

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340106

研究課題名(和文)プラスチックの嫌気生分解の解析

研究課題名(英文)Study of anaerobic biodegradation of biodegradable polyesters

研究代表者

八木 久彰 (Yagi, Hisaaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員

研究者番号：40344121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：4種のプラスチック(ポリ乳酸(PLA)、ポリカプロラクトン(PCL)、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリブチレンサクシネート(PBS))の、37℃と55℃での嫌気生分解試験を行った。また、これらのプラスチックの嫌気生分解に関与している微生物群を、RT-PCR-DGGE法で分析した。分子量を落としたPLAフィルムを作成し、分子量による嫌気生分解速度の差を調べた。

研究成果の概要(英文)：The anaerobic biodegradability of four bioplastics, polycaprolactone (PCL), poly(lactic acid) (PLA), polyhydroxybutyrate (PHB) and poly(butylene succinate) (PBS), were compared at 37 °C and 55 °C. The microorganisms participating in anaerobic bioplastic biodegradation were detected using the RT-PCR DGGE method. The anaerobic biodegradability of different molecular weight PLA films were compared.

研究分野：天然物化学

キーワード：嫌気生分解 生分解プラスチック RT-PCR-DGGE

### 1. 研究開始当初の背景

現在、商業用の嫌気発酵槽として運転されている発酵槽の温度は、55 と 37 の 2 つに分けられる。55 の発酵槽は一般に分解速度が速いので、大きな土地の確保できない都市部に向いているが、温度の維持により多くのエネルギーを使用する。生分解性プラスチックをこれら商業用の大型嫌気発酵槽で処理するには、生分解性プラスチックが、発酵槽内の汚泥で生分解するかどうかを、あらかじめ試験しておかなければならない。プラスチックの嫌気生分解に関する国際標準規格はいくつかあるが、これらはいずれも、発酵槽でのプラスチックの分解性を完全に再現して評価する内容にはなっていない。そこで、発酵槽内でのプラスチックの嫌気での分解性を評価できる新しい試験方法を検討した結果、代表的な生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLA)の 55 での分解性を試験できる試験方法を確立した。

### 2. 研究の目的

プラスチックの嫌気での分解性を評価できる試験方法(ISO13975 法の改良法)を用いて、代表的な生分解プラスチックの 55 と 37 での嫌気分解試験を実施し、そのプラスチックのメタン発酵に参与している微生物を解析する。

### 3. 研究の方法

「55 でのプラスチックの嫌気生分解の解析

山田バイオマスプラントで採取した 37 の液体肥料を、55 で 20 日程度インキュベートして 55 の嫌気汚泥を作った。嫌気汚泥の上層の溶液部分 1.4L と各種プラスチックサンプル 10g を混合して MODA-B 装置に封入し、55 でプラスチックの嫌気分解試験を行った。プラスチックの嫌気分解で放出される二酸化炭素とメタンを MODA-B 装置に取り付けたガスバックに採取して、その体積を測定することからプラスチックの分解度を求めた[1,2]。また、プラスチック分解中に働いている微生物群を解析するため、分解の各段階で汚泥を採取し、RNAlater 中に凍結保存した。汚泥の RT-PCR-DGGE 分析と DGGE バンドの塩基配列解析は、テクノスルガラポに委託分析に出すことにより行った。汚泥からの RNA 抽出と精製は、MORA-EXTRACT kit (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Japan)と SV Total RNA Isolation System (Promega Co., Ltd., USA)を使って行われた。逆転写のためのプライマーには 907r(細菌用)[3]と 519r(古細菌用)[4]を用いた。逆転写反応は ReverTra Ace- $\alpha$ -kit (TOYOBO Co., Ltd., Japan)を用いて、42 20分、99 5分、4 5分の温度条件で行った。合成した cDNA を、AmpliTaq Gold kit (Applied

