[*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 49, No. 3, p. 313–317 (2002)]

ノ ー ト

セルロースのエチレングリコールジグリシジルエーテル架橋処理による セルラーゼに対する安定化

廣戸三佐雄*, 櫻井勝清¹, 小寺 洋, 松島瑞子,
西村裕之, 稲田祐二¹

桐蔭横浜大学工学部医用工学科
(225-8502 横浜市青葉区鉄町 1614)

¹ 桐蔭横浜大学人間科学工学センター
(225-8502 横浜市青葉区鉄町 1614)

The Stabilization of Cellulose by Cross-linking with Ethyleneglycoldiglycidylether and Polyethyleneimine

Misao Hiroto,* Katsukiyo Sakurai,¹ Yoh Kodera, Akiko Matsushima,
Hiroyuki Nishimura and Yuuji Inada¹

*Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Toin University of Yokohama
(1614, Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama 225-8502, Japan)*

¹*HUSTEC, Toin University of Yokohama (1614, Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama 225-8502, Japan)*

The common method for treating industrial wastewater is the activated-sludge process in which specific carriers of bacteria capable of forming active sludge are put in contact with treated water. As a raw material for the carriers, cellulose sponges (native cellulose) are advantageous after use, but one disadvantage is their weakness in physical contact with wastewater as it is being treated. Because of this disadvantage, epoxydated-resin coated carriers (coated cellulose) with hardened surface are used in the treatment plants. It is often observed that the carriers are shortly dissolved, leaving fragments of resins possibly resulting from cellulase. In order to overcome this disadvantage, the cellulose is pretreated with ethyleneglycol-diglycidylether, then crosslinked with polyethyleneimine to ether on the surface of cellulose-sponges (crosslinked cellulose). It has been found that the crosslinked cellulose has an especially superior ability to resist cellulase action, while its adhesion capacity for bacteria is equivalent or greater, compared with that of coated cellulose.

現行の工場排水処理では活性汚泥法を応用したプラントが多く用いられている。活性汚泥を形成している微生物を然るべき担体に付着させ、曝気槽や嫌氣的攪拌槽の中で処理水と接触させる方法である。その担体の素材としてウレタン、ポリプロピレン等も思考されるがセルローススポンジ（未処理セルロース担体）を用いることが担体としての使命を全うした後の廃棄処理を考えても非常に有利である。未処理セルロース担体の欠点は処理液中での担体同士の衝突など物理的衝

撃に弱いことであった。廃水処理プラント製作企業は対応策として、未処理セルロース担体の表面をエポキシ樹脂で覆う（塗布セルロース担体）ことを行ってきた。しかし、排水中に有機物の混入が多い工場では、この塗布セルロース担体を用いても予想外の短期間に、エポキシ樹脂を残して溶け去ってしまうことが多く観察された。その理由は、有機物含有の排水を処理している活性汚泥中の微生物由来のセルラーゼ活性によるものと推定された。

そこで、未処理セルロース担体に化学処理を施して化学構造を変えることにより、セルラーゼ耐性を賦与

* Corresponding author (Hiroto@cc.toin.jp).

すべく、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルをアルカリ環境下で反応させ架橋を形成させた（架橋セルロース担体）。反応混合物を減圧下で乾燥させ、アルカリを中和した後に蒸留水で洗浄・濯ぎを繰り返す。乾燥の後、ポリエチレニミンを架橋セルロース担体の表面に付着しているエチレングリコールジグリシジルエーテルと減圧下で反応させ、架橋セルロース担体の表面近辺だけをエポキシ樹脂化する。架橋セルロース担体は、エポキシ樹脂で覆っただけの塗布セルロース担体に比べ、セルラーゼ耐性において数段勝り、その上、微生物の付着具合も塗布セルロース担体に勝るとも劣らなかった。

工場排水処理は、環境水を富栄養化防止の観点から含有有機物排水を硝化バクテリア（*Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.）や脱窒細菌を活性汚泥中に繁殖させ、排水中の窒素化合物を硝化脱窒反応により除去する生物学的窒素除去法が現在採用されている¹⁾。この方法の効率化のために液中の有効な微生物を固定物に固着させる各種の担体²⁻⁴⁾を排水処理槽内に投入することで活性汚泥の濃縮度を高め、処理液は移動しても処理液中の微生物を流亡させない方法が採用されている。この方法は、それまでの沈澱池のための用地や余剰汚泥処理という、経済的負担の削減に貢献している。微生物固定化担体の素材としては、カチオン性の高級水性樹脂⁵⁾、ポリオレフィン⁵⁾、ウレタン⁶⁾、ポリプロピレン⁶⁾、ポリエチレン⁶⁾等も考案されたがセルロース⁷⁾を用いることが、微生物固定化担体として使用した後の焼却廃棄における公害物質の発生を防止するという点で有利である。即ち、現行の工場排水プラントは、好気条件下でアンモニア態窒素を硝化させる硝化槽と、嫌気条件下で硝酸・亜硝酸態窒素を窒素ガスに還元除去する脱窒槽とからなっているものが多く、この二槽にセルロースの薄片を投入して、その表面に汚泥中の微生物を付着させ働かせた。しかし、セルロース担体そのもの（以下未処理セルロースと呼称）は排水処理槽内の物理的衝撃によって磨耗解体してしまうので、セルロース担体の表面をエポキシ樹脂加工（以下塗布セルロースと呼称）して実用化している⁸⁾。エポキシ樹脂は物理的に強靱であるから、セルローススポンジの表面を覆うことで、セルロース分子を結びつけ、排水処理液槽中で受ける物理的衝撃に抵抗するには有効である。またエポキシ樹脂を形成させるための反応開始剤であるポリイミンの荷電が微生物の荷電と引き合い、微生物を担体に付着しやすくなるという面も有効に作用している。エポキシ樹脂加工は処理水中のセル

