

化学的に修飾したセルラーゼによる セルロース系繊維の酵素加工

Chemically Modified Cellulase Treatment on Cellulosic Fiber

菅井 實夫*

Jitsuo Sugai

(2004年7月28日 受理)

キーワード：綿，セルロース系繊維，ラミー，セルラーゼ，酵素，繊維加工

1. はじめに

微生物による綿繊維の重量損失と強度低下の関係については、早くから研究が進められていたが¹⁾、実際にセルロース系繊維の改質加工に酵素を用いたのは、十数年前から普及し始めたセルラーゼによる綿の減量加工からである。

セルロース系繊維の加工に使用される酵素は、セルロースの β -1, 4グルコシド結合を切断するセルラーゼと総称される酵素である。工業的に用いられる市販セルラーゼは作用機構の異なるさまざまな酵素成分を含んだ複合酵素であり、これら酵素の相乗作用によってセルロースを分解しているものと考えられている。

綿の代表的な製品であるジーンズデニム加工にセルラーゼを用いる有効性が見いだされ²⁻⁴⁾、現在ではバイオウォッシュ加工として、繊維産業における最も代表的な加工法の一つとなった。この加工法は、ストーンウォッシュ加工⁵⁾、*1)や、ケミカルウォッシュに置き換わった加工法である。

さらに、ジーンズ以外の綿ニットや布帛に対するセルラーゼによる分解作用と生地強度変化⁶⁾や、リネン、ラミー、ビスコースレーヨンなどに対するセルラーゼの作用についても研究が行われてきた⁷⁾。また、剛直なテンセルがフィブリル化しやすい性質⁸⁾を利用して、フィブリル化し易い部位を予め除去し、新たなフィブリル化を防ぐ、あるいは調整されたフィブリルを生じさせ、均一なピーチスキン調の表面に加工す

る技術が確立された。

しかしながら、いずれの場合もセルラーゼによる綿セルロース系繊維の加工では、予想以上に繊維の強度を損ねることが報告されている。強度が低下した生地には、柔軟剤処理することで若干強度が回復するとの報告もある^{9,10)}が、減量の程度は、綿織物、ニット等の製品では5%程度まで、タオルでは10%程度以下に抑えることが望ましいとされている¹¹⁾。

我々も、市販のセルラーゼを用い、綿ならびにレーヨンを処理し、繊維の強伸度保持ならびに水分保持挙動について報告した¹²⁾。その結果、繊維の減量率が大きくなるのに伴って、強伸度も大きく低下した。また、綿繊維では、Kassenbeck¹³⁾が報告した応力が集中する特定部位において、まずクラック等の損傷が生じることを確認した。

ビスコースレーヨンの場合も、応力が集中していると言われるスキン層の稜線部位にクラックが生じた。いずれの場合も、高井ら¹⁴⁾が報告したように特異的な部位にクラックが集中することを確認している。すなわち、酵素作用による繊維強度の低下には、繊維固有の形態学的構造の相違が大きくかかわっていると考えられた。

*1) 染色加工機に、染色したジーンズと軽石を入れ、生地表面のインジゴ染料を繊維断片とともに物理的にそぎ取り、生地に柔らかさと少し着古した自然な感じ色合いを与える加工法。染色機械内壁の損傷が大きく、大量の軽石が産業廃棄物として生成する。

2. 酵素処理による繊維強度低下の抑制法

酵素処理時の極度な繊維強度低下を抑制する一つの方法として、繊維が酵素作用をより均等に受けるようにすることで、減量率の大きさに比べ強伸度低下を抑制することができるのではないかと考えた。すなわち、キュブラのように酵素と接する繊維表面の均質性を高め、特異な部分のみが損傷を受けることを回避できるのでないかと考えた。これは、酵素をキュブラ繊維に作用させた場合、綿繊維やビスコースレーヨンの場合と比較し、明らかに繊維の減量率増加に伴う強伸度の低下が緩やかであったことから推論できる¹²⁾。

