

数値シミュレーションによる ポリエチレングリコール生分解性解析

渡辺雅二^{1*}・河合富佐子²

¹岡山大学環境理工学部, 〒700-8530 岡山市津島中3-1-1

²岡山大学資源生物科学研究所, 〒710-0046 倉敷市中央2-20-1

(平成16年7月29日受理)

Analysis of biodegradability for polyethylene glycol via numerical simulation

Masaji Watanabe^{1*} and Fusako Kawai²

Department of Environmental and Mathematical Sciences, Faculty of Environmental Science and Technology,
Okayama University, 1-1, Naka 3-chome, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan¹⁾

Research Institute for bioresources, Okayama University, Chuo 2-20-1, Kurashiki 710-0046, Japan²⁾

Abstract: We examined the biodegradability of polyethylene glycol by analyzing gel permeation chromatography patterns, which were obtained before and after cultivation of a microbial consortium E-1 in culture media containing polyethylene glycol as its sole carbon source. We solved an inverse problem of the initial value problem, which consists of an exogenous depolymerization model and the initial weight distribution, in order to determine an oxidation rate, for which the solution of the initial value problem also satisfies the final condition. Given the oxidation rate, we simulated the transition of the weight distribution solving the initial value problem. We interpret the result that reflects a physical significance of the molecular weight on the oxidation rate, and reach a conclusion concerning the role of the membrane transport in exogenous depolymerization processes.

Key words: biodegradation, polyethylene glycol, exogenous depolymerization, mathematical model, numerical simulation

1. 緒 言

微生物によるポリマーの生分解プロセスは、一般にexogenousタイプとendogenousタイプに分けられる。Exogenousタイプ生分解プロセスでは、ポリマー分子は、モノマーユニットが分子末端で切断されることによって低分子化する。その例の一つにポリエチレン(PE)の生分解がある。PEは直鎖型の長鎖 n -alkaneの構造をもつが、 n -alkaneの酸化の初期段階では、脱水作用により第1級アルコールあるいは第2級アルコールが生産され、それが更にアルデヒドを経て酸になるまで酸化される。こうして末端でカルボン酸が生じると、 n -alkaneは脂肪酸類似構造をもつようになり、 β -酸化が作用し、炭素2つのユニットが切断される。一方、ポリエチレンワックス(PEwax)を唯一の炭素源とする、微生物コンソシアムKH-12の培養後のGPC分析結果を、培養前

のものと比較することにより、培養後はPEwaxの重量分布が高分子側にシフトし、小さい分子ほど分解速度が大きいことが示された [1, 2]。PE生分解に関しては以上の理論的および実験的考察から次のシナリオが想定される：十分に小さいPE分子は微生物によって直接吸収消化され、それ以上のものは直接吸収消化されるようになるまで β -酸化によって徐々に低分子化される。このシナリオに基づく数学モデルが提案され、PE生分解が数学的に解析された。また、数値シミュレーションの結果と実験結果が比較され、その妥当性が検証された [3, 4, 5, 6, 7]。

一方、主鎖切断を要因とするendogenousタイプの解重合プロセスでは加水分解が関与することが多い。Exogenousタイプの生分解プロセスでは、分子は徐々に低分子化するのに対してendogenousタイプ解重合プロセスは、高分子の分解による初期段階での急速な低分子の増加を特徴とする。Endogenousタイプの解重合プロセスの例にはポリビニルアルコール(PVA)の生分解がある。PVAは炭素一つおき

*連絡先, Corresponding author

に水酸基が結合した炭素鎖だが、水酸基の酸化及びモノケトンあるいはジケトンへの脱水作用により分子がランダムな位置で分裂される。このランダムな生分解プロセスの数学モデルも提案され、PVA生分解が数学的に解析された。また、前述のPE生分解の解析同様、数学モデルによる数値シミュレーションの結果と実験結果が比較され、この数学モデルが適切なものであることが確認された [9, 10]。

