

生分解性プラスチックの普及をめざして

－ シャーレで行う簡易評価試験の考案 －

浅田 さくら 池内 翔哉 砂川 優樹 東瀬戸 翔大 松江 梨々子 路次 圭吾
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

生分解性プラスチックの研究には時間がかかってしまい、普及が進まない要因の一つとなっている。本研究では、簡易な生分解性評価法を提案することを目的とした。生分解性プラスチックの普及を進める一助となる。まず、既存の工業規格に基づいた二酸化炭素発生量の測定による試験と色素を用いた試験の再現を試みたが、時間や手間、コストがかかることが分かった。本研究では、後者の方法に工夫を加え、安定した生分解性評価データを簡単かつ安価に得ることに成功した。それに加え、生分解の進行の程度を大まかな数値で表す方法も検討した。

1. はじめに

1.1. 研究動機と目的

生分解性プラスチックは、「使用するときには従来のプラスチック同様の性状と機能を維持しつつ、使用後は自然界の微生物などの働きによって生分解され、最終的には水と二酸化炭素に変換されるプラスチック」[2]([1]よりの転載)と定義されている。

長年プラスチックごみの処理に関する問題の解決策として研究開発が進められてきたが、今も普及が進んでいない。この要因として、生産コストの高さなどが挙げられる。この点の改良には、現在多くの企業や研究所が取り組んでいる。

ここでは、これらの研究が速く進められるようにするために、実験室において短期間で行うことができる生分解性評価法を検討した。

1.2. 先行研究と本研究の特徴

先行研究として農業・食品産業技術総合研究機構の短期間評価試験[3]がある。この研究で示された試験方法では撥水スライドガラス上でフィルムを作成し、96 ウェルマイクロプレートを使用して分光分析するものであった。従来の生分解性の評価試験が数か月を要するのに対し、この研究は1日で評価を行っていた。しかし、この研究で用いられた器具・装置は高価であるため、容易に行える方法ではなかった。また、この研究では独自に開発した分解酵素を使用しており、入手することができないという難点があった。

本研究はこのような点を解決する、安価で簡易な方法である。

2. 既存の工業規格に基づく試験

2.1. 概要

この実験は日本工業規格JIS K6951[4]に基づくものである。

2.2. 材料と方法

第一回では、エコフレックス(脂肪族芳香族ポリエステル, BASF 社), GSP1a(ポリブチレンサクシネート(以下 PBS)(図4に構造式を示す), 三菱ケミカル)を試料として用いた。各ペレットをアイロンで融解させ、20×20 mm 四方に成型したものを試験フィルムとした。第二回と第三回ではGSP1aを用い、後述する方法(但しプラスチックは0.050 g)で作成したものを試験フィルムとした。

文献[4]と同じ方法で基本培養液を作成した。第一回は本校作製のコンポストを植種源とした。コンポスト10 gを基本培養液100 mLに加え、かき混ぜたのち、30分間放置しキッチンペーパーでろ過した。ろ液4.00 mLを基本培養液100 mLと混合したものを試験培養液①とする。第二回と第三回の植種源は活性汚泥を用いた。ミキサーで攪拌した活性汚泥(3 g/L)2 mLを純水50.0 mLに溶解し、基本培養液100 mLに3.093 mL(懸濁固形物濃度3%)混合させた。これを試験培養液②とする。

水酸化ナトリウム水溶液50.0 mL, 石灰水50.0 mL, 試験培養液(①または②)50.0 mL, 水酸化ナトリウム水溶液100 mLを入れたフラスコをこの順でつなぎ、実験装置とした。4個目のフラスコおよび試験フィルムを装置に含めずに約24時間通気した後、4個目のフラスコを装置につなぎ、試験培養液フラスコに試験フィルムを入れて試験を開始した。試験はインキュベーター内で光を遮断して行った。

以上の条件と、各回の水酸化ナトリウム水溶液のモル濃度、設定温度、試料、試験期間を以下の表にまとめた。

表1 各回の実験条件

	第一回	第二回	第三回
植種源	コンポスト	活性汚泥	活性汚泥
濃度	1.1 mol/L	0.94 mol/L	1.0 mol/L
温度	40 °C, 50 °C	35 °C	25 °C, 35 °C
試料	エコフレックス, GSP1a	GSP1a	GSP1a
期間	7/26-8/9	10/10-10/24	11/13-1/12

試験期間終了後、中和滴定により4個目のフラスコの水酸化ナトリウム水溶液モル濃度を測定し、二酸化炭素発生量及び生分解度 $Dt(\%)$ を算出した。一般に次の式から得られる。

$$Dt = \frac{\Sigma(CO_2)t - \Sigma(CO_2)B}{ThCO_2} \times 100$$

$$ThCO_2 = mXc \times 44/12$$

$\Sigma(CO_2)t$ …試験期間中に試験フラスコ中に発生した二酸化炭素質量[mg]

