

学位論文の要旨

生分解性ポリエステル環境分解性と材料寿命制御

(Biodegradability control of aliphatic polyesters based on their environmental degradability)

氏名 鈴木 美和 印

プラスチック廃棄物が引き起こす環境汚染問題の解決策として、生分解性高分子が注目されている。一方で、多くの生分解性高分子の環境分解性は、曝露環境に依存する。また、現在市販の生分解性高分子では、その生分解速度および分解開始時期が制御されていない。これらのことは、生分解性高分子の普及を妨げている要因でもある。理想的な生分解性高分子には、使用期間中、機械的強度を保ち、不要時あるいは廃棄時に速やかに生分解されることが望まれる。

本博士論文では、分解開始時期および分解速度が十分に制御された生分解性高分子を、時限生分解性高分子と定義つける。一方、ある環境中で極端に分解速度が遅い生分解性高分子を、その環境中での潜在的な生分解性高分子と定義つける。

潜在的な生分解性高分子に何らかの生分解トリガーを与えることで、潜在的な生分解性高分子の分解開始時期や分解速度を制御できると考えられる。そこで、本博士論文では、土壌、淡水中で生分解速度が大きく、海水中での生分解速度が極めて低い化学合成生分解性高分子であるポリエチレンスクシネート(PESu)に着目した。つまり、PESuは海水中では潜在的な生分解性高分子として振る舞う。しかし、PESuが海水中で生分解速度が極めて遅い原因はわかっていなかった。

第2章では、PESuが微生物産生脂肪族ポリエステル(PHA)分解酵素である、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]分解酵素によって酵素加水分解されることに着目し、PESuとP(3HB)の環境分解性が異なる原因を、詳しく調べた。P(3HB)分解微生物は、環境を問わず存在しているものの、PESu分解微生物は、海水中からは検出されなかった。また、P(3HB)分解細菌として単離された全ての株が、PESuを分解しなかった。一方で、PESu分解細菌の大部分は、*Bacillus*属であった。この*Bacillus*属のPESu分解細菌は、P(3HB)を分解しなかった。これらのことから、PESuがP(3HB)と異なり海水中で生分解されない原因は、PESuがP(3HB)分解細菌にとってのP(3HB)分解酵素誘導物質として機能しないためであり、加えてPESu分解細菌の属種および環境中の分布の偏りにあることがわかった。

第3章では、PESuが化学合成脂肪族ポリエステルであるポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)と同一の酵素(クチナーゼ)および微生物種により分解される性質に着目し、海洋環境から単離したPCLおよびPESu分解細菌TKCM64株の特徴づけを行い、これに基づきPESuとPCLの海水中での環境分解性の差が生じる原因を考察した。TKCM64株は、*P.*

pachastrellae に近縁な細菌種であった。本株は、PCL を $1.39 \pm 0.09 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$ の速度で分解した。これに対して、本株は、PESu を、PCL 分解速度の 1/50 の速度でしか分解できなかった。また、各種炭素源存在下での菌体増殖レベルと、その培養上清の PCL および PESu 分解活性との関係を調べたところ、本株は、PCL、PCL 加水分解物(6-ヒドロキシヘキササン酸)および主要なクチン構成物(16-ヒドロキシヘキサドデカン酸)の存在下で、菌体増殖と PCL 加水分解酵素の生産誘導が見られた。一方、PESu および PESu 構成物であるエチレングリコールの存在下では、菌体増殖および培養上清の PCL 分解活性が見られなかった。また、各培養上清の PESu 分解活性は、PCL 分解活性と比較して極めて小さかった。これらのことから、本株が生産するポリエステル加水分解酵素は、PCL に対して基質特異性が大きく、他方 PESu に対して小さいことがわかった。これらを総合的に判断すると、高い PCL 分解活性を有する TKCM64 株は、海洋中での PESu の分解には関与していないことが推定される。

第 2 章の結果から、PESu の主たる分解者が *Bacillus* 属の細菌であることがわかった。また、第 2 章および第 3 章で、海水中での PESu 分解速度が極めて低い原因を明らかにした。*Bacillus* 属細菌は芽胞と呼ばれる PESu の融点以上で耐熱性をもつ細胞形態をとる。この高い耐熱性から、PESu 分解細菌の芽胞は、生分解トリガーとして利用可能であると考えた。そこで、第 4 章では、*Bacillus* 属細菌の芽胞と海洋環境中での潜在的な生分解性高分子である PESu に着目し、これらを用いて海洋環境中での時限生分解性高分子の創製を検討した。海砂中から、PESu 分解活性を有する芽胞形成細菌、YKCMOA1 株を単離した。本株は、人工海水中で、PESu を、 $141 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$ の速度で分解した。遺伝系統学および生化学的解析の結果、YKCMOA1 株は *Bacillus pumilus* に近縁な種であることがわかった。本株の芽胞は、 110°C で耐熱性を持ち、YE およびアスパラギンとカラメル混合物を含む人工海水中で発芽することがわかった。本株の芽胞を含有した PESu フィルムは、人工海洋環境および実際の海水中で、分解することがわかった。以上より、芽胞を利用することで、海洋中での PESu の分解促進の可能性を示した。

第 5 章では、本博士論文の総括を行い、今後の展開について述べた。本博士論文では「潜在的な生分解性高分子」に、生分解を開始させる環境を与えることで、「時限生分解性高分子」を創製した。この潜在的な生分解性高分子候補は、PESu 以外にも存在している。そこで、各ポリエステルの環境分解性を、その環境中の菌叢や菌のポリエステル分解活性と共に考察する必要がある。また、芽胞による分解開始時期の制御方法以外の手法として、生分解性高分子加水分解酵素誘導物質の導入を提案した。これにより、高分子の流出環境中の微生物の活性により分解が開始される時限生分解性高分子が創製可能となる。

Microbial degradation of biodegradable plastics is a promising solution for reducing environmental pollution by plastic debris. However, the environmental biodegradability of biodegradable plastics depends on the type of environment. Furthermore, the rate and start time of the biodegradation are difficult to be controlled. For these reasons, biodegradable plastics are not generally used. Ideally, a biodegradable plastic should maintain its mechanical properties during use and undergo rapid biodegradation after its use.

