生成することができる。糖化酵素を用いると、穏やかな反応で単糖を生成することができる²⁾。しかし、稲わらを酵素糖化する場合、稲わらに糖化酵素をそのまま作用させても反応は進行しにくい。それは、糖化基質であるセルロースなどの多糖成分を取り囲むようにリグニンなどが存在しており、酵素糖化を阻害するためといわれている³⁾。そこで、糖化基質をリグニンから引き離す処理（以下、「脱リグニン処理」という）をしなければならない。この脱リグニン処理方法として、アルカリ溶液法³⁾、爆砕法⁴⁻⁶⁾、マイクロウェイ法⁷⁾などが知られている。ここでは、脱リグニン法として、高価な装置などを必要としないアルカリ溶液法を用い、市販のセルラーゼにより稲わらの糖化が可能か検討した結果について報告する。

2 方 法

2.1 稲わらからの酵素糖化による単糖の生成

稲わらから単糖を生成するプロセスは図1の通りである。以下に各プロセスに従って方法を述べる。

2.1.1 稲わらの調整（細分及び乾燥）

アルカリ処理を容易にするため、風乾した稲わらを鋏で約15mm程度に裁断し、ミキサーにかけて細分した。その後105℃、4時間乾燥し、水分を除去した後、実験試料（以

下「乾燥稲わら」という）とした。

2.1.2 アルカリ処理

乾燥稲わら40gを11耐熱ガラス容器に入れ、水酸化ナトリウム溶液400ml（濃度；0.1, 0.5, 1.0, 2.0%）を加えて混合した後、オートクレーブで加圧加熱（処理温度；121℃、処理時間；30, 60分）した。冷却後、孔径1μmのガラスフィルター（以下孔径は同じ）で吸引ろ過し、洗浄液が中性（pH7）になるまで純水を用いて洗浄した後、ガラスフィルター上の稲わらは、105℃で2日間乾燥し、酵素糖化用試料（以下「処理稲わら」という）とした。

また、3.2.2に示すとおり、物質収支を求めるため、ろ液84mlに対し72%硫酸3mlを加え、オートクレーブで121℃、1時間加圧加熱して多糖類を単糖に分解し、放冷後、2%水酸化ナトリウム溶液で中和し、定容後単糖分析に供した。

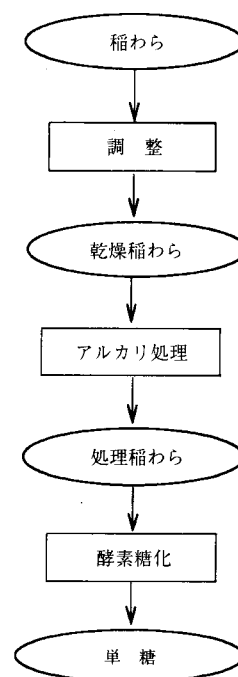


図1 単糖の生成プロセス

表1 アルカリ処理条件

| | |
|------------|--------------------|
| アルカリ溶液 | 水酸化ナトリウム溶液 |
| 濃度 (%) | 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 |
| 処理温度 (°C) | 121 |
| 処理時間 (min) | 30, 60 |

2.1.3 酵素糖化

処理稲わら15gを500ml耐熱ガラス容器に入れ、リン酸緩衝液(pH5)300mlを加え、滅菌(処理温度;121°C, 処理時間;15分)した。雑菌汚染防止のためにトルエン3滴を添加した後、酵素1.5g(アクデモニウムセルラーゼ;明治製菓株式会社製)を加えて、密栓して糖化(温度;37°C, 振とう;100rpm(水平))した。適宜、糖化溶液を採取し遠心分離後、上澄液を単糖の分析試料とした。なお、酵素糖化は分析試料中の単糖濃度が一定になるまで行った。

2.2 リグニンおよび稲わらの構成単糖類の分析

リグニン含量及び脱リグニン処理の効果把握のため、リグニンを分析した。また、本報告では、稲わら中のセルロースなどの多糖成分をグルコースなどの単糖成分に換算した量(以下、「単糖換算組成分量」という)を基準に糖化率を計算した。これらの量は、図2に示すとおり、稲わらの硫酸加水分解より求めた。

