

繊維および繊維製品に対するカビの影響について (第10報)

Aspergillus niger のセルラーゼによるアセテートの崩壊に関する走査型電子顕微鏡的研究

佐藤 睦子

The Influences for Fibers and their Products by Molds (Part 10)

Scanning Electron Microscopic Investigation on the Destruction of Acetates, Damaged by Cellulase of *Aspergillus niger*

MUTSUKO SATO

In previous papers, the damages of most available fibers were clarified on the disordering phenomena of surface structure and lowering of extensibility by molds. In present report, acetates which are slightly damageable by molds, were tested on the disordering with cellulase of *Aspergillus niger* for further research of the mechanism into this problem. Five acetates shown various degree of acetylation and chrySTALLINITY were selected for this experiment and cellulose I was carried out in control test. On the other hand, HCl or butylacetate were used in control agents of the treatment. The disordering of surface structure was observed with scanning electron microscopy and reduction of the total weight and intrinsic viscosity, $[\eta]$, were determined simultaneously.

As the results, the β -1,4 glucosidic bond of acetate was easily hydrolysed in acidic condition of pH 3.5. On the diacetate, the disordering effect was similar to that of cellulose I. It was suggested that the disordering of low acetylated acetate was influenced by the chrySTALLINITY more than acetylation degree. On the other hand, the triacetate which had high degere of acetylation and chrySTALLINITY, were slightly disordered and this damaging effect was similar to that of treatment with HCl or butylacetate.

I. 緒 言

現在でもアセテートの耐菌性問題については、一般論的にはその抵抗性説が優先している。しかしこれは天然セルロースと比較しての問題であって、アセテートもまた微生物の対称になり得るという若干の知見¹⁻³⁾もあることから、再びここで前報における強伸度低下の背景を追求し、作用メカニズムの一端を推測した。その結果を報告する。

II. 実験方法

1) 試料と酵素

試料 1	ジアセテート繊維	太さ 4.3 d
2	" フィルム	厚さ 0.05 m/m
3	" フィルター用繊維	太さ 4d, 捲縮度 25山/1 inch
4	トリアセテート繊維	太さ 3.8 d
5	" フィルム	厚さ 0.05m/m

6 脱脂綿 太さ 2.0 d

繊維はいづれもブライトであり、(三菱レイヨン K.K.), フィルムは電頭のレプリカ用, フィルターはダルである。(日本専売公社) 精製はいづれも四塩化炭素(常温処理)で行ない, 繊維, フィルターは数ミリ長さ, フィルムは1~2ミリ巾で数ミリ長さ, 綿はそのままの形で使用した。

密度勾配管法(四塩化炭素—*n*-ヘキサン 30°C)で比重測定した。

酵素は *Aspergillus niger* のセルラーゼ(Sigma 製) β -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase を用い, その酵素力は1時間にセルロースからグルコースを 1.0 μ モル遊離するのを1単位とした場合, この酵素 1 mg は1.43の力価である。

2) 酢化度と水分率測定

JISL-1037 ('77) により水分率, JISL-1036 ('77) の直接法により酢化度を測定した。

3) 酵素処理

各試料 1 g 内外を精秤し, 次の条件で作用させた。

0.1 M 酢酸塩緩衝液 pH 3.5, 6.0
(トルエン0.2%添加)

4% AN酵素溶液 (試料重量の約 $\frac{1}{2}$ 酵素量)
30°C, 1週間静置

なお, 対照は各 pH の純水処理試料である。

4) 溶媒処理

試料 1 に 10% 塩酸(常温), 酢酸ブチル(煮沸)を作用させた。

5) 走査型電子顕微鏡観察

酵素および溶媒処理した試料の表面構造について超高分解能走査型電子顕微鏡(日立 HFS-2S)で観察した。蒸着金属には金を用い厚さ 300~400 Å, 加速電圧 $V=15\sim 25$ kV, 試料傾斜度 $T=0^\circ$ である。

