

コンバージミル(エネルギー集中型媒体ミル)によるイナワラ 等の糖化効率の評価

誌名	Journal of applied glycoscience
ISSN	13447882
著者	竹田, 匠 二階堂, 満 戸谷, 一英 小原, 実広 中野, 友貴 内宮, 博文
巻/号	56巻2号
掲載ページ	p. 71-76
発行年月	2009年4月

Evaluation of High Intensive Ball Mill Method for Effective Saccharification of Plant Cell Wall Materials

(Received August 25, 2008; Accepted December 9, 2008)

Takumi Takeda,^{1,*} Mitsuru Nikaido,² Kazuhide Totani,² Mitsuhiro Obara,¹
Yuki Nakano¹ and Hirofumi Uchimiya¹

¹*Iwate Biotechnology Research Center
(22-174-4, Narita Kitakami 024-0003, Japan)*

²*Ichinoseki National College of Technology
(Takanashi, Hagishyo, Ichinoseki 021-8511, Japan)*

Abstract: Recently, demand for the bio-fuel (e.g. ethanol) production to overcome green house gas emission has been overwhelmingly accepted in many countries. The majority of bio-ethanol is being produced from sucrose (e.g. sugarcane) and starch (e.g. corn), simultaneously causing the problem of food shortage and the rise of commodity prices. Nevertheless, demand for bio-ethanol as an alternative fuel will increase in the near future. To satisfy such demand, sustainable agriculture and new technology for effective bio-ethanol production from cellulosic materials are urgently needed. Here, we report the effective saccharification of several plant materials, which are mechano-chemically prepared using a high intensive ball mill. Enzymatic digestion of rice straw, sugarbeet and sugarcane with cellulase and xylanase was enhanced by treatment with the high intensive ball mill. Analysis of the digests with cellulase and xylanase revealed an increase in the amount of glucose and xylose residues as compositional sugars. The results might be caused by the destruction of the physical structure of cell walls and non-crystallization of cellulose and depolymerization of wall polysaccharides, because of the occurrence of cello-oligosaccharides from cellulose paper and solubilization of the polysaccharides from plant materials after treatment with the high intensive ball mill. We concluded that treatment with a high intensive ball mill as pre-treatment for enzymatic hydrolysis leads to the effective saccharification of plant cell walls.

Key words: cell wall, high intensive ball mill, saccharification, hydrolysis

コンバージミル (エネルギー集中型媒体ミル) によるイナワラ等の糖化効率の評価

竹田 匠^{1,*}, 二階堂満², 戸谷一英², 小原実広¹, 中野友貴¹, 内宮博文¹

¹岩手生物工学研究センター (024-0003 北上市成田 22-174-4)

²一関高等専門学校 (021-8511 一関市萩荘字高梨)

セルロースは地球で最も多く存在するバイオポリマーであり、植物細胞壁の主要な糖鎖である^{1,2)}。そのため主要な構成糖はセルロースに由来するグルコースである。植物におけるセルロース合成は細胞膜に形成されたロゼットというセルロース合成酵素複合体により行われていると推察されている³⁾。それぞれのセルロース合成酵素複合体から合成されたセルロース繊維は疎水結合や水素結合により互いが規則的に凝集してセルロースマイクロフィブリルを形成する。セルロースの物性や反応性の改良、構造の解析や評価のために非結晶性セルロースの調製が必要であり、ボールミルなどを用いた機械的粉砕法 (メカノケミカル処理)⁴⁾は容易な非結晶性セルロース調製法である。コンバージミル (エネルギー集中型媒体ミル) は高エネルギー付加型の媒体ミルであり、回転する円筒容器 (1 L) とその内壁近

傍に固定されたガイドベーンを設けた装置である。円筒容器を高速回転させると、粉体の一部はガイドベーンと容器内壁とのクリアランスを通過し薄い試料層を形成する。一方、媒体ボール (および粉体の一部) はガイドベーンによって運動方向が変化し、容器内壁の粉体試料層と一点で集中的に衝突する。すなわち、媒体ボールが円筒容器と同伴して回転することなく、媒体の運動エネルギーを効率的に粉体粒子に付与することが可能であり、粉砕効率を高めることができる⁵⁾。

本報告ではコンバージミル (エネルギー集中型媒体ミル) を用いたイナワラ等の植物細胞壁のメカノケミカル粉砕による分解効率の促進とその評価について報告する。

実験材料と実験方法

1. 粉末試料および微粉末試料の調製

イナワラ (コシヒカリの茎葉) はカッターミルで粉砕し

* Corresponding author (Tel. +81-197-68-2911, Fax. +81-197-68-3881, E-mail: ttakeda@ibrc.or.jp).

