

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32507

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350078

研究課題名(和文) ラッカーゼ酵素を用いる環境調和型染色・洗浄に関する研究

研究課題名(英文) The Use of Laccase Enzyme for Eco-friendly Dyeing and Washing

研究代表者

長嶋 直子 (NAGASHIMA, Naoko)

和洋女子大学・生活科学系・准教授

研究者番号：30459599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化還元酵素ラッカーゼを用い、異種二官能型反応染料の分解・脱色挙動を調べ、羊毛の染色における湿潤摩擦堅ろう性の向上と水系洗濯における移染防止の最適条件を検討した。その結果、青系染料はラッカーゼ処理条件がpH 4.5、45において素早く脱色した。実用洗濯を想定し、水系で検討した結果、ラッカーゼ/メディエーター/ノニオン界面活性剤共存下において、添付白布への汚染が抑制された。用いたラッカーゼは青系染料に対する退色に非常に有効に作用し、酵素の基質特異性が非常に大きいことが示唆され、今後羊毛の染色・洗浄への利用の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The decomposition and decoloration of hetero bifunctional reactive dyes with an oxidoreductase, laccase were studied. The improvement of wet rubbing fastness of wool fabrics dyed with the reactive dyes and optimum conditions to prevent migration of the dyes in the aqueous washing were also investigated. As a result, the blue dye was found to be decolorated rapidly under the conditions at pH 4.5 and 45. In addition, the staining on the standard adjacent fabrics in the practical washing was inhibited by using laccase/mediator/nonionic detergent. The substrate specificity of the laccase for the blue dye was very large and the dye was effectively decolorated with the enzyme. Thus it is expected that the enzyme used in this experiment can be applied to the wool dyeing and practical washing.

研究分野：繊維染色加工

キーワード：環境調和型 酵素 ラッカーゼ 羊毛 反応染料 脱色 漂白 洗浄

## 1. 研究開始当初の背景

生体由来物質である酵素は環境調和の観点からその利用が各方面で活発である。環境調和型繊維染色加工および洗浄に関する研究においても、のり抜き・精練工程に応用されたアミラーゼ酵素を筆頭に、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ケラチナーゼ酵素等の活用が試みられてきた。これらの酵素のうち、ケラチナーゼを除く4種については環境調和の観点から衣料用合成洗剤への展開が活発に行われている。

また、繊維染色加工および洗浄の分野における次のような課題に対し、環境調和を指向した酸化還元酵素ペルオキシダーゼによる漂白・移染防止効果について検討が行われている。

- (1) 残留した未固着反応染料による堅ろう度の低下および移染の問題
- (2) 酸素系漂白剤による反応染料染色物の堅ろう度と洗濯時の色泣きの改善法

しかしながら、同じ酸化還元酵素であるラッカーゼの洗浄・染色分野への有効活用についてはほとんど検討されていなかった。

これまでに、筆者は酵素の中でも応用研究、有効活用が乏しい酸化還元酵素であるラッカーゼに注目して、22種のアゾ系、アントラキノン系水溶性色素を中心にラッカーゼによる漂白について次のような検討を行い、ラッカーゼの脱色の有効性を明らかにした。すなわち、

- (1) 酵素反応速度における反応速度パラメータを求め、色素の分解・脱色挙動
- (2) 酸化還元効果を促進する電子伝達メディエーターの添加効果
- (3) 色素分解・脱色の応用としてインジゴデニムに対するラッカーゼの漂白効果

ペルオキシダーゼの場合は過酸化水素の共存が必要になるため、環境調和型繊維染色加工および洗浄整理の実現を目指す上で課題が残っている。一方、ラッカーゼの酸化反応においては溶存酸素があれば十分であり、過酸化水素の添加の必要はない。

また、酵素は高分子量のタンパク質であるため、従来用いられている低分子の酸素系酸化剤と異なり、酵素は繊維の非結晶領域に拡散し作用する可能性はなく、非結晶領域に染着した染料には影響を及ぼさず、染着座席から脱着して溶出した染料にのみ影響を及ぼすものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、環境負荷低減ならびに安心安全な繊維染色加工を目指す、環境調和型エコフレンドリー染色加工・洗浄の一環として、羊毛の反応染色における、

