「多糖・オリゴ糖」特集

生分解性を有する多糖系ポリカルボン酸塩の設計

松 村 秀 一

1.はじめに

多糖は陸上高等動物および海藻中に多量に含まれ、さらに植物や微生物中に広く分布しており、地球上で最も豊富に存在する再生産可能な高分子化合物として従来より広く利用されている。しかしそれらが実際に利用されている割合は年間生産量に比べてわずかであり、大部分が未利用のままとなっている。一方、近年石油化学に由来する高分子化合物が微生物による分解を受けにくいことから、地球環境保全の立場から生分解性を有する代替物の開発が急務となっている。またこれを機をほぼ同じくして二酸化炭素などの地球温暖化ガスの放出量の削減の必要性が叫ばれている。しかし化石エネルギーからなる現在の合成高分子化合物がたとえ生分解されても二酸化炭素やメタンの発生を伴い、この問題の解決にはならない。また次世紀には化石エネルギー自体の枯渇も予想されており、総合的にみて、次世代の有機工業化学体系において、二酸化炭素を利用する光合成によりほぼ無限に入手可能な天然の多糖が、生分解性を有し、再生産可能で安価な機能性高分子原料として最も可能性を持つものとして各方面で注目を集めている。

2.生分解性を有する高分子量ポリカルボン酸塩の設計

ポリアクリル酸塩などのポリビニル型合成高分子電解質が合成洗剤におけるリン酸塩代替ビルダー作用など種々の分野で優れた機能を発揮することが知られているが¹⁻⁴⁾、これらは全くといってよい程微生物による分解を受けず、この点で大量使用には至っていない。これら水溶性高分子化合物は固体状プラスチックとは異なり水溶性がゆえに、一般に回収が困難であり、使用後は下水や河川に流出し、最終的には地球環境中に広く拡散、蓄積

されていくことが懸念されている。合成高分子化合物が天然の高分子化合物とは異なり、一般に環境中の微生物により分解、資化を受けにくいのは、多糖などの天然の高分子化合物が環境中の微生物が産生する酵素により主鎖が切断されて低分子化されるのに対して、ポリビニル型合成高分子などではこのような酵素による主鎖の切断・低分子化が行なわれにくいことによる。合成高分子に生分解性を付与するためには天然に存在する酵素の基質

図1 生分解性を有する高分子量ポリカルボン酸塩の設計と生分解機構

Design of Biodegradable Polycarboxylate Derived from Polysaccharide

筆者紹介 SHUICHI MATSUMURA

Faculty of Science and Technology, Keio University

慶応義塾大学理工学部応用化学科 助教授, 工学博士

筆者は有機工業化学および生体関連化学が専門で、微生物や酵素を用いた機能性物質の合成と応用研究で業績をあげておられる。趣味は、海外衛星テレビの受信。

本稿では、多糖系ポリカルボン酸塩の合成と生分解性およびビルダー特性について詳しく解説していた。

スキーム 1 多糖系ポリカルボン酸塩の合成

図2 5日間の生分解率 (BOD₅/TOD) とポリマー中の糖含量 (F) の関係

- : ジカルボキシアミロース (DCAm)
- △ : ジカルボキシペクチン酸 (DCPa)
- : ジカルボキシセルロース (DCC)
- ▲ : ジカルボキシアルギン酸 (DCAa)
- ◆ : ジカルボキシキシラン (DCXy)

になり、開裂に導かれる官能基団を“生分解性部分”として主鎖中に導入する方法が考えられる (図1)。高分子化合物であるが故に微生物の細胞膜を通過出来ないために生分解を受けないものが、主として菌体外酵素により主鎖が切断され、低分子化されたものが菌体中に取り込まれ分解・資化されれば完全生分解型のものが設計出

