

オフィス古紙糖化酵素の開発

杉森 大助

要約：カイコ (*Bombyx mori*) の腸内から、週刊漫画雑誌紙片（以下、古紙と略す）を唯一の炭素源として、pH 7, 37℃, 3 日間で分解・糖化して良好に生育する微生物を分離することに成功した。カイコ品種中 514 号から c514 株、蚕日本一から J1 株を分離した。これら菌株の 16S rDNA 解析による同定の結果、c514 株は *Pseudoxanthomonas* sp. に属し、J1 株は *Micromonospora* sp. に属することがわかった。c514 株による古紙の糖化培養では、培養液中に還元糖が 0.1 g/L, グルコースが 12 mg/L 生成し、酵素活性は最大 16.1 FPU/L だった。ミキサーを用いた物理的処理法に比べて、c514 株を用いた微生物処理法の方が約2 倍の効率で古紙を糖化できることがわかった。

Key Words: 古紙, 未利用バイオマス, 糖化, セルロース, セルラーゼ, 酵素, 微生物

1. はじめに

リサイクルに適さない古紙などの未利用セルロース資源からグルコース(ブドウ糖)を生産する技術で、最大の課題となっているのが、強力なセルロース分解酵素セルラーゼの開発である。これまでに開発されたセルラーゼとして、*Acremonium cellulolyticus*^{1, 2)}と *Trichoderma reesei*¹⁾由来が知られているが、これら酵素には以下のような技術的課題がある。最適pHが 4.8 付近と酸性で、週刊マンガ紙のようにインクや糊を含む紙に直接作用できないことから、酵素のコストが高価になってしまうなどの問題点がある。この課題を克服するセルラーゼが世界中で探索されているが未だに発見されていない。週刊漫画雑誌は、約半数が断熱材などとしてリサイクルされているが、それ以外は焼却処分されている全く未利用のバイオマスである。本研究では、中性条件下で週刊漫画雑誌の紙片を直接分解・糖化し、グルコースを生成する微生物をカイコ腸内から分離することに成功した。そこで本研究では、当該微生物および微生物が生産する糖化酵素について研究を行った。

2. 実験方法, 結果と考察

古紙を含む無機培地に、土壌試料懸濁液あるいはカイコ腸内懸濁液を接種し、37℃で集積培養を行った。微生物スクリーニングの結果、46 菌株の古紙糖化微生物を単離した。単離菌株のうち古紙分解力の強い菌株の選抜を行った結果、カイコ品種中 514 号から c514 株、蚕日本一から J1 株を分離した(図1, 2)。これら菌株の 16S rDNA 解析による同定の結果、c514 株は *Pseudoxanthomonas* sp. に属し、J1 株は *Micromonospora* sp. に属することがわかった。

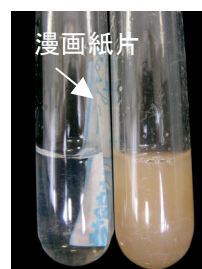


図1. c514 株による古紙分解の様子

左, 微生物無し(コントロール実験); 右, c514 株培養液

これら2菌株を用いて、古紙糖化培養試験を

行った. 100 ml の古紙含有無培地に前培養液を1%接種し, 37℃にてしんとう培養を行った. 各時間毎に培養液中に生成する還元糖濃度とグルコース濃度を測定した. 還元糖濃度は, DNS 法に基づきグルコースを標準物質として測定した. グルコース濃度は, グルコーステストキット法(和光純薬, グルコーステストキットワコー)により測定した. また, 培養上澄み液中および微生物菌体中のセルラーゼ活性を測定した. セルラーゼ活性測定は, 酵素液 0.15 ml, 2.5 mg ろ紙, 50 mM SPB (pH7.0) 0.35 ml からなる酵素反応液で行い, 1 分間にろ紙から1 μmol のグルコースを遊離する酵素量を 1 FPU と定義した.

