

カゼインプラスチックの分解について

加藤 泉水 亀井 彩乃 六車 紗菜 弓削 理子

1. 要旨

牛乳由来のタンパク質から作られるカゼインプラスチックは生分解性をもつことから、プラスチックごみの削減につながると期待されている。しかし現在は、ハンコやボタンなど使用用途が少なく、一般に普及しているとは言い難い。そこで、私たちはカゼインプラスチックの生分解性以外の分解方法について調べることで、新たな場面で使えるようにしたいと考えた。

本研究では、カゼインプラスチックのタンパク質分解酵素や酸性、塩基性の溶液に対する耐性に着目した。まず初めに、タンパク質分解酵素に対する耐性を調べるために、システインプロテアーゼを多く含むパイナップルを使用して実験を行った。カゼインプラスチックをパイナップル溶液に漬けるもの、水に漬けるもの、何もしないものに分け、溶液に漬ける前と後での質量差を測定した。その結果、パイナップル溶液に漬けたカゼインプラスチックの質量が最も大きく減少した。このことから、カゼインプラスチックは酵素によって分解されたと考えられ、酵素を含む食品の保存などには向かないことが分かった。次に、酸性、塩基性の溶液に対する耐性を調べるために、pH1・4・7・10・13のそれぞれの溶液にプラスチックを漬け、質量の変化と曲げ応力を調べた。その結果、pH13の溶液において質量が最も大きく減少し、曲げ応力が最大となった。このことから、カゼインプラスチックは特に強塩基での分解速度が速いと考えられる。曲げ応力については、溶液に漬けた後に存在していた流動体となったカゼインが応力の増大に関係していると考えた。また、この流動体をプラスチックの作成に応用できるのではないかと考えた。

カゼインプラスチックを環境問題の解決に役立てるためには、その使用用途を広げる必要がある。今後は、液性に対する耐性をより詳しく探ることや、流動体となったカゼインを活用した製品の検討が課題として挙げられる。

2. 研究目的

カゼインプラスチックは牛乳に含まれるカゼインと呼ばれるタンパク質を主成分としたプラスチックである。土壌で自然に分解される生分解性プラスチックの一種であるため、プラスチックごみによる海洋汚染など問題の解決が期待されている。しかし、カゼインプラスチックが使用されている用途はハンコやボタンなど限定的であり、普及率がとても低い。そこで、カゼインプラスチックの分解に関する特性をより詳しく調べるとともに、効率的な分解方法を見つけることで、新たな場面で利用できるようになるのではと考えた。

カゼインはその構造内にシステインを含み、システインプロテアーゼと呼ばれる酵素はシステインを含むタンパク質を分解することが知られている。また、カゼインは酸加水分解やアルカリ加水分解がされることが分かっている。(※1) そのため、私たちは、カゼインプラスチックのタンパク質分解酵素や酸性、塩基性の溶液に対する耐性に着目した。システインを含むカゼインプラスチックはシステインプロテアーゼという酵素によって分解されるのではないかと仮説を立てた。カゼインでできたカゼインプラスチックは酸性や塩基性の溶液によって加水分解されるのではないかと仮説を立て実験を行った。

溶液に対する耐性を調べ、カゼインプラスチックで新たな製品を作る際の判断材料とすることを最終目標とする。

〈カゼインについて〉

牛乳の中にはカゼインといわれるタンパク質が存在していて、マイナスの電荷をもつ酢酸が酢酸イオンと水素イオンに電離しカゼインの持つ負の電荷が奪われ沈殿する。乾燥させるとカゼイン間の水が抜け、脱水縮合が起こる。牛乳200mLから作られるカゼインプラスチックの量は脂肪分0.5%であり12gしか作れないことが分かっている。先行研究より、無脂肪牛乳で作製したカゼインプラスチックが成分無調整牛乳や濃牛乳で作製したカゼインプラスチックよりも強度があり、分解されやすいと分かっているため無脂肪牛乳を実験で使用することにした。(※2)

