

グルコースを基本単位とするバイオマスの評価と炭素循環材料の構築

研究代表者 東京大学国際産学共同研究センター 教授 畑中研一

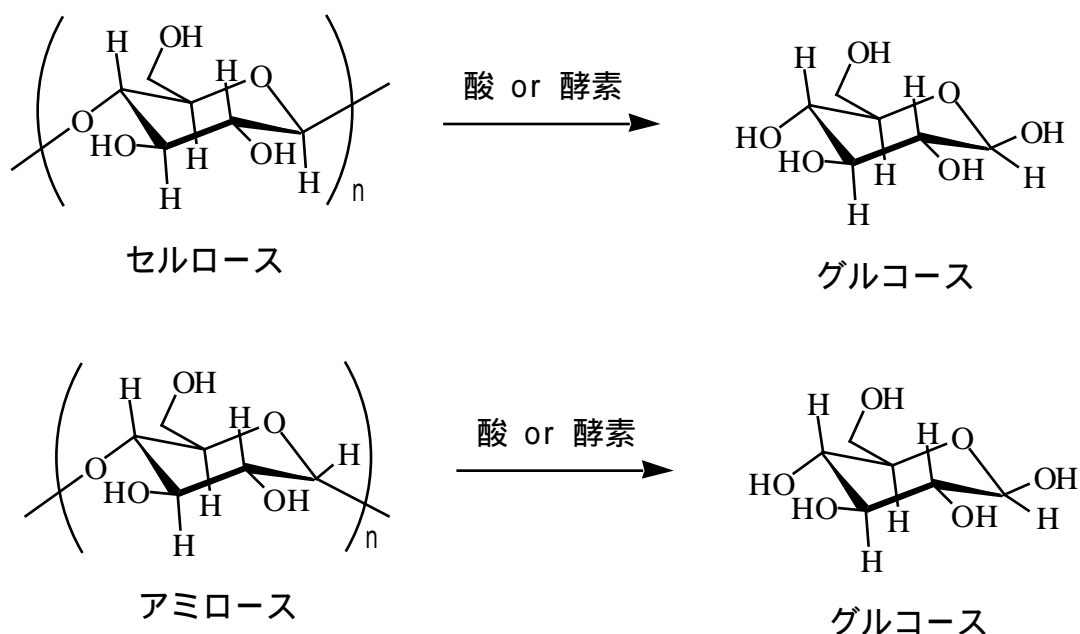
はじめに

サステイナブル社会のための重要な材料としてバイオマスが注目され、我が国でも糖鎖工学（グライコテクノロジー）に関する多数のプロジェクトが進行中である。しかしながら、糖鎖工学に関する多くのプロジェクトが個々の研究の集合体でしかないために、明確な成果が見えてこないのが実状である。糖鎖は構造が複雑である上に機能が個性的であることが原因の一つであると考えられる。本研究では“物質的な価値”を共通の言語として糖鎖工学における共通の土俵（プラットフォーム）を提案する。糖鎖工学において共通の言語となりうる物質はグルコースにおいて他になく、グルコースプラットフォームが最も現実的な糖鎖工学の体系化に結びつくと考えられる。本研究では、『グルコースプラットフォーム（GP）』を中心に、未利用バイオマスなども含む個々の天然糖鎖の価値を評価するとともに、高機能の材料をグルコースから生産する。

本研究では、様々な天然多糖やバイオマス等を「グルコースの生産し易さ」という尺度で評価することを第1の目標とする。即ち、原料としての価値（或いは品質の高低）を数値で表現する。取り扱う原料としては、セルロースやアミロースなど純粋な化合物、木材や紙などの天然資源である。また、グルコースから合成されるポリエステルをPETなど石油由来の汎用プラスチックに匹敵する物性にまで高めることを第2の目標とする。さらに、グルコースを出発物質として作られる高性能分子を製品化することを第3の目標とする。具体的には、天然多糖を原料としたグルコース生産に関しては、セルロースやアミロースなどの純物質、木材や海草などの農林水産資源、未利用バイオマスなどの混合物、といった3段階の原料を想定し、それぞれに適合した分解・精製方法を探索する。一方、グルコースを原料とした材料開発においては、グルコースから得られるヒドロキシメチルフルフラールや脂肪酸などを原料として新規ポリエステルを合成し、汎用材料としての物性評価を行う。さらに、高性能を追求した材料の構築に関しては、細胞表面酵素によるグルコースの認識を利用した細胞接着基質の開発を行うとともに、フッ素を用いた環境低負荷型合成法による新しい界面活性剤の合成などを行う。本稿ではグルコース生産とポリエステル合成について報告する。

