研究論文

水素生成菌による使用済みコピー紙の水素への変換

田 口 文 章***・松 下 敏 也*・能 見 雅 信**

要 旨

使用済みコピー紙を工業用粗セルラーゼE-CELで加水分解し、得られた還元糖を水素生成細菌 *Clostridium beijerinckii* AM21B 株で水素に変換する条件を検討した。温度45℃、pH4.5の酢酸緩衝液400 mlとセルラーゼ2,790 mgを用いてコピー紙量39.6 gを連続的に120時間加水分解し、コピー紙の67.5%に相当する26.72 gの還元糖が回収された。

還元糖5 gを添加したPY培地1 lに水素生成菌AM21B株を接種して、37℃で培養した。培養開始1～2時間後に水素の発生が認められ、6～7時間後に1時間あたりの水素生成量は最大となり、総量としてグルコース5 gから2,719 mlと加水分解物5 gからは3,953 mlの水素が発生した。

これらの結果は、安価な工業用粗セルラーゼが入手できると、裁断されたコピー紙は焼却しないで水素生成菌を用いて水素に変換できる可能性を示した。

キーワード：水素生成細菌、コピー紙、粗セルラーゼ、加水分解物、水素生産

1. は じ め に

日本国内では膨大な廃棄物が排出され、ほぼ半分は植物性廃棄物であり、また排出量の73%は焼却処理されていると言われている^{1,2)}。大量な生ゴミを含む廃棄物の焼却処理は、二酸化炭素をはじめとする温室効果ガスの大量発生による地球温暖化の原因となり、またダイオキシンのような有害物質を新たに生み出すことが懸念されている。

バイオマスや植物性廃棄物のエネルギー源としての検討やその活用法が日本国内であまり注目されないのは、採算性が低いと思われること、地域面積あたりの排出量が限られているとの認識からだと思われる。しかし、植物性廃棄物の代表の一つである使用済みコピー用紙は、都市部での事業所などからは年間を通して大量にまとめて排出される。ところが植物繊維性廃棄物はセルロース、ヘミセルロースとリグニンなどの難分解性高分子を多く含む

ため、市販されている生ゴミ処理機で使われている菌床を含めほとんどの微生物は、本来再生可能な貴重なエネルギー源である植物繊維性廃棄物を部分的には分解できても処理できない。

我々は、これまでに植物性廃棄物を分解し水素を発生する細菌の分離を試みてきた。その結果、シロアリから新規な水素生成菌を多数分離し^{3,4)}、それらの菌株はセルロース、ヘミセルロース、でん粉、キシラン等の六炭糖や五炭糖の多くの糖分を水素に変換できることを報告してきた³⁻¹⁰⁾。シロアリから分離した水素生成菌は、でん粉やキシランを分解し、グルコースと同じ程度に水素を生成する^{4,6)}。しかし、我々の水素生成菌は、コピー用紙などのセルロースを分解して水素を発生するが、その水素生成量はグルコースの3分の1程度で水素発酵は終息し、セルロースを完全に分解することはできない(未発表)。その原因は、セルラーゼの産生量または活性の不充分さおよび水素生成菌の増殖条件と酵素活

*北里大学大学院衛生学研究科 Fumiaki TAGUCHI, Toshiya MATSUSITA (現・千葉大学医学部病院) 2002年12月5日受付
**北里大学大学院医療系研究科 (現・新日本薬業株) Masanobu NOUMI 2003年2月14日受理

性の最適条件との相違などによると推測される^{9,10)}。

そこで、シュレッダーで細かく裁断された使用済みコピー紙を工業用粗セルラーゼで加水分解し、分解物を水素生成菌で連続的に水素に変換するための基礎条件を検討した。

2. 材料と方法

2.1 コピー紙とセルラーゼ

使用済みコピー紙（富士ゼロックス製）を市販のシュレッダーで幅2ミリと長さ15ミリほどの大きさに裁断したものを使用した。セルラーゼは、協和発酵工業(株)（東京）より分与された粉末化した粗セルラーゼ標品（E-CEL）を使用した。E-CEL粉末は、0.1Mの酢酸緩衝液（pH4.5）に溶解して使用した。なおE-CELは、CMCase活性16.4IU/mg、 β -Glucosidase活性0.098IU/mg、Avicelase活性0.665IU/mgとXylanase活性28.8IU/mgを持つとされている（私信、協和発酵工業(株)）。

