

# 学 位 論 文 の 要 旨

脂肪族芳香族ポリエステルの中温環境下での生分解  
(Biodegradation of aliphatic-aromatic polyester under mild conditions)

氏 名 室 井 文 篤 印

農業用マルチフィルムは、農作物の生産量向上に寄与し、農作物の栽培において重要な農業用資材の一つとなっている。しかしながら、使用後の回収および廃棄に労力や費用がかかることが課題である。この問題の解決策の1つとして、微生物により土壤中で分解される生分解性マルチフィルムが注目されている。ポリ（ブチレンアジペート-コ-テレフタレート）（PBAT）は生分解性マルチフィルム材に用いられる脂肪族芳香族ポリエステルである。これまでに高温環境下におけるPBATの生分解機構について、詳細な研究が行われているが、生分解性マルチフィルムがオンサイト処理される好気的中温環境下におけるPBATの詳細な生分解機構は明らかとなっていない。そこで、著者は、本博士論文において、土壤から好気性中温性PBAT分解細菌を単離し、単離株由来のPBAT加水分解酵素を特徴づけすることにより、好気的中温環境下におけるPBATの分解機構を明らかにした。また、PBATの土壤埋設が土壤微生物叢に与える影響を明らかにした。

1章では、研究の背景を述べ、本博士論文の目的を述べた。

2章では、土壤環境より3株のPBAT分解細菌NKCM3101, NKCM3201, およびNKCM3202株を単離した。単離株および近縁種の16S rDNA配列に基づき、近隣接合法により系統樹を発生させた結果、単離株はそれぞれ*Bacillus pumilus*に近縁な種であることが明らかとなった。単離株は、それぞれ6.4, 12.2, および10.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ の速度でPBATフィルムを分解した。この中で最もPBAT分解活性の高いNKCM3201株を、さらに詳細に特徴付けした。NKCM3201株は、30 - 40 °Cでよく増殖する好気性中温性細菌であった。本株のPBAT加水分解酵素（PBATH<sub>Bp</sub>）遺伝子（*pbath<sub>Bp</sub>*）をクローニングしたところ、PBATH<sub>Bp</sub>は34アミノ酸残基からなるシグナルペプチド配列を有する215アミノ酸配列残基からなることがわかった。PBATH<sub>Bp</sub>および関連酵素のアミノ酸配列を用いた系統学的解析より、本酵素は、リパーゼファミリーI4に属する酵素であることがわかった。本酵素のホモロジー3Dモデリングより、本酵素がリッドドメインを持たない $\alpha/\beta$ 加水分解酵素であることが明らかとなった。本酵素は4 - 40 °Cで安定であり、30 °CでPBATフィルムを14.3  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{cm}^2$ の速度で分解した。このことから、本酵素は中温域でPBATの分解に寄与することが示された。本酵素はPBATフィルムの他に、各種脂肪族ポリエステル、ポリ（ブチレンサクシネート-コ-アジペ

ート) (PBSA), ポリエチレンサクシネート (PESu), およびポリカプロラクトン (PCL) をそれぞれ  $3.3 \times 10^2$ ,  $7.0 \times 10^2$ , および  $1.1 \times 10^2 \mu\text{g/day/cm}^2$  の速度で分解した。分解物の同定および定量結果より, 本酵素は PBAT をオリゴマーやモノマーに分解することがわかった。また, 本酵素はアジピン酸および 1,4-ブタンジオールからなるエステル結合をテレフタル酸および 1,4-ブタンジオールからなるエステル結合よりも優先的に切断した。このことが, PBSA, PESu, および PCL の分解速度と比較して PBAT の分解速度が遅い原因であると考えられる。PBATH<sub>Bp</sub> は PBAT をモノマーまで分解したが, NKCM3201 株は PBAT モノマーを資化しなかった。PBAT モノマーが自然環境中で無機化されることを考慮すると, そのような環境中での PBAT の完全分解は本株と他の微生物との共生系により行われると考えられる。

3 章では, PBAT フィルムを 7 ヶ月間土壌埋設し, PBAT が土壌微生物叢に与える影響をポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法により解析した。PBAT フィルム表面近傍土壌 (FS) の真菌叢は, 土壌埋設 7 ヶ月後に大きく変化した。系統学的解析より, Ascomycota 門の真菌が FS に集積されることが明らかとなった。また, PBAT フィルムの存在は, バルク土壌 (BS) の真菌叢に大きな変化をもたらさないものの, ある種の真菌の増殖に影響を及ぼすことがわかった。一方, PBAT は FS および BS における細菌叢にほとんど影響を与えず, PBAT 分解細菌である *B. pumilus* を集積させなかった。また, 7 ヶ月間の期間中, FS および BS から植物生育促進根圏細菌 (PGPR) である *Azospirillum* および *Mesorhizobium* が検出されたことから, PBAT はこれら PGPR に対して負の影響を与えないことが示された。微生物叢変化が生じた土壌を用いて栽培した *Brassica rapa var. chinensis* の乾燥重量は, コントロール土壌で栽培したその乾燥重量と比べて, 有意差がなかったことから, PBAT の土壌埋設に伴う微生物叢変化は植物の生育に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。

