

微生物産生ポリエステルを用いた  
高強度フィルムおよび繊維の作製と  
大型放射光による高次構造解析

2012年3月

東京大学大学院農学生命科学研究科 (博士後期課程)  
生物材料科学専攻 高分子材料学研究室 (指導教員 岩田忠久)

加 部 泰 三

## 論文要旨

現在、プラスチックは生活に欠かすことのできない材料であるが、石油価格の高騰による原料調達問題、埋め立てや焼却などの最終処分が環境に与える負荷、コスト等から、再生可能資源であるバイオマス由来の材料で代替することが望まれている。

ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB))は微生物が糖や植物油からエネルギー貯蔵物質として生体内で生合成する、熱可塑性プラスチックである。また、P(3HB)は自然環境中の微生物によって分解されるため、環境循環型材料として注目を集めている。しかしながら、近年まで P(3HB)は硬くて脆い性質を示すため、材料として注目されていなかった。しかし、超高分子量 P(3HB)の生合成と延伸法の開発により、P(3HB)の物性は劇的に上昇し、P(3HB)は材料として注目を浴びるようになった。しかしながら、超高分子量 P(3HB)は高密度培養することが難しい。したがって、今後 P(3HB)を材料として普及させることを考えると、優れた性質を有する超高分子量 P(3HB)を効率的に使用し、生産性の高い野生株産生 P(3HB)を主体とする高強度フィルムおよび繊維の開発が求められる。一方、高強度化がなされた P(3HB)材料は二つの結晶構造が存在することが知られている。一つは、熔融結晶化や冷結晶化など通常の結晶化手法で形成される 21 へリックス構造( $\alpha$  構造)であり、もう一方は、延伸した P(3HB)中でのみ検出される平面ジグザグ構造( $\beta$  構造)である。 $\beta$  構造については熱的挙動などについての報告が非常に少ない。

本論文では、野生株産生 P(3HB)を主体とし、生産性と高物性を兼ね備えた P(3HB)材料の作製、 $\beta$  構造を有する高強度化されたフィルムの熔融過程の高次構造解析、および、新規の延伸法であるゲルフィルム延伸について詳細に研究を行った。

第一章 「序論」では、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]およびこの共重合体に対する既存の研究を紹介するとともに、本論文の目的を述べた。

第二章 「野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に少量の超高分子量 P(3HB)を添加し、高強度なフィルムの作製を試み

た。超高分子量 P(3HB)が熱的特性、結晶化挙動に与える影響を調べた結果、超高分子量を添加しても球晶成長速度に影響はないが、半結晶化時間が上昇しており、このことから、超高分子量 P(3HB)は核剤の様に振る舞うことが分かった。その後、P(3HB)フィルム、超高分子量 P(3HB) /P(3HB) =5/95 ブレンドフィルム、10/90 ブレンドフィルムおよび超高分子量 P(3HB)フィルムに対して冷延伸法を適用し、高強度フィルムの作製を検討した。冷延伸を適用したところ、超高分子量 P(3HB)フィルムを除くサンプルは 12 倍まで延伸することが出来たが、超高分子量 P(3HB)は 10 倍までしか延伸することができなかった。これは超高分子量 P(3HB)が有する、絡まり合いの多さが原因だと考えられる。各サンプルの最大強度は、P(3HB)、5/95 ブレンド、10/90 ブレンド、超高分子量 P(3HB)の順にそれぞれ 161、242、211、191 MPa であり、特に 5/95 ブレンドは P(3HB)の 1.5 倍、超高分子量 P(3HB)の 1.3 倍の引張強度を有していた。大型放射光 X 線を用いた高次構造解析を行った結果、ブレンドフィルムは一段階延伸にもかかわらず  $\beta$  構造が発現していた。さらに  $\beta$  構造の相対量と引張強度の間には相関がみられた。高次構造解析の結果から、高次構造モデルを構築した。

第三章 「野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に少量の超高分子量 P(3HB)を添加し、熔融紡糸条件の最適化と一段階および二段階冷延伸を適用することで汎用高分子繊維に匹敵する高強度繊維の作製を試みた。GPC による熱分解挙動の測定結果から、超高分子量 P(3HB)の添加によって熱分解速度が抑制されることが分かった。冷延伸を施した結果、超高分子量 P(3HB)を添加したブレンド繊維の強度は、一段階および二段階で 530 MPa、および 740 MPa まで改善されており、ポリエチレンテレフタレート繊維並みの強度を有する高強度繊維を作製することが出来た。大型放射光 X 線回折測定の結果から、超高分子量 P(3HB)の添加は、超高分子量 P(3HB)を添加していない P(3HB)と比較して、 $\beta$  構造の発現量および配向度の上昇を促すことが明らかとなった。

第四章 「P(3HB)の  $\beta$  構造における熱的性質と熔融過程の詳細な高次構造解析」では、 $\beta$

構造が存在するフィルム( $\beta$  フィルム)に対して、大型放射光を用いた昇温リアルタイム X 線測定を行い、 $\beta$  構造の昇温過程での高次構造変化について詳細な分析を行った。昇温リアルタイム広角 X 線解析の結果から、 $\beta$  構造は 110 °C 付近から減少し始め、130 °C で完全に消失した。 $\alpha$  構造のみで形成されるフィルム( $\alpha$  フィルム)が温度の上昇と共に結晶由来のピークの減少を伴うのに対して、 $\beta$  構造を含んだフィルムは結晶由来のピークが上昇し、120 °C 付近から急激な結晶化を示した。昇温リアルタイム小角 X 線散乱図において、 $\alpha$  フィルムは 120 °C 付近から温度の上昇と共に長周期の上昇をおこしていた。これはラメラ結晶の再結晶化によるものである。一方、 $\beta$  フィルムは 120 °C 付近で長周期が一度減少しており、その後 140 °C において増加することが分かった。これは  $\beta$  構造が熔融後  $\alpha$  構造に転移し、その時の収縮力によりラメラ結晶が動いているためであると考えられる。DSC 測定の結果と合わせて、 $\beta$  構造を含む P(3HB)延伸フィルムの熔融モデルを構築した。

第五章 「微生物産生ポリエステルを用いたゲルフィルムの作製、物性および高次構造」では、高強度フィルムおよび高強度高柔軟性フィルムを作製することを目的として、新規の延伸法であるゲル延伸法を超高分子量 P(3HB)および P(3HB)共重合体に適用した。サンプルには超高分子量 P(3HB)あるいは柔軟性の高い P(3HB)共重合体である P(3HB-co-3HH)を選択した。貧溶媒とポリマーを加熱することで溶解させ、急冷することでゲルを作製した。このゲルを乾燥させてゲルフィルムとし、延伸を施すことで高強度化を試みた。超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムは非常に脆く、延伸することが難しかった。P(3HB-co-3HH)は室温での延伸が可能であった。P(3HB-co-3HH)延伸ゲルフィルムおよび P(3HB-co-3HH)延伸キャストフィルムの強度は 151 MPa と 103 MPa であり、高強度化することが出来た。また、延伸前、延伸後、延伸熱処理後のフィルムに対して大型放射光 X 線測定を行い、延伸過程の高次構造変化について詳細な分析を行った。

第六章 「総括」では、本研究の成果を総括するとともに、今後の研究課題や将来展開についてまとめた。



目次

第一章 序論

1-1	はじめに	2
1-2	ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]	4
1-2-1	P(3HB)の生合成経路と超高分子量 P(3HB)の生合成	5
1-2-2	P(3HB)の熱的および機械的性質	6
1-2-3	P(3HB)における二種類の分子鎖および結晶構造	6
1-2-4	P(3HB)の酵素分解性	8
1-2-5	P(3HB)の高強度化	8
1-3	P(3HB)共重合体の特徴とその物性	9
1-4	本研究の目的	10
	参考文献	12

第二章 野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量 P(3HB)の添加効果

2-1	緒言	17
2-2	実験	19
2-2-1	試料	19
2-2-1-1	超高分子量 P(3HB)の生合成	19
2-2-2	分子量測定	20
2-2-3	ブレンドフィルムおよび冷延伸ブレンドフィルムの調製	21
2-2-4	熱的性質の測定	21
2-2-5	球晶成長速度測定	21
2-2-6	半結晶化時間の測定	22
2-2-7	引張試験および長期安定性評価	22
2-2-8	大型放射光を用いた広角および小角 X 線測定	22
2-2-9	酵素分解試験	23
2-3	結果および考察	24

2-3-1	分子量測定	24
2-3-2	熱的性質の測定	24
2-3-3	球晶成長速度と半結晶化時間	25
2-3-4	引張試験および長期安定性評価	28
2-3-5	広角 X 線回折測定	30
2-3-6	小角 X 線散乱測定	34
2-3-7	ブレンドフィルムにおける $\beta$ 構造発現モデル	36
2-3-8	ブレンドフィルムの酵素分解性	38
2-4	結言	39
	参考データ	40
	参考文献	46

### 第三章 P(3HB)繊維における紡糸条件の最適化と超高分子量 P(3HB)の添加効果

3-1	緒言	50
3-2	実験	52
3-2-1	試料	52
3-2-2	分子量変化の測定	52
3-2-3	熔融条件の検討	52
3-2-4	冷延伸温度の検討	53
3-2-5	一段階冷延伸の検討	53
3-2-6	二段階冷延伸繊維の作製	53
3-3	結果および考察	54
3-3-1	熔融紡糸後の分子量	54
3-3-2	熔融条件と引張強度	56
3-3-3	引張強度に対する冷延伸温度の影響	59
3-3-4	一段階冷延伸の強度および高次構造	60
3-3-5	二段階冷延伸の強度および高次構造	63
3-4	結言	66
	参考データ	67
	参考文献	70

#### 第四章 P(3HB)の $\beta$ 構造における熱的性質と溶融過程の詳細な高次構造解析

4-1	緒言	73
4-2	実験	74
4-2-1	試料	74
4-2-2	昇温リアルタイム広角および小角 X 線測定	74
4-2-3	DSC 測定	75
4-3	結果および考察	76
4-3-1	広角 X 線回折測定	76
4-3-2	昇温リアルタイム広角 X 線回折測定	77
4-3-3	小角 X 線散乱測定	83
4-3-4	昇温リアルタイム小角 X 線回折測定	84
4-3-5	高速 DSC 測定	91
4-3-6	溶融過程におけるフィルムの高次構造	93
4-4	結言	95
	参考文献	96

#### 第五章 微生物産生ポリエステルを用いたゲルフィルムの作製、物性および高次構造

5-1	緒言	98
5-2	実験	101
5-2-1	超高分子量 P(3HB)ゲルフィルム	101
5-2-1-1	超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムの作製と延伸熱処理	101
5-2-1-2	引張試験	101
5-2-1-3	広角および小角 X 線回折測定	101
5-2-2	P(3HB-co-3HH) ゲルフィルム	101
5-2-2-1	P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムの作製と延伸熱処理	101
5-2-2-2	走査型電子顕微鏡観察	102
5-2-2-3	引張試験	102
5-2-2-4	P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムに対する X 線回折測定	102
5-2-2-5	酵素分解試験	103
5-3	結果および考察	104

5-3-1	超高分子量 P(3HB)ゲルフィルム	104
5-3-1-1	ゲルフィルム作製における溶媒選択	104
5-3-1-2	UHMW-P(3HB)ゲルフィルムの熱ピン延伸法と機械的性質	105
5-3-1-3	高次構造解析	106
5-3-2	P(3HB-co-3HH)ゲルフィルム	109
5-3-2-1	ゲルフィルム作製における溶媒選択	109
5-3-2-2	表面観察室温延伸および機械的性質	109
5-3-2-3	ゲルフィルムの高次構造解析結果	111
5-3-2-4	延伸過程で起こるゲルフィルムの高次構造変化モデル	115
5-3-2-5	ゲルフィルムの酵素分解性	117
5-4	結言	118
	参考文献	119
第六章 総括		121
発表論文リスト		126
謝辞		127

# 第一章

## 序 論

## 1-1 はじめに

現在、我々の生活においてプラスチックは欠かすことの出来ない材料となっている。プラスチックは、軽く、強度、成形性、耐食性に優れているため、包装容器、筐体材料、構造部材、工業材料など様々な用途で使用されている。Figure 1-1 に日本が生産および排出するプラスチックの年間推移を示す。わが国では2000年代から毎年1400万t前後のプラスチックを生産し、一般使用(放送・容器、コンテナ、家庭用品、衣類、家具)および産業系使用(電気・電子、機器・電線ケーブル、包装・容器、コンテナ、輸送、生産・加工ロス)を合わせて1000万t前後のプラスチック廃棄物を排出している(プラスチック処理促進協会)。この廃棄プラスチックのうち、24%はリサイクルされるものの、63%が焼却され、残りの13%は埋め立てられている(Figure 1-2)(プラスチック処理促進協会, 2011)。焼却処分時には、有害ガスや温室効果ガスなどによる環境負荷や焼却施設の維持コストが大きくかかる。同様に埋め立ては最終処分地の確保が非常に難しい。また、埋め立ての割合は10%であるが、プラスチックは土壌中で分解されないため毎年積算されていくことが問題である。一方、プラスチックの原料である原油に注目すると、年を追うごとに価格が上昇している(Figure 1-3)。特に1990年代と比較すると原油の輸入価格は2倍以上となり安定的な供給に支障が出ている。これは、投機などによる価格のつり上げと発展途上国の石油使用量の増加が原因である。

このように石油を原料とする石油由来プラスチックは環境問題および資源調達問題を抱えており、石油由来プラスチックのみに依存していくことは好ましくない。これらを解決しうる材料としてバイオマス由来のプラスチックがある。これは主に木材、穀物、植物油、牧草等を原料とし、糖(グルコースやスクロース)に変換された後、微生物発酵や化学合成によって重合されるプラスチックである。バイオマスプラスチックは石油の高騰や環境意識の高まりなどを受けて、積極的に研究・開発・推進が行われている材料である。

このようなバイオマスプラスチックの中でも、自然環境中で分解する生分解性を有するプラスチックは環境に与える負荷が低い材料として注目を集めている。これは、生分解されたプラスチックが、水や二酸化炭素などまで分解された後、バイオマスの形成過程で炭素源として取り込まれるため、炭素が循環し、環境に与える負荷が低いためである。持続可能な社会を形成していく上で、生分解性を有しバイオマスから作られる環境

循環型材料の研究・開発は非常に重要である。このような環境循環型の材料として代表的なものとして、化学合成によって重合されるポリ乳酸(PLA)、ポリアミノ酸、化学修飾によって作られる修飾多糖、そして微生物によって生産される微生物産生ポリエステルが挙げられる。

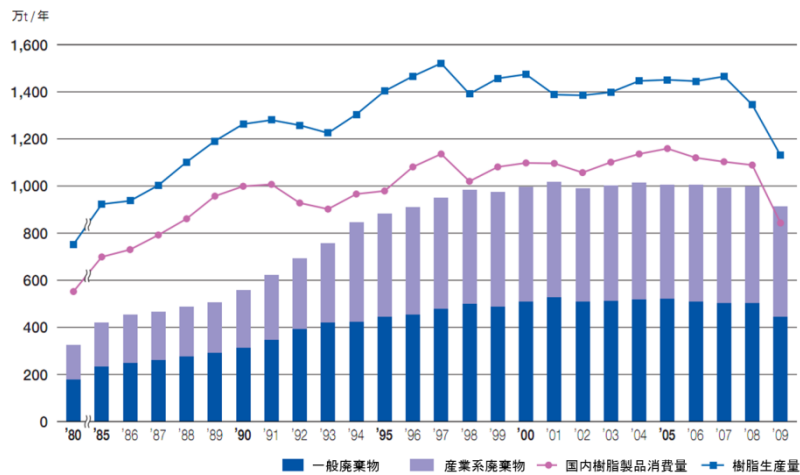


Figure 1-1 Transition of discarded plastic amount.

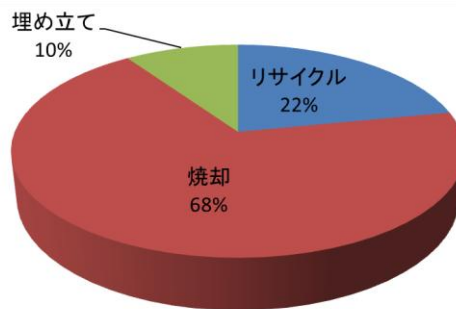


Figure 1-2 Final disposal method of plastic.

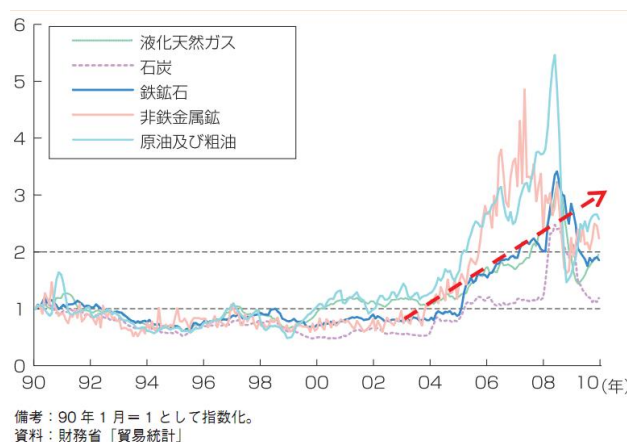


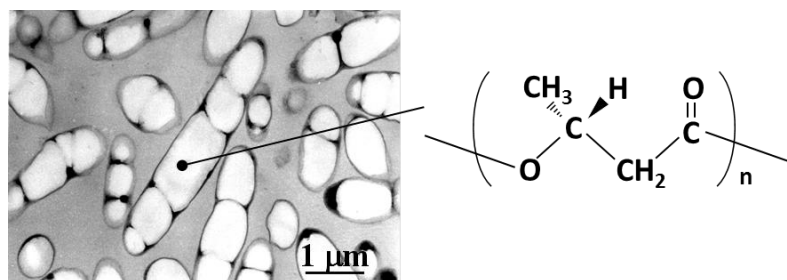
Figure 1-3 The changing prices of various petroleum products.

## 1-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]

微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシヘキサノエート(PHA)は、125 種類以上のグラム陰性菌、グラム陽性細菌および古細菌中で発見されており(Rehm, B. H. A. and Steinbuchel, A., 1999)、人間の脂肪に相当するエネルギー貯蔵物質である(Brandl, H. *et al.*, 1990; Forsyth, W. G. C. *et al.*, 1958)。ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB)) (Figure 1-4)は、PHA の代表的なポリマーであり、熱可塑性を有する立体規則性ポリマーである(Madison, L. L. and Huisman, G. W., 1999)。このポリマーが初めて確認されたのは1926年、フランスの Lemoigne らによって、3-ヒドロキシブタン酸のホモポリマーとして記述されている(Lemoigne, M., 1926; Lemoigne, M., 1927)。その後、多くの研究者たちにより微生物種の違いや、与える炭素源の違いによって、異なる P(3HB)共重合体が生産されると報告されている ((Lenz, R. W. and Marchessault, R. H., 2005; Steinbuchel, A. and Valentin, H. E., 1995; Sudesh, K. *et al.*, 2000; Suriyamongkol, P. *et al.*, 2007)。

P(3HB)について、生産性向上を目的とした研究もなされており、炭素源としてグルコースを用い、遺伝子組み換え微生物に用い、乾燥菌体重量あたり 80 %の P(3HB)を含有することに成功した報告がなされている(Holmes, P. A., 1985)。また、工業スケールでの生産なども研究されてきた(Byrom, D., 1987)。

一方、物性について研究され始めた時期は遅く、材料として報告されたのは1980年代からである(Barham, P. J. *et al.*, 1984; Grassie, N. *et al.*, 1984)。その後、高性能化研究が行われた結果 2000 年代では、バイオリファイナリーを支える生分解性を有する高付加価値材料として注目が集まっている(Snell, K. D. and Peoples, O. P., 2009)。



**Figure 1-4** The TEM image of microorganism-included PHA and chemical structure of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]



### 1-2-1 P(3HB)の生合成経路と超高分子量 P(3HB)の生合成

微生物がグルコースなどの炭素源を取り込むと、解糖系によりアセチル-CoA にまで代謝される。通常 acetyl-CoA は TCA サイクルに入り、細胞分裂や生命活動の維持に利用されるが、窒素やリン成分が制限された状態で、アセチル-CoA は、 $\beta$ -ケトチオラーゼ(pha A)により二量体化し、アセトアセチル-CoA になる。さらに、アセトアセチル-CoA は NADPH 依存性アセトアセチル-CoA レダクターゼ(pha B)による立体特異的還元を経てモノマーである(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA となり、P(3HB)シンターゼ(ポリエステル重合酵素)(pha C)により重合され、P(3HB)が顆粒状に菌体内に合成される(Anderson, A. J. and Dawes, E. A., 1990; Doi, Y., 1990; Verlinden, R. A. J. *et al.*, 2007)(Figure 1-5)。

Kusaka らは *Alcaligenes eutrophus* 由来の PHB 合成酵素遺伝子 *phb CAB* を導入したアンシピリン耐性遺伝子組み換え大腸菌 *Escherichia coli* XL-1 Blue(pSYL105)を酸性条件下(pH=6)で培養することで超高分子量 P(3HB)の生合成に成功した(Kusaka, S. *et al.*, 1997)。また、培養環境を pH6.5 から 7.0 の間で変化させた結果、重量平均分子量  $11 \times 10^6$  から  $1.1 \times 10^6$  の間の異なる分子量を有する超高分子量 P(3HB)の生合成を報告している(Kusaka, S. *et al.*, 1998)。

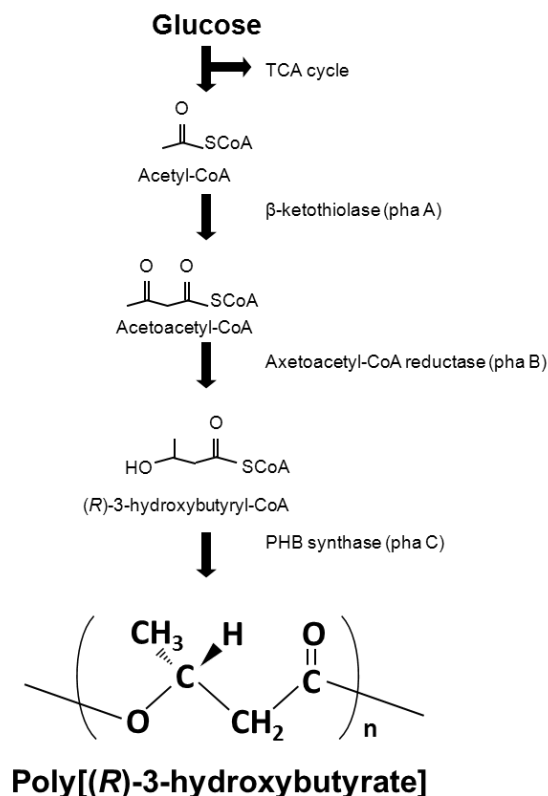


Figure 1-5 Metabolic pathway of biosynthesis for poly[(R)-3-hydroxybutyrate]

### 1-2-2 P(3HB)の熱的および機械的性質

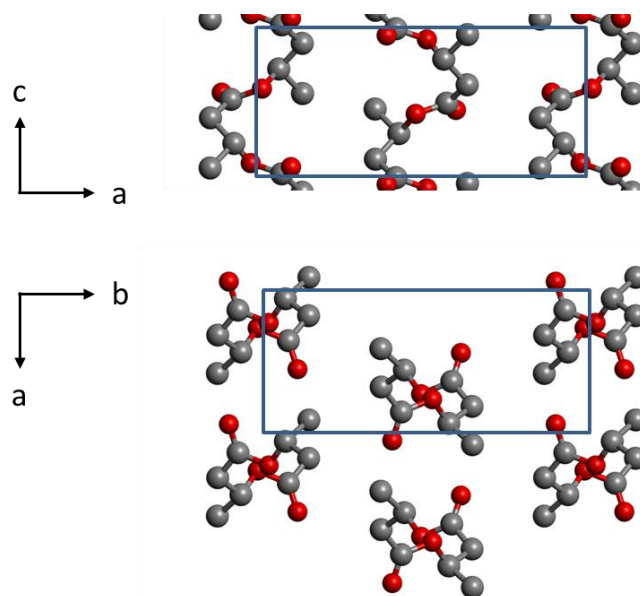
P(3HB)は、融点 180 °C、ガラス転移点 4 °C を有する熱可塑性プラスチックである。熱分解温度(熱によりポリマーが分解しガスになり始める温度)は 260 °C 付近であり(Kim, K. J. *et al.*, 2006)、膨張率から計算した非晶質 P(3HB)の密度は 1.177 g/cm<sup>3</sup>(Barham, P. J. *et al.*, 1984)、X 線測定より算出された P(3HB)結晶の密度は 1.260 g/cm<sup>3</sup> である(Okamura, K. and Marchessault, R. H., 1967)。P(3HB)は結晶性が高く、ガラス転移点が室温以下であるため、常温下で二次結晶化を起こし、経時劣化を起こすことが知られている(Biddlestone, F. *et al.*, 1996; Dekoning, G. J. M. *et al.*, 1992)。例えば、成型直後は 40 % 前後の破壊伸びを有しているが、二次結晶化により 10 時間後で 30 %、150 日後では 10 % 以下まで低下する(Dekoning, G. J. M. and Lemstra, P. J., 1993)。したがって、フィルム形状での引張強度、破壊伸び、弾性率の値は 10 MPa、5 %、0.5 GPa 程度であり、硬くて脆い材料である。

### 1-2-3 P(3HB)における二種類の分子鎖および結晶構造

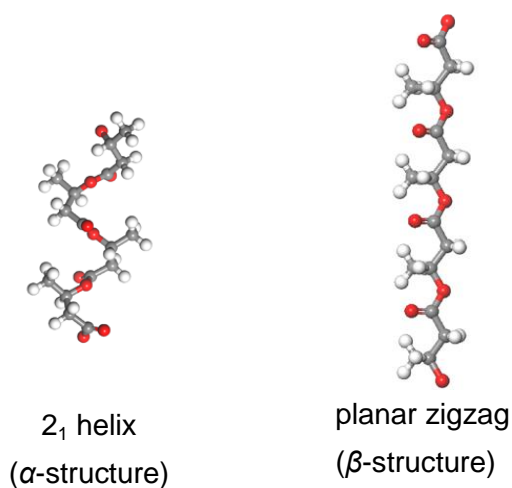
現在、P(3HB)の結晶構造は二種類あると考えられている。一つは、2 回らせん構造をとる分子鎖から形成される  $\alpha$  構造である。 $\alpha$  構造は通常の熔融結晶化によって形成されるラメラ結晶を構成する構造であり、P(3HB)の最も安定な構造である。P(3HB)における  $\alpha$  構造は、格子定数 :  $a = 0.576$  nm、 $b = 1.320$  nm、 $c$  (繊維軸) = 0.596 nm、空間群 :  $P2_12_12_1$  を採り、単位格子中に 2 残基からなる逆平行鎖な 2 本の分子鎖を有し、全ての結晶軸に対し 2 回らせん( $2_1$  ヘリックス)の対称性を有する斜方晶系(orthorhombic lattice)である(Okamura, K. and Marchessault, R. H., 1967; Yokouchi, M. *et al.*, 1973) (Figure 1-6)。

もう一方は、平面ジグザグ構造の分子鎖を採る  $\beta$  構造である。 $\beta$  構造は、Orts らによって P(3HB)共重合体であるポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシバリレート]の冷延伸を施されたフィルム中で初めて報告された(Orts, W. J. *et al.*, 1990)。その後、P(3HB)および P(3HB)共重合体で発見されているが、ほとんどのサンプルが延伸されており、高い引張強度を示す(Fischer, J. J. *et al.*, 2004; Iwata, T. *et al.*, 2003; Yamane, H. *et al.*, 2001)。このため、 $\beta$  構造の発現が高強度化の原因と関係あるのではないかと考えられている。しかし今のところ、 $\beta$  構造の結晶構造は解明されていない。これは、広角 X 線回折測定における  $\beta$  構造由来の反射が赤道線上に一つと、わずかな層線上の回折のみに留まっているためである。

これまで、 $\beta$ 構造の発現は二段階延伸(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003)や微結晶核延伸法(Tanaka, T. *et al.*, 2007)などの一度ラメラ結晶を形成させ、さらに延伸を施す方法で発現している。このことから、ラメラ結晶間の非晶質領域に存在するタイ分子鎖が延伸されることで発現すると考えられている。(Iwata, T. *et al.*, 2005)。



**Figure 1-6** The crystal structure of  $\alpha$ -form P(3HB) ( $a = 0.576$  nm、 $b = 1.320$  nm、 $c$  (fiber axis) =  $0.596$  nm).



**Figure 1-7** Two kinds of molecular conformations: left and right schematic indicates  $2_1$  helix conformation ( $\alpha$ -form) and planar zigzag conformation ( $\beta$ -form), respectively.

#### 1-2-4 P(3HB)の酵素分解性

P(3HB)は、微生物の分泌する酵素によって自然環境中で加水分解することが知られている。P(3HB)の分解酵素は、微生物が菌体内で使用する菌体内酵素と、体外に分泌される菌体外酵素に大きく分類することが出来る。菌体内酵素は微生物内の非晶質 P(3HB)に活性を示し、菌体外酵素は結晶化した P(3HB)にも活性を示す。一般的に、P(3HB)分解酵素の基質特異性は、脂質分解酵素のリパーゼなどと比べると非常に厳密である。菌体外酵素は、分解対象物である P(3HB)に吸着する基質吸着ドメイン、実際に分解を促す触媒ドメイン、さらにこれらをつなぐリンカードメインで構成されている。この触媒ドメインには疎水残基で囲まれている活性中心を含む疎水ポケットがあり、この部位が厳密な基質特異性を与えるのではないかと考えられている(Hisano, T. *et al.*, 2006; 粕谷健一, 2007)。一方、結晶の分解挙動に関しては、Iwata らが P(3HB)および P(3HB)共重合体の単結晶を作製し、*Alcaligenes faecalis* T1 由来の菌体外酵素を用い分解挙動を観察したところ、単結晶の表面からではなく、側面から分解していくことを発見している(Iwata, T. *et al.*, 1999)。

#### 1-2-5 P(3HB)の高強度化

P(3HB)は 1920 年代に発見されたものの、その物性改善が試みられたのは 1990 年代に入ってからである。初めて物性に対して系統的な実験を行ったのは De Konig らで、P(3HB)グラニュール射出成型体の引張試験、衝撃試験、DMA 試験、経時劣化の測定およびアニーリングの効果などについて論じている(Dekoning, G. J. M. and Lemstra, P. J., 1993)。この中で、引張強度は 35 MPa 程度、破壊伸びは 10 %以下と報告している。

繊維については、1999 年に Gordeyev らによって、P(3HB)の熔融紡糸が報告されている。彼らは熔融紡糸後に熱延伸と熱処理を行い、引張強度が 190 MPa の P(3HB)繊維を報告している(Gordeyev, S. A. and Nekrasov, Y. P., 1999)。その後、多くの研究がなされた結果、超高分子量 P(3HB)を用い、冷延伸後さらに延伸を加える二段階冷延伸法と熱処理を適用し、引張強度 1.3 GPa を有する高強度繊維の開発に成功している(Iwata, T. *et al.*, 2004)。

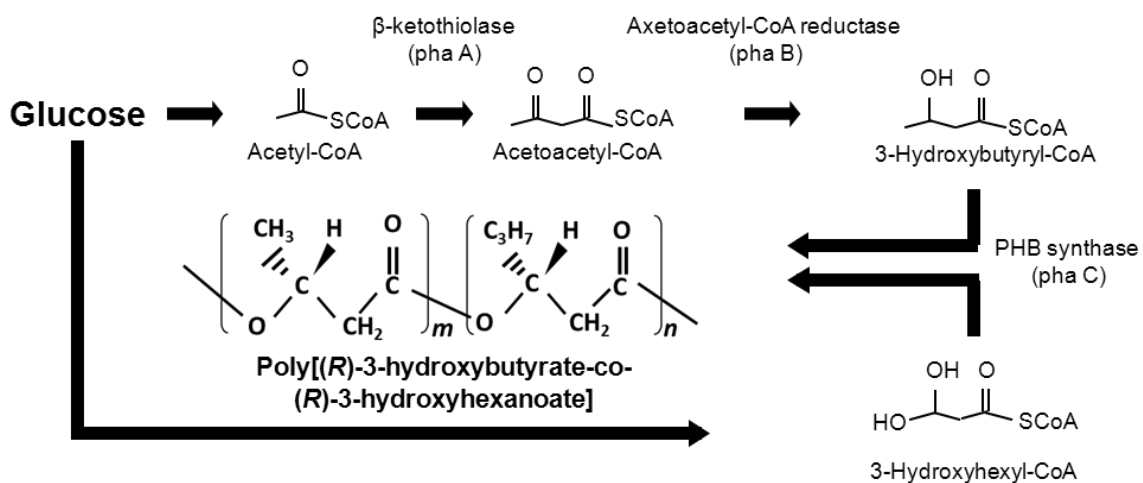
またフィルムに関しても、超高分子量 P(3HB)を用いた二段階延伸法と熱処理の適用が最も高い強度を有しており、このフィルムの引張強度は 388 MPa に達している(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003)。

### 1-3 P(3HB)共重合体の特徴とその物性

Holmes は、*Alcaligenes eutrophus* の培養に炭素源としてグルコースに加えてプロピオン酸を添加することで、3-ヒドロキシバレレートユニットを含む、ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート-co-(*R*)-3-ヒドロキシバレレート] (P(3HB-co-3HV))の合成を報告している (Holmes, P. A., 1985)。さらに、それらの共重合比は炭素源の添加する割合によって0-47%の間で変化することが分かり (Bloembergen, S. *et al.*, 1986)、この3HVユニットがP(3HB)の結晶格子中に共結晶化されることも報告されている (Bluhm, T. L. *et al.*, 1986)。その後、様々な微生物種と炭素源の組合せが試みられ、40以上の異なるモノマーを有するP(3HB)共重合体の合成が報告されてきた (Sudesh, K. *et al.*, 2000)。

これまで、多くのP(3HB)共重合体が報告されているが、3-ヒドロキシヘキサノエートユニットを有するポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート-co-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサノエート] (P(3HB-co-3HH))もまた代表的な共重合体である (Liebergesell, M. *et al.*, 1993)。P(3HB-co-3HH)の生合成においては、*Aeromonas caviae* の合成酵素遺伝子を組み込んだ *Ralstonia eutropha* を用いて生産性の向上に成功している (Kichise, T. *et al.*, 1999; 三木康弘, 2005) (Figure 1-8)。一方、3HHユニットは、P(3HB)の格子中に組み込まれないことが報告されている (Doi, Y. *et al.*, 1995)。

P(3HB)共重合体物性の全体的な傾向として、第二成分の共重合比の上昇に伴って、破壊伸びの上昇と結晶化度の低下が見られる。これは、第二成分が結晶性を低下させるためである。ほとんどのP(3HB)共重合のガラス転移点は室温以下にあり、結晶化しないためゴム状領域の非晶質となり、柔軟な性質を示すようになる。



**Figure 1-8** Metabolic pathway of biosynthesis for poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-co-(*R*)-3-hydroxyhexanoate]

#### 1-4 本研究の目的

環境循環型の材料として注目されている P(3HB)は、超高分子量 P(3HB)の開発と二段階延伸の適用によって高強度化がなされてきた。しかし、超高分子量 P(3HB)は高密度培養を行うことが難しい。このため、P(3HB)を普及させるためには、優れた性質を有する超高分子量 P(3HB)を効率的に使用して、生産性の高い野生株産生 P(3HB)を主体とする高強度フィルムおよび繊維の作製が求められている。一方、高強度化が達成された材料中に存在する  $\beta$  構造について、存在量と材料強度との関係や、この熱的物性についてはほとんど報告がされていない。これらの情報は P(3HB)を材料として使用することを考えた場合、材料としての信頼性を左右する重要な情報である。

そこで本研究では、野生株産生 P(3HB)を主体とし、高物性を兼ね備えた P(3HB)フィルム及び繊維の作製をするとともに、大型放射光を用いた高次構造の詳細な解析を試みた。

第二章「野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に少量の超高分子量 P(3HB)を添加し、高強度なフィルムの作製を試みた。超高分子量 P(3HB)が熱的特性、結晶化挙動に与える影響を調べたのち、冷延伸法を適用することで、高強度フィルムの作製を検討した。作製した冷延伸フィルムに対して機械物性の測定、大型放射光による高次構造、 $\beta$  構造の相対量と強度の関係、酵素分解性の評価を行った。

第三章「P(3HB)繊維における紡糸条件の最適化と超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に超高分子量 P(3HB)を少量添加し、紡糸を行った。熔融温度、熔融時間、延伸温度等の最適な紡糸条件を検討し、超高分子量 P(3HB)の添加による熱分解挙動や配向性に与える影響を検討した。その後、二段階冷延伸を適用することで高強度繊維の作製を試みた。また、作製した繊維について大型放射光を用いた高次構造解析を行った。

第四章「P(3HB)の  $\beta$  構造における熱的性質と熔融過程の詳細な高次構造解析」では、 $\beta$  構造が存在するフィルムに対して、大型放射光を用いた昇温リアルタイム X 線測定を行い、 $\beta$  構造の昇温過程での高次構造変化について詳細な分析を行った。

第五章「微生物産生ポリエステルを用いたゲルフィルムの作製、物性および高次構造」では、超高分子量 P(3HB)あるいは P(3HB)共重合体である P(3HB-co-3HH)を貧溶媒に加え、加熱をすることで熔融し、この溶液を急冷しゲルを作製した。このゲルを乾燥させ

てゲルフィルムとし、延伸を施すことで高強度化を試みた。また、延伸前、延伸後、延伸熱処理後のフィルムに対して大型放射光測定を行い、延伸過程の高次構造変化について詳細な分析を行った。

第六章「総括」では、以上の実験結果から得られた結果をまとめ、P(3HB)の高強度化および高次構造についての知見をまとめた。また、本研究で得られた成果の意義について述べ、今後の課題をまとめた。

## 参考文献

Anderson, A. J., E. A. Dawes (1990):

"Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates" *Microbiol Rev*, **54**, 450-472.

Aoyagi, Y., Y. Doi, T. Iwata (2003):

"Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 209-216.

Barham, P. J., A. Keller, E. L. Otun, P. A. Holmes (1984):

"Crystallization and Morphology of a Bacterial Thermoplastic - Poly-3-Hydroxybutyrate" *J Mater Sci*, **19**, 2781-2794.

Biddlestone, F., A. Harris, J. N. Hay, T. Hammond (1996):

"The physical ageing of amorphous poly(hydroxybutyrate)" *Polym. Int.*, **39**, 221-229.

Bloembergen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer, T. L. Bluhm, R. H. Marchessault (1986):

"Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly(Beta-Hydroxybutyrate-Co-Beta-Hydroxyvalerate)" *Macromolecules*, **19**, 2865-2871.

Bluhm, T. L., G. K. Hamer, R. H. Marchessault, C. A. Fyfe, R. P. Veregin (1986):

"Isodimorphism in Bacterial Poly(Beta-Hydroxybutyrate-Co-Beta-Hydroxyvalerate)" *Macromolecules*, **19**, 2871-2876.

Brandl, H., R. Gross, R. Lenz, R. Fuller (1990):

"Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters

Microbial Bioproducts", **41**, 77-93.

Byrom, D. (1987):

"Polymer Synthesis by Microorganisms - Technology and Economics" *Trends Biotechnol.*, **5**, 246-250.

Dekoning, G. J. M., P. J. Lemstra (1993):

"Crystallization Phenomena in Bacterial Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] .2. Embrittlement and Rejuvenation" *Polymer*, **34**, 4089-4094.

Dekoning, G. J. M., P. J. Lemstra, D. J. T. Hill, T. G. Carswell, J. H. Odonnell (1992):

"Aging Phenomena in Bacterial Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] .1. A Study on the Mobility in Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] Powders by Monitoring the Radical Decay with Temperature after Gamma-Radiolysis at 77-K" *Polymer*, **33**, 3295-3297.

Doi, Y. (1990):

"Microbial Polyesters", VHC Publishers, New York, 1.

Doi, Y., S. Kitamura, H. Abe (1995):



- "Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyhexanoate)" *Macromolecules*, **28**, 4822-4828.
- Fischer, J. J., Y. Aoyagi, M. Enoki, Y. Doi, T. Iwata (2004):  
 "Mechanical properties and enzymatic degradation of poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-[R]-3-hydroxyhexanoate) uniaxially cold-drawn films" *Polym. Degrad. Stab.*, **83**, 453-460.
- Forsyth, W. G. C., A. C. Hayward, J. B. Roberts (1958):  
 "Occurrence of Poly-Beta-Hydroxybutyric Acid in Aerobic Gram-Negative Bacteria" *Nature*, **182**, 800-801.
- Gordeyev, S. A., Y. P. Nekrasov (1999):  
 "Processing and mechanical properties of oriented poly(beta-hydroxybutyrate) fibers" *J. Mater. Sci. Lett.*, **18**, 1691-1692.
- Grassie, N., E. J. Murray, P. A. Holmes (1984):  
 "The Thermal-Degradation of Poly(-D)-Beta-Hydroxybutyric Acid) .1. Identification and Quantitative-Analysis of Products" *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 47-61.
- Hisano, T., K. I. Kasuya, Y. Tezuka, N. Ishii, T. Kobayashi, M. Shiraki, E. Oroudjev, H. Hansma, T. Iwata, et al. (2006):  
 "The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters" *J. Mol. Biol.*, **356**, 993-1004.
- Holmes, P. A. (1985):  
 "Applications of Phb - a Microbially Produced Biodegradable Thermoplastic" *Phys Technol*, **16**, 32-36.
- Iwata, T., Y. Aoyagi, M. Fujita, H. Yamane, Y. Doi, Y. Suzuki, A. Takeuchi, K. Uesugi (2004):  
 "Processing of a Strong Biodegradable Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Fiber and a New Fiber Structure Revealed by Micro-Beam X-Ray Diffraction with Synchrotron Radiation" *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 1100-1104.
- Iwata, T., Y. Doi, S. Nakayama, H. Sasatsuki, S. Teramachi (1999):  
 "Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1" *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 169-176.
- Iwata, T., M. Fujita, Y. Aoyagi, Y. Doi, T. Fujisawa (2005):  
 "Time-resolved X-ray diffraction study on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films during two-step-drawing: Generation mechanism of planar zigzag structure" *Biomacromolecules*, **6**, 1803-1809.
- Iwata, T., K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa, Y. Doi (2003):  
 "Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly([R]-3-hydroxybutyrate)" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 217-224.