2.2 水素生成菌株と培地^{3,4)}

シロアリ *Coptotermes formosanus* より分離した嫌気性有芽胞グラム陽性桿菌である *Clostridium beijerinckii* strain AM21B（以下AM21B株と略称する）を使用した。AM21B株の培養には、嫌気性グローブボックス（MIP-1025型、Forma社製、OHIO, USA）を用いた。グローブボックス内は、水素10%、二酸化炭素10%、窒素ガス80%の混合ガスに置換して嫌気状態にし、菌の培養および嫌気的操作は、すべてグローブボックス内で行った。培養はペプトンと酵母エキスを含むPY液体培地および寒天を加えたPY寒天培地を用いた。菌株継代用の0.3%グルコース加PY（PYG）寒天培地は、滅菌後プラスチックシャーレに分注・平板にし、クリーンベンチ内で30分間乾燥させ、次いで嫌気性グローブボックス内で2時間嫌気状態に放置した後に使用した。菌株の前培養には0.1%グルコース加PYG培地を用いた。

2.3 菌株の培養^{3,4)}

AM21B株をPYG寒天培地表面に塗抹し、37℃の嫌気性グローブボックス内で一晚培養した。毎週1回定期的にグローブボックス内で継代培養し、実験の都度新鮮な菌を種として用いた。水素発酵に用いる菌液は、以下の方法で実験毎に準備した。AM21B菌をPYG寒天平板から無菌的に白金耳で釣菌し、30mlの0.1%グルコース加PYG液体培地に

接種後、グローブボックス内で一晚培養し、これを前培養菌液とした。

2.4 連続発酵と培養液pHの調整⁸⁾

予め5g/lのグルコースまたは還元糖を加えた270mlのPY液体培地を入れてある500mlの三角フラスコにAM21B株前培養菌液30mlを加えて総量を300mlとし、ゴム栓をした後グローブボックスから取り出した。なお加水分解濾過液中の還元糖は、PY培地で約3倍に希釈して5g/lに調整した。還元糖を加えたPY培地を準備し、pHを6.0に自動調整し、37℃で攪拌培養を行った。ゴム栓には数本のステンレス製の吸い取り針とpH電極を取り付け、37℃の恒温槽内でマグネチックスターラーで攪拌しながら培養を行った。

ゴム栓に装着してあるステンレス製の吸い取り針を介して、発生したガス排出（10% NaOH溶液に接続）、培地供給（ペリスタポンプを介して新鮮なPY液体培地に接続）、培地排出（ペリスタポンプを介して培地の抜き取り）、10% NaOH溶液の供給（培地のpHを調節するためペリスタポンプを介して10% NaOH溶液に接続）を行い、更にpHを自動調節するためにpHコントローラー（FC-10型、東京理科製、東京）のpH電極をゴム栓の真中から培地に届くまで挿入した。

培養液のpHは、必要に応じてpHコントローラーで自動的に調節した。連続培養のための培養液の供給と排出は、ペリスタポンプの回転数を調節して、希釈率（ D, h^{-1} ）を約0.1から0.4の範囲に保った。希釈率 $D=1$ は1時間で培地全量を入れ換える率で、毎時間300mlの培地を抜き取ると同時に等量の新鮮な培地を供給する条件である。抜き取った培養液は、pH、糖濃度と濁度の測定に用いた。

連続培養による還元糖からの水素生成は、37℃の恒温槽で攪拌培養し、培養開始5時間前後から培養液のpHを6.0付近にpHコントローラーで調整し、同時に連続培養に切り換えた。

2.5 セルラーゼ活性と還元糖の測定法

酢酸緩衝液（pH4.5）に粗セルラーゼを溶解した液（20ml）にコピー紙を加え、45℃の恒温水槽内で30分間マグネチックスターラーで攪拌しながら良く反応させた。得られた還元糖をグルコースと仮定し、1分間に遊離してくるグルコース重量（g）を算出し、酵素活性値IUを求めた。

加水分解によって得られた還元糖および水素発酵

培地中の残存糖の濃度は、Somogyi-Nelson法で測定した¹¹⁾。測定用試料としては、加水分解液の場合には分子量1万以下の分子のみを通過させるセパレーターを装着した限外濾過機を通してコピー紙の未分解残渣と酵素分子を取り除いた濾過液を、また水素発酵培地の場合には3000rpm、30分間遠心後の上清を、それぞれ糖濃度測定に用いた。

