



Title	酵素剤利用による甘藷芋からのエタノール生産(農芸化学科)
Author(s)	当山, 清善; 石原, 昌信; 与那覇, 和雄; 大久保, 勉
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(31): 35-42
Issue Date	1984-11-19
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3961
Rights	

酵素剤利用による甘藷芋からのエタノール生産[†]

当山清善*・石原昌信*・与那覇和雄*・大久保勉**

Seizen TOYAMA*, Masanobu ISHIHARA*, Kazuo YONAHARA*
and Tsutomu OHKUBO** : Ethanol production from sweet
potato tubers by applying enzyme preparations

Summary

The batch production of ethanol from sweet potato tubers (100kg) by applying commercial enzyme preparations in a 150-L fermentor was investigated. The minced tubers were macerated with pectinase (0.1%, w/w) for 17 hr at 25°C and pH 4.5. The macerated mash (pH 5.5) was heated to dextrinize and liquefy starch with α -amylase (0.05%, w/w) for 10 min at 80°C. The heat-treatment of the mash was useful to facilitate saccharification of starch and to reduce the viscosity. For saccharification, the heat-treated mash (pH 4.5) was treated with glucoamylase (0.1%, w/w) for 4 hr at 40°C. The saccharified mash was supplemented with nutrients and inoculated with dried baker's yeast (0.4%, w/w) for ethanol fermentation at 30°C. After 30 hr fermentation, the ethanol yield of 16.5% (v/v) was achieved and the fermentation efficiency was 82%. During the fermentation, the total carbon dioxide evolved was 6.6 m³. The fermented mash was distilled to produce 50% ethanol (30 L) and stillage by using a distillation apparatus.

緒 言

甘藷は単位面積当たりの年間収量が極めて高い代表的な澱粉質作物で、その芋は省エネルギー的糖化技術を確立することにより燃料用アルコール（エタノール）発酵の重要な原料となり得る。従来、甘藷芋を原料とするアルコール発酵においては、原料に加水して高温で蒸煮したのち麴または酵素剤を加えて糖化し、酵母を加えて発酵する、エネルギー消費型の発酵が行われていた。近年、省エネルギーによるアルコール生産方式を確立するための研究が行われ、上田ら^{3,4)} 山本ら^{5,11,13)} 及び田口ら¹⁾ は、麴または酵素剤を利用して芋の糖化を行ない、甘藷芋からの無蒸煮アルコール発酵技術が開発されつつある。

著者ら^{2,6,7,8,12)}は、甘藷芋の酵素剤による液状化（マセレーション）、澱粉の液化及び糖化性を調べ、

[†]澱粉質物を原料とするアルコール発酵に関する研究（第3報）

*琉球大学農学部農芸化学科

**西南総合開発（株）

琉球大学農学部学術報告 31: 35 ~ 42 (1984)

甘藷芋を原料とした無蒸煮アルコール発酵を実施するに当たっての酵素剤による処理条件の設定を行った。本報では、150 l容発酵槽を用いた甘藷芋の無蒸煮仕込みアルコール発酵を実施するため、芋(100 kg)を市販酵素剤で処理してアルコール発酵試験を行ない、アルコール生産性について検討した。

実験方法

(1) 酵素剤：甘藷芋磨碎物の液化化、澱粉の液化及び糖化には市販酵素剤(上田化学工業)を用いた。酵素剤としては *Bacillus amyloliquefaciens* の α -アミラーゼ(1万 units/g)、*Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼ(6千 units/g)及び *Aspergillus niger* のペクチナーゼ(1万 units/g)で、所定量の各酵素剤粉末を少量の水に溶解して使用した。

(2) 甘藷芋の殺菌と磨碎：実験に供した芋は沖縄県産の「紅イモ、宮農36号」で、水分及び澱粉価はそれぞれ64%及び27%であった。芋の殺菌は、水洗浄した芋を希硫酸(0.2%, pH1.5)に室温で一晩浸漬して行ない、酸浸漬芋の磨碎は電動式磨碎機を用いて行った。

(3) 芋磨碎物の液化化、液化及び糖化：液化化は、芋100kgから得られる磨碎物を塩酸でpH4.5に調節したのち、ペクチナーゼ剤100g及びピロ亜硫酸ナトリウム10g(防腐剤)を加え25°Cで行った。澱粉の液化は、ペクチナーゼ処理した液化化物をpH5.5に調節したのち α -アミラーゼ剤50gを加え80°Cで10分間保つようにゆっくり攪拌して加熱処理を行った。澱粉の糖化は、液化物をpH4.5に調節したのちグルコアミラーゼ剤100gを加え40°Cで行った。各工程の処理は、蒸気導入による間接加熱ができ、電動式自動攪拌ができる装置を用いて行った。液化化、液化及び糖化の程度は、経時的に試料を採取し遠心分離により固液分離を行ない、上澄液について還元糖(グルコースとして)をSomogyi-Nelson法で定量し、g/lで示した。

