セルラーゼ処理による部分カルボキシメチル化綿のモルホロジー観察

東海染工株式会社テクノセンター 山田 稔

信州大学工学部物質工学科

天野良彦・野崎功一・神田鷹久

Morphological Observation of Partially Carboxymethylated Cotton Treated by Cellulase

Minoru Yamada^{*1,*2}, Yoshihiko Amano^{*2}, Kouichi Nozaki^{*2}, and Takahisa Kanda^{*2}

^{*1}Techno Center, Tokai Senko K.K., 1-2 Neshinden, Nishibiwajima-cho,
Nishikasugai-gun, Aichi 452-0068, Japan

^{*2}Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering,
Shinshu University, 4-17-1 Wakasato, Nagano 380-8553, Japan

Abstract: In our previous paper, cotton fabrics which had been modified by carboxymethylation so as to have the degree of substitution of 0.02~0.16 were treated with a commercial cellulase preparation. The modification by carboxymethylation for cotton fabrics apparently inhibited weight loss activity and saccharification activity of cellulase. In this study, by scanning electron microscopy, we observed morphological changes of fiber surface of modified cotton fabrics treated with a commercial cellulase preparation. For unmodified cotton fabrics, deep bias cracks were produced and clear fibrillar layers appeared on the fiber surface by synergistic reaction of cellulase components. On the other hand, for cotton fabrics modified by carboxymethylation, we observed inhibition of catalytic reaction of some cellulase components, as a result of no deep cracks and no appearance of fibril layers on fibers. In addition, we confirmed, by measurements of FT-IR spectra and K/S values of fabrics dyed with a basic dye, that carboxymethyl groups in modified cotton fabrics remained even after treatment with cellulase. From these results, it is suggested that the change in the activity of each cellulase component on modified cotton can affect the synergistic action of cellulases, and consequently the morphology of fiber surface of modified cotton changes compared with unmodified cotton.

(Received 9 July, 2004; Accepted 7 October, 2004)

1. 緒 言

繊維工業において近年セルラーゼの利用が定着しているが[1-3]、実際の工業的生産においては繊維に結合した染料や染色助剤がセルラーゼの作用を阻害し[4-8]、その反応機構をより複雑にしている。一方、カルボキシメチルセルロース（以下、CMC という）は一般に水溶性の高分子であり、セルラーゼの酵素活性の測定にも利用され、CMC に対するセルラーゼの作用機構は多く報告されている[9-12]。前報[13]では、セルラーゼの作用がよく研究されている CMC の知見を基に、綿繊維の一部に染料よりも分子がコンパクトなカルボキシメチル基を導入した。すなわち、綿を高結晶性で不溶性のまま、一部の水酸基をカルボキシメチル化（以下、CM 化という）した繊維布帛を作成し、その改質の度合いによりセルラーゼがどのように作用するかを報告した。その際、イオン性を考慮し、ナトリウム（Na）塩型の CMC-Na 布と酸型の CMC-H 布についてセルラーゼの作用を比較した。即ち、セルラーゼの作用を布帛の

重量変化（減量率）と酵素処理液中に生成する還元糖量（グルコース換算）の観点から報告した。その結果、改質によりセルラーゼの作用が阻害されることを確認した。また、改質セルロースに対するセルラーゼ各成分の作用は、DS（置換度）=0.10 までは不溶性基質として挙動していることが示唆された。さらに、DS=0.16 においては、繊維の膨潤が大きくなり、特に CMC-Na 布においてはエンド型成分の作用により減量率が急激に増大した。更に、脱離した微細なポリマーや水溶性のオリゴマーに対するエキソ型成分の作用により、還元糖量も増加した。

そこで、本論文では CM 化綿布のうち顕著に性質を異にする DS=0.10（不溶性基質として作用）と DS=0.16（膨潤により一部水溶性基質として作用）の CM 化布について、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてモルホロジー観察を行い、改質綿布に対するセルラーゼ各成分の役割について報告する。また、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR）による赤外吸収スペクトルと塩基性染料による染色性から繊維表面の改質程度の変化を考察する。

2. 実験

2.1 試料および酵素

前報[13]において連続乾熱処理法[14]により作成した部分カルボキシメチル化綿布(CM化布)のうち, Na塩型CMC-Na布(図表中ではCM-Cotton-Na)と酸型CMC-H布(図表中ではCM-Cotton-H)について, 各々 $DS=0.10$ と $DS=0.16$ のものを使用した. 酵素は前報と同様Novozymes社の市販セルラーゼ製剤Cellusoft L(*Trichoderma reesei*起源, 酵素活性: 750EGU/g)をそのまま使用した.

