



Title	甘蔗バガスのアルカリ処理条件とアルカリ抽出液の紫外部吸収値との関係(農芸化学科)
Author(s)	当山, 清善; 与那覇, 和雄; 石原, 昌信
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(27): 79-87
Issue Date	1980-11-29
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4088
Rights	

甘蔗バガスのアルカリ処理条件とアルカリ抽出液の紫外外部吸収値との関係†

当山清善*・与那覇和雄*・石原昌信*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHARA and Masanobu ISHIHARA:
Relationship between conditions for alkali-treatment of
sugarcane bagasse and ultraviolet-absorption value of the
alkali extract

I 緒 言

農産廃棄物の再資源化のための技術開発が要請され¹⁾、甘蔗バガス、稲わら及び麦わら等の農産廃棄セルロース物質の有効利用が検討されている^{6,7)}。特に、バガスは農産加工廃棄セルロース物質としては世界で最も多く、主として製糖工場における燃料として使用されているが、余剰バガスの有効な利用法の確立が望まれている。最近、バガスを原料とした微生物菌体タンパクの生産、あるいはバガスの酵素分解を行ない有用な物質に転換させるための研究が行なわれつつある^{2,8,10,13)}。しかし、バガス成分の物理化学的特性により微生物あるいは酵素による分解が極めて困難であり、分解基質として利用するためにはバガスを物理的あるいは化学的手段によって前処理を行ない、リグノセロース構造を破壊する必要がある。

バガスの分解性を高めるために各種の前処理手段が検討されつつあり⁹⁾、また筆者ら^{14,15,16)}は、アルカリ処理がバガスの酵素的分解性を高め、処理バガスが微生物培養の良好な炭素源となり得ることを明らかにした。バガスの分解性がアルカリ処理によって抽出除去される紫外外部吸収物質と関係していることがわかったので、本報ではバガスのアルカリ処理条件と抽出液の紫外外部吸収値ならびにアルカリ処理バガスの微生物あるいは酵素による分解性との関係について報告する。

II 実験方法

(1) バガス原料：供試バガスは、砂糖きび(NCO310)を圧搾法による製糖工程で搾汁後のバガスを直ちに70℃で乾燥したもので、前報¹⁴⁾に従い40メッシュになるように粉碎した。

(2) バガスのアルカリ処理：アルカリ処理は粉碎バガスに所定濃度の水酸化ナトリウム(アルカリ)溶液を加え、120℃で20分間加熱して行った。アルカリ処理した後の固形バガス含有溶液は、濾過を行ない固形部のバガスと液部の抽出液に分別し、前者をアルカリ処理バガス、後者をバガスのアルカリ

† 甘蔗バガスの微生物学的利用に関する研究(第5報)

* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 27: 79~87 (1980)

抽出液とした。固形部のアルカリ処理バガスは水洗したのち70°Cで乾燥した。

(3) アルカリ抽出液の紫外吸収スペクトルとUV-吸収値：バガスのアルカリ処理で得られるアルカリ抽出液の紫外部(UV)吸収スペクトルは、抽出液を希釈したのちpH7.0で日立2波長自記分光光度計356を用いて測定した。抽出液のUV-吸収値(280nm値)は東芝ベックマン(株)SPECTA-20を用いて測定した。

(4) 麹菌の培養：供試菌株にはバガス分解酵素の生産性が高く、またバガス培地で良好な生育を示すことが前報^{14,15)}で確められている *Aspergillus awamori* IFO 4033 を用いた。供試泡盛麹菌株の培養は前報¹⁵⁾に準じ、所定濃度のアルカリ溶液でバガスをアルカリ処理(120°C, 20分)したのち得られるアルカリ抽出液含有バガス(固形のアルカリ処理バガス及びアルカリ抽出液)を炭素源とし、硫酸アンモニウムを窒素源とした無機塩含有液体培地(100 ml, pH6.0)を用いた。培養は30°Cで72時間振とうして行った。麹菌の生育度は、培養後のバガス残渣含有菌体を洗浄、乾燥(50°C)及び粉碎したのち、前報¹⁵⁾に従い全窒素量を求め全粗蛋白含量(%)で示した。