適当に希釈した試料にSomogyi試薬を加えて沸騰水中で正確に10分間煮沸し、直ちに10分間流水中で水冷した。更にNelson試薬を加えて発色させた後、波長660nmにあわせた分光光度計 (Model UV-1200, 島津, 京都) で発色の程度を測定した。試料中の糖の濃度は予めグルコースを用いて作製した検量線から求めた。尚、加水分解液中のグルコース量は、ヘキソキナーゼ法で測定した。

2.6 コピー紙の加水分解

反応液として0.1M酢酸/酢酸Na緩衝液にセルラーゼ粉末を溶解し、シュレッダーで裁断したコピー紙を加え、恒温槽内でマグネチックスターラーで攪拌しながら加水分解を行った。

2.6.1 セルラーゼ活性の至適温度の検討

pH5.0の緩衝液20mlに酵素40mgとコピー紙を0.20g添加し、反応温度を40℃、45℃と50℃とし、各温度で1時間、3時間と5時間反応させて検討した。

2.6.2 酵素活性の至適pHの検討

酵素を40mg、コピー紙を0.20gと反応温度を45℃に固定し、緩衝液20mlのpHを4.0、4.5、5.0、5.5と6.0に調整し、1時間、3時間と5時間反応させて検討した。

2.6.3 熱安定性の検討

pH4.5の緩衝液20mlに酵素40mgを加え、45℃、50℃と55℃の恒温槽中で24時間、48時間と72時間保温した。保温終了後に各温度の酵素液にコピー紙を2%に加えて45℃で30分間保温してコピー紙の加水分解を行った。

2.6.4 pH安定性の検討

pHを4.0、4.5と5.0に調整した緩衝液20mlに酵素40mgを加え、45℃の恒温槽中で24時間、48時間と72時間保温した。保温終了後に各pHの酵素液にコピー紙を0.40gに添加し、45℃で30分間保温してコピー紙の加水分解を行った。

2.6.5 コピー紙の連続加水分解

連続加水分解は、pH4.5の緩衝液400mlにセルラーゼ標品 (E-CEL) を1～3mg/mlとコピー紙を

1～3%に加えて、45℃で20時間マグネチックスターラーで攪拌した。分子量1万以下の分子のみを通過させるセパレーターを装着した限外濾過機 (ミニタンII型, 日本ミリポア, 東京) を通して加水分解液の約3/4を取り除いた。限外濾過を行っている時間は、加水分解の時間から除いた。同量の緩衝液を加えた後、セルラーゼ1～3mg/mlと基質1～3%を追加した。これを数回繰り返して連続で80～120時間加水分解を続けた。

2.7 水素ガスと菌体重量の定量^{3, 4)}

AM21B株の培養液から発生したガスは、10% NaOH液を通して二酸化炭素を吸収後、水上置換法にてメスシリンダーで捕集し、その容量 (ml) を水素ガス量とした。菌体乾燥重量は、予め作成してある吸光度と乾燥菌体重量の換算表より求め、g/ℓで表現した。

3. 実験結果

3.1 セルラーゼ活性の至適温度の検討

酵素活性の至適温度を表1の条件で検討した。遊離した還元糖を定量し、その重量 (g) とコピー紙重量 (g) から酵素活性を基質の分解率で表した。表1に示した結果より酵素活性の至適温度を45℃と決定した。

3.2 至適pHの検討

酵素活性の至適pHを表2の条件で検討した。遊

表1 酵素活性の至適温度

温度	反応時間と分解率 (%)		
	1時間	3時間	5時間
40℃	26.0	35.8	73.5
45℃	27.4	38.6	81.7
50℃	25.7	38.5	75.6

pH5.0の酢酸緩衝液20mlにコピー紙0.20gと酵素40mgを加え、各温度で5時間まで反応させた。添加したコピー紙重量 (g) と得られた還元糖重量 (g) から分解率 (%) を算出した。

表2 酵素活性の至適pH

pH	反応時間と分解率 (%)		
	1時間	3時間	5時間
4.0	46.0	61.3	66.0
4.5	55.6	64.0	71.2
5.0	46.0	62.2	65.2
5.5	45.0	56.5	61.3
6.0	38.3	43.0	43.2

