

Phaeocystis sp.の藻体外被多糖を用いた
生分解性プラスチック作製の試み

環境システム工学コース

1055002 岡花 直人

目次

要旨	4
緒言	5
第1章 <i>Phaeocystis</i> sp.の外被多糖の物理的特性	7
1 1 ハプトースの調整	
1 2 ハプトースの pH 滴定	
1 3 結果	
1 4 考察	
第2章 <i>Phaeocystis</i> sp.の外被多糖を用いた生分解性プラスチックの作製	13
2 1 目的	
2 2 材料と方法	
2 - 2 1 糖量の測定	
2 - 2 - 2 フィルムの作製	
2 - 2 - 3 フィルム強度の測定	
2 - 2 - 4 見かけの粘度の測定	
2 - 2 - 5 ゲルの調整と強度の測定	
2 - 3 結果と考察	
2 - 3 - 1 ハプトースゾル/フィルム	
2 - 3 - 2 コンニャクグルコマンナンゾル/ゲル	
2 - 3 - 3 キサンタンガムフィルム	
2 - 3 - 4 混成ゲル/フィルム	

第3章 ハプトースのアセチル化	29
3-1 目的	
3-2 実験と方法（ハプトースのアセチル化）	
3-2-1 アセチル化度の測定	
3-2-2 酢酸法によるアセチル化	
3-2-3 ピリジン・無水酢酸法によるアセチル化	
3-2-4 灰分除去を目的としたハプトースの精製	
3-2-5 精製ハプトースを用いたアセチル化	
3-3 結果	
3-4 考察	
総括	37
謝辞	39
参考文献	40

要旨

ハプト藻の一種である *Phaeocystis sp.* は海産の微細藻類で外被に炭酸カルシウムの殻（コッコリス）と寒天様の多糖を持つ。この *Phaeocystis sp.* の外被多糖（以後ハプトース）は 80℃ 以上で温浴加熱するか、あるいは pH 2 以下に保持することで炭酸カルシウムの殻ごと容易に剥離する。剥離した寒天様のハプトースは粉末化できている。そこでハプトースのみを使用し汎用プラスチックに代替し得る生分解性プラスチックの作製を試みた。しかし試作フィルムは強度に問題があり、水によって軟化した。強度の改良のために他の多糖との混合フィルムの作製を試みた。そのために、供給量の少ない貴重なハプトースの代わりに、豊富で容易に入手できる多糖を用いてモデル実験を行った。

近年、ようやく詳しい研究がなされ始めたコンニャクグルコマンナンにキサントガムを加熱しながら混合すると 1% 添加しただけで粘性が著しく増加することがわかった。この性質を利用してプラスチックの強度増加を試みたところ、ハプトースだけで作製したプラスチックに比べると混成プラスチックは強度、柔軟性共に著しく増加した。

コンニャクグルコマンナンとキサントガムとで作製したプラスチックは当然ながら親水性で、水によって軟化した。そこで疎水性の汎用プラスチックの材料とするためハプトースの疎水性を増やすように改質しようと考えアセチル化を試みた。

ハプトースはグルコースとキシロースを約 1 : 1 で含む多糖であり、それらの -OH 基をアセチル化した。ハプトースをアセチル化度 16% まで改質することに成功した。

緒言

プラスチックは、我々の生活において欠く事のできない物質であり、様々な場所で、色々な用途に使われている。その理由は、安価で手に入り易く軽量なのに丈夫という特徴をもつからである。しかし、これらのプラスチック製品のほとんどが化石燃料を原料としている。しかも、合成プラスチックの大半が長期間の安定性を持ち、自然界でのごみ問題の原因の一つとなっている。現在、資源の枯渇が心配されている最中、石油資源を用いて製品加工されたプラスチックがそのまま使用され続けることは避けるべきであろう。資源を枯渇してまでごみ問題の原因を作るのも同じく避けるべきである。近年このような理由もあり、化石燃料を原料とせずに、自然界に放置されても微生物により分解され土壌の栄養源にもなる天然高分子を利用した生分解性プラスチックの研究、開発が進められている。そのほとんどが、とうもろこしなどの植物性澱粉を用いた生分解性プラスチックで、一部はすでに市場に出ている。しかし、地球上のいくつもの国では餓死者がでるほど貧困に苦しんでいる。いつかくるであろう人口爆発による飢餓を考えるならば、食糧をわざわざ手を加えて食べることのできない物に変えるのではなく、そのまま人間や家畜の食用として利用するべきであろう。

そこでこれから先の資源として、我々がまだ未利用の物質を使用し生分解性プラスチックの作製を行うことが必要となってくる。原料は安価なほど良く、それを考慮すると植物が最適である。植物は水と二酸化炭素、そして太陽の光があれば成長する。実際、植物を生分解性プラスチックの原料とすると、その栽培に広大な土地と多くの人手を要する。そのため必要な栄養源を与えておけば、ある程度放置しておいても自生する植物が望ましい。成長した植物を収穫する際、他の植物が混ざると原料精製時に面倒となる。そこで他の植物の混生を避けるために塩濃度の高い海に生育する植物が好ましいと考えられる。この二つの条件から、生分解性プラスチックの原料となる植物を海産性の微細藻類に求めた。その中でも外被に炭酸カルシウムの殻と寒天様の多糖を持つハプト藻 *Phaeocystis* sp. に注目した。幸運にも研究の途中、この藻の外被多糖（以後ハプトース）は 80 以

上で温浴加熱するか、あるいは pH 2 以下に保持することで炭酸カルシウムの殻ごと容易に剥離することが分かった。そこでこのハプトースを化石資源に変わる新材料として利用した生分解性プラスチックの作製を試みた。

第一章

Phaeocystis sp.の外被多糖（ハプトース）

1 1 ハプトースの調製

海産性の微細藻類であるハプト藻 *Phaeocystis* sp.は外被に炭酸カルシウムの殻と寒天様の多糖を持つ。下の顕微鏡写真では *Phaeocystis* sp.の寒天様の外被多糖をはっきり写すために墨汁を流し込み撮影を行った（図 1 1）。藻体の直径は外被多糖を含めると 10~15 μm であり、藻体自体は約 5 μm ほどの単細胞藻である。赤潮の原因藻の一種であるという報告もある。本研究で用いた *Phaeocystis* sp.は沖縄県近海で採取後単離して得たものを使用した。

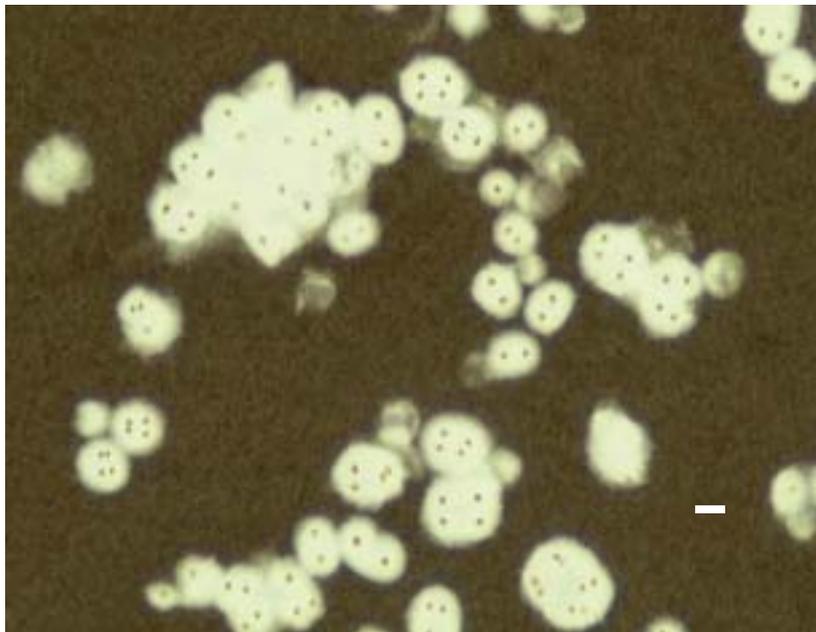


図 1 1 *Phaeocystis* sp.の顕微鏡写真（Bar：10 μm ）

Phaeocystis sp.の培養にはすべて人工海水(アクアマリン、八州薬品)を用い、*Phaeocystis* sp.用強化培地(PES)を加えたものの中で培養を行った

