

実験結果と数値シミュレーションによる ポリマー生分解性解析

渡辺雅二¹⁾・河合富佐子²⁾

¹⁾ 岡山大学環境理工学部環境数理学科, 〒700-8530 岡山市津島中3-1-1

²⁾ 岡山大学資源生物科学研究所, 〒710-0046 倉敷市中央2-20-1

(平成15年5月27日受理)

Analysis of polymeric biodegradability based on experimental results and numerical simulation

Masaji Watanabe¹ and Fusako Kawai²

Department of Environmental and Mathematical Sciences, Faculty of Environmental Science and Technology, Okayama University, 1-1, Naka 3-chome, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan¹⁾

Research Institute for bioresources, Okayama University, Chuo 2-20-1, Kurashiki 710-0046, Japan²⁾

E-mail: watanabe@ems.okayama-u.ac.jp¹⁾, fkawai@rib.okayama-u.ac.jp²⁾

Abstract

We describe techniques that we developed previously in studies of biodegradation of polymeric compounds. We present some experimental results concerning biodegradation of polyethylene. We introduce a mathematical model that govern the evolution of the weight distribution, and show how its inverse problem can be analyzed. We also introduce a mathematical model that governs the evolution of the weight distribution of polymeric compound subjected to enzymatic degradation, and present some numerical results concerning enzymatic degradation of polyvinyl alcohol.

Key words: biodegradation, mathematical model, numerical simulation, polyethylene, polyvinyl alcohol

1. 緒 言

石油から合成された高分子化合物は、常温では化学的に不活性であると一般に考えられていたが、近年それらの物質も自然環境下で分解・資化されることが次第に明らかになった。Albertsson *et al.* は¹⁴C₂O₂の測定により、ポリエチレン (PE) が分解されることを示した [1]。Potts *et al.* は、分子量500前後以下のlinear paraffin分子が数種類の微生物によって資化されることを示した [2]。Haines *et al.* は、tetratetracontane (C₄₄H₉₀, mass of 618) 以下のn-alkaneが20日間以内で酸化されることを示した [3]。

低分子ポリエチレンあるいはポリエチレンワックス (PEwax) を単一炭素源として土壌微生物の集積培養を行い、これらに生育可能な微生物コン

ソーシウムKH-12を得て、PEwaxの分解を確認した (重量減30-50%) [4]。コンソーシウムから主な細菌として *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*属などの9種が分離された。また、ポリエチレンカプセルを土壌に約3ヶ月埋設したのものから、PEwax資化性糸状菌 (カビ) が分離され、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Acromonium*と同定された [5]。

ポリエチレンを炭素源とする微生物の培養実験で培養前と培養後のGPCパターンが比較された。その結果、培養前に比較して培養後は重量分布が高分子側にシフトし、ポリエチレン分子は小さいものほど速く分解されることが明らかにされた。一方、n-alkaneはterminal oxidation, diterminal oxidation, subterminal oxidationのいずれかの経路で酸化されることが知られている。その結果、末

端で酸化されたポリエチレン分子は長鎖脂肪酸類似構造をもつようになり、 β -酸化が作用するようになると思定できる。1サイクルの β -酸化では、分子は炭素原子2つ分のユニットで低分子化する。Kawai *et al.*は、前述の実験結果と理論的考察に基づく数学モデルを提案し、数値シミュレーションにより、その妥当性を検証した [6, 7]。

一般にポリマーの解重合プロセスはendogenousタイプとexogenousタイプの2つに分けられる。 β -酸化によるPE分子の低分子化は、分子末端で生じるexogenousタイプの例である。他方、polyvinyl alcohol (PVA) の分解は分子内部でも切断されるexogenousタイプである [8]。Watanabe *et al.*は酵素によるPVA分解の数学モデルを提案し、PVAの酵素分解実験の数値シミュレーションを行なって、その妥当性を検証した [9]。

