

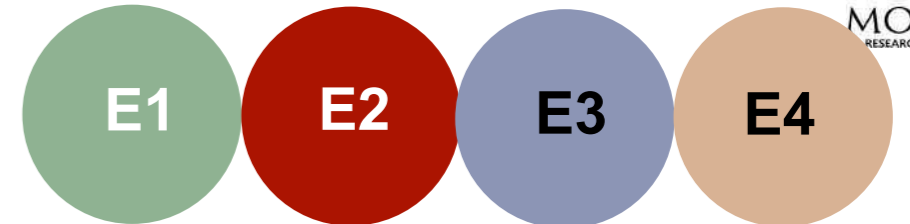
番号: A-12-1J

PJ: 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

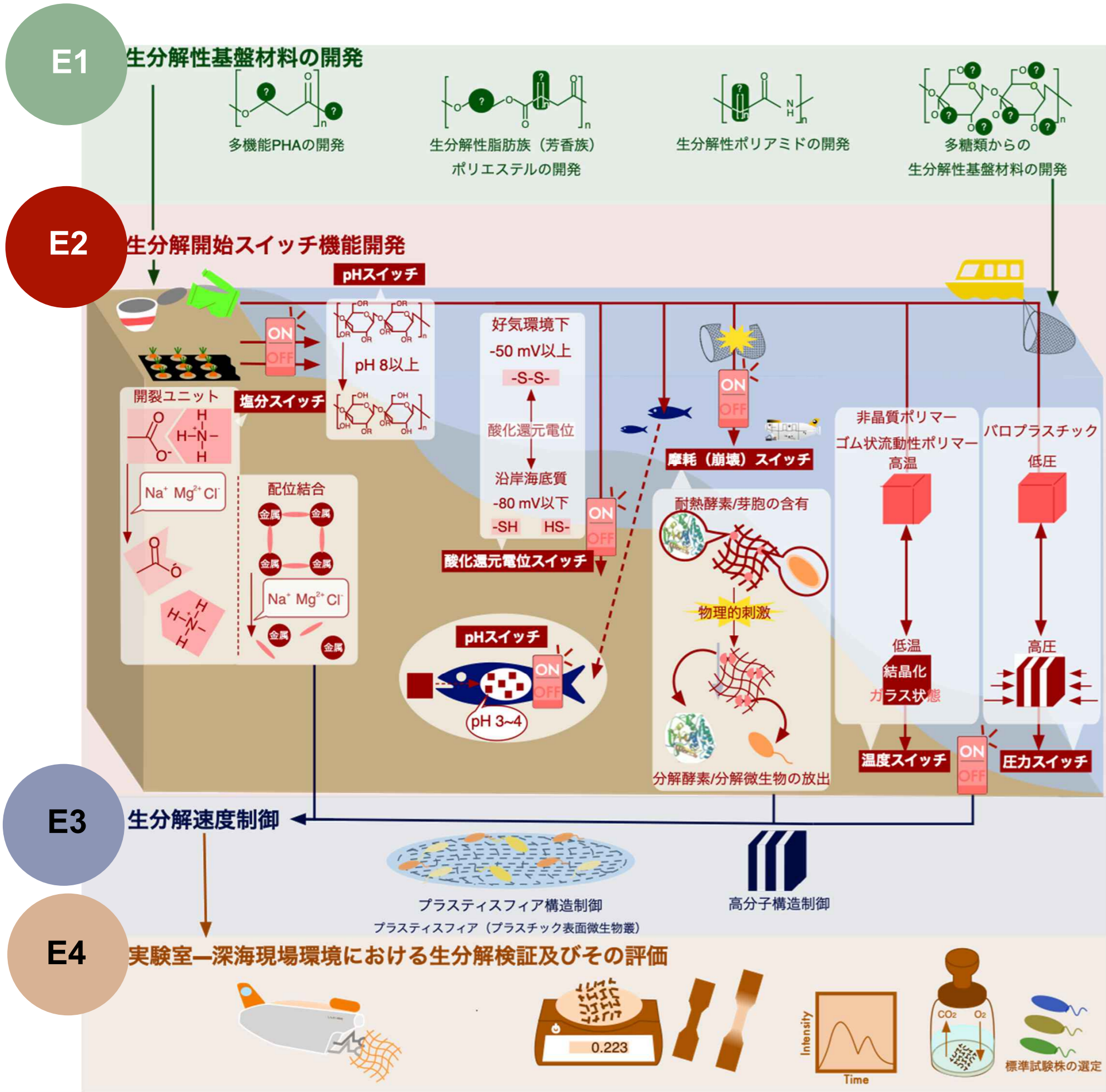
テーマ名: プロジェクト全体

担当機関名: 群馬大学、東京大学、東工大、理研、JAMSTEC

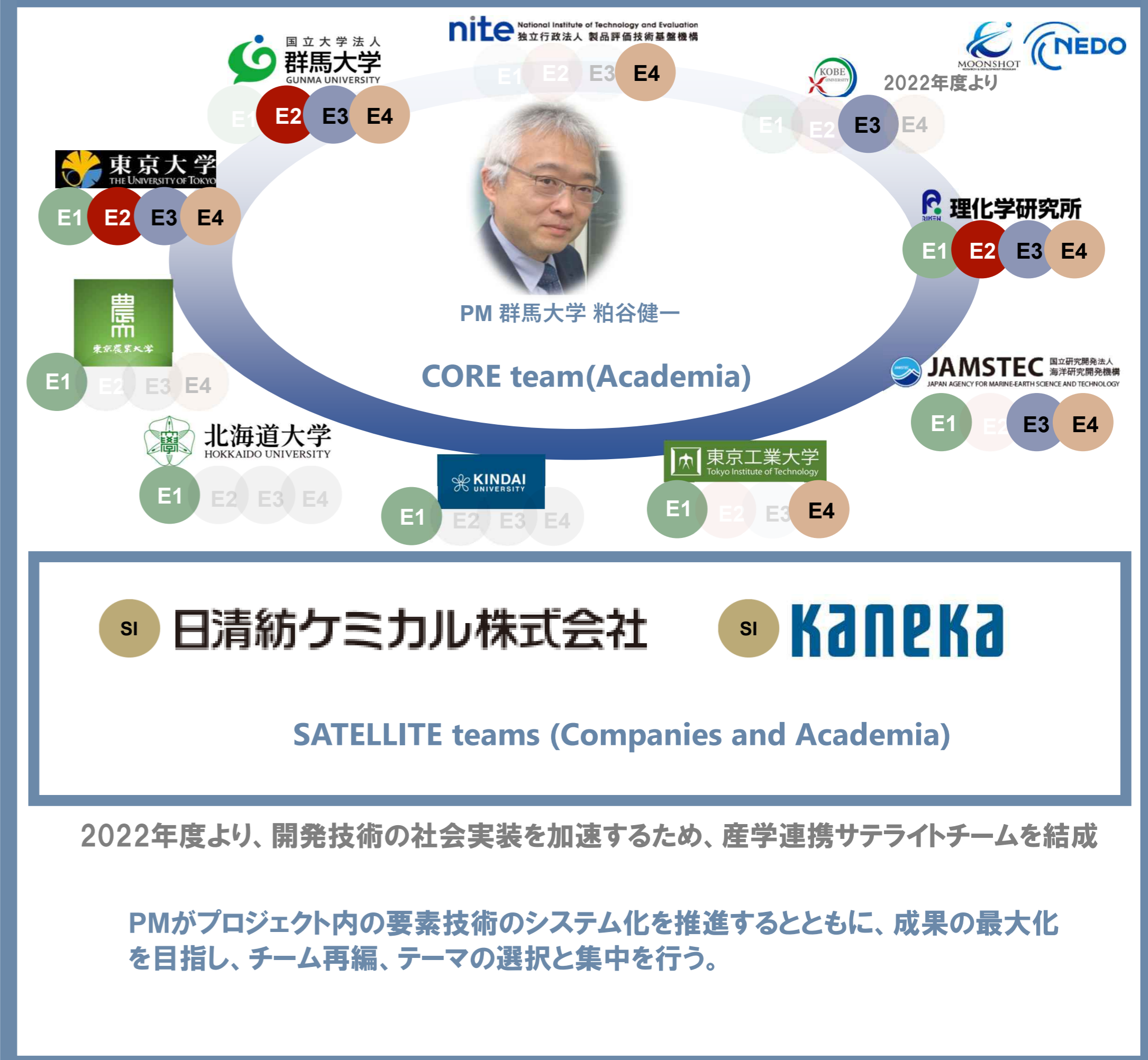
問合せ先: 群馬大学 柏谷健一 (kkasuya@gunma-u.ac.jp)