本論文では、exogenous生分解モデルをポリエチレングリコール (PEG) に適用し、解析および数値シミュレーションを行なった結果を示す。以下、PEGの生分解性を、PEGを唯一の炭素源とする微生物コンソーシアムE-1の培養後の重量分布と培養前の重量分布とともに解析した結果により考察する。Exogenous生分解モデル及び培養前と培養後の重量分布からなる逆問題を数値的に解くことにより得られた酸化率を示す。また、この酸化率をexogenous生分解モデルと培養前の重量分布からなる初期値問題に導入し、重量分布の推移に関する数値シミュレーションを行なった結果を示す。更に、解析結果からPEGのexogenous生分解プロセスにおける細胞膜の影響に関する考察を行う。

2. PEG生分解

2.1 PEGとその代謝プロセス

Polyetherは、潤滑剤、不凍液、インク、化粧品の成分として、あるいは洗剤やpolyurethaneを合成するための原料として利用されている。Polyetherの中では、PEGは最も大量に生産され、主として非イオン界面活性剤として消費されている。Polyetherは、PEGのように水溶性であるか、あるいは油状の液体であり、最終的には河川あるいは海域に排出される。そのため消却処理やリサイクルに適してはいないことから、polyetherに関しては生分解が重要な役割を果たす [12, 13, 14]。

Polyetherは、PEGの他には、polypropylene glycol (PPG), polytetramethylene glycol (PTMG)等を含み、 $HO(R-O)_nH$ で表されるポリマーの総称である：PEG: $R=CH_2CH_2$, PPG: $R=CH_3CHCH_2$, PTMG: $R=(CH_2)_4$ [12]。Polyetherの代謝プロセスは、PEGに関しては、嫌氣的 (Fig. 1 (a)) あるいは好氣的 (Fig. 1 (b)) に、分子末端でモノマーユニットが切断されることが知られている [14]。いずれにしても、PEG分子は、一回の分子末端での解重合プロセスで分子量44 (CH_2CH_2-O) を失う。したがってPEGの生分解プロセスはexogenousタイプである。次節では、exogenousタイプ解重合の数学モデルにより、PEGの生分解性を解析する。

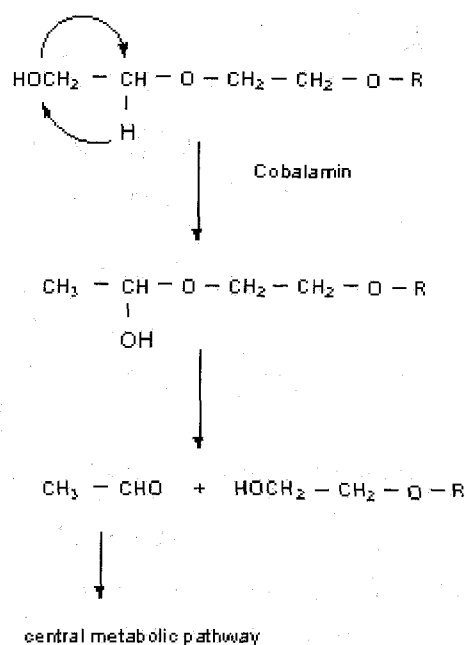


Fig. 1 (a) PEGの嫌氣的代謝

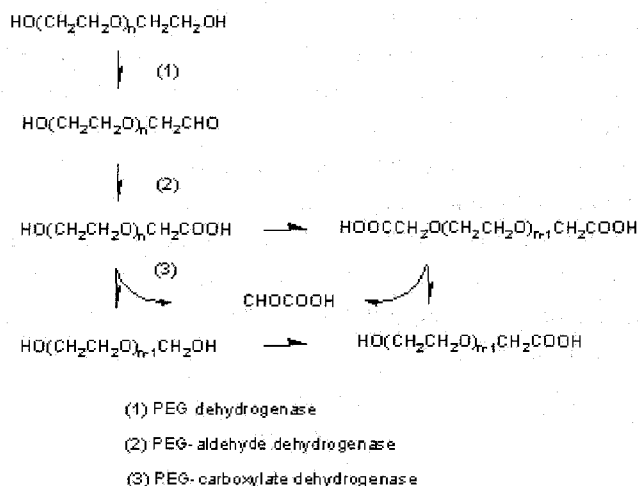


Fig. 1 (b) PEGの好氣的代謝

2.2 微生物培養による重量分布の変化

PEG資化性共生細菌系E-1が、PEGを唯一の炭素源として培養された [12]。Fig. 2(a)は、培養前と6日間培養後のPEGの分子量-重量分布を表すGPC分析結果を示す。Fig. 2(b)は、分子量に関する減少率

