

Environment Research and Technology Development Fund

# 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

## 【1-2005】 バイオマス廃棄物由来イタコン酸からの 海洋分解性バイオナイロンの開発

令和2年度～令和4年度

Development of Marine-degradable Bionylon from Biomass Wastes-derived Itaconic acid

〈研究代表機関〉

国立大学研究開発法人北陸先端科学技術大学院大学

〈研究分担機関〉

国立大学法人 神戸大学

国立研究開発法人 海洋研究開発機構

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和5年5月

目次

I. 成果の概要	..... 1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	

- 5-1. 成果の概要
- 5-2. 環境政策等への貢献
- 5-3. 研究目標の達成状況
- 6. 研究成果の発表状況
  - 6-1. 査読付き論文
  - 6-2. 知的財産権
  - 6-3. その他発表件数
- 7. 国際共同研究等の状況
- 8. 研究者略歴

## II. 成果の詳細

- II-1 バイオナイロンの合成と高性能繊維の作製 ..... 14  
 (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学)

### 要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

- II-2 バイオナイロンの分解性評価と制御 ..... 25  
 (国立研究開発法人海洋研究開発機構)

### 要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

- II-3 廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産 ..... 38  
 (国立大学法人神戸大学)

### 要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細	・・・・・・・・・・	4 6
Ⅳ. 英文Abstract	・・・・・・・・・・	5 2

## I. 成果の概要

課題名 1-2005 バイオマス廃棄物由来イタコン酸からの海洋分解性バイオナイロンの開発  
 課題代表者名 金子 達雄 (国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学  
 先端科学技術研究科 サステイナブルイノベーション研究領域  
 教授)

重点課題 主：【重点課題⑥】グローバルな課題の解決に貢献する研究・技術開発（「海洋プラスチックごみ問題への対応」）

副：【重点課題⑩】地域循環共生圏形成に資する廃棄物処理システムの構築に関する研究・技術開発

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (3-5) 地域循環共生圏の形成に向けたバイオマス廃棄物等を対象とした処理プロセスのより一層の高度化に関する研究

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

### 研究経費

103,303千円

(令和2年度：36,897千円、令和3年度33,148千円、令和4年度：33,258千円)

### 研究体制

(サブテーマ1) バイオナイロンの合成と高性能繊維の作製 (北陸先端科学技術大学院大学)

(サブテーマ2) バイオナイロンの分解性評価と制御 (海洋研究開発機構)

(サブテーマ3) 廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産 (神戸大学)

### 研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 生分解性プラスチック、ナイロン、イタコン酸、廃棄物系バイオマス、海洋プラゴミ問題、分解微生物、生物毒性、模擬深海環境

## 1. はじめに (研究背景等)

G20大阪サミットで海洋プラスチック問題が世界的に緊急に解決すべき問題として挙げられ、また海洋環境で分解するプラスチック開発は第五次環境基本計画にも挙げられたように、その緊急性は自明である。一方、分解性プラスチックの性能の低さがその実用化を妨げている。このトレードオフを打ち破るプラスチックは十分に高い性能と耐久性を持ちながらも「海洋環境に応答して初めて分解のスイッチの入るプラスチック」である。一方、イタコン酸はグルコースを用いた発酵生産により国内外で大量生産されている。また古くから接着剤やゴム添加物などに利用され、米国エネルギー省の掲げる戦略物質の一つに指定されるなど、世界的需要の増加が予想され、廃棄物系バイオマスからの生産が急がれる物質である。他方、そのナイロンへの社会実装例はなかった。そのような中、研究代表者らは科研費萌芽研究によりイタコン酸からナイロンを合成する方法論を初めて開発し、その構造物性を明確化し光刺激応答加水分解性を見出してきた。本

研究開発では、当該イタコン酸由来ナイロンの研究を進展させ、海洋で初めて分解する刺激応答分解性プラスチックの社会実装を目指す。

## 2. 研究開発目的

イタコン酸は可食バイオマス（糖類）から商業生産されており将来食糧との競合が懸念される。そこで、非可食廃棄物系バイオマスを代替資源化するために、微生物による新しいイタコン酸生産技術を構築する。この時、年間約460万トンが未利用資源として残る古紙の利用を背景に、リサイクル紙パルプ等をモデルに、余剰セルロース資源からイタコン酸を発酵生産する。次に、イタコン酸を用いて、バイオナイロン繊維を大量作成し物質添加により熱・力学的物性コントロールを行い、高い熱・力学的物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発する。次に、バイオナイロンの海洋環境での分解性について、BOD試験、生物毒性評価を含む実験室内での分解実験、および実海洋環境と模擬深海環境での分解実験を行うことで新規海洋生分解性プラスチック素材としての有用性を評価する。以上により、廃棄物利用によるバイオナイロン生産システムを概念実証することを全体目標とする。本課題は地域循環共生圏の形成に向けたバイオマス廃棄物等の高度利用化、地球温暖化対策の両方に貢献する重要課題である。

## 3. 研究目標

<p>全体目標</p>	<p>G20大阪サミットで海洋プラスチック問題が世界的に緊急に解決すべき問題として挙げられた。従って、海洋環境で分解するプラスチック開発は第五次環境基本計画にも挙げられるように、その緊急性は自明である。一方、分解性プラスチックの性能の低さがその実用化を妨げている。このトレードオフを打ち破るプラスチックは十分に高い性能と耐久性を持ちながらも「海洋環境に応答して初めて分解のスイッチの入るプラスチック」である。一方、イタコン酸はグルコースを用いた発酵生産により国内外で大量生産されている。また古くから接着剤やゴム添加物などに利用され、米国エネルギー省の掲げる戦略物質の一つに指定されるなど、世界的需要の増加が予想され、廃棄物系バイオマスからの生産が急がれる物質である。</p> <p>そこで本提案では、廃棄系バイオマス由来イタコン酸を用いて刺激応答分解性プラスチックを開発することを目標とする。</p> <div data-bbox="1005 940 1428 1624" style="text-align: center;"> <p>農業用廃棄物系バイオマス</p> <p>イタコン酸 + 各種ジアミン + エタノール → 塩モノマー</p> <p>塩モノマー <math>\xrightarrow{\text{加熱}}</math> バイオナイロン</p> <p>バイオナイロン: 環構造を持ち一般のナイロンよりも高い熱力学性能と低い吸水性を持つ</p> <p>親水化により迅速に分解</p> <p>海洋環境</p> <p>海洋環境応答性ナイロン繊維の開発</p> <p>イタコン酸からの海洋環境応答分解性バイオナイロンの開発概要</p> </div>
<p>サブテーマ1</p>	<p>バイオナイロンの合成と高性能繊維の作製</p>
<p>サブテーマリーダー/所属機関</p>	<p>金子達雄/国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学</p>

目標	バイオナイロン繊維を大量作成し物質添加により熱・力学的物性コントロールを行い、高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発することを目標とする。
----	---

サブテーマ2	バイオナイロンの分解性評価と制御
サブテーマリーダー/所属機関	若井 暁/国立研究開発法人 海洋研究開発機構
目標	バイオナイロンの海洋環境での分解性について、BOD試験、生物毒性評価を含む実験室内での分解実験、および実海洋環境と模擬深海環境での分解実験を行うことで新規海洋生分解性プラスチック素材としての有用性を評価する。

サブテーマ3	廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産
サブテーマリーダー/所属機関	川口 秀夫/国立大学法人 神戸大学
目標	廃棄物系バイオマスである紙パルプやリサイクルパルプを原料に、バイオポリマー原料となるイタコン酸を生産する低炭素型プロセスを開発する。

#### 4. 研究開発内容

イタコン酸は可食バイオマスから商業生産されており将来食糧との競合が懸念される。そこで非可食廃棄物系バイオマスを代替資源化するために、微生物による新たなイタコン酸生産体系を構築した。現在本国の古紙は年間約460万トンが未利用資源として残るため、リサイクル紙パルプ等をモデルに、余剰セルロース資源からのイタコン酸の発酵生産を行い、廃棄物利用によるバイオナイロン生産システムを概念実証した。

このようにして得られたイタコン酸に長鎖脂肪二酸、長鎖脂肪族二アミン、11アミノウンデカン酸などの長鎖脂肪酸を添加して重合して得られるバイオナイロンに関して、大量重合装置を用いてキログラムスケールでサンプルを得、紡糸を行った。この時、延伸処理により配向度および結晶化度を制御し、繊維の熱的・力学的物性を幅広く制御した。またガラス転移温度・融点および分解温度を熱分析により確認した。また、本バイオナイロンと相性の良い層状粘土鉱物（モンモリロナイト）に関し、その含有量と層構造の剥離効果を熱物性および含水率の観点から明確にした。さらに光刺激分解をコントロールするための酸化チタンや光触媒やベンゾフェノンなどの光増感剤などを添加した時の分解性などを調べた。

実際に合成したバイオナイロンを用いて、実験室レベルでの分解特性を評価した。分解状態は質量分析により評価すると共に、培養液中の微生物の群集構造変化や、生物化学的酸素要求（BOD）試験も実施した。また、バイオナイロンが海洋環境で生分解されることは、海洋ごみ対策の観点から重要であるが、分解物による生態系破壊は避けるべきである。したがって、生物毒性評価について、OECDのガイドラインに従った微細藻類を用いた生育阻害試験や海産性藻類を用いた生育阻害試験を実施した。さらに、海洋に流失したプラスチックは生物付着等の影響で深海に沈降することから、深海の高圧環境を模倣できる加圧培養装置を用いて、厳密にコントロールされた加圧時間、物理化学条件での分解試験を行った。

#### 5. 研究成果

##### 5-1. 成果の概要

バイオポリマー原料となるイタコン酸生産を廃棄物系バイオマスから生産するために、紙パルプをモデルバイオマスとして用い、(1)セルロース系バイオマス利用を想定したイタコン酸生産菌の開発、(2)廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価、(3)イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産、の3課題を実施した。イタコン酸生産菌を開発した結果、紙パルプ酵素糖化液からのイタコン酸生産プロセスの開発に成功し、従来の遺伝子組換え菌による可食糖類からの生産性と同等の非可食バイオマス由来イタコン酸収率を達成した。これにより廃棄物利用によるバイオナイロン生産システムを概念実証した。

またイタコン酸およびヘキサメチレンジアミン(化成品)、11-アミノウンデカン酸(ヒマシ油由来)からなるバイオナイロン(非可食バイオ由来度:66.6%-87.5%)に関し、大量重合装置を用いてキログラムスケールでサンプルを得た。このガラス転移温度・融点を評価した。ガラス転移温度50°C程度の組成物に関して、延伸処理により結晶化度を高め、融点が160°Cまであがると同時に、ガラス転移温度が検出不可となることで、耐熱性としての数値が大幅に上昇し軟化温度100°C以上の目標値を遥かに超える値となった。さらに含水率2.7%の組成物が得られ何れも目標が達成された。また、このバイオナイロンに関して層状粘土鉱物を加えることで力学物性等を向上させることにも成功し、力学強度100MPa以上、タフネス100MJ/m<sup>3</sup>以上、海洋環境中で強度低下率50%以下となる材料が開発された。

開発したバイオナイロンを研究資材として分解性評価や生物毒性評価を行い、海水環境で微生物により二酸化炭素まで分解されることを明らかにした。加えて、光刺激を受けた後の溶解したバイオナイロンの生物毒性は、ナイロン原料と同程度の影響しか持っておらず、モノマーユニットにおいてはほとんど毒性がないことを明らかにした。加えて、ナイロン分解実験における微生物群集構造の変化からバイオナイロン資化性微生物の存在が示唆され、当初想定していなかったバイオナイロンを唯一のエネルギー・炭素源として生育可能なバイオナイロン資化性微生物の分離に成功し、想定を上回る成果に達した。また、模擬深海環境での分解実験においても、特定の微生物の濃集を確認し、複数取得したバイオナイロン資化性微生物と一致することを確認した。この結果は、深海環境に適応したバイオナイロン資化性微生物の存在を示している。一連の成果は、海岸、沿岸、深海という海洋を網羅する環境においてバイオナイロンが生分解されることを明らかにしており、新規海洋生分解性プラスチック素材として有用であることを示した。

## 5-2. 環境政策等への貢献

### <行政等が既に活用した成果>

本研究成果であるバイオナイロンの分子設計に基づく新規生分解性プラスチックの開発を提案し、「ムーンショット型研究開発事業/地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現/光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究」に採択され、経済産業省の所管である国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の各種広報で活用された。これは環境政策の一つである海洋プラスチックごみ問題への対応に資する貢献となる。

研究代表者が海洋分解性のバイオナイロン開発を代表として行っていることに基づき、NEDO「海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた技術開発事業/海洋生分解性に係る評価手法の確立」において評価委員として依頼され承諾した。これは環境政策の一つである海洋プラスチックごみ問題への対応に資する貢献となる。

### <行政等が活用することが見込まれる成果>

本研究において、深海模擬環境での分解試験を実施し、本方法が深海実環境での分解実験に置換し得ることを明らかにした。現在までに標準的な圧力環境下での海洋分解性の評価方法が策定されているが、深海環境での海洋分解性については国内外においても策定されておらず、深海模擬実験を国際的な分解性評価方法の国際規格として進めることに貢献する。

環境政策の一つである海洋プラスチックごみ問題への対応に資する分解性ナイロン開発に関し計画以上の進展があり行政等が活用すると考えられる。

### 5-3. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
<p>G20大阪サミットで海洋プラスチック問題が世界的に緊急に解決すべき問題として挙げられた。従って、海洋環境で分解するプラスチック開発は第五次環境基本計画にも挙げられるように、その緊急性は自明である。一方、分解性プラスチックの性能の低さがその実用化を妨げている。このトレードオフを打ち破るプラスチックは十分に高い性能と耐久性を持ちながらも「海洋環境に応答して初めて分解のスイッチの入るプラスチック」である。一方、イタコン酸はグルコースを用いた発酵生産により国内外で大量生産されている。また古くから接着剤やゴム添加物などに利用され、米国エネルギー省の掲げる戦略物質の一つに指定されるなど、世界的需要の増加が予想され、廃棄物系バイオマスからの生産が急がれる物質である。</p> <p>そこで本提案では、廃棄物系バイオマス由来イタコン酸を用いて刺激応答分解性プラスチックを開発することを目標とする。</p>	<p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>イタコン酸生産効率に関して、収率 (0.4 g イタコン酸/g グルコース)、バイオマス酵素糖化率&gt;85%、イタコン酸収率 (0.3 g イタコン酸/g グルコース) の数値目標をいずれも達成した。このイタコン酸を用いてバイオナイロン繊維が得られることを確認し、幅広く組成を振ることでガラス転移温度40℃-97℃、含水率2.4-3.0%、軟化温度最高172℃、力学強度最大360MPa、タフネス291MJ/m<sup>3</sup>となり、かつ良好な海洋崩壊性など、いずれも目標を達成できた。このサンプルを用いて詳細に海洋分解性を調べた結果、光刺激により水溶化したバイオナイロンは、海水性微生物によって二酸化炭素に分解できることを明らかにし、分解微生物が沿岸海域だけでなく深海域にも分布しており全海洋環境において分解できる可能性を明らかにした。</p>

サブテーマ1目標	目標の達成状況
<p>バイオナイロン繊維を大量作成し物質添加により熱・力学的物性コントロールを行い、高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発することを目標とする。</p>	<p>1-1) バイオナイロンのkgスケール合成と添加物の検討 (目標を上回る成果をあげた)</p> <p>10Lスケールの大量重合装置を用いて5kgスケールでバイオナイロンを得た。また本技術を企業に技術移転し、試験機でキログラムスケール合成できることを確認した。炭素数が6から18までの脂肪酸二酸および炭素数が6から12まで脂肪酸二アミン、11-アミノウンデカン酸を用いて種々のバイオナイロンを合成し、ガラス転移温度が40-97℃、融点が115-166℃、分解温度 (10%重量減少温度) が400℃程度の熱物性のサンプルを得た。これによりガラス転移温度50℃以上の物性目標値を達成した。また、11-アミノウン</p>



	<p>デカン酸などの長鎖脂肪酸を高含させた結果含水率2.7%以下となり目標値3%以下を達成した。光増感剤であるベンゾフェノンおよび光触媒である酸化チタンを加えても熱的力学的物性値に大きな影響を及ぼさないことを確認した。モンモリロナイトとのコンポジット作製も良好で、ヤング率は最大2.7倍、破断伸度は10倍以上となり、結果として靱性は5倍以上改善された。釣り糸などの強靱性が必要な用途に関して意義がある。</p> <p>1-2) 高強度なバイオナイロン繊維の作成 (目標を大きく上回る成果をあげた)</p> <p>課題1-1での検討より、生産性と物性のバランスがより繊維として適した組成物はイタコン酸12.5%、ヘキサメチレンジアミン12.5% (ペンタメチレンジアミンでも良い)、11-アミノウンデカン酸75%からなるバイオナイロンであった。これに関して、少量紡糸試験と企業による試験機を用いた紡糸により良好な紡糸性を示した。種々条件を振り配向度0.13で結晶化度55%というサンプルが得られ、最適化試料の力学物性は、力学強度360MPaをとなり目標値を遥かに超える値となった。サブテーマ3により得られる非可食バイオマス由来イタコン酸からのバイオナイロンも同様の結果を示すことを確認した。</p> <p>1-3) 海洋環境で劣化・分解の進むバイオナイロン繊維の開発 (目標どおりの成果をあげた)</p> <p>添加物としてモンモリロナイト、酸化チタン (光触媒)、ベンゾフェノンを選択し、コンポジットを作製した。モンモリロナイトを加えた時に最大タフネス291 MJ/m<sup>3</sup>のサンプルが得られ目標を達成した。これらのコンポジットの海洋分解性を評価した結果、海洋中で崩壊する現象が確認され強度測定が不可能なレベルとなった (強度低下率100% (目標達成))。</p>
--	--

サブテーマ2目標	目標の達成状況
<p>バイオナイロンの海洋環境での分解性について、BOD試験、生物毒性評価を含む実験室内での分解実験、および実海洋環境と模擬深海環境での分解実験を行うことで新規海洋生分解性プラスチック素材としての有用性を評価する。</p>	<p>2-1) バイオナイロンの海洋環境分解性評価 (目標を上回る成果をあげた)</p> <p>予定した条件セットで太陽光曝露下、海水環境中での分解試験を実施した。人工的な紫外線照射環境だけでなく、自然光においてもバイオナイロンが水溶</p>

化することを明らかにした。水溶化により固体材料の回収ができなかったため、当初予定していた形状や重量変化、電子顕微鏡観察が出来なかったが、質量分析を導入して水溶化したポリマー情報を得ることが出来た。この水溶化特性は、紫外線劣化による割れから生じるマイクロプラスチックの形成原理から外れており、当該材料がマイクロプラスチック化しないことを示している。また、BOD試験や質量分析からバイオナイロンが、海水性微生物によって分解されることを実証し、微生物群集構造解析からその役割を担う微生物についても明らかにした。

2-2) バイオナイロンの太陽光照射下での分解性評価と分解物生物毒性試験（目標を大きく上回る成果をあげた）

バイオナイロンが自然光でも水溶化が比較的速やかに起こることから、実環境中での試験では環境中に消失してしまうため、環境条件を明条件と暗条件に置き換え、紫外線照射試料と未照射試料を用いて詳細な分解試験を実施した。未照射試料を用いたBOD試験では、生物分解に伴う酸素消費は観察されず、紫外線照射試料でのみ、バイオナイロンの量依存的なBODの増加がみられた。すなわち、海水性微生物がバイオナイロンを分解して酸素呼吸している。この時の微生物群集構造解析の結果から、特異的に一部の微生物の存在比が顕著に増殖していることから、バイオナイロンを資化（エネルギー源および炭素源として使用）できる可能性が示唆されたため、当初想定していなかったバイオナイロン資化微生物の分離を試みた結果、複数種の微生物の純粋分離に成功した。純粋分離した微生物株を用いたBOD試験により、単一微生物種においてポリマーのバイオナイロンを分解して、二酸化炭素にまで分解することを明らかにした。これらの微生物の全ゲノム解析と遺伝子発現解析の結果、複数のナイロン分解酵素が寄与していることを明らかにした。

上記の分解試験とは別に、バイオナイロンの原料やモノマー材料を用いて生物毒性試験を実施した。淡水性および海産性藻類等に対する生物毒性試験の結果、水溶化したポリマーは原料であるイタコン酸やヘキサメチレンジアミンの毒性と同程度であり、モノマー分子に至ってはさらに毒性が低いことが示さ

	<p>れた。</p> <p>2-3) 深海模擬環境における分解特性評価 (目標を上回る成果をあげた)</p> <p>バイオナイロンを表層海水および海洋堆積物と共にプラスチックチューブに封入して、0.1~50 MPaの範囲で加圧培養を実施した。培養後、バイオナイロンは視認できない状態にまで水溶化していたため、重量測定や電子顕微鏡観察は実施出来なかった。海水および堆積物を回収し、DNAを抽出して微生物群集構造解析を実施した結果、圧力依存的に微生物群集構造が変化すると共に、2-2) で分離したバイオナイロン資化性微生物が集積していることを明らかにした。また、バイオインフォマティクスの過去に採取された海洋堆積物中微生物の遺伝子データベースを検索したところ、ナイロン分解酵素類似遺伝子が広く分布していることを明らかにした。</p>
--	--

