

遺伝子組換え技術による有用酵素の創製と繊維加工への応用に関する研究 —繊維加工に有用な新規酵素を生産する微生物の探索—

山本周治、北野道雄

要 旨

本研究の研究目的としては、羊毛クチクルのみに働く酵素、合成繊維（ポリエステル）を改質する酵素、これらを生産する微生物を土壌からスクリーニングし、これから培養調整した菌株から粗酵素を取り出し繊維への加工適性を評価した。その結果、粗酵素の段階であるが、羊毛の防縮加工に適した酵素が見出された。またポリエステルの改質酵素に関しては、微生物の検索をする前に市販酵素2種類（リパーゼ、ラッカーゼ）を用いて実験を行ったが、柔軟性、吸水性、帯電特性、強伸度等に変化が見られポリエステルの改質に関して有効であることが判った。

1 はじめに

バイオテクノロジーは酒、味噌、醤油といった食品分野に多く用いられ、これらバイオに関する研究は食品業界がリードしていると言って過言ではない。しかしながら、酵素メーカーも食品業界にとどまらず他業種にも酵素利用を拡大していきたいと考えている。また、繊維業界においても汚濁物質を出さないという点からも酵素利用技術について注目したが、現在においては、綿・絹の精練といった一部のみに使われているだけである。羊毛分野において酵素を用いた改質研究は多く行われ、一部実用化しているが、現段階ではたんぱく質分解酵素は特定部位だけをアタックするものがないため、繊維全体の強度低下が大きな問題となっている。特定の部位、例えば羊毛においては羊毛クチクルのみに酵素が働いてくれれば、強度低下を危惧することなく防縮性、風合いの改質につながると考えら

れる。一方、合成繊維においては、世界における全合成繊維に占めるポリエステル繊維のシェアは約67%あり、日本国内でも約66万トンのポリエステル繊維が織編物に使用され、このうち、ポリエステル100%のものにはほとんど苛性ソーダ（水酸化ナトリウム）を用いて風合い改質が行われている。しかし、高濃度の苛性ソーダを排出するため中和などの後処理が必要となる。こうした中、環境負荷の軽減を考えて、天然物を利用した酵素加工が注目を集めている。酵素を用いた改質に関する研究もいくらか見られるが、現段階においても脂肪族ポリエステル繊維に限られた分解による実験程度に限られている。本研究では、リパーゼによってポリエステル繊維を構成する主鎖部分であるエステル結合を切断し、さらに骨格を成すベンゼン環をラッカーゼによって切断することでポリエステル繊維に可能となると考え実験を行った。

2 ケラチン分解酵素の検索

2.1 実験方法

2.2 試料

(1)ケラチン分解酵素生産菌の分離

愛知県下の羊毛紡績、織布工場、染色排水処理場、畑等62ヶ所から採取した土壌試料を表1のように培地組成した寒天平板培地上に塗抹し培養した。育成したカビから単離した菌株で表2に示した液体培地を作製し、振とう培養器で培養した。この後、液体培地をろ過しさらに培養液を透析処理したものを粗酵素液とした。

表1 ケラチン分解酵素生産菌分離用固体培地組成

H ₂ O	100
K ₂ HPO ₄	0.1
KCl	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
Glucose	3
Chloramphenicol	0.01
TritonX-100	250μl
Agar	1.5
Wool Powder	0.3

表2 ケラチン分解酵素生産菌分離用液体培地組成

H ₂ O	100
K ₂ HPO ₄	0.1
KCl	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
Glucose	3
Chloramphenicol	0.01
Wool Powder	0.3

(2)粗酵素による羊毛繊維の処理

JIS添付白布(毛)のたて糸を5~7mmの長さにカットし、これを10本取り、1.5ml容のエッペンチューブに入れ、粗酵素を30℃で20時間、羊毛繊維と反応させた。

(3)電子顕微鏡観察

粗酵素で処理した羊毛繊維を走査型電子顕微鏡を用いて表面観察を行った。

(4)粗酵素による羊毛織物の処理

粗酵素処理羊毛繊維のうち、電顕観察でキューティクル表面やエッジ部分に変化のあった7株の生産する粗酵素を選定した。この粗酵素を用いて6×6cmの大きさにカットしたJIS添付白布(毛)を振とう培養器で回転数120rpm、30℃で20時間反応させた。