$$\frac{f(M) - g(M)}{f(M)} \quad (1)$$

を示す。ただし、 M は分子量を表し $f(M)$ と $g(M)$ は、それぞれ培養前と6日間培養後のPEGの分子量-重量分布を表す関数とする。Fig. 2(b)は、単に培養前と培養後の分子量-重量分布が比較された結果を示し、分子量と分解速度の関係は特に認められない。

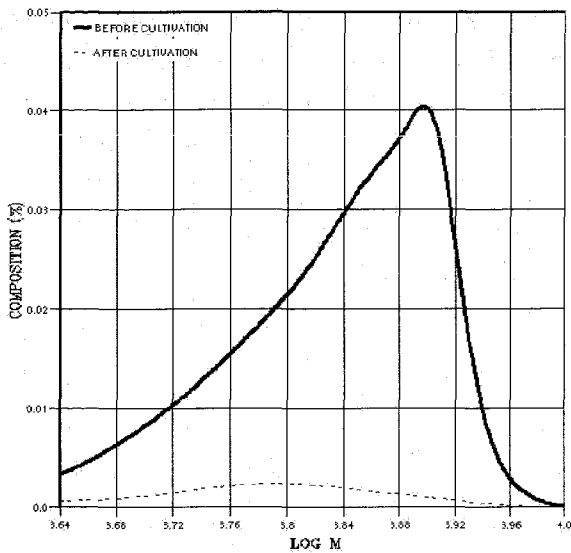


Fig. 2 (a) PEG資化性共生細菌系E-1の培養前と培養後のPEG 6000重量分布 ([12]の結果に基づく)

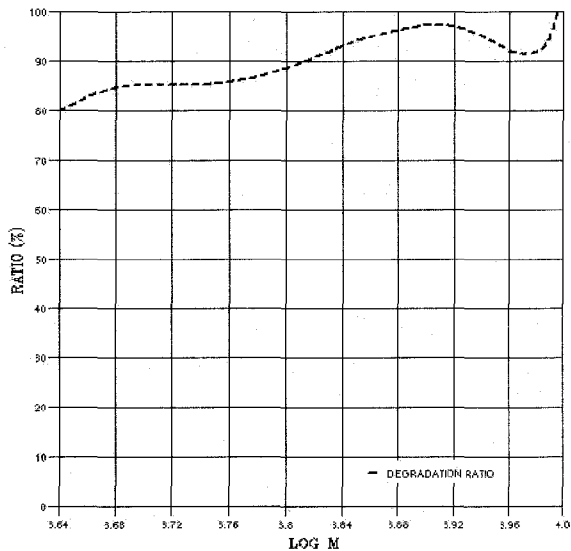


Fig. 2 (b) PEGの好氣的代謝

3. PEG生分解の数理解析

3.1 Exogenous 生分解モデルとその性質

PE生分解プロセスでは、十分に小さい分子は直接吸収消化され、それ以上のものは直接吸収消化されるようになるまで β -酸化によって低分子化するというシナリオが想定された。このシナリオに基づき、次のPE生分解モデルが提案された [3, 4, 5, 6, 7]。

$$\frac{dx}{dt} = -a(M)x + \beta(M+L)\frac{M}{M+L}y \quad (2)$$

ただし t は時間, M は分子量を表し, $x = w(t, M)$ は時刻 t で存在する, 分子量 M をもつ分子の総重量を表す。また, L は一回の β -酸化で一個の分子が失う分子量であり, PEの場合は $L = 28(\text{CH}_2\text{CH}_2)$ となる。更に, $y = w(M+L)$, すなわち時刻 t で存在する, 分子量 $M+L$ をもつ分子の総重量を表す。また, $a(M) = \rho(M) + \beta(M)$ であり, 関数 $\rho(M)$ と $\beta(M)$ は,