6) 酵素処理試料の重量と固有粘度測定

作用溶液の pH 変化を測定し, 基質残査を遠心分離, 水洗後, 精秤し重量減少率を求めた。

また, アセトン, 二塩化メチレン, 銅エチレンジアミン溶液(R 値=2.0のものを調製)を用いて 30°C で各試料の固有粘度 $[\eta]$ を測定した。

III. 実験結果と考察

1) Plate 1, 2 は試料 1 (DA Fiber) であり, 断面形状は乾式紡糸のたて溝が特長的である。

Plate 3 は試料 2 (DA Film) であり, キャスティング法によるフィルムのため表面に粒状構造が一方に並んでいる。

Plate 4, 5 は試料 3 (DA Filter) であり, フィルター効果を向上させるために典型的な Y 型断面を呈し, コア部は高い結晶性を有するものと思われる。

Plate 6 は試料 4 (TA Fiber) である。

Plate 7, 8 は試料 5 (TA Film) であるがこれは試料 2 と異り表裏の二面性があり, 従って艶消面となっている組織は非常に疎である。これは凹凸の多いキャスト板からはがし取った跡とみられる。

Plate 9 は試料 6 (Cotton) であり, 綿セルロースに特長的な斜め方向のフィブリル構造は美しい。

Plate 10~17 は全て酵素処理試料像である。

ところで試料 1~3 の測定した比重は $d=1.28, 1.30, 1.32$ であり, いづれもいわゆる不均一系アセチル化によるものとみられ, そのうちでも前 2 者は均一性が不充分であり, またフィルムは無配向結晶性高分子である。しかしフィルターは捲縮ヒートセットのために, コア部のクリスタットは大きく配向性も良好で, マトリックスの分子充填密度も高いとみられる。また Plate 2 と 5 の比較からフィルターはスキン層の厚さも薄い。

試料 4 (TAFiber), 5 (TA Film) は $d=1.27, 1.29$ で, 均一にアセチル化したポリマーであり, 上述のラテラルオーダーの違いも少い上に中極性のアセチル基が多いことも加わり, その化学反応性はより複雑である。これらのことはそのまま酵素作用に影響し, 即ち試料 1 の Plate 10, 試料 2 の Plate 11 にみられるように表面から膨潤し溶解してゆきフィブリル状を表わすかたちになって示されたり, また試料 3 の Plate 12 のように一部フィブリル構造を表わすが, それに至る溶解機構は高い結晶性のためにあまり膨潤させずにその弱い部分に侵入し, そこを溶解した結果 Plate 13 のような薄層剝離状となる場合, さらに試料 4 の Plate 14, 15 では高い酢化度のために膨潤しにくく薄層状剝離というより塊状剝離状を呈している。(14) はたて裂けであり, これがさらに横方向に作用を受け塊状破壊につながるのであろう。(15) ではフィブリルもみられる。

フィルムである試料 5 の Plate 16 も試料 4 の繊維と同傾向の破壊を示し, このことはジアセテート間でもみられた。即ち, 同じ酢化度の場合ではこの程度の配向性の違いならば酵素作用は影響しないことが解る。また, 低い重合度のアセテートに対し AN 酵素は適当な低膨潤剤として作用したためか, 強い膨潤収縮なしにフィブリル像が得られたと云える。

Plate 17 は試料 6 (Cotton) であり, 試料 1, 2 と同傾向の膨潤溶解とみられ, 即ち, ジアセテート程度の

Table 1. Properties of various Acetate Samples and changes of its Properties by Enzymic Hydrolysis

Sample	degree of acetylation %	density	water content %	weight %		viscosity (η) %
				pH 3.5	pH 6.0	
1 DA Fiber	54.1	1.28	6.5	-3.5	-2.0	-25.0 (1.18)
2 DA Film	54.2	1.30	3.4	-5.8	-3.9	-33.0 (0.75)
3 DA Filter	55.5	1.32	4.5	-1.0	-0.7	-8.1 (1.34)
4 TA Fiber	62.1	1.27	3.3	-2.6	-2.0	-17.0 (1.10)
5 TA Film	62.0	1.29	1.5	-3.1	-2.1	-30.0 (0.77)
6 Cotton	—	1.53	8.6	-7.1	-4.4	-56.0 (5.90)

