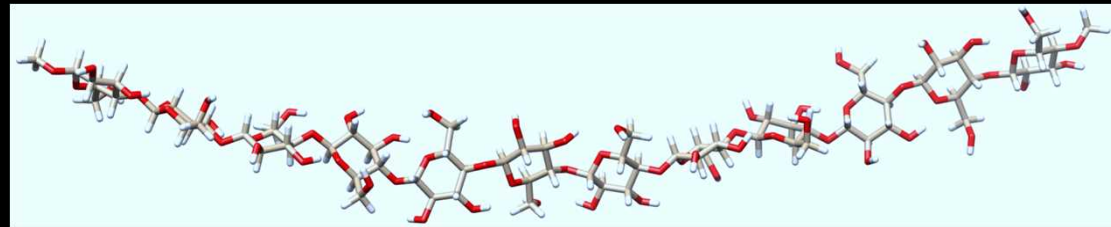
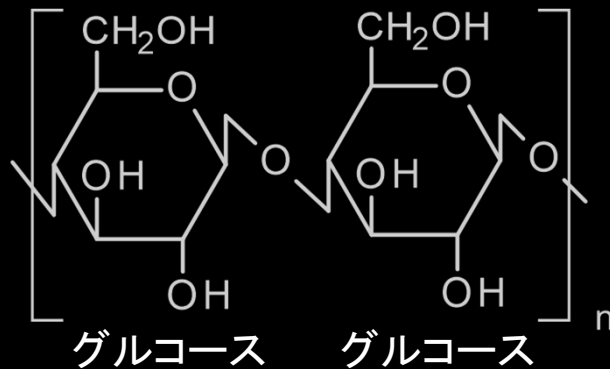


# 環境微生物によるセルロースの修飾 - ナノファイバーへの応用 -

横浜国立大学大学院 工学研究院 機能の創生部門  
教授 武田 穰

2019年6月20日

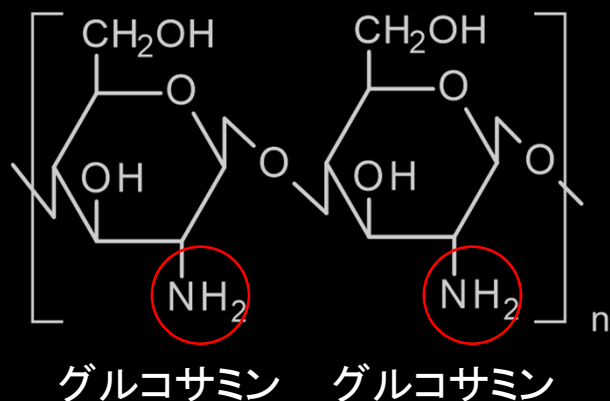
# セルロース



MDシミュレーションのスナップショット

- 植物の細胞壁の主要多糖で酢酸菌での調製可能
- 最も豊富な天然高分子
- グルコースの  $\beta$ -1,4重合体
- 直線状の立体構造
- 規則的かつ高密度な水素結合により強固に会合
- 手軽に得られる強靱な天然高分子
- 安定な反面、反応性に乏しい

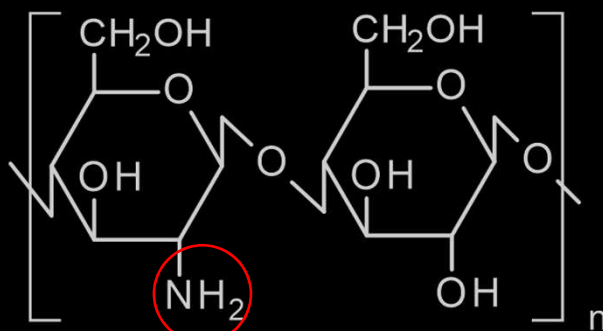
# キトサン



MDシミュレーションのスナップショット

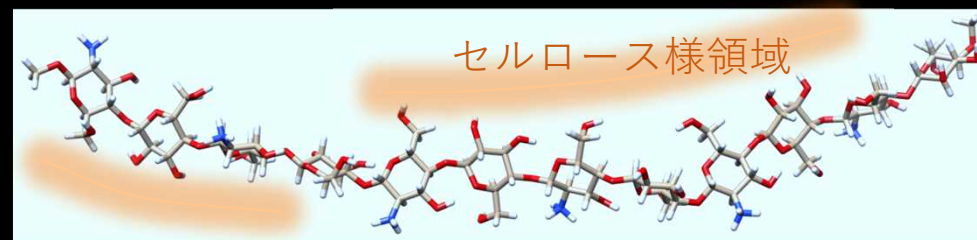
- 甲殻類(エビ、カニなど)の外骨格由来
- 外骨格多糖であるキチンの脱アセチル化物
- グルコサミンのβ-1,4重合体
- 手軽に得られる塩基性多糖
- アミノ基に由来する正電荷により水溶性
- 反応性に富み、種々の機能性を付与できる
- 水溶性ゆえに素材としては活用し難い

