

使用済み印刷製版フィルムからの銀とPETの回収  
—耐熱性アルカリプロテアーゼを用いたフィルムの  
ゼラチン層の酵素加水分解における  
反応動力学とメカニズム—

*Recovery of Silver and PET Film from Used Lith Film  
—Kinetics and Mechanisms of Enzymatic Hydrolysis of  
Gelatin Layers on Film Using Thermostable  
Alkaline Protease—*

増井 昭彦\* 藤原 信明\*  
Akihiko Masui Nobuaki Fujiwara  
安田 昌弘\*\* 石川 治男\*\*  
Masahiro Yasuda Haruo Ishikawa

(2004年7月2日 受理)

Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on lith film was investigated using the thermostabilized mutant enzyme of the alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. B21-2. Thereby, this study developed a new efficient and potential industrial enzymatic process for recovery of silver and polyethylene terephthalate (PET) from used lith film for printing which has not been recycled at all. The rate of gelatin hydrolysis of lith film in a stirred-tank reactor increased with temperature and enzyme concentration. The time required to complete gelatin hydrolysis on lith film was longer than that on X-ray film because of the tightly cross-linked structure of lith film gelatin layers. The time required to complete hydrolysis using the mutant enzyme was less than that using the wild-type enzyme. Gelatin hydrolysis of lith film was well explained by a model which incorporated a number of physical processes such as diffusion of the enzyme and hydrolyzed gelatin through the liquid film on the surface of the gelatin layer, in addition to the chemical process.

キーワード：印刷製版フィルム，アルカリプロテアーゼ，銀，PET，リサイクル，ゼラチン

## 1. はじめに

医療技術の進歩あるいは情報化社会の進展に伴い、医療用直接撮影X線フィルム（レントゲンフィルム）や印刷製版フィルムの使用量は増大している。印刷フィルムは、図1のように厚さ100 $\mu$ mのポリエチレン

テレフタレート（PET）ベースの上に非常に薄い下塗り層が塗付され、次いで感光材である銀を含む乳剤層、そして最上部に保護層が片面に塗布された構造を持つ。医療用直接撮影X線フィルムは、PETの厚さが175 $\mu$ mと厚く、かつ両面に塗付されている点が異なるだけで、基本的には印刷製版フィルムと同じ構造である。フィルムの乳剤層及び保護層の支持体は、いずれもゼラチンと呼ばれるタンパク質であり、感光材の銀は、この乳剤層中に医療用直接撮影X線フィルム

\* 化学環境部 環境・エネルギー・バイオ系

\*\* 大阪府立大学大学院 工学研究科

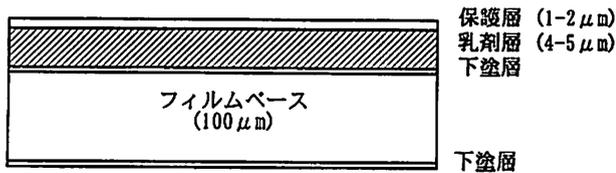


図1 印刷製版フィルムの構造(模式図)  
Structure of lith film

の場合約1.2~1.5%, 印刷製版フィルムの場合約1%含まれる。

写真フィルムのリサイクルは、医療用直接撮影X線フィルムからは、主に種々問題のある焼却法により銀が回収・再利用されているだけで、フィルムベースであるPETは、燃焼されるため再利用されていない。こうした背景から我々は、ゼラチン層を非常に早く分解できる好アルカリ性 *Bacillus* sp. B21-2由来の酵素(アルカリプロテアーゼ)を開発し、無公害技術である酵素を利用したバイオリクターにより、医療用直接撮影X線フィルムから銀とPETを連続的に分別回収するシステムを構築した<sup>1-4)</sup>。

一方、印刷製版フィルムの場合は、X線フィルムにくらべて銀含量が少ないため、回収・再利用されていない。しかしながら、資源リサイクルの観点から使用済み印刷製版フィルムについても、銀とPETを分別回収し、再利用することが望ましい。さらに、X線フィルムの基板のPETは青く着色しているのに対して、印刷製版フィルムの場合は無色透明であるため、再利用の点からは有利である。

