洗剤用プロティナーゼの安定性と洗浄作用について¹⁾

杉浦 衛, 小木曾太郎, 徳山良規

天野鈴代,^{2a)} 吉川周子^{2b)}

岐阜薬科大学,^{2a)} 岐阜女子短期大学^{2b)}

Studies on Stability and Cleansing Effect of Proteinase Used as Detergent Aids¹⁾

MAMORU SUGIURA, TARO OGISO, YOSHINORI TOKUYAMA.

SUZUYO AMANO,^{2a)} and SHUKO YOSHIKAWA^{2b)}

Gifu College of Pharmacy^{2a)} and Gifu Girl's Junior College^{2b)}

(Received November 16, 1970)

Detergents containing proteinase developed in Europe and U.S.A. are produced and used in Japan, but the advantage of such an agent seems to be questionable or negative in this country. Therefore, effectiveness of the agent and stability of the enzyme in the detergent solution were examined.

Alkaline proteinase from *Bacillus subtilis* used in the detergent was more stable than other proteinases such as Molsin, Semialkaline proteinase, Trypsin, or Bromelain towards detergents, tripolyphosphate, and heat (40—50°). Activity of this alkaline proteinase was enhanced with 0.05—0.1 % sodium salt of higher alkyl sulfate and 0.15—0.3 % anionic detergents solution.

Washing effect of detergents containing proteinase towards protein-soiled cloth was markedly accelerated by the combination of anionic or nonionic surfactant and proteinase. This combination had better effect than either the enzyme or the detergent alone. The cleansing action of proteolytic detergents at a low temperature (18°) decreased to one-half of that at 37°. Detergents containing proteinase had poor action on protein-soiled cloths added with rape-seed oil and starch.

近年、わが国においても酵素配合洗剤が製造市販されているが、酵素を洗剤に利用しようとする試みは古くからなされてきた。今世紀の始めにドイツで蛋白質の汚れを除くために脾臓抽出物を用いたという報告がある。³⁾しかし、それが現実に利用され始めたのは近年のことである。10数年前、スイスで酵素配合予洗剤が市販され、³⁾その有効性が確認されてから酵素予洗剤はヨーロッパから米国に発展し、さらにわが国にまで波及してきた。

現在、市販の酵素配合洗剤の使用目的は、通常の洗剤では除去しにくいといわれるミルク、血液、およびその他の蛋白質汚染を酵素で分解除去しようとするものであり、外国では一般に 30—50° の温湯中に浸漬予洗（酵素がこの間に作用する）後、洗剤で洗浄を完結する方法が用いられている。しかし、わが国で行なわれている短時間低温の洗浄の場合は、酵素配合洗剤の効果が否定されるか、あるいは疑問視されている。

そこで、著者らは蛋白質汚染布（以下汚染布）に対す

るプロティナーゼ入り洗剤の有効性を明らかにするため、洗剤用プロティナーゼの安定性、洗剤中での酵素の活性およびデンプン脂肪蛋白質混合汚染布に対する洗浄効果などについて若干の基礎的実験を行なった。

実験の部

実験方法 1. 酵素——洗剤用酵素としては Alcalase (Novo Industries), Biopraxe AL-15 (長瀬産業), Maxatase (Royal Netherland Ferm Ind. Ltd.), Protin A (大和化成), Prozyme C (天野製薬), Suprase (Chas Pfizer) を使用した。その他 Bromelain (South Star Chemical Co., Ltd.), Trypsin (エーザイ), *Aspergillus melleus* 産生の Semialkaline proteinase (天野製薬) および Molsin (盛進製薬) を比較のため使用した。

2. 洗剤および界面活性剤——市販洗剤としてニュービーズ（花王、陰イオン系）、アルコカラー（第一工業、陰イオン系）およびピッチ（花王、非イオン系）を、合成界面活性剤としてネオゲン T（アルキルベンゼンスル

1) 酵素剤の研究 第58報、本報告の要旨は日本薬学会第90年会で発表、札幌、1970年7月。

2) Location: a) Mitahora 492-36, Gifu; b) Nagara-Fukumitsu, Gifu.

3) P. Mannheim, *Soap Perfumery Cosmetics*, **41**, 750 (1968).

