キシラナーゼによるキシラン含有天然物から キシランの加水分解抽出について*

(2) Corncobs に対する前処理条件の検討

日下部 功, 安井恒男, 小林達吉

(東京教育大学農学部木材糖化研究施設)

昭和 50 年 10 月 31 日 受理

Enzymatic Hydrolysis-extraction of Xylan from Xylan-containing Natural Materials

(2) Survey of Optimum Conditions for NaOH-pretreatment of Corncobs

(Studies on Xylanase System of *Streptomyces* Part VI)

By Isao KUSAKABE, Tsuneo YASUI and Tatsuyoshi KOBAYASHI

Laboratory of Wood Hydrolysis and Fermentation, Faculty of Agriculture,

Tokyo University of Education, Komaba-cho, Meguro-ku, Tokyo

Survey of optimal conditions for NaOH-pretreatment of corncobs to make xylan component susceptible to the xylanase action are described.

The optimal concentrations of NaOH for pretreatment were 1~2.5%. At these concentrations, a small amount of xylan as well as a considerable amount of impurities was dissolved into a pretreating alkaline solution, while the major part of xylan was retained in the residues and effectively converted to a hydrolyzable state.

Pretreatment at 30°C for 6 hr, at 50°C for 1 hr or at 70°C for 20 min in the case of steeping in 2% NaOH gave satisfactory results.

Under a desirable condition, the yield of pentosan extracted from corncobs by the action of *Streptomyces* xylanase reached to 92~94% of the total pentosan contained in original materials. Weight loss caused by the pretreatment and the yield of saccharification-residues after the enzymatic hydrolysis-extraction were about 20% and 40% on the basis of weight of original materials, respectively.

Rates of enzymatic hydrolysis of insoluble xylan (hardwood) and xylan remaining in the NaOH-pretreated corncobs were almost the same. (Received October 31, 1975)

緒 言

天然物中のキシランは、分解されにくい状態で存在しており、キシラナーゼに対しても著しい抵抗性がある。従って、キシラナーゼによる天然物キシランの加水分解抽出は、従来、全く注目されていなかった。しかし、前報において、著者らは、キシラン含有天然物を希アルカリ溶液処理⁽¹⁾または高温湿熱処理⁽²⁾などの前処理を行な

えば、キシランは易分解化され、天然物キシランをキシラナーゼで加水分解抽出することによって、キシロースおよびそのオリゴ糖として、容易に得ることができるとを発見し、報告した。さらに、この前処理は、多くのキシラン含有天然物に対しても、一般的に有効であることも明かになった⁽¹⁾。

この報告では、工業的に利用可能と思われるコーンコブ (corncobs, トウモロコシ穂軸) から酵素でキシランを水解抽出するにあたり、NaOH 溶液による前処理方法を取上げ、NaOH 濃度、前処理時間および温度などの前

* *Streptomyces* 属の xylanase 系に関する研究 (第 6 報)。

処理条件を検討し、水解抽出の最適条件設定について若干の基礎的知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. キシラナーゼ 前報⁽¹⁾に記載された酵素液 (*Streptomyces* sp. E-86 の培養濾液) と同一のものを使用した。なお、本実験で使用した酵素液は、すべて同一バッチで調製されたものであって、これを凍結保存し、用時に融解して使用した。

2. コーンコブ アメリカ産のものを使用し (天野製薬株式会社より恵与された)、試料中の全ペントサン含量および酸水解法による中性糖の分析結果を Table I に示した。

