(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009 年 12 月 23 日(23.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/153923 A1

(51) 国際特許分類:
*C07K 14/78* (2006.01) *C08H 1/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/002451

(22) 国際出願日: 2009 年 6 月 2 日(02.06.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2008-156122 2008 年 6 月 16 日(16.06.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 茨城県 **(IBARAKI PREFECTURE)** [JP/JP]; 〒3108555 茨城県水戸市笠原町９７８番６ Ibaraki (JP). 株式会社エコロジーサポート **(ECOLOGYSUPPORT CO., LTD.)** [JP/JP]; 〒1640003 東京都中野区東中野３丁目１６番２３号アーサメジャー４０２ Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 新井幸三 **(ARAI, Kozo)** [JP/JP]; 〒3760011 群馬県桐生市相生町１丁目４９８－１３ Gunma (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 篠塚雅子 **(SHINOTSUKA, Masako)** [JP/JP]; 〒3070015 茨城県結城市大字鹿窪１８９茨城県工業技術センター繊維工業指導所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 木幡行雄 **(KIHATA, Yukio)**; 〒3160015 茨城県日立市金沢町２丁目１６番１８号 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

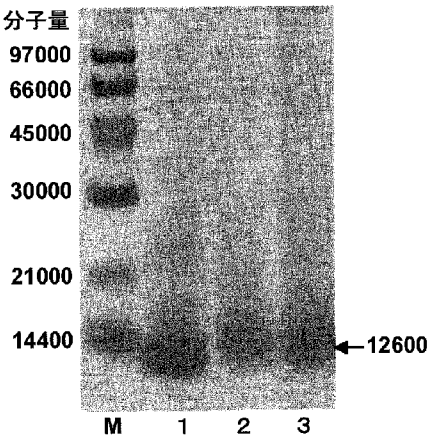
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) **Title**: PROCESS FOR PRODUCING SOLUBLE FEATHER KERATIN PROTEIN

(54) 発明の名称: 可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法

[図1]




SDS-PAGEパターン:Mマーカー, (1)未処理羽毛, (2)pH10.0, (3)pH10.5
BB

AA - Molecular weight
BB - SDS-PAGE pattern: M marker, (1) Untreated feathers (2) pH 10.0, (3) pH 10.5

(57) **Abstract**: Feathers produced when culling poultry or processing broilers cannot easily be used effectively as they stand; therefore, the object is to enable easy conversion of feathers into soluble feather keratin protein. Feathers for filling mattresses were washed with a neutral detergent and then rinsed with water and dried. 1 g of these feathers was put into a 300 ml flask, 50 ml of a 0.2 mol/l thioglycolic acid solution, adjusted to pH 11.0 with sodium hydroxide, were added thereto, and after stirring/shaking at 30ºC for 48 hours this solution was adjusted to 30ºC and then adjusted to pH 7 with acetic acid. 50 ml of 0.4 mol/l sodium bromate solution were added slowly to this solution, over 4 hours, and then the solution was left the stand for 20 hours. The insoluble matter was filtered from the solution, and then the macromolecular material was precipitated by adjusting the pH to close to 3.5 with acetic acid and this precipitate was recovered by centrifugation. The precipitate was made into a paste with acetic acid, and stored in a cool dark place. Solubilization does not cause any decrease in molecular weight.

(57) 要約: 廃鶏やブロイラー処理の際に生じ、そのままでは有効利用が困難な羽毛を可溶性羽毛ケラチン蛋白に容易に変換できるようにすることが目的である。 布団中綿用の羽毛を中性洗剤で洗浄後、水洗いして乾燥させた。この羽毛 1g を 300ml のフラスコに投入し、これに水酸化ナトリウムで pH11.0 に調整した 0.2mol/l 濃度のチオグリコール酸溶液 50ml を加え、30℃で 48 時間撹拌・振とうした後、その溶液の温度を 30℃に調整してから酢酸で pH7 に調整した。この溶液に 0.4mol/l 濃度の臭素酸ナトリウム溶液 50ml を 4 時間掛けて徐々に加え、その後、20 時間放置した。次いで、それらの溶液から不溶物を濾別し、各々酢酸で pH を 3.5 付近に調整して高分子物質を沈澱させ、遠心分離によりその沈殿物を回収した。沈殿物は酢酸酸性のペースト状にして冷暗所に保存した。なお、可溶化処理による分子量低下は起こっていない。

WO 2009/153923 A1

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

# 明　細　書

## 発明の名称 ： 可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法

## 技術分野

[0001] 本発明は、廃鶏やブロイラー処理等により生じた羽毛を処理して可溶性羽毛ケラチン蛋白質に変換する可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に関する。

## 背景技術

[0002] 廃鶏やブロイラー処理により生じる羽毛は、細かく裁断して肥料として利用されるものもあるが、大部分は焼却処分されている。また近年、大量の羽毛布団が廃棄されているが、これらも殆どが焼却処分に付されている。元来、羽毛は天然資源であり、廃棄羽毛を有効利用する立場から羽毛繊維を可溶化する試みがなされてきている。これらの試みには、例えば、特許文献１、２及び３の例がある。

