

令和3年度地球観測技術等調査研究委託事業
「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」
委託業務成果報告書

令和4年5月
国立大学法人 東京大学

本報告書は、文部科学省の地球観測技術等調査研究委託事業による委託業務として、国立大学法人東京大学が実施した令和3年度「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」の成果を取りまとめたものです。

目次	ページ
1, 委託業務の目的	3
2, 実施内容	4
① 酵素合成技術開発	
a. 酵素学的な開発	4
b. 宇宙実験に関わる開発	8
② 微生物合成技術開発	
a. 微生物学的な開発	13
b. 宇宙実験に関わる開発	23
③ バイオ素材評価研究	28
④ 基盤形成活動	
a. 基盤ホームページの作成	33
b. キックオフ研究会	33
c. 学生、企業向け研究会	33
3, まとめ（到達度、波及効果）	34
4, 添付資料（会議資料）	36

1, 委託業務の目的

本提案課題では、微小重力下でのバイオ有機素材の生産を試みる。自然界で最も豊富に存在するが人類が未だにその生産を制御できていないセルロースを中心に、水系かつ微小重力下で合成される素材の構造的、力学的な性質を明らかにし、それらを利用した産業をデザインすることを目的とする。これまでお互い独立してセルロース合成に関する研究を行ってきた東京大学、北海道大学、京都大学と、これまで数々の宇宙実験を展開してきたコンフォーカルサイエンス、JAMSS が協力し、「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発拠点」の形成に向けて、お互いのノウハウや研究技術のシェア、人材育成を行うためのプラットフォーム構築を目指す。本拠点で得られたセルロースおよび各種バイオ素材の力学的性質、分解性などの情報は、宇宙船内でいかに素材を合成し、利用し、リサイクルするかをデザインするために用いられるとともに、地上においてもどのような生産プロセスによって微小重力下と同様の均一なマテリアル生産を再現するかなどを評価し、新規素材産業へ展開していくことを目標とする。

本事業終了後は、拠点としての役割を東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムおよび東京大学未来ビジョン研究センター（IFI）内グローバルコモンズセンターに移し、企業からの寄付・投資によって継続させていくプランを立てている。

このうち、東京大学ではプロジェクトの総合的推進及びバイオセルロースの酵素合成に関わる技術開発、北海道大学ではバイオセルロースの微生物合成に関わる技術開発、京都大学ではこれらのバイオ素材の評価技術開発、株式会社コンフォーカルサイエンスではこれらの宇宙実証実験に係る技術開発を実施する。

2. 実施内容

①酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

(1) 宇宙空間で合成された CDP セルロースの形態評価

かねてより行ってきた宇宙空間でのセルロース合成実験に関して、解析を実施し成果を投稿論文としてまとめた。

[実験結果]

打上げ実験 Kirara#2 にて実施したセロデキストリンフォスホリラーゼ (CDP) を用いた宇宙空間におけるセルロース合成実験の産物を観察した結果、宇宙空間で CDP により合成したセルロースは地上条件で合成した物と比較して、より均一な外見を有していた(図 ①a-1)。

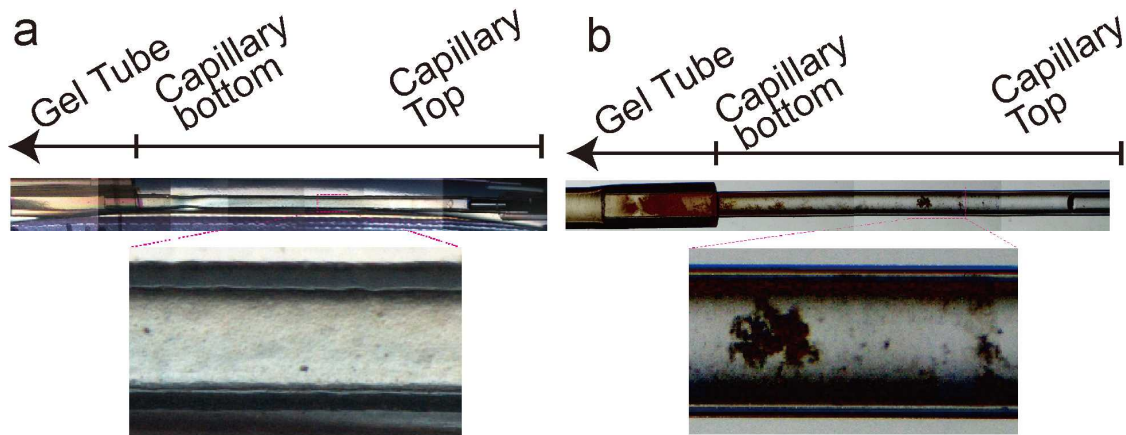


図 ①a-1 CDP によるセルロースの合成 (a:宇宙実験、b:地上対照実験)

今回、反応容器として用いたキャピラリーは石英ガラスによって作られており、電子線等を透過するため内容物を取り出すことなく X 線撮影等を実施する事が出来る。そこで、得られたサンプルを広角 X 線回折測定 (WAXS) により分析した結果、宇宙条件で合成されたセルロースはⅡ型のセルロース結晶に特徴的な (1 $\bar{1}$ 0) 面、(110) 面、(020) 面に基づく回折ピークを有する事が確認された (図 ①a-2)。

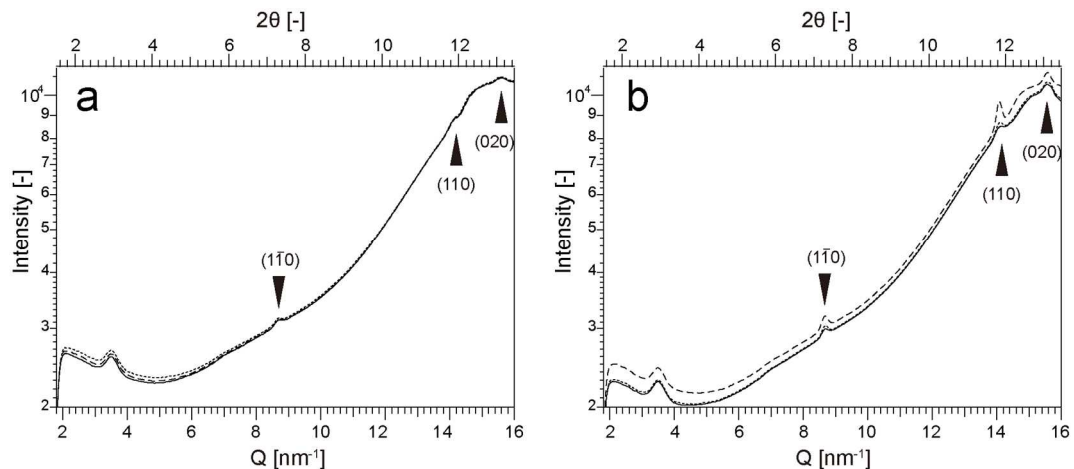


図 ①a-2 広角 X 線回折測定の結果 (a:宇宙実験、b:地上対照実験)

また同じサンプルを小角X線回折測定(SAXS)にて測定した結果、宇宙空間で反応させたサンプルはキャピラリー内の測定位置に関わらず同一の回折パターンを示したのに対し、地上対照サンプルではキャピラリー内の測定位置によって若干異なる回折パターンを示した(図 ①a-3)。この結果から、宇宙空間で反応させたサンプルはキャピラリー全体に渡って一様の構造体を作っている事に対し、地上対照サンプルでは得られる構造体にバラつきがある事が示された。この SAXS パターンを数式解析した結果、合成されたセルロース微結晶は厚さ約 5 nm から成る薄板状の構造を有している事が推定された。この薄板状結晶の様子は宇宙/地上の両条件間で差が無かった。

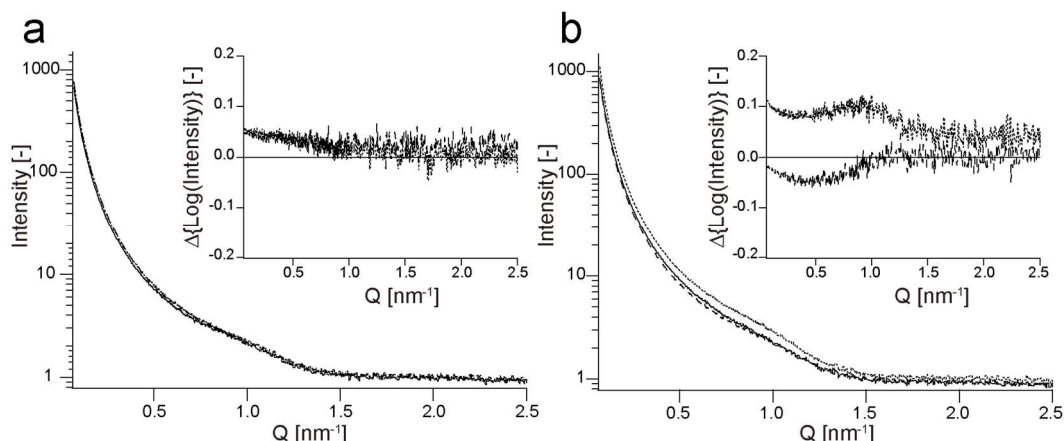


図 ①a-3 小角X線回折測定の結果 (a:宇宙実験、b:地上対照実験)