2.2 実験方法

(1)収縮試験

JIS L1042織物の収縮試験方法G法(電気洗濯機法)で試験した。未処理、比較として市販酵素(プロテアーゼN)処理したもの及び7株の生産する粗酵素で処理したものを二層式電気洗濯機(日立製作所製PS-T36J2型)を用い、水温40℃に洗濯用合成洗剤を20g添加し、浴比が1:30になるように負荷布を投入して洗濯による収縮試験を行なった。ここで、洗濯(5分)→脱水(30秒)→すすぎ洗い(2分)→脱水(1分)を洗濯1回とした。収縮率を下記の計算で面積収縮率として求めた。

$$\text{面積収縮率(\%)} = \frac{\text{最初の面積} - \text{洗濯後の面積}}{\text{最初の面積}} \times 100$$

(2)アーフェンフェルトボール試験

さらに酵素処理した羊毛繊維の防縮性能を調べるため条件の厳しいIWTO-20-69(E)法(アーフェンフェルトボール試験)を行った。これは、標準状態(20℃、65%RH)下に24時間放置した処理羊毛を解きほぐしボール状にしたものを金属容器に蒸留水と一緒に入れ、この容器を激しく攪拌した後に試料の密度を測り防縮性が良ければ、その密度が小さくなるものである。布を手で解きほぐして方向性を完全に無くして軽くボール状にし、重さ1±0.005gにしたものを試料としてアーヘンフェルトボールテスター(DESAGA社製)に

セットし試験を行った。試験終了後、試料フェルトボールを取り出し、自然乾燥した後、直径を9カ所ノギスで測定し、次式で密度を測定した。

$$\delta = \frac{6}{\pi d^3}$$

ここで δ : フェルトボール密度 (g/cm^3)

d : フェルトボールの直径 (cm)

(3)引張試験

粗酵素処理した羊毛織物から糸を取り出し、JIS L1095一般紡績糸試験方法の単糸引張強さ及び伸び率を準用して、引張試験機（株式会社製作所製AG-500A型）でつかみ間隔30mm、引張速度200mm/min、標準状態で強度と伸びを測定した。

