

環境低負荷型バイオベースポリマーの
創成に関する研究

平成 23 年度

村上 小枝子

環境低負荷型バイオベースポリマーの
創成に関する研究

平成 23 年度

村上 小枝子

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	村上 小枝子
主 論 文 題 目 :				
環境低負荷型バイオベースポリマーの創成に関する研究				
(内容の要旨)				
<p>地球規模で様々な環境問題が発生するなかで、原料から廃棄に至る製造プロセス全体の環境負荷を出来る限り小さくする、グリーンケミストリーが提唱されている。ポリマー材料においても、グリーンケミストリーに基づいた技術開発やプロセス設計が求められ、再生可能資源 (バイオマス) とバイオプロセスを利用した環境低負荷型ポリマーやリサイクル手法の開発が行われている。本研究では、ポリマー原料をバイオマスから得られるものに求め、分子設計を行うことにより、高機能を有する環境低負荷型ポリマーを創成することを目的とした。また、得られたポリマーについて、生分解によるバイオリサイクルあるいは酵素触媒によるケミカルリサイクルの可能性を評価するため、生分解性および酵素分解性について検討を行った。</p> <p>第1章は序論であり、本論文の背景となるグリーンケミストリーに基づいた環境低負荷型バイオベースポリマーについて紹介した。</p> <p>第2章では、生分解性を有する微生物産生ポリ(γ-グルタミン酸) (PGA) をジメチルスルホキシド (DMSO) 中、水溶性カルボジイミド存在下、種々の糖で架橋し、新規バイオベースヒドロゲルを合成した。合成したPGAゲルのうち、グルコースで架橋したゲルが、3000 g/g と最も高い吸水率を示した。得られたゲルは、天然の生分解性化合物のみから成ることから、生分解性を有し、環境分野などへの応用が期待される。</p> <p>第3章では、水溶媒中でのアミド結合形成反応に着目し、DMSOなどの有機溶媒よりも環境低負荷な水溶媒中、L-リジンでPGAを架橋し、生分解性バイオベースヒドロゲルを合成した。縮合剤として4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリン塩酸塩 (DMT-MM) を使用した場合に、高収率でゲルが生成した。得られたPGAゲルは、吸水率300~2100 g/gを有し、また、BOD法による生分解度は60%と易分解性であった。</p> <p>第4章では、酵素触媒重合により得られたオリゴ(テトラメチレンカーボネート) ジオールをヘキサメチレンジイソシアネート (HDI) で重合し、酵素分解可能な結合部位を有するポリウレタン (PTeCU) を合成した。PTeCUは酵素により分解され、再重合可能な環状オリゴマーが生成した。</p> <p>第5章では、加水分解性および酵素分解性の制御を目的として乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンを合成した。また、化学修飾可能な水酸基を有するリンゴ酸共重合体をHDIで重合し、リンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタンを合成した。得られたポリウレタンは、アニソール中で酵素により分解され、再重合可能な環状オリゴマーを生成することを明らかにした。</p> <p>第6章では、本研究を総括し、今後の展望について述べた。</p>				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name MURAKAMI, Saeko
<p>Title</p> <p style="padding-left: 40px;">Studies on the environmentally benign bio-based polymers</p>		
<p>Abstract</p> <p>In recent years, in order to reduce the environmental load by polymeric materials, many research studies in the field of polymer science have been energetically made, such as the biodegradable and chemically recyclable plastics, the use of renewable resources, and the application of environmentally benign catalysts, such as enzymes.</p> <p>This report focuses on the design and synthesis of the environmentally benign bio-based polymers with high functionality by use of bio-based materials.</p> <p>In Chapter 1, the environmentally benign polymers based on green chemistry were explained as the introduction of this thesis.</p> <p>In Chapter 2, novel bio-based hydrogels were prepared by crosslinking of microbial poly(γ-glutamic acid) (PGA) with saccharides in the presence of water-soluble carbodiimide in dimethyl sulfoxide. The PGA gel cross-linked by glucose showed the highest water absorption of 3000 g/g.</p> <p>In Chapter 3, bio-based biodegradable hydrogels were prepared by crosslinking of PGA with L-lysine by amide linkage in aqueous solution as the environmentally benign solvent. The PGA gels were prepared in high yields in the presence of 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM). The water absorption of the gels ranged from 300 to 2100 g/g. Biochemical oxygen demand-biodegradability of the gel reached 60% which is the criterion of ready biodegradability.</p> <p>In Chapter 4, a novel enzymatically cleavable poly(tetramethylene carbonate-urethane) (PTeCU) was prepared by combining the biodegradable oligo(tetramethylene carbonate) diol [oligo(TeC) diol] with urethane linkages using hexamethylene diisocyanate (HDI). PTeCU was degraded at the carbonate linkages by lipase to produce cyclic oligomers which can be re-polymerized.</p> <p>In Chapter 5, a novel bio-based polyurethane was prepared by combining the oligolactide diol and oligo(TeC) diol with HDI for the purpose of the control of the hydrolyzability and biodegradability. And also a bio-based polyurethane having hydroxyl functions was prepared by combining the polyol containing malic acid moiety and HDI. The obtained polyurethanes were degraded by lipase to produce cyclic oligomers.</p> <p>In Chapter 6, the conclusions for this thesis were shown.</p>		

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	村上 小枝子
主 論 文 題 目 :				
環境低負荷型バイオベースポリマーの創成に関する研究				
(内容の要旨)				
<p>地球規模で様々な環境問題が発生するなかで、原料から廃棄に至る製造プロセス全体の環境負荷を出来る限り小さくする、グリーンケミストリーが提唱されている。ポリマー材料においても、グリーンケミストリーに基づいた技術開発やプロセス設計が求められ、再生可能資源 (バイオマス) とバイオプロセスを利用した環境低負荷型ポリマーやリサイクル手法の開発が行われている。本研究では、ポリマー原料をバイオマスから得られるものに求め、分子設計を行うことにより、高機能を有する環境低負荷型ポリマーを創成することを目的とした。また、得られたポリマーについて、生分解によるバイオリサイクルあるいは酵素触媒によるケミカルリサイクルの可能性を評価するため、生分解性および酵素分解性について検討を行った。</p> <p>第1章は序論であり、本論文の背景となるグリーンケミストリーに基づいた環境低負荷型バイオベースポリマーについて紹介した。</p> <p>第2章では、生分解性を有する微生物産生ポリ (γ-グルタミン酸) (PGA) をジメチルスルホキシド (DMSO) 中、水溶性カルボジイミド存在下、種々の糖で架橋し、新規バイオベースヒドロゲルを合成した。合成した PGA ゲルのうち、グルコースで架橋したゲルが、3000 g/g と最も高い吸水率を示した。得られたゲルは、天然の生分解性化合物のみから成ることから、生分解性を有し、環境分野などへの応用が期待される。</p> <p>第3章では、水溶媒中でのアミド結合形成反応に着目し、DMSO などの有機溶媒よりも環境低負荷な水溶媒中、L-リジンで PGA を架橋し、生分解性バイオベースヒドロゲルを合成した。縮合剤として 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリン塩酸塩 (DMT-MM) を使用した場合に、高収率でゲルが生成した。得られた PGA ゲルは、吸水率 300~2100 g/g を有し、また、BOD 法による生分解度は 60 % と易分解性であった。</p> <p>第4章では、酵素触媒重合により得られたオリゴ (テトラメチレンカーボネート) ジオールをヘキサメチレンジイソシアネート (HDI) で重合し、酵素分解可能な結合部位を有するポリウレタン (PTeCU) を合成した。PTeCU は酵素により分解され、再重合可能な環状オリゴマーが生成した。</p> <p>第5章では、加水分解性および酵素分解性の制御を目的として乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンを合成した。また、化学修飾可能な水酸基を有するリンゴ酸共重合体を HDI で重合し、リンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタンを合成した。得られたポリウレタンは、アニソール中で酵素により分解され、再重合可能な環状オリゴマーを生成することを明らかにした。</p> <p>第6章では、本研究を総括し、今後の展望について述べた。</p>				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name MURAKAMI, Saeko
<p>Title</p> <p style="padding-left: 40px;">Studies on the environmentally benign bio-based polymers</p>		
<p>Abstract</p> <p>In recent years, in order to reduce the environmental load by polymeric materials, many research studies in the field of polymer science have been energetically made, such as the biodegradable and chemically recyclable plastics, the use of renewable resources, and the application of environmentally benign catalysts, such as enzymes.</p> <p>This report focuses on the design and synthesis of the environmentally benign bio-based polymers with high functionality by use of bio-based materials.</p> <p>In Chapter 1, the environmentally benign polymers based on green chemistry were explained as the introduction of this thesis.</p> <p>In Chapter 2, novel bio-based hydrogels were prepared by crosslinking of microbial poly(γ-glutamic acid) (PGA) with saccharides in the presence of water-soluble carbodiimide in dimethyl sulfoxide. The PGA gel cross-linked by glucose showed the highest water absorption of 3000 g/g.</p> <p>In Chapter 3, bio-based biodegradable hydrogels were prepared by crosslinking of PGA with L-lysine by amide linkage in aqueous solution as the environmentally benign solvent. The PGA gels were prepared in high yields in the presence of 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM). The water absorption of the gels ranged from 300 to 2100 g/g. Biochemical oxygen demand-biodegradability of the gel reached 60% which is the criterion of ready biodegradability.</p> <p>In Chapter 4, a novel enzymatically cleavable poly(tetramethylene carbonate-urethane) (PTeCU) was prepared by combining the biodegradable oligo(tetramethylene carbonate) diol [oligo(TeC) diol] with urethane linkages using hexamethylene diisocyanate (HDI). PTeCU was degraded at the carbonate linkages by lipase to produce cyclic oligomers which can be re-polymerized.</p> <p>In Chapter 5, a novel bio-based polyurethane was prepared by combining the oligolactide diol and oligo(TeC) diol with HDI for the purpose of the control of the hydrolyzability and biodegradability. And also a bio-based polyurethane having hydroxyl functions was prepared by combining the polyol containing malic acid moiety and HDI. The obtained polyurethanes were degraded by lipase to produce cyclic oligomers.</p> <p>In Chapter 6, the conclusions for this thesis were shown.</p>		

学位論文 博士（工学）

環境低負荷型バイオベースポリマーの
創成に関する研究

平成 23 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

村上 小枝子

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 グリーンケミストリー	1
1.3 環境低負荷型高分子	3
1.4 生分解性ポリマーとバイオベースポリマー	4
1.5 バイオプロセスによるポリマー合成とケミカルリサイクル	5
1.6 本論文の研究内容	6
1.7 参考文献	8
第2章 種々の糖により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル	9
2.1 緒言	9
2.2 試薬・機器	12
2.2.1 試薬	12
2.2.2 機器	13
2.3 実験方法	14
2.3.1 ポリ(γ-グルタミン酸) (PGA) と中性糖のジメチルスルホキシド (DMSO) 中でのエステル結合形成による架橋	14
2.3.2 水溶性キトサンによる PGA の架橋	15
2.3.3 PGA ゲルの吸水率測定	15
2.3.4 PGA ゲルのアルカリ加水分解	16
2.4 結果と考察	17
2.4.1 PGA のジオール、中性糖および水溶性キトサンによる架橋	17
2.4.2 PGA ゲルに含まれる架橋剤の含有率とゲルの吸水率に対する反応時の架橋剤添加量の影響	21
2.4.3 PGA ゲルの吸水率に対する架橋剤の化学構造の影響	26
2.4.4 PGA ゲルのアルカリ加水分解	28
2.5 結論	30
2.6 参考文献	31
第3章 アミノ酸により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル	32
3.1 緒言	32
3.2 試薬・機器	34
3.2.1 試薬	34
3.2.2 機器	35

3.3	実験方法	36
3.3.1	水溶性カルボジイミド (WSC) を用いた PGA の水または DMSO 中での架橋	36
3.3.2	4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩 (DMT-MM) を用いた L-リジンによる PGA の水中での架橋	37
3.3.3	PGA ゲルの吸水率測定	39
3.3.4	PGA ゲルの加水分解	39
3.3.5	PGA ゲルの生分解性試験	40
3.4	結果と考察	41
3.4.1	WSC を用いた L-リジンによる PGA の水または DMSO 中での架橋	41
3.4.2	DMT-MM を用いた L-リジンによる PGA の水中での架橋	43
3.4.3	架橋反応における L-リジンおよび DMT-MM の添加量が PGA ゲルの L-リジン含有率および吸水率に与える影響	46
3.4.4	PGA ゲルの加水分解および BOD 法による生分解	49
3.5	結論	52
3.6	参考文献	52
第 4 章 環境低負荷型ポリ (カーボネート-ウレタン) の合成と酵素分解		53
4.1	緒言	53
4.2	試薬・機器	56
4.2.1	試薬	56
4.2.2	機器	57
4.3	実験方法	58
4.3.1	オリゴカーボネートジオールの酵素合成	58
4.3.2	ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールの重合	59
4.3.3	ポリ (カーボネート-ウレタン) フィルムの調製と機械特性の測定	59
4.3.4	酵素分解試験	60
4.3.5	生分解性試験	60
4.4	結果と考察	61
4.4.1	酵素による炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールのオリゴマー化	61
4.4.2	ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールの重合	63
4.4.3	ポリ (カーボネート-ウレタン) の酵素分解	64
4.4.4	ポリ (カーボネート-ウレタン) の熱特性および機械特性	67
4.5	結論	67
4.6	参考文献	68

第5章 バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解	69
5.1 緒言	69
5.2 乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解	70
5.2.1 はじめに	70
5.2.2 試薬・機器	71
5.2.2.1 試薬	71
5.2.2.2 機器	72
5.2.3 実験方法	73
5.2.3.1 オリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの合成	73
5.2.3.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの重合	74
5.2.3.3 ポリ(カーボネート/ラクチド-ウレタン)(PC/LU) フィルムの調製	75
5.2.3.4 加水分解試験	75
5.2.3.5 酵素分解試験	75
5.2.4 結果と考察	76
5.2.4.1 オリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの合成	76
5.2.4.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの重合	76
5.2.4.3 PC/LU の加水分解	78
5.2.4.4 PC/LU の酵素分解	79
5.2.5 結論	82
5.3 リンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解	83
5.3.1 はじめに	83
5.3.2 試薬・機器	85
5.3.2.1 試薬	85
5.3.2.2 機器	86
5.3.3 実験方法	87
5.3.3.1 酵素触媒によるリンゴ酸共重合体の合成	87
5.3.3.2 ジイソシアナートを用いたリンゴ酸共重合体の重合	88
5.3.3.3 酵素分解試験	88
5.3.4 結果と考察	89
5.3.4.1 酵素触媒によるリンゴ酸共重合体の合成	89
5.3.4.2 ヘキサメチレンジイソシアナートを用いたリンゴ酸共重合体の重合	90
5.3.4.3 リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの酵素分解	91
5.3.5 結論	94
5.4 参考文献	95

第 6 章 総括	96
本論文に関する研究発表	100
謝辞	103

第1章 序論

1.1 はじめに

地球温暖化は、近年特に注目されている環境問題のひとつである。干ばつや熱波などの異常気象が世界各地で頻発し、地球温暖化がその原因であるとして強く懸念されている。地球温暖化は、大気中に放出される様々なガスが有する温室効果が原因と考えられている。そのなかで二酸化炭素は総排出量が多いことから、温暖化への寄与度が最も大きい。産業革命以降、化石燃料の使用が増え、その結果、大気中の二酸化炭素の濃度が増加し続けており、今後も、発展途上国の生活レベルの向上や人口増による、二酸化炭素排出量の急激な増大が予測される。2007年には、気候変動に関する政府間パネル（IPCC）が、このままでは2100年の平均気温は、温室効果ガスの排出量が最も多い場合には4.0℃上昇すると発表した^[1]。予測される危機を回避するため、地球温暖化防止のための国際会議が開催されるなど、二酸化炭素排出量の削減に向けた国際的な取り組みが行われている。日本も排出量削減目標を掲げ、その目標の達成に向けた対策が急務となっている。

化学産業はその発展により、医療の進歩、農業生産性の向上などに大きく貢献する一方、公害の発生、健康被害など、多くの弊害も生んできた。しかし、それら弊害の克服は科学技術の進展によるところも大きいといえる。地球規模で様々な環境問題が発生し、深刻化するなかで、化学産業は今後も環境と調和した持続的な発展により、人と社会に貢献していくことが求められている。

このような背景から、原料から廃棄に至る製造プロセス全体の環境負荷を出来る限り小さくする、グリーンケミストリー^[2]の概念が提唱された。グリーンケミストリーが、様々な分野で技術開発やプロセス設計の基本理念として定着し、地球温暖化をはじめとする環境問題解決の一助となることが期待される。

1.2 グリーンケミストリー

グリーンケミストリーは、1990年代に汚染防止の手段のひとつとして生まれ、産業界で定着し、この概念に基づいて開発された技術の工業化も行われてきた。国際純正化学連合（IUPAC）によって、グリーンケミストリーとは、「有害な物質の生成や使用を削減もしくは除去するような化学物質や製造プロセスの創出、設計、応用」であると定義されている^[3]。また、1998年から経済協力開発機構（OECD）によって、環境に優しく、経済的にも有利な化学製品や製造プロセスの開発を促す、サステイナブルケミストリーとよばれる活動も行われ、グリーンケミストリーと関連性の高い領域として、以下の5課題が確認された^[2]。

- 1 自然界のプロセスの利用
- 2 代替溶媒の使用
- 3 より安全な化学物質の設計
- 4 代替反応条件の開発
- 5 エネルギー消費の極小化

これらの課題に対応し、有機合成およびポリマー合成分野においては、原料および製造から廃棄処理に至る各段階での環境負荷を低減するために、次のような観点から研究開発が進められている^[2]。

- 1 代替原料

無害な、あるいは有害性のより低い原料、再生可能原料の利用。

バイオマスを原料に用いた化学製品への移行。

- 2 環境に優しい溶媒、反応条件

より低毒性、環境低負荷な溶媒の使用。

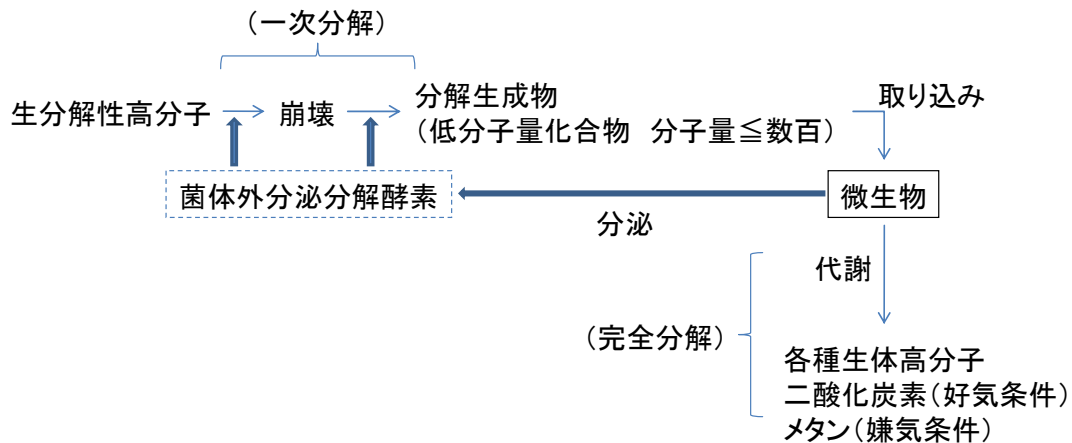
効率的な触媒プロセス開発。温和で効率のよいバイオプロセスの活用。

- 3 より安全な化合物の設計

ライフサイクルを見通した無害な化合物の設計。

リサイクル性、および生分解性の付与。

グリーンケミストリーの概念に則した環境に優しいポリマーは、環境低負荷型高分子と呼ばれている^[4]。1の原料選択の環境低負荷化については、地球温暖化の原因となる二酸化炭素排出量の抑制に資する、再生可能資源（バイオマスなど）を利用したポリマーが注目されている。また、2の製造段階については、環境低負荷型のバイオプロセス（発酵、酵素触媒）と化学変換を組み合わせるポリマーの開発も進められており、これらを併せて、バイオベースポリマーと称している^[5]。3の廃棄処理については、廃棄後に自然界に存在する微生物により生分解されて無害化する生分解性ポリマーが、盛んに研究され、企業化も行われた（Scheme 1.1）。また、ポリマーを新たに製造するよりもエネルギー使用量の少ない、環境低負荷なリサイクルプロセスの開発も重要な課題となっている^[4]。



Scheme 1.1 A process of microbial degradation of biodegradable polymers.^[6]

1.3 環境低負荷型高分子

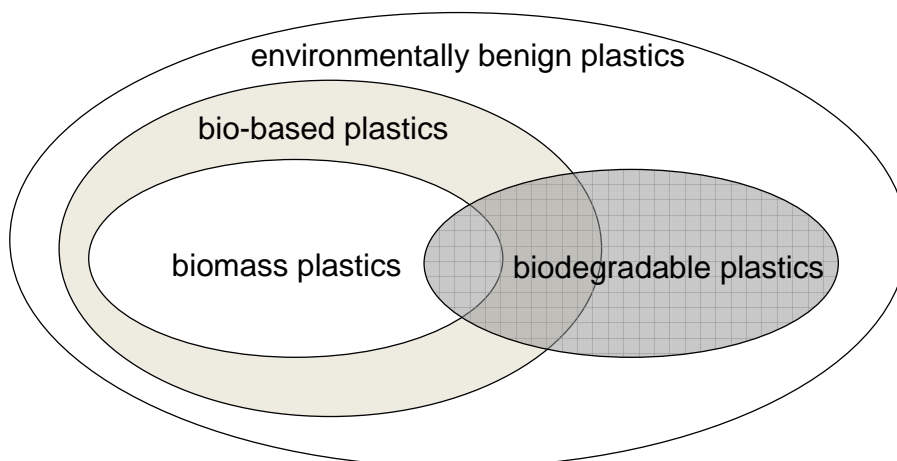
環境低負荷型高分子であるバイオベースポリマーおよび生分解性ポリマーを用いたプラスチックは、それぞれバイオベースプラスチックおよび生分解性プラスチックと呼ばれ、また、バイオマスを原料に用いたプラスチックを特にバイオマスプラスチックと称する場合もある^[7]。これらの一般的な分類を Scheme 1.2 に示した。

すなわち、バイオマスプラスチックはバイオベースプラスチックのひとつであるが、生分解性プラスチックについては、石油化学原料から化学合成されたポリマーを利用し、バイオベースプラスチックではないものも一部含まれる。これは、歴史的背景として、従来の汎用プラスチックが自然界に放置された場合に分解されず、蓄積して生態系に悪影響を及ぼすことへの懸念から、生分解性プラスチックの開発がはじまっており、地球温暖化対策の一貫としてバイオマス利用への要求が高まる前から、研究が行われてきたことによる^[8]。

Scheme 1.2 より、最も望ましい環境低負荷型高分子は、バイオマスを利用した、生分解性を有するバイオベースポリマー (Scheme 1.2 の★に分類される) であり、さらには、低エネルギー・環境低負荷なケミカルリサイクルにより繰り返し原料化、再利用が可能な循環型ポリマーである^[9]。

本研究では、これを理想の環境低負荷型高分子であるとして、ポリマー原料を現在あるいは将来的にバイオマスから得られるものに求め、分子設計を行うことにより環境低負荷型かつ高機能性を有するポリマー材料を創成することを目的として検討を行った。

以下に、これまでに行われた、生分解性ポリマーとバイオベースポリマー、およびバイオプロセスによるポリマー合成とケミカルリサイクルに関する研究について概観する。



Scheme 1.2 Classifications of environmentally benign plastics.

1.4 生分解性ポリマーとバイオベースポリマー

生分解性ポリマーおよびバイオベースポリマーは一般にその由来により Table 1.1 のように分類される。このうち下線を付したものは、バイオベースポリマー、網掛けは、近い将来バイオマスから発酵生産した原料から化学変換により調達可能と見なされているポリマーである。また、ケモバイオ合成系とは、バイオマスをブレイクダウンした素材を原料に用いて化学的に重合したポリマーであり、バイオベースポリマーに分類される^[5]。一部の共重合ポリエステルや、ポリカーボネート、ポリウレタン^[9]についても、原料にバイオマス由来素材を用いたものは、ケモバイオ合成系のバイオベースポリマーと分類できる。このような設計指針の元、環境低負荷、かつ、汎用ポリマーに匹敵する機能性を付与した材料の開発を目指して研究が進められてきた。

現在は、再生可能資源のトウモロコシデンプンなどから得られるグルコースを微生物発酵した乳酸を原料として化学合成されるポリ乳酸が、植物から生まれて自然に還るカーボンニュートラルな材料として注目されている。ポリ乳酸は、2002年にカーギルダウ社（現ネーチャーワークス社）が14万トンのポリ乳酸供給を開始するなど生分解性ポリマーのなかでは生産量も最大で、市場化が最も進んでいる^[9]。その生分解性を生かした食品容器などコンポスト可能な使い捨て製品に加えて、最近では、携帯電話やコピー機の筐体など耐久消費財にも利用が広がっている。汎用ポリマーとのアロイや添加剤を工夫することで、耐熱性や耐衝撃性の向上といった、様々なニーズにあわせた材料開発が行われている。一方で、このような改質に伴い、生分解性やリサイクル性など、本来持っていた利点が失われることも多く、機能性向上との両立が課題である。

Table 1.1 Examples of biodegradable plastics / bio-based polymers.

由来による分類	物質例
天然系	多糖類（セルロース、デンプン） ペプチド、タンパク（コラーゲン、ゼラチン、ケラチン）
微生物合成系	ポリヒドロキシアルカン酸、ポリ（-グルタミン酸）、 ポリ（-リジン）
化学合成系／	ポリエステル（ポリ乳酸、ポリコハク酸ブチレン）
ケモバイオ合成系	ポリカーボネート ポリペプチド ポリウレタン

1.5 バイオプロセスによるポリマー合成とケミカルリサイクル

バイオプロセスによるポリマー合成は、主に微生物発酵によるもの（Table 1.1 の微生物合成系）^[8]と、酵素触媒重合によるものがある。

微生物発酵では、グルコース、油脂などのバイオマスから直接ポリマーを得ることができ、比較的高分子量体を得られるなどの利点がある。一方、遺伝子組み換えなどである程度の改変は可能であるものの、合成は微生物の有する代謝経路に依存するため、生成するポリマーの化学構造は限定される。

酵素触媒重合では、酵素の基質特異性の範囲内であれば、モノマーを自由に選択できるため、微生物をそのまま用いるよりも、ポリマーの分子設計が容易である。ポリマー合成触媒としては、リパーゼ^[10,11]、プロテアーゼ^[12]やホスホリラーゼ^[13]などが、基質となるモノマーにあわせて選択される。

酵素反応は可逆であるため、酵素触媒により合成されたポリマーは、多くはその逆反応（加水分解反応）による分解が可能である。そのため、従来型のケミカルリサイクルでは、ポリマーを分解するために、高温・高圧、高アルカリ条件などを要するのに対し^[14]、酵素触媒重合したポリマーは、常温～100℃以下の比較的温和な条件で、酵素により分解される。これを利用して、酵素によりポリマーを分解し、さらに、分解生成物を酵素で再重合してポリマーのリサイクルを行う、省エネルギーでクリーンな、新たなケミカルリサイクルプロセスの構築が試みられている^[9,15]。

酵素を利用したケミカルリサイクルについては、これまで、主に酵素触媒重合したポリマーや、構造規則性の高い生分解性ポリエステルなどを対象として検討が行われている。酵素触媒重合したオリゴマーを、化学的に鎖延長したポリマーについても同様のプロセスが適用可能であれば、環境低負荷型のケミカルリサイクルとして応用範囲が広がると期待される。

1.6 本論文の研究内容

本研究では、ポリマー原料を現在あるいは将来的にバイオマスから得られるものに求め、分子設計を行って、環境低負荷型かつ高機能性を有するポリマー材料を創成することを目的として検討を行った。

第2章および第3章では、微生物が発酵生産するポリ（ γ -グルタミン酸）を用いたバイオベースヒドロゲルについて、その合成および得られたゲルの吸水性、生分解性に関する検討を行った。

第4章および第5章では、汎用のジイソシアナートを用いて合成したポリウレタンについて、酵素触媒重合したオリゴマーを導入することによる、酵素分解性と易リサイクル性付与の可能性と、高機能化に関する検討を行った。

各章の概要を以下にまとめた。

第2章 種々の糖により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

ポリ（ γ -グルタミン酸）は高い生分解性と生体適合性を有していることから、これまでその高機能化に関して検討が行われ、例えば、架橋により得られるヒドロゲルは、医薬および環境関連分野への利用が期待される。しかし、使用される架橋剤のほとんどは石油由来原料から化学合成されたものである。生分解性ゲルは使用後に環境中や生体内で分解されることを想定しており、ゲルの主鎖部分が天然高分子であるだけでなく、架橋部分にも天然物を用いることが重要である。そこで、ポリ（ γ -グルタミン酸）を種々の糖類で架橋して、新規バイオベースヒドロゲルを合成し、その吸水性および加水分解性について評価した。

第3章 アミノ酸により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

第2章では、反応溶媒としてジメチルスルホキシドを用いたが、グリーンケミストリーの観点からは、有機溶媒でなく、より環境低負荷な水を使用することが望ましい。そこで、本章では、水溶媒中でのアミド結合形成反応に着目し、水溶媒中、L-リジンを用いてポリ（ γ -グルタミン酸）を架橋して、高収率でポリ（ γ -グルタミン酸）ゲルを合成し、その吸水性、加水分解性および生分解性について評価した。

第4章 環境低負荷型ポリ（カーボネート-ウレタン）の合成と酵素分解

ポリウレタンは、ポリオールとジイソシアナートから合成される。ポリオールの分子構造を自由に設計でき、バイオマスの利用や、生分解性、耐水性などの機能性の付与が可能である。本章では、耐水性を有し、かつ酵素分解可能な環境低負荷型ポリウレタンを得ることを目的として、酵素触媒重合した脂肪族オリゴ（カーボネート）ジオールに、汎用のジイソシアナートを反応させて、新規ポリ（カーボネート-ウレタン）を合成し、熱特性お

よび機械特性を評価した。また、1.5 で述べたように酵素触媒重合したポリマーについては、酵素で分解し、その分解生成物を、酵素を用いて再重合することで、ポリマーのリサイクルが可能である。そこで、酵素触媒重合したオリゴマーをジイソシアナートで鎖延長したポリウレタンについても、酵素分解により再重合性を有するオリゴマーへ変換可能か調べるため、得られたポリウレタンの酵素分解性を評価し、分解生成物の解析を行った。

第5章 バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解

バイオマスの発酵あるいは化学変換により供給可能なモノマーを用いて、酵素触媒重合したバイオベースポリオールに、ジイソシアナートを反応させて、バイオベースポリウレタン（乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンおよびリンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタン）を合成し、熱特性などの評価を行った。これらのポリウレタンは、酵素分解可能な結合部位を有していることから、酵素の作用により分解し、再重合性を有するオリゴマーに変換されると期待される。そのため、得られたポリウレタンの酵素分解性および分解生成物についても検討を行った。

第6章 総括

本研究で得られた結果をまとめ、総括した。

1.7 参考文献

- [1] IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change (2007).
- [2] 宮本純之（監訳），グリーンケミストリー，化学同人（2001）.
- [3] P. T. Anastas and T. C. Williamson, Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Synthesis and Processes, Oxford University Press (1998).
- [4] 吉江尚子，高分子，**58**, 181 (2009).
- [5] 高分子学会（編），天然素材プラスチック，共立出版（2006）.
- [6] 土肥義治（編著），生分解性高分子材料，工業調査会（1990）.
- [7] 日本有機資源協会，平成 15 年度バイオ生分解性素材開発・利用評価事業書（2004）.
- [8] 土肥義治（編），生分解性プラスチックのおはなし，日本規格協会（1991）.
- [9] 植物由来プラスチックの高機能化とリサイクル技術，サイエンス&テクノロジー（2007）.
- [10] S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **2**, 105 (2002).
- [11] S. Kobayashi, H. Litter, D. Kaplan, Eds., Enzyme-catalyzed synthesis of polymers, *Advances in Polymer Science*, **194**, Springer (2006).
- [12] Y. Soeda, T. Okamoto, K. Toshima, and S. Matsumura, *Biomacromolecules*, **4**, 196 (2003).
- [13] K. Ohdan, K. Fujii, M. Yanase, T. Takaha, and T. Kuriki, *Biocatal. Biotransform.*, **24**, 77 (2006).
- [14] 長井寿（編著），高分子材料のリサイクル，化学工業日報社（1996）.
- [15] 加藤誠，松村秀一，高分子，**57**, 438 (2008).