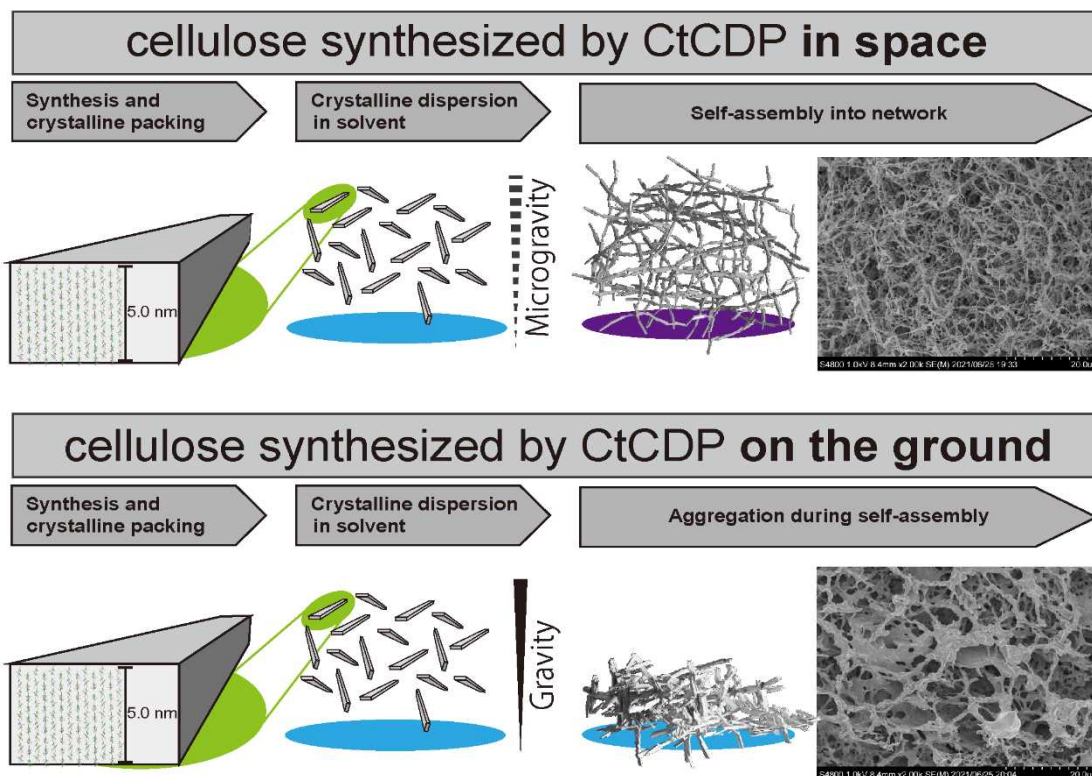


図 ①a-4 セルロース構造体への微小重力の効果

これらの結果を総合すると、宇宙空間でのセルロース合成においては薄板状のセルロース微結晶の生成までは地上条件と変わらない。一方、微結晶が寄り集まって形成されるセルロースのネットワーク構造においては凝集塊状の構造が形成される地上条件と異なり、宇宙条件では薄板結晶がより均一に分散し、一様となったセルロースネットワークを作り出すことが確認された(図 ①a-4)。セルロース微結晶の比重は水より重いことが知られており、地上条件では形成された微結晶が重力によって沈降する際に生じる対流や凝集などの影響が、このネットワーク構造のばらつきを引き起こすと推定された。

また宇宙空間で合成されたセルロースの平均重合度を地上条件と比較した結果、宇宙空間で合成されたセルロースの重合度は一様に上昇しており、平均重合度は7、部分的には重合度11に達した分子も確認された(図 ①a-5)。既報より、宇宙空間にて結晶化し沈殿が形成される物質の核形成率は地上条件と比較して数倍低下する事が報告されている。このことから、セルロースの合成においても、宇宙空間ではより溶解度の低い長鎖のセルロース分子が結晶核に捕らわれることなく長時間溶液中に留まる為にODPによる追加の伸長反応を受けやすく、最終的に合成されるセルロースの重合度が増加したと考えられた。

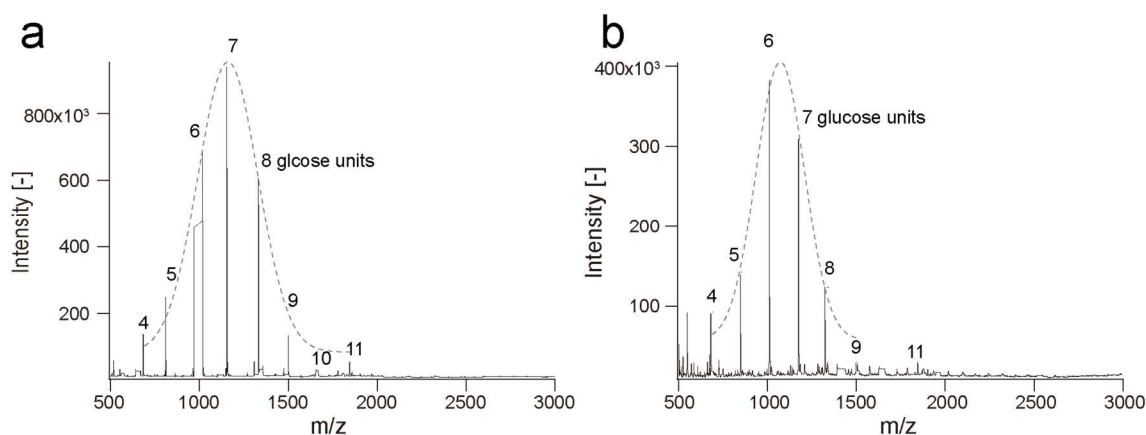


図 ①a-5 セルロース重合度の解析 (a:宇宙実験、b 地上対照実験)

以上の結果から、宇宙環境はODPを用いたセルロース合成における μm オーダーのセルロースネットワーク形成に影響を与え、凝集や部分的な沈降の無い、均一なセルロース系ゲルの形成を引き起こすことが確認された。宇宙空間で合成されたセルロースゲルは地上帰還時に生じる衝撃や重力によっても構造が破壊されていなかった事からある程度の強度を有しており、新しい材料創生手法としての可能性が示されたと考える。

(2) 宇宙空間でのセルロース合成条件の詳細検討

打上げ実験Kirara#2によって得られた宇宙空間でのセルロースゲル生成条件をより詳細に検討するため、 Δ Cys-CDP を発現精製して京大グループ、コンフォーカルサイエンスグループに供与した。また、Kirara#3の宇宙実験機会を利用して、CDP 酵素の量を変えたサンプルの打上げ実験を実施した。

[実験結果]

帰還後のサンプルと、地上対照実験サンプルの外観を図 ①a-6 に示す。観察の結果、今回の実験条件ではKirara#2時と同一の反応条件となるサンプルを含んでいたにも関わらず、合成されたセルロース量が明らかに減少していた。この差の要因が酵素等のサンプルにあるのか、その他の実験条件にあるのかが判明していない為、次回実験に向け検証を進める。

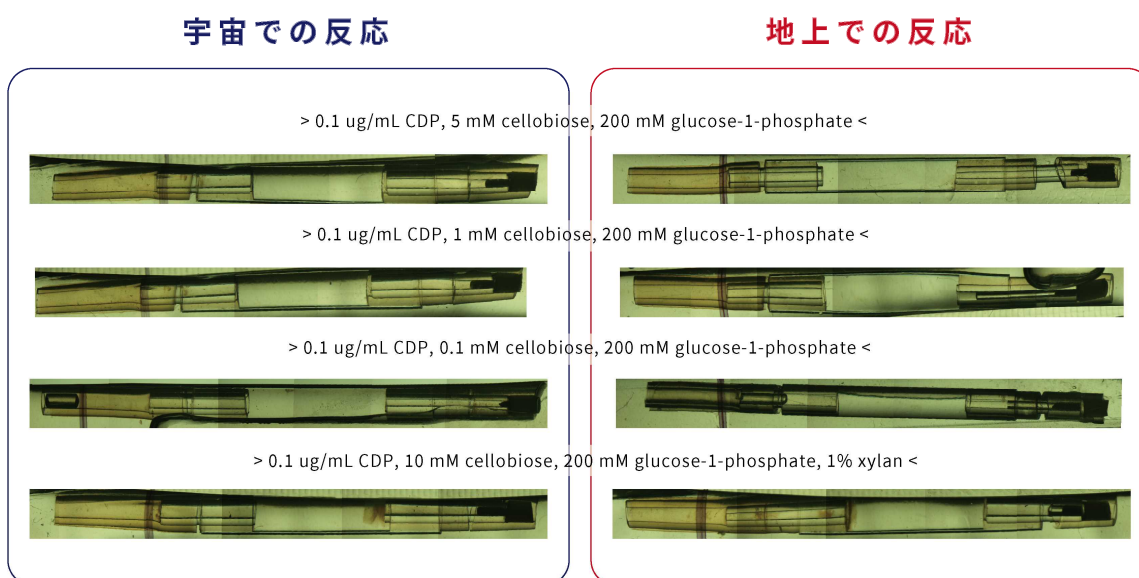


図 ①a-6 CDP によるセルロース合成の詳細解析

b. 宇宙実験に関わる開発

(1) 令和3年度12月に打ち上げのKirara#3での宇宙実験

本宇宙実験のためには、本プログラム開始直後に実験条件の許可申請等を欧州宇宙機関(ESA)に対して提出する必要があった。そこで以前の宇宙実験(Kuga, T. et al. Cellulose 29, 2999-3015 (2022))と同じ実験容器を用い、東京大学グループの提示する反応条件で宇宙実験を実施した。また、帰還時には当分室では実験環境が整っていなかったために、帰国後の試料を直ちに東京大学に届け、解析は東京大学グループで実施した。

