

## 繊維および繊維製品に対するカビの 影響について（第8報）

佐藤 睦子

The Influences for Fibers and their Products by Molds (Part 8)

MUTSUKO SATO

カビによる絹糸の崩壊に関する走査型電子顕微鏡的研究  
Scanning Electron Micrographic Investigation on the  
Destruction of Silk Yarus Damaged by Molds.

<sup>1),2),3)</sup>  
前報におけるカビ傷害による絹糸の表面構造や強伸度変化、さらにフィブロイン溶液の粘度低下などからみた脆化現象をより明確にする目的で、再びフィブロインに *Aspergillus niger* ATCC 6275 (AN) を接種培養したものと塩酸処理したものについて走査型電子顕微鏡を用いてその表面構造を比較し、また AN 抽出液などを作用させてその窒素成分変化を検討した結果、AN のフィブロインに対する作用はその酸性プロテアーゼなどによる相乗的作用であることが認められ、またそれは非結晶部分に大きく作用する濃塩酸の加水分解作用とほぼ同傾向の溶分解機構を示し、それらはフィブロインの熱変性や過酸化水素および光酸化による脆化と類似の形態を示すことが明らかとなり、また汚染繊維の染着条件、その漂白処理などの検討からその色素の性質を考察した。

### I 緒 言

従来より生糸精練の立場から検討されたり利用されたパパイニン、トリプシンや細菌のプロテアーゼはフィブロインに対して影響を与えなかったが<sup>4)</sup>、セリシン保護のない場合はカビ酵素によって作用を受けている<sup>2)</sup> ことからさらにそれについてその作用機構の一端を究明した。その結果を報告する。

### II 実験方法

#### 1) 試料とカビ

練糸 正量番手 15D×2 21中双糸（京都市染織試験場提供）

調整と滅菌処理は前報<sup>1)</sup>の方法により処理した。  
*Aspergillus niger* ATCC 6275 (AN)

2) 孢子懸濁液の調製、接種、培養、および確認培地すべて前報<sup>1)</sup>に準じて処理した。

#### 3) 接種糸の pH 測定

培養日数 6, 10, 20, 30日の試料それぞれを純水抽出したものについて pH を測定した。

#### 4) 塩酸処理

長さ数ミリの試料を次の条件で処理した。  
塩酸濃度 5, 10, 15, 20, 25, 30%  
0~1 hr. ×30°C (浴比 1:30)

#### 5) 光学的検鏡と走査型電子顕微鏡観察

先づ接種糸と塩酸処理糸について光学的検鏡を行い、さらにそれらの一部をとって超高分解能走査型電子顕微鏡（日立明石 HFS-2S, MINI SEM）観察撮影を行った。蒸着金属には金を用い厚さは 700 Å また加速電圧は15KV である。

#### 6) AN 抽出液、透析内液、透析外液、酵素失活液の調製

先づ前報<sup>5)</sup>による方法で AN抽出液を得、（但し、食塩水は純水に変える）それを三等分し、一つはそのまま

減圧濃縮，凍結乾燥し，また一つは透析を加えて凍結乾燥させ，それらを純水で各1%溶液のものとし，トリオール少量を加えて抽出液と透析内液に供した．残りを熱による酵素失活液とし，これと減圧濃縮した透析外液を各規定の溶液にし比較に用いた．また各溶液のpHを測定した．

#### 7) 4種の溶液処理

試料50mg 内外を浴比1:50 30°C×48hr. で作用させた．対照としては各4種溶液および測定した各pHの純水処理試料4種を用いた．

#### 8) 4種溶液処理試料の光学的検鏡

各残留試料と作用溶液微量をとって観察した．

#### 9) 試料の全窒素量と非蛋白性物質生成量の測定

処理後の残留試料を洗浄遠沈し，マイクロケルダール法で全窒素を定量した．さらに透析で酵素蛋白を除いた作用溶液について Folin-Ciocalteu<sup>9)</sup> 法によって非蛋白性分解産物の測定を行った．比色に供する試料溶液調製にはその都度トリオールを用いた．なおpHによる分光吸収差はみられなかった．

