

【研究要旨】

バクテリアによるバイオプラスチックの合成と分解 愛媛大学附属高等学校

<目的>

現在、海には毎年1000万トン以上のプラスチックごみが流入し、マイクロプラスチックによる海洋汚染が問題になっている。私たちはこの問題を解決するために、海洋性細菌に生分解性プラスチックを効率よく合成させる方法を考えた。海洋性細菌が作る生分解性プラスチックなら、海の微生物によって確実に分解されるはずだからである。また、2020年7月からのレジ袋有料化に伴って普及したバイオマスプラスチック配合レジ袋がどのくらい環境にやさしいのかを調べるために、畑の土壌中に埋めて分解される様子を観察した。なお、バイオプラスチックには、資源循環型だが生分解性があるとは限らないバイオマスプラスチックと、二酸化炭素と水に自然分解される生分解性プラスチック（グリーンプラ）がある。この研究はSDGsの17の目標のうち、9「産業と技術革新の基盤をつくる」、12「つくる責任 つかう責任」、14「海の豊かさを守ろう」、15「陸の豊かさを守ろう」などに関係する。

<方法および結果>

(1) 天日塩からの海洋性細菌の単離

海洋性細菌を単離する試料として市販の天日塩を用いた。天日塩は加熱されていないので塩の中に海洋性細菌が休眠しており、世界中を産地とする試料を入手できる。海洋性細菌用のマリンプロス培地（塩分2%含有）に天日塩5%を溶解させて37℃で2日間液体培養した。次に平板寒天培地に増殖した細菌を塗布して培養し、形成されたコロニーの形状や色調をもとに目視で菌株の単離を行った。その結果、12種類の市販の天日塩から66種の菌株を得ることができた。

(2) 培養条件の検討

得られた菌株の最適培養条件を調べるために、pH、栄養分のC/N比、塩分濃度を変化させた培地で培養した。研究目的が生分解性プラスチックの材料になるポリ酪酸（PHB）やポリ乳酸（PLA）を菌体内に合成・蓄積させる培養だからである。その結果、弱アルカリ性が最適条件の菌株が多いが、好アルカリ性細菌も比較的多かった。細菌の細胞膜で耐アルカリ性と耐塩性に働くイオンポーターの仕組みが似ているからではないだろうか。また、C/N比改変では糖分を添加（C増）した増殖が良好であり、培地の5倍希釈（N減）まで増殖には影響がない菌株が多く、10倍希釈でも増殖が良好な菌株もあった。海洋性細菌は貧栄養性の環境に生育しているものが多いためだと考えられる。なお、グルコース添加だと滅菌時にメイラード褐変を生じたためスクロース添加とした。さらに塩分増加の高浸透圧培養ではいずれの菌株も耐塩性細菌ばかりであり、塩分15%添加の方が最適となる好塩性細菌もあった。得られた菌株は天日塩5%添加培養による単離であり、天日塩中（飽和食塩水中）でも死滅していない細菌なのだから、耐塩性を持っているのは当然だと思われる。全体として最も多くの菌株で最適であったpH7.5の弱アルカリ性、培地5倍希釈＋スクロース5%添加、塩分5%添加を培養条件とした。

(3) 菌体内蓄積物質の抽出と物質の特定

菌体内の蓄積物質はレフレメチレンブルー染色、菌体外への分泌物は墨汁染色を行った後、顕微鏡観察で染色状態から存在を確認した。菌体内蓄積物質の抽出には特許公報で公開されていた方法（0.5M水酸化ナトリウムで溶解後、エタノールで析出）を用いた。その結果、多くの菌株の菌体内から蓄積物質を抽出できたが、分泌物からの抽出物はなかった。ここで蓄積物質の収量が多かった3株（イタリア産天日塩由来のI3-1株、I3-3株、南アフリカ産天日塩由来のSA3-6株）を最優良株として選抜した。抽出物の特定は本校の設備では不可能だったので、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ等の分解酵素を作用させた後抽出物が分解されずに残ったことから、タンパク質、セルロース、デンプン等ではないことを確認した。ただし、エタノールによる物質抽出なので核酸の析出混入が避けられないため、メチルグリーン・ピロニン染色液によるウンナ・パッペンハイム染色を行ったところ、I3-1株の抽出物にDNAの混在が認められた。そこで、デオキシリボヌクレアーゼで処理した後に再度染色を行うとDNAが混在していない抽出物が得られた。最後に、抽出物がクロロホルムに完全に溶解し、メタノール添加で析出したことから、この物質はPHBであると判定した。

