

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-319078

(P2007-319078A)

(43) 公開日 平成19年12月13日(2007.12.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N</b> 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 ZABA	4B024
<b>C08J</b> 11/10 (2006.01)	C12N 1/20 A	4B065
<b>C12N</b> 15/09 (2006.01)	C12N 1/20 ZNAF	4F401
<b>C12R</b> 1/10 (2006.01)	C08J 11/10	
	C12N 15/00 A	
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-152729 (P2006-152729)	(71) 出願人	304023318 国立大学法人静岡大学
(22) 出願日	平成18年5月31日 (2006.5.31)		静岡県静岡市駿河区大谷836
		(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
		(74) 代理人	100085279 弁理士 西元 勝一
		(74) 代理人	100099025 弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	徳山 真治 静岡県静岡市駿河区大谷836番地 国立 大学法人静岡大学農学部内
		Fターム(参考)	4B024 AA17 CA01 CA11 CA20 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ乳酸の分解方法及び微生物

(57) 【要約】

【課題】ポリ酸を効率よく分解可能なポリ酸分解方法及びこれに利用可能な微生物を提供する。

【解決手段】ポリ酸分解能を有する微生物バチルス・リケニフォルミス、特にバチルス・リケニフォルミスT7-2 (FERM AP-20920)、又はその破砕物を用いて、生分解性プラスチックであるポリ乳酸を分解する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリ乳酸分解能を有する微生物バチルス・リケニフォルミス又はその破砕物を用いて、ポリ乳酸を分解することを特徴とするポリ乳酸の分解方法。

## 【請求項 2】

前記バチルス・リケニフォルミスが、バチルス・リケニフォルミス T7-2 (FERM AP-20920)であることを特徴とする請求項 1 項記載のポリ乳酸の分解方法。

## 【請求項 3】

バチルス・リケニフォルミス T7-2 (FERM AP-20920)。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ポリ乳酸の分解方法及び微生物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、プラスチックの使用量が増加するにつれて、環境への配慮から天然環境下で分解可能な生分解性プラスチックの開発が進められている。例えばポリ乳酸は、水系環境下で加水分解可能な高分子であり、その分解には酵素が用いられることもある。またポリ乳酸を直接分解する微生物についてもいくつか同定されている。

ポリ乳酸分解能を有する微生物としては、例えば、土中から 30 で分離されたアミコラトプシス属放線菌、サッカロスリクス属放線菌、ストレプトマイセス属放線菌が知られている（例えば、特許文献 1～4）。また分子構造中にエステル結合を有するプラスチックの分解能を有するペニバチルス属細菌も、土中から 30 で分離されている（特許文献 5）。これらの菌は、30 4 時間程度の処理でポリ乳酸を分解する。また、特許文献 6～7 には、土中から 50 で分離されたバチルス・ズブチリス、バチルス・サーキュランス、バチルス・ステロサーモフィラス、アクチノマデュラ属放線菌、スタフィロコッカス属細菌が記載されている。これらの菌は、50 における 2 週間程度の処理でポリ乳酸を分解する。

20

## 【特許文献 1】特開平 9 - 37776 号公報

## 【特許文献 2】特開 2000 - 60540 号公報

30

## 【特許文献 3】特開 2001 - 128693 号公報

## 【特許文献 4】特開平 10 - 108669 号公報

## 【特許文献 5】特開 2004 - 166542 号公報

## 【特許文献 6】特開平 11 - 4680 号公報

## 【特許文献 7】特開平 11 - 46755 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

しかしながら、プラスチックの分解処理速度は一般に温度に依存して速くなるが、微生物の生育適温を超えると微生物による分解活性が低下する。一方、微生物のポリ乳酸の分解能は、その微生物種によって異なる。

40

従って、本発明は、ポリ乳酸を効率よく分解可能なポリ乳酸分解方法及びこれに利用可能な微生物を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明のポリ乳酸の分解方法は、ポリ乳酸分解能を有する微生物バチルス・リケニフォルミス又はその破砕物を用いて、ポリ乳酸を分解することを特徴としている。

また前記バチルス・リケニフォルミスが、バチルス・リケニフォルミス T7-2 (FERM AP-20920)であることが好ましい。

本発明の微生物は、バチルス・リケニフォルミス T7-2 (FERM AP-2092

50

0)である。

【発明の効果】

【0005】

本発明によれば、ポリ乳酸を効率よく分解可能なポリ乳酸分解方法及びこれに利用可能な微生物を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