#### 10) 汚染試料の脱色処理

次の条件で行った．

0.3%過酸化水素60°C×6hr., 0.8%ハイドロサルファイト 40°C×6hr.(浴比1:50)

### III 実験結果と考察

1) フィブロインの酸処理について多くの報告<sup>7),8)</sup>があるがここでの光学的検鏡結果によると，殆ど繊維巾を1.5倍に膨化させる時間は塩酸5%では90分，15%では45分であり，いずれも若干3倍のものやフィブリル様のものもみられる．20%から25%に濃度が進むと2倍になるのは25分が10分に，また繊維の一端に癒着状態のフィブリル様分岐繊維がみられるのは2時間が20分と短縮される．そして25%のものでは繊維の端からはなれた中間部にフィブリル様形態変化の表われるのは90分かかる．また分離した繊維の網目状細片の出現は20%で4時間，25%で2時間，30%で20分である．此様に濃度による変化はみられるが，そしてこれらの条件ではいずれも殆ど不溶であるが，これらのなかには物理的ショックで枝条様フィブリルを表わすものを含んでいる．

ところで接種系も前報<sup>2)</sup>と同結果即ちカビ発生の著しい部分はかなり3.3倍と膨化し，また癒着状態の網目構造やフィブリル様形態変化を表わしており，この傷害像と同程度の構造変化を示した塩酸処理条件は25%90分，30%20分いずれも30°C作用であったのでそれらを比較に選んで電顕観察に供した純果 plate 1~18 を

得た．

1)は対照フィブロインの5000倍像であり，よく知られている<sup>9)</sup>ように繊維軸方向の平行な細いみぞはフィブリル構造が浮き出しているものと思われる．2)~9)は接種系の傷害像であるが先づ2)は光検でかなり膨化していたものの13000倍である．樹脂状の凹凸構造を呈し巾方向にたたまれている結果，細いが全体としてはやはり膨化してさらに収縮している感じがある．3)は6000倍であるが，2)よりも作用が進行した場合とみられ，粒状の隆起をもつ構造が多数表われて平坦部には不規則な陥没がみられる．4)も6000倍であるが陥没集中部にはクラックが入り切断され，また反対側にも大きなクラックがみられる．5)は4)と類似部の13000倍であるがフィブリル様の分岐細繊維がみられる．6)7)は4000倍と6000倍であるが7)ではいわゆるマイクロフィブリル様の微細繊維束がみられ細いものは300Åの巾を示し文献<sup>9)</sup>と一致している．8)9)はいずれも4000倍である．陥没はかなり広面に深厚化されて複雑なクレパスを呈し，8)のくびれた様な細部は溶解の結果であろうか．

10)以下は塩酸処理のものであるが，先づ10)の4000倍ではフィブリル様のたてみぞが繊維軸と平行に収縮しており，続いてたて方向にも収縮している形跡がある．11)も同倍率であるが，これは10)よりも塩酸処理が強いために繊維軸に直角な波状収縮を起し一部にクラックの発生がみられる．12)はさきの13000倍であるがここにみられる代表的な酸縮現象は繊維長さを大きくちぢめ，またカビの場合に比べて膨化度が大きいことからフィブロインからの溶解物量は少ないようである．13)~16)はいずれも25分作用の6000倍であり酸縮に加えて不規則な方向に多数のクラックを生じ作用の強さをあらわしている．結晶，非結晶領域に関係なく繊維表面からの均一な溶出であるアルカリ作用と異なり酸作用は非結晶から始まるとされているが<sup>8)</sup>，ここでもその様な傾向がみられる．

これらの比較からカビの酵素作用による場合も濃塩酸作用に近い様な水解機構をもつことがその構造変化から推測出来るが併し酵素の方がよりランダムにフィブロイン分子をアタックするようである．

また酵素によるクレパス状裂け目は結果的には熱分解や<sup>9),10)</sup>過酸化水素<sup>11)</sup>および光酸化分解<sup>12,13)</sup>，とくに酸化における傷害像いわゆる非結晶部分の横の切断であるクレーズと類似の形態を示し，その部分のペプチド結合切断数はかなり多いと思われる．