ホン酸塩), モノゲン P (高級アルコール硫酸エステルナトリウム) およびノイゲン EA 80 (ポリエチレングリコールニールフェニルエーテル, 以上第一工業) を用いた。

3. 汚染布——汚染布は EMPA Cotton Soil Test Cloth No. 116 (スイス製, 血液, ミルク, 炭素で汚染) を 3×4 cm の大きさに切断して使用した。なお, 一部の実験には上記汚染布をナタネ油または 5% デンプンとナタネ油の混液 (容量比 9:1) に浸漬乾燥したのち供試した。

4. プロティナーゼ活性測定法——カゼイン (E. Merck 製 Hammerstein) 1.5 g を 0.1N NaOH 50 ml に溶解し, これに 0.1N HCl を加え pH 10.0 に調製後, 0.1M Menzel 緩衝液 (Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH 10.0) 20 ml および精製水を加えて 100 ml とした。一部の実験には pH 3.0, 7.0 および 8.0 の 1.5% カゼイン溶液を使用した。

1.5% カゼイン溶液 (pH 10.0) 1 ml を 37° で 5 分間予熱し, 酵素液 1 ml (0.035—0.045 単位) を加え 37° で 20 分間反応したのち TCA-B 液⁴⁾ 2 ml を加え反応を停止する。さらに 20 分間放置後, 東洋ろ紙 No. 131 を用いてろ過し, ろ液 1 ml を 0.55M Na_2CO_3 溶液 5 ml 中に加

え混和する。

これに 5 倍希釈 Folin 試液 1 ml を添加し 30 分放置後波長 660 m μ で比色する。

酵素単位は上記条件下 1 μ mole のチロジンの相当する TCA 可溶物を 1 分間に生成するのに必要な酵素量を 1 単位とした。

5. 洗剤および酵素による汚染布の洗浄—— 37° に予熱した 0.05M Menzel 緩衝液 8 ml, 0.4% 市販洗剤溶液 10 ml および酵素液 2 ml (0.35—0.45 単位/ml) の混液に汚染布 3 枚を浸漬静置する。一定時間後に汚染布各 1 枚を取り出し 5 分間流水中でゆすぎ乾燥したのち, 対照の汚染布と比較するか, 湿式分解後ニンヒドリン法⁵⁾により蛋白質量を求めた。

一部の実験は 18° で, また, 市販洗剤溶液の代りに精製水を用いて行なった。

実験結果

酵素の安定性

洗剤に使用する酵素は洗剤およびトリポリリン酸塩などの添加物に対して, あるいは予洗時の温度 (40 — 50°) および洗濯時のアルカリ性 (pH 9—10) で安定でなければならない。洗剤用酵素の洗濯時の安定性を検討するため, pH 10, 50° での安定性を一般プロティナーゼと比

Fig. 1. Stability of Enzyme in Washing Agent Solution
After the enzymes were incubated in 0.2% detergent solution at pH 10.0, 50° , the activities at intervals of 10 min were measured.

●—●: control ×—×: Picchi
○—○: Aruko Karā △—△: Nyūbizu

4) 赤堀二郎編, “酵素研究法,” 2, 朝倉書店, 1961, p. 241.

5) 日本化学会編, “実験化学講座,” 23, 生物化学 I, 丸善, 1957, p. 127.

Fig. 2. Stability of Enzyme in Washing Agent Solution

After the enzymes were incubated in 0.2 % detergent solution at pH 10.0, 50°. The activities at intervals of 10 min were measured.

●—● : control ×—× : Picchi
○—○ : Aruko Karā △—△ : Nyūbizu

Fig. 3. Stability of Enzyme in Washing Agent Solution

After the enzymes were incubated in 0.2 % detergent solution at PH 10, 50°. The activities at intervals of 10 min were measured.

●—● : control ×—× : Picchi
○—○ : Aruko Karā △—△ : Nyūbizu

較した。

pH 10における酵素の安定性——0.02M Menzel 緩衝液(pH10)中での酵素の安定性を検討した結果、洗剤用酵素は比較的安定で30分後においても75%以上の残存活性を示した。しかし Protin A は若干安定性が劣り30分後の残存活性は55%であった。

洗剤溶液 (pH 10) 中における酵素の安定性——0.2% 市販洗剤溶液(pH 10) 中 50° で各時間予熱したのち酵素

活性を測定した。Fig. 1, 2 および 3 にその結果を示した。Protin A を除いて他の洗剤用プロティナーゼは一般に非イオン系洗剤であるピッチに対して、おおむね安定であったが、陰イオン系の洗剤には比較的不安定であった。Protin A は各洗剤に対してきわめて不安定で20分後に残存活性は10%以下に低下した。一方、比較に用いた Trypsin, Bromelain, Semialkaline proteinase および Molsin は特に不安定であった。Molsin は10分以内に完

