

セリシンの分離・回収法に関する研究

小 林 哲 **
浜 岡 容 ***
浅 田 聡 **
山 崎 正 ****

セリシンの抽出・保存に伴う物理的・化学的变化の基礎的な特性について検討した。

1 はじめに

セリシンはフィブロインとともに生糸を構成しているタンパク質であり、精練工程において分離し、精練廃液として処分されている。近年これらは生体由来の新規タンパク質として注目されはじめ、優れた有機素材としての利用価値が期待されているが¹⁾²⁾、精練廃液中には塩基性物質や界面活性剤などの不純物が含まれており、更に廃液中のセリシンの濃度はかなり希薄なためその単離は極めて困難なものとなっている。

そこで本研究においては、排水・廃棄物の処理の軽減化とセリシンの有効利用を目的として、セリシンの抽出、乾燥・粉末化と保存に伴う物理的・化学的な変化の特性について検討した。

2 材 料

2. 1 試料

生糸（平均繊度30.39デニール、日本産繭）、生織物（変わり古代ちりめん経糸：生糸27中×4本平糸、緯糸：生糸27中×12本強撚カベ撚糸）

2. 2 試薬

ヘキサン（片山化学）、エタノール（片山化学）、炭酸ナトリウム（和光純薬）は試薬特級を用いた。

3 装 置

高圧蒸気処理装置（RCS-60/10SR、日阪製作所）、凍結乾燥機（FDU-810、日本電子）、噴霧乾燥機（SD-I、東京理化）、高速液体クロマトグラフシステム（LC-10A、島津製作所）、走査型電子顕微鏡（JSM-5400、日本電子）

4 方 法

4. 1 セリシンの抽出

ヘキサンを用いて8時間ソックスレー抽出して油脂分

を除去した生糸を、耐熱ビンに入れて蒸留水を加え、高圧蒸気処理装置を用いて一定時間処理してセリシンを溶液を得た。条件に応じて蒸留水に炭酸ナトリウムを添加して抽出を行った。100mlの蒸留水で120℃、60分抽出した場合、 4.87 ± 0.22 gの生糸から凍結乾燥重量が 1.01 ± 0.02 gのセリシンが得られる。

4. 2 セリシン溶液の乾燥

抽出したセリシン溶液を凍結乾燥又は噴霧乾燥した。条件に応じてセリシン溶液にエタノールを、凍結乾燥の場合は乾燥前に、噴霧乾燥の場合は送液の直前に加えた後、乾燥した。乾燥後に得られたセリシンはデシケータ中で減圧保存して、十分乾燥した状態で分析に供した。

4. 3 平均分子量の測定とアミノ酸分析

高速液体クロマトグラフにおいて、分離カラムにShodex Asahipak GS520HQを用いて溶液を分離し、タンパク質標準試料との比較により見かけの平均分子量（以下「平均分子量」と呼ぶ）を測定した。またアミノ酸分析は試料を加水分解し、分離カラムにShimadzu Shim-pack AMINO-NAを用いて溶液を分離し、アミノ酸標準試料との比較によりアミノ酸組成を調べた。

5 結果と考察

5. 1 セリシンの抽出条件の検討

実際の精練行程においては、生糸は強アルカリ性で加熱されるため、セリシンはかなりの加水分解を受ける。pHや加熱温度が変化すると得られるセリシンの形態も変わると予想される。そこで抽出条件（精練条件）とタンパク質分子の形態を決定する最も基本的な因子である平均分子量との関係を調べた。抽出温度を変化させた場合の平均分子量の変化を表1に、抽出の際に浴比を変化させた場合の平均分子量の変化を表2にそれぞれ示す。