$\Sigma(CO_2)B$ …試験期間中に空試験フラスコ中に発生した二酸化炭素質量[mg]

$ThCO_2$ …試験フィルムがすべて分解された時に発生する二酸化炭素量[mg]

m …試験フィルム(プラスチック)の質量[mg]

Xc …化学式から決定した試験フィルムの炭素含有量

44及び12…それぞれ二酸化炭素、炭素のモル質量

2.3. 結果

上式により算出した生分解度は下表の通り。第一回では空試験を行わなかったため算出できなかった。

表2 各試験での生分解度

条件	第一回	第二回	第三回	第三回
	40 °C/50 °C	35 °C	25 °C	35 °C
生分解度	算出なし	1.02 %	55.2 %	-96.9 %

2.4. 考察

一回目の結果についてはゴム栓が劣化して空気が抜け出していたと考えられる。また、コンポスト中の微生物個体数や分解能力の程度を確かめていなかった。石灰水に生じた沈殿は水酸化カルシウムで、その原因は水の蒸発による溶媒の減少だと考えられる。その他の沈殿現象の原因は検討できていない。

二回目の結果については、装置を改善し植種源を活性汚泥としたが結果が出なかったことから期間が短かったと考えられる。

三回目では、二回目と同様の条件で期間を長くすると25 °Cで試験した方は分解されたことから従来のJIS試験では長い期間がかかることが示された。規格によれば60%以上の分解を必要とするため、やや不十分である。また、35 °Cの試験装置でプラス

チックを入れているほうが二酸化炭素発生量が少なかったのは、装置の不備が考えられる。

従来の方法では、長い時間がかかり、また、スムーズに試験を行うのが難しいということがわかった。

3. 試験方法の模索

3.1. 先行研究からの変更点

先行研究では撥水スライドガラスを用いていたが、今回は安価に入手しやすい小型シャーレを用いた。また、分光光度計は1 mL以上の試料をセルに入れて分析する標準的なものを、酵素は、比較的入手しやすいリパーゼの一種であるクチナーゼを用いた。

3.2. 方法

実験に使用したフィルムは次の手順で作成した。小さい褐色瓶にプラスチック0.20 gとナイルブルー溶液400 μ Lを入れた。ここにジクロロメタンを約15 mL入れ、蓋を閉めてシェイカーで振盪した。(溶けない時はジクロロメタンを足して振盪した。)プラスチックが完全に溶けた後瓶の中身をビーカーに出した。瓶を一度ジクロロメタンでゆすぎ、洗液もビーカーに入れた。この液をシャーレに10等分し、溶媒を蒸発させた。(見た目にムラがあるものは使用しない。) ※振盪以外の操作はドラフトチャンバー内で行う。

酵素溶液は次の手順で作成した。0.20 mol/Lリン酸水素二ナトリウム水溶液11.6 mL、0.10 mol/Lクエン酸水溶液8.40 mLを混合し、McIlvaine緩衝液を作成した[5]。これにクチナーゼ20.0 mg(正味量)をMcIlvaine緩衝液20.0 mLに溶かした。

試験は次の手順で行った。フィルム入りシャーレに酵素溶液を4.00 mL入れた(以下、Sample)。またフィルム入りシャーレにMcIlvaine緩衝液のみを4.00 mL入れたシャーレ(以下、Control)を用意した。これらをパラフィンフィルムで蓋をし、37 °Cに設定したインキュベーターに入れて1日置いた。その後、空セルをベースラインにとりSampleとControlの吸光度測定を行った。また、酵素溶液によるグラフへの寄与を調べるために同様に吸光度測定を行った。

