

修飾酵素による綿の精練

茶谷悦司^{*1}、北野道雄^{*2}

Scouring of Cotton with Modified Enzymes

Etsushi CHAYA and Michio KITANO

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1} Food Research Center, AITEC^{*2}

綿の酵素精練の問題点として指摘されている反応時間の長さや精練効果の低さを解決するためには、高温短時間処理に耐える酵素剤の開発が必要である。そこでトランスグルタミナーゼを用いて、ペクチナーゼ、プロテアーゼ等の精練用酵素の安定化を図り、これらを併用して綿の一浴精練を行った。耐熱性が向上した修飾酵素を併用することにより、高温短時間で綿の精練が可能となり、ペクチンなどが効果的に取り除かれた。この方法で精練した綿布の吸水性能、ペクチン除去率は、アルカリ精練と同等であった。

1. はじめに

綿繊維は、原綿の内部を保護するため一次壁にセルロース以外の成分（ペクチン、ワックス、たんぱく質など）を多量に含んでいる。これらの成分は、染色工程において染液の浸透を妨げ、むら染めの原因となるため精練工程で取り除かれる。環境問題への意識の高まりから、温和な条件で処理ができ排水負荷も低いとされる酵素精練が注目を集めるようになり、実験室レベルのみでなく実用化に向けた実機レベルの検討が行われるようになった¹⁾。これらの検討の結果、綿の酵素精練の実用化のためには、反応時間の短縮、精練効果の向上、一浴化が達成されなくてはならないことが確認された。酵素の耐熱性、耐薬品性などが向上し、反応条件の幅が広がれば、複数の酵素を使用した一浴同時処理が可能となり、工程の短縮、エネルギー消費削減が図られ実用化に近づくと考えられる。

一方、酵素剤の安定性を向上させる目的で様々な酵素の化学修飾が試みられている。例えば、治療用酵素として用いられているウリカーゼ、アスパラギナーゼ、ストレプトキナーゼなどをポリエチレングリコールで修飾し、血中でのクリアランスや抗原性を改善する方法²⁾、スーパーオキシドジスムターゼを多糖類、ポリエチレングリコールで修飾し、抗原性抑制や熱安定性向上を図る方法³⁾などが提案されている。ポリエチレングリコールやデキストランといった高分子で酵素を修飾し安定化を図るとすると、活性が大幅に損なわれる場合が多い。また、グルタルアルデヒドなどの架橋試薬の場合、高分子量化による活性低下や、不溶化などが生じるため、期待され

た効果が発揮できない場合が多い。

そこで昨年度、たんぱく質中のグルタミン残基とリジン残基間の架橋を触媒する酵素であるトランスグルタミナーゼ（TGase）を用いてプロテアーゼ等の繊維加工に使用される酵素剤の安定化を図るべく検討した。TGaseでの修飾処理においても適切な反応条件をとれば、活性低下や不溶化などが発生せず、酵素剤の安定化が図れることがわかった⁴⁾。

本年度は熱安定性の向上した修飾酵素剤を併用することにより、精練効果の向上、反応時間の短縮を目指し、酵素精練条件の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 使用酵素剤の選定

酵素剤としてはプロテアーゼ（H社製 *Bacillus subtilis* 起源 900U/mg）、セルラーゼ（H社製 *Aspergillus niger* 起源 4U/mg）、ペクチナーゼ（N社製組換え *Bacillus* 起源 3U/mg）を選定した。また TGase は、微生物起源（*Streptoverticillium* sp.）のもの（A社製 1U/mg）を使用した。

2.2 TGase による酵素修飾反応

選択した酵素剤を緩衝液に溶解し、恒温槽中で TGase と反応させた。各酵素 1U と反応させる TGase の量は、プロテアーゼの場合 20mU、セルラーゼの場合 5 U、ペクチナーゼの場合 10mU とした。反応温度は 20℃、反応時間は 30 分とした。