(表 1-1)。

Phaeocystis sp.を1%寒天PES培地に塗り、明期16時間(平均照度3000Lux)、暗期8時間、25℃の恒温室内で培養を行った。1~2週間で茶色のコロニーが出現し、それを液体培地に移し、10, 50, 500mlと順にスケールアップしながら無菌状態で振盪培養を行った。その後100Lのポリカーボネート製のタンクに移し、エアポンプによるエアレーションによって通気(20L/min) 攪拌と同時に二酸化炭素を供給しながら開放培養を行った。連続集藻機を用いて集藻した。この連続集藻機の主体は穴径0.1µmのフォロファイバーであり、これに培養液を圧入し、通過時に培養液のみを穴から排出する事で培養液を濃縮する。この連続集藻機を用いて、100Lの培養液を10分ほどで約5Lにまで濃縮した後、遠心分離(4000×g、20min)を行い*Phaeocystis* sp.を回収した。保存にはポリエチレン製のボトルで4℃の冷暗室に静置して保管した。収穫した*Phaeocystis* sp.は寒天状のハプトースをもつためゼリー状であった。

Phaeocystis sp.は80℃以上で温浴加熱するか、あるいはpH2以下に保持することで炭酸カルシウムの殻ごと外被多糖(以後ハプトース)が容易に剥離することが分かった。この温浴加熱した*Phaeocystis* sp.は遠心分離することにより藻体とハプトースとに分けることが可能であった。洗浄した*Phaeocystis* sp.をイオン交換水に入れ、100℃で30分間、加熱して藻体とハプトースに分けた。分離したハプトースの溶液が薄いのでロータリーエバポレーター(ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-11、EYELA)を用いて濃縮し、ステンレスメッシュ(80メッシュ)を用いてごみ等を除去した後、80℃にて加熱、攪拌しながらフラッシュエバポレーター(SPRAY DRYER SD-1000、EYELA)を用いて粉末にした。あるいは、上記のステンレスメッシュでの濾過終了後、濃縮したハプトースを凍結乾燥し、これを超高速ミルサーで粉碎した。2つの方法の優劣はないが、後者の方は水に溶けやすいように思われた。

PES

NaNO ₃	350	mg
-Na ₂ glycerophosphate	50	mg
Vitamin B ₁₂	10	μg
Thiamine HCl	500	μg
Biotin	5	μg
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol	500	mg
[Tris(hydroxymethyl)aminomethane]		
<hr/>		
Fe(as EDTA; 1:1 molar)*	25	ml
P- metals**	25	ml
純水	50	ml

*Fe(as EDTA; 1:1 molar)

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	70.2	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	66	mg
<hr/>		
純水	100	ml

**P- metals

H ₃ BO ₃	114	mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4.9	mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.4	mg
ZnCl ₂	1	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.41	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	mg
<hr/>		
純水	100	ml

980ml の人工海水に 20ml の PES を加え、1MHCl で pH を 7.8 に調整する。

表 1 - 1 : *Phaeocystis* sp. の培養に使用した Provasoli の栄養強化海水 (PES) 培地の組成

1 - 2 ハプトースの pH 滴定

ハプトースの滴定曲線

藻体から熱処理によって剥離したハプトースを用いて 0.1N NaOH、あるいは 0.1N HCl を攪拌しながら 0.5ml ずつ滴下し、その時の pH を計測しグラフを作成した。ハプトースはスターラーで攪拌できる様になるまでイオン交換水にて薄めたものを実験に使用した。

1 - 3 結果

ハプトースの滴定曲線

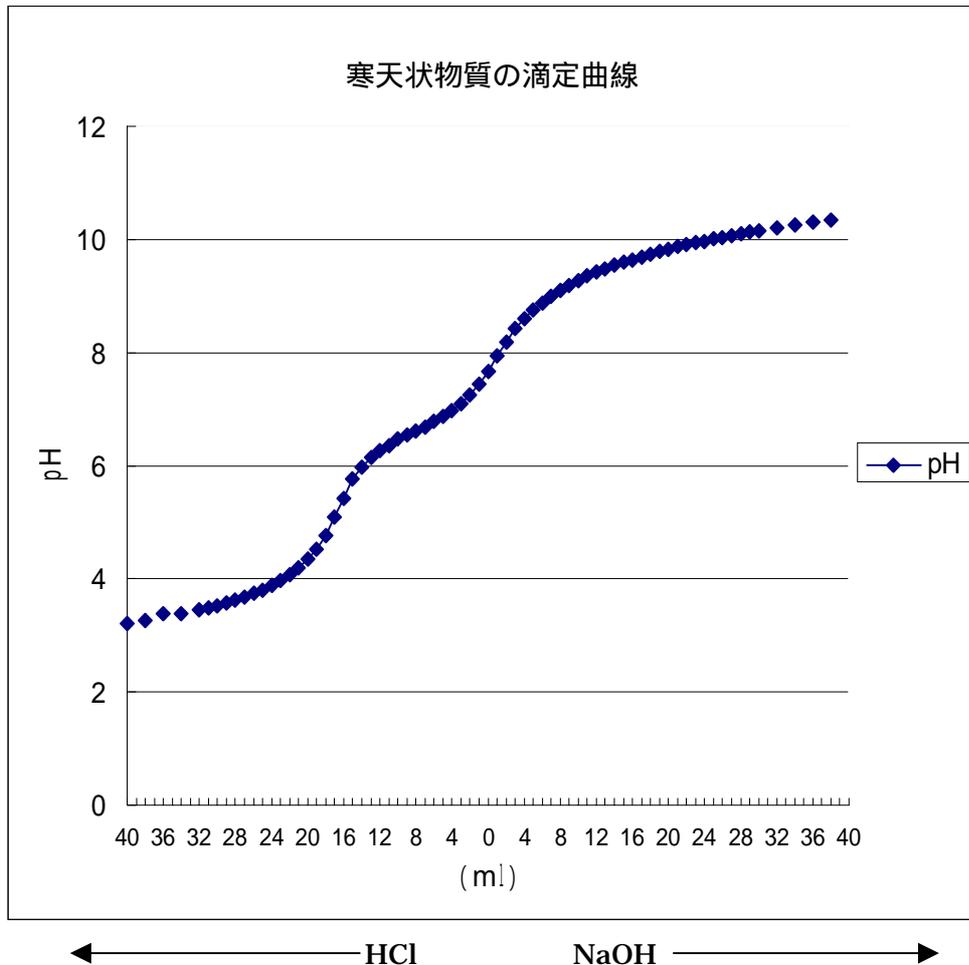


図 1 - 1 : ハプトースの滴定曲線

ハプトースの滴定曲線 (図 1-1) はハプトースには pK がおよそ pH 5 と pH 8 にある残基を構造内に含んでいることを示唆している。

1 - 4 考察

ハプトースの滴定曲線（図 1-1）は pK が約 5 と 8 を持つ 2 つの残基の存在を示唆している。pH = 5 は -カルボキシル基（pK = 4.2）またはイミダゾール基（pK = 6）のどちらかの可能性がある。pK = 8 はスルフヒドリル基（pK = 8.2）だと思われる。これはハプトースのにおいが硫黄くさいことから推測できる。