[実験方法]

輸送船: SpaceX 社ドラゴン補給船 24 号機(Kirara#3)

日程: 2021 年 12 月 21 日(打ち上げ)、翌年 1 月 24 日(国際宇宙ステーション離脱)

実験場所: 国際宇宙ステーション内欧州宇宙機関実験棟「コロンバス」

実験容器: 石英製 2 mm 径結晶用キャピラリーを、5 mm 幅のテックバリア製容器に収納

反応条件: 実験条件 1~4 について、宇宙実験と地上対照実験を実施した。

打ち上げ 3 日前までは、キャピラリーの先端のアガロース部分に拡散抑止をした状態で 4℃保管し、その後外液とキャピラリー間の閉鎖を開放して 20℃保管し、3 日後に打ち上げを実施した。セロデキストリン加リン酸分解酵素(セロデキストリンホスホリラーゼ、 Δ Cys-CDP)及びグルコース-1-リン酸(α -G1P)などの各試薬は、東京大学グループより分与を受けた。

	キャピラリー内液 (36 μ l)			キャピラリー外液 (1 ml)		
	Cellobiose (mM)	Δ Cys-CDP (μ g/ml)	Xylan (%)	Cellobiose (mM)	α -G1P (mM)	Xylan (%)
実験条件1	5	0.1	0	5	200	0
実験条件2	1	0.1	0	1	200	0
実験条件3	0.1	0.1	0	0.1	200	0
実験条件4	10	0.1	1	10	200	1
令和2年度実験	10	0.1	0	10	200	0

[実験結果]

東京大学で生成物の顕微鏡観察などを行った結果、今回の宇宙実験では昨年度実験の追試に失敗し、セルロース合成は進まなかったという結論であった(①a(2)参照)。今後の宇宙実験では、酵素の比活性を確認するために、通例の宇宙実験で実施されるような事前検討を十分に実施する必要が改めて示された。

(2) 令和4年度の宇宙実験のための容器とアルカン隔壁法の開発

これまでに使われてきた拡散抑止方法は、キャピラリー内での酵素反応に限定されたもので、均一なセルロースをより大量に合成する反応容器では使用することができない。そこで、酵素液と基質液を、アルカン層によって分離した状態で充填することができる、新しい容器を開発した。Kirara での実験機会を利用するため、日本から射場まで低温輸送で 2 週間程度かかり、その後射場で 20℃のコンテナに收容して酵素反応を開始させ、2~3 日後に微小重力空間に達する。その後、約 1 か月間微小重力空間に滞在して帰還する。この反応条件に適した、酵素および基質濃度の経時的な調節ができる容器の開発を実施し、アルカン層の隔壁を用いることで成功した。

[R4宇宙実験容器開発]

令和4年度宇宙実験用に、次の特性を持つ容器の開発を進めた。

1. 200万円の予算内で、2条件の検討を実施する。
2. 二重封入の状態でKirara実験装置の上記空間に収納可能。
3. ガス透過性が低く、シールが強固であって、搭載安全基準を満たす。
4. 観察しやすく、サンプルの取り出しがしやすい。

各種検討の結果、素材は三菱ケミカル製テックバリア HX 厚さ 0.07 mm とし、内寸幅 8 mm、高さ 58 mm、奥行き 4 mm（内容積 1.85 ml）、外寸幅 13 mm、高さ 82 mm、奥行き 4.14 mm の直方体容器とすることにした。この容器について、設計、試作、使いやすさの確認の後、条件検討実験用に約 300 本の製造を行った。この容器は、酵素合成法とバクテリア合成法の両方の実験で使用することを予定し、本年度の各種条件検討を実施した。

[実験方法]

R4 容器の中に下層液（蒸留水）を充填後、20℃では液体である適切なアルカン層を充填し、低温で固化させた後に上層液（インク液）を充填する。輸送期間に相当する低温では両液は分離状態を保ち、20℃に昇温後に両液が混合されることを確認する。

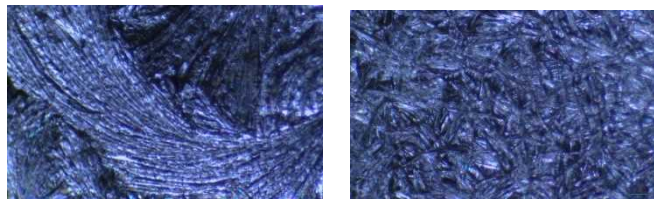


図 ①b-1 2液分離容器

[実験結果]

図 ①b-1 左は両液を充填し、4℃で 3 日間置いたものである。インク液のしみだしは観察されなかった。これを 20℃に 1 時間置くとアルカン層が融解し、1 日後には両液が混和することが確認できた（図 ①b-1 右）。

この時、アルカン層として、ヘキサデカン 100%を用いると両液の分離が不完全でインクの染み出しが観察された。これは固化したときの結晶のきめが粗く隔壁に隙間ができるためと考えられた（図 ①b-2 左）。しかしながらヘキサデカン：ヘプタデカン（9:1）の混合液を用いることで、アルカン層のきめが細くなり（図①b-2 右）、図 ①



図①b-2 顕微鏡像 ヘキサデカン(左)、混合液(右)

b-1 に示すように溶液分離が完全となった。ヘキサデカン：ヘプタデカン（8:2）の混合液は、混合液の融点が低くなりすぎ、取り扱いが難しいため、以後の実験では、9:1の混合液を用いた。

次に、このアルカン隔壁容器内で実際にセルロース合成反応が進むことを確認した。下層液に Δ Cys-CDP (20 μ g/ml) と 10 mM セロビオース混合液を用い、アルカンを重層したのち、4℃で固化させて隔壁を形成させた。その後、上層液として同量の α -GIP (400 mM) を重層し、2 日間 4℃でインキュベートしたのち、20℃に移して反応を開始させた。加温すると、1 時間でアルカン層が最上部に移動し、5 日後には



図①b-3 酵素反応
隔壁有(左)無(右)

セルロースの合成による白濁を目視で確認できた。隔壁の有無で、目視によるセルロースの白濁には大きな違いがみられなかったことから、このアルカン隔壁容器の実用性が確認できた。(図 ①b-3)。

[R4酵素実験容器の改良]

打合せを進める中で、東京大学グループから、可塑性が低い硬い容器の開発を希望された。まず、容器の側面内側に、4 mm x 56 mm のテックバリア片を張り付け、強度を上げることを目指した。しかし、容器内面の疎水性に変化が生じ、温度上昇に伴うアルカン隔壁の融解と移動がスムーズにいかないことが分かった。

そこで、この容器の中に硬い骨組みを入れることを試み、3D プリンター (Raise E2、日本 3D プリンター株式会社) を用いて、各種骨組みを作成し、図 ①b-4 にあるような改良容器を提案したところ、おおむね好評であった。来年度には、アルカン隔壁との相性などを検討していく。



図 ①b-4 改良容器

(3) 令和 4 年度の宇宙実験のための反応溶液条件の検討

東大グループからの情報を引き継ぎ、上記のアルカン隔壁容器で宇宙実験を実施するために、 Δ Cys-CDP によるセルロース合成の反応溶液条件とセルロース合成反応の速度について検討を進めた。

[実験方法]

アルカン隔壁容器の、下層液に Δ Cys-CDP とセロビオース混合液を用い、上層液に α -G1P を用いることを想定し、宇宙実験の容器内で上層液下層液の組成を変えてセルロース合成反応を進行させた。この時の反応速度を、セルロース合成反応によって生産されるリン酸を Malachite Green Phosphate Assay Kits (BioAssay Systems) を使って定量することで解析した。マラカイトグリーン、モリブデン酸、リン酸三ナトリウムによる発色は、プレートリーダー (Multiskan SkyHigh、サーモフィッシャー) で OD_{620} を測定した。既知濃度のリン酸溶液 (リン酸ナトリウム) の発色から作成した検量線を用いて、セルロース合成に使われた α -G1P の反応容量を計算した。

[実験結果]

まず、過去に宇宙実験でセルロース合成に成功した溶液条件に合わせて検討した。 Δ Cys-CDP (0.1 μ g/ml) と 200 mM α -G1P の混合液に、グリコシル受容体であるセ