Fig. 4. Effect of Washing Agent on Enzyme Activity at pH 10.0

Activities were measured in reaction system at 37°.

reaction mixture : 0.5 ml of enzyme solution, 0.5 ml of detergent solution and 1.0 ml of 1.5 % casein solution ; total volume 2.0 ml

(A) Alcalase, (B) Maxatase, (C) Prozyme C

×—× : Picchi ○—○ : Aruko Karā Δ—Δ : Nyūbizu

Fig. 5. Effect of Surface Active Agent on Enzyme Activity at pH 10.0

Activities were measured by the same method as described in Fig. 4.

(A) Alcalase, (B) Maxatase, (C) Prozyme C

●—● : Monogen P ▲—▲ : Neogen T □—□ : Noigen EA 80

全に活性が消失した。

洗剤および界面活性剤の酵素活性におよぼす影響

市販洗剤の酵素活性におよぼす影響を Fig. 4 に示した。非イオン系の洗剤は洗剤用プロティナーゼにはほとんど影響を与えなかったが、0.15—0.3%の陰イオン系洗剤によって酵素活性が著しく増加するのが認められた。洗濯時の洗剤濃度は通常0.2%前後と考えられるの

で実際の洗濯時にはプロティナーゼ作用が増大するものと判断される。この酵素活性の上昇が洗剤中の界面活性剤に基づくのか否かを明らかにするため、合成界面活性剤の酵素におよぼす影響を測定した。界面活性剤の濃度は0.025—0.1%(反応系)を用いた。その結果は Fig. 5 に示すように、界面活性剤の種類によりかなりの差がみられたが、陰イオン界面活性剤のうち高級アルコール硫

エステルナトリウム (モノゲン P) が酵素活性の著しい上昇をもたらした。アルキルベンゼンスルホン酸塩はほとんど影響を与えなかったが、非イオン界面活性剤により若干阻害が認められた。

トリポリリン酸ナトリウムの酵素活性におよぼす影響
市販の洗剤中に安定化剤として大量配合されるトリポリリン酸ナトリウムの酵素活性におよぼす影響を比較した。その結果は Fig. 6 に示すように、一般に洗剤用プロテイナーゼの Prozyme C, Maxatase, Alcalase はこ塩によってほとんど影響されないが、若干、酵素活性を上昇することが認められた。しかしながら、動物起源の trypsin はトリポリリン酸塩の低濃度 (酵素系中 0.01—0.02%) で著しく阻害され、酵素活性がほとんど消失した。

log concentration of tripolyphosphate in enzyme system

Fig. 6. Effect of Sodium Tripolyphosphate on the Activity of Various Proteinases

A mixture consisting of equal volume of the enzyme (0.06—0.08 unit/ml) and tripolyphosphate solution was incubated for 30 min at 45°, and activity of Prozyme C (●—●), Maxatase (×—×), Alcalase (○—○) and trypsin (△—△) were measured, respectively.

汚染布に対する洗浄効果

以上の結果、アルカリプロテイナーゼ配合の洗剤は適

当な条件を選択することによって蛋白質汚染に対して十分その作用を発揮するものと考えられるので、汚染布を使用して実際に洗浄効果を検討した。

蛋白質汚染布に対する洗浄効果

1. プロテイナーゼの単独洗浄 洗剤用プロテイナーゼ数種について、単独洗浄の効果を 37° で測定した結果、各酵素とも長時間放置するほど洗浄作用が増加したが、その効果は十分ではなかった。酵素 0.035—0.045 単位/ml 使用した場合 30 分後の蛋白質除去率は 50 % 程度であった。

2. 洗剤の単独洗浄 洗剤の濃度は通常洗濯に使用される濃度、すなわち 0.2 % で行なったが、洗剤のみでは 37°, 30 分後も蛋白質汚染布の洗浄効果は悪く、蛋白質除去率は 10 % 以下であった。それ故洗剤のみでは蛋白質汚染に対しては十分な効果が期待できないように思われる。

