

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|--|
| 題目(和文) | 化学合成ポリエステルが生分解メカニズムに関する研究 |
| Title(English) | |
| 著者(和文) | 石井成明 |
| Author(English) | Nariaki Ishii |
| 出典(和文) | 学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7242号, 授与年月日:2008年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:井上 義夫 |
| Citation(English) | Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7242号, Conferred date:2008/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner: |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Type(English) | Doctoral Thesis |

化学合成ポリエステルが生分解
メカニズムに関する研究

石井 成明

東京工業大学大学院

生命理工学研究科生体分子機能工学専攻

井上研究室

2008

目次

| | |
|---|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1. 生分解性プラスチック | 2 |
| 1.1.1. はじめに | 2 |
| 1.1.2. 定義 | 2 |
| 1.1.3. 分類 | 4 |
| 1.1.4. 応用 | 4 |
| 1.2. 生分解性プラスチックの構造および物性 | 6 |
| 1.3. 生分解性プラスチックの生分解 | 8 |
| 1.4. アイオノマー | 11 |
| 1.4.1. 物理架橋 | 11 |
| 1.4.2. アイオノマーの定義 | 12 |
| 1.4.3. アイオノマーの歴史的背景および応用 | 12 |
| 1.4.4. マルチプレットクラスターモデル | 13 |
| 1.4.5. 対イオン | 15 |
| 1.4.6. ポリエステルベースアイオノマー | 15 |
| 1.4. 博士論文の狙い | 17 |
| 参考文献 | 19 |
| | |
| 第2章 真菌によるポリエチレンサクシネート (PESu) の分解 | 25 |
| 2.1. 緒言 | 26 |
| 2.2. PESu 分解真菌の探索とその性質 | 27 |
| 2.2.1. 実験方法 | 27 |
| 2.2.1.1. 試薬 | 27 |
| 2.2.1.2. 酵素活性測定 | 28 |
| 2.2.1.3. PESu 分解真菌の単離 | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1.4. 脂肪および各種ポリエステル分解能 | 30 |
| 2.2.1.5. 形態観察 | 30 |
| 2.2.1.6. 培養温度の影響 | 30 |
| 2.2.1.7. 遺伝系統学的解析 | 30 |
| 2.2.1.8. ポリエステルフィルム分解 | 32 |
| 2.2.1.9. ザイモグラム | 33 |
| 2.2.1.10. 分析方法 | 33 |
| 2.2.2. 結果と考察 | 35 |
| 2.2.2.1. PESu 分解真菌の単離 | 35 |
| 2.2.2.2. NKCM1003 株の特徴付け | 37 |
| 2.2.2.3. NKCM1003 および標準株の基質特異性およびポリ エステル分解活性誘導 | 40 |
| 2.2.2.4. 単離株によるポリエステルフィルム分解 | 41 |
| 2.2.2.5. 炭素源の菌体増殖およびポリエステル分解活性発現 への影響 | 44 |
| 2.3. PESu 分解酵素の精製および特徴付け | 47 |
| 2.3.1. 実験 | 47 |
| 2.3.1.1. 試薬 | 47 |
| 2.3.1.2. 活性測定 | 47 |
| 2.3.1.3. PESu 分解酵素の精製 | 47 |
| 2.3.1.4. 精製酵素の性質 | 48 |
| 2.3.1.5. 分析方法 | 50 |
| 2.3.2. 結果と考察 | 51 |
| 2.3.2.1. PESu 分解酵素の精製 | 51 |
| 2.3.2.2. PESu 分解酵素の性質 | 53 |
| 2.4. 結論 | 59 |
| 参考文献 | 60 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------|----|
| 第3章 | ポリブチレンサクシネート (PBSu) 分解微生物の探索とその性質 | 62 |
| 3.1. | 緒言 | 63 |
| 3.2. | PBSu 分解バクテリアの探索とその性質 | 64 |
| 3.2.1. | 実験 | 64 |
| 3.2.1.1. | 試薬 | 64 |
| 3.2.1.2. | PBSu 分解バクテリアの単離 | 65 |
| 3.2.1.3. | 単離株の脂肪および他のポリエステル分解能 | 65 |
| 3.2.1.4. | 形態観察 | 65 |
| 3.2.1.5. | 生理学・生化学的性質の決定 | 65 |
| 3.2.1.6. | 酵素プロファイル | 66 |
| 3.2.1.7. | ゲノム DNA (gDNA) 抽出 | 67 |
| 3.2.1.8. | グアニン+シトシン含率解析 | 67 |
| 3.2.1.9. | イソプレノイドキノン解析 | 67 |
| 3.2.1.10. | 脂肪酸解析 | 68 |
| 3.2.1.11. | 遺伝系統学的解析 | 69 |
| 3.2.1.11. | 温度の影響 | 70 |
| 3.2.1.12. | ポリエステルフィルム分解能 | 70 |
| 3.2.1.13. | 分析方法 | 70 |
| 3.2.2. | 結果と考察 | 70 |
| 3.2.2.1. | PBSu 分解バクテリアの単離 | 70 |
| 3.2.2.2. | PBSu 分解バクテリアの特徴付け | 73 |
| 3.2.2.3. | 単離株によるポリエステルフィルムの分解 | 78 |
| 3.3. | PBSu 分解真菌の探索とその性質 | 83 |
| 3.3.1. | 実験方法 | 83 |
| 3.3.1.1. | 試薬 | 83 |
| 3.3.1.2. | PBSu 分解真菌の単離 | 83 |
| 3.3.1.3. | 脂肪および各種ポリエステル分解能 | 83 |
| 3.3.1.4. | 形態観察 | 83 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.1.5. ゲノム DNA 抽出 | 84 |
| 3.3.1.6. 遺伝系統学解析 | 84 |
| 3.3.1.7. 培養温度の影響 | 84 |
| 3.3.1.8. ポリエステルフィルム分解 | 84 |
| 3.3.2. 結果と考察 | 85 |
| 3.3.2.1. PBSu 分解真菌の単離 | 85 |
| 3.3.2.2. PBSu 分解真菌の特徴付け | 86 |
| 3.2.2.3. 単離株によるポリエステルフィルムの分解 | 89 |
| 3.2.3. 結論 | 95 |
| 参考文献 | 96 |
| | |
| 第 4 章 ポリブチレンサクシネート-co-ブチレンアジペート (PBAT) 分解 | 98 |
| 微生物の探索とその性質 | |
| 4.1. 緒言 | 99 |
| 4.2. 実験 | 100 |
| 4.2.1. 試薬 | 100 |
| 4.2.2. PBAT 分解微生物の単離 | 100 |
| 4.2.3. PBAT 分解菌の特徴付け | 100 |
| 4.2.4. ポリエステルフィルム分解 | 101 |
| 4.3. 結果と考察 | 103 |
| 4.3.1. PBAT 分解微生物の単離 | 103 |
| 4.3.2. 単離株の特徴付け | 104 |
| 4.3.3. ポリエステルフィルム分解 | 108 |
| 4.4. 結論 | 112 |
| 参考文献 | 113 |
| | |
| 第 5 章 脂肪族ポリエステルベースアイオノマーの合成および特徴付け | 115 |
| 5.1. 緒言 | 116 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 5.2. PESu アイオノマーの合成と特徴付け | 117 |
| 5.2.1. 実験 | 117 |
| 5.2.1.1. 試薬 | 117 |
| 5.2.1.2. ポリマー合成 | 117 |
| 5.2.1.3. フィルム作成 | 117 |
| 5.2.1.4. ^1H NMR | 117 |
| 5.2.1.5. 分子量測定 | 118 |
| 5.2.1.6. 広角 X 線解析 | 118 |
| 5.2.1.7. 溶融レオロジー解析 | 118 |
| 5.2.1.8. 偏光光学顕微鏡観察 | 118 |
| 5.2.1.9. 示唆走査熱量測定 | 118 |
| 5.2.1.10. 動的粘弾性解析 | 119 |
| 5.2.1.11. 引っ張り試験 | 119 |
| 5.2.1.12. 生分解性テスト | 119 |
| 5.2.2. 結果と考察 | 121 |
| 5.2.2.1. アイオノマー合成 | 121 |
| 5.2.2.2. 溶融レオロジー | 122 |
| 5.2.2.3. 熱的および動的粘弾性解析 | 123 |
| 5.2.2.4. 球晶形態観察 | 125 |
| 5.2.2.5. 機械特性 | 127 |
| 5.2.2.6. 生分解性 | 129 |
| 5.3. PBSu ベースアイオノマーの合成と特徴付け | 131 |
| 5.3.1. 実験 | 131 |
| 5.3.1.1. 試薬 | 131 |
| 5.3.1.2. ポリマー合成 | 131 |
| 5.3.1.3. フィルム作成 | 131 |
| 5.3.1.4. ^1H NMR | 131 |
| 5.3.1.5. 分子量測定 | 131 |

| | |
|-----------------------|------------|
| 5.3.1.6. 広角 X 線解析 | 131 |
| 5.3.1.7. 溶融レオロジー解析 | 131 |
| 5.3.1.8. 偏光光学顕微鏡観察 | 131 |
| 5.3.1.9. 示唆走査熱量測定 | 132 |
| 5.3.1.10. 動的粘弾性解析 | 132 |
| 5.3.1.11. 引っ張り試験 | 132 |
| 5.3.1.12. 生分解性テスト | 132 |
| 5.3.2. 結果と考察 | 132 |
| 5.3.2.1. アイオノマー合成 | 132 |
| 5.3.2.2. 溶融レオロジー | 134 |
| 5.3.2.3. 熱的および動的粘弾性解析 | 134 |
| 5.3.2.4. 球晶形態観察 | 136 |
| 5.3.2.5. 機械特性 | 138 |
| 5.3.2.6. 生分解性 | 138 |
| 5.4. 結論 | 140 |
| 参考文献 | 141 |
| 第 6 章 結論 | 143 |
| 6.1. 本研究のまとめ | 144 |
| 6.2. 結論 | 146 |
| 6.3. 今後の展望 | 147 |
| 発表論文 | 148 |

第一章

序論

1.1. 生分解性ポリマー

1.1.1. はじめに

最初の人工プラスチック樹脂であるBakeliteは、1909年にL. Baekelandによって考案された¹⁾。さらに、W. H. Carothersのポリアミド（ナイロン）合成の成功が²⁾、化石燃料を用いたポリマー素材の化学合成技術を発達させてきた。特に、1950年代に開発された、Ziegler-Natta触媒は、素材科学に大きなインパクトを与え、ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィンの工業生産を加速させた。今日、われわれの周りには、大量かつさまざまな種類の石油由来合成ポリマーがあふれている。実際、合成ポリマーは、軽量であり、再現性がある優れた加工性を有している。さらに、物理劣化や微生物の攻撃に対する耐性があるなどの優れた物性だけではなく、優れたエネルギー効率およびコストパフォーマンスも併せ持っている。合成ポリマーは、我々の生活に必須なものであり、石油などの化石資源の量は限られているにもかかわらず、世界におけるプラスチックの生産量は年々増加している。一方、この数十年で、石油由来非分解性ポリマーの大量生産、大量消費、そして大量廃棄によって、深刻な地球環境問題が、世界中で引き起こされている。合成ポリマーは、その耐久性のため、廃棄後も環境中に残り、海や土壌汚染を引き起こす^{3,4)}。

生分解性プラスチックは、①使用中は安定で、使用後は生分解されること、②ポリマーだけでなく、モノマーやオリゴマーなどの分解産物も環境に対して無毒であることが必須である⁵⁾。一方、再生可能資源由来のバイオベースポリマーは、持続可能な高分子材料として注目されるようになってきている。

1.1.2. 定義

Table1-1に、さまざまな基準機関が作成した生分解性プラスチックの定義を示す。Chandraらが提案した生分解の一般的な定義は、バクテリア、カビ、酵母およびそれらの酵素が食糧源として消費する物質を分解し、これにより物質の原型が消滅する過程を言う⁶⁾。一方、AlbertssonおよびKarlsson⁷⁾らは、生物（バクテリアやカビなど）やそれらが分泌する産物と関連した酵素あるいは化学分解過程のことを生分解と定義した。

Table 1-1. General Definitions of Biodegradable Polymers by Standard Authorities^{5,8-10)}

| Standard Authorities | Biodegradable plastics |
|--|---|
| ISO 472-1988 | <p>A plastic designed to undergo a significant change in its chemical structure under specific environmental conditions resulting in a loss of some properties that may vary as measured by standard test methods appropriate to the plastic and the application in a period of time that determines its classification. The change in the chemical structure results from the action of naturally occurring microorganisms.</p> |
| ASTM sub-committee D20-96 | <p>A degradable plastic in which the degradation results from the action of naturally occurring microorganisms such as bacteria and fungi.</p> |
| DIN (DIN V49000) German Institute for Standardization | <p>A plastic material is called biodegradable if all its organic compounds undergo a complete biodegradation process. Environmental conditions and the rates of biodegradation are to be determined by standardized methods.</p> |
| CEN (EN13432) | <p>Biodegradable materials break down naturally into carbon dioxide, water and organic matter as a result of exposure to micro-organisms. The EN13432 standard is much stricter, requiring 90% biodegradation within 90 days.</p> |
| Japan BioPlastic Association (JBPA) | <ul style="list-style-type: none"> • Biodegradable plastic + Natural organic material $\geq 50\text{wt}\%$ or $50\text{ vol}\%$. • All components are not I, and II, class specified chemical substances. • Biodegradable materials correspond to any of the following methods. <p>These materials are required 60% biodegradation.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Degradation at aerobic water system (JIS K 6950) 2. Ultimate degradation at aerobic water system (JIS K 6951) 3. Ultimate degradation at aerobic compost system (JIS K 6953) 4. Chemical substances control law biodegradation method (MITI-method) <ul style="list-style-type: none"> • Meet the following requirements <p>The organic materials are accepted as food additive. The organic materials are $\text{LD50 (oral)} > 2000\text{mg/kg}$ The organic materials are $\text{LC50} > 100\text{mg/L}$</p> |

1.1.3. 分類

現在、生分解性高分子材料として研究が進められているものには、大きく分けて、化学合成によるものと、生物由来のものに分けられる (Table1-2)。

これらの生分解性高分子材料は、機能や物性の向上、低コスト化などを目標として、研究、開発が進められている。また、材料寿命を制御するために、生分解性高分子材料の分解についても研究が進められており、酵素分解や微生物による分解、またその微生物が分泌する酵素と分解メカニズムなどについて調べられている。

Table 1-2. Typical biodegradable polymers^{11,12)}

| | |
|----------------------------------|--|
| Chemosynthetic polymers | Poly(2-hydroxypropionate) |
| | Poly(ethylene adipate) |
| | Poly(ethylene succinate) |
| | Poly(butylene succinate) |
| | Poly(butylene succinate- <i>co</i> -adipate) |
| | Poly(ϵ -caprolactone) |
| | Poly(ester-urethane) |
| | Poly(ether-urethane) |
| | Poly(ester-amide)s |
| | Aliphatic-aromatic copolyesters |
| | Aliphatic-polycarbonates |
| Biopolymers | |
| Microbial polymers | Poly(3-hydroxyalkanoate)s |
| | Proteins |
| | Poly(amino acid)s |
| Animal and plant origin polymers | Cellulose |
| | Starch |
| | Chitosan |

1.1.4. 応用

生分解性プラスチックは、さまざまな用途で利用されている (Table1-3)。

Table 1-3. Applications of biodegradable polymers^{5,11-13)}

| Application | Polymers |
|--|----------------------------------|
| Bag | |
| Garbage bag, Compost bag | PBSu, PBSA, PCL, PBAT |
| Draining bag | PBSu, PLA |
| Shopping bag | PBSu, PLA, PCL, PBAT |
| Packaging film, sheet | PBSu, PBSA, PLA, PBAT |
| Bottle, Container. | PBSu, PLA, PCL, PET copolymer |
| Buffer material | PBSu, PLA, starch, PVA |
| Mulch film | PBSu, PBSA, PLA, PCL, PBAT |
| Agricultural film (insect proof sheet) | PBA, PBSu, PBSA, PLA |
| Agriculture, Forestry and Fisheries material (nursery cabinet, artificial algae, net) | PBSu, PBSA, PLA, PBAT |
| Civil engineering and construction material (pile sheet) | PBSu, PLA, PBAT |
| Writing material (clear file, binder, ruler) | PBSu, PLA, PBAT, BS-LA copolymer |
| Play equipment (golf tee) | PBSu, PLA, BS-LA copolymer |
| Convenience goods (card, holder CD) | PBSu, PLA, PVA, PBAT |
| Food utensils (knife, folk, cup, dish) | PBSu, PLA, PET copolymer |
| Fiber product (jumper, towel) | PBSu, PLA, PBSA |
| Rope, tape, band (banding band) | PBSu, PBSA, PLA, PBAT |
| Electrical and electronics device, Car parts | PLA |
| Another items (emulsion, multipurpose film) | PBSu, PLA, PCL, PBAT, starch |

1.2. 生分解性ポリエステル構造および物性

微生物が生産する生分解性ポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシアルカン酸) (P(3HA)) は、1926年にパスツール研究所のLemoigneにより発見された¹⁴⁾。それ以降、多くの微生物がP(3HA)を菌体内に蓄積することが明らかとなり、現在ではさまざまなヒドロキシアルカン酸をモノマー単位とするP(3HA)が知られている¹⁵⁾。P(3HA)の中で、側鎖にメチル基を有するP(3HB)は、最も代表的なP(3HA)の一種である (Figure 1-1 (A))。P(3HB)は、密度1.25 g/cm³、ガラス転移温度4°C、融点180°C、引っ張り強さ40 MPaと、ポリプロピレンと同様な性質を示す一方、破壊伸びが5%と小さく、堅くて脆い性質を持つ^{16,17)}。そのため、P(3HB)の物性を改善する目的で、新しい共重合ポリエステルの発酵合成が検討されている¹⁵⁾。これらのバイオポリエステルは、丈夫な高分子材料として、さまざまな分野での利用が期待されている^{15,18)}。また、P(3HB)は、生分解性だけでなく、生体適合性、光学活性、圧電性などの特性を持つために、生分解性の構造材料として利用されるとともに、医療材料¹⁹⁾、電子材料²⁰⁾などの新しいタイプの機能性材料としての利用が検討されている。

化学合成脂肪族ポリエステルが生分解性を有することは、早くから知られていた²¹⁻²⁵⁾。しかしながら、重合度を上げることが困難で、プラスチックとして利用するには、物性上問題があるとされてきた^{5,26)}。近年、合成技術の改良により、実用に耐える高分子量の脂肪族ポリエステルが得られるようになり^{27,28)}、化学合成脂肪族ポリエステルは環境低負荷材料に適した生分解性素材として注目されるようになってきた^{12,27)}。Figure 1-1およびTable 1-4は、それぞれ代表的な生分解性ポリエステルおよび汎用プラスチックの構造および物性を示している。

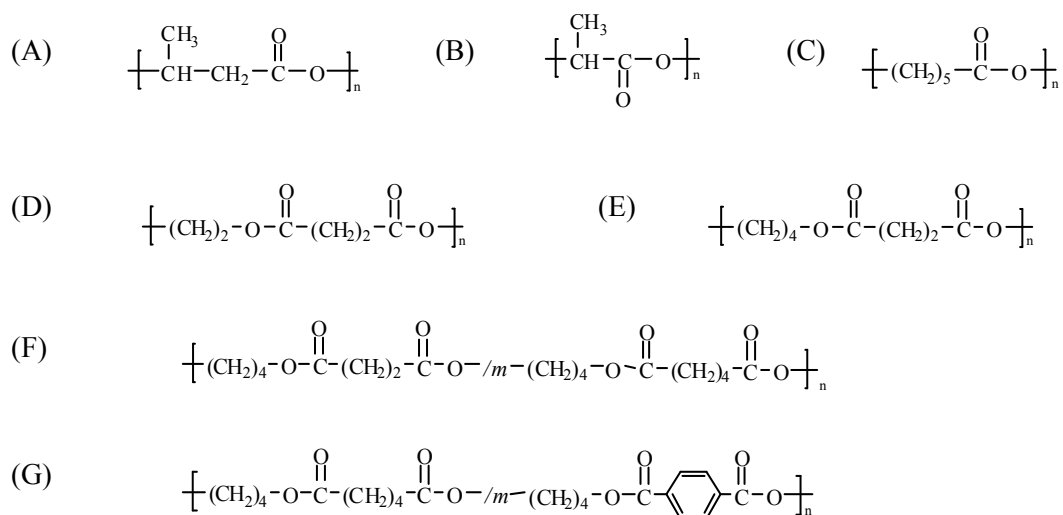


Figure 1-1 Chemical structures of (A) poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)), (B) poly(lactic acid) (PLA), (C) poly(ϵ -caprolactone) (PCL), (D) poly(ethylene succinate) (PESu), (E) poly(butylene succinate) (PBSu), (F) poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) (PBSA), and (G) poly(butylene adipate-*co*-butylene terephthalate) (PBAT).

Table1-4. Properties of biodegradable polyesters, polyethylene (PE), and polypropylene (PP).

| Polymer | Melting temperature (°C) | Density (g/cm ³) | Tensile stress at break (MPa) | Elongation at break (MPa) |
|---------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| P(3HB) | 177 | 1.25 | 40 | 6 |
| PLA | 170 | 1.21 | 45 | 3 |
| PCL | 60 | 1.15 | 4 | 1000 |
| PESu | 104 | 1.34 | 40 | 500 |
| PBSu | 114 | 1.26 | 60 | 600 |
| PBSA | 96 | 1.23 | 40 | 800 |
| PBAT | 110-115 | 1.22 | 36 | 820 |
| PE | 108 | 0.92 | 10 | 600 |
| PP | 164 | 0.9 | 38 | 400 |

ポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) は、ε-カプロラクトンの開環重合によって得られ、ダイセル化学工業から、セルグリーンとして生産、販売されている (Figure1-1 (C))。PCLは、融点 (60°C) が低いために、単独での使用には限界がある。しかしながら、多くの樹脂との相溶性を有することから、改質剤としてセルロースやでんぷんなど、他のポリマーとのブレンドが検討されている¹²⁾。

ポリ乳酸 (PLA) (Figure1-1 (B)) は、1932年にデュポン社のCarothersによって合成された^{5,26)}。その後、デュポン社やエチコン社によってさらなる開発がなされた^{5,26)}。PLAは、乳酸を直接重合する直接重合法、あるいは環状二量体ラクチドを経由する開環重合法により得られる。現在PLAは、三井化学 (レイシア)、カーギルジャパン (ネイチャーワークス) などが生産、販売している^{12,29,30)}。PLAは、ポリプロピレンと類似した機械特性、および化学合成脂肪族ポリエステルの中で最も高い融点 (170°C) を持ち、成形加工性に優れている。さらに、応力誘導したPLA製品は、透明であることから、広範な用途展開が期待されている²⁹⁾。

コハク酸系ポリエステルには、エチレングリコールとコハク酸の縮合体であるポリエチレンサクシネート (PESu)、1,4-ブタンジオールとコハク酸の縮合体であるポリブチレンサクシネート (PBSu)、およびPBSuのコハク酸の20%をアジピン酸に置き換えたポリブチレンサクシネート-co-ブチレンアジペート (PBSA) などがある。

PESuは、比較的高い融点を持ち、ポリプロピレンと類似した機械特性を持つ²⁸⁾ (Figure1-1 (D))。PBSuおよびPBSAは、ビオノーレとして昭和高分子から生産、販売されている。ビオノーレは、ポリエチレンと類似した機械特性、および100°C付近の融点を有している (Figure1-1 (E))。PBSAは、PBSuと比較して、融点が20°C程度低下し、結晶化度も低い²⁷⁾ (Figure1-1 (F))。これらのコハク酸系ポリエステルは、農業用のマルチフィルム、ゴミ袋などに商品化されている。また、これらは、顔料塗工紙のコーティング剤などに利用する生分解性エマルジョンとしての応用も、期待されている^{12,27,28)}。

近年、芳香族ユニットを脂肪族ポリエステルに組み込んだ、脂肪族-芳香族共重合ポリエステルも注目されている³¹⁻³⁶⁾。1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸からなる共重

合ポリエステルは、Eastman Chemical Co. KingsportおよびBASFから、それぞれEaster Bio³⁷⁾およびEcoflex¹²⁾として生産・販売されている (Figure1-1 (G))。一方、Dupon社は、Biomaxという商品名でポリエチレンテレフタレート (PET) に脂肪族ポリエステルユニットを組み込んだ、PETベースの生分解性ポリエステルを生産・販売している³⁸⁾。これら脂肪族 - 芳香族共重合ポリマーの生産量は増加しており、食品包装、シート、および園芸用途などさまざまな分野での使用が期待されている³⁷⁻³⁹⁾。

1.3. 生分解性ポリエステルの生分解

土壌環境中のP(3HB)分解微生物の分布が調べられた⁴⁰⁻⁴²⁾。その結果、中温土壌 (30°C) では、全微生物中のP(3HB)分解微生物の割合は0.2 ~ 11.4%、高温土壌 (50°C) では5 ~ 86%であった。一方、水環境中におけるP(3HB)の分解が調べられた。P(3HB)は、淡水中、海水中において高い分解性を示した⁴⁰⁻⁴⁵⁾。また、土壌⁴⁶⁻⁴⁸⁾、水⁴⁹⁾、海底⁵⁰⁻⁵²⁾、および嫌気性条件⁵³⁾など、さまざまな環境からP(3HB)分解微生物が単離され、P(3HB)分解微生物はさまざまな環境中に広く分布していることが明らかにされた。いくつかの単離株からP(3HB)分解酵素が精製され、その特徴が調べられている。さらに、いくつかの酵素遺伝子がクローニングされている。

天然物であるクチンやスベリンと構造の類似性を有するPCL^{54,55)}は、さまざまな環境中に存在する微生物によって分解されることが知られている^{40-42,44,56,57)}。一方、PCLの酵素分解に関する研究も行われている。TokiwaとSuzukiは、さまざまなエステラーゼやリパーゼによってPCLが加水分解することを報告している²¹⁻²⁵⁾。一方、PCLは、P(3HB)分解酵素によって分解されなかった⁵⁸⁾。PCLの微生物分解および酵素加水分解速度はPCLの分子量と結晶化度が、大きく影響することが報告されている⁷⁾。*Fusarium*属由来のクチン分解酵素とPCL分解酵素との関係を調べられた。*F.solani*の野生株とクチン分解酵素遺伝子を持たない変位株を比較したところ、唯一の炭素源としてPCLを与えた場合、野生株はPCLを分解および資化したが、変位株ではPCLは分解しなかった。さらに、クチン分解酵素の誘導物質に類似したPCLオリゴマーで培養した際、野生株ではPCL分解活性が見られたが、変位株ではPCL分解活性が見られなかった。これらの結果から、*Fusarium*属由来のクチン分解酵素がPCL分解酵素であることが明らかになった⁵⁵⁾。

ポリ乳酸 (PLA) は、古くは生体適合材料として用いられてきた^{12,29)}。PLAは、脂肪族ポリエステルではあるけれども、生物分解に対して耐性があるため、環境中での分解メカニズムは、初期の何らかの非生物的な加水分解と、生成したオリゴマーの生物による取り込みによりなされていると考えられていた²⁹⁾。最近になって、PLAを完全に分解できる微生物群が常磐らによって報告された。これらの微生物は、グラム陽性菌の*Amycolatopsis*属⁵⁹⁻⁶³⁾、*Bacillus*属⁶⁴⁻⁶⁷⁾あるいは、真菌類の*Tritirachium album*⁶⁸⁾に限られている。一方、PLAは、さまざまなタンパク質分解酵素によって分解されることが報告されている⁶⁹⁻⁷²⁾。タンパク質分解酵素が、PLAを分解する理由として、PLAモノマーである乳酸の構造が、アラニンの構造と類似していることが考えられている (Figure1-2)⁷³⁾。また、PLAを分解出来る酵素は、難分解性のタン

パク質であるケラチンに対する分解性を持つものが多く、ケラチン分解活性とPLA分解活性との相関が見いだされている⁷⁰⁾。

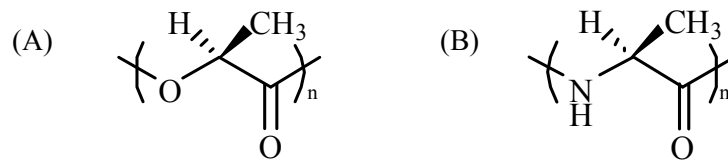


Figure 1-2 Chemical structure of PLA (A), and poly(L-alanine) (B).

PESuは、リパーゼによって分解しない²¹⁻²⁵⁾が、P(3HB)分解酵素により良好な分解性を示す⁷⁴⁻⁷⁷⁾。これは、P(3HB)分解酵素のサブサイト構造が、エチレングリコール-コハク酸ユニットを、2つの3HBユニットとのアナロジーで認識しているためであると考えられている⁷⁵⁻⁷⁷⁾。一方、環境水を用いたPESuの生分解性が調べられた。その結果PESuは、淡水中では良好な分解性を示すが、海水中ではほとんど分解しなかった⁴⁴⁾。また、自然環境中より好熱菌である*Bacillus* sp.TT96株⁷⁸⁾、および中温菌である*Bacillus pumilus* KT1012株⁷⁹⁾が、PESu分解微生物として単離されている。しかしながら、いずれのPESu分解バクテリアもP(3HB)を分解出来なかった^{78,79)}。

ある種の放線菌は、ポリブチレンサクシネート (PBSu) をオリゴマー単位に分解し、最終的に、それらの分解物を資化することができる^{80,81)}。土壌環境中におけるPBSu分解微生物分布が調べられ⁴⁰⁾、さらに菌の単離が行われた⁴²⁾。その結果、それらは*Firmicutes*綱あるいは*Proteobacteria*綱に属していた⁴¹⁾。PBSu分解酵素が、バクテリア*Acidovorax delafieldii* BS-3から精製され、その性質が調べられた⁸²⁾。さらに、分解酵素遺伝子がクローニングされ、酵素蛋白質の一次構造も明らかにされている⁸³⁾。この酵素は、乳化PBSu、乳化PBSA、固体PBSAに対する分解活性と、リパーゼ活性を有していた。また、本酵素は、P(3HB)分解酵素との相同性がなく、*Moraxella*や*Streptomyces*属のリパーゼと高い相同性を示した⁸³⁾。一方、真菌*Aspergillus oryzae*からPBSu分解酵素が精製された⁸⁴⁾。*A. oryzae*由来のPBSu分解酵素は、PBSu、PBSA、およびPLAに対して分解活性を示した。本酵素は、アミノ酸相同性解析から、リパーゼ様酵素であるクチナーゼの一種であると結論付けられた^{84,85)}。

PBSAは、*Chromatium vinosum*由来のリパーゼによって分解され、分子量834までのオリゴマーが水溶性分解産物として溶出した⁸⁶⁾。これ以外のバクテリアリパーゼによっても分解されることが報告されている^{86,87)}。一方、分解菌のスクリーニングも報告されていて、*Acidovorax delafieldii*および*Bacillus sterothermophilus*と同定されている^{82,88)}。近年、50°CにおいてPBSAを分解する真菌として、*Aspergillus versicolor*が単離された⁸⁹⁾。一方、Abeらは、中温域でPBSAを分解する、*A.oryzae*による、PBSA分解メカニズムを明らかにした。まず、*A.oryzae*は、PBSA固体表面上に生育する際、特異に複数の両親媒性タンパク質群を生産する⁹⁰⁾。さらに、それら両親媒性タンパク質が菌体より分泌され、疎水性固体表面に吸着してコンフォメーションが変化した後に、PBSA分解酵素 (クチナーゼCutL1) を特異的にリクルートし、プ

プラスチック固体表面に分解酵素を濃縮することでプラスチック分解を促進する⁹¹⁾。

土壌から単離された真菌*Penicillium* sp. 14-3 からポリエチレンアジペート (PEA) 分解酵素が精製され、その性質が調べられた²²⁾。PEA分解酵素は、さまざまなポリエステルを分解した。ヒドロキシ酸からなるポリエステルについては、PCLが分解されたが、側鎖のあるP(3HB)は分解されなかった。また、ジオールとジカルボン酸からなる脂肪族ポリエステルはよく分解された。不飽和脂肪族ポリエステル、脂環族ポリエステルも分解された。一方、芳香族ポリエステルは分解されなかった。さらに、PEA分解酵素はリパーゼ活性があり、リパーゼの一種と考えられた²²⁾。

脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステルの分解性に関するほとんどの研究は、混合培養によるものであった⁹²⁻⁹⁶⁾。近年、コンポストから20株の脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステル分解菌が得られ、脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステルの分解は、これら菌群の共生で行われていることが明らかになった⁹⁷⁾。これらの単離株中でも、好熱性放線菌である*Thermobifida fusca*は、高い脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステル分解活性を示した⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾。さらに、この菌株から精製された酵素は、リパーゼと高い相同性を示した¹⁰¹⁾。

1.4. アイオノマー

1.4.1. 物理架橋

ポリマー素材の構造および特徴を改善するために、大きく2つの方法が用いられてきた。1つは異なるポリマーのブレンドである。この方法では、ポリマーブレンドシステムの構造および特徴は、ポリマー成分間の混和性あるいは親和性によって決定される。混和性ブレンドの場合、両方の成分が各々の独自性の一部を失い、最終的にブレンド成分の相加平均的な特徴を示す。一方、非混和性ブレンドの場合、相分離を起こすため、ブレンドの特徴は好ましくない場合が多い。また、高分子ブレンドの場合、混合の必須条件であるGibbs自由エネルギーの減少に関係する、エントロピーの寄与が極めて小さい。したがって、水素結合、双極子-双極子あるいはイオン双極子相互作用などのいくつかの特別な相互作用が存在しない限り、ポリマーブレンドのほとんどは、混和しない。もう1つの方法としてあげられるのが、共重合化である。この方法の有利な点は、同じ主鎖に沿って異なるモノマーユニットが共有結合でつながっていることである。さらに、この方法では、共重合ユニット組成、その分布、配列（ランダム、ブロック、グラフトなど）、立体規則性、モノマーの結晶化のしやすさなどのいくつかの要因に依存した、幅広い制御が可能である。

ランダム共重合は、共重合法の中で最も一般的でシンプルな方法であり、工業分野において重要である。工業生産する上で、ポリマーの結晶化度および結晶化速度は非常に重要である。半結晶ポリマーは、熱可塑性および優れた物理特性を持つため、工業的に幅広く用いられている。非結晶性モノマーユニットの半結晶ポリマー主鎖へのランダム共重合化は、熱力学的および結晶化速度に大きく影響することが報告されている¹⁰²⁻¹⁰⁷。ホモポリマーで観察される挙動と比較して、多くの共重合ポリマーは、低い融点、低い結晶化度、および結晶化速度の減少を示す。この挙動は、結晶化ラメラから非結晶化可能ユニットが排除されるためである。共重合ポリマー中の、結晶化できないユニット組成が増加するに伴って、結晶化可能セグメントの平均長および体積フラクションは減少する。

一方、半結晶ポリマーへの架橋ユニットの導入も、熱力学的および結晶化速度に影響することが知られている^{102,108-110}。半結晶共重合ポリマーと同様に、架橋ユニットも結晶から排除される⁹⁸。しかしながら、共重合ユニットは、縦方向の結晶成長を制限する一方、架橋ユニットは、縦および側面の成長の両方を制限することができる。さらに、結晶化度および結晶化速度は、架橋レベルの増加に伴って減少することが確認された¹⁰⁶。一般に、共重合ポリマー中の非結晶化ユニットは、鎖間の動きに影響しない。一方で、ネットワークシステム中の共有架橋は、鎖間の動きを制限する。

アイオノマーのイオン基による架橋は物理架橋である。物理架橋ユニットは結晶相に組み込まれない、分子間相互作用を示す官能基をもつ共重合体であり、共有結合により化学架橋した重合体と一般的な共重合体の中間の構造であると言える¹¹¹⁻¹¹³。熔融状態において、クーロン凝集力は、動的なイオンホッピングプロセスを通し凝集体間を転移することができるイオン対によって、ダイナミックネットワークを形成する¹¹¹。結晶性高分子に架橋を導入する

と、熱力学的性質および結晶化速度が大きく影響を受ける。

1.4.2. アイオノマーの定義

アイオノマーという単語の定義は、不確定だった。アイオノマーという単語は、「強いイオン相互作用が、ポリマーの特徴をコントロールするのに支配的に働く」ということから、比較的少量のイオン基をもったオレフィンベースのポリマーに用いられた¹¹⁴⁾。現在、この定義は、他のポリマーにも適応されている。しかしながら、イオン組成の高いアイオノマーは、比較的高い誘電定数を持つ溶液中において、高分子電解質様の挙動を示す。そのため、この定義の適応は難しく、アイオノマーと高分子電解質を明確に分類できなかった。そこで、EisenbergとRinaudoは、「アイオノマーは、バルク特性が、素材に分散するイオン凝集体によって決定されるポリマー」という定義を提唱した¹¹⁵⁾。この定義によって、高分子電解質とアイオノマーを明確に分類することができるようになった。アイオノマーの重要な特徴は、イオン凝集体を形成することである。これは、高い誘電率における溶液特性が、典型的な分子次元よりも大きい距離の電気相互作用によって作用される高分子電解質と異なる点である。

現在、アイオノマーは、15%以下の少量のイオン基を高分子鎖に導入したイオン性高分子のことをいう。典型的なアイオノマーとして、ホスト疎水性高分子(ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン等)に側鎖として少量のカルボキシル基、スルホン基を導入したイオン性高分子がある¹¹⁶⁻¹²⁰⁾。

1.4.3. アイオノマーの歴史的背景および応用

1965年から、アイオノマーという単語が使われるようになり¹¹⁸⁻¹²⁰⁾、研究数は劇的に増加した。さらに、特許の数も年々増加している。このことは、アイオノマーが商業的に興味深い素材であることを示唆する。実際、アイオノマーは、強靱さ、光学的に透明、優れたヒートシール能、低い温度におけるすぐれた加工特性、オイル耐性、すぐれた金属接着性など有利な点を持つため、Table1-5に示すように、幅広い分野で利用されている¹²¹⁾。

現在までに、世界中で商業的に利用可能なアイオノマー樹脂の80%以上が、半結晶ポリオレフィンベースアイオノマーである¹²²⁾。しかしながら、驚くことにそれらの商業的重要性にも関わらず、半結晶アイオノマーに関する研究は、結晶化挙動における鎖中イオン部分の影響が複雑であるため、アモルファスアイオノマーに関する研究よりもずっと少ない¹²³⁻¹³⁵⁾。

Table 1-5. Examples of Ionomer Applications

| Polymer system | Trade name | Manufacture | Applications |
|--|------------|-------------|--|
| Ethylene-methacrylic acid copolymer | Surlyn | DuPont | Modified thermoplastic |
| Ethylene-acrylic acid copolymer | Iotek | Exxon | Modified thermoplastic |
| Butadiene-acrylic acid copolymer | Hycar | Goodrich | High green-strength elastomer |
| Chlorosulfonated polyethylene | Hypalon | DuPont | Specialty elastomer, covalently cross-linked |
| Perfluorosulfonate ionomers | Nafion | DuPont | Multiple membranes |
| Perfluorocarboxylate ionomers | Flemion | Asahi Glass | Chloro-alkali membrane |
| Telechelic polybutadiene | Hycar | Goodrich | Specialty elastomer uses |
| Sulfonated ethylene-propylene-diene-terpolymer | — | Exxon | Drilling mud additive, elastomer coating |
| Sulfonated polystyrene | — | Exxon | Drilling mud additive |

1.4.4 マルチプレット - クラスタモデル

Figure1-3 は、マルチプレットと運動束縛領域の模式図を示している。Eisenberg, Hird, Mooreらによって提唱されたこの形成原理¹³⁶⁾は、ゴム弾性エネルギーの増加による不安定化を上回る静電エネルギーの利得により起こるとしているが、高度に凝集したマルチプレットの形成ではその大きさはむしろアニオンが球状に集まるときの立体的な制限により決まることを見出した。

さらに、Eisenberg-Hird-Mooreモデルでは、“イオンクラスタ”の概念が新しく提唱された。試料中のイオン基濃度が増加するとき、イオン会合体の大きさも増加すると考えがちだが、大きさそのものはアニオンが球状に集まるときの立体的な制限により決まるため、実際はイオン会合体のサイズはほとんど変化しない^{136,137)}。しかしながら、ある臨界イオン濃度で力学的性質は一変する。Figure1-4 は、異なるイオン基濃度増加におけるイオン会合体と運動束縛領域の変化を模式的に示している¹³⁶⁾。A→B→Cとイオン基の数が増加するに従いイオン会合体の数も増加する。また、イオン会合体の数が増加するに伴い、その周辺の運動束縛領域の面積が増加する。そして、Cでは試料中で運動束縛領域が連続的になる。Eisenbergらは、この連続した運動束縛領域をイオンクラスタと名付けた。イオンクラスタはイオン会合体以外にかなりの部分の主鎖マトリックス層を含んでいる。重要な点として、BとCの違いは試料全体の力学的性質にのみ現れ、X線回折測定では質的な差はないということである。Eisenbergらは、S-7mol%MAA-Naアイオノマーにおいて、試料体積の70%がイオンクラスタ相であると見積もっている。この点が、わずかなイオンが、試料全体の性質を支配しているというアイオノマーの特徴を示す¹³⁷⁾。

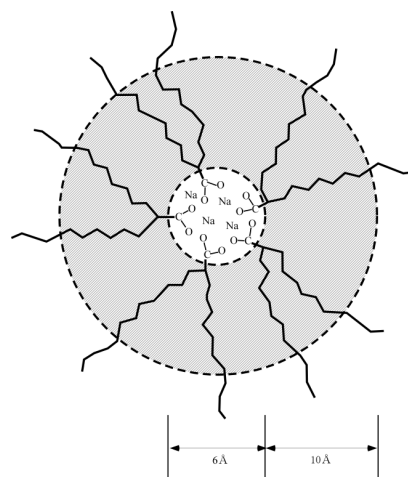


Figure 1-3. Schematic diagram of the region of restricted mobility surrounding a multiplet. White area indicates multiplet, and shaded area indicates region of restricted mobility.

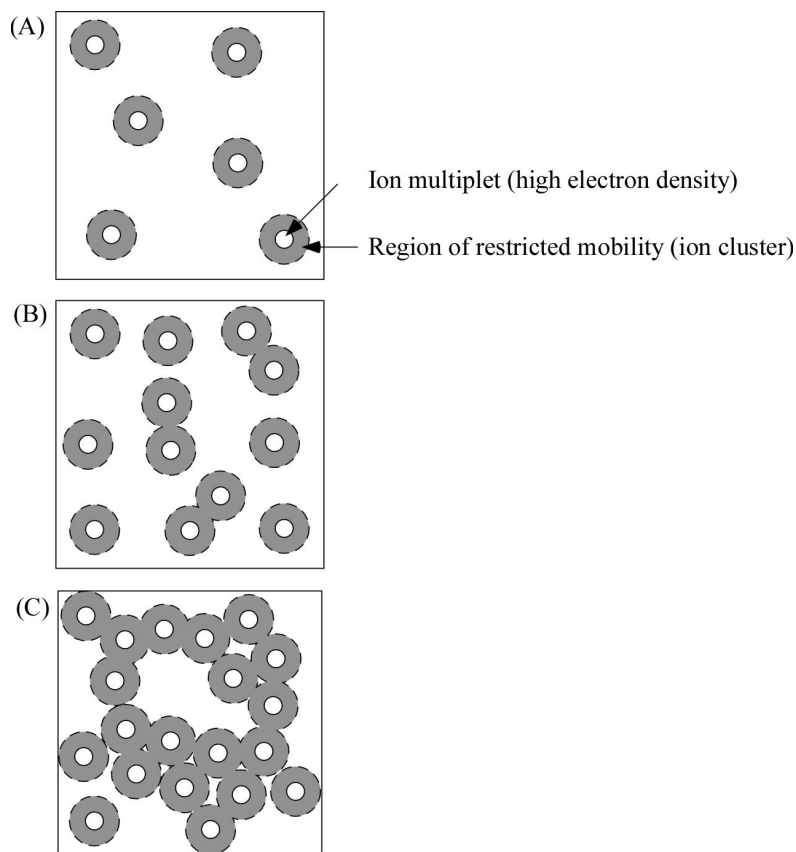


Figure 1-4 Schematic representation of the morphologies of random ionomers at different ion contents: (A) low ion content; (B) intermediate ion content; and (C) high ion content.