本論文では、上述の研究で開発した解析手法と、それらを用いて得られた結果を紹介する。

2. PE生分解実験

2.1 材料と方法

2.1.1 Chemicals

この実験ではPEwaxその他の試薬は市販のものを用いた。

2.1.2 微生物と培養

バクテリアKH-12はPE資化性細菌群であるが、PEwax, 0.5%; ammonium sulfate, 0.1%; sodium nitrate, 0.1%; potassium diphosphate, 0.1%; potassium chloride, 0.1%; magnesium sulfate, 0.02%; Plysurf A210G (第一工業製薬(株)), 0.03%; yeast extract, 0.01%; trace metalsの混合溶液, 1ml/100ml; pH, 7.0-7.2 からなる基礎培地 (100[ml]/500[ml] shaking flask) で28℃で震盪培養を行なった。Trace metals の混合溶液は $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 各0.1[g]/100[ml] からなる。培養開始前には、PEwaxを除く基礎培

地を121℃で15分間蒸気滅菌後80℃以下に冷却した。これにPEwaxを加えて15分間超音波破碎を行い、クリーンベンチで滅菌フラスコに移した。約3ヶ月間の土壌埋設実験後のPEカプセルから分離された糸状菌*Aspergillus sp.* AK-3も同様に培養した。培養後、PEwaxはメンブレン濾過(孔径10 μm)で回収した。濾過によるPEwaxの重量減は10%以下であった。

2.1.3 GPC分析

培養前、培養後の重量分布はGPCで分析した。分析条件は以下の通りである；分析機器：PL-GPC 210 (POLYMER LABORATORIES LTD.) , カラム：Plgel 10 μm MIXED-B (300 x 7.5 mm)X2, 分析温度：140℃, 移動相：*o*-dichlorobenzene。数平均分子量(Mn)と重量平均分子量(Mw)は標準ポリスチレンを用いてUniversal Calibration curveで計算し、PE換算値を用いた。

2.2 実験結果

Aspergillus sp. AK-3の培養前と5週間培養後のGPC分析結果をFig. 1に示す。相対的に低分子がより速く分解され、分布全体が高分子側にシフトしているのがわかる。

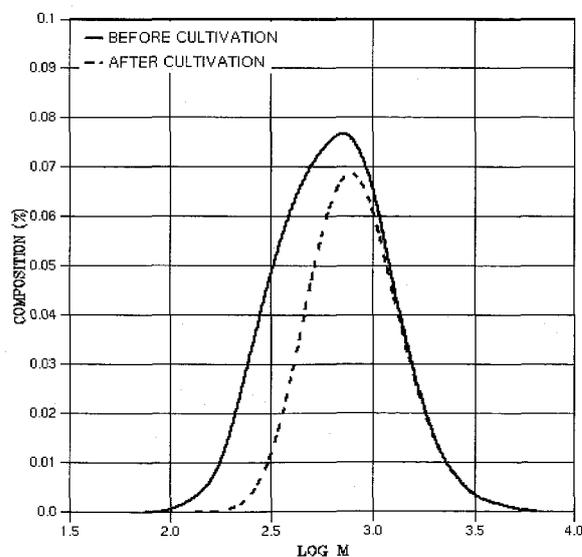


Fig. 1 Weight distribution of PEwax before and after cultivation of *Aspergillus sp.* AK-3.

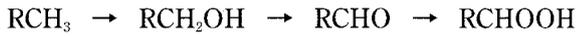
3. PE生分解モデルとシミュレーション

3.1 PE生分解の数学モデル

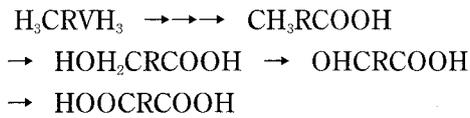
3.1.1 β -酸化によるexogenous解重合

PE は化学構造的には炭化水素であり，基本的にはその代謝経路に従う。したがって，末端からの分解代謝経路である次の三つの代謝経路が作用すると考えられる。

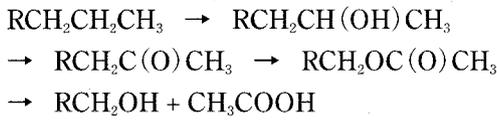
Terminal oxidation



Diterminal oxidation



Subterminal oxidation



炭化水素の代謝経路で代謝された PE は末端が酸化されてカルボン酸が生成し，脂肪酸類似構造となるので， β -酸化経路が働くと考えられる。この場合，1 サイクルの β -酸化で炭素原子 2 つ分のユニットが PE 分子から切断される。