本発明のポリ乳酸の分解方法は、ポリ乳酸分解能を有する微生物バチルス・リケニフォルミス又はその破砕物を用いて、ポリ乳酸を分解することを特徴としている。

【0007】

ポリ乳酸としては、乳酸を主成分とする重合体であればよく、ポリL-乳酸及びポリD-乳酸のようなホモポリマー、ポリL/D-乳酸、これらと他の成分から構成される共重合を挙げることができる。共重合体である場合には、乳酸成分は重量比率が10%以上のものであることが好ましい。また共重合体を構成する他の成分としては、 $\epsilon$ -カプロラクトン、グリコリド、デブシペプチド等を挙げることができる。これらの他の成分は1種であっても、2種以上であってもよい。

10

本発明によって分解可能ポリ乳酸の分子量には特に制限はないが、例えば数平均分子量10,000~100,000、分解速度の観点から好ましくは50,000~300,000とすることができる。

【0008】

本発明のポリ乳酸の分解方法に用いられる微生物は、バチルス・リケニフォルミスである。バチルス・リケニフォルミスであれば、いずれの菌株であってもよいが、特に、バチルス・リケニフォルミスT7-2株(茨城県つくば市東1-1-1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、受領番号FERM AP-20920、2006年5月22日付受領にて寄託)であることが分解活性の高さから好ましい。

20

バチルス・リケニフォルミスT7-2は、後述するように、森林土壌から、50℃の温度条件下でポリ乳酸を分解可能な微生物として分離された菌であり、グラム陽性を示し、TSB(Trypticase Soy Broth, Becton Dickinson)寒天培地、50℃で培養した栄養細胞は0.8×2~3µmの桿菌であり、楕円形の内生孢子を有する。R型のコロニーを形成し、その表面にはしわがあり、光沢はなく、ポリ乳酸の分解について優れた能力を有する。

30

【0009】

本発明に用いられる微生物は、通常用いられる条件下で培養して、維持・増殖させることができる。このような培養条件としては、pH4~10、生育速度の観点から好ましくはpH6.0~8.0のpH、40~60℃、生育速度の観点から好ましくは45~55℃の培養温度とすることができる。

本発明に係る微生物を維持可能な培養用の基本培地(以下、単に「培地」という)としては、窒素源として例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウムなど、その他無機塩類としては、例えばリン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、モリブデン酸ナトリウム、塩化マンガンなどを、それぞれ含むものであって、通常利用される固体又は液体培地であればいずれも好ましく使用できる。なお、培地には、上記成分の他、微生物の成育を促進させるための各種ビタミン、ミネラル、その他の栄養成分を含ませてもよい。

40

【0010】

本微生物は、種々の形態でポリ乳酸の分解に用いられる。このような形態としては、微生物菌体、菌体の破砕物及び微生物の培養上清などの各形態から適宜選択することができる。菌体の場合には、その培養物から遠心分離等の集菌操作によって得られる生菌体、菌体を凍結乾燥した乾燥粉末、微生物を含む培養液のいずれであってもよい。破砕物としては、物理的手段又は化学的手段によって破砕されたものであればよく、物理的手段としては、物理的手段としては、超音波粉碎機、ガラスビーズを用いた細胞破砕機などを挙げる

50

ことができ、化学的手段としては、リゾチームなどの容菌酵素を挙げることができる。物理的手段又は化学的手段を用いて菌体を破碎する場合には、それぞれ破碎物の分解活性を損なわない穏和な条件下で行うことが好ましい。培養上清としては、前述した液体培地中で微生物を培養したものであればよく、培養上清における分解活性の強さから、好ましくは培養2日目以降、更に好ましくは培養3日以降の培養上清を使用することができる。

#### 【0011】

ポリ乳酸の分解処理は、適当な形態に調製された上記微生物を、好気条件下、処理されるべきポリ乳酸と接触させることによって行われる。分解処理時のpHは、pH4～10、分解速度の観点から好ましくはpH6.0～8.0とすることができる。また分解処理時の温度は、40～60、ポリ乳酸の処理速度の観点から好ましくは45～55と

10

することができる。処理時間は、5日間～15日間、処理効率の観点から好ましくは7日間～10日間とすることができる。

また、ポリ乳酸の分解処理を行う際のポリ乳酸の形態は、フィルム(シート)、成型体、破碎物、粉末、懸濁液などを挙げることができ、これらのいずれであってもよい。また分解処理時のポリ乳酸は、上述したようなポリ乳酸単独であってもよく、他のプラスチックとの混合物であってもよい。