第2章 種々の糖により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

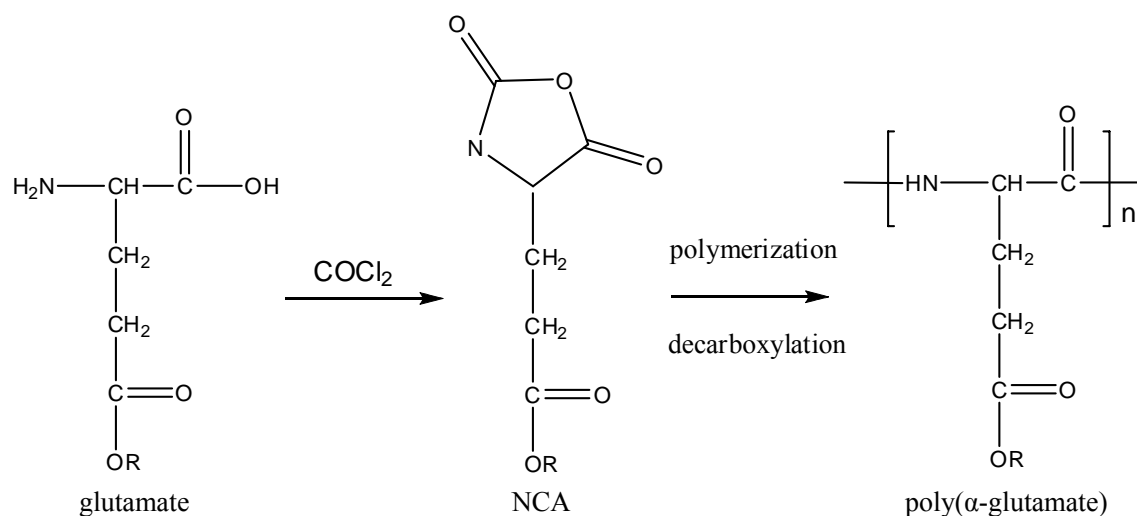
2.1 緒言

ポリアミノ酸は、 α -アミノ酸がペプチド結合によって重縮合した重合体のことをいう。このうち、バイオマスとして存在する α -アミノ酸が、ペプチド結合により重縮合したポリアミノ酸は、バイオベースポリマーであり、自然界に存在する酵素で分解されることから、生分解性を有する環境低負荷型材料のひとつとして期待され、その利用が検討されてきた。

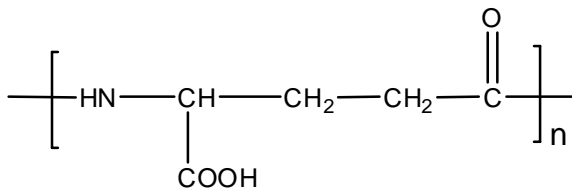
ポリアミノ酸は、その由来から、①天然タンパク質、②微生物による発酵ポリアミノ酸、③化学合成ポリアミノ酸、の3つに大別される^[1]。

天然タンパク質としては、例えば小麦グルテンやトウモロコシ由来のツェイン、コラーゲン、絹フィブロイン、ケラチンなどがある。また、発酵ポリアミノ酸としては、納豆菌によるポリ(α -グルタミン酸) (PGA)、放線菌によるポリ(α -リジン)^[2]およびシアノ細菌が分泌するシアノフィシンが知られている^[3]。

化学合成ポリアミノ酸については、簡便な方法としては、アスパラギン酸の熱重合によってポリ(α -D,L-アスパラギン酸)が合成された例がある^[4]。また、適用可能なアミノ酸の範囲が広く、より一般的な方法としては、アミノ酸にホスゲンを作用させて得られるN-カルボキシ- α -アミノ酸無水物 (NCA) の開環重合で、ポリ(α -アミノ酸)が合成されている。例えば、グルタミン酸は α 位にカルボン酸を有し、 γ 位をエステル保護して合成されるため、 β 位でペプチド結合したポリ(α -グルタミン酸エステル)として得られる (Scheme 2.1)^[5]。一方、微生物により発酵生産される PGA (Scheme 2.2) は、L-アミノ酸のみが β 位でペプチド結合した天然タンパク質とは異なり、D 体と L 体のグルタミン酸を含み、 α 位のカルボキシル基と γ 位のアミノ基がペプチド結合した構造をしている。



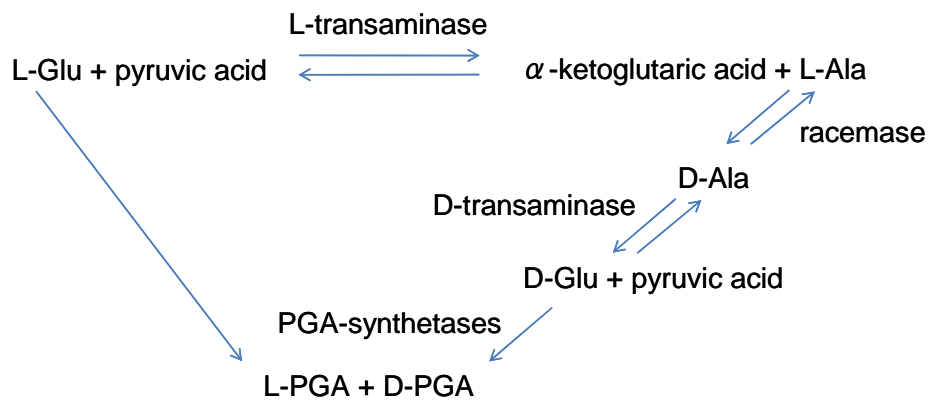
Scheme 2.1 Chemosynthesis of poly(α -glutamate).



Scheme 2.2 Biosynthesized poly(γ -glutamic acid) (PGA).

発酵合成 PGA は、*Bacillus subtilis* F-2-01^[6]や *Bacillus subtilis* IFO3335^[7]など、*Bacillus* 属に属する多くの微生物により発酵生産されることが知られている。*Bacillus* 属は、一般に好気性の有孢子桿菌に分類され、耐熱性で植物の種子に相当する孢子とよばれる耐久性細胞を細胞内に作ることを特徴としている^[5]。Bovarnick は *Bacillus subtilis* の 1 菌株が PGA を菌体外に分泌することを発見し^[1,8]、藤井は日本の伝統的な発酵食品である納豆の糸引き成分が PGA であることを確認した^[9]。

PGA の生合成経路は、原らにより Scheme 2.3 のように提案されている^[10]。



Scheme 2.3 Biosynthesis pathway of PGA.^[10]

PGA は高い生分解性と生体適合性を有していることから、これまでもその高機能化に関して多くの検討が行われてきた。例えば、PGA の医薬分野への利用を目的とした PGA のエステル化に関する研究^[11]などがある。また、PGA を、 γ 線の照射^[12-15]、あるいは、ジハロゲノアルカン^[16,17]やアルキルジアミン^[18]などの架橋剤を用いて架橋することによりゲルが合成されている。これらのゲルの多くはヒドロゲルで、高吸水性を示し、主にドラッグリリースシステム^[13,14,16-18]などの医薬および水処理剤^[15]などの環境関連分野への利用が想定されている。しかし、これまで研究に使用されてきた架橋剤のほとんどは石油由来原料から化学合成されたものである。使用目的から考えて、生分解性ゲルは使用後に環境中や生体内で分解されることを考慮すると、ゲルの主鎖部分が天然高分子であるだけでなく、架橋部分にも天然物を用いることが重要である。さらに、二酸化炭素の排出量削減や石油資源の保護の観点からもバイオマス資源を利用した材料開発が強く求められている。

そこで、著者らは、PGA を誘導体化することなくワンポットで、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中、水溶性カルボジイミド (WSC) の存在下、PGA と種々の糖をエステル結合させて架橋することにより、新規バイオベースヒドロゲルを合成した。国岡らは、水中で WSC の存在下、PGA がアルキルジアミンとのアミド結合により架橋され、最高収率として 100 mg の PGA から 39.9 mg のゲルが得られることを報告した^[18]。本章では、糖により架橋された PGA ゲルが、水溶液中で架橋反応を行った場合に比べて、DMSO 溶液を用いた場合に、より高い収率で得られたことを述べる。また、アルカリ性水溶液中のゲルの加水分解性についても比較検討を行った。

2.2 試薬・機器

2.2.1 試薬

PGA は、明治製菓（株）から提供された試料を用いた。明治製菓（株）の製品データによると、その分子量は、 3.1×10^5 である。その他の試薬は、試薬メーカーから購入した。以下に本章で用いた試薬をまとめた。

Table 2.1 List of reagents.

試薬名	製造会社	等級
1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（水溶性カルボジイミド；WSC）	東京化成工業（株）	特殊用
1,6-ヘキサンジオール	和光純薬工業（株）	特級
D-(+)-グルコース	東京化成工業（株）	特級
D-(-)-フルクトース	東京化成工業（株）	特級
D-(+)-ラクトース一水和物	東京化成工業（株）	特級
水溶性キトサン（脱アセチル化キトサン） ^a	和光純薬工業（株）	
マルトトリオース	和光純薬工業（株）	試薬1級
マルトペンタオース	和光純薬工業（株）	生化学用
マルトヘキサオース	和光純薬工業（株）	生化学用
マルトヘプタオース	和光純薬工業（株）	生化学用
α -シクロデキストリン（ α -CD）	和光純薬工業（株）	試薬1級
β -シクロデキストリン（ β -CD）	和光純薬工業（株）	試薬1級
γ -シクロデキストリン（ γ -CD）	和光純薬工業（株）	特級
4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）	和光純薬工業（株）	特級
4-ピロリジノピリジン（4-PP）	和光純薬工業（株）	
ジメチルスルホキシド（DMSO）	純正化学（株）	特級
重水	Isotec Inc.	
重水酸化ナトリウム、30% w/w溶液	和光純薬工業（株）	
アセトン	和光純薬工業（株）	特級
水酸化ナトリウム	和光純薬工業（株）	特級
トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン	東京化成工業（株）	特級
塩酸	関東化学（株）	特級
ホウ酸	和光純薬工業（株）	日本薬局方
四ホウ酸ナトリウム	和光純薬工業（株）	

^a $M_w = 9.7 \times 10^5$ by SEC measurement. Degree of deacetylation was 0.61 by elemental analysis.

2.2.2 機器

1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ : Waters 650 Waters Corp.

検出器 : Waters 486 tunable absorbance detector Waters Corp.

PGA の測定波長 220 nm

カラムオープン : 860-CO 日本分光 (株)

カラム : Waters Protein-Pak 300SW × 2 Waters Corp. (PGA 測定用)

または、Waters Protein-Pak 125SW Waters Corp. (水溶性キトサン測定用)

検量線用標準試料 : IgM ($M_w = 900000$)、IgG ($M_w = 150000$)、Myoglobin ($M_w = 17800$)、
Tryptophan (F.W. 204.2)

溶離液 : トリス-塩酸緩衝液 50 mM pH 7.5

測定条件 : 温度 = 37

流速 = 0.50 mL/min

注入量 = 5 μ L

2) その他の機器

FT-NMR : JNM-A 400 日本電子 (株)

FT-IR : FTIR-8200PC (株) 島津製作所

2.3 実験方法

2.3.1 PGA と中性糖の DMSO 中でのエステル結合形成による架橋

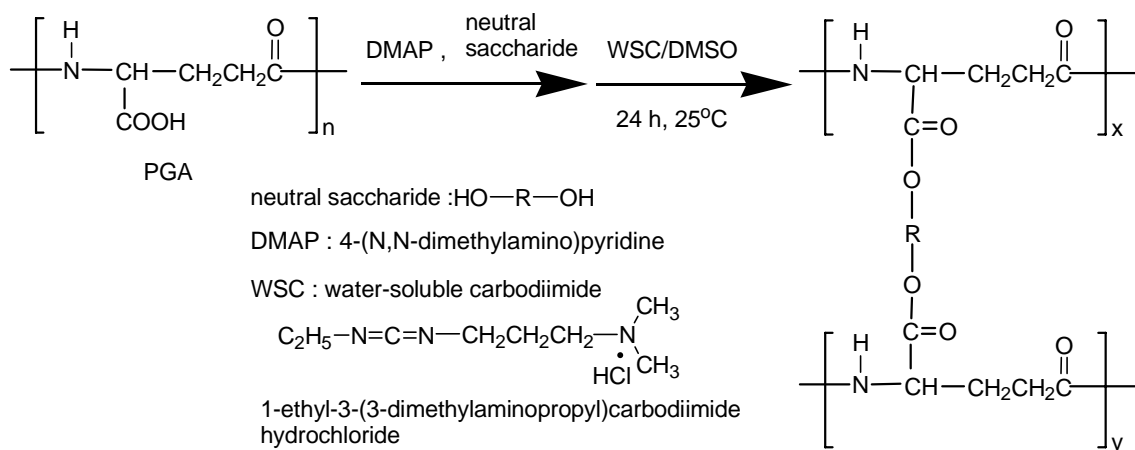
Scheme 2.4 に示す PGA ゲルの合成は次のようにして行った。PGA 100 mg (グルタミン酸残基 0.77 mmol)、DMAP 9.4 mg (0.077 mmol) および糖をねじ口試験管に取り、これに DMSO 0.70 mL を加えた。試験管を超音波洗浄機にかけ、超音波振動によって内容物を DMSO に溶解した。続いて WSC の DMSO 溶液を反応液に加え、25 °C で攪拌した。24 h 後、反応液をアセトンで希釈し、生じた沈殿をデカンテーションにより分離した。続いて、生成物を pH 7 リン酸緩衝溶液に一晩浸漬し、その後 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶液の pH を 8 に調整した。膨潤した PGA ゲルをナイロンメッシュバッグ (255 メッシュ、目開き 57 μm) に移し、そのバッグを蒸留水に浸け、1 週間、1 日 1 回水を入れ替えてゲルを洗浄した。過剰の水を除いた後、吸水膨潤した PGA ゲルを凍結乾燥することにより乾燥 PGA ゲルを得た。乾燥 PGA ゲルの収率は次式により算出した。

$$\text{yield (\%)} = W_{\text{gel}} / (W_{\text{PGA}} + W_{\text{CL}}) \times 100 \quad (1)$$

W_{gel} : 得られた乾燥 PGA ゲルの重量

W_{PGA} : 架橋前の乾燥 PGA の重量

W_{CL} : 反応に使用された架橋剤の重量



Scheme 2.4 Crosslinking of PGA by neutral saccharides.

また、PGA ゲルに含まれる架橋剤の含有率を調べるため、PGA ゲルの加水分解物の ^1H NMR スペクトルを測定した。このとき、水のプロトン由来のピークシグナル 4.80 ppm (2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム (DSS) を基準とする) を内部標準とした。測定に用いたゲルの加水分解物は次のように調製した。測定対象とする PGA ゲルを試験管に取り、 D_2O を加えた。 $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ 溶液を用いて、液 pH を 10 に調整後、試験管を 60°C の恒温器内に一晩置いた。PGA ゲルは、加水分解の進行に伴い、徐々に溶解した。均一な水溶液として得られた PGA ゲルの加水分解物について、NMR スペクトルを測定した。

2.3.2 水溶性キトサンによる PGA の架橋

PGA と DMSO を入れたねじ口試験管を超音波洗浄機にかけ、超音波振動によって溶解した。これに、WSC の DMSO 溶液を添加後、水溶性キトサンの水溶液を反応混合液に加え、 25°C で 24 h 攪拌した。得られた PGA ゲルを 2.3.1 と同様に洗浄、乾燥させた。架橋剤として水溶性キトサンを使用した場合には塩基を添加しなかった。水中で反応する場合には、PGA を 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、その後、PGA 水溶液に水溶性キトサン水溶液および WSC を順に加え、 25°C で攪拌した。24 h 後、反応液をアセトンで希釈し、生じた沈殿をデカンテーションにより分離した。続いて、生成物を pH 7 リン酸緩衝溶液に一晩浸漬し、その後 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶液の pH を 8 に調整した。膨潤した PGA ゲルをナイロンメッシュバッグ (255 メッシュ、目開き $57\ \mu\text{m}$) に移し、そのバッグを蒸留水に浸け、1 週間、1 日 1 回水を入れ替えてゲルを洗浄した。過剰の水を除いた後、吸水膨潤した PGA ゲルを凍結乾燥することにより乾燥 PGA ゲルを得た。乾燥 PGA ゲルの収率は式(1)により算出した。

2.3.3 PGA ゲルの吸水率測定

乾燥 PGA ゲルを秤量し、ナイロンメッシュバッグに入れた。24 h 後、過剰な水を除くためにバッグを吊り下げて 10 分間放置後、重量を測定した。ブランクとして空のナイロンバッグについて同様の操作を行った。PGA ゲルの吸水率 (g/g) は次式により求めた。

$$\text{water absorption} = (Q_1 - Q_0)/Q_0 \quad (2)$$

Q_0 : 乾燥 PGA ゲルの重量

Q_1 : 吸水膨潤した PGA ゲルの重量

2.3.4 PGA ゲルのアルカリ加水分解

架橋剤の含有率の異なる PGA ゲルサンプルを用いて、pH 9 の 0.1 M ホウ酸緩衝溶液中、37 °C で加水分解性試験を行った。緩衝溶液に PGA ゲルをそれぞれ 2 mg/mL の濃度となるように加えた。加水分解の経過は、経時的に上清をサンプリングして SEC により測定、評価した。

2.4 結果と考察

2.4.1 PGA のジオール、中性糖および水溶性キトサンによる架橋

PGAが中性糖によって架橋されるためには、Scheme 2.4に示したようにPGAと糖がエステル結合する必要がある。PGAのカルボキシル基が、水酸基と反応してエステル化する適当な反応条件を探索するため、予備実験として、架橋剤として1,6-ヘキサジオールを用いて検討を行った。その結果、WSCを用いた場合、水中では、水がアルコールより大過剰に存在するため、WSCと水からウレアが生成する反応が優勢となり^[19]、架橋はほとんど起こらなかったが、DMSO中では、塩基の存在下、架橋が進行したことがわかった (Table 2.2)。ここでは、PGAのグルタミン酸残基に対して25 mol %の割合で1,6-ヘキサジオールを用いた。DMAPあるいは4-PPを添加すると、良好な収率でPGAゲルが得られた。DMAPを用いた場合の収率は100 %を越えており、4-PPの場合よりわずかに高かった。収率は、架橋前のフリーのカルボキシル基を有するPGAおよび使用した架橋剤の重量の和を分母とした、2.3.1の式(1)から求めた。見かけ上、収率が100 %を越えたのは、得られたPGAゲルのフリーのカルボキシル基が洗浄時にナトリウム塩化されて重量増加したためと考えられる。

Table 2.2 PGA gel prepared from PGA and 1,6-hexanediol by use of water-soluble carbodiimide (WSC) and various bases in DMSO.^a

	Base	(mg)	Molar ratio of base to glutamic acid residue of PGA (mol-%)	Recovered weight (mg)	Yield (%)
a	NaHCO ₃	32.5	50	trace	-
b	Triethylenediamine	8.7	10	trace	-
c	DMAP	9.4	10	123.6	100
d	4-PP	11.4	10	116.2	94.5

^a Reaction conditions: 100 mg of PGA, 80 mg of WSC, 22.9 mg of 1,6-hexanediol, and 1.0 mL of DMSO; 25 °C for 24 hours.

続いて、予備実験の結果に基づき、DMSO中でWSCおよびDMAPを用いた、PGAの中性糖による架橋について検討した。結果をTable 2.3に示した。予備実験において、25 °Cより高い温度ではゲル化が進行しなかったため、反応は25 °Cで行った。その結果、PGAゲルは様々な中性糖、例えば、D-(-)-フルクトース (単糖)、ラクトース (二糖)、 α -、 β -および γ -CD (環状オリゴ糖)、また、塩基性のアミノ糖である水溶性キトサンなどを用いて合成できることがわかった。

中性糖による架橋反応には、PGA 100 mg (グルタミン酸残基 0.77 mmol)と、そのグルタ

ミン酸残基に対して25 mol %の中性糖、54 mol %のWSC (80 mg)および10 mol %のDMAP (9.4 mg)を使用した。また、溶媒として、DMSOを合計1.0 mL用いた (最終のPGA濃度は100 mg/mL)。

DMSO中の水溶性キトサンによる架橋の場合には、水溶性キトサン水溶液と均一に混合させるため、中性糖を用いる場合よりも半量のPGA (50 mg)で反応を行った。ただし、PGAのグルタミン酸残基に対する各試薬の添加モル比は、中性糖による架橋で使用した場合と同じ割合になるようにした。すなわち、PGA 50 mgのグルタミン酸残基 3.9 mmolに対して、54 mol %のWSC (40 mg)、また、溶媒としてDMSO 0.50 mLを加えて溶解した (最終のPGA濃度は100 mg/mL)。これに、25 mol %の水溶性キトサン(15.6 mg)を蒸留水 0.08 mLに溶かした水溶液を混合した。また、水溶液中で架橋を行う場合には、PGA 50 mg (グルタミン酸残基 0.39 mmol)と、そのグルタミン酸残基に対して25 mol %の水溶性キトサン(15.6 mg)および54 mol %のWSC (40 mg)を蒸留水 0.27 mLに溶解した。

いずれの場合にも、25 °Cで24 h反応を行い、洗浄、乾燥して、PGAゲルを得た。

得られたゲルについて吸水率を比較すると、糖の種類に関わらず、ゲルの収率が低い場合の方が高い吸水率が観測された。収率の低かったPGAゲルは、架橋した糖の量が少なかったと考えられる。結合している糖の量が少ないということは、すなわちゲルの架橋密度が小さいことを意味しており、このことが、収率の低かったPGAゲルが高い吸水率を発現した要因であると考えられる。PGAゲルの収率と吸水率に対する、架橋剤として使用された糖の化学構造や添加量などの影響については、後で議論する。

Table 2.3 PGA gel prepared from PGA and various saccharides.^a

Crosslinker	(mg)	Solvent	Recovered weight (mg)	Yield (%)	Water absorption (g/g)
D-Fructose ^b	34.9	DMSO	131.3	97.4	354
Lactose ^b	69.8	DMSO	147.0	86.6	387
α -CD ^b	188.4	DMSO	163.6	56.7	882
β -CD ^b	218.5	DMSO	100.0	31.4	933
γ -CD ^b	251.1	DMSO	155.5	44.3	981
Water-soluble chitosan ^c	15.6 ^d	DMSO	46.5	70.9	938
Water-soluble chitosan ^e	15.6 ^d	H ₂ O	17.0	23.8	1208

^a Various saccharides (25 mol %) to the glutamic acid residue of added PGA by use of WSC at 25 °C for 24 h.

^b Reaction conditions: 100 mg of PGA, 80 mg of WSC, 9.4 mg of DMAP, and 1.0 mL of DMSO.

^c Reaction conditions: 50 mg of PGA, 40 mg of WSC, and 0.50 mL of DMSO.

^d Reaction conditions: Water-soluble chitosan was added as 0.08 mL of aqueous solution.

^e Reaction conditions: 50 mg of PGA, 40 mg of WSC, and 0.19 mL of 1.0 M NaOH.

PGAのグルタミン酸残基に対して5.0 mol %の β -CDを用いたPGAの架橋について、反応時間を変え、得られた各PGAゲルの収率と吸水率をFigure 2.1に示した。反応時間24 hまで、ゲルの収率が增加するにつれて吸水率は減少した。これは、前述したように、PGAに結合した β -CDが増加して、架橋密度が大きくなったためであると考えられる。しかし、72 h後、収率はやや減少し、吸水率は増加した。このことから、反応混合物を過剰に長い時間そのまま放置すると、DMAPの触媒作用により、系に存在する微量の水（溶媒や糖などに含まれた水）が介在して、Scheme 2.5に示すような反応機構により架橋部分の加水分解が進行し、架橋密度が低下すると推測される。Figure 2.1 においては、最高収率75 %（PGA 100 mgからPGAゲル108 mg）でゲルを得られた。これは、WSCを用いて室温、水溶液中でアルキルジアミンによってPGAを架橋した、国岡らの報告^[18]と比較すると、およそ2.5倍の高い収率であった。DMSO中では、WSCと水の反応によるウレアの生成が起きにくいため、水中の反応よりも収率よくゲルが得られたと考えられる。

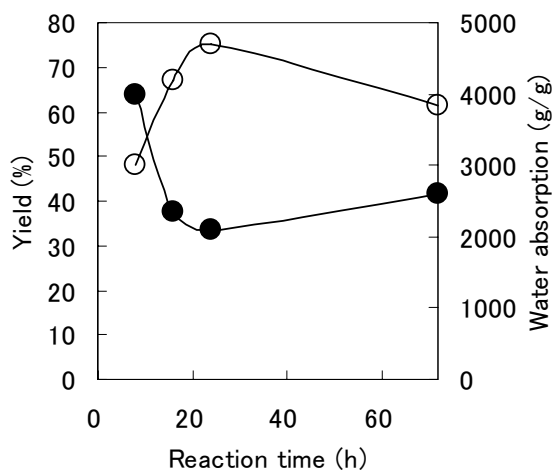
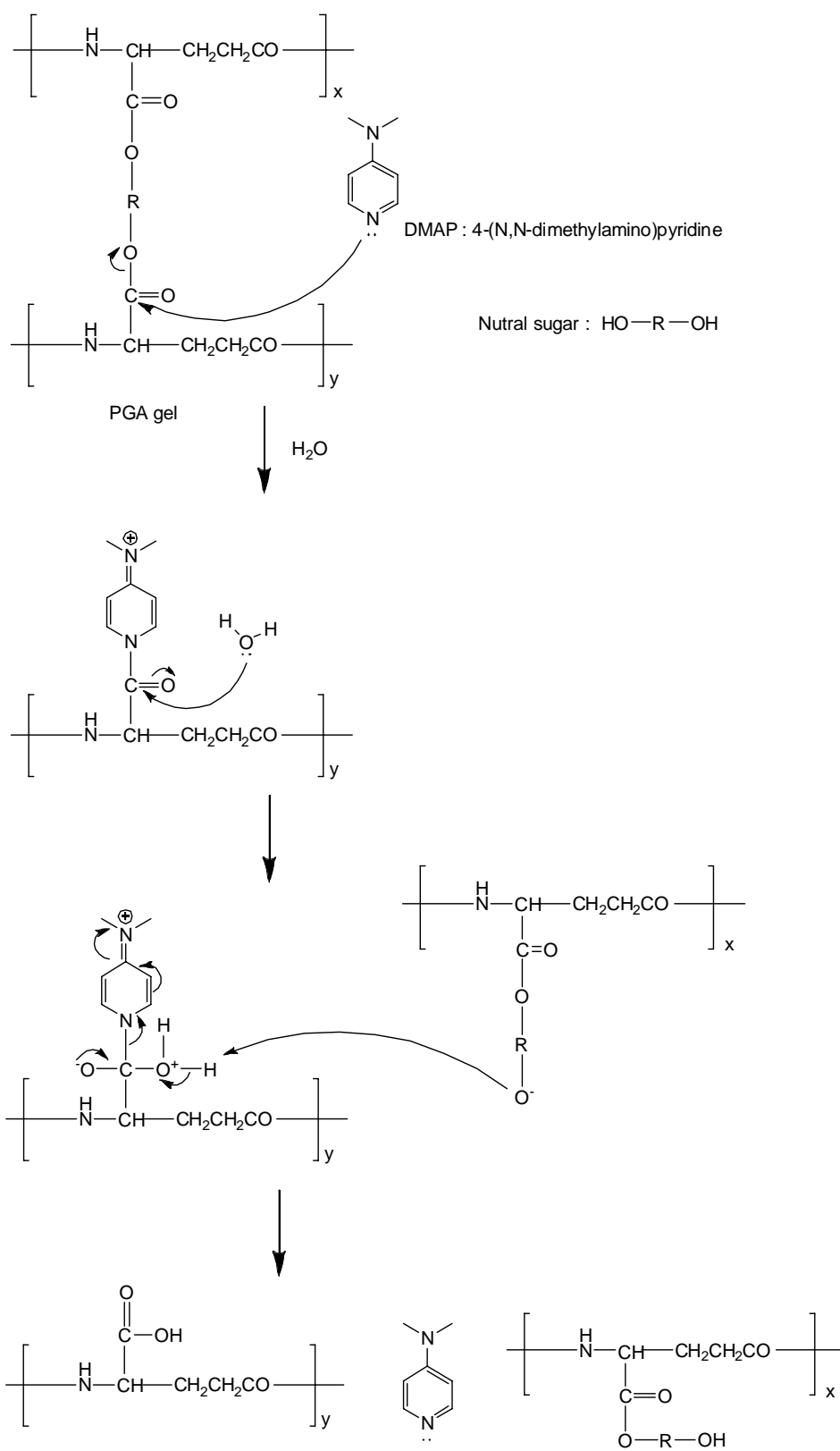


Figure 2.1 Time course of the yield and water absorption of the obtained PGA gel. The PGA gels were prepared by crosslinking PGA with β -cyclodextrin (β -CD) in DMSO at 25 °C by use of 100 mg of PGA, 43.6 mg of β -CD, 80mg of WSC, 9.4 mg of DMAP and 1.0 mL of DMSO. Yield (○) and water absorption (●) are shown.



Scheme 2.5 Estimated mechanism for hydrolysis of crosslinkage.

PGA、 α -CDおよび α -CDで架橋したPGAゲルのIRスペクトルをFigure 2.2に示した。PGAゲルのIRスペクトルにおいては、PGAに由来するピークに加えて、いくつかの α -CDに特徴的なピーク、例えば、1157および1028 cm^{-1} (CH-OHのOH変角およびC-O伸縮、C-O-Cの伸縮を含む) が現れている。これは合成したPGAゲルが α -CDを構成成分として含んでいることを示している。

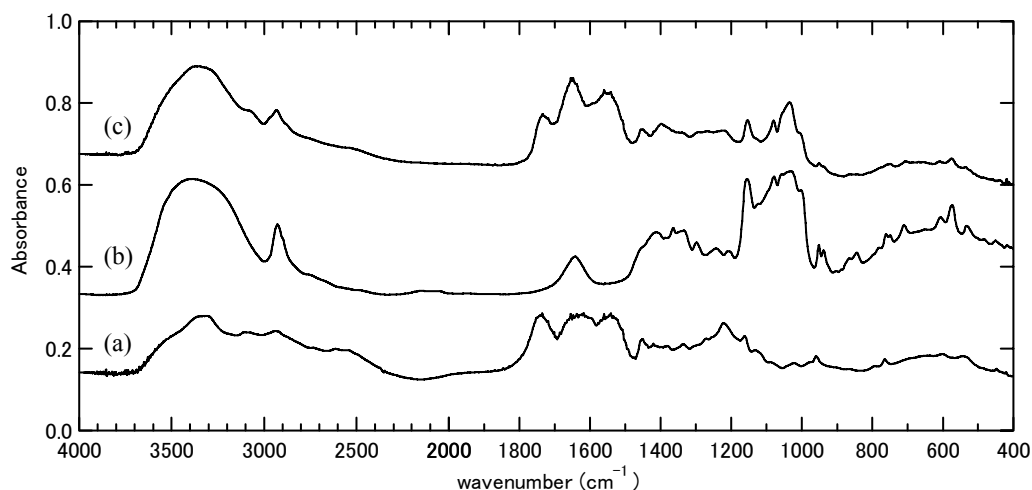


Figure 2.2 IR spectra of (a) PGA, (b) α -CD, and (c) PGA gel crosslinked by 25 mol % α -CD to the glutamic acid residue.