2) 透析外液以外の3種作用液はいずれも同じ呈色液であったにも拘らず，抽出液と酵素失活液処理の残留

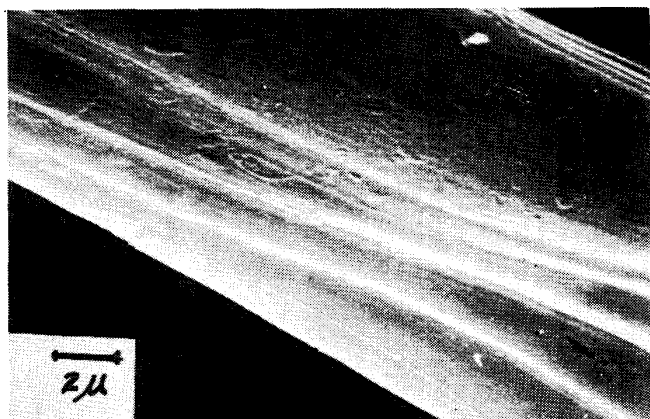


Plate 1



Plate 2

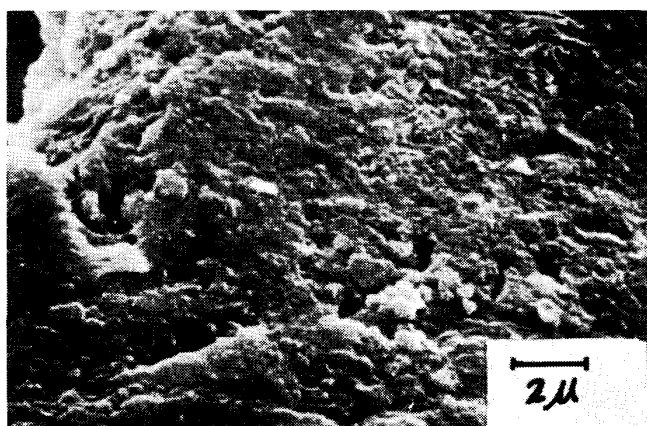


Plate 3



Plate 4

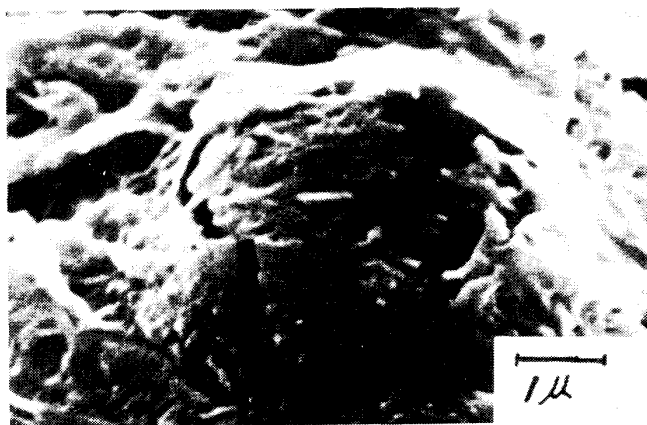


Plate 5



Plate 6

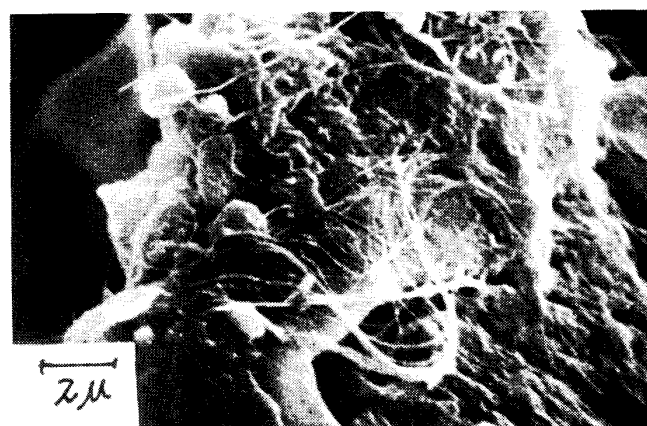


Plate 7

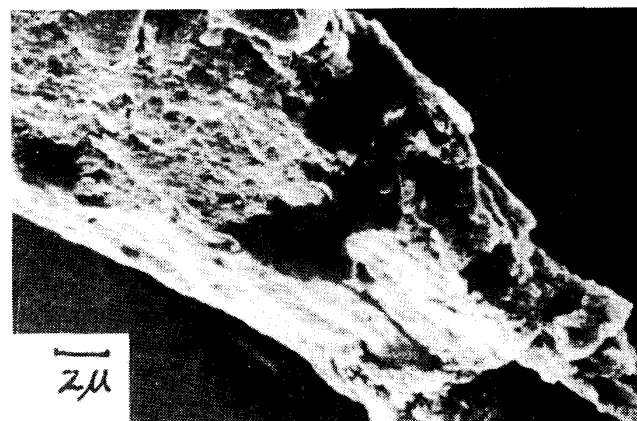


Plate 8



Plate 9

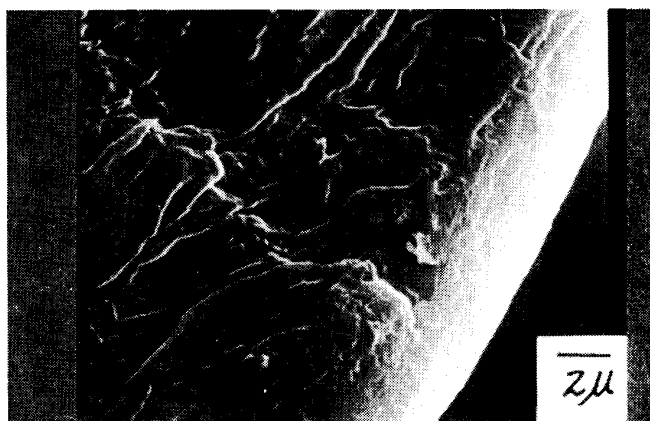


Plate 10

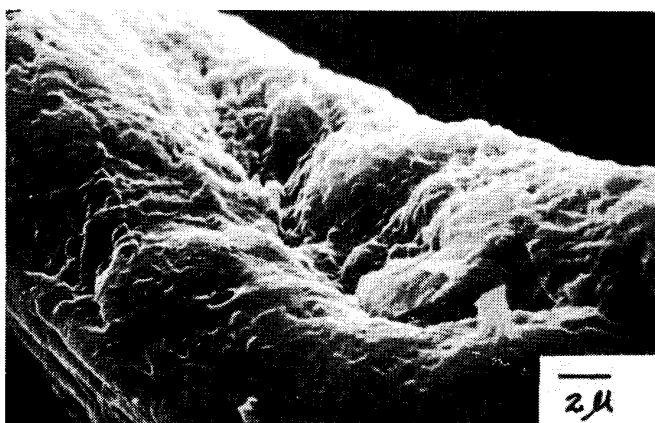


Plate 11

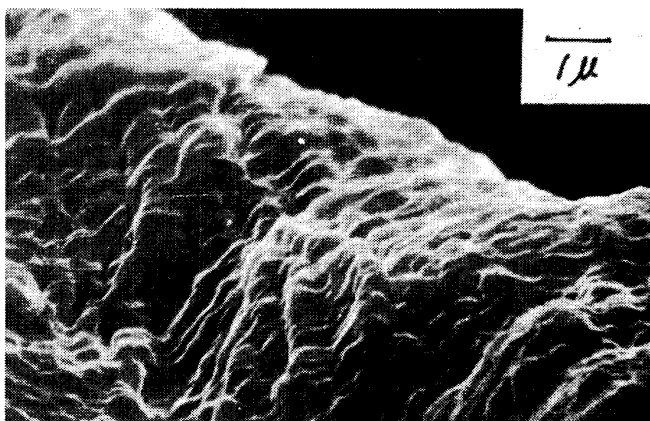


Plate 12

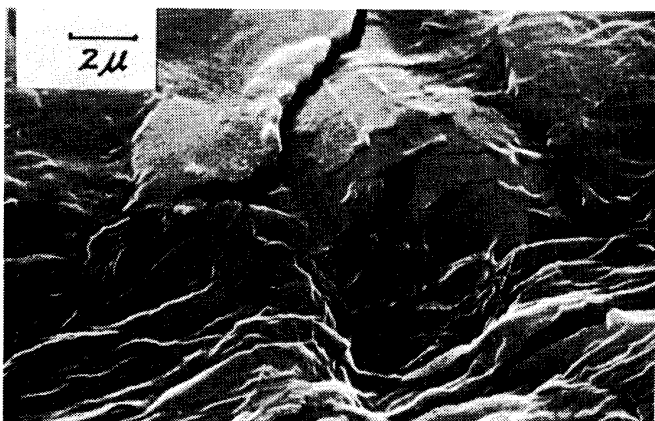


Plate 13

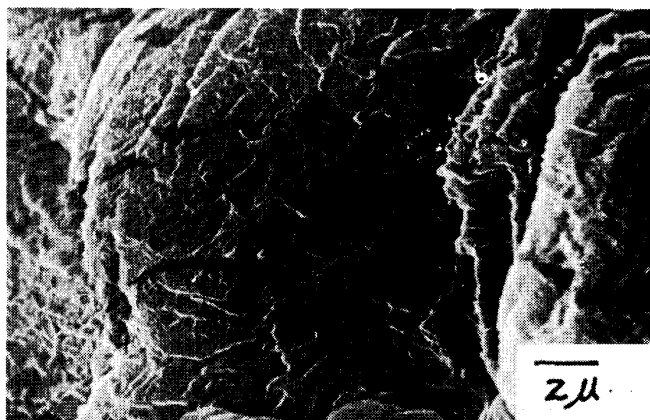


Plate 14

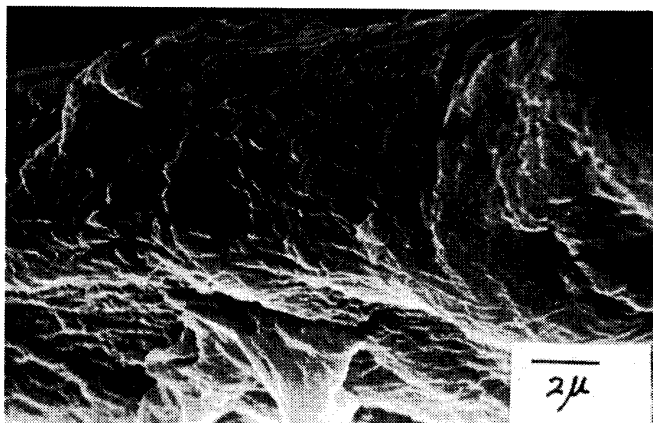