3.1.2 PE生分解シナリオと数学モデル

前述の実験結果と理論的考察から次のシナリオが想定できる：十分に小さいポリエチレン分子は微生物によって直接吸収消化され，それ以上のものは直接吸収消化されるようになるまで β -酸化によって少しずつ小さくなっていく。このシナリオに基づき次の数学モデルが提案された。

$$\frac{dx}{dt} = -\alpha(M)x + \beta(M+L)\frac{M}{M+L}y \quad (1)$$

ただし， t は時間， M は分子量， L は 1 回の β -酸化で消失する分子量を表す。以下に示す数値結果 (3.2.2) を求めるためには炭素原子 2 つのユニット

の分子量 28 とおいた。 $x = w(t, M)$ ， $y = w(t, M+L)$ とする。ただし， t と M の関数 $w(t, M)$ は，時刻 t で分子量 M をもつ全ての分子の総重量を表す。したがって， $y = w(t, M+L)$ は時刻 t で分子量 $M+L$ をもつ全ての分子の総重量となる。 $\beta(M)$ を β -酸化率， $\rho(M)$ を直接吸収消化率， $\alpha(M) = \rho(M) + \beta(M)$ とする。したがって，右辺第 1 項は， β -酸化と直接吸収消化による単位時間当たりの $w(t, M)$ の減少量を表し，第 2 項は，分子量 $M+L$ の分子末端が β -酸化によって切断され，分子量 M をもつ分子になることによる $w(t, M)$ の増加量を表す。初期の重量分布が関数 $f(M)$ により

$$w(0, M) = f(M) \quad (2)$$

で表されるときに，微分方程式(1)は初期条件(2)と共に初期値問題を構成する。

3.2 PE生分解シミュレーション

3.2.1 PE生分解モデルの近似解

初期値問題(1)，(2)の近似解を求めるために，関数 $f(M)$ が正の値をとるすべての点を含む区間 $[a, b]$ を選び，

$$\begin{aligned} \Delta M &= \frac{b-a}{N} \\ M_i &= a + i\Delta M, \quad i = 0, 1, \dots, N \end{aligned} \quad (3)$$

とする。このとき $L = n\Delta M + R$ ， $0 \leq R < \Delta M$ となる正の整数 n と非負の実数 R がある。また，このとき $M_{i+n} \leq M_i + L < M_{i+n+1}$ であり

$$M_{i+L} = \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right)M_{i+n} + \frac{R}{\Delta M}M_{i+n+1}$$

となる。この式より次の近似式が得られる。

$$\begin{aligned} w(t, M_{i+L}) &\approx \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right)w_{i+n}(t) + \frac{R}{\Delta M}w_{i+n+1}(t) \\ \beta(M_{i+L}) &\approx \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right)\beta(M_{i+n}) + \frac{R}{\Delta M}\beta(M_{i+n+1}) \end{aligned}$$

ただし，

$$w_i(t) = w(t, M_i), \quad i = 0, 1, 2, \dots, N$$

とする。 $M = M_i$ とすると式(1)は

$$\frac{dw_i}{dt} = -a_i w_i + \beta_i w_{i+n} + \gamma_i w_{i+n+1} \quad (4)$$

$$i = 0, 1, 2, \dots, N$$

となる。ただし、

$$a_i = a(M_i)$$

$$\beta_i = \sigma_i \frac{M_i}{M_i + L} \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right)$$

$$\gamma_i = \sigma_i \frac{M_i}{M_i + L} \cdot \frac{R}{\Delta M}$$

$$\sigma_i = \left(1 - \frac{R}{\Delta M}\right) \beta(M_{i+n}) + \frac{R}{\Delta M} \beta(M_{i+n+1})$$