[0003] 特許文献１は、架橋構造を有するケラチン蛋白質繊維を液体中で還元処理した後、不溶物を除き、更に還元剤を除去して可溶性ケラチンを得るに際し、カチオン界面活性剤を、還元処理時又は不溶物を除いた後に加えることによる可溶性ケラチンの製造方法である。

[0004] 特許文献２は、少なくとも以下の記載の(A)から(C)の製造行程よりなる羽毛ケラチン加水分解物又はその塩の製造方法であり、

(A)還元剤を含むあるいは含まない非アルカリ性水溶液に羽毛を浸漬し、それを0.2～0.32MPaに加圧しながら121～136℃の高温にすることで、羽毛を軟化させる工程。

(B)(A)工程により得られた羽毛含有非アルカリ水溶液のpHを、塩基を添加してアルカリに調整した後、プロテアーゼを添加して加水分解反応させることにより、軟化させた羽毛を部分的に消化させる工程。

(C)(B)工程により得られた部分的に消化された羽毛を、(I)親水性の置換基で化学修飾する工程、及び／または(II)尿素、アルコール、多価アルコールか

ら選ばれる１種以上を含有する水溶液に高分子のまま可溶化せしめる溶解工程。

[0005] 特許文献３は、鳥類の羽毛を、(1)アルカリ処理により形状変換及び形質変換して得られるオリゴβケラチン誘導体、および／または(2)上記(1)の処理に引き続く紫外線照射処理により形状変換及び形質変換して得られるオリゴβケラチン誘導体の水溶液を存在させることによる水不溶性物質の可溶化またはミクロ乳化分散方法である。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0006] 特許文献1：特開平８－９２２９５号公報

特許文献2：特開２００５－１２０２８６号公報

特許文献3：特開２００４－３３７７４６号公報

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、廃鶏やブロイラー処理、或いは羽毛布団の廃棄の際に生じ、そのままでは有効利用が困難な羽毛を可溶性羽毛ケラチン蛋白質に変換する低コストで高収率の製造方法を提供することを解決の課題とするものである。

## 課題を解決するための手段

[0008] 本発明の１は、鳥類の羽毛を浸漬した水にアルカリ性に調整したチオグリコール酸(TGA)溶液を加えて攪拌振とうする第１工程と、第１工程で得られた溶液を中性付近に調整し、この溶液に酸化剤を加えて所定時間放置することにより可溶性羽毛ケラチン蛋白質を製造する第２工程とによる可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法である。

[0009] 本発明の２は、本発明の１の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、前記第１工程のチオグリコール酸溶液のアルカリ性への調整をリチウム、ナトリウム、アンモニウム又はカリウムの水酸化物によって行い、これによってそれらの溶液をpH8.0～13に調整することとしたものである。

[0010] 本発明の３は、本発明の１又は２の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、前記第２工程の溶液の中性付近への調整を該溶液に酢酸を添加することで行い、これによって該溶液をpH5～8.0に調整することとしたものである。

[0011] 本発明の４は、本発明の１、２又は３の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、前記第１工程の攪拌振とうを前記溶液を20～50℃に保持しながら1/3～120時間行うこととしたものである。

[0012] 本発明の５は、本発明の１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白の製造方法に於いて、前記第２工程の酸化剤として、過酸化水素、臭素酸ソーダ又は空気を用いたものである。

[0013] 本発明の６は、本発明の１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、前記第２工程の酸化剤として過酸化水素又は臭素酸ソーダを用い、該過酸化水素又は臭素酸ソーダを前記放置する時間の内の前半の一定時間の間に継続して徐々に添加することとしたものである。

[0014] 本発明の７は、本発明の１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、前記第２工程の酸化剤として空気を用い、該空気を前記放置する全時間中に継続的にバブリングすることで添加することとしたものである。

[0015] 本発明の８は、本発明の１、２、３、４、５、６又は７の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、第２工程で得られた溶液から不溶物を取り除き、その後、該溶液をpH2～4付近に調整して溶解している羽毛ケラチン蛋白を沈澱させ、遠心分離により沈殿した羽毛ケラチン蛋白質を回収することとしたものである。

[0016] 本発明の９は、本発明の１、２、３、４、５、６又は７の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法に於いて、第２工程で得られた溶液をpH7～8に調整し、この調整に前後して該溶液を濾過して不溶物を取り除いた後、該溶液を分画分子量１０００～５０００のカラムに通して脱塩し、溶解している羽毛ケラチンタンパク質を分取し、すべてのフラクションを集めて、凍結乾燥する

ことにより羽毛ケラチン蛋白質を回収することとしたものである。

## 発明の効果

[0017] 本発明１の可溶性羽毛ケラチン蛋白の製造方法によれば、廃鶏やブロイラー処理等により生じた羽毛を処理して簡単にかつ低廉に可溶性羽毛ケラチン蛋白に変換し、これを有効利用することができる。