* (): Original

置換ならばセルロース I より低い結晶性が主因となり、酵素作用機構そのものは変わらないと云える。

Plate 18 は塩酸作用のものたて割れ膨潤破壊であり、Plate 19 の酢酸ブチル作用ではスキン層のみ剝離溶解し柔くなり、たて方向に収縮した様相を呈し、これがまた溶解して再結晶したものが表面に隆起物の様に乗っているのが Plate 20 である。アセテートに対しては塩酸の方がより作用し易いことが解るし、またこれらと酵素傷害像とは類似形態を示している。

2) 表 1 は重量と固有粘度変化である。各対照試料の変化はみられなかった。重量変化と morphology とは直接的な相関々係はないが、しかしいづれも作用の強弱が誘因となる固有粘度変化とは関係深い有意性が認められる。固有のラテラルオーダーと置換度に支配されたアクセシビリティを物語る各変化値、なかでも高い結晶性のフィルターの値と、水に対して最も非アクセシブルだった TA フィルムなのに恐らくその無配向性と酵素に接する表面積の大きいせい故の値だろうこの両者の変化率がより特長的である。

綿やその誘導体 (プラスチックも含む) などの不溶性セルロースに対する AN セルラーゼ作用についての見解は多様性に富む。pH 2.3~2.5 の AN 酸性セルラーゼはよく働かないと云われ、⁴⁾ 否定的であるが、しかし肯定的な⁵⁻⁷⁾ ものものもある。筆者もさきに^{1,18)} ジアセテート繊維と綿繊維について AN の生菌、抽出液により強伸度低下と重合度低下を認めていた。また、セルロース I についてはあるがその結晶性と酵素作用による変化^{8,9)} 及び置換度の酵素抵抗性についての識見¹⁰⁾ ともこゝで一致しそれは明らかとなった。

ところで TAC の単位格子は単斜晶系の綿や再生セ

ルロースと異なり、擬斜方晶系の構造であり、それはアセチル基を空間に入れるために分子鎖間距離は増大しているが (8.35Å→24.5Å) 原料セルロースに類似しており、その繊維周期もほぼ対応する。分子鎖間距離の増大で分子間の水素結合力も弱くなり、アセテートは AN 酵素分子にとって空間障害とはならないであろう。使用した AN セルラーゼの分子量は明確ではないが Samuelson による¹¹⁾ とセルロース I の場合充分繊維内に入り得るとしており、それよりも分子鎖間距離の広いアセテートへの侵入可能性はたとえアセチル基の抵抗を受けて膨潤しにくく、そして分子間には疎水基同志の結合もあるだろうが、AN 酵素の適当な分子直径がプラスとなり内部に止まるものと充分考えられる。アセテートの場合、水系拡散係数は濃度依存性がない¹²⁾ と云われているが、水とともにマトリックスに入った AN セルラーゼはまず近辺の β -1,4-グルコシッド結合を水解する。そして酵素の拡散スペースが徐々に拡大して連鎖的に酵素反応が進行するのであろう。

その機作は重合度低下度から推測すると分解が繊維末端から進むと云はれる exo の酵素、細菌セルラーゼとは異なり、任意なランダム機構のようで endo 型酵素とみられ、一致する文献も多い^{13,14)}。しかし、セルロースの分子末端基はヘミアセタール構造をもち、加水分解性のアルデヒドプレカーサーである。一般的に酵素はランダム作用ではなくて多数の隣接するグルコース残基が取り去られるという見解¹⁵⁾ や、セルラーゼの純化標品は非還元性末端からのみ選択的に分解し、その分解機構は less random 又は pseudo exo-wise 型であるという知見の紹介¹⁶⁾ とも矛盾してくる。しかし、いづれにせよその強さは不溶性セルロー

