

|      |  |
|------|--|
| 課 題  | <b>糖類を炭素源とした微生物によるバイオポリエステルの生合成</b>      |
| 研究組織 | 中沖 隆彦 (理工学部・教授) 研究代表者<br>石井 大輔 (理工学部・助教) |

## 1. 研究発表

- (1) Pacific Polymer Conference (オーストラリア, 2009年12月)  
Biosynthesis of the Poly (3-hydroxy butyrate) metabolized by Glucose enzymatically hydrolyzed from Disaccharide  
(Ryukoku Univ.) N. Takaoka, D. Ishii, T. Nakaoki
- (2) Pacific Polymer Conference (オーストラリア, 2009年12月)  
Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoate) Copolymer from odd numbered Fatty Acid by *W. eutropha*  
(Ryukoku Univ.) K. Tanigami, T. Nakaoki
- (3) 第1回バイオプラスチックシンポジウム(大阪, 2009年10月)  
微生物を用いたバイオポリエステルの生合成  
(龍谷大理工)中沖隆彦
- (4) 高分子討論会(熊本, 2009年9月)  
セロビオース及びマルトースの酵素加水分解糖を炭素源とした *W. eutropha* によるポリ(3-ヒドロキシブチレート)の生合成  
(龍谷大理工)○高岡奈奈美, 石井大輔, 中沖隆彦
- (5) 高分子討論会(熊本, 2009年9月)  
*W. eutropha* による奇数鎖脂肪酸からのポリヒドロキシアルカノエート共重合体の生合成メカニズム  
(龍谷大理工)○谷上耕一郎, 北村貞嗣, 石井大輔, 中沖隆彦
- (6) 高分子討論会(熊本, 2009年9月)  
*P. putida* でのグリセリンと脂肪酸を炭素源に用いたポリヒドロキシアルカノエートの生合成  
(龍谷大理工)○三浦孝博, 石井大輔, 中沖隆彦
- (7) 繊維学会(東京, 2009年6月)  
*W. eutropha* による脂肪酸からのポリヒドロキシアルカノエートの合成メカニズム  
(龍谷大・理工)○谷上耕一郎, 北村貞嗣, 石井大輔, 中沖隆彦
- (8) 繊維学会(東京, 2009年6月)  
グリセリンおよび脂肪酸を炭素源とした *P. putida* によるポリヒドロキシアルカノエートの生合成  
(龍谷大・理工)○三浦孝博, 石井大輔, 中沖隆彦
- (9) 第45回固体NMR・材料フォーラム(大津, 2009年5月)  
セルロース固体の分子運動性と塩化リチウム・アミド溶媒への溶解性  
○石井大輔, 中沖隆彦, 巽大輔, 松本孝芳
- (10) 第135回ポバール会(京都, 2009年12月)  
生分解性ポリエステルナノファイバーの調製と生体適合性  
○石井大輔, タンファイイン, 馬原淳, 山岡哲二, 岩田忠久
- (11) Materials 2009, 2(4), 1520-1546.  
(Accepted: 21 September 2009 / Published: 9 October 2009)  
"Characterization and Biocompatibility of Biopolyester Nanofibers",  
*Daisuke Ishii, Tang H. Ying, Tetsuji Yamaoka and Tadahisa Iwata*

## 2. 2009年度の研究計画

本プロジェクトではセルロースのグルコースへの酵素加水分解速度を制御しながら、微生物によるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)の生合成を行う。この研究を遂行するにあたり、次の2つのプロセスがある。

第1は、セルロースの糖化によるグルコースの生成である。セルロースは結晶化度が高く、前処理により結晶化度を下げた方が効率よく酵素加水分解が行える。本研究ではセルロースに対して数少ない良溶媒の1つであるアセトアミドを用いて溶解した後、貧溶媒でフィブリルに戻すという新しい試みを行う予定である。その後、酵素セルラーゼによるエンド型加水分解(セルロースの分子鎖の中間のグリコシド結合の加水分解)とそれに続く酵素グルコシダーゼによるエキソ型加水分解(セルロースの分子鎖の末端からグリコシド結合の加水分解)を行ってグルコースを得る。この時の酵素の量と加水分解時間の基礎データを収集する。ここでグルコース生成速度は、微生物を併用したPHAの代謝速度と密接に関係するため、高収率を得るための重要な因子となる。