それぞれ消化吸収率と β -酸化率を表す。本論文で取り扱うPEGの重量分布に関して対象とする分子量は, すべて十分大きく, $\rho(M) = 0$, すなわち

$$a(M) = \beta(M) \quad (3)$$

と想定できる。

PE生分解モデルとして提案された数学モデル(2)は, PE生分解ばかりでなく, PEGのようなexogenous解重合が作用する場合に適用可能な汎用exogenous生分解モデルとみなすことができる。Fig. 1が示すようにPEG分子は, まず末端が酸化され, 次にエーテル結合が切断される。PE生分解の一つの要因である β -酸化に相当するこのプロセスには, 酸化が終始関わっているため, これを酸化と呼び, また $\beta(M)$ を酸化率と呼ぶ。PEGのexogenous解重合の場合, $L = 44(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})$ となる。

方程式(2)の解 $x = w(t, M)$ は初期条件

$$w(0, M) = f(M) \quad (4)$$

を満たすものとする。ただし, 関数 $f(M)$ は初期重量分布を表す。総消費率 $a(M)$ と酸化率 $\beta(M)$ が既知の場合, 方程式(2)と初期条件(4)は, 未知関数 $x = w(t, M)$ を解とする初期値問題を構成する。一方, 初期条件(4)の他, 分解後のある時刻 $t = T$ での重量分布

$$w(T, M) = g(M) \quad (5)$$

が与えられた場合, 方程式(2)と条件(4), (5)は, 初期値問題(2), (4)の解 $x = w(t, M)$ が時刻 $t = T$ での条件(5)を満たすような, 未知の総消費率 $a(M)$ と酸化率 $\beta(M)$ も同時に決定する逆問題を構成する。

3.2 逆問題の数値解

ここでは [5, 7] に示された逆問題の解法をPEG成分解析に適用した結果を提示する。関数 $f(M)$ と $g(M)$ は, 閉区間 $a \leq M \leq b$ に定義された連続関数とする。式(2), (4), (5)からなる逆問題を数値的に解くため, 先ずこの閉区間を l 個の長さ L の小区間 $a + iL \leq M \leq a + (i+1)L$ ($i = 0, 1, \dots, l-1$) に分割する。ただし l は, 次の不当式を満たす, 正の整数であるとする。

$$\frac{b-a}{L} \leq l < \frac{b-a}{L} + 1$$

このとき, 必要であれば $f(M)$ と $g(M)$ の定義域を拡張する。ここで, 正の整数 m を選び, 各小区間を, 更に m 個の小区間

$$M_{i,j-1} \leq M \leq M_{i,j} \quad (i = 0, 1, \dots, l-1, j = 1, 2, \dots, m)$$

に分割する。ただし

$$M_{i,j} = a + iL + j\delta M, \quad \delta M = \frac{L}{m}$$

とする。また, 正の整数 n を選び

$$M_{i,j} = a + iL + j\delta M, \quad \delta M = \frac{L}{m}$$

とする。また

$$a(M_{i,j}), \quad \beta(M_{i,j}), \quad w(t_k, M_{i,j})$$

の近似値をそれぞれ

$$a_{i,j}, \quad \beta_{i,j}, \quad w_{i,j,k}$$

で表す。ただし、式(3)により

$$a_{i,j} = \beta_{i,j}$$

である。また

$$f_{i,j} = f(M_{i,j}), \quad g_{i,j} = g(M_{i,j})$$

とする。

$$w_{i+1,j,k}, \quad \beta_{i+1,j}$$

$$(j = m-1, m-2, \dots, 0, k = 0, 1, \dots, n)$$

が与えられたとき

$$\eta = a_{i,j} \quad (6)$$

は方程式

$$\Phi_{i,j}(\eta) = 0 \quad (7)$$

の解となる。ただし

$$\Phi_{i,j}(\eta) = e^{-\eta T} \left\{ f_{i,j} + \frac{\beta_{i+1,j} M_{i,j}}{M_{i+1,j}} \times \frac{\delta t}{2} \sum_{k=1}^n (e^{\eta t_k} w_{i+1,j,k-1} + e^{\eta t_k} w_{i+1,j,k}) \right\} - g_{i,j}$$