## セルロース + キトサン = 共重合体 (GG)



グルコサミン

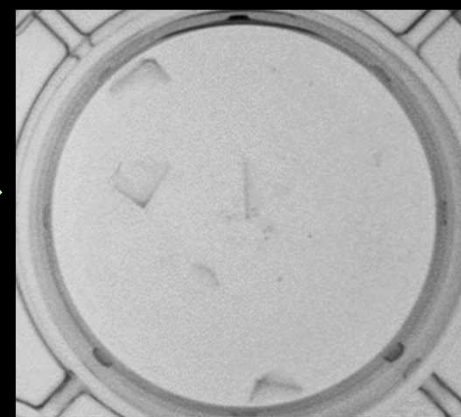
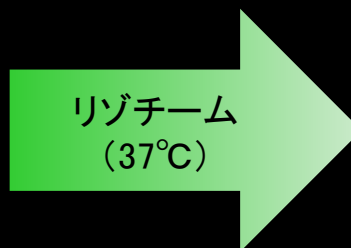
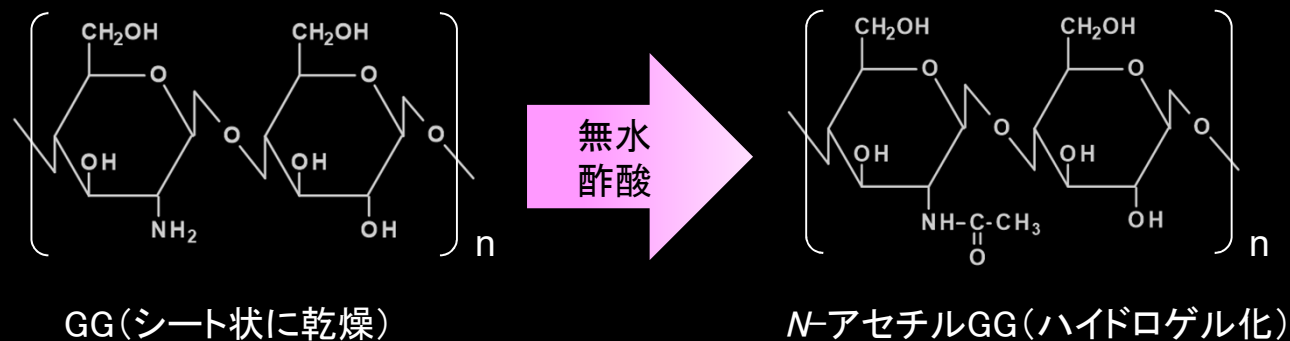
グルコース



MDシミュレーションのスナップショット

- グルコース・グルコサミン  $\beta$ -1,4交互共重合体 (GG)
- 環境細菌 (硫黄酸化細菌) の細胞外構造体成分
- 分子量 ( $8.2 \times 10^4$ 、SECでのデキストラン換算)
- 水溶性で溶液は低粘度 (素早く溶解する)
- キトサン・キチンとのブレンドが可能
- *N*-アセチル化物 (不溶性) はハイドロゲル化が可能
- セルロース様の領域 (アミノ基のない領域) あり
- 直鎖状の立体構造でセルロースとの親和性が予想される

