

ひがんばな由来のデンプン質の糖化に関する研究*

岡田香絵**, 森 晴樹***, 長田秀夫****

Research on Saccharification of Starch Quality of Lycoris Origin

Kae OKADA, Haruki MORI, Hideo NAGATA

Recently, a variety of global problems exists in our surroundings. The oil dryness problem is especially serious. The bioethanol is paid to much attention as new energy to solve this problem. The main raw material of the bioethanol, however, is food such as corn. Then, the ethanol is requested to be synthesized from raw materials other than food. In the present study, the bulb of the lycoris was chosen as substitute past biomass. Usually, the bulb has a lot of starch. The bulb of the lycoris has the poison such as alkaloids. This was saccharified by using the α -amylase and the glucoamylase, and the amount of the reduction sugar was measured by the Somogyi method. And, whether it was possible to use as a raw material of the bioethanol was examined. As a result, it was found that the lycoris contained enough amount of the reduction sugar.

1. はじめに¹⁾

近年、人々の身の周りにはさまざまな地球規模の問題が存在している。人口爆発やそれに伴う食料不足問題、資源枯渇によるエネルギー問題などである。この中の石油枯渇問題は深刻であり、これに代替するエネルギーを製造するため多くの研究者が日々摸索している。中でも新エネルギーとして、バイオエタノールが注目されている。

2010年までに炭酸ガスを6%削減しなければならなくなかった。しかし、京都議定書が締結された後も、現状は年々炭酸ガス排出量が増加する一方である。したがってわが国でもバイオエタノールを導入する方針が定められており、これに関する研究が進められている。

しかしながら、バイオエタノールの主な原料は、とうもろこしやサトウキビといった食料となるものが中心となっており、食糧不足問題に拍車をかけるおそれがあると懸念されている。そこで、食料以外の原料からエタノールを合成することが求められる。

本研究では、従来のバイオマスの代わりとして、彼岸花の球根に注目した。彼岸花の球根にはアルカ

* 原稿受付 平成 22 年 9 月 21 日

** 佐世保工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻

*** 佐世保工業高等専門学校 技術室

**** 佐世保工業高等専門学校 物質工学科

ロイドなどの毒が含まれていて食用にはできない。これを α -アミラーゼを用いて糖化し、Somogyi法により還元糖量を測定することで、バイオエタノールの原料として使用可能かを検討する。また、比較用バイオマスとして、じゃがいも（品種名：男爵）を用いた。

2. 原理

2.1 バイオエタノール¹⁾

バイオエタノールとは、サトウキビ、甜菜、穀類、芋類、草木といった植物資源（バイオマス資源）を原料にしてエタノールを発酵させ、蒸留などにより、濃縮、必要に応じて脱水してつくられるエタノールのことである。

植物資源（バイオマス資源）は、光合成炭酸同化作用により生産される。光合成炭酸同化作用は、太陽光エネルギーを吸収することで、植物細胞内にある色素を触媒として、大気中の炭酸ガスと水から糖に転換する作用である。糖は、植物体内で生成によりデンプンやセルロースなどにも変換され、植物の生長や結実などに使われる。このように植物資源は、太陽光エネルギーを有機炭素源、すなわち、有機炭素エネルギーに変換して蓄積している。

人がこの有機炭素源を燃焼させエネルギーとして利用する際に発生する炭酸ガスは、もともと大気中の炭酸ガスであり、植物を再生産すれば、現在の地球全体についての炭酸ガスの増減はないことになる。このことを「カーボンニュートラル」という。

2.2 Somogyi法⁵⁾

銅塩還元法とヨウ度滴定法を併用したもので、還元糖をアルカリ性銅試薬と加熱して生じた Cu^+ が KIO_3 と KI から硫酸酸性において遊離する I_2 を定量

的に消費するので残存 I_2 をチオ硫酸ソーダ（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ）液で滴定して消費した I_2 を求め、これから糖量を知る方法である。糖と銅試薬との反応はアルカリ度が高いほど速やかに完了するが、得られる Cu_2O は少ない。また酸性側では反応がさらに遅れるので糖試料はあらかじめ中和し、条件を等しくしておく必要がある。また銅試薬の緩衝性を炭酸塩のかわりにアルカリ度の高いリン酸2ソーダ・苛性ソーダでおきかえることもあるが、この場合は加熱時間が短縮される。銅試薬が Na_2SO_4 の飽和液であることは、 Cu_2O の酸化を防ぐためと言われる。

