

木質由来廃棄物バイオマスの酵素糖化

倉掛昌裕*

木質バイオマス（セルロース系）廃棄物の有効利用として粉碎処理したコピー紙およびダンボール紙を 40℃で酵素反応させたところ、セルロースからのグルコース生成量は増加し続け、168 時間でそれぞれ 550 mg/g（収率 79%）および 400mg/g（収率 69%）に達し、また、反応に伴う酵素の失活はなく安定性が維持された。粉碎処理においてセルロース鎖間の水素結合が物理的に切断されるが、再生紙の場合、セルロース鎖間の再配列が均一でないためその処理効果が高められ糖化反応が促進したものと考えられた。湿式粉碎後、乾燥させることなく酵素反応させ、反応 24 時間後に一度再粉碎を行うことで 48 時間後での収率は、粉碎乾燥させた場合の約 1.5 倍になった。ダンボール紙を粉碎後、水およびアセトンで洗浄し酵素反応させたとき、水、アセトンでの洗浄の順で反応性は高まり、アセトン洗浄での糖化促進効果は残存するコーティング剤などの夾雑物がセルロース表面から除去されることで酵素親和性が高まったことによると考えられた。酸およびアルカリ前処理をダンボール紙、牛乳パック、カタログ紙に対して行ったところ、コーティングされたカタログ紙を除いて、酵素反応促進効果はほとんどなく、低下するものさえあった。古紙およびダンボール紙は湿式粉碎を逐次行うことで酵素によるグルコースの収率が高まり、さらに時間をかけて反応させることで高収率になることがわかった。その実用化における評価を行ったところ、高額である酵素剤に対しては農産系バイオマス廃棄物を培地とするフスマ麹式固体培養による酵素生産も組み入れたバイオマスリサイクルシステムの必要性が示唆された。

キーワード：古紙、コピー紙、ダンボール紙、バイオマス、都市廃棄物、セルロース、セルラーゼ

石油など地下資源の枯渇の懸念とともに、これらのエネルギー消費による地球環境の汚染が問題となっている。石油、石炭などの化石燃料の消費による二酸化炭素の増加、SOx、NOx などの有害物質の発生や、石油を原料とするプラスチックなど化学製品の廃棄物からのダイオキシンの発生等、環境そして人体に及ぼす様々な問題が現れ、その対策を考えねばならない状況となっている。これらの問題はインドおよび中国の産業発展によって加速されてきている。特に大気中の二酸化炭素の増加は地球温暖化の原因とされ、1997 年の

〒729-0292 広島県福山市学園町 1 番地三蔵 福山大学 生命工学部 生命栄養科学科。

*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: kurakake@fubac.fukuyama-u.ac.jp

京都議定書にて各国の二酸化炭素削減量が決められた。北極では大量の氷が溶け、シロクマなどの生態系への影響が現れ始めている。オーストラリアの干ばつは、食糧生産に大きな影響を与え、穀物価格の上昇をもたらした。また、あらゆる物価の上昇につながる石油価格の上昇が続いており、ガソリンもリッター180円以上と高騰している。資源の乏しい日本では地球環境に優しい新エネルギーの開発および実用化が急務といえる。そのようなクリーンな新エネルギーや地球環境に影響しないものづくりの研究等はグリーンケミストリーと呼ばれ、多くの専門分野で取り組まれてきている。

エネルギー生産分野では、バイオマス資源は太陽の恵みを得て作られる豊富な資源として期待されている。バイオマスとは生物を物質量として考えるもので、そのほとんどが植物で、年間当たりエネルギー換算で世界のエネルギー消費量の約10倍が生産されている。特に木質バイオマスの有効利用の研究が行われてからは久しい。木質は主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから成っており、それぞれ燃料用エタノールや食品素材などに変換することができる。酵素法によるセルロースの糖化には、その酵素親和性を高めるためリグニンを除去したり、セルロースの結晶化度を低下させたりする前処理が必要であり、物理的、化学的および生物学的前処理の研究が数多く行われてきた^{1,2)}。しかし、酵素法による木質バイオマスの糖化の研究はパイロットプラントまでで^{3,4)}ほとんど実用化されていない。これは主としてコストパフォーマンスが理由となっている。ここでは酵素糖化においてリグニン除去などの前処理がほとんど必要ない都市廃棄物の古紙やダンボール紙の糖変換について検討し、その実用化のための評価を行った。

