

# Studies on Bacterial Cellulose Composites

(バクテリアセルロースコンポジットに関する研究)

## 学位論文内容の要旨

現在環境汚染を引き起こす廃棄合成高分子プラスチックの処理が、大きな社会問題になっている。また近年環境問題に対する関心が高まっており、生分解性高分子素材の開発が強く要望されている。

セルロースは自然界でもっとも豊富に存在する生分解性高分子で、主に高等植物によって合成されるが、ある種の藻類や微生物によっても合成される。この内、微生物によって合成されるセルロースはバクテリアセルロース(BC)と呼ばれ、特に酢酸菌によって合成されるBCは機械的強度が高く、しかも生分解性もあることから、新規の生分解性材料として注目されている。

本論文はBCの特性を生かした、BCとセルロース関連の天然高分子との新たな複合材料、すなわちバクテリアセルロースコンポジット(BCC)の開発を目的として、酢酸菌(*Acetobacter xylinum*(*A. xylinum*))によるBCCの合成条件、構造、機械的強度、生分解性に関する詳細な検討を行ったものであり、6章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の目的を明らかにした。

第2章では種々の水溶性高分子(WSP)を用いた添加培養によってBCCを合成したところ、BCC合成のためのWSPとしてセルロース誘導体が適していた。次に置換基のBCC合成への影響について検討したところ、置換度が小さいカルボキシメチルセルロース(CMC)、と置換基自体が小さいメチルセルロース(MC)がBCCをより形成しやすく、収量は最大で1.8倍にまで増加した。構造解析の結果から、MC、CMCは分子レベルで取り込まれていると考えられた。またBCC収量と含有量の比較から、BC生産自体が増強されていることを見出した。そして特にCMCによる増強効果が大きいことから、この機構について第2章・2で詳細に検討した。

CMCはある種の微生物におけるセルラーゼ誘導物質であることが報告されている。また近年種々の酢酸菌におけるセルラーゼの存在が報告されており、これらのBC生産における役割の解明は、収率の向上と物性のコントロールにおいて非常に重要であると考えられる。そこでCMCによるBC生産の増強に着目し、第2章・2ではCMCによるBC生産増強のメカニズムを解明することを目的とした。まずカビ由来のセルラーゼを用い、セルラーゼにBC生産の増強効果があること、およびBC生産における最適セルラーゼ濃度が存在することを確認した。次に酢酸菌ATCC23769のCMCase遺伝子断片をPCR法によって増幅し、CMCase遺伝子導入菌でCMCase活性の増加とBC生産の増強を確認した。また野生株のセルラーゼ活性が、CMCによって誘導・増強されることを見出した。酢酸菌におけるセルロースフィブリル形成は、①重合→②グルカン鎖の集合・サブエレメンタリーフィブリルの形成・結晶化→③フィブリルサ

ブユニットの形成→④BCリボンの形成の4つの過程によって進行する。CMCはこの内の③→④の過程を阻害し、これによってBC生産速度が増加することから、③→④の過程はフィブリル形成における律速段階の一つであると考えられている。またCMCaseの添加によって細いBCリボンが形成されることから、CMCによるBC生産の増強は、CMCそれ自身ばかりでなく、CMCによって誘導されたセルラーゼによる③→④の過程の相加あるいは相乗的な阻害によると結論した。

第3章ではセルロースと構造が非常に類似しているキチン・キトサンに着目し、キチン・キトサン誘導体 (WSChD)、および水溶性キトサンオリゴマー (WSChO) の添加培養によるBCCの合成を行った。収量・含有量の比較からWSChDはBCCを形成し、BC生産を増強することが解った。またこれらは分子レベルで含有されていることが確認された。一方、WSChOについてはBCCを形成しないにも関わらずBC生産を増強した。収量・グルコース消費・菌体増殖・pHの時間経過から、WSChOによるBC生産の増強は、定常期におけるBC生産性の増加に基づいていることが考えられた。