2.2.1 リグニン量

耐熱ガラス容器に試料0.3g, 72%硫酸3ml, 純水84mlを入れ、30°C, 1時間放置した後、オートクレーブで加圧

表2 酵素糖化条件

| | |
|------------|-------------------------|
| 糖化酵素 | アクデモニウムセルラーゼ(明治製菓株式会社製) |
| 糖化温度 (°C) | 37 |
| 振とう数 (rpm) | 100 (水平) |

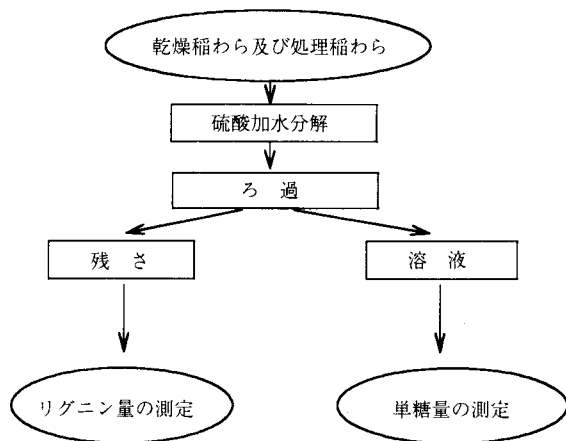


図2 稲わらの単糖換算分量の求め方

加熱分解(温度;121°C, 時間;1時間)した。放冷した後、ガラスフィルターで吸引ろ過し、純水5mlで洗浄した。残渣は、洗浄液が中性になるまで純水で洗浄して、105°C, 4時間乾燥後、秤量し、リグニン量(酸不溶性(klason)リグニン)とした³⁾。

2.2.2 単糖の分析⁹⁾ 単糖分析用溶液200μl, ラミノース水溶液(10g/l)20μl, 0.5MPMP(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)メタノール溶液1ml, 0.3M水酸化ナトリウム溶液1mlを10ml試験管に入れて、混合(温度;70°C, 時間;30分)した。冷却後、0.3M水酸化ナトリウム1ml, 0.3M塩酸1mlを加えて、純水で10mlに定容した。クロロホルム5mlを加えて振とうし、静置後、水層を高速液体クロマトグラフィーでグルコース、キシロース及びアラビノースを分析した。分析条件を表3に示す。

3 結果と考察

3.1 アルカリ処理による脱リグニンの効果

3.1.1 処理稲わらの単糖換算組成分量の比較

乾燥稲わら及び処理稲わらの単糖換算組成分量について表4に示す。単糖換算組成成分比の比較グラフを図3, 図4に示す。

アルカリ濃度が高くなると、リグニンの組成比が減少し、アルカリ処理前の乾燥稲わらと水酸化ナトリウム2%濃度の処理稲わらと比較すると、28%から4%に減った。また、グルコースの組成比が増加した。これは、アルカリ処理により脱リグニンされ、アルカリ濃度が高いほど効果が大きいことを示している³⁾。一方、今回調べた処理時間の範囲において組成比の差はなかった。

3.1.2 酵素糖化

処理稲わらを酵素糖化をした時の糖化溶液中のグルコース濃度の経時変化を図5に示す。糖化溶液中のグルコース濃度は、アルカリ処理の濃度条件に関係なく150時間以上経過すると増加傾向が鈍くなった。この結果より今回の糖化時間は150時間とした。

150時間後の溶液中の処理稲わら1gに対する単糖の生成量と糖化率を表5に示す。高濃度のアルカリ処理をした稲わらは、多くの単糖を生成し、最も多くの単糖を生成したのは水酸化ナトリウム2.0%濃度、30分処理で、処理稲わら1gからグルコース、キシロース及びアラビノースを合わせて、874mgだった。