ス分解菌として著明な¹⁷⁾ *Myrothecium Verrucaria* の比ではない。

なお AN にはセロビアーゼ (β -Glucosidase) もあり、さき^{1,18)} での生菌や抽出液の場合にはこれも関与し、セロビオーズやセロビオーズオクトアセテートが生じるなど、いはゆるセルラーゼの相助作用が6%というジアセテート強伸度低下率や、綿平均重合度低下率30%を与えたのであろう。

3) なお一般にセルラーゼの至適 pH は3.5~7.5と云はれて¹⁹⁾ おり3.5を選び比較に6.0をとったが酸性側で作用が大きい結果を得た。また、フィルターに1%混入していた酸化チタンはこの AN 酵素作用には何ら無関係と考えられる。

4) 耐菌性効果のためのキャラクターゼーションとしてアクリルニトリルでシアノエチル化することなどによりセルロース分子構造を一部変えているが^{20,21)}、綿にくらべ軽微な被害のアセテートといえどもやはり仕上加工の面で適当な処理の必然性を提起する。

IV. 総 括

前報¹⁾ におけるカビ傷害によるアセテート繊維の表面構造や強伸度変化からみた劣化現象をより明確にする目的でセルロース I を対称に酢化度と結晶性の異なるアセテート5種に *Aspergillus niger* のセルラーゼを作用させたものと、塩酸、酢酸ブチル処理したものについて走査型電子顕微鏡によりその表面構造を比較し、またその重量減少と固有粘度変化を検討した。その結果、ANセルラーゼはアセテートの β -1,4グルコシッド結合を水解し、酸性側で反応し易く、そしてジアセテート程度の置換ならばセルロース I よりも低い結晶性が主因となり作用機構そのものはセルロース I に対するものと変わらないが、酢化度や結晶性が増加すると溶解機構も異なるような傷害形態を示し、その作用はかなり低下する。それらはまたランダム機構のよう

であり、endo型酵素作用ともみられる。そして結果的には塩酸や酢酸ブチルによるものとも類似の傷害形態を示すことが判明した。

(1978年7月27日受理)

文 献

- 1) 佐藤; 京都府立大学学術報告, **21**, 25, (1970)
- 2) P.B.Marsh; *Textile Res. J.*, **19**, 487 (1949)
- 3) R.G.H. Siu, E.T. Reese; *Bot. Rev.*, **19**, 377 (1953)
- 4) 池田, 山本, 船津; *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1153 (1973)
- 5) 小川, 外山; *醸工.*, **41**, 282 (1963)
- 6) 外山; *醸工.*, **35**, 196 (1957)
- 7) 香月; 古河電工時報, No. 25, 24 (1961)
- 8) W. Pigman, J.B. Sumner, K. Myrback; *The Enzymes*, **1**, 725 (1950)
- 9) P. Karrer, P. Schubert; *Helv. Chem. Acta*, **11**, 229 (1928)
- 10) E.T. Reese; *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 89 (1957)
- 11) L. Aggebrandt, O. Samuelson; *J. Appl. Polymer Sci.*, **8**, 2813 (1964)
- 12) J.D. Wellons, J.L. Williams, V. Stannett; *J. Polymer Sci.*, **5**, 1341 (1967)
- 13) G.A. Greathouse; *Tex. Res. J.*, **20**, 227 (1950)
- 14) 原田; 化学, **27**, [1], 41~47 (1972)
- 15) K. Selby; *Biochem. J.*, **79**, 562 (1961)
- 16) 河合, 高井; 織学誌, **33**[3]95~100 (1977)
- 17) P. Kooiman, P.A. Roelofsen, S. Sweeris; *Enzymologia*, **16**, 237 (1953)
- 18) 佐藤; 京都府立大学学術報告, **20**, 15 (1169)
- 19) 西沢; セルラーゼ, p. 253 (1974)
- 20) T.F. Cooke, *Text. Res. J.*, **24**, 3, 197 (1954)
- 21) A.A. Armstrong, H.A. Rutherford, *Text. Res. J.*, **33**, 264 (1963)

