

微生物の産生する 高機能性バイオポリマーの産業応用

Industrial application of the high functional polysaccharide by microorganism production

中部大学 応用生物学部 応用生物化学科 教授 倉根隆一郎

Ryuichiro Kurane (Professor)

Chubu University, Department of Biological Chemistry, Applied Microbiology

1. はじめに:「土は宝の山」は本当?

「土は宝の山」という言葉を聞いて一般の方々はどのような考え、感じ方を持たれるのでしょうか? ひょっとしたら、身の周りの「土」が「金」に変わるような“中世の錬金術”を思い浮かべ、PCの上を情報が走り回っている現代においては、“そんなばかな”と頭から切り捨ててしまわれるのではないのでしょうか?

私ども、応用微生物工学を専攻している者にとっては、極めて高い実感と真実性を持っており、まさに本当の言葉であります。例えば、皆さんが抗生物質として使用しているカスガマイシンは奈良の春日大社の土から分離された微生物が生産する抗生物質であるように、多くの抗生物質、抗真菌剤、各種のアミノ酸、各種の核酸、様々な環境汚染物質分解等は土壌等自然界から分離される微生物のなせる業であります。例えば、筑波山麓の土壌から分離された微生物が生産する医薬品で年商1,000億円にのぼる事例があげられます。すなわち、私ども人間の健康と環境を守っているものが、土壌など自然界から分離された微生物が基になっているのです。また、企業にも莫大な利益をもたらしております。

このような背景のもと、微生物に携わる多くの研究者は新たな微生物資源を求めて、生物多様性が豊富なアマゾンの奥地、東南アジアなどの熱帯雨林、温度差を求めて極寒の南極大陸、北極やツンドラ地帯、灼熱の火山地帯、高低差を求めてヒマラヤへと土壌採取に出かけてきました。勿論、生物多様性条約が国際条約として発効している今日においては、これらの微生物資源が存在している国々とMOUなどの覚書をきちんと締結してか

ら遂行していることは当然のことです。生物多様性条約に従うと、海外での土壌等から分離した微生物を利用して商業化した場合には、条約に従い、利益をもたらす微生物がもともと住んでいたその国に利益の相当部分を支払うことが義務付けられております。そのため、経済産業省・NEDOによる複合生物系プロジェクト(筆者がプロジェクトリーダーを務めました)が行われてきました。

ところで、皆さんは土壌1グラムにどの位の微生物数が存在しているかご存知でしょうか? 例えば、肥沃な畑土壌1グラムにはなんと1億もの微生物が住みついているのです。この途方もない微生物群の中から目的の微生物を見つける為には、確かな知恵、工夫と眼が必要であると共に女神様の優しい微笑みの幸運に恵まれることが必要です。

2. 女神様の微笑みに恵まれた有用微生物の産業応用例

“でん粉”と聞いてだれしも植物を考えるといます。微生物がまさか“でん粉”を生産するとは考えつかないと思います。カイコが繭として絹蛋白を生産するように、ある種の微生物も菌体の外に“でん粉”を生産してきます。この微生物でん粉はわずかさスプーン1杯(1グラム)で実に最高で自重の2,000倍すなわち2リットルの水を吸水保水する性能を有しております。この微生物でん粉は国内では大手化粧品メーカーによって保湿剤として実用化商品化され、さらに海外においては世界第2位及び第4位の化粧品メーカーにより欧米にて商品化されており、世界の先進諸国のご婦人、ご令嬢など多くの方々に使って頂いておりますと共に、海外旅行をされる方々は

空港等免税店にて購入して頂いていると思われます。

本稿では「微生物の産生する高機能性バイオポリマーの産業応用」について以下に記すことに致します。

3. 微生物が生産する高機能性吸水保水性バイオポリマー

①はじめに

21世紀型産業を考える時に、産業の持続的発展と環境との調和が大きな問題となってきます。その為には、新しい工業的アプローチが必要不可欠であり、21世紀の産業を考えるとき、製造時・廃棄後に発生する汚染物質を未来の子孫に付け残すのではなく、現時点で処理・浄化することは当然のこととして、同時にその発生を事前に防止・予防することに発想自体を広げなければならぬと考えられます。