2.3 酵素活性評価方法

プロテアーゼ活性は、ミルクカゼインを基質とし、

^{*1} 尾張繊維技術センター 加工技術室 ^{*2} 食品工業技術センター 加工技術室

30 で10分間反応を行った後のTCA可溶成分をフェノール試薬で呈色させ、660nmの吸光度を測定することにより評価した。

セルラーゼ活性は、カルボキシメチルセルロースを基質とし、初期粘度と40 で5分間反応させた後の粘度を測定し、粘度低下率を算出することにより評価した。

ペクチナーゼ活性は、ポリガラクトuron酸を基質とし、37 で20分間反応を行った後反応を停止させ、235nmの吸光度を測定することにより評価した。

2.4 熱安定性評価方法

TGase で修飾されていない三種類の酵素と、TGase で修飾された三種類の酵素を、60 あるいは、70 で所定時間熱処理した後の残存活性を測定することにより熱安定性を評価した。

2.5 綿布の酵素精練処理

のり抜きをした綿ブロードを、三種類の酵素を併用して70 で恒温処理した。酵素液のpHは5.0(酢酸緩衝液)、7.0(リン酸緩衝液)、9.0(ホウ酸緩衝液)とし、非イオン界面活性剤を0.5g/l添加した。反応時間は30分とした。反応終了後90 で10分間失活処理し、その後綿布をよく洗浄し乾燥させた。

2.6 綿ペクチンの測定⁵⁾

シュウ酸アンモニウム抽出 - カルバゾール比色法とルテニウムレッド呈色法で綿ペクチンの除去性を評価した。

綿布を細かく裁断し、シュウ酸アンモニウムで90、3時間抽出処理した後、ろ過、熱水洗浄した。ろ液を加熱濃縮し濃塩酸と三倍容のエタノールを添加し、数時間放置した。これをさらにろ過、酸性アルコール洗浄した後、残渣をろ紙とともに熱水に溶解した。この溶液を濃硫酸で90、10分間加熱処理した。冷却後0.05%カルバゾールエタノール溶液を添加し90分放置した後、520nmにおける吸光度を測定した。検量線はD-ガラクトuron酸で作成し、これからペクチン濃度を算出した。

ルテニウムレッド溶液(ルテニウムレッド0.2g/l、塩化アンモニウム1.0g/l、アンモニア水2.8g/l)中で綿布を染色したのち(室温10分間)綿布を取り出し、沸騰水中で1分間洗浄した。乾燥後綿布を測色に供し540nmにおけるK/Sから綿ペクチン残存量を評価した。

2.7 綿たんぱくの測定

クマシーブリリアントブルー溶液(Bio-Rad BioSafe CBB G-250)中で室温で20分間緩やかに攪拌しつつ染色したのち綿布を取り出し、沸騰水中で1分間洗浄した。乾燥後綿布を測色に供し620nmにおけるK/Sから綿たんぱく残存量を評価した。

2.8 染色性の評価

C.I. Reactive Blue 221 2%o.w.f.で60 恒温染色法

(染料とぼう硝を投入し30分間吸尽処理を行ったのちソーダ灰を添加し60分間固着処理)で染色処理を行った。その後湯洗い、ソーピングを行った。乾燥後綿布を測色に供し、630nmにおけるK/Sから染色性を評価した。

2.9 吸水特性の評価

酵素処理した綿布の吸水特性を、JIS L 1907の滴下法とパイレック法で評価した。滴下法の吸水速度は、滴下した水滴(100μl)を試験片が吸収し鏡面反射が消えるまでの時間を測定した。パイレック法の吸水高さは、試験片の下端を蒸留水に浸漬しそのまま5分間放置し、5分間経過後蒸留水が布を上昇した高さを測定した。

3 . 実験結果及び考察

3.1 トランスグルタミナーゼ(TGase)で修飾された酵素剤の安定性評価

3.1.1 熱安定性、pH安定性

セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼをTGaseで修飾処理した。修飾酵素と未修飾酵素をプロテアーゼは60、ペクチナーゼは70で所定の時間処理した後の残存活性を評価したところ、各々の酵素剤で耐熱性が向上していることがわかった(図1)。TGaseにより、たんぱく質中のリジン残基のε-アミノ基とグルタミン