Plate 15

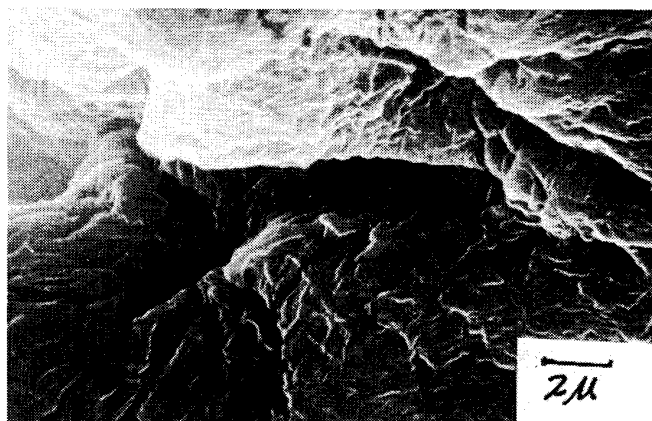


Plate 16

試料のみ著しくANの褐色に染色されている。(前報<sup>14)</sup>ではこれを測色している。)そしてそれは非常に堅牢で酸化、還元いづれの作用でも漂白不能の結果を示した。4種溶液のpHはAN抽出液3.16, 透析内液5.6, 透析外液2.9, 酵素失活液2.8であったため、これは酸性浴で染まる性質のものである。しかもpH 3附近でもかなりの濃さに染まるということは、官能基に強いSO<sub>3</sub><sup>-</sup>H基のようなものでなく弱いOH<sup>-</sup>基などを持った色素酸であろう。ところで文献<sup>15)</sup>によるとAN菌糸体からの抽出液は鉄を含んでおり、その色素はキサントン誘導体であるAsperxanthone (=Flavasperone<sup>16)</sup>), 1-hydroxy dimethoxymethylxantone C<sub>13</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (OMe)<sub>2</sub> Me とされており<sup>15)</sup>, 上述の所見を裏付け、即ち酸性側でカチオン化したフィブロインのアミノ基と造塩する酸性染料のアントラキノン系のものである。