他方、われわれはまったく新規な方法として、固定化酵素の考え方を繊維加工に利用した。すなわち酵素の分子量を増大させ、繊維内部に侵入し難くして、酵素作用を繊維表面に局在化させようと試みた。種々の固定化法が、酵素の安定性を改良する目的で試みられている^{15,16)}。特に、共有結合による固定化法は、担体からの酵素離脱がなく、酵素分子の構造変性を抑制する効果が大い利点がある。固定化酵素の多くは担体が固体であるが、これを繊維(固体)に作用させる場合、酵素反応の効率が低くなることが予想された。

そこで我々は、水溶性高分子を用いて、共有結合法による修飾酵素を用いる方法を採用した。

3. 修飾酵素の調製と綿糸への作用

(1) 試料調製

(A) 綿糸ならびに試薬

綿糸は市販の精練40番双糸(40/2's)を洗浄せずに用いた。水溶性高分子は、市販の無水マレイン酸メチルビニルエーテル共重合体 GANTREZ AN119 (GAF Chemical Corporation 製, MW872000. 以下 MAMEC と略)、酵素液はナガセ生化学工業(株)提供のナガセセルライザー; *Trichoderma viride*系をそのまま使用した。

(B) 修飾酵素の調製

酵素の緩衝溶液に MAMEC 粉末を加え、MAMEC 1g, 市販酵素液 2.5g を 0.1M 酢酸緩衝液 15ml の比率で混合し、20℃, 48時間混合攪拌して、化学的に修飾された酵素(以下、修飾複合酵素と略)を調製した。この条件で調製した酵素の修飾率を、ゲルろ過法(使用カラム; 東ソー SG-2000)で求めた。280nm での溶出液の吸光度を測定し、高分子量化により排除限界近傍に生じた修飾酵素画分のピークの面積と未修飾画分のピーク面積から次式 [1] により修

飾率を計算した。また必要に応じ、分画分子量 300000 の限外ろ過膜(東ソー; UF-2CS-300PS)を用いて、未修飾のままの酵素を排除して精製した。

$$\text{修飾率} = \frac{\text{修飾酵素ピーク面積}}{\text{修飾酵素ピーク面積} + \text{未修飾酵素ピーク面積}} \times 100 (\%) \quad [1]$$

(C) 酵素活性測定方法

市販のアビセルとカルボキシルメチルセルロース(以下, CMC)をセルラーゼ活性測定用の基質とし、酵素作用により生じた還元糖の生成量を、ネルソン-ソモギ(Nelson-Somogyi)法¹⁷⁾により測定した。

(2) 綿糸の酵素処理ならびに物性変化測定方法

(A) 綿糸の酵素処理方法

40番手精練綿双糸を約1gの糸かせにとり、80℃の0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)で1時間膨潤処理を行った。所定濃度の酵素溶液(0.1M 酢酸緩衝液; pH5.0)を浴比1:40となるように入れた容量50mlの三角フラスコに膨潤試料を入れ、40℃の恒温槽中で165回/分で、所定時間処理した。処理後は、直ちに溶液から取り出し、イオン交換水中で10分間煮沸処理することにより酵素を失活させ、続いて水洗、乾燥(105℃)した。

減量率は酵素処理前後の絶乾重量より求めた。

(B) 引張破断強度の測定

引張破断強度は、インストロン試験機を用い、65%RH, 20℃で測定した。試料長200mm, 引張速度は200mm/minの条件で測定し、それぞれ25本の平均値から求めた。

(C) 繊維表面形態観察

酵素処理前後の試料表面の形態変化を走査型電子顕微鏡((株)日本電子製 JSM-T100)により観察した。

(3) 実験結果

(A) MAMEC による酵素タンパクの化学修飾

MAMEC による化学修飾反応を行う場合、MAMEC 微粉末は水により膨化し、粘度が上昇し、24時間後、黄褐色(市販酵素液の溶液色)の透明溶液化した。溶液化の間に図1に示したマレイル化反応が起こっていると考えられている^{18,19)}。すなわち、