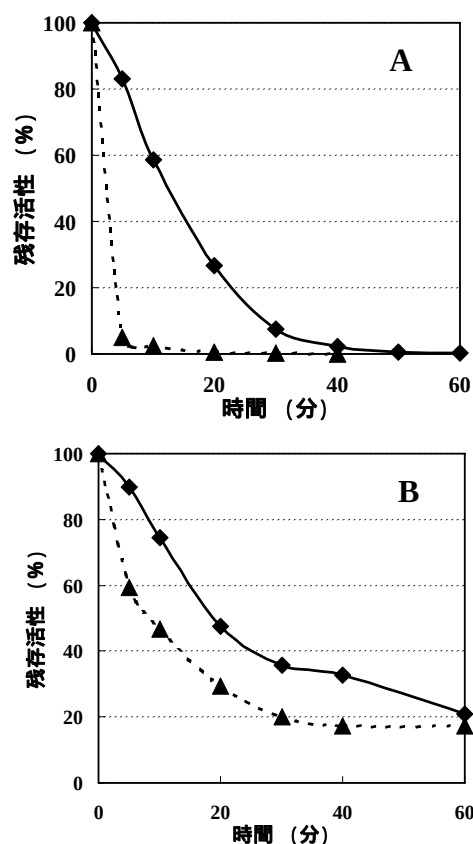


図1 耐熱性評価結果

A: プロテアーゼ、B: ペクチナーゼ

残基の γ - カルボキシアミド基との間に架橋結合が形成されたため、安定化が図られたと考えられる。これらの結果から、TGase で修飾処理により 70 30 分程度の処理に耐えるものと考えられた。

pH に対する安定性の改質効果も期待したが、修飾による改質効果はほとんど見られなかった。

3.1.2 金属イオン依存性

本研究で選択したプロテアーゼ（金属プロティナーゼ）とペクチナーゼは、酵素活性の金属イオン（ Ca^{2+} ）依存性が高く、浴中の金属イオンの濃度に影響を受けやすい。そこで反応浴中に金属イオンを添加し、その影響について評価した。ペクチナーゼは金属イオンの量に敏感で、高濃度になるほど活性が低下した（図 2）。金属封鎖剤の添加により金属イオン濃度を調節して活性測定すると、金属イオン濃度の最適範囲が存在することがわかった（図 3）。

