超臨界二酸化炭素処理がポリエステルの酵素分解性に及ぼす影響

堤 主計* 池田 亮介* 早瀬 伸樹* 中川 克彦*

The Effect of Supercritical Carbon Dioxide Treatment on Enzymatic Degradability of Polyester

Chikara TSUTSUMI*, Ryousuke IKEDA*, Nobuki HAYASE* and Katsuhiko NAKAGAWA*

We have been investigating about the influence affect degradability on enzymatic degradation of polyester treated with supercritical carbon dioxide (scCO₂). The present work assessed the degradability of poly(butylene succinate adipate) (PBSA), as well as its thermal property before and after processing. PBSA which was easy to be degraded with enzymes was used as polymer. Treatment of PBSA films of thickness 100 µm with scCO₂ was performed inside a stainless steel pressure-resistant container (0.5 L) with stirring (100 rpm) in a high-pressure reaction apparatus at 40°C and 14 MPa for 3 h. Lipase CA was used for enzymatic degradation of PBSA. Lipase CA was dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 7) at 5 U/mg polymer of concentration, and the solution was exchanged every 40 hours to maintain enzyme activity. The enzymatic degradation was carried out in a phosphate buffer at 37°C with shaking. Untreated PBSA was easily degraded with lipase CA, and 45% of the original mass remained after 120 h. PBSA processed with scCO₂ was degraded more rapidly, the remaining weight indicated 38% after same time. T_g of PBSA was increased from -42.6°C to -39.9°C after treatment, resulting that scCO₂ processing appears to uniformly contract polymer chains in the amorphous region. It is considered that the closer packing of polymer chains affected degradability of PBSA.

1. 緒言

現在、プラスチックはあらゆるものに利用されており、私たちの生活の一部となっている。プラスチックが普及した理由としては、軽量であり、柔軟性があり、加工しやすく、耐薬品性があり、着色が容易である等の様々な利点が挙げられる。しかしながら、プラスチックには自然の力では分解されないという欠点があり、捨てられるといつまでも残ってしまい、環境や他の生物に多大な影響を及ぼす。また、プラスチックの中には、燃やすと塩化水素ガスや、ダイオキシン等の有害物質が発生するものがあり、廃棄や処理における環境問題として取り上げられている[1]。

このような背景から、自然への影響や環境への配慮を念頭においた生分解性プラスチックの研究が進められるようになった。生分解性プラスチックは通常のプラスチックと同様に使用することができ、使用後は微生物によって水と二酸化炭素に分解される。そのため、埋め立てられたりしてもゴミとして残らず環境に影響を及ぼさない。現在、生分解性プラスチックはゴミ袋や農業用マルチシート等、主にフィルムと

して普及が始まっている。今後は、機能性部品や医療用品へ の応用も期待されている。

生分解性プラスチックの 1 つである脂肪族ポリエステルの分解にはエステラーゼという酵素が用いられている。エステラーゼは大きく分けると、短鎖の炭素結合を持つ低級脂肪酸エステルに作用する「特異的エステラーゼ」と、長鎖の炭素結合を持つ高級脂肪酸エステルに作用する「非特異的エステラーゼ」の2種類に分類される。非特異的エステラーゼの代表例には、本研究室でこれまで使用してきたリパーゼが挙げられる。リパーゼの分解能は1977年、産業技術総合研究所の常盤豊氏によって明らかにされ^[2]、エステル結合を含む生分解性プラスチックの開発が進む中、リパーゼの生態学的役割が注目されるようになってきている^[3]。現在、生分解性ポリエステルを分解するリパーゼの研究は多く報告されて102 [4] [8]

本研究室では、環境適応型分解性ポリエステルの酵素分解における諸因子について研究を行っており、これまでに温度、酵素濃度、基質特異性、金属イオン、組成、pH、結晶性について研究してきた[9-[13]。

平成 30 年 10 月 1 日受付 (Received October 1, 2018)

^{*}新居浜工業高等専門学校生物応用化学科(Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology, Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan)

本研究は、酵素分解の過程において、ポリエステルの重量変化に伴って高分子構造がどのように変化しているか明らかにするために、分解後の融点 (T_m) やガラス転移点 (T_g) などの熱的特性を求め、構造変化を評価した。実験には、酵素分解性の高いポリブチレンサクシネートアジペート (PBSA) をポリエステルとして用い、リパーゼ CA による分解試験を行い、分解過程の構造変化を評価した。さらに、超臨界二酸化炭素 $(scCO_2)$ で処理した PBSA の分解性と熱的特性についても評価した。参考として、酵素分解性の低いポリブチレンサクシネート (PBS) についても同様の実験を行った。

