(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3735918号
(P3735918)
(45)発行日　平成18年1月18日(2006.1.18)　(24)登録日　平成17年11月4日(2005.11.4)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	9/16	(2006.01)	C12N	9/16	Z
C12R	1/01	(2006.01)	C12N	9/16	Z
			C12R	1:01	

請求項の数 1　(全 7 頁)

(21)出願番号　特願平8-9674
(22)出願日　平成8年1月24日(1996.1.24)
(65)公開番号　特開平9-201192
(43)公開日　平成9年8月5日(1997.8.5)
審査請求日　平成14年7月3日(2002.7.3)

特許法第３０条第１項適用　平成７年８月２日　社団法人日本農芸化学会開催の「日本農芸化学会１９９５年度大会」において文書をもって発表

微生物の受託番号　FERM　P-15381

(73)特許権者　000002082
スズキ株式会社
静岡県浜松市高塚町３００番地
(74)代理人　100060069
弁理士　奥山　尚男
(74)代理人　100077713
弁理士　武田　正男
(74)代理人　100072143
弁理士　秋山　暢利
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(72)発明者　神戸　敏明
茨城県つくば市並木２－２０８－３０１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】エステラーゼ活性を有するポリウレタン分解用酵素液の調製方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
エステル系ポリウレタンを炭素源として、Ｃｏｍａｍｏｎａｓ　ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ　ＴＢ－３５株（ＦＥＲＭ　Ｐ－１５３８１）を培養する工程と、該培養によって得られる培養液を遠心分離して、上清と菌体とに分離する工程と、コール酸ナトリウム溶液、デオキシコール酸ナトリウム溶液、ドデシル硫酸ナトリウム溶液から選ばれる界面活性剤によって該菌体からエステラーゼを遊離する工程と、該界面活性剤および該エステラーゼを含有する溶液を限外濾過で濃縮すると共に界面活性剤を除去して菌体付着エステラーゼを得る工程と、ポリウレタン分解エステラーゼを１．９～１８８．０ｍＵ含有するポリウレタン分解用酵素液を調製する工程とからなることを特徴とするエステラーゼ活性を有するポリウレタン分解用酵素液の調製方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、エステラーゼ活性を有するポリウレタン分解用酵素液の調製方法に関する。ポリウレタンは、四輪自動車や二輪自動車のシートクッション、衣類の繊維、靴のクッション、接着剤、塗料等に用いられている。ポリウレタンは、熱硬化性樹脂であり、リサイクルが困難なため、埋め立て処理されることが多い。しかし、ポリウレタンは半永久的に土中に残存するため、埋め立て地の不足を招く原因ともなっている。そこで、近年、ポリウレタンを処理する技術の開発が研究されている。