た後、水で懸濁し、水不溶性画分を粉末(試料)として用いた。サトウダイコンの根系やサトウキビの茎、スギオガクズ、セルロース紙(Whatman 3 MM)は液体窒素中乳鉢で粉碎した後、シヨ糖等を除くため蒸留水で洗浄し、これを粉末(試料)として用いた。これらの粉末はコンバージミル³⁾により微粉碎化し、水で懸濁した後、遠心分離(15,000 rpm, 5分間)により得られた水不溶性画分を微粉末(試料)として、また水可溶性画分を水可溶性糖として使用した。コンバージミル微粉碎条件は、容器内容積1Lを用い、サンプル量15g, ϕ 8クロム鋼球370g(容積80 mL)を投入し、700 rpm, 60分間粉碎とした。

2. セルロース結晶化度の解析

セルロースの結晶化度は、日本電子製JDX-3530型(Cu-K α 線, 30 kV, 30 mA)を使用し、粉末X線回折パターンからSegalの文献⁶⁾を参照し次式から算出した。

$$\text{結晶化度 (\%)} = (I_b - I_a) / I_b \times 100,$$

I_b , $2\theta = 22.5^\circ$ 付近の(002)面の最大ピーク強度,

I_a , $2\theta = 18^\circ$ のピーク強度

3. 細胞壁糖鎖の酵素的分解

イナワラの粉末および微粉末の水不溶性画分(50 mg)を酢酸緩衝液中(100 mM, pH 4.5)において、*Trichoderma reesei*由来のセルラーゼ[0.1–50 mg (0.4–200 U), Sigma]で40°C, 18時間, 反応液量10 mLで反応させた。セルラーゼ処理後、遠心分離(15,000 rpm, 5分間)により上清を回収し、H₂SO₄/Anthrone法⁷⁾により全糖量を測定した。この際、グルコースを標準物質として全糖量を算出した。水不溶性画分に含まれているキシランの分解は、リン酸緩衝液中(100 mM, pH 6.0)において β -Xylanase M 6 (20 U, Megazyme)で40°C, 18時間, 反応液量10 mLで反応させた。*In vitro*における β -Xylanase M 6のカルボキシメチルセルロースおよび1,3-1,4- β -グルカンに対する加水分解活性は認められなかった。

コンバージミルで微粉碎化したセルロース紙(Whatman 3 MM)は、水で懸濁後、遠心分離(15,000 rpm, 5分間)により水可溶性画分を得た。水可溶性画分に含まれるセロオリゴ糖は酢酸緩衝液中(100 mM, pH 4.5), 40°C, 18時間, 反応液量10 mLで β -glucosidase (0.2 U, Megazyme)処理を行った。

4. 構成糖分析

水可溶性画分および酵素分解により生じた可溶性糖は2 M (最終濃度)トリフルオロ酢酸(TFA)存在下, 120°C, 2時間処理により加水分解した。加水分解産物は薄層シリカゲル上で分離した。その際、使用した展開溶媒はブタノール:酢酸:水=2:1:1 (v/v), その後、酢酸エチル:ピリジン:水=8:2:1 (v/v)を用いた。溶媒を乾燥した後、0.5% チモールを含むエタノール-硫酸(19:1, v/v)に浸し、乾燥後105°Cで処理することで構成糖を検出した(Thymol/Ethanol-H₂SO₄法)。セルロース紙のセルラーゼ反応産物および反応産物のTFA分解産物はブタノール:酢酸:水=2:1:1 (v/v)を溶媒として薄層シリ

