

## ポリ乳酸を処理する高温嫌気性消化リアクターの微生物群集構造と乳酸酸化細菌の解析

豊橋技術科学大学 正会員 ○山田剛史、学生会員 萩原達也  
 豊橋技術科学大学 非会員 小川耕太、浜田雅子  
 産業技術総合研究所 非会員 成廣隆

### 1. はじめに

ポリ(L-乳酸)(PLLA)は、化学的性質や物理的性質に優れており、石油系プラスチックの主な代替材としてもっとも有望視されている。将来的には、プラスチック製品としての使命を終えた大量の PLLA 廃材の処理・再利用が大きな課題となると思われる。"きれいな"PLLA 廃材は、熱分解や加水分解による乳酸へのケミカルリサイクルが可能であるが、飲料や食料などが付着した再生へ向かない PLLA 廃材は、埋め立て、焼却およびコンポスト化が考えられている程度である。しかしながら、再生に向かない PLLA 廃材を有効に利用できれば、無駄のない有機資源の循環サイクルを構築することができる<sup>1)</sup>。これらの PLLA 廃材の有効な利用方法の一つは、嫌気性消化リアクターによって、PLLA 廃材をメタンに転換して回収することである。しかしながら、嫌気性消化リアクターでは、PLLA の生物学的加水分解はほとんど期待できないため<sup>1)</sup>、PLLA の化学的加水分解を促進する新たな方法が必要となる。先の報告では、PLLA の化学的加水分解に作用する重量平均分子量 ( $M_w$ ) と結晶化度 ( $X_c$ ) の適切な調整が、高温条件下における PLLA を原料としたメタン生成に有効であることを報告した<sup>1)</sup>。上述した PLLA を原料としたメタン生成反応は、以下のように進行することが想定される。すなわち、①化学的加水分解により、 $M_w$  や  $X_c$  を調整した PLLA から乳酸が放出される。その後、② PLLA から放出された乳酸は、乳酸酸化細菌によって乳酸から酢酸や水素が代謝され、③ メタン生成アーキアによって酢酸や水素からメタンに転換される。しかしながら、現在のところ、当該リアクターにおいてメタン生成に関与する微生物群集はおろか、PLLA から放出される乳酸を資化する乳酸酸化細菌群の情報はほとんどわかっていない。そのため本研究では、PLLA を唯一の原料とした高温嫌気性消化リアクターの処理過程における微生物群集構造の動態を調査するとともに、リアクター内で乳酸酸化反応を担う微生物種を明らかにすることを目的とした。

### 2. 実験方法

本実験で使用した PLLA の  $M_w$  と  $X_c$  は、約 16,000 および約 40%とした。本研究では、 $M_w$  と  $X_c$  を調整した PLLA を処理する高温 (55°C) 嫌気性消化リアクター内の消化汚泥を使用した。当該リアクターは、COD 容積負荷 (VOLR)  $0.5 \sim 2.0 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  および水理的滞留時間 (HRT) 20~100 日で運転されており、良好なメタン生成が確認されていた。嫌気性消化リアクターの微生物群集構造の変化は、リアルタイム定量 PCR 法と Illumina MiSeq による 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域のアンプリコン解析によって調査した。塩基配列情報を基にした分子系統群への帰属は、Quantitative Insights Into Microbial Ecology パイプラインを用いて行った。

次に、55°Cの温度条件下において、10 mM 乳酸と0.01%酵母抽出液を添加した無機塩培地 (pH 7.0) を用いて、嫌気性消化汚泥を植種源とした乳酸酸化細菌の集積培養を行った。集積培養系内の微生物は、16S rRNA 遺伝子クローニング法より調査した。その後、ロールチューブ法によって乳酸酸化細菌の分離・培養を行った。集積培養系や得られた分離株の乳酸酸化能は、液体クロマトグラフィーにより評価した。乳酸酸化能を有する分離株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定した後、分離株の分子系統的位置を調査した。

### 3. 実験結果と考察

運転期間中 (運転期間 0~154 日)、PLLA を原料とした高温嫌気性消化リアクターのバイオガス発生量は  $0.15 \sim 0.23 \text{ m}^3 \cdot \text{kg-PLLA}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  を推移し、発生バイオガス中のメタン濃度は 50~55%付近で安定した。運転 155