#### 【0012】

分解処理におけるポリ乳酸の量は、対象となるポリ乳酸の形態及び処理に用いる微生物の形態によって異なるが、本菌培養液に100mlに対して、0.1～5.0グラムとすることができる。分解速度の観点から0.5～1.0グラムとすることができる。

20

処理は、培養槽に、基本培地、処理対象のポリ乳酸、分解能を有する微生物又はその破碎物を配合した粉末、錠剤、培養液を添加することによって行ってもよく、微生物を活性汚泥及びコンポストに組み込むことによって行ってもよい。

この他、ポリ乳酸の分解に適用可能な条件としては、本発明にかかる微生物の活性を損なわない限り、既知の条件をそのまま適用可能である。

#### 【実施例】

#### 【0013】

以下に本発明の実施例について説明するが、これに限定されるものではない。

#### [実施例1]

#### 1. ポリ乳酸(PLA)を分解する微生物の分離

30

(1) 表1に示す組成のポリ乳酸(PLA)含有基本培地を400ml調製し、それを等量に分け、一つには寒天を6g添加し加熱滅菌(120、20分間)する。加熱滅菌後、寒天を添加していない培地に16mlのジクロロメタンで溶解したPLA(レイシアH400、住友化学)を加え、超音波破碎機を用いて十分に乳化(10分間)させた。この乳化したPLAを、寒天を添加した培地に加え十分攪拌後、シャーレに分注し、PLA乳化寒天培地を作製した。

#### 【0014】

#### 【表1】

成分	量(質量/容量)
ポリ乳酸*	0.10%
酵母エキス	0.10%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.40%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.20%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10%
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.05%
寒天	1.50%

40

pH7.0

\*レイシアH400(住友化学)

50

## 【 0 0 1 5 】

(2) 森林土壌から、マイクロスパーテルを用いて少量の土壌サンプルを採取し、試験管に分注してある3mlの滅菌水に懸濁する。次に超音波洗浄機で試験管を30秒間処理して、さらに攪拌機を用いて十分(3分間)に懸濁する。この懸濁液0.1mlを、上記PLA乳化寒天培地に塗抹し、50℃で培養した。この結果、寒天培地上にPLA分解によるクリアゾーンを形成する微生物T7-2株を得た。

## 【 0 0 1 6 】

## 2. 微生物の同定

分離菌株(T7-2)をTSB(Becton Dickinson)平板培地に画線し、50℃にて24時間培養した。コロニーを楊枝でピックアップし、20μlの滅菌蒸留水に懸濁した。楊枝の先で、押しつぶしながら混ぜ、180μlのInstaGene Matrix(BIO-RAD社製)を加えた。手で軽く攪拌し、100℃で15分間加熱した。加熱後、10秒間以上攪拌し、12,000rpm(13,000×g)で2~3分間遠心した。上澄み20μlを50μlスケールのPCRプレートとして用いた。

10

## 【 0 0 1 7 】

T7-2株の16S rDNA遺伝子の増幅は、後述する表4に記載した9F(配列番号1)及び1541R(配列番号2)をプライマーとして行った。サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Standard(タカラバイオ株式会社)を使用した。ポリメラーゼには、Hot Star Taq DNA polymerase(株式会社キアゲン)を使用した。反応液の組成は以下のとおりとし、PCR反応を、96℃5分間を1サイクル、97℃45秒間、50℃30秒間、74℃1分間の一連の処理を5サイクル、96℃45秒間、50℃30秒間、74℃1分間の一連の処理を25サイクルとして行い、PCR産物は、PCR Purification Kit -Spin Type-(BIONEX社製)を用いて精製した。

20

## 【 0 0 1 8 】

## 【表2】

## 反応液の組成

Hot Star Taq	0.5μl
×10 Buffer	10μl
dNTPs Mixture (2 mM each)	10μl
Templete DNA (10 ng/μl)	5μl
Primer 9F (25 pmol/μl)	2μl
Primer 1541R (25 pmol/μl)	2μl
Sterilized Water	70.5μl
<b>Total</b>	<b>100μl</b>

30

## 【 0 0 1 9 】

DNAシーケンスはダイターミネーター法により行った。塩基配列の決定には、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer(Applied Biosystems社)を使用した。サイクルシーケンス、シーケンス産物の精製、シーケンス条件についてはマニュアルの方法に従い、以下の方法で行った。