サブテーマ3目標	目標の達成状況
<p>廃棄物系バイオマスである紙パルプやリサイクルパルプを原料に、バイオポリマー原料となるイタコン酸を生産する低炭素型プロセスを開発する。</p>	<p>3-1) イタコン酸生産菌の開発 (目標どおりの成果をあげた)</p> <p>イタコン酸収率 (0.4 g イタコン酸/g グルコース) の目標値を上回る生産菌の作製に成功した。 かくはん動力を従来の50%以下に抑制した、低炭素型生産システムを構築した。</p> <p>3-2) 廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価 (目標どおりの成果をあげた)</p> <p>糖化プロセスの最適化により、バイオマスの酵素糖化率 &gt;85%を達成した。 バイオマス糖化液に含まれる発酵阻害候補化合物を同定し、各成分がイタコン酸発酵に与える影響を特定した。</p> <p>3-3) イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産 (目標どおりの成果をあげた)</p> <p>イタコン酸収率 (0.3 g イタコン酸/g グルコース) の目標値を達成した。 イタコン酸の精製法を開発し、バイオマス由来イタコン酸10グラム強を、サブテーマ1 (北陸先端大) に提供することに成功した。</p>

## 6. 研究成果の発表状況

### 6-1. 査読付き論文

<件数>

4件

<主な査読付き論文>

- 1) Mohammad Asif Ali, Tatsuo Kaneko, High-performance BioNylons from Itaconic and Amino Acids with Pepsin Degradability, *Adv. Sus. Sys.*, 2100052 (2021) (IF 6.737)
- 2) H. Kawaguchi, K. Takada, T. Elkasaby, R. Pangestu, M. Toyoshima, P. Kahar, C. Ogino, T. Kaneko, A. Kondo (2022) Recent advances in lignocellulosic biomass white biotechnology for bioplastics, *Bioresour Technol.*, 344(Part B):126165. (IF 10.89) [国際共同研究]
- 3) D. D. Hanh, T. Elkasaby, H. Kawaguchi, Y. Tsuge, C. Ogino, A. Kondo (2023) Enhanced production of itaconic acid from enzymatic hydrolysate of lignocellulosic biomass by recombinant *Corynebacterium glutamicum*, *J Biosci. Bioeng.*, *in press*. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2023.03.011 (IF 3.185)
- 4) T. Elkasaby, D. D. Hanh, H. Kawaguchi, A. Kondo, C. Ogino (2023) Co-utilization of maltose and sodium acetate via engineered *Corynebacterium glutamicum* for improved itaconic acid production, *Biotechnol Bioprocess Eng.*, *in press*. (IF 3.386) [国際共同研究]
- 5) T. Elkasaby, D. D. Hanh, H. Kawaguchi, A. Kondo, C. Ogino (2023) Effect of different metabolic pathways for production of itaconic acid from engineered *Corynebacterium glutamicum*, *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, *in revision*. (IF 3.185) [国際共同研究]

### 6-2. 知的財産権

- 1) 金子 達雄、王 懷玉、マニンダー シン：国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学；「ポリアミド系ポリマー」、特願2020-181536、令和2年10月29日
- 2) 若井 暁、塚谷 京、野牧 秀隆、磯部 紀之：国立研究開発法人海洋研究開発機構；「水溶化イタコン酸由来ポリアミド分解能を有する微生物およびその利用」、特願2022-032898、

### 6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	13件
口頭発表（学会等）	28件
「国民との科学・技術対話」の実施	9件
マスコミ等への公表・報道等	13件
本研究費の研究成果による受賞	3件
その他の成果発表	0件

## 7. 国際共同研究等の状況

- ・バイオベース材料に関し、Phillip Messersmith教授（UCバークレ（米国））の共同研究を開始。意見交換を続け、接着剤への展開を図っている。
- ・海洋分解性バイオナイロンに関してMakoto Ogawa教授（VISTEC（タイ））の共同研究を開始。バイオナイロンへ光触媒をコンポジット化する研究に関してお互いの学生を指導するなどの方法で幅広く展開した。
- ・Mansoura University（エジプト）より、エジプト政府派遣の講師 TAGHREED MAGDY ABDELRAZEK ELKASABY ATALLAH氏を2020年4月より3年間受け入れ、遺伝子組み換えコリネ型細菌での多様なバイオマスからのイタコン酸生産の研究を実施した。
- ・代表者は本成果を高く評価され中華人民共和国において長江講席教授という極めて名誉ある称号を与えられた。2023年4月よりこれを通じて日中における共同研究を開始する。

<非公開>

## 8. 研究者略歴

### 研究代表者

金子 達雄

- 1995年3月 東京工業大学大学院博士前期課程理工学研究科有機材料工学専攻修了
- 1997年3月 同大学院同専攻中途退学（北海道大学へ助手として赴任の為）
- 1998年5月 博士（工学）（東京工業大学）
- 1997年4月 北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻・助手
- 2001年7月 鹿児島大学工学部応用化学工学科・助手
- 2004年4月 大阪大学大学院工学研究科分子化学専攻・助手
- 2006年5月 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科・助教授
- 2007年4月 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科・准教授
- 2012年7月 カリフォルニア大学ロサンゼルス校 客員准教授
- 2016年4月 北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科・教授
- 2023年4月 江南大学化学与材料工程学院（中国）・長江講席教授

### 研究分担者

#### 1) 若井 暁

- 2005年9月 岡山大学大学院自然科学研究科博士後期課程 修了
- 2005年9月 博士（学術）（岡山大学）
- 2005年10月 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部研究職員
- 2009年4月 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部客員研究員
- 2009年4月 広島大学大学院生物圏科学研究科研究員

2013年1月 神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部 特命助教  
2016年4月 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 特命准教授  
2019年4月 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 客員准教授  
2019年4月 国立研究開発法人海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門 研究員

## 2) 川口 秀夫

2002年3月 大阪大学 大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻 博士後期課程 修了 博士 (薬学)  
2002年3月 大阪大学 大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻 博士後期課程 修了 博士 (薬学)  
2002年4月 地球環境産業技術研究機構 研究員  
2007年4月 東京大学 大学院工学系研究科 システム創成学専攻 特任助教  
2012年10月 神戸大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 特命助教  
2016年4月 神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科 特命准教授  
2017年6月 高機能遺伝子デザイン技術研究組合 研究員  
2017年12月 神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科 特命准教授  
2018年7月 神戸大学 先端バイオ工学研究センター 兼任

## II. 成果の詳細

### II-1 バイオナイロンの合成と高性能繊維の作製

国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 サステイナブルイノベーション研究領域 金子達雄  
 先端科学技術研究科 サステイナブルイノベーション研究領域 高田健司  
 先端科学技術研究科 サステイナブルイノベーション研究領域 岡島麻衣子

#### [要旨]

高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型バイオナイロンを非可食バイオマス由来イタコン酸から開発することを目的とし、以下の成果を創出した。1) 5kgスケールでバイオナイロンを得、企業に技術移転した。2) 様々な炭素数のバイオナイロンを合成しガラス転移温度50℃以上で含水率2.7%以下の組成物を得た。3) モンモリロナイトなどの添加物とのコンポジット作製により高タフネス (207 MJ/m<sup>3</sup>) のサンプルを得た。4) 高いバイオ由来度で力学強度400MPaにも上り、海洋崩壊性を示すナイロンを得た。5) 非可食バイオマス由来イタコン酸から上記と同様のバイオナイロン繊維が得られることを確認した。

#### 1. 研究開発目的

バイオナイロン繊維を大量作成し物質添加により熱・力学的物性コントロールを行い、高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発することを目的とする。この時サブテーマ3から提供されたイタコン酸からバイオナイロンが得られることの確認と、サブテーマ2において海洋分解性が起こることの確認を併せることで全体として上記の目的を達成することに留意する。

#### 2. 研究目標

バイオナイロン繊維を大量作成し物質添加により熱・力学的物性コントロールを行い、高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発することを目標とする。

#### 3. 研究開発内容

サブテーマ3より提供されたイタコン酸で非可食バイオマス由来バイオナイロン繊維を開発することを目標に以下の研究を展開した。まず、長鎖脂肪二酸、長鎖脂肪族二アミン、11アミノウンデカン酸などの長鎖脂肪酸から得られるバイオナイロンに関して、大量重合装置を用いてキログラムスケールでサンプルを得た。この時に最適化した合成条件を大手企業に技術移転を行った。これにより得られたペレットから紡糸を行い、延伸処理により配向度および結晶化度を制御し、繊維の熱的・力学的物性を幅広くコントロールした。またガラス転移温度・融点および分解温度を熱分析により確認した結果、熱的力学的な物性値の達成目標を大幅に超えるサンプルが得られた。また、本バイオナイロンと相性の良い層状粘土鉱物（モンモリロナイト）とのコンポジットを作製し高タフネスな成形体も得た。さらに光分解をコントロールするための酸化チタンや光触媒やベンゾフェノンなどの光増感剤などを添加した時の分解性などを調べた。以上により



写真1-1. バイオナイロンを大量合成するための10L反応容器（本体は左

得られたサンプルの海洋環境における崩壊性を定性的に評価した結果、力学強度の測定不可能なレベルまで強度低下することが判明した。

#### 4. 結果及び考察

##### 1-1) バイオナイロンのkgスケール合成と添加物の検討

イタコン酸由来バイオナイロン繊維の社会実装を目指し、バイオナイロンへの物質添加により熱・力学的物性コントロールし、かつ繊維化を行い、高い熱・力学物性と海洋環境応答分解性を併せ持つ環境適応型プラスチック繊維を開発する研究に取り組んだ。

イタコン酸とヘキサメチレンジアミン

(HMDA)からのナイロンNylon 6i (iはイタコン酸の意味)を写真1-1の大量合成用容器にて1kgスケールで大量合成するのが可能であることが判明した。一方、着色および不均一化の問題が生じた(写真1-2左)。着色に関しては反応容器のシール部位のチェックを念入りに行うことで解消を試みたが、シール部位に関しては問題ないことが分かった。不均一化に関しては攪拌羽が直径5cm程度しかなかったのに対し、合成釜の直径が24cmもあり、重合後期に反応液の粘性が増加した際に攪拌がうまくなされていないと考え、攪拌羽の直径を12cm程度にまで大きくして再度合成を試みた。また、その際には重合度の上がりやすいイタコン酸とHMDAと11-アミノウンデカン酸(11AUA)を添加した系を選択した(Nylon 6i, 11)。具体的にはイタコン酸、ヘキサメチレンジアミン、11AUAの3つの原料をエタノールに溶解させ、60℃でそれぞれの溶液を少しずつ混合した。これにより得られた塩モノマーを融点まで加熱することでバルク重合を行い、改良型となるバイオナイロン(式1-1: Nylon 6i, 11)を合成した。ナイロンは一般的に過加熱により架橋する傾向にあり、本系に於いても同様の傾向があったため、適切な条件で合成を行う必要があった。11AUAを75%導入したNylon 6i, 11-75%に関しては220℃程度まで安定であり比較的重合を行いやすい組成物であったため、この組成物に関し企業への技術移転を行った。本系においては、塩モノマーとバイオナイロンの両方の大量合成法を完成させる必要があるが、両方の物質に関して最適化された大量合成条件を大手化学メーカーに技術移転しkgスケールで合成させることに成功した。Nylon 6i, 11-50%についても1kgスケールで大量合成するのが可能であった。ただ、反応液の中央付近では着色の程度が低く繊維化が可能であった(写真1-2右)。一方、反応釜の内壁付近にこびり付いた分画もあり、この分画は茶褐色であり良溶媒であるトリフルオロエタノールに溶解しない架橋体となってしまっていることが分かった。これは内壁付近がもっとも高温であり、熱電対の差し込み場所がさらに内側になっているため温度が想定値よりも高くなっていることが問題であると考えた。さらに攪拌羽の形状を根本的に改良する必要があることも判明した。その後、攪拌羽の形状をU字型にすることや、温度を段階的に上昇させる方法により問題は解決した。これらのサンプルはサブテーマ2に供した。その後いくつかのバイオナイロン



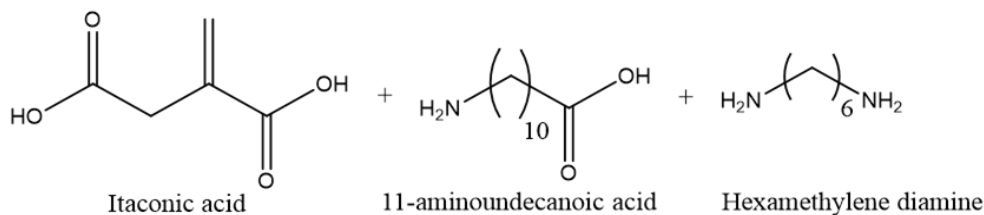
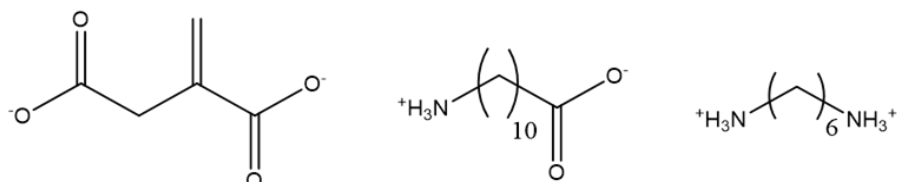
写真1-2. イタコン酸/HMDA/11AUA (50/50/50)の組成で大量合成したNylon6i, 11-50%の外観(左:合成直後の写真 右:条件最適化後に得たサンプルを繊維化したもの)



写真1-3. イタコン酸/HMDA/11AUA (12.5/12.5/75)の組成で最適化条件で技術移転により作製したNylon6i, 11-75%樹脂の外観

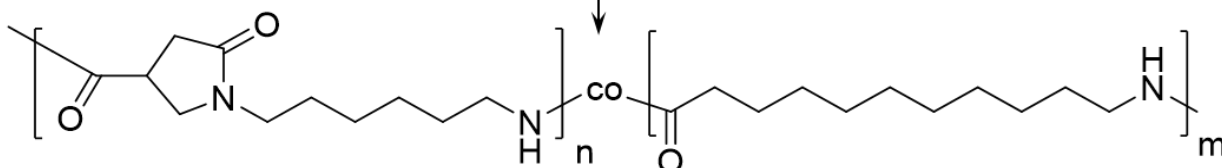
不均一化に関しては攪拌羽が直径5cm程度しかなかったのに対し、合成釜の直径が24cmもあり、重合後期に反応液の粘性が増加した際に攪拌がうまくなされていないと考え、攪拌羽の直径を12cm程度にまで大きくして再度合成を試みた。また、その際には重合度の上がりやすいイタコン酸とHMDAと11-アミノウンデカン酸(11AUA)を添加した系を選択した(Nylon 6i, 11)。具体的にはイタコン酸、ヘキサメチレンジアミン、11AUAの3つの原料をエタノールに溶解させ、60℃でそれぞれの溶液を少しずつ混合した。これにより得られた塩モノマーを融点まで加熱することでバルク重合を行い、改良型となるバイオナイロン(式1-1: Nylon 6i, 11)を合成した。ナイロンは一般的に過加熱により架橋する傾向にあり、本系に於いても同様の傾向があったため、適切な条件で合成を行う必要があった。11AUAを75%導入したNylon 6i, 11-75%に関しては220℃程度まで安定であり比較的重合を行いやすい組成物であったため、この組成物に関し企業への技術移転を行った。本系においては、塩モノマーとバイオナイロンの両方の大量合成法を完成させる必要があるが、両方の物質に関して最適化された大量合成条件を大手化学メーカーに技術移転しkgスケールで合成させることに成功した。Nylon 6i, 11-50%についても1kgスケールで大量合成するのが可能であった。ただ、反応液の中央付近では着色の程度が低く繊維化が可能であった(写真1-2右)。一方、反応釜の内壁付近にこびり付いた分画もあり、この分画は茶褐色であり良溶媒であるトリフルオロエタノールに溶解しない架橋体となってしまっていることが分かった。これは内壁付近がもっとも高温であり、熱電対の差し込み場所がさらに内側になっているため温度が想定値よりも高くなっていることが問題であると考えた。さらに攪拌羽の形状を根本的に改良する必要があることも判明した。その後、攪拌羽の形状をU字型にすることや、温度を段階的に上昇させる方法により問題は解決した。これらのサンプルはサブテーマ2に供した。その後いくつかのバイオナイロン



**Monomers****Salt formation**

EtOH | Stiring, 4 hrs, 60 °C

Dried | Vacuum, 12 hrs, 40 °C

**Polymerization**add 1wt% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> | RT, stirring, N<sub>2</sub>, 1 hrStiring, N<sub>2</sub>, 4 hrs, 220 °C

式1-1. イタコン酸、ヘキサメチレンジアミン、11-アミノウンデカン酸の三元系塩モノマーからの代表的なバイオナイロンの合成スキーム（塩モノマー法）

Nylon6i,11-50%、Nylon 6i,11-33%、Nylon 10i,11-75%においても同様に企業に技術移転を行った。Nylon6i,11-75%樹脂の外観を写真1-3に示すが写真左のペレットから分かるように着色の度合いが低く、繊維も良好に得られた（写真1-3右）。

**1-2) イタコン酸由来バイオナイロン繊維の作製と構造物性**

1-1項で合成した種々のNylon 6i,11に関シラボ内で簡易な手法で熔融紡糸し少量の繊維を作製し、その力学物性を引張試験により行った（写真1-2右）。その結果を熱物性と併せて表1-1に示す。本表から分かるように、ガラス転移温度は11AUAの添加により97°Cから40°C程度まで低下し、より低温で加工できるようになった。一方、HMDAよりも多くの添加モル量になると結晶化が進み融点が出現するために、融点以上で加工する必要が出てきた。融点は結晶化度にもよるが115-160°C程度であり分解温度400°C程度と比較して十分に低いために、加工性という観点では全く問題ないことが分かった。むしろ、融点が出現することで耐熱性が向上したとみなすことも出来、繊維としては扱いやすくなることが判明した。力学物性に関しては、熔融紡糸した繊維を対象に引張試験を行うことで求めた。表1-1から破

表1-1. イタコン酸、ヘキサメチレンジアミン (HMDA)、11-アミノウンデカン酸 (11AUA) からなる各種バイオナイロンの物性 (イタコン酸とHMDAは等モル、HMDA と11AUAの比率を変化させた)

HMDA/11AUA (mol/mol)	10%重量 減少温度 (°C)	融点 (°C)	ガラス転 移温度 (°C)	破断強度 (MPa)	破断伸度 (%)	ヤング率 (MPa)	靱性 (MJ/m <sup>3</sup> )
100/0	400	ND	97	95	3	580	1.2
50/50	424	ND	40	31	54	58	10
47/53	425	-	ND	41	54	69	17
44/56	424	-	ND	114	48	246	31
38/62	424	115	ND	115	49	345	33
33/67	428	135	ND	120	60	214	47
23/77	436	156	ND	80	70	200	46
17/83	425	160	ND	91	70	130	40

(注) ND: 検出されず

断強度、破断伸度、ヤング率がそれぞれ31~120MPa、48~70%、58~345MPaの範囲で制御できることが分かる。本バイオナイロンにおいて特徴的であるのがタフネス (ひずみエネルギー密度) であり最大47MJ/m<sup>3</sup>に至った。11AUA未導入のナイロンの靱性は1.2MJ/m<sup>3</sup>であることから11AUA添加には想定を超える効果があった。11AUAの導入によりガラス転移温度が下がる傾向にあり欠点であるともとれるが、53%以上の導入によりガラス転移温度が消滅し、実質上はガラス転移温度が軟化には関与しなくなるため、明確な融点の検出された62%以上の11AUA導入率においては軟化温度が100°Cを超える状態となった。つまり、釣り糸などの高配向結晶性繊維として用いる際には十分な耐熱性を有すると言える。さらに、11AUA導入率が62%および67%の組成物に関しては破断強度が100MPaを超え、含水率も2.7%およびこれ以下となった。これらの組成物のみで含水率3%以下、力学強度100MPa以上、耐熱温度100°C以上の目標を達成した。実際にかかなり高い力学物性をもち成形性も良好であり、技術移転した企業は本気でこれらのバイオナイロンの実用化に注力する方針を示している。

次に、表1-2に示すようにNylon 6i, 11-33%、50%およびNylon 6i, 11-75%にモンモリロナイトを少量添加 (0.5%から6wt%) することによる力学物性の制御を試みた。その結果、全体として弾性率と破断伸度の両方が上昇する添加率があり、結果として歪エネルギー密度である靱性 (タフネス) が291MJ/m<sup>3</sup>にまで達するレベルとなった。この数値は最高のタフネスを示すとされるジョロウグモのけん引糸 (111MJ/m<sup>3</sup>) の2倍以上にも及ぶ超高靱性となった。モンモリロナイトの導入に関しては適量があり、ヤング率、タフネスともに上昇したあとに下降する傾向にあった。また、破断強度は低下する傾向にあるために破断強度への要求度の低い応用には適用可能と考えられる。

続いて、炭素数の大きい長鎖ジアミン、長鎖脂肪酸、長鎖アミノ酸を用いたバイオナイロン組成物を合成し、その繊維に関して熱的力学的物性を調べた結果を報告する。結果は表1-3にまとめた。二元系は上から3段目までに記載しており、ジアミンの炭素数が8, 10, 12の単純な組成のものである。ガラス転移温度はいずれも50°Cを超えており力学強度は91-96MPaの範囲にあった。融点は存在しないため非晶性ナイロンであることが分かる。したがって特殊な使い方以外には応用は難しいかも知れない。一方、三元系であり表1-1と同様のジアミン/ジカルボン酸によるナイロンの合成システムに $\omega$ アミノ酸 (11AUAなど両端にアミノ基とカルボキシル基を持つもの) を任意の割合で添加する設計論で得た組成物が4から6段目までである。これと比較できるのは表1-1の2段目の組成物であるが、表1-1ではジアミンの炭素数が6であり、この場合には融点が明確に見られなかった。一方、表1-2に示すようにジアミンの炭素数を10, 11, 12と伸ばした際には明確に融点が検出され、その数値は152-156°Cであった。