酢酸緩衝液20ml、コピー紙0.40g、酵素40mg、反応温度45℃。

離した還元糖重量（g）から酵素活性を基質の分解率で表した．表2に示した代表的な結果から至適pHは4.5と考え、以後の実験にはpH4.5の緩衝液を用いることにした．

3.3 熱安定性の検討

pH4.5の緩衝液に溶解した酵素の表3に示した条件での活性を測定した．遊離した還元糖をグルコースと仮定し、その重量（g）から酵素活性（IU）を算出した．各温度における酵素の活性値を表3に示した．酵素活性の至適温度である45℃に保温すると48時間保温後には259.3IUあった酵素活性は133.3IUに減少するが、51.4％の活性が残存することが判明した．

3.4 pH安定性の検討

45℃に保温した場合の酵素活性に対するpHの影響を検討した．各pHにおける酵素の活性値を表4に示した．試験した範囲では、pHの高いほうが活性値の低下は少なかったが、48時間の保温ではpHの影響は認められなかった．酵素活性の至適pHであるpH4.5に48時間と72時間保温した場合、281.5IUあった酵素活性はおおの148.1IUおよび103.4IUに低下したが、初発活性の52.6％および36.7％の活性が残存していた．

3.5 酵素濃度と基質濃度の検討

連続的に加水分解をするために最適な酵素と基質

表3 熱安定性の検討

温度	保温時間と酵素活性（IU）			
	0時間	24時間	48時間	72時間
45℃	259.3	209.6	133.3	91.5
50℃	259.3	192.6	66.7	74.1
55℃	229.6	148.1	59.3	51.8

pH4.5の緩衝液20mlに酵素40mgを溶解し、各温度に72時間まで保温した．その後コピー紙を0.40g加え45℃で30分間保温して加水分解を行った．得られた還元糖をグルコースと仮定し、その重量（g）から酵素活性（IU）を算出した．

表4 pH安定性の検討

pH	保温時間と酵素活性（IU）			
	0時間	24時間	48時間	72時間
pH4.0	237.0	140.7	140.7	96.3
pH4.5	281.5	163.0	148.1	103.4
pH5.0	274.1	170.4	148.1	125.9

pH4.5の緩衝液20mlに酵素40mgを溶解し、各pHに45℃で72時間まで保温した．その後コピー紙を0.40gに加えて45℃で30分間保温して加水分解を行った．

の濃度の検討を行った．緩衝液400ml、コピー紙を3％、4％と5％、酵素を2.0mg/mlと3.0mg/mlに設定し、45℃恒温槽内で24時間加水分解を行った．

結果は示していないが、pH4.5の緩衝液400mlにコピー紙を20.00g加えるとマグネチックスターラーを一定に回転させるのが困難であった．酵素は1,200mg添加した方が800mg添加したものより高値を示したが、その差は数％であった．コピー紙8.0gと酵素800mgで24時間反応させると、最高で添加したコピー紙重量の82.5％に相当する還元が得られた．

3.6 連続加水分解

酵素800mgとコピー紙12.0gを400mlのpH4.5の緩衝液に加え、45℃で加水分解を開始した．20時間後毎に緩衝液の約3/4量を限外濾過して取り除き、同量の緩衝液、酵素1mg/mlとコピー紙2％を追加した．

連続で80時間加水分解を続けた．結果は示していないが、80時間の加水分解で添加したコピー紙の65～70％に相当する還元糖を限外濾過液中に回収できた．

総コピー紙量39.6g、総セルラーゼ量2,790mgを用いて連続120時間加水分解した結果では、26.72gの還元糖が得られたのに対して、未分解残渣は乾燥重量で6.40gあった．120時間に投入したコピー紙重量（g）と得られた還元糖重量（g）から計算すると、基質分解率は67.5％で、未分解物を含めても投入コピー紙重量の83.6％だけが回収されたことになる．その結果、総コピー紙重量から還元糖重量と未分解残渣の重量の和を差し引いた約6.5g（コピー紙重量の16.4％）が未回収であった．