水溶性キトサンによるPGAの架橋の場合には、水溶性キトサンがDMSOに溶解しないため、水溶液としてから反応系に加えた。また、上述の中性糖での架橋と異なり、水溶性キトサン自身がアミノ基を有し、塩基性を示すため、DMAPのような塩基を添加せずに、架橋反応が進行し、不溶性のゲルが得られた。収率は70.9%であり、上述のその他の糖と同程度であった。Table 2に示したように、PGAはDMSO溶液だけでなく、水溶液中でも水溶性キトサンによって架橋された。これは、エステル結合と異なり、アミド結合の生成反応は、WSCの存在下、水中でも進行するためである^[18]。しかし、水中での反応の収率は23.8%と、DMSO中での収率の1/3程度と低かった。水中での収率が低かった原因として、水溶性キトサンよりも水の方が系内に過剰に存在するため、WSCと水の反応によるウレアの生成が優勢となったことが考えられる^[19]。水溶性キトサンを用いた、本反応手法は、塩基性アミノ酸であるL-リジンやL-オルニチンを用いたPGAの架橋反応にも適用可能であり、それについては第3章で述べる^[20]。

2.4.2 PGA ゲルに含まれる架橋剤の含有率とゲルの吸水率に対する反応時の架橋剤添加量の影響

α -CDで架橋されたPGAゲルの加水分解物の ^1H NMRスペクトルをFigure 2.3に示した。また、ゲルに含まれるPGAのグルタミン酸残基に対する、 α -CDの含有率 (mole percent) は次式から算出した。

$$Y \text{ (mol \%)} = [A_{6\text{H}}/(6/m)]/A_{\text{PGA}} \times 100 \quad (3)$$

Y : ゲルに含まれるPGAのグルタミン酸残基に対する糖の含有率 (mole percent)

$A_{6\text{H}}$: 糖のグルコース残基の各プロトンのピーク面積

m : 糖のグルコース残基の数 (α -CDあるいはマルトヘキサオースの場合は、 $m = 6$)

A_{PGA} : PGAのグルタミン酸残基の α -プロトンのピーク面積

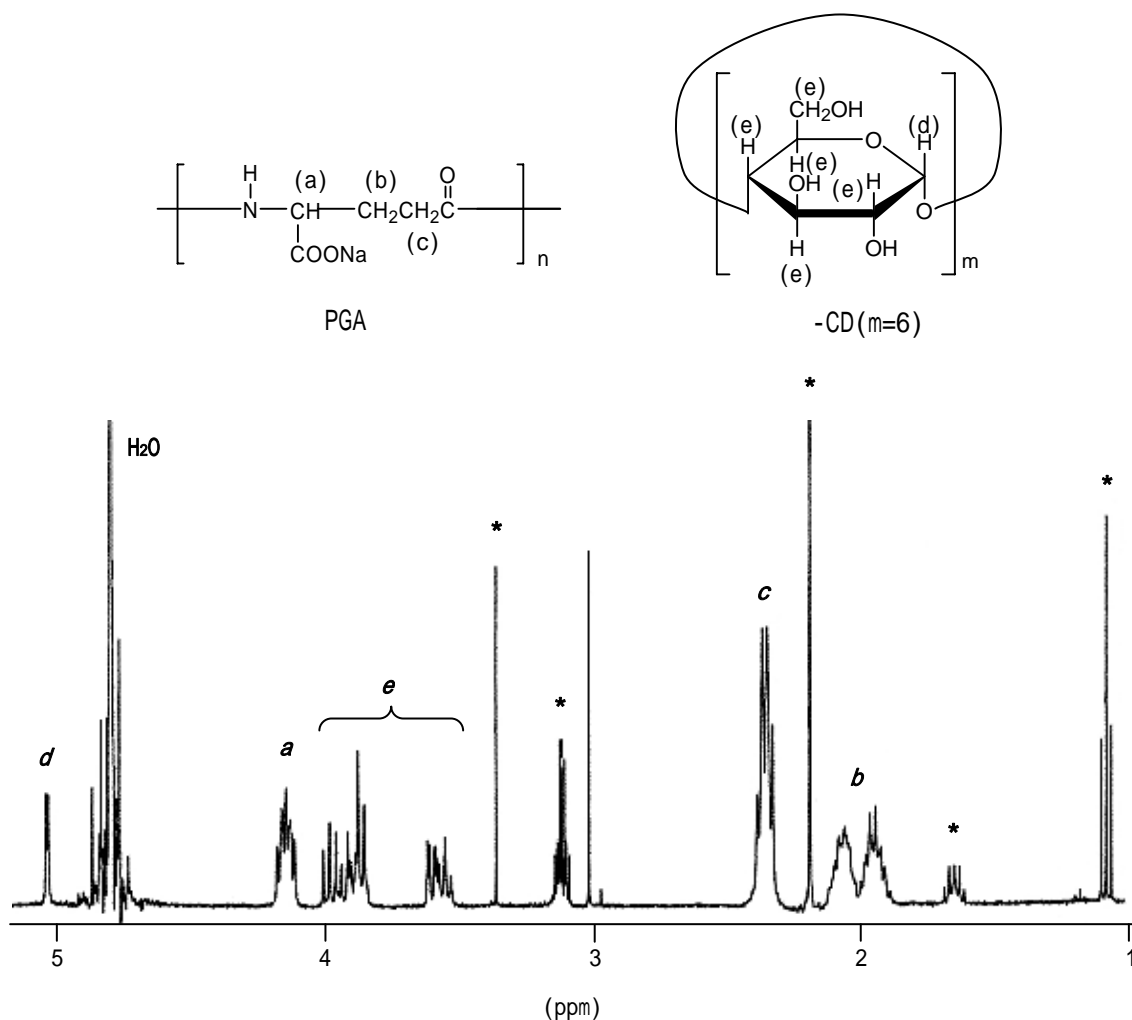


Figure 2.3 ^1H NMR spectrum (400 MHz) of hydrolyzates of PGA gel crosslinked by α -CD in D_2O . A signal of water at 4.80 ppm (from DSS) was used as an internal reference. The PGA gel was stood overnight at 60 °C to dissolve in pH 10 NaOD / D_2O solution. *N-Acyl urea was produced after the addition of α -CD or the PGA-WSC adduct remained in the gel (Scheme 2.6)

PGAゲルに含まれる架橋剤の含有率とゲルの吸水率に対する反応時の架橋剤添加量の影響を調べるため、PGAのグルタミン酸残基に対して、反応時に添加する α -CDのモル比を変えて、数種のPGAゲルサンプルを調製した。Figure 2.4は、反応溶液に添加した α -CD量が増加するに従い、PGAゲルに含まれる α -CD量が増加していることを示している。ゲル中の α -CDの含有率は、各サンプルの ^1H NMR スペクトルから、式(3)を用いて計算した。もし、 α -CDが二官能性の架橋剤として機能したとすると、Figure 2.4のいずれの反応条件においても、化学量論的には、添加した全ての α -CDがPGAと結合することが可能である。しかし、実際には、Figure 2.4からわかるように、得られたPGAゲルに実際に含まれていた α -CDの量からみると、反応時に添加した α -CDの反応率は、反応時に添加した α -CDのPGAに対するモル比が増加するに従い、減少している。この反応率の低さは、 α -CDの立体障害に起因すると考えられる。PGAに結合した α -CDは、そのかさ高い構造のため、WSCによって活性化されたカルボキシル基に、新たに別の α -CDが近づき、結合するのを妨げる。それ故に反応時に添加する α -CDの量が増えると、ゲル中の α -CDの反応率が減少したと考えられる。

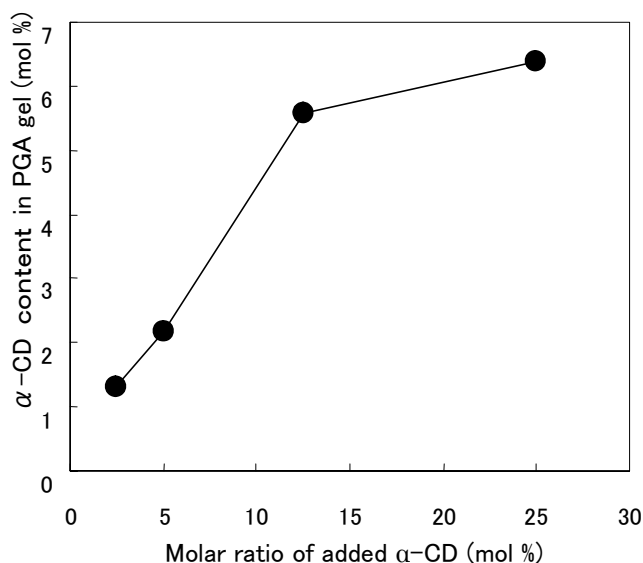


Figure 2.4 Relationship between molar ratio of α -CD added to the reaction solution and α -CD content in the PGA gel calculated from NMR spectra. The PGA gels were prepared using 100 mg of PGA, 9.4 mg of DMAP, 80mg of WSC and 1.0 mL of DMSO at 25 °C for 24 h.

Figure 2.5に、吸水率と、 ^1H NMRスペクトルから求めたPGAゲル中の α -CDの含有率との関係を示した。PGAゲル中の α -CDの含有率が5.6から1.3 mol %まで減少するにつれて、吸水率は470から2200 g/gまで増加した。この結果は、 α -CDの含有率が低い方が、PGAゲルの架橋密度が小さかったことに起因していると考えられる。しかし、一方で、PGAゲルは、 α -CDの含有率が6.4 mol %であったときには、5.6 mol %のときと比較して、より高い吸水率を示した。6.4 mol %の α -CDを含むPGAゲルを調製したときには、PGAのグルタミン酸残基に対して、25 mol %の α -CDを加えており、この量比はFigure 2.5に示したゲルサンプルの中では最も大きい。多くの α -CDが使用された場合には、立体障害などのために、一部の α -CDはPGA分子と架橋せず、Scheme 2.6に示したように、PGAに側鎖として結合していると推測される。結果として、6.4 mol %の α -CDを含むPGAゲルの架橋密度は、5.6 mol %の α -CDを含むPGAゲルよりもやや小さくなっており、それゆえ、吸水率がより大きくなったと考えられる。

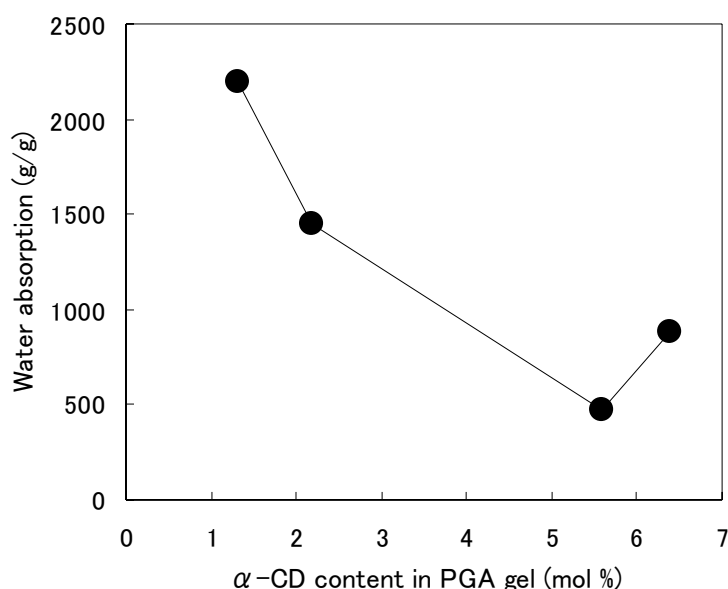
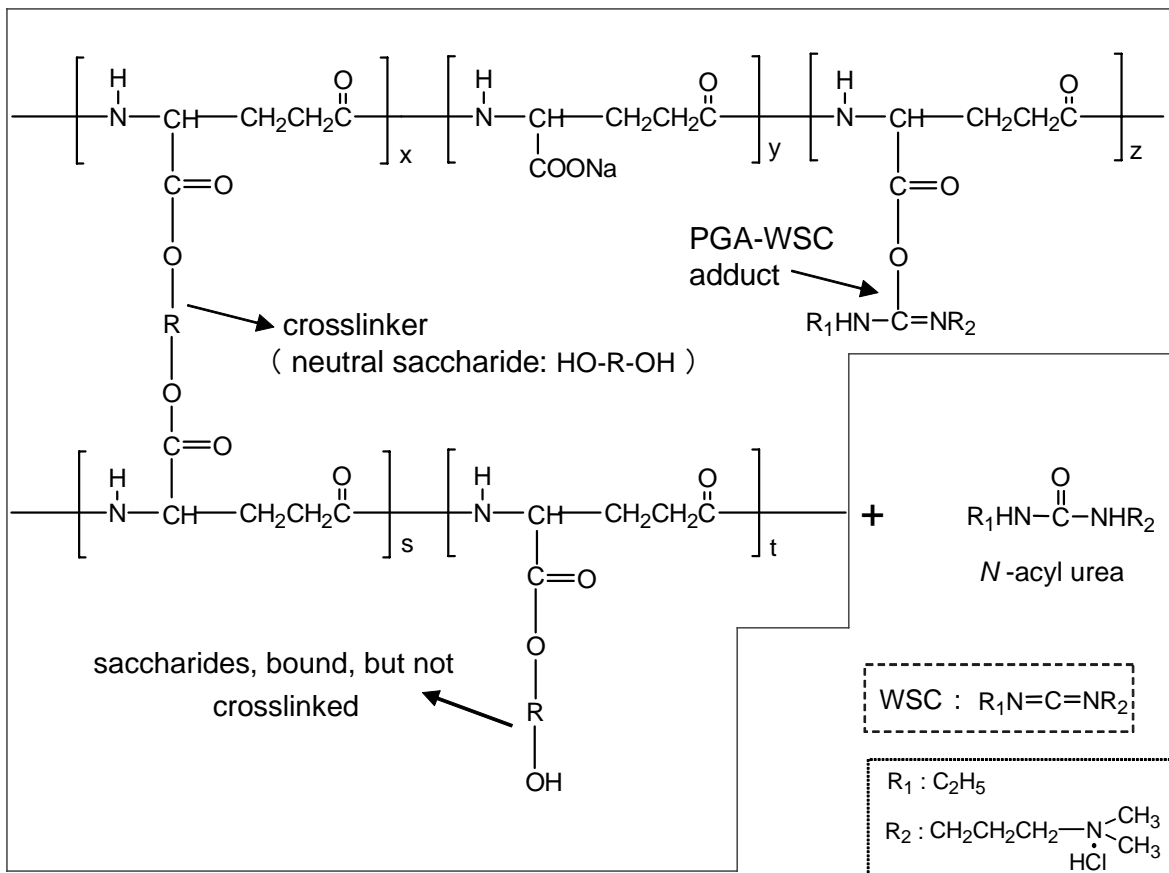


Figure 2.5 Relationship between water absorption and α -CD content in the PGA gels. The PGA gels were prepared with 100 mg of PGA, 9.4 mg of DMAP, 80mg of WSC and 1.0 mL of DMSO at 25 °C for 24 h.



Scheme 2.6 Possible structure of PGA gels crosslinked by neutral saccharides.

2.4.3 PGA ゲルの吸水率に対する架橋剤の化学構造の影響

グルコース残基で構成されている種々の糖によって架橋されたPGAゲルの吸水率および架橋剤の含有率について比較した (Figure 2.6)。PGAゲル中の糖の含有率は、式(3)により決定した。ただし、Figure 2.6aの、グルコースで架橋したPGAゲルについては、 ^1H NMRスペクトルにおいてグルコース由来のプロトンピークが非常に小さく、ピーク面積を使って計算することができなかつたため、糖の含有率 (白い棒グラフ) は示していない。架橋反応においては、PGAのグルタミン酸残基に対して、2.5あるいは12.5 mol %の割合で糖を添加した。結果はそれぞれ、Figure 2.6aおよびFigure 2.6bに示した。Figure 2.6a の吸水率は、いずれもFigure 2.6bの値よりも大きかった。Figure 2.6aに示したゲルはいずれも糖の含有率が低く、Figure 2.6bに示したゲルに比べて、ゲルのネットワーク構造がより粗な状態になっているためと考えられる。これらの結果から、ゲル中の架橋剤の含有率が、ゲルの架橋密度に影響し、そのために、ゲルの吸水率が変化することがわかった。環状オリゴ糖である α -CD ($m=6$) と β -CD ($m=7$) は、直鎖状の糖である、マルトヘキサオース ($m=6$)、マルトヘプタオース ($m=7$) と、それぞれ同数のグルコース残基から構成されている。Figure 2.6aにおいて、PGAゲル中の、マルトヘキサオース ($m=6$) およびマルトヘプタオース ($m=7$) の含有率は、それぞれ相当するCDの含有率とほぼ同等である。しかし、CDで架橋されたゲルは、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースで架橋されたゲルよりも高い吸水率を示した。この結果は、CDの環状構造とマルトヘキサオース、マルトヘプタオースの鎖状構造の違いに起因していると推測される。すなわち、CDのかさ高く柔軟性に欠ける環状構造が、CDによるPGAの架橋を妨げて、ゲルのネットワーク構造を粗な状態にしたと考えられること、また、その一方で、PGAの分子鎖のある1箇所結合した長い鎖状の糖が、別のPGAの分子鎖に到達し、結合して架橋する確率は、環状構造のCDとPGA分子鎖間での確率よりも高いと考えられること、が挙げられる。そして、このために、長い直鎖状の糖 (特に、Figure 2.6のマルトヘキサオースやマルトヘプタオースのような分子量のより大きいオリゴ糖) を用いたPGAゲルの架橋密度が高くなり、結果として、吸水率が低かったと考えられる。

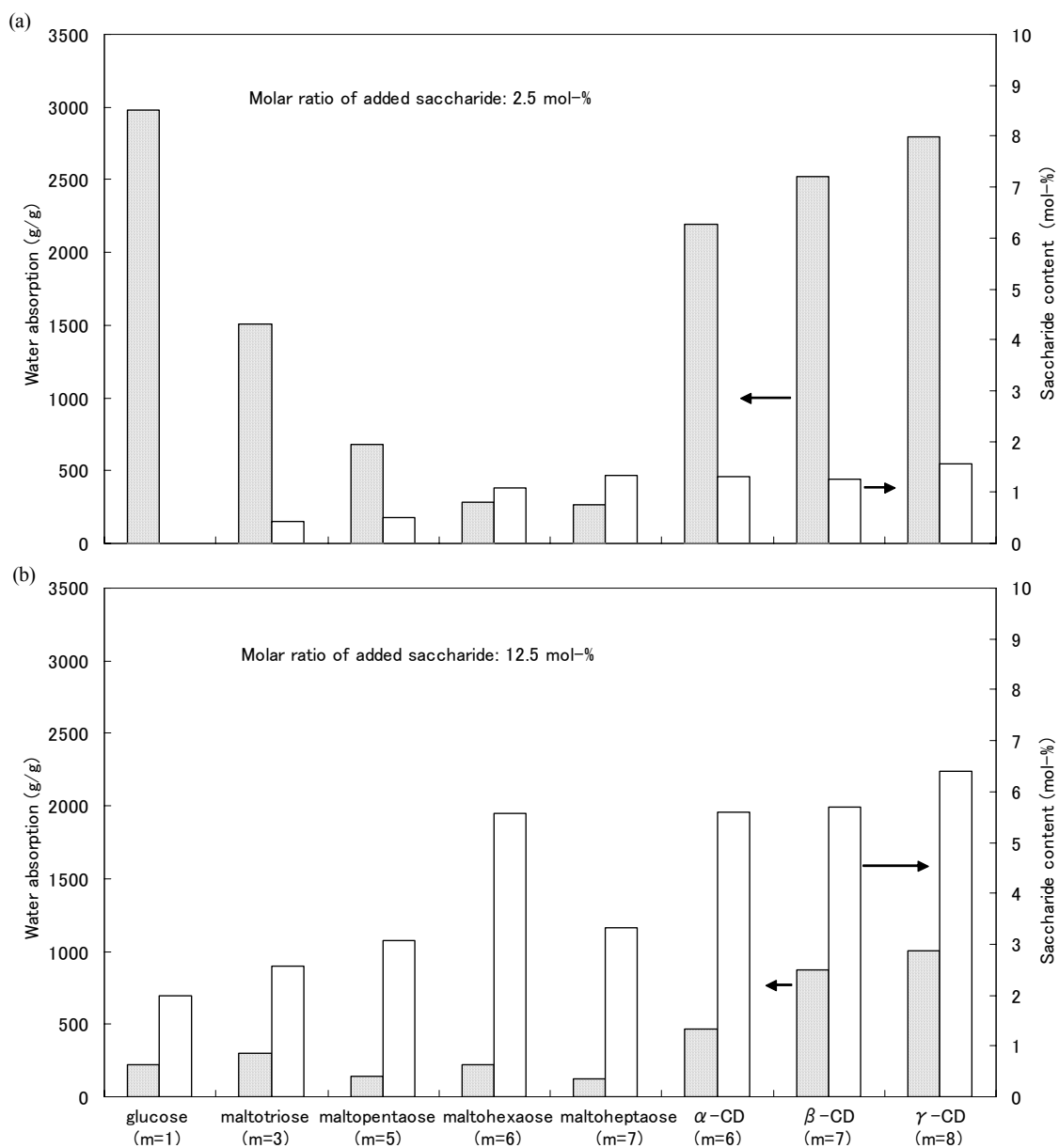


Figure 2.6 Water absorption (left gray bars) and saccharide content (right open bars) of PGA gels crosslinked by saccharides using 100 mg of PGA, 9.4 mg of DMAP, 80mg of WSC and 1.0 mL of DMSO at 25 °C for 24 h. The molar ratio of saccharides, used for the crosslinking, to the glutamic acid residue of PGA was 2.5 mol % (a) and 12.5 mol % (b).

2.4.4 PGA ゲルのアルカリ加水分解

α -CDで架橋されたPGAゲルについて、37 °C、アルカリ性水溶液 (pH 9) 中の加水分解性試験を行った。使用した3種のゲルの、PGAのグルタミン酸残基に対する α -CDの含有率は、1.3、2.2および5.6 mol %であり、また、これらのサンプルの吸水率は、それぞれ順に、2200、1450および470 g/gであった。数時間後、PGAゲルはアルカリ性水溶液に溶解した。SEC分析から、溶解したPGAは、架橋前の原料PGAと同等の分子量を持っていた。このことから、ゲルは、PGA主鎖が切断されたためではなく、架橋部分の切断が起きたために溶解したといえる。また、SEC分析により、上清のPGA濃度を経時的に測定した。サンプルの上清および2.0 mg/mLのPGA水溶液を標準としてSEC測定し、サンプルと標準PGAのクロマトピークの面積比から、上清のPGA濃度を算出した。次式から求めた、架橋ゲルの分解度を、Figure 2.7に示した。

$$D_{\text{gel}} = 2(S_{\text{gel}}/S_{\text{PGA}})/C_{\text{gel}} \quad (4)$$

D_{gel} : PGA ゲルの分解度

C_{gel} : ゲルが100 %分解された場合の最大PGA濃度

S_{PGA} : 標準として測定した2 mg/mL PGA水溶液のピーク面積

S_{gel} : ゲルから分離して上清に溶解してきたPGAのピーク面積

ゲルが100 %分解された場合の最大PGA濃度 (C_{gel}) については、 ^1H NMRスペクトルから、おおよその値を算出した。 C_{gel} は、PGAのグルタミン酸残基に対する α -CDの含有率が、1.3、2.2および5.6 mol %の各PGAゲルについて、順に1.8、1.7および1.4 mg/mLであった。Figure 2.7から、時間経過に従い、PGAと α -CDの架橋構造において、エステル結合が徐々に加水分解され、上清に溶解したPGAの濃度が増加したことがわかる。 α -CDの含有率が高いPGAゲルは、分解度が100 %に達する濃度までPGAが溶解するのに、より長い時間を要した。一部、分解度が1を越えた理由は明らかでないが、おそらくSEC分析の変動のためではないかと思われる。

また、Figure 2.7において、PGAの濃度が急に上昇する、特定の時間 (矢印で示した) の存在が観察された。 α -CDの含有率が、1.3、2.2および5.6 mol %の各PGAゲルについて、その時間は、順に、150、180および300分であり、 α -CDの含有率が高いほど、遅く現れた。これは、 α -CDの含有率が高い方が、溶解までに、加水分解される必要があるエステル結合の量が多いためである。この特定の時間は、加水分解がゲルの溶解の進行によって加速された、一種の臨界時間と考えられる。すなわち、分解の第一段階として、ゲルの表層近くに存在するPGA分子が分離、溶解して上清に移行する。しかし、この段階では、ゲル内部で遊離したPGA分子は、ネットワーク構造の中に取り込まれたままである。ある臨界時間に達す

ると、ネットワーク構造が壊れて、溶解するに十分な程度まで架橋点が加水分解され、PGA分子が、一気に上清に分離、溶解してきたために、PGA濃度の急激な上昇が起きたのではないかと考えられる。

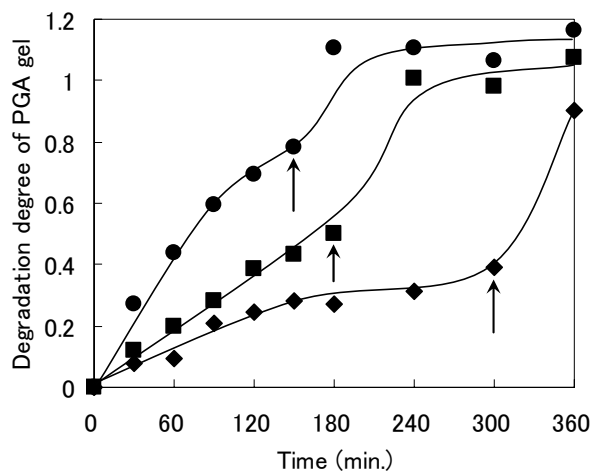


Figure 2.7 Alkaline hydrolysis profiles of PGA gels crosslinked by α -CD. The α -CD contents of the PGA gels were 1.3 mol % (●), 2.2 mol % (■), and 5.6 mol % (◆).

2.5 結論

微生物が発酵生産するPGAを、DMSO中、WSCの存在下、種々の糖で架橋することによって、新規なバイオベースヒドロゲルを合成した。

架橋剤としては、グルコース、マルトース、CDおよび水溶性キトサンなどを使用し、誘導体化などの前処理が不要なワンポット反応により、25 °C、24 hでゲル化を達成した。中性糖で架橋する場合には、DMAPのような塩基を添加すると、比較的高い収率でPGAゲルが得られた。合成したPGAゲルのうち、グルコースで架橋したゲルが、3000 g/gと最も高い吸水率を示した。また、環状オリゴ糖であるCDで架橋されたPGAゲルは、相当する糖残基数を持つ鎖状オリゴ糖で架橋されたPGAゲルよりも高い吸水率を示した。これは、環状オリゴ糖のかさ高く柔軟性に欠ける構造が架橋反応の進行を妨げるために側鎖構造をとるものが多く、鎖状オリゴ糖の場合よりも架橋密度が低くなったためと考えられる。

PGAゲルの吸水率は、架橋剤の含有率およびその化学構造によって変化することがわかった。これらの双方がPGAの架橋密度に影響を与えており、ゲルの架橋密度が高くなると吸水率は減少し、架橋密度が低くなると吸水率は増大するためである。

また、ゲルはアルカリ条件下 (pH 9、37 °C) で加水分解され、ゲルの架橋剤含有率が低い方が、分解速度は速かった。

本研究で得られたゲルは、架橋点でエステル結合した、天然の生分解性化合物のみから成ることから、生分解性を有し、例えば水処理剤、土壌改良材や徐放材料などとして、環境、農業および医薬分野への応用が期待される。

2.6 参考文献

- [1] シーエムシー（編），生分解性プラスチックの実際技術，シーエムシー（1992）.
- [2] 島昭二，大島省一，酒井平一，日本農芸化学会誌，**57**, 221 (1983).
- [3] 高分子学会（編），天然素材プラスチック，共立出版（2006）.
- [4] K. C. Low, A.P. Wheeler, and L. P. Koskan. in *Hydrophilic Polymers*, J. E. Glass, Ed., *Adv. Chem. Ser.* 248, Am. Chem. Soc., Washington, p. 99 (1996).
- [5] 土肥義治（編），生分解性高分子材料，工業調査会（1990）.
- [6] H. Kubota, T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka, and M. Taniguchi, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **57**, 1212 (1993).
- [7] M. Kunioka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 501 (1995).
- [8] M. Bovarnick, *J. Biol. Chem.*, **145**, 15 (1942)
- [9] 藤井久雄，農芸化学会誌，**37**, 407 (1963).
- [10] T. Hara, Y. Fujio, and S. Ueda. *J. Appl. Biochem.*, **4**, 112 (1982).
- [11] H. Kubota, Y. Nambu, and T. Endo, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **31**, 2877 (1993).
- [12] H. J. Choi and M. Kunioka. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 175 (1995)
- [13] H. J. Choi and M. Kunioka, *J. Environ. Polym. Degrad.*, **4**, 123 (1996).
- [14] H. J. Choi and M. Kunioka, *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 33 (1998).
- [15] M. Kunioka, *Macromol. Biosci.*, **4**, 324 (2004).
- [16] D. Gonzales, K. Fan, and M. Sevoian, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **34**, 2019 (1996).
- [17] K. Fan, D. Gonzales, and M. Sevoian, *J. Environ. Polym. Degrad.*, **4**, 253 (1996).
- [18] M. Kunioka and K. Furusawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 1889 (1997).
- [19] N. Nakajima and Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 123 (1995).
- [20] S. Murakami, N. Aoki, and S. Matsumura, *Polym. J.*, **43**, 414 (2011).

第3章 アミノ酸により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

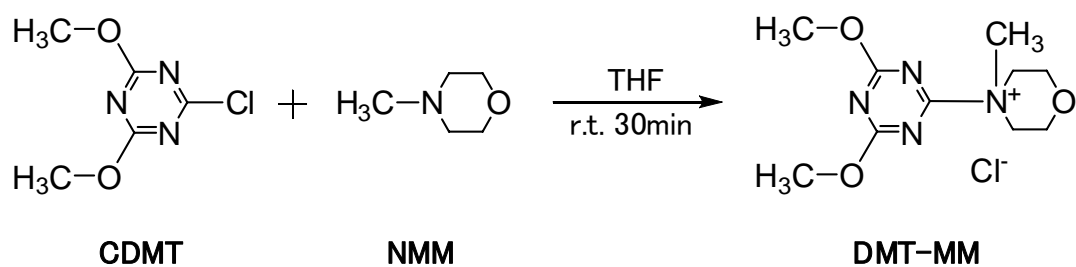
3.1 緒言

微生物により直接発酵生産されるポリアミノ酸である、ポリ(γ-グルタミン酸) (PGA) はカルボキシル基、ポリ(L-リジン) はアミノ基を有しており、それら官能基を利用して、生分解性の高機能性材料の開発を目指した様々な検討が行われてきた^[1]。

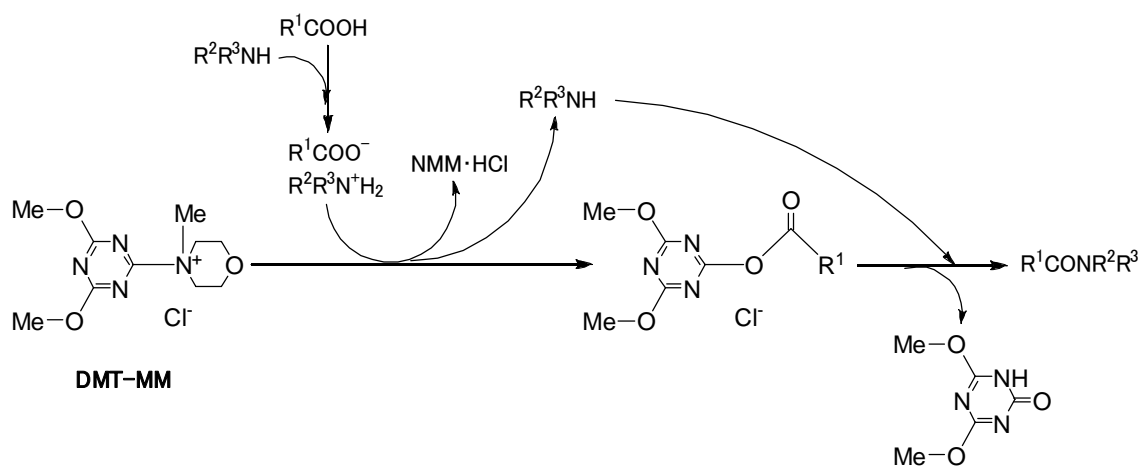
そのなかで著者らは、医薬・化粧品用途、環境分野などへの応用が期待される PGA ゲルに着目した。第2章では、PGA を天然物で架橋し、すべて天然物からなるバイオベースヒドロゲルを得ることを目的として、微生物が発酵生産する PGA を、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中、水溶性カルボジイミド (WSC) を用いて種々の糖で架橋した、PGA ゲルについて述べた^[2]。ここでは反応溶媒として DMSO を用いたが、グリーンケミストリーの観点からは、生成物のみでなく、合成プロセスにおいても、環境負荷を低減することが求められている。すなわち、反応溶媒としては、有機溶媒でなく、より環境低負荷な水を使用することが望ましい^[3]。

水溶媒中 WSC を用いた場合、PGA と α-シクロデキストリン (α-CD) などの中性糖とのエステル結合の形成反応は進行しなかったが、アミノ糖 (キトサン) や塩基性アミノ酸 (L-リジン) とのアミド結合の形成による PGA の架橋反応は進行した。例えば、WSC を用いた PGA の水溶性キトサンによる架橋は、DMSO および水の両方の溶媒で進行したが、DMSO 中での収率が水溶媒中よりも大幅に高かった^[2]。このことから、本章では、水溶媒中でのアミド結合形成反応に着目し、水溶媒中、高収率で PGA ゲルを得られる架橋方法について検討を行った。国嶋らは、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩 (DMT-MM) が、水溶媒中、良好な収率でアミド結合形成反応を進行させることを報告した^[4,5]。DMT-MM は、Scheme 3.1 に示すように、2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン (CDMT) および *N*-メチルモルホリン (NMM) をテトラヒドロフラン (THF) 中で反応させることにより、定量的に得ることができる^[4]。DMT-MM のアミド結合形成反応については、Scheme 3.2 のように、まずカルボキシレートアニオンが DMT-MM を攻撃して活性エステルを生成し、これがアミンにより攻撃を受け、アミド化合物が合成されるという反応機構が提案されている^[4]。

本章では、この DMT-MM を利用した、水溶媒中の L-リジンによる PGA の架橋について述べる。本反応により得られる PGA ゲルは、L-リジンとのアミド結合形成により架橋されており、エステル結合で架橋したゲルよりも、一般に、耐加水分解性が高いと考えられる。また、主鎖、架橋剤とも天然物由来であることから生分解性を有すると期待される。そのため、ゲルの加水分解性および生分解性についても検討を行った。



Scheme 3.1 Preparation of 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) from 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) and *N*-methylmorpholine (NMM) in THF.