3.3. 結果と改善策

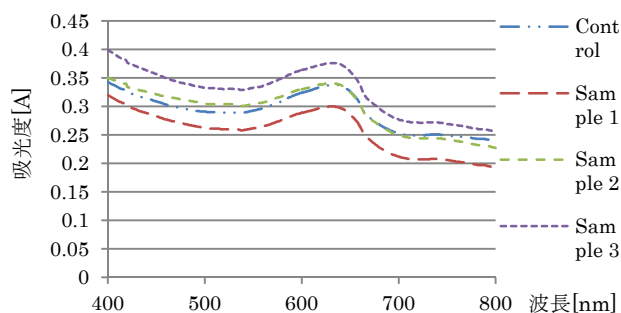


図1 本試験の結果

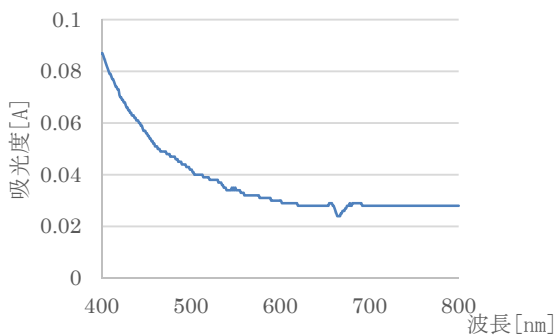


図2 酵素溶液による寄与

図1におけるグラフの高さの大きなばらつきは溶液の濃度が各シャーレで異なっていたからだと考えられる。そこで、蓋に付着した水滴が溶液に戻るようにパラフィンフィルムの蓋をすり鉢状に凹ませるようにした。

また、各溶液の分析で得られたグラフの概形が酷似し、特にSample2とControlのグラフの比較ではナイルブルーが寄与する630 nm付近で吸光度にほとんど差が見られない。これによりあまり分解していないことがわかる。そこで、次の手順で酵素分解を促進するために塩基による加水分解を行った。1.0 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液4.00 mLをフィルム入りシャーレに入れ、1時間放置した。その後1.0 mol/L 塩酸4.00 mLを入れ、中和した。さらに蒸留水で3回洗浄した。

さらに、この分析方法ではグラフに寄与している物質が多く、目的の物質であるナイルブルーによる寄与が見えなくなっていた。寄与する物質が少なくなるように、分析方法をControlをベースラインにとりSampleの吸光度測定を行うように変更した。

3.4. 改善の結果

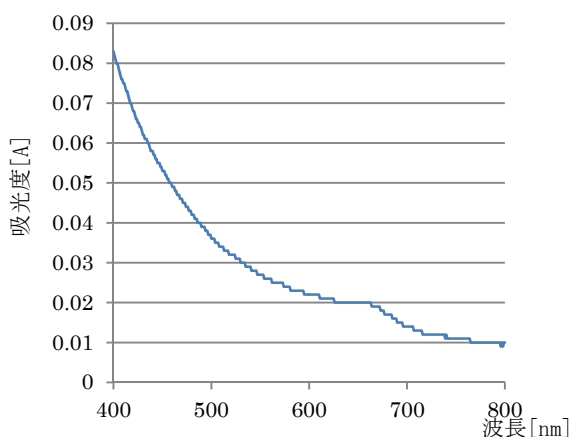


図3 改善後の結果

3.5. 考察

図3において630 nm付近にピークが見られたことから塩基での加水分解による酵素分解の促進が確認

された。しかし、分析方法については分解されて出てきたナイルブルーのみによる寄与でのグラフは得られなかったので改善の余地が見られた。その方法について以下に示す。

4. 試験方法の提案

4.1. フィルム作成

本実験の方法(3.2.)に準じる。

4.2. 酵素溶液(クチナーゼを使用する場合)

本実験の方法(3.2.)に準じる。

4.3. 加水分解

- ①1.0 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 4.00 mLをフィルム入りシャーレに入れる。
- ②1時間放置する。
- ③1.0 mol/L 塩酸 4.00 mLを入れ、中和する。
- ④蒸留水で3回洗浄する。

4.4. 試験

- ①加水分解したフィルム入りシャーレに酵素溶液を4.00 mL入れる(以下, Sample)。また対照のために加水分解したフィルム入りシャーレにMcIlvaine緩衝液のみを4.00 mL入れるシャーレ(以下, Control)、酵素溶液4.00 mLのみのシャーレ(以下, Enzyme)、McIlvaine緩衝液4.00 mLのみのシャーレ(以下, McIlvaine)も用意する。
- ②パラフィンフィルムで蓋をする。この時、すり鉢状に真ん中を凹ませるようにする。
- ③37 °Cに設定したインキュベーターに入れて24時間放置する。ヒーターに直接触れる場所は避ける。

4.5. 分析

Control: Enzyme=1:1 の比率で混合した溶液をベースラインにとり、Sample: McIlvaine=1:1 の比率で混合した溶液の吸光度測定を行う。

4.6. 分解の有無の判定

分析によって得られたグラフは分解によって溶け出したナイルブルー分子のみによる寄与を示すものである。このグラフでナイルブルーの寄与する630 nm付近にピークが見られればプラスチックは分解されたと評価できる。

4.7. データの解釈について

試験後の各シャーレ内(溶液中)の溶質について、Sampleは{酵素(以下, *E*)+McIlvaine(以下, *Mc*)+フィルムから自然に滲み出すナイルブルー(以下, *NB*)+分解によって溶け出すナイルブルー(以下, *nb*)}, Controlは{*Mc*+*NB*}, Enzymeは{*E*+*Mc*}, McIlvaineは{*Mc*}とそれぞれ表せる。ただし、*NB*と*nb*はフィルムの状態に依存する。ここで「Sampleの*NB*とControlの*NB*は等しい(差が誤差の範囲である)」と仮定する。

