

# バイオプラスチックのモノマー生産に関する研究

照屋正映

生分解性を有する微生物由来脂肪族ポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)は、精製が困難であることから、そのモノマーである(R)-3-ヒドロキシ酪酸((R)-3HB)の生産が望まれている。本研究では、PHBの分解により(R)-3HBを得るため、PHBをアルカリ加水分解後、ブチルエステル化物とし、蒸留精製により3-ヒドロキシ酪酸ブチルを得ることができた。

## 1 はじめに

資源の枯渇、二酸化炭素排出による地球温暖化の問題などから、再生可能資源であるバイオマスを利用したバイオプラスチックの開発が望まれている。

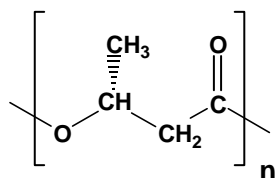


図1 ポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)

脂肪族のポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB) (図1) は、ある種の微生物がその菌体内に貯蔵物質として蓄積し、また、生分解性プラスチックとしての性質を有していることから、微生物による発酵生産が行われ始めている。しかし、発酵後の菌体からのPHB精製が困難であることから、成形加工時の加熱等により異臭を発生するなどの欠点がある。このことから、精製が容易な、PHBのモノマー(R)-3-ヒドロキシ酪酸((R)-3HB)を発酵生産する研究が盛んである<sup>1)2)</sup>いっぽう、菌体から抽出されるPHBをモノマーである(R)-3HBに分解し、高純度のモノマーを得た後、再度重合することにより高純度のPHBを得る方法も考えられる。この方法は、得られたモノマーをベースとして種々の共重合体合成への発展も期待できると同時に、使用済みPHB製品のケミカルリサイクル技術への適用も期待できる。

PHBを分解する方法としては、熱分解<sup>3)</sup>や酸加水分解<sup>4)</sup>、アルカリ加水分解<sup>4)5)</sup>、酵素分解<sup>6)</sup>による方法が報告されているが、熱分解では主にオリゴマーとクロトン酸(CA)が生成され、酸加水分解ではPHBが分解されず、また酵素分解では(R)-3HBへの分解は30%未満である(図2)。

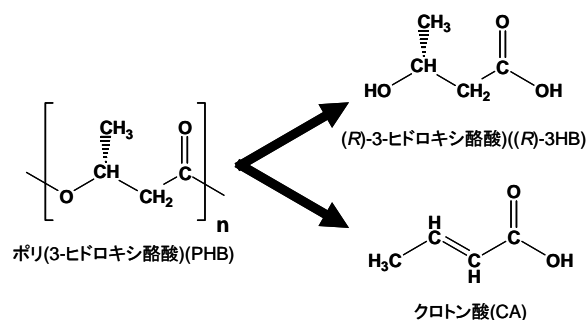


図2 PHBのアルカリ加水分解

アルカリ加水分解については、加水分解物中には(R)-3HBの他にCAが含まれ、特に加水分解温度を上げていくに従いCAの生成割合が増えていくことが報告されているが<sup>4)</sup>、分解後の加水分解物から(R)-3HBの回収・精製についての報告はなされていない。

本研究では、PHBから(R)-3HBを得ることを目的として、PHBをアルカリ加水分解し、加水分解物をエステル化後、蒸留することによって(R)-3HBエステルの回収を行った。

## 2 実験方法

### 2-1 試薬

PHBはシグマアルドリッチジャパン株式会社のものを、DL-3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムは東京化成工業株式会社のものを、クロトン酸、水酸化ナトリウム(特級)、硫酸(特級)、1-ブタノール(特級)、1,2-ジクロロエタン(特級)、炭酸水素ナトリウム(特級)、硫酸ナトリウム(特級)は和光純薬工業株式会社のものを用いた。