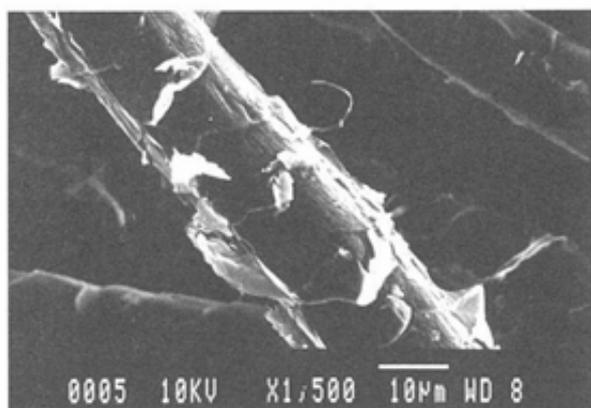


写真1

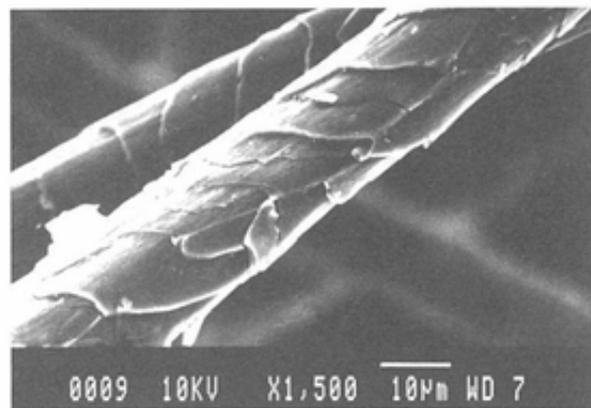


写真2

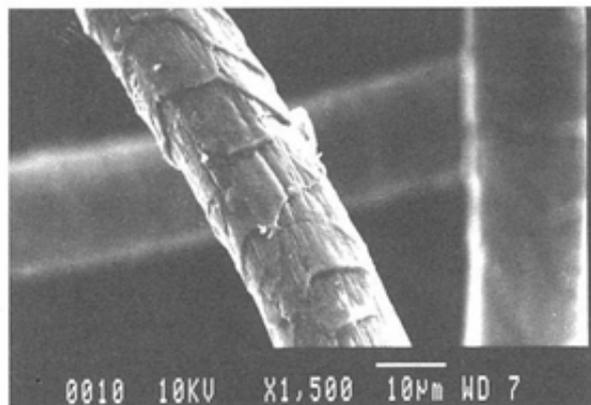


写真3

3 結果及び考察

3.1 粗酵素処理による電子顕微鏡観察

粗酵素を作用させた羊毛繊維を電子顕微鏡による表面観察を行った。これより、写真1、2、3のようにキューティクルの変化状態を次の3つに分類した。

①キューティクルが激しく損傷しているもの。

(写真1)

②キューティクルエッジが部分的に剥離しているもの。(写真2)

③キューティクル表面とエッジに変化の見られるもの。(写真3)

この電顕写真より表3のように分類した7株を選択し、羊毛織物に作用させ、防縮性能と糸の強度伸び変化を測定することとした。

3.2 収縮試験

防縮性の評価方法として洗濯前と各洗濯後

表3 電子顕微鏡観察による分類

記号	分類方法
1	キューティクル表面とエッジに変化の見られるもの
2	キューティクルが激しく損傷しているもの
3	キューティクル表面とエッジに変化の見られるもの
4	キューティクルエッジが部分的に剥離しているもの
5	キューティクル表面とエッジに変化の見られるもの
6	キューティクルエッジが部分的に剥離しているもの
7	キューティクルが激しく損傷しているもの

にマークした、たて、よこの長さを測って面積を計算し、洗濯前後の面積の変化を比較した。今回、洗濯（25分）→脱水（2分30秒）→すすぎ洗い（10分）→脱水（5分）を1サイクルとし、これを5回洗濯とした。8サイクル40回の洗濯による収縮を測定した。その結果、図1に示すように、未処理布は1サイクル5回の洗濯で10%近く収縮したが、粗酵素処理した羊毛織物の収縮率は0~1.4%であった。また、8サイクル40回洗濯した場合、未処理では19%、市販酵素で処理したものは10.4%収縮した。これに対し粗酵素処理した試料布の収縮率は2.8~9.1%と防縮性が向上していた。

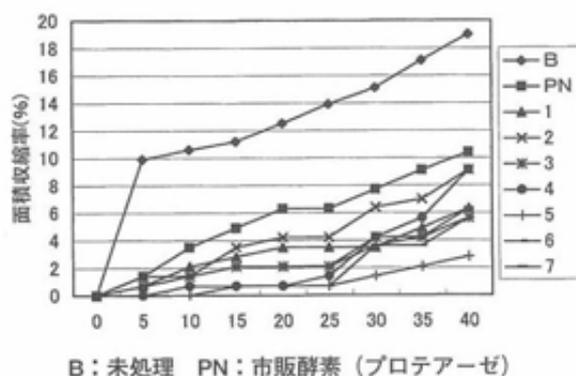


図1 洗濯試験による面積収縮

3.3 アーフェンフェルトボール試験

試験結果を図2に示す。これから、全ての粗酵素処理羊毛で未処理より小さくなったものの市販酵素で処理したものより悪くなったものが1種類 (No.2) あった。

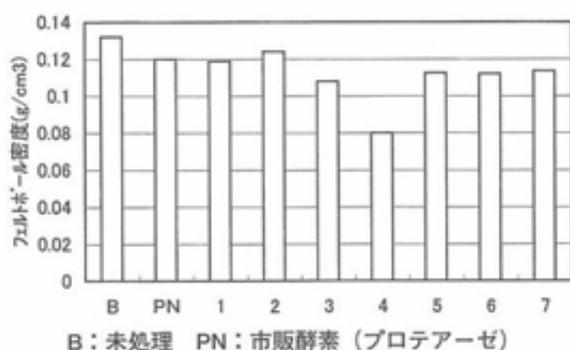


図2 アーフェンフェルトボール試験

3.4 引張試験

今回の新規酵素を探索する目的としては、未処理より強度、伸度の低下が少なく、市販酵素より強度、伸度が向上しているものが良い。未処理を基準にした強度、伸度の変化率で見ると、図3のように強度では、市販酵素の低下が最も高く、伸度は全て増大していた。粗酵素で処理した中にはNo.1、5、7のように未処理や市販酵素処理したものより強度伸度とも増しているものがあった。