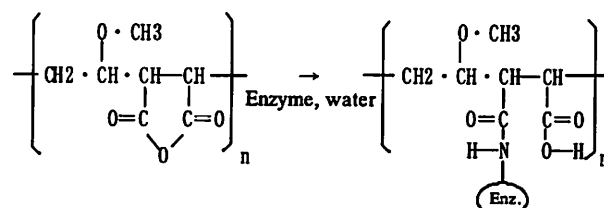


図1 マレイン酸メチルビニルエーテル共重合体による酵素タンパクの化学的修飾

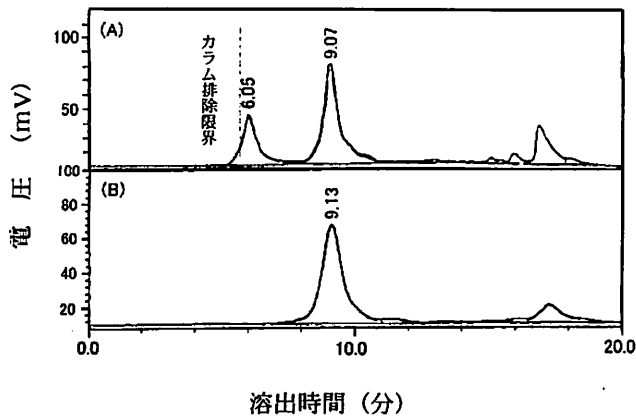


図2 修飾酵素のゲルろ過溶出パターン：(A) 未精製の修飾複合酵素，(B) 元の酵素

マレイン環の解裂部位で、酵素タンパクのアミノ基との間で共有結合が生じ、共有結合に関与しない末端はカルボキシル基となる。なお混入・攪拌10時間にpH2.95に達してからはpHの低下が生じておらず、このとき修飾反応はほぼ終了したものと考えられる。

(B) 修飾複合酵素の分子量

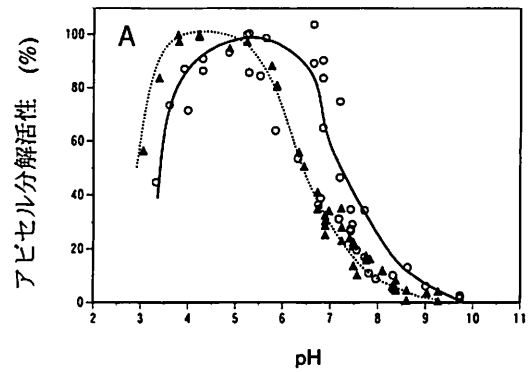
修飾複合酵素のゲルろ過チャートを図2に示した。図は修飾前後のチャートを示したが、まず、元の酵素では、9.13分の溶出ピークがセルラーゼであり、17分付近のピークは夾雑物である。これに対し、6.05分に溶出するピークは高分子量化したセルラーゼであると考えられ、ゲルろ過カラムの排除限界付近に排出されることから数10万以上の分子量になっているものと考えられた。

しかしながら、チャートには未修飾酵素のピークも観察され、修飾は部分的であることがわかる。調製時の混合比、温度を変え検討を加えた結果、MAMEC：セルラーゼ：0.1M-酢酸緩衝液=1:2.5:15、20℃で48時間調製時、60%強の修飾率の修飾複合酵素を調製できた。

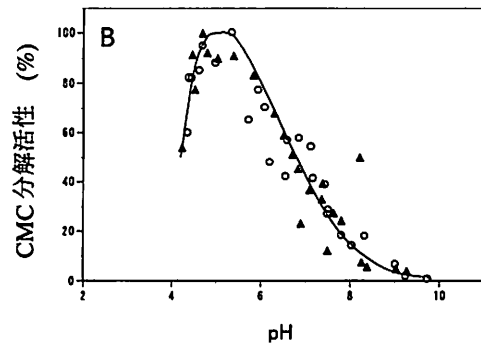
(C) 修飾複合酵素の酵素特性

(a) 最適 pH

修飾複合酵素の作用最適 pH を調べ、図3(A)には溶液 pH と相対アビセル分解活性との関係を、図3(B)には相対 CMC 分解活性との関係を示した。図から明らかのように、MAMEC による修飾複合酵素の作用最適 pH はアルカリ側にシフトし、修飾により中性セルラーゼに改変されたことになる。この原因は、マレイン環開裂と同時に酵素が結合することにより、酵素活性中心の pH 環境がカルボキシル基の存在により酸性サイドに偏っているためであると考えられる。すなわち、外部溶液 pH がアルカリ側に变化した場合にお



