(昭和62年6月25日受理)

延伸および湿熱処理S-カルボキシメチル化 ケラチン膜の染料収着性

大阪府立大学 工学部 古賀城一・引地 規・黒木宣彦
大阪府立繊維技術研究所 上甲恭平

DYE SORPTION BEHAVIOR OF STRETCHED AND HEAT-TREATED S-CARBOXYMETHYLATED KERATIN FILMS

By Joichi Koga*, Tadasu Hikichi*, Nobuhiko Kuroki*,
and Kyohei Joko**

* (Department of Applied Chemistry, University of Osaka Prefecture,
Mozu-Umemachi, Sakai, Osaka 591, Japan)

** (Textile Research Institute of Osaka Prefecture, Asahimachi,
Izumi-Otsu, Osaka 595, Japan)

The sorption behavior of an acid dye, C.I. Acid Orange 7, on S-carboxymethylated keratin cast films structurally altered by stretching and heating has been investigated in relation to the α - β structural transformation of keratin. An apparent difference in the equilibrium dye uptake between the structurally altered keratin films was observed. However, there was a little difference in apparent dyeing affinities of the dye. The amounts of the dye uptake by the films were in the order; unstretched (disoriented α -helix structure) = heat-treated (disoriented β -structure) > stretched (oriented β -structure) films.

(Received June 25, 1987)

1. 緒 言

羊毛繊維は延伸および熱処理により、結晶相において α -Helix 構造から β -型構造に可逆的あるいは不可逆的に構造転移することは周知のことであり、羊毛繊維の構造変化に関する研究が数多く行なわれてきた¹⁾。筆者らは、染色化学の立場から羊毛繊維の構造変化と染料の収着挙動との関係に着目して、延伸および熱処理羊毛繊維への酸性染料の平衡染着量および染色速度について検討してきた²⁻⁶⁾。その結果、延伸および熱処理羊毛繊維いずれの場合も α -Helix 構造の崩壊を伴う内部構造変化とともに平衡染着量および内部拡散速度が増大する結果を得た。また、酸性染料の主たる染着領域はマイクロフィブリルとマトリックスの境界にあり、マイクロフィブリルのカチオン性アミノ酸残基が染着座席であることを推定した⁶⁾。しかし、このような羊毛繊維の構造変化と染料

の収着挙動との関係に結晶相の二次構造がどのように関わりあっているのかは検討されていない。

一方、羊毛を構成する成分タンパク質個々の構造および構造変化に関する研究も行なわれてきた。羊毛ケラチンはシスチン結合(S-S結合)を開裂すると可溶化する。可溶化羊毛ケラチンは繊維のマイクロフィブリルを構成する Low-sulfur (Low-S)、非晶質マトリックスに由来する High-sulfur (High-S) および High-glycin-tyrosine (High-GT) 成分蛋白質に大別される。構成蛋白質個々の固体膜の構造および構造変化については詳細に検討がなされ、Low-S 成分タンパク質のみから調製した S-カルボキシメチル化ケラチン(SCMKA)の固体膜は α -Helix の二次構造を含み、熱および延伸処理により羊毛繊維と同様に β -型構造へと転移をすることなど、ケラチン膜の構造特性に関する基礎的知見が明らかになってきた⁷⁾。これらの知見にもとづいて、可溶化羊毛ケラチ

ンは羊毛繊維の構造変化と染料の吸着挙動との関係を理解する上での一つのモデル試料として有用であるといえる。

そこで、本研究では羊毛のマクロフィブリル内の構成タンパク質の高次構造、とくに二次構造およびその配向度が染料の吸着性におよぼす影響についての知見を得ることを目的として行なった。すなわち、羊毛ケラチンのS-カルボキシメチル誘導体(SCMKA)から調製したキャスト膜およびその延伸膜に対する、酸性染料(C. I. Acid Orange 7)の平衡染着量について検討した。

2. 実験

2.1 羊毛試料および染料

メリノ羊毛トップをアセトン、エチルアルコールでそれぞれ10時間抽出精製したのち、試料として用いた。染料はC. I. Acid Orange 7 (Orange II)で、市販品を蒸留水から再結晶を3回繰返して精製したものを使用した。その他の試薬は市販特級品をそのまま使用し、水は脱イオン後蒸留したものを使用した。