Scheme 3.2 Mechanism of amide-forming reaction by DMT-MM.

3.2 試薬・機器

3.2.1 試薬

PGA は、明治製菓（株）から提供された試料を用いた。明治製菓（株）の製品データによると、その分子量は、 3.1×10^5 である。その他の試薬は、試薬メーカーから購入した。以下に本章で用いた試薬をまとめた。

Table 3.1 List of reagents.

試薬名	製造会社	等級
1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（水溶性カルボジイミド；WSC）	東京化成工業（株）	特殊用
L-リジン一塩酸塩	和光純薬工業（株）	特級
L-オルニチン一塩酸塩	和光純薬工業（株）	特級
4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩（DMT-MM）	和光純薬工業（株）	
2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン（CDMT）	和光純薬工業（株）	有機合成用
N-メチルモルホリン（NMM）	和光純薬工業（株）	特級
テトラヒドロフラン、脱水、安定化剤不含（THF）	和光純薬工業（株）	有機合成用
重水	Isotec Inc.	
重水酸化ナトリウム、30% w/w溶液	和光純薬工業（株）	
ジメチルスルホキシド（DMSO）	純正化学（株）	特級
アセトン	和光純薬工業（株）	特級
アニリン	和光純薬工業（株）	特級
水酸化ナトリウム	和光純薬工業（株）	特級
ホウ酸	和光純薬工業（株）	日本薬局方
四ホウ酸ナトリウム	和光純薬工業（株）	
リン酸二水素カリウム	和光純薬工業（株）	特級
リン酸水素二カリウム	和光純薬工業（株）	特級
リン酸水素二ナトリウム二水和物	和光純薬工業（株）	特級
塩化アンモニウム	純正化学（株）	特級
硫酸マグネシウム七水和物	純正化学（株）	1級
塩化カルシウム二水和物	関東化学（株）	特級
塩化鉄（Ⅲ）六水和物	和光純薬工業（株）	特級
イソチオシアン酸フェニル	和光純薬工業（株）	アミノ酸 配列分析用

2.2.2 機器

1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ : Waters 650 Waters Corp.

検出器 : Waters 486 tunable absorbance detector Waters Corp. 測定波長 220 nm

PGA の測定波長 220 nm

カラムオープン : 860-CO 日本分光 (株)

カラム : Waters Protein-Pak 300SW × 2 Waters Corp.

検量線用標準試料 : IgM ($M_w = 900000$)、IgG ($M_w = 150000$)、Myoglobin ($M_w = 17800$)、
Tryptophan (F.W. 204.2)

溶離液 : トリス-塩酸緩衝液 50 mM pH 7.5

測定条件 : 温度 = 37

流速 = 0.50 mL/min

注入量 = 5 μ L

2) Waters Pico-Tag アミノ酸分析システム

ポンプ : Waters 510 × 2 Waters Corp.

検出器 : Waters 486 tunable absorbance detector Waters Corp.

測定波長 254 nm

デガッサー : SHODEX DEGAS KT-25M 昭和電工 (株)

オートサンプラー : Waters 712 WISP Waters Corp.

カラムオープン : Waters CHM Waters Corp.

温度コントローラー : Waters TCM Waters Corp.

カラム : Waters Pico-Tag method column Waters Corp.

標準試料 : アミノ酸混合標準液、H 型 和光純薬工業 (株)

溶離液 : Pico-Tag 溶離液 A、B 和光純薬工業 (株)

測定条件 : 温度 = 38

流速 = 1.0 mL/min

注入量 = 10 μ L

3) その他の機器

FT-NMR : JNM-A 400 日本電子 (株)

FT-IR : FTIR-8200PC (株) 島津製作所

粘弾性測定装置：ARES 粘弾性測定システム TA Instruments, Co., Ltd

BOD 自動記録測定装置：DKK-BOD-3 電気科学計測（株）

3.3 実験方法

3.3.1 WSC を用いた PGA の水または DMSO 中での架橋

L-リジンで架橋された PGA ゲルの調製方法は、Scheme 3.3 に示した。Scheme 3.3a では、DMSO を反応溶媒として使用した。PGA 100 mg (グルタミン酸残基 0.77 mmol) をねじ口試験管に取り、これに DMSO 0.70 mL を加えた。試験管を超音波洗浄機にかけ、超音波振動によって内容物を DMSO に溶解した。続いて WSC 80 mg (0.42 mmol) の DMSO 溶液 0.30 mL と、L-リジン塩酸塩 35.3 mg (0.19 mmol) を水 0.16 mL に溶解後、設定した pH (pH 5.6~9.7) に 1.0 M NaOH を用いて調整した L-リジン水溶液を、順に、反応混合物に加えた。この反応条件では、PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの添加率は 0.25 である。この反応混合物を 25 °C で攪拌した。24 h 後、反応液をアセトンで希釈し、生じた沈殿をデカンテーションにより分離した。続いて、生成物を pH 7 リン酸緩衝溶液に一晩浸漬し、その後 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶液の pH を 8 に調整した。膨潤した PGA ゲルをナイロンメッシュバッグ (255 メッシュ、目開き 57 μm) に移し、ろ過した。バッグに残った PGA ゲルをバッグごと蒸留水に浸け、1 週間、1 日 1 回水を入れ替えてゲルを洗浄した。過剰の水を除いた後、吸水膨潤した PGA ゲルを凍結乾燥することにより乾燥 PGA ゲルを得た。乾燥 PGA ゲルの収率は次式により算出した。

$$\text{yield (\%)} = W_{\text{gel}} / W_{\text{PGA}} \times 100 \quad (1)$$

W_{gel} ：得られた乾燥 PGA ゲルの重量

W_{PGA} ：架橋前の乾燥 PGA の重量

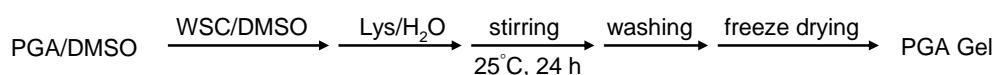
得られた乾燥ゲルでは、PGA の未架橋部分のカルボン酸がナトリウム塩化し、また架橋部分には L-リジン残基が結合している。そのため、架橋反応の進行に従い、収率は 100% を越える場合がある。

Scheme 3.3b に示した方法では、反応溶媒として DMSO の代わりに水が使われている。PGA 50 mg (0.39 mmol) をねじ口試験管に取り、これに 1.0 M NaOH 0.19 mL を加えて PGA を溶解した。WSC 粉末 40 mg (0.21 mmol) および L-リジン塩酸塩 17.7 mg (0.097 mmol) を水 0.08 mL に溶解後 1.0 M NaOH を用いて規定の pH (pH 5.6~9.7) に調整した L-リジン水溶液を、順に、反応混合物に加えた。この反応条件では、前述した DMSO を用いた場合と同様に、PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの添加率は 0.25 である。この反応混合物を 25 °C

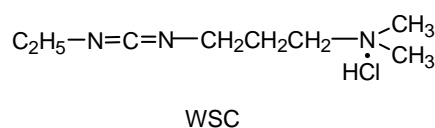
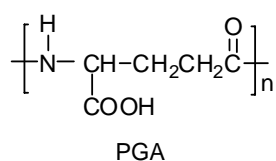
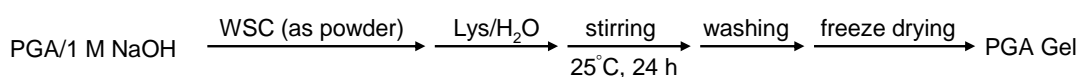
で攪拌した。24 h後、反応液をアセトンで希釈し、生じた沈殿をデカンテーションにより分離した。続いて、生成物をpH 7リン酸緩衝溶液に一晩浸漬し、その後1.0 M水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶液のpHを8に調整した。膨潤したPGAゲルをナイロンメッシュバッグ（255メッシュ、目開き57 μm）に移し、ろ過した。バッグに残ったPGAゲルをバッグごと蒸留水に浸け、1週間、1日1回水を入れ替えてゲルを洗浄した。過剰の水を除いた後、吸水膨潤したPGAゲルを凍結乾燥することにより乾燥PGAゲルを得た。乾燥PGAゲルの収率は式(1)により算出した。

また、α-CDで架橋したPGAゲルも、DMSO中、WSCを用いて前章の方法^[2]に従って合成した。PGAのグルタミン酸残基のモル数に対するα-CDの添加率は0.25である。得られたPGAゲルは後述する加水分解性試験に用いた。

a) Crosslinking in DMSO



b) Crosslinking in water



Scheme 3.3 Methods for crosslinking of poly(γ-glutamic acid) (PGA) with L-lysine by water-soluble carbodiimide (WSC) in dimethyl sulfoxide (DMSO) and water.

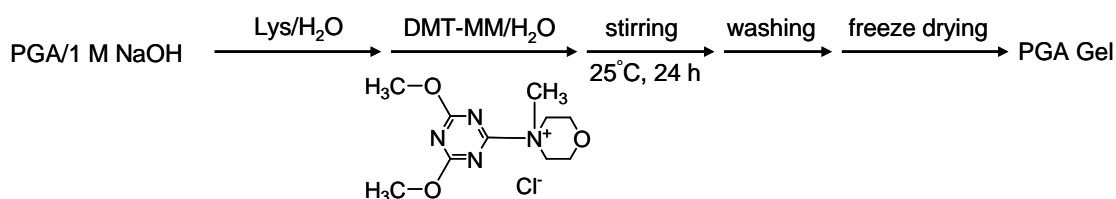
3.3.2 DMT-MM を用いた L-リジンによる PGA の水中での架橋

DMT-MM を用いた PGA ゲルの調製方法を Scheme 3.4 に示した。詳細を以下に記す。PGA 50 mg (0.39 mmol)をねじ口試験管に取り、1.0 M NaOH 0.35 mL を加えて PGA を溶解した。次に、L-リジン塩酸塩 17.7 mg (0.097 mmol)を水 0.08 mL に溶解後 1.0 M NaOH を用いて pH 8.9 に調整した。この L-リジン水溶液をねじ口試験管に加え、0.5 h 攪拌した。本反応条件では、前述した DMSO を用いた場合と同様に、PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの添加率は 0.25 である。攪拌後、DMT-MM 54 mg (0.20 mmol)を 0.20 mL の水に溶かし、反応混合物に加えた。これを 25 °C で 24 h 攪拌した。得られた反応生成物の洗浄、乾燥は 3.3.1 と同様に行った。得られたゲルは、後述の加水分解性試験および生物化学的酸

素要求量(BOD)-生分解性試験に用いた。乾燥 PGA ゲルの収率は、式(1)により算出した。

DMT-MM を用いて L-リジンで架橋した PGA ゲルの ^1H NMR スペクトルを測定した。このとき、水のプロトン由来のピークシグナル 4.80 ppm (2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウムを基準とする) を内部標準とした。測定に用いたゲルの加水分解物は次のように調製した。水不溶の PGA ゲルを試験管にはかり取り、 D_2O を加えた。NaOD/ D_2O 溶液を用いて、液 pH を 10 に調整後、試験管を 60°C の恒温器内に一晩置いた。PGA ゲルは、加水分解の進行に伴い、徐々に溶解した。均一な水溶液として得られた PGA ゲルの加水分解物について、 ^1H NMR スペクトルを測定した。同定したピークシフト値を以下に示した。

$\delta = 1.31$ (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.41 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}$), 1.51 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}$), $1.92, 2.04$ (m, 2H, $\text{O}(\text{O}=\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO})$), 2.35 (m, 2H, $\text{O}(\text{O}=\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO})$), 2.58 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}$), 3.20 (m, 1H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}$), 4.12 (m, 1H, $\text{O}(\text{O}=\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO})$).



Scheme 3.4 A method for crosslinking of PGA with L-lysine by DMT-MM in water.

PGA ゲルに含まれる L-リジンの含有率を決定するため、HPLC によるアミノ酸の定量分析を行った^[6]。PGA ゲル およそ $10\ \mu\text{g}$ を秤量してサンプルチューブに取り、6 M 塩酸/1 % フェノール溶液 $1\ \mu\text{L}$ を加えた後、反応バイアルに入れて真空乾燥させた。6 M 塩酸/1 % フェノール溶液 $200\ \mu\text{L}$ を反応バイアル内底部に入れ、 N_2 雰囲気下、 105°C 、24 h 反応させて、PGA ゲルをアミノ酸に加水分解した。溶液に中和液 (メタノール 2 : H_2O 2 : トリエチルアミン 1 (すべて容量比)) $10\ \mu\text{L}$ を加えて中和、乾燥させた。反応剤 (メタノール 7 : トリエチルアミン 1 : H_2O 1 : イソチオシアン酸フェニル 1) $20\ \mu\text{L}$ を加え、20 分間反応後、ただちに乾燥操作を行って、イソチオシアン酸フェニルアミノ酸誘導体を得た。これに希釈液 (pH 7.4 リン酸緩衝溶液 95 : アセトニトリル 5) $100\ \mu\text{L}$ を加え、ここから $10\ \mu\text{L}$ をサンプルチューブに取り、希釈液 $90\ \mu\text{L}$ を加えて 10 倍希釈し、測定試料とした。アミノ酸混合標準試料についても、最後の 10 倍希釈以外は、PGA ゲルと同様に誘導体化を行って標

準サンプルとし、検量線作成に使用した。各イソチオシアン酸フェニルアミノ酸誘導体の量を Waters Pico-Tag アミノ酸分析システムで測定した。

また、PGA ゲルの架橋密度を評価することを目的として、1.0 Hz におけるゲルの貯蔵弾性率 (G') を粘弾性測定装置を用いて測定した。直径 25 mm の平行プレートを用いて、一定の剪断歪 (3%)、24 °C で、動的周波数掃引試験を 0.10~15 Hz の範囲で行った。粘弾性測定に供するため、DMT-MM を用いて、異なる割合で L-リジンを加えて PGA を架橋した数種のゲルサンプルを、測定用の平行プレート上で合成した。測定は、反応系に DMT-MM を添加してから 24 h 後以降に連続して行い、ゲルの洗浄および乾燥はせずに、そのまま使用した。平行プレート内の PGA ゲルは、厚さ約 0.7 mm で、乾燥ゲル 1 g あたりおよそ 9 g の水を含んだ状態であった。

3.3.3 PGA ゲルの吸水率測定

乾燥 PGA ゲルを秤量し、ゲルの洗浄に使用したものと同タイプのナイロンメッシュバッグに取った。このバッグを 25 °C で蒸留水に浸漬した。24 h 後、バッグを取りだし、余分な水を取り除くため、10 分間吊り下げた。ナイロンメッシュバッグ自体の吸水率を差し引くため、空のナイロンメッシュバッグについても同様の操作を行った。PGA ゲルの吸水率 (Water absorption (gram per gram)) は、次式により算出した。

$$\text{Water absorption} = (Q_1 - Q_0)/Q_0 \quad (2)$$

Q₀: 乾燥 PGA ゲルの重量

Q₁: 吸水後の PGA ゲルの重量

3.3.4 PGA ゲルの加水分解

異なるタイプの架橋剤で架橋した PGA ゲルの加水分解性を比較するため、L-リジンで架橋したゲルおよび α -CD で架橋したゲルの加水分解性試験を行った。L-リジンは PGA とアミド結合で架橋しており、一方、 α -CD はエステル結合で架橋している。加水分解性試験に使用した各 PGA ゲルを合成したときの、PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する架橋剤 (L-リジン、または α -CD) の添加率は 0.25 であり、架橋反応は前述の方法により行った。PGA ゲルを、pH 9、0.1 M ホウ酸緩衝液に濃度が 2.0 mg/mL となるように添加して、37 °C で加水分解性試験を行った。上清中の PGA の濃度を SEC 分析によって、経時的に測定した。このとき、2.0 mg/mL の未架橋の PGA 水溶液を、濃度計算するための標準として測定した。また、L-リジンで架橋した PGA ゲルについては、PGA の最大濃度 (ゲルが完全に加水分解してすべての PGA が上清に溶出した場合の PGA の濃度) は 1.5 mg/mL であり、 α -CD で架

橋した PGA ゲルについては、PGA の最大濃度は 1.4 mg/mL である。すなわち、PGA の加水分解度は次式によって求められる。

$$\text{Degree of hydrolysis} = C_1/C_0 \quad (3)$$

C_0 : PGA の最大濃度

(L-リジンで架橋した PGA ゲルでは 1.5 mg/mL、 α -CD で架橋した PGA ゲルでは 1.4mg/mL)

C_1 : 上清中の PGA 濃度

3.3.5 PGA ゲルの生分解性試験

L-リジンで架橋した PGA ゲルについて、OECD ガイドライン (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 301C, modified MITI test) を参考に、生物化学的酸素要求量 (BOD) の測定による生分解性の評価を行った。

BOD は、BOD 自動記録測定装置を用いて測定した。BOD 試験の培養基は、1 L の蒸留水に下記の組成成分を溶解して調製した。培養基の pH は 7.4 となるようにした。

培養基の組成成分

KH_2PO_4 85 mg

K_2HPO_4 217.5 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 334 mg

NH_4Cl 5 mg

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 mg

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.4 mg

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg

生分解性試験に使用した PGA ゲルを合成したときの、PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの添加率は 0.25 であり、架橋反応は前述の方法により行った。生分解性試験は次のように行った。PGA ゲル 30 mg と培養基 300 mL を BOD 装置に付属の試験ボトルに入れた。下水処理場から採取した活性汚泥を微生物源として使用し、活性汚泥の懸濁汚泥量が 9 mg となるように試験ボトルに加えた。コントロールとして、PGA ゲルの代わりにアニリン 30 mg を入れたボトル、また、ブランクとして、有機物を含まないボトルを準備した。試験ボトルを BOD 装置にセットし、25 °C で攪拌した。BOD による生分解度 (BOD/ThOD) は、装置に記録される BOD 値および理論酸素要求量 (ThOD) から計算した。

3.4 結果と考察

3.4.1 WSC を用いた L-リジン による PGA の水または DMSO 中での架橋

本反応で、PGA は、そのグルタミン酸残基のカルボキシル基と、L-リジンの および位の二つのアミノ基との縮合によって架橋している。この反応は、縮合剤である WSC の存在下、DMSO 中 (Scheme 3.3 の a)、あるいは水中 (Scheme 3.3 の b) で起こった。WSC を用いた L-リジン による PGA の架橋について、種々の pH に調整した L-リジン水溶液を反応系に添加した場合の、DMSO 中での反応 (Figure 3.1) と、水中での反応 (Figure 3.2) を比較した。Figure 3.2 からわかるように、水中での架橋の最高収率は 38 %であった。この収率は、国岡と古澤が報告した、WSC を用いて PGA を 1,3-ジアミノプロパンにより水中で架橋したときの最高収率 (PGA 100 mg と 1,3-ジアミノプロパン 25 μ L を使用、PGA ゲル 39.9 mg を回収) とほぼ同等である^[7]。水溶液中で収率が低かった原因は、WSC と水の反応によるウレアの生成によって WSC が消費されて一部不活性化し、反応性が低下したためと考えられる。

一方、Figure 3.1 に示したように、DMSO 中の反応収率は 80 %以上で、L-リジン水溶液の pH を 5.6 から 9.0 まで変化させても、ほぼ一定の値となった。しかし、PGA ゲルの吸水率については、低い pH の L-リジン水溶液を使用して調製したゲルの方が、吸水率が高かった。ゲルの架橋密度がより低い方が、一般に吸水率は高くなる。このことから、低い pH の L-リジン水溶液を使用して調製した PGA ゲルは、架橋構造を取っている L-リジンが少なく、架橋密度が低くなったと考えられる。想定される PGA ゲルの架橋構造を Scheme 3.5 に示した。Figures 3.1 と 3.2 を比較すると、水中での反応収率の方が DMSO 中よりも低くなっている。WSC を L-リジンによる PGA の架橋に用いる場合には、収率および吸水率、両方の観点からの最も良い結果 (順に、88 %および 2900 g/g) は、DMSO 中、pH 5.6 の L-リジン水溶液を使用したときに得られた。

また、2つのアミノ基間のアルキル鎖長の影響を調べるため、L-オルニチンについても、WSC を用いて DMSO 中で PGA と架橋反応を行って、PGA ゲルを調製した。PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する L-オルニチンの添加率を 0.25、溶液 pH を 9 として反応を行ったとき、得られた PGA ゲルの収率および吸水率は、順に、89 %および 1400 g/g であった。一方、同様の条件で L-リジンで架橋した PGA ゲルの収率および吸水率は、順に、101 %および 710 g/g であった。これらの結果を比較すると、WSC を縮合剤として用いた場合には、L-リジンは L-オルニチンよりも PGA との架橋反応性が高いと推測される。すなわち、L-リジンは、2つのアミノ基間の距離が L-オルニチンよりもメチレン 1 つ分長いため、L-オルニチンと比較すると、その一方のアミノ基が PGA 分子のカルボキシル基に結合した後も、残りの一方が別の PGA 分子に到達しやすく、分子間架橋構造を形成しやすいのではないかと考えられる。国岡らは、PGA を 1,4-ブタンジアミンおよび 1,3-プロパンジアミンで架橋した

場合に、1,4-ブタンジアミンを用いた方がより収率が高く、また吸水率が小さかったことを報告し、メチレン鎖の長さの違いが架橋反応性に影響を与えた可能性について考察している^[7]。本研究においても、同様の傾向を得ており、メチレン1つ分の差が架橋反応性に有意に影響を与える可能性が示唆された。

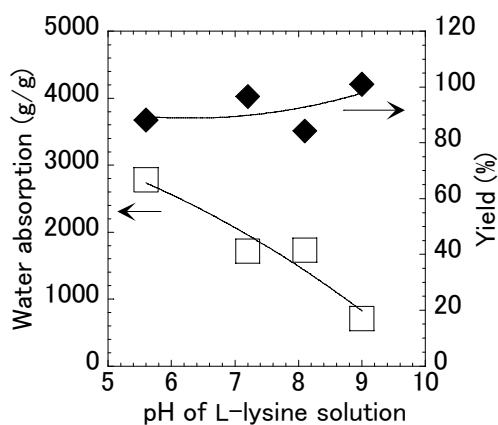


Figure 3.1 Crosslinking of PGA in DMSO by WSC. Relationship between pH of L-lysine solution and water absorption (\square) or yield (\blacklozenge) of the obtained PGAgel. PGA gels were prepared with 100 mg of PGA dissolved in 0.70 mL of DMSO, 35.3 mg of L-lysine monohydrochloride (L-lysine•HCl) in 0.16 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH, and with 80 mg of WSC dissolved in 0.30 mL of DMSO at 25 °C for 24 h.

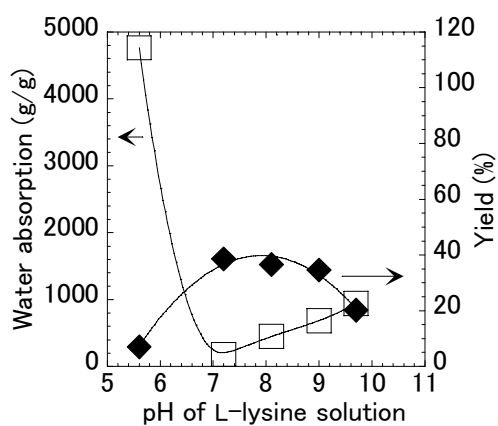


Figure 3.2 Crosslinking of PGA in water by WSC. Relationship between pH of L-lysine solution and water absorption (\square) or yield (\blacklozenge) of the obtained PGA gel. The PGA gels were prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.19 mL of 1.0 M NaOH, 17.7 mg of L-lysine•HCl in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH, and with 40 mg of WSC powder at 25 °C for 24 h.

ンが結合し、また、未反応の PGA のカルボキシル基が洗浄時に中和されてナトリウム塩化することで増加するため、ゲルの収率がよい場合には、収率が 100 % を越える場合がある。例えば、Figure 3.3 で pH 10.7 の L-リジン水溶液を使用し、収率が 133 % (PGA ゲル重量 66.7 mg) であった場合を考えたとき、50 mg の PGA が全てゲルとして回収されているとすると、PGA に結合した L-リジンの重量は、高速液体クロマトグラフによるアミノ酸分析から決定したアミノ酸組成から計算すると、12.0 mg (0.082 mmol) である。そして、残りの PGA ゲルの重量、4.7 mg は、中和によりカルボキシル基に付加したナトリウムイオンによる増加分と推定される。PGA ゲルの吸水率については、より低い pH の L-リジン水溶液を使用して調製したゲルの方が、吸水率が高かった。そして、この結果は、Figure 3.2 に示した、WSC を用いた DMSO 中の反応の結果と同様の傾向であり、高い吸水率の発現は、ゲルの架橋密度の低さに起因するものと考えられる。国嶋らは、DMT-MM を用いた反応は、通常中性から弱いアルカリ性条件下で進行することを報告した。彼らは、カルボキシラートアニオンの反応速度が、フリーのカルボン酸よりもずっと速かったことから、反応の第一段階として、縮合するカルボン酸とアミンが、カルボン酸アンモニウム塩を形成することが DMT-MM によるカルボン酸の活性化を促進したのではないかと結論している^[4]。L-リジン水溶液の pH が下がると、反応混合物中の PGA 側鎖のカルボキシラートアニオンの量は減少する、すなわち、フリーのカルボン酸が増加するため、反応速度が低下し、架橋密度が低くなったと考えられる。

Figure 3.3 に示した DMT-MM を用いて調製したゲルの収率は、Figure 3.2 の WSC を用いた場合よりも、架橋に使用した L-リジン水溶液の pH の範囲において、いずれも高くなっている。このことから、DMT-MM は WSC よりも水中での反応性が高く、より効率良く水中での架橋反応を進行できることがわかった。

また、Figure 3.4 に DMT-MM を用いた架橋の経時変化を示した。反応を行った 24 h では、回収したゲルに含まれている L-リジンのグルタミン酸残基に対するモル比 (Lys/Glu) はほぼ一定であったが、反応初期 (0.5 h) に収率がやや低かった。これは、反応初期には PGA 分子鎖に結合した L-リジンの一部は側鎖として結合するに止まり、水不溶となるまで架橋が進行しなかったため、水に可溶性部分が残る、不溶化したゲルから洗浄操作により失われたためと考えられる。

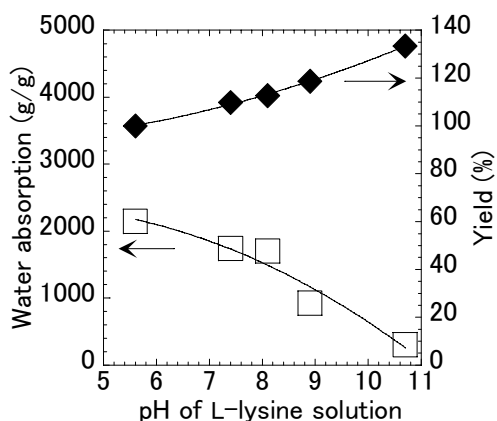


Figure 3.3 Crosslinking of PGA by DMT-MM. Relationship between pH of L-lysine solution and water absorption (□) or yield (◆) of the obtained PGA gel. The PGA gels were prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.35 mL of 1.0 M NaOH, 17.7 mg of L-lysine•HCl dissolved in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH, and with 54 mg of DMT-MM dissolved in 0.20 mL of water at 25 °C for 24 h.

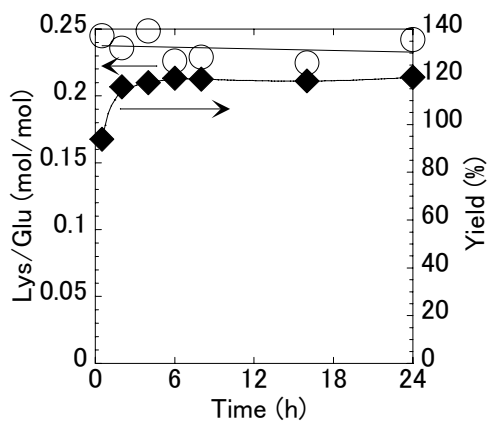


Figure 3.4 Time course of crosslinking by DMT-MM. Molar ratio of L-lysine to glutamic acid residue (Lys/Glu) (O) or yield (◆) of the obtained PGA gel. The PGA gels were prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.35 mL of 1.0 M NaOH, 17.7 mg of L-lysine•HCl dissolved in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH to 8.9, and 54 mg of DMT-MM dissolved in 0.20 mL of water at 25 °C. Values of Lys/Glu in the obtained PGA gels were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

3.4.3 架橋反応における L-リジンおよび DMT-MM の添加量が PGA ゲルの L-リジン含有率および吸水率に与える影響

Figure 3.5 に、PGA の架橋における L-リジンの添加量が、得られた PGA ゲルの L-リジン含有率および吸水率に与える影響について示した。反応に使用された L-リジンの PGA のグルタミン酸残基のモル数に対する添加率 (X 軸 ; Lys/Glu added for crosslinking) の増加に従い、得られた PGA ゲルのグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの含有率 (左 Y 軸 ; Lys/Glu) は増加した。また、左 Y 軸の Lys/Glu が 0.21 のとき吸水率は最小値をとり、0.29 ではわずかに上昇した。

Scheme 3.6 に、DMT-MM 0.5 mol を用いて、グルタミン酸残基数 1 mol を含む PGA に対して、L-リジンの添加モル数を変えて反応を行った場合に形成される、架橋構造のモデル図を示した。反応が理想的に進むとしたとき、DMT-MM の反応機構^[4]を考慮すると、まず、PGA のグルタミン酸残基のカルボキシル基のうち、0.5 mol が DMT-MM によって活性化される。活性化したカルボキシル基 1 つが、L-リジンの側鎖アミノ基 2 つのうち 1 つと反応するため、L-リジンの添加モル数が、活性化したカルボキシル基のモル数の半分以下 (Lys \leq 0.25 mol) であるとき、L-リジンのアミノ基いずれもが PGA と反応し、架橋構造を形成することが可能である。一方、L-リジンの添加モル数が活性化したカルボキシル基の半分より多い場合 (Lys $>$ 0.25 mol)、一部の L-リジンは、1 つの側鎖アミノ基だけで PGA と結合し、側鎖構造を形成すると考えられる。Figure 3.5 に示した一連の実験では、DMT-MM 0.20 mmol およびグルタミン酸残基数 0.39 mmol を含む PGA を用いており、反応が理想的に進行したとすると、最大で 0.20 mmol (使用した PGA のグルタミン酸残基に対するモル比として 0.51) のカルボキシル基が DMT-MM によって活性化されたことになる。得られた PGA ゲルのグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの含有率 (左 Y 軸 ; Lys/Glu) が 0.29 のとき、この値は、PGA の活性化したカルボキシル基のモル比である 0.25 を越えている。つまり、結合している L-リジンのいくつかは、PGA に 1 つのアミノ基だけで結合して側鎖構造を取っており、架橋剤としては機能していないと考えられる。結果として、左 Y 軸の Lys/Glu の値が 0.29 であった PGA ゲルは、0.21 のゲルよりも架橋密度が低下し、そのため吸水率は増加したと推測される。

さらに、Figure 3.5 に示した左 Y 軸の Lys/Glu (得られた PGA ゲルのグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの含有率) の値が 0.11、0.21 および 0.29 であった各 PGA ゲルと、それぞれ相当する反応条件で、測定用パラレルプレート上にゲルを作製し、3.3.2 に記載の方法で、貯蔵弾性率 (G') を測定した。結果を Table 3.2 に示した。各 PGA ゲルの G' は、順に、250、630 および 530 Pa であった。従って、Lys/Glu の値が 0.21 であった PGA ゲルの G' が最も大きく、また、この PGA ゲルの吸水率が最も小さかったことがわかる。架橋密度が大きいとき、一般に G' は大きく、また吸水率は小さくなることから、Lys/Glu の値が 0.21 であった PGA ゲルは、得られた PGA ゲルの中で最も高い架橋密度を有したと考えられる。

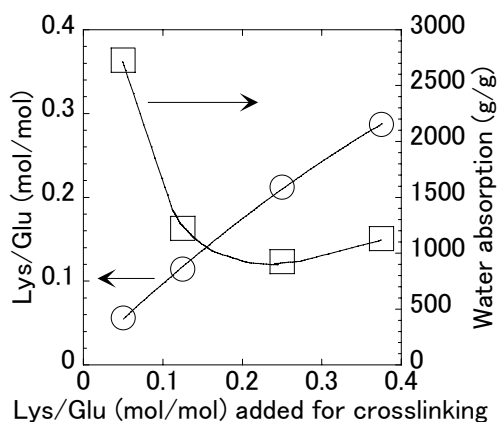
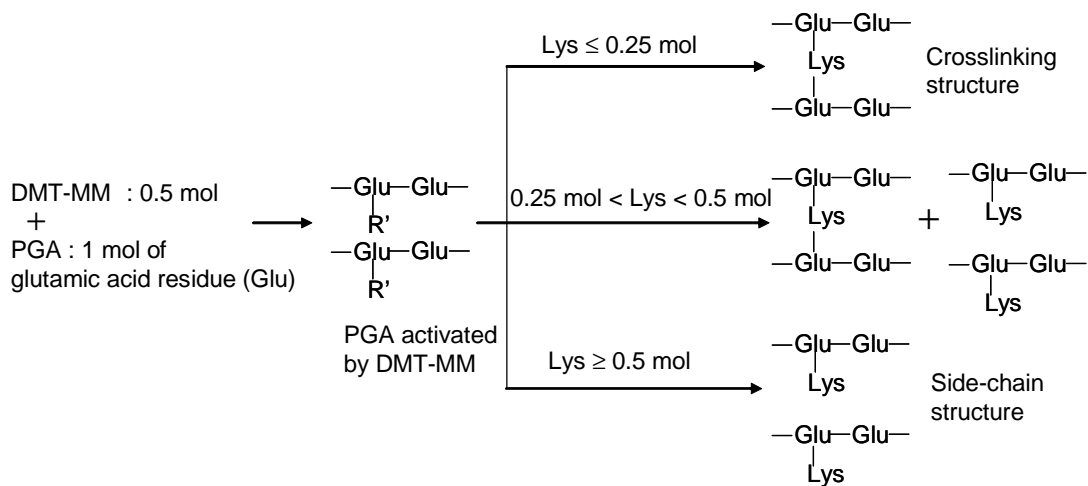


Figure 3.5 Relationship between Lys/Glu added for crosslinking and Lys/Glu in the obtained PGA gel (O) or water absorption (□). The PGA gels were prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.35 mL of 1.0 M NaOH, L-lysine•HCl dissolved in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH to 8.9, and 54 mg of DMT-MM dissolved in 0.20 mL of water at 25 °C for 24 h. Values of Lys/Glu in the obtained PGA gels were determined by HPLC.