Somogyi法の基本反応を以下に示す。

- ① $\text{Cu}^{2+} + \text{還元糖} \rightarrow \text{Cu}_2\text{O}$
- ② $\text{KIO}_3 + 5\text{KI} + 3\text{H}_2\text{SO}_4$
 $\rightarrow 3\text{K}_2\text{SO}_4 + 3\text{H}_2\text{O} + 3\text{I}_2$
- ③ $\text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$
 $\rightarrow 2\text{Cu}^+ + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$
- ④ $2\text{Cu}^+ + \text{I}_2 \rightarrow 2\text{Cu}^{2+} + 2\text{I}^-$
- ⑤ 残存 I_2 を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で滴定

3. 実験方法

3.1 検量線

必要な試薬および手順を以下に示す。

- (1) 試料の調整を行った。

A液：ロッセル塩 45 g、 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 112 g を蒸留水約 400 mL に加熱溶解し、これに $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15 g を蒸留水約 50 mL に溶かしたものを除々に攪拌しながら加え、さらに KIO_3 1.7 g を少量の水に溶かしたものを加えて全量を 500 mL とした。

B液：シュウ酸カリウム 45 g、 KI 20 g を蒸留水に

溶かして 500 mL とした。

C 液 : 2 N の H_2SO_4 溶液を 500 mL 作った。

D 液 : 0.05 N の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液を 1L 作製した。

- (2) グルコース 100 mg を 50 mg の水に溶かした。
- (3) これを倍, 倍に希釈したものを各 20 mL ずつ 4 種類作製した。
- (4) 上記試料について 100 mL の三角フラスコに 10 mL 入れ, A 液 10 mL, 水 10 mL を加えてバーナーにより加熱した。沸騰後正確に 3 分測定し, 氷水内に浸した。
- (5) 冷えたらこれに B 液 10 mL, C 液 10 mL を加え, よく振った。更にデンプン溶液を 1~2 滴垂らした。
- (6) これを D 液で滴定する。終点はライトブルーに変化するときとした。
- (7) 試料を水のみ (BLANK) の場合についても同様の実験を行う。
- (8) 各サンプルの滴定量を N, 水の場合を N_1 とし, $N_1 \cdot N$ を横軸に, グルコース量を縦軸にとり, 検量線を作成した。

3.2 彼岸花球根の糖化時間に伴う糖濃度変化

- (1) 彼岸花球根 50 g を 450 mL の純水と 3 分間ミキサーにかけて粉碎した。これを 10% デンプン溶液とした。
- (2) ミキサーにかけたものを 80°C で 30 分間低温蒸煮した。
- (3) 加熱が終了した溶液を, 55°C まで冷却した。
- (4) 55°C, 700 rpm の条件で糖化を行った。α-アミラーゼは 0.05 g 加えた。
- (5) 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 22 h で適量を探取してろ過し 5 倍希釈して Somogyi 法により各時間における糖の定量を行った。

(6) 横軸に時間 (h), 縦軸に糖濃度 (mg/ml) としてグラフを作成した。

3.3 ジャガイモと彼岸花球根の還元糖量比較

基本操作は 4.2 と同様であるが, α-アミラーゼは 2.5g 加え, 測定は 0 h と 24 h 後に行った。

3.4 グルコアミラーゼ添加時の還元糖量変化

- (1) 彼岸花球根をミキサーにより粉碎し, それをガーゼで絞った液を遠心分離にかけ乾燥させた。これを不溶性デンプンとした。
- (2) (1) の不溶性デンプン 2g を 200 ml の純粋に溶かし 55°C で加熱する。
- (3) α-アミラーゼを 0.2 g 加えて 24 h, 55°C, 700 rpm の条件で糖化した。
- (4) (3) の溶液を 40 °C まで冷却する。
- (5) グルコアミラーゼをそれぞれ 0.1 g, 0.05g, 0.025 g を加えた。
- (6) それを 4 h まで 700 rpm で糖化し, 1 h 毎に Somogyi 法で各還元糖量を測定した。
- (7) 横軸に時間 (h), 縦軸に糖濃度 (mg/ml) としてグラフを作成した。

4. 結果及び考察²⁾³⁾⁴⁾

4.1 グルコース権稜線の作成

検量線作成についての結果を図 1 に示す。図 1 より, グルコース濃度と滴定量には, 比例関係が成り立っていることから良好な検量線が作成できたことがわかる。

4.2 生成糖濃度の反応時間依存性

彼岸花球根の糖化時間に伴う糖濃度変化についての結果を図2に示す。

図2を見てもわかるように、1 h 程度までは時間に伴い糖濃度が比例して増加している傾向にある。2 h になると、それまでの直線関係からはずれてきている。3 h 後から24 h 後まで糖濃度はほとんど変化していない。これは一般的な酵素反応と同様の傾向であり、基質が消費されて足りなくなってきたことや、酵素が変性して活性が低下してきていることが原因であると思われる。この条件下では約3 h でほとんどの糖化は終了しているが、 α -アミラーゼの添加量や、試料の量を変化させることにより糖化時間も変化していくことが予想される。