第2章

ハプトースを用いた生分解性プラスチック作製の試み

2 - 1 目的

PP や PET などの石油資源を材料として強靱でいて熱可逆性で容易に成型でき、しかも長期安定性を持ったプラスチックは埋め立てられても分解しないで、ゴミ公害の源となり、焼却されると有害物質を発生する可能性が高い。このような環境破壊を防ぐために日常生活品に生分解性を持たせて埋め立てられても自然界の微生物によって分解される生分解性プラスチックを *Phaeocystis* sp. のハプトースを用いて作製しようと試みた。

現在、*Phaeocystis* sp. と廃パルプを混練して加圧、加熱して作製したフィルムが生分解性マルチフィルムとして工業化へ試行中である。しかしこのマルチフィルムは廃パルプを使用するため、性状が紙に近くなる。ハプトースと廃パルプでも同様の結果となった。そこで廃パルプを混合せず、ハプトースのみを使用し汎用プラスチックに代替し得る生分解性プラスチックの作製を試みた。

作製したフィルムは半透明で廃パルプ混入フィルム以上の強度を持っていた。しかし汎用プラスチックの代替としてはまだ強度不足であり、親水性で軟化した。そこで強度を補うために他の高分子との混合フィルムの作製を試みた。コンニャクグルコマンナンとキサントガムの間には強い相互作用が存在したので、この性質を利用してプラスチックの強度増加を試みた。しかし、作製した混成プラスチックは当然ながら親水性で、水によって軟化した。

2 - 2 材料と方法

2 - 2 - 1 糖量の測定

使用した多糖の全糖量の測定はすべてフェノール - 硫酸法を用いて行いグルコース換算で表記した。測定するサンプルはキサントガムとコンニャクグルコマンナンは 10mg / 1ml となるようにイオン交換水に 80 ℃ で加熱しながら 6 時間攪拌して均一に溶解し、ハプトースは 80 ℃ にて 1 時間攪拌しながら加熱して溶解した。

2 - 2 - 2 フィルムの作製

原料とするハプトースが製造バッチ毎に濃度が異なるため、ロータリーエバポレーター濃縮後のハプトースを数バッチ分集めて均質に混合して一つの容器に入れ低温室(4 ℃)内にて保管した。このハプトースの全糖量をフェノール - 硫酸法にて測定し、同時に乾燥重量も測定した。ハプトースにイオン交換水を加えて既定の濃度とし、100 ℃ で 3 時間加熱、攪拌したものをテフロン容器内に平らに入れた。これを乾燥機(50 ℃)中で水分を蒸発させ、乾燥したフィルムをプレス機にて加圧、加熱(20MPa, 110 ℃)処理を行った。水分を吸収しやすいためデシケーターに保管した。

2 種混成フィルムは、ハプトースとコンニャクグルコマンナン、ハプトースとキサントガムの 2 種類を作製した。最初にフェノール - 硫酸法にて糖量の測定を行い、グルコース換算でそれぞれ糖を秤り取り、既定量のイオン交換水に加えて、80 ℃ にて 3 時間攪拌しながら溶解した。この溶液を用い上記の要領で 2 種の混成フィルムを作製した。

3 種混成フィルムは、ハプトースとコンニャクグルコマンナンとキサントガムを用いて作製した。作製手順は、上記の 2 種の混成フィルム作製手順と同じである。

2 - 2 - 3 フィルム強度の測定

上記のように作製したフィルム状プラスチックの作製条件を決定するため様々な条件別のフィルムを縦約 5 cm、横幅 1 cmの短冊状に切り、島津小型卓上式試験機 EZ Test を用い引っ張り試験を行いフィルム強度を測定した。

2 - 2 - 4 見かけの粘度の測定

見かけの粘度の測定には、回転粘度計と摩擦粘度計を用いた。回転粘度計は米国ブルックフィールド社製のプログラマブルデジタル粘度計 型式:DV- +、超音波粘度計は富士工業株式会社の超音波粘度計 FUV-1 MODEL-103、を使用した。回転粘度計の測定方法は、測定部位であるスピンドルの回転速度を、2.5, 5, 10, 20, 50, 100rpm と変化させ粘度を測定した後、後術の 2 - 3 - 4、KGM - XAN の相互作用に対する凝固剤の影響の実験結果のように、作業で得た値から対数グラフを書き、スピンドルの回転速度が 0 の時の値に内挿した。超音波粘度計の測定方法は超音波長の L(low)、H(high)を切り替えながら粘度を測定し、計測した値の平均を計算した後一つのグラフにまとめた。

2 - 2 - 5 KGMゲルの調製と強度の測定

コンニャクグルコマンナン (KGM) は市販されている特級の品を用いた。KGM ゲルはイオン交換水と凝固剤としての水酸化カルシウムを用い調製した。調製方法は、まず、KGM をイオン交換水に溶解した。2 時間攪拌後凝固剤として水酸化カルシウムを約 10ml のイオン交換水に溶解してから加えた。3 時間静置させ熟成 (反応) を待ち、その後 100 にて 20 分間温浴した。最後にイオン交換水にさらし余分な水酸化カルシウムを除去した。KGM ゲルは島津製作所の島津小型卓上式試験機 EZ Test を用いて押しつぶしに要する力を測定した。

2 - 3 結果と考察

糖量とフィルム強度の関係

表 2 - 1、は糖量 1g、0.75g、0.5g となるように寒天様ハプトースを測り取り上述の方法でフィルム状プラスチックを作製し強度を測定した結果である。図 2 - 1 は試験片に対する最大荷重値をグラフ化したものである。通常フィルムとは *Phaeocystis sp.* と廃パルプとを混合して作製した既存のマルチフィルムのことであり、糖量はグルコース換算でおよそ 0.4g である。

表 2 - 1 : 糖量とフィルム引張強度の関係

糖量 (g)	引張強度 (MPa)
0.5	23.8
0.75	47.7
1	66.5
通常フィルム	27.7

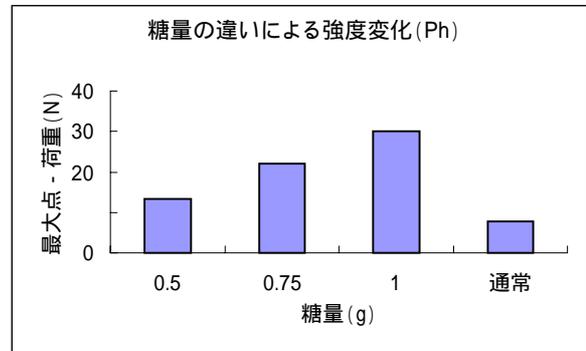


図 2 - 1 : 糖量とフィルム最大点 荷重の関係

この実験結果よりハプトースのみで作製したフィルム状プラスチックは既存の *Phaeocystis sp.* と灰パルプとを混合して作製したマルチフィルムに比べかなりの強度を持っていることがわかった。糖量が増えることによりフィルムの強度も増加することがわかった。

