

Accounts of Materials & Surface Research

Encouragement of Industrial Biology -Biomaterials and Biofuel-

Kengo Sakaguchi

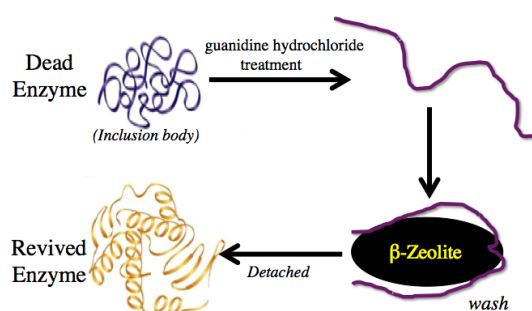
Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology
Tokyo University of Science
Noda-shi, Chiba-ken 278-8510, Japan
Kengo@rs.node.tus.ac.jp

Industrial biology is “biology not limited to the study of life phenomenon”. That is a field that comprehensively integrates biology into engineering such as industrial chemistry, material engineering, and electrical engineering.

Bioengineering is a term often used to express such, however present recognition of the term leads to images of the study of fields that form the basis of existing Bio-based industries (Pharmaceuticals, Cosmetics, Food, Agriculture, Forestry, and Fishery). This is a narrow understanding of Industrial biology.

From a stand point that is different from existing usages of biology, I would like to promote “Industrial biology” that incorporates biology into engineering.

Examples I would like to bring up are bio-materials and bio-fuel that are already in development. The core elements of such are carbon-based polymer material and proteins (base material and catalyst). Forms of both and problems will be introduced. Further, technology that resolves the 5 major issues (Inclusion body, Mass-production of recombinants, Low cost purification of the protein, Chemical plant using enzymes, Enzyme optimization in the plant) with respect to mass production of proteins will be introduced.



Keyword: Industrial biology, Biomaterial, Biofuel, Reholding of inclusion body, Bubble Chromatography, Encapsulation of enzyme, Enzymolysis device

Kengo Sakaguchi received his Ph.D from Hokkaido University in 1972. He then studied in USA and Canada until 1990. He was a professor of Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science since 1990, and then retired in 2012. Then he was a professor of Research Institute of Science & Technology, Tokyo University of Science until March of 2016. He is currently a professor of Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, again. He has long studied about cancer chemotherapy radiosensitizer, SQAG, and industrial biotechnology by using mainly silicate compounds. He recently concentrates his ability to develop glucose fuel battery and mass production method of glucose.



工業生物学の奨め —生物素材・生物燃料—

坂口謙吾

東京理科大学理工学部応用生物科学科

1. 工業生物学の時代。

「工業生物学」とは、ひとことで言うと「生命現象にこだわらない生物学」、工業化学、材料工学、電気電子工学をはじめとする工学領域に生物学を統合的に導入するための領域である。

バイオエンジニアリングと言う用語が過去に汎用されてきたが、この場合、既存のバイオ系産業(医薬品・化粧品・食品飼料・農林水産業)の基礎となる学問を連想しがちであり、狭い観点で理解されている傾向にある。

この稿では、既存のバイオ利用とは異なる観点から、生物学を工学に導入する「工業生物学」領域を提案したい。

既存のバイオ系産業技術とはかけ離れた観点から生物学を工学に導入する方向である。

例えば、液晶の研究と言え、バイオエンジニアリングとは完全に無縁の印象である。

しかし、例えば、液晶の中に DNA を溶かし込むと濃度依存的に高周波数側へ誘電緩和が起きたり DNA の塩基組成の違いで電気伝導度に差があったり、更には誘電異方性 ($\Delta \epsilon$) が大きいほど駆動電圧 (V_{th}) は小さくなったり、液晶分子の双極子モーメントに変化が起きたりする場合もある(参考文献1)。

西暦 2050 年には化石燃料はおろか、それを原料とする化学工業も成立しなくなるという予測が国際的に化学工業界の中からさえ現れつつある。

この予測は、環境汚染・気候異変に対応するためばかりでなく人口増加と生活水準の向上による石炭石油天然ガスなどの量的不足・価格上昇の予測が精密に計算された結果である。したがって、化石燃料の量的不足・価格上昇は、コークスを必須とする鉄の生産にも

大きな影響が及ぶ。

つまり、2050 年より“はるか以前”に、鉄・化石燃料から他の素材や燃料に転換する必要がある。

その科学・工学の基礎の多くは、地球時間の“同時循環型”を基礎とする生物系の「素材」や「燃料(エネルギー)」生産に依存するしかない。いわゆる工学への生物学の導入である。

生物素材・生物エネルギー。

鉄に代わる生物素材と聞いた瞬間に、多くの工学系専門家達にとっては「スカイツリーを木で作る」を連想し「木材で鉄道のレールを作るのか?」と思うイメージがつかまとう。

生物系燃料(エネルギー源)は「乾燥した木材・枯れ葉(そして一部だが、他に動物の糞)」であり、素材も燃料も、産業革命以前の姿そのままでは、新「素材」や新「エネルギー源」として議論するに値しないと思われがちである。

工学と生物学、2つの学問の間に横たわる「化学的純粋」と「生物学的純粋」の概念の混同から来ている。

第1の誤解の例は、生物素材の主成分は本来非常に強靱な材質であるが、それは木材ではない。

木材は軟材であろうと硬材であろうと生物学上の品質(銘柄)は純粋だが、化学成分が純粋な訳ではない。例えば、(木材の主化学成分)セルロースを精製して結晶に近い形で並べると、鉄の何倍もの強度(硬度)になる。しかし、そのままだと堅過ぎて、成長が不可能になるため、他の素材(軟化剤)を用い軟らかくしている。

炭素を組み立てた最強の結晶構造は、ダイヤモンドである。

第2の誤解の例は、例え化学的には純粋な生体成分であろうと、常識はずれのサイズの違いから来る誤解がある。

例えば、遺伝子として話題になる DNA であり、これも長い紐構造になっている。

しかも壊れてはいけないから非常に丈夫な構造になっている。

二重鎖 DNA は、その幅8~10nm 程度である。

そして人間の場合は、1ヶの細胞核に入っているその DNA の長さは約2m 程度である。したがって、10nm=0.000,000,000,001m の太さの紐が2m ということは、直径1mm の紐にすると、200,000,000m=200,000km の長さと同じになる。

直径1mm の太さの DNA の紐を作ると、切断面には約 75 億本の二重鎖 DNA が詰まっていることになる。分子レベルで紙縊りのごとく編み上がるように、キチッと並行に揃っておれば、長さ数 m 程度の紐でも、容易な事では切断出来なくなる。

コストの関係で DNA を大量生産して何かの工業素材にしようというのは時期尚早ではあるが、これは生体成分が極端な構造になっており、常識はずれのサイズの違い誤解を与えがちな例として上げた。

生物素材は、普通の工学的常識の世界とは全く異なるサイズで成立している。

生物系エネルギーの場合も同様である。

工業用の電気エネルギー生産はファラデーの電磁誘導の法則に従い、コイルを巻いた巨大なタービン発電機を回転させるという極めて原始的な方法を用いている。そのため何が何でも強力なパワーで回転させることが発電の代名詞に近い。

