

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00795

研究課題名(和文)天然染料およびラッカーゼ酵素を用いる環境調和型羊毛染色

研究課題名(英文)Eco-friendly dyeing of wool fibers using natural dyes and an enzyme

研究代表者

長嶋 直子(NAGASHIMA, Naoko)

金城学院大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：30459599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：環境調和型染色を目指し、羊毛、天然染料、酵素を用いて検討した。ラッカーゼは天然染料に対し2つの作用を持つ。1つは色素を退色・脱色する作用、2つ目は染料の水素分子をひきつけ共役系が長くなり発色する。ほとんど無色のヘマトキシリンは2つ目の作用によって数分以内に有色物質になった。ヘマトキシリン/ラッカーゼ系で染色した羊毛は大きなK/S値を示し濃色化した。これは発色物質の吸着のためであるが、1時間後K/S値は減少した。一方、バICALIN/ラッカーゼ系の溶液は450nmの色が変化し、この色は長時間安定であった。この溶液で染色した羊毛は高いK/S値を示したが、ルチン/ラッカーゼ系は染着しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能な開発のために、水とエネルギーの有効活用、人の健康と環境に有害な化学物質の削減を推し進める気運が高まっている。とくに特定芳香族アミンの規制が始まり、アゾ基を持たない天然染料が見直されている。本研究では、高機能性合成繊維「新合繊」を凌駕する羊毛繊維の染色に天然染料染色の濃色化、天然由来物質の酵素を染色加工へ応用することを試みた。酸化還元酵素ラッカーゼによる脱色は天然染料-羊毛染色の残液脱色すなわち節水効果が期待できる。一方、ラッカーゼの添加によって天然染料染色の濃色化が可能になったことから、従来の金属媒染とは異なる環境配慮型染色の一つの方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Eco-friendly dyeing was carried out using wool fibers, natural dyes and an enzyme. Laccase have two effects on natural dyes. In the first case natural dyes are decomposed and decolorized by the addition of laccase. This is due to decomposition of the conjugated double bond. In the second case hydrogen atoms of the dye are attracted. Thus conjugated systems become long and colors are developed.

Hematoxylin shows almost colorless. The dye became a color material within few minutes. This is due to the second mechanism. The wool fibers were dyed with the hematoxylin and laccase. The fibers showed large K/S values. This is due to absorption of the colored materials. But after one hour the color showed decrease of K/S value. After the addition of baicalin and laccase the solution changed color at 450nm. This color continued stably for long time. The fibers were dyed using baicalin and laccase and were shown high K/S values. Rutin was not dyed for the fibers.

研究分野：繊維染色加工

キーワード：羊毛 天然染料 染色 酵素

1. 研究開始当初の背景

染色工程には、繊維、染料、染色助剤、染色媒体（主として水）があり、21種の相互作用が働き、染色が進行する。そのため、多量の水、エネルギー、化学物質を使用することから、環境への負荷が大きいことが問題となっており、これらの削減は喫緊の課題である。

合成染料は、特定芳香族アミンを生成する一部のアゾ染料が規制の対象となったことから[1] 発色系にアゾ基を持つものがない天然染料が最近見直されてきている。しかしながら、天然染料は堅ろう性が低いため、媒染剤を用いた染色が一般的である。大量の排液中に金属媒染剤が含まれることは環境への負荷が大きいことが予想され、今後生分解性のよい染色助剤が必要となる。

衣料用繊維は高機能性を付与した合成繊維が市場を席巻しているが、天然繊維の羊毛は、はっ水性、吸水性、難燃性、セットン性、弾力性、防汚性、消臭性、保温性そして染色性に優れ、最近の新合繊の風合い、快適性を凌駕する持続可能な高機能性繊維である。

先に我々は、生体由来物質である酵素のうち酸化還元酵素に分類されるラッカーゼを用いて、合成染料の退色挙動を検討した[2]。ラッカーゼは退色反応のほかに、多価フェノールの水酸基から水素を引き抜き、キノノイド構造を形成する働きをもつが、この作用はあまり有効活用されていない。天然染料には多価フェノール性の水酸基を有するものがあり、ラッカーゼの酸化作用による発色が予想され、金属媒染剤の代替として応用できる可能性がある。

以上のように、天然繊維（羊毛）天然染料 酵素の系による染色が可能となれば、次世代の環境調和型染色への一助となると考えられる。

2. 研究の目的

近年、環境への負荷を低減する環境調和型エコフレンドリー染色加工が強く要請されており、合成化学物質の代わりに天然由来物質の活用が期待されている。本研究は、生体由来物質の天然繊維（羊毛）天然染料および酸化還元酵素（ラッカーゼ）を用いて、持続可能な環境調和型染色加工を目指すことを目的とする。