フィルム作製時の乾燥温度と強度の関係

表 2 - 2 は上述のフィルム作製時の乾燥温度を 40、50、60 と変えて強度変化を調べた結果である。

表 2 - 2 : フィルム作製時の乾燥温度と強度の関係

引張強度 (MPa)

	40	50	60
ハプトース	75.1	66	47.5

重量 (g)

	40	60
ハプトース	1.60	1.65

実験結果より乾燥温度が上がるとフィルムの強度が下がることがわかった。これは、プレス前のフィルム内保水量の違いによりフィルム自体の柔軟性が決定され、そのため、40 と 60 で大きく強度が変化したものと思われる。乾燥温度はハプトースのみでフィルムを作製する場合は 40 が望ましいと思われる。

フィルム作製時の圧力と強度の関係

表 2 - 3 は上述のフィルム作製工程の加圧、加熱時の圧力を変化させることにより強度にどのような影響がでるのか調べた結果である。

表 2 - 3 : フィルム作製時の圧力と強度の関係

	15Mpa	20Mpa	25Mpa
引張強度 (MPa)	37.6	39.2	49.1
厚さ (μm)	45	40	33

圧力が増すことによりフィルムの強度は増加した。しかしそれと共に罅割れしやすくなり柔軟性にかけるフィルムとなった。そのため圧力は 20Mpa が望ましいと思われる。

2 - 3 - 2 コンニャクグルコマンナンゾル/ゲル

混成フィルムの作製ためにコンニャクグルコマンナンの物理的特性を調べた。コンニャクグルコマンナンとは蒟蒻芋から精製されるグルコマンナンのことを言い、グルコースとマンノースが 2 : 3 の割合で連なり、途中にわずかにアセチル基を含む高分子である。グルコマンナンはアルカリ性化合物を加えることでゲル化し、他の高分子と混合し溶解することで粘度に増減の変化を示すというとても興味深い性質を持っている。このような性質を持つためグルコマンナンは中性のゲル化剤、増粘剤等として我々の生活に広く利用されている。しかし、詳しく研究され始めたのは近年のことでまだまだ未開の物質である。そこで圧縮試験機、粘度計

等を用い、コンニャクグルコマンナンの物理的特性を調べると共に、他の高分子との相互作用を確認することを目的として研究を行った。

熟成時間の差による KGM ゲルの変化

図 2 - 2 は KGM ゲル形成における熟成時間を変化させることで KGM ゲルの強度（押しつぶしの力に対する応力）にどのような影響がでるかを調べた結果である。

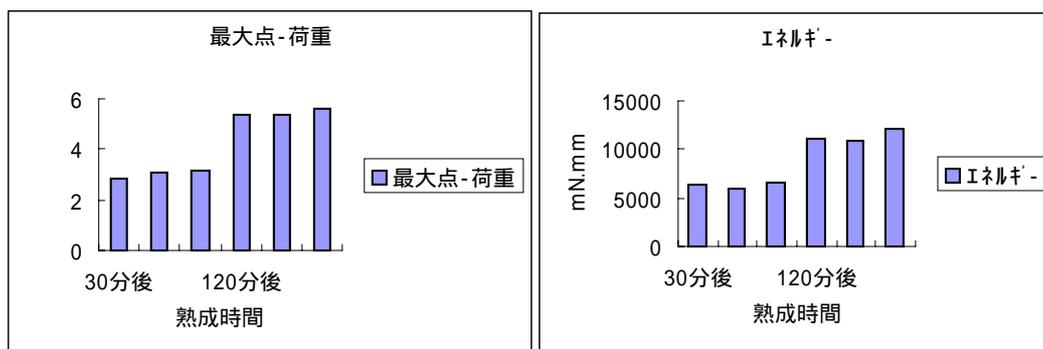


図 2 - 2 : 熟成時間の差による KGM ゲルの強度変化

KGM ゲルは熟成時間が長ければそれに応じて強度が増加した。特に 90 分後と 120 分後の間の 30 分間で大きく増加しており、その後には大きな変化は見られなかった。この結果より、KGM ゲルを調製する際には、作業能率も考えると熟成時間は 2 時間が適していると考えられる。

熟成時の温度差による KGM ゲルの変化

図 2 - 3 は KGM ゲルを形成で過程の熟成温度を変化させることで KGM ゲルの強度にどのような影響がでるかを調べた結果である。

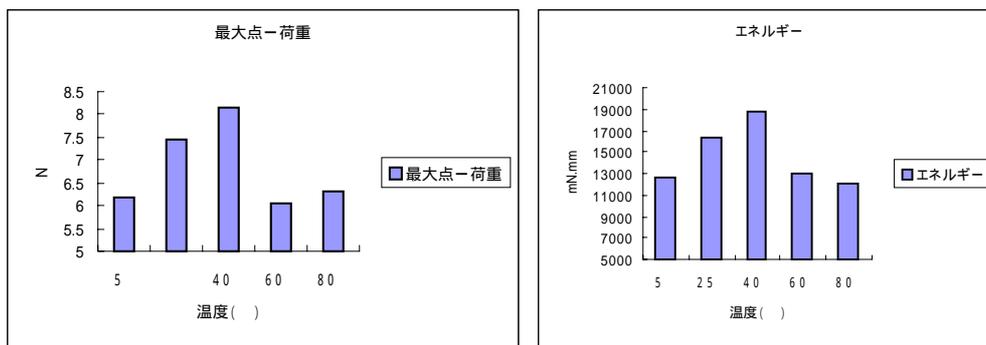


図 2 - 3 : 熟成時の温度差による KGM ゲルの強度変化

熟成温度が 40 までは右上がりに KGM のゲル強度が増加した。しかし 60 、 80 においては、40 と比べると明らかに低くなった。これは 60 、 80 では高温のため KGM に熱が通ってしまい、熟成の進行の前に別の構造にゲル化してしまったと考えられる。図 2 - 2 の結果からは熟成時間の短い KGM ゲルは、十分熟成させたそれに比べ強度が低くなるから 60 、 80 での KGM ゲルは実質、熟成時間 0 分で加熱されたことになり、柔らかくなったのだと考えられる。60 よりも 80 の KGM ゲルが固いのは、熟成温度が 20 高いためと思われる。