実験方法

実験材料 実験に用いたコピー紙、ダンボール紙、カタログ紙、牛乳パックはいずれも研究室での廃棄物を用いた。ここでカタログ紙は写真などが入ったコーティング処理したものを用いた。セルロース含量はそれぞれ62.9、51.9、48.9および62.0%であった。セルラーゼ剤は明治製菓(株)製の *Trichoderma viride* 起源のメイセラゼを用いた。酵素基質のCMC(カルボキシメチルセルロース)は関東化学(株)、オートスペルトキシランはシグマ(株)、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドはナカライテスク(株)製のものを用いた。メイセラゼの酵素活性はCMCを基質としたCMCアーゼ活性で3,629 U/gで、 β -グルコシダーゼ活性は50 U/gであった。

粉碎処理および酵素反応 シュレッダーで裁断した廃棄紙30gを蒸留水600mlに膨潤させ、ミキサーで2分間粉碎した。厚みのあるダンボール紙の場合、はさみで裁断し同様の操作で粉碎した。粉碎後、軽く絞って水分を抜き、バットに広げ、乾燥機に入れ70~80℃で1日乾燥させた。ウェット状で保存する場合は、3000rpmで10分間遠心し、沈殿するウェット状の試料を4℃で保存した。このときの固形分は11.9%であった。粉碎試料1g(乾燥重量)を50mlメジューム瓶に取り、10mg/mlのメイセラゼ10mlを加え混ぜ、よく膨潤させた後、pH5、40℃で反応させた。反応時に粉碎する場合は、24時間後にホモジナイザー(バイオミキサー)での粉碎を1分間行った。

塩酸およびアンモニア前処理 塩酸前処理:10mlネジ付試験管に粉碎試料50mg、蒸留水0.45mlおよび2N塩

木質由来廃棄物バイオマスの酵素糖化

酸 0.05ml を入れ、密封後ブロックヒーターで 120℃、20 分間加熱処理した。放冷後、2N 水酸化ナトリウムを 0.05ml 加えた後、0.1M 酢酸緩衝液 (pH5) を 0.45ml 加え混ぜた。これに 20mg/ml メイセラゼを 0.1ml 加え、40℃で 24 時間反応させた。アンモニア前処理：25ml 耐熱ガラス容器に粉碎試料 2g および 28%アンモニア水 4ml を入れ、よく混ぜ合わせた後、密封してオートクレーブで 120℃、20 分間加熱処理した。放冷後、蓋を開けアスピレーターでの減圧によりある程度アンモニアを除いた後、真空乾燥させた。10ml ネジ付試験管にその処理物を 50mg 量り取り、これに 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5) 1ml および 20mg/ml メイセラゼを 0.1ml 加え、pH5、40℃で 24 時間反応させた。

フスマ麴式固体培養 100ml 三角フラスコにて、コーンハル組成 0、20、40、60、80、100%の小麦フスマ混合物 5g および水 6ml を入れよく混合し、オートクレーブで 120℃、20 分間滅菌した。これに *Aspergillus awamori* K4 株の胞子を植菌し、30℃で 6 日間静置培養した。50ml の蒸留水を加え混ぜ、1 時間放置することで酵素を水に抽出させた後、ろ過したろ液の酵素活性を測定した。

β-グルコシダーゼ活性測定法 1.1mM p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド 0.9ml に酵素試料 0.1ml を加え。pH 5、40℃にて 10 分間正確に反応させた。1M 炭酸ナトリウムを 0.5ml 加え混ぜ、酵素を失活させ、遊離する p-ニトロフェノール量を波長 400nm の吸光度計で比色定量した。ここで 1 分間に 1 μmol の基質を変換させる酵素量を 1U と定義した。

CMC アーゼ (セルラーゼ) および β-キシラナーゼ活性測定法 CMC アーゼには CMC を、キシラナーゼにはオートスベルトキシランを基質として用い、その 2% 溶液または懸濁液 0.5ml に希釈酵素試料 0.5ml を加え。pH 5、40℃にて 10 分間反応させた。1M 炭酸ナトリウムを 0.5ml 加え混ぜ、酵素を失活させ、遊離する還元糖量を DNS (3,5-ジニトロサリチル酸) 法にて定量した。還元糖量をグルコース量で換算し、1 分間に 1 μmol のグルコースを生産させる酵素量をそれぞれ 1U と定義した。