【０００２】
【従来の技術】
ポリウレタンの処理技術としては、埋め立て処理、化学的分解処理、焼却処理を挙げることができる。埋め立て処理は、使用済みポリウレタンや製造工程で生じるポリウレタン片をそのまま埋め立て処分するものである。しかし、次のような欠点がある。ポリウレタンは、スポンジ、クッション等に使用され、密度の低い樹脂であるため、これを土中に埋没させると、地盤が固まらず、安定しない。また、重量の割にかさばるため、輸送効率が悪い。さらに、ポリウレタンは、微生物により分解されず腐らないため、埋立処理場に占める割合が高く、処理場不足の一因となる。
【０００３】
化学的分解処理は、熱分解によりガスや石油に分解するものである。この処理方法は、グリコール分解により原料のポリオールを再生することができるという利点がある。しかし、処分するポリウレタンの品質にばらつきがあるため、分解産物の品質が安定せず、また、処理にかかる費用や手間が莫大であるため、採算があわないという欠点がある。焼却処理は、ポリウレタンを炉で焼却するものである。しかし、次のような欠点がある。まず、旧来の炉では、ポリウレタンの焼却の際に発生する高温に耐えることができない。また、四輪自動車や二輪自動車のシートクッションに使用されているホットキュア製ポリウレタンには、２９％の塩素を含む縮合リン酸エステルが難燃剤として用いられているため、ポリウレタンを焼却する際に、塩化水素が発生し、炉を腐食させる。さらに、焼却時に二酸化炭素や有毒ガスが発生し、大気環境を汚染する。
【０００４】
ポリウレタンの処理技術としては、この他、微生物による処理が考えられる。しかし、微生物による分解処理は、次に述べるように基礎技術の段階であり、まだ実用化していない。エーテル系ポリオールを原料としたエーテル系ポリウレタンは、微生物に耐性であり、分解が困難である。これに対し、エステル系ポリオールを原料としたエステル系ポリウレタンは、微生物の産生する酵素により分解されることが報告されている。例えば、「Ｔｏｋｉｗａ，Ｙ．ｅｔ ａｌ：Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，５２，ｐ１９３７（１９８８）」には、エステル系ポリウレタンがクモノスカビ（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ａｒｒｈｉｚｕｓおよびＲ．ｄｅｌｅｍａｒ）の酵素によって加水分解されることが記載されている。また、「Ｔｏｓｈｉａｋｉ Ｎａｋａｊｉｍａ－Ｋａｍｂｅ ｅｔ ａｌ：ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ １２９，３９－４２（１９９５）」には、土壌から分離した細菌（Ｃｏｍａｍｏｎａｓ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ ＴＢ－３５株）がエステル系ポリウレタンを分解し、アジピン酸とジエチレングリコールを産することが記載されている。Ｃｏｍａｍｏｎａｓ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ ＴＢ－３５株によるエステル系ポリウレタンの分解方法を実験に基づいて説明すると、次の通りである。
【０００５】
まず、ポリジエチレングリコールアジペートと２，４－トリレンジイソシアネートからポリウレタンを合成した。合成したポリウレタンをサイコロ状（約５０ｍｇ）に切断し、口径２５ｍｍの試験管内の５ｍｌの液体培地に入れた。液体培地に菌を１白金耳だけ接種し、３０℃で振とう培養（１２０振動／分）した。ポリウレタンを唯一の炭素源とした場合、７日間で完全に分解した。分解の代謝物質は、主にジエチレングリコールであり、トリメチロールプロパンも少量認められた。ポリウレタンを唯一の炭素源、窒素源とした場合、７日間で重量で４８％分解した。分解の代謝物質は、アジピン酸およびジエチレングリコールであった。
【０００６】
しかし、微生物を接種してポリウレタンを分解する上記の方法は、保存菌株の変異や雑菌による汚染によって分解が困難となるおそれがある。したがって、本発明の目的は、このような菌体を直接用いることなくポリウレタンを分解することができるようにしたエステラーゼ活性を有するポリウレタン分解用酵素液の調製方法を提供することにある。
【０００７】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、請求項１に記載の発明は、エステラーゼ活性を有するポリウレタン分解用酵素液の調製方法であって、エステル系ポリウレタンを炭素源として、Ｃｏｍａｍｏｎａｓ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ ＴＢ－３５株（ＦＥＲＭ Ｐ－１５３８１）を培養する工程と、該培養によって得られる培養液を遠心分離して、上清と菌体とに分離する工程と、コール酸ナトリウム溶液、デオキシコール酸ナトリウム溶液、ドデシル硫酸ナトリウム溶液から選ばれる界面活性剤によって該菌体からエステラーゼを遊離する工程と、該界面活性剤および該エステラーゼを含有する溶液を限外濾過で濃縮すると共に界面活性剤を除去して菌体付着エステラーゼを得る工程と、ポリウレタン分解エステラーゼを１．９～１８８．０ｍＵ含有するポリウレタン分解用酵素液を調製する工程とからなることを特徴とする。