第2は、このグルコースを利用した微生物によるPHAの生合成プロセスの検討である。グルコースの供給速度はPHAの蓄積量に対して重要な因子で、少量のグルコースを逐次添加する方法がとられることが多いが、セルロースの加水分解によるグルコースの供給速度を調整することで、逐次添加法と同じ効果が得られる。したがってグルコースの生成と培養時間を調整することにより、高収率でPHAが得られることが期待される。

### 3. 研究実績の概要(研究経過と成果)

#### はじめに

近年、環境意識の高まりから高分子材料で、“循環型高分子材料”が注目されている。20世紀は石油をもとにした化学工業が大発展して、石油をベースとしたポリオレフィンなどの安価で高機能な高分子材料が大量に生産されるようになった。しかし石油をベースとした高分子材料は、一部はリサイクルされているが、基本的には使用後廃棄されるだけで再生されず循環サイクルには回らない。そこで注目されてきたのが、植物などでんぷん、セルロース、油脂などの再生可能な資源を利用して、高分子材料をつくるということである。その中で、ポリ乳酸は現在最も研究が進んでおり、トウモロコシからできるプラスチックとして知られている。しかしポリ乳酸の軟化温度は低く、耐熱性の問題に加えてコストの問題により、あまり普及していないのが現状である。また原料としてトウモロコシなどの食用植物を用いると、バイオエタノールで問題になった食品高騰と同じ問題を引き起こす。したがって食料問題が解決していない現状で食用植物をもとにしたでんぷんを産業用に転用するには時季尚早といえよう。そこで現在最も有力視される再生可能な循環型炭素源としては植物繊維などを構成するセルロースがある。セルロースは地球上の有機物の中でもっとも多く存在し、トウモロコシなど農作物に加えて、木材などからも大量に廃チップなどが生じる。セルロースの有効利用は循環型材料の原料としては最適であると考えられるが、セルロースは結晶化度が高く、適当な良溶媒を持たないことから加工が困難であり活用されて来なかった。そこで本プロジェクトでは、セルロースの有効活用を目指して、プラスチックの炭素源としての利用を検討することが目的である。

#### 実 験

微生物はテクノスルガから提供された *Wautersia eutropha* (NCIMB 11599)を用いた。酵素セルラーゼは和光純薬から購入した。セルロースの低結晶化は次のようにして行った。8mass%塩化リチウムを溶かしたN,Nジメチルアセトアミド溶液(LiCl/DMA)に乾燥させたセルロースを溶かし、500mlの純粋で再沈させた後、吸引ろ過を経て低結晶化を行った。ナスフラスコにイオン液体である1-ブチル-3-メチル-イミダゾリウムクロライド20gと乾燥させたセルロース1g~2.4gを加え、真空下100℃で12時間攪拌(酸化防止のため)。その後、窒素で常圧まで戻し、水を滴下して再沈、遠心分離と吸引ろ過を繰り返し、セルロースを得た。洗液をアセトン100mlで分液処理。これを2回行う。その後、酢酸エチル100mlで分液処理を2回。エバポレーターで酢酸エチルを除去し、100℃で1日真空乾燥をおこなった。

#### 結果と考察

まず、イオン液体で処理したセルロースの結晶化度を確かめるためにX線回折測定を行った。Fig.1にオリジナルのセルロースとイオン液体で処理した後のX線回折パターンを示した。オリジナルのセルロースは結晶に基づくシャープな回折ピークが観測されたが、イオン液体で処理したセルロースでは $2\theta = 21^\circ$ 付近にブロードなピークがあるだけである。このことはイオン液体で処理して結晶を溶解させて再沈殿させることにより、非晶性となったことを示している。

次にイオン液体で処理したセルロースを酵素セルラーゼによって加水分解を行ない、生成するグルコースの量について検討した。再沈した時に、セルロースが大きな塊となったことで、酵素が接近するための表面積が小さくなったと考えられるため、この解決法として再沈後の塊をミキサーで粉碎した。pH7でセルラーゼ(エンド型およびエキソ型を含む)を50mgと100mg用いて、グルコースの生成量を確認した。得られたグルコースの量を時間に対してプロットしたのがFig.2である。酵素100mgを用いた時、時間に比例してグルコースの生成量も増加した。24時間加