プロジェクトの研究開発の概要・目標

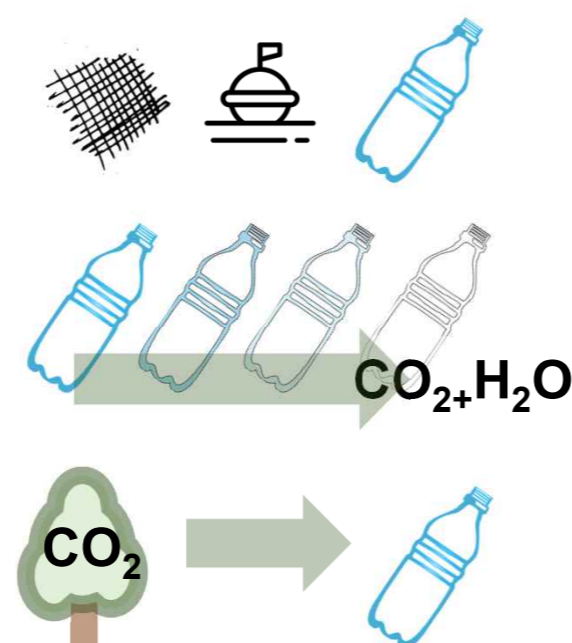


研究開発体制

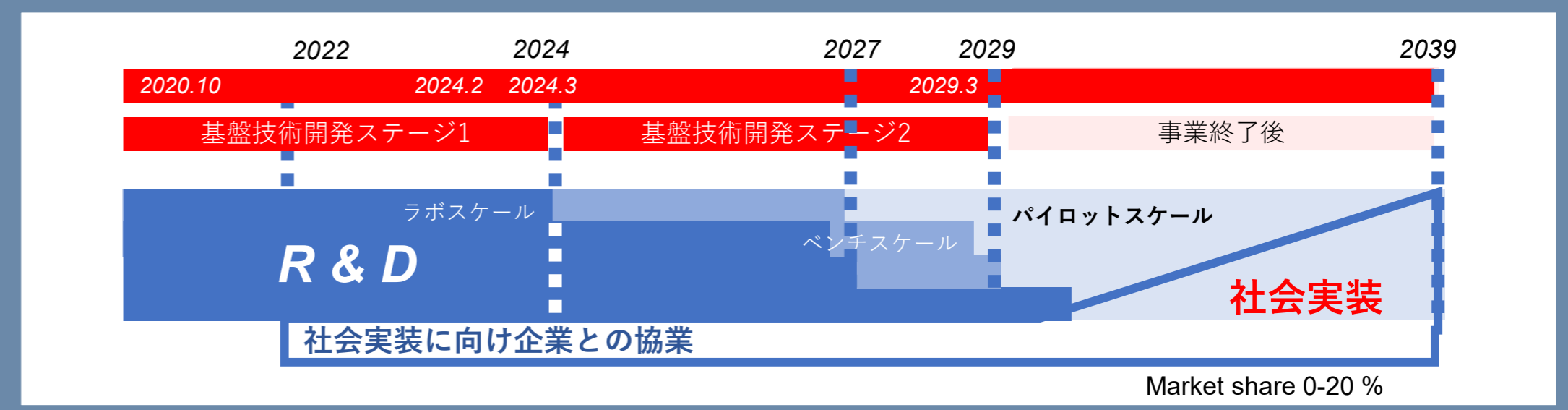


本プロジェクトは、創出技術の社会実装を見据え、以下の最終目標を掲げている。

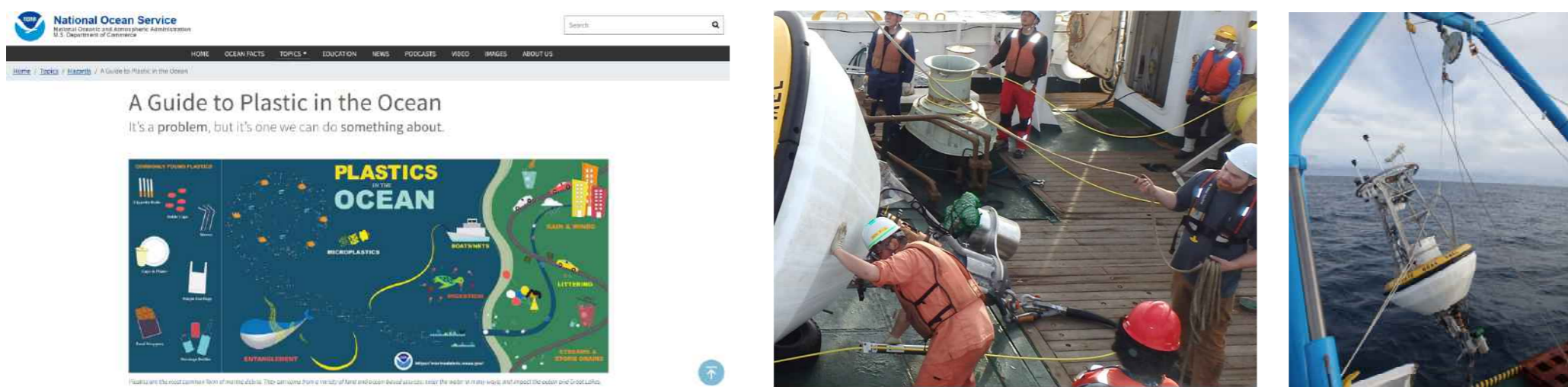
- 1. Switching function... 2. Deep sea field... 3. Biomass, CO2...



研究開発タイムスケジュール



国際連携による効果的かつ効率的な推進



海洋プラスチック汚染研究でも世界をリードするアメリカ海洋大気庁(NOAA)と協力し、海洋表層での生分解プラスチック分解評価を実施。

MOUを結ぶNOAAとJAMSTECが保有する海洋プラスチック分布や海流、海洋環境、付着微生物叢に関する知見を活かし、浮遊プラスチックごみが蓄積している西太平洋海ごみベルトに設置した海洋観測パイを...

国民との科学・技術対話に関する取り組み

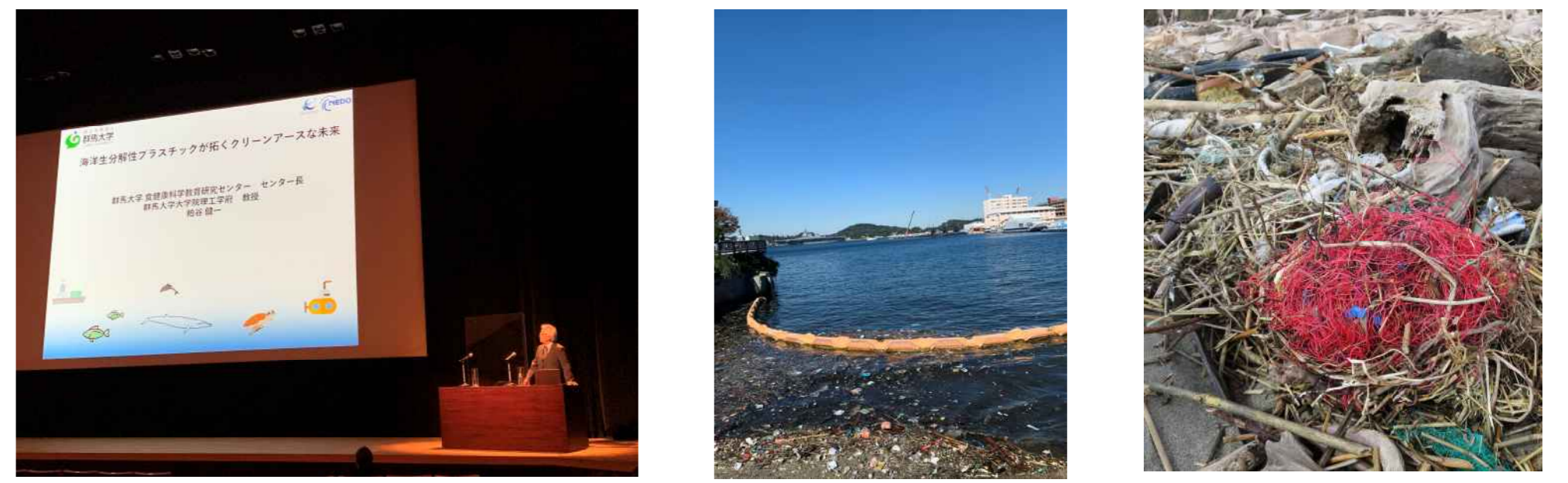


GIGAスクール×深海の一環として、全国の小学生2万4千人以上と、文部科学大臣らとオンライン生中継を行いながら、初島沖855 mに新規生分解性素材を設置。

- メディア出演、市民向け... 東洋紡 環境コラム... ぐんま環境経済フォーラム... 「海洋生分解性プラスチック標準化コンソーシアム」...