2.2 酵素処理

前報[13]と同様, 未改質およびCM化布を $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ にカットし, 酵素濃度 3.2 g/liter , 浴比 $1:25$, 酢酸緩衝液($\text{pH}=5.0$)中で振とう式恒温槽(振幅 40 mm , 100 回/min.)にて 50°C で所定時間処理した. 200分処理布は前報で処理したものを使用した. また, 本報では長時間処理として $12, 24, 48$ 時間処理を行った. 今回使用した試料の基本データを, 前報から引用し表1に示す. 改質の DS は中和滴定法により, 減量率(WL)はセルラーゼ処理前後の絶乾重量からの計算により, また還元糖量(RS)はSomogyi-Nelsonの方法[15,16]により測定した. 一方, 相対吸水率(Relative water absorption)は, 前報において以下の方法により算出した. 各改質綿布を, 酵素処理と同一の浴中処理条件において酵素を入れずに緩衝液($\text{pH}=0.50$)のみで 50 分処理した後, 生地を処理浴から取り出し, 吊下げて自重脱液して 5 分後の生地重量を測定し, その絶乾重量から吸水率を算出した. そして, 未改質布(Sample A)の吸水率を 100 として, 各改質綿布の相対値で表した.

2.3 SEM観察

SEMによる繊維表面のモルホロジー観察は, 日本電子(株)製JSM-T100により行った.

2.4 FT-IR測定

FT-IRによる赤外吸収スペクトルの測定は, 日本分光(株)製FT/IR-460Plusを使用し, ATR法(全反射法)により繊維表面情報として測定した.

2.5 塩基性染料の染色性

セルラーゼ処理前後の各生地をC. I. Basic Blue 105により染色した. 染料 5% (対生地重量), 浴比 $1:50$,

$\text{pH}=5.0$ で振とう式恒温槽(振幅 40 mm , 100 回/min.)にて 80°C で 60 分染色後, 水洗・湯洗・乾燥した. 各染色布の可視部反射率曲線を(株)島津製作所製UV-3100自記分光光度計により測定し, 極大吸収波長における反射率からKubelka-Munk式[17]により染色濃度(K/S値)を計算した.

3. 結果と考察

3.1 SEMによる酵素処理綿布のモルホロジー観察

未改質布ならびにCM化布のセルラーゼ処理 200 分後の繊維表面の状態を, 処理前と比較し図1に示す. 未改質布(Sample A)には 200 分処理により深いクラックが生じていることが確認された. これに対して親水性の大きいNa塩型CMC-Na布の場合, $DS=0.10$ (Sample B)では処理前後でほとんど変化がなく, クラックも認められず, セルラーゼの作用が阻害されていることが確認できた. また, $DS=0.16$ (Sample C)では 200 分処理により繊維表面が溶解状態のように破壊されていることが確認できた. これは, CMC-Na布の親水性が大きく, 繊維の膨潤により繊維表面の一部が溶解またはセルラーゼの作用をより受けたためと考えられる. しかし, この場合においても繊維表面には深いクラックが認められず, 未改質布に対するセルラーゼの作用とは異なった作用がなされたと考えられる. 一方, 親水性の小さい酸型CMC-H布の場合, $DS=0.10$ だけでなく $DS=0.16$ においても繊維表面の状態は処理前後でほとんど変化がなく, クラックも認められず, セルラーゼの作用が阻害されていることが確認できた. この場合には, CMC-Na布に比べ親水性の程度が低く繊維の膨潤による作用が寄与しなかったものと考えられる.