カゲル上で分離した後、Thymol/Ethanol-H₂SO₄法で検出した。

5. アルカリ不溶性画分の調製

イナワラの粉末と微粉末, およびこれらのセルラーゼ処理後の不溶性画分を24%水酸化カリウムで40°C, 18時間処理を3回繰り返した。その後、蒸留水でアルカリ可溶性糖を完全に除去した後、酢酸による中和, 再び蒸留水で洗浄し、凍結乾燥を行った。これにより得られた24%水酸化カリウム不溶性画分をセルロースとして評価した。コシヒカリのイナワラ50 mg中に含まれるアルカリ不溶性画分は14.5 mgであった。

結果と考察

1. セルラーゼ処理におけるコンバージミル処理の効果

乾燥させたイナワラ(コシヒカリの茎葉)をカッターミルで粉碎した粉末の平均粒度68.6 μ m, 結晶化度42.3%であるが、コンバージミル(エネルギー集中型媒体ミル)により微粉碎化された微粉末の平均粒度は19.60 μ m, 結晶化度21.3%であった。このようなイナワラの粉末と微粉末にセルラーゼ処理を施し、コンバージミルの微粉碎化による細胞壁分解への影響を調べた(Fig. 1 (A))。イナワラ粉末に対して微粉末では加水分解反応が促進され、大量の糖が水可溶性画分に検出された。イナワラ微粉末50 mgに対して5 mgのセルラーゼにより分解反応物が最大に達

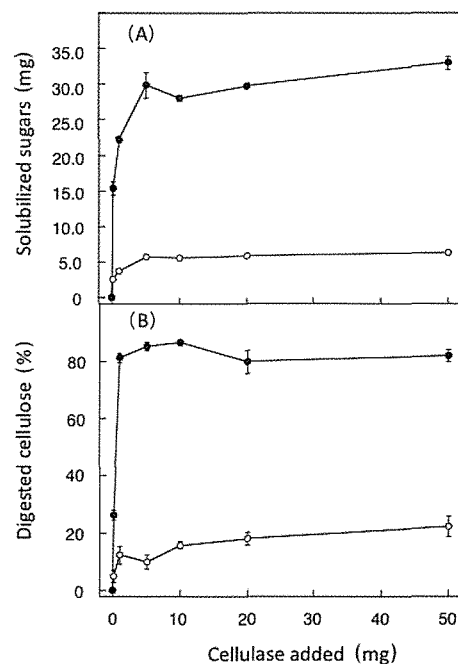


Fig. 1. Quantitative measurements of cell wall of rice straw hydrolyzed by *Trichoderma reesei* cellulase.

Rice straw was ground to powder with a pestle in liquid nitrogen and then a portion was milled to fine powder with a high intensive ball mill. Powder (open circle) and fine powder (closed circle) were treated with *Trichoderma* cellulase (0.1–50 mg) for 18 h at 40°C. The sugars solubilized by cellulase hydrolysis were removed by centrifugation (15,000 rpm, 5 min) and the amount was determined by the H₂SO₄/anthrone method (A). The ratio of digested cellulose/total cellulose was expressed as a percentage (B).

するのに対して、イナワラ粉末では 50 mg のセルラーゼ処理においても微粉末セルラーゼ処理の分解反応物の 1/5 程度であった。セルラーゼ処理後の可溶性画分に含まれる糖を薄層シリカゲル上で分離した結果、イナワラ粉末の水可溶性画分には少量のグルコースと薄層シリカゲルの原点にその他の水可溶性糖が検出されたのに対して、イナワラ微粉末の水可溶性画分にはキシロースやグルコースおよび少量のセロビオースやキシロオリゴ糖と推測される糖、原点にその他の水可溶性糖が検出された (Fig. 2 (A))。また、添加されたセルラーゼ量 (0.1–10.0 mg) の増加に伴いキシロースやグルコース、原点のオリゴ糖量が増加していることが明らかとなった。これらセルラーゼ処理により生じた水可溶性画分の糖を TFA により加水分解して構成糖を薄

層シリカゲル上で分離した結果、イナワラ粉末からは少量のグルコース、イナワラ微粉末からはグルコースとキシロースが検出された (Fig. 2 (B))。本実験に使用したセルラーゼ標品にはセルロースやキシランを分解する酵素が含まれており、イネの主要細胞壁成分であるセルロースやキシランの酵素分解が微粉碎化により促進され、多量のグルコースやキシロースが構成糖として検出されたと推察される。