上: 4か月半の深海設置実験後の分解の様子。 右: 本事業で開発し、現場生分解性を実証した素材の成果を報告したニュースサイト。



番号: A-12-2J

PJ: 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

テーマ名: E1 生分解性基盤材料の開発

担当機関名: 東京大学、東京工業大学、海洋研究開発機構、理化学研究所

問合せ先: 群馬大学 粕谷健一 (kkasuya@gunma-u.ac.jp)



多機能微生物ポリエステル(PHA)の開発: スwitching機能を組み込むための基盤材料開発

グルコース炭素源 + 4-ペンテン酸 → 組換え大腸菌 → P(3HB-co-3HPE) → 大型フラスコ培養(2L) → 精製 → 大量培養により、3H4PEポリマーを200 g以上合成 → 生分解スイッチの組み込みへ

不飽和側鎖 化学修飾導入可能

糖質 + 5-ヘキセン酸 → 細胞内での飽和化 → ヘキサン酸 → 組換え水素細菌 → P(3HB-co-3HHx-co-3H5HE) → 化学修飾導入可能

3~18 mol% 4~31 mol% 不飽和側鎖

多機能PHAの開発: その他

P(3HP)-b-P(2HB) 高靱性材料

末端修飾PHA

Glucose → 2 Acetyl-CoA → PhaA → Acetoacetyl-CoA → PhaB → 3HB-CoA → PhaC → PHA

L-Methionine → 4-Methylthio-2-oxobutanoic acid → LdhA → 2-Hydroxy-4-methylthiobutyric acid (2H4MTB) → HadA → 2H4MTB-CoA → PHA

新規含硫PHA ~30 mol%

酸化実験: 2H4MTB → スルホキシド化 → スルホン化 → 親水化 → チオエステルの機能化

多機能PHAの開発: CO<sub>2</sub>からPHAを生産する

CO<sub>2</sub> → 組換え水素細菌 → P(3HB-co-3HHx)[PHBH]

菌体に利用されず発酵槽から排気された残余ガスをガス貯槽へ返送、循環・再供給する

原料ガスを発酵槽内の培地に通気供給

発酵槽(リアクター) → 原料ガス貯槽

原料ガス: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>

閉鎖循環式ガス培養システムでの水素細菌の培養(ラボスケール)

①各種組換え株のPHBH生産能比較試験

宿主株/組換えプラスミド	菌体濃度 (g/l)	PHBH含有率 (wt%)	3HB (mol%)	3HHx (mol%)
<i>C.necator</i> H16 (野生株)	17.16	68.2	100.0	0
MF01/pBPP-ccr <sub>96</sub> J4a-emd	12.18±0.4	64.0±3.4	94.8±1.1	5.3±1.1
MF01AB1/pBPP-ccr <sub>96</sub> J4a-emd	10.65±1.35	61.7±4.6	52.3±6.2	47.7±6.2
MF01/pBPP-ccr <sub>96</sub> JAc-emd*	11.22±2.67	64.6±8.1	88.7±6.4	11.3±6.4
MF01AB1/pBPP-ccr <sub>96</sub> JAc-emd	8.52±1.00	67.8±1.8	87.1±2.3	11.1±1.3

\*3HHx 10mol%のPHBHが最も物性が良いことが知られている。(～2020年度)

②*C.necator* MF01/JAc株のジャー培養によるPHBH生産試験

菌体濃度 (g/L)	PHBH濃度 (g/L)	3HB (mol%)	3HHx (mol%)	培養時間 (h)	菌体生産性 (g/L/h)
61.4	51.5	94.6	5.4	205	0.300
71.0	58.4	86.2	13.8	119	0.594

PHBH合成に適した無機塩培地組成の探索 (2021年度 最高値) および培養中の無機栄養濃度の制御

発酵槽攪拌性能の向上 等による生産性改善

(2022年度11月現在 最高値)

生分解性バイオマスポリエステルの開発: レゾルシノール骨格を有するポリエステル

グルコース → Fermentation and/or chemical process → レゾルシノール

グルコース → Fermentation → カテキン

レゾルシノール + 2MR (2位メチル化) / 5MR (5位メチル化) / 25MR (5位メチル化) → resorcinol-based semiaromatic polyester

レゾルシノール骨格を有する芳香族ジオールを用いてポリエステルを合成

カルボジイミド系縮合剤を用いた重縮合反応によって、Mn>24kg/molの生成物の取得に成功

多糖類からの生分解性基盤材料の開発: ミドリムシ多糖からの海洋生分解性プラスチック

抽出 熟成形加工 → 射出成形 → 融融紡糸

抽出 熟成形加工: 精密なエステル化、新規加工法開発

射出成形: 酸やアルカリに強い、PP以上の耐衝撃性

融融紡糸: 添加剤なしで紡糸可能、高強度

パラミロン

海洋分解性評価

東京湾の海水を用いた生分解試験

置換度1.6~2.3では、セルロースの約75%の分解速度

多糖から海洋分解性の制御された高性能な新素材の開発に成功

良好な海洋分解性の制御

多糖類からの生分解性基盤材料の開発: 多糖類を用いた新規生分解性透明素材の開発

粉末状の原料(木の主成分であるセルロース)を溶かして固める → PCT/JP2020/039874

紙と完全に同一の素材でそれ以上の機能性

最大2mm厚まで、しなやか、複雑な形にも

コップ状に成形した透明セルロース部材の深海生分解性を立証

設置前 設置後(5ヶ月間)

GIGA×深海の環として、全国の小学生・文科相観覧のもと、初島沖855 mに設置

TBS系列news23や中日新聞、静岡新聞など全国16紙に掲載

セルロースのみからなる透明カップ

加工前 → 加工後 → 乾燥

撥水フィルムなどを内面に貼り付けせずとも、水やホットコーヒーなど液体が漏れない

キッチンのみからなる透明ストロー

加工前 → 加工後 → 乾燥

課題であった脆さを成形・加工技術の改良により克服し、完全にキッチンのみからなる複雑な形状の部材の調製に成功した

着色も容易

深海で2ヶ月で分解 (キッチンのストロー)

10ヶ月で分解 (セルロースのカップ)

社会実装に不可欠な高い加工性を達成するため、成形・加工技術を改良し高い深海分解性を維持したまま完全にセルロースのみ・完全にキッチンのみからなるより複雑な形状の部材の調製に成功した。

番号: A-12-3J

PJ: 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

テーマ名: E2 生分解開始スイッチ機能開発

担当機関名: 群馬大学、東京大学、理化学研究所

問合せ先: 群馬大学 柏谷健一 (kkasuya@gunma-u.ac.jp)



E1

E2

E3

E4

塩濃度スイッチ

**ジカルボン酸型配位子導入ポリエステル(低分子重合体)**

多価金属  $M^{2+}$  → 配位金属導入

NaCl aq. → 塩導入

配位結合形成による鎖延長

配位結合解離による鎖分散

ラクトン・ラクチドモノマー

有機金属触媒 → 開環重合

有機配位子 → 末端修飾

縮合剤

両末端配位子導入型ポリエステル

脂肪酸ポリエステルの分子鎖末端へ配位結合誘導型官能基の導入に成功

トリメリット酸末端/Zn NaCl溶液浸漬後(2日)

トリメリット酸末端導入P[(R)-3HB]/Zn NaCl溶液浸漬前

トリメリット酸末端導入P[(R)-3HB]

GPC測定による分子量変化確認

溶出時間(min)

純水 3wt% NaCl aq.