(5) バガスの酵素分解：酵素反応に使用したバガスは、所定濃度のアルカリ溶液で処理(120°C, 20分)して得た固形のアルカリ処理バガスで、酵素液としては供試泡盛麹菌株をアルカリ抽出液含有バガスを炭素源とした液体培地で振とう培養(72時間)した培養液を用いた。酵素反応の組成はアルカリ処理バガス100 mg、緩衝液(0.05M, pH4.0)及び酵素液で総量10 mlとし、反応は37°Cで3時間振とうして行った。バガスの分解度は、反応で生成した還元糖量を前報¹⁴⁾に準じて測定し、反応混液1.0 ml当りのグルコースmg数で示した。

III 実験結果

1 アルカリ抽出液のUV-吸収スペクトル

バガスをアルカリ溶液で加熱処理するとバガスのアルカリ可溶成分が抽出され、紫外部に吸収を有す

Fig. 1 Ultraviolet-absorption spectra of the alkali-extract of bagasse in neutral solution

Bagasse was ground to 40 mesh and was treated with 0.5% NaOH solution (in a mixture of 1.0g solid/20 ml liquid) at 120°C for 20 min, and then the alkali extract was recovered by filtration. The extract was diluted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 100x diluted) and was scanned from 200 to 340 nm using a recording spectrophotometer.

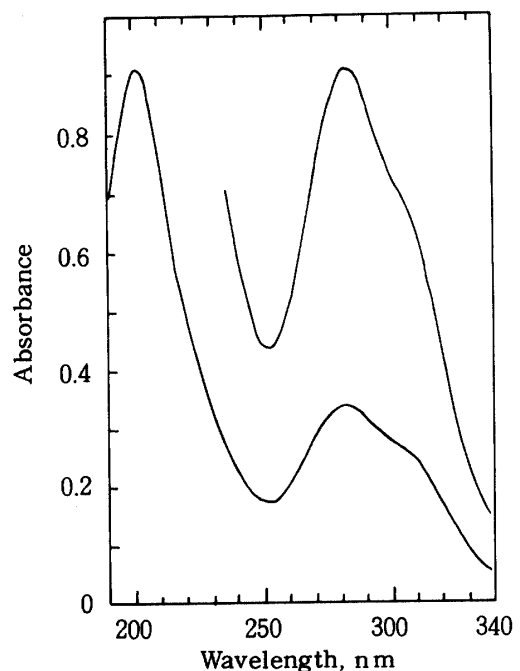
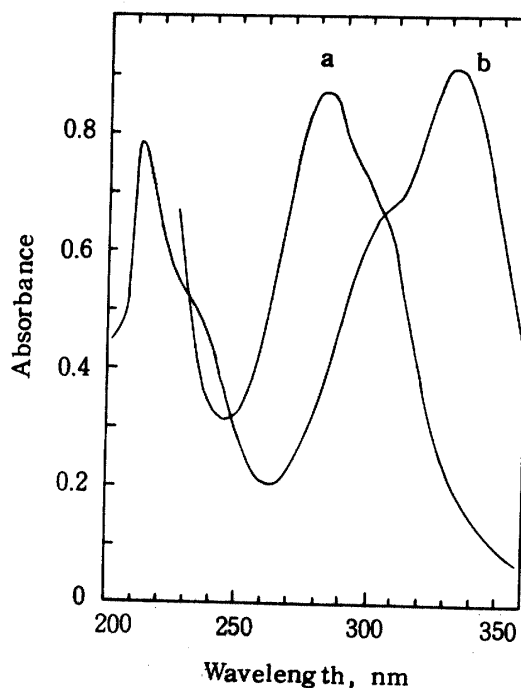


Fig. 2 Ultraviolet-absorption spectra of the alkali extract of bagasse in neutral and alkaline solution

The extract was diluted with 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.0, a) and 0.01 M NaOH solution (pH 13.0, b). Other conditions are the same as Fig. 1.