同時にガラス転移温度はいずれも50°Cであり、破断強度は100MPaを超えるいずれも目標値を超える物性を示す優れたバイオナイロンであった。それ以降はジアミンの炭素数は6-12で、長鎖ジカルボン酸に関してイタコン酸と等モル共重合させたものである (式1-2)。いずれもガラス転移温度が50°C付近、融点は160°C付近、破断強度は100MPa付近の十分に高い物性値を示すものであった。これらに関して

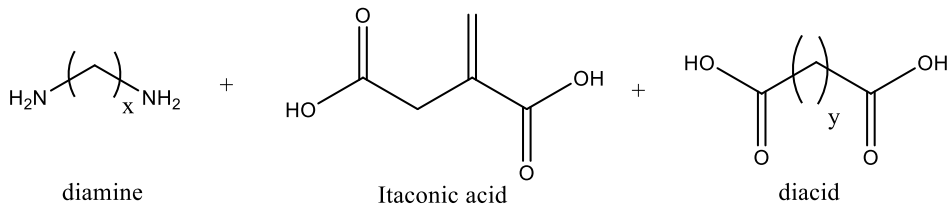
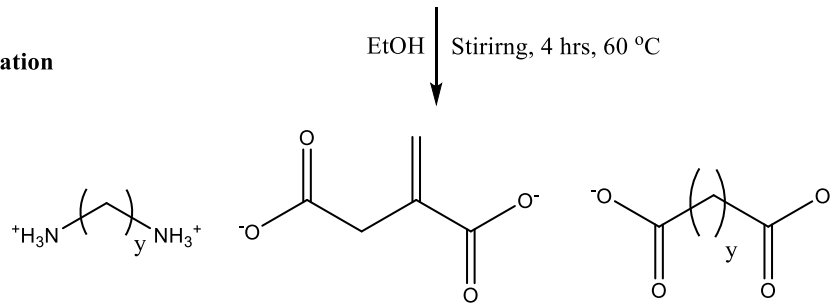
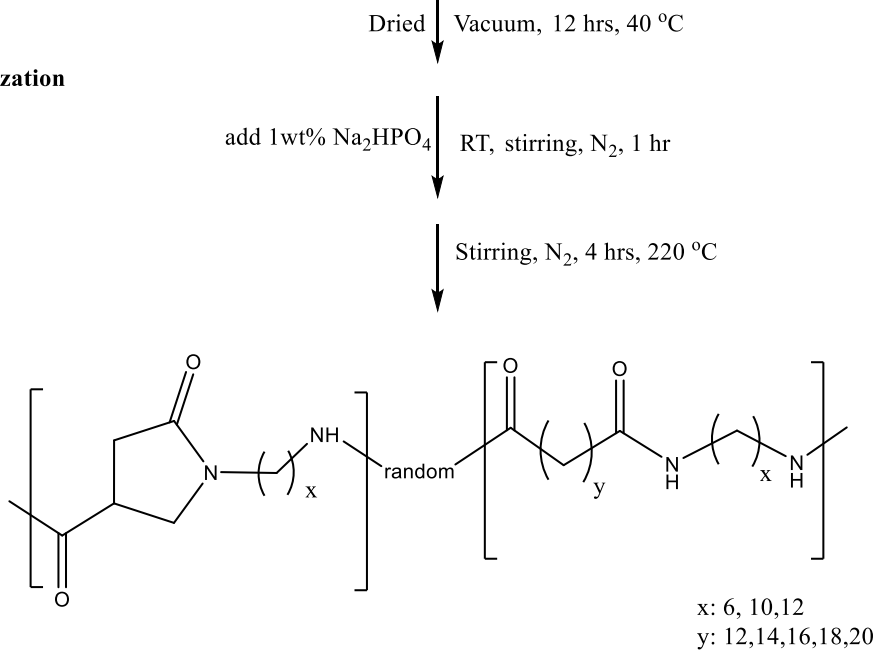
表1-2. Nylon 6i, 11とモンモリロナイトのコンポジットの力学物性

組成	11AUA (mol%)	MMT (wt%)	破断強度 (MPa)	破断伸度 (%)	ヤング率 (MPa)	靱性 (MJ/m <sup>3</sup> )
6i,11	33	—	20	87	250	15
6i,11	33	0.5wt%	26	718	300	124
6i,11	33	1wt%	21	1075	170	171
6i,11	33	3wt%	13	741	163	102
6i,11	33	6wt%	10	706	62	48
6i,11	50	—	105	60	200	50
6i,11	50	0.5wt%	76	150	302	104
6i,11	50	1wt%	65	428	211	291
6i,11	50	3wt%	24	923	129	282
6i,11	50	6wt%	21	725	181	120
6i,11	75	—	130	70	186	50
6i,11	75	0.5wt%	70	510	282	104
6i,11	75	1wt%	62	667	502	291
6i,11	75	3wt%	56	721	371	282
6i,11	75	6wt%	30	484	222	120

表1-3. 様々なジアミン、ジカルボン酸、アミノ酸を用いて得たバイオナイロンの各組成と熱的力学的物性

ジアミン/ ジカルボン酸 (アミノ酸)	組成比	破断強度 (MPa)	破断伸度 (%)	ヤング率 (MPa)	10%重量 減少温度 (°C)	ガラス 転移温度 (°C)	融点 (°C)
8/i	50/50	94	6	250	411	60	ND
10/i	50/50	91	10	242	415	57	ND
12/i	50/50	96	12	255	413	55	ND
10/i(11)	25/25(50)	105	67	198	421	50	152
11/i(11)	25/25(50)	116	70	206	424	50	156
12/i(11)	25/25(50)	120	72	207	428	50	154
10/i 12	50/25 25	120	70	200	439	50	155
12/i 12	50/25 25	115	65	180	443	45	155
6/i 14*	50/25 25	ND	ND	ND	426	50	160
6/i 16	50/25 25	98	9	200	427	50	161
6/i 18	50/25 25	101	10	215	436	50	166
6/i 20	50/25 25	96	10	189	430	44	158

\*ND: 6/i 14に関しては繊維化が不良であり力学物性は測定不可であった。

**Monomers****Salt formation****Polymerization****Bionylon structure**

式 1-2. 長鎖ジアミン、イタコン酸、長鎖ジカルボン酸の三元系塩モノマーからのバイオナイロンの合成スキーム

は物性値に関しては大きな違いが無い場合、バイオ由来度がプラスチックとしての価値となると考えられる。将来的にはいずれもバイオ由来物質になりうるものであるが、現状ではイタコン酸以外には、C10のセバシン酸、デカメチレンジアミン、11AUA が代表的なバイオベースモノマーである。これを考えると2段目と4段目のモノマーが100%のバイオ由来度となるナイロンであり、商品価値を高く維持させることが出来るものである。特にNylon10i, 11 (表1-3では10/i(11)) に関しては目標値を全て達成する優れたサンプルである。また、Nylon6i, 11-75%のサンプルを対象に光触媒である酸化チタンおよび光増感剤であるベンゾフェノンを複合化した所、良好にコンポジットが得られることが分かった。これらのコンポジットの評価結果は項目 1-3 で述べる。

### 1-3) 高強度なバイオナイロン繊維の作成

本項目では、まず成形性の観点からもっとも良好であるNylon6i, 11-75%を選択して検討した。繊維(0.1mmφ)だけではなく、太目のフィラメント(1mmφ程度(3Dプリンティングに活用可能なサイズ))、射出成型体の3通りのものを作製した。その結果、図1-1の上段に示すように、いずれも良好な成形性を示し均一な成形体を得られた。着色しているのは酸化防止剤としてヨウ化銅を極少量添加しているためであるが、色以外には物性的に何の影響も無かった。現在は技術移転企業との共同で、この添加処理をしなくても酸化を極度に抑制できる条件を見出している。これらのサンプルのX線回折測定を行った。まずX線二次元回折像を撮影し、それを全方位に積算したものを図1-1の中段に示す。いずれも回折角 $2\theta$  20.5°程度の位置に明確な回折ピークが見られ、結晶性であることが確認できる。また、水浸サン



写真1-4. バイオ由来100%のバイオナイロン細繊維(0.015φ)の写真(左:Nylon5i, 11 右:Nylon10i, 11)

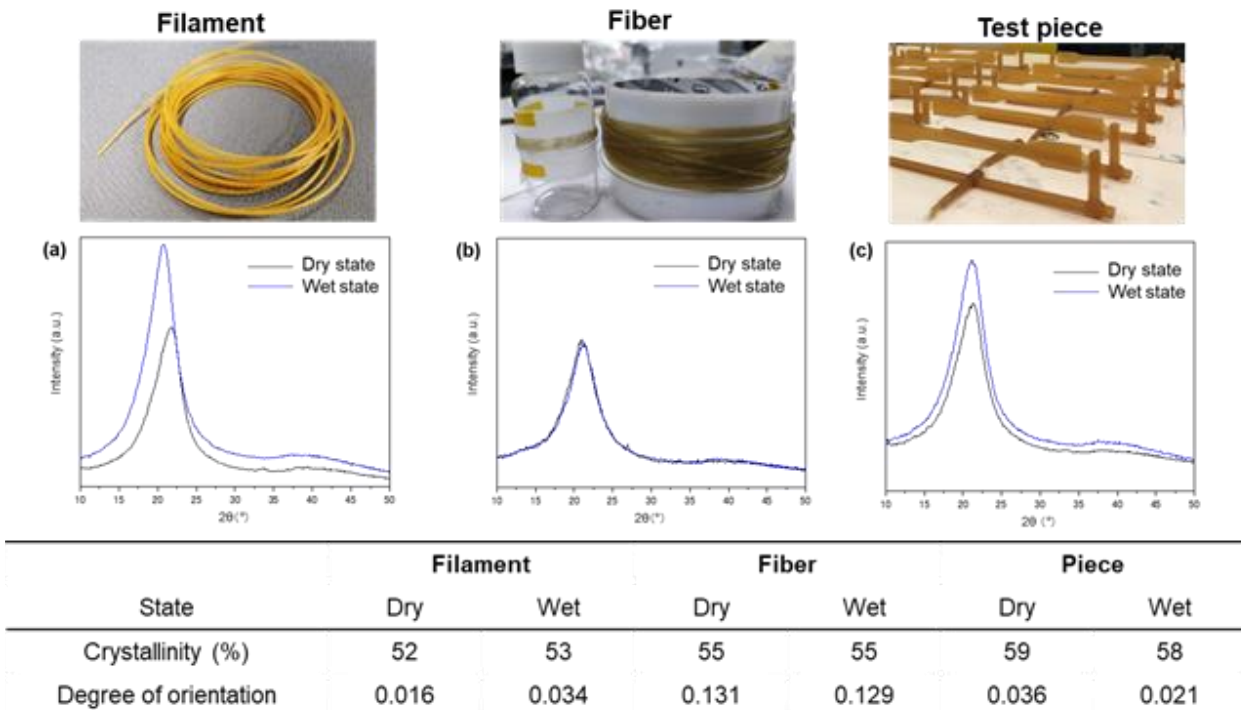
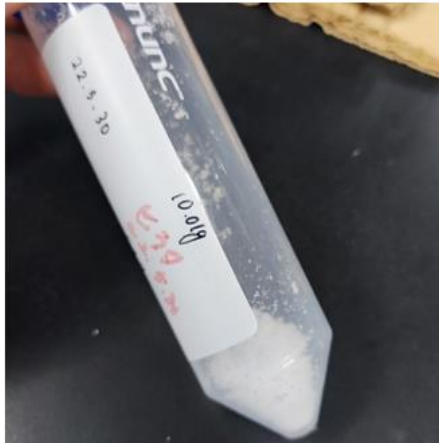


図1-1. Nylon6i, 11-75%のペレットから作成した種々の成形体 上図: フィラメント、繊維、射出成型体テストピースの写真 中段: それぞれの成形体のX線回折写真から積算したX線回折図(乾燥状態、水浸サンプル) 下段: 中段のX線回折図から導出した結晶化度およびX線写真から導出した配向度

ブルの回折ピークの方が乾燥サンプルのものよりも若干大きくなる場合があることも定性的に確認できる。フィラメントの場合に水浸により回折角が少しシフトしていることが分かるが、結晶性が水の影響を受けたのかもしれない。ただ、このサンプルだけの現象であることとシフト値があまり大きくないために深く検討する必要性は無いと判断した。回折ピークから結晶化度を求めると52-59%の範囲で推移することが分かり、成形体の形状などの影響は大きくは受けず、水の影響もそれほどは大きくないことが分かった。配向度に関してはいずれのサンプルに関しても一般のナイロン繊維（配向度：0.7以上）と比較して遥かに低いが、これは特に延伸処理を施していないことと、分子骨格中に環構造を持つために一般のナイロンよりも太い骨格となるため、配向度は上がりにくいのであろう。フィラメントとファイバーの乾燥状態の配向度が8-9倍程度も異なることから、繊維径を細くすることで配向度が上がるという一般的な性質を保持していることも分かる。

続いて、写真1-3の右に示す細繊維（0.015φ）は200℃、引張速度 100 mm/minの条件で紡糸したものであるが、これは360MPaもの高破断強度を示し、目標値を遥かに超えるものであった。X線回折によると十分な配向度に至っておらず、延伸条件を最適化することでさらに力学強度が上昇すると考えられる。この細繊維の融点を測定した所172℃となり、繊維径を細くしただけで結晶化温度も上昇することが

### 非可食バイオマスから 得たイタコン酸



### ナイロン繊維



写真1-5. 非可食バイオマスから得たイタコン酸の写真（左）とそれから得られたNylon10i繊維の写真（0.1φ程度の良好な繊維が得られている）（右）



0 hour

16 hours

72 hours

>100 hours

## ラボ中水浸下における光崩壊を確認

図1-2. Nylon6i, 11-75%のフィルム片を蒸留水に浸し高圧水銀灯で照射した時のフィルム形状変化

分かった。同様の条件で、Nylon5i, 11およびNylon10i, 11を合成しその繊維化を行った。Nylon5i, 11に関しては上記の表中には無いが、後にバイオ由来度および原料入手性の観点から社会実装において有力となる可能性があり、直接Nylon6i, 11の合成条件で大量合成を行ったものである。結果として写真1-4に示すように、極めて良質な繊維が得られ100%バイオ由来ナイロン細繊維を得るに至った。これらの融点はNylon5i, 11に関しては169℃、Nylon10i, 11に関しては172℃であり、耐熱性も十分に高かった。以上によりこれらの組成物も社会実装において有力と考えられる。

また、写真1-5に示すようにサブテーマ3より提供された非可食バイオマス由来イタコン酸を用いてバイオナイロン合成を試みた。Nylon10iを合成した結果、良好な樹脂が得られ、その繊維作製を試みたところ、十分に高い成形性および強度を持つ繊維が得られることが分かり目標を達成した。なお、今後、kgスケールで非可食バイオマスからイタコン酸が得られるようになれば、系統的な力学物性評価を行う予定である。



写真1-6 Nylon6i, 11-33%とベンゾフェノンとのコンポジットフィルムの写真

写真1-7 Nylon6i, 11-75%と酸化チタンとコンポジットフィルムの写真  
(北陸先端大谷池教授協力)

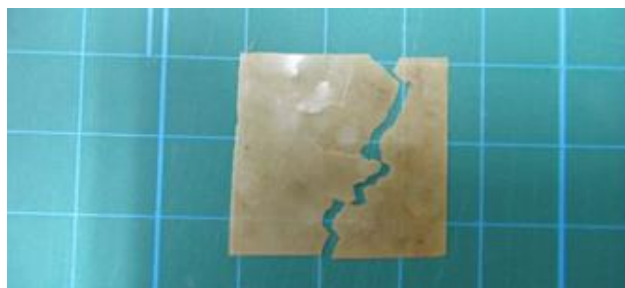


図1-3. Nylon6i, 11-75%と酸化チタンとのコンポジットフィルムを海洋環境中に暴露した時の写真

#### 1-4) 海洋環境で劣化・分解の進むバイオナイロン繊維の開発

本項目は、サブテーマ2と密接に関係する項目であり劣化・分解を専門とするJAMSTECのチームが定量的な評価を行っている。ここでは、サブテーマ1の担当者の行える範囲でフィルムを用いて得た定性的なデータで議論を行った結果を報告する。当初は繊維で試験を行う予定であったが、海洋環境中に繊維を浸漬すると紛失することが多く試験が困難であるために観察の容易なフィルムを選択した。図1-2はNylon6i, 11-75%の試験片を蒸留水中に浸漬し、上方から高圧水銀灯を照射して、その形状変化を観察した結果である。左端の写真は光照射前のサンプルフィルム片の写真であり、白色の非定型な形状のフィルム片を6枚準備し、ビーカー中で蒸留水に浸した状態である。フィルムサイズはビーカーの円底の

直径が30mmであることからセンチメートルスケールのものであることが確認できる。膜圧は50ミクロン程度のもを用いた。16時間照射後の写真を左から二番目の写真に示すが水に膨潤し始めており、白色度が低下し、変形も起こり、一部が崩壊していることが分かる。この高圧水銀灯の照射強度と太陽光を比較すると1時間照射は海洋における太陽光の1か月程度の光エネルギーに相当する。したがって、16か月以内に本サンプルは崩壊し始めると推測される。その後、72時間、100時間以上と照射時間を延ばすことで、その崩壊度は上がり続けることが分かった。崩壊の程度が大きいためサンプル重要や体積などの定量的な評価は出来なかったが、本現象はナイロン11のホモポリマーでは全く起こらなかったため、イタコン酸に由来するピロリドン環の構造変化に基づくものであることが分かる。

このような光崩壊現象は12.5%のみのイタコン酸を使用したのみで観察できるが、これを制御するための添加物として光増感剤であるベンゾフェノンおよび光触媒である酸化チタンを用いて観察を行った。コンポジット化そのものは項目1-1において良好に行われたことを記載しているが、本項目では光崩壊性の制御に関して報告する。写真1-6にはベンゾフェノンを導入したフィルムの写真を示す。この時、海水と同じNaCl濃度に浸して光崩壊を調べ、可視光により崩壊がみられるようになることを期待したが、ベンゾフェノンの効果は見られず、フィルムは安定であった。また、写真1-7に示すようにNylon6i, 11-75と酸化チタンとの均一なコンポジットフィルムが問題なく作成できたため、これを海洋環境中に暴露した。

図1-3に示すように海洋環境中に暴露後に添付のようにひび割れが起こるなど明らかな劣化が確認された。これは引張試験に耐え得るほどの強度は無く明らかな強度低下がみられた。したがって、海洋環境中において50%以下の力学強度低下が確認されたと言える（目標達成）。モンモリロナイトを導入した時のタフネス増加に関しては項目1-1で述べたように目標を大きく上回る結果となった。以上のように何れの項目に於いても目標を達成し、社会実装に向けた研究をさらに展開している状況にある。

## 5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1-1「バイオナイロンのkgスケール合成と添加物の検討」

目標を上回る成果をあげた：達成率100%

- ✓ 5kgスケールでバイオナイロンを大量合成した。
- ✓ ガラス転移温度50℃以上の複数のバイオナイロンを得た。
- ✓ 長鎖脂肪酸を高含させたサンプルで含水率2.7%以下となった。
- ✓ 光増感剤、光触媒、モンモリロナイトとのコンポジット作製も良好であった。

サブテーマ1-2「イタコン酸由来バイオナイロン繊維の作製と構造物性」

目標を大きく上回る成果をあげた：達成率100%

- ✓ 力学強度360MPaの繊維を得た
- ✓ 非可食バイオマス由来イタコン酸からのバイオナイロン繊維を得た。

サブテーマ1-3「海洋環境で劣化・分解の進むバイオナイロン繊維の開発」

目標どおりの成果をあげた。：達成率100%

- ✓ モンモリロナイトを加えた時に最大タフネス291 MJ/m<sup>3</sup>のサンプルが得られた。
- ✓ コンポジットの海洋分解性を評価した結果、海洋中で崩壊する現象が確認され強度測定が不可能なレベルとなった（強度低下率100%）。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。



## II-2 バイオナイロンの分解性評価と制御

国立研究開発法人 海洋研究開発機構

超先鋭研究開発部門 若井 暁

超先鋭研究開発部門 野牧 秀隆

海洋機能利用部門 磯部 紀之

### [要旨]

バイオナイロンの自然光暴露下での海水への水溶化および海水環境中での生分解について検討を行った。14日間の暴露において水溶化が生じていることを明らかにし、質量分析から水溶化状態を明らかにした。加えて、海水を用いたBOD試験により、バイオナイロンが海水性微生物によって分解されることを示し、さらにバイオナイロンを分解して自身の栄養源にすることが可能なバイオナイロン資化性微生物を複数取得した。これらのバイオナイロン資化性微生物のゲノムおよびトランスクリプトーム解析から、ナイロン分解酵素が常に発現状態にあり、バイオナイロンの存在下で様々な遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。水溶化したバイオナイロンの生物毒性は、原材料レベルに留まり、環境調和性が示された。さらに、深海模擬環境での分解試験を実施し、深海環境においても様々なバイオナイロン資化性微生物や深海堆積物中の微生物による分解可能性が示唆された。以上の結果より、環境残存性が既存のナイロン系材料よりも低く、より環境調和性の高い材料であると結論付けた。

