「多糖・オリゴ糖」特集

微生物セルロースの合成とその利用

高井 光 男

1.はじめに

セルロースは地球上で最も豊富に存在する高分子物質で、毎年数千億トン (10^{11} トン) が光合成されている。これらは植物界の構築組織として重要な役割を果たしているのみならず、セルロース繊維は紙、パルプ、衣料用繊維など工業的にも広く利用され人類とのかかわりも古い。微生物が菌体外にセルロースを産生することは古くから知られており、100年程前の1886年に A. J. Brown が炭水化物培地で厚膜を形成する菌の存在を報告している¹⁾。後に Hibbert, Barsha²⁾ によりこの膜がセルロースであること、さらにその X 線回折図が天然繊維の綿と同じであることも確認された³⁾。これらの菌は天然醸造の食酢製造工程で汚染菌としてしばしば現れ、コンニャク状の厚膜セルロースをつくることがある。フィリピンではこのコンニャク状セルロースをシロップ漬けにして“ナタ”と称して低カロリーデザートとして販売されている。セルロース産生菌の中で特に収率の高い *Acetobacter xylinum* と *acetigenus* が知られている。両菌はグルコースなどを基質とする培地中で培養すると菌体外にセルロースを産生する。我々はこのセルロースをバクテリアセルロースまたは微生物セルロースと呼んでいる。バクテリアセルロースは従来のセルロース原料と比較して大きく異なる点はヘミセルロースやリグニンを全く含まず純度の高いセルロースが得られ、脱リグニンの必要がないことである。さらに物理的性質が優れ、いろいろな形状の不織布として生産可能なこと、結晶化度、吸水性、重合度を生合成過程でコントロールできるなどの利点がある。最近ではこのバクテリアセルロースを素材としたスピーカーの音響振動板やろ過膜、医療用パットな

ど具体的用途が特許として出され反響を呼んでいる。ここではバクテリアセルロースの製造法と特性、それに利用と今後の展望について簡単に述べることにする。

2.バクテリアセルロースの製造方法

バクテリアセルロースを製造する方法には大別して菌体存在下で行う *in vivo* 合成と菌体不在下で菌体由来の酵素の働きで行う *in vitro* 合成とがある。ここでは主に前者について述べることにする。セルロースを産生する微生物はアセトバクター属、シュードモナス属、アグロバクテリウム属などがある。これらを培養する培地は炭素源、窒素源、無機塩類の他、微量のアミノ酸、ビタミン等の有機栄養から成っている。代表的な例として *Acetobacter xylinum* (好気性グラム陰性菌、 $0.5\mu \times 2\sim$

表1 Hestrin-Schramm 標準培地と培養条件

培地成分	濃度 (%)
D-グルコース	2.0
バクトペプトン	0.5
酵母エキス	0.5
クエン酸	0.115
リン酸水素 2 ナトリウム	0.27

pH=6.0

培養方法：静置培養（培地表面にセルロースを産生）

培養温度：29℃

培養時間：96時間（4日間）

セルロース収率（乾燥重量）：200mg/100ml

（対グルコース収率10%）

Biosynthesis and Applications of Bacterial Cellulose

筆者紹介 MITSUO TAKAI

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University

北海道大学工学部応用化学科 教授、工学博士

筆者は北海道大学工学部を卒業後、現職につかれ、この間一貫してセルロース、多糖類の微生物合成及びその微細構造を中心とした高分子化学、微生物工学を専攻され、昭和61年繊維学会賞を受賞されている。

趣味はテニス、スキー、釣。

本稿では、微生物セルロースの合成経路及びその配向制御法、構造と物性、機能、用途と経済性まで幅広く紹介して頂いた。

4 μ の桿菌) を通常の Hestrin-Schramm 標準培地による培養条件を表1に示す。炭素源としては純粋なグルコースの他に、シュクロース、マルトース、フラクトース、マンニトール、パルプスラッジ加水分解物、澱粉加水分解物、各種モラセス(糖蜜)などでも良い。窒素源としては有機系のペプトンの他、無機系の硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩、尿素なども有効である。微量有機栄養素は総合的なものとして酵母エキス、ペプトン、大豆蛋白分解物、カザミノ酸を、また単独的なものとしてはアミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸などが使用される。無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩が一般的に使用され、呼吸的代謝と培養中の pH 調整に役立っている。