[0018] 羽毛のケラチン繊維は、その蛋白分子間あるいは分子内に多量のジスルフィド(-SS-)結合が存在し架橋密度の高い巨大な網目構造を形成しており、その可溶化は困難である。このようなジスルフィド結合を還元によって切断し、これをスルフヒドリル基に変換してケラチン鎖の架橋を無くし、高分子の溶解条件を満たしたように見えても、実際には容易に溶解しない。スルフヒドリル基のpK値は9程度でペプチド鎖の加水分解を起こさないような通常のpH領域では、スルフヒドリル基のイオン化のみでは高分子量のケラチンペプチド鎖は水に溶解しない。また、スルフヒドリル基を含むタンパク質は、反応性が高く空気中で速やかに酸化され、不溶化してしまう。本発明の１の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、このような問題を簡単な方法により解決し、高収率で安定な可溶性羽毛ケラチン蛋白質を得ることが可能となったものである。

[0019] 本発明の２の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、前記チオグリコール酸溶液のpHを適切に調整することができる。

[0020] 本発明の３の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、前記酸化剤の投入に先だつ溶液のｐＨの調整を容易に行うことができる。

[0021] 本発明の４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、その反応を良好に進行させることができる。

[0022] 本発明の５の可溶性羽毛ケラチン蛋白の製造方法によれば、前記酸化剤として、過酸化水素、臭素酸ソーダ又は空気を用いることにより、生成しているシステイン残基を酸化し、ジスルフィド結合を生じる三種の反応のうち二種の反応を簡易にかつ良好に生じさせることができるが、三種のうちケラチンの溶解を阻害する他の一種の反応を抑制することができる。

[0023] 本発明の６又は７の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、前記各酸化剤を、前記のように、放置時間の内の前半の一定時間の間に徐々に添加し、あるいはその全時間に渡って継続的に添加することとしたことにより、一層良好に、生成しているシステイン残基を酸化し、ジスルフィド結合を生じる三種の反応のうち二種の反応を効率良く生じさせ、溶解を阻害する他の一種の反応を効果的に抑制することができる。

[0024] 本発明の８及び９の可溶性羽毛ケラチン蛋白の製造方法によれば、溶液中から可溶性羽毛ケラチン蛋白質を良好に回収することができる。

## 図面の簡単な説明

[0025] [図1]実施例２で得た二つの試料及び未処理羽毛のSDS電気泳動パターンを示した図。

## 発明を実施するための形態

[0026] 本発明の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法は、鳥類の羽毛を浸漬した水にアルカリ性に調整したチオグリコール酸溶液を加えて攪拌振とうする第１工程と、第１工程で得られた溶液を中性付近に調整し、この溶液に酸化剤を加えながら所定時間放置することにより可溶性羽毛ケラチン蛋白質を製造する第２工程とによって構成したものである。

[0027] 対象となる羽毛は、既述のように、鳥類のそれであり、廃鶏やブロイラー処理によって生じる羽毛を特に予定しているが、それに限定されるわけではない。

[0028] このような原料となる鳥類の羽毛は、予め中性洗剤で洗浄して汚れを除去し、更に水洗して中性洗剤を除去した上で、風乾し、1～5ｍｍに細断したものである。

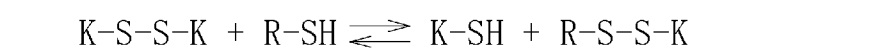
[0029] 羽毛に以上の処理を施した後に、前記第１工程を開始する。

まず該羽毛を水に浸漬する。この水は重量比で該羽毛の20～200倍とするのが適当である。他方、チオグリコール酸溶液をアルカリ性に調整し、これを上記水の中に添加する。このチオグリコール酸溶液濃度は、0.05～5mol/l程度となるように、チオグリコール酸の溶解量を定めておくのが適当である。

またこのチオグリコール酸溶液はpH9.0～13に調整しておくのが好ましいが、そのために種々の塩基を自由に採用することができる。例えば、リチウム、ナトリウム、アンモニウム、又はカリウムの水酸化物を採用することができる。このように羽毛を浸漬した水にアルカリ性に調整したチオグリコール酸を添加してこれを攪拌振とうする。この攪拌振とうは、この溶液を20～50℃に保持しながら1/3～120時間行うのが適当である。

[0030] この第１工程で、前記羽毛を構成するケラチン蛋白質分子のシスチン残基は、以下のように、チオグリコール酸によって還元される。まず、化１に示すように、シスチン残基のジスルフィド基は、前記アルカリ性かつ温度条件の下でチオグリコール酸によって還元され、該ジスルフィド基の一部がスルフヒドリル基に変換し、システイン残基を生成する。また同時に混合ジスルフィド基であるカルボキシメチルアラニルスルフィド残基(CMAD)を生成する。

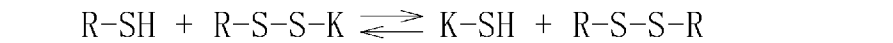
[化1]



(K-S-S-K：ケラチン蛋白質分子鎖のシスチン残基、R-SH：チオグリコール酸(TGA)、K-SH：ケラチン蛋白質分子鎖のシステイン残基、R-S-S-K：カルボキシメチルアラニルジスルフィド(CMAD)残基)

[0031] また、こうして生成したカルボキシメチルアラニルスルフィド残基は、化２に示すように、更にチオグリコール酸によって還元され、そのジスルフィド基の一部が、同様に、スルフヒドリル基に変換してシステイン残基を生成し、同時にジチオジグリコール酸(DTDG)を生成する。