一方、生物にとっても電気は極めて重要で、発電は生物機能の一つである。

だがその発電法は、主として単糖(グルコースなど)の酸化反応に依存している。

中心は ATP と呼ばれる高エネルギー結合の化合物を介して行っている。

現時点では ATP 反応を工業的に利用する段階ではないが、単糖の酸化という現象自体は他の方法を用いると工場でも再現が可能である。

もちろん効率は ATP 反応とは比較にならない程低いですが、理論上、有機化合物の酸化反応は無機化合物の酸化反応より高率の電気生産が可能である。

例えば、酵素触媒などを用いるグルコースの酸化による発電がそれである。

[グルコース→グルコノラクトン+2H⁺+2e⁻]-
-電気→[1/2O₂+2H⁺+2e⁻→H₂O]という化学反応系になり、生じた電気が水になる前に電気を生ずる。

このような容易に工業化出来る簡単な化学反応によって電気の生産が可能である。

工学的なコスト問題、あるいは商業上の問題を新たな観点で考えることも「工業生物学」の世界になる。グルコースは、石炭石油天然ガスよりはるかに高価であり、酸化触媒は更に高価である(つまり発電コストが合わない)。

しかし、グルコース発電に伴って生ずるグルコノラクトンは産業廃棄物ではなく、グルコースよりずっと高価な工業資材である(今のところ高価過ぎて用途が限られているが、もし供給量が充分なら新しい工学素材となり得る)。

つまり、発電の結果生ずるものは産業廃棄物ではなく工業資材である。このような発想の転換が「工業生物学」の原点である。

2. 工業原料選別の観点の生化学

「素材」

鉄・金属に代わる同程度の特性(強度・応力・塑性・耐久性・耐熱性)あるいはそれ以上の特性を持つ「生物素材」とは如何なるものか? 生産コスト面で条件を満たし得るのか? 産業の必要量を満たすだけの量が生産可能か?

「エネルギー源」

化石燃料は1~3億年の「時間」をかけて蓄

積した生物素材であり、かつ圧縮変化し非常に濃縮された成分になっている。

一方、現存の生物の成分は混じり物ばかりで、燃料素材は濃縮されていない。

エネルギー効率で化石燃料に対応出来る「燃料」があり得るのか？もしあったとしても、それは産業が要求するだけの量を低価格で供給出来るのか？

「生物素材」の基本は、天然物としての「高分子化合物」である。

これらの高分子は、石油系合成樹脂と同じように、生体有機化合物の基本単位（例えば、アミノ酸や単糖類など）があり、その単一の基本単位を数珠繋ぎに繰り返すことに寄って高分子化している。

その基本単位の化学構造を改変した成分による人工高分子、あるいは高分子化した構造を化学修飾した成分もこの中に含める。

このような天然「高分子化合物」は主に以下の3つに分類される。

「核酸」「タンパク質」「多糖類」。さらに、高分子ではないが、共役するという意味で「脂肪」が加わる。過去の例として、このうち既に工業素材として汎用されたものは、「多糖類」と「タンパク質」である。

「多糖類」→綿、麻、木材、茅、畳など。

「タンパク質」→絹（生糸）、羊毛。

基本的に“繊維”と“建築土木素材”であり、現代工学の要求する「工業素材」の基本と同じである。

21世紀初頭の今は、この3つのうち「核酸」が工業素材の原型足り得るかどうかは、未だ議論するのが難しい。構造は、繰り返しの基本単位がデオキシリボヌクレオチド(DNA)またはリボヌクレオチド(RNA)がホスホジエステル結合で繋がったヒモ状高分子である。上述のごとく丈夫で細く長い紐だし、特殊な繊維の代わりになってもよいが、まだ使われた例はない。

現段階では、工業素材の原点だった「多糖類」と「タンパク質」が中心になる。

多糖類。

多糖類は、基本的に炭素繊維の観点で考える必要がある。

同じ炭素繊維でも「生体炭素繊維」(BioCarbon Fiber)ということになる。「生体炭素繊維」の多くは基本単位「単糖」の繋がった高分子である。生体内の炭素化合物は水溶性を保つため、ほぼ全ての分子がOH基を持っている。「単糖」は、炭素原子の数で4個(4単糖、C4糖)、5個(5単糖、C5糖)、6個(6単糖、C6糖)に分類され、炭素原子3個の場合はグリセルアルデヒドであり普通はC3糖とは呼ばない。C7(例えば、ヘプチトール)やC8(例えば、オクチトール)は、糖アルコールで天然では高分子化の基礎単位にはならない(食品甘味料である)。なお、炭素2ヶ以下は糖類には含めない。

炭素繊維型の高分子はC3を基本とする成分を用いることも可能である。その一つが乳酸($C_3H_6O_3$)を繋いだポリエステル高分子のポリ乳酸であり既に工業的に汎用されている。同じようなポリエステルでは今ペットボトルの代替品として話題の、C6糖から作られるPEF(ポリエチレンフランジカルボネート)がある。

しかし、強度・応力・伸縮性・耐久性・耐熱性などを考慮した「生体炭素繊維」となると、天然成分の場合はエステル結合ではなくグリコシド結合が普遍的である。プラスチック(ポリエチレン樹脂)の場合はエチレン(C_2H_4)を基礎とするポリエステル結合だが、上記特性を考慮した人工炭素繊維の構造と全く異なるのと似ている(エステル結合では強度不足)。

「単糖」の中で、C4糖は天然における存在量は非常に少ない。つまり、多糖類の原点になっている単位はC5糖とC6糖である。C6糖は、代表的なものがグルコース、マンノース、ガラクトースなどであり、C5糖はリボース(デオキシリボース)、アラビノース、キシロースなどである。これ以外にも多数のC6糖C5糖が存在するが、いずれも「稀少糖」という単語で呼ばれ、天然には非常に僅かしかない。C4糖は、全てこの「稀少糖」に分類される。したがっ

て、植物由来の木材や多糖類系の繊維の基本構造は、C6糖(グルコース、マンノースまたはガラクトース)とC5糖(リボース、デオキシリボース、アラビノースまたはキシロース)で形成されているものがほとんど全部である。その中でもグルコースの高分子が最大量を示す。

グルコースが高分子状に繋がって伸びたものがセルロースまたはデンプンである。この2種は、繋がり方によって桁外れに異なる強度の成分に変わる事を示している(セルロースは β グリコシド結合、デンプンは α グリコシド結合)。

他にキシロースが繋がったキシランを主成分とするヘミセルロース、あるいは主としてマンノースで出来たマンナンを主成分とするヘミセルロースなどがあるが、糖の高分子は正確な構造が分かっていないものが多い。つまり、他の糖類がどのように繋がるとどうなるのか、天然に存在するものでさえほぼ未知な段階である。強度的には「セルロースナノファイバー」のような生体炭素繊維が示すごとく、グルコースの高分子であるセルロースでさえ、鉄に勝る。糖類の中でもっとも生産量が多く、もっとも研究が進んでいるグルコースを基準とする高分子でさえ開発の初期段階にあり、他は基礎研究が未発達でほぼ未知である。

生体内成分の特徴は、ただ1種の成分で成立している場合より、各種の成分の混合によって相互作用を利用する形が多い。

特に「生体炭素繊維」は、その傾向が強い。

現在用いられている石油由来の「人工炭素繊維」は90%以上が炭素である。

一方、「生体炭素繊維」は単糖のグリコシド結合を基本にしている。そのため、繊維の化学構造中はアルコール基(OH)を多数含み、立体構造が出来上がっているため、ある意味でスカスカである(軽量という特性の元)。しかし、強度的には「人工炭素繊維」に比しても遜色ない。また、耐熱性や耐久性においても同様である(もっとも生分解性機能を持っておれ

ば、環境によっては、耐久性はない)。加工性伸縮性を得るためには、今後、木材の中で共存している成分の分析と作用を詳しく調べる必要がある(そのメカは不明だが、生体内では加工性に富んでいる)。

タンパク質。

もう一つの構造体「タンパク質」は如何か?