2wt%以上の濃度の食塩溶液中において、配位結合型ポリマーの配位結合が解離し、分子量が配位結合形成前の状態に戻ることを確認

**両末端水酸基型ポリエステル(低分子重合体)**

多価金属  $M^{2+}$  → 配位金属導入

NaCl aq. → 塩導入

配位結合解離による架橋構造開裂

シクロブタンテトラカルボン酸二無水物: CyBTC

両末端置換基導入体

鎖延長体(数倍体)

シクロブタンテトラカルボン酸導入PCL

Cl-Zn-Cl 塩化亜鉛

40°C, 12 h, ピリジン in DCM

テトラカルボン酸/亜鉛 配位結合架橋型ポリマー

GPCによる分子量変化確認

溶出時間(min)

分子鎖末端および分子鎖中にテトラカルボン酸ユニットを導入したポリマーと金属化合物とを混合すると、架橋構造形成による高分子凝集構造が部分的に生成することを確認

摩耗スイッチ: 芽胞内包生分解性プラスチックの開発

芽胞(休眠細菌)

摩耗後

発芽誘起物質および水の流入

微生物が増殖型に戻る

微生物によるプラスチックの生分解

Weight loss (mg)

Time (days)

図: 芽胞内包生分解性PESuフィルム分解試験結果

- : YE存在下での芽胞内包PESuフィルムの分解試験結果
- : YE存在下でのPESuフィルムの分解試験結果
- △: YE非存在下での芽胞内包PESuフィルムの分解試験結果

- 生分解速度が遅い材料(潜在的生分解性プラスチック)に当該材料の分解微生物を内包させる

酸化還元環境電位 (ORP) スイッチ: 海低質で分解が始まるプラスチックの開発

PBSDT

柔軟なフィルムに成形可能

- PBSA類縁体としてPBSDTを開発
- 還元的環境下でジスルフィド結合の開裂を確認
- 還元分解物は海洋分解性を有する

自然環境(海洋)への流出

還元開裂

低ORP刺激

生分解

易生分解性化合物

SS SS SS SS

HS SH HS SH

摩耗スイッチ: 酵素内包生分解性プラスチックの開発

酵素内包生分解性プラスチックの開発

酵素により包埋した分解酵素が露出することで分解が始まる材料

酵素内包 PLLA

酵素内包 PBS

酵素内包 PBSA

酵素内包 PCL

設置前 3か月設置後

5 μm

自然環境中で分解が難しい、難生分解性ポリエステルに酵素を包埋し、生分解する材料を創製。酵素の耐熱性の低さは、酵素をゲルに固定化する手法で解決。

重量減少率 (%)

Time (days)

失印は酵素を含まないneat材料。比較すると、酵素包埋の効果が認められる。

- ポリ乳酸に加え、リパーゼを内包するPBS、PBSA、PCLを開発した。
- 初島沖深海に3と9か月間設置した後、迅速な分解を確認できた。

初島沖深海設置(海水, 15-20°C, 3ヶ月, 9ヶ月)

pHスイッチ: 多糖エステルで表面コートしたPHAフィルムの開発

pHの変化により表面コート組成が変化し分解が始まる材料

海洋中で生分解性するPHAに、pHで分解が始まるCAをコート

海洋へ流出

使用中は安定

脱アセチル化開始

アセチル化セルロースの生分解

暴露されたPHBHの生分解

重量変化 PHBHが分解

海水条件での分解試験(重量減少)

Relative Weight (%)

Degradation Time (week)

コートあり

コートなし

Hole on CA

露出したPHBH

コートありでは、時間の経過とともに、表面のCAに穴が開き、分解が加速している様子が見える。

- 海洋分解性の高いPHAの表面に、アルカリ条件で化学構造が変わり分解性を示す多糖エステルをコートした。
- 緩衝液(pH7)では分解せず、海洋条件(海水)で分解を確認。

番号: A-12-4J

PJ: 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

テーマ名: E3 生分解速度制御

担当機関名: 群馬大学、東京大学

問合せ先: 群馬大学 柏谷健一 (kkasuya@gunma-u.ac.jp)



### 材料科学的観点からの生分解性速度因子の解明

PHA高強度・高弾性率繊維(微結晶核延伸法)

Microbial polyester fibers	Tensile strength /MPa	Young's modulus /GPa	Elongation at break /%
P(3HB)	1320	18.1	35
P(3HB-co-8 mol%-3HV)	1065	8.0	40
P(3HB-co-9 mol%-3HH)	552	3.8	48

思いっきり引張っても切れない

高強度繊維の海水分解試験

1週間後

バイオフィルム内

繊維表面

球菌

桿菌

繊維

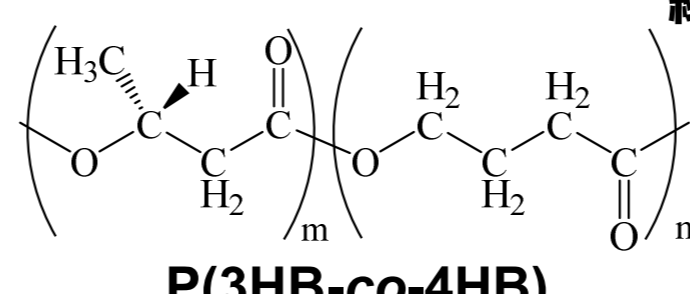
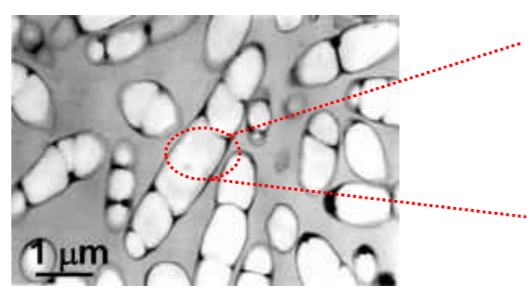
繊維表面近傍に存在する桿菌が主に酵素分解をしている可能性

- 延伸倍率により分解速度制御可能
- 射出成型品と結晶化度一分解速度の関係は逆
- 結晶形態に関連する

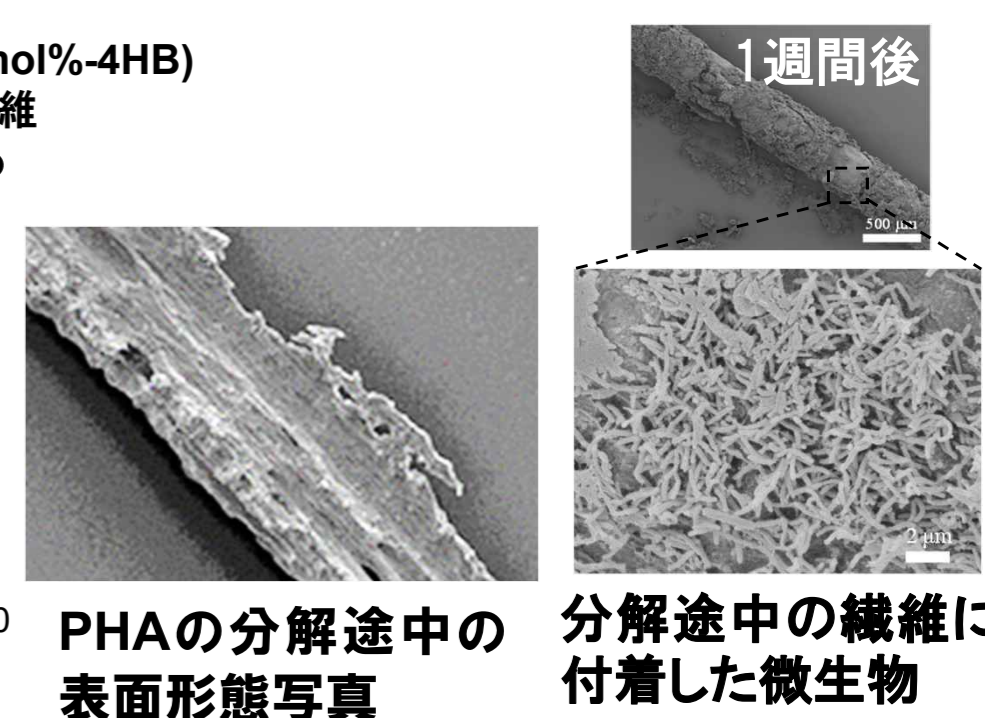
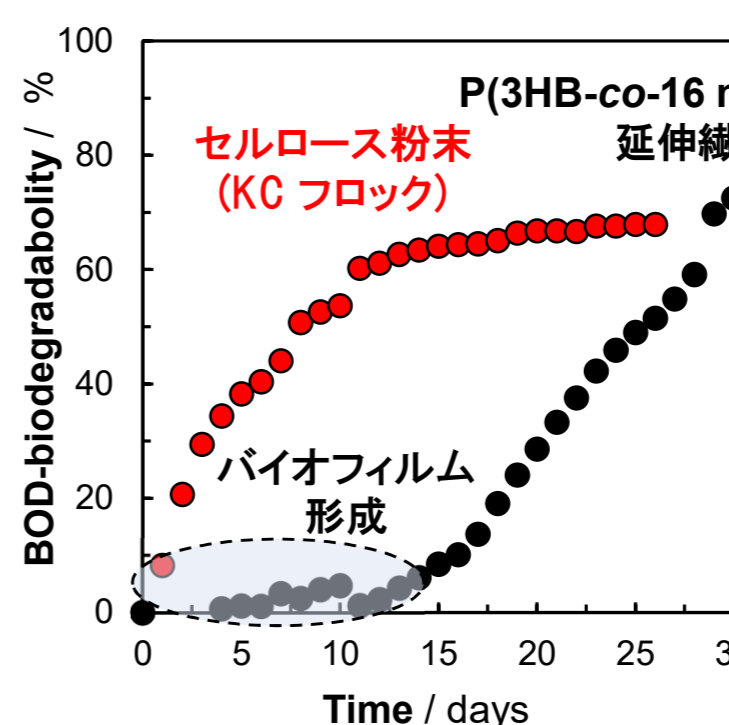
微生物産生ポリエステル(PHA)とP(3HB)共重合体