Biosystems)を用いて PCR で増幅した。プライマーには、GC-341f-534r(細菌用)[5]と GC-344f-519r(古細菌用)[4,6]を用いた。PCR の温度条件は、94 7分を 1 サイクル、94 1分とアニーリング 1分と 72 2分を 20 サイクル行い、アニーリング温度は 65 度から初めて、2 サイクルごとに 1 ずつ下げていき 56 に達するように行った。その後、94 1分と 55 1分と 72 2分のサイクルを 15 回繰り返す、最後に 72 10分を終了させた。DGGE は Bio-Rad DCode system を用いて行った。25-65%の変性剤濃度勾配のポリアクリルアミドゲル(8%(w/v))を用いて、100V60 で 12 時間電気泳動を行った。

「37 でのプラスチックの嫌気生分解の解析」

山田バイオマスプラントで採取した 37 の液体肥料を、37 で 17 日インキュベートして嫌気汚泥中の分解可能な有機物量を減少させた。嫌気汚泥の上層の溶液部分 1.4L と各種プラスチックサンプル 10g を混合して MODA-B 装置に封入し、37 でプラスチックの嫌気分解試験を行った。プラスチックの嫌気分解で放出される二酸化炭素とメタンを MODA-B 装置に取り付けたガスバックに採取して、その体積を測定することからプラスチックの分解度を求めた[1,2]。また、プラスチック分解中に働いている微生物群を解析するため、分解の各段階で汚泥を採取し、RNAlater 中に凍結保存した。汚泥の RT-PCR-DGGE 分析と DGGE バンドの塩基配列解析は、テクノスルガラポに委託分析に出すことにより行った。テクノスルガラポでの分析条件は、上記と同様である。

「分子量を変えた PLA の嫌気分解試験」

分子量を落とした PLA を作成するため、PLA フィルムをイオン交換水中 55 で 31 日および 70 日インキュベートとした。31 日インキュベートとした PLA フィルムの分子量は Mn9000, Mw18000。70 日インキュベートした PLA フィルムの分子量は Mn2800, Mw6500。上記「55 でのプラスチックの嫌気生分解の解析」の方法と同手順で、31 日および 70 日水中でインキュベートした PLA フィルムとインキュベートしていない PLA フィルムの 55 での嫌気生分解試験を行った。

### 4. 研究成果

「55 でのプラスチックの嫌気生分解の解析」

ポリ乳酸(PLA)、ポリカプロラクトン(PCL)、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリブチレンサクシネート(PBS)の各粉末の 55 での嫌気分解試験の結果を図 1 に示す。PHB は 14 日で 90%嫌気分解された。PCL は、50 日で

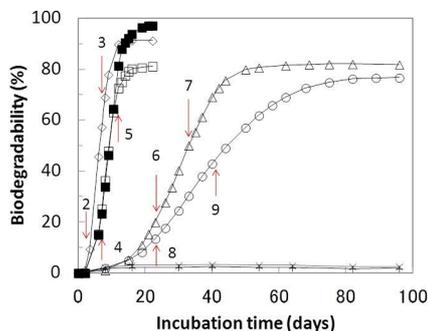


図1 プラスチックの55°Cでの嫌気生分解試験  
◇:セルロース10g, ■:PHB 10g, □:PHB10g, ×:PBS 10g, +:PBS 10g, ○:PLA 10g, △:PCL 10g