キーワード 高温嫌気性消化、ポリ乳酸、化学的加水分解、微生物群集構造、乳酸酸化細菌

連絡先 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 TEL 0532-44-6925

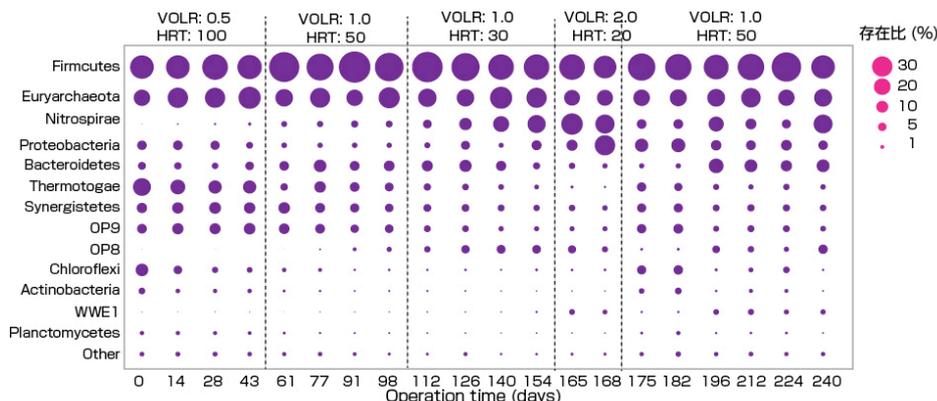


図1 PLLA を処理する高温嫌気性消化リアクター内の微生物群集構造の遷移。バブルプロットは、細菌種を門レベルでグルーピングした時の存在比を示す。

日目を降、HRT の短縮 (20 日) および COD 容積負荷 (2.0 kg-COD・m<sup>-3</sup>・d<sup>-1</sup>) を高めたところ、バイオガス発生量およびメタン濃度の低下が確認された。そのため、COD 容積負荷を 1.0 kg-COD・m<sup>-3</sup>・d<sup>-1</sup> (HRT : 50 日) に下げたところ (運転 165 日目以降)、バイオガス発生量やメタン濃度も徐々に回復した。高温嫌気性消化リアクター内の細菌とアーキアの動態を調査するため、16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム定量 PCR 法と 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行った。高温嫌気性消化リアクター内にはフィルミクテス門細菌、ユリアーキオータ門アーキア、ニトロスピラ門細菌が主要な微生物群として存在しており、メタン生成が悪化するにつれて、アーキア存在率が低下し、ニトロスピラ門細菌の存在率が増加することも観察された (図 1)。

次に、高温嫌気性消化リアクターの安定期に採取した嫌気性消化汚泥を植種源とし、乳酸酸化細菌の集積培養を行った。数回の希釈培養操作を行った結果、形態的に 2~3 種の微生物を含む 2 つの集積培養系 (OG2 と OG5) の構築に成功した。また、これらの集積培養系では、乳酸酸化反応が進行していた。集積培養系内微生物の 16S rRNA 遺伝子クローニング解析を行った結果、OG2 と OG5 集積培養系内の優占種 (clone OG2\_6 と OG5\_3) は、フィルミクテス門に属する *Moorella* 属細菌であることが分かった (図 2)。既存の *Moorella* 属細菌の内、clone OG2\_6 と OG5\_3 に対する近縁種は、*Moorella thermoacetica* であり、その 16S rRNA 遺伝子の相同性は 98% であった。

さらに本研究では、ロールチューブ法を用いて、*Moorella* 属細菌の分離・培養を行った。それぞれの口

ールチューブからコロニーを採取して、液体培地によって 5 日間培養した。その分離操作を 5 回繰り返した結果、OG2 および OG5 集積培養系から、長さ 6.3 μm、幅 0.8 μm を示す桿菌 (PTD1 株と PTD2 株) を分離することに成功した。分離株に対する近縁種は、*Moorella thermoacetica* であり、その 16S rRNA 遺伝子の相同性は 98% であることから、得られた分離株は *Moorella* 属の新種であることが示唆された (図 2)。なお、得られた分離株の 16S rRNA 遺伝子は、集積培養系内から獲得した clone OG2\_6 と OG5\_3 の 16S rRNA 遺伝子配列と完全に一致しており、集積培養系内の優占種をそれぞれ分離できたことを示していた (図 2)。また、高温嫌気性リアクター内の 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析でも、本細菌種の配列が確認できた。乳酸酸化特性試験を行った結果、両分離株とも乳酸酸化能を有していることがわかった。

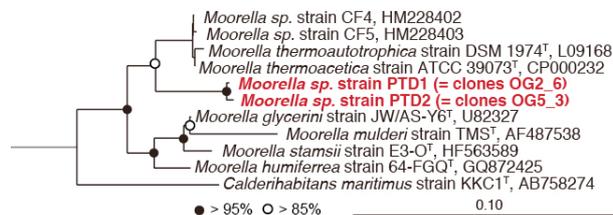


図2 本研究で分離した乳酸酸化細菌 PTD1 株と PTD2 株の分子系統的位。図中の●と○はブートストラップ値を示す。

謝 辞

本研究の一部は、科学技術振興機構 A-STEP 探索タイプおよび第 38 回岩谷科学技術研究助成の支援により行った。ここに深謝の意を表す。

参考文献

1) 山田剛史 ポリ乳酸系バイオマスのエネルギー利用、再生と利用, 40(151) : p105-109 (2016)