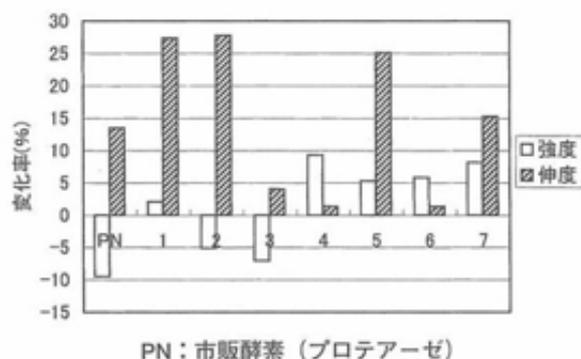


図3 強度伸度変化率

4 酵素によるポリエステル繊維の改質

4.1 酵素の選択

ポリエステル繊維を構成する分鎖主部であるエステル結合を分解すると考えられる酵素リパーゼと骨格を成すベンゼン環を切断すると考えられる酵素ラッカーゼを用いてポリエステル繊維を処理し改質を試みた。酵素はリパーゼPS (天野エンザイム(株)製、記号でLiAとする)、デニライトII S (ノボザイムズジャパン(株)製、同LaA) 及びラッカーゼダイワ (大和化成(株)製、同LaB) を使用した。それを表4に示す。

表4 使用酵素一覧

記号	起源	至適温度(°C)	至適pH
LiA	<i>Pseudomonas</i> sp.	45	7.0
LaA	<i>Aspergillus</i>	60	5.0
LaB	<i>Trametes</i> sp.	70	5.0

4. 2 酵素処理のポリエステル布の処理条件

実験用試料はJISポリエステル添付白布を用いた。これを前処理として60℃で10分間湯洗いし、自然乾燥後使用した。前処理した試料は至適温度、至適pHで酵素を200%o.w.f.添加し、振とう培養機(タイテック製、BR-30L型)を用いて施回振とう120r.p.m.で5時間処理した。その後、90℃の熱水へ20分間失活処理を行い試料とした。ここで、pHはリン酸二水素カリウムとリン酸二水素ナトリウムでpH7に、また酢酸と酢酸ナトリウムでpH5に調整した。

4. 3 実験

(1)電子顕微鏡による表面観察

酵素処理したポリエステル布を走査型電子顕微鏡(日本電子(株)製、JSM-T330型)で繊維の表面観察を行った。

(2)風合い測定装置による評価

酵素処理したポリエステル布の柔軟性を調べるために風合い測定装置(カトーテック(株)製)を用いて引張り、せん断試験(KES-FB1)、曲げ試験(KES-FB2)及び圧縮試験(KES-FB3)を行った。

(3)吸水性試験

酵素処理したポリエステル布をJIS L1907繊維製品の吸水試験方法のうち、吸水速度(滴下法)を準用して吸水速度を測定した。

(4)帯電特性

酵素処理したポリエステル布をJIS L1094織物及び編物の帯電性試験方法のうち、半減期測定法を用いて、半減期測定機(シシド電気(株)製、H-0110型)で測定した。

(5)糸の強伸度試験

酵素処理したポリエステル布からたて、よこ糸を取り出し、JIS L1095単糸引張強さ及

び伸び率を万能引張試験機(島津(株)製、AG-500A型)で測定した。

(6)防しわ試験

酵素処理したポリエステル布をJIS L1059繊維製品の防しわ性試験方法(回復角測定)による水平折りたたみじわの回復性(モンサント法)を用いてしわ回復試験機(昭和重機(株)性)で測定した。

(7)染色試験

酵素処理したポリエステル布を下記の条件で試染機(日本染色機(株)製 カラーベット12型)を用いて図4のような昇温条件で染色した後、測色機(日清紡(株)製 色調専科TX)を用いてK/Sで比較した。