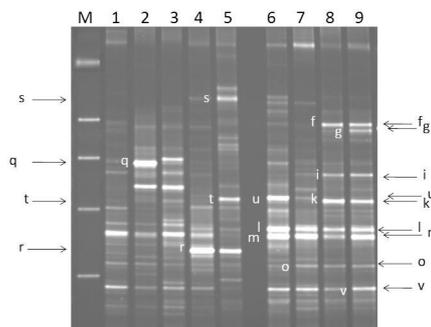


図2 プラスチックの55°Cでの嫌気生分解汚泥のRT-PCR-DGGE分析  
レーン1は嫌気分解試験開始、レーン2-9は図1中のサンプリングポイントに対応。

80%嫌気分解された。PLA は 75 日で 75%嫌気分解された。PBS は 100 日経過後も全く嫌気分解されなかった。嫌気分解実験開始直前と、図 1 の矢印で示すところで汚泥を採集し、汚泥中の RNA を RT-PCR-DGGE で分析した結果を図 2 に示す。PHB の嫌気分解過程(レーン 4, 5)では、バンド r, s, t が現れた。PCL の嫌気分解過程(レーン 6, 7)では、バンド u, l, m, o, v が現れた。PLA の分解過程では、バンド f, g, i, k, l, m, o, v が現れた。それぞれのバンドの塩基配列と、データベース上の塩基配列との相同性を表 1 に示す。PHB の分解過程で現れたバンド r, s, t はそれぞれ Peptococcaceae bacterium, Bacteroides plebeius, Catenibacterium mitsuokai と 97%、100%、98%の相同性を示した。PCL の分解過程で現れたバンド u は、単離されている細菌とは近い相関を示さなかった(相同性は 95%以下)。PLA の分解過程で現れるバンド g は Ureibacillus sp と 100%の相関を示した。しかし、バンド f, i, k は、単離されている細菌とは近い相関を示さなかった。共通に現れるバンド l, v はそれぞれ Bacillus infernus, Propionibacterium sp と 100%、99%の相関を示した。一方、バンド m, o は、単離された細菌とは近い相関を示さなかった。以上より、山田バイオマスプラントから採取した液体肥料から作った 55 の汚泥では、PLA, PCL, PHB の嫌気分解に関する細

DGGE Band	Closest GenBank relative (%)	Sequence similarity	Accession number	Alignment length (bp)
r	Peptococcaceae bacterium Ri50	97 (167/172) <sup>1)</sup>	EU400652	171
s	Bacteroides plebeius	100 (189/189)	AB200222	189
t	Catenibacterium mitsuokai	98 (191/194)	AB643467	194
u	Uncultured Firmicutes bacterium	100 (194/194)	GU957412	
	Syntrophomonas wolfei subsp.	91 (177/194)	DQ449034	195
v	Uncultured bacterium	99 (194/195)	AB494328	
	Propionibacterium sp.	99 (173/174) <sup>2)</sup>	AB453308	173
	Uncultured actinobacterium	100 (173/173)	EU810943	
f	Desulfonosporus sp.	95 (187/196) <sup>3)</sup>	AB436739	195
g	Ureibacillus sp.	100 (194/194)	AM932266	194
i	Uncultured bacterium	92 (180/194) <sup>4)</sup>	FN563177	195
k	Moorella sp.	93 (180/192)	AB127110	193
l	Bacillus infernus	100 (194/194)	U20385	194
m	Uncultured bacterium	100 (177/177)	FJ716076	177
o	Uncultured bacterium	100 (172/172)	EF586058	172
	Desulfotomaculum sp. Strain T93B	92 (158/171)	U33455	
q	Clostridiales bacterium	96 (166/172) <sup>5)</sup>	AY579754	172
	Uncultured bacterium	99 (171/172)	DQ887970	

- 1) There is a gap in the alignment sequence at position 444 of the retrieved sequence.
- 2) There is a gap in the alignment sequence at position 351 of the retrieved sequence.
- 3) There is a gap in the alignment sequence at position 565 of the retrieved sequence and a gap in the retrieved sequence between positions 569 and 570.
- 4) There is a gap in the retrieved sequence between positions 482 and 483.
- 5) There is a gap in the retrieved sequence between positions 400 and 401.

菌には違う種類のものが存在することがわかる。また、嫌気分解に関与している細菌のいくつかは、今まで単離されていない範疇の細菌であることが示唆された。PCL の嫌気分解に関与する古細菌と細菌が、分解過程のどの段階で現れてくるのかを調べた結果が図 3 と図 4 である。図 3 の 1 - 6