アミノ酸がペプチド結合で直鎖状に繋がった繊維である。

ヒトのアミノ酸は標準的なものが約20種類あり、タンパク質はその20種が混合して連なった「ポリペプチド」である。

ポリペプチドを見ると、さほど強靱には見えないが、非常に柔軟で弱いポリペプチドから鉄より強靱なポリペプチドまである。

ポリペプチドを構造素材として用いているのは、主として動物である。

おそらく、運動性を獲得するために構造体としての「多糖類」を進化の中で失ったのだろう(失うことによって運動性を獲得した)。

「タンパク質」による構造維持は、多くはカルシウム(Ca)との共同作用によって維持する傾向が強い(骨など)。そしてよく話題になる節足動物(昆虫など)の外套骨格は、キチン質(ムコ多糖類)とタンパク質の共同作用で形成されている。ムコ多糖類は、バクテリアの細胞壁の主成分でもある。

我々の周囲で見られる「爪」や「髪の毛」「羊毛(ウール)」などは、タンパク質のみで完全に構造維持物質として働いている。いずれも「ケラチンタンパク質」のみで出来ている(ただし、これは物質名の総称、生物分類図に従って各種あり同じではない。人の毛と犬の毛のケラチンではアミノ酸配列が異なる)。あるいは、他に「フィブロインタンパク質」で出来た「蚕の繭(生糸)」や「蜘蛛の糸」などがある。ただし、「フィブロインタンパク質」も物質名の総称、化学構造は同じく生物分類図に従って各種あり、同じではない(カイコとクモは同じタンパク質を作らない)。

タンパク質側の素材は、生糸や羊毛などを除き、歴史的にはほとんどが使用されて来なかったが、その最大の理由は、

- * 精製することが困難(混じり物)
- * 混じり物では強度不足になり易く、生産に際しては品質が常にばらつく(品質管理不可)
- * 動物は植物に比して数的に桁外れに少ないため、大量に同じものを集めることが出来ない(大量生産不可)、ためである。

“混合物・品質管理不可・大量生産不可”問題を解決しない限り、タンパク質素材の産業化は困難である。

この問題を解決する基礎生物学研究が近年進んだ。つまり、全てのタンパク質は遺伝子支配の元で作られており、その遺伝子を操作し、生産が容易な生き物(微生物)に移し、生産させることが可能になった。

蜘蛛の糸タンパク質の生産は、この問題を新方法でクリアしつつある(クモからフィブロインタンパク質の遺伝子を取り出し、微生物に移し創らせる)。

基本的にタンパク質の種類は遺伝子数に一致する。生物種は平均的に見ると、1種類が2万個程度の遺伝子を持っている。例えば、人は3万個弱、ショウジョウバエは1万5千個、ユリは5万個の遺伝子がある。さらに、生物分類学上 150 万種以上の生物種がいる。つまり、平均的に考えても、 $2万 \times 150万 = 約 300 億種類$ の異なるタンパク質があることになる。

このうち、工業素材足り得る特性を持つものはどのくらいか？

今のところ全く不明である。

近年話題になったものでは、これまた昆虫だが、トンボの脇の羽根の付け根にあるゴムタンパク質がある。確かに飛行中のトンボの羽根の上下運動は尋常な速度ではない。これはそのゴムタンパク質によって支えられている。“プロレジン”という名のゴムタンパク質は1遺伝子で生産が可能である。トンボというだけで疑

いの目で見られがちなので、少し説明しておこう。発表によれば、このタンパク質の伸縮性は通常の合成ゴムの2倍以上、非常に劣化しにくい特性がある。もちろん“プロレジン”はタンパク質だから酸アルカリや熱には弱い。既存のゴムの代替えというよりも新領域の開発用になるだろう。このようなものは、ちょっと生物を見渡せばいくらでもある。

これは1例である。

要するに、バイオ系で出てくる素材の用途をあらかじめ生物学の情報から十分に吟味した後、大量生産出来る軌道に乗せる。遺伝子産物を1個1個、“プロレジン”のように全く生命現象を無視した工業利用の観点で、これらを見たとき可能性は無限になる。

但し、この生産量と価格は、過去に話題になってきた農芸化学的な水準ではなく、工業化学のレベルでなければならない。その場合は、タンパク質1種類1種類それぞれを遺伝子導入によって数万トンレベルの生産が必要となる。

そのためには、遺伝子工学の新しい段階が必要であり、鉄や非鉄金属に代わる素材、生体の酸化還元電位反応の利用出来る方向になって行くはずである。

現代の化学は産業革命以来、天然素材から合成素材に転換してきたが、これは次の段階になる。この原点は素材の性能だけではなく、その大量生産能も極めて重要である。

これらが素材の展望である。

では一方、エネルギー生産はどうなるか？

グルコースを酸化すれば電気が得られる。

工業生物学の展開の中で、ここに新たにグルコース燃料発電を加えることが出来る。

しかし現時点では2つの致命的欠点がある。

1つは、グルコースが、他の発電機動力源(石油石炭天然ガス・ウラン・太陽光・風力・地熱・潮力)に比べると、値段が高いため産業化しにくい燃料素材ということである。

もう一つは、グルコースの原料がデンプンであり、デンプンが食品飼料マーケットの主要製

品である、そのため工業的に用いると飢餓を誘発しかねない(場合によっては工業使用量の方が多くなる)。

ここで発想の転換が必要である。

グルコース燃料発電は、廃棄物としてグルコノラクトン(又はグルコン酸)が得られる。現時点では、これ以外の発電による廃棄物はすべて再利用が不可能であるが、グルコン酸(グルコノラクトン)はグルコースの市販価格よりも高い。これを回収して工業的に用いる事が出来れば、燃料価格問題は解消する。

もう一つの方は、グルコースの生産原料をデンプンに求めず、他(例えばセルロース)に求める。欠点ばかりでなく、グルコース燃料発電が可能になれば、既存の概念から外れた利点もある。その発電機の巨大化を可能にすれば、現場の必要サイズに合わせて作れるので、巨大なる送電線網は不要になる。この発電は冷反応で高温高圧が不要なので、安全システムは非常に安価になる。

まず最初の工業生物学の研究方向は、低廉なセルロース分解法の開発に尽きるだろう。

グルコース燃料発電の普遍化と既存の発電法の代替のための技術開発と、セルロース工業分解法の開発は、エネルギー生産の基本になる。

「もう一つの原料、工業触媒」

この第2章のタイトルから多少ズレるが、タンパク質の場合は、工業用素材として直接用いるだけでなく、今までの工業化学ではあり得なかった新用途もある。それは触媒機能を持つ成分(酵素)を大量生産し、工業用の複雑な化学成分のための化学合成に用いる事である。この生体触媒反応を工業化すれば、通常の化学反応では合成不可能な複雑な有機化合物の生産が可能になる。

