「分解性高分子材料」特集

生 分 解 性 の 評 価

酒 井 清 文

1. はじめに

合成高分子と微生物との関係は良すぎても困るし、また悪すぎても困る。合成高分子は我々の生活環境を良くするために開発されたものであり、使用時には微生物の被害を受けることなく安定に存在しなければならない。そのため、JIS, MIL, ASTM などでは工業製品に対するかび抵抗性試験を設けている。一方、これらの化合物を廃棄した時には、環境汚染防止の観点から適切な処理または自然界の浄化作用によって分解される必要がある。

合成高分子に対する微生物の影響を調べた研究はたくさんある。初期のもの^{1,2)}は微生物被害、特にかびの被害に関するもので合成高分子化合物の劣化防止を目的として行われた。かびは合成高分子よりも低分子の添加物を栄養源として生育する。多くの合成高分子は天然に存在しない構造をしておりさらに水との親和性が低いため、一般には微生物の作用を受けにくいと考えられる。しかしその後、合成高分子の種類や生産量が増加するにつれて環境汚染という新たな問題が生じ、1960年頃から合成高分子自身を微生物で積極的に分解しようという研究が行われ始めた³⁻⁶⁾。さらに、ポリエチレングリコール、ポリエステル、ポリビニルアルコール等については微生物による分解が酵素レベルで研究されている⁷⁾。

現在のところ、生分解性プラスチックの定義そのものについて世界的な統一見解はだされておらず、またその試験評価法に関してもまだ確立されていない。これらの点について、アメリカの ASTM (アメリカ材料試験協会) や日本の生分解性プラスチック研究会などで検討中である。ここでは既存の微生物試験について述べ、それらを基に今後の生分解性プラスチックの試験評価法につ

いて解説する。

2. 既存の試験法⁸⁻¹³⁾

現在行われている工業製品に対する微生物試験法としてかび抵抗性試験がある。日本では JIS Z 2911, アメリカでは ASTM G21-70 や MIL-STD-810B (または D) METHOD 508 などが試験法として定められている。これらは合成高分子を含む各種工業製品のかびに対する抵抗性を調べるための試験である。また、難分解性でしかも人の健康を損なうおそれがある化学物質に対し、環境汚染を防止することを目的として、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」が1974年に施行され、それによって各種化学物質について微生物分解性試験 (通称 MITI 法) が行われている。それぞれ試験の目的や方法は異なるが、これからの生分解性プラスチックの試験評価法の参考になるとと思われる。

かび抵抗性試験はかびの被害防止を目的として制定されているが、反対に考えれば分解性の評価である。しかし、この試験法はあくまでかびのみを用いた試験法であって一般的な自然界での生分解性を反映しにくい。ただ試料の形態として固形状態で試験ができるという利点がある。また、MITI 法は自然界での浄化作用に関与している活性汚泥を用いているという点では、かび抵抗性試験とは違い確かに自然界での生分解性を反映していると言える。ただこの試験法においても、あくまで水溶性の化合物が対象であって、水に溶けない物質については試験期間も長くなるであろうし微妙な生分解の度合を判定しにくいと思われる。これらのことを考慮しながら、筆者の試案した試験評価法について説明する。

Evaluation of the Biodegradation of Polymers

筆者紹介 KIIYOFUMI SAKAI

Department of Biochemistry, Osaka Municipal Technical Research Institute

大阪市立工業研究所生物化学課 研究主任 農学博士

筆者は、応用微生物が専門で、著書として「酵素—バイオテクノロジーへの指針—Ⅱ」(共著、朝倉書店)等がある。趣味はラケットボール、テニス、絵画鑑賞。

本稿では、生分解性の評価基準決定上の問題点、環境保護と産業の発展の視点から生分解性評価を解説願った。

3. 今後の試験評価法

生分解とは何か。我々が今問題としている生分解とは自然界の営みの中でどのレベルに位置するのか。生分解試験を考えるためには、これらの事を充分理解しておく必要がある。ここで問題視されている生分解とは、動物や植物によるものではなく主に微生物によるものである。果して微生物とは何か。微生物とは単細胞か菌糸形で組織分化をしていないもの、あるいは多細胞であってもごく初歩的な組織分化しか示していない原生生物のことである¹⁴⁾。このように単純な生物であるがゆえに自然界の種々の環境下で生育することができ、形態的にも生理的にも多種多様であり、自然界のほとんどあらゆる物質を栄養源として生育することができる。図1に微生物