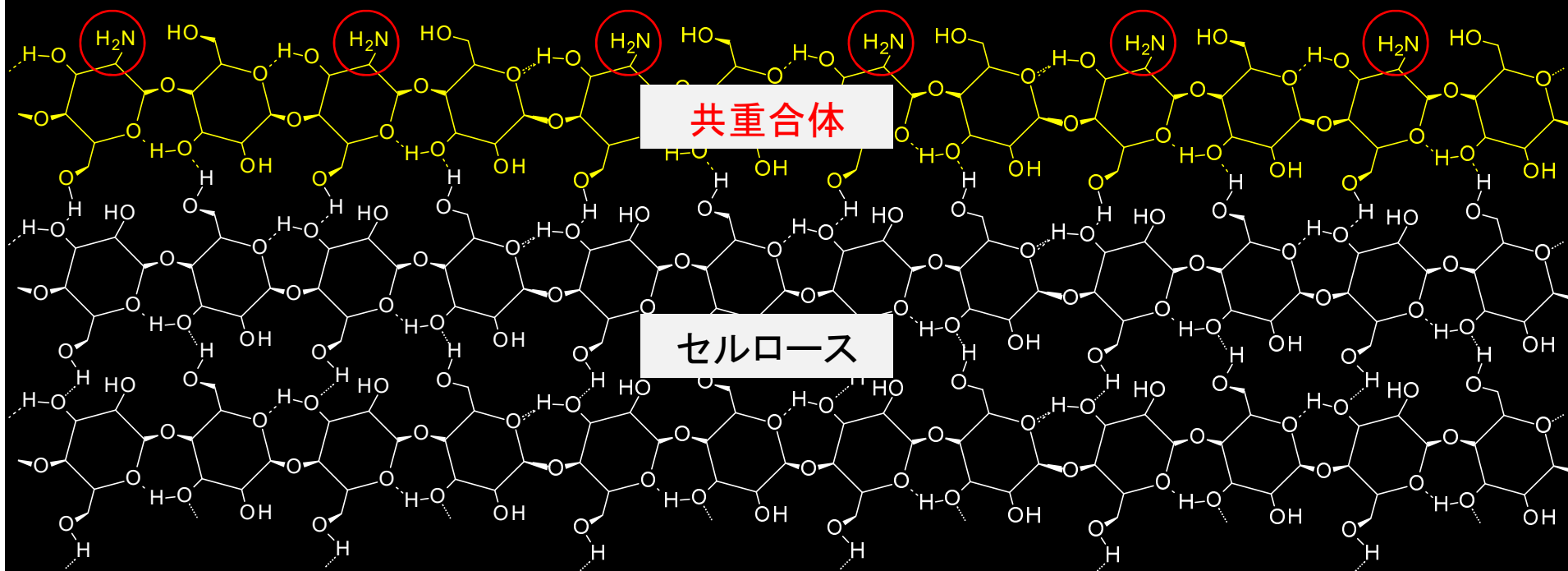
# N-アセチル共重合体ゲルの生分解性



N-アセチル共重合体ゲルの溶菌酵素(リゾチーム)による崩壊

- GGのアミノ基をアセチル化すると不溶性となる
- キチンと同じくリゾチームで分解可能
- 生分解性インプラント素材として活用可能

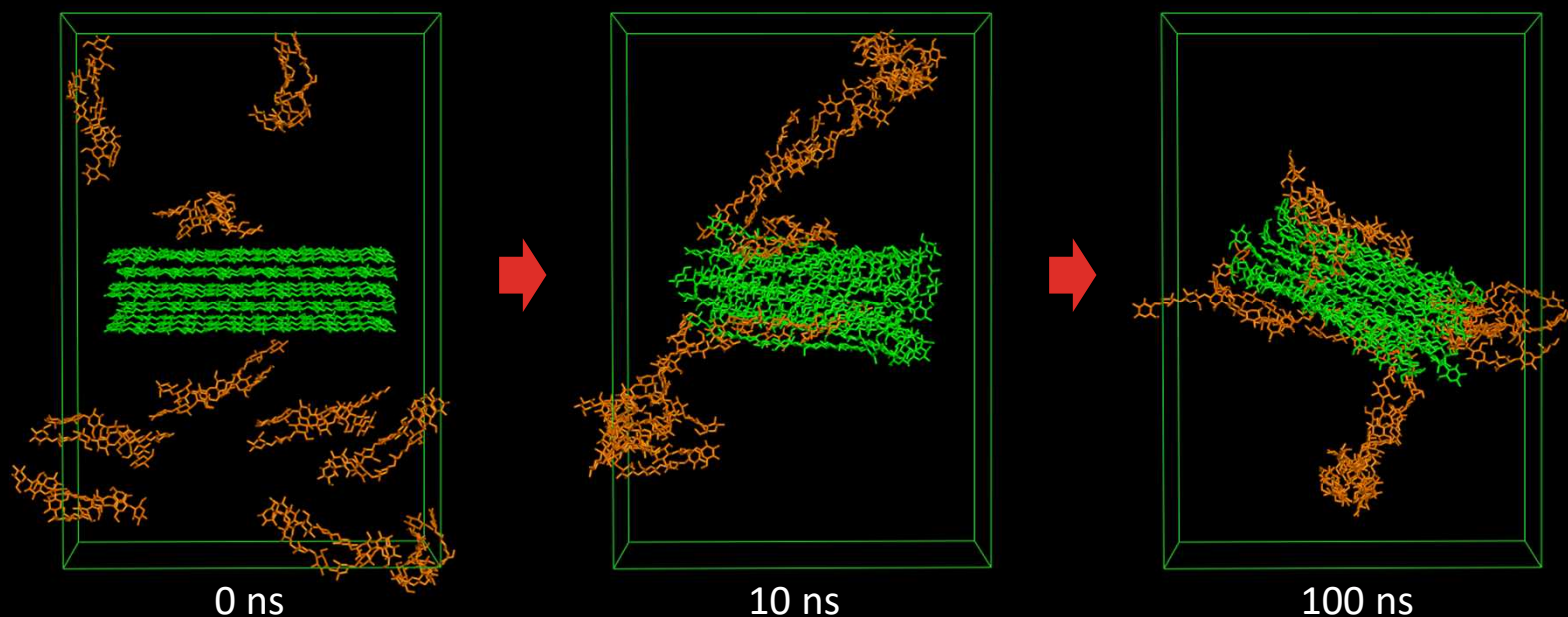
# セルロース + 共重合体(GG) ⇒ アミノ化セルロース



共重合体によってもたらされるアミノ化セルロースの予想構造

- 共重合体溶液中にセルロース素材を浸漬すると共重合体と素材表面との間に強い水素結合が生じ、化学反応なしで表面アミノ化セルロース（表面にアミノ基を有するセルロース素材）が得られるのではないかと
- セルロース素材間の架橋による紙力増強も期待できる

## ■アミノ化セルロースの構造 共重合体(GG)とセルロースの相互作用

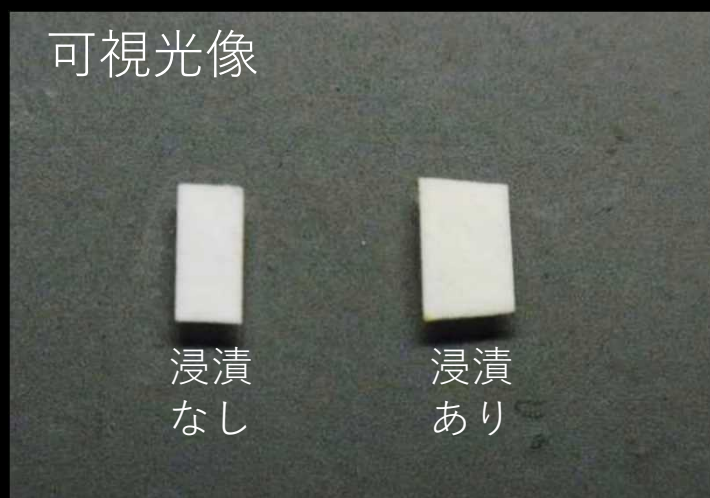


GG・セルロース混合系の分子動力学シミュレーション (300K)

- セルロース(I型結晶)の周囲にGGをランダムに配置
- GGがセルロースに吸着しながら凝集
- GGの吸着は不可逆
- 吸着によりセルロースのアミノ化がもたらされる

## ■アミノ化セルロースの製法

### 共重合体(GG)によるセルロースのアミノ化



蛍光像



共重合体溶液への浸漬による濾紙のアミノ化

- 共重合体溶液(1g/L程度)に浸漬すれば吸着が起こる
- 浸漬時の温度を上げると吸着が促進される
- 再生セルロース、綿、バクテリアルセルロースも可能



## 従来のアミノ化セルロースの合成法

- ✓ エピクロロヒドリンとアルカリを作用させたのちにアミンを反応
- ✓ パラトルエンスルホン酸塩や2-フルオロ-1-メチルピリジニウムでの水酸基の活性化を経てアミンを反応
- ✓ メタクリル酸グリシジルやアクリル酸グリシジルをグラフト化したのちにエポキシ基にアミンを反応
- ✓ エポキシ基を導入してからチオール基を有するアミンを反応
- ✓ 臭素化、アジド化、還元を経てアミノ基を導入
- ✓ アミノ基を有するシランカップリング剤を反応



低効率、禁水反応、有害物質、リンカー残存

## 共重合体(GG)吸着の安定性



蛍光像



水洗



熱水処理



希塩酸処理

熱水および希塩酸に対する安定性

- 熱水処理 (80°C, 14 h) でもアミノ化は保持される
- 希塩酸処理 (0.1 M, 25°C, 14 h) に対しても安定
- 共重合体によるアミノ化は事実上不可逆

## 共重合体によるアミノ化の特徴

- 天然物質によるアミノ化
- 吸着(親和性)によるアミノ化
- 化学反応を要しない
- 常温常圧でのアミノ化
- 短時間でのアミノ化が可能
- 有害な化合物を用いない
- リンカー部分のないアミノ化セルローズが得られる
- 溶液への浸漬によりアミノ化がもたらされる
- 溶液を塗布ないし滴下すれば局所的アミノ化が可能