〈タンパク質分解酵素について〉

カゼインはシステインを含むタンパク質であり(※3)、そのシステインを分解するタンパク質分解酵素を含

む食品として果実があることが分かっている。その中でも、タンパク質分解酵素が多く含まれ簡単に手に入れることができるパイナップルを液体にしたものを本実験に用いた。(※4)

タンパク質分解酵素に分類されるシステインプロテアーゼは植物ではパパイン、フィシン、ブロメラインなどが代表的で、大量に得られるため、古くから構造と機能に関する研究は進んでいる。プロテアーゼは活性基の種類によってシステイン、アスパラギン酸、セリンおよび金属プロテアーゼの4種に分類される。また、システインプロテアーゼの最適 pH は3~8 である。

3.研究方法

タンパク質分解酵素への耐性についての実験(実験1)では、以下の手順で作製したカゼインプラスチックを使用する。

〈実験に使用したもの〉

- ・無脂肪牛乳 100mL
- ・酢酸 (3.0mol/L) 2.0mL
- ・カットパイン (写真 A)
- ・ガラス棒・ビーカー・ガスバーナー
- ・三脚・金網・蒸留水
- ・ガーゼ・製氷皿



カットパイン
(フィリピン産)

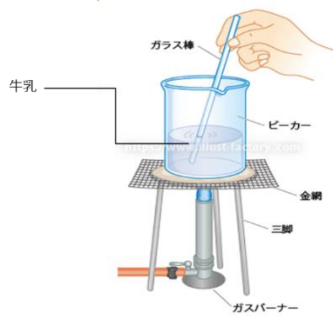


無脂肪牛乳
(トップバリュ)

(写真 A)

1. ビーカーに無脂肪牛乳を 100mL 入れ、沸騰するまでガラス棒でかき混ぜる。

(図 1/写真 B)



(図 1)



(写真 B)

2. 沸騰したら 3.0mol/L の酢酸を 2.0mL 入れて 10 回かき混ぜ、1 分 30 秒放置する。

3. ガーゼで液体をこし、出てきたカゼインを精製水で洗う。

4. 水気を取り、製氷皿にはめて成型する (写真 C)。

5. 冷蔵庫で 2 週間ほど保管する。(写真 D)

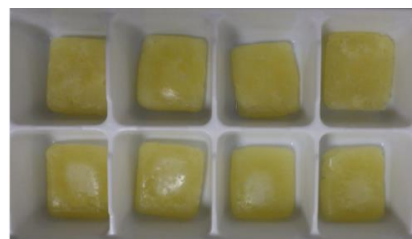
製作したプラスチックの質量が不揃いだったため、質量の小さい順に番号を付け、番号の小さい順にいくつかのグループに分けた。グループ内の個々のプラスチックの質量差を最高でも 0.2g とするため、やすりで削った。

これらのプラスチックを用いて、酵素実験と pH の実験を行った。

使用する製氷皿は縦約 4.3cm 横約 3.6cm、カゼインプラスチックは縦約 3.2cm 横約 2.3cm である。



(写真 C)



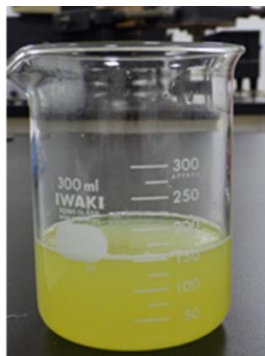
(写真 D)

3-1: タンパク質分解酵素への耐性についての実験 (実験I)

カゼインプラスチックをパイナップル溶液と水に漬け、タンパク質分解酵素によりカゼインがどれだけ分解されるかを調べることでカゼインプラスチックのタンパク質分解酵素への耐性を考察する。

《パイナップルを液体にする手順 (写真E)》

- ① 洗い消毒したトレイの上でパイナップルを、ビニル手袋をつけた手で握りつぶし絞った。
- ② 絞った後のパイナップルとパイナップル汁を全てガーゼで濾した。
- ③ ビーカーに溜まったパイナップル汁を新しいガーゼで再度濾した。

