

ポリ乳酸を処理する高温嫌気性消化リアクターから分離した乳酸酸化細菌の特徴

豊橋技術科学大学 正会員 ○山田剛史、学生会員 原田淳

豊橋技術科学大学 非会員 Surya Giri、浜田雅子、大門裕之

産業技術総合研究所 非会員 延優、成廣隆

1. はじめに

現在、農業資材、衣料、生活衛生資材、電子機器筐体、包装資材などのさまざまなポリ(L-乳酸)(PLLA)製品が市場に供給されており、PLLAは、さらなる利用用途の拡大や普及の拡大が見込まれている。そのため、それらに伴って発生する大量のPLLA廃材の処理を考慮する必要がある。「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に向かない生活衛生資材や包装資材などは、埋め立て、焼却および堆肥化の提案がなされているのみである。埋め立て、焼却および堆肥化の他、そのようなPLLAは、嫌気性消化リアクターにおいてメタンガスに転換して、エネルギーとして利用することも可能である。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¹⁾、PLLAの化学的加水分解を促進させ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)を適切に調整することによって、高温嫌気性消化リアクターにおいて連続的なメタン生成を達成した¹⁾。硫酸塩非存在下における高温嫌気性消化リアクターでは、PLLAから加水分解された乳酸は、ホモ酢酸菌や乳酸酸化共生細菌のような乳酸酸化細菌によって利用されて酢酸や水素が代謝される。その後、メタン生成アーキアによって、酢酸や水素はメタンに転換される。特に、PLLAから加水分解された乳酸を利用する乳酸酸化細菌は、ポリ乳酸を処理する高温嫌気性消化リアクターの最初の微生物反応に関わる微生物群であり、その多様性、生態および生理学的特性の解明は、当該リアクターの処理メカニズムの理解にとって極めて重要である。しかしながら、現在のところ、当該高温嫌気性消化リアクターにおける乳酸酸化細菌群の情報はほとんどな

い。そのため本研究では、培養法によって、PLLAを唯一の基質とした高温嫌気性消化リアクター内の乳酸酸化細菌の実体を明らかにすることを目的とした。さらに本研究では、分離した乳酸酸化細菌の生理学的・遺伝学的特徴を明らかにしたので報告する。

2. 実験方法

本研究では、 M_w と X_c を調整したPLLAを処理する高温(55℃)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 $0.5 \sim 2.0 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ および水理学的滞留時間 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る。

次に、55℃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、上述したリアクター内の嫌気性消化汚泥を植種源とした乳酸酸化細菌の希釈集積培養を行った。集積培養系内の微生物は、16S rRNA 遺伝子クローニング法により調査した。その後、抗生物質を添加したロールチューブ法によって、乳酸酸化細菌の分離を行った。得ら

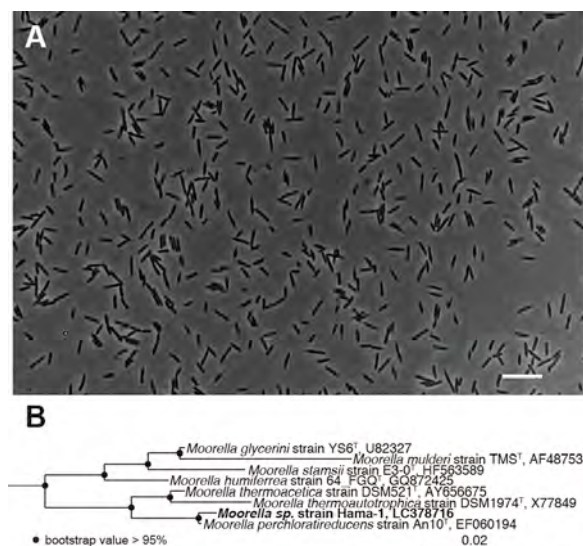


図1 分離した乳酸酸化細菌 Hama-1 株の(A) 位相差顕微鏡写真 (bar= 10μm) と(B) 分子系統学的位置

キーワード 高温嫌気性消化、ポリ乳酸、化学的加水分解、乳酸酸化細菌、*Moorella* 属細菌

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: 0532-44-6906

れた分離株の純粋性は、分離株の 16S rRNA 遺伝子に特異的な DNA プローブによる Fluorescence *in situ* hybridization 法や数種の基質を用いた培養法によって評価した。16S rRNA 遺伝子やゲノム上のハウスキーピング遺伝子をもとに、分離した乳酸酸化細菌の分子系統学的位置を決定した。さらに本研究では、生育温度、生育 pH および基質利用性など、分離株の詳細な生理学的特徴を調査した。分離株の乳酸酸化能や代謝産物は、液体クロマトフィーやガスクロマトグラフィーにより評価した。分離株のドラフトゲノム配列は、全ゲノムショットガンシーケンス法により決定した。ドラフトゲノム配列のアノテーションは、Prokka プログラム²⁾を用いて行った。