ラッカーゼには、2つの作用、すなわち、色素の脱色と発色がある。そこで、種々の天然染料に対するラッカーゼの退色および発色挙動を調べる。退色が確認できた天然染料においては、染色排液にラッカーゼを添加することで節水への一助とし、発色が確認できた天然染料は、羊毛の染色へと展開し、金属媒染剤を用いずに濃色化する条件を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

3 - 1. 試料

羊毛は JIS 添付白布（JIS L 0801）を精練せずにそのまま用いた。

3 - 2. 染料

酵素ラッカーゼによる天然色素の退色・発色挙動を知るため、構造既知で試薬として市販されている色素 7 種を用いた。インジゴをスルホン化し水溶性を示すインジゴカルミン [I]、コチニールの色素カルミン酸 [II]、キハダから得られるベルベリン [III]、マメ科のログウッドに含まれるヘマトキシリン [IV]、ヘマテイン [V]、コガネバナなどに含まれるバイカリン [VI]、そしてエンジュやソバの実に含まれるルチン [VII] である。いずれも東京化成から購入した試薬 1 級のもので、精製せずに使用した。それぞれの色素構造を図 1 に示す。

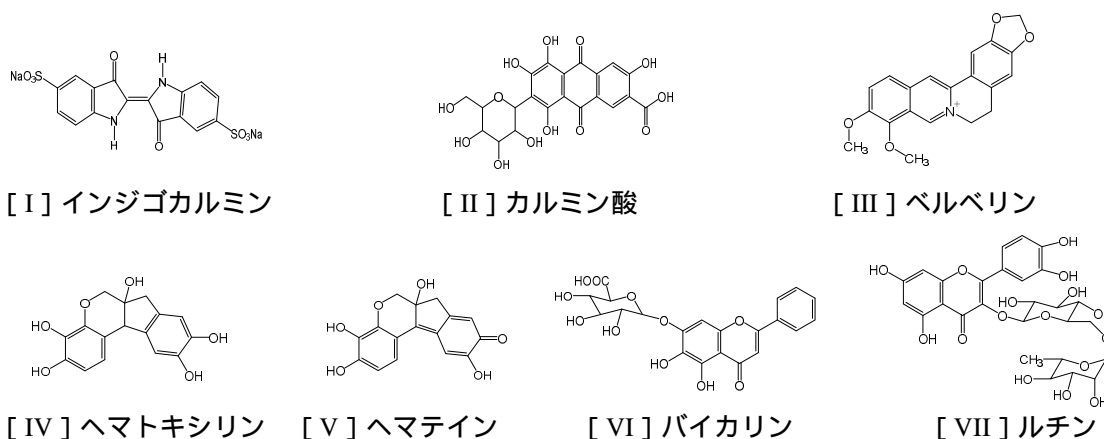


図 1. 用いた天然染料の化学構造

3 - 3. 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。

3 - 4. メディエーター

電子伝達物質である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)を用いた。

3 - 5 . 色素の退色、発色挙動の測定

溶媒として0.1M酢酸 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)または蒸留水を用いて、色素濃度 0.05 g dm⁻³、酵素濃度 0.17 g dm⁻³、メディエーター濃度 0.003 g dm⁻³とし、常温および45℃で1分ごとに計30分間、可視部吸収スペクトルを測定した。

退色速度曲線より、式(1)を用いて、退色速度定数を求めた。

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

ここで、k(min⁻¹)は退色速度定数、OD₀は染料の極大吸収波長における初期光学密度(初期染料濃度に対応)、OD_tは反応時間tにおける光学密度を示す。

3 - 6 . 羊毛染色

ラッカーゼ添加によって発色が確認できた色素を用い、羊毛繊維への染色性を検討した。色素 0.67 g dm⁻³、ラッカーゼ 0.17 g dm⁻³、PPT 0.003 g dm⁻³を0.1 M酢酸 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で調整し、浴比 1:100、45℃、1時間染色した。自然乾燥後、染色布の表面反射率をC光源、2°視野で測定し、K/S曲線を求めた。

4 . 研究成果

4 - 1 . インジゴカルミンに対するラッカーゼ添加効果

藍の色素インジゴは水不溶性であることから、インジゴをスルホン化し水溶性が付与されたインジゴカルミンを用いてラッカーゼ、メディエーターを添加し、室温および45℃の条件でその効果を調べた。図2の(a)はラッカーゼ単独(室温)、(b)はラッカーゼ/PPT共存下、ラッカーゼの至適温度45℃で測定したインジゴカルミンの吸収スペクトルである。