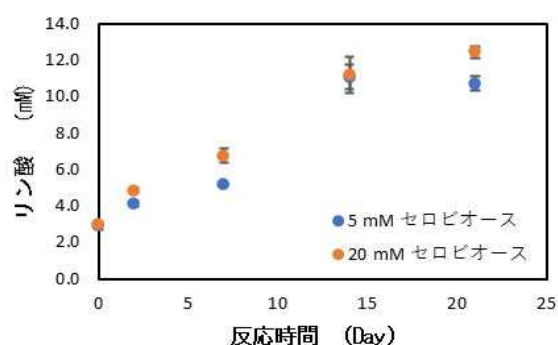
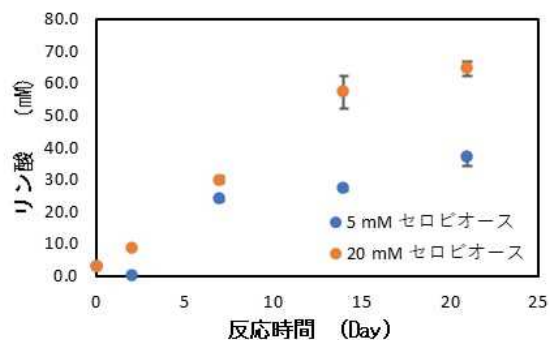


図 ①b-5 セルロース合成反応の追跡 (1)
 Δ Cys-CDP (0.1 μ g/ml)、200 mM α -G1P



図①b-6 セルロース合成反応の追跡 (2)
 Δ Cys-CDP (1.0 μ g/ml)、200 mM α -G1P

ロビオースを5 mM (A) または20 mM (B) 加えて反応を開始させ、反応開始2、7、14、21日後のリン酸の産生量を定量することで、セルロース生産を確認した。反応開始時の反応混合物の発色は、 2.9 ± 0.36 mM (A)、 3.0 ± 0.09 mM (B) 相当であった。21日後でも、セルロースの出現による白濁は目視で確認できず、今回の実験系では、以前の実験より本酵素標品の比活性が低いことが確認された (図 ①b-5)。

そこで、酵素量を増やす ($1.0 \mu\text{g/ml}$) と、リン酸産生量の増加がみられた (図 ①b-6)。この条件では、3週間後に、添加した α -G1P の約1/3の量が重合したと考えられる。東大グループが開発した Δ Cys-CDP が、セルロース合成反応に特化した反応性を持ち、逆反応が極端に抑制されている特性を持ち (2021年セルロース学会発表)、セルロース生産に適した優れた変異体であることが示された。酵素量をさらに増やす ($10 \mu\text{g/ml}$) と、重合反応はさらに早まり、7日後には反応はほぼ停止していた。打ち上げの都合により、酵素反応開始から微小重力空間に達するまでの時間が3日より伸びる可能性もあるため、酵素濃度は数 $\mu\text{g/ml}$ 程度が適切であると結論した。

来年度は、実際に宇宙実験に供するロットの酵素で、宇宙実験と全く同じ容器にアルカン隔壁法を用いて、改めて条件検討を実施する必要がある。

(4) Δ Cys-CDPによるセルロース合成反応の複雑さの解析

このセルロース合成反応は、グリコシル供与体である α -G1P から、リン酸基を乖離させるとともに、グリコシル受容体であるセロビオースに、糖を1分子ずつ付加する反応である。10分子弱の重合により、セルロースは不溶性となり析出沈殿をするために、合成反応は停止する。作り出されたセルロース分子は、分子間相互作用によって板状に会合し、それがさらに相互作用してネットワークを形成し、白濁して見えると考えられている。(3) の反応溶液条件の検討をする中で、実験条件の設定に注意すべき点を見出した。

[実験方法]	Δ Cys-CDP	1		1		10 ($\mu\text{g/ml}$)	
	α -G1P	200		400		200 (mM)	
(3) 参照	cellobiose	5	20	5	20	5	20 (mM)
[実験結果]	リン酸濃度	37.0	64.8	32.7	62.5	42.0	84.8 (mM)

図 ①b-7は、反応3週間後の実験容器の写真である。酵素濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ でセロビオースが5 mM であると、セルロースによる白濁が顕著に観察される。しかしながら、ここでセロビ



図 ①b-7 合成反応でリン酸は産生されている、ほぼ透明に見える

オースを20 mM とすると、白濁はほとんど消失する。同じ試料の、リン酸の産生量を測定すると、高いリン酸の生産量が測定される。このとき、酵素濃度を10倍にすると、セルロースによる白濁が見えてくる。このことから、酵素量に対してグリコシル受容体が過多であると、短く可溶性のセルロースが生産されてくることが示された。酵素反応の条件は、事前によく確認する必要を再確認した。

（５）来年度以降の実験のための、微小重力下における二段階実験デバイスの設計

本年度は基本設計とその実用性の確認を実施した。

〔実験方法〕

本予算で実施できる、Kiraraでの宇宙実験は、外寸幅13 mm、高さ82 mm、奥行き4.14 mmの容器内で実施しなければならない。そこで、アルカン隔壁容器の底にアガロースを入れ、その中に二段階反応に必要な酵素類を含ませる。酵素類がアガロース層から拡散するのに時間がかかるために、二段階目の反応は遅れて始まることを期待する。

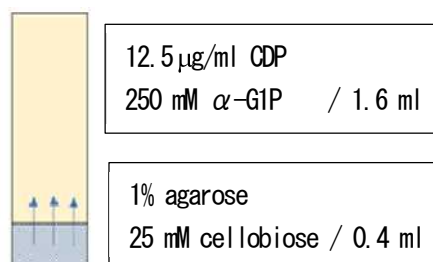


図 ①b-8 2段階反応容器の検討

今年度のモデル実験では図 ①b-8に示すように、1%アガロースにセロビオースを添加し、溶液相に Δ Cys-CDPと α -G1Pを添加した条件でセルロースの酵素合成を実施して、アガロースによる反応遅延効果を検証した。

〔実験結果〕

反応開始後、1、7、14、28日で反応液を回収し、①b(3)の方法で溶液中のリン酸を定量した。その結果、アガロース層を用いた反応容器の1、7、14日までのリン酸の産生量は、用いないコントロール容器の半分程度に低下しており、28日ではコントロールとほぼ等量のリン酸が定量された。したがって、反応容器に1%アガロース層を充填し、この中に二段階目の反応に必要な酵素類を含ませれば、分子量の大きい酵素分子は反応液中にゆっくり拡散し、二段階反応が可能になると判断した。来年度は、東大グループより提供される二段階反応の酵素系を用いて、アガロース濃度や容量について、詳細な設計と実証を実施する。

（６）開発した実験容器がセルロース合成に及ぼす効果の 京大グループによる確認

〔実験方法〕

宇宙実験用容器の中で、終濃度 10 μ g/ml Δ Cys-CDP, 200 mM α -G1P, 5 mM セロビオースを反応させる。上記(3)～(5)と同様に、アガロースにセロビオースを含

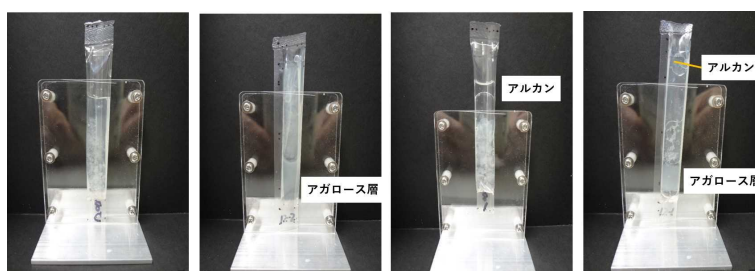


図 ①b-9 標準容器 アガロース添加 アルカン隔壁 R5 年度容器

ませた。R5年度型容器は、アガロース層とアルカン隔壁の両者を組み込んだものとした。20～30日間の合成反応で反応を完全に終了させた後に、試料を京大グループに送付した。

〔実験結果〕 ③ 参照。京大グループからは、 Δ Cys-CDP によるセルロース合成反応に対してアガロースが影響を及ぼす可能性が指摘された。令和4年度には、アガロース層の改良についてさらに検討を進める。

②微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

本プログラムでは微小重力空間（国際宇宙ステーション（ISS））におけるバクテリアセルロース（BC）の合成と、その構造解析を行うことを目標としている。今年度はまず、宇宙実験温度（20℃）で生育し、セルロースを合成可能なセルロース合成菌（酢酸菌）を選抜することを目的とした。

（1）セルロース収量の測定

[実験方法]

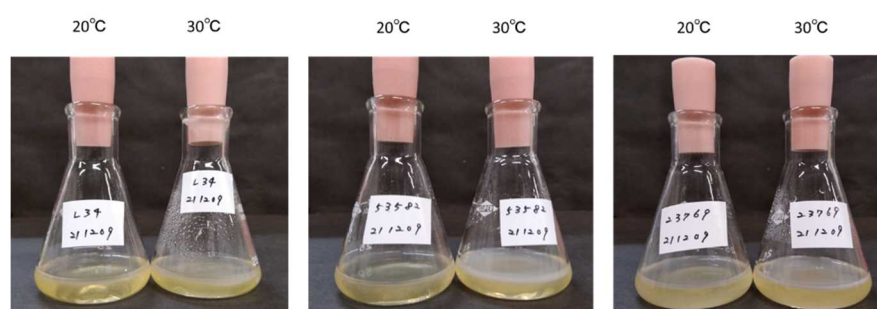
酢酸菌（L34（NEDO-01）、ATCC23769、ATCC53582）のフリーズストックを HS プレートに直接播種し、30℃で3日間培養することによってコロニーを形成させた。コロニーを10 ml の HS 液体培地（50 ml 三角フラスコ）に爪楊枝を使って植菌し、30℃で3日間培養した。生成したセルロース膜を爪楊枝で搾り、得られた菌液を1 ml ずつ HS 液体培地に植菌した（各株5本ずつ）。その後、各酢酸菌を20℃と30℃で1か月培養を行い、生成したセルロースの分析を以下の方法で行った。

