



## 第8回 微生物による生分解性プラスチック製造

藤木哲也

株式会社カネカ GP 事業開発部総括グループ 〒530-8288 大阪市北区中之島 2-3-18

### Biodegradable plastic production by microorganism

Tetsuya Fujiki

Strategic Planning & Administration Group, GP Business Development Division, Kaneka Corporation  
2-3-18, Nakanoshima, Kita-ku Osaka 530-8288, Japan

#### 1. はじめに

「化学工業統計」(経済産業省)によると、ここ数年に国内で生産されているプラスチックは、年間約1,200万トン程度であることから毎年膨大な量が廃棄されていると推定される。これらの大量廃棄物による埋め立て処分場の不足や環境汚染問題が各地で深刻化・表面化して久しい。また、これらの廃棄物の焼却によって放出される地球温暖化ガス(CO<sub>2</sub>)も社会問題となっている。

「バイオプラスチック」とは、再生可能資源(バイオマス)を原料とする「バイオマスプラスチック」と、微生物によって自然環境中で生分解される「生分解性プラスチック」を合わせた総称である。バイオマスプラスチックでは生分解性の有無は問われず、生分解性プラスチックでは原料の由来は問われない。微生物が産生する生分解性プラスチックは両者に分類される。

European Bioplasticsの推定によると生分解性プラスチックの世界の生産能力は2009年23万トン、2011年49万トンであるが、2016年には78万トンと推定されており、一時的にリーマンショックの影響を受けたが毎年20%以上の伸びが予測されている。これまで生分解性プラスチックは廃棄物や環境汚染といった課題の解決策の一つとして開発されてきたが、現在では更に温室効果ガスの削減といった視点から環境調和型生分解性プラスチックが強く求められるようになった。

当社は、バイオマス由来の生分解性プラスチックが廃棄物問題や環境問題に加えて温室効果ガス削減といった課題解決にも貢献できると考え、循環型社会の構築を目指して微生物産生ポリエステルの実用化に向けた取り組みを行っている。本稿では、微生物が産生する生分解性プラスチックの1種であるポリヒドロキシアルカン酸の例として当社の生分解性プラスチックの生産系開発を中心に紹介する。

#### 2. ポリヒドロキシアルカン酸とは

1920年代に仏バスターール研究所のLemoigneがポリヒドロキシアルカン酸(以下PHA)の一種であるポリヒドロキシ酪酸(以下PHB)を見出したが、その後の研究により、多くの微生物が菌体内に種々の構造のPHAを蓄積することが明らかになった。PHAは熱可塑性高分子であり、かつ環境中では炭酸ガスと水に分解されることから環境調和型プラスチックとして種々の応用が期待されてきた。PHAは主にC4、C5のR-3-ヒドロキシアルカン酸から成るshort-chain-length PHA(以下scl-PHA)と、C6~C16のR-3-ヒドロキシアルカン酸から成るmedium-chain-length PHA(以下mcl-PHA)に分類される。これらのうちscl-PHAについては優れた研究開発が行われ、1990年代には英国企業によって製品化されたが(Biopol®)、高価格、硬質という物性から適用用途が限られ、事業的な成功には至らなかった。

### 3. カネカバイオポリマー AONILEX® 生産系の開発

#### 1) 開発の経緯

当社は土壌細菌の1種である *Aeromonas caviae* FA440 が脂肪酸や植物油を炭素源として R-3-ヒドロキシ酪酸(以下 3HB)と R-3-ヒドロキシヘキサ酸(以下 3HHx)の共重合ポリエステル P(3HB-co-3HHx) (以下 AONILEX®) を生産することを見出した (Shimamura *et al.*, 1994). 図1に示したように, AONILEX® は scl-PHA と mcl-PHA の中間の構造を有しており, 図2のように 3HHx 組成比により硬質から軟質まで幅広い物性を示すことから, 先に開発された scl-PHA よりも広範な用途に適用できると考えた.

天然の AONILEX® 生産株である *A. caviae* は, 種々の培養条件検討にもかかわらずその生産性が著しく低く (10 g/l), 工業生産に適した株ではなかった. しかしながら, Fukui & Doi (1997) によって *A. caviae* FA440 より PHA 合成酵素遺伝子 (以下 *phaC*) や エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子等がクローニングされたことから AONILEX® 高生産株育種の可能性が得

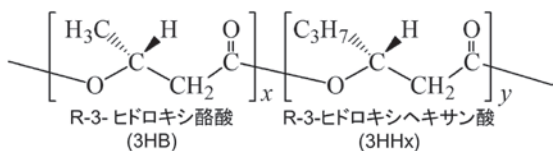


図1 AONILEX® の化学構造

- + 3HB, 3HHx モノマーから成る脂肪族ポリエステル共重合体
- + 3HH 組成比 (y) が増えるに連れて結晶化度が低下
- + 融点: 100 ~ 160°C
- + 分子量 (Mw): 30 万 ~ 90 万

られた. 我々は, 数千トン~数万トンの規模での工業生産を念頭に AONILEX® 生産株の育種を開始した.