3. 前処理方法と水解抽出実験の一般操作および糖の定量法 前処理と水解抽出などの実験方法の概要を Fig. 1 に示した。すなわち、コーンコブをエルレンマイヤーフラスコに秤量し (少量の実験では試験管)、NaOH 溶液を加え、所定の温度および時間浸漬して前処理を行った (浸漬中は、静置または1日1~2回、上下を反転する程度に混合した。なお、使用したコーンコブの量や前処理条件などの詳細は、実験結果の図と表の説明の部分に記載した)。前処理後、バスケット型遠心分離機で固液分離した後、さらに濾液は濾紙で濾過し、前処理液に溶出した溶出ペントサンを、オルシノール法⁽⁸⁾で定量した。一方、固形物はアルカリの反応が消失するまで水洗し、脱水した後、一部を一定量とり、乾物量を測定し、前処理収率を算出した。また、脱水後の未乾燥の固形物を、前報⁽¹⁾記載の糖化試験器に入れ (少量実験の場合には、L字管で振盪)、酵素液を加えて酵素反応を行ない、

Table I. Distribution of Particle Size and Carbohydrate Composition of Corncobs Used

Distribution of particle size							
Mesh size (mm)	14< (1.19<)	14> (1.19>)	16> (0.99>)	20> (0.83>)	24> (0.70>)	28> (0.59>)	32> (0.49>)
% (weight)	3.2	6.6	23.0	24.0	18.2	6.8	8.2
Carbohydrate composition							
Moisture (%)	Potential pentose ^{a)} (%)	Sugar composition ^{b)} (%)					
		Arabinose	Xylose	Galactose	Glucose		
8.3	36.3 (as anhydroxylose) 41.3 (as xylose)	3.4	51.3	0.8	44.7		

^{a)} Based on dry matter, and determined by orcinol method.⁽⁹⁾

^{b)} Based on total amount of neutral sugar, and determined by gas-liquid chromatography.⁽⁴⁾

Fig. 1. Experimental Scheme for Pretreatment of Corncobs and Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Pretreated Corncobs.

ペントサンの水解抽出実験を行なった。経時的にサンプリングし、濾過し、濾液中の直接還元糖および全還元糖(いずれもソモギー法⁽⁵⁾)を測定し、水解抽出率(あるいは量)と糖の平均重合度⁽¹⁾を求めた。なお、水解抽出率は、使用した試料中の全ペントサン含量に対し、水解抽出されたペントサン含量の割合で表わした。さらに、水解抽出実験後の固形物は、水洗し、乾燥し、秤量し、糖化残渣とした。なお、固形物の乾燥は、すべて 95°C で 15~16 時間行なった。

実験結果

1. 前処理における NaOH 濃度の影響

コーンコブを、Fig. 2 に示した各濃度の NaOH 溶液で 30°C, 5 日間前処理した。固液分離後、水洗し、固形物に酵素液を加え、24 時間水解抽出を行なった。Fig. 2 に前処理収率、溶出ペントサン量および糖化残渣の値を示した。すなわち、前処理収率は、NaOH 濃度の増加とともに減少し、2% NaOH 溶液による前処理では、前処理収率は 79%, 4% では 65% であった。一方、溶出ペントサン量は、2% NaOH 以上で増加し、3% NaOH では 10%, 4% では 17% であった。また、糖化残渣は、

Fig. 2. Effect of NaOH Concentration in Pretreatment on Weight Loss and the Amounts of Solubilized Pentosan and Saccharification-residue.

Air dried corncobs 109 g (100 g of dry matter) were steeped into 440 ml of alkaline solution at various concentrations indicated in this figure, at 30°C for 5 days.

—○— dry weight of residue after pretreatment, —●— saccharification-residue, —○— solubilized pentosan.

Fig. 3. Time Course of Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Pretreated Corncobs.

The reaction mixtures consisting of the washed materials pretreated as described in Fig. 2 and 500 g of the xylanase solution were stirred in 1500 ml glass vessels with agitation at 200~300 rpm. Throughout the reaction, the pH was maintained at 5.6~5.8 by the addition of 5 N NaOH or HCl solutions, and temperature was held at 55°C.

Concentration of NaOH solution used for pretreatment; —x— non-treatment, —●— 0.5%, —○— 1%, —△— 1.5%, —○— 2%, —●— 2.5%, —x— 3%, —○— 4%.

Fig. 4. Effect of Pretreatment-time on Weight Loss and Amounts of Solubilized Pentosan and Saccharification-residue.