2. 実験

2-1. 試料

分解試験に使用した 2 種類の環境適応型分解性ポリエステルを以下に示す。表示は、ポリエステル名略称表記 (構成単位の組成比)、製造社名、商品名の順とする。構造式も併記している。

・PBS (B/S比: 50/50)、昭和高分子(株)、ビオノーレ1001

・PBSA (B/S/A 比:50/40/10)、同上、ビオノーレ3001

ポリマーをソルベントキャスト法でフィルム化する際に使用した溶媒は、モレキュラーシーブス (3A) (和光純薬工業(株)製) で脱水したクロロホルム ((株)トクヤマ製) を用いた。モレキュラーシーブスは脱水能力を上げるために電子レンジやヒートガンにより前処理を行い、脱水・活性化させたものを用いた。

分解試験に用いた酵素として、Lipase CA (Candida antractica 由来、SIGMA 製、10 U/mg) を用いた。リン酸二水素一ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウムは和光純薬工業(株)製のものを使用した。

2-2. 高分子の諸物性の測定

ポリエステルの熱的特性 (融点 (T_m) 、ガラス転移点 (T_g) 、融解熱 (ΔH_m))は、(株)リガク製の示差走査熱量計 (Thermo Plus 2 / DSC8230) により求めた。測定は昇温速度 10 $^{\circ}$ C/min、窒素雰囲気下で行い、 T_m と ΔH_m は 1st ヒーティング、 T_g は 2nd ヒーティングにおける DSC 曲線から決定した。

分解試験に用いたポリエステルの数平均分子量 (M_n) および分子量分布 (M_w/M_n) は、(株)日立製作所製 GPC (D-2520)

カラム温度 40℃、示差屈折計 (RI) 検出器) により、溶離液としてクロロホルム (HPLC 用) を用いて流速 1 ml/min で測定し、標準ポリスチレンによる検量線をもとに決定した。分離用カラムは K-804L (Shodex) を、ガードカラムとして K-G (Shodex) を用いた。

ポリエステルを構成する各構成単位の組成比は 400 MHz (BRUKER AVANCEIII HD400) の核磁気共鳴装置を用い、 ¹H NMR 測定により決定した。

2-3. リン酸緩衝溶液の調整

リン酸二水素一ナトリウム($NaH_2PO_4=119.98$)2.995 g を 500 ml のイオン交換水に溶解させ、同様に、リン酸一水素二ナトリウム($Na_2HPO_4=141.96$)3.549 g を 500 ml のイオン交換水に溶解させ、両水溶液を混合さ、pH メーターで確認しながら 50 mM リン酸緩衝溶液(pH 7.0)を調製した。

2-4. 酵素分解試験

リパーゼ CAをポリマー1 mg 当たり5 Uの濃度になるようにリン酸緩衝溶液(pH 7.0)にサンプル管瓶(50 ml)中で溶解させ、37°C に達するまで恒温水槽中に約15分間放置した。ソルベントキャスト法により作製したフィルムを精秤後、網目約1×1 mm のポリエチレンメッシュシートの袋に封入し、酵素分解試験用サンプルとした。分解試験は振とう速度100 rpm/min でサンプル管瓶を往復振とうさせながら37°Cで行った。リパーゼの失活を防ぐために酵素溶液を2日おきに交換した。ポリマーサンプルは20時間ごとに取り出し、水洗後、真空乾燥を3時間行った。酵素分解試験後のサンプルの重量を精秤し、残存重量率により分解性を評価するとともにDSCにより熱的特性も評価した。

3. 結果および考察

3-1. PBSA の酵素分解における融点の変化

本分解試験に使用した環境適応型分解性ポリエステルの物性を Table 1 に示す。酵素はエチレン、ブチレン系ポリエステルの分解用酵素としてリパーゼ CA を用いた。

Table 1. Properties of biodegradable polyesters

Polymer a)	$M_n^{b)}$	$M_{\rm w}/M_{\rm n}^{\rm b)}$	$T_{\rm m}^{\rm c)}$	$\Delta H_{\mathrm{m}}^{\mathrm{c})}$	Tg c)
	$\times 10^4$		°C	J/g	°C
PBS (50/50)	13.22	1.68	113.2	75.3	-33.1
PBSA (50/40/10)	6.42	1.72	93.6	53.2	-42.6

a) Composition of polyester was determined by ¹H NMR. b) Molecular weight was determined by GPC. c) Thermal property was determined by DSC.