PHA:微生物が生産する熱可塑性プラスチック。海洋分解性がある。

P(3HB-co-4HB)はPHAの一種。

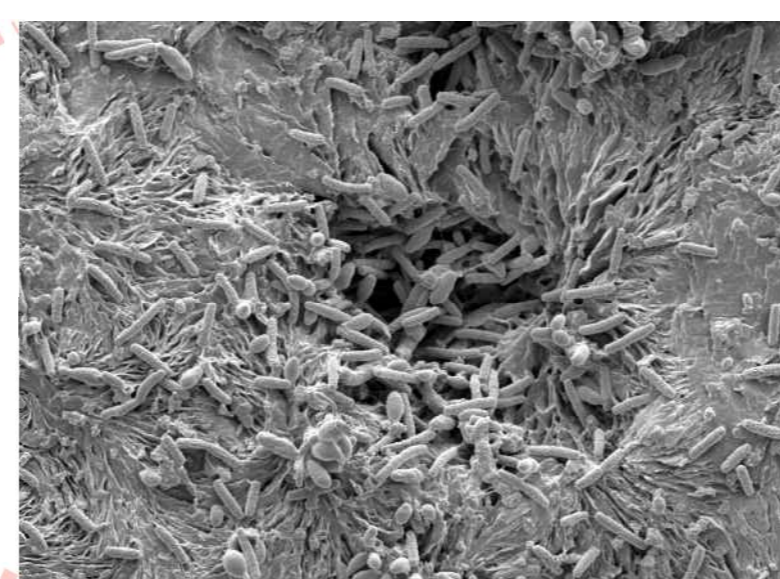
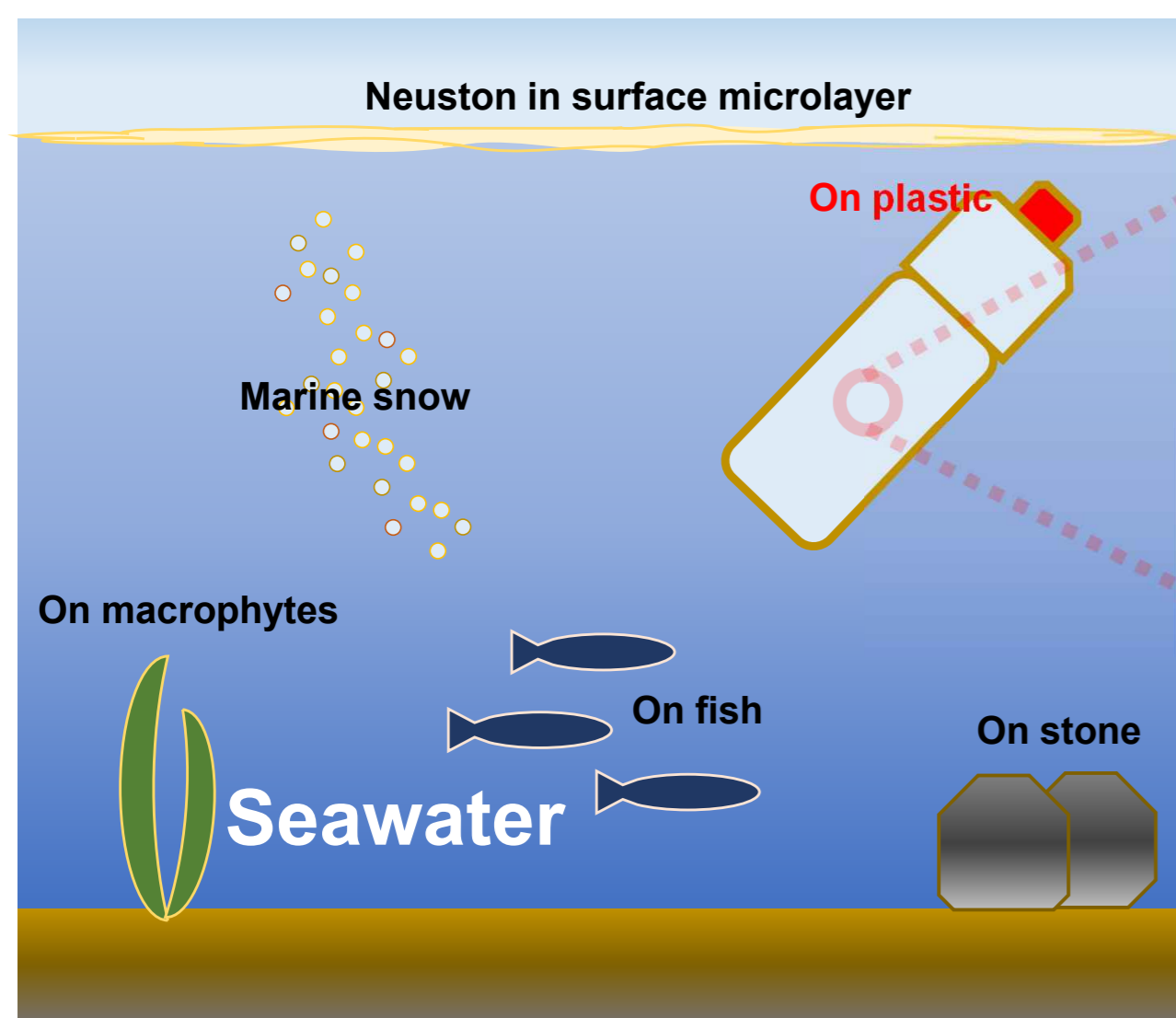