そこで, セルラーゼ処理時間を更に 12 時間および 24 時間, 一部CMC-H布については 48 時間とした場合の繊維表面の状態を図2に示す. 未改質布(Sample A)は 12 時間処理において繊維表面全体に均一にセルラーゼの作用を受け, 繊維表面にフィブリルが平行に並んでいる状態が確認できるようになる. 更に 24 時間処理により, フィブリルの形状が顕著に現れ, フィブリルが平行して並んでいる様子が明確に確認できた. これは, セルラーゼ各成分の相乗作用によりセルロース繊維の各フィブリルの間隙に沿って加水分解が大きく進行したのものと考えられる. これ

Table 1 Relative water absorption, weight loss activity(WL), and saccharification activity(RS) of samples used.

Sample	Fabric	DS	Relative water absorption*	WL* (%)	RS* (mg/ml)
A	Unmodified	0	100	10.4	1.97
B	CM-Cotton-Na	0.10	111	4.6	0.49
C	CM-Cotton-Na	0.16	134	12.9	0.94
D	CM-Cotton-H	0.10	100	2.4	0.40
E	CM-Cotton-H	0.16	118	2.7	0.34

* Treatment with cellulase for 200 min.

に対して CMC-Na 布の場合、DS=0.10 (Sample B) では 200 分処理では認められなかった深いクラックが 12 時間処理で認められ、24 時間処理においては繊維表面に個々のフィブリルが平行に並んでいる状態が確認された。また、DS=0.16 (Sample C) では 200 分処理で現れていた溶解状態が更に進み 12 時間、24 時間共にかなりの状態で溶解による繊維の破壊が観察された。しかし、この場合においても繊維表面には深いクラックは認められず、セルラーゼの作用は未改質布に対する作用とは明らかに異なっている。一方、CMC-H 布の場合、DS=0.10 と DS=0.16 共に 12 時間、24 時間でほとんど変化がなく、更に 48 時間処理において

はじめて DS=0.10 (Sample D) でわずかにクラックが認められた。しかし、DS=0.16 (Sample E) では、ほとんど変化が観察されなかった。

これまでの報告では[18]、水不溶性基質に対するセルラーゼ各成分の作用を形態的に観察すると、エキソ型成分は繊維の表面状態に著しい変化を与え、繊維表面のフィブリル層に沿って深いクラックを生じさせる。これに対し、エンド型成分は繊維表面にわずかのクラックを生じさせるが、各々のクラックは浅く、繊維表面のフィブリル層を全体的にほぐし、溶かすような変化を示す。セルラーゼは多成分系でセルロースを分解し、その際エンド型成分とエキ

Fig. 1 Scanning electron micrographs of the fiber surfaces of cotton treated with cellulase for 200 min.

Fig. 2 Scanning electron micrographs of the fiber surfaces of cotton treated with cellulase for 12, 24 and 48hrs.

ソ型成分の相乗作用が重要と考えられている[19]。一般にエンド型成分は加水分解反応の度に基質から脱離する non-processive 的分解であり、エキソ型成分は加水分解後も基質から脱離せず連続的に酵素反応が進行する processive 的分解とされている[20,21]。従って、これらのセルラーゼ各成分の作用を改質布の繊維表面の観察に当てはめて考察すると、エキソ型成分は改質によるカルボキシメチル基の立体障害により processive 的分解が阻害され易いと考えられる。その結果、繊維表面に深いクラックは生じないと考えられる。これに対して、エンド型成分は、基質との結合と脱着が自由なので、阻害の程度が小さいであろう。前報[13]の結果から、CMC-Na 布において減量率の増加傾向に反して生成還元糖量が増加していないことから、エンド型成分よりもむしろエキソ型成分の作用が阻害されていると考えられる。CMC-Na 布の繊維表面は繊維の膨潤により溶けているようには見えるが、DS=0.16 程度の改質ではセルラーゼの作用無しに繊維自身が溶解するには至らない。これは水溶性基質に対するセルラーゼの作用に似て、エンド型成分が大きく寄与しているものと考えられる。

更に、長時間のセルラーゼ処理において未改質布にフィブリルの明確な形状が観察されるのは、やはりエンド型成分とエキソ型成分の相乗作用が大きく寄与しているものと考えられる。長時間処理において、CMC-Na 布では DS=0.10 でクラックが認められるのに対して、DS=0.16 では溶解状態がより顕著になり、まったくクラックが認められない。DS=0.10 では改質の程度が小さいので、エンド型