図1 微生物による分解作用

物による分解作用を簡単に示した。異化作用により基質は微生物が利用できる物質にまで変化させられ、同化作用によってその分解産物は菌体成分へと代謝されて行く。土壌はそれらの微生物が生存している住処のひとつであり、その数は種々の環境によって異なるが、土壌1グラム中に $10^6 \sim 10^7$ 個程度である。

微生物の細胞には数千種類の酵素が存在し、生体触媒として生命の維持に役だっている。この酵素には、生育環境の変化に関わらず定常的に生産されるものと、生育環境の変化に応じて生産性が変化するものがある。前者は生命維持に必須のものであり、後者は環境に適應するために必要となるものである。後者の例として栄養源の変化が挙げられるが、栄養源として一般的でない芳香族化合物(ベンゼン、トルエンなど)や塩素化合物(PCB、農薬類など)、さらには合成高分子化合物に作用するような酵素が種々の微生物で生産されている。酵素は生分解を行う直接の触媒であり、微生物は酵素を生産する工場である。そして土壌はその工場の敷地である。よって、土壌、微生物、酵素の順にしたがって、生分解の本質に迫っていくわけである。しかし逆に、本質に迫れば迫るほど付随する因子が除かれ、自然の状態からは

遠くなる。

3.1 土壌による生分解試験

土壌を用いて生分解の試験を行う場合の一番の特徴は、自然環境に近い条件で試料が処理されることである。この試験において分解が認められる試料は、自然界でも間違いなく分解されると考えてよい。ただ、自然の状態に近いがゆえにその条件設定が困難である。この土壌による試験と MITI 法はどちらも自然環境に近い条件で試験が行われるという点で似ており、これらの試験を、生分解性プラスチックの生分解性を調べるための1次スクリーニングとして用いるのがよいと思われる。土壌を用いた分解試験の特徴を表1に示す。

表1 土壌による生分解試験

特	徴：自然環境を反映。 完全分解の判定ができる。 定量性、再現性が低い。 試験期間が長い。
土 壌 の 種 類：	各地域の土壌の混合。 特定地域の土壌。
試 験 条 件：	土中に埋める。 屋内の場合は温度(25～30℃)、湿度(95%以上)を保つ。 屋外の場合は自然環境下。 期間は1ヵ月～1年。
評 価 基 準：	BOD。 二酸化炭素の生成。 形状変化。 重量減少。 顕微鏡観察。 引張衝撃試験。

試験を行う際の条件としてまず第1に考えなければならないのが、どこの土壌を使用するかである。微生物は田、畑、野原、山等、場所によって菌層が異なり、また季節によっても菌層が変化する。土壌の使用を一般化させるには、このような自然環境の変化を理解したうえで、試験結果に再現性をもたせる工夫が必要である。そのためには標準となる土壌を調製しなければならない。第2に、試験を屋外でするのか屋内でするのか。微生物の生育には適度な温度と湿度が必要である。そのため試験をどこで行うかが問題となる。再現性を重視すれば屋内が良いし、自然ということを重視すれば屋外が良い。第3に、試験の対照としてどのような高分子化合物を用いるのか。試料が天然物か非天然物かによって分解速度にかなりの差があるので、対照物質も適切なものを選ぶ