2.2 S-カルボキシメチル化ケラチンの調製とLow-S成分タンパク質の分離

還元羊毛ケラチン、すなわち、ケラチンの調製はO'Donnellら⁸⁾の方法に従い、還元剤として2-メルカプトエタノールを用い、8M尿素水溶液(pH 10.3)中25℃で行なった。その後チオール基修飾試薬としてヨード酢酸を用い、常法に従ってS-カルボキシメチル化ケラチンを調製した。Low-S成分タンパク質の分離は常法に従い、成分タンパク質間の溶解性の違いによって行なった。すなわち、High-GT成分タンパク質は純水に不溶のため透析法により沈殿分離した。Low-S成分タンパク質は等電点法(pH 4.4)でHigh-S成分タンパク質と分離した。得られたLow-S成分試料は0.2M酢酸水溶液に再溶解した後、イオン交換水を用いて透析法により精製し、凍結乾燥法によって回収した。

2.3 製膜方法

99%のギ酸にSCMKAを1~2%濃度になるように溶解し、その溶液をテフロン板に流延し風乾により製膜した。

2.4 膜の熱および延伸処理

SCMKA膜を100℃の蒸留水中で30分間熱処理を行った。熱処理した膜は温水中で十分に洗浄した後減圧乾燥した。

膜の延伸は、手動延伸機に膜両端を固定し、水蒸気中で15分間放置した後ゆっくりと所定の延伸率まで延伸し、延伸機に固定したまま冷風で乾燥した。

2.5 染料の吸着実験

羊毛繊維と同様^{2,6)}、浴比1:1000の各濃度の染料溶液中、所定の温度で平衡に達するまで(12時間)染色した。染浴のpHは酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液により調整した。染色後染色試料を十分に水洗し乾燥した。染着量の測定は25%ピリジン水溶液で染着染料を抽出して吸収スペクトル法で決定した。

3. 結果と考察

3.1 SCMKA膜に対するOrange IIの吸着

以前に筆者らは⁶⁾、羊毛繊維における酸性染料の主な染着領域はミクロフィブリルとマクロフィブリルとの境界領域であり、ミクロフィブリルの塩基性アミノ酸残基がその主たる染着座席であることを推定した。Zahnらは羊毛繊維を構成する各タンパク質のアミノ酸組成からそれらの膨潤度係数を算出した。そしてその値から水をはじめとする繊維試薬の収着座席はミクロフィブリルにあるとしている⁹⁾。

そこでまず、ミクロフィブリル構成タンパク質に対する染着挙動を検討するため、ミクロフィブリルに由来するLow-S成分からなるSCMKAキャスト膜へのOrange IIの吸着性について検討した。

図1にギ酸からキャストしたSCMKA膜のX-線写真を示す。この膜は結晶性は良くないが、約10Åの面間隔上に相当する回折リングと約5Åの面間隔上にハロー状回折が認められる。坂部ら⁷⁾はX-線回折強度曲線から、これらの回折リングの面間隔を正確に測定して約10Åの回折リングは9.8Åの回折であること、約5Åのハロー状回折像にはα-型構造に特徴的な5.1Åの回折とともにβ-型構造に特徴的な4.7Åの回折が含まれていることを明らかにしている。筆者らもSCMKA膜の赤外二色性からβ-型構造の存在を認めている¹⁰⁾。すなわち、本実験に用いたSCMKA膜の主な二次構造はα-Helix構造をとっているがβ-型構造も含まれている。水からキャストしたSCMKA膜にはβ-型構造の存在は認められないが、水溶解性が高いため染色実験には使用できない。未処理羊毛にはβ-型構造は含まれていないが、延伸に

Fig. 1. X-ray diffraction pattern of unstretched SCMKA film cast from formic acid.

Fig. 2. Equilibrium adsorption isotherms of Orange II for unstretched SCMKA films at pH 3.0 (●) and 4.2 (○) and temperature at 40°C.

Fig. 3. Reciprocal plots of the adsorption isotherms of Orange II for unstretched SCMKA film at pH 4.2, 40°C.

よって β -構造の形成が確認されているので本実験ではギ酸からキャストした SCMKA 膜を使用した。

図 2 に pH 3.0 および 4.2 における SCMKA キャスト膜に対する Orange II の等温吸着曲線を示す。ここで、 $[D]_s$ は平衡時の染浴濃度、 $[D]_f$ は膜 1 g 当たりの平衡吸着量である。両 pH において、SCMKA 膜への Orange II の吸着は羊毛繊維の場合と同様な等温吸着曲線を示しており、図 3 に示した逆数プロットから明らかなようにいずれの吸着も Langmuir 型であることが分る。