すなわち、人と環境に優しくかつ高機能性の製品を開発することにより、汚染の発生を事前に防止すること（プリベンション）に産業構造を切り替える必要があります。生分解性を持ち、安全で人と環境に優しく、かつ各種の優れた高機能性を有する環境調和型次世代「高機能バイオポリマー」の開発は多方面より期待されております。例えば、カイコが絹蛋白というすばらしい機能性素材を体外に生産するように、微生物もさまざまなバイオポリマーを菌体外に生産しています。「人と環境に優しい」という視点からバイオポリマーをバイオ新素材（バイオニューマテリアル）として捉え、環境調和型の微生物が生産する高機能バイオポリマーの実用化への道を切り開く事を目的として研究開発を開始しました。

本技術的特徴は、自然界で水と炭酸ガスにまで完全に分解される生分解性を持ち、安全で各種の優れた高機能性、すなわち既存の合成吸水剤をはるかに凌駕する性能を有する次世代型の吸水保水性バイオポリマーの微生物生産とその実用化に関するものです。以下に概説します。

②吸水保水性バイオポリマー生産菌

菌体外にバイオポリマーを生産することを指標として、土壌よりの分離株をスクリーニングした結果、B-16株と名付けた細菌が吸水保水性バイオポリマーを最も良く生産することを見出した。本細菌はグラム陰性細菌で *Alcaligenes latus* と同定された。

③ *Alcaligenes latus* B-16株の生産する新規な吸水保水性バイオポリマー

ライフスタイルの変化と共に、種々様々な使い捨て紙オムツや衛生用品が汎用されてきており、これらに人工の合成高分子吸水剤が使用されている。これら合成高分子吸水剤はコストパフォーマンスが良く高い吸水率を示すが、しかしながら、使い捨てであるが故に環境中では容易には分解されず長期間留まり、かつこれらの合成高分子吸水剤の重合用モノマーはアクリル酸又はアクリルアミドであるアクリル酸は人体に強いかゆみを生ずる恐れがあり(Merck Indexより)、またアクリルアミドは神経毒(Merck Indexより)と共に人体に強い発ガン性を示す¹⁾²⁾。このように生態系への影響を解決するために、生分解性があり人と環境に優しい吸水保水機能を持つ代替品の開発が求められていた。

(1) 吸水能

後述の培地で *Alcaligenes latus* B-16株を培養すると多量のバイオポリマーを菌体外に生産してくる。このバイオポリマーを電気泳動的に均一にまで精製した。この精製バイオポリマーを用いて、いわゆるティーバック法にて吸水能力を調べたところ Table 1 に示すように、本精製バイオポリマーは自重の1,300倍(最高値:自重の2,000倍の水を吸水)の水を吸水する高い能力を示した。この値は汎用合成高分子吸水剤の約4~5倍の吸水能力を持つことを示している。

Table 1. Water Absorption Capacities of Various Absorbents

Sample Description		Water absorption Capacity (g) per gram of dried sample
Test Group	SP ^{a)}	1349
	FP ^{a)}	1295.4
Control Group	Pulp	3.8
	Silica Gel	1.4
	Ion-Exchange Resin	2.5
	PVA	4.6
	High-Grade Synthetic High-polymer Absorbent ^{b)}	249.4
	Anionic Synthetic High-polymer Absorbent ^{c)}	363.6

a) Bioabsorbent samples were produced using different culture conditions, i.e., by changing the culture medium's carbon sources; SP: Sucrose, FP: Fructose

b) High Grade Synthetic High polymer Absorbent : poly acrylate / PYA derivative (co-polymer of acrylate and vinyl alcohol.)

c) Anionic Synthetic High-polymer Absorbent : Polyacrylamide derivative, MW. 350 X 10⁴

(2) 保水能

3つの異なる相対湿度、64.8%、34%、33% (いずれも20℃ 室温下)において本精製バイオポリマーがどの程度保水能力を有しているかを合成高分子吸水剤等と比較検討した。その結果、例えば、Fig. 1に示すように、相対湿度33%の乾燥条件下に24時間放置しても保水率80%以上を保持していた。一方、合成吸水剤等は乾燥条件下にての保水性は低い。このように *Alcaligenes latus* B-16株が菌体外に生産してくる本バイオポリマーは冬の乾燥下においても保水性が極めて優れていることが判明した。