* 平成8年度技術開発研究費補助事業の一部である。

** 技術課技師

*** 技術課主査

**** 技術課主任研究員

表1 セリシンの抽出温度と平均分子量

抽出温度 (℃)	練減率 (%)	平均分子量 (kDa)
100	4	299
110	18	280
120	22	259
130	23	234

表2 抽出浴比と平均分子量の関係

浴 比	練減率 (%)	平均分子量 (kDa)
1 : 20	21	316
1 : 25	22	259
1 : 50	23	237

生糸2gを蒸留水50ml中で60分間抽出し、測定には抽出直後のセリシン水溶液を用いた。抽出温度が高くなるに従って平均分子量は減少した。

また浴比の増加に伴って平均分子量は減少した。温度を上げて抽出すると、会合しているセリシン分子と水分子との衝突の確率が高まる。また水素結合に関与しているアミノ酸残基の振動が激しくなる。その結果、会合しているセリシン分子の解離が起こり、平均分子量が減少したものと考えられる。このことは後述のセリシン溶液のゲル化においても重要な要因となると考えられる。

絹織物を水のみで120℃、30分処理した場合練減率が

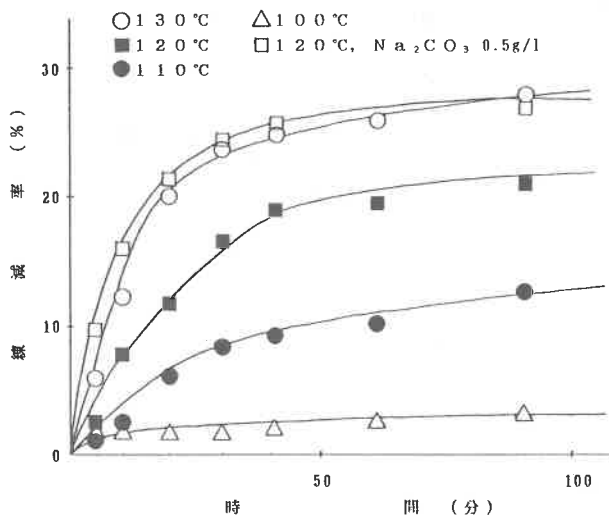


図1 水による絹織物の精練曲線
試料-変わり古代ちりめん
浴比-1:50

約16%、炭酸ナトリウム濃度を0.5g/lに調整して120℃、30分処理した場合練減率が約24%となる(図1)。

織物は生糸どうしが接触しているため、これが精練に影響を及ぼすことがある。特に塩基性物質を用いた場合、織の条件は無視できなくなる。そこで生糸そのものを用いて、抽出時間を30分とし、炭酸ナトリウムの濃度と処理温度を変化させて、練減率を調べた。炭酸ナトリウム濃度の増加に伴って練減率は増加したが濃度が約0.5g/l以上の場合は、処理温度が120℃以上で蒸留水のみを用いて精練した場合と同様に練減率が20%を越えるため、温度による練減率の差は小さくなることが分かった(図2)。

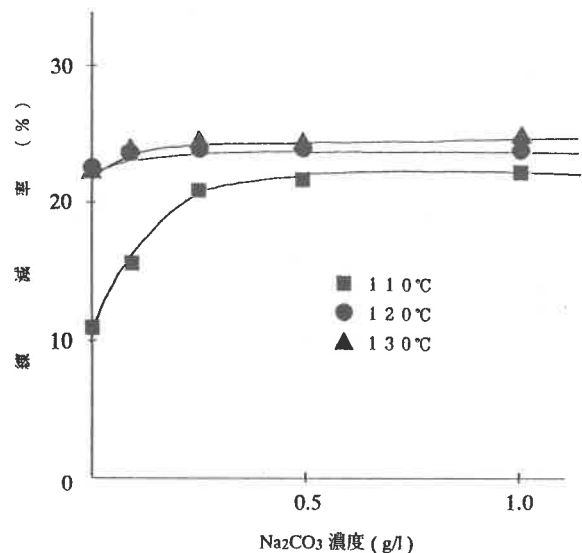


図2 Na₂CO₃濃度と練減率の関係
試料-生糸、浴比-1:50、抽出時間-30分

次に炭酸ナトリウム溶液で抽出した場合の平均分子量の変化について調べた。炭酸ナトリウムの濃度を1.0g/lに調整すると、100℃でも精練が可能になる。生糸を100℃、30分の処理条件で精練した場合、練減率は22%、平均分子量は65kDaであった。