とする。また、このとき

$$\Phi'_{i,j}(\eta) = -e^{-\eta T} \left\{ T f_{i,j} + \frac{\beta_{i+1,j} M_{i,j}}{M_{i+1,j}} \times \frac{\delta t}{2} \sum_{k=1}^n [(T-t_{k-1}) e^{\eta t_{k-1}} w_{i+1,j,k-1} + (T-t_k) e^{\eta t_k} w_{i+1,j,k}] \right\}$$

となる。方程式(7)の近似解は、適切な初期値を選び、ニュートン法

$$\eta_{p+1} = \eta_p - \frac{\Phi_{i,j}(\eta_p)}{\Phi'_{i,j}(\eta_p)}, \quad p = 0, 1, 2, \dots \quad (8)$$

によって求めることができる。

以上の方法で逆問題を解くため、適切な近似値

$$w_{l,j,k}, \quad j = 0, 1, \dots, m-1, k = 0, 1, \dots, n$$

を設定し、 $i = l-1, l-2, \dots, 0$ の順に解析を進める。各ステップでは、 $j = m-1, m-2, \dots, 0$ の順に、方程式(7)が唯一の正の解をもつための条件

$$0 < g_{i,j} < f_{i,j} + \frac{\beta_{i+1,j} M_{i,j}}{M_{i+1,j}} \times \frac{\delta t}{2} \sum_{k=1}^n (w_{i+1,j,k-1} + w_{i+1,j,k})$$

を確認しながら、(7)の近似解をニュートン法(8)で求める。(7)の近似解(6)が得られたならば、その値を代入して

$$w_{i,j,k} = e^{-\eta t_k} \left\{ f_{i,j} + \frac{\beta_{i+1,j} M_{i,j}}{M_{i+1,j}} \times \frac{\delta t}{2} \sum_{p=1}^k (e^{\eta t_{p-1}} w_{i+1,j,p-1} + e^{\eta t_p} w_{i+1,j,p}) \right\}$$

を求める。 $a = 10^{3.64}$, $b = 10^{4.0}$, $L = 44$, $m = 10$, $n = 4800$, $T = 6.0$ として逆問題を数値的に解き、酸化率 $\beta(M)$ を求めた。その結果をFig. 3に示す。また、このと

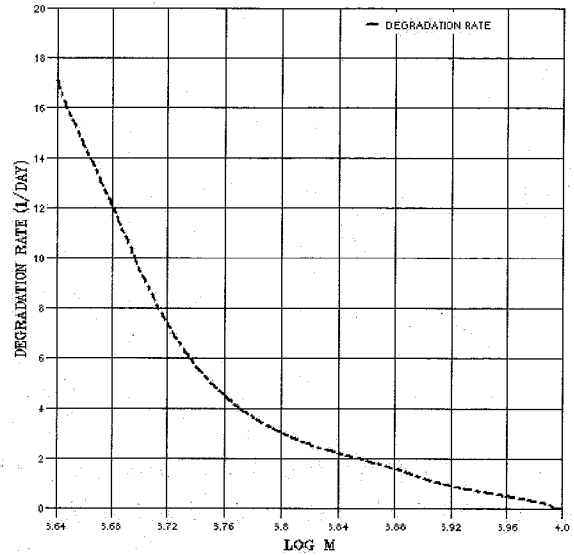


Fig. 3 微生物コンソーシアムE-1の培養前と培養後のPEGの重量減少率

き δt は

$$\delta t = \frac{T}{n} = 0.00125$$

であった。

3.3 PEG生分解数値シミュレーション

酸化率が得られたならば、初期値問題(2), (4)を解くことにより、分解過程における重量分布の遷移に関する数値シミュレーションが可能となる [5, 7]。

そのために、正の整数 N を選び、区間 $a \leq x \leq b$ を N 個の小区間に分ける $N+1$ 個の点

$$M_i = a + i\Delta M \quad (i = 0, 1, 2, \dots, N, \Delta M = \frac{b-a}{N})$$

を定義する。初期値問題(2), (4)の解 $w(t, M)$ の

$$M = M_i$$

における近似解を

$$w_i = w_i(t) \quad (i = 0, 1, \dots, N)$$

で表す。一方 $L = K\Delta M + R$, $0 \leq R \leq \Delta M$ となる非負の整数 K と定数 M があり、次の式が成立する。

$$M_i + L = \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right) M_{i+K} + \frac{R}{\Delta M} M_{i+K+1}$$