#### 2) AONILEX® 生産菌株宿主の検討

*Cupriavidus necator* (旧名 *Ralstonia eutropha*) は PHB を高含量 (80 ~ 90%) で蓄積する菌株として知られており, 前述した Biopol® (R-3-ヒドロキシ酪酸 (以下 3HB) と R-3-ヒドロキシシ草酸 (以下 3HV) の共重合ポリエステル PHBV) の生産株として利用された実績がある. この菌株における PHB や PHBV を高含量蓄積する能力は AONILEX® 生産にも有効と考えた. またこの菌株は植物油を高効率に資化することができるので, AONILEX® 合成酵素の基質である R-3HB-CoA, R-3HHx-CoA の供給にも適している. 加えて全ゲノム配列が報告されていることも菌株の分子育種にとって大きなメリットであった (Pohlmann *et al.*, 2006).

#### 3) 炭素源の検討

我々は PHB 合成酵素活性を欠失した変異株 *C. necator* PHB-4 に *A. caviae* 由来の *phaC* 等を形質転換し, 種々の植物油を炭素源として培養した. その結果, 乾燥菌体重量 80 ~ 110 g/l, AONILEX® 含量 60 ~ 70% を示し, 培養液当たりの AONILEX® 生産量は 60 ~ 70 g/l であった (表 1).

生産される AONILEX® の 3HHx 組成は炭素源として用いた植物油種によって変化し, コーン油, 大豆油といった比較的長鎖脂肪酸含量の高い植物油では 3HHx 組成は低く (約 3% : 硬質), 中鎖脂肪酸含量の高いヤシ油では高 3HHx 組成 (13.8% : 軟質) を示すことが明らかとなった. *C. necator* はアセチル-CoA

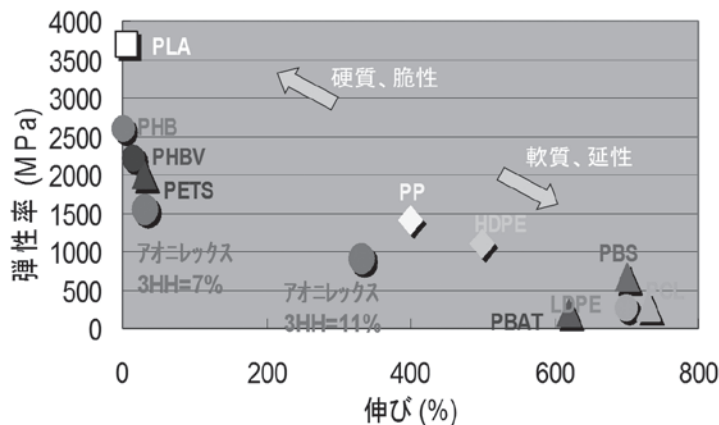


図2 種々の樹脂の弾性率と伸びの相関

二酸化酵素, アセトアセチル-CoA 還元酵素を保有しており, 2分子の acetyl-CoA から R-3HB-CoA を合成することができる (図3). このため AONILEX<sup>®</sup> の基質である R-3HB-CoA は脂肪酸代謝経路である  $\beta$ -酸化経路の中間体(S体は菌体内でR体に変換される)に加えて前記の二酸化経路からも供給される. 長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸では R-3HHx-CoA に対して生産される acetyl-CoA のモル当量が異なることから, 長鎖脂肪酸を高含有する植物油を炭素源とすると菌体内の R-3HB-CoA 濃度が上昇し, 結果として低 3HHx 組成の AONILEX<sup>®</sup> が生産されると解釈される. しかし, 実際には 3HHx 組成だけでなく, 生産性, 分子量等も植物油の種類・流加速度, 培地成分, 通気・攪拌といった培養諸条件と複雑に関連していることが分かった.

#### 4) プラスミドの検討

当初, 我々が遺伝子導入に用いたプラスミドは, *C. necator* PHB-4 用として一般的に用いられていた pJRD215 に *phaC* 等を挿入したものであった.