### 1. 研究開発目的

サブテーマ1において開発されたバイオナイロン部材の海洋環境での生分解性について、再現可能な分析方法で評価すると共に、水溶化および分解によって生じた産物が環境に及ぼす影響を生物毒性の観点から評価し、バイオナイロンの環境適応性を明らかにする。

### 2. 研究目標

バイオナイロンの海洋環境での分解性について、BOD試験、生物毒性評価を含む実験室内での分解実験、および実海洋環境と模擬深海環境での分解実験を行うことで新規海洋生分解性プラスチック素材としての有用性を評価する。

### 3. 研究開発内容

#### (1) 【令和2年度】バイオナイロンの海洋環境分解性評価

サブテーマ1から供給されるバイオナイロンを用いて、実験室レベルでの分解特性を評価する。具体的には、自然海水、コントロールとして滅菌海水、加速試験として希釈栄養塩添加海水、および海洋堆積物ありの各条件の培養瓶にバイオナイロンを入れて培養し、経過時間ごとでの分解状態を調べる。同時に、加速試験として希薄栄養塩を添加した系および自然海水中的の微生物を濃縮した系、コントロールとして滅菌した海水を用いた系も実施する。

分解状態は、分解試験後の形状・重量変化の測定、表面状態の電子顕微鏡観察により評価する。また、バイオナイロン表面に集積した微生物の群集構造解析、海水や活性汚泥を用いた生物化学的酸素要求(BOD)試験も同時に実施する。

#### (2) 【令和3年度】バイオナイロンの太陽光照射下での分解性評価と分解物生物毒性試験

##### ・バイオナイロンの太陽光照射下での分解性評価

実環境(下記、aおよびb)におけるバイオナイロンの分解性を、形状・重量変化の測定、および、表面状態を電子顕微鏡観察により評価する。また、海水を用いたラボベースでの試験と分解に関わる微生物の違いを理解するため、各条件での微生物群集構造解析も実施する。

(a)海洋表層環境での分解評価：光刺激応答性での分解特性獲得を調べるため、実環境にて太陽光が当たる条件、遮光条件、および、一定期間太陽光が当たる条件に置いた後に遮光する三つの条件で分解性を評価する。

(b)干潟環境での分解評価：海洋環境に流出したバイオナイロンが必ず外洋に運ばれて深海に沈降するとは限らず、海岸に滞留したり打ち上げられることも予想されるため、干潟での分解特性についても評価する。

・分解物の生物毒性試験

バイオナイロンが海洋環境で生分解されることは、海洋ごみ対策の観点から重要であるが、分解物による生態系破壊は避けるべきである。したがって、本項目では、令和2年度で実施した実験室レベルでの分解試験から得られる分解物及び中間分解産物を用いて、生物毒性評価を行う。生物毒性評価については、OECDのガイドラインに従い、微細藻類を用いた生育阻害試験、活性汚泥を用いた酸素吸収試験を実施する。

(3) 【令和4年度】深海模擬環境における分解特性評価

JAMSTECでは種々の深海微生物の分離培養、圧力応答などの研究目的で、深海の高圧環境をシミュレートできる加圧培養装置を複数有している。深海底でのバイオナイロン生分解性を評価するため、この加圧培養装置を用い、厳密にコントロールされた加圧時間、物理化学条件での分解試験を行う。

具体的には、(1)および(2)(b)の条件をベースに、加圧培養装置内で分解性評価を実施する。加圧条件は、水深1000～6000 mに相当する10～60 MPaとする。培養試験後、バイオナイロンの付着微生物の群集構造解析、重量測定、電子顕微鏡での形状観察を実施する。

#### 4. 結果及び考察

##### 2-1) バイオナイロンの海洋環境分解性評価

本研究開発項目では、イタコン酸及びジアミンにより合成されたNylon 6iは紫外線に曝されることで親水化が進むことから、屋外の自然光暴露下でNylon 6iの親水化、および、海水中微生物による水溶性ポリマーの分解について検討した。図2-1(A)に示した状態で自然光に曝した結果、Nylon 6iの試験片の親水化が進み、図2-1(B)に示すような親水化及び水溶化が見られた。14日間の暴露試験終了後、Nylon 6iテストピースは原形をとどめないほど水溶化したため、当初予定していた重量測定や形状観察について実施をせず、水溶化したポリマーを質量分析により分析することとした。

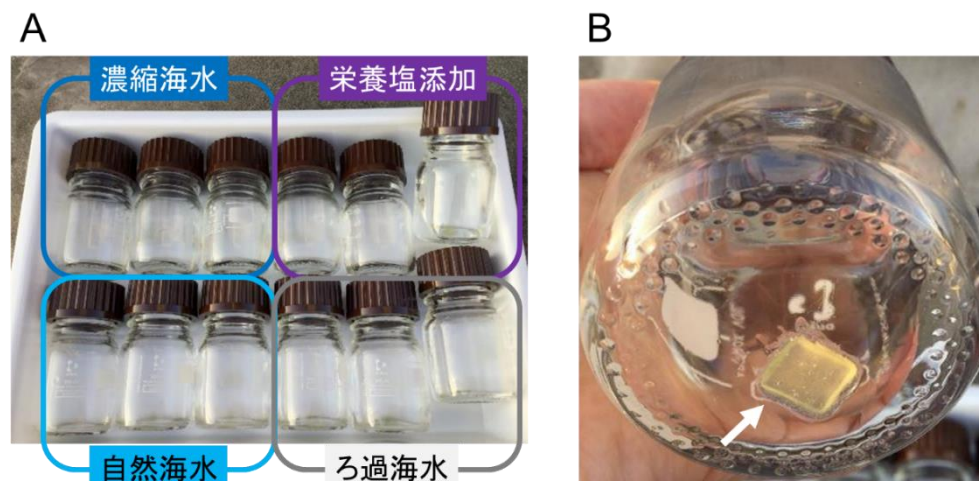


図2-1 バイオナイロンNylon 6iを用いた自然光暴露実験 A：実験セット外観。B：試験開始一日後のバイオナイロンの様子

MALDI-TOF MS解析の結果を図2-2に示す。14日間の自然光および海水への暴露により質量649、859、1069、1279、1490、1700という約210間隔の鋭いピークが観察された。210という質量はイタコン酸 (IA) とヘキサメチレンジアミン (HMDA) から成るモノマー単位に相当し、これらのピークはそれぞれ三～八量体に相当する質量をもつオリゴマー状態で水溶化していることを明らかにした。また、各ピークの前には質量が18少ない脱水した物質のピークや、IAあるいはHDMAユニットが残留していると思わ

れるピークも検出された。これらのピークは、実験開始時の試験液には検出されないため、暴露実験中に試験液に溶出したと考えられる。

これらの水溶化オリゴマーは、自然海水や濃縮海水だけでなく無菌的なろ過海水においても観察されることから、検出されているオリゴマーは自然光（紫外線）によって誘導されているものと考えられ、生物的作用での二酸化炭素までの分解には二週間以上の暴露実験が必要と考えられる。一方で、使用したバイオナイロンが完全に水溶化した場合、3~4 g/Lというかなり濃い濃度で試験液中に存在するため、ろ過海水との差がマスクされた可能性もある。

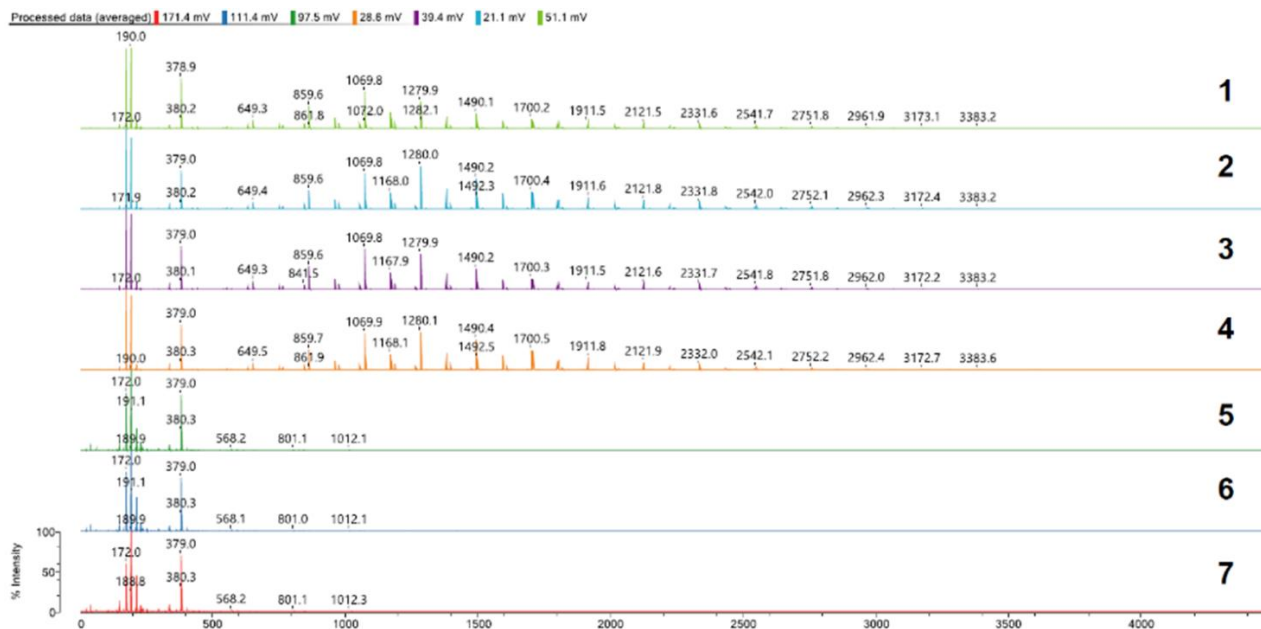


図 2-2 自然光暴露実験試験液のマススペクトル 1：自然海水（14日間暴露）、2：ろ過海水（14日間暴露）、3：生物濃縮海水（14日間暴露）、4：栄養塩添加海水（14日間暴露）、5：自然海水（ゼロ日目）、6：ろ過海水（ゼロ日目）、7：生物濃色海水（ゼロ日目）

本研究開発項目では、水溶化されたバイオナイロンがオリゴマーの状態では環境に残留せず、二酸化炭素にまで分解されることが生分解性としては理想的であることから、淡水系で活性汚泥等を用いた各種化合物の分解試験に使用実績のあるBOD試験をバイオナイロンおよび海水環境で検討した。淡水系のBOD試験で圧力センサー式ボトルトップ型BOD試験機の使用実績があることから、本研究においても同様のBOD試験機を用いて海水を使用したBOD試験について条件検討を実施した。大腸菌をモデル微生物として海水環境でグルコース分解に対するBOD試験をプレテストとして実施し、グルコース濃度依存的なBODを測定できることを確認した（図 2-3 (A)）。

次に、海水にバイオナイロンの構成塩であるイタコン酸とヘキサメチレンジアミン、およびイタコン酸代謝の上流に位置付けられるピルビン酸を添加して、BOD試験を実施した（図 2-3 (B)）。海水単独では、BODは検出限界以下であり、代謝可能な基質が存在する時にBODが上昇することが分かる。イタコン酸単独、ヘキサメチレンジアミン単独、それらの混合物でもBODの上昇が見られた。ピルビン酸が培養24時間後でBODの上昇がみられる一方で、イタコン酸やヘキサメチレンジアミンでは、それぞれ48時間、72時間と遅れる傾向にあり、ピルビン酸の様に細胞内に常に存在するような代謝産物に比べて代謝されるまでに時間を要する可能性が見られた。また、混合基質では、代謝開始がヘキサメチレンジアミンに引きずられる形で遅延しており、各1 mMを混合した基質では試験期間中にBODの上昇が見られなかった。

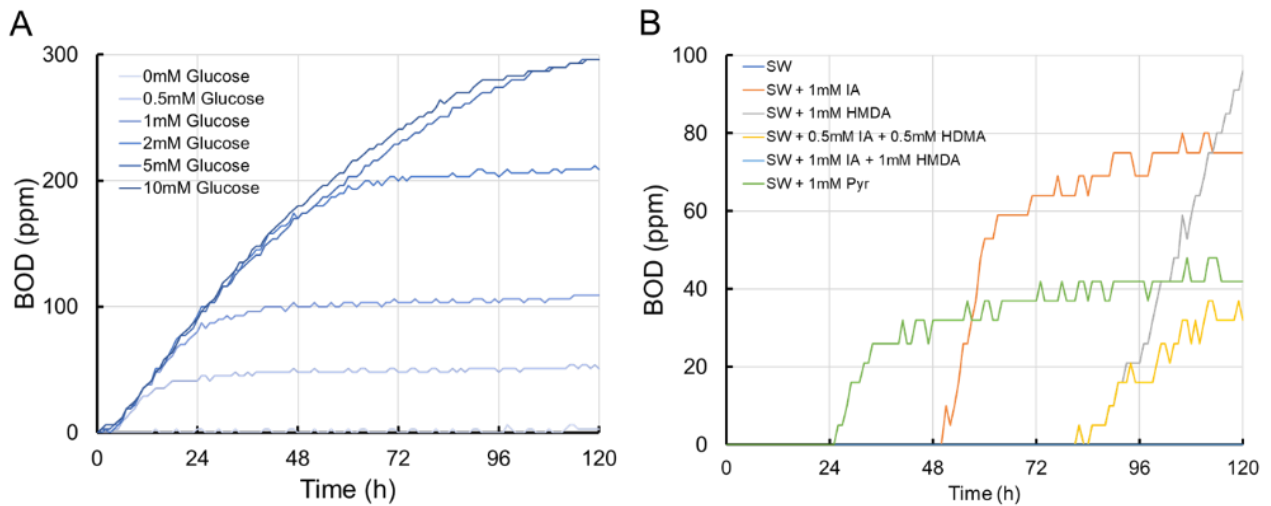


図 2-3 大腸菌 (A) および自然海水 (B) を用いたBOD試験

次に、海水および海水堆積物を添加したBOD試験を実施した (図 2-4)。海水および堆積物のみでも28日間で約200 ppmのBOD値が見られる。これは、海水や堆積物に含まれる有機物等を利用して微生物が酸素呼吸をしている為であり、これよりも高いBOD値が出ると添加した物質が微生物の呼吸基質として使われることになる。生物分解が可能なセルロースをポジティブコントロールとした場合、試験開始1日後から有意にBOD値が上昇しており、14日後で500~600 ppmに達している。これは、海水および堆積物中の微生物がセルロースを分解して生じたグルコースを基質として呼吸をしたことによるものである。同様に、Nylon-6iも培養四日後に急激なBOD値の立ち上がりを示しており、Nylon 6iが微生物の呼吸基質として使われていることを示している。セルロースに比べて立ち上がりの開始が遅れるが、立ち上がった後の傾きはむしろセルロースよりも大きく、かなり速いスピードで代謝されていることが分かる。これは、バイオナイロンが呼吸基質として使えるユニット迄分解されるために必要なラグタイムが存在し、ある程度まで分解が進むと一気に二酸化炭素までの分解反応が進むことを示唆している。一方で、ポリアミド11やポリ乳酸では、有意なBOD値の立ち上がりが見られず、海水・堆積物環境では、ほとんど分解しないことを示している。

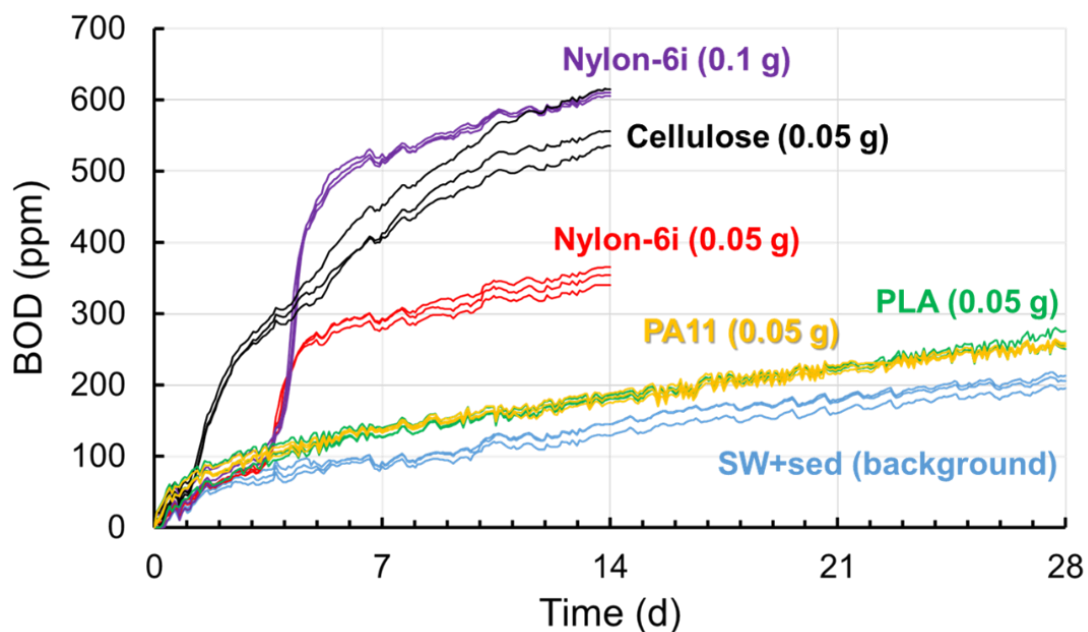


図 2-4 堆積物存在下でのBOD試験

自然海中の微生物は全球的に見た時に同一ではなく、採水地点ごとである程度異なり、特に内湾と外洋では無機および有機栄養塩濃度の違いにより大きく異なる。そこで、内湾に位置するJAMSTEC横須賀本部前から表層水（以下、横須賀海水と呼ぶ）、および、外洋に位置付けられる中部沖縄トラフ表層水（以下、沖縄海水と呼ぶ）を採水し、微生物群集構造の比較を行った。また、実験に使用するにあたり、低温（4℃）での貯蔵が行われることから、横須賀岸壁海水を低温室で一カ月保存した後の微生物群集構造の変化を調べた。

網レベルで微生物群集の存在比を示した積み上げ棒グラフを図2-5に示した。内湾に位置する横須賀海水では、*Alphaproteobacteria* (33.2%)、*Cyanobacteria* (27.9%)、*Bacteroidia* (26.5%)、*Gammaproteobacteria* (3.9%) が主要な構成微生物であったが、一カ月低温で保存することで、*Alphaproteobacteria* (30.8%)、*Cyanobacteria* (3.0%)、*Bacteroidia* (33.3%)、*Gammaproteobacteria* (26.2%) に変化した。他方、沖縄海水では、*Bacteroidia* (2.6%) が顕著に少なく、*Alphaproteobacteria* (29.0%)、*Cyanobacteria* (33.4%)、*Gammaproteobacteria* (24.8%) が主要構成微生物であった。このように、使用する海水によって微生物の構成種が大きく異なるため、海水環境での生分解性評価を行う際に、どのような海水を使用するかが実験結果に影響すると言える。

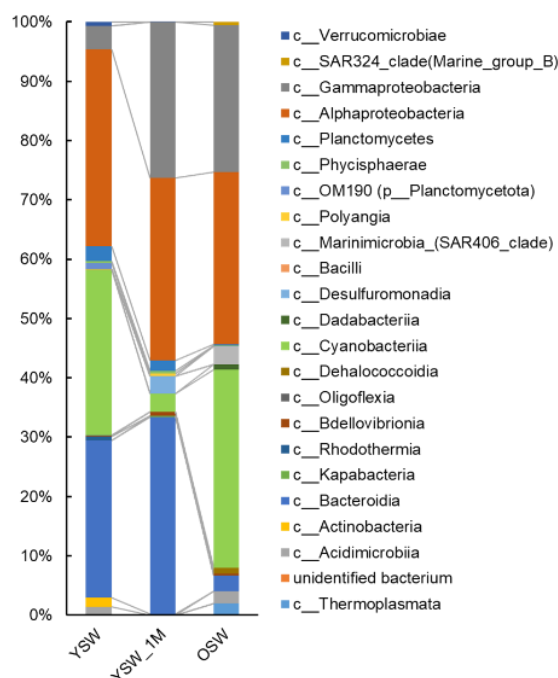


図2-5 使用した海水中の微生物群集構造 各サンプルの微生物を網レベルで集計し、積み上げ棒グラフにより存在率としてプロット。YSW：横須賀海水（採水直後）、YSW\_1M：横須賀海水（低温保管一か月後）、OSW：沖縄海水（採水直後）

使用する海水によって微生物群集構造が異なることから、Nylon 6iを用いて、横須賀海水および沖縄海水を用いた自然光暴露実験を実施し、14日間の培養後の微生物群集構造を解析し、 $\beta$ 多様性（サンプル間の種多様性）をUniFrac距離に基づく二次元グラフにプロットした（図2-6）。横須賀海水を使用した場合はプロットの右上に集中的に集まり、沖縄海水を使用した場合はプロットの左上に集まる傾向があった。UniFrac距離に基づく二次元グラフでは、その距離が微生物の構成種の違いを反映しており、離れた場所に位置するほど微生物群集構造が異なることを意味している。したがって、バイオナイロン素材として同じNylon 6iを使っても、横須賀海水と沖縄海水で異なる微生物群集構造の遷移挙動を示すと言える。Nylon 6iは自然光暴露実験後の溶液の質量分析から、バイオナイロン由来オリゴマーが検出されており、これらのバイオナイロン由来オリゴマーあるいはその部分分解物をそれぞれの海水中の微生物が利用することで、微生物群集構造が変化したと考えられる。一方で、自然海水、生物濃縮海水、栄養塩添加海水のいずれを使用した場合でも、横須賀海水と沖縄海水でそれぞれのクラスターを