これらの点を踏まえて、印刷製版フィルムについても、酵素を用いたシステムの利用が考えられる。しかしながら、印刷製版フィルムのゼラチン層は、X線フィルムの場合よりも強固な架橋構造をとっているため<sup>5)</sup>、X線フィルムに比べて、ゼラチン層の分解が困難で、時間を要すると考えられる。その問題の解決法として高温での反応が考えられる。高温では、酵素の反応速度が増大する(反応温度を10℃上昇させると、反応速度は約2倍になる)ので、処理時間を短くすることができる。したがって、ゼラチン層の分解時間も、反応温度が高くなるほど短くなるが、一般に酵素は熱に弱いため、実際は酵素の熱失活を考慮する必要がある。そこで、活性を低下させることなく、耐熱性に優れた酵素を用いることができれば、熱による失活も抑えられ、高温での繰り返し利用にも耐えられる。そのため、印刷製版フィルムのゼラチン層の分解にあたって、その有用性は更に増すと考えられる。

本研究では、印刷製版フィルムから銀とPETを分

別回収し、完全な再利用を可能にするシステムを開発するために、耐熱化したA187P酵素(好アルカリ性 *Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼの187番目のアミノ酸であるアラニン(Ala-187)をプロリン(Pro)に置換した酵素)<sup>6,7)</sup>を用いて、ゼラチン層の酵素加水分解実験を行った。さらにその結果を用いて、ゼラチン層の酵素加水分解の反応動力学の解明を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 使用フィルム

印刷製版フィルムはLU-100, X線フィルムはnew RX-type(共に富士写真フィルム社製)を用いた。フィルム中のゼラチン量は、それぞれ $7.56 \times 10^{-4} \text{g/cm}^2$ と $8.20 \times 10^{-4} \text{g/cm}^2$ であった。

### (2) 使用酵素

好アルカリ性 *Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼ(野生型酵素)と、その耐熱化酵素(A187P酵素)を用いた。いずれも粗酵素を用いて実験を行った。

### (3) 酵素活性の測定

酵素活性は、Horikoshiの方法に従って、pH11.5, 30℃で測定した<sup>8)</sup>。

### (4) タンパク量の定量

タンパク量は、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いて、Lowryの方法によって測定した<sup>9)</sup>。

### (5) 実験装置

本研究では、ゼラチン層の分解速度測定用小型実験装置として、図2のような内径100mmの回分式攪拌

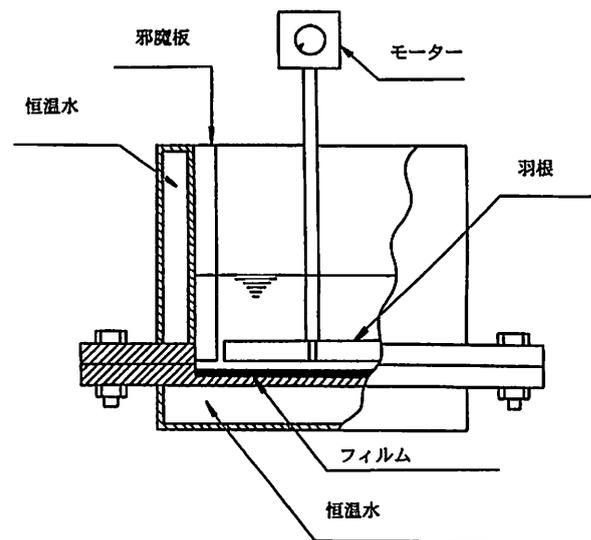


図2 ゼラチン層の加水分解速度測定用小型実験装置  
Stirred tank reactor

槽型反応器を用いた。反応器の内壁には、10mm幅の邪魔板が取り付けられている。さらに、一定温度条件下で反応速度を測定できるように、反応槽本体のまわりと底部にはジャケットを取り付け、恒温水を連続的に流せるようにした。フィルムは反応器の底部に固定し、その表面が酵素溶液に接触するようにした。フィルムの有効表面面積は、78.5cm<sup>2</sup>であった。攪拌機としては、攪拌回転数を調節可能なモーターの先に4枚パドル(攪拌翼径60mm, 高さ6mm)を、フィルム面から2mm上部の位置に取り付けたものを使用した。