(4) アルコール発酵：発酵は、酵素剤で処理して得た芋の糖化物をポンプ移送により発酵槽へ導入し栄養源及び乾燥パン酵母(オリエンタル酵母工業)400gを加え、pH4.5、30°Cでゆるやかに攪拌して行った。栄養源には尿素(200g)リン酸一カリウム(100g)リン酸ニカリウム(100g)及び硫酸マグネシウム(10g)を用いた。防腐剤としてピロ亜硫酸ナトリウム(10g)を加えた。発酵過程で経時的に試料を採取し、遠心分離により固液分離を行ない、上澄液について還元糖及びエタノール濃度を定量した。エタノールはガスクロマトグラフィー(島津, GC-4CPTF)を用いて測定し、容量%で示した。発酵で発生する炭酸ガス量は湿式ガスメーター(品川計測器製作所, NWK-1A)を用いて測定し、総発生炭酸ガス量及び1時間当たりの発生ガス量(l)で示した。発酵終了後の発酵液は、発酵槽から蒸留器へポンプにより移送し、アルコールの蒸留を行った。

(5) 発酵槽及び蒸留器：発酵及び発酵液の蒸留には150 l容の発酵装置及び蒸留装置(関西化学機械製作所)を用いた。Fig.1は、発酵から蒸留までの過程を図式化

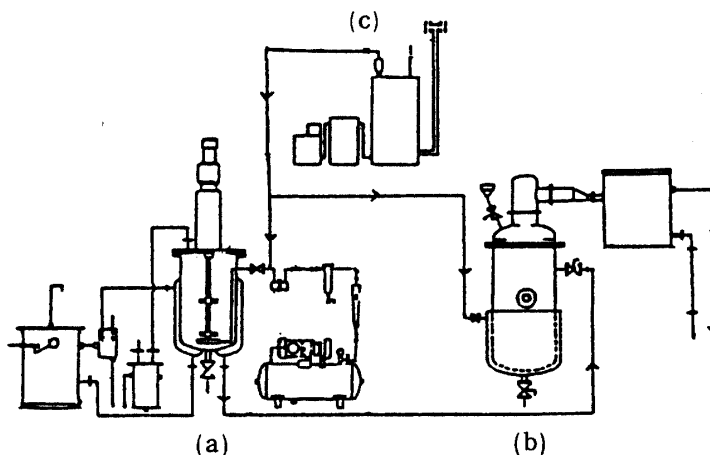


Fig.1 Flow diagram of fermentation and distillation apparatus

(a) fermentor (150 l), (b) still (150 l), (c) boiler

したものである。発酵槽は水封加温式により温度制御ができ、通気及び攪拌ができる装置である。蒸留器は、蒸気による間接加熱で蒸留ができる単式蒸留装置（ポットスチル）である。

実験結果

1. 甘藷芋の酵素剤による処理温度と発酵温度

甘藷芋を無煮沸でアルコール発酵に供するために、洗浄及び酸浸漬した原料芋を磨砕したのち酵素剤を加え芋磨砕物の液化化（マセレーション）、澱粉の液化及び糖化を行った。Fig.2は、芋磨砕物の各酵素剤による処理温度、処理時間及び発酵の経過を図式化したものである。芋磨砕物の液化化の程度は酵素濃度、処理温度及び時間によって異なるが、本実験ではペクチナーゼを加えて25°Cで17時間の処理を行った。液化化物の糖化を促進し、発酵液の蒸留時における粘度低下を図るために、 α -アミラーゼを加え80°Cで10分間加熱処理して澱粉の液化を図った。液化物を冷却したのちグルコアミラーゼを加え40°Cで4時間保って澱粉の糖化を図り、糖化物に酵母を加え、30°Cで発酵を行った。