グリセリン添加による KGM ゲルの変化

図 2 - 4 は KGM にグリセリン溶液を加え上述の方法で KGM ゲルを調製した時の強度変化を調べた結果である。

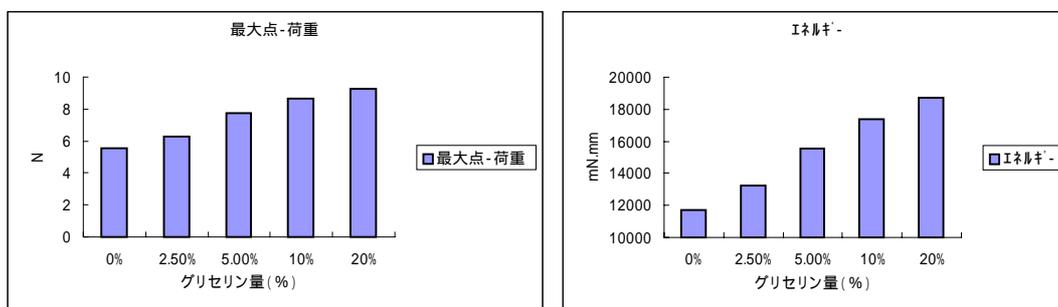


図 2 - 4 : グリセリン添加による KGM ゲルの強度変化

グリセリン量が増すと KGM ゲルの強度も増加した。

塩化ナトリウムの濃度変化による、KGM ゲルの強度変化

図 2 - 5 は KGM に添加した NaCl の濃度によってゲル強度がどのように変化するかを調べた結果である。

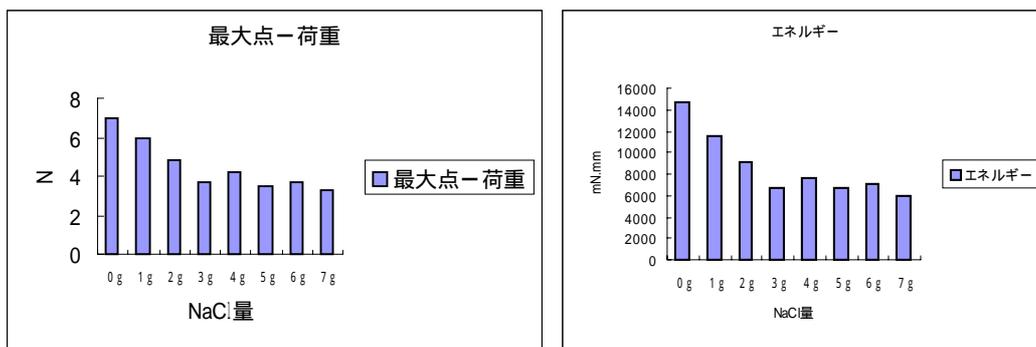


図 2 - 5 : NaCl 添加量の変化によ KGM ゲルの強度変化

塩化ナトリウムの濃度が増すと KGMゲルが柔らかくなった。KGMゲルというものはKGMゾルをアルカリ性にするにより作られていて、KGMの中になんかに含まれているアセチル基がアルカリ性になることにより脱離してその部分が架橋し合い 3 次元的立体構造をつくることによりできる熱可逆的ゲルである。塩化ナトリウムはこのシステムの架橋の部分になんらかの形で阻害しているものと思われる。

KGMゾルの滴定曲線

図 2 - 6 は NaOH を用いた KGM ゾルの滴定曲線である。

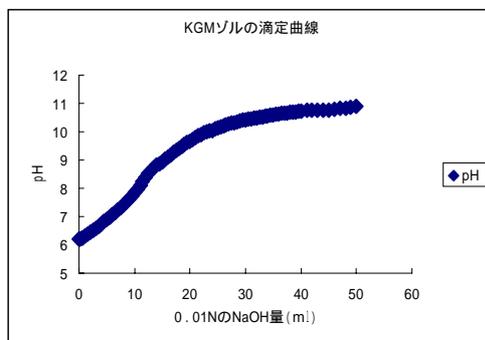


図 2 - 6 : NaOH を用いた KGM ゾルの滴定曲線

KGM ゾルは至適 pH8 ~ 9 の置換基を持っていることがわかった。アセチル基の至適 pH は 8 ~ 8.5 であることから、この実験結果はアセチル基の存在を意味していると思われる。このアセチル基は KGM のゲル化に寄与しているものである。

KGMゾルの pH による見かけの粘度変化

図 2 - 7 は KGM ゾルの見かけの粘度と pH との関係を回転粘度計を用い調べた結果である。

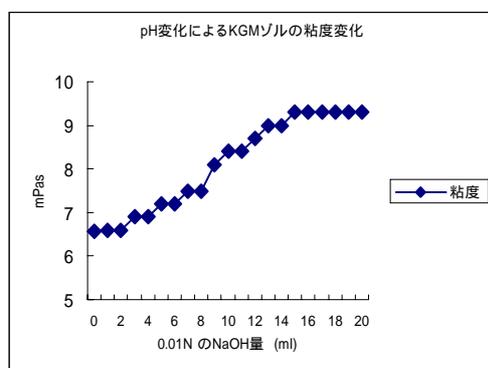


図 2 - 7 : pH 変化による KGM ゾルの粘度変化

NaOH の量が増すと粘度も増加した。この結果は KGM ゲルのゲル化のメカニズムを考えれば容易に予想がついた。

KGM の溶質量の変化による見かけの粘度変化

表 2 - 4 は KGM の溶質量の変化による見かけの粘度変化を調査すると共に、KGM が何時間かけてイオン交換水に溶解するのかを回転粘度計を用いて調べた結果である。(単位 = mPa · s)

表 2 - 4 : 粘度で観る KGM の水への可溶度

粉末 (g) / 時間変化	90 分後	180 分後	270 分後	360 分後
0.05	3.12	2.82	2.64	2.67
0.10	4.89	3.96	3.66	3.36
0.25	24.1	22.7	13.9	10.9
0.50	349.1	307.1	271.1	225.0
0.75	1109	1185	1074	956.2

粉末 (g) / 時間変化	室温放置	Over night (4)
0.05	3.78	6.24
0.10	5.40	9.24
0.25	23.0	45.4
0.50	567.5	1368
0.75	2489	3899
0.00	-	3.90

グルコマンナンは 6 時時間加熱攪拌しても粘度が一定にならなかった、表述の他に 450 分後、540 分後の粘度も測定したがやはり粘度が一定にはならなかった。このことより今後の実験において多糖類の相互作用を粘度によって比較する際には、何時間加熱攪拌したかなどの条件を厳密にする必要がある。

2 - 3 - 3 キサンタンガムゾル/フィルム

キサンタンガムの糖量

キサンタンガム (GUM XANTHAN 11138-66-2 SIGMA) の糖量の測定を行った。結果は結果は 8.95mg / ml となり約 90% が糖という結果となった。

キサンタンガムのフィルムの作製

表 2 - 5、図 2 - 8 はキサンタンガムのフィルムを上述の方法で作製し強度を調べた結果である。

表 2 - 5 : XAN フィルムの引張強度

糖量 (g)	引張強度 (MPa)
0.75	19.6
1	16.18
2	36.5

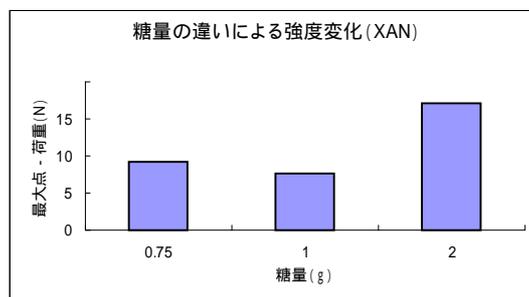


図 2 - 8 : XAN フィルムの最大点 荷重

どの濃度のサンプルもフィルム状にはなったものの強度が低く柔軟性のないものであった。

キサンタンガムの溶質量の変化による見かけの粘度変化

表 2 - 6 はキサンタンガム (XAN) の溶質量の変化による見かけの粘度変化を調査すると共に、キサンタンガムが何時間かけてイオン交換水中に均質化するのかを回転粘度計を用いて調べた結果である。

表 2 - 6 : 粘度で観る XAN の水への可溶度

粉末 (g) / 時間変化	90 分後	180 分後	270 分後	360 分後
0.1	17.9	15.4	12.7	11.6
0.25	46.1	36.4	26.7	22.1

