

生体触媒による生分解性ポリエステル<sup>o</sup>の合成と  
ケミカルリサイクルに関する研究

平成15年度

小山内 靖



# 目次

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b>	<b>1</b>
1.1	研究背景	1
1.2	生分解性プラスチック	2
1.3	菌体内の poly(hydroxyalkanoate)	4
1.4	Poly(hydroxyalkanoate) の生合成	5
1.5	Poly(hydroxyalkanoate) の酵素合成	7
1.6	生分解性材料のリサイクル	8
1.7	本論文の研究内容	9
<b>第 2 章</b>	<b><math>\beta</math>-butyrolactone の酵素触媒重合</b>	<b>11</b>
2.1	緒言	11
2.2	試薬・機器・方法	15
2.2.1	試薬・酵素	15
2.2.2	機器	19
2.2.3	実験方法	21
	(1) 酵素触媒重合	21
	(2) 超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC) による分別	22
	(3) 酵素とオリゴマーの相互作用に関する検討	22
2.3	結果・考察	24
2.3.1	重合条件の検討	24
	(1) 酵素起源の影響	24
	(2) 重合スケールの決定	30
	(3) 酵素濃度の影響	36
	(4) 重合温度の影響	40
	(5) 重合時間の影響	45
2.3.2	酵素触媒重合の重合挙動解析	53

2.3.3	酵素触媒重合により得られるポリマーの構造解析 . . . . .	57
	(1) 構造解析の概要 . . . . .	57
	(2) 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) を用いた構造体の分別 . . . . .	62
	(3) 分別したフラクションに含まれるポリマーの構造解析 . . . . .	64
	(4) SFC の条件検討 . . . . .	69
	(5) 3 種の構造体の組成比に関する検討 . . . . .	76
2.3.4	酵素のオリゴマーに対する基質認識能 . . . . .	80
2.3.5	酵素触媒重合機構について . . . . .	83
2.4	総括 . . . . .	86
<b>第 3 章</b>	<b>有機溶媒中における poly(3-hydroxybutanoate) の酵素分解</b>	<b>89</b>
3.1	緒言 . . . . .	89
3.2	試薬・機器・方法 . . . . .	93
3.2.1	試薬・酵素 . . . . .	93
3.2.2	機器 . . . . .	97
3.2.3	実験方法 . . . . .	99
	(1) 酵素触媒を用いた P(3HB) の合成 . . . . .	99
	(2) <i>syndiotactic</i> P(3HB) の合成 . . . . .	99
	(3) <i>atactic</i> P(3HB) の合成 . . . . .	101
	(4) P(3HB) の酵素分解 . . . . .	106
	(5) 分子量一定の水酸基末端型オリゴマーの調製 . . . . .	106
	(6) 分子量一定の環状型オリゴマーの調製 . . . . .	106
	(7) 分子量一定の水酸基末端型オリゴマーの環化反応 . . . . .	107
	(8) 分子量一定の環状型オリゴマーの酵素反応 . . . . .	107
3.3	結果・考察 . . . . .	108
3.3.1	酵素触媒重合により得られた P(3HB) の酵素分解反応 . . . . .	108
	(1) 酵素起源の影響 . . . . .	108
	(2) 分解に用いる有機溶媒の影響 . . . . .	110
	(3) 分解における酵素濃度の影響 . . . . .	116
	(4) 分解における反応時間の影響 . . . . .	120
	(5) 分解におけるポリマー濃度の影響 . . . . .	123
	(6) 分解における反応温度の影響 . . . . .	126
	(7) ポリマー試料の分子量が分解に及ぼす影響 . . . . .	130
3.3.2	化学触媒重合により得られた P(3HB) の酵素分解反応 . . . . .	135

(1) <i>syndiotactic</i> P(3HB) の分解における酵素濃度の影響 . . . . .	135
(2) <i>syndiotactic</i> P(3HB) の分解における反応時間の影響 . . . . .	138
(3) <i>atactic</i> P(3HB) の分解における酵素濃度の影響 . . . . .	141
(4) <i>atactic</i> P(3HB) の分解における反応時間の影響 . . . . .	143
3.3.3 分解生成物の構造解析 . . . . .	146
(1) <i>syndiotactic</i> P(3HB) 分解生成物の構造 . . . . .	146
(2) <i>atactic</i> P(3HB) 分解生成物の構造 . . . . .	155
3.3.4 酵素触媒分解の反応機構について . . . . .	164
3.3.5 酵素触媒分解における環化反応機構について . . . . .	167
(1) 環化反応のオリゴマーサイズ選択性 . . . . .	167
(2) 環化反応機構 . . . . .	175
3.3.6 酵素触媒分解生成物を用いた反応の開発 . . . . .	178
(1) 分解生成物の再重合 . . . . .	178
(2) 環状オリゴマーの酵素触媒エステル化 . . . . .	181
3.4 総括 . . . . .	183
<b>第 4 章 酵素充填カラムを用いた生分解性脂肪族ポリエステルの連続分解</b>	<b>185</b>
4.1 緒言 . . . . .	185
4.2 試薬・機器・方法 . . . . .	187
4.2.1 試薬・酵素 . . . . .	187
4.2.2 機器 . . . . .	189
4.2.3 実験方法 . . . . .	191
(1) <i>atactic</i> P(3HB) の合成 . . . . .	191
(2) 固定化酵素充填カラムの作製 . . . . .	193
(3) トルエンを移動相に用いたポリエステルの連続分解 . . . . .	194
(4) 超臨界二酸化炭素を移動相に用いたポリエステルの連続分解 . . . . .	195
4.3 結果・考察 . . . . .	197
4.3.1 トルエンを移動相に用いた連続分解 . . . . .	197
(1) P(3HB) の連続分解 . . . . .	197
(2) PCL の連続分解 . . . . .	212
(3) PBA の連続分解 . . . . .	222
4.3.2 超臨界二酸化炭素を移動相に用いた連続分解 . . . . .	234
(1) P(3HB) の連続分解 . . . . .	236
(2) PCL の連続分解 . . . . .	248

(3) PBA の連続分解 . . . . .	257
4.4 総括 . . . . .	266
<b>第 5 章 生分解性脂肪族ポリエステルが生分解性評価</b>	<b>269</b>
5.1 緒言 . . . . .	269
5.2 試薬・機器・原理・方法 . . . . .	271
5.2.1 試薬 . . . . .	271
5.2.2 機器 . . . . .	273
5.2.3 原理 . . . . .	274
(1) 規格 . . . . .	274
(2) 測定装置及び測定方法 . . . . .	283
5.2.4 実験方法 . . . . .	286
(1) atactic P(3HB) の合成 . . . . .	286
(2) poly(butylene succinate-co-butylene adipate) の合成 . . . . .	289
5.3 結果・考察 . . . . .	292
(1) 非天然型 P(3HB) の生分解に関する検討 . . . . .	292
(2) poly(butylene succinate-co-butylene adipate) の生分解試験結果	302
(3) P((R)-3HB) の生分解試験結果 . . . . .	307
(4) 環状型 3HB オリゴマーの生分解試験結果 . . . . .	310
5.4 総括 . . . . .	313
<b>第 6 章 結論</b>	<b>315</b>
<b>付録 A マススペクトロメトリーについて</b>	<b>319</b>
A.1 質量分析の基礎概念 . . . . .	319
A.1.1 質量分析のしくみ . . . . .	319
A.1.2 マススペクトルから得られる情報 . . . . .	320
A.1.3 試料のイオン化法 . . . . .	320
A.1.4 MALDI-TOF MS の測定方法 . . . . .	322
イオンピークの解析について . . . . .	322
A.1.5 APCI MS の測定方法 . . . . .	324
イオンピークの解析について . . . . .	324
<b>本論文に関する研究発表</b>	<b>325</b>

参考文献

329

謝辭

349





## 目次

1.1	PHA in microorganism. . . . .	6
1.2	Proposed mechanism of lipase-catalyzed polymerization of lactones. . .	7
2.1	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed polymerization of lactones.	13
2.2	Conceptual diagram of supercritical carbon dioxide chromatography. . .	20
2.3	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of $\beta$ -butyrolactone. . . . .	21
2.4	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB). . . . .	22
2.5	Chemical structure of lecithin. . . . .	25
2.6	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by CRL catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	26
2.7	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by PPL catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	27
2.8	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by Novozym <sup>®</sup> 435 catalyzed ring- opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	28
2.9	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by Lipase AK catalyzed ring- opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	29
2.10	Effects of the polymerization scale on the relationship between monomer conversion and enzyme concentration: (1) . . . . .	32
2.11	Effects of the polymerization scale on the relationship between monomer conversion and enzyme concentration: (2) . . . . .	33
2.12	Effects of the polymerization scale on the relationship between weight- averaged molecular weight and enzyme concentration: (1) . . . . .	34
2.13	Effects of the polymerization scale on the relationship between weight- averaged molecular weight and enzyme concentration: (2) . . . . .	35
2.14	Effects of the enzyme concentration on the polymerization of $\beta$ -BL. (70 °C) . . . . .	37

2.15	Effects of the enzyme concentration on the polymerization of $\beta$ -BL. (85 °C) . . . . .	38
2.16	Effects of the enzyme concentration on the polymerization of $\beta$ -BL. (90 °C) . . . . .	38
2.17	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL.	41
2.18	Modeling of energy state during the folding of protein. . . . .	44
2.19	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (10 wt.-% of CRL, 85 °C) . . . . .	48
2.20	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (40 wt.-% of CRL, 85 °C) . . . . .	48
2.21	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (10 wt.-% of CRL, 90 °C) . . . . .	49
2.22	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (40 wt.-% of CRL, 90 °C) . . . . .	49
2.23	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (5 wt.-% of PPL, 80 °C) . . . . .	50
2.24	Effects of the polymerization temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. (40 wt.-% of PPL, 80 °C) . . . . .	50
2.25	Proposed mechanism of the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ - butyrolactone. . . . .	53
2.26	Relationship between monomer conversion and number-average molecu- lar weight on polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	56
2.27	Proposed structures of polymers that were contained in crude P(3HB) produced by the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL.	58
2.28	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of crude P(3HB) produced by the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	60
2.29	MALDI-TOF MS spectrum of crude P(3HB) produced by the lipase- catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	61
2.30	SFC profiles of mixtures obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	63
2.31	SFC profiles of separated fraction from mixture. . . . .	63
2.32	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of isolated P(3HB): Fraction A . . . . .	64
2.33	MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction A . . . . .	65
2.34	Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction A . . . . .	65

2.35	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of isolated P(3HB): Fraction B . . . . .	66
2.36	MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction B . . . . .	66
2.37	Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction B . . . . .	67
2.38	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of isolated P(3HB): Fraction C . . . . .	67
2.39	MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction C . . . . .	68
2.40	Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction C . . . . .	68
2.41	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (1) . . . . .	69
2.42	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (2) . . . . .	70
2.43	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (3) . . . . .	70
2.44	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (4) . . . . .	71
2.45	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (5) . . . . .	71
2.46	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (6) . . . . .	72
2.47	SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL: (7) . . . . .	73
2.48	Expanded <sup>1</sup> H-NMR spectrum of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	76
2.49	Expanded region of MALDI-TOF MS spectrum of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	77
2.50	Time course of the composition of three structures of P(3HB) produced by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. (5 wt.-% of PPL, 80 °C)	78
2.51	Time course of the composition of three structures of P(3HB) produced by the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. (40 wt.-% of PPL, 80 °C)	79
2.52	MALDI-TOF MS spectra of fractionated P(3HB) before and after the enzymatic reaction. . . . .	81
2.53	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed inter/intra-molecular trans- esterification of P(3HB) polymer chains. . . . .	82
2.54	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed cyclization. . . . .	84

2.55	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	85
3.1	Conceptual scheme of the enzyme-catalyzed chemical recycling. . . . .	90
3.2	Conceptual diagram of supercritical carbon dioxide chromatography. . . . .	98
3.3	Mechanism of ring-opening polymerization of ( <i>R</i> , <i>S</i> )- $\beta$ -BL using DTD as the catalyst. . . . .	100
3.4	Chemical structure of 1,3-dichlorotetrabutyl distannoxane. . . . .	100
3.5	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of $\beta$ -BL using 1,3-dichlorotetrabutyl distannoxane. . . . .	102
3.6	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1) . . . . .	103
3.7	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2) . . . . .	103
3.8	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of $\beta$ -BL using potassium oleate–18-Crown-6 complex. . . . .	104
3.9	DSC profiles of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of $\beta$ -BL using potassium oleate–18-Crown-6 complex. . . . .	105
3.10	The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in toluene solution. . . . .	111
3.11	The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in diisopropyl ether solution. . . . .	112
3.12	The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in acetonitrile solution. . . . .	112
3.13	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products in various organic solvents. . . . .	113
3.14	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products in several solvents. . . . .	114
3.15	Oligomer structures of the lipase-catalyzed degradation products. . . . .	115
3.16	The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (1) . . . . .	117
3.17	The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (2) . . . . .	118
3.18	The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (3) . . . . .	118
3.19	Proposed mechanisms of the P(3HB)depolymerase-catalyzed degradation of P(3HB) polymer chain. . . . .	119
3.20	Time course of molecular weights of the degradation products. . . . .	121
3.21	Time course of structural composition of the degradation products. . . . .	121
3.22	The effects of polymer concentration on the degradation of P(3HB). . . . .	124
3.23	The effects of polymer concentration on the degradation products structure. . . . .	124
3.24	The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (1) . . . . .	127

3.25	The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (2) .	128
3.26	The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (3) .	128
3.27	The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (4) .	129
3.28	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (1 % of polymer, 24 h) . . . . .	131
3.29	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (1 % of polymer, 48 h) . . . . .	132
3.30	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (1 % of polymer, 72 h) . . . . .	132
3.31	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (0.5 % of polymer, 24 h) . . . . .	133
3.32	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (0.5 % of polymer, 48 h) . . . . .	133
3.33	The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB). (0.5 % of polymer, 72 h) . . . . .	134
3.34	The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>syn</i> -P(3HB): (1) . . . . .	136
3.35	The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>syn</i> -P(3HB): (2) . . . . .	137
3.36	Time course of the molecular weight of the degradation products. . . .	139
3.37	SEC profiles of lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). .	140
3.38	The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	142
3.39	Time course of the lipase-catalyzed degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	144
3.40	SEC profiles of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). .	145
3.41	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> - P(3HB). . . . .	147
3.42	Structures of mixtures that was included in the crude degradation prod- ucts of <i>syn</i> -P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed degradation. . . .	148
3.43	Time course of structural composition of the degradatiion products. . .	148
3.44	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (1 h-degradation) . . . . .	149
3.45	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (2 h-degradation) . . . . .	149

3.46	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (3 h-degradation) . . . . .	150
3.47	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (6 h-degradation) . . . . .	150
3.48	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (9 h-degradation) . . . . .	151
3.49	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (12 h-degradation) . . . . .	151
3.50	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (15 h-degradation) . . . . .	152
3.51	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (18 h-degradation) . . . . .	152
3.52	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (21 h-degradation) . . . . .	153
3.53	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>syn</i> -P(3HB). (24 h-degradation) . . . . .	153
3.54	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	155
3.55	Structures of mixtures that was included in crude degradation products of <i>ata</i> -P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed degradation. . . . .	156
3.56	Time course of structural composition of the degradation products. . . . .	157
3.57	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (1 h-degradation) . . . . .	157
3.58	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (2 h-degradation) . . . . .	158
3.59	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (3 h-degradation) . . . . .	158
3.60	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (6 h-degradation) . . . . .	159
3.61	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (9 h-degradation) . . . . .	159
3.62	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (12 h-degradation) . . . . .	160

3.63	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (15 h-degradation) . . . . .	160
3.64	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (18 h-degradation) . . . . .	161
3.65	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (21 h-degradation) . . . . .	161
3.66	MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of <i>ata</i> -P(3HB). (24 h-degradation) . . . . .	162
3.67	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . .	164
3.68	MALDI-TOF MS spectrum of before and after the cyclization of hydroxy-type 8-mer catalyzed by lipase from <i>Candida antarctica</i> . . . . .	171
3.69	Cyclization rate with keeping the original oligomer size. . . . .	172
3.70	The structure in 3-D of lipase from <i>Candida antarctica</i> with inhibitor (Tween80) by RAS MOL. . . . .	173
3.71	Proposed cyclization mechanism in active site of <i>Candida antarctica</i> . . .	174
3.72	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed cyclization. . . . .	175
3.73	Proposed reaction mechanism of the cyclic oligomer with lipase. . . . .	176
3.74	The lipase-catalyzed reaction of cyclic 7-mer. . . . .	177
3.75	SEC profiles of before and after the lipase-catalyzed re-polymerization of the degradation products. . . . .	179
3.76	SEC profiles of before and after the re-polymerization of the degradation products by tin octanoate. . . . .	180
3.77	MALDI-TOF MS spectrum of before and after the lipase-catalyzed esterification of the degradation products with <i>n</i> -hexanol. . . . .	181
3.78	Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed esterification of a cyclic oligomer with a nucleophile. . . . .	182
4.1	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1) . . . . .	191
4.2	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2) . . . . .	192
4.3	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of $\beta$ -BL using potassium oleate-18-Crown-6 complex. . . . .	192
4.4	DSC curve of the obtained <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	193
4.5	Conceptual scheme of the continuous degradation equipment using the enzyme column. (Mobile phase: toluene) . . . . .	194

4.6	Conceptual scheme of the continuous degradation equipment using the enzyme column. (Mobile phase: supercritical carbone dioxide + toluene)	195
4.7	Effects of flow rate on the RI gram of the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	198
4.8	Effects of polymer concentratioin on the RI gram of the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	199
4.9	Effects of flow rate on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	201
4.10	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	205
4.11	SEC profiles of the partially degraded <i>ata</i> -P(3HB) oligomer and the second degradatiion products by the passage through the enzyme column.	207
4.12	RI gram of continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB) using HPLC pump.	210
4.13	SEC profiles of continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB) using HPLC pump.	210
4.14	MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of <i>ata</i> -P(3HB).	211
4.15	Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL.	214
4.16	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL.	216
4.17	SEC profiles of continuous degradation products of PCL using HPLC pump.	217
4.18	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the continuous degradation products of PCL using HPLC pump.	218
4.19	SEC profiles of the continuous degradation products of PCL using HPLC pump.	219
4.20	SEC profiles of $\epsilon$ -caprolactone.	219
4.21	APCI MS spectrum of the re-crystalized continuous degradation products of PCL using HPLC pump.	220
4.22	SEC profiles of the re-crystalized continuous degradation products of PCL using HPLC pump.	221
4.23	Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA.	224
4.24	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA.	226
4.25	SEC profiles of continuous degradation of PBA using HPLC pump.	230
4.26	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the continuous degradation products of PBA using HPLC pump.	231
4.27	MALDI-TOF MS spectrum of the continuous degradation products of PBA using HPLC pump.	232



4.28	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the continuous degradation products of PBA. . .	233
4.29	Effects of pressure on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	237
4.30	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	239
4.31	Effects of total flow rate on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	242
4.32	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of <i>ata</i> - P(3HB). . . . .	245
4.33	MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of <i>ata</i> -P(3HB): (1) . . . . .	246
4.34	MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of <i>ata</i> -P(3HB): (2) . . . . .	247
4.35	Effects of pressure on the continuous degradation of PCL. . . . .	249
4.36	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of PCL. . . . .	251
4.37	Effects of total flow rate on the continuous degradation of PCL. . . . .	253
4.38	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL. . . . .	255
4.39	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the continuous degradation products of PCL. . . . .	256
4.40	Effects of pressure on the continuous degradation of PBA. . . . .	258
4.41	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of PBA. . . . .	260
4.42	Effects of total flow rate on the continuous degradation of PBA. . . . .	262
4.43	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA. . . . .	264
4.44	MALDI-TOF MS spectrum of the continuous degradation products of PBA. . . . .	265
5.1	Conceptual scheme of BOD sencer system. . . . .	284
5.2	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1) . . . . .	286
5.3	Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2) . . . . .	287
5.4	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymeriza- tion of $\beta$ -BL using potassium oleate–18-Crown-6 complex. . . . .	287
5.5	DSC curve of the obtained <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	288
5.6	Scheme for the sysnthesis of poly(butylene succinate- <i>co</i> -butylene adipate). . . . .	289
5.7	DSC curve of the obtained poly(butylene succinate- <i>co</i> -butylene adipate). . . . .	290
5.8	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of the obtained poly(butylene succinate- <i>co</i> -butylene adipate). . . . .	291
5.9	Biodegradation curve of ( <i>S</i> )-3HB and ( <i>R,S</i> )-3HB. . . . .	295
5.10	Biodegradation curve of <i>ata</i> P(3HB). (block shape) . . . . .	297

---

5.11 Biodegradation curve of <i>ata</i> P(3HB). (thin film) . . . . .	300
5.12 SEC profiles of before and after the biodegradation of <i>ata</i> -P(3HB). . .	300
5.13 Biodegradation curve of P(BS- <i>co</i> -BA). (block shape) . . . . .	305
5.14 Biodegradation curve of P(BS- <i>co</i> -BA). (thin film) . . . . .	305
5.15 Biodegradation curve of poly( <i>R</i> -3-hydroxybutanoate). . . . .	308
5.16 Biodegradation curve of cyclic 3HB oligomer. . . . .	312

# 表目次

1.1	Biodegradable plastics in the Japanese market. . . . .	3
2.1	List of chemical reagents in Chapter 2. . . . .	15
2.2	List of enzymes in Chapter 2. . . . .	17
2.3	The enzyme screening for the lipase-catalyzed polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	24
2.4	Influence of polymerization scale on reproducibility. . . . .	30
2.5	Effects of the enzyme concentration on the polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	36
2.6	Effects of temperature on the polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	40
2.7	Effects of the polymerization time on the polymerization of $\beta$ -BL. (Enzyme: CRL) . . . . .	45
2.8	Effects of the polymerization time on the polymerization of $\beta$ -BL. (Enzyme: PPL) . . . . .	46
2.9	The relationship between monomer conversion and number-average molecular weight on the polymerization of $\beta$ -BL. . . . .	54
2.10	The relationship between HPLC conditions and behaviour of SFC spec- trum. . . . .	75
2.11	Screening of enzymes and organic solvents for the interaction between oligomers and enzyme. . . . .	80
3.1	List of chemical reagents in Chapter 3. . . . .	93
3.2	List of enzymes in Chapter 3. . . . .	95
3.3	Tacticities of the obtained P(3HB) as measured by $^{13}\text{C}$ -NMR. . . . .	105
3.4	The screening of enzyme for the lipase-catalyzed degradation of poly(3- hydroxybutanoate). . . . .	108
3.5	The effects of organic solvents on the lipase-catalyzed degradation of poly(3-hydroxybutanoate). . . . .	110

3.6	The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . . . .	116
3.7	Time course of the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . . . .	120
3.8	The effects of polymer concentration on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . . . .	123
3.9	The effects of temperature on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . . . .	126
3.10	The effects of the initial molecular weight on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB). . . . .	130
3.11	The Effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>syn</i> -P(3HB): (1) . . . . .	135
3.12	The Effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>syn</i> -P(3HB): (2) . . . . .	136
3.13	Time course of the lipase-catalyzed degradation of <i>syn</i> -P(3HB). . . . .	138
3.14	The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	141
3.15	Time course of the lipase-catalyzed degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	143
3.16	Novozym <sup>®</sup> 435 catalyzed cyclization of several molecularly homogeneous linear oligomers. . . . .	167
3.17	The reaction of molecularly homogeneous cyclic oligomers. . . . .	176
3.18	Novozym <sup>®</sup> 435 catalyzed re-polymerization of the degradation products. . . . .	178
4.1	List of chemical reagents in Chapter 4. . . . .	187
4.2	List of enzymes in Chapter 4. . . . .	188
4.3	The continuous degradation of low molecular weight P(3HB) using the enzyme column. . . . .	198
4.4	Effects of flow rate on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	200
4.5	Effects of the column temperature on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	202
4.6	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	204
4.7	Continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB) using HPLC pump. . . . .	208
4.8	Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL. . . . .	213
4.9	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL. . . . .	215
4.10	Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA. . . . .	223

---

4.11	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA.	225
4.12	Continuous degradation of PBA using HPLC pump. . . . .	229
4.13	Effects of pressure on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB). . . . .	236
4.14	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	238
4.15	Effects of total flow rate on the continuous degradation of <i>ata</i> -P(3HB).	241
4.16	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of <i>ata</i> - P(3HB). . . . .	244
4.17	Effects of pressure on the continuous degradation of PCL. . . . .	248
4.18	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of PCL. . . . .	250
4.19	Effects of total flow rate on the continuous degradation of PCL. . . . .	252
4.20	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL.	254
4.21	Effects of pressure on the continuous degradation of PBA. . . . .	257
4.22	Effects of sc CO <sub>2</sub> content on the continuous degradation of PBA. . . . .	259
4.23	Effects of total flow rate on the continuous degradation of PBA. . . . .	261
4.24	Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA.	263
5.1	List of chemical reagents in Chapter 5. . . . .	271
5.2	BOD of ( <i>S</i> )-3HB sodium salt. . . . .	292
5.3	BOD of ( <i>R,S</i> )-3HB. . . . .	293
5.4	BOD of <i>ata</i> -P(3HB). (block shape) . . . . .	296
5.5	BOD of <i>ata</i> -P(3HB). (polymer thin film) . . . . .	298
5.6	BOD of P(BS- <i>co</i> -BA). (block shape) . . . . .	302
5.7	BOD of P(BS- <i>co</i> -BA). (polymer thin film) . . . . .	303
5.8	BOD of P( <i>(R)</i> -3HB). . . . .	307
5.9	BOD of cyclic 3HB oligomer. . . . .	310



# 第1章

## 序論

### 1.1 研究背景

化石資源由来の合成高分子であるプラスチックは天然素材にない優れた性能と機能を有し、現代生活を快適に保つ点で重要な役割を果たしている。自動車、航空機といった輸送機器の構成部品の多くが鉄鋼品からプラスチックに代替されて大幅な重量減が達成され、二酸化炭素排出量削減の一翼を担っている。現代生活を維持する上で、プラスチック製品は欠くことのできない素材になっている。

しかし、あまりにも優れた安定性のため、廃棄されたプラスチック材料は自然環境中で分解されず、また、焼却の際にはダイオキシン等といった有毒ガスが発生される点から様々な環境問題を引き起こしている。現在では埋め立てにより処理されているが、埋め立て処分場の許容量を考えると現行に代わる対処法が必要である。廃プラスチックによる環境破壊は地上のみに留まらず、ゴーストネットと呼ばれる海洋中に放棄された魚網、釣り糸といったプラスチック製品が海洋動物の生態系を大きく崩していることが指摘されており、早期解決が求められている。

こういった背景から自然界に普遍的に存在する微生物により分解される生分解性高分子材料が環境に対して低負荷な高分子材料として注目されている。生分解性高分子材料はバイオマテリアルと称される生体機能材料としても注目されており、生物・医学への応用も期待されている。生分解性高分子材料に関しては現在、国内外の数多くの研究グループにより詳細な研究がなされ、多数の報告が出されている。

また、近年では化石資源に頼らず、さらに製品の全ライフサイクルが環境に対して低負荷な化学産業の創出を目的としたグリーンケミストリーという研究領域が創成された。すなわち、再生可能資源を化石資源の代替として積極的に化成品の原料に利用し、製造工程、使用過程、廃棄過程の全てにおいて環境親和型なプロセスの構築を目指す学問領域である。

日本ではこの概念に循環型社会の構築を加えて、グリーンサステイナブルケミストリーという研究領域が創成され、生分解性材料を含め、化成品のプロセス全般にわたって活発に研究されている。

近年、生分解性高分子材料の研究領域では、再生可能資源を原料に用いた高分子材料の合成研究が盛んに行われている。特にデンプンの乳酸発酵により、容易に得られる乳酸をモノマーに用いたポリ乳酸は米国 Cargill Dow 社が年産 14 万トンのプラントを始動したことから注目を集めている。

活発に研究がなされている生分解性高分子材料であるが、製造コストが他の汎用高分子材料に比べて高いという問題点を抱えており、合成プロセスの簡略化等による製造コストの削減も研究課題に加えられている。また、合成プロセスの触媒についても、従来の重金属を触媒に用いた場合、溶解/再沈殿といった精製方法では残存触媒が除去しきれずに加水分解後の残余物中で濃縮される可能性が指摘され、重金属に代わる環境低負荷型な触媒による生分解性高分子材料の合成も求められている<sup>131)</sup>。さらに、物性面においても汎用プラスチックと同等の性能を有する生分解性高分子材料はまだ数少ない。

また、生分解性高分子材料の廃棄後のプロセスにあたるリサイクルに関してはほとんど検討されていない。自然環境中で分解する素材であるが、循環型社会の構築や炭素資源の有効利用を考慮すると、生分解性高分子材料といえども可能な限り回収してリサイクルすべきであると考えられる。

したがって、生分解性高分子材料開発における研究課題としては、合成プロセスにおける重金属の代替になる触媒開発、材料の高機能化、廃棄後のリサイクルが挙げられる。

そこで、本研究では酵素を触媒に用いた生分解性ポリエステル<sup>132)</sup>の合成及び分解反応を詳細に検討することで、上記の生分解性高分子材料開発における研究課題にアプローチした。研究材料として、モノマーユニットがラセミ体である非天然型 poly(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)]<sup>133)</sup>を選択した。以下に生分解性プラスチックに関する研究の現状について簡単に説明する。

## 1.2 生分解性プラスチック

2003 年 7 月現在、日本国内で実用展開されている生分解性プラスチックを Table 1.1 にまとめた。Table 1.1 に示したように生分解性プラスチックは大きく 3 種類にわけられる。しかし、商品群の多さと化学構造で分別すると澱粉系とポリエステル系の 2 種類である。各製造会社も特徴をもった製品群を生産しているが、どのポリマーに関しても原料が石油資源から再生可能資源に切り替わっているのが大きな特徴である。



Table 1.1: Biodegradable plastics in the Japanese market.

商品名	製造会社	ポリマー名
I 微生物産系		
ビオグリーン (未定) メタポリックス プルラン	三菱ガス化学 鐘淵化学 Metabolix 林原生化学研	ポリヒドロキシブチレート ポリヒドロキシブチレート ポリヒドロキシブチレート マルトトリオース
II 化学合成系		
II-1 脂肪族ポリエステル		
ネイチャーワークス レイシア Eco Plastics U's ビオノーレ 1001 ビオノーレ 3001 GS-Pla セルグリーン トーン ユーペック ルナーレ SE	Cargill Dow Polymer 三井化学 トヨタ自動車(島津) 昭和高分子 昭和高分子 三菱化学(味の素) ダイセル化学工業 Dow Chemical 三菱ガス化学 日本触媒	ポリ乳酸 ポリ乳酸 ポリ乳酸 ポリブチレンサクシネート ポリ(ブチレンサクシネート/アジペート) ポリ(ブチレンサクシネート) ポリカプロラクトン ポリカプロラクトン ポリ(ブチレンサクシネート/カーボネート) ポリエチレンサクシネート
II-2 芳香族ポリエステル		
Ecoflex Biomax EasterBio エンポール	BASF Dupont Eastman Chemicals Ire Chemical	ポリ(ブチレンアジペート/テレフタレート) ポリ(エチレンテレフタレート/サクシネート) ポリ(テトラメチレンアジペート/テレフタレート) ポリ(ブチレンサクシネート/テレフタレート)
II-3 その他合成系		
ポバール ゴーセノール	クラレ 日本合成化学工業 呉羽化学	ポリビニールアルコール ポリビニールアルコール ポリグリコール酸
III 天然物系		
コーンポール プラコーン	日本コーンスターチ 日本食品加工	エステル化澱粉 澱粉/化学合成系

次ページへ続く

前ページからの続き

商品名	製造会社	ポリマー名
Mater-Bi Z	novamont・ケミテック	澱粉/化学合成系 + PCL
Mater-Bi N	novamont・ケミテック	澱粉/化学合成系 + CPE
ワイズパーム	サンコーワイズ	ヤシ殻粉/化学合成系
ドロン CC	アイセロ化学	キトサン/セルロース/澱粉

Table 1.1 に示したポリマーのうち、完全に原料を化石資源に頼っているのはポリカプロラク톤のみである。ポリブチレンサクシネートの原料であるコハク酸も微生物発酵で生産が可能となった。ポリ乳酸の原料である乳酸は現在のところ、食品由来の澱粉を乳酸発酵することにより得ている。世界の食料不足の状況を考慮した場合、澱粉源を食品以外に求めることが課題になるであろう。続いて、微生物産系の生分解性プラスチックについて述べる。

### 1.3 菌体内の poly(hydroxyalkanoate)

1925 年に Lemoigne が巨大枯草菌 *Bacillus megaterium* 内で見出した顆粒が poly((R)-3-hydroxybutyrate)[P(R-3HB)] であることを明らかにして以来、多くの微生物が菌体内に P(R-3HB) を蓄積することがわかった。この P(R-3HB) に代表される poly(hydroxyalkanoate)[PHA] は生産する菌体により組成が異なるが、微生物にとってのエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積されており、栄養飢餓状態の際に分解、代謝される。

このことは微生物は栄養飢餓状態の際に PHA を分解する酵素を分泌し、PHA を分解して菌体内に栄養分として取り込んでいることを表している。PHA の中でも発見の早かった P(R-3HB) が最も詳細に研究されている PHA の一種である。微生物により生産される PHA は基本的に二つのモノマー成分から成る共重合体であるが、その内の一つの成分は大体の菌体において 3HB である。

したがって、3HB をモノマー成分に含む PHA を合成する菌体は前述した通り、生産したポリマーを分解する酵素を有している。このポリマーを分解する酵素はデポリメラーゼ (depolymerase) と呼ばれ、P(R-3HB) を分解する酵素は P(R-3HB) デポリメラーゼと呼ばれている。この P(3HB) デポリメラーゼに関しても P(R-3HB) と同様に非常に活発な研究がなされ<sup>8, 7, 55, 135, 156)</sup>、現在のところ菌体内に貯蔵されている PHA を分解する菌体内 P(R-3HB) デポリメラーゼと菌体外の PHA を分解するために菌体が菌体外へ分泌する

菌体外 P(R-3HB) デポリメラーゼの二種類が存在することが確認されている。

PHA は一般的に合成高分子と同様、熱可塑性を有し、さらに優れた生体適合性及び生分解性をも有している。しかしながら、菌体の生産する P(R-3HB) は全てのモノマーユニットが (R) 体から構成されているために結晶性が非常に高く、硬くて脆い物性を有している。したがって、ホモポリマーでの利用が難しく、環境調和型材料及び生体機能材料としても実用化するには他の PHA との共重合もしくはブレンドによる物性の改良が必要とされている。

この物性改良においても自然界における P(R-3HB) デポリメラーゼの挙動が重要な要素として考えられ、デポリメラーゼの解析も詳細に研究がなされている。その結果、セルロース加水分解酵素であるセルラーゼと同様に、基質と吸着する基質吸着ドメインを活性部位が存在する酵素本体とは別途にリンカーを介して有していることが明らかになっている<sup>135)</sup>。この基質吸着ドメインは P(R-3HB) の結晶領域を認識し、吸着する。P(R-3HB) は疎水性が高いポリマーであり、もちろんのこと水には不溶なポリマーである。したがって、P(R-3HB) デポリメラーゼの作用により加水分解を受ける際にはデポリメラーゼが吸着している必要があり、結晶領域を有さない非晶性の非天然型 P(3HB) はデポリメラーゼの吸着が出来ないために分解反応が進行しにくいという結果も得られている。すなわち、P(R-3HB) の物性改良のためには (S) 体をポリマー中に組み込み、結晶性を低下させる方法もあるが、結晶性を低下させすぎるとデポリメラーゼの吸着量の減少に伴い、分解速度を著しく低下する。

P(R-3HB) デポリメラーゼの活性部位は一般的に 3~4 つのサブサイトを有しており、基質特異性の向上に寄与している。Seebach らは、*Alcaligenes faecalis* T1 由来菌体外 P(R-3HB) デポリメラーゼが有するサブサイトの認識様式について詳細な研究報告を出し、この酵素は 4 つのサブサイトを有しており (R) 体認識の強いサブサイト同士の間中に活性セリン残基が存在するため (R)-(R) 配列が切断を受けるためには必須であることが明らかにした<sup>7)</sup>。そのため、(R) 体と (S) 体が一次的に交互に配列する非天然型 *syndiotactic*-P(3HB) は分解を受けにくいことが阿部らの研究によっても明らかにされている<sup>1)</sup>。

## 1.4 Poly(hydroxyalkanoate) の生合成

PHA 合成の方法としては大きく分けて化学触媒法と生体触媒法があり、生体触媒法はさらに発酵法と酵素法に分けられる。全ての合成手法に関して現在、国内外の様々な研究チームにより詳細に検討されている<sup>16, 17, 33, 133, 161)</sup>。



Fig. 1.1: PHA in microorganism. (Photo/Prof. Doi's Lab.)

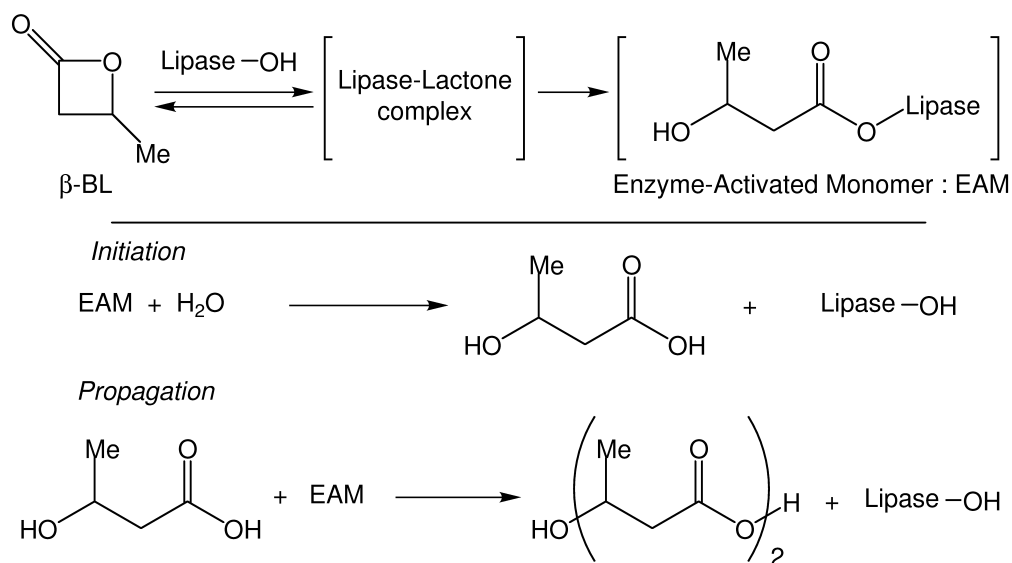
一般に重合に用いた触媒を生成した高分子から 100 %除去することは不可能であるといわれており<sup>131)</sup>、有機金属といった化学触媒により合成した生分解性高分子及び生体機能材料からの触媒の完全なる除去も困難を極める。この残存した触媒による環境汚染や医療材料に用いた際には人体への影響を無視することのできない問題点である。

生体触媒法の中でも発酵法においては 1981 年に ICI 社が水素細菌 *Ralstonia eutropha* を用い、炭素源をグルコースとプロピン酸とした条件で培養することにより 3HB と 3-hydroxyvalirate (3HV) とのランダム共重合体 poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalirate) [P(3HB-co-3HV)] を生合成することに成功し、Biopol の商標で市販化された。この発酵法に関しても研究は活発に研究され、菌体内における PHA 合成がどのようなプロセスにより進行しているのかが明らかになりつつある。Fig. 1.1 に菌体内に生産された PHA の様子を示した。

Lenz らは菌体内の PHA 合成酵素 (ポリメラーゼ) の精製に成功し、*in vitro* にて菌体内で生成される PHA の合成を報告している<sup>149)</sup>。しかしながら、菌体内ポリメラーゼを重合触媒に用いる際には基質が CoA エステルを形成していなければならない、基質合成が非常に煩雑であり、実用化は非常に難しい。したがって、菌体内ポリメラーゼは現段階においては重合反応に用いるというよりも菌体内における PHA 合成経路の確定に用いられるべきであろうと思われる。

## 1.5 Poly(hydroxyalkanoate) の酵素合成

培養条件を変化させることにより菌体の生産する PHA の組成を制御する試みも土肥らの活発な研究により行われている。しかしながら、発酵法は菌体により生産される PHA の有する分子量が飛躍的に大きいといった様々な利点を有しているものの、共重合体の種類及びその組成比といった反応の制御が困難であり、重合反応に汎用性を持たせるのであれば、化学触媒法と酵素法が優れていると考えられる。



Scheme 1.2: Proposed mechanism of lipase-catalyzed polymerization of lactones.

ここでの酵素法とは酵素を触媒とした重合法のことである。酵素は天然由来の生体触媒であるため、この酵素を重合触媒に用いた酵素触媒重合法は環境に対して低負荷な新規重合法として注目されている。また、共重合体の組成比の制御もモノマーの仕込み比を調整することで可能であることや、触媒としての至適条件が通常の化学触媒に比べ大幅に温和であることから反応系の温和化、酵素の有する立体選択能を利用した高立体選択的重合系の構築が期待されている。

生体触媒を重合触媒に用いると合成した高分子に残存した触媒も環境に対して非常に低負荷であるため、プロセス全体が環境調和型であるといえる。生体触媒である酵素を用いた重合により得られたポリマー中には重金属類が含まれないことも西田らの研究により明らかにされている<sup>131)</sup>。

酵素触媒による PHA の合成は環状エステルであるラク톤をモノマーとした条件で様々な検討がなされており、数多くの報告が提出されている<sup>129, 161, 173)</sup>。しかし、現段階

においては酵素触媒重合における反応機構が解明されておらず、詳細な検討が求められている。モノマーと酵素との相互作用に関しては Scheme 1.2 に示す重合機構が提議されており<sup>105, 160)</sup>、酵素触媒重合系内においてはポリマー鎖はこれに従って成長すると考えられている。しかしながら、酵素が生成したポリマーを基質として認識し、ポリマー鎖由来のアシル鎖を有する中間体を形成するか否かは明らかにされていない。

## 1.6 生分解性材料のリサイクル

環境低負荷型材料の創製は環境保護の見地から有用であるが、循環型社会の構築や物質循環といった見地から判断すると、土壌中の微生物に材料を分解させるのはリサイクルシステムが大きすぎるといった問題が提議される。人間の手により回収が困難な材料は自然界中において低負荷に分解させ、回収可能な材料に関しては人間が回収して原料にリサイクルすることが最も望ましいスタイルであると考えられる。

高分子材料のリサイクルには大きく分けて以下の5種類の方法がある<sup>180)</sup>。

1. 高分子状態を維持しながら熔融・溶解して再成型するマテリアルリサイクル法
2. 高分子材料を化学的もしくは生物学的方法により原材料にまで戻し、再び高分子材料を合成するケミカルリサイクル法
3. 廃高分子材料を熱・触媒などの作用により分解して燃料ガス・油などの有用物質に変換して利用するケミカルリサイクル法
4. 廃高分子材料をそのまま高炉原料化、あるいは発電用の石炭代替燃料として利用するサーマルリサイクル法
5. 洗浄して再利用するリユース法

マテリアルリサイクルとしては最近、最も主流である PET [poly(ethyleneterephthalate)] のリサイクルがこれにあたり、マスメディア等でプラスチックリサイクル問題として取り上げられている代表的なリサイクル法である。すなわち、回収した材料をペレット状等に加工し、運送性を向上させた形で保存する。使用する際には使用用途に合わせて熱成形し直してから用いる。この際に入る熱が材料にとって少なくとも2回目であることから物性面での劣化が否めない。このようにリサイクルのたびに物性が低下するリサイクルをカスケード型リサイクルという。

これに対してケミカルリサイクルとは高分子である材料を化学処理により重合性のあるモノマーもしくはオリゴマーへと変換して保存し、使用時には従来通りの重合を経て実用可能な材料へ戻すシステムである。このシステムの大きな利点はリサイクルした材料がリサイクル前の材料と全く同一のものとなることである。また、再重合の際に重合条件を変

更すれば、望む物性を発揮する分子量の材料へと導くことも可能である。さらに、モノマーもしくはオリゴマーへと変換されているため共重合体といった異なる材料への変換が非常に容易であることも利点として挙げられる。

様々な利点を有するケミカルリサイクル法であるが、エネルギー的に低くなっている高分子材料を反応性の高い重合反応前の基質であるモノマーへと変換するために、従来の方法では莫大なエネルギーを必要とする。したがって、新規で環境低負荷なケミカルリサイクルシステムの開発が望まれている。

## 1.7 本論文の研究内容

本研究ではこのような循環型社会システムの創生を念頭に、バイオポリエステルとして知られる P(R-3HB) の、モノマーユニットがラセミ体である非天然型 P(3HB) を酵素触媒重合法により合成し、また、得られたポリマーの酵素触媒によるケミカルリサイクルに関して検討を行った。以下、各章の概要をまとめた。

### 第2章

酵素触媒重合における反応機構を詳細に検討するためには、重合系内における全反応を解明する必要がある。そのためには重合系内に生成するポリマー鎖やオリゴマー鎖の構造解析が必要不可欠となる。高分子鎖の構造解析は核磁気共鳴スペクトル [nuclear magnetical resonance (NMR)] やマススペクトル (MS) の進歩とともに近年、詳細な研究結果が数多く報告されているが<sup>17, 57, 68, 69, 179</sup>、構造体が混合物のままでの詳細な解析は不可能である。当研究室の過去の検討により、 $\beta$ -butyrolactone ( $\beta$ -BL) の酵素触媒重合により得られた P(3HB) の高分子鎖は直鎖状と環状の二つの構造体の混合物であることが示されている<sup>111</sup>。したがって、詳細な構造解析を行うにあたり、それぞれの構造体の単離及び単一分子量への分別も必要となった。

そこで本章では、酵素触媒重合機構の解明を目的に重合系内に生成したポリマー鎖の構造解析を詳細に行うため、超臨界二酸化炭素を移動層としたシルカゲルカラム高速流体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることで構造体の単離を試みた。その結果、構造体及び分子量別に単離が可能であった。本研究では容易に入手できるラセミ体の  $\beta$ -BL を酵素としてはリパーゼを触媒として開環重合させることでバイオポリエステルとして知られる P(R-3HB) の、モノマーユニットがラセミ体である非天然型 P(3HB) を合成し、得られた重合混合物中に含まれるポリマー鎖の構造解析を超臨界二酸化炭素 HPLC、NMR 及び matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて行った。

また、酵素触媒重合反応中における酵素とポリマー鎖の相互作用に関する検討が本重合反応機構の解明には必要と判断された。そこで、超臨界二酸化炭素を移動層とした HPLC により単一分子量に単離したポリマーを基質として用い、溶媒中にて酵素の反応条件にさらした後に MALDI-TOF MS により分子量の分散を追跡することで酵素とポリマーの相互作用に関して検討した。

### 第3章

第3章では試験管内で、有機溶媒中における酵素触媒による非天然型 P(3HB) の分解反応を検討した。基質ポリマーとして、第2章で合成した P(3HB) と既知の合成方法でタクティシティーの異なる高分子量 P(3HB) を合成し、基質ポリマーの分子量やタクティシティーが分解反応に与える影響について検討した。

また、超臨界二酸化炭素を移動層とした HPLC により単一分子量化した環状型及び水酸基末端型オリゴマーと酵素の相互作用を検討し、酵素による環状オリゴマーの形成機構を検討した。

### 第4章

第4章では第3章で開発したポリエステルの酵素分解反応の効率化を目的として、固定化酵素を充填した酵素カラムを利用した連続分解反応について、P(3HB) のほかに poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) 及び poly(butylene adipate) (PBA) をポリマー試料に用いて検討した。

また、連続分解反応の移動相に超臨界二酸化炭素を用いる検討も行い、本連続分解反応が要する有機溶媒量の削減を図った。

### 第5章

第5章では、実験室レベルで簡便に高分子材料の生分解性を評価する方法の開発を行った。資化菌の単離及び生分解機構の詳細な解析には、都市下水処理場より採取した活性汚泥を植種源とした培養液による生分解試験が適していると考え、JIS K6950 に準拠した BOD 法を用い、試料のサンプル形状が生分解挙動に与える影響を検討した。

### 第6章

そして、第6章で本研究で明らかにしたことをまとめ、今後の展望を述べた。



## 第2章

# $\beta$ -butyrolactone の酵素触媒重合

### 2.1 緒言

本章では生分解性高分子材料の、環境に低負荷な重合方法として注目されている酵素触媒重合に関する研究結果について記す。研究の背景を以下に記す。

近年、環境に対して低負荷な化学技術の確立を目指した「グリーンケミストリー」という概念が注目を集めている。グリーンケミストリーの概念は製品のライフサイクル（原料・プロセス・製品・廃棄）全てが環境に対して低負荷でなければならないとするものである<sup>6)</sup>。製品のライフサイクルにおけるプロセスでは、生体触媒を用いた反応が注目を集めている。生体触媒を触媒に用いる試みは重合反応だけでなく、多くの有機合成反応でなされている。生体触媒を用いる利点として、生体触媒の有する位置・立体選択性、高い触媒活性、副反応がないこと並びに温和な条件を反応に適用できることが挙げられる。これらの特性はグリーンケミストリーの概念に合致したプロセスを構築する上で有効であると考えられる。生体触媒を用いる有機合成反応としては、酵素を用いる方法と微生物を用いる方法が挙げられ、反応に応じて適する手法を選択する必要がある。脂肪族ポリエステル合成においても酵素触媒重合法によるものと微生物を用いた生合成法がある。いずれの方法においても反応を直接触媒するのは酵素であるが、大きな相違点があるので以下に記す。

一般に酵素触媒反応と呼ばれる反応は単一の酵素を触媒に用いたものを指す。それに対して、微生物反応では菌体内の様々な酵素が反応に関与する可能性がある。したがって、副反応の有無を考えると酵素触媒反応の方が優れていると考えられる。しかしながら、酵素触媒反応では補酵素<sup>注1</sup>を必要とする場合があり、その際には補酵素を反応系に添加しな

---

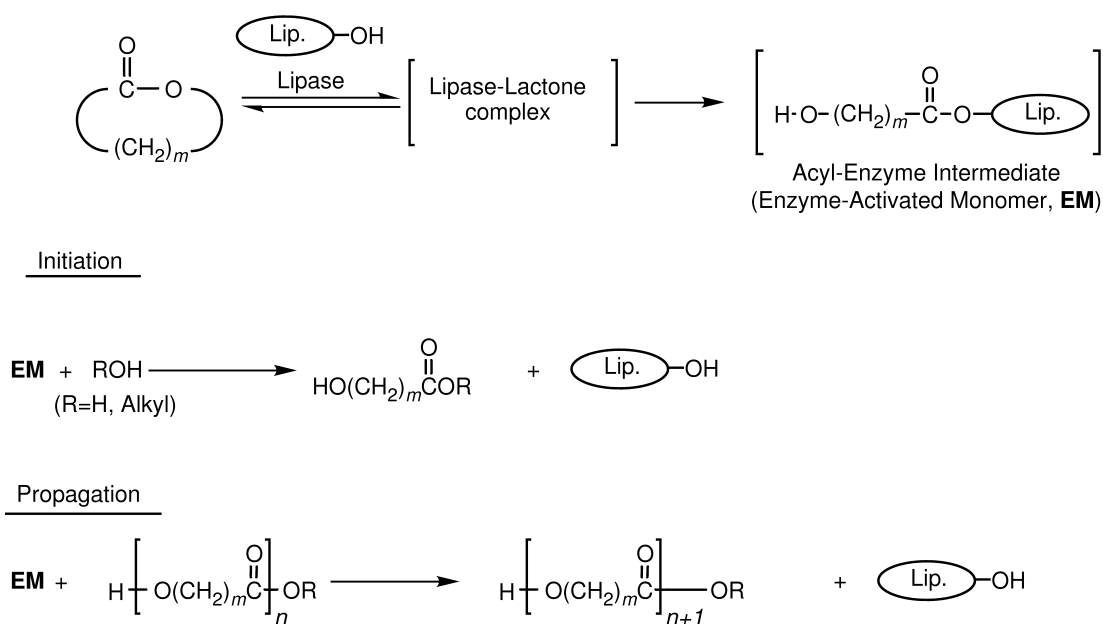
<sup>注1</sup> 補酵素: 助酵素ともいわれる。酵素のタンパク質部分 (アポ酵素) と可逆的に結合して酵素作用の発現に寄与する補欠分子族をいう。ふつうアポ酵素のみあるいは補酵素のみでは活性をもたないが両者が結合すると複合体 (ホロ酵素) を形成して酵素作用を示すようになる。

ればならない。それに対して微生物は補酵素を再生するシステム及び補酵素が結合した基質を供給するシステムを有しているために、微生物反応では補酵素を反応系に添加する必要はない。このように各々特徴を有しており、どちらが優れた反応というものではない。しかしながら、大きな相違点として合成される化合物の化学構造が挙げられる。すなわち、微生物を用いて合成した場合に得られる化合物の化学構造は天然型のみであるが、酵素触媒反応では天然型以外の化学構造を有する化合物の合成が可能となる。したがって、化合物のデザイン性では酵素触媒反応の方が優れていると考えられる。

高分子合成でも生体触媒を用いた環境低負荷なプロセスの構築が注目されている。再生可能資源を基質に用いた微生物の生合成によるポリエステル合成をはじめ、生成ポリマーのデザイン性を取り入れた酵素触媒による重合法も注目されている。また、これらの方法により合成されるポリマーは生分解性を有することも大きな利点であると考えられる。

加水分解酵素を用いた「リパーゼ触媒重合反応」はおよそ 20 年前に名づけられた。リパーゼは通常、水系環境下で脂肪酸エステルの加水分解を触媒する酵素であり、重合反応ではその逆反応を利用する。初期の研究は常温・常圧下でジカルボン酸とジオールもしくはヒドロキシ酸のエステル化が行われ、奥村らがヒドロキシ酸の酵素触媒によるオリゴマー化を初めて確認した<sup>138, 139</sup>。また、この頃にある種のリパーゼは有機溶媒中、100 °C の高温下でも数時間活性を保持していることが Klibanov らの開拓的な研究から明らかにされ<sup>74, 175, 176, 177</sup>、リパーゼ触媒重合に関する研究が本格的に世界中で行われるようになった。しかしながら、得られるポリマー分子量はまだ小さかった。

ポリエステル合成がジカルボン酸とジオールまたはジカルボン酸エステルとジオールの重縮合系である場合や、ヒドロキシ酸化合物の重縮合系である場合には副生成物として水もしくはアルコールが重合系内に生成し、高分子量ポリマーを合成するためにはこれら副生成物を除去する必要がある。この対策として、ジカルボン酸もしくはジカルボン酸エステルの代わりに酸無水物をモノマーに用いたり、ヒドロキシ酸の代わりに分子内エステル化合物であるラクトンモノマーを用いた開環重合を利用するのが一般に知られている。酵素触媒による開環重合は 1993 年に宇山・小林<sup>159, 158</sup>と Knani ら<sup>75</sup>が  $\epsilon$ -カプロラク톤をモノマーに用いて相次いで報告し、酵素触媒重合により得られるポリマーの分子量は飛躍的に向上した。この後、酵素触媒による環状モノマーの重合反応が数多く報告され、1995 年には宇山・小林らによりリパーゼが触媒する酵素触媒開環重合では酵素により活性化されたモノマー (アシル-酵素中間体: 酵素活性化モノマー) を経由して進行するという推定反応機構 (Scheme 2.1 参照) が提唱された<sup>105, 160</sup>。すなわち、鍵反応はセリン型リパーゼの活性部位にあるセリン残基がラクトン環のカルボニル炭素を求核攻撃し、ラクトン環を開環させると同時にアシル中間体を形成する過程である。開始反応は水のアシル中間体に対する求核攻撃によるヒドロキシ酸の生成であり、この水はおそらく酵素に含まれ



Scheme 2.1: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed polymerization of lactones.

ていると考えられている。このヒドロキシ酸が成長反応過程で最も小さな成長片であり、末端水酸基が開始反応の水に代わってアシル中間体を攻撃することによりポリマー鎖は成長する。様々な研究結果から、律速段階はアシル中間体形成過程とされている。

酵素触媒重合の推定反応機構が報告されて以来、反応機構に関して様々な研究結果が報告された。特に Gross らは重合系内の水分含有量に着目し、酵素触媒開環重合の開始段階はアシル中間体に対する水の求核攻撃であることを強く支持している。また、小林・宇山らと Gross らはそれぞれ酵素の有する位置選択性を利用した酵素触媒重縮合についても報告した。すなわち、ジカルボン酸とポリオールとの重縮合反応を酵素を触媒として行った場合、一級水酸基以外の水酸基がアシル酵素中間体を求核攻撃しないことを利用して、保護基の導入を行わずに直鎖状のポリマー合成に成功している。

また、酵素触媒重合を用いた光学活性ポリマーの合成も報告されている。ラセミ体の  $\alpha$ -メチル- $\beta$ -プロピオラクトンにアルコール存在下、*P. fluorescens* 由来リパーゼ PS 30 を作用させることで、(*S*) 体過剰なヒドロキシ酸エステルを一段階目で得ている。ついで、エステルを加水分解してヒドロキシ酸とし、再度リパーゼを用いて重縮合反応を行うことで (*S*) 体過剰なポリマーを得ている<sup>153)</sup>。また、ラセミ体の  $\beta$ -ブチロラクトンとアキラルなラクトンの共重合反応を *Candida antarctica* 由来リパーゼを触媒に用いて行い、ブチロラクトンユニットのエナンチオマー過剰率が 69 % の光学活性ポリマーを得ている。この場合には  $\beta$ -ブチロラクトンの単独重合と比較して、共重合反応の方がブチロラクトンユニッ

トのエナンチオマー過剰率が上昇したことになる<sup>71)</sup>。

一方、酵素触媒によるヒドロキシ酸のラクトン化に関する研究が有機合成化学の分野で行われている。ラクトン化は、酵素的縮合の中で特徴的なものの一つであると考えられる。このリパーゼ触媒によるラクトン化は有機溶媒中で分子内エステル交換反応により進行した。リパーゼによるラクトン化は $\epsilon$ -カプロラクトンをモノマーとして用い、*Candida antarctica* 由来リパーゼを触媒として用いた際にも生じていることを Córdova らが始めて確認し<sup>17)</sup>、重合生成物中に著量の環状ポリマーが生成することを報告した。しかしながら、酵素触媒重合中に大環状ラクトンが著量生成する反応機構については報告されず、詳細な検討が求められている。

そこで、本章ではこのように環境に対して低負荷でありながら、反応機構に不明瞭な領域が広い酵素触媒重合を研究テーマとして取り上げた。特に、大環状ラクトンである環状ポリマーの生成機構を明確にすることで、酵素触媒重合の反応機構を明らかにすることを目的に検討を行った。また、本研究ではラセミ体 $\beta$ -ブチロラクトン ( $\beta$ -butyrolactone:  $\beta$ -BL) の酵素触媒開環重合により、モノマーユニットがラセミ体である非天然型ポリ 3-ヒドロキシブタン酸 [poly(3-hydroxybutanoate): P(3HB)] を合成することで諸検討を行った。

## 2.2 試薬・機器・方法

### 2.2.1 試薬・酵素

本章の研究に用いた試薬類を Table 2.1 にまとめた。

Table 2.1: List of chemical reagents.

試薬名	製造会社	等級
$\beta$ -ブチロラクトン	東京化成工業 (株)	化学用
テトラメチルシラン	東京化成工業 (株)	試薬特級
トリメチルシリルジメチルアゾメタン (2.0 M ヘキサン溶液)	Aldrich Chemical Co., Inc.	
水素化カリウム	ナカライテスク (株)	
炭酸カリウム	純正化学工業 (株)	純正一級
炭酸水素ナトリウム	純正化学工業 (株)	試薬一級
炭酸ナトリウム (無水)	純正化学工業 (株)	純正一級
塩化ナトリウム	純正化学工業 (株)	試薬一級
炭酸カルシウム	純正化学工業 (株)	純正一級
セライト 545	純正化学工業 (株)	化学用
モレキュラーシーブス 4A	純正化学工業 (株)	
硫酸ナトリウム (無水)	関東化学 (株)	鹿一級
重クロロホルム	ISOTEC INC.	
四塩化炭素	純正化学工業 (株)	試薬特級
トルエン	純正化学工業 (株)	純正一級
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
エタノール	信和アルコール (株)	研究用
ジエチルエーテル	純正化学工業 (株)	業務用
塩化メチレン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
酢酸エチル	ゴードー溶剤 (株)	業務用
アセトン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
メタノール	ゴードー溶剤 (株)	業務用
ヘキサン	ゴードー溶剤 (株)	業務用

次ページへ続く

前ページからの続き

試薬名	製造会社	等級
アセトニトリル	ゴードー溶剤(株)	業務用

本文中において特に指示が無い限り、次の試薬は以下のような精製を行った後に反応に用いた。

**$\beta$ -ブチロラクトン** :  $\beta$ -ブチロラクトン 50 mL に対して水素化カルシウムを薬さじ約半分加え、一日静置して予備乾燥後、無水減圧蒸留 (35 °C / 5 mmHg) を行った。

**クロロホルム** : クロロホルム 2 L に対してモレキュラーシーブス 4A を大さじ 1 杯加え、常圧蒸留を行った。

本文中において無水化と記された以下の試薬は下記の方法により精製を行った後に反応に用いた。

**ジエチルエーテル** : ジエチルエーテル 1 L に対して水素化リチウムアルミニウムを薬さじ 2 杯加え、2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

**メタノール** : 単蒸留したメタノール 50 mL にヨウ素を 2~3 つぶ入れ、さらに金属マグネシウムを加えた後、フラスコの底からドライヤーで加熱して金属アルコキシドを合成した。これにメタノール 500 mL を加えて 2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

**1,4-ジオキサン** : 1,4-ジオキサン 100 mL に対して水素化リチウムアルミニウムを薬さじ半分加え、2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

**ヘキサン** : ヘキサン 1 L に対して金属ナトリウム 1 つぶを 4 等分したものを 4 つ加え、2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

本章の研究に用いた酵素を Table 2.2 にまとめた。

Table 2.2: List of enzymes.

Enzyme origin	Ab.	Manufactures
Lipase from <i>Candida rugosa</i>	CRL	Sigma Chemical Co.
Lipase from porcine pancreas Activity = 220 u/mg protein <sup>a)</sup>	PPL	Sigma Chemical Co.
Lipase from porcine pancreas Activity = 100,000 u/mg protein <sup>b)</sup>	Pure PPL	Sigma Chemical Co.
Novozym <sup>®</sup> 435 (Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = Approx. 10,000 PLU/g <sup>c)</sup>	CA	Novozymes Japan
Novozym <sup>®</sup> 525 (Buffer solution) (Lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = 14,100 PLU/mL <sup>c)</sup>	Novozym 525	Novozymes Japan
Lipozyme <sup>®</sup> RM IM (Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i> ) Activity = 5 - 6 BAUN/g <sup>d)</sup>	RM	Novozymes Japan
LIPASE AK "AMANO" 20 (Lipase from <i>Pseudomonas fluorence</i> ) Activity = Not less than 20,000 u/g <sup>e)</sup>	AK	Amano Enzyme Inc.
Lipase PS "AMANO" (Lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> ) Activity = 30,000 u/g <sup>e)</sup>	PS	Amano Enzyme Inc.
LIPASE M "AMANO" 10 (Lipase from <i>Mucor javanicus</i> ) Activity = Not less than 10,000 u/g <sup>e)</sup>	M	Amano Enzyme Inc.
Esterase from porcine pancreas Activity = 19 u/mg solid <sup>f)</sup>	PPE	Sigma Chemical Co.

- a) : **Unit Definition:** One unit will hydrolyze 1.0 microequivalent of fatty acid from a triglyceride in 1 hr at pH 7.7 at 37 °C, unless otherwise indicated.  
Contains approx. 25 % protein.  
54 u/mg protein using triacetin (at pH 7.4)  
220 u/mg protein using olive oil (30 min incubation)
- b) : **Unit Definition:** One unit will hydrolyze 1.0 microequivalent of fatty acid from a triglyceride in 1 hr at pH 7.7 at 37 °C, unless otherwise indicated.  
Contains approx. 70 % protein.  
20,000–100,000 u/mg protein using olive oil
- c) : **Unit Definition:** The ester synthesis activity of Novozym<sup>®</sup> 435 is expressed in propyl laurate units per gram (PLU/g).  
Novozym<sup>®</sup> 435 is immobilized on a macroporous acrylic resin.  
The product has a water content of 1-2 % w/w.
- d) : **Unit Definition:** Typical activity is 5 - 6 BAUN/g. The interesterification activity of Lipozyme<sup>®</sup> RM IM is expressed in batch acidolysis units Novo (BUN/g). Lipozyme<sup>®</sup> RM IM contains no significant side-activities. The rate of reaction is determined by measuring the amount of decanoic acid incorporated into the 1 and 3 positions of the triglycerides in high-oleic sunflower oil.
- e) : **Unit Definition:** One unit of enzyme activity is defined as the enzyme quality which liberates 1  $\mu$ mole of fatty acid per one minute.  
Assay method (JIS Method for Lipase, pH 7.0)
- f) : **Unit Definition:** One unit will hydrolyze 1.0  $\mu$ mole of ethyl butyrate to butyric acid and ethanol per min at pH 8.0 at 25 °C.  
Containing less than 5 % buffer salts.



## 2.2.2 機器

## (1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
カラム	: K-G + AC-80M + K-800D	昭和電工 (株)
検出器	: 示差屈折率計 830-RI	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: クロロホルム (1 % エタノール含有)	
測定条件	: 流速 = 1.0 mL/min.	
	: 注入量 = 100 $\mu$ L (0.1 % クロロホルム溶液)	
	: 温度 = 37 °C	

検量線用標準試料 : Special Polystyrene Standard ケムコ化学 (株)

$$\overline{M}_w = 1.00 \times 10^5 \qquad \overline{M}_w = 9.00 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 5.00 \times 10^4 \qquad \overline{M}_w = 2.20 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 1.75 \times 10^4 \qquad \overline{M}_w = 9.06 \times 10^2$$

## (2) 超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC)

ポンプ (超臨界 CO <sub>2</sub> 発生装置)	: 880-PU	日本分光 (株)
	SFCpak SIL-5	
カラム	: $\phi 4.6 \times 250$ mm (分析用)	日本分光 (株)
	$\phi 10 \times 250$ mm (分取用)	
カラムオープン	: CO-965	日本分光 (株)
検出器	: UV-975 (210 nm) (耐圧セル)	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: 超臨界 CO <sub>2</sub> ・エタノール 混合溶媒 (エタノールはグラジエント設定)	
測定条件	: サンプル毎に調製	
冷却器	: CH-201	サインクス
液化炭酸ガス	: BMM51293	東横化学 (株)

装置の概要を Fig. 2.2 に示した。

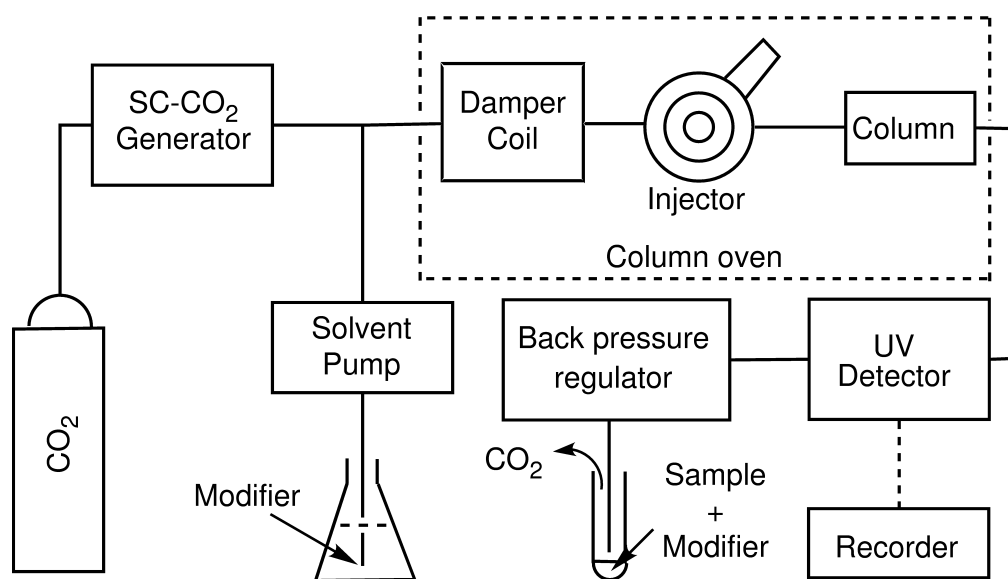


Fig. 2.2: Conceptual diagram of supercritical carbon dioxide chromatography.

FT-NMR	: JEOL GSX270	日本電子 (株)
FT-NMR	: JEOL JNM-LA300	日本電子 (株)
FT-IR	: FT-IR-5300	日本分光 (株)
MALDI-TOF MS	: proflex	Bruker Instruments Inc.
(測定用マトリックス)	: dihydroxybenzoic acid	Sigma Chemical Co.
APCI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
ESI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
遠心分離機	: H-108NA	国産遠心機 (株)
遠心分離機	: H-9R	(株) コクサン
ガラス電極式水素イオン濃度計	: HM-20E	東亜電波工業 (株)
凍結乾燥機	: FDU-830	東京理化機器 (株)
テストチューブミキサー	: TM251	岩城硝子 (株)
分光光度計	: UV-160	島津製作所 (株)

### 2.2.3 実験方法

#### (1) 酵素触媒重合

あらかじめ減圧乾燥しておいた 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に所定量の酵素をはかり取り、次いで減圧乾燥したマイクロシリンジを用いてモノマーである  $\beta$ -BL を 300  $\mu$ L (315 mg) 添加した。その後、試験管内をアルゴン置換した上で密栓し、所定温度の油浴上で所定時間攪拌することにより重合を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL に溶解させ、桐山ロートにセライト 545 を 2 g 敷き詰めて不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去して粗ポリマーを得た。

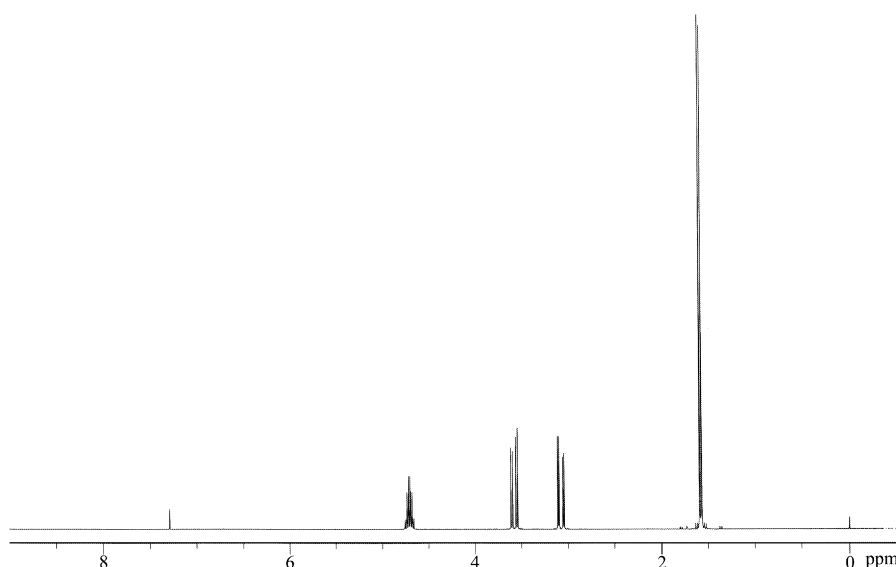


Fig. 2.3:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of  $\beta$ -BL.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.58$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 6.09$  Hz), 3.07 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 3.57 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 4.77 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H,  $J = 6.09$  Hz)

モノマーのポリマーへの転化率は  $^1\text{H-NMR}$  における 1.58 ppm [ $\beta$ -BL] と 1.22~1.33 ppm [P(3HB)] の  $\beta$ -メチル由来ピークの積分値を用いて算出した。また、重合反応の条件検討の際に求めたポリマー分子量はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により求めた。モノマーの  $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 2.3 にポリマーの  $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 2.4 に示した。

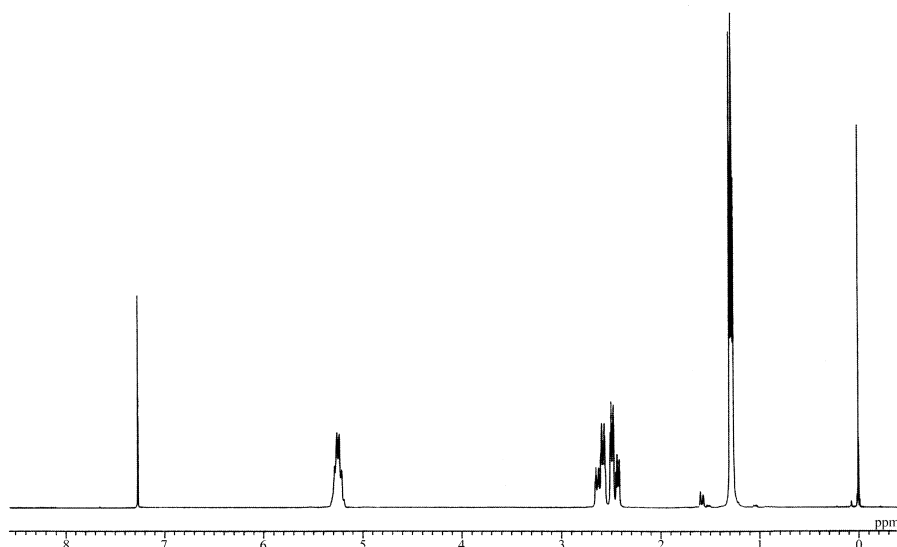


Fig. 2.4: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of P(3HB).

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz: CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.22\sim 1.33$  (—O—CHCH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—CO—O—, 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  (—O—CHCH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—CO—O—, 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  (—O—CHCH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—CO—O—, 1H, br)

## (2) 超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC) による分別

酵素触媒重合により得られたポリマーの詳細な構造解析を行うには得られたポリマーを単一な分子構造もしくは単一な分子量のフラクションに分別する必要がある。そこで本研究では、既に分子量分散を有するポリスチレンから単一分子量を有するフラクションへの分別が報告されている SFC を用いて、 $\beta$ -ブチロラクトンの酵素触媒重合により得られたポリマーを単一な分子構造もしくは単一な分子量のフラクションに分別した。SFC の装置概要は Fig. 2.2 に記した。

## (3) 酵素とオリゴマーの相互作用に関する検討

酵素触媒重合の反応機構を検討する上で、反応系内で順次生成するオリゴマーに対する酵素の基質認識能を調べる必要があった。そこで本研究では、基質として SFC を用いて分別した分子量的に均一なオリゴマーを用いた。その際、基質の得られる量が非常に少量であったことから、基質を有機溶媒を用いて希釈して酵素を作用させた。また、酵素中に含まれる無機不純物として考えられるリン酸カリウム塩を基質に対して直接作用させることにより本検討におけるブランク反応性も検討した。

以下に実験方法を記す。基質であるオリゴマーを十分に減圧乾燥し、所定の有機溶媒

に溶解させた。ついで、あらかじめ所定量の酵素と磁気攪拌子を付した 1.5 mL エッペンチューブに基質が 4 mg 入るように分注した。反応は所定温度に設定したカラムオープン中で行った。また、Novozym<sup>®</sup> 525 は緩衝溶液中に溶解状態で保存されていたので、エッペンチューブに 100  $\mu$ L 分注し、ドライアイス-アセトンを用いて凍結させた後に凍結乾燥したものを反応に用いた。反応の有無は MALDI-TOF MS を用いて確認した。

## 2.3 結果・考察

### 2.3.1 重合条件の検討

#### (1) 酵素起源の影響

酵素は基質特異性を有する触媒である。そこで、本重合系に適する酵素をスクリーニングするため、7種類のリパーゼ (CRL、PPL、CA、RM、AK、PS、M) をモノマーに作用させた。

結果を Table 2.3 にまとめた。また、各リパーゼにより得られた粗ポリマーの代表的な  $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 2.6~2.9 に示した。

Table 2.3: The enzyme screening.

Entry	Enzyme	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time (h)	$\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	CRL	10	70	24	480	4.5
2	CRL	10	70	96	550	27.5
3	CRL	5	80	24	530	4.4
4	CRL	5	80	96	1570	44.7
5	CRL	10	90	24	1370	65.0
6	CRL	10	90	96	1610	98.5
7	PPL	5	80	24	1250	25.6
8	PPL	5	80	96	2780	86.8
9	PPL	40	80	24	1140	95.4
10	PPL	40	80	72	1200	98.6
11	CA	5	60	72	—	2.1
12	CA	20	60	72	180	8.8
13	CA	10	65	96	190	6.6
14	CA	20	65	96	240	11.3
15	PS	10	85	48	890	36.5
16	PS	10	85	96	1200	62.6
17	PS	20	85	48	1060	46.7

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	Enzyme	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time (h)	$\overline{M}_n$	Conv. (%)
18	PS	20	85	96	1030	81.7
19	AK	10	60	24	260	13.1
20	AK	40	60	24	340	51.2
21	IM	10	60	24	280	11.4
22	IM	40	60	24	270	44.5
23	M	10	60	24	260	—
24	M	40	60	24	350	11.7

本検討では7種類のリパーゼを用いて行った。以下に酵素としてリパーゼを用いた理由について記述する。リパーゼは生体内において Fig. 2.5 に示したようなリン脂質やトリアシルグリセリドを加水分解し、栄養源としての脂肪酸を遊離させる役割を有している酵素である。

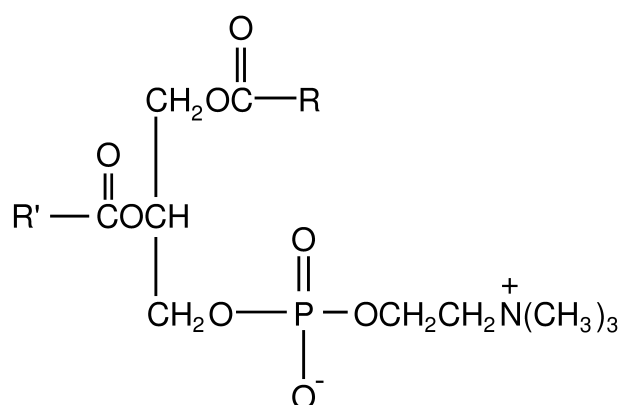


Fig. 2.5: Chemical structure of lecithin.

リパーゼが基質とするトリアシルグリセリドは疎水性が高く、水に不溶である。したがって、酵素の存在する水系環境に適応できる様に酵素そのものは親水性アミノ酸残基により覆われているものの、活性部位には疎水性アミノ酸残基が多く存在することが構造解析の結果より明らかにされている。本重合反応は酵素が触媒するエステル交換反応により進行する。エステル結合の認識能力を有する酵素は他にも多数存在するが、リパーゼのように活性部位の疎水性が高く、水分を制限した反応系で活性を維持できる酵素は他には存在しない。エステラーゼもエステル結合を加水分解する酵素であるが、ポリエステル合成

の際に求められる水を制限した反応系では活性を全く示さなかった。そこで、様々な由来のリパーゼの中から本重合反応で重合活性を示す酵素のスクリーニングを行った。

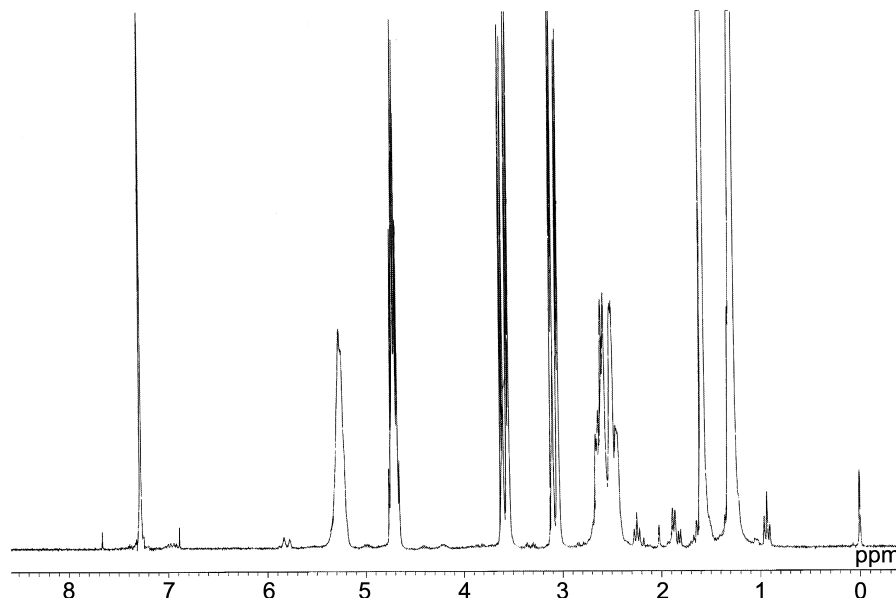


Fig. 2.6:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by CRL catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL. (Entry 4 in Table 2.3)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ): P(3HB);  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.41~2.63 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 4.2 ( $\text{HO}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.16~5.37 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 1.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 7.5$  Hz), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz), 7.0 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, m),  $\beta$ -BL;  $\delta = 1.58$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 6.09$  Hz), 3.07 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 3.57 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 4.77 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H,  $J = 6.09$  Hz)

本研究では、各酵素の有する重合活性をモノマー転化率で判断した。また、モノマー転化率において判断がつきにくい場合には得られたポリマーの数平均分子量を用いて評価した。その結果、 $\beta$ -BL を最もよく開環重合した酵素は PPL であった。ついで CRL、PS の順であり、他の酵素は、 $\beta$ -BL をほとんど基質として認識しないと判断された。

次に得られた各ポリマーの分子構造を Fig. 2.6~2.9 に示した  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを用いて解析した。その結果、酵素起源は得られるポリマーの分子構造に影響を与えないことが明らかとなった。ポリマーの分子構造解析については後に述べる。

PPL は工業的に大量入手可能な酵素であり、反応系のスケールアップや工業化を考慮に入れると PPL を反応に用いる利点は大きい。しかしながら、PPL を代表とする哺乳類





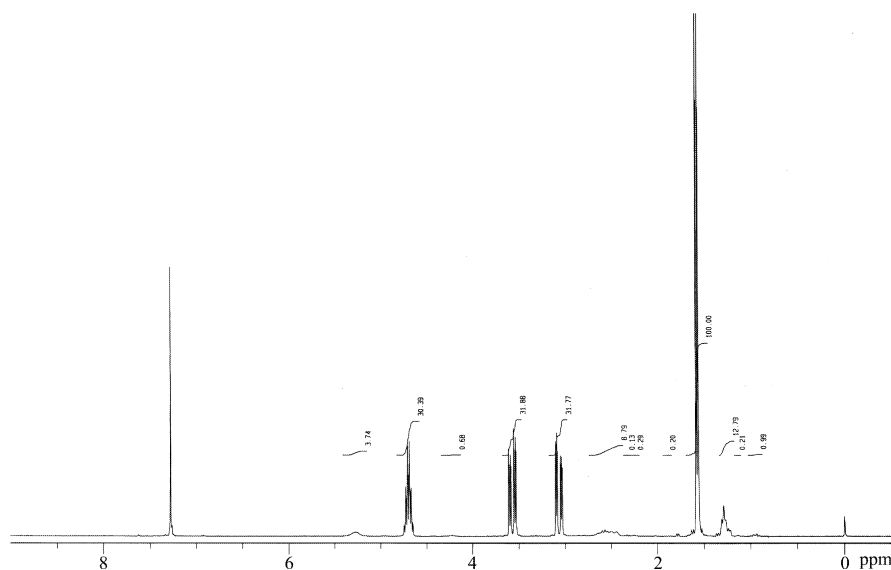


Fig. 2.8:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by Novozym<sup>®</sup> 435 catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL. (Entry 14 in Table 2.3)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ): P(3HB);  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.41~2.63 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 4.2 ( $\text{HO}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.16~5.37 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 1.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 7.5$  Hz), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz), 7.0 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, m),  $\beta$ -BL;  $\delta = 1.58$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 6.09$  Hz), 3.07 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 3.57 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 4.77 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H,  $J = 6.09$  Hz)

最も高かった CRL を主たる触媒として以後の検討を行った。

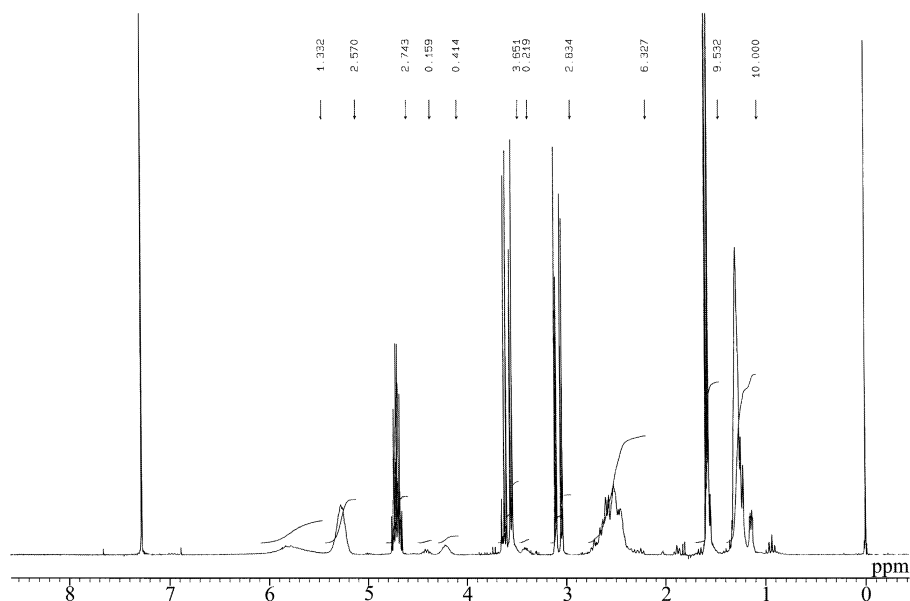


Fig. 2.9:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by Lipase AK catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta\text{-BL}$ . (Entry 20 in Table 2.3)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ): P(3HB);  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.41~2.63 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 4.2 ( $\text{HO}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.16~5.37 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 1.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 7.5$  Hz), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz), 7.0 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, m),  $\beta\text{-BL}$ ;  $\delta = 1.58$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 6.09$  Hz), 3.07 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 3.57 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 4.77 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H,  $J = 6.09$  Hz)

## (2) 重合スケールの決定

本重合系はモノマーに不溶な触媒である酵素を分散させ、攪拌をすることにより進行させた。したがって、攪拌条件を均一に揃えないと重合結果の再現性が乏しくなる。攪拌条件を均一にするためには同じ器具を用いることはもちろんのこと、重合スケールも考慮に入れる必要がある。そこで、本重合の挙動解析に先立ち、安定した重合結果を与える反応スケールを選択することから始めた。本重合系のモノマーである  $\beta$ -BL は沸点が低く、揮発性が高いために重合に用いる反応容器内一杯に気体状態として存在すると考えられた。したがって、反応容器を一定にすれば、揮発する量も一定となるはずであり、モノマー量を変化させることにより揮発により反応系から失われる量が影響を与えない反応スケールを検索することが可能であると考えた。反応スケールについての検討は他の反応条件を全て同一にした上でモノマー量（重量）のみを変化させて行った。この結果から、得られたポリマーの平均分子量とモノマー転化率といった重合結果の再現性に必要最小となる重合スケールを決定した。

結果を Table 2.4 にまとめて示した。また、それぞれのモノマー量におけるモノマー転化率と重量平均分子量の酵素濃度依存の様子を別々に Fig. 2.10、Fig. 2.11 及び Fig. 2.12 に示した。

Table 2.4: Influence of polymerization scale on reproducibility <sup>a)</sup>.

Entry	$\beta$ -BL (mg)	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	105	3	2430	1.6	36.9
2	105	4	2260	1.7	36.5
3	105	5	2720	1.7	46.4
4	105	6	2580	1.7	45.9
5	105	7	2580	1.7	43.9
6	105	8	2620	1.6	54.7
7	105	9	2850	1.7	48.5
8	105	10	2900	1.7	56.8
9	105	20	2830	1.8	62.6
10	105	30	2490	1.8	59.3
11	105	40	2590	1.9	83.3
12	105	50	2250	1.7	76.2

continues to next page

*continues from previous page*

Entry	$\beta$ -BL (mg)	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
13	210	3	1170	1.9	34.8
14	210	4	1700	2.0	43.6
15	210	5	2130	2.0	46.0
16	210	6	1990	1.9	51.6
17	210	7	2770	1.9	55.7
18	210	8	2720	1.9	59.7
19	210	9	2950	2.0	64.6
20	210	10	3250	2.1	70.5
21	315	3	1920	1.6	42.9
22	315	4	1940	1.6	51.0
23	315	5	2120	1.7	51.6
24	315	6	2240	1.6	53.4
25	315	7	2280	1.7	57.9
26	315	8	2280	1.7	57.4
27	315	9	2120	1.6	64.9
28	315	10	2580	1.6	70.5
29	315	20	2210	1.7	89.7
30	315	30	2350	1.7	98.6
31	315	40	1670	1.7	99.1
32	315	50	1680	1.6	95.3
33	525	3	2150	1.6	34.0
34	525	4	2220	1.6	35.4
35	525	5	2500	1.7	45.4
36	525	6	2540	1.6	46.1
37	525	7	2850	1.7	57.5
38	525	8	2840	1.9	58.9
39	525	9	3040	1.9	62.2
40	525	10	2970	1.7	64.0
41	525	20	3070	1.7	82.5
42	525	30	2870	1.7	93.4

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	$\beta$ -BL (mg)	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
43	525	40	2510	1.7	94.0
44	525	50	2330	1.7	97.3

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst at 80 °C for 96 h.

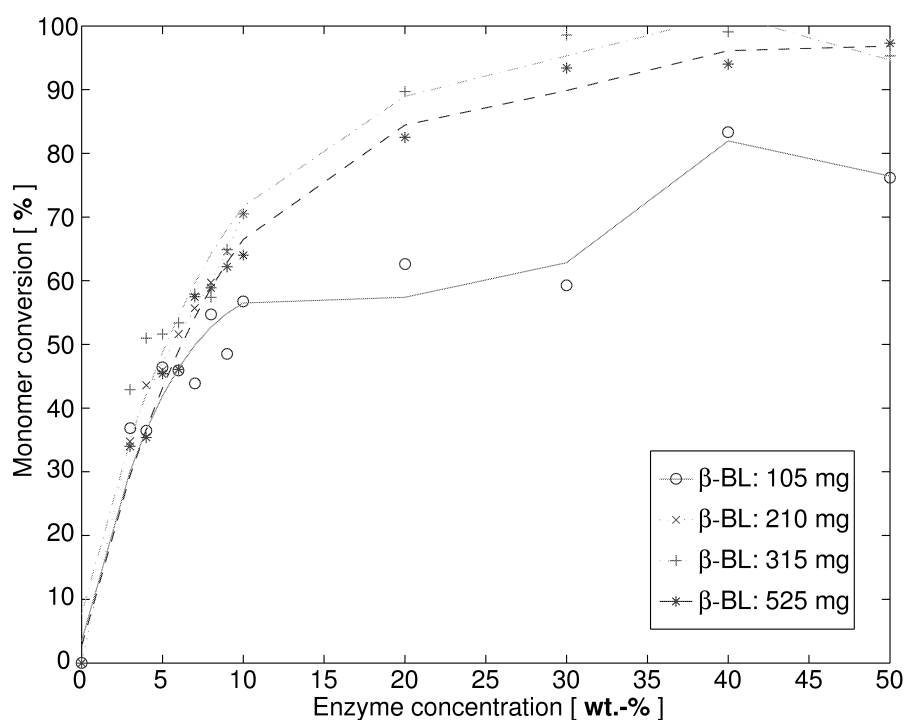


Fig. 2.10: Effects of the polymerization scale on the relationship between monomer conversion and enzyme concentration: (1) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst in 5 mL vial as a reactor at 80 °C for 96 h with stirring.

Fig. 2.10 から、モノマー量が少ない系（特に 105 mg 使用時）ではプロットのばらつきが大きくなる傾向が見られ、重合結果の再現性が低かった。このことは既に述べたモノマーの揮発性が大きく関与しているものと考えられる。それ以外の要因として、はかり取った酵素量のばらつきが考えられる。方法項にも記した通り、本研究において酵素量は反応系のモノマーに対して重量分率を用いてはかり取っている。したがって、モノマー量

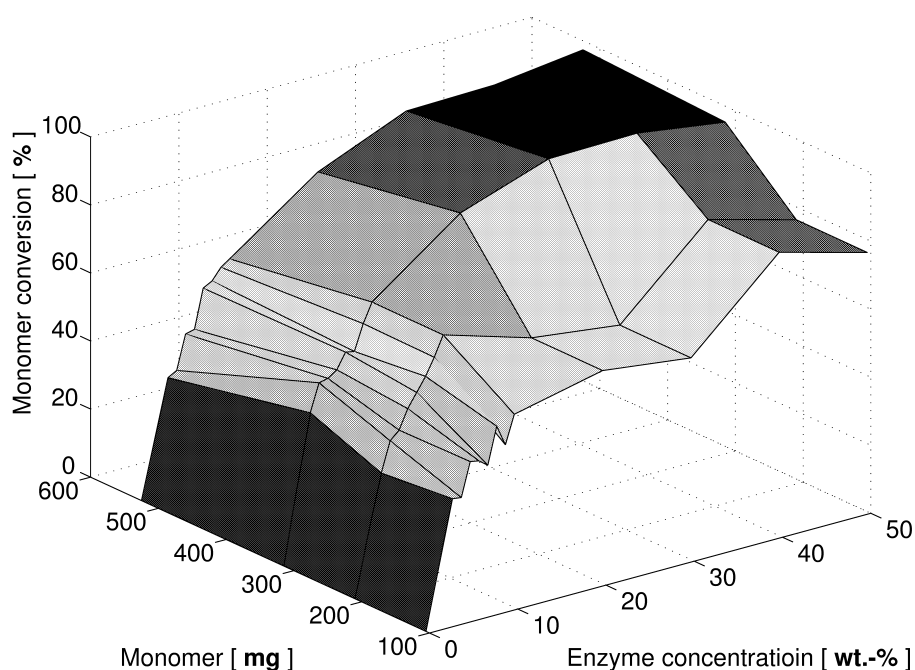


Fig. 2.11: Effects of the polymerization scale on the relationship between monomer conversion and enzyme concentration: (2) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst in 5 mL vial as a reactor at 80 °C for 96 h with stirring.

が少ない系では重量分率の違いによる酵素量の変化幅が非常に小さくなってしまう。より詳細な考察を行うため、このグラフを3次元で表示したものを作成し、Fig. 2.11に記した。

Fig. 2.11から、用いるモノマー量を増加させた際に安定したモノマー転化率と酵素濃度の相関(モノマー量 210 mg の際の高酵素濃度領域データはモノマー量 105 mg のデータを代用)が得られることが明らかになった。用いるモノマー量が小さい時(重合スケールが小さい時)に、特に低酵素濃度域でモノマー転化率が酵素濃度上昇に対して不安定に上下した理由に関して以下に考察する。前述したとおりに、重合スケールが小さすぎる時には酵素をはかり取る際の誤差が重合系に大きく伝播したものと考えられる。105 mg のモノマーを仕込んだ場合は数値上で酵素濃度を 1 wt.-%多く用いても、実際に用いた酵素重量にして 1 mg 程度の違いしかないために得られる値が分散したと考えられる。また、この分散傾向を強くしたのはモノマーの高い揮発性によると考えられる。今回の検討範囲において安定したモノマー転化率と酵素濃度の相関が得られたのはモノマーを多く仕込んだ場合であり、モノマーを 525 mg (500  $\mu$ L) 用いた場合には酵素濃度の上昇に伴ってモノマー転化率が非常に安定して上昇した。すなわち、数値上での酵素濃度の違いが実際に使用した酵素重量に十分な違いを与え、なおかつ、揮発するモノマーの量が反応系に影響を

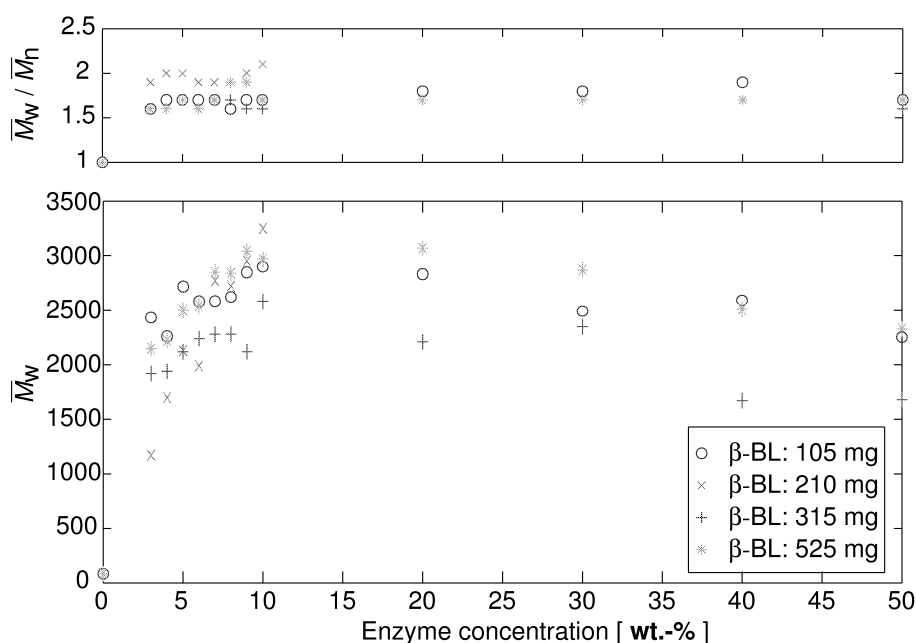


Fig. 2.12: Effects of the polymerization scale on the relationship between weight-averaged molecular weight and enzyme concentration: (1) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst in 5 mL vial as a reactor at 80 °C for 96 h with stirring.

与えない重合スケールの大きさが必要であることが示された。しかしながら、基礎研究を行う上ではなるべく小さな反応系で、なおかつ安定したデータを得ることが望ましい。そのような観点から本相関関係の結果を検討すると、モノマーを 315 mg (300  $\mu$ L) 用いた場合が最適な重合スケールであると考えられた。

同様の検討を、得られるポリマー分子量及び分子量分散のデータについても行った。Fig. 2.12 より、重合スケールは得られるポリマー分子量及び分子量分散と酵素濃度の相関関係に対してさほど影響を与えていないことが明らかとなった。しかしながら、3次元グラフでこの結果を示すと Fig. 2.13 のようになり、モノマーを少量用いた際には低酵素濃度域で酵素濃度の上昇に伴うポリマー分子量の反応は不安定であった。

以上の結果より、本重合反応では 315 mg(300  $\mu$ L) のモノマーを用いた重合スケールが重合反応解析に用いるモノマー転化率、ポリマー分子量及び分子量分散において再現性のあるデータを与える最小スケールであると判断した。

今回、最適モノマー量を決定する際に用いた、モノマー転化率の酵素濃度依存性及びポリマー分子量の酵素濃度依存性に関してはここでは考察せず、**(3) 酵素濃度の影響**の考察項に詳細は記した。なお、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル解析の結果、重合反応のスケールが反応系に与える影響はデータの安定性のみであり、得られるポリマーの分子構造には影響を与え



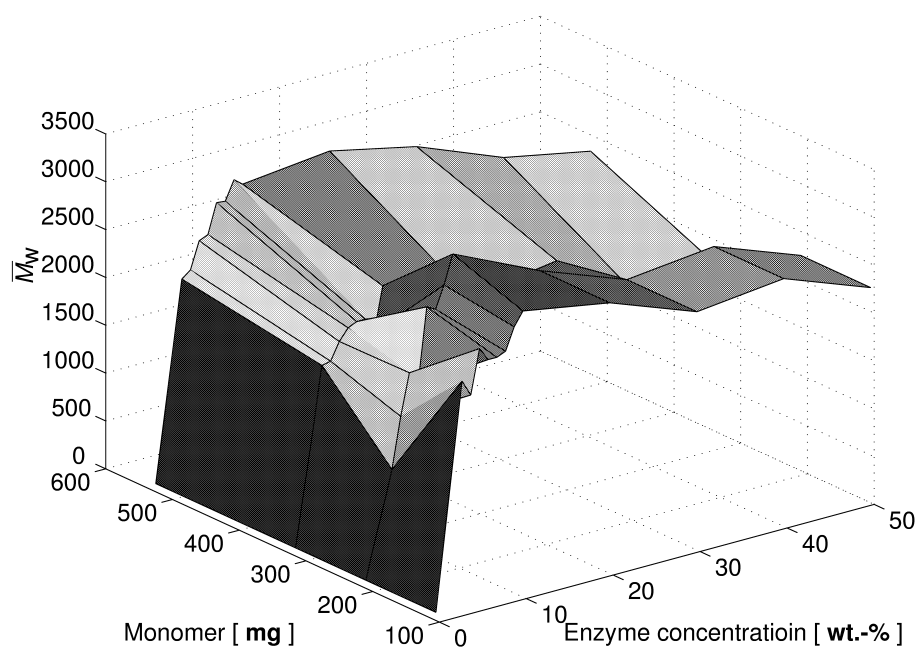


Fig. 2.13: Effects of the polymerization scale on the relationship between weight-averaged molecular weight and enzyme concentration: (2) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst in 5 mL vial as a reactor at 80 °C for 96 h with stirring.

ないことが明らかになった。

### (3) 酵素濃度の影響

化学合成において最適触媒濃度の決定は非常に重要な課題である。これは、触媒が主反応の活性エネルギーを低下させるだけでなく、副反応の活性化エネルギーをも低下させる可能性があるためである。したがって、速い反応速度のために過剰の触媒を反応系に添加すると望まない結果を与える場合がある。しかも、高分子合成反応では触媒濃度が活性点の数を制御している場合が多い。活性点の数はポリマー鎖数に相当するため、モノマー量が一定であった場合にポリマー鎖数は得られるポリマーの平均分子量を決定する要素である。つまり、活性点の上昇は転化率上昇をもたらし、得られるポリマー分子量を低下させる。推定反応機構 (Scheme 2.1) に示したように、酵素触媒重合反応では重合系内の微量な水分が重合開始剤の役割を担っている。したがって、アシル酵素中間体を求核攻撃する水が生成するポリマー鎖数と密接に関連していると考えられ、水分量の上昇はモノマー転化率を上昇させるが、得られるポリマーの分子量を低下させると考えられる。重合系内の水分は酵素由来であるため、重合系内における酵素濃度の上昇は重合系内の水分を上昇させる。

また、酵素濃度は反応速度にも影響を与えられとされる。したがって、酵素濃度は得られるポリマーの分子量と反応速度に同時に影響を与えるため、重合反応条件の最適化には欠かせない要素となる。さらに、酵素はタンパク質であるために触媒活性と高次構造に密接な関係がある。酵素の高次構造崩壊は触媒活性の失活を意味し、長すぎる重合時間や高すぎる重合温度といった高次構造の崩壊を促す条件のもとでは失活しやすいと考えられる。そこで、本検討では、重合時間一定の条件で得られるポリマーの平均分子量とモノマー転化率に対する酵素濃度の影響を検討した。結果を Table 2.5 にまとめた。また、異なる重合温度で重合系の酵素濃度に対する挙動が変化することが示されたので、温度別のグラフを Fig. 2.14 から Fig. 2.16 に記した。

Table 2.5: Effects of the enzyme concentration on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	10	70	490	4.3	4.5
2	20	70	470	4.6	7.4
3	30	70	420	3.4	13.9
4	40	70	430	3.1	20.3

continues to next page

continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
5	10	85	780	2.3	22.9
6	20	85	1060	2.1	58.5
7	30	85	1080	2.0	72.6
8	40	85	1030	2.0	85.2
9	10	90	1370		65.0
10	20	90	1390		89.2
11	30	90	1250		91.5
12	40	90	1120		95.9

a) Bulk polymerization of  $\beta$ -BL(315 mg) using CRL at 70, 85 or 90 °C for 24 h.

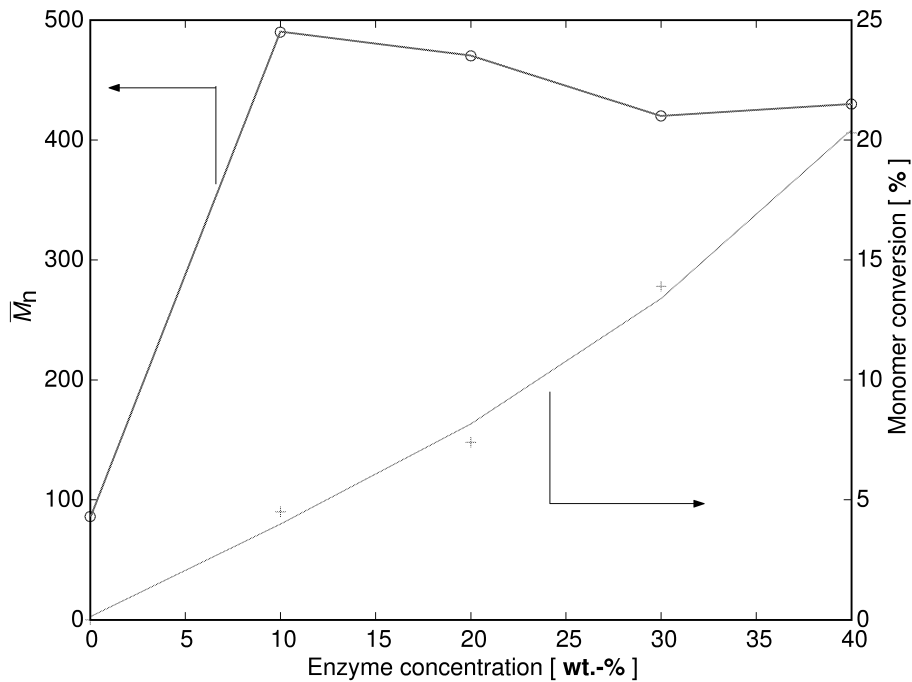


Fig. 2.14: Effects of the enzyme concentration on the polymerization of  $\beta$ -BL. (70 °C) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst at 70 °C for 24 h.