Fig. 1 は PBSA のリパーゼ CA による酵素分解と分解後の $T_{\rm m}$ の変化を示す。縦軸は残存重量率、その第2軸は $T_{\rm m}$ 、横 軸は分解時間を表しており、実線が残存重量率の変化、破線 が $T_{\rm m}$ の変化を示す。PBSA は生分解性ポリエステルの中で $T_{\rm g}$ や $T_{\rm m}$ が低いことから分解温度や ${\rm scCO_2}$ 処理時の温度の影 響を受けやすい。そのため Tg の指標である非晶領域は柔軟 性が高くなり、scCO₂未処理の PBSA は 120 時間で 45%にま で分解された。scCO2処理したサンプルも同様に分解されや すく、同時間で38%の残存重量率を示し、処理サンプルの方 が、分解されやすくなることがわかった。scCO2処理するこ とで Tmは約 1℃ 上昇し、後述しているように結晶性の大き さを示す $\Delta H_{\rm m}$ や非晶領域が流動化する温度である $T_{\rm g}$ も増加 しており、結晶領域や非晶領域における分子鎖間の相互作用 が強くなっている。酵素はもともと分子鎖間の密な状態の結 晶領域には付着しにくいため、非晶領域から酵素による分解 が起こりやすく、処理後の非晶領域における分子鎖間の接近 が酵素分解に最適な空間を構築したことが、分解を早くした 要因であると考えられる。

一方、 T_m については両サンプルでその変化は大きく異なっており、未処理のサンプルは分解の進行にともなって T_m も低下したが、処理したサンプルは 120 時間後でも大きな変化はみられなかった。これらの結果より、未処理の PBSA は結晶領域における分子鎖間の相互作用が処理したものよりも弱いため、結晶領域においても分解が進行しやすくなったと考えられる。処理した PBSA は分子鎖間が密な状態になったため、結晶領域における分子鎖は分解されにくくなり、分解が進んでいるにもかかわらず、 T_m にはあまり変化がみられなかったと推察できる。

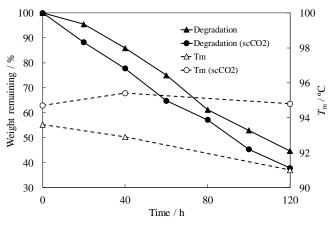


Fig. 1 Change in T_m for enzymatic degradation of PBSA treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

酵素分解性の低いPBSのリパーゼ CA による酵素分解と分解後の T_m の変化を Fig. 2 に示す。PBS はリパーゼ CA によりほとんど分解されていないが、未処理の PBS はもともと結晶性が高いため、 $scCO_2$ 処理をしても T_m に大きな変化はみられなかった。分解性については、未処理のサンプルの方

が分解されやすかったが、 T_m については分解途中で上がる傾向であったが、大きな変化量はみられなかった。PBS は結晶性が高いため $scCO_2$ 処理においても T_m はほとんど変化していないが、分解では $20\sim120$ 時間の間で変化していないことから全領域で分子鎖の相互作用がより強くなったためではないかと考えられる。

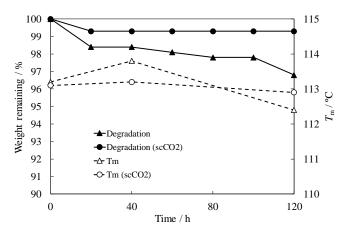


Fig. 2 Change in $T_{\rm m}$ for enzymatic degradation of PBS treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

3-2. PBSA の酵素分解における融解熱の変化

次に、PBSA の酵素分解における $\Delta H_{\rm m}$ の変化について検討した。Fig. 3 は PBSA のリパーゼ CA による酵素分解と分解後の $\Delta H_{\rm m}$ の変化を示す。縦軸は残存重量率、その第 2 軸は $\Delta H_{\rm m}$ 、横軸は分解時間を表しており、実線が残存重量率の変化、破線が $\Delta H_{\rm m}$ の変化を示す。両サンプルとも残存重量率の変化に大きな差はみられないが、前述のように処理したサンプルの方が分解が少し早かった。 ${\rm scCO}_2$ 処理により $\Delta H_{\rm m}$ は 53.2 J/g から 58.4 J/g にまで増加し、結晶領域が拡張したことがわかった。ただ、両サンプルとも分解初期に非晶領域の分解と思われる $\Delta H_{\rm m}$ の増加が確認されており、それ以降は $\Delta H_{\rm m}$ の変化はほとんどみられなかった。これは、非晶領域が優先的に分解されていくのと同時に結晶領域の周辺も徐々に分解され、その結果、 $\Delta H_{\rm m}$ は分解途中から変化量が小さくなっていると考えられる。