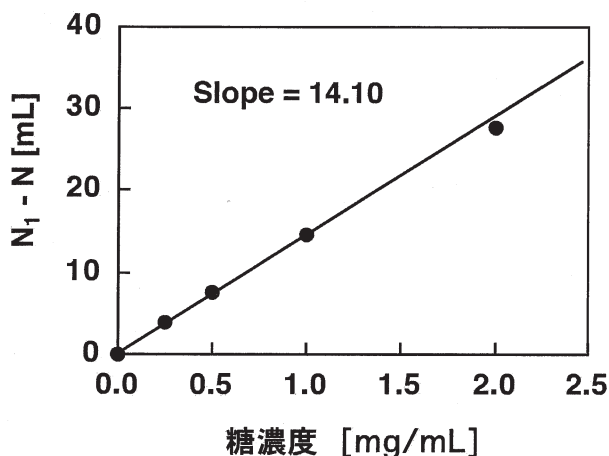


図1 検量線

4.3 生成還元糖量の比較

じゃがいもと彼岸花還元糖量比較についての結果を以下にまとめた。24 h 後 還元糖量をもとに図3を作成した。

じゃがいもと彼岸花球根の還元糖量比較については、生成糖濃度の反応時間依存性を調べた際と同様に全て5倍希釈で計測した。じゃがいもと彼岸花球

根の還元糖量は図3より、じゃがいものほうがやや彼岸花球根より多い結果となっている。しかしながら、前述したとおり、5倍希釈したものを測定しているので微量の滴定誤差でも結果として大きな誤差となっている可能性がある。したがって、現在までの結果からじゃがいも還元糖量と彼岸花球根還元糖量はほとんど変わらないのではないかと考えている。

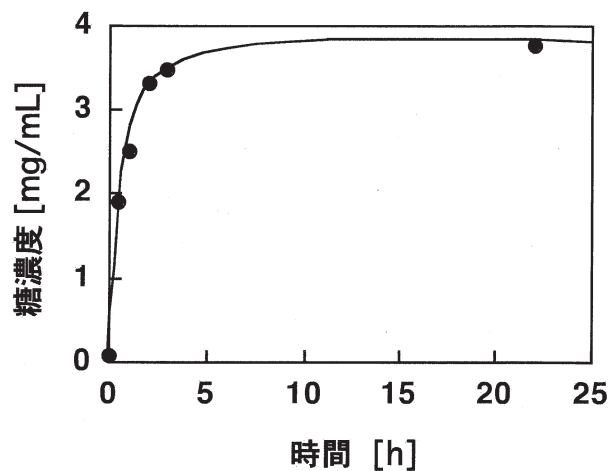


図2 生成糖濃度の経時変化

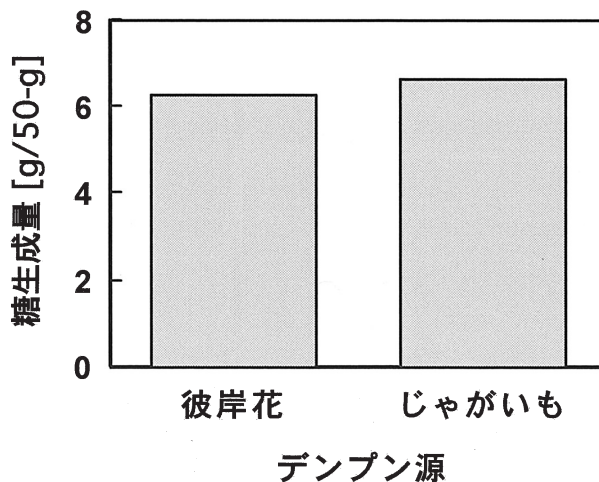


図3 彼岸花とじゃがいもの糖生成量の比較

4.4 グルコアミラーゼの添加効果

グルコアミラーゼ添加時の還元糖量変化についての結果を以下にまとめた。 α -アミラーゼで24h糖化した後の生成糖濃度の経時変化を図4に示す。グルコアミラーゼの添加量を0.1gとした。

グルコアミラーゼの添加量比較については図4を見てもわかるとおり糖化が進んでいることがわかる。グルコアミラーゼ添加前の溶液はすでに α -アミラーゼで糖化を完了した溶液である。その溶液にグルコアミラーゼを加えると再び糖化が進んでいる。 α -アミラーゼは α -1.4結合のみを切断するのに対し、グルコアミラーゼは α -1.4結合のみならず α -1.6結合も切断すると言われている。本実験において再び糖化が進んだ分はこの α -1.6結合分ではないかと推測できる。