(6) 実験方法

フィルムを回分式反応器に取り付け、余熱しておいた10mM ホウ酸緩衝液(pH10.5)を100ml入れ、15分間150rpmで攪拌することによりフィルムを膨潤させた。その後、酵素を加えて反応を開始し、酵素を加えた時間を0minとして、経時的に反応液をサンプリングし、各サンプル中のゼラチン分解物の濃度を測定した。フィルムの種類(印刷製版フィルム, X線フィルム), 酵素の種類(A187P酵素, 野生型酵素), 酵素濃度( $1.1 \times 10^{-7} \sim 5.6 \times 10^{-7} \text{g/ml}$ ), 反応温度(30~60℃)を変化させてその効果を調べた。

3. 結果と考察

(1) 酵素の失活速度の測定

図3は、酵素失活速度定数と温度の関係を示したものである。図からわかるように、両酵素共に温度が

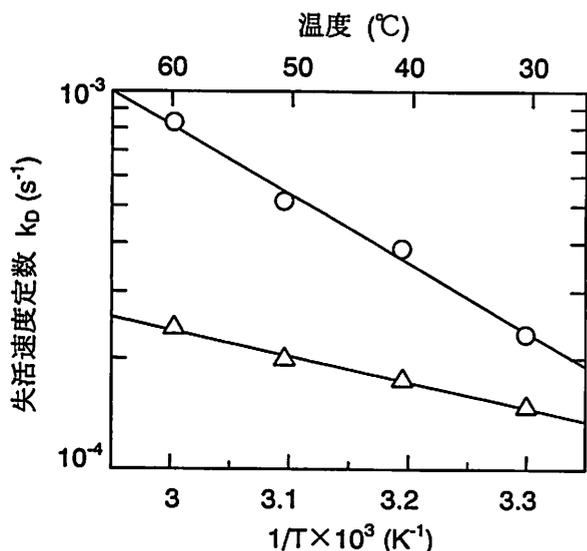


図3 酵素の失活速度に及ぼす温度の影響

○: 野生型酵素 △: A187P 酵素

Effects of temperature on the deactivation rate constants

高いほど失活速度定数は大きくなっている。また、A187P酵素の失活速度定数は、野生型酵素よりもより小さい値を示していた。

(2) フィルムのゼラチン層の酵素加水分解

石川らは、*Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼを用いたX線フィルムのゼラチン層の加水分解の場合、pH10.5の条件で、加水分解時間が最も短く、加水分解速度が最も大きいことを示した<sup>10)</sup>。また、A187P酵素も野生型酵素と同様の至適pHを示すことから<sup>6)</sup>、全ての実験はpH10.5, 150rpmの条件で行った。図4に野生型酵素による印刷製版フィルムのゼラチン層の酵素加水分解に及ぼす温度の影響を示す。いずれの温度においても、反応時間の初期すなわち酵素溶液を添加後しばらくは、加水分解物濃度はほとんど増加せず、誘導期間が存在していることがわかる。言いかえると、この期間ではゼラチン層の加水分解がほとんど進行していない。これは、反応溶液とゼラチン層の間の液境膜に物質移動抵抗が存在するた