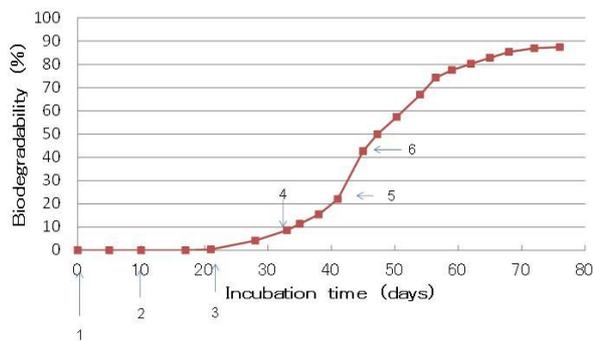


図3 PCLの55°Cでの嫌気生分解

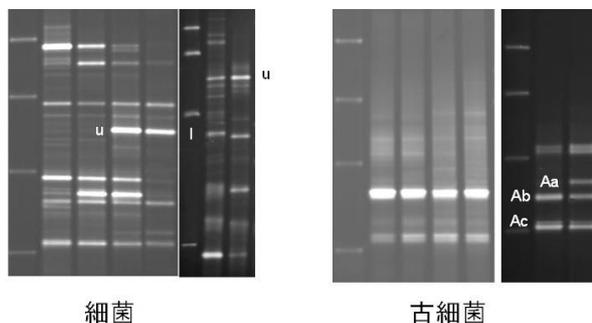


図4 PLCの55°Cでの嫌気生分解汚泥のRT-PCR-DGGE分析  
レーン1-6は、図3中の矢印に対応。Mは分子量マーカー

の時点で汚泥を採集し、その RT-PCR-DGGE の結果を図 4 に示す。PCL の嫌気分解では、20 日過ぎからバイオガスの放出が測定された。バイオガスの放出が測定される直前から(サンプリングポイントの 3 から)、バンド u が出現した。バンド u に対応する細菌が、PCL

の分解に関与している可能性が高いと考えられる。PCLのメタン発酵に関与している古細菌としては、Methanothermobacter marburgensis (99%、バンド Ac)および未単離の古細菌(バンド Aa、Ab)が検出された。

「37」でのプラスチックの嫌気生分解の解析

ポリ乳酸(PLA), ポリカプロラクトン(PCL), ポリヒドロキシ酪酸(PHB), ポリブチレンサクシネート(PBS)の各粉末の37での嫌気分解試験の結果を図5に示す。PHBは9

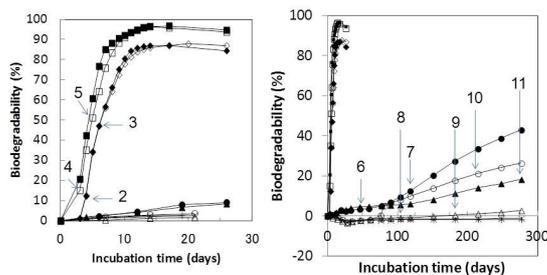


図5 プラスチックの37°Cでの嫌気生分解試験  
◆;セルロース10g, ◇;セルロース10g, ■;PHB 10g, □;PHB10g, ×; PBS 10g, +;PBS 10g; ●; PLA 10g, ○; PLA 10g, ▲; PCL 10g, △; PCL 10g

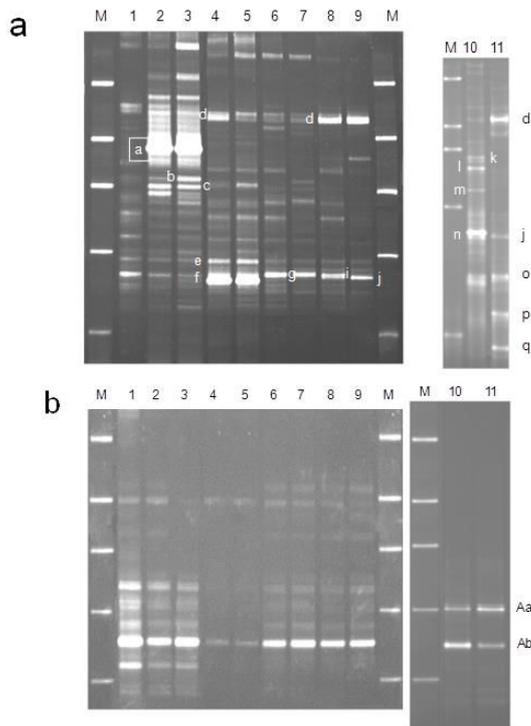


図6 プラスチックの37°Cでの嫌気生分解汚泥のRT-PCR-DGGE分析  
1-11は図5中の矢印に対応。Mは分子量マーカー。(a)細菌 (b)古細菌

日で90%嫌気分解された。PCLは、277日で3および22%嫌気分解された。PLAは277日で29および49%嫌気分解された。PBSは277日経過後も全く嫌気分解されなかった。嫌気分解実験開始直前と、図5の矢印で示す