## ■アミノ化セルロースの用途・特徴

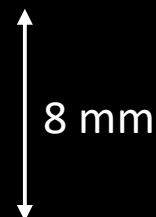
- ◆アミノ基に起因する反応性(標識化、酵素固定化、撥水化など)
- ◆医療用吸着材(血球・血小板吸着性止血素材)
- ◆酸性染料に対する親和性
- ◆紙力増強効果
- ◆重金属イオン吸着材
- ◆DNA精製用担体
- ◆固定化触媒

## 想定用途(1) インクジェットプリンターによるアミノ化印刷

染色前 (可視光像)



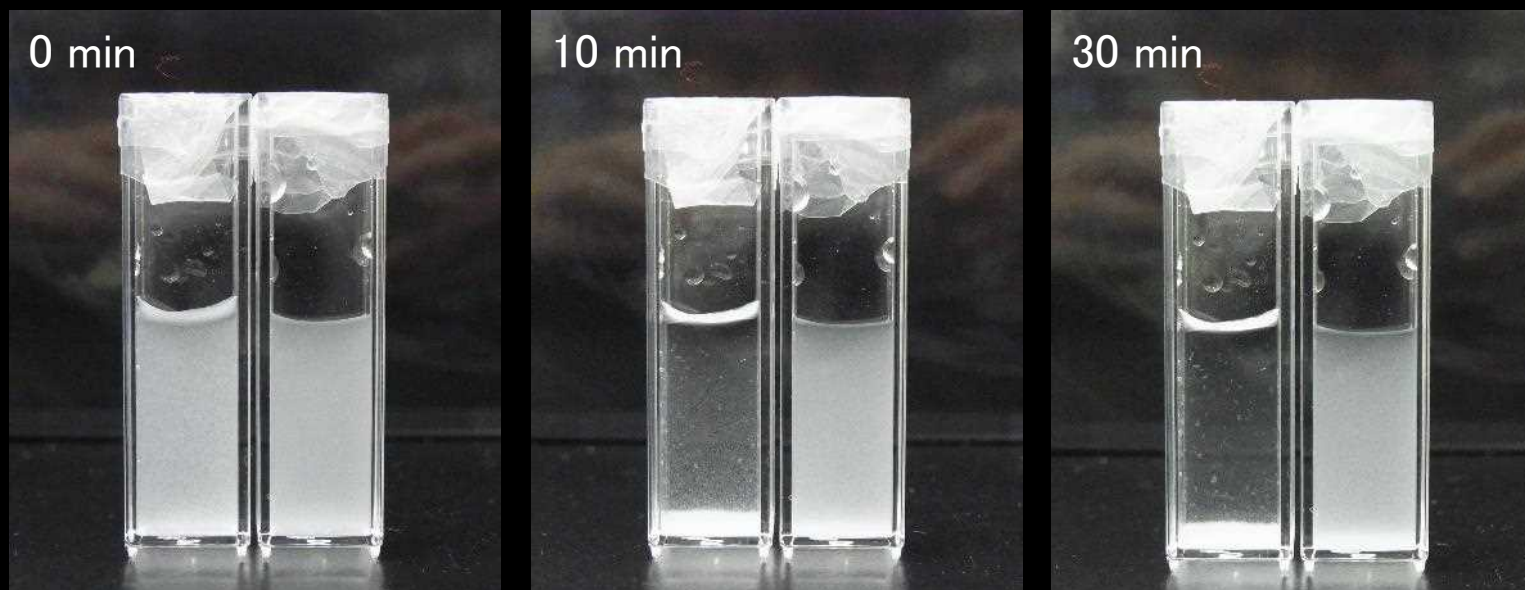
染色後 (蛍光像)



共重合体溶液をインクカートリッジに入れて濾紙に印字し、乾燥後にアミノ基を蛍光染色

市販のインクジェットプリンターの、通常のカートリッジ印刷にて、簡易なアミノ化印刷(セキュリティー性を有する印刷)が可能

## 想定用途(2) セルローズ(パルプ)懸濁液の安定化

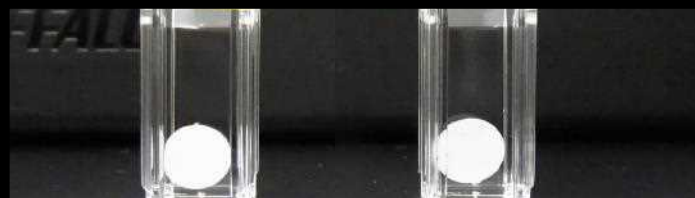


セルローズ懸濁液(2g/L)とグルコサミノグルカンの塩酸溶液(2g/L、0.1M塩酸)を1:1で混合した。比較として、セルローズ懸濁液(2g/L)と塩酸(0.1M塩酸)を1:1で混合した