1. 天然資源の分解によるグルコース生産

セルロース、アミロース、濾紙、コーンスターチを原料として、硫酸による加水分解と酵素による加水分解反応を行って、グルコースおよびその二量体であるセロビオースとマルトースの生成量を測定した。



1.1. 実験

【硫酸による加水分解】

基質 1 g (濾紙の場合は予め約 3・5 mm 四方に切ったものを使う) にイオン交換水を加えて 10・20 分間攪拌した。氷浴中で、水と 10 N 硫酸を加え、全体の溶液量が 10 ml で、酸濃度が 1 N、2 N、5 N となるように調製した。室温で 24 時間攪拌後、炭酸ナトリウムで中和し、遠心分離した上澄みを所定濃度で HPLC (TSK・Gel Amide-80) (展開溶媒はアセトニトリル：水 = 72 : 28) で分析し、生成した糖を測定した。

【酵素による加水分解】

基質 1 g (濾紙の場合は予め約 3・5 mm 四方に切ったものを使う) にイオン交換水を加えて 10・20 分間攪拌した。酵素 (市販のセルラーゼおよびアミラーゼ) を加えて 37 °C で 24 時間震盪させて反応した後、超音波によって酵素を失活させてから遠心分離した。上澄みを所定濃度で HPLC (TSK・Gel Amide-80) を用いて分析し、生成した糖を測定した。