セルラーゼ処理によるセルロースの分解効率を明らかにするため、セルラーゼ処理後の残渣をアルカリ (24% 水酸化カリウム) 処理し、アルカリ不溶性画分をセルロース残量として測定した。その結果、イナワラ粉末では約 20% のセルロースが可溶化されたのに対して、イナワラ微粉

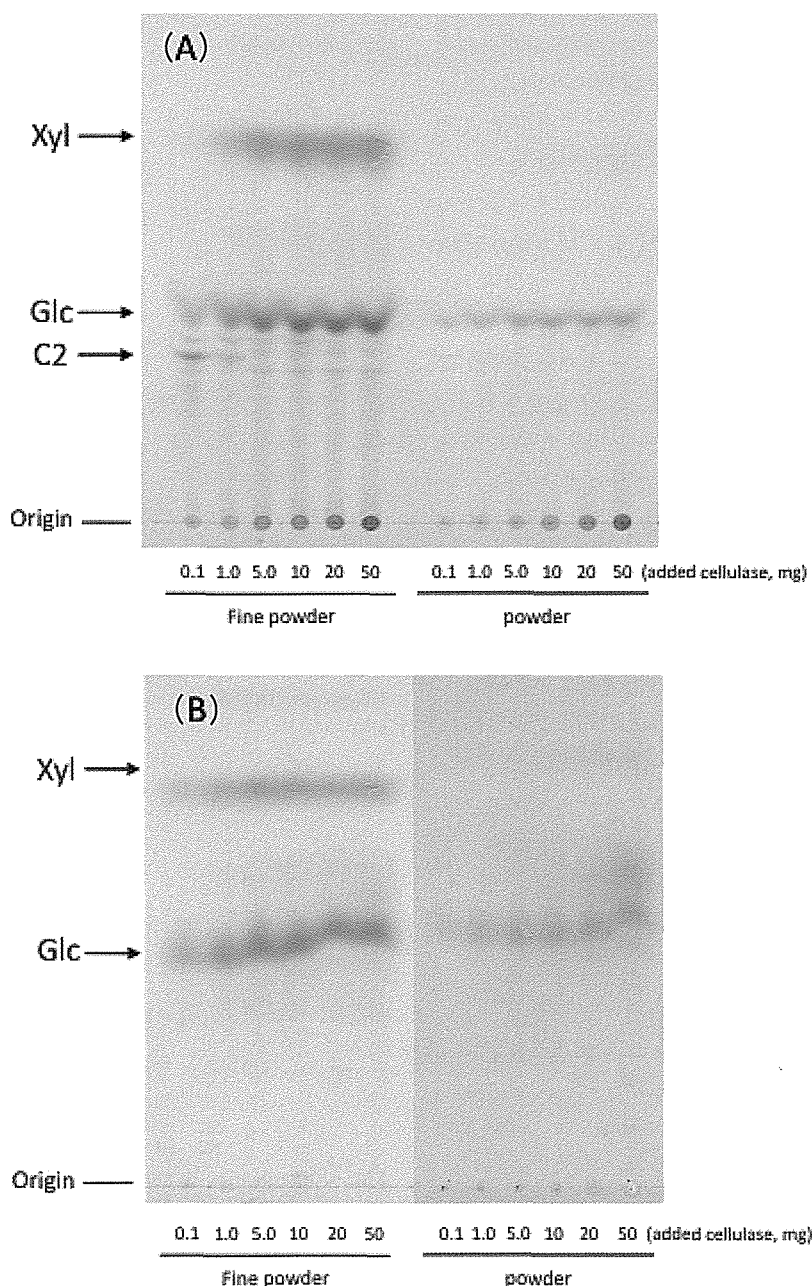


Fig. 2. Separation of the *Trichoderma reesei* cellulase digests of rice straw on thin layer chromatography.

Fine powder and powder of rice straw were digested with *Trichoderma reesei* cellulase (0.1–50.0 mg) for 18 h at 40°C. The solubilized sugar obtained by *Trichoderma reesei* cellulase treatment was hydrolyzed with 2 M TFA for 2 h at 120°C. Both the cellulase digest (A) and TFA hydrolyzate (B) were separated on a silica gel of TLC in butanol/acetic acid/water (2:1:1), followed by ethyl acetate/pyridine/water (8:2:1).