それでは酢酸菌がグルコースやそれ以外の糖類を炭素源とした培地でセルロースをどの程度までつくり得るのであろうか。一般に、一定培地中におけるセルロースの収率には限度があることが多い。それは生成したセルロースがチキソトロピー的性質を持っているため培養液が大きな塊になり、攪拌が不十分となり通気が出来なくなってしまうためで、ゲルの性質上止むを得ない。バクテリアセルロースの生産には、第1に培地中の炭素と窒素の比率が重要で、窒素含量が高すぎると菌体の増殖の方

が旺盛になり、セルロースの生産性が悪くなる。次に重要なのは培地中の pH であって、菌体増殖の pH とセルロース生産のための pH とは必ずしも一致せず、培地組成を調整することにより培養中の pH を一定範囲にする必要がある。また、最適培養温度範囲は28~30℃である。

3.バクテリアセルロースの特性

3.1 生合成経路

酢酸菌がグルコースを炭素源とした培地でセルロースをつくるためには、まずグルコースを利用して菌体が増殖しなければならない。増殖した菌体によってセルロースをつくるためには、セルロース生合成酵素系と別にエネルギー供給の酵素系が伴わなければならない。セルロースの生合成経路を簡単にまとめると次のようになる。グルコースを炭素源とする標準培地で *Acetobacter xylinum* 又は *acetigenus* を培養すると菌体内で G (グルコース) $\rightarrow$ G 6 P (グルコース 6 リン酸) $\rightarrow$ G 1 P (グルコース 1 リン酸) $\rightarrow$ UDPG (ユリジン・ジフォスフェート・グルコース) となり、この UDPG がセルロース合成の前駆体となる。さらに、膜タンパク質であるセルロース合成酵素により原形質外表面上でセルロースが合成されるものと考えられている。最近セルロース合成酵素を

図1 酢酸菌によるセルロース生合成の概念図

活性化する環状ジヌクレオチドの存在が確認され図1の様なセルロース合成に関する概念図が提出されている⁴⁾。これによると、ジグアニレートサイクラーゼは2段階の異なる ppi 解離によって2分子のGTPから直鎖のジヌクレオチド3リン酸(pppGpG)を経由してc-di-GMPを合成する。生合成系に多量の Ca^{++} が存在すると、この環状ヌクレオチドが合成されセルロース合成酵素にアロステリックイフェクターとして働きセルロース合成を活性化する。逆に Ca^{++} 濃度が低いとフォスフォジエステラーゼ(PDE)により環状ジヌクレオチドが分解されセルロース合成が不活性化される。

3.2 重合度

天然セルロースの重合度(グルコース残基の数)測定は従来多くの研究者によって種々の溶媒と方法で行われており、同一種のセルロースでもその測定値はまちまちである。これはセルロースを分離、精製するときに分解が起こるためである。表2に粘度法による測定値を示し

表2 天然セルロースの平均重合度

バクテリアセルロース	2,000~3,700, 5,700
綿繊維	
一次壁セルロース	2,000~6,000
二次壁セルロース	13,000~14,000
パロニア	28,500~40,000
リンター	10,350
靱皮繊維	9,550
木材パルプ繊維	
広葉樹	8,200
針葉樹	8,450

たが、これらは正確な値としてではなく大体の目安と考えた方がよい。バクテリアセルロースは平均重合度2000~5700と綿の一次壁セルロース繊維とほぼ同じ重合度を示している。

3.3 ミクロフィブリル形態

セルロースは、椅子型のD-グルコースが β , 1→4グルコシド結合した直鎖状の高分子であるが、自然界ではこの様な分子が多数集束して物理的構造の基本単位としてミクロフィブリル→フィブリル→繊維などの高次構造を形成している。このセルロースミクロフィブリルのサイズは表3に示すように起源により異なる。これはミクロフィブリル形成機構の相違によるものと考えられている。バクテリアセルロースのミクロフィブリル形態は写真1に示すように幅75~100Åで均一な幅のリボン状である。

表3 天然セルロースのミクロフィブリル幅(Å)

バクテリアセルロース	75~100
パロニアセルロース	250~300
綿及びラミーのセルロース	50~60
木材形成層セルロース	15
植物細胞一次壁セルロース	20~25
木材細胞二次壁セルロース	50~100