粉末 (g) / 時間変化	450 分後	室温放置	Over night (4)
0.1	9.84	13.9	21.8
0.25	19.1	46.5	67.5

(単位 = mPa · s)

キサンタンガムの粘度も一定になることはなく、上述の KGM の実験と同様に何時間加熱攪拌したかなどの条件を厳密にする必要がある。

2-3-4 混成ゲル/フィルム

ハプトースとキサンタンガムとの混成フィルム

表 2-7 はハプトース 0.25g にキサンタンガムを添加した混成フィルムの強度を測定した結果である。

表 2-7 : キサンタンガムとの混合フィルムの引張強度

サンプル(糖量 0.25g)	引張強度 (MPa)
100:0	18.1
99 : 1	20.1
90 : 10	7.1

フィルム状にはなったが強度はとても低いものであった。しかし、99:1 のフィルムはコントロールに比べると強度がやや増していた。このことよりキサンタンガムを増強剤として使用する時は 1% が好ましいと考えられる。しかし全体的にキサンタンガムの量が増えるとフィルムの柔軟性が下がる傾向にあった。

ハプトースとコンニャクグルコマンナンとの混成フィルムの作製

表 2-6 はハプトース 0.5g に主としたとコンニャクグルコマンナンを添加した混成フィルムの強度を測定した結果である。

表 2-8 : コンニャクグルコマンナンとの混合フィルムの引張強度

サンプル(糖量 0.5g)	引張強度 (MPa)
100:0	23.8
99 : 1	49.6
90 : 10	45.8

少量の KGM の混合で強度の増加が見られた。99:1 が最も強度が高かったが、柔軟性にかけていて輝の入りやすいものであった。それに比べ 90:10 のフィルムは 99:1 に比べると輝が入りにくくある程度の強度もあった。そのため増強剤とし

では 90:10 の方が向いているように思われる。

KGM ゲルと XAN の相互作用

表 2 - 9、図 2 - 9 は回転粘度計と超音波粘度計を用いて見かけの粘度を測定することにより、これら 2 つの高分子の相互作用を調べた結果である。KGM と XAN をそれぞれイオン交換水 200g に 0.5g 溶解し 80 で加熱しながら 3 時間溶解する。これを基礎として、KGM と XAN の比率を 100% - 0%、1% - 99%、10% - 90%、20% - 80%、30% - 70%、40% - 60%、50% - 50%、60% - 40%、70% - 30%、80% - 20%、90% - 10%、99% - 1%、0% - 100% と変化させ、3 時間 80 で加熱、攪拌する。そして、3 時間 25 で静置したのち回転粘度計と超音波粘度計にて粘度を測定する。これによって 2 つの高分子の相互作用を観察した。

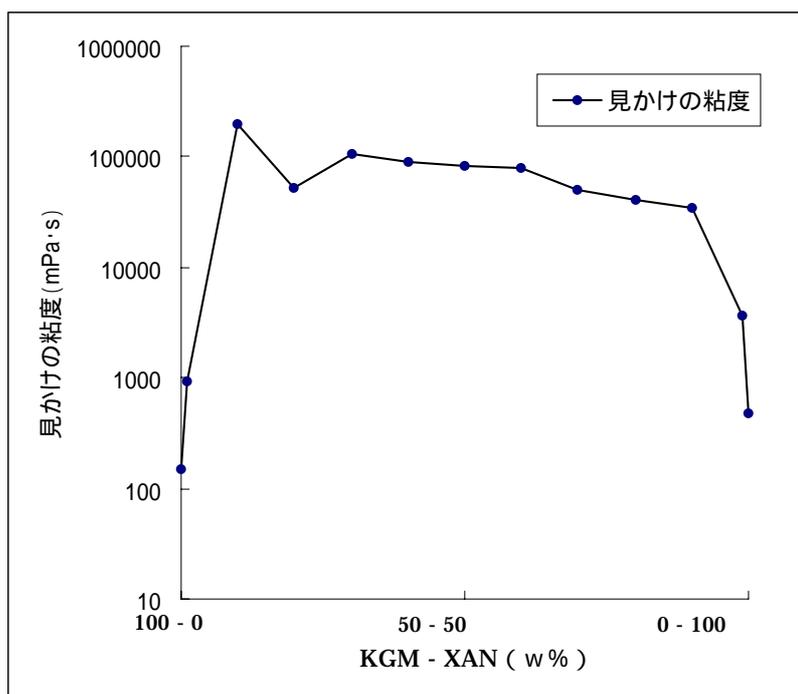


図 2 - 9 : 粘度で見る KGM - XAN の相互作用 (回転粘度計)

表 2 - 9 : 粘度で見る KGM - XAN の相互作用 (回転粘度計)

回転粘度計

KGM	150
1-99	3600
10-90	34000
20-80	41000
30-70	49500
40-60	78000
50-50	81000
60-40	89000
70-30	105000
80-20	52000
90-10	195000
99-1	920
XAN	480

超音波粘度計

KGM	H 384	L 184
1-99	H 3150	L 174
10-90	2137	
20-80	2360	
30-70	3455	
40-60	3873	
50-50	3229	
60-40	3634	
70-30	3243	
80-20	2560	
90-10	2099	
99-1	H 3309	L 233
XAN	H 860	L 253

(単位 = mPa · s)

90 - 10 の時のサンプルはゾルとゲルの中間のような物質で一塊ではあるが流動性もあるといった感じになっているため、高粘度になっていると考えられる。その他のサンプルはゲルとなっているため絡み合った高分子に自由性はないと言える。つまりは完全なゲルよりもゾル、中でもゲルに近いゾルが最も見かけの粘度が高くなると考えられる。超音波粘度計の実験では回転粘度計ほど大きな違いは見られなかったが KGM-XAN との間に相互作用が存在するのは明らかである。

KGM - XAN の相互作用に対する凝固剤の影響

表 2 - 10 は KGM - XAN が 10%-90%,90%-10%のサンプルに水酸化カルシウム (150mg / 10ml) を入れると相互作用にどのような影響が現れるのかを調べた結果である。

表 2 - 10 : 凝固剤の添加による相互作用の変化

10%-90%	スピンドル	mPa·s	90% - 10%	スピンドル	mPa·s
	2.5	28314		2.5	107003
	5	21715		5	57708
	10	15897		10	29034
	20	11398		20	-
	50	5543		50	-
	100	4067		100	-

10-90 のサンプルは水酸化カルシウムを添加することで水気の多いゲルとなった。しかし決して柔らかいわけではなく弾力があり硬いゲルとなった。90-10 のサンプルはゲル化せず、溶液には沈殿が見られた。この沈殿物はグルコマンナンと水酸化カルシウムが反応してできたグルコマンナンゲルだと思われる。この結果より混成フィルムには凝固剤を入れないこととした。

3種類の多糖を用いた混成フィルム

表 2 - 11 はハプトースにコンニャクグルコマンナンとキサントガムとを加えた上述の方法で3種類の多糖を含む混成フィルム強度を調べた結果である。KGMとXANの混合溶液は9:1の混合比時に最も相互作用が強く現れた。ハプトースとKGMの2種混成フィルムは90:10の時良いフィルムが作製できた。このことから3種類の多糖の混合比率をハプトース:KGM:XANが90:9:1となるように調製した。