40

## (1) シーケンスサンプルの調製

シーケンスサンプルの調製は、専用キットBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社製)を使用し、シーケンスには、表4に記載した9F、785F(配列番号3)、802R(配列番号4)を使用した。サイクルシーケンス条件及びサンプル調製方法はマニュアルの方法を一部改変し、表3に示す反応液を用いて、PCR反応を行った。PCR条件は、96℃1分間を1サイクル、96℃10秒間、50℃5秒間、60℃4分間の一連の処理を25サイクルとした。

## 【 0 0 2 0 】

【表 3】

## 反応液の組成

Terminator Ready Reaction Mix		2 $\mu$ l
×5 BigDye Sequencing Buffer		1 $\mu$ l
Primer	(4 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Template DNA	(30 ng)	1 $\mu$ l
Sterilized Water		5.5 $\mu$ l
Total		10 $\mu$ l

10

【0021】

【表 4】

5→3	9F	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG
	785F	5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTC
3→5	1541R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC
	802R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC

【0022】

## (2) シークエンシングサンプルの精製

上記で得られたサンプルに、Clean SEQ (Agencourt社製) 10  $\mu$  l を混ぜながら添加した。62  $\mu$  l の85%エタノールを添加して、ピペティング後、磁気プレート上に置き、3分間静止した。透明になっていることを確認して溶液を廃棄した。85%エタノールを100  $\mu$  l 添加し、30秒静置した。溶液を廃棄し、同操作を繰り返した。37 で10分間インキュベートし、0.1 mM EDTA (pH 8.0) を40  $\mu$  l 加えて、5分間静止した。

20

【0023】

16 S rDNA 部分塩基配列の決定および系統解析は以下のとおりに行った。各プライマーから得られた塩基配列は、Genetix-ATGC ver.10.1 (Software development 社製) で編集し、16 S rDNA 部分塩基配列を決定した(図1)。決定された塩基配列を、大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 日本DNAデータベース (DDBJ : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) よりBLAST検索を行った。BLAST検索の結果から、T7-2株はパチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) と推定した。

30

【0024】

## 3. T7-2株によるPLA分解

上記で得られたT7-2株のPLA分解能を調べた。上記1で使用したPLA乳化寒天培地に、T7-2株を移植し、50 で5日間培養した。結果を図2に示す。50 5日間後の培地には、T7-2株による直径約3.1センチのクリアゾーンが形成された。

また、50 3日間の培養では、T7-2株はPLA乳化寒天培地上に直径約2センチのクリアゾーンが形成した。従来のPLA分解活性性微生物(ストレプトアロテイクス・ヒンズスタヌス、サッカロモノスポラ・アズレア、キブデロスポランギウム・アリズム、サッカロポリスポラ・エリスラエ、サッカロポリスポラ・ホルデイ、ストレプトアロテイクス・ヒンズスタヌス、レントゼア・アルピドカピラタ、アクチノキネオスポラ・リパリア、アクチノポリスポラ・ハロフィラ、アクチノポリスポラ・モルチバリス、アクチノマデュラ・ビリディス、ストレプトマイセス・ピオアセウスニガー、ストレプトマイセス・シアネス、アミコラトプシス・メディテラネイ) が同程度のクリアゾーンを形成するのに2週間かかることから、T7-2株によるPLA分解活性は従来の菌株よりも優れていることがわかる。

40

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 本発明の T 7 - 2 株の 1 6 S r D N A 部分塩基配列である。