Scheme 3.6 Structures formed by the reaction using 1 mol of glutamic acid residue in PGA, 0.5 mol of DMT-MM and different molar ratio of L-lysine. R': carboxyl group activated by DMT-MM.

Table 3.2 Storage elastic modulus and water absorption of the PGA gels

Lys/Glu in the obtained PGA gel	G' (Pa)	Water absorption (g/g)
0.11	250	1200
0.21	630	930
0.29	530	1100

また、Figure 3.6 に、架橋反応に使用した DMT-MM の添加量が、得られた PGA ゲルの L-リジン含有率および吸水率に与える影響について示した。左 Y 軸の Lys/Glu は、得られた PGA ゲルのグルタミン酸残基のモル数に対する L-リジンの含有率である。PGA ゲルの L-リジン含有率は、DMT-MM の添加量によってあまり変化せず、大きな影響を受けなかった。しかし、DMT-MM の添加量が少ない場合 (X 軸 ; DMT-MM/Glu = 0.25 のとき)、収率は低く、吸水率は大きかった (7000 g/g)。Figure 3.6 においては、反応に使用した PGA のカルボキシル基のモル数に対して、添加した L-リジンのアミノ基の割合が 0.5 であったため、DMT-MM/Glu の値が 0.25 であったときには、添加した L-リジンのアミノ基のうち、最大でも半分だけが PGA と結合可能であったことになる。そのため、この反応条件では、PGA と L-リジンは、Scheme 3.6 で示したうちの、側鎖構造 (side-chain structure) に類する構造を多く形成したと推定される。DMT-MM/Glu の値が 0.25 のときには、ゲルの収率は低く、得られたのは緩くて弱いゲルであったが、その原因は、架橋密度が非常に低く、PGA を固い、水不溶のゲルとするには不十分であったためと考えられる。

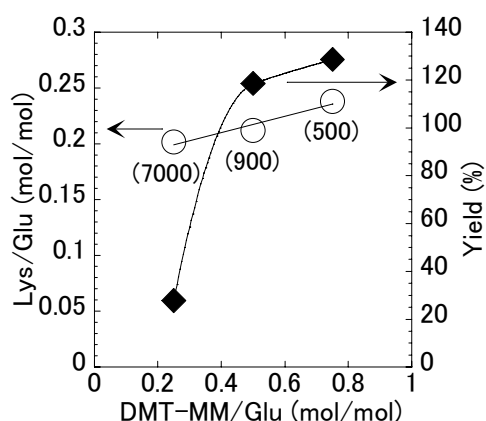


Figure 3.6 Relationship between the molar ratio of DMT-MM to glutamic acid residue added for crosslinking (DMT-MM/Glu) and Lys/Glu (O) or yield (◆) of the obtained PGA gel. The PGA gels were prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.35 mL of 1.0 M NaOH, 17.7 mg of L-lysine•HCl dissolved in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH to 8.9, and DMT-MM dissolved in 0.20 mL of water at 25 °C for 24 h. Values of Lys/Glu in the obtained PGA gels were determined by high-performance liquid chromatography. Numbers in parentheses are water absorptions (g/g) of the obtained PGA gels.

3.4.4 PGA ゲルの加水分解および BOD 法による生分解

種類の異なる架橋結合を比較するため、L-リジンあるいは α -CD で架橋した PGA ゲルについて、37 °C、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9) 中での加水分解性を評価した。L-リジンで架橋した PGA ゲルおよび α -CD で架橋した PGA ゲルを、緩衝液中に 1 h 浸漬したときの吸水率は、それぞれ順に 73 および 50 g/g であった。架橋結合の加水分解が進行するに従い、PGA は徐々に緩衝液に溶解した。SEC 分析により、溶解した PGA は、架橋前の原料 PGA とほぼ等しい分子量を有していることがわかった。このことから、PGA の溶解は、PGA 主鎖の分解によるものではなく、架橋部分の分解によって引き起こされたと考えられる。加水分解性試験の結果を Figure 3.7 に示した。PGA ゲルの架橋構造は、緩衝溶液中で徐々に加水分解され、時間の経過に伴って PGA が溶解し、上清の PGA 濃度が増加する。 α -CD で架橋した PGA ゲルは、21 h 後に PGA の濃度増加はほとんどなく、架橋結合の加水分解はほぼ終了したと見なせるが、一方、L-リジンで架橋した PGA ゲルは、21 h 経ってもまだ全て溶解した場合の最大濃度 (X 軸 ; Degree of hydrolysis = 1) に達していない。L-リジンで架橋した PGA ゲルは、 α -CD で架橋したゲルよりも、耐加水分解性が高いといえる。これは、L-リジンと PGA は、 α -CD と PGA が架橋時に形成するエステル結合よりも耐加水分解性の高い、アミド結

合で架橋しているためである。この結果から、架橋結合の種類を変えることで、加水分解性を制御できる可能性が示された。

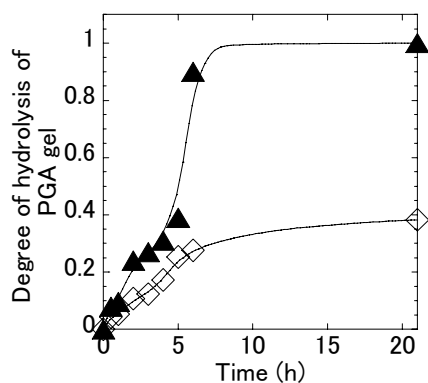


Figure 3.7 Hydrolysis of PGA gels in 0.1-M boric acid–borax buffered solution (pH 9) at 37 °C. The PGA gel crosslinked by amide bond with L-lysine (◇) or crosslinked by ester bond with α -cyclodextrin (▲).

次に、L-リジンで架橋したPGAゲルの生分解性をBOD試験により評価した。試験に使用した培養基中に1h浸漬したときのPGAゲルの吸水率は280 g/gであった。結果をFigure 3.8に示した。BOD法による生分解度は20日間で60%以上に達しており、OECD 301Cによると、PGAゲルは易生分解性とみなすことができる。生分解性試験の結果から、合成したバイオベースPGAゲルは、L-リジンで架橋されており、自然界で生分解されることが考えられることから、使用后生分解することが望ましい、環境中での使用用途、例えば、土壌改良材などに応用可能であると期待される。

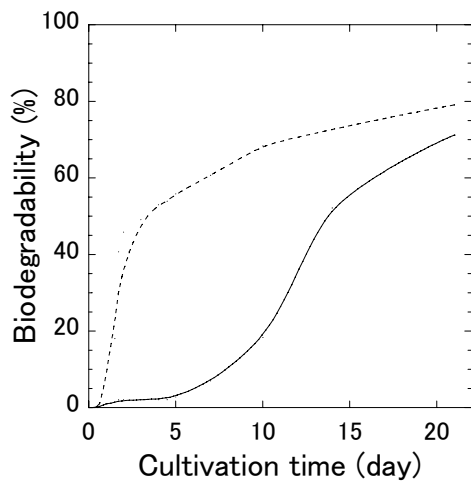


Figure 3.8 Biochemical oxygen demand-biodegradation test of the PGA gel (solid line) and aniline (dashed line) using activated sludge at 25 °C. The PGA gel was prepared with 50 mg of PGA dissolved in 0.35 mL of 1.0 M NaOH, 17.7 mg of L-lysine•HCl dissolved in 0.08 mL of water and 1.0 M NaOH to adjust the pH to 8.9, and 54 mg of DMT-MM dissolved in 0.20 mL of water at 25 °C for 24 h.

3.5 結論

本章では、微生物が発酵生産する PGA を、L-リジンによって水溶液中で架橋し、生分解性のバイオベースヒドロゲルを合成した。縮合剤として WSC あるいは DMT-MM を使用し、誘導体化などの前処理が不要なワンポット反応により、25 °C で架橋を行った。WSC の存在下、反応溶媒として、水を使用するよりも DMSO を使用した場合の方が、より高い収率で PGA ゲルを得ることができた。一方、DMT-MM は WSC よりも、PGA を水中で架橋するために適した縮合剤であり、より高い収率でゲルを得ることができた。L-リジンで架橋した PGA ゲルは、300~2100 g/g の吸水率を示した。PGA ゲルの収率および吸水率は、反応に使用した L-リジン水溶液の pH、DMT-MM および架橋剤の添加量によって影響されることがわかった。L-リジンとアミド結合で架橋した PGA ゲルは、 α -CD とエステル結合で架橋した PGA ゲルよりも、37 °C、pH 9 の緩衝液中での耐加水分解性が高かった。活性汚泥を用いた BOD 法による生分解性試験において、L-リジンで架橋した PGA ゲルの生分解度は 60 % に達し、易分解性を示した。本章で合成した PGA ゲルおよび DMT-MM を用いた PGA の架橋方法は、機能性を有するバイオベースマテリアルの創成に応用可能であると期待される。

3.6 参考文献

- [1] 松崎典弥, 明石満, 機能材料, **28**, 61 (2008).
- [2] S. Murakami and N. Aoki, *Biomacromolecules*, **7**, 2122 (2006).
- [3] P. T. Anastas and T. C. Williamson, *Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Synthesis and Processes*, Oxford University Press (1998).
- [4] M. Kunishima, C. Kawachi, J. Morita, K. Terao, F. Iwasaki, and S. Tani, *Tetrahedron*, **55**, 13159 (1999).
- [5] M. Kunishima, C. Kawachi, K. Hioki, K. Terao, and S. Tani, *Tetrahedron*, **57**, 1551 (2001).
- [6] B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen, and T. L. Tarvin, *J. Chromatogr.*, **336**, 93 (1984).
- [7] M. Kunioka and K. Furusawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 1889 (1997).

第4章 環境低負荷型ポリ（カーボネート-ウレタン）の合成と酵素分解

4.1 緒言

高分子化学において「グリーンケミストリー」を実現するためには、生分解およびケミカルリサイクル可能なプラスチックのデザインと合成、また、プラスチック生産の環境負荷を低減する触媒の開発と利用は、重要な課題のひとつである^[1]。

生物の生命維持に不可欠な、エネルギー代謝などを触媒する酵素は、再生可能な生体触媒であり、その基質特異性や温和な反応条件などの特徴から、副生成物やエネルギー消費量の少ない、環境低負荷な化学合成の反応触媒として利用が進んでいる。酵素を触媒として合成した化学品は、アミノ酸や医薬品原料など、実際の生産現場で使用されており、ポリマー合成についても多くの研究が行われている^[2]。ポリマー合成に加水分解酵素を使用することの一つの利点は、エステルやカーボネート結合のような加水分解可能な結合を持つポリマー鎖は、加水分解酵素により切断することができるため、酵素による重合と分解の可逆反応によるケミカルリサイクルが可能となり、環境低負荷型ポリマーの創成が期待できることである。また、他の利点として、金属を含まないため、ポリマー生産に金属触媒を使用した場合に懸念される、残留金属に起因するポリマーの促進劣化などの問題が発生しにくいことがあげられる。

現在、工業的に生産されている汎用プラスチックには、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリウレタンなど、様々な種類がある。このうち、ポリウレタンは、ポリウレタンフォームとして、国内で年間約18万t生産されている^[3]。ポリウレタンは、一般にポリオールとジイソシアナートの重合反応により合成される。ポリオールとジイソシアナートの組み合わせにより、多様な物性をもつポリマーが得られ、軟質、硬質フォーム、エラストマー、塗料、接着剤など幅広い分野で使用されている。現場での重合も比較的容易であるため、多種、小ロットでの生産も可能である。しかし、重合に使われるイソシアナートの合成には毒性の高いホスゲンが用いられるため、環境負荷が高いことが懸念される。一方で、イソシアナートを用いる方法は利便性が高いため、ポリウレタンの主な製造方法として今後も利用が続くと考えられる。イソシアナート製造方法についても、環境負荷を低減し、安全性を向上させるため、脱ホスゲンに向けた、二酸化炭素を用いる合成法が検討されている^[4]。さらに、使用後のポリウレタンのリサイクルについては、マテリアルリサイクル（接着プレス成形、フィラー用途など）、ケミカルリサイクル（グリコール分解法、アミン分解法など）、およびサーマルリサイクル（減容固形燃料化、液体またはガス燃料化）が検討され、一部実施されている^[5]。しかし、特にケミカルリサイクルについては、ポリウレタンの化学構造の複雑さなどから困難を伴い、検討されている方法も、アルカリや高温条件を必要とするなど環境負荷が高いことが課題となっている。また、一般に使用されている高分子量ポリウレタンで、加水分解性結合を構造中に有さないもの

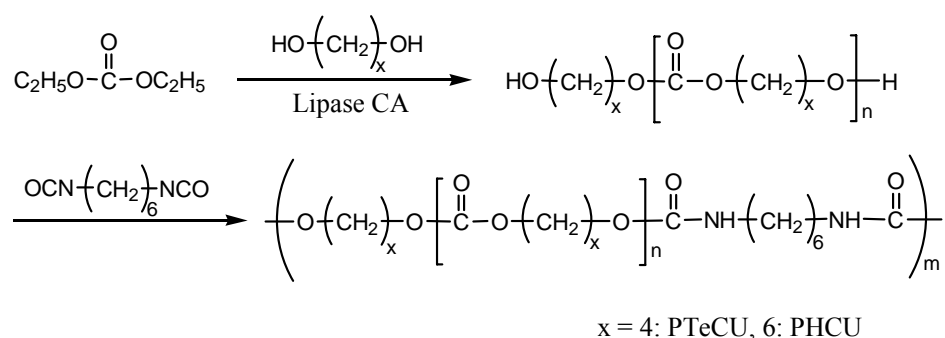
は、通常、ほとんど生分解しない^[6]。これは、おそらく分子構造の複雑さと、酵素分解可能な結合がポリマー鎖中に存在しないか非常に少ないこと、の両方に起因すると考えられる。低分子量のウレタン化合物については、数種の微生物により加水分解されること、そして、加水分解はエステラーゼの触媒作用によって進行することが報告されている^[7,8]。一方、加水分解性の結合を構造中にある程度含むポリウレタンの生分解性については、いくつかの報告がなされている。Darbyらは、最初に、ポリエステルタイプのポリウレタンが、ポリエーテルタイプのポリウレタンより、微生物による分解を受けやすいことを報告した^[9]。ポリ（エステル-ウレタン）の微生物分解は、主としてエステラーゼあるいはリパーゼによるエステル結合の加水分解に起因するものと考えられる^[10-12]。すなわち、分解の第一段階として、ポリウレタン鎖に含まれるポリエステルセグメントが、微生物が分泌する加水分解酵素により加水分解されてウレタンオリゴマーを生成する。生成したウレタンオリゴマーがさらに微生物による作用を受けることで、ポリウレタンの微生物分解が進行する^[13,14]。また、ポリ（カーボネート-ウレタン）についても、酵素によって加水分解可能であることが報告されている^[15,16]。

添田らは、これまでに、分子構造の明らかな生分解性のジウレタン部分をハードセグメントとして、これを、酵素触媒重合により加水分解性のカーボネートあるいはエステル結合でつなげ、高分子量化することで、酵素分解性を有する新規なポリ（カーボネート-ウレタン）およびポリ（エステル-ウレタン）を創成した。それらのポリウレタンは、有機溶媒中リパーゼを作用させることによって、再重合性を有する環状オリゴマーに、容易に変換された。従って、新規に得られたポリ（カーボネート-ウレタン）およびポリ（エステル-ウレタン）は、生分解性を有するだけでなく、リパーゼによりケミカルリサイクル可能である^[17,18]。開発された手法は、構造規則性の高いポリウレタンを分子設計できる利点がある。一方、従来法は、ジイソシアナートと重合する、ポリオールを自由に設計でき、酵素触媒重合したポリオールを利用することもできるため、酵素分解可能な結合部位を有するポリウレタンを簡便に合成可能である。しかし、ジイソシアナートの多様な反応から、分子構造が複雑になると考えられ、ケミカルリサイクルを指向した、酵素による分解と、その分解生成物に関する研究は行われていない。

そこで、著者らは、酵素触媒重合したポリオールを、従来法であるジイソシアナートを用いて鎖延長し、酵素分解可能な結合部位を有するポリウレタンを合成した。さらに、得られたポリウレタンの酵素分解性の評価および分解生成物の解析を行い、酵素によるケミカルリサイクルの可能性について明らかにすることを目的として検討を行った。

本章では、酵素触媒重合した脂肪族オリゴ（カーボネート）ジオールと、ジイソシアナートを用いた、新規ポリ（カーボネート-ウレタン）の合成と酵素分解性について述べる。具体的には、Scheme 4.1 に示したように、リパーゼを用いて重合した脂肪族オリゴ（カーボネート）ジオールに、ヘキサメチレンジイソシアナートを反応させ、金属触媒を使用せずに、ポリ（カーボネート-ウレタン）の合成を行った。

ポリ(カーボネート-ウレタン)は、一般に、ポリ(エステル-ウレタン)よりも耐水性や安定性が高いという利点を持つ。この性質は、通常、生分解性の良否とは相反する関係にある。しかし、ポリオールとして、酵素触媒重合したオリゴ(カーボネート)ジオールを利用することで、耐水性に優れ、かつ酵素分解性を有する、環境低負荷型ポリ(カーボネート-ウレタン)の創成が期待できる。すなわち、酵素によりポリウレタンをオリゴマーレベルまで切断し、分解生成物として、再重合性を有する環状オリゴマーを得られれば、前述の知見^[17,18]から、酵素を用いた再重合によるポリウレタンのケミカルリサイクルの可能性が見いだせる。また、酵素分解性を有するポリウレタンは、環境中においても、まず、微生物の分泌する加水分解酵素によってポリマー鎖が切断されてオリゴマー化し、最終的には、環境中の微生物によって生分解可能と考えられる。そこで、合成したポリ(カーボネート-ウレタン)およびその酵素分解生成物の生分解性についても併せて検討を行った。



Scheme 4.1 Synthesis of poly(tetramethylene carbonate-urethane) (PTeCU) or poly(hexamethylene carbonate-urethane) (PHCU).

4.2 試薬・機器

4.2.1 試薬

固定化リパーゼ（リパーゼCA）は、ノボザイムズ ジャパン（株）からの提供サンプル、あるいはSigma-Aldrich Co.からの購入試薬を用いた。その他の試薬は、試薬メーカーから購入した。以下に本章で用いた試薬をまとめた。

Table 4.1 List of reagents.

試薬名	製造会社	等級
固定化リパーゼ（リパーゼCA；Novozym 435、 <i>Candida antarctica</i> 由来、酵素活性 $\geq 10,000$ U/g）	ノボザイムズ ジャパン（株）	
ポリ（ヘキサメチレンカーボネート）ジオール（数平均分子量（ M_n ） ~ 860 ）	Sigma-Aldrich Co.	
ポリ（ヘキサメチレンカーボネート）ジオール（ $M_n \sim 2000$ ）	Sigma-Aldrich Co.	
炭酸ジエチル	和光純薬工業（株）	特級
1,4-ブタンジオール	東京化成工業（株）	特級
クロロホルム	和光純薬工業（株）	HPLC 用
ヘキサメチレンジイソシアナート	和光純薬工業（株）	1 級
アニソール（脱水）	Sigma-Aldrich Co.	99.7 %
重クロロホルム	Isotec Inc.	
テトラヒドロフラン、HPLC用、安定化剤不含	和光純薬工業（株）	特級
アニリン	和光純薬工業（株）	特級
リン酸二水素カリウム	和光純薬工業（株）	特級
リン酸水素二カリウム	和光純薬工業（株）	特級
リン酸水素二ナトリウム	和光純薬工業（株）	特級
塩化アンモニウム	純正化学（株）	特級
硫酸マグネシウム七水和物	純正化学（株）	1 級
塩化カルシウム二水和物	関東化学（株）	特級
塩化鉄（III）六水和物	和光純薬工業（株）	特級
モレキュラーシーブス4A（ビーズ8～12メッシュ）	純正化学（株）	
セライト 545	純正化学（株）	
ペプチドキャリブレーションスタンダード（1000-4000 Da）	Bruker Daltonics Inc.	
α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸	Bruker Daltonics Inc.	

試薬名	製造会社	等級
2,4-ジヒドロキシ安息香酸	Bruker Daltonics Inc.	
臭化ナトリウム	関東化学 (株)	特級

4.2.2 機器

1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ : CCPD 東ソー (株)

検出器 : RI-8020 東ソー (株)

カラムオープン : CTO-10AC (株) 島津製作所

オートインジェクター : SIL-10A XL (株) 島津製作所

カラム : TSKgel G4000HXL + TSKgel G2500HXL + TSKgel G1000HXL 東ソー (株)

検量線用標準試料 : Polystyrene standard GLサイエンス (株)

$M_w = 1460000, 612000, 90000, 50000, 19000, 9000, 4000, 2100$

Polystyrene standard Scientific Polymer Product Inc.

$M_w = 1110$

Styrene (F.W. 104.15) 東京化成工業 (株)

溶離液 : テトラヒドロフラン (HPLC 用、安定化剤不含、特級) 和光純薬工業 (株)

測定条件 : 温度 = 40

流速 = 1.0 mL/min

注入量 = 20 μ L

2) その他の機器

FT-NMR : JNM-A 400 日本電子 (株)

FT-IR : FTIR-8200PC (株) 島津製作所

材料試験機 : テンシロン万能材料試験機 RTC-1250 (株) オリエンテック

BOD 自動記録測定装置 : DKK-BOD-3 電気科学計測 (株)

飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) : Autoflex Bulker Daltonics Inc.

示差走査熱量計 (DSC) : DSC-3100 マックサイエンス (株)

4.3 実験方法

4.3.1 オリゴカーボネートジオールの酵素合成

オリゴ (テトラメチレンカーボネート) ジオール [oligo(TeC) diol] は、リパーゼ CA を用いて、炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールを反応させて合成した。炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールからの oligo(TeC) diol の合成方法の代表例を以下に示す。1,4-ブタンジオール 900 mg (10 mmol) と炭酸ジエチル 1.21 mL (10 mmol) をナスフラスコに取り、混合、ついでリパーゼ CA 600 mg を加え、溶媒を添加せずに、常圧、70 °C で 24 h 攪拌した。その後、反応容器内の圧力を約 25 mmHg まで下げて、70 °C でさらに 5 h 反応を行った。終了後、反応混合物をクロロホルムに溶解し、クロロホルムに不溶の酵素を濾別した。濾液からクロロホルムを減圧留去して、オリゴマーを回収した。

得られたオリゴマーの分子量を、SEC を用いて測定した。また、¹H NMR と MALDI-TOF MS を用いて、末端基構造の解析を行った。MALDI-TOF MS の測定は、次のように行った。測定試料 2~5 mg/mL クロロホルム溶液、マトリクスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 10 mg/mL THF 溶液およびイオン化助剤として臭化ナトリウム 1 mg/mL メタノール溶液を調製した。測定用サンプルプレートに、イオン化助剤溶液 1 μL を滴下して溶媒を乾燥させ、その上にマトリクス溶液 1 μL を滴下して乾燥後、さらに測定試料溶液 1 μL を重ねて塗布し乾燥させた。これを測定に使用し、イオンの検出は、ポジティブイオン、リフレクターモードで行った。

以降のポリ (カーボネート-ウレタン) の合成には、得られたオリゴマーをそのまま使用した。

Oligo(TeC) diol

¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.77 (m, 4H, CH₂), 3.64-3.73 (m, 2H, OCOOCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 4.16 (m, 4H, OCOOCH₂).

IR (KBr): 2965 (CH₂ 伸縮), 1732 (C=O 伸縮), 1454 cm⁻¹ (CH₂ 変角), 1246 (C-O-C 伸縮).

4.3.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールの重合

ヘキサメチレンジイソシアナートを用いて、oligo(TeC) diol あるいはオリゴ（ヘキサメチレンカーボネート）ジオール [oligo(HC) diol] を、溶媒を用いずに重合し、ポリ（カーボネート-ウレタン）を合成した。ポリ（テトラメチレンカーボネート-ウレタン）(PTeCU) を oligo(TeC) diol から合成する反応の代表例を以下に示す。ナスフラスコに oligo(TeC) diol 2.73 g を取り、75 °C で 3 h、攪拌しながら減圧脱気を行った。これに NCO/OH モル比が 1.05 となるようにヘキサメチレンジイソシアナートを加え、混合物を 1 分間減圧した。その後、フラスコをシールして、80 °C で 72 h、反応を行った。反応終了の目安として、FT-IR により、イソシアナート由来の 2270 cm^{-1} 付近のピークの消失を確認した。

得られたポリマーについて、SEC を用いて分子量測定を行い、DSC によりガラス転移温度 (T_g) を測定した。DSC 測定は、次のように行った。試料 3~5 mg をサンプルパンにはかり取って密閉し、-50~180 °C、昇温速度 10 °C/min で昇温（ファーストヒーティング）した後、-50 °C/min で -50 °C まで急冷した。その後同じ昇温速度で 180 °C まで昇温（セカンドヒーティング）したときに観測された T_g を測定値として記録した。

PTeCU

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.33$ (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.49 (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.77 (m, 4H, $\text{OCOOCH}_2\text{CH}_2$), 3.15 (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.07 (m, 4H, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_2$), 4.16 (m, 4H, OCOOCH_2).

IR(KBr): 3500-3200 (NH 伸縮), 3000-2800 (CH_2 伸縮), 1750-1680 (C=O 伸縮), 1550 (N-H 変角, C-N 伸縮), 1450 (CH_2 変角), 1250 (C-O-C 伸縮), 760 cm^{-1} (CH_2 変角).

4.3.3 ポリ（カーボネート-ウレタン）フィルムの調製と機械特性の測定

合成したポリ（カーボネート-ウレタン）をクロロホルムに溶解して、粘性のある溶液を得た。少量のクロロホルム不溶成分を、ナイロン 66 製のふるい絹（255 メッシュ、目開き $57\text{ }\mu\text{m}$ ）を用いて濾別し、濾液をテフロン製ペトリ皿に注ぎ入れた。ペトリ皿を水平台の上に乗せて溶媒をドラフト内でゆっくり蒸発させ、ポリ（カーボネート-ウレタン）フィルムを形成させた。

また、機械特性の測定のため、JIS K 7127 : 1999 (ISO 527-3 : 1995)、type 5 に従って、ポリ（カーボネート-ウレタン）フィルムをダンベル型にカットした。作製したダンベル型フィルムについて、温度 20 °C、湿度 65 % の環境下、ロードセル 1.00 kgf、クロスヘッド速度 30.0 mm/min で引張試験を行い、最大伸度 (%) および最大荷重を測定して引張強度 (MPa) を求めた。

4.3.4 酵素分解試験

合成したポリ（カーボネート-ウレタン）を、アニソールに 4 mg/mL となるよう分散、溶解し、ポリマー重量比 200 %のリパーゼ CA を添加し、110 °C で 24 h 反応させて、酵素分解試験を行った。分解生成物の分析は、SEC および MALDI-TOF MS を用いて行った。

4.3.5 生分解性試験

合成したポリ（カーボネート-ウレタン）とオリゴカーボネートジオールについて、OECD ガイドライン（OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 301C, modified MITI test）を参考に、生物化学的酸素要求量（BOD）の測定による生分解性評価を行った。

BOD は、BOD 自動記録測定装置を用いて測定した。BOD 試験の培養基は、1 L の蒸留水に下記の組成成分を溶解して調製した。培養基の pH は 7.4 となるようにした。

培養基の組成成分

KH_2PO_4 85 mg

K_2HPO_4 217.5 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 334 mg

NH_4Cl 5 mg

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 mg

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.4 mg

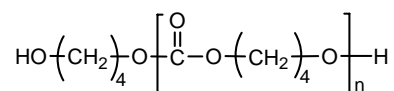
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg

生分解性試験は次のように行った。試験試料 30 mg と培養基 300 mL を BOD 装置に付属の試験ボトルに取った。下水処理場から採取した活性汚泥を微生物源として使用し、活性汚泥の懸濁汚泥量（汚泥固形物量）が 9 mg となるように試験ボトルに加えた。コントロールとして、試験試料の代わりにアニリン 30 mg を入れたボトル、また、ブランクとして、有機物を含まないボトルを準備した。試験ボトルを BOD 装置にセットし、25 °C で攪拌した。BOD による生分解度（BOD/ThOD）は、装置に記録される BOD 値および試料の化学組成式から算出される理論酸素要求量（ThOD）から計算した。

4.4 結果と考察

4.4.1 酵素による炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールのオリゴマー化

リパーゼ CA の存在下、1,4-ブタンジオールと当量の炭酸ジエチルを反応させることで、 M_n 1,500 ($M_w/M_n=1.7$) の oligo(TeC) diol が 84 %の収率で得られた。生成したオリゴマーの両末端は、Figure 4.1 に示した MALDI-TOF MS の測定結果から、ほぼ全て水酸基（ブタンジオール末端）となっていることがわかった。テトラメチレンカーボネートオリゴマーの構造と一致する分子質量 ($m/z = 116n + Na^+$) のピークが確認された。対応するジオールタイプのオリゴマーよりも、分子質量 ($m/z = 44$) だけ小さい、エチルカーボネート末端の直鎖オリゴマー (Scheme 4.2 (a)) は、ほとんどみられなかった。このことは、 1H NMR によっても確認した。すなわち、エチルカーボネート末端に基づくピーク、 $\delta = 1.32$ (t, $J = 7.3$ Hz, $OCOOCH_2CH_3$) は観測されなかった^[19]。また、対応するジオールタイプのオリゴマーよりも、分子質量 ($m/z = 90$) だけ小さい、環状オリゴマー (Scheme 4.2 (b)) についてもほとんどみられなかった。このことから、両末端水酸化されたテトラメチレンカーボネートオリゴマーの合成には、炭酸ジエチルを 1,4-ブタンジオールと当量添加する条件が適していることがわかった。これは、炭酸ジエチルがリパーゼによる副反応により、わずかに分解されて、反応系内の実際のジオールの量比がやや大きくなるためと考えられる。1,4-ブタンジオールと炭酸ジエチルの当量反応では、ウレタン反応の原料として適する、両末端水酸基のオリゴマーが得られたが、比較的分子量のオリゴマー (M_n 1,500) が生成した。一方、1,4-ブタンジオールにその 2 倍量の炭酸ジエチルを用いた場合には、より高い分子量のオリゴマー (M_n 4,800) が得られ、エチルカーボネート末端を 70 %、水酸基末端を 30 %有するオリゴマーが生成した。同様に、リパーゼ CA を用いて 1,6-ヘキサジオールと当量の炭酸ジエチルを反応させることで、oligo(HC) diol (M_n 3,400) が収率 91 %で得られた (Scheme 4.1)。



oligo(tetramethylene carbonate) diol

[oligo(TeC) diol]: $M = 116n + 90$

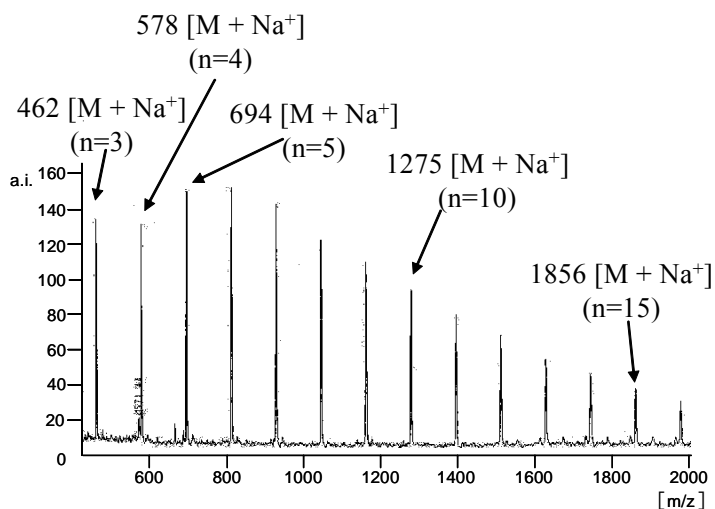
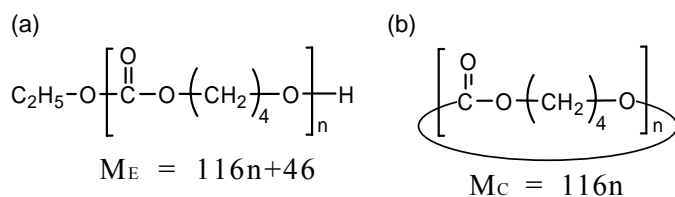


Figure 4.1 Typical MALDI-TOF mass spectrum of oligo(tetramethylene carbonate) diol [oligo(TeC) diol] obtained by oligomerization of diethyl carbonate (1.21 mL; 10 mmol) and 1,4-butanediol (900 mg; 10 mmol), using lipase CA (600 mg) at 70 °C for 24 h under atmospheric pressure and 5 h under 25 mmHg.