酵素反応は全て常温の冷反応のため、高熱高圧が不要な工場になる。酵素触媒法の工業化が可能になれば、理論的には、地球上に存在するほとんど全ての有機化合物が合成可能になる。「多糖類」も、遠い未来かもしれない

が、長期的には酵素合成法によって生産出来る時もある。このような発想はほとんど無限に可能になるが、生物学的な素材の発想の自由度に依存する。

卓近な問題として上記の「グルコースをセルロースから供給する」がある。その分解はセルラーゼ(セルロース分解酵素)で行う。セルラーゼには多数の種類が存在し、セルロースの化学構造に依存して順番に分解する。その過程は大きく分けて3つある。まず、エンドグルカナーゼ(更なるカテゴリーが数種類ある)という酵素が、セルロースの紐をあちこちズタズタに切り裂く。次に、その切り裂かれた破片をセロビオヒドラーゼ(これもまた更なるカテゴリーが数種類ある)で、グルコースが2~3個繋がったオリゴ糖に分解される。最後に β グルコシダーゼ(更なるカテゴリーが数種類ある)が、そのオリゴ糖を1個1個のグルコースにする。

天然には多種のセルロースがあり、それぞれの化学構造が少しずつ異なっている。これらの酵素群はそれぞれの構造に対応して存在している。これらセルラーゼ群は、その混合比によって分解能を変更させることにより、それぞれのセルロース素材に適応している。従って、上記酵素群のそれぞれの遺伝子を単離し、遺伝子工学的に大量生産できる。さらに、その混合比を選ぶことによって、高率のセルロース分解が可能になるので、グルコース素材の産業型大量生産の基礎になる。この酵素群を生産する話を中心に「もう一つの原料、工業触媒」の話は進めよう。

3. 生物素材・生物燃料の低廉大量生産技術

生物素材や生物燃料を大量生産する際の実際の基本技術の解説に入ろう。

21世紀初頭段階の工業生物学では、生物素材は「多糖類」と「タンパク質」、生物燃料は「グルコースなどの単糖類」を基本としている。さらに「酵素」(=「タンパク質」の一種)などは、工業用化学反応の触媒としての機能が期待されている。この3つの生産技術を議論する。

「多糖類」工業素材の大量生産。

現在汎用されている人工炭素繊維の原料は基本的にエチレン(C₂H₄)なので、特に石油である必要はない。エチレンはコストを無視すればアルコール発酵から生産が可能である。同様に石油プラスチック類の代わりとなるバイオプラスチックの研究も盛んである。これらはエステル結合(カルボン酸とアルコールの縮合)に基づいた繊維状の高分子なので、繰り返す基本単位の生体有機物がカルボン酸とアルコールを持っておれば創れる。しかし、種々開発されているが生産コスト、特に原料コストが制限事項になっている。その観点で既に汎用されているバイオプラスチックに、ポリ乳酸とポリエチレンフランジカルボネート(PEF)がある。ポリ乳酸の場合は、2013年度の国際生産量は80万トンを超え、乳酸の品質と値段以外はほぼ問題点は解決している。

PEFの生産は、基本的にFDCA(フランジカルボネート)の生産に依存している。

このFDCAはグルコースまたはフルクトースから生産される。ペットボトルとして有名な石油プラスチックPET(ポリエチレンテレフタレート)と良く似た性質があり、その代用として期待されている。これらは化学合成品だが、さらに天然素材として木材粉末から高圧洗浄処理を施すことにより取り出したセルロース素材などが話題になっている。いわゆるセルロースナノファイバーである。PEFやセルロースナノファイバーなどの生産は既存の工業化学的方法で可能で難問はほぼ無いので、既に工業生産に入っている。ポリ乳酸は単純な大量生産から更に次の段階に入っている。その原料であるL-乳酸の生産が発酵に依存しているため、乳酸の品質問題と生産コスト低廉化である。乳酸の連続発酵法の開発が急務である(新方法の開発に成功したので後述する)。

これらは既に汎用化されている多糖系の生物素材であるが、今後はエステル結合ばかりでなく新たな高分子合成法がドンドン開発されて行くだろう(例えば、グリコシド結合)。

このような多糖類素材や炭素繊維は、緊急

に解決しておかねばならない問題がある。

炭素系高分子素材の問題は新種を創り出すこともさることながら、セルロースナノファイバーに代表されるように、硬質の生物素材(炭素素材)が極めて加工性に富まないことである。硬質の炭素系高分子素材は、加工出来る品質への改善が先行する。つまり、工業用「柔軟剤」の開発である。今のところ柔軟性のある状態の加工に耐え得る応用法しかなく、限定されたものに留まっている。

人工炭素繊維の類型合成は、既存の化学合成法の発展となり特に生物系の新たなる実験法が必要な訳ではない。

一方、多糖類素材(単糖の高分子化)は、生体内合成法(例えば、酵素法など)を参考に今後の開発の余地が大きい。化学合成法は、既に存在する(あるいはこれから出て来る素材も含めた)多糖類素材を化学修飾するには汎用されると思われるが、直接、単糖類を化学的に高分子化することは、現時点ではかなり困難である。

グリコシド結合の化学合成法の発展が望まれる。

「タンパク質」工業素材の大量生産。

生物学応用で、もっとも期待されてきたのは膨大な選択肢を持つ「タンパク質」素材の大量生産である。この場合は、遺伝子工学技術を用いる生物系合成法が中心になる。

遺伝子工学技術で目的のタンパク質の遺伝子が微生物に導入、その微生物を既存の発酵技術で大量生産すれば、そのタンパク質の無限生産が可能となり、全てが解決する筈であった。いわゆる「レコンビナントタンパク質」である。バイオテクノロジーとして非常にもて囃され期待された根幹であった。今後も同様であろう。しかし、実際にはレコンビナントタンパク質の工業生産は以下の難点のため相対的に進まなかった。

特に以下の5つはほぼ致命的な条件になっている。

難問1 遺伝子工学で作ったレコンビナント

タンパク質が変性沈殿

難問2 工業スケールの大量生産法なし

難問3 タンパク質を低コストで精製出来ず

難問4 酵素を化学プラントに出来ず

難問5 多数の反応酵素の最適化が出来ず

この展望がない限り、全般的に工業的な生物素材や生物燃料には未来がない。

生物素材も生物燃料も基本はグルコースなどの単糖の大量生産に依存する傾向が強く、工業単糖(主としてグルコース)の生産はセルロースなどの酵素分解に依存する。

つまり酵素触媒の大量供給が一番望まれている。

そこで以下、難問1~5までの問題の解決法を中心に述べてい。

これらを突破しなければ、「タンパク質」素材は工業原料や素材にはなり得ないので、挑戦してみた。

4. レコンビナントタンパク質の低廉大量生産技術

「難問1」「リフォールディング装置」の開発

特に難問1は最難関で、遺伝子を大腸菌に導入すると、レコンビナントタンパク質が、その立体構造を元通り再現出来ず不可逆的に沈殿してしまう場合が多い。

宿主として酵母を用いるとリスクはかなり減るが、酵母は真核生物の為、生産性が大きく下がる(工業的には極めて低生産性で、遺伝子工学全体が信用を失う元になっている)。この沈殿物はインクルージョンボディ(Inclusion body、封入体)と呼ばれる。