1.4.5 対イオン

Table1-6は、アイオノマーに用いられる主な対イオンを示している。イオン凝集体の形成は、アイオノマーの諸物性を特徴づけるものであり、アイオノマー中のイオン基の性質は、対イオンの性質によっても支配される。対イオンとして、 Na^+ 、 Zn^{2+} 等をはじめとして、金属イオンが最もよく使われている。本研究では、最も代表的な対イオンである、 Na^+ イオンを対イオンとして用いた。

Table1-6 Counter ion

alkali metal ion and alkalineearth metal ion

monovalent ion : Li^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+

bivalent ion : Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}

trivalent ion : Al^{3+}

Transition metal ion

bivalent ion : Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}

trivalent ion : Co^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+}

Organic ammonium ion (NH_4^+)

Transition metal-organic amine complex ion

$[\text{M}-(\text{alkylamine})_n]^{2+}$

M: Zn(II) , Cu(II) , Mn(II) , Co(V) etc

Bond of dissimilar polymer chain

Anion (Cl^- , Br^- , I^-)

1.4.6. ポリエステルベースアイオノマー

先に述べたように、アイオノマーはそのマトリックス中にイオン凝集体を含む高分子と定義される。イオン基は静電引力によって会合し、ナノメートルサイズのイオン凝集体を生成し、高分子マトリックス中に分散する^{126,135}。このような凝集体を形成するには、疎水性の主鎖と少量の(通常、15mol%以下)イオン基を持つことが必要である。実際に、多くのアイオノマーの構造と形態に関する研究は、理論、そして実験上でもポリエチレンもしくはポリスチレンのような疎水性の高分子を元に行われてきた。

イオン凝集体の理論的なモデルは、凝集体の限界のサイズにおけるエネルギーと鎖の立体配置による効果によって表される¹³⁸⁻¹⁴⁵。いくつかの理論は結晶による束縛を考慮に入れていないと批評されている¹³⁸。イオン相互作用、鎖の立体配置による効果、表面張力、界面相互作用、特に結晶性アイオノマーでは、結晶化によって引き起こされる鎖の運動性の束縛によるエネルギーを含む多くの複雑性によって、完全な理論を構築することは困難である¹³²。イオン基に共有結合した炭化水素鎖を含む鎖の構造におよぼす立体配置の効果は、Eisenberg¹⁴⁵のモデルまたはYarussoとCooper^{146,147}のモデルによって議論されている。ポリエス

テルベースのアイオノマーは、炭化水素の部分をエステルのカルボニル基とエステルの酸素に置き換えた繰り返し単位を持つ構造である。ポリオレフィンベースのアイオノマーにおいては、イオン凝集体をイオン基に結合した疎水性の炭化水素基が取り巻いており、対照的にポリエステルベースのアイオノマーにおいては、イオンドメインの表面は親水性の部分を含んでいると見なすことができ、それがポリエステルベースのアイオノマーのイオン凝集体のサイズや構造に影響しうる。

多くのアイオノマーの研究の中でも、脂肪族ポリエステルベースのアイオノマーについての報告は少なく、バイオマテリアルとしての可能性について研究されたのはつい最近である。^{131,134,146,147} Shermannと共同研究者らは、カルボン酸末端をもったポリ(ε-カプロラクトン)あるいはポリ乳酸から、水酸化金属水溶液を用いた滴下法によってポリ乳酸およびポリ(ε-カプロラクトン)ベース生分解性テレケリックアイオノマーを合成した^{148,149}。しかしながら、これらのアイオノマーの分子量はとても小さく、実用には向かないとされている。近年、Hanらは、バルク重縮合法によって高分子量のポリブチレンサクシネート(PBSu)ベースアイオノマーを合成し、イオン凝集体は、ポリエステルマトリクス中において形成され、架橋のように作用することを見出した^{129-131,134}。3mol%のイオン基導入(芳香族5-スルホン化イソフタル酸ナトリウム塩)によって、元のPBSuと比較して、熱的性質が低下した以外は、動的粘弾性および溶融特性が著しく改善された。これらの結果は、効果的に鎖の可動性を制限、結晶化度を減少させ、そして結晶化を遅くする、強固な分子間イオン凝集体のためである。PBSuは、元のPBSuと比較して良好なフィルム表面への細胞吸着と細胞増殖特性を示し、フィブロネクチンやビトロネクチンなどの細胞吸着タンパクの優先吸着できる表面親水性のためである。一方、Ishidaらは、イオン基として、脂肪族イオン基であるスルホン化コハク酸を導入したPBSuアイオノマーの合成に成功した^{145,146}。脂肪族イオン基が、芳香族イオン基と同様に、溶融特性、動的粘弾性を改善し、さらに核剤として働くことが明らかになった。一方、脂肪族イオン基の導入によって、結晶化温度などの熱特性も改善された。これらの結果から、導入するイオン基の化学構造の違いによって、イオン凝集体の結合力や安定性に違いが生じると考えられる^{129-131,150,151}。これらの研究は、イオン凝集体の多様性が、イオン凝集体の構造やダイナミクスおよび結晶化などの素材特性におよぼす効果を研究する上で、非常に興味深く重要である。

1.5. 本研究の目的

現在、プラスチックは、幅広い分野で使用され、我々の生活において、欠かせない重要な材料となっている。しかし、合成プラスチックの多くは、自然環境中では分解されないため、プラスチック廃棄物は、年々増殖し、これをどのように管理し、処理すべきかが、大きな社会問題になっている。このような背景から、プラスチック廃棄物による環境負荷を軽減する新しい素材として、使用後は土に還る生分解性ポリエステルが、注目されている。

近年、新しい合成技術の開発により、実用に耐える高分子量の脂肪族ポリエステルが得られるようになり、化学合成の生分解性ポリエステルは、環境低負荷材料に適した生分解性素材として注目されるようになってきた。さらに、化学合成生分解性ポリエステルは、微生物由来の生分解性プラスチックと比較して、低コストで生産できるため、すでにいくつかの化学メーカーより商業生産されている。

生分解性のある、PESu、PBSuおよびPBATなどのジオールとジカルボン酸から得られる化学合成ポリエステルは、100℃付近の融点、およびポリエチレンと類似した機械特性を有しており、現在、農林業分野や土木分野など、自然環境中で利用され、使用後の回収・リサイクルが困難な分野において、応用が検討されている。

一方、これらの化学合成ポリエステルは、暴露環境により、生分解速度が著しく異なることがわかっている。この原因としては、それぞれの環境での分解微生物群の差が影響していると考えられている。生分解性ポリエステルの本格的な普及を目前にして、材料の分解予測情報は重要である。

これらのポリエステルの分解予測を可能にするためには、どのような微生物が、これらのポリエステル分解に関与しているかを明らかにする必要がある。また、家庭用コンポスト生成装置のような閉鎖系で生分解性高分子を処理する際に、分解微生物を生物製剤として添加することにより、安定したコンポスト生成が実現できる可能性がある。

本研究の第一の目的は、化学合成の生分解性ポリエステルの一種である、PESu、PBSuおよびPBATが、環境中で、どのような微生物によって分解されるかについて詳しく調べることである。第2章では、自然環境中からPESuを分解する真菌を単離し、同定する。さらに、固体のPESuを良く分解する真菌から、PESu分解酵素を精製し、その性質について調べる。第3章では、自然環境中から、PBSu分解微生物の単離、同定を行う。さらに分解微生物が分泌するPBSu分解酵素の生産について調べる。4章では、PBAT分解微生物を単離し、同定する。さらに、環境中におけるPBATの分解パターンおよび資化性について調べる。

アイオノマーは、導入するイオン基の量が少量にもかかわらずポリマー物性を変化させることが可能である。アイオノマーの概念を生分解性プラスチックに取り入れることで、生分解性を保ちながら、物性の改善が可能であることが予想される。近年、生分解性脂肪族ポリエステルベースのアイオノマーに関する研究が進められるようになり、結晶化挙動の変化、その機械的性質の改善などの研究結果が報告されている。このことより、今後はさらにさまざまな生分解性脂肪族ポリエステルベースのアイオノマーについての研究が進められると考えられる。これらの研究は、生分解性ポリエステルの物理的性質および生分解性の調節をす

ることに大きく貢献することも予想される。しかしながら、脂肪族ポリエステルベースのアイオノマーの開発・研究に関する歴史は浅く、これらの素材に関する情報は不足している。それゆえ、脂肪族ポリエステルベースのアイオノマーに関する研究を行うことは、工業的にも学術的にも重要な意義を持つと言える。

本研究の第二の目的は、イオン基を導入した化学合成脂肪族ポリエステルを合成し、その物性変化および生分解性を調べることである。第5章では、代表的な化学合成脂肪族ポリエステルであるPESuおよびPBSuベースのアイオノマーを合成し、物理特性および生分解性評価を行った。最後に第6章では、各章の研究成果を総括し、今後の研究課題について論じる。

参考文献

- [1] L.H. Baekeland *Ind. Eng. Chem*, I, 149(1909)
- [2] Carothers W. H., *Chemical Rev.*, **1932**, 8; 353.
- [3] Pruter A. T. *Mar Pollut. Bull.*, **1990**, 18, 305.
- [4] Thompson R. C., Olsen Y., Mitchell R. P., Davis A., Rowland S. J., John A. W. G., McGonigle D., Russell A. E., *Science*, **2004**, 304, 838.
- [5] <http://www.jbpaweb.net/>
- [6] Chandra, R.; Rustgi, R. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, 23, 1273.
- [7] Albertsson, A. C.; Karlsson, S. in "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers"; Blackie: Glasgow; **1994**, 48.
- [8] <http://www.astm.org/COMMIT/SUBCOMMIT/D2096.htm>
- [9] <http://www.din.de/cmd?level=tpl-home&contextid=din&lang=en>
- [10] <http://www.cen.eu/cenorm/homepage.htm>
- [11] Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B. *Polym. Int.* **1998**, 47, 89.
- [12] Gross R.-A., Kalra B., *Science*, **2002**, 297, 803.
- [13] Kanai, Y. Abstracts of The 8th World Conference on Biodegradable Polymers and Plastics, 2004, 59.
- [14] Lemoignei, M., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*, **1926**, 8,770.
- [15] Steinbuchel, A., Valentin, H.E., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, 128, 219
- [16] Wiliamson, D.H. and Wilkinson, J.F., *J.Gen. Microbiol.*, **1958**, 19, 198.
- [17] Pedros-Alio, C., Mas, J. and Gurreo, R., *Arch. Microbiol.*,1985, 143, 178.
- [18] Sudesh K., Loo CY.,Goh LK., Iwata T., Maeda M., *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 1199
- [19] Abe H., Doi Y., Yamamoto, Y., *Macromol. Rep.***1992**, A29, 229.
- [20] Fukuda E., Ando Y., *Biorheology*, **1988**, 25: 297.
- [21] Tokiwa Y., Ando T., Suzuki T., *J. Ferment. Technol.*, **1976**, 54, 603.
- [22] Tokiwa Y., Suzuki T., *Agric. Biol. Chem.* **1977**, 41: 265.
- [23] Tokiwa Y., Suzuki T., *Nature*, **1977**, 270, 76.
- [24] Tokiwa Y. Suzuki T., *Agric. Biol. Chem.*, **1978**, 42, 1071
- [25] Tokiwa Y., Suzuki T., Ando T., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1979**, 24, 1701.
- [26] Carothers W.-H., Dorrough G. L., Van Natta F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1932**, 54, 761.
- [27] Fujimaki T., *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 209.
- [28] Ito H, Nanba T, Kobayashi H. Japan patent application number 90216;1994
- [29] <http://www.natureworksllc.com/>
- [30] Lunt J., *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 145.
- [31] Witt U, Muller R.J., Augusta J., Widdecke H., Deckwer W.D., *Macromol. Chem. Phys.*, **1994**, 195, 793.
- [32] Muller R.J., Witt U., Rantze E., Deckwer W.D. *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**; 59, 203.

- [33] Atfani M., Brisse F., *Macromolecules* **1999**, 32, 7741.
- [34] Ki H.C., Park O.O. *Polymer*, **2001**, 42, 1849.
- [35] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Macromol. Sci-Pure Appl. Chem.* **1995**; A32 (4), 851.
- [36] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1995**, 3, 215.
- [37] http://www.eastman.com/brands/Easter_Bio/Easter_Bio_intro.asp.
- [38] <http://www.dupont.com/polyester/resins/products/biomax/biomax.html>
- [39] Yamamoto M., Muller Muller R.-J., Deckwer W.-D., Weinheim; Germany: Wiley-VCH VerlagGmbH; 2002, 199
- [40] Nishida, H., Tokiwa Y. *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1993** 1, 227.
- [41] Suyama T. Tokiwa Y., Ouishanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 5008.
- [42] Tansengco M. L., Tokiwa Y. *Chem. Lett.*, **1998**, 24, 1043.
- [43] Doi Y., Kasuya K., Abe H., Koyama N., Ishiwatari S., Takagi K., Yoshida Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1996**, 51, 281.
- [44] Kasuya K., Takagi K., Ishiwatari S., Yoshida Y., Doi Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 327.
- [45] Ohura T., Aoyagi Y., Takagi K., Yoshida Y., Kasuya K., Doi Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1999**, 63, 23.
- [46] Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59, 3233.
- [47] Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J., *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1994**, 2, 177.
- [48] Jendrossek D., *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.*, **2000**, 71, 293.
- [49] Mergaert J., Wouters A., Anderson C., Swings J., *Can. J. Microbiol.*, **1995**, 41 [Suppl 1], 154.
- [50] Gonda K.E., Jendrossek D., Molitoris H.P., *Hydrobiologia*, **2000**, 426, 173.
- [51] Kasuya K., Takano T., Tezuka Y., Hsieh W.-C., Mitomo H., Doi Y., *Int. J. Biolog. Macromol.*, **2003**, 33, 221.
- [52] Kasuya K., Mitomo H., Nakahara M., Akiba A., Kudo T., Doi Y., *Biomacromol.*, **2000**, 1, 194.
- [53] Janssen P. H., Harfoot C. G., *Arch. Microbiol.*, **1990**, 154, 253.
- [54] Martinez C., Geus P. D., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C., *Nature*, **1992**, 356, 615.
- [55] Murphy C.A., Cameron J.A., Huang S.J., Vinopal R.T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, 62, 456.
- [56] Tokiwa Y., Calabia B.P., *Biotechnol. Lett.*, **2004**, 26, 1181.
- [57] Mergaert J., and J. Swings, *J. Ind. Microbiol.*, **1996**, 17, 463.
- [58] Oda Y., Asari H., Urakami T., Tonomura K., *J. Ferment. Technol.*, **1995**, 80, 265.
- [59] Ikura Y., Kudo T., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1999**, 45, 247.

- [60] Nakamura N., Tomita T., Abe N., Kamio Y. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67, 345.
- [61] Pranamuda H., Tokiwa Y., Tanaka H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1997**, 61, 1637.
- [62] Pranamuda H., Tokiwa Y., *Biotechnol. Lett.*, **1999**, 21, 901.
- [63] Paranamuda H., Tsuchii A., Tokiwa Y., *Macromo. Biosci.*, **2001**, 1, 25.
- [64] Sakai K., Kawano H., Iwami A., Nakamura M., Moriguchi M., *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 298.
- [65] Teeraphatpornchai T., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nakayama M., Nomura N., Nakahara T., Uchiyama H., *Biotechnol. Lett.*, **2003**, 25, 23.
- [66] Tomita K., Kuroki Y., Nakai K., *J. Biosci. Bioeng.*, **1999**, 87, 752.
- [67] Tomita K., Tsuji H., Nakajima T., Kikuchi Y., Ikarashi K., Ikeda N., *Polym. Degrad. Stab.*, **2003**, 81: 167-171
- [68] Jarerat A., Tokiwa Y., *Macromol. Biosci.*, **2001**, 1, 136.
- [69] Iwata T., Doi Y., *Macromolecules*, **1998**, 31, 2461.
- [70] Oda Y., Yonetsu A., Urakami T., Tonomura K., *J. Polym. Environ.*, **2000**, 8, 29.
- [71] Renée T. MacDonald, Stephen P. McCarthy, and Richard A. Gross, *Macromolecules*, **1996**, 29, 7356.
- [72] Williams D.F. *Eng Med.*, **1981**, 10, 5.
- [73] Pranamuda H., Chollakup R., Tokiwa Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 65, 4220.
- [74] Gan Z., Abe H., and Doi Y., *Biomacromol.*, **2001**, 2, 313.
- [75] Kasuya K., Ohura T., Masuda K., and Doi Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1999**, 24, 329.
- [76] Hisano T, Kasuya K, Tezuka Y, Ishii N, Kobayashi T, Shiraki M, et al., *J Mol Biol* **2006**, 356, 993.
- [77] Ohura T, Kasuya K, Doi Y. *Appl Environ Microbiol*, **1999**, 65, 189.
- [78] Tansengco M. L., Tokiwa Y., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 12, 133.
- [79] Tezuka Y., Ishii N., Kasuya K., Mitomo H., *Polym. Degrad. Stab.*, **2004**, 84, 115.
- [80] Jarerat A., Tokiwa Y., *Biotechnol. Lett.*, **2001**, 23, 647.
- [81] Pranamuda H., Tokiwa Y., Tanaka H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61, 1828.
- [82] Uchida H., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Tokiwa Y., Nakahara T., *FEMS Microbiol. Lett.*, **2000**, 189, 25.
- [83] Uchida H., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Nakahara T., and Nakajima-Kambe T. *J. Biosci. Bioeng.*, **2002**. 93, 245.
- [84] Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K, Nakajima T., *Appl Microbiol Biotechnol.*, **2005**. 67, 778.
- [85] Maeda H et al., *Appl. Microbiol. Biotech.*, **2004**, 65, 74.
- [86] Ando Y., Yoshikawa K., Nishioka M., Ishioka R., Yakabe Y. *Polym. Degrad. Stab.*, 1998, 61, 129.
- [87] Kitakuni E., Yoshikawa K., Nakano K., Sasuga J., Nobiki M., Naoi H., Yokota Y., Ishioka R., Yomabe Y., *Environ. Toxicol. chem.*, **2001**, 20, 941.

- [88] Tomita K., Kuroki Y., Hayashi N., Komukai Y., *J. Biosci. Bioeng.*, **2000**, 90, 350.
- [89] Zhao J.-H., Wang X.-Q., Zeng J., Yang G., Shi F.-H., Yan Q., *Polym. Degrad. Stab.*, **2005**, 90, 173..
- [90] Takahashi T et al., *Mol. Microbiol.*, **2005**, 57, 1780.
- [91] Ohtaki S. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 2407.
- [92] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1996**, 4, 9.
- [93] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1997**, 5 (2), 81.
- [94] Witt U., Yamamoto M., Seeliger U., Muller R.J., Warzelhan V. *Angew Chem. Int. Ed.* **1999**; 38(10), 1438.
- [95] Muller R.-J., Kleeberg I., Deckwer W.-D. *J. Biotechnol.* **2001**, 86, 87.
- [96] Abou-Zeid D.M., Muller R.J., Deckwer W.D. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1687.
- [97] Kleeberg I., Henz C., Kroppenstent R.M., muller R.J., Decker W.D. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 1731.
- [98] Witt U., Yamamoto M., Kleeberg I., Deckwer W.D., Muller R.J. *Chemosphere*, **2001**, 44, 289.
- [99] Marten E. Muller R.-J. Deckwer W.-D., *Polym. Degrad. Stab.*, **2005**, 88, 371.
- [100] Gouda MK., Kleeberg I., Heuvel J., Muller RJ., Deckwer WD., *Biotechnol Prog.*, **2002**, 18, 927.
- [101] Kleeberg I. Welzel K. VandenHeuval J. Muller R.J. Deckwer W.D. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 262.
- [102] Mandelkern, L. *Crystallization in Polymers*; McGraw-Hill: New York, 1964.
- [103] Wunderlich, B. *Macromolecular Physics*; Academic Press: New York, 1976; Vol. 2.
- [104] Alamo, R. G.; Viers, B. D.; Mandelkern, L. *Macromolecules* **1995**, 28, 3205.
- [105] Alamo, R. G.; Chan, E. K. M.; Mandelkern, L.; Voigt-Martin, I. G. *Macromolecules* **1992**, 25, 6381.
- [106] Alamo, R. G.; Mandelkern, L. *Macromolecules* **1991**, 24, 6480.
- [107] Goulet, L.; Prud'Homme, R. E. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1990**, 28, 2329.
- [108] Hekkedahl, N.; Wood, L. A. *Ind. Eng. Chem.* **1941**, 33, 381.
- [109] Mandelkern, L.; Roberts, D. E.; Halpin, J. C.; Price, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 46.
- [110] Gent, A. N. *J. Polym. Sci.* **1955**, 18, 321.
- [111] Hird, B.; Eisenberg, A. *Macromolecules*, **1992**, 25, 6466.
- [112] Eisenberg, A. *Macromolecules*, **1971**, 4, 125.
- [113] Eisenberg, A.; Hird, B.; Moore, R. B. *Macromolecules*, **1990**, 23, 4098.
- [114] Rees, R. W.; Vaughan, D. J. *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **1965**, 6, 287.
- [115] Eisenberg, A.; Rinaudo, M. *Polymer Bull.* **1990**, 24, 671.
- [116] Eisenberg, A., King M. "Ion-Content Polymers" Academic Press, NY (1977)
- [117] Eisenberg, A. Kim S. J., "Introduction to Ionomers" Chap5 Willey, NY (1998)
- [118] Yeager H.L., Eisenberg, A., "Perfluorinated Ionomer Membrane", ACS Symposium Series,

- 180; Eisenberg, A., Yeager H.L., eds p1, Am. Chem. Soc., Washington DC (1982)
- [119] Willson A.D. Prosser H.J. Eds “Developments in Ionic Polymers-1” Appl Sci Pub., London (1982).
- [120] Tant M.R., Mauritz K.A., Wilkes G.L. “Ionomers- synthesis, structure, properties and applications” Blackie Acad & Professional, London (1997)
- [121] Tant, M. R.; Mauritz, K. A.; Wilkes, G. L. “Ionomers: synthesis, structure, properties and application”; Blackie Academic & Professional: London, 1997.
- [122] S. Yano, E. Hirose; Editors, “Ionomer and Ion-containing Polymer”; CMC Shuppan Co. Ltd., Japan, 2003.
- [123] Tadano, K.; Hirasawa, E.; Yamamoto, H.; Yano, S. *Macromolecules* **1989**, *22*, 226.
- [124] Orler, E. B.; Calhoun, B. H.; Moore, R. B. *Macromolecules* **1996**, *29*, 5965.
- [125] Quiram, D. J.; Register, R. A.; Ryan, A. J. *Macromolecules* **1998**, *31*, 1432.
- [126] Sauer, E. B.; Mclean, R. S. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7939.
- [127] Kang, H.; Lin, Q.; Armentrout, R. S.; Long, T. E. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8738.
- [128] Yoo, Y.-T.; Lee, B. J.; Han, S.-I.; Im, S.-S.; Kim, D.-K. *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79*, 257.
- [129] Han, S.-I.; Im, S.-S.; Kim, D.-K. *Polymer*, **2003**, *44*, 7165.
- [130] Han, S.-I.; Lee, W.-D.; Kim, D.-K.; Im, S.-S. *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *25*, 753.
- [131] Han, S.-I.; Yoo, Y.-T.; Kim, D.-K.; Im, S.-S. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 199.
- [132] Kutsumizu, S.; Goto, M.; Yano, S. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4821.
- [133] Jia, Y.; Kleinhammes, A.; Wu, Y. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2781.
- [134] Han, S.-I.; Kang, S.-W.; Kim, B.-S.; Im, S.-S. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 367.
- [135] Winey, K. I.; Laurer, J. H.; Kirkmeyer, B. P. *Macromolecules* **2000**, *33*, 507.
- [136] Eisenberg, A.; Hird, B.; Moore, R. B. *Macromolecules* **1990**, *23*, 4098.
- [137] Hird B., Eisenberg A., *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **1990**, *28*, 1665.
- [138] Mauritz, K. A. J. *Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1988**, *C28* (1), 65.
- [139] Tant, M. R.; Wilkes, G. L. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1988**, *C28* (1), 1.
- [140] Eisenberg, A.; Hird, B.; Moore, R. B. *Macromolecules* **1990**, *23*, 4098.
- [141] Eisenberg, A.; Kim, J.-S. “Introduction to Ionomers”; John Wiley & Sons: New York, 1998.
- [142] Gierke, T. D.; Munn, G. E.; Wilson, F. C. *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* **1981**, *19*, 1687.
- [143] Gierke, T. D.; Hsu, W. Y. In *Perfluorinated Ionomer Membranes*; Eisenberg, A., Yeager, H. L., Eds.; ACS Symposium Series No. 180; American Chemical Society: Washington, DC, 1982; Chapter 13, p 283.
- [144] Yeager, H. L.; Steck, A. *J. Electrochem. Soc.* **1981**, *128*, 1880.
- [145] Eisenberg, A. *Macromolecules* **1970**, *3*, 147.
- [146] Yarusso, D. J.; Cooper, S. L. *Polymer* **1985**, *26*, 371.
- [147] Yarusso, D. J.; Cooper, S. L. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1871.
- [148] Sherman, J. W.; Storey, R. F. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 1996, *37*, 952.

- [149] Storey, R. F.; Sherman, J. W. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 1998, 39, 602.
- [150] Ishida K., Han SI., Inoue Y., Im SS. *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, 206, 1028.
- [151] Ishida K, Han SI., Im SS., Inoue Y., *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 146.

第2章

真菌によるポリエチレンサクシネート (PESu) の分解

2.1. 緒言

プラスチックは、軽く、腐らず、さまざまな形に成形できるなど、優れた特性を持つため、幅広い分野で使用され、我々の生活に欠かせない材料となっている。現在、全世界で、年間1億トン以上ものプラスチックが石油から化学合成により生産されている。一方で、プラスチックのほとんどが自然環境中で分解されないために、プラスチック廃棄物の処理処分が、国際的な環境問題となっている^{1,2)}。このような背景から、一般的な非分解性プラスチックに変わって、使用后、生態系に取り込まれていく生分解性プラスチックが注目されている。

コハク酸とエチレングリコールとの重縮合体であるポリエチレンサクシネート (PESu) は、脂肪族の生分解性ポリエステルである。現在PESuは、農業用マルチフィルムやゴミ袋として一部で利用されている³⁻⁵⁾。

PESuは、微生物由来の生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸類と異なり⁶⁻⁹⁾、暴露環境の違いにより、生分解速度が大きく異なることが知られている^{6,9)}。これは、PESuを分解する微生物種とその分布が、偏在していることが原因であると考えられている^{6,9)}。現在までに高温条件下でPESu乳化培地上にクリアゾーンを形成する好熱性バクテリア *Bacillus* sp. TT96株が、土壌から単離されている¹⁰⁾。 *Bacillus* sp. TT96株は、固体PCLに対して高い分解活性を有し、固体PESuおよび固体PBSuに対しても分解活性を有していた。一方で、中温条件下で、PESuを分解するバクテリアとして、 *Bacillus pumilus* KT1012株が、単離された¹¹⁾。 *B. pumilus* KT1012株は、おだやかな温度条件下 (30℃) において固体PESuフィルムを0.03 mg/cm²/dayの速度で分解した¹¹⁾。

以前の当研究室における研究より、バクテリアに加えて真菌類もPESuの重要な分解微生物の一群であることが示唆されている。そこで、本研究では、PESuを分解する真菌に着目し、自然環境中からPESu分解真菌を単離し、同定する。さらに、PESu分解真菌の生産するPESu分解酵素を精製し、その性質を詳細に調べる。

2.2. PESu分解真菌の単離および特徴付け

2.2.1. 実験方法

2.2.1.1. 試薬

(1) 脂肪族ポリエステル

ポリエチレンサクシネート (PESu) は、日本触媒 (株) より提供された。ポリブチレンサクシネート (PBSu)、およびポリブチレンサクシネートアジペート (PBSA) は、昭和高分子、ポリ乳酸 (PLA) は、島津製作所、ポリ (ϵ -カプロラクトン) は、ダイセル化学工業、ポリ (3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) は、モンサント社から各々提供された。それぞれの高分子をクロロホルムに溶解し、メタノールおよびヘキサンを加えて再沈させた。溶媒を含む沈殿物を、濾紙上に回収し、濾物を乳鉢でパウダーになるまですり潰した。パウダー状にした高分子を減圧乾燥させた後、使用した。本実験で用いたポリエステルの物性をTable2-1に示す。

Table2-1. Properties of polyester samples

| Polyester | $M_w \times 10^3$ | M_w/M_n | T_m (°C) | T_g (°C) |
|-----------|-------------------|-----------|------------|------------|
| PESu | 181 | 2.2 | 106 | -9 |
| PBSu | 176 | 2.2 | 117 | -32 |
| PBSA | 85 | 2.1 | 92 | -44 |
| PLA | 275 | 2.6 | 176 | 68 |
| PCL | 64 | 1.7 | 59 | -58 |
| P(3HB) | 700 | 2.1 | 178 | 4 |

(2) 乳化ポリエステルの作製

乳化ポリエステルは、以下の手順で作成された。まず、0.2%のポリエステル塩化メチレン溶液に、0.01% plysurf (第一工業社製)、およびMilliQ水を加え、超音波処理 (OUT PUT 5で1分間 (TOMY UD-200)) によって混合溶液を乳化した。乳化液中の塩化メチレンは、その後、加熱することにより、完全に除去された。

(3) 脂肪族ポリエステルフィルムの作製

脂肪族ポリエステルを、クロロホルムに溶解し、2%(wt/v)クロロホルム溶液とした。ガラス製のフラットシャーレに、2%ポリエステル-クロロホルム溶液2.5mLを入れ、ソルベントキャスト法でフィルムを作製した。溶媒が完全に蒸発した後、結晶化が平衡に達するまで、フィルムを室温で3週間放置し、その後、使用した。

溶融結晶化フィルムは、ソルベントキャスト法で作製したPESuフィルムをテフロンシートではさみ、150°Cで1分間熱プレスして溶解し、85°Cで3日間、等温結晶化させることにより作成された¹¹⁾。

(4) 3HBダイマーの調製

0.1 M トリエタノールアミンバッファー (pH 7.4) 5 mL に、P(3HB) 100 mg、および *R. pikettii* 由来の P(3HB) 分解酵素 10 µg を加え、37°C で、24 時間保温した。遠心分離 (10000 rpm、10 分、4°C) によって、未分解の P(3HB) を除去した。反応溶液に Butyltoyopearl を加え、4°C で、15 分攪拌した。遠心分離 (10000 rpm、10 分、4°C) によって、Butyltoyopearl を除去した。この作業を 2 回繰り返した後、反応溶液を凍結乾燥し、得られたものを 3HB ダイマーとした。

(5) 微生物、およびベクター

実験で使用した微生物、およびベクターを Table 2-2、および Table 2-3 に示す。*Aspergillus clavatus* NCBR 33020 は、標準株として用いた。*Penicillium funiculosum* IFO 6345 は、P(3HB) 分解酵素を生産する比較株として用いた。

(6) その他の試薬

市販の特級試薬をそのまま使用した。

Table 2-2 Fungal strains used.

| Strain | Relevant Characteristics | Reference |
|-------------------------------|---|------------|
| <i>A. clavatus</i> NBRC33020 | Type culture | 12 |
| <i>P. funiculosum</i> IFO6345 | P(3HB) depolymerase producing fungus | 13,14,15 |
| <i>E. coli</i> DH5α | supE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15)hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA | TOYOBO |
| NKCM1003 | PEsu-degrading fungal isolate | This study |

Table 2-3 Vectors used.

| Vector | Genetic Marker | Description | Reference | |
|----------|----------------|-------------------------|--|------------|
| Plasmids | pGEM-T easy | Amp ^r , lacZ | T-cloning vector | Promega |
| | pUC18 | Amp ^r , lacZ | General cloning vector | TaKaRa |
| | ITS-1001 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region of strain NKCM1001 | This study |
| | ITS-1003 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region of strain NKCM1003 | This study |
| | ITS-1012 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region of strain NKCM1012 | This study |
| | ITS-003 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region of strain KTF003 | This study |
| | ITS-004 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region of strain KTF004 | This study |

2.2.1.2. 酵素活性測定

(1) P(3HB)分解酵素活性 (濁度法) ^{16,17)}

P(3HB)分解酵素活性は、精製したP(3HB)微粒子を基質として濁度法で決定した。反応溶液の組成を、Table 2-4 に示す。

P(3HB)微粒子を超音波処理し、バッファー (Table2-4) 中に懸濁させた。この中に所定量の培養上清を注入することにより分解反応を開始した。P(3HB)分解酵素により、水に不溶性のP(3HB)微粒子は水溶性オリゴマーへと分解される。酵素分解中の反応溶液濁度の時間変化を650 nmの光の透過度の減少から測定した。この実験では、光路長1 cmのセルを用いて日立製U-2000ダブルビーム分光光度計によりP(3HB)分解速度を評価した。1 Unitは、1分間に650 nmの濁度を1減少させるために必要な酵素量とし、培養上清中の活性はmU/mLで表した。

(2) 重量減少法¹⁶⁾

0.1 Mリン酸バッファー (pH 7.4) 800 μ Lに、培養上清200 μ L、およびPESuフィルム (10 \times 10 \times 0.15 mm) を加え、30 $^{\circ}$ Cで、24時間保温した。フィルムを回収した後、それをメタノールとMilliQ水で洗浄し、凍結乾燥した。分解前のフィルム重量から分解後のフィルム重量を減算することによって、PESu分解活性を決定した。活性は、単位面積・一時間当たりのフィルムの重量減少量 (μ g/cm²/h) で表した。

Table 2-4 The composition of reaction mixture.

| | |
|------------------------|-----------------|
| P(3HB) granule | 400 μ g/ml |
| Tris-HCl buffer(pH7.5) | 50 μ mol/ml |
| CaCl ₂ | 1 μ mol/m |

2.2.1.3. PESu分解真菌の単離

さまざまな環境サンプル (乾燥土壌：群馬大学記念館前、湿った土壌：茨城県霞ヶ浦、乾燥土壌：群馬県桐生市、粘土質土壌：茨城県桜川、粘土質土壌：群馬県桐生市、山の土壌：千葉県成田市、山の土壌：広島県広島市、環境水：千葉県手賀沼) を微生物接種源として、PESu分解真菌を単離した。土壌1 gを、10 mLの滅菌生理的食塩水に懸濁し、10分間静置した。あらかじめテトラサイクリン溶液100 μ Lを塗布したPESu乳化固体培地 (Table2-5) に、この土壌懸濁液の上清あるいは環境水サンプル50 μ Lを均一に塗布した。PESu乳化培地上で、コロニーの周辺にクリアゾーンを形成した株を、PESu分解真菌として選択した。微生物の純化を、LB培地を用いて画線法により行った。乳化PESuを、2.2.1.1. (2) に従って作成した。

Table 2-5 The composition of polyester emulsified medium (pH6.0).

| | |
|--------------------------------------|----------|
| K ₂ HPO ₄ | 1.0 g/l |
| NaNO ₃ | 2.0 g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g/l |
| KCl | 0.5 g/l |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.01 g/l |
| Plysurf | 0.1 g/l |
| Polyester | 2.0 g/l |

2.2.1.4. 脂肪および各種ポリエステル分解能

単離株の脂肪および各種ポリエステル分解能を、オリーブオイルまたは脂肪族ポリエステル (PESu、PBSu、PBSA、P(3HB)、PCL、およびPLA) 分散培地上でのクリアゾーン形成能により評価した。

2.2.1.5. 形態観察

NKCM 1003株を、PESuフィルムをおいた基本寒天培地上に、画線した。菌体が付着したPESuフィルムを、2.5%のグルタルアルデヒド溶液に浸し、室温で1時間保持した。MilliQ水で洗浄後、50、60、70、80、90、および100%エタノールに順次、それぞれ20分間浸し、脱水した。最後に試料を酢酸イソアミルで60分間置換し、その後凍結乾燥した。これを金で真空蒸着して、走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-6700FS、JEOL社製) でフィルム表面を観察した (SEM観察の条件は、2.2.1.9. (1) 参照)。

PESu乳化培地を塗布したスライドガラスに菌体を植え付け、30°Cで96時間培養した。これを光学顕微鏡 (OM) 用サンプルとし、観察を行った (OM観察の条件は、2.2.1.9. (2) 参照)。

2.2.1.6. 培養温度の影響

PESu乳化固体培地に菌株を植菌し、4~60°Cで保温した。それぞれの温度における菌株の増殖度合とクリアゾーンの形成能力を観察した。

2.2.1.7. 遺伝系統学的解析

(1) ゲノムDNA (gDNA) 抽出¹⁸⁾

PESu分解真菌NKCM 1003株をLB培地100mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。対数増殖期後期の菌体を、遠心分離 (6000×g、10分間、4°C) により回収した。得られた菌体を、液体窒素と乳鉢を用いて、パウダーになるまですり潰した。パウダー状にした菌体を、TEバッファー (Table 2-6) 12mLに懸濁した。懸濁液に10% SDS 750μL、Proteinase K 50μLを加え、60°Cで4時間保温した。続いて等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1, v/v) を加え、氷上で30分間静置した。その後、遠心分離 (8000 rpm、30分間、室温) により上層を回収した。回収した上層に、等量のイソプロパノール、1/10倍量の5M NaClを加え、gDNAを沈殿させて回収し、70%エタノール1mLで、すすいだ。gDNAを減圧乾燥させた後、TEバッファー9mLに、溶かした。続いて、Ribonuclease A (シグマ社製) 1μLを加え、37°Cで1時間保温し、RNAを分解した。再度フェノール/クロロホルム抽出を行い、イソプロパノール沈殿によりgDNAを回収し、減圧乾燥させた後、TEバッファー500μLに溶かした。

Table 2-6. The composition of TE buffer(pH8.0).

| | |
|----------|------|
| Tris-HCl | 10mM |
| EDTA | 1mM |

(2) Internal Transcribed Spacer (ITS) region 配列解析

PESu分解真菌のITS領域を、PCR法により増幅した。使用したプライマーは、ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、およびITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3')¹⁹⁾であり、これらを各々20 pmol用いた (Figure 2-1)。40 µg/mLに調整したgDNA溶液5 µLを、98 °C、10分間保温した後、急冷し、これをテンプレートとして用いた。サーマルサイクルは、94 °C 5分、(94 °C 20秒–55 °C 30秒–72 °C 2分) × 25回、72 °C 10分の条件で実行した。酵素はEx Taq polymerase (TaKaRa社製)を用いた (PCRの反応量、サーマルサイクルは、Table 2-7参照)。得られたPCR産物を1.5%(wt/v)アガロースゲル中で電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルを、10分間エチジウムブロマイド-TAE緩衝溶液 (EtBr)に浸した後、脱イオン蒸留水(DIW)ですすいだ。その後、310nmのUV光をゲルに照射し、バンドの位置を確認した。

このPCR産物1.5 µLをLigation Kit Ver2 (TaKaRa社製)を用いて17 ng/µLのpGEM-T Easy Vector (Promega社製)に連結した (Table. 2-8)。新たに構築したプラスミドをpGEMT-ITSE3と命名した。塩化カルシウム法を用いて、組み換えプラスミドを*E. coli* DH5αに形質転換した。これを isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG、1 mM) 25 µL、5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal、0.1 mM) 30 µL、およびアンピシリン(100 µg/mL)50 µLを塗布した2%(wt/v)LB寒天培地上に塗布し、37 °Cで一晩培養した。プレート上に形成されたコロニーの中から、白色コロニーを選択し、FlexiPrep Kit (GEヘルスケア社製)を用いてプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAのインサートチェックは、制限酵素*EcoRI*を用いて行った。プラスミドDNAの消化は、*EcoRI* 1 µL、buffer O⁺ 1 µL (Fermentas社製)、および抽出したプラスミド8 µLを37 °Cで2時間静置することにより行った。インサートの確認されたプラスミドDNAを持つ組み換え大腸菌株を、レプリカからLA培地に植菌し、37 °Cで12時間振とう培養した。培養液よりFlexiPrep Kit (GEヘルスケア社製)を用いてプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNA濃度は分光光度計Gene Quant pro (Pharmacia Biotech社製)を用いて測定した。得られたクローンを、シーケンシング解析した。シーケンシングサンプルは、PCR法により調製された (2.2.1.10. (6) 参照)。シーケンシングには、CEQ2000 (ベックマン・コールター社製)を用いた (2.2.1.10. (6) 参照)。塩基配列及び相同性解析は、プログラムGENETYXあるいはプログラムblastnを用いて行った。シーケンシングにより得られた配列データと、GeneBankより入手した配列データをclustalW法によりアライメント解析した。アライメント解析データに基づき、プログラムDendroMakerを用いて、系統樹を生成した²⁰⁾。

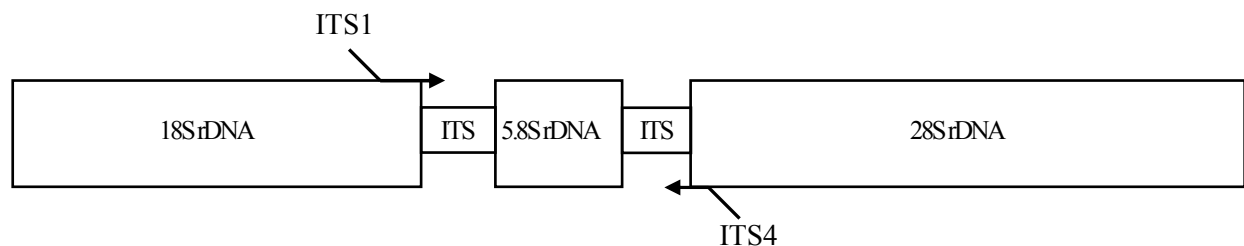


Figure. 2-1 Position of primers used for PCR

Table 2-7. PCR experiment.

| PCR condition | | Thermal cycles |
|--------------------|-------|------------------------|
| Template(40ng/μL) | 5μL | 98 °C 10min (pre heat) |
| | | 94 °C 5min |
| 10×Ex Taq buffer | 1μL | ↓ |
| dNTP Mix | 1μL | |
| ITS1 (20pmol) | 0.2μL | 94 °C 20sec |
| ITS4 (20pmol) | 0.2μL | 55 °C 30sec |
| Ex Taq (Enzyme) | 0.1μL | 72 °C 2min |
| ddH ₂ O | 2.5μL | 25cycles |
| Total | 10μL | ↓ |
| | | 72 °C 10min |

Table. 2-8. Ligation Mixture(total 10μL)

| | |
|-----------------------------|-------|
| Ligation Kit ver .2 | 5μL |
| pGEM T Easy Vector(17ng/μL) | 1μL |
| ddH ₂ O | 2.5μL |
| PCR product | 1.5μL |

2.2.1.8. ポリエステルフィルム分解

(1) さまざまな炭素源下における菌体増殖度合とPESuおよびP(3HB)分解活性分泌

PESu分解真菌をLB培地 1.5 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した(前培養)。グルコース、フルクトース、デンプン、オリーブオイル、プライサーフ、乳化PESu、P(3HB)、クエン酸、コハク酸、ブタン酸、3HBモノマー、3HBダイマー(2.2.1.1(4)参照)、あるいはエチレングリコーを0.2%含む基本培地(Table 2-9)、およびLB培地3 mLに、前培養液30 μLを加え、30°Cで7日間振とう培養した。その後、培養上清を、遠心分離し、上清および菌体を回収した。菌体増殖は、乾燥菌体重量測定によって決定した。菌体回収後の培養上清中の、PESuおよびP(3HB)分解活性測定を行った。すべての実験は、各3回行った。

(2) ポリエステルフィルム分解能力

PESu分解真菌を、LB培地 1.5 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した(前培養)。ポリエステルフィルム(PESu、PBSu、P(3HB)、PCL、およびPLA)(10×10×0.15 mm)を含む基本培地(Table 2-9)3 mLに対して、前培養液30 μLを加えた。これを、30°Cで5、10、15、あるいは20日間、振とう培養した。必要に応じて、基本培地に0.2%のP(3HB)グラニュールを添加した。培養後フィルムは、2.2.1.8.(1)と同様に処理した。

Table 2-9 The composition of medium (pH6.0).

| | |
|--------------------------------------|----------|
| K ₂ HPO ₄ | 1.0 g/l |
| NaNO ₃ | 2.0 g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g/l |
| KCl | 0.5 g/l |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.01 g/l |

2.2.1.9. ザイモグラム

NKCM 1003株を、PESuあるいはP(3HB)を含んだ基本培地 (Table2-9)、あるいはLB培地に植え付け30°Cで7日間培養した。遠心分離 (10000 rpm、20分間、4°C) によって菌体を除去した培養上清を、凍結乾燥によって濃縮した。この凍結乾燥濃縮物 (およそ1000倍) をザイモグラム用サンプルとして用いた。ファストシステム (アマシヤム ファルマシア社製) を用いて、等電点電気泳動を行った (前泳動 (2000V、2.5mA、3.5W) ・サンプル添加 (200V、2.5mA、3.5W) ・本泳動 (2000V、2.5mA、3.5W))。等電点マーカーとして、アマシヤム ファルマシア社のpI Callbration Kit (trypsinogen (pI-9.30), lentil lectin-basic band (pI-8.65), lentil lectin-middle band (pI-8.45), lentil lectin-acidic band (pI-8.15), myoglobin-basic band (pI-7.35), myoglobinacidic band (pI-6.85), human carbonic anhydrase B (pI-6.55), bovine carbonic anhydrase B (pI-5.85), β-lactoglobulin A (pI-5.20), soybean trypsin inhibitor (pI-4.55), amyloglucosidase (pI-3.50)) を用いた。ゲルは、PhastGel IEF 3-9 (Amersham Biosciences社製) を用いた。ポリエステル分解活性検出のため泳動後のゲルを、10mMリン酸緩衝液 (pH7.4) および0.2%のPESuあるいはP(3HB)を含んだ0.8%アガロースゲル上に乗せ、37°C、48時間保温した。その後、タンパク検出のため、銀染色 (関東化学社製) した。

2.2.1.10. 分析方法

(1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

分解後のPESuフィルムを凍結乾燥した。Quick auto coater JFC-1500 (JEOL社製) を用いてフィルムに金を真空蒸着した。このとき、50Åの厚さの蒸着を、2回行った。この試料を、SEM (JSM-6700FS、JEOL社製) を用いて観察した。

(2) 光学顕微鏡 (OM) 観察

菌体の光学顕微鏡観察は、位相差装置 (olympus BX-PHD) を取り付けたOlympus社製の光学顕微鏡 (Olympus BX50) を用いて観察した。

(3) ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) 測定

GPC測定には、日本分光株式会社製のLC-Net/ADCを用い、検出部にはRI-2031を用いた。カラムには、Tosoh TSK-G2000HXLを用いた。移動相は流速1ml/minのクロロホルムで、38°Cで保温された。試料には、1.0mg/mlのクロロホルム溶液を用いた。分子量解析は、日本分

光株式会社製のJASCOBORWINを用いて行った。

(4) 示差走査熱量測定 (DSC)

ポリマーの融点およびガラス転移点は、DSC測定によって決定された。DSC測定には、冷却装置のついたDSC - 60 (Shimadzu社製)を用いた。測定は、窒素雰囲気下、流速30 mL/minで行った。

(5) 機械特性測定

フィルムの機械特性測定は、TOYOBALD WIN社製のTensilon/UTM-20Lを用いて行った。フィルムを、ダンベル型 (1818-92) に切り取り、測定用試料とした。ロードセル1 kg、引っ張り速度2 mm/min、ゲージ間2.5 mmの条件で測定した。

(6) DNAシーケンシング解析

DTCS Quick Start kitを用いてPCR法により、シーケンシングサンプルを調製した。使用したプライマーは、M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')、およびM13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')であり、これらを各々1.6 pmol用いた。テンプレートは、2.5 μ LのDNA溶液を、96 °C、1分間保温した後、急冷することにより変性させたものを用いた。サーマルサイクルは、(96 °C 20秒-50 °C 20秒-60 °C 4分) \times 50回の条件で実行された (PCRの反応量、サーマルサイクルはTable 2-10参照)。シーケンシングにはマルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000 (ベックマン・コールター社製)を用いた。塩基配列及び相同性検索は、プログラムGENETYXあるいはプログラムblastを用いて行った。

Table 2-10 PCR experiment.

| PCR condition | | Thermal cycles |
|----------------------|-------------------|-----------------------|
| Template | 120ng | 96 °C 1min (pre heat) |
| ddH ₂ O | up to 2.5 μ L | |
| ----- | | 96 °C 20sec |
| DTCS Quick Start Mix | 2 μ L | 50 °C 20sec |
| Primer (1.6pmol) | 0.5 μ L | 60 °C 4min |
| ----- | | 50cycles |
| Total | 5 μ L | |

2.2.2. 結果と考察

2.2.2.1. PESu分解真菌の単離

(1) PESu分解真菌の単離

各地の環境サンプルを微生物接種源として、PESu乳化固体培地を用いたクリアゾーン法により、PESu分解真菌をスクリーニングした。その結果、PESu乳化固体培地上で、コロニー周辺に明確なクリアゾーンを形成するPESu分解真菌20株を単離した（Figure2-2、Table2-11）。

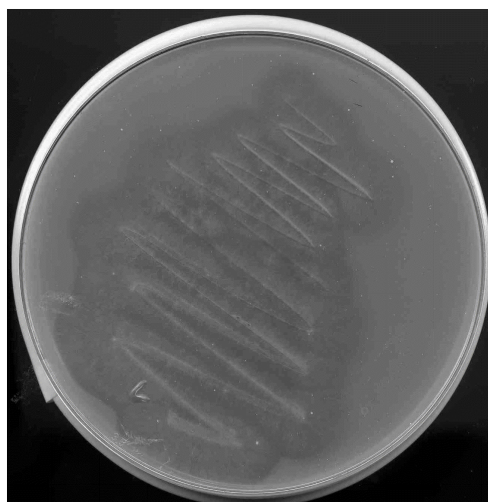


Figure 2-2 The clearing zone on the PESu emulsified plates formed by the PESu-degrading fungus strain NKCM1003

(2) 単離PESu分解真菌株の脂肪およびポリエステル分解能

Table2-8に、ポリエステルおよびオリーブオイル分散固体培地での単離PESu分解株のクリアゾーン形成能を示す。すべてのPESu分解真菌が、P(3HB)培地上にもクリアゾーンを形成した。一方で、単離株のおよそ半数は、リパーゼ（クチナーゼを含む）によって加水分解されるPCL²¹⁻²³およびオリーブオイルを含む培地上にクリアゾーンを形成しなかった。これらの結果は、単離菌株がリパーゼではなく、P(3HB)分解酵素によってPESuを分解している可能性を示唆している。

(3) PESu分解株によるPESuフィルム分解

乳化PESuプレート上で、クリアゾーンを形成した単離株の固体PESu分解能力を調べるために、PESuフィルムを基質として分解実験を行った。20株の単離株のうち、16株がフィルムを分解することがわかった（Table2-11）。単離株によるフィルムの重量減少量は、0.3～21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。一方、KTF005、KTF006、KTF007およびKTF011株は、PESuフィルムを分解しなかった。16株の分解真菌中、NKCM1003株が、最も速くフィルムを分解した（21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ）。

Table 2-11. The ability of PESu film degradation and clear zone formation on the plates containing polymer emulsions or olive oil by PESu-degrading fungal isolates, *A. clavatus* NBRC33030, and *P. funiculosum* IFO6345.

| Strain | PESu | PBSu | PBSA | P(3HB) | PCL | PLA | Olive oil | Weight loss of PESu film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Source |
|----------------------------------|------|------|------|--------|-----|-----|-----------|---|-------------------------------|
| NKCM1001 | +++ | - | + | +++ | - | - | + | 9.2 | Dry soil at Gunma university. |
| NKCM1002 | ++ | - | ++ | +++ | ++ | - | - | 1.6 | Wet soil at lake Kasumigaura |
| NKCM1003 | +++ | - | ++ | +++ | +++ | - | + | 20.8 | Wet soil at lake Kasumigaura |
| NKCM1004 | ++ | + | + | +++ | ++ | - | + | 4.7 | Dry soil at Gunma university |
| NKCM1005 | ++ | - | ++ | +++ | ++ | - | ++ | 0.93 | Dry soil of a field |
| NKCM1006 | +++ | + | ++ | +++ | +++ | - | ++ | 3.88 | Clay soil by Sakura river |
| NKCM1007 | ++ | + | + | +++ | ++ | - | ++ | 2.8 | Dry soil of a field |
| NKCM1008 | +++ | + | +++ | +++ | +++ | - | ++ | 15.5 | Clay soil at rice field |
| NKCM1009 | +++ | - | - | +++ | + | - | - | 5.6 | Soil at Mt.Narita |
| NKCM1010 | ++ | ++ | - | +++ | - | - | ++ | 20.1 | Soil at mountain |
| NKCM1011 | + | - | - | +++ | - | - | ++ | 0.4 | Soil at Mt.Narita |
| NKCM1012 | ++ | - | ++ | +++ | + | - | ++ | 5.25 | Dry soil of a field |
| KTF002 | +++ | +++ | ++ | +++ | - | - | + | 0.3 | Freshwater from Teganuma |
| KTF003 | +++ | + | + | +++ | - | - | - | 7.2 | Freshwater from Teganuma |
| KTF004 | +++ | - | - | +++ | - | - | - | 7.8 | Freshwater from Teganuma |
| KTF005 | ++ | - | ++ | +++ | - | - | - | 0 | Freshwater from Teganuma |
| KTF006 | ++ | - | ++ | +++ | - | - | - | 0 | Freshwater from Teganuma |
| KTF007 | ++ | - | - | +++ | - | - | - | 0 | Freshwater from Teganuma |
| KTF008 | ++ | - | - | +++ | ++ | - | ++ | 0.4 | Freshwater from Teganuma |
| KTF011 | +++ | - | - | +++ | ++ | - | ++ | 0 | Freshwater from Teganuma |
| <i>A. clavatus</i> NBRC33020 | + | - | + | + | + | - | +++ | 0.4 | NBRC |
| <i>P. funiculosum</i> IFO6345 | - | - | - | +++ | - | - | ++ | 0 | NBRC |

+++; A large clearing zone was formed around the isolate.