3. プロテイナーゼ配合洗剤による洗浄 プロテイナーゼを陰イオン系の洗剤溶液へ添加 (0.04—0.045 単位/ml になる) することにより、Table I に示すように蛋白質汚染布の蛋白質除去率は増加し、著効が認められた。また、非イオン系洗剤であるピッチを用いた場合もほとんど同程度の効果が得られた。これらプロテイナーゼ入り洗剤による洗浄は、プロテイナーゼまたは洗剤単独の場合に比較して著しい効果を示した。

4. 油脂およびデンプン油脂添加蛋白質汚染布に対するプロテイナーゼ配合洗剤の洗浄効果 わが国の家庭における汚染はその食生活から考えて、大部分が単純な蛋白質のみによる汚染ではなく、油脂および炭水化物などが相加された汚染と考えられる。そこで前記のようなナタネ油添加蛋白質汚染布およびナタネ油・デンプン添加蛋白質汚染布を用いて、それに対するプロテイナーゼ配合洗剤の効果を 37° で検討した。その結果 Fig. 7 に示すように、酵素配合洗剤は油脂添加蛋白質汚染布に対してかなりの洗浄効果を示したが、蛋白質汚染布の場合よりは幾分その効果が減退した。一方、ナタネ油・デ

TABLE I. Laundering Effect of Proteolytic Washing Agents on Soil Test Cloths

Laundering time (min)	Washing agent	Protein removed with the agent (%)			
		Alcalase	Maxatase	Prozyme C	Protin A
10	Nyūbizu	72.0	69.8	69.6	70.3
	Picchi	70.0	68.5	69.0	68.7
30	Nyūbizu	83.5	82.7	82.3	81.0
	Picchi	81.3	80.4	81.6	80.5

Three pieces of Cotton Soil Test Cloths (3×4 cm) with blood, milk and carbon were immersed in the mixture consisting of 10 ml of 0.4 % washing agent solution, 8 ml of 0.01M Menzel buffer (pH 10.0) and 2 ml of enzyme solution (0.35—0.45 unit/ml) for indicated time.

Fig. 7. Laundrying Effect of Proteolytic Washing Agent on Soil Test Cloths

Laundrying effect of proteolytic washing agent on various soil test cloths was compared as described in the text at 37°, using 0.04—0.045 unit proteinase/ml, respectively. a) soil test cloth with blood, milk and carbon (A), b) A immersed in colza oil, c) A immersed in 5% starch solution with rape-seed oil added to 10% (v/v) and dried

ブン添加汚染布の洗浄効果はきわめて不良で、蛋白質除去率は30分後にわずか30%であった。

また、冷水(18°)中においては、いずれの汚染布の場合も、酵素配合洗剤の効果はさらに減少し37°の約1/2弱の洗浄効果を示すにすぎなかった。

デンプン添加汚染布の洗浄効果をますため、タカアミラーゼ(三共)を洗剤液中に1—2mg添加し、1時間静置したが、ほとんど効果が認められなかった。

考 察

酵素洗浄について数多くの研究がなされてきたが、⁶⁾蛋白質汚染布の酵素洗浄については、皆川、^{6b)} Moulton^{6d)}により、酵素濃度、pH、温度などの影響について詳細に報告されている。しかしながら、実際の洗濯時に相当する条件での研究は、ほとんど行なわれていなかった。

そこで、洗剤中に配合される酵素が十分活性を発現しているのか、また、わが国で行なわれている短時間冷水中の洗浄の際に酵素が作用するか否かを明らかにするた

め若干の検討を行なった。実験には現在市販されている洗剤用酵素、すなわち *Bacillus* 属の産生するアルカリプロティナーゼおよび比較実験のため他の起源の酸性、弱アルカリ性プロティナーゼを使用した。

洗剤用プロティナーゼの安定性について検討した結果、一般に蛋白質変性剤である陰イオン系の界面活性剤は酵素活性を幾分低下させるが、その阻害率は他起源のプロティナーゼ、たとえば Molsin, Semialkaline proteinase, trypsin などに較べかなり低かった。この結果は30°で酵素の安定性を検討した鶴の報告⁷⁾と大体一致した。また、興味あることは、洗剤中に安定化剤として大量配合されるトリポリリン酸塩は洗剤用プロティナーゼを全く阻害しないか、酵素活性を若干増加することである。これらの結果から洗剤用酵素は洗剤液中で比較的安定であり、その作用は十分発現できるものと判断される。

