

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

山本周治^{*1}、北野道雄^{*1}、安田庄子^{*2}、松井淳子^{*2}、半谷 朗^{*3}

Application of The Recombinant Fungal Enzyme to The Textile Industry

Shuji YAMAMOTO^{*1}, Michio KITANO^{*1}, Shoko YASUDA^{*2}, Junko MATSUI^{*2}
and Akira HANYA^{*3}

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1} Food Research Center, AITEC^{*2*}^{*3}

羊毛キューティクルのみに働く酵素を生産する微生物を土壌からスクリーニングし、これら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正を評価した。その結果、この菌から採取できた酵素の中に防縮性能を向上させることができる酵素を発見できた。また今回遺伝子組換えによって得られた酵素では活性が市販の酵素よりも低くても防縮性能が高く、強伸度の低下が少ないことがわかった。

1. はじめに

羊毛表面は堅いキューティクルに覆われこの鱗状の形が縮絨性に寄与している。このキューティクルは羊毛をフェルト化させ羊毛織編物を収縮させる大きな原因となっている。これを防止するために、多くは化学薬品を用いて加工を行っているが環境面からもそれに変わる防縮加工が求められてきた。我々は羊毛に対して防縮性、柔軟性等を付与する目的で市販酵素を用いて改質研究を行ってきた。しかし、市販酵素では羊毛の表面から内部にかけて酵素がアタックするために繊維全体の強度低下が問題となる。そこで酵素が選択的に表面キューティクルだけに作用すればその問題が解決できる。そこで愛知県下の羊毛紡績工場、織布工場、染色廃水処理場、畑等62カ所から採取した土壌試料からスクリーニングし、そこからキューティクルを特異的に分解する酵素を生産するカビを分離し、ケラチン分解用粗酵素を取り出した。この内、不溶性ケラチン分解活性を示す粗酵素を羊毛繊維に作用させ電子顕微鏡観察を行い、その中でキューティクル表面やエッジに変化が見られた7種類の酵素について洗濯試験を行い、その面積収縮率から防縮性を評価した。また、粗酵素処理後の強伸度についても調べた。さらにその粗酵素を精製するためにこうじ菌より遺伝子組換え精製酵素を生産させた。その精製酵素を用いて洗濯及び強伸度試験を行い物性を評価した。

2. 実験方法

培養したカビから粗酵素を取り出し、羊毛繊維に作用させ電子顕微鏡による表面観察を行った。その中で表面に変化があった粗酵素を6cm×6cmの羊毛添付白布に

作用させ、予備的に収縮および強伸度試験を行い、性能を評価した。その後、物性試験で結果が良かった酵素をこうじ菌を用いて精製し、試料を30cm×30cmにスケールアップして同様に試験を行った。またこの時、酵素の持つ性能の指標として活性値を測定し、それぞれの酵素の活性値試料を作成することとした。

2.1 粗酵素による収縮試験

JIS L 1042 織物の収縮試験G法（電気洗濯機法）を準用し試験した。二層式電気洗濯機を用い、水温40℃で洗濯用合成洗剤20gを添加し、浴比が1:30になるように負荷布を投入した。洗いはソフト洗いでネットを使用した。洗濯時間は洗濯（5分）脱水（30秒）すすぎ洗い（2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。

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

2.2 粗酵素による強伸度試験

今回の新規酵素を探索する目的としては、強伸度の低下が少なく、市販酵素よりも強伸度が低下が少ないことが望ましいので、それを確認するためにJIS L 1069天然繊維の引張試験方法を準用し羊毛糸の強伸度を測定した。

2.3 酵素の活性値測定

7種類の粗酵素で処理した試験布の中で、収縮試験で面積収縮率が小さかったもの及び強伸度の低下が比較的少なかった No. 7の粗酵素をこうじ菌を用いてさらに精製し、2種類の酵素を作成した。それぞれ酵素の活性値をそろえて試験布を作成するため、アゾカゼインを基質とするプロテアーゼ測定法により各処理液の活性値を測定した。

2.4 精製酵素による収縮試験

精製したB、C2種類の酵素を粗酵素のときよりも拡大した羊毛添付白布に作用させ粗酵素と同様の収縮試験を行った。

2.5 精製酵素による強伸度試験

精製した2種類の酵素を粗酵素のときよりも引張間隔を伸ばし2/60梳毛糸を用いて粗酵素と同様の強伸度試験を行った。

2.6 高活性精製酵素による収縮試験

精製した2種類の酵素の内、収縮率試験のよかった酵素Bをさらに精製高活性化した酵素B-S処理試料の収縮率試験を行った。

2.7 精製酵素による強伸度試験

高活性化した酵素B-Sを用いて強伸度試験を行った。

2.8 精製酵素処理による羊毛繊維の顕微鏡写真

電子顕微鏡を用いて精製酵素で処理した羊毛表面を観察した。

3. 結果及び考察

3.1 粗酵素による収縮試験

防縮性の評価方法として洗濯前と各洗濯後にマークした、たて、よこの長さを測って面積を計算し、洗濯後の面積の変化を比較した。今回、洗濯(25分) 脱水(2.5分) すすぎ洗い(10分) 脱水(2.5分) すすぎ洗い(10分) 脱水(10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。結果を図1示す。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。中でもNo.7が40回洗濯後でも、面積収縮率が2.8%で最も小さかった。