表3 液体クロマトグラフィー測定条件

| | |
|-------|--|
| カラム | Inertsil ODS-2 (4.6mmID×150mm, 5μm particle) |
| 移動相 | CH ₃ CN:100mMリン酸緩衝液(pH7.0)=13:87 |
| 流量 | 1.0ml/mim |
| カラム温度 | 50°C |
| 注入量 | 50μl |
| 検出器 | フォトダイオードアレイ(測定波長:245nm) |

表4 処理稲わらの単糖換算組成成分量

| 処理条件 | | 単糖換算組成成分量 (mg/g-処理稲わら) | | | |
|------------|------------|------------------------|-------|-------|--------|
| NaOH濃度 (%) | 処理時間 (min) | Klasonリグニン | グルコース | キシロース | アラビノース |
| 2.0 | 60 | 37 | 751 | 172 | 40 |
| 1.0 | 60 | 98 | 672 | 183 | 47 |
| 0.5 | 60 | 228 | 564 | 160 | 47 |
| 0.1 | 60 | 315 | 486 | 153 | 46 |
| 2.0 | 30 | 47 | 739 | 177 | 36 |
| 1.0 | 30 | 112 | 653 | 179 | 55 |
| 0.5 | 30 | 266 | 542 | 144 | 48 |
| 0.1 | 30 | 294 | 495 | 165 | 46 |
| 0 | 0 | 280 | 523 | 157 | 41 |

注) 小数点第1位を四捨五入したため、合計と一致しない場合がある。

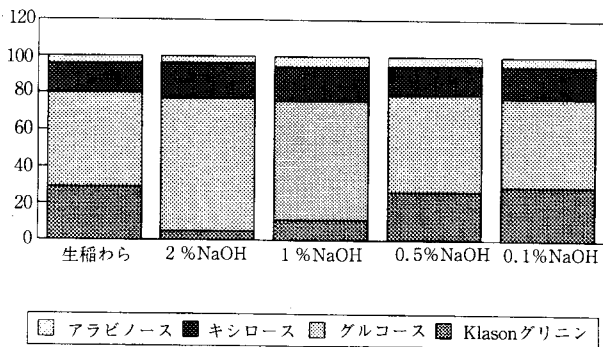


図3 アルカリ処理による稲わらの単糖換算組成成分比の変化 (処理時間:60min)