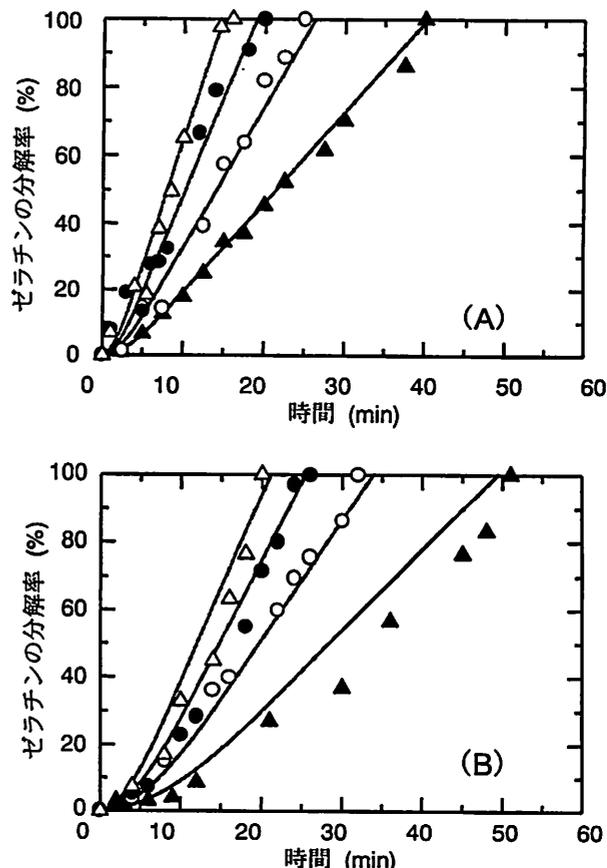


図4 野生型酵素による印刷製版フィルムのゼラチン層加水分解に及ぼす温度の影響

酵素濃度:  $5.6 \times 10^{-7} \text{g/cm}^3$  (A),  $2.2 \times 10^{-7} \text{g/cm}^3$  (B)  
温度: 30℃ (▲), 40℃ (○), 50℃ (●), 60℃ (△)

Effects of temperature on the time courses of the gelatin hydrolysis of the lith film by wild-type enzyme

めに、酵素溶液を添加してしばらくはゼラチン表面に到達している酵素量が少ないためである。しかし、時間が経過するにつれて、しだいに酵素が溶液中からゼラチン層へ移動していくので、ゼラチン表面に吸着した酵素量が増加し、加水分解が進行することになる。いずれの酵素濃度 ( $1.1 \times 10^{-7}$  及び  $5.6 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^3$ ) においても、温度が高いほど加水分解に必要な時間が短くなる。また、温度にかかわらず、酵素濃度が高いと、加水分解速度がより速く進行することがわかる。

野生型酵素による X 線フィルムを用いた同様の実験結果を図 5 に示す。図 4 と 5 の結果を比較すると、印刷製版フィルムのゼラチン層の加水分解に必要な時間は、X 線フィルムの場合よりもより長いことが明らかになった。これは、印刷製版フィルムのゼラチン層は、X 線フィルムの場合よりも強固な架橋構造をとっているためであると考えられる<sup>5)</sup>。