水分解した後は約 300mg のグルコースが得られた。オリジナルのセルロースでは結晶化度が高いため酵素があまり効かず、加水分解は十分ではなかったが、イオン液体で結晶化度を下げることにより、加水分解を促進することができたと考えられる。

### ポリエステル生合成

我々はこれまで二糖類と酵素の組み合わせにより、単糖の供給速度を制御することにより、PHA の蓄積を行ってきた<sup>1)</sup>。本プロジェクトでは結晶化度を下げたセルロースを用いて、加えるセルラーゼの量を変えてグルコース供給速度を制御してPHA の蓄積を行った。Fig.3 は pH7 でセルロースを加水分解すると同時にPHA の蓄積を行った結果である。PHA 収率は培養時間とともに増加し72時間では 30% に達した。オリジナルのセルロースではグルコースに分解する速度が遅いため 8.3% の収率であったが、今回は非常に高い収率でPHA を得ることができた。

以上のことから、酵素を利用してセルロースからグルコース生成速度を制御して、*W.eutropha* によるバイオポリエステルであるPHA を収率 30% で得ることができた。しかし収率はまだ十分高いものではなく、今後は50%以上の収率でPHA を得る必要がある。

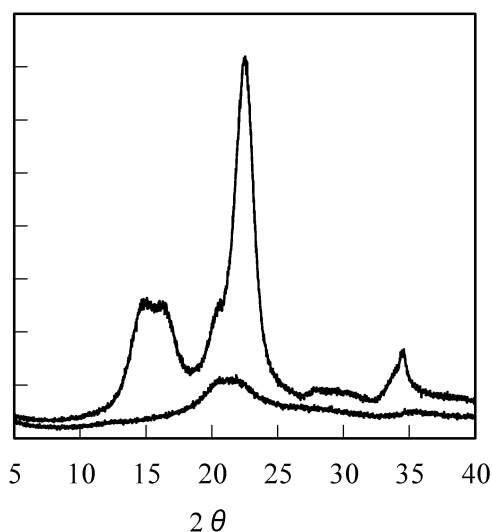


Fig.1 X-ray diffraction of original cellulose and cellulose after treated.

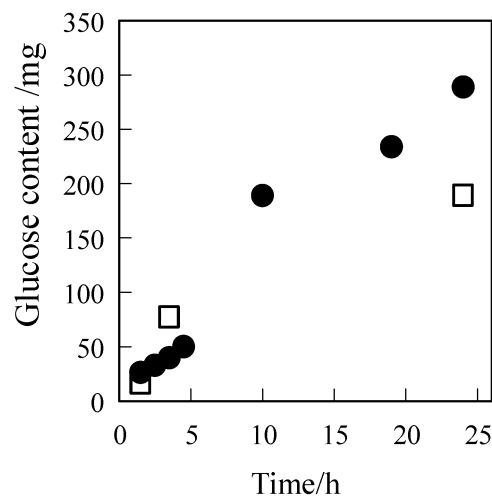


Fig.2 Time dependence of glucose concentration produced by hydrolysis of mixer pulverization cellulose (2g) in the nitrogen-free mineral medium containing cellulase at pH7 (●; 100mg, □; 50mg).

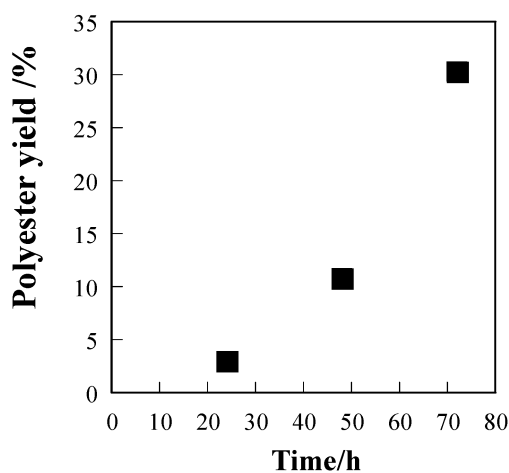


Fig.3 Time dependence of polyester yield by *W. eutropha* as carbon source cellulose (2g) in the medium at pH7.

### 参考文献

- 1) T. Nakaoki, Y. Kinose, M. Kuriyama, *Research Trends in Polymer Science*, 7, 109-114 (2008).