蛋白質汚染布に対する洗浄効果は、酵素単独でも幾分認められたが、洗剤のみでは作用が弱く、十分な効果が期待できなかった。しかしながら、洗剤と酵素とを併用することにより著しい洗浄効果が観察された。おそらく両者が相乗的に作用するものと判断される。この相乗効果は Fig. 4 と 5 に示したように0.2%附近の陰イオン系洗剤あるいは0.05—0.1%の高級アルコール硫酸エステルナリウムによる酵素活性の上昇に基づくものと考えられる。一般に界面活性剤は蛋白質を変性(conformationの変化を含む)する作用を有するので、⁸⁾汚染布上の蛋白質が界面活性剤により部分変性され酵素作用を受け易くなること^{8d)}および界面活性剤の作用により酵素が繊維の各部に浸透しやすくなるためと推定される。

酵素配合洗剤が日本式洗濯の際に十分効果を発揮するか否かは興味ある問題である。この問題を解決するため蛋白質汚染布以外にナタネ油添加蛋白質汚染布およびナタネ油・デンプン添加蛋白質汚染布を用いて37°と18°で60分間の洗浄効果を検討した。37°においては Fig. 7 に示したように蛋白質汚染布に対して酵素配合洗剤は十分効果を発揮したが、ナタネ油添加のそれに対しては幾分効果が劣り、ナタネ油デンプン添加汚染布ではその効果が著しく減少した。ナタネ油添加汚染布は洗剤中に

- 6) a) 横山修三, 島内四郎, 水島春男, 繊維学会誌, **23**, 444 (1967); b) 皆川 基, 第1回被服整理学夏季セミナー, 1968年7月; c) 皆川 基, 笹鹿比桜子, 奥山春彦, 第7回油化学討論会, 1968年10月; d) G. D. Moulton, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.*, **46**, 507 (1969).
- 7) 鶴 大典, 科学と工業, **43**, 199 (1969).
- 8) a) F. W. Putnam, *Advanc. Protein Chem.*, **4**, 79 (1948); b) E. D. Wills, *Biochem. J.*, **57**, 110 (1954); c) M. Ikemiya, *Bull. Inst. Chem. Res.*, Kyoto Univ., **35**, 81 (1957); d) A. Imanishi, Y. Momotani, T. Isemura, *J. Biochem. (Tokyo)*, **57**, 417 (1965); e) B. Jirgensons, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 59 (1961); **96**, 321 (1962); d) F. Haurowitz, M. Tunca, P. Schwerin V. Goksu, *J. Biol. Chem.*, **157**, 621 (1945).

浸漬することにより油脂が布より剥離し除かれるため、蛋白質汚染布に類似した酵素作用を受けるものと考えられる。一方、ナタネ油・デンプン添加蛋白質酸汚染布は乾燥すると表面がデンプンの被膜でおおわれるため、プロティナーゼの作用を受けにくくなるものと判断される。家庭の洗濯時の温度に近い18°においては、これら酵素の作用は至適温度(40—50°)から外れるためさらに低下し、37°の場合の1/2弱に減少した。したがって、酵素配合洗剤は、わが国の家庭における洗浄方法では、炭水化物、蛋白質などの混合汚染の場合、その効果が十分発揮できないものと考えられる。

また、タカアミラーゼを洗剤に添加した場合に、デンプン添加汚染布の洗浄効果はほとんど認められなかったが、この理由は、タカアミラーゼが界面活性剤により変性失活するためと判断される。

総 括

1) 洗剤用プロティナーゼは一般のプロティナーゼに

比較して、界面活性剤、トリポリリン酸塩および熱(50°)に対して比較的安定であり、洗剤液中で酵素作用を行なうことができるものと考えられる。

2) 洗剤用プロティナーゼは陰イオン界面活性剤の高級アルコール硫酸エステルナトリウム(0.05—0.1%)あるいは陰イオン系の洗剤(0.15—0.3%)により、その酵素活性を2倍近くに上昇した。

3) 蛋白質汚染布に対する酵素配合洗剤の洗浄効果は酵素あるいは洗剤単独より両者を併用することにより著しい相乗作用を認めた。また、同じ酵素単位を用いる限り、洗剤用プロティナーゼ間の優劣はほとんどみられなかった。

4) 37°での酵素配合洗剤の洗浄効果に比較して18°では、その効果はかなり低下した。

5) 脂質・デンプン添加蛋白質汚染布に対する酵素配合洗剤の効果はきわめて不良であった。