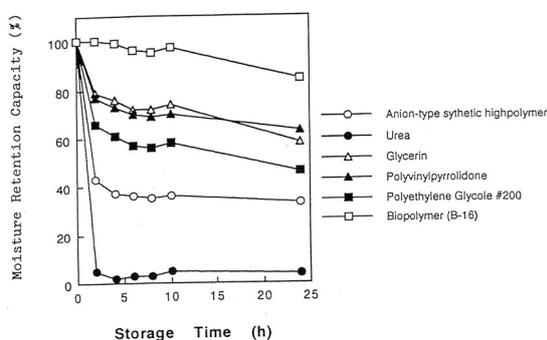


Fig. 1. Moisture retention capacities of various absorbents. Conditions: 33% relative humidity, 20°C, in desiccator containing a saturated of magnesium chloride.

(3) 食塩存在下での吸水能

各濃度の食塩存在下での本精製バイオポリマーの吸水能力をFig. 2に示した。この結果、合成高分子吸水剤が食塩中でその機能を大幅に低下させるのに対し、*Alcaligenes latus* 由来の本バイオポリマーは0.9%の

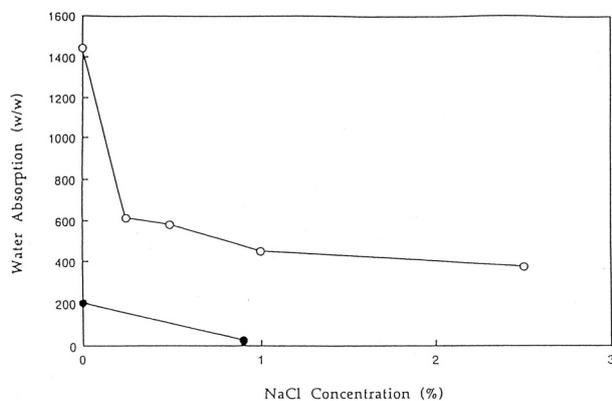


Fig. 2. Bioabsorbent and Synthetic High Polymer Absorbent Water Absorption Capacities in the Presence of Various NaCl Concentrations. ○, bioabsorbent (SP sample); ●, high-grade water absorbing synthetic high-polymer (Sumika Gel S-50).

食塩水中でも自重の約500倍の水を吸水する能力を示し、汎用合成高分子吸水剤の20倍近い能力を持っていた。この500倍という値は合成高分子吸水剤の真水における吸水量の約2倍の値である。

(4) *Alcaligenes latus* B-16株の生産する吸水保水性バイオポリマーの培養条件と精製

本吸水保水性バイオポリマーの生産には、炭素源としてグルコース、シュクロース、キシロース、フラクトース、ラムノース、セロビオースが好ましく、リンの濃度はリン酸として0.03%~0.6%、無機窒素源としては尿素が、また有機窒素源等としての酵母エキスの濃度は0.5%が最も好ましいことが検討の結果判かった。このような結果から *Alcaligenes latus*による本吸水保水性バイオポリマーの生産培地として、1リットル当たり、Sucrose (又は Glucose) 10g, K_2HPO_4 4.5g, KH_2PO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, Urea 1g, Yeast Extract 0.5g (pH7.2)と決定し、30℃にて5~7日間培養生産することとした。以上のような結果より、本菌は本バイオポリマーを培養液1リットル当たり乾燥重量で20~25g菌体外に生産する。

ところで、*Alcaligenes latus*が菌体外に生産するバイオポリマーは精製の過程より2種類存在する事が判明した。その精製工程をFig. 3に示す。一方は高分子酸