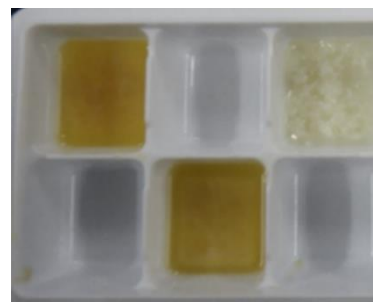


(写真E)

濾したパイナップル液を実験Iでパイナップル溶液として用いることとした。パイナップル溶液は 150mL ほど得られた。

《実験方法》

- ① 9つのサンプルに番号を付け、全てのサンプルの質量を量った。
- ② 質量の小さい順に3個ずつ3つのグループに分けた。
- ③ 製作時にプラスチックの成型に使用した製氷皿にカゼインプラスチックを一つずつ入れ、パイナップル溶液と水を 15mL 入れた。
- ④ 一週間後に取り出し、蒸留水でパイナップル溶液に漬けたカゼインプラスチックを洗い流した。
- ⑤ 乾燥させるため、冷蔵庫に入れた。
- ⑥ 冷蔵庫から取り出し、質量、厚さを調べた。



(写真F: 実験の様子)

—途中経過—

この実験方法に従い実験を進める中で、パイナップル溶液に漬けたものと水に漬けたものに細菌らしき微生物が発生したため実験を中断し、ピンセットを用いてプラスチックに発生したコロニーを取り除き、水で洗い流した。したがって、コロニーの発生を防止するため、カゼインプラスチックの製作時と実験時の方法を新たに考え直した。(写真G-1, 2, 3)



パイナップル溶液に漬けていた
プラスチック

G-1

水に漬けていた
プラスチック

G-2

(写真G)

G-3

【改善点】

改善点I カゼインプラスチックを成型する製氷皿をハイターで処理し、使用前の消毒を徹底した。

改善点II カゼインプラスチックを成型した後、乾熱滅菌機にかけシリカゲルの入った恒温槽（25℃）に入れ一週間ほど保管した。

改善点III カゼインプラスチックを各液体に漬ける際、製氷皿でなく密閉できる小分け袋を使用した。
追記：乾燥にかかる時間を早めるため、恒温槽に保管する前に電子レンジで様子を見ながら水分を飛ばした。

以降の実験では一貫してこの方法でカゼインプラスチックを作製し、各実験を行った。

《3-1の実験方法》

- ①, ②は同様に行った。
- ③ 密閉できる小分け袋にカゼインプラスチックを入れ、パイナップル溶液と水をそれぞれ 15mL ずつ注いだ。また、何もしないもの（ネガティブコントロール：以下 NC）を用意した。（写真 H）
- ④ 一週間後に取り出し、蒸留水でパイナップル溶液に漬けたカゼインプラスチックを洗い流した。
- ⑤ 乾燥させるため、恒温槽で一週間保管した。（写真 I）
- ⑥ 一週間後、取り出して質量、厚さを調べる。



パイナップル溶液に漬けたプラスチック

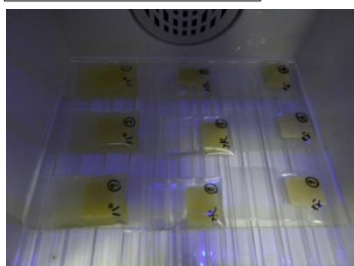


水に漬けたプラスチック



何もしないプラスチック

（写真 H）



（写真 I）

3-2：異なる pH の溶液への耐性についての実験

《実験方法》

6mol/L の塩酸と 6mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を希釈し pH1, pH4, pH7, pH10, pH13 の溶液を作った。（写真 J）