- (1) ソーピング工程の未固着反応染料の除去
- (2) 繊維に残留した未固着反応染料の洗濯時の堅ろう度低下(移染)、湿摩擦、色泣き

等を改善するため、天然由来物質で環境に優しい酸化還元酵素の1つであるラッカーゼを用いて、異種二官能型反応染料の分解・脱色挙動を調べ、染色・洗浄への有効活用を目的とする。

本研究では、先行研究JSPS 科研費 23500916において成果の得られた環境調和型防縮加工を行った羊毛を用いて、異種二官能型反応染料で染色し、ソーピング工程時にラッカーゼを添加し、未固着染料を除去する際に必要な多量の水・エネルギーを削減することを目指す。

また、反応染色したウォッシュブルウールの洗濯において、繊維-染料間の結合が開裂することによって生じる染料の白場部分への汚染・色泣き・移染が起こることを防止するため、洗剤中へのラッカーゼの添加効果について調べ、環境に優しいラッカーゼ酵素の有効利用を目指す。

またさらに、ラッカーゼはセルラーゼ酵素のように繊維基質に作用し繊維の強度低下に影響を及ぼさないことに着目し、これまで検討されていなかった衣料用合成洗剤への応用展開の糸口についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 酵素

*Trametes sp.*由来のラッカーゼを主成分とするラッカーゼ M120(天野エンザイム)を用いた。

### (2) 染料

異種二官能型反応染料(住友化学)の3原色(Sumifix Supra Blue, Red, Yellow)および一官能型反応染料、黒色(Sumifix WF)を使用した。

### (3) メディエーター

酸化還元反応の反応伝達物質(メディエーター)としてフェノチアジン-10-プロピオン酸(PPT)を使用した。

### (4) ラッカーゼによる色素の退色挙動

異種二官能型反応染料に対するラッカーゼの退色挙動を知るため、以下の方法で測定した。

測定溶液は0.1 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)および蒸留水を用いた。セル内で染料濃度 $27 \text{ mg/dm}^3$ 、酵素濃度 $170 \text{ mg/dm}^3$ 、PPT濃度 $3 \text{ mg/dm}^3$ となるように調整した。処理温度を30、40、45および50とし、分光光度計(島津 UV-2600)を使用して、400~700 nmにおける可視吸収スペクトルの時間変化(0~30分)を測定した。

退色速度曲線より、式(1)を用いて見かけの初期退色速度定数 $k(\text{min}^{-1})$ を求めた。

$$\ln(OD_0/OD_t) = k \cdot t \quad (1)$$

ここで、 $OD_0$ は染料の極大吸収波長における退色前の光学密度、 $OD_t$ は反応時間 $t$ 後のそれを示す。

#### (5) 界面活性剤共存下におけるラッカーゼの脱色効果

水系洗濯を想定し、ノニオン（ポリオキシエチレンアルキルエーテル、POE）およびアニオン（直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、LAS）界面活性剤共存下におけるラッカーゼの脱色効果についても同様に検討した。

#### (6) 羊毛の反応染色

先行研究 JSPS 科研費 23500916 で購入した染色装置（AHIBA）を使用し異種二官能型反応染料（Blue）による羊毛染色を行った。

吸尽工程の染色条件は、染料濃度 5 % o. w. f、酢酸 2 mL、浴比 1 : 100 とし、室温から染色を開始し、1 分間に 3 の条件で昇温させ、95 で 60 分染色した。続く固着工程は 28 % アンモニア水溶液を 2 g / L に希釈し、浴比 1 : 100、80、20 分処理した。その後、酢酸で中和し、水洗、自然乾燥した。

#### (7) ラッカーゼ処理染色布の消費性能評価

ラッカーゼが未固着反応染料にのみ作用するかどうかを調べるため、反応染色後の羊毛布をラッカーゼおよび界面活性剤水溶液で洗濯し（40、1 時間）乾燥後の試料の表面反射率を測定し、K/S 値を求めた。

さらに、ラッカーゼ処理による汚染防止効果を検討するため、摩擦に対する堅ろう度試験（JIS L 0849）に準拠し、乾燥・湿潤摩擦試験を行い、汚染の等級を判定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 温度依存性

まず 4 種の反応染料のラッカーゼ共存下における可視吸収スペクトルを 30 で測定した。Blue の結果を図 1 に、Black の結果を図 2（メディエーター共存下）に示す。