写真1 バクテリアセルロースミクロフィブリルの電子顕微鏡写真BC: 酢酸菌

写真2 バクテリアセルロース膜(熱乾)のX線回折写真
入射X線を膜面に(A)垂直、(B)平行に照射

3.4 バクテリアセルロース膜の構造

バクテリアセルロースは菌体から押し出された後もしばらくは非晶状態を保持しているが時間が経過するにつれて結晶化が進行し、最終的には綿や亜麻のセルロースと同一のX線回折図を示し、セルロースI結晶構造を形成する。ただ異なる点は特定の微結晶面が生成膜面に平行に並ぶいわゆる選択的面配向構造を有することである。(写真2)。リボン状に生成するミクロフィブリル自体既に選択的面配向構造を持つことから考えて、膜全体としての面配向性はこのリボン状ミクロフィブリルの膜中での並び方によって決定される。すなわち、リボン面

が膜面に平行に配列するほど面配向度が高くなる。従って、培地中に生成したバクテリアセルロース膜から再生する仕方によって配向度の異なる膜を調製できる。図2は種々の再生試薬から再生乾燥したバクテリアセルロース膜のX線回折図である。これによると膜中に含まれている水をアセトン、氷酢酸などの極性試薬で置換すると(110)回折強度が水から再生した場合より強くなり、面配向度が高くなる⁵⁾。一方、四塩化炭素、シクロヘキサンなどの非極性試薬では反対に低くなっている(表4)。

図2 種々の再生試薬より再生したバクテリアセルロース膜のX線回折図

(A)アセトン、(B)氷酢酸、(C)ピリジン、(D)水、(E)四塩化炭素、(F)シクロヘキサン

4.バクテリアセルロースの物性と利用

培地中に生じるゲル状のバクテリアセルロース膜を希アルカリで除蛋白、水洗後ホットプレスで105℃で乾燥すると羊皮紙状のフィルムができる。このフィルムの物理的性質、動的ヤング率も最高50GPaの強度を示す。この値は新聞紙などの普通の紙の数十倍、ポリエチレンやアラミド紙の数倍の強度に相当する。この超高強度的性質を利用して、音をより忠実に伝えるスピーカーの振動板として利用する特許が最近提出されている⁶⁾。このような超高強度のセルロースフィルムができるのは、ミクロフィブリル内は勿論のこと、ミクロフィブリル間でもセルロース水酸基による強固な水素結合を形成すること及び(110)微結晶面の選択的面配向性によるものと考えられる。この他、膜形態としての利用分野は耐薬品性に優れていることから限外ろ過用の分離膜もある⁷⁾。さらに未乾燥のバクテリアセルロースを機械的にミクロフィブリル化すると水分保持能が高くなる。このようなミクロフィブリル化したセルロースは分散性に優れていると同時に人体に対する安全性もあることから、食品や化粧品、医薬品への用途がある。例えば食品、化粧品、医薬品または塗料の粘度保持、食品原料生地の強化、水分保持食品の安定化向上、低カロリー添加物または乳化安定助剤、水系高分子の補強剤など広い範囲にわたって利用ができる。また、クロマトグラフィー用担体、微生物や酵素の固定化用担体としての利用も可能である。

通常の Hestrin-Schramm 標準培地(表1)における酢酸菌培養でバクテリアセルロースの収量は10%程度(対グルコース)、PQQ(酸化補酵素ピロロキノリンキノン)添加培養でも高々14%(対シュクロース)と低い。基質炭素源としてはグルコース、シュクロースのほかにマルトース、フラクトース、マンニトール、転化

表4 種々の再生試薬によるバクテリアセルロース膜の面配向度

再生試薬	面 配 向 度	
	(X線回折強度比(110)/(020))	
	高さ強度比	面積強度比
アセトン	1.256	1.216
氷酢酸	1.251	1.493
ピリジン	1.196	1.341
水	1.050	1.138
四塩化炭素	0.669	0.646
シクロヘキサン	0.602	0.584

糖, エタノール, グリセロールなどでもよい。また, 製紙工場からでるパルプスラッジ加水分解物や農林産廃棄物なども有望である。たとえばフィリピンで商業生産されている“ナタ”の場合, 基質として安価で手に入りやすい砂糖キビ糖とココナツミルクが利用されその経済性を支えている。この様な基質の多様性は工場設備の立地にかかなりの自由度を与え, また基質の価格変動による影響を回避でき経済的に有利である。バクテリアセルロースの価格はある試算によると現在のところ乾燥重量 1 kg 当り 10 万円だそうだと⁸⁾。従って価格面では明かに他のセルロース源と競争できない。培養効率とスケールの経済性改善により大きなコスト低減は可能であるがその下限は基質原料の価格によって決まる。通常この種の基質価格は木材パルプや綿と同程度であり, 結果としてバクテリアセルロースは他のセルロースより高くなる。従ってその利用は高付加価値製品に限定され, オーディオスピーカー振動板や創傷保護剤はこのモデルの応用例と言える。