- ① 使用するカゼインプラスチックの質量を測定し、6つのグループに分けた。
- ② カゼインプラスチックを小分け袋に入れ、それぞれの水溶液を 15mL 注ぎ、空気を抜き密閉した。また、何もいれないものを用意した。（NC）
- ③ 恒温槽で 3 日間保管した。
- ④ 3 日後取り出し乾燥させるため、シャーレに移し恒温槽で保管した。
- ⑤ 乾燥したら質量、曲げ応力を調べた。



（写真 J）

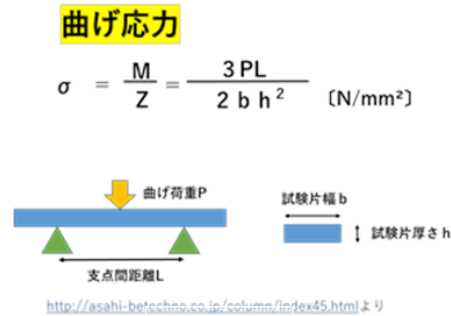
〈曲げ応力について〉

デジタルフォースゲージ（写真 K）を用いて三点曲げ試験を行った。この時、中心から支点までの距離が等しくなるように設置した。また、実験の様子を録画した映像をスローモーションで再生することで、試料に加わった最大荷重の値を測定した。

この時、試験片の厚さや支点間距離が強度 (N) に影響を与えてしまうことを考慮し、材料固有の値であり、厚さや長さに影響されない曲げ応力 (N/mm²) の値を、試験片の幅・厚さ・支点間距離・試料に加わった曲げ荷重を測ることを出す。(図2) 曲げ応力の値が大きいほど、割れにくいと考察できる。



(写真 K)



(図 2)

4.結果

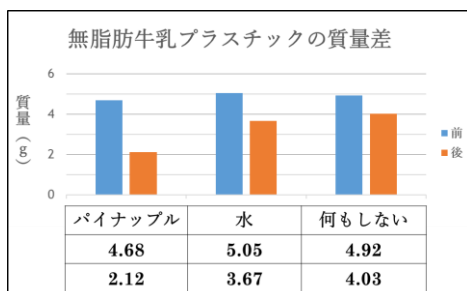
4-1: タンパク質分解酵素への耐性についての実験

水につけたプラスチックの一つがボロボロに崩れていて測定不可能であったため、他のプラスチック 3 つの平均値をとった。

3 つそれぞれのグループの水に漬けたもの、パイナップル溶液に漬けたもの、なにもしなかったものの質量と厚さの変化量の平均値を下のグラフで表した。

4-1-1: 質量の変化について

パイナップル溶液に漬けた時のみ質量が大きく減少した。(図 3) パイナップル溶液に漬けたプラスチックはドロドロに溶けていたため、カゼインプラスチックが溶け出した分、質量が減少したと考えられる。(写真 L-1, 2, 3)



(図 3)



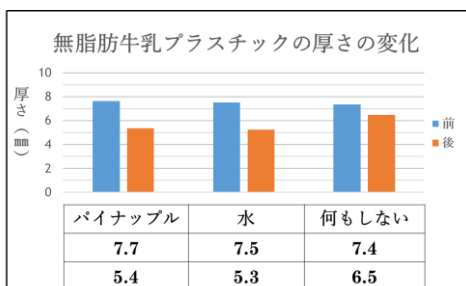
(L-1)

(L-2)

(L-3)

4-1-2: 厚さの変化について

パイナップル溶液に漬けたもの、水に漬けたもの、NC どれも厚さはさほど減少しなかった。(図 4)



(図 4)

4-2: 異なる pH の溶液への耐性についての実験

* グラフ内に何もなしの値と比較するための点線を引いている

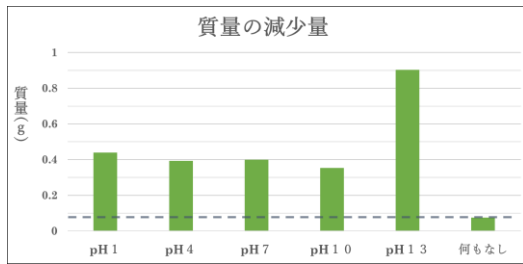
各 pH で 6 個のカゼインプラスチックを用い、合計 36 個のカゼインプラスチック試料の質量の減少量についてグラフにしたところ、pH1~10 において何もなしより質量が減少したものの、pH13 における質量は他と比べて、