HPLC による糖分析 サンプルングした糖化反応液を 3000rpm、10 分間遠心分離し、その上清を蒸留水にて 10 倍希釈した後、0.22 μm ポアサイズのメンブランフィルターでろ過し、その 10 μL を HPLC に供した。HPLC のカラムには日立化成製の GC-610C を用い、カラム温度を 60℃、キャリアーを蒸留水、流速を 1ml/min とした。

結果および考察

図 1 は粉碎・乾燥したコピー紙およびダンボール紙を 40℃で酵素反応させたときの生成グルコース量の変化を示したもので、反応時間に伴いグルコース生成量は増加し続け、168 時間での生成量はそれぞれ 550 mg/g (収率 79%) および 400mg/g (収率 69%) に達した。コピー紙およびダンボール紙は木質から製造されたもので、その工程においてリグニンは除去されており、比較的酵素親和性は高い状態となっている。ここでの前処理は粉碎処理で、セルロース鎖間の水素結合を物理的に切断することにある。コピー紙もダンボール紙も再生紙であり、溶解・薄膜化した後、叩解という操作でセルロース鎖間の水素結合を再形成させることで紙の強固な構造を作ることになる。しかし、これら再生紙の場合、セルロース鎖間の再配列が均一でない

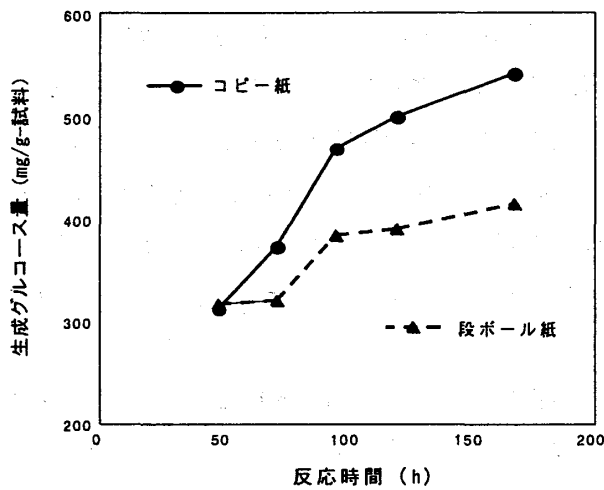


図1 コピー紙およびダンボール紙の酵素反応
(試料10%、酵素100mg/g-試料、pH5、40℃)

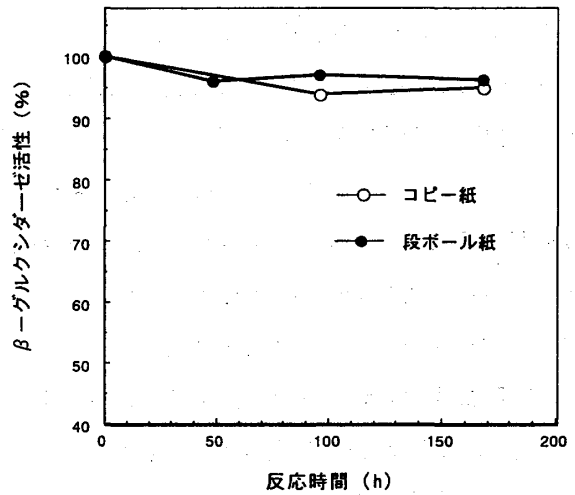


図2 セルロース糖化反応時での酵素安定性

ため崩壊しやすい構造になっており、粉碎処理のみによって酵素反応を高めることができると思われる。生成グルコース量が増加し続けるのは、そのセルロース構造の崩壊が徐々に進むためと思われるが、酵素活性も維持されていることがわかる。セルラーゼは多成分酵素であり主としてエンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼおよびβ-グルコシダーゼから成る。エンドグルカナーゼおよびエキソグルカナーゼは結晶性セルロースに吸着し両者の相乗効果によりセロビオースを切り出し、β-グルコシダーゼはそのセロビオースをグルコースに加水分解する^{5,6)}。β-グルコシダーゼはセルロースに吸着しないので液中で攪拌の影響を直接受けることになるが、図2に示した反応液中のβ-グルコシダーゼ活性は反応168時間においてもほとんど低下せず安定性が高いことがわかった。このことより都市廃棄物の再生紙である古紙やダンボール紙は、粉碎処理し長時間酵素反応させることでグルコースが高収率で得られることがわかった。