形成しており、これらの人為的操作が群集構造に大きく影響していないことが示された。

次に、横須賀海水を使用して、SA、DDA、AUAの三種のバイオナイロンを用いた自然光暴露実験後の微生物群集構造についても解析した。これらの三種のバイオナイロンを用いた場合、Nylon 6iとは逆方向の左下方向にプロットが分布しており、明らかに異なる微生物群集構造になったことが示された。また、バイオナイロンDDAを使用した際は近い距離にプロットが集約したが、SAとAUAでは試験条件（自然海水か生物濃縮海水か）でプロットが分散した。この時の試験条件と分散に特定の傾向はみられず、何が原因となっているかは不明であるが、Nylon 6iを用いた試験とは明らかに群集構造の変化のベクトルが変わっており、水溶化したバイオナイロン分解産物が微生物群集構造に影響していることが強く示唆される。また、SAやAUAの一部では横須賀海水を使用しているにもかかわらず沖縄海水の群集構造に近づいており興味深い。

次に、自然光暴露実験後の各サンプルの代表的なものについて、その構成微生物の割合を網レベルで図2-7に示した。横須賀海水を用いたNylon 6iでは、*Cyanobacteria*の減少と*Gammaproteobacteria*の増加が傾向として見られ、沖縄海水ではその特徴が顕著に出て*Gammaproteobacteria*が全体の8~9割を占めるほどに増加していた。他方、添加物ありバイオナイロンでは、SA-SW-Liq以外で、*Bacteroidia*と*Cyanobacteria*の顕著な減少が観察され、*Alphaproteobacteria*が主要構成微生物となっていた。

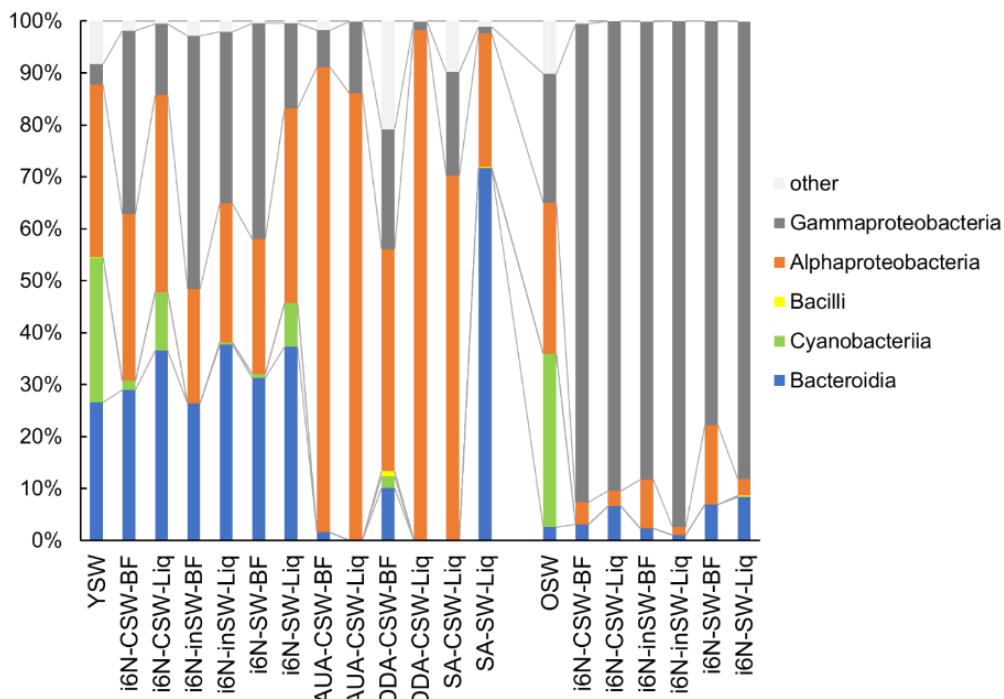


図2-7 使用海水及び自然光暴露後の微生物群集構造 各サンプルの微生物を網レベルで集計し、積み上げ棒グラフにより存在率としてプロット

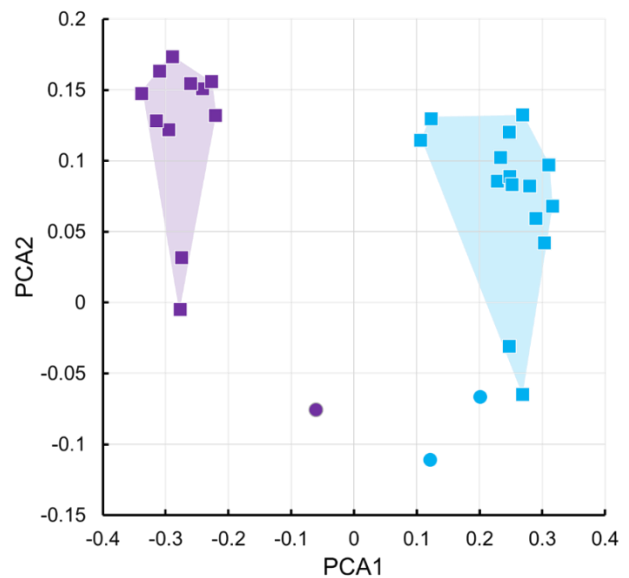


図2-6 海水及び自然光暴露実験後の微生物群集構造のβ多様性 Unweighted UniFrac距離に基づく主座標分布プロット。水色背景：横須賀海水サンプルのクラスター、紫背景：沖縄海水サンプルのクラスター

## 2-2) バイオナイロンの太陽光照射下での分解性評価と分解物生物毒性試験

2-1) において明らかになったように、バイオナイロンは水溶化すると海水中に速やかに溶解するため、実環境での評価を実施するのが難しい。そこで、本研究項目では、実海洋環境や干潟での暴露実験を回避し、これらの環境を明環境および暗環境と定義して紫外線照射後バイオナイロンと未照射ナイロンを用いて実験を実施した。

分解性の一つの評価方法として2-1)と同様にBOD試験を実施した。暗条件を想定した未照射バイオナイロンを用いた場合、コントロール区であるバイオナイロン未添加の場合と同じプロットを示した(図2-8(A))。これは、水溶化反応が起こっていない場合には、生物分解を受けないことを示している。さらに、紫外線照射したバイオナイロンでは、濃度依存的にBOD値が上昇しており、微生物による呼吸基質として水溶化バイオナイロンが消費されていることを示している(図2-8(B))。バイオナイロンを0.1 g使用した場合、450 ppm程度で反応が飽和しており、バイオナイロン無添加区との差分からバイオナイロン消費に利用された樽俎量を求めて分解率を計算した結果、約70%まで分解されていることが示された(図2-8(C))。

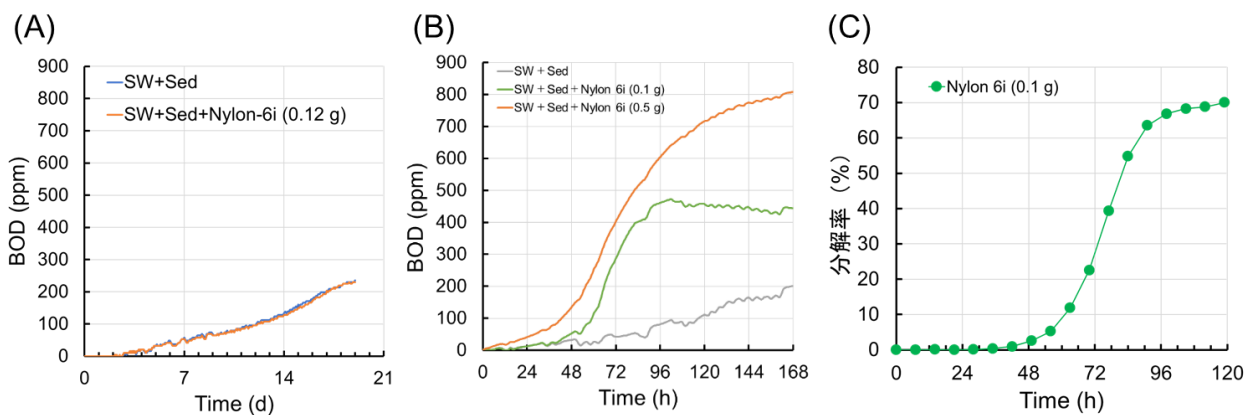


図2-8 海水と堆積物を用いたBOD試験 (A)未照射バイオナイロン、(B)紫外線照射バイオナイロン、(C)分解率

BOD試験においてバイオナイロンが微生物分解を受けていることが強く示唆されたため、MALDI-TOF-MSを用いて質量分析を行い、水溶化したバイオナイロンの分解状況について調べた。バイオナイロンを添加した区画では、2量体および3量体に由来するピークが検出され、バイオナイロンを添加していない区画ではこれらのピークは検出されなかった(図2-9)。2-1)の水溶化バイオナイロンの質量分析では、5量体をピークトップとして多数のポリマー・オリゴマーピークが検出されたが、BOD試験後には4量体以上のピークが有意に減少しており、実際に分解されていることが証明された。

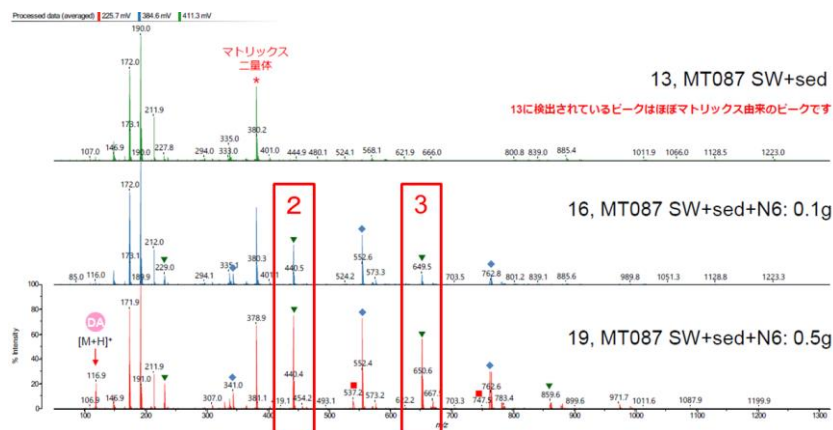


図2-9 BOD試験後の液の質量分析結果

次に、2-1)においてBOD試験後に微生物群集構造が大きく変化していることから、一部の微生物がバイオナイロンを分解するだけでなく、エネルギー源・炭素源として使っていることが考えられるため、バイオナイロン資化性微生物の分離を試みた。人工海水に水溶性バイオナイロンを添加し、ゲランガムで固化させたプレートにBOD試験後の液を塗布したところ、複数のコロニーが形成された(図2-10)。これらのコロニーをMarine Broth 2216プレート培地を用いて純粋分離し、DNAを抽出して、16S rRNA遺伝子の配列を決定し、大きく三つ(*Marinobacter* sp. BN-1、*Sulfitobacter* sp. BN-2、*Shewanella* sp. BN-3)に分類した。さらに、これら三種微生物の全ゲノム配列をMiSeqおよびナノポアシーケンサー(MinION)を用いて決定した。それぞれにおいて、3,000個以上の遺伝子が見つかり、その中には既知のナイロン分解酵素と相同なタンパク質が見つかった(表2-1)。*Sulfitobacter* sp. BN-2および*Shewanella* sp. BN-3では、環状二量体を切断する酵素、エキソ型酵素、エンド型酵素の働きが異なる三種の酵素セットを有しており、効率的なナイロン分解を単独で実施できる可能性が示された。

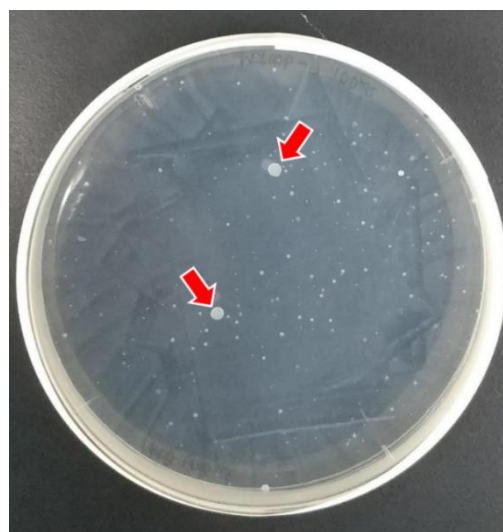


図2-10 バイオナイロン人工海水プレート上に形成されたコロニー

表2-1 バイオナイロン分解微生物の全ゲノム解析結果

	<i>Marinobacter</i> sp. BN-1	<i>Sulfitobacter</i> sp. BN-2	<i>Shewanella</i> sp. BN-3
Sequencing			
-short reads analysis (MiSeq)	○ [6.64 Gbp]	○ [5.25 Gbp]	○
-long reads analysis (MinION)	○	○	○
de novo assemble	Unicycler (hybrid)	Unicycler (hybrid)	Unicycler (hybrid)
-used short reads	All	All	All
-used long reads	19,453 reads [554,074,725 bp]	4,000 reads [48,449,753 bp]	40,063 reads [>1,000,000,000 bp]
-result	14 contigs [4,078,104 bp]	Complete [3,221,442 bp]	9 contigs [4,639,713 bp]
Annotation (DFAST)			
-CDSs	3,737	3,100	3,909
-NylA (CCG93690): 環状ダイマー分解	○ (99.5%:L03460)	○ (29.3%:L27030)	○ (21.2%:L_10710)
-NylB (CGC96581):エキソ型 (モノマー生成に重要)	○ (97.5%:L30490)	○ (28.5%:L22570)	○ (26.5%:L_30470)
-NylC (WP_222209079):エンド型	N.D.	○ (41.0%:L01370)	○ (36.8%:L_00840)

次に、純粋分離株と水溶性バイオナイロンを用いてBOD試験を実施した。人工海水とバイオナイロンだけの場合、BOD値は有意に上昇せず、人工海水と微生物だけの場合、120時間で30~40 ppmまでBOD値が上昇した。他方、人工海水とバイオナイロンと微生物が入っている場合、開始直後から有意にBOD値は上昇し、24時間で200~300 ppmに達した(図2-11)。この結果より、純粋分離株は実際にバイオナイロンを分解していることが示された。BOD試験開始後24時間で有意にBOD値が上昇していることから、BOD試験液の一部を回収し、RNAを抽出して、バイオナイロン分解時の遺伝子発現について調べた。抽出したトータルRNAを用いてRNA-Seqを実施し、得られたリードを先の実験で決めた全ゲノムにマッピングすることで、各遺伝子の相対的な発現量を調べた。全ゲノム解析でアノテーションされたナイロン



分解酵素は、バイオナイロン無添加と添加で発現量に差異はなく、ナイロン分解酵素は構成的に発現していることが明らかとなった（図2-12(A)）。一方で、ナイロン添加区において多数の遺伝子発現が上昇しており（図2-12(B)）、バイオナイロンあるいは分解物がこれらの遺伝子発現を誘導していると推定される。発現が上昇している遺伝子群の中には、基質取り込みに関する遺伝子が多数みられるため、細胞外でバイオナイロンのポリマー・オリゴマーを分解し、取り込み可能な状態になった炭化水素化合物を用いて細胞内代謝で利用してエネルギー生産等を行っているものと推定できる。

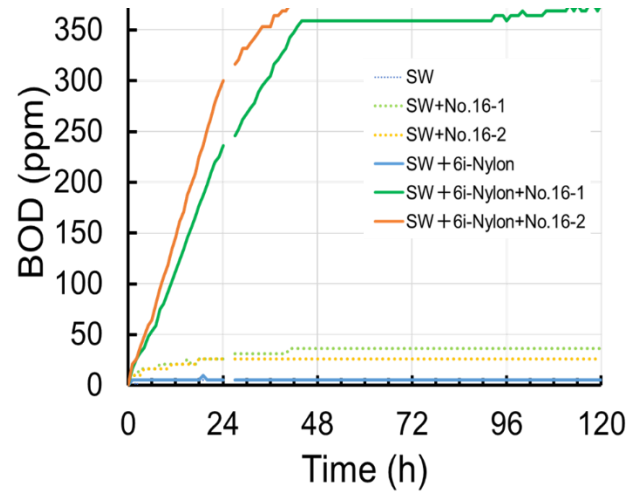


図2-1-1 バイオナイロン資化性微生物を用いたBOD試験

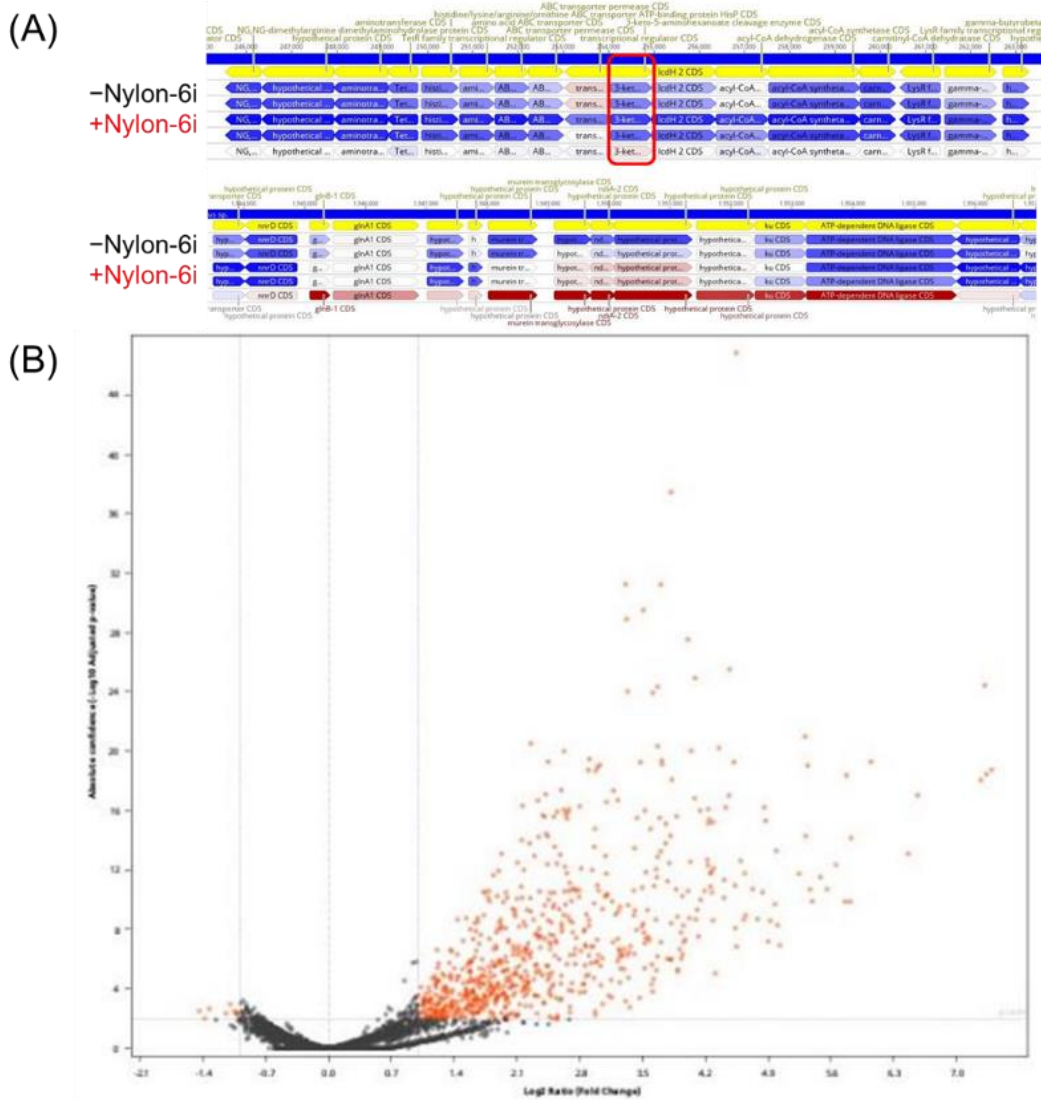


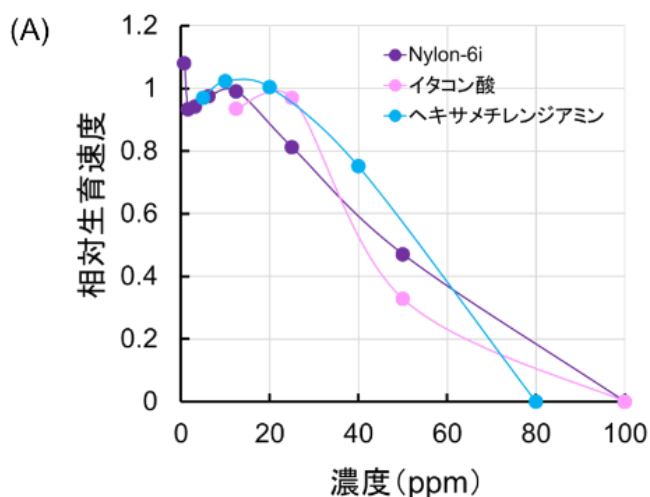
図2-1-2 バイオナイロン添加有無での遺伝子発現量の変化 (A)ナイロン分解酵素をコードしている遺伝子周辺や高発現遺伝子クラスター、(B)ボルケーノプロット：赤色のプロットがバイオナイロン分解微生物において発現量が上昇している遺伝子