- Kichise, T., T. Fukui, Y. Yoshida, Y. Doi (1999):  
 "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis" *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 69-77.
- Kim, K. J., Y. Doi, H. Abe (2006):  
 "Effects of residual metal compounds and chain-end structure on thermal degradation of poly(3-hydroxybutyric acid)" *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 769-777.
- Kusaka, S., H. Abe, S. Y. Lee, Y. Doi (1997):  
 "Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143.
- Kusaka, S., T. Iwata, Y. Doi (1998):  
 "Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate]" *J Macromol Sci Pure*, **A35**, 319-335.
- Lemoigne, M. (1926):  
 "Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique." *Bull Soc Chim Biol*, **8**, 770-782.
- Lemoigne, M. (1927):  
 "Études sur l'autolyse microbienne: origine de l'acide boxybutyrique formé par autolyse." *Ann Inst Pasteur*, **41**, 148-165.
- Lenz, R. W., R. H. Marchessault (2005):  
 "Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology" *Biomacromolecules*, **6**, 1-8.
- Liebergessell, M., F. Mayer, A. Steinbuchel (1993):  
 "Analysis of Polyhydroxyalkanoic Acid-Biosynthesis Genes of Anoxygenic Phototrophic Bacteria Reveals Synthesis of a Polyester Exhibiting an Unusual Composition" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 292-300.
- Madison, L. L., G. W. Huisman (1999):  
 "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic" *Microbiol Mol Biol R*, **63**, 21-+.
- Okamura, K., R. H. Marchessault (1967):  
 "X-Ray Structure of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate", 709.
- Orts, W. J., R. H. Marchessault, T. L. Bluhm, G. K. Hamer (1990):  
 "Observation of Strain-Induced Beta-Form in Poly(Beta-Hydroxyalkanoates)" *Macromolecules*, **23**, 5368-5370.
- Rehm, B. H. A., A. Steinbuchel (1999):  
 "Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis" *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 3-19.
- Snell, K. D., O. P. Peoples (2009):

- "PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries" *Biofuel Bioprod Bior*, **3**, 456-467.
- Steinbuechel, A., H. E. Valentin (1995):  
"Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids" *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 219-228.
- Sudesh, K., H. Abe, Y. Doi (2000):  
"Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters" *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555.
- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney, S. Shah (2007):  
"Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review" *Biotechnol. Adv.*, **25**, 148-175.
- Tanaka, T., T. Yabe, S. Teramachi, T. Iwata (2007):  
"Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near T-g" *Polym. Degrad. Stab.*, **92**, 1016-1024.
- Verlinden, R. A. J., D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, I. Radecka (2007):  
"Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates" *J Appl Microbiol*, **102**, 1437-1449.
- Yamane, H., K. Terao, S. Hiki, Y. Kimura (2001):  
"Mechanical properties and higher order structure of bacterial homo poly(3-hydroxybutyrate) melt spun fibers" *Polymer*, **42**, 3241-3248.
- Yokouchi, M., Y. Chatani, H. Tadokoro, Teranish.K, H. Tani (1973):  
"Structural Studies of Polyesters .5. Molecular and Crystal-Structures of Optically-Active and Racemic Poly(Beta-Hydroxybutyrate)" *Polymer*, **14**, 267-272.
- プラスチック処理促進協会 (2011):  
"プラスチック再資源化フロー図(2010年)",  
[http://www2.pwmi.or.jp/siryo/flow/flow\\_pdf/flow2010.pdf](http://www2.pwmi.or.jp/siryo/flow/flow_pdf/flow2010.pdf), 1-11.
- 三木康弘 (2005):  
"グリーンプラスチック材料技術と動向", シーエムシー出版, 東京, 25-29,
- 粕谷健一 (2007):  
"生分解性高分子分解酵素" *マテリアルライフ学会誌*, **19**, 1-7.

## 第二章

野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量

P(3HB)の添加効果

## 2-1 緒言

ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB))は、糖などの再生可能資源から微生物によって生合成され、自然環境中で微生物によって分解される環境循環型プラスチックである。また、P(3HB)は熱可塑性を有しているため、石油資源由来のプラスチックにかわる代替材料として期待されている(Doi, Y., 1990; Steinbuchel, A. and Valentin, H. E., 1995)。しかしながら、P(3HB)はガラス転移点( $T_g$ )が4°Cと室温よりも低く、室温下で二次結晶化の進行によって、既存の石油由来プラスチックと比較して硬くて脆い性質を示す(Dekoning, G. J. M. and Lemstra, P. J., 1993; Lenz, R. W. and Marchessault, R. H., 2005; Scandola, M. *et al.*, 1989)。このため、固体構造の基礎研究(Barham, P. J. *et al.*, 1984)に加え、様々な(共重合化(Bluhm, T. L. *et al.*, 1986; Doi, Y. *et al.*, 1995; Doi, Y. *et al.*, 1988)、コンポジット化(Park, J. W. *et al.*, 2005a; Park, J. W. *et al.*, 2005b)、ポリマーブレンド化(Abe, H. *et al.*, 1995; Ha, C. and Cho, W., 2002))による物性の改善が試みられてきた。

さらに、高分子の物性改善手法として、超高分子量化が挙げられる。P(3HB)においても超高分子量化が試みられ、Kusakaらは遺伝子組み換え大腸菌を用いた超高分子量P(3HB)の生合成に成功した(Kusaka, S. *et al.*, 1997; Kusaka, S. *et al.*, 1998)。Iwataらはこの超高分子量P(3HB)を用いてフィルムを作製し、熱延伸を適用したところ、引張強度は287 MPaまで上昇した。この値は未延伸のP(3HB)の引張強度である十数MPaから劇的に上昇しており、汎用プラスチックに匹敵する高強度P(3HB)フィルムの開発に成功している(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003)。また、分子鎖の配向と熱処理によって二次結晶化による経時劣化も抑えられていた。

一方、分子量に依存しない延伸方法として、冷延伸法が開発された(Iwata, T. *et al.*, 2003)。冷延伸法は、一度溶融したP(3HB)を $T_g$ 付近まで急冷し、結晶化を抑制した状態で延伸を施す手法であり、溶融粘度が低く熱延伸の適用できない野生株産生P(3HB)にも適用できる延伸法である。Iwataらは冷延伸法を用いて引張強度195 MPaを有するP(3HB)フィルムの作製を報告している(Iwata, T. *et al.*, 2003)。さらに、これらの延伸法が適用されたフィルムの結晶化度および分子鎖の配向度は非常に高くなっており、二次結晶化が抑制されることで経時劣化が生じないことが示された。

超高分子量P(3HB)は高い加工性と高物性を示す一方で、これを生合成する微生物の高密度培養が難しい。このため、今後は超高分子量P(3HB)を効率的に使用し、高物性

な材料を作製することが、重要となる。本章では、超高分子量 P(3HB)を野生株産生 P(3HB)に少量添加し、熱的性質、結晶化挙動、機械物性、高次構造に与える効果を調べることを目的とした。

超高分子量体の効率的な使用方法としては、低分子量ポリエチレン(PE)に対する超高分子量 PE の少量添加が報告されている(Bin, Y. Z. *et al.*, 2001; Tincer, T. and Coskun, M., 1993)。超高分子量 PE が添加されたポリエチレンブレンドは、超高分子量 PE の入っていないフィルムと比較して、引張強度や破壊伸びといった機械物性の向上が示されている。また、他の研究者は超高分子量成分がシシカバブ構造におけるシシ構造の主成分になり、応力を担うことで物性改善が示されることを示唆している(Keum, J. K. *et al.*, 2008; Ogino, Y. *et al.*, 2006)。このような現象は P(3HB)と超高分子量 P(3HB)のブレンドにおいても期待できる。

これまで、延伸が施された P(3HB)フィルムの高次構造解析に関する研究が進んでおり、高強度 P(3HB)フィルムには二種類の分子鎖構造が存在することが明らかになっている。一つは、P(3HB)が結晶を形成する際に取り 2<sub>1</sub> ヘリックス構造( $\alpha$  構造)である(Okamura, K. and Marchessault, R. H., 1967; Yokouchi, M. *et al.*, 1973)。もう一方は、平面ジグザグ構造( $\beta$  構造)である(Orts, W. J. *et al.*, 1990; Tanaka, F. *et al.*, 2004)。この構造は高強度化がなされた P(3HB)フィルムおよび繊維の中で観察されており(Iwata, T., 2005; Iwata, T. *et al.*, 2004)、高強度化の原因ではないかと考えられている。本研究では冷延伸を施した P(3HB)フィルムの大型放射光を用いた詳細な分析を行い、高次構造の形成機構を解明することを目的とする。さらに、超高分子量 P(3HB)が P(3HB)の大きな特徴である生分解性に対して与える影響についても評価した。

## 2-2 実験

### 2-2-1 試料

P(3HB)は、ICI 社製の P(3HB)グラニューールをクロロホルムと共に 2 g/80 mL の濃度で耐圧管に入れ、塊が出来ないように慎重に振りながら 100 °C のオイルバス中で 10 分の加熱を行い溶解し、その後、濃縮した後ヘキサン中へ投入し再沈殿することで精製した(2-2-1-2 参照)。遺伝子組み換え大腸菌を用い、Kahari らの方法を参考に超高分子量 P(3HB)についてはグルコースを炭素源として生合成をおこなった(Kahar, P. *et al.*, 2005)。

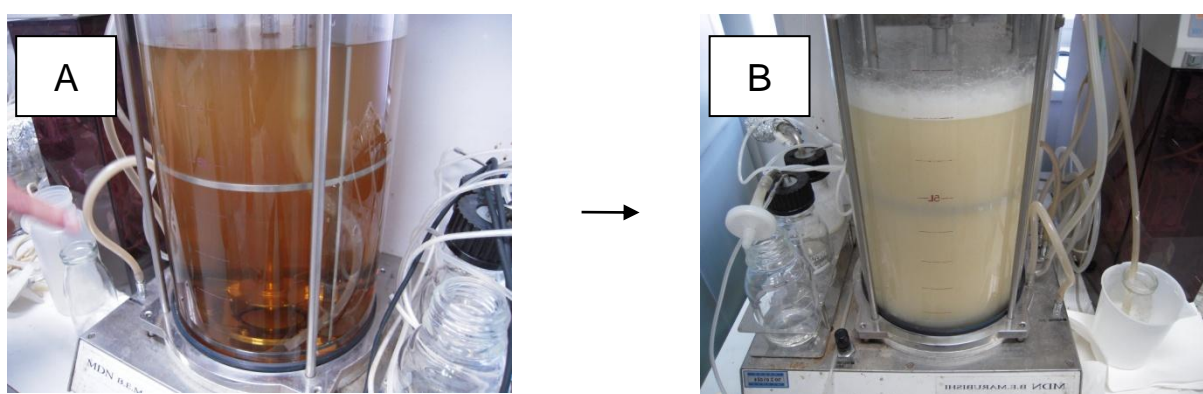
#### 2-2-1-1 超高分子量 P(3HB)の生合成

超高分子量 P(3HB)は、遺伝子組み換え大腸菌を用いて生合成した。5.1 g の Tryptone Pepton、2.5 g の Yeast Extract、5.0 g の Sodium Chloride を純水 500 mL に投入し攪拌し、LB 培地を作製した。LB 培地を 500 mL の坂口フラスコ 5 本に分取し、オートクレーブで滅菌した。坂口フラスコの温度が室温に戻ったことを確認した後、抗生物質のアンプシリン(濃度 100 g/mL)を 0.125 mL 投入した。プラスミド(pGEM-*phaC<sub>Da</sub>AB*)を組み込んだ遺伝子組み換え大腸菌菌体液 (*E. coli* JM109 株)を 1.5 mL 投入し、24 h の前培養を行った。

次に、65 g の Tryptone Pepton、32.5 g の Yeast Extract、65 g の Sodium Chloride を 6500 mL の純水と共に大型培養槽ジャーファーメンターに投入し、培養槽ごと滅菌した。炭素源である 185 g のグルコースを 500 mL の pure water に投入し、完全に溶解するまで攪拌を行った。グルコース溶液および抗生物質アンプシリン(濃度 100 g/mL)4 mL を滅菌した BL 培地の入ったジャーファーメンターに投入し、攪拌および空気の供給を開始した。ジャーファーメンターの温度が室温付近まで低下したことを確認し、前培養した菌体液を投入し、本培養を開始した。本培養は温度 35.3 °C、pH 制御は行わず、培地を投入しない回分培養とし、培養時間は 48 時間とした。攪拌回転数は、100 rpm (0-10 h)、100 rpm (10-24 h)、300 rpm (24-48 h)と多段的に変化させた(カッコ内は培養時間)。

培養後、培地は Figure 2-1 のように琥珀色の透明な液体から乳白色の液体に変化する。この液体を回収し、8000 rpm で遠心分離することで、固形分(菌体)を回収した。この菌体を純水で洗い、再度固形分回収することで残留した培地を取り除いた。この洗い操作は 3 回程度行った。洗浄した菌体は冷凍し、凍結乾燥器で乾燥させることで乾燥菌体と

した。この乾燥菌体 20 g 前後を乳鉢で粉末状にし、2000 mL のクロロホルムに投入することで菌体からポリマーをクロロホルムに溶解させた。この菌体/クロロホルム溶液をろ紙で濾過した。ろ紙は 101、1 の順番で使用した。回収したクロロホルム溶液をエバポレーターで濃縮し、この濃縮液をヘキサンに投入し再沈殿させることで精製を行った。析出したポリマーに真空乾燥機を用い 40 °C、24 h 以上乾燥させ。超高分子量 P(3HB) を得た。



**Figure 2-1** The photographs of culture apparatus (A) before and (B) after culture.

## 2-2-2 分子量測定

ポリマーの分子量測定は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)(Shimadzu 10A システム)を用いて行った。検出器として RID-10A 示差屈折計を用い、カラムに Shodex の K-G(ガードカラム)、K-806M(広範囲分離カラム)と K-802(低分子量用カラム)を直列につなぎ用いた。カラムオーブンは 40 °C とし、溶離液のクロロホルムには HPLC グレードを用いた。流速は 0.8 mL/分、サンプル注入量は 50  $\mu$ l を一回とした。また、サンプル溶液の濃度は P(3HB)および超高分子量 P(3HB)で、それぞれ 1 mg/mL および 0.5 mg/mL とした。溶解は耐圧管内で行い、100 °C で 10 分間の加熱を行った。溶解したサンプルは 0.45  $\mu$ m のポア径を有する PTFE 製フィルターを通した後サンプル管に封入し、濾過した。分子量の算出には、9 点の異なる分子量を有する校正用ポリスチレンスタンダードを用いて検量線を作製し、これを使用した。



### 2-2-3 ブレンドフィルムおよび冷延伸ブレンドフィルムの調製

P(3HB)に対する超高分子量 P(3HB)の少量添加および混合は、耐圧管を用いた熱クロロホルム中で行った。クロロホルム溶液をシャーレに流し込み、アルミホイルで表面を覆い、直径約 1mm の穴を 7 か所に開けた。静置することで 2-3 日かけ溶媒を揮発させブレンドフィルムを調製した。ブレンド比率は超高分子量 P(3HB)/P(3HB)(w/w)=0/100(P(3HB))、5/95、10/90、100/0(超高分子量 P(3HB))とした。

作製したフィルムは、200 °Cあるいは210 °Cにセットしたホットプレスを用い、3 MPaの圧力下で30 秒かけ熔融した。熔融後、フィルムを0 °C付近に調製した氷浴に投入し、非晶質状態のサンプルを作製し、サンプルを延伸機に取り付けゆっくりと冷延伸を行った。延伸後、手回し延伸機ごと高温乾燥器に投入し、100 °Cで2時間の熱処理を行い冷延伸サンプルとした。

### 2-2-4 熱的性質の測定

ガラス点移転( $T_g$ )と融点( $T_m$ )は、イントラクーラーを取り付けた示差走査熱量計(PerkinElme, DSC8500)を用いて測定した。測定雰囲気は窒素(20 mL/分)とし、-50 °Cから210 °Cまで20 °C/分で昇温し、1 分間保持することで完全にサンプルを熔融させた。続いて、200 °C/分で-50 °Cまで急冷し、3分間保持した後、再度210 °Cまで20 °C/分で昇温し、セカンドランで $T_g$ および $T_m$ を測定した。サンプルは1 mg 前後とし、サンプルパンはアルミ製のものを使用した。温度較正にはインジウムを使用した。

### 2-2-5 球晶成長速度測定

球晶成長速度の測定は CCD カメラ(Shimadzu moticam2000)を取り付けた偏光顕微鏡(Nikon, ECLIPSE C600POL)を使用し、測定を行った。光源はハロゲンランプを用い、光路上の検光子の後に色鋭板( $\lambda=633$  nm)を通した。サンプルはステージ上にセットした温度ジャンプ装置(ジャパンハイテック)にセットし、200 °Cで1 分間熔融後、所定の結晶化温度にセットしたヒートブロック状に移し、同時に測定を開始した。一定間隔で画像を撮影し、結晶化時間に対する球晶径をプロットすることで、傾きから球晶成長速度を算出した。

#### 2-2-6 半結晶化時間の測定

各サンプルの半結晶化時間の測定は DSC を用いて測定した。昇温速度 200 °C/分で -50 °C から 210 °C まで昇温し、30 秒間保持することでサンプルを完全に溶融した後、降温速度 200 °C で所定の結晶化温度( $T_c$ )までサンプルを冷却し、保持した。非晶質状態から結晶化温度で保持されたサンプルは結晶化に伴う吸熱が検出され、サンプルはその結晶化温度で吸熱ピークが検出されなくなるまで 1 時間程度保持した。得られた保持時間に対する吸熱曲線を保持時間に対する積算曲線に変換することで時間に対する結晶化度の曲線とした。この時、結晶化度が 50 % になった時の保持時間を半結晶化時間とした。

#### 2-2-7 引張試験および長期安定性評価

作製したフィルムの引張試験を室温環境下で行い、引張強度、破壊伸び、弾性率を測定した。引張試験機(Shimadzu, EZ-test)の引張速度 20 mm/分とし、初期長 10 mm とした。サンプルの幅は 3 mm とし、試験数は 5 回とした。

長期安定性の評価については、容易に作製できる 12 倍延伸 10 % ブレンドフィルムを使用した。保持環境は大気・室温下とし、保持時間は 600 日とした。

#### 2-2-8 大型放射光を用いた広角および小角 X 線測定

広角および小角 X 線回折測定は、大型放射光施設 SPring-8(播磨、日本)の理研専用ビームライン BL45XU を用いて実験を行った。X 線の波長は 0.09 nm とし、広角および小角のカメラ長さは較正物質である  $CeO_2$  とベヘン酸銀を用いて校正を行った結果、それぞれ 110 mm、2400 mm であった。検出器には CCD カメラ (Hamamatsu Photonics, C7300-12-NR)を用いた。結晶化度は広角 X 線回折図を円環平均することで一次元プロファイルを作製し、このプロファイルにおける結晶相由来の面積が全体のピーク面積を占める面積として算出した(Vonk, C. G., 1973)。また、長周期は小角 X 線回折図に円環平均を適用し、最大強度の角度をブラッグの式( $2d\sin\theta=n\lambda$ )を用い算出した。

### 2-2-9 酵素分解試験

各サンプルの酵素分解を *Ralstonia pickettii* T1 由来の菌体外酵素を用いた水溶液を使用し行った。延伸サンプルおよび未延伸サンプルは総面積が  $2\text{ cm}^2$  になるように切り取り、酵素を含む、pH 7.4 に調製した  $50\text{ mmol/L}$  のリン酸緩衝液(酵素濃度= $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) $1\text{ mL}$  に投入した。分解温度を  $37\text{ }^\circ\text{C}$  とし、12 時間ごとにフィルムの重量を測定し、分解時間に対する重量減少量をプロットした。これらの点がなす直線の傾きから酵素分解速度を算出した。

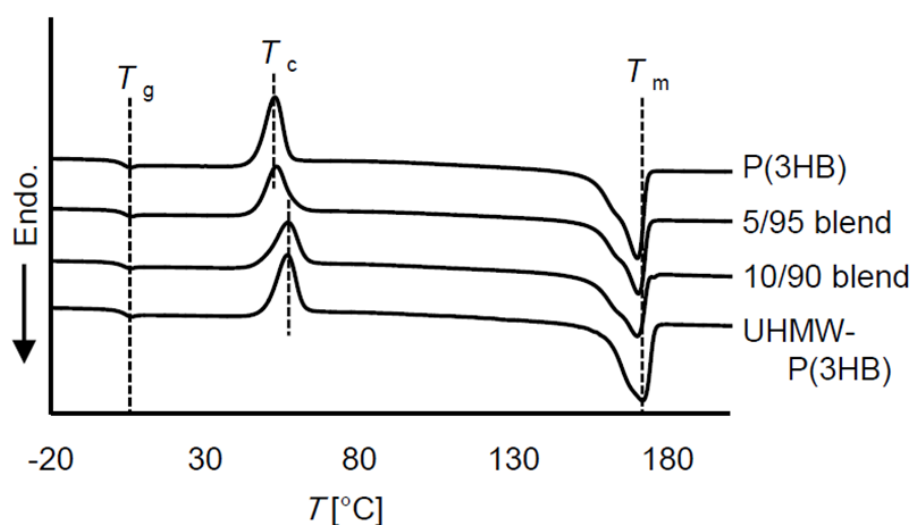
## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 分子量測定

野生株 P(3HB)の重量平均分子量は  $5.2 \times 10^5$ 、多分散度は 1.6 であった。また、生合成した超高分子量 P(3HB)の分子量の重量平均分子量は  $2.7 \times 10^6$ 、多分散度は 1.6 であった。また、ブレンドサンプル(5/95、10/90)についても GPC を用いた分子量測定を行ったが、検出された分子量は P(3HB)の結果とほぼ同様であった(重量平均分子量  $\approx 5 \sim 8 \times 10^5$ )。これは、添加された超高分子量 P(3HB)の量が少なく、超高分子量 P(3HB)由来のピークが弱いため検出できていないためであると考えられる。

### 2-3-2 熱的性質の測定

DSC 測定で得られた各サンプルの DSC 曲線を Figure 2-2 に示す。また、各サンプルのガラス転移点、融点、溶解エントロピーを Table 2-1 に示す。すべてのサンプルのガラス転移点は  $2^\circ\text{C}$  付近に存在していた。結晶化に由来する発熱ピークは、P(3HB)、5/95、10/90、超高分子量 P(3HB)のそれぞれで、 $53$ 、 $58$ 、 $57$ 、 $57^\circ\text{C}$  であった。10/95 ブレンドで得られたわずかな結晶化温度の上昇は超高分子量 P(3HB)の添加による効果であると考えられる。P(3HB)と超高分子量 P(3HB)の融点はそれぞれ  $170^\circ\text{C}$  と  $172^\circ\text{C}$  に存在していた。超高分子量 P(3HB)の高い融点は、厚いラメラ結晶が存在していることを示している。



**Figure 2-2** DSC heating curves for P(3HB), 5/95 blend, 10/90 blend and UHMW-P(3HB) films.

**Table 2-1** Thermal properties of P(3HB), UHMW-P(3HB) and blend films.

sample	Tg (°C)	Tc (°C)	Tm (°C)	ΔH
P(3HB)	1.8	53	170	110
5/95	2.2	53	170	94
10/90	2.1	57	170	94
UHMW-P(3HB)	2.4	57	172	110

### 2-3-3 球晶成長速度と半結晶化時間

等温下で結晶化されたサンプルの結晶化度は、ラメラ結晶の体積と結晶核形成頻度によって支配される。等温結晶化過程において、ある時間( $t$ )の単位体積を占める球晶の体積( $X$ )は Avrami の式により下記のように現される(Avrami, M., 1939)。

$$X = 1 - \exp(-X_0) \quad (2-1)$$

$$X_0 = \int_0^t Nv d\tau \quad (2-2)$$

$$X = 1 - \exp\left(-\int_0^t I\tau \cdot \left(\frac{4\pi}{3}\right) \cdot \{G(t-\tau)\}^3 d\tau\right) \quad (2-3)$$

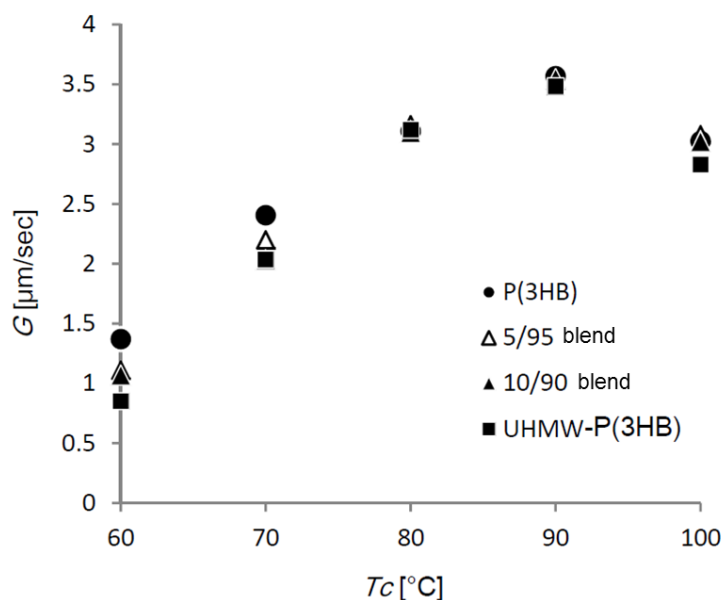
この時、 $N$  および  $v$  は、球晶の数および一つの核から成長した球晶の体積を示す。また、 $I$ 、 $G$ 、 $t$  および  $\tau$  はそれぞれ核形成頻度、球晶成長速度、観測時間と結晶化誘導時間(結晶化が観察されるまでの時間)である。これらの式を変形し、結晶化度 50 % の時の時間を  $t_{1/2}$  (半結晶化時間) とすると、以下のような式が得られる。

$$t_{1/2}^5 = \frac{15 \ln 2}{4\pi I G^3} \quad (2-4)$$

以上の式から、半結晶化時間は核形成頻度および球晶成長速度に反比例していることがわかる。換言すれば、半結晶化時間の減少は結晶化速度の上昇を意味しており、これは

核形成頻度あるいは球晶成長速度の上昇が原因だと言える。このように半結晶化時間と球晶成長速度は結晶化速度と結晶成長速度をはかる尺度になり、これらを測定することで、結晶化挙動に対する超高分子量添加の大まかな効果がわかる。

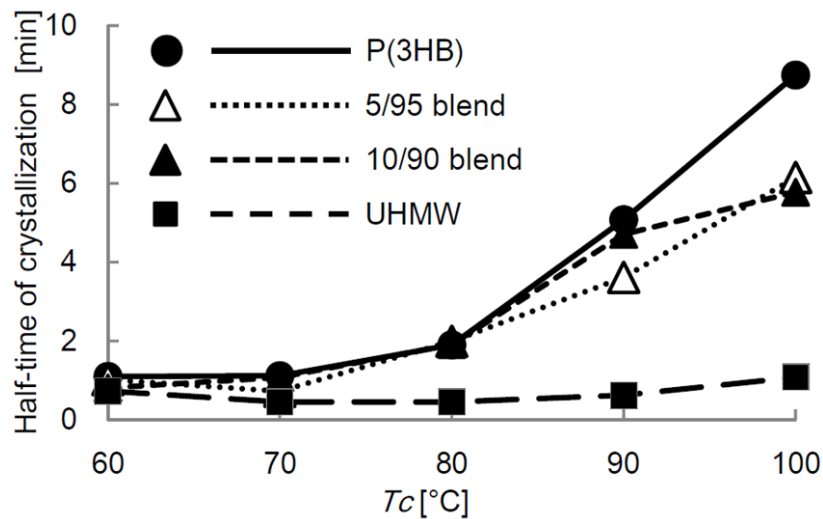
Figure 2-3 は各サンプルの結晶化温度に対して球晶成長速度をプロットした図である。それぞれのサンプルの最大値は 90 °C 付近に存在しており、また、各サンプル間で球晶成長速度の大きな差は認められなかった。しかし、他のサンプルと比較して、常に超高分子量 P(3HB)単体の球晶成長速度は遅く、超高分子量 P(3HB)の添加によって若干低下した。これは超高分子量体の絡み合いが多いため分子鎖の運動性を阻害したためであると考えられる。このような結果は、他のポリマーでも確認されている(Lemstra, P. J. *et al.*, 1974; Magill, J. H., 1964)。



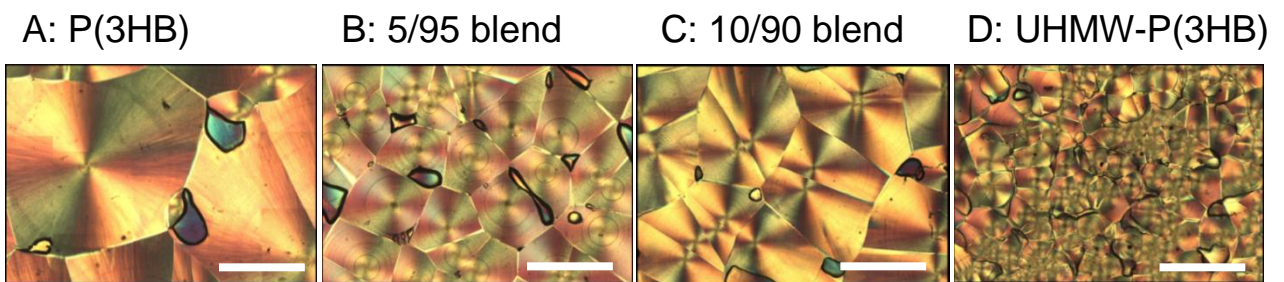
**Figure 2-3** Radial growth rate ( $G$ ) of spherulites as a function of crystallization temperature ( $T_c$ ).

次に、各サンプルの結晶化温度に対する半結晶化時間を Figure 2-4 に示す。P(3HB)の半結晶化時間は結晶化温度の上昇と共に上昇した。一方、超高分子量 P(3HB)単体の半結晶化時間は、P(3HB)の結果と比較して、各温度で常に短かった。ブレンドの  $t_{1/2}$  は 80 °C から 100 °C の高温領域で P(3HB)と超高分子量 P(3HB)の中間に位置する値をとり、このことから超高分子量 P(3HB)の添加は高い結晶化温度(80-100 °C)で、結晶化時間を短くすることがわかった。高温領域における球晶成長速度は各サンプル間で大きな変化が見られないため(Figure 2-3)、添加された超高分子量 P(3HB)は核剤の様に振る舞い、核形成を

促すことが示唆された。Figure 2-5 は結晶化温度 100 ° Cにおける各サンプルの偏光顕微鏡図である。超高分子量 P(3HB)の添加によって球晶数の増加が示されており、この結果も超高分子量 P(3HB)が結晶核剤の様に振る舞うことを支持している。このような現象は超高分子量 P(3HB)の有する絡み合いに由来すると考えられる。



**Figure 2-4** Crystallization half-time ( $t_{1/2}$ ) as a function of crystallization temperature ( $T_c$ ).



**Figure 2-5** Polarization optical microscope graphics of each samples annealed at 100 °C: (A) P(3HB), (B) 5/95 blend, (C) 10/90 blend and (D) UHMW-P(3HB). White bar indicate a scale at 500  $\mu\text{m}$ .

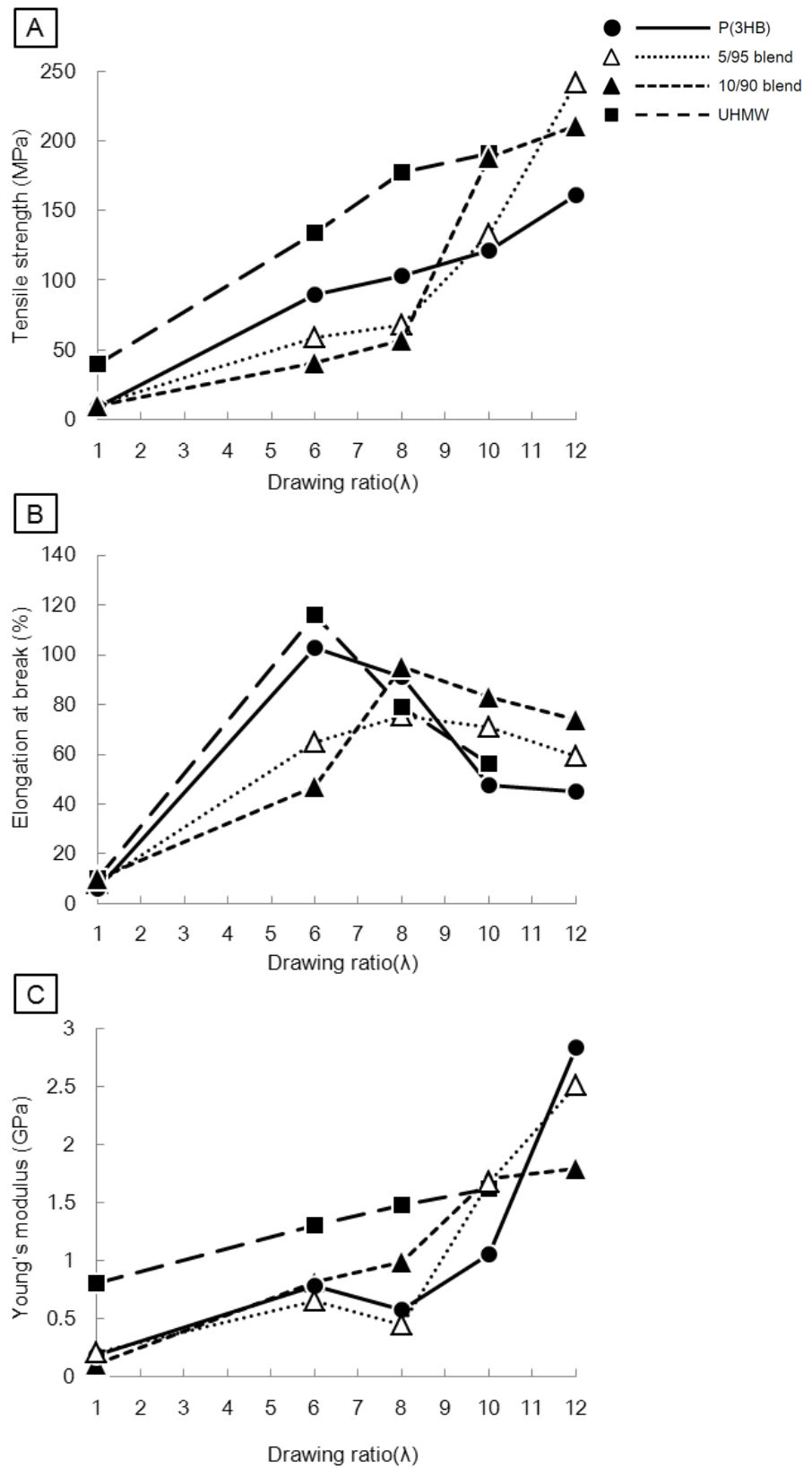
#### 2-3-4 引張試験および長期安定性評価

Figure 2-6 に延伸された各サンプルの引張試験結果を示す。P(3HB)、5/95、10/90 ブレンドは 12 倍までの延伸が可能であったが、超高分子量 P(3HB) 単体では 10 倍までしか延伸することが出来なかった。超高分子量 P(3HB) は絡み合いが多く、分子鎖が配向しきる前に絡まり合いの多い箇所に応力が集中し、破断したと考えられる。P(3HB) と超高分子量 P(3HB) の引張強度は延伸倍率に比例して直線的に上昇した。野生株と超高分子量の強度上昇は延伸倍率の上昇に伴う分子鎖配向によるものである。一方、5/95 および 10/90 ブレンドの引張強度は延伸倍率 8 倍まで徐々に上昇し、それ以降の延伸倍率で急激に上昇した。この結果は延伸倍率 8 倍からブレンドフィルム内の構造に大きな変化があったことを示唆している。

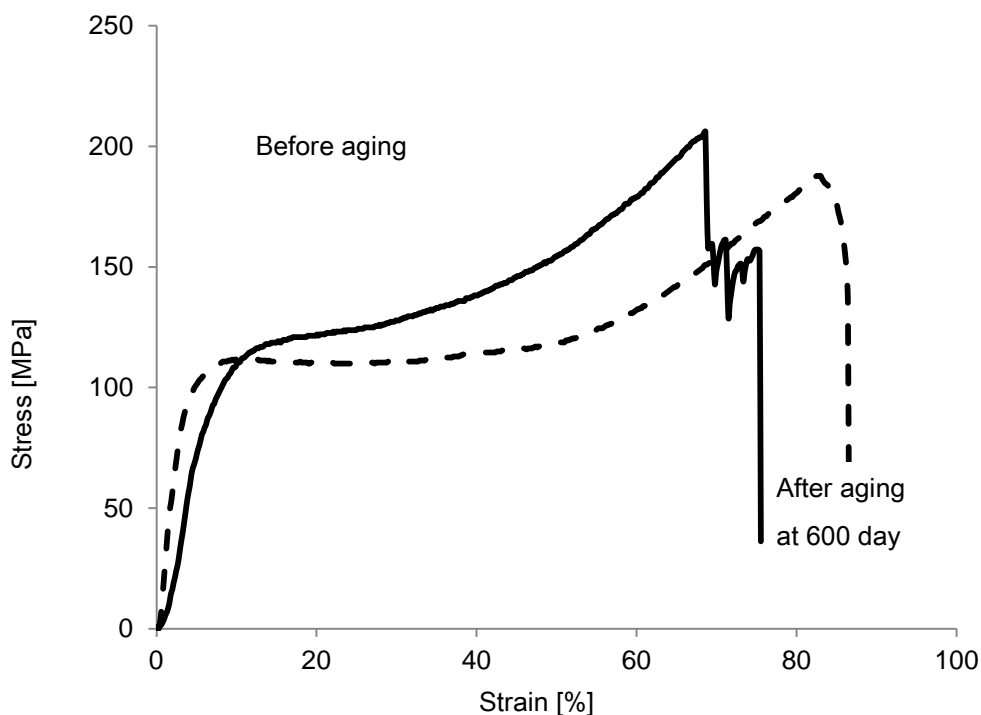
破壊伸び(Figure 2-6B)に注目すると、全てのサンプルで延伸倍率 6 倍あるいは 8 倍まで上昇し、その後、延伸倍率の上昇と共に低下していった。延伸倍率が低倍率の時、延伸倍率と共に分子鎖は徐々に配向し、配向しきるまで延伸倍率は上昇する。しかし、さらに延伸を施したフィルムは分子鎖が配向しきっているためすぐに分子鎖に応力がかかり、破壊伸びは低下したと考えられる。

次に、Figure 2-7 に作製直後、および長期保存した延伸フィルムの応力-ひずみ曲線図を示し、引張強度、破壊伸び、弾性率を Table 2-2 に示す。サンプルには再現性良く作製できる 12 倍冷延伸 10%ブレンドフィルムを用いた。作製直後と長期間保持後の延伸フィルムを比較すると、最大強度および破壊伸びはほぼ同様な値を示した。P(3HB) のガラス転移点は室温よりも低いため、室温下で保持された P(3HB) フィルムは二次結晶化を起こし、引張強度および破壊伸びは低下することが知られている(Dekoning, G. J. M. and Lemstra, P. J., 1993)。一方で、Kusaka らは超高分子量 P(3HB) を用いた冷延伸熱処理フィルムにおいて、180 日間の保持後でも引張強度および破壊伸びに減少が見られないことを報告している(Kusaka, S. *et al.*, 1998)。また、Aoyagi らは冷延伸を施した超高分子量 P(3HB) 15 倍延伸フィルムを 60 日間保持したのち、引張試験を行った結果、引張強度と破壊伸びが経時劣化しないことを明らかにした(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003)。これらは延伸されること配向結晶が形成され、二次結晶化が抑制されるためである。本研究では、600 日間という長い時間、保持を行ったにもかかわらず引張強度および破壊伸びに減少は見られなかった。このことから、冷延伸ブレンドフィルムの長期安定性が示された。





**Figure 2-6** Mechanical properties of cold-drawn films annealed at 100 °C for 2h. (A) Tensile strength, (B) elongation at break, and (C) Young's modulus as functions of drawing ratio. A drawing ratio of 1 is the undrawn film.



**Figure 2-7** Stress-strain curves of cold-drawn 10/90 blend films at drawing ratio of 12. Line and dashed line indicate immediately after prepared film and aged film after 600 day, respectively.

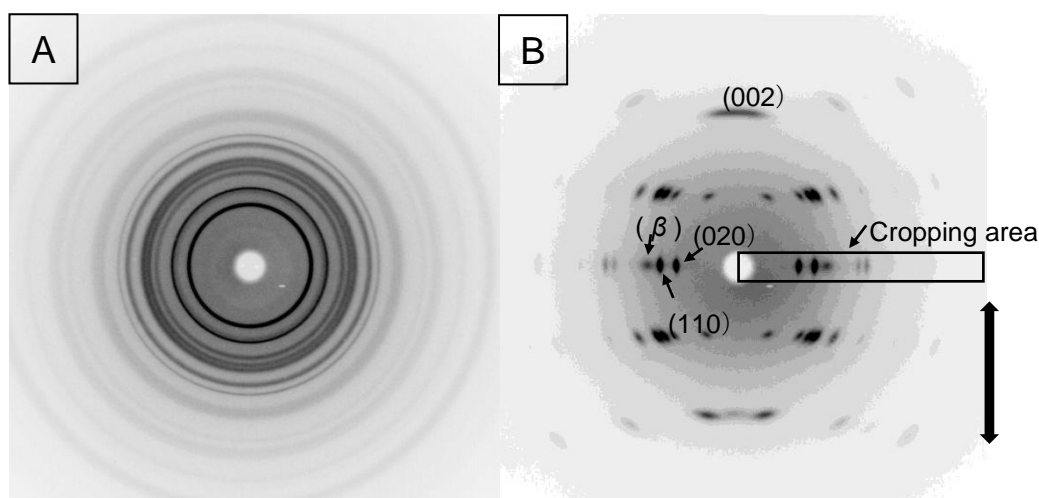
**Table 2-2** The mechanical properties of cold drawn film and aged film after 600 day.

	Before stored	After 600 day	Stored
Tensile strength (MPa) :	211	→	204
Elongation at break (%) :	74	→	93
Young's modulus (GPa) :	2.51	→	3.37

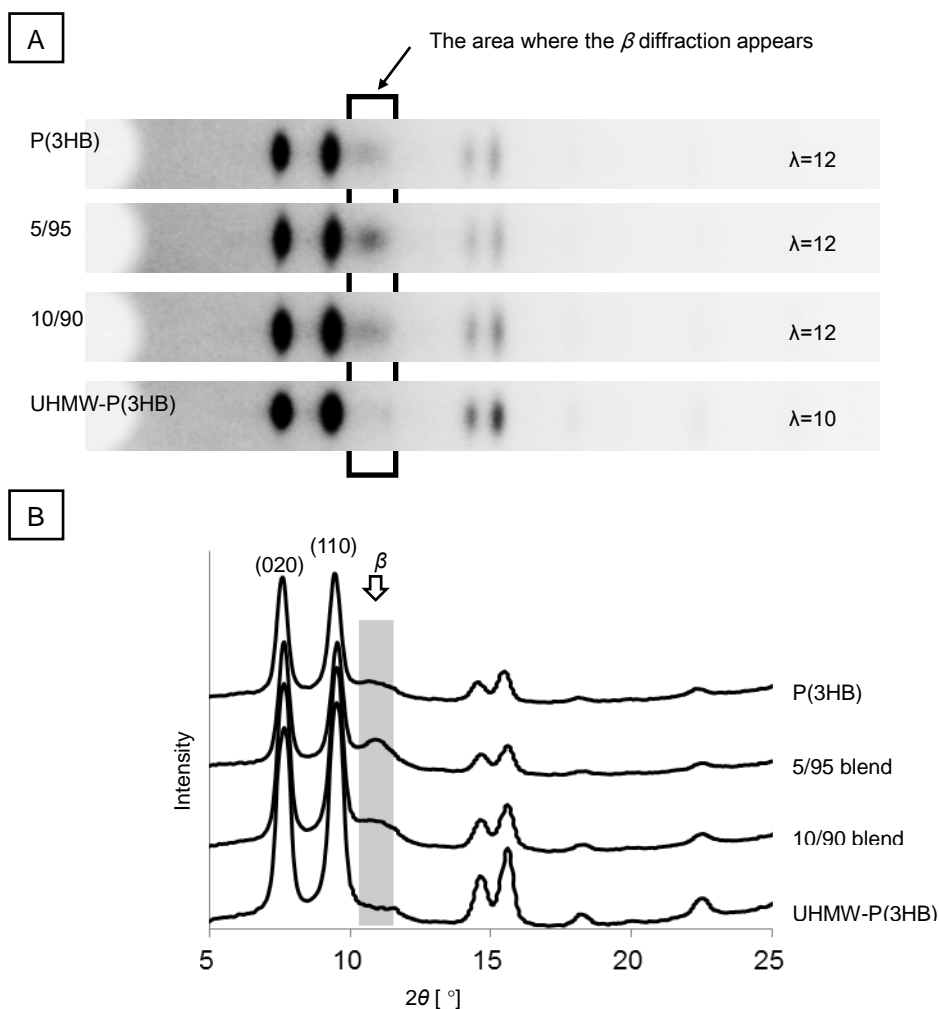
### 2-3-5 広角 X 線回折測定

引張試験の結果から、8 倍以上に延伸したブレンドフィルムの引張強度は急上昇しており、延伸した P(3HB)や超高分子量 P(3HB)フィルムとは異なった挙動を見せた。このような挙動は延伸フィルム間の高次構造の違いによるものであると考えられる。そこで、広角および小角 X 線回折測定(WAXD and SAXS)を行い、高次構造と物性の関係を明らかにすることを試みた。Figure 2-8A に代表的な広角 X 線回折パターン(WAXD)を示す。尚、全てのサンプルの広角 X 線回折図は補足データ(Figure 2-II)に示した。未延伸 P(3HB)フィルムの回折図(Figure 2-8A)には、結晶がランダム配向していることを示すリングパ

ターンが観察された。一方、12倍延伸5/95ブレンドフィルムの広角X線回折パターン上には、P(3HB)のもっとも安定な構造である $2_1$ ヘリックス構造( $\alpha$ 構造)からなる結晶に由来する回折がシャープに表れており、分子鎖が高配向していることが示された(Figure 2-8B)。これに加えて、平面ジグザグ構造( $\beta$ 構造)結晶由来の反射が新たに出現していた。これまで、P(3HB)の $\beta$ 構造は結晶の形成後さらに延伸を施す二段階延伸で報告されているが(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003; Iwata, T. *et al.*, 2005)、一段階の延伸のみで $\beta$ 構造が発現する例は報告されていない。このため、超高分子量P(3HB)の添加が $\beta$ 構造の発現を促したと考えられる。P(3HB)における $\beta$ 構造の発現は高強度化が達成されたフィルムあるいは繊維で検出されており、このため高強度化を促す要因ではないかと議論されている。これ以降、広角X線回折図における $\beta$ 構造由来の反射が顕著に出現する赤道線上の回折に着目し、この周辺を切り出した。Figure 2-9は延伸可能な最大延伸倍率まで延伸されたフィルムの広角X線回折図の切り出し回折図である。切り出した箇所はFigure 2-8Bの太線で囲っている範囲である。Figure 2-9Aに示されている枠は $\beta$ 構造結晶由来の反射が出現する領域である。5/95ブレンドにはP(3HB)には出現していない強い回折が出現していた。超高分子量P(3HB)の含有率の高い10/90にも回折は出現しているものの、5/95と比較するとその強度は弱い。 $\beta$ 構造を定量的に評価するため、Figure 2-9Aの回折図における一次元強度プロファイルを積算した。この強度プロファイルをFigure 2-9Bに示す。また、全てのサンプルの赤道線強度プロファイルは参考データFigure 2-IIIに示した。強度プロファイルからは $\beta$ 構造由来の回折がはっきりと表れている。



**Figure 2-8** WAXD patterns of : (A) undrawn 5/95 blend film, and (B) 5/95 blend film at a drawing ratio of 12. The arrow indicates the drawing direction.