この変成沈殿したタンパク質を元の状態に戻せないか?この反応をリフォールディング(Refolding)と呼ぶ。そして、封入体の定量的なリフォールディングが非常に困難、工業用の遺伝子工学などは実現不可能という雰囲気が醸し出した。

「工業生物学」の原点に戻ろう。

タンパク質は火山灰や粘土、岩石などと親和性のあるものが多い(参考文献2)。

このような樹脂に吸着した生体高分子は水のない乾燥条件下でも X 線や NMR 測定が可能

になる。

ケイ酸塩化合物は、化学合成が確立いろいろな化合物がラセン構造に至るまで自在に作り出せる(参考文献2)。その材質は超高压、極高温、極低温、極端な pH などの物理条件にも耐えられる。このような目的に合う可能性の高いケイ酸塩化合物を検討し、ゼオライト系とメソポーラスシリカ系化合物を選んだ。その探索の中で、ケイ酸塩化合物の中にリフォールディング能をもつ有力な成分を見出した(参考文献3)。

探索は、

*まず封入体を塩酸グアニジンで、ペプチドを綴じかけた状態から引き延ばす。

*その引き延ばしたペプチドが吸着する固形物(この場合は火山灰や粘土を含むケイ酸塩化合物)を探索。

*もし、吸着する固形物が見つければ、そこから剥がす方法を探す。

*剥がした成分が水溶性を取り戻していたら、活性を測定する。

その結果見出されたのが工業化学分野の原料としては普遍的なゼオライトである。そのリフォールディング能には強弱があり、 β -ゼオライトが効果的であった(参考文献4)。さらに、酵素は、これらの化合物に疎水結合(ファンデルワールス力)で吸着するという事を見いだした(参考文献3)。酵素は正確に等電点で吸着し、吸着量は非常に大きいことを見出した(参考文献3)。調べたものの中で非常に効率的に良かったものは一部のゼオライトのみで、その中でも特に β -ゼオライトが非常

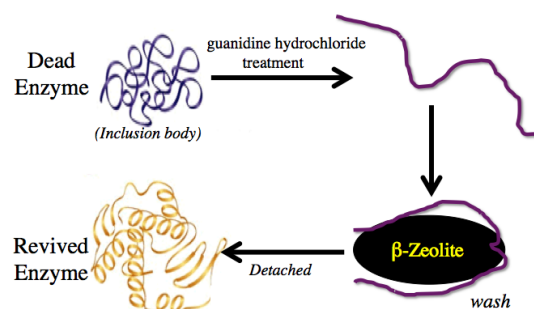


Figure 1. Refolding of Inclusion body by β -zeolite

に良かった(参考文献3)。

Figure1から明らかな様に、封入体をむりやり塩酸グアニジンで可溶化しβ-ゼオライト樹脂に吸着させ脱着させるだけで立体構造が元に戻る。

このリフォールディング法は封入体に限らず、普通の酵素などを高温で変性させた変成タンパク質にも適用できる。さらに回収率や定量性を上げるために吸着脱着の条件は改良の余地があるが、産業的な封入体の可溶化リフォールディングには、極めて有望である。さらに、この技術は理論的には300億種類の遺伝子全てに適用出来る。したがって、量産問題さえ解決すれば、身体の中で使用されている酵素や素材は工夫によって全て産業素材として転用が可能だろう。

「難問2」 工業スケール「酵素の生産」

生産されたレコンビナントタンパク質は、菌体内に蓄積し外部に放出されない。したがって通常の発酵生産とは異なり、その生産量は菌体数に依存する。

コストの低廉化のためには、ひたすら培地の限界まで菌数を増やす「培養生産の連続化」法が必要になる(発酵は不要。以下「発酵」という単語は用いない)。

理論的には非常に小さな容器を Figure 2のごとく、連続的に何十何百と並べて培養しながら連続した分取が可能な装置を創り出せば良い。

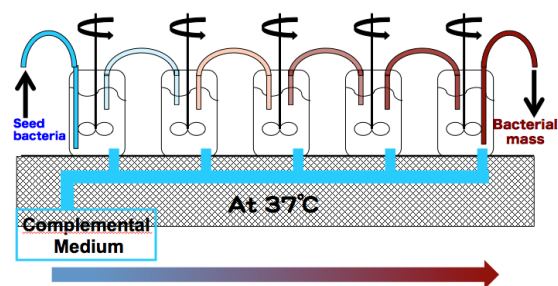


Figure 2. Continuous Mass Culture of Recombinant Bacteria

この方法は、既にかかなり汎用されており、リフォールディングが不要な封入体そのものを製

品として用いる分野では既に商品化が始まっている。例として、話題の「蜘蛛の糸タンパク質」がある。しかし、「生きた」評品(酵素類)の場合はリフォールディング過程が必須なので、その次の素材となる。このような「生きた」酵素触媒には、工学的に用いる為には精製された高純度のタンパク質であることが望ましい。

「難問3」 レコンビナントタンパク質の低コスト精製「バブルクロマト装置」

素精製タンパク質粉末の更なる大幅な精製を行う必要がある。既存のクロマト法ではコスト的に不可能である。そこで、タンパク質それぞれの界面活性度を利用した分離精製法を考案した。名付けてバブルクロマト法である(参考文献5)。この方法は原理的には大昔からある(石炭の浮遊選鉱法)。「バブルクロマト装置」はその濃縮と精製を行う方法として開発した(Figure 3)。

これはタンパク質の等電点を利用して泡でタンパク質を分離する方法である。

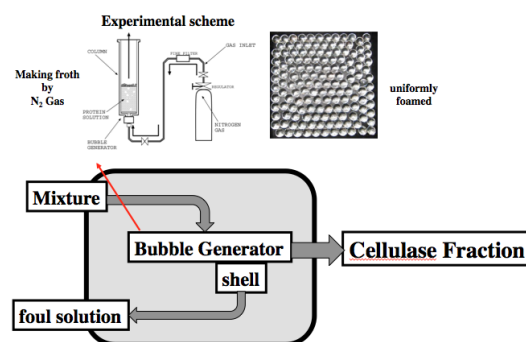


Figure 3. Bubble Chromatography of Protein

水に溶かしたタンパク質は下から窒素ガスで送り込むと、溶液の pH を目的のタンパク質の等電点にしておくだけで、そのタンパク質のみが泡の表面に吸着して、上澄みに集合した。さらに、タンパク質が全部泡に移ってしまうと、たちまち泡は出なくなる。100%近い回収率で、タンパク質は泡に移行し回収される。その移行は溶液の pH がタンパク質の等電点と同じモノに限られる。異なるタンパク質同士でも等電点が異なれば簡単に分離する。この装置も「リフォールディング装置」も非常に大容量の