以上の結果から、水溶化したバイオナイロンが海水環境の微生物によって分解可能であることが示された。一方で、紫外線照射後に水溶化したバイオナイロンが分解性微生物以外の生物に対する毒性については不明である。そこで、水溶化バイオナイロンの生物毒性実験を実施した。まず、OECD No. 201に従い、藻類生長阻害試験として生物毒性を調べた。バイオナイロンの原料であるイタコン酸およびヘキサメチレンジアミドの生長率半減濃度 (ErC<sub>50</sub>) はそれぞれ 39.9 および 38.5 ppm であり、SDS 文献値と同程度であった。次に水溶化バイオナイロンを用いた場合、ErC<sub>50</sub> は 40.2 ppm であり、原材料とほぼ同等の生物毒性を示した (図 2-13)。この結果より、水溶化したバイオナイロンは著しい毒性は示さないと考えられる。次に、イタコン酸バイオナイロンモノマーを用いて、ISO 規格に従い海産性生物に対する生物毒性試験を実施した。海産発光細菌、海産微細藻類、塩水性甲殻類、淡水産微細藻類のいずれに対しても、生長率半減濃度は 1,000 ppm 以上であり、ほとんど毒性がないことが示された (表 2-2)。

表 2-2 ISO規格に基づいた生物毒性試験結果

試験名	試験方法	供試生物名	毒性指標	毒性値	EC50 or LC50 (ppm)
海産発光細菌	ISO 11348-1 (2007)	<i>Aliivibrio fischeri</i> NRRL B-11177	発光阻害	30-min EC50	>1000
塩水性甲殻類	ISO/TS 20787 (2017)	<i>Artemia salina</i> JBL Artemio Pur	急性致死	2-day LC50	>1000
海産微細藻類	ISO 10253 (2016)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> NIES-4392	増殖阻害	3-day EC50	>1000
淡水産微細藻類	ISO 8692 (2012)	<i>Raphidocelis subcapitata</i> NIES-35	増殖阻害	3-day EC50	>1000

本研究項目では、バイオナイロンの分解特性と生物毒性の評価を行い、海水性微生物によってバイオナイロンが二酸化炭素にまで分解され、また分解過程で生じる水溶化バイオナイロン分子 (ポリマー・オリゴマー) やモノマー分子の生物毒性が低いことが証明された。これにより、バイオナイロンが高い環境適合性を持っていることが示された。



(B)

物質	ErC <sub>50</sub> (0-72 h) (ppm)	SDS文献値 (ppm)
Nylon-6i	40.2	-
イタコン酸	39.9	47
ヘキサメチレンジアミン	38.5	18.1

図 2-13 淡水性藻類に対する生物毒性試験結果 (A) 試験材の濃度と生育速度、(B) 実験値と文献値の比較

2-3) 深海模擬環境における分解特性評価

本研究項目では、バイオナイロン素材が深海に沈降した場合を想定して実験室レベルで深海模擬環境を再現し実験を実施した。深海模擬環境は、耐圧培養器を用いて再現した。BOD試験で有意な分解反応が観察された、海水と堆積物をベースとし、バイオナイロン無添加、固形バイオナイロン添加、水溶性バイオナイロン添加の三条件とし、5 mL容チューブに入れて、シリコン系自己融着テープを用いて封をし、無加圧、10、20、30、40、および50 MPaに加圧して、培養を実施した(図2-14)。深海を模倣した低温(4°C)では変化が見られない可能性もあり、中温

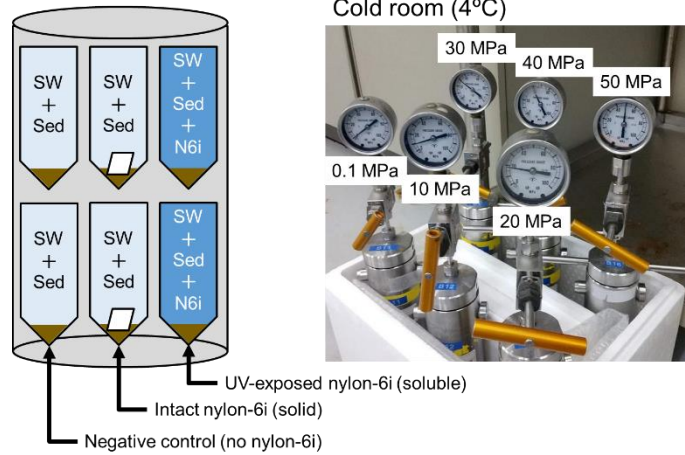


図2-14 実験室レベルでの加圧培養試験

(25°C)でも、0.1 MPaおよび50 MPaでの加

圧培養を実施した。培養開始、6ヶ月後にチューブを取り出し、海水および堆積物中の微生物からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子断片を標的としてMiSeqによるアンプリコンシーケンシングを実施した。

抽出したDNAの量は、圧力に対する依存性を示した。例えば、25°Cで培養した時、0.1 MPaと50 MPaのDNA抽出量を比較すると、50 MPaの培養物において顕著にDNA量が少なく、これは溶液側と堆積側の両方で見られた(図2-15)。同様に、4°Cの場合、圧力が高くなるにつれて徐々にDNA抽出量が減少し、50 MPaで最も低くなった。本実験では、表層海水を用いて加圧培養試験を実施しており、深海5,000 mに相当する50 MPaでは多くの微生物が死滅したと考えられるが、4,000 m相当の40 MPa程度までは表層海水中の微生物も生残していると考えられる。

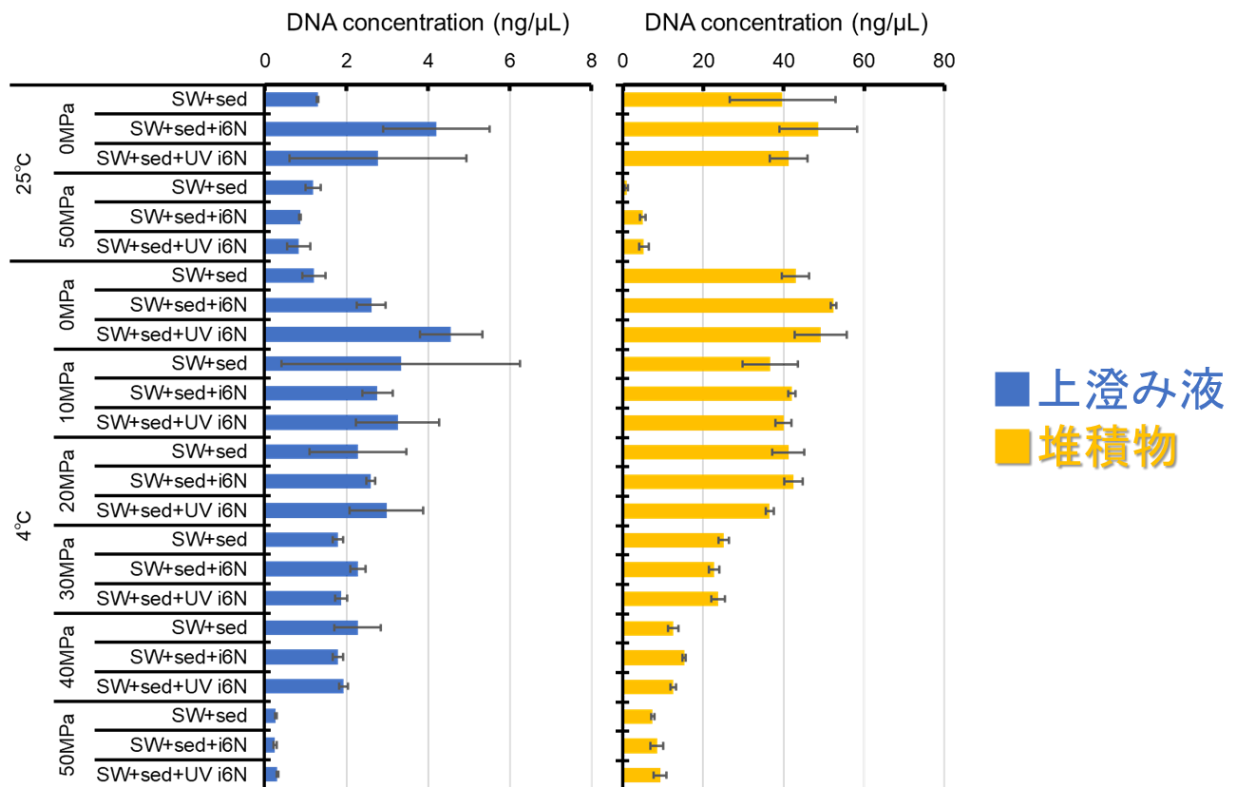


図2-15 加圧培養試験後のDNA抽出量

次に、加圧培養試験の培養物に対する微生物群集構造解析を実施した。25°Cで培養した時の培養物と試験に用いた海水と堆積物の微生物群集構造を相対存在比として図2-16に示している。培養試験後、使用した海水や堆積物とは明らかに異なる微生物群集構造になっている。特に、25°C、大気圧環境で培養した時の溶液側に、バイオナイロン資化性微生物BN-1株として分離した*Marinobacter*属と同じ微生物が数10%にまで達しており、本菌が25°C、大気圧下で活動可能であることを示している。一方で、50 MPaに加圧した場合は、*Marinobacter*属はほとんど存在が確認できない。

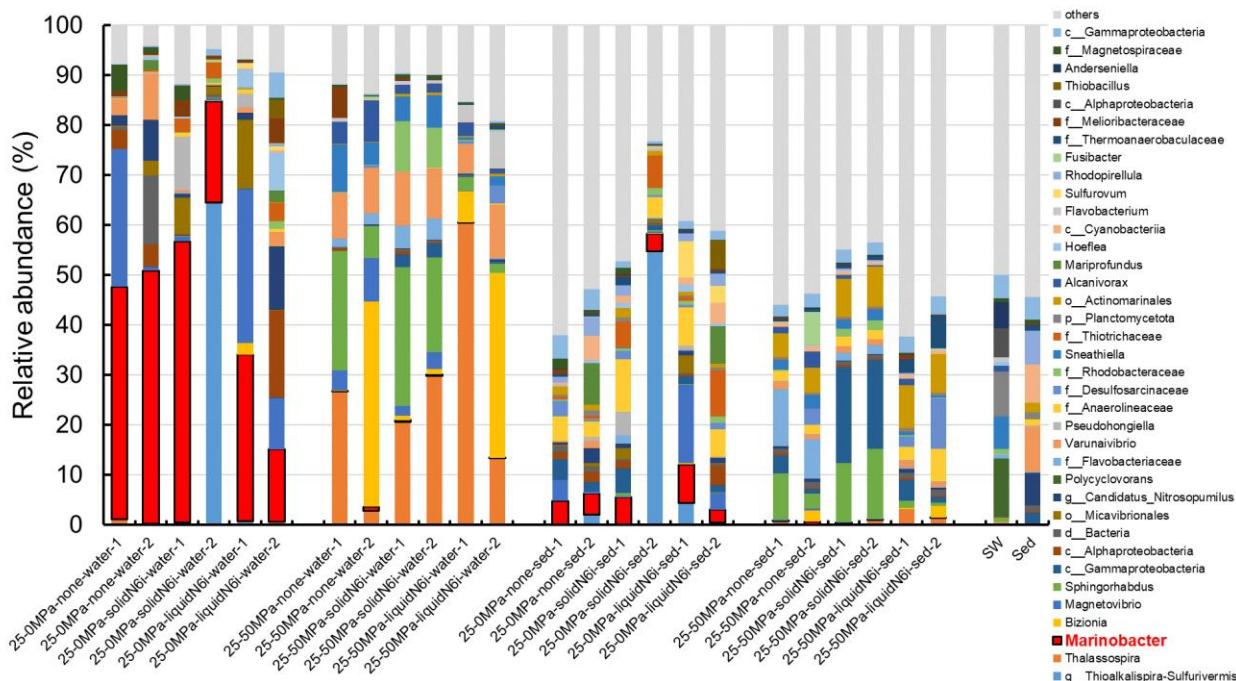


図2-16 25°Cでの加圧培養実験後の微生物群集構造

次により深海環境に近い4°Cでの加圧培養試験結果を図2-17に示す。25°Cの場合と異なり、4°Cでは大気圧下でも*Marinobacter*属細菌はほとんどみられず、顕著に異なる微生物群集構造になっている。ここで注目すべき点は、バイオナイロン資化性微生物BN-2株と同属の*Sulfitobacter*属細菌が比較的多く検出された。20 MPaまでは*Thalassolituus*属細菌が主要な構成種であるが、30および40 MPaでは*Bizionia*属細菌が主要な構成種となり、50 MPaでは*Varunaivibrio*属細菌が全体の半分を占める。加えて、30 MPaの時に*Shewanella*属細菌が有意に多い。*Shewanella*属細菌は海洋環境に広く分布していることが知られており、深海に適応した種の存在も知られており、矛盾はない。加えて、バイオナイロン資化性微生物BN-3株は*Shewanella*属細菌であり、同様にバイオナイロン資化性の*Shewanella*属細菌が集積している可能性が考えられる。

深海模擬環境を想定した試験において、常温常圧で*Marinobacter*属細菌、低温低圧で*Sulfitobacter*属細菌、低温高圧で*Shewanella*属細菌が検出されており、いずれもバイオナイロン資化性微生物と同属である。すなわち、実際の海洋環境においても、各環境での物理化学的なパラメータに対応した微生物株がバイオナイロンの分解に貢献すると考えられる。また、これらの培養実験とは別に、JAMSTECが保有している非公開の深海堆積物DNAデータベースを対象としたナイロン分解酵素の探索を行った結果、様々な地点の深海堆積物から多様性に富んだ約370個の相同遺伝子配列を見出している。これは、深海適応した*Shewanella*属細菌に加えて、多様なナイロン分解微生物が深海堆積物中に存在しており、水溶化した当該バイオナイロンは深海環境においても分解される可能性が高く、環境残存性が既存のナイロン系材料よりも低く、より環境調和性の高い材料であると結論付けることができる。

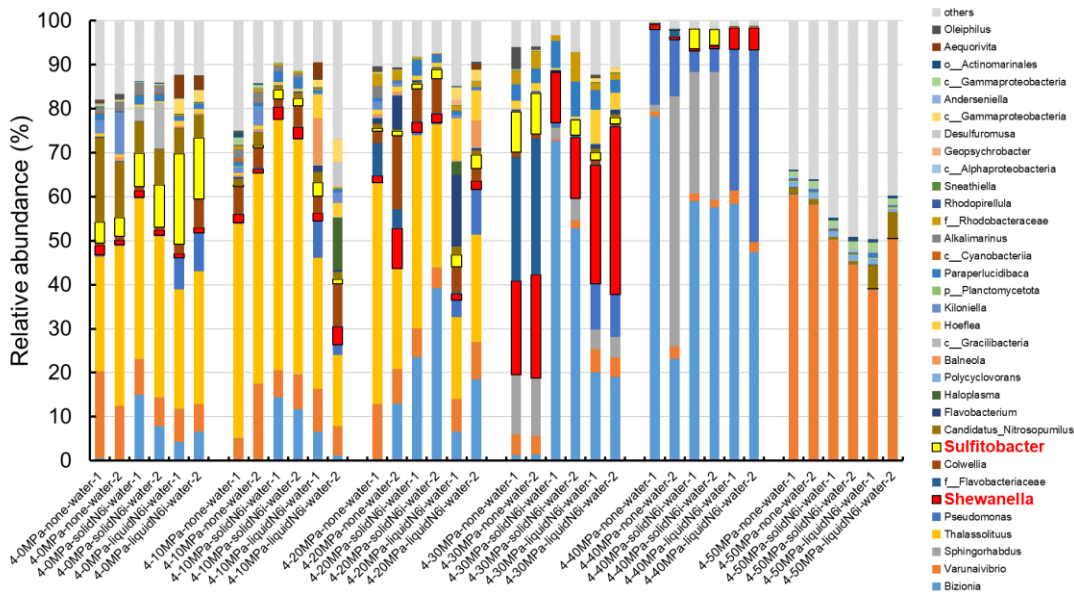


図2-17 4°Cでの加圧培養実験後の微生物群集構造（液体側サンプルのみ）

## 5. 研究目標の達成状況

### サブテーマ2-1「バイオナイロンの海洋環境分解性評価」

目標を上回る成果をあげた：達成率100%

- ✓ 自然光においても海水中で水溶化することを明らかにした。
- ✓ 当初予定には無かったMALDI-TOF-MSによる分析から水溶化状態を明らかにした。
- ✓ 他の部材との分解性の比較を行いバイオナイロンの優位性を示した。

### サブテーマ2-2「バイオナイロンの太陽光照射下での分解性評価と分解物生物毒性試験」

目標を大きく上回る成果をあげた：達成率100%

- ✓ 紫外線暴露履歴の無いバイオナイロンは微生物分解を受けないことを明らかにした。
- ✓ 水溶化したバイオナイロンが微生物により二酸化炭素に分解されることを明らかにした。
- ✓ 分解試験後の培養液から実際にバイオナイロンを分解して利用できる微生物を複数取得した。
- ✓ 分離したバイオナイロン資化性微生物の全ゲノムを解析し、ナイロン分解酵素を特定した。
- ✓ バイオナイロン分解時の遺伝子発現量を調べ、その代謝過程を推定した。
- ✓ 水溶化したバイオナイロンやモノマーの生物毒性評価が十分に低いことを明らかにした。

### サブテーマ2-3「深海模擬環境における分解特性評価」

目標を上回る成果をあげた。：達成率100%

- ✓ 実環境での試験が難しい深海環境を模倣した実験系を確立して分解試験を実施した。
- ✓ 圧力依存的に微生物群集構造が異なることを明らかにし、本研究で分離したバイオナイロン資化性微生物が、様々な温度・圧力環境で分解に寄与する可能性を示した。
- ✓ 当初の予定にはなかったが、独自の深海堆積物遺伝子データベースから深海環境にナイロン分解酵素が広く分布していることを明らかにした。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

## II-3 廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産

国立大学法人 神戸大学

大学院科学技術イノベーション研究科 川口 秀夫  
大学院工学研究科応用科学専攻 荻野 千秋

### [要旨]

イタコン酸の商業生産は、現在可食バイオマス（糖類）の資源利用に依存しており、将来的な食糧生産との競合が懸念される。そこで本課題では非可食廃棄物系バイオマスを代替資源化するために、微生物による新たなイタコン酸生産体系を構築する。現在本国の古紙は年間約460万トンが未利用資源として残る。そこでサブテーマ3では、リサイクル紙パルプ等をモデルに、（1）セルロース系バイオマス利用を想定したイタコン酸生産菌の開発、（2）廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価、（3）イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産、の3課題を実施し、発酵液からのイタコン酸精製法を開発しサブテーマ1に試供して、廃棄物利用によるバイオナイロン生産システムを概念実証した。

### 1. 研究開発目的

地域資源循環社会の構築に向けて、廃棄系/未利用資源であるセルロース系バイオマスを原料に、生分解性プラスチック原料となるイタコン酸を生産する、微生物およびその生産プロセスを開発する。紙パルプを未利用モデル原料に、発酵により生産したイタコン酸を精製して、サブテーマ1にポリマー原料を提供する。

### 2. 研究目標

廃棄物系バイオマスである紙パルプやリサイクルパルプを原料に、バイオポリマー原料となるイタコン酸を生産する低炭素型プロセスを開発する。

### 3. 研究開発内容

神戸大学で実施するサブテーマ3「廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産」では、非可食廃棄物系バイオマスを代替資源化するために、微生物による新たなイタコン酸生産体系の構築を研究している。現在本国の古紙は年間約460万トンが未利用資源として残る。そこでリサイクル紙パルプ等をモデルに、余剰セルロース資源からのイタコン酸の発酵生産を行いサブテーマ1に供することで、廃棄物利用によるバイオナイロン生産システムの概念実証に取り組んだ（図3-1；Kawaguchi, *et al.* 2022）。

サブテーマ3-1「イタコン酸生産菌の開発」では、イタコン酸収率を改善した第4世代生産菌を作製するとともに、イタコン酸生産の増進メカニズムを検証した。サブテーマ3-2「廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価」では、廃棄物系バイオマス由来成分を分析し、各分子種がイタコン酸の生産に与える影響を定量評価した。さらに、サブテーマ3-3「イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産」では、紙パルプから高濃度のイタコン酸を生産する系を開発し、また精製法を開発してサブテーマ1（北陸先端大）にポリマー合成のためのイタコン酸を提供した。以下に、各実施項目の詳細を記す。