Fig. 2.14 から Fig. 2.16 より、モノマー転化率は重合温度に拠らず、酵素濃度の増加に伴って上昇することが確認された。これは、単純に重合系内の触媒量増加に伴う反応速度

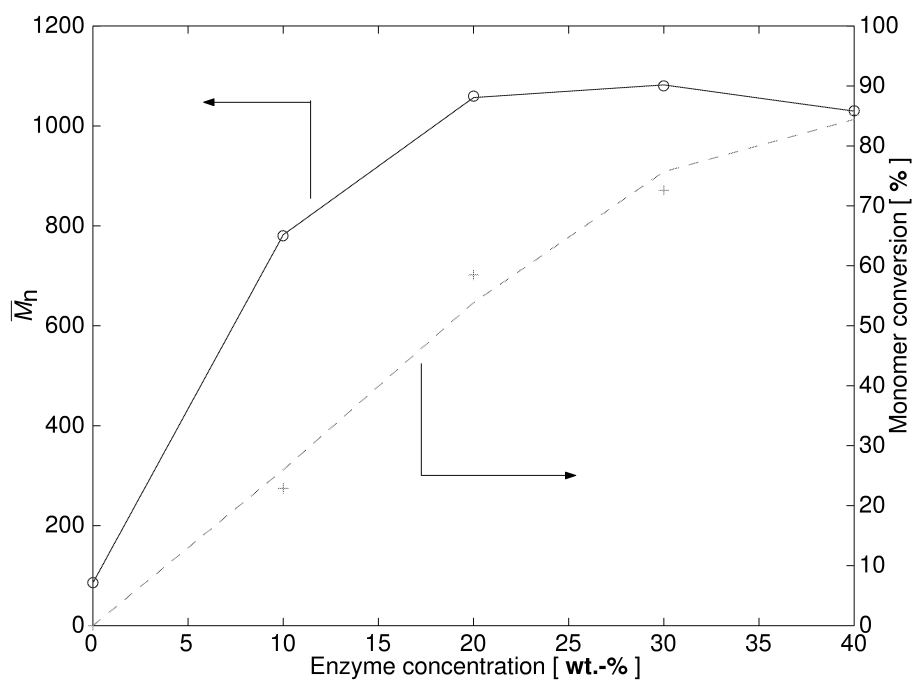


Fig. 2.15: Effects of the enzyme concentration on the polymerization of  $\beta$ -BL. (85 °C) <sup>b)</sup>  
<sup>b)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst at 85 °C for 24 h.

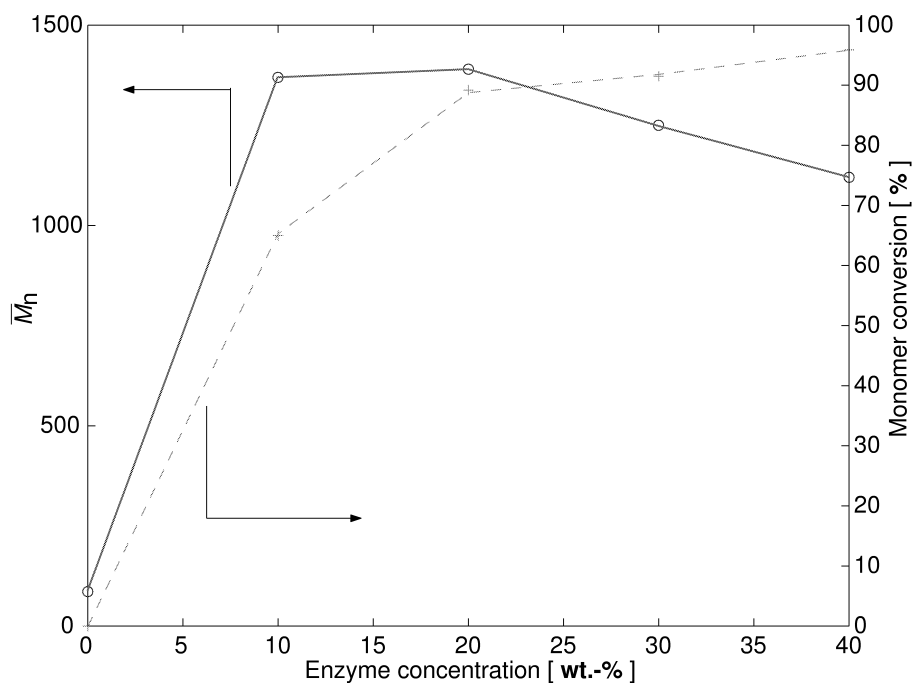


Fig. 2.16: Effects of the enzyme concentration on the polymerization of  $\beta$ -BL. (90 °C) <sup>c)</sup>  
<sup>c)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst at 90 °C for 24 h.

上昇を意味している。この結果は、酵素触媒開環重合に関する報告において例外無く確認されていることである。重合反応では反応速度と同時に、得られるポリマー分子量の上昇を示す重合速度を考慮しなければならない。それは、高い反応速度がポリマー分子量を与えるとは限らないからである。Fig. 2.14 から Fig. 2.16 より、得られたポリマーの分子量は重合系内の酵素濃度の影響を強く受けていたことが確認された。すなわち、重合時間と重合温度が一定であった場合、ポリマー分子量は酵素濃度の上昇に伴い増加するが、ある酵素濃度以上では減少に転じる挙動が確認された。Fig. 2.14 では、最も高い酵素濃度でポリマー分子量が僅かに上昇しているが、この原因はモノマー転化率が極端に低く反応混合物中のポリマー濃度が非常に低かったために分子量測定において精度が低下したと考えられる。したがって、この結果は考察の対象から除外した。

本検討で確認されたこのような重合挙動は、他のモノマーを用いた酵素触媒開環重合でも同様に確認されている。これは酵素触媒重合においては触媒濃度が活性点の数を制御しているためである。すなわち、酵素濃度が最適点を越えて系内に存在すると、モノマーが多くのポリマー鎖によって消費され、一本のポリマー鎖に連結されるモノマーユニットの数が減少する。したがって、高酵素濃度領域で得られたポリマー分子量は最適酵素濃度領域で得られたそれに比べて減少したと考えられる。

本検討の結果、モノマー転化率と得られたポリマー分子量は重合系の酵素濃度の影響を強く受けることが明らかになった。また、酵素濃度の上昇とともに増加するモノマー転化率と異なり、ポリマー分子量は酵素濃度の上昇に伴い増加した後にある酵素濃度以上で減少に転じることが明らかになった。

また、重合挙動の酵素濃度依存性を 3 種の重合温度により検討した結果、重合挙動が重合温度依存性を有することも同時に明らかになった。重合挙動の重合温度依存性については、(4) 重合温度の影響の考察項に詳細を記した。

## (4) 重合温度の影響

酵素触媒反応において、反応温度は非常に重要な要素である。なぜならば、酵素活性の保持において酵素の有する高次構造は非常に重要であり、高い反応温度がその高次構造に悪影響を与える可能性が高いからである。しかしながら、反応温度は反応系のエネルギーであるため、反応速度を上昇させるためには反応温度を上げる必要がある。

酵素は生体の温度で最適な活性を有している触媒であり、水系の反応の場合には 37~40 °C 前後で最も高い活性を有している。このような温和な条件下において活性を有する触媒を反応系に組み込むことが環境調和型反応プロセスの構築に効果的と判断されている。しかしながら、本重合系が水を制限した系であり、基質であるモノマーの構造がリパーゼの本来の基質であるトリアシルグリセリドと大きく異なることから、最適重合温度が生体内の温度であるとは限らない。実際、先の検討からも最適な重合温度が 37~40 °C ではないことが示されている。現在までの酵素触媒重合に関する報告では、得られるポリマーの分子量は低重合温度で上昇しておらず、どの報告でも約 60~80 °C の範囲で重合温度の検討を行っている。

ここでは重合温度が得られるポリマーの分子量とモノマー転化率に対して与える影響について、水の沸点を超えない 90 °C を最も高い重合温度として検討した。また、これまでの酵素の高次構造に関する報告を踏まえて重合温度と酵素活性について考察を行った。結果を Table 2.6 及び Fig. 2.17 に記した。

Table 2.6: Effects of temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	40	70	430	3.1	20.3
2	40	80	970	1.9	40.7
3	40	85	1030	2.0	85.2
4	40	90	1120	2.1	95.9
5	10	70	480		4.5
6	10	85	780		22.9
7	10	90	1370		95.9

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as catalyst for 24 h.

Fig. 2.17 より、モノマー転化率とポリマーの分子量は重合温度の上昇と共に増加する

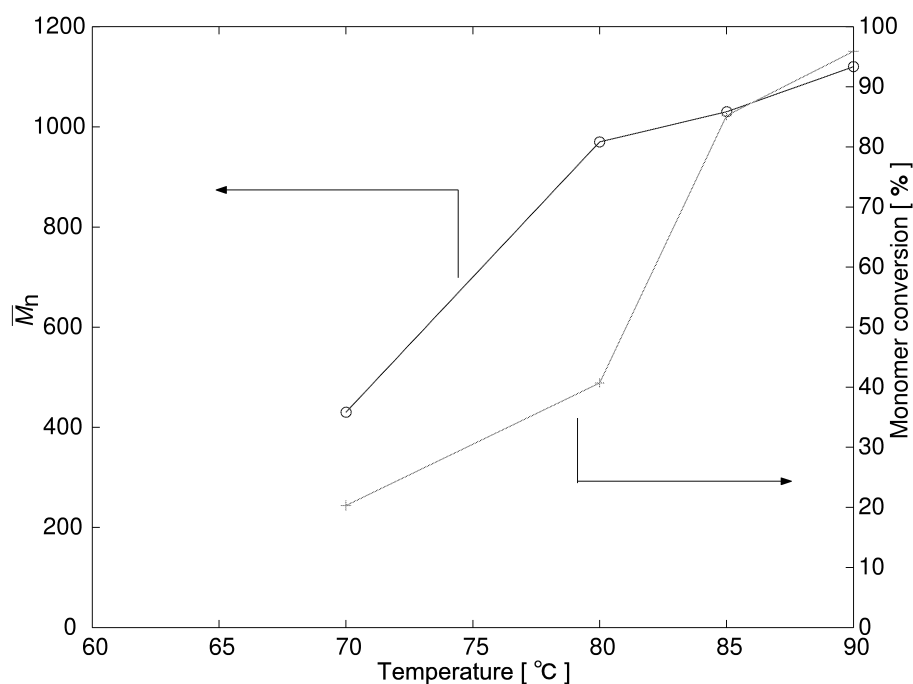


Fig. 2.17: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 40 wt.-% CRL as catalyst at for 24 h.

ことが明らかとなった。重合温度の増加によりモノマー転化率が上昇したのは反応系により多くのエネルギーが加えられたためである。本研究ではモノマー転化率をラクトン環の開環率から求めており、本研究でモノマーとして用いている  $\beta$ -BL は環歪の大きな 4 員環ラクトンであることから、モノマー転化率が全て酵素の作用と判断することは出来ない。そこで、得られたポリマーの分子量における反応温度依存性を次いで検討した。

本検討から、ポリマー分子量は重合温度の上昇に伴い増加することが明らかとなった。また、前項の検討でも重合温度が最適酵素濃度に影響を与えている結果が得られている。そこで、得られるポリマーの分子量に対する重合温度の影響は前項 ((3) 酵素濃度の影響) の結果と合わせて考察する。

酵素活性に関しては得られるポリマー分子量とモノマー転化率を合わせて考える必要がある。まず、2.17 の結果を中心に考えると、ポリマー分子量を増加させるためには重合温度を上昇させなければならないという結果が得られた。そこで、酵素触媒重合にこのような高温が必要である理由について考察する。

酵素が本来の活性を発現する温度領域は酵素起源に依存する。好熱菌由来を除くと一般に生体内の温度域 (37~40 °C) に最適温度を有し、本検討により得られた重合活性を示す

温度領域 (60~90 °C) と大きく異なる。重合活性を有する温度領域がこの様に本来の最適温度領域と異なった理由としては、反応場があまりにも異なることと本来の基質であるトリアシルグリセリドとモノマーである  $\beta$ -BL の構造の違いが挙げられると考えられる。しかし、最適温度が上昇したことは上記の説明からは理解できない。なぜなら、酵素の最適温度で基質として与えた化合物が認識されずに活性が発現されないのであれば、化学構造的に適していなかったという上記の説明で済むが、反応温度を増加させることにより活性が上昇する理由にならないからである。

(3) **酵素濃度の影響**の Fig. 2.15 と 2.16 を比較すると、重合温度の増加が最適酵素濃度を低下させたことが明らかである。したがって、温度増加に伴って重合反応が進行した理由として「重合活性を示したと確認された温度領域では酵素は熱失活し、酵素が触媒していない副反応により重合が進行した」とは考えられない。すなわち、重合系は酵素濃度の影響を高い重合温度においても大きく受けており、重合温度の増加に伴う最適酵素濃度の低下は高い重合温度において酵素の重合活性上昇を意味し、本検討に用いた重合温度領域において酵素は失活していないと判断できる。そこで、重合反応に高温が必要になった理由を既に報告されている酵素本来の作用機構から考察する。

本酵素触媒重合はリパーゼを触媒として用いている。リパーゼ本来の活性は、水に不溶で疎水性の高い基質であるトリアシルグリセリドの加水分解であり、活性部位周辺は高い疎水性を有するアミノ酸残基より構成されている。リパーゼ本来の活性発現について近年詳細に解析されており、ヒト由来の膵臓リパーゼに関してはネイティブ状態の X 線解析による高次構造解析と、阻害剤と結合した状態での X 線解析による高次構造解析が既に完了している<sup>165)</sup>。また、本研究で用いている CRL についても、立体選択性及び光学活性エステル識別機構が詳細に研究され、報告されている<sup>134, 141)</sup>。ここでは現在までに構造解析及び作用機構解析が完了し、報告されているリパーゼ本来の活性発現機構を説明し、それらを踏まえて本検討の結果について考察する。

リパーゼは他の酵素と異なり、水系反応系に溶解しない疎水性基質に対して触媒活性を示す特異的な酵素と分類出来る。他の酵素では基質濃度の上昇に対して一次的な反応率の上昇が確認されるが、リパーゼを用いた反応系は異なる挙動を示す。すなわち、基質濃度が低く基質が反応系に溶解する濃度範囲ではほとんど活性を示さず、基質濃度が上昇して水溶液中に基質が疎水性の界面<sup>注2</sup>形成を開始する領域から反応率が急激に上昇する。この挙動はリパーゼが疎水性界面の認識能を有することを示している。この疎水性界面認識能の発現機構はリパーゼの活性部位の位置に関係していることが高次構造解析から明らか

注2 疎水性の界面: 油などの疎水性が高い化合物は水に溶解しにくいいため、一定濃度以上では油滴を形成する。ここで疎水性の界面とは形成された基質の油滴と反応系である水との界面を指す。



になった。他の酵素は活性部位を本体の窪みに有している場合が多い。しかしながら、リパーゼは活性部位を本体の窪みに有するが、活性部位のある窪みの反応系側に存在するリッドと呼ばれる蓋が活性を発現しない際に閉じて活性部位と反応系を遮断している。このリッドは油滴のように非常に大きな疎水場が存在する時に開き、基質が油滴として存在している疎水場と活性部位を直結させる役割を担っている。このため、リパーゼの活性は基質濃度が油滴形成濃度に達するまで低く、油滴形成濃度に基質濃度が達した途端に急激に活性が上昇するのである。このリッドが存在する理由は、上記の役割の他に水が活性部位に入り込んで活性部位の疎水性を低下させるのを防ぐためとされている。

このリッドが重合反応に与える影響について著者は以下のように考察した。重合反応系は疎水場であるが油滴による疎水性界面は形成されていないので、リパーゼのリッドの開閉に関して決定することは出来ない。そこで、37~40℃のモノマー中では酵素のリッドが閉じたままだと仮定し、重合反応に高温が必要となった理由を「高い重合温度はリパーゼのリッドを開くために必要なエネルギーを与えていた」と推定した。この仮説は、温度により酵素の高次構造が受ける影響に関する記述により説明できると考えた。そこで、以下に酵素の高次構造保持機構について述べる。酵素の高次構造保持についてはタンパク質の折りたたみ(フォールディング)機構研究により詳細な検討が行われている。フォールディング機構研究では、タンパク質工学の見地からタンパク質の一次配列がいかにして機能発現を有する高次構造にフォールディングされるかが研究されている。ここでは、フォールディング機構研究において明らかになりつつある、フォールディング・ファネル(フォールディング過程におけるエネルギー鳥瞰図<sup>183)</sup>)を用いる。

フォールディング機構の解析の結果、Fig. 2.18に示した4つのフォールディング・ファネルが考えられた。(a)の形が原点であり、順次改良が加えられて最終的に(d)の形になった。したがって、現在ではこれら(a)~(d)のうち、ネイティブ構造に辿りつく上でいくつかの経路を持ちながらフォールディングが一つに収束していく(d)の形が支持されている。この図では $x-y$ 軸がタンパク質の構造を表し、 $z$ 軸がエネルギー状態を表している。また、この図ではネイティブ状態においてエネルギー状態が最も低くなると解釈している。リパーゼのネイティブ状態におけるリッドの開閉に関しては全く明らかになっていない。そこで、リッドの閉じた状態をネイティブ状態と仮定すると、リッドの開いた状態はネイティブではなく、一段階エネルギー的に高い状態である。

この構造に関する仮説を重合挙動に当てはめると、モノマーに酵素を添加した段階ではリパーゼはリッドを閉じたネイティブ状態である。そして、反応系が水系でなく基質が油滴を形成していないため、基質の油滴による疎水性界面の存在により容易に開くリッドが開かず重合活性を発現しなかったと考えることができる。さらに、高い重合温度は高次構造をネイティブ状態から一段階エネルギー状態が高いリッドの開いた高次構造に移行させ

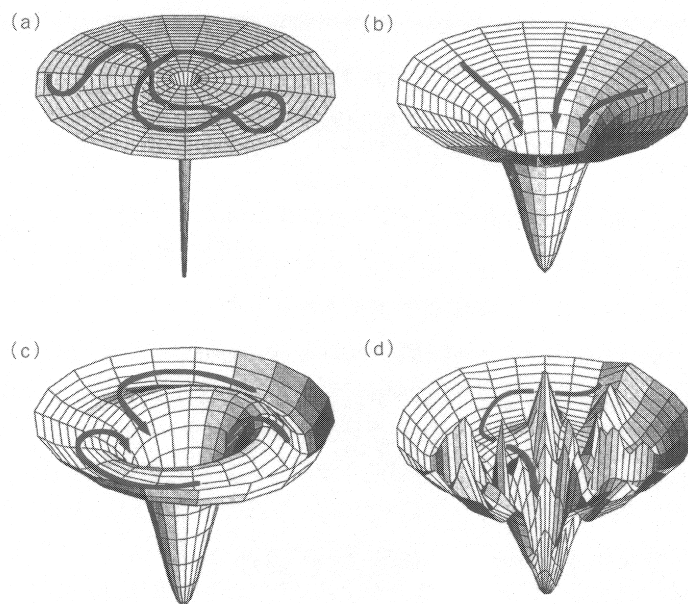


Fig. 2.18: Modeling of energy state during the folding of protein.

るために必要なエネルギーであると仮定できる。以上の仮説は、高い重合温度で酵素活性が発現された理由と  $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  で重合活性をまったく示さなかった理由を同時に説明することが出来る。

一方、重合ではなく、リパーゼ触媒による低分子化合物のエステル交換反応などは  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  で十分に進行する。さらに、本研究で重合触媒として用いた PPL はメタノールを含むジエチルエーテル中、 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  で *S* 体  $\beta$ -BL に対する優先的なメチルエステル化を触媒し、ラセミ体  $\beta$ -BL の光学分割に用いられた酵素でもある<sup>170)</sup>。これらの結果は  $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  において疎水性界面が存在しなくてもリパーゼのリッドが開くことを示しており、リッドの開閉に疎水性界面の存在及び温度以外の要素が関わっていると考えられる。したがって、この構造に関する仮説は本重合系における一つの可能性として位置づけた。また、タンパク質のフォールディング機構は明らかでない点が多く、このフォールディング機構を用いた考察はあくまで推定である。今後、酵素のフォールディング機構が解明され、リパーゼのリッド開閉機構についても明らかになることを期待しながら本項の考察を締めくくる。

## (5) 重合時間の影響

一般に、主生成物に対する副反応を含む反応では、長すぎる反応時間は望む生成物の生成量を減少させる可能性がある。本検討のような重合反応によるポリエステル合成では、そのような副反応として熱分解反応及び加水分解反応があげられる。したがって、副反応が主反応よりも進行すると得られるポリマーの分子量が低下する。

現在までに提唱されている酵素触媒重合の反応機構は重合系内に生成したポリマーの分解反応を含まない。しかしながら、酵素触媒重合に関する多数の報告が重合反応と分解反応が系内で同時に進行していることを示している。これは系内の重合反応終了後に分解反応のみが進行することを意味する。そこで、重合時間が本重合系に与える影響について検討した。

今までの検討から、重合速度は酵素濃度及び重合温度の影響を著しく受けることが明らかであるので、本検討では一定重合温度、一定酵素濃度の条件で重合時間が重合反応に対して与える影響を検証した。CRLを触媒として用いた結果を Table 2.7 にまとめ、酵素濃度、重合温度別のグラフを Fig. 2.19 から Fig. 2.22 に示した。また、PPLを触媒として用いた結果は Table 2.8 にまとめ、酵素濃度別のグラフを Fig. 2.23 及び Fig. 2.24 に示した。

Table 2.7: Effects of the polymerization time on the polymerization of  $\beta$ -BL.  
(Enzyme: CRL) <sup>a)</sup>

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	10	85	12	510	3.8	9.0
2	10	85	24	780	2.3	22.9
3	10	85	48	1340	1.9	65.0
4	10	85	72	1680	1.9	88.8
5	40	85	12	720	2.2	53.2
6	40	85	24	1030	2.0	85.2
7	40	85	48	1110	2.0	97.3
8	40	85	72	1060	2.1	96.9
9	10	90	6	550	3.4	9.6
10	10	90	12	880	1.9	35.9
11	10	90	18	1200	2.0	54.7
12	10	90	24	1370	2.0	65.0

continues to next page

continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
13	10	90	38	1660	1.9	85.8
14	10	90	48	1540	2.0	92.3
15	10	90	72	1580	1.9	95.7
16	10	90	96	1610	2.1	98.5
17	40	90	6	770	2.4	52.6
18	40	90	12	1080	2.1	90.6
19	40	90	18	1080	2.0	93.2
20	40	90	24	1120	2.1	95.9
21	40	90	38	1160	2.0	95.6
22	40	90	48	1090	2.0	97.6
23	40	90	72	1120	2.0	98.1
24	40	90	96	1090	2.1	99.0

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL (315 mg) using 10 or 40 wt.-% CRL at 85 or 90 °C.

Table 2.8: Effects of the polymerization time on the polymerization of  $\beta$ -BL.  
(Enzyme: PPL) <sup>b)</sup>

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Temp. (°C)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	5	80	12.5	700	1.8	12.7
2	5	80	18	830	2.1	18.7
3	5	80	24	1250	1.8	25.6
4	5	80	48	2290	1.6	55.9
5	5	80	72	2690	1.7	80.3
6	5	80	96	2780	1.7	86.8
7	5	80	120	2860	1.8	91.1
8	40	80	1	240	—	7.7
9	40	80	2	310	—	12.1
10	40	80	3	390	—	21.2

continues to next page

continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Temp. (°C)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
11	40	80	4	500	1.6	32.1
12	40	80	6	630	2.0	45.6
13	40	80	8	820	1.8	60.8
14	40	80	10	960	1.8	75.5
15	40	80	12	1080	1.9	85.2
16	40	80	14	1020	2.0	88.5
17	40	80	16	1070	2.0	91.3
18	40	80	18	1120	2.8	94.1
19	40	80	20	1190	2.0	94.6
20	40	80	22	1110	2.2	94.8
21	40	80	24	1140	2.0	95.4
22	40	80	48	1140	2.0	98.5
23	40	80	72	1200	1.9	98.6

<sup>b)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 5 or 40 wt.-% PPL at 80 °C.

はじめに、CRLを触媒として用いた反応に対する考察を記す。モノマー転化率は反応温度及び酵素濃度によらず重合時間に伴って上昇した。重合速度が遅い場合 (Fig. 2.19 参照) は得られるポリマーの分子量が重合時間に伴って増加する傾向が確認された。しかしながら、重合速度が比較的速い場合 (Fig. 2.20, 2.21 及び 2.22 参照) では得られるポリマーの分子量は重合時間に伴って増加した後、プラトーに達するか低下傾向に転じた。以上の結果から、Fig. 2.19 では重合時間の増加に伴う分子量増加のプラトー化もしくは低下が確認されなかったが、重合時間をさらに延長すれば他の条件と同様に分子量増加がプラトー化もしくは低下すると考えられる。したがって、これらの結果より重合温度及び酵素濃度に依存せず、得られるポリマーの分子量は重合時間に伴って増加した後にプラトーに達し、次いで低下傾向に転じることが示された。

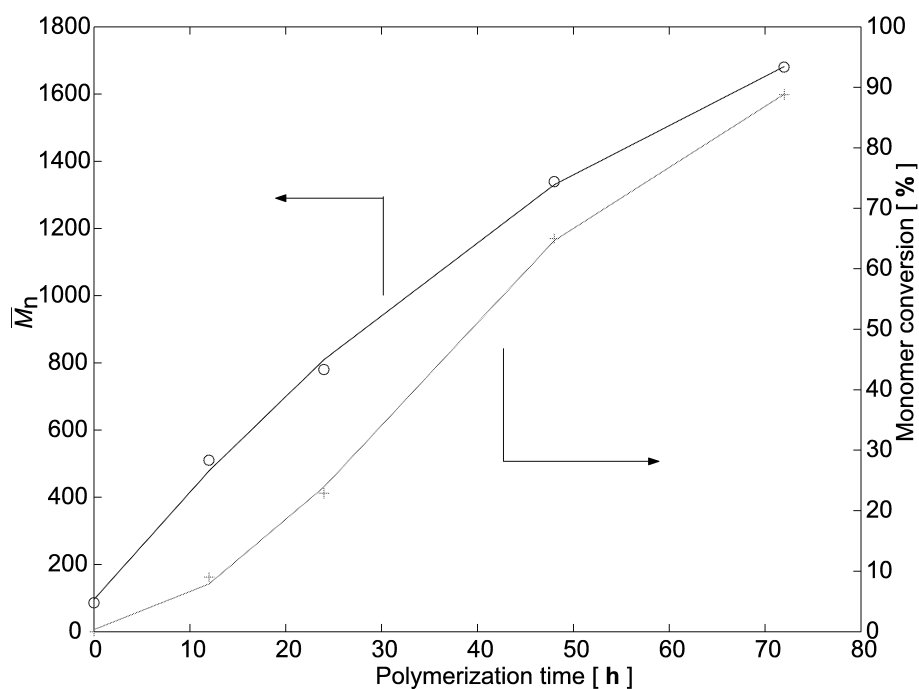


Fig. 2.19: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.  
 a) Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 10 wt.-% CRL as catalyst at 85 °C.

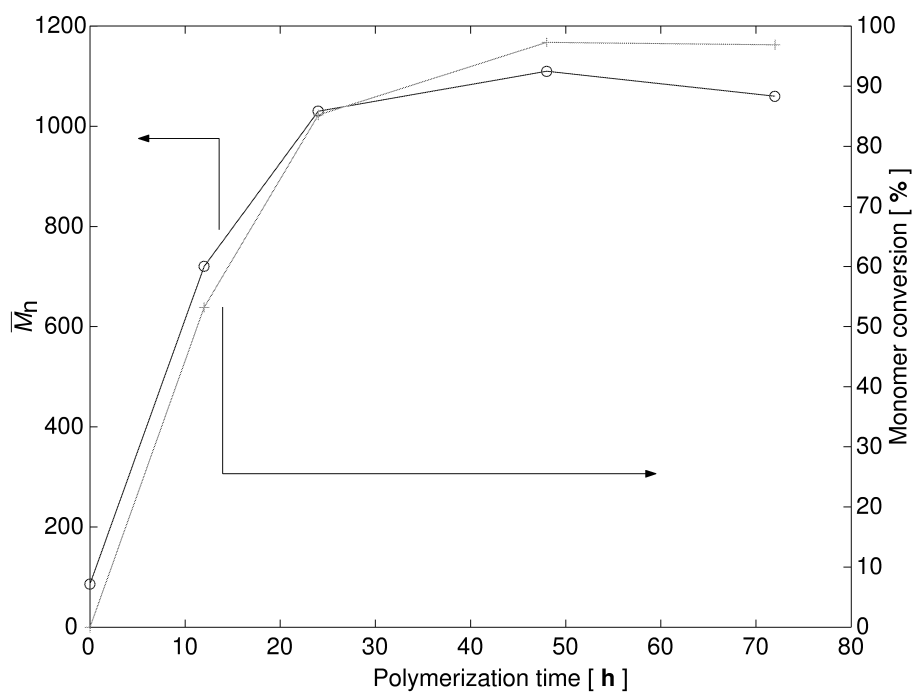


Fig. 2.20: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>b)</sup>.  
 b) Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 40 wt.-% CRL as catalyst at 85 °C.

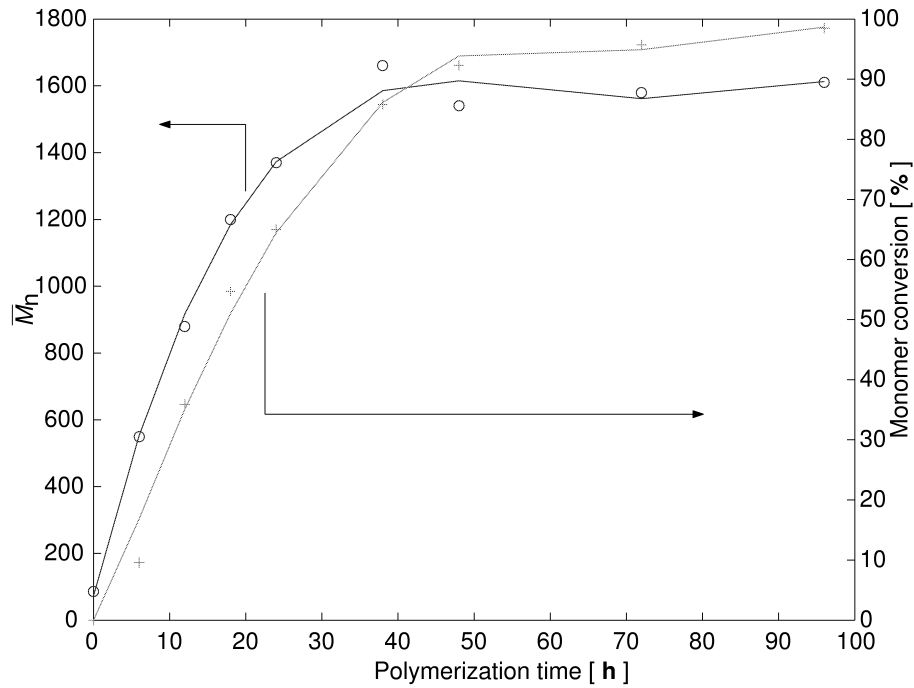


Fig. 2.21: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>c)</sup>.  
<sup>c)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 10 wt.-% CRL as catalyst at 90 °C.

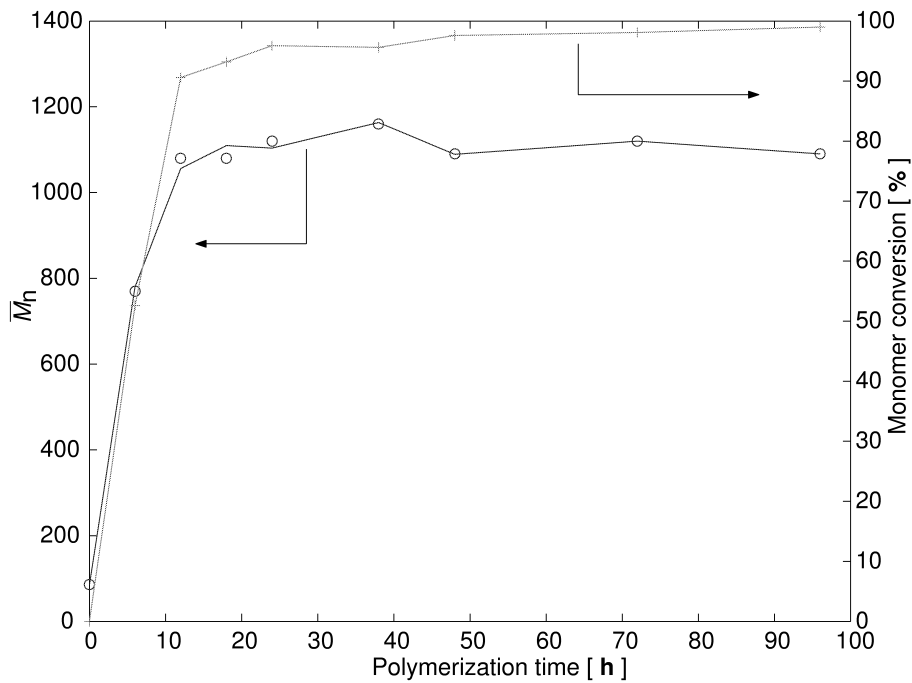


Fig. 2.22: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>d)</sup>.  
<sup>d)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 40 wt.-% CRL as catalyst at 90 °C.

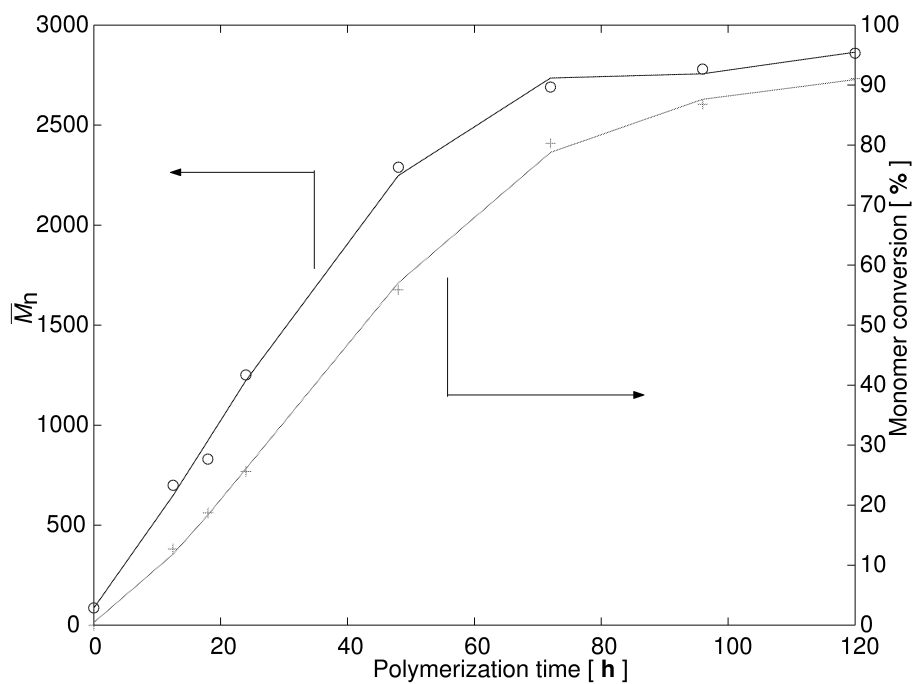


Fig. 2.23: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>e)</sup>.

<sup>e)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 5 wt.-% PPL as catalyst at 80 °C.

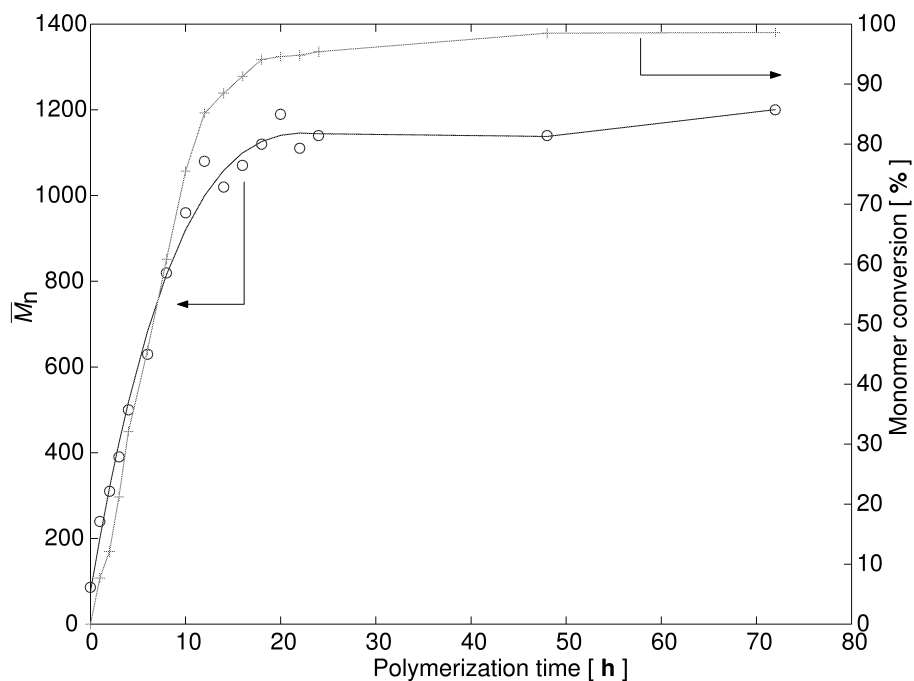


Fig. 2.24: Effects of the polymerization temperature on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>f)</sup>.

<sup>f)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 40 wt.-% PPL as catalyst at 80 °C.



重合時間に伴って得られるポリマーの分子量が減少する傾向は、重合系内に副反応である生成ポリマーの分解反応が存在することを示している。したがって、ポリマー鎖の成長反応度とポリマー鎖の分解反応が同レベルである時には、分子量増加においてプラトーと観測され、ポリマー鎖の成長反応終了後は分解反応のみが重合系内において進行し、重合系全体として分子量の低下が観測されたと考えられる。また、重合温度がポリエステル一般的な天井温度<sup>注3</sup>である 180 °C 付近より遥かに低いことから、この分解反応は触媒として用いた酵素による生成ポリマーの加水分解であると第一に考えられる。そこで、重合反応系の水について詳しく考察する。

酵素触媒重合は開始反応とされるモノマーの加水分解反応が酵素に由来する水分を利用して行われているため、完全な無水条件下では酵素触媒重合は進行しない。本研究の様に酵素触媒重合が確認されるのは酵素中に含まれる水分に関しては無水化を施していない場合に限られる。したがって、生成ポリマーの加水分解反応でも酵素に含まれる水分が利用される可能性は高い。しかし、分解反応が顕著に確認されるのは重合終期の段階であり、重合初期段階における開始反応が終了し、重合系内の水分量によりポリマー鎖数が決定された後である。したがって、酵素がポリマーを認識したとしても加水分解に利用する水分が限りなく少ない可能性が高い。加えて、成長反応終了後に酵素によるポリマー鎖の加水分解反応のみが進行した場合、重合終期の段階に観測される分子量低下はかなり大きくなると考えられる。以上の考察から、加水分解以外の反応も存在すると判断し、重合系内において生じ得る反応について以下に考察した。

触媒である酵素がモノマーのみならずポリマーをも基質として認識して、アシル酵素中間体を形成したと仮定すると、加水分解反応以外に酵素が触媒する反応としてエステル交換反応が挙げられる。酵素触媒によるエステル交換反応は重合系内に存在するポリマー鎖の末端水酸基が求核剤としてアシル酵素中間体を攻撃した場合に生じる。一方、提唱されている反応機構 (Scheme 2.1) では、モノマー由来のアシル鎖を有するアシル酵素中間体のみが重合系内に存在し、このアシル酵素中間体に対して重合系内のポリマー末端水酸基が求核攻撃を行った場合に成長反応が生じるとしている。そこで、酵素がポリマーをも基質として認識して、アシル酵素中間体を形成した場合に生じるエステル交換反応について詳細な考察を行った。

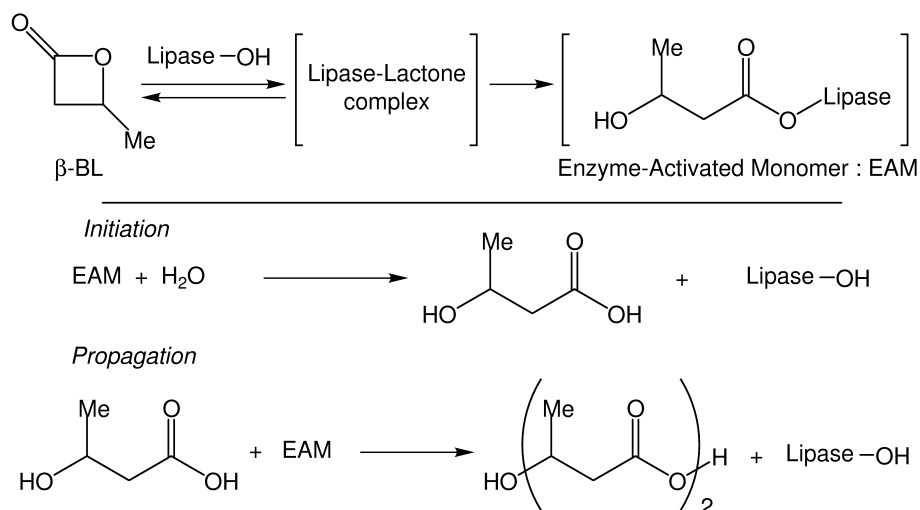
ここに異なる分子量を有する二つのポリマー鎖 (A), (B) があり、これらのポリマー鎖間で酵素を触媒としたエステル交換反応が生じたと仮定する。酵素に基質として認識された

<sup>注3</sup> **天井温度**: 可逆的な付加重合反応で標準自由エネルギー変化が 0 となる温度。  $T = \Delta H / \Delta S$  で与えられる。 $\Delta H$ 、 $\Delta S$  はそれぞれ標準エンタルピー変化、標準エントロピー変化である。この温度以上では重合体よりも単量体の方が熱力学的に安定となるため、重合体は解重合をおこし、単量体に分解される。

ポリマー鎖 (A) はアシル酵素中間体形成時に、酵素と結合を組み直したエステル結合よりカルボキシル基末端側が切断され、フリーのポリマー鎖断片 (C) を系内に放出する。この段階で反応系にはアシル酵素中間体とポリマー鎖断片 (C) 及びポリマー鎖 (B) が存在している。ここで、切断されたポリマー鎖断片 (C) がアシル酵素中間体に対して求核攻撃すると反応開始前の状態に戻り、反応系の分子量は変化しない。それに対して、ポリマー鎖 (B) がアシル酵素中間体に対して求核攻撃するとポリマー鎖 (B) は伸長したことになり、ポリマー鎖 (B) の分子量が増加する。一方、ポリマー鎖 (A) は結果的にポリマー鎖断片 (C) となっており、分子量は低下している。このように、エステル交換反応では反応系全体のポリマー鎖を構成しているモノマーユニットの数とポリマー鎖数が反応開始前後で変化していないので、反応系内の数平均分子量は変化しない。

以上の考察から、本重合系内には酵素触媒によるポリマー成長反応の他に、ポリマー鎖由来のアシル鎖を有するアシル酵素中間体を経由した加水分解反応とエステル交換反応が存在すると考えられる。また、得られるポリマー分子量は成長反応と分解反応のみによって決定されるが、ポリマー鎖由来のアシル鎖を有するアシル酵素中間体が系内に生成しても、平均分子量を保持するエステル交換反応が緩衝作用を示したために、ポリマー分子量低下が緩やかであったと考えられる。いずれにしても、本検討の結果、重合系内にポリマー鎖由来のアシル鎖を有するアシル酵素中間体の生成が示され、提唱されている反応機構 (Scheme 2.1) に含まれていない反応が存在すると考えられた。

## 2.3.2 酵素触媒重合の重合挙動解析

Scheme 2.25: Proposed mechanism of the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL.

Scheme 2.25 に酵素触媒重合の現在までに推定されている反応機構 (Scheme 2.1) を本重合系に当てはめることで示した。この反応機構では酵素により活性化されたモノマーに重合系内のオリゴマーが求核攻撃することによりポリマー鎖が成長する。このような逐次的なポリマー鎖成長反応の場合、モノマー転化率と得られるポリマー分子量の間に一次相関が成立することがリビング重合<sup>注4</sup>の研究により広く知られている。すなわち、ポリマー鎖数が重合初期段階で決定された以降はモノマーがポリマー鎖の成長のみに消費されるため、モノマー転化率の上昇に伴って得られるポリマー分子量は一次的に増加する。

したがって、モノマー転化率とポリマー分子量の相関関係を検討することにより、本重合反応が Scheme 2.25 に示した反応機構のみで進行したか否かを判断することが可能である。また、モノマー転化率とポリマー分子量の相関関係は重合系の酵素濃度の影響を強く受けると考えられる。すなわち、酵素濃度増加に伴って重合系内のポリマー鎖数も増加するため、得られる相関関係の傾きが小さくなると考えられる。

そこで、本項では本重合系における副反応の有無を確認するため、ポリマー分子量とモノマー転化率の相関性を検討した。本重合系の基本的な重合挙動の解析で得られた知見をもとに、幅広いモノマー転化率でのデータが得られるように重合条件を設定した。また、重合反応に用いた酵素濃度がポリマー分子量とモノマー転化率の相関に与える影響につい

<sup>注4</sup> リビング重合: 重合反応中に停止反応や連鎖移動反応がおこらず、単量体が反応しつくしたあとも連鎖成長末端が活性を保持している重合

でも検討を行うため、3種の異なる酵素濃度を設定して解析した。結果を Table 2.9 及び Fig. 2.26 にまとめた。

Table 2.9: The relationship between monomer conversion and number-average molecular weight on the polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
1	5	12	–	–	1.64
2	5	24	530	1.8	4.4
3	5	36	600	2.0	8.2
4	5	48	880	2.0	14.0
5	5	60	950	2.0	22.4
6	5	72	1300	1.9	29.7
7	5	84	1450	1.9	36.5
8	5	96	1570	1.9	44.7
9	5	108	1650	1.9	50.7
10	5	120	1620	1.9	55.9
11	5	132	1890	1.9	61.8
12	5	144	1710	2.0	69.2
13	5	156	1930	1.9	67.2
14	5	168	1960	1.9	75.6
15	5	180	1960	2.0	79.7
16	20	12	260	1.5	6.72
17	20	24	760	2.0	17.6
18	20	36	1120	2.0	33.5
19	20	48	1530	2.0	51.5
20	20	60	1820	2.1	61.8
21	20	72	1940	1.9	70.8
22	20	96	1860	2.0	88.5
23	20	120	1840	1.9	89.2
24	40	2	–	–	0.794
25	40	4	–	–	2.04
26	40	5	300	1.6	2.32

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Time(h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Conv. (%)
27	40	6	270	1.6	2.45
28	40	7	250	1.7	4.56
29	40	12	480	1.7	11.9
30	40	18	730	1.9	26.1
31	40	24	970	1.9	40.7
32	40	30	1180	2.0	53.3
33	40	36	1410	2.2	72.3
34	40	42	1450	2.0	79.7
35	40	48	1650	1.8	76.7
36	40	54	1660	2.0	84.3
37	40	72	1740	2.0	91.5
38	40	96	1880	2.3	96.3
39	40	120	1870	2.2	96.6

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL at 80 °C.

Fig. 2.26 中の破線は各酵素濃度における近似一次直線を示している。Fig. 2.26 より、CRL 濃度が 40 wt.-% の場合にはモノマー転化率-ポリマー分子量間にある程度の一次関係が存在し、CRL 濃度が 5 及び 20 wt.-% の場合には一次関係が存在しないことが明らかになった。

Scheme 2.25 に示された推定反応機構から活性点の数は酵素濃度に依存すると考えられ、活性点数の減少に伴ってモノマー転化率-ポリマー分子量間の一次相関直線の傾きは大きくなると推測される。しかしながら、Fig. 2.26 で各酵素濃度における近似直線を比較検討すると、傾きは酵素濃度の影響をさほど受けず、近似直線の  $y$  軸切片が酵素濃度の影響を強く受けた。Fig. 2.26 における  $y$  軸切片はモノマー転化率が 0 % の時の分子量を表すため、原理的に  $y$  軸切片は酵素濃度の影響を受けないはずである。

Fig. 2.26 における近似直線の  $y$  軸切片がモノマー分子量より著しく大きな値を示した理由は、重合の進行に伴うプロットの傾きの低下だと考えられた。そこで各酵素濃度のプロット群に二つの近似直線を当てはめたものを実線で記した。すると、各プロット群は一本よりも二本の近似直線を用いて作製した近似線に沿っていることが明らかになった。

二本の近似直線を用いてプロットを解析すると、モノマー転化率で 20~30 % までの間は

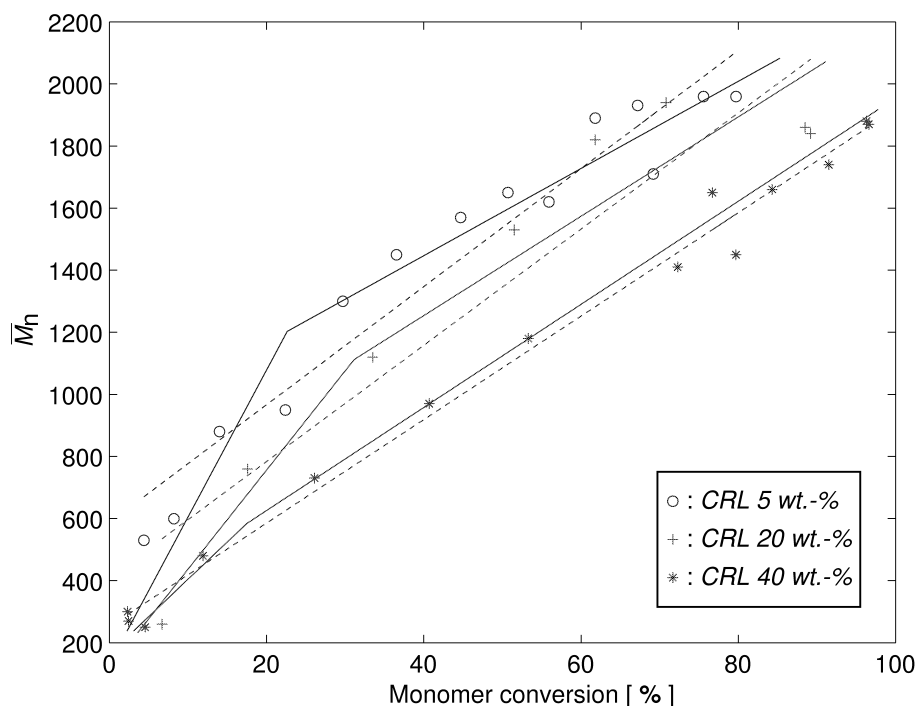


Fig. 2.26: Relationship between monomer conversion and number-average molecular weight on polymerization of  $\beta$ -BL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using CRL as the catalyst at 80 °C.

各酵素濃度でも、同じモノマー転化率で与えられるポリマー分子量が酵素濃度の影響を強く受けていることが明らかとなった。すなわち、酵素濃度が低いほど系内のポリマー鎖数が制限され、モノマーが効率的にポリマー鎖の成長に利用されたと考えられる。モノマー転化率がさらに上昇すると、特に CRL を 5 wt.-% 用いた場合にはプロット群の近似直線の傾きが変化して小さくなったことが明らかになった。このことから、Scheme 2.25 に示された以外の反応が重合系内に存在していることが示された。さらに、Scheme 2.25 に示されずに重合系内に存在する反応はモノマー転化率が低い段階ではあまり進行していないと考えられた。

### 2.3.3 酵素触媒重合により得られるポリマーの構造解析

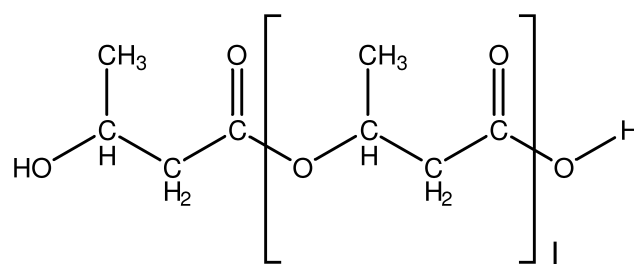
#### (1) 構造解析の概要

Scheme 2.25 に記した推定反応機構には生成ポリマーの分解反応が含まれていないが、本研究における検討及び様々な報告より、酵素を触媒とした重合反応においても分解反応等の副反応が同時に進行していることが明らかになった。そこで、本項では $\beta$ -ブチロラクトン ( $\beta$ -BL) の酵素触媒重合の反応機構解明を目的に、得られたポリマー構造の詳細な解析を行った。

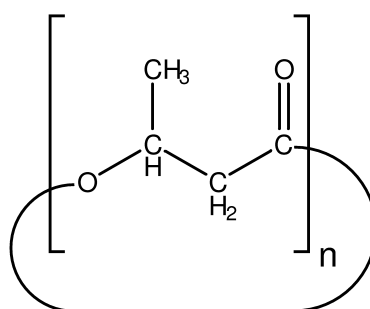
化合物が分子量分散を有するために、高分子化合物の構造解析は一般に困難である。 $^1\text{H-NMR}$  の積分値と質量分析計を用いる構造解析手法を用いるためには高分子材料の分子量を均一にする必要がある。

本研究では酵素触媒重合により得られたポリマーの構造解析に超臨界流体 HPLC を導入し、構造別もしくは分子量別に単離することを試みた。その単離に先立ち、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られたポリマー構造を推定した。

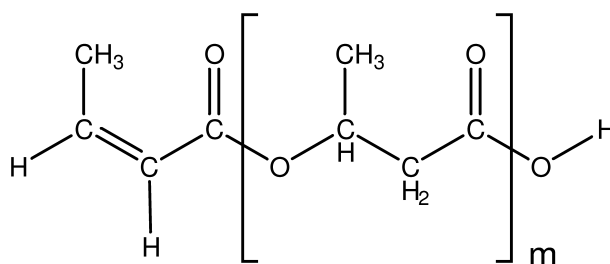
$\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られるポリマーの構造解析は既に検討され、得られたポリマー中には水酸基末端型と環状型 (Fig. 2.27 中、それぞれ a) Hydroxy-type と b) Cyclic-type に相当) が存在すると報告されている<sup>111)</sup>。しかしながら、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの  $\delta = 1.85, 5.80, 6.95$  ppm 付近に現れるピーク (Fig. 2.28 参照) が報告されている二つの推定構造体には帰属できなかった。そこで、これらのピークはポリマー主鎖中の末端水酸基が $\beta$ 脱離して生じる不飽和結合部位に結合しているプロトン並びにメチル基由来であると仮定した。この構造をクロトネート型 (Fig. 2.27 中、c) Crotonate-type に相当) とした。環状型は末端を有さないために末端モノマーユニット由来のピークは現れず、環状型に由来するスペクトルはポリマー主鎖中の繰り返しユニット由来のスペクトルと同一であると考えた。また、水酸基末端型の確認は報告に従い、末端水酸基の結合するメチン基由来のピークを用いて検討を進めた。MALDI-TOF MS を用いた質量分析より、 $18\text{ m/z}$  の間隔を有する一組のスペクトルがモノマーユニットの分子量である  $86.09\text{ m/z}$  間隔で規則正しく現れることが確認された。 $18\text{ m/z}$  を水分子と考えると、 $18\text{ m/z}$  小さなスペクトルは  $18\text{ m/z}$  大きなスペクトルに帰属されるポリマー構造の脱水型であると考えられる。この結果から、得られたポリマー構造として水酸基末端型と環状型が推定された。しかしながら、ポリマー主鎖中の末端水酸基が $\beta$ 脱離して生じた不飽和結合を有する構造 (クロトネート型) も水酸基末端型の脱水反応により得られるため、水酸基末端型と同じ重合度では分子量が環状型と等しい。したがって、 $^1\text{H-NMR}$  と MALDI-TOF MS の結果からだけでは、分子量が水酸基末端型より  $18$  小さいスペクトルが環状型とクロトネート型のどちらに由



a) Hydroxy-type



b) Cyclic-type



c) Crotonate-type

Fig. 2.27: Proposed structures of polymers that were contained in crude P(3HB) produced by the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL.

来するかを決定できない。そこで、 $^1\text{H-NMR}$  を用いた末端構造解析から推定された末端水酸基型とクロトネート型の2種の構造のみが存在すると仮定して以下に示した式を構築し、式を補正しながら考察を行った。

$$\frac{X + Y + Z}{X + Y} = Q \quad (2.1)$$



$X$  :  $^1\text{H-NMR}$  チャートにおける 5.80 もしくは 6.95 ppm のピークの積分値 (クロトネート型の不飽和結合部位のプロトン由来: クロトネート型の数と等価)

$Y$  :  $^1\text{H-NMR}$  チャートにおける 4.20 ppm のピークの積分値 (水酸基末端メチン基のプロトン由来: 水酸基末端型の数と等価)

$Z$  :  $^1\text{H-NMR}$  チャートにおける 5.25 ppm のピークの積分値 (全ポリマーの繰り返しユニット中のメチン基プロトン由来)

$Q$  : 仮定の平均重合度 (水酸基末端型とクロトネート型のみが存在すると仮定して求めた理論重合度)

式 2.1 はポリマー主鎖中のメチン基に由来するプロトンと不飽和結合片側のプロトンの合計を、水酸基末端型とクロトネート型の数を示すプロトン量で除しているため、ポリマー中に環状型が存在すると測定される実際の平均重合度よりも大きな値を導く。そこで、実際の平均重合度を  $^1\text{H-NMR}$  により求めるためには環状型の数に相当する  $C$  を導入した以下の式 2.2 が必要となる。

$$\frac{X + Y + Z}{X + Y + C} = P \quad (2.2)$$

$C$  : 環状型の数を示す値

$P$  : 実際の平均重合度

したがって、実際の平均重合度が求めれば、式 2.2 を用いて環状型の数を示す  $C$  の値を求めることが出来る。しかしながら、現在では正確にポリマーの平均重合度を求める手段はないので、本考察においては SEC より求めた数平均分子量  $\overline{M}_n$  をモノマーユニットの分子量で除する以下の式 2.3 を用いて実際の平均重合度を求めた。

$$\frac{\overline{M}_n}{86.09} = L \quad (2.3)$$

$L$  : 実際の平均重合度

以上の式 2.1, 2.2 並びに 2.3 を合わせると式 2.4 を導くことが出来、この式 2.4 を用いた計算により環状型の存在の確認を行った。

$$C = \frac{X + Y + Z}{\frac{\overline{M}_n}{86.09}} - X - Y \quad (2.4)$$

以上の計算の結果より、環状型の存在が強く示唆された。したがって、 $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS 解析の結果と合わせて考えると、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られるポリマーの構造は水酸基末端型、環状型及びクロトネート型の3種類であることが示された。以上の検討結果を受けて、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られるポリマーの構造を  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS スペクトルに帰属した。重合により得られた粗ポリマー中に含まれる構造体を混合物のまま、構造体の帰属を行った。Fig. 2.28 及び 2.29 に粗ポリマーの  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS スペクトルを記載した。

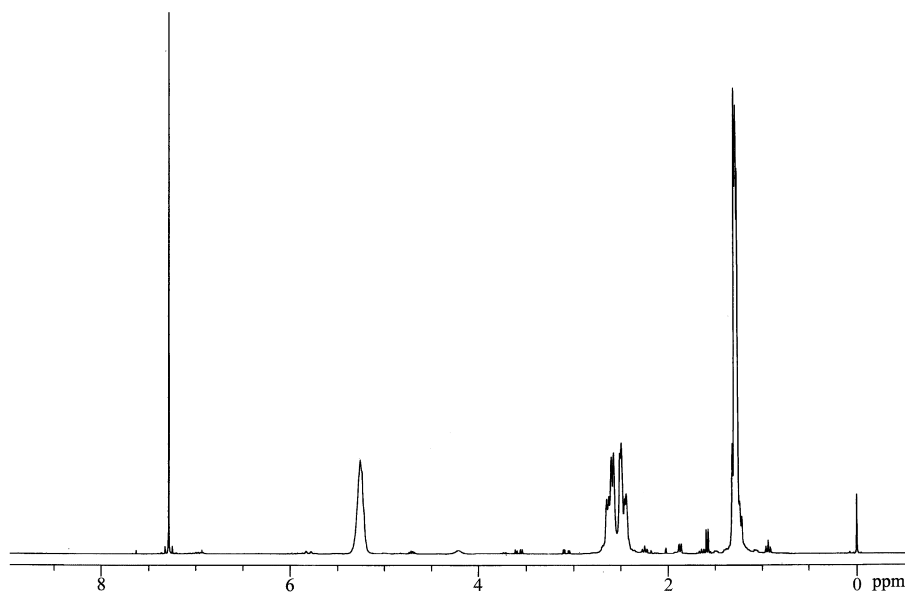


Fig. 2.28:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of crude P(3HB) produced by the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ): P(3HB);  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.41~2.63 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 4.2 ( $\text{HO}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.16~5.37 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 1.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 7.5$  Hz), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz), 7.0 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, m),  $\beta$ -BL;  $\delta = 1.58$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 6.09$  Hz), 3.07 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 3.57 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, dd,  $J = 4.00, 16.4$  Hz), 4.77 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H,  $J = 6.09$  Hz)

Fig. 2.28 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルには、反応終了直後であるためにモノマーに由来するピーク ( $\delta = 1.58, 3.35, 4.7$  ppm) が現れているが、今回の検討には影響を与えないと判断した。また、Fig. 2.28 のスペクトルには Fig. 2.27 中の b) に示した環状型ポリマーの帰属を示していない。環状型ポリマーは末端基を有さないために、末端に存在するモノマーユニット由来の特異的な化学シフトに帰属するプロトンが構造に含まれていない。したがっ

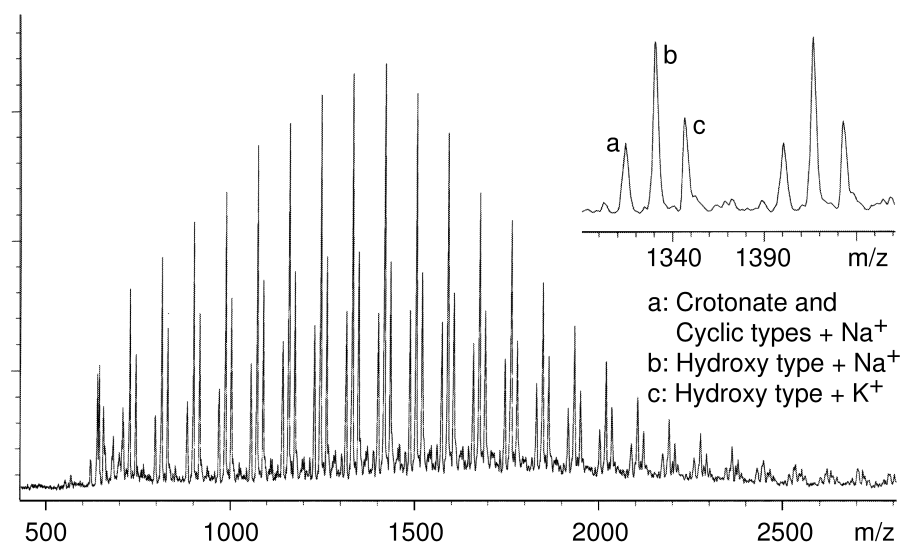


Fig. 2.29: MALDI-TOF MS spectrum of crude P(3HB) produced by the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL.

て、環状型ポリマーに含まれている全てのプロトンがポリマー主鎖の繰り返しユニットと同じ化学シフトに現れると考えられるため、帰属は省略した。環状型ポリマーの<sup>1</sup>H-NMRチャートに関しては後に詳細を記した。また、MALDI-TOF MSの測定条件に関しては巻末の付録中に記した。

## (2) 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) を用いた構造体の分別

LC(Liquid Chromatography) を用いて構造体を分別する場合、分解能の調節は流速及びカラム温度を変化させて行う。したがって、分解能調節の幅はあまり広くない。しかしながら、SFC を用いた場合、主溶媒である超臨界  $\text{CO}_2$  の物性が温度、圧力に大きく影響を受けて溶解力を変化させるため、必然的に分解能も温度、圧力に依存して大きく変化する。さらにモディファイヤーを用いるため、モディファイヤーの流量も分解能を変化させる。すなわち、目的とする分子量もしくは構造を有するオリゴマーを分別する際に LC よりも詳細な条件設定を行える。以前は高分子を分子量により分別する場合、SEC(Size Exclusion Chromatography) を用いるほかなかった。SEC を用いて分別した場合、各フラクションの分子量分散を分別前と比較して絞り込まれるが、各フラクションに含まれるポリマーの分子量を単一にすることは不可能であった。

これまでの検討から、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合で得られるポリマーは 3 種類の構造体を有することが示された。そこで、3 種類の構造体の混合物から単一構造もしくは単一分子量を有するオリゴマーフラクションへの分別を試みた。まず、シリカゲルカラムを用いた構造による分別を考えたが、TLC により分別条件検討の結果、構造もしくは重合度の違いによる分別は不可能であった。そこで、分別の方法としてはポリスチレン等を用いた単一分子量を有するオリゴマーフラクションへの分別が報告されている超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) が適していると考えた。

ここでは SFC の分別挙動解析に先立ち、SFC を用いて分別したフラクションが SFC チャートにおいて単一となることを確認した。Fig. 2.30 に分別前の SFC チャートを示し、Fig. 2.30 中でマークを付したピークを分別したものの SFC チャートを Fig. 2.31 に示した。

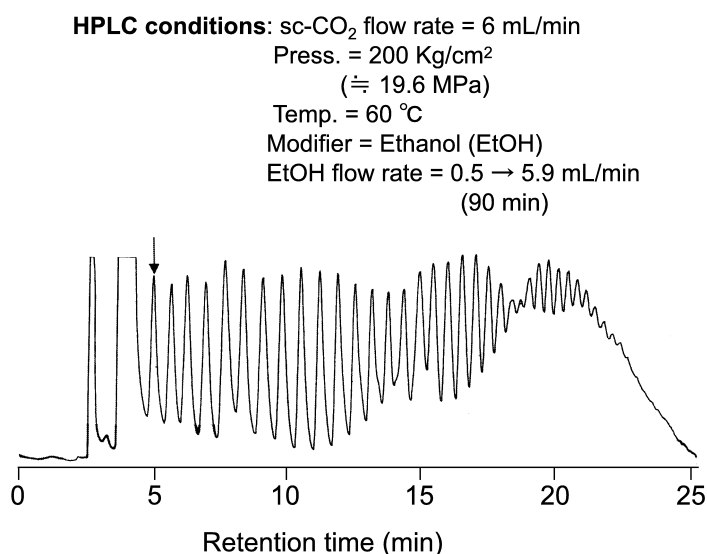


Fig. 2.30: SFC profiles of mixtures obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL.

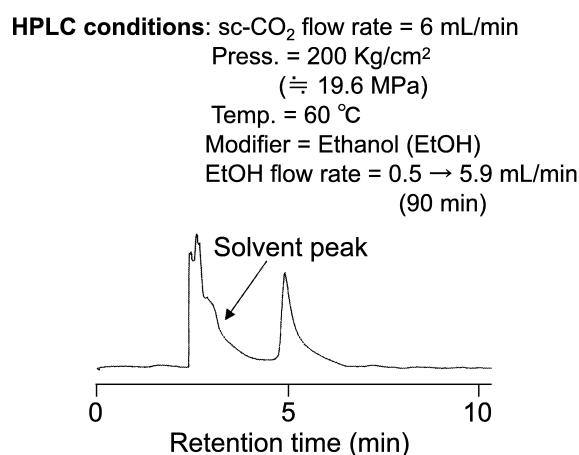


Fig. 2.31: SFC profiles of separated fraction from mixture.

以上の結果より、SFC チャートに現れる一連のピークはピーク毎の分別により単離できることが示された。分別後のピークの保持時間は、分別前のそれと比較して絶対値に多少の差があるものの、重合混合物中の他のピークは分別操作により排除されていることが明らかとなった。そこで、分別された各オリゴマーフラクションの構造解析を<sup>1</sup>H-NMR 及び MALDI TOF-MS を用いて行うことにより、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合で得られるポリマーの詳細な構造解析並びに SFC の分別挙動解析を目的として検討を行った。

### (3) 分別したフラクションに含まれるポリマーの構造解析

本検討で用いた SFC はカラムの担体がシリカゲルであるため、それぞれの構造体の有する保持時間はそれぞれの極性に大きく依存すると判断した。これら3種類の構造体の中では水酸基末端型がヒドロキシル基末端とカルボキシル基末端を有するため一番極性が高いと判断し、末端を有さない環状型が最も極性が低いと考えて分別条件を検討した。検討の結果、構造体別に分別することが可能であった。以下に単離したフラクション A~C の  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS チャートをそれぞれ示し、それらのスペクトル解析により導かれた分子構造を示した。

#### フラクション A

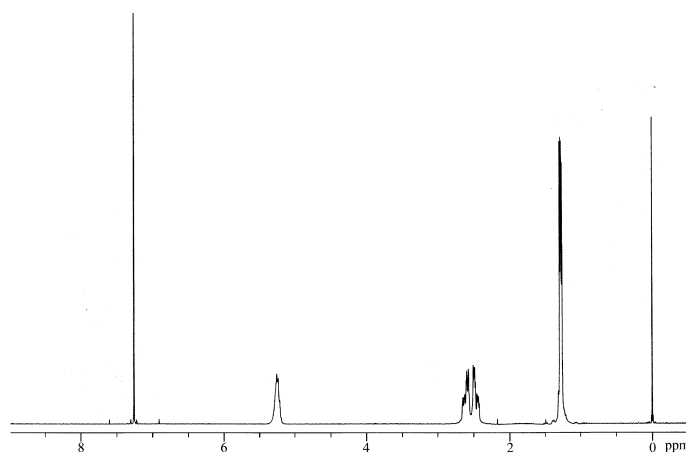


Fig. 2.32:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of isolated P(3HB): Fraction A

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.3$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.6 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 5.3 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

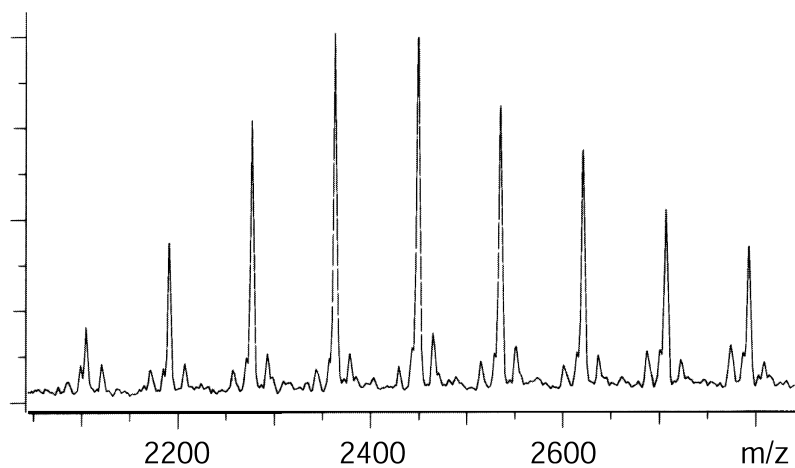


Fig. 2.33: MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction A

Fig. 2.32 及び 2.33 のスペクトル解析の結果、フラクション A に含まれる構造体は Fig. 2.34 に示した水酸基末端型であった。

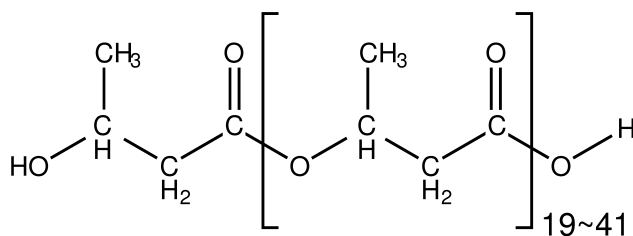
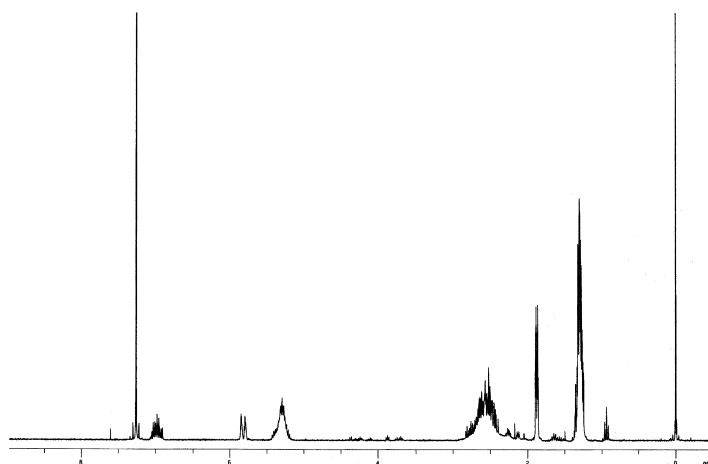


Fig. 2.34: Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction A

## フラクション B

Fig. 2.35:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of isolated P(3HB): Fraction B

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.3$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.6 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 5.3 ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 4.2 ( $\text{HO}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 7.0 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, m), 1.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, d,  $J = 7.5$  Hz), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz).

a: Crotonate type (4-mer) +  $\text{H}^+$   
 b: Crotonate type (4-mer) +  $\text{Na}^+$   
 c: matrix

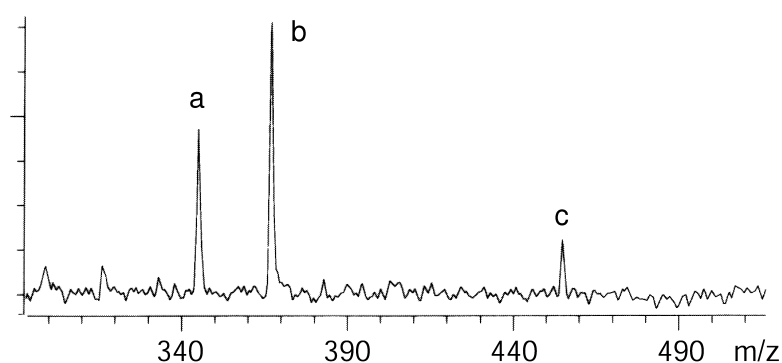


Fig. 2.36: MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction B

Fig. 2.35 及び 2.36 のスペクトル解析の結果、本フラクションに含まれる構造体は Fig. 2.37 に示すような Crotonate-type であった。



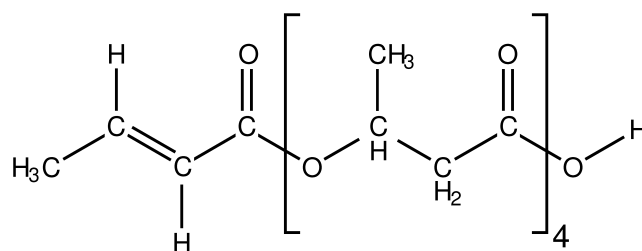
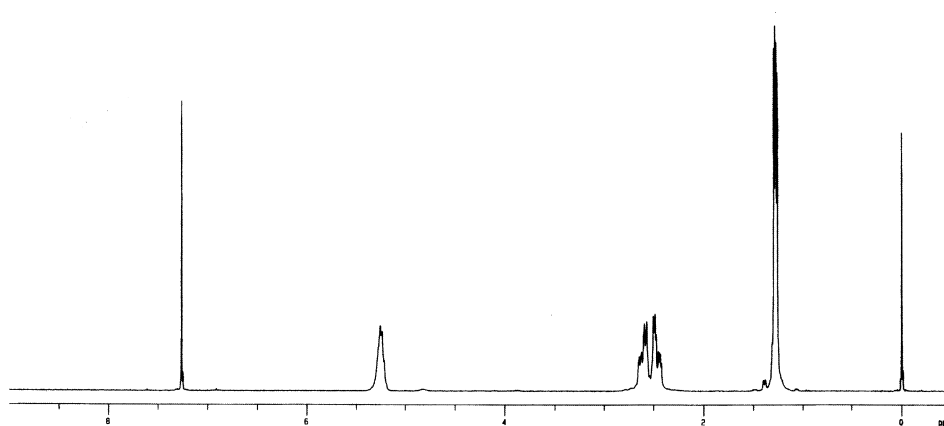


Fig. 2.37: Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction B

## フラクシオン C

Fig. 2.38:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of isolated P(3HB): Fraction C

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.3$  ( $-\text{O}-\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m), 2.6 ( $-\text{O}-\text{CH}\text{C}\underline{\text{H}}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m), 5.3 ( $-\text{O}-\text{C}\underline{\text{H}}\text{C}\text{H}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

Fig. 2.38 及び 2.39 の解析の結果、本フラクシオンに含まれる構造体は Fig. 2.40 に示すような Cyclic-type であった。

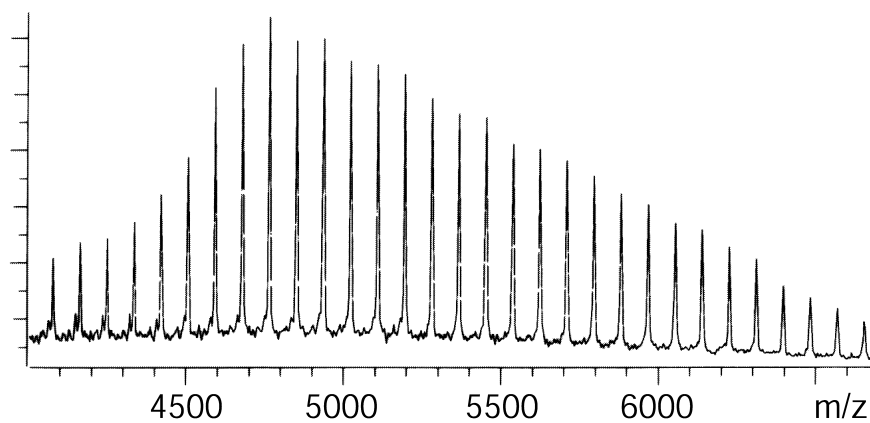


Fig. 2.39: MALDI-TOF MS spectrum of isolated P(3HB): Fraction C

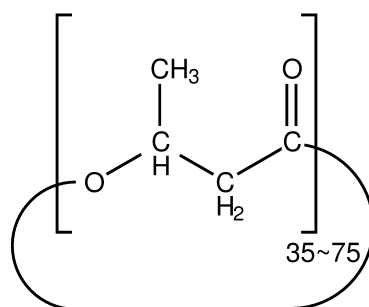


Fig. 2.40: Proposed structure of isolated P(3HB): Fraction C

#### (4) SFC の条件検討

先の検討により、SFC を用いることにより単一構造体への分別は可能であることが示されたが、単一分子量への分別はより詳細な分別条件の検討が必要であった。SFC は分解能を決定する要素を LC に比べて多く有するため、SFC の分別条件において圧力、カラム温度及びモディファイヤーの流量が SFC チャートに与える影響について検討した。クロマトグラフィーの条件は数値化してまとめることができないため、様々な条件で得られたチャートを記載した。

最も基本的なチャートを Fig. 2.41 に示した。本項では、このチャートを分取に適するスペクトルへ変換するために行った条件検討に関して記載する。

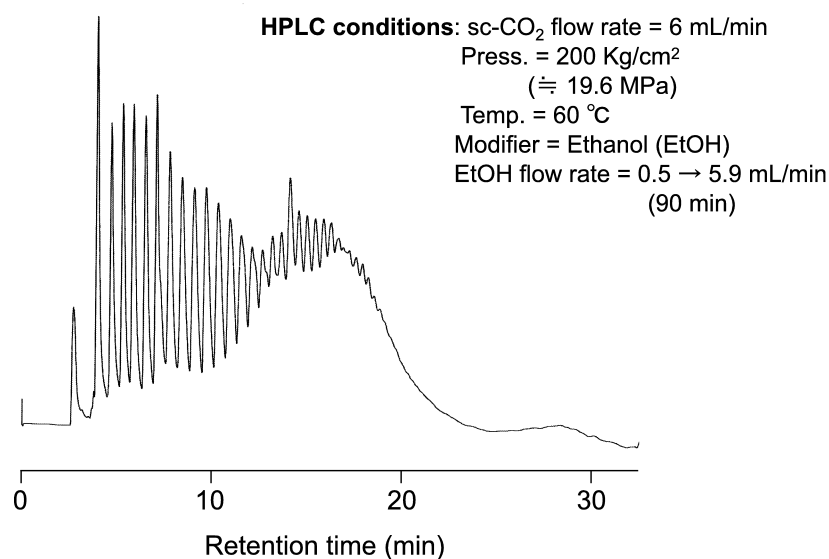


Fig. 2.41: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL:  
(1)

ピークの高さは HPLC 内に注入したサンプル量及び記録計の感度に依存するので、ピーク間の谷のベースラインに対する接近挙動を検討した。

HPLC 構成パーツの変更に伴い、圧力表示が MPa に変更された。圧力の若干な差が HPLC チャートへ与える影響を検討した。

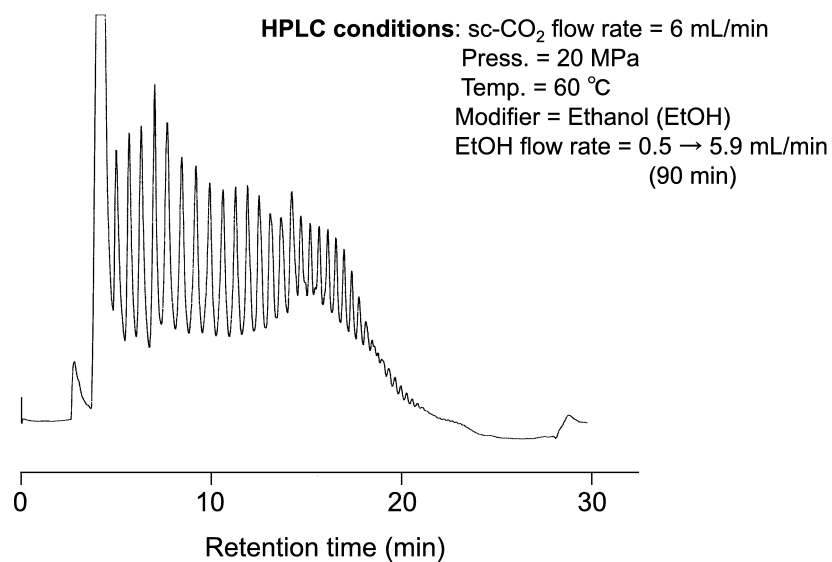


Fig. 2.42: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (2)

圧力及びカラム温度の影響を検討した。モディファイヤーの等の条件は Fig. 2.42 から変更していない。

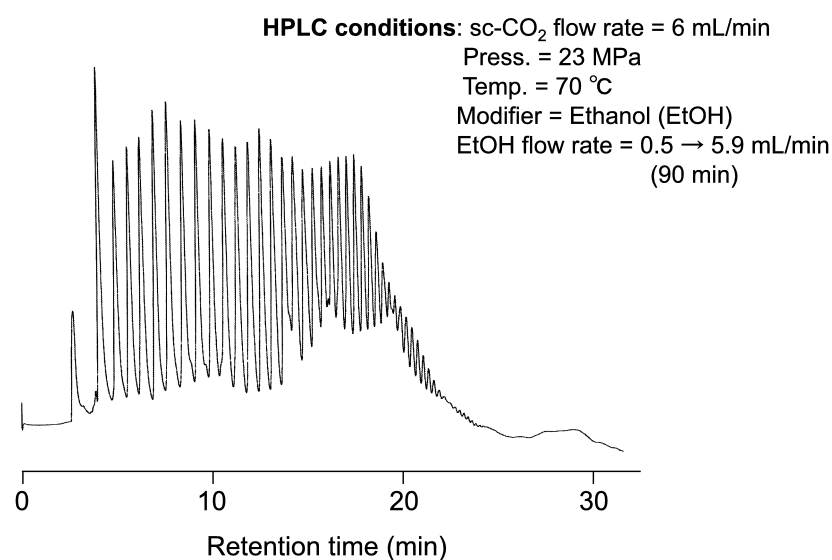


Fig. 2.43: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (3)

圧力さらに上昇させるとスペクトル間隔が狭まり、分別が困難となったためにモディファイヤー流量上昇の傾きを低下させた。

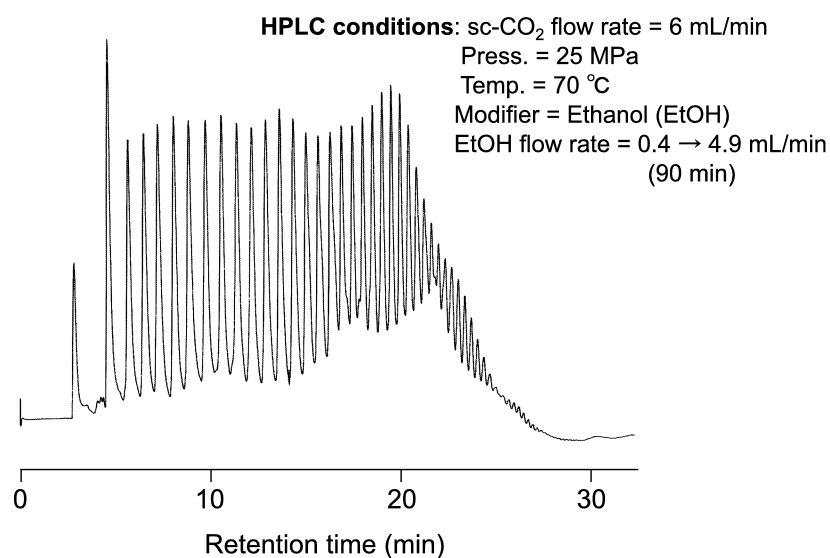


Fig. 2.44: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (4)

モディファイヤー流量の上昇に二つの傾きを用いて検討した。条件における ( ) 内の時間はサンプルを注入してからの合計時間を表す。

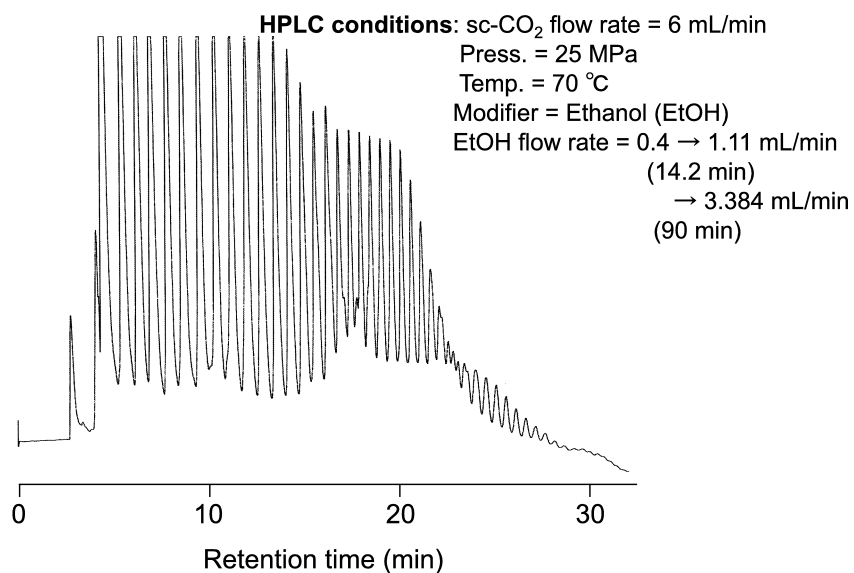


Fig. 2.45: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (5)

Fig. 2.45 より、モディファイヤーの詳細な流量設定が分解能を調整する上で非常に有効であることが明らかとなった。そこで、モディファイヤーの流量設定を詳細に検討した。

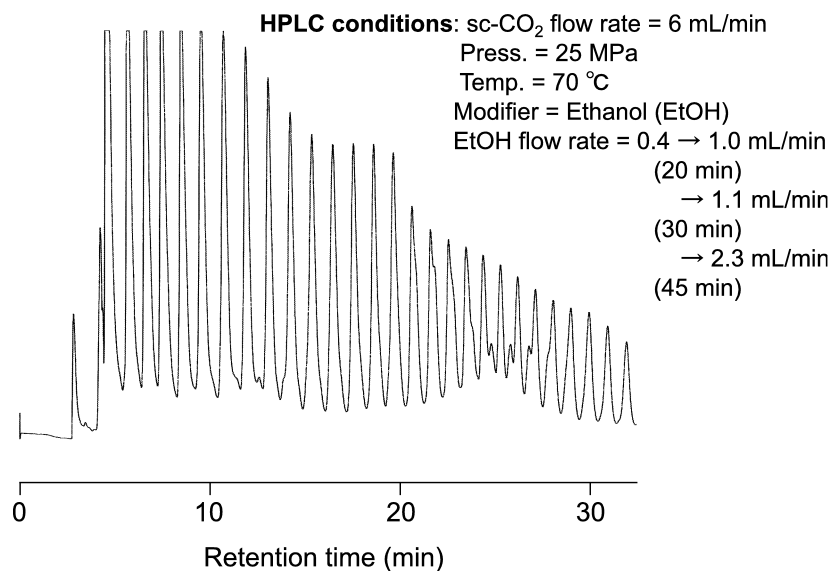


Fig. 2.46: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (6)

一回の分別操作で構造と分子量が単一なフラクションを得ることは困難であった。そこで、モディファイヤーの効果に着目してエタノール中に様々な溶媒の添加を試みた。しかしながら、クロロホルム、アセトンは検出器の UV 波長における吸収が強くチャートを著しく乱した。

特に困難であったのは環状型とクロトネート型の分別であった。そこで、この両者を分別する方法としてモディファイヤーの酸性度を上げることで、クロトネート型が有するカルボキシル基とカラム担体であるシリカゲルとの相互作用を低下させてお互いの保持時間をシフトさせる検討を行った。すなわち 0.5 % 酢酸を含むエタノールをモディファイヤーとして用いて分別条件の検討を行った。

以下に SFC の条件検討の結果、明らかとなった点について述べる。基本とした Fig. 2.41 においては保持時間が短い領域においてきれいなスペクトルが得られ、分別が容易であった。しかし、保持時間が長い領域ではスペクトル間隔が短くなるとともにスペクトル間の谷が浅くなり、スペクトルの分別が出来ずに混合物のままのフラクションが得られた。

Fig. 2.42 では、Fig. 2.41 と比較して若干スペクトル同士の谷が深くなっていた。圧力設定の単位変更に伴って圧力が若干上昇したためと考え、圧力上昇は分離能の上昇をもたらすと判断した。また、分離能の上昇は圧力上昇に伴う sc-CO<sub>2</sub> の有する溶解力が上昇したためと考えた。したがって、sc-CO<sub>2</sub> の溶解力の上昇に伴ってスペクトル間の谷が深く

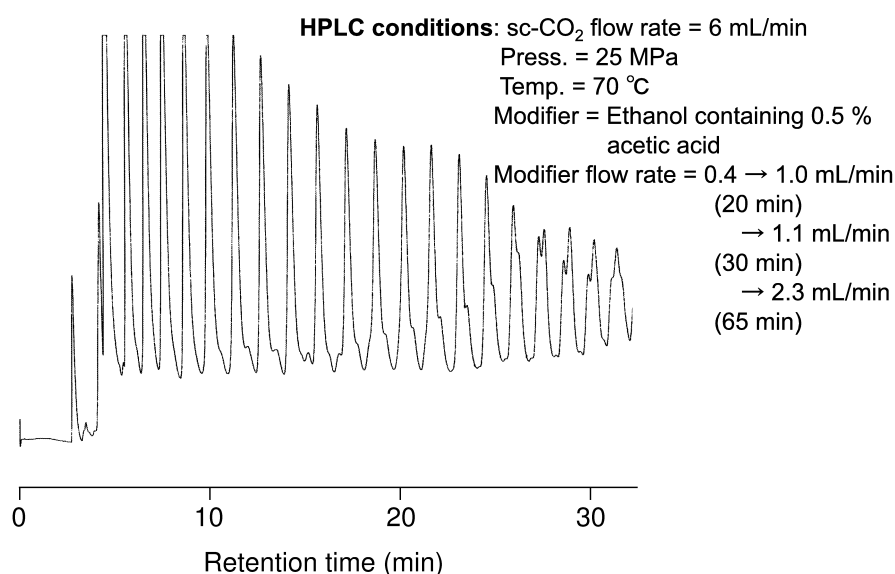


Fig. 2.47: SFC profiles of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (7)

なり、分別操作が容易になると判断した。

sc-CO<sub>2</sub> は圧力、温度の上昇に伴い、溶解力が上昇する性質を有する。そこで、カラム温度を 70 °C に、圧力を 23 MPa へと上昇させたところ、Fig. 2.43 に示すチャートが得られた。チャートを Fig. 2.42 と比較すると分離能が上昇し、スペクトル間の谷が非常に深くなることが明らかとなった。そこで、圧力を更に 25 MPa へと上昇させた。その結果、分離能は更に上昇してスペクトル間の谷は非常に深いものとなり、ベースラインにまで接近した。圧力の変化のみでスペクトル間の谷を深くするとスペクトル間隔が狭まり、分別が困難となった。そこで、スペクトル間隔を広げるためにモディファイヤーの流量を低下させた。その結果、Fig. 2.44 に示したチャートが得られた。この分別条件では保持時間において 15 分まで分別が可能であった。しかしながら、それ以降の保持時間においてはスペクトル間の谷が浅く、分別は困難であった。このスペクトル間の谷が浅くなる傾向は、スペクトル間隔が保持時間の増加に伴って狭くなっているためと判断した。

以上の検討結果、モディファイヤー流量増加を一段階で設定していることに問題があると考えられた。そこで、モディファイヤー流量を二つの流量増加曲線を用いて設定する検討を行った。流量増加を変化させる保持時間は、スペクトル間隔が狭まる直前とした。また、その保持時間以降ではスペクトル間隔を広げるために流量増加率を低下させた。その結果、Fig. 2.45 に示したように、高保持時間においてもきれいなスペクトルが得られた。以上の結果より、sc-CO<sub>2</sub> の溶解力における限界のために高保持時間のスペクトルが分かれなかったのではなく、モディファイヤー流量が過剰であったためにスペクトル間の谷が

浅くなったと考えられる。そこで、モディファイヤーの流量増加曲線の屈曲点を二つに増加した。その結果、Fig. 2.46 に示したチャートが得られた。この段階で、分別後のフラクションにおける単独構造体の組成率は上昇した。

しかしながら、環状型とクロトネート型では重合度が等しい場合にお互いの極性が非常に近いことが示唆された。したがって、SFC を用いた今までの分別では分子量は単一であっても二つの構造体の混合物にしか分別することが出来なかった。また、高保持時間における分別では、異なる重合度を有した水酸基末端型が同じフラクションに含まれた。これは、これら構造体の極性があまりにも近いためであると判断した。そこで、これら構造体の分子構造に着目して検討した。分子構造的には環状型のみカルボキシル基末端を有さないという特徴がある。カルボキシル基はシリカゲルと相互作用をするため、TLC ではカルボキシル基を有する化合物のプロットはブロードとなる。この現象は HPLC チャート上におけるテーリングであると考えることができる。この現象はカルボキシル基よりも酸解離度が高い、もしくは酸解離度において同等の溶媒を展開溶媒に添加することにより抑制することができる。すなわち、酸を展開溶媒に添加することによりカルボキシル基とシリカゲルの相互作用が低下し、TLC における同一化合物の Rf 値変化及び HPLC における保持時間の変化が確認される。この現象を応用して SFC の分別条件の検討を行った。

すなわち、モディファイヤーに酢酸を少量添加することで、カルボキシル基を有するクロトネート型と水酸基末端型の保持時間をシフトさせることで環状型の分別が容易に出来ると考えた。その結果、Fig. 2.47 に示したようにチャート上においてスペクトルに肩が出来ることが確認された。この肩に由来する構造体は、酢酸を用いないときには同一スペクトル内に隠れていたと考えられ、分別を行う上でモディファイヤーに酢酸を添加することが非常に有効手段であることが明らかとなった。しかしながら、初回の分別操作に酢酸含有モディファイヤーを用いると、分別後のフラクションが混合物であった場合に更なるスペクトル分別の手段を限定してしまうため、著者は初回にエタノールのみをモディファイヤーとして用い、再カラムの際に酢酸含有エタノールをモディファイヤーとして用いた。

以上の検討結果を Table 2.10 にまとめた。



Table 2.10: The relationship between HPLC conditions and behaviour of SFC spectrum.

SFC の条件変更点	: 結果
圧力の上昇	: sc-CO <sub>2</sub> の溶解力上昇及び SFC においては分離能の上昇を引き起こした。
カラム温度の上昇	: sc-CO <sub>2</sub> の溶解力上昇及び SFC においては分離能の上昇を引き起こした。
sc-CO <sub>2</sub> の溶解力上昇	: 低保持時間でスペクトル間の谷を深くするが、高保持時間ではスペクトル間隔を狭める効果がある。スペクトル間隔が狭まり過ぎるとスペクトル間の谷が浅くなる。
モディファイヤー流量増加速度	: 傾きを急にするとスペクトル間隔が狭まり、穏やかにするとスペクトル間隔は広がる。また、増加曲線の傾きは流量の他段階で変更可能であり、チャートを綺麗にする際に有効であった。
酢酸添加	: 酢酸を添加したモディファイヤーを用いることで、カルボキシル基を有する構造体の保持時間を短くすることが可能となった。

## (5) 3種の構造体の組成比に関する検討

これまでの検討から  $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られたポリマーは3種類の構造体の混合物として与えられていることが明らかとなった。構造体の組成比を求める手法として、(1) 構造解析の概要中で示した2.4式が挙げられる。2.4式は  $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られたポリマー中に環状型が含まれていることを示したが、計算過程に SEC より求めたポリマーの平均分子量を用いている。SEC より求めた平均分子量は重合挙動の追跡において有効な値であるが、低分子量 ( $M < 906$ ) では検量線の範囲外となる等、厳密性に欠く。したがって、構造体の組成比を求める計算式に SEC より求めたポリマーの平均分子量を用いることは好ましくない。そこで、本項では  $^1\text{H-NMR}$  と MALDI-TOF MS のスペクトル積分値を用いた計算式を構築し、これら3種類の構造体の組成比について経時変化を検討した。

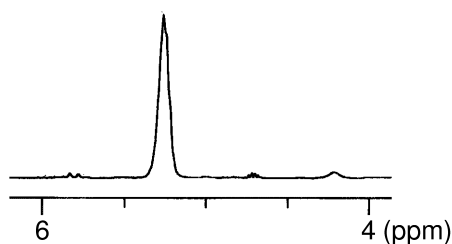


Fig. 2.48: Expanded  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.2$  ( $\text{HO}-\underline{\text{CH}}\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.3 ( $-\text{O}-\underline{\text{CH}}\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br), 5.85 ( $\text{H}-\text{CCH}_3-\underline{\text{CH}}-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, d,  $J = 15$  Hz).

Fig. 2.48 に示した  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいて  $\delta = 4.2$  ppm に現れている水酸基末端型構造の末端水酸基が結合するメチン基に由来するピークの積分値を水酸基末端型の数を示す数値 ( $Hy$ ) として扱った。また、5.85 ppm に現れているクロトネート型のオレフィン末端片側のプロトンに由来するピークの積分値をクロトネート型の数を示す数値 ( $Cro$ ) として扱った。これらの比率を求めることにより、以下の様に水酸基末端型とクロトネート型の組成比を算出した。

$$Hy : Cro$$

本研究で行った MALDI-TOF MS スペクトル解析の結果、18  $m/z$  間隔を有する一組のスペクトルの内、 $m/z$  が大きいスペクトルは水酸基末端型に帰属され、小さいスペクトル

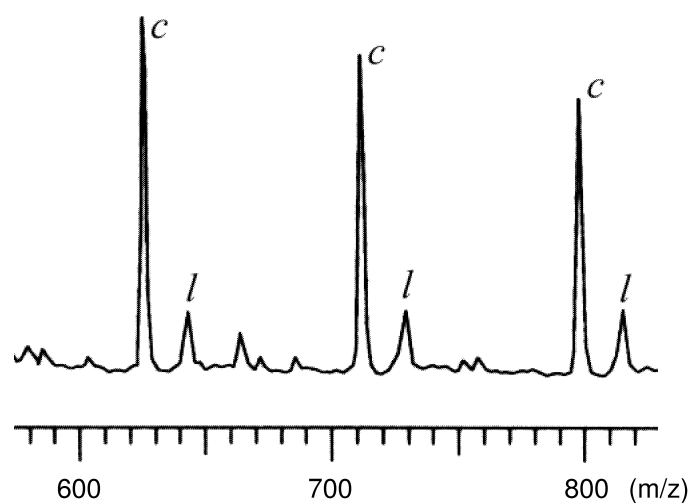


Fig. 2.49: Expanded region of MALDI-TOF MS spectrum of P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL.

は環状型とクロトネート型に帰属された。そこで、MALDI-TOF MS スペクトルの積分値解析を Córdoba らが報告した方法<sup>17)</sup>に従い、それぞれのスペクトル積分値をそれぞれの構造体の数を示す数値として扱った。すなわち、MALDI-TOF MS のスペクトル *c* の積分値の総和とスペクトル *l* の積分値の総和の比率を求めることで (Fig. 2.49 参照)、以下の様に水酸基末端型と環状型 (*Cyc*) + クロトネート型の比率を求めた。

$$Hy : Cro + Cyc$$

以上、求めた二つの比率式を下記のように連立させることにより、環状型の組成比を求めた。

$$\begin{cases} Hy : Cro \\ Hy : Cro + Cyc \end{cases}$$

この計算方法にしたがって求めた各構造体組成比の経時変化を Fig. 2.50 と Fig. 2.51 に示した。

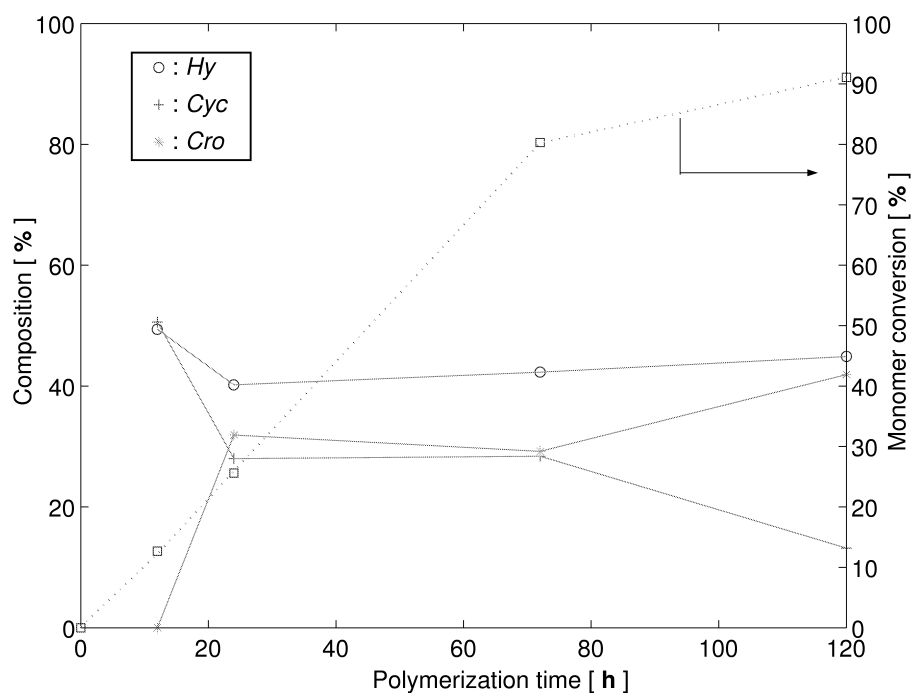


Fig. 2.50: Time course of the composition of three structures of P(3HB) produced by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (1) <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 5 wt.-% PPL at 80 °C.