そしてこの場合、繊維に吸着した鉄と染料が、或いは繊維に吸着した染料に鉄がキレート結合してそこに媒染性をも付与したため、30℃×48hr. というような低い条件でも強固な染着となったのであろう。さらに分泌物中には他にも染色現象に助剂的な役割を果す物質が含まれていたかも知れないし、フィブロインにとってはアルカリ側のpH 5.6で鉄は除かれた条件である透析内液処理の残留試料が不染であったのも当然である。

3) 抽出液と透析内液処理試料の光学的検鏡結果については、これら2種溶液間に程度の差はあるがいつでも生菌接種系の場合と同様の傷害であり、また抽出液中には高濃度塩酸処理の場合と同様なフィブロインの網目状細片が若干浮遊しており、これは洗浄で溶解フィブロイン群の一部になるのであろう。

窒素の変化

作用 (pH)	窒素減少率(%)	溶解フィブロイン量 (卵白Alb相当量 $\gamma$ )
抽出液	-10.4	948
透析内液	-0.3	28
透析外液	-0.1	0
酵素失活液	0	0

として燐蛋白およびアルブミン様のものが明らかにされている<sup>17)</sup>が、この場合透析外液処理のもの分解物量が0であったことから酵素蛋白以外の窒素はでないことがわかる。次に全窒素減少率-10.4%を示した抽出液処理のものの特長が問題となり、非蛋白性物質生成量がこれを裏付け即ちAlb相当量として948 $\gamma$ を示している。ところでフィブロイン表面には疎水性蛋白質がでていたため直接的には酵素作用を受けない

