

# セルロース系廃棄物の再資源化技術の開発

【環境化学室】

池山恒平・山本浩康・小川美緒・森 明寛\*<sup>1</sup>

## 1 はじめに

植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロースは地球上に最も豊富に存在する再生産可能なバイオマス資源である。特に植物を基本とするバイオマスは光合成により二酸化炭素から直接合成されるため、バイオマスの利用は地球上の環境保全にも大きく貢献するものと期待されている。

このような中、鳥取県での和紙産地（青谷・佐治）において紙くずおよび製紙汚泥のほとんどは脱水後焼却処理がなされ、十分にリサイクルが行われてるとは言えない状態にあり、鳥取県で循環型社会を形成するための課題の一つとなっている。また和紙成形時に排出される製品端材の処理費も企業の大きな負担となっている現状があり、早急にリサイクル技術を確立する必要がある。

そこで本研究では、酵素反応を利用し、紙くず・製紙汚泥等セルロース含有廃棄物を糖やアルコール等の有用物へ転化する技術を開発するため、菌の検索・反応条件の検討およびモデル的な生物反応装置の開発を目的とした。

## 2 方法

### 1) 検索土壌の採取

青谷製紙工場、佐治紙漉工房より採取した製紙汚泥および鳥取県内土壌23サンプルについてセルロース資化性細菌のスクリーニングを行った。

### 2) 培地

培地は、以下に示す培地を用いて培養を行った。なお、セルラーゼ活性の強さの点から活発な研究がなされている *Trichoderma*<sup>1)</sup>、*Aspergillus*<sup>2)</sup> などの糸状菌用の培地と、一般的に糸状菌に比べセルラーゼ活性が低いとされる *Pseudomonas*<sup>3)</sup>、*Cellulomonas*<sup>4)</sup> などの細菌類についても新規利用も視野に入れ、2種の培地を用意した。

### 【培地組成】

#### (1) 細菌類用

0.2%	NaNO <sub>3</sub>
0.1%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.005%	MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O
0.001%	FeCl <sub>3</sub>

#### C源

0.1%	CMセルロース (CMC)
1%	アビセル
(pH 7、pH 9 の2種を調整)	
必要に応じ、0.7% - Agarを添加	

#### (2) 糸状菌用

##### Czapek培地 (Cz培地)

0.3%	NaNO <sub>3</sub>
0.1%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.05%	MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O
0.0001%	FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O

#### C源

2%	CMセルロース (CMC)
2%	アビセル
(pH5.8)	
必要に応じ、1.5% - Agarを添加	

#### 3) 培養方法

##### (1) 細菌類

採取した23サンプルをCMCおよびアビセルを添加した細菌用培地に接種し、30℃で10日間振とう培養を行った。この操作を3回繰り返すことで集積培養を行い、この集積培養した液体培地を平面培地に植菌し、更に4日間・30℃で培養し菌株の単離を行った。

##### (2) 糸状菌類

採取した23のサンプルをCMCのみを添加したCz培地に接種し、25℃で30日間静置培養し1次スクリーニングを行った。次に炭素源としてアビセルのみを添加したCz培地に植菌し、25℃で培養し菌株の単離を行った。その後、単離をした菌株に対しCMCを0.5%、コンゴレッドを0.2%添加したCz液体培地で25℃で20日浸とう培養し、培地のコンゴレッドの色が消失した菌株につ

\* 1 現中部総合事務所福祉保健局

いて活性測定を行った。

#### 4) 工業用酵素

市販の工業用セルラーゼ（8社15種）を利用した反応系について、製紙汚泥との反応を検討した。

#### 5) 蛋白定量

遠心分離（6000rpm、10min）後、培養液中の遊離蛋白をBradford法により定量した。

#### 6) 酵素活性測定方法<sup>5)</sup>

上記の培養により単離した菌株の培養液を遠心分離（6000rpm、10min）したものを粗酵素液として以下の測定に用いた。各反応により生成した還元糖はSomogyi-Nelson法<sup>6)</sup>により測定した。なお、各酵素の1酵素単位は、1分間にグルコース換算で1  $\mu$ molの還元糖を遊離する酵素量と定義した。