MALDI-TOF MS 測定も分子量測定の際には検量線を用いて近似値を示す。しかし、本項で用いている組成比算出方法では近似値である分子量を用いずに MALDI-TOF MS より求めた組成比と <sup>1</sup>H-NMR より求めた組成比を用いている。本組成比算出方法の欠点として、MALDI-TOF MS 測定においてモノマーレベルの分子量検出が難しいことや分子量分散のために <sup>1</sup>H-NMR のピークがブロードであるためのピーク積分値の信頼性低下が挙げられる。しかしながら、近似値を用いていないことから**(1) 構造解析の概要**中で示した 2.4 式を用いて求めた組成比と比較した際に信頼度は向上しており、本重合系でのポリマー混合物中の組成比計算方法としては本手法が最も信頼性が高いと考えられる。

Fig. 2.50 と Fig. 2.51 で各構造体組成比の絶対値は異なったが、各構造体組成比の経時変化は非常に近い挙動を示した。すなわち、環状型の組成比は経時的に減少し、クロトネート型は重合初期段階以降に生成され始めることが明らかとなった。つまり、環状型はモノマー転化率が低い状態 (モノマーを溶媒と考えると重合系内が希薄な状態) において著量生成している。このことは環状型が分子間反応ではなく、分子内反応で生成していることを示唆している。また、クロトネート型は重合反応開始直後に生成しておらず、酵素濃度を増加した際に組成比及び絶対量が減少したことから、クロトネート型生成は何かしらの酵素由来の触媒作用ではないと考えられる。

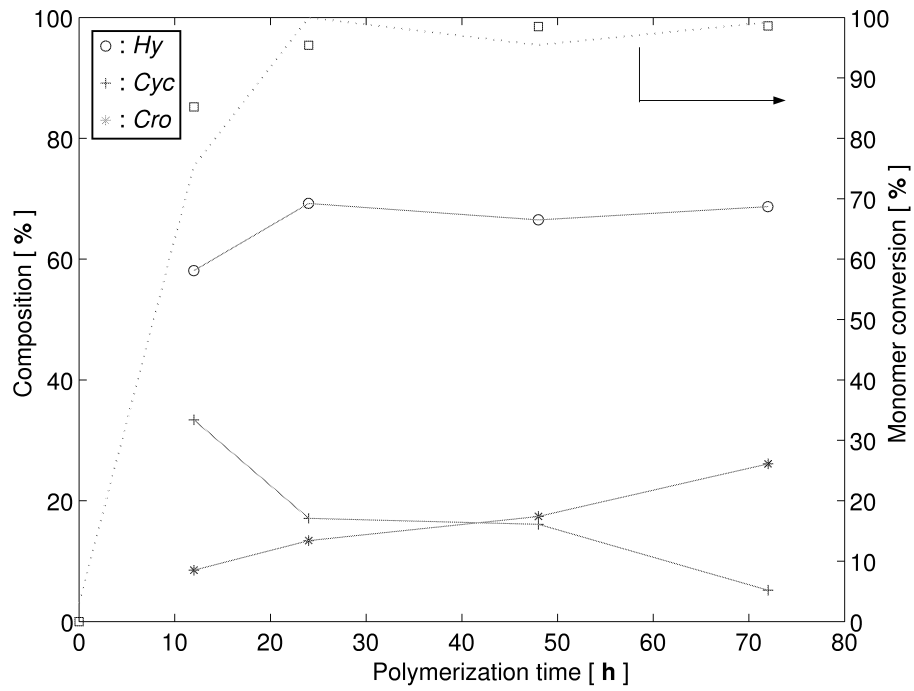


Fig. 2.51: Time course of the composition of three structures of P(3HB) produced by the lipase-catalyzed polymerization of  $\beta$ -BL: (2) <sup>b)</sup>

<sup>b)</sup> Bulk polymerization of  $\beta$ -BL using 40 wt.-% PPL at 80 °C.

本検討結果の詳細は後の酵素触媒重合機構についてに記した。

### 2.3.4 酵素のオリゴマーに対する基質認識能

これまでに提唱されているラクトン環の酵素触媒重合の反応機構 (Scheme 2.25) はモノマーと酵素の相互作用に関してのみであり、重合の進行とともに生成するオリゴマー鎖及びポリマー鎖に対する酵素の基質認識能に関しては未だ不明瞭な点が多い。本研究のこれまでの解析から、重合反応中に他の反応が同時に進行していることが示され、Scheme 2.25 に示した反応機構からは生成が説明できない環状型及びクロトネート型の分別も行われた。ある種の脂肪族ポリエステルは緩衝溶液中で、油脂加水分解酵素 (リパーゼ) の作用により分解されることが知られている。このことは重合系内に生成するオリゴマー鎖及びポリマー鎖がリパーゼの基質となることを示している。

酵素のオリゴマーやポリマーに対する基質認識能が報告されていない理由は、オリゴマーが有する分子量分散のために解析が非常に困難であるからである。酵素がオリゴマー鎖もしくはポリマー鎖を基質として認識した結果、加水分解とエステル交換反応が重合系内で生じると考えられる。これらの反応により得られる構造体は分子量分散を有するオリゴマー及びポリマーの集合体であると推測され、分子構造の根本的な変化がないために、 $^1\text{H-NMR}$  では反応の有無を検証できない。また、反応前後の分子量変化が小さければ、SEC による反応が存在することの証明は困難である。

このように一般的な測定方法ではオリゴマー鎖及びポリマー鎖を酵素が基質として認識したか否かを明らかにするのは困難であるが、明らかとなれば酵素触媒重合の反応機構に関して判明する領域は大きい。そこで、解析を困難にしている基質オリゴマーの分子量分散を限りなく小さくすれば本解析は可能であると考え、SFC を用いて分取した単一分子量を有するオリゴマーを基質として用いることとした。分子量変化の追跡は MALDI-TOF MS を用いて行った。

結果を Table 2.11 にまとめた。また、反応前後の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 2.52 に示した。

Table 2.11: Screening of enzymes and organic solvents for the interaction between oligomers and enzyme <sup>a)</sup>.

Entry	Enzyme	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Reaction
1	Novozym <sup>®</sup> 525	IPE(*)	60	12	Yes
2	Novozym <sup>®</sup> 525	IPE(*)	60	48	Yes
3	Novozym <sup>®</sup> 525	toluene	60	96	Yes
4	Novozym <sup>®</sup> 525	toluene	80	72	No

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	Enzyme	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Reaction
5	CRL	IPE(*)	60	48	No
6	CRL	toluene	80	48	No
7	PPL	IPE(*)	60	48	No
8	PPL	toluene	80	48	No
9	PPE	IPE(*)	60	48	No
10	PPE	toluene	80	48	No
11	salt(*)	IPE	60	48	No
12	—	IPE	60	48	No

a) 4.1 mg of oligomers in 500  $\mu$ L of solvent and enzyme were stirred.

(\*)IPE = Diisopropyl ether, (\*)salt = Potassium phosphate

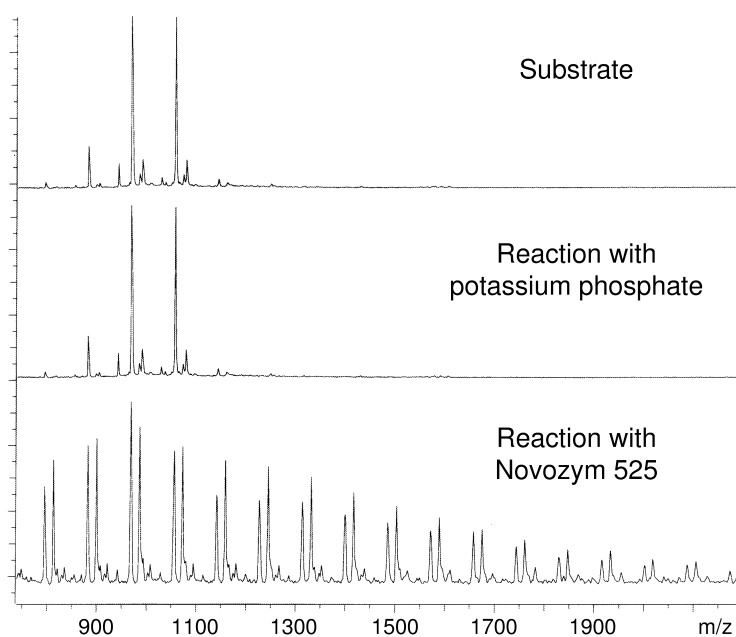
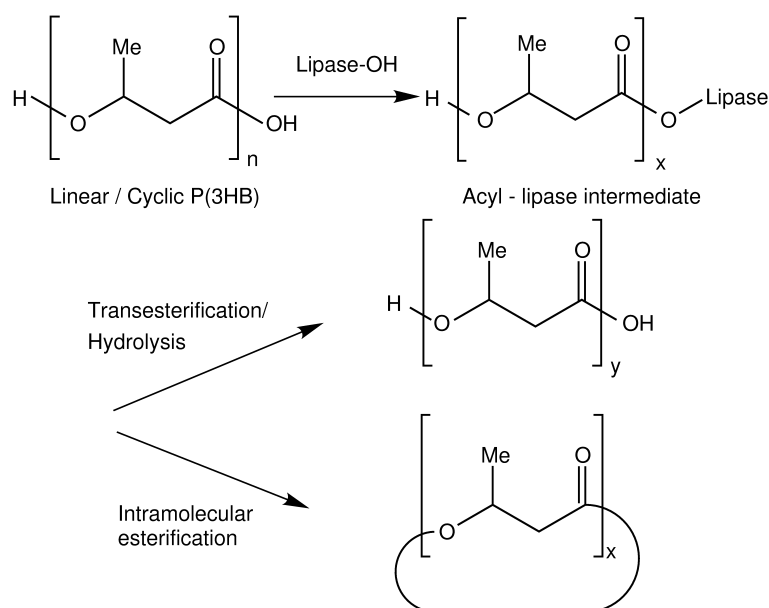


Fig. 2.52: MALDI-TOF MS spectra of fractionated P(3HB) before and after the enzymatic reaction <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 4.1 mg of oligomers in 500  $\mu$ L of IPE and Novozym<sup>®</sup> 525 (lyophilized powder from 100  $\mu$ L of Novozym<sup>®</sup> 525 solution) were stirred at 60 °C for 48 h.

酵素中に含まれると考えられるリン酸塩を作用させても全く反応の進行が確認されなかったことから、本反応は酵素の作用により進行していると考えられる。また、反応後の



Scheme 2.53: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed inter/intra-molecular transesterification of P(3HB) polymer chains.

スペクトルより、反応が単純なエステル化のみではなく、広範囲にわたる加水分解反応及びエステル交換反応であることが示された。

ここでは、基質が非常に微量であったために有機溶媒で希釈した。したがって、酵素の有機溶媒耐性を考慮せずに Novozym<sup>®</sup> 525 以外の酵素がオリゴマーを認識しないと断定できない。しかし、本検討結果は、リパーゼが有機溶媒環境下においてオリゴマーを基質として認識することを明確にした。

本検討の結果をまとめると、リパーゼはモノマーのみならず、ポリマー鎖をも基質として認識し、加水分解反応及びエステル交換反応を引き起こすことが明らかとなった。したがって、重合反応中においても Scheme 2.53 のように酵素は重合系内に生成したポリマーを基質として認識し、エステル交換もしくは加水分解反応を生じることが示された。



### 2.3.5 酵素触媒重合機構について

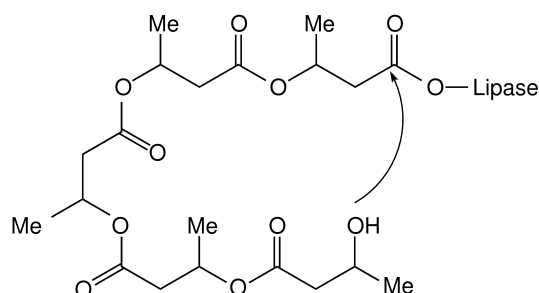
これまでの検討から、酵素触媒重合に関して新たな知見が得られた。Scheme 1.2 に示したこれまで提唱されている反応機構に加え、新たな反応機構を本研究結果から提唱するに至った。すなわち、重合系内において酵素は、モノマーのみならず、重合系内に生成したポリマー鎖をも基質として認識する (Scheme 2.53) ことが示された。また、酵素がポリマー鎖を基質として認識したために、環状型とクロトネート型が生成することが示された。以下に詳細を記す。

新たに推定した酵素触媒重合機構は先の検討から明らかとなったリパーゼがポリマー鎖を基質として認識する過程を組み込んで構築した。酵素触媒重合中で生じる環化機構には Scheme 2.54 に示すように分子内反応と分子間反応の二つが考えられる。いずれもリパーゼがポリマー鎖を認識するまでは同様に進行する。構造体の組成比に関する検討結果より、環状体の組成比は低いモノマー転化率の段階で高かった。モノマー転化率が低い状態は重合系内のポリマー鎖数が少ない状態であることから、モノマーを溶媒と考えると酵素がポリマー鎖を基質として認識して形成されたアシル酵素中間体同士の分子間距離は長い。アシル酵素中間体同士の分子間距離が遠い状態で環状体の組成比が高いことから、本重合系での環化反応は Scheme 2.54 内の a) に示したアシル酵素中間体における分子内エステル交換反応により進行していると考えられる。

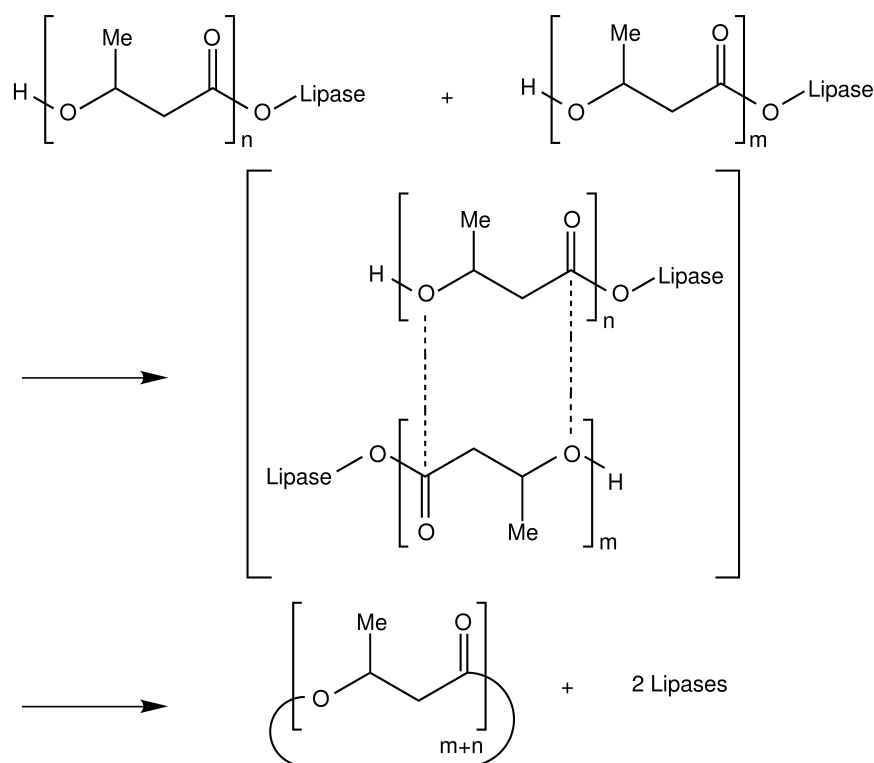
ここで、重合系内の酵素活性化モノマーを含めたアシル酵素中間体の数は重合初期段階より変化せず、アシル酵素中間体同士の分子間距離が重合反応を通して一定だと仮定する。重合初期段階ではこの条件で環状体が多く生成した。しかしながら、モノマーは酵素活性化モノマーを経由してヒドロキシ酸へと連続的に変換されるため、重合初期段階以降では重合系内に求核攻撃能力を有する水酸基末端型オリゴマーが多数生成する。したがって、重合初期段階にみられたアシル酵素中間体での分子内エステル交換反応以外にアシル酵素中間体に対する系内オリゴマーの求核攻撃による分子間エステル交換反応が進行して成長反応が生じると考えられる。さらに、環状型も酵素の基質として認識されると仮定すると生成した環状型も酵素触媒による分子間エステル交換反応により消費されるため、環状型の組成比が経時的に著しく減少すると考えられる。以上の考察は構造体組成比の検討で得られた結果とよく一致していることから、信頼性は非常に高いものと考えられる。

クロトネート型が生成する理由は現在のところ明らかになっていない。3-ヒドロキシブタン酸は  $\beta$  位に水酸基を有している。 $\beta$  位水酸基はアルカリ条件下で容易に  $\beta$  脱離して不飽和結合を形成する。したがって、本重合により得られたクロトネート型も  $\beta$  脱離により形成されたと考えられる。すなわち、酵素活性化モノマーに対する水酸基の求核攻撃はアルカリ条件下でのエステル交換反応と近似しているため、アルカリ条件下で生じる電荷

## a) Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed intramolecular cyclization



## b) Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed intermolecular cyclization

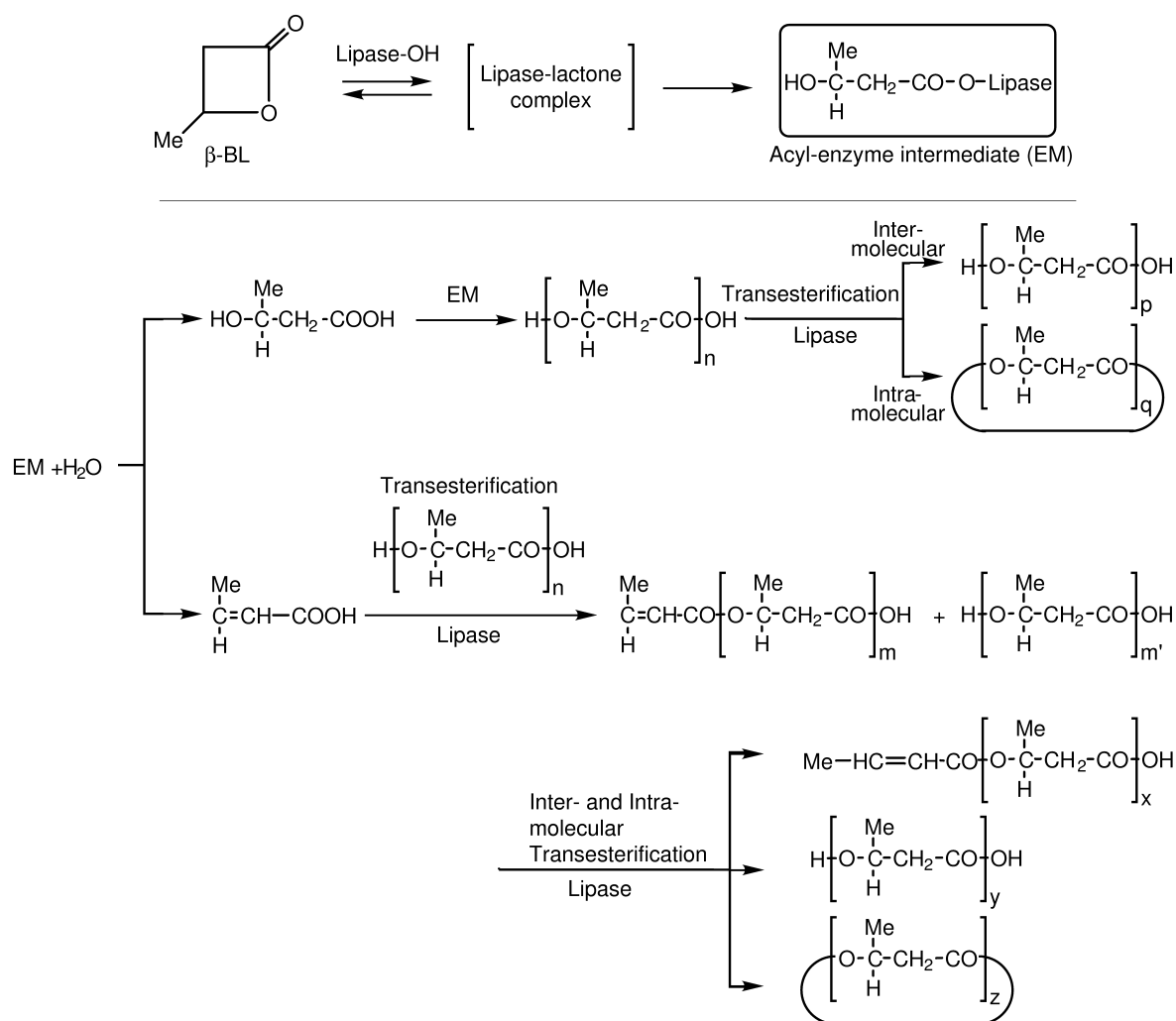


Scheme 2.54: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed cyclization.

移動が酵素活性化モノマー内で起こったと考えられる。これには重合系内の水分含有量も関与している可能性がある。また、重合系内のポリマー鎖と酵素が形成したアシル酵素中間体では、求核攻撃の際の電荷移動が末端水酸基に影響するとは考えられないため、末端水酸基の $\beta$ 脱離は酵素活性化モノマーに対して求核攻撃が生じる際だと考えられる。さらに、構造体組成比の検討結果より、重合初期段階にはクロトネート型オリゴマーが形成されていないことが明らかになった。重合初期段階に生成されていないことから、クロトネート型形成はアシル酵素中間体にオリゴマーが求核攻撃する際であるとも考えられる。

以上の考察から本研究では酵素活性化モノマーに対する水酸基の求核攻撃が生じた際に $\beta$ 脱離が生じたと推定した。水酸基の求核攻撃性はオリゴマーよりも水の方が強いので、本研究では「クロトネート型形成はアシル酵素中間体に水が求核攻撃する際である」という仮説を導いた。

以上の検討結果を反応機構にまとめ、Scheme 2.55 に示した。



Scheme 2.55: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL.

## 2.4 総括

本章にて検討した項目に関して以下の通りに総括した。

1. 酵素スクリーニングの結果、良好に  $\beta$ -BL を開環重合させて相当する P(3HB) を生成物として与える酵素は PPL 及び CRL であった。重合系は酵素濃度、反応温度、重合時間の影響を大きく受けた。酵素濃度はポリマー分子量とモノマー転化率のいずれにも強い影響を与えた。反応温度は 60~80 °C が適しており、酵素が水系環境下で示す最適温度領域 (35~40 °C) では本重合に対する触媒活性を示さなかった。モノマー転化率は重合時間と共に上昇したが、ポリマー分子量は重合時間と共に上昇した後、下降に転じた。
2.  $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られた P(3HB) を超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC) を用いて、単一構造もしくは単一分子量に分別した。分別したオリゴマーフラクションの  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS による構造解析を行った結果、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られた P(3HB) 中には直鎖状ポリマーとして、末端に水酸基を有する水酸基末端型と末端水酸基の  $\beta$  脱離により生じた不飽和結合を有するクロトネート型が存在し、さらに末端を有さない環状ポリマーの存在が確認された。したがって、 $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られた P(3HB) は 3 種類の末端構造を有するものの混合物が重合生成物として与えられていることを明らかにした。
3.  $\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られた P(3HB) を SFC により単一分子量オリゴマーに分別し、有機溶媒に溶解させた後に再度酵素を作用させた。MALDI-TOF MS 解析の結果、酵素はオリゴマー鎖を認識して広範囲の分子量領域で加水分解反応及びエステル交換反応を生じることが明らかとなった。したがって、酵素触媒重合系において酵素はモノマーのみならずポリマー鎖をも基質として認識し、加水分解反応及びエステル交換反応を生じていることを明らかにした。
4. 重合生成物中の各構造体組成比に関して経時変化を検討した結果、酵素濃度の違いによらずに、環状型の組成比は低モノマー転化率の段階で著量生成していることが明らかとなった。重合系内においてポリマー濃度が低い段階で環状型が著量生成されたことから、酵素がポリマー鎖を基質として認識して形成されたポリマー鎖由来のアシル鎖を有するアシル酵素中間体内での分子内エステル交換反応により環状型が生成することを示した。

5. 重合生成物中の各構造体組成比に関して経時変化を検討した結果、酵素濃度の上昇に伴ったクロトネート型の絶対量及び組成比の上昇は確認されなかった。したがって、クロトネート型生成は酵素に由来する触媒活性で得られた構造体ではないことが示された。そこで、クロトネート型は酵素活性化モノマーに水が求核攻撃する際に生成すると考えられた。



## 第3章

# 有機溶媒中における poly(3-hydroxybutanoate) の酵素分解

### 3.1 緒言

本章では生分解性高分子材料の環境に低負荷な酵素触媒を用いた原料化に関する研究結果について記す。研究の背景を以下に記す。

生分解性高分子材料の大きな特徴の一つに廃棄後、自然環境中に普遍的に存在する微生物により分解・資化されて水と二酸化炭素になることが挙げられる。この分解により生成した水と二酸化炭素は地球上の植物などにより再び固定化されて再生可能資源になる。したがって、生分解性高分子材料を使うことにより、高分子材料に起因する環境問題の中でも廃棄後の諸問題を解決できると期待されている。

また、今現在、問題視されている環境問題の中に二酸化炭素排出量の増加が挙げられる。これは炭素を固定していた化石資源を人類が多量に利用していることに起因する。高分子材料の多くも化石資源由来であることから、この問題を解決する策として再生可能資源を原料に用いた高分子材料の開発も注目される研究分野である。再生可能資源を原料に用いて生分解性高分子材料を合成することで、高分子材料に起因する地球上の二酸化炭素は収支のバランスが取られる。この二酸化炭素排出量増加問題を考慮に入れると、高分子化学領域において検討すべき項目では、再生可能資源を原料に用いる以外に使用後の高分子材料を再利用すること(リサイクル)が挙げられる。すなわち、環境中に放出せざるを得ない高分子材料については自然環境中で水と二酸化炭素に分解させ、使用後に回収できる高分子材料については生分解性材料といえども回収し、効率的に原料化すべきであると考えられる。

高分子材料のリサイクルには大きく分けて以下の5種類の方法がある<sup>180)</sup>。

1. 高分子状態を維持しながら熔融・溶解して再成型するマテリアルリサイクル法
2. 高分子材料を化学的もしくは生物学的的方法により原材料にまで戻し、再び高分子材料を合成するケミカルリサイクル法
3. 廃高分子材料を熱・触媒などの作用により分解して燃料ガス・油などの有用物質に変換して利用するケミカルリサイクル法
4. 廃高分子材料をそのまま高炉原料化、あるいは発電用の石炭代替燃料として利用するサーマルリサイクル法
5. 洗浄して再利用するリユース法

ここでは循環型化学工業の確立に有用であると考えられる、上の2. に記した**化学的に高分子材料を高分子材料の原料へと変換するケミカルリサイクル**について記す。一般に高分子材料の原料であるモノマーはエネルギー的に高いため、従来検討されてきた方法で高分子材料を原料に戻すためには熱・圧力など多大なエネルギーを要した。そのため、バージンモノマーと再生モノマーでは価格面で大きな差が生じ、実用化は不可能とされてきた。そこで、本研究では生分解性高分子材料が酵素が切断可能な結合で構成されていることに着目し、酵素を触媒に用いた生分解性高分子材料のケミカルリサイクルについて検討を行った。ポリマーとして化石資源由来の非天然型 poly(3-hydroxybutanoate) [P(3HB)] の場合の概念図を Fig. 3.1 に示した。

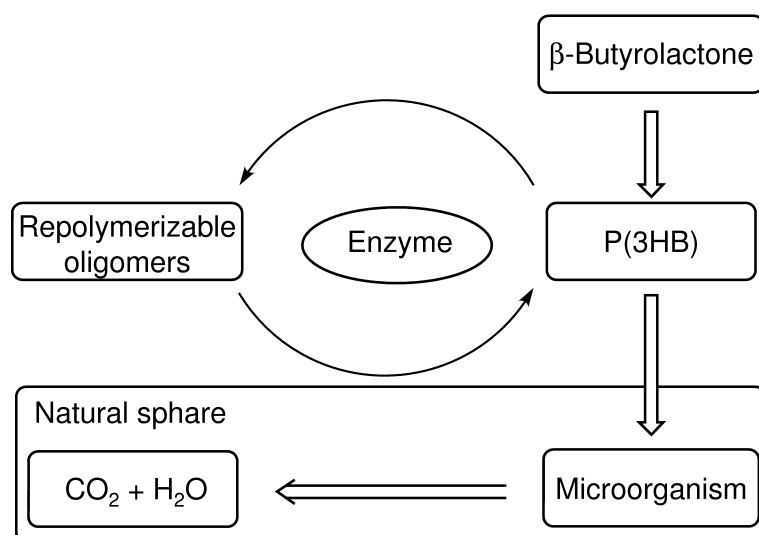


Fig. 3.1: Conceptual scheme of the enzyme-catalyzed chemical recycling.

ついで、本研究の分解系が水系ではなく有機溶媒系である理由について説明する。本研究は生体触媒を用いたケミカルリサイクルの構築が最終的な目的である。したがって、分解生成物の取得と分子構造が重要である。近年、水系（緩衝溶液）における様々な脂肪族



ポリエステルのリパーゼによる分解が報告されている。このことは自然環境中に放出された脂肪族ポリエステルが特異的な分解菌ではなく、一般的なリパーゼにより分解されることを示しており、生分解性ポリマーの環境低負荷性を示している。しかし水系反応はケミカルリサイクル系を構築する際に適切な方法ではないと考えられる。

すなわち、ポリマーがオリゴマーやモノマーにまで分解された場合、水系では分解生成物が水中に溶解する。それらの分解生成物を回収するためには有機溶媒を用いた抽出、もしくは水分を減圧濃縮により除去する必要がある。しかし、抽出操作では分解生成物を100%回収するのが困難であり、水の減圧濃縮は必要とされるエネルギーが非常に大きい上に緩衝溶液由来の塩を同時に回収してしまう問題点が挙げられる。

そこで、本研究ではリパーゼが他の酵素と比較して有機溶媒に対する耐性に優れていることを利用し、有機溶媒に溶解させたポリマーをリパーゼにより切断させる方法を選択した。

P(3HB) 分解酵素は基質吸着部位を構造内に有しており、そのために水に不溶なポリマーを水中において切断することができるとされているが、リパーゼはそのような基質吸着部位を有さないために溶媒にポリマーが溶解することが最低限必要であると考えた。また、リパーゼは有機溶媒に対する耐性に優れているが、親水性溶媒中では他の酵素と同様に活性を失うことが知られている。したがって、有機溶媒を選択するポイントとしては次の4点を重視した。

- ① ポリマーを溶解できること
- ② 酵素が活性を保持することができること
- ③ 沸点がある程度高く、反応系がある程度の温度に耐えられること
- ④ 環境に対する負荷を考え、ハロゲン系溶媒でないこと

PPL がジエチルエーテル中においても活性を保持することは報告されているが、ジエチルエーテルは沸点が低いために選択しなかった。また、クロロホルムはポリマーに対して良溶媒であるが、ハロゲン系溶媒であると同時にクロロホルム中では酵素が活性を失いやすいことが知られているため選択しなかった。

トルエンは溶媒自体も生分解性であること、ポリマーに対して良溶媒であることから選択した。また、ジイソプロピルエーテルを選択した理由としてはオリゴマーと酵素の相互作用を検討した際に酵素がジイソプロピルエーテル中において活性を保持していることが確認されており、さらにジエチルエーテルと比較して沸点が高いことが挙げられる。しかしながら、この溶媒は爆発性が非常に高く、蒸留により純度を上げると更に爆発性が上昇するとされている。本検討においても蒸留といった精製を行わずに用いており、溶媒中に含まれる安定剤といった化合物の影響

を完全に無視することができない。したがって、適切な溶媒とは考えることができないが、溶媒の相違が分解挙動に与える影響を検討するために用いた。

過去の当研究室の報告により、poly(trimethylene carbonate) がアセトニトリル中 Novozym<sup>®</sup> 435 の作用を受けて分解することが確認されているため<sup>117, 118, 186</sup>、アセトニトリルを溶媒として選択した。また、アセトニトリルは親水性が非常に高い溶媒であるため、溶媒の疎水性が分解挙動に対して与える影響を検討できると考えた。

したがって、本研究では前章でも検討を行った非天然型 P(3HB) の各種有機溶媒中における酵素分解反応について詳細な検討を行った。特に得られた分解生成物の構造については前章と同様、MALDI-TOF MS を用いた詳細な検討を行った。

## 3.2 試薬・機器・方法

### 3.2.1 試薬・酵素

本章の研究に用いた試薬類を Table 3.1 にまとめた。

Table 3.1: List of chemical reagents.

試薬名	製造会社	等級
$\beta$ -ブチロラクトン	東京化成工業 (株)	化学用
<i>p</i> -トルエンスルホン酸一水和物	東京化成工業 (株)	化学用
ジブチルチンジクロリド	東京化成工業 (株)	
オレイン酸カリウム	東京化成工業 (株)	
18-Crown-6	Aldrich Chemical Co., Inc.	
オクタン酸スズ	東京化成工業 (株)	
テトラブトキシチタン (IV)	Aldrich Chemical Co., Inc.	
水素化カリウム	ナカライテスク (株)	
ドライソーダ	ナカライテスク (株)	
炭酸カリウム	純正化学工業 (株)	純正一級
炭酸水素ナトリウム	純正化学工業 (株)	試薬一級
炭酸ナトリウム (無水)	純正化学工業 (株)	純正一級
塩化ナトリウム	純正化学工業 (株)	試薬一級
炭酸カルシウム	純正化学工業 (株)	純正一級
セライト 545	純正化学工業 (株)	化学用
モレキュラーシーブス 4A	純正化学工業 (株)	
硫酸ナトリウム (無水)	関東化学 (株)	鹿一級
重クロロホルム	ISOTEC INC.	
ピリジン	純正化学工業 (株)	純正特級
トルエン	純正化学工業 (株)	純正一級
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
エタノール	信和アルコール (株)	研究用

次ページへ続く

前ページからの続き

試薬名	製造会社	等級
ジエチルエーテル	純正化学工業 (株)	業務用
塩化メチレン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
酢酸エチル	ゴードー溶剤 (株)	業務用
アセトン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
メタノール	ゴードー溶剤 (株)	業務用
ヘキサン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
アセトニトリル	ゴードー溶剤 (株)	業務用

本文中において特に指示が無い限り、次の試薬は以下のような精製を行った後に反応に用いた。

**$\beta$ -ブチロラクトン** :  $\beta$ -ブチロラクトン 50 mL に対して水素化カルシウムを薬さじ約半分加え、一日静置して予備乾燥後、無水減圧蒸留 (35 °C / 5 mmHg) を行った。

**クロロホルム** : クロロホルム 2 L に対してモレキュラーシーブス 4A を大さじ 1 杯加え、常圧蒸留を行った。

本文中において無水化と記された以下の試薬は下記の方法により精製を行った後に反応に用いた。

**トルエン** : トルエン 300 mL に対してドライソーダを薬さじ半分加え、2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

**キシレン** : キシレン 300 mL に対してドライソーダを薬さじ半分加え、2 時間加熱還流後、無水常圧蒸留を行った。

本章の研究に用いた酵素を以下にまとめた。

Table 3.2: List of enzymes.

Enzyme origin	Ab.	Manufactures
Lipase from <i>Candida rugosa</i>	CRL	Sigma Chemical Co.
Lipase from porcine pancreas Activity = 220 u/mg protein <sup>a)</sup>	PPL	Sigma Chemical Co.
Novozym <sup>®</sup> 435 (Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = Approx. 10,000 PLU/g <sup>b)</sup>	CA	Novozymes Japan
Novozym <sup>®</sup> 525 (Buffer solution) (Lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = 14,100 PLU/mL <sup>b)</sup>	Novozym <sup>®</sup> 525	Novozymes Japan
NS 40013 PPW 20004 (Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = 20 kLU/g <sup>c)</sup>	Silica Novozym	Novozymes Japan
Lipozyme <sup>®</sup> RM IM (Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i> ) Activity = 5 - 6 BAUN/g <sup>d)</sup>	RM	Novozymes Japan
LIPASE AK "AMANO" 20 (Lipase from <i>Pseudomonas fluorence</i> ) Activity = Not less than 20,000 u/g <sup>e)</sup>	AK	Amano Enzyme Inc.
Lipase PS "AMANO" (Lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> ) Activity = 30,000 u/g <sup>e)</sup>	PS	Amano Enzyme Inc.

- <sup>a)</sup> : **Unit Definition** : One unit will hydrolyze 1.0 microequivalent of fatty acid from a triglyceride in 1 hr at pH 7.7 at 37 °C, unless otherwise indicated.  
Contains approx. 25 % protein.  
54 u/mg protein using triacetin (at pH 7.4)  
220 u/mg protein using olive oil (30 min incubation)

- b) : **Unit Definition** : The ester synthesis activity of Novozym<sup>®</sup> 435 is expressed in Propyl Lautate Units per gram (PLU/g).  
Novozym<sup>®</sup> 435 is immobilized on a macroporous acrylic resin.  
The product has a water content of 1-2 % w/w.
- c) : **Unit Definition** : Tributyrin was hydrolyzed under standard conditions at 30 °C, pH: 7.0, and the activity was determined from the alkali consumption using a pH-stat (Radiometer). The activity was given as LU (lipase unit), where 1 LU corresponds to the amount of lipase, which liberates 1 mmol titrable butyric acid per minute. 1 kLU = 1000 LU.  
Immobilization of *Candida anttarentica* lipase B (E.C. no. 3.1.1.3) by granulation on Sipemat<sup>®</sup> 22 (Degussa) was performed.
- d) : **Unit Definition**: Typical activity is 5 - 6 BAUN/g. The interesterification activity of Lipozyme<sup>®</sup> RM IM is expressed in batch acidolysis units Novo (BUN/g). Lipozyme<sup>®</sup> RM IM contains no significant side-activities. The rate of reaction is determined by measuring the amount of decanoic acid incorporated into the 1 and 3 positions of the triglycerides in high-oleic sunflower oil.
- e) : **Unit Definition**: One unit of enzyme activity is defined as the enzyme quality which liberates 1  $\mu$ mole of fatty acid per one minute.  
Assay method (JIS Method for Lipase, pH 7.0)

## 3.2.2 機器

## (1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
カラム	: K-G + AC-80M + K-800D	昭和電工 (株)
検出器	: 示差屈折率計 830-RI	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: クロロホルム (1 % エタノール含有)	
測定条件	: 流速 = 1.0 mL/min.	
	: 注入量 = 100 $\mu$ L (0.1 % クロロホルム溶液)	
	: 温度 = 37 °C	

検量線用標準試料 : Special Polystyrene Standard ケムコ化学 (株)

$$\overline{M}_w = 1.00 \times 10^5 \qquad \overline{M}_w = 9.00 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 5.00 \times 10^4 \qquad \overline{M}_w = 2.20 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 1.75 \times 10^4 \qquad \overline{M}_w = 9.06 \times 10^2$$

## (2) 超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC)

ポンプ (超臨界 CO <sub>2</sub> 発生装置)	: 880-PU	日本分光 (株)
	SFCpak SIL-5	
カラム	: $\phi 4.6 \times 250$ mm (分析用)	日本分光 (株)
	$\phi 10 \times 250$ mm (分取用)	
カラムオープン	: CO-965	日本分光 (株)
検出器	: UV-975 (210 nm) (耐圧セル)	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: 超臨界 CO <sub>2</sub> ・エタノール 混合溶媒 (エタノールはグラジエント設定)	
測定条件	: サンプル毎に調製	
冷却器	: CH-201	サインクス
液化炭酸ガス	: BMM51293	東横化学 (株)

装置の概要を Fig. 3.2 に示した。

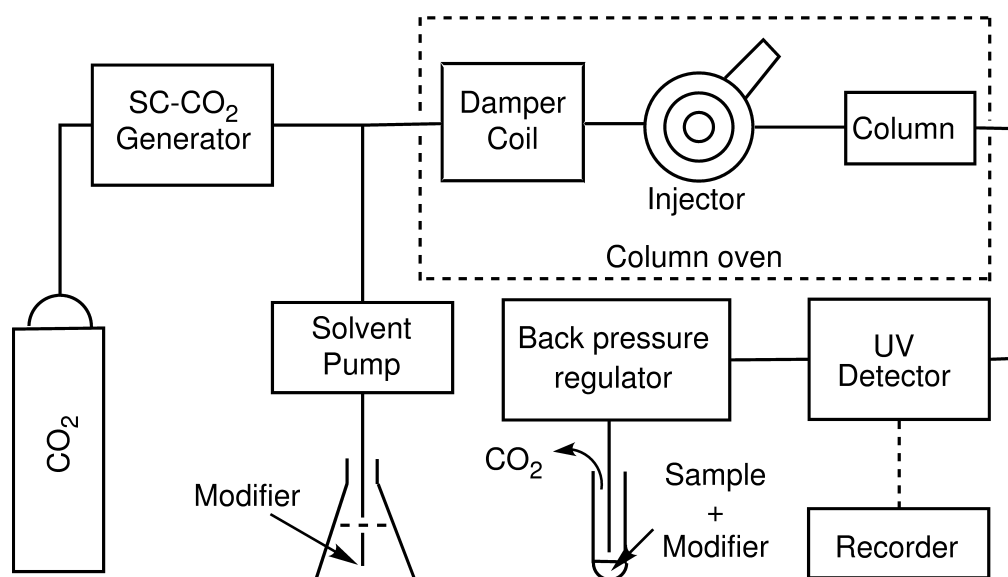


Fig. 3.2: Conceptual diagram of supercritical carbon dioxide chromatography.

FT-NMR	: JEOL GSX270	日本電子 (株)
FT-NMR	: JEOL JNM-LA300	日本電子 (株)
FT-IR	: FT-IR-5300	日本分光 (株)
MALDI-TOF MS	: proflex	Bruker Instruments Inc.
(測定用マトリックス)	: dihydroxybenzoic acid	Sigma Chemical Co.
APCI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
ESI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
遠心分離機	: H-108NA	国産遠心機 (株)
遠心分離機	: H-9R	(株) コクサン
ガラス電極式水素イオン濃度計	: HM-20E	東亜電波工業 (株)
凍結乾燥機	: FDU-830	東京理化機器 (株)
テストチューブミキサー	: TM251	岩城硝子 (株)
分光光度計	: UV-160	島津製作所 (株)



### 3.2.3 実験方法

#### (1) 酵素触媒を用いた P(3HB) の合成

あらかじめ減圧乾燥しておいた 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に所定量の酵素をはかり取り、次いで減圧乾燥したマイクロシリンジを用いてモノマーである  $\beta$ -ブチロラクトン ( $\beta$ -butyrolactone:  $\beta$ -BL) を 300  $\mu$ L (315 mg) 添加した。その後、試験管内をアルゴン置換した上で密栓し、所定温度の油浴上で所定時間攪拌することにより重合を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL に溶解させ、桐山ロートにセライト 545 を 2 g 敷き詰めて不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去して粗ポリマーを得た。

ポリマーの精製方法を以下に記す。得られたポリマーをクロロホルムに溶解させ、メンブランフィルターを用いて含まれている不溶な部分を濾別した。メンブランフィルターは孔径 = 1.0  $\mu$ m のものを一段階目に用い、次いで孔径 = 0.5  $\mu$ m のものを用いた。濾過の後にクロロホルムを減圧留去し、次いでジエチルエーテル：ヘキサン = 1：1 の混合溶媒に徐々に滴下して再沈殿を行った。再沈殿は磁気攪拌子を用いて行い、1.5 時間ずつ 2 回行った。再沈殿の後に沈殿物をクロロホルムで回収し、クロロホルムを減圧留去することで精製ポリマーを得た。精製ポリマーは真空デシケーターで十分に乾燥を行ってから基質として用いた。

#### (2) *syndiotactic* P(3HB) の合成

本研究ではシンジオタクチック性の強い P(3HB) を 1,3-ジクロロテトラブチルジスタノキサン (1,3-dichlorotetrabutyl distannoxane, DTD) を触媒に用いて、 $\beta$ -BL の開環重合により合成した。Scheme 3.3 に DTD を触媒に用いた際の重合機構を示した。Scheme 3.3 に示した通り、ジスタノキサン系触媒による開環重合はモノマーの挿入反応によりポリマー鎖の伸長が生じる。また、この挿入の際にモノマーの立体配置が関与するので、生成ポリマーの一次配列はシンジオタクチックの傾向が強くなる<sup>57, 54)</sup>。

**重合触媒 (DTD) の合成:** DTD の合成は Okawara らの報告<sup>137)</sup> にしたがって行った。すなわち、3.0 g のジブチルチンジクロリド (1 mmol) を 10 mL のエタノールに溶解させ、そこへ 0.78 g のピリジン (1 mmol) を溶解させた 3 mL のエタノールを加えて攪拌した。さらに水を 20 滴程加え、白濁を確認し、その白濁が消失するまで 60~70 °C の湯浴上で数分間、加熱攪拌した。白濁消失後、反応容器を常温で 30~40 分間放置することにより徐冷し、エタノールに対して難溶性である生成物を結晶として析出させた。

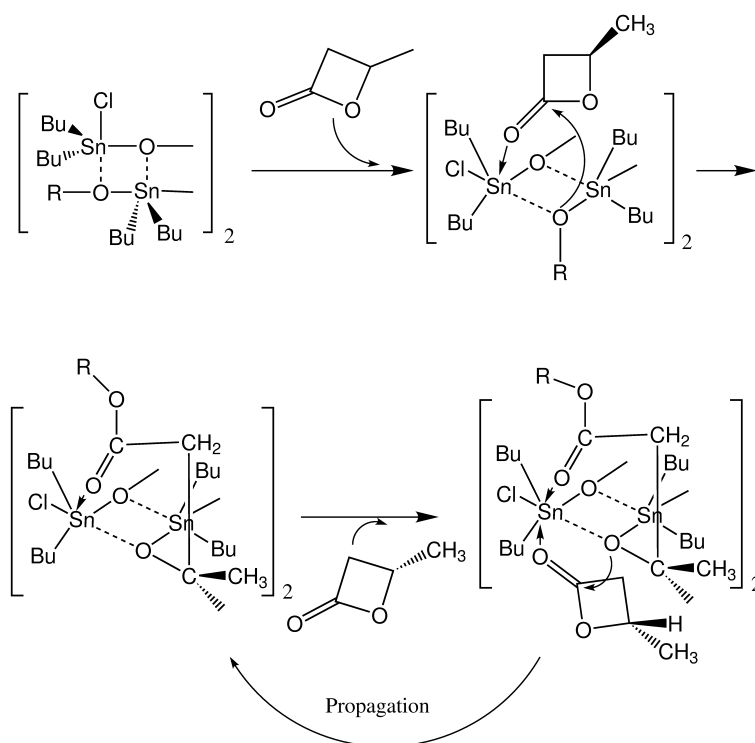


Fig. 3.3: Mechanism of ring-opening polymerization of  $(R, S)$ - $\beta$ -butyrolactone using DTD as the catalyst. (R : Residues of the hydroxy compounds)

得られた結晶を吸引濾過により回収し、漏斗上でエタノールを用いて洗浄を行った。ついで、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で1~2時間、減圧乾燥を行った。さらに、 $30\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ において溶解するまでn-ヘキサンを滴下し、 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ において一晩放置して再結晶化を行うことにより、結晶の精製を行った。DSC測定により、得られた白色結晶の融点が $113\sim 116\text{ }^{\circ}\text{C}$  (文献値 =  $114\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>137)</sup>)であったため、これを合成確認とした。Fig. 3.4にDTDの構造式を記す。

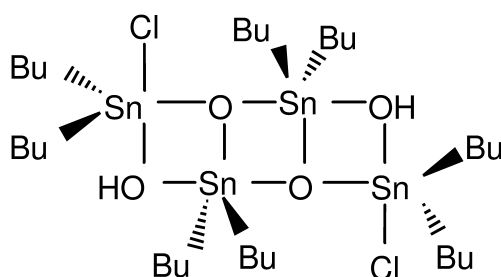


Fig.3.4: Chemical structure of 1,3-dichlorotetrabutyl distannoxane.

**$\beta$ -BLの精製:** 一般的に有機金属触媒を用いた反応は基質の高い精製度が求められる。本重合反応も例外ではなく、試薬の項で述べた精製方法では基質の精製度が低いために重合

反応は進行しなかった。精製度を低下させている原因としては購入した試薬中に含まれている酪酸などのカルボン酸が考えられたので、これらカルボン酸を除去する精製法を考えた。そこで、金属触媒重合に用いる  $\beta$ -BL は以下に記した方法により厳密に精製を行った。

すなわち、50 g の  $\beta$ -BL をジエチルエーテル 50 mL に溶解させて 500 mL 分液漏斗に移し、そこへ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 50 mL を加えて、カルボン酸の水層側への抽出操作を 6 回繰り返した。ついで、飽和塩化ナトリウム水溶液を 50 mL 加え、エーテル層を洗浄した。得られたエーテル層に硫酸ナトリウムを加え、一晚乾燥を行った。硫酸ナトリウムを綿栓濾過により濾別し、エーテル層をエバポレーターで減圧濃縮することにより粗精製  $\beta$ -BL を得た。得られた粗精製  $\beta$ -BL に水素化カルシウムをスパチュラ 2 杯分加えて常圧下で乾燥を行った後、減圧蒸留 (34 mmHg, 76 °C) を行うことで  $\beta$ -BL の無水化及び精製を行った。減圧蒸留を同条件にて 2 回繰り返した。

**重合方法:** 26 mg ( $2.36 \times 10^{-5}$  mol) の DTD を三方コック及び磁気攪拌子を付した 5 mL ナス型フラスコにはかり取り、90 °C の油浴中で系内を 6 時間減圧にすることにより十分に乾燥した。ついで、フラスコを油浴につけたまま、系内をアルゴンで解圧し、直ちにシリンジにて  $\beta$ -BL 3.0 mL ( $= 3.66 \times 10^{-2}$  mol, 3.15 g) を加えることにより重合反応を開始させた。重合は 8 時間行った。重合反応終了後、反応混合物を 4 mL のクロロホルムに溶解させることにより重合反応を停止させ、あらかじめ用意しておいた磁気攪拌子を付した 200 mL ナス型フラスコ内のジエチルエーテル：ヘキサン = 1 : 1 混合溶媒 200 mL 中に徐々に滴下し、再沈殿による精製を行った。

精製ポリマーの分子構造の確認を  $^1\text{H-NMR}$  により行った。 $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 3.5 に示した。SEC 測定の結果、分子量は  $\overline{M}_w = 105400$ ,  $\overline{M}_n = 54700$  及び分子量分散は  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$  であった。

また、得られたポリマーのシンジオタクチック性の確認を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 義夫教授並びに吉江 尚子助手 (現東京大学 生産技術研究所 物質・生命部門 助教授) のご協力により  $^{13}\text{C-NMR}$  を用いた解析により行った。結果を Table 3.3 に示した。

### (3) *atactic* P(3HB) の合成

*atactic* P(3HB) の合成は Jedliński らや Kurcok らにより詳細に検討され<sup>61, 101)</sup>、一般にアニオン重合によりラクトンを開環重合した場合にアタクチックなポリマーが得られることが明らかにされている。アニオン重合の反応機構に関しては未だ不明瞭な点が多いが、アニオン重合により得られるポリマーの一次配列はアタクチックであることが明らかにされているため、本研究では *atactic* P(3HB) の合成を  $\beta$ -BL のアニオン重合により行った。

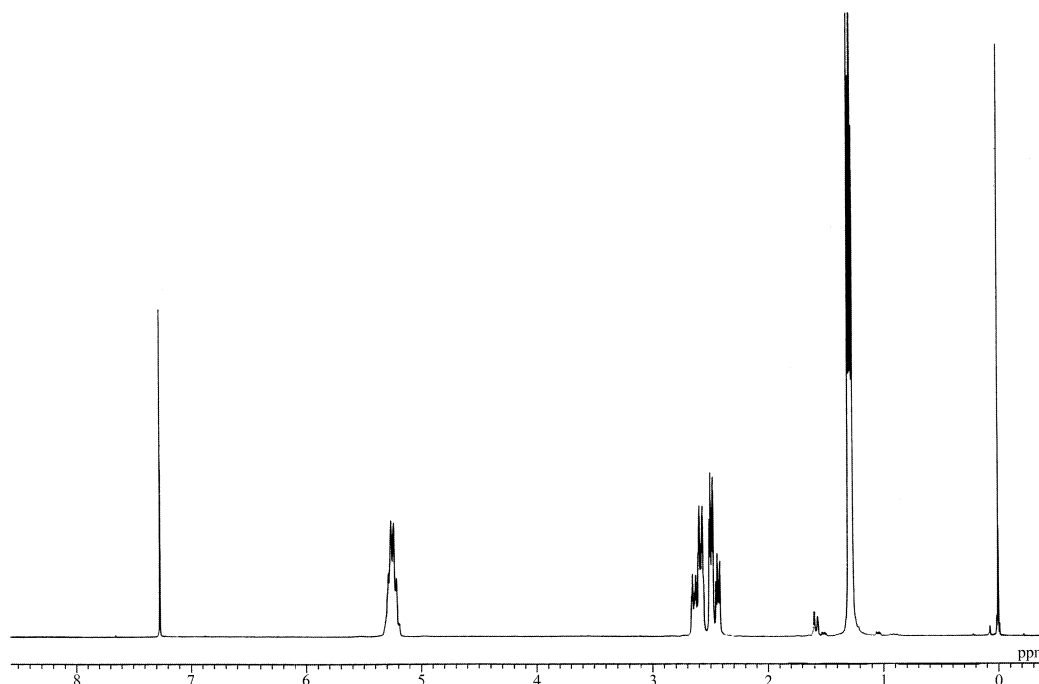


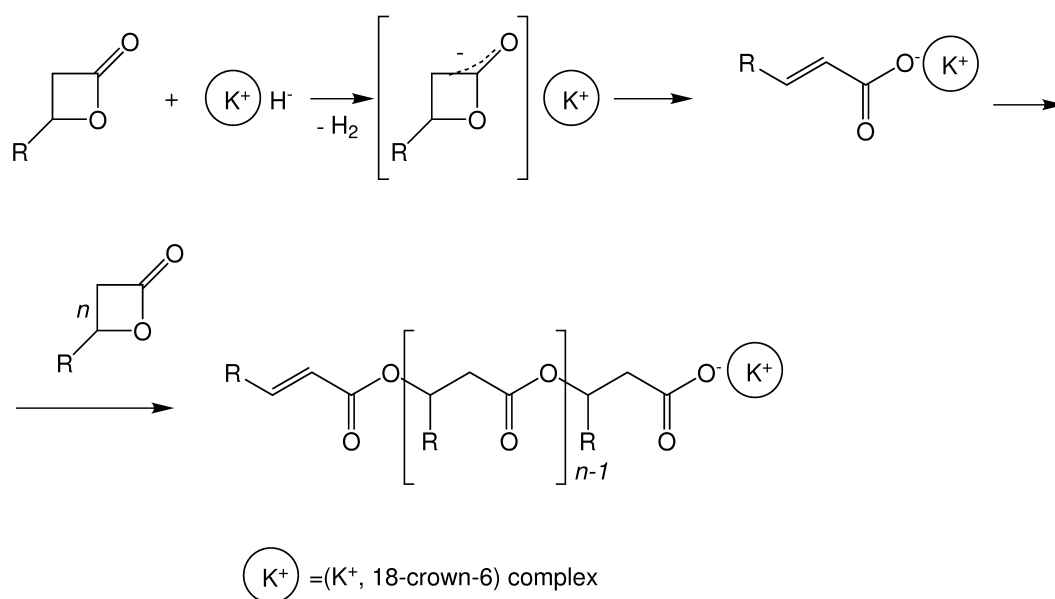
Fig.3.5:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of  $\beta\text{-BL}$  using 1,3-dichlorotetrabutyl distannoxane.

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

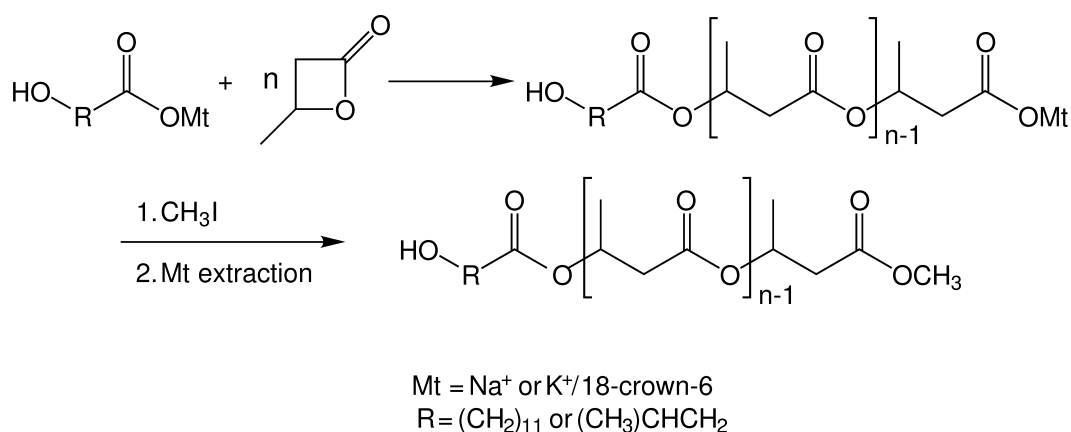
現在、提唱されている二つのアニオン重合機構を Scheme 3.6 及び 3.7 に示した。

**$\beta\text{-BL}$  の精製:** 50 g の  $\beta\text{-BL}$  をジエチルエーテル 50 mL に溶解させて 500 mL 分液漏斗に移し、そこへ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 50 mL を加えて、酪酸などのカルボン酸の水層側への抽出操作を 6 回繰り返した。ついで、飽和塩化ナトリウム水溶液を 50 mL 加え、エーテル層を洗浄した。得られたエーテル層に硫酸ナトリウムを加え、一晚乾燥を行った。硫酸ナトリウムを綿栓濾過により濾別し、エーテル層をエバポレーターで減圧濃縮することにより粗精製  $\beta\text{-BL}$  を得た。得られた粗精製  $\beta\text{-BL}$  に水素化カルシウムをスパチュラ 2 杯分加えて常圧下で乾燥を行った後、減圧蒸留 (34 mmHg,  $76^\circ\text{C}$ ) を行うことで  $\beta\text{-BL}$  の無水化及び精製を行った。減圧蒸留を同条件にて 2 回繰り返した。

**重合反応:** 18-Crown-6 0.02 g ( $7.56 \times 10^{-5}$  mol) 及びオレイン酸カリウム 0.024 g ( $7.56 \times 10^{-5}$  mol) を三方コック及び磁気攪拌子を付した 5 mL ナス型フラスコにはかり取り、フラスコ系内を常温で 4 時間減圧にすることにより十分に乾燥を行った。フラスコ系内を常温でアルゴンにより解圧し、直ちにシリンジにて  $\beta\text{-BL}$  を 3.0 mL (=  $3.66 \times 10^{-2}$  mol, 3.15 g) 加えることにより重合反応を開始させた。重合反応は  $26^\circ\text{C}$  のインキュベーター中



Scheme 3.6: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1)



Scheme 3.7: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2)

において 72 時間行った。重合反応終了後、反応混合物を計 4 mL のクロロホルムに溶解させることにより重合反応を停止させ、あらかじめ用意しておいた磁気攪拌子を付した 200 mL ナス型フラスコ内のメタノール 150 mL 中に徐々に滴下し、再沈殿による精製を行った。収量は 2.31 g (収率 73.3 %) であった。

精製ポリマーの分子構造の確認を <sup>1</sup>H-NMR により行った。<sup>1</sup>H-NMR チャートを Fig. 3.8 に示した。SEC 測定より、分子量は  $\overline{M}_w = 30600$ ,  $\overline{M}_n = 25200$  及び分子量分散は  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$  であった。

また、得られたポリマーのアイソタクチック性の確認を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 義夫教授並びに吉江 尚子助手 (現東京大学 生産技術研究所 物質・生命部門 助教授) のご協力により  $^{13}\text{C}$ -NMR、DDSC 及び DSC を用いた解析により行った。結果を Table 3.3 に示した。

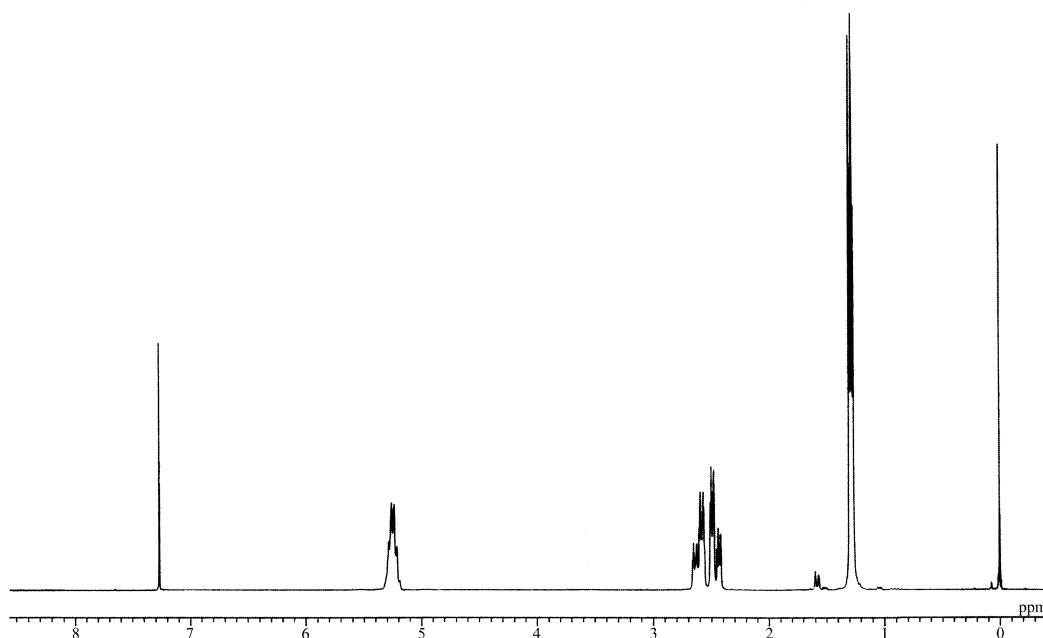


Fig. 3.8:  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL using potassium oleate-18-Crown-6 complex.

$^1\text{H}$ -NMR (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

Table 3.3: Tacticities of the obtained P(3HB) as measured by  $^{13}\text{C}$ -NMR.

Sample	Diad (169 ppm)		Triad (40.8 ppm)			
	( <i>s</i> )	( <i>i</i> )	( <i>si</i> )	( <i>ii</i> )	( <i>ss</i> )	( <i>is</i> )
Syn-P(3HB)	0.60	0.40	0.25	0.15	0.38	0.22
Ata-P(3HB)	0.50	0.50	0.28	0.25	0.24	0.23

*s* : Syndiotactic diad stereosequence

*i* : Isotactic diad stereosequence

*si* : Syndiotactic-Isotactic triad stereosequence

*ii* : Isotactic-Isotactic triad stereosequence

*ss* : Syndiotactic-Syndiotactic triad stereosequence

*is* : Isotactic-Syndiotactic triad stereosequence

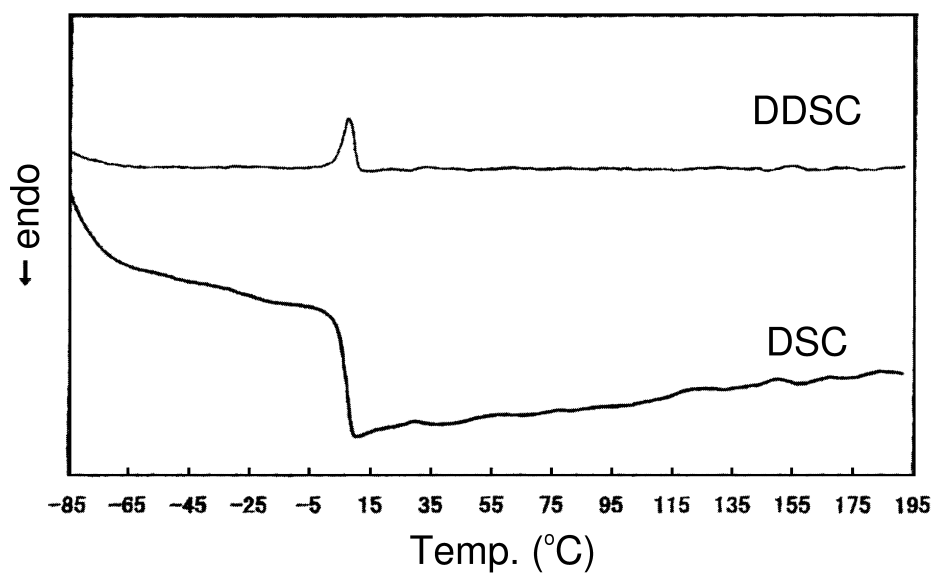


Fig. 3.9: DSC profiles of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of  $\beta$ -BL using potassium oleate-18-Crown-6 complex.

#### (4) P(3HB) の酵素分解

減圧乾燥した 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に P(3HB) 10 mg をはかり取り、ついで、別途用意した豆試験管に所定量の各種酵素をはかり取り、その酵素を先に用意したねじキャップ付き試験管内へ添加した。試験管内混合物に 1 mL の有機溶媒を加え、1% P(3HB) 溶液とした。ついで、試験管内をアルゴン置換した上で密栓し、所定温度の油浴上で所定時間攪拌することにより分解を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL で溶解させ、セライト 545 を 2 g 敷き詰めた桐山ロートで不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去して粗分解物を得た。

分解挙動解析は得られる分解生成物の分子量を SEC を用いて測定することにより行った。また、分解生成物の構造解析は  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS により解析した。

#### (5) 分子量一定の水酸基末端型オリゴマーの調製

減圧乾燥した 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に所定量の CRL をはかり取り、次いで減圧乾燥したマイクロシリンジを用いてモノマーである  $\beta$ -BL を 300  $\mu\text{L}$  (315 mg) 添加した。その後、試験管内に水を 10 mg 添加した上でアルゴン置換して密栓し、所定温度の油浴上で所定時間攪拌することにより重合を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL で溶解させ、セライト 545 を 2 g 敷き詰めた桐山ロートで不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去して粗オリゴ (3HB) を得た。

得られた粗オリゴ (3HB) を SFC を用いて単一分子量に分別することで、4~10 量体の水酸基末端型オリゴマーをそれぞれ調製した。分子構造の確認は  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS により解析した。

#### (6) 分子量一定の環状型オリゴマーの調製

減圧乾燥した 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に P(3HB) 10 mg をはかり取り、ついで、別途用意した豆試験管に所定量の Novozym<sup>®</sup> 435 をはかり取り、先に用意したねじキャップ付き試験管内へ添加した。試験管内混合物にトルエン 2 mL を加えた。ついで、試験管内をアルゴン置換して密栓し、40 °C の油浴上で 24 時間攪拌することにより分解を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL で溶解させ、セライト 545 を 2 g 敷き詰めた桐山ロートで不溶物を濾別した。さらにクロロ



ホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去して環状型オリゴマー混合物を得た。

得られた環状型オリゴマー混合物を SFC を用いて単一分子量に分別することで、7~11 量体の環状型オリゴマーをそれぞれ調製した。分子構造の確認は  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS により解析した。

### (7) 分子量一定の水酸基末端型オリゴマーの環化反応

減圧乾燥した 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に調製したオリゴマー 10 mg をはかり取り、ついで、別途用意した豆試験管に 100 mg のセライト固定化リパーゼ Silica Novozym をはかり取り、先に用意したねじキャップ付き試験管内へ添加した。試験管内混合物にキシレン 4 mL を加えた。ついで、試験管内をアルゴン置換して密栓し、40 °C の油浴上で 24 時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL で溶解させ、セライト 545 を 2 g 敷き詰めた桐山ロートで不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去してオリゴマー混合物を得た。

得られたオリゴマー混合物の分子構造を MALDI-TOF MS により解析し、Córdova らの方法<sup>17)</sup> にしたがってスペクトル積分値から混合物中の組成比を計算した。

### (8) 分子量一定の環状型オリゴマーの酵素反応

減圧乾燥した 6 mm 攪拌子を付したねじキャップ付き試験管 ( $\phi 13 \times 100$  mm) に調製したオリゴマー 10 mg をはかり取り、ついで、別途用意した豆試験管に 100 mg のセライト固定化リパーゼ Silica Novozym をはかり取り、先に用意したねじキャップ付き試験管内へ添加した。試験管内混合物にキシレン 4 mL を加えた。ついで、試験管内をアルゴン置換して密栓し、40 °C の油浴上で 24 時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、反応混合物をクロロホルム 2 mL で溶解させ、セライト 545 を 2 g 敷き詰めた桐山ロートで不溶物を濾別した。さらにクロロホルム (合計 20 mL) で数回洗浄した。次いで、クロロホルムを減圧留去してオリゴマー混合物を得た。

得られたオリゴマー混合物の分子構造を MALDI-TOF MS により解析した。

### 3.3 結果・考察

#### 3.3.1 酵素触媒重合により得られた P(3HB) の酵素分解反応

##### (1) 酵素起源の影響

本分解反応系でも、酵素本来の基質と構造上大きく異なる高分子を基質として用いている。したがって、酵素起源により分解挙動が異なることが推察された。用いる酵素として、エステル交換能及び加水分解能を有し、さらに各種有機溶媒に対する耐性が高いとされているリパーゼを選択した。また、分解反応の酵素スクリーニングに用いる有機溶媒は、当研究室が既に酵素触媒分解反応の溶媒として報告したアセトニトリル-水混合溶媒を用いて行った。酵素スクリーニングの際、酵素固有の活性値等を考慮に入れた適切な濃度を用いる方法もあるが、公開されている活性値は異なる基質を用いて求めたものであり、本検討には適用できなかった。したがって、酵素の有する分解能が容易に確認できるように、各酵素を一定の高酵素濃度 (800 wt.-%) で作用させた。以下に本分解系における各酵素の分解能についてまとめた。分解能の有無はポリマー試料の SEC チャート変化から判断した。

Table 3.4: The screening of enzyme for the lipase-catalyzed degradation of poly(3-hydroxybutanoate) <sup>a)</sup>.

Entry	Enzyme	Degradation
1	Novozym <sup>®</sup> 435	YES
2	Lipozyme <sup>®</sup> RM IM	Slightly
3	AK	Slightly
4	CRL	NO
5	PPL	NO
6	PS	NO

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) acetonitrile-water solution was stirred with 800 wt.-% lipase at 60 °C for 24 h.

スクリーニングの結果、酵素触媒重合により得られた P(3HB) を有機溶媒中で効果的に分解する酵素は Novozym<sup>®</sup> 435 であることが明らかとなった。また、 $\beta$ -BL の開環重合に適した触媒能を有する酵素と、それにより得られたポリマーを分解するのに適した触媒能を有する酵素は異なることが明らかとなった。これは、モノマーとポリマーとの間の構造

的相違が大きいためと考えられる。

今回の検討から、CRL、PPL 及び PS は本分解系に適していないことが明らかとなった。しかしながら、これらの酵素は緩衝溶液中といった他の分解系で分解活性を示す可能性があるため、本検討結果のみではこれらの酵素が P(3HB) 構造を認識しないとは判断できない。すなわち、CRL 及び PPL は  $\beta$ -BL の開環重合を非常によく触媒し、重合反応の過程においてポリマー鎖を認識して環状体を生成物をして与えていることが示されている。このことは CRL や PPL が P(3HB) 構造を認識することを意味する。

極性が高く、水とよく混和する性質を有するアセトニトリル中では酵素が活性を失いやすい。Novozym<sup>®</sup> 435 は、このような反応系でも高い活性を保持しており、特異的な酵素であると考えられる。同じ固定化酵素である Lipozyme<sup>®</sup> RM IM の分解活性は若干であったことから、固定化の作用のみが分解活性に影響を与えたとは考えられない。同様の結果が当研究室で他の脂肪族系ポリマーを用いた解析の際にも確認されており、P(3HB) を用いた際のみ確認される特異的なものではなかった。したがって、Novozym<sup>®</sup> 435 が本分解反応系に対する優れた耐性を有していると考えられる。

## (2) 分解に用いる有機溶媒の影響

近年、酵素の様々な有機溶媒中における触媒活性に関して多数報告され、ある種の有機溶媒中では活性維持が困難であることも明らかにされている。例えば、水との親和性が高い有機溶媒中では酵素反応に必要な水分が有機溶媒に抽出されるため、酵素活性が維持できずに失活することが知られている。そこで、ここでは酵素活性が有機溶媒に影響を受けて増減することを考慮に入れ、十分な酵素活性が保たれると考えられる高酵素濃度を用いて、トルエン、ジイソプロピルエーテル及びアセトニトリルの3種類の溶媒中で分解反応を検討した。また、本項では有機溶媒が本分解系に与える影響を、先の検討で分解能を有することが確認された Novozym<sup>®</sup> 435 を触媒に用いて検討した。

結果を Table 3.5 及び Fig. 3.10~3.12 に示した。また、得られた分解生成物の MALDI-TOF MS チャートを Fig. 3.13 及び 3.14 に示した。

Table 3.5: The effects of organic solvents on the lipase-catalyzed degradation of poly(3-hydroxybutanoate) <sup>a)</sup>.

Entry	Time (h)	Organic solvent	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	12	toluene	420	1820
2	24	toluene	400	1860
3	36	toluene	380	1560
4	48	toluene	360	1900
5	72	toluene	360	1880
6	12	diisopropyl ether	410	2200
7	24	diisopropyl ether	360	1940
8	36	diisopropyl ether	350	1860
9	48	diisopropyl ether	340	1980
10	72	diisopropyl ether	360	2040
11	12	acetonitrile	980	2790
12	24	acetonitrile	760	2400
13	36	acetonitrile	730	2330
14	48	acetonitrile	630	2190
15	72	acetonitrile	700	2420

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 2870$ ,  $\overline{M}_n = 1420$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.02$

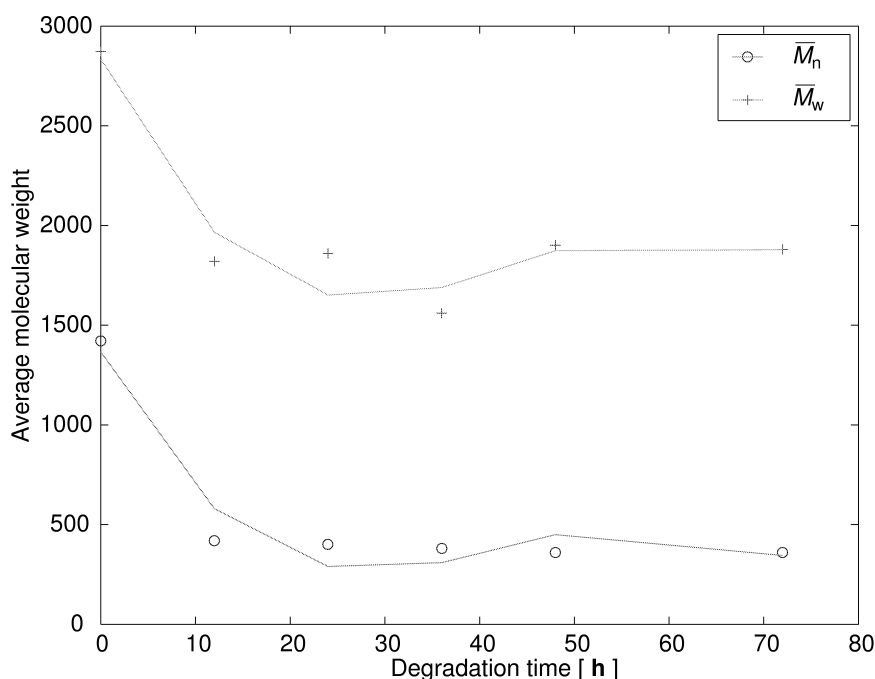


Fig. 3.10: The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in toluene solution <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

Fig. 3.10～3.12 より、基質と分解生成物の混合物の有する分子量から判断すると、分解速度としては

トルエン溶液 ≧ ジイソプロピルエーテル溶液 > アセトニトリル溶液

の順番であった。

各溶媒の疎水性は大きく異なり、溶媒中における水の状態が異なる。特にアセトニトリルは親水性が高く、溶媒中の水分は混和という形態を形成する。それに対してトルエンは疎水性が非常に高いため水分はほとんど溶媒中に存在しない。ジイソプロピルエーテルは両者の中間程度の疎水性であるといえる。

この順番は溶媒の疎水性の強さに相当していることから、酵素活性の発現に溶媒の疎水性が大きく関与していることが示された。高い分子量のポリマーを基質に用いる時には溶媒の高分子材料に対する溶解性が分解挙動に影響を与える可能性があるが、本検討では用いたポリマーの分子量がさほど高くないことから、肉眼で観察する限り、全ての溶媒系でポリマー試料は完全に溶解していた。

得られた各分解生成物の構造を MALDI-TOF MS と <sup>1</sup>H-NMR を用いて解析したところ、分解生成物の末端構造が用いる有機溶媒の影響を大きく受けることが明らかになった。3 種各分解生成物の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 3.13 に示した。

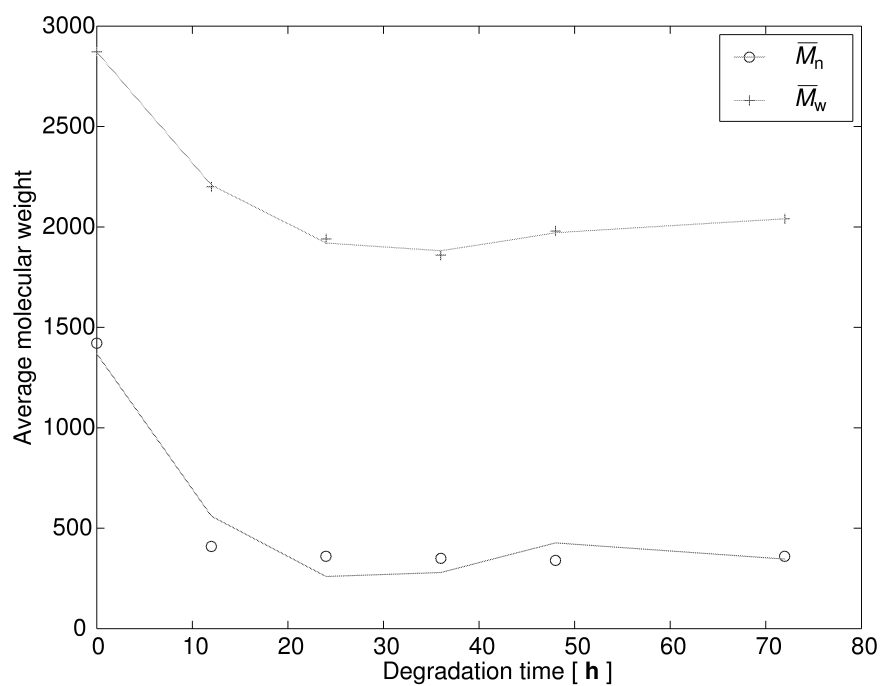


Fig. 3.11: The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in diisopropyl ether solution <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 1 % P(3HB) diisopropyl ether solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

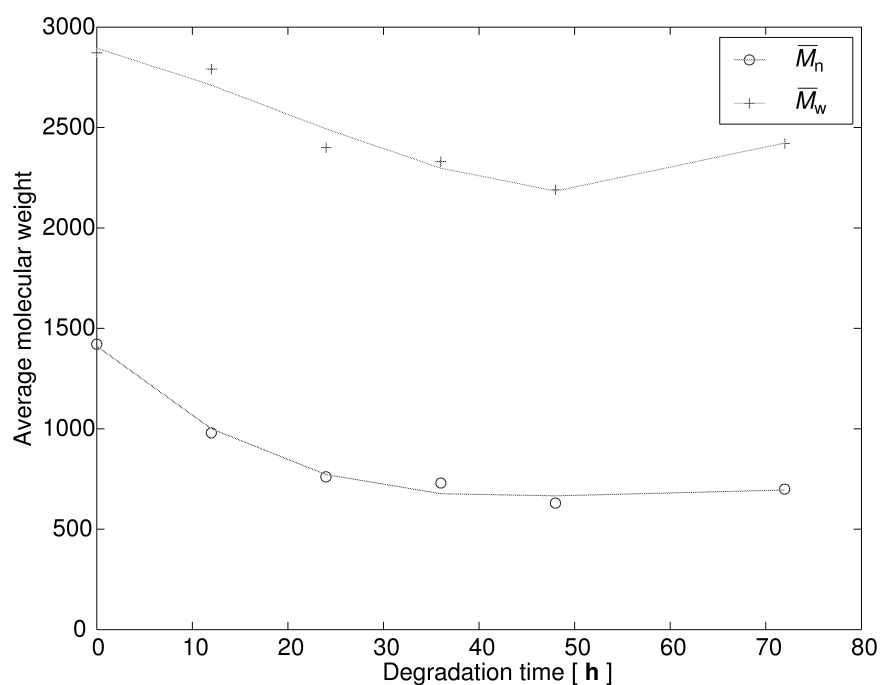


Fig. 3.12: The lipase-catalyzed degradation of P(3HB) in acetonitrile solution <sup>c)</sup>.

<sup>c)</sup> 1 % P(3HB) acetonitrile solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

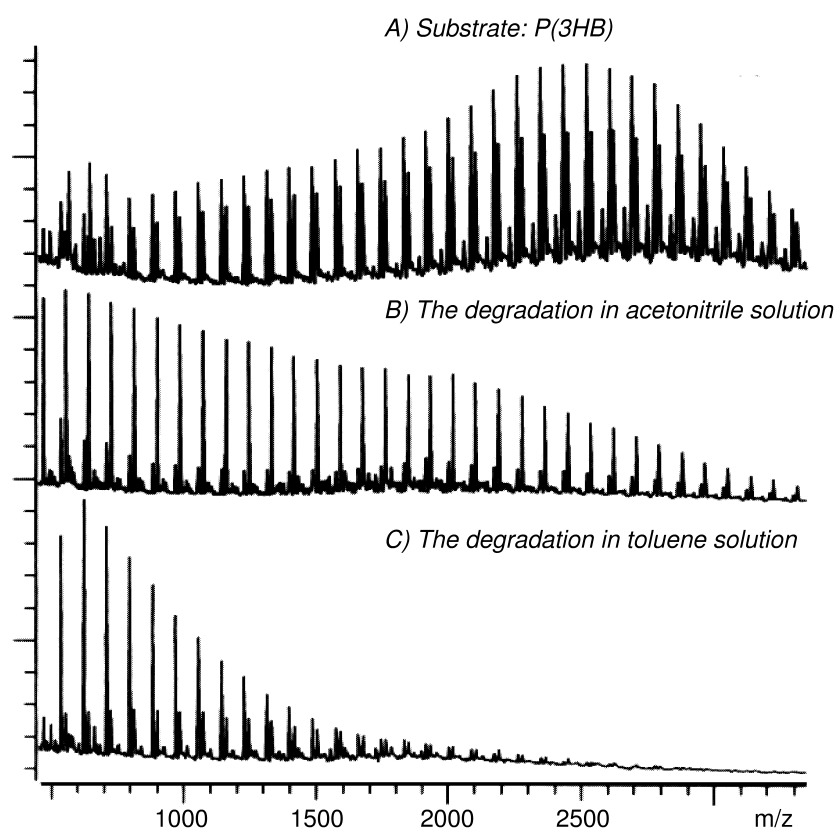


Fig. 3.13: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products in various organic solvents.

Fig. 3.13で、A)は基質として用いたP(3HB)のスペクトル、B)はアセトニトリルを溶媒に用いた分解により得られた分解生成物のスペクトル、C)はトルエンを溶媒に用いた分解により得られた分解生成物のスペクトルを示している。B)とC)をスペクトルを詳しく解析すると、規則正しく現れている一組のスペクトルの中で、スペクトル比が異なっていることが明らかとなった。詳細な解析を行うための拡大図をFig. 3.14に示した。

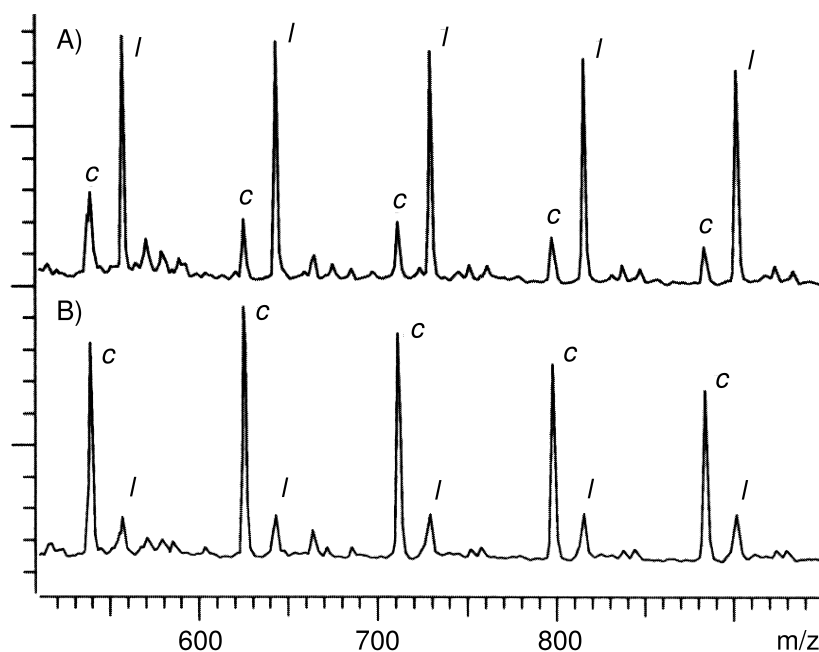
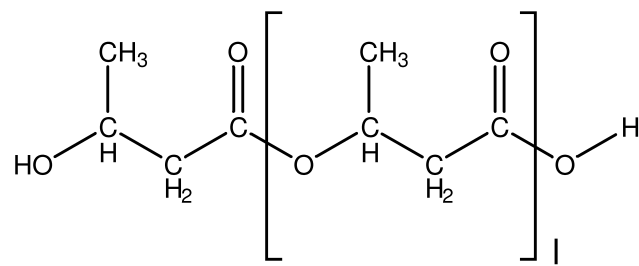


Fig. 3.14: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products in several solvents.

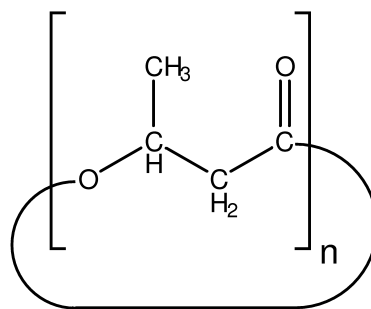
Fig. 3.14 で、A) はアセトニトリルを溶媒に用いた分解により得られた分解生成物のスペクトル、B) はトルエンを溶媒に用いた分解により得られた分解生成物のスペクトルを示している。また、脇に *c* とマークしているピークは分子量的に Fig. 3.15 に示した構造体内、b) 及び c) に由来するピークであり、*l* とマークしているピークは分子量的に Fig. 3.15 中の a) に由来するピークである。したがって、分解反応に用いる溶媒の疎水性は酵素活性の発現に大きく関与しているだけでなく、得られる分解生成物の分子構造にも大きな影響を与えていることが示された。また、分解反応に親水性溶媒を用いると分解生成物として水酸基末端型が優先して得られ、疎水性溶媒を用いると環状型もしくはクロトネート型が優先して得られることが明らかとなった。このように用いる有機溶媒の種類によって分解生成物の分子構造が変化する理由については酵素触媒分解の反応機構についてに記す。

以上の結果より、分解反応に用いる溶媒の選択により、得られる分解生成物の構造を制御できることが明らかとなった。また、分解生成物は環状である方が再重合に好ましいと判断し、以降の検討は特別な場合を除いてトルエンを有機溶媒として用いた。

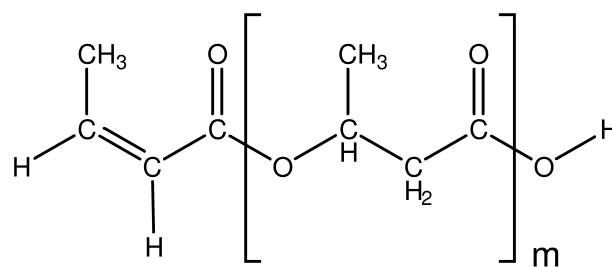




a) Hydroxy-type



b) Cyclic-type



c) Crotonate-type

Fig. 3.15: Oligomer structures of the lipase-catalyzed degradation products.

## (3) 分解における酵素濃度の影響

本項では、一定温度及び一定時間の分解反応において酵素濃度が分解挙動に与える影響を検討した。

結果を Table 3.6 にまとめ、分解時間別のグラフを Fig. 3.16~3.18 に示した。

Table 3.6: The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt%)	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	100	24	940	2960
2	150	24	680	2110
3	200	24	510	1730
4	250	24	490	1640
5	300	24	440	1490
6	500	24	470	1660
7	800	24	470	1730
8	1000	24	480	1890
9	100	48	630	2360
10	300	48	410	1300
11	500	48	400	1500
12	800	48	420	1660
13	1000	48	420	1840
14	100	96	450	1730
15	300	96	340	1160
16	500	96	350	1350
17	800	96	350	1640
18	1000	96	370	1870

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 4410$ ,  $\overline{M}_n = 2020$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.19$

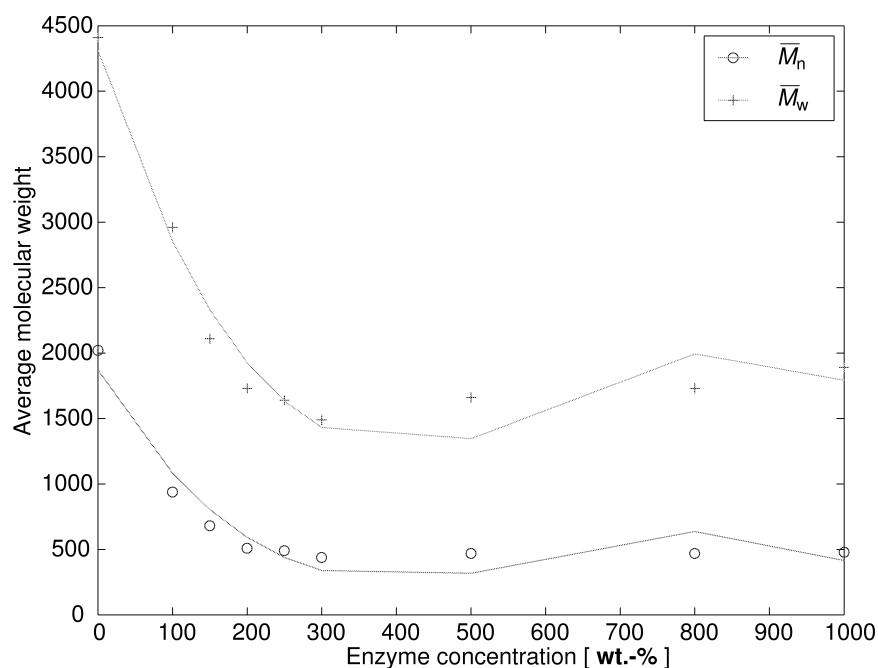


Fig. 3.16: The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (1) <sup>a)</sup>  
<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 24 h.

Fig. 3.16~3.18 より、酵素濃度は P(3HB) の酵素触媒分解反応に対して影響を与えることが明らかになった。また、分解反応時間によらず 300 wt.-% の酵素を用いた時に最も分解反応が進行し、得られる分解生成物の平均分子量が検討した中で最も小さくなった。300 wt.-% 以上の酵素濃度で分解させた時には、分解生成物の分子量は若干ながら上昇した。

分解反応系の場合、触媒濃度は十分な反応時間の後に得られる生成物の分子量に影響を与えないと考えられる。すなわち、分解反応は重合反応と異なり、触媒濃度は分解速度のみを制御しているため、低酵素濃度でも分解反応時間を十分に長く設定すれば分解生成物の分子量は平衡値まで減少すると考えられる。本分解系では、低酵素濃度では反応時間に応じて分解生成物の分子量が低下した。それに対して高酵素濃度では分解生成物の分子量が反応時間に応じた低下を示さなかった。このことは反応系が平衡に達していることを表し、分解反応速度が低下していないことを示している。したがって、本分解系で観測された高酵素濃度での若干の分解活性低下は、P(3HB) 分解酵素の場合とは異なる理由によるものと考えられる。

ところで、本分解反応で用いた Novozym<sup>®</sup> 435 はアクリル樹脂に固定化された酵素であるため、酵素の重量濃度中には担体の重量も含まれている。また、分解生成物の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルに若干ではあるが、帰属不可能なピークが含まれている。これらのピークは Novozym<sup>®</sup> 435 を疎水性溶媒で洗浄した時に抽出される物質の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルと重

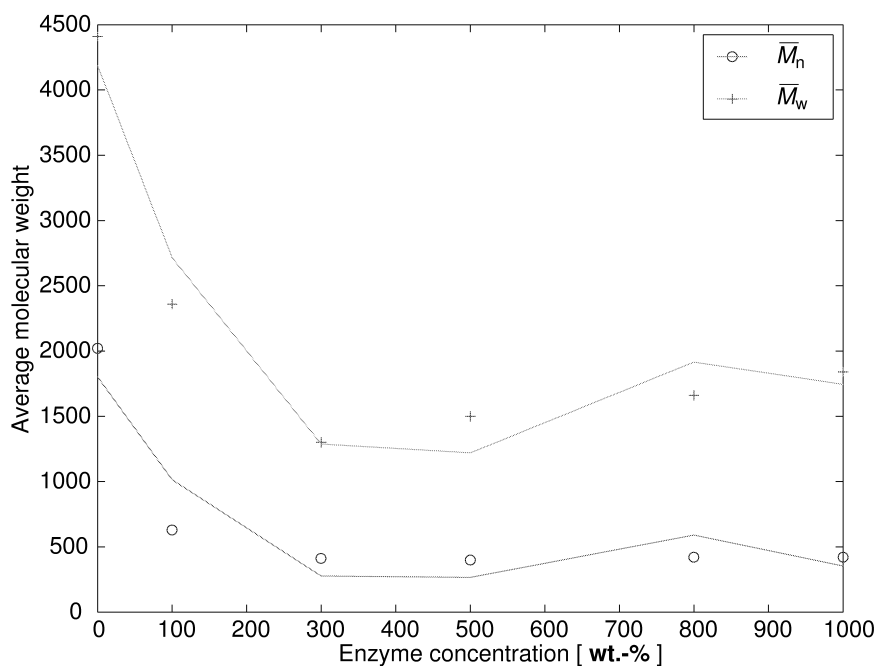


Fig. 3.17: The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (2) <sup>b)</sup>  
<sup>b)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 48 h.

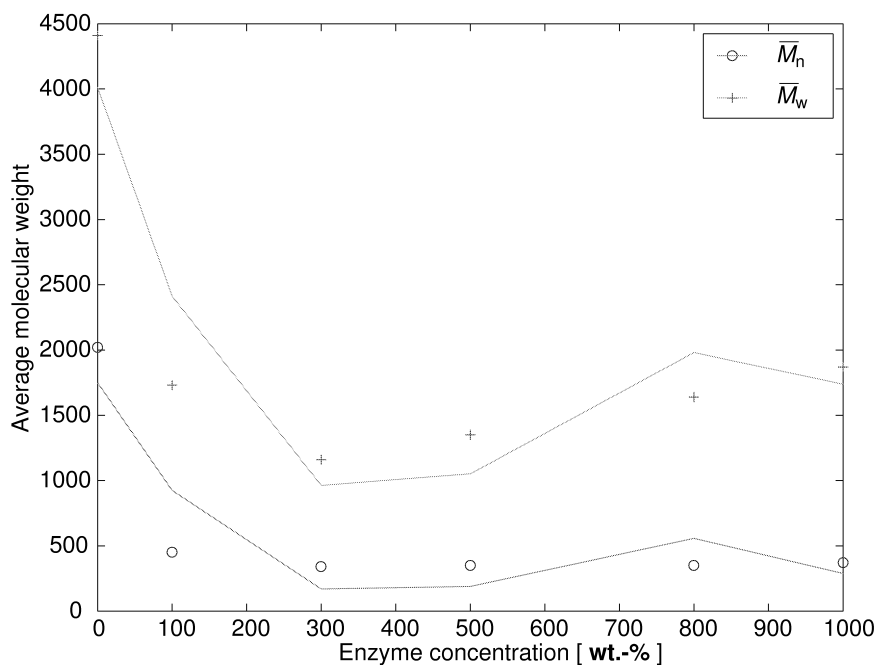


Fig. 3.18: The effects of enzyme concentration on the degradation of P(3HB): (3) <sup>c)</sup>  
<sup>c)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 96 h.

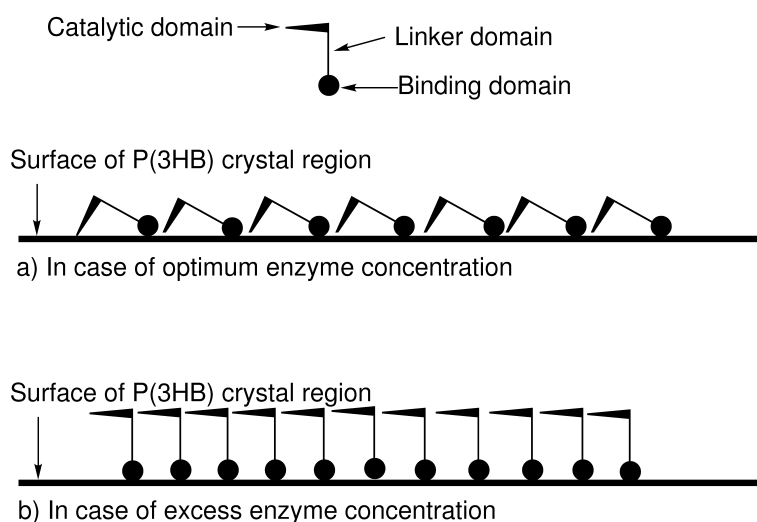


Fig. 3.19: Proposed mechanisms of the P(3HB) depolymerase-catalyzed degradation of P(3HB) polymer chain.

なる。この物質は Novozym<sup>®</sup> 435 中に含まれる固定化剤や安定化剤と考えられ、分解生成物中にも含まれていることから、高酵素濃度で観測された若干の分解生成物分子量の増加は Novozym<sup>®</sup> 435 の固定化剤が SEC 測定の際に悪影響を及ぼしたと考えることができる。

確かに、本検討と同様に酵素濃度が最適濃度を超過した際に分解活性が低下する例は P(3HB) デポリメラーゼの研究結果で土肥らにより報告されている。土肥らは最適酵素濃度よりも高い酵素濃度において活性が減少する要因として酵素が基質吸着領域及びリンカー領域を有しているためと考察し、酵素のアミノ酸一次配列解析及びその他多くの検討より基質吸着領域及びリンカー領域の存在を明らかにした。基質吸着領域とリンカー領域のために過剰な酵素濃度で分解活性が減少するのは Fig. 3.19 に示すような状態になるためである。すなわち、酵素本体に触媒領域と基質吸着領域を有していれば、酵素濃度の上昇に伴って分解活性も上昇し、酵素濃度が全基質に吸着する濃度に達すると分解活性は上昇しなくなるが、その際に減少傾向に転じることは考えられない。一方、P(3HB) デポリメラーゼは基質吸着領域と触媒領域がフレキシブルなリンカー領域で結合されている。そのため、過剰な酵素濃度は基質吸着領域の基質に対する過剰な吸着を生じ、触媒領域が基質に接近することができない。その結果、分解活性が減少すると考えられている。

しかし、本分解反応で用いた酵素は基質吸着領域及びリンカー領域を有していないことが、高次構造解析の結果明らかとなっている<sup>157)</sup>。したがって、高酵素濃度で観測された若干の分解生成物分子量の増加は Novozym<sup>®</sup> 435 の固定化剤が SEC 測定の際に悪影響を及ぼしたと考えた。

## (4) 分解における反応時間の影響

本項では先の検討で最適酵素濃度として導かれた 300 wt.-% の Novozym<sup>®</sup> 435 を用いて分解生成物分子量と分解生成物構造体比の経時変化を検討した。構造体の組成比は方法項に記したように Córdova らの方法に従い、MALDI-TOF MS 測定により求めた。なお、一組のスペクトル中、18 m/z 小さいスペクトルは環状型として計算した。

結果を Table 3.7 及び Fig. 3.20, 3.21 に示した。

Table 3.7: Time course of the lipase-catalyzed degradation of P(3HB)<sup>a)</sup>.

Entry	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	OH : Cy <sup>b)</sup>
1	6	520	1690	43.6 : 56.4
2	14	420	1280	29.0 : 71.0
3	18	410	1280	32.4 : 67.6
4	24	390	1130	28.0 : 72.0
5	36	350	870	22.9 : 77.1
6	48	330	880	31.4 : 68.6

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 2870$ ,  $\overline{M}_n = 1420$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.02$

<sup>b)</sup> **OH**: Hydroxy type, **Cy**: Cyclic type

Fig. 3.7 より、本分解反応は比較的速い速度で進行することが明らかとなった。分解生成物の数平均分子量は分解反応開始後、12 時間程度で一定値に達した。また、重量平均分子量も分解反応開始後、36 時間程度で一定値に達した。以上のことから、酵素触媒分解反応は酵素触媒重合の場合と比べて最適な反応時間が短いことが明らかとなった。これは分解反応では最適酵素濃度が高いことと、反応が酵素触媒による順反応で進行したためと考えられる。

これは、基質であるポリマーの全体的な低分子量化ではなく、この挙動のために、分解反応直後に数平均分子量は極端な低下を引き起こし、後から重量平均分子量が平衡値に達したと考えられる。

高分子材料の分解反応挙動として、分子鎖の末端から切断されるものとランダムに切断されるものが挙げられる。分子鎖の末端から切断されると、ポリマー鎖全体が末端から徐々に短くなるために、経時に伴ってポリマー全体が徐々に低分子量化する。したがって、重量平均分子量と数平均分子量の低下挙動は似たものとなる。それに対して、ポリマー鎖

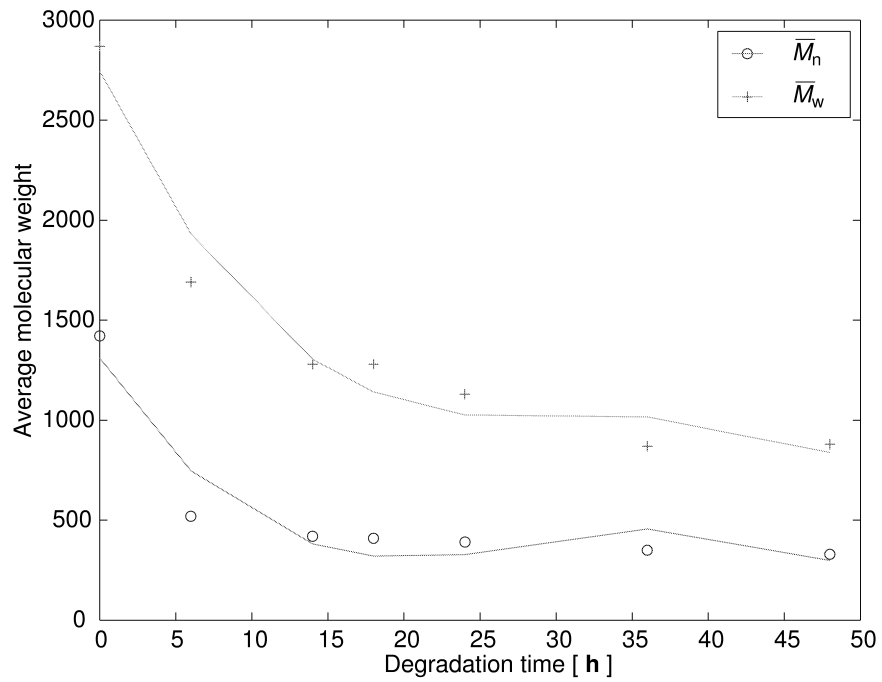


Fig. 3.20: Time course of molecular weights of the degradation products <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

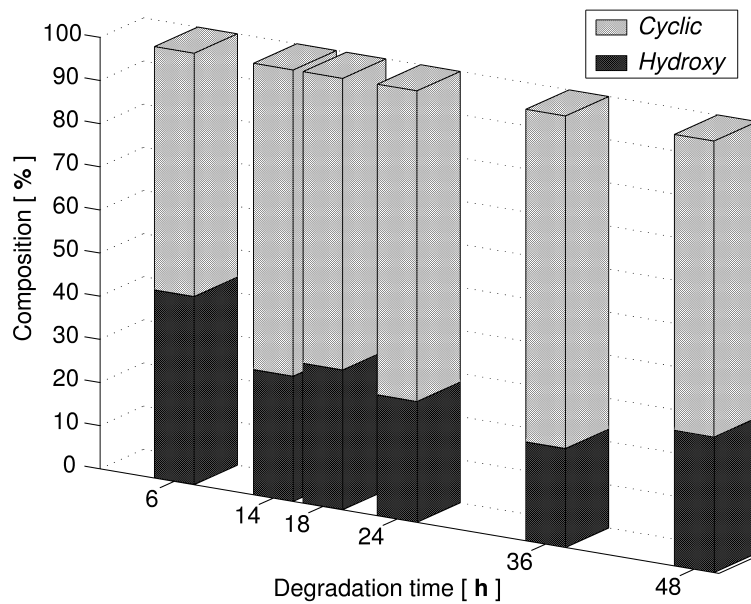


Fig. 3.21: Time course of structural composition of the degradation products <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C.