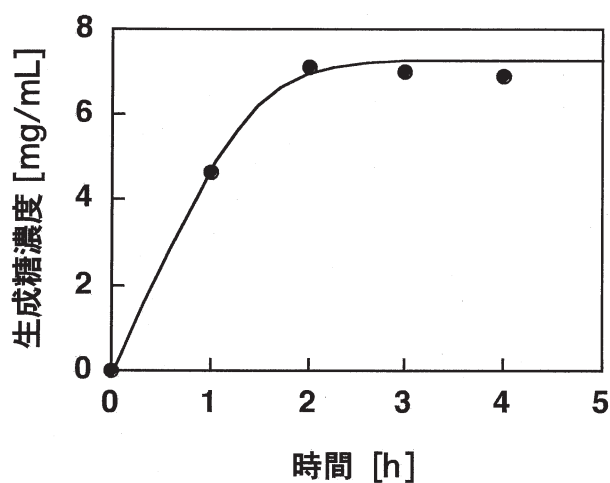


図4 グルコアミラーゼ添加時の生成糖濃度の経時変化

また添加量の違いについて2時間後の結果を図5に示す。生成糖濃度はグルコアミラーゼの添加量を増加させるに従って増加していることがわかる。反応時間が同一であることから生成糖濃度の差異は反応速度の差と考えられ、添加量が多いほど反応が速

くなることがわかった。

この結果から、グルコアミラーゼの添加量が少なすぎると反応速度は遅くなることがわかる。逆に添加量が増えると反応速度は速くなるが、溶液中のデンプン量に対してグルコアミラーゼが充分であればそれ以上添加量が増やしても著しい糖化効率は得られないと考えられる。

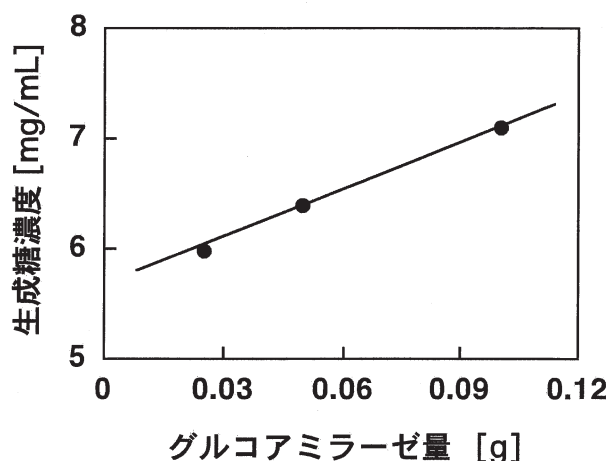


図5 生成糖濃度のグルコアミラーゼ量依存性

5. おわりに

バイオエタノールは日本でも導入が期待されるクリーンエネルギーであるが、さまざまな問題もある。人口爆発に伴う食料不足がこれに深く関わっていることははじめに述べた。

従来の食用可能な原料にかわる非食用な原料を使用したバイオエタノールの製造を実現するため、本実験では彼岸花球根を原料とすることに注目した。バイオエタノールの原料としての要因には2つの点が重要になってくる。1つ目は非食用であることである。そして2つ目は原料に含まれる還元糖量が多いことである。彼岸花の球根は、アルカロイドなどの毒を含んでいて食用にはできない。つまり、1つ目の要因は満たしていることになる。2つ目の要因

についてはじゃがいもと還元糖量比較することにより、バイオエタノール原料に使用可能かどうか判断した。

その結果、図2より、デンプン質の糖化に用いる α -アミラーゼが彼岸花球根を糖化することが確認できた。

また、じゃがいもと彼岸花球根の還元糖量比較では、図3より、じゃがいもとほぼ同等のデンプンを含んでいることがわかった。

これらのことから彼岸花の球根は、バイオエタノール原料使用条件の2つ目を満たしていることがわかった。

グルコアミラーゼの添加量による還元糖量の比較については図4より、グルコアミラーゼは α -アミラーゼが転化できないデンプン鎖を切断し糖化を進めることがわかった。そして、添加量が少なすぎると反応速度は遅くなり、添加量が増えると早くなることがわかった。

6. 参考文献

- (1) 社団法人アルコール協会編, 工業調査会: バイオエタノール製造技術, p.12-15, p.37-39, p.49-50, p.60-65, p.76-8 (2003)
- (2) 藤本大三郎著, 裳華房: 酵素の科学 p.16-18, p.101-103 (1988)
- (3) 林 寛著 鈴木裕行・志田万里子・伊藤順子・玉賀理恵 共著, 三共出版株式会社: わかりやすい生化学 p.47 (2005)
- (4) 中村道徳監修 大西正健・坂野好幸・谷口 肇編 学会出版センター: アミラーゼ 生物工学へのアプローチ p.15-21 (1986)
- (5) 福井作蔵 著 学会出版センター: 生物化学実験法 1 還元糖の定量法 p.9-11, p.45 (1969)