とする。N+1個の未知関数

$$w_i = w_i(t), \quad i = 0, 1, 2, \dots, N$$

を解とするN+1個の微分方程式は初期条件

$$w_i(0) = f_i \equiv f(M_i), \quad i = 0, 1, 2, \dots, N \quad (5)$$

を満たす。

3.2.2 PE生分解モデルの逆問題とその近似解

図1に示した結果のように、微生物の培養前と培養後のPE重量分布が与えられているときに初期値問題(1),(2)の解 $w(t, M)$ が

$$w(T, M) = g(M) \quad (6)$$

を満たすような関数 $a(M)$ と $\beta(M)$ を求めるための逆問題を設定できる。ただし、 T は培養時間、 $g(M)$ は培養後のPE重量分布を表す関数とする。

微生物は、大きなPE分子は直接吸収消化できない。したがって、 $M \geq \tilde{M}$ のときに $\rho(M) = 0$ となる、ある \tilde{M} がある。一方、 β -酸化率 $\beta(M)$ の逆数は、一回の β -酸化が分子量 M のPE分子に対してかかる時間であり β -酸化は分子末端に作用するので、 β -酸化率は定数であると理論上想定できる。しかし、 β -酸化は微生物体内で進行する化学反応であり、PE分子がその作用を受けるためには、その一端でも細胞内に入らなければならない。したがって、 β -酸化もPE分子が大きくなると共に、その作用が低下するが、ある程度の範囲では理論通り作用すると想定できる。したがって $M < \tilde{M}$ のときに $\beta(M)$ は定数であると仮定してよい。そこで、 $a(M_i)$ の近似値 $a_i, i = 0, 1, 2, \dots, N$ と $a(\tilde{M})$ の近

似値 \tilde{a} が与えられたときに、 $\beta(M_i)$ の近似値 λ_i を次のとおり定義する。

$$\lambda_i = \begin{cases} \tilde{a}, & M_i \leq \tilde{M} \\ a_i, & M_i > \tilde{M} \end{cases} \quad (7)$$

一方、初期値問題(3), (4)の解は

$$w_i(t) = e^{-a_i t} \{f_i + I(t)\}$$

$$I(t) = \int_0^t e^{a_i s} [\beta_i w_{i+n}(s) + \gamma_i w_{i+n+1}(s)] ds$$

で表される。この式は $t = T$ とおくと次の形に変形できる。

$$a_i = \frac{1}{T} \ln \left(\frac{1}{g_i} |f_i + I(T)| \right) \quad (8)$$

近似値 $a_i, i = 0, 1, 2, \dots, N$ が与えられたときに、この式によって新しい近似値を計算できる。すなわち、 $\beta(M_i)$ の近似値 λ_i を式(7)によって定義すると、初期値問題(4), (5)の近似解を求めることができる。そこで、式(8)の右辺の積分 $I(T)$ を求めることによって新しい近似値を求めることができる。このようにして得られた結果をFig. 2に示す。

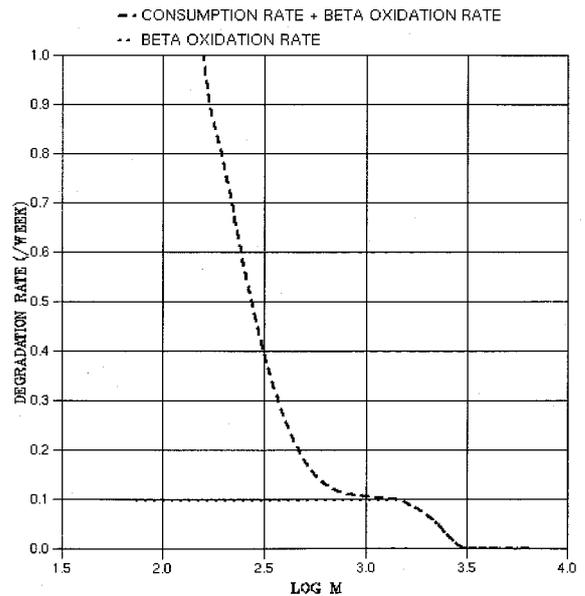


Fig. 2 Consumption rate and β -oxidation rate of PE wax biodegradation by *Aspergillus* sp. AK-3.