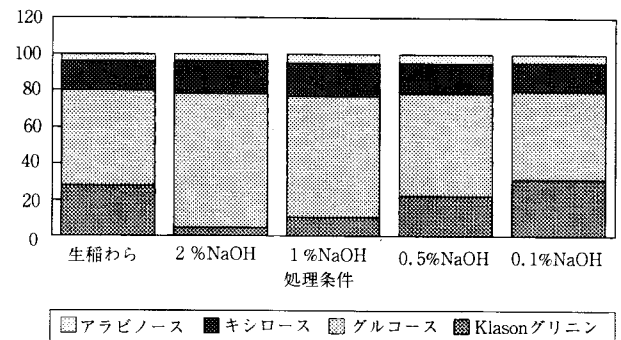


図4 アルカリ処理による稲わらの単糖換算組成成分比の変化

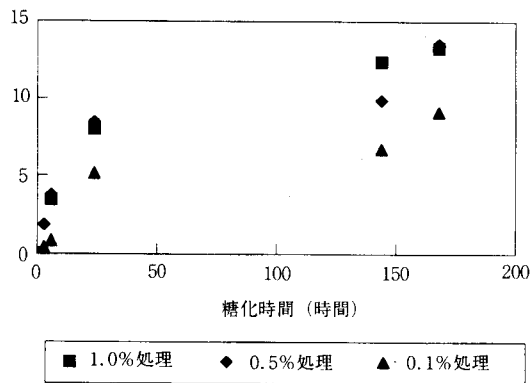


図5 糖化液中のグルコース濃度の経時変化

表5 150時間後の単糖の生成量と糖化率

| 処理条件 | | 生成量 (mg/g-処理稲わら) | | | 糖化率 (%) | | |
|------------|------------|------------------|-------|--------|---------|-------|--------|
| NaOH濃度 (%) | 処理時間 (min) | グルコース | キシロース | アラビノース | グルコース | キシロース | アラビノース |
| 2.0 | 60 | 639 | 131 | 25 | 85.1 | 76.1 | 63.0 |
| 1.0 | 60 | 542 | 123 | 32 | 80.6 | 67.3 | 67.4 |
| 0.5 | 60 | 373 | 85 | 37 | 66.1 | 53.0 | 78.2 |
| 0.1 | 60 | 241 | 33 | 18 | 49.6 | 21.6 | 39.2 |
| 2.0 | 30 | 735 | 105 | 34 | 99.4 | 59.2 | 94.1 |
| 1.0 | 30 | 592 | 94 | 38 | 90.7 | 52.4 | 68.5 |
| 0.5 | 30 | 414 | 63 | 34 | 76.4 | 43.7 | 70.7 |
| 0.1 | 30 | 214 | 26 | 14 | 43.2 | 15.8 | 30.4 |

糖化率（ここでは、糖化率＝処理稲わら 1 g あたりの酵素糖化による単糖の生成量/処理稲わら 1 g あたりの単糖換算組成成分量×100とする。）は、水酸化ナトリウム1.0～2.0%濃度で、グルコースは、81～99%だった。キシロースも処理濃度が高いほど糖化率が高かった。これらのことから、アルカリ処理濃度が高くなる程、酵素糖化が進みやすい傾向が確認された。

3.2 アルカリ処理法の課題

アルカリ処理法について、脱リグニンの効果は認められ、処理稲わらに対する糖化率も高くなることがわかったが、以下のとおり、さらに検討すべき点も明らかになった。

3.2.1 アルカリ処理に伴う稲わらの減量

アルカリ処理に伴う稲わらの減量（以下、「処理減量」という）を表6に示す。アルカリ濃度が高くなるにつれて、処理減量が増え、2.0%濃度、60分処理では、乾燥稲わら

表6 アルカリ処理に伴う稲わらの減量

| NaOH濃度(%) | 処理時間(min) | 処理減量(mg/g-乾燥稲わら) |
|-----------|-----------|------------------|
| 2.0 | 60 | 648 |
| 1.0 | 60 | 558 |
| 0.5 | 60 | 378 |
| 0.1 | 60 | 247 |
| 2.0 | 30 | 627 |
| 1.0 | 30 | 543 |
| 0.5 | 30 | 349 |
| 0.1 | 30 | 227 |

1 g に対して648mg 減少した。これは乾燥稲わらの組成成分量において、リグニンは280mg であることから、リグニンの他に糖化基質も含まれることも考えられた。

3.2.2 アルカリ溶液中の単糖の存在量

そこで、処理減量がアルカリ処理による可溶性区分に糖類として存在するか検討した。アルカリ溶液中の単糖の存在量について表7に示す。存在量は、乾燥稲わら 1 g に対してグルコースは4.0mg～7.9mg、キシロースは0.0mg～24.5mg、アラビノースは0.0mg～8.8mg だった。この結果では、キシロース、アラビノースは処理濃度が高くなるにつれて存在量が多くなる傾向があるものの、これらの量は、3.2.1で示した処理減量に比べ、非常に少ない。従って、この処理減量を、アルカリ溶液中への糖化基質の移行で説明はできず、今のところ不明である。

3.2.3 質量の収支

アルカリ処理前の乾燥稲わらを基準に質量の収支について計算した。乾燥稲わら 1 g に対する単糖の生成量を表8に示す。水酸化ナトリウム0.5%濃度以上のアルカリ処理をして酵素糖化した場合には、乾燥稲わら 1 g に対するグルコースの生成量は差がなく、60分処理では225～239mg、30分処理では269～274mg が生成したことになる。これは乾燥稲わらの組成成分量のグルコース分523mg と比較して43～52%にあたる。一方、0.1%処理では60分処理では181mg、30分処理では165mg で、32～35%と少なかった。この結果により、1.0%、2.0%濃度処理では、高い糖化率であるが、アルカリ処理による糖化基質の処理減量が多い