**Figure 2-9** (A) Equatorial line of WAXD pattern of drawn films.  $\lambda$  indicates the maximum drawing ratio. (B) Line profile of drawn films. The wavelength of X-ray was 0.09 nm.

次に、 $\beta$  構造結晶の存在量を算出しようと試みたが、全結晶中で  $\beta$  構造結晶の占める割合を算出することは難しかった。なぜなら、 $\beta$  構造結晶由来の回折点は赤道線に出現する反射以外は、はっきりと観察することができないからである。これは  $\beta$  構造結晶の出現する条件に原因があると考えられる。P(3HB)の  $\beta$  構造結晶は延伸が適用され、高配向した材料にのみ出現する。加えて、 $\beta$  構造を有するサンプルは、作製過程で何らかの方法で①結晶化を施されたのち、②再度延伸され、③熱処理されている。①で形成されたラメラ結晶間のタイ分子鎖が②の過程で延ばされ、この延ばされたタイ分子鎖は③の熱処理過程で結晶化を進行させるが、分子鎖の両端をラメラ結晶によって固定されているため安定状態の  $2_1$  ヘリックス( $\alpha$ )構造をとることが出来ず、準安定状態である平面ジ

グザグ構造( $\beta$  構造)をとると考えられる。このように、タイ分子鎖が延伸によって引き伸ばされた場合、延伸方向に分子鎖は配向し、 $ab$  面からみた位置は規則的に配置されるものの、 $ac$  面および  $ab$  面から見た構造は規則性を持つのは難しい。なぜならば、タイ分子鎖の末端は固定されており、 $c$  軸方向に動けないためである。この結果、 $(hk0)$ 面の配向が強くなり赤道線の反射が強く出ると考えられる。

$\beta$  構造結晶の量を各サンプル間で相対的に評価するため、特定の  $\alpha$  構造由来の回折強度に対する  $\beta$  構造由来の回折強度の比率を算出し、これを  $\beta$  強度比  $R_{\beta/\alpha(020)}$  として設定した。この値は、 $\beta$  の正確な体積分率を示すものではないが、各サンプル間の相対的な存在比率として使用できる。

$$R_{\beta/\alpha(020)} = \int I_{\beta} dI / \int I_{\alpha(020)} dI \quad (2-5)$$

$\alpha$  構造結晶由来の回折強度面積( $\int I_{\alpha} dI$ )には、最も強い強度を示す  $\alpha(020)$  反射を使用した。

Figure 2-10 は各サンプルの  $\beta$  強度比( $R_{\beta/\alpha(020)}$ )を延伸倍率の関数としてプロットしたものである。P(3HB)と超高分子量 P(3HB)の  $R_{\beta/\alpha(020)}$  は延伸倍率と共に、なだらか上昇するが、5/95 および 10/90 ブレンドの  $R_{\beta/\alpha(020)}$  は 10 倍から増加している。特に、5/95 ブレンドは高延伸倍率において急激に  $R_{\beta/\alpha(020)}$  が上昇しており、引張試験の結果と相関が示された。

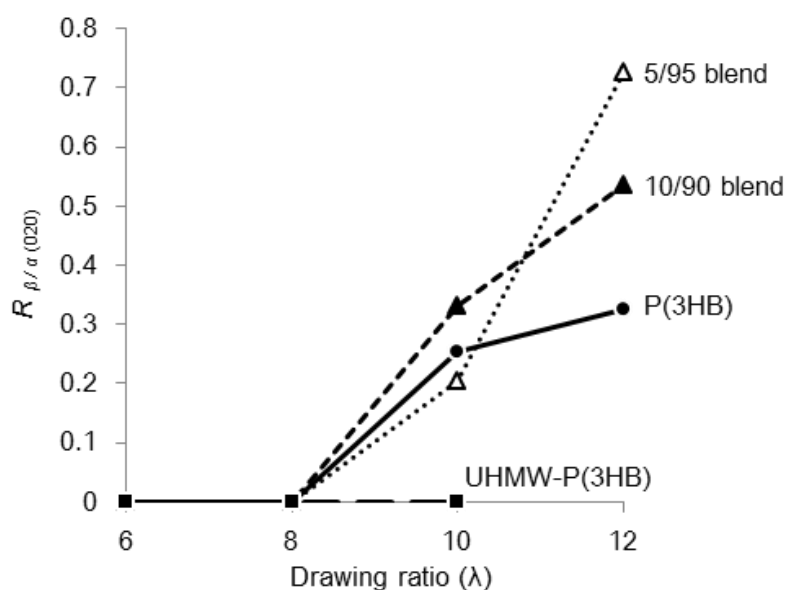
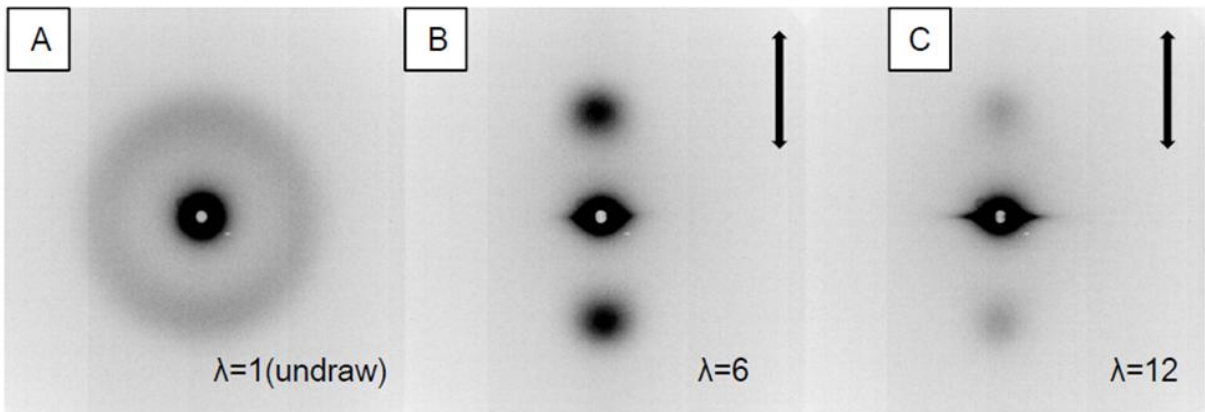


Figure 2-10 Intensity ratio of the  $\beta$ -form reflection to the (020) reflection of the  $\alpha$ -form.

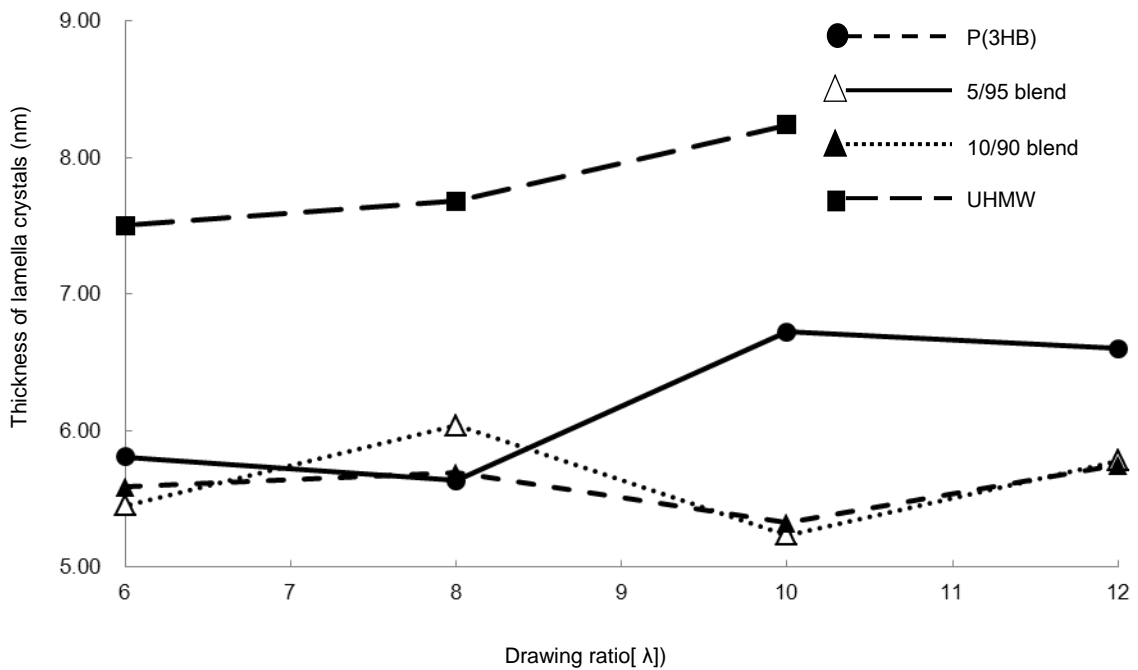
### 2-3-6 小角 X 線散乱測定

Figure 2-11 に、小角 X 線散乱図(SAXS)を示す。SAXS の形態は各サンプル間で大きな違いが現れなかったため、5/95 ブレンドフィルムの未延伸、延伸倍率 6 倍および 12 倍のフィルムを撮影したものを代表として示した。全てのフィルムの散乱図は、参考データ Figure 2-IV に示した。未延伸の時、SAXS は結晶がランダムに存在するリング状の散乱パターンを示した。延伸を行うと、低倍率では延伸方向に対して平行な周期構造を有することを示す強い二点の散乱が子午線上に出現した。さらに延伸を施すと二点の強い散乱強度は減少し、赤道線上にストリーク散乱が出現した。小角 X 線測定において、散乱は周期構造の密度差に由来するものである。このため、延伸倍率 6 倍のフィルムで測定された散乱は周期的に配置しているラメラ結晶とその間に存在する非晶質の密度差が反映されたものであると言える。延伸倍率 12 倍フィルムで検出された散乱の減少は、結晶化度およびラメラ結晶厚の上昇によって密度差が小さくなっていることが原因であると考えられる。赤道線上のストリーク散乱に関しては、サンプル形状が繊維の場合、エッジからの散乱が考えられるが、今回のサンプルはフィルムであり、X 線のビーム径 (600×200  $\mu\text{m}$ ) に対してフィルムの幅が十分広いことからストリーク散乱の出現はフィルム内部に存在する延伸方向に対して垂直な長周期構造が出現したことを意味する。この長周期構造は、シシカバブ構造のシシの周期と考えられる。

Table 2-3 に、広角 X 線回折測定から算出した結晶化度および結晶配向度、小角 X 線回折から算出した長周期、および結晶化度と長周期から算出したラメラ結晶厚を力学物性と共にまとめた。延伸された P(3HB)フィルムのラメラ結晶厚が 6 nm であるのに対して、超高分子量 P(3HB)延伸フィルムのラメラ結晶厚は 8 nm 前後と厚かった。5/95 や 10/90 の延伸ブレンドブレンド中におけるラメラ結晶厚は 6 nm 前後であり、これはブレンド延伸フィルム中で超高分子量 P(3HB)分子鎖が  $\beta$  構造結晶の主成分としてラメラ結晶の間に存在していることを示唆している。なぜならば、もしも超高分子量 P(3HB)が単体でラメラ結晶を形成しているのであれば、ブレンドのラメラ厚さが野生株の厚さよりも大きくなると考えられるためである。また、P(3HB)および超高分子量 P(3HB)フィルムは延伸倍率の増加と共にラメラ結晶厚が上昇していくが、ブレンドしたフィルムのラメラ結晶厚は延伸倍率が増加しても上昇しなかった(Figure 2-12)。



**Figure 2-11** SAXS patterns of a 5/95 blend film that is: (A) undrawn, and with a drawing ratio of (B) 6, and (C) 12. The arrow indicates the drawing direction.



**Figure 2-12** Thickness of lamella crystals against various drawing ratio and UHMW-P(3HB) contents rate.

**Table 2-3** Mechanical properties, crystallinity, long period, lamella thickness and (020) orientation of blend films at various drawing ratio and UHMW-P(3HB) contents rate.

Samples	drawing ratio ( $\lambda$ )	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Young's modulus (GPa)	Crystallinity (%)	long period ( $L_p$ ) (nm)	lamella thickness ( $l_p$ ) (nm)	(020) Orientation
P(3HB)	1	9	6	0.18	70	8.83	6.18	-
	12	161	45	2.83	78	8.51	6.64	95.6
5/95	1	11	8	0.11	67	7.96	5.33	-
	12	242	88	1.5	75	7.74	5.81	95.6
10/90	1	10	10	0.21	67	8.25	5.53	-
	12	211	74	2.51	72	7.93	5.71	95
UHMW	1	40	10	0.8	68	9.68	6.58	-
	10	191	56	1.62	73	11.22	8.19	95.6

### 2-3-7 ブレンドフィルムにおける $\beta$ 構造発現モデル

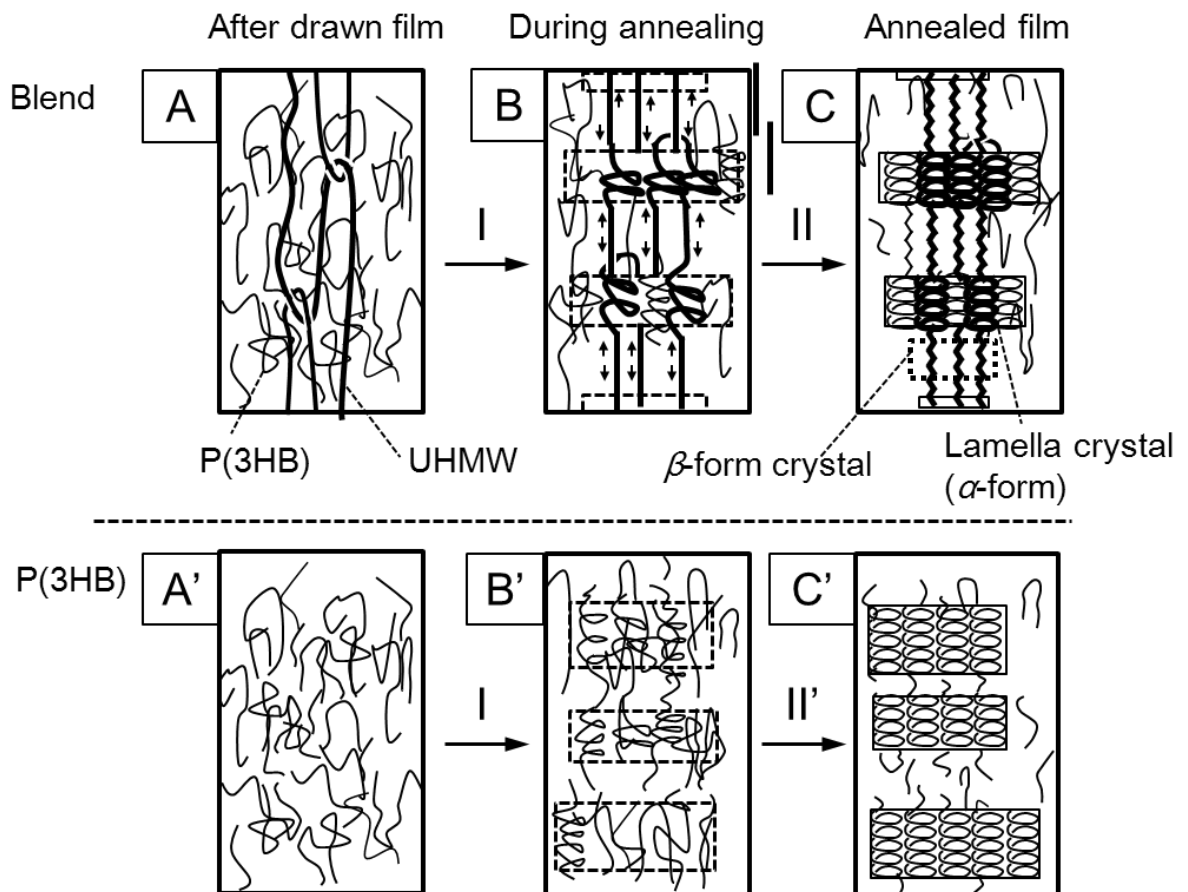
超高分子量 P(3HB)を P(3HB)に少量添加したブレンドフィルムは、一段階延伸にもかかわらず $\beta$ 構造の発現が認められた。また、P(3HB)や UHMW-P(3HB)と比較して、ラメラ結晶厚が薄かったことも特徴的である。以上の結果を基に、考えられる延伸ブレンドフィルムの高次構造モデルを構築し、Figure 2-13 に示した。Figure 2-13 の、上段および下段は、それぞれ、ブレンドフィルムおよび P(3HB)の高次構造モデルである。また、A, A'は延伸直後、B, B'は熱処理中、C, C'は熱処理終了後の高次構造を示している。

超高分子量 P(3HB)の入ったブレンドフィルムを延伸すると、超高分子量 P(3HB) は延ばされ、P(3HB)と比較して長い範囲に存在していると考えられる(Figure 2-13A)。このように超高分子量成分が優先して配向する現象は、超高分子量 PE などの研究でも報告されている(Ogino, Y. *et al.*, 2006)。このフィルムを熱処理すると、超高分子量 P (3HB) は多くのタイ分子鎖を形成すると考えられる。その後、熱処理の進行とともに、ラメラ結晶は厚化成長するために分子鎖を手繰り寄せる(Figure 2-13B)。熱処理による厚化過程において、分子鎖の両端、あるいは複数をラメラ結晶に固定されているタイ分子鎖は、両端をラメラ結晶によって巻き取られる、この巻き取る力を駆動力としてタイ分子鎖が $\beta$ 構造になると推測される(Figure 2-13B および C)。また、小角 X 散乱において、超高分



分子量 P(3HB) を添加するとラメラ結晶が薄くなるのは、このためだと考えられる。

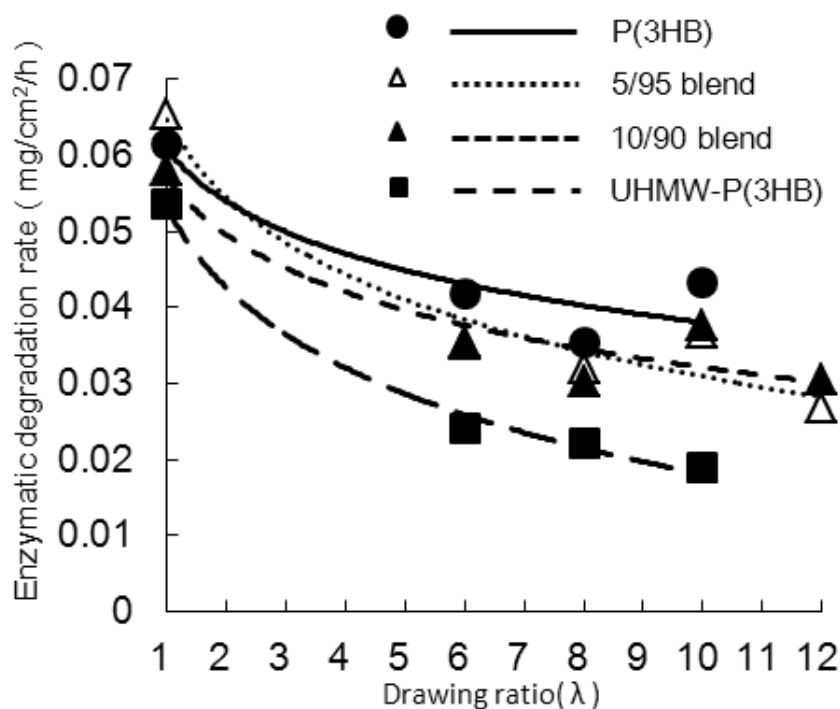
一方、通常分子量の P(3HB) 単体の場合 (figure 2-13 A'), 配向した分子鎖が熱処理を受けてラメラ結晶が形成されるが (figure 2-13 B'), タイ分子鎖の量が少ないため  $\beta$  構造の形成量は少ない。また、タイ分子鎖が少ないためラメラ結晶同士の結びつきが弱く、ラメラ結晶の厚化による分子鎖の巻き取りが起きた際に、ラメラ結晶自体が動くことで巻き取る力を緩和してしまうことも考えられる (figure 2-13 C')。



**Figure 2-13** Schematic illustrations showing the proposed mechanism for generating  $\beta$ -form structures in blend and P(3HB) films. (I) Initial crystallization of lamellar crystals ( $\alpha$ -form). (II) Generating the  $\beta$ -form in an amorphous region during further crystallization. (II') Movement of lamellar crystals during further crystallization.

### 2-3-8 ブレンドフィルムの酵素分解性

Figure 2-14 に酵素分解速度を各サンプルの延伸倍率に対してプロットした。横軸は延伸倍率、縦軸は単位面積当たりの重量減少速度である。超高分子量 P(3HB)フィルムの分解速度は、全ての延伸倍率で P(3HB)やブレンドフィルムの分解速度より遅い値を示した。さらに、各サンプルの分解速度は延伸倍率の上昇と共に減少する傾向を示した。これは結晶化度やラメラ結晶厚の上昇が原因である。それぞれの分解速度を比較すると、P(3HB)>ブレンド>超高分子量 P(3HB)の順番に速かった。この結果は、超高分子量の添加によってある程度生分解速度を制御できることを示している。



**Figure 2-14** Enzymatic degradation rate of P(3HB), blend and UHMW-P(3HB) films in an aqueous solution of polyhydroxybutyrate depolymerase at 37 °C.

## 2-4 結言

超高分子量 P(3HB)の効率的な使用を目的として、通常分子量を有する野生株産生 P(3HB)に対する添加効果について検討を行った。野生株由来の P(3HB)に遺伝子組み換え菌を用いて生合成した超高分子量 P(3HB)を 5 % あるいは 10 % の割合で少量添加し、熱物性、結晶成長、力学物性、高次構造に与える影響を検討した。

超高分子量 P(3HB)は、融点やガラス転移点といった熱物性や球晶成長速度に大きな変化を与えないが、結晶化温度が高温(80-100 °C)の時、半結晶化時間は速くなることが分かった。本研究より、超高分子量 P(3HB)は核剤の様に振る舞い、核の形成を促すことが示唆された。この現象は超高分子量 P(3HB)の有する絡み合いの多さが原因だと考えられる。

各サンプルに冷延伸を施したところ、P(3HB)、5/95 ブレンド、10/90 ブレンドは延伸倍率 12 倍まで延伸できたが超高分子量 P(3HB)単体は 10 倍までしか延伸が出来なかった。各サンプルの最大強度は、P(3HB)、5/95 ブレンド、10/90 ブレンド、超高分子量 P(3HB)の順にそれぞれ 161、242、211、191 MPa であり、特に 5/95 ブレンドは P(3HB)の 1.5 倍、超高分子量 P(3HB)の 1.3 倍の引張強度を有していた。

それぞれの高次構造を解析するため大型放射光施設(SPring-8)での広角および小角 X 線回折測定を行ったところ、12 倍まで延伸した 5/95 ブレンドフィルムには高強度 P(3HB)フィルムで観察される平面ジグザグ構造( $\beta$  構造)由来の回折が出現していた。延伸倍率の異なる各サンプルの  $\beta$  構造を定量的に評価するため  $R_{\beta/\alpha(020)}$  を算出したところ、引張強度との相関が示されることが分かった。広角および小角 X 線散乱の結果から、超高分子量 P(3HB)を添加したブレンドフィルムの高次構造形成モデルを構築した。

酵素分解速度を測定したところ、超高分子量 P(3HB)の添加量と共に分解速度は低下していった。このことから超高分子量 P(3HB)の添加によってある程度、酵素分解速度を制御できることが示唆された。

参考データ

Figure 2-I アブラミプロット

DSC を用いた等温結晶化時間の測定において、サンプル間で半結晶化時間の著しく異なっていた結晶化温度 100 °C および 90 °C の結果についてアブラミ式を用いてリプロットした結果を Figure I に示す。また、このグラフから算出したアブラミ指数を Table I に示す。本試験で使用したサンプルの形状はフィルムであり、アブラミ指数がとりうる数字は 3 以上になるはずであるが、今回、数値は 2 付近を示した。この結果は成長形態が一方向性(線状成長)であることを示している。これまでの報告によると、P(3HB)の結晶化温度が 100°C である時、アブラミ指数は 2.4-3.0、2.6 である。今回の結果はこれらの値よりもさらに低い数値を有していた。これはラメラ厚の厚化などが影響していると考えられるが、この挙動を詳細に解釈するにはさらなる実験結果が必要である。

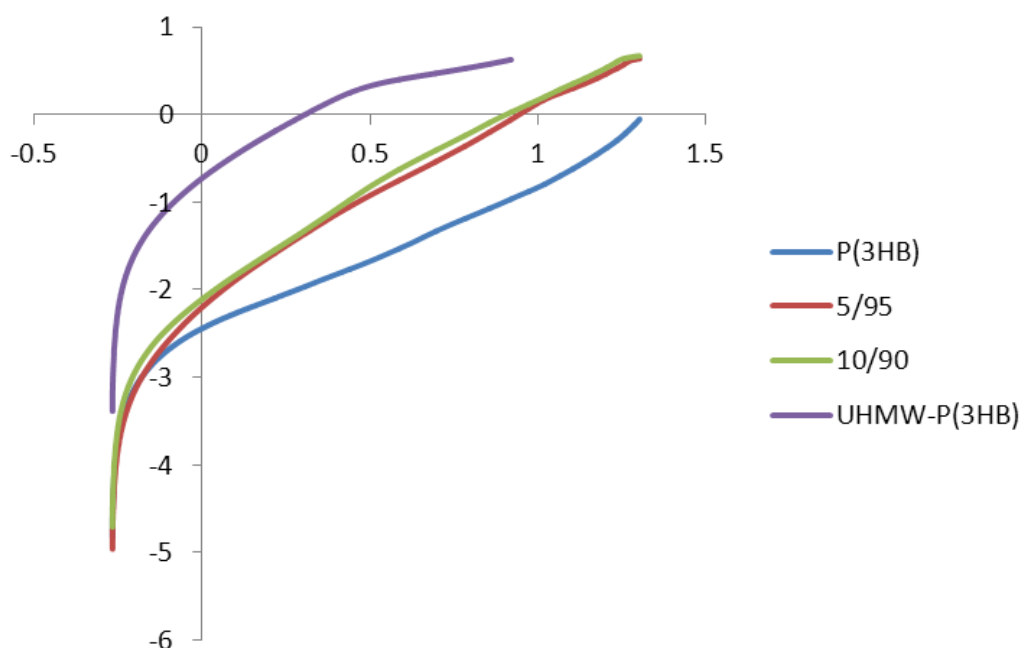


Figure I The Avrami plotted curves of samples crystallized at 100 ° C.

Table I The *n* of Avrami equation

		Sample (P(3HB)/UHMW-P(3HB))			
		0/100	5/95	10/90	100/0
Crystallization temperature	100	1.83	2.17	2.13	2.26
	90	2.27	3.86	2.93	2.30

Figure 2-II 延伸倍率の異なる各フィルムの広角 X 線回折図

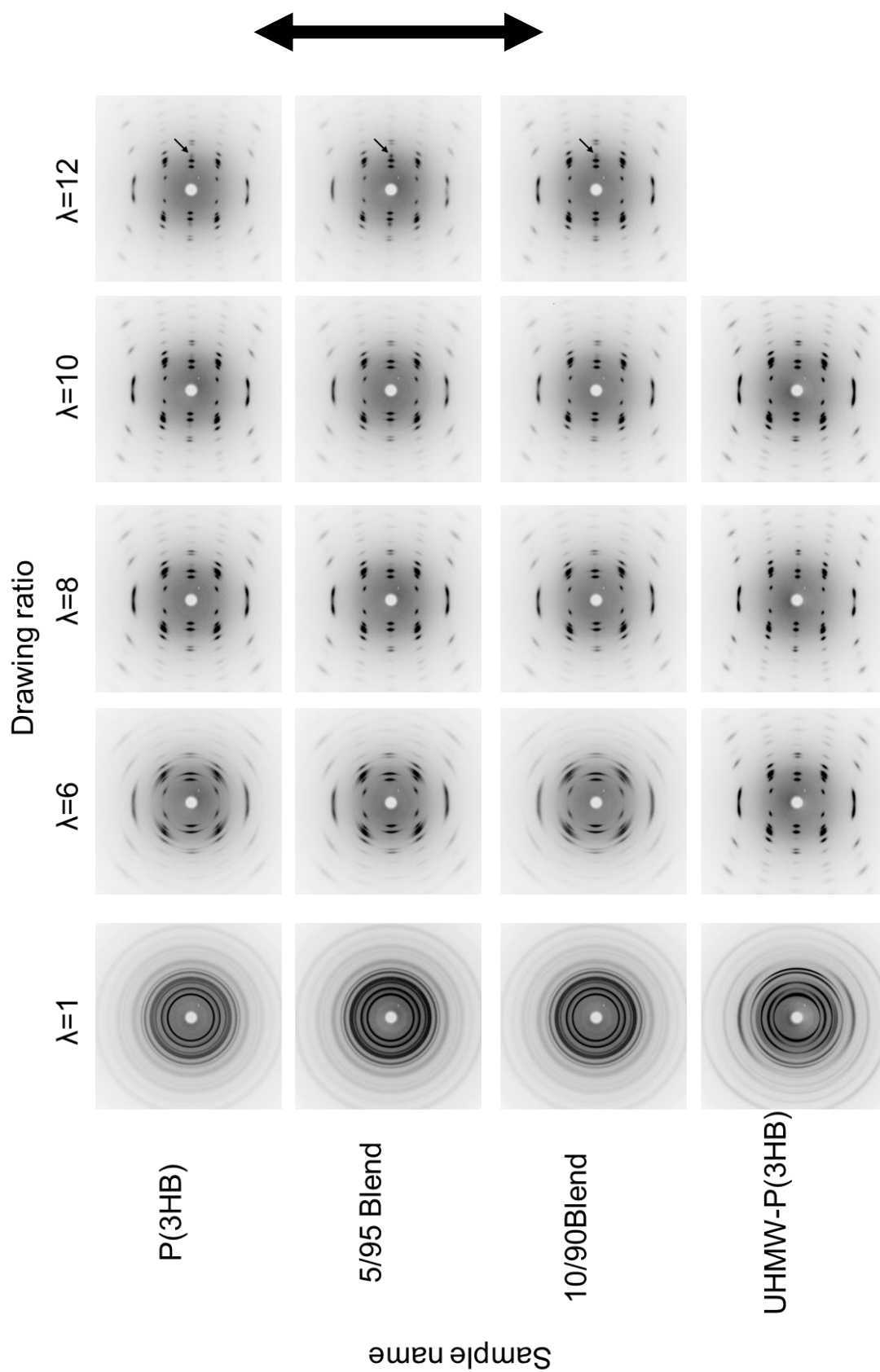
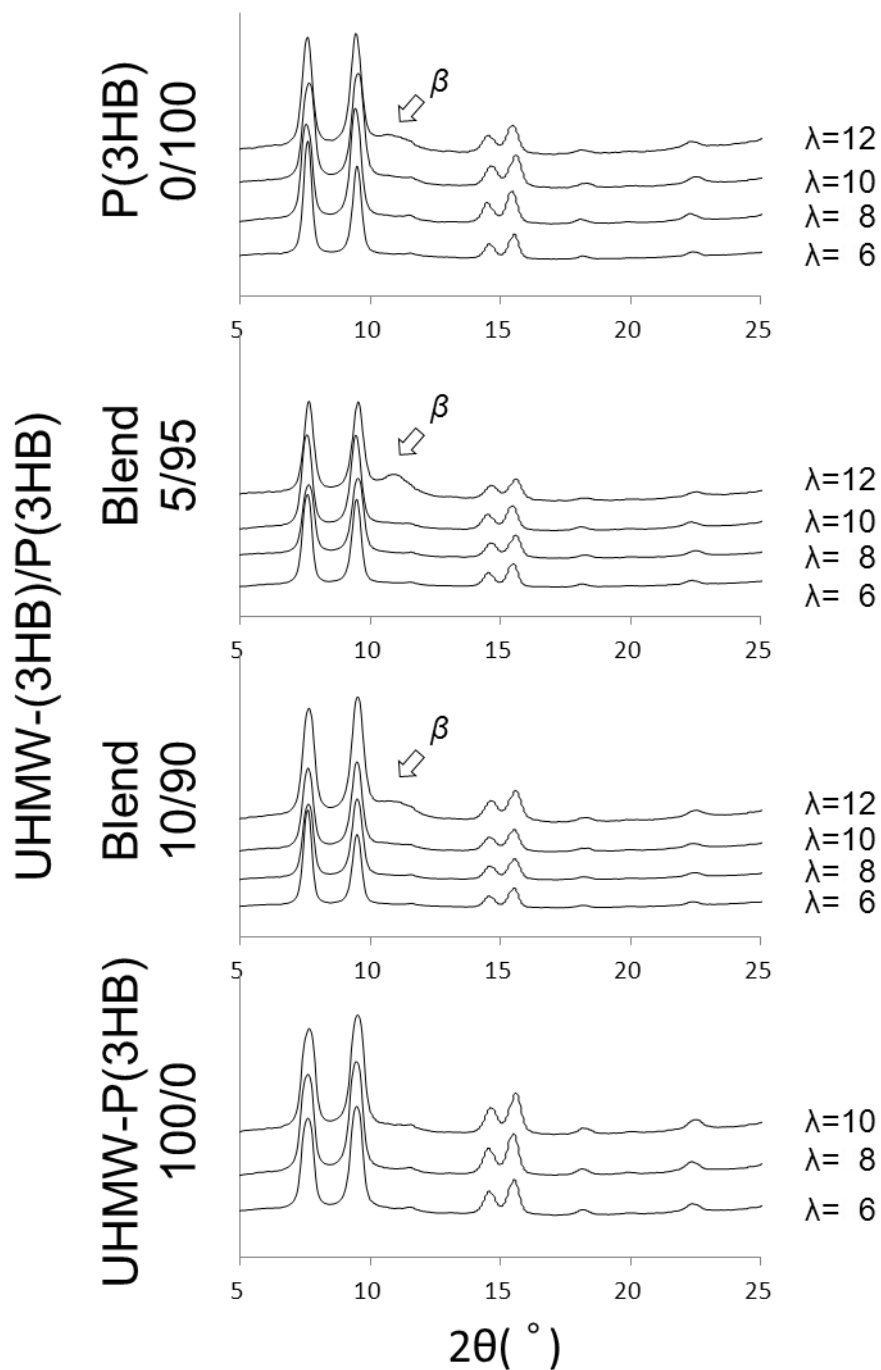


Figure 2-I WAXD patterns undrawn and cold-drawn P(3HB), UHMW-P(3HB) and blend films. The arrows indicate the direction of drawing ratio.

Figure 2-III 延伸倍率の異なるフィルムの回折図から構築した赤道線プロファイル



**Figure 2-III** WAXD equatorial scans of P(3HB) blend film drawn at various drawing ratio and UHMW-P(3HB) contents rate. The arrows indicate the diffraction from  $\beta$ -form structure.

Figure 2-IV 延伸倍率の異なる各フィルムの小角 X 線回折図

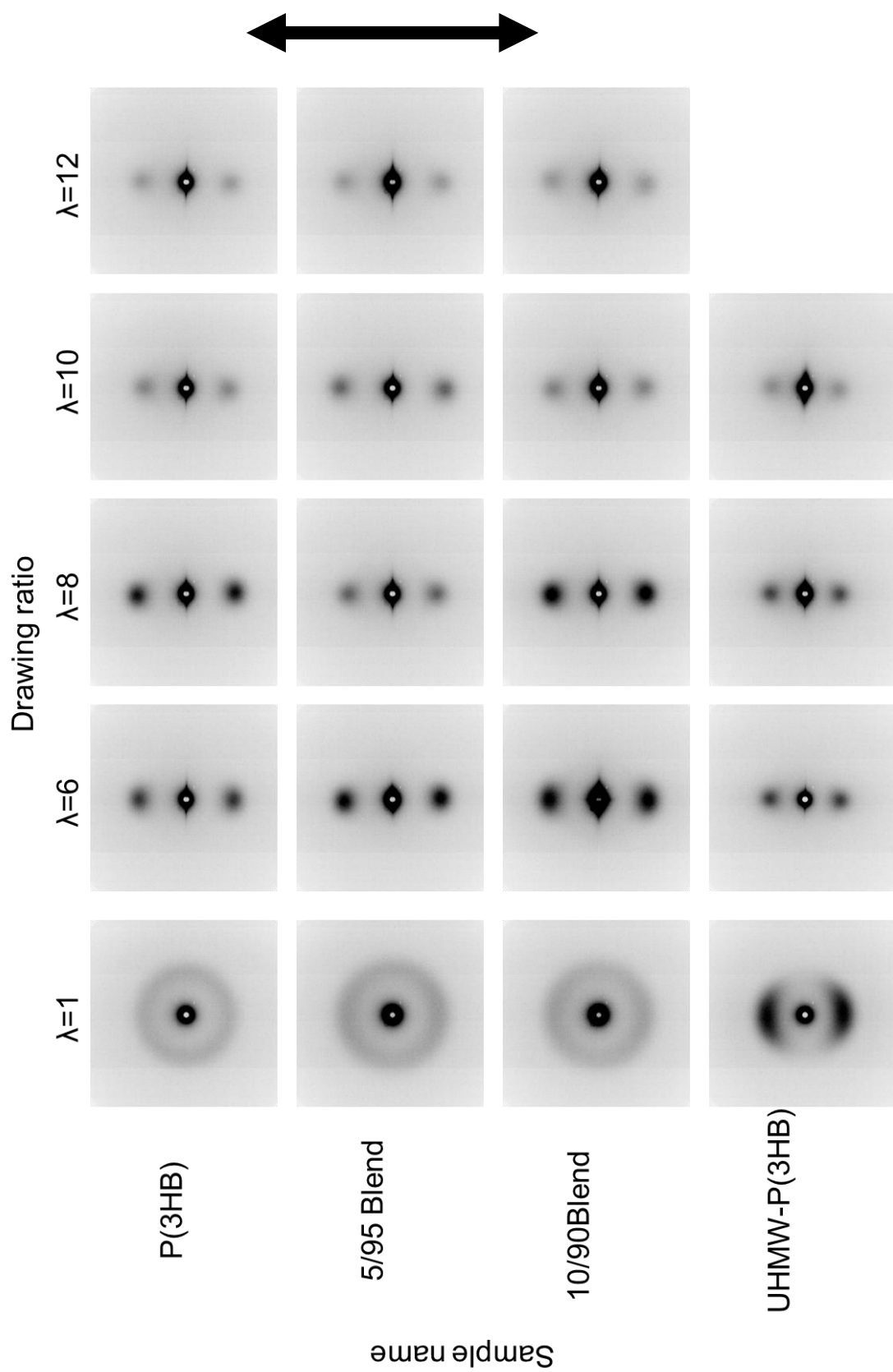
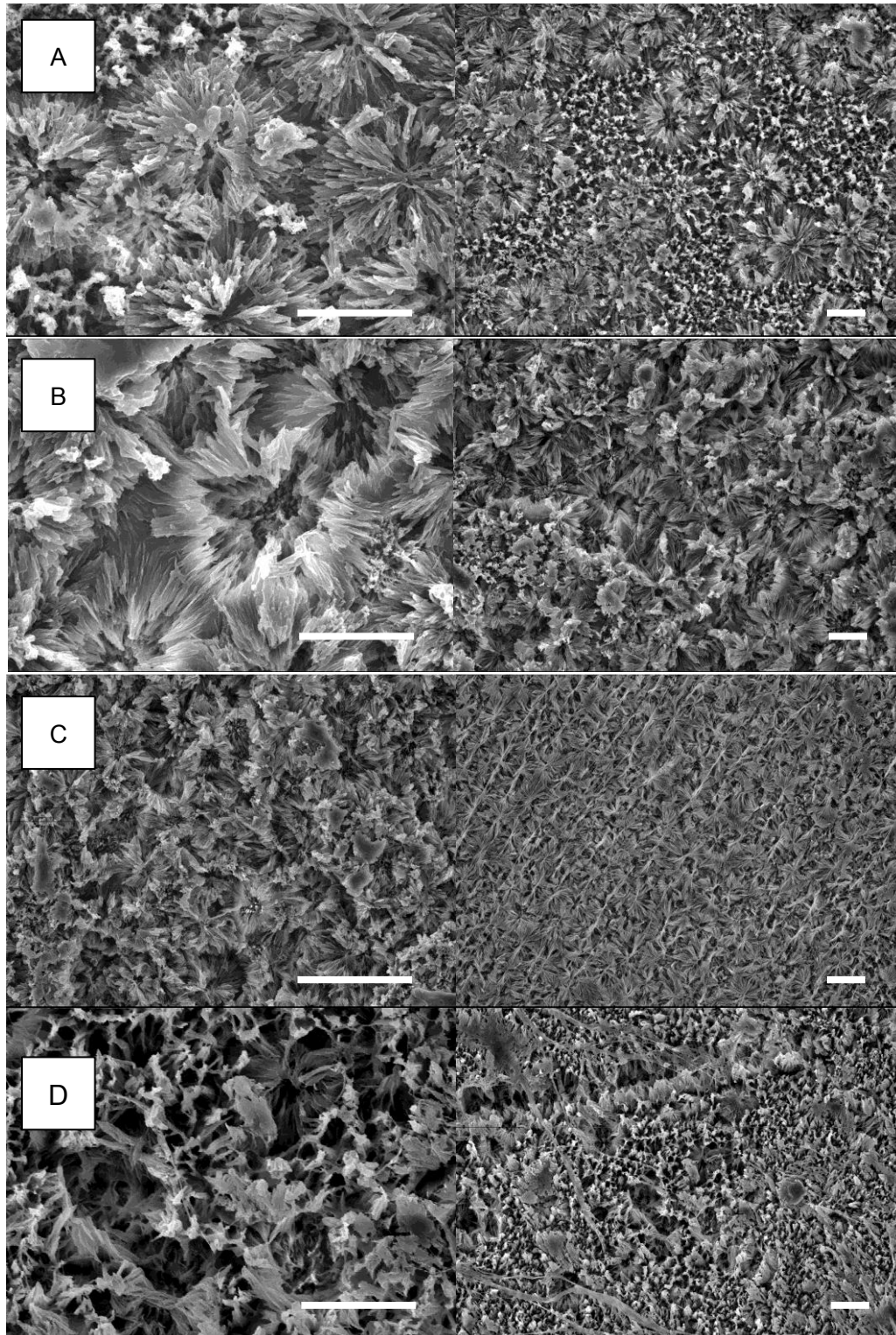


Figure 2-IV SAXS patterns undrawn and cold-drawn P(3HB), UHMW-P(3HB) and blend films. The arrows indicate the direction of drawing ratio.