図 6 は、A187P 酵素による印刷製版フィルムのゼラチン層の酵素加水分解に及ぼす温度の影響を示す。

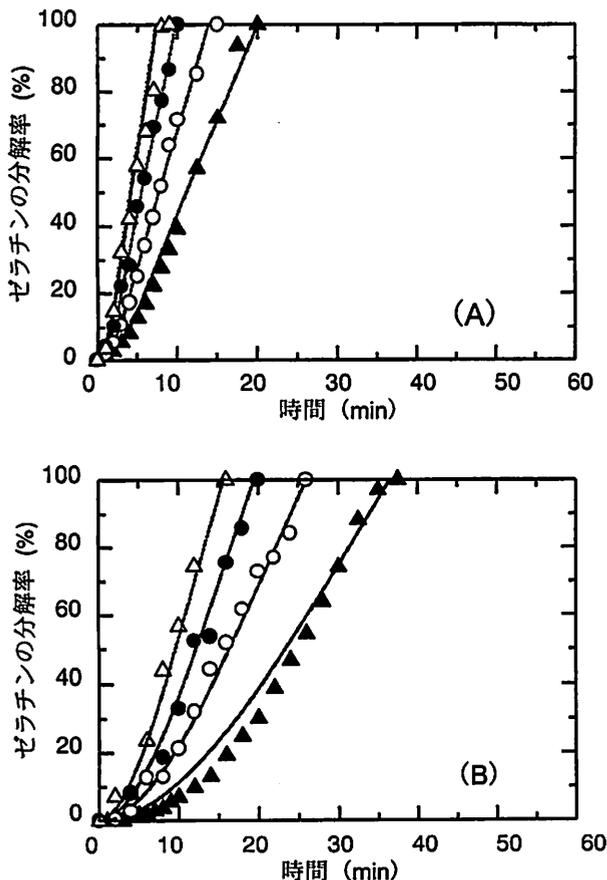


図 5 野生型酵素による X 線フィルムのゼラチン層加水分解に及ぼす温度の影響

酵素濃度： $5.6 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^3$  (A),  $1.1 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^3$  (B)  
温度： $30^\circ\text{C}$  (▲),  $40^\circ\text{C}$  (○),  $50^\circ\text{C}$  (●),  $60^\circ\text{C}$  (△)  
Effects of temperature on the time courses of the gelatin hydrolysis of X-ray film by wild-type enzyme

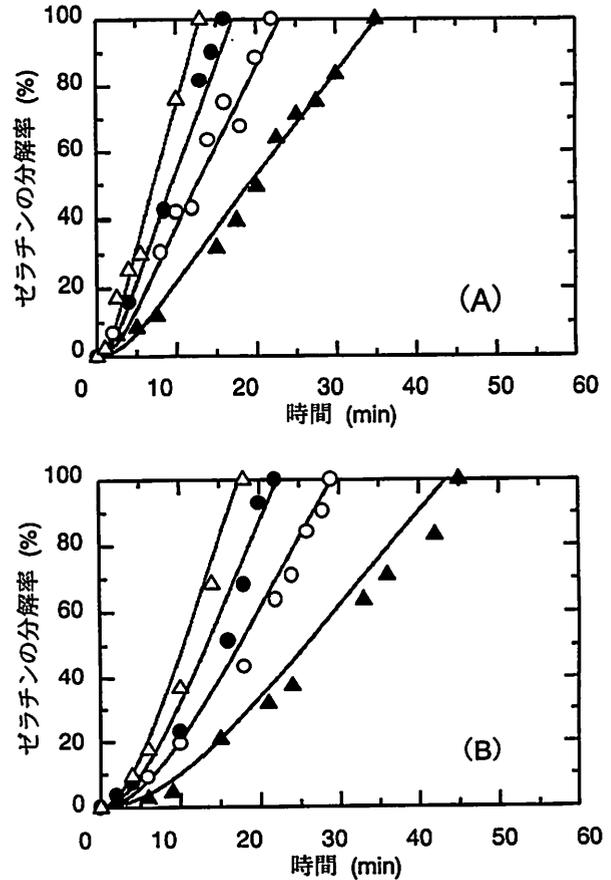


図 6 A187P 酵素による印刷製版フィルムのゼラチン層加水分解に及ぼす温度の影響  
酵素濃度： $5.6 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^3$  (A),  $2.2 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^3$  (B)  
温度： $30^\circ\text{C}$  (▲),  $40^\circ\text{C}$  (○),  $50^\circ\text{C}$  (●),  $60^\circ\text{C}$  (△)  
Effects of temperature on the time courses of the gelatin hydrolysis of lith film by A187P enzyme

野生型酵素の場合と同様に、加水分解時間は反応温度が高くなるに従って短くなっていった。しかし、A187P 酵素を用いると、 $30^\circ\text{C}$ ～ $60^\circ\text{C}$ のいずれの場合でも、野生型酵素の場合に比べてより短い時間で加水分解が完了することがわかった。

これらの結果は、印刷製版フィルムのゼラチン層の酵素加水分解は、X 線フィルムの場合と同様の条件<sup>4)</sup>で行うことは困難であること、及び A187P 酵素による印刷製版フィルムのゼラチン層の加水分解は、野生型酵素を用いた場合よりも加水分解速度が増大し、工業的に有利であることを示唆するものであった。そのため、印刷製版フィルムの酵素加水分解に A187P 酵素を利用すれば、野生型酵素に比べて加水分解時間の短縮が可能であり、それと同時に反応容器の小型化やフィルムの取扱量の増加が可能になると考えられる。