セルロースを培養温度と菌種ごとに三角フラスコにまとめて回収し、それぞれ R0 水で表面を洗浄した後、1% NaOH を300 ml ずつ加え、121℃、15分間でオートクレーブ処理を行った。冷却後、R0 水に置換し、121℃、15分間オートクレーブ処理を行った。この操作をさらに2回行い、最終的に中性になるまで R0 水での洗浄を行った。各菌につき4枚ずつのセルロース膜をテフロン板に置き、30℃の恒温槽中で乾燥した。乾燥後、デシケーター中減圧下で2 hr 乾燥させ、それぞれの重量を測定した。

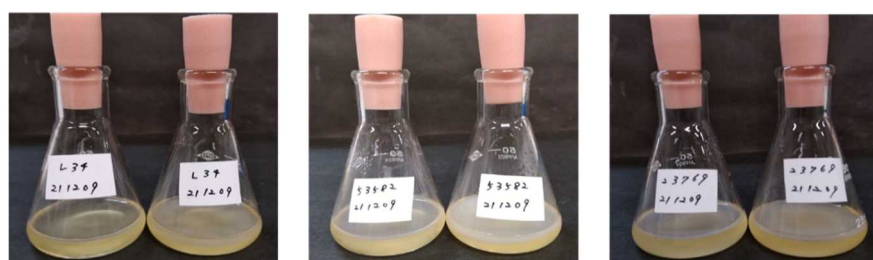
[実験結果]

① セルロース収量の変化

4日後



7日後

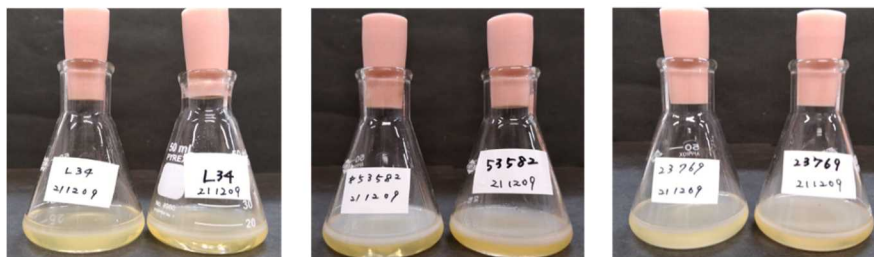


L34(NEDO-01)

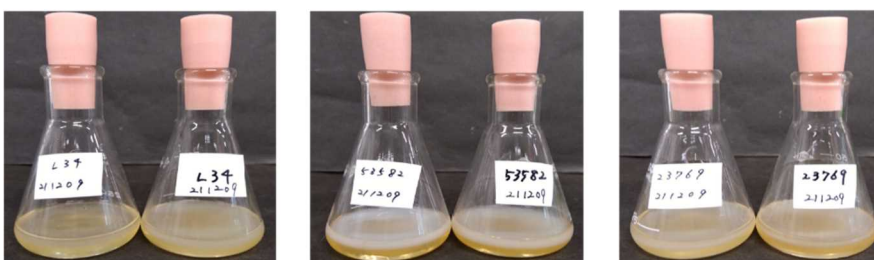
ATCC53582

ATCC23769

15日後



29日後



L34(NEDO-01)

ATCC53582

ATCC23769

図 ②a-1 各菌株におけるセルロース生産の様子（培養温度：20℃、30℃）

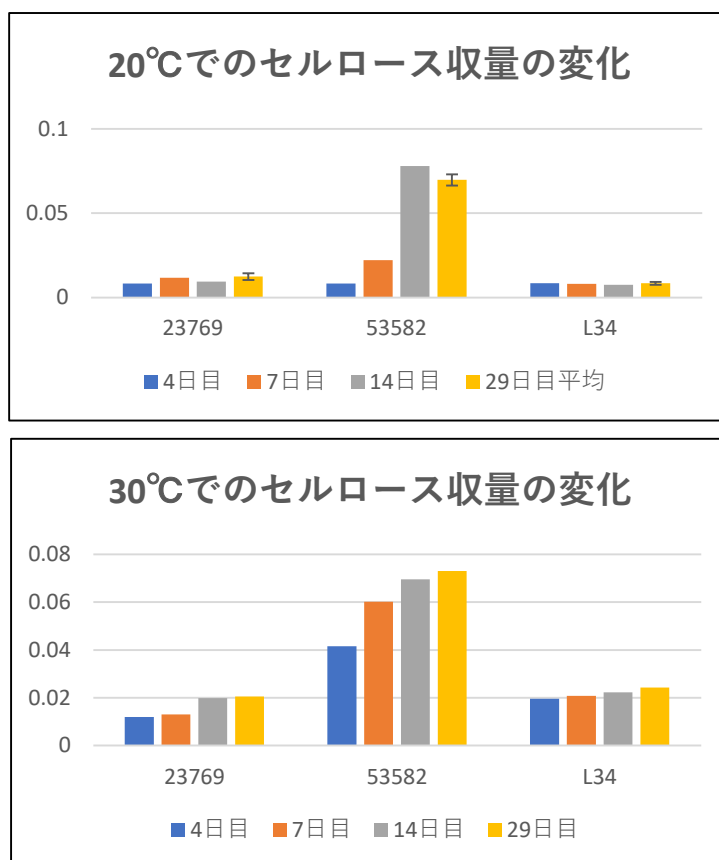


図 ②a-2 各菌株におけるセルロース収量の変化（培養温度：20℃、30℃）

各菌株、培養温度におけるセルロース生産の様子（図 ②a-1）とセルロース収量（図 ②a-2）は以上の通りであった。ATCC53582 株において、29 日後の収量は 20℃と 30℃でほぼ同じであった。また、20℃において培養初期の収量は少なく、培養中期以降で急激に上昇する傾向が見られた。微小重力空間だけでセルロースを合成させるため、ロケット発射前におけるセルロース合成が起こらないようにする必要がある。低温において生産速度をかなり抑えられることが確認されており、菌体と培地の混合のタイミングおよび初期の菌体量をコントロールすることにより、地上におけるセルロース生産はコントロール可能であると考えられる。

（２）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による培養液の分析

〔実験方法〕

生成したセルロース膜を除去した各菌の培養液 500 μ l ずつを限外ろ過フィルター付き（分画分子量 3k）エッペンに入れ、14,000 $\times$ g で 3~5 min 遠心した。遠心後、限外ろ過膜を通過した培養液を HPLC で分析した。HS 培地（未使用）についても同様な解析を行い、グルコース濃度の変化を確認した。

〔実験結果〕

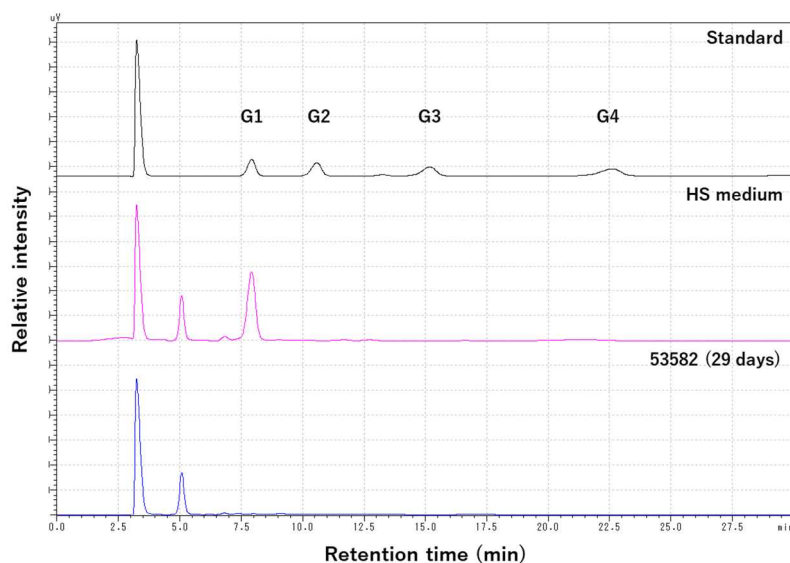


図 ②a-3 HPLCによる培養液の分析（スタンダード、HS 培地（未使用）、培養液）

培養 29 日後において培地中にグルコースが残存していないことが確認された。セルロース合成は完結しており、培養 14 日後と 29 日後においてセルロース収量はほとんど変化していないことも考慮すると地上に戻ってからのセルロース生産は行われないと考えられる。

（３）SEMによるセルロース繊維の観察

〔実験方法〕

（１）のセルロースのうち、各菌につき 1 枚ずつを凍結乾燥し、金蒸着後に、加速電圧 5 kV で SEM 観察した。IMAGE-J を用いて繊維幅の計測を行った。