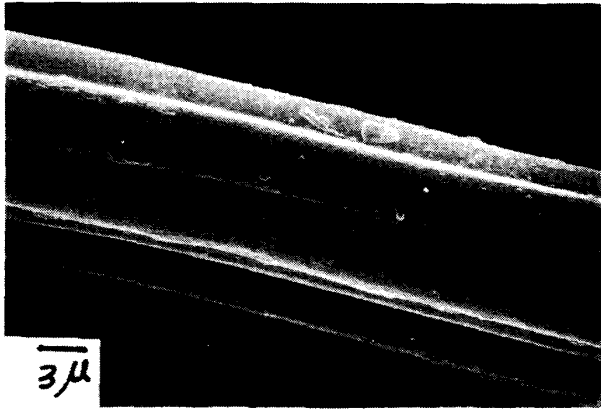


Plate 1

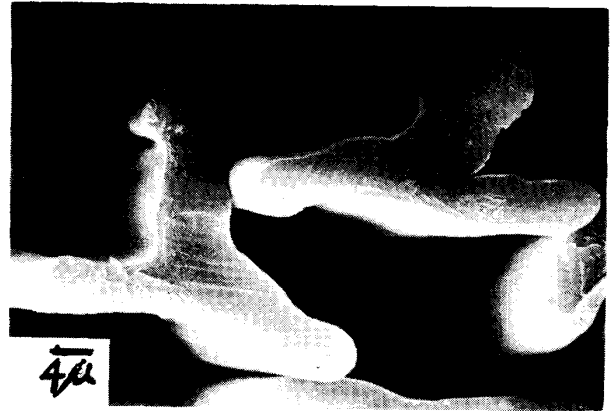


Plate 5

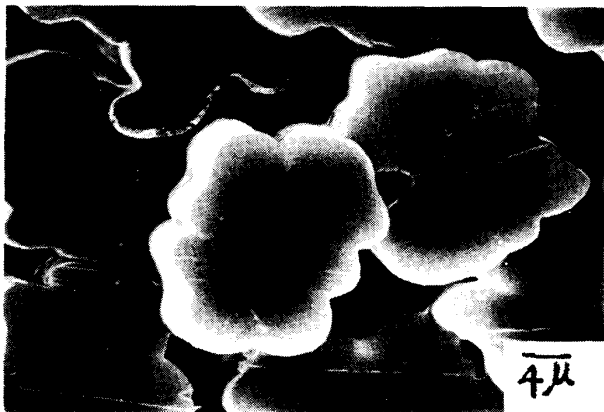


Plate 2

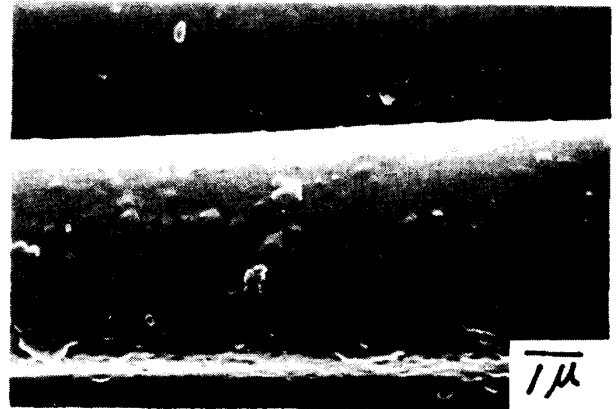


Plate 6

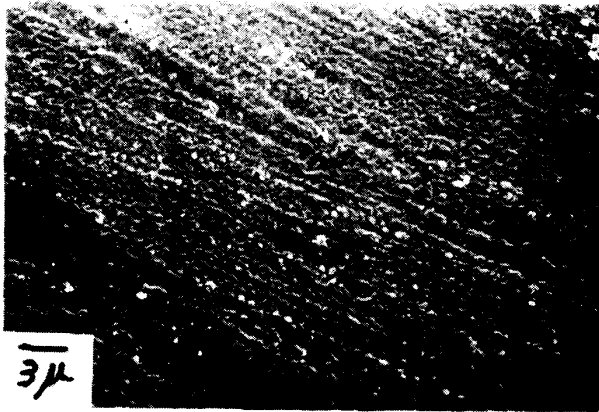