○ 修飾複合酵素 ▲ 元の酵素



○ 修飾複合酵素 ▲ 元の酵素

図3 アビセル分解活性ならびに CMC 分解活性に及ぼす pH の影響

(各緩衝液は、pH3.0-3.9(乳酸)、pH3.8-5.8(酢酸)、pH5.3-7(21/30M-リン酸)、pH7.2-8.3(1/15M-リン酸)、pH5.9-8.1(コリジン)、ならびにpH6.9-9.8(ホウ酸)を用いた。)

いても、活性中心の pH 環境は酸性に保たれ活性低下が抑制されると考えることができる^{20,21)}。

他方、CMC 分解活性については、修飾の有無に関わらずほぼ同様の挙動を示したことから、今回の化学修飾方法では酵素の CMC 分解活性は改変されないものと考えられた。

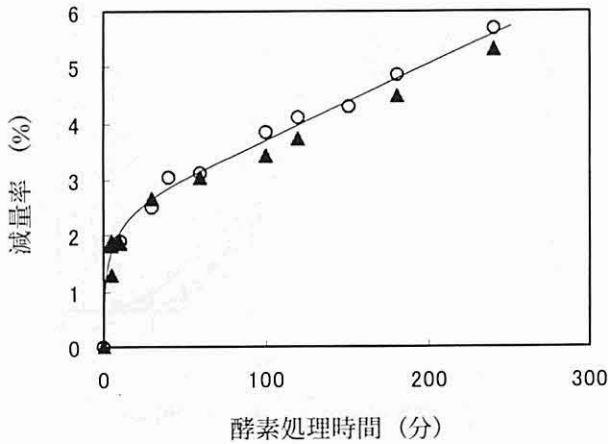
(b) 熱安定性

修飾複合酵素を30℃から70℃までの温度で30分静置した後、アビセル分解活性を測定した。未修飾酵素は50℃以上で急激に活性が低下し、60℃では20%まで低下した。修飾複合酵素は60℃では、ほぼ100%の活性を保持し、70℃では20%強に低下した。化学修飾により、酵素の熱安定性が向上することがわかった。

(D) 修飾複合酵素の綿糸への作用

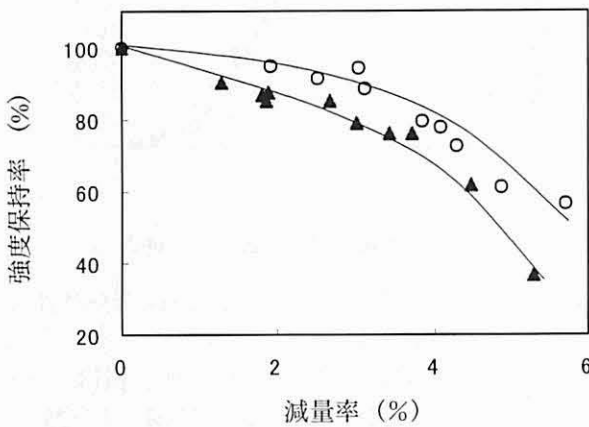
(a) 減量率と強度保持率

未修飾酵素溶液2g/lとアビセル分解活性が等しくなるよう修飾複合酵素液の濃度を調整し、40番手の



○ 修飾複合酵素 ▲ 元の酵素

図4 pH5.0, 40°Cで酵素処理した精練綿糸(40番手双糸)の減量挙動



○ 修飾複合酵素 ▲ 元の酵素

図5 図4で調製した精練綿糸の強度保持挙動

精練綿双糸を40°Cで240分まで振とう処理した場合の、減量挙動を図4に示す。アビセル分解活性を揃えたためほぼ同等の減量挙動を示している。

図5に減量率に対する強度保持挙動を示す。図から明らかに、修飾複合酵素処理糸の方が未修飾酵素処理糸に比べ強度を保持しており、その強度保持率の差は、減量率が高くなるに従い大きくなり、減量率4%以上では15%程度高くなっていることがわかる。

