

16. 竹 1 本からとれる糖の量の推定

静岡県立科学技術高校自然科学部
2 年 小林祐一郎 他 4 名

1 研究の動機

私たち自然科学部では昨年度、科学技術高校の北側の谷津山も含め日本全体で問題になっている放置竹林の竹を使って、バイオエタールを作ろうと考えた。竹はバイオエタノールの材料がセルロース由来なので、デンプン由来のトウモロコシなどの食料とは競合せず、また竹を使うことで、谷津山の生態系を脅かす放置竹林の拡大も防ぐこともできると考えたからである。竹からバイオエタノールを生成するには、まず竹中のセルロースを分解して、アルコール発酵の材料となる糖にする必要がある。竹から糖がどれだけとれるかわかれば、そのあとのアルコール発酵により生成されるバイオエタノール量の推定の目安になると考え、今年度は竹からとれる糖の量を調べようと考えた。

2 研究の目的

竹から効率よく糖を取り出す糖化の方法を検討し、竹一本から取れる糖の量を測定する。

3 2 種の糖定量法の結果を比較することによる糖化の進み具合の検討

(1) 目的 竹を用いて糖化反応まで行ったものを、2 種の糖定量法を用いて結果を比較し、糖化が十分おこなわれているか検討する。

(2) 方法 以下のア～ウにしたがって実験を実施した。

ア 材料（竹）の採取・粉砕処理

(ア) 材料となる竹を谷津山から採取し、葉と稈に分ける。

(イ) 葉はさみで細かく切り分け、さらに粉にしたもの、稈はのこぎりで、できる限り薄く削り、出てきた粉を採取する。

ア 2 種の糖定量法の結果を比較することによる糖化の進み具合の検討

竹の構成成分として、バイオエタノール生成のためのアルコール発酵の材料になるグルコースが結合したセルロース以外に、リグニン等が含まれるため、それらをのぞくために以下の処理をした。

イ 高温・高圧処理 粉砕処理した稈 10g に脱イオン水を加え三角フラスコに入れ、オートクレーブで 20 分間高温高圧処理した。

ウ アルカリ処理 葉と、粉の葉それぞれ 10g と、高温・高圧処理した稈の粉をビーカーに入れ 0.25mol/L の NaOH 溶液を 200mL 加え、1 時間加熱しリグニンを取り除き、その後中和した。

エ 酵素処理 取り出したセルロースを糖化するために 5%セルラーゼ溶液を使用した。以下の 6 種の溶液をつくりセルラーゼの最適 pH 5 の条件に設定し、恒温器で 50℃ で 2 日間糖化反応を行わせた。

表 1 使用した溶液の基質と基質濃度

基質	基質濃度
葉	10%
葉	20%
粉の葉	10%
粉の葉	20%
稈	10%
稈	20%

用いた酵素：セルラーゼ溶液
最適 pH 5 最適温度 50℃

オ 糖の量の測定実験

(ア) フェノール硫酸法による測定

セルラーゼ処理した6種類の溶液(表1)について、フェノール硫酸法で糖量の測定を行った。フェノール硫酸法は糖類を硫酸と加熱すると、フルフラール誘導体が生成し、ホルミル基がフェノールと縮合発色するという特徴により、発色波長490nmで吸光度を測定し糖(グルコース)の量を推定する方法である。(使用した薬品・器具: 5%フェノール、濃硫酸、吸光度計)

グルコース0.1%標準液を希釈し、0(ブランク)、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ を入れた試験管を用意し、その試験管に5%フェノール1mLを加えて、よく振り混ぜる。その後、試験管に自動分注器を用いて濃硫酸5mLを手早く加える。その試験管を20分間室温に保ち490nmで吸光度を測り検量線を引く。次に6種の液(表1)を希釈したもの1mLをそれぞれ試験管に入れ上記の操作を行う。

(イ) ソモギー変法による測定

セルラーゼ処理した6種類の溶液(表1)についてソモギー変法で還元糖の量の推定を行う。ソモギー変法は還元糖をアルカリ性銅試薬と加熱することで Cu_2O (酸化第一銅)が生成され、この Cu_2O に I_2 (ヨウ素)を作用させると Cu_2O の量に比例して I_2 が消費される。次に残っている I_2 をチオ硫酸ナトリウム標準液で滴定し、その値から消費された I_2 量を算出し、消費された I_2 量に相当する還元糖量を求めるという定量法である。