無添加系のパルプは10分以内で沈殿したが、グルコサミノグルカン添加系では30分静置後もパルプ(正確にはアミノ化パルプ)の分散が維持された

## 想定用途(3) セルラーゼ耐性の付与

濾紙、アミノ化濾紙  
 ↓  
 セルラーゼ添加・反応  
 ↓  
 還元力定量(DNS法)  
 ↓  
 セロビオース濃度算出

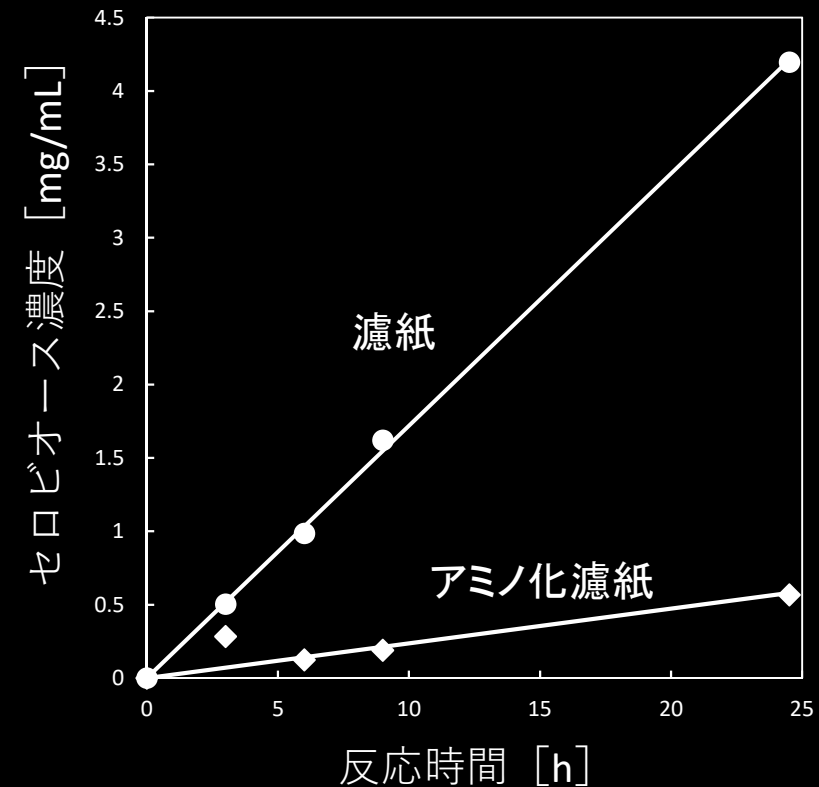


濾紙

アミノ化濾紙



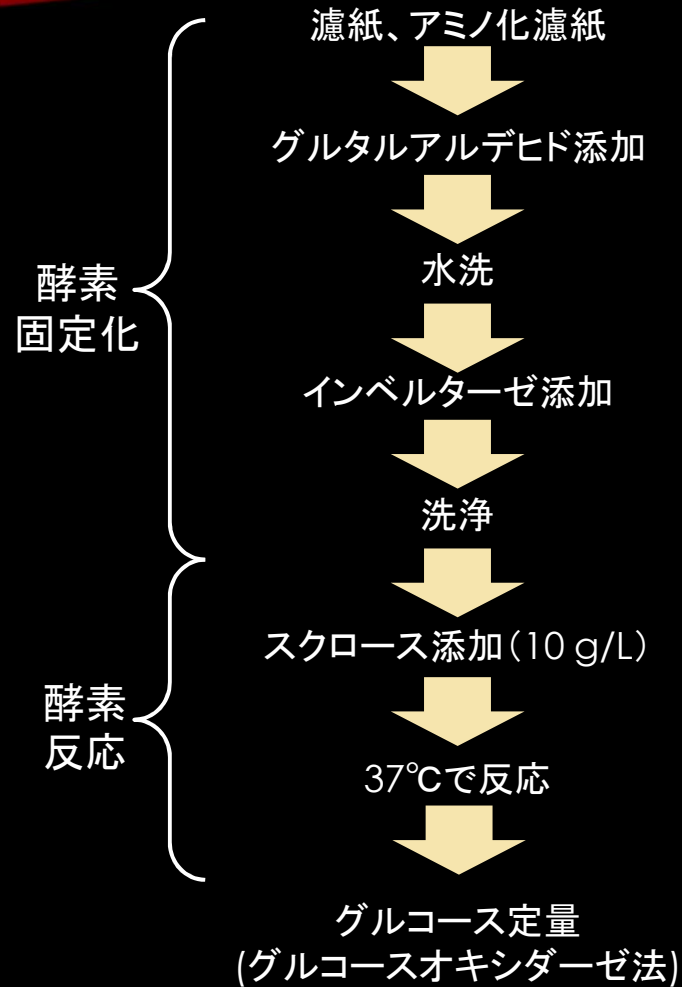
アミノ化濾紙のセルラーゼ耐性



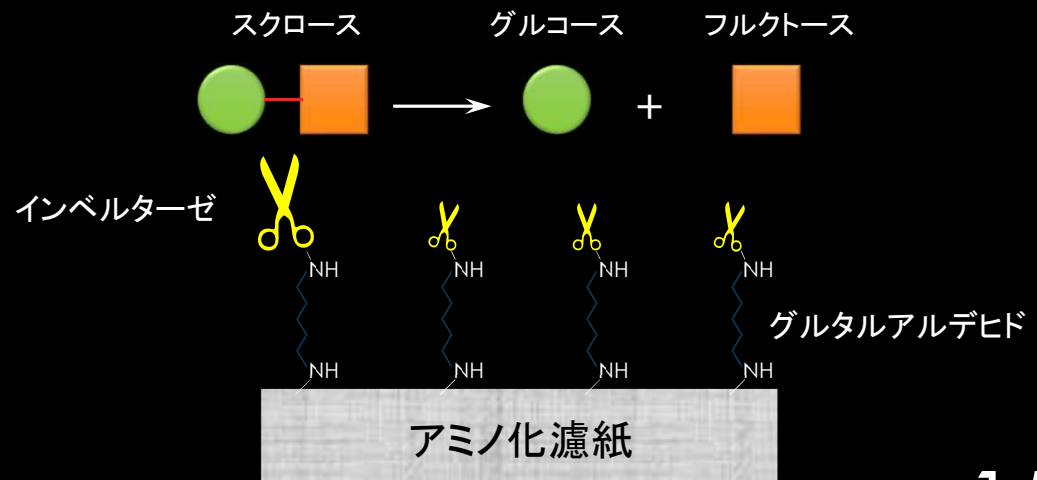
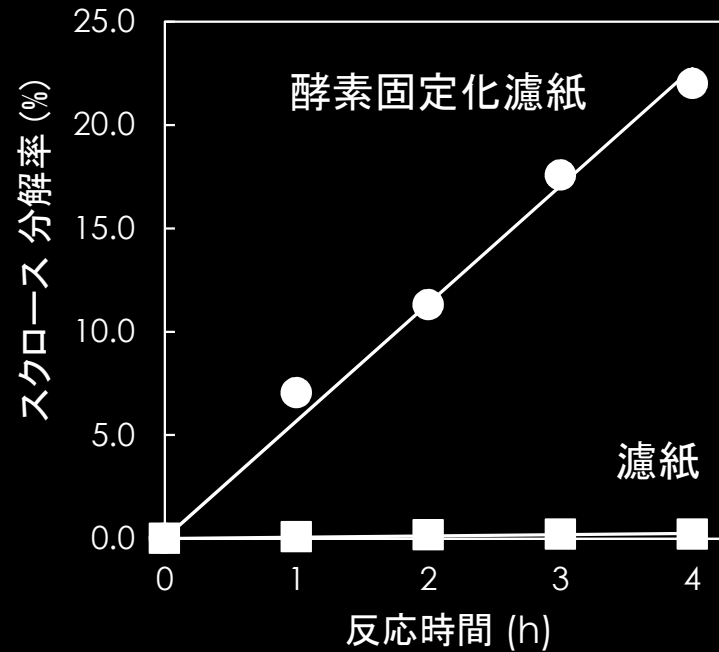
セルラーゼの作用