Air dried corncobs (109 g) were steeped into 440 ml of solutions containing 9.0 g of NaOH at 30°C for time indicated in this figure.

—○— dry weight of residue after pretreatment, —●— saccharification-residue, —○— solubilized pentosan.

NaOH 濃度 2% までは漸次減少したが, 2% 以上の濃度ではほとんど変化がなかった。

次に, Fig. 3 に酵素によるペントサン水解抽出率の経時変化 (0~8, 24 時間) を示した。すなわち, 24 時間酵素反応後の水解抽出率は, 無処理では約 30% であったが, 2% NaOH 処理では約 93% に達した。

2. 前処理時間の影響

2% NaOH, 30°C で, Fig. 4 に示した時間 (0~12 時間, 1~5 日) の前処理を行なった。前処理収率は, 前処理初期に急激な減少を示したが (20 分間処理後で収率 88.3%), その後の減少はわずかであった。一方, 溶出ペントサン量は, 初期から緩慢な増加を示した。糖化残渣は, 長時間処理でも約 40% に止まった。

次に, Fig. 5 に酵素によるペントサン水解抽出率の経時変化を示した。24 時間酵素反応後の水解抽出率は, 前処理 6 時間ないし 12 時間では, 約 94% に達した。

3. NaOH の総量を一定とし, 濃度の異なる NaOH 溶液による前処理

水 440 ml, 590 ml, 890 ml, 1790 ml の各々に, NaOH 9 g を溶解した溶液 (NaOH 濃度は, 各々 2, 1.5, 1, 0.5% に相当) に, コーンコブ 109 g を加え, 30°C で 5 時間前処理した。Fig. 6 に前処理収率, 糖化残渣, アルカリ消費量および溶出ペントサン量を示した。なお, アルカリ消費量は, 前処理液中に残存している NaOH を

Fig. 5. Time Course of Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Corncoobs Pretreated for Various Duration.

The washed materials pretreated by method described in Fig. 4 were subjected to hydrolysis by 500 g of xylanase solution. Enzyme reactions were carried out as described in Fig. 3.

Pretreatment-time: —x— non-treatment, —●— 20 min, —○— 1 hr, —◐— 3 hr, —◑— 6 hr, —◒— 12 hr, ----- 1, 2, 3, 4 and 5 days.

Fig. 6. Effect of Concentrations of Alkaline Solutions Containing the Same Amount of NaOH in Pretreatment on Weight Loss, Amounts of Solubilized Pentosan and Saccharification-residue.

Air dried corncoobs 109 g were steeped into 440 ml, 590 ml, 890 ml and 1790 ml of solutions containing 9.0 g of NaOH, at 30°C for 5 hr.

—○— dry weight of residue after pretreatment, —●— saccharification-residue, —○— NaOH consumed, —◐— solubilized pentosan.

Fig. 7. Time Course of Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Corncoobs Pretreated by the Alkaline Solutions at Various Concentrations Containing the Same Amount of NaOH.

The washed materials pretreated by method described in Fig. 6 were subjected to hydrolysis by 500 g of the xylanase solution. Enzyme reactions were carried out as described in Fig. 3.

Concentration of NaOH: —●— 0.5%, —○— 1%, —◐— 1.5%, —◑— 2%.

HCl で定量し, 残存 NaOH 量から消費 NaOH 量を算出し, 乾物コーンコブ 100 g に消費された NaOH 量として表示した. この条件下では, 0.5% 以下の濃度では, 前処理による重量減少も少なく (前処理収率も高く), 消費 NaOH 量も少なかった. 糖化残渣は, 1% 以上の濃度ではほぼ一定となったが, 溶出ペントサン量は, 濃度にはほぼ比例して増加した.

次に, Fig. 7 に水解抽出率の経時変化を示した. 水解抽出率は, 1 および 2% の NaOH 処理ではほとんど同じ結果となったが (91~94%), 0.5% 以下では, 24 時間水解抽出後約 80% で, 従って前処理が不十分と思われる.