次に反応性がより高かったコピー紙についてその粉碎方法について検討を行った。水分で湿潤させた後ミキサーでの湿式粉碎を行い、その後乾燥させたものとそのままのウェット状のものを48時間酵素反応させたところ、図3に示すように、乾燥させないものの方が高い収率となることがわかった。さらに反応24時間後に一度バイオミキサーでの再粉碎を行うことでその収率が高まり、48時間で52%にも達した。これは乾燥物を反応させた場合の約1.5倍になる。湿式粉碎の場合、分離したセルロース鎖間に水分子が介入し、再配列を抑制するのに対して、乾燥した場合、水分の離脱による鎖長間の再配列が起こり酵素への親和性を阻害するものと考えられ

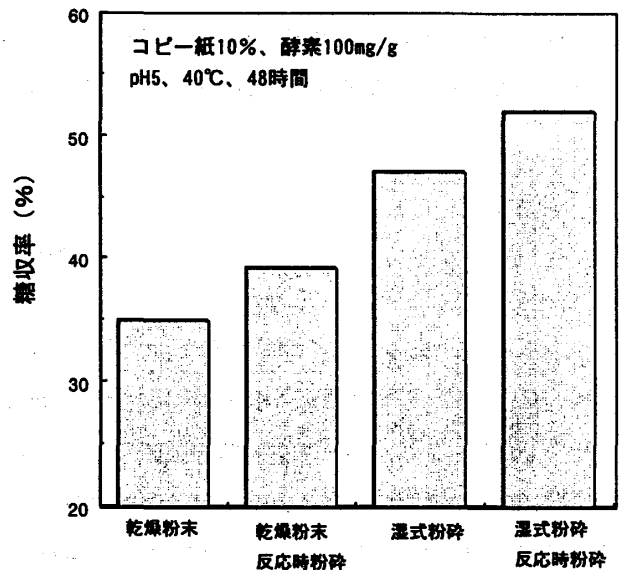


図3 コピー紙の粉碎処理条件

木質由来廃棄物バイオマスの酵素糖化

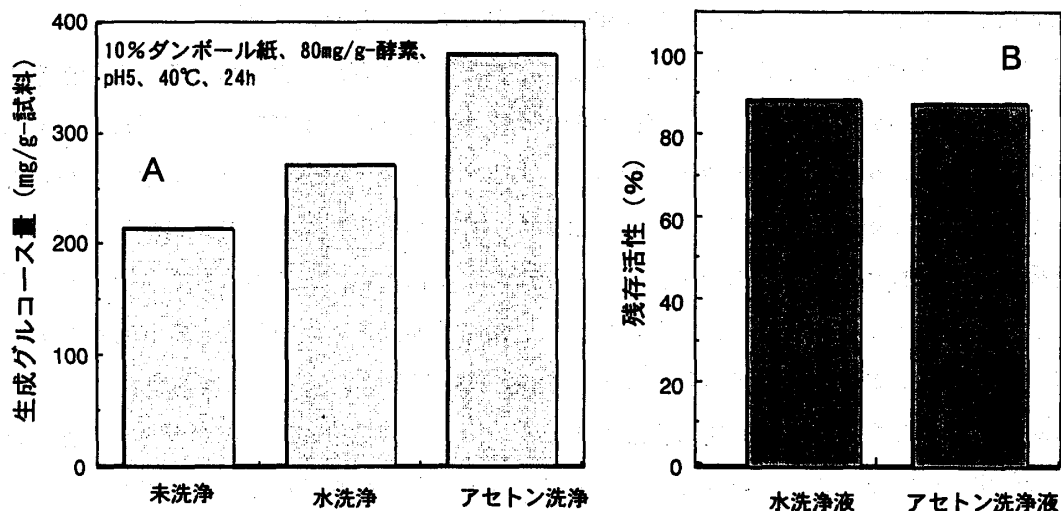


図4 糖化反応に及ぼす洗浄効果および洗浄溶出液の酵素活性に及ぼす影響

る。また、反応途中での再粉碎には、セルロース鎖長間の再配列の抑制効果があるものと思われる。そのため反応時の粉碎を繰り返すこと、さらにはその回数、時間を制御することで、糖収率の向上が期待できる。ダンボール紙の場合、その反応性はコピー紙より低くなったが、これはその材質によるものと思われる。再生紙は元の紙類が上質の場合には、トイレットペーパーやコピー紙に再生されるが、再生が繰り返されるとその材質も低下し、新聞紙や箱に利用されるようになり、最終的にダンボール紙になる。よってダンボール紙にはインクやコーティング剤等の不純物が含まれる割合が高く、また増強剤も加えられるので、それらのセルロース鎖への吸着の影響が大きくなる。