### 繊維のBOD海洋分解性評価(海水:東京湾、お台場)



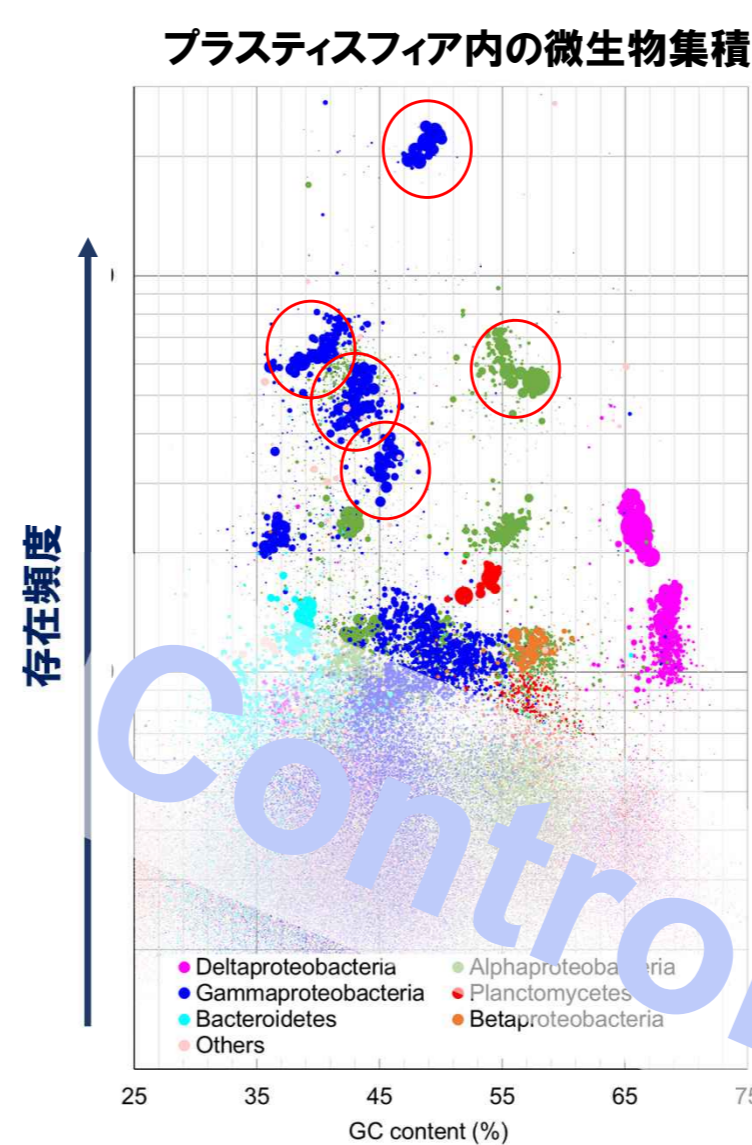
伸縮性能のある生分解性繊維の開発に成功

### プラスティスフィア:プラスチック表面の微生物フローラ



生分解性プラスチック表面に形成されたプラスティスフィアの電子顕微鏡写真。

メタゲノム解析

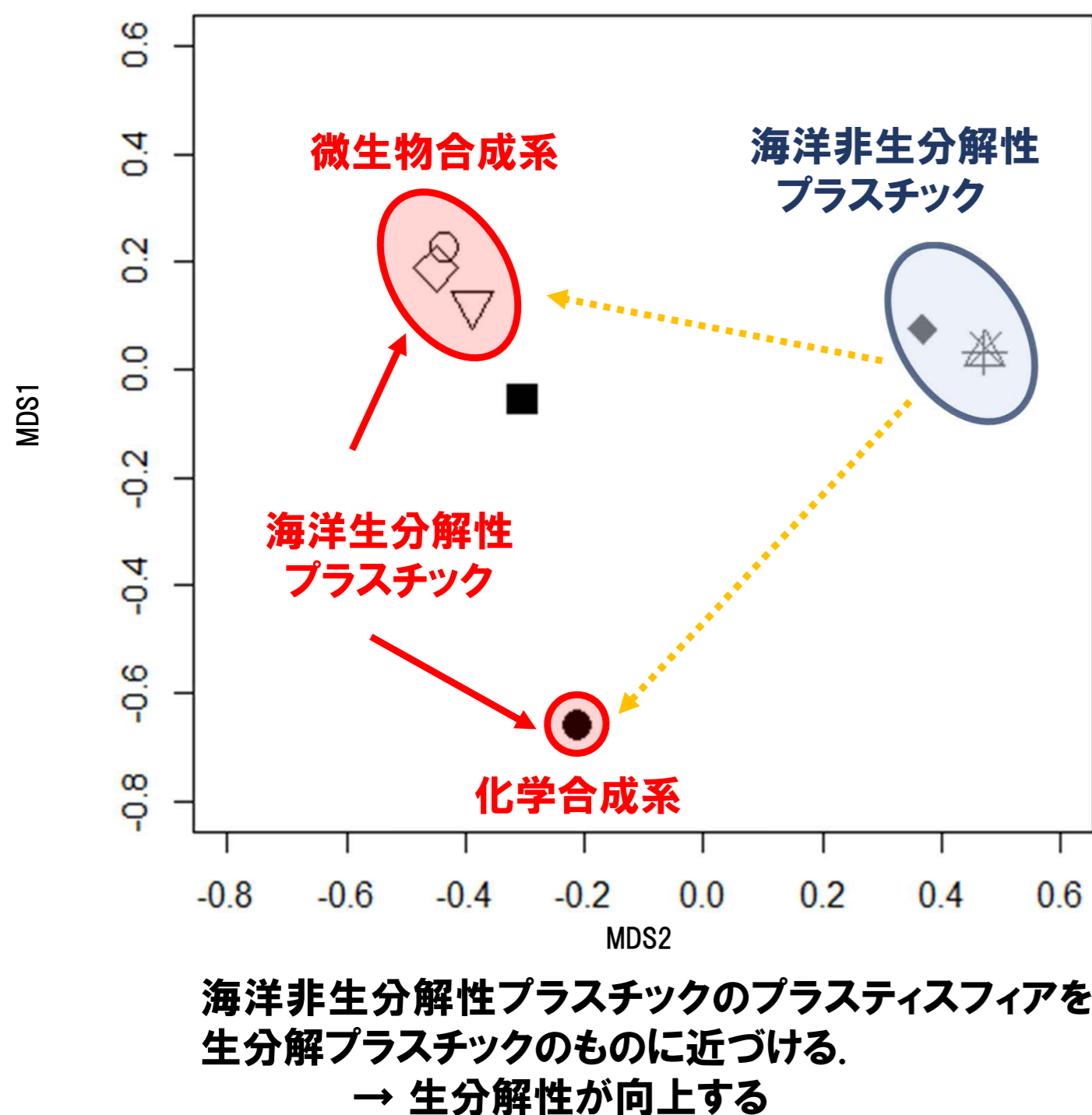


存在頻度が高い微生物 = プラスチックの生分解に関わる微生物のゲノム情報が得られる

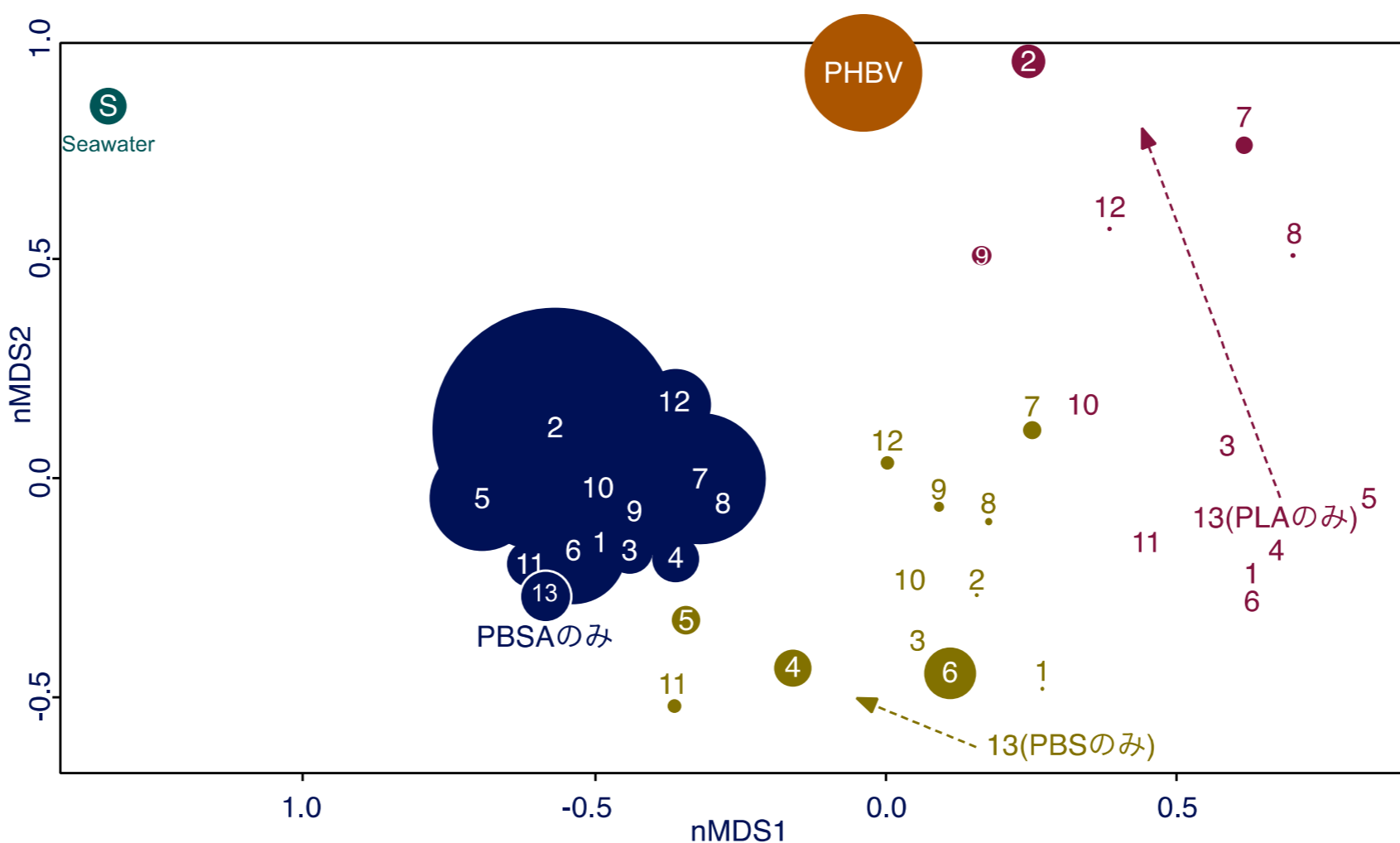
プラスチックの生分解機構の解明し分解制御へ 海洋以外の環境(淡水)でも同様の実験を実施中



### プラスティスフィア構造制御による生分解性速度制御



生分解性基盤樹脂にプラスティスフィア制御物質候補を10%混練した。作成したフィルムを海水に曝露させ、重量減少量および表面微生物叢を評価した。



Bray-Curtis指数に基づく非計量多次元尺度法(nMDS)による各フィルム表面微生物叢の類似性。プロット内の数字はプラスティスフィア制御物質候補の種類を示す。プロットの面積は、海水を除き、生分解性基盤樹脂の分解速度の大きさを表す。