Figure 2-V SEMによる酵素エッチングした未延伸ブレンドフィルムの表面形態

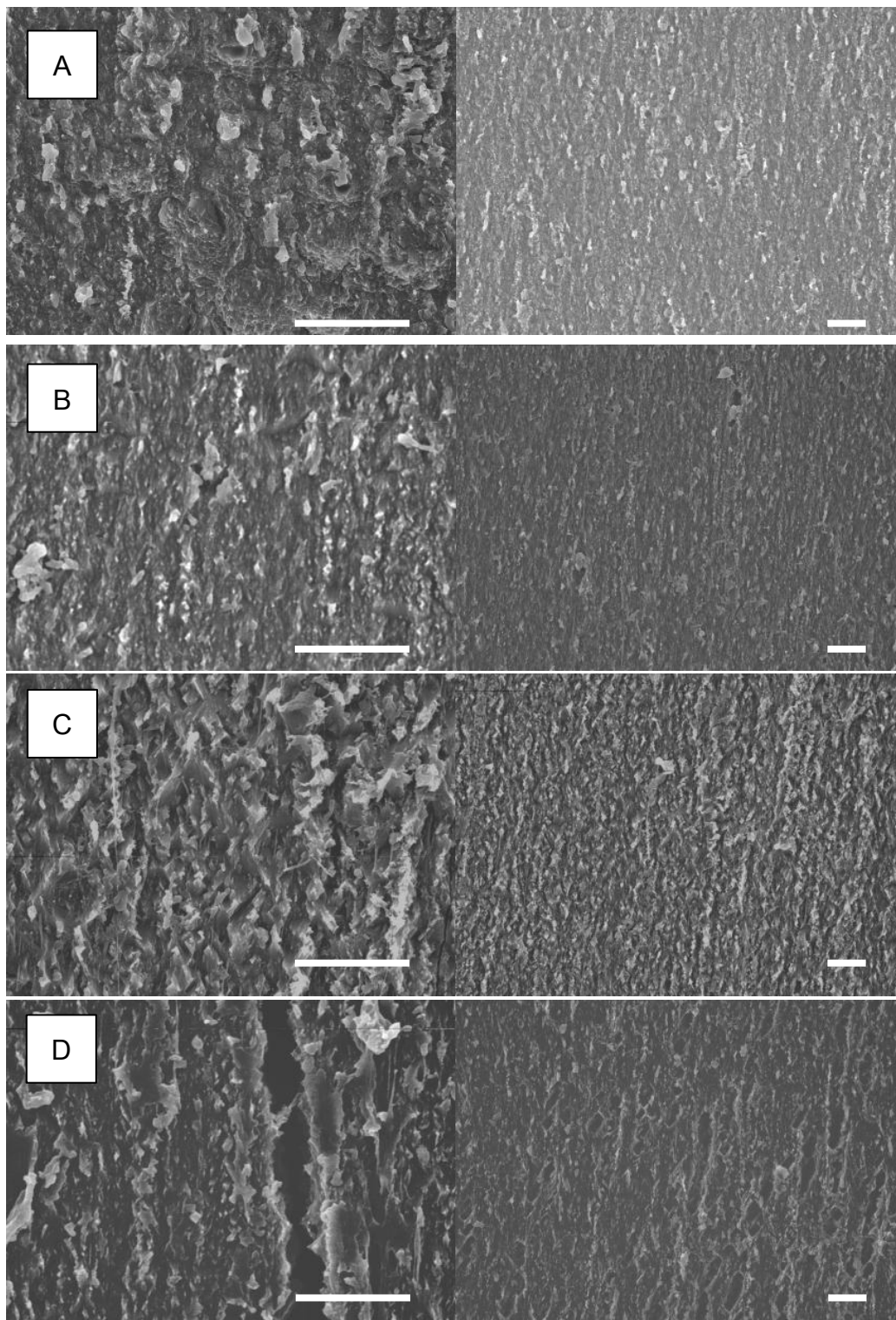
各サンプルに対して3時間の酵素分解を行い、その後、SEMを使用し撮影した表面形態図をFigure 2-Vに示す。



**Figure 2-V** SEM image of surface on A)P(3HB), B)5/95 blend, C)10/90 blend, and D)UHMW-P(3HB) films. The drawing ratios of these samples are 1 (undrawn). White bar indicates the scale at 10  $\mu\text{m}$ .



Figure 2-VI SEMによる酵素エッチングした12倍延伸フィルムの表面形態



**Figure 2-V** SEM image of surface on A)P(3HB), B)5/95 blend, C)10/90 blend, and D)UHMW-P(3HB) films. The drawing ratios of these samples are 1 (undrawn). White bar indicates the scale at 10  $\mu\text{m}$ .

## 参考文献

Abe, H., I. Matsubara, Y. Doi (1995):

"Physical-Properties and Enzymatic Degradability of Polymer Blends of Bacterial Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] and Poly[(R,S)-3-Hydroxybutyrate] Stereoisomers" *Macromolecules*, **28**, 844-853.

Aoyagi, Y., Y. Doi, T. Iwata (2003):

"Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 209-216.

Avrami, M. (1939):

"Kinetics of phase change I - General theory" *J. Chem. Phys.*, **7**, 1103-1112.

Barham, P. J., A. Keller, E. L. Otun, P. A. Holmes (1984):

"Crystallization and Morphology of a Bacterial Thermoplastic - Poly-3-Hydroxybutyrate" *J Mater Sci*, **19**, 2781-2794.

Bin, Y. Z., L. Ma, R. Adachi, H. Kurosu, M. Matsuo (2001):

"Ultra-drawing of low molecular weight polyethylene - ultra-high molecular weight polyethylene blend films prepared by gelation/crystallization from semi-dilute solutions" *Polymer*, **42**, 8125-8135.

Bluhm, T. L., G. K. Hamer, R. H. Marchessault, C. A. Fyfe, R. P. Veregin (1986):

"Isodimorphism in Bacterial Poly(Beta-Hydroxybutyrate-Co-Beta-Hydroxyvalerate)" *Macromolecules*, **19**, 2871-2876.

Dekoning, G. J. M., P. J. Lemstra (1993):

"Crystallization Phenomena in Bacterial Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] .2. Embrittlement and Rejuvenation" *Polymer*, **34**, 4089-4094.

Doi, Y. (1990):

"Microbial Polyesters", VHC Publishers, New York, 1.

Doi, Y., S. Kitamura, H. Abe (1995):

"Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyhexanoate)" *Macromolecules*, **28**, 4822-4828.

Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga (1988):

"Production of Copolyesters of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyvalerate by *Alcaligenes-Eutrophus* from Butyric and Pentanoic Acids" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330-334.

Ha, C., W. Cho (2002):

"Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends" *Prog. Polym. Sci.*, **27**, 759-809.

Iwata, T. (2005):

- "Strong fibers and films of microbial polyesters" *Macromol Biosci*, **5**, 689-701.
- Iwata, T., Y. Aoyagi, M. Fujita, H. Yamane, Y. Doi, Y. Suzuki, A. Takeuchi, K. Uesugi (2004):  
 "Processing of a Strong Biodegradable Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Fiber and a New Fiber Structure Revealed by Micro-Beam X-Ray Diffraction with Synchrotron Radiation" *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 1100-1104.
- Iwata, T., M. Fujita, Y. Aoyagi, Y. Doi, T. Fujisawa (2005):  
 "Time-resolved X-ray diffraction study on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films during two-step-drawing: Generation mechanism of planar zigzag structure" *Biomacromolecules*, **6**, 1803-1809.
- Iwata, T., K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa, Y. Doi (2003):  
 "Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 217-224.
- Kahar, P., J. Agus, Y. Kikkawa, K. Taguchi, Y. Doi, T. Tsuge (2005):  
 "Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant Escherichia coli" *Polym. Degrad. Stab.*, **87**, 161-169.
- Keum, J. K., F. Zuo, B. S. Hsiao (2008):  
 "Formation and stability of shear-induced shish-kebab structure in highly entangled melts of UHMWPE/HDPE blends" *Macromolecules*, **41**, 4766-4776.
- Kusaka, S., H. Abe, S. Y. Lee, Y. Doi (1997):  
 "Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant Escherichia coli" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143.
- Kusaka, S., T. Iwata, Y. Doi (1998):  
 "Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate]" *J Macromol Sci Pure*, **A35**, 319-335.
- Lemstra, P. J., J. Postma, G. Challa (1974):  
 "Molecular-Weight Dependence of Spherulitic Growth-Rate of Isotactic Polystyrene" *Polymer*, **15**, 757-759.
- Lenz, R. W., R. H. Marchessault (2005):  
 "Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology" *Biomacromolecules*, **6**, 1-8.
- Magill, J. H. (1964):  
 "Crystallization of Poly-( Tetramethyl-P-Silphenylene )-Siloxane Polymers" *J. Appl. Phys.*, **35**, 3249-&.
- Ogino, Y., H. Fukushima, G. Matsuba, N. Takahashi, K. Nishida, T. Kanaya (2006):  
 "Effects of high molecular weight component on crystallization of polyethylene under shear flow" *Polymer*, **47**, 5669-5677.
- Okamura, K., R. H. Marchessault (1967):

- "X-Ray Structure of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate", 709.
- Orts, W. J., R. H. Marchessault, T. L. Bluhm, G. K. Hamer (1990):  
"Observation of Strain-Induced Beta-Form in Poly(Beta-Hydroxyalkanoates)"  
*Macromolecules*, **23**, 5368-5370.
- Park, J. W., Y. Doi, T. Iwata (2005a):  
"Unique crystalline orientation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/cellulose propionate blends under uniaxial drawing" *Macromolecules*, **38**, 2345-2354.
- Park, J. W., T. Tanaka, Y. Doi, T. Iwata (2005b):  
"Uniaxial drawing of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/cellulose acetate butyrate blends and their orientation behavior" *Macromol Biosci*, **5**, 840-852.
- Scandola, M., G. Ceccorulli, M. Pizzoli (1989):  
"The Physical Aging of Bacterial Poly(D-Beta-Hydroxybutyrate)" *Makromol Chem-Rapid*, **10**, 47-50.
- Steinbuechel, A., H. E. Valentin (1995):  
"Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids" *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 219-228.
- Tanaka, F., Y. Doi, T. Iwata (2004):  
"The deformation of the chain molecules and crystallites in poly([R]-3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) under tensile stress" *Polym. Degrad. Stab.*, **85**, 893-901.
- Tincer, T., M. Coskun (1993):  
"Melt Blending of Ultra-High-Molecular-Weight and High-Density Polyethylene - the Effect of Mixing Rate on Thermal, Mechanical, and Morphological Properties" *Polym. Eng. Sci.*, **33**, 1243-1250.
- Vonk, C. G. (1973):  
"Computerization of Rulands X-Ray Method for Determination of Crystallinity in Polymers" *J. Appl. Crystallogr.*, **6**, 148-152.
- Yokouchi, M., Y. Chatani, H. Tadokoro, Teranish.K, H. Tani (1973):  
"Structural Studies of Polyesters .5. Molecular and Crystal-Structures of Optically-Active and Racemic Poly(Beta-Hydroxybutyrate)" *Polymer*, **14**, 267-272.

## 第三章

# P(3HB)繊維における紡糸条件の最適化と 超高分子量 P(3HB)の添加効果

### 3-1 緒言

P(3HB)繊維については、1999年に Gordeyev らが熱延伸を試み 190MPa の繊維を報告している(Gordeyev, S. A. *et al.*, 2001)。その後、2000年に Schmack らが高速熔融紡糸と熱延伸を行い、引張強度 330 MPa を(Schmack, G. *et al.*, 2000)、Yamane らが 310 MPa(Yamane, H. *et al.*, 2001)を、Furuhashi らが 416 MPa の繊維の作製を報告している(Furuhashi, Y. *et al.*, 2004)。P(3HB)の引張強度が上がらない原因の一つは、熔融温度と熱分解温度が近いことである。Gordeyev らは、熱分解を伴わない紡糸方法としてゲル紡糸を試みているが、作製された繊維の強度は 360MPa 程度である(Gordeyev, S. A. *et al.*, 2001)。

一方、Kusaka らは遺伝子組み換え大腸菌を用いることで超高分子量 P(3HB)の生合成に成功している(Kusaka, S. *et al.*, 1997)。Iwata らはこの超高分子量 P(3HB)に二段階熱延伸を適用した結果、引張強度 1320 MPa を有する高強度 P(3HB)の作製に成功した(Iwata, T. *et al.*, 2004)。また、Tanaka らは分子量に依存しない延伸方法として微結晶核延伸法を開発し、この繊維の引張強度は 740 MPa まで上昇した(Tanaka, T. *et al.*, 2007c)。また、この繊維はサブナノスケールの空孔を有するユニークな構造であった(Tanaka, T. *et al.*, 2007a)。しかし、超高分子量 P(3HB)は高物性を有しているものの、野生株よりも生産コストが高い。このため超高分子量 P(3HB)をより効率よく使用する方法が求められている。また、微結晶核延伸法は、高強度繊維を作製することは出来るが、作製過程で長い微結晶核形成時間を使用するため、工業的には不利である。

本報告の目的は、第一に、野生株 P(3HB)に対する超高分子量 P(3HB)の添加効果を調査することである。例えば、ポリエチレン(PE)に超高分子量 PE を添加すると機械物性などが上昇することが報告されている(Ogino, Y. *et al.*, 2006; Sawatari, C. *et al.*, 1986)。これは、超高分子量の増加によって、材料内部で荷重を担うタイ分子鎖が増加するため、あるいは応力を担うシシカバブ構造におけるシシ構造が増加するためではないかとされている。このように超高分子量体の添加は、P(3HB)についても同様な効果が期待できる。第二に、超高分子量添加 P(3HB)繊維(ブレンド繊維)に対する最適な紡糸条件を精査することである。繊維の延伸方法には、冷延伸法を選択した。冷延伸法とは、P(3HB)を紡糸直後に  $T_g$  以下に急冷することで非晶質状態を作り出し、この状態で延伸を行う方法である。冷延伸法は有機溶媒を使用せず、通常の紡糸にかかる時間と比べて同等程度の時間で紡糸が出来るため比較的工業化に向いている手法である。現在、冷延伸法の

作製条件が繊維の物性に与える影響は詳細に報告されていない。このような実験データは P(3HB)繊維を作製あるいは工業化する上で、有用になると予想される。

## 3-2 実験

### 3-2-1 試料

通常の分子量を有する P(3HB)は、ICI 社から提供して頂いたものを使用した[重量平均分子量 ( $M_w$ ) =  $5.2 \times 10^5$ 、多分散度 (DPI) =1.6]。また、超高分子量 P(3HB)(UHMW-P(3HB))の生合成は、*E. coli* JM109 を用い 2-2-1-2 とほぼ同様な手法で生合成を行ったが、収率を高めるため、Kahar の方法を参考にした(Kahar, P. *et al.*, 2005)。生合成した UHMW-P(3HB)は 2-2-2 と同様に GPC を使用し分子量を測定したところ、重量平均分子量( $M_w$ ) =  $3.47 \times 10^6$  多分散度(DPI) =2.66 であった。

P(3HB)および UHMW-P(3HB)をクロロホルムに溶解させ、溶液状態の両者を UHMW-P(3HB)/P(3HB)=5/95 の比率で混合した。ブレンド溶液は、エバポレーターを用いて濃縮し、メタノールで析出沈殿させ、真空乾燥機の中で 3 日間乾燥させた。その後、十分に脱気した試料に対して冷圧プレスを施し、厚さ 2 mm 程度の板状にした後、分割することで圧縮サンプルを作製した。以降、この圧縮サンプルを熔融紡糸機に充填し、熔融紡糸を行った。

### 3-2-2 分子量変化の測定

熔融紡糸時における熱分解の影響を調べるため、熔融温度、熔融時間に対する分子量の変化を測定した。P(3HB)あるいはブレンド物を所定温度にした熔融紡糸機に詰め込んだ。その後、1分から10分まで、1分ごとにサンプルを押出すことで熔融時間の影響を受けた熱分解サンプルを回収した。温度は 180 °C、190 °C、200 °C の三点とした。熱分解サンプルは、GPC を用いて分子量を測定した。

### 3-2-3 熔融条件の検討

熔融温度 3 点(180、190、200 °C)と熔融時間 3 点(2、5、9 分)の組合せで、9 条件の紡糸を行った。ダイ直径を 1mm とし、巻取り速度 160 rpm で巻取を行った。紡糸直後に約 0 °C の水浴中で巻取を行い、水中で手回し延伸機に取り付け、約 4 °C の水浴中で冷延伸を施した。延伸倍率は 10 倍とし、80 °C、30 分で熱処理を施した。

作製したサンプルは引張試験および広角 X 線回折(WAXD)を行い、力学物性の評価及び高次構造の解析をおこなった。引張試験は 2-2-7、WAXD は大型放射光施設(SPring-8)



の BL-45XU で、2-2-8 と同様におこなった。

#### 3-2-4 冷延伸温度の検討

ブレンドサンプルを熔融温度 200 °C、熔融時間 2 分、ダイ直径 1 mm で押出し、巻取り速度 160 rpm および巻取り温度 0 °C で巻取りを行った。その後、0-24 °C の間の異なる温度で延伸を行った。延伸倍率は 6 および 12 倍とした。延伸した繊維は 80 °C で 30 分間熱処理を行った。

#### 3-2-5 一段階冷延伸の検討

熔融温度を 200 °C とし、熔融時間は、充填を開始した時点から測定し、2 分前後に紡糸された糸をサンプルとした。巻取は氷水中(0 °C)で行い、非晶質状態のサンプルが大気に触れないように氷浴中で手回し延伸機に取り付けた。その後、水温 4 °C の水浴に手回し延伸機を浸し、ガラス転移点近くで冷延伸を施した。延伸倍率 1 倍(未延伸)から延伸倍率 14 倍までの異なる延伸倍率のサンプルを作製し、温度 80 °C、30 分で熱処理を施し、一段階冷延伸熱処理サンプルを作製した。

#### 3-2-6 二段階冷延伸繊維の作製

熔融温度を 200 °C とし、熔融時間は、充填を開始した時点から測定し、2 分前後に紡糸された糸をサンプルとした。巻取は氷水中(0 °C)で行い、非晶質状態のサンプルがガラス転移点よりも高い温度である大気に触れないように氷浴中で手回し延伸機に取り付けた。水温 4 °C の水浴に手回し延伸機を浸し、ガラス転移点近くで延伸倍率 6 倍まで冷延伸を施した。その後、手回し延伸機を 8 °C の水浴に移し、さらに二段階冷延伸を施した。その後、温度 80 °C、30 分で熱処理を施し二段階冷延伸サンプルを作製した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 熔融紡糸後の分子量

Figure 3-1 に異なる熔融温度における熔融時間の経過に伴う分子量の変化を示す。全ての温度で分子量は、熔融初期に大きく分子量の低下が起こることが分かった。これは P(3HB) の熱分解がランダムに進行するためである(Aoyagi, Y. *et al.*, 2002; Grassie, N. *et al.*, 1984b)。野生株の重量平均分子量に注目すると熔融初期(熔融時間 1 分)で大幅に分子量が低下している。これは熔融温度が高いほど顕著であり、200 °C に関しては、1 分間で重量平均分子量は半分程度まで減少していた。一方で、超高分子量を 5 % 添加したブレンドを P(3HB) と比較すると、分解初期(1 分)で分子量低下が抑えられていた。次に、分子量低下の傾向を調べるために、熱分解の速度を表す尺度である熱分解定数の算出を行った。

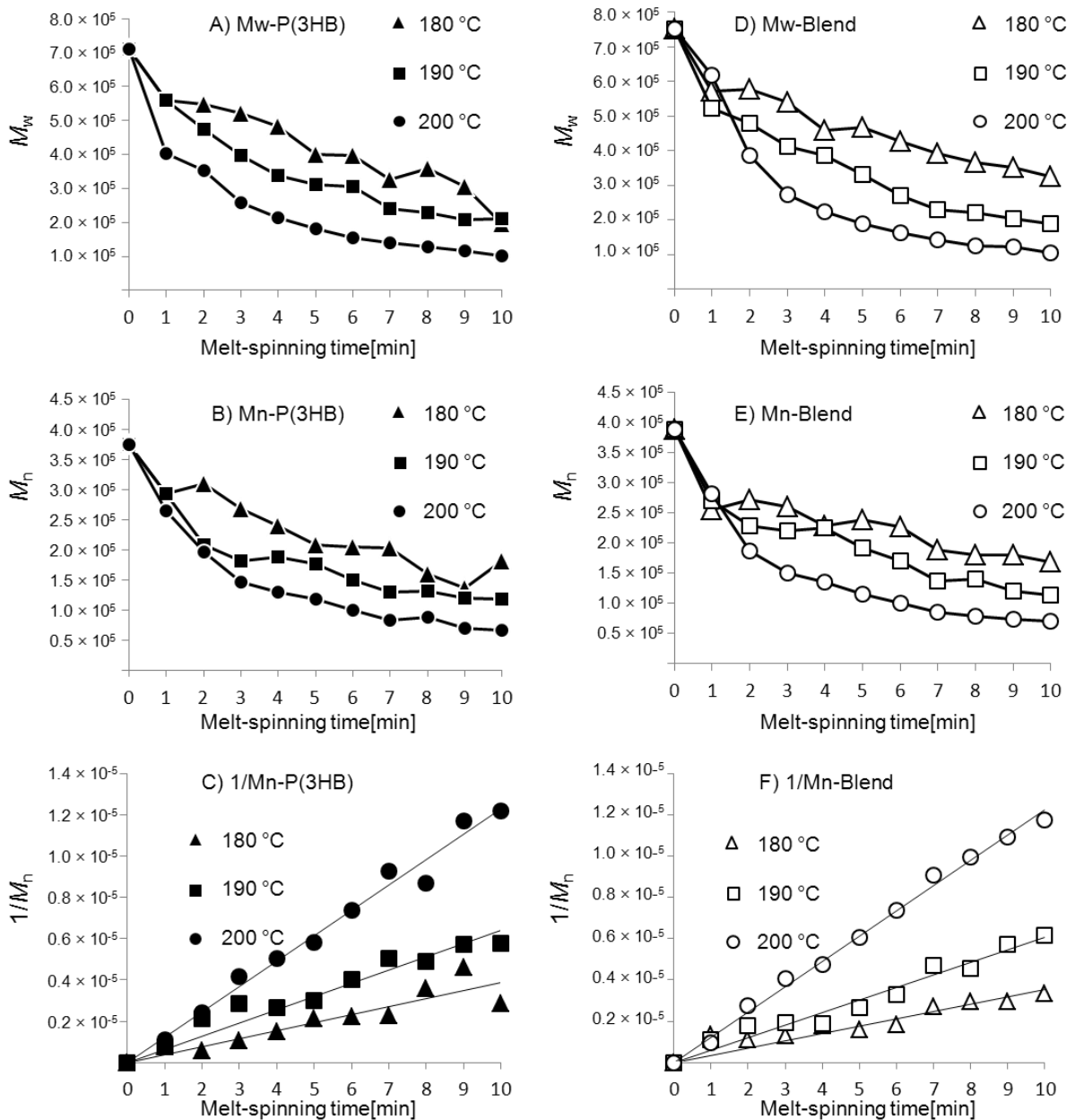
P(3HB) の熱分解がランダム分解であるならば、化学反応速度論における二次の逆反応と考えられ、以下のように表すことが出来る(Grassie, N. *et al.*, 1984a; Kim, K. J. *et al.*, 2006)。

$$\frac{1}{P_{n,t}} = K_d t + \frac{1}{P_{n,0}} \quad \dots (3-1)$$

この時、 $P_{n,t}$  は熔融時間( $t$ )の時の数平均分子量、 $P_{n,0}$  は時間 0 (=熱分解前)の時の数平均分子量である。 $K_d$  は熱分解速度定数であり、この値が大きいくほど分解速度が速いと言える。ここで、Figure 3-1(B, E) は熱分解速度に対する数平均分子量の変化であり、この値を用いて X 軸に熔融時間を、Y 軸に数平均分子量の逆数をプロットしたものが Figure 3-1(C, F) である。この時の傾きが熱分解速度定数  $K_d$  である。Figure 3-1 から算出した  $K_d$  を Table 3-1 に示す。

それぞれの温度における P(3HB) とブレンドの  $K_d$  を比較すると、いずれも超高分子量を添加したブレンドが低い値を示した。このことは超高分子量の添加によって熱分解が若干抑制されたことを示唆している。通常、理想的に熱が伝わる場合には高分子の熱分解は活性化エネルギー、つまり高分子の一次構造で決定され分子量とは関係ないと言われている。一方で、熱の伝わり方は分子鎖の運動性が増加することに起因しており、超

高分子量の添加は P(3HB)の運動性を低下させ、熱伝導を遅延させたため分解速度定数が低下したと考えられる。



**Figure 3-1** Relationships between molecular weight and melt-spinning time. Left and right columns show results for P(3HB) and the blend, respectively. Weight-average (A, D), and number average (B, E) molecular weights and inverse of  $M_n$  (C, F) are displayed.

**Table 3-1** Heat decomposition rate constant of each sample at three temperatures (180, 190, 200 °C), as calculated from the slope of melt-spinning time vs.  $1/M_n$  in Figure 3-1 (C and F)

Melt-spinning Temperature [°C]	Sample			
	P(3HB)		blend	
180	$(0.323 \pm 0.016) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	$(0.253 \pm 0.009) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$
190	$(0.533 \pm 0.010) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	$(0.463 \pm 0.016) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$
200	$(1.021 \pm 0.025) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	$(0.976 \pm 0.013) \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$

### 3-3-2 溶融条件と引張強度

Table 3-2 にブレンドサンプルに対して各溶融温度で紡糸を行い、10 倍まで冷延伸を適用した繊維の紡糸操作性を示す。180 °C-2 分および 180 °C-4 分で紡糸を試みたところ、押し出された繊維は非常に硬くて脆く、巻き取ることが出来なかった。また、溶融時間を 8 分まで長くすると紡糸は行えるものの、10 倍まで延伸することは出来なかった。これは溶融が不完全であるためだと考えられる。一方、200 °C-8 分で溶融した時は、溶融体の粘度が非常に低く、連続的な紡糸をすることが出来なかった。これは 200 °C で長い時間加熱されたため分子量低下が進行しているためだと考えられる。Figure 3-1 で示したように 200 °C-8 分で溶融したサンプルの重量平均分子量は  $10 \times 10^5$  近くまで低下している。180 °C-8 分 ( $M_w = 2.0 \times 10^5$ ) や 190 °C-4 分 ( $M_w = 3.5 \times 10^5$ ) では紡糸することが可能であるため、P(3HB) の紡糸が可能な限界分子量は  $M_w = 1.00 \times 10^5$  前後にあると考えられる。延伸することができた 190 °C-8 分、200 °C-2 分および 200 °C-4 分の引張強度は、それぞれ 241 MPa、283 MPa および 276 MPa であり、今回の条件では 200 °C-2 分が最も高い値を示した。

以上のことから、紡糸された P(3HB)繊維の引張強度は、熔融時間の経過によって、熔融の進行に伴う強度上昇と分子量低下に伴う強度減少の影響をうけると考えられる。この二つの要素は熔融温度と熔融時間によって、どちらが支配的か決定される。熔融温度が高い場合、短い時間で熔融が終了するため、2分では熔融進行にともなう引張強度の上昇が支配的であると考えられる。しかし、熔融時間が長くなると、分子量低下が急速に進行し、分子量低下に伴う強度の低下が支配的になる。

Figure 3-2 は、ブレンドを 190 °C-8 分、200 °C-2 分および 200°C-4 分かけて熔融させ紡糸した繊維の広角 X 線回折測定 (WAXD) 図である。190 °C-8 分で紡糸した繊維の WAXD 図には  $\alpha$ ( $2_1$ ヘリックス)構造の分子鎖が延伸方向に配向していることを示す回折パターンを示したが、同時に低配向性を示すリングパターンもわずかながら確認された。このため 190 °C-8 分の条件では出発サンプル由来の結晶が溶け残っていることが証明された。次に、200 °C-2 分で紡糸した繊維の WAXD パターンには、 $\alpha$  構造の分子鎖が延伸方向に高配向していることを示すシャープな回折が示された。さらに、P(3HB)の高強度化繊維に共通して観察される、 $\beta$ (平面ジグザグ)構造に由来する回折も検出された。これまでの PHB 繊維に対する研究で  $\beta$  構造が発現する場合、微結晶核延伸法や冷延伸二段延伸繊維のように  $\alpha$  結晶の形成後、非晶質領域のタイ分子鎖に応力がかかり、この状態で熱処理されることで  $\beta$  構造が形成されるモデルが一般的である。本研究において、ブレンド繊維は一段階にも拘わらず  $\beta$  構造が発現していた。このため、二章におけるフィルムの結果と同様に、超高分子量 P(3HB)の添加はタイ分子鎖の増加や  $\beta$  構造の形成を促している可能性がある。

**Table 3-2** The Effects of melt-spinning time and melt-spinning temperature on spinning processability of the blend

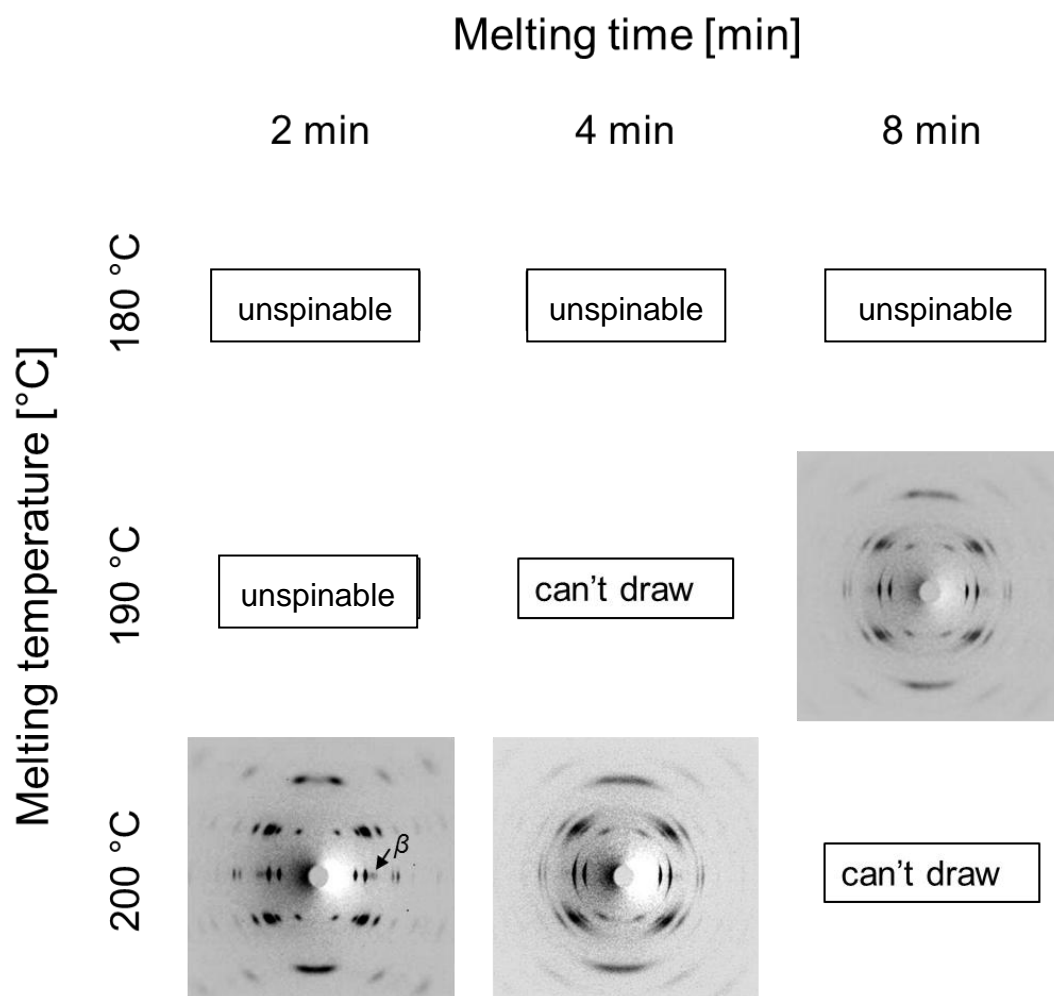
Melt-spinning Temperature [°C]	Melt-spinning time [min]		
	2	4	8
180	x <sup>a</sup>	x <sup>a</sup>	▲
190	x <sup>a</sup>	▲	○
200	○	○	x <sup>b</sup>

x<sup>a</sup>: The melted blend was unable to be spun because that was solid.

▲ : The melted blend was able to be spun but unable to draw

○ : The melted blend was able to be applied the spinning and drawing

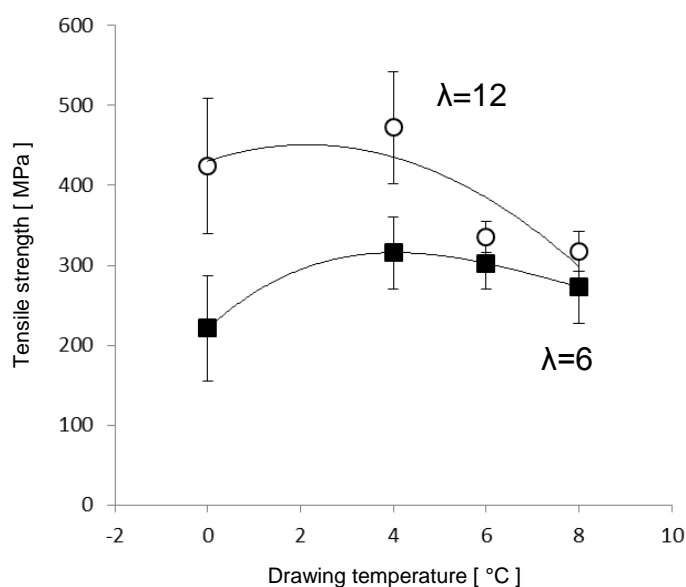
x<sup>b</sup>: The melted blend was unable to be spun because the viscosity of that was low



**Figure 3-2** The WAXD diffraction of blend fiber of different melt-spinning conditions.

### 3-3-3 引張強度に対する冷延伸温度の影響

Figure 3-3 に、引張強度と冷延伸温度の関係を示す。横軸は冷延伸温度、縦軸は引張強度を示しており、延伸倍率はそれぞれ 6 倍と 12 倍である。延伸倍率が 6 倍と低い場合は、引張強度は延伸温度の上昇と共に 300 MPa 程度まで上昇し、4 °C から 8 °C にかけて、300 MPa 程度まで低下した。P(3HB)のガラス点移転温度( $T_g$ )は 4 °C 付近に存在しており、0 °C はガラス状領域となっている。このため延伸温度の上昇は分子鎖の運動性を上げ、分子鎖配向を促す効果があると考えられる。一方で、延伸温度の上昇は同時に結晶化を促進させてしまい、分子鎖が十分に配向する前に結晶を形成し、配向度を下げってしまうため 4 °C から 8 °C の間では強度が低下したと考えられる。また、引張強度は延伸温度が 4 °C の時に最大となり、それ以降は強度が低下していった。このことは、延伸温度が 6 °C 以上では、延伸によって分子鎖が配向するよりも早く、結晶化速度が進行すると示唆している。



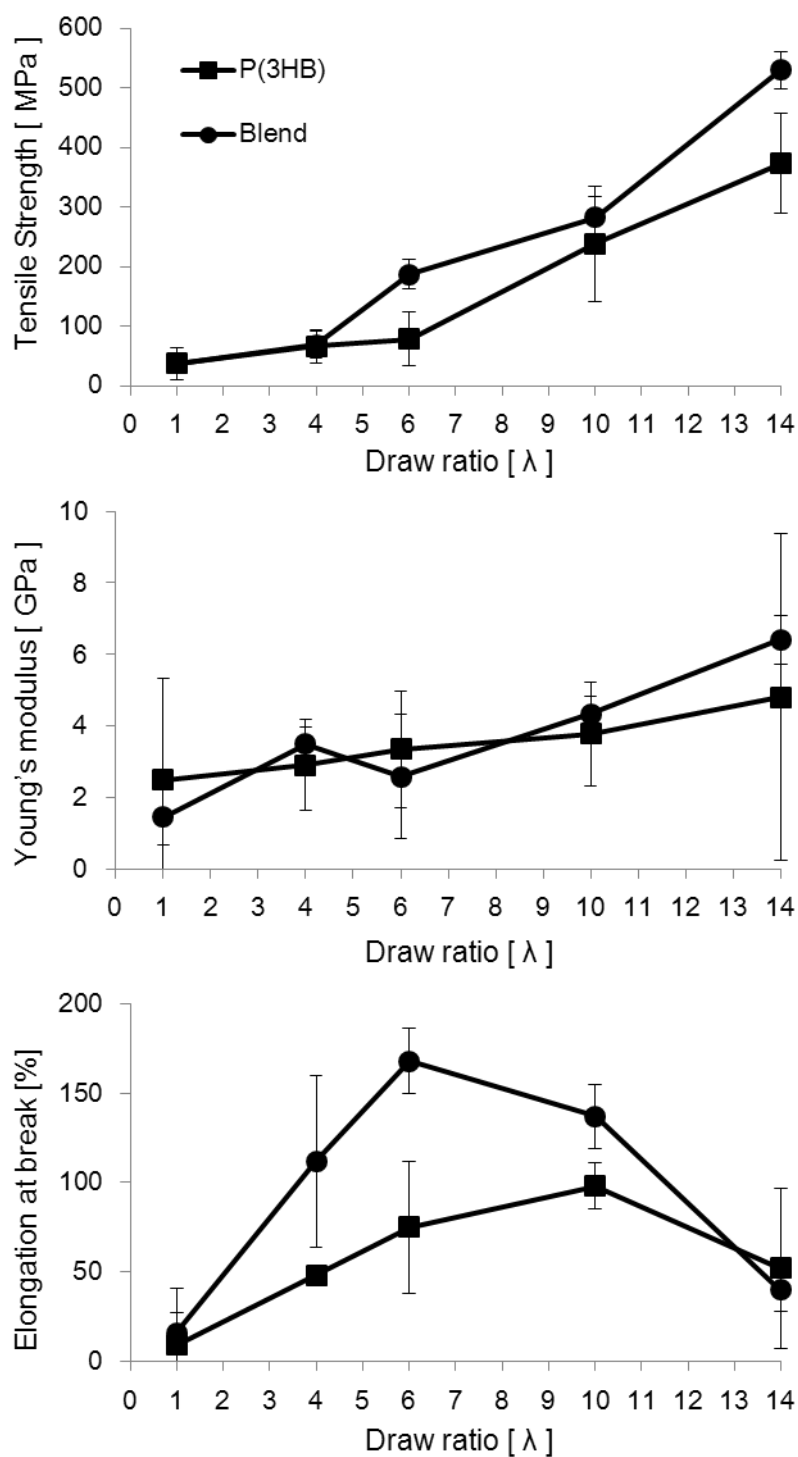
**Figure 3-3** The tensile strength of cold-drawn blend fiber as a function of drawing temperature on cold-drawing process. The drawing ratio of each samples are chosen at 6 and 12 times.

### 3-3-4 一段階冷延伸の強度および高次構造

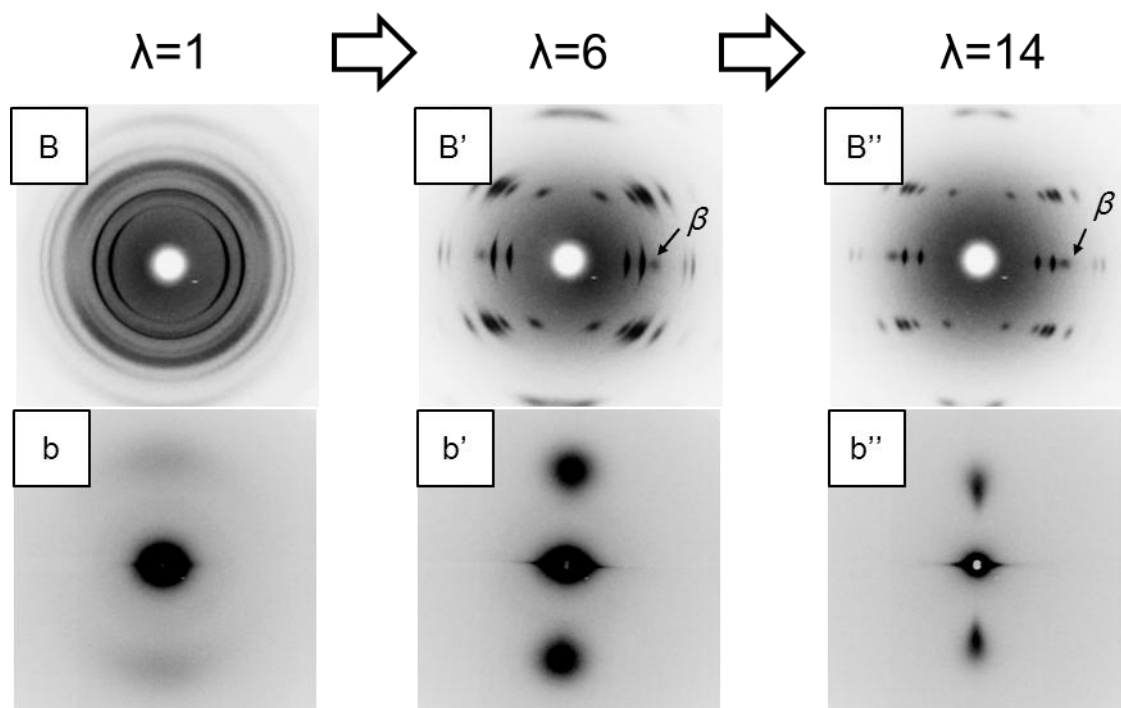
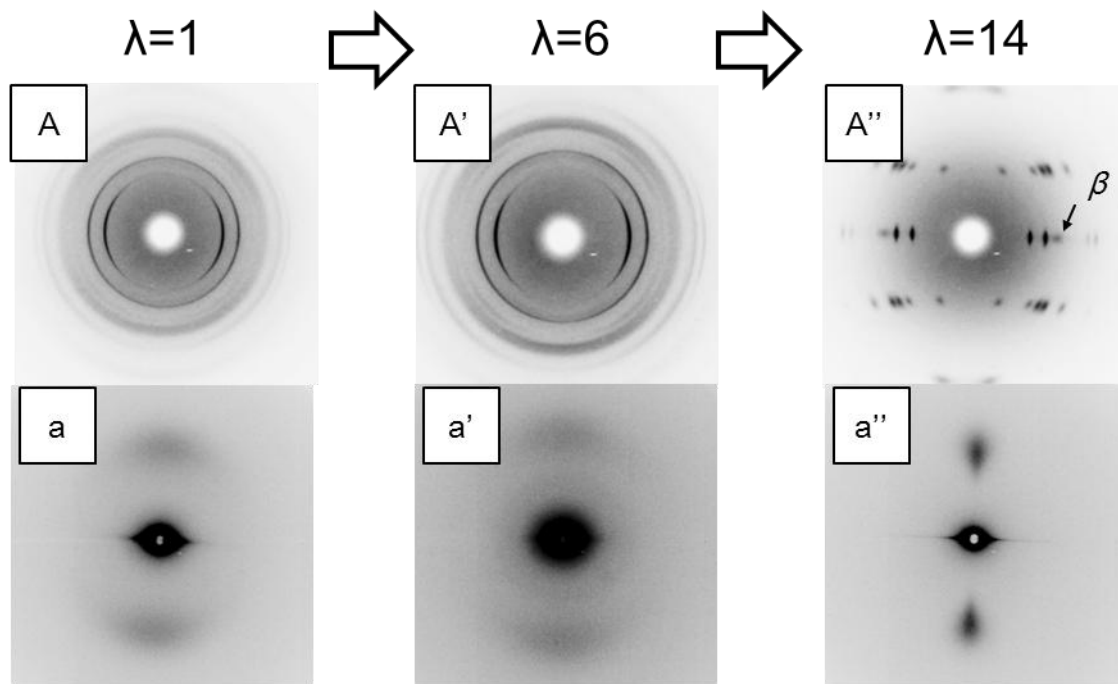
ここまで結果を基に、P(3HB)に対して熔融温度 200 °C、熔融時間 2 分、で紡糸を行い、延伸温度 4 °C で一段階冷延伸を施し、延伸サンプルを作製した。Figure 3-4 に P(3HB) およびブレンド繊維の引張試験結果を示す。P(3HB)が延伸倍率 6 倍から強度が上昇していくのに対して、ブレンドでは延伸倍率 4 倍から強度の上昇が認められた。また、延伸倍率 14 倍における両者の引張強度は、P(3HB)が 373 MPa であるのに対して、ブレンドは 530 MPa までの向上がなされた。一方、破壊伸びに注目すると、ブレンドは 6 倍まで、P(3HB)は 10 倍まで、延伸倍率と共に破壊伸びが上昇した。これは、延伸することによって分子鎖が配向し、引張試験中に破断せず再配列(配向)される分子鎖が増えるためである。

Figure 3-5 に、P(3HB)およびブレンド繊維における延伸倍率 1、6、14 倍の冷延伸と熱処理を施した冷延伸繊維の広角および小角 X 線回折図を示す。P(3HB)の場合、延伸倍率 1 倍の WAXD 図における赤道線方向にはアーク状の回折が検出された(Figure 3-5 A)。また、SAXS 図(Figure 3-5 a)の子午線方向にもブロードな散乱が見られることから紡糸直後の状態でもある程度分子鎖が配向していることがわかった。延伸倍率を上げていくと延伸倍率 6 倍までは延伸倍率 1 倍と同様な WAXD および SAXS 図(Figure 3-5 A' と a') が観察されたが、延伸倍率 14 倍では  $\beta$  構造回折を含む分子鎖の高配向性を示すシャープな回折点を有する WAXD 図(Figure 3-5 A)と、延伸方向に対して垂直な周期構造の存在を示す子午線上の強い散乱を有する SAXS 図(Figure 3-5 a'')が観察された。P(3HB)の引張強度は延伸倍率 6 倍から強度が上昇しているため、分子鎖も延伸倍率 6 倍程度を境に配向していると考えられる。次に、超高分子量 P(3HB)を添加したブレンドと比較すると、延伸倍率 6 倍で WAXD 図(Figure 3-5 B')上にラメラ結晶の高配向に由来するシャープな回折と  $\beta$  構造に由来する回折が出現していた。また SAXS 図(Figure 3-5 b')の子午線上に周期構造に由来する強い散乱が認められたことから、ブレンド繊維では延伸倍率 6 倍ですでに分子鎖の配向が始まっていることが分かった。また、 $\beta$  構造に由来する回折が延伸倍率 6 倍と低倍率で出現していることから超高分子量 P(3HB)の添加は、絡み合いおよびタイ分子鎖の増加を促していると考えられる。





**Figure 3-4** Mechanical properties of cold-drawn fibers as a function of draw ratio. (A) tensile strength, (B) Young's modulus, (C) elongation at break.