【０００８】

【発明の実施の形態】

本発明におけるエステル系ポリウレタンとは、ポリオールとしてポリエステルを用いたポリウレタンをいう。本発明で用いるＣｏｍａｍｏｎａｓ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ ＴＢ－３５株（ＦＥＲＭ Ｐ－１５３８１）は、茨城県つくば市内の土壌から分離した細菌であり、ポリウレタンを分解することが知られている。ＴＢ－３５株の科学的性質を次に記す。

【０００９】

性質

細胞形態	桿菌
グラム染色	陰性
呼吸	嫌気性
運動性	＋
オキシダーゼ	＋
カタラーゼ	＋
硝酸塩還元	＋
インドール形成	－
アルギニンジヒドロラーゼ	－
ウレアーゼ	－
β－ガラクトシダーゼ	－
フルクトースＯ－Ｆからの酸	＋
エスクリン、ゲラチンの加水分解	－
トゥイーン８０の加水分解	＋
マンニトール利用性	＋
グルコン酸塩利用性	＋
アジピン酸塩利用性	＋
リンゴ酸塩利用性	＋
クエン酸塩利用性	＋
酢酸塩利用性	＋
グルコース利用性	－
アラビノース利用性	－
マンノース利用性	－
マルトース利用性	－
カプリン酸塩利用性	－
フェニル酢酸塩利用性	－
Ｎ－アセチルグルコサミン利用性	－
キノン型	ユビキノン（Ｑ－８）
Ｇ＋Ｃのモル％	６８．８％

【００１０】

培養液の遠心分離は、通常、８０００ｒｐｍで１０分間行う。

界面活性剤としては、コール酸ナトリウム溶液、デオキシコール酸ナトリウム溶液、ドデシル硫酸ナトリウム溶液のいずれかを用いる。特に、コール酸ナトリウム溶液が、酵素を阻害せず、抽出効率が高い点で好ましい。コール酸ナトリウム溶液の濃度は、０．００４５～５６．８重量％であり、好ましくは０．３～５重量％であり、特に好ましくは２重量％である。

ポリウレタン分解用酵素液は、１．９～１８８．０ｍＵ、好ましくは１５．０～１００ｍＵの濃度となるように調整し、ポリウレタンに添加する。濃度が１．９ｍＵ未満または１８８．０ｍＵを超えるとポリウレタン分解活性が低下して、本発明の効果を得ることができない。ここで、エステラーゼの活性測定は、エステラーゼによりｐ－ニトロフェニルアセテートから遊離されたｐ－ニトロフェノールの量を４０５ｎｍの吸光度で測定することによって行う。１分間に１μｍｏｌのｐ－ニトロフェノールを遊離させる酵素量を１Ｕ（ｕｎｉｔ）とする。ポリウレタンを分解するときは、ポリウレタンをフィルム状、粒状等の表面積の大きな形状にするのが好ましい。

【００１１】

【実施例】

ポリジエチレングリコールアジペート（ポリオール末端の官能基数２．７、重量平均分子量２５００）と２，４－トリレンジイソシアネートからエステル系ポリウレタンを合成した。合成したエステル系ポリウレタンをサイコロ状（約５０ｍｇ）に切断し、口径２５ｍｍの試験管内の５ｍｌの液体培地に入れた。培地の組成を表１に示す。培地の最終ｐＨは７．２に調整した。

【００１２】

【表１】

成　　分	含 有 量
KH_2PO_4	2g／L
K_2HPO_4	7g／L
NH_4NO_3	1g／L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0．1g／L
$ZuSO_4 \cdot 7H_2O$	1mg／L
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0．1mg／L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10mg／L
$MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$	2mg／L
蒸留水	1000mL

【００１３】

実施例１～３

液体培地にＣｏｍａｍｏｎａｓ　ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ　ＴＢ－３５株を１白金耳だけ接種し、３０℃での振とう培養（１２０振動／分）を７日間行なった。その後、培養液を遠心分離し、上清と菌体に分離した。上清を限外濾過することによって濃縮し、菌体外エステラーゼを得た。一方、分離した菌体を、２重量％のコール酸ナトリウムを含む０．１