### プラスティスフィア制御物質候補

物質	候補
1	CE
2	A
3	CH
4	P
5	SH
6	HH
7	C
8	C
9	AN
10	AC
11	P
12	Y
13	Negative control

PBSAの場合 No.2, No.5, No.6, No.7

PBSの場合 No.5, No.6

PLAの場合 No.2, No.7, No.9

に分解速度上昇効果。

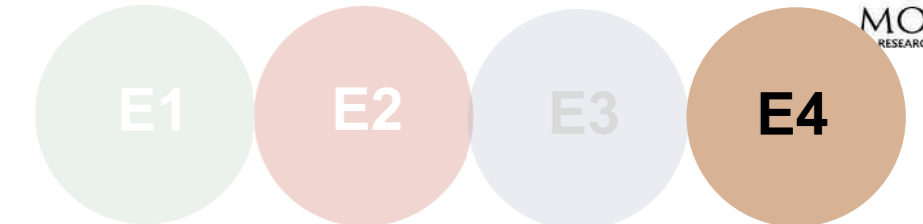
番号: A-12-5J

PJ: 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

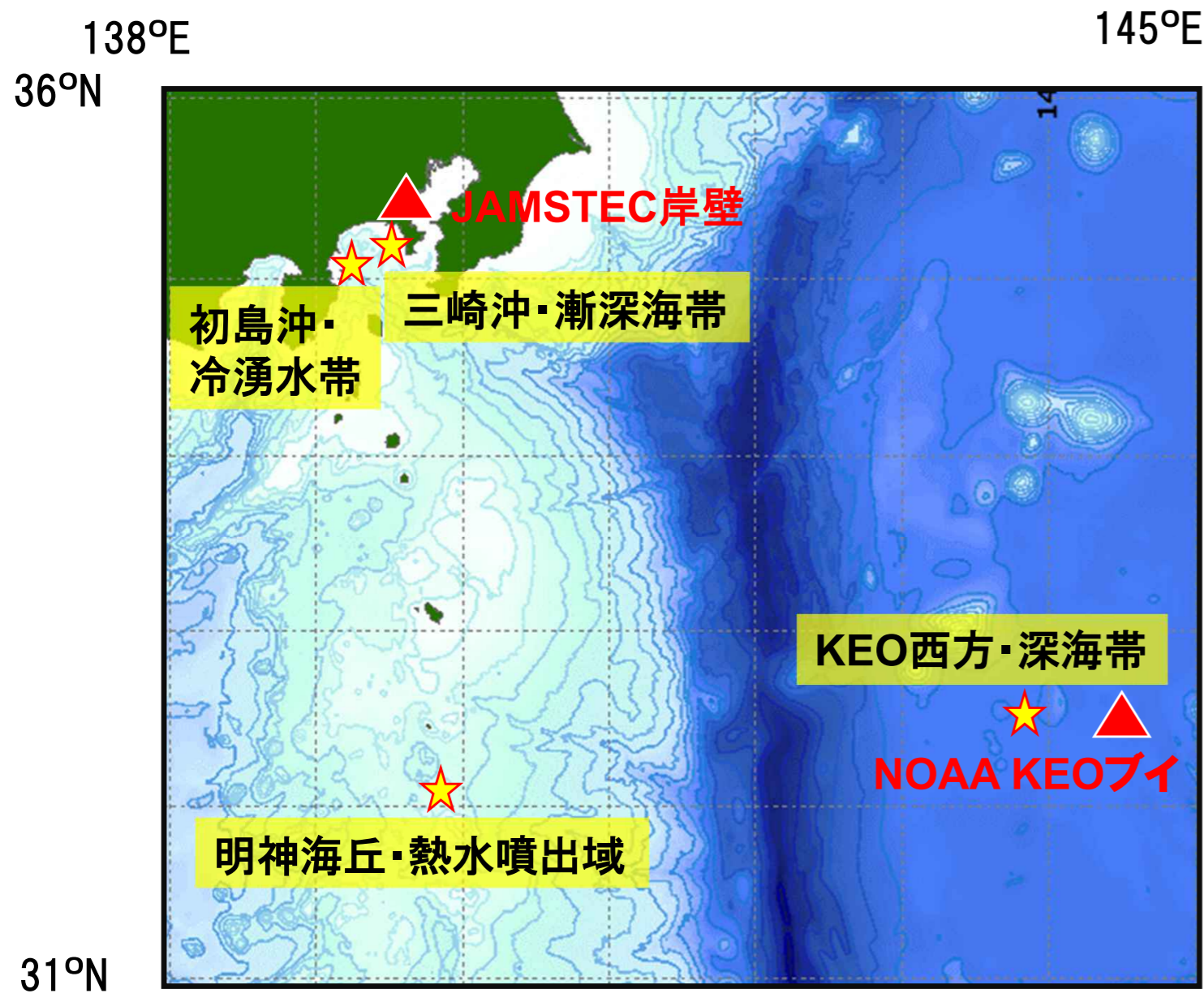
テーマ名: E4 実験室-深海現場環境における生分解検証及びその評価

担当機関名: 群馬大学、東京大学、海洋研究開発機構

問合せ先: 群馬大学 柏谷健一 (kkasuya@gunma-u.ac.jp)



海洋現場での生分解性検証実験



2020-2022年度に計6航海を行い、深海底に40種類以上の新規生分解性素材を設置。プラスチックごみの蓄積量が多い深海底での評価実験を行っているのは世界でも本プロジェクトのみであり、深海実環境での新素材の分解度を唯一正確に評価することができる。

2022年4月には北西太平洋の海洋表層に6種類の新規生分解性素材を設置。

一部については回収し、7項目の物性・化学試験の他、付着微生物のメタオミクス解析も行い、分解度とその分解プロセスの評価を進めている。



潜水船による設置・回収作業



深海底に設置された新素材を含むチャンバー



表層係留ブイに取り付けられた生分解性プラチャンバー

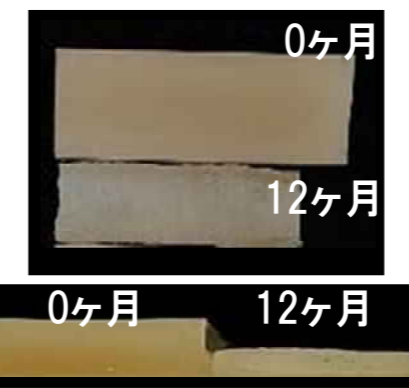
海洋現場での生分解性検証実験: 浅海

生分解性プラスチックの岸壁分解(浅海分解)

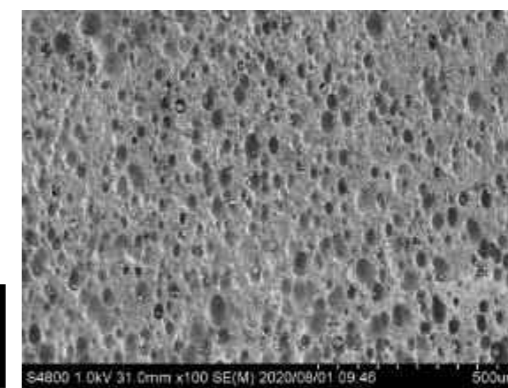
Table showing dimensions and weight of biodegradable plastic before and after 12 months in shallow water, including a reduction rate of 70% in weight.