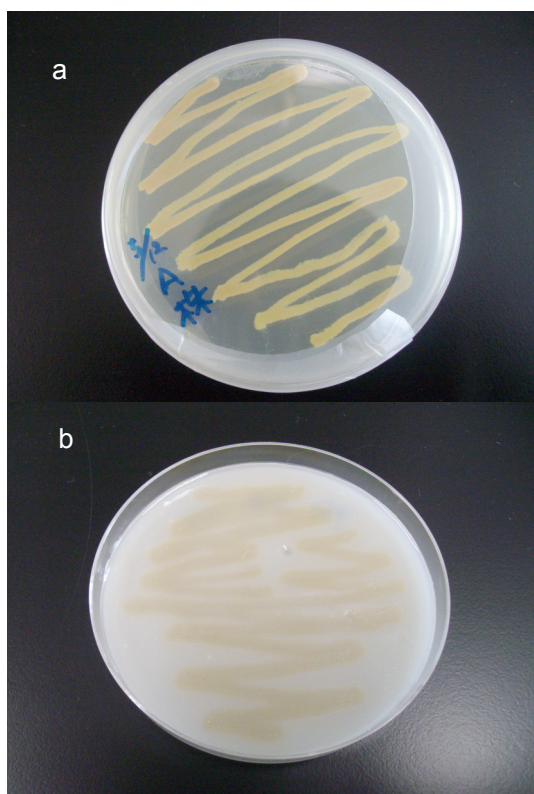


図2. 寒天平板上における古紙分解微生物の様子

a, 普通寒天培地に生育した c514 株; b, CMC 寒天培地に生育した J1 株

本研究では, 古紙分解能力が高かった c514 株について調べた. 古紙を含む無機培地に c514 株を培養し, 培養液中に含まれる還元糖濃度とグルコース濃度の測定を行った. また, 培養上清中の酵素活性について測定した. その結果, 培養液中に還元糖が 0.1 g/L, グルコースが 12 mg/L 生成し, 酵素活性は最大 16.1 U/L だった(図3). c514 株の糖化能力および酵素活性は既報菌株に比べて低かったものの, c514 株培養時に古紙が細かい繊維状まで分解されていた.

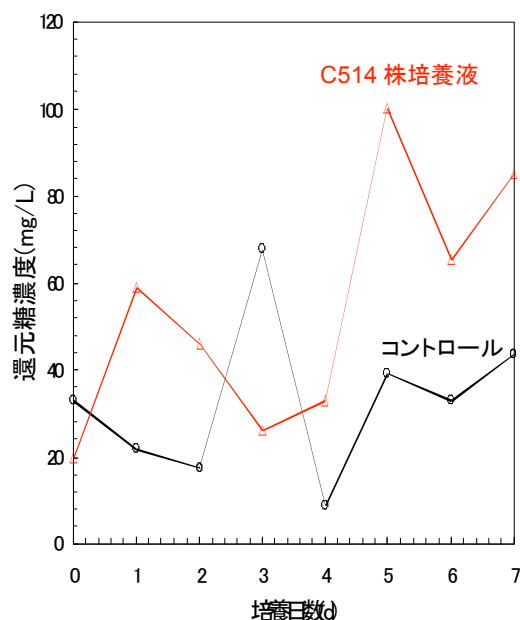


図3. c514 株生育における古紙糖化の経時変化

そこで, 古紙糖化の前処理方法として c514 株を用いる微生物処理法とミキサーで紙を粉砕する物理処理法で比較を行った. c514 株培養残渣に *Aspergillus niger* セルラーゼ(ナカライ製)を 150 U 添加し, 酵素反応(37℃, pH 5.0)を行った. その結果, 酵素糖化は約 24 時間で停止し, 微生物処理法では還元糖が 4.54 g/L, グルコースが 0.642 g/L 生成した(図4).

物理処理法では還元糖が 2.32 g/L, グルコースが 0.273 g/L 生成した(図4). これより, 微生物処理法は物理処理法に比べてセルラーゼが作用しやすい状態にまで古紙が分解されたと考えられる.