3.2 粗酵素による強伸度試験

今回の新規酵素を探索する目的としては、強伸度の低下が少なく、市販酵素より強伸度の低下が少ないものが良い。未処理を基準にした強伸度の変化率で比較した。その結果、図2のようになり強度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のように強伸度が増しているものがあった。

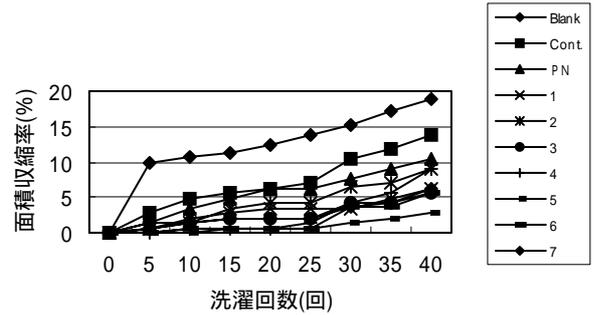


図1 粗酵素処理による収縮試験

B:未処理 PN:市販酵素

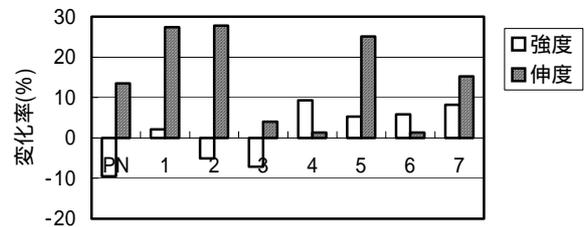


図2 強伸度変化率

3.3 酵素の活性値測定

粗酵素による試験結果から、No.7の結果が優れていたため、これを分離精製した酵素を2種類作成し、活性値をそろえて添付白布及び2/60梳毛糸に作用させ、その特性を評価することとした。プロテアーゼ測定法により測定した市販酵素PN、精製酵素B、Cの各活性値を表1に示す。今回の試験布を作成するに当たって表1のように活性値をほぼ同じ値にそろえた。

表1 酵素の活性値

酵素名	活性値
PN	112,198
B	81,874
C	106,134

3.4 精製酵素による収縮試験

表2の条件で毛添付白布を処理し、粗酵素で処理した同じ条件で試験した試験布をスケールアップして収縮試験を行った。この結果図3のように精製した酵素Bがコントロール処理や市販酵素で処理したものより面積収縮率が低く防縮性が優れていた。

表2 試験布の処理条件

名前	記号	pH	温度()	時間(h)	振とう回数(r.p.m.)	備考
未処理	Blank	-	-	-	-	-
コントロール処理	Con.	7	30	5	120	緩衝液のみで処理
市販酵素(1)	PN	7	55	5	120	市販酵素プロアゼNGで処理
酵素B(1)	B	7	30	5	120	精製酵素で処理
酵素C	C	7	30	5	120	精製酵素で処理
酵素B(2)	B-S	7	30	5	120	酵素B(1)を高活性化した酵素で処理
市販酵素(2)	PN-5	7	55	5	120	市販酵素(1)の10倍添加処理

(注) 酵素B、C、B-Sの添加量：市販酵素(PN)5%o.w.f.と同活性値相当量を添加。

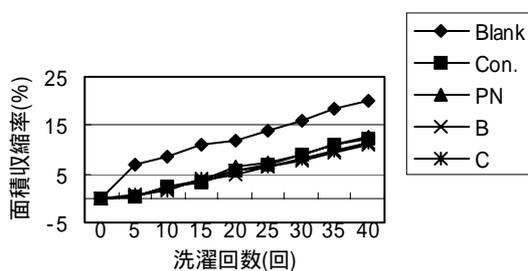


図3 精製酵素処理による収縮試験

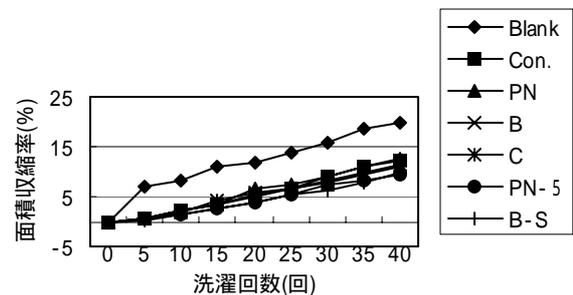


図5 精製酵素処理による収縮試験

3.5 精製酵素による強伸度試験

強伸度を変化率で見た場合、図4のように強度は酵素Cの低下が少なく市販酵素と酵素Bではほぼ同程度の減少であった。またコントロール処理と比較すると強度は酵素処理したものは減少していた。伸度は、コントロール処理の変化が大きく次に酵素Bであった。

