

# 生分解性プラスチックを分解する微生物と天然高分子

常盤 豊

人類は20世紀、石油などの化石資源を利用して、シルクや天然ゴムなどを真似てナイロン、合成ゴムなどを次々と発明し、プラスチック工業を発展させてきた。しかし近年、環境汚染問題が深刻になり、自然界の物質循環に適合する生分解性プラスチックのニーズが高くなってきた。最近では、化石資源に替わって、再生可能なバイオマスから微生物や酵素などの生体触媒を利用してL-乳酸やD-3-ヒドロキシ酪酸、コハク酸などの生分解性プラスチックの原料を生産することが期待されている(図1)。

生分解性プラスチックの代表的なものの化学構造を図2に示した。石油化学原料から合成されたポリカプロラクトン(PCL)とポリ(ブチレンサクシネート)(PBS)、微生物が生産するポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)、バイオマスを原料としたものとしてポリ(L-乳酸)(PLA)がある。これらは石油あるいはバイオマスなど原料に関わらず、すべてが脂肪族ポリエステルと呼ばれる高分子物質である。

それぞれの脂肪族ポリエステルを分解する微生物の分布状況は、地域の違いにあまり関係なく、PCL > PHB > PBS > PLAの順に減少していることが明らかになってきた<sup>1,2)</sup>。

本稿では、生分解性プラスチックを分解する微生物や

酵素が、天然高分子を分解する微生物や酵素と関連があることが明らかになってきたことについて述べる。

## 石油化学原料からの生分解性プラスチック

**PCLおよびPBSを分解する微生物** 1976年、筆者らは土壌より分離したカビ *Penicillium* 属の 26-1 株(ATCC36507)が高分子量PCL(Mn: 25,000)を分解することを見いだした<sup>3)</sup>。0.1% PCLを含む培地に胞子を接種して30°Cで培養した場合、PCLの減少につれて菌体は増殖し、培養7日目で最高に達した。PCLは12日後にはほとんど完全に消失した。PCLは26-1株によりε-ヒドロキシカプロン酸に分解され、資化された。

PCLは人工的に合成された合成高分子であるが、好気・嫌気的環境や高温環境などの自然環境中において容易に分解されることが、その後の研究で明らかになってきた。

また、筆者らは、土壌からPBS分解菌として分離した放線菌 *Amycolatopsis* 属の HT-6 株を選び、PBS(Mn: 57,400)の分解過程について調べた<sup>4)</sup>。培養液中の0.1% PBSはHT-6株により培養初期に急速に分解され、4日間で初期重量の80%が消失し、培養液中に4-ヒドロキシ酪酸が蓄積した。PBSはオリゴマーを経て構成単位の1,4-ブタジオールとコハク酸に分解され、さらに1,4-ブタジオールは4-ヒドロキシ酪酸とコハク酸を経てHT-6株により代謝されていくと考えられた。HT-6株はPBSの他にPCLおよびPHBをもよく分解資化したが、ポリL-乳酸は分解できなかった。

また、HT-6株が菌体外に分泌する粗酵素はPBS、ポリ

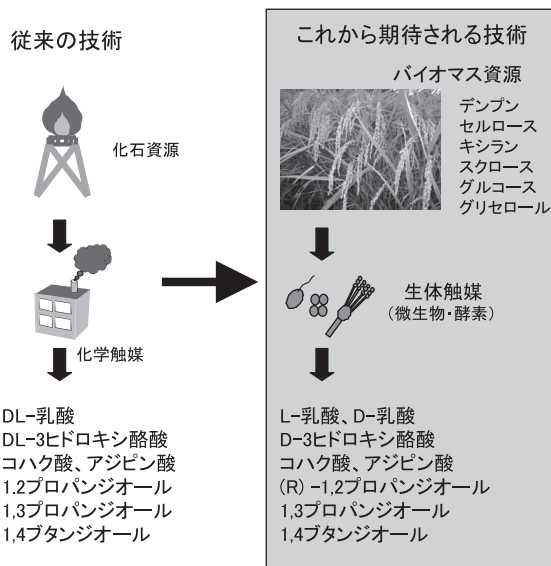


図1. バイオマスからの高分子原料の生産

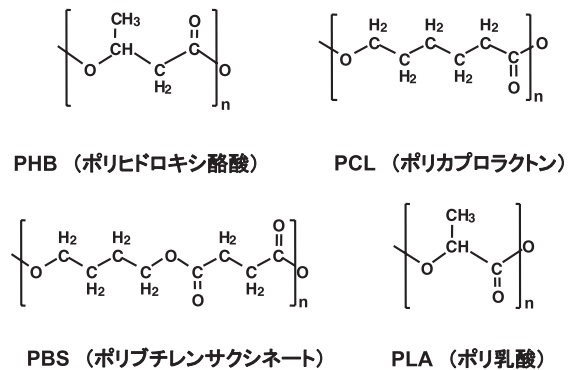


図2. 生分解性プラスチックの代表例

カプロラクトンおよびポリヒドロキシ酪酸を分解することができた。

好熱性の放線菌 *Microbispora rosea*, *Excellispora japonica* および *E. viridilutea* も PBS を 50°C で分解でき、PBS フィルムの非結晶部分が速く分解されることが知られている。