(3) 結果及び考察

セルラーゼ処理した6種類の溶液(表1)に含まれる糖の量(溶液中%)の結果は表2の通りで、それをグラフにしたものが図1である。フェノール硫酸法では溶液中の全糖量を表し、ソモギー変法では、還元糖量の総量をグルコース換算で表す。フェノール硫酸法では、その測定の操作の過程で二糖類以上の結合が切れ、単糖になったものをグルコース換算で求めたものである。一方、ソモギー変法は還元糖量(還元末端を持つ単糖等)をグルコース換算したものであり、フェノール硫酸法での値は、この実験の理想値であり、ソモギー変法では実際にエタノールに発酵に使える、竹から取り出すことができた実際の単糖(グルコース等)の量を表す。フェノール硫酸法とソモギー変法の結果を比較して、糖化反応の進行具合を確かめた。二つの結果が大きく差があり、ソモギー変法の値が小さい結果となったら、単糖までの糖化が進行していなかったといえる。

グラフの結果から、次のことがいえる。

基質濃度を10%、20%とそれぞれかえたことで反応生成物である糖の量は10%のものに対して20%のものは2倍になると予想したが、その傾向は3つ(葉、粉の葉、稈)ともみられなかった。粉の葉10%と稈10%ではソモギー変法の結果で、コントロール(酵素セルラーゼのみで滴定したもの)の値を引くと生成物量である糖の量が0となり、単糖まで分解されていない。

葉と稈20%についてフェノール硫酸とソモギー変法の結果を比べると還元糖量は少ないが、フェノール硫酸で調べた全糖量は出ていたので酵素セルラーゼによるグルコースまでの分解が十分に進んでいなかったと考えられる。

そこで酵素セルラーゼが十分機能していなかったと考えられたため、糖化までの操作の過程を見直したところ、次の3点が考えられた。

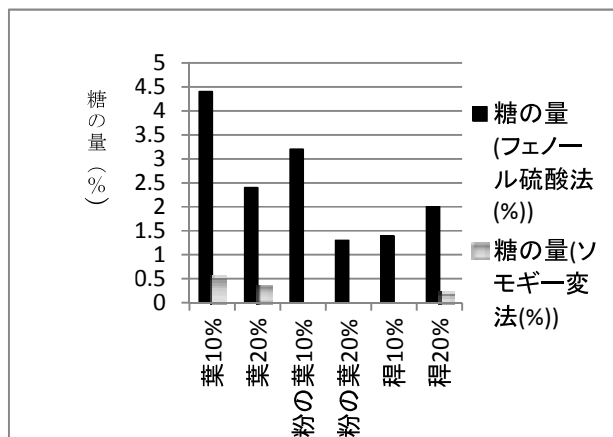
ア アルカリ処理の後の中和の段階でリグニンが試料に付着していて、酵素の働きに影響を及ぼしている。

イ アルカリ処理の後の中和により生成した塩が酵素の阻害をしている。

ウ 使用した酵素濃度が適性でなかった。以上の3点を検討するために4の実験を行った

表2 フェノール硫酸法、ソモギー変法による糖の量の測定

基質濃度	糖の量(フェノール硫酸法(%))	糖の量(ソモギー変法(%))
葉 10%	4.4	0.52
葉 20%	2.4	0.34
粉の葉 10%	3.2	0
粉の葉 20%	1.3	0
稈 10%	1.39	0
稈 20%	2	0.19



4 酵素セルラーゼの働きを阻害する原因と酵素濃度の検討

図1 フェノール硫酸法、ソモギー変法による糖の量の測定

(1) 目的

- ・ 酵素セルラーゼによる分解実験を、基質としてろ紙(セルロース)を用いて行うことで、アルカリ処理したあとの中和の操作ででてきたリグニン及び塩が酵素セルラーゼの働きを阻害するか確認する。
- ・ 酵素濃度を変えてろ紙分解実験を行うことで、結果に違いが出るか確認する。また、十分に酵素反応を示す酵素の最少の濃度を調べる。

(2) 方法

5mm 角から 10mm 角の大きさに切ったろ紙6枚(セルロース)を①から⑥のシャーレに入れ、①から③は酵素濃度を 4.0、1.0、0.5%と変え酵素セルラーゼの反応に違いが出るか調べる。④は塩を加え、⑤はリグニンを加え、⑥はリグニンと塩を加え、それぞれが酵素セルラーゼの働きを阻害するかを調べために、シャーレを恒温器で 50℃、1日処理した。