このように炭酸ナトリウムを加えて抽出すると、蒸留水のみで抽出した場合よりも、かなり平均分子量は減少する。炭酸ナトリウム溶液で抽出した場合には、分子間の水素結合の解離だけではなく、分子鎖の加水分解も起こっているものと考えられる。またこの溶液を精製する場合には、更に脱塩が必要となる。したがってセリシンを抽出する手段としては適切ではないと思われる。

セリシンのアミノ酸組成と抽出温度の関係を調べるために、アミノ酸分析を行った。抽出温度が高くなるとともに、アスパラギン酸やグリシンなどは若干減少し、逆

にトレオニン若干増加したが、顕著な差は認められなかった（表3）。

表3 各温度におけるセリシンのアミノ酸組成

	100℃	110℃	120℃
Asp	18.1	17.6	17.1
Thr	4.9	6.7	7.0
Ser	32.7	34.6	34.4
Glu	5.0	3.3	3.4
Pro	0.5	0.4	0.5
Gly	22.9	21.1	20.2
Ala	4.2	4.0	4.4
Cys	0.1	0.1	0.1
Val	2.0	2.3	2.4
Met	0.02	0.02	0.03
Ile	0.4	0.4	0.6
Leu	0.8	0.8	1.0
Tyr	2.0	2.7	2.8
Phe	0.4	0.3	0.4
His	1.0	1.2	1.2
Lys	2.5	1.9	1.9
Arg	2.3	2.6	2.6

セリシンは4種のサブタイプに分けられ、それぞれが層状に分布していることが知られている³⁾。セリシンの抽出過程においては、生糸の表面から徐々にセリシンが溶出するため、抽出温度が高くなると、その抽出液はいくつかのサブタイプのセリシンの混合物になっていると考えられる。これが抽出温度によるアミノ酸組成の変化に影響を及ぼしていると考えられる。

5. 2 セリシン溶液のゲル化

熱水中で抽出したセリシンを常温でしばらく放置すると溶液はゲル化し、再び加熱するとゾルになる。このゾル-ゲル転移の挙動は可逆的であることが知られている⁴⁾⁵⁾。タンパク質を溶液の状態で保存する場合、分解などによる変性を伴うことは避けられない。そこでセリシン溶液の保存条件とゲル化の関係について検討した。

蒸留水による120℃、60分の抽出で得られた1%セリシン水溶液を希釈して、セリシン水溶液の濃度及び保存温度とゲル化時間（ゲル化するまでに要する時間）との関係を調べた（図3）。直径90mmのシャーレに10mlのセリシン水溶液を入れて密封し、各保存温度で水平に静置してゲル化を観察した。ゲル化の判定は、シャーレを約30度傾けて溶液が流れ出さなくなった時点とした。

1%および0.75%の場合は保存温度20℃で一旦ゲル化時間が短くなったが、それ以外においてはいずれの場合も保存温度が高くなるとゲル化時間は長くなった。保存温度が高いほどセリシン分子の運動エネルギーが増大し、分子間の水素結合が形成されにくくなるためと考えられ