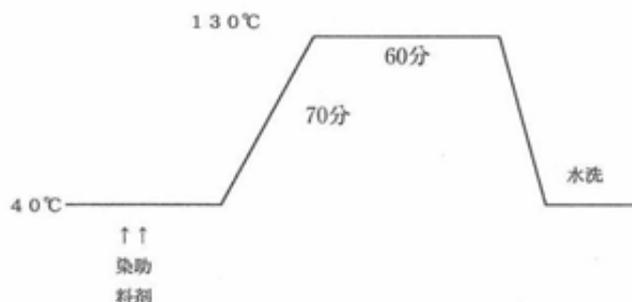


図4 染色昇温条件

染料	Kayalon Polyester Blue T-SF	1.0%o.w.f.
助剂	分散剤	1.0g/l
	酢酸	2.0%o.w.f.
	酢酸ナトリウム	1.0%o.w.f.
浴比	1:43	

ここで、(2)から(6)までの試験は標準状態(温度20℃、相対湿度65%RH)で行った。

5 結果と考察

(1)電子顕微鏡による表面観察

電子顕微鏡で酵素処理したポリエステル繊維を拡大観察すると、写真4の未処理に比べて表面に大きな変化が見られた。表5の酵素処理条件4の電子顕微鏡写真が写真5であるがポリエステル繊維の表面を引っかきえぐった

表5 酵素処理条件

番号	記号	温度(°C)	時間(h)	撹拌(r.p.m.)	浴比	pH	添加量(o.w.f.)
1	LaA	60	5	120	1:100	5.0	200
2	LaB	70	5	120	1:100	5.0	200
3	LaA	60	5	120	1:100	5.0	200
4	LiA	45	5	120	1:100	7.0	200
	LaB	70	5	120	1:100	5.0	200
5	LiA	45	5	120	1:100	7.0	200
	LaA	60	5	120	1:100	5.0	200
6	LiA	45	5	120	1:100	7.0	200
7	LiA	45	5	120	1:100	7.0	200
	LaB	70	5	120	1:100	5.0	200