来る。もちろんこの際、高分子の高次構造が酵素の接近や酵素と“生分解性部分”との結合を妨げるようなものでないことが要求される。合成高分子鎖中に組み込む事により生分解性が付与される事が期待される“生分解性部分”としては、エステル、⁵⁾ ビニルアルコール連鎖、^{6,7)} 糖鎖^{8,11)} などがある¹²⁾。しかしビニルアルコール連鎖や糖鎖部分を“生分解性部分”としてポリマー鎖中に組み込む場合には、これら官能基の両末端がヘテロ高分子鎖で固定された分子構造を有することから、分解酵素の基質となるためにはある一定鎖長以上の連鎖を必要とし、また単独の状態で存在する場合に比べて、より長い連鎖が必要とされる (図1)。生分解性を有する高分子化合物の設計を考えた場合、多糖加水分解酵素の基質となり得る範囲で多糖の分子修飾による機能化が行なえれば、生分解性を有する機能性高分子が得られるのではないかと考えられる。さらに近年の糖鎖の持つ特異な機能に対する関心と高まりを考え合わせれば、有機工業化学分野ばかりでなく、生体機能関連化学分野など広く種々の分野での応用が期待される。

3. 糖鎖部分を主鎖中に有する高分子量ポリカルボン酸塩の合成^{8-11, 13)}

生分解性糖鎖部分を有する高分子量ポリカルボン酸塩を多糖の隣接ジオール部分を過ヨウ素酸によりランダムに酸化開裂しジアルデヒド体としたのち、亜塩素酸により相当するジカルボキシル体に酸化することにより得た。(スキーム1) ジカルボキシル化度はジアルデヒド化を行なう際に過ヨウ素酸水溶液濃度および反応時間を変えることにより調節した。さらに近年、より容易に効率的に酸化開裂体を得る試みがなされている¹⁴⁾。

図3 ジカルボキシペクチン酸ナトリウム塩 (DCPa) の生分解性試験前後のGPC曲線

—: 0日 (初期),: 5日後, -·-·-: 30日後

化合物コード (DCPa) につづく数字は数平均分子量 ($\bar{M}_n$) を, カッコ内の数字はジカルボキシル化度 (mol%) を示す。

4. 多糖系高分子量ポリカルボン酸塩の生分解性⁸⁻¹²⁾

4.1 生物化学的酸素要求量 (BOD) 試験による生分解性の評価

糖質部分を含有する高分子量ポリカルボン酸塩の生分解はポリマー鎖中に存在する糖質部分が環境中の微生物酵素により切断され, 分子量が低下し (一次生分解), その低分子化したフラグメントがさらに分解・資化されることによる (究極的分解)。好氣的分解機構を考えた場合, 低分子化されたフラグメントがさらに分解・資化される場合には酸素を必要とする事から, 生物化学的酸素要求量 (BOD) を測定する事により, その完全分解性を予測する事が可能である。図2にはポリマーの生分解性の傾向を比較する目的で, 5日間の生物化学的酸素要求量 (BOD_5) を求め, 理論酸素要求量 (TOD) との比を5日間の分解率として示した。生分解率はポリマー中の糖含量が増加するのに従って向上しており, ポリマー中の糖部分が生分解に寄与していることが認められる。一方, 糖含量が50%以下のものは天然の糖質より得られたものであってもほとんど生分解を受けない。同じジカルボキシル化度のものと比べてみると, 原料の多糖により分解性に差異が見られ, 試験を行なったものの中ではキシラン誘導体が最も優れており, アルギン酸誘導体の分解度が低かった。

4.2 ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) による生分解性の評価

一般に高分子化合物と称されるものは比較的低分子量のものから高分子量のものまで分子量分布を有している。また調製法によっては未反応モノマーまたはオリゴマーを含有している場合もあり, 低分子量フラクションの方が一般に生分解が容易な場合が多いことを考えると, 生分解性の評価を行なう場合に特に注意を要する。一般に多用されている BOD 法が微生物の面から生分解性の評価を行なうのに対して, 高分子化合物の生分解性の評価を行なうにあたってはポリマー部分の変化を追跡することが特に重要となる。そこで図3には活性汚泥による長期間のポリマーの分解挙動を GPC を用いて分析を行なった例を示した。糖鎖部分を有するものはその含量に応じてまず, 初期的な主鎖の切断による低分子化が起り, ついで生じた低分子化合物がさらに分解・資化されている様子が確認される。この際, 低分子化されたものは経時的にさらに低分子化される事なく, 同じ分子量分布でオリゴマー濃度のみが減少している事から, 一次分解により生じたオリゴマーにおいては, 何らかの形で生分解の始まったオリゴマー鎖はそれ以外のものより優先的に早く分解・資化が進んでいるものと考えられる。