必要がある。

土壌を用いた試験の場合に参考になるのが MITI 法である。MITI 法の場合、自然に近い状態で再現性を重視して行われているからである。土壌の選択や管理などある程度は MITI 法に準拠して決めればよい。また、屋外の適切な場所を選んで、その土壌を生分解試験用に調製しておくのもよいであろう。天然物を原料とした高分子の場合は、対照物質としてデンプン、セルロース、PHB などを使用すればよい。非天然物を原料とした場合にも、対照物質として天然高分子を使うのがよいが、その分解性の遅さを考慮して選ぶべきであろう。試験を行うときの温度、湿度、期間はこれまでの微生物試験を参考にして決めるのがよい。温度は25～30℃、湿度は95%以上、そして期間は1カ月ないし1年。一般に合成高分子の場合は水との親和性が低く微生物の作用を受けにくいので試験に時間がかかる。試料の形状は板状またはフィルム状がよい。

土壌を用いた試験では、化学的、物理的な分析法を用いて定量性のある結果を出すのは困難である。できるとすれば BOD の測定や二酸化炭素の測定であるが、値が微量では判定が困難である。一番確かなのが形状変化、重量減少、顕微鏡観察による判断である。最後に試験結果の評価法であるが、表2に示すようにおおまかに3段

表2 評価法

劣	化：高分子化合物の低分子化(異化作用)
崩	壊：高分子化合物の低分子化(異化作用)
資	化：高分子化合物の低分子化(異化作用)
	分解産物の代謝(同化作用)

階に分けられると思う。分解度の一番低い段階として劣化という評価が考えられる。この評価は、外見上の形態的变化は認められないが、顕微鏡観察で試料の表面に被害が認められるものや、引張衝撃試験で対照より強度が低下しているものに適応される。この場合の分解は主に微生物の異化作用によるものであり、試料の部分的な低分子化が生じていると考えられる。この段階の分解では BOD や二酸化炭素の測定をしても明確な結果は得られず、同化作用が働いているかどうかは判定困難である。第2の分解度として崩壊ということが考えられる。この評価は外見上の形態的变化が認められ試料が破壊されているが、破壊によって生じた断片が残存している場合に適応される。この場合の分解は劣化の場合と同じで微生物の異化作用が主たる原因に考えられ同化作用の判定は困難である。分解が一番進んだ段階として資化という判定を与える。この評価は、試料が微生物の作用によって

低分子化され、さらにその低分子化合物が微生物の体内で代謝されて二酸化炭素と水にまで変換された場合に適応される。この場合の分解は微生物の異化作用と同化作用が連動して働いた場合である。

3.2 微生物による生分解試験

この試験法の特徴は性質のわかった微生物を特定して用いるということである。よって試料の化学構造などがわかっていれば、それに応じて特定の微生物を選択し試験することができる。この場合の条件設定は容易に規格化することができ、再現性のある結果が得られる。この試験法の参考になるのがかび抵抗性試験であり、この試験に用いられているかび類に種々の細菌類を新たに加えれば、かなり広い範囲の試料について試験を行うことができるであろう。表3にこの試験法についてのまとめを示した。

表3 微生物による生分解試験

特	徴：完全分解が明確に判定できる。 定量性、再現性がある。 自然環境を反映しにくい。 試料中の低分子化合物にも作用するので誤差を生じる。
微生物の種類：	かび抵抗性試験のかびおよび新たに選択した細菌類。 分解性がわかっている特定の微生物。
試験条件：	液体培養。 固体培養。 人工土壌、人工淡水、人工海水。 温度(28～30℃)、(湿度95%以上)、 酸素。 期間は1カ月以内。
評価基準：	微生物の生育。 BOD。 二酸化炭素の生成。 形状変化。 重量減少。 顕微鏡観察。 引張衝撃試験。