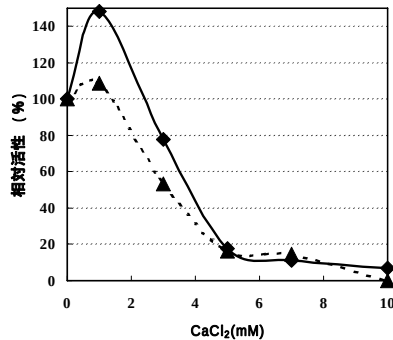


図 2 ペクチナーゼ活性に対する金属イオン添加量の影響

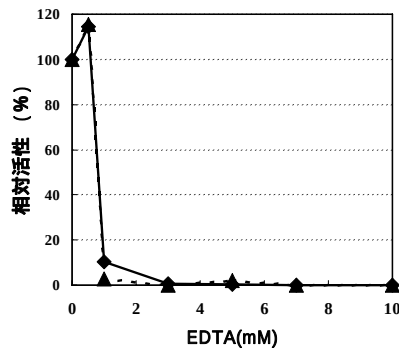


図 3 ペクチナーゼ活性に対する金属イオン封鎖剤の影響

一方、プロテアーゼについては金属イオンの濃度が高くなると活性が徐々に低下した。また金属封鎖剤の添加で活性が著しく低下した。

3.1.3 酵素併用耐性の評価

酵素を混合したときの、他の酵素剤の活性に対する影響を評価した。ペクチナーゼ、セルラーゼのプロテアーゼ活性に対する影響はほとんどなかったが、プロテアー

ゼのペクチナーゼ活性に対する影響は大きかった（表 1）。これはペクチナーゼ等がプロテアーゼの基質となり分解したことによるものと考えられた。

表 1 併用耐性評価結果

処理時間（分）	残存活性（％）
0	100
10	56.7
30	0

- ・ペクチナーゼ 6 U / プロテアーゼ 225 U を混合
- ・37 で所定時間処理した後にペクチナーゼ活性を測定

3.2 修飾酵素を用いた綿の精練

3.2.1 精練処理基本条件

モデル基質を用いた安定性評価結果を基に、基本精練処理条件を仮決定した。プロテアーゼによる他の酵素の分解を考慮し、プロテアーゼ処理を行った後ペクチナーゼ、セルラーゼ処理を行う恒温一浴二段処理とした。

キレート剤の添加によりプロテアーゼを失活させた後、ペクチナーゼとセルラーゼを添加し反応させることとした。

反応温度は修飾酵素の耐熱性を考慮し 70 とした。

3.2.2 精練条件の決定

修飾酵素を併用した精練条件（酵素量、反応 pH、酵素投入方法など）を決定するため、吸水速度、ペクチン残存量、染色濃度などを指標として精練効果を評価した。

酵素量は吸水速度を指標として決定した。ペクチナーゼの場合 500 U / g 綿（図 4）、プロテアーゼの場合 20 k U / g 綿、セルラーゼの場合 200 U / g 綿で吸水性が著しく向上した。よってこれらを基本酵素量とした。

反応 pH についてはペクチン残存量と吸水速度を評価

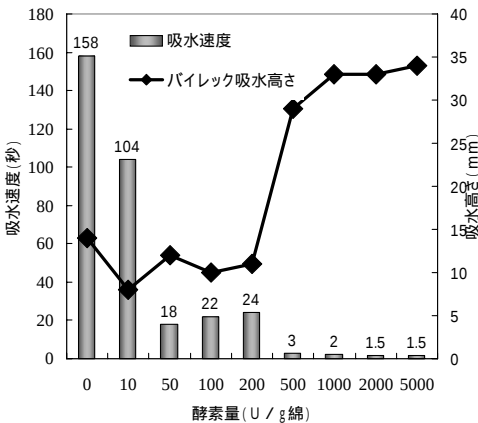


図 4 ペクチナーゼ反応条件の検討

緩衝液：12.5mM リン酸緩衝液 pH8.0

反応温度：55 反応時間：2 時間

反応 pH についてはペクチン残存量と吸水速度を評価した結果、pH = 7.0 が適当であった（図 5）。

酵素投入方法については、一浴二段処理（プロテアーゼ処理→キレート剤添加→ペクチナーゼ、セルラーゼ処理：分割と表記）と一浴一段処理（三種の酵素を同時に投入：一括と表記）との処理効果の差は顕著でなかった（図 5）。分割投入により反応時間が短縮されたことと、金属イオン封鎖剤の添加量の不適などが期待された処理効果が吸水速度の差として現れなかった原因と考えられた。

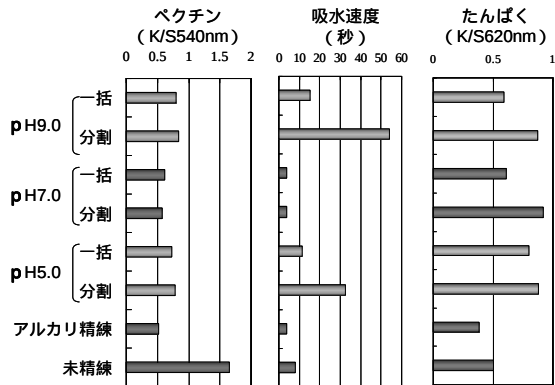


図 5 併用処理条件の検討（反応 pH の影響）

原綿の一次壁にはペクチン、たんぱく質、ワックスなどの夾雑物が含まれるが、一種類の酵素剤ですべてを除去することは不可能である。これらの夾雑物は複雑に影響しあって存在するため、これらを除去するためには、各々を分解可能な酵素剤を併用する必要がある。単独の酵素剤で処理したものと、三種の酵素剤を併用したものとの精練効果を比較したところ、併用処理の優位性が確認できた（図 6）。