[化2]



(K-S-S-R：ジチオジグリコール酸(DTDG))

[0032] 羽毛を溶解させるためには、ジスルフィド結合をほぼ完全に切断することが必要である。即ち、羽毛ケラチン蛋白質の殆ど全てのシスチン残基をシス

テイン残基に変換することが必要である。前記化２の平衡がほぼ完全に右側に偏ればシスチン残基のジスルフィド結合はチオグリコール酸による還元によって切断され、スルフヒドリル基に変換され、システイン残基を生じる。こうしてケラチン蛋白質分子鎖の架橋がなくなると、高分子のケラチン蛋白質分子鎖の溶解条件が満たされることになるが、スルフヒドリル基のpK値は9程度（アミノ酸システインとしてのpK値は8.35）であり、ペプチド鎖の加水分解を起こさないような通常のpH領域では、スルフヒドリル基のイオン化のみでは高分子量のケラチンペプチド鎖を水に溶解させることはできない。

[0033] そこで、酸化反応を利用し、前記カルボキシメチルアラニルスルフィド残基（混合ジスルフィド基）を多量ケラチン蛋白質分子鎖に導入することができれば、カルボキシル基：-COOH（pK値＝3～4）を中性付近で陰イオン化（$-COO^-$）し、ケラチン蛋白鎖を溶解させるに十分な高分子イオンを形成させることができることになる。

[0034] ここで、第２工程では、以上の第１工程で得られた溶液を中性付近に調整し、この溶液に酸化剤を加えながら所定時間放置し、可溶性羽毛ケラチン蛋白質を生成させる。

[0035] 前記溶液のpH5～8.0への調整は種々の酸を用いて自由に行うことが可能である。例えば、酢酸を用い、これを添加することによって前記pHに調整する。更にこの溶液は、前記のように、酸化剤を加えながら、かつ20℃前後に保持しながら、所定時間放置する。

[0036] 前記酸化剤としては、過酸化水素、臭素酸ソーダ又は空気を用いることができる。また酸化剤として過酸化水素又は臭素酸ソーダを用いる場合は、該酸化剤を前記放置する全時間の内の前半の一定時間の間に継続して徐々に添加することとするのが適当である。この場合の酸化剤の溶液濃度は、$1/10^2$～1/10mol/lとするのが適当である。更に又酸化剤として空気を用いる場合は、該空気を前記放置する全時間中に継続的にバブリングすることで添加することとするのが適当である。このとき、同時に、前記のように、当該の溶液を20℃前後に保持しておくべきである。このように、20℃前後に保持しながら、

かつ酸化剤を添加しながら放置する所定時間は3～10時間程度とするのが適当である。これによって可溶性羽毛ケラチンを生成させることができる。

[0037] 第２工程で、以上のようにして酸化剤を添加すると、以下の化３、化４及び化５の反応が同時に生じる。しかし、化３は高分子鎖であるケラチン蛋白質分子鎖に結合したスルフヒドリル基同士の酸化によるジスルフィド結合の生成反応であり、立体化学的にもこのような鎖間距離が膨潤離間した鎖間に形成されるジスルフィド結合の生成反応速度は、化４のケラチン高分子鎖－低分子（チオグリコール酸）の反応速度及び化５のジチオジグリコール酸（DTDG）を生成する低分子同士の反応速度に比較して充分に小さい。従って、結果として化４及び化５の反応が優先的に生じ、系に残存するシステイン残基のスルフヒドリル基の大部分はカルボキシメチルアラニルジスルフィド残基及びジチオジグリコール酸（DTDG）に変換される。なお、化５は、以上の羽毛ケラチン蛋白の反応とは無関係な、低分子であるチオグリコール酸同士の反応であり、以上の三つの酸化反応の内、化５が最も反応速度が大きく、速やかにジチオジグリコール酸を生成する。

[0038] [化3]



[化4]



[化5]



[0039] ここで、化５の反応は化２と共役しているため、過剰のR-S-S-Rの生成により化6（化２の逆反応）の反応が生じる。即ち、化２の平衡が左に偏り、更に化１の平衡も左に偏るため、K-S-S-Kの結合が再生されることになる。換言すれば、化５によるジチオジグリコール酸（DTDG）の生成は溶解を抑制する方

向に作用することになる。そこで、この問題を解決するためには、化１及び化２の平衡移動反応速度を遅くすることによって、ラジカル機構で進む化４及び化５の反応の方をイオン反応で進む化１及び化２より相対的に速くすることができれば、化２及び化１の反応は実質的に無視できることになる。そこで、中性或いはやや酸性側で酸化反応を生じさせることでラジカル反応を効率良く起こし、一方、平衡移動反応を遅くするためには、系のpHを７程度にして、R-S$^-$イオンの濃度をできるだけ減少させることにより求核攻撃で進むSH/SS交換反応（平衡反応）を抑制することにした。このようにして、化４の反応を利用してCMAD残基を分子鎖に導入することにより水に可溶性の羽毛ケラチン蛋白質を簡単に合成することができる。