【 図 2 】 本発明の T 7 - 2 株による P L A 分解活性を示す写真である。

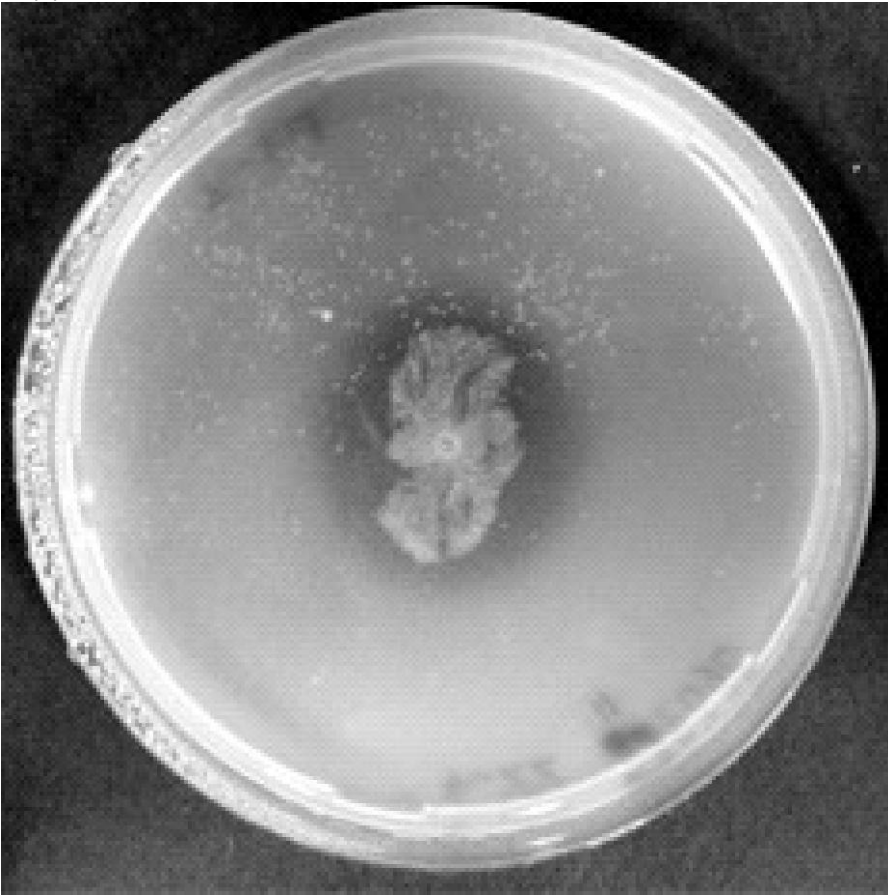
【 図 1 】

```

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagangg gaacttgcctc 60
cctgatglla gcgcgggacg ggtagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat 120
gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagangg gaacttgcctc 60
cctgatglla gcgcgggacg ggtagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat 120
aaciccggga aacccgggct aataccggat gcttgttga acgcctggt tcaaatataa 180
aagttggcct ttactacca ettaacagatg gaccocgggc gcattageta gtttggtagg 240
taacggctca ccaagcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtagtcgg ccacaetggg 300
actgagacac gccccagact cctaccggag gcagcagtag ggaatctcc gcaatggacg 360
aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaagttt tccgactgta aaactctgtt 420
gttagggag aacaagtaac gttcgaatag ggcgtacct tgacgttacc taaccagaaa 480
gccacggcta actacgtcc agcagccgcg gtaataccta ggtggcaagc gttgtccgaa 540
attattgggc gtaaacgcgc cgcagggcgt ttcttaagtc tgatgtgaaa gcccccggct 600
caaccgggga ggttcattgg aaactgggga acttgatgc agaagagaa agtgggaattc 660
cagctglagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaaacac cagtggcga ggcgactctc 720
tggctctgaa ctgacgtgca gscgcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg 780
gtagtcacg ccgtaaacga tgagtactaa gtttagagg gtttccgcc ttttagtctg 840
cagcaaacgc attaagcaat ccgctgggg agtacgctc caagactgaa actcaaaaga 900
attgacgggg gccgcacaa gggtagagc atgtggtta attcaagca acgcgaagan 960
ccttaccagg tctgacate ctctgacaac cctagagata gggcttcccc ttccggggca 1020
gggtgacaag tggtagatgg ttgtcgtcag ctctgtcgt gtagatgttg gtttaagtccc 1080
gcaacgagcg caacccttga tcttagtgc cagcttcag ttgggcaete taagtgact 1140
gccggtgaca aaccggaggg aggtggggat gacgtcaat catcatgcc cttatgacct 1200
ggctacaca cgtgtacaa tgggcagaac aaaggcagc gaagccgca ggcataagca 1260
atccacaaa tctgttctca gttcagatc cagtctgcaa ctgcactgcg tgaagctgga 1320
atcgttagta atcgcggate agcatgcgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
cgcctctac accacgagag ttgttaaac ccgaagtcgg tgaggtaac ttttggagcc 1440
agcccgcaa ggtgggacag atgattgggg tgaag 1475

```

【 図 2 】



【 配列表 】

[2007319078000001.app](#)



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
	C 1 2 N	1/20	A
	C 1 2 R	1:10	

Fターム(参考) 4B065 AA15X AC20 BB40 CA55  
4F401 AA22 AA30 AD07 AD10 CA77