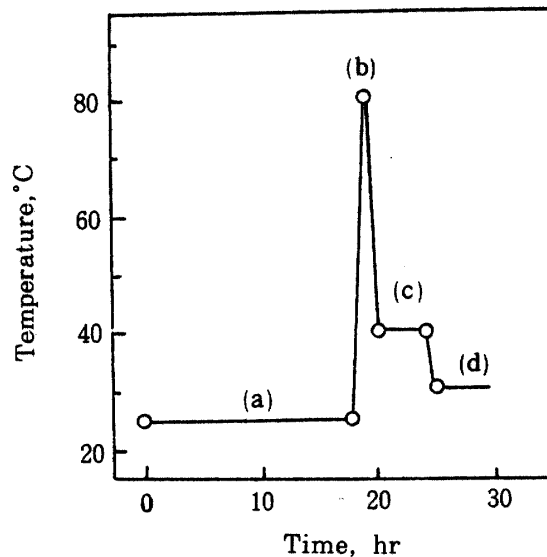


Fig.2 Temperature changes in the processes of maceration, liquefaction, saccharification and fermentation of mashed sweet potato tubers

Mashed sweet potato tubers were treated with pectinase(a, maceration), α -amylase(b, liquefaction) and glucoamylase(c, saccharification), and then inoculated with dried yeast (d, fermentation). The commercial enzyme preparations used are pectinase of *Aspergillus niger*, α -amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* and glucoamylase of *Rhizopus niveus*, respectively.

2. 甘藷芋の酵素処理及び発酵過程における還元糖量、アルコール濃度及びpHの変化

Fig.3は、洗浄及び酸浸漬した芋100kgを磨砕したのち酵素剤による処理及びアルコール発酵を行ない、各過程における還元糖量、アルコール濃度及びpHの変化を調べた結果である。固形の芋磨砕物（pH4.5）はペクチナーゼ（0.1%）で処理（25°C）することによって液化化され、攪拌ができるようになる。本実験条件下での磨砕物の液化化には8~10時間を要した。液化化に伴って液中の還元糖量の増大がみられるが、液化化完了時の還元糖量は100 g/lであった。液化化物を70°C付近まで加熱すると粘性が著しく高くなるが、 α -アミラーゼ（0.05%）を加えて80°Cで10分間処理して澱粉を液化することにより粘性は急激に低下した。加熱処理して得た液化物の還元糖量は120 g/lであった。液化物にグルコアミラーゼ（0.1%）を加え、40°Cで処理することにより澱粉の糖化が行われ還元糖量が増大し、4時間の処理で240 g/lに達した。発酵は、液化物中の澱粉が完全に糖化されない時点の糖化液に酵母と栄養源を加えて30°Cで行った。発酵の進行に伴ない発酵液中の還元糖量が減少し、発酵30時間でアルコール

濃度16.3%の発酵液が得られた。供試芋の澱粉価から算出した発酵歩合は85%であった。発酵液を蒸留装置に移送し蒸留した結果、アルコール濃度50%の留液30Lが得られた。

3. 甘藷芋液状化物の加熱処理とアルコール生産との関係

酵素剤を用いた芋磨碎物の処理において、グルコアミラーゼによる澱粉の糖化は液状化物を α -アミラーゼ存在下で加熱処理することにより促進されることが明らかになったのであるが、液状化物を加熱処理(80°C, 10分)せずにグルコアミラーゼを加えて糖化を行ない、発酵に供することができるかどうかを調べた(Fig.4)。ペクチナーゼにより処理して得た芋の液状化物にグルコアミラーゼ(0.1

%を加えて処理(40°C, 4時間)しても澱粉の糖化は行われず、還元糖の増大もみられない。加熱処理しないで得た糖化物に酵母(0.4%)を加えて発酵を行った結果、発酵30時間でアルコール濃度8%の発酵液が得られた。アルコール濃度は、 α -アミラーゼ存在下で加熱処理したのちグルコアミラーゼを加えて処理した糖化物からのアルコール濃度の約50%である。 α -アミラーゼ存在下で加熱処理しない糖化物から得た発酵液は、加熱蒸留時に著しく粘度が高くなり、蒸留によるアルコールの回収が困難であった。

4. 酵素処理した甘藷芋磨碎物の発酵過程における炭酸ガスの発生経過

Fig.5は、芋磨碎物(100kg)をペクチナーゼ、 α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼによりそれぞれ液状化、液化及び糖化処理を行ったのち酵母を加えて発酵を行ない、発酵過程における発生炭酸ガス量、還元糖量及びアルコール濃度の変化を調べた結果である。酵素処理して得た糖化物へ酵母を添加すると直ちに糖が消費され、炭酸ガスが発生しアルコールが生産される。発酵1時間当たりの炭酸ガスの発生量は発酵7~8時間目で最も多く、その後急激に減少する。炭酸ガスの発生は発酵40時間目で停止し