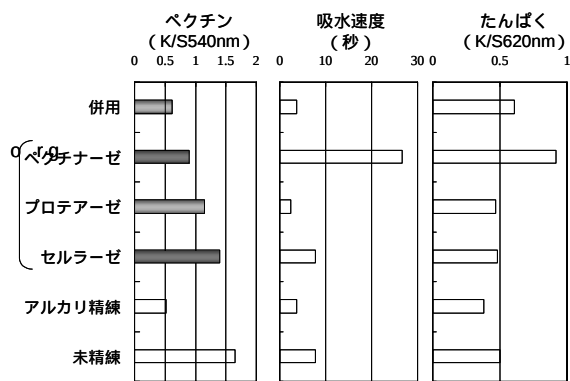


図 6 併用処理と単独処理の精練効果比較

これらの結果を基に pH = 7.0、一浴一段処理での処理を最適条件と決定した。

3.2.3 修飾酵素併用法とアルカリ法（従来法）で精練された綿布の特性比較

アルカリ法で精練した綿布（NaOH 2 g/l、浸透剤

1 g/l、100 、30 分処理）との特性比較を行った（表 2）。ペクチン残量、吸水速度、染色濃度ともに遜色ない特性を示した（表 2）。

表 2 修飾酵素併用法とアルカリ法との比較

精練方法	処理条件	ペクチン残量 (mg/g 綿)	吸水速度 (秒)	染色濃度 (K/S)
修飾酵素併用法	混合酵素 70 、30分	0.05	3.64	6.60
アルカリ法	NaOH 2 g/l 100 、30分	0	3.70	5.69
未精練	-	5.43	7.84	6.84

4. 結び

ここでは選択した酵素剤に反応させる TGase の最適添加量、反応温度、pH 等を検討した。選択した酵素ごとに最適条件を見だし、調製した修飾酵素の熱安定性が向上することを確認した。また修飾処理により活性が大幅に失われないことも確認した。

修飾酵素の安定性が向上したことにより、複数の酵素を一浴で併用することや高温短時間で処理することが可能となった。このことにより酵素精練の欠点といわれてきた精練効果の低さや反応時間の長さを解決することができた。そしてアルカリ精練とのペクチン残量、吸水速度などの精練効果の比較から、パッチ処理においてはアルカリ精練と同等の精練効果が得られた。

しかし、綿の精練は連続処理で行われることが多く、さらなる反応時間短縮が必要となると考えられる。このためには、綿の一次壁の不純物に対してより効果的に作用する酵素の検索が必要となってくる。

また、酵素精練では葉ごみが除去しきれないことと、処理後の綿布の白度が十分でないことのため、漂白工程が必須となることから、工程短縮のためには精練と漂白が同時に行えることが望ましい。このためには精練用酵素と併用可能な漂白酵素の検索が必要となってくる。

糊抜き、精練、漂白工程を酵素を用いて連続的に行うことができれば、綿織物の準備工程は劇的に改善され、環境に優しい繊維加工を求める業界のニーズに応えることができると思われる。

文献

- 1) 高岸徹：繊維学会誌, 57, P125 (2001)
- 2) 特公昭 61-42558 号、特開昭 57-118789 号公報
- 3) 特開昭 58-16685 号公報
- 4) 茶谷悦司、北野道雄：テキスタイル & ファッション, 21, No.9, 15-18 (2004)
- 5) 石原彰浩、木野浩成、前嶋義夫、乾 拓雄：浜松工業技術センター報告, 4, 18-22 (1994)