[0040] [化6]

$$K\text{-}SH + R\text{-}S\text{-}S\text{-}R(excess) \rightleftharpoons K\text{-}S\text{-}S\text{-}R + R\text{-}SH$$

[0041] 以上のようにして生成された可溶性羽毛ケラチン蛋白質は、以上の溶液から次のようにして回収する。

[0042] まず、以上の溶液から不溶物を取り除いた上で、該溶液を酢酸又は塩酸でpH3～4付近に調整して溶解している羽毛ケラチン蛋白質を沈澱させる。沈殿した羽毛ケラチン蛋白質は遠心分離により溶液から分離することができる。なお溶液からの不溶物の除去は濾過等によって行うことができる。該蛋白質の保存は酢酸酸性のペースト状態にして、冷暗所で行うことができる。

[0043] また前記のようにして生成された可溶性羽毛ケラチン蛋白質溶液から不溶物を取り除いた上で、該溶液をpH８に調整し、該溶液をゲルろ過により精製した。即ち、分画分子量１０００～５０００のゲルを充填したカラムに通して、脱塩、分取し、全フラクションを凍結乾燥することによって固体状態で羽毛ケラチン蛋白質を得ることができる。該蛋白質の保存は冷暗所で行うことができる。

[0044] 本発明に於いては、以上のように、羽毛ケラチン蛋白質を水に溶解可能にするには、化２に示すように、過剰のチオグリコール酸で羽毛ケラチン蛋白

質を還元し、次に化４、化５、化６に示すように系を酸化し溶液中の残余のスルフヒドリル基を混合ジスルフィド基（カルボキシメチルアラニルジスルフィド基）に変換させる。こうして十分な量の混合ジスルフィド基を高分子量の羽毛ケラチン蛋白質分子鎖に導入することができることになるものである。

[0045] 以上のように、本発明の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法によれば、廃鶏やブロイラー処理等により生じた羽毛を処理して簡単にかつ低廉に可溶性羽毛ケラチン蛋白質に変換し、これを有効利用することができる。

## 実施例 1

[0046] 布団中綿用の羽毛（ホワイトグース100%）を中性洗剤で洗浄後、水洗いし、乾燥させた。この羽毛を1gずつ４本の300mlのフラスコに投入し、その内３本には、それぞれ水酸化ナトリウムでpH11.0に調整した0.2mol/l濃度のチオグリコール酸溶液50mlを加え、残りの１本には水酸化ナトリウムでpH11.0に調整した0.5mol/l濃度のチオグリコール酸溶液50mlを加え、その内のNa-TGA濃度0. 5mol/l濃度を加えた１本については、30℃で48時間の攪拌・振とうを行い、他の３本の内の２本については、いずれも30℃で、ただし一方は48時間、他方は120時間の攪拌・振とうを行い、残りの１本については、50℃で1/3時間の攪拌・振とうを行い、その後、いずれの溶液の温度も30℃に調整してから酢酸でpH7に調整した。これらの溶液に0.4mol/l濃度の臭素酸ナトリウム溶液50mlをそれぞれ4時間掛けて徐々に加え、その後、20時間放置した（従って溶液中の臭素酸ソーダの濃度は0.2mol/l）。次いで、それらの溶液から不溶物を濾別し、各々酢酸でpHを3.5付近に調整して高分子物質を沈澱させ、遠心分離によりその沈殿物を回収した。沈殿物重量及び不溶残渣重量Wresは真空乾燥してから測定を行った。沈殿法による沈殿物重量測定では、沈殿物の回収過程で実験誤差が入り信頼性に欠けたので、不溶残渣重量から次の数１により、残渣収率Yres(%)を求めた。

[0047]

[数1]

$$Yres(\%)=100\ (W_0-Wres)\ /W_0$$

(Yres(%)：残渣収率、$W_0$：投入羽毛重量、Wres：不溶残渣重量)

[0048] 次の表１に還元反応条件と残渣収率を示す。

[0049] [表1]

還元反応条件と残渣収率

| Na-TGA 濃度 (mol/l) | 反応温度 (℃) | 時間(h) | 残渣収率 Yres (%) |
|---|---|---|---|
| 0.2 | 50 | 1/3 | 84 |
| 0.2 | 30 | 48 | 99 |
| 0.2 | 30 | 120 | 100 |
| 0.5 | 30 | 48 | 95 |

試料: 1g ダウン, Na-TGA(浴比 50 倍), pH11.0;
酸化: 0.2mol/l $NaBrO_3$, 30℃, 24h.