末ではわずか1 mgのセルラーゼ処理により約80%のセルロースが可溶化されたと推察された (Fig. 1 (B)). ユーカリ木粉のボールミル処理では、わずか3%のリグニンの抽出量が増加しただけであるため⁸⁾, イナワラのコバージミル処理においてもほとんどのリグニンの分解や低分子化はほとんど起こらず、アルカリ不溶性画分にリグニンが残存していると考えられる。しかし、イナワラのリグニン含量が木粉に比べはるかに低いため、リグニンによる酵素分解の阻害はほとんど生じていないと推測される。

2. コバージミル処理によるセルロースの低分子化

ボールミルを用いた微粉砕化によりセルロースの結晶度が低下することは報告⁹⁾されているが、コバージミル処理によりセルロースの低分子化および可溶性も生じていることが明らかとなった (Fig. 3 (A)). 主としてセルロースから成るセルロース紙 (Whatman 3 MM) をコバージミルにより微粉砕化したところ、処理時間の増加に伴い水可溶性糖は増加し、ミル処理15分後に全重量の0.1%、処理120分後に0.6%が水可溶性となった。また、水可溶性画分に含まれる糖は薄層シリカゲル上で分離した結果、グルコースやセロビオース、セロトリオース、セロテトラオースおよび原点にそれ以上の分子量を有するオリゴ糖が検出された (Fig. 3 (A)). また、これらの水可溶性糖は β -1,4-glucosidase 処理により大部分がグルコースへと分解されているため、水可溶性糖の大部分はセルロースの低分子化により生じたセロオリゴ糖に由来することが示唆された (Fig. 3 (B)). このようにコバージミルを用いた微粉砕処理により細胞構造の破壊やセルロース結晶化度の低下、セルロースの低分子化 (可溶性) が起こり、セルラーゼ等による細胞壁分解を向上させたと考えられる。セルロースはグルコース残基が β -1,4-グリコシド結合しているが、グルコース残基の数が増加するにつれて水に対する溶解度が減少し、グルコース残基が7以上の β -1,4-グリコシド結合を形成する糖鎖はほとんど水に不溶性を示す¹⁰⁾。ここで検出

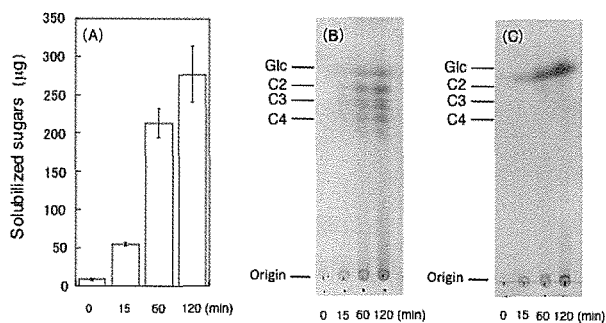


Fig. 3. Analysis of solubilized sugars from cellulose paper subjected to a high intensive ball mill.

Cellulose paper (Whatman 3 MM paper) was milled with a high intensive ball mill as described in the MATERIALS AND METHODS for 0, 15, 60 and 120 min, respectively. The fine powder was suspended in water, followed by the centrifugation (15,000 rpm, 5 min) to collect the solubilized sugars. The amount of the solubilized sugars was determined by H_2SO_4 /anthrone method (A). Both the solubilized sugars (B) and the digest of solubilized sugars with β -glucosidase (C) were developed on a silica gel of TLC in butanol/acetic acid/water (2:1:1).