3. 実験結果と考察

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 種の微生物を含む集積培養系の構築に成功した。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、集積培養系内の優占種は、フィルミクテス門に属する *Moorella* 属細菌であった。

さらに本研究では、既存の *Moorella* 属細菌が耐性を有するストレプトマイシンを添加した希釈培養法とロールチューブ法を繰り返すことで、集積培養系内の *Moorella* 属細菌の分離を行った。その結果、長さ 6.3 μm 、幅 0.8 μm を示す桿菌 (Hama-1 株) を分離することに成功した (図 1-A)。16S rRNA 遺伝子を基にした分子系統解析は、分離した Hama-1 株の近縁種は、*Moorella perchloratireducens* であり、16S rRNA 遺伝子の相同性は 99.6%であることを示した (図 1-B)。一方、ゲノム上のハウスキーピング遺伝子を基にした分子系統解析では、Hama-1 株は、*M. perchloratireducens* よりも *Moorella thermoacetica* や *Moorella thermoautotrophica* と近縁であることを示した。

Hama-1 株の詳細な生理学的特徴を調査したところ、*M. perchloratireducens* と比較して、生育温度範囲、生育 pH 範囲や基質利用性などの形質が異なっていた。特に、*M. perchloratireducens* は、乳酸および H_2/CO_2 を炭素源およびエネルギー源として利用できないが³⁾、Hama-1 株は、これらの基質を利用して酢酸のみを代謝産物として生成できた (図 2)。従って、これらの分子系統解析や生理学的特徴は、Hama-1 株が、

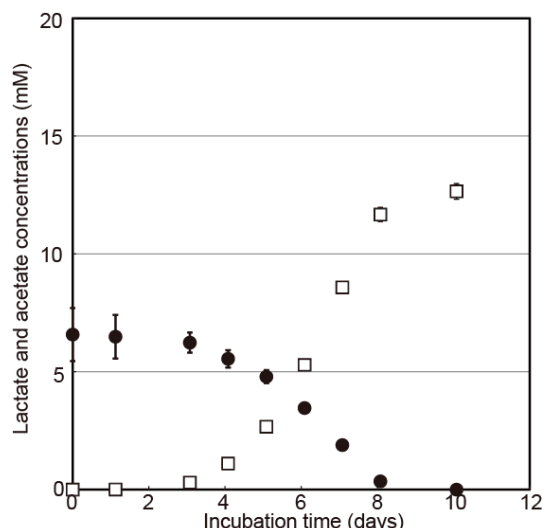


図 2 乳酸および酵母抽出液を添加した液体培地 (pH 7.0) における分離した Hama-1 株による乳酸濃度 (●)と代謝された酢酸 (□) 濃度の変化。

Moorella 属の新種であることを強く支持していた。

次に、本研究では、Hama-1 株のドラフトゲノム配列を決定した。その結果、Hama-1 株のドラフトゲノムは、 H_2/CO_2 から酢酸を生成する Wood-Ljungdahl経路のカルボニルおよびメチル分枝を触媒する酵素をコードする全ての遺伝子を有していた。また、Hama-1 株のドラフトゲノムは、乳酸から酢酸生成に関わる酵素をコードする全ての遺伝子も保有していた。これらの生理学的特徴や遺伝学的特徴は、Hama-1 株がホモ酢酸菌であり、高温嫌気性消化リアクターにおいて、ポリ乳酸から加水分解された乳酸を基質として酢酸を生成する反応を担っていることを示していた。

謝 辞

本研究の一部は、科研費基盤研究 B (17H03333) および科学技術振興機構 A-STEP 探索タイプの支援により行った。ここに深謝の意を表する。

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): 105-109 (2016)
- 2) Seemann T., Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30: 2068-2069 (2014)
- 3) Balk M., van Gelder T., Weelink S.A., Stams A.J.M., (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella perchloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage. Appl. Environ. Microbiol. 74: 403-409 (2008)