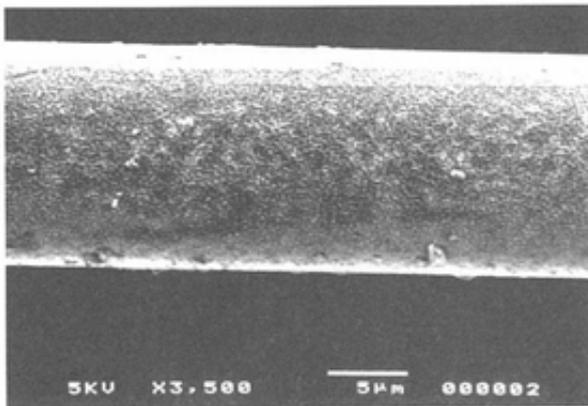


写真4

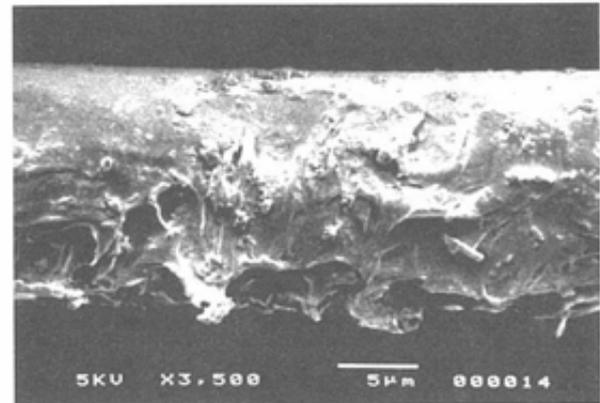


写真5

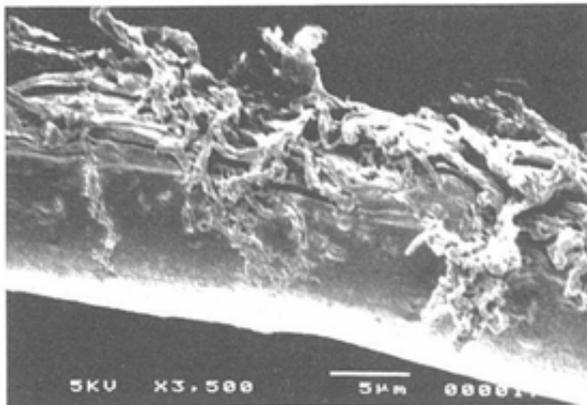


写真6

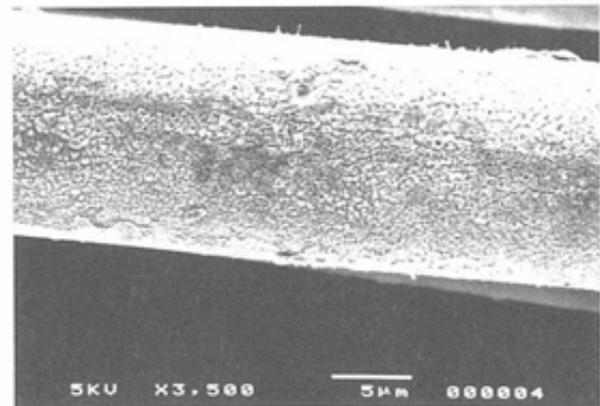


写真7

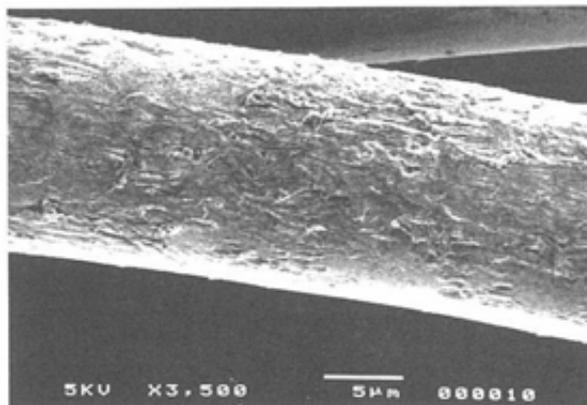


写真8

ような変化が見られた。また写真6は酵素処理条件7であるが表面がフィブリル化され、めくれあがったような感じの変化があった。写真7は酵素処理条件2によって処理したもので、写真8は酵素処理条件5によって処理したものであるが電顕写真で見える限りでは両方の酵素を用いて処理した方が表面の変化が大きいのうに思われた。

(2)風合い測定装置による評価

酵素処理ポリエステル布を風合い測定装置を用いてせん断、引張り (KES-FB1)、曲げ (KES-FB2) 及び圧縮 (KES-FB3) を測定し、その中でも柔軟性に寄与していると考えられるせん断剛さ (大きいほど剛い)、引張り剛さ (大きいほど剛い)、曲げ剛さ (大きいほど曲げ剛い) 及び圧縮剛さ (大きいほど剛い) で比較することとした。

ア せん断剛さ

せん断剛性の結果は、図5のようになった。酵素処理条件1は未処理と同等であったがその他の酵素処理ポリエステル布で数値が減少し、せん断剛性は低下していることがわかった。中でも酵素処理条件3の減少が最も大きかった。