①セルラーゼ(酵素濃度 4.0%)	④セルラーゼ(酵素濃度 4.0%)	+ 塩(NaCl)
②セルラーゼ(酵素濃度 1.0%)	⑤セルラーゼ(酵素濃度 4.0%)	+ リグニン
③セルラーゼ(酵素濃度 0.5%)	⑥セルラーゼ(酵素濃度 4.0%)	+ リグニン + 塩

(3) 結果及び考察

結果は表3の通りである。○はろ紙がすべて分解されたことを表す。×はろ紙がすべて分解されなかったことを表す。①から③ではどの酵素濃度でも分解を確認できたため、3で行った実験の酵素濃度が、3-(2)のセルラーゼによる分解があまり進んでいないことの原因ではないといえる。また、4.0、1.0、0.5%ではどれも分解の程度の違いはなかったため、酵素セルラーゼが十分に反応を示す最少酵素濃度は3つの中では、0.5%といえる。

④から⑥の結果から⑤の塩だけでは分解は確認され、④と⑥のリグニンが入っているものではどちらも、ろ紙が分解されなかったため、リグニンはセルラーゼによる分解時に影響を及ぼす原因だといえる。

表3 酵素濃度、リグニンと塩の酵素阻害

酵素濃度	混合物	分解の状態	
①	4.0%	-	○(分解された)
②	1.0%	-	○
③	0.5%	-	○
④	4.0%	リグニン	×(分解されない)
⑤	4.0%	塩(NaCl)	○
⑥	4.0%	リグニン塩(NaCl)	×

5 アルカリ処理を改善(リグニンを取り除いた)した溶液を用いての竹から取れる糖の量の測定

表4 使用した溶液の酵素濃度と基質濃度

基質	酵素濃度 (セルラーゼ)	基質濃度
葉	0.5%	1g
葉	0.5%	2g
粉の葉	0.5%	1g
粉の葉	0.5%	2g
稈	0.5%	1g
稈	0.5%	2g

(1) 目的

竹の葉、稈からとれる糖の量を求める。

(2) 方法

4の結果よりアルカリ処理の後に試料をよく水洗し(リグニンを取り除き)中和し3-(2)に準じて、酵素濃度0.5%で再度実験を行った(表4)。

還元糖量を調べるために今回はソモギー変法のみ。

(3) 結果及び考察

改善した実験の結果は表5の通りになり、グラフにしたものが図2の通りになった(溶液1mL中に含まれるグルコース換算の還元糖量mg単位を表す)。全ての溶液で還元糖が確認された。

3-(3)の結果及び考察から改善前では見られなかったが、今回稈と葉では基質が2倍だと反応生成物(還元糖量)も2倍になることが見られたため酵素(セルラーゼ)が働いていたと考えられる。しかし粉の葉では1.31mgから1.88mgとなり変化が少なかった。

以上の結果から、酵素セルラーゼの反応により糖化が行われたといえるが、その結果の違いが3種の基質(葉、粉の葉、稈)の粒子の大きさに関係があるかもしれないと考え次の実験を行った。

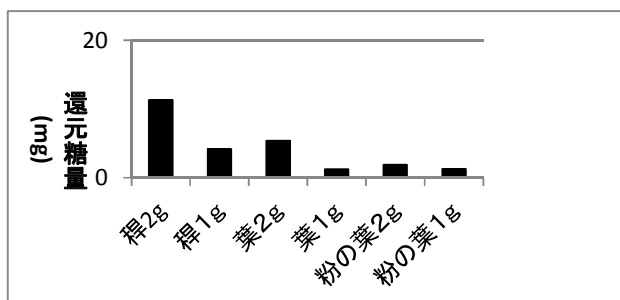


図2 ソモギー変法による還元糖の測定

表5 ソモギー変法による還元糖の測定

基質	還元糖量(mg)
稈 2g	11.3
稈 1g	4.19
葉 2g	5.38
葉 1g	1.25
粉の葉 2g	1.88
粉の葉 1g	1.31

6 基質の粒子の大きさと生成される還元糖量の関係

(1) 目的

基質粒子の大きさととれる糖量の違いの関係性を調べる。

(2) 方法

5の実験で用いた基質(葉、粉の葉、稈)のgあたりの粒子の大きさを顕微鏡(粉の葉稈は接眼、対物マイクロメーターを使用)で測定し、粒子の表面積を算出した。(なお粒子はその形を立方体と考え表面積を測定した)