表 2 - 11 - 1 : ハプトースとの二種の混成フィルムの強度

サンプル(糖量 0.5g)	引張強度(MPa)
ハプトース . . . 100%	39.7
ハプトース : KGM . . . 90 : 10	51.3
ハプトース : XAN . . . 99 : 1	48.7

この結果より KGM と XAN の 2 種の多糖類を加えることにより、3 種の多糖類の相互作用で、より強靱なフィルムができるのではないかと考えた。上の実験で最も強度の高かった 10% コンニャクグルコマンナンをコントロールとして、ハプトース：コンニャクグルコマンナン：キサンタンガムが 90：9：1 となるようにフィルム作製した。

表 2 - 11 - 2：三種の多糖混合溶液の見かけの粘度

25

スピンドル回転数 (RPM)	90:10:0	90:9:1
100	6.6	7.32

(mPa · s)

表 2 - 11 - 3：三種の多糖混成フィルムの強度

サンプル(糖量 1g)	引張強度 (MPa)
90 : 10 : 0	82.4
90 : 9 : 1	77.5

予想と反し、溶液の見かけの粘度が高くともフィルムの強度は低いという結果になった。しかしながらこれは引っ張り強度だけを調べたものであり、違う視点からの調査を行えば様々な相違点が見られると考える。ただ強度という面だけで見ると KGM だけの方が良い結果となった。

第3章

ハプトースのアセチル化

3 - 1 目的

汎用プラスチックとして使用するには天候の変化に強く、特に雨や湿気等の水に強い必要がある。そこで本来の材料であるハプトースを用いて、ハプトースそのものの改質を考えアセチル化を試みた。上記の2種の実験を成功させ、強靱で水気に強い生分解性プラスチックを作製することが本研究の目的である。この実験の成功により、*Phaeocystis* sp.由来のハプトースは生物材料としての用途が広がり、環境破壊、資源枯渇の抑制につながる筈である。

3 - 2 実験と方法

ハプトースのアセチル化

ハプトースを汎用プラスチックの代替として使用するには天候の変化に強く、特に雨や湿気等の水に強い必要があると考えられるので、ハプトースそのものの改質を考え、ハプトースの主成分であるグルコースとキシロースの - OH 基をアセチル化することとした。

3 - 2 - 1 アセチル化度の測定

アセチル基の付加の度合いを示す指数をアセチル化度と言い、でんぷんではこれが6～7%だと親水性で水に可溶であり、それ以上だと水に不溶でアセトンに可溶となると報告されている。アセチル基含有量の測定には以下のEberstadt法を用いた。サンプルを砕き粉末とし、そこから1g秤りとり105℃で2時間乾燥した。処理後のサンプルに75%エタノールを40ml加え60℃で30分間加熱、攪拌する。その後0.5MのNaOH40mlを加え、60℃で15分間加熱、攪拌した後、室温で48時間冷却した。冷却後過剰のアルカリを0.5MのHClでpH7まで滴定し、さらに0.5MのHClを1ml加え、小過剰の酸を0.5MのNaOHでpH7まで滴定する。その滴定量の値を下記の式に代入しアセチル化度を計算する。アセチル化処理前のサンプルをコントロールとし測定した。

$$\text{アセチル基含有率} = \{(A - B) N_b - (C - D) N_a\} \times 4.3/w$$

A : サンプルに加えた NaOH の ml

B : コントロールに加えた NaOH の ml

C : サンプルに加えた HCl の ml

D : コントロールに加えた HCl の ml

N_a : HCl の規定度 (0.5M)

N_b : NaOH の規定度 (0.5M)

w : サンプルの重量(g)

3-2-2 酢酸・無水酢酸法によるアセチル化

ハプトースを 2.96 g 測り、それに 22.2ml の酢酸を加え 100 で 30 分間攪拌し前処理を行った。その後溶液を濾過して過剰な酢酸を除き、酢酸、無水酢酸、硫酸を 40 : 40 : 1 になるように調整した混液を 44.9ml 加え、60 分間室温にて攪拌した。次に遠心分離機を用いて 5 分間 - 2900 × g で遠心後、上澄みを除去し沈殿物をイオン交換水で洗浄した。イオン交換水で十分に洗浄した後 60 にて水分がなくなるまで乾燥する。

3-2-3 ピリジン・無水酢酸法によるアセチル化

ピリジン・無水酢酸法でセルロースをアセチル化した場合、生成物は水、アルコールに不溶で、酢酸、クロロフォルム、アセトンに可溶と報告されている。

ハプトースを 5g 秤り取り、イオン交換水 55ml に 95 にて 20 分間攪拌して分散した後、溶液を 5 倍量のエタノール中に攪拌注入し、遠心分離機を用いて析出物を遠心分離 (5min - 2900 × g) した。その後、温浴加熱を行いある程度エタノールを気化させた後、60 の乾燥機内にて減圧乾燥し含有水分が 1 % 以下になるまで放置する。その後デシケータ内で一晩保存した後、ピリジン 44ml、無水酢酸 17.3ml を加えた混液中に攪拌しながら加え、100 で 4 時間、還流する。反応溶液を室温で冷却後、内容物を 100ml のエタノール中に攪拌注入し、エタノール中の析出物を遠心分離機を用いて遠心分離 (5min - 2900 × g) し、さらに沈殿物に 500ml のエタノールを加え遠心分離 (5min - 2900 × g) をして洗浄した。この工程を 2 ~ 3 回繰り返し十分に洗浄した。その後 500ml のエタノールに分散し、一晩室温に放置後ホットスターラーなどを用いある程度までエタノールを蒸発させた後 60 の乾燥機内でさらにエタノールを蒸発させデシケータ内に保管した。

上記の実験工程の還流による反応時間を 4 時間と 8 時間の二通り行い、それによるアセチル化度の違いを調べた。

3 - 2 - 4 灰分除去を目的としたハプトースの精製

加熱処理で剥離調整された粗ハプトースは 35%前後の灰分を含有するため、灰分除去を目的としたハプトースの精製を行った。4 M の塩酸にハプトースを 5mg / ml となるように溶解し冷却しながら 2 時間攪拌した。ついで、透析膜に入れ水に対して 24 時間透析し、凍結乾燥後高速ミルサーを用い粉末化した。精製ハプトース粉末をイオン交換水に溶解し、ヘキサンとイソプロパノールを加えよく攪拌した後、色素を含む上澄みのヘキサンを除去した。この作業を 3 ~ 4 回繰り返し色素除去を行った後、凍結乾燥を行いミキサーで粉末化した。

3 - 2 - 5 精製ハプトースを用いたアセチル化

精製ハプトースのピリジン・無水酢酸法によるアセチル化では還流による反応時間を 4 時間と 8 時間の二通り行ってアセチル化度の違いを調べた。

3 - 3 結果と考察

ハプトースの主成分であるグルコースとキシロースの - OH 基をアセチル化し、その程度を Eberstadt 法を用いて測定した。

酢酸・無水酢酸法によるアセチル化

酢酸と無水酢酸を用いて粗ハプトースのアセチル化を試みた結果、

酢酸・無水酢酸法・・・1.34%

となり、アセチル化度が低く合成した粉末は容易に水に溶解した。

ピリジン・無水酢酸法によるアセチル化

ピリジン・無水酢酸法によるハプトースのアセチル化度の反応還流時間(4時間、8時間)依存性を調べた結果、

ピリジン・無水酢酸法(還流4時間)・・・6.35%

ピリジン・無水酢酸法(還流8時間)・・・16.13%

既報の論文より、最初は還流反応を4時間行っていたが、良い結果が得られなかった。そこで還流時間を延長した結果、高いアセチル化度を得ることができた。還流8時間で合成した粉末はイオン交換水に溶解しにくいものとなった。ハプトースを用いたアセチル化の還流条件については更なる研究が必要と思われる。