Plate 3

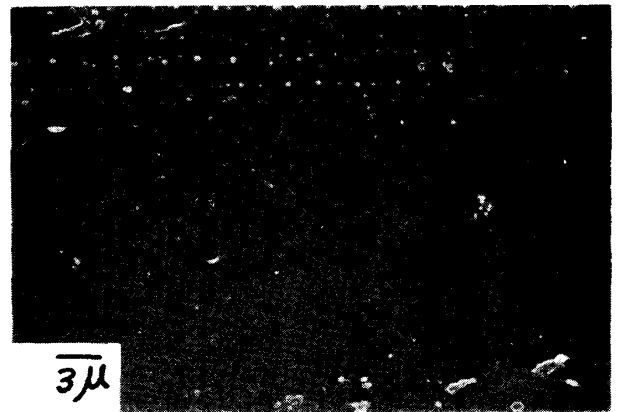


Plate 7



Plate 4

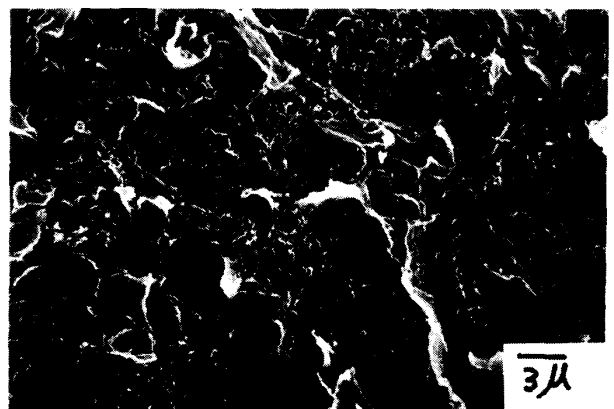


Plate 8

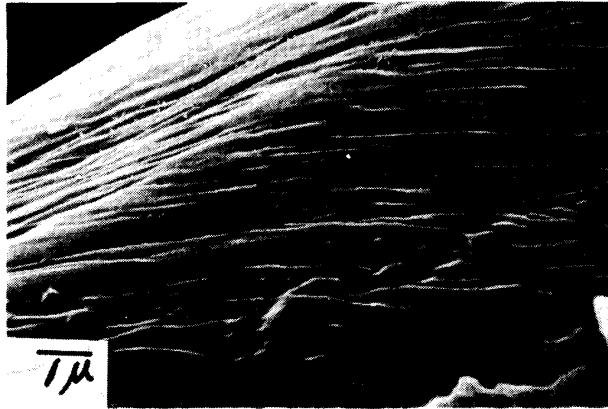


Plate 9

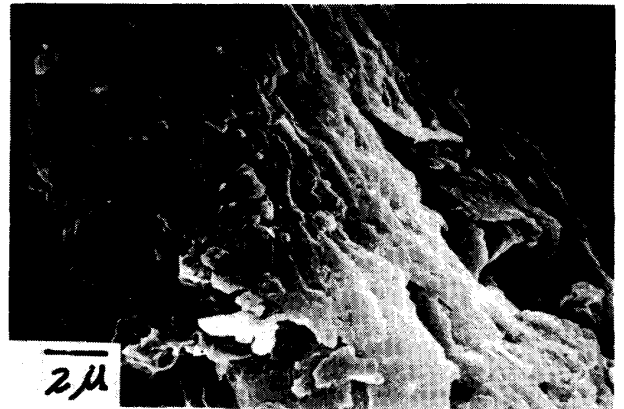


Plate 13