(4) PHB生産性の向上

選抜した上記3株について、マリンプロス培地の希釈濃度とスクロース添加濃度の組合せを変えて培養し、菌体内にPHBが効率よく蓄積される条件を調べた。その結果、I3-1株、I3-3株とも培地を5倍、10倍に希釈しても菌体の増殖には影響がなかったが、PHBの収量は低下する傾向が見られた。しかし、培地希釈時にスクロースを添加しておくことでPHBの収量が回復することがわかった。最終的に、I3-1株、I3-3株とも培地10倍希釈＋スクロース5%添加で経済的なPHB生産が可能になった。それに対してSA3-6株は通常培養でのPHB収量がI3-1株、I3-3株より多かったが、培地を希釈するとPHB収量が大幅に低下し、スクロースを添加しても効果がないことから経済的なPHB生産菌にはならないと判断した。

(5) 抽出したPHBのプラスチック性能と生分解性

菌体から抽出したPHBをビニールに塗って乾燥させてから曲げ伸ばしを行ったところ、プラスチックと同様の可塑性や伸縮性があった。また、抽出したPHBをプラスチックシートに塗り広げて乾燥させた後に畑の土壌中に埋めておいたところ、3か月後には完全に分解されていた。日本における生分解性プラスチックの定義は「コンポスト中で3か月以内に6割以上の分解」なので、抽出したPHBには十分な生分解性があると言える。

(6) バイオマスプラスチック配合レジ袋の生分解性

レジ袋有料化によって私たちの身近にバイオマスプラスチック配合のレジ袋が普及した。そこで、バイオマスプラスチックの配合率が異なるレジ袋を畑の土壌中に埋めて分解速度を調べた。その結果、配合率10%、25%、30%のレジ袋には3か月でわずかな分解が見られたが、50%、90%といった高配合率のレジ袋には分解が全く認められなかった。バイオマスプラスチックの配合率が高い50%、90%のレジ袋は、配合率が30%以下のレジ袋に比べて手触りがごわごと分厚く堅かったことから頑丈に作られていることが推察された。そのため、私たちはデンプンからバイオマスプラスチックを実際に合成して比較した。この100%バイオマスプラスチックの薄膜は土壌中で完全に分解した。このことからバイオマスプラスチック配合レジ袋の生分解性は、バイオマスプラスチック配合率以外の部分を占める「強度向上のために添加された分解されにくいプラスチック成分」に左右されると推定された。バイオマスプラスチック配合率が高くなるほど頑丈に作られるため、配合率の高さが生分解性に反映されにくいのではないだろうか。

<展望>

本研究では生分解性プラスチックになるPHBの生産に向けて、市販の天日塩を試料として世界中から優良な菌株を得られたこと、最適な培養・生産条件を検討できたことに意義を感じている。また、培地を希釈して培養しても糖の添加でPHB産生が良好になることから、経済的な生産が可能になる。さらに、バイオマスプラスチック配合レジ袋の土壌中における生分解性には、配合率の高さが必ずしも反映されないという意外な結果も得られた。バイオマスプラスチックは二酸化炭素削減に効果があると宣伝されているが、実際にデンプンからバイオマスプラスチックを合成して感じたことは、製造過程に膨大なエネルギーが必要になることから、実際にどれだけの二酸化炭素削減につながっているのか疑問に思った。その点、細菌によるPHB合成はエコな製造ができるので環境負荷が少ないと感じた。なお、最近ではPHBを医薬品や飼料に利用する特許も多数出願されており、生分解性プラスチック以外の用途も多いようである。

今後は、高校の設備ではできなかった菌株の種の同定や抽出したPHBの分子量の測定を大学や研究機関に依頼して行いたい。そして生分解性プラスチックの有意義な普及活動にも取り組んでいきたいと考えている。生分解性の高さはプラスチック製品としての強度や耐久性にはつながらないので、早期の分解が望まれる使い捨ての小型プラスチックに応用したい。その一例として徐放性肥料カプセルへの利用を考えている。これはポリエチレンで肥料をコーティングした直径2~3mmの農業製品で、水田に散布されて肥料が溶出した後に河川から海洋に流出して一次マイクロプラスチックになる。今後、徐放性肥料カプセルの製造企業に対して生分解性プラスチック化への提案を行う予定である。