### (3) フィルムのゼラチン層の酵素加水分解モデル

印刷製版フィルムは、ベースフィルムの片側のみに

乳剤層と保護層がある点を除けば、X線フィルムと構造が同様であるので、我々が先に提案したX線フィルムのゼラチン層の加水分解反応の機構のモデル<sup>10)</sup>を基にして解析を行った。

石川らは、X線フィルムのゼラチン層の加水分解反応機構のモデル化にあたっては、酵素の液境膜内拡散、酵素のゼラチン膜表面への吸着、吸着酵素による加水分解反応、ゼラチン分解物の膜上からの脱着、ゼラチン分解物の液境膜内の拡散、ならびに酵素の失活を考慮した。これらの過程における、酵素濃度とゼラチン分解物の濃度変化の基礎式は以下ようになる。

使用記号

- A : X線フィルムと印刷製版フィルムの経時的なゼラチン量 (g)
- D : 拡散係数 (cm<sup>2</sup>・s<sup>-1</sup>)
- E : ゼラチン表面の酵素濃度 (g・cm<sup>-3</sup>)
- E<sub>b</sub> : 溶液中の酵素濃度 (g・cm<sup>-3</sup>)
- E<sub>s</sub> : ゼラチン膜表面に吸着した酵素濃度 (g・cm<sup>-2</sup>)
- E<sub>0</sub> : 酵素の初期濃度 (g・cm<sup>-3</sup>)
- K<sub>1</sub> : Langmuirの吸着平衡定数 (cm<sup>3</sup>・g<sup>-1</sup>)
- K<sub>2</sub> : 脱着平衡定数 (cm)
- k<sub>1</sub> : 反応速度定数 (s<sup>-1</sup>)
- k<sub>D</sub> : 失活速度定数 (s<sup>-1</sup>)
- k<sub>L</sub> : 物質移動係数 (cm・s<sup>-1</sup>)
- M : 分子量 (g・mol<sup>-1</sup>)
- P<sub>b</sub> : 溶液中のゼラチン分解物の濃度 (g・cm<sup>-3</sup>)
- P<sub>s</sub> : ゼラチン膜表面に吸着したゼラチン分解物の濃度 (g・cm<sup>-2</sup>)
- q<sub>m</sub> : 最大吸着量 (g・cm<sup>-2</sup>)
- Re : レーノルズ数 (-)
- S : フィルムの接触面積 (cm<sup>2</sup>)
- Sc : シュミット数 (-)
- Sh : シャーウッド数 (-)
- T : 温度 (K)
- t : 時間 (s)
- V : 溶液体積 (cm<sup>3</sup>)
- μ : 溶液の粘度 (g・cm<sup>-1</sup>・s<sup>-1</sup>)

添字

- b : 液本体中
- E : 酵素
- P : ゼラチン
- s : ゼラチン表面
- t : 時間 t=t
- 0 : 時間 t=0

$$dE_b/dt = -S/V \times k_{LE} (E_b - E) - k_D E_b \quad (1)$$

$$dE_s/dt = k_{LE} (E_b - E) \quad (2)$$

$$dP_s/dt = k_1 E_s - k_{LP} (P_s/K_2 - P_b) \quad (3)$$

$$dP_b/dt = S/V \times k_{LP} (P_s/K_2 - P_b) \quad (4)$$

また、酵素のゼラチン膜上への吸着はLangmuir型の吸着等温式に従うものとする、ゼラチン膜上に吸着した酵素の単位面積当たりの酵素量は、次式で与えられる。

$$E_s = q_m K_1 E / (1 + K_1 E) \quad (5)$$

ゼラチンの物質収支式は、次式で与えられる。

$$A_0 = A + S P_s + V P_b \quad (6)$$

式(1)~(6)は、Runge-Kutta-Gill法により式(7)で与えられる初期条件に従って解くことができる。

$$t=0; E=0, E_b=E_0, E_s=0, P_b=0, P_s=0 \quad (7)$$

酵素およびゼラチン分解物の物質移動係数(k<sub>LE</sub>およびk<sub>LP</sub>)は、次の実験式を利用して推算できる<sup>10)</sup>。