3.2.3 PE生分解数値シミュレーション

Fig. 2に示した直接吸収消化率と β -酸化率を用

いて計算したPE生分解モデルの数値解の変化を1 WEEK毎に示す (Fig. 3)。

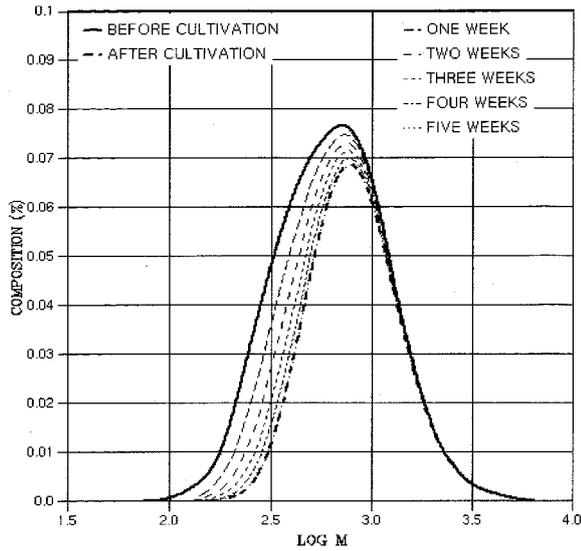


Fig. 3 Numerical simulation of PE wax biodegradation by *Aspergillus* sp. AK-3.

4. PVA酵素分解モデルと数値シミュレーション

4.1 PVA酵素分解と数学モデル

4.1.1 Endogenous 解重合によるPVA酵素分解

PVAの酵素分解は、分子が、その末端に限らず内部でも切断されるendogenousタイプの例である。PVAの酵素分解では、隣接する2つの2級アルコール基が酸化されたジケトン構造になり、加

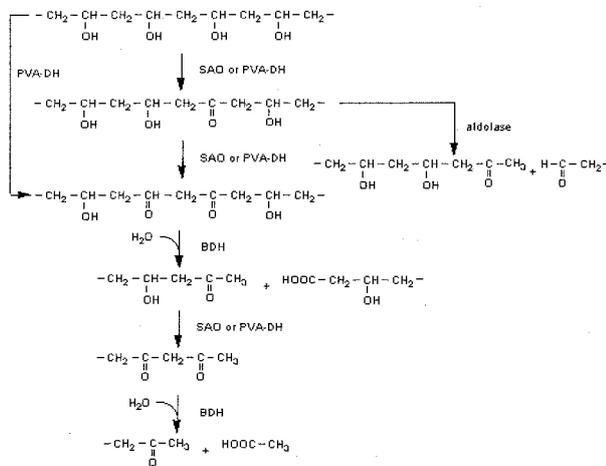


Fig. 4 Metabolic pathways of PVA [10,11]. SAO: secondary alcohol oxidase, PVA-DH: PVA dehydrogenase, BDH: β -diketone hydrogenase.