4. 前処理温度の影響

コーンコブを 2% NaOH で, 50°C および 70°C で, 各々 20 分, 1, 3, 6 時間前処理した (2% NaOH, 30°C, 6 時間前処理を対照試験とした). 前処理での NaOH 消費量, 溶出ペントサンおよび前処理収率, さらに, 水洗した固形物について, 水解抽出率および糖化残渣などを求めた (Table II). 前処理温度を高めると, 前処理に要する時間は著しく短縮された. 30°C, 6 時間前処理を基準とし, 50°C では 1~2 時間, 70°C では 20 分~1 時間で同等の前処理効果があった.

5. 水解抽出におよぼす酵素量の影響

コーンコブを 2% NaOH で 30°C, 5 時間前処理した後, 酵素量を 50~500 ml の間で実験を行ない, 水解抽

出率および糖の平均重合度の経時変化を測定した (Fig. 8-A, 8-B). その結果から, コーンコブ 100 g に対して, 酵素液を 300 ml (36,000 units, キシラナーゼの純蛋白として約 145 mg) 程度使用すれば, 90% 以上の水解抽出率が得られることがわかった (Fig. 8-A). また, 平均重合度の低下も 500 ml 使用のものと大差がなかった. 糖化液の平均重合度は, 使用した酵素量が少ない場合には, 反応初期に重合度が高くなる傾向にあり, さらに反応末期でも重合度は高かった (Fig. 8-B).

6. 酵素水解に対する抽出キシランと前処理コーンコブの比較

パルプの mercerization 工程から排出された広葉樹キシラン⁽⁶⁾の酵素による可溶化と, 前処理したコーンコブからキシランを水解抽出する難易の比較実験を行なった. その結果, 抽出キシランと前処理コーンコブのキシランは, ほぼ同じ速さで可溶化され, 可溶化率も同程度であることが明かになった (Fig. 9).

考 察

コーンコブの NaOH 溶液による前処理の効果的な条件を検討した結果, NaOH 濃度が 2~2.5% の場合が, 酵素によるキシランの水解抽出に最も有効で, 2.5% 以上では, ここで定義した水解抽出率は減少した (Fig. 3). これは, NaOH 濃度が高くなるにつれ (2.5% 以上), 前処理液中に溶出するペントサン量が増加するためであ

Table II. Effect of Pretreatment-temperature on Enzymatic Hydrolysis-extraction

Pretreatment				Enzymatic hydrolysis-extraction			Percentage of pentosan extracted ^{c)} (%)		
Temp. (°C)	Time	NaOH consumed ^{a)}	Residue ^{a)} (%)	Residue (%)		DP	Pretreatment +	Enzyme reaction	= Total
				a)	b)				
30	6 hr	6.8 g	82.3	44.2	53.7	1.64	5.4	+	94.2 = 99.6
50	6 hr	7.0	78.7	40.4	51.3	1.46	8.1	+	93.2 = 101.3
50	3 hr	7.0	80.3	41.8	52.1	1.45	6.8	+	92.7 = 99.5
50	1 hr	7.0	82.7	43.9	53.2	1.46	5.2	+	91.2 = 96.4
50	20 min	7.0	85.2	49.5	58.2	1.46	3.8	+	88.2 = 92.0
70	6 hr	7.3	75.4	37.8	50.1	1.41	11.1	+	90.1 = 101.2
70	3 hr	7.3	76.4	38.5	50.4	1.42	9.7	+	92.7 = 100.4
70	1 hr	7.3	78.8	40.7	51.7	1.42	7.8	+	91.3 = 99.1
70	20 min	7.2	81.5	43.9	53.9	1.47	6.1	+	92.3 = 93.4

^{a)} Based on dry raw corncobs. ^{b)} Based on dry pretreated materials. ^{c)} Based on total pentosan of dry raw corncobs. DP; average degree of polymerization.