図2(a)より、ラッカーゼ単独(室温)ではインジゴカルミンに対する退色は認められなかった。しかしながら、図2(b)より、ラッカーゼ/PPT添加(45℃)では時間とともに600nmの吸光度が大きく低下し、退色が認められた。

そこで、インジゴカルミンについて、退色挙動を定量的に取り扱うために、 $\ln(OD_0/OD_t) \sim$ 時間曲線を調べた。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(min⁻¹)を式(1)より算出した。その結果、ラッカーゼ単独の室温および45℃のk(min⁻¹)は0、メディエーター共存下において、室温は0.017、45℃で0.056となり、約3倍退色効果が高いことがわかった。

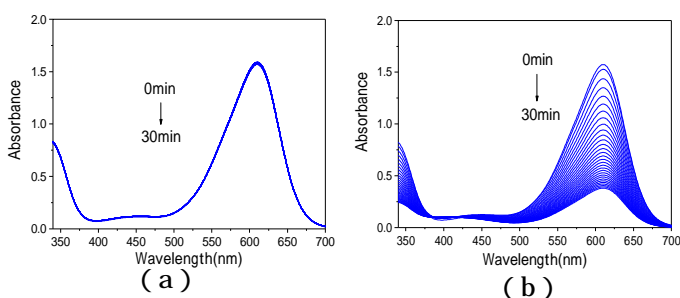


図2. インジゴカルミンに対するラッカーゼ、PPT添加効果
(a)ラッカーゼ、室温 (b)ラッカーゼ/PPT、45℃

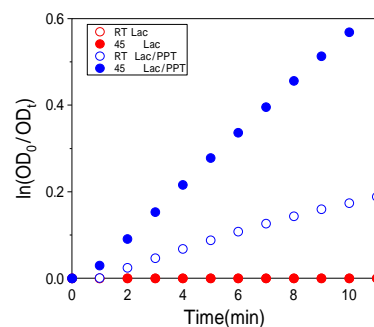


図3. インジゴカルミン/ラッカーゼ/PPTの見かけの退色速度曲線

4 - 2 . カルミン酸に対するラッカーゼの効果

コチニールの色素であるカルミン酸にラッカーゼおよびメディエーターを添加し、その挙動を検討した。室温下においても20分以内でほとんど退色したことから、カルミン酸はラッカーゼによる退色効果が大きく、メディエーターを添加すると退色効果はさらに大きくなることがわかった。カルミン酸はキノイド構造を持つ天然染料であるが、このような結果は、キノイド構造を持つ合成染料と同様である[2]。

そこで、カルミン酸についてもインジゴカルミンと同様に、退色挙動を定量的に調べた。その結果、ラッカーゼ単独(室温)のk(min⁻¹)に比べ、45℃のそれは約8倍増加し、メディエーター共存下においても室温に比べて45℃で約3.5倍の値を示した。

インジゴカルミンおよびカルミン酸に対する退色挙動の結果から、用いたラッカーゼの基質特異性は非常に大きく、天然染料においてもキノイド構造、アントラキノン構造をもつ色素に対する分解作用は非常に顕著であることがわかった。

4 - 3 . ベルベリンに対するラッカーゼ添加効果

キノイド構造を持たず、カチオンサイトを有するベルベリン[III]に対するラッカーゼ添加後の吸収スペクトルを調べた。ベルベリンは常温で溶解しなかったため、上澄み液を用いた。

45 の条件下においても、ラッカーゼ/メディエーターの添加による退色は全く認められなかった。アクリジンオレンジ系およびトリフェニルメタン系のカチオン構造を持つ合成染料と同様であった [2]

4-4. ヘマテインに対するラッカーゼ添加効果

多くの水酸基を持ち、キノノイド構造を有するヘマテイン [V] について調べた。

0.1M 酢酸 酢酸ナトリウム緩衝溶液に溶解したヘマテインは明確な λ_{\max} を示さないが、ラッカーゼ添加によって紫外可視吸収スペクトル全体が時間とともに上昇する傾向がみられた。とくに、420nm 付近に等吸収点を示すことから、ヘマテインとは異なる構造の色素が形成されたことを示唆している。つまり、ヘマテインの水酸基の一部がラッカーゼによって酸化され、キノノイド構造を形成し、濃色化したと推察される。