されたセロオリゴ糖はコバージミルによりグルコース残基が6以下であり、グルコース残基が7以上の糖鎖は水不溶性ではあるが、低分子化していると推測される。

3. キシラナーゼ処理におけるコバージミル処理の効果

キシランに対する基質特異性が高いキシラナーゼ (β -Xylanase M6) を用いて、微粉砕化によるキシラン分解への影響を調べた (Fig. 4). その結果、イナワラ微粉末ではイナワラ粉末の約4倍量の糖が可溶性画分に検出された。キシラナーゼ処理により得られた可溶性画分をTFAで加水分解した後、薄層シリカゲル上で分離した結果、主成分としてキシロースが検出された (Fig. 4 (B)). イナワラ粉末では2回のキシラナーゼ処理を行ってもわずかのキシランが分解されたのに対して、微粉末では1回目のキシラナーゼ処理により分解可能なキシランが効率良く分解された。単子葉植物であるトウモロコシの主要ヘミセルロース

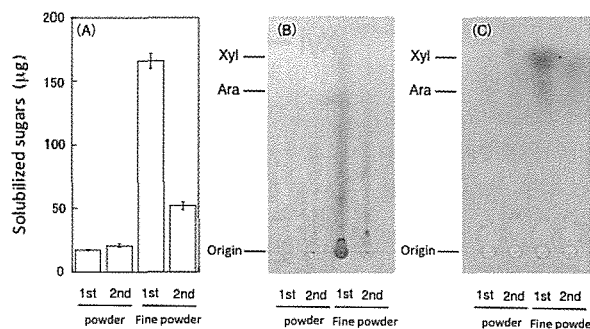


Fig. 4. Evaluation of xylan hydrolysis of rice straw with β -xylanase.

Coarse and fine powders of rice straw were treated with β -xylanase for 18 h at $40^\circ C$. After removing the solubilized sugars, β -xylanase treatment was carried out again. Pairs of β -xylanase treated fractions of fine powder and powder were assayed for solubilized sugars by H_2SO_4 /anthrone method (A). Both the solubilized sugars by β -xylanase treatment (B) and the TFA hydrolysate of the solubilized sugars with β -xylanase treatment (C) were developed on a silica gel of TLC in butanol/acetic acid/water (2:1:1), followed by ethyl acetate/pyridine/water (8:2:1).

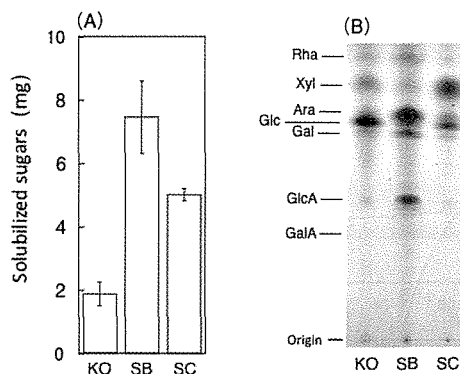


Fig. 5. Evaluation of solubilization of cell wall with high intensive ball mill.

Fine powder of rice straw, sugar beet and sugarcane was suspended in water and the supernatant was recovered by centrifugation. The amount of the solubilized sugars in the supernatant was measured by the H_2SO_4 /anthrone method (A). KO, rice straw; SB, sugar beet; SC, sugarcane. TFA hydrolysates of the soluble sugars were separated on a silica gel of TLC (B). KO, rice straw; SB, sugar beet; SC, sugarcane.

Table 1. Effects of milling on the digestion of cell wall material by cellulase.

Sample	Cellulase (mg)	Solubilized sugar (ratio) (mg)
Rice straw/ Rice straw milled	0.1	3.70±0.24/26.28±0.50 (7.1)
Rice straw/ Rice straw milled	1.0	4.60±0.50/40.55±4.87 (8.8)
Sugarcane/ Sugarcane milled	0.1	2.28±0.36/25.77±0.94 (11.3)
Sugarcane/ Sugarcane milled	1.0	3.33±0.42/37.98±0.32 (11.4)
Sugar beet/ Sugar beet milled	0.1	5.39±0.62/24.57±2.29 (4.5)
Sugar beet/ Sugar beet milled	1.0	8.72±1.99/27.07±5.17 (3.0)
Cedar/ Cedar milled	0.1	0.021±0.003/0.906±0.047 (43.1)
Cedar/ Cedar milled	0.5	0.032±0.004/3.122±0.123 (97.6)
Cedar/ Cedar milled	1.0	0.094±0.013/4.127±0.123 (43.9)
Cedar/ Cedar milled	2.0	0.128±0.006/5.537±0.054 (43.3)

Plant wall materials were milled by high intensive ball milling. The milled materials (50 mg) were treated with *Trichoderma reesei* cellulase. The solubilized sugar was measured by the anthrone/H₂SO₄ method and the effect of milling was estimated in comparison with the digestibility of non-milled materials.