Scheme 4.2 Possible structures of oligomers obtained by oligomerization of diethyl carbonate and 1,4-butanediol, using lipase CA.

4.4.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールの重合

ポリウレタンの合成には、ヘキサメチレンジイソシアナートを用いた。ヘキサメチレンジイソシアナートは、一般に汎用されているジイソシアナートのひとつであり、また、生成されるのは脂肪族ポリウレタンであるため、構造に芳香環を有するジイソシアナートを用いた芳香族ポリウレタンよりも、比較的生分解を受けやすいと考えられるためである。

オリゴカーボネートジオールには、4.4.1 で酵素合成した oligo(TeC) diol および市販の oligo(HC) diol (Sigma-Aldrich Co.より購入した分子量の異なる2種のポリ(ヘキサメチレンカーボネート)ジオール)を使用した。ポリ(カーボネート-ウレタン)の合成結果を Table 4.2 に示した。ジオール成分として、oligo(TeC) diol を用いた場合には、 M_n 36,400 の PTeCU が得られた (entry 1)。また、分子量の異なる2種の oligo(HC) diol を用いた場合には、それぞれ、 M_n 36,900 および 26,700 のポリ(ヘキサメチレンカーボネート-ウレタン) (PHCU) が得られた (entry 2, 3)。分子量が小さいオリゴカーボネートジオールを使用したとき (entry 1, 2) の方が、得られたポリウレタンの分子量はやや大きくなった。ここでは、NCO/OH モル比を一定にして反応を行っており、分子量が小さいオリゴカーボネートジオールの方が同重量あたりの OH の数が多いので、加えるジイソシアナートの量が多くなる。また、無溶媒で反応を行っているため、分子量が小さい方が、粘度が低く、反応性が向上する。そのため、鎖延長が起きやすく、分子量が大きくなったと推測される。

Table 4.2 Poly(carbonate-urethane)s by polymerization of hexamethylene diisocyanate and oligocarbonate diols.

Entry	Oligocarbonate diol		Poly(carbonate-urethane)					
		M_n		M_n	M_w/M_n	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)	T_g (°C)
1	oligo(TeC)diol	1,500	PTeCU	36,400	2.8	18.7	410	-29
2	oligo(HC)diol*	1,500	PHCU	36,900	1.4	1.98	33	-42
3	oligo(HC)diol*	3,900	PHCU	26,700	1.5	1.82	10	-50

* oligo(HC) diol: oligo(hexamethylene carbonate) diol

4.4.3 ポリ（カーボネート-ウレタン）の酵素分解

本章で合成したポリ（カーボネート-ウレタン）は、加水分解酵素により主鎖分解を起こすことを期待して設計した。そこで、4.4.2 で合成した PTeCU および PHCU を、アニソールに分散、溶解し、リパーゼ CA を用いた酵素分解試験を行った。このとき、加水分解に伴う、脱炭酸反応を避けるため、無水アニソールを溶媒として使用した。PTeCU の酵素分解反応前後の、SEC クロマトグラムの変化を Figure 4.2 に示した。PTeCU のポリマーのピークが、オリゴマー領域にシフトしたことがわかる。しかし、PHCU はいずれも、PTeCU と同条件ではリパーゼ CA によってオリゴマーレベルまで分解されなかった。PHCU のアニソールへの溶解性が低かったことが一因として考えられる。

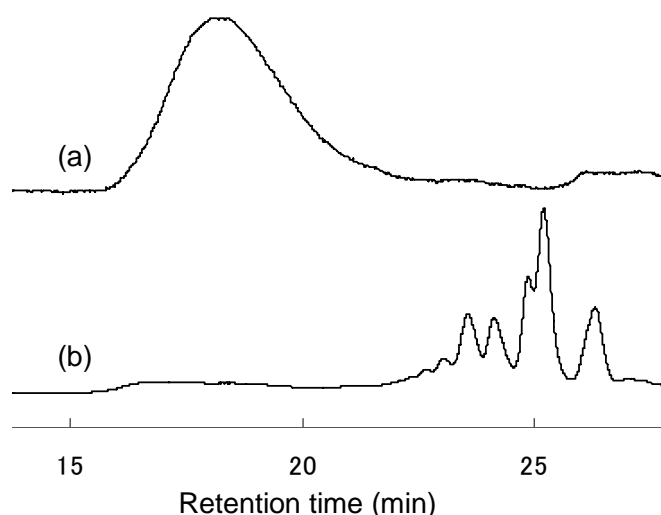
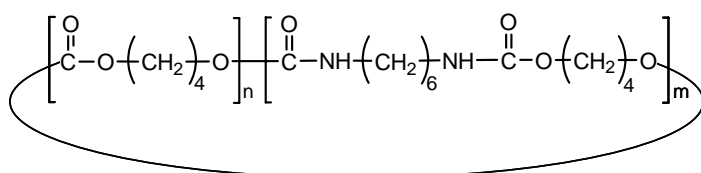


Figure 4.2 SEC profiles of the degradation products of 4 mg/mL PTeCU in anisol by 200 wt-% of lipase CA at 110 °C for 24 h. (a) before degradation. (b) after degradation.

酵素分解生成物の分子構造について MALDI-TOF MS を用いて分析を行った。その結果を Figure 4.3 に示した。MALDI-TOF MS と $^1\text{H NMR}$ の測定結果から、分解生成物は、主に環状オリゴマーから成っていると考えられる。例えば、397、513、655 および 771 m/z で観測されたピークは、環状オリゴマー由来と同定された。一方、371、487、629 および 745 m/z のピークは、計算上、環状オリゴマーおよび末端水酸基を持つ鎖状オリゴマー、両方の分子質量と一致する。しかし、 $^1\text{H NMR}$ では、末端水酸基に由来するメチレンプロトンのピークはほとんど観測されなかった。PTeCU の酵素分解は、溶媒として無水アニソールを使用し、反応系に水を添加しない、鎖状オリゴマーが生成しない条件で行っていることから、分解生成物中には対応する鎖状構造は含まれていないと考えられる。また、類似した反応条件で、構造規則性の高い、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリ（カーボネート-ウレタン）

やポリ（エステル-ウレタン）を有機溶媒中でリパーゼを用いて酵素分解した場合、対応する環状オリゴマーのみが選択的に生成され、ポリマーのケミカルリサイクルに利用できることが報告されている^[17, 18, 20-23]。以上の結果から、これまで報告されている、酵素リパーゼを用いた分解と分解生成物（環状オリゴマー）の再重合によるケミカルリサイクルシステム^[17, 18, 20-23]が、PTeCUのような構造規則性の低いポリウレタンにも応用できる可能性があることが示された。



cyclic oligomer: $M = 258m + 116n$

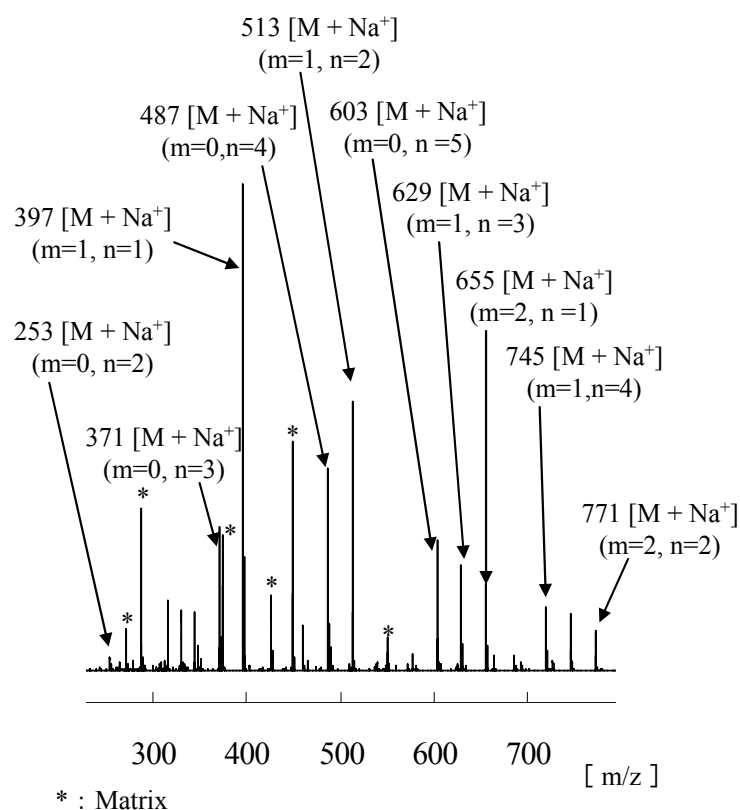


Figure 4.3 MALDI-TOF mass spectrum of the degradation products of 4 mg/mL PTeCU in anisol by 200 wt-% of lipase CA at 110 °C for 24 h.

さらに、得られた酵素分解生成物について BOD 測定を行った。活性汚泥を用いて測定した BOD 値と計算した ThOD から求めた、ポリマーおよびオリゴマーの生分解度を Figure 4.4 に示した。PTeCU の酵素分解生成物の活性汚泥による生分解度は 28 日間で 48% に達した。この結果から、PTeCU は、コンポスト条件のような適切な環境下で、低分子成分に加水分解されれば、最終的に生分解可能であると考えられる。ポリ（カーボネート-ウレタン）のソフトセグメントとして用いた oligo(TeC) diol は、1,4-ブタンジオールと炭酸ジエチルにリパーゼ触媒を作用させて重合したが、この oligo(TeC) diol 単独の場合には、活性汚泥によって容易に生分解され、Figure 4.4 に示すように、BOD による生分解度は培養期間 2 週間以内で 60% に達した。一方、PTeCU フィルム（厚さ 100 μm ）は BOD 試験液中ではほとんど生分解されず、生分解度は 6% 程度にとどまった。今回の BOD 試験条件下で PTeCU の生分解が遅かったのは、PTeCU フィルムの疎水性が高く、微生物による攻撃を受けにくいとめと考えられる。これらの結果から、合成された PTeCU は、耐水性が高く、かつ酵素分解可能であり、潜在的に生分解性を有するポリウレタンであることが示唆された。

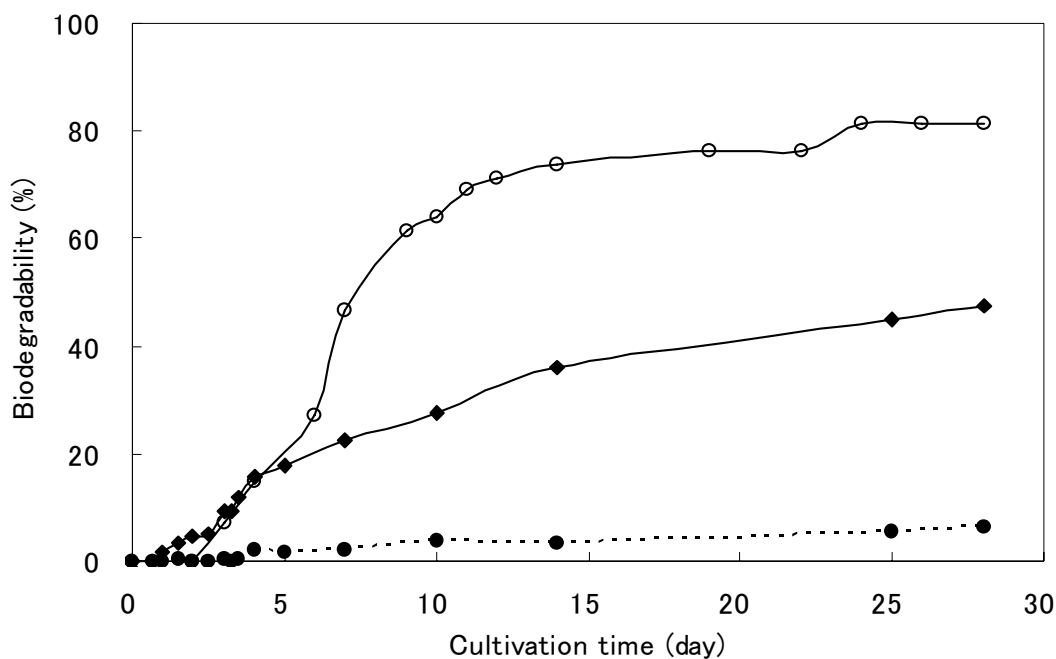


Figure 4.4 BOD biodegradability of oligo(TeC) diol (\circ), PTeCU (\bullet), and the enzymatic degradation product of PTeCU (\blacklozenge). The test was conducted using activated sludge at 25 $^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 ポリ（カーボネート-ウレタン）の熱特性および機械特性

DSC を用いて、ポリ（カーボネート-ウレタン）の熱特性を測定した。結果は、Table 4.2 に示している。ポリ（カーボネート-ウレタン）のソフトセグメントに由来する T_g について比較すると、ソフトセグメントとして oligo(HC) diol を用いた PHCU の方が、oligo(TeC) diol を用いた PTeCU に比べて、 T_g はより低い値を示した。カーボネート結合間のアルキル鎖が oligo(HC) diol の方が長く、よりポリマー鎖の柔軟性が高いためであると考えられる。

また、ポリ（カーボネート-ウレタン）フィルムについて機械特性を測定した。その結果を、Table 4.2 に示した。PTeCU フィルム（厚さ 100 μm ）の引張強度と伸びは、順に 18.7 MPa と 410 %であった。低密度ポリエチレン（LDPE）フィルム（厚さ 30 μm ）の引張強度および伸びの文献値は、それぞれ 10 MPa と 440 %であり^[24]、PTeCU フィルムは LDPE と同等以上の強度を有していた。また、PTeCU フィルムは、PHCU フィルムよりも 10 倍以上高い引張強度と伸びを示した。ポリマー主鎖のアルキル鎖として、PTeCU はイソシアナート由来のヘキサメチレンおよびオリゴカーボネート由来のブチレン鎖を含むが、PHCU は全てヘキサメチレン鎖からなっているため、カーボネートおよびウレタン結合間の相互作用が増大し、硬く、もろいフィルムとなったと考えられる。すなわち、ポリウレタンのソフトセグメントとして oligo(TeC) diol を導入した場合には、oligo(HC) diol の場合と比較して、フィルムの引張強度と伸びの両方を増大できることが示された。

4.5 結論

環境低負荷型脂肪族ポリ（カーボネート-ウレタン）を、oligo(TeC) diol をソフトセグメントとしてヘキサメチレンジイソシアナートで重合し、合成した。ポリウレタンの合成に用いた oligo(TeC) diol については、1,4-ブタンジオールと等モルの炭酸ジエチルにリパーゼ CA を作用させて重合し、 M_n 1,500 のオリゴマーを収率 84 %で得た。 M_n 36,400 の PTeCU フィルムの引張強度と伸びは、それぞれ、18.7 MPa および 410 %であった。また、PTeCU はアニソール溶媒中でリパーゼ CA によって酵素分解された。このとき、分解生成物として、リパーゼ CA を用いた再重合によるポリマーのケミカルリサイクルに利用可能と期待される、環状オリゴマーを主として生成することがわかった。また、生成したオリゴマーは分子量が数百程度であり、活性汚泥による BOD 試験で 28 日間で生分解度 48 %に達し、生分解性を有していた。一方、PTeCU フィルムは同条件ではほとんど生分解されなかった。PTeCU フィルムの疎水性が高く、微生物による攻撃を受けにくいと考えられる。これらの結果から、得られた PTeCU は、耐水性が高く、かつ酵素分解可能であり、潜在的に生分解性を有するポリウレタンであることが示唆された。

4.6 参考文献

- [1] 安保正一, 岩倉千秋, 白井正充, 高田十志和, 角岡正仏, 中原武利, 水野一彦著, グリーンケミストリー入門, p.82, アイピーシー (2000).
- [2] 加藤誠, 松村秀一, 高分子, **57**, 438 (2008).
- [3] 経済産業省化学工業統計平成 22 年年報
- [4] W. D. McGhee, D. P. Riley, *Organometallics*, **11**, 900 (1992).
- [5] 松永勝治 (監修), ポリウレタンの基礎と応用, p.294, シーエムシー出版 (2000).
- [6] G. T. Howard, *Int. Biodet. Biodegr.*, **49**, 245 (2002).
- [7] S. Owen, T. Otani, S. Masaoka, and T. Ohe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 244 (1996).
- [8] T. Ohshiro, M. Shinji, Y. Morita, Y. Takayama, and Y. Izumi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 546 (1997).
- [9] R. T. Darby and A. M. Kaplan, *Appl. Microbiol.*, **16**, 900 (1968).
- [10] Y. Tokiwa, T. Suzuki, and K. Takeda, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1937 (1988).
- [11] J. P. Santerre, R. S. Labow, D. G. Duguay, D. Erfle, and G. A. Adams, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 1187 (1994).
- [12] G. B. Wang, J. P. Santerre, and R. S. Labow, *J. Chromatog., B*, **698**, 69 (1997).
- [13] T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, F. Onuma, and T. Nakahara, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 134 (1999).
- [14] I. Dupret, C. David, M. Colpaert, J.-M. Loutz, and C. Wauven, *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2508 (1999).
- [15] Y. W. Tang, R. S. Labow, and J. P. Santerre, *J. Biomed. Mater. Res.*, **56**, 516 (2001).
- [16] Y. W. Tang, R. S. Labow, and J. P. Santerre, *Biomaterials*, **24**, 2805 (2003).
- [17] Y. Soeda, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **4**, 721 (2004).
- [18] Y. Soeda, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **5**, 277 (2005).
- [19] S. Matsumura, S. Harai, and K. Toshima, *Macromol. Chem. Phys.*, **201**, 1632 (2000).
- [20] S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **2**, 105 (2002).
- [21] S. Okajima, R. Kondo, K. Toshima, and S. Matsumura, *Biomacromolecules*, **4**, 1514 (2003).
- [22] Y. Takahashi, S. Okajima, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **4**, 346 (2004).
- [23] Y. Osanai, K. Toshima, and S. Matsumura, *Green Chem.*, **5**, 567 (2003).
- [24] 小屋敷修, プラスチックス, **52**, (10), 36 (2001).

第5章 バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解

5.1 緒言

ポリウレタンのライフサイクル全体での環境負荷を低くするという観点から、重合反応に用いるポリオールに、バイオマス由来原料を利用する試みが広く行われている。近年では、大豆油変性ポリオール、ひまし油変性ポリオールなどが開発され、従来のポリエーテルジオールなどに数十%混合させたものが実際に利用されている^[1a]。しかし、バイオマス由来原料に代替することのみでは、ポリウレタンのリサイクルの困難さについては課題が残る。前述のように、酵素触媒重合により得られた、比較的構造規則性の高いポリマーについては、酵素を用いたケミカルリサイクルが検討されているが^[2,3]、イソシアナートを用いた汎用的な方法で得られたポリウレタンについての酵素分解とその生成物に関する検討はほとんど行われていない。イソシアナートを用いて合成したバイオベースポリウレタンについても、酵素分解により、酵素の重合反応基質となりうる環状オリゴマーの生成が認められれば、酵素を用いた環境低負荷型ケミカルリサイクルの可能性が見いだせる。

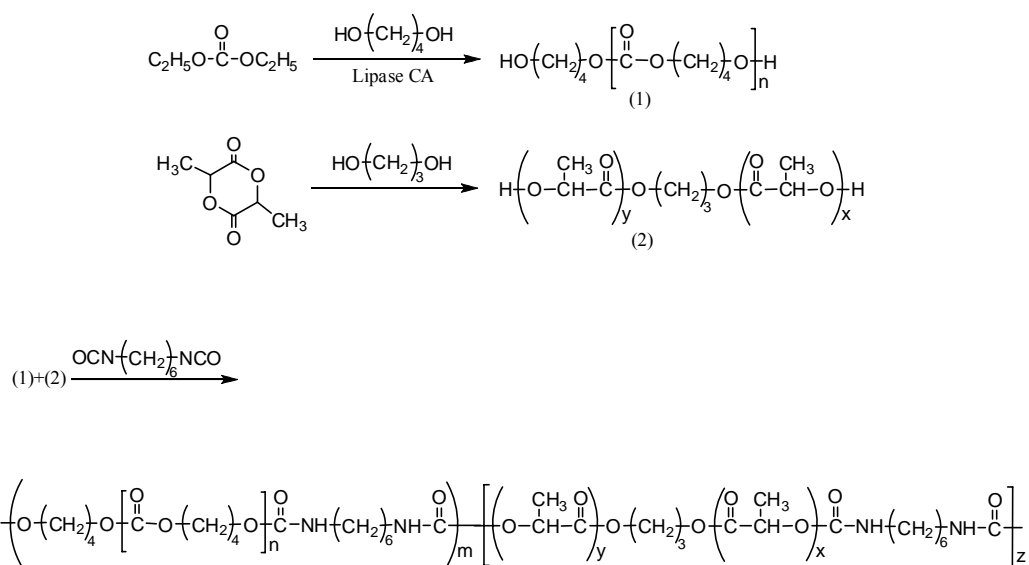
本章では、バイオマス由来原料から得られるモノマーを用いて、エステル結合やカーボネート結合を有するバイオベースポリオールを酵素触媒重合し、ポリウレタンの合成に利用することを試みた。5.2では、乳酸オリゴマーを含有するバイオベースポリウレタン、5.3ではリンゴ酸共重合体を含有するバイオベースポリウレタンについて述べる。得られたバイオベースポリウレタンは、酵素分解可能な結合部位を有することから、ポリウレタンに酵素を作用させることで、ポリオール部分から酵素により加水分解されると考えられる。さらに、その分解生成物を酵素によって再重合することができれば、将来的に、酵素を用いたケミカルリサイクルシステムの構築が可能となることが期待されることから、合成したポリウレタンの酵素分解性についても検討を行った。

5.2 乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解

5.2.1 はじめに

ポリ(L-乳酸)は、再生可能な農産物資源を原料として、微生物による乳酸発酵と化学的な高分子化反応の組み合わせにより生産される、コンポスト可能な脂肪族ポリエステル樹脂である。環境負荷の低いバイオベースポリマーとして注目され、幅広い用途に利用が進められている^[1]。ポリ(L-乳酸)は、末端に水酸基を有しているため、ポリ(L-乳酸)をジイソシアナートで重合することで、ポリ(エステル-ウレタン)が得られる^[4]。しかし、ポリ(エステル-ウレタン)は、加水分解による劣化を起こしやすい問題がある^[5]。一方、ポリ(カーボネート-ウレタン)の耐水性と安定性は、一般的にポリ(エステル-ウレタン)よりも高い。それゆえ、ポリウレタンの加水分解性は、カーボネートとエステル構造の導入によって制御可能と考えられる。また、得られたポリ(カーボネート/エステル-ウレタン)にリパーゼを作用させることでオリゴマーに分解し、このとき、分解生成物として環状オリゴマーを得ることができれば、これにリパーゼを作用させることで、ポリウレタンの再重合、ケミカルリサイクルも可能と期待される。

そこで本節では、加水分解性と酵素分解性を制御したバイオベースポリウレタンの創成を目的として、Scheme 5.2.1 に示すように、オリゴ(テトラメチレンカーボネート)ジオール [oligo(TeC) diol] とオリゴラクチドジオール [oligo(LA) diol] をヘキサメチレンジイソシアナートで重合し、乳酸オリゴマーを含有するポリ(カーボネート/エステル-ウレタン)を合成、物性評価を行った。



Scheme 5.2.1 Synthesis of poly(carbonate/ester-urethane)s containing the lactide oligomer.

5.2.2 試薬・機器

5.2.2.1 試薬

固定化リパーゼ（リパーゼ CA）は、ノボザイムズ ジャパン（株）からの提供サンプル、あるいは Sigma-Aldrich Co.からの購入試薬を用いた。その他の試薬は、試薬メーカーから購入した。以下に用いた試薬をまとめた。

Table 5.2.1 List of reagents.

試薬名	製造会社	等級
固定化リパーゼ（リパーゼ CA ; Novozym 435、 <i>Candida antarctica</i> 由来、酵素活性 $\geq 10,000$ U/g)	ノボザイムズ ジャパン （株）	
プロテイナーゼ K (<i>Tritirachium album</i> 由来、酵素 活性 = 23 units/g)	和光純薬工業（株）	
炭酸ジエチル	和光純薬工業（株）	特級
1,4-ブタンジオール	東京化成工業（株）	特級
クロロホルム	和光純薬工業（株）	特級
1,3-プロパンジオール	和光純薬工業（株）	特級
L,L-ラクチド	Sigma-Aldrich Co.	98 %
ヘキサメチレンジイソシアナート	和光純薬工業（株）	1 級
水酸化ナトリウム	和光純薬工業（株）	特級
アニソール（脱水）	Sigma-Aldrich Co.	99.7 %
重クロロホルム	Isotec Inc.	
テトラヒドロフラン、HPLC用、安定化剤不含	和光純薬工業（株）	特級
モレキュラーシーブス4A（ビーズ8~12メッシュ）	純正化学（株）	
セライト 545	純正化学（株）	
ペプチドキャリブレーションスタンダード (1000-4000 Da)	Bruker Daltonics Inc.	
α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸	Bruker Daltonics Inc.	
2,4-ジヒドロキシ安息香酸	Bruker Daltonics Inc.	
臭化ナトリウム	関東化学（株）	特級

5.2.2.2 機器

1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ : CCPD 東ソー (株)

検出器 : RI-8020 東ソー (株)

カラムオープン : CTO-10AC (株) 島津製作所

オートインジェクター : SIL-10A XL (株) 島津製作所

カラム : TSKgel G4000HXL + TSKgel G2500HXL + TSKgel G1000HXL 東ソー (株)

検量線用標準試料 : Polystyrene standard GLサイエンス (株)

$M_w = 1460000, 612000, 90000, 50000, 19000, 9000, 4000, 2100$

Polystyrene standard Scientific Polymer Product Inc.

$M_w = 1110$

Styrene (F.W. 104.15) 東京化成工業 (株)

溶離液 : テトラヒドロフラン (HPLC 用、安定化剤不含、特級) 和光純薬工業 (株)

測定条件 : 温度 = 40

流速 = 1.0 mL/min

2) その他の機器

FT-NMR : JNM-A 400 日本電子 (株)

FT-IR : FTIR-8200PC (株) 島津製作所

材料試験機 : テンシロン万能材料試験機 RTC-1250 (株) オリエンテック

飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) : Autoflex Bulker Daltonics Inc.

示差走査熱量計 (DSC) : DSC- 3100 マックサイエンス (株)

5.2.3 実験方法

5.2.3.1 オリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの合成

第4章に述べた方法で、リパーゼ CA を用いて、炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールを反応させて oligo(TeC) diol を合成した^[6]。また、1,3-プロパンジオールを開始剤として L,L-ラクチドを開環重合し、末端に水酸基を有する oligo(LA)diol を得た。合成方法を以下に示す。L,L-ラクチド 200 mg (1.4 mmol) と 1,3-プロパンジオール 16 μ L (0.22 mmol) を試験管にはかり取った。試験管内を N₂ ガスでパージし、大気圧下、130 °C で 72 h、無溶媒で反応させて oligo(LA) diol を得た。得られたオリゴマーの分子量を、SEC および ¹H NMR を用いて測定した。また、¹H NMR と MALDI-TOF MS を用いて、末端基構造の解析を行った。¹H NMR の結果から計算した oligo(LA) diol の M_n は 820 であった。また、MALDI-TOF MS の測定は、次のように行った。測定試料 2~5 mg/mL クロロホルム溶液、マトリクスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 10 mg/mL THF 溶液およびイオン化助剤として臭化ナトリウム 1 mg/mL メタノール溶液を調製した。測定用サンプルプレートに、イオン化助剤溶液 1 μ L を滴下して溶媒を乾燥させ、その上にマトリクス溶液 1 μ L を滴下して乾燥後、さらに測定試料溶液 1 μ L を重ねて塗布し乾燥させた。これを測定に使用し、イオンの検出は、ポジティブイオン、リフレクターモードで行った。

以降のポリ (テトラメチレンカーボネート-ウレタン) (PTeCU)、ポリ (ラクチド-ウレタン) (PLU) およびポリ (カーボネート/ラクチド-ウレタン) (PC/LU) の合成には、得られたオリゴマーをそのまま使用した。

Oligo(LA) diol

¹H NMR (CDCl₃) : δ = 1.53, 1.60 (m, 3H, CH₃), 2.01 (m, 2H, CH₂), 4.23 (m, 4H, OCH₂), 4.37 (m, 1H, OCOCH₂OH), 5.16 (m, 1H, OCOCHOC).

IR (KBr): 2996, 2935 (CH₃ 伸縮), 1750 (C=O 伸縮), 1450 (CH₃ 変角), 1085 cm⁻¹ (C-O-C 伸縮).

5.2.3.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの重合

PC/LUについては、反応に使用する、oligo(TeC) diol と oligo(LA) diol の各モノマーユニット数の比 (TeC/LA) が 7/3、5/5、3/7 となるように仕込み比を変え、ヘキサメチレンジイソシアナートと反応させて、PC/LU 7/3、PC/LU 5/5 および PC/LU 3/7 を得た。以下に PC/LU 5/5 の合成方法について示す。ナスフラスコに oligo(TeC) diol 0.60 g と oligo(LA) diol 0.37 g をはかり取り、75 °Cで 3 h、攪拌しながら減圧脱気を行った。これに、NCO/OH モル比が 1 となるようにヘキサメチレンジイソシアナートを加え、混合物を 1 分間減圧した。その後、フラスコをシールして、80 °Cで 72 h、反応を行った。反応終了の目安として、FT-IR により、イソシアナート由来の 2270 cm⁻¹ 付近のピークの消失を確認した。

PTeCU および PLU は、それぞれ oligo(TeC) diol および oligo(LA) diol に対して、NCO/OH モル比が 1 となるようにヘキサメチレンジイソシアナートを加え、PC/LU 5/5 と同様にして合成を行った。

得られたポリマーについて、SEC を用いて分子量測定を行い、また、DSC によりガラス転移温度 (T_g) を測定した。DSC 測定は、次のように行った。試料 3~5 mg をサンプルパンにはかり取って密閉し、-50~180 °C、昇温速度 10 °C/min で昇温 (ファーストヒーティング) した後、-50 °C/min で-50 °C まで急冷した。その後同じ昇温速度で 180 °C まで昇温 (セカンドヒーティング) したときに観測される T_g を測定値として記録した。

PC/LU 5/5

¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.33 (m, 4H, OCONHCH₂CH₂CH₂), 1.49 (m, 4H, OCONHCH₂CH₂CH₂), 1.53, 1.60 (m, 3H, CH₃), 1.77 (m, 4H, OCOOCH₂CH₂), 2.01 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂O), 3.16 (m, 4H, OCONHCH₂CH₂CH₂), 4.08 (m, 4H, NHCOOCH₂CH₂), 4.16 (m, 4H, OCOOCH₂), 4.20 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂O), 5.16 (m, 1H, OCOCHOC).