る抽出液が得られる。Fig. 1 はバガス (2.0 g) に 20 倍量の 0.5% アルカリ溶液を加え、120°C で 20 分間処理したのち固液分離を行ない、アルカリ抽出液の紫外外部吸収スペクトルを測定した結果である。バガスのアルカリ抽出液は、アルカリ溶液では褐色を呈しているが、スペクトルの測定はリン酸緩衝液 (0.01 M, pH 7.0) で 100 倍に希釈した抽出液を用いて行った。図から明らかなように、バガスのアルカリ抽出液は 202 nm と 280 nm に吸収極大があり、310 nm 付近に吸収の肩がある。

Fig. 2 は、アルカリ抽出液を pH 7.0 と pH 13.0 におけるスペクトルである。抽出液のスペクトルをアルカリ性で測定すると、pH 7.0 で 280 nm にある吸収極大が 330 nm に移動し、305 nm に吸収の肩を有するようになる。また、pH 7.0 でみられた 202 nm の吸収極大は、アルカリ性で 212 nm に移動した。以下の実験における抽出液の UV-吸収値は、pH 7.0 での吸収極大である 280 nm における吸光度を測定して示した。

2 アルカリ濃度と抽出液の 280 nm 値

バガスをアルカリ溶液で加熱処理して得られる抽出液は紫外外部に吸収があり、pH 7.0 で 280 nm に吸収極大を有することがわかった (Fig. 1)。バガスを処理するアルカリ濃度と抽出液の紫外外部における吸収との関係を調べるために、バガスに 20 倍量の各種濃度のアルカリ溶液を加え、120°C で 20 分間処理を行った。Fig. 3 は、各種濃度のアルカリ溶液で処理した抽出液の pH 7.0 での 280 nm における吸収値とともに、アルカリ処理後のバガス重量及び抽出液の pH を測定した結果である。抽出液の 280 nm 値はバガスを処理するアルカリ溶液の濃度の増加に伴って増大し、0.5% アルカリ濃度で最高の値に達する。アルカリ濃度をさらに高めてバガスを処理しても、抽出液の 280 nm 値の増大はほとんどみられない。一方、バガス重量はアルカリ濃度の増加に伴って減少し、0.5% アルカリ溶液で 60%、2.0% アルカリ溶液で 50% に減少した。アルカリ抽出液の pH はアルカリ濃度の増加に伴って高くなり、0.75% アルカリ溶液で最も高い値 (pH 13.0) となった。抽出液の 280 nm 値及びバガス重量の減少からみたバガスを処理するアルカリ濃度は 0.5% で充分であることが明らかとなった。

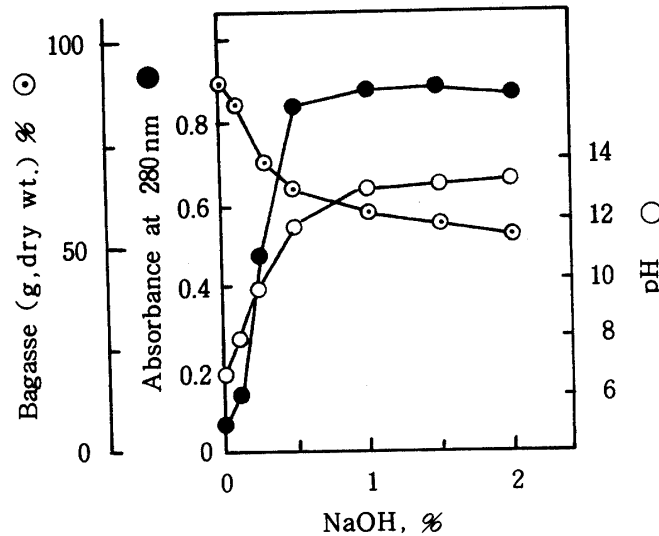


Fig. 3 Effect of NaOH concentration in the alkali-treatment mixture on the absorption value at 280 nm and pH of alkali extract, and the dry weight of bagasse