ところで汚泥を採集し、汚泥中のRNAをRT-PCR-DGGEで分析した結果を図6に示す。PHBの嫌気分解過程(レーン4, 5)では、バンドd,e,fが現れた。PCLの嫌気分解過程(レーン8, 9, 11)では、バンドd,i,j,o,p,qが現れた。PLAの分解過程(レーン6, 7, 10)では、バンドg,l,m,nが現れた。それぞれのバンドの塩基配列と、データベース上の塩基配列との相同性を表2に示す。PHBの分解過程で現れたバンドd,e,fはそれぞれAcrobacter thereius, Clostridium sp., Clostridium sp.と98%, 98%, 98%の相同性を示した。PCLの分解過程で現れたバンドi, j, o, p, qは、単離されている細菌とは近い相関を示さなかった(相同性は95%以下)。特にバンドp, qは、単離されていない細菌を含めても近い相関を示すものがなかった。PLAの分解過程で現れるバンドl, m, nは、Xanthomonadaceae bacterium,

表2 Summary of identified DGGE amplicons and similarity (%) to their closest matches in GenBank

DGGE Band	Closest GenBank relative	Sequence similarity (%)	Accession number	Alignment length (bp)
a	<i>Fibrobacter intestinalis</i>	90 (166/184)	M62690	184
	Uncultured bacterium	100 (186/186)	JQ151385	
b	<i>Clostridium</i> sp.	97 (184/189)	AE596885	189
	Uncultured Eacteroidetes bacterium	100 (189/189)	HQ290300	
c	<i>Spirochaeta zuelzeriae</i>	96 (186/193)	M88725	193
	Uncultured bacterium	100 (193/193)	GQ139098	
d	<i>Arcobacter thereius</i>	98 (167/169)	AY314754	169
	Uncultured bacterium	100 (169/169)	GQ136753	
e	<i>Clostridium</i> sp.	98 (166/169)	AY949856	169
	Uncultured bacterium	99 (168/169)	KC007387	
f	<i>Clostridium</i> sp.	98 (167/169)	AY949856	169
	Uncultured bacterium	100 (169/169)	KC007387	
g	<i>P. acetylenicus</i>	91 (179/196) <sup>1</sup>	X70955	196
	Uncultured bacterium	100 (196/196)	HQ183995	
i	<i>P. acetylenicus</i>	90 (178/196) <sup>2</sup>	X70955	196
	Uncultured bacterium	99 (195/196)	HQ183995	
j	Delta proteobacterium	93 (182/195)	AY459365	195
	Uncultured bacterium	100 (195/195)	HQ183996	
k	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	90 (176/195)	CF000252	195
	Uncultured delta proteobacterium	100 (195/195)	HQ183849	
l	Xanthomonadaceae bacterium	100 (194/194)	KC252880	194
m	<i>Mesorhizobium</i> sp.	100 (169/169)	KF034935	169
n	<i>Thiorhodococcus mannitoliphagus</i>	94 (184/194) <sup>3</sup>	FM178272	193
	Delta proteobacterium	92 (181/196)	AY459365	196
o	Uncultured bacterium	97 (192/196) <sup>4</sup>	KC466467	
p	<i>Geobacter hephaestius</i>	88 (173/196)	AY737507	196
	Uncultured delta proteobacterium	89 (176/196)	EU551095	
q	<i>Thiocystis violacea</i>	90 (178/196)	FN293060	196
	Uncultured bacterium	90 (178/196)	JF341561	
Aa	<i>Methanobacterium petrolearium</i>	95 (142/148)	AE542742	148
	Uncultured Methanobacterium sp.	97 (145/148)	HQ271198	
Ab	<i>Methanoseta concilii</i>	97 (144/148)	AE542742	144

There is a gap in the retrieved sequence between positions 466 and 467.  
There is a gap in the retrieved sequence between positions 466 and 467.  
There is a gap in the alignment sequence at position 435 of the retrieved sequence.  
There is a gap in the retrieved sequence between positions 450 and 451.