表1 油脂種による生産物への影響

油脂種	乾燥菌体重量 (g/l)	AONILEX 生産量 (g/l)	3HHx 組成比 (mol%)	分子量 (万 Mw)
大豆油	98	62	3	168
綿実油	88	56	2.5	125
菜種油	86	52	2.7	142
コーン油	103	68	2.7	182
パーム W オレイン油	100	62	3	167
ピーナッツ油	90	45	4.6	73
ヤシ油	66	34	13.8	146
パーム核油	86	48	6.8	73
パーム核油オレイン	108	71	5	187

培養条件 (10l ジャー, 攪拌 400 rpm, 通気 0.6 vvm, pH 6.8, 温度 28°C)

pJRD215 は広宿主域プラスミド RSF1010 由来のベクターであり自己伝達性はないが, 接合伝達に関与する遺伝子群 (*mobABC*, *oriT* 等) を保有している. 遺伝子組換え菌を用いた工業的物質生産において有利な第二種使用等拡散防止措置確認 (GILSP 確認) の取得には, 接合伝達能の無いプラスミドが必要であった. また *C. necator* PHB-4 株において AONILEX<sup>®</sup> 生産性が充分ではなかった原因の一つとして pJRD215 の不安定性が挙げられた. pJRD215 にコードされる抗生物質耐性遺伝子に対応したカナマイシンを添加した条件下では安定だが, カナマイシン非存在下では徐々に pJRD215 は菌体内から排除 (脱落) していく現象が認められた. 研究室レベルでは抗生物質の使用は可能であるが, 工業的規模での培養では培地コスト及び培養廃液処理の観点から使用することはできない. 我々は *C. necator* の類縁株 *C. metallidurans* が保有するメガプラスミド pMOL28 複製開始領域やプラスミドの安定化に関与する領域等を用いて, 非選択圧条件下でも安定に維持・複製されるプラスミド pCUP2 (図4) を開発した (佐藤, 2007). 種々の検討により *phaC* 等を挿入した pCUP2 を保有する *C. necator* の生産能力は *A. caviae* と比べると飛躍的に向上した. AONILEX<sup>®</sup> 生産・蓄積状況の電子顕微鏡写真を図5に示す.

#### 4. AONILEX<sup>®</sup> の生分解性

一般的に微生物産物である PHA は優れた生分解性を示すことが知られている. 国内における主要な生分解性プラスチックの用途として農業用マルチフィルムがある. 当社で試作したマルチフィルム (主原料 AONILEX<sup>®</sup>) を用いたフィールドテストでは, 敷設性・生分解性・鋤き込み性は市販品 (石油由来の生分解性プラスチック製) と比較して特に問題なく良好な

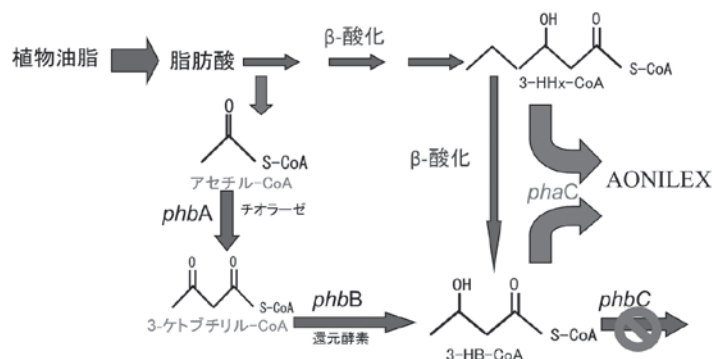


図3 AONILEX<sup>®</sup> 生合成経路

レベルであった。

AONILEX<sup>®</sup> は図6に示すように、嫌氣的条件下、好氣的条件下、コンポスト化条件下のいずれにおいても優れた生分解性を有することを確認している。その結果、AONILEX<sup>®</sup> は日本バイオプラスチック協会が認定する生分解性プラスチックとしてグリーンプラのポジティブリストに登録されているほか、欧州においても OK compost, OK compost Home の認証を受けている。

5. 実証設備による AONILEX<sup>®</sup> の試験生産

AONILEX<sup>®</sup> の実用化に向けた取り組みにおいて、これまでに AONILEX<sup>®</sup> 生産株の育種、培養諸条件の確立、精製法の構築、樹脂加工技術開発を進め、工業化への一応の目処を得ることができた。製造技術のスケールアップ検証や更なる樹脂加工技術開発と開発用樹脂確保を目的に、独立行政法人科学技術振興機構の委託開発を受託して実証生産設備（生産能力：約1,000 トン/年）を兵庫県高砂市の当社工場内に建設し2011年春から本格稼働している。