図4Aはダンボール紙を水およびアセトンで洗浄し酵素反応させたときの結果で、水、アセトンでの洗浄の順で反応性は高まり、アセトン洗浄の効果が最も高いことがわかる。また、図4Bに示すように各洗浄での抽出物による酵素阻害が比較的少ないことより、アセトン洗浄での糖化促進効果は残存するコーティング剤、インクなどがセ

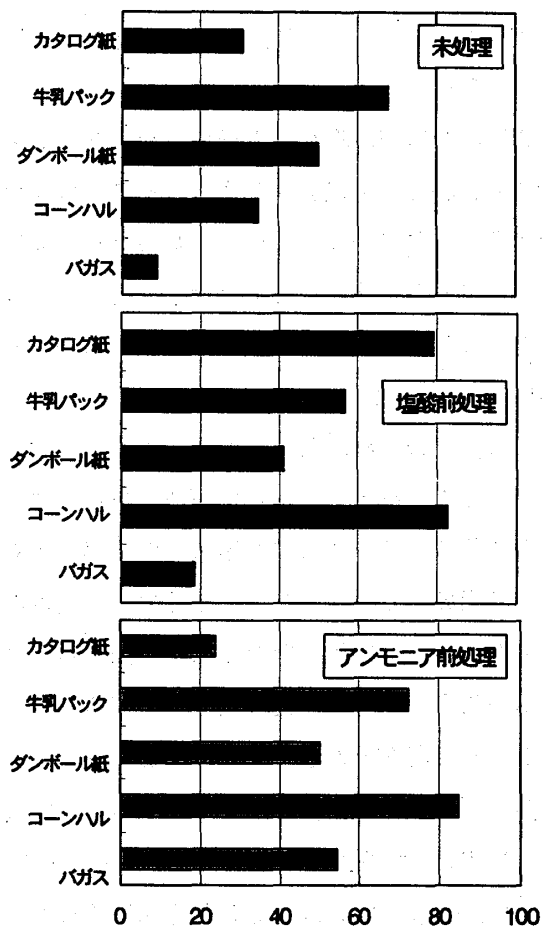


図5 硫酸およびアンモニア前処理の酵素反応に及ぼす影響

ルコース表面から除去されることで酵素の親和性が高まったためと考えられる。

次にリグニンを含むリグノセルロース（針葉樹、広葉樹、草本類）によく用いられる前処理を行い、酵素反応に及ぼす影響について調べた。ここでは比較的操作が容易な酸およびアルカリ処理^{7,8)}を用いダンボール紙、牛乳パック、カタログ紙の前処理を行った。図5に示すように比較のために用いた農産廃棄物のバガス（さとうきびの搾り粕）およびコーンハル（とうもろこし種皮）ではいずれの処理においても高い酵素反応促進効果が認められたが、リグニンを含まない都市廃棄物は未処理と比べカタログ紙を除いて前処理効果はほとんどなく、低下するものさえあった。カタログ紙の酸前処理で高い効果が認められたのはコーティング剤が酸で分解され酵素が作用できるセルロースの表面積が増加したためと考えられる。

以上の結果から木質由来都市廃棄物の古紙およびダンボール紙は湿式粉碎を逐次行うことで酵素によるグルコースの収率が高まり、さらに時間をかけて反応させることで高収率となることがわかった。しかし、実際、その生産性は経済的に有効なのであろうか。また設備的なことも問題となる。以下に課題点を示す。