がランダムに切断されて低分子量化された場合、系内に様々な分子量を有する分解生成物が存在するために、重量平均分子量と数平均分子量に大きな隔たりが生じる。

結果より、経時変化における数平均分子量の低下挙動と重量平均分子量の低下挙動は異なることが明らかとなった。したがって、本分解系では酵素が P(3HB) 鎖をランダムに切断したと考えられる。しかし、経時に伴う一定分子量への収束が確認されたことから、完全な無秩序な分解ではなく、一定分子量のオリゴマー化反応が存在すると考えられた。

Fig. 3.21 で環状型としている比率の中にはクロトネート型が含まれている。しかし、前章の考察より、クロトネート型は酵素活性化モノマーに対する水の求核攻撃により生成すると考えられた。したがって、本分解反応ではクロトネート型は生成せず、グラフにおける環状型組成比の上昇は分解生成物中の環状型の組成比上昇を示すと考えられる。反応機構に関しては**酵素触媒分解反応機構**についてに詳細を記した。



## (5) 分解におけるポリマー濃度の影響

本分解反応は有機溶媒にポリマーを溶解させて行っているため、ポリマー濃度の影響を検討する必要がある。このポリマー濃度は有機化学反応においては基質濃度に相当する。一般に、分子間距離が長い方が反応系にとって有利となる分子内反応においては基質濃度を下げて反応を行い、逆に分子間距離が短い方が有利となる分子間反応では基質濃度を高くして反応を行う。そこで、本分解反応系の反応機構を推定するため、ポリマー濃度が分解反応に与える影響について検討を行った。また、本検討でも構造体の組成比は方法項に記したように Córdova らの方法に従い、MALDI-TOF MS 測定により求めた。なお、一組のスペクトル中、18 m/z 小さいスペクトルは環状型として計算した。

結果を Table 3.8 及び Fig. 3.22, 3.23 に示した。

Table 3.8: The effects of polymer concentration on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	OH : Cy <sup>b)</sup>
1	10	550	1710	63.5 : 36.5
2	2	390	1190	29.0 : 71.0
3	1	390	1150	32.4 : 67.6
4	0.5	380	1110	28.0 : 72.0
5	0.25	360	950	22.9 : 77.1

<sup>a)</sup> Toluene solution of P(3HB) was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 24 h. Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 2870$ ,  $\overline{M}_n = 1420$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.02$

<sup>b)</sup> **OH**: Hydroxy type, **Cy**: Cyclic type

Fig. 3.22 より、分解生成物の数平均分子量はさほどポリマー濃度の影響を受けなく、重量平均分子量はポリマー濃度の影響を著しく受けることが明らかになった。この結果より、本分解反応系は希釈条件下で良好に進行することが明らかとなった。

また、Fig. 3.23 より、ポリマー濃度の低下に伴って環状型の組成比が上昇することが明らかになった。この結果より、環状型の分解生成物を与える反応は分子内反応にて進行していることが示された。先の検討より明らかになった「環状型分解生成物の組成比が経時的に上昇する」現象と、本検討結果より、本分解反応は分子内反応にて環状型生成物を与えながら進行しているために、希釈条件下にて良好に分解して高い環状体組成比を与えた

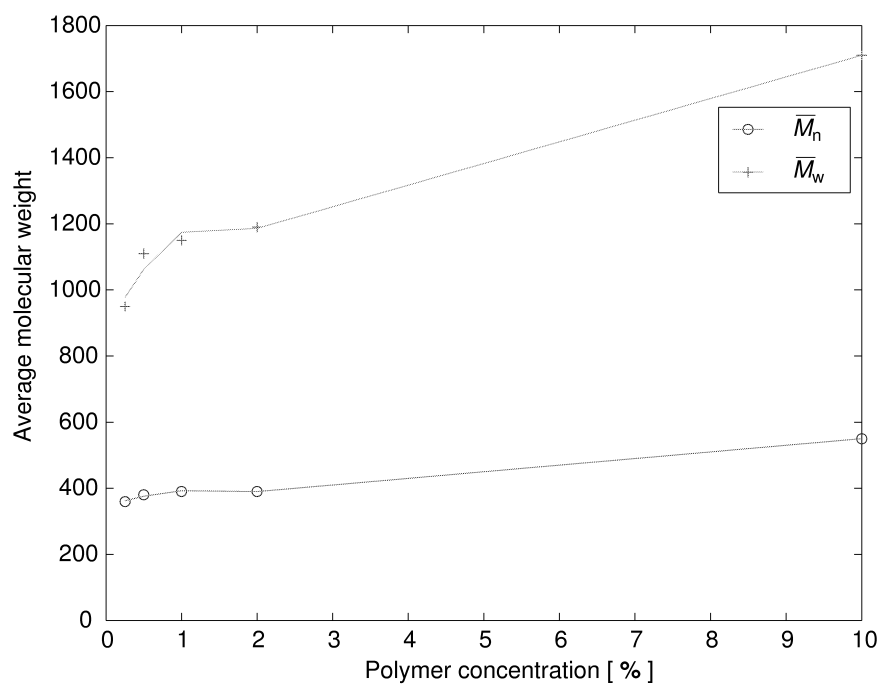


Fig. 3.22: The effects of polymer concentration on the degradation of P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> Toluene solution of P(3HB) was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 24 h.

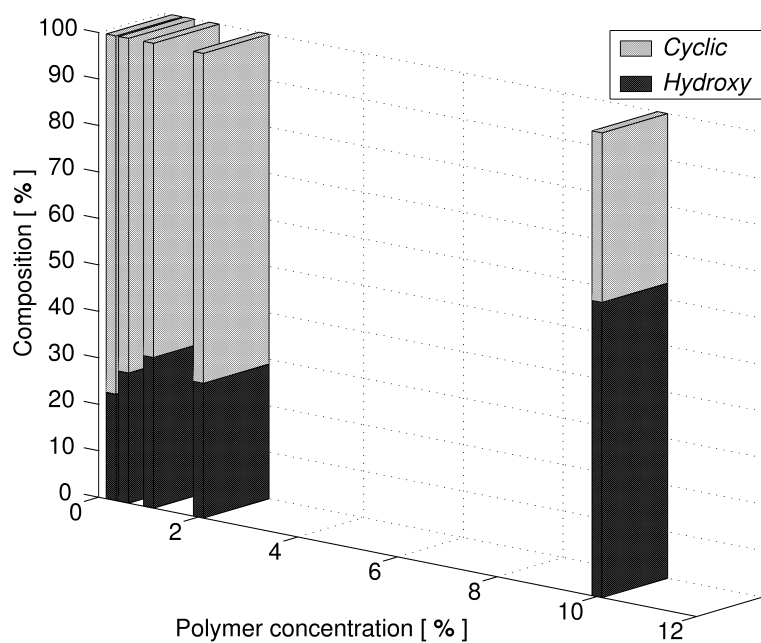


Fig. 3.23: The effects of polymer concentration on the degradation products structure <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> Toluene solution of P(3HB) was stirred with 300 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 24 h.

と考えられる。

また、ポリマー濃度が反応系に与える影響として、有機溶媒中におけるポリマー鎖の広がりと考えられる。一般に、ポリマーを有機溶媒で希釈していくとポリマー鎖は高次構造的に広がる。本検討で用いた Novozym<sup>®</sup> 435 は活性セリン残基を活性部位の最奥に有する<sup>157)</sup>。すなわち、アシル酵素中間体を形成するために基質は活性部位内深くに入りこむ必要がある。したがって、基質であるポリマー鎖は柔軟さを有しないと活性セリン残基に接近できなく、ポリマー鎖が高次構造的に広がれば柔軟さも上昇して活性セリン残基に接近できると考えられる。また、希釈効果により得られる分解生成物の構造体組成比が変化したが、その際にアシル酵素中間体のアシル鎖が溶媒の影響を受けて高次構造を変化させたこと可能性も考えられる。しかしながら、本検討では有機溶媒中における酵素触媒分解の反応機構解析を目的としており、今までの検討で矛盾点がないことからこれ以上の考察は行わなかった。

## (6) 分解における反応温度の影響

酵素を有機反応の触媒に用いる利点の一つに至適温度が従来の化学触媒と比較して大幅に低いことがある。反応温度の低下は低エネルギー化につながるために環境対策にもなる。そこで、低エネルギーによる分解反応系構築の可能性と、高い反応温度での酵素の熱失活に関する知見を得るため、反応温度に関して詳細に検討を行った。

結果を Table 3.9 及び Fig. 3.24~3.27 に示した。

Table 3.9: The effects of temperature on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	100	50	24	540	1580
2	300	50	24	400	1170
3	500	50	24	400	1330
4	800	50	24	420	1600
5	100	60	24	580	1770
6	300	60	24	390	1140
7	500	60	24	380	1240
8	800	60	24	370	1420
9	100	70	12	610	1850
10	300	70	12	400	1290
11	500	70	12	380	1410
12	800	70	12	360	1430
13	100	70	24	480	1510
14	300	70	24	350	1130
15	500	70	24	360	1350
16	800	70	24	360	1720
17	100	70	48	310	620
18	300	70	48	300	1060
19	500	70	48	310	1090
20	800	70	48	300	1390

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt%)	Temp. (°C)	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
21	100	90	24	740	2120
22	300	90	24	380	1220
23	500	90	24	330	1070
24	800	90	24	330	1440

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 2870$ ,  $\overline{M}_n = 1420$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.02$

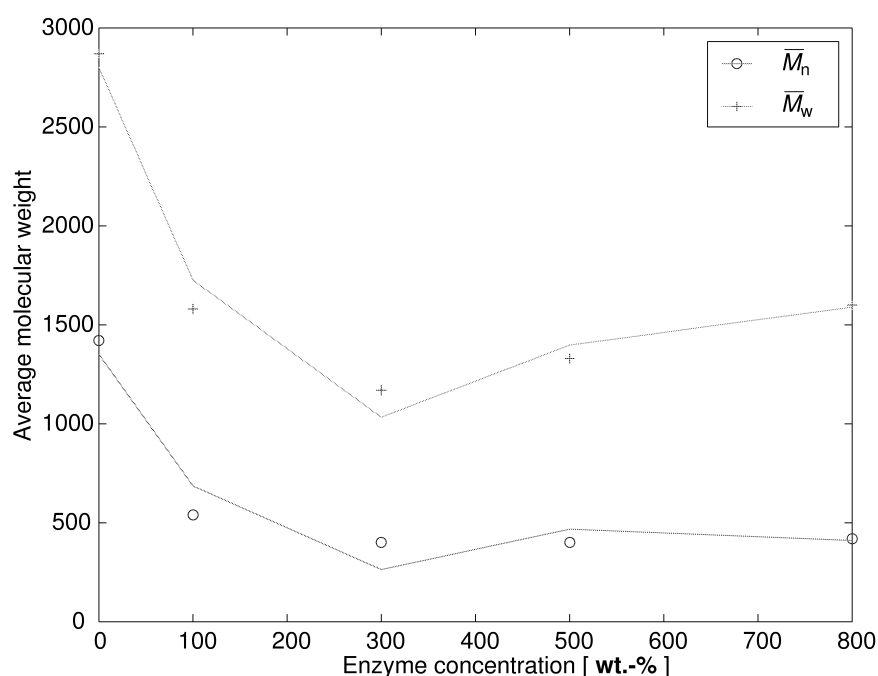


Fig. 3.24: The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (1) <sup>b)</sup>

<sup>b)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 50 °C for 24 h.

Fig. 3.24~3.27 より、50~70 °Cの間では酵素濃度に対する分解挙動に差異はなく、いずれも分解生成物の平均分子量を最も低下させた最適酵素濃度は 300 wt.-%であった。それに対して分解温度を 90 °Cにした時には最適酵素濃度が 500 wt.-%へと高濃度側へ移行した。高い反応温度で高酵素濃度が必要になったのは高い反応温度のために酵素が熱失活し、より多くの酵素が分解活性の維持に必要であったと考えられる。

反応温度を 70 °Cまでの範囲では、最適酵素濃度において同一反応時間では反応温度が高い方が得られる分解生成物の分子量は低下した。これは反応系に与えられたエネルギー

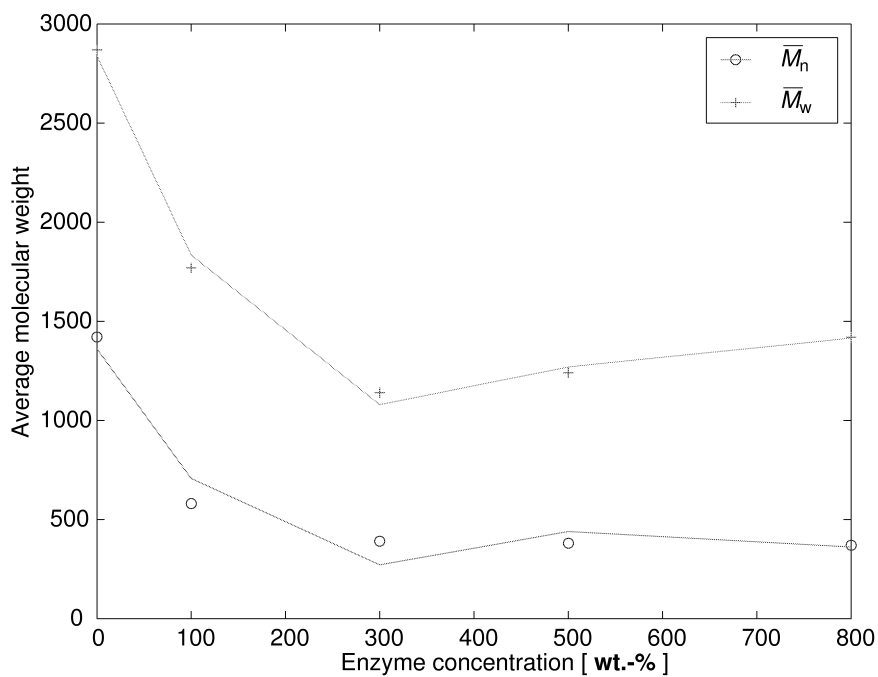


Fig. 3.25: The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (2) <sup>c)</sup>  
<sup>c)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 60 °C for 24 h.

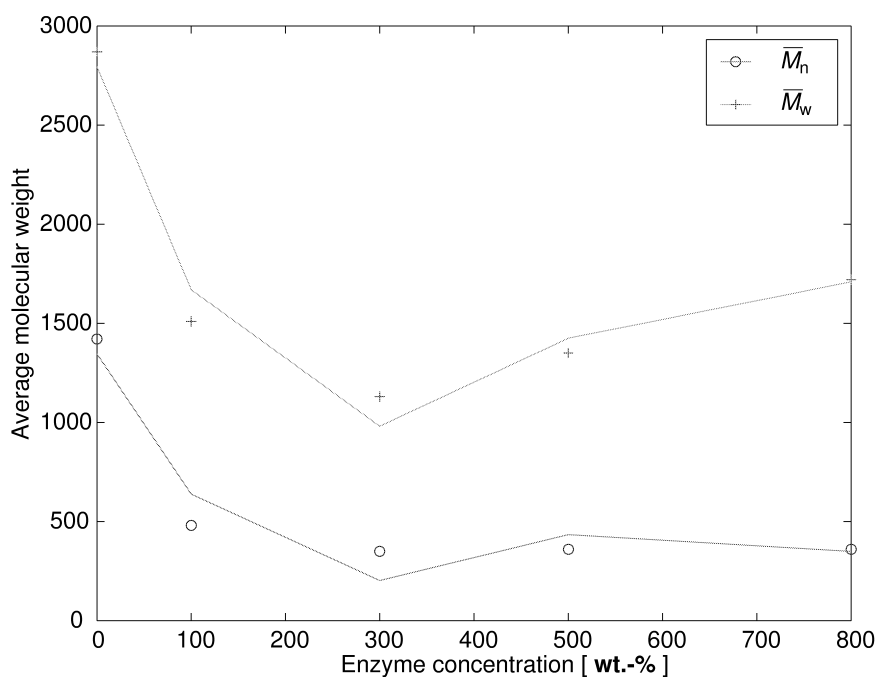


Fig. 3.26: The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (3) <sup>d)</sup>  
<sup>d)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 70 °C for 24 h.

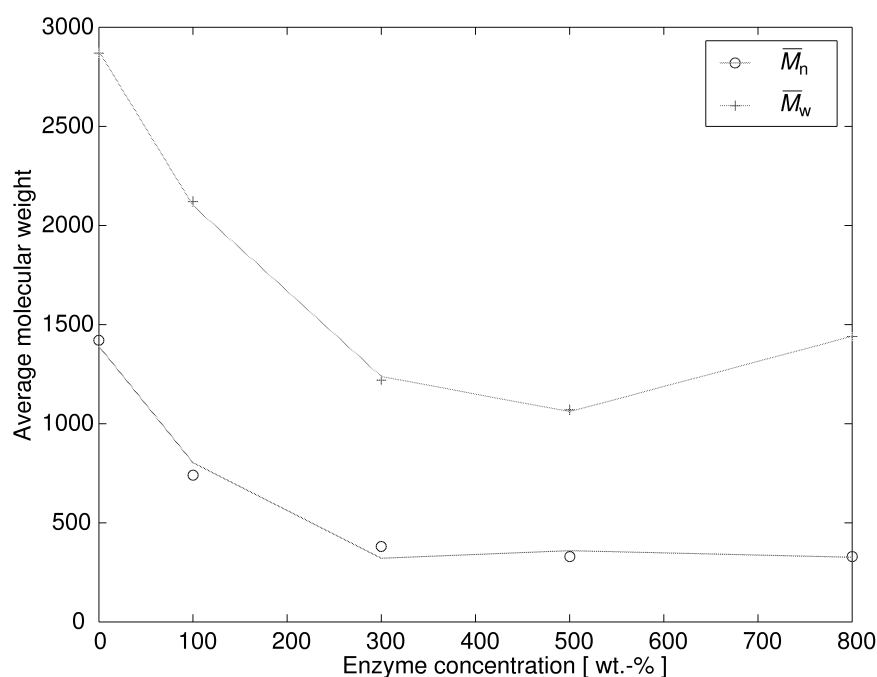


Fig. 3.27: The effects of reaction temperature on the degradation of P(3HB): (4) <sup>e)</sup>  
<sup>e)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 90 °C for 24 h.

が大きかったために反応速度が速くなった結果だと考えられる。酵素触媒重合に要求された高い反応温度が分解反応に必要とされなかったのは、分解反応が酵素活性の順反応に近い形で進行するためと考えられる。

また、先に記したようにリパーゼは通常リッドを活性部位の反応系側に有しており、活性に大きく関与していることが知られている。重合反応では、このリッドが開いた高次構造をとるために高い反応温度が要求されたと考察した。しかしながら、Novozym<sup>®</sup> 435は *Candida antarctica* という微生物由来のリパーゼを固定化したものではなく、*Candida antarctica* 内のリパーゼ発現をコードする DNA 領域を *Aspergillus oryzae* に組み込んで大量発現させて得られたリパーゼをアクリル樹脂に固定化したものである。Novozym<sup>®</sup> 435は Lipase B として詳細に研究され、X 線を用いた結晶構造解析により活性部位周辺の構造が明らかになっている。その結果、Lipase B はリッドを有しておらず、他のリパーゼと異なり、活性セリン残基は活性部位の最奥に存在することが明らかになっている<sup>157)</sup>。したがって、活性を示すためにリッドが開く必要がなく、常温付近の温度で反応系に対して十分なエネルギーが与えられたと考えられる。

本検討の結果、50 °C程度の温和な反応温度で十分に分解反応は進行し、低エネルギー型のポリマー分解が可能であることが明らかとなった。

## (7) ポリマー試料の分子量が分解に及ぼす影響

先の検討では、分解生成物の分子量と基質に用いたポリマー試料の分子量が一部重なったために、分解反応機構の解析が困難であった。そこで、本項では分解生成物の分子量領域を含まない精製ポリマーを基質に用いた分解反応を行うことで、分解挙動の再確認を行った。また、ポリマー試料の分子量が本分解反応に与える影響を調べることで本分解反応系の一般性を検討した。精製方法の詳細は方法項に記した。また、反応温度の検討から更なる低温化が可能であると示唆されたので、酵素本来の至適温度に近い 40 °C で分解反応を試みた。

結果を Table 3.10 及び Fig. 3.28~3.33 に示した。

Table 3.10: The effects of the initial molecular weight on the lipase-catalyzed degradation of P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Polymer conc. (%)	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	50	1	24	1070	2910
2	100	1	24	560	1990
3	300	1	24	470	2260
4	500	1	24	520	3160
5	50	1	48	720	2260
6	100	1	48	470	1450
7	300	1	48	440	1430
8	500	1	48	470	2250
9	50	1	72	650	2130
10	100	1	72	460	1480
11	300	1	72	420	1680
12	500	1	72	480	2840
13	50	0.5	24	1120	2950
14	100	0.5	24	660	2760
15	300	0.5	24	480	2230
16	500	0.5	24	500	3160
17	50	0.5	48	890	2880
18	100	0.5	48	610	1920

*continues to next page*



continues from previous page

Entry	Enz. conc. (wt.-%)	Polymer conc. (%)	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
19	300	0.5	48	450	2120
20	500	0.5	48	480	2580
21	50	0.5	72	670	2590
22	100	0.5	72	510	1650
23	300	0.5	72	390	990
24	500	0.5	72	400	980

<sup>a)</sup> Toluene solution of P(3HB) was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 4740$ ,  $\overline{M}_n = 2660$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.78$

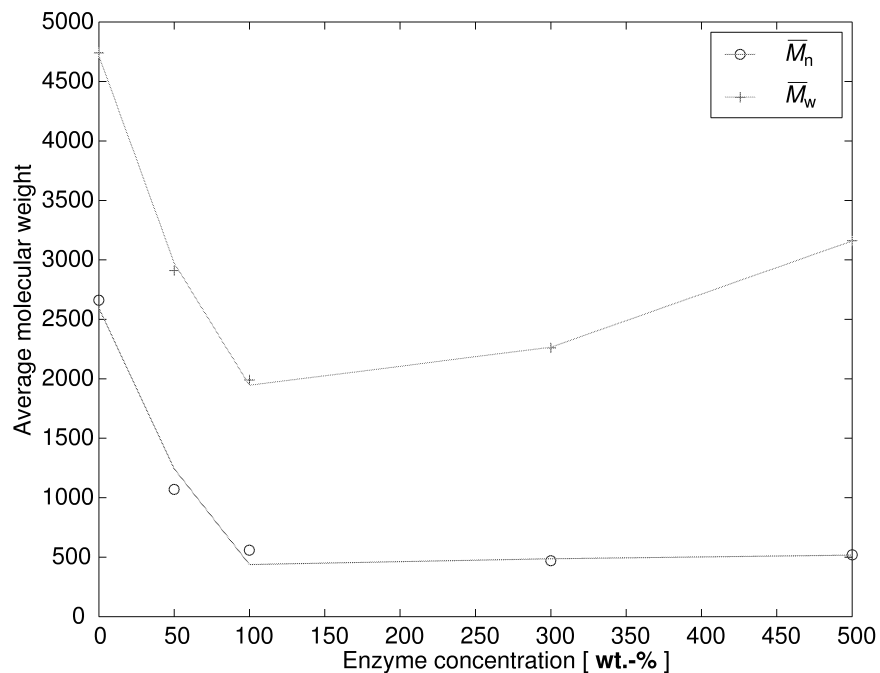


Fig. 3.28: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 1% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24 h.

Fig. 3.28~3.33 と先に得られた結果の比較検討より、本分解反応系はポリマー試料の分子量に依存しないことが示された。また、先の反応温度の条件検討では行わなかった 40 °C でも分解反応は迅速に進行し、本分解反応が酵素が本来活性を示している生体温度付近でも進行することが確認された。同時に、反応温度の低下により酵素濃度依存性が大きく

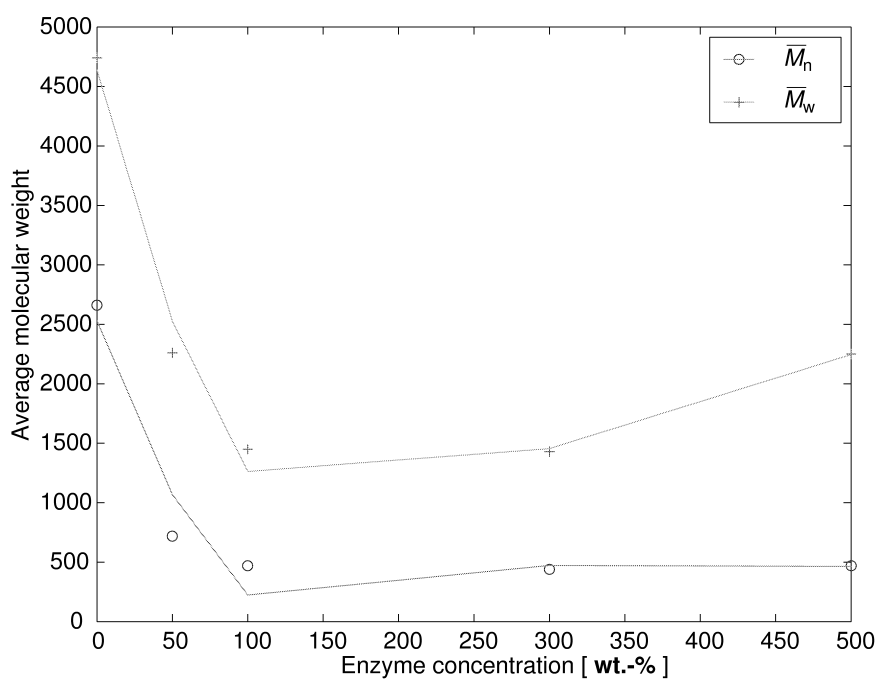


Fig. 3.29: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>c)</sup>.  
<sup>c)</sup> 1% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 48 h.

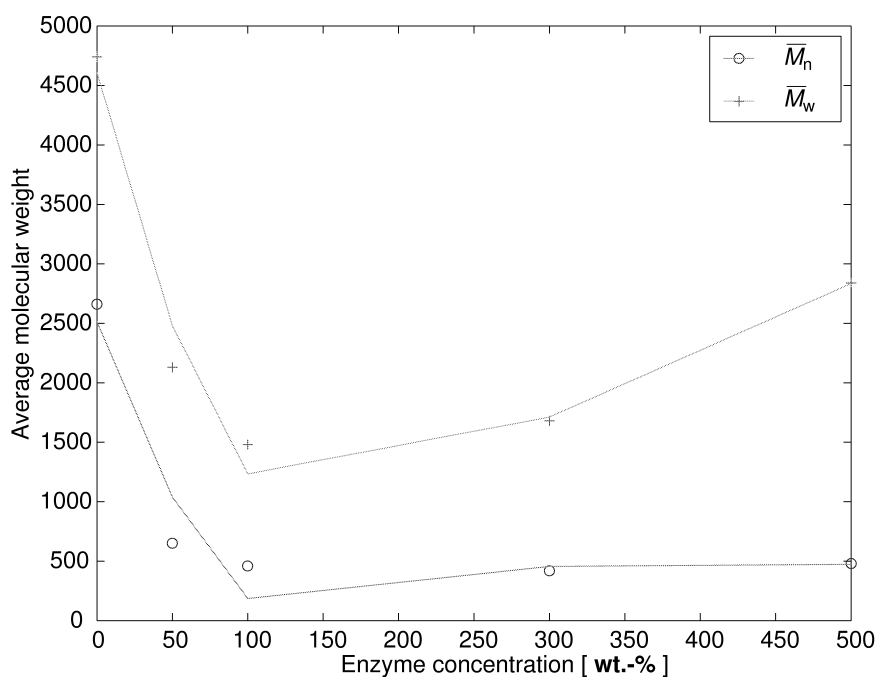


Fig. 3.30: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>d)</sup>.  
<sup>d)</sup> 1% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 72 h.

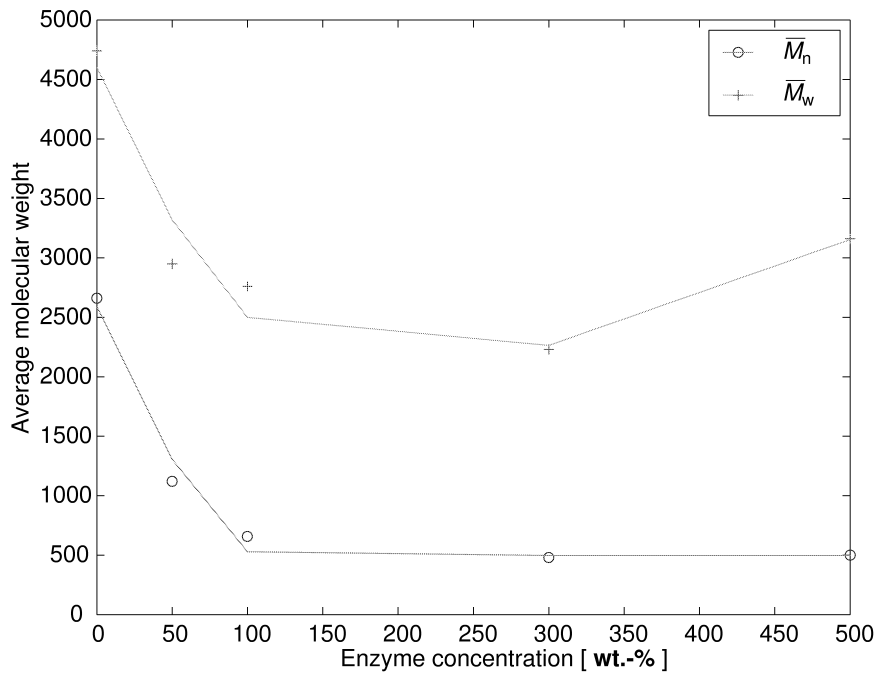


Fig. 3.31: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>e)</sup>.  
<sup>e)</sup> 0.5% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24 h.

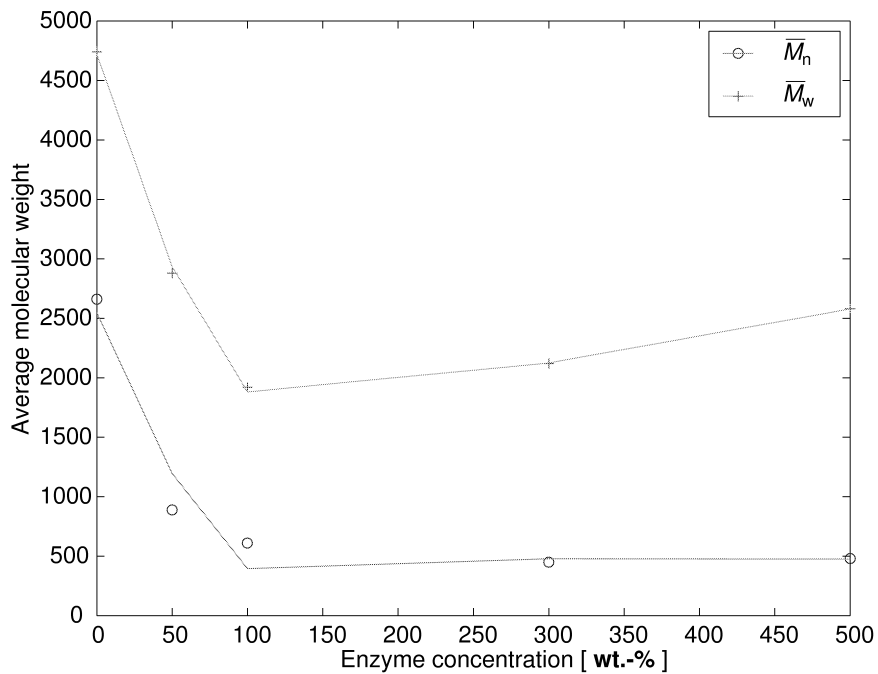


Fig. 3.32: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>f)</sup>.  
<sup>f)</sup> 0.5% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 48 h.

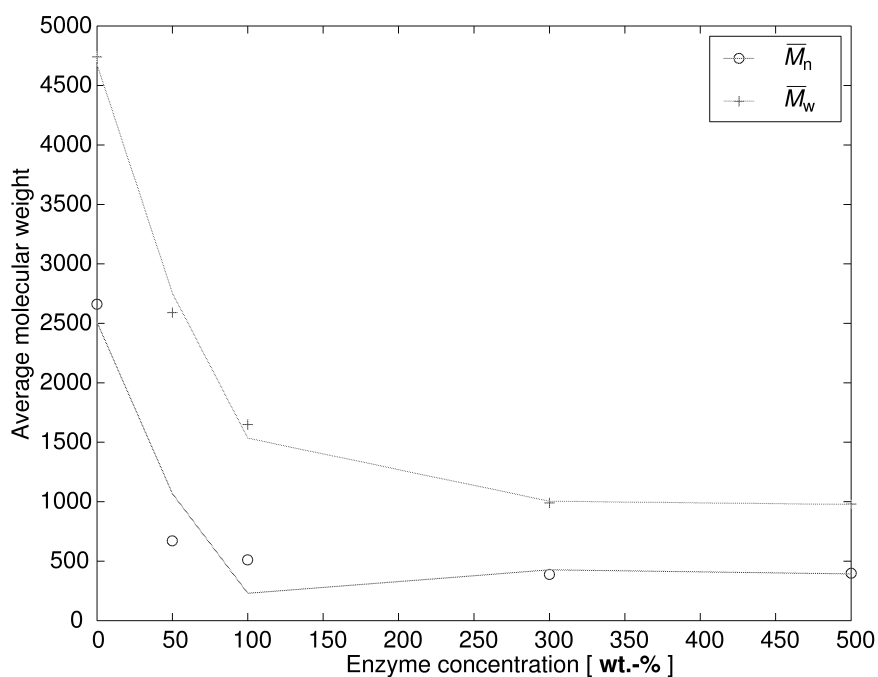


Fig. 3.33: The effects of the initial molecular weight on the degradation of P(3HB) <sup>g)</sup>.  
<sup>g)</sup> 0.5% P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 72 h.

なることが明らかとなり、重量平均分子量の酵素濃度依存の結果から、反応温度が低いときには低酵素濃度で反応の進行が著しく遅くなることが示された。また、本検討で用いたポリマー試料はあらかじめ分解生成物の分子量領域を除去したので、得られたオリゴマーは全て分解反応により得られたものである。本検討により得られた分解結果とこれまでに得られた分解結果に差異がないことから、ポリマー試料に高分子量ポリマーを用いても分解挙動はさほど変化しないことが推測された。

### 3.3.2 化学触媒重合により得られた P(3HB) の酵素分解反応

$\beta$ -BL の酵素触媒重合により得られた非天然型 P(3HB) が有機溶媒中、ポリマー試料の分子量の影響を受けずに Novozym<sup>®</sup> 435 の作用を受け迅速にオリゴマーにまで分解されることが確認された。そこで、化学触媒重合により得られた高分子量 P(3HB) を基質に用いて本分解反応を検討した。化学触媒重合により得られるポリマーの一次配列は既に多数報告されているので、本研究ではポリマー試料のタクティシティーが分解反応に与える影響も検討するため、*syndiotactic* P(3HB)(以下 *syn*-P(3HB)) と *atactic* P(3HB)(以下 *ata*-P(3HB)) をポリマー試料に用いて分解反応を行った。

#### (1) *syndiotactic* P(3HB) の分解における酵素濃度の影響

ポリマー試料の分子量を大幅に変更したため、酵素濃度の影響を再度検討した。分解条件としては既に得られた結果より、有機溶媒としてトルエンを用いて 40 °C で Novozym<sup>®</sup> 435 を作用させた。

結果を Table 3.11 及び Fig. 3.34 に示した。

Table 3.11: The Effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *syn*-P(3HB): (1) <sup>a)</sup>

Entry	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	50	1180	47590
2	100	970	43770
3	300	560	10460
4	500	560	7790

<sup>a)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 105350$ ,  $\overline{M}_n = 54700$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$

Fig. 3.34 より、酵素濃度増加に対する重量平均分子量の低下傾向がポリマー分子量の大幅な増加に伴って弱くなることが明らかとなった。これまでの検討で、本分解反応は基質のポリマー濃度を低下させたときに迅速に進行することが示されたので、本検討でもポリマー濃度を低下させて再度検討を行った。

結果を Table 3.12 及び Fig. 3.35 に示した。

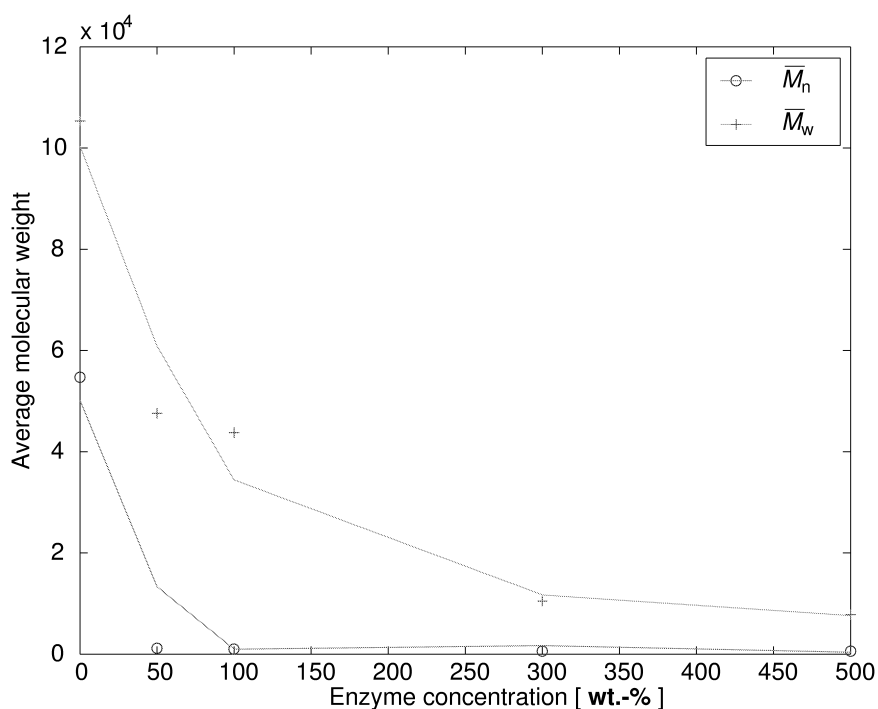


Fig. 3.34: The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *syn*-P(3HB): (1) <sup>b)</sup>

<sup>b)</sup> 1 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

Table 3.12: The Effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *syn*-P(3HB): (2) <sup>c)</sup>

Entry	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	0	59960	119770
2	50	1580	53790
3	100	820	26340
4	300	580	6460
5	500	550	3050

<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 105350$ ,  $\overline{M}_n = 54700$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$

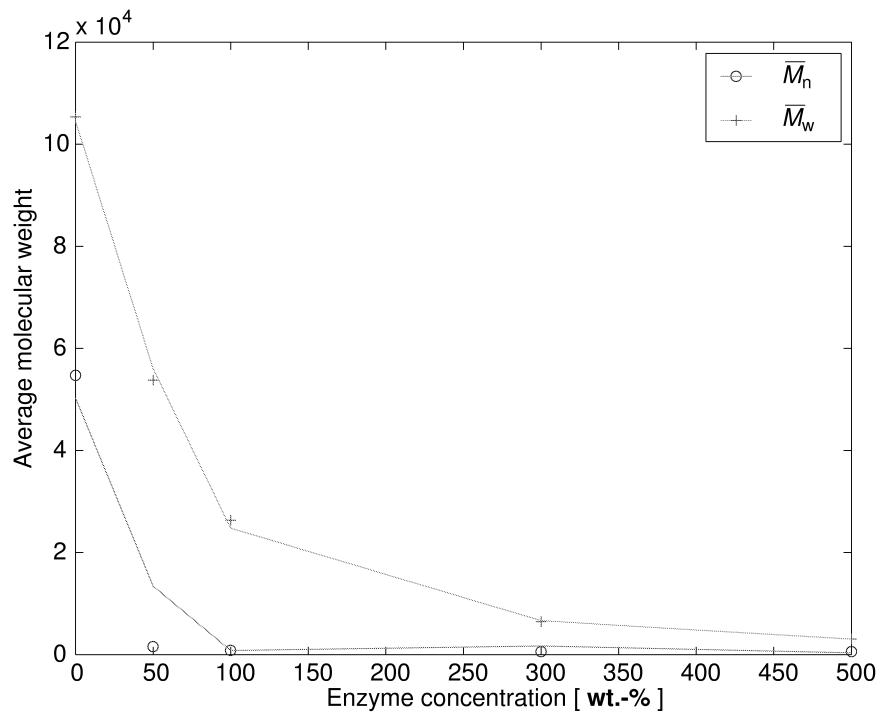


Fig. 3.35: The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *syn*-P(3HB): (2) <sup>d)</sup>

<sup>d)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

Fig. 3.34、3.35 より、基質のポリマー分子量に依存せずに希釈効果が得られることが明らかになった。すなわち、分解生成物の数平均分子量は 1 % のポリマー濃度で分解させたときにも十分に低下したのに対して、重量平均分子量の低下傾向は弱かった。一方、0.5 % のポリマー濃度で分解させたときには分解生成物の重量平均分子量も十分に低下することが確認された。また、分解に要する最適酵素濃度はポリマー試料の分子量増加に伴って増大した。すなわち、0.5 % のポリマー溶液を用いて分解が良好に進行した場合でも、300 wt.-% より 500 wt.-% の Novozym<sup>®</sup> 435 を用いた時のほうが明らかに分解生成物の平均分子量は低下した。したがって、以降の検討は特別な場合を除いて 500 wt.-% の Novozym<sup>®</sup> 435 を用いて行った。

(2) *syndiotactic* P(3HB) の分解における反応時間の影響

先の検討から明らかになった、*syn*-P(3HB) 分解での至適酵素濃度である 500 wt.-% の Novozym<sup>®</sup> 435 を用いて分解挙動の経時変化について検討を行った。

結果を Table 3.13 及び Fig. 3.36 に示した。

Table 3.13: Time course of the lipase-catalyzed degradation of *syn*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	1	2620	68860
2	2	1710	56600
3	3	1240	42450
4	6	780	18380
5	9	730	13690
6	12	590	4460
7	15	610	7560
8	18	490	2650
9	21	490	2070
10	24	470	1730

<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 500 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 105350$ ,  $\overline{M}_n = 54700$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$

Fig. 3.36 より、本分解反応は迅速に進行することが明らかになった。すなわち、分解生成物の数平均分子量は反応開始後 1 時間で 2620 に減少し、重量平均分子量も 24 時間後には 1730 に減少した。

分解生成物の平均分子量は未反応のポリマー試料も含めて計算した数値であるため、数平均分子量の解析から分解反応系内の分子鎖数の変化を推測することができる。すなわち、反応開始後 1 時間で数平均分子量は約 1/20 に減少したことから、反応系内の分子鎖数は 1 時間の間に 20 倍に増加したことを意味している。この分子鎖数の増加は経時的に減少し、反応開始後 6 時間以降では、ほぼ横ばいとなった。

また、重量平均分子量は分解生成物中に分子量の大きなものが含まれていると影響を強く受ける。すなわち、本検討の平均分子量の求め方からは、ポリマー試料が反応終了後も未反応で残存した場合、分解生成物の重量平均分子量は大きな値を示す。したがって、重



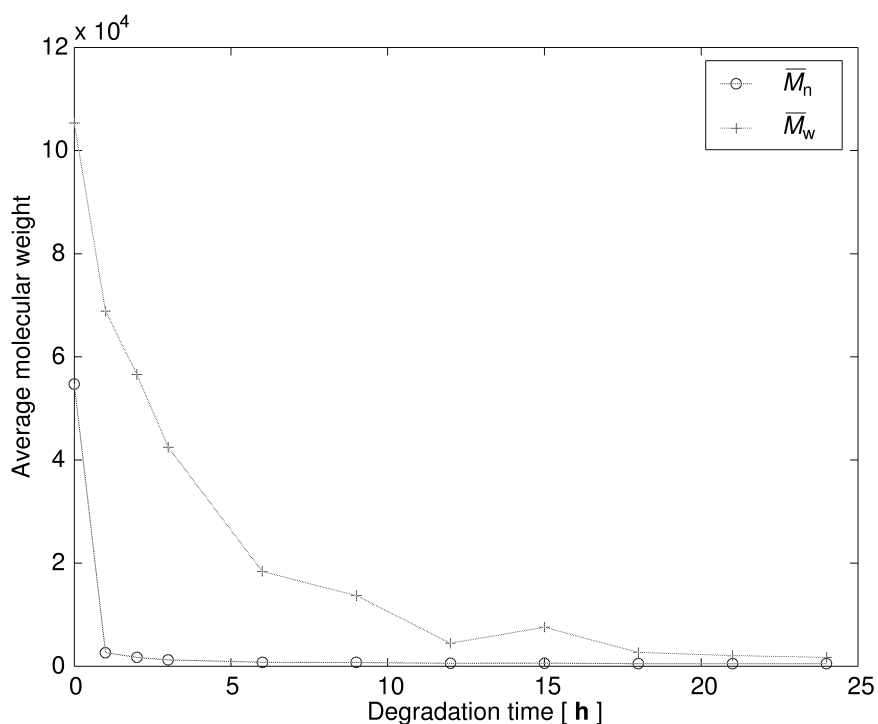


Fig. 3.36: Time course of the molecular weight of the degradation products <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 500 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C.

量平均分子量が低下している間は、分解生成物中に未反応のポリマー試料が含まれていることを示唆している。このことから、ポリマー試料が完全に分解されるために24時間要したと考えることができる。分解における分子量移動の様子をSECチャートを用いてFig. 3.37に示した。

Fig. 3.37より、基質としたポリマー由来のピーク(以下ピーク(A))、最終的に到達する分解生成物由来のピーク(以下ピーク(B))及びその両者の中間に現れるピーク(以下ピーク(C))の3つが経時的に変化していた。分解挙動を解析するにあたり、ピーク(C)の経時変化は重要である。酵素触媒反応によるポリマー鎖の切断様式は、ポリマー鎖の末端から切断されるエキソ型分解とポリマー鎖の中程をランダムに切断されるエンド型分解の二つがある。エキソ型分解反応ではピーク(A)が徐々に低分子量側へ移行し、一方エンド型分解反応ではポリマー鎖がランダムに切断されるためにピーク(A)が急激に低分子量側へ移行することが知られている。本分解反応の場合、ピーク(A)はピーク位置を変化させずに、ピーク(B)が現れたことからランダムな分解反応を推測される。しかしながら、モノマーにまでは分解されなかったことから、酵素がある大きさのオリゴマーを選択的に与えていることが推測された。このことに関しては分解反応機構についてに詳細に記した。

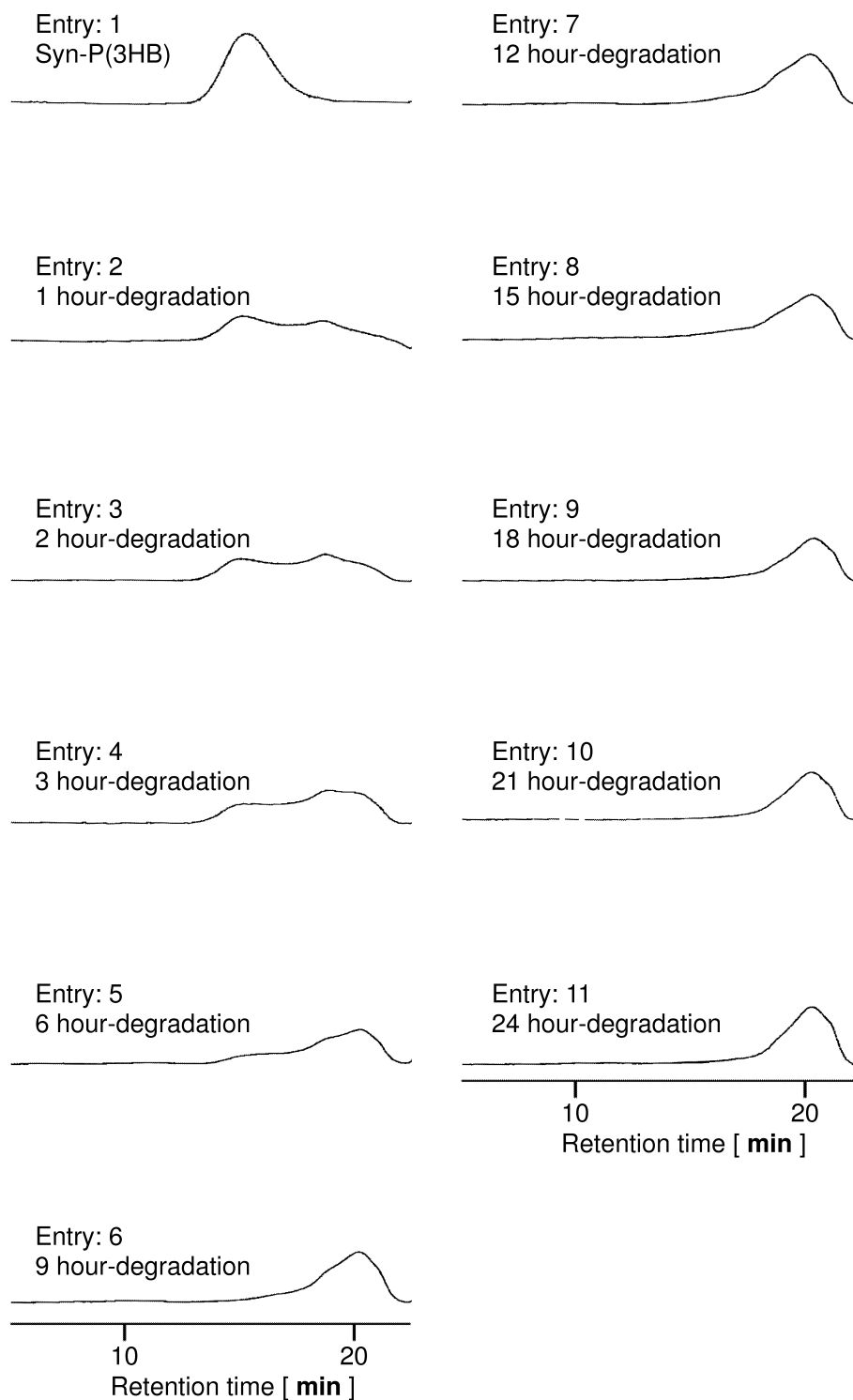


Fig. 3.37: SEC profiles of lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB).  
Initial *P*(3HB):  $\overline{M}_w = 105350$ ,  $\overline{M}_n = 54700$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$

(3) *atactic* P(3HB) の分解における酵素濃度の影響

*ata*-P(3HB) をポリマー試料に用いて本分解反応を検討した。本検討に用いた *ata*-P(3HB) は数平均分子量が前項で用いた *syn*-P(3HB) の半分にしか満たない。したがって、前項及び前々項において最適酵素濃度は求めたが、再度最適酵素濃度を検討した。分解条件としては前項の結果をもとに有機溶媒としてトルエンを用い、0.5 % のポリマー濃度、40 °C において Novozym<sup>®</sup> 435 を作用させた。

結果を Table 3.14 及び Fig. 3.38 に示した。

Table 3.14: The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Enz. conc. (wt%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	50	1770	17260
2	100	990	11420
3	300	470	2110
4	500	420	1440

<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h. Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 30600$ ,  $\overline{M}_n = 25200$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$

Fig. 3.38 より、ポリマー試料を *ata*-P(3HB) に変更しても本分解反応は迅速に進行することが明らかとなった。ポリマー試料の分子量が異なるため、単純な *syn*-P(3HB) と *ata*-P(3HB) 分解反応の比較は行えないが、いずれも本分解反応に適したポリマー試料であることが示された。

*Alcaligenes faecalis* T1 由来菌体外 P(3HB) デポリメラーゼは4つのサブサイトを有し、活性セリン残基が (*R*) 体を強く認識する二つのサブサイト間に存在する。したがって、切断を受けるためには (*R*)-(*R*) 配列が必須である<sup>7)</sup>。このため、*Alcaligenes faecalis* T1 由来菌体外 P(3HB) デポリメラーゼは (*R*) 体モノマーと (*S*) 体モノマーが交互に配列した *Syn*-P(3HB) に対する分解活性が低い。それに対して、*syn*-P(3HB) と *ata*-P(3HB) いずれのポリマーも良好に分解したことから、Novozym<sup>®</sup> 435 を用いた本分解反応系は基質に用いた P(3HB) のタクティシティーの影響を受けないと考えられる。

また、*ata*-P(3HB) を基質に用いたときも *syn*-P(3HB) を基質に用いたときと同様、40 °C で24時間分解させたときは500 wt.-%の Novozym<sup>®</sup> 435 を用いた際に分解生成物の平均分子量は最も低下した。したがって、特別な場合を除いて以後の検討は500 wt.-%の

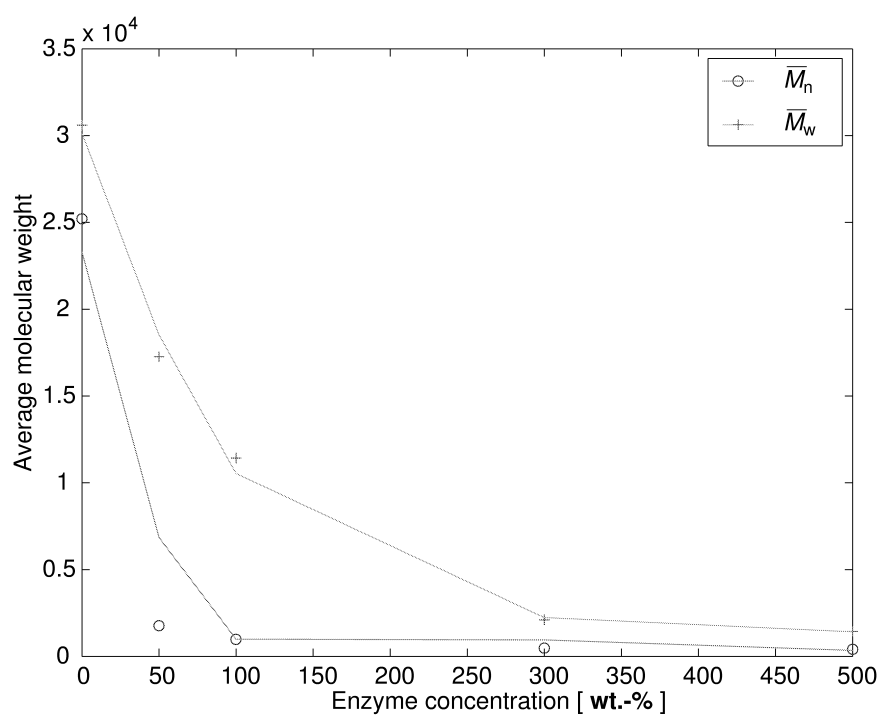


Fig. 3.38: The effects of enzyme concentration on the lipase-catalyzed degradation of *ata*-P(3HB) <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

Novozym<sup>®</sup> 435 を用いて行った。

(4) *atactic* P(3HB) の分解における反応時間の影響

本項では、500 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 を用いて *ata*-P(3HB) を分解したときの経時変化について検討を行った。

結果を Table 3.15 及び Fig. 3.39 に示した。

Table 3.15: Time course of the lipase-catalyzed degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Time (h)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1	1	1770	15670
2	2	1150	11290
3	3	1010	10370
4	6	660	6030
5	9	580	4410
6	12	490	2710
7	15	450	2410
8	18	430	1750
9	21	390	1170
10	24	410	1390

<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 500 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 30600$ ,  $\overline{M}_n = 25200$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$

Fig. 3.39 より、*ata*-P(3HB) も *syn*-P(3HB) と同様にポリマー濃度 0.5 %、40 °C で 500 wt.-% の Novozym<sup>®</sup> 435 を作用させたときには迅速に分解され、反応開始後 24 時間で分解生成物の平均分子量は平衡に達することが明らかになった。

本検討も分解生成物の平均分子量は未反応のポリマー試料を含めて計算しているため、ポリマー試料が未反応で残存している間は重量平均分子量が大きな値を示した。基質に用いた *syn*-P(3HB) と *ata*-P(3HB) は分子量が大幅に異なるため、同条件下であっても分解速度を単純に比較することができない。しかしながら、Fig. 3.36 と 3.39 と比較検討すると、いずれも反応開始直後に未反応ポリマー試料を含めた分解生成物の数平均分子量は急激に減少し、重量平均分子量は反応開始後 24 時間で平衡に達したことが明らかになった。

また、分解における分子量移動の様子を SEC チャートを用いて Fig. 3.40 に示した。Fig. 3.40 より、分解挙動はポリマー試料のタクティシティーによらずエンド型で進行し、

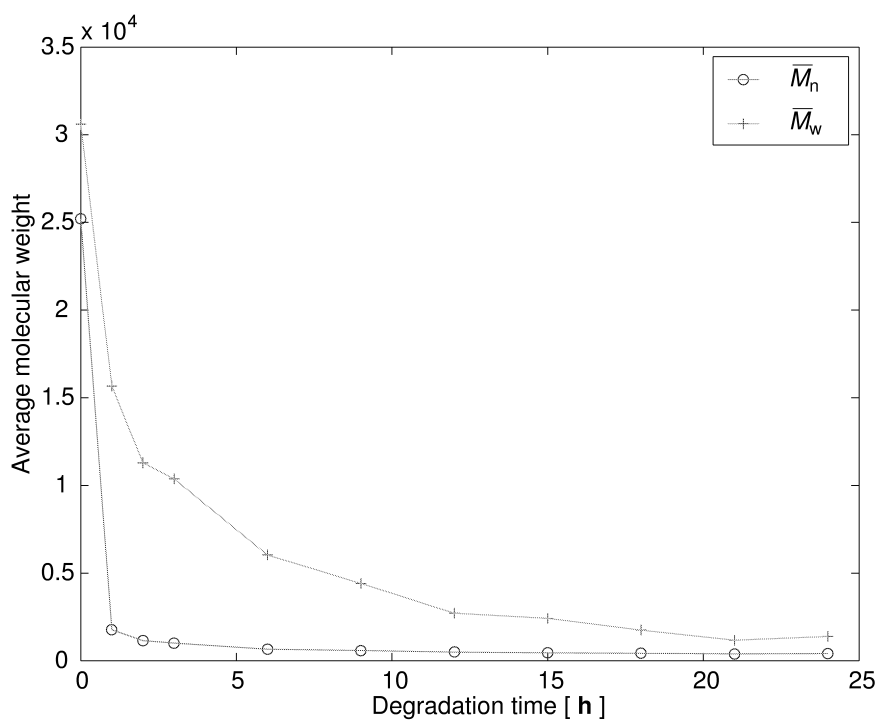


Fig. 3.39: Time course of the lipase-catalyzed degradation of *ata*-P(3HB) <sup>b)</sup>.

<sup>b)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 500 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C.

一定分子量のオリゴマーを生成物として与えていることが明らかとなった。しかしながら、全てのモノマーユニットが (*R*) 体である天然型 P(3HB) は高い結晶性のために有機溶媒に対して難溶であることが知られている。本分解反応はポリマー試料が有機溶媒に溶解していることが必要最低条件であるため、ポリマー試料のタクティシティーに依存しない本分解反応であっても天然型 P(3HB) 分解に適用可能であるかは別の問題である。

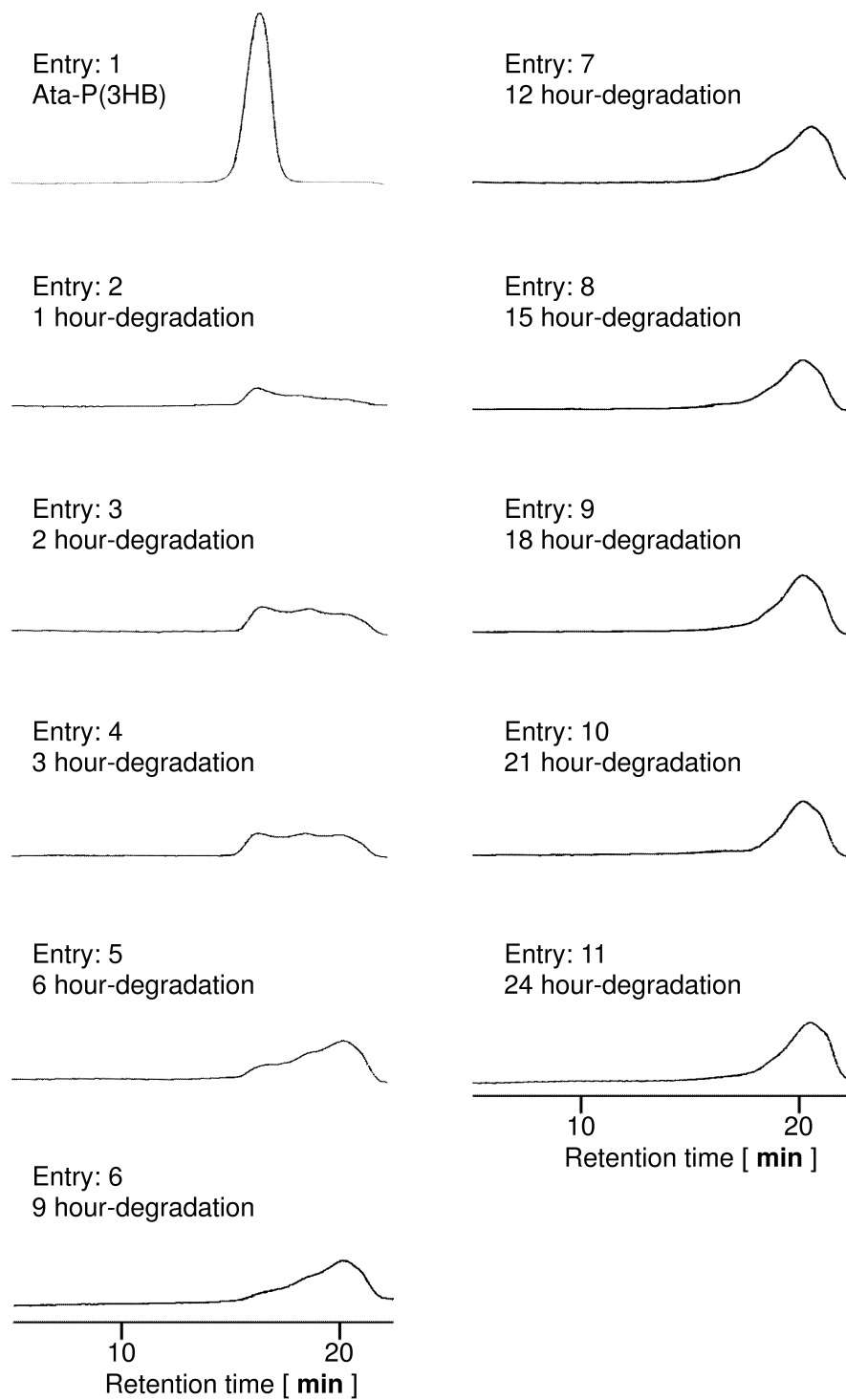


Fig. 3.40: SEC profiles of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB).  
Initial *P*(3HB):  $\overline{M}_w = 30600$ ,  $\overline{M}_n = 25200$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$

### 3.3.3 分解生成物の構造解析

これまでの検討から、本分解反応はポリマー試料のタクティシティーによらず迅速に進行することが確認された。そこで、本分解反応機構に関して検討を行うために、本分解反応により得られる分解生成物の分子構造を解析した。

酵素触媒重合により得られた P(3HB) をポリマー試料に用いて得られた分解生成物の構造解析は、反応に用いる有機溶媒を検討する段階で行った。その結果、水酸基末端型、環状型、クロトネート型構造の混合物であることが明らかになった。クロトネート型オリゴマーは生成機構が不明であるが、これまでの検討から酵素触媒重合の過程で生成することが確認されており、基質に用いたポリマー中にも含まれていた構造である。酵素触媒重合機構の考察から、クロトネート型は酵素活性化モノマーに対して水が求核攻撃した際に生成していると考えられたため、本分解反応でクロトネート型が生成する可能性は極めて低い。したがって、分解生成物中に含まれるクロトネート型はポリマー試料由来であり、分解反応の過程で生成したものではないと考えられた。しかし、これまでの検討からは分解生成物中に含まれていたクロトネート型が本分解反応により生成した構造であるかを断言できない。そこで、本項では本分解反応により生成するオリゴマーの構造を明らかにするため、ポリマー試料がクロトネート末端基をほぼ含まない *syn*-P(3HB) ( $\overline{M}_n = 54700$ ,  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.93$ ) と *ata*-P(3HB) ( $\overline{M}_n = 25200$ ,  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$ ) の分解生成物について詳細な構造解析を行った。

#### (1) *syndiotactic* P(3HB) 分解生成物の構造

これまでの検討から、ポリマー試料が完全に分解されてオリゴマーへと変換される反応条件が明らかになった。分解生成物の構造を解析する際には不完全な分解反応終了後の生成物ではなく、完全に分解反応が進行して得られた分解生成物を用いたほうが良いと考えられる。*syn*-P(3HB) を完全に分解して得られた分解生成物の  $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 3.41 に示した。

Fig. 3.41 中には帰属不可能なスペクトルが含まれているが、これらは酵素中に含まれ、有機溶媒により抽出された固定化剤や安定化剤であることが確認されている。また、クロトネート型末端にある不飽和結合由来のスペクトルが現れなかったことから、分解生成物中にクロトネート型構造が含まれないことが明らかになった。したがって、分解生成物中に含まれる化合物は Fig. 3.42 に示される二つの構造体であることが明らかになった。

Fig. 3.42 に示した二つの構造体を質量分析すると、同じ重合度のときに 18  $m/z$  の差がある。したがって、MALDI-TOF MS スペクトルに現れるピークは完全に帰属される。そ



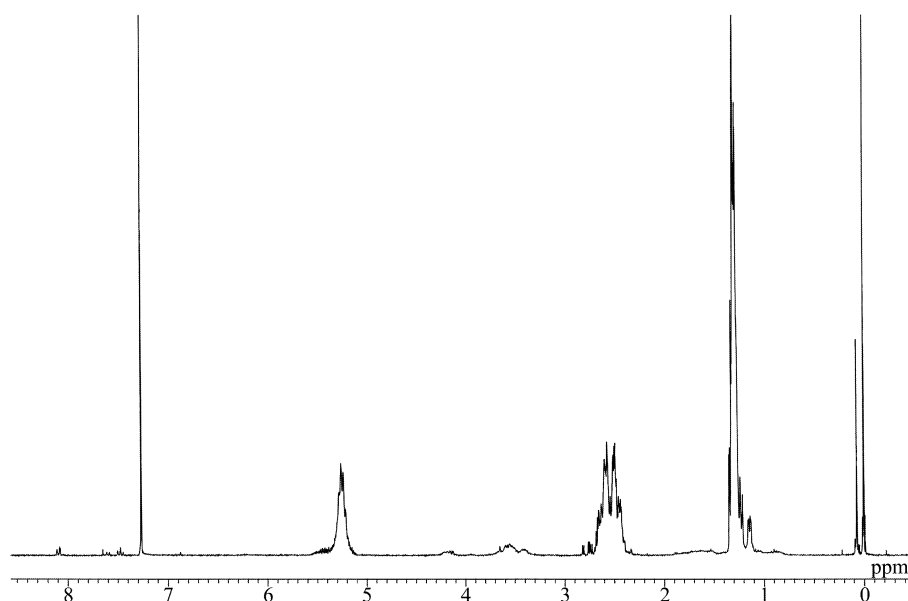


Fig. 3.41:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB) <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

ここで、本項では MALDI-TOF MS を用いた分解生成物の経時変化解析を行った。分解生成物の MALDI-TOF MS スペクトルを分解反応時間順に Fig. 3.44~3.53 に示した。

Fig. 3.44~3.53 の解析より、18 m/z の間隔を有する一組のスペクトルがモノマーユニットの分子量である 86.09 間隔に現れることが明らかになった。分解生成物中には水酸基末端型と環状型のみが存在するため、18 m/z の間隔を有する一組のスペクトルの中で分子量の大きいピークが水酸基末端型に帰属され、小さいピークが環状型に帰属される。したがって、本分解反応は環状型オリゴマーを主成分とした分解生成物を与える特徴を有していることが明らかになった。そこで、得られたオリゴマー混合物の MALDI-TOF MS スペクトルを Córdoba らの方法<sup>17)</sup> にしたがって解析し、スペクトル積分値から混合物中のナトリウム付加体について組成比を 30 量体までの範囲で計算した。計算結果を Fig. 3.43 にまとめた。環状型オリゴマーの生成機構についてはここでは考察せず、後の分解反応機構についてに詳細を記した。

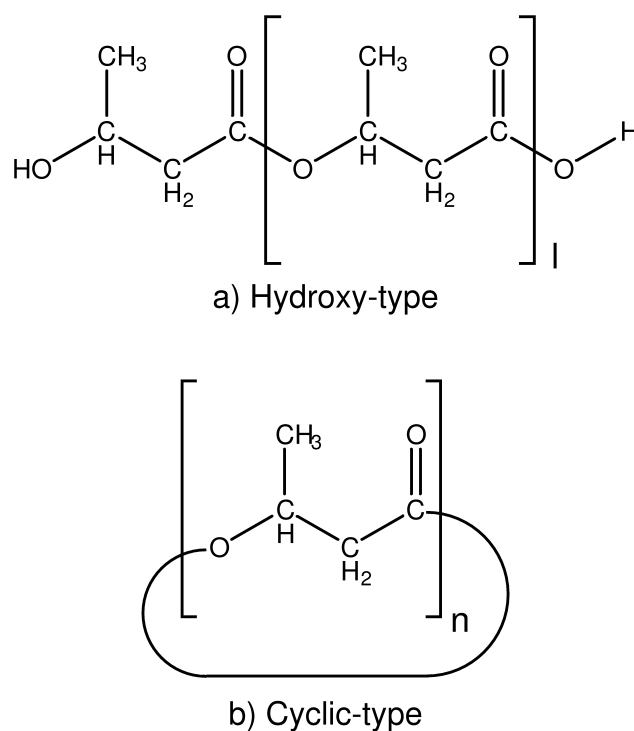


Fig. 3.42: Structures of mixtures that was included in the crude degradation products of *syn*-P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed degradation.

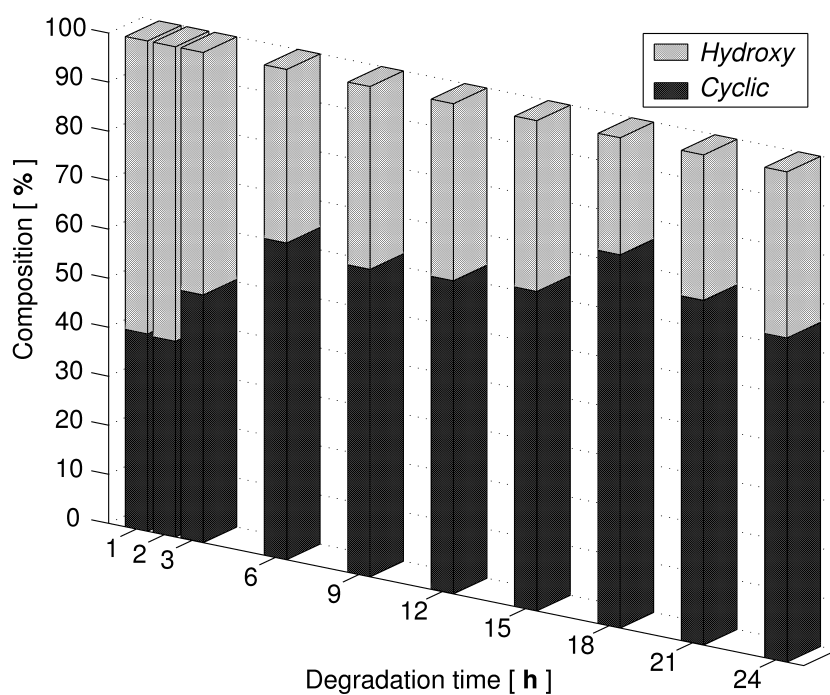


Fig. 3.43: Time course of structural composition of the degradation products.

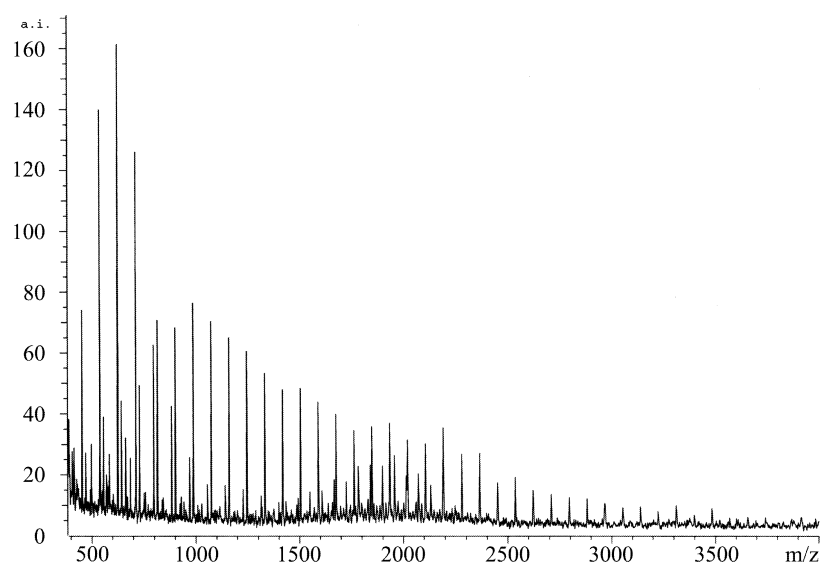


Fig. 3.44: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 2; **1 h-degradation**)

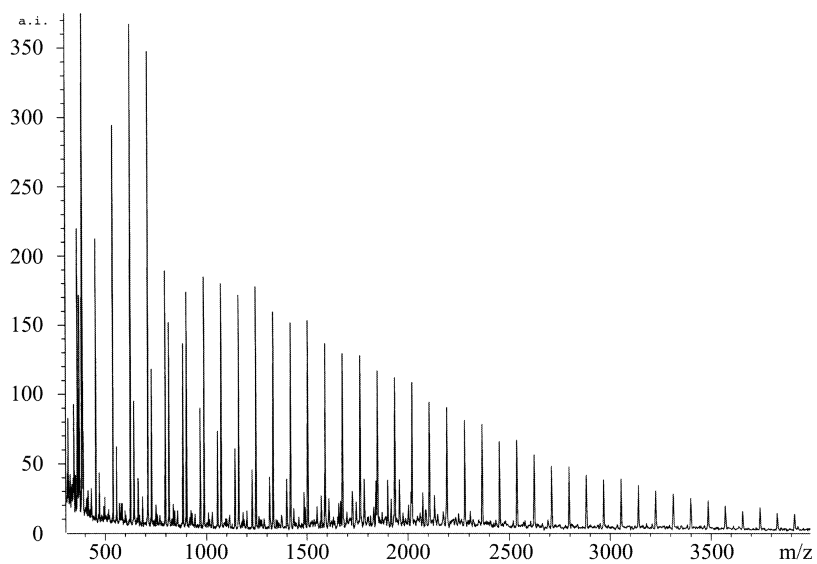


Fig. 3.45: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 3; **2 h-degradation**)

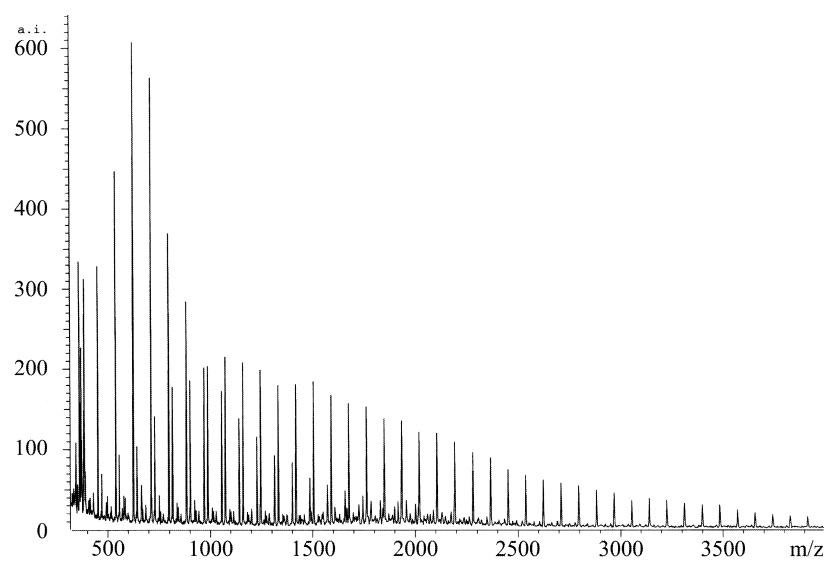


Fig. 3.46: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 4; **3 h-degradation**)

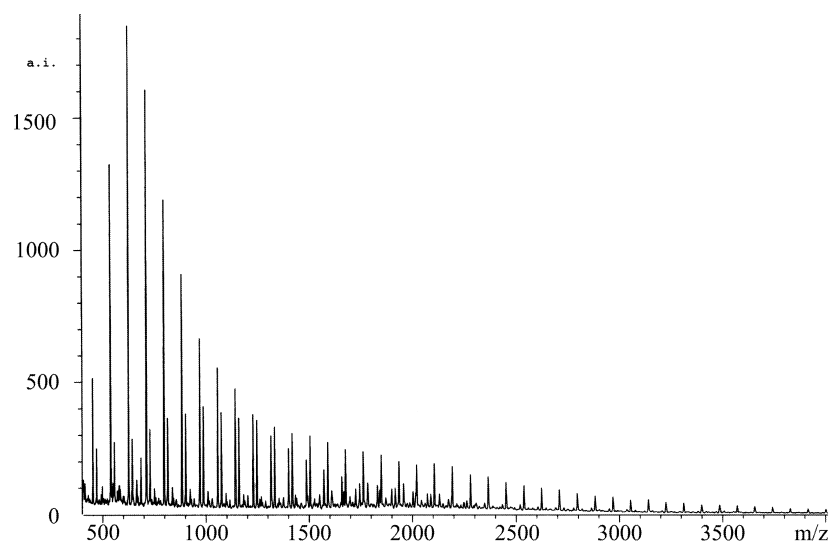


Fig. 3.47: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 5; **6 h-degradation**)

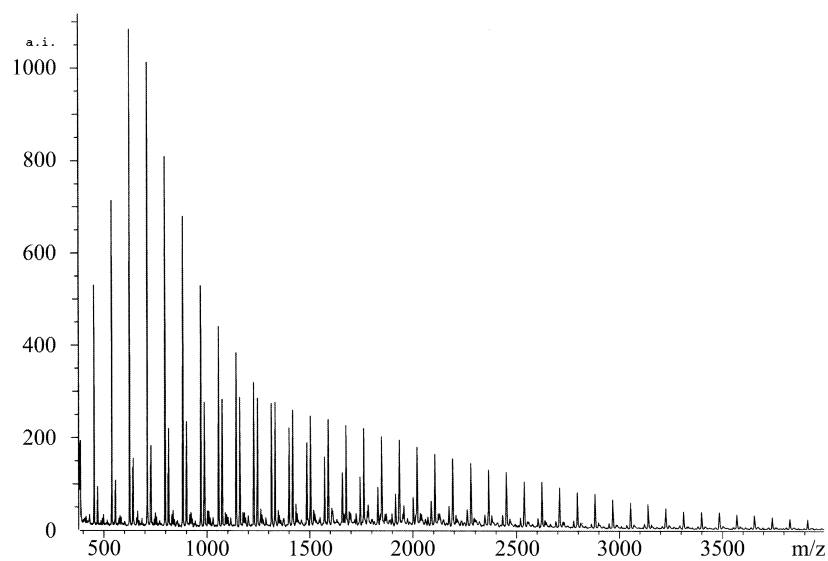


Fig. 3.48: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 6; **9 h-degradation**)

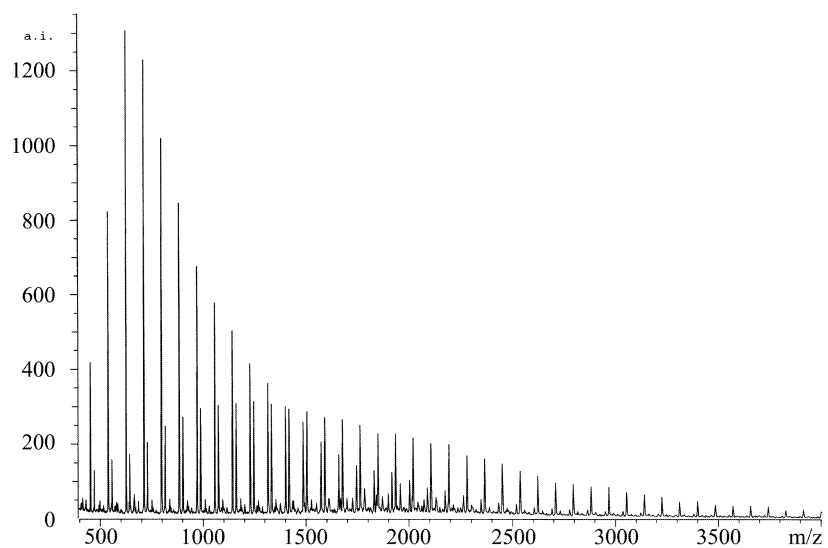


Fig. 3.49: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 7; **12 h-degradation**)

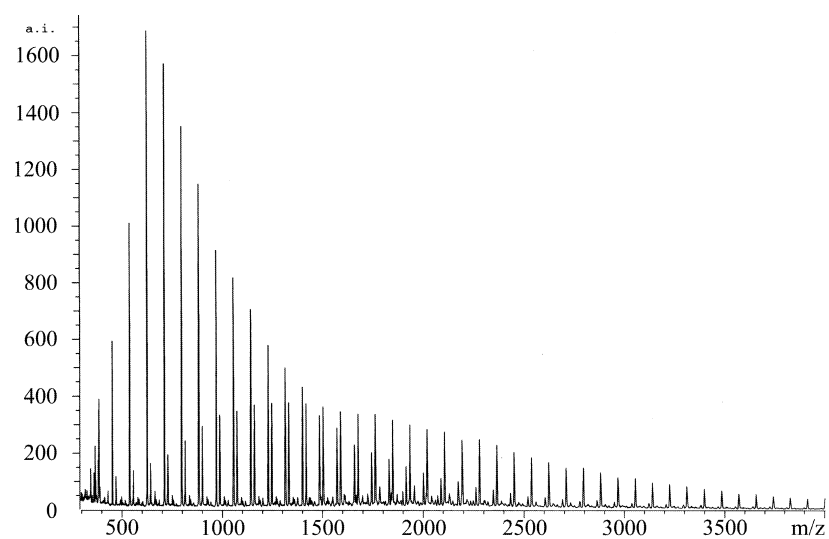


Fig. 3.50: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 8; **15 h-degradation**)

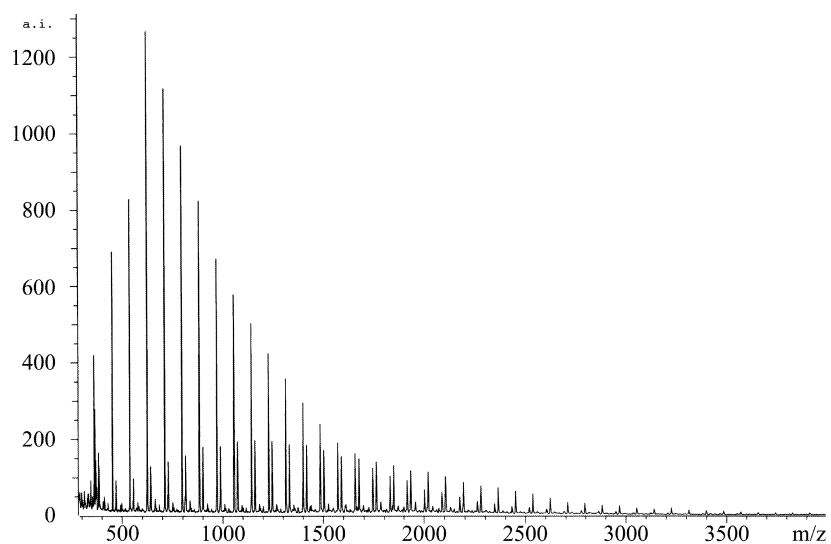


Fig. 3.51: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 9; **18 h-degradation**)

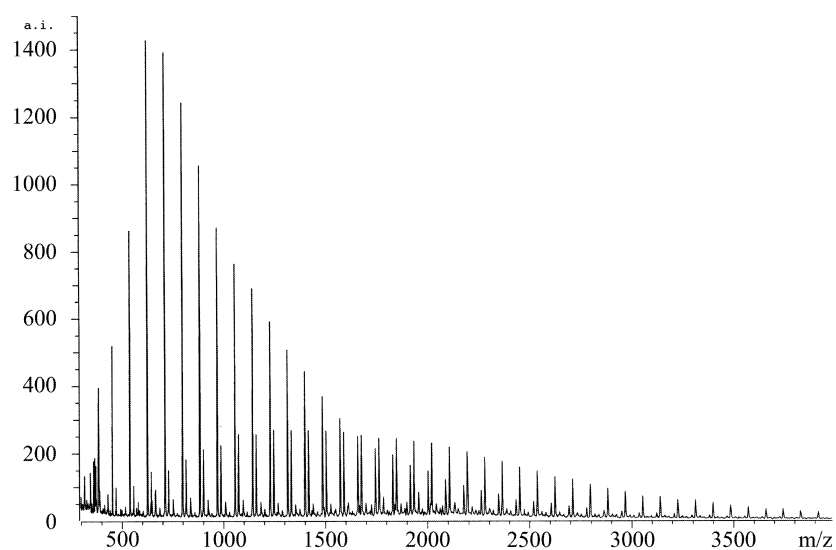


Fig. 3.52: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 10; **21 h-degradation**)

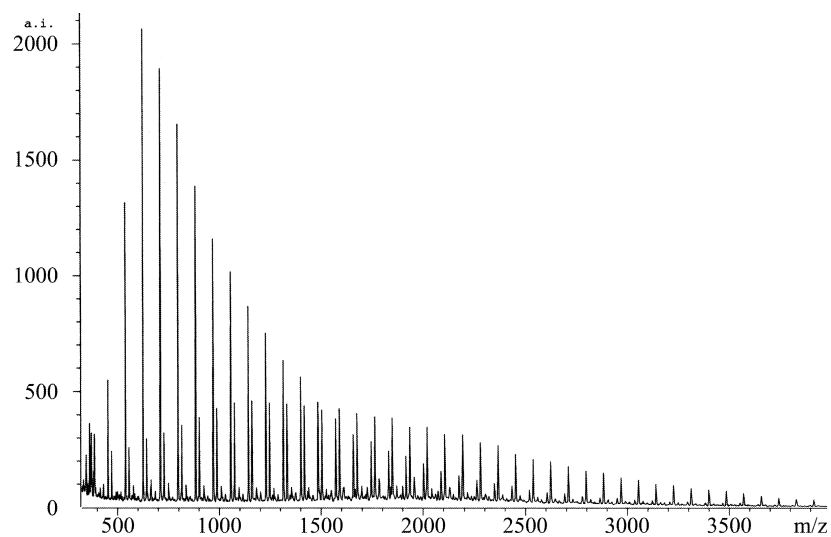


Fig. 3.53: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *syn*-P(3HB). (Table 3.13: Entry 11; **24 h-degradation**)

また、Fig. 3.43 より、水酸基末端型構造は分解反応開始直後に分解生成物中に著量含まれていて、分解反応の進行に伴って減少するのに対して、環状型は反応開始直後から著量含まれている上に反応時間の経過に伴って組成比が上昇することが明らかになった。水酸基末端型はポリマー試料の加水分解反応により生成すると考えられるため、本分解反応の初期段階では酵素触媒によるポリマー試料の加水分解反応が迅速に進行していると考えられる。このことは SEC チャートの経時変化から推測された、ポリマーのランダムなエンド型分解を支持する結果となった。

しかしながら、酵素触媒による加水分解反応のみでは環状型オリゴマーは生成しない。したがって、本分解反応はポリマー試料の加水分解と環状型オリゴマー生成という二つの反応機構により進行していることが示された。SEC チャートの経時変化より、ランダムなエンド型分解と同時に一定分子量のオリゴマーを与える分解反応が系内に存在することが示唆されているため、環状型オリゴマー生成反応は一定分子量のオリゴマーを優先的に与えている可能性が考えられる。Fig. 3.44~3.53 の分子量解析から、分解反応時間に依存せずに環状 7 量体オリゴマーがピークトップであったことから、環状型オリゴマー生成反応が与える一定分子量のオリゴマーが環状 7 量体オリゴマーであることが示された。



(2) *atactic* P(3HB) 分解生成物の構造

*ata*-P(3HB) の完全な分解反応により得られた分解生成物の  $^1\text{H-NMR}$  チャートを Fig. 3.54 に示した。

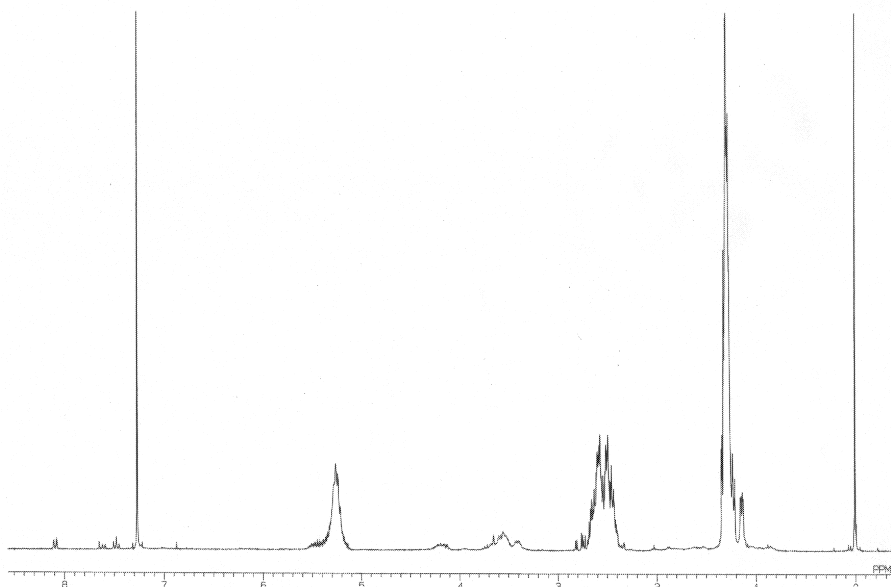


Fig. 3.54:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 0.5 % P(3HB) toluene solution was stirred with 800 wt.-% Novozym<sup>®</sup> 435 at 40 °C for 24h.

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

Fig. 3.41 中には帰属不可能なスペクトルが含まれているが、これらは酵素中に含まれ、有機溶媒により抽出された固定化剤や安定化剤であることが確認されている。また、*syn*-P(3HB) 分解生成物の場合と同様、クロトネート型末端にある不飽和結合由来のスペクトルが現れなかったことから、分解生成物中にクロトネート型構造が含まれないことが明らかになった。したがって、分解生成物に含まれる化合物は Fig. 3.55 に示される二つの構造体であることが明らかになった。

*ata*-P(3HB) を基質に用いたときも、分解生成物に含まれる構造は Fig. 3.55 に示した二つの構造体であると明らかになったので、本項では *syn*-P(3HB) 分解生成物の構造解析と同様、MALDI-TOF MS を用いて分解生成物の経時変化を解析した。分解生成物の MALDI-TOF MS スペクトルを分解反応時間順に Fig. 3.57~3.66 に示した。

Fig. 3.57~3.66 の解析より、18 m/z の間隔を有する一組のスペクトルがモノマーユ

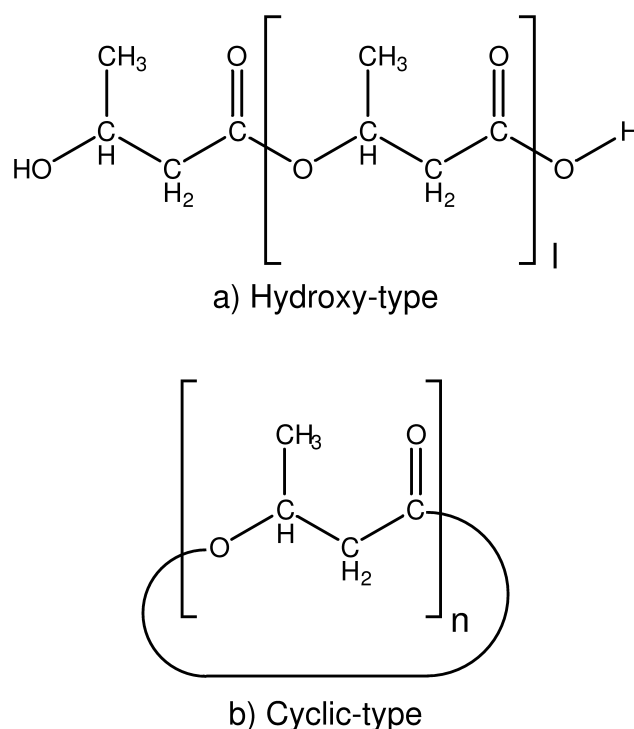


Fig. 3.55: Structures of mixtures that was included in crude degradation products of *ata*-P(3HB) obtained by the lipase-catalyzed degradation.

ニットの分子量である 86.09 間隔に現れることが明らかになった。分解生成物中には水酸基末端型と環状型のみが存在するため、18  $m/z$  の間隔を有する一組のスペクトルの中で分子量の大きいピークが水酸基末端型に帰属され、小さいピークが環状型に帰属される。したがって、*ata*-P(3HB) をポリマー試料に用いたときも本分解反応は環状型オリゴマーを主成分とした分解生成物を与える特徴を有していることが明らかになった。そこで、ここでも、得られたオリゴマー混合物の MALDI-TOF MS スペクトルを Córdoba らの方法<sup>17)</sup> にしたがって解析し、スペクトル積分値から混合物中のナトリウム付加体について組成比を 30 量体までの範囲で計算した。計算結果を Fig. 3.56 にまとめた。

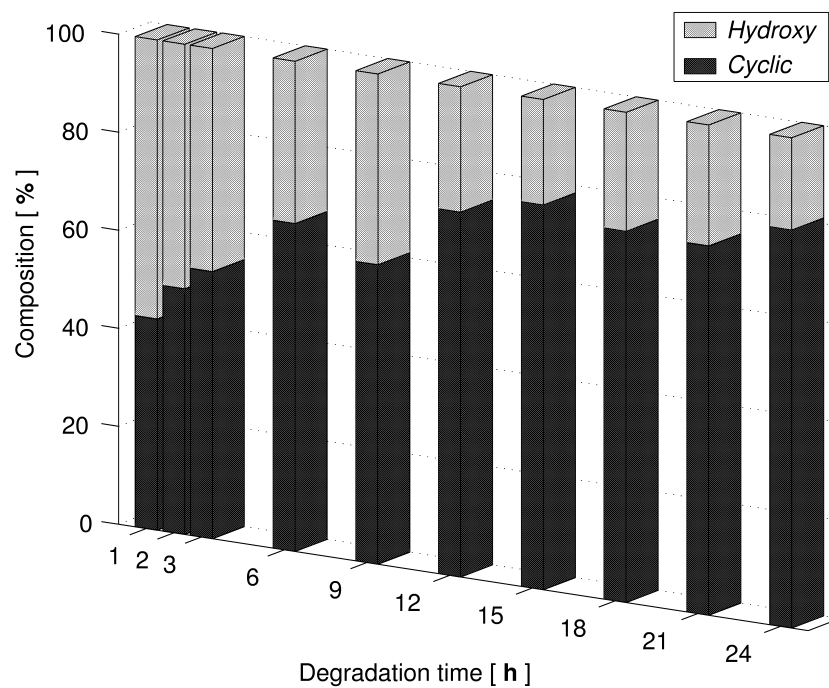


Fig. 3.56: Time course of structural composition of the degradation products.

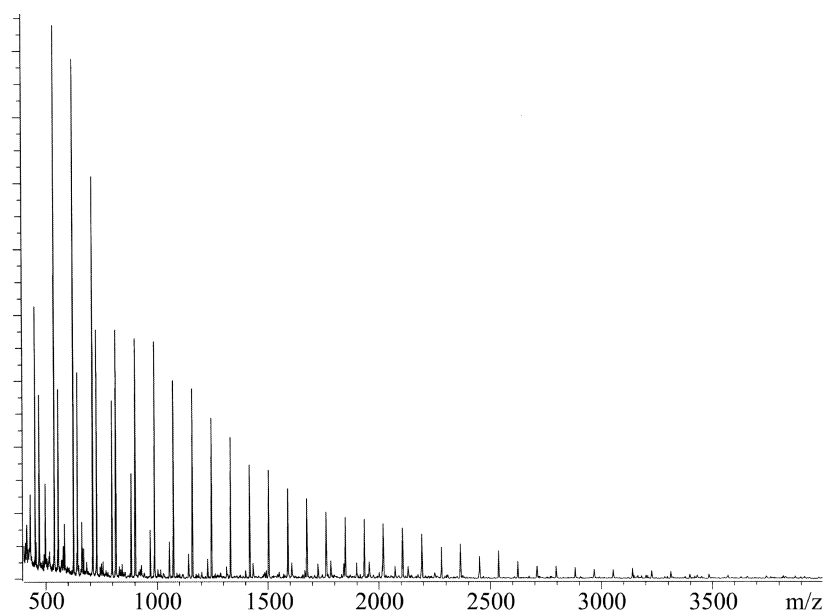


Fig. 3.57: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 2; 1 h-degradation)

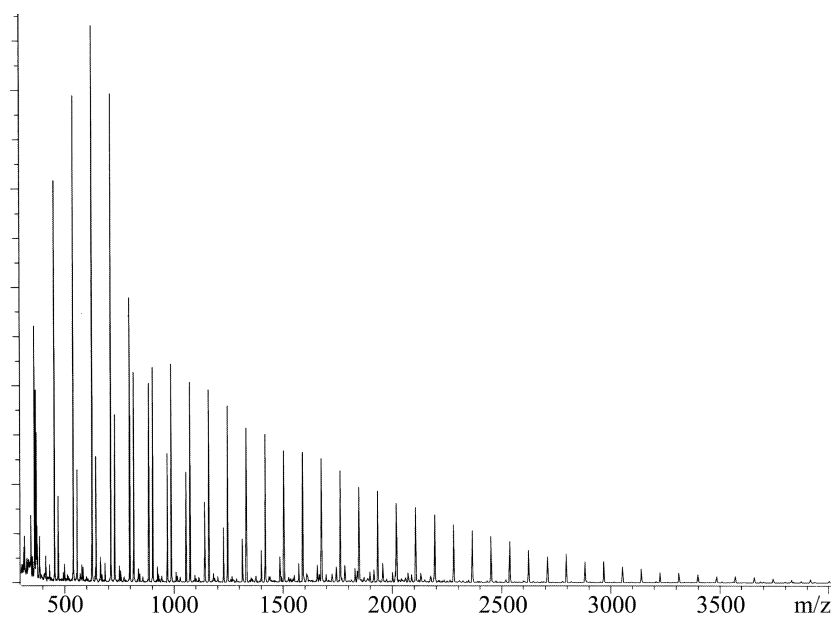


Fig. 3.58: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 3; **2 h-degradation**)

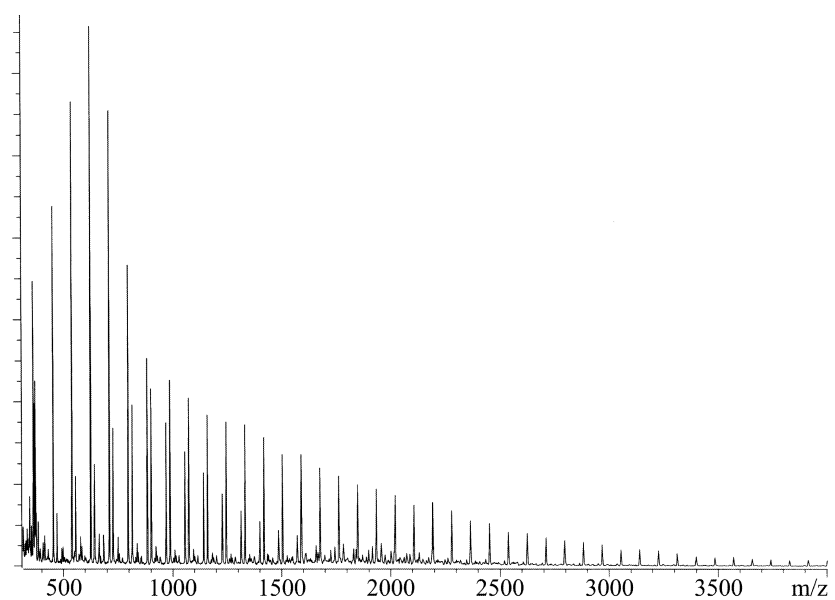


Fig. 3.59: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 4; **3 h-degradation**)

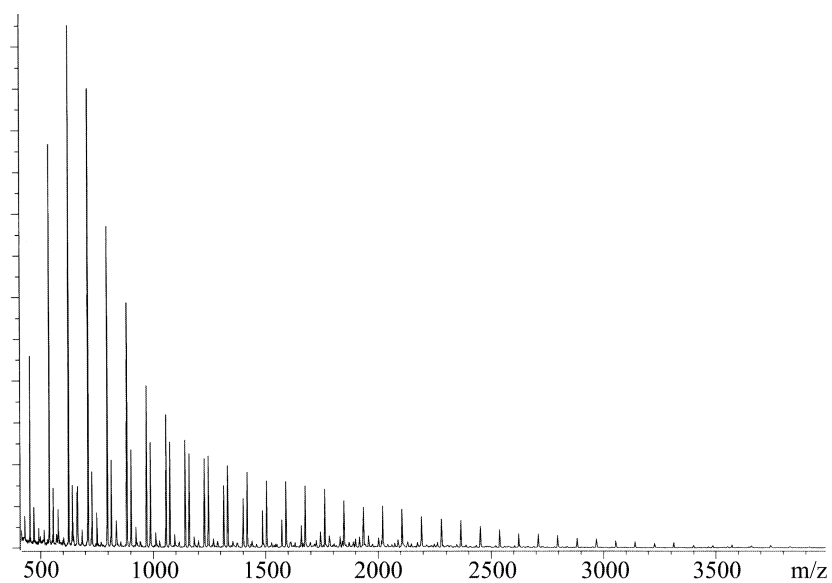


Fig. 3.60: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 5; **6 h-degradation**)

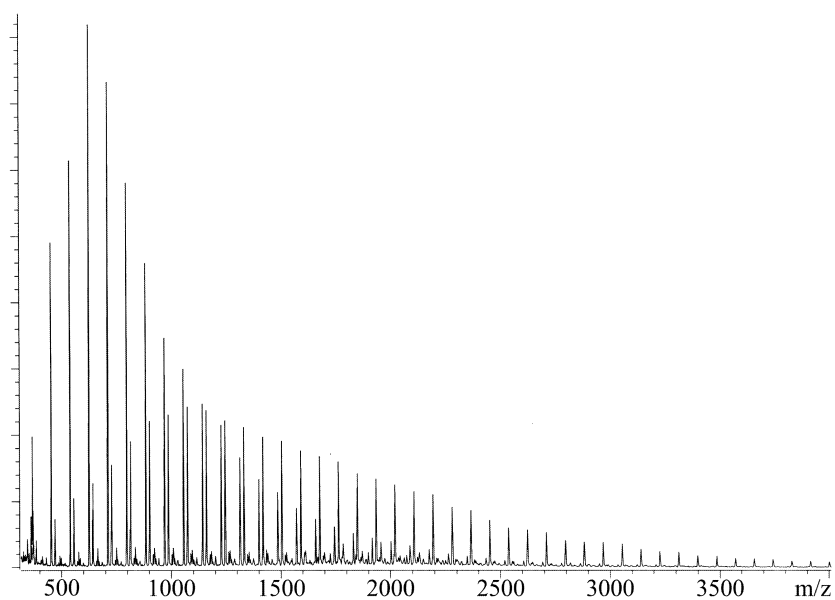


Fig. 3.61: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 6; **9 h-degradation**)

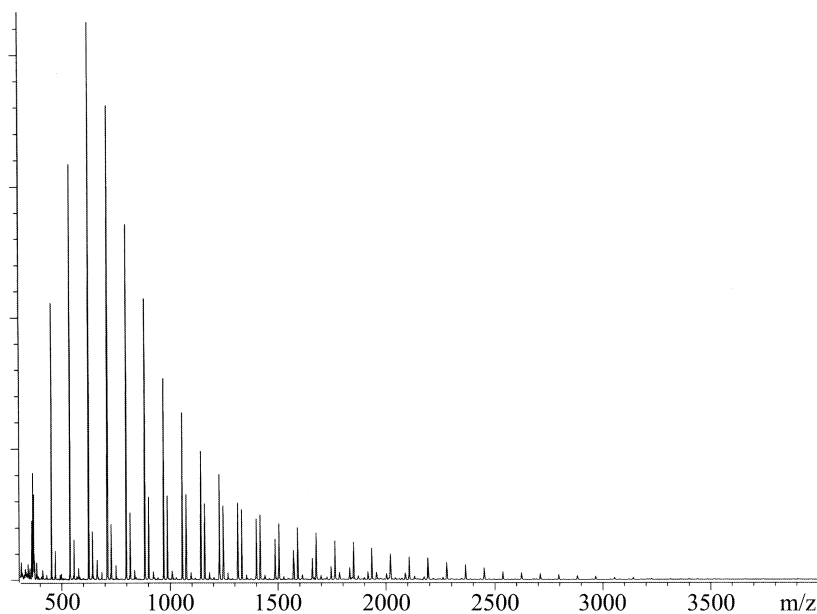


Fig. 3.62: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 7; **12 h-degradation**)

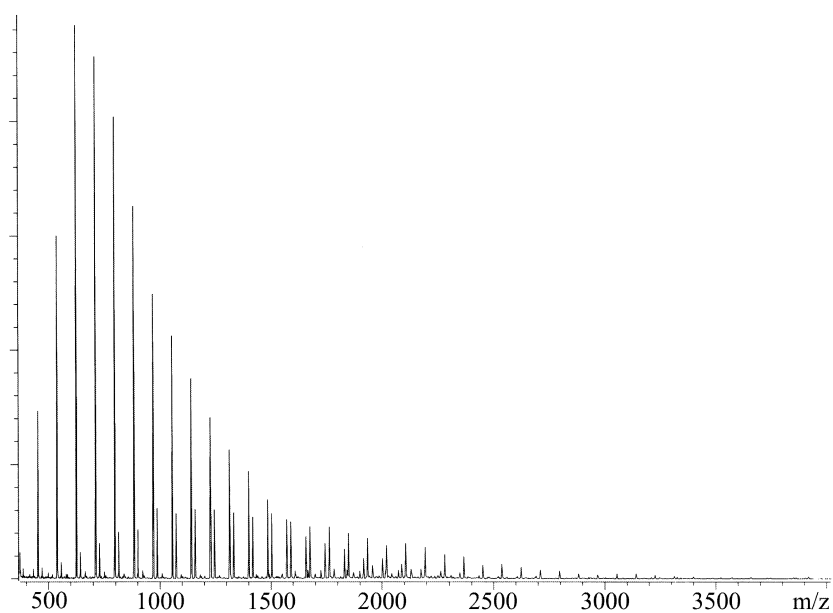


Fig. 3.63: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 8; **15 h-degradation**)

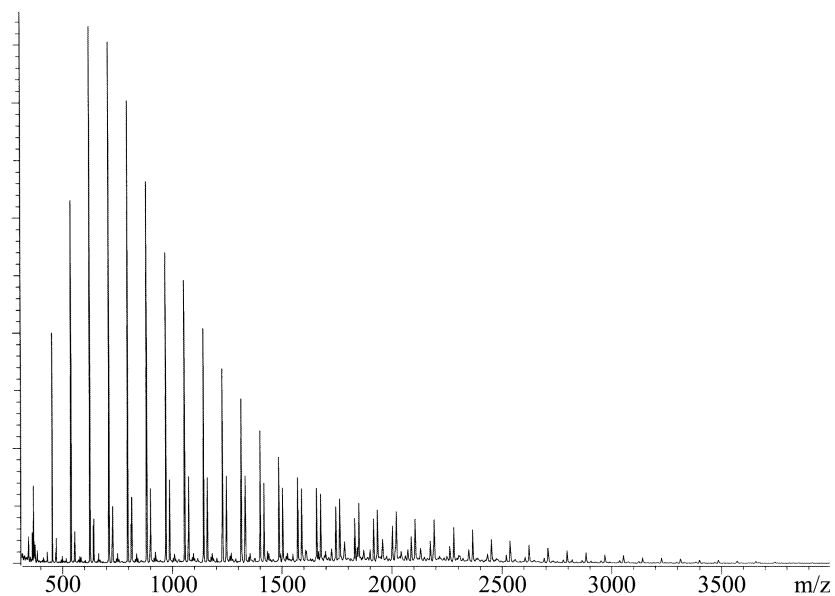


Fig. 3.64: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 9; **18 h-degradation**)

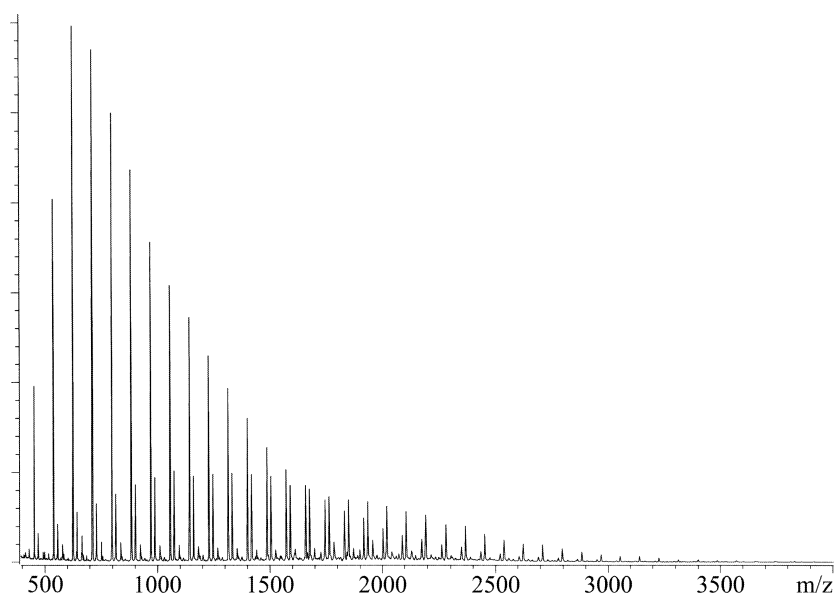


Fig. 3.65: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 10; **21 h-degradation**)

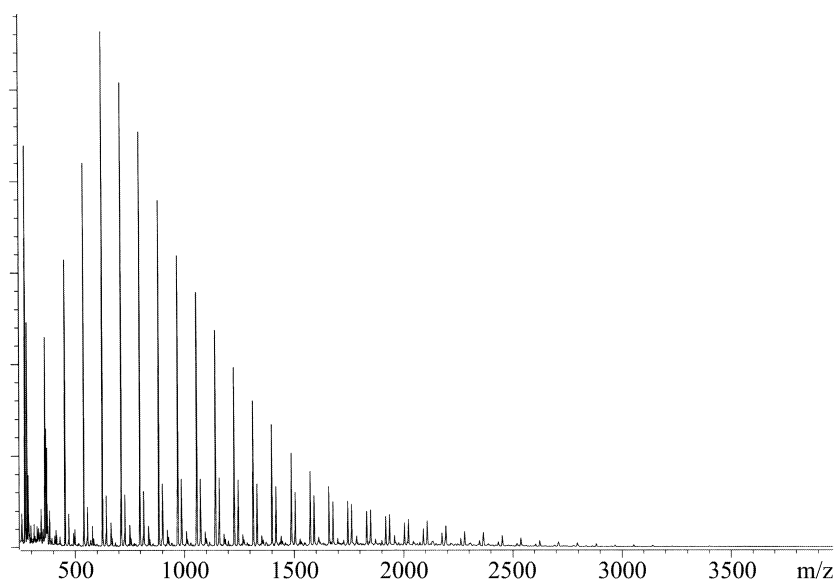


Fig. 3.66: MALDI-TOF MS spectrum of the lipase-catalyzed degradation products of *ata*-P(3HB). (Table 3.15: Entry 11; **24 h-degradation**)

また、構造体の組成比変化は *ata*-P(3HB) を基質に用いても *syn*-P(3HB) を基質に用いた場合と同様の結果が得られた。すなわち、Fig. 3.56 より、水酸基末端型構造は分解反応開始直後に分解生成物中に著量含まれていて、分解反応の進行に伴って減少するのに対して、環状型は反応開始直後から著量含まれている上に反応時間の経過に伴って組成比が上昇することが明らかになった。

これまでの検討から本分解反応はポリマー試料のタクティシティーの影響を受けないことが示されており、本検討による分解生成物の構造解析の結果も本分解反応がポリマー試料のタクティシティーに影響されずに進行すること示した。

すなわち、化学触媒重合により得られた高分子量 P(3HB) を有機溶媒中で Novozym<sup>®</sup> 435 により分解させたところ、分解生成物はポリマー試料のタクティシティーに影響されずに環状型が主成分であった。また、分解生成物構造の経時変化解析より、*syn*-P(3HB) と *ata*-P(3HB) いずれのポリマーを基質に用いても分解反応開始直後は分解生成物中の水酸基末端型オリゴマーの組成比は比較的高く、反応の進行に伴って環状型へと移行していくことが明らかとなった。以上の結果から、本分解反応は反応系に存在した微量の水分を用いた加水分解反応によるポリマー試料のオリゴマー化と環状型オリゴマー生成反応の二つが同時に進行していると考えられた。また、*ata*-P(3HB) を基質に用いても、分解反応時間に依存せずに環状 7 量体オリゴマーが MALDI-TOF MS スペクトル中でピークトップであったことから、環状型オリゴマー生成反応が与える一定分子量のオリゴマーが環状 7 量体オリゴマーであると考えられた。

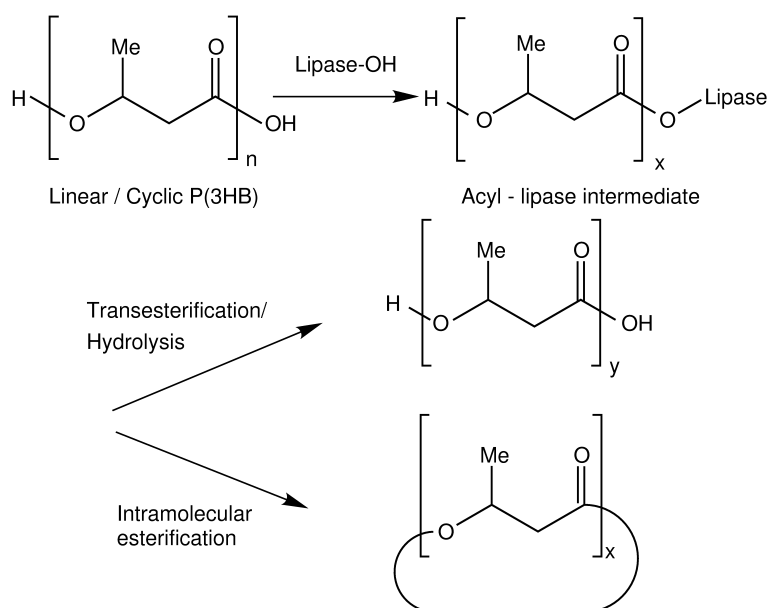


また、反応溶媒にトルエンよりも若干疎水性の高い *o*-キシレンを用いても本反応は迅速に進行し、生成物中の環状型オリゴマー組成率が若干上昇することも明らかになった。さらに、ポリマー試料である *ata*-P(3HB) の数平均分子量を 110000 に増加させてキシレン中、800 wt.-%の Novozym<sup>®</sup> 435 を作用させたところ、分解反応はポリマー試料の分子量の影響を全く受けずに進行して環状型オリゴマーを主生成物として与えた。

以上の検討から、本分解反応はトルエンや *o*-キシレンといった疎水性有機溶媒中で P(3HB) のタクティシティーやポリマー試料の分子量の影響を受けずに迅速に進行し、環状型オリゴマーを主生成物として与えることが明らかになった。

### 3.3.4 酵素触媒分解の反応機構について

酵素触媒重合反応の解析から、リパーゼは P(3HB) ポリマー鎖をも基質として認識し、Scheme 3.67 に示したようなアシル酵素中間体を形成することが示された。したがって、酵素触媒反応による P(3HB) ポリマー鎖の分解反応も Scheme 3.67 に示したようにアシル酵素中間体を經由して進行すると考えられる。また、本分解反応がポリマー試料のタクティシティーの影響を受けなかったことから、本反応に用いた Novozym<sup>®</sup> 435 はアシル酵素中間体形成時に広い基質特異性を有していることが示唆された。



Scheme 3.67: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed degradation of P(3HB).