このとき次の近似式が成り立つ。

$$w(t, M_i + L) \approx \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right) w(t, M_{i+K}) + \frac{R}{\Delta M} w(t, M_{i+K+1})$$

$$\beta(M_i + L) \approx \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right) \beta(M_{i+K}) + \frac{R}{\Delta M} \beta(M_{i+K+1})$$

これら近似式を微分方程式(2)に代入し、

$$M = M_i$$

とおくと次の $N+1$ 個の線形微分方程式が得られる。

$$\frac{dw_i}{dt} = -a_i w_i + \beta_i w_{i+K} + \gamma_i w_{i+K+1} \quad (i=0, 1, \dots, N) \quad (9)$$

ただし Δt とする。ここでの

$$\begin{aligned} a_i &= a(M_i) \\ \beta_i &= \sigma_i \frac{M_i}{M_i + L} \left(1 - \frac{R}{\Delta M} \right) \\ \gamma_i &= \sigma_i \frac{M_i}{M_i + L} \cdot \frac{R}{\Delta M} \\ \sigma_i &= \left(1 - \frac{R}{\Delta M} \right) \beta(M_{i+K}) + \frac{R}{\Delta M} \beta(M_{i+K+1}) \end{aligned}$$

の近似値は、前節の解析で得られた

$$a_{j,k}, \beta_{j,k}$$

から次の近似式により、求めることができる。

$$\begin{aligned} a(M_i) &\approx \frac{M_{j,k} - M_i}{\Delta M} a_{j,k-1} + \frac{M_i - M_{j,k-1}}{\Delta M} a_{j,k} \\ \beta(M_i) &\approx \frac{M_{j,k} - M_i}{\Delta M} \beta_{j,k-1} + \frac{M_i - M_{j,k-1}}{\Delta M} \beta_{j,k} \end{aligned}$$

ただし

$$M_{j,k-1} \leq M_i \leq \Delta M_{j,k}$$

とする。 $N=10000$ として、初期近似を生成するための Runge-Kutta法 とともに、4 次 Adams-Bashforth Adams-Moulton 予測子-修正子法 [11] を用いて線形方程式系(9)を解いた。また、このときの時間ステップの幅を 0.00125 とした。その結果を Fig. 4 に示す。培養 6 日後の重量分布に関する実験結果と数値

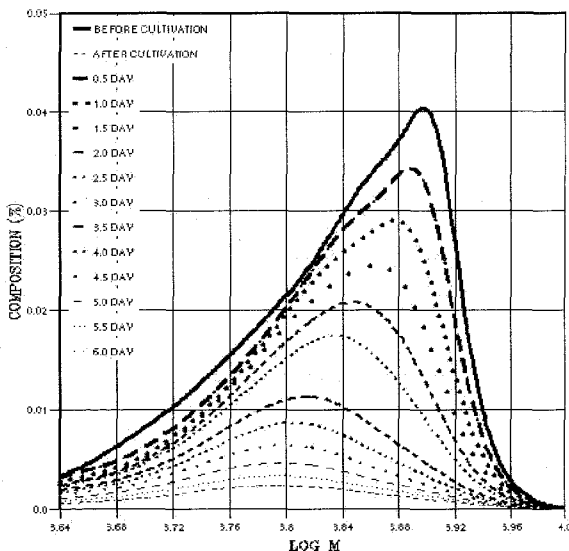


Fig. 4 PEG重量分布遷移のシミュレーション

結果は、ほとんど見分けのつかないほど一致していることから、Fig. 4に示された数値結果は、現実の重量分布の推移を適切に表していることが分かる。

4. 結論

酸化率 $\beta(M)$ は単位時間及び単位重量当たりの重量減少量を表す。それと同時に $\beta(M)$ は単位時間当たり分解を受ける分子数の割合、すなわち一個の分子が分解を受ける割合も表す。したがって、その逆数は一個の分子に exogenous 解重合が作用するため要する時間を表す。一方、この exogenous 解重合は分子末端で作用することを考えると、その作用に要する時間は、分子量 M には無関係であり、したがって関数 $\beta(M)$ は定数関数であるといえる。