Corncobs 3.27 g (3.00 g of dry matter) were added to 13.5 ml of pre-heated 2% NaOH solution and held at 50 or 70°C for the time indicated in this Table, and then quickly cooled in ice water, followed by determination of solubilized pentosan. The pre-treated materials were enclosed into a gauze bag and washed by tap water for overnight, and filtered by centrifugal filtration for 3 min. This wet pretreated materials (5.0~5.3 g) were subjected to 15 ml of xylanase solution, and pH and temperature of the reaction mixture were adjusted to 5.7 and 55°C, respectively. The enzyme reactions were continued for 24 hr on a Monod shaker.

Fig. 8. Effect of Enzyme Concentration on Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Pretreated Corncobs.

A: Relationship between reaction time and percentage of pentosan extracted.

B: Average degree of polymerization of hydrolyzate.

Air dried corncobs (645 g) were steeped into 2650 g of alkaline solution containing 54 g of NaOH and held at 30°C for 5 hr with occasional agitation. After washing the solid materials, the pretreated materials was dehydrated at 1250×g for 3 min by using a basket type centrifuge, and 1266 g of wet residue was obtained. Each parts of one-sixth of the wet residue were added to xylanase solution containing the given amount of enzyme solution and aliquot of water, and the mixtures were incubated under pH 5.6~5.8 at 55°C for 24 hr in 1500 ml glass vessel with agitator.

Given amounts of xylanase solution and water; —○— 50 g and 450 ml, —○— 100 g and 400 ml, —●— 200 g and 300 ml, —○— 300 g and 200 ml, —●— 400 g and 100 ml, —○— 500 g of xylanase solution.

って、2% 以上で溶出は顕著になる (Fig. 2)。しかし、前処理物中のペントサンに対する水解抽出率は、NaOH 濃度が高くなっても低下しない。また糖化残渣量も、2% 以上では大差ない。また2% では、前処理終了まで、pH は 10 以上に保持されたが、1.5% では前処理4日後に 8.6 に低下した (未発表)。これらのことから、処理濃度は 2~2.5% が適当と判断される。

一方、使用アルカリの絶対量という面からみると、十

Fig. 9. Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Xylan (hardwood) and Pentosan Remaining in the Pretreated Corncobs.

Corncobs were pretreated with 2% NaOH solution at 30°C for 6 hr. Reaction mixtures were consisted of given amounts of insoluble hardwood xylan obtained from mercerization process or pentosan remaining in the pretreated corncobs and xylanase solution. Enzyme reactions were as outlined in the Fig. 3.

Given amounts of xylan and xylanase solution; —●— 32.3 g of insoluble xylan and 200 ml of xylanase solution, —○— pretreated corncobs containing 33.1 g as pentosan and 300 ml of xylanase solution, —○— pretreated corncobs containing 32.4 g as pentosan and 200 ml of xylanase solution.

分な液量を使用すれば、1% NaOH 溶液でも十分効果があるが、0.5% では不十分であった (Fig. 7)。このように、前処理には、NaOH 濃度、NaOH 絶対量および pH などが関係していると考えられる。アルカリ処理による酵素易分解化のメカニズムは不明であるが、一部にアルカリ消費反応が含まれることは確かであって、コーンコブ 100 g 当り、6.5~7.3 g の NaOH が消費される計算になる (Fig. 6, Table II)。天然物中のキシランは、アセチル化されていることが知られており⁽⁷⁻¹⁰⁾、この水解的脱アセチル化反応に NaOH が消費されるものと思われる。事実、他の試料の処理液中に、アセチル基が検出されている (未発表)。以上のことから、効果的な前処理には、NaOH 溶液の濃度は、前処理液中にペントサンがあまり溶出しな程度 (1~2.5%) とし、かつコーンコブ 100 g 当り、約 7 g 以上の NaOH が必要であると思われる。なお、前処理廃液中に残存するアルカリは、再使用が可能であった (未発表)。

次に、2% NaOH 濃度で、前処理時間の影響について調べた実験では、30°C、6 時間の前処理でも十分に高い

水解率を得ることができた (Fig. 5). さらに, 温度を高めれば, 前処理時間は著しく短縮され, 2% NaOH 濃度では, 50°C で 1 時間または 70°C で 20 分処理で十分であった (Table II).