(b) 走査型電子顕微鏡による形態観察

修飾複合酵素ならびに未修飾酵素による分解作用を受けた綿糸の繊維表面形態をSEM写真により観察した結果を図6, 7に示した。両試料とも酵素のアビセル分解活性を等しく調整し、40°C, 8時間振とう処理により10%減量した精練綿糸である。図6に示した未酵素処理の場合、繊維表面部位のフィブリル-フィブリル間に大きなクラックが観察され、局所的な損傷を受けていることがわかった。他方、図7に示す修飾複合酵素処理の場合も、クラック等の形成部位は未修

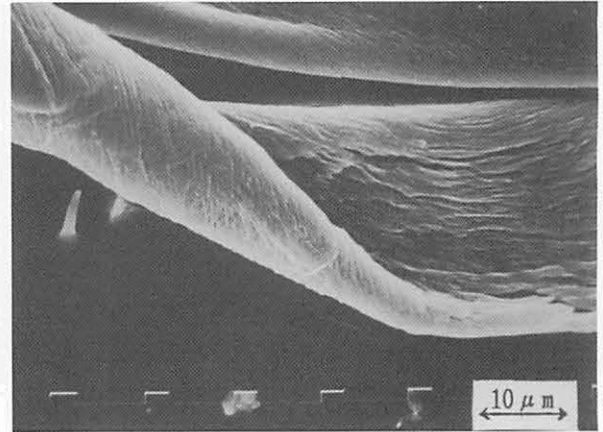


図6 修飾していない元の酵素で処理した精練綿糸の繊維表面SEM写真

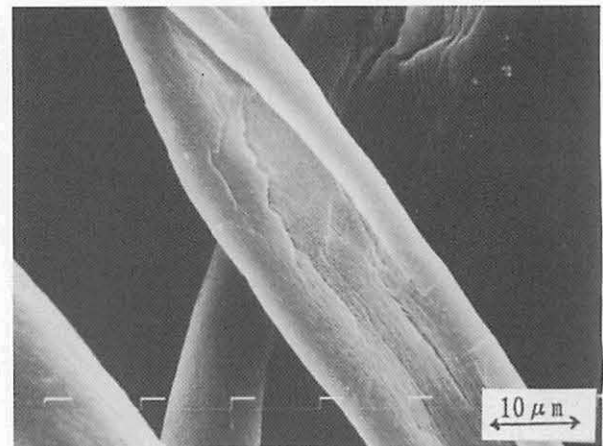


図7 未精製の修飾酵素で処理した精練綿糸の繊維表面SEM写真

飾酵素処理の場合と変わらないが、その損傷は明らかに軽減している。このことから、修飾複合酵素の場合、分解作用が繊維表面上の特定部位に偏在して生じるのではなく、ある程度、繊維表面の全体にわたりより均等に作用していることが伺えた。

(c) 修飾酵素画分の作用

ところで、修飾複合酵素による分解挙動は修飾酵素成分(画分)と未修飾酵素成分(画分)との協同作用によるものである。そこで、調製した修飾複合酵素中の未修飾セルラーゼを限外ろ過膜により除去し、修飾酵素画分のみを精製した。精製修飾酵素の濃度を未修飾酵素溶液2g/lとアビセル分解活性が等しくなるよう調整し、40番手の精練綿双糸を40°Cで24時間振とう処理した。修飾酵素の綿繊維に対する減量速度はかなり低く、24時間の処理で約6%の減量率を示した。これらのことから、修飾複合酵素処理による強度低下抑制効果は、(1)短時間処理においては、修飾酵素は綿繊維内部への浸透が妨げられるため、その加水分解作