### 2-2 PHBのアルカリ加水分解

PHBを6M水酸化ナトリウム水溶液に分散させ、50℃で1時間アルカリ加水分解を行った。加水分解の進行は、10分毎に反応液から1mLを分注し、3M硫酸水溶液で中和した後、シリンジフィルタでろ過したものを高速液体クロマトグラフ分析(溶離液: 4mM過塩素酸水溶液、カラム: Shimpak SPR-H 250mm x 7.8mm φ、カラムオープン

温度：40℃、流速：0.6mL/min、検出器：示差屈折検出器）により、DL-3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムおよびCAを標品として分析した。加水分解終了後、6M 硫酸水溶液でpH7に調整した後、ろ過し、ろ液を減圧乾固させてPHBアルカリ加水分解物を得た。

### 2-3 PHB アルカリ加水分解物からのブチルエステル化による(R)-3HBの精製

2-2で得たPHBアルカリ加水分解物に1-ブタノールを加え、触媒として硫酸を加え、ディーンスタークトラップを装着したナス型フラスコで2~3時間、共沸脱水することによりブチルエステル化反応を行った。反応終了後、1,2-ジクロロエタン、蒸留水を加えて分液し、水層を除去後、有機層を再度蒸留水で分液し、水層を除去した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で有機層を洗浄した。洗浄後、水層を除去し、有機層に硫酸ナトリウムを加え、攪拌しながら脱水し、ろ過した後、エバポレーターで1,2-ジクロロエタンおよび1-ブタノールを除去し、淡黄色のPHBアルカリ加水分解物エステル化物を得た。

PHBアルカリ加水分解物エステル化物は、減圧蒸留により精製を行った。得られた留分については、核磁気共鳴スペクトル分析（日本電子270MHz、溶媒：重クロロホルム）により化合物を特定した。

## 3 実験結果および考察

### 3-1 PHBのアルカリ加水分解

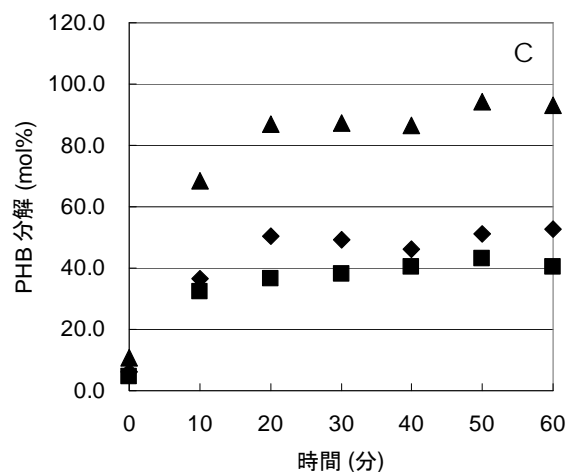
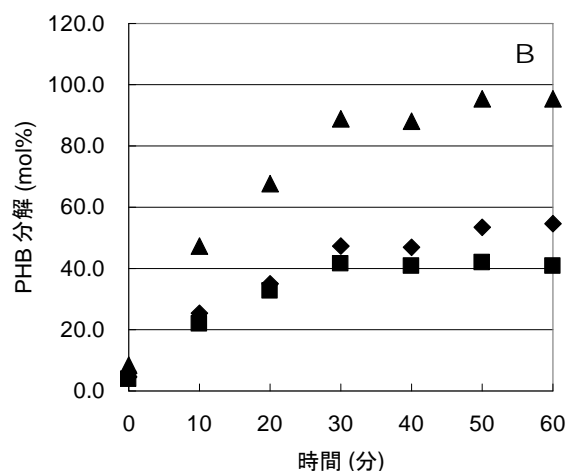
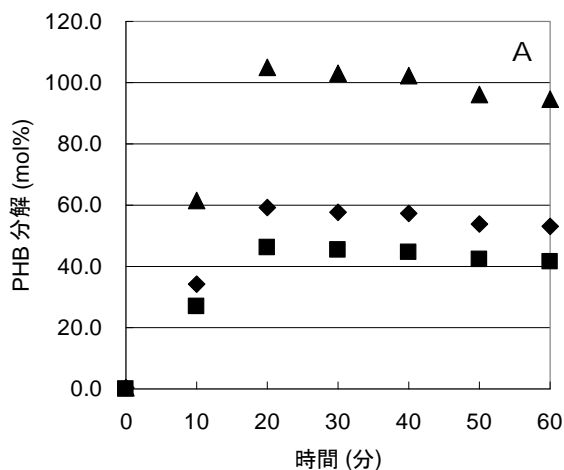