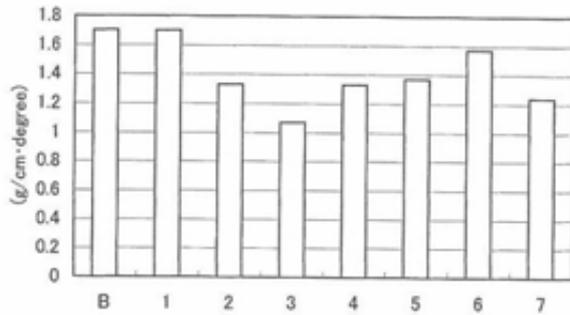


図5 せん断剛さ

イ 引張り剛さ

引張り剛さの結果は、図6のようになった。全ての酵素処理ポリエステル布は未処理布に比べてわずかに減少していた。

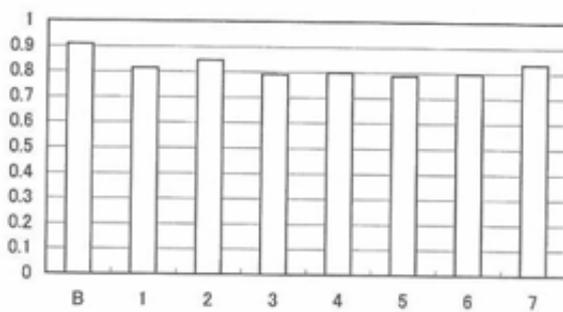


図6 引張り剛さ

ウ 曲げ剛さ

曲げ剛性の結果は、図7のようになった。

曲げ剛性に関しては酵素処理ポリエステル布で全て減少し、その減少も大きかった。中でも酵素処理条件3の減少が大きかった。

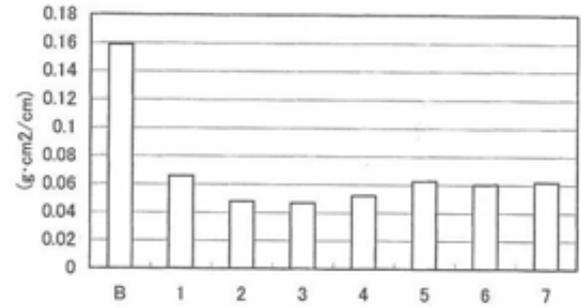


図7 曲げ剛さ

エ 圧縮剛さ

圧縮剛さの結果は、図8のようになった。圧縮剛さに関しては酵素処理ポリエステル布で全て減少した。中でも酵素処理条件6の減少が最も大きかった。

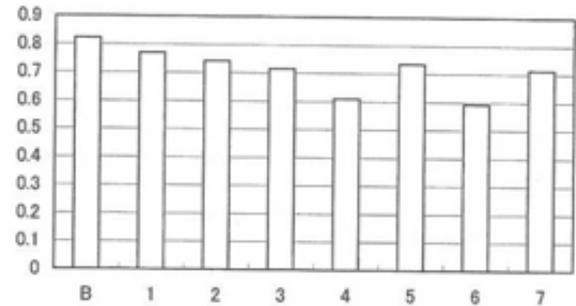


図8 圧縮剛さ

(3)吸水性試験

電子顕微鏡写真から表面が脆化しフィブリル化されたようになっており、この部分に水が浸入しやすいと思われたので吸水性を調べた。この結果を図9に示す。全ての酵素処理で未処理よりも高い吸水性を示した。未処理の生地が12秒近くかかるのに対して酵素処理

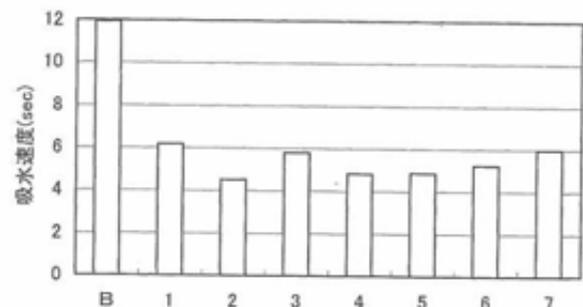


図9 吸水性

ポリエステル布は5~6秒で蒸留水を吸水した。この結果、繊維表面に亀裂が入り水が潜り込み易くなったために吸水性が向上したと考えられる。

(4)帯電特性

帯電特性においても図10のように半減期、飽和電圧とも減少していた。特に、酵素処理条件1、2、3、4及び6での半減期の減少が著しかった。

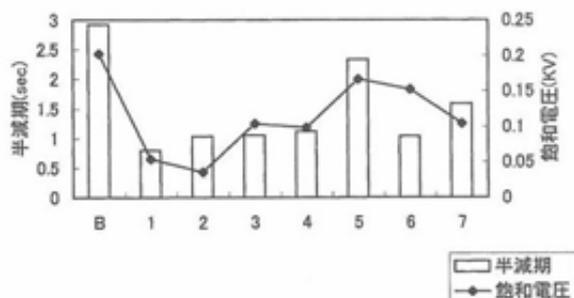


図10 帯電特性

(5)糸の強伸度試験

未処理及び酵素処理したポリエステル布から糸を取り出し引張試験機で強度及び伸度の測定を行った。結果はたて、よこを平均して未処理との強度伸度の変化率として図11に示した。酵素処理したものは未処理に比べ強度、伸度ともに減少した。中でも酵素処理条件7の強度、伸度とも低下が著しかった。

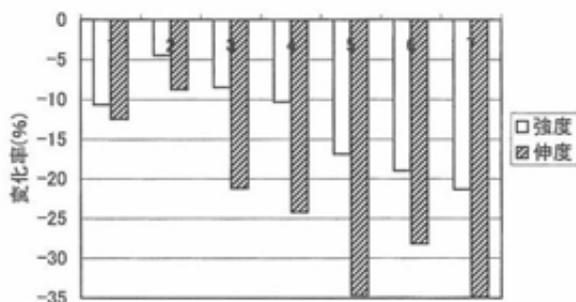


図11 強度伸度の変化率

(6)防しわ試験

防しわ試験はしわ回復角を読み取り、次式によって防しわ率を求め比較した。この結果を、図12に示す。たて方向では防しわ性が酵

素処理条件3以外は同等か向上が見られ、よこ方向では全ての酵素処理ポリエステル布で向上した。これは、ポリエステル繊維が酵素処理によって若干細くなったため繊維が動きやすくなって、防しわ性が向上したと思われる。

