

学位論文題名

Biobleaching of *Acacia* kraft pulp by
extracellular enzymes secreted from white-rot fungi

(白色腐朽菌の菌体外酵素による
アカシアクラフトパルプのバイオブリーチング)

学位論文内容の要旨

Due to the environmental concern, bleaching sequences of kraft pulp should be shifting away from the use of conventional bleaching chemicals. The use of enzymes in pulp and paper industry is alternative techniques for an environmental safety. As white-rot fungi can selectively degrade lignin, white-rot fungi are expected to use in biobleaching process. The ability of white-rot fungi to degrade lignin is associated with their extracellular lignolytic enzymes, together with low-molecular weight cofactors. Here I study the ability of Indonesian white-rot fungi to degrade residual lignin in *Acacia* kraft pulp using extracellular enzymes from selected fungal strains.

It has been completed to screen on white-rot fungi from Indonesia for biobleaching of *Acacia* oxygen-delignified kraft pulp (A-OKP). Five novel fungal strains (KB-1.1, CF-11, CF-18, LP-7, and LP3-72) showed high biobleaching activity *in vivo* as compared with *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. Internal Transcribed spacer (ITS) sequences of the five fungal strains was compared with data in GenBank database at the DNA Data Bank of Japan (DDBJ), from which KB-1.1 showed 93% similarity with *Irpex lacteus*, CF-11 and CF-18 showed 94% similarity with *Trametes* sp. LP-7 showed 94% similarity with *Lentinus tigrinus*, and LP3-72 showed 95% similarity with *Phanerochaete sordida*.

The five selected strains showed good biobleaching ability *in vivo*. However, it took time to get biobleaching activity (at least 3 weeks). Then I study on using extracellular enzymes *in vitro*. In this study, I used the most potential strains *I. lacteus* KB-1.1 and *L. tigrinus* LP-7. They

were cultured in three types of economical media of agricultural and forestry wastes, then extracellular enzyme activities and stabilities were investigated. Biobleaching activities to A-OKP were estimated from kappa number reduction as an indicator of delignification. After 3 days of incubation, the extracellular enzymes, which were prepared from *I. lacteus* and *L. tigrinus* cultures in media of *Acacia mangium* wood powder supplemented with rice bran and additional 1% glucose (WRBG), resulted in significant decrease of 4.4% and 6.7%, respectively.

To reduce cost, I examined effect of palm sugar instead of glucose in culture medium on extracellular enzyme production. Both strains showed higher lignolytic activities on *A. mangium* wood powder supplemented with rice bran and additional 1% palm sugar (WRBP). Effect of the combined extracellular enzyme of *I. lacteus* and *L. tigrinus* was examined, which achieved higher kappa number reduction (7.4%) as compared with single extracellular enzyme. Effect of shaking was also examined and it was concluded that shaking reduced incubation time from 3 days to 1 day. Finally biobleaching procedure was established as; 1) pulp was treated with combined extracellular enzymes produced from *I. lacteus* and *L. tigrinus*, manganese peroxidase (MnP) activity ($74 \pm 7.5 \mu\text{mol/L/min}$), manganese-independent peroxidase (MIP) activity ($41 \pm 4.0 \mu\text{mol/L/min}$), laccase activity ($18 \pm 4.7 \mu\text{mol/L/min}$), and cellulase activity ($99 \pm 1.8 \mu\text{mol/L/min}$), and 2) reagent was added such as H_2O_2 , NaOH, MgSO_4 , and Na_2SiO_3 . As results, kraft paper decreased the kappa number by 25% and increased in physical properties of burst index (35%), tensile index (20%), and tear index (12%).

In conclusion, biobleaching method of A-OKP was established using two important breakthrough technologies; 1) to apply mixed extracellular enzyme secreted from *I. lacteus* and *L. tigrinus*, and 2) to apply cheap medium composed of WRBP. This new novel biobleaching technology contributes to reduce environmental pollution, because this technology replaces chemical process.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満
副 査 教 授 浦 木 康 光
副 査 准教授 玉 井 裕
副 査 助 教 渡 部 敏 裕

学 位 論 文 題 名

Biobleaching of *Acacia* kraft pulp by extracellular enzymes secreted from white-rot fungi

(白色腐朽菌の菌体外酵素による

アカシアクラフトパルプのバイオブリーチング)