図3 PHBのアルカリ加水分解

A: 500mM、B: 750mM、C: 1000mM

▲: PHB全分解(mol%)、◆: PHB→3HB生成(mol%)、  
■: PHB→CA生成(mol%)

表1 PHBのアルカリ加水分解

	500mM	750mM	1000mM
PHB→3HB分解(mol%)	57.0	54.6	52.7
PHB→CA分解(mol%)	44.0	40.9	40.4
PHB全分解(mol%)	101.0	95.5	93.1
CA/3HB	0.77	0.75	0.77

図3、表1に各PHB濃度（(R)-3HB単位として）におけるアルカリ加水分解の挙動と最終的な分解率を示す。PHB濃度500mMでは、PHBは(R)-3HBとCAに100%分解し、これ以上の濃度（750mM, 1000mM）ではわずかに分解率が減少（96%(750mM), 93%(1000mM)）した程度であった。また、いずれの濃度においても20-30分の間でPHBの分解は完了しており、CAと(R)-3HBの生成比(CA/3HB)も、ほとんど変化がなかった。

### 3-2 PHB アルカリ加水分解物からのブチルエステル化による(R)-3HBの精製

2-3 で得られた PHB アルカリ加水分解物のエステル化物の減圧蒸留による精製を行ったところ、真空度 2.7kPa、沸点 105-112°C で無色透明の液体が得られた。得られた留分について <sup>1</sup>H-NMR 測定を行ったところ、スペクトルから 3-ヒドロキシ酪酸ブチルと同定した (図 4)。3 位の炭素の R 体、S 体の確認は行っていないが、Saeki らは、高温高压水中での PHB の加水分解を行い、190°C 以上から顕著なラセミ化が起きていると報告している<sup>7)</sup>。本研究では、アルカリ加水分解温度が 50°C、エステル化温度が 1-ブタノールの沸点付近での還流として 118°C 付近であり、ほとんどラセミ化は起こっていないと考えられ、今回合成した 3-ヒドロキシ酪酸ブチルは R 体で占められていると考えられる。