第4章ではより簡便にBCCを合成する方法として混合培養を試行した。

第4章-1では酢酸菌 *A. xylinum* NCI1005が合成する菌体外水溶性多糖のキャラクター化を行なった。GPCによる分子量測定、酸加水分解による構成糖の分析、NMRによる詳細な構造解析の結果、この水溶性多糖が分子量数万～数十万のレバンであることを見出した。第4章-2ではBC合成酢酸菌としてATCC10245とNCI1051、WSP合成酢酸菌としてNCI1005を用いて混合培養を行った。スクロースを基質とした混合培養によってBCCを合成することに成功した。またスクロースを基質としたBC合成酢酸菌の単独培養に比べBC生産が増強され、これはNCI1005のレバンスクララーゼによるスクロースの加水分解によって、BC合成酢酸菌の低いスクロース資化性が補われたためであると結論した。

第5章ではBCCの機械的強度と生分解性に関する検討を行った。機械的強度は膜の動的ヤング率を測定することによって評価した。ヤング率の測定結果から、MC、CMCが分子レベルでBC中に取り込まれることによって機械的強度が2～3倍に飛躍的に増加した。分解性についてはセルラーゼに対する分解性および、土壌中における分解性によって評価した。セルラーゼ受容能を有するCMCを含有させたBCCは分解速度は低下するが、通常のBCと同様にセルラーゼによってほとんど分解された。一方、セルラーゼ受容能を有さないMCを含有させたBCCは、セルラーゼによって20%程度しか分解されなかった。土壌中における分解試験ではBCC (MC)・BCC

(CMC)ともに分解性がNBCに比べて若干減少するが、4週間でかなりの部分が分解された。つまりWSPを含有させることによって、BCの生分解性制御が可能であり、BCCにおけるヤング率の増加、および分解性の低下は、WSPがフィブリルサブユニット表面およびリボン間に含有されることによる膜内の水素結合の増加と緻密化に起因していると考えた。

第6章は総括であり、本研究によって高機能性・高強度を有し、生分解性制御可能な新規材料の合成が可能となったことを結論した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 井 光 男  
副 査 教 授 横 田 和 明  
副 査 教 授 棟 方 正 信  
副 査 助 教 授 恵 良 田 知 樹

学 位 論 文 題 名

## Studies on Bacterial Cellulose Composites

(バクテリアセルロースコンポジットに関する研究)

現在環境汚染を引き起こす廃棄合成高分子プラスチックの処理が、大きな社会問題になっている。また近年環境問題に対する関心が高まっており、生分解性高分子素材の開発が強く要望されている。セルロースは自然界でもっとも豊富に存在する生分解性高分子で、主に高等植物によって合成されるが、ある種の藻類や微生物によっても合成される。この内、微生物によって合成されるセルロースはバクテリアセルロース (BC) と呼ばれ、特に酢酸菌によって合成されるBCは機械的強度が高く、しかも生分解性もあることから、新規生分解性材料として注目されている。

本論文はBCの特性を生かした、BCとセルロース関連の天然高分子との新たな複合材料、すなわちバクテリアセルロースコンポジット (BCC) の開発を目的として、酢酸菌

(*Acetobacter xylinum* (A. *xylinum*)) によるBCCの合成条件、構造、機械的強度、生分解性に関する詳細な検討を行ったものであり、その主要な成果は次のとおりである。

(1) 種々の水溶性高分子 (WSP) の存在下での培養によるBCの生産によってBCCが合成され、その合成にはセルロース誘導体が適していることを見出した。次にセルロース誘導体の置換基のBCC合成への影響について検討したところ、置換度が小さいカルボキシメチルセルロース (CMC)、あるいは置換基自体が小さいメチルセルロース (MC) がBCCをより形成しやすく、収量は最大で1.8倍にまで増加した。構造解析の結果から、MC、CMCは分子レベルで取り込まれていると考えられた。またBCC収量と含有量の比較から、BC生産自体が増強されていることを見出した。