$$Sh = 0.319 Re^{0.756} Sc^{0.297} \quad (8)$$

ゼラチン分解物および酵素の拡散係数は、次のYoungらが提案した式を用いて推算できる<sup>11)</sup>。

$$D = 8.34 \times 10^{-8} (T/\mu M)^{1/3} \quad (9)$$

ゼラチン分解物の平均分子量(M)は、フィルムの種類に係わらず2,200Daで<sup>10)</sup>、野生型酵素とA187P酵素の分子量(M)は26,700Da<sup>6)</sup>を用いた。これらの式を用いて推算した拡散係数と物質移動係数を表1に示す。酵素の失活速度定数(k<sub>D</sub>)は、図3に示した値

表1 酵素及びゼラチンの拡散係数と物質移動係数  
Estimated diffusivities and mass transfer coefficients

温度 (°C)		拡散係数 D (cm <sup>2</sup> ・s <sup>-1</sup> )	物質移動係数 k <sub>L</sub> (cm・s <sup>-1</sup> )
30	酵素	1.05×10 <sup>-6</sup>	4.34×10 <sup>-4</sup>
	ゼラチン	2.42×10 <sup>-6</sup>	9.97×10 <sup>-4</sup>
40	酵素	1.34×10 <sup>-6</sup>	5.63×10 <sup>-4</sup>
	ゼラチン	3.07×10 <sup>-6</sup>	1.29×10 <sup>-3</sup>
50	酵素	1.64×10 <sup>-6</sup>	7.02×10 <sup>-4</sup>
	ゼラチン	3.77×10 <sup>-6</sup>	1.61×10 <sup>-3</sup>
60	酵素	1.98×10 <sup>-6</sup>	8.58×10 <sup>-4</sup>
	ゼラチン	4.54×10 <sup>-6</sup>	1.97×10 <sup>-3</sup>

を用いた。

図4~6の実線は、上で述べた方法により計算した理論線を示している。これらの図から明らかのように、実験の結果と計算結果はほぼ一致しているのがわかる。

図7は、加水分解速度定数k<sub>1</sub>に及ぼす温度の影響を示している。加水分解速度定数の対数と絶対温度の逆数の間には直線関係があり、温度の上昇につれて速

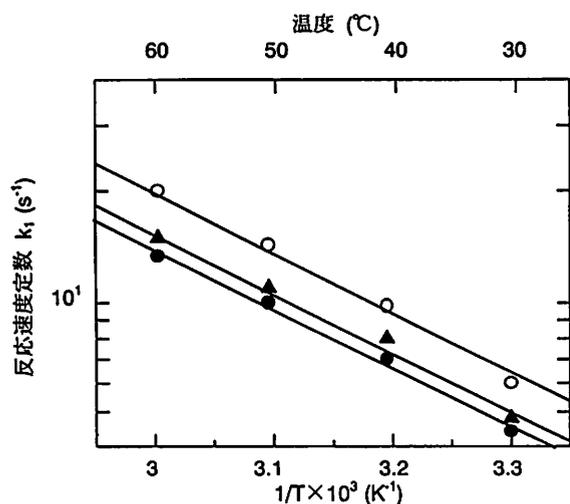


図7 反応速度定数に及ぼす温度の影響

○: X線フィルム, 野生型酵素  
●: 印刷製版フィルム, 野生型酵素  
▲: 印刷製版フィルム, A187P 酵素

Reaction rate constants

度定数が大きくなっている。すなわち、加水分解速度定数と温度の関係は、Arrheniusの式で表すことができる。印刷製版フィルムと野生型酵素、印刷製版フィルムとA187P酵素を用いて測定した反応速度定数は、印刷製版フィルムのゼラチン層の強固な架橋構造のため、X線フィルムと野生型酵素を用いた場合よりも小さな値を示していた。一方、反応の活性化エネルギーは、31.5kJ/molでフィルムや酵素の種類にかかわらず一定であった。

図8は、酵素のゼラチン膜表面への吸着関係を表す。Langmuirの吸着等温式の最大吸着量 $q_m$ と平衡定数 $K_1$ に及ぼす温度の影響を示している。ゼラチン