Bagasse was treated with different concentrations of NaOH solution (in a mixture of 1.0 g of solid/20 ml of liquid) at 120°C for 20 min as shown in Fig. 1. After removing the alkali extract by filtration, the solid alkali-treated bagasse was washed with water and dried, and weighed. The alkali extract was diluted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 100 x diluted) and the absorption peak at 280nm was determined.

3 アルカリ溶液量と抽出液の 280 nm 値

バガスを処理するアルカリ濃度は 0.5% が適当であることがわかったが (Fig. 3), 次にバガス重量に対するアルカリ溶液量と抽出液の 280 nm 値との関係を調べた。アルカリ処理は, バガス (2.0 g) に各種容量の 0.5% アルカリ溶液を加え, 120°C で 20 分間処理を行ない, 各処理液を所定量に希釈したのち固液分離を行った。Fig. 4 には, 各種アルカリ溶液量で処理した抽出液の 280 nm 値と pH 及びバガス重量の変化を示した。アルカリ溶液量に対するバガス重量比, すなわちアルカリ溶液添加比率が小さいと抽出液の 280 nm 値はほとんど変化がみられないが, その比率が 7.5 以上で直線的に増加し, 20 で最高に達する。アルカリ溶液の添加量はバガス重量に対し 20 倍量が適当であることを示している。バガス重量もアルカリ溶液量の増加に伴って減少し, 20 倍量以上のアルカリ溶液でバガス重量の減少が大きい。アルカリ抽出液の pH は, アルカリ溶液量の増加とともに上昇する。

4 バガス量と抽出液の 280 nm 値

アルカリ処理におけるバガス量と抽出液の 280 nm 値との関係を調べるために, 各種量のバガスに 20 倍量の 0.5% アルカリ溶液を加え, 120°C で 20 分間処理を行なったのち, 抽出液の 280 nm 値及び pH を測定した (Fig. 5)。図から明らかなように, バガス量の増加とともに抽出液の 280 nm 値が直線的に増大し, バガス量が 6.0% で最も高い値に達する。バガス量が多いと抽出液の 280 nm 値は減少す

る。従って、抽出液の 280 nm 値に基づくバガスの最適濃度は 6.7～7.0% である。抽出液の pH は、バガス量の増加に伴なって低下する。

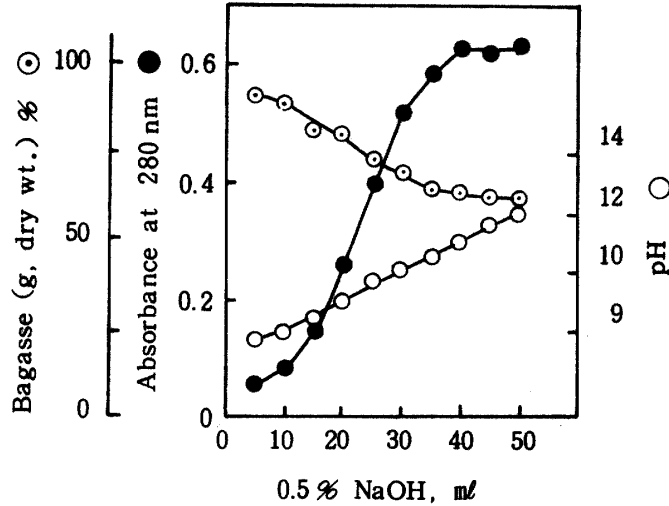
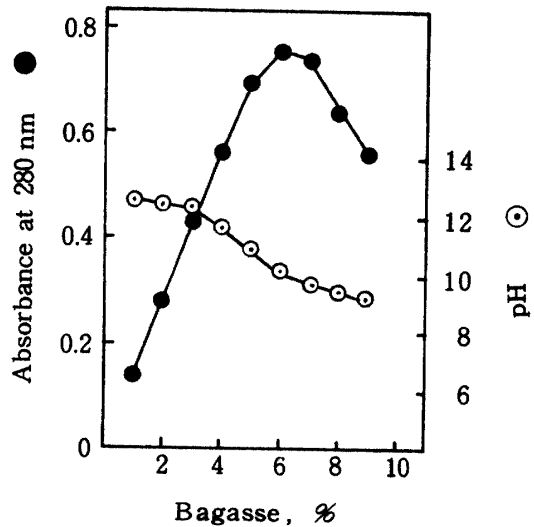