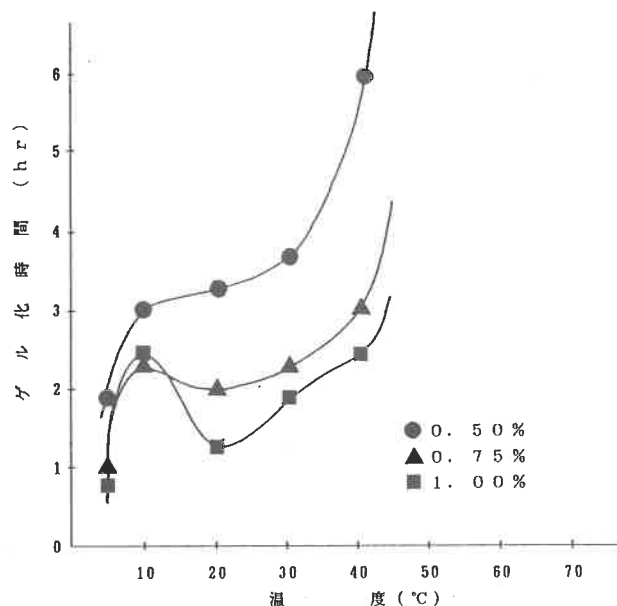


図3 セリシン水溶液の保存温度とゲル化時間の関係

る。また濃度が高いほど分子が接近し、ゲル化し易くなるためであると考えられる。10～20℃におけるゲル化時間の変動は、セリシン濃度が高いほど顕著であった。したがって形成するゲルの形態に変化が起こったと推測される。これは構成するセリシン分子鎖の立体構造がこの温度の間で大きく変化したと推測できる。

また同様の方法で、水溶液のpHがゲル化時間に及ぼす影響について調べた。なお水溶液のpHは、10M水酸化ナトリウム水溶液と1M塩酸を用いて調整した。1%セリシン水溶液を各pHに調整し37℃におけるゲル化時間を調べた（図4）。pH5ではセリシンが約30分後に、等電点付近では即座に微粒子状に凝集・沈降し沈澱物を生じたが、pH6以上ではゲル化が観察されpHの増加と

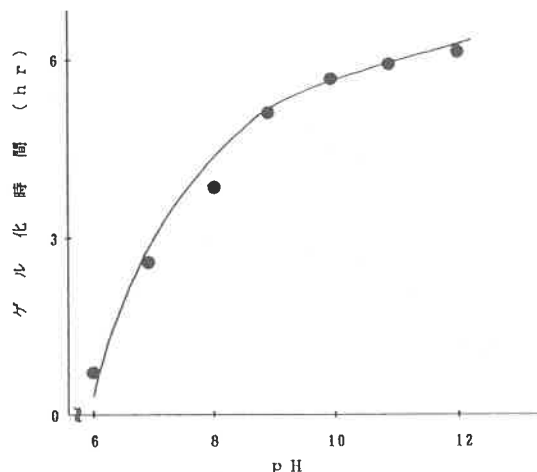


図4 セリシン水溶液のゲル化時間に対するpHの影響
(セリシン水溶液 1 wt %, 37℃)

ともにゲル化時間も長くなる傾向が見られた。

一般にタンパク質は等電点において溶解度が最小となる。そのことを利用した分別沈澱もセリシンの回収法として有効であると思われる。セリシンを溶液状のまま保存することを考えた場合、タンパク質はアルカリ性において不安定であり、変性の可能性があるため高pHでの保存は適さないと考えられる。