++; A midium clearing zone was formed around the isolate.

++; A small clearing zone was formed around the isolate.

-; No clearing zone was formed around the isolate.

a) Each strain was incubated at 30°C on mineral medium containing PESu film. After 10 days the film was pick up, washed with distilled water, and weighed. Weight loss was calculated by subtracting the weight of degraded film from initial weight of the film.

2.2.2.2. NKCM1003株の特徴付け

(1) NKCM1003株の形態観察

Figure2-3は、NKCM1003株の走査型電子顕微鏡（SEM）像および光学顕微鏡（OM）像を示している。本菌株は糸状菌であり、菌糸の太さは $5.4\pm 0.6\mu\text{m}$ であることがわかった

(Figure2-3 (A))。また、本菌株の菌糸は、隔壁で区切られた有隔菌糸であることも明らかとなった (Figure2-3 (B))。いくつかの菌糸末端には、分生子形成も確認された (Figure2-3 (C))。本菌株の形態学的特徴は、子のう菌種が示す特徴と類似している^{12, 24)}。

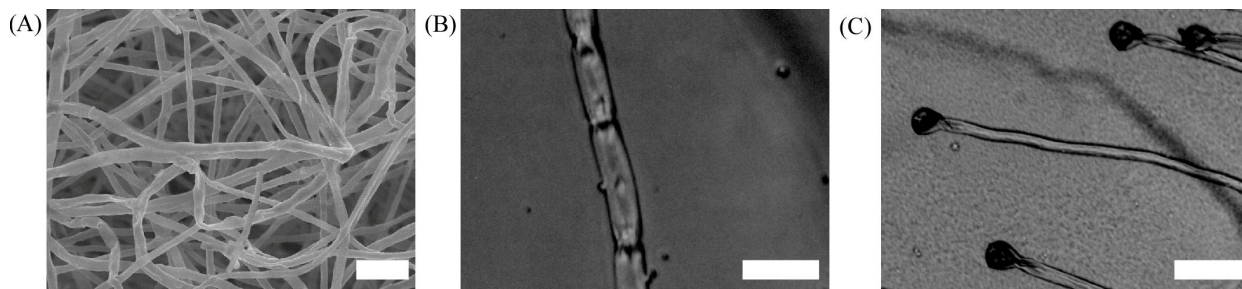


Figure 2-3. Scanning electronic micrograph of PESu-degrading strain NKCM1003. The white bar indicates $10\mu\text{m}$ in length (A), and phase-contrast optical micrographs of strain NKCM1003 (B) and (C). The white bar indicate $10\mu\text{m}$ (B) and $20\mu\text{m}$ in length (C).

(2) 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

4～60℃において、NKCM1003株の菌体の増殖と、クリアゾーン形成能を、観察した (Table2-12)。NKCM1003株は、20～45℃の培養温度で増殖可能であり、30～35℃で最もよく増殖した。一方、本菌株は、4℃および50℃以上で培養した場合、増殖しなかった。標準株として用いた*A. clavatus*は、20～40℃で増殖し、25～30℃で最もよく増殖した。一方、*A. clavatus*は、4℃および45℃以上で培養した場合、菌体増殖が確認されなかった。また、両方の株は、増殖が確認されたすべての温度で、乳化PESu培地上にクリアゾーンを形成した。これらの結果は、NKCM1003株は、菌体増殖の至適温度が30℃付近である中温性真菌であることを示している。さらに、本菌株は*A. clavatus*と比較して幅広い温度域においてPESuを分解できることも明らかになった。

Table 2-12 Effect of temperature of the growth and clearing zone formation on the PESu emulsified plates of strain NKCM1003.

| Temperature | NKCM1003 | | <i>A.clavatus</i> NBRC 33020 | |
|-------------|----------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | Growth | Clearing zone formation | Growth | Clearing zone formation |
| 4 °C | - | - | - | - |
| 20 °C | ++ | + | ++ | + |
| 25 °C | ++ | ++ | +++ | + |
| 30 °C | +++ | +++ | +++ | + |
| 35 °C | +++ | +++ | ++ | + |
| 40 °C | ++ | ++ | ++ | + |
| 45 °C | ++ | + | - | - |
| 50 °C | - | - | - | - |
| 55 °C | - | - | - | - |
| 60 °C | - | - | - | - |

+++ : means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++ : means not growing, a clearing zone was not formed.

+ : means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

- : means growth was good, or a medium clearing zone was formed

(3) PESu分解真菌の遺伝学的解析 (ITS配列解析)

NKCM 1 0 0 3 株を含む 5 株の PESu 分解真菌の ITS 配列に基づいて系統学的解析を行った (Figure 2-4)。PESu 分解真菌単離株 KTF 0 0 3、KTF 0 0 4 および NKCM 1 0 0 1 は、P(3HB) 分解真菌として報告されている *Fusarium* や *Paecilomyces* 属と同じ Sordariomycetes 綱に属していることがわかった。一方、菌株 NKCM 1 0 0 3 および NKCM 1 0 1 2 株は、P(3HB) 分解種として報告されている *Aspergillus* や *Penicillium* 属と同じ Eurotiomycetes 綱に属していた。NKCM 1 0 0 3 株と *A.clavatus* の ITS 領域の相同性は 99.8% であった。

これらの PESu 分解真菌 5 株は、いずれも Ascomycota 門に属しており、P(3HB) 分解真菌と近縁種であることがわかった。さらに、すべての PESu 分解真菌が P(3HB) 分解活性も示すことから (Table 2-11)、PESu 分解真菌群は P(3HB) 分解真菌のサブグループであることが示唆された^{12-15, 25, 26)} (Figure 2-5)。

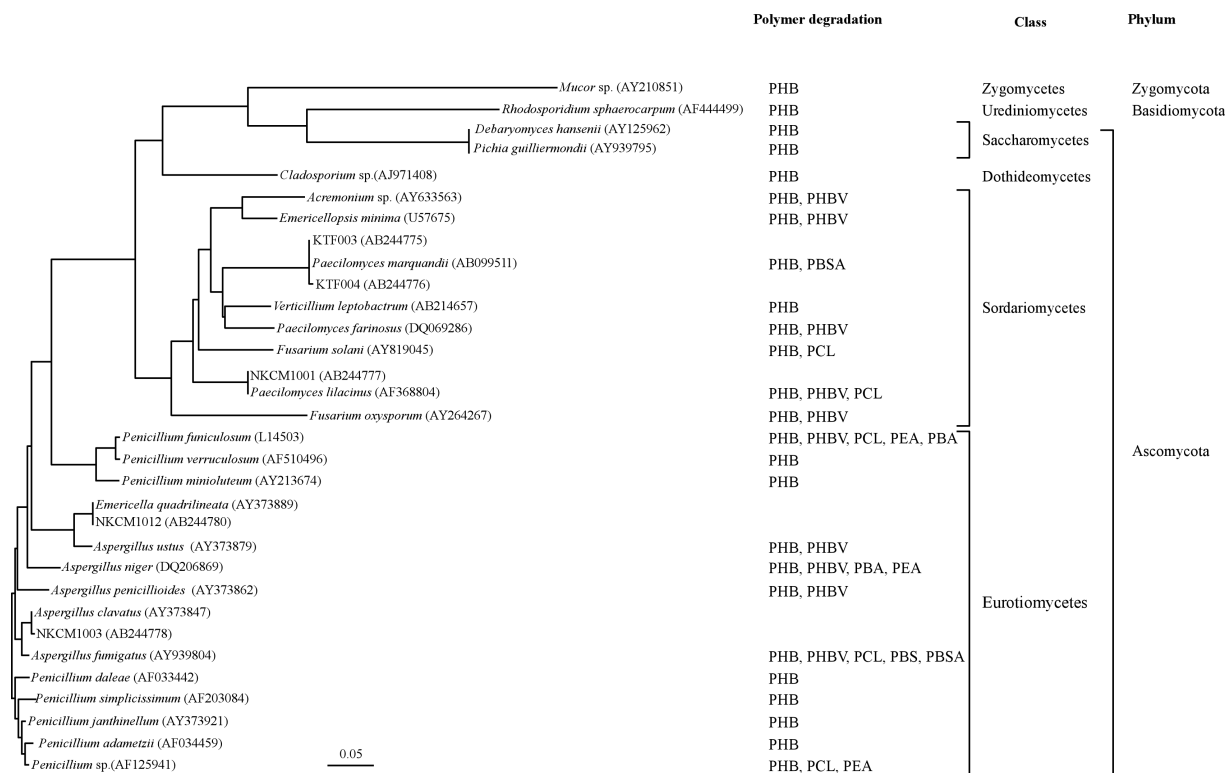


Figure 2-4. Phylogenetic tree of the PESu-degrading isolates, related fungi and P(3HB)-degrading fungi based on ITS and 5.8S rDNA sequence comparisons. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 2% estimated sequence divergence.

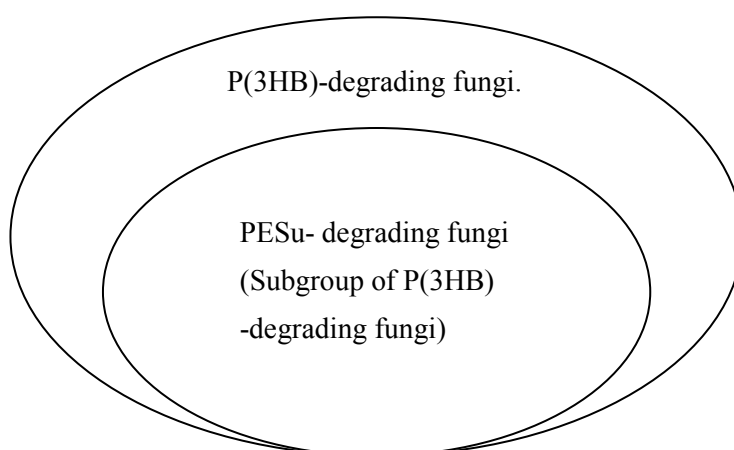


Figure 2-5. Relationship between PESu-degrading fungi and P(3HB)-degrading fungi.

2.2.2.3. NKCM 1 0 0 3 および標準株のポリエステル分解活性誘導

Table 2-13は、PESuおよびP(3HB)を含んだ基本培地中における、PESu分解真菌NKCM 1 0 0 3株、標準株である*Aspergillus clavatus* NCBR 3 3 0 2 0、および*Penicillium funiculosum* IFO 6 3 4 5 (P(3HB)分解酵素生産株)の増殖度合および培養上清に含まれるポリエステル分解活性を示している。NKCM 1 0 0 3株は、P(3HB)およびPESu両方の培地において良好な増殖挙動を示した。さらに、両方の培養上清中に比較的高いPESuおよびP(3HB)分解活性を生産した。標準株である*A. clavatus*も、両方の培地においてNKCM 1 0 0 3株と同程度の菌体増殖が確認されたが、ポリエステル分解活性はNKCM 1 0 0 3株と比較して低かった。P(3HB)分解酵素生産株である*P. funiculosum*は、P(3HB)を含んだ基本培地において、良好な菌体増殖を示した。また、その上培養清には、PESuおよびP(3HB)分解活性が確認された。一方、PESuを含んだ基本培地においては、菌体はほとんど増殖せず、ポリエステル分解活性も確認されなかった。*P. funiculosum*の生産するP(3HB)分解酵素は、PESuに対する分解活性を有している¹⁵⁾。つまり、*P. funiculosum*を、P(3HB)存在下において培養した際、生産されるP(3HB)分解酵素によりPESuが分解を受けていると考えられる。一方で、PESu存在下において、*P. funiculosum*は、P(3HB)分解酵素を誘導生産しないため、上清には活性を発現しない。NKCM 1 0 0 3株においてもP(3HB)分解酵素とPESu分解酵素が同一であると仮定した場合、本株は分解酵素をP(3HB)およびPESuのどちらの存在下においても生産できると推定される。つまり、自然環境中において、NKCM 1 0 0 3株のように構成的にP(3HB)分解酵素を分泌生産する菌株群が、PESu分解に大きく寄与すると考えられる。

Table 2-13. The relationship between expression of PESu hydrolase activity and P(3HB) depolymerase activity of strain NKCM1003 isolate, *A. clavatus* NBRC 33020, *P. funiculosum* IFO 6345, when they were cultivated on the minimal medium containing PESu or P(3HB) as the sole carbon source.

| Carbon source | Growth (mg) | PESu hydrolase activity ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$) | P(3HB) depolymerase activity (mU/mL) |
|--------------------------------|-----------------|--|--------------------------------------|
| Strain NKCM1003 | | | |
| PESu | 3.6 \pm 0.3 | 10.1 \pm 0.5 | 82 \pm 5 |
| P(3HB) | 4.1 \pm 0.2 | 16.5 \pm 0.7 | 83 \pm 10 |
| <i>A. clavatus</i> NBRC33020 | | | |
| PESu | 2.3 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.01 | 6 \pm 0.5 |
| P(3HB) | 2.9 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.02 | 6 \pm 0.5 |
| <i>P. funiculosum</i> IFO 6345 | | | |
| PESu | 0.24 \pm 0.02 | 0 | 0 |
| P(3HB) | 5.6 \pm 0.2 | 14.7 \pm 0.5 | 84 \pm 5 |

2.2.2.4. 単離株によるポリエステルフィルム分解

(1) NKCM1003株によるPESuフィルムの分解

PESuフィルムを含む液体基本培地で、NKCM1003株を、5、10、15、あるいは20日間培養した。その後、フィルムを回収し、フィルムの重量減少量を測定した (Figure2-6)。培養15日までは、培養時間の増加とともに、PESuフィルムの重量減少量は直線的に増加した。培養15日以降は、フィルム表面に多数の小孔が出現し、フィルムの崩壊が始まった。培養20日後では、さらにフィルムの崩壊が進行した。培養時間に伴って、フィルムの機械強度は、低下した (Figure2-6 (b))。一方、菌を接種しないコントロールでは、フィルム重量減少は、見られなかったが、経時的に機械強度はわずかに低下した。

培養後のフィルムの分子量を、GPCを用いて測定した。NKCM1003株を接種したものでは、培養前後においてフィルムの分子量変化は見られなかった (Figure2-7 (a))。一方、菌体を接種しないコントロールにおいても、フィルムの分子量変化が見られなかった。このことから、PESuは、20日間の保温で、非酵素的な加水分解による作用をほとんど受けていないことがわかった。

培養後のPESuフィルム表面を、SEMにより観察した (Figure2-7)。培養前のフィルム表面は、滑らかであったが、5日間培養したフィルムでは、フィルム表面の非晶部から分解が進み、ラメラが露出してきた様子が確認された (Figure2-7 (A)、(B))。10日間培養したものは、非結晶部が完全に分解され、ラメラが露出している様子が観察され (Figure2-7 (C))、20日間培養したものは、さらに表面が荒くなっていた (Figure2-7 (D))。一方、コントロールフィルムは、培養20日後でも、フィルム表面は滑らかなままであった。これらの結果は、PESuフィルムの分解は、分子量低下を伴う非酵素的な加水分解によるものではなく、微生物が分泌した酵素による、高分子表面からの分解であることを示唆している^{27,28)}。

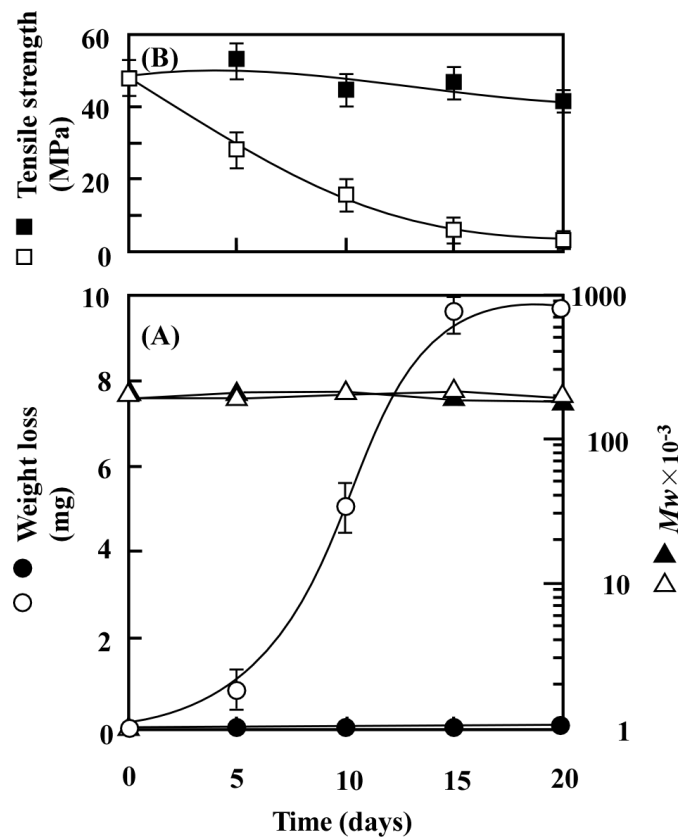


Figure 2-6. Degradation of PESu film by strain NKCM1003. Dumbbell specimen of PESu was incubated with strain NKCM1003 in the mineral medium at 30°C. (A) The time course of weight loss and weigh-average molecular mass (M_w) of PESu specimen. Weight losses of the specimens during incubation with and without strain NKCM1003 were indicated as open (○) and closed (●) circles, respectively. Weight loss indicates the value per 1.0 cm² of the specimen. M_w s during incubation with and without strain NKCM1003 were indicated as open (□) and closed (▲) triangles, respectively. (B) The time course of mechanical property of the PESu specimens. Tensile strengths of the specimens during incubation with and without strain NKCM1003 were indicated as open (□) and closed (■) quadrangles, respectively. All experiments were performed in triplicate. Error bars indicate the width of experimental values.

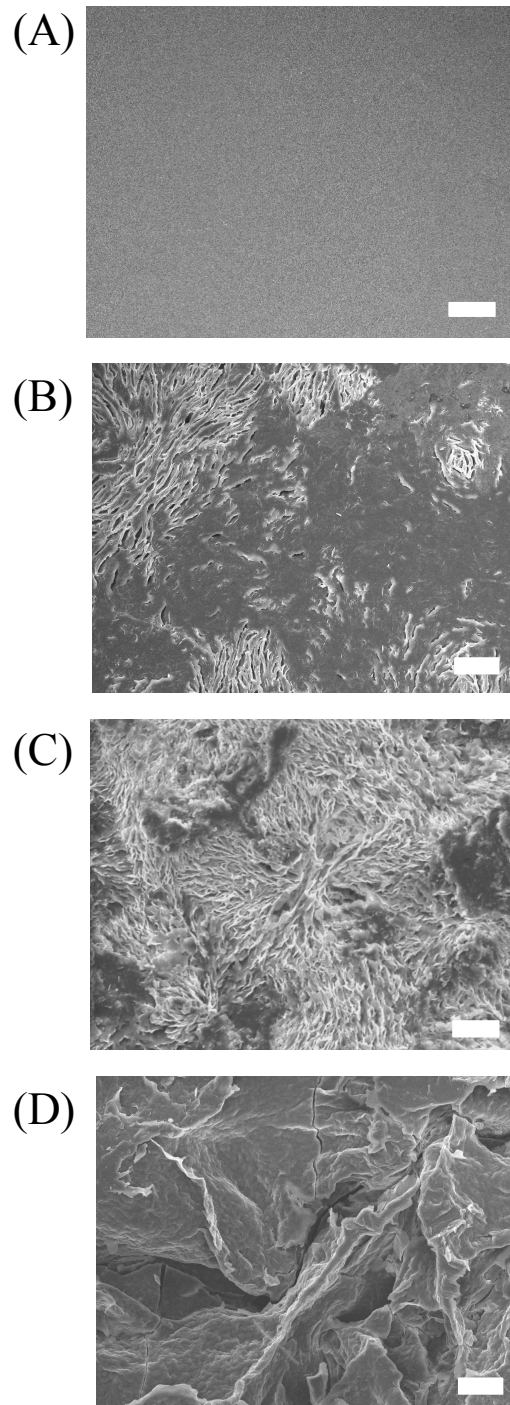


Figure 2-7. Scanning electron micrographs of PESu film surfaces before (A) and after degradation by strain NKCM1003 for 5 (B), 10 (C) and 20 days (D). The white bars indicate 20 μ m in length.

(2) NKCM 1 0 0 3 株による各種ポリエステルの分解

5種類のポリエステルフィルム (PESu、PBSu、P(3HB)、PCL、およびPLA) を含む液体基本培地で、NKCM 1 0 0 3 株を、10日間培養した。その後、残ったフィルムを回収し、フィルムの重量減少量を測定した (Table2-14)。NKCM 1 0 0 3 株は、P(3HB) ($14 \pm 1 \mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$) およびPCL ($2.5 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$) フィルムを分解した。一方、本菌株は、PBSu、およびPLAフィルムを分解しなかった。

PESuは、リパーゼでは分解されず、P(3HB)分解酵素により分解されることが知られている^{15,21-23})。NKCM 1 0 0 3 株は、PESuに加えて、P(3HB)を分解した。このことは、NKCM 1 0 0 3 株が分泌しているPESu分解酵素はP(3HB)分解酵素であることを示唆している。一方、NKCM 1 0 0 3 株はPCLを分解した。PCLはリパーゼにより分解され、P(3HB)分解酵素では分解されないことが知られている。これらを総合的に判断すると、NKCM 1 0 0 3 株は、P(3HB)分解酵素に加えて、リパーゼ様の酵素も分泌している可能性がある。

Table2-14. Degradation of various polyester films by strain NKCM1003^{a)}

| Substrate | Degradation rate of film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{b)} | Dry cell weight (mg) ^{b)} |
|-----------|--|---------------------------------------|
| PESu | 20.8 \pm 2 | 3.6 \pm 0.3 |
| PBSu | 0 | 0.2 \pm 0.01 |
| P(3HB) | 15.5 \pm 1 | 4.1 \pm 0.2 |
| PCL | 2.9 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.2 |
| PLA | 0 | 0.1 \pm 0.02 |

a) Strain NKCM1003 was cultured in 3mL medium containing polyester films (1 \times 1 \times 0.1mm, ca.15mg) at 30 °C for 10 days.

b) Values are means \pm standard errors of the means.

2.2.2.5. 炭素源の菌体増殖およびポリエステル分解活性発現への影響

Table2-15は、さまざまな炭素源を含む培地中でのNKCM 1 0 0 3 株の増殖挙動、および培養上清中へのPESuおよびP(3HB)分解活性発現度合を示している。NKCM 1 0 0 3 株は、乳化ポリマーを作る際に用いる界面活性剤であるプライサーフを唯一の炭素源とした場合には増殖せず、それ以外の炭素源を用いた場合には良好な増殖を示し。本菌株は、PESuを唯一の炭素源として培養した際、良好な菌体増殖を示した。これは、本菌株がPESuの分解だけでなく、分解産物を資化できることを示唆している。

本菌株は、PESu、P(3HB)、3HBモノマー、および3HBダイマーを炭素源とした場合、高いPESuおよびP(3HB)分解活性の両方を示した。さらに、本株を、乳化PESuを炭素源として培養した場合、その上清に、やや低いPESuおよびP(3HB)分解活性が検出された。一方、他の炭素源を用いた場合、良好な菌体増殖が確認されたにも関わらず、PESuおよびP(3HB)分解活性の両方が検出されなかった。これらの結果は、本株のPESu分解活性の発現が、易資化性の炭素

源存在下において、その炭素源あるいは代謝分解物によって抑制されていることを示唆している^{29,30)}。

Figure2-8 (A) は、等電点電気泳動後のゲルを銀染色した泳動像を示している。一方、Figure2-8 (B) および (C) は、PESu加水分解およびP(3HB)分解酵素活性染色像を示す。NKCM 1003株を、PESuあるいはP(3HB)を含んだ培地で培養した際、上清濃縮物はpI 5.6付近に単一バンドを示した。さらに、両方の活性染色において、ほぼ同じ位置にクリアゾーンの形成が確認された。この結果は、PESu加水分解が、本菌株が分泌するP(3HB)分解酵素によって引き起こされることを強く示唆している。さらに、本菌株のP(3HB)分解酵素生産は、易資化性の炭素源存在下においては、抑制されることもわかった。

Table 2-15. PESu film degradation by strain NKCM1003 grown on various media and the growth levels.

| Carbon source | Growth(mg) ^{c)} | PESu hydrolase activity ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{d)} | P(3HB) depolymerase activity (mU/mL) ^{e)} |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|
| PESu ^{a)} | 3.6±0.3 | 10.1±5.0 | 82±5 |
| Emulsified PESu ^{a)} | 2.3±0.2 | 2.1±0.4 | 21±4 |
| P(3HB) ^{a)} | 4.1±0.2 | 16.5±7.0 | 83±10 |
| 3HB monomer ^{a)} | 2.9±0.3 | 15.8±5.0 | 62±7 |
| 3HB dimer ^{a)} | 3.9±0.3 | 21.6±9.0 | 90±5 |
| LB medium ^{b)} | 4.6±0.3 | 0 | 0 |
| Glucose ^{a)} | 3.9±0.2 | 0 | 0 |
| Fructose ^{a)} | 3.2±0.3 | 0 | 0 |
| Starch ^{a)} | 2.7±0.3 | 0 | 0 |
| Oliveoil ^{a)} | 3.1±0.2 | 0 | 0 |
| Ethylene glycol ^{a)} | 2.3±0.2 | 0 | 0 |
| Citric acid ^{a)} | 2.7±0.2 | 0 | 0 |
| Succinic acid ^{a)} | 3.2±0.3 | 0 | 0 |
| Butylic acid ^{a)} | 3.3±0.2 | 0 | 0 |
| Plysurf ^{a)} | 0 | 0 | 0 |

a) Strain NKCM1003 was cultured on the minimal medium containing 0.2% each carbon source for 10 days.

b) Strain NKCM1003 was cultured on the LB medium for 10 days.

c) Growth levels of the strain were evaluated by the dry cell weight after incubation for 10 days.

d) PESu hydrolysis activity of strain NKCM1003 supernatant.

e) P(3HB) depolymerase activity of strain NKCM1003 supernatant.

All experiments were performed in triplicate. Errors (\pm) indicate the width of experimental data.

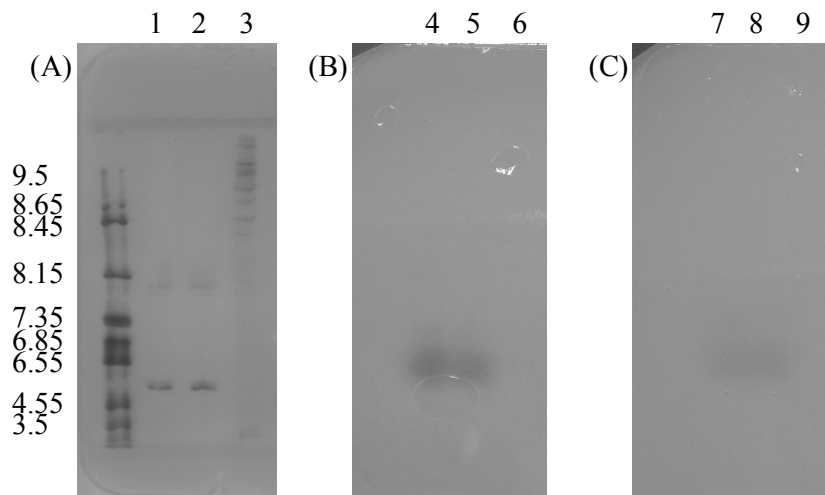


Figure 2-8. Zymogram analysis of PESu-grown (lanes 1, 4, and 7), P(3HB)-grown (lanes 2, 5, and 8), and LB medium-grown (lanes 3, 6, and 9) culture supernatants of strain NKCM1003. PhastGel IEF (A) and clear zone and pI bands on PESu-including agarose gel (B) and P(3HB)-including agarose gel (C). After electrophoresis PhastGel IEF 3-9 were and placed on polymer-containing agarose gels, and incubated at 37°C for 24 hours. The numbers on the left are value of pI .

2.3. PESu分解酵素の精製および特徴付け

2.3.1. 実験

2.3.1.1. 試薬

(1) ポリエステルサンプル

PESu、PBSu、PBSA、PLA、PCL、およびP(3HB)に関しては、2.2.1.1 (1) を参照。ポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシ吉草酸) (P(3HB-co-14mol%3HV)) は、*Wauteria eutropha* ATCC17699を用いて合成された³⁷⁾。ポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-4-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB-co-5mol%4HB)) は、*Delftia acidovorans* DS-17によって生産された³⁸⁾。ポリ(3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサノ酸) (P(3HB-co-10mol%3HH)) は、*Aeromonas caviae*によって生産された³⁹⁾。ポリ(δ -バレロラクトン) (PVL) は、化学合成された⁴⁰⁾。本研究で用いたすべてのポリマーは、2.2.1.1 (1) のように再沈澱してから用いた。

(2) ポリエステルフィルムの作製

2.2.1.1 (3) を参照。

2.3.1.2. 酵素活性測定

(1) P(3HB)分解酵素活性 (濁度法)¹⁶⁾

2.2.1.2. 活性測定 (1) 参照

(2) 重量減少法¹⁶⁾

0.1 Mリン酸バッファー (pH 7.4) 1 mLに、PESuフィルム (10×10×0.15 mm) および精製酵素を加え、37°Cで、24時間保温した。フィルムを回収した後、それをメタノールとMilliQ水で洗浄し、凍結乾燥した。分解前のフィルム重量から分解後のフィルム重量を減算することによって、PESu分解活性を決定した。活性は、単位面積・一時間当たりのフィルムの重量減少量 (mg/cm²/h) で表した。

2.3.1.3. PESu分解酵素の精製

(1) 培養上清の経時的な活性測定

LB培地 (Table2-15) で、NKCM1003株を、30°Cで一晩振とう培養した (前培養)。0.1% (wt/vol) PESuを含んだ基本液体培地 (Table2-15) 200 mLに2 mLの前培養液を植え継ぎ、30°Cで振とう培養した。24時間ごとに培養液をサンプリングし、重量減少法および濁度法により酵素活性測定を行った。

(2) NKCM1003株由来PESu分解酵素の精製¹³⁾

LB液体培地 (Table2-16) 100 mLに、NKCM1003株を植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。この前培養液を、10 mL/Lの割合で、0.1% (wt/vol) PESuを含んだ基本液体培地 (Table2-16) 2 L (200 mL×10) に植え継ぎ、30°Cで72時間振とう培養した。遠心分離 (8000 rpm、20分、4°C) によって菌体を除去した。菌体を除去したNKCM1003株の培養上清を、0.45 µmのセルロースフィルターでろ過し、そのろ液に、0.3 Mとなるように硫酸アンモニウムを加えた。これを、予め0.3 M硫酸アンモニウムを含む10 mMリン酸バッファー (pH 7.5) で平衡化したButyl-Tyopearl (疎水性クロマト担体、TOSHO製) カラムに、吸着させた。次に10 mMリン酸バッファー (pH 7.5) を、20 mL流した後、硫酸アンモニウム濃度 (10 mMリン酸バッファー中) を、0.3-0 Mに直線的に減少させた。続いてエタノール (10 mMリン酸バッファー中) の割合を、0~40%に直線的に変化させて、酵素を溶出させた。分解活性のある画分を集め、10 mMリン酸バッファー (pH 7.0) で、24時間透析し、その後、AQUA KEEP™ (吸水性ポリマー、住友精化) を用いて濃縮した。濃縮物を10 mMリン酸バッファー (pH 7.0) で透析した。これを酵素標品とし、使用するまで4°Cで保存した。

Table 2-16 The composition of media for culture of NKCM1003.

| LB medium (pH6.0) | | Basal medium (pH6.5) | |
|-------------------|--------|--------------------------------------|----------|
| Tryptone Peptone | 10 g/l | K ₂ HPO ₄ | 0.7 g/l |
| Yeast extract | 5 g/l | KH ₂ PO ₄ | 0.7 g/l |
| NaCl | 5 g/l | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.7 g/l |
| Glucose | 20g/l | NH ₄ Cl | 1.0 g/l |
| | | NaNO ₃ | 1.0 g/l |
| | | NaCl | 0.05 g/l |
| | | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.02 g/l |
| | | ZnSO ₄ | 0.07 g/l |

2.3.1.4. 精製酵素の性質

(1) pH安定性

pH 2~11の0.1 M各種バッファー (グリシン、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス-塩酸、ホウ酸ナトリウム、あるいは炭酸ナトリウム) に、等量の酵素溶液を添加し、37°Cで5時間保持した。その後、混合溶液の残存活性を重量減少法 (2.3.1.2. (2) 参照) によって測定した。

(2) 至適pH

pH 2~11の0.1 M各種バッファー (同上) 1 mLに、PESuフィルム (10×10×0.15

mm) と酵素を加え、37°Cで24時間保持した。フィルムを回収後、それをメタノールおよびMilliQ水で洗浄した。フィルムは、恒量になるまで凍結乾燥装置で乾燥した。フィルムの重量減少量は、2.3.1.2. (2) と同様の方法で算出した。

(3) 温度安定性

精製した酵素を、0.1 Mリン酸緩衝液中 (pH 7.4)、20~80°Cの一定温度で30分間保持した。その後、混合溶液の残存活性を重量減少法 (2.3.1.2. (2) 参照) によって測定した。

(4) 等電点

ファストシステム (アマシャム ファルマシア社製) を用いて、等電点電気泳動を行った (2000 V、2.5 mA、3.5 W)。等電点マーカーとして、アマシャム ファルマシア社のpI Callbration Kit (trypsinogen (pI-9.30), lentil lectin-basic band (pI-8.65), lentil lectin-middle band (pI-8.45), lentil lectin-acidic band (pI-8.15), myoglobin-basic band (pI-7.35), myoglobinacidic band (pI-6.85), human carbonic anhydrase B (pI-6.55), bovine carbonic anhydrase B (pI-5.85), β -lactoglobulin A (pI-5.20), soybean trypsin inhibitor (pI-4.55), amyloglucosidase (pI-3.50)) を用いた。ゲルは、PhastGel IEF 3-9 (Amersham Biosciences社製) を用いた。

(5) 阻害剤

精製した3 μ gの酵素と各種阻害剤を、10 mMリン酸緩衝液中 (pH 7.0)、30°Cで60分間保温した。その後、混合溶液の残存活性を重量減少法によって測定した (2.3.1.2. (2) 参照)。

(6) 基質特異性

0.1 Mリン酸バッファー (pH 7.4) 1 mLにポリエステルフィルム (10 \times 10 \times 0.15 mm) と酵素を加え、37°Cで24時間保温した。その後、フィルムをメタノールとMilliQ水で洗浄し、凍結乾燥して重量を測定した。フィルムの重量減少量は、2.3.1.2. (2) と同様の方法で算出した。

(7) 速度論的解析

精製酵素の分解の速度論的解析を行った。P(3HB)基質とする濁度法により、基質分解速度を測定した。P(3HB)の酵素加水分解速度(R)は、次の式を用いて決定した³¹⁾。

$$R=ksK[E]/(1+K[E])^2 \quad (1)$$

ここで、ksは酵素によるP(3HB)鎖の加水分解速度定数、Kは酵素の見掛けの吸着平衡定数、[E]は酵素濃度を示している。Deltagraph Pro 4 (ポラロイド社製) を使用して、速度論的デー

タを解析した。

(8) リパーゼ活性測定

精製酵素のリパーゼ活性を、リパーゼキットS (マルコ製薬株式会社製) を用いて測定した。実験手順の詳細は、マニュアルに従った。

(9) エステラーゼ活性測定

精製酵素のエステラーゼ活性を、水溶性基質である*para*-nitrophenyl acetate (PNPA)、および*para*-nitrophenyl butyrate (PNPB) を用いて測定した。反応溶液は、100 μ Lの1%PNPAあるいはPNPB溶液 (1,4-ジオキサン、polyoxyethylene 9-laurylether (1 : 1) 溶液)、所定量の酵素、および0.1 Mリン酸バッファーを加え、MilliQ水によって1 mLに調製した。PNPAおよびPNPBの加水分解速度は、分解生成物である*para*-nitrophenylの増加量を、400 nmの波長で追跡することによって求めた。吸光度の経時変化を、U-2000型ダブルビーム分光光度計 (日立製) を用いて測定した。*para*-nitrophenolのモル吸光係数は、18000 ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$) とした。1ユニット (U) は、1分間に1 molの*para*-nitrophenolを生じさせるために必要な酵素量とした。

(10) 分解産物の同定

PESuフィルムの酵素加水分解後に得られる水溶性分解物の解析は、Micromass ZQ システム (Waters社製) を用いて行った。水溶性分解物の分離は、液体クロマトグラフィーを用いて行った。

2.3.1.5. 分析方法

(1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法

Laemmli法³²⁾により、SDS-PAGEを行った。分子量マーカーとして、MBI Fermentas社のProtein Molecular Weight Marker (β -galactosidase (116000), Bovine serum albumin (66200), Ovalbumin (45000), Lactate dehydrogenase (35000), RE *Bsp*981 (25000), β -lactoglobulin (18400), Lysozyme (14400)) を用いた。電気泳動後のタンパク質は、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) 法 (KANTO) を用いて染色した。

(2) 蛋白質定量

タンパク質濃度を、Bradford法³³⁾ (Bio-Rad Protein Assay) により、牛血清アルブミン (BSA) を標準物質として決定した。

2.3.2. 結果と考察

2.3.2.1. PESu分解酵素の精製

(1) NKCM 1 0 0 3 株の培養上清のPESuおよびP(3HB)分解活性の経時的変化

PESuを含む基本培地で、NKCM 1 0 0 3 株を培養した。その際の培養上清のPESuフィルム分解活性およびP(3HB)分解活性を経時的に調べた。培養上清のPESuフィルム分解活性は、培養開始より3日目まで上昇し、その後減少した。(Figure 2-9)。一方、P(3HB)分解活性も、PESuフィルム分解活性とほぼ同様の挙動を示した。

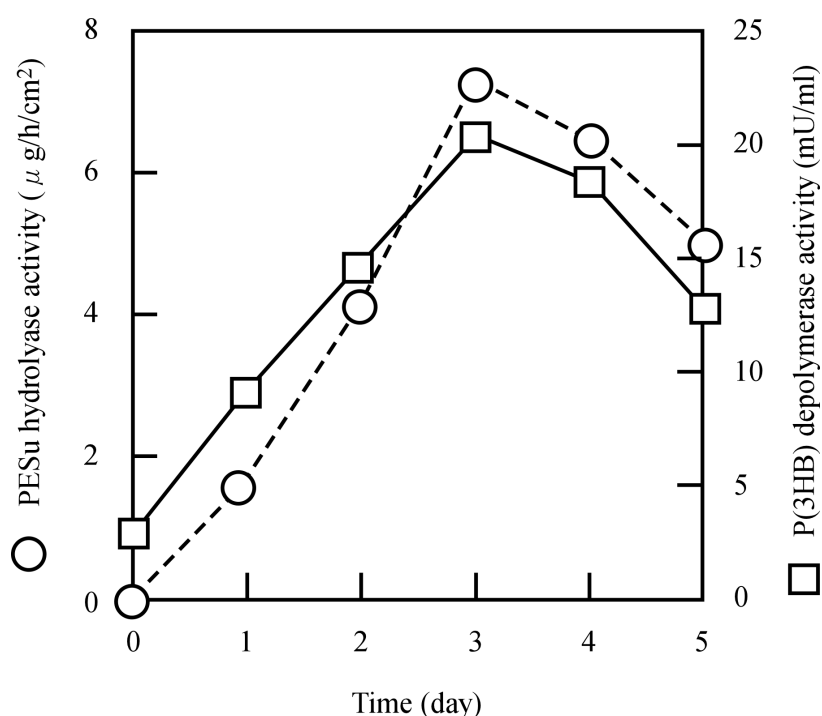


Figure 2-9. PESu hydrolase and P(3HB) depolymerase activities in the culture supernatant of *A. clavatus* NKCM1003. The strain was aerobically cultivated in the minimum medium at 30 °C for 0–5 days.

(2) NKCM 1 0 0 3 株由来PESu分解酵素の精製

PESu基本培地で増殖させたNKCM 1 0 0 3 株の培養上清から、NKCM 1 0 0 3 株由来PESu分解酵素を、疎水性カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。Figure 2-10は、酵素活性と蛋白質溶出曲線を示している。PESu分解活性ピークの溶出容量は、P(3HB)分解活性のそれとほぼ一致していた。活性の確認された画分を分取し、濃縮および透析し、精製酵素標品とした。

精製した酵素は、ドデシル硫酸ナトリウム電気泳動 (SDS-PAGE) によって電気泳動的に均一であることが確認された (Figure 2-11)。本酵素の分子量は、SDS-PAGEから約 57,000 と決定された。一方、本酵素の等電点は、pH 5.6 であることが明らかとなった。

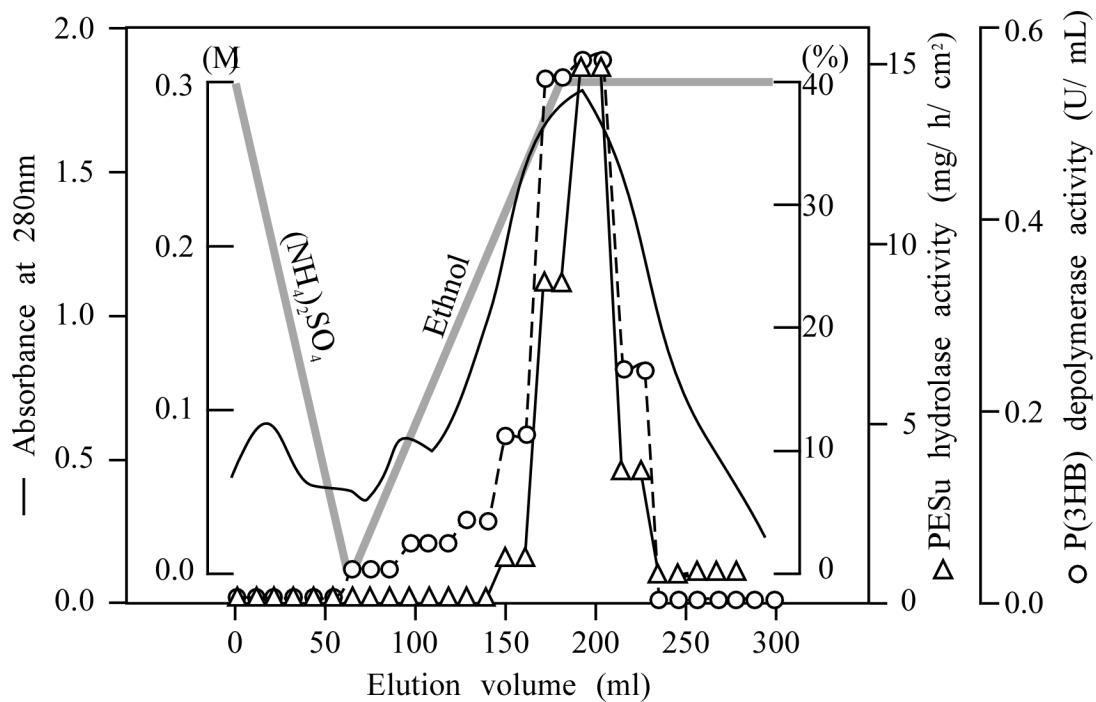


Figure 2-10. Elution profile of PESu hydrolase. Three liters of the supernatant of *A. clavatus* NKCM1003 culture supernatant was applied to a Butyl-Toyopearl column. PESu hydrolase was eluted from the column with concentration gradients of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and ethanol. PESu hydrolase activity was determined by the weight loss method by using the PESu film. The P(3HB) depolymerase activity was determined by a turbidimetric method. After recovering the active fractions, they were concentrated with a water-absorption gel.

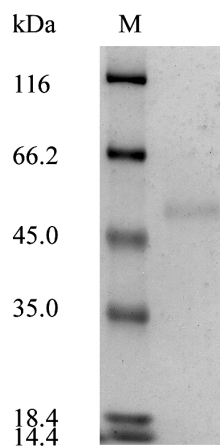


Figure 2-11. SDS-PAGE analysis of PESu hydrolase. Lane M: molecular mass markers.