けれど、アンモニア精練によって表面がエッチングをおこした場合には酵素作用を受け易くなるとされている。本実験の精練法からはこれは考えられない。ここでは、透析外液や酵素失活液作用の影響はないが酵素の存在するところ、抽出液、透析内液作用では影響がでてきている。そしてそれは殆ど酵素だけの透析内液作用では28 $\gamma$ という僅少であるが抽出液という酵素と分泌物両者の共存する場合には948 $\gamma$ という大きな値となっており、このフィブロイン溶解量からANの酸性プロテアーゼが判明したことになる。この値には溶出されたアミノ酸だけでなく、透析によった酵素蛋白と溶解群との分離からは、おそらくトリペプチド程度の分解物も含まれているだろうし、948 $\gamma$ という値は試料の窒素減少量970 $\gamma$ に近似値である。

ANは蔞酸、クエン酸を産生し、分泌する3種のプロテアーゼ、中性、弱酸性、酸性のうち主なものはAspergillopeptidase Aといわれる酸性プロテアーゼ<sup>18)</sup> (pH1.5~6.0, とくに2.0附近)で、それはペプシン様のものであるとされている<sup>19)</sup>。分子量は35000<sup>20)</sup>、その構造は不明であり、基質特異性<sup>21, 22)</sup>はペプシンよりも広いとされている<sup>23)</sup>。