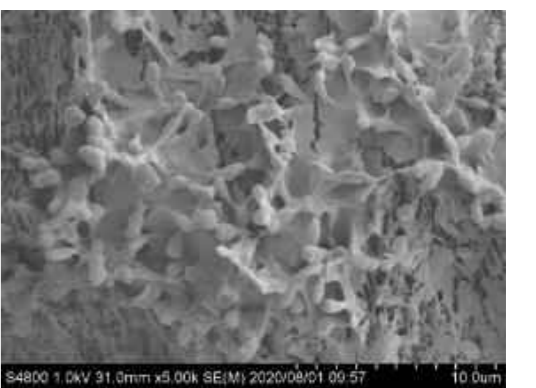
設置の様子



寸法変化



表面の様子



付着した分解微生物

海洋現場での生分解性検証実験: 深海

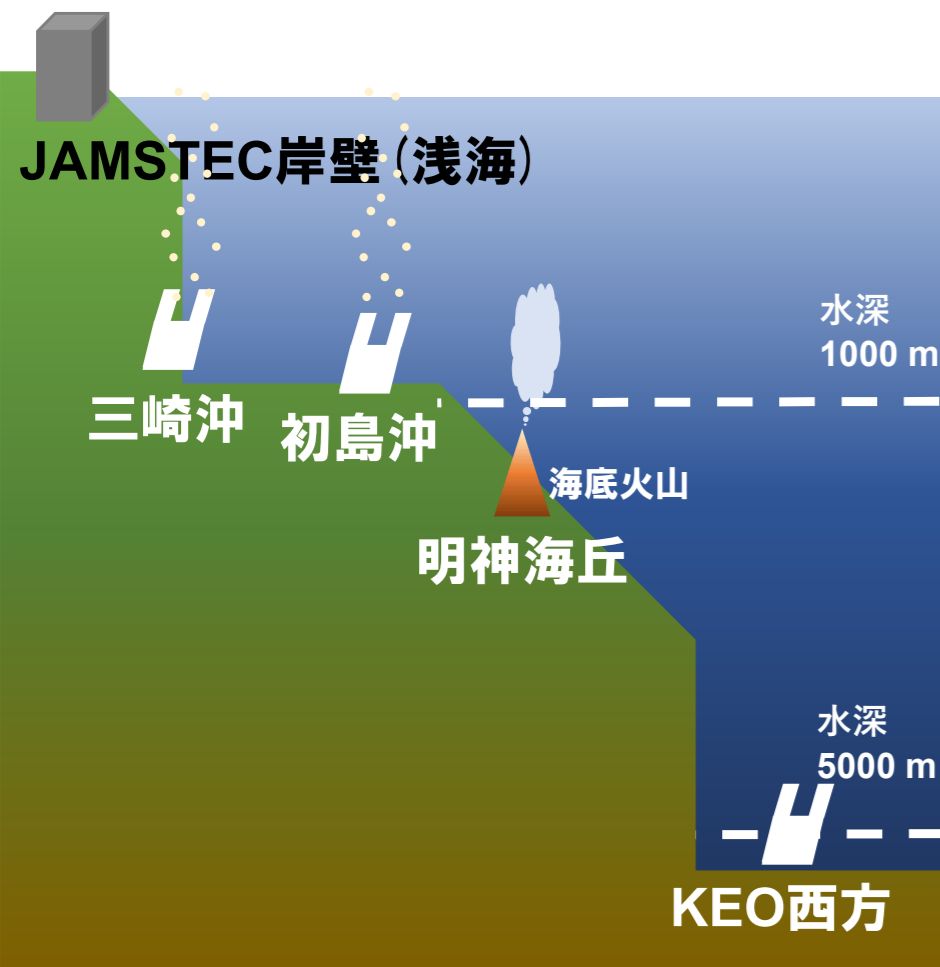


Table showing salinity, temperature, and dissolved oxygen levels at different study sites in the deep sea.



生分解性プラスチック



設置4か月後のサンプル



ロボットアームを用いた回収



生分解性プラスチックを入れたチャンバー



サンプル・海底土・深海水の回収



サンプル直下の海底土の採取

実験室内での生分解度評価

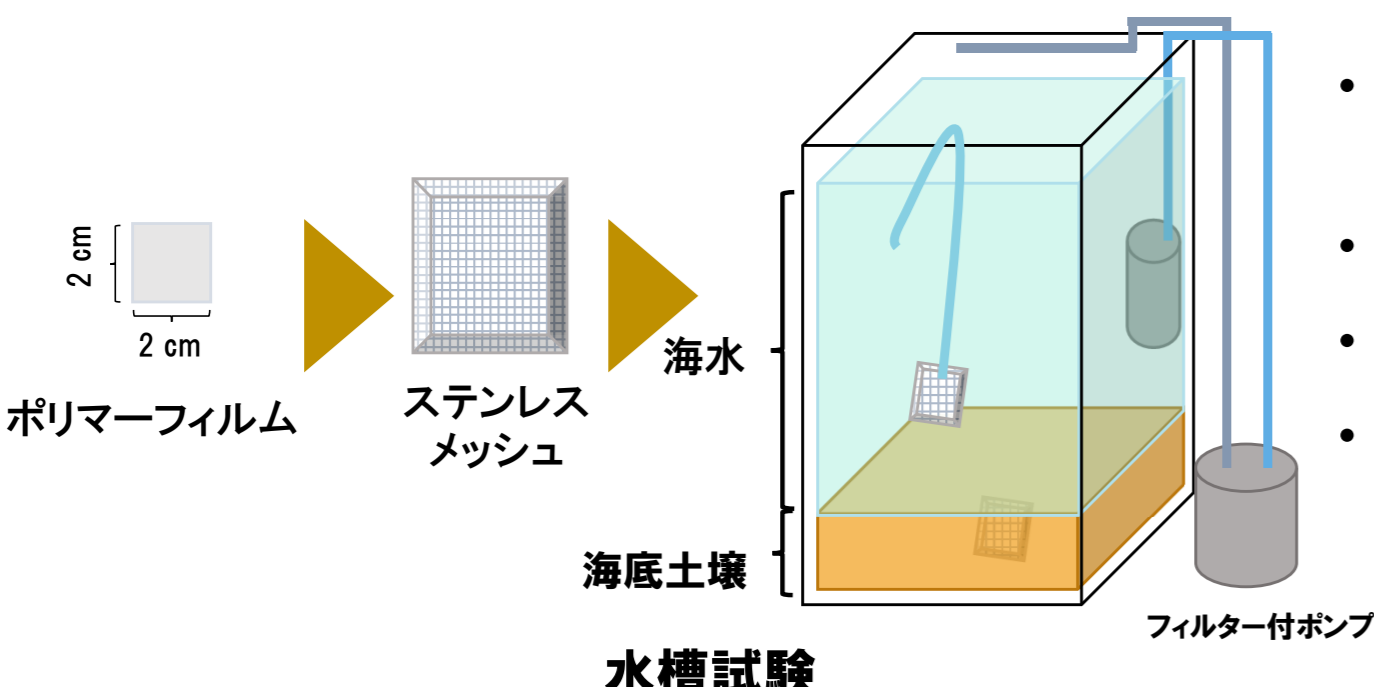


Biodegradation rate formula: 生分解度% = (O2 / ThOD) x 100

O2: 試験化合物の異化に使用された酸素要求量 (BOD)

ThOD: 理論的酸素要求量

BOD生分解度測定



- List of evaluation items: Film weight reduction (collapse degree), surface morphology observation, material property evaluation, and biodegradation of polyethylene terephthalate.

微生物叢選抜によるBOD生分解度試験の最適化

①基盤樹脂分解細菌の取得に適したバイオフィーム形成方法の検討及び菌株の分離

実験室浸漬(4ヶ月間)

- Lab immersion details: PBSA, PBAT film pieces, 4 collection sites, and search for optimal conditions.



実海域浸漬(5ヶ月間)

- Field immersion details: Iwate Prefecture, 10m depth, PBSA, PBS, PBAT, PCL films.



Plastics from the field yielded 230 bacterial strains.

②分離菌株の分解特性解析及び生分解評価用カクテル菌株の選抜

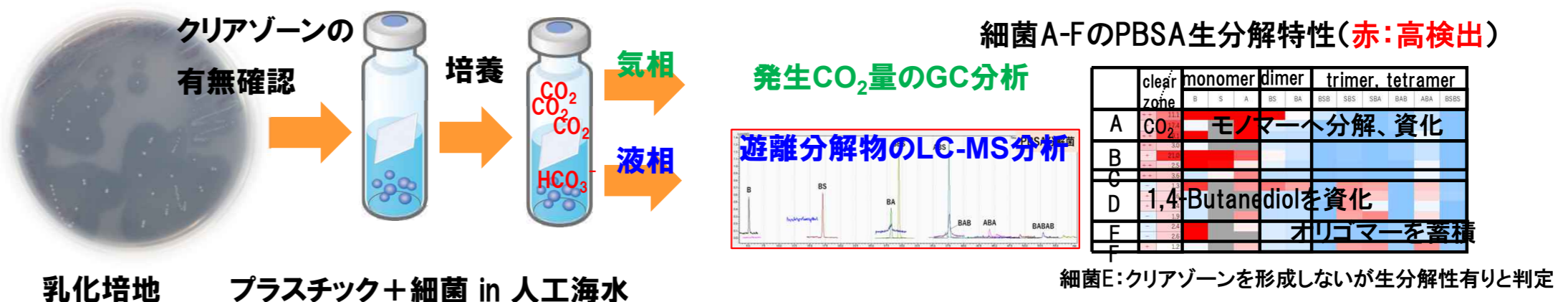


Table showing the biodegradation characteristics of bacterial strains A-F on PBSA, including monomer, dimer, trimer, and tetramer breakdown.

Summary of the biodegradation evaluation process, including the selection of bacterial strains for testing based on their characteristics in emulsion culture and GC analysis.