Table 2-17に、酵素精製の結果を示す。最終的に、培養上清 2Lから 0.15 mgの精製酵素が得られ、回収率は 9.1 %、精製度は 10 倍となった。

Table 2-17. Purification of PESu hydrolase from strain NKCM1003.

| Step | Total activity (mg/h/cm ²) | Total protein (mg) | Specific activity (mg/h/cm ² /protein mg) ^{a)} | Recovery (%) |
|-----------------|---|-----------------------|---|-----------------|
| Supernatant | 36.75 | 17.00 | 2.16 | 100 |
| Butyl toyopearl | 3.35 | 0.15 | 22.3 | 9.1 |

a) The PESu hydrolase activity was determined by the weight loss method by using the PESu film

2.3.2.2. PESu分解酵素の性質

(1) pHおよび温度の効果

Figure2-12 (A) に示すように、本酵素はpH 5～8の間では、37°C、5時間保温後も高い活性を保持していた。また、本酵素の至適pHは、7であった (Figure2-12 (B))。一方、各温度の環境中で30分保持した後の酵素活性を測定したところ、40°C以下の保温に対して、活性を失わなかった (Figure2-13)。

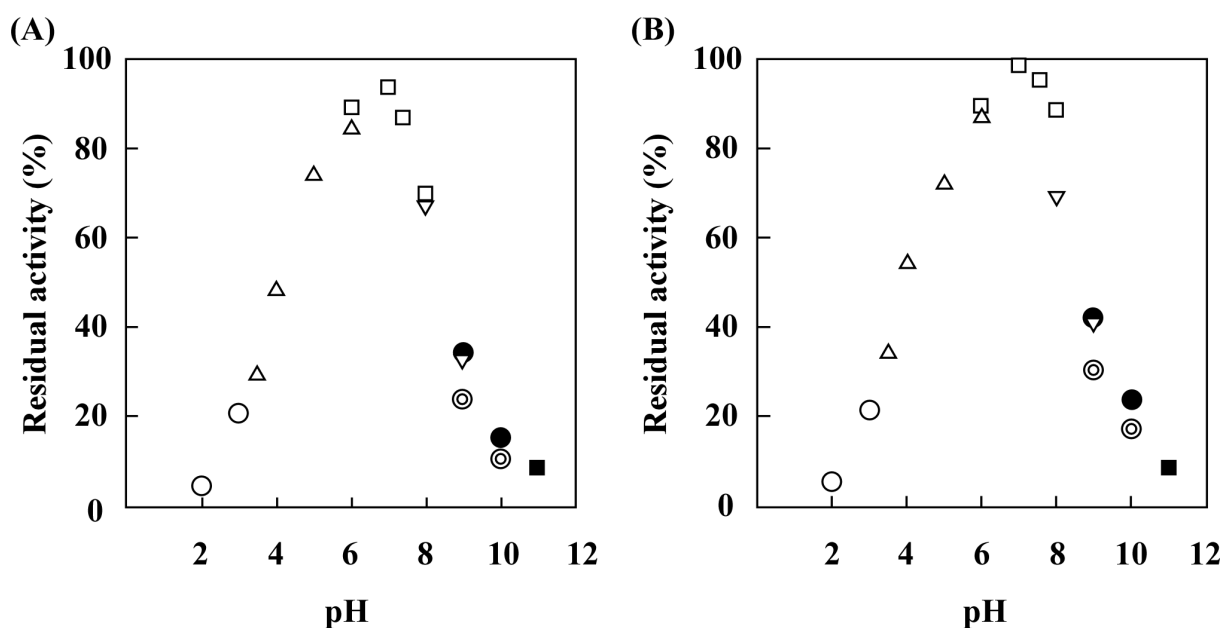


Figure 2-12 (A) Effect of pH on the stability of PESu hydrolase from strain NKCM1003. The enzyme was incubated at 37°C for 5h at different pH value, and the residual activity was measured at pH7.4. (B) Effect of pH on the activity of PESu hydrolase from strain NKCM1003.

(○;Glycine-HCl, △;Na-acetate, □;Na-phosphate, ▽;Tris-HCl, ⊙Na-borate, ●;Na-Glycine, ■;NaHCO).

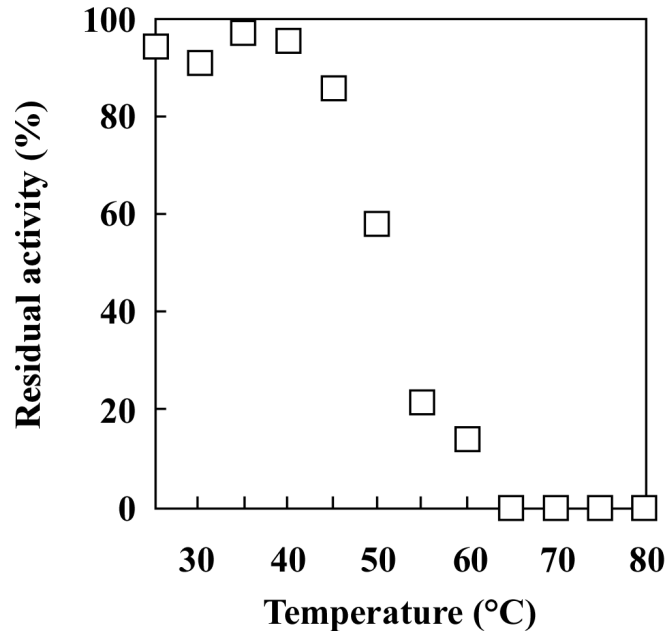


Figure 2-13 Effect of temperature on stability of PESu hydrolase from strain NKCM1003. The enzyme was incubated in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.5) for 30min at different temperatures, and the residual activity was measured.

(2) 阻害剤の効果

本酵素の阻害剤の効果調べた (Table 2-18)。その結果、本酵素は、DFP、DANおよびDTTによって完全に失活した。一方、PMSF、およびTPCKを用いた場合、活性を失わなかった。これらの結果は、本酵素が、活性中心にセリンおよびアスパラギン酸残基を持ち、さらに分子内に、ジスルフィド結合を持つことを示唆している。

Table 2-18. Inhibition of PESu hydrolase by various reagents

| Reagent | Concentration (mM) | Activity (%) |
|--------------------|--------------------|--------------|
| None | - | 100 |
| DFP | 5×10^{-4} | 0 |
| DAN | 25 | 0 |
| PMSF | 10 | 90 |
| TPCK ^{a)} | 10 | 98 |
| DTT | 5 | 0 |

The enzyme was incubated with the reagent in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, at 30 °C for 60 min and then assayed. The activity in the absence of any reagent is taken as 100%.

a) Incubated in 0.1M sodium formate, pH 5.5, containing 12.5 mM CuCl₂

(4) 基質特異性

本酵素の基質特異性を調べた (Figure 2-14)。本酵素は、PESuの他にP(3HB)、P(3HB-co-14mol%3HV)、P(3HB-co-5mol%4HB)、およびP(3HB-co-10mol%3HHx)フィルムを分解した。一方、PBSu, PCL、およびPBSAなどは分解しなかった。

本酵素の分解する基質の一次構造の特徴は、2つのカルボニル炭素に挟まれた主鎖が、3もしくは4の、炭素原子あるいは酸素原子からなるポリエステルであった。この基質特異性は、P(3HB)分解酵素 (*P. stutzeri*、および*D. acidovorans*由来の酵素)のそれと類似している^{16,34-36}。

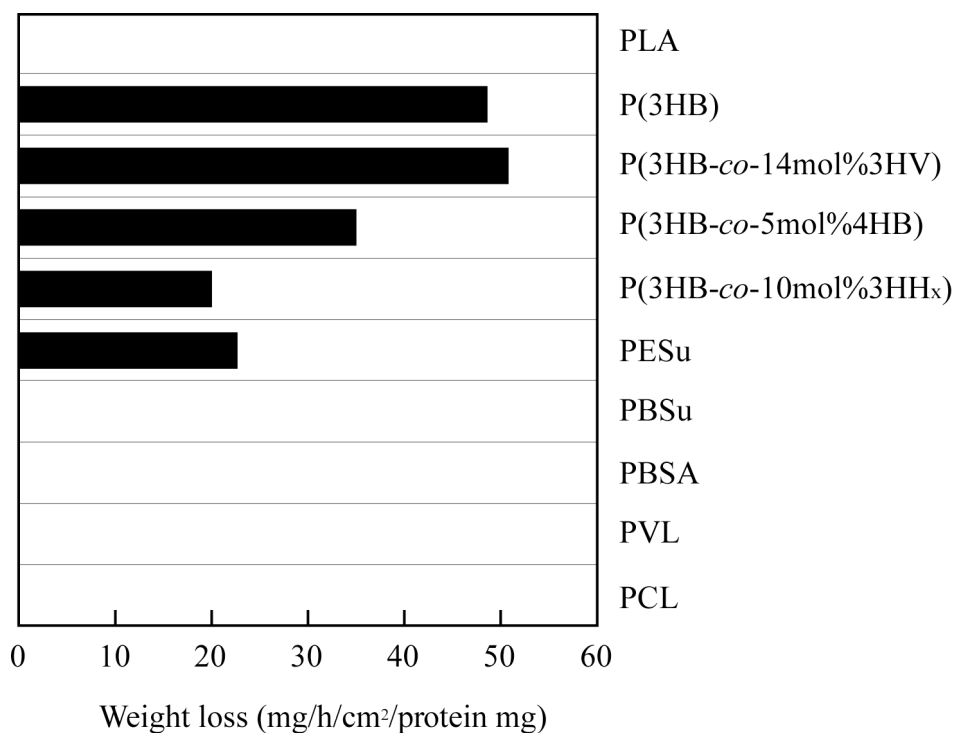


Figure 2-14. Substrate specificity of PESu hydrolase. Ten polyester films (1 × 1 × 0.15 cm) were used as the substrate. The reaction mixture contained a film, enzyme, and 1 mL of phosphate buffer (pH 7.4) in a small bottle. Enzymatic degradation was performed at 37 °C for 24 h. The activity was expressed as the weight loss of the film per unit surface area per hour (mg/cm²/h).

また、本酵素は、PNPAやPNPBなどの水溶性エステル基質をよく分解したが、リパーゼ活性を、ほとんど示さなかった (Table2-19)。さらに本酵素は、高いP(3HB)グラニューール分解活性を示した。これらの結果を総合的に判断して、本酵素は、P(3HB)分解酵素の一種であると結論付けた。

Table 2-19 Substrate specificity of purified PESu hydrolase from strain NKCM1003.

| Substrate | Specific activity (U/protein mg) |
|----------------|----------------------------------|
| P(3HB) granule | 22.4 |
| Lipase | 0.0128 |
| PNPA | 0.39 |
| PNPB | 7.2 |

(3) 分解産物の同定

PESuの酵素分解産物を、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析 (LC-MS) を用いて調べた。分解産物として、S (分子量: 118)、ES (162)、ESE (206)、SES (262)、ESES (306)、ESESE (350)、SESES (406)、ESESES (450)、ESESESE (494)、SESESES (550)、ESESESES (594)、ESESESESE (638)、SESESESES (694)、ESESESESES (722)、ESESESESESE (782) およびSESESESESES (838) が検出された (S: コハク酸ユニット、E: エチレングリコールユニット)。これらの中で、ES、ESE、SES、およびESESが主な分解産物として検出された (Table2-20, Figure2-15)。

P(3HB)分解酵素は、基質として少なくとも3つのモノマーユニットを認識し、エステル結合の酵素加水分解速度は、ポリマー鎖におけるセカンド及びサードモノマーユニットのR2とR3に強く依存する⁴²⁾。R2の主鎖の炭素鎖の長さは、活性部位が基質を容易に結合するために、3あるいは4の炭素原子に限定されるかもしれない。また、*Pseudomonas stutzeri*由来のP(3HB)分解酵素 (PhaZ_{Pst}) の4つのサブサイトは、PESuダイマー (SESE) と3HBテトラマーの構造が類似しているため (Figure2-15)、PESuを基質として認識すると考えられている^{35,41)}。さらに、PhaZ_{Pst}によるPESuの主な酵素加水分解産物は、PESu分解酵素による主な加水分解産物と同じ、ESE、ESESである³⁵⁾。これらの結果から、NKCM1003由来のPESu分解酵素と*P. stutzeri*由来のP(3HB)分解酵素のサブサイトの基質認識は、類似していることが予想される。

Table2-20. Molecular weight and structure of main water-soluble products from PESu.

| Oligomer ^{a)} | Molecular weight | Structure |
|------------------------|------------------|-----------|
| ES | 162 | |
| ESE | 206 | |
| SES | 262 | |
| ESES | 306 | |

a) S; succinic acid, E; ethyleneglycol

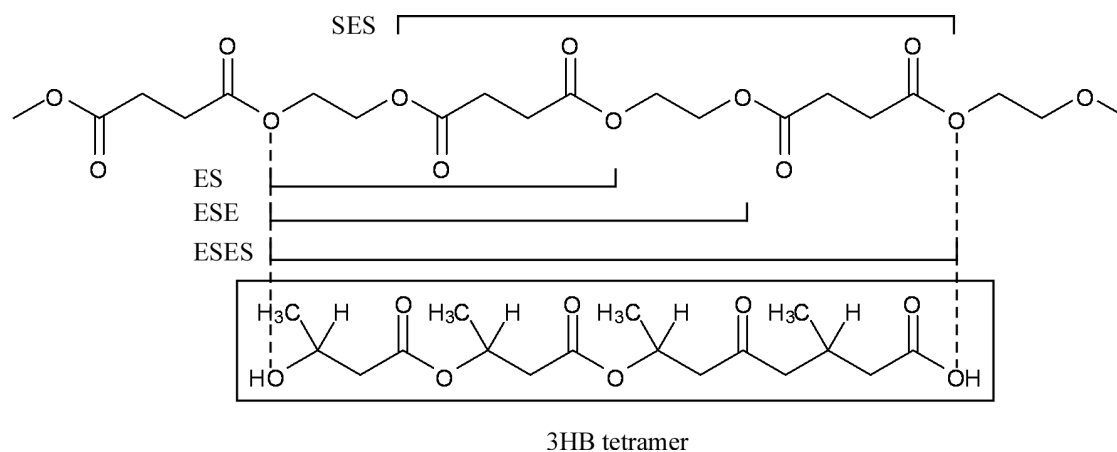


Figure 2-15. PESu hydrolytic pattern.

(5) 速度論的解析

濁度法によって、本酵素のP(3HB)酵素加水分解機構を速度論的に解析した。Figure 2-16に加水分解速度と酵素濃度の関係を示す。本酵素の加水分解速度の最大値は、酵素濃度がおよそ4.0 $\mu\text{g/ml}$ のときに認められ、酵素加水分解速度は、酵素濃度がそれ以上になると徐々に減少した。

P(3HB)の酵素加水分解反応は、酵素が基質に吸着する反応と、酵素が高分子鎖を加水分解する反応から構成されている。そのため、酵素が基質に対して過剰に存在する場合、触媒ドメインが基質表面に接近しにくくなり、加水分解速度は低下する³¹⁾。

Table2-20は、2.3.1.4 (7)の(1)式から決定したNKCM 1 0 0 3株由来PESu分解酵素、*P.funiculosum*由来のP(3HB)分解酵素¹⁵⁾、および*Pseudomonas stutzeri*由来のP(3HB)分解酵素³⁶⁾の速度定数 k_s 、および吸着平行定数 K 値を示す。 K 値の比較から、PESu分解酵素は、 PhaZ_{Pfu} と比較してP(3HB)表面との親和性が高いことが明らかとなった。PESu分解酵素の分子量は、基質結合ドメインを持たない PhaZ_{Pfu} よりも分子量が大きいことから、PESu分解酵素の比較的高い表面親和性は、基質結合ドメインの存在によることが示唆された。一方、 PhaZ_{Pst} のP(3HB)

親和性はPESu分解酵素のそれよりも高かった。これはバクテリア由来P(3HB)分解酵素の基質結合ドメインが、カビ由来P(3HB)分解酵素の基質結合ドメインよりも高い親和性を持つことを示唆している。これらの結果から、PESu分解酵素はマルチドメイン酵素であると考えられる。

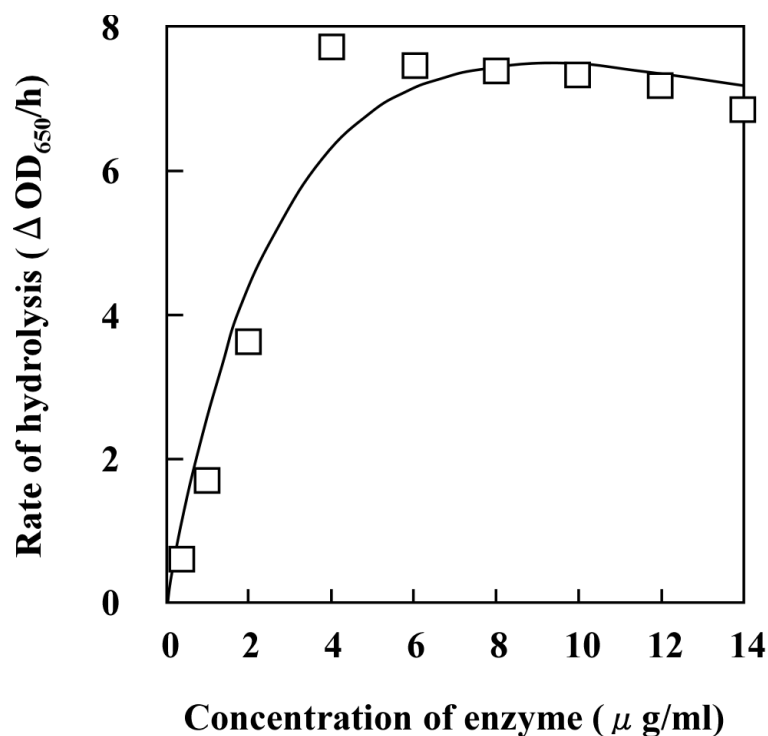


Figure 2-16. Effect of enzyme concentration on the rate of P(3HB) degradation at 37°C during enzymatic degradation. Reaction mixture contained 50mM Tris-HCl (pH7.5), 400μg of P(3HB) granule, 1mM CaCl₂, and 0.4-14μg of enzyme. The decrease in turbidity of P(3HB) was measured photometrically (650nm) at 37 °C.

Table 2-20. Kinetic parameters of enzymes.

| Strain | Enzyme | K (mL/μg) | ks (U) |
|--------------------------------------|---------------------|-----------|--------|
| <i>A.clavatus</i> NKCM1003 | PESu hydrolase | 0.11 | 0.50 |
| <i>P.funiculosum</i> IFO6354 | PhaZ _{Pfu} | 0.06 | 0.20 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> JCM10168 | PhaZ _{Pst} | 0.17 | 0.52 |

2.4. まとめ

自然環境中より20株のPESu分解真菌を単離した。単離株の基質特異性を調べた結果、すべてのPESu分解真菌がP(3HB)にも分解活性を示した (Table2-11)。単離株について遺伝学的解析を行った結果、PESu分解真菌は、P(3HB)分解真菌と関連していた (Figure2-4)。培養上清の活性測定、およびザイモグラムの結果、PESu分解活性が検出されたすべての培養上清においてP(3HB)分解活性が示された (Table2-15、Figure2-8)。これらの結果から、PESu分解酵素は、P(3HB)分解酵素であることが示唆された。

PESu分解単離株NKCM1003株のポリエステル分解活性の誘導パターンを、P(3HB)分解真菌である*P. funiculosum*と比較した。NKCM1003株は、PESuおよびP(3HB)存在下でPESu分解活性とP(3HB)分解活性の両方を示した。一方、*P. funiculosum*は、PESuを唯一の炭素源とした場合、P(3HB)分解酵素を分泌しなかった。この結果から、構成的にP(3HB)を分泌するPESu分解真菌NKCM1003株は、自然環境中においてPESuの分解に大きく寄与することが示唆された (Table2-13)。

NKCM1003株から、PESu分解酵素を精製した。本酵素は、分子量57000、等電点の5.6の単一ポリペプチドであった (Figure2-11)。本酵素は、P(3HB)分解活性を有しており、さらに、サブサイト構造および基質特異性が、P(3HB)分解酵素と類似していた (Figure2-15、Figure2-16)。これらのことより、本酵素が、P(3HB)分解酵素であると結論付けた。

参考文献

- [1] Thompson R. C., Olsen Y., Mitchell R. P., Davis A., Rowland S. J., John A. W. G McGonigle D., Russell A. E. *Science*, **2004**, 304: 838.
- [2] Doi Y. (1990) "Microbial Polyesters". VCH Publishers, New York
- [3] Fujimaki T. *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 209.
- [4] Gross R.-A., Kalra B. *Science*, **2002**, 297, 803.
- [5] 井上義夫監修. (2002) グリーンプラスチック最新技術. シーエムシー出版.
- [6] Doi Y., Kasuya K., Abe H., Koyama N., Ishiwatari S., Takagi K., Yoshida Y. *Polym. Degrad. Stab.*, **1996**, 51, 281.
- [7] Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J., Kersters K., *FEMS Microbiol Rev.*, **1992**, 103, 317.
- [8] Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59, 3233.
- [9] Kasuya K., Takagi K., Ishiwatari S., Yoshida Y., Doi Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 327.
- [10] Tansengco M. L., Tokiwa Y., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 12, 133.
- [11] Tezuka Y., Ishii N., Kasuya K., Mitomo H., *Polym. Degrad. Stab.*, **2004**, 84, 115.
- [12] Latge J. P., *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, 12, 310.
- [13] Miyazaki S., Takahashi K., Shiraki M., Saito T., Tezuka Y., Kasuya K., *J. Polym. Environ.* **2002**, 8, 175.
- [14] Brucato C.L., Wong S.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, 290 (2), 497.
- [15] Hisano T.; Kasuya K.; Tezuka Y.; Ishii N.; Kobayashi T.; Shiraki M.; Oroudjev E.; Hansma H.; Iwata T.; Doi Y.; Saito T.; Miki K. *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 993.
- [16] Kasuya K., Ohura T., Masuda K., and Doi Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1996**, 24, 329.
- [17] Kasuya, K.; Mitomo, H.; Nakahara, M.; Akiba, A.; Kudo, T.; Doi, Y. *Biomacromolecules*. **2000**, 1, 194.
- [18] Pablo A.-N., Aurelio A.-V., Carmen C.-C., Arturo F.-C., Everardo L.-R., Carlos C.-M., *Focus*, **2000**, 22, 14.
- [19] White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press Inc; 1990. p315.
- [20] Saitou N., Nei M., *Mol Biol Evol*, **1987**, 4, 406.
- [21] Tokiwa Y., Suzuki T. *Nature*, **1977**, 270, 76.

- [22] Tokiwa Y. Suzuki T., *Agric. Biol. Chem.*, **1978**, 42, 1071.
- [23] Tokiwa Y., Suzuki T. *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, 1323.
- [24] Guarro J., Gene J., Stchigel A. M., *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, 12, 454.
- [25] Thomas, M. Scherer; R. Clinton Fuller; Robert, W. Lenz; Steve Goodwin. *Polym. Degrad. Stab.* **1999**, 64, 267.
- [26] Kim, D.H.; Rhee, Y.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 300.
- [27] Koyama N., Doi Y., *Can. J. Microbiol.*, **1995**, 41(Suppl. 1), 316.
- [28] Kumagai, Y.; Kanesawa, Y.; Doi, Y. *Macromol. Chem.* **1992**, 193, 53.
- [29] Giuliano, B.; Donzelli, G.; Harman, G. E. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 61, 5643.
- [30] Thomsson, E.; Larsson, C., Albers, E.; Nilsson, A.; Franze'n, C. J.; Gustafsson, L. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 3251.
- [31] Kasuya K., Inoue Y., Yamada K., and Doi Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1995**, 48, 167.
- [32] Laemmli U.K., *Nature.*, **1970**, 227, 680.
- [33] Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248.
- [34] Gan, Z.; Abe, H.; Doi, Y. *Biomacromolecules.* **2000**, 1, 713.
- [35] Iwata, T.; Doi, Y.; Isono, K.; Yoshida, Y. *Macromolecules.* **2001**, 34, 7343.
- [36] Ohura, T.; Kasuya, K.; Doi, Y. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 65, 189.
- [37] Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1988**, 28, 330.
- [38] H. Mitomo, W.-C. Hsieh, K. Nishiwaki, K. Kasuya, Y. Doi, *Polymer*, **2001**, 42, 3455.
- [39] E. Shimamura, K. Kasuya, G. Kobayashi, T. Shiotani, Y. Shima, Y. Doi, *Macromolecules*, **1994**, 27, 878.
- [40] M. Aubin, R.E. Prud'homme, *Polymer*, **1981**, 22, 1223.
- [41] Ohura T, Kasuya K, Doi Y. *Appl Environ Microbiol* **1999**, 65, 189.
- [42] Abe H., Doi Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1999**, 25, 185.

第3章

ポリブチレンサクシネート (PBSu) 分解微生物の 探索とその性質.

3.1.緒言

現在、合成プラスチックは、幅広い分野で使用され、我々の生活において必要不可欠な材料となっている。一方、合成プラスチックの多くは、自然環境中で分解しない。その結果、廃プラスチックは年々蓄積し、これをどのように処理するべきかが大きな課題の1つとなっている。このような背景から、自然環境中で微生物などの作用によって分解する生分解性プラスチックが注目されている。

近年、合成技術の改良により、実用に耐える高分子量の脂肪族ポリエステルが得られるようになり、化学合成脂肪族ポリエステルは、環境低負荷材料に適した生分解性素材として注目されるようになってきた^{1,2)}。化学合成脂肪族ポリエステルは、微生物由来の生分解性プラスチックと比較して、生産コストがより低いため、いくつかの化学メーカーによって生産、販売されている³⁾。コハク酸と1,4-ブタンジオールの重縮合体であるポリブチレンサクシネート (PBSu) は、代表的な化学合成脂肪族ポリエステルの1つである²⁾。PBSuは、比較的高い融点、優れた加工特性、およびポリエチレンと類似した機械特性を有している。現在、PBSuは、農業用資材、包装用資材、および日用雑貨品を中心にその用途分野が広がりつつある^{2,4)}。

これまでにPBSuの分解性に関するいくつかの研究が行われてきた⁵⁻⁸⁾。自然環境中に存在するPBSu分解微生物の分布は、PCLやP(3HB)分解微生物と比較して少ない可能性が示された⁵⁻⁸⁾。また、いくつかの菌株がPBSu分解微生物として単離・特徴付けされているが⁷⁻⁹⁾、PBSuの生分解性および生分解メカニズムに関しては、まだ不明な点が多い。

PBSuを、生分解性ポリマーとして扱うためには、生分解性を明らかにする必要がある。環境中からPBSuをよく分解する微生物が単離できれば、生分解性メカニズムを明らかにでき、材料寿命予測にも役立つ。また、ポリマーを投入したコンポスト生成装置に対する添加微生物製剤としての応用も期待できる。

本章では、自然環境中から、PBSu分解微生物を単離し、同定する。さらに、分解微生物による分解酵素の生産について調べる。

3.2. ポリブチレンサクシネート (PBSu) 分解バクテリアの 探索とその性質

3.2.1. 実験

3.2.1.1. 試薬

(1) 微生物、およびベクター

実験で使用した微生物、およびベクターをTable 3-1、およびTable 3-2に示す。*Rhodococcus fascians* NBRC100625は、標準株として用いた。

(2) その他の試薬

市販の特級試薬をそのまま使用した。

Table 3-1. Bacterial strains used.

| Strain | Relevant Characteristic | Reference |
|---|--|------------|
| <i>Rhodococcus fascians</i> NBRC100625 | Type culture | 10 |
| <i>E. coli</i> DH5 α | supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZAM15) hsdR17 rec A1 endA1gyrA96 thi-1 relA1 | Toyobo |
| NKCM 8906 | PBSu-degrading bacterium | This study |

Table 3-2. Vectors used.

| Vector | Genetic Marker | Description | Reference |
|-------------|-------------------------|---------------------------------|------------|
| Plasmids | | | |
| pGEM-T easy | Amp ^r , lacZ | T-cloning vector | Promega |
| pUC18 | Amp ^r , lacZ | General cloning vector | TaKaRa |
| 16S-8901 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing 16S rDNA | This study |
| 16S-8903 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing 16S rDNA | This study |
| 16S-8904 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing 16S rDNA | This study |
| 16S-8905 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing 16S rDNA | This study |
| 16S-8906 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing 16S rDNA | This study |

3.2.1.2. PBSu分解微生物の単離法

土壌（乾燥土壌（群馬大学記念館前、長野県長野市）、湿土壌（茨城県霞ヶ浦、群馬県浅見沼、茨城県桜川、長野県千曲川、長野県にぎり川、広島県太田川）、森林の土壌（千葉県成田山、広島県広島市）、畑地（群馬県邑楽郡、群馬県吉井町））あるいは環境水（群馬県利根川、渡良瀬川、あまが池、長野県千曲川、にぎり川、広島県太田川、茨城県霞ヶ浦、および桜川）を、微生物接種源として、PBSu分解微生物を単離した。土壌1gを、10mLの滅菌生理的食塩水に懸濁し、10分間静置した。PBSu乳化固体培地（Table3-3）に、この土壌懸濁液の上清、または環境水50μLを均一に塗布した。PBSu乳化培地上で、コロニーの周辺にクリアゾーンを形成した株を、PBSu分解微生物として選択した。微生物の純化を、LB培地を用いて画線法により行った。乳化PBSuを、2.2.1.1.（2）に従って作成した。

Table 3-3. The composition of polyester emulsified medium (pH7.0).

| | |
|--|----------|
| K ₂ HPO ₄ | 4.6 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 11.6 g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g/l |
| NH ₄ Cl | 1.0 g/l |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.1 g/l |
| Yeast extract | 0.5 g/l |
| Plysurf | 0.1 g/l |
| Polyester | 2.0 g/l |

3.2.1.3. 単離株の脂肪および他のポリエステル分解能

2.2.1.4. 参照

3.2.1.4. 形態観察

2.2.1.5. 参照

3.2.1.5. 生理学・生化学的性質の決定

（1）生化学的、および生理学的性質

グラム染色とオキシダーゼの生産を、Color Gram2キット(バイオメリューバイテック社製)、アミノペプチダーゼテスト、およびオキシダーゼテスト(メルク社製)を使用して調べた。その他の生化学的テスト、および炭素源資化性テストは、グラム陰性菌同定キットAPI 20NE（バイオメリューバイテック社製）を用いた。実験手順の詳細は、マニュアルに従った。30°Cで好氣的に培養し、24時間および48時間後に、自発的反応と試薬添加による呈色反応を読み取った。

（2）ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）合成能力

（a）菌の培養

NKCM8906株、および*R. fascians* NBRC100625株を、各々液体LB培地1.5 mLに植菌し、30°Cで一晩培養した。この培養液1 mLを、1段階培地 (Table3-4) に植え継ぎ、22時間振とう培養した。その後、遠心分離 (5000 rpm、15分間、4°C) を行い、滅菌MilliQ水で洗浄し、同様に遠心分離により集菌した。この菌を、炭素源をオリーブオイル、あるいはブタン酸を用いた2段階培地 (Table3-4) で44時間振とう培養を行い、菌体ペレットを凍結乾燥させた。凍結乾燥後、乾燥菌体を秤量し、菌体内ポリエステル含率およびポリエステル組成を、ガスクロマトグラフィーを用いて分析した。

(b) ガスクロマトグラフィー分析

ポリエステルの収率および組成をガスクロマトグラフィー(GC)で定量するため、得られた乾燥菌体に含まれるポリエステルを、メタノリシスによって3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルとした。まず、乾燥菌体約30 mgをねじ口試験管に入れた。次に、1.7 mLのメタノールと0.3 mLの濃硫酸と2 mLのクロロホルムを加え、口を密閉した後に100°C、140分間メタノリシスを行った。その後、室温まで冷却し、1 mLの蒸留水を加えて1分間激しく振とうした。静置後2層に分離した下層 (クロロホルム層) をピペットで分取し、内部標準物質として等量の0.1%カプリル酸メチル溶液と混合したものを測定サンプルとした。GCによる測定条件は、ディテクター温度250°C、インジェクター温度280°C、カラムオープン初期温度70°C、初期温度保持時間5分、カラム上昇速度10°C/min、カラム最終温度280°C、昇温最終温度保持時間5分で行った。カラムはニュートラボンドー1 (GLサイエンス社製、30 m×2.5 mm) を用い、ピーク検出はFID法によった。

Table 3-4. The compositions of media

| 1st stage culture (pH7.2) | | 2nd stage culture (pH7.0) | |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|---------|
| Yeast extract | 10g/l | KH ₂ PO ₄ | 1.5g/l |
| Tryptone pepton | 10g/l | K ₂ HPO ₄ | 1.5g/l |
| Beef extract | 5g/l | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.25g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 1.5g/l | Yeast extract | 0.05g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 1.5g/l | Tween85 | 0.5g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1g/l | Carbon source | 10g/l |

3.2.1.6. 酵素プロファイル

API ZYM(ビオメリュー・バイテック社製)を用いてPBSu分解バクテリアの酵素プロファイルを作成した。PBSu分解バクテリアのコロニーを、白金耳に1ループ取り、2mLの0.85%滅菌生理的食塩水に懸濁させた。懸濁液をAPI ZYMプレートのカップに接種し、37°Cで約4時間保温した。ZYM A試薬とZYM B試薬を、カップに1滴ずつ添加した後、蛍光灯をコントロールカップ溶液の黄色い発色がなくなるまで照射した。呈色反応は、判定表に基づいて評価した。

3.2.1.7. ゲノムDNA (gDNA) 抽出^{11,12)}

NKCM 8906株、および*R. fascians* NBRC 100625株を、各々LB培地 (Table3-5) 100 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。対数増殖期初期にある菌体を遠心分離 (5000 rpm、10分間、4°C) により回収した。得られた菌体を、TEバッファー (Table2-6) 8.505 mLに懸濁した。懸濁液にリゾチーム85 mgを加え、37°Cで9時間保温した。その後、10% SDS 450 μL、Proteinase K 45 μLを加え、50°Cで1晩保温した。続いて等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1, v/v) を加え、室温で30分間穏やかに振とうした。その後、遠心分離 (8000 rpm、30分間、室温) により上層を回収した。回収した上層に、等量のイソプロパノール、1/10倍量の5 M NaClを加え、ゲノムDNAを沈殿させて回収し、70%エタノール1 mLですすいだ。RNA処理は、2.2.1.7. (1)と同様に行った。

3.2.1.8. グアニン+シトシン (G+C) 含率解析¹²⁻¹⁵⁾

(1) ヌクレオシド試料の作製

0.4 mg/mLに調製したgDNA溶液20 μLを100°Cで5分間保ち、氷水中で急冷した。このゲノム溶液に、ヌクレアーゼP1溶液 (Table3-5) 20 μLを加え、50°Cで1時間保ち、ヌクレオチドとした。これにエビアルカリフォスファターゼ (ベーリンガー社製) 1 μLを加えて、37°Cで1時間保ち、脱リン酸化することにより、ヌクレオシド試料とした。ヌクレオシド試料を、すみやかに高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。

(2) 高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

HPLCシステムは、島津社製のものを使用した。カラムは、LICHROSPHER 100 RP-8 (C8、Merk社製、0.4 × 2.5 cm) を用いた。試料は、島津社製のオートインジェクター (SIL-10AD) を用いて、50 μLずつ注入した。溶出は、流速1 mL/minで、溶媒として0.02 M NH₄H₂PO₄ 溶液 (pH無調整) -アセトニトリル (20:1, v/v) を用いて行った。検出は、島津社製のSPD-10Aを用いて、260 nmにて行った。

3.2.1.9. イソプレノイドキノン解析^{12,16-18)}

(1) 菌体からのキノン抽出

NKCM 8906株、および*R. fascians* NBRC 100625株を、各々LB培地 (Table3-5) 200 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。遠心分離 (5000 rpm、10分間、4°C) により菌体を回収した。滅菌生理的食塩水に菌体を再懸濁し、遠心分離 (5000 rpm、10分間、4°C) により菌体を回収した。これを2回繰り返す、菌体を洗浄した。得られた菌体を凍結乾燥させた。凍結乾燥菌体約200 mgを、十分粉碎した。この粉碎菌体に、20 mLのクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を加えて浸漬し、一晩暗所に放置した。その後、これをろ過し、ろ紙上の菌体をクロロホルム-メタノールですすいで、そのろ液を集めた。続いて、このろ液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。このとき、ウォーターバスの温度は40°C以下に設定した。残渣にアセトン1.5 mLを加え、抽出した。これを2回繰り返す、

アセトン画分を、窒素ガス気流下で、200 μ Lに濃縮した。次に、TLCによる精製を行った。濃縮したアセトン溶液全量を、蛍光剤入りシリカゲルTLC (Kiesel-gel 60F254、Merck社製) にアプライした。このとき、標準物質として、ビタミンK1をあわせて展開した。展開溶媒にはヘキサン-ベンゼン-クロロホルム (5:2:1, v/v) を使用した。紫外線照射装置 (310 nm) を用いてスポットを確認し、ビタミンK1の少し上にでてきたメナキノンのスポットのシリカゲルをかきとった。これを2 mLのアセトンで2回抽出した。遠心分離により、上清を回収し、窒素ガス気流下で200 μ Lに濃縮した。

(2) 分子種の同定

精製した試料を、逆相型TLC (KC8 Octyl reversed phase、Whatman社製) を用いて、展開した。展開溶媒には、アセトン-水 (99:1, v/v) を用いた。紫外線照射装置 (310 nm) を用いて、スポットを確認した。

3.2.1.10. 脂肪酸解析^{13,19-21)}

(1) 脂肪酸メチルエステルの調製

MIDI法により脂肪酸メチルエステルを調整した。NKCM8906株、および*R. fascians*をLB培地 (Table3-5) 200 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。遠心分離 (5000 rpm、10分間、4°C) により菌体を回収した。滅菌生理的食塩水に菌体を再懸濁し、遠心分離 (5000 rpm、10分間、4°C) により菌体を回収した。これを2回繰り返し、菌体を洗浄した。この湿菌体40 mgにアルカリけん化液 (Table3-5) 1 mLを加えた。これを100°Cで5分間保った後、5~10秒間よく振り、さらに100°Cで25分間保温した。その後、流水で温度を下げ、メチル化試薬 (Table3-5) 2 mLを加え、80°Cで10分間保温した。流水で温度を下げた後、抽出用溶媒 (Table3-5) 1.25 mLを加え、室温で10分間ゆっくり攪拌した。その後、水相を取り除き、残った溶媒相に洗浄液 (Table3-5) 3 mLを加え、室温で5分間ゆっくり攪拌した。この溶媒相の2/3を取り、ガスクロマトグラフィー (GC) 用の分析試料とした。

(2) ガスクロマトグラフィー (GC) 解析

GCによる測定条件は、ディテクター温度260°C、インジェクター温度255°C、カラムオープン初期温度150°C、初期温度保持時間4 min、カラム昇温速度4°C/min、カラム最終温度250°C、昇温最終温度保持時間20 minである。カラムは、ニュートラボンドー1 (GLサイエンス社製、30×0.25 mm) を使用した。ピークの検出はFID法によった。ピークの同定には、バクテリア同定用標準物質バクテリア酸メチルエステル (BAME) ミックス (スペルコ社製) を用いた。

Table 3-5. The composition of solutions

| LB medium (pH6.0) | | Nuclease P1 solution | |
|----------------------------------|--------|-------------------------|----------|
| Tryptone Peptone | 10 g/l | Nuclease P1 | 0.1mg/ml |
| Yeast extract | 5 g/l | CH ₃ COONa | 40mM |
| NaCl | 5 g/l | ZnSO ₄ | 2mM |
| Alkaline saponification solution | | Washing solution | |
| NaOH | 15g | NaOH | 1.2g |
| Methanol | 50ml | MilliQ water | 100ml |
| MilliQ water | 50ml | Extraction solvent | |
| Methylation reagent | | Hexane | 50ml |
| 6N HCl | 130ml | tert-Butyl methyl ether | 50ml |
| Methanol | 110ml | | |

3.2.1.11. 遺伝系統学的解析^{12, 22)}

PBSu分解バクテリアの16S rDNAをPCR法により増幅した。使用したプライマーは、16Sf (5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3')、16Sr (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3')、であり、これらを各々20 pmol用いた。PCRの条件は、Table2-7 参照。PCR産物を、pGEM-T Easy Vector (プロメガ社製) に連結した (Table2-8)。新たに構築されたプラスミドをpGEMT16Sと命名した。この組み換えプラスミドを*E.coli* DH5 α に形質転換した。形質転換株の培養は、2.2.1.7 (2)と同様に行われた。得られたクローンをシーケンシング解析した。シーケンシングサンプルはDTCS Quick Start kit(Beckman Coulter社製)を用いてPCR法により調製された(2.2.1.10(6)参照)。Table3-6およびFigure3-1は、PCRに用いたプライマー配列および遺伝子マップを示している。シーケンシングには、CEQ2000(Beckman Coulter社製)を用いた(2.2.1.10(6)参照)。

Table. 3-6. Primer used for sequencing in this study.

| | |
|------|---------------------|
| M13f | GTAAAACGACGGCCAG |
| M13r | CAGGAAACAGCTATGAC |
| 16Sf | GTTTGATCATGGCTCAG |
| 16Sr | TACCTTGTTACGATTCA |
| 357r | CTCCTACGGGAGGCAGCAG |
| 522f | CAGCMGCCGCGGTAATWC |
| 786r | CTACCAGGGTATCTAATC |
| 943r | ACCGCTTGTGCGGGCCC |

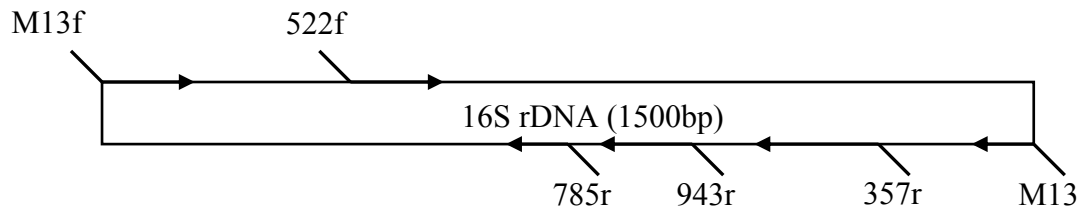


Figure. 3-1 Position of primers used for sequencing.

3.2.1.12. 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

2.2.1.6参照

3.2.1.13. PBSu分解バクテリアによるポリエステルフィルムの分解

(1) さまざまな炭素源下における菌体増殖度合およびPBSu分解活性分泌

NKCM8906株を、LB培地1.5 mLに植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。さまざまな炭素源を0.2%含む基本培地 (Table3-3) およびLB培地3 mLに、PBSuフィルム (10×10×0.15 mm) および前培養液30 μLを添加し、30°Cで10日間振とう培養した。培養上清に分泌されるPBSu分解活性は、重量減少法によって決定した。すべての実験は、各3回行った。

(2) ポリエステルフィルム分解能力

NKCM8906株に関して、6種類のポリエステルフィルム (PBSu、PESu、PBSA、P(3HB)、PCL、およびPLA) の分解能を調べた (2.2.1.8. (2) 参照)

(3) リパーゼ活性^{23,24)}

リパーゼ活性は滴定法によって決定した。1 mLのオリーブオイル、4 mLの50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH7.8)、50 μLの1 M CaCl₂溶液、および50 μLの培養上清をサンプル瓶に入れ、30°Cで30分間攪拌した。10 mlの95%エタノールを添加することで反応を停止した。反応の間に遊離した脂肪酸量は、1 mMのKOH溶液を滴定し、pH7.8に合わせるまでの量から算出した。溶液のpH調整には、accumet[®] AB15 pH mater (Fisher scientific社製) を用いた。1ユニットは、1分間当たり1 μmolの脂肪酸を遊離させる酵素量とした。

3.2.2. 結果と考察

3.2.2.1. PBSu分解微生物の単離

各地の土壌、および環境水を微生物接種源としてPBSu乳化固体培地を用いたクリアゾーン法により、10株のPBSu分解バクテリアを単離した (Table3-7、Figure3-2)。このことから、淡水と土壌環境中には、PBSu分解バクテリアが分布していることがわかった。アミノペプチダーゼテストに基づいて、10株のPBSu分解微生物のうち、7株はグラム陽性菌、3株をグ

ラム陰性菌であると判断した。

Table3-7は、単離株の種々のポリエステル、およびオリーブオイル乳化培地上でのクリアゾーン形成能、およびフィルム分解速度を示している。すべてのPBSu分解細菌が、PLAおよびP(3HB)乳化培地上にクリアゾーンを形成しなかった。一方、すべてのPBSu分解微生物が、PCL、PBSA、およびオリーブオイル培地上にクリアゾーンを形成した。PCLおよびPBSAは、リパーゼによって分解することが知られている²⁵⁻²⁹)。また、固体PBSAおよび乳化PBSuを分解する*Acidovorax delafieldii* strain BS-3由来のPBSu分解酵素は、リパーゼ活性があり、酵素蛋白質は、*Moraxella*や*Streptomyces*属のリパーゼと相同性があった^{30,31})。これらの結果を総合的に判断すると、本研究において単離されたPBSu分解微生物が分泌するPBSu分解酵素は、リパーゼ様酵素である可能性が高い。

単離した10株のPBSu分解細菌のうち、9株がPBSuフィルムを分解した(Table3-6)。単離株によるPBSuフィルムの分解速度は、0.08~0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。NKCM 8906株は、PBSu分解細菌中、最も高いPBSuフィルム分解活性を示した(0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)。さらに、NKCM 8906株の特徴を詳細に調べた。

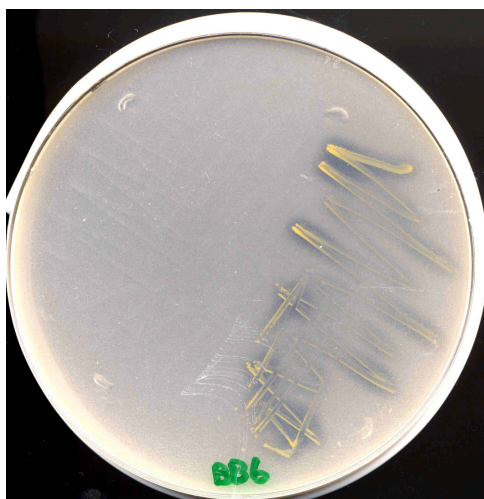


Figure 3-2. The clearing zone on the PBSu emulsified plates formed by PBSu-degrading bacterium.

Table 3-7. The ability of PBSu film degradation and clear zone formation on the plates containing polymer emulsions or olive oil by PBSu-degrading bacteria.

| Strain | PBSu | PESu | PBSA | P(3HB) | PCL | PLA | Olive oil | Weight loss of PBSu film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Source |
|----------|------|------|------|--------|-----|-----|-----------|---|-------------------------------|
| NKCM8901 | ++ | - | ++ | - | +++ | - | +++ | 0.33 | Dry soil at Gunma university |
| NKCM8902 | +++ | +++ | ++ | - | +++ | - | ++ | 0.25 | Soil at Mt. Narita |
| NKCM8903 | ++ | - | ++ | - | +++ | - | +++ | 0.25 | Freshwater from Tone river |
| NKCM8904 | + | - | + | - | + | - | ++ | 0.38 | Freshwater from Tone river |
| NKCM8905 | +++ | +++ | +++ | - | +++ | - | ++ | 0.71 | Wet soil at Kasumigaura |
| NKCM8906 | ++ | ++ | +++ | - | +++ | - | +++ | 0.80 | Wet soil at Kasumigaura |
| NKCM8907 | ++ | +++ | ++ | - | ++ | - | ++ | 0.16 | Freshwater from Chikuma river |
| NKCM8908 | +++ | +++ | +++ | - | +++ | - | +++ | 0.16 | Dry soil at Gunma university |
| NKCM8909 | ++ | +++ | ++ | - | +++ | - | ++ | 0.08 | Freshwater from Sakura river |
| NKCM8910 | ++ | +++ | ++ | - | +++ | - | +++ | 0 | Soil at mountain |

a) Each strain was incubated at 30 °C on mineral medium containing PBSu film. After 10 days the film was pick up, washed with distilled water, and weighed. Weight loss was calculated by subtracting the weight of degraded film from initial weight of the film.

+++; A large clearing zone was formed around the isolate.

++; A midium clearing zone was formed around the isolate.

++; A small clearing zone was formed around the isolate.

-; No clearing zone was formed around the isolate.