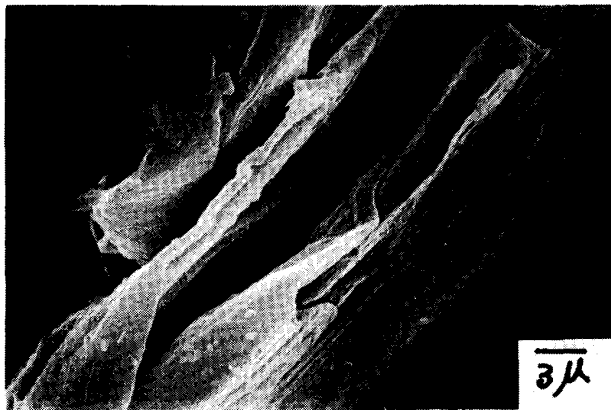


Plate 10

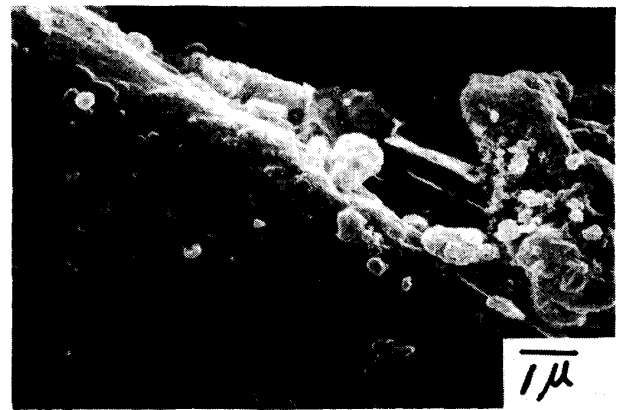


Plate 14

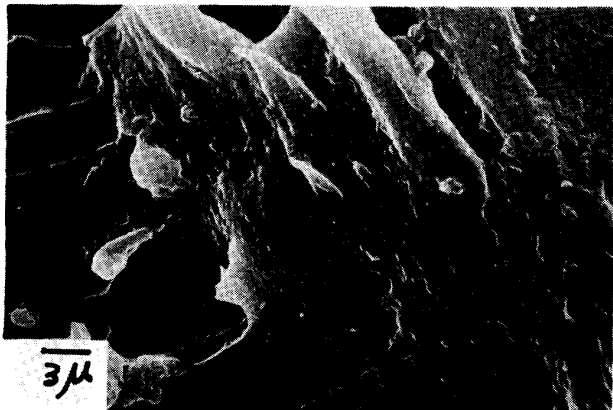


Plate 11

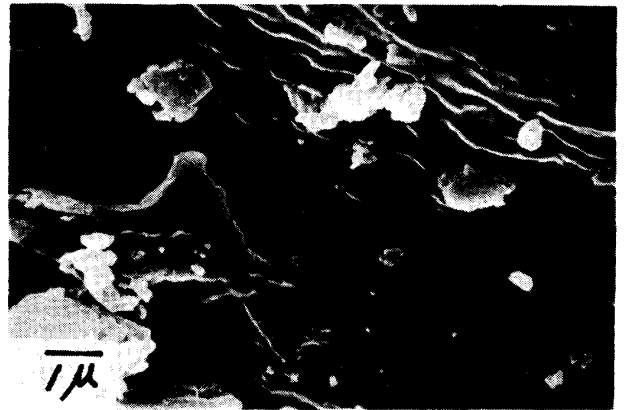


Plate 15

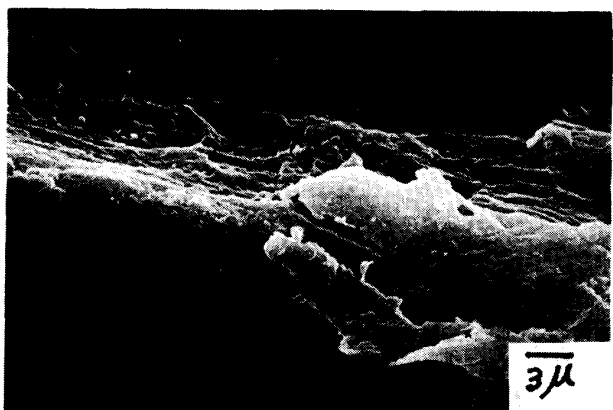