[0050] 以上の表１のデータから理解できるように、この実施例１によれば、TGA濃度0.2mol/l以上、温度30℃以上、４８時間以上の反応時間で行った可溶性羽毛ケラチン蛋白質の収率は95%以上に達する。50℃、1/3時間の還元反応でも84%が得られた。

## 実施例 2

[0051] 布団中綿用の羽毛（ホワイトグース100%）を中性洗剤で洗浄後、水洗いし、乾燥させ約5mmに細断した。この羽毛を0.2gずつ50mlの１０本のフラスコに投入し、水酸化ナトリウムでpH9.0、10.0、10.5、10.75、11.0、11.25、11.5、12.0、12.5、13.0に調整した0.2mol/l濃度のチオグリコール酸溶液10mlをそれぞれ上記フラスコ中に加え、これらを30℃、48時間攪拌・振とうした後、これらの溶液を30℃にしてから酢酸でpH7に調整した。これらの溶液に0.4mol/l濃度の臭素酸ナトリウム溶液10mlを4時間掛けて徐々に加え、その後、20時間放置した（従って溶液中の臭素酸ソーダの濃度は0.2mol/l）。次いで、それらの溶液から不溶物を取り除くため濾別した。各々濾液に酢酸ソーダを加えてpH8に調整してから各溶液を分画分子量１０００～５０００のゲルを充填したカラムに通して脱塩、分取し、全フラクションを凍結乾燥

させた。その凍結乾燥重量Wsolを測定した。可溶性羽毛ケラチン蛋白質の収率(%)を凍結乾燥収率Ysolとして次の数２のように定義して求めた。

[0052] [数2]

$$Ysol(\%) = 100(Wsol/W_0)$$

(Ysol(%)：凍結乾燥収率、Wsol：凍結乾燥重量、$W_0$：投入羽毛重量)

[0053] 表２にチオグリコール酸ナトリウム（Na-TGA）還元系のpH変化と凍結乾燥収率Ysolとの関係を示す。

[0054] [表2]

チオグリコール酸ナトリウム（Na-TGA）還元系の pH と凍結乾燥収率 Ysol

| pH | 9.0 | 10.0 | 10.5 | 10.75 | 11.0 | 11.25 | 11.5 | 12.0 | 12.5 | 13.0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ysol (%) | 31.0 | 71.5 | 88.0 | 85.3 | 99.0 | 97.3 | 93.6 | 97.9 | 99.0 | 99.9 |

試料: 0.2g ダウン, 還元: 0.2mol/l Na-TGA10mL（浴比 50 倍), 30℃, 48h;
酸化: 0.2mol/l $NaBrO_3$, 30℃, 24h.

[0055] 表２のデータから実施例２によれば還元系のpH11以上では殆ど完全に羽毛ケラチンから可溶性ケラチン蛋白質を取り出すことができることが分かる。

## 実施例 3

[0056] 布団中綿用の羽毛（ホワイトグース100%）を中性洗剤で洗浄後、水洗いし、乾燥させ約5mmに細断した。この羽毛を0.2gずつ６本の50mlのフラスコに投入し、水酸化ナトリウムでpH11.0に調整した0.025、0.05、0.10、0.15、0.20、0.50mol/l濃度のチオグリコール酸溶液10mlを各フラスコ中に加え、これらを30℃、48時間攪拌・振とうした後、これらの溶液を30℃にしてから酢酸でpH7に調整した。これらの溶液に0.4mol/l濃度の臭素酸ナトリウム溶液10mlを4時間掛けて徐々に加え、その後、20時間放置した（従って溶液中の臭素酸ソーダの濃度は0.2mol/l）。次いで、それらの溶液から不溶物を取り除くため濾別した。各濾液に酢酸ソーダを加えてpH8に調整してから各溶液を分画分子量１０００～５０００のゲルを充填したカラムに通して脱塩、分取し、全フラクションを凍結乾燥させた。凍結乾燥重量Wsol及び不溶残渣重量Wresを測定した。後者の重量は真空乾燥してから測定を行った。可溶性羽毛ケラチン

蛋白質の収率(%)を、凍結乾燥収率Ysol及び残渣収率Yresを、それぞれ次の数３、数４のように定義して求めた。

[0057] [数3]

$$Ysol(\%)=100(Wsol/W_0)$$

（Ysol(%)：凍結乾燥収率、Wsol：凍結乾燥重量、$W_0$：投入羽毛重量）

[数4]

$$Yres(\%)=100\ (W_0-Wres)\ /W_0$$

（Yres(%)：残渣乾燥収率、Wo：投入羽毛重量、Wres：不溶残渣重量）

[0058] 表３にチオグリコール酸（Na-TGA）濃度変化と凍結乾燥収率及び残渣収率との関係を示す。

[0059] [表3]

Na-TGA 濃度変化と収率

| Na-TGA 濃度 (mol/l) | 凍結乾燥収率, Ysol (%) | 残渣収率, Yres (%) |
|---|---|---|
| 0.025 | 13.7 | 10.0 |
| 0.05 | 45.0 | 43.5 |
| 0.10 | 85.5 | 82.6 |
| 0.15 | 90.8 | 88.3 |
| 0.20 | 94.3 | 90.4 |
| 0.50 | 87.1 | 85.7 |

試料: 0.2g ダウン, Na-TGA(浴比 50 倍), pH11.0,30℃, 48h;
酸化: 0.2mol/l $NaBrO_3$, 30℃, 24h.