3.2.2.2. PBSu分解バクテリアの特徴付け

(1) 形態学的特徴

単離バクテリア中、最も高いPBSuフィルム分解活性を示したNKCM8906株の形態を、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した (Figure3-3)。PBSu分解バクテリアNKCM8906株は、コリネ型の形態で、菌の直径はおよそ0.4~0.6 μm程度であることがわかった。これらの特徴は、*Corynebacterium*属や*Rhodococcus*属に共通して見られるものと一致していた。

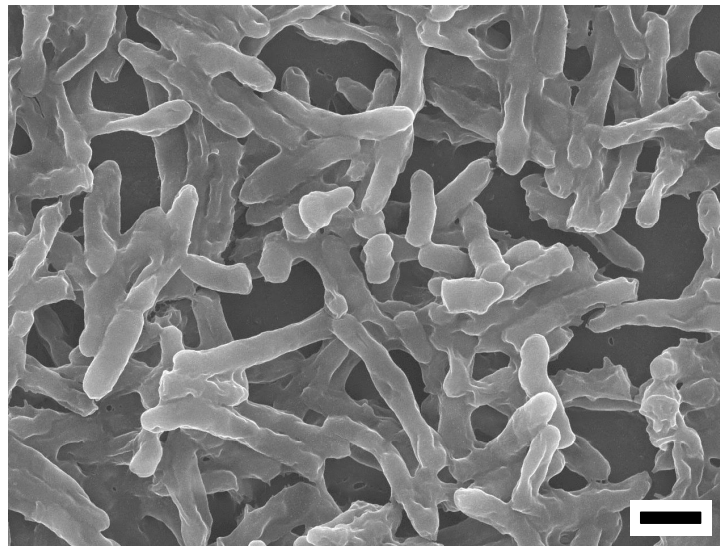


Figure 3-3. SEMs of strain NKCM8906. The black bars indicate 1 μm in length

(2) 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

培養温度4~60℃において、NKCM8906株の菌体増殖、およびクリアゾーン形成能を調べた (Table3-8)。NKCM8906株は、4℃および40℃以上では増殖せず、20~30℃で最もよく増殖した。また、菌体増殖が確認されたすべての温度において、乳化PBSu培地上にクリアゾーンを形成した。標準株として用いた*R. fascians*も、単離株と同様に、4℃および40℃以上では増殖せず、20~25℃で最もよく増殖した。一方、*R. fascians*は、単離株と比較してPBSuに対する分解活性が低く、40℃では乳化PBSu培地上にクリアゾーンを形成しなかった。この結果から、NKCM8906株は、*R. fascians*と同様に、増殖の至適温度が20~30℃であり、40℃以上では増殖しない中温性のバクテリアであることがわかった。また、標準株と比較して、単離株の方が広い温度域でPBSuに対して分解活性を示すことがわかった。

Table 3-8. Effect of temperature of the growth and clearing zone formation on the PBSu emulsified plates of strain NKCM8906.

| Temperature | NKCM 8906 | | <i>R. fascians</i> NBRC100625 | |
|-------------|-----------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | Growth | Clearing zone formation | Growth | Clearing zone formation |
| 4 °C | - | - | - | - |
| 20 °C | ++ | + | ++ | + |
| 25 °C | +++ | ++ | ++ | + |
| 30 °C | ++ | ++ | + | + |
| 35 °C | + | + | + | - |
| 40 °C | - | - | - | - |
| 45 °C | - | - | - | - |
| 50 °C | - | - | - | - |
| 55 °C | - | - | - | - |
| 60 °C | - | - | - | - |

+++ : means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++ : means not growing, a clearing zone was not formed.

+ : means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

- : means growth was good, or a medium clearing zone was formed

(3) NKCM 8906株の生化学・生理学的性質

PBSu分解バクテリアNKCM 8906株の生理学的テスト、生化学的テスト、キノン解析、およびゲノムDNAのG+C含率解析を行った (Table3-9)。このとき、*R. fascians* NBRC100625を標準株として用いた。本菌株は、グラム陽性であり、その生化学的、および生理学的性質は、*R. fascians*と類似していた。呼吸の電子伝達系の補酵素であるイソプレノイドキノンの種類は、*R. fascians*と同様のイソプレノイド鎖のイソプレン単位数が8のメナキノン (MK-8)であった^{32,33)}。また、ゲノムDNAのG+C含率は、65.9%であった。一方、標準株として用いた*R. fascians*のgDNAのG+C含率は、66.4%であった。*R. fascians*のgDNAのG+C含率は、61~67.6%の間であることが報告されている³³⁻³⁵⁾。このことから、本菌株のgDNAのG+C含率は、*R. fascians*のそれと類似していると言える。NKCM 8906株は、オリーブオイルあるいはブタン酸を炭素源とした際、ポリヒドロキシブタン酸あるいはポリヒドロキシブタン酸とポリヒドロキシ吉草酸の共重合ポリエステルを蓄積した。一方、標準株として用いた*R. fascians*は、PHAを蓄積しなかった。

Table 3-9. Biochemical and physiological properties of strain NKCM8906.

| | NKCM8906 | <i>R. fascians</i> NBRC100625 |
|-------------------------------------|----------|-------------------------------|
| Characteristics | | |
| Gram strain | Pos. | Pos. |
| Oxidase | - | - |
| Aminopeptidase | - | - |
| Nitrate reduction | - | - |
| Oxidation of glucose to gluconate | - | - |
| Indole production | - | - |
| Arginine dehydrolase | - | - |
| Urease | + | - |
| Hydrolysis of esculin | - | - |
| Hydrolysis of gelatin | - | - |
| β -Galactosidase | - | - |
| Utilization of carbon source | | |
| Glucose | - | + |
| L-Arabinose | + | + |
| D-mannose | + | + |
| D-mannitol | + | + |
| N-Acetyl-D-glucosamine | - | + |
| Maltose | - | + |
| Gluconate | - | + |
| <i>n</i> -Capric acid | - | - |
| Adipic acid | + | + |
| dl-Maleic acid | - | + |
| Citrate | - | - |
| Phenyl acetate | - | - |
| G+C content | 65.9 | 66.4 |
| Quinone | MK-8 | MK-8 |
| PHA accumulation | + | - |

Table3-10にNKCM 8 9 0 6 株の酵素プロファイルを示す。NKCM 8 9 0 6 株および標準株として用いた*R. fascians*の両方が、Leucine arylamidase活性を示した。さらに、NKCM 8 9 0 6 株および*R. fascians*の両方が、Lipase (C4)、Esterase Lipase (C8)、およびEsterase (C4) 活性を示した。単離株は、リパーゼによって分解される、オリーブオイル、およびPCL乳化培地上にクリアゾーンを形成した。この結果は、本菌株が、リパーゼ生産株であることを示している。

Table 3-10. Enzyme production profile of strain NKCM8906

| Enzyme | NKCM8906 | <i>R. fascians</i> NBRC100625 |
|----------------------------------|----------|-------------------------------|
| Alkaline phosphatase | 1 | 1 |
| Esterase(C4) | 1 | 2 |
| Esterase lipase(C8) | 3 | 3 |
| Lipase(C4) | 1 | 1 |
| Leucine arylamidase | 5 | 5 |
| Valine arylamidase | 3 | 1 |
| Cystine arylamidase | 1 | 1 |
| Trypsine | 0 | 0 |
| Cymotrypsine | 0 | 0 |
| Acid phosphate | 1 | 1 |
| Naphtol AS-BI phosphohydrolase | 1 | 1 |
| α -galactosidase | 0 | 0 |
| β -galactosidase | 0 | 0 |
| β -gluconidase | 0 | 0 |
| α -glucosidase | 5 | 1 |
| β -glucosidase | 0 | 0 |
| N-acetyl- β -glucosamidase | 0 | 0 |
| α -manosidase | 0 | 0 |
| α -fucosidase | 0 | 0 |

Amount of free substrate; 0: none, 1: 5nmol, 2: 10nmol, 3: 20nmol, 4: 30nmol, and 5: more than 40nmol.

(4) NKCM 8906 株の菌体脂肪酸組成

NKCM 8906 株の菌体脂肪酸組成を調べた (Table 3-11)。本菌株の菌体脂肪酸は、オレイン酸 (C18:1n9c) を第一成分とし、次にパルミチン酸 (C16:0) を多く含んでいた。それ以外に、パルミトレイン酸 (C16:1n9c) やステアリン酸 (C18:0) も含んでいた。標準株として用いた *R. fascians* は、NKCM 8906 株と同様に、オレイン酸 (C18:1n9c) を第一成分とし、次にパルミチン酸 (C16:0) を多く含んでいた。本単離株の菌体脂肪酸組成において、C16:0 と C18:1、それに次いで C18:0、C16:1 が、主成分であるが、このパターンは、*Rhodococcus* 属、および *Corynebacterium* 属に特徴的に見られる^{36,37)}。

Table 3-11. Cellular fatty acid composition (% w/w) of strain NKCM8906

| Fatty acid | <i>R. fascians</i> | | Fatty acid | <i>R. fascians</i> | |
|------------|--------------------|-----------|------------|--------------------|-----------|
| | NKCM8906 | NBRC10062 | | NKCM8906 | NBRC10062 |
| | | 5 | | | 5 |
| 2-OH C10:0 | | | 2-OH C16:0 | | |
| C11:0 | | | C16:1n9c | 18.70 | 15.77 |
| C12:0 | | | C17:0 | 6.26 | 9.40 |
| 2-OH C12:0 | | | i-C17:0 | | |
| 3-OH C12:0 | | | a-C17:0 | 1.48 | 8.61 |
| C13:0 | | | C17:0 cyc | | |
| C14:0 | 5.41 | 6.17 | C18:0 | 0.93 | 0.18 |
| 2-OH C14:0 | | | C18:1n9c | 42.14 | 30.25 |
| 3-OH C14:0 | | | C18:1n9t | | |
| C15:0 | 3.19 | 10.74 | C18:2-9,12 | | |
| i-C15:0 | | | C19:0 | | |
| a-C15:0 | | 0.45 | C19:0 cyc | | |
| C16:0 | 21.89 | 18.43 | C20:0 | | |
| i-C16:0 | | | | | |

(5) PBSu分解バクテリアの遺伝学系統的解析 (16S rDNA配列解析)

PBSu分解微生物のrDNA配列に基づき作製した系統樹を、Figure 3-4に示す。PBSuバクテリアNKCM 8906 株の16S rDNA配列は、*Actinobacteria* 網に属する *Rhodococcus fascians* のそれと、99.3%の高い相同性を示した。また、先の生化学的、生理学的性質、gDNAのG+C含量、イソプレノイドキノンの種類、および菌体脂肪酸組成からも、*Rhodococcus* 属の性質にあてはまることから、本菌株は、*Rhodococcus fascians* に最も近縁な種であることが判明した。また、16S rDNA配列解析より、NKCM 8901 株、NKCM 8903 株、およびNKCM 8904 株は、*Proteobacteria* 網に属していることがわかった。(Figure 3-4)。一方、NKCM 8905 株は、*Firmicutes* 網に属していた。

常磐らは、土壌環境中からPBSu分解バクテリアとして、*Proteobacteria*網、あるいは*Firmicutes*網に属するバクテリア群を単離・同定している⁸⁾。本研究において、*Proteobacteria*網、および*Firmicutes*網以外に、*Actinobacteria*網もPBSu分解に関与していることが明らかとなった。

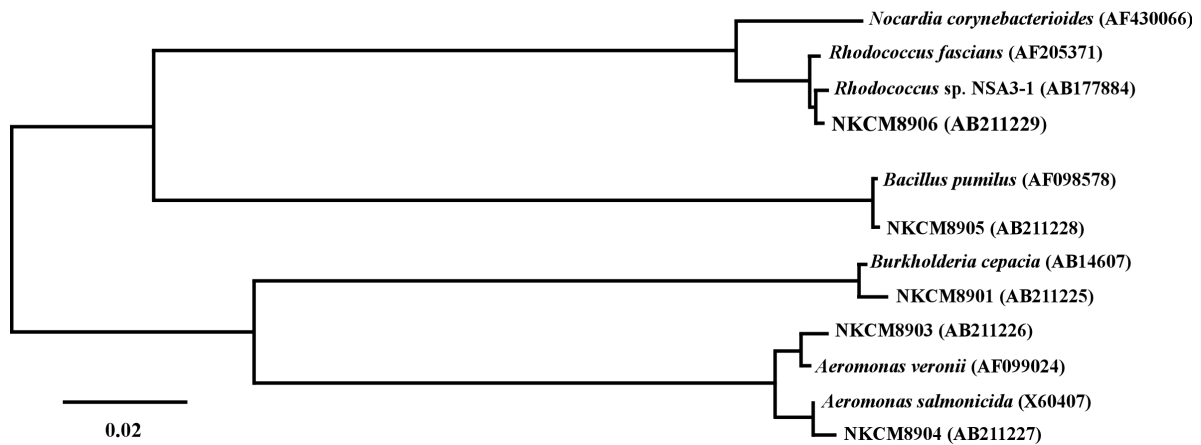


Figure 3-4. Neighbor-joining phylogenetic tree of the PBSu-degrading isolates and related bacteria based on 16S rDNA sequence comparisons. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 2% estimated sequence divergence.

3.2.2.3. PBSu分解微生物によるポリエステルフィルムの分解

(1) PBSuフィルムのNKCM 8906株による分解過程

Figure3-5は、NKCM 8906による、PBSuフィルムの分解過程を示している。PBSuフィルムの重量減少量は、培養時間の経過に対して直線的に増加した。PBSuフィルムの機械強度は、経時的に低下した。

培養後のフィルムの分子量を、GPCを用いて測定した (Figure3-5(A))。菌体接種の有無、および培養時間にかかわらず、PBSuフィルムの分子量は、ほとんど変化しなかった。これらの結果は、PBSuフィルムが培養の間、非酵素的な加水分解を受けないことを示している³⁸⁾。

Figure3-6は、NKCM 8906株による分解前後のPBSuフィルム表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を示している。分解前のPBSuフィルムの表面は、非常に滑らかであった (Figure3-6 (A))。本菌株接種後10日で、フィルム表面に滑らかな部分を残し、多数の亀裂が見られるようになった。(Figure3-6 (B))。さらに、30日後では、フィルム表面の滑らかな部分が減少し、それぞれの亀裂がより大きくなった (Figure3-6 (C))。これらの結果は、PBSuフィルムの重量減少は微生物が分泌した酵素による高分子表面からの分解であることを示唆している。

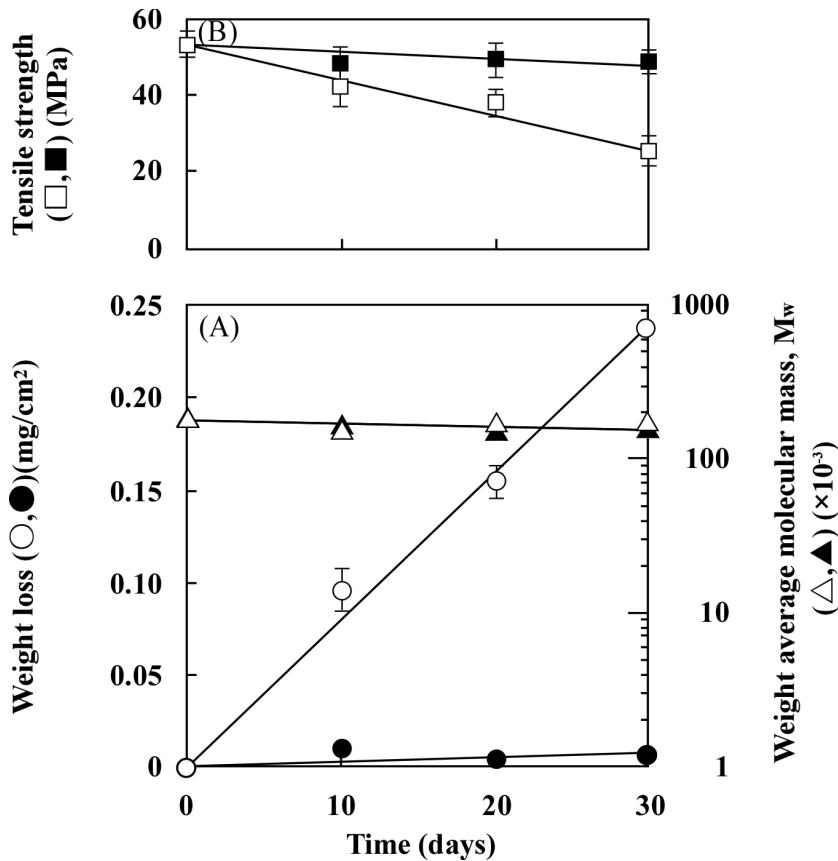


Figure3-5 . Degradation of PBSu film by Strain NKCM8906. Dumbbell specimen of PBSu was incubated with strain NKCM8906 in the mineral medium at 30°C.(A) The time course of weight loss and weight-average molecular mass (M_w) of PBSu specimen. Weight losses of the specimens during incubation with and without strain NKCM8906 were indicated as open (○) and closed (●) circles, respectively. Weight loss indicates the value per cm² of specimen. M_ws during incubation with and without strain NKCM8906 were indicated as open (△) and closed (▲) triangles, respectively. (B) Time course of mechanical property of the PBSu specimens. Tensile strengths of the specimens during incubation with and without strain NKCM8906 were indicated as open (□) and closed (■) quadrangles, respectively. All experiments were performed in triplicate. Error bars indicate the width of experimental values.

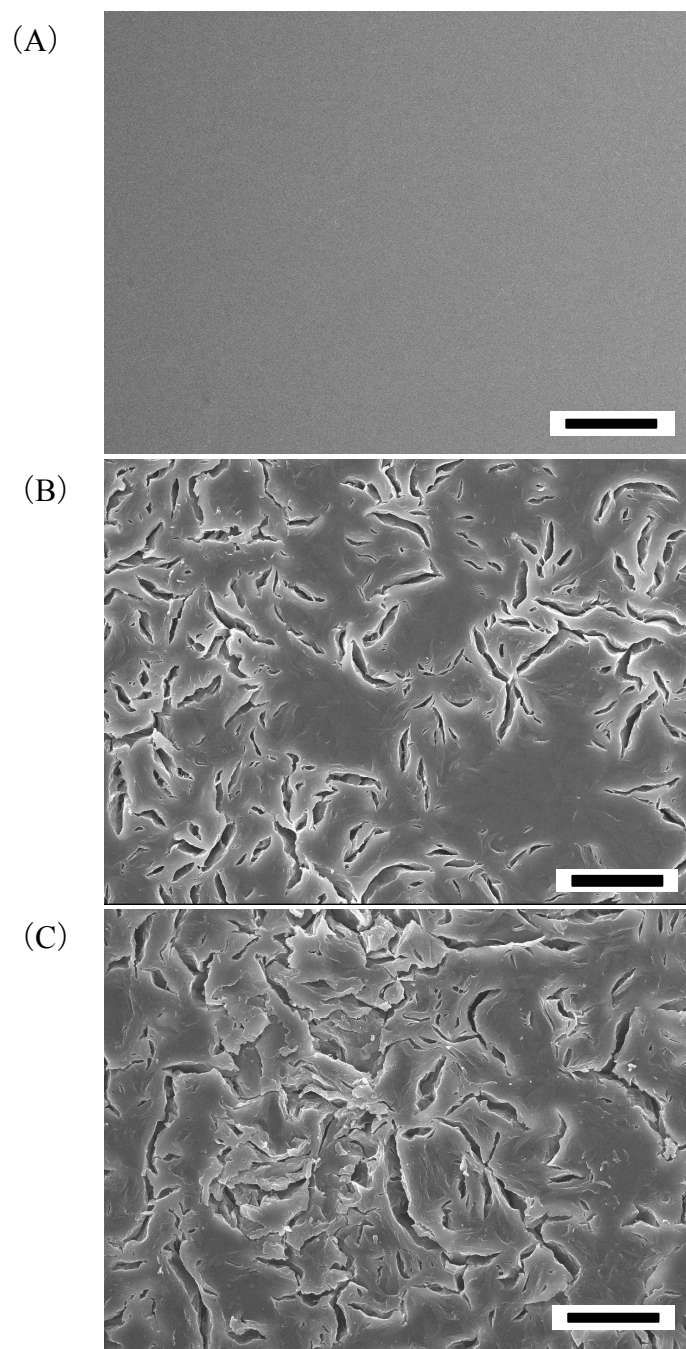


Figure3-6. SEMs of PBSu film surfaces before (A) and after degradation by strain NKCM 8906 for 10 days (B), 30 days (C). The black bars indicate 10 μ m in length.

(2) 各種ポリエステルフィルム分解

6種類のポリエステルフィルム (PBSu、PBSA、PESu、P(3HB)、PCL、およびPLA) を含む液体基本培地で、PBSu分解微生物を10日間培養した後、フィルムを取り出して重量減少量を測定した (Table3-12)。

PBSu分解バクテリアNKCM8906株は、PBSuフィルム以外にもリパーゼにより分解することで知られているPCL²⁵⁻²⁸、およびPBSA^{29,39}フィルムを分解した。さらに、本株は、オリーブオイル培地上にクリアゾーンを形成した。このことは、本菌株がリパーゼ様酵素によって、PBSuを分解することを示唆する。一方、本菌株は、PESuフィルムを分解したが、P(3HB)フィルムは分解しなかった。In vitroにおいて、PESuは、リパーゼによって分解されず、P(3HB)分解酵素によって分解されることが報告されている^{40,41}。API ZYMより本菌株は、リパーゼを生産することがわかっている (Table3-10)。これらのことから、本菌株は、PBSu分解酵素に加えて、P(3HB)分解酵素とは異なるエステル加水分解酵素を生産すると考えられる。

Table3-12. Degradation of various polyester films by strain NKCM8906

| Substrate | Degradation rate of film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Cell growth (mg) ^{b)} |
|-----------|--|-----------------------------------|
| PBSu | 0.8±0.02 | ++ |
| PBSA | 2.7±0.04 | +++ |
| PESu | 1.6±0.03 | +++ |
| P(3HB) | 0 | + |
| PCL | 0.37±0.02 | ++ |
| PLA | 0 | + |

a) Strains were cultured in 3mL medium containing polyester films (1×1×0.1mm, ca.15mg) at 30 °C for 10 days.

b) +++, optical density at 600nm (OD_{600}) of more than 1.0; ++, OD_{600} between 0.5 and 1.0; +, OD_{600} of less than 0.5.

Errors (±) indicate the width of experimental data.

(3) さまざまな炭素源によるPBSu分解微生物の生育とPBSuフィルム分解活性

Table3-13は、さまざまな培地でNKCM8906株を培養した際の、菌体増殖および培養上清の分解活性の関係を示している。NKCM8906株は、本研究で用いたすべての炭素源で増殖が確認された。中でもオリーブオイルおよびLB培地を用いた場合、良好な菌体増殖が確認された。フィルム分解については、LB培地を用いた際は、基本培地のみの場合よりフィルム重量減少量が大きく、オリーブオイル炭素源とした際に、重量減少量は最大となった。この結果は、NKCM8906株のPBSu分解活性の発現において、カタボライト抑制を受けないことを示唆している。培養上清のリパーゼおよびエステラーゼ活性は、PBSu分解活性と相関関係が見られた。本菌株は、PCL、PBSA、およびオリーブオイルに対して活性を示した

(Table3-7)。さらに、本菌株は、リパーゼ、およびエステラーゼリパーゼを分泌することが示された (Table3-10)。これらの結果は、本株が、リパーゼ様酵素によってPBSuを分解することを示唆する。

Table 3-13. Effect of carbon source on the PBSu hydrolysis activity of strain NKCM8906.

| Carbon source | Growth ^{d)} | Weight loss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{e)} | PNPB (mU/mL) ^{f)} | Lipase activity (mU/mL) ^{f)} |
|--|----------------------|---|-------------------------------|--|
| Mineral medium ^{a)} +PBSu film | ++ | 0.19 | 22 | 0.51 |
| PCL ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.21 | 21 | 0.55 |
| PBSA ^{c)} +PBSu film | +++ | 0.25 | 27 | 0.54 |
| LB medium ^{b)} +PBSu film | +++ | 0.49 | 34 | 0.66 |
| Glucose ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.17 | 29 | 0.17 |
| Fructose ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.18 | 21 | 0.19 |
| Starch ^{c)} +PBSu film | + | 0.09 | 12 | 0.17 |
| Olive oil ^{c)} +PBSu film | +++ | 0.61 | 42 | 0.53 |
| Tributylin ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.26 | 20 | 0.43 |
| Tripalmitin ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.20 | 14 | 0.17 |
| Citric acid ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.36 | 26 | 0.43 |
| Succinic acid ^{c)} +PBSu film | ++ | 0.17 | 32 | 0.31 |
| Ethylene glycol ^{c)} +PBSu film | + | 0.15 | 16 | 0.22 |
| 1,4-Butanediol ^{c)} +PBSu film | + | 0.16 | 19 | 0.29 |

a) Strain NKCM8906 with PBSu film was cultured on the minimal medium for 10days.

b) Strain NKCM8906 with PBSu film was cultured on the LB medium for 10 days.

c) Strain NKCM8906 with PBSu film was cultured on the minimal medium containing 0.2% each carbon source for 10 days.

d) +++, optical density at 600nm (OD_{600}) of more than 1.0; ++, OD_{600} between 0.5 and 1.0; +, OD_{600} of less than 0.5.

e) Weight loss of PBSu film for 10 days at 30 °C.

f) Activity of NKCM8906 culture supernatant.

3.3. PBSu分解真菌の探索とその性質

3.3.1. 実験

3.3.1.1. 微生物、およびベクター

実験で使用した微生物、およびベクターをTable 3-14、およびTable 3-15に示す。
Aspergillus fumigatus NBRC33022は、標準株として用いた。

Table 3-14 Bacterial and fungal strains used.

| Strain | Relevant Characteristic | Reference |
|---|--|------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> NBRC33022 | Type culture | 42 |
| <i>E. coli</i> DH5 α | supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZAM15) hsdR17 rec A1 endA1gyrA96 thi-1 relA1 | Toyobo |
| NKCM 1706 | PBSu-degrading fungus | This study |

Table 3-15 Vectors used.

| Vector | Genetic Marker | Description | Reference |
|-------------|-------------------------|-----------------------------------|------------|
| Plasmids | | | |
| pGEM-T easy | Amp ^r , lacZ | T-cloning vector | Promega |
| pUC18 | Amp ^r , lacZ | General cloning vector | TaKaRa |
| ITS-1706 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |
| ITS-1707 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |
| ITS-1708 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |
| ITS-1712 | Amp ^r , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |

3.3.1.2. PBSu分解真菌の単離法

3.2.1.2. 参照。

3.3.1.3. 脂肪および各種ポリエステル分解能

2.2.1.4. 参照

3.3.1.4. 形態観察

2.2.1.5. 参照

3.3.1.5. ゲノムDNA (gDNA) 抽出^{11,12)}

2.2.1.7. (1) 参照

3.3.1.6. 遺伝系統学的解析

2.2.1.7. (2) 参照

3.3.1.7. 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

2.2.1.6参照

3.3.1.8. PBSu分解微生物によるポリエステルフィルムの分解

(1) さまざまな炭素源下における菌体増殖とPBSu分解活性分泌

2.2.1.8 (1) 参照

(2) NKCM 1706のPBSu環境分解への寄与

NKCM 1706株の環境中におけるPBSu分解への寄与を調べた。NKCM 1706株をLB培地100 mLに植え付け、30°C、48時間培養した。遠心分離によって菌体を回収した。採取してきた土壌サンプル100 gに、湿菌体0.5 gおよびPBSuフィルムを添加し、30°Cで5、10、15、20、25、あるいは30日間培養した。分解後のフィルムをメタノール、MilliQ水で洗浄し、凍結乾燥した。フィルムの初期重量から分解後のフィルムの重量を減算し、重量減少量を算出した。また、菌株を接種しない非滅菌系、およびオートクレーブ処理したネガティブコントロールも同様に処理した。

(3) ポリエステルフィルム分解能力

NKCM 1706株に関して、6種類のポリエステルフィルム (PBSu、PESu、PBSA、P(3HB)、PCL、およびPLA) の分解能を調べた (2.2.1.8. (2) 参照)

(4) PBSu分解活性

培養上清のPBSu分解活性は、濁度法によって決定した。PBSu基質は、0.1% (w/v)の乳化PBSuを含んだ50 mMリン酸緩衝液 (pH7.0)を用いた。750 μLのPBSu基質に、250 μLの培養上清を加え、30°Cで60分培養した。1ユニットは、650 nmの濁度を1減少させるために必要な酵素量とした。

(5) リパーゼ活性^{23,24)}

3.2.1.13 (3) 参照

3.3.2. 結果と考察

3.3.2.1. PBSu分解真菌の単離

(1) PBSu分解真菌の単離

各地の土壌、および環境水を微生物接種源として、PBSu乳化固体培地を用いたクリアゾーン法により、PBSu分解真菌を単離した。その結果、PBSu乳化固体培地上で、コロニー周辺に明確なクリアゾーンを形成する12株のPBSu分解真菌を単離した (Figure3-7、Table3-16)。

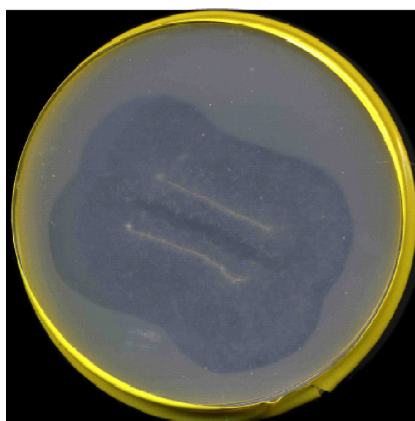


Figure 3-7 The clearing zone on the PBSu emulsified plates formed by PBSu-degrading fungus .

(2) 単離PBSu分解真菌株の脂肪およびポリエステル分解能

Table3-16は、単離株の種々のポリエステル、およびオリーブオイル乳化培地上でのクリアゾーン形成能を示している。すべてのPBSu分解真菌が、PLA乳化培地上にクリアゾーンを形成しなかった。一方、すべてのPBSu分解微生物が、PCL、PBSA、およびオリーブオイル培地上にクリアゾーンを形成した。PBSu、PBSAおよびPCLは、リパーゼによって分解することが知られている^{25-29,39)}。近年、*Aspergillus oryzae*由来のPBSu分解酵素は、リパーゼと近縁な酵素であるクチナーゼであると結論付けられた⁴³⁾。これらの結果を総合的に判断すると、本研究において単離されたPBSu分解微生物が分泌するPBSu分解酵素は、リパーゼ様酵素である可能性が高い。

(3) PBSu分解株のPBSuフィルム分解

PBSu分解微生物のフィルム分解能力を調べた。その後、フィルムを取り出して重量減少量を測定した。12株のPBSu分解真菌のうち、11株が、PBSuフィルムを分解し、その分解速度は、0.08~10.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった (Table3-16)。NKCM1706株は、PBSu分解真菌中、最も高いPBSu分解活性を示した (10.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)。高いPBSu分解活性を示したPBSu分解真菌NKCM1706株の特徴を、それぞれ詳細に調べた。

Table 3-16. The ability of PBSu film degradation and clear zone formation on the plates containing polymer emulsions or olive oil by PBSu-degrading isolates.

| Strain | PBSu | PESu | PBSA | P(3HB) | PCL | PLA | Olive oil | Weight loss of PBSu film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Sources |
|----------|------|------|------|--------|-----|-----|-----------|---|----------------------------------|
| NKCM1701 | + | - | +++ | +++ | +++ | - | +++ | 1.17 | Dry soil at Gunma university |
| NKCM1702 | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | - | +++ | 1.04 | Dry soil of a field at Gunma |
| NKCM1703 | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | - | ++ | 1.50 | Wet soil around lake Kasumigaura |
| NKCM1704 | + | - | ++ | - | ++ | - | ++ | 1.38 | Soil at Mt. Narita |
| NKCM1705 | ++ | - | + | +++ | +++ | - | +++ | 1.21 | Soil at Mountain |
| NKCM1706 | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | - | +++ | 10.5 | Wet soil around lake Kasumigaura |
| NKCM1707 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | +++ | 9.00 | Soil at Mountain |
| NKCM1708 | ++ | + | ++ | ++ | +++ | - | +++ | 3.13 | Soil at Mt. Narita |
| NKCM1709 | + | + | ++ | +++ | ++ | - | +++ | 0.38 | Dry soil of a field at Nagano |
| NKCM1710 | ++ | + | +++ | +++ | ++ | - | ++ | 0.08 | Dry soil of a field at Nagano |
| NKCM1711 | + | + | ++ | +++ | + | - | ++ | 0.16 | Dry soil at Gunma university |
| NKCM1712 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | - | ++ | 10.0 | Soil at Mt. Narita |

Each strain was incubated at 30 °C on mineral medium containing PBSu film. After 10 days the film was pick up, washed with distilled water, and weighed. Weight loss was calculated by subtracting the weight of degraded film from initial weight of the film.

+++; A large clearing zone was formed around the isolate.,

++; A midium clearing zone was formed around the isolate.

++; A small clearing zone was formed around the isolate.

-; No clearing zone was formed around the isolate.

3.2.2.2. PBSu分解真菌の特徴付け

(1) 形態学的特徴

最もPBSuフィルムを分解したPBSu分解真菌NKCM1706株の形態を、光学顕微鏡(OM)で観察した(Figure3-8)。NKCM1706株は、糸状菌であり、菌糸の太さは、 $5.0\pm 0.5\mu\text{m}$ 程度であることがわかった(Figure3-8(A))また、本菌株の菌糸は、隔壁で区切られた、有隔菌糸であることも明らかになった(Figure3-8(A))。いくつかの菌糸末端には、直径 $20\mu\text{m}$ の分生子形成も確認された(Figure3-8(B))。本菌株の形態学的特徴は、子のう菌種が示す特徴と類似している⁴⁴⁾。

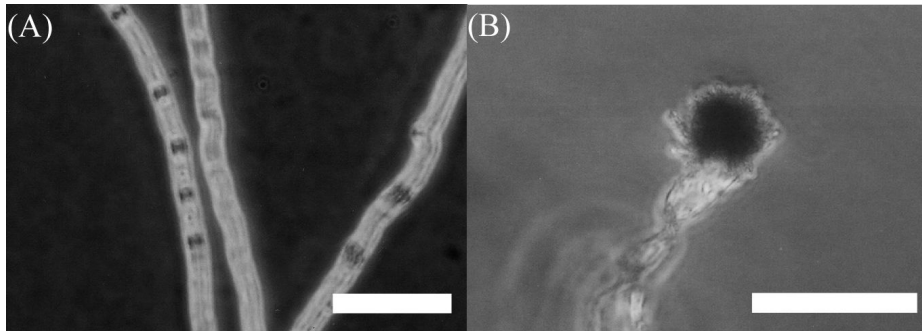


Figure 3-8. Phase-contrast optical micrographs of strain NKCM1706. The white bars indicate 20 μm (A) and 40 μm (B), respectively.

(2) 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

20～60℃において、NKCM1706株の菌体増殖、およびクリアゾーン形成能を調べた (Table3-17)。本菌株は、55℃以上では増殖せず、30～35℃で最もよく増殖した。また、NKCM1706株は、菌体増殖が確認されたすべての温度においてクリアゾーンを形成し、中でも25～40℃で高いPBSu分解活性を示した。標準株である*A.fumigatus*も、他離株同様、55℃以上では増殖せず、25～30℃で最もよく増殖した。この結果から、NKCM1706株は、*A.fumigatus*と同様に、菌体増殖の至適温度が、30℃付近であり、55℃以上では増殖しない中温性真菌であることが明らかになった。一方、*A.fumigatus*は、50℃の培養温度ではPBSuに分解活性を示さなかった。

Table 3-17 Effect of temperature of the growth and clearing zone formation on the PBSu emulsified plates of strain NKCM1706.

| Temperature | NKCM 1706 | | <i>A. fumigatus</i> NBRC33022 | |
|-------------|-----------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | Growth | Clearing zone formation | Growth | Clearing zone formation |
| 4 °C | - | - | - | - |
| 20 °C | ++ | + | ++ | ++ |
| 25 °C | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 30 °C | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 35 °C | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 40 °C | ++ | ++ | ++ | + |
| 45 °C | + | + | ++ | + |
| 50 °C | + | + | ++ | - |
| 55 °C | - | - | - | - |
| 60 °C | - | - | - | - |

+++ : means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++ : means not growing, a clearing zone was not formed.

+ : means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

- : means growth was good, or a medium clearing zone was formed

(3) 分解産物の同定

NKCM 1706によってPBSuを培養した際に得られる分解産物を、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析装置(LC-MS)を用いて調べた。分解産物として、B(分子量:90)、S(118)、SB(190)、BSB(262)、SBS(290)、SBSB(362)、BSBSB(434)、SBSBS(462)、およびSBSBSB(534)が検出された(S:コハク酸ユニット、E:エチレングリコールユニット)。さらに、ヘキサメチレンジイソシアネート(H)由来のジウレタンユニットを含む、BHBおよびSBHBも分解産物として検出された。これらの中で、SB、BSB、SBS、およびSBSBが主な分解産物として検出された。

SB、BSB、SBSなどのオリゴマーが、主な分解産物として検出されたのに対して、PBSuの構成成分である1,4-ブタンジオールおよびコハク酸は、ほとんど検出されなかった。これは、培養中に産出されたPBSuの構成成分が、本株によって資化されたことが考えられる。

ヘキサメチレンジイソシアネートは、PBSuの分子量を高くするためのジョイントとして用いられている。PBSu中に含まれるヘキサメチレンジイソシアネート量は、微量であるにもかかわらず、これを含んだオリゴマーが、分解産物として検出された。このことは、これらのオリゴマーが、微生物分解に対して耐性を持つことを示唆している。Kitakuniらは、ウレタン結合を持つビスヒドロキシブチルヘキサメチレンジカーボネート(BHB)およびウレタン結合を持たないビスヒドロキシブチルサクシネート(BSB)のBOD-生分解度を比較した³⁹⁾。両方のオリゴマーにおいて、最終的な生分解性は類似していたが、BHBの生分解速度は、BSBの生分解速度と比較して遅かった³⁹⁾。これらのことを総合的に判断して、NKCM 1706株などのPBSu分解微生物によって加水分解されたPBSuのオリゴマーは、自然環境中で完全に資化されることが予想される。

(4) 遺伝系統学的解析

高いPBSu分解活性を示した真菌のITS領域配列に基づき作製した系統樹を、Figure3-9に示す。PBSu真菌NKCM 1706のITS領域の配列は、Ascomycota門に属する*Aspergillus fumigatus*のそれと最も高い相同性を示した。本株の形態的特徴は、子のう菌類の特徴と類似していた(Figure3-9)。これらの結果から、NKCM 1706株は、*A. fumigatus*と近縁な種である可能性が高い。

他のPBSu分解真菌NKCM 1707、NKCM 1708、およびNKCM 1712株も、Ascomycota門の菌株であり、それぞれ*Fusarium solani*、*Aspergillus niger*、および*Paecilomyces fumosoroseus*と近縁な種であることが明らかになった。単離株は、PCL分解真菌と近縁な種であった⁴⁵⁾。また、本研究で単離したすべての菌株が、PCLおよびオリーブオイル分散培地上にクリアゾーンを形成した。これらの結果は、PBSu分解真菌が、PCL分解真菌と関連していることを示唆している。

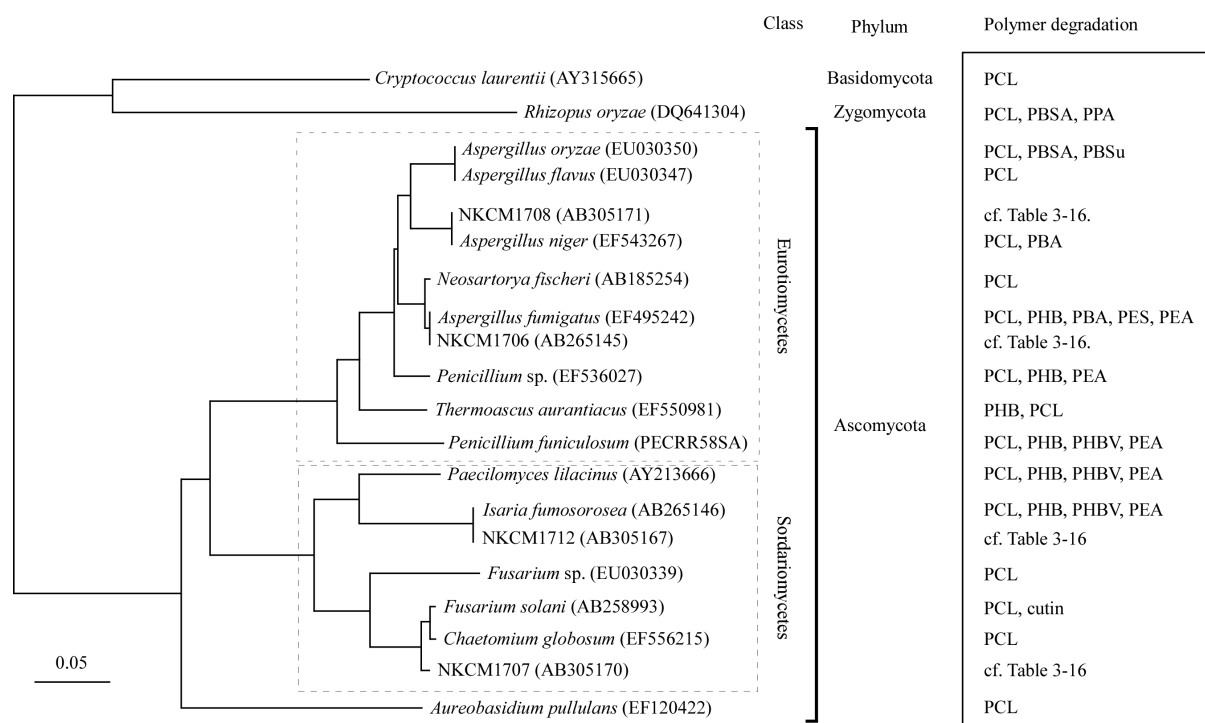


Figure 3-9. Phylogenetic tree of the PBSu-degrading isolates based on ITS and 5.8S rDNA sequence comparisons. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 5% estimated sequence divergence.

3.3.2.5. PBSu分解微生物によるポリエステルフィルムの分解

(1) 液体培養液を用いたPBSuフィルムの経時分解

Figure3-10は、PBSu分解真菌NKCM 1 7 0 6株による、PBSuフィルムの分解過程を示している。培養5日目まではフィルムの重量減少量および機械強度の低下の傾きが小さかったが、培養5日目以降傾きが大きくなった。本株は、30日間の培養で初期重量のおよそ70%のPBSuフィルムを分解した。

培養後のフィルムの分子量を、GPCを用いて測定した (Figure3-10(A))。菌体接種の有無、および培養時間にかかわらず、PBSuフィルムの分子量は、ほとんど変化しなかった。これらの結果は、PBSuフィルムが培養の間、非酵素的な加水分解を受けないことを示す³⁸⁾。

Figure3-11は、NKCM 1 7 0 6によるPBSuフィルムの分解前後でのフィルム表面のSEM像を示している。本株接種後5日間の培養で、滑らかな部分は残っているが、フィルム表面が分解された様子が確認され (Figure3-11 (B))、培養10日では、分解がフィルム全体に及んでいることが確認された (Figure3-11 (C))。さらに、培養20日後では、13-22μm程度の半球状の穴がフィルム表面に観察され、フィルムの一部が崩壊していた。(Figure3-11 (D))。これらの結果から、PBSuフィルムの重量減少は、微生物が分泌した酵素による、高分子表面からの分解であることを示唆している。

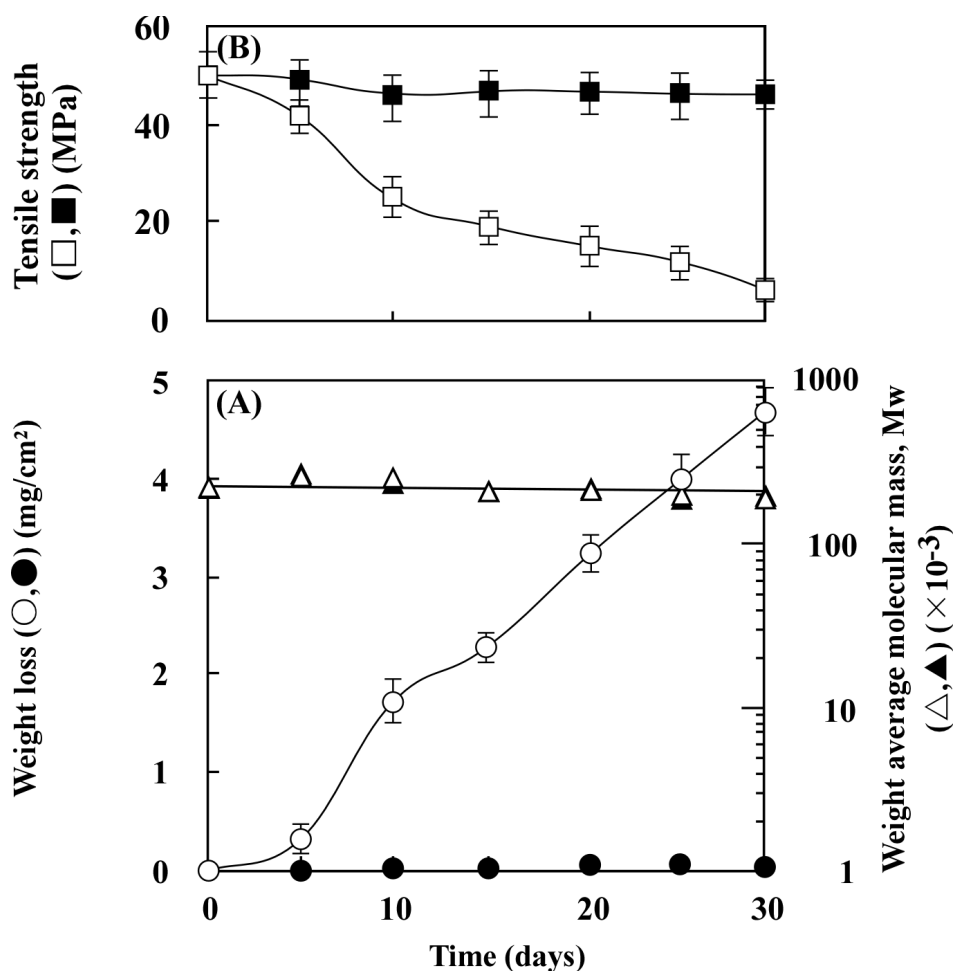


Figure3-10. Degradation of PBSu film by Strain NKCM1706. Dumbbell specimen of PBSu was incubated with strain NKCM1706 in the mineral medium at 30°C.(A) The time course of weight loss and weight-average molecular mass (M_w) of PBSu specimen. Weight losses of the specimens during incubation with and without strain NKCM1706 were indicated as open (○) and closed (●) circles, respectively. Weight loss indicates the value per cm^2 of specimen. M_w during incubation with and without strain NKCM1706 were indicated as open (△) and closed (▲) triangles, respectively. (B) Time course of mechanical property of the PBSu specimens. Tensile strengths of the specimens during incubation with and without strain NKCM1706 were indicated as open (□) and closed (■) quadrangles, respectively. All experiments were performed in triplicate. Error bars indicate the width of experimental values.

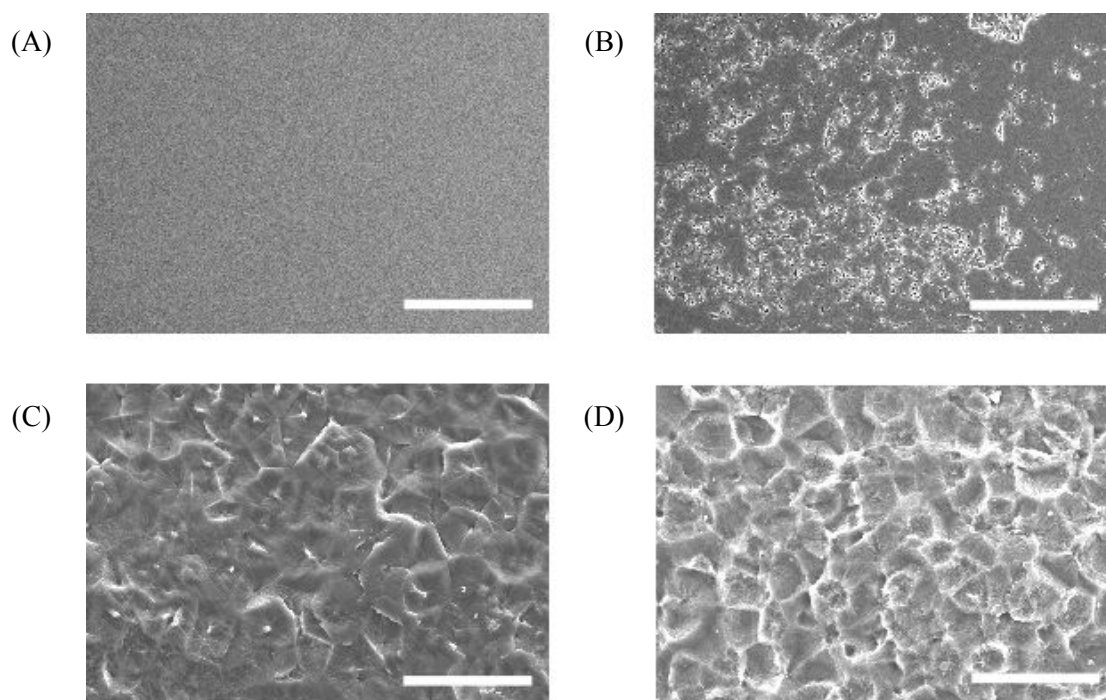


Figure 3-11. Scanning electron micrographs of PBSu film surfaces before (A) and after degradation by strain NKCM1706 for 5 (B), 10 (C), and 20 days (D). The white bars indicate 20 μ m in length.