はアラビノグルクロノキシラン (GAX) であると報告されている^{11,12)}. イネも同様に主要ヘミセルロースであるキシランが微粉砕化によりセルラーゼ標品 (Fig. 2) およびキシラナーゼにより効率的に分解された. キシランはセルロースと水素結合を形成したり, 他のヘミセルロースと複雑に絡み合っているが, 微粉砕化による細胞壁構造の破壊が起こり, キシラナーゼが基質となるキシランを認識しやすくなったため, キシランの分解が促進されたと推察される.

4. コンバージミル処理によって生じる水可溶性糖の解析

コンバージミルによるイナワラの微粉砕化により, 水可溶性糖が生じた (Fig. 5 (A)). 水可溶性糖を TFA で加水分解した後, 薄層シリカゲル上で分離した結果, 主としてグルコースとキシロース, そして少量のアラビノースやガラクトース, ラムノースが検出された. この結果から, コンバージミルによるイナワラの微粉砕化により細胞壁成分のセルロースやキシラン, 1,3-1,4-β-グルカン, ペクチンの低分子化が生じ, 水可溶性糖として検出されたと推察される.

5. コンバージミルによるその他の植物バイオマスの糖化促進

前述のようにイナワラの微粉砕化により細胞壁分解が促進されたため, サトウキビとサトウダイコンの搾りかす, スギオガクズをコンバージミルにより微粉砕化し, 細胞壁成分の低分子化およびセルラーゼによる細胞壁分解への影響を調べた. サトウキビおよびサトウダイコンの微粉末を水で懸濁すると水可溶性糖が検出された (Fig. 5 (A)). この水可溶性糖を TFA で加水分解した後, 薄層シリカゲル上で分離した結果, サトウダイコンの水可溶性糖からはラムノースやアラビノース, グルコース, ガラクトース, グルクロン酸などの単糖が検出された (Fig. 5 (B)). またサトウキビからは主としてキシロースやグルコース, 少量のアラビノースやガラクトースが検出された. これらの結果より, コンバージミル処理により生じた水可溶性糖はセル

ロースやヘミセルロース, ペクチンなどの細胞壁成分が低分子化した単糖やオリゴ糖であると推測された. 次にセルラーゼ処理による細胞壁分解への影響について調べたところ, サトウダイコンおよびサトウキビの微粉砕化により細胞壁分解が促進されることが明らかとなった (Table 1). また, スギオガクズのミルによる微粉砕化を試みた結果, セルラーゼによる糖化効率は 10% 程度であった. これはコンバージミルによるリグニンの分解や低分子化が生じていないことが, 酵素分解率が低かった原因の一つと推測された.

以上のようにコンバージミルを用いたイナワラ, サトウダイコン, サトウキビ等の微粉砕化は細胞壁構造の破壊や細胞壁成分の低分子を引き起こし, 細胞壁分解酵素による加水分解を促進するため, 細胞壁糖化の前処理として有効な手段になり得ると結論づけた.

現在, バイオエタノールの原料としてトウモロコシや小麦の種子 (デンプン), サトウダイコンやサトウキビのシヨ糖が使用されているため, 食料問題が生じている. 元来食料として利用されていたこれらのデンプンやシヨ糖を食料として利用し, その残渣や茎葉 (イナワラやコーンストーパー, サトウダイコンやサトウキビの搾りかす) に含まれるセルロース等の細胞壁糖鎖をバイオエタノールの原料として利用することが望ましい. 本報告で示されたようにコンバージミルを用いたメカノケミカル粉砕 (微粉砕化, 非結晶化, 低分子化) はセルロースを主とする植物細胞壁の糖化の前処理として有効な手段になり得る. 今後は省エネルギー型で多量粉砕可能なメカノケミカル粉砕装置の開発が望まれる.

文 献

- 1) G. Franz and W. Blaschek: Cellulose. in *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 2, Carbohydrates, P.M. Dey and J.B. Harborne, eds., Academic Press, New York, pp. 291-322 (1990).
- 2) R.M. Brown Jr.: The biosynthesis of cellulose.. *J. Macromol. Sci.*, **10**, 1345-1373 (1996).