Fig. 4 Effect of the volume of NaOH solution in the alkali-treatment mixture on the absorption value at 280 nm and pH of alkali extract, and the dry weight of bagasse

Bagasse (2.0 g) was treated with different volumes of 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min. Other conditions are the same as Fig. 3.

Fig. 5 Effect of bagasse concentration in the alkali-treatment mixture on the absorption value at 280 nm and pH of alkali extract

Various amounts of bagasse were treated with 0.5% NaOH solution (100ml) at 120°C for 20 min. Other conditions are the same as Fig. 3.

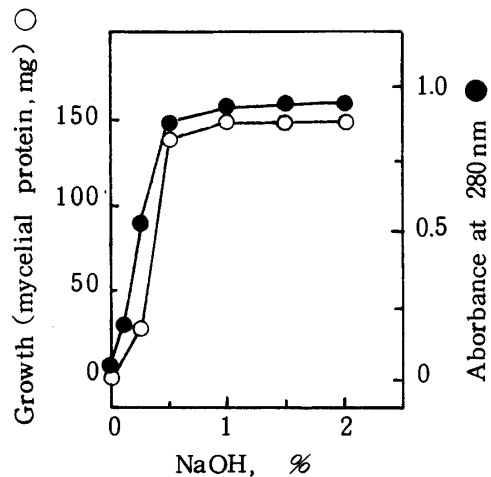


5 アルカリ処理バガス含有培地における泡盛麹菌の生育

バガスをアルカリ溶液で加熱処理すると、280 nm に吸収極大を有する抽出液が得られることがわかったので、次に抽出液の 280 nm 値とアルカリ処理バガスを炭素源とした培地における泡盛麹菌の生育との関係を調べた。培養基質に用いたバガスのアルカリ処理は、バガスに対して 20 倍量の各種濃度のアルカリ溶液を加え、120°C で 20 分間加熱して行った。各処理溶液を中和したのち硫酸アンモニウムを含む無機塩を加えて液体培地を調製し、泡盛麹菌の培養を行なった。Fig. 6 には、各種濃度のアルカリ溶液

で処理したバガス培地における泡盛麹菌の生育度及びアルカリ処理して得られる抽出液の280nm値を示した。供試泡盛麹菌株はアルカリ処理したバガス培地で良好に生育し、バガスを処理するアルカリ濃度の増加に伴って生育度が増大する。最も高い生育度に達するアルカリ溶液の濃度は0.5%であり、1.0%以上のアルカリ溶液でバガスを処理しても生育度は高められない。また、泡盛麹菌の生育度は各種濃度のアルカリ溶液で処理して得た抽出液の280nm値と平行関係にあり、0.5%アルカリ溶液処理で両者が最も高い値に達する。このことは、アルカリ溶液でバガスから抽出される紫外外部吸収物質が供試泡盛麹菌株によるバガス成分の資化分解性と関係していることを示している。