4-5. カテコール構造を有する色素に対するラッカーゼ添加効果

ヘマテイン色素はラッカーゼによって濃色化することが分かった。そこで、ヘマテインの前駆物質であり、カテコール構造を2つ有するヘマトキシリン [IV] に対するラッカーゼおよびラッカーゼ/PPT の添加効果を室温および45 で調べた。

図4は室温においてヘマトキシリンにラッカーゼを添加した結果であるが、ほとんど無色であったヘマトキシリンの可視吸収スペクトルは450 nm 付近に極大吸収を示し、3分後にはそのピークは短波長にシフトし、さらに時間の経過とともに短波長ピークは減少する傾向を示した。PPTを添加した場合もその挙動はほとんど同じである。また、ラッカーゼの至適温度に近い45 においてはラッカーゼの作用はより顕著になった。

ヘマトキシリンはキノノイド構造を持たないため共役系は短く、それ自身はほとんど無色であるが、カテコール構造を2つ有するため水酸基を多くもつ。この水酸基はラッカーゼ添加によって酸化されキノノイド構造となり、ほとんど無色のヘマトキシリンが発色して450 nm 付近にピークを示したと推察される。しかしながら、ラッカーゼのもう一つの作用によって還元され、形成されたキノノイド構造を持つ発色物質が速やかに分解したと考えられる。

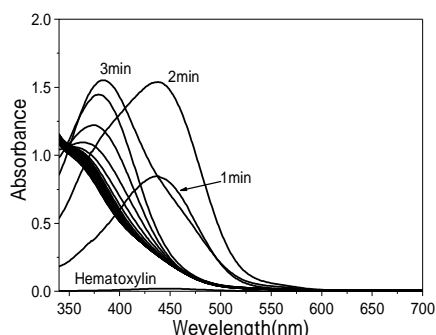


図4. ヘマトキシリン/ラッカーゼの吸収スペクトル (室温、pH4.5)

4-6. フラボン・フラボノール系色素に対するラッカーゼ添加効果

フラボン・フラボノール系色素のバイカリン、ルチンを用いてラッカーゼ添加の影響について、吸収スペクトルを中心に検討した。

室温で溶解しなかったバイカリンは60 まで加温後、室温に戻して用いた。ルチンは90 で加熱後、室温に戻し上澄み液を用いた。酵素濃度は 1 g dm^{-3} 、メディエーター濃度 0.2 g dm^{-3} とし、セル内で染料：酵素：メディエーターを2：1：1の割合になるように調整し、45 で30分間、可視吸収スペクトルを測定した。

まず、バイカリンのラッカーゼ添加前の吸収スペクトルは、450nm よりも長波長側において吸光度はほぼ0を示し、350nm 近辺の短波長の吸収が大きく、溶液は淡い黄色を呈していた。ラッカーゼ添加1分後には、450nm 付近の吸光度が増加し、30分後には約5倍の値となった。

このようなラッカーゼ添加による吸光度の増加は、バイカリンの構造が変化したことを示唆している。ラッカーゼはフェノール性化合物のオルトおよびパラ位にある OH から水素を引き抜き、ラッカーゼによって5-位の水酸基のみ酸化され、 $\text{O}=\text{C}$ 二重結合となり、発色に寄与したものと推察される。

次に、ルチンに対するラッカーゼおよびメディエーター添加効果を調べた。0分では350nm に極大吸収が認められ、425nm より長波長側では吸収はほとんど認められなかった。しかしながら、ラッカーゼを添加すると、長波長側の吸光度が上昇し、400nm 付近で等吸収点を示し、350nm の吸収が低下した。メディエーターを添加した場合も同じ傾向を示し、ラッカーゼ単独に比べて、若干長波長側の吸収が大きな値を示した。

以上の結果から、フラボン・フラボノールの天然色素に対するラッカーゼの効果は、ナフタレン環のパラ、オルト位に水酸基を有する構造に比べて、カテコール構造の水酸基を優先的に酸化し、キノノイド構造を形成することによって発色が期待できることがわかった。

4-7. ヘマトキシリン/ラッカーゼによる羊毛染色

ヘマトキシリン/ラッカーゼ系を羊毛染色に応用した。その結果を表1に示す。表1より、目視において、ラッカーゼ添加後すぐに染色した羊毛の濃色化が確認できた。

そこで、K/S 値を求めて比較した。ヘマトキシリン単独では、未染色布の K/S 曲線とほぼ同じ値であり、発色は認められなかった。しかしながら、ヘマトキシリン/ラッカーゼおよびヘマトキシリン/ラッカーゼ/PPT を調整後、すぐに染色した羊毛の K/S 曲線は、400nm 付近のピークと 575nm 付近のショルダーピークを有しており、かなり大きい値を示していた。一方、調整後1時間経過した後に染色した羊毛の K/S 曲線は、調整後すぐに染色した場合に比べ400nm 付近のピークは半分以下となり、575nm 付近のショルダーピークは消失していた。そのため、K/S 値が低下することが明らかになった。