[0060] 実施例３によれば、表３のデータから理解されるように、チオグリコール酸濃度により凍結乾燥収率及び残渣乾燥収率は大きく変化しており、チオグリコール酸濃度が可溶性羽毛ケラチン蛋白質の収率に決定的な影響をもつことが見出された。表３のデータから、チオグリコール酸濃度は0.20mol/l濃度のときに最も良い結果が得られ、また凍結乾燥収率及び残渣収率の両者は実験誤差内で一致することも分かった。

## 実施例 4

[0061] 布団中綿用の羽毛（ホワイトグース100%）を中性洗剤で洗浄後、水洗いし

、乾燥させ約5mmに細断した。この羽毛を0.2gずつ50mlの５本のフラスコに投入し、水酸化ナトリウムでpH11.0に調整した0.20mol/l濃度のチオグリコール酸溶液を5、6、8、10及び20ml（浴比として、各々25、30、40、50及び100倍）を各々上記フラスコ中に加え、これらを30℃、48時間攪拌・振とうした後、これらの溶液を30℃にしてから酢酸でpH7に調整した。これらの溶液に0.4mol/l濃度の臭素酸ナトリウム溶液10mlを4時間掛けて徐々に加え、その後、20時間放置した（従って溶液中の臭素酸ソーダの濃度は0.2mol/l）。次いで、それらの溶液から不溶物を取り除くため濾別した。濾液に酢酸ソーダを加えてpH8に調整してから溶液を分画分子量１０００～５０００のゲルを充填したカラムに通して脱塩、分取し、全フラクションを凍結乾燥させた。凍結乾燥重量、Wsolを測定した。浴比の変化と収率との結果を表４に示す。

[0062] [表4]

浴比の変化と収率

| 浴比(倍) | 25 | 30 | 40 | 50 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ysol (%) | 71.9 | 83.4 | 87.1 | 90.4 | 86.7 |

試料: 0.2g ダウン, 0.2mol/l Na-TGA, pH11.0,30℃,48h;
酸化: 0.2mol/l $NaBrO_3$, 30℃, 24h.

[0063] 実施例４によれば、表4のデータから分かるように、浴比５０倍のとき収率は最大値を示す。羽毛中のジスルフィド(-SS-)結合含量に対して過大量のチオグリコール酸(TGA)の存在は、前記化６の反応の抑制が十分に機能せず、前記化２及び化１の反応が起こるためである。

## 実施例 5

[0064] 還元系のpHを変化させて得られた可溶性羽毛ケラチンタンパク質のSDS-PAGEによる電気泳動法を用いて分子量についてのキャラクタリゼイションを行った。試料として、実施例２に於ける表2中pH10.0及び10.5の条件（還元: 0.2mol/l Na-TGA10mL（浴比50倍), 30℃, 48h; 酸化: 0.2mol/l $NaBrO_3$, 30℃, 24h.）で得られた、それぞれ凍結乾燥収率が71.5 及び88.0 %のSDS電気泳動パターンを未処理羽毛のそれと共に図１に示す。何れの試料の分子量も約１２６００を示し、未処理羽毛（オリジナル）のタンパク質と同様に単分散状態

のタンパク質であり、可溶化処理による分子量低下は起こらないことが分かった。

## 産業上の利用可能性

[0065] 本発明によれば、廃鶏やブロイラー処理等により生じた羽毛を処理して容易に可溶性ケラチン蛋白質に変換することが可能であり、焼却処分されてきた羽毛類を、ダメージ毛髪或いは爪の修復などの美容分野、機能性蛋白質フィルムや蛋白質成形品等の食品や工業分野、或いは水田に投入する肥料等として農業分野で有効利用することができる。

# 請求の範囲

[請求項1] 鳥類の羽毛を浸漬した水にアルカリ性に調整したチオグリコール酸(TGA)溶液を加えて攪拌振とうする第１工程と、

第１工程で得られた溶液を中性付近に調整し、この溶液に酸化剤を加えて所定時間放置することにより可溶性羽毛ケラチン蛋白質を製造する第２工程と、

による可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項2] 前記第１工程のチオグリコール酸溶液のアルカリ性への調整をリチウム、ナトリウム、アンモニウム又はカリウムの水酸化物によって行い、これによってそれらの溶液をpH8.0～13に調整することとした請求項１の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項3] 前記第２工程の溶液の中性付近への調整を該溶液に酢酸を添加することで行い、これによって該溶液をpH5～8.0に調整することとした請求項１又は２の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項4] 前記第１工程の攪拌振とうを、前記溶液を20～50℃に保持しながら1/3～120時間行うこととした請求項１、２又は３の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項5] 前記第２工程の酸化剤として、過酸化水素、臭素酸ソーダ又は空気を用いた請求項１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項6] 前記第２工程の酸化剤として過酸化水素又は臭素酸ソーダを用い、該過酸化水素又は臭素酸ソーダを前記放置する時間の内の前半の一定時間の間に継続して徐々に添加することとした請求項１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