また、環状型オリゴマーが低ポリマー試料で著量生成したことから、本分解反応では Scheme 3.67 に示したように酵素がポリマー試料を認識してアシル酵素中間体を形成した後分子内エステル交換反応にて環状型オリゴマーを生成したと考えられる。また、本分解反応はポリマー試料濃度が低い方がより迅速に進行したことから、このアシル酵素中間体における分子内エステル交換反応が主たる分解反応であると考えられる。したがって、本分解反応は反応系に対して加水分解反応のための水を添加する必要がないために、トルエンのような疎水性有機溶媒中でも迅速に進行したと考えられる。

有機溶媒環境中における酵素触媒反応が数多く報告され、酵素が有機溶媒中で活性を示すためには酵素が高次構造保持のための結晶水を有することが必須であると知られている。したがって、結晶水を吸収してしまう親水性溶媒環境では酵素活性は低下し、疎水性溶媒環境では酵素活性を良好に維持する。リパーゼを触媒に用いた反応も例外ではなく、基質

の溶解性のために親水性溶媒を用いるときには酵素活性維持のために少量の水分添加が必要となる。今回の反応溶媒に関する検討では、上記のように広く知られている現象と若干異なる結果が得られた。すなわち、親水性溶媒であるアセトニトリル中でも分解反応が進行した。酵素スクリーニングのときにはアセトニトリルに酵素活性維持のための水分を添加したが、反応溶媒スクリーニングのときには水分添加を行っていない。これは、本分解反応で用いた Novozym<sup>®</sup> 435 が固定化酵素であるため、非固定化酵素に比べて高次構造が安定しているために水分添加を行わなかった親水性溶媒中でも高次構造を保持した結果だと考えられる。

また、アセトニトリル中では水が溶媒と混和という形態で存在することが知られている。したがって、アセトニトリル中で本分解反応を行った場合に水酸基末端型オリゴマーが主生成物として得られたのは、アシル酵素中間体に対する求核攻撃性に優れた水が系内に安定して存在したためと考えられる。それに対して、水が系内に存在しにくいトルエン溶液中での分解反応では水を用いずにアシル酵素中間体における分子内エステル交換反応により分解反応が進行し、環状型オリゴマーが主生成物として得られたと考えられる。したがって、酵素活性部位周辺の水分の存在状態を制御することで、分解反応の進行形態を加水分解型と分子内エステル交換型の中から選択できると考えられる。しかしながら、親水性溶媒中の水分を限りなく除去した場合、酵素活性維持に必要な水分が全て溶媒中へと拡散して酵素の分解活性が著しく低下する可能性が大きい。また、ジイソプロピルエーテル溶液中での分解反応により得られた分解生成物の環状型オリゴマーと水酸基末端型オリゴマーの組成比は、トルエン溶液中での分解反応で得られたそれとアセトニトリル溶液中での分解反応で得られたその中間を示していた。以上のことから、本分解反応で得られる構造体を制御する場合には反応系内の水分量を制御するよりも、反応溶媒を適切に選択する方法が優れていると考えられる。

水がアシル酵素中間体に対して優れた求核攻撃性を有していることは、分解生成物中における構造体組成比の経時変化からも示された。すなわち、分解反応開始直後には主生成物が環状体オリゴマーであるものの、水酸基末端型オリゴマーの組成比が分解反応終了時に比べて遥かに高い。この結果は、分解反応の初期段階で加水分解反応が多く生じていることを示している。酵素は活性保持に必要な水以外にも水分を保持していると考えられており、これらの水が分解反応に関与したと考えられる。すなわち、アシル酵素中間体に対する水の求核攻撃性はアシル酵素中間体のアシル鎖末端水酸基や系内に存在するオリゴマーの末端水酸基のそれより強いために、分解反応の初期段階では酵素由来の水を用いた加水分解反応が優先して生じていると考えられる。したがって、SEC チャートを用いた分解反応の経時変化解析より、分解初期はランダムなエンド型で進行したことが示されたのは、酵素由来の水を利用した加水分解反応であると考えられた。

しかしながら、加水分解反応が用いる水分は添加した酵素に由来しているため、反応系に限られた量しか存在しない。したがって、酵素由来の水分が加水分解反応で完全に消費された分解反応中盤からは、主たる分解反応がアシル酵素中間体における分子内エステル交換による環化反応に移行する。このために分解反応の進行に伴って分解生成物中の水酸基末端型オリゴマー組成比が減少し、環状型オリゴマー組成比が上昇したと考えられる。

### 3.3.5 酵素触媒分解における環化反応機構について

環状型オリゴマーを与える環化反応は Scheme 3.67 に示したように、アシル酵素中間体におけるバックバイティング的な分子内エステル交換反応により進行することが今までの検討から示された。

しかしながら、本分解反応では反応時間に影響されずに 7 量体の環状型オリゴマーが優先して得られることが明らかになっており、このオリゴマーサイズ選択的な反応は Scheme 3.67 からだけでは説明できない。そこで本項では有機溶媒中における酵素触媒環化反応について詳細に検討した。

本検討は SFC を用いて単一分子量に分別したオリゴマーを基質として用いることで行った。SFC に関しては第 2 章 酵素触媒重合に詳細を記した。

#### (1) 環化反応のオリゴマーサイズ選択性

本項では単一分子量に分別した 4~10 量体の水酸基末端型オリゴマーを基質に用いて検討した。これら基質を P(3HB) 分解反応と同条件下で Novozym<sup>®</sup> 435 と作用させて得られたオリゴマーサイズを MALDI-TOF MS により解析し、本環化反応のオリゴマーサイズ選択性を検討した。MALDI-TOF MS スペクトルの積分値解析は Córdova らが報告した方法<sup>17)</sup>に従った。結果を Table 3.16 にまとめた。

Table 3.16: Novozym<sup>®</sup> 435 catalyzed cyclization of several molecularly homogeneous linear oligomers<sup>a)</sup>.

Entry	Substrate	Products	Composition <sup>b)</sup>	
			<i>Cyclic</i>	<i>Linear</i>
1	<i>Linear</i> 4-mer	3-mer	1.00	0.54
2		4-mer	1.05	3.70
3		5-mer	0.86	1.64
4		6-mer	0.55	1.00
5		7-mer	1.12	0.90
6		8-mer	0.49	0.62
7		9-mer	0.26	0.19
8		10-mer	0.10	0.10

*continues to next page*

*continues from previous page*

Entry	Substrate	Products	Composition <sup>b)</sup>	
			<i>Cyclic</i>	<i>Linear</i>
9	<i>Linear 5-mer</i>	3-mer	1.00	0.61
10		4-mer	1.47	8.86
11		5-mer	8.12	26.04
12		6-mer	6.55	9.37
13		7-mer	6.23	5.33
14		8-mer	5.60	4.95
15		9-mer	3.48	3.44
16		10-mer	2.50	3.03
17	<i>Linear 6-mer</i>	3-mer	1.00	0.00
18		4-mer	0.08	0.28
19		5-mer	2.70	1.40
20		6-mer	9.63	2.34
21		7-mer	3.23	6.52
22		8-mer	1.97	2.02
23		9-mer	1.49	1.77
24		10-mer	0.58	0.84
25		11-mer	0.50	0.72
26		12-mer	0.28	0.66
27		13-mer	0.00	0.39
28	<i>Linear 7-mer</i>	3-mer	1.00	0.00
29		4-mer	0.82	2.73
30		5-mer	2.86	5.02
31		6-mer	17.95	11.84
32		7-mer	40.54	22.38
33		8-mer	6.33	7.33
34		9-mer	2.84	4.67
35		10-mer	3.14	3.98
36		11-mer	1.27	3.60

*continues to next page*

*continues from previous page*

Entry	Substrate	Products	Composition <sup>b)</sup>	
			<i>Cyclic</i>	<i>Linear</i>
37	<i>Linear 7-mer</i>	12-mer	0.93	2.81
38		13-mer	0.68	1.63
39		14-mer	0.47	1.55
40	<i>Linear 8-mer</i>	3-mer	1.00	4.71
41		4-mer	1.05	13.06
42		5-mer	8.03	12.71
43		6-mer	34.09	12.37
44		7-mer	71.37	30.25
45		8-mer	71.10	46.99
46		9-mer	8.11	6.91
47		10-mer	3.58	4.36
48		11-mer	4.81	3.20
49		12-mer	1.53	2.83
50		13-mer	0.00	2.97
51	<i>Linear 9-mer</i>	3-mer	1.00	0.00
52		4-mer	0.69	1.20
53		5-mer	2.35	2.18
54		6-mer	8.21	3.37
55		7-mer	13.31	5.71
56		8-mer	17.66	12.13
57		9-mer	18.13	15.98
58		10-mer	2.36	3.67
59		11-mer	1.22	2.27
60		12-mer	1.15	1.67
61		13-mer	0.50	1.46
62		14-mer	0.24	1.07
63		15-mer	0.00	0.95
64		16-mer	0.00	0.60

*continues to next page*

continues from previous page

Entry	Substrate	Products	Composition <sup>b)</sup>	
			Cyclic	Linear
65	Linear 9-mer	17-mer	0.00	0.43
66		18-mer	0.00	0.18
67	Linear 10-mer	3-mer	1.00	0.57
68		4-mer	0.29	1.23
69		5-mer	1.58	0.83
70		6-mer	4.18	1.24
71		7-mer	5.81	1.42
72		8-mer	5.92	2.23
73		9-mer	7.33	3.97
74		10-mer	6.90	4.79
75		11-mer	1.57	1.43
76		12-mer	0.83	0.58
77		13-mer	0.79	0.63
78		14-mer	0.32	0.33

<sup>a)</sup> 0.25 % Toluene solution of the molecularly homogeneous oligomer was stirred with 1000 wt.-% Silica Novozym at 40 °C for 24 h.

<sup>b)</sup> Relative value to cyclic 3-mer.

Table 3.16 に示した組成比の値は環状型 3 量体のスペクトル積分値を 1 として計算した。したがって、絶対値に意味はなく、同一基質のデータ内で mole 比を求めることにより他の基質と比較できるものである。

本検討により、いずれのオリゴマーサイズを基質に用いても、基質オリゴマーよりも大きなオリゴマーが生成物中に含まれることが確認された。したがって、本検討のように基質濃度を低下させたときでも、リパーゼ触媒による分子間エステル交換反応が進行することが明らかになった。

生成物中に含まれる環状型オリゴマーの比率を解析した結果、4, 5-mer を基質に用いた場合は生成物中の環状型組成比が 30 % 台であるのに対して、6~10-mer を基質に用いると生成物中の環状型組成比は 50 % 台後半にまで上昇することが明らかになった。この結果より、本分解反応中に生じた環化反応はこれまでの検討から示されたように、オリゴマーサイズ選択性を有しており、その選択されるオリゴマーサイズは 6-mer 以上であると考え



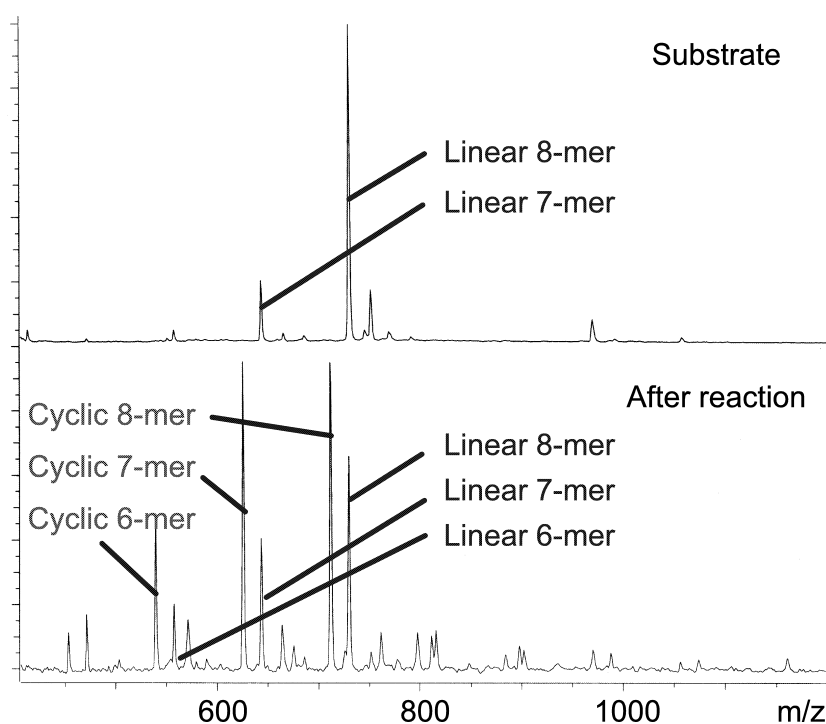


Fig. 3.68: MALDI-TOF MS spectrum of before and after the cyclization of hydroxy-type 8-mer catalyzed by lipase from *Candida antarctica*<sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 0.25 % Toluene solution of the molecularly homogeneous oligomer was stirred with 1000 wt.-% Silica Novozym at 40 °C for 24 h.

られる。8量体の水酸基末端型オリゴマーを環化させた際のMALDI-TOF MSスペクトルをFig. 3.68に示した。

また、環化反応におけるオリゴマーサイズ選択性はアシル酵素中間体を形成する段階で決定され则认为られる。先の検討から、本分解反応に用いた *Candida antarctica* 由来リパーゼを6-mer以上の大きさのオリゴマーに作用させたときに環化反応が良好に進行することが示されたが、この結果からは本反応のオリゴマーサイズ選択性は導き出せない。すなわち、酵素が基質を認識してアシル酵素中間体を形成した際に最も確率の高いアシル鎖長がオリゴマーサイズ選択性の結果であり、この本環化反応に適したオリゴマーサイズより大きなオリゴマーを基質に用いれば、酵素は適したアシル鎖長を用いて中間体を形成し、環状型生成物を与えると考えられる。そこで、環化反応で生成する環状型オリゴマーの大きさを詳細に検討することで基質オリゴマーサイズの保持性を調べ、本環化反応のオリゴマーサイズ選択性について検討した。本検討は基質オリゴマーの環状型組成比が生成物全体に占める割合を算出することで行った。結果をFig. 3.69に示した。

Fig. 3.69より、基質として用いたオリゴマーのサイズを変更せずに最も環化したのは

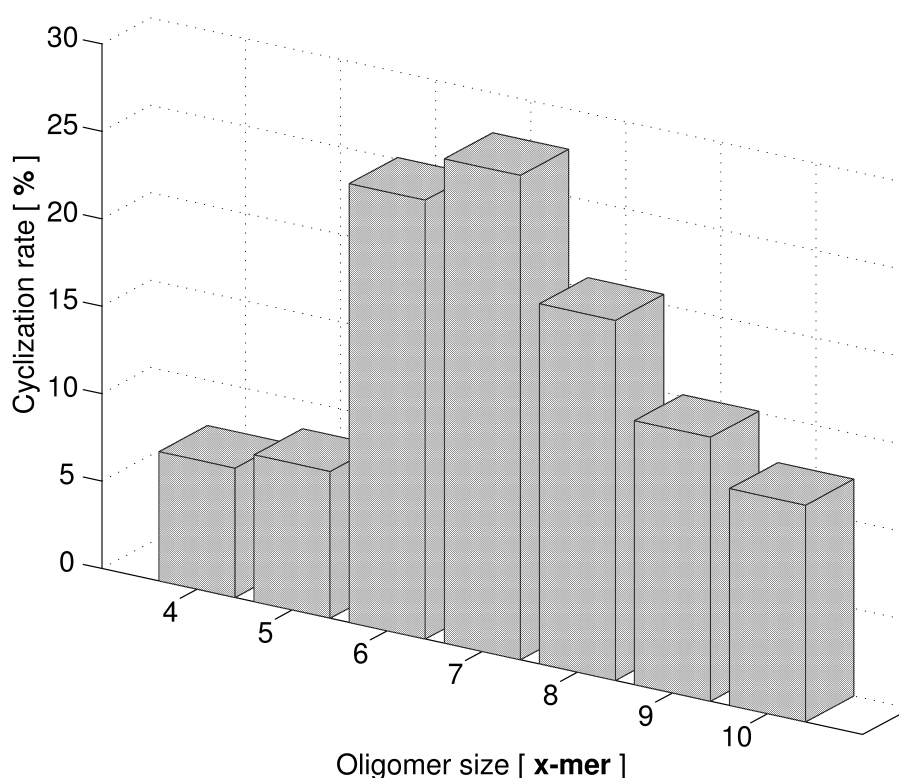


Fig. 3.69: Cyclization rate with keeping the original oligomer size <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 0.25 % Toluene solution of the molecularly homogeneous oligomer was stirred with 1000 wt.-% Silica Novozym at 40 °C for 24 h.

7-mer の水酸基末端型オリゴマーを酵素に作用させたときであった。したがって、*Candida antarctica* 由来リパーゼが環化反応を行う際にアシル鎖として最もよく認識するのは 3-ヒドロキシブタン酸ユニットで 7 量体の長さであると考えられる。また、Fig. 3.69 の形状がポリマー分解生成物の MALDI-TOF MS スペクトルの形状に類似していることから、ポリマーの分解反応過程でもこのオリゴマーサイズ選択性が存在することが示唆された。しかし、本酵素の有するオリゴマーサイズ選択性は厳密なものではなく、3-ヒドロキシブタン酸ユニットの場合には 6~8 量体程度のオリゴマーと良好なアフィニティーを有することが Fig 3.69 より示唆された。これは本酵素がサブユニットなどを有していないために、正確なオリゴマーサイズを認識できないためと考えられる。ただし、4, 5-mer の環状型の生成率は他のオリゴマーサイズと比べて明らかに低かったことから、4, 5-mer の環状型オリゴマーが本酵素の活性部位領域で立体障害を持つ可能性やこれらのサイズのオリゴマーを基質に用いた際に  $k_{cat}$  や  $k_m$  値が大きく変化した可能性が示唆された。

以上の検討から *Candida antarctica* 由来リパーゼが環化反応を行う際にオリゴマーサイズ選択性を有していることが示されたので、既に Uppenbergr により報告された *Candida*

*antarctica* 由来リパーゼの活性部位周辺の立体構造<sup>157)</sup> と合わせて以下に考察した。また、PROTEIN DATA BANK に保管されている、*Candida antarctica* 由来リパーゼと酵素阻害剤である Tween80 が結合した活性部位周辺の立体構造を Fig. 3.70 に示した。

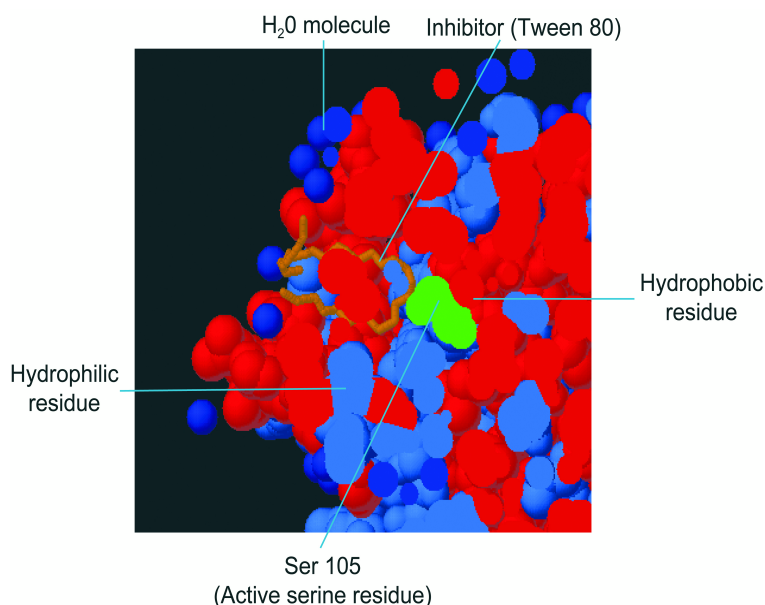


Fig. 3.70: The structure in 3-D of lipase from *Candida antarctica* with inhibitor (Tween80) by RAS MOL. (PDBid. = 1LBT)

*Candida antarctica* 由来リパーゼの活性セリン残基は Ser 105(105 番目のセリン残基) であると報告されており<sup>157)</sup>、Fig. 3.70 では阻害剤が活性部位に入り込んでいる様子がわかる。また、この活性部位のポケット内に存在する阻害剤の炭素骨格の数は 20 を超えており、非常に大きな基質も収容できることが示唆された。

そこで、Uppenberg らが報告した *Candida antarctica* 由来リパーゼの活性部位周辺を二次元図<sup>157)</sup> に 7 量体の環状型 3HB オリゴマーをあてはめた図を作成し、Fig. 3.71 に記した。

若干のひずみが確認されたが、28 員環である 7 量体環状型がすっぽりと収まる大きさを本酵素が有していることが示唆された。また、報告より活性部位ポケットの側面からアミノ酸残基側鎖が張り出していることが明らかになっている (Fig. 3.71 ではアミノ酸残基を示した)。したがって、環化反応で 4 及び 5 量体オリゴマーの環化率が低かったのは、4 及び 5 量体の環状型がこれらアミノ酸残基側鎖と立体障害があった可能性が高い。

また、当研究室の江端らの報告により、ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)を有機溶媒中で本酵素により分解させたときには 2 量体の環状型が得られた。これは 14 員環の大きさであり、活性部位ポケットの側面から張り出したアミノ酸残基側鎖と立体障害がなければ、中程度

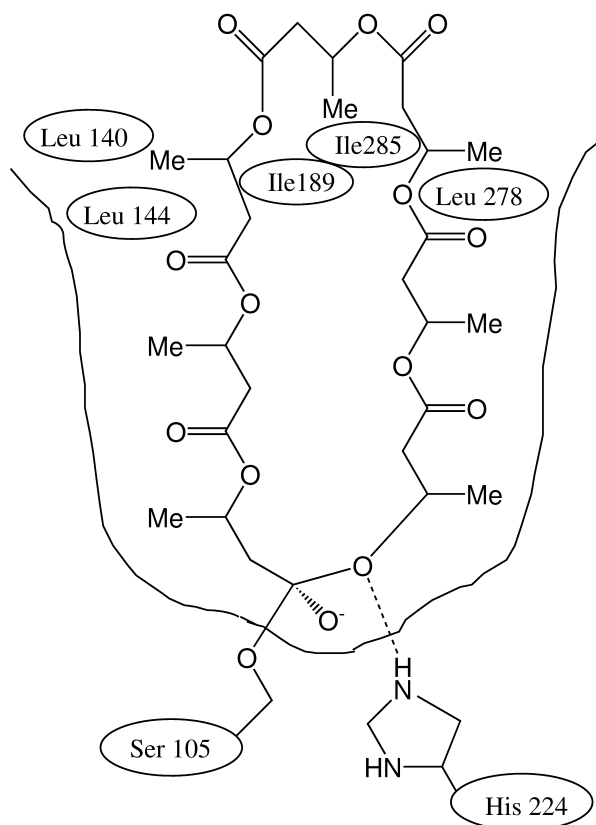


Fig. 3.71: Proposed cyclization mechanism in active site of *Candida antarctica*.

の大きさのマクロリドが本酵素により合成できることが示された。本分解反応においても4及び5量体の環状型オリゴマーよりも3量体の環状型オリゴマーの組成比の方が高かった。(Table 3.16 参照)

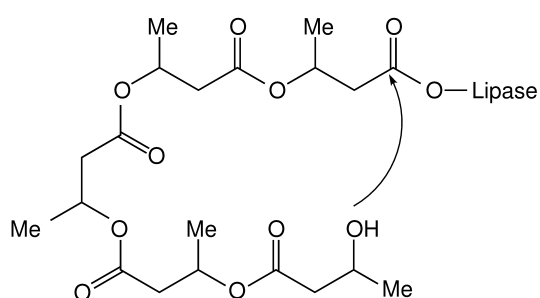
一方、本酵素がリッドを有さないために、より大きな環状型オリゴマーも立体障害をもち、本酵素の活性部位に入ることができ、合成可能であると考えられる。しかしながら、活性部位から反応系側に張り出したオリゴマー領域が酵素と相互作用を有さないため、オリゴマーサイズの増加に伴って、酵素との親和力は低下すると考えられる。したがって、本酵素のオリゴマーサイズ選択性は7量体を中心に示され、より大きな環状型オリゴマーについては立体障害がないために徐々に環化率が低下したと考えられる。

以上の検討から、本分解反応で酵素として用いた *Candida antarctica* 由来リパーゼは直鎖状オリゴマーを環化させるときにサイズ選択性を有していることが示された。そのオリゴマーサイズ選択性のために、3-ヒドロキシブタン酸ユニットでは7量体が最も良好に環化されることが明らかになった。その結果、P(3HB)の分解生成物中には分解反応時間に影響されずに7量体の環状型が最も高い比率で含まれたと考えられる。

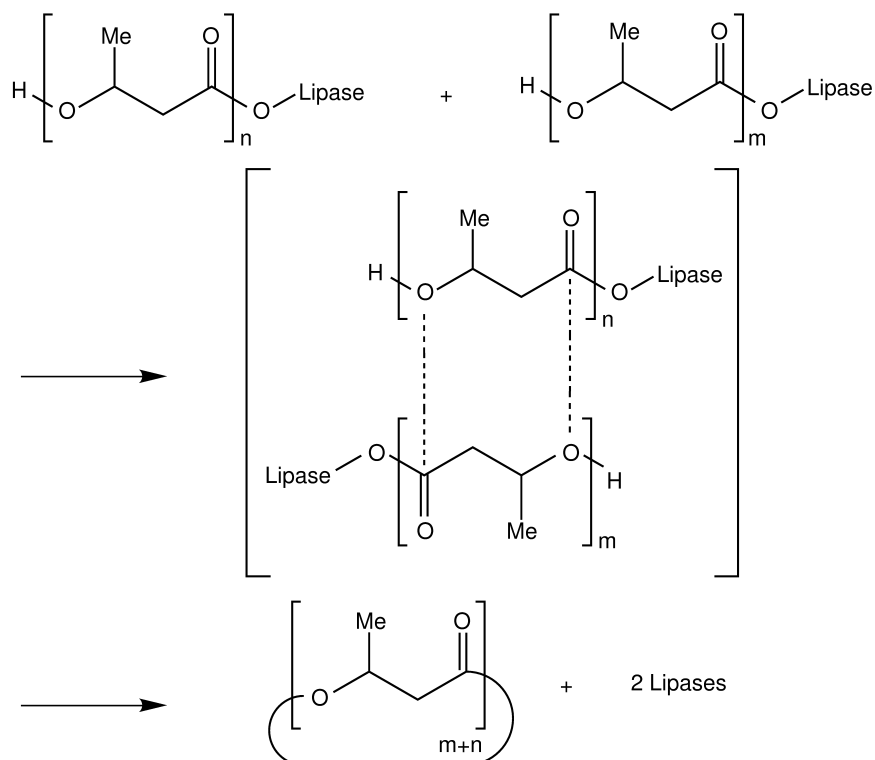
## (2) 環化反応機構

これまでの検討から、本環化反応はアシル酵素中間体内の分子内エステル交換反応により進行していることが示された。第2章 酵素触媒重合においても環状型生成機構について考察したが、一般に環化反応には Fig. 3.72 に示したように分子間反応によるものと分子内反応によるものがある。そこで、単一分子量に分別した環状型オリゴマーを基質に用いた検討を行った。

## a) Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed intramolecular cyclization



## b) Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed intermolecular cyclization



Scheme 3.72: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed cyclization.

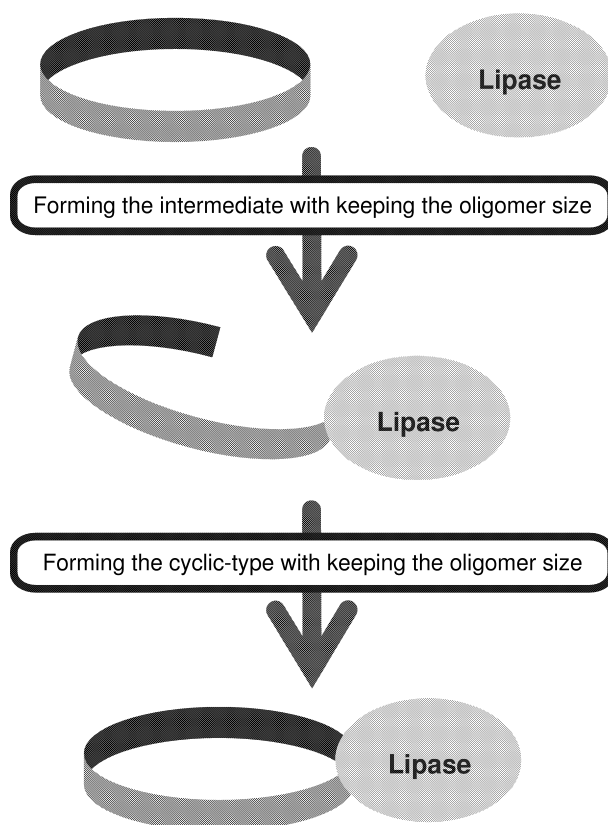


Fig. 3.73: Proposed reaction mechanism of the cyclic oligomer with lipase.

Table 3.17: The reaction of molecularly homogeneous cyclic oligomers <sup>a)</sup>.

Entry	Substrate	Main product
1	7-mer	7-mer
2	8-mer	8-mer
3	9-mer	9-mer
4	10-mer	10-mer
5	11-mer	11-mer

<sup>a)</sup> 0.25 % Toluene solution of the molecularly homogeneous oligomer was stirred with 1000 wt.-% Silica Novozym at 40 °C for 24 h.

Fig. 3.73 に示したように本環化反応がアシル酵素中間体内における分子内エステル交換反応により進行するならば、環状型オリゴマーを基質に用いた場合、律速がアシル酵素中間体形成と水酸基の求核攻撃のどちらの過程であっても、生成物は基質と同じオリゴマー

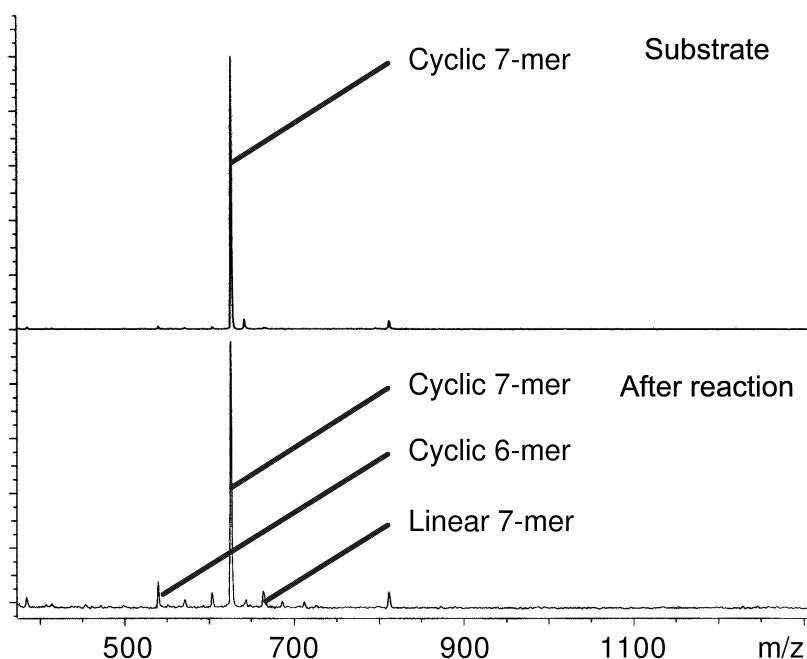


Fig. 3.74: The lipase-catalyzed reaction of cyclic 7-mer <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 0.25 % Toluene solution of the molecularly homogeneous oligomer was stirred with 1000 wt.-% Silica Novozym at 40 °C for 24 h.

サイズを有するはずである。一方、アシル酵素中間体が  $n$  個凝集した分子間エステル交換反応で環化反応が進行すると、得られる環状オリゴマーのオリゴマーサイズは基質に用いたオリゴマーの  $n$  倍になるはずである。

Table 3.17 に単一分子量の環状型オリゴマー 4~11 量体を分解反応と同条件にさらした結果をまとめた。生成物の確認は MALDI-TOF MS を用いて行った。また、7 量体の環状型オリゴマーを用いた反応前後の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 3.74 に示した。

Table 3.17 並びに Fig. 3.74 より、反応前後で主生成物のオリゴマーサイズが変化しないことが明らかとなった。Fig. 3.74 中では基質以外のオリゴマーサイズが生成物中に若干含まれたことが確認された。また、基質の開環体である水酸基末端型オリゴマーは酵素に含まれる水を用いた加水分解反応により生成したと考えられる。したがって、確認された基質オリゴマーよりも小さな環状オリゴマーは、開環反応により生じた水酸基末端型オリゴマーの再環化反応により生成したと考えられる。したがって、本環化反応はこれまでの検討により示されたように、アシル酵素中間体内における分子内エステル交換反応により進行したと考えられる。

### 3.3.6 酵素触媒分解生成物を用いた反応の開発

これまでの検討から、疎水性有機溶媒中でリパーゼを触媒に用いて非天然型 P(3HB) を分解させた場合、環状型オリゴマーが選択的に得られることが明らかになった。そこで、得られた環状オリゴマーを原料に用いた反応について検討した。

#### (1) 分解生成物の再重合

##### a) リパーゼを触媒に用いた再重合反応

環境低負荷な生分解性ポリエステルケミカルリサイクル構築のためには、分解生成物の再重合にも酵素触媒を用いることが望まれる。そこで、ここでは分解反応の触媒に用いた *Candida antarctica* 由来リパーゼをシリカゲルに固定化した Silica Novozym を触媒に用いて、分解生成物の再重合反応について検討した。結果を Table 3.18 にまとめた。

Table 3.18: Novozym<sup>®</sup> 435 catalyzed re-polymerization of the degradation products.

Entry	Enzyme conc. (wt.-%)	Temp. (°C)	Solvent (μL)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$
1 <sup>a)</sup>	100	60	20	680	1600
2 <sup>a)</sup>	100	60	100	620	1300
3 <sup>a)</sup>	100	60	200	380	1100
4 <sup>b)</sup>	5	60	bulk	620	1200
5 <sup>b)</sup>	10	60	bulk	730	1600
6 <sup>b)</sup>	20	60	bulk	720	1600
7 <sup>b)</sup>	50	60	bulk	900	2600
8 <sup>b)</sup>	100	60	bulk	1500	4200
9 <sup>c)</sup>	10	80	bulk	650	1500
10 <sup>c)</sup>	20	80	bulk	760	2100
11 <sup>c)</sup>	50	80	bulk	980	3000
12 <sup>c)</sup>	100	80	bulk	1400	3700
13 <sup>c)</sup>	200	80	bulk	1100	2700
14 <sup>d)</sup>	100	60	20	—	4900



- a) 10 mg of the degradation products in xylene was stirred with 100 wt.-% Silica Novozym at 60 °C for 72 h.
- b) 10 mg of the degradation products was stirred with Silica Novozym at 60 °C for 48 h in bulk.
- c) 10 mg of the degradation products was stirred with Silica Novozym at 80 °C for 48 h in bulk.
- d) 10 mg of the degradation products in toluene was stirred with 100 wt.-% Silica Novozym at 60 °C for 24 h in azeotropic conditions.

Fig. 3.75 に再重合の様子を SEC チャートで示したものを記した。

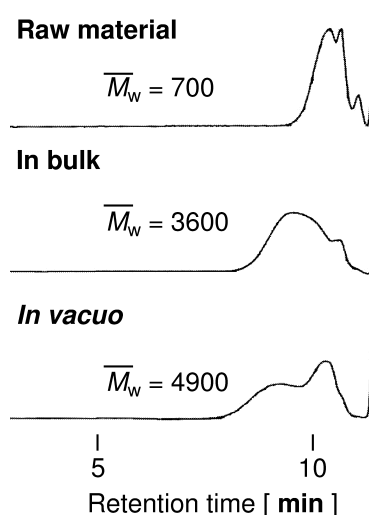


Fig. 3.75: SEC profiles of before and after the lipase-catalyzed re-polymerization of the degradation products.

以上の結果より、有機溶媒中における非天然型 P(3HB) の酵素触媒分解生成物である環状型オリゴマーはリパーゼを触媒に再重合反応の良好な基質になることが明らかになった。また、第 2 章 酵素触媒重合で検討した  $\beta$ -BL をモノマーに用いた場合よりも得られるポリマーの分子量が増加することも明らかになった。反応系内を減圧にした際に基質オリゴマーが重合反応後にも残存した理由として、反応に必要な開始剤である水が系外に放出されたためと考えられるため、減圧開始時点を系内にある程度のオリゴマーが蓄積した時点にする必要があると考えられる。また、本再重合反応系を有機溶媒にて希釈した場合、得られるポリマー分子量が小さくなったことから、本系は有機溶媒の添加により分解反応側に大きく平衡が偏っていると考えられる。

## b) 金属触媒に用いた再重合反応

有機溶媒中における非天然型 P(3HB) の酵素触媒分解生成物である環状型オリゴマーの一般的な重合性を検討するため、ここでは通常の高分子合成で用いられている金属触媒による再重合反応について検討した。

環境低負荷な金属触媒であるチタン系金属触媒と最も一般的な重合触媒であるオクタン酸スズを触媒に用いて様々な条件で検討したところオクタン酸スズを用いた際に良好な再重合反応が進行した。再重合の結果を SEC チャートを用いて Fig. 3.76 に示した。

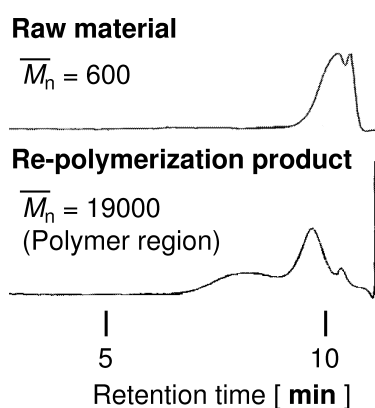


Fig. 3.76: SEC profiles of before and after the re-polymerization of the degradation products by tin octanoate <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup>: The degradation product was stirred with tin octanoate at 100 °C for 6 h.

以上の結果より、環状型 3HB オリゴマーは最も一般的な金属触媒であるオクタン酸スズにより重合反応が迅速に進行することが明らかになった。重合触媒として報告されている金属系触媒は多数存在するため、金属触媒を用いた再重合反応では反応条件検討にまだ領域が残されていると考えられる。しかし、オクタン酸スズで再重合反応が進行したことは、適切な反応系検索において重要な知見であると考えられる。近年は環境に低付加な金属触媒の開発も進んでいることから、環状 3HB オリゴマーもいずれは環境低負荷な触媒により再重合され、ポリマー試料の分子量に到達することが期待される。

## (2) 環状オリゴマーの酵素触媒エステル化

ここでは、有機溶媒中における非天然型 P(3HB) の酵素触媒分解生成物である環状型オリゴマーを基質に用いた酵素触媒エステル化反応について検討した。すなわち、本分解反応に用いた酵素はアシル鎖長選択性を有することが示されたため、単一分子量に分別した環状オリゴマーに対するエステル化反応においてもランダムなエステル化ではなく、エステル化反応においてアシル鎖長が保存されることが期待される。反応前後の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 3.77 に示した。

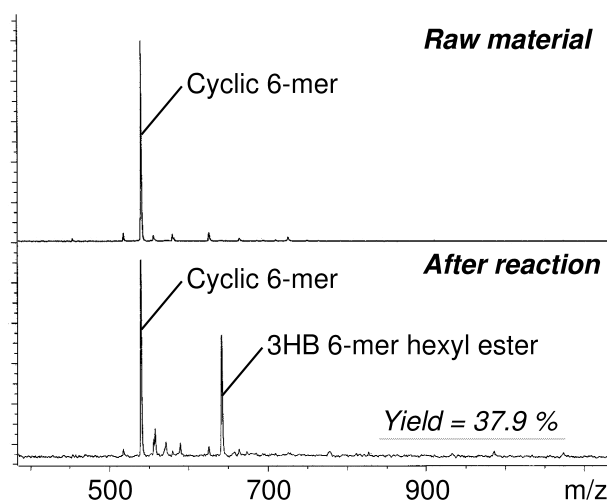


Fig. 3.77: MALDI-TOF MS spectrum of before and after the lipase-catalyzed esterification of the degradation products with *n*-hexanol <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup>: A mixture of cyclic 3HB 6-mer (1.3 mg) and immobilized lipase from *Candida antarctica* (6.5 mg) was stirred in toluene (260  $\mu$ L) containing *n*-hexanol (40.7 mg) at 40 °C for 48 h.

Fig. 3.77 より、*Candida antarctica* 由来リパーゼを触媒に用いた単一分子量の環状 3HB オリゴマーのエステル化では、ランダムなエステル化はおこらずに、基質に用いた 6 量体オリゴマーのエステル体のみが生成することが明らかになった。

これは本エステル化反応が Fig. 3.78 に示す機構で進行したためと考えられる。すなわち、原料に用いたオリゴマーが環状構造を有しているため、酵素とアシル中間体を形成する際に、アシル鎖長は必ず原料に用いたオリゴマーと同一になる。そこへアルコールが求核攻撃を仕掛けるため、得られるエステル体のアシル鎖長は原料のオリゴマーから保存されると考えられる。本反応は逆反応も容易に進行することが予想され、得られた鎖状エステルからの環状型生成も十分に考えられる。収率が低く留まったことから、生成物である鎖状エステルの方が基質として認識されやすいと考えられる。これは、鎖状エステルのアルコール側が全く置換基を有さないのに対して、環状オリゴマーのアルコール酸素が置換

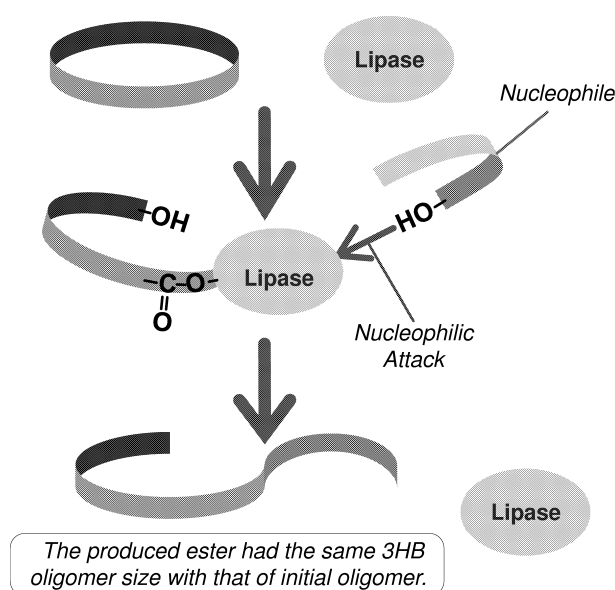


Fig. 3.78: Proposed mechanisms of the lipase-catalyzed esterification of a cyclic oligomer with a nucleophile.

基を有する炭素に結合していることに由来する立体的かさ高さが影響していると考えられる。しかし、これらの問題は求核剤濃度などで解決できる可能性が高く、複数のエステル結合を有した基質のエステル化反応をランダムではなく進行させるのは非常に困難であることなどから、本エステル化反応並びに本検討で明らかにした知見は重要であると考えられる。また、本検討の結果、有機溶媒中における非天然型 P(3HB) の酵素触媒分解生成物である環状型オリゴマーは再重合の原料だけでなく、有機合成における重要な合成中間体としても利用できることが示された。

## 3.4 総括

本章における検討結果を以下のように総括した。

1. 分解反応に用いる有機溶媒の疎水性を変化させることで、分解生成物中に含まれる水酸基末端型と環状型の構造組成比を制御できることが示された。すなわち、親水性有機溶媒中で分解させた場合には水酸基末端型オリゴマーが主生成物として得られ、疎水性有機溶媒中で分解させた場合には環状型オリゴマーが主生成物として得られた。
2. トルエンや *o*-キシレンといった疎水性有機溶媒中での分解反応は迅速に進行し、24 時間でほぼ平衡に達した。また、本分解反応速度はポリマー試料濃度の影響を強く受け、ポリマー濃度が低い方がより迅速に分解反応が進行し、ポリマー試料濃度の低下に伴って分解生成物中の環状体組成比が上昇した。
3. 反応温度は分解反応にさほど影響を与えなかったが、高い反応温度は酵素の分解活性を失活させた。また、40 °C でも分解反応は迅速に進行した。
4. ポリマー試料の分子量は分解反応にさほど影響を与えなかったが、高分子量ポリマーを基質に用いた場合、分解反応を迅速に進行させるために要した酵素量は若干上昇した。また、ポリマー試料のタクティシティーは分解反応に影響を与えなかった。
5. トルエンや *o*-キシレンといった疎水性有機溶媒中で分解反応を行った場合、分解生成物は環状型オリゴマーが主成分であった。しかしながら、分解反応開始直後は分解生成物中に水酸基末端型オリゴマーが多く存在した。したがって、本分解反応では、初期段階にランダム加水分解反応が優先的に進行し、その後に環化反応が進行すると考えられた。
6. 本分解反応に用いた酵素による環化反応を単一分子量に分別した水酸基末端型オリゴマーを用いて詳細に検討した結果、*Candida antarctica* 由来リパーゼはアシル酵素中間体を形成する段階でオリゴマーサイズ選択性を有すると考えられた。その結果、分解生成物中の環状型 7 量体が反応時間によらずに最も生成していた。
7. 本酵素による環化反応機構を単一分子量に分別した環状型オリゴマーを用いて検討した結果、反応前後でオリゴマーサイズが変化しないことが明らかになった。したがって、本環化反応はアシル酵素中間体内の分子内エステル交換反応により進行したと考えられた。
8. 本分解反応により得られた環状型オリゴマーはリパーゼもしくはオクタン酸スズを触媒に用いた開環重合により容易に再重合した。また、リパーゼを触媒とした重

合反応では、 $\beta$ -BL を原料に用いた重合反応よりも得られるポリマー分子量が増加した。

9. リパーゼを触媒に用いたエステル化反応の基質に単一分子量の環状型オリゴマーを用いた結果、得られたエステル体のアシル鎖長は基質の有するアシル鎖長から変化せず、ランダムなエステル化反応が生じなかった。

## 第4章

# 酵素充填カラムを用いた生分解性脂肪族ポリエステルの連続分解

### 4.1 緒言

本研究のこれまでの検討から、化学合成により得られる非天然型 P(3HB) はトルエンやキシレンといった疎水性有機溶媒中で Novozym<sup>®</sup> 435 の作用を受けて迅速に分解し、合成中間体やポリマーの原料として有用な環状型オリゴマーへと変換されることが明らかになった。また、当研究室のこれまでの検討から、ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトン [poly( $\epsilon$ -caprolactone): PCL] やポリブチレンアジペート [poly(butylene adipate): PBA] も同様に疎水性有機溶媒中で Novozym<sup>®</sup> 435 の作用により分解され、環状型オリゴマーへと変換されることが見出された<sup>25, 26, 136, 188</sup>)。PCL に関しては微量の水を含む超臨界二酸化炭素中でも Novozym<sup>®</sup> 435 の作用により分解されることが確認された<sup>83, 119, 190</sup>)。

以上の結果から、酵素による本分解反応は、生分解性ポリマーを再生可能資源として利用できる可能性を示した。しかしながら、特に P(3HB) をポリマー試料に用いた場合、本分解反応は迅速に分解反応を進行させるために高い酵素濃度を要求すると同時に、分解生成物中の環状型オリゴマーの組成比を高くするためには多くの有機溶媒を使用するため、より効率的な反応系の構築が求められた。

これらの問題点を解決し、また、本分解反応を工業的に適用することを視野にいれた場合、反応はこれまでの検討のようなバッチ式ではなく、連続法が望ましいと考えられる。酵素を用いた反応を連続的に行う検討は既に Novozymes Japan 社が行っており、油脂の酵素触媒による連続エステル交換反応を実用化している。その際の反応器は酵素充填カラムであり、ポンプを用いて連続的に基質である油脂を通過させることで連続エステル交換反応とした。その原理で、連続的に本分解反応を行うことが可能か否かを考察した結果、

以下のように可能であると考えられた。

1. Novozym<sup>®</sup> 435 は繰り返しの使用に耐えられる。
2. 反応器は Novozym<sup>®</sup> 435 を HPLC 用カラムに充填することで作製できる。
3. 分解温度の制御は作製した酵素カラムをカラムオープン内に設置することで可能である。
4. 酵素カラムに通過させるポリマー量の制御は調製するポリマー溶液の濃度調整及び HPLC ポンプを用いることで可能である。
5. 環状オリゴマー生成機構の解析結果から、一度生成した環状オリゴマーは希釈条件下で求核剤が存在しない場合に酵素の作用を受けず、直鎖状オリゴマーのみが酵素の作用を受けて環化することが明らかである。

そこで、本章では固定化酵素カラムを作製し、それに連続的にポリマー試料溶液を通過させる連続分解反応について検討した。移動相に用いる溶媒の検討は、はじめに工業的にも使用が可能であり、バッチ式本分解反応に溶媒として用いられることが確認されたトルエンを用いて行った。ついで、用いる有機溶媒量の更なる削減と本分解反応の反応性の向上を期待して、環境低負荷溶媒として着目されている超臨界二酸化炭素を移動相に用いる検討も行った。



## 4.2 試薬・機器・方法

### 4.2.1 試薬・酵素

本章の研究に用いた試薬類を Table 4.1 にまとめた。

Table 4.1: List of chemical reagents.

試薬名	製造会社	等級
$\beta$ -ブチロラクトン	東京化成工業 (株)	化学用
ジブチルチンジクロリド	東京化成工業 (株)	
オレイン酸カリウム	東京化成工業 (株)	
18-Crown-6	Aldrich Chemical Co., Inc.	
ピリジン	純正化学工業 (株)	純正特級
水素化カリウム	ナカライテスク (株)	
ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトン (平均分子量: 約 70,000 - 100,000)	和光純薬工業 (株)	
ポリブチレンアジペート (Average Mw: ca. 12,000 (GPC))	Aldrich Chemical Co., Inc.	
セライト 545	純正化学工業 (株)	化学用
モレキュラーシーブス 4A	純正化学工業 (株)	
重クロロホルム	ISOTEC INC.	
トルエン	純正化学工業 (株)	純正一級
トルエン	関東化学 (株)	HPLC 用
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
エタノール	信和アルコール (株)	研究用
アセトン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
メタノール	ゴードー溶剤 (株)	業務用
ヘキサン	ゴードー溶剤 (株)	業務用

本文中において特に指示が無い限り、次の試薬は以下のような精製を行った後に反応に用いた。

- $\beta$ -ブチロラクトン** : 50 g の  $\beta$ -BL をジエチルエーテル 50 mL に溶解させて 500 mL 分液漏斗に移し、そこへ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 50 mL を加えて、酪酸などのカルボン酸の水層側への抽出操作を 6 回繰り返した。ついで、飽和塩化ナトリウム水溶液を 50 mL 加え、エーテル層を洗浄した。得られたエーテル層に硫酸ナトリウムを加え、一晚乾燥を行った。硫酸ナトリウムを綿栓濾過により濾別し、エーテル層をエバポレーターで減圧濃縮することにより粗精製  $\beta$ -BL を得た。得られた粗精製  $\beta$ -BL に水素化カルシウムをスパチュラ 2 杯分加えて常圧下で乾燥を行った後、減圧蒸留 (34 mmHg, 76 °C) を行うことで  $\beta$ -BL の無水化及び精製を行った。減圧蒸留を同条件にて 2 回繰り返した。
- クロロホルム** : クロロホルム 2 L に対してモレキュラーシーブス 4A を大きじ 1 杯加え、常圧蒸留を行った。

本章の研究に用いた酵素を以下の Table 4.2 に記した。

Table 4.2: List of enzymes.

Enzyme origin	Ab.	Manufactures
Novozym <sup>®</sup> 435 (Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> ) Activity = Approx. 10,000 PLU/g <sup>b)</sup>	CA	Novozymes Japan

- <sup>b)</sup> : **Unit Definition** : The ester synthesis activity of Novozym 435 is expressed in Propyl Lautate Units per gram (PLU/g).  
Novozym 435 is immobilized on a macroporous acrylic resin.  
The product has a water content of 1-2 % w/w.

## 4.2.2 機器

## (1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
カラム	: GPC K-G + GPC K-804	昭和電工 (株)
カラムオープン	: CO-2065 Plus	日本分光 (株)
検出器	: 示差屈折率計 RI-930	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: クロロホルム (1 % エタノール含有)	
測定条件	: 流速 = 1.0 mL/min.	
	: 注入量 = 100 $\mu$ L (0.1 % クロロホルム溶液)	
	: 温度 = 37 $^{\circ}$ C	
検量線用標準試料	: Special Polystyrene Standard	ケムコ化学 (株)

$$\overline{M}_w = 1.00 \times 10^5$$

$$\overline{M}_w = 9.00 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 5.00 \times 10^4$$

$$\overline{M}_w = 2.20 \times 10^3$$

$$\overline{M}_w = 1.75 \times 10^4$$

$$\overline{M}_w = 9.06 \times 10^2$$

(2) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (サイズ排除限界:  $M = 2100$ )

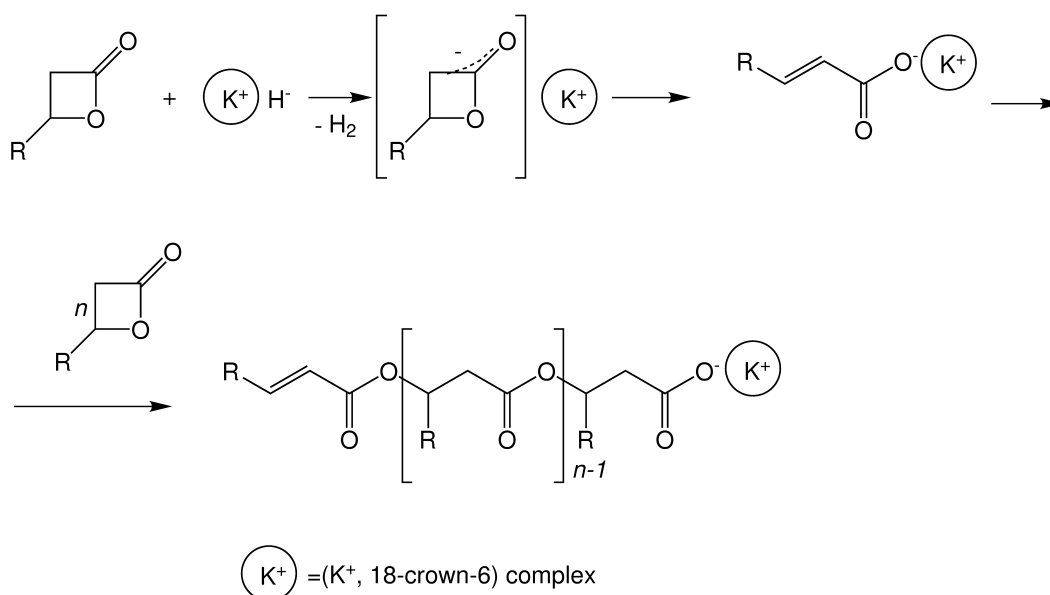
ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
カラム	: GPC K-G + GPC K-801	昭和電工 (株)
カラムオープン	: CO-2065 Plus	日本分光 (株)
検出器	: 示差屈折率計 RI-930	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: クロロホルム (1 % エタノール含有)	
測定条件	: 流速 = 1.0 mL/min.	
	: 注入量 = 20 $\mu$ L (0.3 % クロロホルム溶液)	
	: 温度 = 37 $^{\circ}$ C	

FT-NMR	: Varian NMR 300	Varian, Inc.
FT-NMR	: JEOL JNM-LA300	日本電子(株)
FT-IR	: FT-IR-5300	日本分光(株)
MALDI-TOF MS	: proflex	Bruker Instruments Inc.
MALDI-TOF MS	: ultraflex	Bruker Instruments Inc.
(測定用マトリックス)	: dihydroxybenzoic acid	Sigma Chemical Co.
APCI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
ESI-MS	: LCQ	Finnigan MAT Inc.
示差走査熱量計	: DSC-60	(株)島津製作所
遠心分離機	: H-108NA	国産遠心機(株)
遠心分離機	: H-9R	(株)コクサン
ガラス電極式水素イオン濃度計	: HM-20E	東亜電波工業(株)
凍結乾燥機	: FDU-830	東京理化機器(株)
テストチューブミキサー	: TM251	岩城硝子(株)
分光光度計	: UV-160	島津製作所(株)

## 4.2.3 実験方法

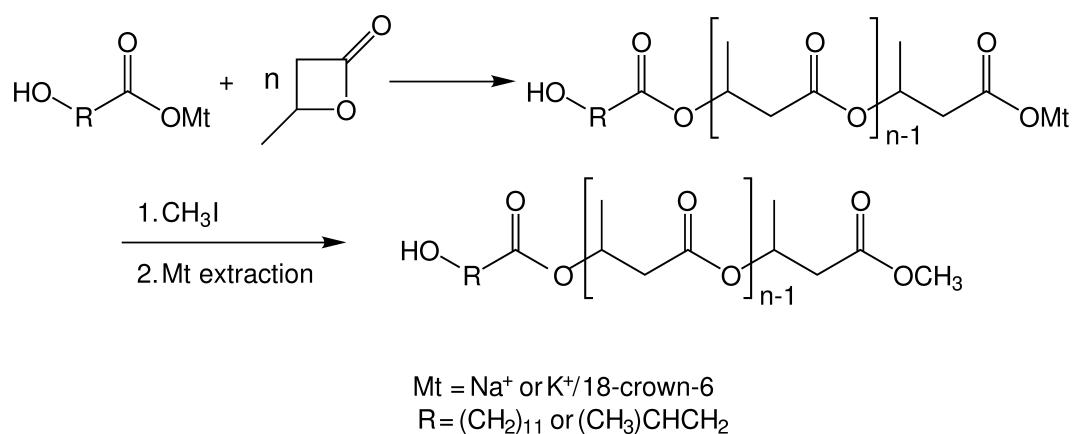
(1) *atactic* P(3HB) の合成

*atactic* P(3HB) の合成は Jedliński らや Kurcok らにより詳細に検討され<sup>61, 101)</sup>、一般にアニオン重合によりラク톤を開環重合した場合にアタクチックなポリマーが得られることが明らかにされている。アニオン重合の反応機構に関しては未だ不明瞭な点が多いが、アニオン重合により得られるポリマーの一次配列はアタクチックであることが明らかにされているため、本研究では *atactic* P(3HB) の合成を  $\beta$ -BL のアニオン重合により行った。現在、提唱されている二つのアニオン重合機構を Scheme 4.1 及び 4.2 に示した。



Scheme 4.1: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1)

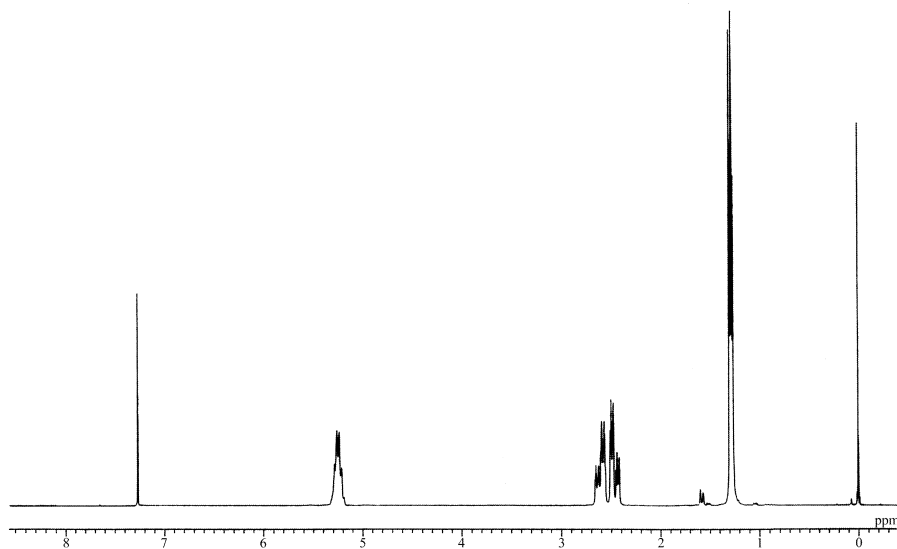
**重合反応:** 18-Crown-6 4.8 mg ( $1.82 \times 10^{-5}$  mol) 及びオレイン酸カリウム 5.9 mg ( $1.84 \times 10^{-5}$  mol) を三方コック及び磁気攪拌子を付した 5 mL ナス型フラスコにはかり取り、フラスコ系内を常温で 4 時間減圧にすることにより十分に乾燥を行った。フラスコ系内を常温でアルゴンにより解圧し、直ちにシリンジにて  $\beta$ -BL を 3.0 mL (=  $3.66 \times 10^{-2}$  mol, 3.15 g) 加えることにより重合反応を開始させた。重合反応は 26 °C のインキュベーター中において 72 時間行った。重合反応終了後、反応混合物を 4 mL のクロロホルムに溶解させることにより重合反応を停止させ、あらかじめ用意しておいた磁気攪拌子を付した 200 mL ナス型フラスコ内のメタノール 150 mL 中に徐々に滴下し、再沈殿による精製を行った。収量は 2.31 g (収率 73.3 %) であった。



Scheme 4.2: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2)

精製ポリマーの分子構造の確認を $^1\text{H-NMR}$ により行った。 $^1\text{H-NMR}$ チャートを Fig. 4.3 に示した。SEC 測定より、分子量は  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  及び分子量分散は  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$  であった。

また、得られたポリマーのアイソタクチック性の確認を DSC を用いた解析により行った。DSC カーブを Fig. 4.4 に示した。

Fig. 4.3:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of  $\beta\text{-BL}$  using potassium oleate-18-Crown-6 complex.

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

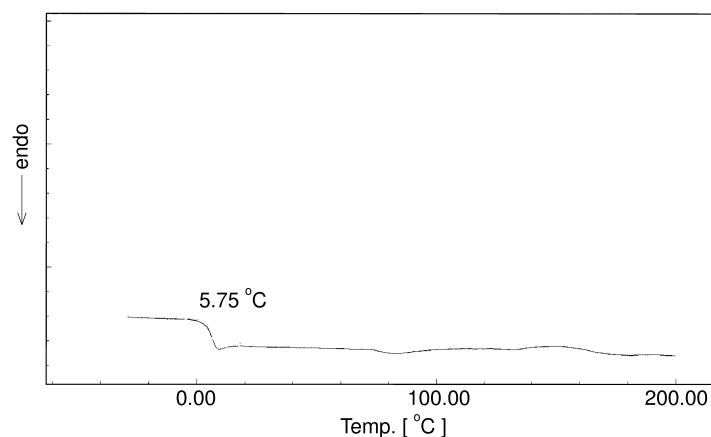


Fig. 4.4: DSC curve of the obtained *ata*-P(3HB).

また、タクティシティーが *atactic* であった場合、P(3HB) は完全非結晶であることが明らかなので、ここで得られた P(3HB) が *atactic* であることを DSC により確認した。Fig. 4.4 に示した DSC カーブより、得られた P(3HB) はガラス転移温度のみを有し、結晶融解ピークを有さないことから完全非晶質であることが明らかになった。

## (2) 固定化酵素充填カラムの作製

反応器である酵素カラムの作製を行った。これまでの検討から *Candida antarctica* 由来のリパーゼを多孔質アクリル樹脂表面に固定化した Novozym<sup>®</sup> 435 がトルエンやキシレン中で最も良く脂肪族ポリエステルを分解することが確認されたので、本酵素カラムは Novozym<sup>®</sup> 435 を充填することで作製した。また、本酵素は固定化剤や安定化剤を含むことが確認されたので、充填前にトルエンを用いて洗浄した。

すなわち、200 mL のフラスコに 100 mL のトルエンと 7.5 g の Novozym<sup>®</sup> 435 を入れ、攪拌を行わないで 60 °C の油浴にて 24 時間静置することで固定化剤や安定化剤をトルエン層に抽出した。抽出終了後、濾紙による吸引濾過を行い、濾紙上の Novozym<sup>®</sup> 435 をトルエンにて十分に洗浄した。洗浄後、減圧下 2 時間程度乾燥を行うことでカラムに充填する酵素を調製した。

洗浄し、乾燥させた HPLC 用カラム ( $\phi$  7.8 mm  $\times$  300mm) に先に前処理した酵素を充填した。酵素をカラムに良く充填させるために、充填は時折カラムを振動させながら行った。充填前後のカラム重量の差から充填された Novozym<sup>®</sup> 435 は 6.8 g であったことを確認した。

## (3) トルエンを移動相に用いたポリエステルの連続分解

## 連続分解装置概要

ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
	固定化酵素充填カラム	
カラム	: カラムサイズ: $\phi$ 7.8 mm $\times$ 300mm	
	酵素: Novozym <sup>®</sup> 435	
カラムオーブン	: 860-CO	日本分光 (株)
検出器	: 示差屈折率計 830-RI	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)

装置の概要を Fig. 4.5 に示した。すなわち、調製した各脂肪族ポリエステルのトルエン

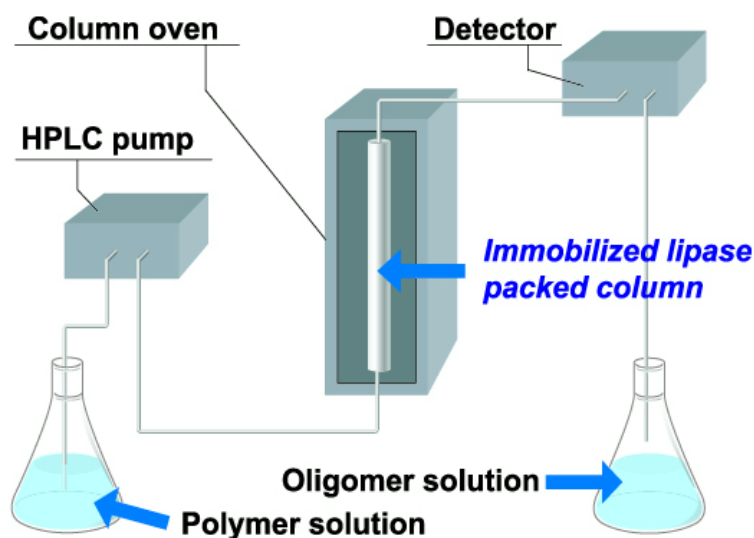


Fig. 4.5: Conceptual scheme of the continuous degradation equipment using the enzyme column. (Mobile phase: toluene)

溶液を HPLC ポンプを用いて連続的に反応器である酵素充填カラムに通過させることで連続分解反応を行った。ポリマー試料は合成した P(3HB) を除いて、精製は行わずに購入した状態で用いた。反応温度の制御はカラムオーブンを用いて行い、酵素カラムに通過させるポリマー量の制御は HPLC ポンプを用いてポリマー溶液の流速を制御することで行った。ただし、詳細な分解挙動の解析を行うため、通常の連続分解反応は 1 mL のサンプルループを付したレオダイナミックサンプルインジェクターを用いて 1 mL のポリマー溶液を酵素カラムに通過させることで行った。連続分解反応装置内の分解生成物の濃度変化を本連続分解装置に付した示差屈折率系を用いて解析し、分解反応に要する時間などを検討した。



本連続分解装置の分解挙動は回収した分解生成物の分子量を SEC を用いて測定することにより行った。また、分解生成物の構造解析は  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS により解析した。

#### (4) 超臨界二酸化炭素を移動相に用いたポリエステルの連続分解

##### 連続分解装置概要

ポンプ	:	880-PU	日本分光 (株)
		固定化酵素充填カラム	
カラム	:	カラムサイズ: $\phi$ 7.8 mm $\times$ 300mm	
		酵素: Novozym <sup>®</sup> 435	
カラムオープン	:	CO-965	日本分光 (株)
検出器	:	UV-975 (210 nm)	日本分光 (株)
		(耐圧セル)	
レコーダー	:	807-IT	日本分光 (株)
冷却器	:	CH-201	サインクス
液化炭酸ガス	:	BMM51293	東横化学 (株)

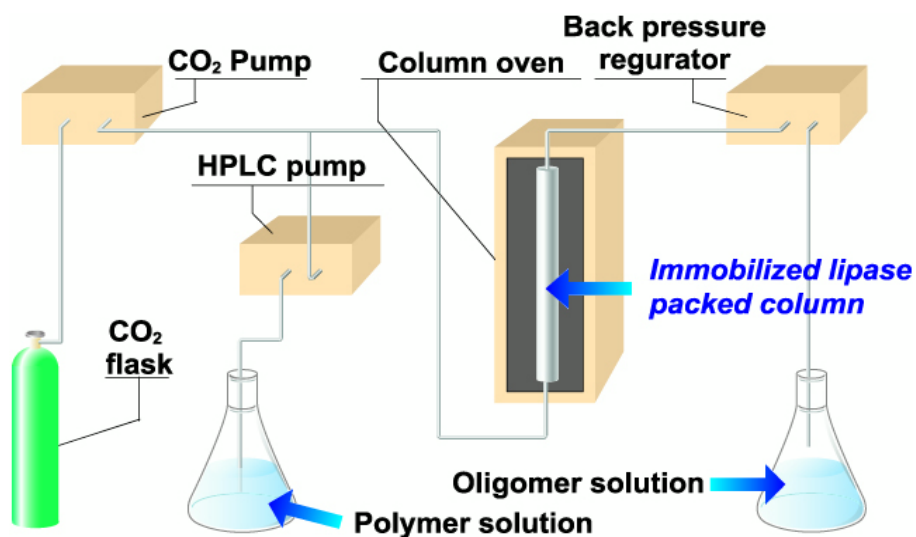


Fig. 4.6: Conceptual scheme of the continuous degradation equipment using the enzyme column. (Mobile phase: supercritical carbone dioxide + toluene)

装置の概要を Fig. 4.6 に示した。すなわち、調製した各脂肪族ポリエステルのトルエン溶液と超臨界二酸化炭素の混合溶媒を HPLC ポンプにより連続的に反応器である酵素充填

カラムに通過させることで連続分解反応を行った。ポリマー試料は合成した P(3HB) を除いて、精製は行わずに購入した状態で用いた。反応温度の制御はカラムオーブンをを用いて行い、酵素カラムに通過させるポリマー量の制御は HPLC ポンプを用いてポリマー溶液の流速を制御することで行った。ただし、詳細な分解挙動の解析を行うため、通常の連続分解反応は 1 mL のサンプルループを付したレオダイナミックサンプルインジェクターを用いて 1 mL のポリマー溶液を酵素カラムに通過させることで行った。超臨界二酸化炭素の脂肪族ポリエステルに対する溶解性は低いため、連続分解反応の移動相には超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いた。混合溶媒の比率は各 HPLC ポンプの流速制御により調整した。本連続分解装置の分解挙動は回収した分解生成物の分子量を SEC を用いて測定することにより行った。また、分解生成物の構造解析は  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS により解析した。

## 4.3 結果・考察

### 4.3.1 トルエンを移動相に用いた連続分解

本項ではトルエンのみを移動相に用いて行った連続分解反応の結果について記す。本研究では本連続分解反応の一般性を確認するため、3種の生分解性脂肪族ポリエステルをポリマー試料に用いて検討を行った。すなわち、本研究のこれまでの検討に用いた化学合成により得られた非天然型 P(3HB)、代表的な生分解性脂肪族ポリエステルとして広く知られておりモノマーユニットがヒドロキシ酸である PCL 及びモノマーユニットがジカルボン酸とジオールから構築される PBA をポリマー試料として用いた。それぞれのポリマー試料に対して独立に検討を行い、結果・考察をまとめた。また、方法項に記したように、特に指示がない場合にはレオダインスンプルインジェクターを用いて 1 mL のポリマー溶液を酵素カラムに通過させることで本連続分解の挙動を詳細に検討した。HPLC 用以外のトルエンを移動相に用いた際に検出器が安定しなかったため、HPLC 用のトルエンを移動相に用いて検討を行った。また、酵素カラムの使用開始直後は酵素の洗浄操作でも残留した固定化剤や安定化剤の抽出が確認されたため、カラムを通過した移動相中に固定化剤や安定化剤が含まれなくなるまで空運転を行った後に詳細な検討を行った。

#### (1) P(3HB) の連続分解

##### 低分子量 P(3HB) の分解

はじめに本連続分解装置を用いた分解を確認するため、低分子量 *ata*-P(3HB) ( $\overline{M}_n = 2900$ ,  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.50$ ) を調製してポリマー試料に用いた。また、本連続分解反応に対して影響を与える因子を検討するため、カラム温度以外の要素であるポリマー試料の濃度及び移動相の流速の変化が分解生成物の分子量及び分子量分散に与える影響について検討した。さらに、ポリマーが酵素カラムを通過するために要する時間がバッチ式分解反応の検討より求めた分解に必要な時間よりもはるかに短いことが空運転の段階で示されたので、短い反応時間で分解反応が完全に進行するようにカラム温度は比較的高めの 70 °C に設定した。

結果を Table 4.3 に示した。

Table 4.3: The continuous degradation of low molecular weight P(3HB) using the enzyme column <sup>a)</sup>.

Entry	Flow rate (mL/min)	Polymer conc. (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.1	3	460	770	1.68
2	0.1	6	500	890	1.76
3	0.2	1	340	560	1.64
4	0.2	3	450	770	1.70
5	0.2	6	480	930	1.94
6	0.4	3	500	990	1.97
7	0.4	6	550	1300	2.37

<sup>a)</sup> 1 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 70 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 4400$ ,  $\overline{M}_n = 2900$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.50$

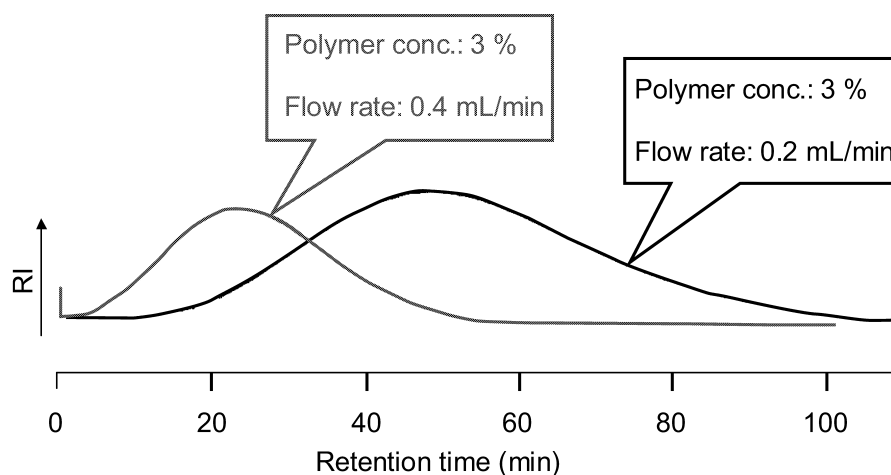


Fig. 4.7: Effects of flow rate on the RI gram of the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 70 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 4400$ ,  $\overline{M}_n = 2900$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.50$

以上の結果から、本連続分解装置を用いることでP(3HB)の分解反応を行えることが示された。また、調製するポリマー試料溶液の濃度及び移動相の流速が本連続分解反応に対して大きな影響を与えることが示された。すなわち、高いポリマー濃度及び速い流速で分解反応を行った場合には得られる分解生成物の平均分子量及び分子量分散が上昇することが明らかになった。

また、連続分解装置に付した RI 検出器を用いて、反応装置内における分解生成物濃度の挙動を検討した。Fig. 4.7 に移動相の流速の変化が反応装置内の分解生成物濃度に与える影響を表す検出曲線を示した。

この二つの RI 検出曲線は高さを揃えるために検出感度を調整した。検出感度が同一の場合、流速の増加に伴ってピークの高さは増加した。この検出曲線より、移動相の流速増加に伴ってポリマー試料が酵素カラムを通過するのに要する時間が短くなることが明らかになった。したがって、本連続分解反応の場合は反応時間の制御を移動相の流速制御により行えることが示された。また、移動相の流速を遅くすると RI 検出曲線における分解生成物のピークがブロードになることが示され、流速低下に伴って連続分解反応装置内においてポリマー試料もしくは分解生成物が拡散する可能性が示唆された。

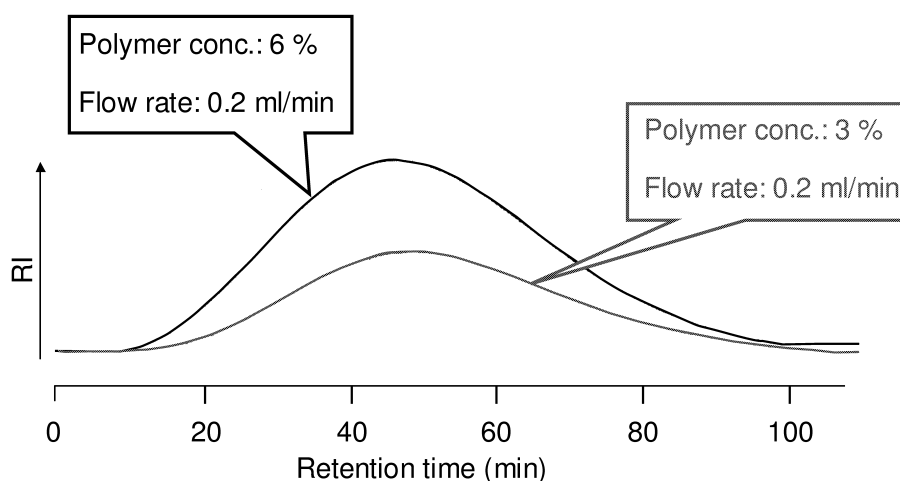


Fig. 4.8: Effects of polymer concentration on the RI gram of the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 70 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 4400$ ,  $\overline{M}_n = 2900$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.50$

Fig. 4.7 にポリマー試料濃度の変化が反応装置内の分解生成物濃度に与える影響を表す検出曲線を示した。この二つの検出曲線からポリマー試料濃度はポリマー試料の酵素カラムにおける保持時間に影響を与えないことが明らかになった。すなわち、ポリマー試料濃度は本連続分解反応における反応時間には影響を与えず、酵素カラム内のポリマー試料濃度もしくは分解生成物濃度のみに影響を与えることが示された。

### 移動相の流速の影響

本連続分解反応では移動相の流速が分解生成物の平均分子量及び分子量分散に影響を与えることが明らかになったので、ここでは流速が本連続分解反応に与える影響について詳細に検討した。検討に用いるポリマー濃度は3%で固定し、カラム温度は先の検討で用いた70℃とした。また、先の検討からP(3HB)が本連続分解装置により分解可能であることが明らかになったので、本検討以降は別途調製した高分子量 *ata*-P(3HB) ( $\overline{M}_n = 110000$ ,  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$ ) をポリマー試料に用いて分解反応を解析した。

ポリマー試料の分子量を大幅に上昇させた結果、分解反応が不完全に進行した場合には分解生成物中にポリマー試料が未反応のまま含まれることが明らかになった。分解生成物の平均分子量を求める際に未反応ポリマーを含めて計算すると分解反応により得られた生成物の分子量が明らかにならないため、本研究では分解生成物中の生成オリゴマー領域の分子量を分解生成物の分子量とした。また、分解率を示すオリゴマー収率はSECの検量線による分子量  $M = 6792$  以下をオリゴマーとすることでSECチャートより算出 ( $C.\overline{M}_wD$  値) した。

結果をTable 4.4に示した。また、分解生成物のSECチャートを3次元表示したものを作成し、Fig. 4.9に示した。

Table 4.4: Effects of flow rate on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.1	86.9	450	770	1.70
2	0.2	59.7	490	820	1.69
3	0.4	40.6	510	840	1.65
4	0.8	26.3	560	1200	2.14

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 70 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の検討の結果、移動相の流速が本連続分解反応に与える影響を系統的に解析できた。Fig. 4.9は検討を行った流速で得られる各分解生成物のSECチャートを3次元的に並べたものである。ここでは画面奥に向かって速い流速で得られた分解生成物のSECチャートを示した。Fig. 4.9より、流速を速めるにしたがって、未反応のポリマー試料が分解生成物中に多く含まれることから、流速の増加に伴ってオリゴマー収率が著しく低下するこ

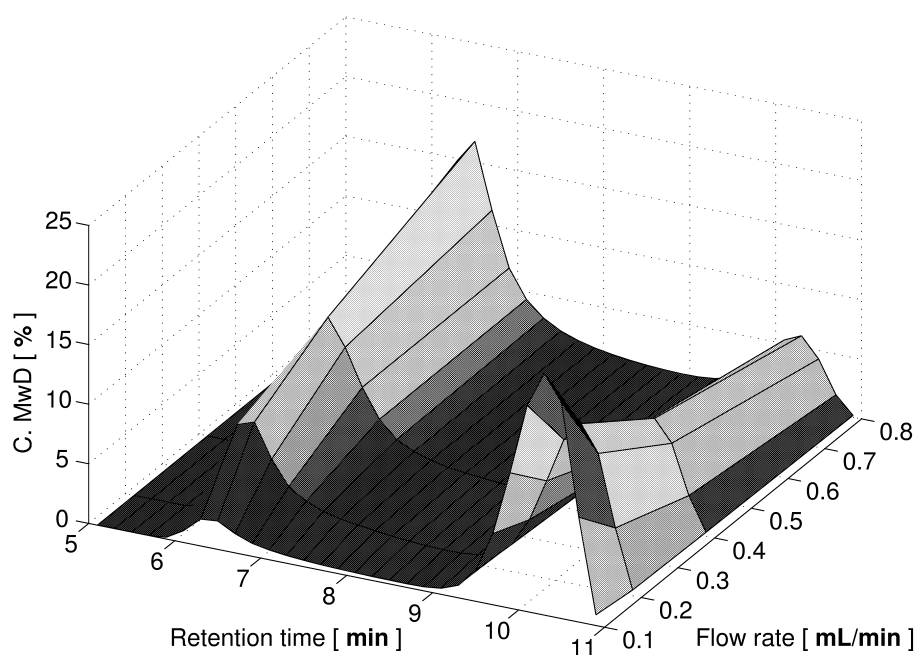


Fig. 4.9: Effects of flow rate on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 70 °C.

とが明らかになった。

先の RI 検出曲線を用いた検討から、移動相の流速は本連続分解反応の反応時間を制御することが示された。したがって、移動相の流速が分解反応に影響を与えた理由として、移動相の流速が本分解反応における反応時間を制御しているためと推測される。すなわち、本連続分解反応で移動相の流速を減少させることは、バッチ式分解反応において反応時間を短くすることと同義であると考えた。

しかし、同時に分解生成物中には分解反応により生成した低分子量オリゴマーと未反応のポリマーのみが含まれることが明らかになった。すなわち、分子量的にポリマー試料と生成オリゴマーの間となるオリゴマーはほとんど生成しておらず、分解生成物の SEC チャートは二峰性を示した。Table 4.4 に示した分解生成物の分子量及び分子量分散の値からも本連続分解反応により得られる低分子量オリゴマーの分子量及び分子量分散に対して移動相の流速が影響を与えないことが明らかになった。この結果は、本分解反応によりある決まった分子量のオリゴマーが選択的に生成していることを示している。分解反応機構については後の分解生成物の分子構造にて詳細に記す。

### カラム温度の影響

本連続分解反応の酵素カラムに用いている酵素は固定化酵素であるため、非固定化酵素に比べて熱失活に対して耐性を有している。しかし、工業化を視野に入れると酵素カラムの寿命が非常に重要な要素となり、可能な限り寿命を延ばす検討が必要となる。本検討まで約1ヶ月間、同一の酵素カラムを用いて70℃における連続分解反応を検討してきたが、若干ながら、酵素のポリマー分解活性が低下した。これは酵素の熱失活によるものと考えられることから、ここではカラム温度の本連続分解反応に対する影響を検討した。70℃で十分な分解活性を示し、これ以上の温度は酵素の熱失活を促進すると考えられることから70℃以上での検討は行わなかった。下限の温度はバッチ式の検討から明らかになっており、カラムオープンが安定に制御できる40℃とした。したがって、カラム温度が40～70℃の間で得られる分解生成物を解析し、オリゴマー収率並びに生成オリゴマーの平均分子量・分子量分散を検討した。分解生成物中の生成オリゴマー領域の分子量を分解生成物の分子量とした。また、分解率を示すオリゴマー収率はSECの検量線による分子量  $M = 6792$  以下をオリゴマーとすることでSECチャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.5 に示した。

Table 4.5: Effects of the column temperature on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Temperature (°C)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	40	>99.9	550	820	1.49
2	50	98.9	420	700	1.66
3	60	96.9	480	760	1.57
4	70	97.2	340	560	1.68

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の検討の結果、カラム温度は酵素のポリマー試料に対する分解活性にさほど影響を与えないことが明らかになった。分解反応温度の分解に対する影響についてはバッチ式分解反応の検討で既に行っており、反応温度を40℃まで低下させても本分解反応は迅速に進行することが確認されている。したがって、同様の結果が本連続分解反応の場合にも確認されたと考えられる。バッチ式分解反応の場合には分解反応温度の低下により分解に要する酵素濃度が若干上昇することが示されたが、本酵素カラムを用いた場合には反応温度



の低下がオリゴマー収率を上昇させることが明らかになった。

SEC チャートは示さないが、高いカラム温度で分解反応を行った場合に確認されたオリゴマー収率の低下は分解生成物中に未反応のポリマー試料が若干量含まれるためであった。したがって、本酵素カラムは検討を行った温度域の中で最も低い 40 °C で一番高いポリマー分解活性を示すことが明らかになった。

40 °C という常温近辺で本連続分解反応が進行したことは酵素カラムの寿命にも大きな影響を与えると考えられ、70 °C で運転した場合と比較して飛躍的に酵素カラムの寿命が延びることが期待される。また、バッチ式分解反応の大きな利点である、温和な条件での生分解性脂肪族ポリエステル为原料化をそのまま連続分解反応にも適応できたことは大きな知見であると考えられる。

したがって、以降の検討は酵素カラムの寿命も考慮に入れ、40 °C で行った。

### ポリマー試料濃度の影響

これまでの検討から移動相の流速は 0.1 mL/min でカラム温度は 40 °C が本連続分解反応に適した条件であることが示された。先の検討からポリマー試料濃度も本分解反応に影響を与える要素として考えられたため、ここではポリマー試料濃度が本連続分解反応に与える影響を検討した。

バッチ式分解反応の検討結果より、ポリマー試料を溶媒を用いて希釈した方が本分解反応は迅速に進行することが確認されている。しかし、分解反応に用いる有機溶媒量の削減を考慮すると分解に最適なポリマー試料の濃度の決定は重要な要素であり、有機溶媒による単純な希釈は分解反応に要する有機溶媒量の増大を招く恐れがある。

また、これまでの検討から移動相の流速を 0.1 mL/min にすると、ポリマー試料が連続分解反応装置内で拡散するため、酵素カラムに注入したポリマー試料全量を回収するのに洗浄用の有機溶媒を多量に消費することが示された。そこで、ここでの検討では移動相の流速を 0.2 mL/min で固定し、注入するポリマー試料濃度の連続分解反応に対する影響を 40 °C で検討した。分解生成物中の生成オリゴマー領域の分子量を分解生成物の分子量とした。また、分解率を示すオリゴマー収率は SEC の検量線による分子量  $M = 6792$  以下をオリゴマーとすることで SEC チャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.6 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.10 に示した。

Table 4.6: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.25	>99.9	470	690	1.49
2	0.5	99.9	500	770	1.55
3	1.0	99.8	530	820	1.55
4	3.0	89.7	500	830	1.65

<sup>a)</sup> 1 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の検討より、本連続分解反応はポリマー試料濃度の影響を受けることが示された。すなわち、ポリマー試料濃度の上昇に伴って分解率を示すオリゴマー収率が低下することが明らかになった。しかし、分解により得られたオリゴマーの平均分子量及び分子量分散

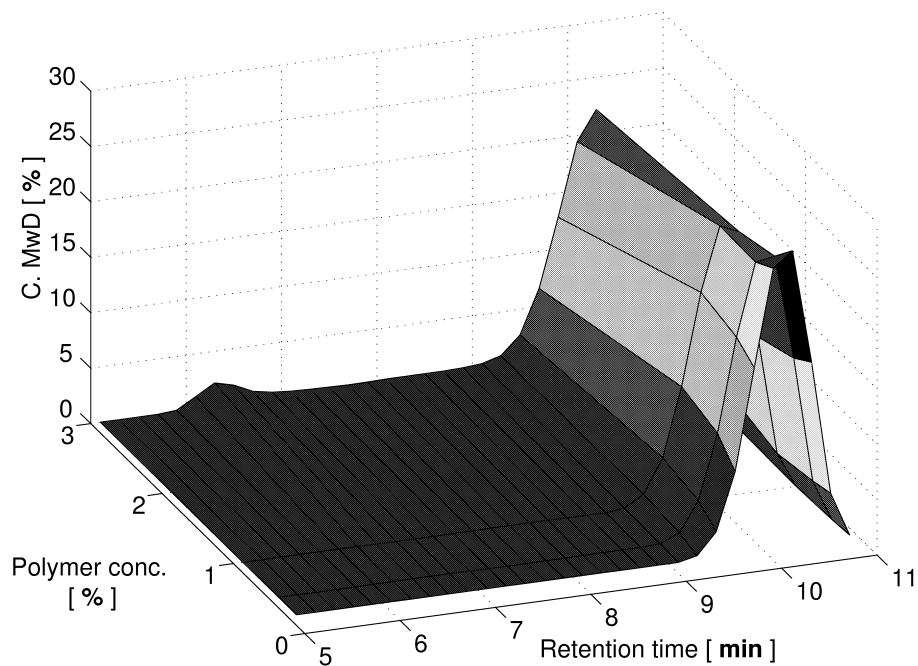


Fig. 4.10: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 1 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

はポリマー試料濃度の影響を受けなかった。

Fig. 4.10 より、ポリマー試料濃度の上昇に伴うオリゴマー収率の低下は分解生成物中にポリマー試料が未反応のまま残存したことが原因であると考えられる。

移動相の流速の影響を検討した結果と合わせて考えると、本連続分解反応における分解条件の変更は得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散には影響を与えず、分解率に大きな影響を与えることが示された。

Fig. 4.8 より、ポリマー試料濃度の変化はポリマー試料の酵素カラム通過に要する時間に対しては影響を与えないことが明らかになった。したがって、ポリマー試料濃度の変化は分解時間に対して影響を与えないと考えられ、本検討の結果は本酵素カラムが単位時間あたりに分解できるポリマー量に限界値が存在することを示すと考えられる。

### 非完全分解生成物の再カラムに関する検討

これまでの検討から、高すぎるポリマー試料濃度や速すぎる移動相の流速はポリマー試料の不完全な分解の原因となり、ポリマー試料が未反応のまま分解生成物中に含まれることが明らかになった。

一般に高分子を用いる反応では、反応終了後の低分子化合物と高分子化合物の混合物からどちらか片方を得る場合、貧溶媒と良溶媒による再沈殿法が用いられる。本連続分解反応でも分解条件によっては分解生成物中にポリマー試料が未反応のまま含まれることから、反応後の混合物から目的生成物であるオリゴマーを得る場合には再沈殿法による精製が考えられる。しかし、再沈殿法は溶媒を多量に消費し、プロセスとして煩雑になることから、より簡便に目的生成物を得るプロセスの確立が重要であると考えられる。

酵素触媒によるバッチ式分解反応の検討結果より、本分解反応で用いている酵素は一度生成した環状型オリゴマーに対して希釈条件下で求核剤が存在しない場合に作用しないことが明らかになった。この結果は、高分子化合物であるポリマー試料と低分子化合物であるオリゴマーを分別せずに混合物のまま再度酵素カラムに通過させることで、分解反応が完全に進行する可能性を示した。

したがって、本検討では部分的な分解反応により得られた未反応のポリマー試料とオリゴマーの混合物をトルエンに再溶解させ、再度酵素カラムに注入した場合に得られる分解生成物を解析することで、本連続分解反応を用いた効率的なオリゴマー合成を検討した。

再分解前後の SEC チャートを Fig. 4.11 に示した。この結果より、連続分解反応が不完全に進行した場合でも、ポリマー試料を含む分解生成物を再度トルエンに溶解させ、酵素カラムに注入することで分解率 >99.9 % の分解生成物へと変換できることが明らかになった。

また、SEC チャートのオリゴマーピークを解析した結果、酵素カラムへの再注入を行っても一段階目に既に得られたオリゴマーに対しては全く影響を与えないことが明らかになった。すなわち、生成したオリゴマーの平均分子量及び分子量分散は再カラムの前後で変化しなかった。

したがって、オリゴマー合成プロセスにおいて反応終了後の反応混合物中にポリマー試料が含まれた場合でも、本連続分解反応を利用することにより目的生成物であるオリゴマーは溶媒による再沈殿を行わずに容易に得られることが示された。

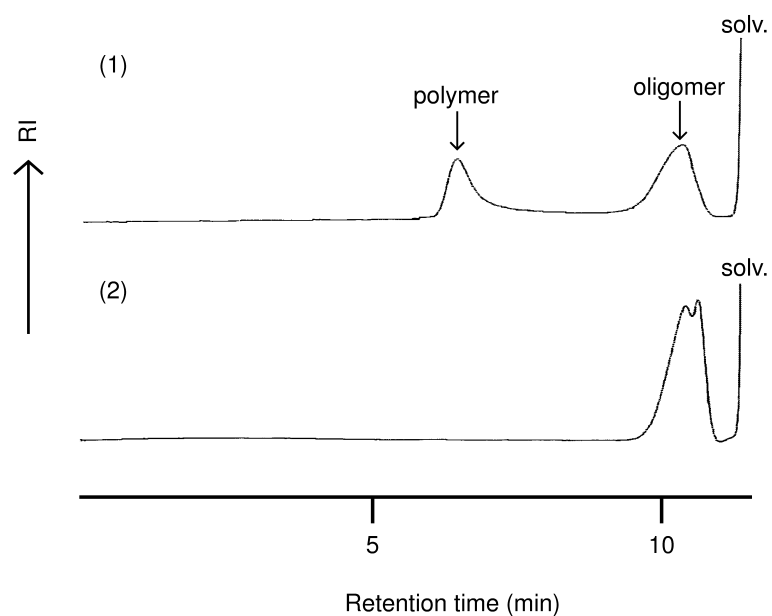


Fig. 4.11: SEC profiles of the partially degraded *ata*-P(3HB) oligomer (1) and the second degradation products (2) by the passage through the enzyme column <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> (1) 1 mL of 5 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. (2) 1 mL of 1 % toluene solution of (1) was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

## HPLC ポンプを用いたポリマー溶液の連続注入による分解反応

ここでは、これまでの検討から得られた知見を用いて、HPLC ポンプによりポリマー試料溶液を酵素カラムに連続注入する連続分解反応について検討を行った。

ここではポリマー試料濃度、ポリマー溶液の量及び移動相の流速がオリゴマー収率及び得られたオリゴマーの平均分子量と分子量分散に与える影響について検討した。ポリマー試料溶液の注入が終了した時点で移動相を HPLC 用トルエンに切り替えて、移動相を流し続けた。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 4882$  以下とし、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。また、RI 検出器により系内の分解生成物濃度も解析した。

結果を Table 4.7 に示した。

Table 4.7: Continuous degradation of *ata*-P(3HB) using HPLC pump.

Entry	Polymer conc. (%)	Polymer solution (mL)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1 <sup>a)</sup>	1.0	10	94.3	540	920	1.70
2 <sup>a)</sup>	1.0	20	67.9	560	1030	1.85
3 <sup>a)</sup>	0.5	20	93.9	520	930	1.80
4 <sup>a)</sup>	0.25	20	>99.9	480	820	1.70
5 <sup>b)</sup>	0.25	20	>99.9	490	860	1.74
6 <sup>b)</sup>	0.25	40	ca. 99.0	580	990	1.70

<sup>a)</sup> *P*(3HB) toluene solution was injected using a HPLC pump into the enzyme column at a flow rate of 0.1 mL/min at 40 °C.