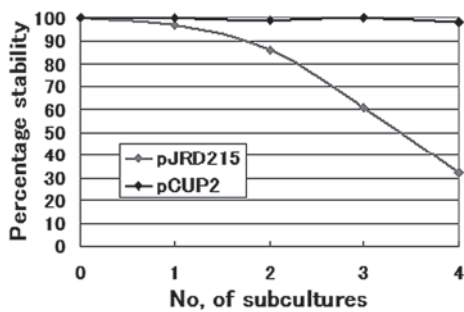


図4 プラスミドの安定性比較

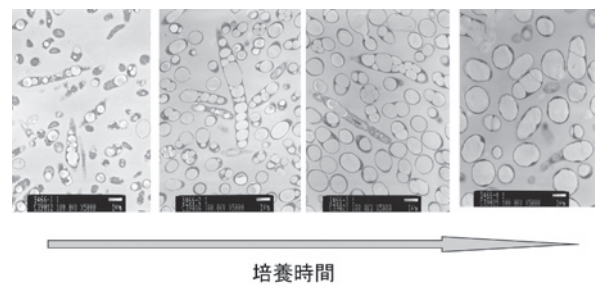
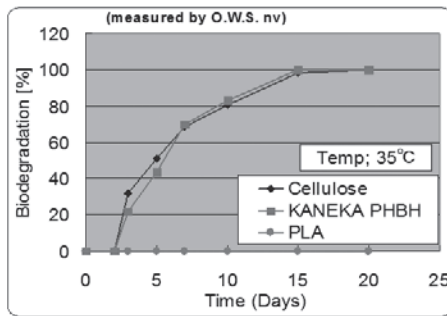
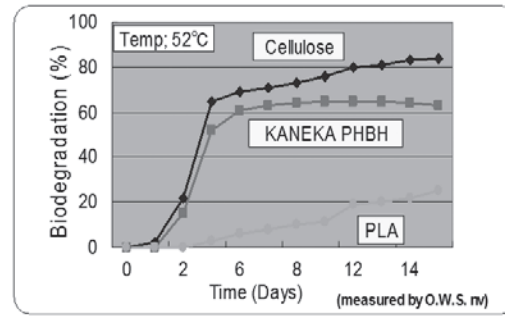


図5 C. necator の AONILEX<sup>®</sup> 蓄積状況

嫌気条件

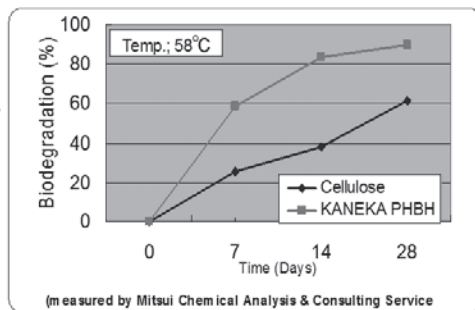


ISO14853 (aqueous phase)

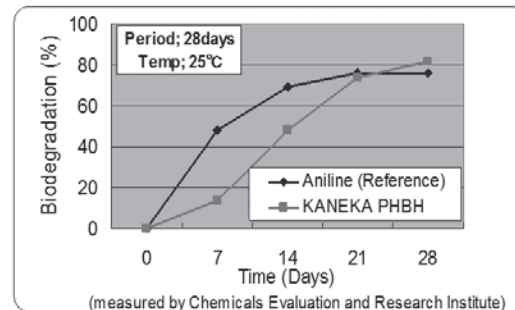


ISO15985 (solid phase)

好気条件



ISO14855 (compost)



ISO14851(activated sludge)

図6 AONILEX<sup>®</sup> の生分解性

## 6. 終わりに

現在約 71 億人の世界人口は 2050 年には 90 億を超えるかと推定されており、食糧不足が深刻化することが予想されている。特に欧州においては生分解性プラスチックに関しても単なるバイオマス由来というだけでなく、食糧と競合しない非可食バイオマスへの原料転換が求められつつある。当社としてもこの要望に応えるべく検討し、非可食バイオマスを炭素源としても食用植物油の場合と同等の生産性・物性が得られる技術的な目処を付けている。

また欧州では生ゴミをコンポスト処理（堆肥化）することが一般的になり、生分解性プラスチックを使用した生ゴミ回収袋（コンポストバッグ）が普及してきている。更に近年の欧州各国ではコンポストバッグ等の生分解性バッグのバイオマス由来度を 50% 以上にしなければならない法律が施行されつつある。このような状況は好氣的及び嫌氣的条件下での生分解性に優れた AONILEX® の特徴を活かせる用途と考えられ、AONILEX® 開発にとっては大きな追い風となると期待している。

## 文献

- Shimamura, E., Kasuya, K., Kobayashi, G., Shiotani, T., Shima, Y. & Doi, Y. 1994. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* **27**: 878-880.
- Fukui, T. & Doi, Y. 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4821-4830.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitingen, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbuchel, A., Friedrich, B. & Bowen, B. 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol.* **24**: 1257-1262.
- 佐藤俊輔 2007. 特願 2007-542665.