- (A) 古紙等の材料の収集
- (B) 酵素反応器などの設備
- (C) 酵素の価格とグルコース生産性
- (D) グルコースのエタノールへの変換
- (E) その他

(A) については現在の古紙のリサイクルシステムと同様であるので問題はない。古紙の回収率は60%以上であり、特に新聞紙、ダンボール紙の回収率は90%以上である。(B)の酵素反応器は現在の再生紙製造工程で用いられているパルサーという大型の粉碎機を改良し、粉碎と酵素反応を同時に行えるようにすることは可能である。(C)については、コピー紙の場合、1トンからその約600kgのグルコースを生産できる。実験と同じ酵素を使用し、酵素濃度を50mg/g試料とすると50kgの酵素が必要となる。酵素は時価であるが5,000円/kgとするならば25万円必要となる。一方、グルコースも時価であるが300円/kgとすると18万円で、これだけの単純な収益を考えれば7万円の赤字となる。しかし、酵素量については反応条件を検討することでその濃度を下げることは可能である。また酵素剤が汎用されるようになるとその時価は大きく下がることも予想できる。さらに酵素の固定化再利用も可能であるので費用については改善できると思われる。しかし、酵素の生産についてもバイオマスの利用に組み込み総合的な生産システムを構築することがより良いことである。ここで用いたセルラーゼ剤の生産には、農産廃棄物であるバガス、コーンハル、小麦フスマなどを培地に用いたフスマ麹式固体培養することが最も適していると思われる。この固体培養法は小麦フスマを主とする農産廃棄物を適度に湿らせ、好気性のカビ類を生育させる静置培養で、設備としては恒温室（室）が必要なくらいで、培養操作も簡単であるので低コストで行える。この培養法にてカビは多くの酵素を高活性で生産する。図6Aは小麦フスマおよびコーンハル混合培地で水分55%として、その培地配合を変化させ *Aspergillus awamori* K4株を5日間固体培養したときの酵素生産性を示したものである。コーンハル組成60%以上で培地1g当たり70U以上のセルラーゼを生産した。酵素を水で抽出し硫酸塩析等を行うことで高活性の酵素剤が容易に調製できる。また図6Bに示すように、同時にキシラナーゼも生産しておりこれはコーン

木質由来廃棄物バイオマスの酵素糖化

ハル 80%培地にて約 600U が得られた。この酵素はセルロース関連バイオマスの成分であるアラビノキシランの加水分解酵素であるので有効的に利用できる。このように酵素生産も組み込んだ木質バイオマスの利用システムを確立することがその実用化に必要であると思われる。(D) については、糖化と酵母による発酵を同時にする同時糖化醗酵が有効と思われる⁹⁾。その利点は反応器が複数要らない、グルコースが迅速にエタノールへ変換できるので酵素への生成物阻害がなくなり反応速度が高まるなどがあげられる。問題としては酵母の最適温度 30℃ に酵素反応も合わせることになることであるが、現在、耐熱性の酵母の研究もなされている^{10,11)}。

以上のように古紙等の酵素糖化は現在の古紙収集および再生紙生産技術を利用することで比較的容易に実用化できるものと考えられるが、現在の経済的な状況からはむずかしいようである。今後、化石燃料の枯渇や環境問題が生活に大きく影響するようになれば実施されうと思われるが、そのような状況になる前に実用化の目途を立てておくことが望ましいであろう。