##### (1) カルボキシメチルセルラーゼ活性

(CMCアーゼ活性、エンドグルカナナーゼ活性)

1%のCMCを含む0.1M-リン酸緩衝液（pH7.0）および粗酵素液の等量から成る全量0.5mLの反応液組成で、30 で30min反応を行い、遊離した還元糖を測定した。

##### (2) アビセラナーゼ活性

(セロビオヒドラターゼ活性)

1%のアビセルを含む0.1M-リン酸緩衝液（pH7.0）および粗酵素液の等量から成る全量1mLの反応液組成で、30 で30min反応を行い、加熱により反応を停止させ、遠心分離（3000rpm、10min）による未反応のアビセル除去後、上清中の遊離した還元糖を測定した。

##### (3) $\beta$ -グルコシダーゼ活性

1%のサリシンを含む0.1M-酢酸緩衝液（pH5.0）および粗酵素液の等量から成る全量0.5mLの反応液組成で、30 で30min反応を行い、遊離した還元糖を測定した。

## 3 結果

### 1) スクリーニング

青谷製紙工場、佐治紙漉工房より採取した製紙汚泥および鳥取県内土壌23サンプルについて、細菌類用培地および糸状菌用培地を用いてセルロース資化性細菌のスクリーニングを行った。

この結果、細菌類用・糸状菌用培地の各培地を用いた集積培養・1次スクリーニングにより約800株を単離した。これらの単離菌株に対し細菌類について、30・4日間の浸とう培養後、フェノール硫酸法による全糖量測定およびカルボキシメチルセルラーゼ活性を測定し、細菌類用培地使用のpH7に調整した培地より1株、同じくpH9に調整した培地より8株を選択した。また、糸状菌類についてはCMCを0.5%、コンゴレッドを0.2%添加したCz液体培地で25 で20日浸とう培養し、培地のコンゴレッドの色が消失した菌株について活性測定を行うことにより20株を選択した。

選択した単離菌株の活性および比活性をTable 1～3に示す。

セルロースを基質とするためのkey酵素となるカルボキシメチルセルラーゼ、アビセラナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼの3種の酵素活性をもつ菌株を4株確認した。

### 2) 工業用酵素

スクリーニングに平行してコスト的にも非常に安く、また大量に手に入れることの出来る市販の工業用セルラーゼを利用して、実際の製紙汚泥や端材との反応について検討した。

#### (1) 工業用酵素活性

工業用セルラーゼ活性は、通常ろ紙片の崩壊活性から求められることが多く、その測定にばらつきが見られるため、当所で再度活性を測定した。測定方法は「6) 酵素活性測定方法」に従い測定した。結果をFig. 1及びFig. 2に示す。CMCアーゼの活性が最大1339U/g、アビセラナーゼの活性が最大38.5U/g、 $\beta$ -グルコシダーゼの活性が最大84.9U/gであった。

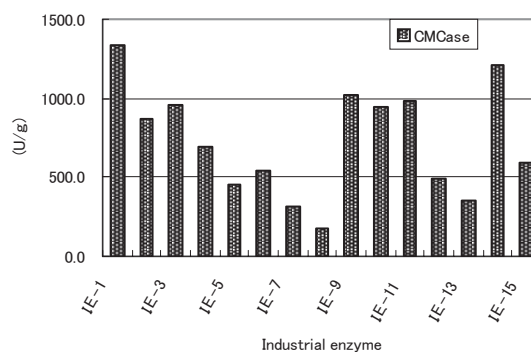


Fig. 1 CMCCase

Table 1 : The culture medium for bacteria (pH7 : 1 strain)

No.	CMCase		Avicelase		$\beta$ -glucosidase	
	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)
W733	24.7	149.7	0.5	3.1	0.6	3.4

Table 2 : The culture medium for bacteria (pH9 : 8 strains)