つぎに、pH 4.2 における SCMKA 膜に対する Orange II の吸着の見掛けの熱力学的パラメータを常法により求めた。まず、図 2 の結果から見掛けの親和力 ($-\Delta\mu^\circ$) を次式により求めた。

$$-\Delta\mu^\circ = RT \ln (\theta / (1 - \theta)) - RT \ln [D]_s \quad (1)$$

ここで、 θ は染料の座席占有率を表しており、 $\theta = [D]_f / S$ から求めた。 S は飽和吸着量である。

また、染色熱 (ΔH°) は異なる温度で得た親和力の値を用いて Arrhenius plots より求め (図 4)、染色のエントロピー変化 (ΔS°) は $\Delta\mu^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$ の関係から算出した。得られた熱力学的パラメータを表 1 に示す。なお、羊毛繊維に対する Orange II の染色の熱力学的パラメータと比較するため、以前に求めた結果²⁾ を併記した。

表 1 に示したように SCMKA 膜と羊毛繊維の熱力学的パラメータは測定温度範囲が異なるため直接比較することは難しいが、60°C の結果の比較では、明らか

Fig. 4. Arrhenius plots of adsorption affinities of Orange II for unstretched SCMKA film at pH 4.2.

Table 1. Thermodynamic parameters for dyeing of wool fiber and SCMKA films by C. I. Acid Orange II.

Samples	Temp. (°C)	$-\Delta\mu^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (e.u.)
Untreated SCMKA and heat-treated SCMKA	40	4.68		
	50	4.67	5.2	1.7
	60	4.65		
200% stretched SCMKA	40	4.65		
	50	4.62	5.4	2.3
	60	4.61		
Wool fiber	60	5.73		
	70	5.72		
	80	5.63	8.0	6.9
	90	5.55		

にSCMKA膜の $\Delta\mu^\circ$ が羊毛繊維のそれと比較して小さな値となっている。この親和力の差は ΔH° , ΔS° 両項の寄与の差によることが表1からわかる。SCMKA膜におけるカルボキシル基の増加は静電的反発による染料アニオンの結合の減少をもたらす結果となる。さらに、SCMKA膜にはシスチン結合は無く、カルボキシル基が多く含まれているためSCMKA膜のポリペプチド鎖はルーズに相互作用しており、疎水性ドメインが羊毛繊維と比較して減少している。そのため染料との静電的および水素結合による相互作用が羊毛繊維と比較して弱められることが考えられ、これらの効果が ΔH° と ΔS° 項の差として表われたのであろう。

3.2 湿熱および延伸処理SCMKA膜に対するOrange IIの吸着

すでに述べたように、SCMKA膜は熱および延伸処理により羊毛繊維と非常に類似した構造転移を示す。図5に湿熱処理したSCMKA膜と水蒸気中で200%延伸処理したSCMKA膜のX-線回折写真を示す。

Fig. 5. X-ray diffraction patterns of heat-treated (a) and 200% stretched (b) SCMKA films.

未処理のSCMKA膜では、図1に見られたような約10 Åと約5 Åの面間隔上にブロードな回折リングを示し、結晶性の低い無配向 α -Helix構造をとるが、湿熱処理により5.1 Åより短い面間隔の明瞭な回折リングが現れている。これは4.7 Åの回折であり高度に β -構造化したことを示すものである。

200%延伸処理したSCMKA膜の回折写真では、9.8 Åの回折が赤道上に、 β -構造に特徴的な4.7 Åの回折が赤道上にアーク状に明瞭に現れ、200%延伸処理により高度に配向した β -構造をとっていることがわかる。

図5の写真では明らかではないが、坂部ら⁷⁾は水蒸気中で300%延伸したSCMKA膜の回折写真において子午線上に5.1 Åのアーク状回折が存在することを報告している。また、彼等はアルコール水溶液中でこの膜を延伸処理した結果、延伸とともに、まず α -Helixの配向がおこり、さらに延伸することにより β -構造が発現することを明らかにしている。

一方、羊毛繊維の場合では、僅かな延伸によって α -

Helixが減少し、代って β -型構造の形成が始まり、延伸率が約60%で α -Helixが消滅する。60%以上の延伸では β -構造が高度に配向されることが報告されている¹¹⁾。

延伸羊毛繊維に対するOrange IIの染着量は、延伸率55%まで延伸率の増加とともに増加すること、この増加は α -型結晶構造の崩壊と関係することを明らかにした²⁾。しかしマイクロフィブリルケラチンの α - β 構造転移によるものか、あるいはもっと高次の構造変化、例えばマイクロフィブリルおよびマトリックスのポリペプチド鎖の乱れによるものか明らかではない。また、LiBr水溶液処理して55%過収縮した羊毛繊維に対するOrange IIの染着量は延伸率100%の繊維のそれよりさらに増加するが、過収縮羊毛を300%延伸すると100%延伸羊毛の吸着量とほぼ同じ値になることを見出した⁶⁾。この現象は、配向した α -型結晶構造が過収縮処理によりランダム β -型構造へと乱れた構造に変化して、染料の吸着量が増加すること、そしてランダム β -型構造は300%延伸によって高度に配向した β -型結晶構造へと変化するため染着量がわずかながら減少するものと考えた。