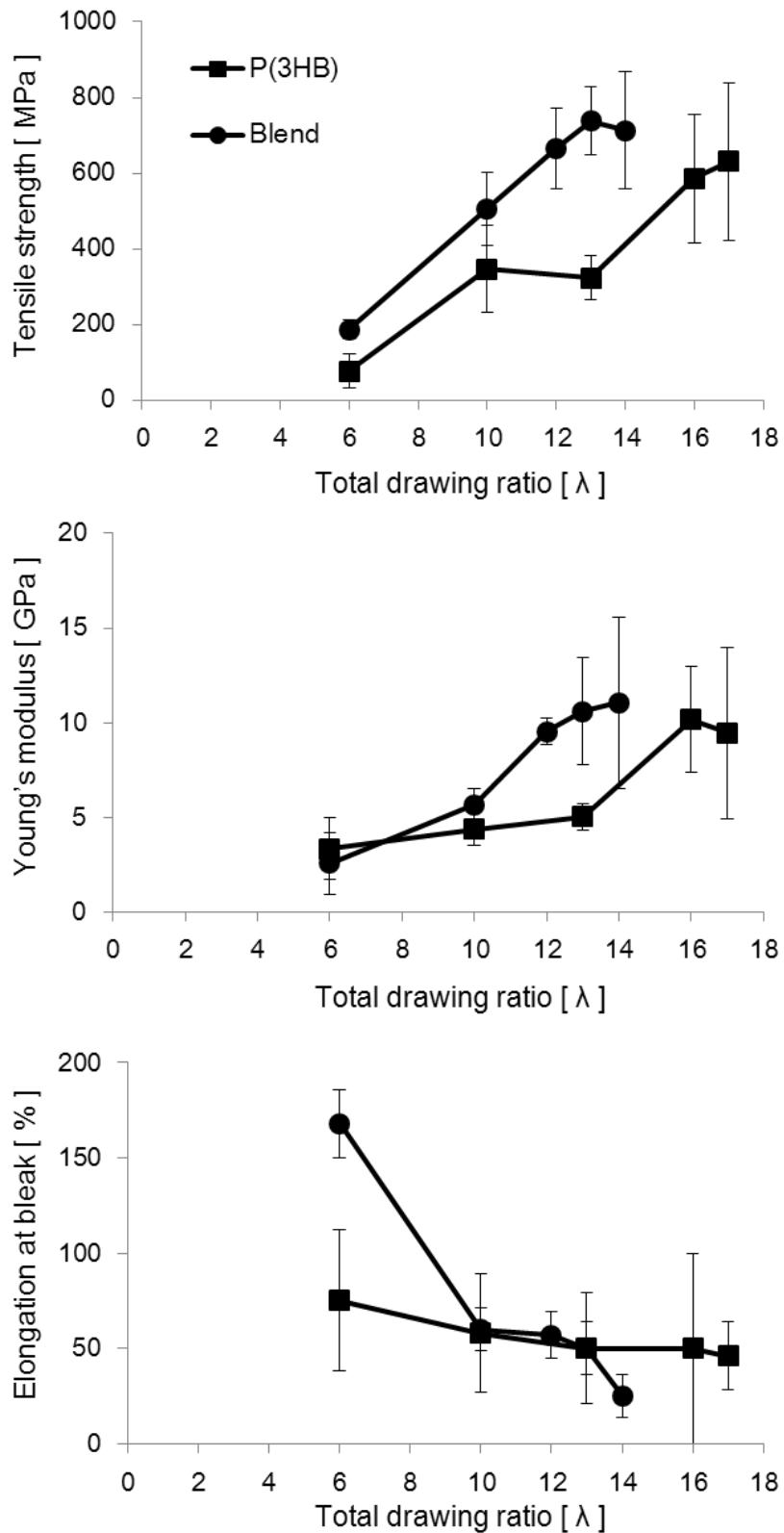


**Figure 3-5** WAXD and SAXS patterns of one-step cold-drawn fibers. (A,a) and (B,b) are P(3HB) and blend, respectively. Capital and small letter indicate WAXD and SAXD. Diagrams with prime and double prime represent that drawing ratio are 6 and 14, respectively.

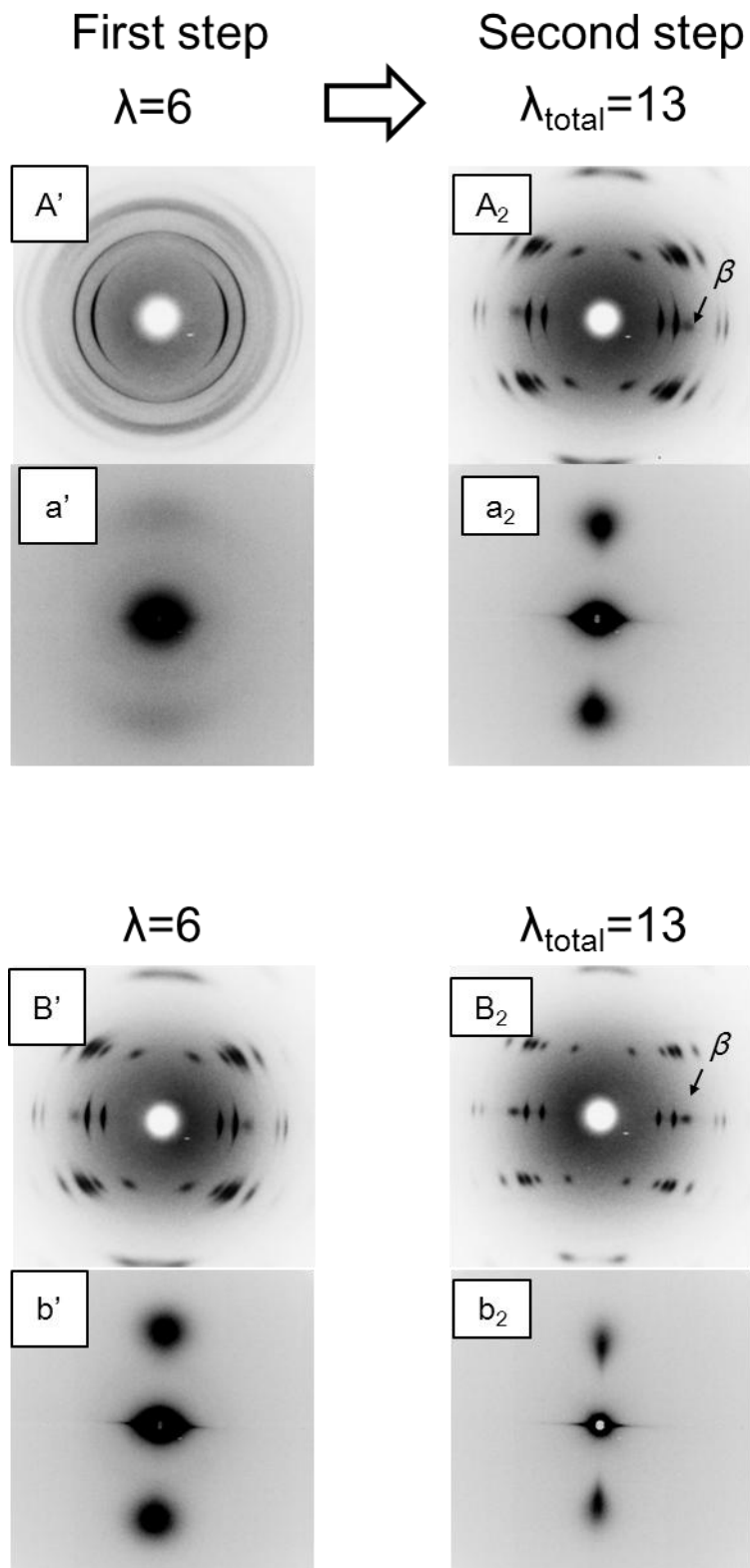
### 3-3-5 二段階冷延伸の強度および高次構造

Figure 3-6 に二段階冷延伸した P(3HB)およびブレンド繊維の引張試験結果を示す。P(3HB)に二段延伸法を適用すると、引張強度や配向度が上昇すると知られている。これは、一段階目の延伸温度より高い温度で行う二段階目の延伸時に、結晶の形成と分子鎖の配向が同時に起るためである。形成された結晶は分子鎖同士をつなぐため（物理的架橋のような状態）、分子鎖のすべりが起こらず、延伸応力は効率的に伝わる。横軸は総延伸倍率を示し、総延伸倍率 6 倍は一段階冷延伸のみの繊維である。P(3HB)の二段階冷延伸は総延伸倍率 17 倍までの延伸が可能であり、引張強度は 630 MPa まで上昇した。この値は、これまで報告されている高速熔融紡糸(Schmack, G. *et al.*, 2000)、熱延伸(Yamane, H. *et al.*, 2001)、二段階延伸(Furuhashi, Y. *et al.*, 2004)よりも高い値を示した。次にブレンド繊維に注目すると、総延伸倍率 13 倍の引張強度は 740 MPa を示した。二段階繊維の場合でも P(3HB)よりも低い延伸倍率で強度の上昇が認められた。

Figure 3-7 に総延伸倍率 13 倍を有する、P(3HB)およびブレンドから作製した二段階冷延伸繊維の WAXD および SAXS 図を示す。ブレンドの WAXD 図(Figure 3-7 B')には、明確な  $\beta$  構造由来の回折が赤道線上に現れていた。P(3HB)およびブレンドの WAXD 図における二段階冷延伸前後を比較すると、同一な延伸倍率( $\lambda=13$ )の場合、ブレンドの方が P(3HB)よりもシャープな回折を示していた。同様に、SAXS 図同士を比較すると子午線上の散乱は P(3HB)のほうが円形であり、ブレンドでは楕円型の散乱を示した。この楕円形は、延伸方向に対してラメラ結晶が垂直に配向しており、その周期にばらつきがある場合に出現する。以上の結果は、総延伸倍率 13 倍で十分に分子鎖が配向していることを示唆している。



**Figure 3-6** Mechanical properties of P(3HB) and blend fibers prepared by two step cold-drawing, respectively. (A) Tensile strength, (B) Young's modulus, (C) Elongation at break.



**Figure 3-7** WAXD and SAXS pattern of cold-drawn and two-step cold-drawn fibers. (A',a') and (B',b') are diagrams with prime and double prime represent that drawing ratio are 6. A<sub>2</sub>, a<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>, b<sub>2</sub> indicate two-step cold-drawn fibers.

### 3-4 結言

P(3HB)および超高分子量 P(3HB)と P(3HB)のブレンドについて、最適紡糸条件の検討を行った結果、熔融温度 200 °C、熔融時間 2 分前後であった。分子量測定および引張強度測定の結果から、熔融開始直後から分子量は大きく低下し、紡糸可能な限界分子量は  $M_w=1.00 \times 10^5$  前後であった。また、冷延伸の温度は 0 °C から 8 °C の範囲で引張強度に影響を与え、4 °C で最も高い引張強度を示した。以上の結果を基に、一段階冷延伸を施したところ、P(3HB)では引張強度 373 MPa、ブレンドフィルムでは 530 MPa を有する繊維を作製することが出来た(Table 3-3)。広角および小角 X 線回折の結果から、超高分子量 P(3HB)の添加は分子鎖の配向を促すことが分かった。さらに、二段延伸を試みた結果、P(3HB)では 630 MPa、ブレンドでは 740 MPa の引張強度を有する高強度繊維を作製することができた(Table 3-3)。広角および小角 X 線回折測定結果から、超高分子量の添加は絡み合いの上昇、あるいは残留結晶の増加を促すことで、分子鎖同士を繋げている可能性が示唆された。

**Table 3-3** Tensile strength, Young's modulus, and elongation at break of one- and two-step cold drawn fibers.

drawing method	sample	first drawing ratio ( $\lambda$ )	second drawing ratio ( $\lambda$ )	Total drawing ratio ( $\lambda$ )	Tensile strength (MPa)	elongation at break (%)	Young's modulus (GPa)	
1 step cold-drawing	P(3HB)	1	-	1	37 ± 27	9 ± 32	2.49 ± 2.85	
		6	-	6	78 ± 45	75 ± 37	3.34 ± 1.64	
		14	-	14	373 ± 84	52 ± 45	4.80 ± 4.56	
	Blend	1	-	1	37 ± 2	16 ± 11	1.44 ± 0.78	
		6	-	6	187 ± 25	168 ± 18	2.58 ± 1.73	
		14	-	14	530 ± 31	40 ± 12	6.41 ± 0.69	
	2 step cold-drawing	P(3HB)	6	1	6	78 ± 45	75 ± 37	3.34 ± 1.64
			6	1.7	10	347 ± 114	58 ± 31	4.37 ± 0.86
			6	2.2	13	324 ± 59	50 ± 29	5.04 ± 0.71
blend		6	2.8	17	630 ± 209	46 ± 18	9.46 ± 4.53	
		6	1	6	187 ± 25	168 ± 18	2.58 ± 1.73	
blend		6	1.6	10	506 ± 97	60 ± 11	5.67 ± 1.32	
		6	2.2	13	740 ± 90	50 ± 14	10.6 ± 0.35	

## 参考データ

Figure 3-I,3-II 溶融条件と半結晶化時間

等温結晶化過程の DSC 曲線から算出される半結晶化時間( $t_{1/2}$ )は熱履歴に影響を受ける。溶融が不完全である場合は、溶け残りが結晶核として振る舞うため  $t_{1/2}$  は短くなり、完全に溶けている場合は長くなる。Figure 3-II は、一定温度(溶融温度)、一定時間(溶融時間)で保持した後、すぐに結晶化温度まで冷却し(Figure 3-I)、半結晶化時間を溶融温度ごとに溶融時間に対してプロットした図である。溶融温度には測定が容易な  $90^{\circ}\text{C}$  を選択した。溶融温度が  $200^{\circ}\text{C}$  の場合は、P(3HB)、ブレンド共に  $t_{1/2}$  が各溶融時間で近い値を有しているため、溶融時間 2 min で十分に溶融が進行していると考えられる。

溶融温度  $190^{\circ}\text{C}$  の P(3HB)とブレンドを倍率較すると、ブレンドの  $t_{1/2}$  が P(3HB)の  $t_{1/2}$  と比較して短い値を有していた。この、短い  $t_{1/2}$  は超高分子量 P(3HB)の添加により溶け残りが増加する可能性を示唆している。 $190^{\circ}\text{C}$  付近で見つかる溶け残り結晶(残留結晶)による影響は、高次構造制御に使用できるかもしれない。例えば微結晶核延伸法(Tanaka, T. *et al.*, 2007b)は  $T_g$  付近で保持することで小さな結晶核を作り、その後延伸している。残留結晶の影響に対する考察やこれらを用いた高次構造制御の可能性についてはさらなる実験結果が必要である。

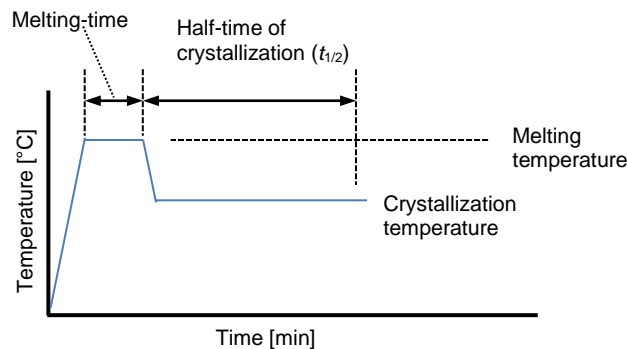


Figure 3-I The heating profile before isothermal crystallization stage for Figure 3-II

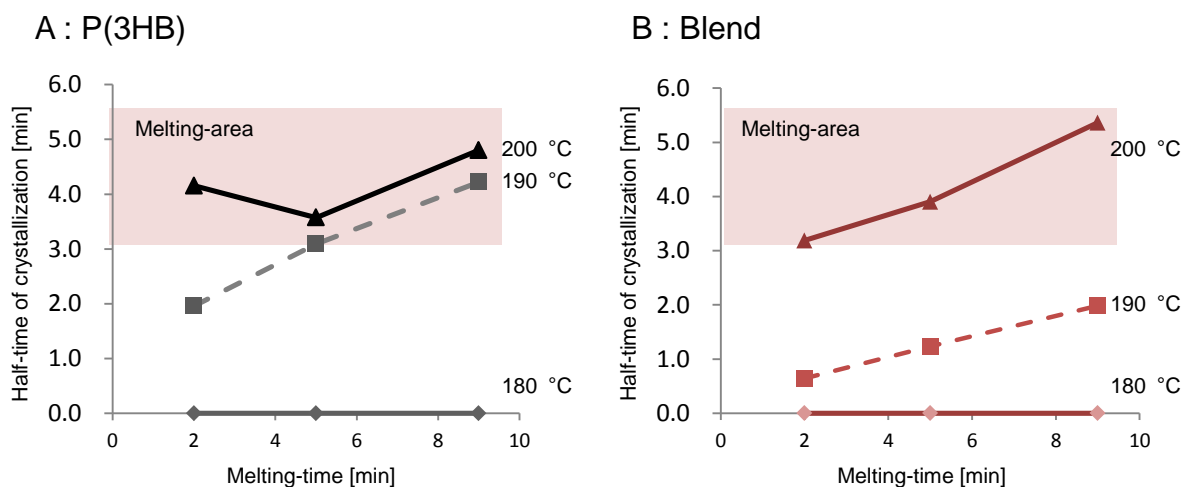


Figure 3-II Half-time of crystallization at each melting-temperature as a function of melting-time.

Figure 3-III 一段階冷延伸繊維の広角および小角 X 線回折図

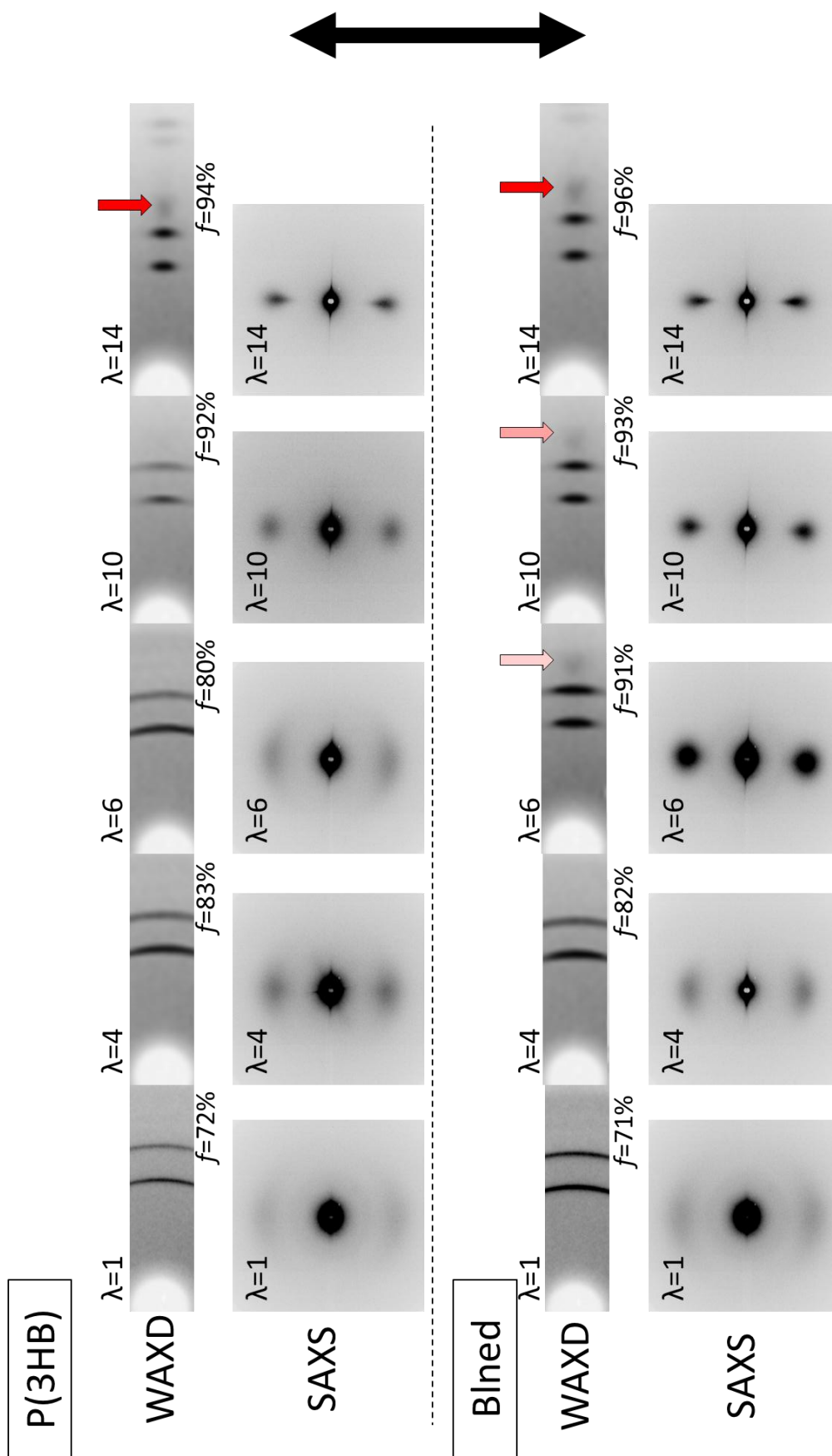


Figure 3-III SAXS patterns and Equatorial line of WAXD patterns of one-step cold-drawn fibers.  $\lambda$ ,  $f$ , arrowhead and double-headed arrow indicate the drawing ratio, degree of orientation,  $\beta$ -diffraction and drawing direction.



Figure 3-IV 一段階冷延伸繊維の  $\beta$  強度比

Figure 3-5 から式(2-5)を使用し  $\beta$  強度比( $R_{\beta/\alpha(020)}$ )を算出した結果を Figure 3-IV に示す。

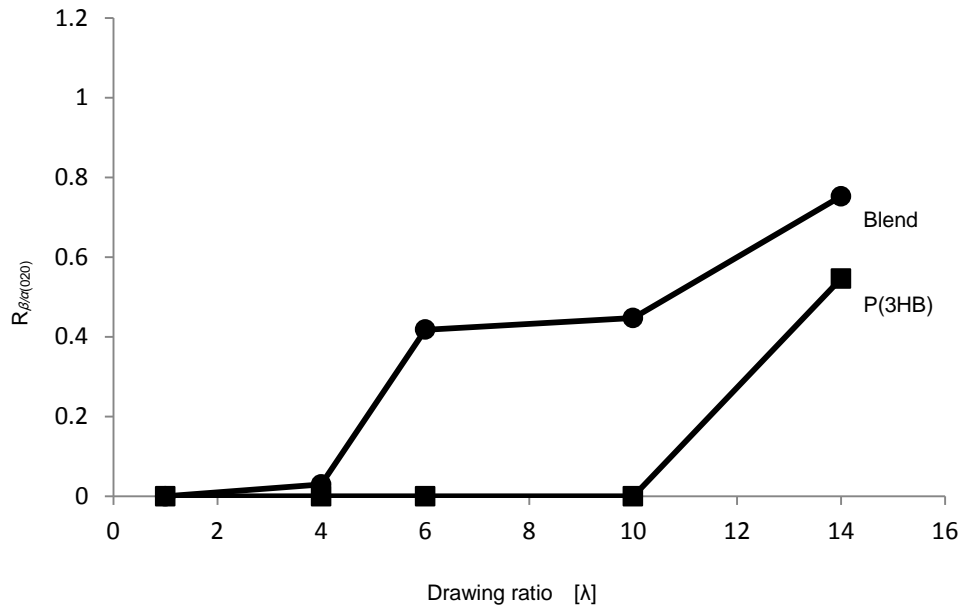


Figure 3-IV Intensity ratio of the  $\beta$ -form reflection against the (020) reflection of the  $\alpha$ -form in one-step cold-drawn fibers.

Figure 3-V 二段階冷延伸繊維の  $\beta$  強度比

Figure 3-7 から式(2-5)を使用し  $\beta$  強度比( $R_{\beta/\alpha(020)}$ )を算出した結果を Figure 3-V に示す。

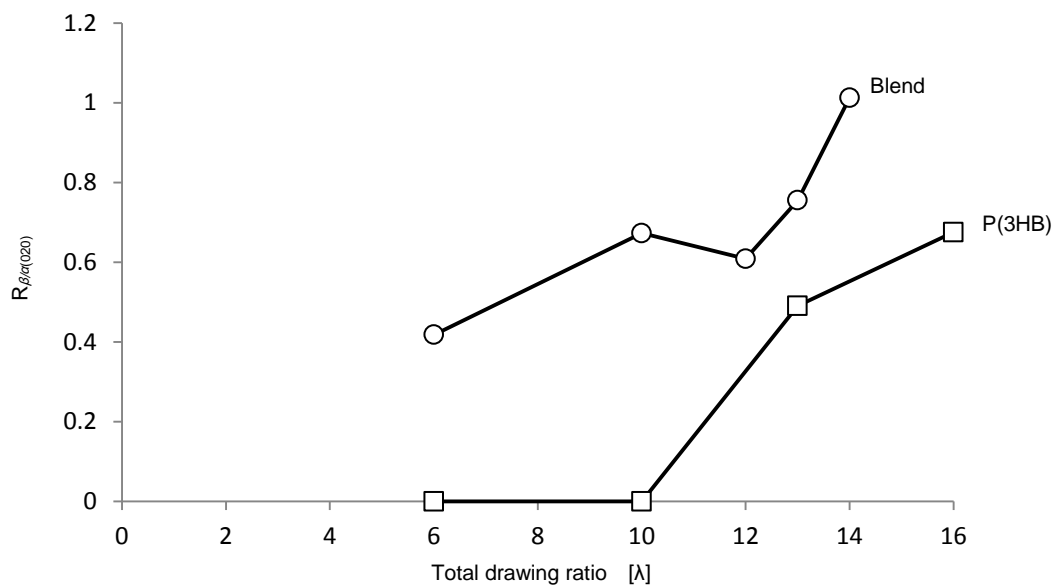


Figure 3-V Intensity ratio of the  $\beta$ -form reflection against the (020) reflection of the  $\alpha$ -form in two-step cold-drawn fibers.

## 参考文献

Aoyagi, Y., K. Yamashita, Y. Doi (2002):

"Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[epsilon-caprolactone], and poly[(S)-lactide]" *Polym. Degrad. Stab.*, **76**, 53-59.

Furuhashi, Y., Y. Imamura, Y. Jikihara, H. Yamane (2004):

"Higher order structures and mechanical properties of bacterial homo poly(3-hydroxybutyrate) fibers prepared by cold-drawing and annealing processes" *Polymer*, **45**, 5703-5712.

Gordeyev, S. A., Y. P. Nekrasov, S. J. Shilton (2001):

"Processing of gel-spun poly(beta-hydroxybutyrate) fibers" *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**, 2260-2264.

Grassie, N., E. J. Murray, P. A. Holmes (1984a):

"The Thermal-Degradation of Poly(-(D)-Beta-Hydroxybutyric Acid) .2. Changes in Molecular-Weight" *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 95-103.

Grassie, N., E. J. Murray, P. A. Holmes (1984b):

"The Thermal-Degradation of Poly(-(D)-Beta-Hydroxybutyric Acid) .3. The Reaction-Mechanism" *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 127-134.

Iwata, T., Y. Aoyagi, M. Fujita, H. Yamane, Y. Doi, Y. Suzuki, A. Takeuchi, K. Uesugi (2004):

"Processing of a Strong Biodegradable Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Fiber and a New Fiber Structure Revealed by Micro-Beam X-Ray Diffraction with Synchrotron Radiation" *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 1100-1104.

Kahar, P., J. Agus, Y. Kikkawa, K. Taguchi, Y. Doi, T. Tsuge (2005):

"Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant *Escherichia coli*" *Polym. Degrad. Stab.*, **87**, 161-169.

Kim, K. J., Y. Doi, H. Abe (2006):

"Effects of residual metal compounds and chain-end structure on thermal degradation of poly(3-hydroxybutyric acid)" *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 769-777.

Kusaka, S., H. Abe, S. Y. Lee, Y. Doi (1997):

"Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143.

Ogino, Y., H. Fukushima, G. Matsuba, N. Takahashi, K. Nishida, T. Kanaya (2006):

"Effects of high molecular weight component on crystallization of polyethylene under shear flow" *Polymer*, **47**, 5669-5677.

Sawatari, C., T. Okumura, M. Matsuo (1986):

"Molecular-Weight Dependence on the Morphological Properties of Polyethylene Gels" *Polym. J.*, **18**, 741-758.

Schmack, G., D. Jehnichen, R. Vogel, B. Tandler (2000):

"Biodegradable fibers of poly(3-hydroxybutyrate) produced by high-speed melt spinning and spin drawing" *J Polym Sci Pol Phys*, **38**, 2841-2850.

Tanaka, T., K. Uesugi, A. Takeuchi, Y. Suzuki, T. Iwata (2007a):

"Analysis of inner structure in high-strength biodegradable fibers by X-ray microtomography using synchrotron radiation" *Polymer*, **48**, 6145-6151.

Tanaka, T., T. Yabe, S. Teramachi, T. Iwata (2007b):

"Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near T-g" *Polym. Degrad. Stab.*, **92**, 1016-1024.

Tanaka, T., T. Yabe, S. Teramachi, T. Iwata (2007c):

"Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near Tg" *Polym. Degrad. Stab.*, **92**, 1016-1024.

Yamane, H., K. Terao, S. Hiki, Y. Kimura (2001):

"Mechanical properties and higher order structure of bacterial homo poly(3-hydroxybutyrate) melt spun fibers" *Polymer*, **42**, 3241-3248.

## 第四章

P(3HB)の  $\beta$  構造における熱的性質と  
溶融過程の詳細な高次構造解析

## 4-1 緒言

P(3HB)には、二種類の結晶構造があることが報告されている。一つは、P(3HB)の最も安定な結晶構造である2回らせん構造( $\alpha$ 構造)である(Figure 2-1)。これは、格子定数： $a = 0.576$  nm、 $b = 1.320$  nm、 $c$  (繊維周期) $= 0.596$  nm、空間群  $P2_12_12_1$ 、全ての結晶軸に対して垂直な2回らせん軸を有する斜方晶系である(Okamura, K. and Marchessault, R. H., 1967; Yokouchi, M. *et al.*, 1973)。もう一つは、平面ジグザグ構造( $\beta$ 構造)である(Orts, W. J. *et al.*, 1990; Tanaka, F. *et al.*, 2004)(Figure 2-1)。X線回折測定によって、P(3HB)の $\beta$ 構造は、引張強度の高い繊維やフィルムで測定されているものの、回折点が赤道線上に一点とわずかな層線回折しか現れず、正確な結晶構造は決定されていない(Iwata, T. *et al.*, 2006)。さらに、P(3HB)の $\beta$ 構造単体に対する詳細な熱的特性に対する報告は少ない。そこで、本研究では、大型放射光を用いた昇温リアルタイム広角および小角X線回折と高速DSC測定を行い、P(3HB)における $\beta$ 構造の熱的挙動および昇温時の高次構造変化について詳細に把握することを目的として分析をおこなった。

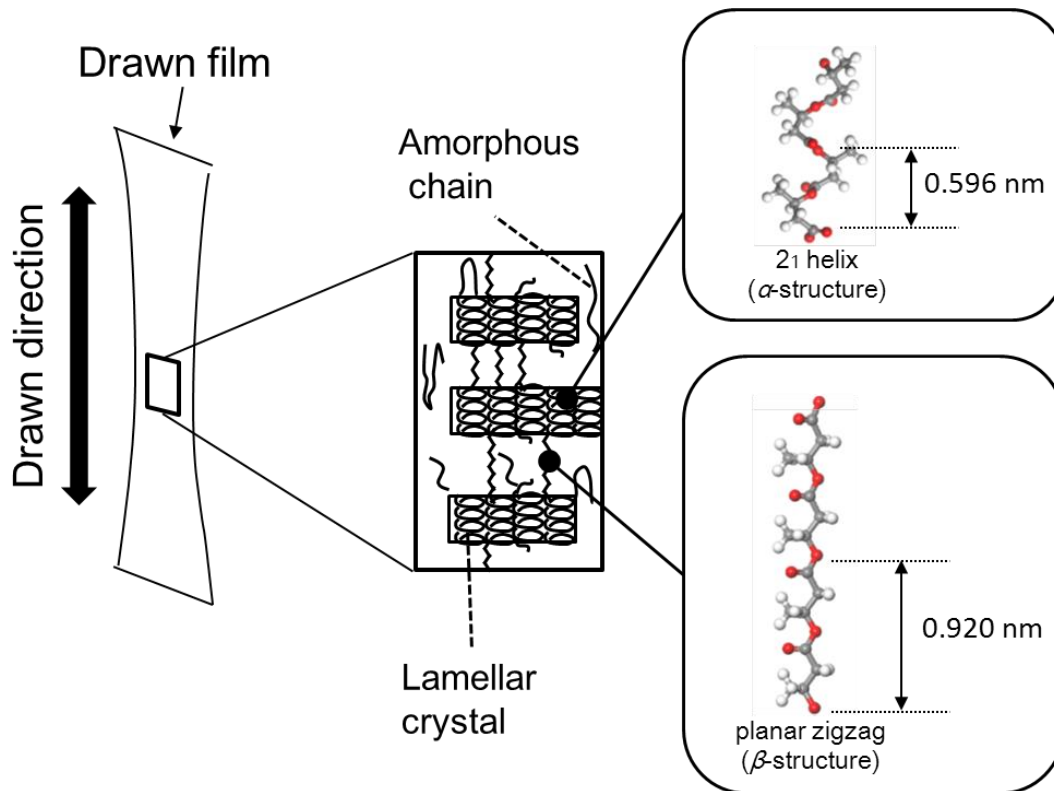


Figure 4-1 Two kinds of molecular chains of P(3HB).

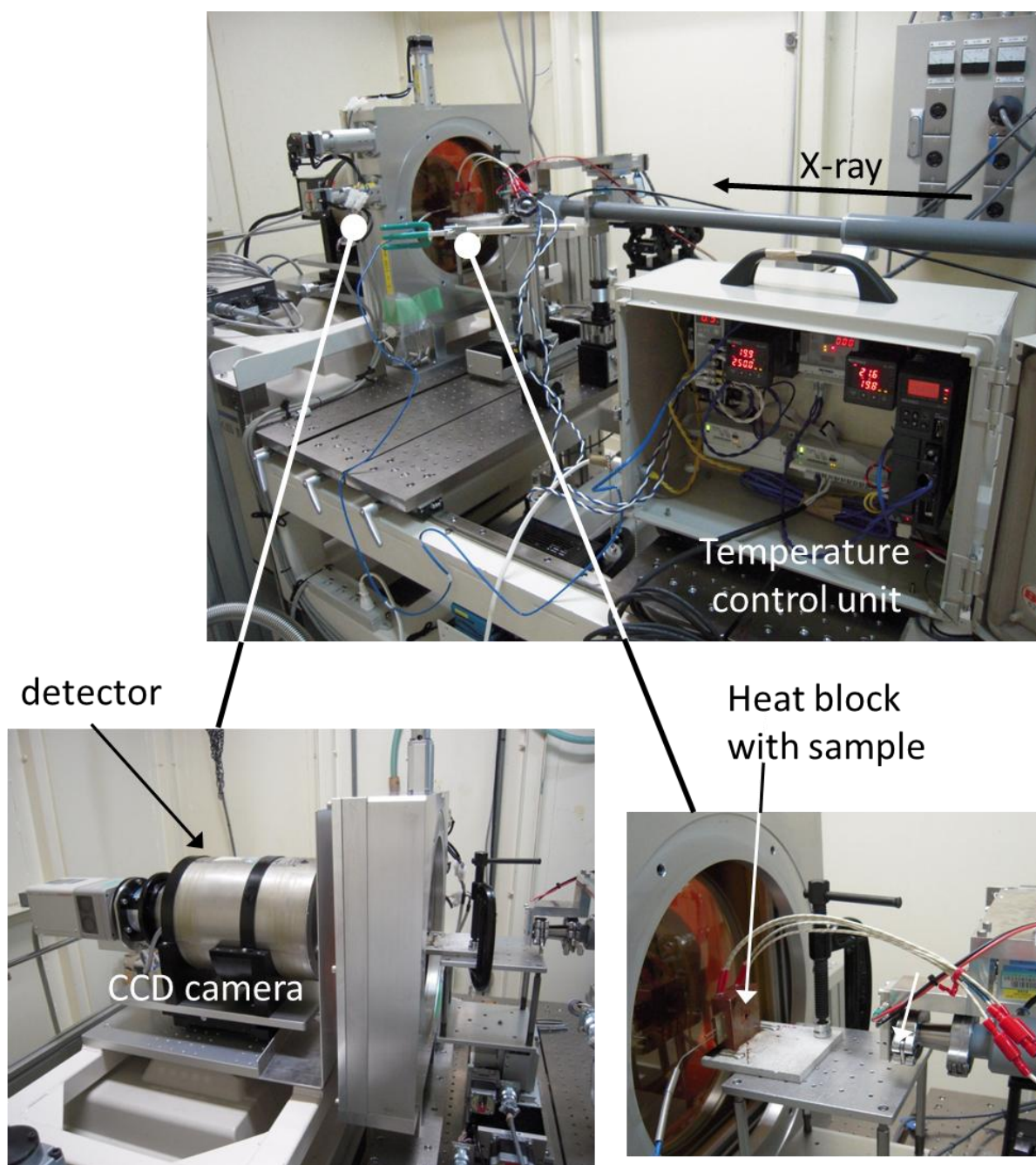
## 4-2 実験

### 4-2-1 試料

P(3HB)は、ICI 社製(重量平均分子量( $M_w$ ) =  $7.11 \times 10^5$ 、多分散度(DPI) = 2.23)を使用し、超高分子量 P(3HB)(UHMW-P(3HB))は *E. coli* JM109 を用い Kahar (Kahar, P. *et al.*, 2005)らの手法を参考に生合成した(重量平均分子量( $M_w$ ) =  $3.78 \times 10^6$ 、多分散度(DPI) = 1.64)。精製した P(3HB)および UHMW-P(3HB)をクロロホルムに溶解させ、溶液状態の両者をブレンドした。ブレンド比率は、UHMW-P(3HB)/P(3HB) = 5/95 とした。ブレンド溶液はエバポレーターを用いて濃縮し、ヘキサンで析出沈殿させ、真空乾燥機の中で3日間乾燥させた。その後、ソルベントキャスト法を用いてフィルムを作製し、真空乾燥機内で3日間乾燥させた。その後、ホットプレスを用いて 200 °C、30 秒、3 MPa で熔融後、氷水中に投入し、非晶質状態のフィルムを調製した。氷水に投入後すぐに手回し延伸機にフィルムをセットし、0 °C 付近で冷延伸を施した。作製した延伸サンプルを延伸機ごと 100 °C の乾燥機中に投入し2時間アニーリングを施した。

### 4-2-2 昇温リアルタイム広角および小角 X 線測定

基本的な測定条件は 2-2-8 と同様にした。サンプルとして、あらかじめ WAXD 測定を行い  $\beta$  構造由来の回折が確認された冷延伸 12 倍延伸ブレンドフィルムと、対照サンプルとして  $\beta$  構造を含まない冷延伸 10 倍延伸ブレンドフィルムを用いた。昇温リアルタイム X 線測定は、SPring-8 の BL45XU で行った。ビームライン内に昇温装置を設置し、ビーム通過スリットのあるヒートブロックを設置した(Figure 4-2)。ヒートブロックにフィルムを取り付け、30 °C から 200 °C までの間、2.5 °C 刻みで測定を行った。ヒートブロックの昇温速度は平均昇温速度 10 °C /分とした。また、撮影条件は露光時間 0.056 秒、積算回数 1 回とした。解析には Fit2D および HerMesJ-1D を使用した。