Fig. 6 Relationship between the growth of *Asp. awamori* on alkali-treated bagasse and the absorption value at 280nm of alkali extract



Bagasse was treated with different concentrations of NaOH solution and the absorption value at 280nm of alkali extract was determined as shown in Fig. 3. *Aspergillus awamori* was grown in a liquid medium containing 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% KCl , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1.5% alkali-treated bagasse. The cultures were carried out in 500ml-shake flask using 100ml of the medium at 30°C for 72 hr with shaking. Fungal mycelia and residual bagasse were collected, washed, dried at 50°C, and weighed. The degree of the growth was shown as the amount of crude protein yield in the dried material.

6 アルカリ処理バガスの酵素分解性と抽出液の280nm値との関係

供試泡盛麹菌株はアルカリ処理したバガスを炭素源とした培地で良好な生育を示し、その生育度がアルカリ抽出液の280nm値と関係していることが明らかとなったので、次に固形のアルカリ処理バガスの酵素による分解性と抽出液の280nm値との関係を調べた。酵素反応基質には、20倍量の各種濃度アルカリ溶液で処理(120°C, 20分)して得た固形のアルカリ処理バガスを用い、アルカリ抽出液含有バガス培地で泡盛麹菌を培養して得た培養液を酵素液として用いた。各種濃度のアルカリ処理バガスを基質とした酵素反応で増加する還元糖と抽出液の280nm値との関係を示したのがFig. 7である。無処理のバガスは供試泡盛麹菌株の酵素によってほとんど分解されないが、アルカリ溶液で処理したバガスは分解を受け還元糖が増加する。最も高い分解が0.5%アルカリ溶液で処理したバガスで得られ、高濃度のアルカリ溶液でバガスを処理しても分解性は高められていない。アルカリ処理バガスの酵素による分

解性の増加も抽出液の 280 nm 値の増加と一致している。従って、アルカリ溶液でバガスから抽出される紫外外部吸収物質が固形バガスの酵素による分解性にも関与していることが示唆される。

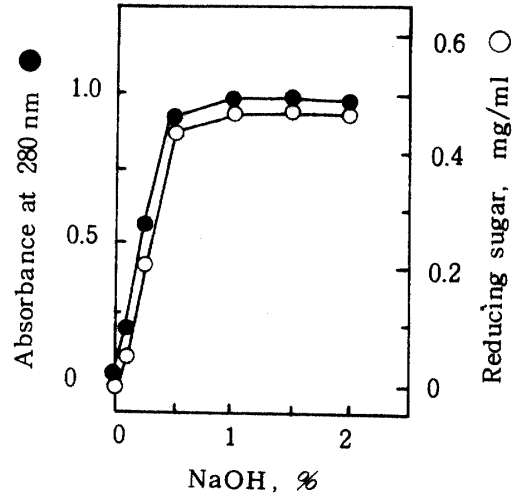


Fig. 7 Relationship between the enzymatic degradability of alkali-treated bagasse and the absorption value at 280 nm of alkali extract

Bagasse was treated with NaOH solution and the absorption value at 280nm was determined as shown in Fig. 3. *Asp. awamori* was grown in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution as shown in Fig. 6. The reaction mixture for the enzyme assay contained 5.0 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.0), 100 mg of alkali-treated bagasse and culture filtrate of the strain in a volume of 10 ml. The enzyme reaction was carried out at 37°C for 3 hr with shaking. The degradability of bagasse was shown as an increase in the amount of glucose(mg) in the reaction mixture (1 ml).