No.	CMCase		Avicelase		-glucosidase	
	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)
M907	28.6	205.4	N.D.	-	0.2	1.8
M909	29.5	385.4	N.D.	-	0.7	9.7
M913	43.9	328.6	3.7	27.4	6.7	49.9
M914	29.7	202.8	N.D.	-	N.D.	-
M920	20.7	148.2	N.D.	-	N.D.	-
M926	35.6	226.2	N.D.	-	N.D.	-
M927	43.4	348.9	N.D.	-	5.7	45.4
M931	38.0	241.4	N.D.	-	N.D.	-

Table 3 : The culture medium for filamentous fungi (20 strains)

No.	CMCase		Avicelase		-glucosidas	
	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)	Activity (mU/mL)	Specific activity (U/g)
M 1	20.5	57.7	3.3	9.2	N.D.	-
M 2	19.5	118.5	N.D.	-	N.D.	-
M 3	6.9	35.2	N.D.	-	N.D.	-
M 4	11.5	70.3	0.8	4.6	N.D.	-
M 5	6.2	38.2	N.D.	-	N.D.	-
M 6	8.4	41.0	N.D.	-	N.D.	-
M 8	8.9	37.3	2.8	11.8	N.D.	-
M 10	10.1	30.4	1.5	4.4	N.D.	-
M 11	13.7	65.2	2.8	13.2	N.D.	-
M 13	20.1	46.8	2.3	5.4	N.D.	-
M 15	16.0	66.4	N.D.	-	N.D.	-
M 16	16.0	71.8	N.D.	-	2.2	9.8
M 17	30.5	120.0	11.6	45.5	5.1	20.2
M 18	13.3	70.0	N.D.	-	N.D.	-
M 21	8.5	41.8	N.D.	-	N.D.	-
M 22	19.5	125.8	0.2	1.5	N.D.	-
M 24	13.3	75.7	1.6	8.9	N.D.	-
M 25	11.4	58.1	6.0	30.6	N.D.	-
M 28	27.3	91.1	10.3	34.4	N.D.	-
M 30	19.0	78.9	1.8	7.3	3.0	12.4

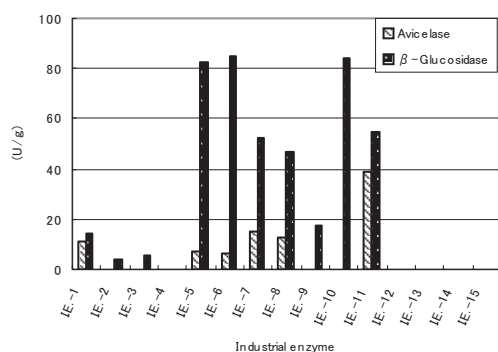


Fig. 2 Avicelase and β-Glucosidase

## (2) 還元糖と自己消化

工業用酵素には培養段階で培養液に糖が使用され、キャリアオーバーとして製品に糖が含まれる場合や、酵素活性を調整するために販売前にデキストリンが添加される場合があるため、使用する工業用酵素の中に含まれる還元糖の量を求めた。また、製品の状態で含まれるデキストリンから還元糖を生成する場合や、残留する解糖系の酵素により糖を分解することが考えられるため、グルコースの最終濃度が1%となるように調整し、20時間後の変化率を求めた。製品に含まれる還元糖の量をFig. 3に、

また自己消化の変化率をTable 4 に示す。

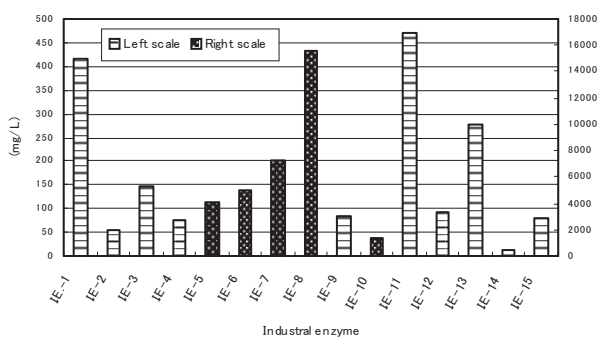


Fig. 3 Quantity of reducing sugar included in an industrial enzyme

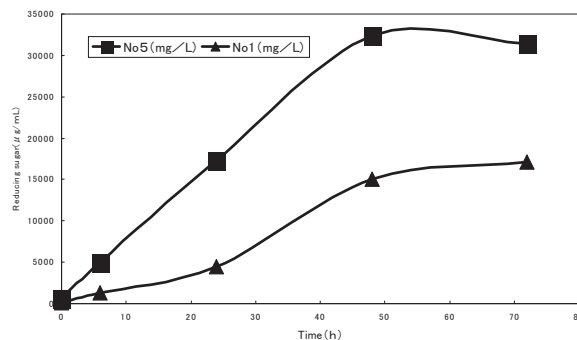


Fig. 4 The reaction of paper manufacture grime and industrial enzyme (No.1, No.5)