しかし、この酸化作用は細胞内で働くので、分子が酸化作用を受けるには、少なくとも末端が outer membrane を通過し、periplasum に進入しなくてはならない。単位時間当たり、ある一定の長さの部分が outer membrane を通過すると想定すると、その部分が分子末端を含む可能性は、分子が長くなるほど (分子量 M が大きくなるほど) 小さくなる。したがって、この物理的要因により、実際には分子量 M が大きくなるほど酸化率 $\beta(M)$ は小さくなる、すなわち関数 $\beta(M)$ は減少関数であると考えられる。Fig. 3は、少なくともそこに示された分子量の範囲では、この推論が正当なものであることを示している。また、Fig. 4の数値シミュレーション結果は、Fig. 3の酸化率が妥当なものであることを示している。この結論は、実験データを導入した、数学モデルに基づく解析により導かれたものであり、Fig. 2(b)に示された結果のように、単に実験結果からだけでは得られない。したがって exogenous 生分解モデルは PEG 生分解の解析にも適用可能であることが示された。

文献

1. F. Kawai, M. Shibata, S. Yokoyama, S. Maeda, K. Tada, and S. Hayashi. Biodegradability of Scott-Gelead photodegradable polyethylene and polyethylene wax by microorganisms. *Macromol. Symp.* 144, 73-84 (1999).
2. 柴田勝, 河合富佐子, 横山茂雄, 多田啓司, 酒井裕一, 巢立康博, “土壤肥料学会講演要旨集第45集”, p.207 (1999).
3. F. Kawai, M. Watanabe, M. Shibata, S. Yokoyama, Yasuhiro Sudate, Experimental analysis and numerical simulation for biodegradability of polyethylene, *Polymer Degradation and Stability* 76, 129-135 (2002).
4. M. Watanabe, F. Kawai, M. Shibata, S. Yokoyama, Y. Sudate, Computational method for analysis of polyethylene biodegradation, *Journal of Computational*

- and Applied Mathematics*, 161, 133-144 (2003).
5. F. Kawai, M. Watanabe, M. Shibata, S. Yokoyama, Y. Sudate, S. Hayashi, Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi, accepted for publication in *Polymer Degradation and Stability*.
 6. 渡辺雅二・河合富佐子, 実験結果と数値シミュレーションによるポリマー生分解性解析 (Masaji Watanabe and Fusako Kawai, Analysis of polymeric biodegradability based on experimental results and numerical simulation), 環境制御 (*Environmental Research and Control*), 第25号, 25-32, (2003).
 7. M. Watanabe, F. Kawai, M. Shibata, S. Yokoyama, Y. Sudate, S. Hayashi, Analytical and computational techniques for exogenous depolymerization of xenobiotic polymers, accepted for publication in *Mathematical Biosciences*.
 8. 河合富佐子, 合成高分子, 今中忠行 (監修) 「微生物利用の大展開」, NTS (株), 東京, 865-870 (2002).
 9. M. Watanabe, F. Kawai, Numerical Simulation for Enzymatic Degradation of Poly(vinyl Alcohol), *Polymer Degradation and Stability*, 81, 393-399 (2003).
 10. M. Watanabe, F. Kawai, Mathematical modelling and computational analysis of enzymatic degradation of xenobiotic polymers, submitted for publication.
 11. J. D. Lambert, *Computational Methods in Ordinary Differential Equations*, John Wiley & Sons, Chichester (1973).
 12. 河合富佐子, ポリエーテルの生分解性と化学構造, 高分子論文集50 (10), 775-780 (1993).
 13. F. Kawai, Breakdown of plastics and polymers by microorganisms, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 52, 151-194 (1995).
 14. F. Kawai, Microbial degradation of polyethers, *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 30-38 (2002)