(2) NKCM 1706 株のPBSu環境分解への寄与

Figure3-12は、土壌環境中におけるNKCM 1706 株の培養時間とPBSuフィルムの重量減少の関係を示している。NKCM 1706 株を植え付けた土壌におけるPBSuフィルムの分解速度は、培養5日目以降に上昇した。培養20日後には、フィルムの一部で崩壊が始まっていた。本株は、培養30日間で、初期重量のおよそ80%のPBSuフィルムを分解した。この結果は、水中での分解実験の結果と同様の傾向であった(3.3.2.5.(1))。一方、菌株を接種していない非滅菌系では、30日間の培養でおよそ15%の重量減少が見られた。ネガティブコントロールでは、フィルムの重量減少は見られなかった。NKCM 1706 株を接種した土壌と、菌株を接種しない非滅菌系とでは30日間の培養で、フィルムの重量減少におよそ5倍の差が生じた。これらの結果は、NKCM 1706 が、実際の土中において、PBSuフィルムの分解に大きく寄与していることを示唆している。

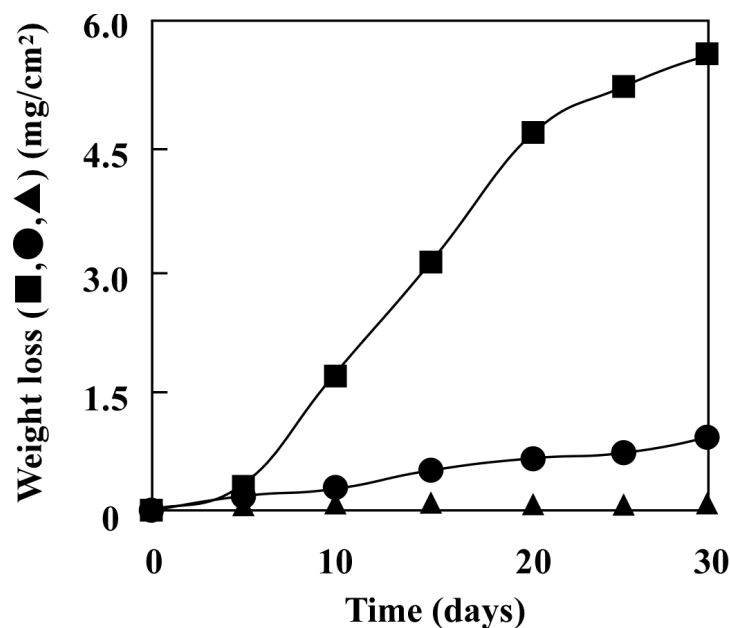


Figure 3-12. Degradation of PBSu film in soil sample. Weight loss of PBSu film with strain NKCM1706 (■), native soil (without strain) (●), and negative control (sterilized) (▲). All experiments were performed in triplicate.

(3) 各種ポリエステルフィルム分解

NKCM1706株の、各種ポリエステルフィルム (PBSu、PBSA、PESu、P(3HB)、PCL、およびPLA) 分解能を調べた (Table3-18)。NKCM1706株は、PLAを除いて本研究で用いたすべてのポリエステルフィルムに分解活性を示した。本菌株は、PCL分解活性に比べて、高いPBSu分解活性を示した。これまでの研究において、PCLは、PBSuに比べて良好な分解性を示すことが知られている。この結果は、本菌株が分泌するPBSu分解酵素は、PBSuに高い基質特異性を有する特殊なリパーゼ様酵素である可能性を示している。

さらに、本菌株は、PESuおよびP(3HB)フィルムを分解した。これらのことから、本菌株は、PBSu分解酵素以外に、P(3HB)分解酵素を分泌していることがわかった⁴¹⁾。

Table3-18. Degradation of various polyester films by strain NKCM1706

| Substrate | Degradation rate of film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Dry cell weight (mg) ^{b)} |
|-----------|--|---------------------------------------|
| PBSu | 10.5 \pm 2 | 4.3 \pm 0.2 |
| PBSA | 22 \pm 1 | 4.7 \pm 0.5 |
| PESu | 10 \pm 2 | 4.7 \pm 0.1 |
| P(3HB) | 14 \pm 1 | 4.4 \pm 0.3 |
| PCL | 4.2 \pm 0.5 | 3.4 \pm 0.4 |
| PLA | 0 | 0.1 \pm 0.02 |

a) Strains were cultured in 3mL medium containing polyester films (1 \times 1 \times 0.1mm, ca.15mg) at 30 °C for 10 days.

b) Growth level of the strain were evaluated by the dry cell weight after incubation for 10 days.

All experiments were performed in triplicate. Errors (\pm) indicate the width of experimental data.

(4) 炭素源の菌体増殖およびPBSu分解活性発現への影響

Table3-19は、さまざまな炭素源を含む培地中でのNKCM 1706株の増殖挙動、および培養上清へのPBSu分解活性発現度合を示している。本菌株を、炭素源を含まない基本培地で培養した場合、菌体増殖は、ほとんど見られなかった。一方、本研究で用いたすべての炭素源を用いた場合、良好な増殖を示した。

本菌株は、PBSu、PBSA、およびPCLを炭素源として用いた場合、PBSu分解活性を示した。一方、PBSuの構成成分である1,4-ブタンジオールおよびコハク酸を炭素源として用いた場合、良好な菌体増殖を示したが、培養上清中にPBSu分解活性は確認されなかった。これらは、PBSu分解酵素の誘導物質が、PBSuオリゴマーであることを示している。さらに、PCLもPBSu分解酵素の誘導物質であることが示唆された。

PBSu分解活性が見られた培養上清では、比較的高いリパーゼ活性も確認された。しかしながら、オリーブオイルを炭素源とした場合、高いリパーゼ活性は確認されたが、PBSu分解活性は確認されなかった。系統的解析の結果、PBSu分解真菌は、PCL分解真菌と近縁な種であった。これらの結果を総合的に考えると、本菌株が分泌するPBSu分解酵素は、リパーゼ様酵素の中でも、クチナーゼのようなPCL分解酵素と関連する酵素である可能性が高い^{46,47)}。

Table 3-19. Effect of carbon source on the PBSu hydrolysis activity of strain NKCM1706.

| Carbon source | Cell growth (mg) ^{d)} | PBSu hydrolysis activity (mU/mL) ^{e)} | pNPB activity (mU/mL) ^{e)} | Lipase activity (mU/mL) ^{e)} |
|------------------------------|-----------------------------------|---|--|--|
| None ^{a)} | 0.3±0.1 | 0 | 0 | 0 |
| PBSu ^{b)} | 4.3±0.4 | 23±3 | 65±6 | 1.45±0.1 |
| PBSA ^{b)} | 4.7±0.5 | 27±1 | 72±3 | 1.63±0.24 |
| PCL ^{b)} | 3.4±0.4 | 11±3 | 55±7 | 1.29±0.12 |
| PESu ^{b)} | 4.7±0.1 | 0 | 28±4 | 0.56±0.08 |
| P(3HB) ^{b)} | 4.4±0.3 | 0 | 23±6 | 0.41±0.1 |
| Glucose ^{b)} | 5.1±0.2 | 0 | 11±1 | 0 |
| Fructose ^{b)} | 4.5±0.1 | 0 | 10±1 | 0.27±0.07 |
| Starch ^{b)} | 3.5±0.2 | 0 | 18±2 | 0.26±0.06 |
| Olive oil ^{b)} | 4.7±0.1 | 0 | 35±9 | 1.45±0.02 |
| Tributylin ^{b)} | 4.2±0.4 | 0 | 77±8 | 0.66±0.1 |
| Tripalmitin ^{b)} | 3.9±0.1 | 0 | 21±4 | 0.43±0.05 |
| Succinic acid ^{b)} | 4.1±0.4 | 0 | 10±1 | 0.28±0.07 |
| 1,4-Butanediol ^{b)} | 3.7±0.6 | 0 | 12±6 | 0.36±0.05 |
| LB medium ^{c)} | 5.2±0.2 | 0 | 10±3 | 0 |

a) Strain NKCM1706 was cultured on the mineral medium.

b) Strain NKCM1706 was cultured on the minimal medium containing 0.2% each carbon source for 10 days.

c) Strain NKCM1706 was cultured on LB medium.

d) Growth level of the strain were evaluated by the dry cell weight after incubation for 10 days.

e) PBSu hydrolytic activity of the culture supernatant.

All experiments were performed in triplicate. Errors (±) indicate the width of experimental data.

3.5. 結論

環境中より、中温性PBSu分解細菌が10株単離された。10株のPBSu分解細菌のうち、7株がグラム陽性菌、3株がグラム陰性菌であった。PBSu分解細菌の遺伝学的解析をした。その結果、*Proteobacteria*網、*Firmicutes*網、および*Actinobacteria*網に属する細菌がPBSu分解に関与していることがわかった。これまでの研究で、*Proteobacteria*網、*Firmicutes*網に属する細菌がPBSuを分解することが報告されていた。本研究において、*Actinobacteria*網の細菌もPBSuを分解できることを明らかにした。

PBSu分解細菌単離株中最も高い分解活性を示したNKCM 8906株の酵素分泌パターンを調べた。その結果、NKCM 8906株は、オリーブオイルを炭素源として培養した場合、最も高いPBSu分解活性を示した。さらに、すべての株が、リパーゼによって分解することが知られているPCL、PBSA、オリーブオイル培地上にクリアゾーンを形成した。これらの結果から、PBSu分解細菌は、リパーゼ様酵素によってPBSuを分解することがわかった。

一方、自然環境中から12株のPBSu分解真菌が単離された。すべてのPBSu分解真菌が、PBSA、およびPCL乳化培地上にクリアゾーンを形成した。さらに、遺伝学的解析も行った。その結果、PBSu分解真菌は、PCL分解真菌と近縁な種であった。

PBSu分解真菌中最も高いPBSu分解活性を示したNKCM 1706株について詳細な特徴付けを行った。NKCM 1706株は、自然環境中においてPBSuの分解に大きく寄与することがわかった。本菌株は、PBSuを構成成分まで分解し、それを資化できることが明らかになった。さらに、本菌株が分泌するPBSu分解酵素について調べた。その結果、本菌株が分泌するPBSu分解酵素は、構成成分によっては誘導されず、PBSu、PBSuオリゴマーによって誘導されることがわかった。また、PCLもPBSu分解酵素の誘導物質であることが示唆された。PBSu分解活性とリパーゼ活性には、相関関係が見られた。一方、オリーブオイルを炭素源とした場合、高いリパーゼ活性が確認されたが、PBSu分解活性は見られなかった。これらの結果から、NKCM 1706株が分泌するPBSu分解酵素は、リパーゼの中でもクチナーゼなどのようなPCL分解酵素と関連する可能性が示された。

参考文献

- [1] 井上義夫監修. (2002) グリーンプラスチック最新技術. シーエムシー出版.
- [2] Fujimaki T. *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 209
- [3] Gross R.-A., Kalra B. *Science*, **2002**, 297, 803.
- [4] <http://www.jbpaweb.net/>
- [5] Kasuya K., Takagi K., Ishiwatari S., Yoshida Y., Doi Y., *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 59, 327.
- [6] Tansengco M. L., Tokiwa Y. *Chem. Lett.*, **1998**, 24, 1043.
- [7] Pranamuda H., Tokiwa Y., Tanaka H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61, 1828.
- [8] Suyama T. Tokiwa Y., Ouishanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 5008.
- [9] Jarerat A., Tokiwa Y., *Biotechnol. Lett.*, **2001**, 23, 647.
- [10] Goodfellow M. *Appl. Microbiol.*, **1984** 5, 225.
- [11] Pablo A.-N., Aurelio A.-V., Carmen C.-C., Arturo F.-C., Everardo L.-R., Carlos C.-M., *.Focus*, **2000**, 22, 14.
- [12] 鈴木健一郎、平石明、横田明. 微生物の分類・同定実験法. シュプリンガー・フェアラーク 東京株式会社.
- [13] Wakizaka A., Kurosaka K., Okuhara E. *J. Chromatogr.*, **1979**, 162, 319.
- [14] Katayama-Fujimura Y., Komatsu Y., Kurasiki H. Kaneko T. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 3169.
- [15] Mesbah M., Premachandran U., Whitman WB. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1989**, 39, 159.
- [16] Tamaoka J., Komagata K. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1984**, 25, 125.
- [17] Yamada Y., Inouye G., Tahara Y., Kondo K. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1976**, 22, 203.
- [18] Collins MD., Shah HN., Minnikin DE. *J. Appl. Bacteriol.*, **1980**, 48, 277.
- [19] Dees SB., Moss CW. *J. Clin. Microbiol.*, **1975** 1, 414.
- [20] Moss CW. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, 337.
- [21] Miller LT. *J. Clin. Microbiol.*, **1982**, 16, 540.
- [22] Lane DJ. Wiley, New York, 1991.
- [23] Iizumi, T.; Nakamura, K.; Fukase, T. *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54, 1253.
- [24] Sugihara, A.; Tani, T.; Tominaga, Y. *J. Biochem.*, **1991**, 109, 211.
- [25] Tokiwa Y., Suzuki T., and Takeda K. *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, 1323.
- [26] Tokiwa Y., Ando T., Suzuki T., and Takeda K. *American Chemical Society, Washington D. C.*, **1990**, 136.
- [27] Tokiwa Y., and Suzuki T. *Nature.*, **1977**, 270, 76.
- [28] Tokiwa Y., Suzuki T., and Takeda K. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 1071.
- [29] Ando Y., Yoshikawa K., Nishioka M., Ishioka R., Yakabe Y. *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 61, 129.
- [30] Uchida, H., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Tokiwa, Y., and Nakahara, T. *FEMS Microbiol Lett.*, **2000**, 189, 25.

- [31] Uchida, H., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Nakahara, T., Nakajima-Kambe, T. *J. Biosci. Bioeng.*, **2002** 93, 245.
- [32] Collins M. D., Pirouz T., Goodfellow M. *J. Cen. Microbiol.*, **1977**, 100, 221.
- [33] Suzuki K., Kaneko T., Komagata K. *Int. J. Syst. Bac.*, **1981**, 31, 131.
- [34] Starr M. P., Mandel M., Murata N. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1975**, 21, 13.
- [35] Yamada K., Komagata K. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1970**, 16, 215.
- [36] Suzuki K., Komagata K. *Int. J. Syst. Bac.*, **1983**, 33, 188.
- [37] Collins M.D., Goodfellow M. and Minnikin D. E. aeger, K. *J. Gen. Microbiol.*, **1982**, 128, 2503.
- [38] Koyama N., Doi Y. *Can. J. Microbiol.*, **1995**, 41(Suppl. 1), 316.
- [39] Kitakuni E., Yoshikawa K., Nakano K., Sasuga J., Nobiki M., Naoi H., Yokota Y., Ishioka R., Yomabe Y. *Environ. Toxicol. chem.*, **2001**, 20, 941.
- [40] Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T.; Tonomura, K. *J. Ferment. Bioeng.*, **1995**, 80, 265.
- [41] Hisano T.; Kasuya K.; Tezuka Y.; Ishii N.; Kobayashi T.; Shiraki M.; Oroudjev E.; Hansma H.; Iwata T.; Doi Y.; Saito T.; Miki K. *J. Mol. Biol.*, **2006**, 356, 993.
- [42] Latge J. P. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999** 12: 310.
- [43] Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K, Nakajima T., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2005, 67, 778.
- [44] Guarro J., Gene J., Stchigel A. M. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, 12, 4.
- [45] Kim, D.H.; Rhee, Y.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 300.
- [46] Martinez C., Geus P. D., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C., *Nature*, **1992**, 356, 615.
- [47] Murphy C.A., Cameron J.A., Huang S.J., Vinopal R.T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, 62, 456.

第4章

ポリブチレンアジペート-*co*-ブチレンテレフタレート (PBAT) 分解微生物の探索とその性質

4.1. 緒言

廃プラスチックが引き起こす問題を解決するための手段の1つとして、生分解性プラスチックが注目されている。これまでに、ポリブチレンサクシネート (PBSu)、ポリカプロラク톤 (PCL)、およびポリヒドロキシアルカン酸 (PHAs) などの脂肪族ポリエステルが、生分解性素材として商品化されてきた¹⁻³⁾。しかしながら、脂肪族ポリエステルは、汎用プラスチックと比較してコストが高く、物理特性も制限されているため、幅広い分野での応用は制限されている。一方、ポリエチレンテレフタレート (PET) やポリブチレンテレフタレート (PBT) などの芳香族ポリエステルは、優れた熱特性および物理特性を示す。生分解性を保ちながら、物理特性を向上させるための試みとして、脂肪族ユニットに芳香族ユニットを導入した、脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステルが考えられてきた⁴⁻⁷⁾。

Wittらは、1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸からなる共重合ポリエステルは、テレフタル酸が60 mol%になっても生分解性が保たれることを見出した⁸⁻¹³⁾。多くの研究が行われた結果、現在では、1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸からなるポリブチレンアジペート-co-ブチレンテレフタレート (PBAT) は、BASF (Ecoflex[®])^{14,15)}およびEastman (Easter Bio[®])¹⁶⁾から商業生産されている。さらに、最近DuPont社が、PETに脂肪族ユニットを導入した、Biomax[®]を生産・販売している¹⁷⁾。これら脂肪族 - 芳香族共重合ポリエステルは、農業分野、およびポリマー改質剤に用いられている¹⁴⁻¹⁸⁾。

これまでに、報告されている脂肪族 - 芳香族ポリエステルの生分解性は、ほとんどが混合培養における研究である¹⁰⁻¹³⁾。最近、Kleebergらは、高温コンポストから、20株の好熱性PBAT分解バクテリアを単離した^{19,20)}。さらに、20株のうち最も高いPBAT分解活性を示した*T. fusca*からPBAT分解酵素が精製され、その特徴が調べられた²¹⁾。一方、これまでに中温性のPBAT分解微生物に関する報告はない。これらのポリマーを、生分解性ポリマーとして扱うためには、中温域において、どのような微生物がPBATの分解に関与しているかを明らかにする必要がある。

本章では、自然環境中から、中温性のPBAT分解微生物を単離し、同定する。さらに、分解微生物による分解酵素の生産について調べる。

4.2. 実験

4.2.1. 試薬

(1) ポリエステル

ポリ（ブチレンアジペート-*co*-ブチレンテレフタレート）（PBAT）は、BASF社から提供された。他のポリマーに関する情報およびポリマーの精製は、2.2.1.1.（1）参照。

(2) 微生物、およびベクター

実験で使用した微生物、およびベクターをTable4-1、およびTable4-2に示す。

Table 4-1 Bacterial and fungal strains used.

| Strain | Relevant Characteristic | Reference |
|-----------------------------|--|------------|
| <i>E. coli</i> DH5 α | supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZAM15) hsdR17 rec A1 endA1gyrA96 thi-1 relA1 | Toyobo |
| NKCM 1712 | PBAT-degrading fungus | This study |

Table 4-2 Vectors used.

| Vector | Genetic Marker | Description | Reference | |
|----------|----------------|-------------------------|-----------------------------------|------------|
| Plasmids | pGEM-T easy | Amp ^R , lacZ | T-cloning vector | Promega |
| | pUC18 | Amp ^R , lacZ | General cloning vector | TaKaRa |
| | ITS-1712 | Amp ^R , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |
| | ITS-1713 | Amp ^R , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |
| | ITS-2510 | Amp ^R , lacZ | pGEM-T easy containing ITS region | This study |

4.2.2. PBAT分解微生物の単離

3.2.1.2参照

4.2.3. PBAT分解菌の特徴付け

(1) 形態観察

2.2.1.5.参照

(2) 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

2.2.1.6参照

(3) 分解産物の同定

2.3.1.4（8）参照

(4) 構成成分資化性^{19,20)}

(a) 培養・サンプル調整

PBATの構成成分である1,4-ブタンジオール、アジピン酸、あるいはテレフタル酸を加えた基本培地に、NKCM1712株を植え付け、30℃で7日間培養した。遠心分離(1000 rpm、20分、4℃)によって菌体を除去し、培養上清を凍結乾燥した。凍結乾燥物をメタノリシスした(3.2.1.5(2)参照)。その後、室温まで冷却し、1 mLの蒸留水を加えて1分間激しく振とうした。静置後2層に分離した下層(クロロホルム層)をピペットで分取し、測定サンプルとした。菌株を植え付けないコントロールサンプルも同様に処理した。

(b) ガスクロマトグラフィー(GC)分析

GCによる測定条件は、ディテクター温度300℃、インジェクター温度250℃、カラムオープン初期温度80℃、初期温度保持時間4分、カラム上昇速度10℃/min、カラム最終温度300℃、昇温最終温度保持時間4分で行った。カラムはニュートラボンドー1(GLサイエンス社製、30m×2.5mm)を用い、ピーク検出はFID法によった。

(5) 遺伝系統学的解析

2.2.1.7.参照

4.2.4. PBAT分解微生物によるポリエステルフィルムの分解

(1) さまざまな培地中におけるPBATフィルムの分解

2.2.1.7.参照

(2) 生物化学的酸素要求量(BOD)生分解度評価²²⁻²⁴⁾

(a) 原理(JIS K 6950参照)

生化学的酸素要求量(BOD)とは、化学物質または有機物が、水中の好氣的生物酸化によって消費された溶存酸素の質量濃度をいう。測定原理は、フラン瓶内の好氣的微生物を用いてポリマーサンプルの生分解度を求める。フラン瓶内には、唯一の炭素源、エネルギー源として、有機炭素の濃度が、100~2,000mg/Lであるサンプル、ならびに植種源となる活性汚泥または土壌を加える。フラン瓶内は攪拌され、発生した二酸化炭素は、試験フラスコの頭部につけられた吸収剤(NaOH溶液)に吸収される。本研究での酸素の消費量(BOD)は、マンメーター法を用いている。液中の溶存酸素消費に伴い、溶存酸素はフラン瓶内の気相から液相内に補給される。気相部分の酸素分圧が補給につれて低下することになり、気相部分は常に一定の圧を保とうとするため、ビューレットの毛細管から恒温槽の水を吸い込み、容積変化を起こす。この容積変化が酸素消費量となる。

(b) 操作

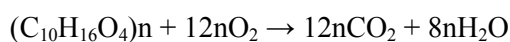
フラン瓶に、A液(緩衝液)、B液(硫酸マグネシウム液)、C液(塩化カルシウム液)、およびD液(塩化第三鉄溶液)をそれぞれ200µLずつ加え、蒸留水で200 mLにFill upした(Table4-3)。

PBATフィルム約8.5 mgを加え、オートクレーブした。またシリンダーやゴムを、エタノール滅菌した。乳化PBATを含む基本培地で前培養したNKCM 1712株を、50 μL植え付けた。またBODの基準として、試料を入れない、ネガティブコントロールも同様に処理した。CO₂吸収剤は、水酸化ナトリウム水溶液（4.0%）を用い、吸収剤容器に1 mL加えた。その後、BOD TESTER (タイテック社製) にフラン瓶をセットしてスターラーを回転させ、30分放置した。30分後消費酸素量を目盛りを0に調節し、30日間、25°Cで測定した。

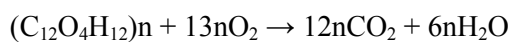
(c).理論

理論的な完全反応式は以下の通りである。

脂肪族ユニット(Mn = 200)



芳香族ユニット(Mn = 220)



脂肪族ユニットと芳香族ユニットの比が、3 : 2より、 $Mn = 200 \times 0.6 + 220 \times 0.4 = 208$ [g/mol]

サンプルの質量をもとに理論的酸素要求量(ThOD)を計算し、BOD生分解度を計算する。

$$8.5(\text{mg}) \div 208(\text{g/mol}) \times 12.4(\text{酸素必要量}) \times 22.4(\text{L/mol}) = 11.35\text{mL}$$

PBATを100%生分解するためには、酸素要求量が11.35mLとなる。

よって、PBATの生分解度(BOD)は、

$$\text{測定した酸素消費量(mL)} / \text{理論的酸素要求量11.35(mL)} \times 100(\%)$$

で求めることができる。

Table. 4-3 The composition of mineral nutrients used for BOD measurement.

| | | | |
|---|----------|--------------------------------------|---------|
| Solution A (pH7.2) | | Solution C | |
| K ₂ HPO ₄ | 21.75g/L | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 36.4g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 8.5g/L | | |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 33.4g/L | Solution D | |
| Solution B | | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.25g/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 22.5g/L | | |

(3) 単離株のPBAT環境分解への寄与

2.2.1.7.参照

(4) ポリエステルフィルム分解能力

7種類のポリエステルフィルム (PBAT、PBSu、PESu、PBSA、P(3HB)、PCL、およびPLA) の分解能力を調べた。2.2.1.7.参照

4.3. 結果と考察

4.3.1. PBAT分解微生物の単離

各地の環境サンプルを微生物接種源として、PBAT乳化固体培地を用いたクリアゾーン法により、PBAT分解微生物をスクリーニングした。その結果、PBAT乳化固体培地上で、コロニー周辺に明確なクリアゾーンを形成するPBAT分解微生物5株を単離した (Figure4-1)。アミノペプチダーゼテスト、あるいはコロニーの形態に基づいて、5株のPBAT分解微生物を、グラム陽性菌 (2株)、および真菌類 (3株) であると判断した (Table4-4)。

すべての単離菌株がPBATフィルムに対して分解活性を示した (Table4-4)。単離株中最も高いPBAT分解活性を示したNKCM 1 7 1 2株について詳細に特徴付けした。

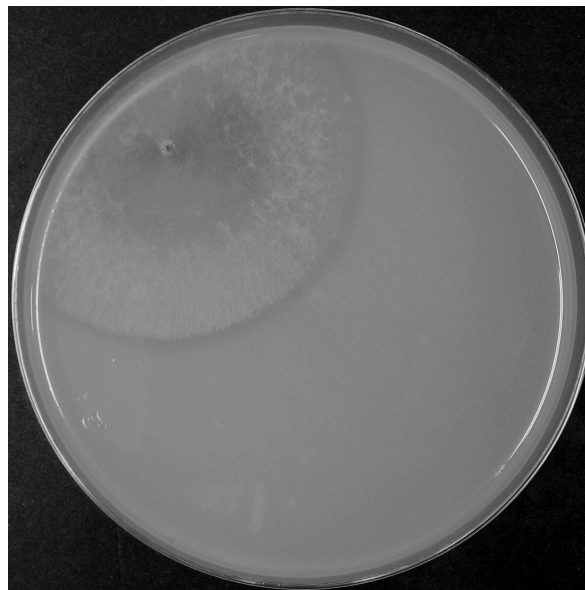


Figure 4-1. The clearing zone on the PBAT emulsified plates formed by strain NKCM1712.

Table4-4. Isolates and their ability to degrade PBAT film.

| Strain | Organism | Degradation rate of film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{a)} | Source |
|----------|----------|--|------------|
| NKCM1712 | Fungi | 3.5±0.3 | Soil |
| NKCM1713 | Fungi | 2.8±0.1 | Soil |
| NKCM2510 | Fungi | 2.1±0.3 | Soil |
| NKCM2511 | Bacteria | 0.6±0.05 | Soil |
| NKCM2512 | Bacteria | 0.49±0.1 | Pond water |

a) Isolated strains were cultured at 30 °C on medium containing aliphatic-aromatic copolyester film. After 10 days, the weight loss of each film was determined.

4.3.2. NKCM 1712 株の特徴付け

(1) 形態学的特徴

最も高いPBAT分解活性を示したNKCM 1712 株の菌糸の色は、白色であり (Figure4-1)、菌糸の太さは、 $2.0\pm 0.5\mu\text{m}$ 程度であった (Figure4-2)。さらに、本菌株の菌糸は、隔壁で区切られた有隔菌糸であり。本菌株の形態の特徴は、子のう菌の菌糸の特徴と類似していた²⁵⁾。

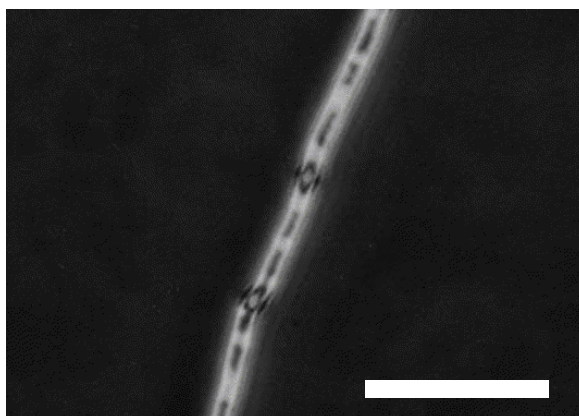


Figure 4-2. Phase-contrast optical micrographs of strain NKCM1712.

The white bars indicate 20 μm .

(2) 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

培養温度 4 ~ 60 °Cにおいて、NKCM 1712 株の菌体増殖、およびクリアゾーン形成能を調べた (Table4-5)。本菌株は、55 °C以上では増殖せず、30 ~ 35 °Cで最もよく増殖した。また、NKCM 1712 株は、20 ~ 45 °Cで培養した際、PBAT培地上にクリアゾーンを形成したが、50 °Cで培養した場合、クリアゾーンを形成しなかった。この結果から、NKCM 1712 株は、中温性真菌であることが明らかになった。

Table 4-5 Effect of temperature of the growth and clearing zone formation on the PBAT emulsified plates of strain NKCM1712.

| Temperature | Growth | Clearing zone formation |
|-------------|--------|-------------------------|
| 4 °C | - | - |
| 20 °C | ++ | + |
| 25 °C | +++ | +++ |
| 30 °C | +++ | +++ |
| 35 °C | +++ | +++ |
| 40 °C | ++ | ++ |
| 45 °C | + | + |
| 50 °C | + | - |
| 55 °C | - | - |
| 60 °C | - | - |

+++ : means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++ : means not growing, a clearing zone was not formed.

+ : means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

- : means growth was good, or a medium clearing zone was formed

(4) PBAT構成成分の資化性

NKCM 1 7 1 2 株のPBAT構成成分資化性を調べた (Table4-6) 。本菌株は、炭素源を含まない培地においては、ほとんど菌体増殖しなかった。一方、PBATの構成成分である、1,4-ブタンジオール、アジピン酸、あるいはテレフタル酸を加えた培地では、菌体増殖が確認された。ガスクロマトグラフィーのピークエリアから、モノマーの分解度を算出した。その結果、本菌株は、7日間の培養において、1, 4 - ブタンジオール、アジピン酸、およびテレフタル酸をそれぞれ98.1%、97.6%、および52.2%資化した。さらに、本菌株は、14日間の培養で、0.2%のテレフタル酸を完全に資化した。この結果は、本菌株が、PBAT分解物に対して高い資化性を有していることを示している。

Table4-6. Degradation of monomer of PBAT by strain NKCM1712.

| Carbon source | Dry cell weight (mg) | Degradation rate (%) | Degradation rate (mg/h) |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| None | 0.2±0.02 | — | — |
| 1,4-butanediol ^{a)} | 3.3±0.2 | 98.1 | 1.17 |
| Adipic acid ^{a)} | 3.1±0.2 | 97.6 | 1.16 |
| Terephthalic acid ^{a)} | 2.4±0.3 | 52.2 | 0.62 |

a) Strain NKCM1712 was cultured on the minimal medium containing 0.2% each carbon source for 7 days.

(3) 分解産物の同定

PBATフィルムをNKCM 1712株と共に培養した際に産出される分解産物を、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析 (LC-MS) を用いて調べた。分解産物として、B (分子量: 90)、A (146)、T (166)、AB (218)、TB (238)、BAB (290)、BTB (310)、ABA (346)、ABT (366)、およびABAB (418) が検出された (B: ブタンジオールユニット、A: アジピン酸ユニット、T: テレフタル酸ユニット)。これらの中で、T、AB、TB、BAB、およびBTBが主な分解産物として検出された。一方、PBATの構成成分である1,4-ブタンジオールおよびアジピン酸は検出されなかった。

PBAT分解細菌*Thermobifida fusca*をPBATと共に培養した上清中から、AB、BAB、ABABなどのオリゴマーが検出された^{19,20}。この結果は、*T. fusca*が分泌するPBAT分解酵素とNKCM 1712株が分泌するPBAT分解酵素の分解パターンが類似していることが考えられる。

*T. fusca*のPBATの分解産物は、主に構成成分である1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸であった^{19,20}。一方、本菌株をPBATフィルムと共に培養した後の上清中に、1,4-ブタンジオールおよびアジピン酸が検出されなかった。NKCM 1712株は、PBATの構成成分を資化できる (Table4-6)。これらのことは、*T. fusca*がPBATを完全分解できないのに対して、NKCM 1712株はPBATを完全分解できることを示唆している。

分解産物の同定を行った結果、*T. fusca*は、PBATの一次分解のみを行うのに対して、NKCM 1712株は、PBATを完全分解できることが示唆される (Figure4-3)。本菌株によるPBATの分解メカニズムとして、まず、菌株が分泌するPBAT酵素が、PBATをモノエステルあるいはジエステルからなるオリゴマーに加水分解後、さらに構成成分にまで加水分解する。次いで、加水分解によって放出された構成成分は、菌株によって資化される。

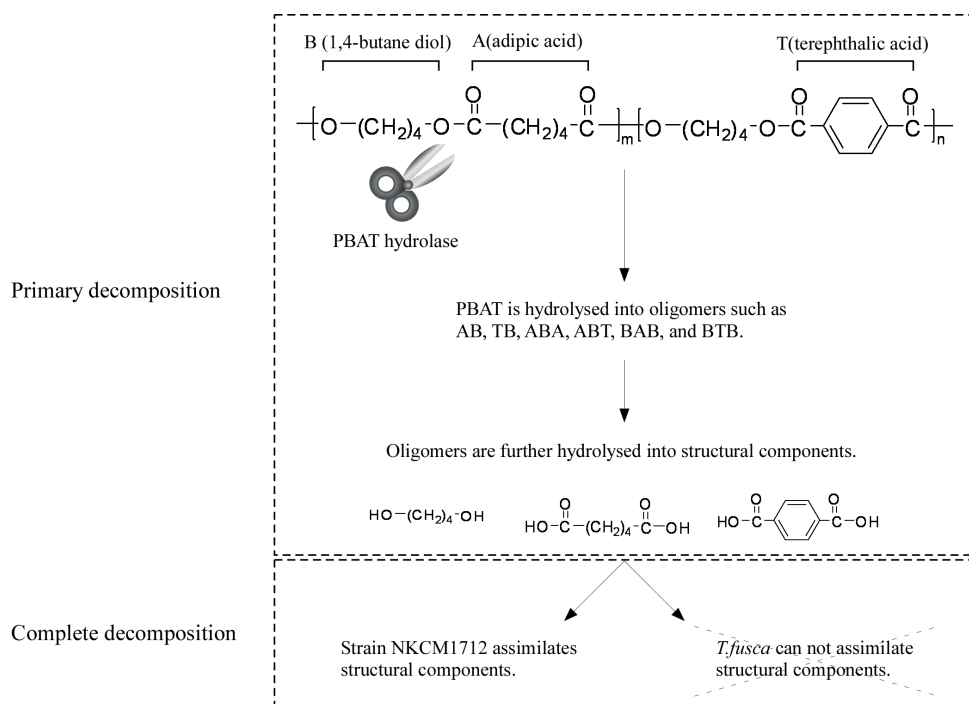


Figure 4-3. Degradation mechanism of PBAT by strain NKCM1712.

(5) 各種ポリエステルフィルム分解

NKCM1712株の、各種ポリエステルフィルム (PBAT、PBSu、PBSA、PESu、P(3HB)、PCL、およびPLA) 分解能を調べた (Table4-7)。本菌株は、PBATフィルムに加え、PCL、PBSA、およびPBSuフィルムに対して分解活性を示した。PCL、PBSA、およびPBSuは、リパーゼによって分解されることが知られている²⁶⁻³¹⁾。 *T.fusca*の生産するPBAT分解酵素も、リパーゼと高い相同性を有している²¹⁾。これらのことは、PBATが、本株の生産するリパーゼ様酵素によって分解を受けていることを示唆している。また、本菌株は、PESuおよびP(3HB)フィルムを分解した。この結果は、本菌株が、PBAT分解酵素に加えて、P(3HB)分解酵素も分泌していることを意味している^{32,33)}。

Table4-7 Degradation of various polyester films by strain NKCM1712^{a)}

| Substrate | Clear zone formation | Degradation rate of film | |
|-----------|----------------------|--|----------------------|
| | | ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | Dry cell weight (mg) |
| PBAT | +++ | 3.5±0.3 | 3.1±0.1 |
| PLA | - | 0 | 0.1±0.02 |
| P(3HB) | +++ | 11±0.6 | 4.0±0.3 |
| PESu | +++ | 15±1 | 3.5±0.1 |
| PBSu | ++ | 10±1.2 | 3.3±0.2 |
| PBSA | ++ | 28±3 | 3.7±0.5 |
| PCL | ++ | 13±0.2 | 2.5±0.4 |

a) Strain NKCM1712 was cultured in 3mL medium containing polyester films (1×1×0.1mm, ca.15mg) at 30 C for 10 days. Values are means ± standard errors of the means.

(6) 遺伝系統学的解析

NKCM1712株および近縁種のITS領域配列に基づき作製した系統樹を、Figure4-4に示す。NKCM1712株のITS領域配列は、*Isaria fumosorosea*のそれと100%の相同性を示した。また、本菌株の形態学的特徴は、子のう菌種が示すものと類似していた (Figure4-2)。これらの結果から、本菌株は、*Isaria fumosorosea*と近縁な種であることが示唆された。

一方、本研究で単離された3株のPBAT分解真菌すべてが、Ascomycota門に属していた。これまでの研究で、Ascomycota門に属する真菌は、PCLやP(3HB)などのポリマー分解に大きく寄与することが報告されている^{34,35)}。この結果は、Ascomycota門の真菌がPBATの分解にも寄与することを示唆している。

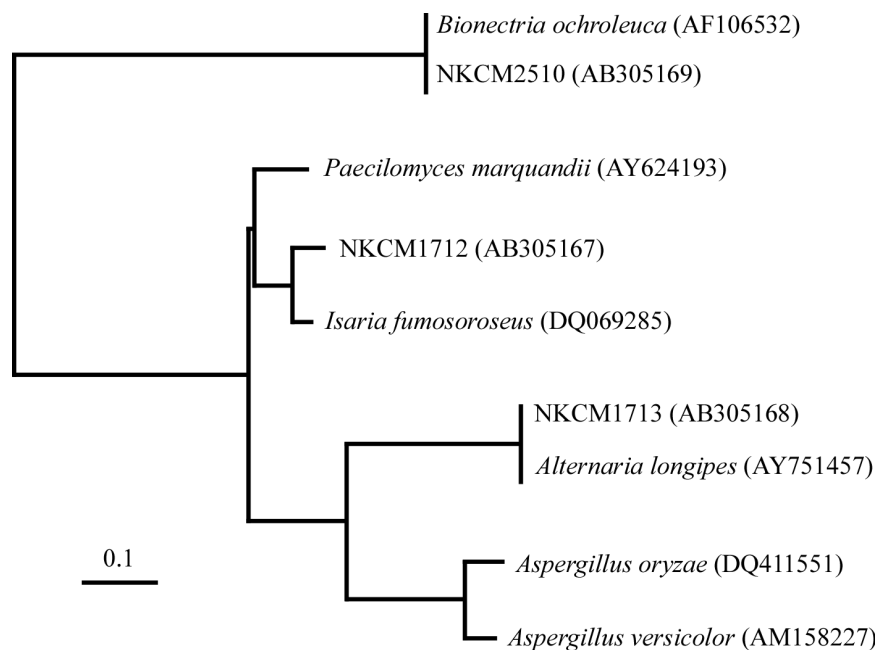


Figure 4-4. Phylogenetic tree of PBAT-degrading isolates and related fungi based on ITS and 5.8S rDNA sequence comparisons. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 10% estimated sequence divergence.

4.3.3. NKCM 1 7 1 2 株によるポリエステルフィルムの分解

(1) 液体培養液を用いたPBSuフィルムの経時分解

Figure4-5に、NKCM 1 7 1 2によるPBATの分解過程を示す。PBATフィルムの分解速度は、培養5日目までの誘導期を過ぎた後、急激に増加した。本菌株は、30日間の培養で、およそ初期重量の25%のPBATフィルムを分解した (Figure4-5 (A))。さらに、BOD生分解度は30日間でおおよそ17%であり、フィルムの重量減少量と比較的近い値を示した (Figure4-5 (B))。一方、菌株を植え付けていないコントロールでは、フィルムの重量減少は、確認されなかった。この結果は、PBATフィルムの分解が、本菌株が分泌したPBAT分解酵素によることを示唆している。

Figure4-6は、培養前後のPBATフィルム表面のSEM像を示している。培養前のPBATフィルム表面は、非常に滑らかであった (Figure4-6 (A))。本菌株接種後5日で、フィルム表面に滑らかな部分を残し、多数のクラックが見られ (Figure4-6 (B))、培養10日後では、分解がフィルム全体に及んでいた (Figure4-6 (C))。さらに、30日後のフィルム表面では、直径20~30 μm の半球状の穴が観察された (Figure4-6 (D))。これらの結果は、NKCM 1 7 1 2株が分泌するPBAT分解酵素が、フィルム表面のアモルファス部分を優先的に分解することを示唆している。

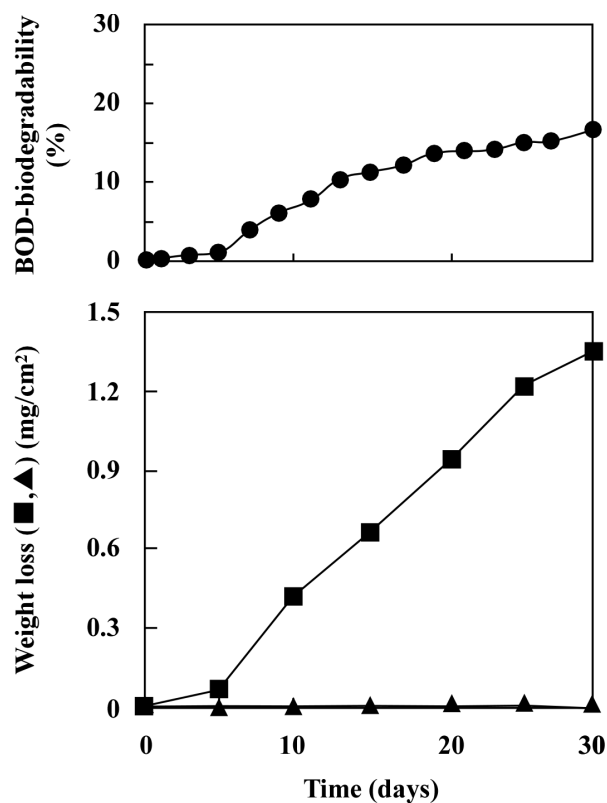


Figure 4-5. Degradation of PBAT film by strain NKCM1712. PBAT film ($10 \times 10 \times 0.1$ mm) was incubated with strain NKCM1712 in the mineral medium at 30°C (A). Weight loss of film (■); control (without strain NKCM1712) (▲), and BOD biodegradation curves of aliphatic-aromatic copolyester by strain NKCM1712 at 25°C (●). All experiments were performed in triplicate.

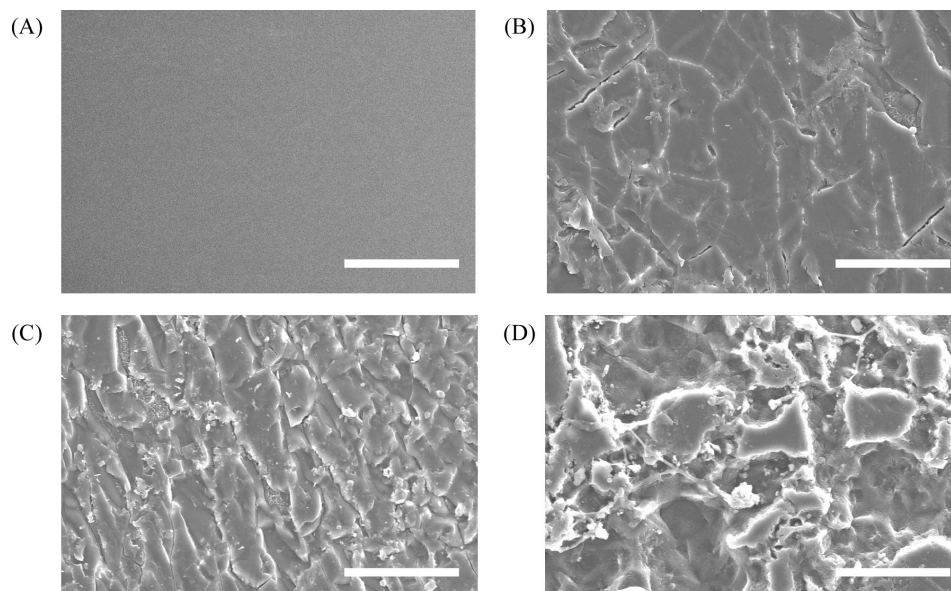


Figure 4-6 Scanning electron micrographs of PBAT film surfaces before (A) and after degradation by strain NKCM1712 for 5 (B), 10 (C) and 30 days (D). The white bars indicate $50\mu\text{m}$ in length.

(2) 単離株の PBAT 環境分解への寄与

Figure4-7は、土壌中におけるNKCM 1 7 1 2の培養時間とPBATフィルムの重量減少量の関係を示している。NKCM 1 7 1 2株を植え付けた土壌におけるPBATフィルムの分解速度は、培養5日目以降早くなった。本菌株は、30日間の培養で、初期重量のおよそ35%のPBATフィルムが分解した。この結果は、水中での分解実験の結果と同様の傾向であった(4.3.3.

(1))。一方、菌株を接種していない非滅菌系では、30日間の培養でおよそ8%の重量減少が見られた。一方、ネガティブコントロールでは、フィルムの重量減少は見られなかった。NKCM 1 7 1 2を接種した土壌と、菌株を接種しない非滅菌系とでは、30日間の培養で、フィルムの重量減少量に4.5倍の差が生じた。これらの結果は、NKCM 1 7 1 2が、実際の土中においてPBATの分解に大きく寄与していることを示唆している。

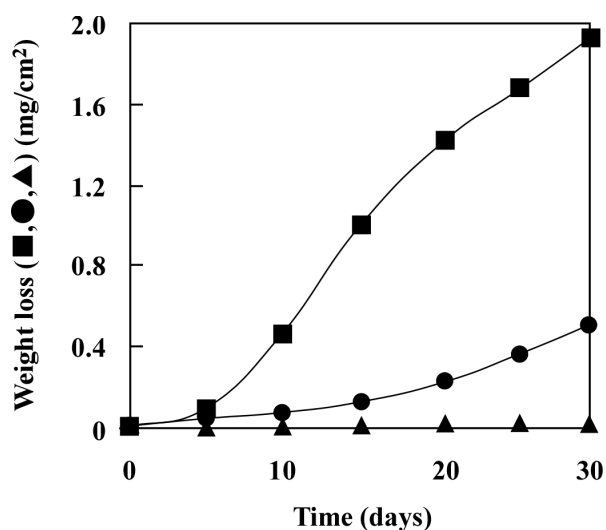


Figure 4-7. Degradation of PBAT film in soil sample. Weight loss of PBAT film with strain NKCM1712 (■), positive control (without strain) (●), and negative control (sterilized) (▲). All experiments were performed in triplicate.