3.7 加水分解濾過液を用いた水素発酵

加水分解濾液中の還元糖を用いてグルコースを基質とした時との水素生成の比較を行った．pHを6.0に自動調整し、37℃で攪拌培養を行った．

水素ガスは、培養開始2時間後より発生し、その後は急激に増大した．6～7時間後に1時間あたりの発生量は最大値を示した．代表的な結果を図-1に示した．対照として用いたグルコースと比較して還元糖の場合は、水素発生の立ち上がりが速く、総生成量は還元糖5グラムからは3,953mlでグルコースからは2,719mlと約45％も多かった．

3.8 加水分解濾過液を用いた連続水素発酵

培地の供給量から全体の希釈率（D, h⁻¹）を変え

図-1 加水分解濾過液からの水素生成
 □—グルコース 5 g/l ■—加水分解紙 5 g/l

て連続培養による還元糖からの水素生成を検討した。希釈率の低い方から順次実験を開始し、水素生成量や培養液の濁度等が一定になっていることを確認しながら各希釈率ごとに12時間連続的に培養した。その間1時間間隔で培養液の供給量、細菌の乾燥重量、残存糖濃度と水素の生成量を測定した。各測定値は、培養液1ℓに換算し、表5に示した。

希釈率を大きくするにつれて、水素の生成量は増大した。希釈率が各々0.30と0.29の時還元糖とグルコースからの1時間当たりの水素生成量は、各々最大値を示し427ml/h/ℓと333ml/h/ℓであった。希釈率が各々0.21まで廃液中の糖量はゼロとなり、供給糖量1.05 g/ℓ/hrが消費された。1 gの糖消費量

あたりの菌体収量が最大になる条件は、還元糖とグルコースと共に同じで希釈率が0.11の時、この菌体収量が最大を示す条件での1時間当たりの水素生成量 (ml/hr/ℓ) は最少であった。

4. 考 察

pH4.5の緩衝液と45℃の反応温度でコピー紙39.6 g、セルラーゼ2,790 mgを用いて連続120時間加水分解した結果、26.72 gの還元糖と6.40 gの未分解残渣が得られたが、約6.5 g (基質の16.4%) が未回収であった。このときの分解率は67.5%であったが、80時間の連続加水分解では添加したコピー紙の70～80%に相当する還元糖が回収された。使用済みコピー紙は、10数%のセルロース以外の物質が含まれることから (私信、富士ゼロックス)、100%完全に加水分解されることは期待できない。本研究の結果からも、投入したコピー紙重量の約16%が未回収であった。

コピー紙の加水分解液を限外濾過して得られた糖分は、水素生成菌AM21B株で効率よく水素に変換されることが本実験から判明した。図-1と表5に示した成績からも明らかなように、基質グラム当たりの水素生成量は、加水分解物からの水素生成量が常にグルコースから生成される水素量よりも有意に大であった。そこでコピー紙の加水分解を独立に3回行って得た試料をSomogyi-Nelson法で、還元糖をヘキソキナーゼ法でグルコースを定量した。表6

表5 連続水素発酵

希釈率	供給速度 ml/hr	pH	菌体量 mg/ℓ	供給糖量 g/ℓ/hr	廃液糖量 g/ℓ/hr	消費糖量 g/ℓ/hr	菌体量/消費量 g-cells/g	水素量 ml/hr	水素量 ml/hr/ℓ	水素量/消費量 ml/g-Glc
グルコース										
D=0.11	32	5.45	870	0.53	0.00	0.53	1.64	42	140	264
D=0.21	62	5.91	820	1.05	0.00	1.05	0.78	65	217	207
D=0.29	87	5.87	840	1.47	0.48	0.99	0.85	100	333	336
D=0.40	120	5.70	820	2.00	0.82	0.70	1.17	122	310	443
加水分解物										
D=0.11	32	5.98	820	0.32	0.00	0.32	2.56	60	200	625
D=0.21	64	5.97	860	1.05	0.00	1.05	0.82	94	313	298
D=0.30	90	5.90	690	1.50	0.58	0.92	0.75	118	427	464
D=0.40	120	5.98	640	2.00	1.16	0.45	1.42	190	363	807