表7 アルカリ溶液中の単糖の存在量

| 処理条件 | | 溶解量 (mg/g-乾燥稲わら) | | |
|-----------|-----------|------------------|-------|--------|
| NaOH濃度(%) | 処理時間(min) | グルコース | キシロース | アラビノース |
| 2.0 | 30 | 4.2 | 20.6 | 7.5 |
| 1.0 | 30 | 4.4 | 13.4 | 5.8 |
| 0.5 | 30 | 5.6 | 10.8 | 3.7 |
| 0.1 | 30 | 7.9 | 0.0 | 0.0 |
| 2.0 | 60 | 4.8 | 24.5 | 8.8 |
| 1.0 | 60 | 4.0 | 15.0 | 5.9 |
| 0.5 | 60 | 4.2 | 11.4 | 3.9 |
| 0.1 | 60 | 5.8 | 0.2 | 0.6 |

表8 乾燥稲わら 1 g に対する単糖の生成量

| 処理条件 | | 単糖生成量 (mg/g-乾燥稲わら) | | |
|-----------|-----------|--------------------|-------|--------|
| NaOH濃度(%) | 処理時間(min) | グルコース | キシロース | アラビノース |
| 2.0 | 60 | 225 | 46 | 9 |
| 1.0 | 60 | 239 | 54 | 14 |
| 0.5 | 60 | 232 | 53 | 23 |
| 0.1 | 60 | 181 | 25 | 14 |
| 2.0 | 30 | 274 | 39 | 13 |
| 1.0 | 30 | 271 | 43 | 17 |
| 0.5 | 30 | 269 | 41 | 22 |
| 0.1 | 30 | 165 | 21 | 11 |

ことから、低い糖化率の0.5%濃度処理と同程度の単糖量となった。0.1%濃度処理においては、処理稲わらに脱リグニン効果がほとんどないため、酵素糖化が進みにくく、単糖の生成量が少なくなったと考えられる。

以上の結果から、乾燥稲わらに対する質量の収支の観点からは、0.5~2%の範囲では、アルカリ処理による脱リグニン効果を反映できない結果となった。

4 ま と め

稲わらの一つの有効利用として、稲わらに含まれるセルロース、ヘミセルロースなどの多糖を酵素糖化して単糖を生成するにあたり、脱リグニン処理として行ったアルカリ溶液法に関して以下の知見が得られた。

- (1) 0.1%~2.0%の水酸化ナトリウムによるアルカリ処理では、処理濃度が高くなるにつれて、脱リグニン処理され、1.0%~2.0%濃度では酵素糖化が進みやすくなる効果が認められた。
- (2) 30分と60分のアルカリ処理時間の違いでは、脱リグニン処理とその効果に大きな差はなかった。
- (3) 今回のアルカリ処理条件では処理濃度が高くなるにつれて、糖化基質の処理減量が多くなった。
- (4) 今回のアルカリ処理条件では、乾燥稲わら1g中のグ

ルコースを最大で52%取りだせたが、高率にするにはさらに条件を検討する必要がある。

最後に、本研究にあたり、酵素を提供して頂いた明治製菓株式会社に深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 新潟県, 新潟県稲わら等焼却防止対策会議 平成7年度土づくり推進対策資料 (1995).
- 2) 外山 信男, 小川喜八郎, 外山 英男: 発酵と工業, **39**, 812 (1981).
- 3) 桑原 正章, 他: 木材学会誌, **34**, 75 (1988).
- 4) 中村 嘉利: 科学工学論文集, **17**, 504 (1991).
- 5) 掘津 弘章: 廃棄物学会誌, **2**, 131 (1991).
- 6) 沢田 達郎, 中村 嘉利, 折笠 仁志, 大永 誠, 井上 英一: 環境科学学会誌, **10**, 313 (1997).
- 7) 沢田 達郎, 桑原 正章, 中村 嘉利, 隅田 弘, 科学工学論文集, **12**, 1 (1986).
- 8) 日本分析化学会編: 分析化学便覧 (改訂4版) 試料編, 丸善, p.1011 (1991).
- 9) 日本分析化学会編: 分析化学便覧 (改訂4版) 試料編, 丸善, p.1142 (1991).