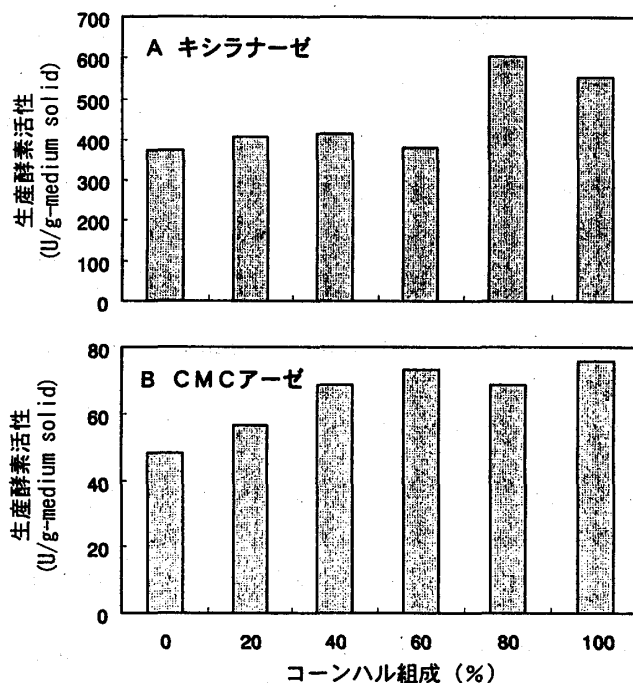


図6 フスマ麹式固体培養による酵素の生産
(培養条件:小麦フスマおよびコーンハル 5g、水 6ml、30℃、5日間)

文献

- 1) Kurakake, M., Ooshima, H. and Harano, Y. Pretreatment of bagasse by UCT-solvent for the enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 111-121 (1991)
- 2) Sun, Y. and Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: review. *Bioresource Technology* 83, 1-11 (2002).
- 3) Hsu, T. A., Himmel, M., Schell, D., Farmer, J. and Berggren, M. Design and initial operation of a high-solids, pilot-scale reactor for dilute-acid pretreatment of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58, 3-18(1996).

- 4) Schell, D.J., Farmer, J., Newman, M., and McMillan, J.D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105-108**, 69-85(2003).
- 5) Eriksson, K.E. and Pettersson, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pullverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physicochemical characterization of five endo-1,4- β - glucanases. *Eur J Biochem.* **51**,193-206 (1975).
- 6) Wood, T.M. and McCrae, S.I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone or in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem J* **171**, 61-72(1978).
- 7) Kurakake, M., Ouchi, K., Kisaka, W. and Komaki, T. Production of L-arabinose and xylose from Corn Hull and Bagasse. *Journal of Applied Glycoscience*, **52**, 281-285 (2005).
- 8) Kurakake, M., Kisaka, W., Ouchi, K., and Komaki, T. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of Corn husk, Bagasse and Switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90**, 251-259 (2001).
- 9) Huang, S.Y. and Chen, J.C. Ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with temperature profiling. *J Ferment Technol* **66**, 509-516(1988).
- 10) Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabanas, A., Carrasco, J., Martin, C., Negro, M. J., Saez, F., and Saez, R. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **28-29**, 307-15(1991).
- 11) Barron, N., Marchant, R., McHale, L., and McHale, A. P. Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**(3), 518-20 (1995).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (7), 11-19 (2008)

Utilization of cellulose-relating biomass resources, municipal wastes by enzymatic hydrolysis.

Masahiro Kurakake*

Department of Nutrition and Life Science, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Enzymatic hydrolysis of office paper and corrugated cardboard wastes, cellulose-relating biomass resources proceeded gradually at 40°C for 168h, and the production of glucose from cellulose achieved to 550mg/g and 400mg/g, 79% and 69% in yields, respectively. Furthermore, the enzyme maintained the activity in the mixture during the reaction. Simple grinding treatment to the municipal wastes was effective to enhancement of enzymatic reaction because of loose rearrangement among cellulose chains formed in their recycle process. When wet-ground sample was applied to enzymatic reaction without drying, and ground once in 24h during the reaction, the glucose yield in 48h was increased by 1.5 fold than that in the hydrolysis of dried-ground sample. In the corrugated cardboard waste, the enzymatic hydrolysis was enhanced by washing with acetone. It was considered that other including substances such as coating reagent, ink *etc.* were removed from cellulose surface using acetone. Although pretreatments with dilute acid or alkaline solution were examined to these municipal wastes, enzymatic hydrolysis was not enhanced or decreased inversely, except for catalog paper coated with chemical substances.

Practical utilization of office paper and corrugated cardboard wastes by enzymatic hydrolysis was evaluated in wide viewpoint. Especially, high price of commercial enzyme is important subject. Therefore, biomass-recycle system containing enzyme production; solid fermentation with agricultural wastes such as wheat bran and corn hull is necessary to decrease the cost.

Key words : office paper, corrugated cardboard, biomass, maniple waste, cellulose, cellulase