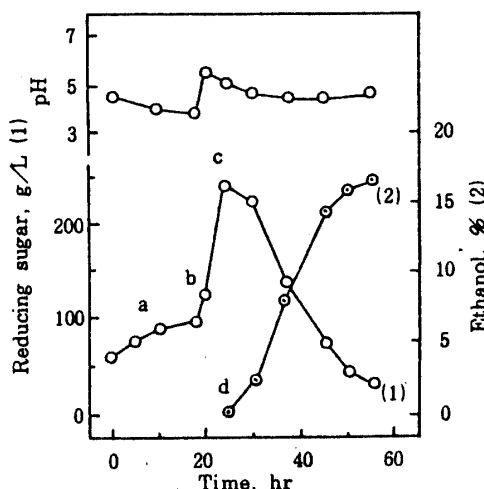


Fig.3 Changes in reducing sugar, pH and ethanol during maceration, liquefaction, saccharification and fermentation of sweet potato mash

Sweet potato tubers(100kg) were washed with water and steeped in 0.2% sulfuric acid overnight to sterilize them and mashed. The mashed tubers were macerated with pectinase(100 g) at pH 4.5 and 25°C for 17 hr(a) The macerated mash was heated with α -amylase(50 g) at pH 5.5 and 80°C for 10 min(b), and then saccharified with glucoamylase(100 g) at pH 4.5 and 40°C for 4 hr(c). The saccharified mash was used for the ethanol fermentation(d) which was conducted at 30°C after supplement with $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (100 g), $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ (100 g), $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ (100 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g) and $\text{K}_2 \text{S}_2 \text{O}_5$ (100 ppm). The medium was inoculated with dried baker's yeast(400 g). Reducing sugar was determined by the Somogyi's method using glucose as a standard. Ethanol concentration was determined using gas chromatography.

当山ほか：甘藷の酵素糖化とアルコール発酵

た。発酵40時間で発生する総炭酸ガス量は6.6 m³であった。

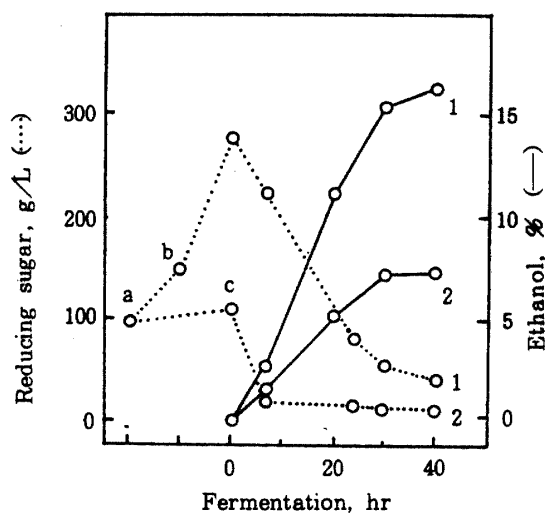


Fig.4 Effect of heat-treatment with α -amylase of macerated sweet potato mash on ethanol production

The macerated mash (100 kg) was treated (1) or not treated (2) with α -amylase at 80°C for 10 min, and then treated with glucoamylase. The treated mashes were inoculated with dried yeast. After maceration with pectinase (a), heat-treatment with α -amylase (b) and saccharification with glucoamylase (c). Other conditions are the same as Fig.3.

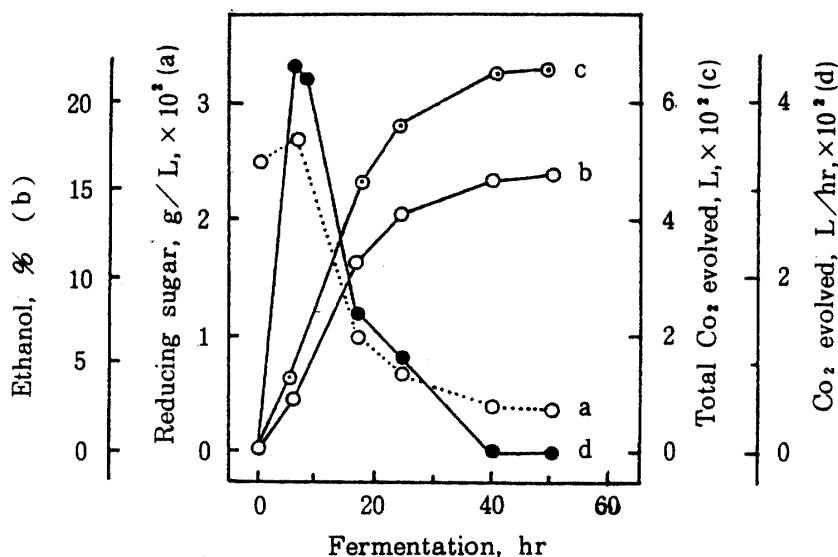


Fig.5 Time profiles of carbon dioxide evolution, residual sugar and ethanol during fermentation of enzyme treated-sweet potato mash