共重合体を用いたアミノ化を施すとセルロース素材にセルラーゼ耐性がもたらされる

# 想定用途(4) 酵素の固定化



酵素固定化の流れ





# 想定用途(5) 撥水加工

濾紙、アミノ化濾紙



ドデカナール 処理  
(メタノール・酢酸)



80°C, 1 h



洗浄(メタノール)



水洗

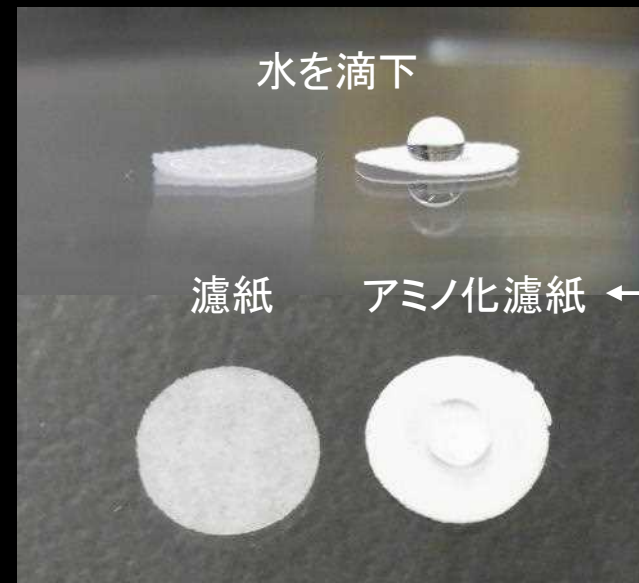
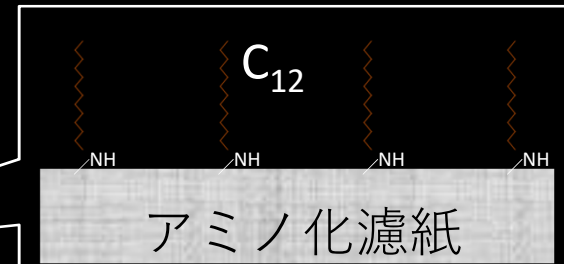