ものを取り扱うことが可能であるし、生産も大規模化が可能である。

「難問4」 酵素の化学プラント「酵素を固層化・集積化した触媒装置」

この場合は、触媒反応を行う生きた酵素を用いる行程を大規模化する条件の設定になる。実験室の中では、酵素を用い「A」→「B」の化学反応を触媒させる時、単純に試験中の液の中に「A」成分と酵素を混ぜて適温で放置、時間とともに液を取り出し、その液の中から「B」成分を分け取る。酵素反応は、酵素の耐久力が極めて重要である。そして「B」を分け取る過程とは、液中から酵素タンパク質や残存「A」成分から分取精製をしなければならない。ともに工場型の数十数百トンレベルになった時、許容出来る過程ではない。そのままでは天文学的なコストを要する。

工業化ステップの問題点の改善法。

その難点を解決する方法が、この項で述べる酵素の固層化・集積化法である。

ケイ酸塩化合物の適用により成功した(参考文献6)。

一般に化学工場で触媒を用いる場合は、触媒は固体で、触媒タンクの内部に装着されており(固層化されている)、そこを気体か液体の物質が通過する際に化学反応が起きるようになっていく。

現時点では、酵素と生成素材の分別もこのような方法を開発し、コストを桁外れに下げないと実用にならない。

酵素も工業触媒と同じく、固層化されかつ集積化される必要がある。

その試みが、この「固層化・集積化した触媒装置」である。

酵素生産のプラント化(固層化・集積化)

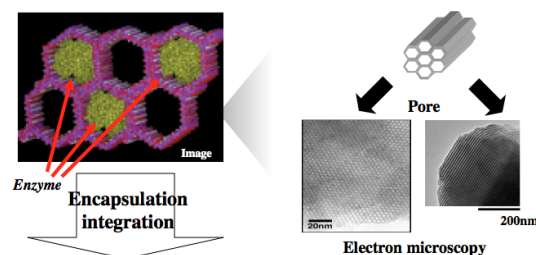
新しい方法による酵素標品の固層化に成功した(参考文献6)。

これは酵素が通常では失活する高温条件下でも活性を維持させることができ、極端な固層化と集積化が可能以上に、劣化を防ぎ何度

でも再利用が可能であることを意味する。工場用バイリアクター素材として魅力的であり、メソポーラスシリカが良いことを発見した。このケイ酸塩化合物は電子顕微鏡で見ると蜂の巣状の網のような構造である。そこで、酵素がちょうどピッタリ入るものを作った。この成分では適合出来ない大型サイズの酵素も多い。そのためこの成功は単に一例であり、更に大きなサイズのケイ酸塩化合物の合成や探索は今後のテーマでもある。

ここではメソポーラスシリカで語ろう。

その機能を確認するために、タンパク質としては非常に不安定な赤血球タンパク質(ヘモグロビン)をメソポーラスシリカにはめ込み調べてみた(Figure 4)。



Stable Enzyme Powder

Figure 4. Encapsulation of Enzyme into Layered Silicate

ヘモグロビンは4つのグロビンが一つになって機能するため熱に非常に弱い(85℃では完全に変性する)。しかし、メソポーラスシリカにはめ込んだヘモグロビンの一酸化炭素結合能は、85℃でも全く変性せず同じ機能を発揮した(Figure 5)。

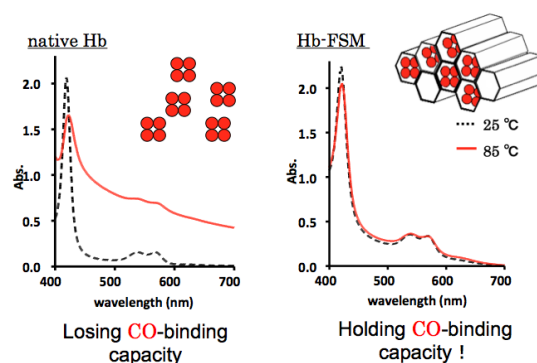


Figure 5. Thermal Resistance of Encapsulated Haemoglobin

各種の酵素で試してみたが、比較的簡単に沢山の穴に酵素を1個1個生きたまま埋め込むことができる。更に、酵素の“耐熱性”を大幅に高め、かつ“耐久性”が増すので、2つの予想外のメリットも生まれた。これは文字通り、工場プラントの金属触媒などと同じ用法で用いることが可能となる (Figure 6)。

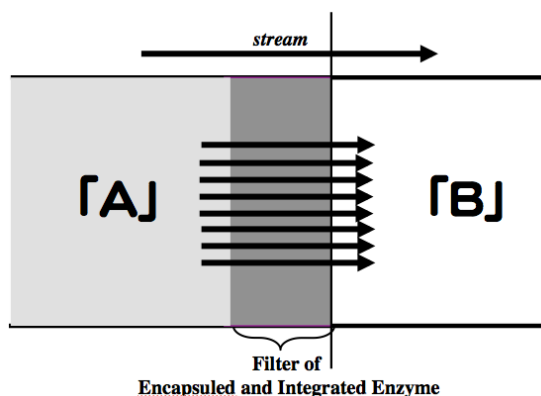


Figure 6. Continuous Enzymolysis device I

「難問5」 多数の反応酵素の最適化システム

Figure 6のような酵素触媒プラントが出来れば、完了だが、このような生化学反応には、もう一つ無機触媒反応路とはまた違った問題がある。それは生体内で行われて合成されている化学物質(複雑な有機化合物)の加工を工場過程にする時である。如何なるものかは、例を挙げて説明した方が分かり易いだろう。

グルコース量産のためのセルロースの酵素分解を考えてみよう。前述した様にセルラーゼは総称であり、1種類の酵素ではない。木材を破壊する場合、前述したように、長いセルロース繊維を切るエンドグルカナナーゼ群、その切られた端からオリゴ糖の状態で切り出すセロビオヒドラーゼ群、そのオリゴ糖をバラバラのグルコースにする β -グルコシダーゼ群がいる。その酵素反応は種類により最適条件が異なり、極めて正確にコントロールされて進行する。これを取り出し人為的に行う場合は、反応系は酵素群の混合比と、出来れば最適条件に合わせた順番の反応が極めて重要である。それに適合した合成プラントを作る必要がある。

このシステムは、Figure 6の固層化集積化プラントを改良することにより簡単に解決することができる。つまり、準備されたそれぞれのセル

ラーゼの集積化層(濾過式にしておけばよい)を順番に並べれば良い (Figure 7)。

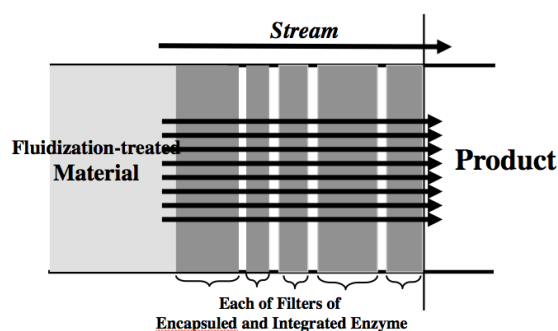


Figure 7. Continuous Enzymolysis device II

まず異なる酵素による反応系の順番は図7のフィルター層の順にする。各層は、各酵素の最適温度至適 pH にアジャスト出来る装置にする。必要とされる金属イオン量も同様である。また、各層の厚さ(幅)は、その酵素の分解反応速度や分解能に依存して変える。

セルロースの場合は、この図の流動化した原料という点が大きな問題になり、化学的方法の導入(例えば、超臨界法など)や、動植物のセルロース可溶化システムがヒントを与えるだろう(植物が生長する際に用いる可溶化成分エクспанシンや、牛の唾液など)。水溶性の基質の場合は、このシステムにより完全に解決出来る。