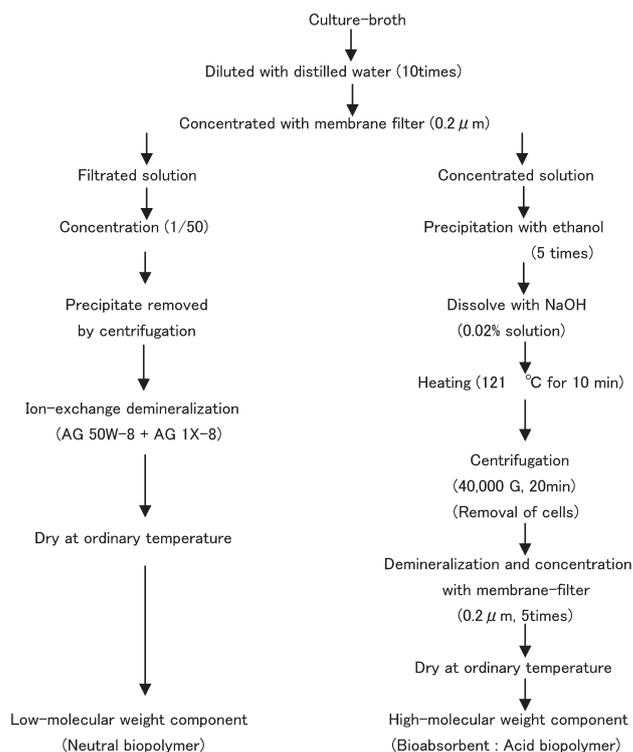


Fig. 3. Biopolymer purification

性多糖(分子量;約 5×10^9)であり、他方は低分子中性多糖(分子量;50,000~100,000)であった。その生産比は高分子酸性多糖が20に対し低分子中性多糖は1にすぎない。このうちどちらの多糖が吸水保水性バイオポリマーであるかを調べたところ、高分子酸性多糖が自重の約1,400倍の吸水の値を示したことにより *Alcaligenes latus* が生産する吸水保水性バイオポリマーは分子量が 5×10^9 である巨大高分子酸性多糖であることが判明した。この吸水保水性バイオポリマーはFig. 3に示すフローで精製したところ、電気泳動的に均一であった。

(5) *Alcaligenes latus* の生産する多糖性吸水保水性バイオポリマーの構成糖の決定と結合様式の決定

(5-1) 吸水保水性バイオポリマーの構成糖の決定

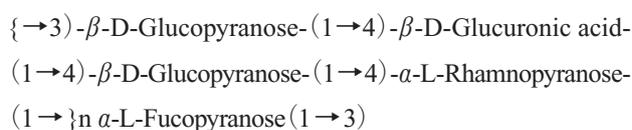
電気泳動的に均一にまで精製した本吸水保水性バイオポリマーを2M H_2SO_4 で100°C 2時間加水分解してから、TLC, HP, LC, GC及びGC-MSにて構成糖を調べた。一例としてHPLCの分析チャートをFig. 4に示した。

4種類の分析結果より、本吸水保水性バイオポリマーはグルコース、ラムノース、フコース、グルクロン酸の4種類の糖より構成されている多糖類であることを明らかにした。

各々の構成糖比は、加水分解条件をいろいろとふるることにより、グルコース:ラムノース:フコース:グルクロン酸=1.8:1.1:1:1とした。

(5-2) 吸水保水性バイオポリマー等の多糖結合様式の決定

電気泳動的に均一にまで精製した本バイオポリマーを用いて、単糖類分析、メチレーション分析、一次元及び二次元の 1H 及び ^{13}C NMR分析と酵素分解を駆使し、MALDI-TOF-MSとLC-MS機器分析を行うことによって、その繰り返し構造(リピートユニット)の結合様式を決定した。吸水性バイオポリマーは、特定のユニットの繰り返しで構成されており、下記の特定のユニットの繰り返し構造を有すると結論された。



5-1及び5-2の結果より、*Alcaligenes latus*の生産する吸水保水性バイオポリマーは4種の糖より構成されており、その主鎖としてはグルコース、ラムノース、グルクロン酸の3種類の糖が結合し、側鎖としてフコースより構成されている事が判明した。これら4種の糖の中で特に注目されるのはフコースである。フコースは小麦や稲等の陸上の植物からは見つからず、わずかにヒジキや海藻等の海の植物中に検出される極めてめずらしい糖である。吸水保水性バイオポリマーは、合成高分子吸収剤