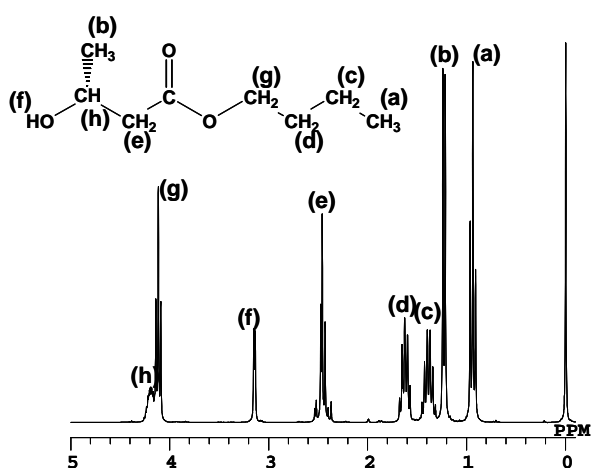


図 4 2.7kPa、105-112°C留分の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

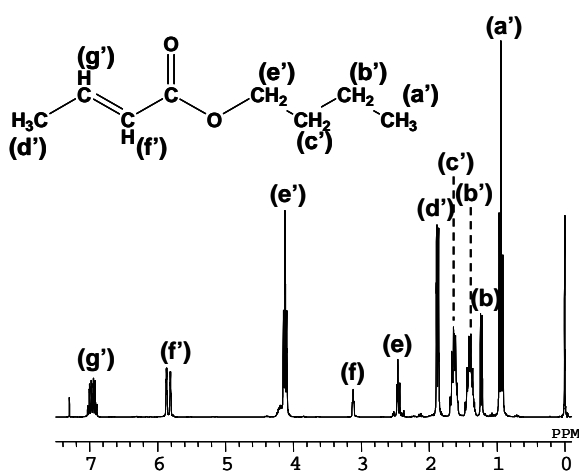


図 5 2.7kPa、88-90°C留分の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

次に、真空度 2.7kPa、沸点 88-90°C で無色透明の液体が

得られた留分について <sup>1</sup>H-NMR 測定を行ったところ、既知スペクトル<sup>8)</sup>との比較によりクロトン酸ブチルが確認できたが、3-ヒドロキシ酪酸ブチルのシグナル (b)、(e)、(f) も若干見られ 3-ヒドロキシ酪酸ブチルの混入が示唆される (図 5)。CA やそのエステルは合成化学の原料や化粧品原料、食品添加物、香料、またゴムなどの軟化剤として利用が可能であり、クロトン酸ブチルについても高純度を得るための蒸留条件の検討が必要と考えられる。

### 4 まとめ

PHB アルカリ加水分解を、PHB 濃度を変化させて行ったところ、分解率がわずかに減少するのみで PHB アルカリ加水分解物として (R)-3HB と CA が生成し、その生成比に変化はなかった。PHB アルカリ加水分解物をブチルエステル化物とした後、減圧下、蒸留精製し、無色透明の液体を得、<sup>1</sup>H-NMR 分析より 3-ヒドロキシ酪酸ブチルと同定した。3-ヒドロキシ酪酸ブチル留出の前に、無色透明の液体を得、<sup>1</sup>H-NMR 分析よりクロトン酸ブチルと同定できたが、3-ヒドロキシ酪酸ブチルの混入も確認され、蒸留条件の検討が必要であることがわかった。

本研究は「バイオマスの微生物による処理技術の研究 (2009 技 005)」の一環として行ったものである。

### 謝辞

本研究は、独立行政法人産業技術総合研究所の平成 22 年度地域産業活性化支援事業において行いました。研究遂行に当たり御協力いただきました独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門生体物質工学研究グループ相羽誠一主任研究員に感謝致します。

### 参考文献

- 1) C. U. Ugwu, Y. Tokiwa, H. Aoyagi, H. Uchiyama, H. Tanaka, UV mutagenesis of *Cupriavidus necator* for extracellular production of (R)-3-hydroxybutyric acid, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 236-242(2008)
- 2) Hai-Jun Gao, Qiong Wu, Guo-Qiang Chen, Enhanced production of D-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 213, 59-65(2002)
- 3) Hiromichi Morikawa, Robert H. Marchessault, Pyrolysis of bacterial polyalkanoates, *Canadian Journal of Chemistry*, 59, 2306-2313(1981)
- 4) Jian Yu, David Plackett, Lilian X. L. Chen, Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and

alkaline conditions, *Polymer Degradation and Stability*, 89, 289-299(2005)

5) Yue Cui, John P. Barford, Reinhard Renneberg, Determination of Poly(3-hydroxybutyrate) Using a Combination of Enzyme-based Biosensor and Alkaline Hydrolysis, *ANALYTICAL SCIENCES*, 22, 1323-1326(2006)

6) Buenaventurada P. Calabia, Yutaka Tokiwa, A novel PHB depolymerase from a thermophilic *Streptomyces* sp., *Biotechnology Letters*, 28, 383-388(2006)

7) Takashi Saeki, Takayuki Tsugeki, Hideo Tsuji, Hiroyuki Daimon, Koichi Fujie, Hydrolytic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] in the melt, *Polymer*, 46, 2157-2162(2005)

8) SDBSWeb : <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2011 年 8 月 24 日)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。