Plate 12



Plate 16

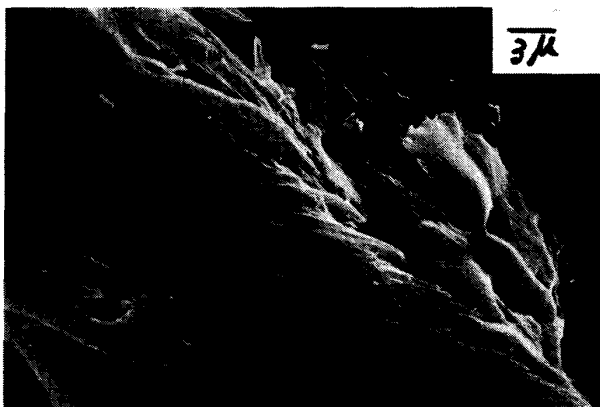


Plate 17

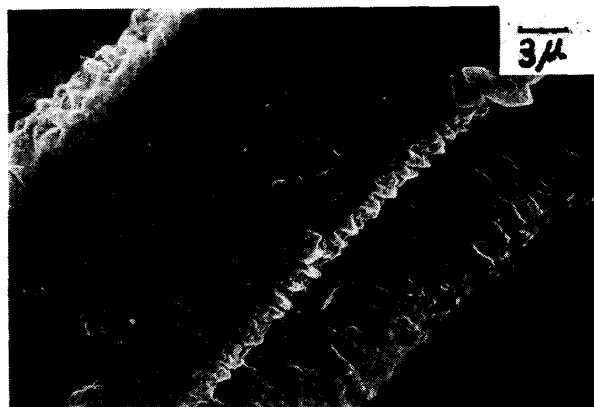


Plate 19

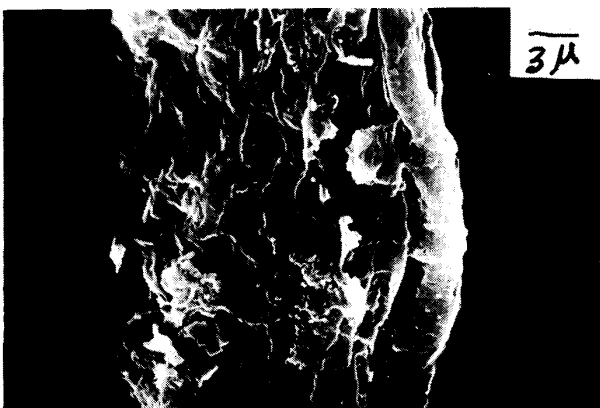


Plate 18

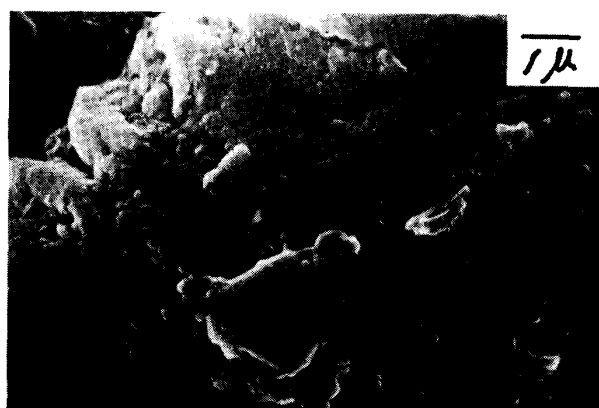


Plate 20