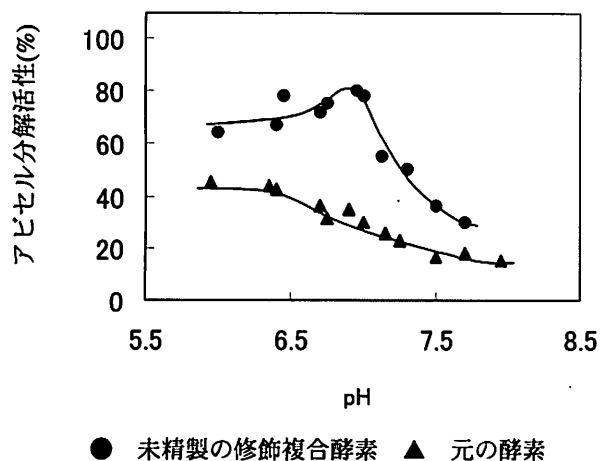


図8 1/20-ホウ酸緩衝液系でのアビセル分解活性

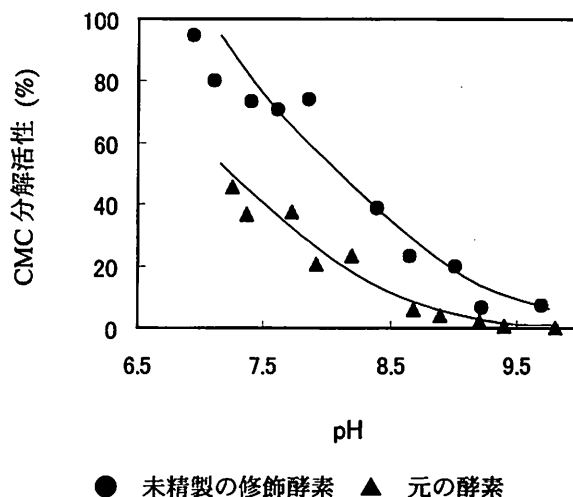


図9 1/20-ホウ酸緩衝液系でのCMC分解活性

用が強度低下に寄与しない綿繊維表面に限定されたこと、(2) 高分子量の修飾酵素が繊維表面に局在化することにより未修飾酵素の作用が抑制されたことによるものと考えられた。

(d) ホウ酸緩衝液系での酵素活性

最適pHについて調べた中で、極めて特異な現象として、pH8近傍では緩衝液組成によって、常に相対活性値が大きく異なることを見いだした。すなわち、ホウ酸緩衝液での修飾複合酵素の相対活性値が常になる傾向を認めた。そこで、pH8.0の1/20M-ホウ酸緩衝液に1M-酢酸を添加し、pHを6から8まで変化した溶液系について検討し、図8に示した。修飾複合酵素の相対活性は、pH7で極大値を持つ曲線を描き、最大活性値(pH5.0)の80%を示した²²⁾。それに対し、未修飾酵素の活性は、ほとんど変化が見られなかった。

ところが、図には示していないが、3/20Mまでホウ酸添加量を増し、1M-酢酸を用いてpHを調整した溶液系では、修飾複合酵素の相対活性曲線は、図3(A)に示した修飾酵素の活性曲線に近づいた。したがって、ホウ酸濃度には適正值が存在することが示唆された。

次に、ホウ酸緩衝液系でのCMC分解活性保持率変化を図9に示したが、修飾複合酵素のCMC分解活性はアルカリ側でも高い値を保持した。

ホウ酸が糖およびこれと類縁のポリオキシ化合物と極めて容易かつすみやかに反応して、負の電荷を持つホウ酸化合物を形成することから^{23,24)}、この種の反応が関与しているものと推察される。しかし、未修飾酵素系ではホウ酸により活性化される現象が見られなかったことからすれば、基質となるセルロースの水酸基がホウ酸と化合物を形成したと考えるより、むしろ