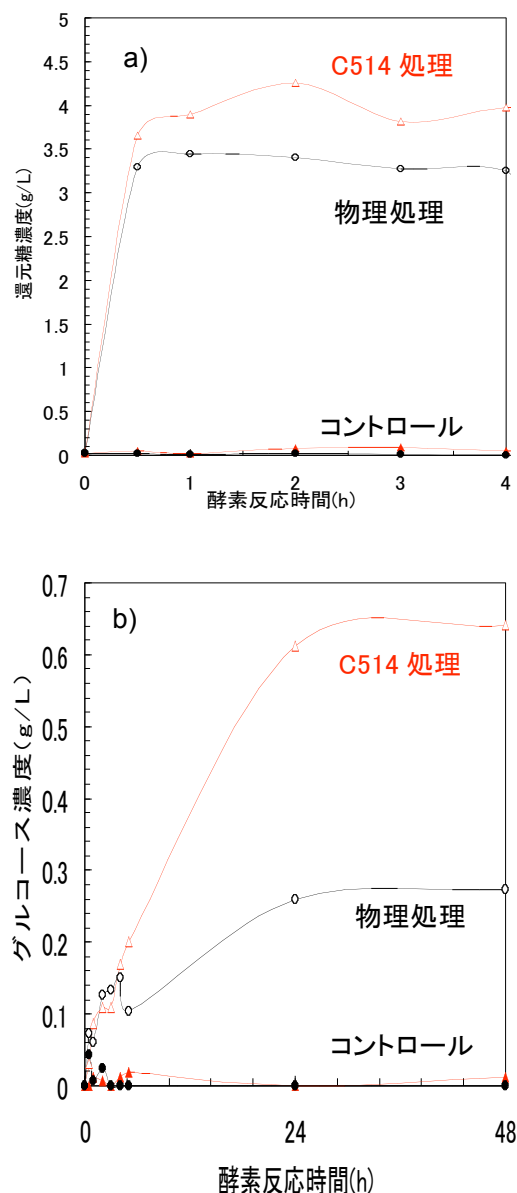


図4. 市販セルラーゼによる古紙糖化における前処理方法の影響(37°C, pH 5)
a) 還元糖生成の経時変化; b) グルコース生成の経時変化

C514 株よりセルラーゼの精製を試みた. ま

ず, セルラーゼの所在を明らかにするため培養上清と菌体内成分と分離し, それぞれの酵素活性を調べた結果, 本酵素は菌体外に分泌されていることがわかった. そこで, C514 株培養上清を酵素精製の出発材料とした. 培養上清を回収し, 硫酸精製および陰イオン, 陽イオン, 疎水相互作用クロマトグラフィーの条件検討を行った. 硫酸精製条件を明らかにし, その後陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことで精製が可能になったことがわかった. しかしながら, 活性が微弱なため精製を進めるには至らなかった.

3. おわりに

本研究では, 福島県に所縁の深いカイコ2品種の腸内から古紙糖化能力を有する細菌 *Pseudoxanthomonas* sp. C514 株と放線菌 *Micromonospora* sp. J1 株を分離することができた. カイコから古紙糖化微生物が分離できたこと, これら微生物がセルラーゼを生産することについては全く新しい発見であった. しかしながら, これら微生物が生産する酵素の活性は, 従来酵素の活性に比べ低く, さらに研究を続けるには問題があった.

謝辞

カイコを快く分譲していただきました福島県農業総合センター作物園芸部畑作グループ 瓜田章二科長に深謝します. 本研究を行ってくれた神林雅人君に感謝の意を表す. 本研究の一部は, JST シーズ発掘試験「昆虫の腸内共生微生物由来セルラーゼの精製とその特徴解明」による支援を受けたものである.

文 献

- (1) 矢野伸一, セルロース系バイオエタノール

の製造技術動向，ペテロテック，31（6），
429-434（2008）.

(2) 山辺 倫，セルロース原料の分解方法，特
開 2003-135052.