図 1 から明らかなように、Blue の場合には 30 においても短時間で分解・退色することが分かる。Red および Black 場合には、30 ではほとんど退色しないが（図 2）、温度を 40、45、50 に上げることによって退色が進むようになる。しかしながら Yellow では 50 に上げてほとんど退色しない。したがって、

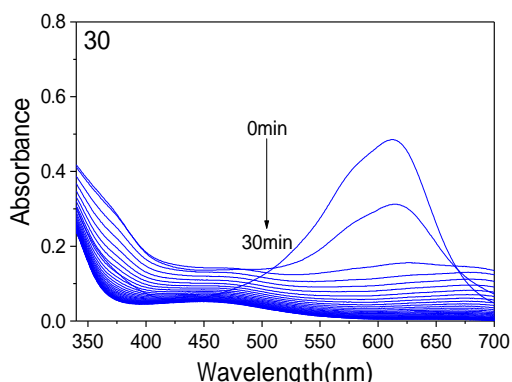


図 1. 異種二官能型反応染料（Blue）のラッカーゼ共存下における可視吸収スペクトル（30、pH 4.5）

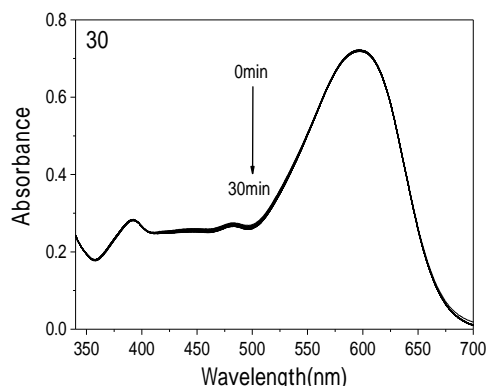


図 2. 一官能型反応染料（黒）のラッカーゼ/PPT 共存下における可視吸収スペクトル（30、pH 4.5）

ラッカーゼの退色におよぼす効果は、Blue Black > Red > Yellow となり、Blue の退色速度は顕著に大きく、Yellow はほとんど退色しないことが分かった。

用いた反応染料の化学構造は明らかでないが、Blue の色素母体はアントラキノン系、Yellow のそれはアゾ系と推定される。先に調べた酸性染料のラッカーゼによる退色においても、アゾ系に比べてアントラキノン系の退色速度が大きく、用いたラッカーゼの基質特異性は顕著である。

そこで Blue を中心にして、退色の温度依存性を調べるため、極大吸収波長の OD の時間変化をプロットした。その結果を図 3 に示す。

30 から 50 に変化すると、退色速度は顕著に増大し、50 においては数分以内で退色することが分かった。50 以上においては実用的でないため測定を行わなかった。

つぎに、退色挙動を定量的に取り扱うために、 $\ln(OD_0/OD_t) \sim$  時間曲線を図 4（Blue, 45）に示す。

図 4 から明らかなように、退色速度曲線は反応のごく初期では一次反応であることから、その傾きから見かけの退色速度定数  $k$  を式(1)より算出した。その結果、Blue の場合、

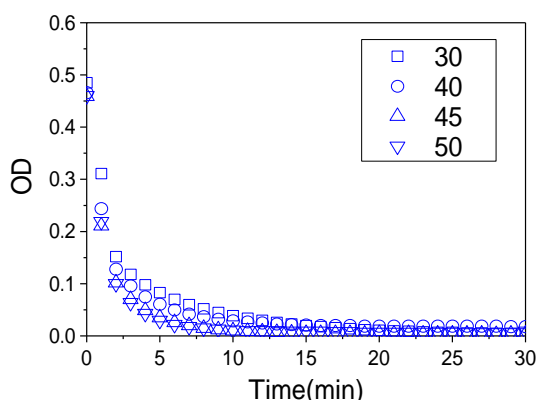


図 3. 種々の温度における異種二官能型反応染料（Blue）のラッカーゼによる退色挙動（pH 4.5）

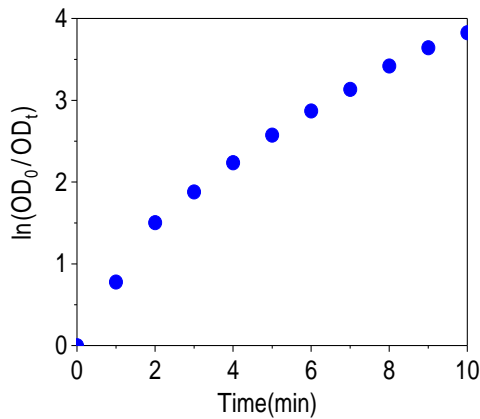


図 4 異種二官能型反応染料 (Blue) のみかけの退色速度 (pH 4.5、45 )