Fig. 4 に PBS のリパーゼ CA による酵素分解と分解後の $\Delta H_{\rm m}$ の変化を示す。前述したように PBS はリパーゼ CA によりほとんど分解されなかったが、未処理の PBS は緩やかに分解された。ただ、酵素分解としては分解速度が遅いため、この重量減少は加水分解による影響が大きいと思われる。 $\Delta H_{\rm m}$ については、処理、未処理にかかわらず 120 時間までは増加傾向であった。これは結晶性が高いために分解が遅く、非晶領域から分解されたことを示している。特に、未処理の PBS は 88.7 J/g まで上昇しており、 ${\rm scCO}_2$ 処理したものよりも非晶領域における空間が疎の状態であると思われるため、加水分解などの分解が非晶領域で優先的に進行したことが考えられる。

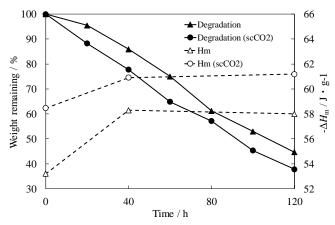


Fig. 3 Change in $\Delta H_{\rm m}$ for enzymatic degradation of PBSA treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

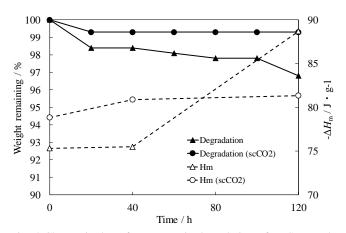


Fig. 4 Change in $\Delta H_{\rm m}$ for enzymatic degradation of PBS treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

3-3. PBSA の酵素分解におけるガラス転移点の変化

PBSA のリパーゼ CA による酵素分解と分解後の T_g の変化 を Fig. 5 に示す。PBSA はポリエステルの中でも酵素分解さ れやすく、分解過程における Tg は連続的に増加していた。 Tg の増加は非晶領域における分子鎖の相互作用が強い部分 が残っていることを示しており、非晶領域でも分子鎖間が広 い部分から分解が進行していると思われる。また、PBSAは PBS よりも結晶性がそれほど高くないため、結晶領域の分解 も進んでいることが予想される。これらのことは ΔHm が分 解初期で増加していたことからもわかるように両領域で分 解が進行していると判断できる。PBSAは scCO2 処理により Tgが 2.7℃ 増加しており、非晶領域において分子鎖間が接近 したのではないかと考えられる。処理した PBSA の T_g が 120 時間後に低下した理由として、scCO2処理により分子鎖間が 密になった構造がリパーゼ CA により分解されやすくなり、 結果として非晶領域における分子鎖間の間隔が広がったこ とが原因であると思われる。結晶領域においても、 $T_{\rm m}$ や $\Delta H_{\rm m}$ からそれほど分子鎖の相互作用が強いラメラ構造を形成し ているとは思われないことから、scCO2処理により非晶領域 における分子鎖の間隔がかなり密になったとは考えられに くい。よって、 $scCO_2$ 処理した PBSA の T_g は分解により低下したものと考えられる。

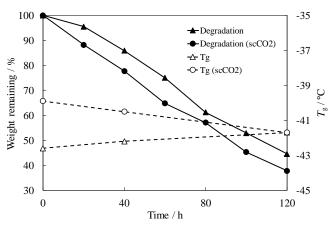


Fig. 5 Change in T_g for enzymatic degradation of PBSA treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

Fig. 6 は PBS のリパーゼ CA による酵素分解と分解後の T_g の変化を示す。未処理の PBS は緩やかに分解されており、 T_g の変化は分解初期では一時増加したが、途中から減少傾向であり、非晶領域の分解において相互作用の弱い部分から分解がおこり、ある程度の空間ができた後に非晶領域全体で分解が進行したと考えられる。 $scCO_2$ 処理により T_g は $4.6^{\circ}C$ も上昇しており、非晶領域における分子鎖間の間隔が狭くなり、その結果、分解が遅くなったと考えられる。このような構造のため、非晶領域の分子鎖間の疎な構造部分が分解されると、より空間が広がることが予想されるため分解にともない T_g は低下したものと思われる。

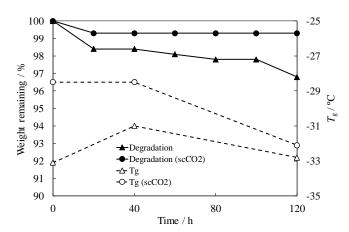


Fig. 6 Change in T_g for enzymatic degradation of PBS treated with or without scCO₂ (40°C, 14 MPa, 3 h) with lipase CA.