4.3 単離したポリマー分解菌による生分解性の評価

生分解試験の菌源として活性汚泥を用いた場合、活性汚泥が種々の微生物の混合物であり、ポリマーに多種の菌体が同時に作用することから分解挙動は複雑になる。さらに地域や季節的要因、さらには栄養条件などにより構成する菌種がたえず大きく変化していることも事実であり、これらを用いて生分解性の評価を行なうと再現性の問題が生じてくる。これらのことを考え合わせると、特別に分子設計されたポリマーの生分解性を評価したり、生分解機構を予測するためには単一の菌体を用いた方が容易である。本節ではポリマーを唯一の炭素源として生育出来るポリマー分解菌を集積培養法により得、単離したジカルボキシアミロース (DCAm) 分解菌, *Alcaligenes brochoseptica* KN014株によるポリマーの分解挙動を GPC を用いて調べた例を示す¹⁰⁾。*A. brochoseptica* をグルコースを増殖基質として5日間前培養を行い、ついでこの培養液中に DCAm を添加すると1時間でもとのポリマー部分 (GPC のピークトップ $M=22000$) が減少し、オリゴマー (GPC ピークトップ $M=2000$) が生じた (図4)。これはグルコースを用いた前培養により DCAm 分解菌による糖質加水分解酵素 (α -アミラーゼ) が培養液中に蓄積され、このために糖鎖部分での加水分解が生じ分子量が低下し、オリゴマーの生成が見られた。培養をつづけると14日後までは菌体の増加とともにポリマー部分の減少とオリゴマー部分の増加が認められた。それ以後もとのポリマー濃度が低くなるにつれオリゴマー部分も減少し、50日後にはもとのポリマーも酵素分解により生成したと考えるオリゴマーも認められなくなった。これらの事は、まず *A. brochoseptica* KN014の糖質加水分解酵素により主鎖が切断され、ついで低分子化されたオリゴマーがさらに同菌体により分解、資化されていることを示している。同様の結果はジカルボキシキシラン (DCXy) 分解菌として *Arthrobacter* sp. および *Flavobacterium* sp.⁸⁾、およびジカルボキシスターチ (DCS) 分解菌 *Pseudomonas* sp. および *Ochrobactrum anthropi*¹¹⁾ についても見られた。

5. ポリマーの酵素分解⁹⁾

ポリマー主鎖中に糖部分を有するポリカルボン酸塩の生分解性は糖含量に依存している。これは生分解性部分である糖連鎖部分が糖質加水分解酵素により切断されることによる。この際に糖質加水分解酵素の基質となり切断を受けるためには、ある一定以上の長さを有する糖連鎖ブロックが必要である。多糖のジカルボキシル化反応がランダムに生じていると考えられることから、未反応糖連鎖もランダムに主鎖中に存在し、このことから、同

図4 DCAm分解菌 *Alcaligenes brochoseptica* KN014による DCAm ($\bar{M}_n=29000$, ジカルボキシル化度26 mol%) の生分解による GPC 曲線の変化
(1) 0日, (2) 3日, (3) 14日
(4) 24日, (5) 50日