(3) さまざまな炭素源によるPBAT分解微生物の生育とPBATフィルム分解活性

Table4-8は、さまざまな炭素源を含んだ培地でNKCM 1 7 1 2株を培養した際の、菌体増殖および培養上清の分解活性の関係を示している。NKCM 1 7 1 2株は、用いたすべての炭素源上で増殖した。培養上清のリパーゼ活性を測定した結果、PBAT分解活性とリパーゼ活性には相関関係が見られた。PBATを分解する好熱性細菌*T. fusca*由来のPBAT分解酵素は、リパーゼの一種であると考えられている²¹⁾。また、本菌株は、リパーゼによって分解されるPCLおよびPBSAフィルムを分解した。これらの結果を総合的に判断して、本菌株は、リパーゼ様活性によってPBATフィルムを分解していると結論づけられる。

一方、グルコースおよびフルクトースを加えた基本培地、およびLB培地においてNKCM 1 7 1 2株を培養した場合、良好な菌体増殖は見られたが、PBATフィルムの重量減少量はほとんど確認されなかった。この結果は、NKCM 1 7 1 2株のPBAT分解活性の発現は、カタボライト抑制を受けることを示唆している^{36,37)}。

Table 4-8. PBAT film degradation by strain NKCM1712 grown on various media and the growth levels.

| Carbon source | Growth ^{d)} | PBAT hydrolytic activity ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ^{e)} | Lipase activity (U/L) |
|--|----------------------|--|--------------------------|
| Mineral medium ^{a)} +PBAT film | 3.1 \pm 0.1 | 3.5 \pm 0.2 | 1.10 \pm 0.08 |
| LB medium ^{b)} +PBAT film | 4.3 \pm 0.2 | 0.25 \pm 0.1 | 0.08 \pm 0.03 |
| Glucose ^{c)} +PBAT film | 3.6 \pm 0.3 | 0.25 \pm 0.1 | 0 |
| Fructose ^{c)} +PBAT film | 3.9 \pm 0.3 | 0.4 \pm 0.1 | 0.06 \pm 0.01 |
| Olive oil ^{c)} +PBAT film | 3.9 \pm 0.1 | 2.6 \pm 0.2 | 0.98 \pm 0.05 |
| Tributylin ^{c)} +PBAT film | 3.9 \pm 0.2 | 3.1 \pm 0.1 | 1.31 \pm 0.13 |
| Adipic acid ^{c)} +PBAT film | 3.0 \pm 0.2 | 2.8 \pm 0.07 | 0.73 \pm 0.04 |
| Terephthalic acid ^{c)} +PBAT film | 2.5 \pm 0.3 | 2.6 \pm 0.2 | 0.58 \pm 0.07 |
| 1,4-butanediol ^{c)} +PBAT film | 3.2 \pm 0.2 | 3.0 \pm 0.3 | 0.64 \pm 0.08 |

a) Strain NKCM1712 with PBAT film was cultured on mineral medium for 10 days.

b) Strain NKCM1712 with PBAT was cultured on LB medium for 10 days.

c) Strain NKCM1712 with PBAT was cultured on mineral medium containing 0.1% each carbon source for 10 days.

d) Growth levels of the strain were evaluated by the dry cell weight after incubation for 10 days.

e) Weight loss of PBAT film for 10 days at 30 °C.

All experiments were performed in triplicate. Errors (\pm) indicate the width of experimental data.

4.4. 結論

環境中より、5株の中温性PBAT分解微生物を単離した (Table4-4)。単離株中、最も高いPBAT分解活性を示したNKCM 1 7 1 2株に関して詳細な特徴を調べた。遺伝学的解析を行った結果、本株はAscomycota門に属する*Isaria fumosoroseus*と近縁な種であることがわかった (Figure4-4)。

NKCM 1 7 1 2株によるPBATの分解性を調べた。NKCM 1 7 1 2株は、30日間の培養でおよそ25%のPBATフィルムを分解した (Figure4-5)。培養上清中の分解産物の同定、および構成成分の資化性を調べた結果、本株はPBATを1次分解ではなく完全分解できることがわかった (Table4-6、Figure4-3)。一方、in situにおけるPBAT分解菌の寄与を調べた (Figure4-7)。本菌株を接種した土壌と菌株を接種しない土壌とでは、30日間の培養でおよそ4.5倍の重量減少の差が生じた。このことから、NKCM 1 7 1 2株は自然環境中においてPBAT分解に大きく寄与することが示唆された。

さらに、本菌株が分泌するPBAT分解酵素について調べた。本菌株は、リパーゼによって分解されるPCL、PBSAに対して分解活性を示した。また、PBAT分解活性とリパーゼ活性には相関関係が見られた。これらの結果から、NKCM 1 7 1 2株が分泌するPBAT分解酵素は、リパーゼ様酵素であることが予想された (Table4-8)。一方、本菌株はPBAT分解酵素分泌の際、カタボライト抑制を受けることもわかった。

参考文献

- [1] Ishioka R, Kitakuni E, Ichikawa Y. Biopolymers, volume 4. In: Doi Y, Steinbuhchel A, editors. Polyesters III: applications and commercial products. Weinheim: Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002. p. 275.
- [2] Gruber P, O'Brien M. Biopolymers, volume 4. In: Doi Y, Steinbuhchel A, editors. Polyesters III: applications and commercial products. Weinheim: Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002. p. 235.
- [3] Asrar J, Gruys KJ. Biopolymers, volume 4. In: Doi Y, Steinbuhchel A, editors. Polyesters III: applications and commercial products. Weinheim: Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002. p. 53.
- [4] Witt U, Muller R.J., Augusta J., Widdecke H., Deckwer W.D., *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195: 793.
- [5] Muller R.J., Witt U., Rantze E., Deckwer W.D. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**; 59, 203.
- [6] Atfani M., Brisse F., *Macromolecules* **1999**; 32: 7741.
- [7] Ki H.C., Park O.O. *Polymer* **2001**; 42, 1849.
- [8] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Macromol. Sci-Pure Appl. Chem.* 1995; A32 (4), 851
- [9] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1995**; 3, 215.
- [10] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1996**; 4, 9.
- [11] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1997**; 5 (2), 81
- [12] Witt U., Yamamoto M., Seeliger U., Muller R.J., Warzelhan V. *Angew Chem. Int. Ed.* **1999**; 38(10), 1438
- [13] Muller R.-J., Kleeberg I., Deckwer W.-D. *J. Biotechnol.* **2001**; 86, 87
- [14] <http://www2.basf.de/basf2/html/plastics/englisch/pages/biokstoff/ecoflex.htm>
- [15] Yamamoto M., Muller Muller R.-J., Deckwer W.-D., Weinheim; Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, **2002**, 199.
- [16] http://www.eastman.com/brands/Easter_Bio/Easter_Bio_intro.asp.
- [17] <http://www.dupont.com/polyester/resins/products/biomax/biomax.html>.
- [18] <http://www.jbpaweb.net/>
- [19] Kleeberg I., Hetz C., Kropenstedt RM., Muller RJ., Deckwer WD., *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1731.
- [20] Witt U., Yamamoto M., Kleeberg I., Deckwer WD., Muller RJ., *Chemosphere.* **2001**, 44, 289.
- [21] Kleeberg I. Welzel K. VandenHeuval J. Muller R.J. Deckwer W.D. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 262
- [22] Yakabe, Y.; Kitano, M. *Biodegradable Plastics and Polymers*, ed. Doi, Y. and Fukuda, K. Elsevier, Amsterdam, **1994**, p. 331.
- [23] Kasuya, K.; Takagi, K.; Ishiwatari, S.; Yoshida, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59, 327.
- [24] JIS K 6950: 1994, Plastics – Testing Method for Aerobic Biodegradability by Activated

Sludge.

- [25] Guarro J., Gene J., Stchigel A. M. *Clin. Microbiol.Rev.*, **1999**, 12: 454.
- [26] Tokiwa Y., Suzuki T., and Takeda K. *Agric. Biol. Chem.*,**1986**, 50: 1323.
- [27] Tokiwa Y., Ando T., Suzuki T., and Takeda K. *American Chemical Society, Washington D. C.*,**1990**: 136.
- [28] Tokiwa Y., and Suzuki T. *Nature.*, **1977**, 270: 76.
- [29] Tokiwa Y., Suzuki T., and Takeda K. *Agric. Biol. Chem.***1978**, 42: 1071.
- [30] Ando Y., Yoshikawa K., Nishioka M., Ishioka R., Yakabe Y. *Polym. Degrad. Stab.*, **1998**, 61, 129.
- [31] Kitakuni E., Yoshikawa K., Nakano K., Sasuga J., Nobiki M., Naoi H., Yokota Y., Ishioka R., Yomabe Y. *Environ. Toxicol. chem.*, **2001**, 20, 941.
- [32] Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T.; Tonomura, K. *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, 80, 265.
- [33] Hisano T.; Kasuya K.; Tezuka Y.; Ishii N.; Kobayashi T.; Shiraki M.; Oroudjev E.; Hansma H.; Iwata T.; Doi Y.; Saito T.; Miki K. *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 993.
- [34] Darby, R. T.; Kaplan, A. M. *Appl. Microbiol.* **1968**, 16, 900.
- [35] Kim, D.H.; Rhee, Y.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 61, 300.
- [36] Thomsson, E.; Larsson, C., Albers, E.; Nilsson, A.; Franze'n, C. J.; Gustafsson, L. *Appl.Environ. Mirobiol.* **2003**, 69, 3251.
- [37] Morton, D. S.; Oliver, J. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 3653.

第5章

脂肪族ポリエスエルベースアイオノマーの合成

5.1. 緒言

近年、高分子合成技術の改良¹⁾によって、脂肪族ポリエステルは、環境低負荷材料に適した生分解性素材として注目されるようになってきた¹⁻⁴⁾。現在までに、脂肪族ポリエステルの物性改善を目的としてさまざまな研究が行われてきた⁵⁻⁷⁾。共重合化やブレンドはポリマーの機械強度を改善するための重要な方法である⁵⁻⁷⁾。一方で、これらの方法により作られたポリマーの物理強度にはいくつかの問題がある。例えば、共重合化は、ポリエステルの結晶化度を低下させる。その生分解性や延性を増大させるためには、10–30 mol%の第二モノマー成分が必要となるが、これらの組成の脂肪族ポリエステルは、融点降下が著しい⁸⁻¹⁰⁾。これらを打開するには、新しい物性改善の方法論が必要である。

アイオノマーを用いるポリエステル物性改善のアプローチは、これらの手法に代わるものとして注目されている。アイオノマーは、高分子鎖に少量のイオン基を持つイオン含有ポリマーとして定義されている¹¹⁾。アイオノマーは、ホスト疎水性高分子マトリクス中で親水性イオン基がカウンターイオンと共に凝集し、マイクロ相分離を起こし、マルチプレットあるいはイオン会合体のようなイオン凝集体を形成する点に特徴がある。イオン凝集体は強い架橋点となり、ホスト高分子の性質をある程度保ちながら、物理特性（機械強度の増強、高い溶解粘度、熱特性の増加など）を大きく変え、時には新しい機能を発現させる。アイオノマーとは、イオン基により修飾あるいは変性を受けたイオン性高分子であり、広く研究されている¹²⁻¹⁷⁾。

これまでに、芳香族イオンおよび脂肪族イオン基を導入したいくつかの生分解性プラスチックベースアイオノマーが合成され、その特徴が調べられている¹⁸⁻²⁵⁾。しかしながら、生分解性プラスチックアイオノマーの生分解性に関する情報は少ない。

本章では、脂肪族ポリエステルの新しい物性改善法として、アイオノマーを合成した。具体的には、脂肪族ポリエステルであるポリエチレンサクシネート (PESu) およびポリブチレンサクシネート (PBSu) のアイオノマーの合成を行い、物理特性の変化および生分解性を調べる。

5.2. ポリエチレンサクシネートベースアイオノマーの合成

およびその特徴付け

5.2.1. 実験

5.2.1.1. 試薬

コハク酸、エチレングリコール、および5 - スルホン化ジメチルイソフタル酸 (DMSI) は、アルドッチ社から購入し、そのまま使用した。チタニウムテトラブトキシドも、アルドリッチ社から購入し、そのまま使用した。

5.2.1.2. ポリマー合成^{18,19)}

PESu および PESu アイオノマーは、2段階の重縮合によって合成した。コハク酸、DMSI、およびエチレングリコールを、コンデンサー、窒素チューブ、およびマグネットスターラーを取り付けた3つ口フラスコに投入した。ジカルボン酸とジオールのモル比は、1 : 1.2とした。開始剤として、チタニウムテトラブトキシド (0.3 wt%) を加えた。モノマー混合物を、190°C、2時間攪拌することで融解させた。その間、副産物として得られる水は、窒素ガスを流すことで、除去した。その後、反応混合物を、オーバーヘッドスターラーおよび温度制御装置を取り付けたガラスリアクターに移し、温度を230°Cに上昇させた。低分子量反応物を除去するために、減圧した (< 0.1 mmHg)。熔融粘度が臨界値 (40 N·cm) に達するまで、温度を230°Cに保った (5 - 7時間)。

5.2.1.3. フィルム作成

ポリマーサンプルを、0.3 mm のスチールスペーサーを挟んだ2枚のアルミニウムプレート上に投入した。ポリマーフィルムは、150°C、3分、10000 psi で圧縮成型することで作成した。フィルムは、結晶化が平衡に達するまで、少なくとも室温、減圧下で2週間保った。

5.2.1.4. ¹H NMR

ポリマー中のイオン含率を、Bruker 300-MHz を用いて測定した ¹H NMR スペクトルから決定した。内部標準物質としてテトラメチルシランを用いた。ポリマー試料は、CDCl₃/TFA-d (重水素化トリフルオロ酢酸) 中に、溶解した。濃度を、20 mg/mL とした。

5.2.1.5. 分子量測定

ポリマーの数平均分子量、重量平均分子量、および多分散度の決定には、日本分光株式会社製の LC-Net/ADC を用い、検出部には RI-2031 を用いた。カラムは、Tosoh TSK-G2000HXL を用いた。移動相は流速 1 mL/min のクロロホルム、38 °C で測定した。試料は、1.0 mg/ml のクロロホルム溶液を用いた。解析は、日本分光株式会社製の JASCOBORWIN を用いて行った。

5.2.1.6. 広角 X 線解析 (WAXD)

ポリマーの結晶化度は、広角 X 線回折測定 (WAXD) によって決定した。WAXD 測定は、Rigaku Denki X-ray generator (Rigaku model D/MAX-2500) を用いた。測定条件は、40 kV、100 mA、スキャン角度は、 $5^\circ < 2\theta < 40^\circ$ (2θ : 回折角度、 θ : Bragg 角)、スキャンスピードは、5 °/min で行った。

5.2.1.7. 溶融レオロジー

ポリマーのレオロジー挙動を、直径 25 mm、ギャップ 1 mm の平衡プレートを用いて、ダイナミック振動粘度計 (Advanced Rheometric Expansion System (ARES), Rheometric Scientific Inc.) を用いて調べた。測定は、温度 130 °C、周波数を 1 から 450 rad/s まで増加させることにより行った。

5.2.1.8. 偏光光学顕微鏡観察 (POM)

ポリマーの球晶形態は、位相差装置 (olympus BX-PHD) および L-600A ホットステージ (Linkam 社製) を取り付けた Olympus 社製の光学顕微鏡 (Olympus BX50) を用いて観察した。PESu フィルムを、スライドガラスおよびカバーガラスに挟み、130 °C、3分保温し、完全に溶融させた。その後、50 °C に急冷却し、結晶化が十分に行われるまで 50 °C で 60 分以上保温した。

5.2.1.9. 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC 測定には、冷却装置のついた DSC - 60 (Shimadzu 社製) を用いた。測定は、窒素雰囲気下、流速 30 mL/min で行った。サンプル (およそ 4 mg) を、アルミニウムパンに入れ、10 °C/min の加熱速度で 20 °C から 130 °C まで加熱し、130 °C で 5分保つことで完全に溶融させた。ポリマーの融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_f) は、それぞれ加熱過程におけるピークの最大値およびピーク積分から算出した。その後、10 °C/min の冷却速度で 20 °C まで冷却した (非等温結晶化)。結晶化温度および結晶化熱は、それぞれ冷却過程におけるピークの最大値およびピーク積分から算出した。

5.2.1.10. 動的粘弾性解析 (DMA)

ポリマーのガラス転移温度 (T_g) は、Dynamic mechanical analysis (DMA) によって測定した。DMA は、DMS6100 (セイコ-インスツルメンツ社製) を用い、1 Htz の周波数、感知レバーテンシルモード、2 °C/min の昇温速度で測定した。ポリマー試料を-50°C に冷却後、2 °C/min で 80°C まで昇温した。tan δ の極大値を、ポリマーのガラス転移温度 (T_g) とした。

5.2.1.11. 引っ張り試験

ポリマーの機械強度を、Instron を用いて測定した。厚さ 0.3 mm のフィルムから幅 3.5 mm、ゲージ長 14 mm のダンベル型に切り取り、測定試料とした。測定条件は、ロードセル 1 kg、引っ張り速度 10 mm/min、ゲージ間 26 mm とした。

5.2.1.12. 生分解性テスト

(1) 酵素分解²⁶⁻²⁸⁾

0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) 1 mL に、ポリエステルフィルム (10 × 10 × 0.3 mm) と *Penicillium funiculosum* 由来の P (3 HB) 分解酵素^{26,27)}を、10 mL サンプル菅瓶に加え、37°C で 1, 2, 3, および 5 日間保温した。バッファーおよび酵素を 24 時間毎に交換した。フィルムを、メタノールと MilliQ 水で洗浄し、凍結乾燥した後、重量測定した。フィルムの重量減少量は、2.3.1.2. (2) と同様の方法で算出した²⁸⁾。

(2) 生物学的酸素要求量 (BOD 生分解テスト)²⁹⁻³¹⁾

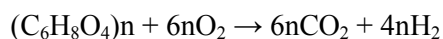
フラン瓶に、A液(緩衝液)、B液(硫酸マグネシウム液)、C液(塩化カルシウム液)、および D液(塩化第三鉄溶液)をそれぞれ 200 μ L ずつ加え、蒸留水で 200 mL に調製した (Table 5-1)。ポリマーサンプル約 10 mg および微生物接種源として、阿左美沼の水 (灌漑用のため池として作られた沼、群馬県桐生市) 20 μ L を加えた。また BOD の基準として、試料を入れないネガティブコントロールも同様に処理した。CO₂ 吸収剤は、水酸化ナトリウム水溶液 (4.0%) を用い、吸収剤容器に 1 mL 加えた。その後、BOD TESTER (タイテック社製) にフラン瓶をセットしてスターラーを回転させ、30 分放置した。30 分後消費酸素量の目盛りを 0 に調節し、30 日間、25°C で測定した。

(c).理論

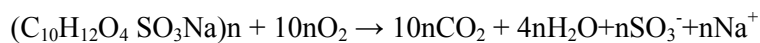
試料についての理論的な完全無機化反応式は以下の通りである。

PESui-3 の場合

脂肪族ユニット (Mn = 144)



イオン基ユニット (Mn = 295)



脂肪族ユニットとイオンユニットの比が、97 : 3 より、

$$Mn = 144 \times 0.97 + 295 \times 0.03 = 148.53 [\text{g/mol}]$$

サンプルの質量をもとに理論的酸素要求量(ThOD)を計算し、BOD 生分解度を計算する。

$$12(\text{mg}) \div 148.53(\text{g/mol}) \times 6.12(\text{酸素必要量}) \times 22.4(\text{L/mol}) = 11.07\text{mL}$$

PEsui-3 を 100%生分解するためには、酸素要求量が 11.07mL となる。

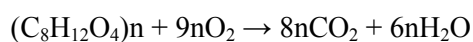
よって、PBAT の生分解度(BOD)は、

$$\text{測定した酸素消費量(mL)} / \text{理論的酸素要求量 } 11.07(\text{mL}) \times 100(\%)$$

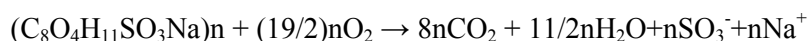
で求めることができる。

PBSui-3 の場合

脂肪族ユニット(Mn = 172)



イオン基ユニット(Mn = 274)



脂肪族ユニットとイオンユニットの比が、97 : 3 より、

$$Mn = 172 \times 0.97 + 274 \times 0.03 = 175.06 [\text{g/mol}]$$

サンプルの質量をもとに理論的酸素要求量(ThOD)を計算し、BOD 生分解度を計算する。

$$9(\text{mg}) \div 175.06(\text{g/mol}) \times 9.015(\text{酸素必要量}) \times 22.4(\text{L/mol}) = 10.4\text{mL}$$

PBSui-3 を 100%生分解するためには、酸素要求量が 10.4mL となる。

よって、PBAT の生分解度(BOD)は、

$$\text{測定した酸素消費量(mL)} / \text{理論的酸素要求量 } 10.4(\text{mL}) \times 100(\%)$$

で求めることができる。

Table. 5-1 The composition of mineral nutrients used for BOD measurement.

| | | | |
|---|----------|--------------------------------------|---------|
| Solution A (pH7.2) | | Solution C | |
| K ₂ HPO ₄ | 21.75g/L | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 36.4g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 8.5g/L | | |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 33.4g/L | Solution D | |
| Solution B | | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.25g/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 22.5g/L | | |

5.2.2. 結果と考察

5.2.2.1. ポリマー合成

Table 5-2 に、反応時間、仕込み組成、ポリマーの組成、および分子量を示す。DMSI 濃度の上昇に伴って、熔融粘度の臨界値に達するまでの時間は、長くなった。一方、ポリマーの分子量は、DMSI 濃度の上昇に伴って低下した。

Figure 5-1 は、PESui-3 の ^1H NMR スペクトルを示している。 α および β は、それぞれ PESu の繰り返しユニットである、コハク酸およびエチレングリコールのメチレン水素由来のピークである。 ε および λ は、導入したイオン基のベンゼン環由来のピークである。 δ は、DMSI に隣接するメチレン水素由来のピークである。共重合ポリマー中に導入された DMSI 含率は、4.5 ppm 付近の DMSI に隣接するメチレン水素(-OCH₂CH₂O-)と 4.3 ppm 付近のコハク酸と隣接するメチレン水素の積分比を用いて決定した。 ^1H NMR 解析の結果、PESu 中に導入された DMSI 含率は、仕込み比とほぼ一致していた。

Table5-2. Composition and molecular weight of PESu and its ionomers.

| Polymer code | Reaction time | Composition | | Average molecular weight ^{b)} | |
|--------------|---------------|--|--|--|-----------|
| | | Feed composition (succinic acid/DMSI) | Experimental composition ^{a)} (succinic acid/DMSI) | $M_n \times 10^{-4}$ | M_w/M_n |
| PESu | 2+5 | 100/0 | 100/0 | 4.0 | 1.80 |
| PESui-1 | 2+6 | 99/1 | 99/1 | 3.5 | 2.01 |
| PESui-3 | 2+7 | 97/3 | 97/3 | 3.0 | 2.21 |
| PESui-5 | 2+7 | 95/5 | 95.2/4.8 | 2.2 | 2.52 |

a) Measured by ^1H NMR

b) Measured by GPC

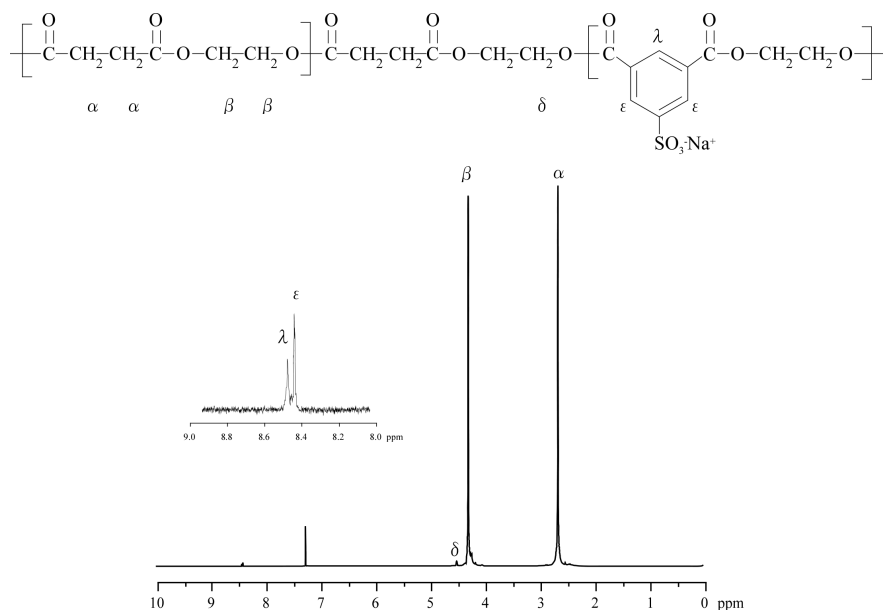


Figure 5-1. ^1H NMR spectrum of PESui-3.

5.2.2.2. 溶融レオロジー

Figure 5-2は、 130°C における、各種アイオノマーの角周波数(ω)と溶融粘度(η)との関係を示している。アイオノマーの溶融レオロジーは、重量平均分子量およびイオン凝集体由来の物理架橋の2つの要因によって決定される²³⁾。Table 5-2に見られるように、PESu ホモポリマーの重量平均分子量は、アイオノマーのそれよりも高いにもかかわらず、低角周波数の場合、アイオノマーの溶融粘度は、PESu の溶融粘度よりも高かった。この結果は、分子量による効果と比較して、イオン基間の物理架橋による効果の方が、溶融粘度に大きく影響したためであると考えられる。しかしながら、高い角周波数では、アイオノマーの溶融粘度は、低下した。一方、PESu ホモポリマーの溶融粘度は、一定値を示していた。このことから、せん断力の増加によって、物理架橋が破壊することが示唆された。PESui-5 の溶融粘度は、すべての ω 値において、PESui-3 よりも溶融粘度が低かった。この比較的低い PESui-5 の溶融粘度は、臨界イオン数を超えた結果であると推測される。イオン基数が臨界値よりも低い場合、アイオノマー鎖は、主に分子間イオン対相互作用によってお互いに架橋する。一方、イオン基数が増加するに従い、分子内イオン対相互作用も増加する³²⁾。

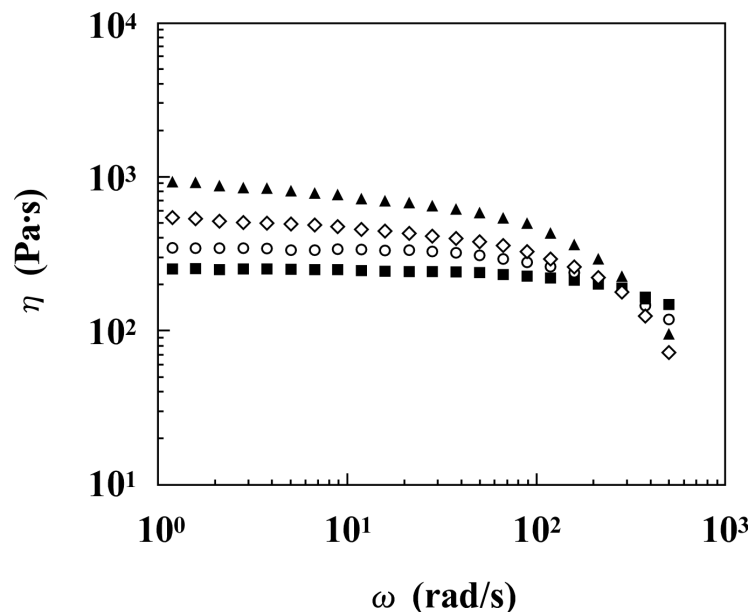


Figure 5-2. Melt viscosity (η) of PESu and PESui's as a function of frequency (ω) measured at 130 °C. PESu (■); PESui-1 (○); PESui-3 (▲); and PESui-5 (◇).

5.2.2.3. 熱的特性および動的粘弾性

Table 5 – 3 に、ポリマーの熱的性質を示す。導入イオン基数の増加に伴って、融点は、わずかに低下した。一方、イオン基数の増加に伴って、結晶化温度は大きく低下し、発熱ピークの強度は小さくなった (Figure 5 – 3)。また、ポリマー鎖中のイオン基数の増加に伴い、ポリマーの融解エンタルピーは小さくなった。さらに、過冷却度はイオン基数の増加に伴い大きくなった。熱的性質における同様の現象は、PBSu および PBA のアイオノマー化によっても見られることが報告されている^{18,19)}。イオン基導入による一連の現象は、イオン基がポリマー鎖中で凝集することにより、結晶化度を低下させることによって生じると考えられる。

Figure 5 – 4 は、ポリマーの広角 X 線回折 (WAXD) パターンを示している。すべてのポリマーが、20.0 °、23.1 °、および 26.7 ° に強いピークを示した。WAXD ピーク幅は、イオン基数の増加によって幅広くなったが、面間隔に大きな変化は見られなかった。PESu ホモポリマーの結晶化度は 44.5 % であったが、イオン基数の増加に伴い、結晶化度は低下した。これは、イオンユニットが結晶部分から追い出され、その結果として結晶領域が減少したためであると考えられる。

Figure 5 – 5 は、ポリマーの貯蔵弾性率 (G') および $\tan \delta$ を示している。アイオノマーの貯蔵弾性率は、20 ~ 40 °C 付近に見られるラバープラトー領域において PESu ホモポリマーのそれよりも大きかった (Figure 5 – 4 (A))。さらに、Figure 5 – 4 (B) に見られるように、イオン基数の増加に伴いガラス転移温度は上昇した。これは、イオン基間の静電的な引力による物理架橋に起因すると考えられる。一方、PESui-5 の貯蔵弾性率は、ガラス転移部分より高い温度領域において、温度の増加に伴い急激に低下した。これは、分子内イオン相互作用による物理架橋が増加するためであると考えられる³²⁾。

Table5-3. Thermal properties of PESu and its ionomers.

| Sample | T_g (°C) ^{a)} | T_m (°C) ^{b)} | ΔH_f (J/g) ^{b)} | T_c (°C) ^{b)} | $T_m - T_c$ (°C) |
|---------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------|
| PESu | 3.3 | 102.8 | 42.5 | 57.2 | 45.6 |
| PESui-1 | 5.5 | 100.9 | 38.6 | 49.4 | 51.5 |
| PESui-3 | 8.9 | 97.9 | 34.2 | 44.3 | 53.6 |
| PESui-5 | 12.1 | 96.6 | 27.3 | 40.5 | 56.1 |

a) Measured by DMA, 2 °C/min.

b) Measured by DSC, 10 °C/min.

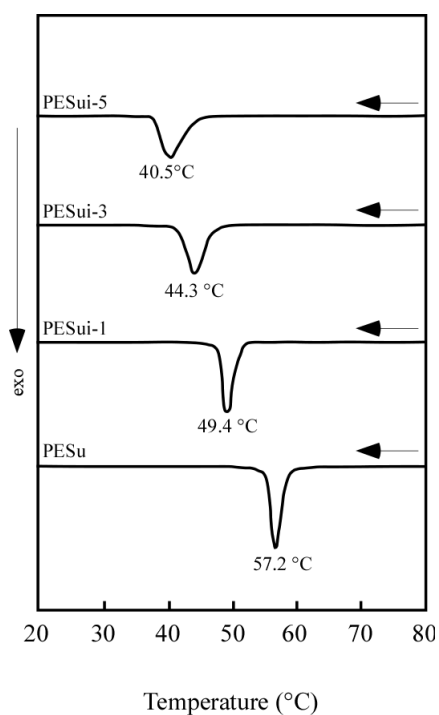


Figure 5-3. DSC traces of PESu and PESui's in the non-isothermal crystallization at a cooling rate 10 °C/min.

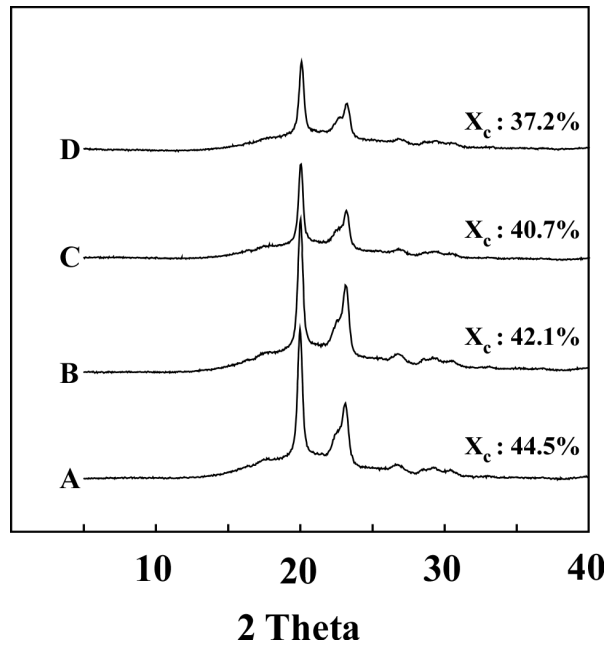


Figure 5-4. WAXD patterns of PESu and PESui films crystallized at 50 °C. A, PESu; B, PESui-1; C, PESui-3; D, PESui-5. The crystallinity was calculated by deconvolution of the WAXD patterns using a curve-fitting program.

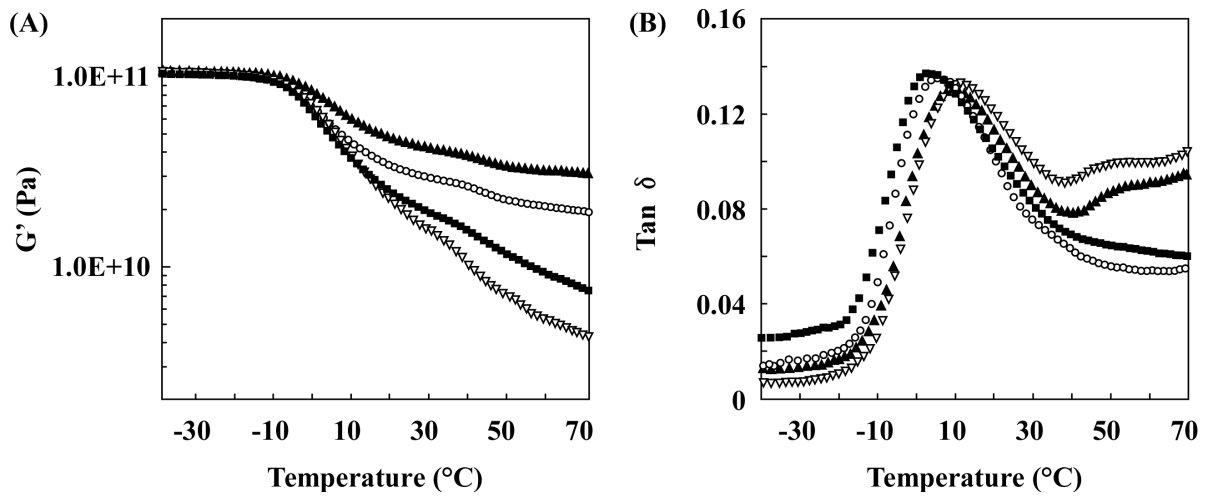


Figure 5-5. Storage modulus (A) and $\tan \delta$ (B) of PESu and PESui's versus temperature. PESu (■); PESui-1 (○); PESui-3 (▲); and PESui-5 (▽).

5.2.2.4. 球晶形態観察

Figure 5-6 は、50 °C で等温結晶化させた各種 PESu アイオノマーフィルムの偏光光学顕微鏡像を示している。結晶サイズは、イオン基数が多いほど小さくなった。この結果は、PESu 鎖へ導入したイオン基が形成した凝集体が、結晶核として働くことを示唆している。既報より、ランダムアイオノマー中のイオン凝集体は、核形成促進剤として働くことが知られている^{24,25,33,34}。

Figure 5-7 は、結晶化温度を変化させて各種 PESu アイオノマーの球晶を成長させたときの球晶成長速度を結晶化温度に対してプロットした結果を示してある。球晶観察は、結晶化温度を 30 から 70 °C まで変化させて行った。PESu ホモポリマーでは、結晶化温度が 55 °C 付近で球晶成長速度の最大値を示し、その値は約 0.43 $\mu\text{m/s}$ であった。球晶成長速度は、イオン基数の増加に伴って低下し、PESui-5mol%の最大球晶成長速度は、PESu ホモポリマーの約 1/3 までさがった。また、イオン基数の増加に伴い、球晶成長速度の最大値を示す結晶化温度が、55 °C から 40 °C まで低温側にシフトした。これは、PESu 鎖へ導入したイオン基凝集体が、ポリマー鎖の動きを抑制し、結晶形成を妨げる働きをするためであると考えられる。

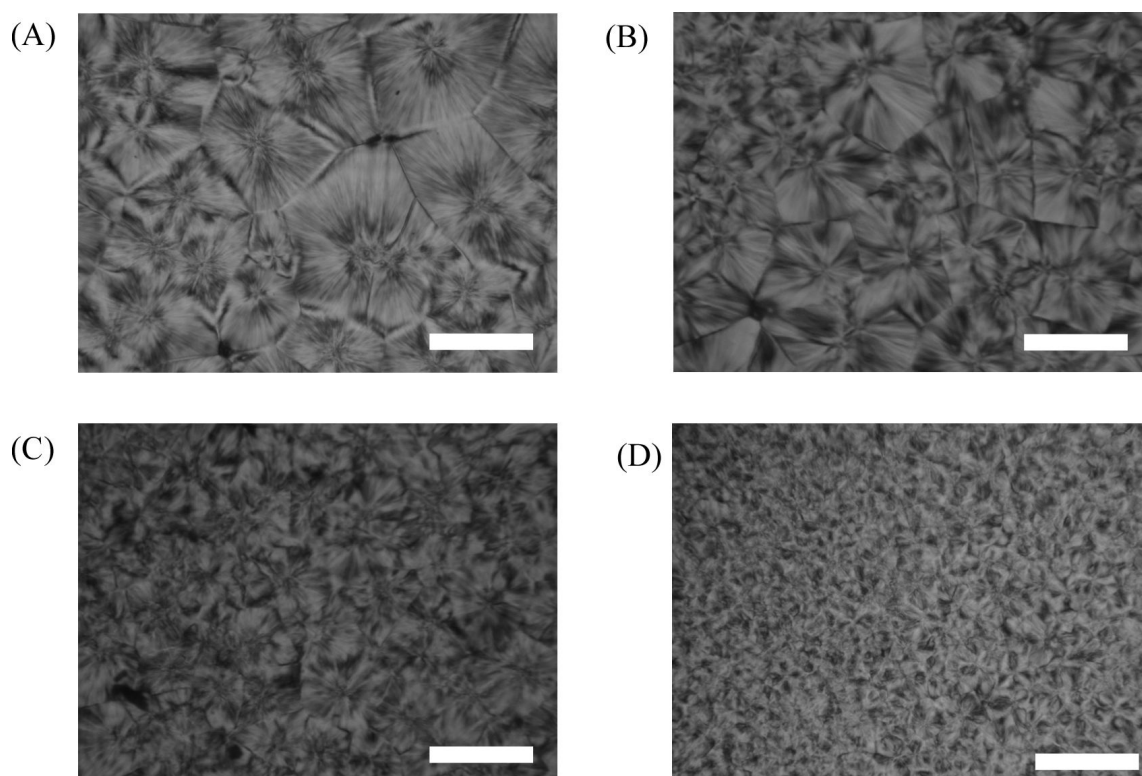


Figure 5-6. Spherulitic morphologies of PESu and PESui's measured with POM at 50 °C; (A) PESu, (B) PESui-1, (C) PESui-3, and (D) PESui-5. White bars indicate 50 μm .

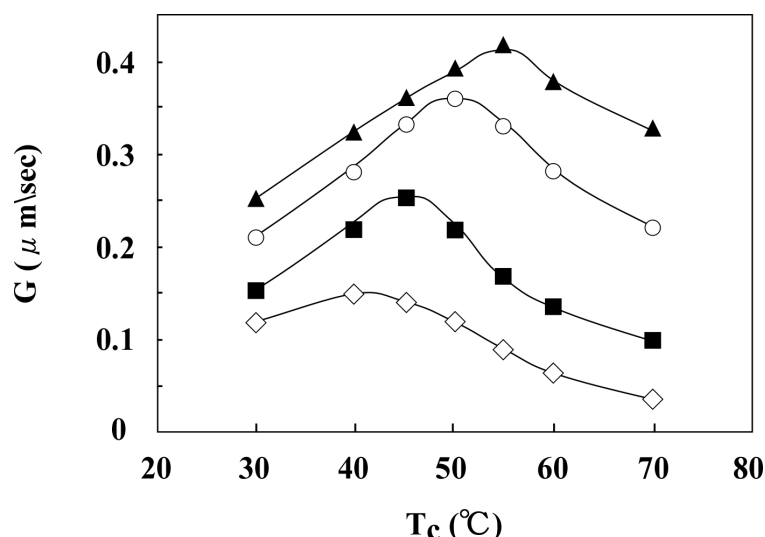


Figure 5-7. Radial growth rate (G) of PESu and PESui's at various crystallization temperatures (T_c). PESu (▲); PESui-1 (○); PESui-3 (■); and PESui-5 (◇).

5.2.2.5. 引っ張り特性

Figure 5-8は、各種アイオノマーの引っ張り特性を示している。引っ張り伸びは、導入イオン基数の増加に伴い減少した。一方、イオン基数の増加に伴い、引っ張り強度は増大した。これは、イオン凝集体形成による物理架橋のためであると考えられる。しかしながら、PESui-5は、PESui-3と比較して低い引っ張り強度を示した。この原因として、イオン基数が多い場合、マルチプレット周辺の運動束縛領域が多くなり、マトリクスの不連続部分が出現するためであると考えられる。Figure 5-9は、イオン基数の増加に伴うイオン凝集体とその周辺の運動束縛領域の変化の模式図を示している。導入イオン基の増加に伴ってイオン凝集体の数も増加する。1mol% (Figure 5-9(A)) および 3mol% (Figure 5-9(B)) の場合では、マトリクス部分は連続であるが、5mol%導入した場合はマトリクスの不連続部分が出現する (Figure 5-9(C))。Eisenbergらが提唱したマルチプレット-クラスターモデルでは、臨界イオン数以上になると物理特性が大きく変化することが報告されている³⁵⁾。さらに、イオン基数が増加したことにより、分子間凝集体だけでなく、分子内凝集体の形成も増えたことも原因であると考えられる。Xieらは、スルホン化ポリスチレンナトリウム塩のイオン凝集体について研究し、臨界スルホン化度が4mol%以上のときに、分子内イオン凝集体が形成されることを見出している³⁶⁾。本研究において、PESui-5の貯蔵弾性率、引っ張り強度、および熔融粘度は、PESui-3のそれよりも低い値を示した。これらを総合的に考えると、臨界イオン数は、少なくとも3mol%と5mol%との間にある可能性が高い。

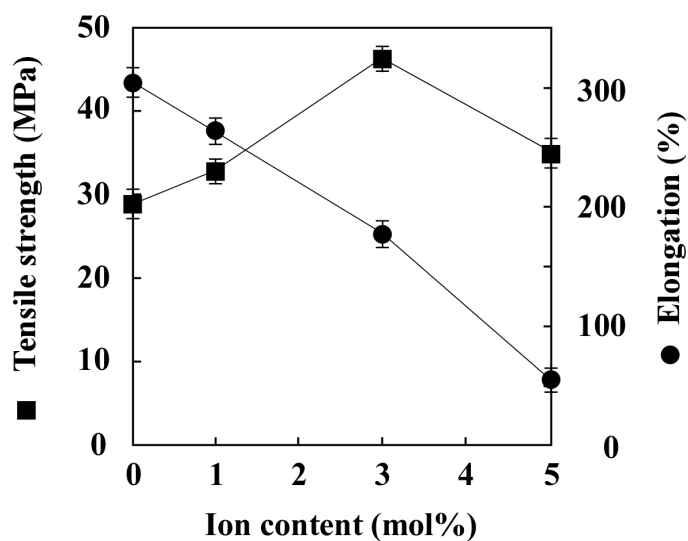


Figure 5-8. Tensile strength (■) and elongation (●) of PESu and PESuI's versus DMSI content.

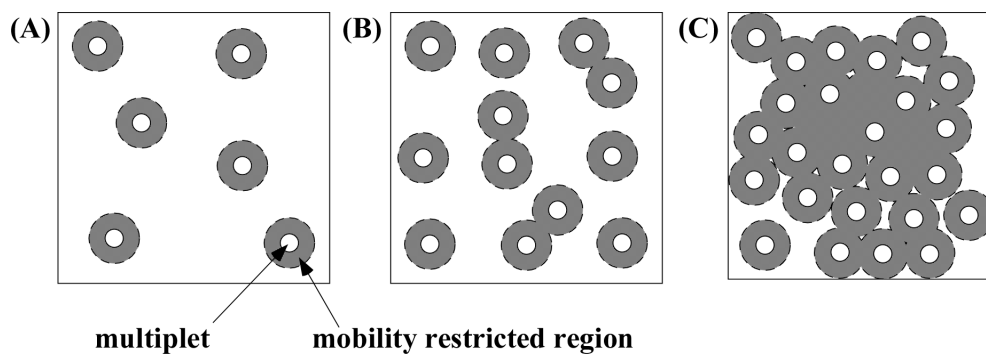


Figure 5-9. Schematic diagram of the ion aggregations and the region of restricted mobility at different ion contents: (A) 1 mol%; (B) 3 mol%, and (C) 5 mol%.

5.2.2.6. 生分解性試験

P. funiculosum 由来の P(3HB)分解酵素を用いて、各種アイオノマーの酵素分解速度を調べた (Figure5-10 (A))。すべてのサンプルにおいて、重量減少量は、時間に比例して増加した。分解速度は、イオン基数が多い程、大きくなった。Kumagai らは、P(3HB)分解酵素による P(3HB)の酵素分解速度は、結晶化度に大きく依存し、フィルムの結晶化度の低下に従い増加することを見出している³⁷⁾。P(3HB)分解酵素は、フィルム表面の非晶領域に存在するポリマー鎖を優先的に切断し、続いて結晶領域のポリマー鎖を切断すると報告されている³⁸⁾。非晶領域に存在する鎖の P(3HB)の酵素分解速度は、結晶領域に存在するポリマー鎖のその約 20 倍速いことが報告されている³⁷⁾。WAXD 解析より、PESuI においてイオン基数の増加に伴い結晶化度が低下することが示された。したがって、PESuI の場合、イオン基数の増加に伴う酵素加水分解速度の促進は、フィルムの結晶化度が低下したためであると考えられる (Figure5-10 (B))。

Figure 5-11 は、各種アイオノマーの BOD 生分解度曲線を示している。PESu ホモポリマーの BOD 生分解度は、時間とともに増加し、培養 24 日間で約 80% の BOD 生分解度を示した。一方、アイオノマーの BOD 生分解度の増加速度は、PESu ホモポリマーよりも大きく、18 から 20 日間で約 80% の BOD 生分解度に達した。また、すべてのポリマー試料の重量生分解度は、28 日後の分解試験で 100% に達した。これらの結果から、PESu ホモポリマーだけでなく、PESu アイオノマーも、環境中に存在する微生物によって完全分解されることが示唆された。ポリマー試料の重量生分解度と BOD 生分解度との間には、20~25% の違いが見られる。これは、後者においてはポリマー試料の分解生成物が微生物の活動エネルギーとして利用されるだけでなく、微生物増殖によるバイオマス形成に利用されているためであると考えられる。

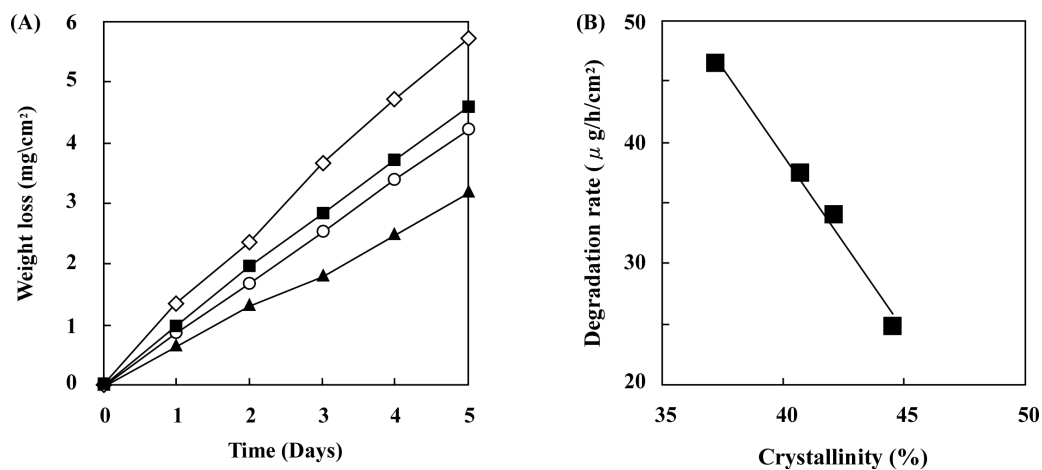


Figure5-10. The relation between the weight loss and incubation time (A), and the relation between degradation rate and the X-ray crystallinity for PESu (▲); PESui-1 (○); PESui-3 (■); and PESui-5 (◇).