大きく減少していた。(図5)

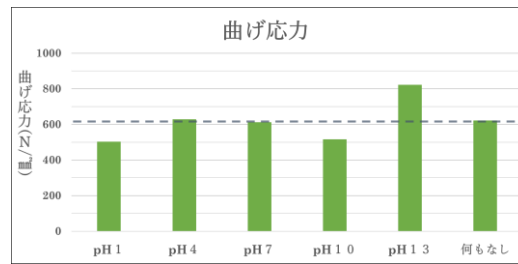
また質量を測ったカゼインプラスチックを用いて曲げ応力を出すと、pH1~10ではほとんど何もなしの値以下となったが、pH13では曲げ応力の値が何もなしより大きくなり、割れにくくなった。(図6)



(写真 N)



(図5)



(図6)

5.考察

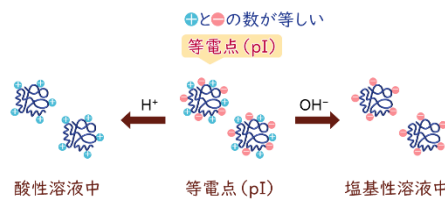
5-1: 実験Ⅰ タンパク質分解酵素への耐性についての実験

実験の結果より、パイナップル溶液に漬けた時のカゼインプラスチックの質量の減少量が一番大きいことから、カゼインプラスチックは水に比べてパイナップル溶液に漬けた時の方が分解されやすく、パイナップル溶液内のシステインプロテアーゼによって分解されたのではないかと考えられる。

また、カゼインプラスチックは水によって分解されにくいのではないかと考えられる。

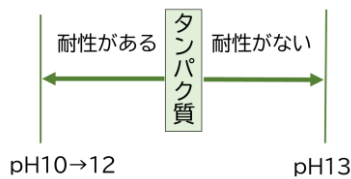
5-2: 実験Ⅱ異なる pH の溶液への耐性についての実験

強塩基溶液下では、一定期間内のカゼインプラスチックの質量の減少量が大きいことから、強塩基溶液下での分解速度が大きいといえる。強塩基性において質量が大きく減少したのは、等電点に関係していると考えられる。カゼインは等電点の値が、pH4.6であり、酸性である。そのため、この等電点の値から大きく離れた強塩基性では電荷が大きくなる(=極性が大きくなる)ため、水への親和性が高くなり、多くのプラスチックが溶けたと考えられる。(図7)

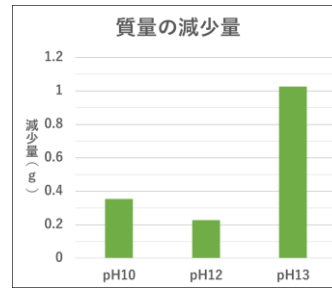


(図7*<https://idenwatch.com/seikagaku5-4/>より)

この質量の減少量についての結果からカゼインの耐性における変化点が、pH10とpH13の間にあるのではないかと考察した。(図8)そこで、より細かな変化点を見つけるためにpH12において質量の減少量を測定した。pH12ではpH13とは異なり、あまり質量が減少しなかった。(図9)



(図 8)



(図 9)

この結果から、カゼインの耐性における変化点が pH12 と pH13 の間であると考えられる。また、強度についても強塩基性においてのみ、何もなかったプラスチックより曲げ応力の値が大きくなり、割れにくいという結果となった。