MAMECで化学修飾した修飾酵素とホウ酸が化合物を形成し、酵素反応部位のpH環境を酸性化したことにより、酸性セルラーゼとしての作用が顕著に現れたものと考えられる。いずれにしても、ホウ酸の作用については今後検討を深める必要があるものと考えているが、調製した修飾複合酵素は中性セルラーゼとしての応用が期待できることがわかった²⁵⁾。またこの条件で綿糸ならびにラミー(麻)糸にビーカー試験を行うと、綿糸では両酵素作用に相違は見られなかったが、ラミー糸では修飾複合酵素処理の優位性が認められた。そこで次に、酵素処理が困難だとされるラミー生地を実機で酵素処理した。

4. 実機を用いたラミー生地の酵素加工

(1) 修飾複合酵素と試験布

ラミー100%布(60番手単糸, 平織り, トスコ(株)製)を用いた。試験布を加工機にて湯洗い・脱液後、PAS-600(洛東化成工業(株))を2g/Lの濃度に調整した85℃の処理液を注入し、浴比1:60の条件で30分間糊抜き処理した。脱液後90℃の水を注入し、10分間の湯洗いを、水を換え3回行った。処理布は、85℃のタンブラー乾燥機(Asahi ANT2020)で25分間乾燥処理した。以下の実験では、この布を基準布とした。

(2) ラミー生地の酵素加工

気液流型酵素加工機, CUT-MJ-25R((株)日阪製作所製)を用い、ホウ酸で調整した中性条件下、修飾複合酵素は1.4g/l, 未修飾酵素は2.0g/lの濃度で50℃, 浴比1:60で処理した。所定時間毎に生地長50cmずつサンプリングし、85℃, 浴比1:100で15分

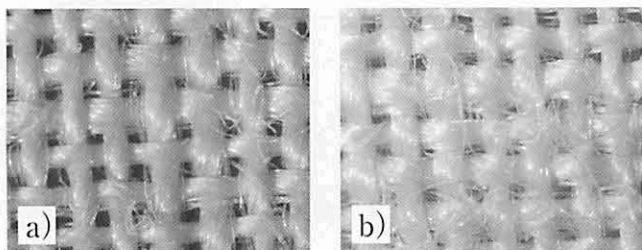


図10 未精製の修飾酵素で処理したラミー生地表面写真 a) 200分処理後, b) 基準布

ワッシャー処理し、酵素を失活させ、水を換え、85℃、10分間の湯洗いを、3回行った。処理後の布は、85℃のタンブラー乾燥機 (Asahi ANT2020) で25分間乾燥処理した。

(3) 生地に生じた物性変化の測定

生地の減量率は、実機での処理のため厳密な意味での減量率を求めることが困難であるが、織密度の変化が極めて小さかったために、各試料から正確に20cm角の生地を切り取り、20℃、65%RHで調整したのち、生地重量から換算した。また各試料からタテ糸を抜き取り、オートグラフ ((株) 島津製作所製) を用い糸長20cm、引張り速度20cm/minで測定し、破断時の強伸度を求めた。圧縮・曲げ・表面・せん断・引張りの各特性変化については、KES風合い試験機 (カトーテック(株); KES-FB システム) により求めた。

5. 結果と考察

両酵素による生地の減量挙動に大きな差は見られなかった。酵素によるラミー生地の減量処理により、生地表面の不要な毛羽が除去され、生地を構成する糸一糸間の毛羽が除去された結果を図10に示す。

また強度保持率変化を図11に示す。未修飾酵素処理では、40分までで糸強度が急速に低下した。他方、修飾複合酵素で処理した場合、緩やかな強度低下を示し、200分処理において70%の保持率を保持した。またこれら酵素処理を受けたラミー生地の風合は、全体として処理時間が長くなるにつれ、各特性に対する生地の反発性が低下する傾向が現れ、いわゆる柔らかさが増す傾向にあることがわかった。

酵素加工では、加工により得られる特性と強度低下のバランスを常に考慮する必要性があるが、この修飾複合酵素処理の場合、実際の操作上よりゆとりのある条件が設定できるものと考えられる。