これは単純な高分子分解反応に過ぎないが、同じシステムで広範に生化学反応に適用出来る。ただ順番に各酵素を遺伝子工学的に大量生産し、暗反応どおりの順番に並べたこのような装置を創れば良いことになる。

酵素触媒の合成化学工場モデル。

バイオ素材として幅広く可能性の高いタンパク質の工業生産に関する2次生産技術をまとめてみよう。

特に触媒の種類は天文学的に高い数である。そのまま鉄の代わりに用いる素材としてのタンパク質も同じプロセスで生産が可能である。

バイオ素材利用で今後もっとも汎用されるのは、酵素触媒による有機化合物の合成化学

工場であろう。

まず、目的の遺伝子を探す。

例があると分かり易いので、ここでもセルラーゼを例に挙げよう。

進化系統樹に従ってそれぞれの酵素の存在分布(の傾向)を調べる(Figure 8)。

セルラーゼの場合、エンドグルカナーゼ(EG)は主に菌類までの生物種に分布している傾向にある。この傾向はセルロースを骨格の基本としている生き物に多いことを示している。セルラーゼに限らず、このような酵素の傾向探しは、生物種の生活環を理解しながら探索する。

一方、 β -グルカナーゼ(BGL)は旧口動物門(昆虫など外套骨格生物種へと進化する系統、Figure 8)には存在せず他のほとんどの生物種に存在する。

逆にヒドラーゼ(CBH)は新口動物門(人などの脊椎動物種へと進化する系統、Figure 8)にはあまりない。工業用遺伝子の探索は、こういう生物学的特性の調査がまず最初に来る。

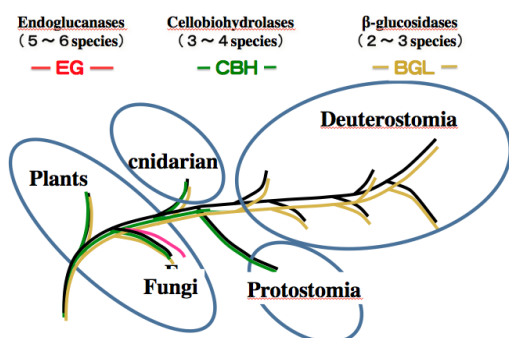


Figure 8. Cellulases in Phylogenetic Tree

この図を見ると、脊椎動物では EG や CBH が不在で植物繊維を消化出来ないのではないかという疑問が湧く。

実際に人は出来ない、でも、草食の哺乳動物(ウシウマ羊など、象やキリンだって同様)は、干し草や雑草を消化している、如何にして？

実は、彼らは腹の中にセルロース分解が可能なバクテリアを飼っている。

この細菌類がセルラーゼを分泌し、宿主の動物と共生している(人の腸の乳酸菌と同じような形である)。只、そのような細菌類は、ほと

んどが絶対嫌気性菌と呼ばれる種に属する。そのため、人工的に酸素のある環境で増やすことが極めて困難で、そのセルラーゼ遺伝子 DNA を取り出すまでには至っていない。

新しいセルラーゼの探索は、生物分類学的に Figure 8 を参照にしながら、その生物種の中で強力な酵素種を持つものを探索することは直ぐに可能である。

多くは必ず目的の機能をその生物種の生活の中で用いている場合が多いので、その生物種や近縁種の生活環を調べ、その酵素を用いる目的と機能を探る。

工業目的に合致する機能があれば次の過程に進む。

この際の重要な点は、大腸菌で作られたレコンビナントタンパク質(セルラーゼ)が変性沈殿したインクルージョンボディになるような培養法をむしろ選択する。なるべく高速で増殖させること第一である。さらに、わざと大量のセルラーゼ封入体を生産させる(封入体セルラーゼ生産)。

その理由は、Figure 9 に示すように安価かつ高速で精製するステップを経るためである。

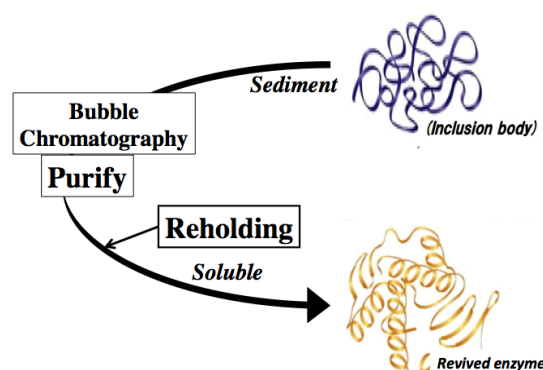


Figure 9. Protein Purification by using Inclusion Body and its Rehoding

大量培養が完了した大腸菌を濾過洗浄して集める。そのまま音波処理あるいは電氣的に破砕する。その破砕された溶液をそのままバブルクロマト装置にかける(Figure 3)。

変性沈殿したレコンビナントセルラーゼはアワの方に先に吸着して浮かび上がるので、ア

ワを集める装置を開発すれば、簡単に精製される。そのアワを直接リフォールディング装置 (Figure 1) にかけて、変性タンパク質を元の生きた酵素に戻す。この酵素液を粉末化する。

非常に高品質の酵素が要求される場合は、結晶化のプロセスを入れる。

少し余談になるが、この方法もケイ酸塩化合物の利用によってタンパク質の結晶化が研究室レベルから工場レベルにまでスケールアップさせた方法も得た (文献7)。

「酵素を自動結晶化する装置」

目的のレコンビナント酵素タンパク質を上記の方法で大量生産したとする。次はこのタンパク質をケイ酸塩化合物に混ぜて放置すると、簡単に結晶化する (Figure 10) (文献7)。もちろん全てのタンパク質が同じように簡単に結晶化する訳ではないので、それぞれのレコンビナントタンパク質ごとに層状ケイ酸塩の種類や吸着結晶化の条件を詳しく検討する必要がある。

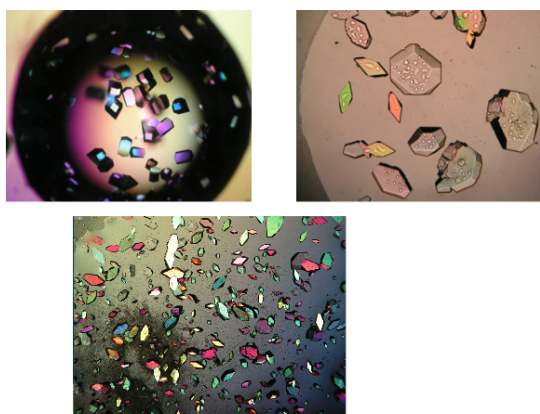


Figure 10. Proteins crystallized on Layered Silicate

次はその酵素触媒を用いた新製品 (生体型の有機化合物) を造る工場になる。セルラーゼの場合はいろいろな種類があるので、今原料として用いる予定のセルロース原料に合わせた酵素の種類、そしてその混合比などを調べる必要がある。また各々の酵素の最適な機

能条件が異なることも多い。その条件が定まり、使用する製品が決まれば、その酵素評品をケイ酸塩化合物に嵌め込み固層化・集積化のプロセスがまず必要である。そのためには新たにその産業を興す必要がある (その会社は「専用の孔の化合物」が商品となる)。そして酵素の固層化・集積化を行い、その酵素入り粉末を得る (Figure 4)。