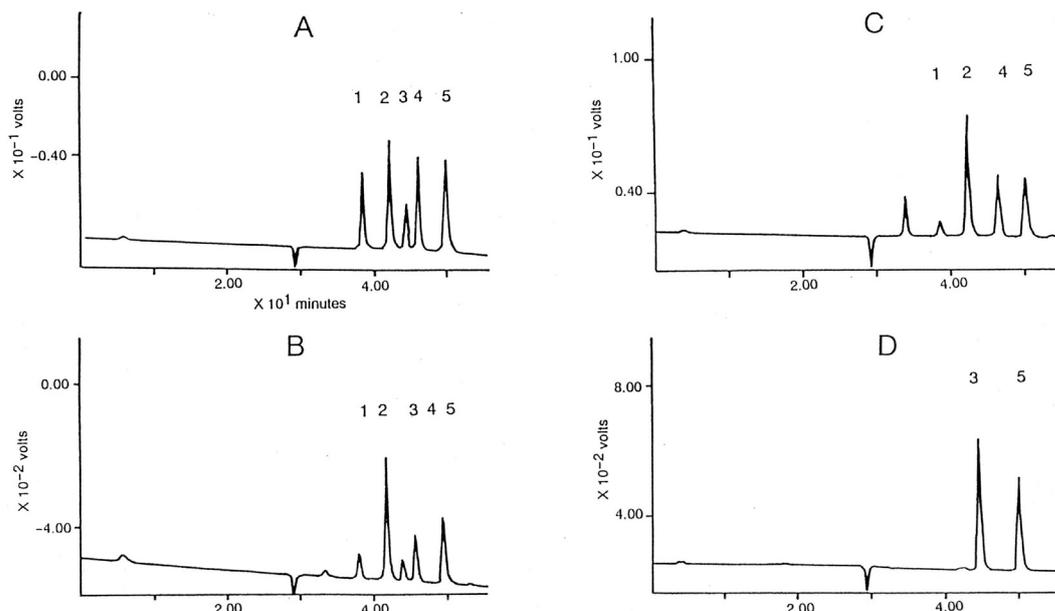


Fig. 4. HPLC Charts for Standard Samples and the Hydrolyzate of the Bioabsorbent.

A: Standard samples. 1. Glucuronic acid 2. Glucose 3. Mannose 4. Rhamnose 5. Fucose.
 B: Hydrolyzate of polysaccharide component including high and low-molecular-weight biopolymer before separation.
 C: Hydrolyzate of the high-molecular-weight acid biopolymer (the bioabsorbent).
 D: Hydrolyzate of the low-molecular-weight neutral biopolymer.

がイオン結合の力で水分を取り込んでいるのに対して、特定の繰り返し構造を構成する4種の糖が、特に手に相当するフコースが水分子をまるで抱きかかえるようにして水を吸水しているものと強く示唆された。

(6) 大量工業品の実生産プロセスならびに高純度精製実生産プロセスの開発

酵母エキスは *Alcaligenes latus* B-16株が吸水保水性バイオポリマーを生産する上で有効な培地成分である。しかしながら、実規模で大量に実生産プロセスに乗せる上で少なからず問題点を含んでいる。例えば酵母エキスそのものに基準品(スタンダード)がなく、かつ工業上で大量に使用するには高価格である。これらの問題点を解決するために完全合成培地の検討を行った。酵母エキスの代替としてアミノ酸の効果について Table 2 に示した。Table 2 に示すように、数種のアミノ酸の培地への添加が、特に価格等を考慮すると Glycine の添加が有効であった。同様に微量なミネラルの効果について検討したところ鉄イオンの添加が有効であることが示された。

以上のような結果より、完全合成培地として培地 1リットル当たり、Glucose 10g, K₂HPO₄ 4.5g, KH₂PO₄ 1.5g, Urea 1g, FeSO₄·7H₂O 10mg, Glycine 0.1g, pH7と決定した。

また、吸水保水性バイオポリマーは高い増粘性も示す。この増粘性をコントロールする手段としてアルカリ条件下での熱処理を試みたところ Table 3 に示すようにその粘性をコントロール出来ることが示された。

Table 2. Effects of amino acid and yeast extract on biopolymer production (viscosity : cps)

Amino acid	Viscosity (cps)	Amino acid	Viscosity (cps)
Yeast extract	2,140	Valine	900
Methionine	1,200	Tyrosine	920
Leucine	120	Histidine	540
Isoleucine	200	Proline	20
Phenylalanine	540	Aspartic acid	40
Tryptophan	32	Glycine	3,400
Threonine	480	Citrulline	4,000
Glutamic acid	2,656	Lysine	520
Alanine	320	Arginine	2,440
Serine	240	Cysteine	320
Ornithine	800	none	—

— : No viscosity was found,

Rotary viscometer, no.3 rotor, 30rpm.