水分解された炭素鎖が切断されて低分子化する。最近松村らはモノケトン構造がアルドラーゼにより切断されることを報告した (Fig. 4)。

しかし、いずれにしても炭素がアトランダムに任意の場所で切断されることにはかわりはない。Fig. 5は培養前と2日間培養後のPVAのGPCパターンを示す。

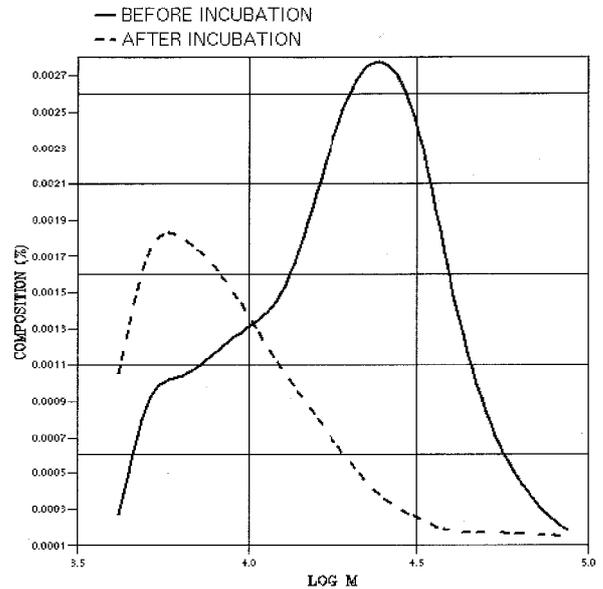


Fig. 5 Weight distribution of PVA before and after enzymatic degradation. Based on data in [12], p. 234 (with permission by Prof. S. Matsumura).

4.1.2 PVA酵素分解モデル

PEの場合同様、時刻 t で存在する分子量 M をもつ分子の総重量を $w(t, M)$ で表す。また、分子量 A 以上 B 以下の分子の集合を $C(A, B)$ で表す。 $C(A, B)$ に属する分子の総重量は積分

$$y = \int_A^B w(t, M) dM \quad (6)$$

で表される。 $K \leq M$ のとき、 $P(t, K, M)$ を $w(t, M)$ から $w(t, K)$ への移動率とする。このとき、 $C(A, B)$ から $C(D, E)$ への単位時間当たりの重量移動は

$$\iint_R p(t, K, M) dM dK$$

となる。ただし

$$R = \{(K, M) \mid K \leq M, D \leq K \leq E, A \leq M \leq B\}$$

とする。 $C(A, B)$ の単位時間当たりの重量減少は

$$\int_A^B \int_0^M p(t, K, M) dK dM$$

重量増加は

$$\int_A^B \int_M^\infty p(t, K, M) dK dM$$

となり、式(9)で定義される y の変化率は、これら積分の差、すなわち

$$\frac{dy}{dt} = - \int_A^B \int_0^M p(t, K, M) dK dM + \int_A^B \int_M^\infty p(t, M, K) dK dM$$

となる。この式の両辺を $B-A$ で割り、 $B \rightarrow A$ とすると

$$\frac{dx}{dt} = - \int_0^A p(t, K, A) dK + \int_A^\infty p(t, A, K) dK \quad (10)$$

となる。ただし、 $x = w(t, A)$ とする。

ここで、単位時間当たりの $x = w(t, M)$ の分解量は、 $x = w(t, M)$ 自身に比例し、分解率 $\lambda(M)$ を用いて

$$\lambda(M) w(t, M)$$

で表されるとする。分子量 M の分子がアトランダムに分解されるときにできる分子の数は区間 $[0, M]$ に一様に分布される。したがって

$$p(t, K, M) = c \frac{K}{M} \lambda(M) w(t, M)$$

となる K に依存しない c がある。一方 $C(A, B)$ における重量減少は

$$\int_A^B \lambda(M) w(t, M) dM \quad (11)$$

であり、これは $A \leq M \leq B$ のときの $C(0, M)$ における重量増加

$$\int_A^B \int_0^M p(t, K, M) dK dM = \int_A^B \int_0^M c \frac{K}{M} \lambda(M) w(t, M) dK dM \quad (12)$$

に等しい。式(11)、(12)より

$$c \frac{M}{2} = 1$$

となり、したがって

$$p(t, K, M) = \frac{2K}{M^2} \lambda(M) w(t, M) \quad (13)$$

となる。式(10)、(13)より $x = w(t, M)$ は次の式を満たす。

$$\frac{dx}{dt} = -\lambda(M)x + \int_M^\infty \frac{2K}{M^2} \lambda(K) w(t, K) dK \quad (14)$$