本論文で, 著者は, PBAT が好気的中温環境でも微生物により低分子量化されることを見出した。最終的に PBAT は, 中温環境下において微生物共生系により完全分解されると結論付けた。また, 土壌微生物の群集解析より, 植物病原菌を含めた PBAT 分解微生物は土壌中に集積しないことが示唆された。このことは, PBAT の農業用資材としての応用にとっての利点となる。一方で, 分解微生物が土壌中に集積されないことは, PBAT の生分解速度の低さの原因の一つである, と推測される。従って, PBAT の生分解速度向上のために, NKCM3201 株を土壌散布することは, 有効であると考えられる。本博士論文により得られた結果は, 土壌などの中温環境における PBAT の生分解機構解明において重要な知見となる。

## 要旨 英訳

Agricultural mulch films, which contribute to increasing crop yield, are one of important materials in agriculture. However, removal and disposal of the non-biodegradable mulch films after use would cause environmental and economical problems. As a solution of the problems, biodegradable mulch films are paid attention. A biodegradable aliphatic-aromatic polyester, poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) (PBAT) is used as a material of biodegradable mulch films. Biodegradation mechanisms of PBAT under aerobic mild conditions were little studied in detail, although those under high temperature conditions were understood. Therefore, I isolated and characterized aerobic mesophilic PBAT-degrading bacteria and PBAT hydrolase from an isolate. In addition, I also investigated an influence of PBAT on soil microbiota.

In the first chapter, the background and purpose of this study were described.

In the second chapter, 3 PBAT-degrading isolates, NKCM3101, NKCM3201, and NKCM3202 were isolated from soil environments. Phylogenetic analysis on the basis of 16S rDNA sequences of these strains and related species revealed that these isolates were closely related to *Bacillus pumilus*. Strain NKCM3101, NKCM3201, and NKCM3202 degraded PBAT films at the rate of 6.4, 12.2, and 10.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ , respectively. NKCM3201 that showed the highest degradation activity of the film among them was further characterized in detail. The strain is an aerobic mesophile, which grew well in the range of 30-40 °C. PBAT hydrolase (PBATH<sub>Bp</sub>) gene (*pbath<sub>Bp</sub>*) encoding 215 amino acid residues containing 34 amino acid residues of signal peptide was cloned from genomic DNA of NKCM3201. Phylogenetic analysis of the enzyme revealed that PBATH<sub>Bp</sub> belonged to lipase family I.4. Homology 3D modeling of PBATH<sub>Bp</sub> showed the enzyme was alpha/beta hydrolase without lid domain. The enzyme was stable in the range of 4-40 °C. PBATH<sub>Bp</sub> hydrolyzed PBAT film at 30 °C, indicating that it contributes to degradation of PBAT under the mild condition. PBATH<sub>Bp</sub> also hydrolyzed other polyesters films, poly(butylene succinate-*co*-adipate) (PBSA), poly(ethylene succinate) (PESu), and polycaprolactone (PCL), at the rates of  $3.3 \times 10^2$ ,  $7.0 \times 10^2$ , and  $1.1 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{day}/\text{cm}^2$ , respectively. Identification and quantification of PBAT degradation products by PBATH<sub>Bp</sub> revealed the enzyme hydrolyzed PBAT to monomers and oligomers. Moreover, the enzyme preferably cleaved ester bond between adipate and 1,4-butanediol compared with that of between terephthalate and 1,4-butanediol. This preference would be a reason why the degradation rate of PBAT was slower than that of PBSA, PESu, and PCL. Strain NKCM3201 did not assimilate PBAT monomer, though PBATH<sub>Bp</sub> degraded PBAT to monomers. Considering that PBAT monomers were mineralized in natural environment, complete degradation of PBAT was performed by NKCM3201 and symbionts in such environment.

In the third chapter, an influence of PBAT on soil microbiota during the incubation of soil and PBAT films for 7 months was analyzed using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method. The analysis of the soil in the vicinity of film surface (FS)

showed fungal flora was drastically changed after incubation for 7 months. Phylogenetic analysis revealed fungi belonging to phylum Ascomycota were enriched in FS after 7 months. Although PBAT film hardly affected on fungal flora in bulk soil (BS), some of species were influenced there. On the other hand, PBAT film hardly affected on the bacterial flora in FS and BS. In addition, PBAT did not enriched PBAT-degrading bacteria *B. pumilus*. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Azospirillum* and *Mesorhizobium* were detected in FS and BS during the course of incubation for 7 months, suggesting that PBAT did not affect on the growth of the PGPRs negatively. Dry weight of *Brassica rapa* var. *chinensis* grown on the soil whose microbiota were changed accompanying with the degradation of PBAT film for 7 months was not significant differences compared with that of *B. rapa* var. *chinensis* grown on control soil. This suggests that the changes in microbiota did not influence on plant growth.

In this thesis, I clarified PBAT is hydrolyzed by an aerobic mesophile, *Bacillus pumilus* mild condition. It was concluded that those hydrolysates would be completely mineralized by symbionts under mild conditions. In addition, I clarified PBAT-degrading microorganisms containing plant pathogens are not enriched in soil in the presence of PBAT, indicating that PBAT is suitable for use as agricultural materials. On the other hand, non-enrichment of PBAT-degrading microorganisms under the presence of PBAT makes it difficult to control the biodegradation of PBAT. So therefore, adding NKCM3201 to soil environment would be effective for controlling of PBAT degradation rate. This thesis provides insight into biodegradation mechanisms of PBAT under aerobic mild conditions.