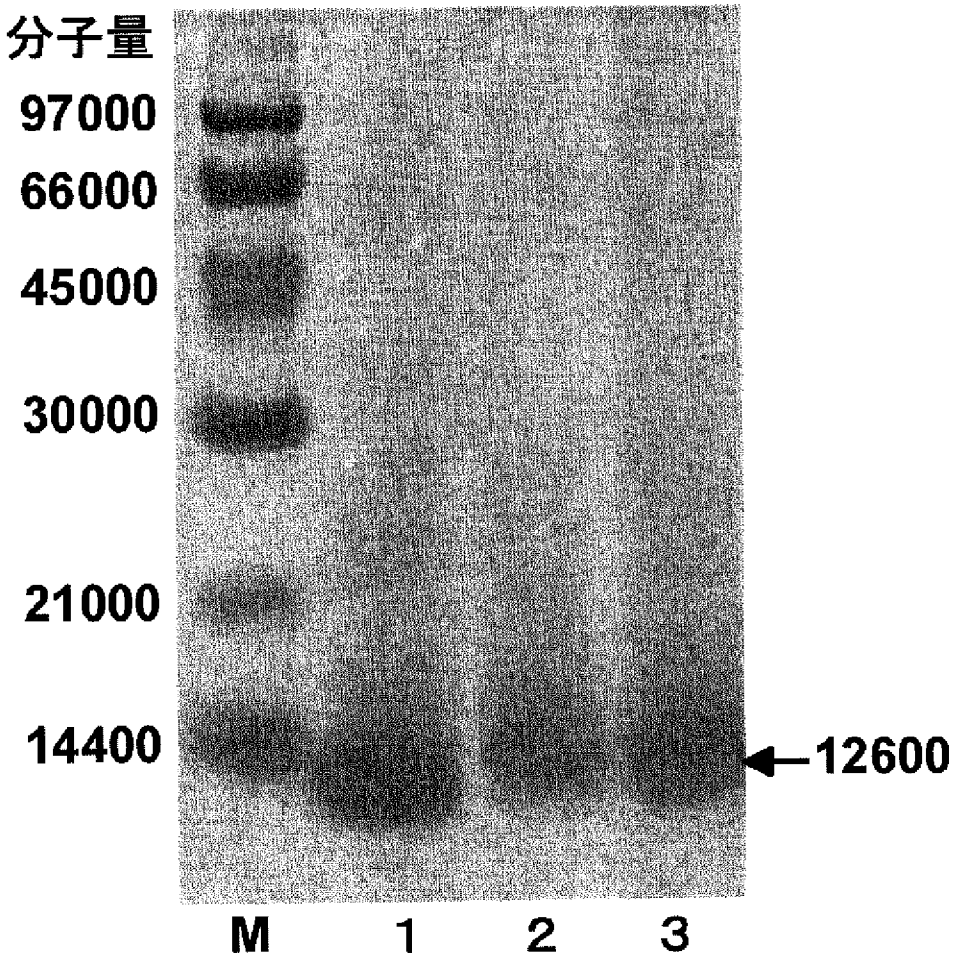
[請求項7] 前記第２工程の酸化剤として空気を用い、該空気を前記放置する全時間中に継続的にバブリングすることで添加することとした請求項１、２、３又は４の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項8] 前記第２工程で得られた溶液から不溶物を濾過して取り除き、その

後、該溶液をpH2～4付近に調整して溶解している羽毛ケラチン蛋白質を沈澱させ、遠心分離により沈殿した羽毛ケラチン蛋白質を回収することによる請求項１、２、３、４、５、６又は７の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[請求項9] 前記第２工程で得られた溶液をpH7～8に調整した後、溶液を濾過して不溶物を取り除き、その後、該溶液を分画分子量１０００～５０００のゲルカラムに通して脱塩し、溶解している羽毛ケラチンタンパク質を分取し、すべてのフラクションを集めて、凍結乾燥することによる請求項１、２、３、４、５、６又は７の可溶性羽毛ケラチン蛋白質の製造方法。

[図1]




SDS-PAGEパターン:Mマーカー，(1)未処理羽毛，(2)pH10.0,(3)pH10.5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/002451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
*C07K14/78*(2006.01)i, *C08H1/00*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K14/78, C08H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | JP 7-126296 A (Kao Corp.),<br>16 May, 1995 (16.05.95),<br>Whole document; Par. Nos. [0011] to [0022]<br>& US 5763583 A & EP 628573 A1<br>& CN 1105029 A | 1-9 |
| X | JP 9-2919 A (Kao Corp.),<br>07 January, 1997 (07.01.97),<br>Whole document; Par. Nos. [0009] to [0020]<br>(Family: none) | 1-9 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 29 July, 2009 (29.07.09) | 11 August, 2009 (11.08.09) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br><br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００９／００２４５１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/78(2006.01)i, C08H1/00(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/78, C08H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|---|---|
| 日本国実用新案公報 | １９２２－１９９６年 |
| 日本国公開実用新案公報 | １９７１－２００９年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２００９年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２００９年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求項の番号 |
|---|---|---|
| X | JP 7-126296 A（花王株式会社）1995.05.16, 全体、【００１１】－【００２２】段落 & US 5763583 A & EP 628573 A1 & CN 1105029 A | １－９ |
| X | JP 9-2919 A（花王株式会社）1997.01.07, 全体、【０００９】－【００２０】段落（ファミリーなし） | １－９ |

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 |
|---|---|
| ２９．０７．２００９ | １１．０８．２００９ |


国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３７６３
濱田　光浩
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８