Mashed sweet potato (100 kg) was treated with enzyme preparations and then inoculated with dried yeast for ethanol fermentation. The gas evolved during the fermentation was determined by a gas meter. Other conditions are the same as Fig.3.

考 察

甘藷芋を無蒸煮でアルコール発酵の原料に供するためには、芋の組織細胞を崩壊して液状化(マセレーション)を図り澱粉の糖化を促進する必要がある。*Asp. niger*によって生産されるペクチナーゼが芋の組織細胞を崩壊することが明らかにされ、芋の液状化処理のためにペクチナーゼ剤が用いられている。^{5,11)} 芋を磨砕したのちペクチナーゼで処理すると、固形の磨砕物は処理時間とともに溶解・液状化され、攪拌が容易となりポンプ移送も可能となる。液状化の程度は酵素濃度及び処理温度によって異なることが前報^{7,8)}で明らかになったが、本実験では、酵素濃度及び処理温度をそれぞれ0.1%及び25°Cを採用した。磨砕物の液状化の進行に伴って還元糖量の増大がみられるが、その量は液状化完了時でも100g/l以上には増加しない。液状化物にグルコアミラーゼを加えて処理(40°C, 4時間)しても澱粉の糖化は行われず、還元糖の増大もみられない。

グルコアミラーゼによる澱粉の糖化は、液状化物を加熱処理(80°C, 10分間)することによって促進されるが、⁶⁾ 加熱処理時に粘性が高くなり攪拌が困難となる。また、加熱処理して糖化、発酵を行った発酵液は蒸留時に高い粘性を示し、アルコールの分離が困難であった。従って、液状化物中の澱粉の糖化を図るためには、 α -アミラーゼ存在下で加熱処理を行って粘度の低下を図り、澱粉を液化したのちグルコアミラーゼを加えて糖化を行なう必要がある。液化された澱粉は、グルコアミラーゼによつて容易に糖化され、高濃度の糖液が得られるが、^{7,8)} 発酵に当たっては糖化途中で酵母を加えて糖化と発酵を同時に進行させることによりアルコール濃度の高い発酵液が得られる。⁶⁾ 無加熱の液状化物にグルコアミラーゼと酵母を加えても発酵は進行するが、発酵液のアルコール濃度は低く、加熱処理して発酵した濃度の約50%に留まった。しかし、酵母存在下で無加熱処理の液状化物中の澱粉が高濃度のグルコアミラーゼによって糖化されることが明らかにされている。¹⁾

糖化液に酵母を加えると直ちに発酵が開始され、炭酸ガスが発生しアルコールが生産される。炭酸ガスの発生速度は発酵液の初発糖濃度及び接種酵母量によって異なるが、1時間当たりの炭酸ガス発生量は発酵7~8時間目で最高値に達する。糖化液を発酵して得られる発酵液のアルコール濃度は、供試原料芋の澱粉含量、酵素剤による処理条件及び使用酵母等によって異なるが、本実験条件下ではアルコール濃度16.5%の発酵液が得られた。芋100kgから発酵30時間で生産されるアルコール量は13kgで、原料の澱粉価(27.0)から算出される発酵歩合は85.0%である。また、発酵で発生する総炭酸ガス量は6.6m³で、発生炭酸ガス量から算出される発酵液中の発酵性糖はグルコースとして25kgに相当する。発酵液を単式蒸留装置を用いて蒸留を行った結果、アルコール濃度65%留液20lと22%留液10lが得られ、アルコール蒸留歩合は92%であった。現在、アルコール蒸留廃液及び甘藷茎葉等を原料としたメタン発酵を行ない、メタンガスをアルコール生産の所要熱源として利用するための研究も実施中である。^{9,10,14,15)}