原理的に、測定する溶液中の溶質からベースラインの溶液中の溶質を引いた残りの物質が寄与するグラフが吸光度測定にて得られる。4.5.での分析では混合する比率が1:1であるので、

$$\begin{aligned} & (\text{Sample} + \text{Mcllvaine}) - (\text{Control} + \text{Enzyme}) \\ &= (E + Mc + NB + nb + Mc) \\ & \quad - (Mc + NB + E + Mc) = nb \end{aligned}$$

で表されるように、確かに nb のみが寄与するグラフが得られる。ここで特筆すべき点は、混合すると体積が2倍になるので、得られるグラフは試験溶液の1/2の濃度の nb が寄与しているということである。

5. 今後の展望

5.1. 試験の改良

- 塩基による加水分解を温度の高い環境で行うことでこの反応の速度を上げ、より短時間で試験を開始できると考える。
- 吸光度のスケールが小さく、誤差を無視できない場合がある。
→フィルム中のナイロブルー含有量を増やす。 nb が寄与するグラフの630 nm付近で吸光度 $A=0.5$ ほどのデータが取れるようになれば誤差を無視できるようになる。
- 試験ごとに外れ値が1つは出ていた。
→多数のデータを取る必要がある。
- どれほどの精度で仮定が正しいかを検証する必要がある。

5.2. 生分解進行指数の算出

4.7.での仮定が測定精度の範囲内で成り立つ場合、吸光度は物質の濃度に比例するので、まず nb による寄与のグラフ、 NB による寄与のグラフとナイロブルーの検量線を比較することで nb と NB の濃度を求める。ここで、分解時に水が発生するが、溶液中の水よりもはるかに少ないので濃度は変わらないとみなせる。次にフィルム中のナイロブルーが4.00 mLの溶液に全て溶けだした時の濃度を計算する。以上より次式で定義した生分解進行指数を算出できる。

$$\begin{aligned} & \text{生分解進行指数} \\ &= \frac{(nb\text{濃度})}{(\text{最大ナイロブルー濃度}) - (NB\text{濃度})} \end{aligned}$$

ただし、この計算式は自然にナイロブルーが溶出した後もフィルム中のナイロブルー濃度が一定であるとみなせる条件下で成り立つ。また、この指数が1になった場合も生分解が完了しているとは言えない。分子鎖がすべて分解される前にナイロブルーがすべて溶出すると考えられるからである。さらに、先に

「フィルム中のナイロブルーが4.00 mLの溶液に全て溶けだした時の濃度を計算する」と述べたが、水酸化ナトリウムでの加水分解によって溶け出したナイロブルーの量を考慮しなければならないので、その計算方法については検討中である。

この算出した生分解進行指数の信頼性の向上には5.1.で示したように nb の寄与を示すグラフのスケールが大きくなるような改良を加えることが必要である。

謝辞

本校教諭の中澤克行先生、南勉先生、岡田美樹先生、大友浩一郎様をはじめとする本校サイエンスアドバイザーの皆様には本研究についてご指導頂いたことに心から感謝の意を表します。また、試料を提供して頂いた弘栄貿易株式会社様、三菱ケミカル株式会社様、酵素を提供して下さった東北大学大学院農学研究科教授五味勝也先生に深く感謝致します。

[参考文献・参考URL]

- [1]生分解性プラスチック研究会, 入門 生分解性プラスチック技術, オーム社, 2006
- [2]生分解性プラスチック-環境技術解説 | 環境展望台 : 国立環境研究所 環境情報メディア <http://tenbou.nies.go.jp/science/description/detail.php?id=54> (2018/12/28 現在)
- [3]Yukiko Shinozaki etc. , Rapid and simple colorimetric assay for detecting the enzymatic degradation of biodegradable plastic films, Journal of Bioscience and Bioengineering 2013, VOL.115 No.1, 111-114
- [4]JIS K 6951:2000 プラスチック-水系培養液中の好氣的究極生分解度の求め方-発生二酸化炭素量の測定による方法 , <http://kikakurui.com/k6/K6951-2000-01.html> , (2019/1/28 現在)
- [5]J. Biol., A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. , 1920

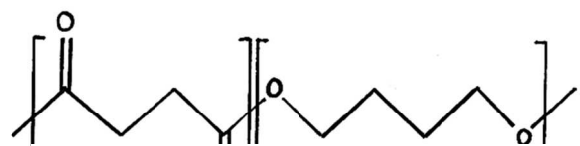


図4 PBSの構造式