**Figure 4-2** The photograph of experimental instrument for in-situ X-ray measurement with elevated temperature.

#### 4-2-3 DSC 測定

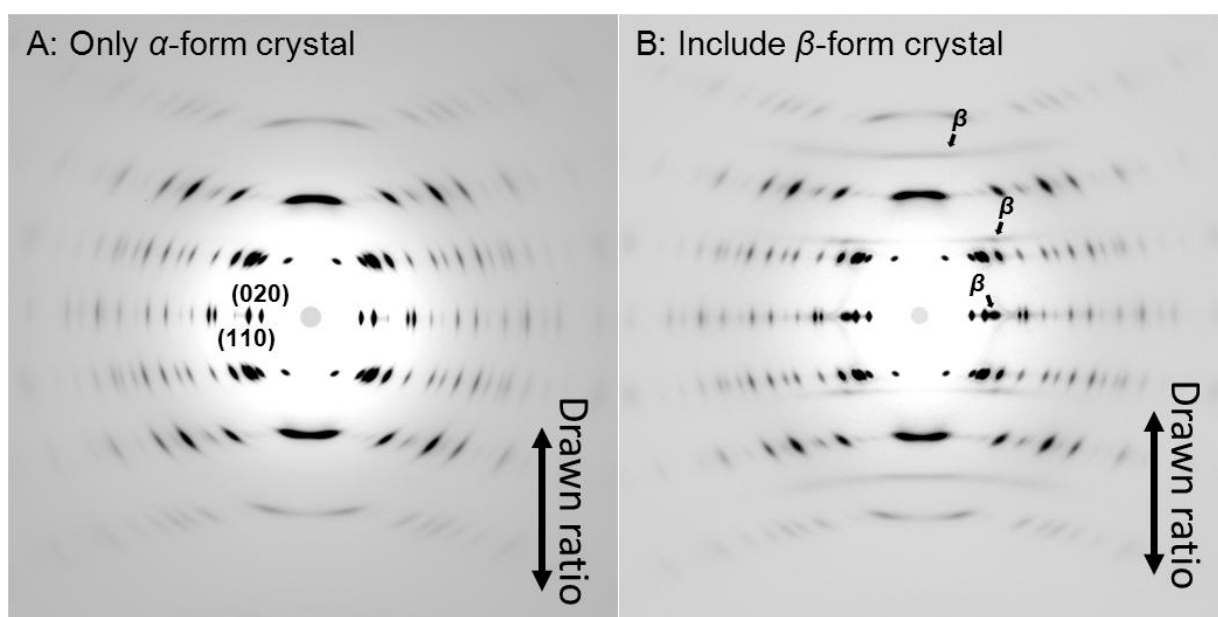
DSC 測定には、DSC8500(パーキンエルマー)を用いた。温度較正には Indium を使用した。測定雰囲気を窒素とし、測定範囲-50 °C から 200 °C の間で、昇温速度は 10 °C /分 および 200 °C /分で行った。アルミパンにサンプルを約 1mg 前後充填し測定を行った。

## 4-3 結果および考察

### 4-3-1 広角 X 線回折測定

作製した延伸フィルムに  $\beta$  構造が存在するかを調べるため広角 X 線測定を行った。Figure 4-3A に、 $\beta$  構造の存在しない  $\alpha$  構造のみのフィルム(以降  $\alpha$  フィルムと呼ぶ)の WAXD 図を示し、Figure 4-3B に 12 倍まで延伸し、 $\beta$  構造を含むフィルム(以降  $\beta$  フィルムと呼ぶ)の WAXD 図を示す。Figure 4-3A における  $\alpha$  構造由来の回折点にはミラー指数を記した。 $\beta$  フィルムの回折図(Figure 4-3B)には、赤道線上に強い  $\beta$  構造由来の回折が現れ、さらに、第一および第二層線を検出することが出来た。このことから、 $\beta$  構造はメソ構造などではなく、結晶構造をとることが分かった。

Vonk の手法を用いて算出した  $\alpha$  フィルムおよび  $\beta$  フィルム、結晶化度はそれぞれ 67 % および 66 % であった。

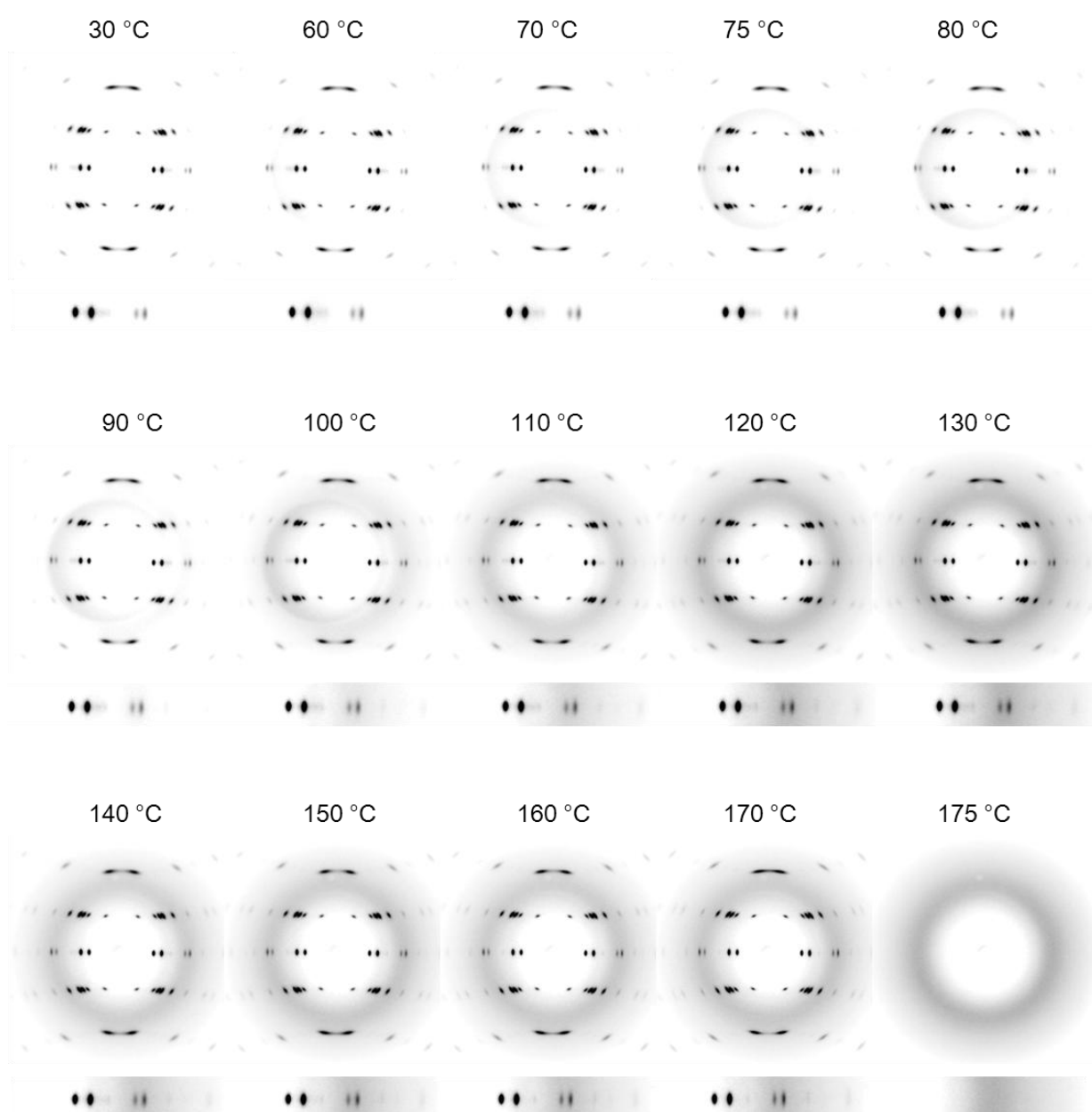


**Figure 4-3** 2-D WAXD patterns of the cold-drawn films, which consist of (A) only  $\alpha$ -form and (B) both  $\alpha$ -form and  $\beta$  form.



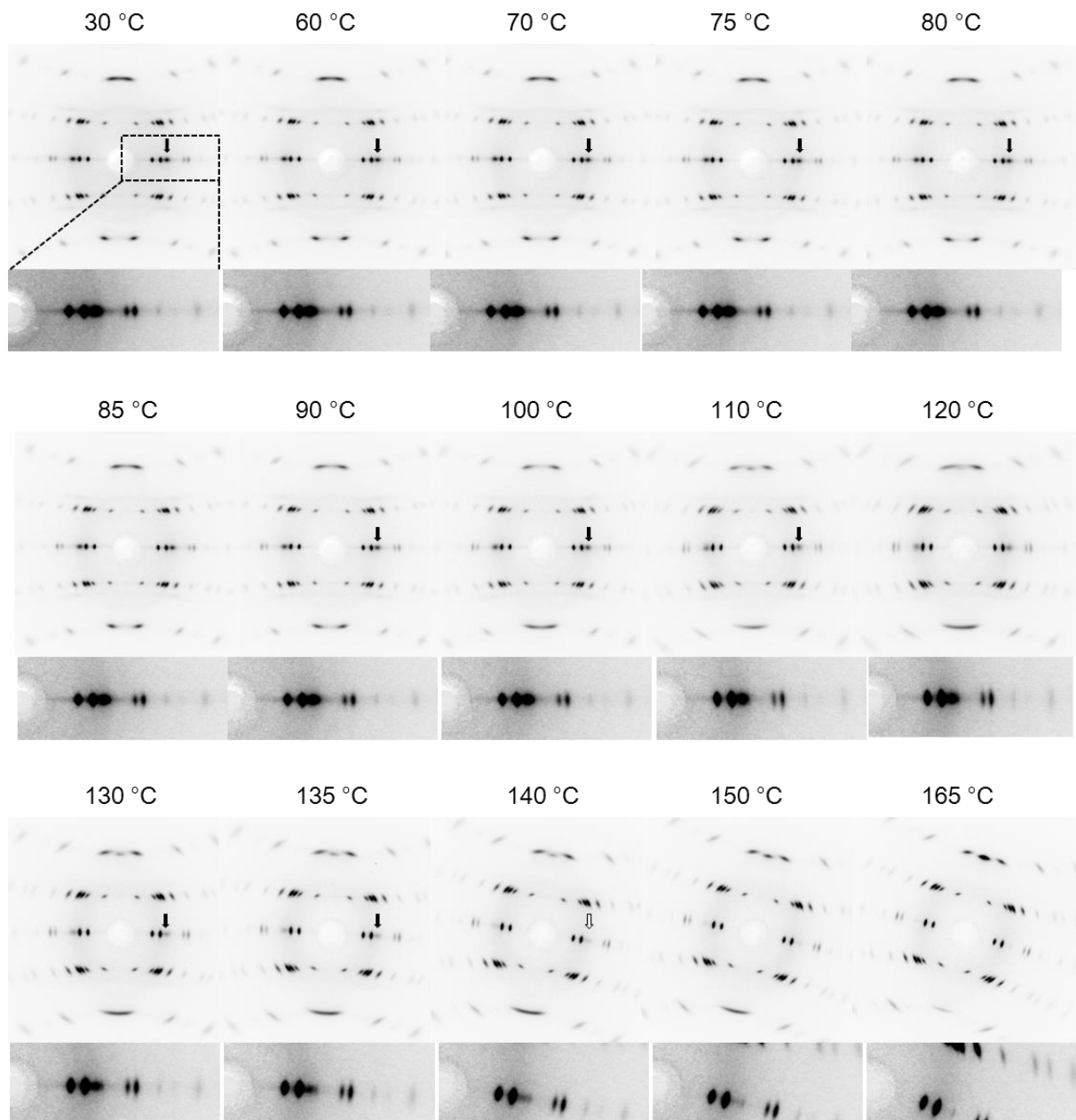
#### 4-3-2 昇温リアルタイム広角 X 線回折測定

Figure 4-4 に  $\alpha$  フィルムの昇温過程における広角 X 線回折図を示す。80 °C までは大きな変化は見られないが 90 °C 付近から非晶質に由来するブロードな散乱が出現した。その後も非晶質は増え続け、175 °C で非晶質のピークのみを残して結晶質由来の回折は消失した。これは 175 °C を超えた時点でフィルムが熔融したためである。



**Figure 4-4** 2-D WAXD patterns of the cold-drawn films with only  $\alpha$ -form crystal during the elevated temperature.

Figure 4-5 に昇温過程で撮影した  $\beta$  フィルムからの WAXD 図を示す。赤道線付近の矢印は  $\beta$  回折を示す。点線で囲まれた部分については下に拡大して示した。100 °C 付近から  $\beta$  回折は弱くなり、150 °C で消失した。また 130 °C 付近から回折図が傾いている。これはフィルムが熱変形していることに起因している。170 °C に到達すると一瞬で回折がすべて消失した。これは、熔融の進行と共にフィルムが形状を保てず溶け落ちたためであると考えられる。



**Figure 4-5** WAXD patterns of the cold-drawn films including  $\beta$ -form and  $\alpha$ -form crystals during the elevated temperature.

Figure 4-5 の回折図では、温度と共に変化していく  $\beta$  構造の残存量を定量的に評価することは出来ない。そこで赤道線に対してそれぞれ方位角  $11^\circ$  の範囲を切り出し(中心角  $22^\circ$  の扇形)その範囲の回折を 1 次元プロファイルに変換したものを Figure 4-6 に示す。Figure 4-6 の曲線は下から順に、30-165  $^\circ\text{C}$  までの Figure 4-5 に相当する回折図に由来している。 $\beta$  回折図由来のピークは 135  $^\circ\text{C}$  付近からは判別できないほど強度が減少していた。P(3HB)の非晶質ハローは  $\alpha(110)$  と  $\beta$  回折の間に存在しており、熔融の進行と共に非晶質ハローが他の回折と重なる。このため、昇温過程の X 線回折測定に置いて、単純な回折強度増減を用いた評価は、温度と共に増加する非晶質の量までも結晶として加算してしまう恐れがあり、昇温測定には望ましくない。そこで、この一次元プロファイルに対してピーク分離を行った。ピーク分離ソフトウェア HerMesJ-1D を用い、ピークのフィッティングにはガウス関数を適用した。

Figure 4-7 はピークを分離した結果である。7 つに分離されたピークの帰属を Table1 に示す。1,2,4,5 はそれぞれ  $\alpha$  構造由来の回折である。3 番が赤道線上に現れる  $\beta$  構造由来の回折である。

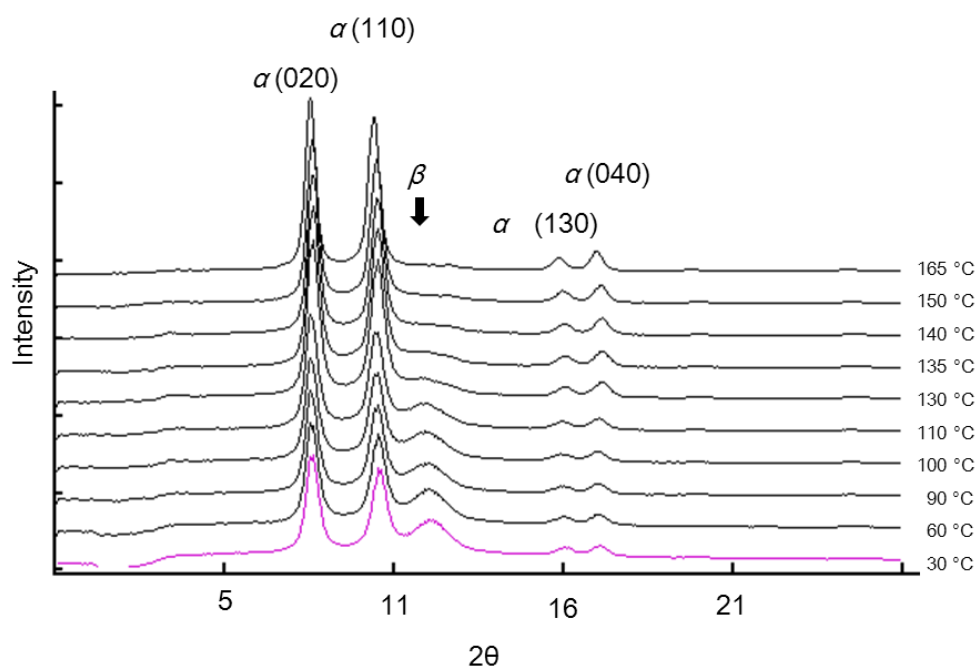
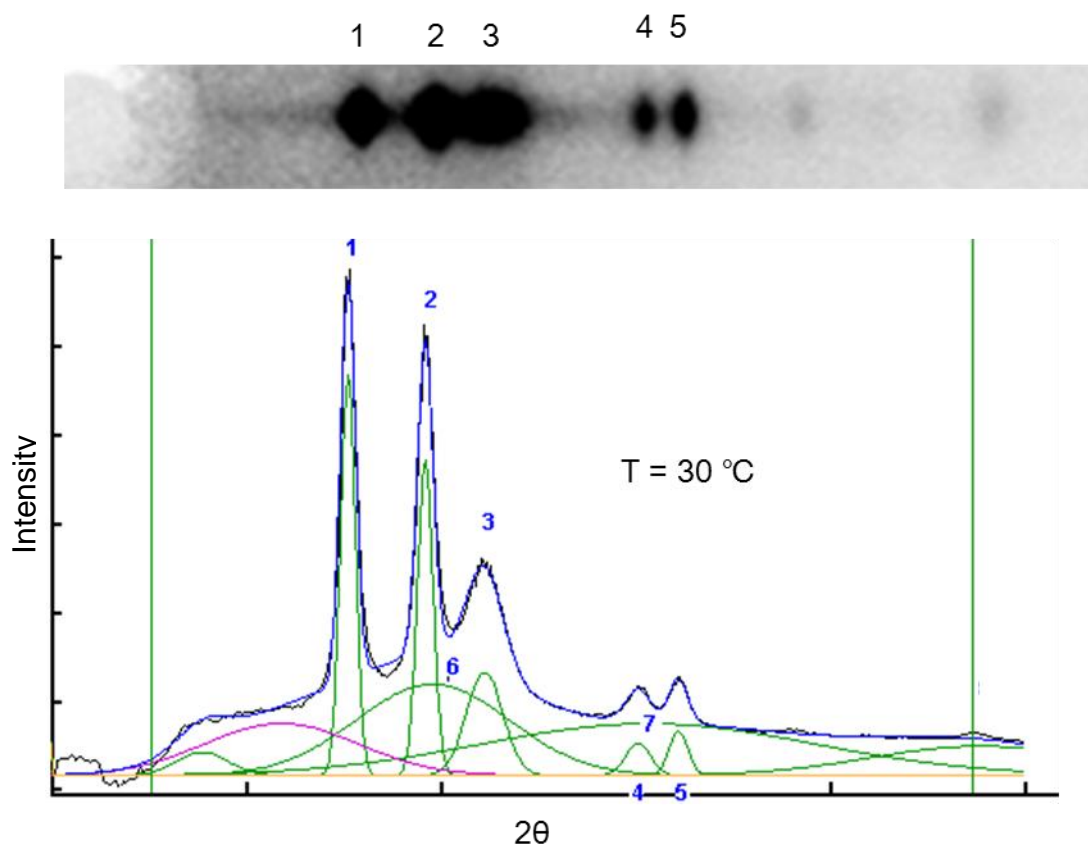


Figure 4-6 Equator line scans of the WAXS patterns.



**Figure 4-7** Peak separation of WAXD profile against equator line.

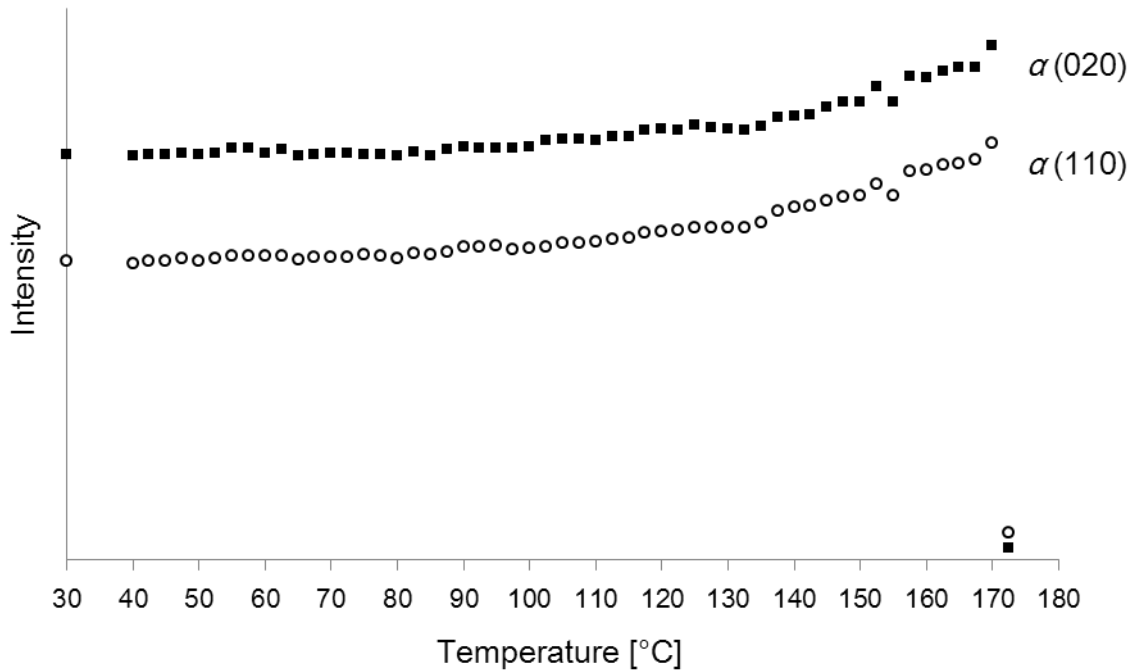
**Table 1** Peak assignment of Figure 4-7.

1	2	3	4	5
$\alpha(020)$	$\alpha(110)$	$\beta$ on equator	$\alpha(130)$	$\alpha(040)$
6	7			
amorphous	amorphous			

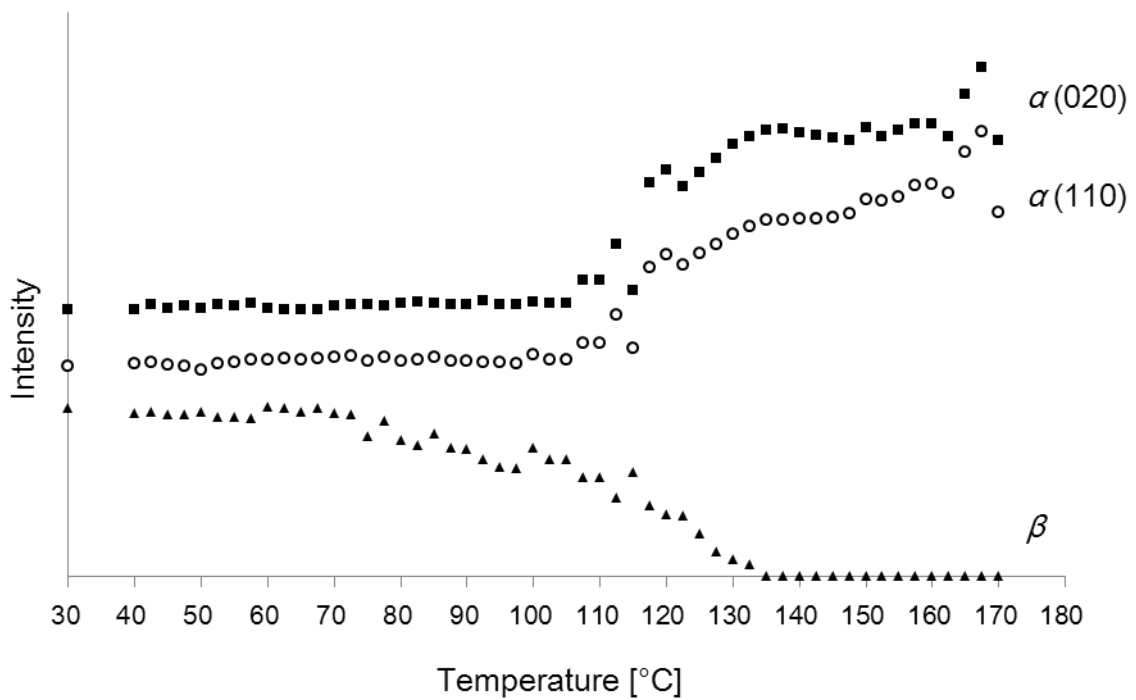
以上の操作によって解析された、赤道線の一次元プロファイルにおける  $\alpha(020)$ 、 $\alpha(110)$  および  $\beta$  回折ピーク面積の強度について温度の関数としてまとめたものを Figure 4-8、Figure 4-9、Figure 4-10(A and B)に示す。まず、 $\alpha$  フィルムの回折強度曲線 (Figure 4-8) における  $\alpha(020)$  および  $\alpha(110)$  のピーク強度だが、昇温の開始と共に、徐々に強度は上昇し、170 °C を超えた時点で強度は消失した。また、130 °C 付近から 170 °C の間で強度の上昇は若干大きくなっていった。これはラメラ結晶の厚化に起因する再結晶化によると考えられる。

次に、 $\beta$  フィルム内の  $\alpha(020)$ 、 $\alpha(110)$  に対する回折強度曲線(Figure 4-9)だが、110° C まで一定であるが、強度はその後、130 °C に至るまで大きく上昇した。その後ほぼ一定の強度で推移し、160 °C 付近で再度強度は上昇し、170 °C で消失した。 $\alpha$  フィルムと比較して、110-130 °C 付近の強度上昇は  $\beta$  構造を有するフィルム特有の挙動であることが明らかとなった。160 °C 付近の強度上昇は再結晶化によるラメラ結晶の厚化に起因すると考えられる。

Figure 4-9 の  $\beta$  構造回折強度曲線は、60 °C 付近で一度強度が上昇し、70 °C 付近から減少を始めた。また 110 °C 付近から減少の速度は速くなり、135 °C で  $\beta$  構造由来の回折は完全に消滅した。



**Figure 4-8** The intensity curves of  $\alpha(020)$  and  $\alpha(110)$  on the equatorial line in  $\alpha$ -film.



**Figure 4-9** The intensity curves of  $\alpha(020)$ ,  $\alpha(110)$  and  $\beta$ -form on the equatorial line from  $\beta$ -film.

### 4-3-3 小角 X 線散乱測定

$\alpha$  フィルムおよび  $\beta$  フィルムの小角 X 線散乱図を Figure 4-10 に示す。回折図の子午線に注目した場合、中心からの距離は高次構造の周期を表し、方位角は周期構造の傾きを表している。また、中心からの距離や方位角に分布がある場合、長周期の距離と長周期構造の傾きにばらつきがあることを示している。 $\alpha$  フィルムには子午線上に円形上の散乱が出現した。子午線上の散乱は延伸方向に対して垂直方向に周期構造があることを示している。これは、積層ラメラ結晶によるものであり、円形であることから、比較的周期が揃っていると考えられる。子午線上の散乱が弱いのは、分子鎖が高配向した後に結晶化を起こしたため、ラメラ結晶が密に充填しているためだと考えられる。

一方、 $\beta$  フィルムの散乱図において子午線上の散乱は見られるものの円形ではなく、中心に向かって鋭角を向ける涙型の散乱であった。これはラメラ結晶周期の乱れを表しており  $\beta$  構造の形成過程で周期性が崩れたためだと考えられる。

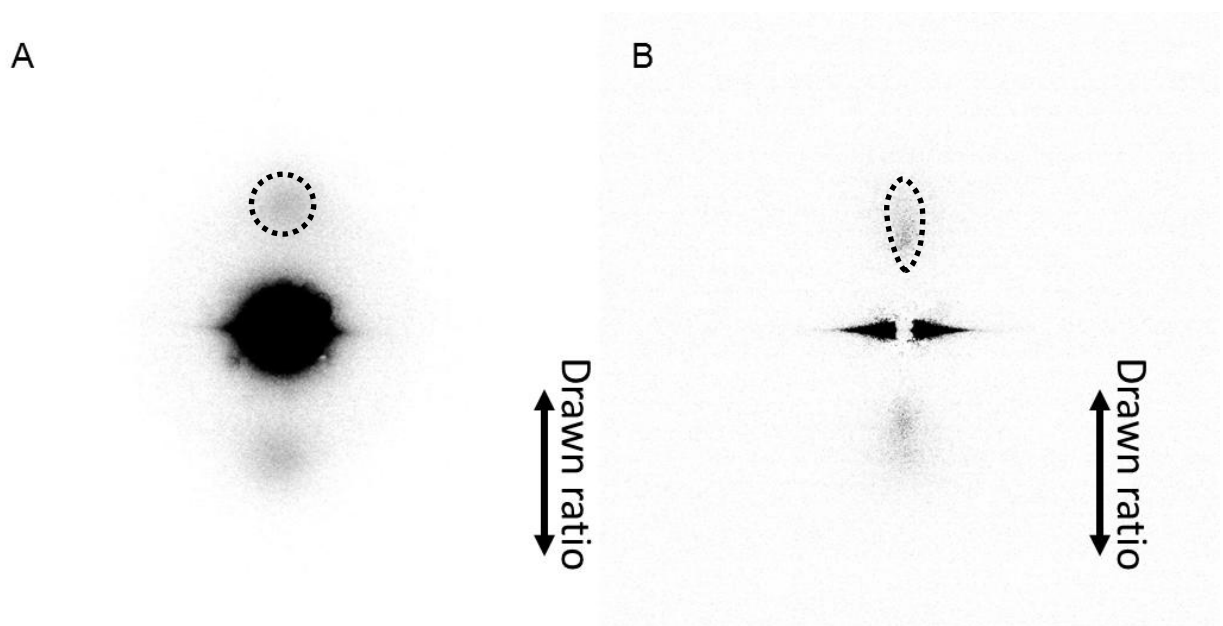


Figure 4-10 2-D SAXS patterns of  $\alpha$ -film (A) and  $\beta$ -film(B).

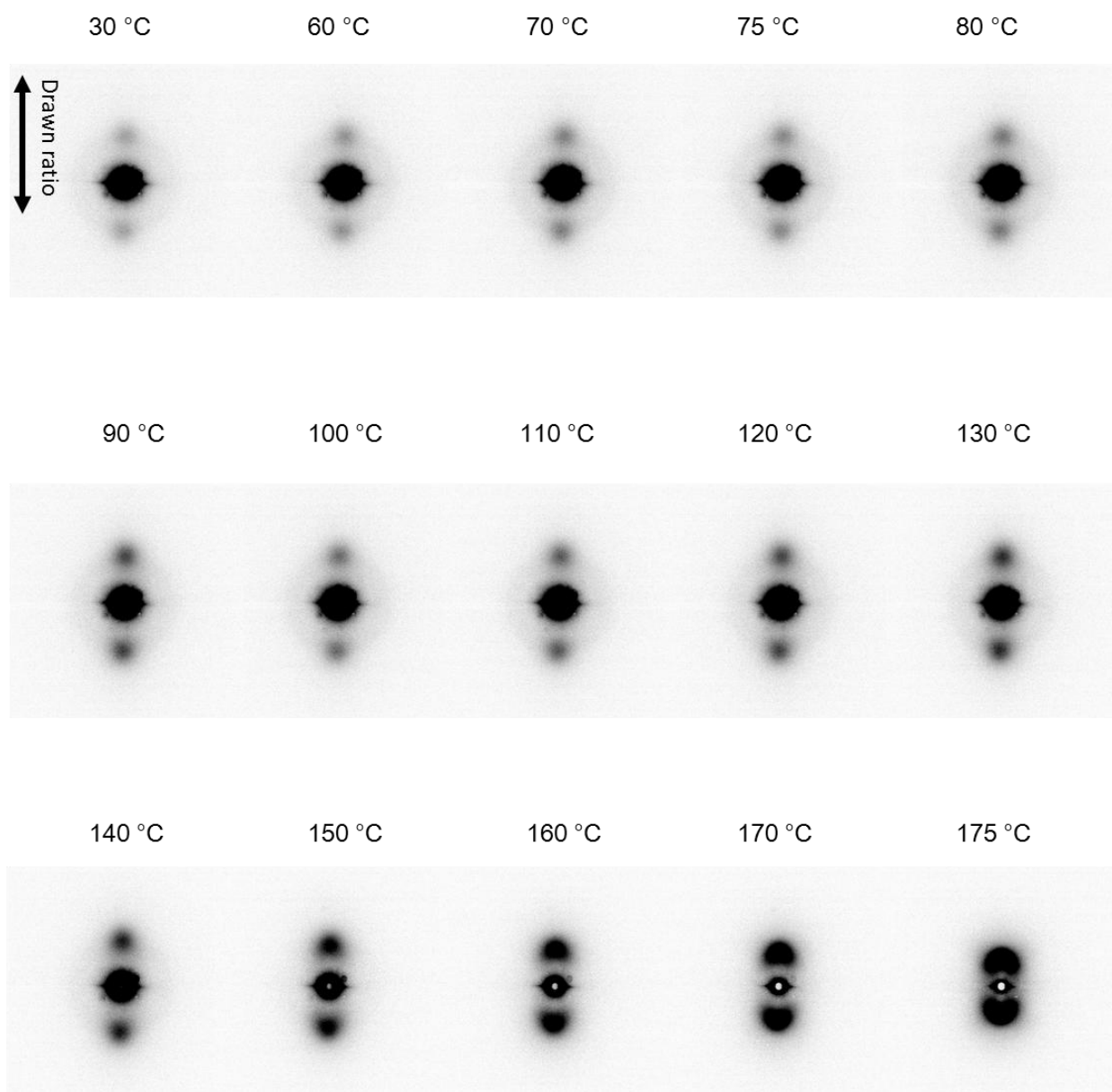
#### 4-3-4 昇温リアルタイム小角 X 線回折測定

$\alpha$  フィルム対して、昇温過程における小角 X 線散乱を撮影し、代表的な結果を Figure 4-11 に示す。常温から始めた  $\alpha$  フィルムに対する昇温は 175 °C まで可能であった。この温度以降は散乱が消失したため熔融変形が起こり、フィルムが溶け落ちたと考えられる。80 °C 付近から子午線上に存在する散乱の強度上昇が観察された。小角散乱において、散乱強度の上昇は電子密度差の増加を示す。このため、昇温と共にラメラ結晶間に存在する薄いラメラ結晶が熔融し、電子密度差が生じたと考えられる。昇温前の小角において、長周期は乱れていないことから、この薄いラメラの量は少なく、室温化での保存による二次結晶化で形成されたラメラ結晶でないかと予想される。

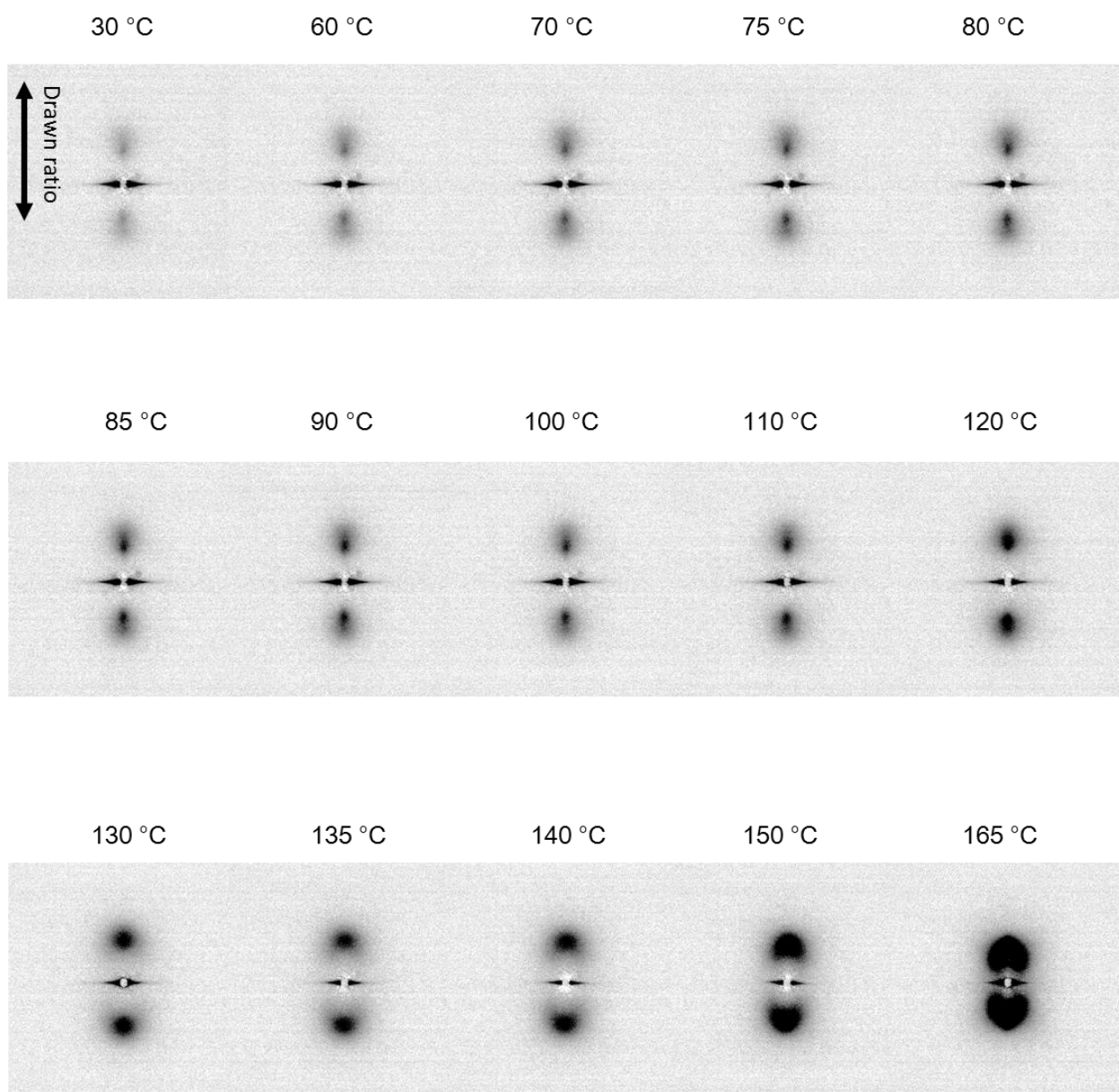
次に、 $\beta$  フィルムで同様に行った昇温リアルタイム小角 X 線回折測定の結果を Figure 4-12 に示す。 $\beta$  フィルムの場合は、常温から昇温し、加熱を続けたところ  $\alpha$  フィルムよりも 10 °C 温度の低い 165 °C で散乱の消失を観察した。 $\beta$  フィルムの場合は、 $\alpha$  フィルムと比較して、子午線上の散乱が多様な動きを見せた。まず、昇温が進むにつれ、散乱強度は強まり、75 °C 付近で散乱の形状は鋭角を中心に向ける三角形になった。さらに上昇を続けると、100 °C から 110 °C にかけて散乱強度の中心部が外側に移り、120-130 °C では形状が円となった。140 °C 付近になると円形下腹部が中心に引っ張られるように垂れていき、150 °C では散乱の位置が中心に移っていった。エッジ散乱は加熱前と比較して、短くなっていった。

以上のように、昇温過程においてフィルムの散乱形状および強度はダイナミックに変化を起こす。このことは  $\beta$  フィルムで特に顕著であった。これは、 $\beta$  構造を有する  $\beta$  フィルムの高次構造が複雑な挙動を示すためである。そこで、次に、これらの散乱図に対して方位角方向に強度を積算し、ピークトップの位置を算出することで長周期を求めた。積算範囲は、熔融直前の動きを考慮し、方位角 30 ° から 150 ° までとした。





**Figure 4-11** 2-D SAXS patterns of the cold-drawn films consisted of only  $\alpha$ -form structure crystal elevated temperature, which were taken at the temperatures indicated in the images.



**Figure 4-12** 2-D SAXS patterns of the cold-drawn films consisted of the  $\beta$  form and  $\alpha$ -form structure crystal elevated temperature, which were taken at the temperatures indicated in the images.