Mesorhizobium sp.と100%の相同性を示した。一方、バンドg, k, nは、単離されている細菌とは近い相関を示さなかった。

以上より、山田バイオマスプラントから採取した37の液体肥料には、PLA, PCL, PHBの嫌気分解に関与する細菌には違う種類のもが存在することがわかる。また、37の嫌気分解に関与している細菌のいくつかは、今まで単離されていない範疇の細菌であることが示唆された。

「分子量を変えたPLAの嫌気分解試験」

3通りの分子量のPLAフィルムの嫌気分解速度の試験結果を図5に示す。31日水中でイ

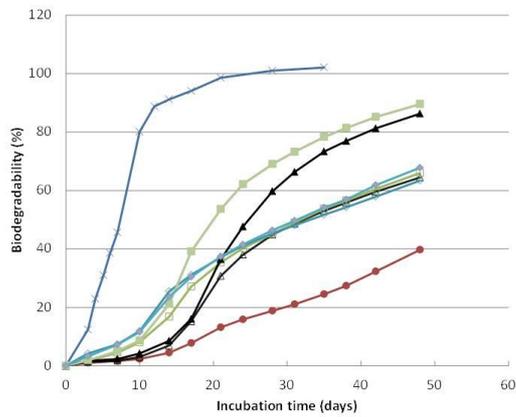


図7 分子量を変えたPLAフュルムの55°Cでの嫌気生分解試験  
55°Cの水中で31日インキュベートしたPLAフュルム(□、■)、  
55°Cの水中で70日インキュベートしたPLAフュルム(◇、◆)、  
PLAフィルム(△、▲)、PLA粉末(●)、セルロース(×)

ンキュベートして分子量を落とした PLA フィルムは、14日 で 20%前後、21日 で 35 及び 53%分解した。70 日水中でインキュベートして分子量を落とした PLA フィルムは、14日 で 20%、21日 で 30 および 36%分解した。28 日以降は、無処理の PLA フィルムと 31 日水中でインキュベートした PLA フィルムの各 1 つの反応容器を除いて、同じ分解速度で分解した。水中でインキュベートして分子量を落とした PLA フィルムは、分解初期の分解は早くなったが、最終的な分解速度は 3 通りのフィルムで違いが現れなかった。(無処理の PLA フィルムと 31 日インキュベートした PLA フィルムの各 1 つの反応容器を除く。)分子量を落とした PLA フィルムは、分解が早く始まったが、最終的な分解速度は同じになった。

#### 「引用文献」

- [1] Yagi H, Ninomiya F, Funabashi M, Kunioka M. Polym Degrad Stab 2009;94:1397-1404
- [2] Yagi H, Ninomiya F, Funabashi M, Kunioka M. Int J Mol Sci 2009;10:3824-35
- [3] Ishii, K, Takii S, Fukunaga S, Aoki K. J Gen Appl Microbiol 2000;46:85-93.
- [4] Ovreás L, Forney L, Daae FL, Torsvik V. Appl Environ Microbiol 2007;63:3367-73
- [5] Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. Environ Microbiol 1993;59:695-700
- [6] Casamayor EO, Schafer H, Banerás L, Pedrós-Alió C, Muyzer G 2000;66:499-508

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hisaaki Yagi, Fumi Ninomiya, Masahiro Funabashi, Masao Kunioka, Mesophilic anaerobic biodegradation test and analysis of eubacteria and archaea involved in anaerobic biodegradation of four specified biodegradable polyesters. Poly Degrad Stab 2014;110:278-283

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

八木 久彰 (YAGI HISAAKI)

産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員

研究者番号：40344121

(2)研究分担者

国岡 正雄 (KUNIOKA MASAO)

産業技術総合研究所・機能化学研究部門・研究グループ長

研究者番号：60211885