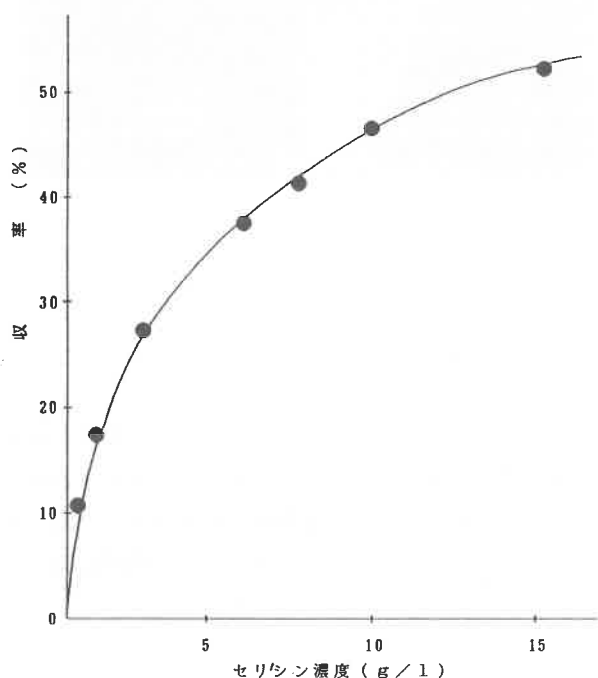


図5 セリシン濃度と噴霧乾燥法収率の関係

5. 3 セリシン水溶液の乾燥・粉末化の検討

凍結乾燥法は、セリシンの乾燥・粉末化法として有効であるが、噴霧乾燥法に関する報告は少ない⁷⁾⁸⁾。そこで噴霧乾燥法についてセリシンの濃度と収率の関係を調べた(図5)。

噴霧乾燥は100 mlのセリシン水溶液を、送液速度100 ml/hr、入口温度120℃の条件で行った。濃度の増加に伴って収率は増加した。セリシン濃度が低い場合、見かけの分子量が低いことは述べた。その結果、吸引機内に吸引されやすくなり収率が低下するものと思われる。

逆に濃度の高い場合には、いくつかの分子が会合した状態、つまり見かけの分子量が大きい状態で乾燥されるため、濃度依存的な収率の増大が見られたものと考えられる。

また送液速度を変化させたときの収率の変化について調べた(図6)。

120℃、60分の条件で抽出した1%のセリシン水溶液を用いて噴霧乾燥機に供したところ、収率は流速に比例して増加した。しかし流速が毎時700 ml以上になるとセ

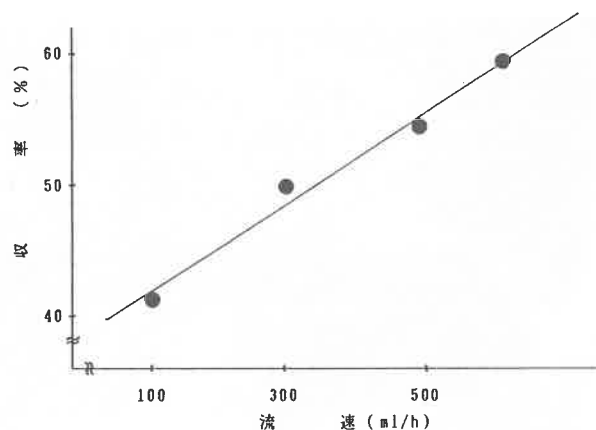


図6 噴霧流速と収率の関係

リシン粉末は完全に乾燥しなかった。

セリシン粉末を電子顕微鏡で観察すると、凍結乾燥と噴霧乾燥ではセリシンの形状が異なっていた。そこで120℃、60分の抽出条件で得られたセリシン水溶液を噴霧乾燥機に供し、得られたセリシン粉末の平均分子量を調べたところ、235kDaであった。一方、同様の抽出条件で得られたセリシン水溶液を凍結乾燥に供し、得られたセリシン粉末の平均分子量は276kDaであり、この違いは乾燥時のプロセスの違いに起因するものと考えられる。

5. 4 セリシンに対する有機溶媒の効果

タンパク質を精製するときの初期の段階で用いられる有機溶媒による沈澱法は、比較的容易な分別の手段として知られている⁸⁾⁹⁾。また、セリシン溶液にエタノールを添加すると溶液状のままでも保存が可能となる⁷⁾。そこでタンパク質の沈澱に最もよく利用されるエタノールをセリシン溶液に加えて乾燥した、粉末化セリシンの特徴について調べた。

120℃、60分の処理条件で抽出したセリシン水溶液にエタノールを加えた後凍結乾燥した。得られた粉末を電子顕微鏡で観察すると、エタノールを加えた場合に粒子が微細になることが認められた(図7)。またエタノールの添加によってセリシンの平均分子量は減少する傾向が見られた(データ未発表)。