45 において  $k(\text{min}^{-1})$  の値は 0.568、メディエーター共存下では 0.573、Black ではそれぞれ 0.002、0.011 の値を示した。

### (2) メディエーターの効果

酸化反応を強力にするために反応伝達物質 (メディエーター) が用いられる。ラッカーゼは還元状態のメディエーターから電子を受け取り、メディエーターをラジカル状態にする反応を触媒し、このラジカル状態になったメディエーターが染料を酸化する。大部分のメディエーターは再び還元状態にもどり何度も同じ働きをする。しかしながら、Blue においては酵素添加のみによる退色速度が非常に大きいため、メディエーターの顕著な添加効果は見られなかった。Black においてもメディエーターを添加しても退色の促進効果は非常に小さい。

以上の結果から、Blue に関しては退色に非常に有効に作用し、用いたラッカーゼの基質特異性が非常に大きいことが示唆され、今後染色・洗浄への利用の可能性が期待される。しかしながら、添加効果の小さい色素母体に対して、高効率の分解を可能にする有効なメディエーターの探索が必要であると考えられる。

### (3) 溶媒効果の検討

退色の大きい Blue を中心に溶媒効果を検討した。一例として、図 5 に Blue の水系、45 におけるラッカーゼ/PPT による退色速度曲線を示す。極大吸収波長は時間と共に低下し退色するが、水系においては酢酸緩衝液 (pH 4.5) 系よりも退色速度が低下する。

図 6 に水系における Blue の初期退色速度曲線を示す。図 6 から明らかなように、酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中の退色速度 (図中の ) は非常に速く 10 分程度でほとんど退色するが、水系ではかなり遅くなることが分かった (図中の )。しかし水系にメディエーターを添加すると退色はかなり速くなる (図中の )。先の酢酸緩衝液系においては、この系における退色速度が非常に大きいため、メディエ

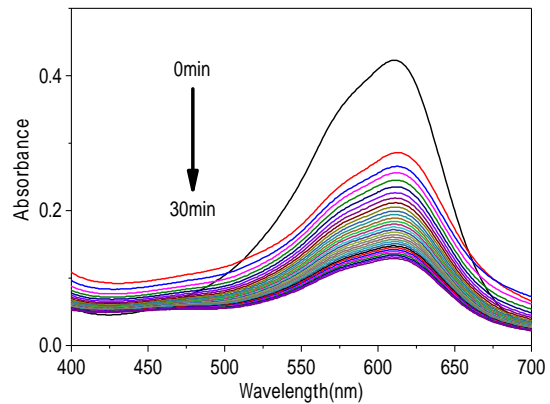


図 5. 異種二官能型反応染料 (Blue) のラッカーゼ/PPT 共存下における退色速度曲線 (水系、45 )

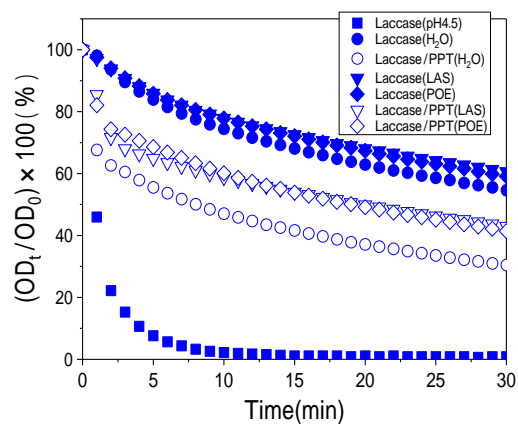


図 6. 種々の溶媒における異種二官能反応染料 (Blue) の退色挙動 (45 )

ーターの顕著な添加効果は見られなかった。退色初期は擬一次反応に従うことから、式 (1) より見かけの退色速度定数  $k(\text{min}^{-1})$  を算出し、各溶媒の影響を調べた。その結果、水系の Blue に対するラッカーゼ単独の  $k$  は、酢酸緩衝液系のそれに比べて  $1/16$  となり、退色速度がかなり低下した。