要 約

甘藷芋(100kg)を酵素剤で処理し、150l容発酵槽を用いて発酵を行ないエタノール生産について検討した。

芋の磨砕物にペクチナーゼ(100g)を加えて処理(pH4.5, 25°C, 18時間)することにより液状化を図った。澱粉の糊化と液化を図るために、液状化物に α -アミラーゼ(50g)を加えて加熱処理(pH5.5, 80°C, 10分間)を行った。加熱処理することにより澱粉の糖化が容易となり、液状化物の粘度も低下した。加熱処理して得た液状化物はグルコアミラーゼ(100g)で処理(pH4.5, 40°C, 4時間)することにより糖化された。糖化物に栄養源と乾燥パン酵母(400g)を加えてpH4.5, 30°Cでエタノール発酵を行った。発酵30時間でエタノール濃度16.5%の発酵液が得られ、発酵歩合は82%であった。発酵過程で6.6m³の炭酸ガスが発生した。発酵液を単式蒸留装置で蒸留することにより、50%エタノール溶液

30ℓ が得られた。

本研究を実施するに当たりご指導下さった大阪市立大学理学部山本武彦教授に感謝します。

なお、本研究の費用の一部は昭和56年度、57年度及び58年度文部省科学研究費補助金、エネルギー特別研究によったもので謝意を表します。

引用文献

1. Chua, J.W., Fukui, N., Wakabayashi, Y., Yoshida, T., Taguchi, H. 1984 Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy-saving production of ethanol, J. Ferment. Technol. 62: 123 ~ 130
2. 石原昌信, 与那覇和雄, 当山清善 1982 微生物起源酵素剤による甘藷生澱粉および生甘藷の分解について, 琉大農学報 29: 39~45
3. Matsuoka, H., Koba, Y., Ueda, S. 1982 Alcohol fermentation of sweet potato without cooking. J. Ferment. Technol. 60: 599 ~ 602
4. Saha, B. C., Ueda, S. 1982 Alcohol fermentation of raw sweet potato by a non-conventional method using *Endomycopsis fibulgera* glucoamylase preparation, Biotechnol. Bioeng. 25: 1181~1186
5. Svendsby, O., Kakutani, K., Matsumura, Y., Iizuka, M., Yamamoto, T. 1981 Ethanol fermentation of uncooked sweet potato with the application of enzymes, J. Ferment. Technol. 59: 485 ~ 487
6. 当山清善, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷を原料とするアルコール生産：酵素によるいも組織の液状化と糖化について, 日本農芸化学会 昭和58年度大会 要旨集 p. 44
7. 当山清善, 石原昌信, 与那覇和雄, 大久保勉 1983 生甘藷の酵素による糖化とアルコール発酵, 琉大農学報 30: 185 ~ 192
8. Toyama, S., Yonaha, K., Ishihara, M. 1984 Enzymatic processes of raw sweet potato tubers for ethanol fermentation, "Research on energy from biomass", SPEY 7, p. 163 ~ 165
9. 当山清善, 大久保勉, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷茎葉のメタン発酵 第1報 小型容器を用いた発酵, 琉大農学報 30: 177 ~ 184
10. 当山清善, 大久保勉, 石原昌信, 与那覇和雄 1983 甘藷いもアルコール蒸留廃液のメタン発酵：発酵条件の検討, 日本醗酵工学会 昭和58年度大会 要旨集 p. 278
11. 山本武彦, 松村芳一, 角谷和生, 上中居和雄 1982 イモの酵素によるマセレーションとアルコール発酵, 澱粉科学 29: 117 ~ 122
12. 上中居和雄, 弾津幹夫, 野尻導彦, 与那覇和雄, 当山清善, 山本武彦 1983 甘藷の無蒸煮アルコール発酵—酵素液状化物の処理とアルコール発酵時の条件, 日本農芸化学会 昭和58年度大会 要旨集 p. 44
13. Yamamoto, T., Matsumura, Y., Uenakai, K. 1984 Application of enzyme for isolation of starch and alcohol fermentation of uncooked starchy tubers and roots, "Research on energy from biomass", SPEY 7, p. 191 ~ 195
14. Yamamoto, T., Oi, S., Toyama, S. 1982 Methane fermentation of leaf and stem of sweet potato to supply energy for production of alcohol and fertilizer for cultivation of the crop, EC. 2nd Conference on energy from biomass, Berlin

15. Yamamoto, Y., Oi S., Toyama, S., Miyazato, K. 1984 The anaerobic digestion of leaf and stem of sweet potato to use save energy for production of alcohol from the potato, "Research on energy from biomass", SPEY 7, p. 197 ~ 199