初期の重量分布を表す関数 $f(M)$ が与えられたときに微分方程式(14)は初期条件(2)と共に初期値問題を構成する。

4.2 PVA酵素分解の数値シミュレーション

4.2.1 PVA酵素分解モデルの逆問題とその近似解

区間 $[a, b]$ を選び、 ΔM と $N+1$ 個の点 M_i を(3)で定義し、微分方程式(14)の解 $x = w(t, M)$ の $M = M_i$ における近似値を $w_i = w_i(t)$ で表す。 $M = M_i$ とおいて右辺の積分に台形則を適用することにより次の近似式を導くことができる。

$$\begin{aligned} \frac{dw_i}{dt} &= -a_i w_i + M_i \Delta M F_i \\ F_i &= 2 \sum_{j=i+1}^{N-1} \frac{1}{M_j^2} \lambda_j w_j + \frac{1}{M_N^2} \lambda_N w_N \\ \lambda_i &= \lambda(M_i) \\ a_i &= \lambda_i \left(1 - \frac{\Delta M}{M_i} \right) \end{aligned} \quad (15)$$

微分方程式系(15)は初期条件(5)と共に初期値問題を構成する。

酵素分解後 $t = T$ での重量分布が、関数 $g(M)$ により(6)で表されるときに、微分方程式(14)は条件(2)と(6)と共に分解率 $\lambda(M)$ を求めるための逆問題を構成する。一方、初期値問題(15)の解は

$$\begin{aligned} w_i(t) &= e^{-a_i t} \{ f_i + I(t) \} \\ I(t) &= M_i \Delta M \int_0^t e^{a_i s} F_i(s) ds \end{aligned}$$

で表すことができる。そこで、 $t = T$ とおき(8)の式に変形し反復計算を行なうことによって λ_i の近似値を求めることができる。Fig. 5 のGPCデータをもとに計算した分解率のグラフをFig. 6に示す。

4.2.2 PVA酵素分解シミュレーション

Fig. 6に示した分解率を用いた初期値問題の数値解の変化を0.2 DAY毎に示す (Fig. 7)。

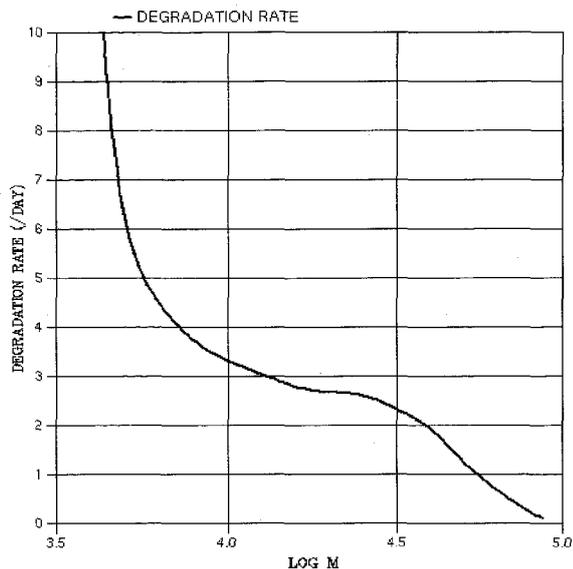


Fig. 6 Enzymatic degradation rate of PVA.