IR (KBr): 3500-3200 (NH 伸縮), 3000-2800 (CH₃, CH₂ 伸縮), 1740 (C=O 伸縮), 1540 (N-H 変角, C-N 伸縮), 1450 (CH₃, CH₂ 変角), 1240 (C-O-C 伸縮), 1090 (C-O-C 伸縮), 800 cm⁻¹ (CH₂ 変角).

5.2.3.3 PC/LU フィルムの調製

PC/LU をクロロホルムに溶解し、得られた粘濁な溶液をテフロン製ペトリ皿に注ぎ入れた。ペトリ皿を水平台の上に載せて溶媒をドラフト内でゆっくり蒸発させ、PC/LU フィルム（厚さ約 100 μm ）を形成させた。

また、機械特性の測定のため、JIS K 7127 : 1999 (ISO 527-3 : 1995)、type 5 に従って、PC/LU フィルムをダンベル型にカットした。作製したダンベル型フィルムについて、温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 65 % の環境下、ロードセル 1.00 kgf、クロスヘッド速度 30.0 mm/min で引張試験を行い、最大伸度 (%) および最大荷重を測定して引張強度 (MPa) を求めた。

5.2.3.4 加水分解試験

PC/LU フィルムを 0.1 M NaOH 水溶液に浸漬し、35 $^{\circ}\text{C}$ で加水分解試験を行った。経時的に、残存フィルムを回収して、重量を測定した。

5.2.3.5 酵素分解試験

PC/LU の酵素分解試験には、プロテイナーゼ K とリパーゼ CA を用いた。プロテイナーゼ K による酵素分解は、PC/LU フィルム (2.5 mg/mL) を入れた pH 8 Tris-HCl 緩衝溶液に酵素 (5 IU/mL) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 日間行った。リパーゼ CA による酵素分解は、PTeCU については、アニソールに 4 mg/mL の濃度で溶かした PTeCU に、酵素 (200 wt-%) を添加して、110 $^{\circ}\text{C}$ で 24 h 行った。また、PC/LU と PLU については、アニソールに 1 mg/mL の濃度で溶かした PC/LU あるいは PLU に、酵素 (500 wt-%) を添加して、100 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間行った。分解生成物を秤量し、さらに、SEC あるいは MALDI-TOF MS で分析した。

5.2.4 結果と考察

5.2.4.1 オリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの合成

リパーゼ CA を用いた、炭酸ジエチルと 1,4-ブタンジオールの酵素触媒重合により oligo(TeC) diol を合成し、前章に記載の方法に従って分析を行った^[6]。また、1,3-プロパンジオールを開始剤とする、L,L-ラクチドの開環重合により oligo(LA) diol を合成した。Table 5.2.2 に示したように、L,L-ラクチドと 1,3-プロパンジオールの仕込み比を変えることによって、分子量の異なる 3 種の oligo(LA) diol が得られた。このうち、PTeCU、PLU および PC/LU の合成には、oligo(TeC) diol (M_n 1,500) と oligo(LA) diol (M_n 820) を用いた。

Table 5.2.2 Preparation of oligo(LA) diol by the ring-opening oligomerization of L,L-lactide and 1,3-propanediol at 130 °C for 72 h.

Entry	L, L-lactide (mmol)	1,3-propanediol (mmol)	M_n
1	1.4	0.44	470
2	1.4	0.22	820
3	1.4	0.11	1,300

5.2.4.2 ジイソシアナートを用いたオリゴカーボネートジオールおよびオリゴラクチドジオールの重合

ポリウレタンの合成には、ヘキサメチレンジイソシアナートを選択した。ヘキサメチレンジイソシアナートは、工業的に利用される一般的なジイソシアナートのひとつであり、また、これを用いて合成される脂肪族ポリウレタンは、芳香族ポリウレタンよりも生分解をうけやすいと考えられるためである。

ヘキサメチレンジイソシアナートを用いて oligo(TeC) diol および oligo(LA) diol を重合し、PTeCU、PLU および PC/LU 3 種 (PC/LU 7/3、PC/LU 5/5、PC/LU 3/7) を得た。結果を Table 5.2.3 に示した。

Table 5.2.3 PTeCU, PLU and PC/LUs by polymerization of hexamethylene diisocyanate with oligo(TeC) diol and oligo(LA) diol.

Entry	Polyurethane	$M_n (\times 10^{-4})$	Tensile		
			strength (MPa)	Elongation (%)	T_g (°C)
1	PTeCU	3.6	12.6	445	-36.4
2	PC/LU 7/3	1.4	2.1	11.7	-19.9
3	PC/LU 5/5	1.9	0.5	474	-9.8
4	PC/LU 3/7	2.2	0.6	49.0	-4.2
5	PLU	1.2	0.5	17.0	23.3

分子量は、PTeCU が最大で、PC/LU 5/5 と 3/7 がその約 60 %、PC/LU 7/3 が約 40 %で PLU と同程度であった。単純に oligo(TeC) diol の含有率が高いほど分子量が高いという結果にはならなかった。反応中にオリゴマーの一部がエステル交換することにより末端基の反応性が変化したことが一因として考えられる。

PTeCU、PLU および PC/LU の熱特性を DSC を用いて測定し、結果を Table 5.2.3 に示した。融点については、PLU のみ 37.4 °C に観測された。これは、oligo(TeC) diol のような脂肪族ポリカーボネートはフレキシビリティのあるカーボネート基を有しており、これを含むポリマー鎖のコンフォメーションがランダムになりやすく^[7]、結晶部位が生成しにくいからであると考えられる。また、ソフトセグメントとして oligo(TeC) diol の含有率が高い PC/LU や PTeCU の方が、 T_g が低かった。この理由としては、oligo(LA) diol はエステル結合の存在密度が高く分子間力が強いが、oligo(TeC) diol はアルキルカーボネートを有しており分子の柔軟性が高いため、oligo(TeC) diol の含有率が高いポリマーの方が分子間の相互作用が弱まり、 T_g が低くなったことが考えられる。

つぎに、PTeCU、PLU および PC/LU フィルムの機械特性を測定した結果を Table 5.2.3 に示した。ソフトセグメントとして oligo(TeC) diol の含有率が高くなるにつれて、すなわち PLU (entry 5) から PC/LU 5/5 (entry 3) までは伸びが増大し、7/3 (entry 2) では伸びは低下する一方、強度がやや大きくなった。このことから、oligo(TeC) diol の含有率が増加するとき、その割合が低いときにはアルキル鎖を有する oligo(TeC) diol が導入されることにより oligo(LA) diol の分子間力が弱まり、柔軟性が高くなることが影響して、伸びを増大させたと考えられる (entry 3)。さらに oligo(TeC) diol の含有率が高くなると PTeCU の性質に近づくため PLU よりも強度は向上したが (entry 2)、逆に、PTeCU と比較すると oligo(LA) diol の混合により、分子量が半分以下に低下しており、そのために強度、伸びともに低下したポリマーとなってしまったと推測される。

以上の結果から、ジオール成分として oligo(LA) diol のみを利用した PLU に比べて、

oligo(TeC) diol を添加してポリウレタンを合成することで、柔軟性を付与し、伸びを改善できることが示唆された。

5.2.4.3 PC/LU の加水分解

0.1 M NaOH 中で、合成した PC/LU などの加水分解試験を行った。Figure 5.2.1 に、加水分解試験中のポリマーの重量減少率の経時変化を示した。PLU は試験期間で速やかに加水分解されたが、一方、PTeCU はほとんど重量変化せず、また、3 種の PC/LU についても加水分解の進行は緩やかであった。一般にカーボネート結合の方がエステル結合よりも耐加水分解性が高いことが知られており^[8]、また、PC/LU についてもオリゴカーボネートの導入によりポリウレタンの疎水性が向上したために、フィルムの加水分解が抑制されたと考えられる。

このことから、ポリウレタンのソフトセグメントとしてオリゴカーボネートを導入すると、オリゴラクチド（オリゴエステル）単独の場合と比べて耐加水分解性が向上できる可能性が示唆された。

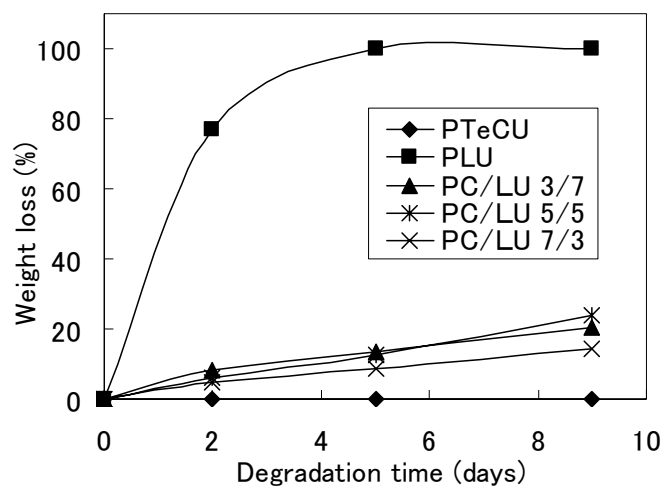


Figure 5.2.1 Alkaline hydrolysis of PTeCU, PLU and PC/LUs in 0.1 M NaOH at 35 °C.

5.2.4.4 PC/LU の酵素分解

次に、プロテイナーゼ K およびリパーゼ CA を用いて、PTeCU、PLU および PC/LU の酵素分解試験を行った。

Table 5.2.4 にプロテイナーゼ K による分解試験 5 日後の PC/LU フィルムの重量減少率と試験前後の数平均分子量 (M_n) を示した。

PTeCU は今回の試験期間では全く分解されなかった。PLU は完全に分解されて、溶液からの回収ができなかったため、試験後の分子量は測定していない。オリゴラクチドの含有率の高い PC/LU は、緩衝溶液中でプロテイナーゼ K により容易に分解された。このことは、分解試験前後の PC/LU の SEC クロマトグラムを比較することによっても確認できた。プロテイナーゼ K はポリ (L-乳酸) を加水分解する酵素として知られている^[9]。そのため、プロテイナーゼ K は、PC/LU のオリゴラクチド部位を認識して分解していると考えられる。以上の結果から、オリゴラクチド含有率によって PC/LU の酵素分解性を制御できる可能性が示された。

Table 5.2.4 Enzymatic degradation of PLU and PC/LUs (2.5 mg/mL) in pH 8 Tris-HCl buffered solution at 37 °C using proteinase K.

Entry	Polyurethane	Weight loss (%)	$M_n (\times 10^{-4})$	
			before degradation	after degradation
1	PTeCU	0	3.6	3.6
2	PC/LU 7/3	18	1.4	1.2
3	PC/LU 5/5	85	1.9	0.9
4	PC/LU 3/7	95	2.2	0.7
5	PLU	100	1.2	n.d.

リパーゼ CA による酵素分解試験では、加水分解に伴う、脱炭酸反応を避けるため、無水アニソールを溶媒として使用した。分解試験前後の PC/LU 7/3 の SEC クロマトグラムを Figure 5.2.2 に示した。PC/LU 7/3 のポリマーのピークが、オリゴマー領域にシフトしたことがわかる。一方、PLU は、同条件ではリパーゼ CA によって全く分解されなかった。SEC の結果を比較すると、オリゴカーボネート含有率の高い PC/LU の方が、アニソール中でのリパーゼ CA による酵素分解が進行しやすいことがわかった。この理由を以下に考察する。酵素反応は合成と分解の平衡反応で可逆性を有する。PC/LU に含まれるオリゴカーボネート [oligo(TeC) diol] の合成にはリパーゼ CA を使用しており、その逆反応として、オリゴカーボネート部分は酵素の反応基質として認識され、分解が進行したと考えられる。一方、

ポリ (L-乳酸) は水系では一般にリパーゼによる分解を受けないことが知られている^[1b]。高橋らは、リパーゼ CA (500 wt-%) によりポリ (L-乳酸) を *o*-キシレン中 (1 mg/mL) で加水分解し、環状オリゴマーが得られたことを報告しており^[10]、今回の実験では、酵素濃度、温度および基質濃度は同じ条件を使用した。しかし、PLU は、エステルよりも加水分解を受けにくいウレタン構造を含んでいることから、ポリ (L-乳酸) よりもリパーゼ CA による加水分解がより進行しにくかったと考えられる。

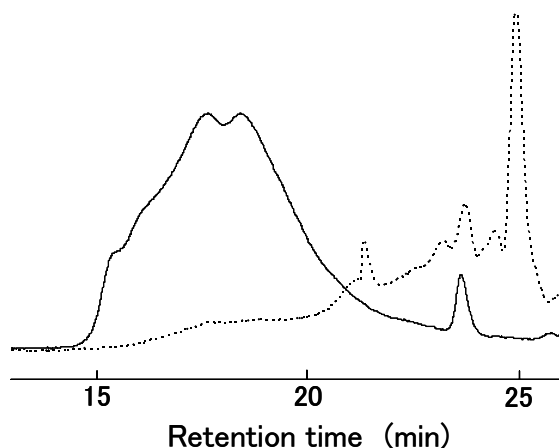


Figure 5.2.2 The SEC profile changes of the degradation products of PC/LU 7/3 in anisole by lipase CA at 100 °C for 48 h. Solid line: before degradation, dashed line: after degradation.

PC/LU 7/3 の酵素分解生成物を MALDI-TOF MS を用いて測定し、分子構造解析を行った。MALDI-TOF MS の結果から、分解生成物は環状オリゴマーを含んでいることが示唆された。例えば、397 および 513 m/z のピークは、カーボネート-ウレタン構造 (Figure 5.2.3 (a)、順に、 $[M_C (i=1, j=1) + Na^+]$ および $[M_C (i=2, j=1) + Na^+]$) 由来であると同定できる。629 m/z のピークは、計算値からは、環状および鎖状両方の構造に対応する。また、411 m/z のピークは、ラクチド-ウレタン構造の環状オリゴマー由来であると同定される (Figure 5.2.3 (b)、 $[M_L (r=1, s=1) + Na^+]$)。さらに、ラクチドオリゴマー由来であると同定できるピークも確認された。

前章でも述べたように、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリ (カーボネート-ウレタン) やポリ (エステル-ウレタン) を有機溶媒中でリパーゼを用いて酵素分解した場合、対応する環状オリゴマーのみが選択的に生成され、ポリマーのケミカルリサイクルに利用できることが報告されている^[2, 3, 10-13]。

本研究で行った PC/LU 7/3 の酵素分解試験の結果から、酵素分解生成物は、カーボネート-ウレタンおよび、ラクチド-ウレタン構造を有する環状オリゴマーを含んでいることがわかった。これらは酵素を用いた重合の反応基質となり得ると考えられ、PC/LU についても、酵素リパーゼを用いた分解と分解生成物 (環状オリゴマー) の再重合によるケミカルリサイクルシステム^[2, 3, 10-13]が構築可能と期待される。

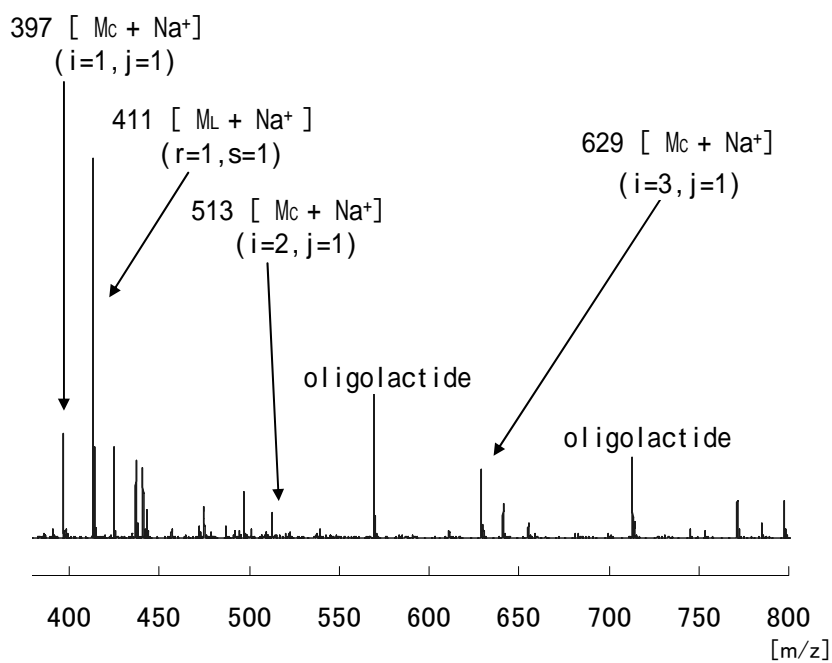
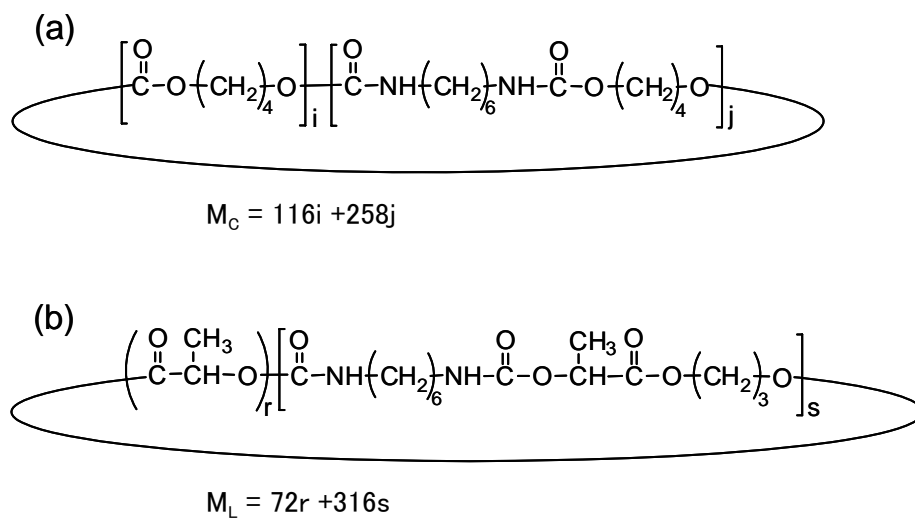


Figure 5.2.3 MALDI-TOF mass spectrum of the degradation products of PC/LU 7/3 in anisole by lipase at 100 °C for 48 h.

5.2.5 結論

一連の環境低負荷型 PC/LU を、oligo(TeC) diol と oligo(LA) diol の仕込み比を変えてヘキサメチレンジイソシアナートで重合し、合成した。アルカリ水溶液中で PC/LU の加水分解試験を行ったところ、オリゴカーボネートを含有する PC/LU は、PLU よりも耐加水分解性が向上していることが示唆された。酵素分解試験については、オリゴラクチドの含有率が高い PC/LU の方が、緩衝溶液中でより容易にプロテイナーゼ K によって分解された。一方、アニソール中でのリパーゼ CA による酵素分解では、オリゴカーボネートの含有率が高い PC/LU で分解が進行した。分解生成物は、酵素による再重合反応に利用可能と期待される環状オリゴマーを含んでいることがわかった。

5.3 リンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解

5.3.1 はじめに

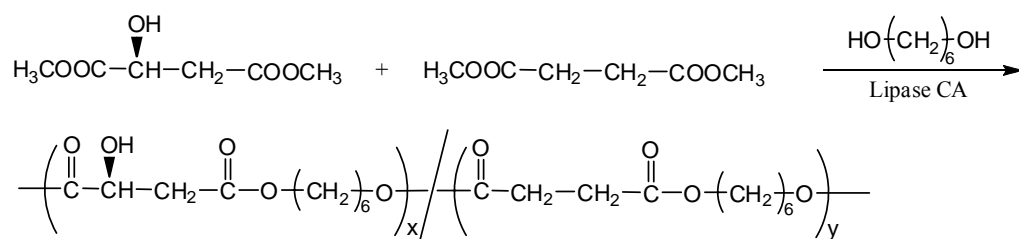
前節で取り上げた、L-乳酸から合成されるポリ(L-乳酸)は、現在最も利用が進んでいる代表的なバイオベースポリマーである。しかし、化学修飾可能なカルボキシル基や水酸基などを持たないため、化学修飾でポリマー自体の性質を変えるのではなく、無機物を混合することや、ポリカーボネートなどの汎用ポリマーとアロイ化することなどで、樹脂材料としての高機能化や物性改善が行われている^[1]。

これに対して、L-リンゴ酸は、L-乳酸同様に微生物による発酵生産が可能なバイオマス由来原料であり、1分子に2個のカルボキシル基と1個の2級水酸基を持つ。L-リンゴ酸のホモポリマーであるポリ(L-リンゴ酸)や、グリコリドやラクチドとの共重合ポリマーは、L-リンゴ酸由来の遊離のカルボキシル基を有するため、化学修飾可能であることから、機能性の生分解性ポリマーとして、主にドラッグデリバリーシステムなどへの応用が試みられている^[14,15]。松村らは、酵素触媒を用いたL-リンゴ酸エステルをベースとするポリマー合成について、ラクトンとの共重合により重量平均分子量(M_w) 32,100のポリカルボキシレートが得られることを報告している^[16]。

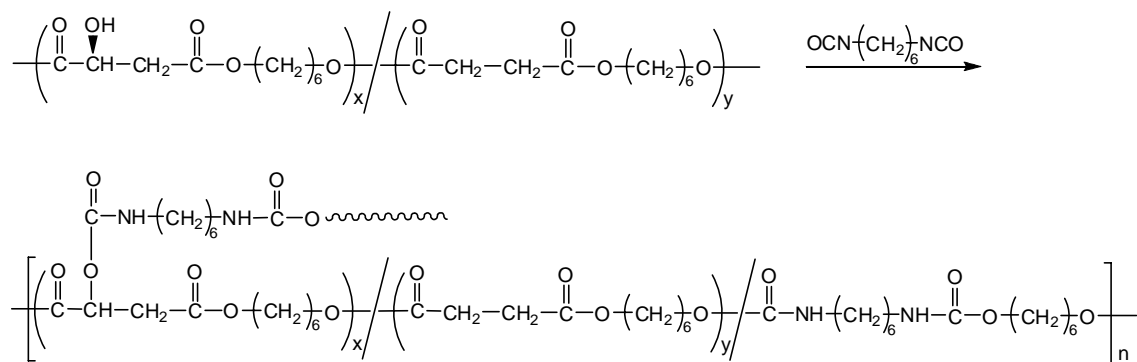
また、L-リンゴ酸は2つのカルボキシル基を有するので、ジオールと重縮合することで、水酸基を持つポリマーの合成が可能である。水酸基を有するポリエステルについては、スズ触媒を用いた各種ジオール成分との脱水重縮合^[17]や、リパーゼを触媒とするL-リンゴ酸とアジピン酸および1,8-オクタンジオールとの共重合^[18,19]などが報告されている。特に、リパーゼを重合触媒として用いた場合には、酵素の基質特異性から、L-リンゴ酸の2級水酸基は全く反応せず、1,8-オクタンジオールの持つ1級水酸基のみが、選択的にL-リンゴ酸とアジピン酸のカルボキシル基と重縮合し、遊離の水酸基を有する、直鎖状のポリエステルを生成する^[18]。化学合成的手法と比べて、水酸基の保護、脱保護が不要となることが大きな特徴である。さらに、山下らは、できる限りバイオマス由来原料を使用し、バイオプロセスを活用したバイオベースポリマーを創成するという観点から、L-リンゴ酸とコハク酸(糖から発酵生産)および1,6-ヘキサンジオール(糖からの化学変換により得られるアジピン酸^[20]を還元することで合成)を用いた、リパーゼを触媒とするリンゴ酸共重合体の合成(Scheme 5.3.1)について検討を行った^[21]。このとき得られるリンゴ酸共重合体は、L-リンゴ酸の2級水酸基が反応せずに残るため、複数の水酸基を有しており、化学修飾により、機能性材料の創成が可能と期待される。

本研究ではこれらの知見をもとに、組成の異なる一連のリンゴ酸共重合体を合成し、これとジイソシアナートを反応させて、2級水酸基を介した架橋構造を一部有するバイオベースポリウレタンを得た(Scheme 5.3.2)。水酸基含有率の異なる共重合体を用いて、各種のリンゴ酸共重合体含有ポリウレタンを合成し、その物性評価を行った。

また、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンは、酵素により加水分解可能な結合を有するので、リパーゼを作用させることで低分子化可能と考えられる。このとき、分解生成物として再重合性を有する環状オリゴマーを得ることができれば、これを基質としたリパーゼによるポリウレタンの再重合、ケミカルリサイクルの可能性が見出される。そこで、得られたリンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの酵素分解性についても併せて検討を行った。



Scheme 5.3.1 Synthesis of poly[(hexanediol-L-malate)-*co*-(hexanediol-succinate)] [poly(HM-*co*-HS)].



Scheme 5.3.2 Synthesis of polyurethane containing oligo(HM-*co*-HS).

5.3.2 試薬・機器

5.3.2.1 試薬

固定化リパーゼ（リパーゼCA）は、ノボザイムズ ジャパン（株）からの提供サンプル、あるいは Sigma-Aldrich Co.からの購入試薬を用いた。その他の試薬は、試薬メーカーから購入した。以下に用いた試薬をまとめた。

Table 5.3.1 List of reagents.

試薬名	製造会社	等級
固定化リパーゼ（リパーゼCA ; Novozym 435、 <i>Candida antarctica</i> 由来、酵素活性 $\geq 10,000$ U/g)	ノボザイムズ ジャパン （株）	
L-リンゴ酸ジメチル	東京化成工業（株）	98.0%以上
コハク酸ジメチル	東京化成工業（株）	1級
1,6-ヘキサンジオール	和光純薬工業（株）	特級
クロロホルム	和光純薬工業（株）	特級
ヘキサメチレンジイソシアナート	和光純薬工業（株）	1級
アニソール（脱水）	Sigma-Aldrich Co.	99.7%
重クロロホルム	Isotec Inc.	
テトラヒドロフラン、HPLC用、安定化剤不含	和光純薬工業（株）	特級
モレキュラーシーブス4A（ビーズ8~12メッシュ）	純正化学（株）	
セライト 545	純正化学（株）	
ペプチドキャリブレーションスタンダード (1000-4000 Da)	Bruker Daltonics Inc.	
α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸	Bruker Daltonics Inc.	
2,4-ジヒドロキシ安息香酸	Bruker Daltonics Inc.	
臭化ナトリウム	関東化学（株）	特級

5.3.2.2 機器

1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポンプ : CCPD 東ソー (株)

検出器 : RI-8020 東ソー (株)

カラムオープン : CTO-10AC (株) 島津製作所

オートインジェクター : SIL-10A XL (株) 島津製作所

カラム : TSKgel G4000HXL + TSKgel G2500HXL + TSKgel G1000HXL 東ソー (株)

検量線用標準試料 : Polystyrene standard GLサイエンス (株)

$M_w = 1460000, 612000, 90000, 50000, 19000, 9000, 4000, 2100$

Polystyrene standard Scientific Polymer Product Inc.

$M_w = 1110$

Styrene (F.W. 104.15) 東京化成工業 (株)

溶離液 : テトラヒドロフラン (HPLC 用、安定化剤不含、特級) 和光純薬工業 (株)

測定条件 : 温度 = 40

流速 = 1.0 mL/min

2) その他の機器

FT-NMR : JNM-A 400 日本電子 (株)

FT-IR : FTIR-8200PC (株) 島津製作所

飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) : Autoflex Bulker Daltonics Inc.

示差走査熱量計 (DSC) : DSC- 3100 マックサイエンス (株)

5.3.3 実験方法

5.3.3.1 酵素触媒によるリンゴ酸共重合体の合成

リンゴ酸共重合体は、L-リンゴ酸ジメチルとコハク酸ジメチルおよび1,6-ヘキサンジオールに、触媒としてリパーゼ CA を作用させて合成した。このとき、L-リンゴ酸ジメチルとコハク酸ジメチルの仕込み比（モル比）を変えて、共重合組成の異なるリンゴ酸共重合体を得た。L-リンゴ酸ジメチルとコハク酸ジメチルの仕込み比（M/S）を 7/3 としたときの、リンゴ酸共重合体の合成方法は次のとおりである。まず、小カラムにモレキュラーシーブス 4A（ビーズ）を充填し、150 °C の乾燥器で 2 時間乾燥させた。L-リンゴ酸ジメチル 107 μ L（0.82 mmol）とコハク酸ジメチル 250 μ L（1.9 mmol）および 1,6-ヘキサメチレンジオール 323 mg（2.7 mmol）をナスフラスコにはかり取り、50 °C の乾燥器に入れて内容を溶解し、均一な溶液とした。ナスフラスコにリパーゼ CA 177 mg を入れ、フラスコ内を N₂ ガスでパージし、加熱乾燥させた小カラムを取り付け、大気圧下、70 °C で 48 h、無溶媒で反応させた。終了後、反応混合物をクロロホルムに溶解し、クロロホルムに不溶の酵素を濾別した。濾液からクロロホルムを減圧留去して、リンゴ酸共重合体を回収した。

得られたリンゴ酸共重合体の分子量を、SEC および ¹H NMR を用いて測定した。また、¹H NMR と MALDI-TOF MS を用いて、末端基構造の解析を行った。MALDI-TOF MS の測定は、次のように行った。測定試料 2~5 mg/mL クロロホルム溶液、マトリクスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 10 mg/mL THF 溶液および、イオン化助剤として臭化ナトリウム 1 mg/mL メタノール溶液を調製した。測定用サンプルプレートに、イオン化助剤溶液 1 μ L を滴下して溶媒を乾燥させ、その上にマトリクス溶液 1 μ L を滴下して乾燥後、さらに測定試料溶液 1 μ L を重ねて塗布し乾燥させた。これを測定に使用し、イオンの検出は、ポジティブイオン、リフレクターモードで行った。

以降のリンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの合成には、得られたリンゴ酸共重合体をそのまま使用した。

Oligo (HM-co-HS) (M/S = 3/7)

¹H NMR (CDCl₃) : δ = 1.38 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂), 1.57, 1.63 (m, 4H, OCH₂CH₂), 2.62 (m, 4H, OCOCH₂), 2.79, 2.86 [dd, 2H, OCOCH₂CH(OH)], 3.26 [m, 1H, OCOCH₂CH(OH)], 3.65 (d, 2H, CH₂CH₂CH₂OH), 3.70 (s, 3H, CH₂CH₂COOCH₃), 3.72 (s, 3H, CH(OH)CH₂COOCH₃), 3.82 (s, 3H, CH₂CH(OH)COOCH₃), 4.08, 4.20 (m, 4H, COOCH₂), 4.49 [m, 1H, OCOCH₂CH(OH)].

IR (KBr): 3492 (OH 伸縮), 2936, 2862 (CH₂ 伸縮), 1725 (C=O 伸縮), 1158 cm⁻¹ (C-O-C 伸縮).

5.3.3.2 ジイソシアナートを用いたリンゴ酸共重合体の重合

リンゴ酸共重合体をヘキサメチレンジイソシアナートで重合し、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンを得た。このとき、リンゴ酸共重合体およそ 1 mol に対して、ヘキサメチレンジイソシアナートを 1 mol 加えて反応を行った。化学量論的には、リンゴ酸共重合体 1 分子あたり約 2 個の水酸基が、イソシアナート基と反応してウレタン結合を形成することに相当する。以下に、リンゴ酸共重合体 (M/S = 3/7) を用いた場合のポリウレタンの合成方法について示す。ナスフラスコに、リンゴ酸共重合体 (M/S = 3/7) 0.50 g をはかり取り、75 で 3 h、攪拌しながら減圧脱気を行った。これに、ヘキサメチレンジイソシアナート 31 μ L を加え、混合物を 1 分間減圧した。その後、フラスコをシールして、80 $^{\circ}$ C で 72 h、反応を行った。反応終了の目安として、FT-IR により、イソシアナート由来の 2270 cm^{-1} 付近のピークの消失を確認した。

得られたポリマーについて、SEC を用いて分子量測定を行い、また、DSC によりガラス転移温度 (T_g)、融点 (T_m) および結晶化温度 (T_c) を測定した。DSC 測定は、次のように行った。試料 3~5 mg をサンプルパンにはかり取って密閉し、-50~180 $^{\circ}$ C、昇温速度 10 $^{\circ}$ C/min で昇温 (ファーストヒーティング) した後、-50 $^{\circ}$ C/min で -50 $^{\circ}$ C まで急冷した。その後同じ昇温速度で 180 $^{\circ}$ C まで昇温 (セカンドヒーティング) したときに観測される T_g 、 T_m および T_c を測定値として記録した。

Polyurethane containing oligo(HM-co-HS) (M/S = 3/7)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.35 (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.38 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.60 (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.64 (m, 4H, OCH_2CH_2), 2.62 (m, 4H, OCOCH_2), 2.79, 2.86 [dd, 2H, $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{OH})$], 3.16 (m, 4H, $\text{OCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29 [m, 1H, $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{OH})$], 3.70 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 3.72 (s, 3H, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 3.82 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOCH}_3$), 4.08, 4.20 (m, 4H, COOCH_2), 4.49 [m, 1H, $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{OH})$].