これはエタノールを添加することによって、セリシンの分子間の静電的な相互作用が弱められた結果、分子間の会合が弱まり、みかけの分子量が減少したものと考えられる。つまり有機溶媒の添加によってセリシンのバルキネスが影響を受けるものと考えられる。

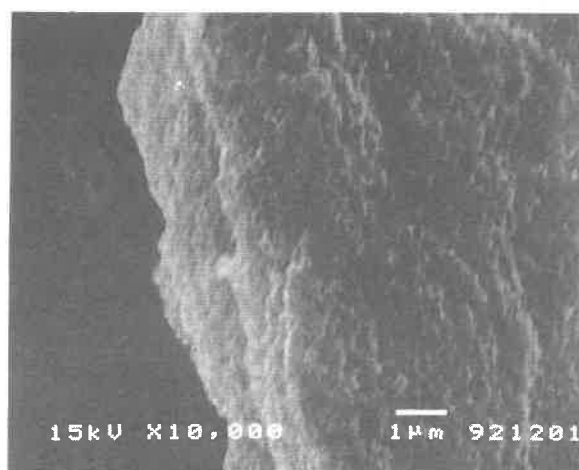


図7 凍結乾燥セリシンの電子顕微鏡写真
左：control 右：10%のエタノールを含むセリシン溶液を凍結乾燥したもの

6 総括

セリシンはフィブロインと異なり、その有用性や利用法に関する研究はいまだ十分に蓄積されていない。セリシンを回収し有効利用するためには、セリシンの物理的・化学的特性を知ることが不可欠である。

本研究ではセリシンを応用していく上での前段階としての、抽出・保存に伴う物理的・化学的变化について考察した。タンパク質を扱う上で最も問題となるのは変性、例えば分離・抽出の際の一次構造や二次構造の変化が挙げられる。したがっていかにタンパク質を変性させずに抽出・保存するかが重要な鍵となる。

セリシンはセリン、アスパラギン酸、トレオニン、グルタミン酸などの親水性アミノ酸が多いため、常温では分子間で水素結合を形成して絡み合い、容易に網目構造を形成してゲル化し易いものと思われる。フィブロイン分子がグリシンとアラニンの繰り返し構造を主としているのと同様に³⁾¹⁰⁾、セリシンはグリシン、セリン及びアスパラギン酸の繰り返し構造から成るものと推定される。構成アミノ酸のバルキネスの違いにより、セリシンは分子が β 化しても水素結合した分子間に容易に水が侵入し易く、ゲルの網目構造が容易に切断されゾルになりやすいものと考えられる。

乾燥後のセリシンは、保存温度や湿度によって刻々とその構造を変化させている¹¹⁾。したがってタンパク質を

保存する場合、どのような用途に利用するかを念頭に置かねばならない。セリシンのような繊維状タンパク質は爪や毛髪のようにアミノ酸の配列が分子によって少しずつ異なることが多く、セリシンのアミノ酸配列を利用した機能性を応用したり、その生理活性を追求するのは難しい。したがって分離・精製後に加水分解して得られるオリゴペプチドやアミノ酸単体としての利用に関しても検討していく余地があるものと考えられる。

7. 引用文献

- 1) 平林潔: 繊維誌, **45**, 263 (1989)
- 2) 秋山大二郎ら: 日蚕雑, **62**, 392 (1993)
- 3) 小松計一: 蚕糸報, **26**, 163 (1975)
- 4) 平林潔ら: 日蚕雑, **58**, 81 (1989)
- 5) 朱良均ら: 日蚕雑, **64**, 415 (1995)
- 6) 朱良均ら: 日蚕雑, **65**, 270 (1996)
- 7) 早川潔ら: 京中セン技報, **201**, 6 (1993)
- 8) E. J. Cohn, *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946)
- 9) R. K. Morton: "Methods in Enzymology", Academic Press, New York, **1**, 25 (1955)
- 10) Lucas O., *et al*: *Biochem. J.*, **66**, 968 (1957)
- 11) 浅田聡ら: *in press*