- 3) S. Kimura, W. Laosinchai, T. Itoh, X. Cui, R.C. Linder and R.M. Brown Jr.: Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell*, **11**, 2075-2085 (1999).
- 4) 遠藤貴士, 北川良一, 廣津孝弘, 細川 純: 機械的粉碎によるセルロース繊維の微粒子形成挙動. 高分子論文集, **56**, 166-173 (1999).
- 5) 佐藤友章, 丹野浩一, 浅田 格, 武田光博: 新しいエネルギー集中型媒体ミルによる ZnO-TiO₂ 系化合物粉末のメカノケミカル合成. 粉体および粉末冶金, **53**, 62-67 (2006).
- 6) L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin Jr. and C.M. Conrad: An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.*, **29**, 786-794 (1959).
- 7) Z. Dische: Color reactions of carbohydrates. in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, R.L. Whistler and M.K. Wolfson eds., Academic Press, New York, pp. 475-514 (1958).
- 8) 遠藤貴士: 粉碎技術による木質バイオマスの液体燃料および成形材料転換. 粉体と工業, **38**, 33-39 (2006).
- 9) T. Hayashi, T. Takeda, K. Ogawa and Y. Mitsuishi: Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 893-899 (1994).
- 10) 遠藤貴士: ボールミル処理による非晶セルロースの調整. *Cellulose Commun.*, **13**, 80-84 (2006).
- 11) N.C. Carpita: Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea mays* coleoptiles. *Plant Physiol.*, **72**, 515-521 (1983).
- 12) N.C. Carpita, M. Defornez, K. Findlay, B. Wells, D.A. Shoue and G. Catchpole: Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. R.H. Wilson and M. McCann, eds., *Plant Physiol.*, **127**, 551-565 (2001).

コンバージミル (エネルギー集中型媒体ミル) による イナワラ等の糖化効率の評価

竹田 匠¹, 二階堂満², 戸谷一英², 小原実広¹

中野友貴¹, 内宮博文¹

¹ 岩手生物工学研究センター

(024-0003 北上市成田 22-174-4)

² 一関高等専門学校

(021-8511 一関市萩荘字高梨)

近年バイオエタノールの原料として、膨大な量のトウモロコシやサトウキビ等が使用されるようになった。その結果、主要穀物の不足、食品価格の上昇を招いている。そのため、食用部位は食料として利用し、茎葉 (イナワラやコーンストーバー、バガス) などをバイオエタノールの原材料として効率良く利用することが望まれている。特に、これらに由来する細胞壁糖鎖を効率良くグルコースへと変換する糖化技術の開発が求められている。そこで、コンバージミル (エネルギー集中型ミル) を用いてイナワラ、サトウダイコンおよびサトウキビの搾りかす等を微粉碎化して、セルラーゼによる加水分解の向上を検討した。その結果、全種類の微粉末においてセルラーゼによる加水分解が促進された。単子葉植物であるイネはヘミセルロースであるキシランが細胞構造の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、キシランに対して特異性の高い β -Xylanase M6 を微粉末に処理し、キシランの加水分解を調べた結果、微粉末におけるキシランの分解が促進された。これは微粉碎化による細胞構造の破壊やキシランの低分子化がキシランの加水分解を促進したと推察された。また、セルロース紙を微粉碎化することによりグルコースやセロオリゴ糖が生成されることより、高度に結晶化しているセルロースが非結晶化および低分子化していることが推察された。イナワラやサトウキビの微粉末を水で懸濁することで得られた水可溶性画分にはグルコースやキシロースを構成糖とする糖鎖が存在し、サトウダイコン微粉末の水可溶性画分からはラムノースやアラビノース、グルコース、ガラクトース、グルクロン酸などの構成糖が検出された。これらの結果より、セルロースやヘミセルロース、ペクチンの低分子化が起こっていることが推察された。このようにコンバージミルを用いた微粉碎化により、細胞構造の破壊とともに細胞壁糖鎖であるセルロースやヘミセルロース、ペクチンの低分子化が生じ、細胞壁分解酵素であるセルラーゼやキシラナーゼによる加水分解が促進されることが明らかとなった。