<sup>b)</sup> *P*(3HB) toluene solution was injected using a HPLC pump into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

Initial *P*(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の結果から、基本的な分解挙動においては 1 mL のポリマー試料溶液を分解させる場合と同様であったことから、1 mL のサンプルループを付したレオダイインジェクターを用いたポリマー試料溶液の分解反応は本連続分解挙動の解析を行う際に適していることが示された。

また、1 mL のポリマー試料溶液を分解させた場合と同様、得られたオリゴマーの平均分子量及び分子量分散は分解条件の影響をさほど受けなかった。しかし、完全分解可能な

条件がポリマー試料濃度などにおいて異なったので以下に考察した。

はじめに Entry 1 と 2 の結果を比較検討した。異なる条件は HPLC ポンプにより注入したポリマー試料溶液量のみである。いずれの場合も移動相の流速は 0.1 mL/min でポリマー試料濃度は 1 % であり、1 mL のポリマー試料溶液を分解させた場合には完全分解した条件である。しかし、本検討ではいずれも不完全分解であった。この理由として酵素カラム内でのポリマー試料の拡散が考えられる。すなわち、酵素カラム内でのポリマー試料の拡散速度が移動相の面速度よりも大きいため、1 mL のポリマー試料溶液を分解させた場合には反応場である酵素カラム内でのポリマー試料濃度が調製したものよりも小さくなったと考えられる。それに対して、10 mL もしくは 20 mL のポリマー試料溶液を注入した場合には、ポリマー試料の拡散速度が移動相の面速度よりも大きくても常にポリマー試料が酵素カラムに注入されるために酵素カラム内のポリマー試料濃度が調製した値に近づき、結果として完全分解しなかったと考えられる。また、10 mL のポリマー試料を注入した際に既に本酵素カラムが完全分解できるポリマー試料の許容量を超えており、更に、より多くのポリマー試料溶液の注入により酵素カラム内のポリマー試料濃度は調製した値に近づくため、20 mL のポリマー試料溶液を注入した際には 10 mL のポリマー試料溶液を分解させた場合よりもオリゴマー収率が低下したと考えられる。

ポリマー試料濃度の影響については既に検討を行い、ポリマー試料濃度の増加はポリマー試料の不完全分解の原因となることが示された。そこで、より低い濃度のポリマー試料溶液を調製し、HPLC ポンプを用いて酵素カラムに連続注入した結果を Entry 3 に示した。この結果より、HPLC ポンプを用いてポリマー試料溶液を連続注入する場合においても 1 mL のポリマー試料溶液を分解した場合と同様、ポリマー試料濃度の低下によりオリゴマー収率が增加することが明らかになった。

そこで、HPLC ポンプを用いた本連続分解反応によりポリマー試料の完全分解を行うため、ポリマー試料濃度を更に低下させた溶液を調製して酵素カラムに連続注入した。得られた結果を Entry 4 に示した。結果は予測通りにポリマー試料が完全に分解したことを示した。

ついで、ポリマー試料の酵素カラム内における拡散抑制効果を狙って、移動相の流速を増加させて同様の検討を行った。結果を Entry 5 に示した。結果はポリマー試料の完全分解であったが、RI 検出器を用いた解析から分解生成物濃度は一定値を示さないことが明らかになった。一定濃度のポリマー試料溶液を連続的に酵素カラムに注入しているため、分解生成物も一定濃度になると考えられる。この結果から、ポリマー試料溶液を 20 mL 用いた場合では酵素カラム内でポリマー試料濃度が一定になる以前にポリマー試料溶液の連続注入が終了したと考えた。

そこで、同じ濃度のポリマー試料溶液を 40 mL 調製し、同様にして酵素カラムに連続注

入した。結果を Entry 6 に示し、ほぼ完全にポリマー試料が分解したことが明らかになった。また、RI 検出器を用いて描いた検出曲線を Fig. 4.12 に示した。分解生成物濃度の経時変化を表す検出曲線上に一定値を示す範囲が示されたことから、Entry 6 の条件では酵素カラム内におけるポリマー試料濃度は調製値で一定となったことが示された。また、Entry 6 の条件を用いた連続分解前後の SEC チャートを Fig. 4.13 に示した。

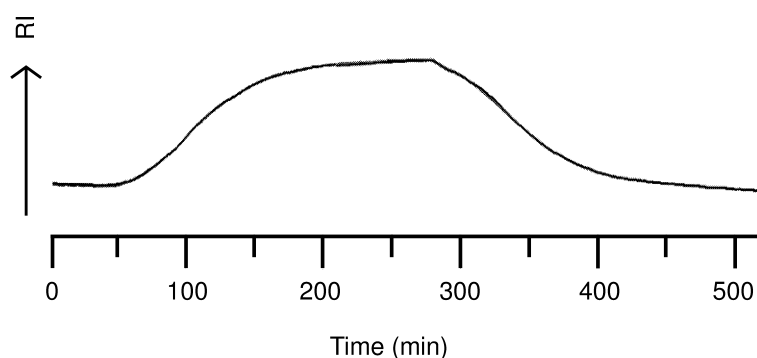


Fig. 4.12: RI gram of continuous degradation of *ata*-P(3HB) using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

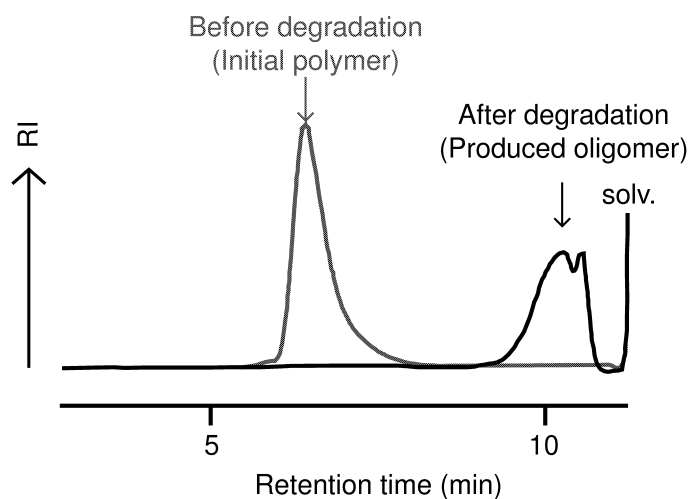


Fig. 4.13: SEC profiles of continuous degradation of *ata*-P(3HB) using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.



### 分解生成物の分子構造

トルエンやキシレンといった疎水性有機溶媒中で脂肪族ポリエステルを酵素により分解させたときの最大の特徴は分解生成物が環状型オリゴマーとなることである。したがって、分解反応を連続法にすることで効率化を図る際にも分解生成物の分子構造は重要な要素である。本研究ではこれまでに酵素触媒重合による $\beta$ -BLの開環重合で得られるP(3HB)の分子構造解析及びP(3HB)の酵素触媒によるバッチ式分解反応で得られるオリゴマーの分子構造解析を行ってきた。その結果、 $^1\text{H-NMR}$ 及びMALDI-TOF MSの両者を用いた解析により分子構造解析を行えることが示されたので、ここでも $^1\text{H-NMR}$ 及びMALDI-TOF MSを用いて分解生成物の構造解析を行った。

ここではポリマー濃度: 1%、流速: 0.2 mL/min及びカラム温度: 40 °Cの条件で分解が完全に進行して得られたオリゴマーの分子構造を解析した。 $^1\text{H-NMR}$ の解析の結果、オリゴマーの水酸基末端に帰属されるピーク (4.20 ppm) が現れなかったことから、本連続分解反応で得られたオリゴマーは環状構造を有していることが推定された。MALDI-TOF MSスペクトルはFig. 4.14に示したように、モノマーユニットの分子量 86.09 毎に現れる主たるスペクトルが環状型に帰属された。

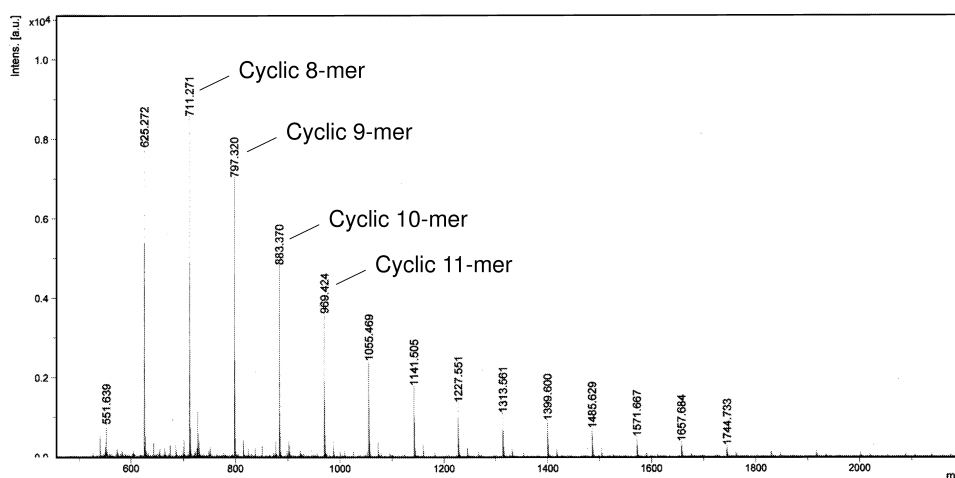


Fig. 4.14: MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min and 40 °C.

したがって、酵素カラムを用いた連続分解反応でも、非天然型 P(3HB) をポリマー試料とした場合、得られるオリゴマーは環状型構造であることが明らかになった。また、酵素カラムに充填した酵素についても多量の有機溶媒で洗浄されているため、 $^1\text{H-NMR}$ の解析より、分解生成物中に固定化剤や安定化剤などが含まれなかった。

## (2) PCLの連続分解

ポリエステルは分子構造的に大きく二つに分けられる。すなわち、モノマーユニットがヒドロキシ酸である AB 型ポリエステル<sup>注1</sup>とジカルボン酸部位とジオール部位から構成されている AA-BB 型ポリエステル<sup>注2</sup>である。既に上市されている生分解性脂肪族ポリエステルもこれら二種類がある。

本連続分解反応法が P(3HB) に適用可能であることが明らかになり、酵素カラムを反応器として用いたポリマーの連続分解反応は他の脂肪族ポリエステルに対しても適用可能であることが示された。そこで、代表的な生分解性脂肪族ポリエステルであり分子構造的に P(3HB) と同じく AB 型ポリエステルである PCL を次なるポリマー試料に用いて本連続分解反応を検討した。

PCL のバッチ式分解反応については既に当研究室の江端らにより詳細に検討された。<sup>25, 26, 188</sup> すなわち、トルエンやキシレンといった疎水性有機溶媒に溶解させた PCL に Novozym<sup>®</sup> 435 の作用させることで、分解反応が迅速に進行してモノマーユニットの環状二量体であるジカプロラクトン (DCL) が選択に得られることが確認された。また、DCL は酵素触媒重合反応の良好な基質となり、再度重合させることで分解前の PCL へ再変換可能であることが確認された。以上の結果から酵素触媒を用いた PCL のケミカルリサイクル構築が示された。この酵素触媒によるケミカルリサイクル法を工業的に確立させるためには、やはり PCL を原料に用いた連続的な DCL 合成が必須であると考えられる。

P(3HB) をポリマー試料に用いたこれまでの検討から、カラム温度の上昇はカラム寿命の低下及び若干なポリマー分解活性の低下を招く恐れがあることが示されたので、ここではカラム温度を 40 °C で固定して検討を行った。また、酵素カラムを用いた本連続分解法の一般性を検討するため、P(3HB) をポリマー試料に用いて行ったものと同じ検討項目を PCL をポリマー試料に用いて行った。

---

注1 AB 型ポリエステル: モノマーユニットが酸 (acid: A) と塩基 (base: B) の両者と有する分子構造のポリエステルのこと

注2 AA-BB 型ポリエステル: モノマーユニットがジカルボン酸 (AA) とジオール (BB) から構成される分子構造のポリエステルのこと

### 移動相の流速の影響

P(3HB) の連続分解反応では、移動相の流速が分解率に大きな影響を与えた。バッチ式分解反応の結果を P(3HB) の場合と比較検討すると、PCLの方が P(3HB) よりも Novozym<sup>®</sup> 435 を用いた本分解反応で迅速に分解することが明らかになっている。したがって、完全分解が可能な移動相の流速は絶対値が (3HB) の場合と異なる結果になると推測した。そこで、ここでは異なるポリマー試料を用いて移動相の流速が全体的な分解挙動に与える影響を解析し、絶対値については詳細な検討を行わなかった。分解生成物中の生成オリゴマー領域の分子量を分解生成物の分子量とした。また、分解率を示すオリゴマー収率は SEC の検量線による分子量  $M = 1347$  以下をオリゴマーとすることで SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.8 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元的に並べたものを作成し、Fig. 4.15 に示した。

Table 4.8: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	Flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.1	>99.9	240	280	1.18
2	0.2	>99.9	230	260	1.12
3	0.4	98.5	240	270	1.13
4	0.8	86.6	230	260	1.13

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の結果から、ポリマー試料に PCL を用いても移動相の流速は本連続分解反応に影響を与えることが明らかになった。すなわち、流速の増加に伴って分解率を示すオリゴマー収率が低下した。

P(3HB) を基質に用いた検討とカラム温度が違うので単純な比較検討はできないが、同一のポリマー試料濃度及び流速での分解率を比較検討すると明らかに PCLの方が P(3HB) よりも高かった。これはバッチ式分解反応の結果と一致しており、本連続分解反応を用いたポリマー試料の分解性はバッチ式分解反応で予測が可能であることが示された。

また、移動相の流速が影響を与える要素は分解率のみであり、分解により得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散には影響を与えなかった。この結果はポリマー試料に P(3HB) を用いた場合と一致していることから、本連続分解反応の一般的な挙動であるこ

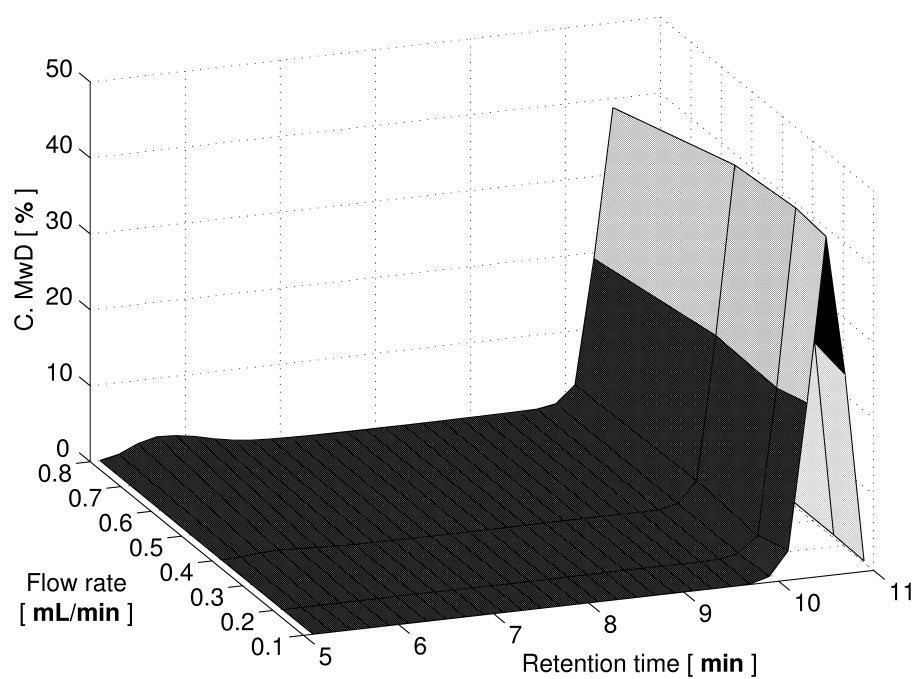


Fig. 4.15: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

とが示された。

### ポリマー試料濃度の影響

P(3HB) をポリマー試料に用いた場合、試料ポリマー濃度の上昇は不完全な分解の原因となり、オリゴマー収率の減少を引き起こすことが示された。したがって、ここでは PCL をポリマー試料に用いてポリマー試料濃度の本連続分解反応に与える影響について検討した。

ここでは P(3HB) をポリマー試料に用いて得られた結果と比較検討するため、P(3HB) をポリマー試料に用いて検討を行ったときと同条件で検討を行った。すなわち、カラム温度は 40 °C、移動相の流速は 0.2 mL/min に固定してポリマー試料濃度の影響を検討した。

P(3HB) をポリマー試料に用いた場合、検討範囲で最もポリマー濃度が高かった 3 % のポリマー溶液を分解させた際にポリマー試料が未反応のまま分解生成物に含まれた。しかし、先の検討から PCL をポリマー試料に用いた場合は同条件で分解生成物中に未反応ポリマー試料が含まれないことが確認された。したがって、本検討ではポリマー試料濃度が連続分解反応により得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散に与える影響を検討した。

結果を Table 4.9 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元的に並べたものを作成し、Fig. 4.16 に示した。

Table 4.9: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.25	>99.9	220	240	1.08
2	0.5	>99.9	220	240	1.08
3	1.0	>99.9	220	240	1.08
4	3.0	>99.9	230	260	1.12

<sup>a)</sup> 1 mL of PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の結果より、ポリマー試料濃度の変化は得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散に大きな影響を与えないことが示された。しかし、詳細に SEC チャートを解析すると高いポリマー試料濃度の条件で得られたオリゴマーは、非常に僅かではあるが高い分子量分散値を示した。

これまでの検討から、本連続分解反応はポリマー試料によらず似た挙動を示すことが明

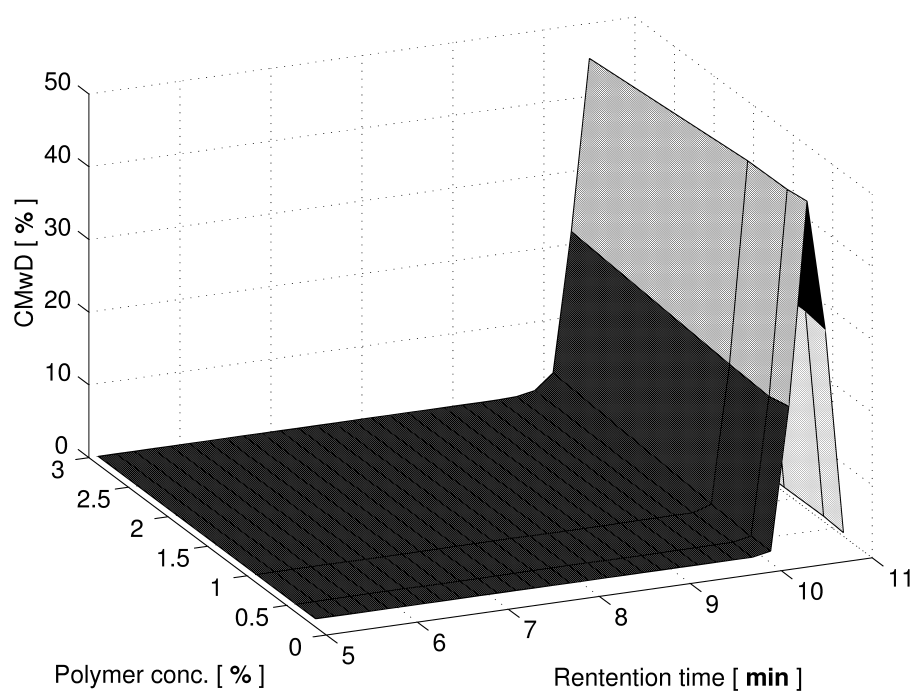


Fig. 4.16: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

らかになった。ポリマー試料に P(3HB) を用いた場合、ポリマー試料濃度の上昇はポリマー試料の不完全な分解の原因になることが示された。したがって、本検討範囲では PCL の分解率にポリマー試料濃度は影響を与えなかったが、ポリマー試料濃度をより高めた場合にはオリゴマー収率が低下する可能性が高いと考えられる。

## HPLC ポンプを用いたポリマー溶液の連続注入による分解反応

*ata*-P(3HB) を基質に用いた場合で良好な結果が得られた 0.25 % のポリマー溶液 40 mL を HPLC ポンプで酵素カラムに連続注入する分解反応について検討を行った。

分解前後の SEC チャートを Fig. 4.17 に示した。

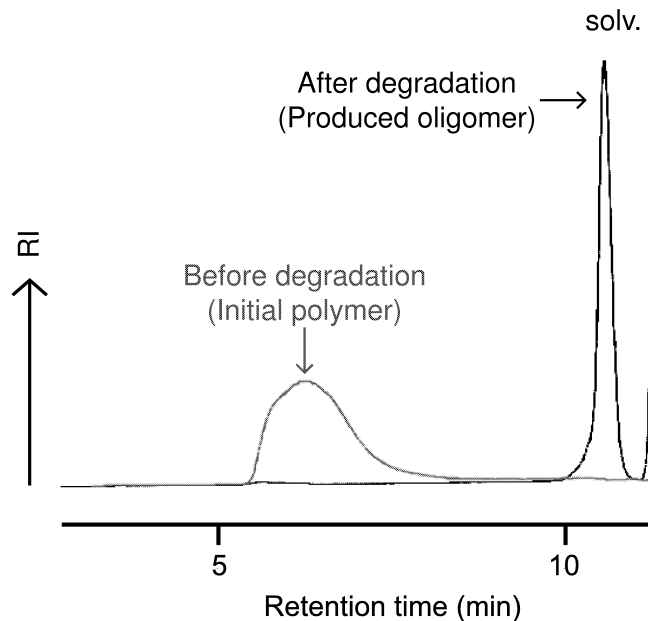


Fig. 4.17: SEC profiles of continuous degradation products of PCL using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

Fig. 4.17 より、PCL をポリマー試料に用いた場合でも、*ata*-P(3HB) をポリマー試料に用いた場合と同様、ポリマーのトルエン溶液を HPLC ポンプで酵素カラムに連続的に注入する連続分解反応が良好に進行することが明らかになった。また、得られたオリゴマーの SEC チャートは 1 mL のトルエン溶液を分解させた場合と全く同様であり、同時に注入するポリマー量が得られるオリゴマー分子量に影響を与えないことが示された。

## 分解生成物の分子構造

PCL の低分子分解物の構造解析についてはスペクトルが検出されないため、MALDI-TOF MS を用いることができない。したがって、当研究室の江端が既に行ったように<sup>188)</sup>、ここでは<sup>1</sup>H-NMR、低分子量 SEC 及び APCI MS を用いて解析を行った。

分解生成物の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを Fig. 4.18 に示した。帰属は江端の修士論文に従った<sup>188)</sup>。

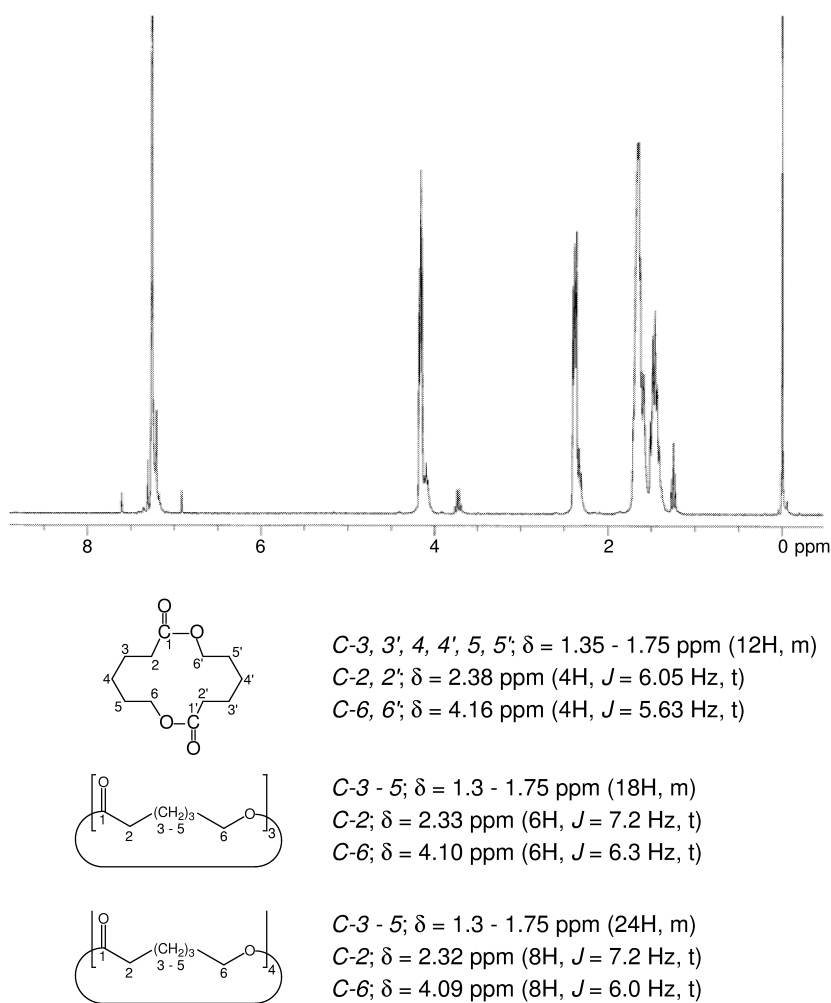


Fig. 4.18: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the continuous degradation products of PCL using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

スペクトルの帰属より、分解反応による主生成物は環状 2 量体であり、同時に環状 3、4 量体も含まれていることが明らかになった。



そこで、サイズ排除限界が  $M = 2100$  の低分子量用 SEC を用いて分解生成物の詳細な分子量分散を検討した。保持時間を含めた結果を Fig. 4.19 に記した。

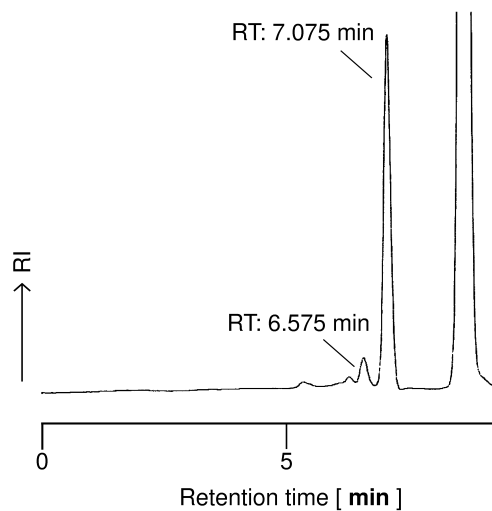


Fig. 4.19: SEC profiles of the continuous degradation products of PCL using HPLC pump <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

Fig. 4.19 より、分解生成物中の主生成物は低分子量用 SEC において 7.075 分の保持時間を有することが明らかになった。同様にして環状 1 量体である  $\epsilon$ -カプロラクトンの保持時間を測定した。結果を Fig. 4.20 に記した。

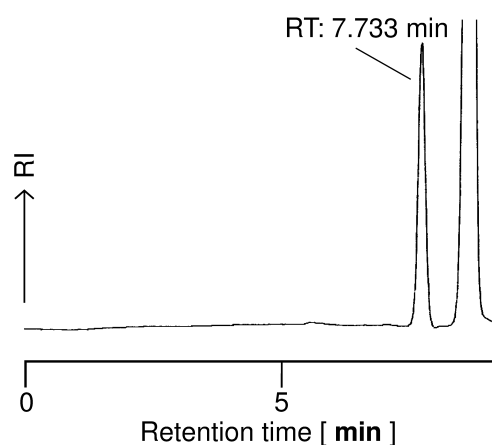


Fig. 4.20: SEC profiles of  $\epsilon$ -caprolactone.

以上の測定から、分解生成物中にはモノマーである  $\epsilon$ -カプロラクトンはほぼ含まれないことが明らかになった。そこで、分解生成物中の主生成物が環状 2 量体であることを確認

するために、分解混合物を THF により再結晶で精製して後に APCI MS により分子量を測定した。精製後の APCI MS スペクトルを Fig. 4.21 に示した。

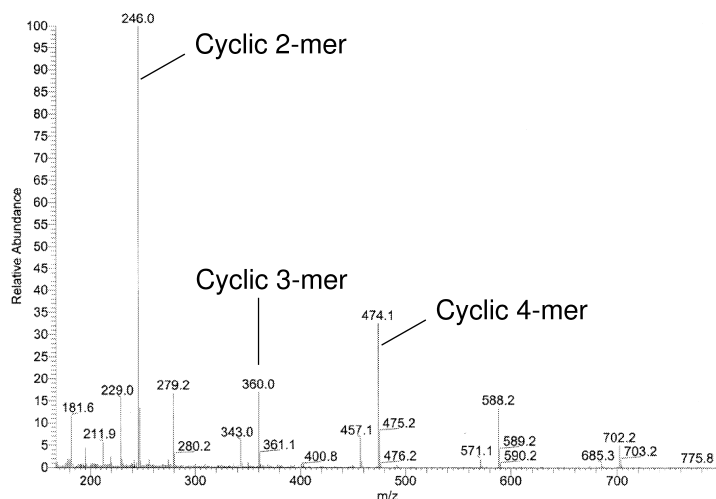


Fig. 4.21: APCI MS spectrum of the re-crystallized continuous degradation products of PCL using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. The re-crystallization was performed from THF solution.

また、再結晶による精製後の SEC チャートを Fig. 4.22 に示した。精製後でも主構造体の保持時間が 7.075 分であったことから、再結晶により、分解生成物中の主生成物濃度を増加させたことが示された。また、Fig. 4.21 より、主生成物の分子量は  $M = 246.0$  であり、これは環状 2 量体に水イオンが付加した分子量である。APCI MS スペクトルではイオン化で水素か水が付加してもものが検出される。したがって、環状型と水酸基末端型を APCI MS スペクトルのみで判断するのは難しいが、中性イオンが検出されないことから、検出される水付加した環状型オリゴマーと水素付加した直鎖型オリゴマーでは 1 m/z の差がある。したがって、本検討のように <sup>1</sup>H-NMR スペクトルと合わせて解析することで、APCI MS も MALDI-TOF MS と同様、分子構造解析において有効な測定方法である。

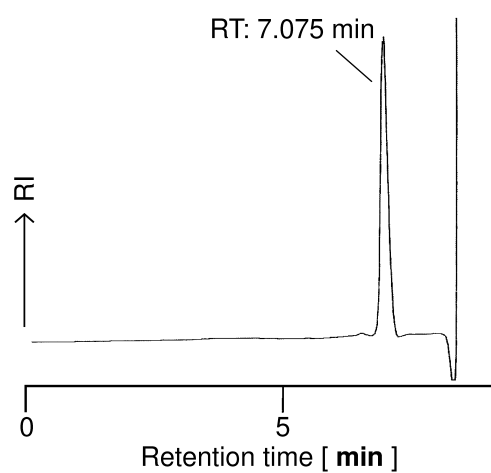


Fig. 4.22: SEC profiles of the re-crystallized continuous degradation products of PCL using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 40 mL of 0.25 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. The re-crystallization was performed from THF solution.

### (3) PBA の連続分解

これまでの検討から本連続分解反応は 40 °C にてトルエンに溶解する生分解性脂肪族ポリエステルを迅速に分解することが示された。しかし、これまでに検討を行った P(3HB) と PCL は分子構造的に AB 型ポリエステルであり、モノマーユニットがジカルボン酸部位とジオール部位から構成される AA-BB 型生分解性脂肪族ポリエステルを基質に用いた検討も本連続分解反応の一般性を示すためには必要であると考えられる。

また、一般に AA-BB 型ポリエステルはジカルボン酸とジオールの脱水縮重合により合成される。その際、酸と塩基のモル濃度を同一にしないと得られるポリマーの分子量は低下する。AB 型ポリエステルは一般に環状モノマーの開環重合もしくはヒドロキシ酸の脱水縮重合により合成されるため、酸と塩基のモル濃度は調整する必要がない。そのため、特に AA-BB 型ポリエステルの代表格であるポリエチレンテレフタレート (PET) の合成において原料に環状型モノマーユニットを用いる検討がなされ、環状オリゴマーを原料に用いた重合反応により得られるポリマーの高分子量化や重合時間の短縮が可能であることが示されている。したがって、AA-BB 型ポリエステルを構成するモノマーユニットの環状型オリゴマー合成プロセス確立は工業的にも重要であると考えらる。

PBA の酵素触媒による有機溶媒中でのバッチ式分解反応については当研究室の岡島らにより詳細に行われた<sup>136)</sup>。その結果、トルエンやキシレンといった疎水性有機溶媒中で PBA は Novozym<sup>®</sup> 435 の作用により迅速に分解され 2 及び 3 量体を中心とする環状型オリゴマーへと変換されることが明らかになった。また、これら環状オリゴマーは酵素触媒重合により PBA と再変換可能であり、再変換された PBA は原料に用いたポリマー試料よりも分子量が増加することが明らかになった<sup>136)</sup>。

そこで、本研究では酵素カラムを用いた連続分解法による PBA の環状オリゴマー化において、ポリマー試料に PCL を用いた場合と同様、移動相の流速が分解反応に及ぼす影響並びにポリマー試料濃度の影響に関して詳細な検討を行った。そして得られた知見をもとに HPLC ポンプを用いたポリマー溶液の連続注入による分解反応を行い、本連続分解反応で得られた生成物の分子構造を検討した。

### 移動相の流速の影響

P(3HB) 及び PCL の連続分解反応では、移動相の流速が分解率に大きな影響を与えた。また、同じポリマー試料濃度で分解を行っても完全分解を行うことのできる移動相の流速はポリマー試料の種類に依存した。これは Novozym<sup>®</sup> 435 を用いたバッチ式分解反応で P(3HB) と PCL の分解挙動に差があったことをそのまま反映した結果であると考えられる。したがって、ポリマー試料に PBA を用いた場合においても完全分解が可能な移動相の流速はポリマー試料に P(3HB) 及び PCL を用いた場合と異なる結果になると推測した。そこで、ここでも完全分解が可能な移動相の流速についても詳細な検討は行わず、移動相の流速の変化が全体的な分解挙動に与える影響を解析した。

結果を Table 4.10 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元的に並べたものを作成し、Fig. 4.23 に示した。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 4685$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

Table 4.10: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	Flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.1	>99.9	310	440	1.44
2	0.2	>99.9	260	370	1.39
3	0.4	>99.9	280	410	1.43
4	0.8	>99.9	290	420	1.44

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

以上の結果から、移動相の流速が連続分解に与える影響は PBA をポリマー試料として用いた場合と P(3HB) や PCL をポリマー試料に用いた場合とで異なることが示された。すなわち、P(3HB) や PCL をポリマー試料に用いた場合では移動相の流速の増加に伴ってポリマー試料が未反応のまま分解生成物中に含まれるため分解率を表すオリゴマー収率が低下したが、ポリマー試料に PBA を用いた場合、本検討の範囲内ではいずれの流速を用いてもポリマー試料は完全に分解した。また、流速の変化は分解反応により得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散に大きな影響を与えないことが示され、この結果は P(3HB) や PCL をポリマー試料に用いた場合と同様であった。

本検討で移動相の流速がオリゴマー収率に対して影響を与えなかった理由の一つにポリ

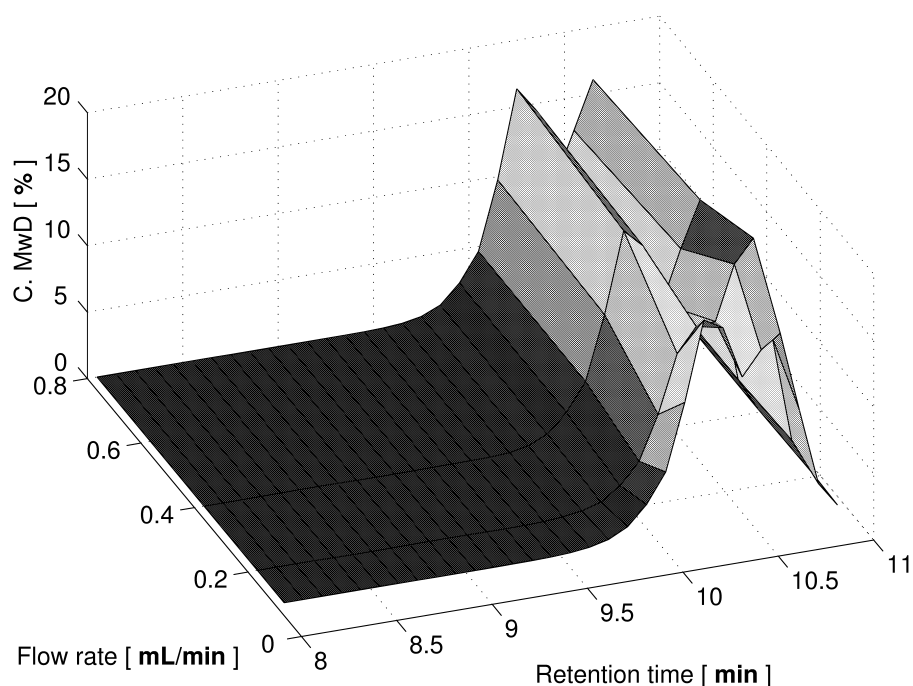


Fig. 4.23: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

マー試料の分子量が挙げられる。すなわち、AB型ポリエステルであるP(3HB)とPCLは環状モノマーであるラクトンの開環重合で合成されたものであったのに対し、AA-BB型ポリエステルであるPBAは脱水縮重合で合成されたものであったため、分子量が大幅に小さかった。

ポリマー試料の分子量が分解反応に与える影響については、P(3HB)のバッチ式酵素触媒分解反応に関する研究で検討した。その結果、ポリマー試料の分子量の違いはさほど影響を与えないが、分子量が小さいポリマーを分解させる際にはより少ない酵素濃度で分解が進行したり、より短い時間で完全分解する結果が得られた。したがって、PBAをポリマー試料に用いた場合にはポリマー試料の分子量が小さいために、本連続分解反応も非常に迅速に進行したと考えられる。移動相の流速の変化はバッチ式分解反応における分解反応時間に相当すると考えられることから、本検討の範囲上限である0.8 mL/minの条件で定められる分解時間はPBAが完全分解するために十分な時間であったと考えられる。

### ポリマー試料濃度の影響

本検討では P(3HB) や PCL をポリマー試料に用いて得られた結果と比較検討するため、P(3HB) 及び PCL をポリマー試料として用いて行ったポリマー試料濃度の影響に関する検討と同条件で検討を行った。すなわち、カラム温度は 40 °C、移動相の流速は 0.2 mL/min に固定してポリマー試料濃度の影響を検討した。

P(3HB) をポリマー試料に用いた場合、検討範囲で最もポリマー濃度が高かった 3 % のポリマー溶液を分解させた際にポリマー試料が未反応のまま分解生成物に含まれた。しかし、先の検討から PBA をポリマー試料に用いた場合は PCL をポリマー試料として用いた場合と同様、3 % のポリマー試料溶液を分解させる条件で分解生成物中に未反応ポリマー試料が含まれないことが確認された。したがって、本検討ではポリマー試料濃度が連続分解反応により得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散に与える影響を検討した。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 4685$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.11 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元的に並べたものを作成し、Fig. 4.24 に示した。

Table 4.11: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.25	>99.9	200	250	1.23
2	0.5	>99.9	200	230	1.18
3	1.0	>99.9	210	270	1.27
4	3.0	>99.9	260	370	1.39

<sup>a)</sup> 1 mL of PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

Table 4.11 より、若干であるものの、ポリマー試料濃度が高かった場合に得られるオリゴマーの分子量分散が大きくなった。この傾向は Fig. 4.24 の方がより顕著に示した。

PBA をトルエンやキシレンといった疎水性溶媒中で Novozym<sup>®</sup> 435 の作用により分解させた場合、SEC チャートのオリゴマーピークは二峰性になる。これまでの研究からこの二峰のうちの低分子量側が環状 1 量体、高分子量側が環状 2 量体及びそれ以上の大きさの

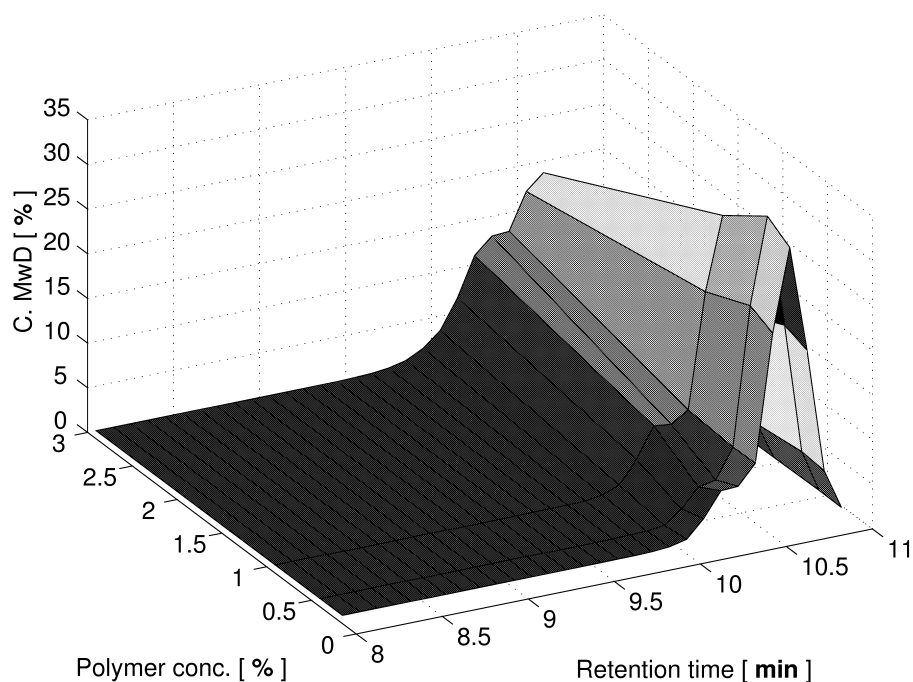


Fig. 4.24: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

オリゴマーに帰属された。

したがって、本検討の結果はポリマー試料濃度の変化は得られる環状オリゴマーのリングサイズに影響を与えたことを示すと考えられる。本連続分解反応を用いて P(3HB) や PCL を分解させた場合には、ポリマー試料濃度の変化は得られるオリゴマーサイズに影響を与えなかった。このポリマー試料の違いによる相違は AB 型ポリエステルと AA-BB 型ポリエステルの分子構造の違いに起因していると考えられる。すなわち、本検討の結果より、ポリマー試料濃度を増加させた場合に分解生成物のオリゴマーサイズが影響を受け、得られる環状オリゴマーサイズが 1 量体から 2 量体へと移行することが明らかになった。Chem 3D pro を用いて環状 1 量体と環状 2 量体の熱エネルギーを計算した結果、それぞれ  $-189.74 \text{ kcal/mol}$  と  $-330.01 \text{ kcal/mol}$  であり環状 2 量体の方が熱的に安定であることが示された。また、微量の水を含むトルエン中におけるバッチ式分解反応では環状 2 量体が選択的に得られた <sup>136)</sup> ことから本分解反応は環状 2 量体を選択的に生成する反応であると考えられる。

*Candida antarctica* 由来のリパーゼは活性部位入り口付近に嵩高いアミノ酸残基側鎖があるため <sup>157)</sup>、環状化合物が生成する際にはこれらアミノ酸残基側鎖と生成する環状化合物の間に立体障害がないように、アミノ酸残基側鎖より外側を迂回して環状型を形成するかアミノ酸残基より内側で小さく環状型を形成することが必要と考えられる。そこで酵素



のオリゴマーサイズ選択性について考えると、P(3HB)の分解反応では環状6~8量体が選択的に合成されたことから24~32員環の環状化合物が活性部位と大きさに親和性が高いと考えられ、またPCLの分解反応では環状2量体が選択的に合成されたことから14員環も大きさに親和性が高いと考えられる。したがって、アミノ酸残基より外側を迂回して環状型を形成する場合は24員環以上の大きさが必要であり、アミノ酸残基より内側で小さく環状型を形成するには14員環程度の大きさであることが必要であると考えられる。

PBAの分解生成物である環状1量体と環状2量体はそれぞれ12員環及び24員環であることから、どちらも選択的に合成される可能性がある。したがって、PBAをポリマー試料に用いた場合には酵素のオリゴマーサイズ選択性が厳密ではないと考えられる。しかしながら、環状2量体の方が環状1量体に比べて熱的エネルギーが小さいためにバッチ式分解反応では環状2量体が選択的に合成されたと考えられる。したがって、ここでは本連続分解反応においてポリマー試料濃度を低下させた際に環状1量体が選択的に合成された理由について考察した。

AB型ポリエステルとAA-BB型ポリエステルが酵素と中間体を形成する段階で大きな違いは、ポリマー分子鎖が方向性を有するか否かである。すなわち、AB型ポリエステルの基質としたアシル酵素中間体形成時には常にアシル鎖末端が水酸基であるのに対して、AA-BB型ポリエステルの基質としたアシル酵素中間体形成時にはアシル鎖末端がカルボキシル基である可能性があるため、AA-BB型ポリエステルのポリマー試料に用いた場合にはアシル酵素中間体内で分子内エステル交換反応が行えない場合がある。そのような場合にはアシル酵素中間体に対して水の求核攻撃が系内に存在するオリゴマーの水酸基末端が求核攻撃がない限り、アシル鎖は反応系内に放出されない。バッチ式分解反応ではアシル酵素中間体形成時に放出された水酸基末端オリゴマーが同一反応系内に存在するが、連続分解反応ではその水酸基末端オリゴマーが移動相により反応場から除去される。したがって、ポリマー試料濃度が低い場合にはアシル酵素中間体がオリゴマー鎖の水酸基末端により求核攻撃される可能性は低く、水による求核攻撃を受ける可能性が上昇する。その結果、加水分解反応により短くなったオリゴマー鎖が分子間エステル交換反応により長くなる可能性が低下しと考えられる。

環状2量体はエネルギー的に1量体よりも安定であるが、アシル酵素中間体内の分子間エステル交換反応で合成されるためには2量体よりも長いオリゴマー鎖が酵素により認識されてアシル酵素中間体を形成する必要がある。また、水を強制的に添加したトルエン中でのPBAの分解反応でもジカルボン酸とジオールまでは分解されないことが明らかになっており、酵素はエステル結合を含むジカルボン酸とジオールから構成されるユニットを最小モノマー単位として認識すると考えられる。したがって、ポリマー試料濃度を低下させて分子間エステル交換反応を抑制した場合、2量体よりも小さくなったオリゴマーは

伸長できずに最小モノマー単位まで短くなったと考えられる。ただし、環状2量体が生成する可能性を完全に排除することはできないために、ポリマー試料濃度を0.25%まで低下させても環状2量体は生成したと考えられる。

以上の考察をまとめると、PBAのバッチ式分解反応では熱的に安定な環状2量体が優先して得られるが、本連続分解反応ではポリマー試料濃度を低下させた際に効果的に分子間エステル交換反応を抑制し、エネルギー的に環状2量体よりも高い環状1量体を優先的に合成できたと考えられる。

### HPLC ポンプを用いたポリマー溶液の連続注入による分解反応

ここでは、これまでの検討から得られた知見を用いて、HPLC ポンプによりポリマー試料溶液を酵素カラムに連続注入する連続分解反応について検討を行った。ここでは本連続分解反応の最適化は行わずに、HPLC ポンプを用いたポリマー溶液の連続注入による分解反応の一般性の確認を行うことに主眼をおいて検討を行った。

本検討では、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 7946$  以下とし、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。また、RI 検出器により系内の分解生成物濃度も解析した。

分解条件及び結果を Table 4.12 に示した。

Table 4.12: Continuous degradation of PBA using HPLC pump.

Entry	Polymer conc. (%)	Polymer solution (mL)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1 <sup>a)</sup>	1.0	20	>99.9	480	940	1.98

<sup>a)</sup> PBA toluene solution was injected using a HPLC pump into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

また、連続分解前後の SEC チャートを Fig. 4.25 に示した。Fig. 4.25 より、分解後の SEC チャートにはポリマー試料ピークが完全に消失したことが明らかになった。

以上の結果より、上記の条件では得られたオリゴマーの平均分子量並びに分子量分散値が若干大きいものの、PBA のトルエン溶液を HPLC ポンプを用いて連続的に酵素カラムに注入した場合でも分解反応は完全に進行することが明らかになった。先に行ったポリマー試料濃度に関する検討結果より、ポリマー試料濃度を低下させれば生成オリゴマーの平均分子量並びに分子量分散を小さく抑えられると考えられる。

また、RI 検出器により得られた検出曲線の解析より、本検討における条件で分解生成物がある時点で濃度一定になったことが明らかになり、酵素カラム内においてポリマー試料濃度が調製値に達してもポリマー試料の分解反応が完全に進行することが示された。

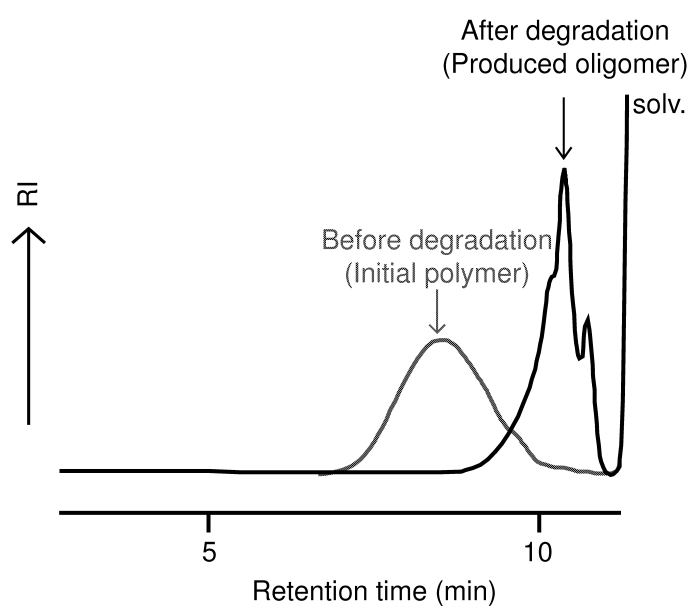


Fig. 4.25: SEC profiles of continuous degradation of PBA using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 20 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

### 分解生成物の分子構造

ここでは、HPLC ポンプを用いて酵素カラムにポリマー溶液を連続注入して得られたオリゴマーの構造解析を行った。PBA の有機溶媒中での酵素分解生成物に関する構造解析は当研究室の岡島が既に行っているため<sup>136)</sup>、ここでは同様に  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS を用いて解析を行った。

分解生成物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを Fig. 4.26 に示した。帰属は岡島らの発表に従った<sup>136)</sup>。

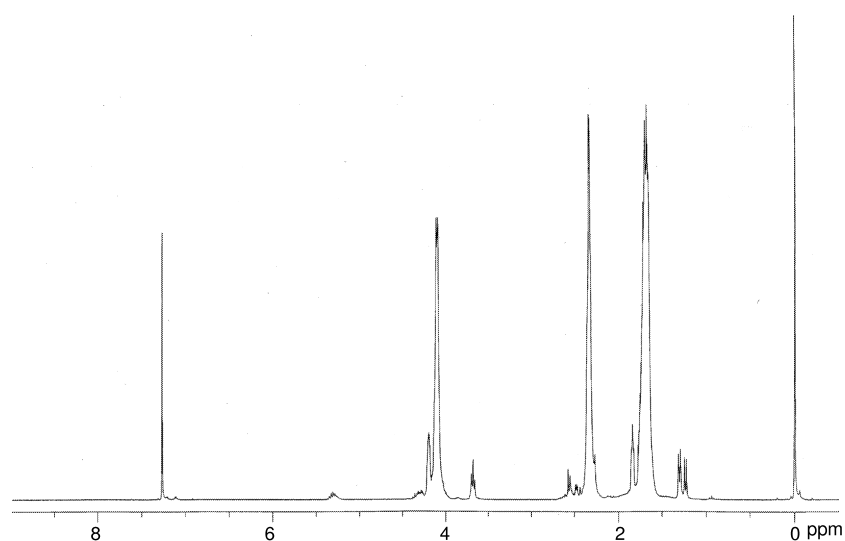


Fig. 4.26:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the continuous degradation products of PBA using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 20 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) : Cyclic butylene adipate diester  $\delta = 1.68$  ( $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ , 4H, m), 1.73 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-$ , 4H, m), 2.34 ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , 4H, m), 4.12 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ , 4H, m)

Terminal hydroxy methylene proton  $\delta = 3.65$  ( $\text{HO}-\text{CH}_2-$ , 2H, m)

Fig. 4.26 より、水酸基末端を有するオリゴマーが含まれているものの、主生成物は環状 2 量体であることが明らかになった。また、スペクトル形状がブロードであることから、環状 2 量体以外にも環状型オリゴマーが含まれていると考えられた。そこで、分解生成物の分子量解析を MALDI-TOF MS を用いて行った。分解生成物の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 4.27 に示した。

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル及び MALDI-TOF MS スペクトルより、PBA の分解反応において酵素カラムを用いた連続分解でも試験管を用いたバッチ式と同様、環状型オリゴマーが

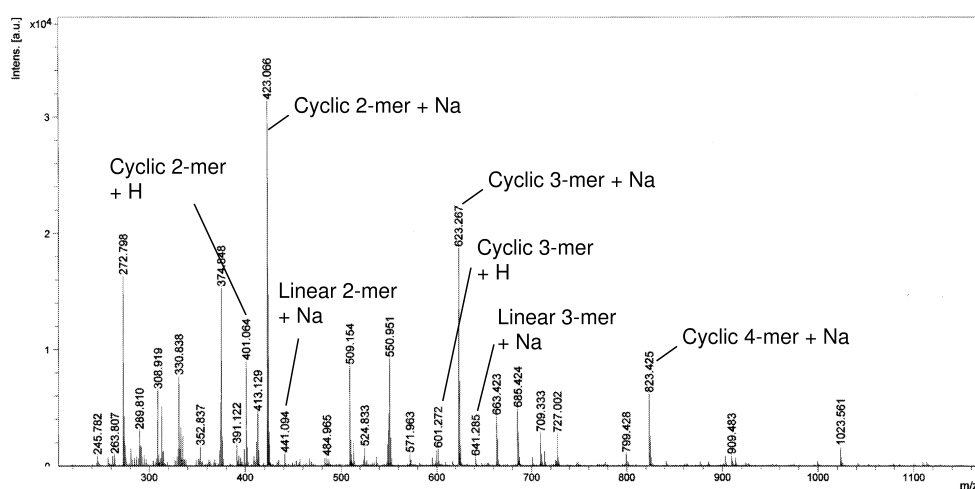


Fig. 4.27: MALDI-TOF MS spectrum of the continuous degradation products of PBA using HPLC pump <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 20 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

主生成物となることが明らかになった。また、オリゴマーサイズもバッチ式と同様、2量体に収束した。

ここで、Table PBA ポリマー濃度の影響 Entry 1 の連続分解反応条件で得られたオリゴマーの分子構造解析を行った。すなわち、SEC チャートから環状1量体が主生成物として得られたことが示されたため、<sup>1</sup>H-NMR 及び MALDI-TOF MS を用いて解析を試みた。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルと環状2量体の帰属を Fig. 4.28 に示した。

Fig. 4.28 より、環状2量体に帰属されるスペクトルの近傍に環状2量体の帰属とは異なるスペクトルが得られた。また、SEC チャートの解析から示されたように環状2量体のスペクトルも含まれていることが明らかになった。水酸基末端型オリゴマーに由来するスペクトルも得られたが、プロトン量から計算すると僅かであり、新たに得られたスペクトルは環状1量体に帰属されると考えられる。そこで、MALDI-TOF MS を用いて分子量解析を行ったが、分子量が M = 200 付近はマトリクス由来のスペクトルも多数存在しており、確実な帰属を行うことができなかった。本検討ではマトリクスとして DHB 及び HABA を使用したが、他のマトリクスで良好なスペクトルが得られる可能性がある。また、APCI を用いた解析も行ったが、良好なスペクトルを得るには至らなかった。

したがって、分子量の決定は行えなかったが、SEC チャート及び <sup>1</sup>H-NMR スペクトルが環状1量体の著量な存在を支持しているため、今後このような低分子化合物の確実な分子量解析が行われることを期待する。

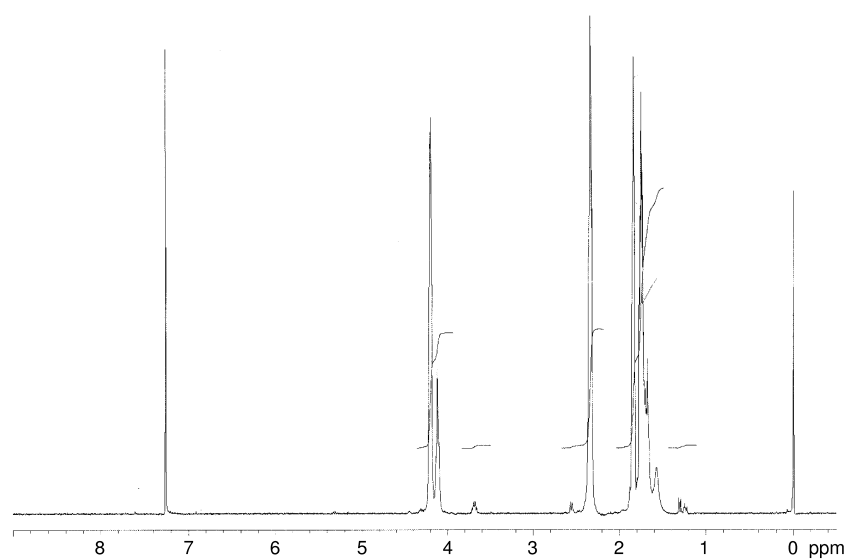


Fig. 4.28:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the continuous degradation products of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 0.25 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ) : Cyclic butylene adipate diester  $\delta = 1.68$  ( $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ , 4H, m), 1.73 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-$ , 4H, m), 2.34 ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , 4H, m), 4.12 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ , 4H, m)

Terminal hydroxy methylene proton  $\delta = 3.65$  ( $\text{HO}-\text{CH}_2-$ , 2H, m)

### 4.3.2 超臨界二酸化炭素を移動相に用いた連続分解

近年、環境に対して温和な化学反応の開発が世界的に求められている。既存の化学反応の環境に対する負荷を低減する方法はいくつも存在する。その中に化学反応に用いる有機溶媒量の削減を行うことで、環境低負荷な反応系を構築することが検討されている。有機溶媒系から水系溶媒への変換を行うための触媒の研究、揮発性がないイオン性流体を用いる反応系<sup>66)</sup>の開発及び超臨界流体を用いる反応系<sup>67)</sup>の開発などが挙げられる。それぞれが研究段階にあるために実用化された技術はまだ少ないが、抽出などに関しては超臨界流体を用いる試みがなされている。

超臨界流体とは、臨界点を越えた状態の流体の総称である。現段階で研究されている超臨界流体は二酸化炭素をはじめ、水及びメタノールなどが挙げられる。これらの中で臨界点が最も常温・常圧に近いのは二酸化炭素であり、超臨界二酸化炭素は簡単に得ることができる超臨界流体であるといえる。

超臨界流体を酵素反応や微生物反応に用いる試みは1985年に初めて行われた<sup>66)</sup>。Kamatらは超臨界二酸化炭素中で *Candida cylindracea* を用いたエステル交換反応について検討を行い、超臨界二酸化炭素中における特異的な酵素活性上昇を報告した<sup>67)</sup>。超臨界二酸化炭素を酵素反応や微生物反応の媒体に用いる検討は当研究室でも既に行われており、中村らは超臨界二酸化炭素中で休止菌体を用いたキトサンの糖転移反応について詳細な検討を行い、常圧で行った糖転移反応では得られないオリゴ糖鎖を有するキシロトリオシドの合成に成功した<sup>128, 189)</sup>。また、近藤らは微量の水分を含む超臨界二酸化炭素中で PCL に Novozym<sup>®</sup> 435 を作用させても疎水性有機溶媒中の分解反応で得られる環状オリゴマーを合成することに成功した。さらに超臨界二酸化炭素の圧力調整により環状型オリゴマーの組成比を制御できることを見出し、環状型オリゴマー合成に要する有機溶媒量の大幅な削減が可能であることを示した<sup>83)</sup>。

酵素カラムを用い、トルエンを移動相にした連続分解は、生分解性脂肪族ポリエステルの酵素触媒による環状オリゴマー化に要する有機溶媒量と酵素量の削減を実現した。そこで、ここでは更に効率的な連続分解法を開発するため、固定化酵素充填カラムによる生分解性脂肪族ポリエステルの連続分解の移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いる検討を行った。移動相を超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒にした理由は、超臨界二酸化炭素の脂肪族ポリエステルに対する溶解性が低いために、脂肪族ポリエステルの良溶媒を添加する必要性があったことと、その溶媒が工業的に利用可能であり、酵素活性を失活させないことが挙げられる。トルエンはこれら条件を満たしており、さらに先の検討でトルエンを用いたので、移動相に用いる超臨界二酸化炭素が連続分解反応に与える影響を比較検討する際に適していると考えられた。



超臨界二酸化炭素は温度及び圧力の変化に応じて物性を変化させる流体である。したがって、本来であれば温度及び圧力が本連続分解反応に与える影響について検討すべきであると考えられるが、高い反応温度は酵素のポリマー分解活性を低下させることが示されたので、本研究では移動相にトルエンのみを用いて検討を行った場合と同じく、カラム温度を 40 °C に固定して圧力のみを変化させて検討を行った。

したがって、ここでは圧力が連続分解反応に与える影響、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が連続分解反応に与える影響、移動相の流速が連続分解反応に与える影響、ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響及び連続分解反応により得られたオリゴマーの分子構造について検討を行った。またポリマー試料は、トルエンのみを移動相とした連続分解反応を検討した際に用いた P(3HB)、PCL 及び PBA とした。

## (1) P(3HB) の連続分解

ここでは P(3HB) をポリマー試料として用い、圧力が連続分解反応に与える影響、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が連続分解反応に与える影響、移動相の流速が連続分解反応に与える影響、ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響及び連続分解反応により得られたオリゴマーの分子構造について検討を行った。ついで、ここで得られた結果とトルエンのみを移動相に用いた連続分解の結果を比較検討した。

## 圧力が連続分解反応に与える影響

二酸化炭素の圧力における臨界点が 8 MPa 近辺であるため、ここでは 9 MPa 以上で検討を行った。また、高い圧力は酵素活性を低下させる可能性が考えられたため、上限は 20 MPa として検討を行った。また、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は試運転で良好な結果が得られた 4 : 1 (0.4 mL/min + 0.1 mL/min) とした。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 6526$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.13 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.29 に示した。

Table 4.13: Effects of pressure on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Pressure (MPa)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	9	>99.9	540	780	1.45
2	11	>99.9	640	970	1.51
3	13	99.8	500	780	1.57
4	15	>99.9	580	950	1.62
5	18	99.9	590	1000	1.68
6	20	99.4	510	980	1.92

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C. A flow rate of sc CO<sub>2</sub> and toluene was 0.4 mL/min and 0.1 mL/min, respectively.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

Table 4.13 に示した結果より、連続分解反応装置系内の圧力は 9~20 MPa の範囲内で

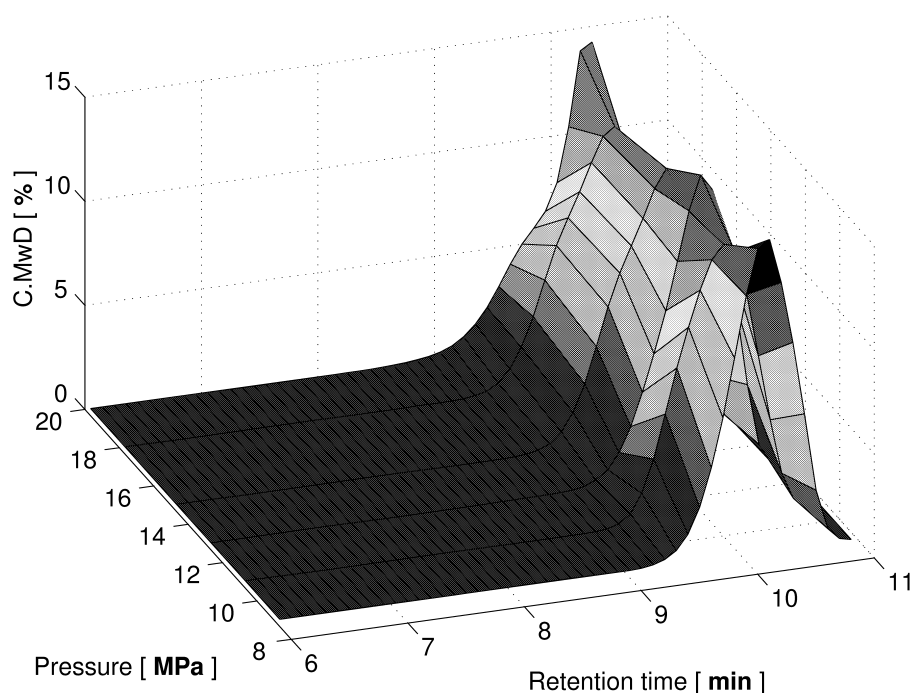


Fig. 4.29: Effects of pressure on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % *ata*-P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

分解反応に影響を与えないことが示された。また、Fig. 4.29 に示した分解生成物の SEC チャートからも、いずれの圧力にて分解した分解生成物中にも未反応のポリマー試料は含まれておらず、分解反応が完全に進行したことが示された。

超臨界二酸化炭素を反応媒体に用いた酵素触媒による PCL のバッチ式分解反応の検討より、反応系の圧力増加は有機溶媒を反応媒体として用いた時の希釈効果と同義であることが示された。したがって、本連続分解反応においても系内の圧力増加は酵素のポリマー分解活性上昇を導くことが期待されたが、本検討範囲の下限である 9 MPa の圧力を用いた段階でポリマー試料が完全に分解されたことから、圧力増加に伴う酵素のポリマー分解活性上昇は確認できなかった。

結果を詳細に検討すると僅かではあるが、反応系内の圧力を 20 MPa に設定して分解反応を行った場合、得られたオリゴマーの分子量分散値が上昇した。Fig. 4.9 から系内の圧力が 20 MPa の際に得られたオリゴマーのピーク形状が他の圧力で得られたオリゴマーのそれと異なった。したがって、本来であればさらに反応系内の圧力を増加させて系統的な検討を行うべきだが、高い圧力は長期的な酵素活性に悪影響を与える可能性があり、また高い圧力で得られるオリゴマーの分子量分散は増加する可能性が高かったことから、ここでは詳細な検討を行わなかった。

## 超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が連続分解反応に与える影響

超臨界二酸化炭素を用いた本連続分解反応では脂肪族ポリエステルの良溶媒であるトルエンを添加した混合溶媒を移動相として用いている。そこで、圧力・温度・全体の流速を一定にして、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が本連続分解反応に与える影響について検討した。

カラム温度については酵素の分解活性を考慮し、40 °Cとした。先の検討から圧力が本連続分解反応に影響を与えないことが明らかになったので、ここでは15 MPaとした。全体の流速は先の検討で0.5 mL/minとした際に良好な分解が確認されたので、ここでも0.5 mL/minとした。また、ポリマー試料濃度は1%に固定して検討を行った。

超臨界二酸化炭素100%溶媒にはポリエステルが溶解しない可能性が考えられたので、ここでは移動相に超臨界二酸化炭素のみを用いる検討は行わなかった。したがって、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は2:8(0.1 mL/min + 0.4 mL/min) ~ 8:2(0.4 mL/min + 0.1 mL/min)の範囲で検討を行った。

結果をTable 4.14に示した。ここでは、オリゴマー領域をSECの検量線による分子量 $M = 4685$ 以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率はSECチャートより算出( $C \cdot \overline{M}_w D$ 値)した。しかし、Entry 1~3はオリゴマー収率が非常に低かったので、オリゴマー領域の分子量は計算しなかった。また、分解生成物のSECチャートを3次元表示したものを作成し、Fig. 4.30に示した。

Table 4.14: Effects of sc CO<sub>2</sub> content on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	sc CO <sub>2</sub> content (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	20	12.3	—	—	—
2	40	4.3	—	—	—
3	60	24.1	—	—	—
4	80	99.8	500	750	1.48

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a pressure of 15 MPa, a total flow rate of 0.5 mL/min and 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の結果から、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は本連続分解反応に対して大き

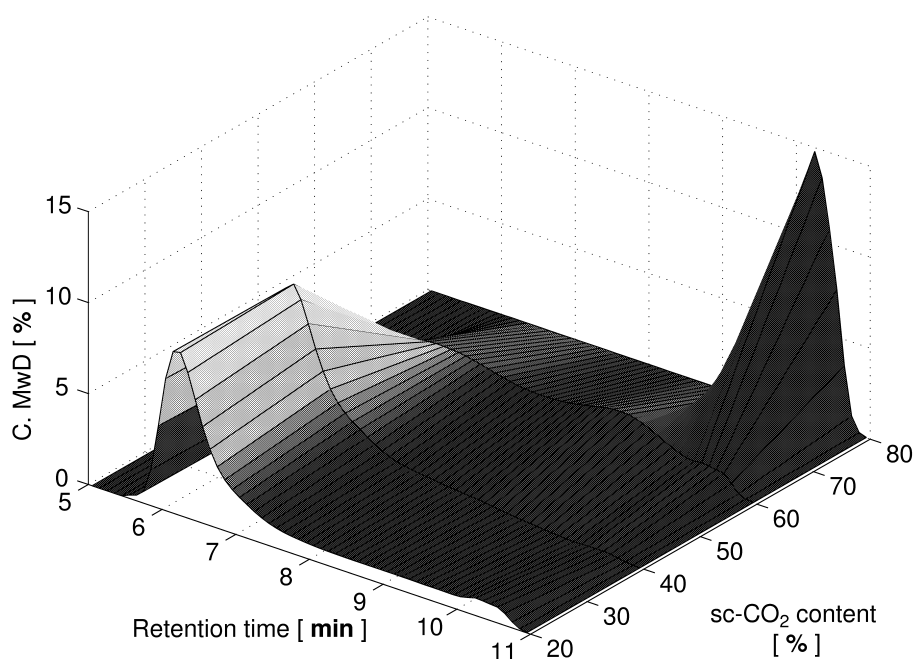


Fig. 4.30: Effects of sc CO<sub>2</sub> content on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

く影響を与えることが明らかになった。すなわち、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素濃度上昇に伴って得られる分解生成物中に含まれる未反応ポリマー試料が減少し、超臨界二酸化炭素の組成比が 80 % では分解生成物中に未反応ポリマー試料が全く含まれないことが明らかになった。

したがって、超臨界二酸化炭素を用いることにより酵素のポリマー分解活性が上昇したことが示された。混合溶媒中のトルエンの組成比が高い条件では同じ圧力であっても分解反応がさほど進行しなかったことから、超臨界二酸化炭素を用いることによる本連続分解反応の分解性の上昇は高い圧力が原因ではないと考えられる。

超臨界流体は圧力によって物性を変化させる特徴を有する。これは、圧力上昇に伴って系内に含まれる流体分子の数が、液体を圧縮する場合よりも飛躍的に上昇することが一つの理由として説明されている。この考え方を本連続分解反応に適応させると、混合溶媒中のトルエン組成比が高い状態では圧力が上昇しても溶媒分子の数にさほど変化はない。しかし、同じ圧力で混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比が上昇することは溶媒分子数の上昇を意味すると考えられる。

酵素触媒によるバッチ式分解反応の検討結果から、本分解反応は高希釈条件下でより迅速に進行することが明らかになった。そこで、溶媒分子数の上昇がポリマーを希釈すると仮定すると、同じ圧力で混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比を上昇させることはポリ

マーをさらに希釈することと同義になる。したがって、超臨界二酸化炭素組成比の上昇に伴ってポリマーの分解率が上昇したと考えられる。

また、有機溶媒中での酵素活性はより疎水場での方が高いことが知られている。リパーゼを用いた有機合成反応がヘキサンやオクタンといった溶媒中でよく行われるのはこのためである。超臨界二酸化炭素の疎水性を有機溶媒に例えるとヘキサンに近いとされている。したがって、超臨界二酸化炭素組成比の上昇に伴うポリマー分解活性の上昇は反応場の疎水性に起因しているとも考えられる。

さらに、超臨界二酸化炭素中でリパーゼを用いてエステル化反応の検討を行った報告では、ヘキサン中での反応と比較して、温度の上昇に伴う特異的な酵素活性の上昇が確認されている<sup>65, 67, 66</sup>)。したがって、酵素活性の上昇に関して、明らかになってはいないが、結果より、酵素のポリマー分解活性は超臨界二酸化炭素組成比の上昇に伴って増加しており、今後、超臨界二酸化炭素中での様々な酵素反応が報告され、様々な角度から本結果が検討されることが期待される。

### 移動相の流速が連続分解反応に与える影響

トルエンのみと移動相に用いて P(3HB) を連続分解させた場合、流速の増加に伴って分解生成物中に含まれる未反応のポリマー試料量が増加し、分解率が大幅に減少することが明らかになった。そこで、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を移動相に用いた本連続分解反応においても移動相の流速が分解反応に及ぼす影響について検討した。

先の検討から、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が 4 : 1 の時に良好な連続分解反応が進行することが明らかになったので、ここでは超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比を 4 : 1 に固定して、全体の流速を変化させることで検討を行った。また、圧力は 15 MPa でポリマー試料濃度を 1 % に固定して検討を行った。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 4685$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.15 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.31 に示した。

Table 4.15: Effects of total flow rate on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Total flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.5	99.8	500	750	1.48
2	1.0	99.2	660	1110	1.67
3	1.5	86.2	1010	2670	2.64

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

The ratio of sc CO<sub>2</sub> and toluene was 4 : 1.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

以上の検討から、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合でも、移動相の流速は本連続分解反応に影響を与えることが明らかになった。Table 4.15 より、移動相の全体的な流速を増加させた際にオリゴマー収率が低下することが示されたが、移動相の全体的な流速を大幅に増加させても分解生成物中に未反応のポリマー試料は含まれず、ポリマー試料は移動相の流速の影響を受けずに完全に分解することが明らかになった。

本検討の結果、分解生成物の平均分子量並びに分子量分散が流速の影響を大きく受けることが明らかになった。Fig. 4.31 では画面奥に向かって速い流速での連続分解反応によ

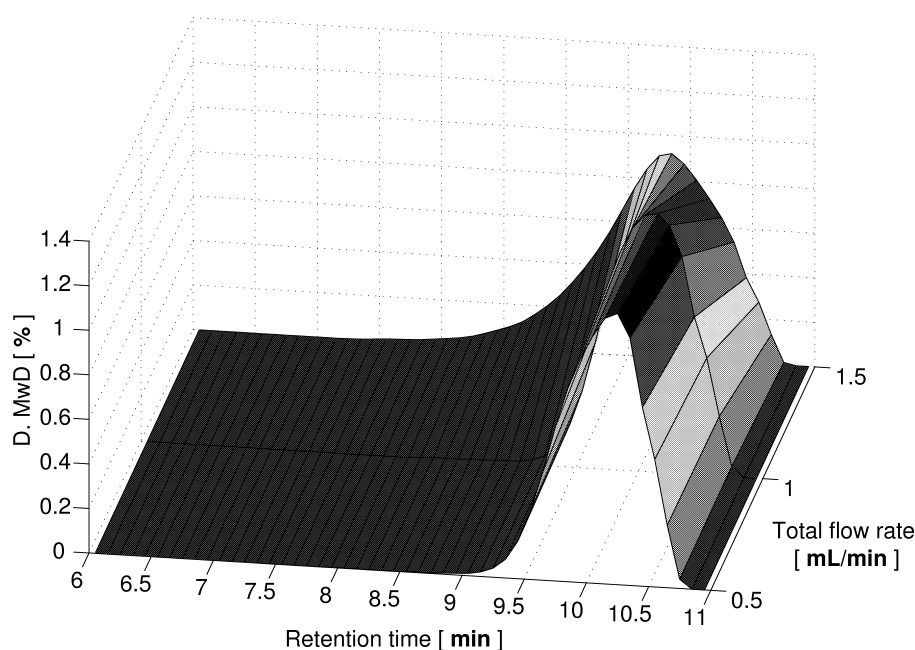


Fig. 4.31: Effects of total flow rate on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

り得られた分解生成物の SEC チャートを示した。この図から、移動相の流速を増加させるにしたがって、ポリマー試料が未反応のまま含まれることはないが、分解反応により得られたオリゴマーピークの頂点が高分子量側へと移行したことが明らかになった。また、オリゴマーピークが現れる幅を示す分子量分散も流速の増加に伴って増大し、分解反応によるオリゴマー化が収束までには至らなかったことが示された。

トルエンのみを移動相に用いて P(3HB) の連続分解反応を行い、移動相の流速の増加させた場合はポリマー試料が未反応のまま分解生成物中に含まれ、オリゴマー収率は大幅に低下した。この結果と本検討の結果の比較検討から、超臨界二酸化炭素を移動相に用いることで酵素のポリマー試料に対する分解活性が上昇したと考えられる。

全体的な移動相の流速は本連続分解反応において、分解反応時間を制御していると考えられる。すなわち、流速を増加させるとポリマー試料が酵素カラムを通過するのに要する時間が短縮されることから、反応時間を短くした場合と同義であると考えられる。したがって、超臨界二酸化炭素を用いることで酵素のポリマー分解活性が上昇したために、移動相の流速を増加させてもポリマー試料が未反応の状態での分解生成物中に含まれなかったと考えられる。この考察結果は超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比に関する先の知見と一致した。したがって、超臨界二酸化炭素を用いることで酵素のポリマー分解活性が上昇し、単位重量あたりのポリマー試料を完全分解するのに要する時間が短縮されたと考えら



れる。

超臨界二酸化炭素を用いることにより、酵素の分解活性が上昇したことが示されたが、移動相の速すぎる流速は得られるオリゴマーの分子量及び分子量分散を増加させた。したがって、得られるオリゴマーの分子量及び分子量分散を低く抑えるためには移動相の流速を制御する必要がある。本研究での以降の検討は全体的な流速を 0.5 mL/min に固定して検討を行った。

### ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響

トルエンのみを移動相に用いて P(3HB) を連続分解させた場合、ポリマー試料濃度は本連続分解反応に影響を与え、高すぎるポリマー試料濃度は不完全な分解反応の原因となり、分解生成物中に未反応のポリマー試料が含まれることが明らかになった。そこで、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた本連続分解反応においてもポリマー試料濃度が分解反応に与える影響について検討を行った。

今までの検討から、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は 4 : 1 で全体的な移動相の流速は 0.5 mL/min の際に良好な分解反応が進行することが確認されたので、ここではこれらの条件を用いてポリマー試料濃度の影響を検討した。また圧力は 15 MPa に固定した。

結果を Table 4.16 に示した。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 6526$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.32 に示した。

Table 4.16: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	1	99.8	500	750	1.48
2	2	99.9	640	1000	1.56
3	3	>99.9	540	840	1.54
4	4	96.5	530	810	1.53
5	5	97.6	540	760	1.40

<sup>a)</sup> 1 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial P(3HB):  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.16$

Table 4.16 及び Fig. 4.32 より、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合にはポリマー試料濃度が分解反応に対してさほど影響を与えないことが明らかになった。すなわち、本分解反応により得られるオリゴマーの分子量及び分子量分散の解析結果から、ポリマー試料濃度を増加させてもオリゴマーの平均分子量、分子量ピークトップ及び分子量分散が全く変化しないことが明らかになった。トルエンのみを移動相に用いた連続分解反応でも高すぎるポリマー試料濃度は不完全な分解を生じ、分解率の著しい低下の原因であったが、得られるオリゴマーの分子量は影響を受けなかった。超臨界二酸化炭素を移動相に用いた

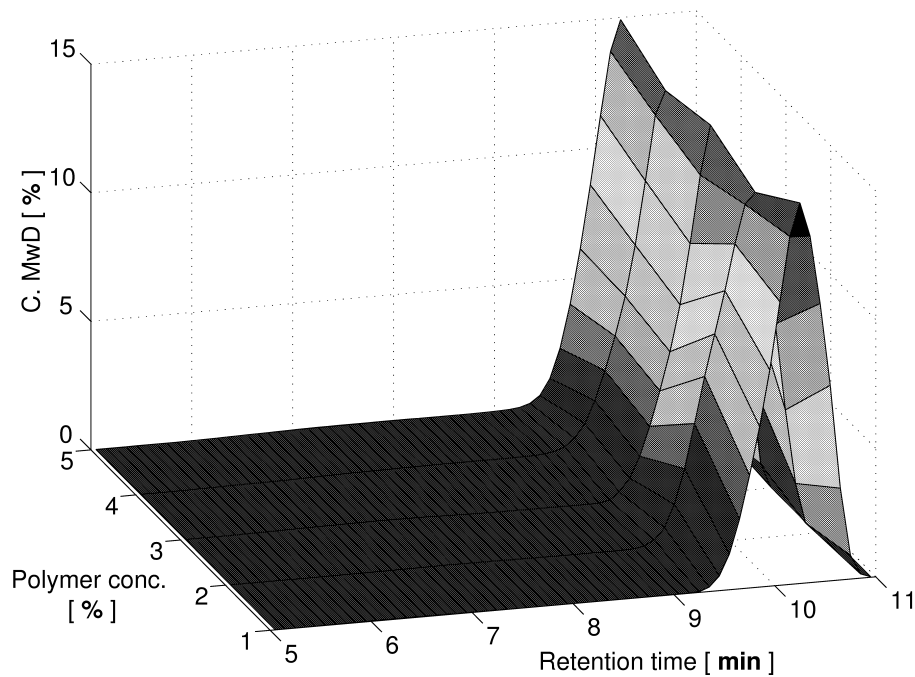


Fig. 4.32: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

本連続分解反応の場合でも同様に、ポリマー試料濃度は得られるオリゴマーに対して影響を与えないことが示された。

トルエンのみを移動相に用いた場合、ポリマー試料濃度が最も影響を与えたのは分解率であった。すなわち、ポリマー試料濃度の増加に伴って分解生成物中に含まれる未反応ポリマー試料の濃度が上昇した。しかし、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた本検討の範囲ではポリマー試料濃度を上昇させても分解生成物中に未反応ポリマー試料は全く含まれないことが明らかになった。したがって、より高いポリマー試料濃度を検討すべきであると考えられたが、ポリマー試料濃度が5%の段階でポリマー試料溶液の粘度が非常に高くなっており、ポリマー試料濃度を5%以上にして検討することは技術的に不可能であった。

したがって、本検討の結果から超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合、ポリマー試料濃度が5%以下の範囲では得られるオリゴマーの分子量並びに分子量分散及びオリゴマー収率にポリマー試料濃度は影響を与えないことが示された。この結果は超臨界二酸化炭素を用いたことによる酵素のポリマー分解活性上昇の結果であると考えられ、本連続分解反応が要する有機溶媒量を大幅に削減する上で重要な知見であると考えられる。

## 連続分解反応により得られたオリゴマーの分子構造

トルエンのみを移動相に用いた連続分解反応で得られたオリゴマーの分子構造解析と同様に、 $^1\text{H-NMR}$  と MALDI-TOF MS を用いて分解生成物の分子構造を解析した。ここでは完全分解が進行したサンプルとして、全体の流速が  $0.5\text{ mL/min}$  (sc  $\text{CO}_2$  : toluene = 4 : 1)、圧力が  $15\text{ MPa}$  及び温度が  $40\text{ }^\circ\text{C}$  の分解条件で得られたオリゴマーの分子構造解析並びに、不完全な分解が進行したサンプルとして Table 4.15 Entry 3 に示した、全体の流速が  $1.5\text{ mL/min}$  (sc  $\text{CO}_2$  : toluene = 4 : 1)、圧力が  $15\text{ MPa}$  及び温度が  $40\text{ }^\circ\text{C}$  の分解条件で得られたオリゴマーの分子構造解析を行った。

$^1\text{H-NMR}$  の解析の結果、完全に分解反応が進行して得られた分解生成物中にはオリゴマーの水酸基末端に帰属されるピーク ( $4.20\text{ ppm}$ ) がほぼ現れなかったことから、本連続分解反応で得られたオリゴマーは環状構造を有していることが推定された。MALDI-TOF MS スペクトルは Fig. 4.33 に示したように、モノマーユニットの分子量  $86.09$  毎に現れる主たるスペクトルが環状型に帰属された。

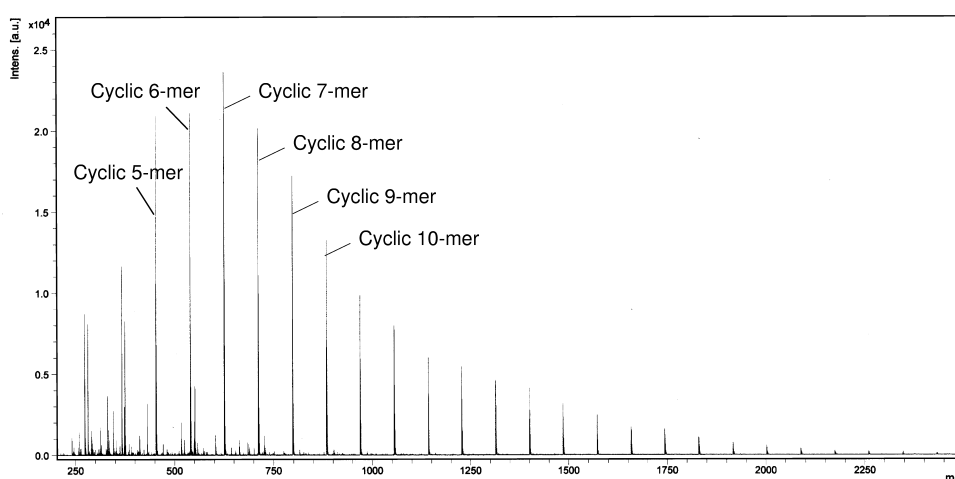


Fig. 4.33: MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of *ata*-P(3HB)<sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup>  $1\text{ mL}$  of *P*(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a total flow rate of  $0.5\text{ mL/min}$  (sc  $\text{CO}_2$  : toluene = 4 : 1),  $15\text{ MPa}$  and  $40\text{ }^\circ\text{C}$ .

ついで、分解生成物の分子量及び分子量分散が比較的大きかった、Table 4.15 Entry 3 の条件で得られたオリゴマーの MALDI-TOF MS を Fig. 4.34 に記した。

Fig. 4.34 より、直鎖状の水酸基末端型オリゴマーが分解生成物中に著量含まれていることが明らかになった。したがって、分解生成物の分子量及び分子量分散が比較的大きかったのは、分解反応が完全に進行する前に分解生成物が酵素カラムから除外されてしまったと考えられる。また、分解反応が完全に進行しなかった場合、水酸基末端を有するオリゴマーが著量含まれるのは、バッチ式分解反応における分解反応初期段階と同様であり、酵

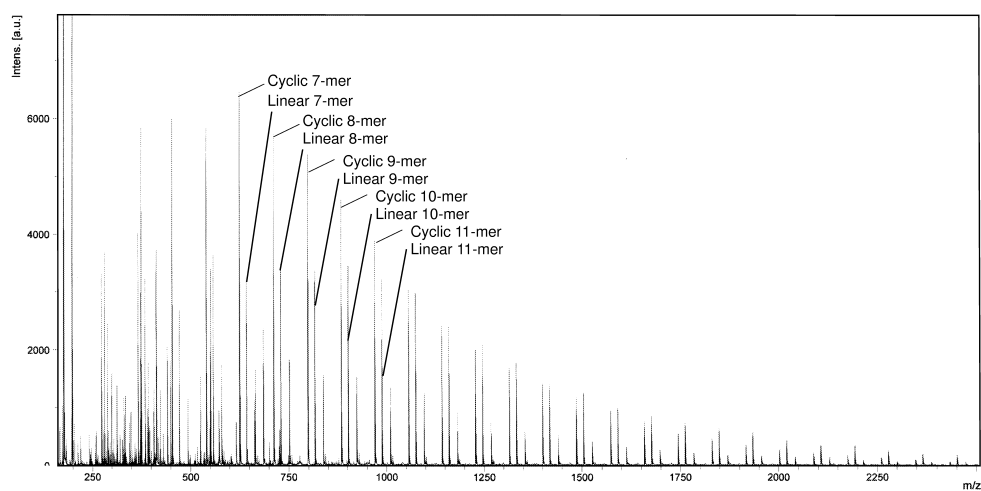


Fig. 4.34: MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of *ata*-P(3HB) <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 1 mL of P(3HB) toluene solution was injected into the enzyme column at a total flow rate of 1.5 mL/min (*sc* CO<sub>2</sub> : toluene = 4 : 1), 15 MPa and 40 °C.

素カラムと超臨界二酸化炭素の利用でポリマー分解活性が増加した際にも、反応機構は試験管内で生じているものと同様であることが明らかになった。

## (2) PCL の連続分解

## 圧力が連続分解反応に与える影響

二酸化炭素の圧力における臨界点が 8 MPa 近辺であるため、ここでは 9 MPa 以上で検討を行った。また、高い圧力は酵素活性を低下させる可能性が考えられたため、上限は 20 MPa として検討を行った。また、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は試運転で良好な結果が得られた 4 : 1 (0.4 mL/min + 0.1 mL/min) とした。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 1347$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.17 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.35 に示した。

Table 4.17: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	Pressure (MPa)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	9	>99.9	210	230	1.10
2	11	>99.9	210	240	1.11
3	13	>99.9	220	240	1.10
4	15	>99.9	220	240	1.10
5	18	>99.9	210	230	1.10
6	20	>99.9	290	320	1.11

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の検討から、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた本連続分解反応において系内の圧力は分解反応に影響を与えないことが明らかになった。この結果は P(3HB) をポリマー試料に用いた場合と同様であり、本連続分解反応の一般的な挙動であると考えられた。

すなわち、Table 4.17 より、系内の圧力変化が分解率を表すオリゴマー収率、分解生成物の平均分子量並びに分子量分散に全く影響を与えないことが示され、Fig. 4.35 に示した分解生成物の SEC チャートより、いずれの圧力を用いた分解反応により得られた分解生成物中にも未反応のポリマー試料は含まれないことが明らかになった。

しかし、高すぎる圧力は長期的な酵素活性に悪影響を及ぼすと考えられたことから、以

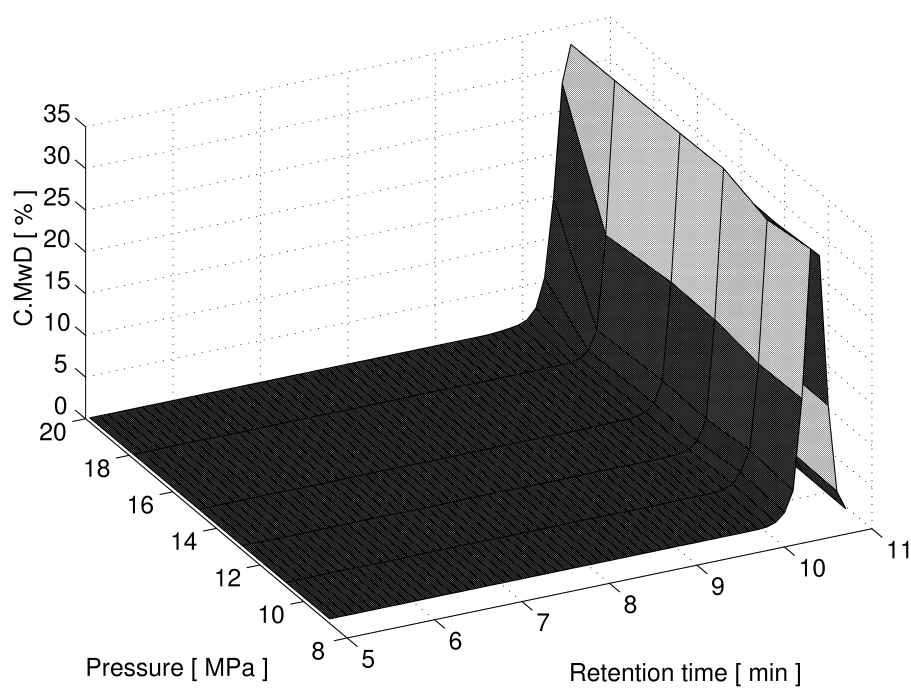


Fig. 4.35: Effects of pressure on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

降の PCL をポリマー試料に用いた検討では P(3HB) をポリマー試料に用いた検討と同様、系内の圧力を 15 MPa に固定して行った。

## 超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が連続分解反応に与える影響

超臨界二酸化炭素を用いた本連続分解反応では脂肪族ポリエステルの良溶媒であるトルエンを添加した混合溶媒を移動相として用いている。そこで、P(3HB)をポリマー試料として用いた検討と同様、ここでは圧力・温度・全体の流速を一定にして、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が本連続分解反応に与える影響について検討した。

超臨界二酸化炭素 100 % 溶媒にはポリエステルが溶解しない可能性が考えられたので、ここでは移動相に超臨界二酸化炭素のみを用いる検討は行わなかった。また、移動相の全体的な流速は P(3HB) をポリマー試料に用いた場合と同様に 0.5 mL/min に固定した。したがって、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は 2 : 8 (0.1 mL/min + 0.4 mL/min) ~ 8 : 2 (0.4 mL/min + 0.1 mL/min) の範囲で検討を行った。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2728$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C.\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.18 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.36 に示した。

Table 4.18: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	sc CO <sub>2</sub> content (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	20	50.5	250	270	1.10
2	40	>99.9	240	270	1.11
3	60	>99.9	240	260	1.09
4	80	>99.9	210	240	1.10

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a pressure of 15 MPa, a total flow rate of 0.5 mL/min and 40 °C.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の検討結果より、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は PCL の連続分解反応に対して影響を与えた。すなわち、混合溶媒中における超臨界二酸化炭素のトルエンに対する比率が小さな場合では、ポリマー試料が未反応のまま分解生成物中に含まれることが明らかになった。分解反応が不完全になる混合比は異なったが、この結果は P(3HB) をポリマー試料に用いた場合と一致していた。したがって、本検討の結果も移動相に超臨界二酸化炭素を用いることで酵素のポリマー分解活性が上昇したことを示すと考えられる。



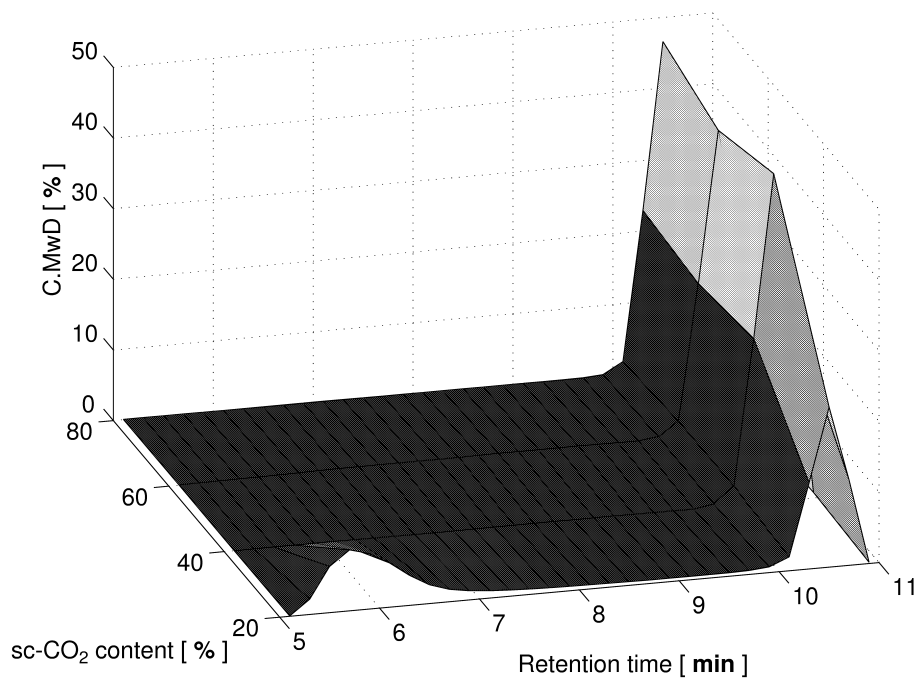


Fig. 4.36: Effects of sc CO<sub>2</sub> content on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

連続分解反応が不完全になった混合溶媒の組成比がポリマー試料の種類に依存したのは、トルエンのみを移動相に用いた連続分解反応での反応性の違いを反映した結果であると考えられる。すなわち、P(3HB) をポリマー試料に用いた場合は分解反応が条件に対して敏感に応答した。それに対して、PCL は分解反応が P(3HB) よりも迅速に進行するために、P(3HB) が完全分解条件しない条件においても完全分解した。これまでの検討から超臨界二酸化炭素は反応場の希釈効果を担っていると考えられるため、PCL をポリマー試料に用いた場合は P(3HB) をポリマー試料に用いた場合よりもポリマー試料の完全分解に要する希釈度が小さかったと考えられる。

### 移動相の流速が連続分解反応に与える影響

移動相にトルエンのみを用いた PCL の本連続分解反応では、移動相の流速が分解反応に影響を与えた。また、P(3HB) をポリマー試料に用い、移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いた場合では、いずれの流速においてもポリマー試料は完全分解したが、流速の増加に伴って得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散値が上昇した。そこで、本検討では PCL をポリマー試料に用いて、移動相である超臨界二酸化炭素をトルエン混合溶媒の流速が本連続分解反応に与える影響について検討した。

先の検討から PCL をポリマー試料に用いた場合、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比が 40 % でポリマー試料の完全分解が確認されたが、これまでの検討から超臨界二酸化炭素が酵素のポリマー分解活性を上昇させることが示された。そこで、本検討では P(3HB) をポリマー試料に用いた検討と同様、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比を 80 % とすることで、酵素のポリマー分解活性を上昇でき、さらにポリマー試料の違いによる分解挙動の違いを検討できると考えた。

したがって、ここでは超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比を 4 : 1 に固定して、全体の流速を変化させることで検討を行った。また、圧力は 15 MPa でポリマー試料濃度を 1 % に固定して検討を行った。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2996$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.19 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.37 に示した。

Table 4.19: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	Total flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.5	98.4	210	240	1.10
2	1.0	99.5	220	240	1.10
3	1.5	99.8	220	240	1.10

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

The ratio of sc CO<sub>2</sub> and toluene was 4 : 1.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の結果より、PCL をポリマー試料に用いて移動相の超臨界二酸化炭素とトルエンの組成比を 4 : 1 にした場合、本連続分解反応は全体的な流速の影響を受けないことが明ら

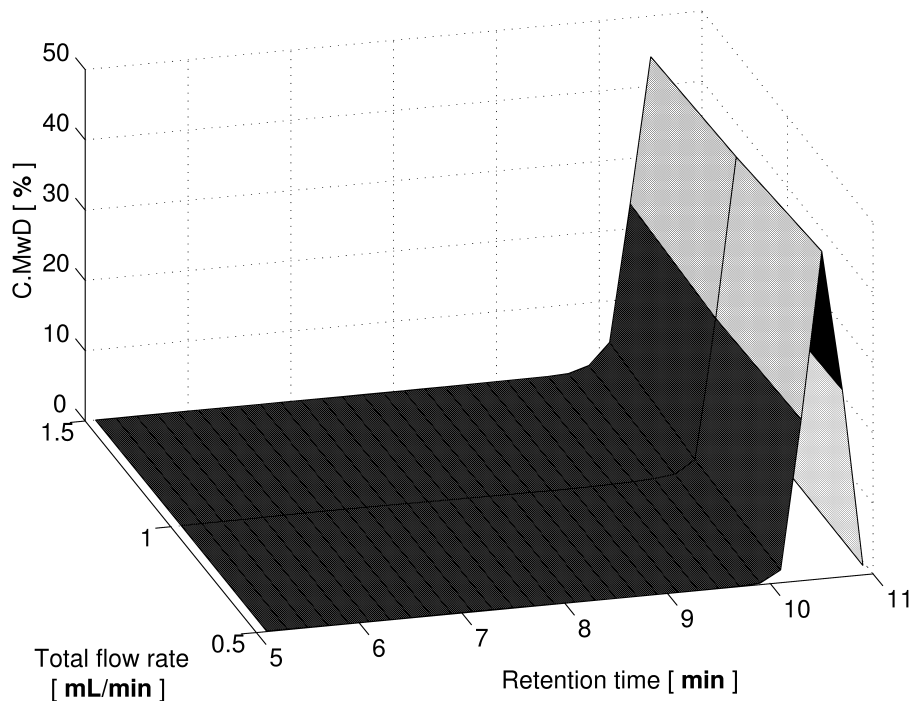


Fig. 4.37: Effects of total flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

かになった。

超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合、連続分解装置に RI 検出器を付すことができなかったため、系内のポリマー試料もしくは分解生成物の濃度変化を検討できなかった。しかし、トルエンのみを移動相に用いた際に流速は酵素カラム通過に要する反応時間を制御していることが示されたため、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合も同様に流速は反応時間を制御していると考えられる。

したがって、PCL をポリマー試料に用いた場合、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比が 80 % で全体的な流速を 1.5 mL/min にして定められる反応時間が完全分解及び得られるオリゴマーの収束化に十分な時間であったと考えられる。

### ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響

これまでの検討から、トルエンのみを移動相に用いて得られた結果と同様、移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いた場合でも、PCLをポリマー試料に用いた方がP(3HB)をポリマー試料に用いるよりも迅速に分解することが示された。

P(3HB)をポリマー試料に用いてポリマー試料濃度の影響を検討した結果、5%までポリマー濃度を増加させても分解反応はさほど影響を受けないことが明らかになった。したがって、ポリマー試料に分解性のより良好なPCLを用いた場合もポリマー試料濃度の影響を受けずに本連続分解反応が進行すると予測された。

そこで、ここではPCLをポリマー試料として用い、ポリマー試料濃度が分解反応に与える影響について検討することで、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を移動相に用いた際の一般的挙動解析を行った。検討範囲はP(3HB)をポリマー試料に用いて行った検討と同じポリマー試料濃度範囲で行い、ポリマー試料の違いが本分解反応に与える影響についても同時に検討した。ここでは、オリゴマー領域をSECの検量線による分子量 $M = 2996$ 以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率はSECチャートより算出( $C \cdot \overline{M}_w D$ 値)した。

結果をTable 4.20に示した。また、分解生成物のSECチャートを3次元表示したものを作成し、Fig. 4.38に示した。

Table 4.20: Effects of flow rate on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	1	98.4	210	240	1.10
2	3	98.9	240	270	1.14
3	5	98.0	240	280	1.18

<sup>a)</sup> 1 mL of PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PCL:  $\overline{M}_w = 177000$ ,  $\overline{M}_n = 131000$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.35$

以上の結果より、P(3HB)をポリマー試料として用いた場合と同様、PCLをポリマー試料に用いても本連続分解反応はポリマー試料濃度の影響を受けなかった。Table 4.20において、ポリマー分解率を表すオリゴマー収率の値が多少上下したが、これはSECチャートのベースラインの安定性に起因するものと考えられ、Fig. 4.38からも明らかのように、分解生成物中に未反応のポリマー試料ピークは現れなかった。

ただし、詳細にFig. 4.38を解析するとオリゴマーピークの高分子量側がポリマー試料

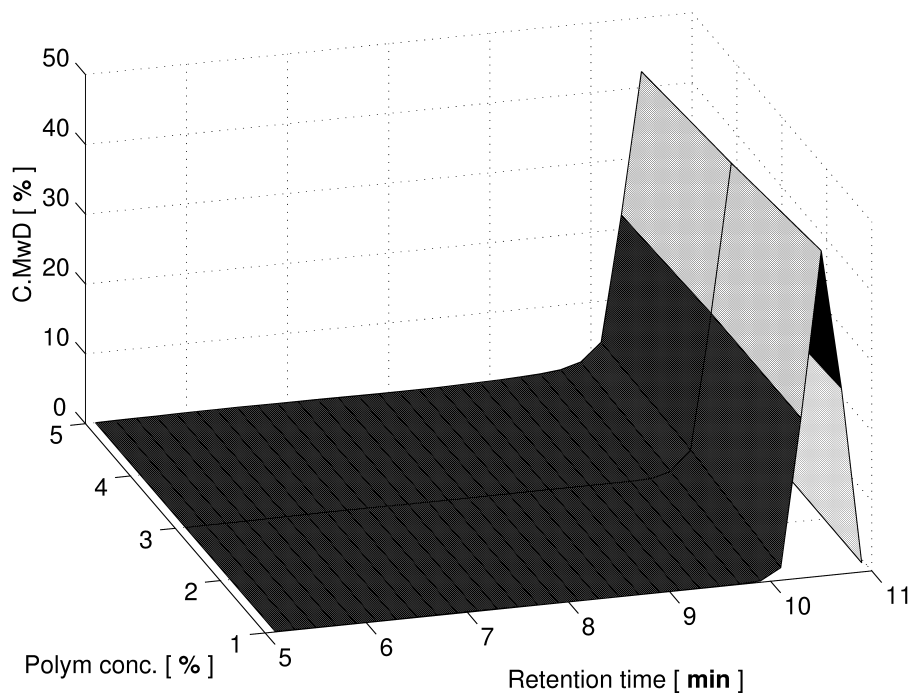


Fig. 4.38: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PCL <sup>a)</sup>.  
<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

濃度の増加に伴ってごく僅かに高くなっていることから、ポリマー試料濃度をさらに上昇させた場合、得られるオリゴマーの分子量分散値が大きくなると考えられた。P(3HB)をポリマー試料に用いた際にはSECチャートにおけるオリゴマーピークはポリマー試料濃度の影響を全く受けなかったことから、得られるオリゴマーの分子量及び分子量分散が影響を受けないポリマー試料濃度上限はポリマー試料の種類やその分子量の影響を受ける可能性が考えられた。

しかしながら、5%という比較的高いポリマー試料溶液を用いても完全分解した結果は、P(3HB)をポリマー試料に用いた検討結果と同様に本連続分解を用いることにより分解反応に要する有機溶媒を大幅に削減できることを示し、本連続分解反応がバッチ式に比べて効率化が図られた結果であると考えられる。

## 連続分解反応により得られたオリゴマーの分子構造

PCL をポリマー試料に用いて酵素カラムによる連続分解反応を行った場合、得られた SEC チャートはトルエンのみを移動相に用いた場合と同一であった。したがって、ここでの分子構造解析は  $^1\text{H-NMR}$  のみを用いて行った。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを Fig. 4.39 に記した。

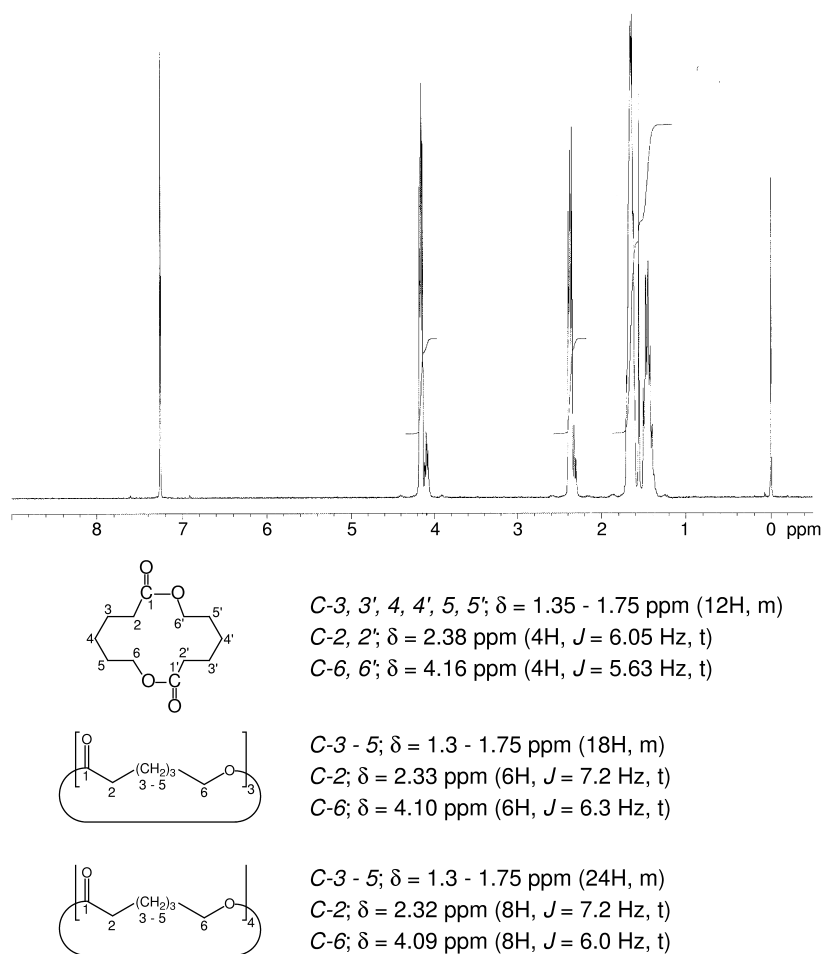


Fig. 4.39:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the continuous degradation products of PCL <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 3 % PCL toluene solution was injected into the enzyme column at a total flow rate of 0.5 mL/min (sc CO<sub>2</sub> : toluene = 4 : 1), 15 MPa and 40 °C.

