

水生植物およびクリーニングクロップの酵素糖化における前処理方法の検討

鳥取大学大学院工学研究科 学生会員 ○前田光太郎

水道機工株式会社 非会員 中谷慎吾

鳥取大学大学院工学研究科 正会員 赤尾聡史, 増田貴則, 細井由彦

1. はじめに

農閑期に過剰肥料を吸収させる目的で作付けされる植物(クリーニングクロップ)や水域に異常繁茂する水生植物を刈り取ることは、その場の栄養塩除去につながる。ただし、この環境浄化がサイクルとして回るためには、植物体バイオマスを有効利用していくことが必要である。これらバイオマスは、エタノール発酵やL-乳酸発酵の原料に用いることができるが、発酵利用するためには糖化が必要である。ところで、農作物非可食部を原料とした発酵では、糖化方法として酵素糖化が主流である。ただし、前処理方法によって糖回収率に差が生じる。本研究では、アルカリ処理¹⁾、Alkaline/Oxidation(A/O)処理¹⁾、希硫酸処理²⁾、酢酸-エタノール処理³⁾およびH₂O₂処理の5つの前処理方法における糖回収率の比較を行った。原料は、水生植物としてヒシとホテイアオイ、クリーニングクロップとしてトウモロコシとソルガムを用いた。

2. 実験方法

2.1 使用材料

水生植物はヒシ(鳥取市湖山池)とホテイアオイ(南国市石土池)を用いた。クリーニングクロップはトウモロコシ(高知大学農学部より提供)とソルガム(高知大学農学部より提供)を用いた。前処理にはこれらバイオマスを70℃で乾燥し、ミル破碎(5分)したものを乾燥バイオマスとして用いた。

2.2 前処理方法

アルカリ処理、A/O処理、希硫酸処理、酢酸-エタノール処理およびH₂O₂処理を用いた。乾燥バイオマス10gに対して、アルカリ処理では1%水酸化ナトリウム水溶液100mlを加えて、室温で24時間反応させた。A/O処理では1%水酸化ナトリウム水溶液100mlを加えて、室温で12時間反応させた後、

30%過酸化水素水を1ml添加し12時間反応させた。希硫酸処理では1%希硫酸水溶液100mlを加えて、オートクレーブで121℃、30分反応を行った。酢酸-エタノール処理ではエタノール37.5mlに対し蒸留水12.5ml、酢酸0.25mlを添加し、オートクレーブで121℃、60分反応させた。H₂O₂処理では過酸化水素水を30ml加え12時間反応を行った。反応後は、アルカリ処理、A/O処理、希硫酸処理およびH₂O₂処理では0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)で3回洗浄を行った。洗浄したバイオマスは70℃で24時間乾燥し、ミル破碎(5分)したものを前処理済バイオマスとして用いた。

2.3 酵素糖化方法

酵素はメイセラゼ(明治製菓)を用いた。糖化では、滅菌済15mlチューブに前処理済バイオマス0.2gを入れ、酵素溶液(酵素濃度2.0g/L、0.1M酢酸緩衝液)を4ml加えた。反応条件は、pH4.5、45℃で48時間(n=3)とした。糖化後のろ液中の生成グルコース濃度を測定した。グルコース測定にはグルコースキット-グルコースCII-テストワコーを用いた。グルコース変換率は式(1)によって求めた。

$$\text{グルコース変換率} = \frac{\text{生成グルコース量}}{\text{前処理済バイオマス量}} \quad (1)$$

糖化の経時変化では、300mlの三角フラスコに前処理済バイオマス12.5gを入れ、酵素溶液を250ml加えた。糖化条件はpH4.5、45℃で72時間(n=2)をした。

3. 結果

3.1 前処理方法の比較

図1に前処理済バイオマスに対するグルコース変換率を示す。ヒシおよびホテイアオイなどの水生植物では、希硫酸処理が最も高いグルコース変換率になった。グルコース変換率は0.16であった。一方で、

A/O 処理も希硫酸処理に匹敵する高いグルコース変換率(0.15)となった。ヒシについて、乾燥バイオマスあたりの前処理後バイオマス回収率は、希硫酸処理が 0.58, A/O 処理が 0.76 であった。乾燥バイオマスあたりのグルコース変換率を求めた結果、希硫酸処理におけるグルコース収率は 0.09, A/O 処理では 0.11 であった。水生植物において乾燥バイオマスを基準に効率的にグルコースを回収できる前処理方法は A/O 処理と考えられた。