1.2. 結果と考察

HPLC測定結果の例を図1に示し、グルコースの生成量を表1に示す。

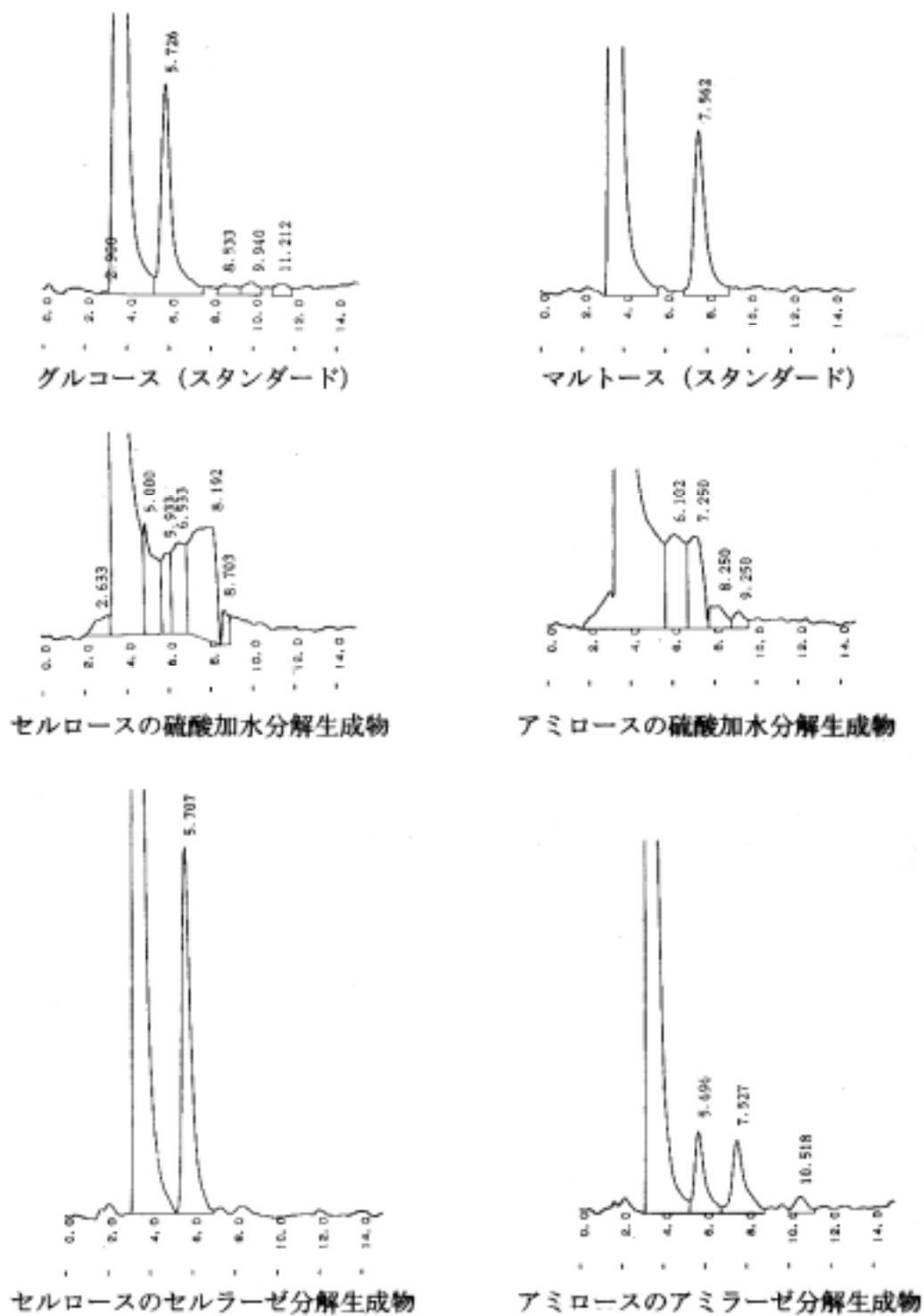


図1 多糖の加水分解生成物のHPLC

表1 多糖の加水分解によるグルコースの生成

基質	触媒	グルコース (%)	二糖 (%)	三糖 (%)
セルロース	1 N 硫酸	1.6	0.0	-
セルロース	2 N 硫酸	1.4	0.0	-
セルロース	5 N 硫酸	1.2	3.7	-
セルロース	アミラーゼ	0.0	0.0	0.0
セルロース	セルラーゼ	0.0	0.0	0.0
セルロース	セルラーゼ (多量)	20.8	0.0	0.0
濾紙	1 N 硫酸	0.0	0.0	-
濾紙	2 N 硫酸	2.0	0.0	-
濾紙	5 N 硫酸	2.2	5.1	-
濾紙	アミラーゼ	0.0	0.0	0.0
濾紙	セルラーゼ	0.0	0.0	0.0
濾紙	セルラーゼ (多量)	21.9	0.0	0.0
アミロース	1 N 硫酸	0.0	0.0	-
アミロース	2 N 硫酸	1.4	1.9	-
アミロース	5 N 硫酸	2.0	5.2	-
アミロース	アミラーゼ	11.7	16.6	3.5
アミロース	セルラーゼ	11.0	0.0	0.0
アミロース	セルラーゼ (多量)	27.2	0.0	0.0
コーンスターチ	1 N 硫酸	0.0	0.0	-
コーンスターチ	2 N 硫酸	1.9	1.9	-
コーンスターチ	5 N 硫酸	2.0	5.4	-
コーンスターチ	アミラーゼ	6.5	9.8	1.9
コーンスターチ	セルラーゼ	5.5	0.0	0.0
コーンスターチ	セルラーゼ (多量)	18.9	0.0	0.0

セルロースやアミロースなどの多糖を硫酸で加水分解すると、生成物のHPLC分析結果が示すように、単糖や二糖の他に多種類の分解副生成物が多く混入し、分離精製することが難しいと思われる。また、濾紙やコーンスターチの硫酸による加水分解反応でも同じようなことが起こっていると思われるHPLCチャートが得られた。一方、酵素（セルラーゼ）を用いてセルロースを加水分解すると、グルコースの単一ピークが観察され、グルコースの生産方法に適していると言える。また、酵素（アミラーゼ）を用いてアミロースを加水分解すると、グルコースとマルトースのピークが主生成物として観察された。濾紙やコーンスターチも同様に酵素によって分解され、比較的純度の高いグルコースやマルトースを与えた。

酵素による加水分解反応に関しては、セルロースがセルラーゼで分解され、アミラーゼでは分解されなかったのは予想通りであったが、アミロースやコーンスターチがアミラーゼのみならずセルラーゼによっても分解することは予想外の結果である。これはセルラーゼ中にグルコシダーゼ（不純物）が混入したためであると考えられるが、アミラーゼによる分解では単糖、二糖、三糖（およびそれ以上のオリゴ糖）の混合物を与えたのに対して、セルラーゼでは単糖であるグルコースのみを選択的に与えている。不純物であるグルコシダーゼの働きであるとはいえ、興味深い結果である。

以上の実験結果により、グルコース生産には酸を用いる加水分解反応よりも酵素を用いる加水分解反応の方が（精製その他の点で）有利であること、用いる原料（多糖）は、セルロースやアミロースなどの純物質と濾紙やコーンスターチなどのように不純物を含む材料のどちらでも利用できること、また、グルコース単品の生産にはアミラーゼよりもセルラーゼが適していることなどが分かった。原料の供給できる量、価格、食料か否か、などを考慮すると、紙や木材などのバイオマスにセルラーゼを反応させる方法が効率よくグルコースを与えると考えられる。