一方、メディエーター共存下の水系では 2 分以内に大きく退色し、 $k$  は酢酸緩衝液系のそれに比べて約  $1/2$  となった。本実験で使用した Blue は、水系においてメディエーターが共存することで、色素の退色がかなり進むことが確認できた。

以上の結果から、水系ではラッカーゼ単独による色素分解の効果は比較的小さいが、メディエーター添加によって酵素の酸化還元反応が促進され、脱色されることが分かった。用いる溶媒によってラッカーゼの退色挙動およびメディエーターの酸化還元反応への効果が異なることが示唆された。

### (4) 界面活性剤共存下の検討

水系洗濯を想定し、界面活性剤/ラッカーゼ共存下における Blue の退色挙動を検討した。その結果も図 6 に同時に示す。

図 6 より、ラッカーゼ/メディエーター系に界面活性剤を添加すると(図中の△)、界面活性剤非共存の場合(図中の○)に比べて若干退色は抑制されるが、ごく初期のk値は同程度であった。

退色反応の大きな低下に至らなかったことから、ラッカーゼは本実験で用いた界面活性剤による影響は比較的小さく、活性部位への基質の取り込み、反応活性等の影響を受けにくいことが推察される。

#### (5) 消費性能評価

反応染色布に対するラッカーゼの作用を知るため、染色布をラッカーゼ水溶液で洗濯し、洗濯の有無による表面反射率への影響を調べた。その結果、K/S 曲線ではほとんど変化は見られず、ラッカーゼが固着した染料には作用しないことが示唆された。

そこで、それらの試料の湿潤摩擦堅ろう度を調べた結果、汚染の等級は4級から4-5級を示し、良好な結果を得た。さらに、汚染布の表面反射率を測定し、K/S 値から汚染性を比較したところ、ラッカーゼ/PPT 水溶液で洗濯した試料が最もK/S 値が低く、汚染されにくい結果となった。また、界面活性剤共存下においては、LAS に比べ POE 共存下の方がK/S 値が低かった。

したがって、実用洗濯を想定した場合、ノニオン界面活性剤の方がラッカーゼに好適であることが示唆された。

今後、ラッカーゼによる退色効果が小さい色素母体に対して、高効率の分解を可能にする有効なメディエーターを探索することで、衣料用合成洗剤への実用化が期待できる。さらに、反応染料染色における未固着染料除去に必要な多量の水・エネルギーを削減することが可能になり、ラッカーゼによる環境負荷低減型の繊維染色加工が可能になると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 2 件)

高岸徹, 長嶋直子, 平田雄一, ラッカーゼによる異種二官能型反応染料の分解・脱色:羊毛の反応染色への応用(独)日本学術振興会繊維・高分子機能加工第120委員会年次報告, **67**, pp.40-43(2017), 査読無

高岸徹, 長嶋直子, 水溶液中における異種二官能型反応染料のラッカーゼによる分解・脱色挙動,(独)日本学術振興会繊維・高分子機能加工第120委員会年次報告, **66**, pp.48-51(2015), 査読無

##### [学会発表](計 4 件)

長嶋直子, 平田雄一, 高岸徹, ラッカー

ゼによる異種二官能型反応染料の分解・脱色:羊毛の反応染色への応用,(一社)繊維学会染色研究委員会 第53回染色化学討論会, 2016年9月20日, 山形・山形大学

長嶋直子, 酵素の繊維染色加工,(一社)日本家政学会第1回家政学夏季セミナー(招待講演), 2016年8月30日, 東京・実践女子大学渋谷キャンパス

長嶋直子, 高岸徹, 羊毛の反応染色におけるラッカーゼの利用, 2016年6月8日~10日, 東京・タワーホール船堀

長嶋直子, 高岸徹, 水溶液中における異種二官能型反応染料のラッカーゼによる分解・脱色挙動,(一社)繊維学会秋季研究発表会, 2015年10月22日~23日, 京都・京都工芸繊維大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長嶋直子 (NAGASHIMA, Naoko)  
和洋女子大学・生活科学系・准教授  
研究者番号: 30459599

##### (2) 研究協力者

高岸 徹 (TAKAGISHI, Toru)  
大阪府立大学・名誉教授