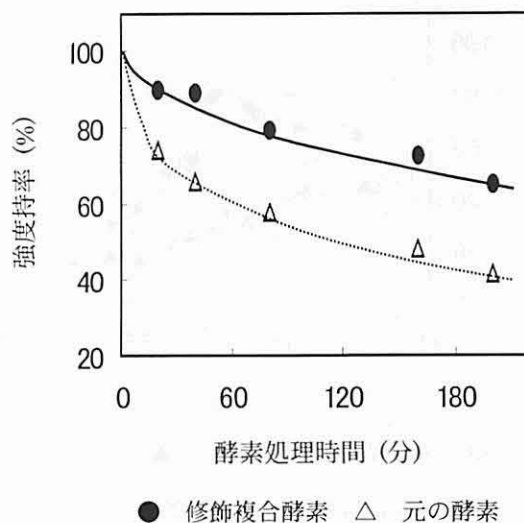


図11 pH7.0, 50℃の条件下、未精製の修飾酵素で処理したラミー繊維の強度保持挙動

参考文献

- 1) G. A. Greathouse: Text. Res. J., **20** (1950) p.22
- 2) D. Kochavi, T. Videbaek, and D. Cedroni: Am. Dyest. Rep., **79**, No.2 (1990) p.24
- 3) R. M. Tyndall: Am. Dyest. Rep., **79**, No.5 (1990) p.22
- 4) S. Klahorst, A. Kumar, and M. M. Mullins: Text. Chem. Color., **26**, No.2, (1994) p.13
- 5) R. J. Harper and A. H. Lambert: Text. Chem. Color., **24**, No.2 (1992) p.13
- 6) R. Tyndall: M., Text. Chem. Color., **24**, No.6 (1992) p.23
- 7) G. Buschele-Diller, S. H. Zeronian, N. Pan and M. Y. Yoon: Text. Res. J., **64** (1994) p.270
- 8) A. Kumar, et al: Text. Chem. Color. & Am. Dyest. Rep., **1** (1999) p.37
- 9) 谷田 治: 染色工業, **37** (1989) p.122
- 10) 谷田 治: 染色研究, **33** (1989) p.22
- 11) 松田泰介, 細川光弘: 三重県工業技術センター研究報告, No.13 (1989), p.16
- 12) 上甲恭平, 菅井実夫, 木村和臣, 林 壽郎, 荒井基夫: 繊維学会誌, **56** (2000), p.473
- 13) P. Kassenbeck: Textile Res. J. **40** (1970) p.330
- 14) M. Takai, J. Hayashi, K. Nishizawa and T. Kanda: Appl. Polymer Sympo., **37** (1983) p.345
- 15) R. Axen: *Insoluble Enzyme*, Edited by M. Salmona, C. Soronio and S. Garattini, Raven Press, New York (1974) p.9
- 16) E. K. Katchlski: *Enzyme Engineering*, Edited by H. H. Weetall and G. P. Royer, Prentice Hall, New York (1982) p.12
- 17) M. Somogyi: Notes on Sugar Determination, J. Biol. Chem., **195** (1952) p.19
- 18) Y. Yabushita, K. Suyama and K. Takagi: Chem. Pharm. Bull. **36** (1988) p.954
- 19) T. Kajiuchi and J. W. Park: J. Chem. Eng. Japan, **25** (1992) p.202
- 20) 上慶一之, 古田雅一, 岡 勝仁, 林 壽郎: 繊維学会誌,

- 55 (1999) p.166
- 21) R. Ulbrich, A. Schellenberger and W. Damerau: Biotechnol Bioeng., 28 (1986) p.511
- 22) 菅井実夫, 上甲恭平, 林 壽郎, 荒井基夫: 繊維学会誌, 58 (2002) p.466
- 23) S. Shubhada, and P. V. Sundaram: Enzyme Microb. Technol., 15 (1993) p.881
- 24) 実験化学講座 生物化学 I, 日本化学会編, 丸善23 (1957) p.439
- 25) 菅井実夫, 上甲恭平, 林 壽郎, 荒井基夫: 繊維学会誌, 60 (2004) p.16