このような実験結果にさらに考察を加えるため、延伸によって配向 β -型構造をとったSCMKA膜および湿熱処理によってランダム β -構造をとったSCMKA膜についてOrange IIの吸着性を検討した。

図6に湿熱および200%延伸処理したSCMKA膜へのpH 4.2におけるOrange IIの等温吸着曲線を示す。いずれの等温吸着曲線もLangmuir型を示し、これらの吸着機構は未処理SCMKA膜の場合と基本的には変わらないことがわかる。平衡吸着量においては、湿熱処理膜の値は未処理膜の値と同じであるのに対し、延伸膜では明らかに減少している。まず、湿熱処理膜の結果は、ランダムな高次構造であれば成分タンパク質の二次構造の相

Fig. 6. Equilibrium adsorption isotherms of Orange II for heat-treated (●) and 200% stretched (○) SCMKA films at pH 4.2, 40°C.

違は吸着座席である解離基と染料との相互作用には影響しないことを示すものである。したがって、延伸処理膜の平衡染着量の減少は α -ヘリックスまたは β -構造をとるポリペプチド鎖の配向度の増加によってその結晶領域の中に染着座席である解離基が組込まれたことによる吸着座席の減少によるものと考えられる。これらの染着にともなう熱力学的パラメータをまとめて表1に示した。

表1の結果から明らかなように延伸膜と未処理膜とで ΔH° および ΔS° 項にわずかな差異が認められるものの、 $\Delta \mu^\circ$ はほぼ一致している。このことは、延伸膜と未処理膜とで配向度の相違に基づく染着状態の若干の相違があるものの、それらが親和力に大きく影響するほどのものではない。したがって延伸膜に対する染着量の減少は二次構造の変化に原因する親和力の低下ではなく、上に述べたように二次構造の配向による染着に有効な座席数の減少に原因したものとして理解できる。

以上、ケラチン膜に対するOrange IIの吸着性はケラチンの二次構造が α -ヘリックスであれ β -型構造であれ、高度な配向していなければほぼ等しいことが分かった。しかし延伸により高度に配向した β -構造ケラチンに対しては吸着量の減少がみられ、これはケラチン分子上の吸着座席であるカチオン残基が結晶領域内に組込まれるためと考えた。したがって、延伸羊毛の染着量の増加は α -型および β -型ケラチンに対する染着量の相違ではなく、もっと高次の構造変化、例えばミクロフィブリルマトリックス間の結合の乱れによる吸着座席数の増加に原因することが推定できる。

4. 謝 辞

S-カルボキシメチル化ケラチンの調製法の詳細について、京都大学化学研究所・宮本武明助教授、伊藤啓博士にご教示戴いた。ここに付記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) E. G. Bendit, M. Feughelman, 'Keratin' in "Encyclopedia of Polymer Science and Technology", Vol. 8. John Wiley, New York (1968).
- 2) K. Joko, J. Koga, Y. Lim, N. Kuroki, *Sen-i Gakkaishi*, **39**, T-198 (1983).
- 3) J. Koga, K. Joko, N. Kuroki, *Proc. 7th Int. Wool Text. Res. Conf. Tokyo*, Vol. V, 14 (1985).
- 4) K. Joko, J. Koga, N. Kuroki, *Proc. 7th Int. Wool Text. Res. Conf. Tokyo*, Vol. V, 23 (1985).
- 5) 上甲恭平, 古賀城一, 黒木宣彦, *織学誌*, **42**, T-308 (1986).
- 6) J. Koga, K. Joko, N. Kuroki, *Sen-i Gakkaishi*, **42**, T-685 (1986).
- 7) H. Sakabe, T. Miyamoto, H. Inagaki, *Sen-i Gakkaishi*, **37**, T-293 (1981).
- 8) I. J. O'Donnel, E. O. P. Thompson, *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**, 973 (1964).
- 9) H. Zahn, Plenary Lecture in *Proc. 6th Int. Wool Text. Res. Conf., Pretoria*, P.1 (1980).
- 10) Unpublished data.
- 11) K. Arai, S. Arai, *Int. Biol. Macromol.*, **2**, 361 (1980).