

# 廃棄物系バイオマス为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<sup>1)</sup>、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、生産コストが高いため、通常のプラスチックよりも普及していない<sup>2)</sup>。

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<sup>3)</sup>。

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壌から探索することを目的とした。

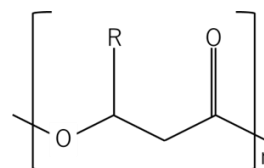


図 1 PHA の構造図

## 2. 方法

### 2-1. スクリーニング

大学構内から採取した土壌を約 1 g はかり取り 0.85%NaCl に懸濁させた。その上澄みを希釈し、グリセロールを 5%添加した 1/100 LB 寒天培地と油を 2%添加した 1/100 LB 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 (NaHPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/L, 0.2g/mL MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 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 1/100 LB 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クし、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℃、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℃、

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 15 mg に 15%(v/v)硫酸メタノール 2 mL とクロロホルム 2 mL 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 1 mL 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。

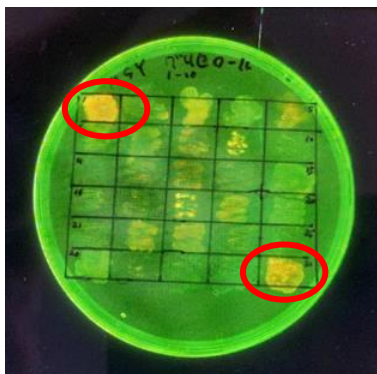


図 2 グリセロールを 5%添加した低栄養源培地

### 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、43.7 wt%の蓄積が確認された。

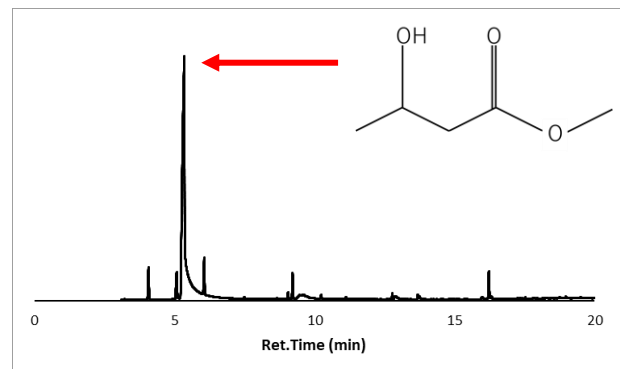


図 3 グリセロールを炭素源とした *Bacillus* 属のクロマトグラフ

## 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 43.7 wt%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*, *Bioresourc Technology*, Volume 292. November 2019.11