IV 考 察

甘蔗バガスをアルカリ処理すると脱リグニンが行なわれ、アルカリ処理されたバガスは微生物による資化醗酵性が向上し、微生物起源酵素によって分解されやすくなることが認められている^{4,8,9)}。アルカリ処理によって難分解性のバガスが微生物及び酵素の作用を受けやすくなることは、リグノセルロース結晶構造が破壊されることに基因するものと考えられるが、詳細な機構は解明されていない。

アルカリ処理によってバガスから抽出されるアルカリ可溶成分について調べた結果、バガスをアルカリ溶液で処理するとバガス重量が減少するとともに、紫外部に吸収を有し、pH7.0で280nmに吸収極大を有する抽出液が得られる (Fig. 1)。紫外部に吸収を有する抽出液はアルカリ溶液で処理したバガスから得られ、水溶液で処理したバガスからは得られない。抽出液の280nm値は、バガスを処理するアルカリ溶液の濃度及びアルカリ溶液の量によって異なり (Fig. 3 及び Fig. 4)、最も高い280nm値はバガス重量に対し20倍量の0.5%アルカリ溶液を加えて処理したバガスから得られる。抽出液における280nm値の増大に伴って固形バガスの重量が減少しており、抽出液の吸収値はアルカリ溶液で抽出されるアルカリ可溶成分に依存していることを示している。抽出液のpHが10.5以上で高い紫外外部吸収値が得られ、本吸収値は、バガスに対するアルカリ量及び溶液量によって異なるとともに、処理温度の増大に伴って高い値が得られる。

筆者ら^{14,15,16)}は、泡盛麹菌がアルカリ溶液で処理したバガスを炭素源とした培地で良好な生育を示し、アルカリ処理した固形のバガスが同菌株の酵素によって分解されやすくなることを明らかにした。バガスの資化分解性及び酵素による分解性が、アルカリ処理で得られる抽出液の280 nmの増加に伴って増大する (Fig. 6 及び Fig. 7)。抽出液の280 nm値が高い値を示すアルカリ濃度で処理されたバガスが、微生物培養及び酵素分解の良好な基質となり得る。このことは、バガス成分の分解性がバガスに含まれる紫外部吸収物質をアルカリ処理によって抽出除去することにより促進されることを示している。

最近、バガス成分の酵素による加水分解性とバガスの前処理との関係が調べられ、アルカリ処理した固形バガスの酵素的分解機構の解明が行なわれつつある^{3,5)}。アルカリ処理によってバガスのリグニン及びヘミセルロース等のアルカリ可溶成分が抽出除去され^{11,17)}、リグニン・セルロース複合体の結晶構造の物理化学的变化がおこり^{9,12)} 酵素作用が受けやすくなるものと考えられる。本研究で、バガスの分解性がバガスの紫外部吸収物質をアルカリ溶液で抽出除去することにより著しく高められることが明らかになり、本吸収物質がセルロースあるいはリグニンと結合していることが示唆される。本物質は透析性の低分子で、フェノール化合物であることが判明しており、今後本物質の単離・同定を行ない、本物質とバガスセルロースの分解性との関係についてさらに検討する予定である。

V 要 約

甘蔗バガスのアルカリ処理を行ない、アルカリ抽出液の紫外部吸収値とアルカリ処理条件との関係について調べた。バガスに水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液を加え、120°Cで20分処理するとバガス重量が減少するとともに、紫外部に吸収を有する抽出液が得られた。抽出液は、pH7.0で280 nm及び202 nmに吸収極大を有し、310 nmに吸収の肩があった。アルカリ抽出液の280 nm値は、バガスを処理するアルカリ溶液の濃度及び液量の増加に伴って増大した。バガス重量に対して20倍量の0.5% NaOH溶液を加え、120°Cで20分間処理すると高い280 nm値を有した抽出液が得られた。バガスの微生物及び酵素による分解性は、アルカリ処理でバガスから紫外部吸収物質を除去することにより高められた。

本研究は、昭和54年度文部省科学研究費特別研究「環境科学」, 「資源循環領域」の「植物廃棄物有効利用に関する研究」(樋口隆昌班)における分担研究の一部として行われたものである。