ラーゼに対する耐性の付加も兼ねていたのである⁸⁾が、ビール・ウISKY工場など、排水中に有機物を多く含む食品工場の排水処理において、この塗布セルロース担体が自然の摩耗によるとは思われないほどのもろさで崩壊することが報告されてきた。それら工場の取り扱い原料と排出成分から予想されるセルロースの溶解原因物質として、排液中にセルラーゼの存在が考えられる。エポキシ加工とはいえ塗布しただけであるので、セルロースの化学構造には変化がないためセルラーゼが反応基質としてエポキシ加工したセルロースを認識することがその原因である。

本論文の目的は、塗布セルロースの生成材料を転用して、セルロースにエポキシ剤を架橋反応させセルロース誘導体として、塗布セルロースの微生物固定化担体よりセルラーゼ耐性が優れ、かつ微生物の付着力も劣らない新規な微生物担体を生成することにある。

実験材料と方法

1. 材 料

一辺が 5 mm の立方体セルローススポンジチップおよび塗布セルロース微生物担体（商品名 BM アクアセル担体、タイホー工業）を使用した。エチレングリコールジグリシジルエーテル（商品名デナコール）EX-810（長瀬産業）、高分子ポリエチレニミン（商品名エポミン、日本触媒）、セルラーゼ（1000 U/mg, *Trichoderma viride* 由来、和光純薬）は市販のものをを用い、その他の薬品は分析用試薬特級を用いた。

2. 架橋セルロース微生物固定化担体の製法

5.0 g の未処理セルロースチップに 2.8 mL のポリエチレニミンの水溶液を常圧の下に 1 時間攪拌した後、80℃ に加温しつつ減圧乾燥する。その後 0.002 M の炭酸水素ナトリウム 250 mL を加え、9.2 mL のエチレングリコールジグリシジルエーテルを 60℃ の水浴上で 1 時間攪拌して、分子間および分子内の架橋反応を行う^{9,10)}。時間経過後、0.002 M 塩酸 250 mL により中和し、その後蒸留水で洗浄後 60℃ で減圧乾燥した。

3. セルラーゼ耐性試験法（残量による比較）

乾燥させ秤量した試料チップ 5 粒（約 25 mg）を試料ごとに 6 本の蓋付き試験管に取り、1000 U（約 50 mg）のセルラーゼを溶解している 0.2 M のリン酸・クエン酸緩衝溶液（pH 4.5）2 mL を加え、振盪培養器にて 37℃・60 rpm の振動で培養し反応時間経過後に 1 本ずつ、蒸留水で洗浄して加熱乾燥後、残存質量を測定し培養開始前に測定した質量と比較した。

Fig. 3. Time courses of cellulose stabilities to cellulase.

The sample cellulose (25 mg) reacted in 2 mL of 0.2 M citric-phosphate buffer (pH 4.5) with cellulase (1000 U) at 60°C for 1 to 6 weeks. Residual ratio to cellulase = $100 \times (\text{weight after a given time}) / (\text{starting weight})$. Curve A, cross-linked cellulose; curve B, coated cellulose; curve C, native cellulose.

Fig. 5. Time courses of total sugar concentration produced from celluloses by cellulase.

Cellulose sample (75 mg) reacted to cellulase in citrate-phosphate buffer (pH 4.5) at 37°C over 1 to 4 h. After a given time, the measurement of total sugar concentration was carried out. Curve A, cross-linked cellulose; curve B, coated cellulose; curve C, native cellulose.

Fig. 4. The forms of two types of celluloses after treatment with cellulase.

III, Coated cellulose; IV, cross-linked cellulose.