乾燥



撥水性評価

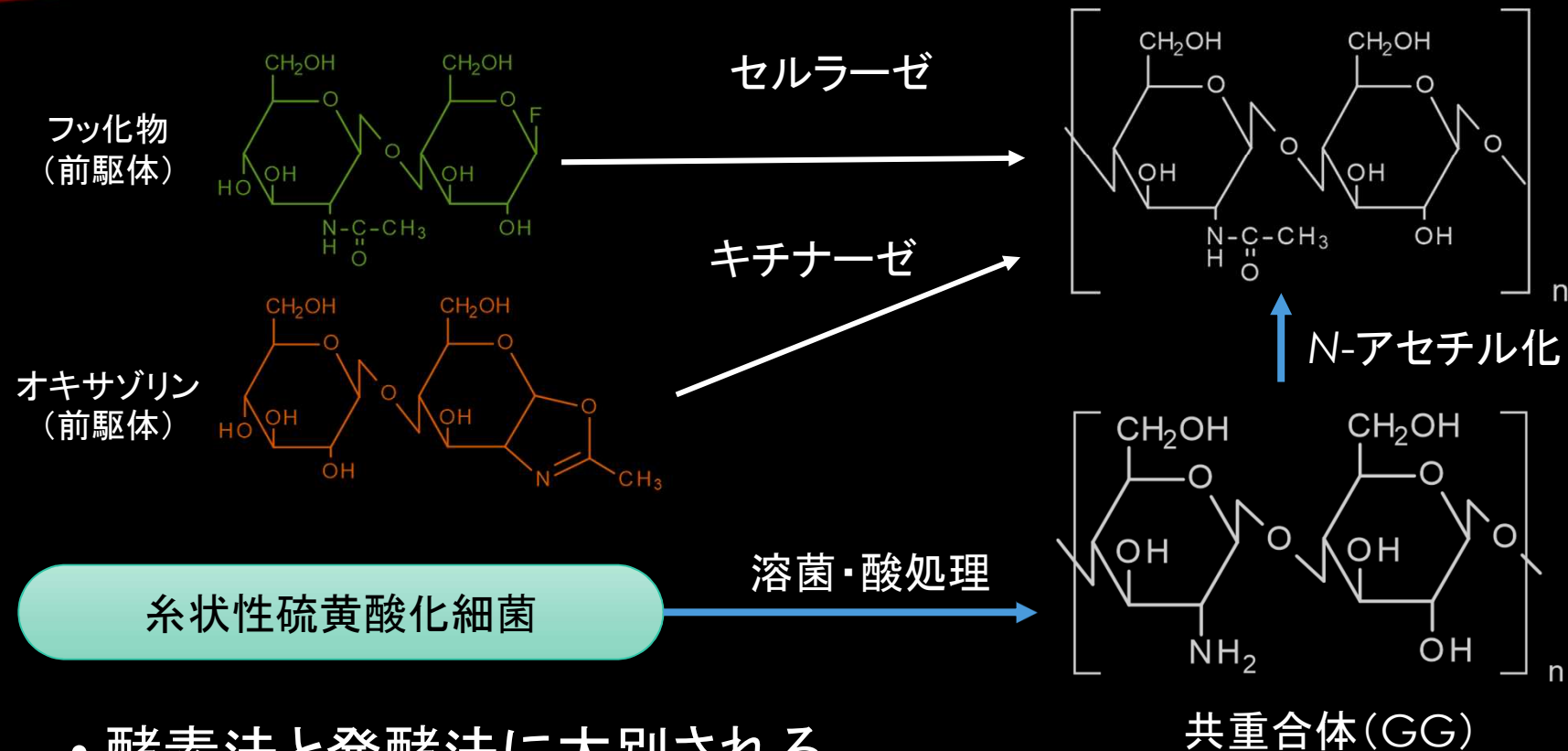
アシル化濾紙の調製手順



ドデカナールによる撥水加工

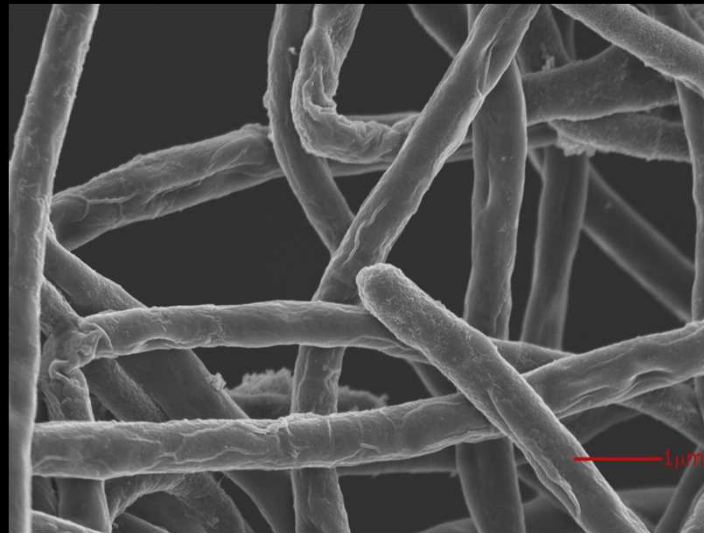
共重合体を用いれば風合いを損なわず撥水性を付与できる

## ■ 共重合体(GG)の調製方法

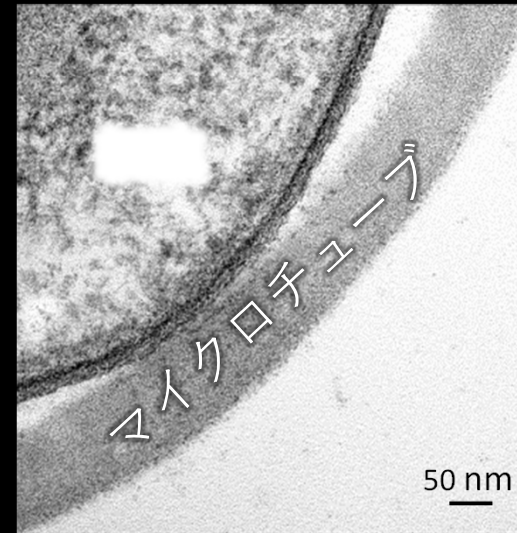


- 酵素法と発酵法に大別される
- 酵素法ではN-アセチル化物が得られ前駆体が必要
- 発酵法では硫黄酸化細菌の菌体から回収
- 発酵法では前駆体は必要なく原料となるのは増殖基質
- 酢酸菌を用いた発酵法もあるが共重合体は得られない

# 共重合体(GG)合成細菌 = *Thiothrix*属 (安全な活性汚泥細菌)



SEM像



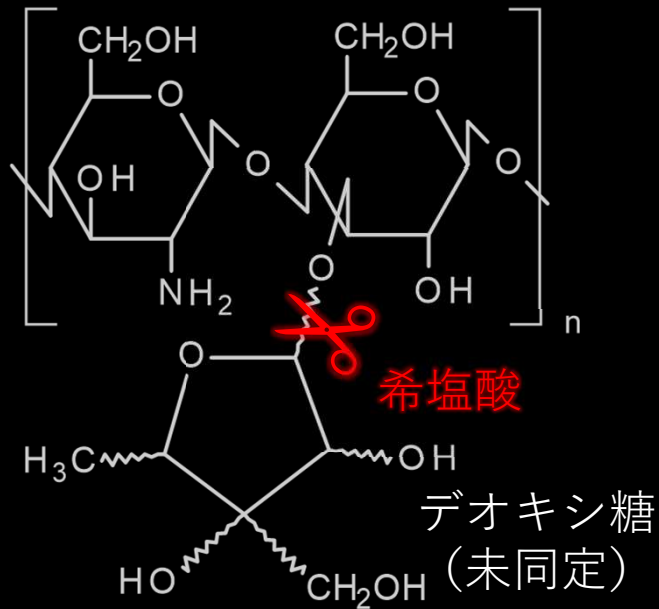
TEM像

硫黄酸化細菌 (*Thiothrix* 属) の電子顕微鏡像

# マイクロチューブの組成

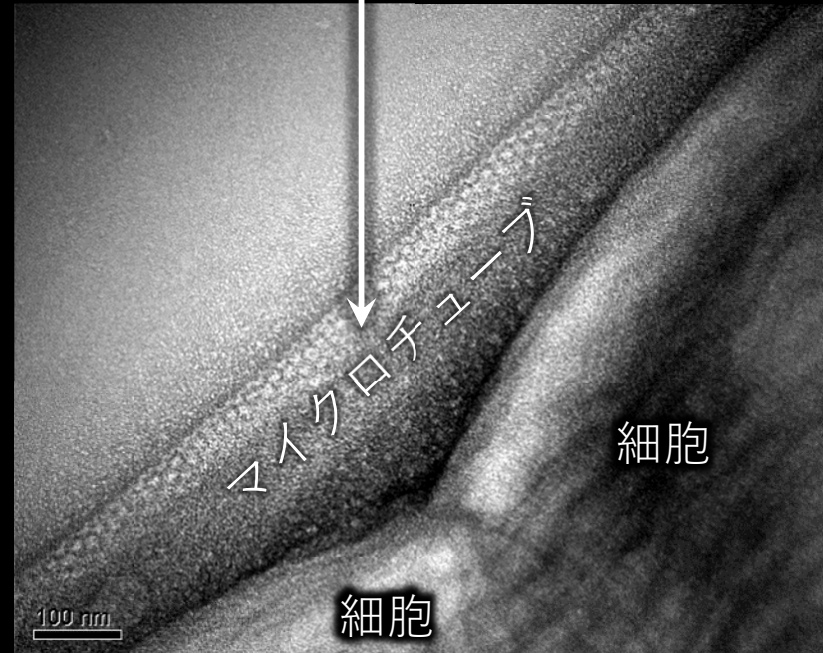
グルコサミン

グルコース



マイクロチューブ形成多糖

(格子模様はマイクロチューブ表面のS-レイヤー)