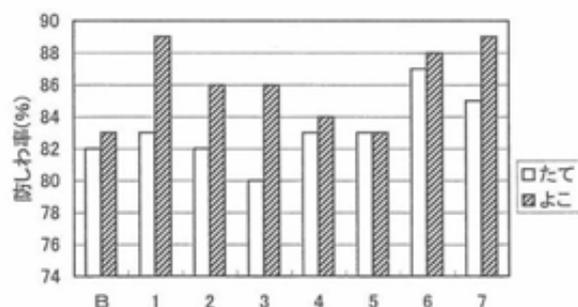


図12 防しわ試験

(7)染色試験

染色した酵素処理ポリエステル布をK/Sで評価した。その結果を未処理に対するK/Sの変化率として図13に示す。これから酵素処理条件4、7のラッカーゼとリパーゼを併用した場合に、染色濃度が増大していることが判った。

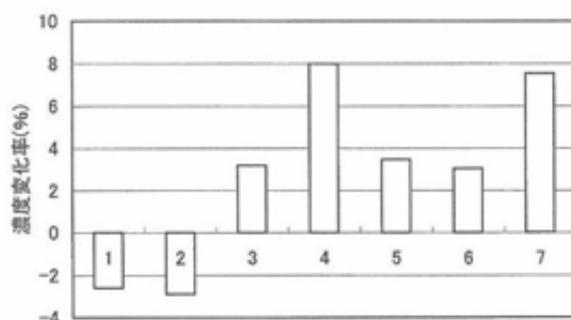


図13 K/Sによる濃度変化率

6 おわりに

本研究は、平成12年度から3年間の予定で愛知県食品工業技術センターと共同で研究を行っている。その初年度として①土壌から採取した菌株より粗酵素を取り出し、羊毛の羊毛クチクルのみに働く酵素の探索。②合成繊維(ポリエステル)を改質する酵素を土壌から探索する前実験として市販品酵素を使用してポリエステル繊維の改質を試みた。①では

土壌より採取した菌株より取り出した7種類の粗酵素によって処理した羊毛繊維布では市販の酵素で処理した羊毛繊維布に比べて防縮性は優れていた。また、強度低下も少ないものがあることから、本酵素は従来酵素より優れた特性を持ち、羊毛防縮加工に有用である酵素が探索できた。来年度よりこれらを精製した酵素を用いてさらに羊毛に対する特性を調べる予定である。②では市販用酵素（リパーゼとラッカーゼ）を組み合わせることにより大きな表面変化が見られた。特に、今回の柔軟性、吸水性、帯電特性、強伸度、防しわ性、染色性に係わる結果を総合的に見た場合、リパーゼとラッカーゼ両方の処理をポリエステル布に対して行うのが最も効果の高い処理方法であると思われる。また、酵素処理した試験布のデータを個々に見てみると数値のばらつきが大きな場合もあった。これは、酵素が不均一に作用し脆化が大きいところとそうでないところがあるためと考えられる。今年度の研究から、酵素を使用してポリエステル繊維を改質できることからアルカリ剤が不用で、羊毛等あらゆる繊維との混紡、交織

品に対してもポリエステル繊維の改質が可能となる。ただ、水酸化ナトリウムによる処理とは異なる表面変化を確認できたが、今回はアルカリ処理に比べて酵素処理の減量変化はあまり大きくないと思われるので、今後はさらに分解を促す酵素の発見が待たれる。

なお、本研究は愛知県食品工業技術センターと共同で研究を行ったものである。

謝 辞

本研究の遂行にあたり酵素を提供していただいた大和化成株式会社に深く感謝の意を表します。

引用文献

茶谷ら；テキスタイル&ファッションVol.15.No.2.'99

茶谷；愛知県食品工業技術センター研究報告メモ

兵庫県立工業技術センター、京都工芸繊維大学；加工技術Vol.34.No.5.'99

日本化学繊維協会；繊維ハンドブック2002