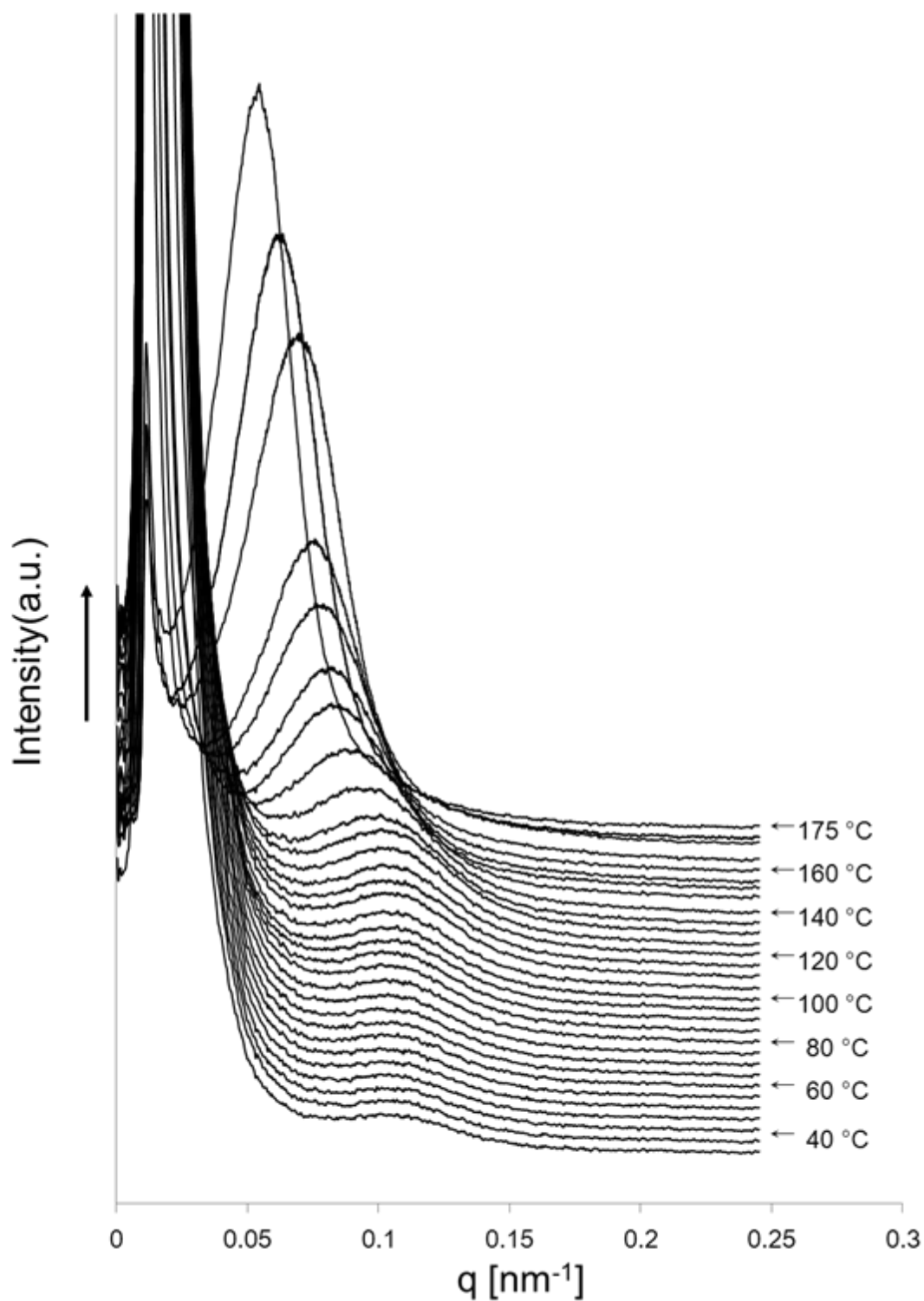
$\alpha$  フィルムおよび  $\beta$  フィルムの一次元プロファイルを Figure 4-13 および Figure 4-14 に示す。X 軸は散乱ベクトル( $q=2\sin\theta/\lambda$ )とした。 $\alpha$  フィルムのピークトップは  $q=0.11 \text{ nm}^{-1}$  付近に存在しており、昇温と共に、 $q$  の値は小さくなった(Figure 4-13)。 $q$  値の減少は長周期の増加を表すため、昇温することで長周期が増加することを示している。

一方、 $\beta$  フィルムのピークトップは 0.08 付近から始まり、120 °C 付近からピークトップは一度上昇し、その後低下した(Figure 4-14)。つまり、 $\beta$  構造を含む  $\beta$  フィルムは、一度、長周期が小さくなり、その後厚化するということが示唆された。そこで、このピークトップの位置から各温度における長周期の算出を試みた。

各温度における長周期を Figure 4-15 に示す。Y 軸は長周期(単位は nm)である。 $\alpha$  フィルムは初期の長周期が 10 nm であるのに対して、 $\beta$  フィルムでは 12 nm と若干長かった。昇温によって  $\alpha$  フィルムは 120 °C 付近から周期の長期化が始まり、140 °C 付近で周期は大きく上昇した。Figure 4-8 に示されている  $\alpha(020)$  および  $(110)$  強度曲線でも 140 °C 付近で強度が上昇しているため、これはラメラ結晶の厚化が原因である。一方、 $\beta$  フィルムは、110 °C 付近で、一度、周期が短くなっており、その後 140 °C から再び周期が長くなっていった。また、その後続く長周期の変化は、 $\alpha$  フィルムと同じように進んだ。Fujita らは P(3HB) 単結晶の積層マットを使用した昇温リアルタイム小角 X 線測定をおこなった結果、120 °C までは長周期が変わらず、その後 127 °C で長周期の急激な上昇を確認している(Fujita, M. *et al.*, 2005)。このような挙動は本研究の  $\alpha$  フィルムと同様であり、長周期の上昇はラメラ結晶の厚化に由来すると考えられる。

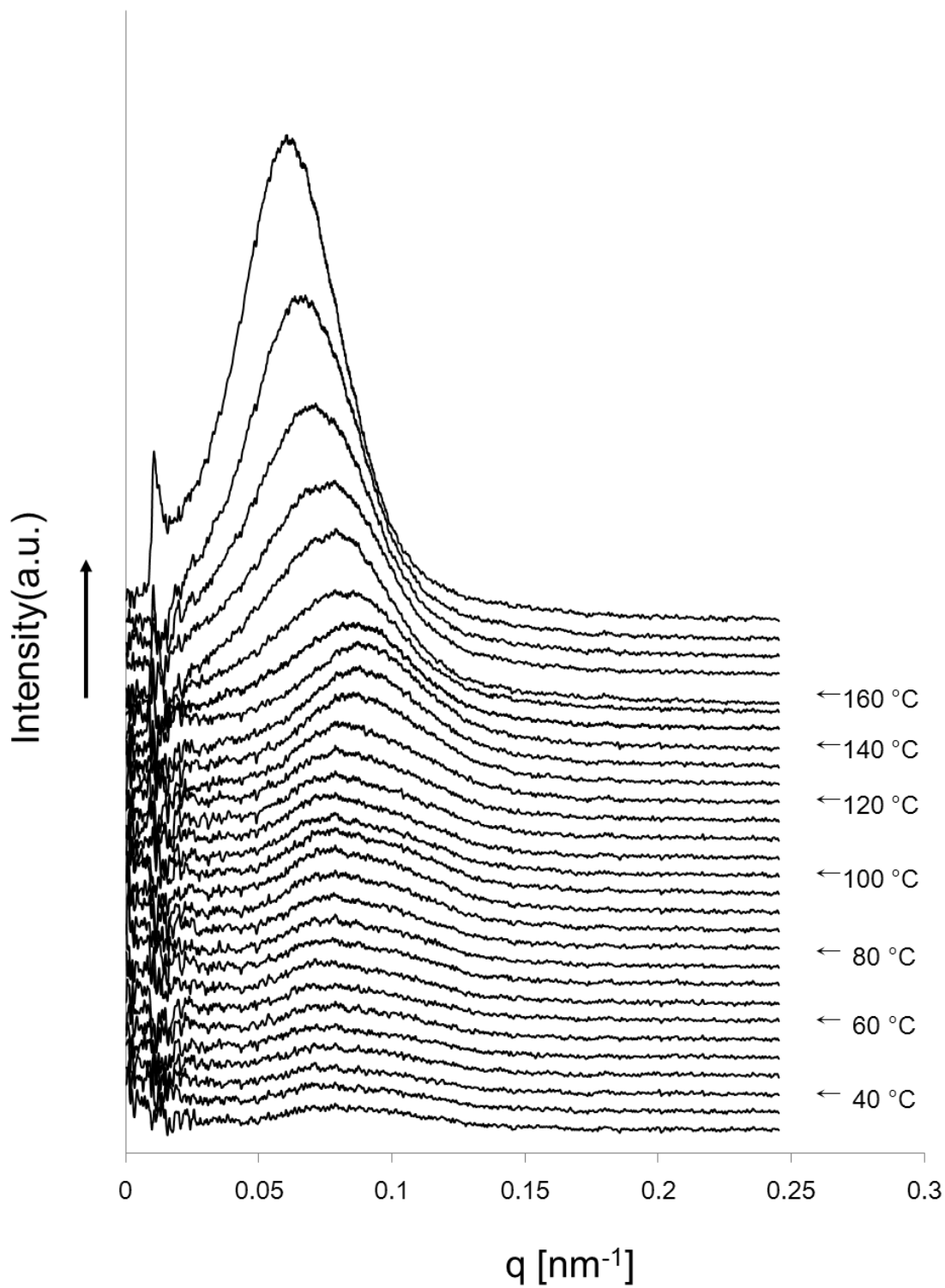
一方、 $\beta$  フィルムに現れた、一度長周期が短くなるような挙動はどのような報告もなされていない。この挙動は  $\beta$  構造を含むフィルム特有のものであると考えられる。

**A**:  $\alpha$ -film

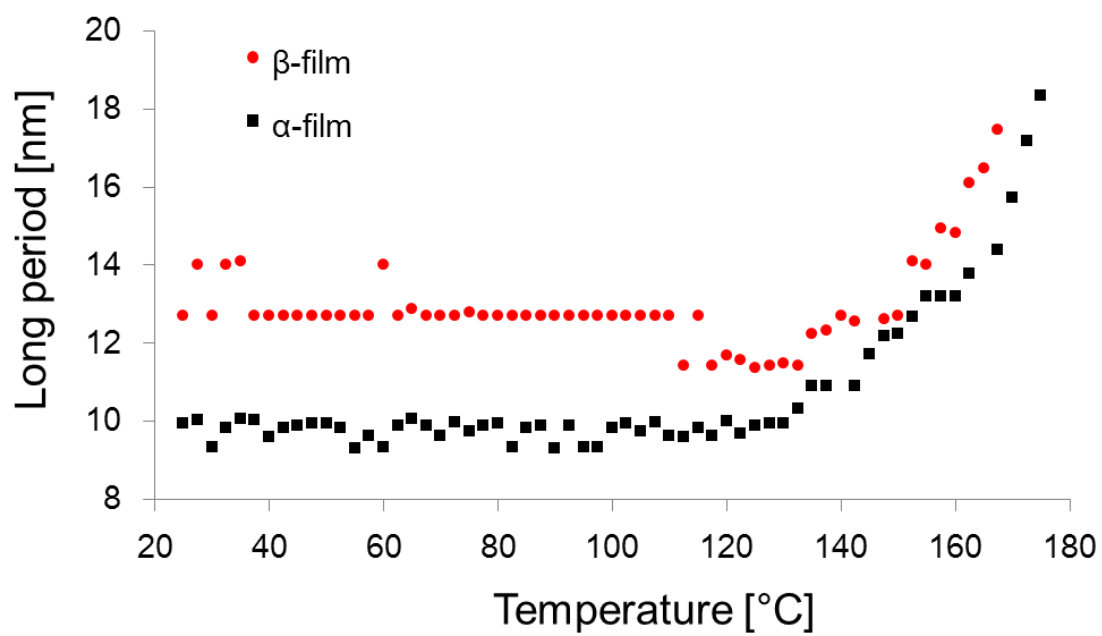


**Figure 4-13** 1-D SAXS patterns of the cold-drawn films consisted of the  $\beta$  form and  $\alpha$ -form structure crystal elevated temperature, which were taken at the temperatures indicated in the images.

**B** :  $\beta$ -film



**Figure 4-13** 1-D SAXS patterns of the cold-drawn films consisted of the  $\beta$  form and  $\alpha$ -form structure crystal elevated temperature, which were taken at the temperatures indicated in the images.



**Figure 4-15** The long period as a function of temperature.

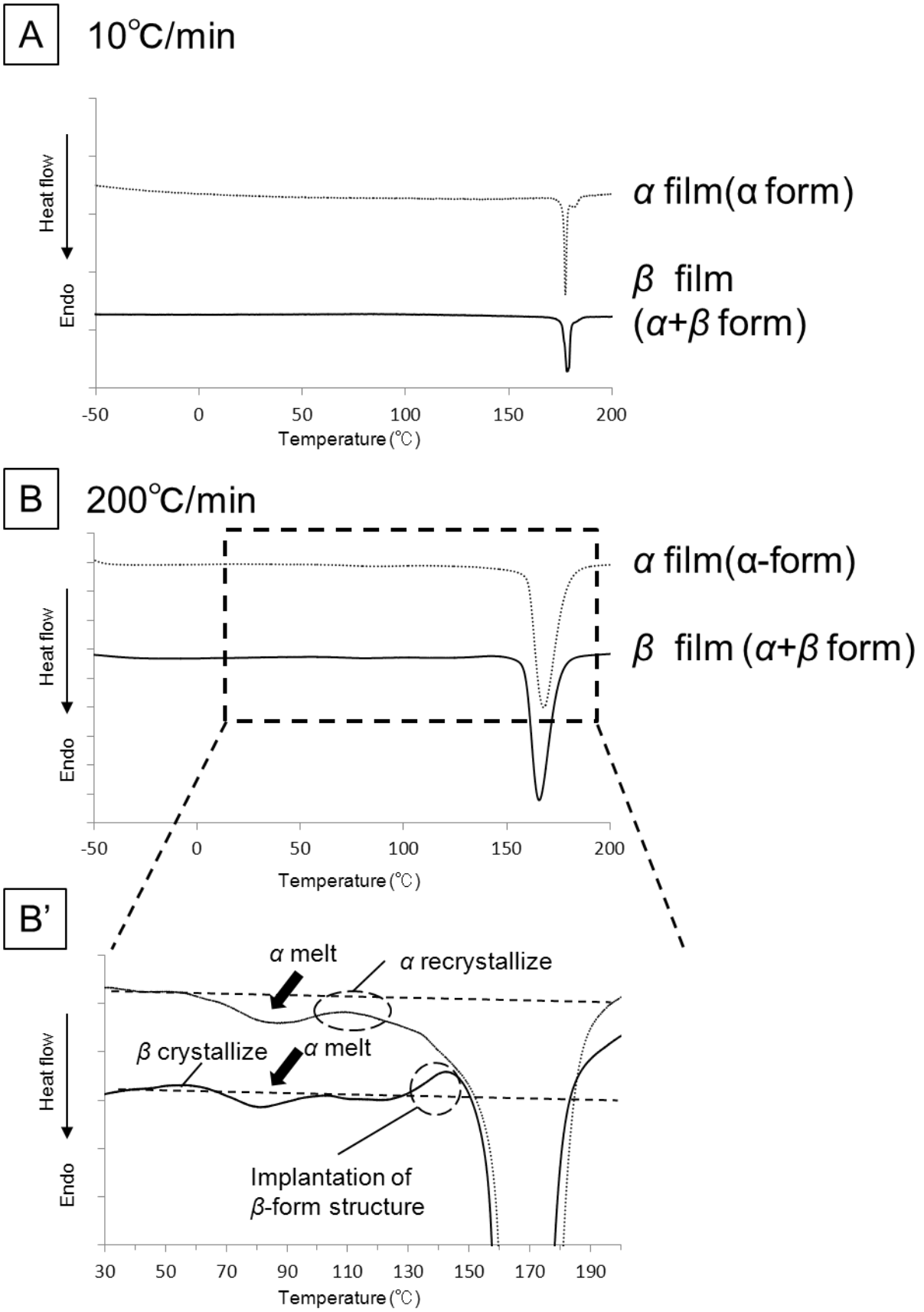
#### 4-3-5 高速 DSC 測定

Figure 4-16 に DSC 測定の結果を示す。昇温 X 線回折測定と同じ昇温速度 10 °C /分で行った DSC 曲線(Figure 4-16A)からは、 $\beta$  構造の変化に由来するピークを観察することは出来なかった。そこで、昇温速度を 20 倍の 200 °C /分まで上昇させ高速 DSC 測定を行った。高速 DSC は昇温速度が速く、温度に対して時間が圧縮されるため、ブロードなピークや弱いピークの検出に向いている(しかし、温度の正確性は落ちる。真の温度より高い温度に値が出やすく、温度が近いピークは分離が難しくなる)。Figure 4-16B に高速 DSC 測定の結果を示す。 $\alpha$  フィルムと  $\beta$  フィルムに違いが無いように見えるが、拡大(Figure 4-16B')することで変化が確認できる。

$\alpha$  フィルムには 70 °C から 100 °C にかけて溶融に由来する吸熱ピークが出現した。昇温リアルタイム広角 X 線測定において、70 °C から 100 °C にかけては溶融に由来する強度の上昇が起こっていることから、この温度範囲で、室温下で生じる二次結晶化によって形成された少量の不安定な結晶が溶融していると考えられる。110 °C 付近の発熱は、再結晶化に由来する発熱ピークである。

$\beta$  フィルムの DSC カーブは特徴的である。50 °C から 70 °C にかけて発熱が、70 °C 付近から吸熱反応が起こり、110 °C で吸熱、130 °C から 150 °C にかけて発熱ピークが出現する。その後、溶融ピークが現れる。

昇温リアルタイム広角 X 線測定と比較すると、50-70 °C にかけての発熱は、 $\beta$  構造強度曲線(Figure4-9)でも強度が若干上昇しているため、 $\beta$  構造の分子鎖充填がより密になるためだと考えられる。また 70 °C 付近の吸熱ピークは  $\alpha$  フィルムと同様に二次結晶化によって生成された小さな結晶が溶融したことが原因だと考えられる。110-130 °C 付近にわずかにみられる吸熱は、広角 X 線の  $\beta$  構造の回折強度の減少と一致するため、 $\beta$  構造の融点であり、DSC で初めて  $\beta$  構造の溶融をとらえたのではないかと考えられる。130-150 °C 付近で出現した発熱ピークは  $\beta$  フィルムでのみ観察された。これは、 $\beta$  構造が溶融した後、 $\alpha$  構造結晶が生成したためと考えられる。



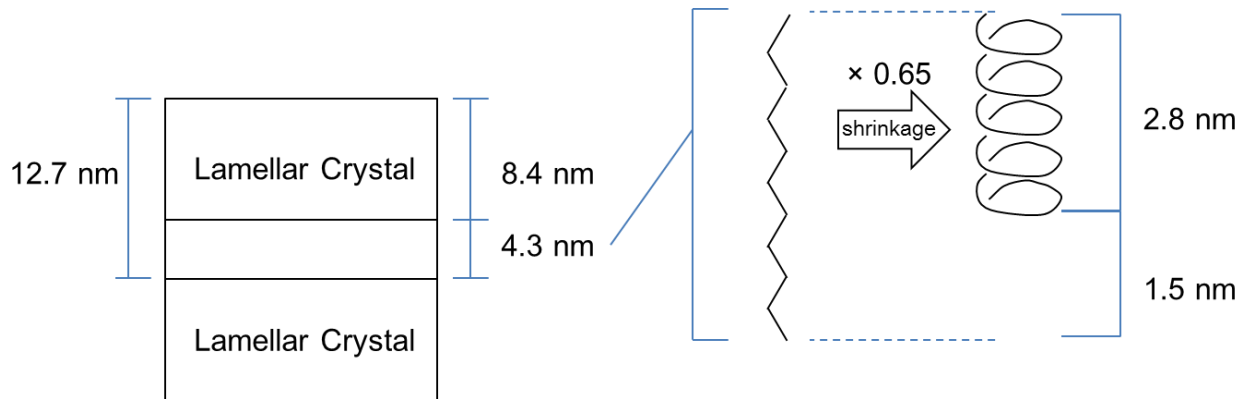
**Figure 4-16** DSC curves. Dotted line and solid line indicate the  $\alpha$ -film and  $\beta$ -film, respectively. (A) Normal DSC curves, (B) hyper DSC curves, and (B)' close-up from B.



#### 4-3-6 溶融過程におけるフィルムの高次構造

ここまでの結果から、 $\alpha$  フィルムと比較して、 $\beta$  フィルムの溶融挙動は特徴的であった。特に 110-130 °C の範囲では、① $\alpha(110)$ および  $\alpha(020)$ の急激な増加(Figure 4-9)、② $\beta$  構造回折の急激な現象(Figure 4-9)、そして、③長周期の減少(Figure 4-14)が観察された。このことから、 $\beta$  構造は 110-130 °C において溶融し、 $\alpha$  構造に転移していると考えられる。以上の結果から、 $\beta$  構造を有する P(3HB)フィルムの溶融過程における高次構造モデルについて考察を行った。まず、昇温前はラメラ結晶の間に  $\beta$  構造の分子鎖が存在している。この  $\beta$  フィルムが 110-130 °C の範囲まで昇温されると、徐々に  $\beta$  構造が  $\alpha$  構造に転移することで  $\alpha$  構造の量は顕著に増加する(→①②の理由)。この時、 $\beta$  構造は収縮するように  $\alpha$  構造に転移するため長周期が一度減少する(→③の理由)。そして、160 °C 付近でラメラ結晶の厚化が始まり(Figure 4-17 C)、最後に 170 °C 付近で溶融する。

次に、 $\beta$  フィルムの昇温による長周期の変化(Figure 4-14)に示されている、110-130 °C 付近で起こる長周期が収縮する現象から、 $\beta$  構造がどの程度収縮するかを検討した(Figure 4-17)。今、 $\beta$  構造がラメラ結晶同士の間には存在すると仮定すると、 $\beta$  構造が延伸方向に対して存在している距離は、長周期からラメラ結晶間を引いた長さで表される。 $\beta$  フィルムにおける昇温前の結晶化度は 66 %で、長周期は 12.7 nm であるためラメラ結晶厚は 8.4 nm である。そうすると、 $\beta$  構造の存在している距離は 4.3 nm になる。この  $\beta$  構造( $c=0.920$  nm)が全て  $\alpha$  構造( $c=0.596$ )に転移したとすると、 $\beta$  構造は延伸方向に対して  $0.65(0.596/0.920)$ 倍に縮むことになる。つまり、4.3 nm の  $\beta$  構造は 2.8 nm の  $\alpha$  構造に転移し、この差 1.5 nm は  $\beta$  フィルム内の  $\beta$  構造が収縮する長さの最大値であると考えられる。 $\beta$  フィルムにおける溶融過程の小角から算出した長周期の変化(Figure 4-16)において、30 °C (長周期=12.7)と 130 °C (長周期=11.6)の差は 1.1 nm であり、収縮した長周期の距離からも、110-130 °C 付近で  $\beta$  構造は  $\alpha$  構造に転移していると考えられる。



**Figure 4-17** Schematic illustration of structural transition from  $\beta$ -form structure to  $\alpha$ -form structure..

#### 4-4 結言

微生物産生ポリエステルの代表的なポリマーであるポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート)(P(3HB))に対して、冷延伸を施し、通常 P(3HB)が採りうる  $2_1$ ヘリックス構造( $\alpha$ 構造)に加えて伸びきり鎖構造( $\beta$ 構造)が存在するフィルムを作製した。このフィルムに対して昇温過程でのリアルタイム X 線観察を行い、 $\beta$ 構造および高次構造の変化を観察した。この結果、 $\beta$ フィルムは 110-130 °C の範囲で  $\alpha(020)$   $\alpha(110)$ に由来する回折強度が、 $\alpha$ フィルムと比較して、おおきく上昇していることが観察された。 $\beta$ 構造由来の回折は、110 °C まで緩やかに減少、110-130 °C の間で減少が大きくなり、135 °C 付近で完全消失した。小角 X 線回折測定の結果から算出した長周期では、110-130 °C で長周期が減少し、その後上昇するという特異な挙動が観察された。高速 DSC を用いて、 $\beta$ フィルムに対する昇温時の熱的な挙動を測定したところ、130-150 °C 付近で、 $\alpha$ フィルムでは認められない発熱が検出された。

以上の結果から、 $\beta$ フィルム内に存在する  $\beta$ 構造は 110-130 °C で溶解し、 $\alpha$ 構造に移していることが示された。

## 参考文献

- Fujita, M., T. Sawayanagi, T. Tanaka, T. Iwata, H. Abe, Y. Doi, K. Ito, T. Fujisawa (2005):  
"Synchrotron SAXS and WAXS studies on changes in structural and thermal properties of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals during heating" *Macromol. Rapid Commun.*, **26**, 678-683.
- Iwata, T., Y. Aoyagi, T. Tanaka, M. Fujita, A. Takeuchi, Y. Suzuki, K. Uesugi (2006):  
"Microbeam X-ray diffraction and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers with two kinds of molecular conformations" *Macromolecules*, **39**, 5789-5795.
- Kahar, P., J. Agus, Y. Kikkawa, K. Taguchi, Y. Doi, T. Tsuge (2005):  
"Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant Escherichia coli" *Polym. Degrad. Stab.*, **87**, 161-169.
- Okamura, K., R. H. Marchessault (1967):  
"X-Ray Structure of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate", 709.
- Orts, W. J., R. H. Marchessault, T. L. Bluhm, G. K. Hamer (1990):  
"Observation of Strain-Induced Beta-Form in Poly(Beta-Hydroxyalkanoates)" *Macromolecules*, **23**, 5368-5370.
- Tanaka, F., Y. Doi, T. Iwata (2004):  
"The deformation of the chain molecules and crystallites in poly([R]-3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) under tensile stress" *Polym. Degrad. Stab.*, **85**, 893-901.
- Yokouchi, M., Y. Chatani, H. Tadokoro, Teranish.K, H. Tani (1973):  
"Structural Studies of Polyesters .5. Molecular and Crystal-Structures of Optically-Active and Racemic Poly(Beta-Hydroxybutyrate)" *Polymer*, **14**, 267-272.

## 第五章

# 微生物産生ポリエステルを用いたゲルフィルムの 作製、物性および高次構造

## 5-1 緒言

高分子材料に対する物性改善は様々なアプローチ方法があるが、代表的なものに①分子量を増加させる超高分子量化、②モノマーに第二成分を導入する共重合化、③延伸などを行い、高次構造を制御する高次構造制御、といったものが挙げられる。

P(3HB)については、Kusaka らが遺伝子組み換え菌を用いて分子量 1000 万を超える超高分子量 P(3HB)(UHMW-P(3HB))の開発に成功しており(Kusaka, S. *et al.*, 1997)、Aoyagi らはこれに二段階熱延伸法を用いて、破壊強度 388 MPa を有する高強度フィルムの作製に成功している(Aoyagi, Y. *et al.*, 2003)。一方で、超高分子量を用いたにもかかわらず、延伸倍率は 15 倍程度であった。例えば超高分子量 PE においては延伸倍率 30-200 倍程度まで延伸を施した高強度フィルムの作製に成功した報告もされているため(Smith, P. and Lemstra, P. J., 1979; Smith, P. and Lemstra, P. J., 1980; M. Matsuo, K. I., N. Abumiya, 1984)、超高分子量 P(3HB)にはさらに高い強度を出せるポテンシャルがあるといえる。

次に、共重合化の利点だが、柔軟な物性を有する第二モノマーが導入された共重合体は、結晶性が低下するため二次結晶化による影響が少ないことが挙げられる。それゆえ、組成比を変化させることにより硬い状態から、柔軟な状態まで様々な物性を有する P(3HB)共重合体が開発されてきた(Sudesh, K. *et al.*, 2000)。代表的なものとして、共重合体としては、3-ヒドロキシバレレートユニットを導入したポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシバレレート] (P(3HB-co-3HV))や 3-ヒドロキシヘキサノエートユニットを導入したポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート](P(3HB-co-3HH))が挙げられる。P(3HB)の共重合化は柔軟になる反面、引張強度や弾性率といった機械物性の低下を伴うため、こちらに関しても物性の向上が図られている。

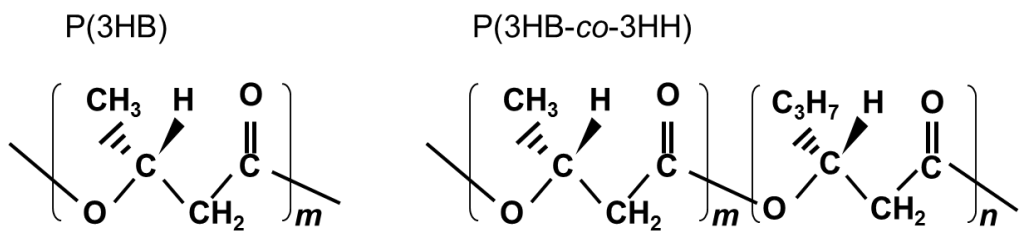
これまで P(3HB)や P(3HB)共重合体を用いて、高強度フィルムや繊維を作製するために、冷延伸法(Iwata, T. *et al.*, 2003; Fischer, J. J. *et al.*, 2004)やその他の延伸方法が開発されてきた(Dekoning, G. J. M. *et al.*, 1994; Aoyagi, Y. *et al.*, 2003; Tanaka, T. *et al.*, 2007)。これまで P(3HB)には、一般的な延伸法である熱延伸法が適用できなかった。なぜなら、P(3HB)の融点が熱分解温度と非常に近く、熔融粘度も低くいためである。

本章では、超高分子量 P(3HB) および P(3HB)共重合体である P(3HB-co-3HH)(Figure 5-1)に対する物性改善手法として、新規延伸法であるゲルフィルムの適用と高次構造変

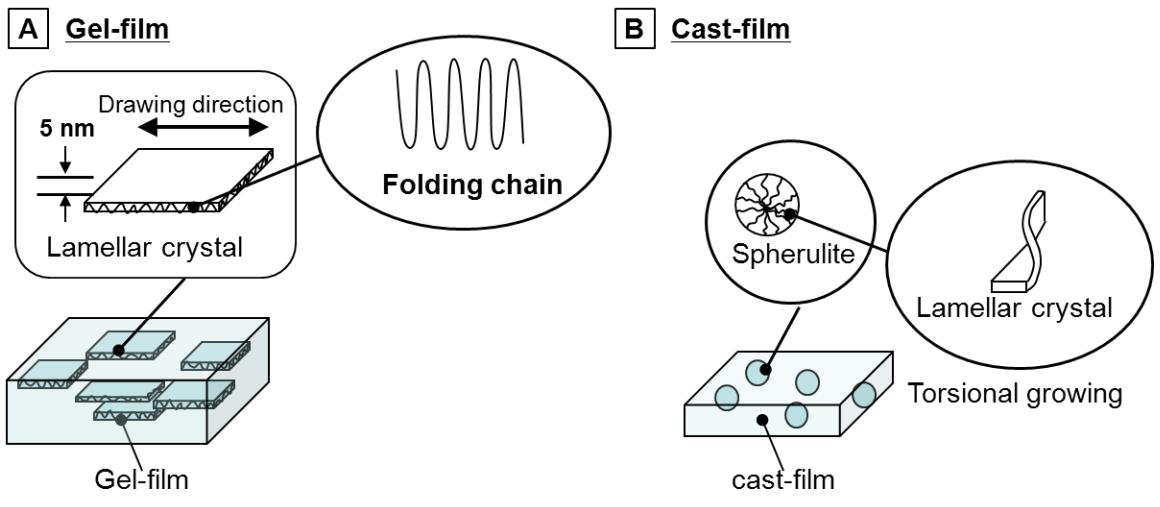
化の解析を目的に実験を行った。

ゲルフィルムとは、貧溶媒に溶解したポリマー溶液を急冷することで出来るゲルを長期間乾燥させて得られるフィルムのことである。良溶媒で作製されるキャストフィルム内部構造は、ラメラ結晶が複雑に成長することで形成される球晶構造であるが、ゲルフィルムでは球晶構造を形成せず、ラメラ結晶がフィルム面に対して平行に積層しながら面配向した独特な高次構造を有している(Figure 5-2)(M. Matsuo, K. I., N. Abumiya, 1984)。また、貧溶媒が分子鎖の運動性を拘束しながら揮発するため分子鎖の絡まり合いが少なく、熱延伸などの延伸を施した場合、分子鎖が高配向し、高強度フィルムを作製できることがポリエチレンなどについて報告されている(Smith, P. and Lemstra, P. J., 1979; Smith, P. *et al.*, 1981)。

本章では、最初に、超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムを作製し、延伸を施した後、機械強度および高次構造の解析を行った。次に、機械物性の向上が認められた P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムに対し、詳細な分析として、SEM による表面観察、引張強度測定、大型放射光 X 線を用いた高次構造解析および高次構造変化挙動の推察、酵素分解性の評価を行った。



**Figure 5-1** Chemical structures of poly[(*R*)-3-hydroxy butyrate](P(3HB)) and Poly[(*R*)-3-hydroxy butyrate-co-(*R*)-3-hydroxyhexanoate] (P(3HB-co-3HH)).



**Figure 5-2** Schematic illustration for distinct structure of gel-film



## 5-2 実験方法

### 5-2-1 超高分子量 P(3HB)ゲルフィルム

#### 5-2-1-1 超高分子量 P(3HB) ゲルフィルムの作製と延伸熱処理

試料として 2-2-1-1 と同様な方法で生合成した超高分子量 P(3HB)(重量平均分子量= $5.6 \times 10^6$  多分散度 = 1.5)を用いた。p-xylene、1,2-dichloroethane(DCE)、toluene、dimethylformamide(DMF)、decahydronaphthalene、propylene carbonate から溶媒の選定を行い、p-xylene を溶媒として選定した。濃度 1(w/v)%となるよう耐圧管にいれ、オイルバス中、120 °C、40 分間で p-xylene に加熱溶解させた。溶解後直ちに、氷水であらかじめ冷やしておいたテフロンシャーレに溶液を流し込み急冷し、20 日間以上かけ室温でゆっくり乾燥させ、ゲルフィルムを作製した。また、比較としてクロロホルムを用いたキャストフィルムも作製した。作製したゲルフィルムに熱ピン延伸法を適用し、延伸後 100 °C で 2 時間の熱処理を行った。

#### 5-2-1-2 引張試験

フィルムの機械的性質は、小型卓上試験機(EZ test、SHIMADZU)を用いた引張試験により測定した。サンプルの大きさを正確に測り、初期長 10 mm、引張速度 20 mm/min で測定を行った。

#### 5-2-1-3 広角および小角 X 線回折測定

X 線回折装置(RINT UltraX18, RIGAKU, Japan)を用い、電圧 40 kV、電流 110 mA で発生させた波長  $\lambda=0.15418$  nm の X 線を真空下でサンプルに照射し、イメージングプレート (Imaging Plate BAS-SR 127, FUJI FILM, Japan)で記録した。ビーム径は 0.3 mm で、照射時間 60 分間、カメラ長 50 mm で広角 X 線測定(WAXD)を行い、同様に照射時間 120 分間、カメラ長 600 mm で小角 X 線測定(SAXS)を行った。

### 5-2-2 P(3HB-co-3HH) ゲルフィルム

#### 5-2-2-1 P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムの作製と延伸熱処理

試料には、P&G 社製の P(3HB-co-12 mol %-3HH)(重量平均分子量( $M_w$ )= $5.8 \times 10^5$ 、多分

散度(PDI)=1.9)を用いた。*p*-xylene、1,2-dichloroethane (DCE)、toluene、DMF、propylene carbonate から溶媒の選定を行い、DCE をゲルフィルムの溶媒として決定した。溶液濃度を 2.5 w/v % に調製し、耐圧管を用いて 80 °C で P(3HB-co-3HH) を DCE に溶解させた。溶解後直ちに、氷水であらかじめ冷やしておいたテフロンシャーレに溶液を流し込み急冷し、20 日間程度かけ室温でゆっくり乾燥させ、ゲルフィルムを作製した。また、比較としてクロロホルムを用いたキャストフィルムも作製した。作製したゲルフィルムおよびキャストフィルムは、手回し延伸機を用いて室温で延伸し、延伸後 80 °C で 2 時間の熱処理を行った。

#### 5-2-2-2 走査型電子顕微鏡観察

ゲルフィルムおよびキャストフィルムの表面形態を電界放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM S-4000、(株)日立製作所)を用いて観察した。測定サンプルは観察前に、イオンスパッタ装置(イオンスパッタ E-1030、日立製作所)を用いてフィルム表面を白金で蒸着した。

#### 5-2-2-3 引張試験

5-2-1-2 と同様に行った。

#### 5-2-2-4 P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムに対する X 線回折測定

広角および小角 X 線回折測定は、大型放射光施設 SPring-8 の BL45XU で行った。波長 0.09 nm の X 線を用い、広角 X 線測定はカメラ長 128 mm、小角 X 線測定はカメラ長 2810 mm で行った。フィルム面に対して平行方向と垂直方向に対して X 線を入射し、広角および小角 X 線回折測定を行った。

広角 X 線回折図から回折強度曲線を描き、空気散乱を除いた後、全体のピーク領域に対する結晶由来のピーク領域の面積比から結晶化度( $X_c$ )を算出した。また、さらに、式(1)に(020)回折から得られた半値幅( $\beta_c$ )角度を代入し、結晶配向度( $f_c$ )を算出した。Bragg の式(2)に波長、小角 X 線散乱図から得られた散乱角を代入し、長周期( $L_p$ )を算出した。

$$f_c = (180 - \beta_c) / 180 \quad (1)$$

$$L_p = n\lambda / 2 \sin \theta \quad (2)$$

#### 5-2-2-5 酵素分解試験

ゲルフィルムおよびキャストフィルムの酵素分解試験は、200 µg/mL の分解酵素水溶液を 5 µl 添加した、pH 7.4 の 0.1 M-リン酸バッファー1 mL 中で行った。分解環境は恒温槽中 37 °C、振動速度 120 rpm とし、3 h ごとに重量を測定することで、分解時間に対する重量損失をプロットした。分解酵素は、*Ralstonia pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素を用いた。

### 5-3 結果および考察

#### 5-3-1 超高分子量 P(3HB)ゲルフィルム

##### 5-3-1-1 ゲルフィルム作製における溶媒選択

Table 5-1 に、種々の溶媒に UHMW-P(3HB)あるいは P(3HB-co-3HH)を溶解させ、急冷した際のゲル化挙動をまとめた。

P(3HB)に対して、DMF、decahydronaphthalene および propylene carbonate は急冷時にゲル化せず、製膜性もよくなかった。DCE および toluene は急冷直後にはゲル化せず、溶媒の揮発過程でゲル化が起きた。*p*-xylene は急冷直後にゲル化が起き (Figure 5-3)、製膜性も高かった。このため、UHMW-P(3HB)ゲルフィルム作製は *p*-xylene を溶媒に使用した。

**Table 5-1** The used solvent and gelation for UHMW-P(3HB)

Solvent	Gelation	Drying time [day]	Film-forming properties
<i>p</i> -xylene	○	30	○
dichloromethane (DCE)	△	18	△
toluene	△	17	△
dimethylformamide (DMF)	×	-	×
decahydronaphthalene	-	-	×
propylene carbonate	○	-	×

[Gelation] ○: gelation after quenching, △: take a long time to gelation, ×: not gel, -: not solve

[Drying time] -: not drying

[Film-forming properties] ○: uniformity, △: shrinkage, ×: not forming to film



**Figure 5-3** Photograph of UHMW-P(3HB) gel

### 5-3-1-2 UHMW-P(3HB)ゲルフィルムの熱ピン延伸法と機械的性質

UHMW-P(3HB)ゲルフィルムは手回し延伸器を用いて延伸を試みたが、非常に脆いフィルムであったため、手回し延伸器に取り付けている間にフィルムが破断してしまい、室温での延伸は不可能だった。また、フィルムの両端をピンセットでつかみ、100-140 °C のオイルバス中で延伸を行ったところ若干延伸できたものの、ピンセットで挟んだ部分で破断してしまい延伸することは出来なかった。そこでフィルムを部分的に加熱し、延伸する熱 PIN 延伸法を用いて 135-145 °C で延伸を試みたところ、10 倍以上の延伸が再現性良く可能となり、最大延伸倍率 30 倍の P(3HB) 延伸ゲルフィルムの作製に成功した。

Table 5-2 に UHMW-P(3HB)ゲルフィルムの引張試験結果を示す。未延伸の UHMW-P(3HB)ゲルフィルムの破壊強度は 4 MPa であり、低強度であった。延伸により破壊強度が増加したものの、延伸倍率が高いにもかかわらず破壊強度は 30 MPa 程度であった。これは熱ピン延伸過程でゲルの特徴的な構造がすべて熔融しており、通常の熱延伸に近くなっていることや、延伸後の固定化が非常に困難であることなどが原因であると考えられる。

この様に、超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムは非常にもろくハンドリングも難しかった。さらに物性の改善を行うのであれば混合溶媒なども含めた溶媒の選定を行い強いゲルを作製することが重要だと考えられる。

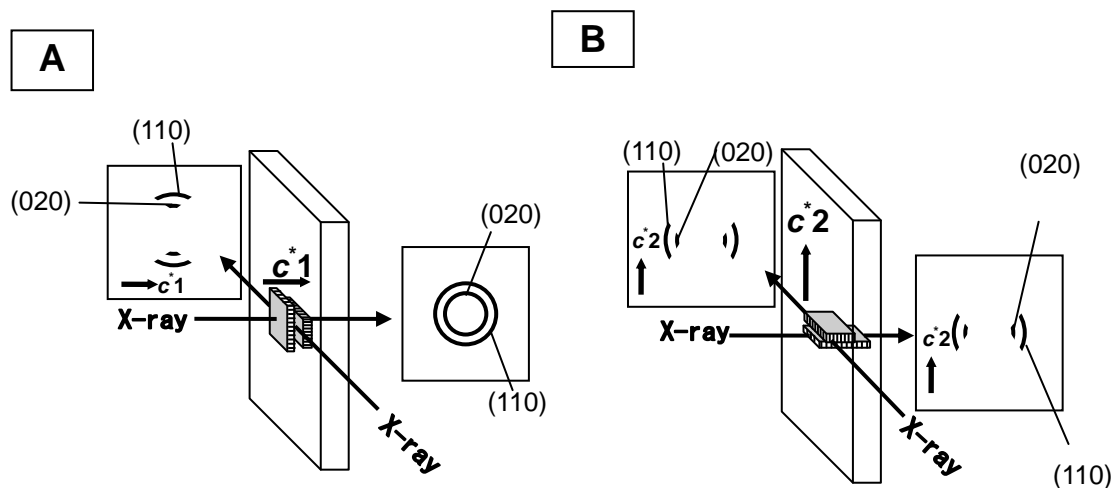
**Table 5-2** The mechanical properties of drawn UHMW-P(3HB) gel-film

Drawing ratio ( $\lambda$ )	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Young's modulus (GPa)
1	4 ± 1	6 ± 3	0.14 ± 0.01
10	30 ± 8	25 ± 9	0.51 ± 0.14
20	33 ± 26	47 ± 37	0.36 ± 0.12
30	27 ± 9	15 ± 11	0.45 ± 0.15

### 5-3-1-3 高次構造解析

X線回折測定におけるX線のフィルムに対する入射方向、フィルム中のラメラ結晶の配向方向、および広角X線回折測定パターンとの関係をFigure 5-4に示す。フィルム面に対して、Aはラメラ結晶が平行に面配向しており、Bはラメラ結晶が垂直に積層している。ラメラ結晶がフィルム面に対して平行に面配向している場合(Figure 5-4(A))、X線をフィルム面に対し垂直方向から入射するとリングパターンが現れる。また、フィルム面に対して平行な方向からX線回折測定を行うと、回折図の上下方向に(020)と(110)の回折が現れる。以下ではフィルム面に対してc軸が直行するラメラ結晶を $c^*1$ ラメラ結晶とし、この時のc軸を $c^*1$ とした。

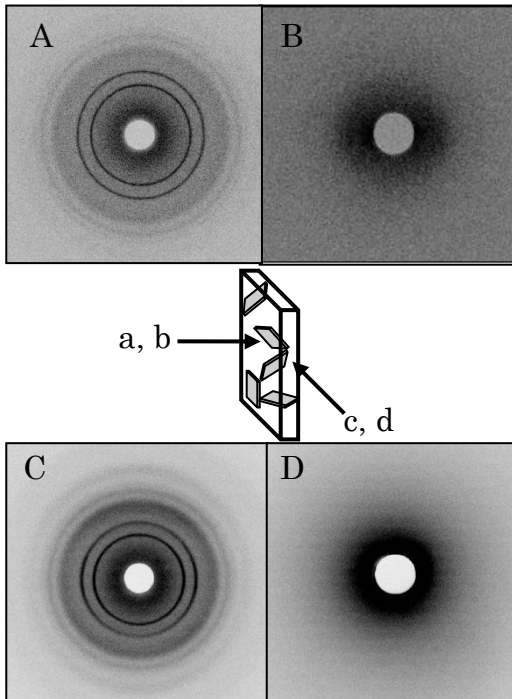
同様に、フィルム面に対してラメラ結晶が垂直に面配向している場合(Figure 5-4 (B))、X線をフィルム面に対して垂直および平行方向から入射したいずれの場合においても、回折図の左右方向に(020)と(110)の回折が現れる。このフィルム面に対してc軸が平行に存在するラメラ結晶を $c^*2$ ラメラ結晶とし、この時のc軸を $c^*2$ とした(Figure 5-4(B))。



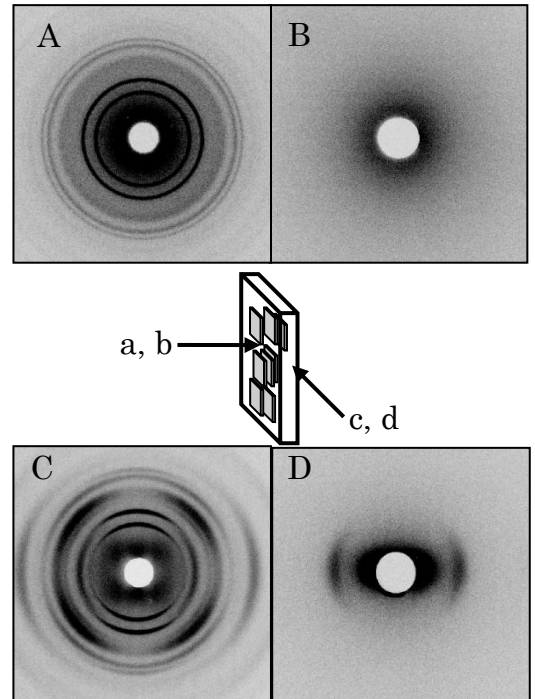
**Figure 5-4** Schematic illustrations of relation among incident direction of X-ray, crystal direction and diffraction pattern. (A)  $c^*$  of lamella crystal which is parallel to film surface is  $c^*1$  and (B)  $c^*$  of lamella crystal in perpendicular to vertical direction is  $c^*2$ .