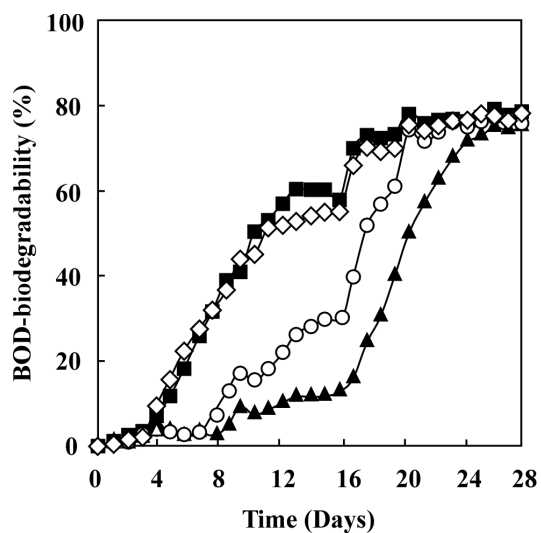


Figure5-11. BOD-degradation curves of PESu and PESui's in Azami pond water. PESu (▲); PESui-1 (○); PESui-3 (■); and PESui-5 (◇).

5.3. ポリブチレンサクシネートベースアイオノマーの合成およびその特徴付け

5.3.1. 実験

5.3.1.1. 試薬

コハク酸、および 1,4-ブタンジオールは、アルドチッチ社から購入し、そのまま使用した。チタニウムテトラブトキシドも、アルドリッチ社から購入し、そのまま使用した。本研究で用いた脂肪族イオン基である、スルホン化ジメチルフマル酸エステル (SDMF)は、ジメチルフマル酸(DMF)および NaHSO₃ から合成された³⁹⁾。

5.3.1.2. ポリマー合成²⁴⁾

PBSu および PBSu アイオノマーを合成するためのモノマーとして、コハク酸、1,4-ブタンジオール、および SDMF を用いた。合成方法は、5.2.1.2. 参照

5.3.1.3. フィルム作成

5.2.1.3. 参照

5.3.1.4. ¹H NMR

5.2.1.4 参照

5.3.1.5. 分子量測定

5.2.1.5. 参照

5.3.1.6. 広角 X 線解析 (WAXD)

5.2.1.6. 参照

5.3.1.7. 溶融レオロジー

測定は、150°C で行った (5.2.1.7.参照)。

5.3.1.8. 偏光光学顕微鏡観察 (POM)

PBSu フィルムを、スライドガラスおよびカバーガラスに挟み、150°C、3分保温し、完全に溶融させた。その後、90°C に急冷し、90°C で60分保温した。偏光光学顕微鏡観察は、5.2.1.8.参照

5.3.1.9. 示差走査熱量測定 (DSC)

5.2.1.9.参照

5.3.1.10. 動的粘弾性解析 (DMA)

ポリマー試料を -70°C に冷却後、 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 90°C まで昇温した(4.2.1.10.参照)。

5.3.1.11. 引っ張り試験

5.2.1.11.参照

5.3.1.12. 生分解性テスト

(1) 酵素分解^{28,40)}

0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) 1 mL に、ポリエステルフィルム ($10 \times 10 \times 0.3$ mm) と *Chromobacterium viscosum* 由来のリポプロテインリパーゼ (Fluka 社製) 溶液 10 μL を 10 mL サンプル菅瓶にいれ、 30°C で1, 2, 3, 4, および5日間保温した。酵素濃度は2.5 mg/mL (250 U/mL) に調整したものを用いた。フィルムの回収および重量減少測定は、5.2.1.12.(1) 参照。

(2) 生物学的酸素要求量 (BOD 生分解テスト)

5.2.1.12 (2).参照

5.3.2. 結果と考察

5.3.2.1. ポリマー合成

Table 5-4 に、臨界粘度に達するまでの時間、仕込み比、ポリマーの組成、および分子量を示す。芳香族イオン基を導入した場合と同様、加えた SDMF 濃度が高い程、反応液が臨界粘度に達するまでに多くの時間を要した。一方、各種試料の分子量は、SDMF 濃度が高いほど低下した。

Figure 5-12 に、PBSui-3 の ^1H NMR スペクトルを示す。 α 、 β および γ は、それぞれ、PBSu の繰り返しユニット由来のピークである。 δ は、SDMF のプロトン由来のピークである。共重合ポリマー中に導入された SDMF 含率は、6.8 ppm 付近に見られた SDMF のメチレン水素と 2.6 ppm 付近に見られたメチレン水素 ($-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$) の積分比を用いて決定した²⁴⁾。 ^1H NMR 解析の結果、PBSu 中に導入された SDMF 含率は、仕込み比とほぼ一致していた。

Table5-4. Composition and molecular weight of PBSu and its ionomers.

| Polymer code | Reaction time | Composition | | Average molecular weight ^{b)} | |
|--------------|---------------|---|--|--|-----------|
| | | Molar ratio in feed (succinic acid/SDMF) | Molar ratio in real composition ^{a)} (succinic acid/SDMF) | $M_n \times 10^{-4}$ | M_w/M_n |
| PBSu | 2+3 | 100/0 | 100/0 | 5.0 | 2.11 |
| PBSui-1 | 2+4 | 99/1 | 99/1 | 3.8 | 2.41 |
| PBSui-3 | 2+6 | 97/3 | 97.3/2.7 | 2.6 | 2.78 |
| PBSui-5 | 2+7 | 95/5 | 95.1/4.9 | 1.8 | 3.24 |

a) Measured by ¹H NMR

b) Measured by GPC

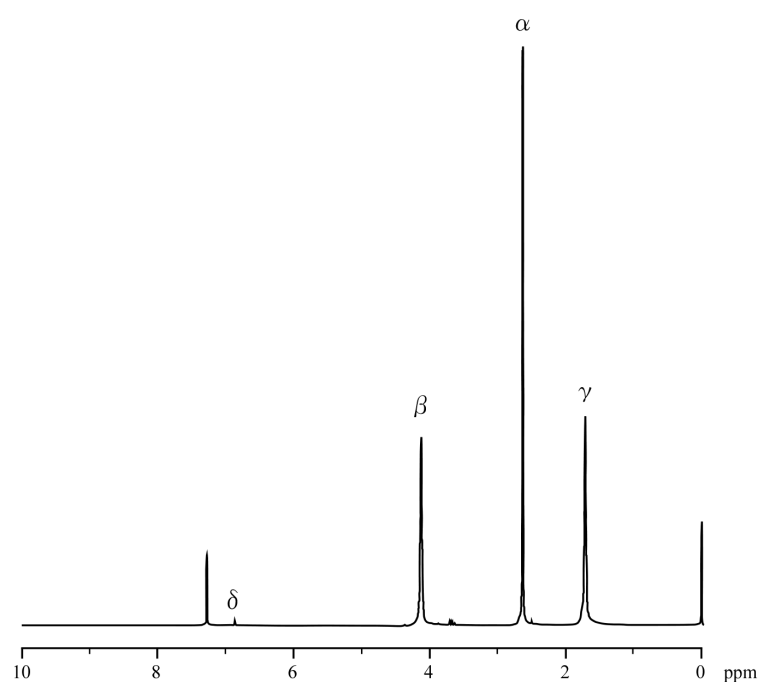
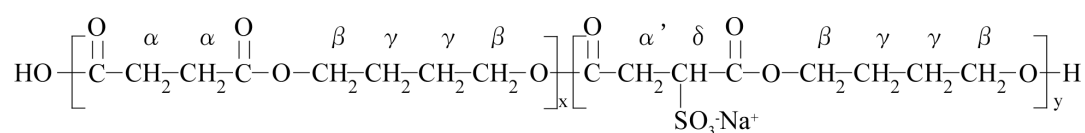


Figure 5-12. ¹H NMR spectrum of PBSui-3.

5.3.2.2. 溶融レオロジー

Figure 5-13は、150 °Cにおける、各種 PBSu アイオノマーの角周波数(ω)と溶融粘度(η)の関係を示している。4.2.2.4.で述べたように、アイオノマーの溶融レオロジーは、重量平均分子量およびイオン凝集体由来の物理架橋の2つの要因によって決定される。PBSu ホモポリマーの重量平均分子量は、アイオノマーのそれよりも高いにもかかわらず、低角周波数の場合、アイオノマーの溶融粘度は、PBSu ホモポリマーのそれよりも高かった。この結果は、ポリマー中に導入したイオン基による凝集体が、物理架橋を形成していることを示唆する。さらに、低角周波数においては、分子量による効果と比較して、イオン基間の物理架橋の方が、より溶融粘度に大きく影響したためであると考えられる。しかしながら、角周波数が大きくなるに従い、アイオノマーの溶融粘度は、低下した。PBSui-1、PBSui-3、および PBSui-5 は、それぞれ5、12、および21 rad/sの角周波数において、PBSu よりも小さな溶融粘度を示した。一方、PBSu ホモポリマーは、一定の溶融粘度を示した。この結果は、せん断力の増加によって物理架橋が破壊され、分子量の効果が大きく影響したためであると考えられる。

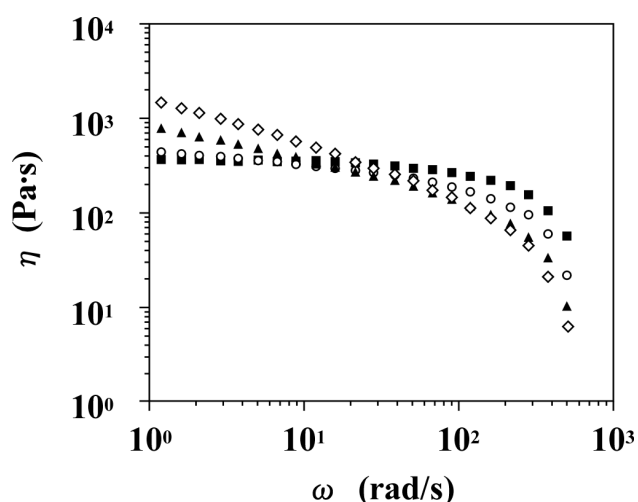


Figure 5-13. Melt viscosity (η) of PBSu and PBSui's as a function of frequency (ω) measured at 150 °C. PBSu (■); PBSui-1 (○); PBSui-3 (▲); and PBSui-5 (◇).

5.3.2.3. 熱的特性および動的粘弾性

Table 5-5に、ポリマーの熱的性質を示す。導入イオン基数の増加に伴って、融点および融解エンタルピーは、わずかに低下した。また、イオン基の導入により、ホモポリマーと比較して、結晶化温度は3.5~7°C上昇した (Figure 5-14)。これらの結果は、ポリマー中に導入されたイオン基が形成するイオン凝集体が、結晶核として働くためであると考えられる。Ishidaらは、低濃度 (<1.2mol%) のSDMFを導入したPBSu アイオノマーにおいて結晶化温度が上昇することを見いだしている²⁴⁾。一方、PBSui-5はPBSui-3と比較して結晶化温度が低下した。これは、イオン基数が増加し、鎖の運動性が制限されたためであると考

えられる。

Figure 5-15は、ポリマーの広角 X 線回折 (WAXD) パターンを示す。すべてのポリマーが(020)、(021)、(110)、および(111)面に起因するピークを、それぞれ、19.3°、21.7°、22.8°、および28.7°に示した。イオン基数の増加に伴い、結晶化度は低下した。この原因として、導入されたイオン基ユニットが、結晶部分から排除され、その結果として、結晶領域が減少したと考えられる。

Figure 5-16は、各種試料の貯蔵弾性率 (G') および $\tan \delta$ を示す。アイオノマーの貯蔵弾性率は、PBSu ホモポリマーのそれよりも高かった (Figure 5-15 (A))。さらに、イオン基数の増加に伴い、ガラス転移温度の上昇が観察された (Figure 5-15 (B))。これは、導入されたイオン基間の相互作用によって形成された物理架橋が、ポリマー鎖の動きを効果的に制限するためであると考えられる。

Table5-5. Thermal properties of PBSu and its ionomers.

| Sample | T_g (°C) ^{a)} | T_m (°C) ^{b)} | ΔH_f (J/g) ^{b)} | T_c (°C) ^{b)} | T_m-T_c (°C) |
|---------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------|
| PBSu | -21.1 | 114.2 | 78.5 | 72.2 | 42.0 |
| PBSui-1 | -18.4 | 114.2 | 77.7 | 77.4 | 36.8 |
| PBSui-3 | -15.0 | 113.8 | 75.5 | 79.0 | 34.8 |
| PBSui-5 | -12.3 | 112.9 | 71.3 | 75.7 | 37.2 |

a) Measured by DMA, 2 °C/min.

b) Measured by DSC, 10 °C/min.

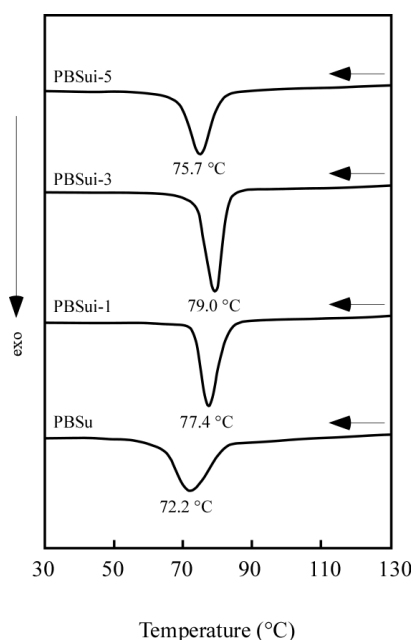


Figure 5-14. DSC traces of PBSu and PBSui's in the non-isothermal crystallization at a cooling rate 10 °C/min.

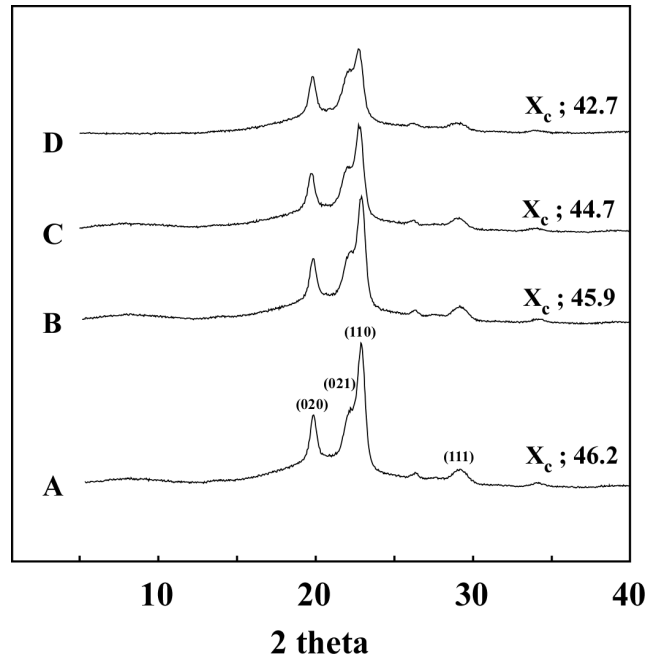


Figure 5-15. WAXD patterns of PBSu and PBSui films crystallized at 70 °C. A, PBSu; B, PBSui-1; C, PBSui-3; D, PBSui-5. The crystallinity was calculated by deconvolution of the WAXD patterns using a curve-fitting program.

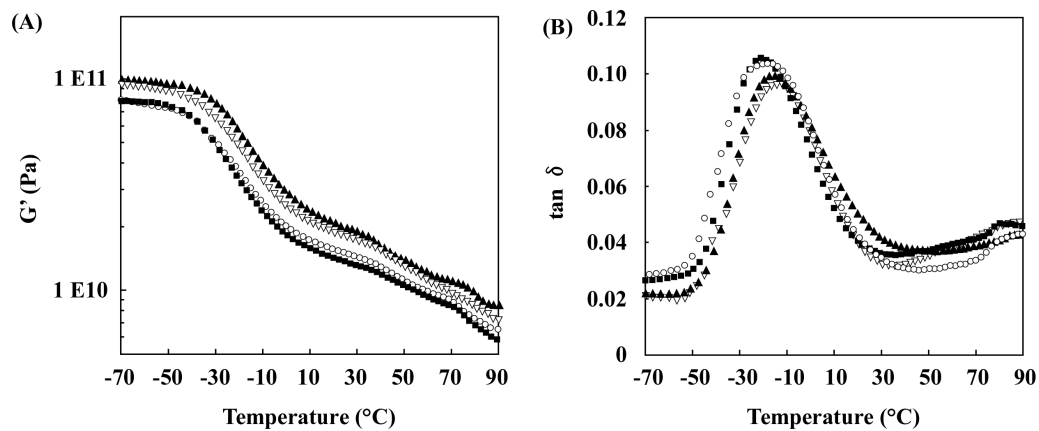


Figure 5-16. Storage modulus (A) and $\tan \delta$ (B) of PBSu and PBSui's versus temperature. PBSu (■); PBSui-1 (○); PBSui-3 (▲); and PBSui-5 (▽).

5.3.2.4. 球晶形態観察

Figure 5-17は、90 °Cで等温結晶化させた各種PBSuアイオノマーフィルムの偏光顕微鏡像を示している。ポリマー試料の結晶成長速度は、球晶半径を時間に対してプロットして、その時の傾きより算出した。PBSuホモポリマーの球晶は、直径50～100 μm の大きさであった。イオン基数の増加に伴い、球晶のサイズは小さくなった。

Figure 5-18は、結晶化温度を変化させて各種PBSuアイオノマーの球晶を成長させたと

きの球晶成長速度を結晶化温度に対してプロットした結果を示してある。PBSu ホモポリマーでは、結晶化温度が70°C付近で球晶成長速度は最大値を示し、その値は約3 $\mu\text{m}/\text{s}$ であった。球晶成長速度の最大値を示す結晶化温度は、イオン基の増加にともなって70°Cから80°Cまで高温側にシフトすることがわかった。また各種 PBSu アイオノマーの球晶成長速度の最大値に大きな変化は見られなかった。これらの結果は、PESu 鎖へ導入したイオン基凝集体が、結晶核として働き、PBSu 鎖の核形成を効果的に誘発することを示唆する。

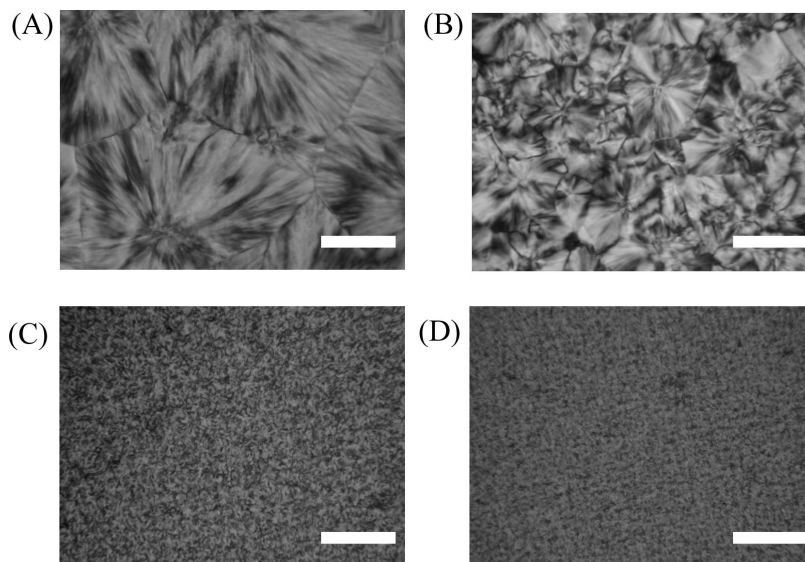


Figure 5-17. Spherulitic morphologies of PBSu and PBSui's measured with POM at 90 °C; (A) PBSu, (B) PBSui-1, (C) PBSui-3, and (D) PBSui-5. White bars indicate 50 μm .

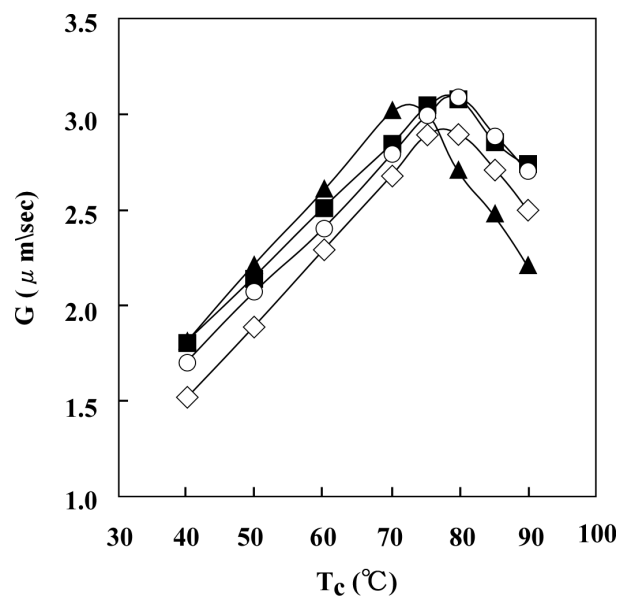


Figure 5-18. Radial growth rate (G) of PBSu and PBSui's at various crystallization temperatures (T_c). PBSu (▲); PBSui-1 (○); PBSui-3 (■); and PBSui-5 (◇).

5.3.2.5. 機械特性

Figure 5-19は、ポリマーの引っ張り特性を示している。イオン基を導入することで、引っ張り伸びは、著しく低下した。一方、アイオノマーの引っ張り強度は、PBSu ホモポリマーのそれよりも大きい値を示した。これは、イオン凝集体によって形成された物理架橋のためであると考えられる。しかしながら、PBSui-5は、PBSui-3と比較して低い引っ張り強度を示した。この原因は、臨界イオン数を超えたためであると推測される。イオン基数が大きい場合、分子内イオン対相互作用が増加する³³⁾。また、イオン凝集体の数が増加するに従い、凝集体周辺の運動束縛領域も増える。これによりマトリクスの不連続部分が出現し、物性が大きく変化することが報告されている (Figure 5-9)。PBSui-5の結晶化温度、貯蔵弾性率、および引っ張り強度は、PBSui-3と比較して低い値を示した。これらの結果を総合的に考えると、PBSuでは臨界イオン数は、3 mol%と5 mol%の間にある可能性が高い。

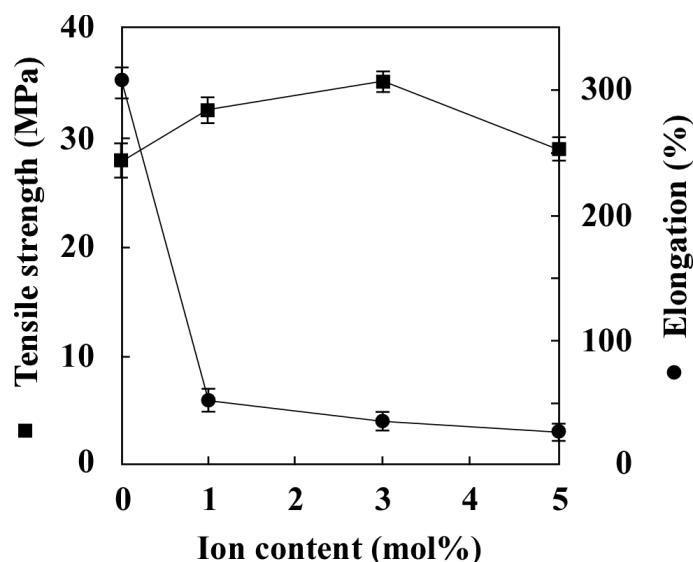


Figure 5-19. Tensile strength (■) and elongation (●) of PBSu and PBSui's versus SDMF content.

5.3.2.6. 生分解性

C. viscosum 由来のリポプロテインリパーゼを用いて、ポリマーの酵素分解性を調べた (Figure 5-20 (A))。すべてのサンプルにおいて、重量減少量は、保温時間に比例して増加した。加水分解速度は、イオン基数の増加に伴って増加した。これは、PESu アイオノマーで見られた結果と同様、イオン基の導入によって、ポリマーの結晶化度が低下したためであると考えられる (Figure 5-20 (B))。

Figure 5-21は、各種 PBSu アイオノマーの BOD 生分解度曲線を示した。イオン基数の増加に伴い、BOD 生分解度の誘導期間が短くなった。すべてのポリマー試料の BOD 生分解度は、培養時間とともに増加した。培養 44 日後における PBSu ホモポリマー、PBSui-1、PBSui-3、および PBSui-5 の BOD 生分解度は、それぞれ 61%、65%、72%、および 7

3%であった。一方、培養44日後における PBSu ホモポリマー、PBSui-1、PBSui-3、および PBSui-5 の重量生分解度は、それぞれ、72%、76%、84%、および84%であり、酵素加水分解および、BOD 生分解度の結果と同じ傾向を示していた。これらの結果から、PBSu へのイオン基の導入は、生分解速度を上昇させることがわかった。

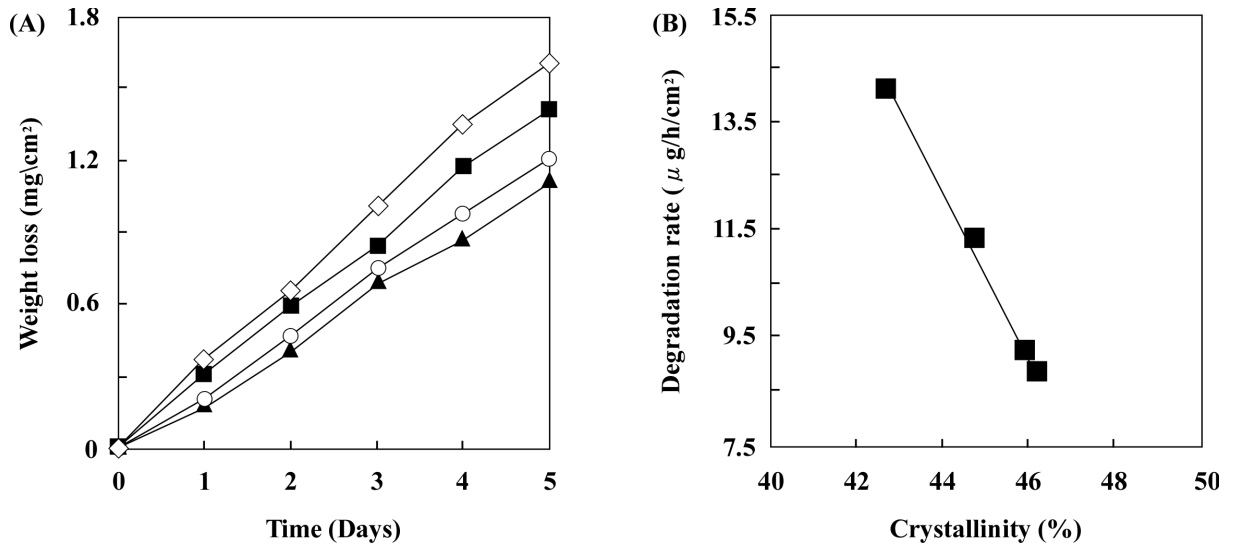


Figure 5-20. The relation between the weight loss and incubation time (A), and the relation between degradation rate and the X-ray crystallinity for PBSu (▲); PBSui-1 (○); PBSui-3 (■); and PBSui-5 (◇).

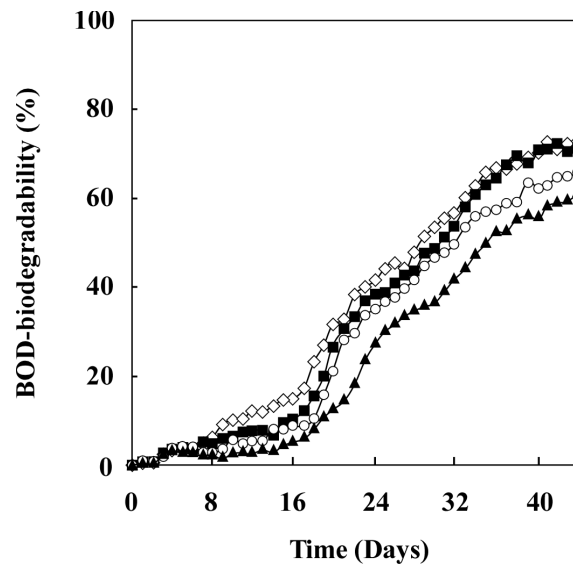


Figure 5-21. BOD-degradation curves of PBSu and PBSui's in Azami pond water. PBSu (▲); PBSui-1 (○); PBSui-3 (■); and PBSui-5 (◇).

5.4. 結言

本章では、アイオノマーの概念を取り入れ、脂肪族ポリエステル¹⁾の物性および生分解性の調節を行うことを検討した。2段階のバルク重合によって、ポリマー鎖中にイオン基をランダムに導入した、ランダム共重合アイオノマーを得ることに成功した。

これまでの研究で報告されているように、イオン基を導入することで、熱特性、引っ張り特性、動的粘弾性および溶融粘度などの物理特性、および球晶形態が大きく変化した。

さらに、イオン基数の増加に伴い、酵素分解速度が促進されることが明らかになった。

これらの結果から、イオン基を導入することで、生分解性プラスチックの物理特性および生分解性速度を制御することができることが示唆された。

参考文献

- [1] Fujimaki, T. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 209.
- [2] Japan patent. Ito, H; Nanba, T; Kobayashi, H. Application Number 1994-90216.
- [3] Doi, Y. Microbial polyesters. New York: VCH Publishers; 1990.
- [4] Gross, R.; Kalra, B. *Science* **2002**, *297*, 803.
- [5] S.-Y. Lee, J.-W. Park, Y.-T. Yoo, S.-S. Im, *Polym. Degrad. Stab.* **2002**, *78*, 63.
- [6] J. Kasperczyk, *Macromol. Symp.* **2001**, *175*, 19.
- [7] K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503.
- [8] J.-W. Park, D.-K. Kim, S.-S. Im, *Polym. Int.* **2000**, *51*, 239.
- [9] H. Abe, Y. Doi, Y. Hori, T. Hagiwara, *Polymer* **1997**, *39*, 59.
- [10] G. J. Howard, S. Knutton, *Polymer* **1969**, *9*, 527.
- [11] Brown Hp, Gibbs C.F, *Ind, Eng. Chem.*, **1955**, *47*, 1007.
- [12] Eisenberg A., King M., “Ion-Containing Polymers” Academic Press, NY, 1977.
- [13] Eisenberg A., Kim J. S., “Introduction to Ionomers”, Chap5 Willey, NY 1998.
- [14] Holliday L. “Ionic Polymers”, Applied Sci Pub., London 1975.
- [15] Tant M.R., Mauritz K.A., Wilkes G.L., “Ionomers- Synthesis, Structure, Properties and Applications”, Blackie Acad & Professional, London 1997.
- [16] Wilson A.D., Prosser H.J., “Developments in Ionic Polymers-1”, Appl Aci Pub., London 1982.
- [17] Pineri M., Eisenberg A., “Structure and Properties of Ionomers”, NATO ASI Series 1987.
- [18] Yoo, Y.-T.; Lee, B. J.; Han, S.-I.; Im, S.-S.; Kim, D.-K. *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79*, 257.
- [19] Han, S.-I.; Im, S.-S.; Kim, D.-K. *Polymer* **2003**, *44*, 7165.
- [20] Han, S.-I.; Lee, W.-D.; Kim, D.-K.; Im, S.-S. *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *25*, 753.
- [21] Sherman, J. W.; Storey, R. F. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1996**, *37*, 952.
- [22] Storey, R. F.; Sherman, J. W. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1998**, *39*, 602.
- [23] Ishida K., Han S.I., Inoue Y., Im S.S., *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 1028.
- [24] Ishida K., Han S.I., Im S.S., Inoue Y., *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 146.
- [25] HanS.I., Gu B. H., Nam K.H., Im S.J, Kim S.C. Im S.S. *Polymer* ,2007, *48*, 1830.
- [26] Miyazaki, S.; Takahashi, K.; Shiraki, M.; Saito, T.; Tezuka, Y.; Kasuya, K. *J. Polym. Environ.* **2000**, *8*, 175.
- [27] T. Hisano, K. Kasuya, Y. Tezuka, N. Ishii, T. Kobayashi, M. Shiraki, E. Oroudjev, H. Hansma, T Iwata, Y. Doi, T. Saito, K. Miki, *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 993.
- [28] Kasuya, K.; Ohura, T.; Masuda, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 329.
- [29] Yakabe, Y.; Kitano, M. *Bodegradable Plastics and Polymers*, ed. Doi, Y. and Fukuda, K. Elsevier, Amsterdam, **1994**, p. 331.
- [30] Kasuya, K.; Takagi, K.; Ishiwatari, S.; Yoshida, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**,

59,327.

- [31] JIS K 6950: 1994, Plastics – Testing Method for Aerobic Biodegradability by Activated Sludge.
- [32] Lundberg R.D., Philips R.R., *J. Polym Sci. Polym. Phys Ed* **1982**, 20, 1143.
- [33] Yu, Y.; Jin, M.; Bu, H. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 1894.
- [34] Yu, Y.; Bu, H. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, 202, 421
- [35] Eisenberg, A.; Hird, B.; Moore, R. B. *Macromolecules* **1990**, 23, 4099.
- [36] Xie R., Weiss R.A., *Comp Theor Polym Sci* **1997**, 7, 65.
- [37] Kumagai Y, Kanesawa Y, Doi Y., *Makromol. Chem.* **1992**,193,53.
- [38] Iwata T., *Macromol. Biosci.*, **2005**, 5, 689.
- [39] Wang X., Wang L., Li H., Tang X., Chang F., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, 77, 184.
- [39] Kitakuni E., Yoshikawa K., Nakano K., Sasuga J., Nobiki M., Naoi H., Yokota Y., Ishioka R., Yomabe Y., *Environ. Toxicol. Chem.*, **2001**, 20, 941.

第 6 章

結論

6.1 本研究のまとめ

プラスチック消費量が増加するにつれ、廃棄プラスチックの有効利用、再資源化が重要な課題になってきた。このような背景のもと、使用中は優れた性能を持ち、廃棄後は環境中の微生物によって完全に分解される生分解性プラスチックの開発が期待されている。

本研究で取り上げた、化学合成生分解性ポリエステルは、近年の合成技術の発達および比較的安い生産コストのために、すでにくつかの化学メーカーが生産・販売している。一方で、化学合成生分解性ポリエステルの生分解性については、不明な点が多かった。これらの本格的な普及を目前にして、材料の分解予測を行うことは、重要である。

本研究では、化学合成ポリエステルの分解予測を可能にするために、ポリエチレンサクシネート (PESu)、ポリブチレンサクシネート (PBSu)、およびポリブチレンアジペート-*co*-ブチレンテレフタレート (PBAT) の微生物分解について研究をした。さらに、目的に合わせて生分解性およびポリマー物性を調節することを目指し、PESuおよびPBSuアイオノマーの合成を行い、これらの特徴を調べた。

第1章 [序論] では、廃プラスチックに起因する環境問題について述べ、その問題の解決策の一つとしての生分解性プラスチックの意義について述べた。中でも、本研究で焦点をあてた化学合成ポリエステルの構造、物性、ならびに、生分解に関するこれまでの研究の経緯について述べた。さらに、アイオノマーの特徴について述べた。最後に、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章 [真菌によるポリエチレンサクシネート (PESu) の分解] では、環境中より、PESu分解真菌を単離し、その性質を調べた。

土壌より20株の中温性PESu分解真菌を単離した。単離されたPESu分解真菌は、子の菌類であった。これらの結果より、中温域の自然環境中でのPESu分解は、中温性のバクテリア以外に、中温性真菌も大きな役割を果たしていることがわかった。

すべての単離株は、PESu以外に、P(3HB)も分解することが判明した。単離株中、最も固体PESu分解活性の高いNKCM1003株の培養上清から、PESu分解酵素を精製し、その性質を調べた。本酵素は、分子量57000、等電点5.6の単一ポリペプチドであった。また、本酵素の至適pHは、7であり、pH5~8、および40℃以下で安定に存在した。一方、本酵素は、P(3HB)分解活性を有しており、またその他の基質に対する分解活性も*P.stutzeri*由来P(3HB)分解酵素と類似していた。これらのことより、本酵素は、P(3HB)分解酵素であることが示唆された。

第3章 [ポリブチレンサクシネート (PBSu) 分解微生物の探索とその性質] では、環

境中より、PBSu分解微生物を単離し、その性質を調べた。

10株のPBSu分解バクテリアを単離し、その性質を調べた。単離された10株のPBSu分解バクテリアのうち、7株がグラム陽性菌、3株がグラム陰性菌であった。単離株をさらに詳しく同定するために、遺伝学的解析した(rDNA配列解析)。その結果、Proteobacteria網、Firmicutes網、およびActinobacteria網に属するバクテリアがPBSuの分解に関与していることがわかった。

PBSu分解バクテリア中、高いPBSu分解活性を示したNKCM 8906株について、それらの性質を詳しく調べた。PBSu分解バクテリアNKCM 8906株の生化学的、生理学的性質、ゲノムDNAのG+C含率、イソプレノイドキノンの種類、および菌体脂肪酸組成を調べ、さらに16S rDNA配列解析を行った結果、本株は*Rhodococcus fascians*に最も近縁な種であることが判明した。本株が生産するPBSu分解酵素について調べた。本株の培養上清が示すPBSu分解活性とリパーゼ活性には相関関係があった。さらに、すべてのPBSu分解バクテリアが、リパーゼによって分解されるPCL、PBSA、およびオリーブオイルに対して分解活性を示した。これらの結果から、PBSu分解バクテリアが生産するPBSu分解酵素は、リパーゼ様酵素であることが示唆された。

一方、自然環境中から12株のPBSu分解真菌が単離された。すべてのPBSu分解真菌が、PCL、PBSA、オリーブオイルに対して分解活性を示した。また、PBSu分解真菌について系統学的解析を行った結果、PBSu分解真菌はPCL分解真菌と関連があった。

PBSu分解真菌中、最も高いPBSu分解活性を示したNKCM 1706株の特徴を詳細に調べた。本菌株は、中温性の真菌であった。PBSuの分解過程を調べた結果、本株は先ずPBSuをオリゴマーに分解し、次いでオリゴマーを構成成分にまで分解する。最後に、構成成分は本株によって取り込まれることが予想された。さらに、本株の酵素分泌について調べた結果、本株が分泌するPBSu分解酵素は、オリーブオイルおよび構成成分によっては誘導されず、PBSuオリゴマーおよびPCLによって誘導されるリパーゼの中でもクチナーゼと関連した酵素であることが示唆された。

第4章 [ポリブチレンアジペート-co-ブチレンテレフタレート (PBAT) 分解微生物の探索とその性質] では、環境中より、PBAT分解微生物を単離し、その性質を調べた。

自然環境中から5株のPBAT分解微生物を単離した。単離株中、最も高いPBAT分解活性を示したNKCM 1712株の特徴を調べた。NKCM 1712株は、中温性の真菌であり、*Isaria fumosoroseus*と高い近縁な種であった。本菌株が生産するPBAT分解について調べた結果、本菌株が分泌するPBAT分解酵素は、リパーゼ様酵素であることが示唆された。構成成分の資化性および分解産物の同定を行った結果、本菌株は、PBATを完全分解できることがわかった。さらに、土中における分解実験を行った結果、本菌株は自然環境中においてPBATの分解に大きく関与している可能性が示された。

第5章 [脂肪族ポリエステルベースアイオノマーの合成]では、化学合成脂肪族ポリエステルである、PESuおよびPBSuにイオン基をランダムに導入したランダムアイオノマーを合成し、その特徴を調べた。

少量のイオン基導入にもかかわらず、熱的性質、結晶化度、動的粘弾性、引張特性、および溶融レオロジーに大きな変化が見られた。球晶の形態観察を行った結果、導入したイオン基が核の役割を果たすために、結晶サイズが小さくなることがわかった。ポリマー試料に関して、酵素分解テストを行った。イオン基数の上昇に伴い、酵素加水分解速度は上昇した。これは、イオン基を導入することによって、結晶化度が減少するためであることが示された。これらの結果から、少量のイオン基導入によって、ポリマーの物理特性および生分解性を調整できることが明らかになった。

6.2. 結論

本研究の結果から以下のような結論を示す

1. どのような微生物がPESu、PBSuおよびPBATの分解に関与しているかがわかった。また、単離株がどのような酵素によってポリエステルを分解するかを明らかにした。
2. ポリエステル分解微生物が分泌する酵素によって、PESu、PBSuおよびPBATはモノマーやダイマーなどにまで分解された後、最終的に構成成分にまで分解される。さらに分解産物として放出された構成成分は、単離分解微生物あるいは自然環境中に存在する微生物によって完全に資化されることがわかった。
3. 単離分解微生物は、自然環境中においてポリエステル分解に大きく寄与していた。また、単離菌株によるそれぞれのポリエステルフィルムの分解速度が明らかになった。
4. イオン基の導入量によってPESuおよびPBSuの溶融特性、熱特性、引張特性、結晶化度、球晶サイズを制御することができた。また、イオン基を導入することで生分解速度を向上させるとともに、イオン基量によって生分解速度を制御することもわかった。

6.3. 今後の展望

化学合成生分解性ポリエステルの研究室内での分解実験と、実際の環境中での分解との間の不一致を是正し、分解予測を可能にするために、本博士論文では、まず化学合成ポリエステルの生分解性の大きな制御因子の一つであるポリエステル分解微生物およびその酵素の働きを明らかにすることを目的として研究を行った。

単離したポリエステル分解微生物は、ポリエステルの分解だけでなく完全に資化することができることがわかった。さらに、自然環境中においてポリエステルの分解に大きく寄与することも明らかになった。本研究の結果から、単離株は家庭用コンポスト生成装置のような閉鎖系でこれらのポリエステルを処理する際に、生物製剤として利用できる可能性がある。

一方、これらの化学合成ポリエステルの生分解性材料として利用する場合、より制御された物性および生分解性が要求される。本博士論文の第二の目的として、ポリエステルにイオン基を導入することにより、合成的にその物性および生分解性制御を検討した。

イオン基の導入量によって熔融特性、熱特性、引張特性、結晶化度、球晶サイズおよび生分解性を制御することに成功した。このことから、生分解性ポリエステルのアイオノマー化は物性および生分解性を制御するための優れた方法であると言える。本研究の結果は、生分解性プラスチックの物性および生分解性改善に関して新たな知見を与える。また、イオン基の導入量を制御することで用途に応じたポリマーを作成できると考えられる。

発表論文

第2章

Nariaki Ishii, Yoshio Inoue, Ken-ichiro Shimada, Yoko Tezuka, Hiroshi Mitomo, Ken-ichi Kasuya

Fungal degradation of poly(ethylene succinate)
Polym. Degrad. Stab., 92, 44-52, (2007).

Nariaki Ishii, Hiroshi Mitomo, Ken-ichi Kasuya, Yoshio Inoue

Purification and Characterization of Poly(ethylene succinate) Hydrolase from the Mesophilic Fungus *Aspergillus clavatus* NKCM1003
Macromol. Symp. 249-250, 545-550, (2007).

第3章

Nariaki Ishii, Yoshio Inoue, Tomoko Tagaya, Hiroshi Mitomo, Daisuke Nagai, and Ken-ichi Kasuya

Isolation and characterization of poly(butylenes succinate)-degrading fungi.
Polym. Degrad. Stab. In press

第4章

Nariaki Ishii, Yoshio Inoue, Hiroshi Mitomo, Ken-ichi Kasuya

Isolation and characterization of poly(butylenes adipate-co-butylene terephtharate)-degrading fungi.
Submitted

第5章

Nariaki Ishii, Jung Seop Lim, Ken-ichi Kasuya, Seung Soon Im, Yoshio Inoue,
Synthesis and characterization poly(ethylene succinate)(PESu)-based ionomers.
To be submitted.

関連論文

Yoko Tezuka, Nariaki Ishii, Ken-ichi Kasuya, Hiroshi Mitomo

Degradation of Poly(ethylene succinate) by Mesophilic Bacteria
Polym. Degrad. Stab., 84, 115-121, (2004).

Bo Zhu, Shogo Tanaka, Lidan Feng, Nariaki Ishii, Ken-ichi Kasuya, Yoshiharu Doi, Yoshio

Inoue

Enzymatic Hydrolysis of Thioester Linkages in Bacterial
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate)s by Poly(3-hydroxybutyrate)
Depolymerase Isolated from *Ralstonia pikettii* T1
Polymer Journal, 37, 711-715, (2005).

Yuki Hirota, Naoko Yoshie, Nariaki Ishii, Ken-ichi Kasuya, Yoshio Inoue

Correlation between Solid-State Structure and Enzymatic Degradability of Cocrystallized
Blends
Macromol. Biosci., 5, 1094-1100, (2005).

Tamao Hisano, Ken-ichi Kasuya, Yoko Tezuka, Nariaki Ishii, Teruyuki Kobayashi, Mari Shiraki,
Emin Oroudjev, Helen Hansma, Tadahisa Iwata, Yoshiharu Doi, Terumi Saito, Kunio Miki

The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum*
Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters
J. Mol. Biol., 356, 993-1004, (2006).

Ken-ichi Kasuya, Yoko Tezuka, Nariaki Ishii, Yoko Yamagata, Mari Shiraki, Terumi Saito,
Tamao Hisano, Tadahisa Iwata, Yoshiharu Doi

Molecular Characterization of the Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase Gene from
Penicillium funiculosum
Macromol. Symp., 249-250, 540-544, (2007).

Zhenguo Li, Hao Lin, Nariaki Ishii, Guo-Qiang Chen, Yoshio Inoue

Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of
3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates
Polym. Degrad. Stab., 92, 1708-1714, (2007).

Bo Zhu, Yong He, Haruo Nishida, Koji Yazawa, Nariaki Ishii, Ken-ichi Kasuya, Yoshio Inoue

Crystalline-Structure-Dependent Enzymatic Degradation of Polymeric
Poly(3-hydroxypropionate)
Biomacromolecules, In press.

謝辞

本論文を作成するにあたり様々なご援助をしてくださった方々に感謝の意を表します

研究面のみならず生活面においても数多くの御助言と暖かい激励を頂きました、井上義夫教授に心より御礼申し上げます。本博士論文の審査の労を賜わるとともに、ご指導頂きました、藤平正道教授、櫻井実教授、大谷弘之准教授、および菅耕作准教授に心より御礼申し上げます。本研究の実施にあたり、的確な御指導、御助言を頂きました、矢沢宏次助教に心から感謝致します。本研究を実施するにあたり、実験および論文作成のみならず、研究に対する姿勢にいたるまで、適切な御指導、御助言を頂いた、群馬大学粕谷健一准教授に心より感謝の意を表します。

最後に、公私にわたりお世話になった、井上研究室の皆様に御礼申し上げます。