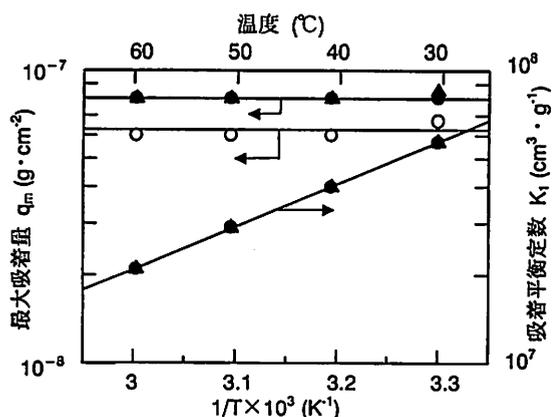


図8 Langmuirの吸着等温式の反応動力学定数

○: X線フィルム, 野生型酵素  
●: 印刷製版フィルム, 野生型酵素  
▲: 印刷製版フィルム, A187P 酵素

Kinetic constants of the Langmuir formula

膜表面上の吸着活性点の総数は、温度には無関係に一定、すなわち $q_m$ は一定と考えられる。図から明らかのように、実測の $q_m$ は一定値を示しており、推論と一致している。また、一般に吸着平衡定数は温度に対する減少関数である。これらの実験値は、Langmuirの吸着等温式を満足している。従って、実験結果のフィティングにより求めた動力学定数と平衡定数は、熱力学的に妥当であると言える。

以上の動力学定数と平衡定数の結果から考えると、先に提案したX線フィルムのゼラチン層の加水分解反応の機構のモデルは、印刷製版フィルムの場合にも適応できることが推察された。

#### 4. 結論

使用済み印刷製版フィルムから銀とPETを分別回収する有効な酵素プロセスを開発するため、*Bacillus* sp. B21-2由来のアルカリプロテアーゼを耐熱化したA187P酵素を用いて、フィルムのゼラチン層の酵素加水分解実験を行った。加水分解実験は、バッチ操作で回分式槽型反応器の底部にフィルムを固定して、ゼラチンの加水分解を経時的に測定した。その結果、フィルムのゼラチン層の酵素加水分解の速度は、温度と酵素濃度により増大することがわかった。また、印刷製版フィルムは、X線フィルムに比べてゼラチン層の強固な架橋構造のため、ゼラチン層の加水分解速度が小さくなることがわかった。さらに、A187P酵素を用いた場合、印刷製版フィルムのゼラチン層の酵素加水分解に要する時間は、野生型酵素の場合にくらべてどの温度でも短縮されることがわかった。すなわち、A187P酵素は、どの温度領域においても、野生型酵素よりも安定で活性を保持していると考えられる。従って、A187P酵素を用いた酵素プロセスは、高温領域に限らず、野生型酵素を用いた場合よりも工業的により有用であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) N. Fujiwara and K. Yamamoto: *J. Ferment. Technol.*, **65** (1987) p.345
- 2) 藤原信明, 山元和彦: *醗酵工学会誌*, **65** (1987) p.531
- 3) 藤原信明, 都宮孝彦: *BIO INDUSTRY*, **5** (1988) p.201
- 4) N. Fujiwara, T. Tsumiya, T. Katada, T. Hosobuchi and K. Yamamoto: *Process Biochem.*, **24** (1989) p.155
- 5) 小林恒典: *リスフィルムの知識*, 印刷学会出版部 (1988) p.45
- 6) A. Masui, N. Fujiwara, K. Yamamoto, M. Takagi and T. Imanaka: *J. Ferment. Bioeng.*, **85** (1998) p.30

- 7) A. Masui, N. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka:  
Biotechnol. Tech., 13 (1999) p.813
- 8) K. Horikoshi: Agric. Biol. Chem., 35 (1971) p.1407
- 9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J.  
Randall: J. Biol. Chem., 193 (1951) p.265
- 10) H. Ishikawa, K. Ishimi, M. Sugiura, A. Sowa and N.  
Fujiwara: J. Ferment. Bioeng., 76 (1993) p.300