4. 結 論

本研究では、生分解性ポリエステルの酵素分解過程における構造変化を明らかにするために、DSC 測定により分解後の T_m や T_g などの熱的特性を求め、構造状態を評価した。分

解用ポリマーとして酵素分解性の高い PBSA を用い、リパーゼ CA による分解試験を行い、分解過程の構造変化を評価した。 さらに、 $scCO_2$ で処理した場合の PBSA の分解性と熱的特性についても評価し、未処理との違いを検討した。

分解試験の結果、 $scCO_2$ 未処理の PBSA は 120 時間で 45% にまで分解され、 $scCO_2$ 処理したサンプルは 38%の残存重量率を示し、処理した方が、分解されやすくなることがわかった。これら分解過程におけるサンプルを DSC 測定したところ、 T_m は両サンプルでその変化は大きく異なっており、未処理のサンプルは分解にともない T_m も低下したが、処理したサンプルは 120 時間後でも大きな変化はみられなかった。

 $\Delta H_{\rm m}$ の解析においては、 ${\rm scCO_2}$ 処理により PBSA の $\Delta H_{\rm m}$ は 53.2 J/g から 58.4 J/g にまで増加し、結晶領域が拡張したことがわかった。分解中の $\Delta H_{\rm m}$ の変化は、両サンプルとも分解初期に増加傾向であり、非晶領域が優先的に分解されていることがわかった。それ以降、 $\Delta H_{\rm m}$ はほとんど不変となっており、非晶領域が優先的に分解されていくのと同時に結晶領域の周辺も徐々に分解され、その結果、 $\Delta H_{\rm m}$ は分解途中から変化量が小さくなったと考えられる。

 T_g の解析では、PBSAの分解にともない T_g は連続的に増加していた。 T_g の増加は非晶領域において分子鎖の相互作用が強い部分が残っていることを示しており、非晶領域でも分子鎖間が広い部分から分解が進行していると考えられる。 $scCO_2$ 処理により T_g は 2.7° C 増加し、非晶領域において分子鎖間が接近したと考えられる。 処理した PBSA の T_g が 120 時間後に低下したが、これは $scCO_2$ 処理によりリパーゼ CA にとって適度に密になった構造が分解を促進し、分解後に非晶領域における分子鎖間の間隔が広がったと考えられる。

参考文献

- [1] 生分解性プラスチックのおはなし, 土肥 義治, 関日本 規格協会 (2001).
- [2] Y. Tokiwa and T.Suzuki, Agric. Biol. Chem., 41, 265-274 (1977).
- [3] 生分解性プラスチックハンドブック, 編集代表 土肥 義治, ㈱エヌ・ティー・エス (1995).
- [4] H. Kitamoto, S. Yoshida, M. Koitabashi, K. Yamamoto-Tamura, H. Ueda, T. Yarimizu, Y. Sameshima-Yamashita, J. Biosci. Bioeng., 125, 199-204 (2018).
- [5] X. Hu, Z. Gao, Z. Wang, T. Su, L. Yang, P. Li, Polym. Degrad. Stab., 134, 211-219 (2016).
- [6] V. Tserki, P. Matzinos, E. Pavlidou, D. Vachliotis, C. Panayiotou, Polym. Degrad. Stab., 91, 367-376 (2006).
- [7] C. Tsutsumi, N. Hayase, K. Nakagawa, S. Tanaka, Y. Miyahara, Macromol. Symp., 197, 431-442 (2003).
- [8] H. Uchida, T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, N.

- Nomura, Y. Tokiwa, T. Nakahara, FEMS Microbiol. Lett., 189, 25-29 (2000).
- [9] 堤主計、藤井美咲、小松万記、早瀬伸樹、中川克彦、新居浜工業高等専門学校紀要 第45巻 35-38 (2009).
- [10] 堤主計、小松万記、藤井美咲、早瀬伸樹、中川克彦、新居浜工業高等専門学校紀要 第 45 巻 39-42 (2009).
- [11] 堤主計、武市知大、藤井美咲、早瀬伸樹、中川克彦、新居浜工業高等専門学校紀要 第 46 巻 43-46 (2010).
- [12] 堤主計、田所海彦、久保田信、早瀬伸樹、中川克彦、新居浜工業高等専門学校紀要 第49巻 29-34 (2013).
- [13] 堤主計、三好桃子、川崎叡、辻久巳、塩見正樹、早瀬伸樹、中川克彦、新居浜工業高等専門学校紀要 第52巻 7-14 (2015).