上でのべたようにバイオセルロースの生産性は現在のところ低く, これをいかにして向上させるかが商業化の鍵を握っているといえる。まず第一に, セルロース産生酢酸菌自体の不安定性がある。振とう培養または施回培養を連続して行うとこの菌はセルロース収量を低下させ変異株を作り易い。培地の pH, 酸素濃度, 代謝産物などが変種出現の原因と考えられるが, この不安定性は工業的生産を行う場合問題となる。また *Acetobacter* のセルロース産生株はグルコース培地で育成させた場合, 糖代謝の副産物としてグルコン酸を生成する。このグルコン酸の生成はバッチ式および連続式培養系における pH 調整を困難にし, セルロースの合成速度を低下させる。従って, これは工業化において培養器の形状を決定する際, 重要な因子となる。他の一つは, 培養系で生成するゲル状のセルロース膜が系における酸素拡散の障害となることである。*Acetobacter xylinum* は好気性菌であるため代謝機能を活発に維持するため酸素を必要とする。しかし, 生成物である不溶性セルロースゲルは培養媒体中への酸素拡散を著しく阻害する。静置培養におけるセルロース合成は気液界面で活発に行われる。従って静置培養で行うかぎり, 細胞育成とセルロース合成を最大にするため体積を犠牲にして気液界面の表面積を最大にしなければならない。”ナタ”食品製造のようにウェット状態で利用する場合は静置培養で充分採算が取れるが, 乾燥重量で大量のセルロースを合成しなければならない時は膨大な表面積を必要とする。例えば, 乾燥重量で 1 kg の生産を行うためには約 410 m² の面積を必要とす

る。従って, バイオリアクターの設計, 考案にもこの固体状生成物の問題を考慮する必要がある。一方, セルロース収量の高い酢酸菌の育種と遺伝子組み換え技術による改良も必要である。最近, Cetus 社の H. C. Wong⁹⁾らとテキサス大の Brown¹⁰⁾らはセルロース合成酵素の単離精製とアミノ酸配列の決定を行っていると報告している。これが明確になると, セルロース合成酵素の効率のクローン化と他種生物への形質転換によりセルロース合成の効率化が容易になる。さらにセルロース合成と細胞壁形成及び形態発現との相関をもっと良く理解できるようになるであろう。最終的には, これら遺伝子工学及び蛋白質工学的技術を駆使して強力で安定なセルロース合成酵素を調整し, *in vitro* 的セルロース合成を目指すことであろう。この系が確立されればセルロース産業に対するインパクトは大きく, 森林資源の保存も可能となるであろう。

参考文献

- 1) A. J. Brown, *J. Chem. Soc.*, **49**, 432 (1886)
- 2) H. Hibbert, *Science*, **71**, 419 (1930)
H. Hibbert, J. Barsha, *Can. J. Res.*, **5**, 580 (1931)
- 3) H. Mark, G. V. Susich, *Z. Physik. Chem. Abt. B*, **4**, 431 (1929)
- 4) P. Ross, H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Ohana, R. Mayer, S. Braun,
E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, M. Benziman, *Nature (London)*, **325**, (1987)
- 5) M. Takai, Y. Tsuta, J. Hayashi, S. Watanabe, *Polym. J.*, **7**, 157 (1975)
- 6) 特開昭61-281800
- 7) 野々村文就, 高井光男, 林 治助, 繊維学会シンポジウム予稿集, C-126 (1988)
- 8) 日経バイオテック, 1988.10.24, p.9
- 9) Hing C. Wong, Anna L. Fear, Roger D. Calhoon, Gregory H. Eichinger,
Raphael Mayer, Dorit Amikam, Morshe Benziman, David H. Gelfand,
James H. Meade, Anne W. Emerick, Robert Bruner, Arie Ben-Bassat,
Rony Tal, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 8130-8134 (1990)
- 10) Inder M. Saxena, Fong Chyr Lin, R. M. Brown, *Plant Molecular Biology*, **15**, 637-683 (1990)

(平成 4 年 1 月 27 日受理)