

The 13th SPSJ International Polymer Conference に参加して

西村 天真

Tenma NISHIMURA

物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は2023年7月18日から21日にかけ、北海道の札幌コンベンションセンターで開催された「The 13th International Polymer Conference」に参加し、「Each Molecular Weight of Block Copolymer for P3HA Biosynthesized by *P. putida*」というタイトルでポスター発表を行った。

2. 発表内容

2.1 研究背景

Poly (3-hydroxyalkanoate) (P3HA) はエネルギー貯蓄物質として多様な微生物中に蓄積されるバイオポリエステルであり、菌体 *Pseudomonas putida* (*P. putida*) に炭素源として脂肪酸を与えると、繰り返しユニットの炭素数が5-12の中鎖長 P3HA が生合成される。また、本研究室では、菌体 *Ralstonia eutropha* を用いて、第一の炭素源を含む培養液で培養後、菌体と培養液を分離して第二の炭素源で培養することで、ブロック共重合体を生合成できることを示した。そこで、本研究では、菌体 *P. putida* に第一の炭素源として奇数鎖炭素脂肪酸であるノナン酸、第二の炭素源として偶数鎖脂肪酸であるデカン酸を用いたときの、ブロック共重合体の生合成および各ブロックの分子量変化について検討した。

2.2 実験操作

P. putida (JCM No.6160) を N free の無機培地と第一の炭素源であるノナン酸 5mmol に加えて 26℃, 120rpm で振とう培養した。再び遠心分離を行ってから N free の無機培地と第二の炭素源である

デカン酸 5mmol を加えて 26℃, 120rpm で振とう培養し、24h の凍結乾燥後に、クロロホルムで菌体内のポリマーを抽出した。得られた試料については、ノナン酸での培養時間を x 時間、デカン酸での培養時間を y 時間として、Nx-Dy と表す。

2.3 結果と考察

脂肪酸による生合成では、 β 酸化により偶数脂肪酸からは偶数炭素ユニット、奇数脂肪酸からは奇数炭素ユニットの P3HA が生合成できるため、ノナン酸を用いた時は 3HV (C=5), 3HHp (C=7), 3HN (C=9) が、デカン酸を用いた時は 3HHx (C=6), 3HO (C=8), 3HD (C=10) が生合成され、この2つのブロック共重合体になっている。13C NMR のメチル炭素は異なる化学シフトを与えるので各ピーク面積を用いて以下の式によりブロック分率を求めた。

デカン酸由来の P3HA の分率＝

$$\frac{\text{偶数炭素ユニットのメチル基ピーク面積}}{\text{全ユニットのメチル基の合計ピーク面積}}$$

ノナン酸由来の P3HA の分率＝

$$\frac{\text{奇数炭素ユニットのメチル基ピーク面積}}{\text{全ユニットのメチル基の合計ピーク面積}}$$

ノナン酸での培養時間を 72h に固定し、デカン酸での培養時間を変化させた時の各ブロック分率を図1に示した。デカン酸での培養時間が長くなるにつれノナン酸由来の P3HA の分率は小さくなり、デカン酸由来の P3HA の分率は大きくなった。これは、第二の炭素源での培養時間が長くなるにつれて、ノナン酸由来の P3HA がエネルギー源として代謝される一方、デカン酸由来の P3HA は蓄積だけされていることを示している。

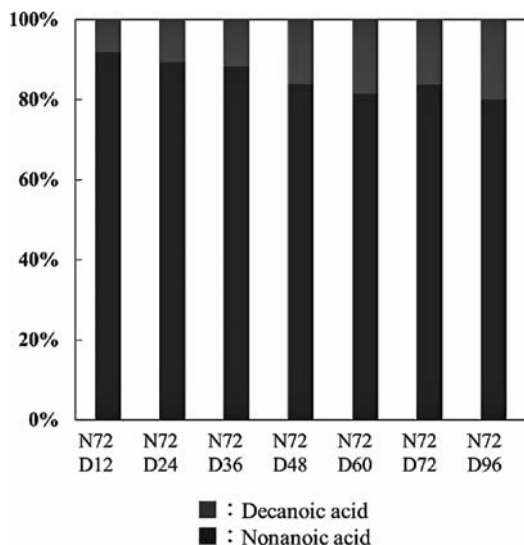


図1 ノナン酸での培養時間を72時間に固定し、デカン酸での培養時間を変えた時のブロック分率

次に、SECにより各培養時間におけるP3HAの数平均分子量(M_n)を測定し、 ^{13}C NMRより求めた各炭素源由来のP3HAの分率をかけてそれぞれのブロックの分子量を図2に示した。デカン酸での培養時間によらず全体の分子量はほぼ一定となった。また、デカン酸由来のP3HAの分子量は大きくなっているのに対して、ノナン酸由来のP3HAの分子量は小さくなった。

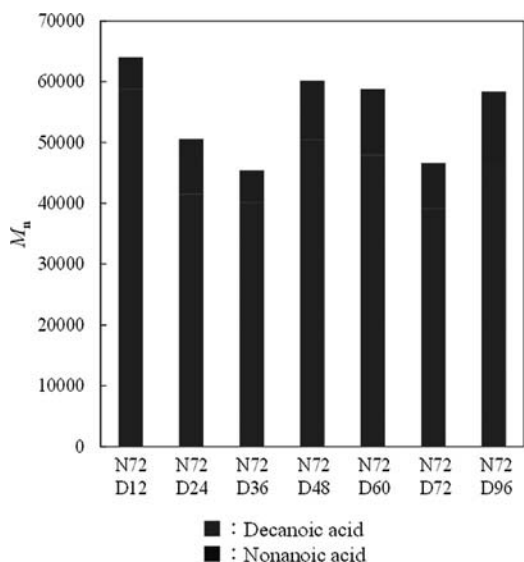


図2 各試料の数平均分子量

図3で各ブロックの分子量をデカン酸での培養時間に対してプロットした。デカン酸での培養時間が長くなるにつれてノナン酸から生合成されたP3HAの分子量は減少し、デカン酸から生合成されたP3HAの分子量は増加した。また、ノナン酸から生合成されたP3HAの分子量の傾きより消費速度、デカン酸から生合成されたP3HAの分子量の傾きより重合速度が求められる。

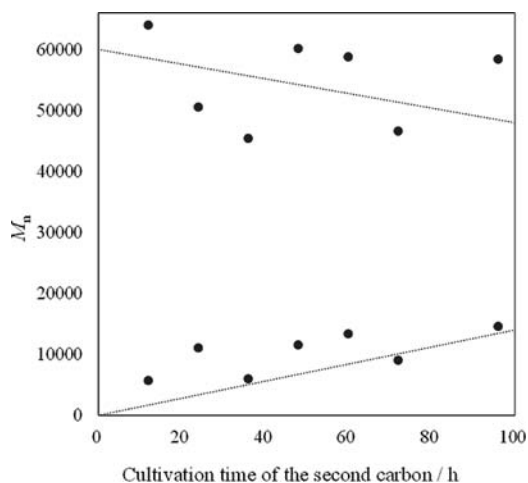


図3 各ブロックの分子量のデカン酸での培養時間依存性

ノナン酸由来のP3HAは約120/hで減少し、デカン酸由来のP3HAは約140/hで増加していることが分かった。これより、デカン酸由来のP3HAの増加速度とノナン酸由来のP3HAの消費速度がほぼ同じであるため、全体の分子量が一定になったと考えられる。