成分の作用が長く続いた結果としてクラックが生じたのか、あるいはエンド型成分の長時間の作用の結果、繊維表面の改質基が減少し未改質布と同様の酵素作用が生じ、その結果エキソ型成分の作用が顕著に現れクラックが生じたのかが判断できない。そこで、セルラーゼ処理により改質基であるカルボキシメチル基が減少しているか否かを、FT-IR および染料の染着性により検討した。

3.2 FT-IR による赤外吸収スペクトル

FT-IR による赤外吸収スペクトルの測定を ATR 法で行うことにより、繊維表面の情報が得られる。未改質布 (Sample A) についてセルラーゼ処理前ならびに CMC-Na 布の DS=0.10 (Sample B) についてセルラーゼ処理前および 200 分、12 時間、24 時間の各処理布の吸収スペクトルを図 3 に示す。未改質布のセルラーゼ処理前(1)と比較して、CMC-Na 布 DS=0.10 のセルラーゼ処理前(2)の赤外吸収スペクトルでは 1590cm^{-1} 付近 (カーソル位置) にカルボン酸塩による C=O 伸縮の吸収が認められ、明らかにカルボキシメチル化され Na 塩となっているものと考えられる。この CMC-Na 布をセルラーゼ処理した場合の赤外吸収スペクトル 200 分(3)、12 時間(4)、24 時間(5)においても、改質に起因するカルボン酸塩による C=O 伸縮の吸収は依然として残存していることが確認できる。このことは、長時間のセルラーゼ処理布の SEM 観察において、改質布がセルラーゼによるダメージを受けながらも未処理布のような極端なフィブリルの顕在化のような状態に至っていないこととよく一致する。

一方、CMC-Na 布の DS=0.16 (Sample C) についても、

Fig. 3 FT-IR spectra of Sample A (unmodified cotton) and Sample B (CM-Cotton-Na with DS 0.10) treated with cellulase. (1) Sample A: untreated. (2) Sample B: untreated. (3) Sample B: treated for 200 min. (4) Sample B: treated for 12 hrs. (5) Sample B: treated for 24 hrs.

Fig. 4 K/S values of CM-Cotton-Na and unmodified cotton fabrics dyed with a basic dye against incubation time of cellulase treatment.

DS=0.10 (Sample B)と同様の吸収スペクトルを示した(図は省略)。このことも同様にSEMからの考察でセルラーゼによるダメージを受けていないことと一致する。

3.3 塩基性染料の染着性

CM化布について、その改質基としてのカルボキシメチル基の存在をセルラーゼ処理前後で確認するために、綿汚染性の少ない塩基性染料(C. I. Basic Blue 105)で染色し、その染色濃度から考察した。

未改質布 (Sample A) と改質布 CMC-Na 布の DS=0.10 (Sample B), DS=0.16 (Sample C) の3種類の生地について、塩基性染料の染着性を染色濃度として K/S 値で現し、セルラーゼ処理時間に対してプロットした結果を図4に示す。CMC-Na 布の DS=0.10 (Sample B) と DS=0.16 (Sample C) は共に塩基性染料で高濃度に染色され、アニオン基であるカルボキシメチル基の存在を確認することが出来た。一方、未改質布 (Sample A) はほとんど染色されず、染色濃度 K/S 値が DS を反映していることが確認できた。図4において、セルラーゼ処理の初期において若干の K/S 値の低下が認められるが、処理時間が長時間にわたっても K/S 値が極端に低下しておらず、セルラーゼ処理によりカルボキシメチル基が繊維表面から大きく減少していないことが確認できる。このことは、FT-IR の赤外吸収スペクトルにおいてカルボン酸塩の C=O 伸縮の吸収ピークが大きく減少していないこととよく一致している。すなわち、改質は綿繊維の非晶部においてなされていること、および長時間のセルラーゼ処理においても改質基であるカルボキシメチル基が減少していないことから、改質後の綿繊維の非晶部にはセルラーゼがほとんど作用しておらず、酵素作用が明らかに阻害されていることが推察される。また、SEM によるモルホロジー観察の結果、未改質布で認められた非晶部の脱落による顕著なフィブリルの観察が改質布にお

