

廃棄物系バイオマスを原料としたプラスチック生産菌の単離

Isolation of bacteria for bioplastic production utilizing waste biomass

石井 純音
指導教員 後藤 早希, 浦瀬 太郎

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 水環境工学研究室

キーワード：バイオプラスチック, PHA, 廃棄物系バイオマス

1. 緒言

通常のプラスチックはさまざまな特性を持っており、安価であるため世界中で使用されている。だが、分解されないために環境中に堆積し、問題になっている。また、原料である化石燃料は埋蔵量が減少しており¹⁾、安定供給が難しくなる可能性がある。

自然界に存在する一部の微生物はさまざまな炭素源を利用して、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と呼ばれるポリエステルをエネルギー貯蔵物質として菌体内に貯蔵する(図1)。

PHAはプラスチックとして使用できる物質で、使用後は微生物によって二酸化炭素と水に分解されるため、環境低負荷材料として期待されている。

PHAはそれを構成するモノマーの鎖長により、炭素数3~5の短鎖長のSCL-PHAと炭素数6~14の中鎖長のMCL-PHAに分類される。SCL-PHAの代表的なものに炭素数4の3-ヒドロキシブタン酸(3HB)をモノマー単位とするポリヒドロキシブタン酸(P(3HB))があげられる。PHAはモノマー組成により、多様な物性を示すが、生産コストが高いいため、通常のプラスチックよりも普及していない²⁾。

最近、廃棄物系バイオマスを炭素源として利用することで、産業廃棄物の有用活用とコスト効率の高いPHA生産を目指した研究が行われている³⁾。

そこで本研究では、廃棄物系バイオマスを想定して油・グリセロールからPHAを生産する細菌を大学の土壤から探索することを目的とした。

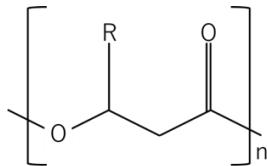


図1 PHAの構造図

2. 方法

2-1. スクリーニング

大学構内から採取した土壤を約1gはかり取り0.85%NaClに懸濁させた。その上澄みを希釀し、グリセロールを5%添加した1/100LB寒天培地と油を2%添加した1/100LB寒天培地にプレーティングしコロニーを形成させた。

低栄養源培地(NaHPO₄·12H₂O 9 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, NH₄Cl 0.5 g/L, 0.2 g/mL MgSO₄·7H₂O 1 mL/L, Trace element soln. 1 mL/L, Yeast extract 0.5 g/L, Agarose 15 g/L)にナイルレッド溶液(0.25 mg/L)と油(0.5%)またはグリセロール(5%)を添加したスクリーニング寒天培地を作製した。

前述の1/100LB培地に形成したコロニーからスクリーニング寒天培地にストリーカーし、PHA生産菌を単離した。単離した細菌の16S rRNA遺伝子解析を行い、菌種同定した。

2-2. 培養

簡易スクリーニングにより、PHA生産菌と考えられる細菌をLB培地に接種し、30°C、一晩前培養した。油(0.5%)またはグリセロール(5%)を添加した低栄養源培地に前培養液500 μLを添加し、30°C、

72時間培養した。本培養した菌を集菌し、凍結乾燥させた。

2-3. PHAモノマー組成の定性・定量

GC/MSを用いてPHAの定性・定量分析を行った。乾燥菌体約15mgに15%(v/v)硫酸メタノール2mLとクロロホルム2mLを添加し、100°C、140分でメタノリシス化した。反応終了後、室温まで冷却し、純水1mLを加えて攪拌し、2層になるまで静置した。クロロホルム層を回収し、GC/MS用測定サンプルとした。検量線の作製には精製したP(3HB)を用いた。

3. 結果

3-1. スクリーニング

脂肪酸と結合し、紫外線を照射すると蛍光するナイルレッド溶液を添加し、PHA生産菌であるかどうかを目視で判断した。図2のように蛍光している株を選択し、油含有培地から1株・グリセロール含有培地から2株単離した。

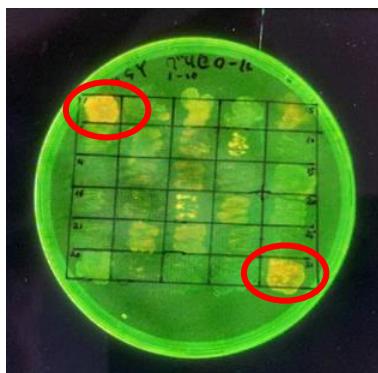


図2 グリセロールを5%添加した低栄養源培地

3-2. 遺伝子解析

遺伝子解析を行った結果、PHAを生産する菌として油含有培地からは*Streptomyces*属(1株)、グリセロール含有培地からは*Bacillus*属(1株)と*Gottfriedia*属(1株)が単離された。

3-3. PHAモノマー組成の定性・定量

GC/MSを用いて定性分析を行った結果、油を炭素源とする*Streptomyces*属からはPHA由来のモノマーピークは検出されなかった。グリセロールを炭

素源とした2株のうち*Gottfriedia*属ではピークが確認されなかったが、*Bacillus*属では図3のように保持時間5.35分付近にモノマーピークを確認することができた。シミラリティ検索の結果、メチルエステル化された3HBと96%一致したため、単離した*Bacillus*属の株はグリセロールからP(3HB)を合成したことが考えられた。さらに定量分析した結果、43.7wt%の蓄積が確認された。

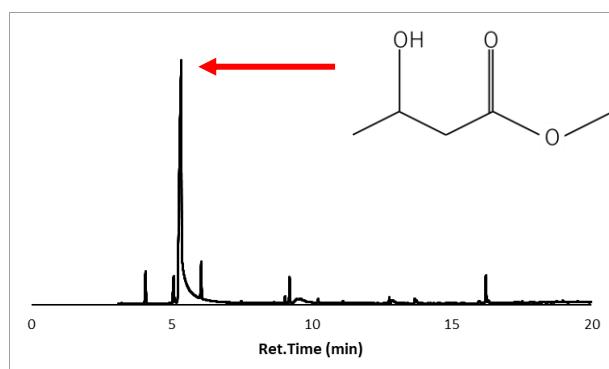


図3 グリセロールを炭素源とした*Bacillus*属のクロマトグラフ

4. 結論と今後の展望

大学構内から油とグリセロールを炭素源とするPHAを蓄積する菌として、油を炭素源とする*Streptomyces*属、グリセロールを炭素源とする*Bacillus*属と*Gottfriedia*属が単離された。GC/MSによる定性・定量分析の結果、単離した*Bacillus*属の株はグリセロールを炭素源としてPHAのひとつであるP(3HB)を43.7wt%蓄積したことを確認した。

今後は、油とグリセロール以外にも廃棄物系バイオマスとして多いキシロースを炭素源とした探索を行う。

5. 参考文献

- 1)Aderemi T. Adeleye et al, *Process Biochemistry*, P174-193.2020.9
- 2)Vibhuti Sharma et al, *Polymer Volume* 212. 2021.1
- 3)Iva Pernicova et al, *Bioresource Technology*, Volume 292.November 2019.11