まず決めなければならない試験条件は、どのような種類の微生物を使用するかである。使用する微生物の種類によって“一般”と“特殊”に分けることができる。

一般試験：自然界に普遍的に存在している微生物を使用する試験。

特殊試験：試料の化学構造に応じて定められた微生物を使用する試験。

一般試験の場合、全ての試料を対象とし、用いる微生物はいくつかの種類を混合して試験に供する。特殊試験の場合は、試料の化学構造からその結合様式や構成成分が明らかになっているので、それらを分解するのに適した微生物を選択し試験を行う。ただこの場合、試験に用いる微生物は単独で用いる場合と混合で用いる場合がある。というのは、主鎖の結合を分解する微生物と分解された低分子化合物をさらに分解する微生物とが同じであるとは限らないからである。

次に試験環境であるが、一般的には微生物の生育に最低限必要な栄養分(無機塩、ビタミン、アミノ酸、酵母エキスなど)を含む液体培地または固体培地(液体培地に寒天を添加して固化した培地)を用いて試験をするのがよいと思われる。温度は28~30℃、湿度は95%以上で、期間は1カ月程度とし、液体培地の場合は静置または振とうによって培養を行う。その他に自然環境をシミュレートする試みとして、人工土壌、人工淡水、人工海水などに微生物を添加して試験することも考えられる。ただこの場合、条件設定をかなり考慮して決める必要がある。試験の対照物質としては土壌の試験の場合と同じ物を用いる。

このような特定の微生物を用いる試験の場合、天然物から調製された試料はそれを分解する微生物がすでにわかっているので比較的簡単に試験することができる。しかし合成化合物から調製された試料に関しては、現在のところ合成高分子の分解微生物が限られているので、その数を増やすためにさらにそのような分解微生物について調査する必要があると思われる。ただ合成高分子化合物を分解する微生物が、自然界でどの程度普遍的に生存分布しているかが問題として残る。

この微生物試験の評価基準として一番簡単なのが、微生物の生育の有無を調べることである。微生物が試料に作用してそれを栄養源としていれば必ず生育するし、そうでなければ生育しない。ここで注意しなければならない点がある。それは試料に混じっている種々の低分子の添加物である。微生物は高分子化合物を分解せずに添加物を栄養源として生育することが多いからである。この他に土壌の場合と同様に、形状変化、重量変化、顕微鏡観察、引張衝撃試験などによって調べる必要がある。

最終評価については、土壌のところで述べたのと同様である。

3.3 酵素による生分解試験

この試験法の特徴は、高分子化合物の分解に直接関与している酵素を用いることであり、定量性および再現性に優れ短期間で結果を得ることができる。合成高分子の

分解機構を調べるためには必ず分解酵素を用いて調べるのが常法である。そのため、試料の化学構造がわかればそれに適合した酵素を用いて分解試験を行うことができる。また、微生物試験のように分解産物がさらに資化されるということがないので、分解産物を調べることもできる。この試験の特徴を表4に示す。

表4 酵素による生分解試験

特 徴:	試料の化学構造に応じて試験できる。 試験が簡便である。 試験期間が短い。 定量性、再現性がある。 自然環境を反映していない。 試料の種類が限られる。
酵 素 の 種 類:	天然高分子の分解酵素(アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、PHB分解酵素、プロテアーゼなど)。 合成高分子の分解酵素(ポリエチレングリコール分解酵素、ポリイソブレン分解酵素、ポリビニルアルコール分解酵素など)
試 験 条 件:	通常の酵素反応の条件。 水溶液中。 温度(30℃付近)、pH(中性付近)、酸素。 期間は数時間~数日。
評 価 基 準:	分解産物の定量。 分子量分布。 可溶性の全有機炭素量。 形状変化。 顕微鏡観察。 引張衝撃試験。