供給速度ml/hr: 300 mlの細菌培養液に1時間に供給した新鮮培地の量,

菌体量mg/ℓ: 培養液1ℓ中の乾燥菌体重量,

供給糖量g/ℓ/hr: 培養液1ℓに換算した供給培地中の糖量, 廃液糖量g/ℓ/hr: 廃液1ℓ中に検出される糖量,

消費糖量g/ℓ/hr: 供給糖量から廃液糖量を差し引いた数値,

菌体量/消費量g-cells/g: 消費糖量1グラムあたりの乾燥菌体重量,

水素量ml/hr: 300 mlの細菌培養液から回収された水素生成量,

水素量ml/hr/ℓ: 培養液1ℓに換算した1時間当たりの水素生成量,

水素量/消費量ml/g-Glc: グルコースに換算した消費糖量1グラムから生成した水素量

表6 コピー紙酵素加水分解中の糖測定値の差

サンプル	測 定 糖 量 (g/1 ℓ)		B/A %
	ソモジー法 (A)	ヘキソキナーゼ法 (B)	
# 1	18.50	12.17	65.78
# 2	16.25	11.41	70.22
# 3	16.25	11.84	72.86
平均	17.00	11.81	69.47

に示したように、加水分解物は還元糖量のうち約66～73%，平均で約70%がグルコースであることが判った。表6の結果は、加水分解物の約30%は、セロビオースやオリゴ糖などからなる可能性を示唆するものと考えられる。従って、グラムあたりの水素生成量は、加水分解物の方がグルコースよりも大となったものと考えられる。

しかし、図-1に示したグラフから、還元糖を加えた培養での水素ガスの発生は、グルコースと比較して、早く立ち上がり、水素生成量が最大値を示す時間も速かった。このような現象の起こる原因は不明である。

AM21B株を含めシロアリから分離した水素生成菌は、スターチやキシランを分解する誘導酵素を産生し、その誘導酵素の作用により基質は加水分解され、その結果得られた糖分を速やかに水素に変換できる^{4, 6)}。このスターチやキシランを基質とした場合では、水素生成菌の増殖と酵素産生ならびに酵素活性などの至適条件が偶然にほぼ同じであったことが酵素産生、加水分解と水素生成などの反応が同時に進行するものと考えられる。ところが、本実験に用いたセルラーゼ標品の酵素活性を最大に発現する条件は、pHは4.5で反応温度は45℃であった。そのためコピー紙の酵素による加水分解の条件とAM21B菌の増殖と水素生成の条件（pH5.5～6.0と37℃）が異なるため、加水分解と水素発酵を同時に進行させることができなかった。

ここに報告した内容は、使用済みコピー紙を工業用粗セルラーゼ標品で処理すると約80%が加水分解され、得られた還元糖はAM21B菌でグルコースと少なくとも同程度に水素へ変換させられることを机上モデルとして示した。近い将来弱酸性域で活性を示す安価なセルラーゼ標品が購入できる体制が確立されれば、膨大な廃棄物となる使用済みコピー紙は焼却に回さないで、微生物を利用した水素回収型廃棄物処理が安価に実施可能であることを示唆して

いる。

使用済みコピー紙や新聞紙を水素生成菌で直接水素に変換させるためには、pH6.0前後の弱酸性液で活性を示すセルラーゼの開発が望まれる。その解決策の一つとして、水素生成菌に弱酸性液で活性を示すセルラーゼ遺伝子を導入してセルロースの分解と水素生成を同時に行える菌株の作出が今後の検討課題と考えられる。

5. ま と め

シュレッダーで裁断された使用済みコピー紙を工業用粗セルラーゼ（E-CEL）で処理して得た還元糖を含む加水分解物は、シロアリから分離した水素生成細菌*Clostridium beijerinckii* AM21B株で直接水素に変換できるかを検討した。

- 1) E-CEL粉末800mgとコピー紙12.0gをpH4.5の0.1M酢酸緩衝液400mlに加え45℃で攪拌しながら連続的に加水分解を開始した。20時間後毎に緩衝液の約3/4量を限外濾過して取り除き、同量の緩衝液、酵素400mgとコピー紙8.00gを追加した。連続120時間の加水分解で添加したコピー紙重量の67.5%に相当する還元糖を限外濾過液中に回収できた。還元糖の約70%がグルコースであった。
- 2) 連続的に加水分解した場合、添加したコピー紙重量の約16%強の未分解物が残渣となり、またほぼ同量の未回収物があつた。
- 3) 加水分解物またはグルコースを5g/ℓ添加した1ℓのPY培地に水素生成菌AM21B株を接種して、37℃に保温した。培養開始1～2時間後に水素ガスの発生が認められ、6～7時間後に1時間あたりの水素生成量は最大となり10時間程度で水素発酵はほぼ終息した。総量としてグルコースから2,719mlと加水分解物からは3,953mlの水素が発生した。