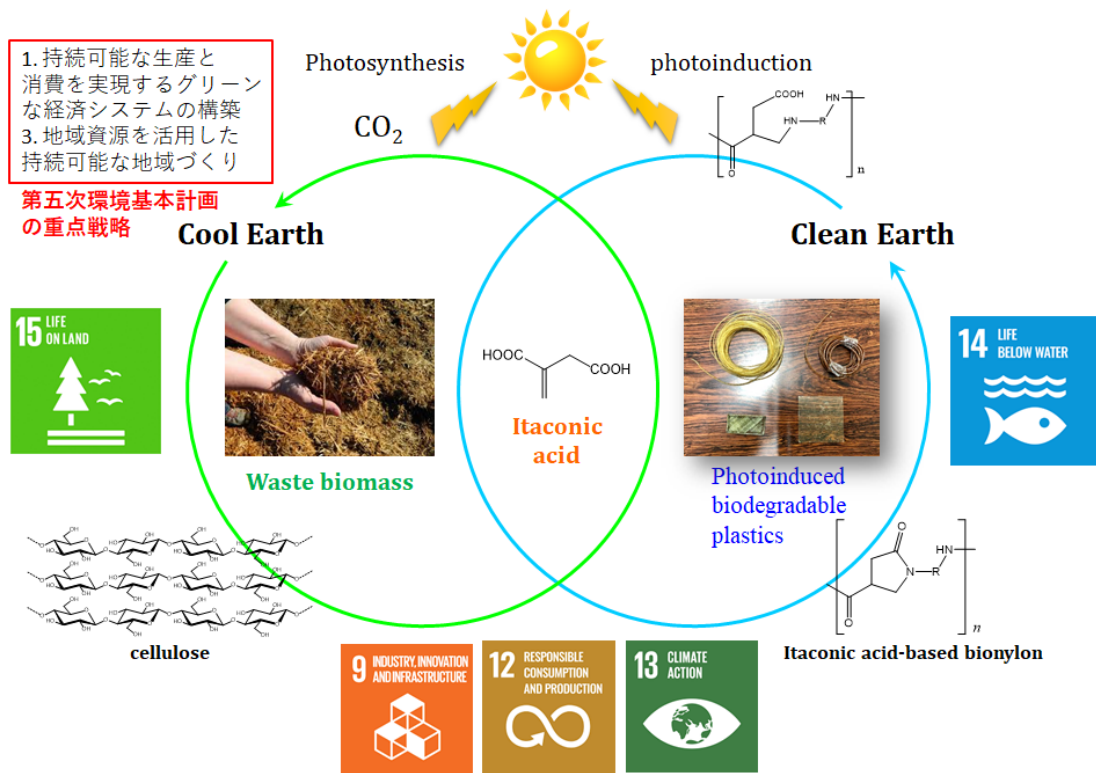


図3-1 廃棄物系バイオマスからのイタコン酸生産を利用した地域資源の循環による海洋分解性バイオナイロンの開発

#### 4. 結果及び考察

サブテーマ3-1「イタコン酸生産菌の開発」では、目標収率（0.3 g イタコン酸/g グルコース）を達成するための、宿主の代謝改変に取り組んだ。生産菌の代謝ネットワークデザイン概略を図2に示す。デザイン①「イタコン酸合成経路の導入」とデザイン②「副産物（乳酸）の生成抑制」を導入した宿主をベースに、イタコン酸生産の直接基質である *cis*-aconitate (*cis*-Aco)の利用率を向上させるために、デザイン③「誘導型 *icdh*の発現量低下」とデザイン④「副産物（コハク酸）の生成抑制」を個別あるいは、まとめて導入した宿主を作製した（図3-2）。

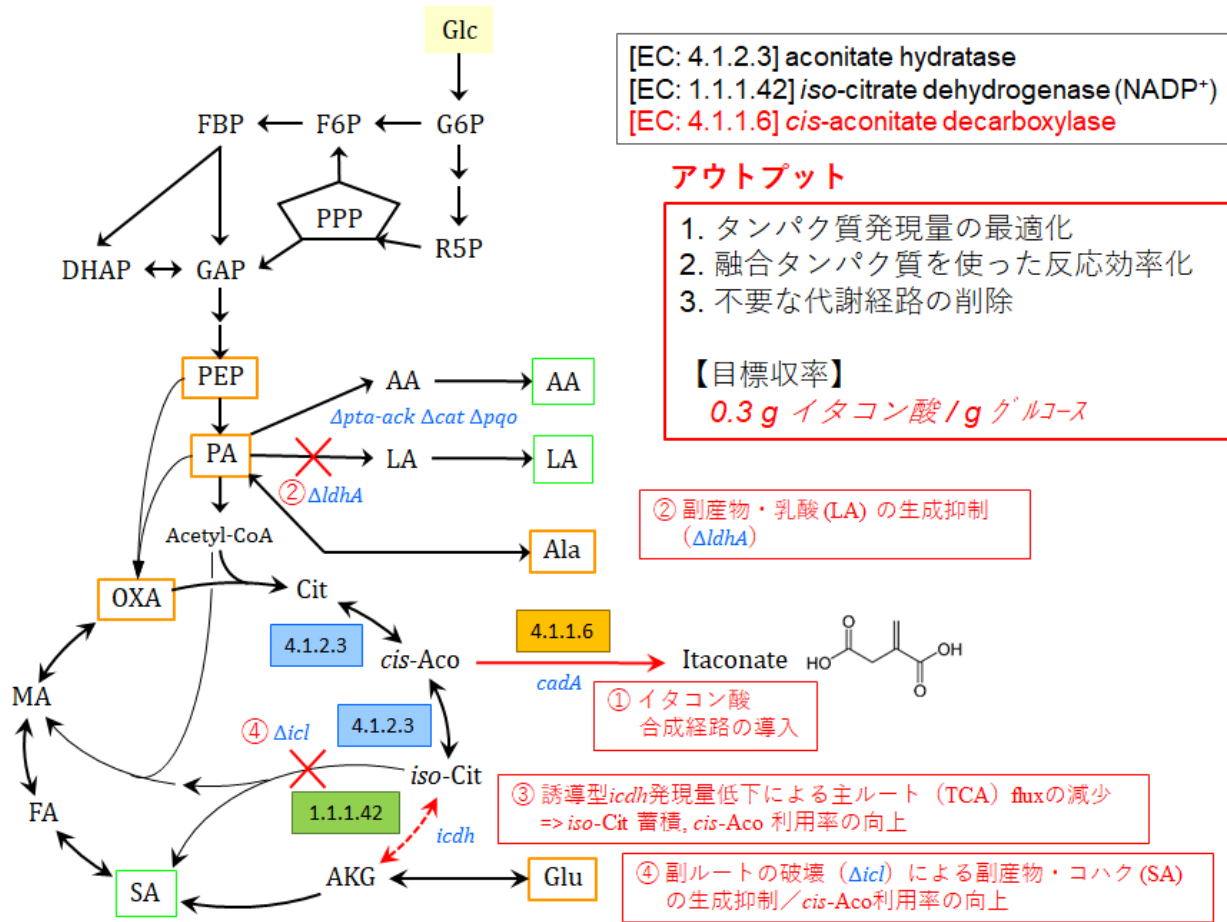
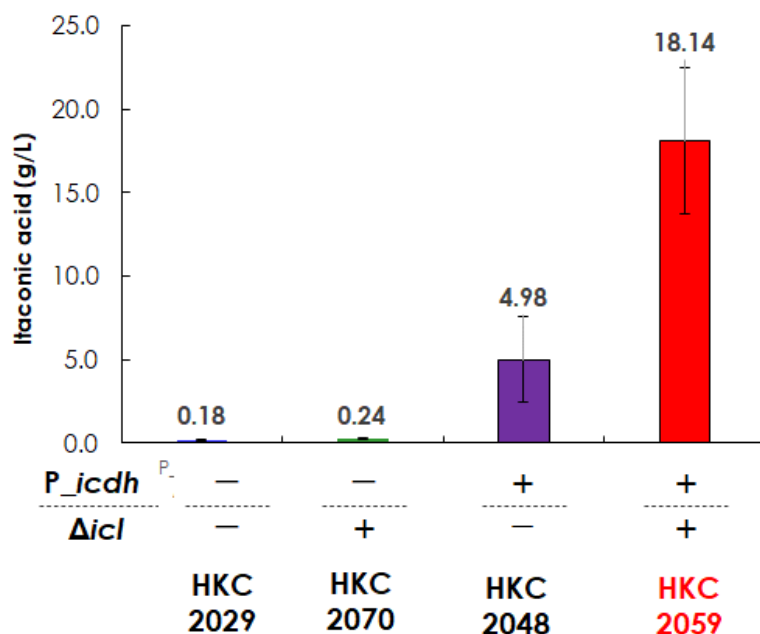


図3-2 イタコン酸収率を向上させるための宿主の代謝改変デザイン概要

これらの宿主をもとに作製したイタコン酸生産株の生産性を比較した結果を図3-3に記す。図3-2に示したデザイン①と②の導入株 (HKC2029) と比べて、デザイン④[副産物 (コハク酸) の生成抑制]を単独導入した株 (HKC2070) ではイタコン酸増産効果は限定的だった (イタコン酸 < 0.25 g/L)。これに対し、デザイン③[誘導型 *icdh* の発現量低下]の導入は非常に効果的で (HKC2048)、イタコン酸の生産濃度はHKC2029と比べて27倍増加した (4.98 g/L)。さらに、デザイン③とデザイン④の2つの導入はイタコン酸増産に相乗効果を示し (HKC2059)、HKC2029と比べてイタコン酸濃度は100倍に増加した (18.1 g/L)。





菌株名	図2に記載した代謝デザインの導入			
	①	②	③	④
HKC2029	+	+	-	-
HKC2070	+	+	-	+
HKC2048	+	+	+	-
HKC2059	+	+	+	+

HKC2029 ( $\Delta ldh / malE_{cadA_{opt}}$ ) ; HKC2070 ( $\Delta ldh \Delta icl / malE_{cadA_{opt}}$ ) ;  
 HKC2048 ( $\Delta ldh P_{30310\_icdh} / malE_{cadA_{opt}}$ ) ; HKC2059 ( $\Delta ldh \Delta icl P_{30310\_icdh} / malE_{cadA_{opt}}$ ) .

図3-3 コリネ型細菌における宿主代謝経路の改変によるイタコン酸生産の向上

サブテーマ3-2「廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価」では、バイオマスの糖化効率>85%の技術シーズ開発と共に、モデル廃棄物系バイオマスである紙パルプから酵素糖化液を調製し、この酵素糖化液を炭素源とした場合のイタコン酸生産への影響を調べた。紙パルプ酵素糖化液に含まれるリグノセルロース由来の“発酵阻害候補化合物”をGC-MSにより分析し、分子構造にもとづいて5種に分類した(図3-4左)。分類した5種の化合物群を個別にあるいは混合し、濃度を変えて培地に添加してイタコン酸発酵に与える影響を調べた。その結果、D群(4-ヒドロキシ)桂皮酸誘導体)、B群(芳香族アルデヒド)の順で、イタコン酸生産に対する顕著な添加容量依存的阻害作用が認められた(D群は65 mg/Lの添加で、B群は280 mg/Lの添加で、それぞれイタコン酸生産が50%に低下；図3-4右)。対照的に、発酵阻害物質として有名なA群(フルフラールなどフランアルデヒド誘導体)は全添加濃度で発酵阻害は認められず、むしろイタコン酸生産に対する発酵促進作用を示した。

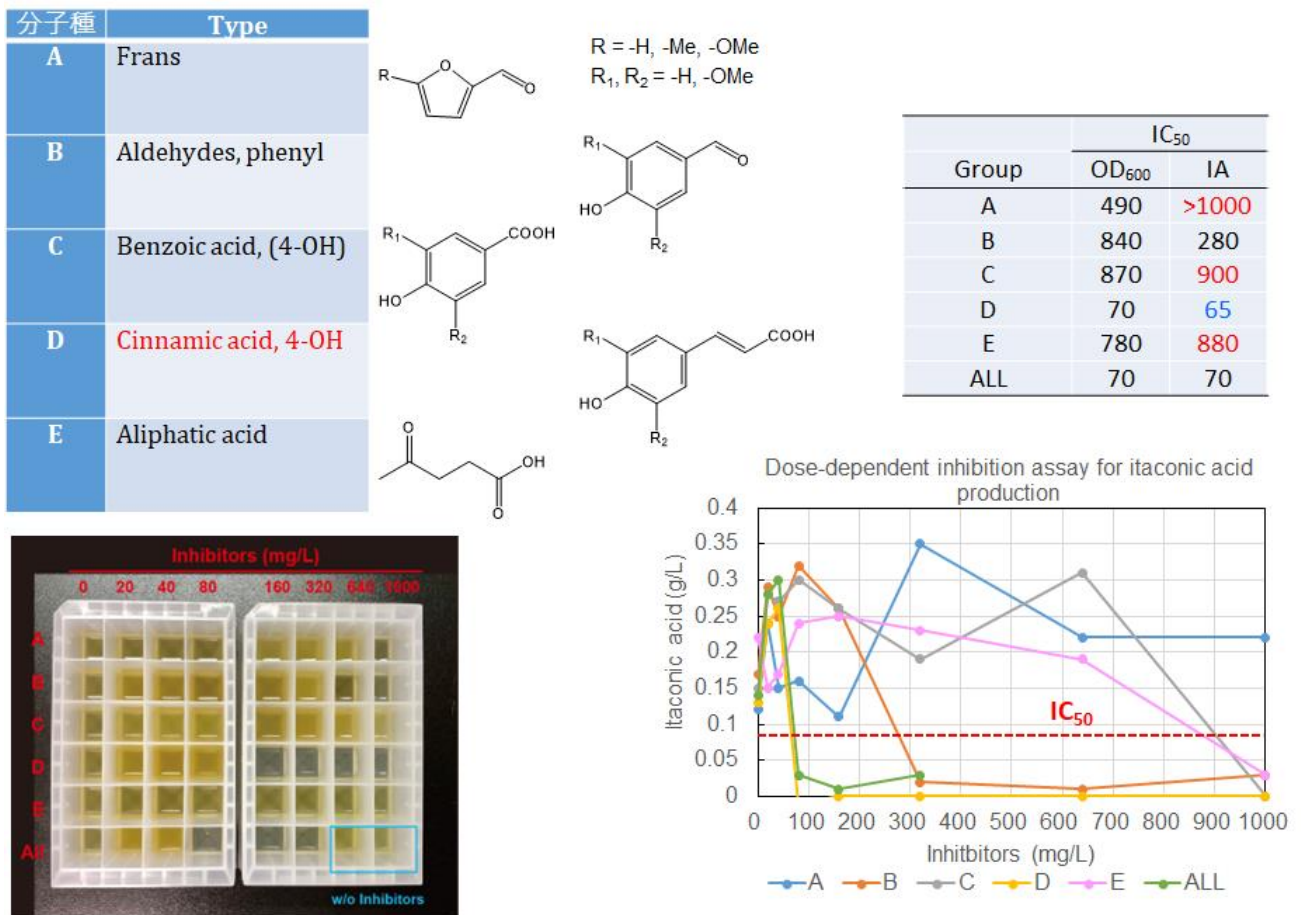


図3-4 紙パルプ酵素糖化液に含まれる発酵阻害候補化合物（左）とイタコン酸生産における発酵阻害の添加容量依存性の解析（右）

サブテーマ3-3「イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産」では、サブテーマ3-1で開発したイタコン酸生産菌を用いて、紙パルプの酵素糖化液からのイタコン酸生産を行うとともに、サブテーマ1にイタコン酸を提供するための発酵液からの精製方法の開発に取り組んだ。第4世代株を用いて基質の逐次添加培養によるイタコン酸の生産を行った結果、紙パルプの酵素糖化液では、イタコン酸濃度がグルコース標品と比べて18倍増加し、イタコン酸濃度は6.1 g/L、収率は0.3 g-イタコン酸/g-グルコースを達成した（図3-5; Hanh, *et al.* 2023）。紙パルプ酵素糖化液でイタコン酸が増産した要因として、サブテーマ3-2で検証した糖化液由来成分（化合物A群など）による発酵促進作用が考えられる。さらに、培地へのNaCl添加によるイタコン酸生産の促進作用を発見し、バイオマスからのイタコン酸生産濃度は最大で40.6 g/Lに達した（表3-1）。

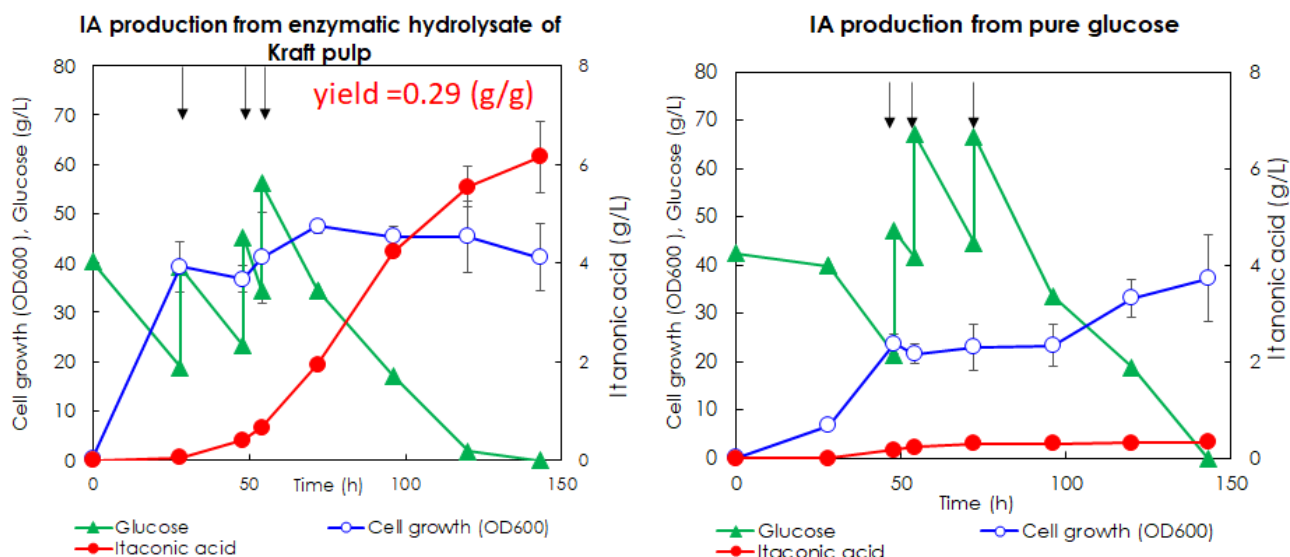


図3-5 遺伝子組換え第4世代株 ( $\Delta Idh \Delta icl$  P<sub>30310\_icdh/malE\_cadA\_opt) による紙パルプ糖化液 (左) グルコース (右) によるグルコースからのイタコン酸生産. (矢印: 基質の逐次添加)</sub>

表3-1 逐次添加培養におけるNaClの添加がイタコン酸発酵に与える影響

	NaCl添加濃度 (g/L)			
	0	5	10	25
イタコン酸終濃度 (g/L)	27.8	27.3	40.6	19.9
イタコン酸収率 (g/g-グルコース)	0.25	0.17	0.29	0.22

発酵液からイタコン酸を精製するために、トリオクチルアミン (TOA) を用いた液-液抽出による分画と、pHシフト (酸性化) による溶解度差を利用した結晶析出を組み合わせた方法に取り組んだ (図3-6)。各工程の条件を最適化した結果、回収率約50%で純度約100%のイタコン酸精製に成功した。開発した方法を用いて発酵と精製を繰り返すことで、10グラム超の精製イタコン酸をサブテーマ1に提供することができた。

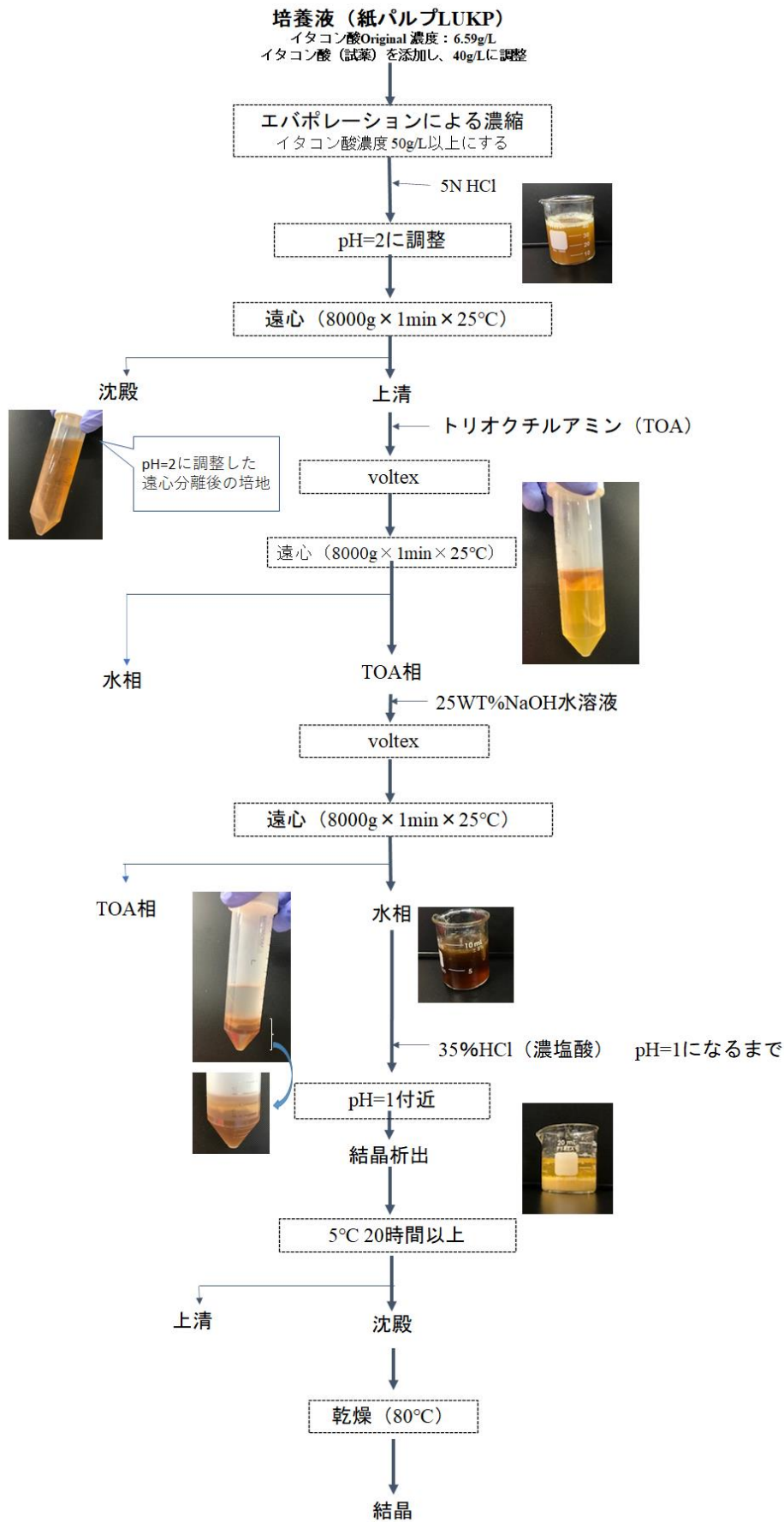


図3-6 発酵液からのイタコン酸精製法の開発

## 5. 研究目標の達成状況

サブテーマ3-1「イタコン酸生産菌の開発」

目標どおりの成果をあげた：達成率100%

- ✓ イタコン酸収率 (0.4 g イタコン酸/g グルコース) の目標値を上回る生産菌の作製に成功した。
- ✓ かくはん動力を従来の50%以下に抑制した、低炭素型生産システムを構築した。