Culture conditions : Glucose 1%, urea 0.1%, vitamin mixture, metal mixture, pH7.2, Erlenmeyer flask (300ml), rotary shaker, 180rpm/min, 7d at 30°C.

Vitamin mixture : p-aminobenzoic acid 20 µg, inositol 0.2mg, vitamin A 2 µg, nicotinic acid 40 µg, vitamin B₁₂ 0.5µg, vitamin B₁ 40 µg, Ca-pantothenate 0.4 mg, vitamin B₂ 40 µg, vitamin B₆ 40µg / 1,000ml of the medium.

Metal mixture : FeSO₄·7H₂O 5mg, Na₂WO₄·2H₂O 0.5 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.5 mg, MnSO₄·5H₂O 0.5 mg, CaCl₂ 10mg / 1,000 ml of the medium.

Table 3. Viscosity comparison of various thickening agents

	Apparent viscosity (mPa·s)		
	30°C	50°C	78°C
B-16 polymer (untreated)	50	45	45
Xanthan gum	56	36	11
Wellan gum	46	40	20
Rhamzan gum	76	70	65
B-16 polymer (pH 12.25, 5 min)	175	168	147
B-16 polymer (pH 12.25, 80 min)	515	380	230

The viscosities were measured with a BM-type rotational viscometer (no.2 rotior, 30rpm, 1 min) after storing each polymer aqueous solution (0.1wt%) overnight at 30°C, 50°C and 78°C.

(7) 実用商品化

(7-1) 吸水保水性バイオポリマーの基本的性状

実用・商品化を行う上での本吸水保水性バイオポリマーの基本的な性状を検討した。本吸水保水性バイオポリマーはシュウドプラスチック性を示すと共に、温度安定性も極めて優れていた。粘度を指標として各種のポリマーの温度安定性を Fig. 5 に示した。Fig. 5 に示すように本吸水保水性バイオポリマーは 5°C~80°Cまで完全に安定であることが示された。さらに、pH安定性も pH4-12 の範囲で一定である (pH3でゲル化)。塩濃度安定性も 0.025%NaCl 濃度以上でわずかに上昇した後 1%まで一定の安定性を示すと共に保存安定性も極めて優れており、また、5°C、32°C、50°Cの保存下で4週間の高い安定性を示し、商品の販売における様々な環境条件下にて何ら問題点が無いことが示された。

<The viscosity vs. temperature>

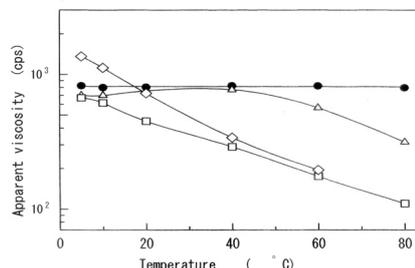


Fig. 5. Apparent Viscosities vs. Temperature of the bioabsorbent from *A.latus* B-16 and other polymers.

●; B-16 polymer (0.2%), △; Xanthan gum (0.5%), □; Sodium alginate (1.0%), ◇; HPMC (1.0%).

(7-2) 化粧品等への適用による実用・商品化

Alcaligenes latus B-16株が生産する吸水保水性バイオポリマーの化粧品への実用・商品化はカネボウ化粧品研究所により開発された。化粧品の分野においては

人間の肌にいかに水分を与えてうるおいを与えるかが極めて重要であり、人と環境に優しいバイオポリマーをその素材として用途開発がなされ、厚生省(当時)の審査を経て発売され、今日に至るまでその使用量は年々増加してきている。最初に発売された新しいタイプのパックと共に現在では化粧水や乳液にも採用されている。また、海外の世界第2位および第4位の化粧品メーカーにも本吸水保水性バイオポリマーは輸出されている。今後とも様々な化粧品の可能性が大きく開けるものと期待されている。