30日間培養した接種系のpH変化も5.5→3.1→4.9であったが、これは培養中の各次点での平均的なものであり、或いは酸性度のもっと強い時や部分もあっただろう。一般的にAspergillaceaeにはパバイン型(pH5.0)のプロテアーゼもあるといわれている<sup>24)</sup>ことからANの弱酸性プロテアーゼがこれに当り、培養の初期と後期にはこれが関与したかも知れないし、透析内液作用pHが5.6であった場合の溶解フィブロイン量28 $\gamma$ もこのパバイン型の弱酸性プロテアーゼが原因していたのかもしれない。この値も試料の窒素減少量28 $\gamma$ と一致し実験誤差とは見なされない。いづれにしてもフィブロインの酵素作用に対しては好適なカビなのであろう。

フィブロインの窒素を栄養源として著しい発生をしたカビの長期にわたる作用の場合は、分泌物などの影響で水素結合力が弱まり、おそらく分子鎖中のペプチド結合およびチロジン残基のフェノール性水酸基と、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ロイシンなどのカルボシル基が切断されてフィブロイン主鎖は酵素作用を受けることになるのではなからうか。酵素蛋白が分子間に入りその活性中心にとって化学的にも立体構造的にも適当な配置の基質部分と作用した結果、非結晶領域の溶解にともない続いて結晶部分が崩壊すると考えられ、これにはカビの相乗的作用の大きいことが明らかとなった。

5) 前報<sup>2)</sup>におけるカビにより著しく低下した引張り強伸度の値は、クラックや陥没などが形成されたために、丁度V字型ノッチをつけて測定していることになった結果であろうし、またその低下度が-50%と傷害形態が同傾向と認められた酸化による場合のそれに<sup>11), 12)</sup>近似値であるのも興味深いものである。

#### IV 総 括

走査型電子顕微鏡を用いて、ANによるフィブロイン傷害を、塩酸の作用を対照にし観察した結果、その作用機構の特長が明らかとなり、さらに窒素成分変化、溶解フィブロイン定量により、酸性プロテアーゼを主とするANの相乗的作用が認められ、またその汚染機構を検討することから若干の知見を得た。

(1976年7月31日受理)

#### 文 献

- 1) 佐藤 ; 京都府立大学学術報告, 17, (1966)
- 2) " " " " 19, (1968)
- 3) " " " " 20, (1969)
- 4) 皆川 ; 織学誌, 16, 507~513, (1960)
- 5) 佐藤 ; 京都府立大学学術報告, 25, (1974)
- 6) 日本化学会編 ; 実験化学講座23, 39, (1957)
- 7) 桑原 ; 織学誌, 24, 3, 108~112 (1968)
- 8) " ; 日蚕誌, 38, 1, 11~15 (1969)
- 9) " ; 織学誌, 23, 10, 477~483, 484~489, (1967)
- 10) 加藤他 ; 日蚕誌, 42, 3, 219~223, (1973)
- 11) 桑原 ; 織学誌, 24, 7, 330~335, (1968)
- 12) " ; " , 25, 2, 88~96, (1969)
- 13) " ; 日蚕誌, 39, 1, 18~22, (1970)
- 14) 佐藤 ; 京都府立大学学術報告, 18, (1967)
- 15) N. A. Lund et al ; J. Chem. Soc., 24, 34, (1953)
- 16) B. W. Bycroft. et al ; Soc., 40, (1962)
- 17) 友田他 ; 微生物工学講座5, 231, (1964)
- 18) ディクソン ; 酵素, 734, (1970)
- 19) Y. Koaze et al ; Agr. Biol. Chem. 28, 4, 216~223 (1964)
- 20) E. Ichishima et al ; Biochim. Biophys. Acta, 110, 155, (1965)
- 21) 山田 ; 微生物利用学概論, 307, (1974)
- 22) Boyer et al ; The Enzymes, 4, 212, (1960)
- 23) F. Yoshida et al ; Agr. Biol. chem. 25, 102, (1959)
- 24) 井口他 ; 日本農芸化学会誌, 29, 394, (1955)