$^1\text{H-NMR}$  においてスペクトルデータの一致から、超臨界二酸化炭素を移動相に用い、酵素のポリマー分解活性が上昇した際でも、PCL の連続分解反応で得られるオリゴマーは環状 2 量体が主生成物であることが明らかになった。

## (3) PBA の連続分解

## 圧力が連続分解反応に与える影響

二酸化炭素の圧力における臨界点が 8 MPa 近辺であるため、P(3HB) 及び PCL をポリマー試料に用いて行った検討と同様、ここでは 9 MPa 以上で検討を行った。また、高い圧力は酵素活性を低下させる可能性があるため、上限は 20 MPa として検討を行った。また、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比はこれまでの検討で良好な結果が得られた 4 : 1 (0.4 mL/min + 0.1 mL/min) とした。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2728$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.21 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.40 に示した。

Table 4.21: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	Pressure (MPa)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	9	>99.9	320	420	1.31
2	11	>99.9	350	440	1.26
3	13	>99.9	370	450	1.23
4	15	>99.9	430	490	1.14
5	18	>99.9	410	500	1.20
6	20	>99.9	370	450	1.21

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

以上の検討から、PBA をポリマー試料に用いた場合でも、反応系内の圧力はポリマー分解率に影響を与えないことが明らかになった。この結果は P(3HB) 及び PCL をポリマー試料に用いた場合と同様であり、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を移動相に用いた本連続分解反応の一般的挙動であると考えられる。しかしながら、Fig. 4.40 より、圧力の変化がオリゴマーサイズに影響を与えることが明らかになった。すなわち、SEC チャートのオリゴマーピーク形状が圧力増加に伴って収束することが明らかになった。

超臨界二酸化炭素の圧力増加が酵素反応系に対して与える影響に関しては未だ推察の域を超えない領域である。近藤らは PCL をポリマー試料とした酵素触媒分解反応で超臨界

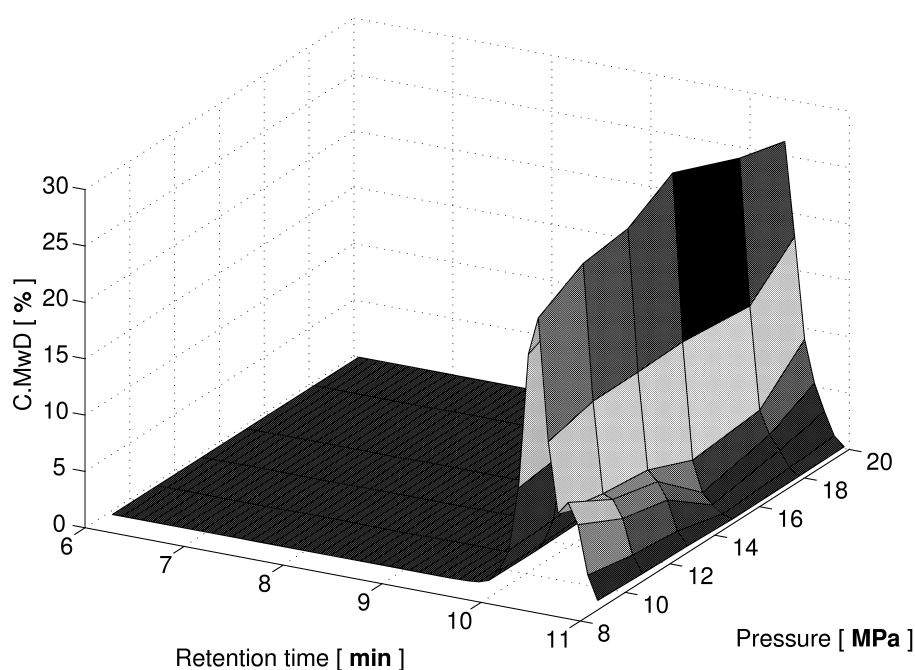


Fig. 4.40: Effects of pressure on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

二酸化炭素の圧力増加に伴って得られるオリゴマーが環状 2 量体に収束することを見出し、圧力増加は有機溶媒中における希釈効果と同義であると考察した<sup>190)</sup>。

トルエンのみを移動相に用いた PBA の連続分解反応ではポリマー試料濃度の低下に伴って得られるオリゴマーが 1 量体に収束することが明らかになった。したがって、超臨界二酸化炭素の圧力増加が希釈効果のみを生じたとすると、圧力増加に伴って得られるオリゴマーは環状 1 量体に収束すると考えられる。しかし、実際は圧力増加に伴って環状 2 量体に収束した。この結果より、超臨界二酸化炭素の圧力増加は希釈効果のみではなく酵素活性に対しても影響を与えたと考えられる。すなわち、熱的に安定な環状 2 量体を安定して与えるために必要な分子間エステル交換反応によるオリゴマー鎖の伸長反応が圧力の増加に伴って生じやすくなったと考えられる。

しかし、高い圧力は酵素カラムの長期的なポリマー分解活性に悪影響を与える可能性があること、並びに他のポリマー試料の連続分解反応と同条件で比較検討を行うため、以降の検討は圧力を 15 MPa に固定して行った。



### 超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が連続分解反応に与える影響

P(3HB) や PCL をポリマー試料に用いたこれまでの検討から、移動相における超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は本連続分解反応に大きな影響を与え、超臨界二酸化炭素組成比低下に伴って分解率が低下することが明らかになった。そこでここでは、PBA をポリマー試料に用いて同様の検討を行った。

全体の流速は先の検討で 0.5 mL/min とした際に良好な分解が確認されたので、ここでも 0.5 mL/min とした。また、ポリマー試料濃度は 1 % に固定して検討を行った。超臨界二酸化炭素 100 % 溶媒にはポリエステルが溶解しない可能性が考えられたので、ここでは移動相に超臨界二酸化炭素のみを用いる検討は行わなかった。したがって、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は 2 : 8 (0.1 mL/min + 0.4 mL/min) ~ 8 : 2 (0.4 mL/min + 0.1 mL/min) の範囲で検討を行った。

結果を Table 4.22 に示した。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2728$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.41 に示した。

Table 4.22: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	sc CO <sub>2</sub> content (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	20	>99.9	320	430	1.37
2	40	>99.9	440	540	1.24
3	60	>99.9	450	550	1.22
4	80	>99.9	430	490	1.14

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a pressure of 15 MPa, a total flow rate of 0.5 mL/min and 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

以上の結果より、移動相の超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比は PBA の連続分解反応におけるポリマー分解率に対して影響を与えないことが明らかになった。しかし、超臨界二酸化炭素組成比の低下は得られるオリゴマーサイズに対して影響を与えることが Fig. 4.41 より明らかになった。

すなわち、超臨界二酸化炭素組成比の低下に伴ってオリゴマーピークが二峰性を示し、環状 1 量体に帰属される低分子量側のピークが増大した。したがって、環状 2 量体を選択

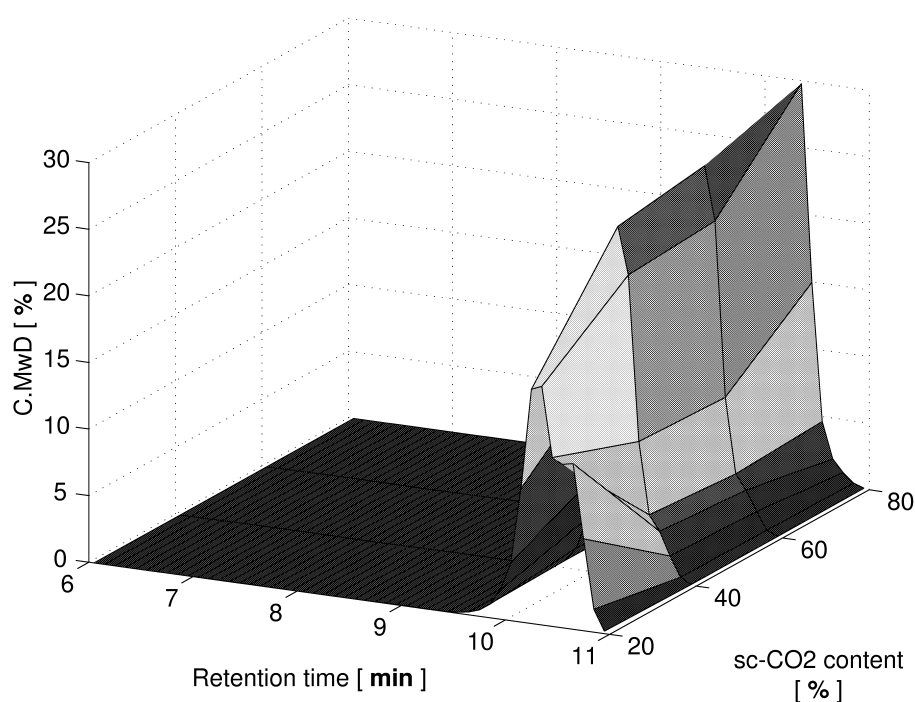


Fig. 4.41: Effects of pressure on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

的に合成するためには超臨界二酸化炭素の組成比を上昇させる必要があると示された。

また、本検討の結果と先の圧力に関する検討結果を合わせて考えると、圧力の増加に伴って得られるオリゴマーは環状 2 量体へ収束したが、同じ圧力であっても超臨界二酸化炭素組成比が低下すると環状 2 量体への収束性が低下することが示された。したがって、本連続分解反応を用いて PBA を連続分解し、環状 2 量体のオリゴマーを選択的に合成するためには超臨界二酸化炭素の組成比が重要な要素であると考えられた。

さらに、P(3HB) 及び PCL をポリマー試料に用いた場合に超臨界二酸化炭素組成比の低下に伴ってポリマー分解率が大幅に低下した結果と合わせて考えると、ポリマー試料の分子量の影響もあると考えられるが PBA が本連続分解反応に適したポリマー試料であると考えられる。

### 移動相の流速が連続分解反応に与える影響

P(3HB) をポリマー試料に用い、移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いた場合には、いずれの流速においてもポリマー試料は完全分解したが、流速の増加に伴って得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散値が上昇した。そこで、本検討では PBA をポリマー試料に用いて、移動相である超臨界二酸化炭素をトルエン混合溶媒の流速が本連続分解反応に与える影響について検討した。

先の検討から PBA をポリマー試料に用いた場合、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比の影響を受けずにポリマー試料の完全分解が確認されたが、これまでの検討から超臨界二酸化炭素が酵素のポリマー分解活性を上昇させることが示された。そこで、本検討では P(3HB) をポリマー試料に用いた検討と同様、混合溶媒中の超臨界二酸化炭素組成比を 80% とすることで、酵素のポリマー分解活性を上昇でき、さらにポリマー試料の違いによる分解挙動の違いを検討できると考えた。

したがって、ここでは超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比を 4 : 1 に固定して、全体の流速を変化させることで検討を行った。また、圧力は 15 MPa でポリマー試料濃度を 1% に固定して検討を行った。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2728$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C\overline{M}_wD$  値) した。

結果を Table 4.23 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.42 に示した。

Table 4.23: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	Total flow rate (mL/min)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	0.5	>99.9	430	490	1.14
2	1.0	>99.9	400	490	1.23
3	1.5	>99.9	430	510	1.21

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

The ratio of sc CO<sub>2</sub> and toluene was 4 : 1.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

以上の結果より、移動相における超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が 4 : 1 だった場合、全体の流速は PBA をポリマー試料とした本連続分解反応に対して影響を与えず、ポリマー試料は完全に分解することが明らかになった。この結果は P(3HB) 及び PCL を

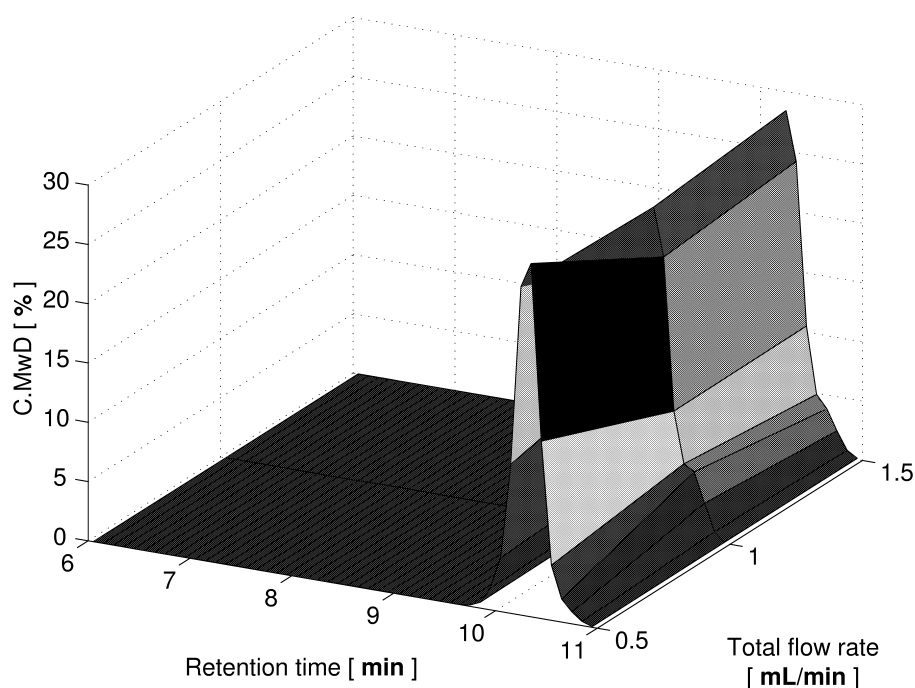


Fig. 4.42: Effects of total flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

ポリマー試料に用いた場合と同様であり、P(3HB)、PCL 及び PBA をポリマー試料に用いた場合、超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比が 4 : 1 で全体の流速が 1.5 mL/min で定められる酵素カラム通過時間がポリマー試料の完全分解に十分な時間であったと考えられる。また、PCL と PBA をポリマー試料に用いた場合には、得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散も全体的な流速の影響を受けないことが明らかになった。

移動相の流速は酵素カラム通過に要する時間を制御すると同時に流速の増加は酵素カラム内におけるポリマー試料の拡散を抑制していると考えられる。したがって、流速を増加させた際にもオリゴマーの収束先が環状 2 量体であるという本検討の結果と、これまでの検討結果を合わせて考えると、ポリマー試料濃度が希釈された際に得られるオリゴマーが環状 1 量体へ収束する挙動は矛盾していないと考えられた。

### ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響

トルエンのみを移動相に用いた場合、ポリマー試料濃度を低下させることで生成オリゴマーが環状 1 量体へ収束することが示された。したがって、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合も同様の挙動が得られるか確認すべきだと考えられるが、既にトルエンのみを移動相に用いた検討で環状 1 量体の優先的合成法が確立され、さらにこれまでの検討から、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合には生成オリゴマーが環状 2 量体が優先的に生成することが示された。また、ここではポリマー試料濃度を増加させることで用いる有機溶媒量を削減させることを目的としたので、本検討ではポリマー試料濃度を増加させた際の PBA の連続分解反応を検討した。

検討範囲は P(3HB) 及び PCL をポリマー試料に用いて行った検討と同じポリマー試料濃度範囲で行い、ポリマー試料の違いが本分解反応に与える影響についても同時に検討した。ここでは、オリゴマー領域を SEC の検量線による分子量  $M = 2728$  以下として、分解生成物の平均分子量及び分子量分散値はオリゴマー領域に限定して計算し、オリゴマー収率は SEC チャートより算出 ( $C \cdot \overline{M}_w D$  値) した。

結果を Table 4.24 に示した。また、分解生成物の SEC チャートを 3 次元表示したものを作成し、Fig. 4.43 に示した。

Table 4.24: Effects of flow rate on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

Entry	Polymer conc. (%)	Oligomer yield (%)	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
1	1	>99.9	430	490	1.14
2	3	>99.9	410	530	1.30
3	5	>99.9	460	590	1.28

<sup>a)</sup> 1 mL of PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

Initial PBA:  $\overline{M}_w = 18000$ ,  $\overline{M}_n = 6500$  and  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.80$

以上の結果より、PBA の連続分解反応でもポリマー試料濃度がポリマー分解率に対して影響を与えないことが明らかになった。また、得られたオリゴマーの平均分子量及び分子量分散に対してもさほど影響を与えないことが明らかになった。ただし、得られたオリゴマーの重量平均分子量はポリマー試料濃度の上昇に伴って僅かに上昇することが確認された。P(3HB) をポリマー試料に用いた場合には得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散がポリマー試料濃度の全く影響を受けず、PCL をポリマー試料に用いた検討では同様に得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散が僅かにポリマー試料濃度の影

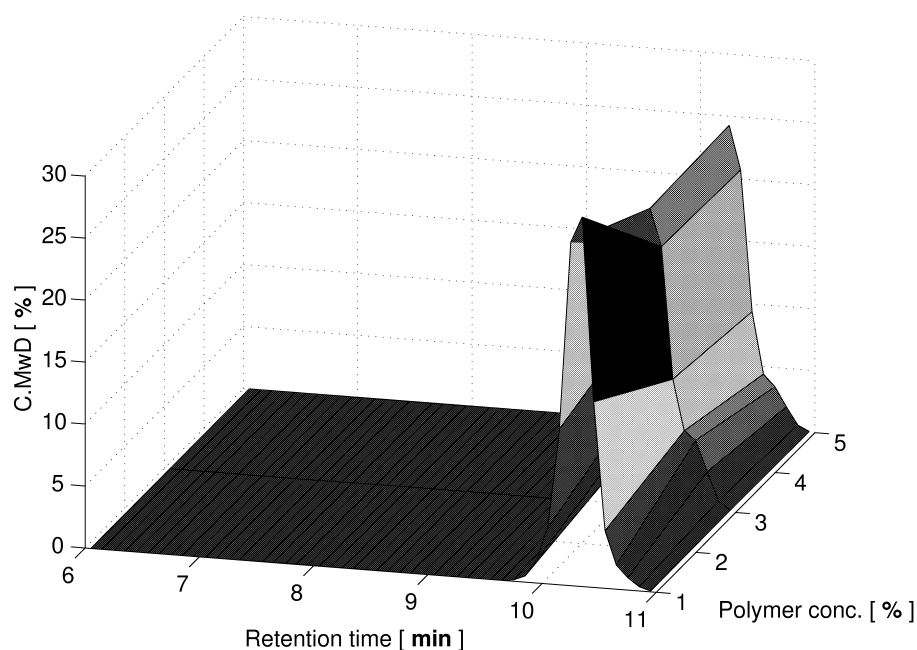


Fig. 4.43: Effects of polymer concentration on the continuous degradation of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of 1 % PBA toluene solution was injected into the enzyme column at 40 °C.

響を受けたことから、ポリマー試料濃度が連続分解反応に与える影響はポリマー試料分子量及びポリマー試料の種類に依存することが示された。

これまでの検討より、PBA をポリマー試料に用いた連続分解反応ではポリマー試料濃度を低下させた際に環状 1 量体が優先的に生成オリゴマー中に含まれることが示された。本検討でポリマー試料濃度を増加させた際には環状 1 量体の優先的な生成がみられなかったことから、PBA をポリマー試料に用いた酵素分解反応で環状 1 量体を優先的に合成するは、連続分解反応を用いてポリマー試料濃度を低下させる必要があると考えられた。

## 連続分解反応により得られたオリゴマーの分子構造

PBA をポリマー試料に用いて酵素カラムによる連続分解反応を反応を行った場合、得られた SEC チャートはトルエンのみを移動相に用いた場合の環状 2 量体が主分解生成物であった場合と同一であった。また、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルも環状 2 量体が主分解生成物であった場合と一致し、さらに水酸基末端に由来する 3.65 ppm のスペクトルの減少が確認された。したがって、ここでの分子構造解析は MALDI-TOF MS のみを用いて行い、特に水酸基末端型オリゴマーとの組成比に着目した。MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 4.44 に記した。

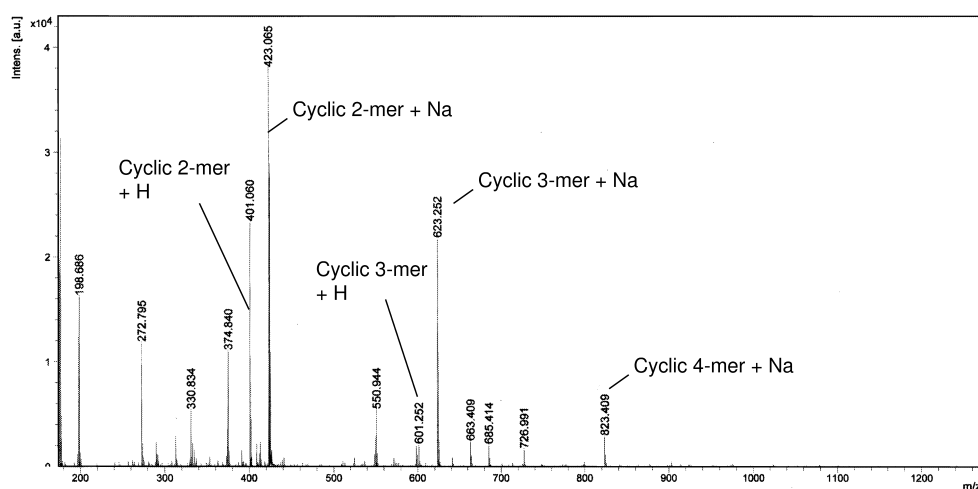


Fig. 4.44: MALDI-TOF MS spectrum of the continuous degradation products of PBA <sup>a)</sup>.

<sup>a)</sup> 1 mL of PBA toluene solution was injected into the enzyme column at a total flow rate of 0.5 mL/min (sc CO<sub>2</sub> : toluene = 4 : 1), 15 MPa and 40 °C.

Fig. 4.44 より、超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合、PBA の酵素カラムによる連続分解反応の生成物中には水酸基末端を有するオリゴマーがほとんど含まれないことが明らかになった。したがって、AA-BB 型ポリマーの原料となる環状型オリゴマー合成には、超臨界二酸化炭素を利用した酵素触媒によるポリマーの分解反応が有効であることが明らかになった。

## 4.4 総括

本章における検討結果を以下のように総括した。

1. Novozym<sup>®</sup> 435 を充填した酵素カラムを作製してこれを反応器とし、トルエンのみを移動相とした生分解性脂肪族ポリエステルの連続分解装置を設計・評価した。その結果、P(3HB)、PCL 及び PBA をポリマー試料として用いた場合、いずれのポリエステルも酵素カラムを通過させるだけで迅速に分解し、環状型を主生成物とするオリゴマーに分解された。
2. 連続分解装置に付した RI 検出器により、1 mL のポリマー溶液を注入した際の反応系内のポリマー試料もしくは分解生成物の濃度変化を検討した結果、移動相の流速はポリマー試料もしくは分解生成物が酵素カラム通過に要する時間に影響を与えた。したがって、本連続分解装置を用いた分解反応における反応時間の制御は移動相の流速調整により行うことができると考えられる。また、移動相の流速を低下させると RI 検出曲線は非常に幅広くなることから、移動相の流速低下に伴って酵素カラム内でポリマー試料もしくは分解生成物が拡散すると考えられる。
3. 連続分解装置に付した RI 検出器により、1 mL のポリマー溶液を注入した際の反応系内のポリマー試料もしくは分解生成物の濃度変化を検討した結果、ポリマー試料濃度の変化は酵素カラム通過に要する時間に影響を与えなかった。
4. 酵素カラム温度の連続分解反応に対する影響を検討した結果、40~70 °C の範囲ではいずれの反応温度でも良好に P(3HB) の分解反応が進行した。また、70 °C では酵素のポリマー分解活性が経時的に若干低下する傾向が示された。したがって、酵素カラムの長期的なポリマー分解活性維持のためには 40 °C 近辺まで酵素カラム温度を下げる必要がある。また、PCL 及び PBA をポリマー試料に用いた場合は 40 °C にて良好に分解反応が進行することを確認した。
5. PBA をポリマー試料に用いた連続分解反応ではポリマー試料濃度を低下させることにより、試験管内で行うバッチ式分解反応では得にくい環状 1 量体が著量生成することが示された。バッチ式分解反応ではより熱エネルギー的に安定な環状 2 量体が主生成物として得られることから、PBA の環状モノマー合成において本連続分解反応が適することが示された。
6. 本連続分解反応に要する有機溶媒量の削減及び更なる効率的な連続分解反応法の確立を目指し、移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いた P(3HB)、PCL 及び PBA の連続分解反応を検討した。その結果、いずれのポリマー試料もトルエン単独より迅速に分解し、環状型を主生成物とするオリゴマーが得られた。



7. P(3HB) をポリマー試料に用いたポリマー試料濃度に関する検討で、移動相にトルエンのみを用いた場合と超臨界二酸化炭素との混合溶媒を用いた場合を比較検討した結果、ポリマー試料が完全分解する際の上限ポリマー試料濃度が超臨界二酸化炭素を用いた際に大幅に上昇した。また、移動相中における超臨界二酸化炭素とトルエンの混合比を検討した結果、PBA をポリマー試料の用いた場合を除いて超臨界二酸化炭素組成比の低下に伴ってポリマー分解率が低下した。また、PBA をポリマー試料に用いた場合では、超臨界二酸化炭素組成比の低下に伴って得られるオリゴマーの平均分子量及び分子量分散が増加した。これらの結果より、超臨界二酸化炭素を用いることにより酵素カラムのポリマー分解活性が上昇すると考えられる。
8. PBA をポリマー試料とした連続分解反応のポリマー試料濃度に関する検討で、移動相にトルエンのみを用いた場合と超臨界二酸化炭素を移動相に用いた場合の比較検討した結果、反応系内圧力の増加は希釈効果のみではなく酵素のポリマー分解活性を上昇させると考えられた。しかし、反応系内の圧力が連続分解反応に与える影響を P(3HB)、PCL 及び PBA をポリマー試料に用いて検討した結果、圧力変化は分解反応に大きな影響を与えなかった。超臨界二酸化炭素組成比が高い条件での反応系内圧力増加は反応系の希釈などが考えられ、今後より詳細な解析が求められる。
9. 本章の検討により、生分解性脂肪族ポリエステルの酵素触媒によるオリゴマー化プロセスの大幅な効率化が図られた。特に分解反応に要する酵素量に関しては長期的に使用可能な酵素カラムを用いることで大幅な削減を達成した。また、分解反応に要する有機溶媒量に関しても、超臨界二酸化炭素を用いることで大幅に削減可能である。



## 第5章

# 生分解性脂肪族ポリエステルの生分解性評価

### 5.1 緒言

生分解性脂肪族ポリエステルの生分解性評価には大きく分けて4種類の方法が挙げられる。1つ目は堆肥化(コンポスト化)過程における生分解性評価であり、コンポスト中におけるサンプルの重量減少や発生二酸化炭素量の測定から生分解率を求める。2つ目は土壤埋没試験によるもので、これはサンプルを土壤に埋没させ、分解に伴う重量減少や分子量低下を測定することでそのサンプルの生分解率を測定する。3つ目はあらかじめ既知であるサンプルの分解酵素を含む緩衝溶液中でサンプルの重量減少や分子量低下を測定し、生分解率を測定するものである。最後の4つ目は都市下水処理場由来の活性汚泥を植種源に用いた培養液中で微生物によりサンプルを分解させ、その際に消費される生物化学的酸素要求量(Biochemical Oxigene Demand: BOD)を理論酸素要求量(Theoretical Oxigene Demand: ThOD)で除することにより生分解率を測定するBOD法である。土壤埋没試験(フィールドテスト)が最も自然環境下に近い試験法であると考えられるが、活性汚泥を用いるBOD法により得られた結果は、生分解性プラスチック研究会が行ったフィールドテストの結果と矛盾せず、自然環境下での生分解性を反映することが示されている。

近年、市場からの生分解性高分子材料に対する関心が高まったことから生分解性の定義づけがなされ、生分解性評価方法がJIS及びISOで規格化された。これらの規格では上記した4種類の評価方法のうち、コンポスト過程における生分解性評価とBOD法に関して評価方法を詳細に規定している。

現在、生分解性高分子材料の廃棄後の処理策としてコンポスト化が最も注目されているため、コンポスト中での生分解性評価は重要であると考えられる。しかし、コンポストは

調製が困難であり、またコンポストの中は比較的高温 (50~60 °C付近) 及び高湿 (70 %付近) であるため、初期分解反応が単純加水分解反応に依存する場合が多い。従って、実験室レベルで化学的に分解機構を解明する方法としては適さないと考えられる。

BOD 法は低分子有機化合物の生分解性評価のために古くから用いられている方法である。OECD テストガイドライン 301 でも規格化がなされており、高分子材料の生分解性評価法はこれらが基になっている。規格化された評価法は JIS K 6950: 2000 (ISO 14851 : 1999) プラスチック-水系培養液中の好氣的究極生分解度の求め方 - 閉鎖呼吸計を用いる酸素消費量の測定による方法であり、1994年に制定されて2000年に改正されたものである。評価法の基本原理はBOD法であり、サンプルのみが炭素源の培養液中で測定されたBODをThODで除することにより生分解率を計算する。BOD法の場合、サンプルが全て酸化されて二酸化炭素と水になった時に生分解率100%とするが、実際はサンプル由来の炭素が二酸化炭素にならずに微生物の成長にも使われるため、生分解率が60%を超えたものを易分解性とする。ただし、水溶性物質の生分解性評価では評価期間が28日間であったが、高分子材料の生分解性評価では最大6ヶ月となった。すなわち、BOD法で半年以内に生分解率が60%に達せばサンプルが生分解性であると示される。

このように規定された高分子材料の生分解性評価法であるが、サンプル形状に関する規定がない。非水溶性高分子材料の生分解性には培養液中のサンプル表面積が大きな影響を与えるため、データ比較のためにはサンプル形状を揃える必要があり、粉体がよいと JIS K 6950: 2000 に記されているが、サンプルの比重が小さい場合に粉体は培養液中に沈まず、接触表面積が小さくなってしまう可能性がある。また、一つのサンプルの測定のために半年間要するのは効率が悪く、生分解率が低いサンプルの測定では半年間も微生物が栄養素がない状態で生存できるとは考えられない。従って、実験室レベルでの生分解性評価法の確立を考えると、なるべく短い期間で易分解性高分子材料サンプルの生分解率が60%に達するサンプル形状を検討し、そのサンプル形状を用いて新規材料の生分解性の可能性及び自然環境中での生分解性の尺度を得ることが重要であると考えた。

そこで、本章では JIS K 6950: 2000 に則った BOD 法を用いて高分子材料の生分解性評価法を行い、特にポリマーサンプル形状の影響を検討することで、実験室レベルで新規材料の生分解性の可能性及び自然環境中での生分解性の尺度を得る方法の確立を目的とした。また、本研究で検討を行った非天然型 P(3HB) の生分解性に関する報告がないことから、構成するモノマーも含めて生分解性の検討を行った。

## 5.2 試薬・機器・原理・方法

### 5.2.1 試薬

本章の研究に用いた試薬類を Table 5.1 にまとめた。

Table 5.1: List of chemical reagents.

試薬名	製造会社	等級	
$\beta$ -ブチロラクトン	東京化成工業 (株)	化学用	
オレイン酸カリウム	東京化成工業 (株)		
18-Crown-6	Aldrich Chemical Co., Inc.		
水素化カリウム	ナカライテスク (株)		
アジピン酸	関東化学 (株)		
コハク酸	関東化学 (株)		
1, 4-ブタンジオール	関東化学 (株)		
チタン テトラブトキシド	Aldrich Chemical Co., Inc.		
DL-3-ヒドロキシ-n-酪酸 (S)-(+)-3-Hydroxybutyric acid sodium salt	東京化成工業 (株) Aldrich Chemical Co., Inc.		試薬
Poly(3-hydroxybutyric acid natural origin	Aldrich Chemical Co., Inc.		
無水リン酸二水素カリウム	純正化学工業 (株)		
無水リン酸水素二カリウム	純正化学工業 (株)		
リン酸水素二ナトリウム二水和物	純正化学工業 (株)		
塩化アンモニウム	純正化学工業 (株)		
硫酸マグネシウム七水和物	純正化学工業 (株)		
塩化カルシウム二水和物	純正化学工業 (株)		
塩化鉄 (III) 六水和物	純正化学工業 (株)		
炭酸水素ナトリウム	純正化学工業 (株)		
塩化ナトリウム	純正化学工業 (株)	試薬一級	

次ページへ続く

前ページからの続き

試薬名	製造会社	等級
セライト 545	純正化学工業 (株)	化学用
硫酸ナトリウム (無水)	関東化学 (株)	鹿一級
重クロロホルム	ISOTEC INC.	
トルエン	純正化学工業 (株)	純正一級
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
エタノール	信和アルコール (株)	研究用
ジエチルエーテル	純正化学工業 (株)	業務用
塩化メチレン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
酢酸エチル	ゴードー溶剤 (株)	業務用
アセトン	ゴードー溶剤 (株)	業務用
メタノール	ゴードー溶剤 (株)	業務用
ヘキサン	ゴードー溶剤 (株)	業務用

本文中において特に指示が無い限り、次の試薬は以下のような精製を行った後に反応に用いた。

**$\beta$ -ブチロラクトン** : 50 g の  $\beta$ -BL をジエチルエーテル 50 mL に溶解させて 500 mL 分液漏斗に移し、そこへ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 50 mL を加えて、酪酸などのカルボン酸の水層側への抽出操作を 6 回繰り返した。ついで、飽和塩化ナトリウム水溶液を 50 mL 加え、エーテル層を洗浄した。得られたエーテル層に硫酸ナトリウムを加え、一晚乾燥を行った。硫酸ナトリウムを綿栓濾過により濾別し、エーテル層をエバポレーターで減圧濃縮することにより粗精製  $\beta$ -BL を得た。得られた粗精製  $\beta$ -BL に水素化カルシウムをスパチュラ 2 杯分加えて常圧下で乾燥を行った後、減圧蒸留 (34 mmHg, 76 °C) を行うことで  $\beta$ -BL の無水化及び精製を行った。減圧蒸留を同条件にて 2 回繰り返した。

**クロロホルム** : クロロホルム 2 L に対してモレキュラーシーブス 4A を大きじ 1 杯加え、常圧蒸留を行った。

## 5.2.2 機器

## (1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ	: 880-PU	日本分光 (株)
カラム	: K-G + AC-80M + K-800D	昭和電工 (株)
検出器	: 示差屈折率計 830-RI	日本分光 (株)
レコーダー	: 807-IT	日本分光 (株)
溶離液	: クロロホルム (1 % エタノール含有)	
測定条件	: 流速 = 1.0 mL/min.	
	: 注入量 = 100 $\mu$ L (0.1 % クロロホルム溶液)	
	: 温度 = 37 $^{\circ}$ C	
検量線用標準試料	: Special Polystyrene Standard	ケムコ化学 (株)
	$\overline{M}_w = 1.00 \times 10^5$	$\overline{M}_w = 9.00 \times 10^3$
	$\overline{M}_w = 5.00 \times 10^4$	$\overline{M}_w = 2.20 \times 10^3$
	$\overline{M}_w = 1.75 \times 10^4$	$\overline{M}_w = 9.06 \times 10^2$
FT-NMR	: JEOL GSX270	日本電子 (株)
FT-NMR	: JEOL JNM-LA300	日本電子 (株)
FT-IR	: FT-IR-5300	日本分光 (株)
示差走査熱量計	: DSC-60	(株) 島津製作所
遠心分離機	: H-108NA	国産遠心機 (株)
遠心分離機	: H-9R	(株) コクサン
ガラス電極式水素イオン濃度計	: HM-20E	東亜電波工業 (株)
凍結乾燥機	: FDU-830	東京理化機器 (株)
テストチューブミキサー	: TM251	岩城硝子 (株)
分光光度計	: UV-160	(株) 島津製作所

## 5.2.3 原理

### (1) 規格

ここでは、JIS K 6950: 2000 (ISO 14851 : 1999) プラスチック-水系培養液中の好氣的究極生分解度の求め方 – 閉鎖呼吸計を用いる酸素消費量の測定による方法内で本研究を行う上で必要な項目を抜粋した。

**1. 適用範囲** この規格は、閉鎖呼吸計を用い酸素消費量を測定することによって、成形添加物を含むプラスチック材料の好氣的生分解度を求めるための方法について規定する。試験材料は、水系培養液による実験室条件下で、活性汚泥、コンポスト又は土壌からの植種源に暴露される。

もし、植種源として非じゅん(馴)化活性汚泥を用いる場合には、この試験は、水系自然環境下での生分解過程を模擬し、混合又は予暴露植種源を用いる場合は、試験材料のあらゆる生分解性の可能性を検討する方法である。

この規格に使用された条件は、必ずしも最大の生分解が生じる最適条件に対応しないが、あらゆる生分解性の可能性又は自然環境下でのプラスチック材料の生分解性の尺度を測定するように定められている。

この方法は、炭素収支を計算することによって、生分解度の試験を向上させるものである(任意)。

この方法が適用される物質は、

- 天然及び/又は、合成高分子、共重合体又は、これらの混合物;
- 可塑剤、着色剤又は他の物質のような添加剤を含むプラスチック材料;
- 水溶性高分子;
- 植種源に存在する微生物に試験条件下で阻害的でない材料。阻害性効果は、阻害対照を使用するか、又は他の適切な方法(例えば、ISO 8192 参照)によって決定できる。もし試験材料が、植種源に阻害的で、低い試験濃度であるなら、他の植種源又は予暴露植種源を用いることができる。

### 2. 引用規格

ISO 8245: 1999, ISO 9408, ISO 10634, ISO/TR 15462

**3. 定義** この規格では、次の定義を適用する。

**3.1 好氣的究極生分解 (ultimate aerobic biodegradation)** 微生物による酸素の存在下での、有機物の二酸化炭素、水及び存在する他の元素の無機塩(無機質化)並びに新しいバイオマスへの分解。

**3.2 活性汚泥 (activated sludge)** 細菌又は他の微生物の成長によって好氣的廃水処理において溶存酸素の存在下、作られるバイオマス。

**3.3 活性汚泥の懸濁固形物濃度 (concentration of suspended solids of an activated sludge)** 既知量の活性汚泥をろ過又は遠心分離し、105 °Cで一定質量になるまで乾燥することによって得られた固形物量。

**3.4 生物化学的酸素要求量 BOD(biochemical oxygen demand)** 化学物質又は有機物が、特定条件下で、水中で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。試験物質 1 mg 又は 1 g 当たりの mg-酸素量として表される。

**3.5 理論酸素要求量 ThOD(theoretical oxygen demand)** 化学物質が、完全に酸化されるために必要とされる分子式から計算される最大理論酸素要求量。試験物質 1 mg 又は 1 g 当たり必要と



される mg-酸素量として表される。

**3.6 全有機炭素量 TOC(total organic carbon)** 水溶液及び水懸濁中の有機物に存在する有機炭素の総量。

**3.7 溶存有機炭素量 DOC(dissolved organic carbon)** 特定の相分離、例えば、15 分間、40000  $\text{ms}^{-2}$  の遠心分離、又は 0.2  $\mu\text{m}$ —0.45  $\mu\text{m}$  直径の孔をもつ膜を用いる膜ろ過によって除去不可能な水中の有機炭素部分。

**3.8 誘導期 (lag phase)** 試験の開始から、分解微生物のじゅん化及び選択のために要する時間 (日数) であり、化学物質又は有機物の生分解度が、理論最大分解度の 10 %に達する。

**3.9 生分解の最大レベル (maximum level of biodegradation)** 化学物質又は有機物が試験中に到達する最大生分解度で百分率で表示される。これ以上生分解は起こらない。

**3.10 生分解期 (biodegradation phase)** 試験の誘導期終了時から生分解の最大レベルの約 90 %に到達するまでの時間 (日数)。

**3.11 定常期 (plateau phase)** 生分解期の最後 (最大生分解レベル) から試験終了までの時間 (日数)。

**3.12 予暴露 (pre-exposure)** 微生物のじゅん化及び選択によって試験物質を分解する植種源の能力向上を目的とする試験対象化学物質又は有機物存在下での植種源の前培養。

**3.13 予調整 (pre-conditioning)** 試験条件での微生物のじゅん化によって試験性能の向上を目的とする試験物質の存在しない試験条件での植種源の前培養。

**4. 原理** 水試験系の好氣的微生物を用いてプラスチック材料の生分解度を求める。試験混合物は、無機塩培養液及び唯一の炭素源、エネルギー源として、有機炭素濃度が、100  $\text{mg/l}$ ~2000  $\text{mg/l}$  である試験材料、並びに植種源として活性汚泥若しくは活性土壌又はコンポストの懸濁液を含んでいる。この混合物は、呼吸計の密閉フラスコ中でかくはんされる。発生した二酸化炭素は、試験フラスコの頭部に付けられた適切な吸収剤で吸収される。酸素の消費量 (BOD) は、例えば、呼吸計フラスコの気体体積を一定に保つのに要する酸素の量を測るか、体積又は圧力 (又は両方の組合せ) を自動的若しくは手動で測ることによって測定される。呼吸計の一例は**附属書 C**に示されている (ここでは割愛)。この代わりに ISO 10708(**附属書 D 参照**)(ここでは割愛)による二相密閉瓶方式も使用できる。

生分解度は、BOD と理論酸素要求量 (ThOD) の比として計算され、パーセントで表される。BOD に対する硝化反応の影響は考慮しなければならない。試験結果は、生分解度曲線の定常期から決定された生分解の最大レベルである。生分解度の補足的な情報を得るために炭素収支を計算してもよい (**附属書 E**)(ここでは割愛)。

各種の有機物に対して用いられる ISO 9408 と違って、この規格はプラスチック材料の生分解度を測定するために特別に作成されたものである。この特別な要求に基づいて、植種源、試験培養液を選択し、また炭素収支の計算によって生分解度の評価の精度を向上させるのを可能にした。

**5. 試験環境** 培養は、暗所又は散乱光下、微生物に有害な種々の蒸気から遮断された囲いの中、一定温度 ( $\pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ 以内) 望ましくは (20~25)  $^{\circ}\text{C} \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  又は、使用される植種源と試験環境によって他の適切な温度に保たれたところで行わなければならない。

**備考** 植種源がコンポストの場合は、より高い温度が適切であろう。

**6. 試薬** 評価の定まった分析用試薬だけを用いる。

**6.1 蒸留水又は脱イオン水** 有害な物質 (特に銅) と DOC 2  $\text{mg/l}$  以上を含まないもの。

6.2 試験培養液 試験の目的に応じて、異なった試験培養液を使用できる。例えば、自然環境を模擬する場合は、標準試験培養液 (6.2.1) を用いる。試験材料が高濃度で使用される場合は、より高い緩衝能力と栄養分濃度をもつ最適化試験培養液 (6.2.2) を用いる (ここでは割愛)。

### 6.2.1 標準試験培養液

#### 6.2.1.1 溶液 A

無水りん酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	8.5 g
無水りん酸水素二カリウム ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	21.75 g
りん酸水素二ナトリウム二水和物 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	33.4 g
塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0.5 g

を水 (6.1) に溶解して 1000 ml にする。

備考 溶液の正確な組成は pH によって確認でき、それは 7.4 がよい。

6.2.1.2 溶液 B 硫酸マグネシウム七水和物 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22.5 g を水 (6.1) に溶解し、全量を 1000 ml とする。

6.2.1.3 溶液 C 塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36.4 g を水 (6.1) に溶解し、全量を 1000 ml とする。

6.2.1.4 溶液 D 塩化鉄 (III) 六水和物 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.25 g を水 (6.1) に溶解し、全量を 1000 ml とする。

沈殿を防ぐために、使用直前に新しく溶液を調製するか、又は濃塩酸 (HCl) を 1 滴若しくはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の 0.4 g/l 水溶液を 1 滴添加する。

6.2.1.5 調製 試験培養液 1000 ml を調製するため、500 ml の水 (6.1) に

— 溶液 A を 10 ml

— 溶液 B~D をそれぞれ 1 ml ずつ

加え、水 (6.1) を加えて全量を 1000 ml にする。

6.2.2 最適化試験培養液 ここでは割愛。

6.3 ピロりん酸塩溶液 二りん酸四ナトリウム塩 ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) 2.66 g を水 (6.1) に溶解し、全量を 1000 ml にする。

6.4 二酸化炭素吸収剤 望ましくはソーダ石灰又は他の適切な吸収剤。

7. 装置 すべてのガラス器具は、完全に洗浄され、特に有機物又は有害物質が付着してはならない。

通常の実験室の器具のほかに次のものを用意する。

7.1 閉鎖呼吸計 すべての必要な器具及びかくはん機を備えた試験容器 (フラスコ) を含む閉鎖呼吸計。恒温室又は、定温装置 (例えば、恒温水槽) の中に設置する (例として附属書 C 参照)(ここでは割愛)。

備考 十分な精度で生物化学的酸素要求量を測定できるいかなる呼吸計でもよいが、望ましくは、消費酸素量を検知し、自動的にその酸素を補給する装置がよい。これによって分解過程における酸素不足及び微生物活性の阻害が生じない。呼吸計の代わりに二相密閉瓶も使用できる (附属書 D 参照)(ここでは割愛)。

7.2 全有機炭素量 (TOC) 及び溶存有機炭素量 (DOC) を測定するための分析機器 (ISO 8245 参照)

7.3 硝酸塩及び亜硝酸塩を測定するための分析機器

備考 硝化反応が起こっているかどうかを調べるために定性試験を最初に行うことを推奨する。もし、培養液中に硝酸塩/亜硝酸塩の存在が認められるならば、適切な試験方法

(例えば、イオンクロマトグラフ法)による定量が必要である。

7.4 遠心分離機又は有機炭素を著しく吸着したり、放出したりしない膜フィルター(孔径 0.45  $\mu\text{m}$ )をもつろ過装置。

7.5 はかり 通常実験室で使用されるはかり。

7.6 pHメーター 通常実験室で使用される pHメーター。

## 8. 操作

8.1 試験材料 試験材料<sup>(1)</sup>は、質量が既知で、試験に用いる呼吸計で BOD が測定可能な十分な量の炭素を含んでいなければならない。ThOD(附属書 A 参照)及び TOC(例えば、ISO 8245 を使用)を化学式から計算するか、元素分析によって決定する。試験材料濃度は、少なくとも 100 mg/l とする。この濃度は、ThOD として約 170 mg/l 又は TOC として約 60mg/l に相当する。もし、呼吸計の感度に余裕がある場合、より低濃度を用いることもできる。試験材料濃度の最大値は、試験に使用する呼吸計の酸素供給力と試験培養液によって決まる。最適化試験培養液(6.2.2)を使用する場合、試験材料濃度は C/N 比が約 40:1 になる約 2000 mg/l を超えてはいけない。より高濃度での試験が必要な場合、試験培養液の窒素濃度を増やさなければならない。

備考 1. 自然環境中での生分解過程を模擬する場合、標準培養液を使用し、試験材料濃度を 100 mg/l とすることを推奨する。

2. 試験材料<sup>(1)</sup>は、粉体を用いるべきであるが、フィルム、破片、断片又は成形品を用いてもよい。試験材料の形状は、生分解度に影響を及ぼすことがある。異なるタイプのプラスチック間で分解度を比較する場合、同一の形状の試料を用いるべきである。粉体を試験材料とする場合、限定した狭い範囲の粒度分布をもつ試料を使用すべきである。最大直径が 250  $\mu\text{m}$  の粒度分布が推奨される。また、試験材料の形状によって使用する試験装置の大きさが決まる。かくはん方式などの試験条件によって機械的な異常が発生しないことを調べておかなければならない。試験材料を加工する場合は、試験材料の分解挙動に影響を与えてはいけない(例えば、混合物の場合は粉体を使用する)。任意としてポリマー試験材料の水素、酸素、窒素、りん及び硫黄含量並びに、例えば、サイズ排除クロマトグラフ法によって分子量を測定する(ASTM D 3536-91 その他の標準法を参照)。可塑剤などの添加物を含んでいないポリマーを試験材料とすることが望ましい。試験材料中に、そのような添加物が含まれている場合、プラスチック材料の正確な生分解度を評価するためには添加物の生分解性に関する情報が必要である。

注<sup>(1)</sup> 一般にプラスチック材料の物性を比較するときは、試験材料の形状を厳密に規定していることが多い。この規格を用いて異なるタイプのプラスチック間で生分解度を比較する場合、同一形状(大きさ、形、厚み)の試験材料を用いる。同一形状の試験材料を用意できれば、試験時期が異なるような場合の比較も可能であるが、一般には、時期が異なると同一形状の試験材料を用意することは難しいので、同じ粒径の粉体を用いるのがよい。

水に難溶な物質の取扱いについての詳細は、ISO 10634 を参照する。

8.2 対照材料 アニリン又は生分解度が既知のポリマー(例えば、微結晶セルロース粉体、灰分のないセルロースろ紙、又はポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸)を対照材料とする。可能なら TOC、形状及び大きさは、試験材料と同じにする。

陰性対照として、試験材料と同じ形状の非分解性ポリマー(例えば、ポリエチレン)を用いること

ができる。

**8.3 植種源の調製方法** 主として、家庭下水を処理している下水処理場の活性汚泥が植種源に適する。これは、活性な好気的環境から得られ、広範囲のプラスチック材料が試験されるどの地域でも利用できる。代わりに、土壌及びコンポストの懸濁液を植種源として用いることもできる。幾つかのプラスチック材料の分解には、菌類が重要な役目をしているので、特定の廃水処理系での生分解性を調べる場合、植種源は、そのような環境から採取しなければならない。

植種源は、十分な分解活性をもった多様な凝集微生物フローラを得るため、8.3.1及び8.3.2に記載された植種源又はそれらの混合物から調製する。植種源の内性呼吸量が多い場合、使用前にばっ(曝)気を行って植種源を安定化させる。試験温度を使用した植種源と調和させる(5.の備考参照)。

**備考** 使用する植種源のコロニー形成数(CFU)を測定することは有益である。試験混合物は、少なくとも $10^6$  CFU/mlの菌数を含んでいなければならない。

**8.3.1 廃水処理場から採取した植種源** 主として、家庭下水を処理して正常に稼動している下水処理場又は実験室プラントから活性汚泥を採取する。十分にかくはんし、好気的条件に保ち、採取した日に使用することが望ましい(少なくとも72時間以内に使用する。)

使用する前に、懸濁固形物濃度を測定する(例えば、ISO 11923を使用する。)。必要に応じて活性汚泥を濃縮して、試験系に添加する汚泥量が最小限量となるようにする。懸濁固形物濃度が30 mg/l~1000 mg/lになるように適正量の汚泥を添加する。

**備考 1.** 自然環境における生分解過程を模擬する場合や、炭素収支に測定を行う場合(附属書E)(ここでは割愛)、植種源濃度は、懸濁固形物濃度として30 mg/lとすることが推奨される。固形物は、炭素収支の測定を妨害するので、次の方法で植種源を調製することが推奨される。活性汚泥500 mlを採り、破碎混合機又はそれに相当する高速ミキサーを用いて中程度のスピードで2分間均一化する。上澄み液に固形物がほとんど含まれなくなるまで、少なくとも30分間放置する。上澄み液をデカンテーションで採り、試験液中濃度として1容量%~5容量%となるように試験フラスコに添加する。このとき、汚泥粒子が混入するのを避ける。

2. 植種源は予調整を行ってよいが、通常は予暴露した植種源は使用しない。特に自然環境化下での生分解挙動を模擬した標準試験の場合はそうである。試験の目的に応じて予暴露を行った植種源を用いることができる。この場合、試験報告書には、予暴露した植種源を用いたこと及び予暴露の詳細な方法を明記する(例えば、予暴露菌を用いた条件での生分解度=X%)。予暴露した植種源は、種々の条件下で行っている適切な実験室内生分解試験(ISO/TR 15462参照)又は関連した環境条件が存在する場所(例えば、環境中に物質が存在する地域又は工場処理場)から採取することができる。

**8.3.2 土壌及び/又はコンポスト植種源** ここでは割愛。

**8.4 試験** 少なくとも次の試験を含む数のフラスコを用意する。

- a) 試験材料用フラスコ(略号F<sub>T</sub>) 2個(2)
- b) 空試験用フラスコ(略号F<sub>B</sub>) 2個(2)
- c) 対照材料を用いて植種源の活性を調べるためのフラスコ(略号F<sub>C</sub>)1個  
必要に応じて次のフラスコを用意する。
- d) 加水分解などの非生物的分解又は非微生物的分解を調べるためのフラスコ(略号F<sub>S</sub>)1個。  
F<sub>S</sub>中の試験溶液は、例えば、オートクレーブか塩化水銀(II)(HgCl<sub>2</sub>)の10 g/l溶液を5 ml

を添加するか、その他の微生物活性抑制物質を添加することによって殺菌しなければならない。必要ならば、同量の抑制物質を試験期間中加える。

- e) 試験材料と同一形状の非分解性プラスチック材料を試験材料とする陰性対照用フラスコ (略号  $F_N$ ) 1 個。
- f) 試験材料の微生物活性阻害性を調べるためのフラスコ (略号  $F_T$ ) 1 個。  
試験材料及び対照材料中の炭素量と培養液の窒素量は、少なくとも約 C/N 比を 40:1 にする。必要に応じて窒素を添加する。

注<sup>(2)</sup> 試験の繰り返し数を確保するため、試験材料、及び空試験用のフラスコを 2 個用意する。試験実施上可能であれば、これらを 3 個ずつ、また c)~f) のフラスコを複数にしてもよい。

表 1(ここでは割愛) に示されているように試験培養液 (6.2) 及び植種源 (8.3) の適正量を各試験フラスコに添加する。

各フラスコの pH を測定し、必要ならば 7 に調整する。二酸化炭素吸収剤 (6.4) を呼吸計 (附属書 C 参照)(ここでは割愛) の吸収剤容器に入れる。各フラスコに試験材料 (8.1)、対照材料又は陰性対照材料 (8.2) を表 1(ここでは割愛) に従って添加する。炭素収支を測定する場合 (附属書 E 参照)(ここでは割愛)、試験開始時及び試験終了後に、DOC 及びバイオマスの測定用に、各フラスコ又は別個に設けたフラスコから所定量の試験溶液を分取する。分取した液量は、最終試験液量を調整するとき、又は、試験結果を計算するとき考慮する。

これらの試験フラスコを恒温環境 5 に置いて所定の温度になるまで放置する。試験フラスコを呼吸計に接続し、かくはんを開始する。圧力計の目盛を読み取る (手動装置の場合) 又は酸素消費量の記録計が正常に作動しているかを確認する (自動測定呼吸計の場合)。その他の方法として附属書 D(ここでは割愛) に示す二相密閉瓶法を用いることができる。

BOD 値が一定レベルに至り (定常期になる)、それ以上は分解が進まないと考えられるときに、試験は終了したとみなされる。最長の試験期間は 6 ヶ月。長期試験の場合は、試験系 (例えば、試験容器及び連結部分の気密性) に特別な注意を払うべきである。

試験終了後に、フラスコ  $F_T$  の pH、硝酸及び亜硝酸濃度 (備考 6.参照) を直ちに測定するか、一部を分取して測定材料として保存する。硝酸及び亜硝酸濃度は、硝化反応に対する分解度の補正に用いる。

備考 アリルチオ尿素は生分解されるので、短期間でしか硝化反応を阻害することができない。このため硝化反応の阻害剤としてアリルチオ尿素を添加することは推奨できない。しかし、経験的に植種源濃度が低い場合 (約 1 容量%)、阻害剤を使用しなくても長期間硝化反応は起こらないことが分かっている。

## 9. 計算及び結果の表示

9.1 計算 適切なタイプの呼吸計に対して製造業者から与えられた方法を使用して、それぞれのフラスコごとに酸素消費量を測り、試験材料の特定の生物化学的酸素要求量  $BOD_S$  は、試験フラスコ  $F_T$  と空試験フラスコ  $F_B$  の酸素消費量差を試験材料の濃度で割り、式 (1) によって算出する。

$$BOD_S = \frac{BOD_t - BOD_{Bt}}{\rho_{TC}} \dots \dots \dots (1)$$

ここに、  $BOD_S$  : 試験材料グラム当たりの特定 BOD 値 (mg)。  
 $BOD_t$  : 時間  $t$  で試験材料に含まれるフラスコ  $F_T$  の BOD 値 (mg/l)。  
 $BOD_{Bt}$  : 時間  $t$  で空試験対照  $F_B$  の BOD 値 (mg/l)。

$\rho_{TC}$  : フラスコ  $F_T$  の反応混合物中の試験材料の濃度 (mg/l)。

理論上の酸素要求量に対する特定の生物化学的酸素要求量の比として生分解度百分率  $D_t$  は、次の式 (2) によって算出する [試験材料グラム当たりの ThOD 値 (mg)]。

$$D_t = \frac{BOD_s}{ThOD} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

同様な方法で BOD 及び対照材料  $F_C$  の生分解度百分率を算出する。もし、含まれているならば生分解でない分解度チェック  $F_S$ 、及び陰性対照  $F_N$  についても算出する。

**備考**  $ThOD$  の計算は**附属書 A**を参照。もし、亜硝酸塩及び硝酸塩の有意な濃度が測定されたら、酸素要求量は硝化によるものとみなす (**附属書 B** 参照)(ここでは割愛)。炭素収支を計算する場合は、**附属書 E**(ここでは割愛) に与えられている情報を使用する。

**9.2 結果の表示及び解釈** 測定された BOD 値及び生分解度百分率を測定間隔ごとに、また、試験フラスコごとに表を作って表示する。時間の関数としてフラスコごとの BOD 曲線をプロットする。二つのフラスコの結果が似たようなものなら、平均曲線をプロットする。

生分解度曲線の定常期の平均値、又は例えば、曲線が下降また、更に定常期にゆっくり増加するときに最高値として測定された最高レベルの生分解度は、その試験材料の生分解度の特性を表す。炭素収支が計算されるならば、この収支結果は最終生分解度の特性を表す。

試験材料のぬ (濡) れ能力及び形状は、得られた結果に影響を及ぼすかもしれない。したがって、その試験方法は、類似の化学構造のプラスチック材料の比較に限定されるかもしれない。

試験材料の毒性に関する情報は、低い生分解性を示す試験結果の解釈に有効であるかもしれない。

**10. 結果の正当性** 試験は、次のような場合に正当であると考えられる。

- a) 対照材料の生分解度 (植種源チェック  $F_C$ ) は、試験の終了時で 60 % 以上でなければならない。
- b) 試験終了時の空試験  $F_B$  中の BOD 量は、実験で得られた上限値を超えてはならない (この値は植種源の量によるが、例えば、30 mg/l の乾燥物を使用した場合、実験室間試験が示しているように 60 mg/l である。)

フラスコ  $F_I$  (阻害チェック) を含むならば、その生分解度百分率が 25 % 以下で、試験材料の十分な分解がみられないならば、試験材料は抑制的であると推定することができる。

フラスコ  $F_S$  (非生物的分解チェック) を含むならば、その BOD の有意な量 (10 % 以上) が観測される場合は、非生物的分解プロセスが生じているかもしれない。

フラスコ  $F_N$  (陰性対照) を含むならば、その BOD の有意な量は見られない。

これらの基準が満たされない場合は、その試験は他の予調整された又は予暴露された植種源を使って繰り返し行う。

**11. 試験報告書** 試験報告書には、少なくとも次の情報を含むべきである。

- a) この規格及びそれぞれの付属書の番号の記載
- b) 試験材料及び対照材料を同定するために必要なすべての情報: TOC、ThOD、化学組成、化学式 (分かるなら)、形状、形態、量/濃度を含む
- c) 試験条件の主なパラメータ: 試験容積、使用した試験培養液、培養温度、最終 pH を含む
- d) 使用された植種源の出所及び量: 使用されたコンポストの予暴露の細目及び状態を含む
- e) 使用された分析技術: 呼吸計の原理、TOC、硝酸塩/亜硝酸塩の決定を含む
- f) 得られた試験及び対照材料の試験結果のすべて (表及びグラフ形式で): 測定された BOD、生分解度百分率、時間に対するこれらの変数の対応する分解曲線<sup>(3)</sup>、硝酸塩/亜硝酸塩濃度を

含む

- g) 誘導期、分解期、分解の最高レベルの期間及び全体の試験期間  
そして任意に実施されて測定された場合は
- h) 微生物の働きでない分解チェック  $F_S$ 、阻害対照  $F_I$ 、及び陰性対照  $F_N$  の結果
- i) 次の例を含む炭素収支の測定結果
- 1) 二酸化炭素に酸化され BOD による生分解度から見積もられた試験材料の全炭素量
  - 2) 水溶性の物質による培養期間を通じての試験培養液中の DOC の増加
  - 3) 試験を通じてのバイオマス中の有機炭素の増加
  - 4) 試験終了時での残りのポリマーの炭素含量
  - 5) 試験材料によって作られた炭素パーセントとして測定され表示された全炭素の合計量
- j) 植種された試験混合物中のコロニー形成単位 (CFU/ml)
- k) 他の関連データすべて (例えば、試料の最初の分子量、生分解されないで残ったポリマーの分子量)
- 注<sup>(3)</sup> 分解度が 50 % を超える場合、分解度が 50 % に達するまでの時間を示してもよい。

### 附属書 A(参考) 理論酸素要求量 (ThOD)

A.1 ThOD の計算 分子量  $M_t$  をもつ物質  $C_cH_hCl_{cl}N_nS_sP_pNa_nO_o$  の理論酸素要求量は、元素組成が既知か、元素分析によって決定することができれば、次の式によって算出することができる。

$$ThOD = \frac{16[2c + 0.5(h - cl - 3n) + 3s + 2.5p + 0.5na - o]}{M_t}$$

この計算は、炭素は二酸化炭素に、水素は水に、りんは  $P_2O_5$  に、硫黄は六価の酸化状態に、さらに、塩素はハロゲン化水素になることを暗に示している。N、P、及び S の酸化は、分析によって確認する必要がある。この計算では、窒素はアンモニウムとして放出される。硝化の影響は、附属書 B 参照 (ここでは割愛)。

ThOD を試験物質 1 g 又は 1 mg 当たりの mg-酸素量として表示する。

A.2 例: ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (PHB)

化学式<sup>3)</sup>  $C_4H_6O_2$   $c = 4, h = 6, o = 2$ 、ユニット分子量  $M_t$ : 86

$$ThOD = \frac{16[2 \times 4 + 0.5 \times 6 - 2]}{86}$$

$$ThOD = 1.6744 \text{ mg/mgPHB} = 1674.4 \text{ mg/gPHB}$$

A.3 例: ポリエチレン/でんぷん/グリセロールブレンド物 (ここでは割愛)

<sup>3)</sup> PHB は、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸モノマーからなる高分子である。重合 (エステル形成) のために水が除去される。したがって、PHB の最終的な分子式は、モノマーから (化学反応によって外れる) 水 1 分子を差し引いたものに等しい。

附属書 F(参考) 生分解度試験の終わりに、水に不溶性のポリマーの  
残存量及びその分子量を測定する例

生分解度試験の終わりに残っているポリマーの量又は分子量を測定する方法を使うことが役立つかもしれない。次のような方法又は他の方法が、水と混和しない有機溶剤に溶ける水に不溶性ポリマーを分析するために使われる。

- a) 分液漏斗に試験混合物を移液し、適切な有機溶剤を加え、残ったポリマーを抽出するために10分～20分間振とうする。水層から有機溶剤層を分離する。新しい溶剤を加え、この手順を繰り返す。
- b) 有機抽出物を混合して乾燥するまで溶媒を蒸発させる。その固体サンプルを適正な容量の適切な溶質に溶解する。
- c) サイズ排除クロマトグラフ法のゲルを詰めたカラムを使った高速液体クロマトグラフ (HPLC) に適正量を注入する。分析を開始しクロマトグラフを記録する。
- d) 検量線を使ってポリマー量を測定する。
- e) (検量線の作成には) 同じポリマー又は、試験ポリマーに類似の構造をもつ分子量が既知のポリマーをクロマトグラフに注入することによってポリマーの分子量を測定する。保持時間と分子量の関係がクロマトグラムから得られる。これらの関係 (検量線) を使って分子量を計算する。

試験ポリマーの絶対分子量は、Low Angle Laser Light Scattering (LALLS) 及び Differential Refractive Index (示差屈折率) を組み合わせた検知器をもった HPLC によっても測定することができる。



## (2) 測定装置及び測定方法

### a) 測定装置

本研究ではアクタック(株)製 BOD センサーシステムを BOD 測定装置として用いて検討を行った。そこで、本装置の測定原理及び測定方法について以下に説明する。単語及び略号は JIS 規格で用いられているものを用いた。

本装置はインキュベータ内にて測定するものである。各培養フラスコにキャップを兼ねた減圧センサー及び BOD 値表示モニターが付されている。フラスコ内の減圧分をセンサーが感知して BOD 値を算出して表示する。表示される BOD 値の単位は JIS 規格と異なり  $\text{mgO}_2/\text{L}$  であり、試験培養液 1 L 当たりが消費する酸素量である。従って、生分解率を求めるために用いる ThOD 値の単位も  $\text{mgO}_2/\text{L}$  に揃える必要がある。生分解度は先と同様、BOD 値と ThOD 値の比から求め、以下の式のように生分解度百分率として計算した。すなわち、試料が含まれるフラスコ ( $F_T$ ) の BOD 値から菌体の基礎呼吸により消費された酸素量を表す空試験の BOD 値 (ブランク:  $F_B$ ) を引いたものを、試料が分解資化される際の BOD 値とした。この際、菌体の呼吸により放出された二酸化炭素は吸収剤により吸収されるためフラスコ中の気相の変化には影響を与えない。

$$\text{生分解率} [\%] = \frac{A - B}{ThOD} \times 100$$

ここに、 A : 試料溶液の BOD 値 ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ ) ( $F_T$ )。

B : 空試験の BOD 値 ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ ) ( $F_B$ )。

装置の模式図を Fig. 5.1 に示した。

### b) 測定方法

当研究室における以前の検討から測定範囲を 0 - 250  $\text{mgO}_2/\text{L}$  とした時に安定した BOD 値が得られることが示されたので、本研究でも測定範囲を 0 - 250  $\text{mgO}_2/\text{L}$  とした。

測定範囲を 0 - 250  $\text{mgO}_2/\text{L}$  とした時に要する培養液は 250 mL であるので、試料の ThOD 値と基礎呼吸により消費される空試験の BOD 値の合計が 62.5 (=250/4)  $\text{mgO}_2/250$  mL に収まるように試料量を調整した。例えば P(3HB) を試料とした場合は ThOD=1.6744  $\text{mgO}_2/\text{mgP}(3\text{HB})$  なので、試料 29.9 mg の際に 50  $\text{mgO}_2/250$  mL (200  $\text{mgO}_2/\text{L}$ ) となり、空試験の BOD 値が 12.5  $\text{mgO}_2/250$  mL (50  $\text{mgO}_2/\text{L}$ ) まで許容される。

活性汚泥上清は横浜市港北区下水処理場より採取した活性汚泥を 3 時間曝気し、その後静置することで調製した。

試験培養液は JIS K 6950: 2000 (ISO 14851: 1999) の 6.2.1 標準試験培養液に従って調製した。すなわち、以下の溶液 A ~ D を調製し、

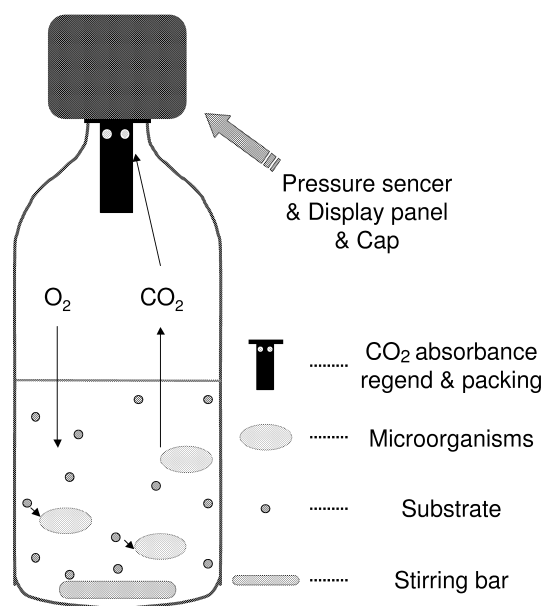


Fig. 5.1: Conceptual scheme of BOD sencer system.

溶液 A	無水りん酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	8.5 g
	無水りん酸水素二カリウム ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	21.75 g
	りん酸水素二ナトリウム二水和物 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	33.4 g
	塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0.5 g

を水に溶解して 1000 mL にする。

溶液 B 硫酸マグネシウム七水和物 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22.5 g を水に溶解し、全量を 1000 mL とする。

溶液 C 塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36.4 g を水に溶解し、全量を 1000 mL とする。

溶液 D 塩化鉄 (III) 六水和物 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.25 g を水に溶解し、全量を 1000 mL とする。

500 mL の水に溶液 A を 10 mL 及び溶液 B~D をそれぞれ 1 mL ずつ加え、水を加えて全量を 1000 mL にした上で、塩酸水溶液を用いて最終 pH 値を 7 にして試験培養液とした。

ポリマー薄膜の形成方法について以下に記す。フラスコ内に形成したポリマー薄膜全てが培養液と接触する必要がある。従って、あらかじめフラスコに 250 mL のクロロホルムを入れ、250 mL の培養液が入った際の液高さのところにビニールテープなどでマーキングを行った。液高さ測定用のクロロホルムを除去し、試料のクロロホルム溶液をフラスコに入れた。試料のクロロホルム溶液がマーキング位置より出ないようにフラスコを傾けながらフラスコ下部をドライヤーで熱することで、フラスコ内において溶媒キャストを行い、

フラスコ内に試料の薄膜を形成した。なお、溶媒キャストを行う際、アスピレーターポンプを用いてフラスコ内のクロロホルム蒸気をフラスコ外に排出することにより、溶媒キャストに要する時間が大幅に短縮されることが薄膜調製の検討より明らかになった。

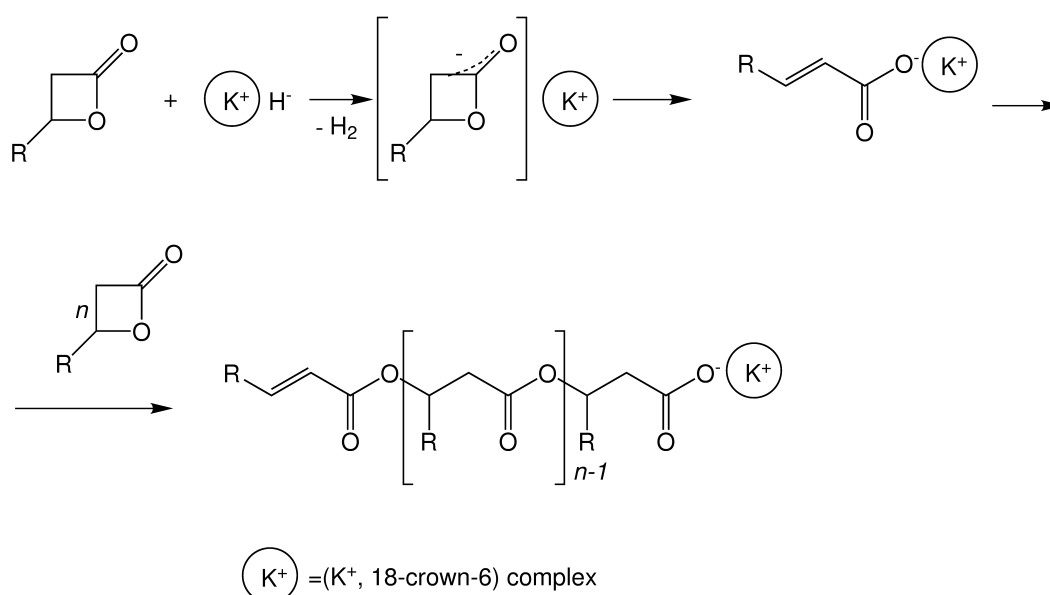
なお、参照試料として用いたアニリンは粘性の高い液体であり、重量を測定したものをフラスコに入れることは困難である。従って、本研究ではマイクロシリンジを用いて定められた量をはかり取った。マイクロシリンジにて入れられたアニリンの重量は、同様にしてはかり取ったアニリン重量の、最高値及び最低値を除外して求めた平均値とした。

BOD センサーシステムのフラスコに試料を入れ (試料薄膜を形成していない場合)、ついで活性汚泥上清 (5 vol.-%以下) と試験培養液を合計で 250 mL 加え、水酸化ナトリウムを 2 ~ 3 粒入れたパッキンをした上で減圧センサー付キャップをしめた。なお、インキュベータ内の温度 (25 °C) とフラスコの温度に差があるとフラスコ内の圧力に影響を与えるため、キャップを緩めた状態でインキュベータ内に 30 ~ 60 分程度放置してからキャップを完全にしめて測定を開始した。

## 5.2.4 実験方法

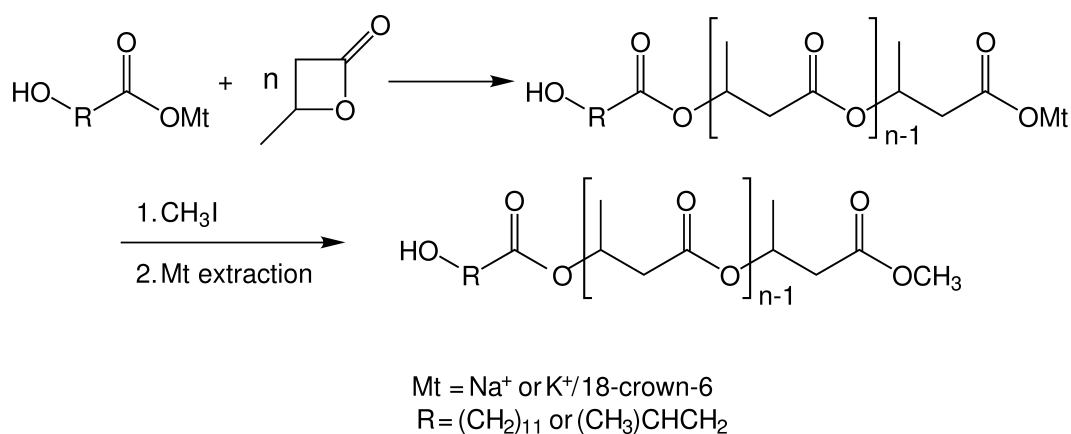
## (1) atactic P(3HB) の合成

*atactic* P(3HB) の合成は Jedliński らや Kurcok らにより詳細に検討され<sup>61, 101)</sup>、一般にアニオン重合によりラク톤を開環重合した場合にアタクチックなポリマーが得られることが明らかにされている。アニオン重合の反応機構に関しては未だ不明瞭な点が多いが、アニオン重合により得られるポリマーの一次配列はアタクチックであることが明らかにされているため、本研究では *atactic* P(3HB) の合成を  $\beta$ -BL のアニオン重合により行った。現在、提唱されている二つのアニオン重合機構を Scheme 5.2 及び 5.3 に示した。



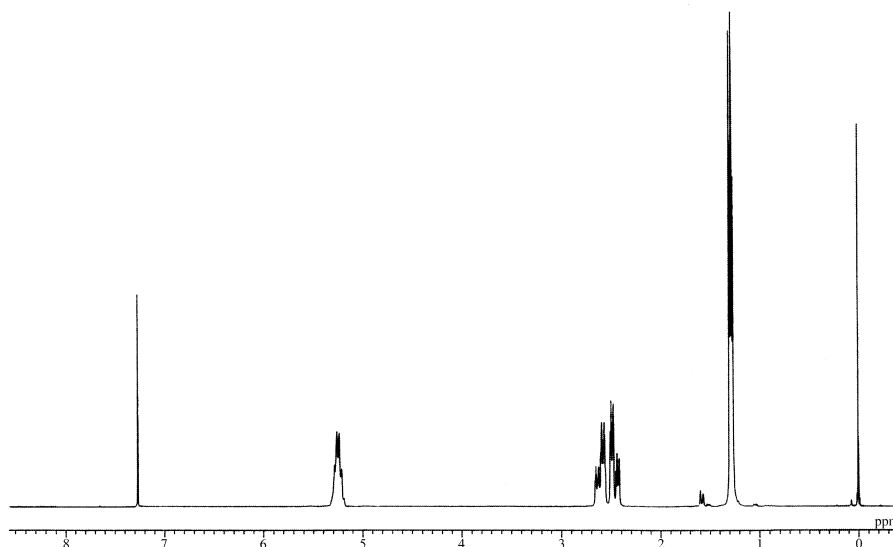
Scheme 5.2: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (1)

**重合反応:** 18-Crown-6 4.8 mg ( $1.82 \times 10^{-5}$  mol) 及びオレイン酸カリウム 5.9 mg ( $1.84 \times 10^{-5}$  mol) を三方コック及び磁気攪拌子を付した 5 mL ナス型フラスコにはかり取り、フラスコ系内を常温で 4 時間減圧にすることにより十分に乾燥を行った。フラスコ系内を常温でアルゴンにより解圧し、直ちにシリンジにて  $\beta$ -BL を 3.0 mL (=  $3.66 \times 10^{-2}$  mol, 3.15 g) 加えることにより重合反応を開始させた。重合反応は 26 °C のインキュベーター中において 72 時間行った。重合反応終了後、反応混合物を 4 mL のクロロホルムに溶解させることにより重合反応を停止させ、あらかじめ用意しておいた磁気攪拌子を付した 200 mL ナス型フラスコ内のメタノール 150 mL 中に徐々に滴下し、再沈殿による精製を行った。収量は 2.31 g (収率 73.3 %) であった。



Scheme 5.3: Proposed mechanism of anionic polymerization of lactones: (2)

精製ポリマーの分子構造の確認を $^1\text{H-NMR}$ により行った。 $^1\text{H-NMR}$ チャートを Fig. 5.4 に示した。SEC 測定より、分子量は  $\overline{M}_w = 128000$ ,  $\overline{M}_n = 110000$  及び分子量分散は  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.21$  であった。

Fig. 5.4:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of P(3HB) obtained by the ring-opening polymerization of  $\beta\text{-BL}$  using potassium oleate-18-Crown-6 complex.

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz:  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.22\sim 1.33$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 3H, m),  $2.41\sim 2.63$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 2H, m),  $5.16\sim 5.37$  ( $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ , 1H, br)

また、タクティシティーが *atactic* であった場合、P(3HB) は完全非結晶であることが明らかなので、ここで得られた P(3HB) が *atactic* であることを DSC により確認した。Fig.

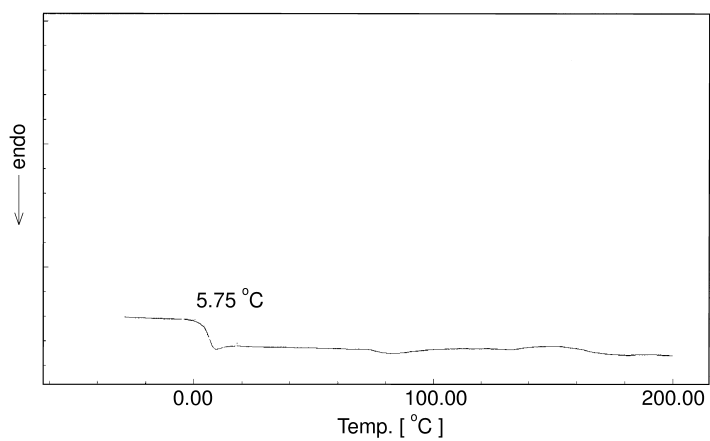
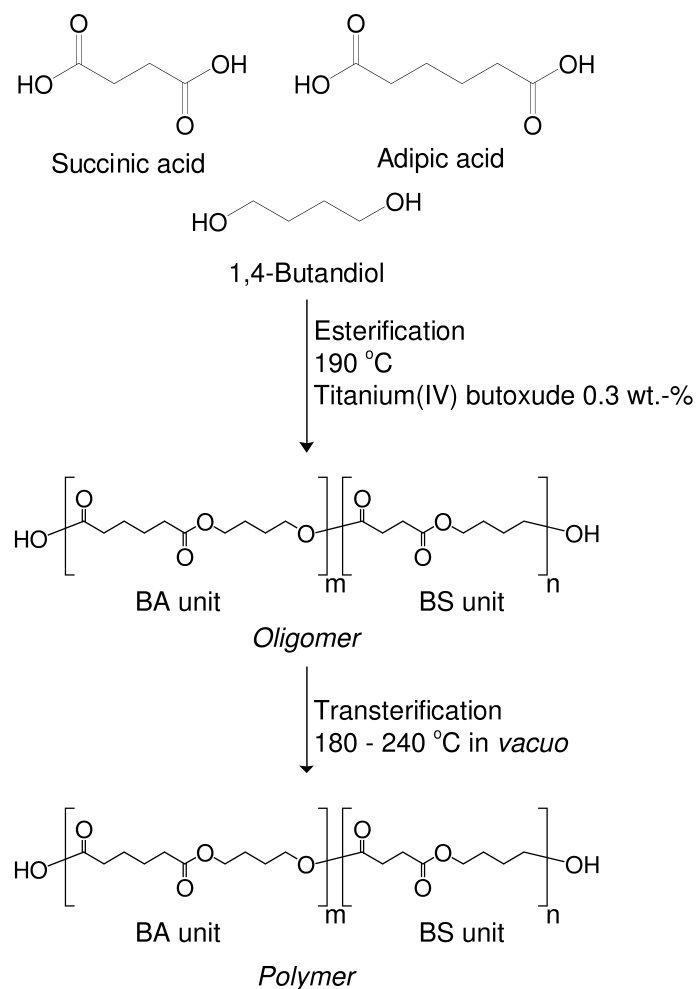


Fig. 5.5: DSC curve of the obtained *ata*-P(3HB).

5.5に示したDSCカーブより、得られたP(3HB)はガラス転移温度のみを有し、結晶融解ピークを有さないことから完全非晶質であることが明らかになった。

(2) poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) の合成

易分解性が報告されている poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) の合成を韓国漢陽大学校 工学部 繊維工学科 任承淳 教授 (Professor Seung Soon Im) のもとで行った。合成方法は Scheme 5.6 に示したように、オリゴマー化とポリマー化の二段階反応で行った。以下に BS:BA=7:3 のポリマー合成について詳細を記した。



Scheme 5.6: Scheme for the synthesis of poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate).

すなわち、コハク酸 165.326 g (1.4 mol)、アジピン酸 87.684 g (0.6 mol) 及び 1,4-ブタンジオール 216.288 g (2.4 mol; acids:diol=1:1.2) をマントルヒータ上の三口フラスコにはかり取った。三口にはそれぞれ窒素導入管、温度センサー及び静水の入ったリービッヒ冷却管を付した。このリービッヒ冷却管の上にト字管を付してその上部は温度計、側部は流水を通したリービッヒ冷却管を付した。マントルヒータは温度センサー付の温度コントローラーで制御した。

はじめに、反応混合物を 100 °C へと昇温させてから触媒であるチタン (IV) テトラブトキシド (1.408 g; 0.3 wt.-% to monomers) を添加した。添加終了後に反応温度を 190 °C へと昇温した。190 ~ 220 °C の間で 3 ~ 4 時間エステル化反応を行い、流水を通したリービッヒ冷却管より理論量の水を回収できた段階でオリゴマー化終了とした。なお、水の理論量は全てのカルボキシル基がエステル化された時に生じる水の量 (65.43 g) とし、確認はメスシリンダーで行った。オリゴマー化の終了後は一旦反応物をアルミパンに注ぐことでオリゴマーを固化させた。

重合反応は無触媒で行った。すなわち、150 g のオリゴマーを反応容器に入れ、攪拌棒及び減圧管を付したシリコン栓でしめた。反応容器をオイルバスに設置し、温度制御はオイルバスで行った。反応初期温度を 180 °C として毎分 1 °C の速度で 240 °C まで昇温した。減圧具合は反応系を観察しながら調整し、最終的に 1.5 torr まで減圧させた。その際、系内がバブリングしないように注意をはらった。

240 °C は poly(butylene succinate-co-butylene adipate) の融点よりも高いために系が固化することはない。従って、重合反応終了は系の粘度から判断するしかなく、今回の場合は 3 時間 15 分後に最も粘度が上昇したので、この時点で反応終了とした。反応終了後に溶融したポリマーを水をはったアルミパンに注ぎ、急冷することでポリマーを得た。

得られたポリマーの分子構造解析は  $^1\text{H-NMR}$ 、DSC 及び SEC 測定で行い、DSC カーブと  $^1\text{H-NMR}$  チャートをそれぞれ Fig. 5.7 及び 5.8 に示した。DSC 測定の結果より、結晶融解ピークが一つであったことからランダム共重合体を得られたことが明らかになった。また、Nikolic らの帰属<sup>130)</sup>に従った  $^1\text{H-NMR}$  解析より、ポリマー中の BS:BA 比は 6.8:3.0 であることが明らかになった。さらに SEC 測定より分子量は  $\overline{M}_w = 113500$ ,  $\overline{M}_n = 62500$  及び分子量分散は  $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.82$  であった。

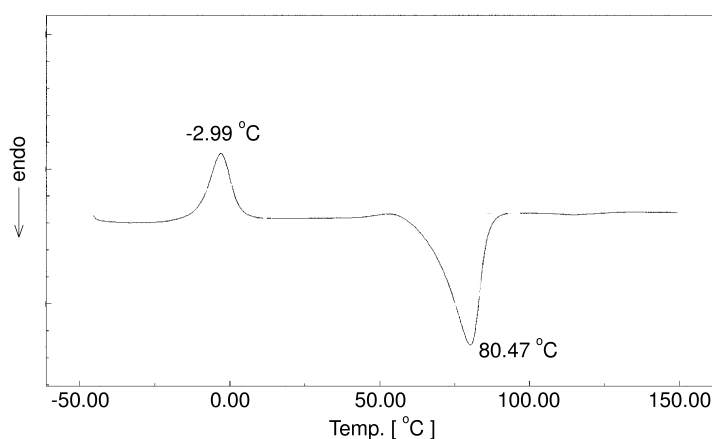
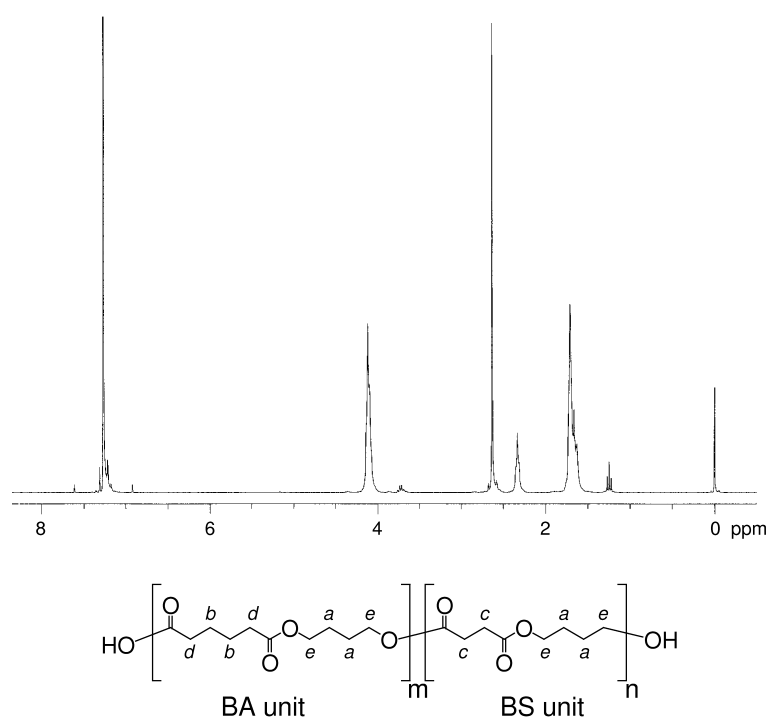


Fig. 5.7: DSC curve of the obtained poly(butylene succinate-co-butylene adipate).





$a, b; \delta = 1.63 - 1.71 \text{ ppm}$

$c; \delta = 2.33 \text{ ppm}$

$d; \delta = 2.63 \text{ ppm}$

$e; \delta = 4.09 - 4.12 \text{ ppm}$

Fig. 5.8:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the obtained poly(butylene succinate-co-butylene adipate).

## 5.3 結果・考察

### (1) 非天然型 P(3HB) の生分解に関する検討

#### a) 非天然型 P(3HB) を構成するモノマーの生分解性

全てが (*R*) 体モノマーで構成される天然型 P(3HB) は自然界中で良好に生分解することが知られている。しかし、(*S*) 体モノマーを含む非天然型 P(3HB) の生分解に関しては、P(3HB) 分解酵素を用いた酵素分解の報告はあるが、活性汚泥由来の微生物による報告はない。そこで、非天然型 P(3HB) 中に含まれる (*S*) 体モノマーの生分解性を評価した。評価には (*S*) 体モノマーのナトリウム塩とラセミ体のモノマーを用い、28 日間で測定を行った。結果を Table 5.2, 5.3 及び Fig. 5.9 に示した。

Table 5.2: BOD of (*S*)-3HB sodium salt.

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	1	3.5	1.5	10	5.6
2	6	6	0	39.5	20.9
3	6	24.5	11.2	63	35.6
4	7	80	44.4	76.5	43.4
5	5	83	47.4	84.5	49.7
6	6.5	87	48.9	92.5	53.8
7	6.5	93.5	52.9	97.5	56.9
8	4.5	98.5	57.1	102	60.9
9	6	102.5	58.7	105	61.9
10	4.5	105	61.1	106	63.4
11	4.5	108	62.9	110	65.9
12	4.5	110.5	64.4	113	67.8
13	4.5	112.5	65.7	118	70.9
14	6.5	116.5	66.9	121.5	71.9
15	6.5	120	69.0	125	74.1
16	9.5	122	68.4	128	74.1
17	9.5	122	68.4	130	75.3

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C$ <sup>a)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T$ <sup>b)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
18	9.5	122	68.4	133.5	77.5
19	9.5	124	69.6	135	78.4
20	9.5	123.5	69.3	139.5	81.3
21	9.5	124.5	69.9	140	81.6
22	15	128.5	69.0	145	81.3
23	13.5	126.5	68.7	145.5	82.5
24	15	129	69.3	146.5	82.2
25	13	130	71.1	147	83.8
26	16	128	68.1	148	82.5
27	14.5	130	70.2	148	83.4
28	15.5	130.5	69.9	149.5	83.8

<sup>a)</sup> : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of  $F_C$  was 164.5 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of  $F_T((S)$ -3HB) was 164.5 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

Table 5.3: BOD of (*R,S*)-3HB.

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C$ <sup>a)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T$ <sup>b)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	1	3.5	1.5	13	7.5
2	6	6	0	40	21.3
3	6	24.5	11.2	56	31.3
4	7	80	44.4	67	37.5
5	5	83	47.4	77	45.0
6	6.5	87	48.9	83	47.8
7	6.5	93.5	52.9	88.5	51.3
8	4.5	98.5	57.1	96.5	57.5
9	6	102.5	58.7	101.5	59.7

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
10	4.5	105	61.1	105	62.8
11	4.5	108	62.9	112	67.2
12	4.5	110.5	64.4	115.5	69.4
13	4.5	112.5	65.7	120	72.2
14	6.5	116.5	66.9	125	74.1
15	6.5	120	69.0	130	77.2
16	9.5	122	68.4	133	77.2
17	9.5	122	68.4	134	77.8
18	9.5	122	68.4	137	79.7
19	9.5	124	69.6	138.5	80.6
20	9.5	123.5	69.3	141.5	82.5
21	9.5	124.5	69.9	139	80.9
22	15	128.5	69.0	143	80.0
23	13.5	126.5	68.7	143	80.9
24	15	129	69.3	144	80.6
25	13	130	71.1	145.5	82.8
26	16	128	68.1	146.5	81.6
27	14.5	130	70.2	146	82.2
28	15.5	130.5	69.9	146	81.6

<sup>a)</sup> : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of  $F_C$  was 164.5 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of  $F_T$ ((*R,S*)-3HB) was 164.5 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

以上の結果より、(*S*)-3HB 及び (*R,S*)-3HB のいずれも 10 日間程度で易分解性の目安となる生分解率 (BOD/*ThOD* (%)) が 60 % に達したことが明らかになった。さらに Fig. 5.9 より、(*S*)-3HB と (*R,S*)-3HB の生分解曲線がほぼ同一であったことから、モノマーの立体化学は微生物による生分解に影響を与えないことが明らかになった。

従って、(*S*)-3HB を含む非天然型 P(3HB) もポリマー鎖が加水分解反応を受け、モノマーサイズまで分子量が低下すれば微生物によって資化・代謝されて水と二酸化炭素になると考えられる。

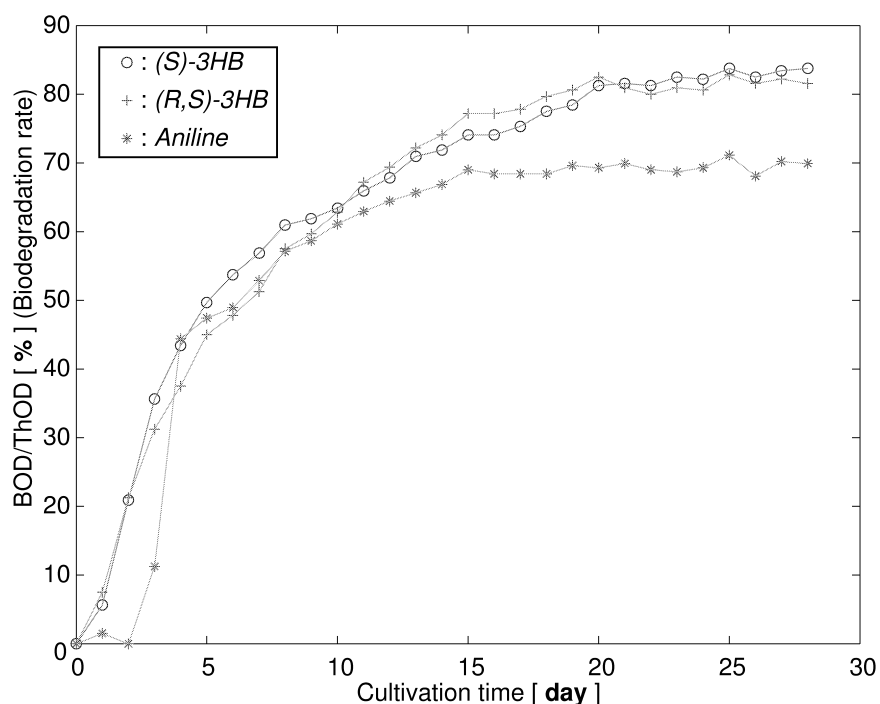


Fig. 5.9: Biodegradation curve of (S)-3HB and (R,S)-3HB.

天然型 P(3HB) が微生物による生分解を受ける際には、微生物により分泌される P(3HB) 分解酵素が効果的に天然型 P(3HB) を加水分解することが知られている。また、P(3HB) 分解酵素の作用機構に関する研究結果より、酵素が吸着する結晶領域を有さない非天然型 P(3HB) である *ata*-P(3HB) は常温近辺では、本酵素により全く分解を受けないことが知られている。

しかし、ガラス転移温度に近づくにつれて *ata*-P(3HB) も P(3HB) 分解酵素により分解作用を受けるという報告があり<sup>53)</sup>、また、結晶性高分子材料と海島構造を形成するようにブレンドした *ata*-P(3HB) は P(3HB) 分解酵素により分解することが報告されている<sup>127)</sup>。さらに、*ata*-P(3HB) を分解する触媒能を有する P(3HB) 分解酵素も発見され、報告された<sup>166)</sup>。これらの結果は *ata*-P(3HB) ポリマー鎖が常温においても他のエステル加水分解酵素により認識される可能性を多分に示している。そこで、続いて *ata*-P(3HB) の生分解性評価を行った。

b) *ata*-P(3HB) の生分解性

*ata*-P(3HB) はガラス転移点を 5 °C 近傍に有する完全非晶質な高分子であり、常温ではゴム状であることから常温での粉体化は不可能な素材である。そこで、はじめの生分解性評価は、粉体化を行わずに塊状のものをサンプルとした。測定は旧 JIS 規格で示された 28 日間で行った。結果を Table 5.4 及び Fig. 5.10 に示した。

Table 5.4: BOD of *ata*-P(3HB).

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	3	0	0	4	0.6
2	9	0	0	9	0
3	12	12	0	12	0
4	14	73	36.5	15	0.6
5	17	78	39.0	20	1.8
6	20	84	42.0	23	1.8
7	21	89	44.5	24	1.8
8	24	96	48.0	27	1.8
9	24	103	51.5	28	2.4
10	24	109	54.5	28	2.4
11	25	111	55.5	30	3.0
12	27	111	55.5	31	2.4
13	28	113	56.5	33	3.0
14	28	114	57.0	34	3.6
15	28	114	57.0	33	3.0
16	28	117	58.5	36	4.7
17	28	117	58.5	36	4.7
18	29	119	59.5	36	4.1
19	29	121	60.5	36	4.1
20	29	124	62.0	39	5.9
21	29	125	62.5	39	5.9
22	29	125	62.5	37	4.7
23	29	127	63.5	39	5.9

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^a$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio-degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^b$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio-degradation of $F_T$ (%)
24	29	125	62.5	39	5.9
25	29	126	63.0	42	7.7
26	29	129	64.5	42	7.7
27	30	127	63.5	42	7.1
28	30	127	63.5	46	9.5

<sup>a)</sup> : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of  $F_C$  was 200.0 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of  $F_T$ (P(3HB)) was 168.78 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

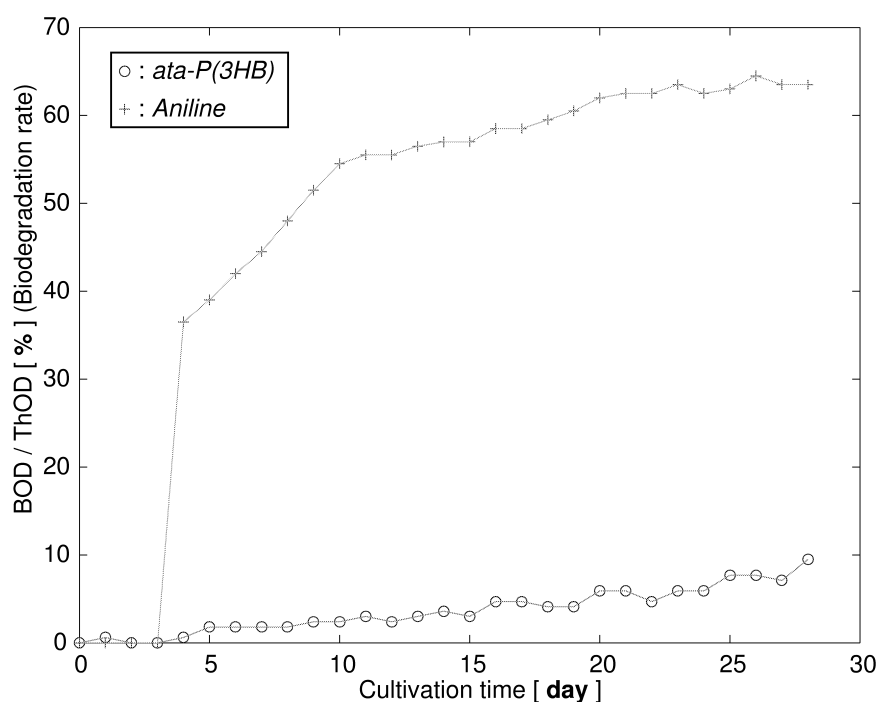


Fig. 5.10: Biodegradation curve of *ata* P(3HB). (block shape)

以上の結果において、空試験の BOD 値と *ata*-P(3HB) の入ったフラスコの BOD 値に明らかな差があったことから、*ata*-P(3HB) は微生物による分解性を有すると考えられる。しかしながら、28 日間の培養後での生分解率 (BOD/ThOD) は 10 %弱であった。JIS K6950 では生分解性プラスチックの条件として、半年間の培養後に生分解率 (BOD/ThOD) が 60

%を示すことを挙げている。従って、本検討も半年間の培養を行うべきであったと考えられるが、本試験はサンプル以外に炭素源をフラスコに加えておらず、28日間の培養後での生分解率 (BOD/ThOD) が 10 %弱では、半年間持続可能な微生物の生育条件ではないと判断した。

今回の試験ではサンプル形状が塊状 (球状) であった。球状サンプルは単位重量が培養液と接触する面積が最も小さな形状である。水に不溶な高分子材料が培養液中の酵素により分解される際には、材料と培養液の接触面積が生分解速度に最も大きな影響を与える。

接触面積のみを考慮した場合、最も生分解試験に適したサンプル形状は粉体である。しかしながら、*ata*-P(3HB) の粉体調製は不可能である。そこで、粉体ではなく、培養液とサンプルの接触面積が球状形状よりも大きなサンプル形状を検討する必要があると考えられる。

また、*ata*-P(3HB) 単独でのフィルム成形も物性上困難である。そこで、フラスコ内部に *ata*-P(3HB) の薄膜を溶媒キャスト法で作製することを試みた。すなわち、クロロホルムに溶解させたサンプルをフラスコに入れ、培養液が入る液高さまでの範囲でフラスコ内部に薄膜を形成させることで、球状サンプルよりもはるかに大きな接触面積が期待できる。

そこで、上記の方法により試験フラスコ内にサンプルの薄膜を形成させて BOD 測定を行った結果について Table 5.5 及び Fig. 5.11 に示した。

Table 5.5: BOD of *ata*-P(3HB). (polymer thin film)

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	0	0	0	1	0.5
2	0	0	0	3.5	1.8
3	0	44.0	27.0	12.5	6.3
4	0	63.5	38.9	22.5	11.3
5	0	70.0	42.9	26.0	13.0
6	0	75.0	46.0	30.5	15.3
7	5.0	87.0	50.2	35.5	15.3
8	4.0	93.0	54.5	40.0	18.0
9	1.0	90.5	54.8	42.0	20.5
10	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—

continues to next page



continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^a)$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^b)$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
12	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—
14	6.5	106	61.0	52.5	23.0
15	6.5	106	61.0	52.5	23.0
16	8.5	108	61.0	54.5	23.0
17	6.5	106	61.0	53.5	23.5
18	6.5	106	61.0	54.5	24.0
19	14.0	114	61.3	58.0	22.0
20	17.0	112	58.2	58.5	20.8
21	18.0	112	57.6	58.5	20.3
22	17.0	110	57.0	58.5	20.8
23	9.5	111	62.2	56.5	23.5
24	15.0	115	61.3	62.0	23.5
25	17.5	118	61.3	64.0	23.3
26	16.0	116	61.3	64.5	24.3
27	17.0	117	61.3	66.0	24.5
28	15.0	114	60.7	67.5	26.3

<sup>a)</sup> : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of  $F_C$  was 163.2 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of  $F_T$ (P(3HB)) was 200.0 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

以上の結果、28日培養後の *ata*-P(3HB) の生分解率が 25 % を超えることが明らかになった。水溶性有機材料の生分解性評価法から判断すると、生分解率が 25 % を超えた場合にその試料は本質的に生分解性を有すると考えられる。従って、*ata*-P(3HB) は本質的に生分解性を有すると考えられる。また、サンプルの粉体を調製できない場合に薄膜をフラスコ内に形成させる方法は生分解性を判断する上で有効であることが示された。

先の BOD 試験と試験日が異なり、試験に用いた微生物群は異なる。従って、単純な比較は好ましくないが、今回の結果より、*ata*-P(3HB) は本質的に生分解性を有する高分子材料であり、前回は球状というサンプル形状が水に不溶な材料の試験に適していなかったことが示された。

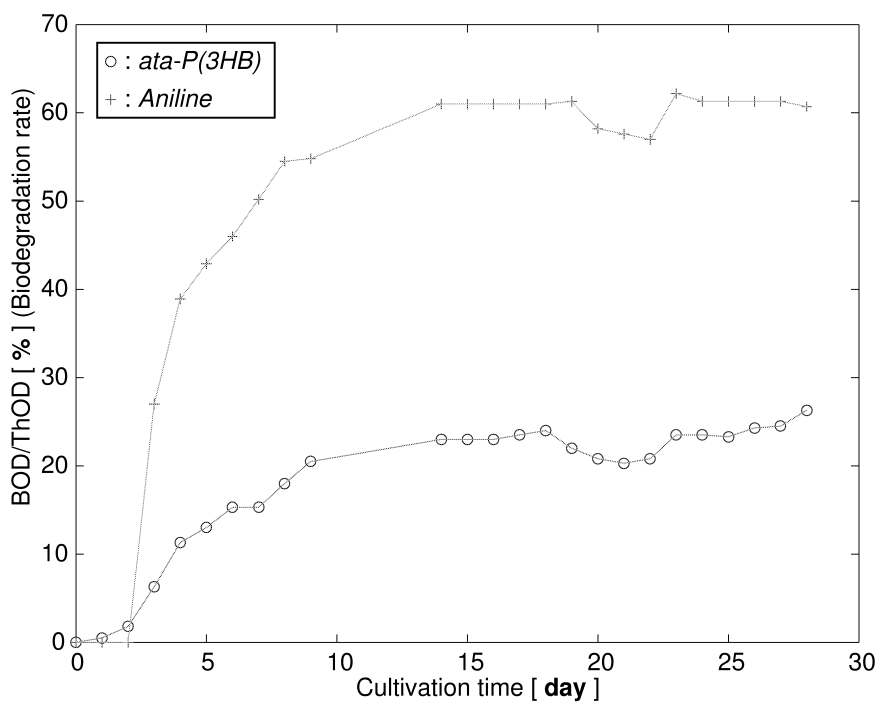


Fig. 5.11: Biodegradation curve of *ata* P(3HB). (thin film)

微生物による分解反応が進行したことが明らかになったので、JIS K6950 の附属書 F に従い、クロロホルムを用いてフラスコ内の残存ポリマーを回収し、残存ポリマーの分子量を SEC を用いて測定した。分解前後の SEC チャートを Fig. 5.12 に示した。

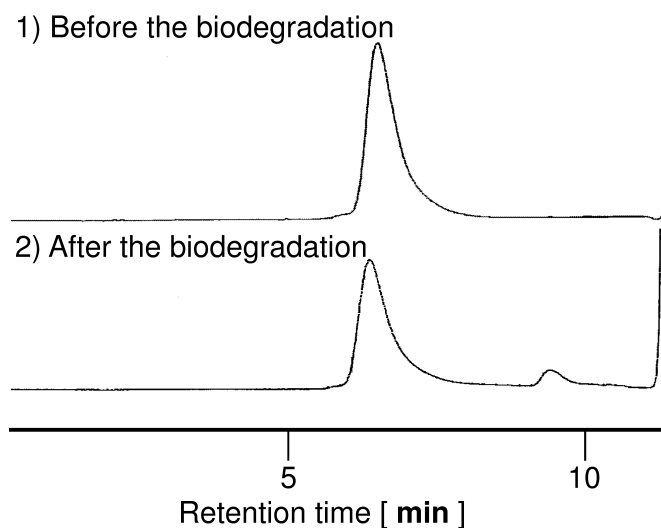


Fig. 5.12: SEC profiles of before and after the biodegradation of *ata*-P(3HB).