フィルム面に対して垂直および水平方向から撮影した、ソルベントキャストフィルム、ゲルフィルム、20倍延伸ゲルフィルムの広角X線回折図(WAXD)と小角X線回折図を、それぞれ Figure 5-5、Figure 5-6、Figure 5-7 に示す。

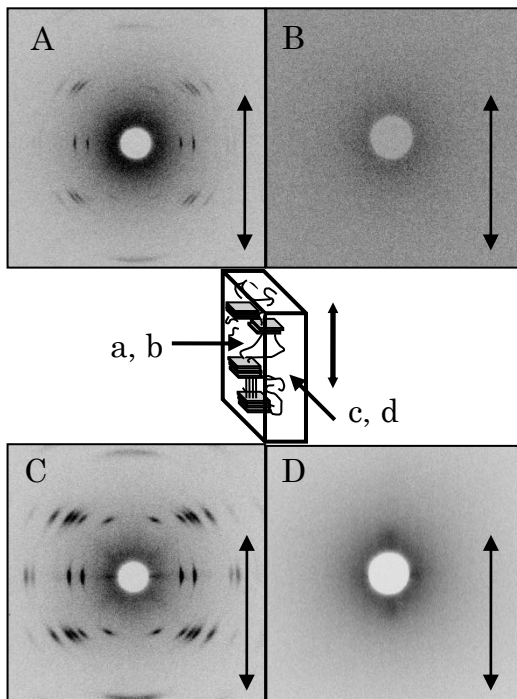
P(3HB)フィルムの一般的な作製方法であるソルベントキャスト法を用いて作製したフィルムの広角X線回折図からは、フィルム面に対して垂直および水平方向から撮影したX線回折図(Figure 5-5(A)と(C))に示されるように、P(3HB)の $\alpha$ 構造に由来するリングパターンが示された。しかし、同様にフィルム面に対して垂直および水平方向から撮影したFigure 5-5(B)と(D)に示した小角X線散乱図では周期的な構造に由来する回折が現れていないことから、ソルベントキャストフィルムでは、 $\alpha$ 構造からなるラメラ結晶がランダムに配向していることが確認された。これに対して本研究で作製したゲルフィルムにおいて、フィルム面に対して水平方向から撮影した Figure 5-6(C)の広角X線回折図において、赤道線上にアーク状の回折が現れており、同様な方向から撮影した Figure 5-6(D)の小角X線散乱図に子午線方向に周期性に由来する散乱が確認できることから、超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムの結晶構造は、ラメラ結晶がフィルム面に対して、水平に配向し積層した $c^*1$ ラメラ結晶が積層している構造であることが示唆された。このような構造を有するP(3HB)ゲルフィルムを用いて熱PIN延伸法を行ったところ、30倍まで延伸が可能であり、20倍まで再現性良く延伸できた。20倍に延伸した超高分子量P(3HB)ゲルフィルムの広角X線回折図では、フィルム面に対して垂直、および水平ともに $\alpha$ 構造に由来する回折が出現しており(Figure 5-7(A)、(C))、延伸方向に対して垂直方向にラメラ結晶( $c^*2$ ラメラ結晶)が高配向していることが分かる。Figure 5-7(D)には延伸方向に周期性の回折が若干認められることから、 $c^*2$ ラメラ結晶が周期的に配向していることが考えられる。これは熱を加えながら延伸したため、 $c^*1$ ラメラ結晶で構成されるゲルフィルム特有の構造を融かし、熱ピン延伸を施された後に $c^*2$ ラメラ結晶で構成される高次構造が形成されたためだと考えられる。



**Figure 5-5** X-ray diffraction patterns of undrawn UHMW-P(3HB) cast-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a,b,c and d denote X-ray incident direction.



**Figure 5-6** X-ray diffraction patterns of undrawn UHMW-P(3HB) gel-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a,b,c and d denote X-ray incident direction.



**Figure 5-7** X-ray diffraction patterns of 20 times draw and annealed UHMW-P(3HB) gel-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a,b,c and d denote X-ray incident direction. The arrows indicate the drawing direction. - 108 -



### 5-3-2 P(3HB-co-3HH) ゲルフィルム

#### 5-3-2-1 ゲルフィルム作製における溶媒選択

Table 5-3 に、種々の溶媒に P(3HB-co-3HH)を溶解させ、急冷した際のゲル化挙動をまとめた。P(3HB-co-3HH)において、*p*-xylene、1,2-dichloroethane (DCE)、toluene、propylene carbonate のいずれの溶媒も急冷時にゲル化することはなかった。しかしながら、DCEのみ時間経過と共にゾル化を経て若干ゲル化が確認された。このため、P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムの作製は溶媒として DCE を用いた。

**Table 5-3** The relationship solvent and gelation for P(3HB-co-3HH)

Solvent	Gelation	Drying time [day]	Film-forming properties
<i>p</i> -xylene	×	-	-
DCE	△	25	○
propylene carbonate	×	-	-
toluene	×	-	-

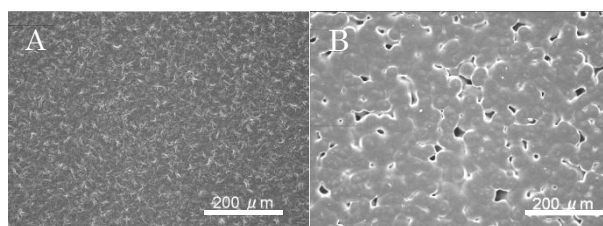
[Gelation] ○: gelation after quenching, △: take a long time to gelation, ×: not gel, -: not solve

[Drying time] -: not drying

[Film-forming properties] ○: uniformity, △: shrinkage, ×: not forming to film

#### 5-3-2-2 表面観察室温延伸および機械的性質

Figure 5-8 に P(3HB-co-3HH)ゲルフィルムおよび P(3HB-co-3HH)キャストフィルム表面の SEM 像を示す。キャストフィルム表面(B)には、溶媒が揮発した際にできた空孔が観察されたが、ゲルフィルムの表面(A)には空孔が観察されず平滑な表面を有していた。これはゲルフィルムの乾燥時間が 20 日程度と非常に長く、ゆっくり溶媒が揮発したためだと考えられる。このような表面形態は P(3HB)でも同様であった。



**Figure 5-8** Scanning electron micrographs of (A) gel-film and (B) cast-film surface.

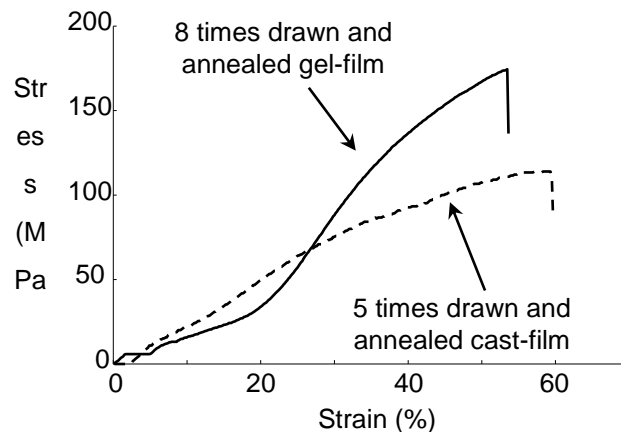
延伸機を用いて、キャストフィルムおよびゲルフィルムに延伸を試みたところ、室温での一軸延伸が可能であった。その結果、キャストフィルムは、5倍までしか延伸することができなかったが、ゲルフィルムは8倍まで延伸することが可能であった。これはゲルフィルムにおける分子鎖の絡まり合いが、キャストフィルムと比較して少ないためだと考えられる。

Table 5-4 に延伸後熱処理を施したゲルフィルムとキャストフィルム、および比較として Jenny らが報告した冷延伸フィルムの機械的性質(Fischer, J. J. *et al.*, 2004)を示す。ゲルフィルムの引張強度は延伸倍率の増加とともに上昇しており、8倍延伸ゲルフィルムは、引張強度 151 MPa、破壊伸び 58 %、弾性率 0.27 GPa を示し、これまで報告されている冷延伸フィルムよりも高強度で柔軟なフィルムを作製することができた。Figure 5-9 に5倍延伸熱処理キャストフィルムと 8倍延伸熱処理ゲルフィルムの応力-ひずみ曲線を示す。5倍延伸熱処理キャストフィルムのカーブが破壊まで降伏点を持たず、一定の変形挙動を示したのに対し、8倍延伸熱処理ゲルフィルムは破壊に至るまで二段階の変形挙動を示した。

変形初期ではラメラ結晶間の非晶質分子鎖が伸ばされるため、フィルムの変形に必要な応力は小さいと考えられる。一方、変形後期では、結晶間のタイ分子鎖が引き延ばされ伸びきり鎖として応力を担うため、応力-ひずみ曲線の傾きが大きくなったと考えられる。

**Table 5-4** Mechanical properties of gel- and cast-films.

Sample	Draw ratio	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Young's modulus (GPa)
gel-film	1(undrawn)	17 ± 4	766 ± 56	0.08 ± 0.03
	6	61 ± 33	83 ± 30	0.14 ± 0.03
	8	151 ± 15	58 ± 6	0.27 ± 0.03
cast-film	1(undrawn)	16 ± 2	791 ± 52	0.13 ± 0.11
	5	103 ± 11	58 ± 3	0.22 ± 0.22
cold-drawn film <sup>7)</sup>	5	53 ± 4	204 ± 18	0.30 ± 0.01



**Figure 5-9** Stress-strain curves of 8 times drawn and annealed gel-film and 5 times drawn and annealed cast-film.

### 5-3-2-3 ゲルフィルムの高次構造解析結果

X線回折測定におけるX線のフィルムに対する入射方向、フィルム中のラメラ結晶の配向方向、および広角X線回折測定パターンとの関係は5-3-1-3と同様である。

Figure 5-10にキャストフィルムの広角および小角X線回折の結果を示す。フィルム面に対して垂直および平行方向から撮影した広角X線回折図(Figure 5-10(A, C))には、(020)と(110)面に由来する回折がリングパターンとして現れた。また、小角X線回折図(Figure 5-4(B, D))には薄いリング状パターンが見られたが、明確な散乱は認められなかった。従って、キャストフィルム内ではラメラ結晶が三次元的にランダムに存在していることが示された。

ゲルフィルムに対する広角および小角X線回折の結果をFigure 5-11に示す。フィルム面に対して垂直方向(a)から撮影した広角X線回折図(Figure 5-11(A))には(020)と(110)に由来するリングパターンが現れており、垂直方向(b)から撮影した小角X線回折図(Figure 5-11(B))には明確な散乱は認められなかった。しかし、フィルム面に対して水平方向(c)から撮影した広角X線回折図(Figure 5-11(C))には $c^*1$ の赤道線方向(回折図上下方向)にアーク上の回折が見られ、さらに、弱い明瞭な第一層線が現れていた。また、

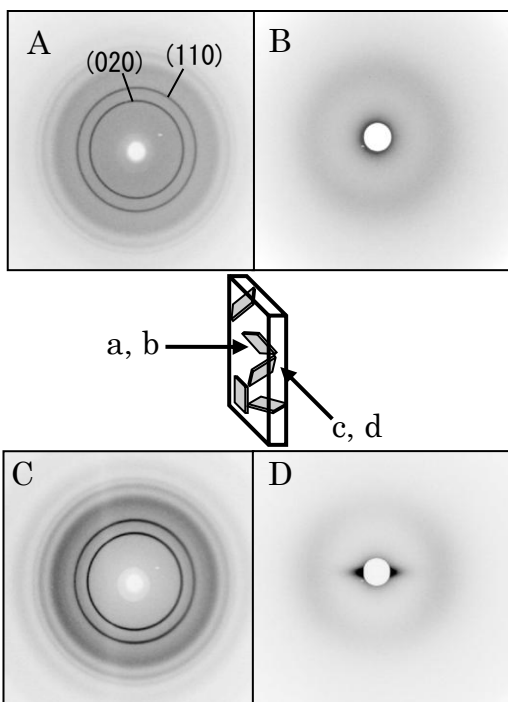
水平方向(d)から撮影した小角 X 線回折図(Figure 5-11(D))における  $c^*1$  の子午線方向(回折図の左右方向)に二点の強い散乱が認められた。このことから、ゲルフィルムの中でラメラ結晶がフィルム面に対して平行に面配向していることがわかった。広角および小角 X 線回折測定結果より、結晶化度は 40 %、配向度は 0.60、長周期は 8.0 nm であった (Table 5-5)。

キャストフィルムに室温延伸および熱処理を施した、5 倍延伸熱処理キャストフィルムの X 線回折図を Figure 5-12 に示す。フィルム面に対して垂直方向(a)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-12(A))には、(020)と(110)の弱いリングパターンに加えて、(020)(110)に由来する配向性の強い回折が  $c^*2$  の赤道線方向(回折図左右方向)に現れた。垂直方向(b)から撮影した小角 X 線回折図(Figure 5-12(B))には、 $c^*2$  の子午線方向(回折図上下方向)に散乱が認められた。フィルム面に対して水平方向(c)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-12(C))にも Figure 5-12 と同様な弱いリングパターンと  $c^*2$  の赤道線方向(回折図左右方向)に回折があり、水平方向(d)から撮影した小角 X 線回折図(D)にも Figure 5-12(B)と同様に  $c^*2$  の子午線方向(回折図上下方向)に散乱が認められた。以上の結果から、5 倍延伸熱処理キャストフィルム内ではラメラ結晶がフィルム面に対して垂直に配向していることがわかった。広角 X 線回折図のリングパターンは未延伸キャストフィルムの球晶が残留していたためであると予想される。

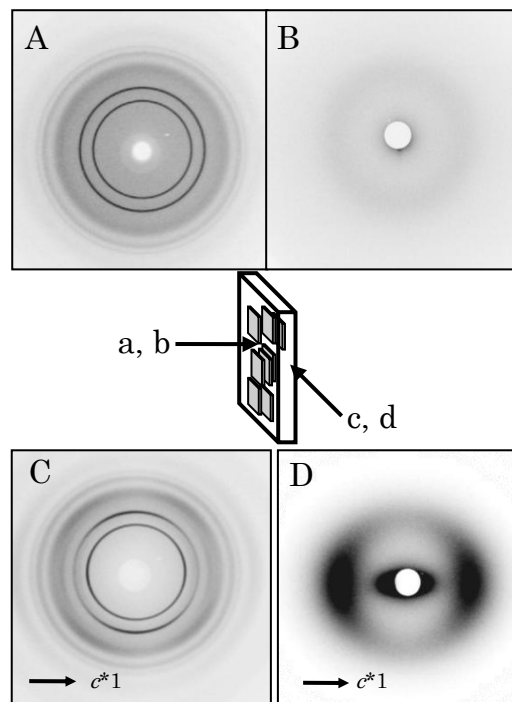
次に、8 倍延伸熱処理ゲルフィルムの X 線回折図を Figure 5-13 に示す。フィルム面に対して垂直方向(a)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-13(A))にはリングパターンの上に、延伸前には確認されなかった  $c^*2$  の存在を示す明確な(020)と(110)回折が新たに現れていた。フィルム面に対して垂直方向(b)から撮影した小角 X 線回折図(Figure 5-13(B))には、ラメラ結晶の長周期に由来する強い二つの散乱が認められた。このことから 8 倍延伸熱処理ゲルフィルム内には、フィルム面に対して垂直な  $c^*2$  ラメラ結晶が存在することがわかった。一方、フィルム面に対して平行方向(c)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-13(C))には  $c^*2$  を示す(020)と(110)回折に加えて、5 倍延伸熱処理キャストフィルムには認められなかった  $c^*1$  に由来する(020)と(110)回折が認められた。フィルムに対して水平方向(d)から撮影した小角 X 線回折図には  $c^*2$  ラメラ結晶の長周期に由来する散乱と、 $c^*1$  ラメラ結晶の長周期に由来する散乱が同時に認められた。以上の結果から、8 倍延伸熱処理ゲルフィルム内のラメラ結晶はフィルム面に対して水平に面配向している  $c^*1$  ラメラ結晶と、フィルム面に対して垂直に積層配向している  $c^*2$

ラメラ結晶が同時に存在していることがわかった。また、フィルム面に対して垂直方向(a)および水平方向(c)から撮影した広角 X 線回折図には高強度化の原因といわれている伸びきり鎖構造( $\beta$  構造)に由来する回折が現れていた。広角および小角 X 線回折測定結果より算出した、結晶化度は 48% であり、延伸および熱処理を施すことにより上昇した (Table 5-5)。

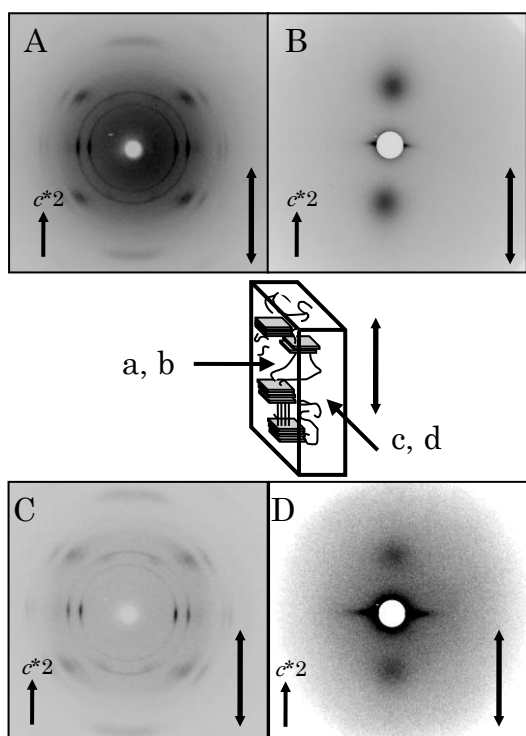
ここまでの実験結果により、8 倍延伸熱処理を施したゲルフィルム中には  $c^*1$  ラメラ結晶と  $c^*2$  ラメラ結晶の二つが混在していることがわかった。しかし、新たに出現した  $c^*2$  ラメラ結晶がどのように形成されるかは判明していない。そこで、8 倍延伸を施し、熱処理を施さない 8 倍延伸フィルムを作製し、X 線回折測定を試みた。延伸フィルムは熱処理を施さなければ収縮してしまうため延伸後に固定し、張力を掛け続けて測定した。8 倍延伸ゲルフィルムの X 線回折図を Figure 5-14 に示す。フィルム面に対して垂直方向(a)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-14(A))には、 $c^*2$  ラメラ結晶に由来する(020)と(110)回折が新たに出現し、平行方向から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-14 (C))の平行方向(c)から撮影した広角 X 線回折図(Figure 5-14 (C))にも  $c^*2$  に由来する(020)と(110)回折が新たに現れた。この結果から、新たに出現した  $c^*2$  ラメラ結晶は熱処理過程で出現したものではなく、もともと存在していた  $c^*1$  ラメラ結晶が延伸過程で回転したものであることが示唆された。広角 X 線回折測定から算出した 8 倍延伸ゲルフィルムの結晶化度は 50 % であり、熱処理後の結晶化度よりも高い値を示した。これは延伸によって破断した細かな結晶が熱処理によって熔融したためだと考えられる。次に、フィルム面に対し平行方向(d)から撮影した小角 X 線図について、熱処理後(Figure 5-13 (D))と熱処理前(Figure 5-14 (D))を比較したところ、熱処理前では回折図の左右方向に強い散乱が存在していたが、熱処理を施すことで回折図の上下方向の散乱が強くなっていた。これは、熱処理による  $c^*2$  ラメラ結晶の形成、および  $c^*1$  ラメラ結晶の一部が熔融したためだと考えられる。



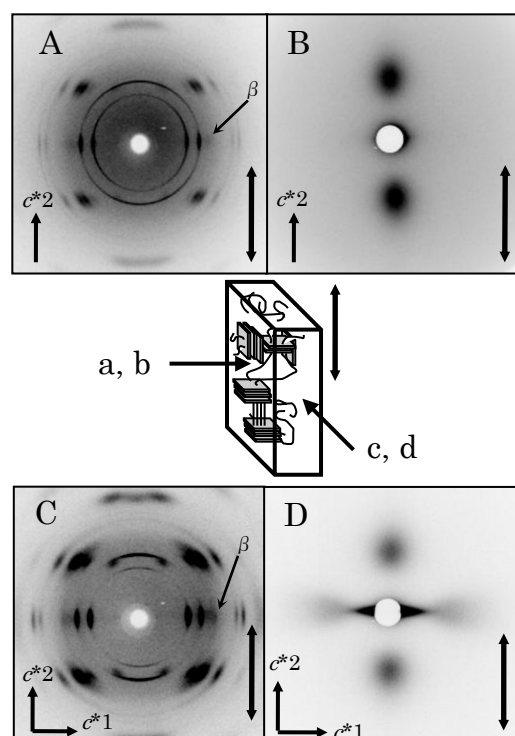
**Figure 5-10** X-ray diffraction patterns of undrawn cast-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a, b, c and d denote X-ray incident direction.



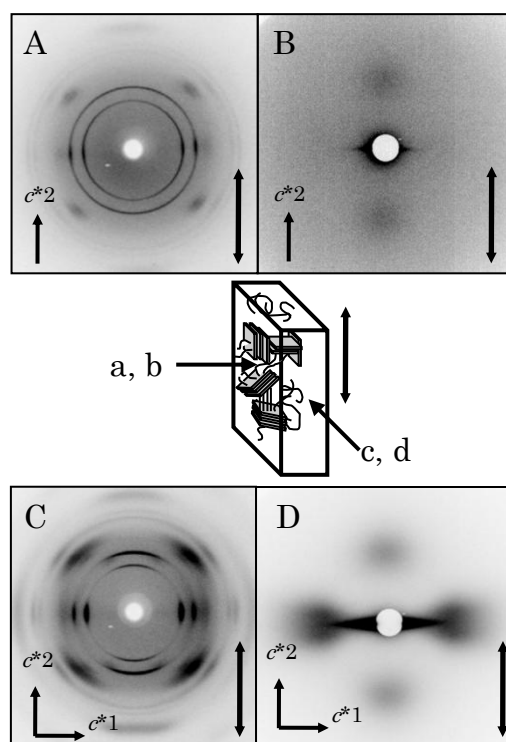
**Figure 5-11** X-ray diffraction patterns of undrawn gel-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a, b, c and d denote X-ray incident direction.



**Figure 5-12** X-ray diffraction patterns of 5 times draw and annealed cast-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a, b, c and d denote X-ray incident direction. The arrows indicate the drawing direction.



**Figure 5-13** X-ray diffraction patterns of 8 times draw and annealed gel-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a, b, c and d denote X-ray incident direction. The arrows indicate the drawing direction.



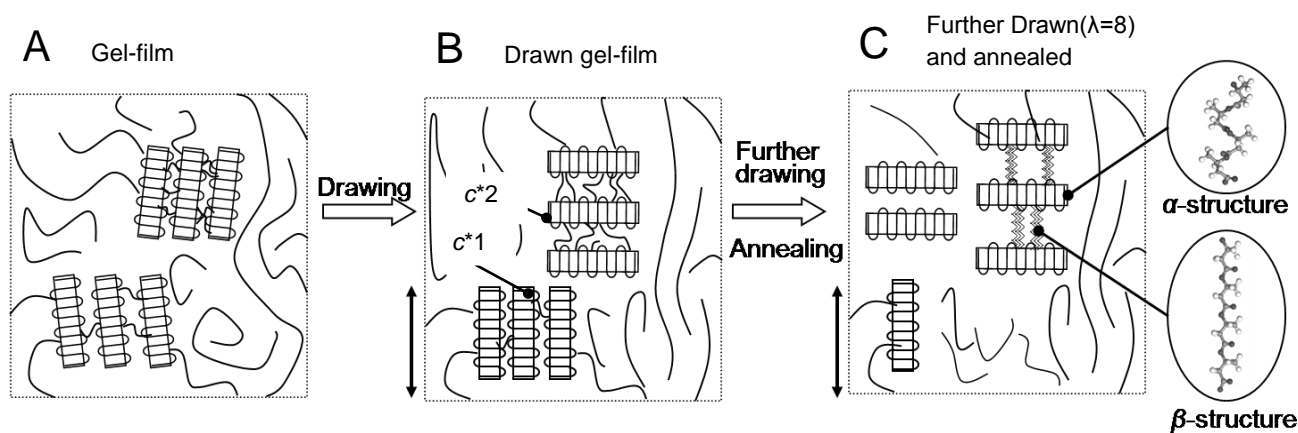
**Figure 5-14** X-ray diffraction patterns of 8 times draw gel-film. (A) WAXD and (B) SAXS patterns perpendicular to the film surface. (C) WAXD and (D) SAXS patterns parallel to the film surface. a,b,c and d denote X-ray incident direction. The arrows indicate the drawing direction.

#### 5-3-2-4 延伸過程で起こるゲルフィルムの高次構造変化モデル

以上の結果から、ゲルフィルムに延伸および熱処理を施す過程をモデル図として Figure 5-15 に示す。ゲルフィルム内には  $c^*1$  ラメラ結晶がフィルム面に対して積層しながら面配向している(Figure 5-15 (A))。ゲルフィルムに延伸を施すことで  $c^*1$  ラメラ結晶が回転し、 $c^*2$  ラメラ結晶となる(Figure 5-15 (B))。延伸が進むにつれラメラ結晶間のタイ分子鎖から  $\beta$  構造が発現し、熱処理を施すことで一部の  $c^*1$  ラメラ結晶が溶融する(Figure 5-15 (C))。このため、最終的な延伸熱処理ゲルフィルムのラメラ結晶配向は、ゲルフィルム形成時に存在していたフィルム面に対して垂直な  $c^*1$  ラメラ結晶と、延伸時にラメラ結晶が回転することによって形成されるフィルム面に対して垂直に配向した  $c^*2$  ラメラ結晶の二種類が存在していた。また、高強度化の原因である伸びきり鎖構造も発現していた。

**Table 5-5** Crystallinity, long period and crystal orientation of gel-films.

Sample	Incident direction	Crystallinity (%)	Crystal orientation	Long period (nm)
Undrawn gel-film	Through	40	-	-
	Edge		$c^*1$ : 0.60	$c^*1$ : 8.0
Drawn ( $\lambda=8$ ) gel-film	Through	50	-	$c^*1$ : 7.3
	Edge		$c^*1$ : 0.72	-
			$c^*2$ : 0.90	$c^*2$ : 7.8
Drawn ( $\lambda=8$ ) and annealed gel-film	Through	48	-	$c^*1$ : 8.6
	Edge		$c^*1$ : 0.82	-
			$c^*2$ : 0.94	$c^*2$ : 8.5
Undrawn cast-film	Through	44	-	-
	Edge		-	-
Drawn ( $\lambda = 5$ ) and annealed	Through	52	-	$c^*1$ : 8.9
	Edge		$c^*1$ : 0.89	-

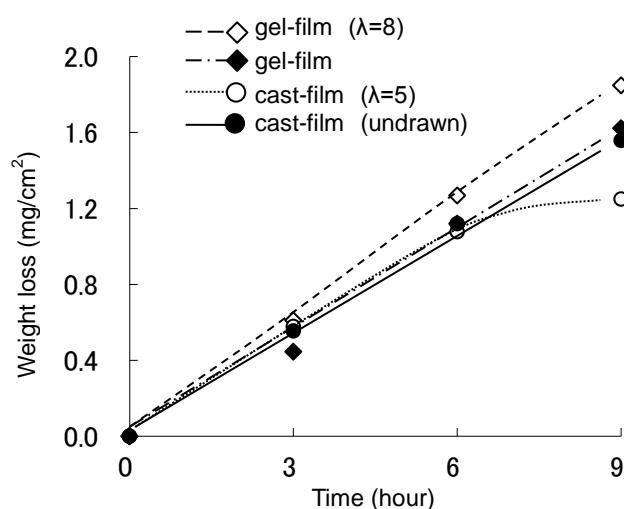


**Figure 5-15** Schematic illustrations for the microstructure change of the gel-film. The arrows indicate the drawing direction. (A) Gel-film in the crude state. (B) Lamella crystals rotated during the drawing procedure. (C)  $\beta$ -structure (planar zigzag conformation) appeared when applied further drawing. Annealing leads to increase  $c^*2$  lamella crystals and melting of  $c^*1$  lamella crystals.



#### 5-3-2-4 ゲルフィルムの酵素分解性

未延伸および延伸熱処理を施したゲルフィルムとキャストフィルムの酵素分解の実験結果を Figure 5-16 に示す。未延伸ゲルフィルムと未延伸キャストフィルムの酵素分解性に大きな違いは認められなかった。一方、8 倍延伸熱処理ゲルフィルムは、5 倍延伸キャストフィルムと比較して若干分解速度が上昇していた。これまで、延伸された P(3HB) の分解速度は、非晶質の分子鎖、高強度化の要因であるとされる平面ジグザグ構造( $\beta$  構造)、ラメラ結晶を構成する 2 回らせん構造( $\alpha$  構造)分子鎖の順番に速いと報告されている(Tanaka, T. *et al.*, 2006; Tanaka, T. *et al.*, 2007)。延伸ゲルフィルム内の高次構造にも  $\beta$  構造の存在が確認されており、 $\beta$  構造が優先的に分解されたため、ほぼすべての結晶が  $\alpha$  構造である延伸キャストフィルムよりも分解速度が速かったと考えられる。



**Figure 5-16** Enzymatic degradation of P(3HB-co-3HH) gel-films and cast-films in an aqueous solution of P(3HB) depolymerase at 37 °C.

## 5-4 結論

超高分子量ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート]およびポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサノエート](P(3HB-*co*-3HH))を用いてラメラ結晶がフィルム面に対して平行に配向したゲルフィルムを作製することができた。

超高分子量-P(3HB)ゲルフィルムは非常に脆く熱延伸は難しかったが、熱ピン延伸法の適用が可能であり、30倍までの延伸が可能であった。一方、広角 X 線回折図および SAXS の結果から、熱ピン延伸法適用後のラメラ結晶はほぼすべてフィルム面に対して垂直であり、熱延伸などで報告されているフィルムの高次構造と同様であった。

P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルムに対して室温で延伸を施したところ、8倍までの延伸が可能であり、引張強度 151 MPa、破壊伸び 58 %、弾性率 0.27 GPa を有する高強度で柔軟なフィルムを作製することができた。

広角および小角 X 線解析を行い、P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルム、延伸 P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルムおよび延伸熱処理 P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルムの高次構造解析を行った。この結果、P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルム内ではラメラ結晶がフィルム面に対して水平に面配向していた。P(3HB-*co*-3HH)ゲルフィルムに延伸を施すと、フィルム面に対して平行に配向していたラメラ結晶が回転を起こしフィルム面に垂直なラメラ結晶が形成され、さらに延伸を施すことで、ラメラ結晶間のタイ分子鎖が伸ばされ伸びきり鎖構造が出現することが示された。延伸後、熱処理を施すことでフィルム面に対して垂直なラメラ結晶は整列し、小さな結晶は熔融するとわかった。

未延伸のゲルフィルムとキャストフィルムの酵素分解性に大きな違いは認められなかった。しかしながら、延伸した場合、延伸ゲルフィルムの分解速度が若干上昇していた。これは  $\beta$  構造の発現に起因していると考えられる。

## 参考文献

Aoyagi, Y., Y. Doi, T. Iwata (2003):

"Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 209-216.

Dekoning, G. J. M., A. H. C. Scheeren, P. J. Lemstra, M. Peeters, H. Reynaers (1994):

"Crystallization Phenomena in Bacterial Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] .3. Toughening Via Texture Changes" *Polymer*, **35**, 4598-4605.

Fischer, J. J., Y. Aoyagi, M. Enoki, Y. Doi, T. Iwata (2004):

"Mechanical properties and enzymatic degradation of poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-[R]-3-hydroxyhexanoate) uniaxially cold-drawn films" *Polym. Degrad. Stab.*, **83**, 453-460.

Iwata, T., K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa, Y. Doi (2003):

"Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly([R]-3-hydroxybutyrate)" *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 217-224.

Kusaka, S., H. Abe, S. Y. Lee, Y. Doi (1997):

"Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143.

M. Matsuo, K. I., N. Abumiya (1984):

"Deformation mechanism of dry gel polyethylene up to a draw ratio of 300." *Sen-I Gakkaishi*, **40**, T275-T284.

Smith, P., P. J. Lemstra (1979):

"Ultra-high-Strength Polyethylene Filaments by Solution Spinning-Drawing .2. Influence of Solvent on the Drawability" *Makromol Chem*, **180**, 2983-2986.

Smith, P., P. J. Lemstra (1980):

"Ultra-high Strength Polyethylene Filaments by Solution Spinning-Drawing .3. Influence of Drawing Temperature" *Polymer*, **21**, 1341-1343.

Smith, P., P. J. Lemstra, J. P. L. Pijpers, A. M. Kiel (1981):

"Ultra-Drawing of High Molecular-Weight Polyethylene Cast from Solution .3. Morphology and Structure" *Colloid. Polym. Sci.*, **259**, 1070-1080.

Sudesh, K., H. Abe, Y. Doi (2000):

"Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters" *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555.

Tanaka, T., M. Fujita, A. Takeuchi, Y. Suzuki, K. Uesugi, K. Ito, T. Fujisawa, Y. Doi, T. Iwata (2006):

"Formation of highly ordered structure in poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] high-strength fibers"

*Macromolecules*, **39**, 2940-2946.

Tanaka, T., T. Yabe, S. Teramachi, T. Iwata (2007):

"Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near T-g" *Polym. Degrad. Stab.*, **92**, 1016-1024.

## 第六章

### 総 括

近年、経済的あるいは環境的な背景から、プラスチックの原料として石油のみに依存していくことは、持続可能な社会の形成、安定的な材料供給や生産活動を行う上で好ましくない。そこで、再生可能資源であるバイオマスから生産され、自然環境中で分解される環境循環型材料に注目が集まっている。その中でも、熱可塑性を示し、微生物が産出する脂肪族ポリエステルである、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)は実用化が求められている材料である。PHA 族の代表としてポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB))が挙げられる。P(3HB)は、融点 180 °C を有するプラスチックであり、ガラス転移点が室温以下の 4 °C 付近に存在するため、室温保持すると二次結晶化による経時劣化を起し、硬くて脆い性質を示すため、実用化は困難であると言われてきた。

しかし、最近、超高分子量 P(3HB)の生合成や新しい延伸法の開発により、P(3HB)の物性は劇的に上昇し、P(3HB)は材料として注目を浴びるようになった。しかしながら、超高分子量 P(3HB)は高密度培養することが難しい。したがって、今後 P(3HB)を材料として普及させることを考えると、優れた性質を有する超高分子量 P(3HB)を効率的に使用して、生産性の高い野生株産生 P(3HB)を主体とする高強度フィルムおよび繊維の作製が求められる。これにより、高強度化がなされた P(3HB)材料には二つの結晶構造が存在することが知られている。一つは、熔融結晶化や冷結晶化など通常の結晶化手法で形成される 2<sub>1</sub>ヘリックス構造( $\alpha$  構造)であり、もう一方は、延伸した P(3HB)中でのみ検出される平面ジグザグ構造( $\beta$  構造)である。 $\beta$  構造は、X 線を除く分析機器で検出することが難しいため、 $\beta$  構造と物性の量的関係や熱的挙動などについての報告は非常に少ない。

本論文では、野生株産生 P(3HB)を主体とし、生産性と高物性を兼ね備えた P(3HB)材料の作製を目的とした。また、高次構造に  $\beta$  構造を含む材料の、物性と熱的な挙動に対して、大型放射光 X 線を主体とする分析を行い、詳細な分析を試みた。

第一章「序論」では、P(3HB)の生合成、熱的機械的物性、結晶構造、酵素分解性、高強度化および P(3HB)共重合体に対して報告された研究成果をまとめ、さらに本研究の目的を示した。

第二章「野生株産生 P(3HB)フィルムにおける超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に少量の超高分子量 P(3HB)を添加し、高強度なフィルムの作製を試

みた。超高分子量 P(3HB)が熱的特性、結晶化挙動に与える影響を調べた結果、超高分子量を添加しても球晶成長速度に影響はないが、半結晶化時間が上昇しており、このことから、超高分子量 P(3HB)は核剤の様に振る舞うことが分かった。その後、P(3HB)フィルム、P(3HB)/超高分子量 P(3HB)=5/95 ブレンドフィルム、10/90 ブレンドフィルムおよび超高分子量 P(3HB)フィルムに対して冷延伸法を適用することで、高強度フィルムの作製を検討した。各サンプルの最大強度は、P(3HB)、5/95 ブレンド、10/90 ブレンド、超高分子量 P(3HB)の順にそれぞれ 161、242、211、191 MPa であり、特に 5/95 ブレンドは P(3HB)の 1.5 倍、超高分子量 P(3HB)の 1.3 倍の引張強度を有していた。大型放射光 X 線を用いた高次構造を行った結果、ブレンドフィルムは一段延伸にもかかわらず  $\beta$  構造が発現していた。さらに  $\beta$  構造の相対量と引張強度の間には相関がみられた。

第三章「P(3HB)繊維における紡糸条件の最適化と超高分子量 P(3HB)の添加効果」では、野生株産生 P(3HB)に超高分子量 P(3HB)を P(3HB)/超高分子量 P(3HB)=5/95 の割合でブレンドし、紡糸を行った。180、190、200 °C の三種類の熔融温度を選択し、0-10 分までの熱分解を測定し、熱分解定数を調べた。この結果、超高分子量の添加は分解初期で分解を抑制することが分かった。これは絡み合いなどによって、熱による分子運動の伝達を遅延させるためだと考えられる。その後、熔融温度として 180、190、200 °C を、熔融時間として 2、4、8 分を選択しこれらの組合せである(3×3=)9 通りの条件で紡糸を行い、最適条件を精査した。最も高い強度を示した 200 °C-2 分を熔融紡糸条件として採用し、次に最適な冷延伸温度を、ガラス転移点±4 °C の範囲(0-8 °C)から選択し検討した。この結果、4 °C が最も強度および延伸性がよいことが分かった。4 °C 以下はガラス状態のため分子鎖運動の低下が起き、4 °C 以上では結晶化の進行によって分子鎖配向を阻害すると考えられる。最適条件を使用し、一段階延伸および二段階冷延伸を適用し、高強度繊維の作製を試みた。二段延伸の適用によって P(3HB)および 5/95 ブレンドの引張強度はそれぞれ 630 MPa および 740 MPa まで上昇した。作製した繊維について大型放射光 X 線を用いた高次構造解析を行った。

第四章「P(3HB)の  $\beta$  構造における熱的性質と熔融過程の詳細な高次構造解析」では、 $\beta$  構造が存在するフィルムに対して、大型放射光を用いた昇温リアルタイム X 線測定を行い、 $\beta$  構造の昇温過程での高次構造変化について詳細な分析を行った。昇温リアルタ

イム広角 X 線解析の結果から、 $\beta$  構造は 110 °C 付近から減少し始め、130 °C で完全に消失した。 $\alpha$  構造のみで形成されるフィルム( $\alpha$  フィルム)が温度の上昇と共に結晶由来のピークの減少を伴うのに対して、 $\beta$  構造を含んだフィルム( $\beta$  フィルム)は結晶由来のピークが上昇し、120 °C 付近から急激な結晶化を示した。昇温リアルタイム小角 X 線散乱図において、 $\alpha$  フィルムは 120 °C 付近から温度の上昇と共に長周期の上昇をおこした。これはラメラ結晶の再結晶化によるものである。一方、 $\beta$  フィルムは 120 °C 付近で長周期が一度減少しており、その後 140 °C において増加することが分かった。これは  $\beta$  構造が熔融後  $\alpha$  構造に転移し、その時の収縮力によりラメラ結晶が動いているためであると考えられる。DSC 測定の結果と合わせて、 $\beta$  構造を含む P(3HB)延伸フィルムの熔融過程における高次構造に対して考察を行った。

第五章「微生物産生ポリエステルを用いたゲルフィルムの作製、物性および高次構造」では、超高分子量体 PE に対して適用され、高い物性改善が報告されているゲル延伸法を超高分子量 P(3HB)および P(3HB-co-3HH)に適用することを試みた。それぞれの貧溶媒を検討したところ、超高分子量 P(3HB)には *p*-xylene を、P(3HB-co-3HH)には 1,2-dichloromethan が最適であった。貧溶媒とポリマーを耐圧管に封入し、加熱することで溶解させ、急冷することでゲルを作製した。このゲルを乾燥させてゲルフィルムとし、延伸を施すことで高強度化を試みた。超高分子量 P(3HB)ゲルフィルムは非常に脆く、延伸することが難しかった。P(3HB-co-3HH)は室温での延伸が可能であった。P(3HB-co-3HH)延伸ゲルフィルムおよび P(3HB-co-3HH)延伸キャストフィルムの強度は 151MPa と 103MPa であり、高強度化することが出来た。また、延伸前、延伸後、延伸熱処理後のフィルムに対して大型放射光 X 線測定を行い、延伸過程の高次構造変化について詳細な分析を行った。この結果、延伸された P(3HB-co-3HH)ゲルフィルム内でラメラ結晶は回転していることが分かった。

以上、本論文「微生物産生ポリエステルを用いた高強度フィルムおよび繊維の作製と大型放射光による高次構造解析」では、超高分子量 P(3HB)を P(3HB)に少量添加することで超高分子量 P(3HB)単体に匹敵するフィルムおよび繊維の作製に成功した。また、大型放射光(SPring-8)を使用した高次構造を解析することで  $\beta$  構造と物性関係、および昇温時の高次構造変化を観察することが出来た。



今後、P(3HB)はさらなる高強度化が求められると予想される。これは、新規の材料を汎用化する上で、極端な物性は用途を広げ、市場を拡大するためである。今後の課題としては、超高分子量 P(3HB)を使用した超高強度フィルムの作製、野生株 P(3HB)を使用した高強度フィルムの作製を目的とした新規延伸法の開発が重要である。本論文によって、P(3HB)の熱分解が非常早く、また物性に与える影響が大きいことが分かった。これに加えて、超高分子量 P(3HB)は絡み合いが多く、熔融紡糸や冷延伸でこれ以上の高強度化を求めることは難しい。そのため、湿式紡糸や可塑剤の開発は有効な手段である。また、野生株 P(3HB)に関しては、微結晶核延伸法などを適用することで高強度化が図られている。この手法もまた、核形成後の延伸がカギであり、今後は核形成を制御することによる延伸方法の開発が期待される。

また、高次構造解析について、 $\beta$  構造の発現条件は明確に決定されていない。これまでの報告によると、結晶化後の延伸と熱処理が一つの条件である。本研究の昇温リアルタイム X 線測定において、 $\beta$  構造が  $\alpha$  構造に転移することが示唆され、この時の収縮力はラメラ結晶周期を変化させるほど強いことが示された。今後は、延伸後、熱処理過程でのリアルタイム X 線測定や、非晶質あるいは  $\beta$  構造から  $\alpha$  構造へ変化するときの収縮力を測定することで、 $\beta$  構造発現の解明に繋がると考えられる。

## 発表論文

### 第五章

- (1) *繊維学会誌* **Vol.66**, No.10, Page 253-260 (2010)

「ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート]のゲルフィ  
ルム作製, 高次構造解析および酵素分解性」

(加部泰三、田中稔久、粕谷健一、伊藤和輝、高田昌樹、竹村彰夫、岩田忠久)

### 第二章

- (2) *Macromolecules*, **Vol.45**, Issue 4, Page 1858-1865 (2012)

“Physical and Structural Effects of Adding Ultra-High-Molecular-Weight  
Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] to Wild-type Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]”

(Taizo Kabe, Takeharu Tsuge, Ken-ichi Kasuya, Akio Takemura, Takaaki Hikima,  
Masaki Takata, and Tadahisa Iwata)

### 第三章

- (3) *ACS symposium series on Biobased Monomers, Polymers and Materials* (in  
*press*)(2012)

“Processing, mechanical properties and structure analysis of melt-spun fibers of  
P(3HB)/UHMW-P(3HB) identical blend”

(Taizo Kabe, Takeharu Tsuge, Takaaki Hikima, Masaki Takata, Akio Takemura, and  
Tadahisa Iwata)

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、研究の進め方、論文作成に至るまで、多大な御指導を頂くとともに、研究者としての姿勢まで御教授いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科、岩田忠久准教授に心より御礼を申し上げます。

本論文での学位申請に当たり、御指導、御助言を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科・竹村彰夫准教授、江前敏晴准教授、和田昌久准教授、理化学研究所バイオマス工学プログラム・阿部英喜チームリーダーに心より感謝いたします。

本研究におきまして、的確な御助言や御協力を頂きました東京大学大学院生物材料科学専攻・堀成人助教、信州大学繊維学部・田中稔久准教授に御礼申し上げます。

本研究の実験に際しまして、超高分子量 P(3HB)を生合成させていただきました東京工業大学大学院・柘植丈治准教授、P(3HB)分解酵素の提供をしていただきました群馬大学大学院・粕谷健一教授、大型放射光施設への受け入れをしていただきました理化学研究所/播磨研究所・高田昌樹主任研究員、大型放射光施設での実験補助をしていただきました理化学研究所/播磨研究所・伊藤和輝研究員(現、株式会社リガク)、理化学研究所/播磨研究所・引間孝明研究員、X線解析プログラムを提供していただきました東京大学大学院生物材料科学専攻・丸林弘典博士に心より御礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、実験や考察、論文作成に対する御助言や御協力を頂きました東京大学大学院生物材料科学専攻・岩本伸一郎博士(現、産業技術総合研究所)、本郷千鶴博士、ロジャース有希子博士に心より御礼を申し上げます。

また、研究室で研究を進めるに当たり、公私ともにお世話になりました東京大学高分子材料学研究室の大学院生、学部生、卒業生の皆様に御礼申し上げます。

最後に、大学生生活を支援していただいた祖父、両親に深く感謝いたします。