さらに、工業品グレードの本吸水保水性バイオポリマーがボールペンにも書きやすさと途中で途切れないことから採用され販売されている。

(7-3) さらなる可能性を目指して;砂漠の緑化

21世紀をおびやかす地球規模でのグローバルな問題として地球温暖化と共に砂漠化の急速な拡大がある。国連等の統計によると、地球全体で毎年20年前には60,000km²(ほぼ日本の四国の総面積に匹敵)が、そして今日では砂漠化面積は年々増加し日本の九州の総面積が砂漠化していると報告されている。

*Alcaligenes latus*の生産する吸水保水性バイオポリマーを砂とわずかに混ぜて保水力を調べてみた。Fig. 6にその結果を示した(Fig. 6 左 20℃、真ん中 45℃、右 70℃)。Fig. 6に示すように他の吸水保水剤と比較して、極少量の添加量で本吸水保水性バイオポリマーの保水力が極めて優れていることが判かる。この基本的な性質を基にして、ホウレン草レベルであるが種子の発芽割合及び苗の成長速度が極めて少量の水を供給しているに

過ぎない極乾燥条件下においても、十分な水を散水している時と同様な発芽割合と成長速度が確認された。微生物が産生する吸水保水性バイオポリマーは砂漠緑化という地球規模での大問題に、もしかしたら寄与できうる可能性を秘めているものと考えている。すなわち、微生物が作り出す吸水保水性バイオポリマーは、4種類の糖より構成されている人と環境に優しいバイオポリマーである。土に混ぜてもいづれは生分解されると共に、環境に悪影響がなく、わずかな水で水分豊かな肥沃な大地を作り出せる可能性を秘めている。21世紀が直面する大きなグローバルイシューとして地球全体で進む砂漠化防止に役立つ大きなポテンシャルがある可能性が期待できる。

【謝 辞】

本吸水保水性バイオポリマーは伯東(株)四日市研究所の野畑靖浩氏と黒宮友美氏との共同研究成果です。心より感謝の念を示します。また、吸水保水性バイオポリマーの構成糖結合様式の決定については京都大学大学院(農学系)東 順一教授に、実生産培養については(株)興人 久芳啓資氏をはじめ関係者の皆様に、化粧品の実用化については当時のカネボウ(株)化粧品研究所の大西重樹博士はじめ、さらに多くのご賛同者・ご協力者の皆さまに対して、本紙面を借りまして厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Vanhorick, M.; and Moens, W. Carcinogenesis, 1983, 4(11), 1459-1463.
- 2) Dearfield, K. L.; Abermathy, C.O.; Ottley, M. S. Brantner, J. H.; Hayes, P. F. Mutat. Res. 1988, 195(1), 45-77.

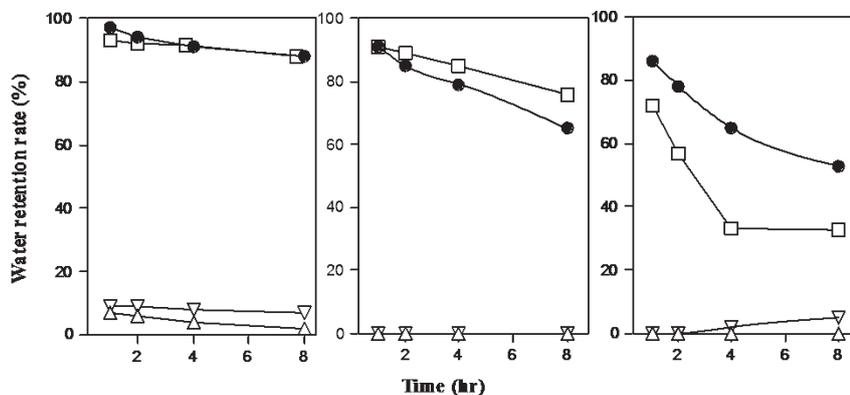


Fig. 6. Effect of temperature on reducing drainage activities of the bioabsorbent from *A. latus* B-16 and other polymers.

●, bioabsorbent 213 ppm; □, sodium alginate 3,077 ppm; △, xanthan gum 611 ppm; ▽, anionic polymer 868 ppm. Apparent viscosity of each sample was 50 cps. The particle diameter of sand was 50-80 mesh.