(3) 結果及び考察

結果は以下に表わす。表6以下の値を元に粒子の表面積の大きさを測定したものである。稈1gあたりの粒子の表面積は $0.42\text{m}^2/\text{g}$ と3種の中で1番大きく、葉と稈では部位が違うためそのまま比較はできないが稈の還元糖(図3)の割合が高い理由として酵素と接する面積が多いことが理由として考えられる。

また稈の表面積が1番大きくなった理由として、顕微鏡観察中に稈には隙間が多くみられたことがいえる。葉と粉の葉では1gあたりの粒子の表面積は、葉($0.0049\text{m}^2/\text{g}$)と比べ、粉の葉($0.048\text{m}^2/\text{g}$)のほうが大きく、酵素と接する面積が多いため還元糖(図3)の割合も高いと予想されるが、基質(粉の葉)2gでは1.88mg(溶液1mL中に含まれるグルコース換算の還元糖量)しか生成されなかった。

表6 1gあたりの粒子の片面と側面の表面積

基質	1gあたりの粒子の表面積
葉	0.0049m ² /g
粉の葉	0.048m ² /g
稈	0.42m ² /g

7 全体の考察(糖化率の算出)

(1) 糖化率の算出

5-(3)の結果(基質2gで実験したもの)をもとにソモギー変法での結果から、糖化率を下記のように算出し、竹一本あたりからとれる稈・葉のグルコース換算の糖量を求めた。

(糖化率はアルカリ処理後の乾燥重量からどれだけ還元糖がとれたかの割合で求めた。)

文献によると、糖化率が杉材等では70%とあったため、稈の糖化率31.0%は低い値であり、今回、酵素セルラーゼの反応はみられたが、その前段階の高温・高圧処理、アルカリ処理の見直しにより糖化率をあげられる可能性があると考えられる。

表7 糖化率

基質	糖化率
葉	15.5%
粉の葉	5.0%
稈	31.0%

$$\text{糖化率} = \frac{\text{還元糖量(グルコース換算)}}{\text{稈(葉)の重量(乾燥)}} \times 100\%$$

(2) 竹一本の稈・葉からとれる糖量の推定

昨年度の研究結果より求めた竹一本あたりの稈・葉の乾燥重量、次にアルカリ処理後の乾燥重量、表7の糖化率から推定した糖量を表8に表した。

表9は昨年度の研究結果より谷津山東斜面の竹の総重量を求め、そこから糖化率をかけ、推定される糖量を算出した。

表8 竹の乾燥重量・アルカリ処理後の乾燥重量・糖化率から求めた糖量

乾燥重量(kg/竹一本)	アルカリ処理後の乾燥重量(kg/竹一本)	還元糖量(kg/竹一本)
葉 3.7	1.9	0.29
稈 20.8	12.8	4.10

表9 谷津山東斜面の竹の総重量・糖化率から求めた糖量

乾燥重量(kg/谷津山東斜面の竹 3936本)	糖量(kg/谷津山東斜面の竹 3936本)
葉 1.45×10 ⁴ kg	2.23×10 ³ kg
稈 8.19×10 ⁴ kg	2.53×10 ⁴ kg

8 まとめ

- ・リグニンは、酵素セルラーゼのセルロースへの分解への働きを妨げる性質がある。
- ・アルカリ処理のあとの中和の過程で生じる塩は酵素セルラーゼの働きを妨げるとはいえない。
- ・稈は葉より粒子の表面積が大きいため糖の量が多いと考えられる。
- ・糖化率は、葉15.5%葉の粉5.0%稈31.0%となり、稈が一番取り出せた。
- ・竹1本(葉3.7kg、稈20.8kg)からとれる還元糖量は葉が0.29kg、稈4.10kgと推定される。

9 今後の課題

- ・7で竹一本あたりの糖量、谷津山東斜面の糖量が求められたので実際にグルコースからアルコール発酵によりエタノールを生成し、谷津山北川斜面の放置竹林からとれるバイオエタノール量を推定する。

10 参考文献

- ・小川喜八郎 セルロースのバイオコンバージョン 大阪公立大学共同出版社
- ・浅田祥司他 総合食品学実験 建帛社
- ・西山隆造 安楽豊満 化学実験 Ohmsha
- ・今優太ら 竹の高さ、重量を推定する計算式の考察 H25 生徒理科研究論文