[実験結果]

23769 20°C

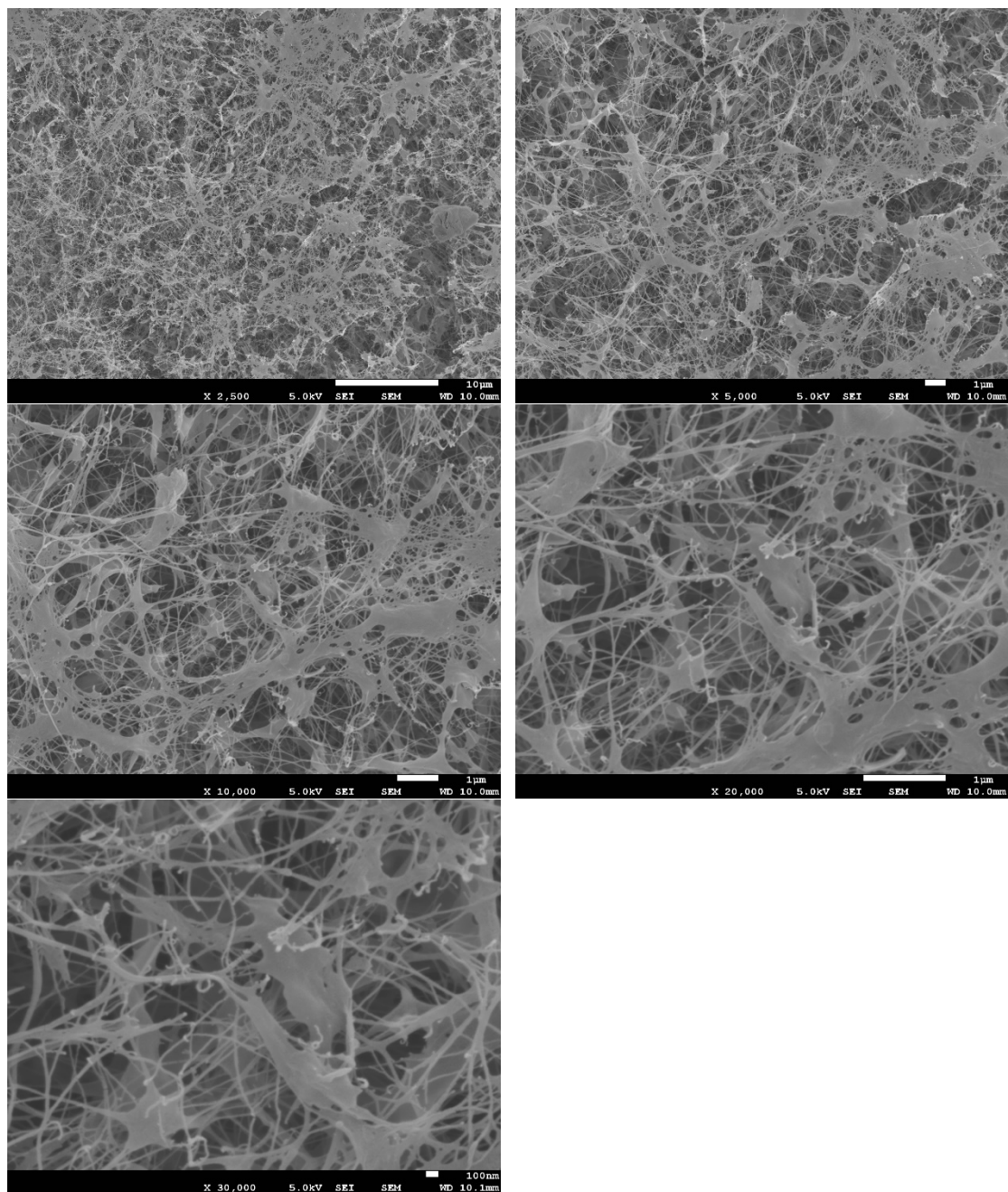


図 ②a-4 ATCC23769 20°C セルロース繊維のSEM観察像

23769 30°C

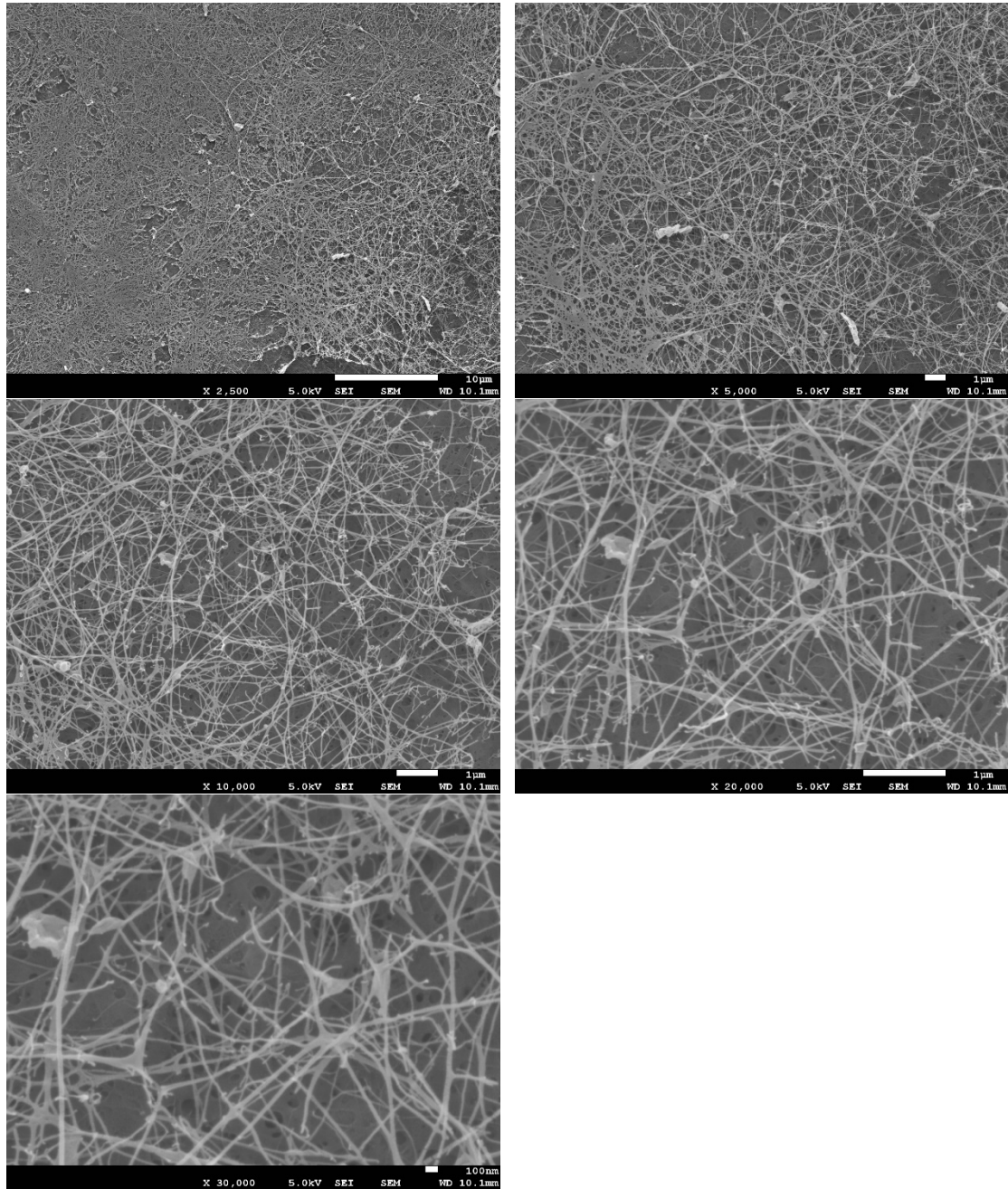


図 ②a-5 ATCC23769 30°C セルロース繊維のSEM 観察像

53582 20°C