このような結果から、調整直後に生成された発色物質は羊毛に速やかに吸着し、媒染剤を使用せずに羊毛の濃色染色が可能となることが分かった。しかしながら、図4のヘマトキシリン/ラッカーゼ系の吸収スペクトルが示すように、時間経過とともに発色物質は分解されるため、1時間後の染色では K/S 値が低下したと推定される。

表1. ヘマトキシリン/ラッカーゼ/PPT 羊毛染色

条件	ヘマトキシリンのみ	ヘマトキシリン/ラッカーゼ		ヘマトキシリン/ラッカーゼ/PPT	
		調整後 すぐに染色	調整1時間後 に染色	調整後 すぐに染色	調整1時間後 に染色
染色布 (羊毛)					

4-8. バイカリン/ラッカーゼによる羊毛染色

バイカリン/ラッカーゼ、ルチン/ラッカーゼを羊毛染色に応用した。バイカリン単独に比べ、バイカリン/ラッカーゼ染色羊毛の方が 440~560nm の範囲で K/S 値が高く、若干濃色に染まった。一方、ルチン単独、ルチン/ラッカーゼ染色羊毛の K/S 値はほとんど変わらず、濃色化は得られなかった。

バイカリンはルチンに比べ、その色素構造は小さい。本研究での染色温度は 45 であり、バイカリン/ラッカーゼの色素は羊毛繊維内部へ比較的拡散しやすかったと推察される。

4-9. まとめ

本研究で用いたラッカーゼは、天然染料のうち、その発色がアントラキノンあるいはキノイド構造が主である場合、色素の退色に特異的に作用することが明らかとなった。一方、多くの水酸基を有し、カテコール構造やナフタレン環に隣り合う水酸基が位置する構造を有する天然染料の場合には、ラッカーゼ添加による発色効果が大きいことが分かった。

このような事実をもとに、生体由来物質の活用、すなわち天然染料染色における節水や移染防止を視野に入れたラッカーゼの検討、天然繊維 天然染料染色における媒染剤の代替としてラッカーゼの発色作用を展開することは、地球環境の改善に不可欠な持続可能な開発に貢献できるものと考えられる。

文献

- [1] 平成 27 年政令第 175 号有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第 2 条第 2 項の物質を定める政令の一部を改定する政令(2016 年 4 月 1 日施行)
- [2] 長嶋, 石川, 高岸, 織学誌, **69**, pp.183-190 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 長嶋直子、高岸徹	4. 巻 69
2. 論文標題 ヘマトキシリンに対するラッカーゼの効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 (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	6. 最初と最後の頁 47,50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長嶋直子、高岸徹	4. 巻 68
2. 論文標題 天然染料およびラッカーゼ酵素を用いる環境調和型羊毛染色	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 (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	6. 最初と最後の頁 51,54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長嶋直子、高岸徹	4. 巻 70
2. 論文標題 天然染料に対するラッカーゼの効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 (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	6. 最初と最後の頁 44,47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長嶋直子、高岸徹
2. 発表標題 ヘマトキシリンに対するラッカーゼの効果
3. 学会等名 第55回染色化学討論会 主催：（一社）繊維学会 染色研究委員会（福井・福井大）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長嶋直子
2. 発表標題 染料に対するラッカーゼの作用
3. 学会等名 第32回東海支部若手研究発表会 共催：(一社)日本繊維製品消費科学会東海支部、(一社)繊維学会東海支部、(一社)日本繊維機械学会東海支部 (愛知・金城学院大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長嶋直子、高岸徹
2. 発表標題 天然染料およびラッカーゼ酵素を用いる環境調和型羊毛染色
3. 学会等名 第54回染色化学討論会 主催：(一社)繊維学会 染色研究委員会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長嶋直子、高岸徹
2. 発表標題 天然染料に対するラッカーゼの影響
3. 学会等名 第56回染色化学討論会 主催：(一社)繊維学会 秋季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶋直子
2. 発表標題 持続可能な繊維染色加工
3. 学会等名 被服材料学部会夏季セミナー 主催：(一社)日本家政学会 被服材料学部会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高岸 徹 (TAKAGISHI Toru)		