図5 糖質加水分解酵素による分子量低下度 (X) とポリマー鎖中の糖含量 (F) の関係

- : DCAm + α -アミラーゼ
- △: DCPa + ペクチナーゼ
- ◆: DCXy + キシランナーゼ

じジカルボキシル化度のもので比べた時に、分子量の低下度が大きい方がより短い糖連鎖部分でも酵素の基質となり、切断が生じていることを意味している。そこで、

はじめにポリマーに糖質加水分解酵素を作用させた時の一次生分解による分子量低下度 (X) を求め、図5にポリマー中の糖含量 (F) と分子量低下度 (X) の関係を各ポリマー系列について示した。加水分解酵素によるポリマーの分子量低下度 (X) は糖含量に明確に依存しており、糖含量の多いポリマー程分解が顕著に表れた。一方、糖含量が50%以下のものは事実上酵素による分解は認められなかった。同じ糖含量のもので比べれば、DCXyにキシラナーゼを作用させた時がDCAmに α -アミラーゼを作用させた場合や、ジカルボキシペクチン酸 (DCPa) にペクチナーゼを作用させた場合に比べて分解度は大きかった。このことは、ジカルボキシ化多糖のポリマー鎖中においてキシラナーゼの基質となりうるキシロピラノース連鎖が α -アミラーゼやペクチナーゼの基質となり得る糖連鎖にくらべて短いことを意味している。また、見方を変えれば、ポリマー鎖中にこのような長さのブロックの存在しないものは、たとえ短い糖の連鎖が含まれていても環境中に多く存在する多糖加水分解酵素の作用を全く受けず、ポリマーの生分解の第一段階である主鎖の切断による低分子化が生じないことになり、生分解が進行しないものと予想される。なお、ポリマーの分子量低下が糖鎖ブロック部分のみで生じ、しかも未反応糖部分がランダムに存在しているとして、ピラノース環がいくつ連結した糖ブロックで切断が生じているかを、酵素反応による分子量低下度 (X) から推定すると、DCXyでは8個程度、DCAmでは13個程度、DCPaでは10-13個程度と推定される。

6. 活性汚泥を酵素に見立てた生分解

α -アミラーゼやキシラナーゼは活性汚泥中に一般的に存在しており、本酵素反応と同様の結果が活性汚泥を用いた反応でも得られる。また反対の言い方をすれば、環境中で容易に分解されるポリマーは活性汚泥に含まれる酵素でもって主鎖が切断されなければならない。実際、活性汚泥培養液中にジカルボキシ化多糖を加えることにより先の酵素反応とほぼ同じ分子量低下度 (X) が認められ、環境中でもDCAmと同様、DCXyおよびDCPaも主鎖中のグリコシド結合部分が活性汚泥培養液中に存在する当該酵素により切断され、低分子化が起こっていることが確認された。

7. 合成洗剤用ビルダー作用

一般に衣料用合成洗剤中には、界面活性剤と共用することによりその洗浄性能を著しく向上させるビルダーと総称される一連の成分が配合されている。特にトリポリリン酸ナトリウム (STPP) は最も重要なビルダーとし

て広く用いられてきたが、近年、リン酸塩による富栄養化の問題に関連して新規ビルダーの開発が盛んに行われている。ビルダーの作用として主要なものに洗浄液中の硬水イオンの封鎖、汚垢成分の分散作用の促進や再汚染防止作用などが挙げられる、このような性質を合わせもつものとしてボクアクリル酸塩などの水溶性の高分子量ポリカルボン酸塩が検討されている^{1-4, 15-18)}。しかし、これらは一般に著しく生分解性に劣ることも古くから指摘されており、環境問題に関連して現在までのところ、合成洗剤用ビルダーとしての大量使用には至っていない⁴⁾。機能と生分解性を合わせ持つ高分子量ポリカルボン酸塩の開発が各方面で望まれている。図6には高分子量ポリカルボン酸塩の機能評価の一つとしてまず衣料用合成洗剤用ビルダー性能を比較するために、ポリマーを衣料用重質洗剤のビルダーとして用いた時の洗浄力を、トリポリリン酸ナトリウム (STPP) の洗浄率を10、3-オキサペンタン二酸二ナトリウム (ODA) の洗浄率を0とした時の相対値で示した。洗浄力増強作用はポリマーのジカルボキシ化度に依存しており、カルボキシ化含量の高い方が優れ、ジカルボキシ化度が60mol%程度でSTPPと同等かそれ以上の優れた効果を示すものが見られた。また、この程度のジカルボキシ化度があれば、ポリ (アクリル酸ナトリウム) の洗浄力とも同等であった。分子構造に関しては、デンプン族か