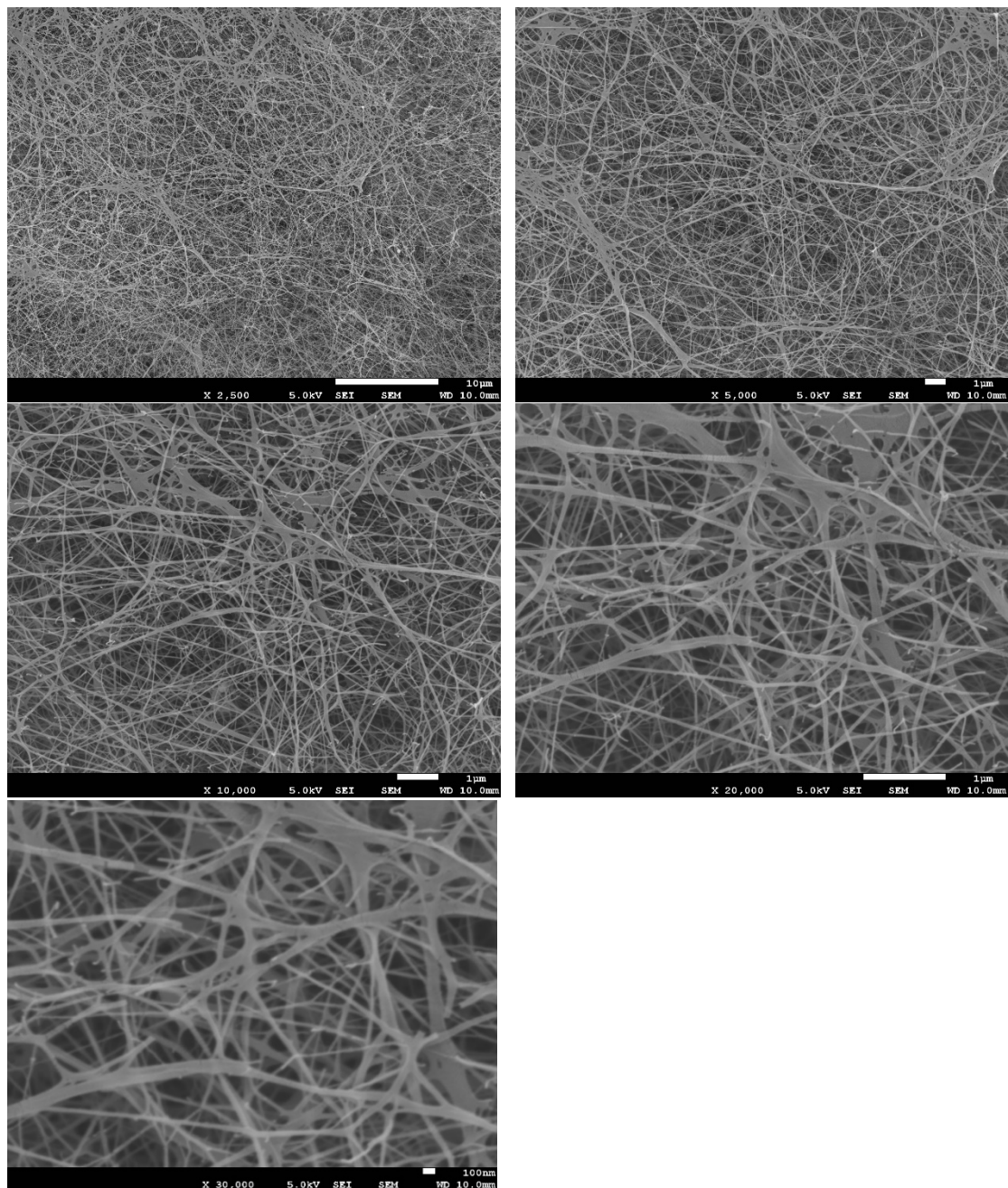


図 ②a-6 ATCC53582 20°Cセルロース繊維のSEM観察像

53582 30°C

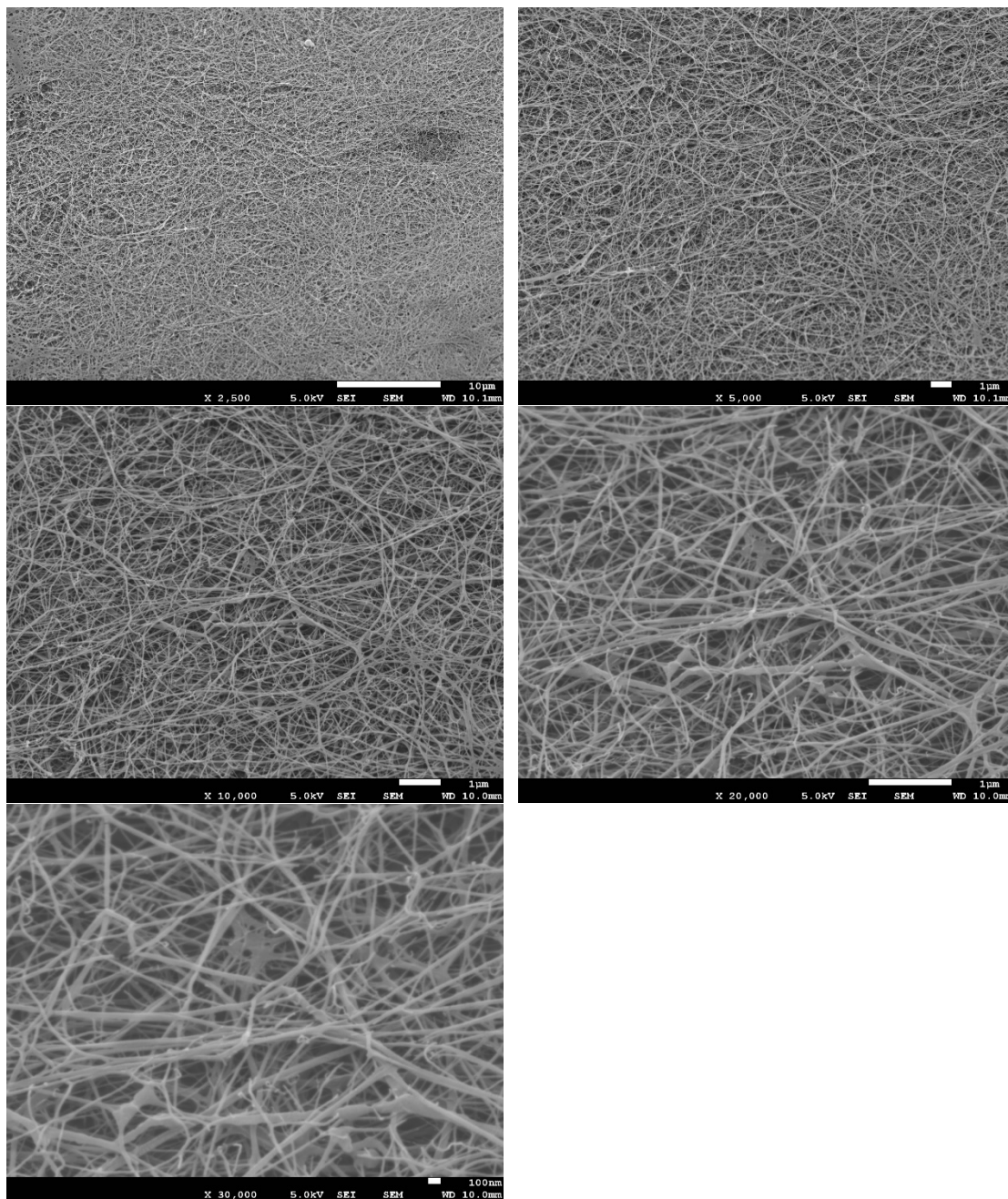


図 ②a-7 ATCC53582 30°Cセルロース繊維の SEM 観察像

L34 20°C

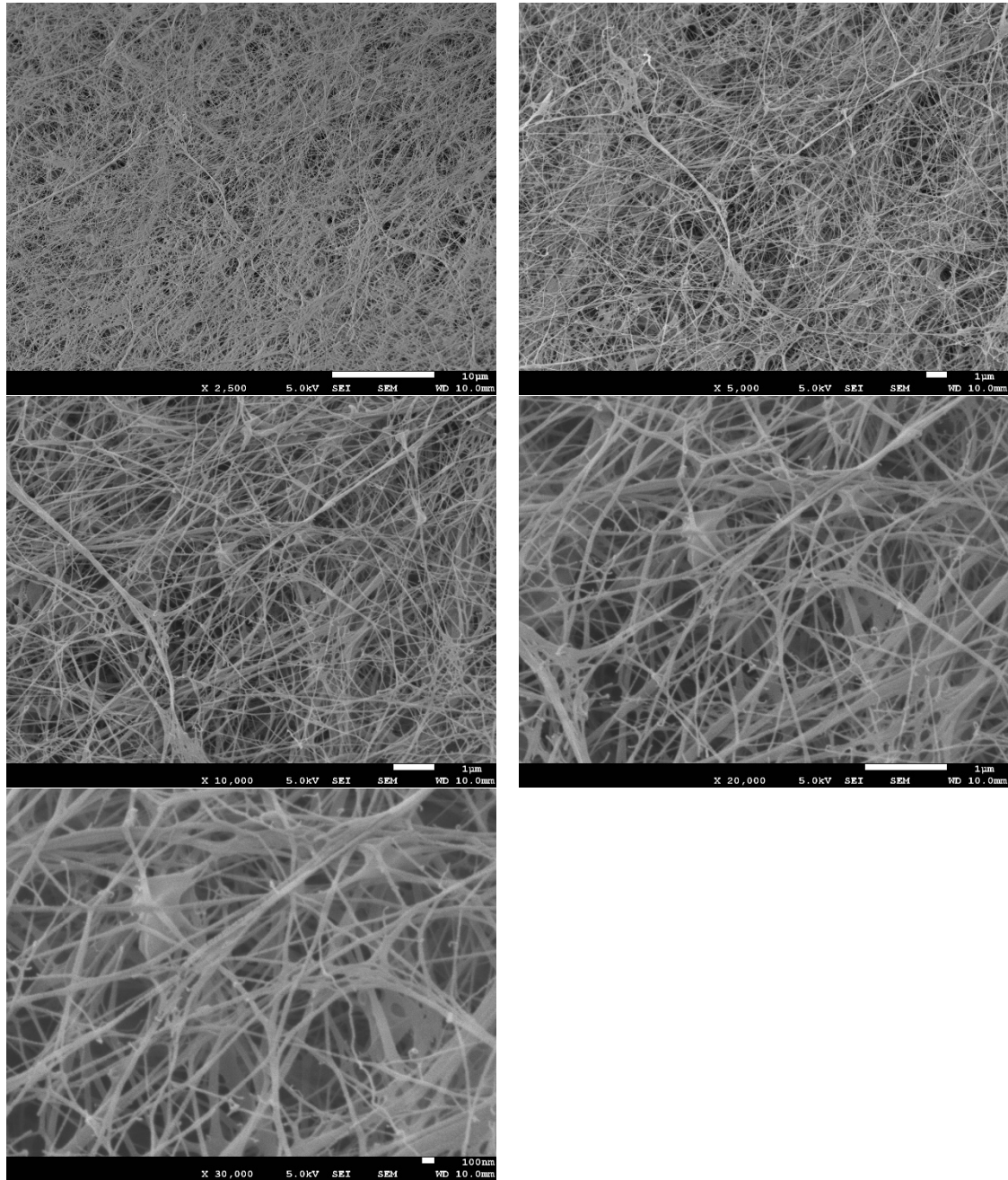