トウモロコシおよびソルガムなどのクリーニングクロップでは、A/O 処理が最も高いグルコース変換率になった(図 1)。A/O 処理におけるグルコース変換率は 0.34 であった。その他の処理では、アルカリ処理が A/O 処理に劣るが、高いグルコース変換率(0.33)であった。トウモロコシについて、乾燥バイオマスあたりの前処理後バイオマスの回収率は、A/O 処理およびアルカリ処理とも 0.71 であった。クリーニングクロップにおいて乾燥バイオマスを基準に効率的にグルコースを回収できる前処理は A/O 処理であった。

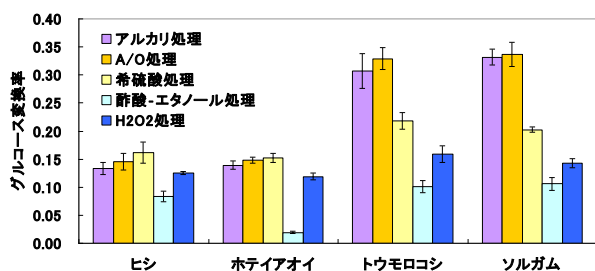


図 1 前処理済バイオマスのグルコース変換率

3.2 糖化の時系列変化

グルコース変換率の高かった A/O 処理済バイオマスの酵素糖化におけるグルコース変換率の経時変化を図 2 に示す。バイオマス 50 g/L の条件で実施した場合、A/O 処理済バイオマスの酵素糖化は 24 時間で終わることを確認した。また、ここでのグルコース変換率は 3.1 とほぼ等しい結果であった。ところで、セルロース・微結晶を用いた同様の実験(セルロース 50 g/L)では 72 時間の糖化時間を必要とし、グルコース変換率は 0.60 であった。これに対して、A/O 処理済バイオマスを用いた酵素糖化では、糖化が 1 日で終了しているものの、変換率は水生植物で 0.13, クリーニングクロップで 0.33 であった。A/O

処理済バイオマスはセルロース以外にもヘミセルロースやリグニンを含んでおり、そのため低い値となったと考えられる。実際に A/O 処理済トウモロコシの脱脂後の組成を調べた結果、 α -セルロース含有率は 40%であった。A/O 処理済トウモロコシの α -セルロースあたりのグルコース変換率では 0.8 程度と高い値であった。

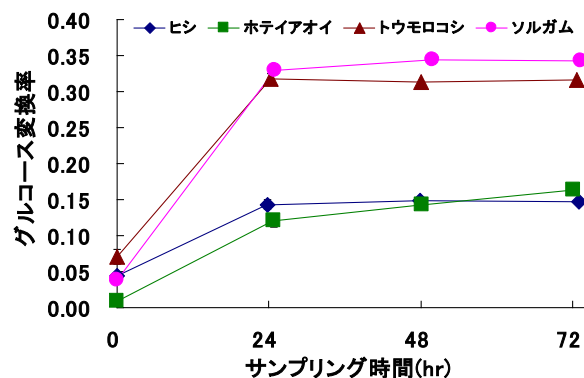


図 2 A/O 処理済バイオマスの酵素糖化におけるグルコース変換率の経時変化

4. 結論

本研究は、水生植物およびクリーニングクロップを効率的に糖化する前処理方法の検討と酵素糖化の時系列変化を確認した。前処理済バイオマスのグルコース変換率については、水生植物は希硫酸処理、クリーニングクロップは A/O 処理が高い値を示した。一方で、乾燥バイオマスを基準に効率的にグルコースを回収できるのは水生植物・クリーニングクロップともに A/O 処理であった。また、A/O 処理済バイオマスの酵素糖化は、バイオマス 50g/L の場合 24 時間で終了していることを確認した。

謝辞

本研究は、高知大学農学部藤原拓教授より試料の提供を受けました。また、明治製菓株式会社より酵素の提供を受けました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 磯部晴夫ら, 第 43 回日本水環境学会年会講演集, pp.99, 2009
- 山本哲史ら, 大成建設技術センター報, 第 40 号, 2007
- 寺本好邦ら, セルロース学会誌, Vol16, No.1, 2009