これらの結果から、裁断された使用済みコピー紙を加水分解して得た還元糖は、グルコースと同じように水素に変換できることが判明した。このモデル実験の結果は、弱酸性域で活性を示す安価なセルラーゼが入手できるようになると、コピー紙や新聞紙などの印刷物廃棄物は水素に変換できる可能性を示唆するものと考えられる。

謝辞：セルラーゼ標品（E-CEL）は、協和発酵工業(株)より分与された。また本研究の一部は、協和発酵工業(株)からの研究助成金によって行われた。

参考文献

- 1) 環境省平成12年版「環境白書」:総説 第3章わが国の環境の現状, <http://www.env.go.jp/policy/hakusyo/hakusyo.php3?kid=212>
- 2) 谷川昇, 堤紀子:資源環境対策, **32**, 1041-1048, (1996)
- 3) Taguchi F., Chang J. D., Mizukami N., Saito-Taki T. and Hasegawa K. Isolation of a hydrogen-producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B from termites. *Can. J. Microbiol.* **39**, 726-730 (1993)
- 4) Taguchi F., Chang J. D., Takiguchi S. and Morimoto M. Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 244-245 (1992)
- 5) Taguchi F., Mizukami N., Hasegawa K. and Saito-Taki T. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No.2. *Can. J. Microbiol.* **40**, 228-233 (1994)
- 6) Taguchi F., Hasegawa K., Saito-Taki T. and Hara K. Simultaneous production of xylanase and hydrogen using xylan in batch culture of *Clostridium* sp. Strain X53. *J. Ferm. Bioeng.* **81**, 178-180 (1996)
- 7) Taguchi F., Mizukami N., Hasegawa K., Saito-Taki T. and Morimoto M. Effect of amylase accumulation on hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* strain AM21B. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 565-567 (1994)
- 8) Taguchi F., Mizukami N., Saito-Taki T. and Hasegawa K. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No.2. *Can. J. Microbiol.* **41**, 536-540 (1995)
- 9) Taguchi F., Mizukami N., Yamada H., Hasegawa K. and Saito-Taki T. Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. Strain No.2. *Enzyme and Microbil Tech.* **17**, 147-150 (1995)
- 10) Taguchi F., Yamada H., Hasegawa K., Saito-Taki T. and Hara K. Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain No.2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *J. Ferm. Bioeng.* **82**, 80-83 (1996)
- 11) Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23 (1951)

Conversion of Shredded Plain Copy-Sheets to Hydrogen Using A Hydrogen-Producing Bacterial Strain

Fumiaki TAGUCHI, Toshiya MATSUSHITA, Masanobu NOUMI

ABSTRACT

We studied on the basic conditions for conversion of reducing sugars obtained by hydrolyzing of used-shredded plain copy sheets with industrial crude cellulase E-CEL to hydrogen using a hydrogen-producing bacterial strain *Clostridium beijerinckii* AM21B.

In this study, 39.6 g of used-shredded plain copy sheets were hydrolyzed at a temperature of 45 °C, in 400 ml of acetate buffer, pH 4.5, and 2,790 mg of cellulase continuously for 120 hours and yielded 26.72 g of reducing sugars which was equivalent to 67.5 % of the shredded plain copy sheets.

The hydrogen-producing bacterial strain AM21B was inoculated to one liter of PY medium containing 5 g of the reducing sugars, and incubated at 37 °C. Hydrogen was generated after 1 to 2 hr of culture, the amount of hydrogen produced per hr reaching its maximum after 6 to 7 hr of culture, so that a total amount of hydrogen produced was 2,719 ml from 5 g of glucose as a control and 3,953 ml from 5 g of the hydrolysate from shredded copy sheets.

These results showed that the used-shredded plain copy sheets should be possible to convert to hydrogen by hydrolyzing the copy sheets using hydrogen-producing bacteria without combustion, if an inexpensive, industrial grade crude cellulase(s) would be readily available.

Key Words : hydrogen-producing bacterial strain, shredded copy-sheets, crude cellulase, hydrolysate, hydrogen production