今回の実験によりグルコース生産の大まかな方向性が分かってきたと思われるが、当初計画した「グルコースの生産し易さ」という尺度で数値化するまでは至らなかった。酵素による加水分解条件のさらなる検討や基質の前処理などによる収率の向上によって、より精密な数値化に近づいていくと考えられ、今後の課題とする。

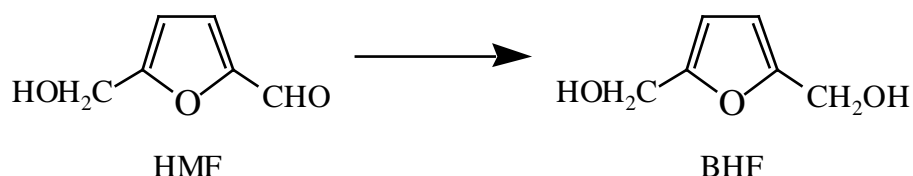
2. ヒドロキシメチルフルフラールの効率的な生成とポリエステル合成

当初予定していたグルコースからのヒドロキシメチルフルフラール(HMF)の効率的に生成に関しては、実際の合成を行わなかったが、化学工学的な多くの研究により、10~20%の収率であると考えられる。グルコースの重合体であるセルロースを熱分解すると、ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)が得られる。江原と坂は、超臨界水を用いたセルロースの高圧熱分解によって、最大9.5%の収率でHMFを得ている。望月らは、回分式反応器を用いて直接もみ殻を260℃で処理したところ、2.5%の収率でHMFを単離している。また、世利らは、糖からHMFを合成する際にランタノイドイオンが高効率な触媒として働くことを報告している。HMFは還元すると、ビスヒドロキシメチルフランとなるが、ビスヒドロキシメチルフランは酸硬化性フラン樹脂の添加剤として用いられている。本研究では、HMFを原料としたポリエステル合成研究を行った。

バイオマスやセルロースの熱分解によって得られるヒドロキシメチルフルフラール(HMF)を原料としてポリエステルの合成を行った。HMFを還元して得られるビスヒドロキシメチルフラン(BHF)を天然のジカルボン酸であるコハク酸、フマル酸、マレイン酸と重縮合を行ってポリエステルを合成した。重縮合は、酸クロリドを用いる方法と縮合剤を用いる方法により行った。縮合剤を用いて合成したBHFとコハク酸とのポリエステルの数平均重合度は最高30のものが得られ、NMRおよびIRスペクトルから直鎖状の規則性ポリマーであることがわかった。また、2種類のジカルボン酸を混合してBHFと重縮合を行って、共重合体を合成した。得られたポリエステルのDSC測定から、ポリエステルの融点とガラス転移点を求めた。

2-1. 実験

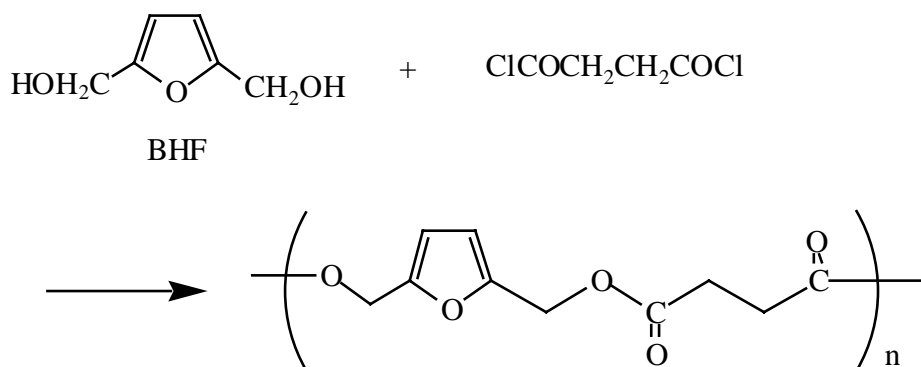
【2,5-ビス-ヒドロキシメチルフラン(BHF)の合成】



氷浴中、窒素気流下で、脱水メタノール(70 mL)と1N水酸化ナトリウム水溶液(0.2 mL)の混合物に、水素化ホウ素ナトリウム(6.1 g, 161 mmol)を5回に分けて加え、30分間かくはんした。そこにHMF(9.96 g, 79 mmol)の脱水メタノール(20 mL)溶液を滴下し、滴下ロートを10 mLの脱水メタノールで洗