**PCL や PBS を分解する酵素** 1977年に著者らは、微生物起源のリパーゼや豚肝臓のエステラーゼが、石油化学原料から人工的に化学合成されたポリカプロラクトン (PCL) やポリ (エチレンアジペート) (PEA) などの脂肪族ポリエステルを分解することを明らかにした<sup>5)</sup>。一般に、リパーゼ (エステラーゼ、クチナーゼも含む) は PCL, PEA, PBS, PBSA (ポリブチレンサクシネート・アジペート共重合体) などエステル結合間の炭素鎖の比較的長いポリエステルのエステル結合を切断する。微生物由来 PHB (融点 178°C) とポリ L-乳酸 (融点 175°C) はリパーゼやエステラーゼでは分解されないが、それらのラセミ体高分子は融点が低く、リパーゼやエステラーゼの作用を受けることが知られている。

自然界には、松柏類の葉の表面のエステロイドや植物表面のクチン、スベリンなどの天然のポリエステルが豊富に存在するので、リパーゼやエステラーゼがそれらの脂肪族ポリエステルを分解するのに関与していると考えられる。また、植物病原菌のクチナーゼも、PCL や PBSA などの脂肪族ポリエステルを分解することができる。微生物は PCL や PBS を、植物の表面に存在しているクチンやスベリンなど天然ポリエステルの類似物として認識し、分解していると考えられる<sup>6)</sup>。

#### 微生物が生産する生分解性プラスチック

**PHB を分解する微生物<sup>7)</sup>** ある種の微生物はグルコースや脂肪酸などから、貯蔵物質として菌体内に PHB を蓄積する。PHB の蓄積は、窒素源や無機塩類などを欠乏させて微生物の増殖を制限した場合に促進される。PHB 生産菌として、*Cupriavidus necator* (旧名 *Ralstonia eutropha*) や *Alcaligenes latus*, *Azotobacter chroococcum* が知られており、グルコースやデンプンから培養液 1 l あたり 60~120 g の PHB が生産されている。しかし、菌体内から PHB を効率的に回収し、精製するのがたいへん困難である。

最近、PHB のモノマーである D-3-ヒドロキシ酪酸を生産した後、化学合成法により不純物の少ない PHB を製造するプロセスが提案されている<sup>8)</sup>。

PHB は融点が高いにもかかわらず、微生物によって速やかに分解される。また、PHB を分解する微生物は自然

環境中に広く存在しており、湖沼の底泥や埋め立て地のような嫌気条件下でも速やかに分解される特徴がある。Chowdhury は 1963 年に、PHB 分解菌として *Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属、*Streptomyces* 属の菌株を見いだしている。

しかし、PHB を熱処理してフィルムに加工すると微生物による分解速度は、著しく小さくなる。PHB の微生物分解は、表面上に形成される微生物のコロニー (集落) による半球状分解 (結晶と非結晶部分を区別しないで分解) と、微生物が分泌した酵素による選択的分解 (非結晶部分をより速く分解) の二通りの機構で行われている。

**PHB を分解する酵素** 菌体外の PHB デポリメラーゼは *Alcaligenes* 属、*Comamonas* 属、*Pseudomonas* 属などの菌株から精製されており、PHB フィルムを速やかに分解することが報告されている。リパーゼは、活性中心付近にリパーゼボックスと呼ばれるアミノ酸配列 Gly-X-Ser-X-Gly を持つが、PHB を分解する酵素の PHB デポリメラーゼもリパーゼボックスを持っている。PHB デポリメラーゼは、ポリ (4-ヒドロキシ酪酸) や、ポリプロピオラクトン、ポリエチレンサクシネート、PEA などの石油化学系原料からのポリエステルをも分解することができる。

最近、筆者らは、強力な PHB 分解菌として土壌から分離した *Streptomyces* 属に属する好熱性の MG 株が、培養液中に非常に強い耐熱性 PHB デポリメラーゼを生産することを見いだした。この PHB デポリメラーゼは、医薬品などの原料となる光学純度の高い D-3-ヒドロキシ酪酸を PHB から生産するのに適していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。

#### バイオマス原料からの生分解性プラスチック

**ポリ L-乳酸 (PLA) を分解する微生物<sup>10)</sup>** すぐれた機械的特性をもっている PLA (融点: 175°C) は、すでに繊維やフィルムとして製品化されている。

PLA の原料となる発酵 L-乳酸は、高い光学純度が求められる。光学純度の高い L-乳酸を得るには、生産菌株の選定がたいへん重要である。筆者らは、シュガーケーン、シュガービート、キャッサバ、米などのバイオマス資源からポリ乳酸の原料である L-乳酸 (あるいは D-乳酸) を効率的に生産するため、生産菌の探索・育種および培養プロセスの改良とともに、発酵乳酸の膜分離技術やクロマト分離技術を組み合わせた高純度乳酸の高効率生産システムの開発を行っている。