菌体表面のTEM像

- マイクロチューブを希塩酸処理すると共重合体が遊離する
- マイクロチューブはS-レイヤータンパク質で覆われている
- S-レイヤータンパク質は分子量 $1.6 \times 10^5$ の酸性タンパク質

## Thiothrix属の培養



フラスコ培養



ジャーファーメンター培養

- 硫黄源：硫化ナトリウム・チオ硫酸ナトリウム
- 炭素源：酢酸ナトリウムなど
- 窒素源：硫酸アンモニウム
- その他：リン酸塩、マグネシウム塩などの無機塩類
- 培養温度：30°C
- 培養時間：5-6日

## 菌体の回収



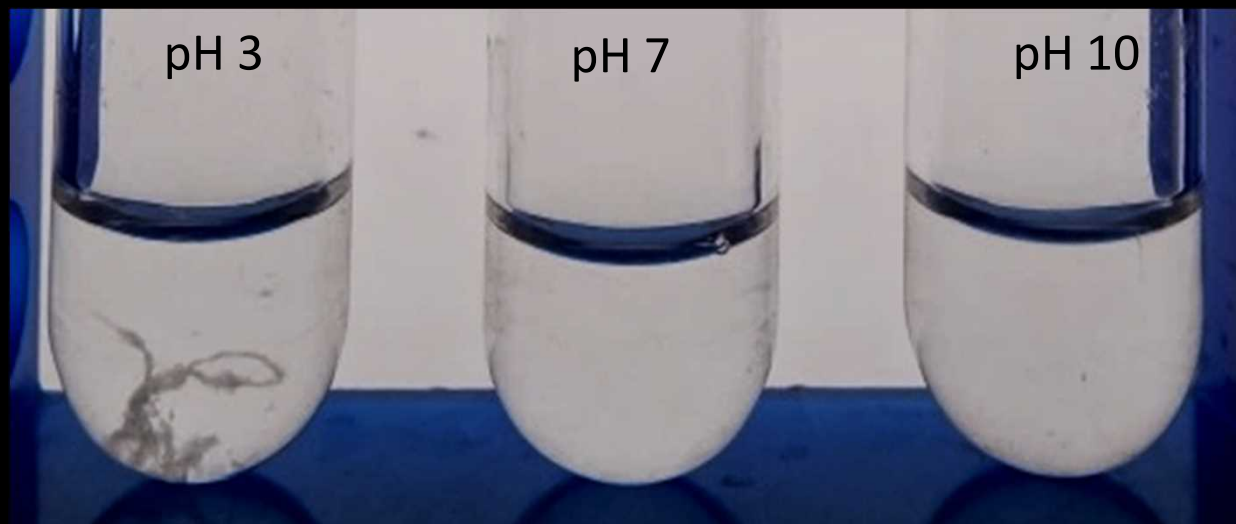
フラスコ培養後の菌体の状態



吸引ろ過での集菌

- 濾過による菌体回収が可能
- ガラス繊維濾紙(保持粒径1  $\mu\text{m}$ 程度)で補足可能
- 菌体はケーキ層として回収
- 濾過助剤(珪藻土など)による目詰まり対策も有効

## 酸性下での菌体凝集



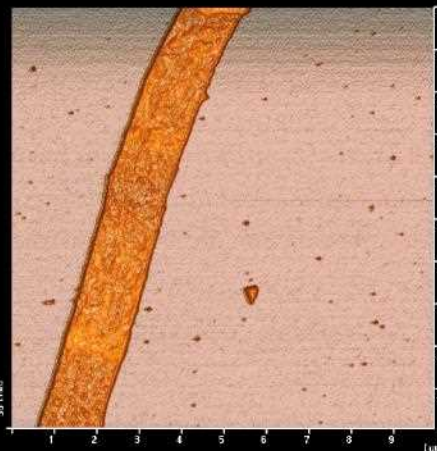
*Thiothrix*属の培養液にHClないしNaOHを加えてpHを調整

- 菌体は酸性下 (pH4程度) で凝集
- 酸性下では濾過による回収が容易
- 酸性タンパク質 (S-レイヤー) が凝集の要因
- PACなどの凝集剤での凝集も可能

## 共重合体(GG)の調製



菌体 (SPM像)



マイクロチューブ



共重合体 (GG)

- 酵素、NaOH、界面活性剤で溶菌しマイクロチューブを回収
- マイクロチューブから共重合体を遊離 (0.5 M HCl, 80°C, 3h)
- 共重合体を回収・乾燥 (収量: 16 mg/L-培地)



## ■ 実用化に向けた課題

- 供給能力の向上
  - 培養の高密度化
    - (菌株の育種・スクリーニング)
    - (培養条件の最適化)
  - 集菌手順の効率化
  - 共重合体調製手順の簡素化
- 吸着条件の最適化
  - 共重合体濃度、塩濃度、温度、時間など
- 用途開拓
  - セルロースナノファイバーの表面改質
  - 局所的アミノ化技術の確立

## ■ 企業への期待

- 供給能力の向上
  - ・発酵生産に関する実践的ノウハウ
  - ・パイロットプラント規模での培養
  - ・集菌及び共重合体調製の効率化
- 用途開拓
  - ・セルロースナノファイバー等の供給
  - ・アミノ化セルロース派生素材の開発
  - ・アミノ化セルロース系素材の実用性評価
  - ・アミノ化印刷技術の確立

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : アミノ化セルロース及びアミノ化セルロースの製造方法
- 出願番号 : 特願2018-121990
- 出願人 : 国立大学法人横浜国立大学
- 発明者 : 武田 穰

# お問い合わせ先

横浜国立大学

産学官連携推進部門 知的財産支援室

向 弘明 (むこう ひろあき)

TEL (045) 339-4452

FAX (045) 339-4457

e-mail [muko-hiroaki-vx@ynu.ac.jp](mailto:muko-hiroaki-vx@ynu.ac.jp)