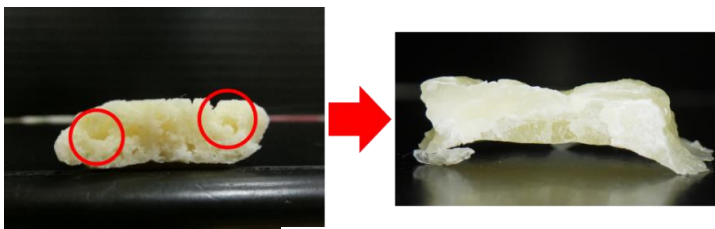
なぜ強塩基性における曲げ応力の値が大きくなったのかを調べるため、実験後のプラスチックの様子を pH ごとに比較した。すると、強塩基性でのみカゼインプラスチックが流動体となって存在していた。(写真 O)



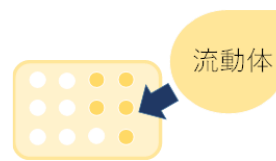
(写真 O)

また、カゼインプラスチックの断面を観察したところ、複数の穴が見られた。(写真 P)

このことから、強塩基性において強度が上がったのはカゼインプラスチックの構造内にある穴(写真内の赤丸)に流動体が入り込んで固まったからだと考えられる。(図 10)



(写真 P)



(図 10)

6. 結論

環境問題の解決が期待されているカゼインプラスチックを普及させるためにはその詳しい性質を知る必要がある。そのため本研究では、カゼインプラスチックのタンパク質分解酵素や pH の異なる溶液に対する耐性について、質量の減少量と曲げ応力に焦点を当て、検討した。

パイナップル溶液に漬けたものが水に漬けたものより質量が減少したことから、カゼインプラスチックはタンパク質分解酵素によって分解されると考えられる。また、強塩基に漬けたカゼインプラスチックは一定期間における質量の減少量が大きいことから、他と比べて強塩基での分解速度が速いことが分かった。

以上のことから、カゼインプラスチックは酵素を含む食品や強塩基の溶液の保存には向かないと考える。しかし、強塩基に漬けた際にできた流動体となったカゼインは、沈殿したカゼインよりも成型がしやすく、様々な製品の作成に繋げられるのではないかと考えている。

東京大学、岩田教授らは研究で、プラスチック内に酵素を内包し、水の環境下に置かれると、フィルム表面の傷から水が浸透し、徐々に分解されるプラスチックの作製に成功している。この研究では、ポリ乳酸ペレットと高耐熱性固定化酵素を高温での熱処理によって均一に混ぜる過程が必要となる。(※5) しかし、流動体となったカゼインを使用すれば、熱処理する必要がなくなり、熱耐性を持たない酵素でも、容易にこのようなプラスチックを作ることができるのではないかと考えている。

土壌で自然に分解される生分解性プラスチックを普及させることができれば、様々な環境問題の解決につながる。しかし現在、生分解性プラスチックの普及率は 0.02% ととても低い。そのため、今後より細かな液性に対する耐性を探るとともに、流動体となったカゼインを用いた製品の作成を検討することが望まれる。

7.参考文献

※1 加水分解について Waters Corporation (2023)

<https://www.waters.com/nextgen/jp/ja/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/introduction-to-hydrolysis.html>

※2 生分解性プラスチックの研究 Part2 群馬大学教育学部附属中学校2年大澤知恩 (2012)

https://www.tsukuba.ac.jp/community/students-kagakunome/shyo_list/2012/jrhigh/3.pdf

※3 システインを多く含む食品 WholeFoodCatalog

<https://wholefoodcatalog.com/nutrient/cystine/foods/high/2/>

※4 タンパク質分解酵素の研究～1 番肉を柔らかくできる酵素は何か?～ 千葉市立貝塚中学校第一学年
朝倉陽暉

<https://www.city.chiba.jp/kyoiku/gakkokyoiku/kyoikushido/documents/30tanpakusitu.pdf>

※5 分解開始スイッチ機能を有する酵素内包生分解性プラスチックの開発—使っているときは分解せず、環境に出ると分解する生分解性プラスチック— 東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部

https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20200730-1.html