いては認められず、また、減量率が大きく SEM 観察でも繊維表面が溶解状態にあった CMC-Na 布 DS=0.16 においてもカルボキシメチル基が脱落していないことが推察できる。

4. 結 論

部分カルボキシメチル化綿の改質基質に対する市販セルラーゼ製剤の作用を、SEM によるモルホロジー観察、FT-IR による赤外吸収スペクトル、ならびに塩基性染料による染着性から検討した。

未改質布はセルラーゼの作用を大きく受け、深いクラックが発生した後にフィブリルが平行して並んでいる状態が表面形状として顕著に観察された。これに対して、Na 塩型の CMC-Na 布においては DS=0.10 でセルラーゼの作用が大きく阻害されており、長時間処理してはじめて形態変化が認められた。また、DS=0.16 では繊維の膨潤性が大きく、繊維表面を溶解させるような破壊が観察された。これらの場合においても、繊維表面にはクラックが生じにくく、特にエキソ型成分の作用が大きく阻害されているものと考えられる。これは、エキソ型成分の作用が processive 的分解と考えた場合、カルボキシメチル基による立体障害により、阻害を受けやすいこととも一致している。一方、繊維表面の溶解にはエンド型成分が主に作用しているものと考えられる。また、酸型の CMC-H 布においては繊維の親水性が小さく膨潤の作用も少なく、また、DS による改質の差も小さい。それゆえに、いずれの DS においてもセルラーゼの作用が阻害されることが観察された。

一方、FT-IR の吸収スペクトルから、セルラーゼ処理により改質基であるカルボキシメチル基が減少していないことが認められ、また、塩基性染料によるカルボキシメチル基の確認においても、FT-IR と同様にセルラーゼ処理による改質基の減少がほとんど生じていないことが確認された。従って、長時間反応においてもエキソ型成分への阻害は継続していると推察される。

今後、精製された分画酵素を用いて、改質による基質の立体障害がセルラーゼ各成分の作用にどのように影響を及ぼすかにつき、より詳細な検討を続ける予定である。

文 献

1. M. Wadman, *J. Soc. Dyers and Colourists*, **110**, 367 (1994).
2. A. Kumar, M. Y. Yoon, and C. Purtell, *Textile Chemist and Colorist*, **29**, 37 (1997).
3. L. G. Snyder, *Textile Chemist and Colorist*, **29**, 27 (1997).
4. R. Mori, T. Haga, and T. Takagishi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **45**, 1869 (1992).
5. R. Mori, T. Haga, and T. Takagishi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **59**, 1263 (1996).

6. H. Koo, M. Ueda, and T. Wakida, *Textile Res. J.*, **64**, 70 (1994).
7. G. Buschle-Diller and M. K. Traore, *Textile Res. J.*, **68**, 185 (1998).
8. M. Ueda, H. Koo, and T. Wakida, *Textile Res. J.*, **64**, 615 (1994).
9. M. G. Wirick, *J. Polym. Sci. A-1*, **6**, 1965 (1968).
10. K. E. Eriksson and B. H. Hollmark, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **133**, 233 (1969).
11. S. S. Bhattacharjee and A. S. Perlin, *J. Polym. Sci. C*, **36**, 509 (1971).
12. T. Kanda, K. Wakabayashi, and K. Nisizawa, *J. Biochem.*, **87**, 1635 (1980).
13. M. Yamada, Y. Amano, E. Horikawa, Y. Izawa, K. Nozaki, and T. Kanda, *Sen'i Gakkaishi*, **61**, 13 (2005).
14. R. M. Reinhardt and T. W. Fenner, *I & E C Prod. Res. and Develop.*, **4**, 82 (1965).
15. M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
16. N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
17. P. Kubelka and F. Munk, *Z. Tech. Phys.*, **12**, 593 (1931).
18. E. Hoshino, Y. Sasaki, K. Mori, M. Okazaki, K. Nisizawa, and T. Kanda, *J. Biochem.*, **114**, 236 (1993).
19. E. Hoshino and T. Kanda, *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 87 (1997).
20. T. Kanda and M. Samejima, *Sen'i Gakkaishi*, **55**, P-193 (1999).
21. B. Henrissat, *Cell. Commun.*, **5**, 84 (1998).