Fig. 5.12 より、残存ポリマーの分子量は分解前と比較してさほど変化しないことが明らかになった。水に不溶な高分子材料が微生物による分解を受ける場合、残存ポリマーは分解前と同じ分子量を有することが知られている。これは、ポリマーを分解する酵素によりポリマーから水溶性であるオリゴマーが切り出され、水溶性オリゴマーが微生物により分解・資化されるために分解前後のポリマー分子量に変化がないと説明されている。従って、*ata*-P(3HB) も上記の分解機構に従って分解・資化されたと考えられる。

詳細に Fig. 5.12 における分解前後の SEC チャートと比較すると、分解反応によりサンプルピークの低分子量側が減少し、サンプルピーク全体が高分子量側に若干移行したことが明らかになった。これは、低分子量のポリマー鎖の方が高分子量のそれよりも微生物が分泌する酵素により加水分解を受けやすいためと考えられ、*ata*-P(3HB) の生分解性は分子量に依存することが示唆された。

非天然型 P(3HB) の生分解性に関する報告はなく、本研究において確認された生分解に関与する酵素に関しては未知である。しかしながら、自然環境中で脂肪族ポリエステルを分解する酵素として P(3HB) 分解酵素とリパーゼが挙げられているため、今回確認された分解反応もいずれかの酵素により進行したと考えられる。

P(3HB) 分解酵素がポリマーを分解する際には酵素が吸着する結晶領域をポリマーが有していることが条件とされている。しかし、今回の結果より、完全非結晶の *ata*-P(3HB) が自然環境中の微生物により分解することが明らかになった。従って、このような完全非結晶ポリマーを分解する酵素の研究は、生分解性高分子材料を設計する上で重要な知見を与えると考えられる。その際に、本研究で用いた生分解性測定法のように、生分解過程の培養液を採取できる方法は有効であるため、今後更なる研究が進行することを期待する。

## (2)poly(butylene succinate-co-butylene adipate) の生分解試験結果

本研究で *ata*-P(3HB) の生分解性測定に用いたポリマー薄膜が他のポリマーの生分解性試験に対しても有効であるかを検証するために、良好な生分解性が報告されている poly(butylene succinate-co-butylene adipate) を参照試料として用い、生分解性試験を行った。poly(butylene succinate-co-butylene adipate) は粉体サンプルの調製も可能であるが、ここでは塊状サンプルとポリマー薄膜サンプルの両者を試料とすることで比較検討を行った。塊状サンプルを用いた場合の結果を Table 5.6 に、ポリマー薄膜を用いた際の結果を Table 5.7 に示した。また、それぞれの生分解曲線を Fig. 5.13 及び 5.14 に示した。なお、塊状サンプルを試料とした際、同じ重量のサンプルをはかり取ることが不可能だったため、二つのフラスコで ThOD が異なった。そのため、Table 5.6 には参照物質であるアニリンの BOD 値は記さず、生分解曲線を Fig. 5.13 に記した。また、Fig. 5.13 における poly(butylene succinate-co-butylene adipate) の生分解曲線は二つのフラスコの平均値を用いて作成した。

Table 5.6: BOD of P(BS-co-BA). (block shape)

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	$F_{T1}^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio-degradation of $F_{T1}$ (%)	$F_{T2}^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio-degradation of $F_{T2}$ (%)
1	0.5	0	0	0	0
2	2.0	0	0	0	0
3	1.5	1	0	1	0
4	1.5	0	0	0	0
5	0.5	3	1.5	1	0.3
6	—	—	—	—	—
7	1.5	4	1.5	3	0.9
8	2.0	6	2.5	6	2.5
9	—	—	—	—	—
10	3.5	7	2.1	7	2.2
11	4.5	9	2.8	9	2.8
12	2.0	9	4.3	10	5.1
13	2.5	10	4.6	12	6.0
14	2.5	10	4.6	12	6.0

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	$F_{T1}^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_{T1}$ (%)	$F_{T2}^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_{T2}$ (%)
15	2.5	10	4.6	12	6.0
16	1.5	9	4.6	12	6.6
17	2.5	12	5.8	15	7.9
18	2.5	14	7.1	15	7.9
19	2.5	14	7.1	17	9.2
20	2.5	14	7.1	17	9.2
21	1.5	14	7.7	17	9.8
22	—	—	—	—	—
23	3.5	17	8.3	20	10.4
24	3.5	18	8.9	21	11.1
25	2.0	17	9.2	18	10.1

<sup>a)</sup> : *ThOD* of  $F_{T1}$ (P(BS-co-BA)) was 162.97 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of  $F_{T2}$ (P(BS-co-BA)) was 158.05 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

Table 5.7: BOD of P(BS-co-BA). (polymer thin film)

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	$F_T^{b),c)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	0	0	0	9	4.5
2	0	0	0	12	6.0
3	0	44.0	27.0	12	6.0
4	0	63.5	38.9	15	7.5
5	0	70.0	42.9	15	7.5
6	0	75.0	46.0	15	7.5
7	5.0	87.0	50.2	21	8.0
8	4.0	93.0	54.5	24	10.0
9	1.0	90.5	54.8	32	15.5
10	—	—	—	—	—

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$	Average of $F_C^{a)}$	Bio-degradation of $F_C$ (%)	$F_T^{b),c)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio-degradation of $F_T$ (%)
11	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—
14	6.5	106	61.0	71	32.3
15	6.5	106	61.0	75	34.3
16	8.5	108	61.0	81	36.3
17	6.5	106	61.0	85	39.3
18	6.5	106	61.0	88	40.8
19	14.0	114	61.3	94	40.0
20	17.0	112	58.2	97	40.0
21	18.0	112	57.6	100	41.0
22	17.0	110	57.0	103	43.0
23	9.5	111	62.2	102	46.3
24	15.0	115	61.3	111	48.0
25	17.5	118	61.3	114	48.3
26	16.0	116	61.3	119	51.5
27	17.0	117	61.3	123	53.0
28	15.0	114	60.7	127	56.0

a) : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of  $F_C$  was 163.2 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

b) : This  $F_T$  was performed by one flask.

c) : *ThOD* of  $F_T$ (P(BS-*co*-BA)) was 200.0 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

塊状サンプルを用いた際の BOD 試験は参照物質であるアニリンの生分解率が最終的に 60 %に満たなかったため、参考値として考えた。

試験日が異なるため、本来 Fig. 5.13 と 5.14 の単純な比較は行えないが、25 日後の生分解率において明らかな差が生じた。すなわち、Fig. 5.13 では 25 日後における poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) の生分解率が 10 % 不足であったのに対して、Fig. 5.14 では 28 日後の生分解率が 55 % を超える結果となった。

このポリマー薄膜を試料として用いた際に良好な生分解性が確認されたのは *ata*-P(3HB)

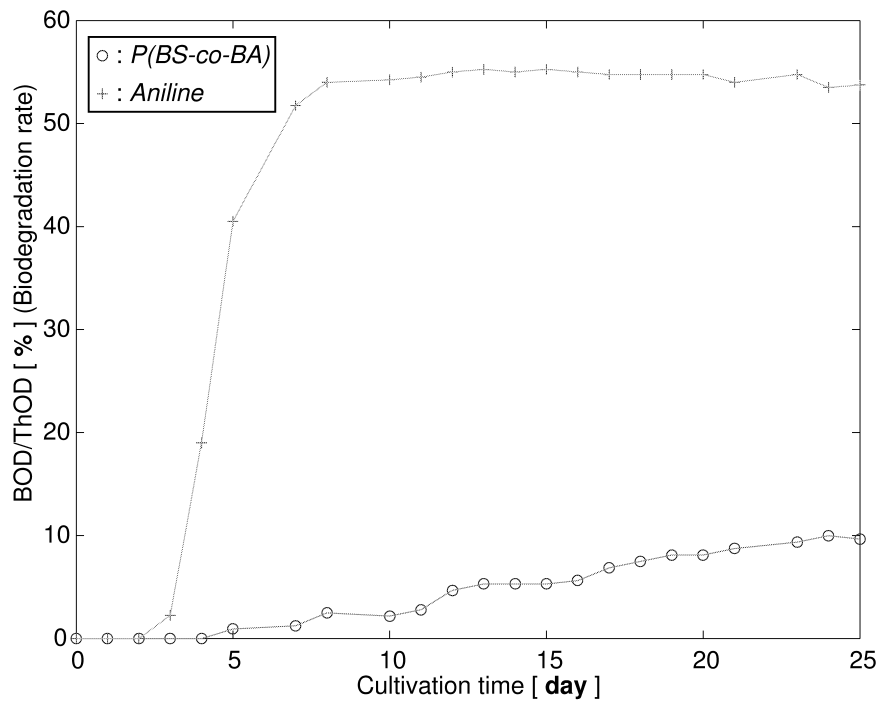


Fig. 5.13: Biodegradation curve of P(BS-co-BA). (block shape)

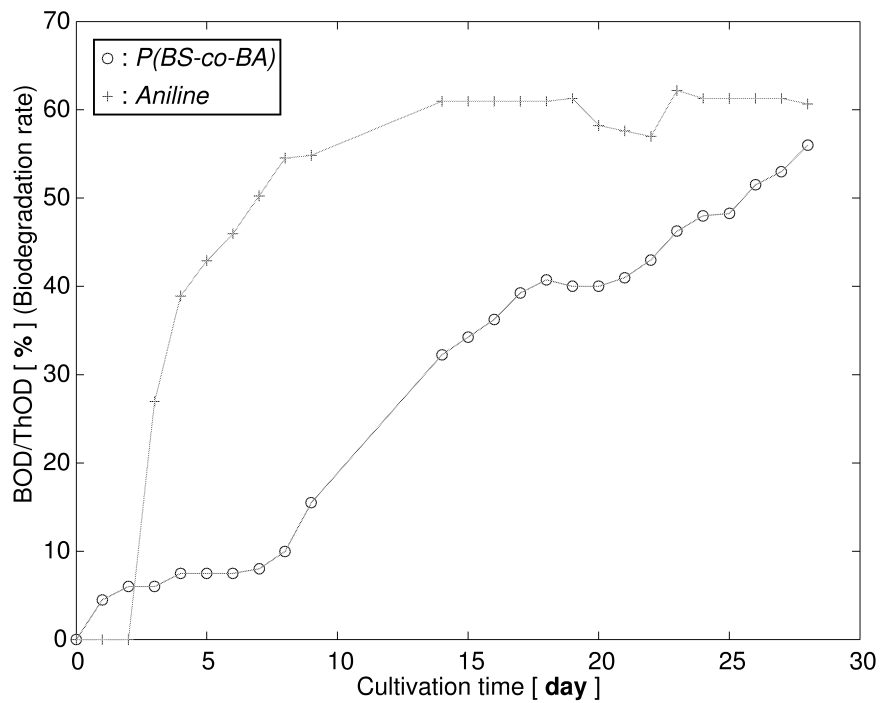


Fig. 5.14: Biodegradation curve of P(BS-co-BA). (thin film)

を試料として用いた場合と同様であることから、水に不溶である脂肪族ポリエステルの培養液を用いた生分解試験では、ポリマー薄膜を試料として用いることの有用性が確認された。

本研究で開発した生分解性試験法は標準規格である JIS K6950 に則っており、短時間で水に不溶である高分子材料の生分解性を評価する上で有用であると考えられる。また、用いた BOD 測定装置は単純な構造である上に、各フラスコの培養期間を任意に設定できるため、培養液中の全有機炭素量 (TOC) の経時変化及び残存ポリマー分子量の経時変化が測定可能である。従って、生分解試験だけでなく、生分解機構の解析にも用いることができると考えられる。天然型 P(3HB) を除き、生分解性脂肪族ポリエステルの詳細な生分解機構には未だに不明瞭な領域が多い。本方法が生分解機構に関する詳細な研究を行う際に利用されることを期待する。



**(3)P((R)-3HB) の生分解試験結果**

これまでの検討より、水に不溶である高分子材料の生分解測定において、フラスコ内に形成した試料のポリマー薄膜がサンプル形状として優れていることが示された。そこで、ここでは JIS K6950 でも参照物質として取り上げられているポリ ((R)-3-ヒドロキシ酪酸) の生分解試験においてサンプル形状をポリマー薄膜とすることで試験の正当性を評価した。

結果を Table 5.8 に示し、生分解曲線を Fig. 5.15 に示した。

Table 5.8: BOD of P((R)-3HB).

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	4.5	0	0	1.5	0
2	9.5	6.5	0	12.5	1.5
3	10.0	20.5	6.5	38.0	14.0
4	11.0	75.0	39.3	56.5	22.8
5	5.0	72.0	41.2	66.0	30.5
6	8.0	81.5	45.2	83.0	37.5
7	12.0	93.0	49.8	101	44.5
8	13.0	100	53.5	112	49.3
9	6.0	91.0	52.2	118	56.0
10	6.0	91.5	52.6	125	59.3
11	6.0	94.5	54.4	133	63.3
12	8.0	98.0	55.3	139	65.3
13	12.5	109	59.0	149	68.3
14	12.5	109	59.0	151	69.0
15	12.5	109	59.0	153	70.0
16	12.5	109	59.0	156	71.8
17	16.0	115	60.8	163	73.5
18	16.5	115	60.5	167	75.0
19	16.0	115	60.5	170	76.8
20	14.5	113	60.5	170	77.8
21	17.0	117	61.5	175	79.0

continues to next page

continues from previous page

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
22	19.5	125	64.5	178	79.3
23	18.0	117	60.5	180	80.8
24	18.5	117	60.2	182	81.5
25	21.5	120	60.5	185	81.5
26	18.5	119	61.5	185	83.0
27	19.0	119	61.2	186	83.3
28	24.0	128	63.9	192	83.8
29	26.0	131	64.5	189	81.5
30	24.0	129	64.2	188	81.8

a) : Aniline was used as the reference material.  $ThOD$  of  $F_C$  was 162.7 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

b) :  $ThOD$  of  $F_T((R)\text{-}P(3HB))$  was 200.0 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

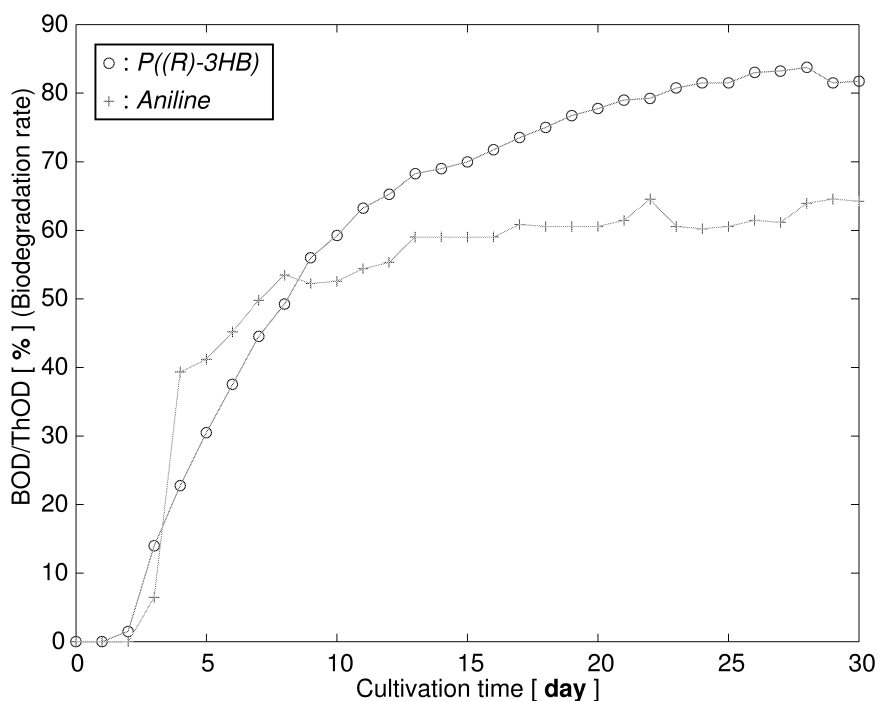


Fig. 5.15: Biodegradation curve of poly((R)-3-hydroxybutanoate).

以上の結果より、10日間程度でP((R)-3HB)の生分解率が60%に達することが示され、ポリマー薄膜をサンプル形状とした生分解試験の正当性が示された。

結晶性高分子材料の生分解では、試料の結晶化度が分解反応に影響を与えることが知られている。これは、P((R)-3HB)分解酵素が高分子材料の結晶領域に吸着するためでもあるが、リパーゼといったP((R)-3HB)分解酵素以外の加水分解酵素が非晶領域しか分解できないことにも起因する。

従って、JIS K6950には特記されていないが、試料の初期結晶化度の違いが生分解過程に大きな影響を与える可能性がある。また、培養液を用いた生分解試験では系内に水が多量に存在し、この水が試料に与える影響も無視することはできない。水は一種の可塑剤のような役割を持ち、長期間にわたる生分解過程の中で試料の結晶化度を上昇させるとも言われている。

本研究で開発した生分解試験法では試料の結晶化度を制御することが困難であることから、上記の問題点を解決する方法には適していないと考えられる。しかし、P((R)-3HB)を参照物質とすることで、10日間程度で調製した培養液の状態を知ることができ、また、粉体調製が不可能な高分子材料に対しても有効である本生分解試験法は、新規に合成した高分子材料の生分解を実験室レベルで検証する方法として適していると考えられる。

## (4) 環状型 3HB オリゴマーの生分解試験結果

これまでの検討より、水に不溶である脂肪族ポリエステルについても薄膜をフラスコ内に形成させることにより、培養液を用いた生分解試験が行えることが示された。

そこで、第3及び4章にて合成した環状型 3HB オリゴマーについてもフラスコ内に薄膜を形成させることにより、生分解試験を行った。環状型 3HB オリゴマーは水に不溶であるが、クロロホルムに可溶でありフラスコ内に薄膜を形成するに適した素材である。また既に、構成するモノマーについては生分解試験を行い、立体化学に影響されずに良好に生分解されることを確認している。

結果を Table 5.9 に示し、生分解曲線を Fig. 5.16 に示した。

Table 5.9: BOD of cyclic 3HB oligomer.

days	Average of $F_B$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of $F_C^{a)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_C$ (%)	Average of $F_T^{b)}$ [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of $F_T$ (%)
1	4.5	0	0	12.0	3.8
2	9.5	6.5	0	19.5	5.0
3	10.0	20.5	6.5	32.5	11.3
4	11.0	75.0	39.3	43.5	16.3
5	5.0	72.0	41.2	53.0	24.0
6	8.0	81.5	45.2	65.0	28.5
7	12.0	93.0	49.8	73.5	30.8
8	13.0	100	53.5	80.5	33.8
9	6.0	91.0	52.2	88.5	41.3
10	6.0	91.5	52.6	96.0	45.0
11	6.0	94.5	54.4	101	47.3
12	8.0	98.0	55.3	105	48.3
13	12.5	109	59.0	109	48.3
14	12.5	109	59.0	112	49.5
15	12.5	109	59.0	114	50.5
16	12.5	109	59.0	117	52.3
17	16.0	115	60.8	125	54.5
18	16.5	115	60.5	127	55.3

*continues to next page*

continues from previous page

days	Average of F <sub>B</sub> [mgO <sub>2</sub> /L]	Average of F <sub>C</sub> <sup>a)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of F <sub>C</sub> (%)	Average of F <sub>T</sub> <sup>b)</sup> [mgO <sub>2</sub> /L]	Bio- degradation of F <sub>T</sub> (%)
19	16.0	115	60.5	132	57.8
20	14.5	113	60.5	131	58.3
21	17.0	117	61.5	140	61.3
22	19.5	125	64.5	142	61.3
23	18.0	117	60.5	143	62.5
24	18.5	117	60.2	147	64.0
25	21.5	120	60.5	147	62.8
26	18.5	119	61.5	151	66.3
27	19.0	119	61.2	153	66.8
28	24.0	128	63.9	154	64.8
29	26.0	131	64.5	156	65.0
30	24.0	129	64.2	158	67.0

<sup>a)</sup> : Aniline was used as the reference material. *ThOD* of F<sub>C</sub> was 162.7 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

<sup>b)</sup> : *ThOD* of F<sub>T</sub>(Cyclic 3HB oligomer) was 200.0 mgO<sub>2</sub>/L at this test.

以上の結果より、水に不溶である環状 3HB オリゴマーの生分解率は 20 日程度で 60 % に達することから環状 3HB オリゴマーが優れた生分解性を有することが明らかになった。従って、本研究で行ったポリ (3-ヒドロキシブタン酸) の環状オリゴマーへの変換が生分解性を低下させていないことが明らかになった。従って、環状オリゴマー化プロセスの過程で環状オリゴマーが自然環境中に流出してしまった場合でも、環状オリゴマーが自然環境に負荷を与えずに生分解することが示された。

同時に、本研究で開発した薄膜試料を用いた培養液による生分解試験は水に不溶の高分子材料のみならず、水に不溶のオリゴマーについても有効であることが示された。また、ポリ (3-ヒドロキシブタン酸) については同じように水に不溶であっても、環状オリゴマーの生分解性はポリマーと比較して著しく高いことが明らかになった。

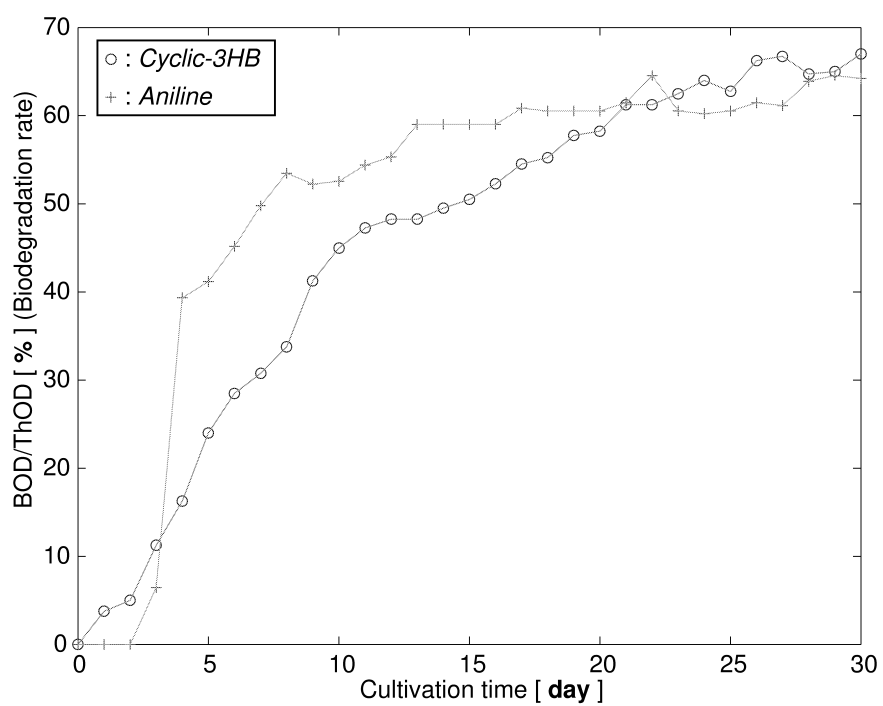


Fig. 5.16: Biodegradation curve of cyclic 3HB oligomer.

## 5.4 総括

本章における検討結果を以下のように総括した。

1. 非天然型 P(3HB) を構成するモノマーの生分解試験を行った結果、3-ヒドロキシブタン酸は立体化学に依存せずに良好に生分解することが明らかになった。
2. JIS K 6950: 2000 (ISO 14851 : 1999) プラスチック-水系培養液中の好氣的究極生分解度の求め方 – 閉鎖呼吸計を用いる酸素消費量の測定による方法に準拠した生分解試験を *ata*-P(3HB) に対して行った結果、サンプル形状としてフラスコ内に形成した薄膜が適していることが明らかになった。
3. *ata*-P(3HB) のポリマー薄膜を用いた生分解試験の結果、28 日間の培養で生分解率が 25 % を超え、*ata*-P(3HB) が本質的に生分解性を有することが示された。また、28 日後に残存した試料の SEC による分子量解析の結果、分解前の試料と比較して大きな違いはなかったが、ポリマーピークの低分子量側が高分子量側に比べて小さくなった。従って、同様に水に不溶であっても低い分子量のポリマーの方が生分解を受けやすいと考えられた。
4. poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) を試料に用いて生分解試験におけるサンプル形状を検討した結果、*ata*-P(3HB) を試料とした場合と同様、ポリマー薄膜をサンプル形状とした際に良好な生分解が確認された。また、JIS K 6950: 2000 (ISO 14851 : 1999) において参照物質として挙げられているポリ ((*R*)-3-ヒドロキシ酪酸) についてもポリマー薄膜をサンプル形状として生分解試験を行った結果、10 日間程度で生分解率が 60 % に達することが明らかになり、調製した培養液の状態を知る上でもポリマー薄膜をサンプル形状とすることが生分解試験に適していることを明らかにした。
5. 水に不溶である環状 3HB オリゴマーについても薄膜をフラスコ内に形成させることで生分解試験を行った。その結果、20 日間程度で生分解率が 60 % に達し、易分解性であることが示された。従って、第 3 及び 4 章で開発した脂肪族ポリエステル環状オリゴマー化を行う上で、プロセス過程で環状オリゴマーが自然環境中に放出された場合でも環境に負荷を与えずに迅速に生分解されることが明らかになった。





## 第6章

### 結論

近年、高分子材料に起因する様々な環境問題を解決するため、生分解性高分子材料の開発が注目を集めている。一言に生分解性高分子材料の開発といっても様々なアプローチがある。新規生分解性高分子材料の合成、微生物を用いた効率的な生分解性高分子の生合成、生分解性高分子材料の高機能化、生分解機構の解明や生分解性高分子分解酵素に関する研究が挙げられる。

本論文では、生分解性高分子材料の環境低負荷なケミカルリサイクル法の開発を目指して、生分解性高分子の合成と分解の触媒に酵素を用い、特に反応機構の詳細を検討した。本研究で行った検討により見出したことを以下のようにまとめた。

#### 1. 酵素触媒重合における反応機構 (第2章)

$\beta$ -ブチロラク톤をモノマーに用いて、酵素触媒開環重合による非天然型ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)(P3HB)の合成について検討を行った。特に本酵素触媒重合で得られるポリマー中に著量含まれる環状型構造体に注目し、その生成機構から酵素触媒重合機構を詳細に検討した。

はじめに、 $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS 解析から存在が示された環状型構造体を重合混合物から分別する検討を、超臨界二酸化炭素クロマトグラフィー (SFC) を用いて行った。種々検討を行った結果、SFC を用いることで重合混合物を構造体及び分子量別に分別できることを見出した。構造体及び分子量別に分別したフラクションを  $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS 解析し、 $\beta$ -ブチロラク톤の酵素触媒重合で得られたポリマー中には環状型、水酸基末端型及びクロトネート型構造を有する3種類のポリマーが含まれていることを見出した。また、 $^1\text{H-NMR}$  及び MALDI-TOF MS 解析で得られるスペクトル積分値を用いた各組成比の計算方法を考案した。

さらに、SFC を用いて単一分子量に分別したオリゴマーに再度酵素を作用させる検討を行い、酵素がオリゴマーを基質として認識し、広い分子領域に渡って加水分解及びエステ

ル交換反応を引き起こすことを見出した。この結果より、従来提唱されていたラクトン類の酵素触媒重合機構に、酵素と重合系内のオリゴマーとの相互作用を加えた新しい重合機構を提唱した。

残存金属触媒を含まない高分子材料を合成するためには、生体触媒を積極的に利用することが必要だと考えられる。今後、重合活性の高い酵素が開発され、得られるポリマーの高分子量化が図られることを期待する。

## 2. 酵素触媒を利用した生分解性高分子の環状オリゴマー化 (第3, 4章)

自然環境中で微生物により分解される生分解性高分子材料であっても、できる限りリサイクルすべきである。リサイクルの中でも、循環型社会の確立や二酸化炭素排出量の削減を目指した場合、高分子材料を原料へ化学的に変換するケミカルリサイクルが望まれる。そこで、第2章で見出した、酵素がポリマー鎖をも基質として認識できる触媒能を、生分解性脂肪族ポリエステルの環状オリゴマー化に利用する検討を行った。

はじめに、2種類 (*syndiotactic*, *atactic*) の非天然型 P(3HB) を化学合成し、基質ポリマーに用いて酵素による分解反応を検討した。分解に用いる有機溶媒の種類を親水性溶媒から疎水性溶媒に変化させることで、得られるオリゴマーの構造が水酸基末端を有する直鎖型から環状型へ変化した。分解により得られたオリゴマーの再重合性を考慮すると環状型が望ましいため、分解生成物中の環状型組成比を上昇させる検討を行った結果、トルエンやキシレンといった基質ポリマーの良溶媒であると同時に疎水性の高い溶媒中、ポリマー濃度を低下させた際に環状型組成比が上昇することを見出した。また、反応温度は 40 °C であっても分解反応は迅速に進行したことから、環境調和型分解反応系を開発できたといえる。

そこで、環状オリゴマー形成機構について詳細な検討を行った。すなわち、SFC を用いて 3~10 量体程度の単一分子量を有する環状型及び水酸基末端型オリゴマーを調製し、ポリマーの分解条件にさらすことで、分解反応における環化機構を検討した。単一分子量の水酸基末端型オリゴマーをポリマーの分解条件にさらした結果、環状型形成において基質オリゴマーサイズの保持率が基質オリゴマーサイズに依存することが明らかになった。すなわち、7 量体よりも大きな水酸基末端型オリゴマーの環化反応では、ポリマーの分解反応で主生成物である環状 7 量体が著量生成することが明らかになり、環化反応の際に酵素がアシル鎖として 3-ヒドロキシ酪酸の 7 量体を良好に認識することを見出した。また、単一分子量の環状型オリゴマーをポリマーの分解条件にさらしても、基質オリゴマーサイズによらず反応前後でオリゴマーサイズに変化は生じなかった。この結果より、環化機構がアシル酵素中間体内における分子内エステル交換反応により進行することを見出した。

得られた環状オリゴマーの再重合反応を触媒に酵素及び金属触媒を用いて検討した。分

解反応に用いた酵素を触媒に用いた再重合反応では、極少量の有機溶媒の添加により得られるポリマー分子量低下が確認され、有機溶媒中における本酵素と P(3HB) の組み合わせは、平衡が分解反応側に大きく傾いていることが明らかになった。触媒に高分子合成で最も一般的な触媒であるオクタン酸スズを用いた際、再重合反応は良好に進行した。今後、重合活性の高い酵素の開発や環境低負荷な金属触媒の開発が期待される。また、分解反応に用いた酵素を触媒とした環状型オリゴマーのエステル化反応を検討した。すなわち、SFC を用いて単一分子量化した環状オリゴマーの *n*-ヘキサノールを含む有機溶媒中での酵素触媒エステル化を行った結果、得られたエステルのアシル側であるオリゴマーのサイズは基質オリゴマーのサイズから全く変化しなかった。これらの結果より、本分解反応により得られた環状型オリゴマーは再重合反応の基質や新規材料の合成中間体などとして有用であることを見出した。

本分解反応が要する有機溶媒量及び酵素量の削減を目的として、固定化酵素を充填した酵素カラムを作製し、これにポリマーのトルエン溶液を通過させて分解反応を行う連続分解反応の開発を行った。基質ポリマーに P(3HB)、ポリ ( $\epsilon$ -カプロラクトン)(PCL) 及びポリ (ブチレンアジペート)(PBA) を用いて検討を行った結果、いずれのポリマーも酵素カラムを通過する間に分解し、環状型オリゴマーへ効率よく変換されることを見出した。また、この連続分解装置の移動相に超臨界二酸化炭素とトルエンの混合溶媒を用いる検討を行った結果、超臨界二酸化炭素組成比の上昇に伴って酵素カラムのポリマー分解活性が増加することが明らかになり、超臨界二酸化炭素と酵素カラムの利用により、目的であった本分解反応が要する有機溶媒量及び酵素量の削減を達成した。

### 3. 生分解性評価法の開発 (第5章)

生分解性高分子材料は自然環境中である程度の期間を経て完全分解される。しかし、新規生分解性高分子材料の開発などにおいては、短期間で生分解挙動を把握する必要がある。そこで、本研究では JIS K6950 に準拠した活性汚泥を用いる高分子材料の生分解性評価を検討した。生分解性評価は生物化学酸素要求量 (BOD) を測定することに行った。高分子材料の生分解速度には材料形状が大きな影響を与える。本研究では塊状サンプルとポリマー薄膜を試料としたときの生分解挙動を検討し、ポリマー薄膜を試料とした際に短期間で良好な生分解が生じることを見出した。JIS K6950 内で参照試料として記されている天然型 P(3HB) のポリマー薄膜を試料とした場合、10 日程度で生分解率が 60 %に達し、調製した培養液の状態を知る上でもポリマー薄膜が生分解評価に優れていることを見出した。

また、ここで開発した生分解性評価方法は培養液を用いていることから、培養液の全有機炭素濃度の測定が可能である。したがって、生分解性評価のみならず全有機炭素濃度変化から詳細な生分解機構の解析にも利用が期待され、さらに、高分子材料資化菌の単離の

際にも短期間で資化菌の増殖が期待される。

生分解性高分子材料の市場は、まさに動き始めたばかりである。2001年11月に米国 Cargill Dow 社が年産14万トンのポリ乳酸プラントを始動し、生分解性高分子材料の市場が拡大し始めた。Cargill Dow 社はトウモロコシを原料に、乳酸発酵にてポリ乳酸のモノマーである乳酸を効率よく得ている。このように化石資源に頼らず、再生可能資源を原料にした新しい化学産業の創製が求められていると思われる。なぜならば、化石資源から合成した生分解性高分子が自然環境中で分解して水と二酸化炭素になった場合、結局は二酸化炭素の排出量が原料に用いた化石資源を燃焼処理した場合と同等になってしまうからである。したがって、地上の二酸化炭素を固定化する再生可能資源を有効に利用し、さらにリサイクルすることが豊かな循環型社会を構築する上で必要だと考えられる。

生分解性高分子材料の生分解機構には未だ不明瞭な領域も多く残されている。生分解性高分子材料の高機能化はもちろんのこと、生分解に必要な最低条件などを明確にしていくことが、今後生分解性高分子材料が一般社会に深く浸透するために必要なことだと思われる。また、世界規模での食糧問題を考慮すると、再生可能資源を食糧資源以外から得る必要があると思われる。

最後に、本研究「**生体触媒による生分解性ポリエステルの合成とケミカルリサイクルに関する研究**」が生分解性高分子材料の高機能化や生分解機構の解明、さらには循環型社会構築において一翼を担うことを期待して結論を締めくくる。

## 付録 A

# マスマスペクトロメトリーについて

本研究における生成物の詳細な分子構造解析は質量分析に頼るところが大きい。そこで、ここでは、質量分析における基礎概念について丹羽著「最新のマスマスペクトロメトリー」<sup>182)</sup>の中から本研究に関連する部分をまとめた。

### A.1 質量分析の基礎概念

#### A.1.1 質量分析のしくみ

質量分析の原理は、試料をいろいろな方法でイオン化して、得られたイオンを質量/電荷 ( $m/z$ ) にしたがって分離し、各イオンの強度を測定する分析方法である。質量分析計の構成は、試料をイオン化し、生成したイオンを質量分析部方向に加速するイオン源、イオンを  $m/z$  にもとづいて分離する質量分析部および  $m/z$  により分離されたイオンを検出するイオン検出部からなる。また質量分析計は、ターボ分子ポンプまたは油拡散ポンプによってつねに高真空に維持されている。この高真空のため、イオン源から飛行したイオンは、ほかの気体分子との相互作用による散乱あるいは断片化されることなく検出される。そしてイオン検出器に到達したイオンは、増幅されたのち電気信号に変換されて、データ処理される。

たとえば、電子イオン化 (EI) では、70 eV の電子をガス状試料分子にイオン源内で衝突させる。高エネルギー電子と試料分子との衝突により、十分なエネルギーが試料分子に与えられると、試料分子から 1 個の電子が脱離 (正イオン) あるいは付加 (負イオン) して、もとの試料分子と同じ質量を有する分子イオン (molecular ion,  $M^+$  あるいは  $M^-$ ) が生成する。この分子イオンは、ラジカルイオンとして存在している。生成した分子イオンは、内部エネルギーが高いため化学結合の開裂が起き、原子または原子団が離脱して分解する。

このとき質量の大きなイオンから質量の小さなイオンに分解していく過程をフラグメンテーションといい、その結果生成したイオンをフラグメントイオンという。

### A.1.2 マススペクトルから得られる情報

マススペクトルとは、イオン化により生成したイオンの  $m/z$  を x 軸に、それに対するイオンの相対強度 (%) を y 軸に示したものをいう。マススペクトルにみられるイオンピークのうちで、イオン量が最も多いピークをベースピークといい、ほかのイオンピークはベースピークのイオン量を 100 % としたときの相対強度 (%) で表す。マススペクトルは試料分子それぞれに固有の情報が得られることから、分子の構造解析に用いられる。

### A.1.3 試料のイオン化法

分子を質量分析するためには、まず試料をイオン化させなければならない。イオン化することによって、電磁氣的相互作用を利用し、イオンを質量の違いによって分離することができる。いろいろなイオン化法があるが、対象化合物の分子量、極性、熱安定性、揮発性などの違いによってイオン化の効率が異なり、適当なイオン化法を選択する必要がある。ここでは、本研究に用いた MALDI 法、APCI 法及び ESI 法について簡単に説明する。

#### a) MALDI 法

Hillenkamp らによって開発されたマトリックスアシスティドレーザーデソープションイオン化 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) は、分子量  $10^5$  領域のタンパク質、あるいは分子量  $10^4$  領域の炭水化物、ポリヌクレオチドなどの高分子量物質をイオン化することができる。レーザーとしては、いろいろな波長 (UV 266, 337, 355 nm; IR 2.79, 2.94, 10.6  $\mu\text{m}$ ) とパルス寿命 (0.5 ~ 200 ns) を有するものが用いられている。このレーザーの波長により、マトリックスが選択される。波長 337 nm の  $\text{N}_2$  レーザーによる MALDI では、マトリックスとしてシナピン酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA)、2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ) 安息香酸 (HABA)、2-アミノ安息香酸、3-ヒドロキシピコリン酸などが用いられる。

このマトリックスとしてあげた物質は、次のような分析に用いられる。シナピン酸は、タンパク質やペプチドの分析に広く用いられている。DHBA は、ペプチド (分子量 2000 以下)、糖質、糖脂質、極性合成ポリマーの分析によく用いられる。HABA は、タンパク質、極性あるいは非極性の合成ポリマーの分析に用いられる。

試料とマトリックス溶液をモル比で ( $10^{-2}$  ~  $5 \times 10^{-4}$ ):1 に混合した後、混合溶液をターゲット上で乾固し結晶状態にする。パルスレーザー照射により大きなエネルギーがマト

リックス分子に与えられ、 $(M + H)^+$ 、 $(M + Na)^+$  などの試料由来イオンとマトリックス由来イオンが脱離する。微量のリン酸緩衝液、トリス緩衝液、グアニジン、SDS、 $NaN_3$  により試料が汚染されていても MALDI 分析が可能である。MALDI-飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) によりタンパク質の分子量が 0.05 % の誤差範囲で決定できる。

### b) APCI 法

大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 法とは、大気圧でコロナ放電によって行われるイオン化方式である。APCI は液体のイオン化法として、Horning らにより開発された。溶媒はコロナ放電によってイオン化され、生成した溶媒イオンは試料分子とイオン分子反応を起こし、試料分子のイオン化が起こる。その結果プロトン付加分子イオン  $(M + H)^+$ 、 $(M - H)^-$  を生成する。ドリフト電圧を変えることによりフラグメントイオンが生成するため、構造情報が得られる。

### c) ESI 法

Dole らによって開発され、Fenn らによって改良されたエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) 法は、 $(M + nH)^{n+}$  や  $(M - n)^{n-}$  などの多価イオンを生成させることができる。ESI を用いることにより分子量  $10^5$  領域のタンパク質の分子量を 0.01 % の誤差範囲で正確に測定することが可能になった。ESI は LC/MS や CZE/MS のイオン化としても用いられている。水またはメタノール/水 (本研究ではアセトニトリル/水) などに溶解した液体試料を、50 ~ 200  $\mu$ l/分の流速でキャピラリー先端を通して大気圧の ESI イオン源に噴霧する。溶出液の蒸発を促進するため窒素ガス (シースガスあるいはネプライザーガスという) とともに試料溶液を噴霧する。キャピラリー先端は高電圧 (正イオンの検出には、たとえば +5 ~ +6 kV) に印加されているため、先端からの溶出液は高度に荷電した微細な霧状の液滴となる。溶媒の蒸発により液滴が十分に小さくなると、電気的反発力が表面張力を上まわるので、液滴は一気に細分化され最後に溶質分子に電荷が移った状態になる。このようにして液相から気相への直接イオンの蒸発が行われ、細孔を通して質量分析部に導かれる。

ESI の利点は、

- 1) 高極性、不揮発性で、しかも高分子量物質をイオン化することができる。
- 2) 多価イオンを生成するため、質量分析計のもっている質量範囲がせまくても、高分子量物質を測定することができる。

ことがあげられる。とくに 2) については、イオンはその質量  $m$  で直接分離されるのではなく  $m/z$  で分離されるため、たとえば質量 10000 で電荷が 20 の場合、 $m/z = 10000/20 = 500$  にイオンピークが検出される。タンパク質などの大分子の ESI マススペクトルは、多くの多価イオンを示す特徴的なつり鐘状の分布をしている。この隣接するイオンは荷電数が 1

ずつ異なっている。(荷電数を知るすべとして、同位体のスペクトルとの間隔を測る方法がある。すなわち、 $z = 2$  であれば同位体とは  $m/z = 0.5$  のずれが生じる。)

#### A.1.4 MALDI-TOF MS の測定方法

1. **ポリマー溶液の調製** : 測定したいサンプル 1 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 200  $\mu\text{L}$  を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用いた。
2. **測定** : マトリックスとしての 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 10 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 900  $\mu\text{L}$  と HPLC 用メタノール 100  $\mu\text{L}$  の混合溶媒を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用い、これをマトリックス溶液とした。ついで、先に調製したポリマー溶液 10  $\mu\text{L}$  とマトリックス溶液 90  $\mu\text{L}$  を 0.5 mL エッペンチューブ内にて混合し、試料溶液とした。攪拌はタッチミキサーを用いた。試料溶液 10  $\mu\text{L}$  をターゲット上に塗布し、薄膜結晶を作成した。この時点においてターゲット上にサンプルが 20 pmol となるようにポリマー濃度は適宜調整した。

#### イオンピークの解析について

MALDI-TOF MS 測定では一般の質量分析法と同様に  $m/z$  を測定する。従ってイオン化、もしくはイオンの配位した形で測定される。また、非常に高感度な測定装置であるため、 $m/z = 1$  の違いをも検出することが出来る。従って、ポリマーサンプル測定において通常、合成系内中に多く含まれていたアルカリ金属が配位して検出される。多くの場合は  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$  もしくは  $\text{K}^+$  が配位して測定されるが、異なる金属が配位していると、構造解析を非常に困難にする。通常の測定では  $\text{Na}^+$  が配位したスペクトルが著量測定され、 $\text{Na}^+$  が付加したものとして解析を行う。しかしながら、触媒としての酵素量を増加させた結果に得られたポリマー中には  $\text{K}^+$  が多く含まれており、MALDI-TOF MS チャート上にも  $\text{K}^+$  付加体のスペクトルが著量測定される。 $\text{Na}^+$  付加体と  $\text{K}^+$  付加体の分子量の差は 16 であり、これが構造の違いに由来する分子量の違いなのかが明らかではなくなるため、解析を困難にする。そこで、解析を容易にするための配位した金属の交換処理の方法について以下に記す。

1. **ポリマー溶液の調製** : 測定したいサンプル 1 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 200  $\mu\text{L}$  を用いて溶解させた。攪拌はタッチミ



キサーを用いた。

2. **Li マトリックス溶液の調製** : 交換させる金属として、低分子量領域に配位力の強い Li を選択した場合は以下のように行った。すなわち、Lithium trifluoromethanesulfonate 10 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 900  $\mu\text{L}$  と HPLC 用メタノール 100  $\mu\text{L}$  の混合溶媒を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用いた。
3. **Na マトリックス溶液の調製** : 交換させる金属として、元来配位が強く生じている Na を選択した場合は以下のように行った。すなわち、Sodium iodide もしくは Sodium bromide 10 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 900  $\mu\text{L}$  と HPLC 用メタノール 100  $\mu\text{L}$  の混合溶媒を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用いた。
4. **K マトリックス溶液の調製** : 交換させる金属として、比較的高分子量領域に配位力の強い K を選択した場合は以下のように行った。すなわち、Potassium iodide もしくは Potassium bromide 10 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 900  $\mu\text{L}$  と HPLC 用メタノール 100  $\mu\text{L}$  の混合溶媒を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用いた。
5. **測定** : マトリックスとしての 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 10 mg を 1.5 mL エッペンチューブにはかり取り、HPLC 用クロロホルム 900  $\mu\text{L}$  と HPLC 用メタノール 100  $\mu\text{L}$  の混合溶媒を用いて溶解させた。攪拌はタッチミキサーを用い、これをマトリックス溶液とした。ついで、先に調製したポリマー溶液 10  $\mu\text{L}$ 、金属マトリックス溶液 5  $\mu\text{L}$  及びマトリックス溶液 90  $\mu\text{L}$  を 0.5 mL エッペンチューブ内にて混合し、試料溶液とした。攪拌はタッチミキサーを用いた。試料溶液 10  $\mu\text{L}$  をターゲット上に塗布し、薄膜結晶を作成した。この時点においてターゲット上にサンプルが 20 pmol となるようにポリマー濃度は適宜調整した。配位した金属のスペクトルのシフトを確認しながら適宜金属マトリックス溶液の添加量を調整した。

以上の操作により、金属の交換反応が生じるため構造解析は容易になる。しかしながら、試料がカルボキシル基を有している場合、カルボキシル基の水素と金属の交換反応までが起こることも確認された。測定条件の最適化が必要かと思われる。また、高分子の分解生成物中、PCL の分解生成物は MALDI-TOF MS による検出を行うことができなかった。マトリックスの変更で検出可能になるか明らかでないが、検討するべきであると思われる。

### A.1.5 APCI MS の測定方法

1. **ポリマー溶液の調製及び測定方法** : 測定したいサンプルを 0.05 %程度になるようにアセトニトリル/水に溶解させ、試料溶液とした。攪拌はタッチミキサーを用いた。この際、微量の混合物がスペクトルとして現れるため、溶液調製には細心の注意を払い、数度の共洗いをすることを勧める。調製した試料溶液をシリンジにてサンプルループを付したレオダインに注入し、質量分析計本体の調整が終了したら、試料を導入した。

#### イオンピークの解析について

APCI MS では、プロトン付加分子イオンのほかに水付加分子イオンが検出される。従って、本研究のように水の分子量の違いを求める構造解析方法に APCI MS を用いる際にはスペクトルを注意深く解析する必要がある。しかし、1  $m/z$  のずれを検出できるため、APCI MS も有効に使えることが本研究により明らかになった。従って、 $^1\text{H-NMR}$  と合わせて構造解析を行うことにより、MALDI-TOF MS にて検出できないような試料の構造解析に適する方法だと思われる。

# 本論文に関する研究発表

## 学術論文発表

1. "Lipase-Catalyzed Reaction of Molecularly Pure Linear and Cyclic Poly(3-hydroxybutanoate)s: Evidence of Cyclic Polymer Formation" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, Chemistry Letters, 2000, 5, 576-577
2. "Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -butyrolactone: End-Group Analysis of Poly(3-hydroxybutanoate) Using Supercritical Fluid Chromatography" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, Macromolecular Bioscience, 2001, 1, 171-177
3. "Lipase-Catalyzed Transformation of Unnatural Type Poly(3-hydroxybutanoate) into Reactive Cyclic Oligomer" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Naoko Yoshie, Yoshio Inoue, Shuichi Matsumura, Macromolecular Bioscience, 2002, 2, 88-94
4. "Enzymatic Degradation of Poly(*R,S*-3-hydroxybutanoate) to Cyclic Oligomers Under Continuous Flow" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, Green Chemistry, 2003, 5, 567-570

## 国際会議発表

1. "Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -Lactones" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, IP'99 IUPAC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IONIC POLYMERIZATION 於：京都国際会議場、1999. 7. 19 ~ 7. 23
2. "Novel Sustainable Chemical Recycling of Poly(3-hydroxy butanoate) Using Enzyme" Yasushi Osanai, Kimihito Nishikawa, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, 6th International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics & 9th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society at The Hyatt Regency Waikiki Hotel Honolulu, Hawaii USA, 2000. 12. 12 ~ 12. 16

3. "Lipase-Catalyzed Transformation of Unnatural Type Poly(3-hydroxy butanoate) into Reactive Cyclic Oligomer" Yasushi Osanai, Shuichi Matsumura 9th TIT-KAIST Joint Symposium on Macromolecular Science and Technology, 於：東京工業大学 百年記念館、2002. 1. 28 ~ 1. 29
4. "Lipase-Catalyzed Transformation of Unnatural Type Poly(3-hydroxybutanoate) Directed Towards Sustainable Chemical Recycling" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura 7th World Conference on BIODEGRADABLE POLYMERS & PLASTICS at GRAND HOTEL CONTINENTAL, Pisa Italy, 2002. 6. 4 ~ 6. 8
5. "Sustainable Chemical Recycling of Biodegradable Polyester Using Enzymatic Reaction" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura GSC Tokyo 2003 於：早稲田大学 国際会議場、2003. 3. 13 ~ 3. 15
6. "Enzymatic Degradation of Biodegradable Aliphatic Polyester Under Continuous Flow" Yasushi Osanai, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, 1st IUPAC International Conference on Bio-based Polymers at RIKEN, Saitama Japan, 2003. 11. 12 ~ 11.14

### 国内学会発表

1. 「 $\beta$ -ブチロラク톤の酵素触媒による開環重合」 小山内 靖、鈴木 陽一、戸嶋 一敦、松村 秀一、粕谷 健一、土肥 義治 第48回 高分子討論会 於：新潟大学 五十嵐キャンパス、1999. 10. 6 ~ 10. 8
2. 「 $\beta$ -ブチロラク톤の酵素触媒重合により得られた P(3HB) の分子構造」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第49回 高分子学会年次大会 於：名古屋国際会議場、2000. 5. 29 ~ 5. 31
3. 「循環型ケミカルリサイクルを指向した Poly(3-hydroxybutanoate) の酵素触媒による合成と分解」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第49回 高分子討論会 於：東北大学川内北キャンパス、2000. 9. 27 ~ 9. 29
4. 「生体触媒を利用した非天然型 P(3HB) の循環型ケミカルリサイクル」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第50回 高分子学会年次大会 於：大阪国際会議場、2001. 5. 23 ~ 5.25
5. 「非天然型 P(3HB) の循環型ケミカルリサイクルを指向した酵素による分解と再重合」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第50回 高分子討論会 於：早稲田大学 大久保キャンパス、2001. 9. 12 ~ 9. 14

6. 「バイオプロセスによる非天然型 P(3HB) の循環型ケミカルリサイクル」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 2001-2 エコマテリアル研究会 於：ホテルメゾン軽井沢、2001. 10. 18 ~ 10. 19
7. 「非天然型 poly(3-hydroxybutanoate) の酵素触媒分解反応における分解機構及び分解生成物を基質に用いた反応」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第 51 回 高分子学会年次大会 於：パシフィコ横浜、2002. 5. 29 ~ 5. 31
8. 「固定化酵素充填カラムを用いた生分解性ポリマーの連続分解」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第 52 回 高分子学会年次大会 於：名古屋国際会議場、2003. 5. 28 ~ 5. 30
9. 「酵素カラムを用いた脂肪族ポリエステルの連続分解による環状オリゴマーの合成」 小山内 靖、戸嶋 一敦、松村 秀一 第 52 回 高分子討論会 於：山口大学 吉田キャンパス、2003. 9. 24 ~ 9. 26

### その他論文発表

1. "Enzymatic Hydrolysis of Chemosynthesized Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) by Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp. TP4 and *Ralstonia pickettii* T1" Yi Wang, Yasuhide Inagawa, Yasushi Osanai, Ken-ichi Kasuya, Terumi Saito, Shuichi Matsumura, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue, *Biomacromolecules*, 2002, 3, 894-898
2. "Phase-Separation Enhanced Enzymatic Degradation of Atactic Poly(*R,S*-3-hydroxy butyrate) in the Blends with Poly(methyl methacrylate)" Yang-Ho Na, Yong He, Tetsuo Nishiwaki, Yasuhide Inagawa, Yasushi Osanai, Shuichi Matsumura, Terumi Saito, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue, *Polymer Degradation and Stability*, 2003, 79, 535-545
3. "Thermal and Infrared Spectroscopic Studies on Hydrogen-Bonding Interaction of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate)s with Natural Polyphenol Catechin" Bo Zhu, Jianchun Li, Yong He, Yasushi Osanai, Shuichi Matsumura and Yoshio Inoue, *Green Chemistry*, 2003, 5, 580-586
4. "Enzymatic Synthesis and Chemical Recycling of Green Polymers" Shuichi Matsumura, Yasushi Osanai, Yasuyuki Soeda, Kazunobu Toshima, *Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications*, submitted (invited)



## 参考文献

- [1] Hideki Abe, Isao Matsubara, Yoshiharu Doi, Yoji Hori, and Akio Yamaguchi. Physical Properties and Enzymic Degradability of Poly(3-hydroxybutyrate) Stereoisomers with Different Stereoregularities. *Macromolecules*, Vol. 27, No. 21, pp. 6018–6025, 1994.
- [2] Hideki Abe and Yoshiharu Doi. Enzymic and Environmental Degradation of Racemic Poly(3-hydroxybutyric acid)s with Different Stereoregularities. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 27, pp. 8683–8688, 1996.
- [3] Hideki Abe and Yoshiharu Doi. Side-Chain Effect of Second Monomer Units on Crystalline Morphology, Thermal Properties, and Enzymatic Degradability for Random Copolyesters of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with (*R*)-3-Hydroxyalkanoic Acids. *Biomacromolecules*, Vol. 3, No. 1, pp. 133–138, 2002.
- [4] Talal F. Al-Azemi and Kirpal S. Bisht. One-step synthesis of polycarbonates bearing pendant carboxyl groups by lipase-catalyzed ring-opening polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 40, No. 9, pp. 1267–1274, 2002.
- [5] Talal F. Al-Azemi, Leelakrishna Kondaveti, and Kirpal S. Bisht. Solventless Enantioselective Ring-Opening Polymerization of Substituted  $\epsilon$ -Caprolactones by Enzymatic Catalysis. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 9, pp. 3380–3386, 2002.
- [6] Paul Anastas and John Warner, editors. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford Univ Press, 1998.
- [7] Beat M. Bachmann and Dieter Seebach. Synthesis and structure of linear and cyclic oligomers of 3-hydroxybutanoic acid with specific sequences of (*R*)- and (*S*)-configurations. *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 81, No. 12, pp. 2430–2461, 1998.
- [8] Beat M. Bachmann and Dieter Seebach. Investigation of the Enzymic Cleavage of Diastereomeric Oligo(3-hydroxybutanoates) Containing Two to Eight HB

- Units. A Model for the Stereoselectivity of PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules*, Vol. 32, No. 6, pp. 1777–1784, 1999.
- [9] Kirpal S. Bisht and Richard A. Gross. The synthesis and polymerization of glycolipid-based monomers. *ACS Symposium Series (Biopolymers from Polysaccharides and Aggroproteins)*, Vol. 786, pp. 222–239, 2001.
- [10] Kirpal S. Bisht and Talal F. Al-Azemi. Biocatalytic synthesis of novel functional polycarbonates. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 156–171, 2003.
- [11] Kurt F. Brandstadt, John C. Saam, and Ajit Sharma. Enzyme-catalyzed direct polyesterification. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 141–155, 2003.
- [12] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, and L. Thim. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, Vol. 351, No. 6326, pp. 491–494, 1991.
- [13] A. Cao, Y. Arai, N. Yoshie K. Kasuya, Y. Doi, and Y. Inoue. Solid structure and biodegradation of the compositionally fractionated poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s. *Polymer*, Vol. 40, No. 24, pp. 6821–6830, 1999.
- [14] Amin Cao, Naoki Asakawa, Naoko Yoshie, and Yoshio Inoue. High-resolution solid-state  $^{13}\text{C}$  n.m.r. study on phase structure of the compositionally fractionated bacterial copolyester poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s. *Polymer*, Vol. 40, No. 12, pp. 3309–3322, 1999.
- [15] Apurva K. Chaudhary, Sanjay V. Kamat, Eric J. Beckman, Alan J. Russell, David Nurok, Robert M. Kleyle, and Paul Hajdu. Control of Subtilisin Substrate Specificity by Solvent Engineering in Organic Solvents and Supercritical Fluoroform. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 118, No. 51, pp. 12891–12901, 1996.
- [16] Apurva K. Chaudhary, Jesus Lopez, Eric J. Beckman, and Alan J. Russell. Biocatalytic Solvent-Free Polymerization To Produce High Molecular Weight Polyesters. *Biotechnology Progress*, Vol. 13, No. 3, pp. 318–325, 1997.
- [17] Armando Cordova, Tommy Iversen, Karl Hult, and Mats. Martinelle. Lipase-catalyzed formation of macrocycles by ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone. *Polymer*, Vol. 39, No. 25, pp. 6519–6524, 1998.



- [18] Armando Cordova, Tommy Iversen, and Karl Hult. Lipase-Catalyzed Synthesis of Methyl 6-O-Poly( $\epsilon$ -caprolactone)glycopyranosides. *Macromolecules*, Vol. 31, No. 4, pp. 1040–1045, 1998.
- [19] Armando Cordova, Anders Hult, Karl Hult, Henrik Ihre, Tommy Iversen, and Eva Malmstroem. Synthesis of a Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Monosubstituted First Generation Dendrimer by Lipase Catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 120, No. 51, pp. 13521–13522, 1998.
- [20] A. Cordova, T. Iversen, and K. Hult. Lipase-catalyzed formation of end-functionalized poly ( $\epsilon$ -caprolactone) by initiation and termination reactions. *Polymer*, Vol. 40, No. 24, pp. 6709–6721, 1999.
- [21] Armando Cordova. Synthesis of Amphiphilic Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Macromonomers by Lipase Catalysis. *Biomacromolecules*, Vol. 2, No. 4, pp. 1347–1351, 2001.
- [22] Fang Deng and Richard A. Gross. Enzyme-catalyzed lactone ring-opening polymerizations: regioselectivity and the preparation of a star-shaped polymer. *ACS Symposium Series (Biopolymers from Polysaccharides and Agropoteins)*, Vol. 786, pp. 195–221, 2001.
- [23] Andrzej Duda, Adam Kowalski, Stanislaw Penczek, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Kinetics of the Ring-Opening Polymerization of 6-, 7-, 9-, 12-, 13-, 16-, and 17-Membered Lactones. Comparison of Chemical and Enzymatic Polymerizations. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 11, pp. 4266–4270, 2002.
- [24] Ansil Dyal, Katja Loos, Mayumi Noto, Seung. W. Chang, Chiara Spagnoli, Kurikka V. P. M. Shafi, Abraham Ulman, Mary Cowman, and Richard A. Gross. Activity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on g-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Magnetic Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 125, No. 7, pp. 1684–1685, 2003.
- [25] Hiroki Ebata, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Lipase-catalyzed transformation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) into cyclic dicaprolactone. *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 4, pp. 511–514, 2000.
- [26] Hiroki Ebata, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. A strategy for increasing molecular weight of polyester by lipase-catalyzed polymerization. *Chemistry Letters*, No. 8, pp. 798–799, 2001.
- [27] Fabrizia Faustinella, Louis C. Smith, and Lawrence Chan. Functional topology of a surface loop shielding the catalytic center in lipoprotein lipase. *Biochem-*

- istry*, Vol. 31, No. 32, pp. 7219–7223, 1992.
- [28] Jun Feng, Feng He, and Renxi Zhuo. Polymerization of Trimethylene Carbonate with High Molecular Weight Catalyzed by Immobilized Lipase on Silica Microparticles. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 19, pp. 7175–7177, 2002.
- [29] Jun Feng, Renxi Zhuo, and Feng He. Enzymatic ring-opening copolymerization of trimethylene carbonate and ethylene ethyl phosphate. *Science in China, Series B: Chemistry*, Vol. 46, No. 2, pp. 160–167, 2003.
- [30] Jun Feng, Renxi Zhuo, Feng He, and Xuli Wang. Synthesis of functional polycarbonates by lipase-catalyzed ring-opening polymerization. *Macromolecular Symposia (2002 IUPAC World Polymer Congress)*, Vol. 195, pp. 237–240, 2003.
- [31] Yakai Feng, Doris Klee, and Hartwig Hoecker. Synthesis and characterization of a new ABA triblock copolymers with poly[3(*S*)-isobutylmorpholine-2,5-dione] and poly(ethylene oxide) blocks. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 200, No. 10, pp. 2276–2283, 1999.
- [32] Yakai Feng, Jens Knuefermann, Doris Klee, and Hartwig Hoecker. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of 3(*S*)-isopropylmorpholine-2,5-dione. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 20, No. 2, pp. 88–90, 1999.
- [33] Yakai Feng, Jens Knuefermann, Doris Klee, and Hartwig Hoecker. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of 3(*S*)-isopropylmorpholine-2,5-dione. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 200, No. 6, pp. 1506–1514, 1999.
- [34] Lino Ferreira, Maria H. Gil, Rui Carvalho, Carlos F. G. C. Geraldes, Dae-Yun Kim, and Jonathan S. Dordick. Biocatalytic Polytransesterification of Inulin with Divinyl adipate. *Chemistry of Materials*, Vol. 14, No. 10, pp. 4009–4011, 2002.
- [35] Maria Letizia Focarete, Mariastella Scandola, Dieter Jendrossek, Grazyna Adamus, Wanda Sikorska, and Marek Kowalczyk. Bioassimilation of atactic poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyrate] oligomers by selected bacterial strains. *Macromolecules*, Vol. 32, No. 15, pp. 4814–4818, 1999.
- [36] Maria Letizia Focarete, Massimo Gazzano, Mariastella Scandola, Ajay Kumar, and Richard A. Gross. Copolymers of  $\omega$ -pentadecalactone and trimethylene carbonate from lipase catalysis: influence of microstructure on solid-state properties. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 21, pp. 8066–8071, 2002.
- [37] Pawel Grochulski, Yunge Li, Joseph D. Schrag, Francois Bouthillier, Penny Smith, David Harrison, Byron Rubin, and Mirosław Cygler. Insights into inter-

- facial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 17, pp. 12843–12847, 1993.
- [38] Richard A. Gross, Christopher DeMello, Robert W. Lenz, Helmut Brandl, and R. Clinton Fuller. The biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, Vol. 22, No. 3, pp. 1106–1115, 1989.
- [39] Richard A. Gross, Gregory A. Birrer, Anne Marie Cromwick, Stephen A. Giannos, and Stephen P. McCarthy. *Polymers from biotechnology: bacterial polyesters and  $\gamma$ -poly(glutamic acid)*, pp. 200–213. Biotechnol. Polym. Technomic, 1993.
- [40] Richard A. Gross. *Bacterial polyesters and structural variability in microbial synthesis*, pp. 173–188. Biomed. Polym. Hanser, 1994.
- [41] Richard A. Gross, Jin Xu, Yuri Y. Svirkin, Lori A. Henderson, Kirpal S. Bisht, David L. Kaplan, and Graham Swift. Enzymes in organic media as catalysts for polyester synthesis. *Polymeric Materials Science and Engineering*, Vol. 74, pp. 67–68, 1996.
- [42] R. A. Gross, B. Kalra, and A. Kumar. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 55, No. 6, pp. 655–660, 2001.
- [43] Richard A. Gross, Ajay Kumar, and Bhanu Kalra. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chemical Reviews*, Vol. 101, No. 7, pp. 2097–2124, 2001.
- [44] Richard A. Gross and Bhanu Kalra. Biodegradable polymers for the environment. *Science*, Vol. 297, No. 5582, pp. 803–807, 2002.
- [45] Richard A. Gross and Bhanu Kalra. Biopolymers and the environment. Response. *Science*, Vol. 299, No. 5608, pp. 823–825, 2003.
- [46] S. Gryglewicz. Enzyme catalysed synthesis of some adipic esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 15, No. 1, 2001.
- [47] Zhi Wei Guo and Charles J. Sih. Enzymic synthesis of macrocyclic lactones. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 110, No. 6, pp. 1999–2001, 1988.
- [48] Shigeki Habaue, Momoko Asai, Masatake Morita, Yoshio Okamoto, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Chemospecific ring-opening polymerization of  $\alpha$ -methylene macrolides. *Polymer*, Vol. 44, No. 18, pp. 5195–5200, 2003.
- [49] F. He, R. X. Zhuo, L. J. Liu, D. B. Jin, J. Feng, and X. L. Wang. Immobilized lipase on porous silica beads: preparation and application for enzymatic ring-

- opening polymerization of cyclic phosphate. *Reactive & Functional Polymers*, Vol. 47, No. 2, pp. 153–158, 2001.
- [50] Feng He, Suming Li, Michel Vert, and Renxi Zhuo. Enzyme-catalyzed polymerization and degradation of copolymers prepared from  $\epsilon$ -caprolactone and poly(ethylene glycol). *Polymer*, Vol. 44, No. 18, pp. 5145–5151, 2003.
- [51] Feng He, Yingxia Wang, Jun Feng, Renxi Zhuo, and Xuli Wang. Synthesis of poly[(5-benzyloxy-trimethylene carbonate)-*co*-(5,5-dimethyl-trimethylene carbonate)] catalyzed by immobilized lipase on silica particles with different size. *Polymer*, Vol. 44, No. 11, pp. 3215–3219, 2003.
- [52] Yong He, Takashi Masuda, Amin Cao, Naoko Yoshie, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue. Thermal, crystallization, and biodegradation behavior of poly(3-hydroxybutyrate) blends with poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate) and poly(butylene succinate-*co*- $\epsilon$ -caprolactone). *Polymer Journal*, Vol. 31, No. 2, pp. 184–192, 1999.
- [53] Yong He, Xintao Shuai, Ken-ichi Kasuya, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue. Enzymatic Degradation of Atactic Poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) Induced by Amorphous Polymers and the Enzymatic Degradation Temperature Window of an Amorphous Polymer System. *Biomacromolecules*, Vol. 2, No. 3, pp. 1045–1051, 2001.
- [54] S. Hiki, M. Miyamoto, and Y. Kimura. Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [*R,S*] -poly(3-hydroxybutyrate) and its utilization to click copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer. *Polymer*, Vol. 41, No. 20, pp. 7369–7379, 2000.
- [55] Tomohiro Hiraishi, Takeshi Ohura, Shizue Ito, Ken-ichi Kasuya, and Yoshiharu Doi. Function of the Catalytic Domain of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 3, pp. 320–324, 2000.
- [56] Yoji Hori, Motoki Suzuki, Akio Yamaguchi, and Takao Nishishita. Ring-opening polymerization of optically active  $\beta$ -butyrolactone using distannoxane catalysts: synthesis of high-molecular-weight poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, Vol. 26, No. 20, pp. 5533–5534, 1993.
- [57] Yoji Hori and Toshimitsu Hagiwara. Ring-opening polymerization of  $\beta$ -butyrolactone catalyzed by distannoxane complexes: study of the mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 25, No. 1, pp. 237–245,

- 1999.
- [58] Yongmei Hu and Lu-Kwang Ju. Lipase-Mediated Deacetylation and Oligomerization of Lactonic Sophorolipids. *Biotechnology Progress*, Vol. 19, No. 2, pp. 303–311, 2003.
- [59] Makoto Iida, Shuji Hayase, and Takeo Araki. Carbon-13 NMR spectroscopy of poly( $\beta$ -substituted  $\beta$ -propiolactone)s. Tacticity recognition in 1,5-substituted polymer system and stereospecific contact of shift reagent. *Macromolecules*, Vol. 11, No. 3, pp. 490–493, 1978.
- [60] Shin Iwata, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Enzyme-catalyzed preparation of aliphatic polyesters containing thioester linkages. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 24, No. 7, pp. 467–471, 2003.
- [61] Zbigniew Jedlinski. Novel electron transfer polymerization processes with alkali metal supramolecular complex as catalyst. *Macromolecular Symposia*, Vol. 134, pp. 51–61, 1998.
- [62] Volker Joerres, Helmut Keul, and Hartwig Hoecker. Aminolysis of  $\alpha$ -hydroxy acid esters with  $\alpha$ -amino acid salts; first step in the synthesis of optically active 2,5-morpholinediones. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 199, No. 5, pp. 825–833, 1998.
- [63] Volker Joerres, Helmut Keul, and Hartwig Hoecker. Polymerization of (3*S*,6*S*)-3-isopropyl-6-methyl-2,5-morpholinedione with tin octoate and tin acetylacetonate. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 199, No. 5, pp. 835–843, 1998.
- [64] Motoaki Kamachi, Shiming Zhang, Steve Goodwin, and Robert W. Lenz. Enzymatic Polymerization and Characterization of New Poly(3-hydroxyalkanoate)s by a Bacterial Polymerase. *Macromolecules*, Vol. 34, No. 20, pp. 6889–6894, 2001.
- [65] Sanjay V. Kamat, Eric J. Beckman, and Alan J. Russell. Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluoroform. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 115, No. 19, pp. 8845–8846, 1993.
- [66] Sanjay V. Kamat, Eric J. Beckman, and Alan J. Russell. Enzyme activity in supercritical fluids. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 15, No. 1, pp. 41–71, 1995.
- [67] Sanjay Kamat, Glenn Critchley, Eric J. Beckman, and Alan J. Russell. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does

- carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 46, No. 6, pp. 610–620, 1995.
- [68] John E. Kemnitzer, Stephen P. McCarthy, and Richard A. Gross. Preparation of predominantly syndiotactic poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by the tributyltin methoxide catalyzed ring-opening polymerization of racemic  $\beta$ -butyrolactone. *Macromolecules*, Vol. 26, No. 6, pp. 1221–1229, 1993.
- [69] John E. Kemnitzer, Stephen P. McCarthy, and Richard A. Gross. Syndiospecific ring-opening polymerization of  $\beta$ -butyrolactone to form predominantly syndiotactic poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) using tin(IV) catalysts. *Macromolecules*, Vol. 26, No. 23, pp. 6143–6150, 1993.
- [70] Helmut Keul, Martin Melchior, Stephan Neffgen, Michael Gotsche, and Hartwig Hoecker. Well defined polymer structures by ionic ring-opening polymerization of cyclic monomers comprising the respective structure. *Macromolecular Symposia (International Symposium on Ionic Polymerization, 1995)*, Vol. 107, pp. 285–295, 1996.
- [71] Hirofumi Kikuchi, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Lipase-Catalyzed Enantioselective Copolymerization of Substituted Lactones to Optically Active Polyesters. *Macromolecules*, Vol. 33, No. 24, pp. 8971–8975, 2000.
- [72] Hirofumi Kikuchi, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of substituted lactones. *Polymer Journal*, Vol. 34, No. 11, pp. 835–840, 2002.
- [73] Dae-Yun Kim and Jonathan S. Dordick. Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 76, No. 3, pp. 200–206, 2001.
- [74] Alexander M. Klivanov. Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH*, Vol. 16, No. 6, pp. 354–359, 1986.
- [75] Dafna Knani, Arie L. Gutman, and David H. Kohn. Enzymic polyesterification in organic media. Enzyme-catalyzed synthesis of linear polyesters. I. Condensation polymerization of linear hydroxyester. II. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 31, No. 5, pp. 1221–1232, 1993.
- [76] Shiro Kobayashi and Hiroshi Uyama. *Biocatalytical routes to polymers.*, Vol. 20 of *Materials Science and Technology (Synthesis of Polymers)*, pp. 549–569. Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999.

- [77] Shiro Kobayashi, Hiroshi Uyama, and Shunsaku Kimura. Enzymatic polymerization. *Chemical Reviews (Washington, D. C.)*, Vol. 101, No. 12, pp. 3793–3818, 2001.
- [78] Shiro Kobayashi, Hiroshi Uyama, and Masashi Ohmae. Enzymatic polymerization for precision polymer synthesis. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 74, No. 4, pp. 613–635, 2001.
- [79] Shiro Kobayashi and Hiroshi Uyama. In vitro biosynthesis of polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Biopolyesters)*, Vol. 71, pp. 241–262, 2001.
- [80] Shiro Kobayashi and Hiroshi Uyama. *Enzymatic polymerization to polyesters.*, pp. 373–400. Biopolymers 3a. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002.
- [81] Shiro Kobayashi and Hiroshi Uyama. In vitro polyester synthesis via enzymatic polymerization. *Current Organic Chemistry*, Vol. 6, No. 2, pp. 209–222, 2002.
- [82] Shiro Kobayashi and Hiroshi Uyama. Enantioselective and regioselective polymerization with lipase catalysis to polyesters. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 128–140, 2003.
- [83] Reiko Kondo, Kazunobu Toshima, and Matsumura Shuichi. Lipase-Catalyzed Selective Transformation of Polycaprolactone into Cyclic Dicaprolactone and Its Repolymerization in Supercritical Carbon Dioxide. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 2, No. 6, pp. 267–271, 2002.
- [84] Ajay Kumar, Bhanu Kalra, Alex Dekhterman, and Richard A. Gross. Efficient Ring-Opening Polymerization and Copolymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone and  $\omega$ -Pentadecalactone Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Macromolecules*, Vol. 33, No. 17, pp. 6303–6309, 2000.
- [85] Ajay Kumar, R. A. Gross, and D. Jendrossek. Poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*: Catalysis of Esterifications in Organic Media. *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 65, No. 23, pp. 7800–7806, 2000.
- [86] Ajay Kumar and Richard A. Gross. *Candida antarctica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature. *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 1, pp. 133–138, 2000.
- [87] Ajay Kumar and Richard A. Gross. *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 122, No. 48, pp. 11767–11770, 2000.

- [88] Ajay Kumar, Karan Garg, and Richard A. Gross. Copolymerizations of  $\omega$ -Pentadecalactone and Trimethylene Carbonate by Chemical and Lipase Catalysis. *Macromolecules*, Vol. 34, No. 11, pp. 3527–3533, 2001.
- [89] Ajay Kumar, Richard A. Gross, Yunbing Wang, and Marc A. Hillmyer. Recognition by Lipases of  $\omega$ -Hydroxyl Macroinitiators for Diblock Copolymer Synthesis. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 20, pp. 7606–7611, 2002.
- [90] Ajay Kumar, Richard A. Gross, Yunbing Wang, and Marc A Hillmyer. Recognition by Lipases of  $\omega$ -Hydroxyl Macroinitiators for Diblock Copolymer Synthesis. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 20, pp. 7606–7611, 2002.
- [91] Ajay Kumar, Bhanu Kalra, and Richard A. Gross. Lipase-catalyzed polytransesterification reactions. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 172–186, 2003.
- [92] Rajesh Kumar, Najam A. Shakil, Ming-H. Chen, Virinder S. Parmar, Lynne A. Samuelson, Jayant Kumar, and Arthur C. Watterson. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of novel functionalized amphiphilic polymers. *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry*, Vol. 39, No. 10, pp. 1137–1149, 2002.
- [93] Rajesh Kumar and Richard A. Gross. Enzyme-catalyzed synthesis of well-defined macromers built around a sugar core. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 107–118, 2003.
- [94] Vijayendra Kumar, Virinder S. Parmar, Jayant Samuelson, Lynne A.; Kumar, and Ashok L. Cholli. Enzyme mediated oxidative polymerization of 4-hydroxybenzyl alcohol for optical applications. *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry*, Vol. 39, No. 10, pp. 1183–1193, 2002.
- [95] Piotr Kurcok, Zbigniew Jedlinski, and Marek Kowalczyk. Reactions of  $\beta$ -lactones with potassium alkoxides and their complexes with 18-crown-6 in aprotic solvents. *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 58, No. 16, pp. 4219–4220, 1993.
- [96] Piotr Kurcok, Marek Kowalczyk, and Zbigniew Jedlinski. Response to "On the Ambident Reactivity of  $\beta$ -Lactones in Their Reactions with Alcoholates Initiating Polymerization". *Macromolecules*, Vol. 27, No. 17, pp. 4833–4835, 1994.
- [97] Piotr Kurcok, Andrzej Matuszowicz, and Zbigniew Jedlinski. Anionic polymerization of  $\beta$ -lactones initiated with potassium hydride. A convenient route to



- polyester macromonomers. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 16, No. 3, pp. 201–206, 1995.
- [98] Piotr Kurcok, Marek Kowalczyk, Grazyna Adamus, Zbigniew Jedlinski, and Robert W Lenz. Degradability of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)s. Correlation with chemical microstructure. *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry*, No. 4, pp. 875–880, 1995.
- [99] Piotr Kurcok, Andrzej Matuszowicz, Zbigniew Jedlinski, Hans R. Kricheldorf, Philippe Dubois, and Robert Jerome. Substituent effect in anionic polymerization of  $\beta$ -lactones initiated by alkali metal alkoxides. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 16, No. 7, pp. 513–519, 1995.
- [100] Piotr Kurcok, Philippe Dubois, and Robert Jerome. Polymerization of  $\beta$ -butyrolactone initiated with  $\text{Al}(\text{i-PrO})_3$ . *Polymer International*, Vol. 41, No. 4, pp. 479–485, 1996.
- [101] Piotr Kurcok, Philippe Dubois, Wanda Sikorska, Zbigniew Jedlinski, and Robert Jerome. Macromolecular Engineering of Lactones and Lactides. 24. Controlled Synthesis of (*R,S*)- $\beta$ -Butyrolactone-*b*- $\epsilon$ -Caprolactone Block Copolymers by Anionic and Coordination Polymerization. *Macromolecules*, Vol. 30, No. 19, pp. 5591–5595, 1997.
- [102] Piotr Kurcok, Monika Smiga, and Zbigniew Jedlinski.  $\beta$ -Butyrolactone polymerization initiated with tetrabutylammonium carboxylates: a novel approach to biomimetic polyester synthesis. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 40, No. 13, pp. 2184–2189, 2002.
- [103] Thierry Lalot and Ernest Marechal. Enzyme-catalyzed polyester synthesis. *International Journal of Polymeric Materials*, Vol. 50, No. 3, pp. 267–286, 2001.
- [104] Arnaud Lavalette, Thierry Lalot, Maryvonne Brigodiot, and Ernest Marechal. Lipase-Catalyzed Synthesis of a Pure Macrocyclic Polyester from Dimethyl Terephthalate and Diethylene Glycol. *Biomacromolecules*, Vol. 3, No. 2, pp. 225–228, 2002.
- [105] Renee T. MacDonald, Satish K. Pulapura, Yuri Y. Svirkin, Richard A. Gross, David L. Kaplan, Joseph Akkara, Graham Swift, and Steven Wolk. Enzyme-Catalyzed  $\epsilon$ -Caprolactone Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules*, Vol. 28, No. 1, pp. 73–78, 1995.
- [106] Yasukatsu Maeda, Atsuyoshi Nakayama, Norioki Kawasaki, Kazuko Hayashi, Seiichi Aiba, and Noboru Yamamoto. Ring-opening copolymerization of succinic

- anhydride with ethylene oxide initiated by magnesium diethoxide. *Polymer*, Vol. 38, No. 18, pp. 4719–4725, 1997.
- [107] Yasukatsu Maeda, Atsuyoshi Nakayama, Ioannis Arvanitoyannis, Norioki Kawasaki, Kazuko Hayashi, Noboru Yamamoto, and Seiichi Aiba. Synthesis and characterization of copoly(succinic anhydride-ethylene oxide)-poly(L-lactide) block copolymer. *Polymer Journal*, Vol. 32, No. 4, pp. 307–315, 2000.
- [108] Yasukatsu Maeda, Takuya Maeda, Kazumi Yamaguchi, Shizuo Kubota, Atsuyoshi Nakayama, Norioki Kawasaki, Noboru Yamamoto, and Seiichi Aiba. Synthesis and characterization of novel biodegradable copolyesters by transreaction of poly(ethylene terephthalate) with copoly(succinic anhydride/ethylene oxide). *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 38, No. 24, pp. 4478–4489, 2000.
- [109] Anil Mahapatro, Bhanu Kalra, Ajay Kumar, and Richard A. Gross. Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 3, pp. 544–551, 2003.
- [110] Shuichi Matsumura, Hideki Beppu, and Kazunobu Toshima. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of four-membered lactones; preparation of poly( $\beta$ -propiolactone) and poly( $\beta$ -malic acid). *ACS Symposium Series (Enzymes in Polymer Synthesis)*, Vol. 684, pp. 74–89, 1998.
- [111] Shuichi Matsumura, Yoichi Suzuki, Keisuke Tsukada, Kazunobu Toshima, Yoshiharu Doi, and Ken-ichi Kasuya. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -butyrolactone to the cyclic and linear poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, Vol. 31, No. 19, pp. 6444–6449, 1998.
- [112] Shuichi Matsumura, Takeshi Okamoto, Keisuke Tsukada, and Kazunobu Toshima. Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of oxiranes and succinic anhydride forming polyesters bearing functional groups. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 19, No. 6, pp. 295–298, 1998.
- [113] Shuichi Matsumura, Hideki Beppu, and Kazunobu Toshima. Enzymic preparation of malate-based polycarboxylates having higher molecular weights by copolymerization with lactone. *Chemistry Letters*, No. 3, pp. 249–250, 1999.
- [114] Shuichi Matsumura, Keisuke Tsukada, and Kazunobu Toshima. Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s. *International Journal of Biological Macro-*

- molecules*, Vol. 25, No. 1, pp. 161–167, 1999.
- [115] Shuichi Matsumura, Takeshi Okamoto, Keisuke Tsukada, Noriyuki Mizutani, and Kazunobu Toshima. Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of oxiranes and dicarboxylic anhydride forming polyesters bearing carboxyl groups and their physicochemical properties and biodegradability. *Macromolecular Symposia*, Vol. 144, pp. 219–235, 1999.
- [116] Shuichi Matsumura, Hiroki Ebata, and Kazunobu Toshima. A new strategy for sustainable polymer recycling using an enzyme: poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 21, No. 12, pp. 860–863, 2000.
- [117] Shuichi Matsumura, Satoshi Harai, and Kazunobu Toshima. Lipase-catalyzed polymerization of diethyl carbonate and diol to aliphatic poly(alkylene carbonate). *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 201, No. 14, pp. 1632–1639, 2000.
- [118] Shuichi Matsumura, Satoshi Harai, and Kazunobu Toshima. Lipase-catalyzed transformation of poly(trimethylene carbonate) into cyclic monomer, trimethylene carbonate: a new strategy for sustainable polymer recycling using an enzyme. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 22, No. 3, pp. 215–218, 2001.
- [119] Shuichi Matsumura, Hiroki Ebata, Reiko Kondo, and Kazunobu Toshima. Organic solvent-free enzymatic transformation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) into repolymerizable oligomers in supercritical carbon dioxide. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 22, No. 16, pp. 1325–1329, 2001.
- [120] Shuichi Matsumura. Enzyme-catalyzed synthesis and chemical recycling of polyesters. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 2, No. 3, pp. 105–126, 2002.
- [121] Ying Mei, Ajay Kumar, and Richard A. Gross. Probing Water-Temperature Relationships for Lipase-Catalyzed Lactone Ring-Opening Polymerizations. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 14, pp. 5444–5448, 2002.
- [122] Ying Mei, Ajay Kumar, and Richard Gross. Kinetics and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Solution Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone. *Macromolecules*, Vol. 36, No. 15, pp. 5530–5536, 2003.
- [123] Martin Melchior, Helmut Keul, and Hartwig Hoecker. Depolymerization of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] to Cyclic Oligomers and Polymerization of the Cyclic Trimer: An Example of Thermodynamic Recycling. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 20, pp. 6442–6451, 1996.

- [124] Yoshiko Miura, Takayasu Ikeda, and Kazukiyo Kobayashi. Chemoenzymatically Synthesized Glycoconjugate Polymers. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 2, pp. 410–415, 2003.
- [125] Giorgio Montaudo and Paola Rizzarelli. Synthesis and enzymatic degradation of aliphatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 70, No. 2, pp. 305–314, 2000.
- [126] Kenji Mori, Tomoo Nukada, and Takashi Ebata. Pheromone synthesis. XLII. Synthesis of optically active forms of methyl (*E*)-2,4,5-tetradecatrienoate, the pheromone of the male dried bean beetle. *Tetrahedron*, Vol. 37, No. 7, pp. 1343–1347, 1981.
- [127] Yang-Ho Na, Yong He, Tetsuo Nishiwaki, Yasuhide Inagawa, Yasushi Osanai, Shuichi Matsumura, Terumi Saito, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue. Phase-separation enhanced enzymatic degradation of atactic poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) in the blends with poly(methyl methacrylate). *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 79, No. 3, pp. 535–545, 2003.
- [128] Takehiro Nakamura, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. One-step synthesis of *n*-octyl  $\beta$ -D-xylotrioside, xylobioside and xyloside from xylan and *n*-octanol using acetone powder of *Aureobasidium pullulans* in supercritical fluids. *Biotechnology Letters*, Vol. 22, No. 14, pp. 1183–1189, 2000.
- [129] Shuhei Namekawa, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Enzymatic Synthesis of Polyesters from Lactones, Dicarboxylic Acid Divinyl Esters, and Glycols through Combination of Ring-Opening Polymerization and Polycondensation. *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 3, pp. 335–338, 2000.
- [130] Marija S. Nikolic and Jasna Djonlagic. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-*co*-butylene adipate)s. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 74, pp. 263–270, 2001.
- [131] Haruo Nishida, Mitsuhiro Yamashita, Masumi Nagashima, Takeshi Endo, and Yutaka Tokiwa. Synthesis of metal-free poly(1,4-dioxan-2-one) by enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 38, No. 9, pp. 1560–1567, 2000.
- [132] Hidekazu Nishino, Toshiaki Mori, and Yoshio Okahata. Enzymatic silicone oligomerization catalyzed by a lipid-coated lipase. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, Vol. 22, pp. 2684–2685, 2002.
- [133] Geoffrey A. R. Nobes, Romas J. Kazlauskas, and Robert H Marchessault.

- Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones: A Novel Route to Poly(hydroxyalkanoate)s. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 14, pp. 4829–4833, 1996.
- [134] David O'Hagan and Naveed A. Zaidi. Hydrolytic resolution of tertiary acetylenic acetate esters with the lipase from *Candida cylindracea*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, No. 8, pp. 947–949, 1992.
- [135] Takeshi Ohura, Ken-Ichi Kasuya, and Yoshiharu Doi. Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 1, pp. 189–197, 1999.
- [136] Sachiko Okajima, Reiko Kondo, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Lipase-Catalyzed Transformation of Poly(butylene adipate) and Poly(butylene succinate) into Repolymerizable Cyclic Oligomers. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 6, pp. 1514–1519, 2003.
- [137] Rokuro Okawara and Masanori Wada. Preparation and properties of dimeric tetra-alkyldistannoxane derivatives:  $\text{XR}_2\text{SnOSnR}_2\text{OH}$  and  $\text{XR}_2\text{SnOSnR}_2\text{OR}'$ . *Journal of Organometallic Chemistry*, Vol. 1, No. 1, pp. 81–88, 1963.
- [138] Susumu Okumura, Mieko Iwai, and Yoshio Tsujisaka. Synthesis of estolides during hydrolysis of castor oil by *Geotrichum candidum* lipase. *Yukagaku*, Vol. 32, No. 5, pp. 271–273, 1983.
- [139] Susumu Okumura, Mieko Iwai, and Yoshio Tominaga. Synthesis of ester oligomer by *Aspergillus niger* lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 48, No. 11, pp. 2805–2808, 1984.
- [140] Anna A. Panova, Sonia Taktak, Solo Randriamahefa, Sandrine Cammas-Marion, Philippe Guerin, and David L. Kaplan. Polymerization of Propyl Malolactonate in the Presence of *Candida rugosa* Lipase. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 1, pp. 19–27, 2003.
- [141] Giuseppe Pedrocchi-Fantoni and Stefano Servi. Regio- and chemiselective properties of lipase from *Candida cylindracea*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, No. 8, pp. 1029–1033, 1992.
- [142] Mathur Rajesh, Shubhen Kapila, Paul Nam, Stephen Forciniti, Daniel; Lorbert, and Charles Schasteen. Enzymatic Synthesis and Characterization of L-Methionine and 2-Hydroxy-4-(methylthio)butanoic Acid (HMB) Co-oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, No. 9, pp. 2461–2467,

- 2003.
- [143] Michael S. Reeve, Stephen P. McCarthy, and Richard A. Gross. Preparation and characterization of (*R*)-poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) and (*R*)-poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)-poly(lactide) degradable diblock copolymers. *Macromolecules*, Vol. 26, No. 5, pp. 888–894, 1993.
- [144] Mathavee Sathupunya, Sujitra Wongkasemjit, and Erdogan Gulari. Prepolymer synthesis of polyester by using lipase as a catalyst. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, Vol. 11, No. 2, pp. 38–54, 2002.
- [145] Toshio Sato, Toshiyuki Itoh, Chihiro Hattori, and Tamotsu Fujisawa. A simple stereoselective synthesis of (1*R*,3*R*,5*S*)-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane using regioselective ring-opening of (*R*)- $\beta$ -methyl- $\beta$ -propiolactone. *Chemistry Letters*, No. 9, pp. 1391–1392, 1983.
- [146] Naoki Serata, Chieko Yanagi, and Shigeru Kunugi. Revisiting the ring-opening bulk polymerization of  $\epsilon$ -caprolactones using commercial lipases. *Biocatalysis and Biotransformation*, Vol. 20, No. 2, pp. 111–116, 2002.
- [147] Yasuyuki Soeda, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Novel enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of glycidol. *Chemistry Letters*, No. 1, pp. 76–77, 2001.
- [148] Yasuyuki Soeda, Takeshi Okamoto, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Enzymatic ring-opening polymerization of oxiranes and dicarboxylic anhydrides. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 2, No. 9, pp. 429–436, 2002.
- [149] Jae Jun Song, Shiming Zhang, Robert W. Lenz, and Steve Goodwin. In Vitro Polymerization and Copolymerization of 3-Hydroxypropionyl-CoA with the PHB Synthase from *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 3, pp. 433–439, 2000.
- [150] Alexander Steinbuchel. In vivo and in vitro metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates biosynthesis pathways. *ACS Symposium Series (Biocatalysis in Polymer Science)*, Vol. 840, pp. 120–123, 2003.
- [151] Yoichi Suzuki, Seiichi Taguchi, Terumi Saito, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, and Yoshiharu Doi. Involvement of Catalytic Amino Acid Residues in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters. *Biomacromolecules*, Vol. 2, No. 2, pp. 541–544, 2001.
- [152] Yoichi Suzuki, Seiichi Taguchi, Tamao Hisano, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, and Yoshiharu Doi. Correlation between Structure of the Lactones

- and Substrate Specificity in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 3, pp. 537–543, 2003.
- [153] Yuri Y. Svirkin, Jin Xu, Richard A. Gross, David L. Kaplan, and Graham Swift. Enzyme-catalyzed stereoelective ring-opening polymerization of  $\alpha$ -methyl- $\beta$ -propiolactone. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 13, pp. 4591–4597, 1996.
- [154] Tetsufumi Takamoto, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi. Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in supercritical carbon dioxide. *e-Polymers [online computer file]* [[http://www.e-polymers.org/papers/kobayashi\\_110601.pdf](http://www.e-polymers.org/papers/kobayashi_110601.pdf)], 2001.
- [155] Hiroaki Tasaki, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Enzymatic synthesis and polymerization of cyclic trimethylene carbonate monomer with/without methyl substituent. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 3, No. 8, pp. 436–441, 2003.
- [156] Megumi Uefuji, Ken-Ichi Kasuya, and Yoshiharu Doi. Enzymic degradation of poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *pseudomonas stutzeri*. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 58, No. 3, pp. 275–281, 1997.
- [157] Jonas Uppenberg, Niklas Oehrner, Martin Norin, Karl Hult, Gerard J. Kleywegt, Shamkant Patkar, Viggo Waagen, Thorleif Anthonsen, and T. Alwyn Jones. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, Vol. 34, No. 51, pp. 16838–16851, 1995.
- [158] Hiroshi Uyama and Shiro Kobayashi. Enzymic ring-opening polymerization of lactones catalyzed by lipase. *Chemistry Letters*, No. 7, pp. 1149–1150, 1993.
- [159] Hiroshi Uyama, Kazuhiro Takeya, and Shiro Kobayashi. Synthesis of polyesters by enzymic ring-opening copolymerization using lipase catalyst. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences*, Vol. 69, No. 8, pp. 203–207, 1993.
- [160] Hiroshi Uyama, Kazuhiro Takeya, and Shiro Kobayashi. Enzymic ring-opening polymerization lactones to polyesters by lipase catalyst: unusually high reactivity of macrolides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 68, No. 1, pp. 56–61, 1995.
- [161] Hiroshi Uyama, Hirofumi Kikuchi, Kazuhiro Takeya, Norio Hoshi, and Shiro Kobayashi. Immobilized lipase showing high catalytic activity toward enzymic

- ring-opening polymerization of macrolides. *Chemistry Letters*, No. 2, pp. 107–108, 1996.
- [162] Hiroshi Uyama, Kojiro Inada, and Shiro Kobayashi. Regioselectivity control in lipase-catalyzed polymerization of divinyl sebacate and triols. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 1, No. 1, pp. 40–44, 2001.
- [163] Hiroshi Uyama and Shiro Kobayashi. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 19, pp. 117–127, 2002.
- [164] Hiroshi Uyama and Shiro Kobayashi. Enzymatic polymerization: an environmentally benign method of polymer synthesis. *Kobunshi*, Vol. 52, No. 4, pp. 251–254, 2003.
- [165] Herman van Tilbeurgh, Marie Pierre Egloff, Chrislaine Martinez, Nathalie Rugani, Robert Verger, and Christian Cambillau. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by x-ray crystallography. *Nature*, Vol. 362, No. 6423, pp. 814–820, 1993.
- [166] Yi Wang, Yasuhide Inagawa, Yasushi Osanai, Ken ichi Kasuya, Terumi Saito, Shuichi Matsumura, Yoshiharu Doi, and Yoshio Inoue. Enzymatic Hydrolysis of Chemosynthesized Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) by Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp. TP4 and *Ralstonia pickettii* T1. *Biomacromolecules*, Vol. 3, No. 5, pp. 894–898, 2002.
- [167] F. K. Winkler, A. D'Arcy, and W. Hunziker. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, Vol. 343, No. 6260, pp. 771–774, 1990.
- [168] Bin Wu, Robert W. Lenz, and Thomas Scherer. Preparation, properties, and biodegradation of stereoregular copolymers of (*R,S*)-3-butyrolactone and 4-butyrolactone. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 199, No. 10, pp. 2079–2085, 1998.
- [169] Wenhua Xie, Jun Li, Depu Chen, and Peng George Wang. Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -Butyrolactone by Thermophilic Lipases. *Macromolecules*, Vol. 30, No. 22, pp. 6997–6998, 1997.
- [170] Jin Xu, Richard A. Gross, David L. Kaplan, and Graham Swift. Chemoenzymic Route to Poly(3-hydroxybutyrate) Stereoisomers. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 11, pp. 3857–3861, 1996.
- [171] Jin Xu, Richard A. Gross, David L. Kaplan, and Graham Swift. Chemoenzymic Synthesis and Study of Poly( $\alpha$ -methyl- $\beta$ -propiolactone) Stereocopoly-



- mers. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 13, pp. 4582–4590, 1996.
- [172] Jin Xu, Stephen P. McCarthy, and Richard A. Gross. Racemic  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -propiolactone Polymerization by Organometallic Catalyst Systems. *Macromolecules*, Vol. 29, No. 13, pp. 4565–4571, 1996.
- [173] Hajime Yasuda, Mohad-Serah Aludin, Naoyuki Kitamura, Mari Tanabe, and Hiroyuki Sirahama. Syntheses and Physical Properties of Novel Optically Active Poly(ester-carbonate)s by Copolymerization of Substituted Trimethylene Carbonate with  $\epsilon$ -Caprolactone and Their Biodegradation Behavior. *Macromolecules*, Vol. 32, No. 19, pp. 6047–6057, 1999.
- [174] Ga-Er Yu and R. H. Marchessault. Characterization of low molecular weight poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis. *Polymer (Volume Date 2000)*, Vol. 41, No. 3, pp. 1087–1098, 1999.
- [175] Aleksey Zaks and Alexander M. Klibanov. Enzymic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, Vol. 224, No. 4654, pp. 1249–1251, 1984.
- [176] Aleksey Zaks and Alexander M. Klibanov. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 82, No. 10, pp. 3192–3196, 1985.
- [177] Aleksey Zaks and Alexander M. Klibanov. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 108, No. 10, pp. 2767–2768, 1986.
- [178] Shiming Zhang, Steve Kolvek, Robert W. Lenz, and Steve Goodwin. Mechanism of the Polymerization Reaction Initiated and Catalyzed by the Polyhydroxybutyrate Synthase of *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 3, pp. 504–509, 2003.
- [179] Yan Zhang, Richard A. Gross, and Robert W Lenz. Stereochemistry of the ring-opening polymerization of (*S*)- $\beta$ -butyrolactone. *Macromolecules*, Vol. 23, No. 13, pp. 3206–3212, 1990.
- [180] 社団法人未踏科学技術協会「エコマテリアル研究会」教科書作成委員会（編）．エコマテリアル学 —基礎と応用—．日科技連出版社，2002．
- [181] 池田功夫．有機溶媒系での酵素の反応性に影響する因子．高分子加工，Vol. 46，pp. 225–229，1997．
- [182] 丹羽利充（編）．最新のマススペクトロメトリー —生化学・医学への応用—．化学同人，1995．
- [183] 中村春木，有坂文雄（編）．タンパク質のかたちと物性．共立出版，1997．

- [184] 野瀬卓平, 中浜精一, 宮田清蔵 (編). 大学院高分子科学. 講談社, 1997.
- [185] 別部秀樹. 酵素を触媒とした重合反応による生分解性ポリエステル合成; ポリ( $\beta$ -リンゴ酸)の合成と解析, 慶應義塾大学大学院理工学研究科応用化学専攻, 1998.
- [186] 原井敬. 酵素触媒を用いた脂肪族カーボネートの合成とケミカルリサイクルに関する研究, 慶應義塾大学大学院理工学研究科応用化学専攻, 2000.
- [187] 岡本武. 酵素触媒重合によるオキシランとジカルボン酸無水物からの機能性ポリエステル合成, 慶應義塾大学大学院理工学研究科応用化学専攻, 2000.
- [188] 江端洋樹. 酵素を利用した脂肪族ポリエステルの循環型ポリマーリサイクル, 慶應義塾大学大学院理工学研究科応用化学専攻, 2001.
- [189] 中村武広. 超臨界流体を用いた生体触媒によるアルキルグリコシドの多糖と長鎖アルコールからの一段階合成, 慶應義塾大学大学院理工学研究科応用化学専攻, 2001.
- [190] 近藤玲子. バイオプロセスによる環境低負荷型高分子の創製とケミカルリサイクル, 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻, 2003.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの学会に参加する機会を与えて下さったうえに、多大なご教授、ご鞭撻、ご指導を賜り、研究生活を有意義なものとさせていただいた慶應義塾大学 理工学部の松村 秀一 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、合成及び構造解析等において適切なお教授、ご鞭撻、ご指導を賜りました慶應義塾大学 理工学部の戸嶋 一敦 教授に深く感謝いたします。

本論文の執筆に際し、数々の有益なお教授、ご意見を賜りました慶應義塾大学 理工学部の太田 博道 教授、川口 春馬 教授に深く感謝いたします。

隣接する研究室の教授であり、父でもあり、研究生活と私生活両者において適切な御指導をいただきました慶應義塾大学 理工学部の小山内 州一 教授にお礼を申し上げます。

ポリマーの構造解析においては多大な御教授、御鞭撻、御指導を賜り、また TIT-KAIST の拠点交流事業における韓国留学で大変お世話になりました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の井上 義夫 教授並びに吉江 尚子 助手 (現 東京大学 生産技術研究所 物質・生命部門 助教授) にお礼を申し上げます。

TIT-KAIST の拠点交流事業における韓国留学で、私を留学生として研究室に引き受けていただき、また、高分子物性解析などにおいて数々の有益なお教授、ご鞭撻、ご指導を賜りました韓国 漢陽大学校 工科大学 応用化学工学部 任 承淳 教授に深く感謝いたします。

シンジオタクチック P(3HB) 合成において多大な御教授、御鞭撻、御指導を賜りました京都工芸繊維大学 繊維学部 高分子学科 高分子合成研究室の木村 義晴 教授並びに比木 茂寛氏にお礼を申し上げます。

マラソンなどの機会において研究室生活を楽しいものさせていただいた油化学研究室の朝倉 浩一 助教授にお礼を申し上げます。

慶應義塾高等学校からの友達であり、ともに研究者の道へ歩み始めた梅田 浩紀氏、斎藤智也氏、彌富 仁氏に深く感謝いたします。また、私の研究室生活を実り豊かなものにしていただいた、松村研究室・戸嶋研究室の城島 孝明氏を初めとした先輩方、同輩、後輩の皆様感謝いたします。さらに進路や細々な書類などの面では後期博士課程同期である川口研究室の佐藤 保信氏に相談に乗って頂きました。研究以外の面では元級友の山崎 喜史氏、伊藤 朋子氏、中筋 麻貴氏に大変お世話になりました。心より感謝いたします。

TIT-KAIST の拠点交流事業における韓国留学で、右も左も分からない私のお世話を辛抱強くしていただいた韓国 漢陽大学校 工科大学 応用化学工学部 Han, Sang-Il 氏と Li, Wanduk 氏をはじめ、任 承淳 教授の研究室の方々に心から感謝いたします。

最後になりましたが、長期にわたる学生生活を支えて下さいました数多くの友人並びに夜遅い帰宅にも関わらず温かく研究生活を見守っていただいた家族に対して厚くお礼を申し上げ、本論文の締めくくりとさせていただきます。

2004 年 2 月 4 日

慶應義塾大学 大学院 理工学研究科  
基礎理工学専攻 生命理工学専修  
生体機能分子化学研究室

生体触媒による生分解性ポリエステル<sup>o</sup>の合成と  
ケミカルリサイクルに関する研究

著者: 小山内 靖

主査: 松村 秀一 教授

副査: 太田 博道 教授

川口 春馬 教授

戸嶋 一敦 教授

2004年2月4日 第一刷発行

Copyright © 2004 Yasushi OSANAI

All Rights Reserved