(2) CMCはある種の微生物におけるセルラーゼの誘導物質であることが知られており、また近年種々の酢酸菌におけるセルラーゼの存在が報告されている。したがってBC生産におけるCMCの役割の解明は、収率の向上と物性のコントロールにおいて非常に重要である。まずカビ由来のセルラーゼを用い、セルラーゼにBC生産の増強効果があること、およびBC生産において最適セルラーゼ濃度が存在することを確認した。次に酢酸菌 ATCC23769のCMCase遺伝子断片をPCR法によって増幅し、CMCase遺伝子導入菌でCMCase活性の増加とBC生産の増強を確認した。また野生株のセルラーゼ活性が、CMCによって誘導・増強されることを見出した。酢酸菌におけるセルロースフィブリル形成は、①重合→②グルカン鎖の集合・サブエレメンタリーフィブリルの形成・結晶化→③フィブ

リルサブユニットの形成→④BCリボンの形成の4つの過程によって進行する。CMCはこの内の③→④の過程を阻害し、これによってBC生産速度が増加することから、③→④の過程はフィブリル形成における律速段階の一つであると考えられている。またCMCaseの添加によって細いBCリボンが形成されることから、CMCによるBC生産の増強は、CMCそれ自身ばかりでなく、CMCによって誘導されたセルラーゼによる③→④の過程の相加的、あるいは相乗的な阻害によると結論した。

(3) セルロースと構造が非常に類似しているキチン・キトサンに着目し、キチン・キトサン誘導體 (WShD)、および水溶性キトサンオリゴマー (WShO) の添加培養によるBCCの合成を行った。収量・含有量の比較からWShDはBCCを形成し、BC生産を増強することが解った。またこれらは分子レベルで含有されていることが確認された。一方、WShOについてはBCCを形成しないにも関わらずBC生産を増強した。収量・グルコース消費・菌体増殖・pHの時間経過の解析から、WShOは菌体を活性化し、定常期(培養後期)におけるBC生産を増強していることが考えられた。

(4) 酢酸菌 *A. xylinum* NCI1005が合成する菌体外水溶性多糖のキャラクタリゼーションを行なった。GPCによる分子量測定、酸加水分解による構成糖の分析、NMRによる詳細な構造解析の結果、この水溶性多糖が分子量数万~数十万の $\beta$ -(2→6)-フラクタン(レバン)であることを見出した。

(5) BC合成酢酸菌としてATCC10245とNCI1051、WSP合成酢酸菌としてNCI1005を用いて混合培養を行い、スクロースを基質としたBCC合成に成功した。またスクロースを基質とするBC合成酢酸菌の単独培養に比べBC生産が増強されることを見出した。これはNCI1005のレバンスクララーゼによるスクロースの加水分解によって、BC合成酢酸菌の低いスクロース資化性が補われたためであると推定した。

(6) MC、CMCが分子レベルでBC中に取り込まれることによって機械的強度が2~3倍に飛躍的に増加することを見出した。生分解性についてはセルラーゼ標品に対する分解性および、土壤中における分解性によって評価した。セルラーゼによって分解されるCMCを含有させたBCCは、初期の分解速度は低いが、最終的には通常のBCと同様にセルラーゼによってほとんど分解された。これらBCCにおけるヤング率の増加、および分解性の低下は、WSPがフィブリルサブユニット表面やリボン間に含有されることによる膜内の水素結合の増加と緻密化に起因していると考えた。一方、セルラーゼによって分解されないMCを含有させたBCCは、セルラーゼによって20%程度しか分解されなかった。土壤中における分解試験ではBCC(MC)およびBCC(CMC)ともに分解性がコントロールのBC(NBC)に比べて若干減少するが、4週間で大部分が分解された。このようにWSPを含有させることによって、BCの物性制御と生分解性制御が可能となった。

これを要するに、著者は、微生物を用いた高強度の生分解性材料の新しい合成方法を開発し、さらに収量を増加させることに成功するとともにその機構を明らかにしており、高分子材料工学に寄与するところが大きい。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格があるものと認める。