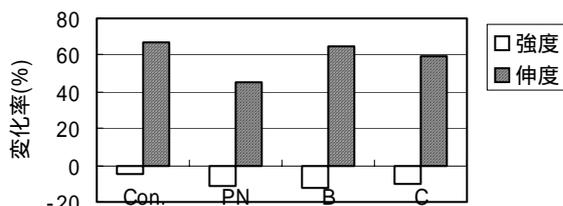


図4 強伸度変化率

3.7 高活性精製酵素による強伸度試験

高活性化した酵素B-Sは図6のように防縮性能が向上しても酵素Bと比較して強伸度ともに変化はほとんどなかった。それに比べ添加量を増加して処理した試験布(PN-5)は強伸度ともに低下した。またコントロール処理と比較すると強度はわずかに低下したが、伸度はほぼ同じであった。

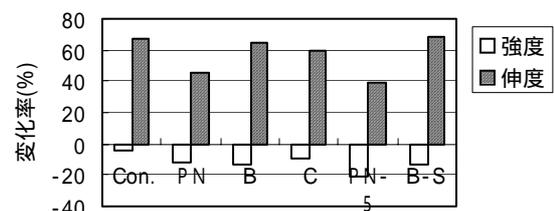


図6 強伸度変化率

3.6 高活性精製酵素による収縮試験

前回の試験で活性をそろえて試験を行った酵素の中でコントロール処理、市販酵素及び酵素Cで処理したもののより酵素Bの防縮性が優れていたため、酵素Bをさらに高活性化させ培養した。この酵素B-S(活性値103,100u)及び比較のため通常の10倍添加した市販酵素PN-5(活性値354,722u)で試験した。その結果、図5のように酵素B-Sは、酵素Bより優れた防縮性を示し、酵素PN-5で処理したものと同等の防縮性を示した。

3.8 精製酵素処理による羊毛繊維の顕微鏡写真

酵素B-Sで処理した羊毛繊維の表面を2000倍に拡大して電子顕微鏡によって観察した。その結果、未処理試験料(写真1)に比べて酵素B-Sで処理した試験布(写真2)はキューティクルが剥がれていることが確認できた。

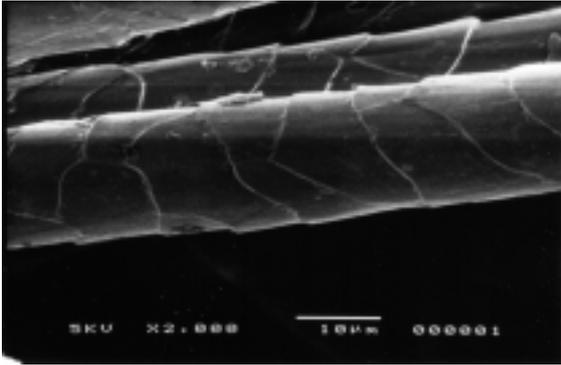


写真1 未処理

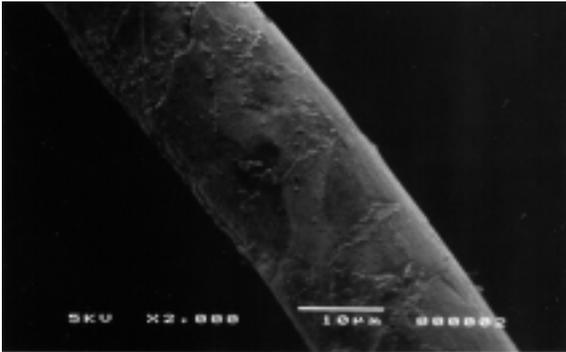


写真2 酵素処理

4. まとめ

遺伝子組換えによる新規繊維加工用生産菌の創製と、新規繊維加工酵素により処理した繊維素材の特性を評価した。高いケラチン分解活性を示した粗酵素をこうじ菌で組換え精製した酵素を羊毛繊維に作用させて、収縮及び強伸度の試験を行った。この結果、土壌より採取した菌の生産する酵素の中から防縮性を向上させることができる酵素を発見できた。また、今回開発した酵素は活性が市販酵素より低くても防縮性が高く、強伸度の低下が少ないことが分かった。

文献

- 1) 山本、北野; テキスタイル&ファッション, 18, 3(2002)
- 2) 茶谷ら; 生研機構・地域先端研究原稿
- 3) 茶谷ら; 日本生物工学会講演要旨集(2002)