サブテーマ3-2「廃棄物系バイオマス利用技術の開発とイタコン酸生産への影響評価」

目標どおりの成果をあげた：達成率100%

- ✓ 糖化プロセスの最適化により、バイオマスの酵素糖化率 >85%を達成した。
- ✓ バイオマス糖化液に含まれる発酵阻害候補化合物を同定し、各成分がイタコン酸発酵に与える影響を特定した。

サブテーマ3-3「イタコン酸の非可食バイオマスからの高効率生産」

目標どおりの成果をあげた：達成率100%

- ✓ イタコン酸収率 (0.3 g イタコン酸/g グルコース) の目標値を達成した。
- ✓ イタコン酸の精製法を開発し、バイオマス由来イタコン酸10グラム強を、サブテーマ1（北陸先端大）に提供することに成功した。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

##### <査読付き論文>

###### 【サブテーマ1】

- 1) Mohammad Asif Ali, Tatsuo Kaneko, High-performance BioNylons from Itaconic and Amino Acids with Pepsin Degradability, *Adv. Sus. Sys.*, 2100052 (2021) (Impact Factor 6.737)

###### 【サブテーマ2】

- 1) S. Wakai, M. Tsukatani, N. Isobe, H. Nomaki, T. Nishikaze, Y. Yamazaki, M. Asif Ali, T. Kaneko (2023) Light-response solubilization and biological degradation of itaconate-based nylon in a seawater environment. *npj Mater. Degrad.*, in preparation (IF:6.889)

###### 【サブテーマ3】

- 1) H. Kawaguchi, K. Takada, T. Elkasaby, R. Pangestu, M. Toyoshima, P. Kahar, C. Ogino, T. Kaneko, A. Kondo (2022) Recent advances in lignocellulosic biomass white biotechnology for bioplastics, *Bioresour Technol.*, 344(Part B):126165. (IF 9.642) [国際共同研究]
- 2) D. D. Hanh, T. Elkasaby, H. Kawaguchi, Y. Tsuge, C. Ogino, A. Kondo (2023) Enhanced production of itaconic acid from enzymatic hydrolysate of lignocellulosic biomass by recombinant *Corynebacterium glutamicum*, *J Biosci. Bioeng.*, *in press*. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2023.03.011 (IF 3.185)
- 3) T. Elkasaby, D. D. Hanh, H. Kawaguchi, A. Kondo, C. Ogino (2023) Effect of different metabolic pathways for production of itaconic acid from engineered *Corynebacterium glutamicum*, *J Biosci. Bioeng.*, *in press*. (IF 3.185) [国際共同研究]
- 4) T. Elkasaby, D. D. Hanh, H. Kawaguchi, A. Kondo, C. Ogino (2023) Co-utilization of maltose and sodium acetate via engineered *Corynebacterium glutamicum* for improved itaconic acid production, *Biotechnol Bioprocess Eng.*, *submitted*. (IF 3.386) [国際共同研究]

##### <査読付き論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

##### <その他誌上発表（査読なし）>

###### 【サブテーマ1】

- 1) 高田健司、金子達雄、Web Journal（アクトライエム）、2023年1月27日発行第28巻第8号pp. 7-10  
「海洋生分解性を志向したバイオポリアミド設計」
- 2) 高田健司、金子達雄、月刊誌「Material Stage」（株式会社 技術情報協会）2023年1月10日発行第22巻第10号pp. 63-68、ISSN：1346-3926  
「イタコン酸由来で光誘起親水化する分解性バイオナイロンとその可能性について」
- 3) 高田健司、金子達雄、月刊バイオインダストリー（株式会社シーエムシー出版）2022年10月第39巻第10号pp. 18-24. ISSN：なし  
「イタコン酸由来で光誘起親水化する分解性バイオポリアミド」

- 4) 高田健司、金子達雄、繊維学会誌2022年 4月第78巻第4号pp. 156-161 企画特集「先端繊維素材研究委員会特集」  
「持続可能社会の実現に貢献できる高性能バイオプラスチックの設計」
- 5) 高田健司、金子達雄、ネットワークポリマー論文集 Vol.42, No. 6, pp. 243-250 (2021)  
ISSN:2433-3786 (査読あり)  
「バイオ由来のジアミンを用いたポリイミドの合成とネットワークポリマーへの応用」
- 6) 金子達雄、Shimadzu application notes, 70 (2021)  
「光誘起加水分解性バイオナイロンの光分解成分解析」
- 7) 金子達雄、青淵 872 (11)、24-26 (2021)  
「胃液で分解されるバイオナイロン」
- 8) 高田健司、金子達雄、バイオマテリアル学会誌 2021, > 39-3, pp. 188-193 (オンライン) ISSN 2434-0359 (冊子体) ISSN 1347-7080  
「刺激応答分解性バイオベースナイロンの開発」
- 9) 高田健司、金子達雄、書籍『環境汚染問題を解決する生分解性プラスチック開発～分解性評価から新素材まで～』(P.233-P.242)、株式会社エヌ・ティー・エス ISBN: 978-4-86043-814-2 C3058  
第2編第4章第1節 生分解性開始スイッチ機能の開発第1節: 光スイッチ型海洋分解性プラスチックの開発
- 10) Yin Hongrong、高田健司、金子達雄、化学装置2022年9月号第64巻第9号pp. 55-60  
「光誘起親水化する分解性バイオナイロン」
- 11) 金子達雄・岡島麻衣子、クリーンテクノロジー (日本工業出版) 印刷中  
「光誘起分解性のバイオナイロンの開発—スイッチ型海洋分解性プラスチックを目指して—」
- 12) 金子達雄、Mohammad Asif Ali、岡島麻衣子、日本ゴム協会誌95(10) 298-304 (2022)  
「天然物質を用いた環境適応型プラスチックの開発～刺激応答型環境分解材料を目指して」
- 13) 金子達雄、Mohammad Asif Ali、岡島麻衣子、科学と工業 96(7), 207-215 (2022)  
「光スイッチ型分解性のバイオプラスチックの開発」

### 【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

## (2) 口頭発表 (学会等)

### 【サブテーマ1】

- 1) 金子達雄 第7回スマートMD共研講座講演会 招待講演「高性能化バイオプラスチックはゴミ問題解決の突破口か？」 2020年9月10日 オンライン
- 2) 金子達雄 小松市ごーる17例会 招待講演「めざせペットボトル特区—プラスチックとは—」 2020年10月16日 小松市芦城センター (石川県小松市)
- 3) Tatsuo Kaneko JWC2020 (併催GRIP2020) 招待講演「Development of High-performance Bioplastics Aimed to Photo-switched Degradation in Ocean」 2020年11月9日 北陸先端科学技術大学院大学 (JAIST) (石川県能美市) & オンライン
- 4) 金子達雄 第29回ポリマー材料フォーラム 招待講演 ライフサイエンス・環境材料「分解性と高性能を両立するバイオプラスチックの分子設計」 2020年11月26日 オンライン
- 5) 金子達雄 フォトポリマー懇話会 第241回講演会 招待講演「感光性分解コントロール型バイオポリマー」 2020年12月3日 オンライン
- 6) Tatsuo Kaneko INTERNATIONAL WEBINAR SERIES ON BIOPOLYMER COMPOSITES: SERIES 1 招待講演

- “New molecular design concept of high-performance bioplastics” 2021年4月2日 オンライン
- 7) 金子達雄 技術情報協会【Live配信セミナー】海洋生分解性プラスチックの開発と評価 招待講演「光スイッチ型海洋分解性プラスチックの特徴と応用」2021年6月11日 オンライン
  - 8) 金子達雄 第58回 先端繊維素材研究委員会 (AFMc) 公開ミニシンポジウム— 持続可能な社会の実現に貢献できる材料 — 招待講演「持続可能な社会の実現に貢献できる高性能バイオプラスチックの設計」 オンライン
  - 9) 金子達雄 Md Asif Ali, Maiko Okajima, APA Bioforum 2021 招待講演 “Itaconamide Nylon having photo-triggered hydrolysis aiming to biodegradable plastics in marine environment” Aug. 27, 2021, Online
  - 10) 金子達雄 技術情報協会 招待講演「バイオナイロンの合成特性制御とその繊維化」2022. 7. 6 オンライン
  - 11) 金子達雄 第71回高分子学会年次大会 高分子学会設立70周年記念 招待講演 「ヘテロ環の革新的設計に基づく持続可能プラスチックの設計」2022. 5. 25 オンライン 金子達雄 環境配慮型資材\_原料セミナー アパレル・ファッション協会, 招待講演「スイッチ型分解性バイオナイロンの合成と繊維化」2022. 7. 19 オンライン
  - 12) 金子達雄 新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会 反応分科会 招待講演「光スイッチ型生分解性プラスチックの設計」2022. 7. 28 オンライン
  - 13)
  - 14) 玉垣里菜、柿崎翔、Yin Hongrong、高田健司、金子達雄 第71回高分子学会北陸支部研究発表会「イタコン酸/クマル酸由来の光応答性バイオポリアミドエステル合成」2022年11月20日、富山県立大学射水キャンパス (富山県射水市)

### 【サブテーマ2】

- 1) 若井暁、塚谷京、磯部紀之、野牧秀隆、金子達雄、第73回日本生物工学会大会 (2021)  
「光刺激応答性バイオナイロンの海水中微生物群集構造に対する影響」
- 2) T. Nishikaze, Y. Yamazaki, S. Wakai, M. Tsukatani, N. Isobe, H. Nomaki, M. Asif Ali, T. Kaneko, 69th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2021)  
“Investigation of Marine Degradation Characteristics of Bioplastics using MALDI-TOFMS and MALDI-DITMS”
- 3) 若井暁、塚谷京、西風隆司、山崎雄三、磯部紀之、野牧秀隆、Asif Ali Mohammad、金子達雄、日本農芸化学会2022年度大会 (2022)  
「光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性評価および分解性微生物の特定」
- 4) 西風隆司、山崎雄三、若井暁、塚谷京、磯部紀之、野牧秀隆、Mohammad Asif Ali、金子達雄、第70回質量分析総合討論会 (2022)  
「卓上MALDI-MSを用いた分解性バイオナイロンの海洋分解特性の評価」
- 5) 若井暁、日本農芸化学会関東支部2022年度例会 (2022) (依頼講演)  
「光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性評価および分解性微生物の特定」
- 6) 若井暁、塚谷京、磯部紀之、野牧秀隆、Asif Ali Mohammad、金子達雄、第75回日本生物工学会大会 (2023)  
「深海模擬環境でのバイオナイロン分解実験における圧力依存的微生物群集構造」 (発表申し込み済み)

### 【サブテーマ3】

- 1) Hideo Kawaguchi, Tomohisa Hasunuma, Takashi Sazuka, Tatsuo Kaneko, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, The 27<sup>th</sup> Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2022) (2022/12/9).



- 「Bioprocessing to synthesize high performance bioplastics from lignocellulosic biomass」
- 2) Dao Duy Hanh, Hideo Kawaguchi、日本農芸化学会関西支部 第523回講演会 (2022/12/3)  
「Itaconic acid production from enzymatic hydrolysate of lignocellulosic biomass by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*」
  - 3) 川口 秀夫、佐塚 隆志、創立100周年記念 第74回日本生物工学大会 シンポジウム13 “光スリッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究” (2022/10/18)
  - 4) 川口 秀夫「新しいバイオプラスチック開発のための植物バイオマスを原料とする発酵プロセス」(シンポジウム基調講演)
  - 5) Dao Duy Hanh, Hideo Kawaguchi、日本農芸化学会2022年度京都大会 (2022/3/17)  
「Itaconic acid production from hydrolysates of lignocellulosic biomass by recombinant *Corynebacterium glutamicum*」
  - 6) Hideo Kawaguchi, Dao Duy Hanh, Yasuo Ohnishi, Takashi Sazuka, Tatsuo Kaneko, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, The 26<sup>th</sup> Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2021) (2021/11/19).  
「Microbial monomer production from lignocellulosic biomass for bioplastic synthesis」(Oral)
  - 7) 川口 秀夫、2021年度 第12回グリーンソサエティーセミナー、法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター (2021/11/2)  
「微生物を活用した循環型社会の構築：カーボンニュートラルな植物資源からつくる新しいバイオプラスチック」(招待講演)
  - 8) Hideo Kawaguchi, Tatsuo Kaneko, Takashi Sazuka, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, JAIST World Conference 2020—International Symposium for Innovative Sustainable Materials & The 7<sup>th</sup> International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2020) (2020/11/9).  
「Microbial production of aromatic compounds applied to synthesize bioplastics from plant biomass」(Keynote lecturer)
  - 9) 川口 秀夫、北勢バイオコミュニティ研究会キックオフセミナー、三重大学(2020/11/6)  
「微生物を活用したバイオリファイナリー研究：植物からつくるバイオプラスチック」(招待講演)

### (3) 「国民との科学・技術対話」の実施

#### 【サブテーマ1】

- 1) 石川県小松市 ごーる17例会 市民講座「めざせペットボトル特区ープラスチックとはー」  
2020年10月16日小松市芦城センターでの講演など3度にわたり海洋プラスチックごみ問題に関する指導を行った
- 2) 2020年度金沢大学グローバルサイエンスキャンパス(GSC)事業にて、6月より半年間かけて石川県立七尾高校の生徒に対しバイオポリマーに関する体験学習指導を行った
- 3) 2)の指導高校生によるJWC2020(併催GRIP2020)国際会議におけるポスター発表を指導 優秀ポスター賞受賞
- 4) 2021年度金沢大学GSC事業において石川県立七尾高校に対し体験学習指導を開始(2名)
- 5) 研究室ホームページ上での研究成果の継続的な発信を行っている

#### 【サブテーマ2】

- 1) 武蔵高等学校中学校次世代科学者育成プログラム(REDF) G2 summer program(主催:武蔵高等学校中学校)にて野外及び実験室での体験学習指導および三件の講演(2021年7月28日および29

- 日、海の公園および武蔵大学、参加者約30名)
- 2) プログラミングで海のSDGs講演会（主催：イエローピンプロジェクト）にて講演（2022年11月27日、横須賀、参加者約30名）
  - 3) チームくじら号科学部（主催：NPO法人チームくじら号）にて模擬実験と講演（2023年4月16日、東京、参加者20名）
  - 4) 武蔵高等学校中学校次世代科学者育成プログラム（RED）G2 summer program（主催：武蔵高等学校中学校）にて野外及び実験室での体験学習指導および一件の講演（2023年7月25日および26日、海の公園および武蔵大学）（予定）

### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

## （4）マスコミ等への公表・報道等

### 【サブテーマ1】

- 1) プレスリリース（2021年5月10日JAIST web「消化酵素により分解するナイロンの開発」）
- 2) 北國新聞（2021年5月11日、石川地方紙「高性能ナイロン開発-消化酵素で分解可能-」）
- 3) 米国ニュース記事 AlphaGalileo（2021年5月11日“Pepsin-Degradable Plastics of BioNylons from Itaconic and Amino Acids”）
- 4) 欧州ニュース記事 Eurekalert（2021年5月11日“Pepsin-Degradable Plastics of BioNylons from Itaconic and Amino Acids”）
- 5) 日刊工業新聞（2021年5月13日、全国版、「北陸先端大、高強度バイオナイロン開発 消化酵素で分解」）
- 6) 北陸中日新聞（2021年5月23日、全国版、に「海のプラごみ誤飲 生き物救え」「胃液で分解のナイロン」）
- 7) 織研新聞（2021年5月26日、全国版、1頁 「胃で分解されるナイロンを開発」
- 8) 石川テレビ「石川さん Live News イット！」（2021年5月27日 胃液で分解されるナイロンについて3分ほど放映、のちにYoutubeで公開 <https://www.youtube.com/watch?v=KeVTLKpDvi4&t=1s>）
- 9) 北陸放送「レオスタ」（2021年6月7日 胃液で分解されるナイロンについて3分ほど放映）
- 10) 小松テレビ nomiチャンネル [地上11ch]「まるごとnomi」（2021年6月7日-17日 奇数時間に放送“北陸先端大胃液で分解されるナイロンを開発”）
- 11) 日経産業新聞（2023年2月10日、全国版 「海水と太陽光でプラ生分解 菌の働き自在、海洋汚染防ぐ」

### 【サブテーマ2】

- 1) 日刊工業新聞（2022年5月12日、全国版、21頁、「紫外線で水溶化 北陸先端大などナイロン新素材開発」）
- 2) ニュースイッチ（2022年5月13日、web記事、「紫外線で水溶化するすごいナイロン新素材は海洋プラごみ問題を解決するか」）

### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

## （5）本研究費の研究成果による受賞

### 【サブテーマ1】

2021年12月25日 金子達雄 和歌山市文化表彰 文化功労章

2021年8月25日 綿谷裕太 (金大 GSC による指導) 魚のウロコからのバイオプラスチックの開発  
鶴岡バイオサミット 優秀発表賞

#### 【サブテーマ2】

2022年4月 日本農芸化学会2022年度大会 トピックス賞「光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性評価および分解性微生物の特定」

#### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

### (6) その他の成果発表

#### 【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

#### 【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

#### 【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

## IV. 英文Abstract

**Development of Marine-degradable Bionylon from Biomass Wastes-derived Itaconic acid**

Principal Investigator: Tatsuo KANEKO, Satoshi WAKAI, Hideo KAWAGUCHI

Institution: Japan Advanced Institute of Science and Technology

1-1 Asahidai, Nomi City, Ishikawa, JAPAN

Tel: +81-761-51-1631 / Fax: +81-761-51-1635

E-mail: kaneko@jaist.ac.jp

Cooperated by: Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Kobe University

[Abstract]

Key Words: Biodegradable plastics, Nylon, Itaconic acid, Waste biomass, Marine plastic waste problem

Itaconic acid (IA) is commercially produced from edible starch and glucose, and future competition with food is a concern. Therefore, a new IA production technology using recombinant microorganisms capable of utilizing nonedible waste biomass as alternative resource is being studied. In this project, amino acid-producing *Corynebacterium glutamicum* is metabolically engineered, and is used for IA production from Kraft pulp as a model nonedible lignocellulosic biomass. Approximately 4.6 million tons of Kraft pulp remains unused; it is widely used as feedstock in the paper industry and has been considered as an attractive renewable substrate for the production of biofuels and biochemicals. IA is extracted from culture using purification process, and the purified bio-based IA is then used to synthesize a unique bio-based nylon. A series of environmentally adaptable bio-nylons with high thermomechanical properties and degradability are developed from the IA derived from nonedible biomass. The following results are obtained. (1) Bionylons are produced on a scale of 5 kg, and the technology is transferred to a company; (2) synthesized bionylons with various carbon numbers and their composites exhibit a glass transition temperature of 50 °C or higher and water content of 2.7% or lower; (3) produced composite samples exhibit high toughness (207 MJ/m<sup>3</sup>) by combining with additives such as montmorillonite; (4) produced bionylons with high bio-derivation degree exhibit mechanical strength of up to 400 MPa and marine degradability; (5) bionylons are produced from nonedible biomass-derived IA. Similar to above, bionylon fibers are developed. The biodegradability and biotoxicity of bionylon derived from IA and hexamethylenediamine (nylon-6i) are investigated. Nylon-6i is soluble in pure water under intense ultraviolet irradiation and solubilizes in seawater under natural sunlight irradiation. The biodegradability of the solubilized nylon-6i is confirmed by BOD tests using seawater and marine sediments. Three nylon-6i consuming microorganisms are isolated from the supernatant of the BOD test, and genomic and transcriptomic analyses reveals that these microorganisms possess several nylon-degrading enzymes and express these genes when cultured with nylon-6i. Furthermore, molecular genetic testing using simulated seafloor cultures and the deep-sea sediment genome database reveal that genes for nylon-degrading enzymes are widely distributed in the deep-sea environment. In addition, biotoxicity tests using freshwater fish, marine microalgae, and marine crustaceans reveal that the toxicity of the solubilized polymer and monomer is extremely low. According to these findings, nylon-6i is an environmentally-friendly material with high biodegradability and low biotoxicity.