図6 相対洗浄力とポリマー鎖中の糖含量 (F) の関係

○: DCAm, △: DCPa, ●: DCC,
▲: DCAa, ◆: DCXy

ら得られたポリカルボン酸塩 (DCAm) の方がセルロースより得られたもの (DCC) に比べてビルダー性能に優れた。これは DCAm が α -グリコシド結合を有し、一方 DCC が β -グリコシド結合を有することから、前者の方が水溶液中で規則的なヘリックスを形成し、ビルダー作用のうちの重要な機能の一つであるカルシウムイオン封鎖を効率的に行なえることによるものと考えられる。本試験は同重量で試験を行なっていることから、同じジカルボキシル化度で比べてユニット当たりのカルボキシル基密度が高いベクチン酸誘導体 DCPa は相当するアミロース誘導体 (DCAm) に比べて優れ、また、 β -グリコシド結合により成るものでもユニット当たりの分子量の小さいキシラン誘導体 (DCXy) がセルロース誘導体 (DCC) に比べて優れた。これらの中でアルギン酸誘導体 DCAa の洗浄力が相対的に劣っていたが、これもその分子構造に起因しているものと考えられる。なお、先に示した洗浄力はポリマーのジカルボキシル化度に依存していたが、これは試料ポリマーの配合量を一定にして試験を行なっているためである。これに対してポリマーの配合量を増やすことにより洗浄力を向上させられることが確かめられている。

8. おわりに

二酸化炭素と水により光合成によって得られ、再生産可能な天然の多糖を有機工業化学体系における機能性高分子原料として利用出来れば、現在の石油化学体系に基礎を置く高分子化学工業における資源・エネルギーの面ばかりでなく、生分解性の問題や二酸化炭素など温暖化ガスの放出といった地球環境問題の解決にも寄与出来ることが期待される。また本稿で記した糖質系ポリカルボン酸塩は化石エネルギーに替わる再生産可能なバイオマスより得られる機能性ポリマーとしての意味合いに加えて各種糖鎖を生分解部分として有していることから、たとえば細胞認識機能を持つポリカルボン酸型生分解性高分子としてなど多くの分野で今後の展開が期待される。

文 献

- 1) 阿部芳郎, 松村秀一, 三浦健司, 酒井 要, 油化学, **30**, 757 (1981).
- 2) M. M. Crutchfield, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 58 (1978).
- 3) E. A. Matzner, M. M. Crutchfield, R. P. Langguth, R. D. Swisher, *Tenside*, **10**, 239 (1973).
- 4) H. C. Kemper, R. J. Martens, J. R. Nooi, C. E. Stubbs, *Tenside*, **12**, 47 (1975).
- 5) W. J. Bailey, B. Gapud, Synthesis of Biodegradable Polyethylene, 423 "Polymer Stabilization and Degradation", ACS Symposium Series **280** (1985).
- 6) M. Shimao, H. Saimoto, N. Kato, C. Sakazawa, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 605 (1983).
- 7) 松村秀一, 前田秀一, 高橋 淳, 吉川貞雄, 高分子論文集, **45**, 317 (1988).
- 8) S. Matsumura, S. Maeda, S. Yoshikawa, *Makromol. Chem.*, **191**, 1269 (1990).
- 9) S. Matsumura, M. Nishioka, S. Yoshikawa, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **12**, 89 (1991).
- 10) 松村秀一, 西岡 誠, 吉川貞雄, 高分子論文集, **48**, 231 (1991).
- 11) 松村秀一, 小林里香, 吉川貞雄, 油化学, **40**, 415 (1991).
- 12) S. Matsumura, S. Yoshikawa, Biodegradable Poly (carboxylic acid) Design, ACS Symposium Series, "Agricultural & Synthetic Polymer : Utilization & Biodegradability". American Chemical Society, **433**, 124 (1990).
- 13) M. S. Nieuwenhuizen, A. P. G. Kieboom, H. van Beekum, *Starch*, **37**, 192 (1985).
- 14) M. Floor, L. P. M. Hofsteede, W. P. T. Groenland, L. A. Th. Verhaar, A. P. G. Kieboom, and H. van Beekum, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **108**, 384 (1989).
- 15) 阿部芳郎, 松村秀一ら, 油化学, **30**, 757 (1981), **31**, 586 (1982), **33**, 211, 219, 228 (1984), **34**, 202 (1985), **35**, 167, 937 (1986), **36**, 874 (1987).
- 16) S. Matsumura, S. Maeda, S. Yoshikawa, N. Chikazumi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **39**, 245 (1990).
- 17) S. Matsumura, S. Maeda, S. Yoshikawa, N. Chikazumi, T. Senda, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **38**, 612 (1989).
- 18) 阿部芳郎, 表面, **19**, 542 (1984).

(平成 4 年 1 月 30 日受理)