この固層集積化酵素を生産工場プラントの消耗触媒として用いる (Figure 7)。ここではセルロース分解の例にしたが、他の製品を作るときも同様である。現代の工業化学では合成しにくい複雑な化学構造の製品を作り出すには最適だろう。

以上のごとく、最近に至りレコンビナントタンパク質の低廉大量生産技術に関する難問1~5の初期段階はほぼ解決出来る状態になりつつある。今後は素材や燃料の原点となる「グルコースなどの単糖類」の生産が、食糧生産問題と絡まらずに独立出来る可能性が高い。そして「酵素を触媒とする化学反応」の工業化も進むだろう。なお、ここで述べた技術の全ては、基本的に 21 世紀初頭現在のバイオ系工業技術の段階に過ぎない。今後ドンドン、これらの工業技術は進化し革新されて行くことになる。現時点の技術である事をご理解いただきたい。

補足すると、ケイ酸塩化合物と生物素材との親和性は非常に広範囲に渡り、今後の工業生物学的な融合研究に大いに役立つことが分かった。

その結果もここに加えておく。

生体高分子に限らずバクテリア細胞といえどもケイ酸塩 (ゼオライト) にくっ付くことが分かった (Figure 11) (文献8)。

ゼオライトに種類により親和性が異なり、吸着した細菌類も異なる (親和性の高いものの方がより沢山吸着する) (Figure 11) (文献8)。

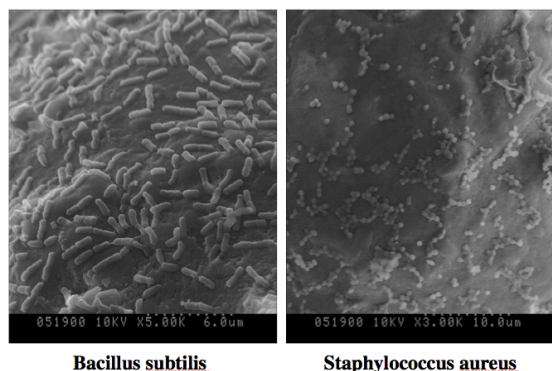


Figure 11. Absorption of Cells on Zeolite

吸着したバクテリアは全く正常に生存し剥がれず(極めて剥がれ難い)、フリーのときと同じように発酵生産出来る。この条件は、ほとんどの細菌類に当て嵌まった。生菌の「固層化」であり、「集積化」も可能になる。ただし菌によって条件は異なり、ゼオライトはたくさんの種類があるので、最適なゼオライト化合物を探索する必要がある。しかも化学合成が可能なケイ酸塩化合物なので、逆に菌の特性に合わせた化合物合成も探索出来る。

例えば、乳酸菌を付ければ、そのまま乳酸発酵が可能である。

菌類と乳酸を分ける必要がないので、乳酸の品質が高くなる。この方式を適用して乳酸菌の固層化・集積化を行えば、Figure 12のごとき新しい連続発酵法が可能になるかもしれない。

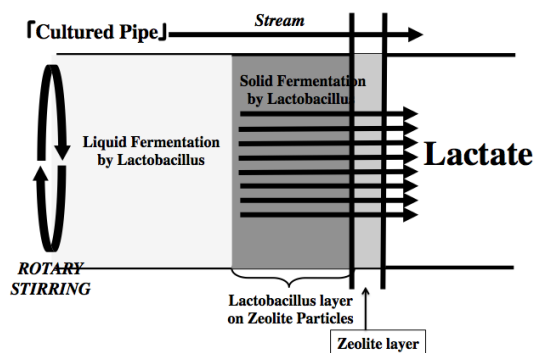


Figure 12. Continuous Fermentation of Lactate

この方法により、ポリ乳酸の生産コストの低廉化と高品質が得られれば、巨大なマーケットが有り得る。

5. おわりに

「工業生物学」とバイオエンジニアリングとの違いを問われるが、工業素材や燃料を生物由来の物質に代えて次世代の工学へと繋ぐことを第1の目的にした分野が必要である、その分野を「工業生物学」と呼ぶことを提案したい。その観点から本総説を書いたが、まだ断片的な知識ばかりで全体に初歩的な段階にあり、化学と生物学の繋がりも悪く尻切れトンボのような形で終わっている部分が多くご容赦いただきたい。生命現象の研究ではなく、工業的な生物素材生物燃料の原点となる科学の今後の発展とその広がりを待ちたい。

6. 謝辞

本総説を執筆するに当たり、東京理科大学総合研究院の阿部正彦教授、東京理科大学理工学部応用生物科学科の菅原二三男教授、および東京理科大学発ベンチャー(株)アクティブの皆様方に多大なご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) K. Iwabata et al, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2010**, 49, 087002-1~087002-5; K. Iwabata et al, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2013**, 52: 097301-1~097301-5; K. Iwabata et al, *Molecules*, **2013**, 18: 4703-4717; M. Yoshida et al, *Molecular Crystals & Liquid Crystals*, **2014**, 595, 55-62
- 2) Y. Akiyama et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1420-1422; M. Matsui et al., *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 1555-1560; H. Chiku et al., *Anal. Biochem.*, **2003**, 318, 80-85; T. Shiomi et al, *Biomaterials*, **2005**, 26, 5564-5571; T. Shiomi et al, *Chem. Commun.*, **2005**, 42, 5325 - 5327; M. Matsui et al, *Analytical Methods*, **2014**, 6, 3569-3572; M. Matsui et al, *Separation & Purification Technology*, **2015**, 149, 103-109
- 3) H. Chiku et al, *Anal. Biochem.*, **2006**, 348, 307-314; 角田達朗 et al, ゼオライト,

- 2006, 23, 64-72
- 4) T. Nara et al, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2009**, 68: 68-73; H. Togashi et al, *Biotechnol. Prog.*, **2009**, 25, 200-206; T. Nara et al, *Biotechnol. Prog.*, **2009**, 25, 1071-1077; T. Nara et al, *Am. Inst. Chem. Engineers.*, **2009**, 25, 1071-1077
 - 5) T. Nakabayashi et al, *Anal. Biochem.*, **2011**, 419, 173-179
 - 6) Y. Urabe et al, *CHEMBIOCHEM*, **2007**, 8, 668-674; T. Shiomi et al, *Chem. Commun.*, **2007**, 42, 4404-4406; T. Shiomi et al, *Chem. Mater.*, **2007**, 19, 4486-4493; A. Takimoto et al, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2008**, 116, 601-606; T. Shiomi et al, *Small*, **2009**, 5, 67-71; S. Matsuura et al, *Chem. Comm.*, **2010**, 46, 2941-2943; T. Y. Nara et al, *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.*, **2010**, 64, 107-112; S. Matsuura et al, *Microporous & Mesoporous Materials*, **2010**, 131, 245-251
 - 7) K. Ino et al, *PLoS ONE*, **2011**, 6(7): e22582
 - 8) M. Kubota et al, *Appl. & Environment. Microbiol.*, **2005**, 71: 8895-8902; M. Kubota et al, *J. Dairy Science*, **2007**, 90: 4100-4107; M. Kubota et al, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2008**, 64: 88-97.