文 献

1. Detroy, R. W. and Hesseltine, C. W. 1978 Availability and utilisation of agricultural and agro-industrial wastes, *Process Biochemistry*, 13: 2 ~ 8
2. Dekker, R. F. H. and Richards, G. N. 1973 Effect of delignification on the in vitro rumen digestion of polysaccharides of bagasse, *J. Sci. Fd. Agric.*, 24: 375 ~ 379
3. Dwivedi, C. P. and Ghose, T. K. 1979 A model on hydrolysis of bagasse cellulose by enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414, *J. Ferment. Technol.*, 57: 15 ~ 24
4. Garcia-Martinez, D. V., Ogawa, T., Shinmyo, A. and Enatsu, T. 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzyme produced by *Penicillium variable*, 52: 378 ~ 387
5. Ghose, T. K. and Bisaria, V. S., 1979 Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances, *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 131 ~ 146
6. Han, Y. W. 1975 Microbial fermentation of rice straw: Nutritive composition and in vitro

- digestibility of the fermentation products, *Appl. Microbiol.*, 29: 510 ~ 514
7. Hartley, R. D., Jones, E. C., King, N. J. and Smith, G. A. 1974 Modified wood waste and straw as potential components of animal feeds, *J. Sci. Fd. Agric.*, 25: 433 ~ 437
 8. Han, Y. W. and Callihan, C. D. 1974 Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth, *Appl. Microbiol.*, 27: 159 ~ 165
 9. Millett, M. A. and Baker, A. J. 1975 Pretreatment to enhance chemical, enzymatic, and microbial attack of cellulose materials, *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 193 ~ 219
 10. Srinivasan, V. R. and Han, Y. W. 1969 Utilization of bagasse, *Advan. Chem. Ser.*, 95: 447 ~ 460
 11. Shiroma, S. 1979 The effects of treatment of bagasse with sodium hydroxide under steam pressure in chemical changes and digestibility, II. Effect on cellulose preparation, *Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus* 26: 371 ~ 378
 12. Tarkow, H. and Feist, W. C. 1969 A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia, *Advan. Chem. Ser.*, 95: 197 ~ 217
 13. Toyama, N. and Ogawa, K. 1975 Sugar production from agricultural woody wastes by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 5, 225 ~ 244
 14. 当山清善, 与那覇和雄, 池間洋一郎, 上原初枝 1976 泡盛麹菌のバガス分解酵素について, *琉大農学報* 23: 195 ~ 203
 15. 当山清善, 与那覇和雄, 上原初枝 1977 バガスを炭素源とする泡盛麹菌の培養, *琉大農学報* 24: 253 ~ 261
 16. Toyama, S., Yonaha, K. and Uehara, H. 1978 Growth of *Aspergillus awamori* on sugar cane bagasse, "Microbiology for environmental cleaning" (ed. by Arima, K.), p. 604 ~ 611, Scientific reports of the research project "Environment Cleaning by Microorganisms, 1974 - 1977",
 17. 安田正昭, 金城棟秀, 比嘉賀得, 清水俊秀 1977 沖縄産甘蔗バガスの化学組成とその多額類について, *琉大農学報* 24: 269 ~ 274

Summary

Sugarcane bagasse was treated with alkali, and the effects of conditions for the alkali-treatment on the ultraviolet-absorption value of the alkali-extract were investigated. When bagasse was treated with NaOH solution at 120°C for 20 min, the dry weight of bagasse decreased and the alkali-extract showed characteristic ultraviolet absorption. The extract had absorption peaks at 280nm and 202nm, and shoulder at 310nm in neutral solution. The absorption value at 280nm of the alkali-extract increased with increase in the concentration and volume of NaOH solution. When bagasse was treated with 0.5% NaOH solution in ratio of 1 : 20(w/v) at 120°C for 20 min, the high absorption-value at 280nm of the extract was obtained. The removal of the ultraviolet-absorbing material of bagasse by treatment with alkali caused an increase in the degradability of the bagasse by microorganism and enzyme.