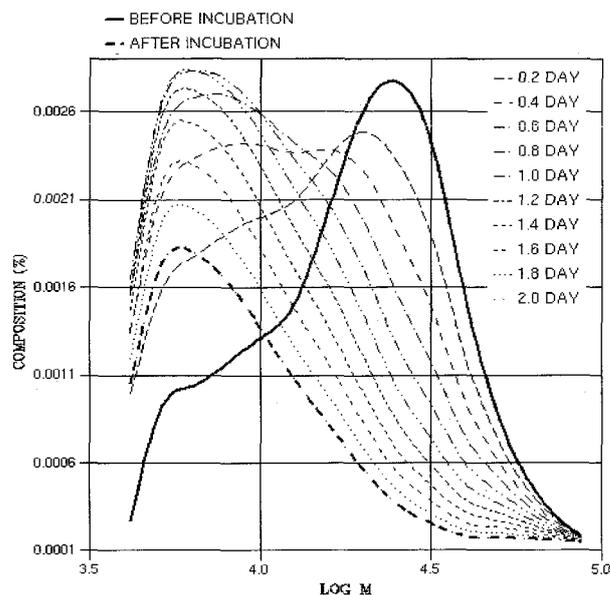


Fig. 7 Numerical simulation of enzymatic degradation of PVA.

5. 結論

PE生分解シナリオから導き出された数学モデルに培養前、培養後のGPCデータを適用することにより直接吸取消化率及び β -酸化率を求めることが可能となった。また、実験結果と数値シミュレーションが良く一致することから、PE生分解シナリオの妥当性を検証できた。PVA酵素分解に関しても、PVA酵素分解モデルに分解前及び分解後のGPCデータを適用し、分解率を求めることが可能となった。また、数値シミュレーションにより実験では捉えられない分解の経過を把握できた。

謝 辞

本研究の遂行には柴田勝氏（チッソ旭肥料株式会社）、横山茂男氏（旭化成株式会社基礎原料事業部肥料技術部）、巢立康博氏（チッソ旭肥料株式会社技術部）、林静恵氏（旭化成株式会社機能膜技術開発部）、松村秀一氏（慶應義塾大学理工学部）に多大なご協力をいただいた。

文 献

1. A.-C. Albertsson, S.O. Andersson and S. Karlsson, *Polym. Degr. Stabil.*, 18, 73 (1987).
2. J. E. Potts, R. A. Clendinning, W. B. Ackart and W. D. Niegisch, *Polymer Preprints*, 13, 629 (1972).
3. J. R. Haines and M. Alexander, *Appl. Microbiol.*, 28, 1084-1085 (1974).
4. F. Kawai, M. Shibata, S. Yokoyama, S. Maeda, K. Tada, and S. Hayashi. *Biodegradability of Scott-Gelead photodegradable polyethylene and polyethylene wax by microorganisms. Macromol. Symp.*, 144, 73-84 (1999).
5. 柴田, 河合, 横山, 多田, 酒井, 巢立, 土壤肥料学会 (北海道), 1999年7月
6. Fusako Kawai, Masaji Watanabe, Masaru Shibata, Shigeo Yokoyama, Yasuhiro Sudate, *Experimental analysis and numerical simulation for biodegradability of polyethylene, Polymer Degradation and Stability*, 76, 129-135 (2002).
7. Masaji Watanabe, Fusako Kawai, Masaru Shibata, Shigeo Yokoyama, Yasuhiro Sudate, A

- computational method for analysis of polyethylene biodegradation, *Journal of Computational and Applied Mathematics*, in press.
8. F. Kawai, Sphingomonads involved in the biodegradation of xenobiotic polymers, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **23**, 400-407 (1999).
 9. Masaji Watanabe, Fusako Kawai, Numerical Simulation for Enzymatic Degradation of Poly(vinyl Alcohol), *Polymer Degradation and Stability*, **81**, 393-399 (2003).
 10. F. Kawai, Xenobiotic polymers, T. Imanaka (ed.) *Great Development of Microorganisms*, NTS. Inc., Tokyo, 865-870 (2002).
 11. S. Matsumura, N. Tomizawa, A. Toki, K. Nishikawa and K. Toshima, *Macromolecules*, **32**, 7753-7761 (1999).
 12. S. Matsumura, N. Tomizawa, A. Toki and K. Toshima, Alexander Steinbüchel (Ed.), *Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers*, Proceedings of an International Symposium, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 230-238 (1999).