通常, われわれの実験で使っている酵素量は, 乾物コーンコブ 100 g 当り, 500 ml (約 60,000 units) であるが, 酵素量を 1/2 程度に減量しても, 水解抽出率はそれほど低下しなかった (Fig. 8-A).

最後に, 酵素水解に対する抽出キシランと前処理コーンコブの比較を行なったが, 前処理したコーンコブのキシランは, 抽出キシランが可溶化されるとほぼ同程度の速度で水解されることが判明した (Fig. 9). このことは前処理された結果, コーンコブ中のキシランは, 酵素作用に対する抵抗性が消失し, 抽出キシランと同様な状態になったものと推定される.

なお, 糖化残渣は, 使用したコーンコブの約 40% の収率で得られたが (Fig. 2, 4, 6 および Table II), これは, 酸水解法で分析した結果, グルコース成分が大部分であった (未発表). 粗酵素中には, セルロース分解酵素が共存しているが⁽¹⁾, 本菌のセルラーゼはあまり強くなく, 従って処理コーンコブのセルロースは, さほど水解されず, 糖化残渣としてセルロース成分のみが, ほとんど変化せずに残ることになる. さらに, この高純度のセルロース残渣も利用することができる (未発表).

要 約

Streptomyces sp. E-86 のキシラナーゼで, corncobs からキシランを加水分解抽出する目的で, NaOH 溶液による前処理条件の検討を行ない, 次の結果を得た.

1. NaOH の濃度は, 前処理液中に, ペントサンがあまり溶出しない程度の濃度で, 1~2.5% が適当であった.

2. 2% NaOH 溶液による前処理時間は, 30°C では約 6 時間, 50°C では約 1 時間, 70°C では 20 分で十分で

あり, これらの条件で前処理した後, 酵素による水解抽出率は, 使用した試料の全ペントサンに対し 92~94% であった. また, 前処理後の固形分および水解抽出後の糖化残渣の収率は, 対原料, 各々約 80% および 40% であった.

3. 前処理で, 乾物 corncobs 100 g 当り, 約 7 g の NaOH が消費された. 従って, corncobs 100 g を前処理するには, 7 g 以上の NaOH が必要である.

4. 前処理後の corncobs キシランの水解抽出速度と, 広葉樹から抽出された不溶性キシランの可溶化速度とは, ほぼ同程度であった.

本稿を終るにあたり, コーンコブを恵みくださった天野製菓株式会社, 高木嘉昌氏に感謝します. 本研究の一部は, 昭和 45 年 4 月, 日本農芸化学会大会 (福岡大学) で講演発表した.

なお, 本研究の費用の一部は, 昭和 49 年度文部省科学研究費補助金 (特定研究 “微生物による環境浄化”) によったもので, あわせて謝意を表します.

- (1) 日下部 功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **50**, 199 (1976).
- (2) 日下部 功, 安井恒男: 第 8 回林産化学談話会講演 (1973).
- (3) W. R. Ferrell and H. K. King: *Analyst*, **78**, 80 (1953).
- (4) L. G. Borchardt and C. V. Piper: *Tappi*, **53**, 257 (1970).
- (5) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- (6) 日下部 功, 安井恒男, 小林達吉: 醸工, **53**, 135 (1975).
- (7) E. Häggglund, B. Lindberg and J. McPherson: *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1160 (1956).
- (8) H. O. Bouveng, P. J. Garegg and B. Lindberg: *ibid.*, **14**, 742 (1960).
- (9) H. O. Bouveng: *ibid.*, **15**, 96 (1961).
- (10) 山岸 隆, 善本知孝, 南 享二: 木材誌, **16**, 87 (1970).