酵素試験の場合は、土壌や微生物試験と違って試験条件を決めるのは簡単である。用いる酵素は試料の結合様式に従って決めればよい。また反応は通常の酵素反応に準じて条件を決めればよいのである。酵素反応の条件とは、水溶液中で酵素がよく作用する温度(通常は30℃とpH(通常は中性付近))を選び、反応に酸素が必要であれば振とうし、そうでなければ静置して行うというものである。試料は板状やフィルム状でもよいが、粉碎したり乳化剤などによってエマルジョンとして用いた方が応性は上がる。試験期間は数時間~数日である。ただこの場合も微生物試験の特殊試験と同様で、合成された高分子すべてに対応できず、その適用範囲は現在取得可能な酵素の種類に限られる。

この試験結果に対する評価基準は、分解によって生じた低分子化合物が存在するかどうかであり、もともと構成成分がわかっているのでその成分に適した分析を行えば分解性が判断できる。例えば、デンプンはアミラーゼで分解されてグルコースから成るオリゴ糖を生じるのでこのオリゴ糖を定量すればよい。また分解のパターンおよび経時変化は、ゲルろ過法で簡便に測定することができる。その他、土壌や微生物のところで用いられた方法も適用される。

最終評価については土壌のところで述べたのと同様である。

4. おわりに

生分解性プラスチックの生分解性についての試験法ならびに評価については、世界的にも統一見解が出されておらず、現在、種々の機関で討議が行われているところである。よって、ここで解説した内容については筆者の考えがかなり入っており、部分的に独断と偏見が過ぎたところがあるかもしれない。この点に関してはご容赦願いたい。ただ、大筋においてはここで述べた内容に間違いはないと確信する。生分解性プラスチックの開発が活発に行われ各種製品ができあがった際に、最終判断を下す試験評価法というのは慎重に討議されて決定されなければならない。自然環境の保護を目的とする限りはある程度厳しい試験評価法が必要であろう。ただ、その製品の使用目的により、分解度合によるレベル分けをして評価するのがよいと思われる。

現在、使い捨て時代という状態が続いている。確かに、衛生、利便性、美観などの点を考慮すればプラスチックはすばらしい物質である。環境保護ということを考えるにあたって、消費者も努力する必要があるし、さらに企業に対する責任および期待は大きいのではないかと思う。これからの生分解性プラスチックの開発に対し、企業の誠意努力に期待したい。

文 献

- 1) A. E. Brown, *Mod. Plast.*, **23**, 189 (1946)
 - 2) S. Berk, H. Ebert, and L. Teitell, *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 1115 (1957)
 - 3) E. L. Fincher and W. J. Payne, *Appl. Microbiol.*, **10**, 542 (1962)
 - 4) R. T. Darby and A. M. Kaplan, *Appl. Microbiol.*, **16**, 900 (1968)
 - 5) F. Rodriguez, *Chem. Tech.*, **1**, 409 (1971)
 - 6) J. E. Potts, R. A. Clendinning, W. B. Ackart, and W. D. Niegisch, *Polymer Preprint*, **13**, 629 (1972)
 - 7) 酒井清文, 科学と工業, **62**, 39 (1988)
 - 8) JIS Z 2911 (1981)
 - 9) ASTM G21-70 (1985)
 - 10) MIL-STD-810B METHOD 508 (1967)
 - 11) MIL-STD-810D METHOD 508 (1967)
 - 12) 化学物質の審査及び製造法等の規則に関する法規集, 通商産業調査会
 - 13) 化学物質の審査及び製造法等の規則に関する法律
 - 14) 山口辰良, 「一般微生物学」, 技報堂 (1974)
- (平成3年7月1日受理)

繊維学会 会員募集について

当学会では、正会員、学生会員、また維持、賛助会員に新しく加入される個人、法人の皆様の少しでも多くなることを強く希望致しております。

会員の皆様の近くにおられる方々に、繊維学会に入会するようご勧誘いただければ幸甚です。

入会申込用紙、定款等は、当学会事務局に用意しておりますのでご請求下さい。なお繊維学会が開催する行事の受付で、新入会員の入会受付も致しますのでご利用下さい。入会手続きをしていただきました方々の同参加費は会員料金となります。