Table 4 : change rate of reducing sugar (%)

Enzyme No.	I.E.-1	I.E.-2	I.E.-3	I.E.-4	I.E.-5	I.E.-6	I.E.-7	I.E.-8	I.E.-9	I.E.-10
(%)	92.7	91.9	103.2	108.1	94.2	143.3	50.6	54.0	108.1	105.5

Enzyme No.	I.E.-11	I.E.-12	I.E.-13	I.E.-14	I.E.-15
(%)	2.3	95.5	110.2	106.4	124.4

No.6、No.15の酵素で還元糖の上昇が、No.7、No.8及びNo.11で添加した還元糖の減少が見られた。これらの結果より、3つのKey酵素を持ち、糖が大きく変化しないNo.5、及びCMCの活性が最も高いNo.1の酵素を、実廃棄物である製紙汚泥と反応させることとした。

### (3) 経時変化

pH7のリン酸緩衝液に製紙汚泥を1g添加し、No.1及びNo.5をCMCアーゼ活性で50U混合し、40で経時変化を測定した。結果をFig. 4に示す。

この反応で、No.1及びNo.5の各々の系で、最大17000ppm、31000ppmの還元糖が生成した。Fig.5の写真のうち、右側が製紙汚泥の反応前で、左が反応後の製紙汚泥を示す。反応前は流動性がほとんどない状態であったが、両酵素とも反応後は沈殿が僅かに残る程度まで消化された。

また、データは示さないがNo.1及びNo.5の各反応系に前培養を行った酵母を添加し、そのエタノール生成量を測定したが、各系とも72時間後で約0.1%程度のエタノールしか生成されずアピセラゼ、グルコシダーゼといった下流の酵素活性が不足していることが示唆された。



Fig. 5 Before and after the reaction of paper manufacture grime and industrial enzyme. The right is after reaction and the left is before.

## 4 まとめ

- 1) 青谷製紙工場、佐治紙漉工房より採取した製紙汚泥および鳥取県内土壌より、セルロース資化性細菌として細菌類9株、糸状菌類20株を単離し、このうち、セルロースを基質とするためのkey酵素となるカルボキシメチルセルラーゼ、アピセラゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの3種の酵素活性をもつ菌株を4株確認した。
- 2) 我々は酵素反応を用いた系において、応用可能な生成還元糖の濃度を10%程度と考えているが、市販の工業用酵素を製紙汚泥に直接作用させただけでは還元糖で約3%でしかなかった。市販の15種類の工業用

酵素について、その由来や精製状態が様々であり、今後反応系を構築するにあたり更に組み合わせ等を検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Okada, G. : Enzymatic Studies on a Cellulase System of *Trichoder viride*. *J. Biochem.* 77 : 33-42, 1975.
- 2) Okada, G. : Purification and Properties of a Celluase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 49 : 1257-1265, 1985.
- 3) Nakamura, K. and K. Kitamura : Isolation and Identification of Crystalline Cellulose Hydrolyzing bacterium and its Enzymatic Properties. *J. ferment Technol.* 61 : 343-348, 1983.
- 4) Yosikawa, T. , H. Suzuki, and K. Nisikawa : Biogenesis of Multiple Cellulase Components of *Pseudomonas Fluorescens* var . *cellulosa* . *J. Biochem.* 75 : 531-540, 1974.
- 5) 佐藤陽介、岡本辰夫 : 弘前大学農学部學術報告 No 51, 1-14, 1989.
- 6) 日本食品工業学会 : 食品分析法, 170-172, 光琳, 1982.