In this thesis, I define “timing-biodegradable plastics” as biodegradable plastics with a fully controllable biodegradation rate and biodegradation start time. I also define “potentially biodegradable plastics” as biodegradable plastics that do not biodegrade in specific environments. When mixed with biodegradable triggers, potentially biodegradable plastics might biodegrade. It is expected that timing-biodegradable plastics can be prepared from potentially biodegradable plastics and biodegradable triggers.

To prepare timing-biodegradable plastics in seawater, I focused on poly(ethylene succinate) (PESu) because this polymer biodegrades much more slowly in seawater than in soil and freshwater, so qualifies as a potentially biodegradable plastic in seawater. However why the biodegradation rate of PESu is extremely slow in seawater has not been investigated.

In Chapters 2 and 3 of this thesis, I reveal the cause of the low biodegradability of PESu in seawater. In Chapter 4, I isolate PESu-degrading spore forming bacteria in a marine environment and prepare a timing-biodegradable plastic in seawater. The preparation comprises PESu with PESu-degrading spore forming bacteria as the biodegradable trigger.

PESu was degraded by poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) depolymerase *in vitro*. Whereas P(3HB) biodegraded well in all environments, PESu hardly biodegraded in a marine environment. To understand the different environmental degradabilities of PESu and P(3HB), I investigated the distributions of P(3HB)- and PESu-degrading microbes in various environments. P(3HB)-degrading microbes existed in all environmental samples collected for this study, but PESu-degrading microbes were never detected in marine environments. None of the bacterial isolates that were screened for P(3HB)-degrading activity in their various environments could degrade PESu, suggesting that PESu does not induce the production of bacterial P(3HB) depolymerase, and that P(3HB)-degrading bacteria are not involved in PESu biodegradation in actual environments. The PESu-degrading bacteria isolated from the study environments belonged to the phyla Firmicutes and Proteobacteria. Most of the PESu-degrading isolates belonged to the genus *Bacillus*. Moreover, most of them could not degrade P(3HB), suggesting that PESu is not degraded by P(3HB) depolymerase in actual environments. Collectively, these results might explain the low biodegradability of PESu in marine environments.

Both the PESu and poly(ϵ -caprolactone)(PCL) polymers can be degraded by the same cutinase like enzyme and by the same microbes. In Chapter 3, I noted this fact and isolated PCL and a PESu- degrading bacterium (strain TKCM 64) from coastal seawater. After characterizing the strain and identifying its properties, I discussed why the environmental degradability differs between PESu and PCL in seawater. Strain TKCM 64, which is closely related to *Pseudomonas pachastrellae*, degraded PCL film at a rate of $1.39 \pm 0.09 \text{ mg cm}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$, but degraded PESu film at only 1/50 the PCL-degrading rate. In the presence of PCL and its hydrolysate,

6-hydroxyhexanoic acid (6HH), supplemented by a major component of cutin (16-hydroxyhexadecanoic acid), the strain grew well and exhibited high PCL hydrolytic activity. On the other hand, in the presence of PESu and its component (ethylene glycol), the strain failed to grow and its PCL hydrolytic activity was zero. In addition, the PESu hydrolytic activities in the supernatants of strain TKCM 64 were very much lower than the PCL hydrolytic activities. This result suggests that the polyester hydrolytic enzyme produced by TKCM64 has high substrate specificity for PCL, but low substrate specificity for PESu. Both results suggest that PCL-degrading seawater microbes (such as strain TKCM 64) are not involved in PESu biodegradation in seawater.

In Chapter 2, I assign the major PESu-degrading bacteria to the genus *Bacillus*. In Chapters 2 and 3, I also clarify why the biodegradability of PESu is low in seawater. The spores formed by *Bacillus* species have high heat tolerance, above the melting point of PESu. By virtue of their thermotolerance, spores of PESu-degrading *Bacillus* species are potentially exploitable as a biodegradable trigger additive. To test this idea, I prepared a timing-biodegradable plastic in seawater using PESu as the potentially biodegradable plastics and PESu-degrading spore-forming bacteria as the biodegradable trigger (Chapter 4). I isolated a strain of PESu-degrading spore-forming bacterium (strain YKCMOA1) that degrades PESu films at $141 \mu\text{g cm}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$ in artificial seawater. In phylogenetic and phenotypic analyses, strain YKCMOA1 proved to be closely related to *Bacillus pumilus*. The D value of strain-YKCMOA1 spores at 110°C was 27.8 min. The germination of strain-YKCMOA1 spores was started by yeast extracts and a mixture of asparagine and caramel. Spore-containing PESu film degraded in both artificial and natural seawater. Chapter 4 shows that spores can indeed be exploited as biodegradable triggers that promote the degradation of PESu in seawater.

In Chapter 5, I provided my perspectives on future developments. In this thesis, I proposed that timing-biodegradable plastics could be prepared from potentially biodegradable plastics with biological trigger system. The other candidates of potentially biodegradable plastics also exist besides PESu. Therefore, in order to understand environmental degradability of polyesters we should also discuss microbial flora and polyester degradation activity of microbes. Furthermore, induction of inducer of a biodegradable plastic hydrolase was proposed as a novel biodegradable control method. Eventually, it would be possible to prepare the timing-biodegradable plastics degraded by microbes in environments.