本論文は英文 64 頁、図 12、表 5、6 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

環境問題に対する関心の高まりから、クラフトパルプの漂白過程は、これまで利用されてきた塩素系漂白剤からの転換を迫られている。紙パルプ工業における酵素の利用は環境に優しい代替手段である。白色腐朽菌はリグニンを選択的に分解できるため、バイオブリーチングにおける利用が期待される。白色腐朽菌のリグニン分解能力はその菌体外リグニン分解酵素と低分子の補因子が関与している。本研究では、選抜された白色腐朽菌株の産出する菌体外酵素によるアカシアクラフトパルプにおける残さリグニンの分解について検討した。

これまでに、酸素脱リグニンアカシアクラフトパルプ (*Acacia* oxygen-delignified kraft pulp : A-OKP) のバイオブリーチングに適した白色腐朽菌のスクリーニングが完了している。新規の五つの株 (KB-1.1、CF-11、CF-18、LP-7、LP3-72) の *in vivo* バイオブリーチング活性は、これまでに知られていた *Trametes versicolor* および *Phanerochaete chrysosporium* よりも高かった。ITS 領域の塩基配列解析について、塩基配列データベース (GenBank/DDBJ) で相同性検索を行ったところ、KB-1.1 は *Irpex lacteus* に対し 93% の、CF-11 と CF-18 は *Trametes* sp. に対し 94% の、LP-7 は *Lentinus tigrinus* に対し 94% の、LP3-72 は *Phanerochaete sordida* に対し 95% の相同性をそれぞれ示した。

この五つの株は *in vivo* での高いバイオブリーチング活性を示した。しかし、最低 3 週間の期間が漂白に必要であるという問題があった。そこで、菌体外酵素によ

る *in vitro* におけるバイオブリーチングを試みた。この実験では、最もバイオブリーチングに適すると考えられた二株、*I. lacteus* KB-1.1 および *L. tigrinus* LP-7 を供試した。農業あるいは林産業からの廃棄物を使った三種類の経済的な培地を用いてこれらの菌株を培養し、菌体外酵素の活性及び安定性を調査した。A-OKP のバイオブリーチング活性は脱リグニンの指標であるカップー価の減少率から求めた。*I. lacteus* KB-1.1 および *L. tigrinus* LP-7 から得た菌体外酵素を、*Acacia mangium* の木粉に米ぬかのみ、あるいは米ぬかと 1% のグルコースを加えた培地に添加し 3 日間培養し、回収した菌体外酵素を用いて A-OKP のバイオブリーチング活性を調べたところ、それぞれカップー価が 4.4%、6.7% 減少した。

菌体外酵素を用いたバイオブリーチングのコストを下げるため、酵素生産時に用いるグルコースの代わりにパームシュガーを用いる系を検討した。両菌株ともに、パームシュガーを用いた場合でも高いリグニン分解活性を示した。さらに、両菌株の産出する菌体外酵素を混合した場合の効果についても検討したところ、非混合の場合と比べて高い活性（7.4% のカップー価減少）が認められた。また、菌体外酵素産出のための培養を振とう培養にすることで、3 日かかった培養期間が 1 日に短縮できた。最終的に菌体外酵素による A-OKP のバイオブリーチングは以下のように要約される：1) *I. lacteus* と *L. tigrinus* の産出する菌体外酵素を混合し、パルプを処理し（このときの manganese peroxidase 活性： $74 \pm 7.5 \mu\text{mol/L/min}$ 、manganese-independent peroxidase 活性： $41 \pm 4.0 \mu\text{mol/L/min}$ 、laccase 活性： $18 \pm 4.7 \mu\text{mol/L/min}$ 、cellulase 活性： $99 \pm 1.8 \mu\text{mol/L/min}$ ）、2) H_2O_2 、 NaOH 、 MgSO_4 、 Na_2SiO_3 といった試薬を添加した。この処理により、kappa number は 25% 減少し、物理的性質として引張り強さは 20%、破裂強さは 35%、引裂き強さは 12% 向上した。

以上、本研究は A-OKP のバイオブリーチングにおける以下のような革新的手法を確立した：1) *I. lacteus* と *L. tigrinus* の産出する菌体外酵素を混合したものを用いる、2) 振とうにより培養時間を短縮できる、3) 無菌条件で行う必要はない、4) パルプ濃度は低い方がよい、5) 木粉、米ぬか、パームシュガーからなる安価な培地を用いることができる。これら新規のバイオブリーチング技術は環境汚染を抑制し、今日の技術の代替手法として実現可能なシステムである。

よって審査員一同は、アフリダが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。