図 ②a-8 L34 20°C セルロース繊維のSEM観察像

L34 30°C

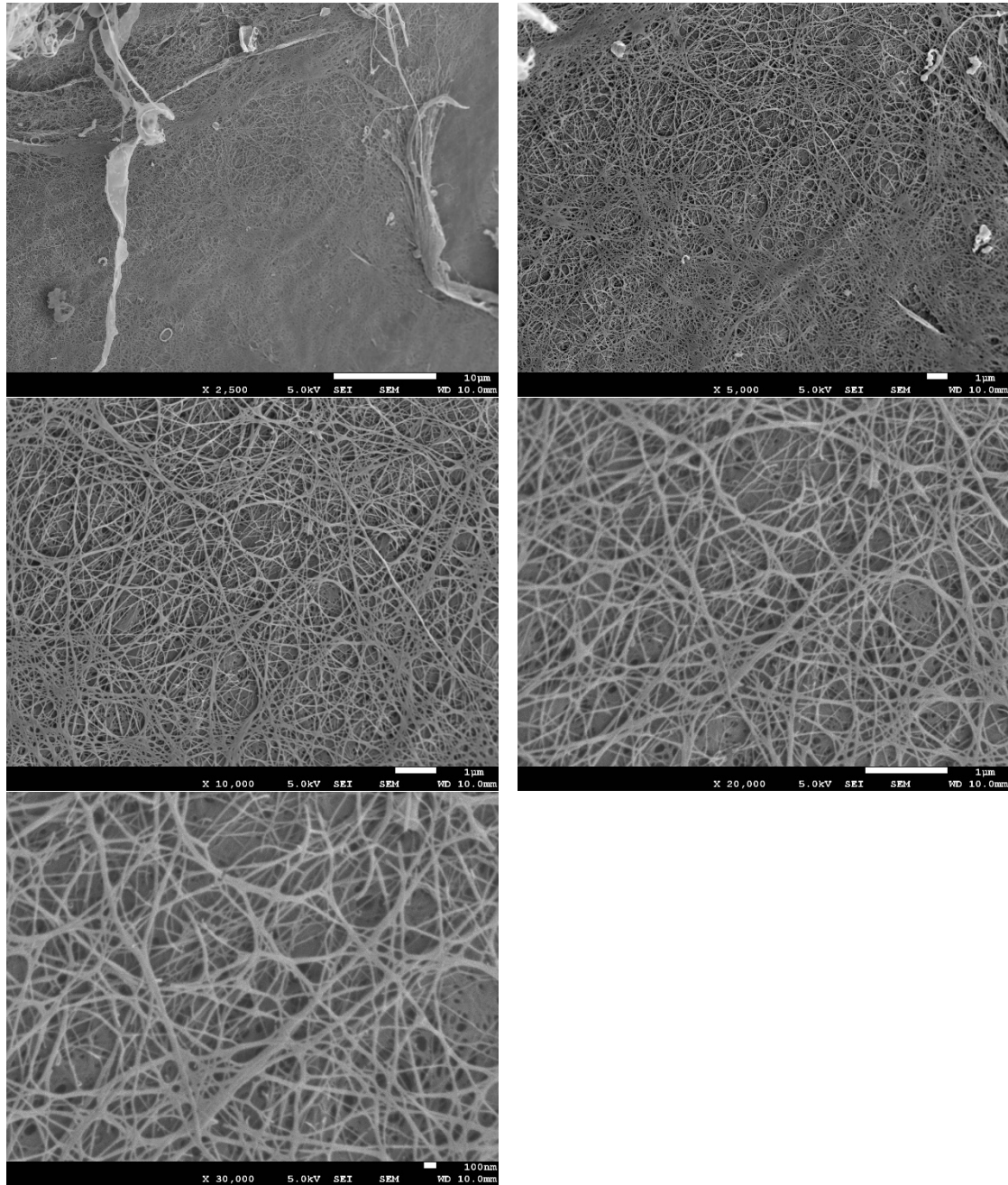


図 ②a-9 L34 30°C セルロース繊維のSEM観察像

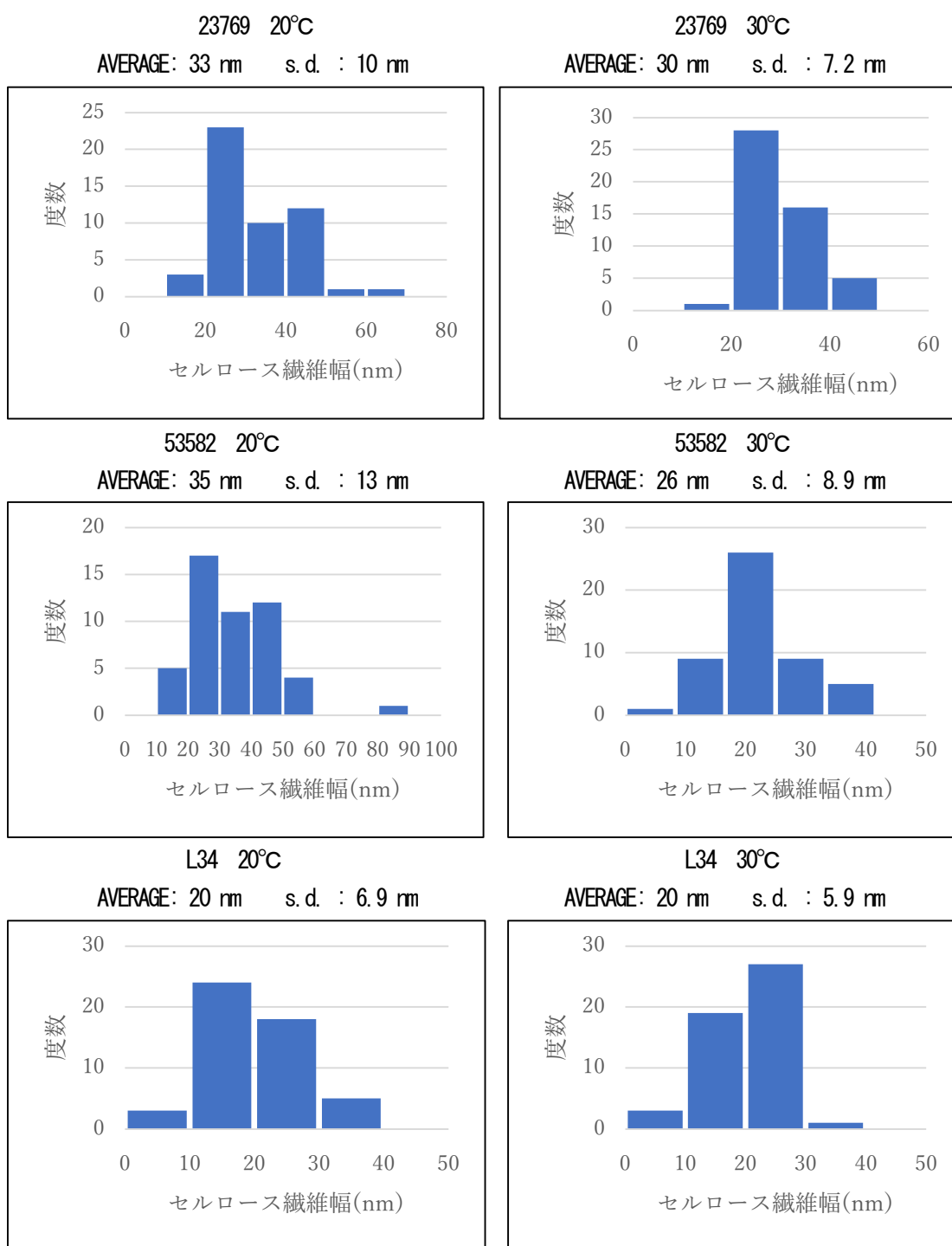


図 ②a-10 IMAGE Jによるセルロース繊維幅の解析

各菌株において、温度による繊維形体および繊維幅の顕著な変化は見られなかった。