IR (KBr): 3471 (OH 伸縮), 3396 (NH 伸縮), 2937, 2861 (CH_2 伸縮), 1726 (C=O 伸縮), 1527 (N-H 変角, C-N 伸縮), 1157 cm^{-1} (C-O-C 伸縮).

5.3.3.3 酵素分解試験

リパーゼ CA を用いてリンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの酵素分解試験を行った。アニソールに 4 mg/mL の濃度で溶解したポリウレタンに対して酵素 (200 wt-%) を添加して 110 $^{\circ}$ C で 24 h 反応させた。分解生成物の分析は、SEC および MALDI-TOF MS を用いて行った。

5.3.4. 結果と考察

5.3.4.1 酵素触媒によるリンゴ酸共重合体の合成

リパーゼ CA の存在下、L-リンゴ酸ジメチルとコハク酸ジメチルの混合比を変え、1,6-ヘキサジオールと反応させて、一連の共重合体組成を持つリンゴ酸共重合体 (M/S = 10/0, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8, 1/9, 0/10) を得た。¹H NMR の解析から、末端基には、水酸基とメチルエステル基をおよそ 50 %ずつ含むことがわかった。Table 5.3.2 に、得られたリンゴ酸共重合体の SEC 測定により求めた数平均分子量 (M_n) および ¹H NMR により決定したリンゴ酸とコハク酸の組成比を示した。

Table 5.3.2 Preparation of oligo(HM-*co*-HS) by the oligomerization of dimethyl L-malate, dimethyl succinate (2.7 mmol) and 1,6-hexanediol (2.7 mmol) using lipase CA (177 mg) at 70 °C for 48 h.

Molar ratio of malate/succinate	Malic acid content (calcd. by NMR)	$M_n (\times 10^{-3})$
10/0	1.0	2.4
9/1	0.97	2.4
8/2	0.83	2.4
7/3	0.73	2.6
6/4	0.63	2.4
5/5	0.51	2.8
4/6	0.41	2.9
3/7	0.30	3.1
2/8	0.20	4.0
1/9	0.10	3.6
0/10	0	3.7

リンゴ酸共重合体の分子量は、コハク酸の比率が 50 %以上になると、少しずつ大きくなる傾向が認められた。このことから、L-リンゴ酸のカルボキシル基は、コハク酸よりも反応性が低かったと推測される。山下らは、エステル結合生成について、L-リンゴ酸ジメチルの水酸基と同じ炭素にあるカルボキシル基と、もう一方のカルボキシル基を比較した場合、それらの酵素認識性には、ほとんど差異がないことを報告しており^[21]、リパーゼによる重縮合では、電子求引基である水酸基の存在が、カルボキシル基へのアルコールの求核置換反応を妨げることの影響は小さいと思われる。Li らは、L-リンゴ酸、アジピン酸および 1,8-オクタンジオールの反応系で、L-リンゴ酸の仕込み比が多くなると分子量が低下するという、

今回の結果と同様の傾向を報告している^[18,19]。Liらは、この理由として、L-リンゴ酸は水酸基を有しているため親水性が高く、疎水性である酵素の活性部位にコハク酸より入り込みにくいこと、また、水酸基を有する L-リンゴ酸の濃度が高まると、水素結合が強まるために、反応系の粘性が上がり、酵素の活性部位への反応基質の移動が妨げられたことをあげて、考察している^[18,19]。本研究で得られた結果も、これと同様なメカニズムによるものと考えられる。

また、L-リンゴ酸の仕込み比が高くなると、得られたリンゴ酸共重合体の L-リンゴ酸の含有率が、仕込み比よりもやや高くなる傾向が認められた。L-リンゴ酸の仕込み比が大きい場合には、重合が進行してリンゴ酸共重合体中の L-リンゴ酸の含有率が高くなると水素結合の強い水酸基を持つ L-リンゴ酸同士が凝集し、酵素の周囲の粘性を上昇させ、コハク酸の酵素の活性部位への移動を妨げるために、コハク酸の含有率が仕込み時よりも低くなるのではないかと推測される。

5.3.4.2 ヘキサメチレンジイソシアナートを用いたリンゴ酸共重合体の重合

ヘキサメチレンジイソシアナートを用いて 5.3.4.1 で合成した組成の異なる一連のリンゴ酸共重合体を重合し、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンを得た。結果を Table 5.3.3 に示した。

L-リンゴ酸の含有率が高いリンゴ酸共重合体を用いた場合、得られたポリウレタンの分子量分散が大きくなった。これは、リンゴ酸共重合体中の水酸基の含有率が高いため、ジイソシアナートによる分子間の架橋が起りやすくなり、一部架橋構造を形成して、見かけの分子量が大きくなったためと考えられる。

次に、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの熱特性を DSC で測定し、結果を Table 5.3.3 に示した。コハク酸の含有率が 80 % 以上の場合には、半結晶性のポリマーとなり、 T_m が観測され、また、コハク酸の含有率が高くなるほど T_m が高くなった。これは、ヘキサメチレンサクシネート鎖の結晶性が高く、その含有率が高まると、半結晶性のポリウレタンとなったためと考えられる。また、 $M/S = 1/9$ の場合にのみ、 T_c が観測され、分子の再配列による冷結晶化が起こっていることがわかった。 T_g が低いヘキサメチレンサクシネート鎖が T_g 以上の温度になり、かなり自由に動けるようになっているが、水素結合が強く T_g の高いヘキサメチレンマレート鎖に束縛され、結晶化構造を形成したのではないかと考えられる。同様の現象は、ポリ（ブチレンサクシネート-co-ブチレンマレート）についても報告されている^[22]。 T_g については、L-リンゴ酸の含有率が高いポリウレタンの方が、高くなる傾向がみられた。L-リンゴ酸が水酸基を有するため、その含有率が高くなると、分子間の水素結合が強くなるためと考えられる^[22]。

Table 5.3.3 Preparation of polyurethane containing oligo(HM-co-HS) by polymerization of hexamethylene diisocyanate with oligo(HM-co-HS) having different content of L-malate and succinate.

Entry	Molar ratio of malate/succinate	Polyurethane				
		$M_w (\times 10^{-4})$	M_w/M_n	$T_g (^\circ)$	$T_m (^\circ)$	$T_c (^\circ)$
1	10/0	7.3	10.9	-36.5	—	—
2	9/1	16.1	21.9	-40.0	—	—
3	8/2	15.4	20.0	-44.0	—	—
4	7/3	13.6	17.0	-44.1	—	—
5	6/4	16.4	21.3	-48.2	—	—
6	5/5	1.7*	3.1	-43.5	—	—
7	4/6	5.0	6.4	-51.0	—	—
8	3/7	8.7	9.3	-50.7	—	—
9	2/8	4.1	6.1	-52.3	21.5	—
10	1/9	3.5	3.9	-53.7	25.4, 34.3	-20.0
11	0/10	1.2	1.8	—	43.8	—

* Polyurethane from entry 6 was partly insoluble in THF.

5.3.4.3 リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの酵素分解

リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンについて、リパーゼ CA による酵素分解試験を行った。分解試験前後のリンゴ酸共重合体含有ポリウレタン ($M/S = 3/7$) の SEC クロマトグラムを Fig. 5.3.1 に示した。リンゴ酸共重合体含有ポリウレタン ($M/S = 3/7$) のポリマーのピークが、オリゴマー領域にシフトしたことがわかる。 $M/S = 10/0$ および $0/10$ についても同様であり、ポリウレタンの分解性に対する L-リンゴ酸とコハク酸の含有率の影響はとくに認められなかった。

次に、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタン ($M/S = 3/7$) の酵素分解生成物について、MALDI-TOF MS を用いた分子構造の解析を行った。Figure 5.3.2 に示した MALDI-TOF MS の結果から、分解生成物は環状オリゴマーを含んでいることが示唆された。例えば、 $423 m/z$ のピークは、ヘキサメチレンサクシネート構造 [$Q(x=0, y=2, z=0) + Na^+$] 由来であると同定できる。 $439 m/z$ のピークは、ヘキサメチレンマレート-ヘキサメチレンサクシネート構造 [$Q(x=1, y=1, z=0) + Na^+$]、 $455 m/z$ のピークは、ヘキサメチレンマレート構造 [$Q(x=2, y=0, z=0) + Na^+$] に対応する。また、 509 および $525 m/z$ のピークは、それぞれ、ヘキサメチレンサク

シネート-ウレタン構造 $[Q (x=0, y=1, z=1) + Na^+]$ およびヘキサメチレンマレート-ウレタン構造 $[Q (x=1, y=0, z=1) + Na^+]$ の環状オリゴマー由来であると同定される。

リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンのリパーゼ CA による酵素分解試験の結果から、ヘキサメチレンサクシネート-ウレタン構造およびヘキサメチレンマレート-ウレタン構造を有する環状オリゴマーの生成がみとめられた。環状オリゴマーは酵素の反応基質となりうることから、酵素リパーゼを用いた分解と分解生成物（環状オリゴマー）の再重合によるケミカルリサイクルシステム^[2, 3, 10-13]が、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンについても適用できる可能性があることが示された。

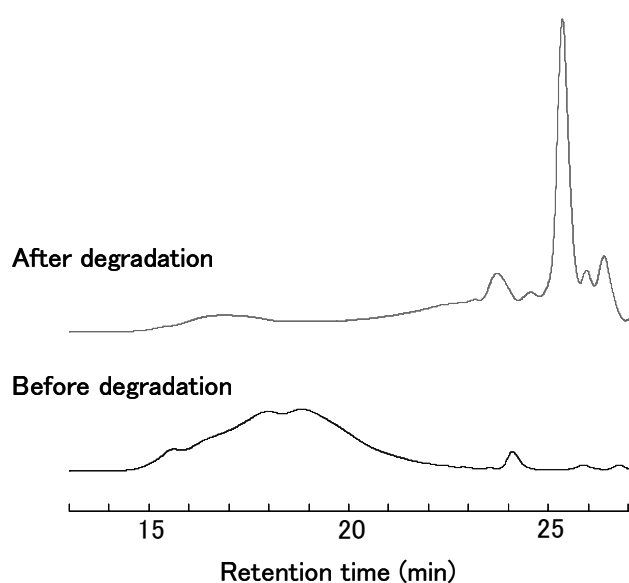
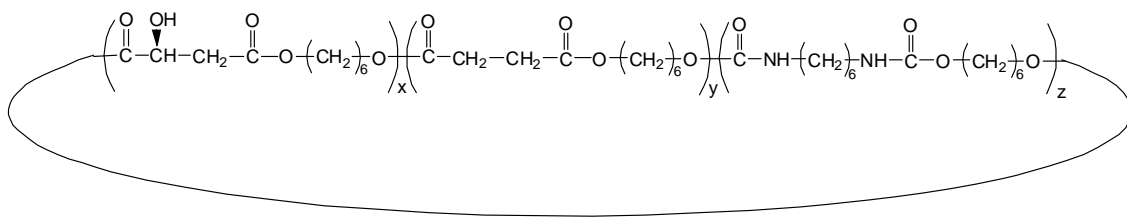


Figure 5.3.1 The SEC profile changes of the degradation products of polyurethane containing oligo(HM-co-HS) (M/S = 3/7) in anisole by lipase CA at 110 °C for 24 h.



$$Q = 216x + 200y + 258z$$

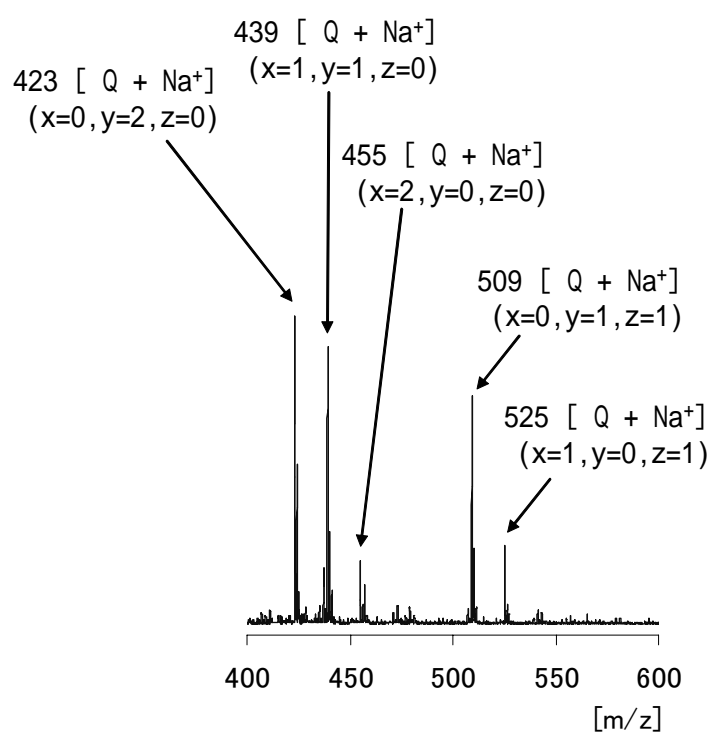


Figure 5.3.2 MALDI-TOF mass spectrum of the degradation products of polyurethane containing oligo(HM-co-HS) (M/S = 3/7) in anisole by lipase at 110 °C for 24 h.

5.3.5 結論

リパーゼ CA を用いて、L-リンゴ酸とコハク酸の組成比の異なる、一連のリンゴ酸共重合体を得た。コハク酸との共重合比を変えることにより、共重合体の水酸基含有率を任意に制御可能であった。得られたリンゴ酸共重合体を、ヘキサメチレンジイソシアナートを用いて重合し、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンを合成した。リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンの熱特性を測定したところ、コハク酸の含有率が 80 % 以上の場合には、半結晶性のポリマーとなり、 T_m が観測された。 T_g については、水酸基を有する L-リンゴ酸の含有率が高いポリウレタンの方が、高くなった。また、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンは、リパーゼ CA によりオリゴマーレベルまで分解され、分解生成物として環状オリゴマーの生成がみとめられた。環状オリゴマーは再重合性を有し、酵素の反応基質となりうることから、酵素リパーゼを用いた分解と分解生成物の再重合によるケミカルリサイクルの可能性が示された。

5.4 参考文献

- [1] 植物由来プラスチックの高機能化とリサイクル技術, a) p.162, b) p.44, サイエンス&テクノロジー (2007).
- [2] Y. Soeda, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **4**, 721 (2004).
- [3] Y. Soeda, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **5**, 277 (2005).
- [4] J. Seppala, A. Helman, and H. Korhonen, *Macromol. Biosci.*, **4**, 208 (2004).
- [5] 大武義人, 松中宏至 (監修), 高分子材料の事故原因究明と PL 法, p.80, アクネ技術センター (1999).
- [6] S. Murakami, N. Aoki, and S. Matsumura, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **32**, 1211 (2007).
- [7] 堤主計, 中川克彦, 白浜博幸, 安田源, 高分子論文集, **58**, 245 (2001).
- [8] 玄丞侏, 竹本喜一, 砂本順三, 明石満 (共編), 高分子と医療, p.21, 三田会出版 (1989).
- [9] H. Tuji and S. Miyauchi, *Polym. Degrad. Stab.*, **71**, 415 (2001).
- [10] Y. Takahashi, S. Okajima, K. Toshima, and S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **4**, 346 (2004).
- [11] S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **2**, 105 (2002).
- [12] S. Okajima, R. Kondo, K. Toshima, and S. Matsumura, *Biomacromolecules*, **4**, 1514 (2003).
- [13] Y. Osanai, K. Toshima, and S. Matsumura, *Green Chem.*, **5**, 567 (2003).
- [14] 高分子学会 (編), 天然素材プラスチック, 共立出版 (2006).
- [15] 木村良晴, 城谷健二, 北尾敏男, 高分子加工, **37**, 327 (1988).
- [16] S. Matsumura, H. Beppu, and K. Toshima, *Chem. Lett.*, **3**, 249 (1999).
- [17] Y. Shibata and A. Takasu, *J. Polym. Sci. Part A*, **47**, 5747 (2009).
- [18] G. Li, D. Yao, and M. Zong, *Eur. Polym. J.*, **44**, 1123 (2008).
- [19] D. Yao, N. H. Kim, J. H. Lee, T. Kuila, G. Li, and S. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, **120**, 1114 (2011).
- [20] 川島伸之, 日本化学会第 87 回春季年会講演予稿集, 2 A2-33 (2007).
- [21] 山下徹郎, 卒業論文, 慶應義塾大学理工学部応用化学科 (2009).
- [22] S. Zhang, J. Yang, X. Liu, J. Chang, and A. Cao, *Biomacromolecules*, **4**, 437 (2003).

第6章 総括

地球規模で様々な環境問題が発生し、深刻化するなかで、化学産業は今後も環境と調和した持続的な発展により、人と社会に貢献していくことが求められている。このような背景から、原料から廃棄に至る製造プロセス全体の環境負荷を出来る限り小さくする、グリーンケミストリーが提唱された。グリーンケミストリーに基づいた技術開発やプロセス設計が、ポリマー材料においても強く求められ、再生可能資源（バイオマス）とバイオプロセスを利用した環境低負荷型ポリマーや、環境低負荷なリサイクル手法などについて、様々な研究が行われている。

本研究では、ポリマー原料として、バイオマスから発酵あるいは化学変換可能なものを主として利用し、分子設計を行って、環境低負荷型かつ高機能性を有するポリマー材料を創成することを目的として検討を行った。また、得られたポリマーについて、生分解によるバイオリサイクルあるいは酵素触媒によるケミカルリサイクルの可能性を評価するため、生分解性および酵素分解性を調べた。

本研究で得られた結果を以下にまとめた。

(1) 種々の糖により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

生分解性ゲルは使用後に環境中や生体内で分解されることが想定されており、ゲルの主鎖部分が天然高分子であるだけでなく、架橋部分にも天然物を用いることが重要である。そこで、微生物が発酵生産し、高い生分解性を有するポリ（ γ -グルタミン酸）（PGA）を、ジメチルスルホキシド（DMSO）中、水溶性カルボジイミド（WSC）の存在下、種々の糖で架橋して、新規バイオベースヒドロゲルを合成し、その吸水性および加水分解性について評価した。

架橋剤としては、グルコース、マルトース、シクロデキストリン（CD）および水溶性キトサンなどを使用し、誘導体化などの前処理が不要なワンポット反応により、25℃、24hで架橋を達成した。中性糖で架橋する場合には、4-ジメチルアミノピリジンのような塩基を添加すると、比較的高い収率でPGAゲルが得られた。合成したPGAゲルのうち、グルコースで架橋したゲルが、3000 g/gと最も高い吸水率を示した。また、環状オリゴ糖であるCDで架橋されたPGAゲルは、相当する糖残基数を持つ鎖状オリゴ糖で架橋されたPGAゲルよりも高い吸水率を示した。これは、環状オリゴ糖のかさ高く柔軟性に欠ける構造が架橋反応の進行を妨げて側鎖構造をとるものが多く、鎖状オリゴ糖の場合よりも架橋密度が低くなったためと考えられた。PGAゲルの吸水率は、架橋剤の含有率およびその化学構造によって変化することがわかった。これらの双方がPGAの架橋密度に影響を与えており、ゲルの架橋密度が高くなると吸水率は減少し、架橋密度が低くなると吸水率は増大するためである。また、ゲルはアルカリ条件下（pH 9、37℃）で加水分解され、ゲルの架橋剤含有率が低い方が、分解速度は速かった。

本研究で得られたゲルは、架橋点でエステル結合した、天然の生分解性化合物のみから成ることから、生分解性を有し、例えば水処理剤、土壌改良材や徐放材料などとして、環境、農業および医薬分野への応用が期待される。

(2) アミノ酸により架橋されたバイオベースポリグルタミン酸ゲル

グリーンケミストリーの観点からは、反応溶媒として DMSO などの有機溶媒でなく、より環境低負荷な水を使用することが望ましい。そこで、水溶媒中でのアミド結合形成反応に着目し、水溶媒中、L-リジンをを用いて PGA を架橋して、バイオベースヒドロゲルを合成し、その吸水性、加水分解性および生分解性について評価した。

縮合剤として WSC あるいは 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩 (DMT-MM) を使用し、誘導体化などの前処理が不要なワンポット反応により、25 °C で架橋を行った。WSC の存在下では、反応溶媒として、水を使用するよりも DMSO を使用した場合の方が、より高い収率で PGA ゲルを得ることができた。一方、DMT-MM は WSC よりも、PGA を水中で架橋するために適した縮合剤であり、より高い収率でゲルを得ることができた。L-リジン で架橋した PGA ゲルは、300~2100 g/g の吸水率を示した。PGA ゲルの収率および吸水率は、反応に使用した L-リジン水溶液の pH、DMT-MM および架橋剤の添加量によって影響されることがわかった。L-リジンとアミド結合で架橋した PGA ゲルは、 α -CD とエステル結合で架橋した PGA ゲルよりも、37°C、pH 9 の緩衝液中での耐加水分解性が高かった。活性汚泥を用いた BOD 法による生分解性試験において、L-リジンで架橋した PGA ゲルの生分解度は 60 % に達し、易分解性を示した。

PGA を L-リジンで架橋した生分解性バイオベースヒドロゲルおよび DMT-MM を用いた PGA の架橋方法は、機能性を有するバイオベースマテリアルの創成に応用可能であると期待される。

(3) 環境低負荷型ポリ (カーボネート-ウレタン) の合成と酵素分解

環境低負荷型脂肪族ポリ (カーボネート-ウレタン) を、オリゴ (テトラメチレンカーボネート) ジオール [oligo(TeC) diol] をソフトセグメントとしてヘキサメチレンジイソシアナートで重合し、合成した。ポリウレタンの合成に用いた oligo(TeC) diol については、1,4-ブタンジオールと当量の炭酸ジエチルにリパーゼ CA を作用させて重合し、 M_n 1,500 のオリゴマーを収率 84 % で得た。 M_n 36,400 のポリ (テトラメチレンカーボネート-ウレタン) (PTeCU) フィルムの引張強度と伸びは、それぞれ、18.7 MPa および 410 % であった。また、PTeCU はアニソール中でリパーゼ CA によって酵素分解され、分解生成物として、環状オリゴマーを主として生成することがわかった。環状オリゴマーは再重合性を有することから、リパーゼ CA を用いたポリマーのケミカルリサイクルが期待される。また、生成したオリゴマーは分子量が数百程度であり、活性汚泥により生分解されることがわかった。PTeCU は、例えばコンポストなどの適当な条件の下で、微生物の分泌する加水分解酵素により低

分子化された後、微生物により資化されると考えられる。これらの結果から、得られた PTeCU は、耐水性が高く、かつ酵素分解可能であり、潜在的に生分解性を有するポリウレタンであることが示唆された。

(4) バイオベースポリウレタンの合成と酵素分解

バイオマスの発酵あるいは化学変換により供給可能なモノマーを用いて、酵素触媒重合したバイオベースポリオールに、ジイソシアナートを反応させて、バイオベースポリウレタン（乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンおよびリンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタン）を合成した。

乳酸オリゴマー含有バイオベースポリウレタンは、加水分解性と酵素分解性を制御した環境低負荷型ポリウレタンを得ることを目的として合成した。オリゴラクチドジオールと oligo(TeC) diol の仕込み比を変えて、ヘキサメチレンジイソシアナートによる重合を行い、一連のポリ（カーボネート/ラクチド-ウレタン）(PC/LU) を得た。アルカリ水溶液中で PC/LU の加水分解試験を行ったところ、オリゴカーボネートを含有する PC/LU は、ポリ（ラクチド-ウレタン）よりも耐加水分解性が向上していることが示唆された。酵素分解試験については、オリゴラクチドの含有率が高い PC/LU の方が、緩衝溶液中でより容易にプロテイナーゼ K によって分解された。一方、アニソール中でのリパーゼ CA による酵素分解では、オリゴカーボネートの含有率が高い PC/LU で分解が進行した。分解生成物は、酵素による再重合反応に利用可能と期待される環状オリゴマーを含んでいることがわかった。

リンゴ酸共重合体含有バイオベースポリウレタンは、2級水酸基を有するリンゴ酸共重合体にヘキサメチレンジイソシアナートを反応させて合成した。リンゴ酸共重合体は、L-リンゴ酸ジメチル、コハク酸ジメチルおよび 1,6-ヘキサメチレンジオールにリパーゼ CA を作用させて重合した。このとき、L-リンゴ酸とコハク酸の共重合比を変えることで、共重合体の水酸基含有率を任意に制御可能であった。水酸基含有率の異なる一連の共重合体から合成したポリウレタンの熱特性を測定したところ、コハク酸の含有率が 80 % 以上の場合には、半結晶性のポリマーとなり、融点が観測された。ガラス転移温度については、水酸基を有する L-リンゴ酸の含有率が高いポリウレタンの方が、高くなった。また、リンゴ酸共重合体含有ポリウレタンは、リパーゼ CA によりオリゴマーレベルまで分解され、分解生成物として環状オリゴマーの生成がみとめられた。環状オリゴマーは再重合性を有することから、酵素リパーゼを用いた再重合によるケミカルリサイクルの可能性が示唆された。得られたリンゴ酸共重合体含有ポリウレタンは、水酸基を有することから、化学修飾により、高機能化が可能と期待される。

本研究では、高機能性を有する環境低負荷型バイオベースポリマーの創成を目指した。バイオベースヒドロゲルについては、微生物が発酵生産するポリ（ γ -グルタミン酸）を糖あるいはアミノ酸で架橋することに成功し、優れた吸水性と生分解性を有する高機能性ゲ

ルを得ることができた。また、環境低負荷型ポリウレタンについては、酵素触媒で合成されたバイオベースオリゴマーを、汎用のジイソシアナートで重合し、酵素分解可能な結合部位を有するポリウレタンを合成した。また、加水分解性の制御あるいは化学修飾可能な水酸基の導入による機能化を行った。さらに、得られたポリウレタンの酵素分解性を明らかにし、酵素によるケミカルリサイクルの可能性について言及した。

本研究の成果が、バイオマスを基盤とする環境低負荷型ポリマー創成の一助となる知見となれば幸いである。

本論文に関する研究発表

主論文に関する原著論文

1. "Bio-Based Hydrogels Prepared by Cross-Linking of Microbial Poly(γ -glutamic acid) with Various Saccharides"
Saeko Murakami and Nobuyoshi Aoki, *Biomacromolecules*, **7**, 2122-2127 (2006).
2. "Bio-Based Biodegradable Hydrogels Prepared by Crosslinking of Microbial Poly(γ -glutamic acid) with L-lysine in aqueous solution"
Saeko Murakami, Nobuyoshi Aoki, and Shuichi Matsumura, *Polymer Journal*, **43**, 414-420 (2011).
3. "Synthesis and Enzymatic Degradation of Environmentally Benign Poly(carbonate-urethane)s"
Saeko Murakami, Nobuyoshi Aoki, and Shuichi Matsumura, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **32**, 1211-1214 (2007).
4. "Synthesis and Enzymatic Degradation of Environmentally Benign Poly(carbonate/ester-urethane)s Containing Lactide Oligomer"
Saeko Murakami, Nobuyoshi Aoki, and Shuichi Matsumura, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **35**, 805-808 (2010).

その他の論文

1. "Enzyme-Catalyzed Polymerization of L-Aspartate"
Shuichi Matsumura, Yasuhiro Tsushima, Nobuyuki Ootzawa, Saeko Murakami, Kazunobu Toshima, and Graham Swift, *Macromolecular Rapid Communications*, **20**, 7-11 (1999).
2. 「生分解性ポリ (γ -グルタミン酸) ゲルの合成とその物性 (I) -ジエポキシ化合物による架橋-」
村上小枝子, 遠藤剛, 神奈川県産業技術総合研究所研究報告, No.7, 72-75 (2001).
3. 「生分解性プラスチックの土壌埋設による分解性評価」
村上小枝子, 青木信義, 今井雄一郎, 木村皓一, 高橋亮, 堀越禎一, 神奈川県産業技術総合研究所研究報告, No.8, 47-50 (2002).

国際会議発表

1. "Preparation of Poly(γ -glutamic acid) Gel Cross-Linked by Saccharides and Amino Acids and its Swelling Property"
Saeko Murakami and Nobuyoshi Aoki, 1st IUPAC International Conference on Bio-based Polymers, RIKEN Institute, Saitama, Japan, November 12-14, 2003.

2. "Bio-based Hydrogels Prepared by Crosslinking of Microbial Poly(γ -glutamic acid) with L-Lysine in Aqueous Solution"

Saeko Murakami, Nobuyoshi Aoki, and Shuichi Matsumura, Advanced Polymeric Materials and Technology Symposium, Jeju Shilla Hotel, Jeju Island, South Korea, January 24-27, 2010.

国内学会発表

1. 「ポリ (γ -グルタミン酸) の架橋とその性質」

村上小枝子、青木信義、遠藤剛、日本化学会第 78 春季年会(2000)、日本大学船橋キャンパス、2000 年 3 月 28-31 日

2. 「天然物により架橋されたポリ (γ -グルタミン酸) の合成とその吸水特性」

村上小枝子、青木信義、遠藤剛、日本化学会第 79 春季年会(2001)、甲南大学岡本キャンパス、2001 年 3 月 28-31 日

3. 「シクロデキストリンにより架橋されたハイドロゲルの合成とその吸水特性」

村上小枝子、青木信義、シクロデキストリンシンポジウム、同志社大学、2001 年 9 月 27-28 日

4. 「ポリ (γ -グルタミン酸) のアミノ酸架橋による生分解性高吸水性材料の合成」

村上小枝子、青木信義、第 51 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2002 年 5 月 29-31 日

5. 「環境低負荷型ポリ (カーボネート-ウレタン) の合成と生分解性」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 53 回高分子学会年次大会、神戸国際会議場、2004 年 5 月 25-27 日

6. 「環境低負荷型ポリ (カーボネート-ウレタン) の生分解性」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 54 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2005 年 5 月 25-27 日

7. 「環境低負荷型ポリ (カーボネート/エステル-ウレタン) の合成と生分解性」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 55 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2006 年 5 月 24-26 日

8. " Synthesis and Enzymatic Degradation of Environmentally Benign Poly(carbonate-urethane)s "

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 16 回日本 MRS 学術シンポジウム、日本大学理工学部駿河台校舎、2006 年 12 月 8-10 日

9. 「乳酸オリゴマーを用いた環境低負荷型ポリ (カーボネート/エステル-ウレタン) の合成と酵素分解」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 56 回高分子学会年次大会、国立京都国際会館、2007 年 5 月 29-31 日

10. 「乳酸オリゴマーを用いた環境低負荷型ポリ (カーボネート/エステル-ウレタン) の合

成と物性」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 57 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2008 年 5 月 28-30 日

11. " Preparation and Enzymatic Degradation of Environmentally Benign Poly(carbonate/ester-urethane)s Based on Lactide Oligomer "

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜情報文化センター、波止場会館、2009 年 12 月 7-9 日

12. 「リンゴ酸共重合体を含有する環境低負荷型ポリウレタンの合成と物性」

村上小枝子、青木信義、松村秀一、第 59 回高分子討論会、北海道大学、2010 年 9 月 15-17 日

特許出願

1. 特開 2002-128899 「生分解性を有する吸水性高分子」

謝辞

本研究を行うにあたり、大学4年時からの長きにわたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学理工学部 松村秀一教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、多くの貴重なご意見、ご指導を賜りました、慶應義塾大学理工学部 戸嶋一敦教授、西山繁教授、薬学部 須貝威教授に心より御礼申し上げます。

博士課程で研究を行うにあたり、神奈川県より2年間、大学院修学支援をいただきましたことに深く感謝致します。

ポリ(-グルタミン酸)ゲルの研究を行うきっかけを与えていただき、初めての学会発表をご指導いただきました近畿大学分子工学研究所 遠藤剛教授に心より感謝致します。

センターへの入所以来、実験の仕方から論文の書き方まで基本からご指導いただきました神奈川県産業技術センター 青木信義博士に心より感謝し、深く御礼申し上げます。入所当時に研究に対する心構えを指導いただいた佐藤隴博士に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、仕事面で多くのサポートをしていただいた、加藤千尋博士、田中聡美博士、粘弾性測定についてご教示いただいた津留崎恭一博士、分子量分析にご協力くださった高見和清氏をはじめ、ご支援賜りました神奈川県産業技術センターの皆様へ深く御礼申し上げます。

博士課程でのテーマ設定にあたり、酵素触媒重合の方法などを教えていただき、有意義なディスカッションをさせていただいた、松村研究室OBの加藤誠博士、山戸太氏をはじめ、色々と助けていただいた松村研究室のOB、後輩の皆様へ心より御礼申し上げます。

最後に、支えてくれた両親といつも笑顔で癒してくれた可愛いおいに深く感謝致します。