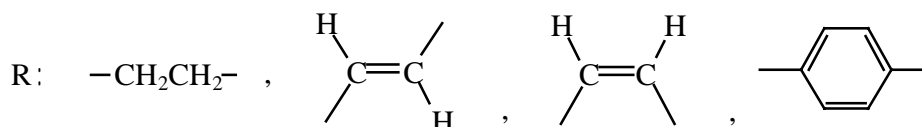
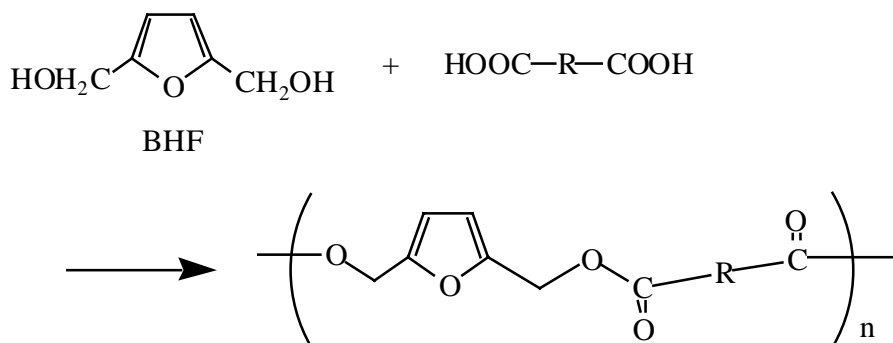
浄し、反応溶液に加えた。TLCにより、原料のスポットが完全に消失したのを確認後、エバポレーターにより溶媒を除去した。酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水で洗浄し、水層を酢酸エチルで再抽出（水層に BHF がなくなるまで）して、一次抽出液と合わせた。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、エバポレーターで酢酸エチルを除去した。残渣をクロロホルムに溶解し、数回再結晶を行って、BHF を白色結晶として得た。収量 9.23 g (91.6%)。

【BHF とコハク酸ジクロリドとの重縮合】



所定量の BHF を 1,2-ジクロロエタンに溶解し、ピリジンを加えて氷浴中に 30 分間静置した。コハク酸ジクロリドは滴下ロートを用いてゆっくりと滴下し、30 分間反応後、室温で 24 時間反応した。反応溶液に大量のメタノールを加えて沈殿したポリマーをクロロホルム-メタノールにより再沈殿して精製した（クロロホルムに不溶のポリマーはクロロホルム-DMF 混合溶媒を用いて精製した）。

【縮合剤を用いた BHF とジカルボン酸の重縮合】



ジカルボン酸（コハク酸、フマル酸、マレイン酸、テレフタル酸）の 1,2-ジクロロエタン溶液に N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC, 縮合剤)と N,N'-ジメチルアミノピリジン(DMAP)を加え、窒素気流下、室温で 30 分間かくはんした後、BHF を加えて 24 時間反応した。反応の終了は、反応溶液に大量のメタノールを加え、ポリマーを沈殿させることにより行った。得られたポリマーはクロロホルム-メタノールを用いた再沈殿により精製した。

2 - 2 . 結果と考察

BHF とコハク酸ジクロリドとの重縮合について各種溶媒を用いて室温で行った結果、1,2-ジクロロエタン中での反応が、高収率で、数平均分子量が 4500 のポリエステルを与えた。得られたポリマーの ^1H および ^{13}C NMR スペクトルと IR スペクトルから規則性の直鎖ポリエステルであることが分かった。

縮合剤である N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を用いた BHF とコハク酸の重縮合はジクロロエタン中でも N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中でも収率良くポリマーを生成し、10~30 量体のポリエステルが得られた。このポリマーも ^1H および ^{13}C NMR スペクトルと IR スペクトルから規則性の直鎖ポリエステルであることが分かった。フマル酸やマレイン酸、テレフタル酸の重縮合ではポリマーの収率がコハク酸の場合と比べて低い。これは、縮合剤である DCC がカルボキシル基と反応する際、二重結合やベンゼン環と共役しているカルボキシル基が安定化されていて、DCC との反応性が低いためであると考えられる。

得られたポリエステルやコポリエステルを DSC を測定すると、BHF とコハク酸のポリエステルおよびコハク酸を含むコポリエステルは 11~29 にガラス転移温度が存在した。一方、BHF とフマル酸のポリエステルおよび BHF とマレイン酸のポリエステルではガラス転移温度が観察されなかった。また、BHF とフマル酸のポリエステルの融点は 208 と高く、比較として合成した BHF とテレフタル酸のポリエステルの融点(230)や汎用ポリエステルである PET の融点(254)にも近く、新しいポリエステル材料として期待できる。さらに、BHF とマレイン酸のポリエステルと比べて、マレイン酸とコハク酸の混合物から得られたコポリエステルの融点は 165~167 (DSC 測定では明確な吸熱ピークが観測されなかったが、融点測定器を用いた目視観察により融点を求めた)と高温であった。