スキーなど食品工場においては同様標品が極めて短期間にIIのように分解された。この弱点を補うためにエチレングリコールジグリシジルエーテルを未処理の微生物固定化担体に架橋させた (Fig. 2)。データは示していないが、この状態のままでも十分にセルラーゼ耐性があったが、処理水中で浮遊している間の衝突による物理的衝撃によって分解された。そのため、架橋反応

後その微生物固定化担体表面上の未反応エチレングリコールジグリシジルエーテルにポリエチレンイミンを働かせて、そこにエポキシ樹脂を形成させた。このポリエチレンイミン処理は、微生物固定化担体表面の物理的強度を増加させるばかりでなく、ポリエチレンイミンの荷電による微生物付着能をも賦与するものである⁸⁾。

未処理セルロース担体、塗布セルロース担体と架橋セルロース担体のセルラーゼ耐性をセルラーゼ反応後の残存率、すなわち反応時間経過後の残存固形物の質量を経時的に比較した結果を Fig. 3 に示す。未処理セルロース (C) は反応開始1週間後には、溶液を若干濁らした程度の痕跡を残して完全にその担体の形状を止めていなかった。塗布セルロース担体 (B) は反応開始2週間後においてその外見上は形状を保っているように見え、かつ、残存質量の低下は2週間で止まったように見えるが、セルロースは分解されて質量のほとんどはエポキシ樹脂のものである。6週間にわたる反応後の残渣の組成百分率が硫酸処理後の残渣の組成百分率とほぼ一致していることから裏付けられる。一方、架橋セルロース担体 (A) はその残存質量の低下は全くみられない。Fig. 4 のⅢは塗布セルロース担体にセルラーゼ反応を6週間続けた後の状態を示し、Ⅳは架橋セルロースの同様状態を示す。ともにセルラー

ゼ反応を施した後、桐山ロートで濾過洗浄し乾燥したものである。Ⅲはセルローススポンジに塗布されていたエポキシ樹脂と少量のセルロースが残ったものである。Ⅳは見かけも質量も反応前と全く変わらず強力なセルラーゼ耐性を獲得していることがわかる。

未処理セルロース担体、塗布セルロース担体と架橋セルロース担体にセルラーゼを働かせ経時的に反応液中の可溶性糖分をグルコース換算で測定した結果をFig. 5に示す。この実験ではセルラーゼ濃度を長期間の耐性実験に比べ7.8倍とし短期間に耐性比較ができるようにした。未処理セルロース担体は与条件下で加水分解を受け、初めの一時間内に形は崩れてしまい懸濁状態のままであり、以後糖濃度には変化がみられなかった。塗布セルロース担体は表面をエポキシ樹脂で覆われているため加水分解を受けるのが比較的遅く、反応液中の糖濃度は未処理セルロース担体のそれと比べかなり低かった。架橋セルロース担体の場合は、4時間の反応中には検知できる糖濃度はなかった。

微生物固定化担体の表面加工方法の条件を、一部変えることによってセルロースの化学構造を改変し、その成果として化学的にセルラーゼ耐性を、物理学的には機械的強度をもった新規な微生物固定化担体を生成した。

文 献

- 1) 環境エンジニアリング㈱, 松山秀明, 松島豊彦, 古宮紀之: 新規微生物含癒排水の生物学的処理方法, 微生物付着用担体及び流動担体生物処理装置. 特開平 9-75075, 1997-03-25.
- 2) 大成建設㈱, 瀧 實則: 有機性排水処理設備の立ち上げ方法. 特開平 11-147097, 1999-06-02.
- 3) 荏原製作所㈱, 鈴木ひとみ, 佐久間博司, 牧 恭子, 森 康輔: 有機性汚水の処理方法及び処理装置. 特開平 2001-104980, 2001-04-17.
- 4) 昭和エンジニアリング㈱, 坂田芳治, 本田一好, 竹倉紘一: 担体併用生物反応槽の分離方法. 特開平 10-296283, 1998-11-10.
- 5) テラルテクノサービス㈱, 長津 功: 担体活性汚泥法及び処理装置. 特開平 2000-279983, 2000-10-10.
- 6) 味の素㈱, 山中 茂, 江藤 譲, 高野佐敏: 修飾された微生物産生セルロースのゲルおよび動物細胞膜との複合体. 特開昭 63-152601, 1988-06-25.
- 7) バイオマテリアル㈱, 藤井直幸, 宇井竜司, 坪田 宏: セルロースの生分解抑制剤組成物および微生物固定化担体. 特開平 7-196846, 1995-08-01.
- 8) 熱化学工業㈱, 森田 徹, 西山和成: 含水ゲル組成物. 特開平 5-239263, 1993-09-17.
- 9) K. Tomihata and Y. Ikeda: Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*, **18**, 189-195 (1997).
- 10) 三菱化学㈱, 黒柳能光: 架橋ヒアルロン酸スポンジの製造方法. 特開平 11-322807, 1999-11-26.
- 11) M. Dubois, K.A. Giltes, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).

(2001年8月24日受付; 2001年12月25日受理)