Mのリン酸バッファー（ｐＨ７）中に入れ、エステラーゼをリン酸バッファー中に遊離させた。８０００ｒｐｍで１０分間遠心分離して菌体を分離した後、リン酸バッファーの上清を限外濾過機を用いて限外濾過して濃縮すると共にコール酸を除去し、菌体付着エステラーゼを得た。菌体付着エステラーゼは、１．９～１８８．０ｍＵの濃度となるように調整し、ポリウレタン分解用酵素液とした。

厚さ１ｍｍのフィルム状に合成した１０ｍｇのポリウレタンに１ｍＬの酵素液を加え、３０℃で４８時間反応させた。その結果、ポリウレタンの重量が０．４～１．３ｍｇ減少した。結果を表２に示す。

【００１４】

【表２】

	エステラーゼ	エステラーゼ活性 (mU)	ポリウレタン(mg)		
			0hr	48hr	減少量
実施例１	菌体付着	188.0	10.6	9.9	0.7
実施例２	菌体付着	18.8	9.9	8.6	1.3
実施例３	菌体付着	1.9	10.2	9.8	0.4
比較例１	菌体付着	1880.0	10.2	10.0	0.2
比較例２	菌体外	235.0	10.2	10.1	0.1
比較例３	菌体外	23.5	10.2	9.9	0.3
比較例４	菌体外	2.4	10.4	10.1	0.3
対照例	－	0.0	10.2	10.0	0.2

【００１５】

比較例１

エステラーゼの濃度を１８８０．０ｍＵとした他は実施例１～３と同様にして実験を行った。結果を表２に示す。

【００１６】

比較例２～４

菌体外エステラーゼについても、実施例１～３と同様にして実験を行った。結果を表２

に示す。菌体外エステラーゼを用いたのでは、どの濃度においてもポリウレタンの分解はほとんど見られなかった。結果を表２に示す。

【００１７】

対照例

ポリウレタン分解用酵素液の代わりにｐＨ７．０のリン酸緩衝液を用いた他は、実施例１～３と同様にして実験を行った。結果を表２に示す。

【００１８】

【発明の効果】

本発明に係るポリウレタン分解用酵素液を用いると、従来方法によるポリウレタンの処理における欠点を伴わずに、３０℃で保温するだけで、大規模な機械や大きな労力を必要とせずに、簡単な操作で効率的にエステル系ポリウレタンを分解し、処理することができる。また、微生物は、保存作業が大変であり、継代培養によって変異を起こしやすいが、本発明のようなポリウレタン分解用酵素液として用いるのであれば、安定したポリウレタンの分解処理が可能になる。さらに、本発明に係るポリウレタン分解用酵素液を用いると、ポリウレタンの分解産物としてジエチレングリコール等の有用化学物質を得ることができる。

フロントページの続き

(72)発明者　中原　忠篤
茨城県つくば市並木２－１３１－１０１
(72)発明者　小沼　文子
茨城県つくば市春日４－２－７　アカデミーハイツ２０６号室
(72)発明者　金原　則子
静岡県浜松市高塚町３００番地　スズキ株式会社内
(72)発明者　岩田　央子
静岡県浜松市高塚町３００番地　スズキ株式会社内

審査官　佐久　敬

(56)参考文献　特開昭５８－００５１８９（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１３２１８４（ＪＰ，Ａ）
FEMS Microbiology Letters (1995), Vol.129, p.39-42
Int Biodeterior Biodegradation (1994), Vol.33, p.103-113
Int Biodeterior Biodegradation (1993), Vol.31, p.209-225
Int Biodeterior Biodegradation (1996), Vol.37, p.69-79

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N　9/00-9/99
CA(STN)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlusファイル(JOIS)