灰分除去を目的としたハプトースの精製

アセチル化がハプトースの純度に依存するかどうかを調べるため、灰分除去を目的としたハプトースの精製を行った。

粗ハプトース全糖量・・・3.55 mg/ml
精製ハプトース全糖量・・・5.17 mg/ml

上記の結果よりハプトースの糖含有量が増え精製されたことがわかった。このように得た精製ハプトースを用いてアセチル化を行った。

精製ハプトースを用いたアセチル化

ピリジン・無水酢酸法による精製ハプトースのアセチル化度の還流反応時間（4時間、8時間）依存性を調べた結果、

ピリジン・無水酢酸法（還流4時間）・・・14.14%
ピリジン・無水酢酸法（還流8時間）・・・8.6%

精製したことにより、還流反応4時間で高いアセチル化度を得ることができたが、還流反応を8時間と長くしたことにより逆反応が起きたと考えられ、アセチル化度が下がった。精製したことにより、還流時間4時間で水に溶けにくいアセチル化ハプトースの合成に成功したが、上記のアセチル化実験と同様に還流反応の最適条件を調査する必要があると思われる。

3 - 4 考察

現在、我々の生活に欠く事のできない物質であるプラスチックの代替として様々な生分解性プラスチックが作製され一部は既に市販されている。本研究で作製した *Phaeocystis* sp. のハプトースを原料としたプラスチックもそのような生分解性プラスチックに成長させたいと考えている。ハプトースのプラスチックの最適な作製工程は、糖として 1g のハプトースに 10% の KGM と 1% の XAN を加えイオン交換水に十分溶解した後、50 にて乾燥させ 100 、200 kg/cm²、20 分で加圧、加熱処理を行うのが最も良いという結果となった。この時原料とするハプトースを上記のアセチル化実験で合成したアセチル化ハプトースを使用すれば、強靱で水気に強い生分解性プラスチックが作製できると考えられる。そのプラスチックの試作品は完成しており、水気に強く強度も損なわれていないフィルム状プラスチックとなった。作製法は下記の通りである。まずアセチル化ハプトースを 1g 測り取り、アセチル化したことにより水に溶けにくくなったためアセトンに溶解し、これを上記の条件でプレス機にかけフィルム状とした。プレスすることによるプレス前のそれに比べ格段に水に溶けにくいものとなった。



写真：アセチル化ハプトースを用いたフィルム状プラスチック

プレス前のものは水に 1 時間くらいで溶解するのに比べプレス後は 1 日水中で攪拌しても細かくはなるものの溶解せず肉眼で確認することができた。プラスチックを実用化するにはこの耐水性のみならず、強度や靱性、屈曲性などの物性ととも加工性も考える必要がある。道のりは長いですが、更なる研究を重ねることにより間違いなく現在のプラスチックに代替し得るものが完成すると確信している。

総括

石油資源の枯渇が心配される今日において使い捨てるだけのプラスチックを石油資源を原料として作製することは避けるべきである。また、長期間安定性を持つ石油資源由来のプラスチックは環境保全の面からも使用を制限する必要がある。このような背景もあり我々の環境に対する関心は近年更に強くなってきている。日本では平成12年4月に包装容器リサイクル法が施行され、石油資源由来のプラスチックの使い捨ては減少傾向にある。この他にも家電、建築廃材等のリサイクル法、グリーン購入法等と環境保全に関する法が整備されてきている。そこで必要となってくるのが環境に負荷が少なく原料を枯渇資源に頼らない生分解性プラスチックの開発である。

現在、生物由来の様々なプラスチックが研究、開発されていて一部は既に市販されているものもある。微生物由来の高分子を用いた生分解性プラスチックも開発されている。しかし微生物の培養に手間がかかり培養に有機溶媒を必要とする。また、植物でんぷん由来の生分解性プラスチックが開発され市販されている。これは広大な土地でとうもろこしやじゃがいも等を大規模栽培し我々の食用、家畜の飼料にならなかった余剰農産物を利用したプラスチックだが、食べることのできるものをわざわざエネルギーと労力を使用し、使い捨てプラスチックにすることは奇妙である。いつれくるであろう人口爆発による食料難の際は今までプラスチックの原料としていた植物を食用として出荷するであろう。その時はまた植物に変わる新材料を開発する必要がでてくる。

こういった理由から、我々研究チームは海水を用いての大量培養が容易で太陽と二酸化炭素とある程度の養分で成長するハプト藻 *Phaeocystis* sp.に注目し、この海産性微細藻類を用いた生分解性プラスチックの研究、開発を行ってきた。しかし、工業化による大量生産を考えた時、解決しなくてはならない問題点が多く存在する。一つはコスト削減のために天日開放による *Phaeocystis* sp.の大量培養を行うことである。原料の処理工程をスムーズに行うために他の藻類のコンタミネーションを防ぐ必要がある。そのためにはイスラエルやメキシコなどで日

本の企業が行っているような高塩濃度培養液での藻体培養が考えられる。現在、2 倍の塩濃度海水で正常に生育する *Phaeocystis* sp. の高塩耐性株を分離した。

本研究で作製した生分解性プラスチックは十分な強度を持っており数種の高分子と混合することで様々な特性を持ったプラスチックができあがった。これは *Phaeocystis* sp. の藻体、ハプトースの新材料としての可能性を示唆しており、更なる多方面での活用が期待できる。そのためにもこのハプトースの更なる研究、開発が必要であり試験内容も JIS 規格等に沿った方法で行い具体的にその有用性を示していく必要がある。

現代社会は物で溢れている。それは人間が後先考えず便利だ、安価だという理由だけで大量に作り出してきた結果であり、その代償として環境破壊や資源枯渇という問題に直面している。ものを作るということは誰にでも容易にできることである。しかしそうやって開発された製品のほとんどは廃棄後のことを後から考えている。これから先、我々研究者は環境保全を念頭に置き、開発段階から作ったものが廃棄され埋め立てられたその後まで考えた研究、開発を行うべきであり、そこまで考える責任があるのではないだろうか。

謝辞

上述の実験研究を行いまとめるにあたり、御指導と御助力を賜った高知工科大学工学部物質・環境システム工学科長兼同大学院物質・環境システム工学コース長向畑恭男教授に厚く御礼申し上げます、ここに深く感謝の意を表します。また、本研究において有益なる御助言と御尽力をいただいた高知工科大学榎本恵一教授、大濱武教授、有賀修助教授、佐塚正樹講師、大阪教育大学生田享介助手に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、絶えずご協力いただいた森川彰氏、田中宣秀氏、関裕美氏、山下志津香氏、石川香織氏、江村英人氏、奥田聡氏、環境生物工学研究室の卒業生及び在籍する学生諸君に厚く御礼申し上げます。

参考文献

沖野哲 (1993): こんにゃくの科学

Kenji Maekaji(1973) : The Mechanism of Gelation of Konjac Mannan

食品に関するシンポジウム要旨集 (2000): 食品物性シンポジウム委員会

西成勝 (2001): 食品の物性とゾル ゲル転移

」