今まで、ポリ乳酸の分解性については、加水分解と酵素分解について明らかになっているだけで、微生物分解については研究されていなかった。1997年、筆者らはポ

リ乳酸を分解する放線菌 (*Amycolatopsis* 属) の分離に初めて成功した。この放線菌は、30°Cにおいてポリ乳酸フィルムを14日間で60%分解し、残りを小さく断片化した。この結果から、ポリ乳酸は分子運動がたいへん小さいガラス転移温度 (53 ~ 59°C) 以下でも微生物により分解されることが明らかとなった。その後、筆者らは、シルクフィブロインを分解する微生物として土壌から分離した菌株が *Amycolatopsis* 属に属し、シルクフィブロインの他に PLA も分解できること、*Amycolatopsis* 属に属する多くの菌株が PLA とシルクフィブロインを分解することをも見いだした。

さらに、系統的類縁関係の明確な放線菌を用いて PLA の分解能を調べた。その結果、*Pseudonocardiaceae* 科およびその近縁属に属する *Amycolatopsis* 属、*Kibdelosporangium* 属、*Lentzea* 属、*Saccharothrix* 属および *Streptoalloteichus* 属の菌に限って PLA 分解能があることを確認した。PLA の分解能を示した多くの菌株はシルクフィブロインの分解能も示した。このことから、これらの放線菌は、化学合成された PLA を天然のシルク類似物として認識していると考えられた。

一方、カビ *Tritirachium album* がゼラチン存在下で PLA フィルムをよく分解することも見いだされている。この *T. album* は PLA 分解酵素として古くから知られているプロテナーゼ K の生産菌株でもある。

**ポリ L-乳酸 (PLA) を分解する酵素**<sup>11,12)</sup> *Amycolatopsis orientalis*, *Lentzea waywayandensis* および *Tritirachium album* の3菌株を用いて、筆者らは PLA 分解酵素の誘導生産について検討を行った。*A. orientalis* の PLA 分解酵素は、シルクフィブロインやエラスチン、ケラチン、コラーゲンなどの不溶性タンパク質によって顕著に誘導生産されることが明らかとなった。*A. orientalis* の場合、シルクフィブロインが最も顕著に PLA 分解酵素を誘導生産させることができた。

一方、*L. waywayandensis* や *T. album* の PLA 分解酵素は、シルクフィブロインでは誘導されなかったが、エラスチンにより著しく誘導生産された。シルクフィブロインやエラスチンは、L-アラニンユニットをたいへん多く含む不溶性タンパク質である。PLA 分解酵素は、高分子中の  $\alpha$ -アミド結合と  $\alpha$ -エステル結合の両者を分解できる酵素

である。

最近、*Amycolatopsis* 属の培養液から PLA 分解酵素を単一に精製し、この酵素がポリ乳酸に特異的に作用し、PHB や PCL、PBS は分解できないことを明らかにした。また、PLA 分解酵素がシルクフィブロインやアラニンオリゴマーを分解することを明らかにした。このことは、PLA の L-乳酸ユニットとタンパク質の L-アラニンユニットの立体構造に類似性が高いためではないかと推察された。

### 今後の展望

脂肪族ポリエステルは、クチンやスベリンなどの天然高分子として広く存在している。リパーゼは、種々の脂肪族ポリエステルを広く分解できることが明らかになってきた。微生物は、石油化学原料から合成された PCL や PBS などの生分解性プラスチックをクチンやスベリンの類似体として認識していることがわかった。しかし、高い融点をもつ PHB は、PHB 分解のために進化した PHB デポリメラーゼでのみ分解される。

一方、微生物は PLA をシルクフィブロインやエラスチン、ゼラチンなどの類似物と認識しており、プロテアーゼにより分解されることが明らかになった。

天然高分子についての理解がさらに進めば、今後も、種々の生分解性高分子の創出が期待される。

### 文 献

- 1) Nishida, H. *et al.*: *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1**, 227 (1993).
- 2) Pranamuda, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1637 (1997).
- 3) Tokiwa, Y. *et al.*: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 603 (1976).
- 4) Pranamuda, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1828 (1995).
- 5) Tokiwa, Y. *et al.*: *Nature*, **270**, 76 (1977).
- 6) Nishida, H. *et al.*: *Chem. Lett.*, 1547 (1994).
- 7) Tokiwa, Y. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1181 (2004).
- 8) Tokiwa, Y. *et al.*: *J. Biotechnology*, in press.
- 9) Calabia, P. B. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **28**, 383 (2006).
- 10) Tokiwa, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 244 (2006).
- 11) Jarerat, A. *et al.*: *J. Polym. Environ.*, **12**, 139 (2004).
- 12) Jarerat, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 726 (2006).