

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24561013

研究課題名(和文)低温創製バイオマス炭吸着タンパク質の熱安定化特性

研究課題名(英文)Thermal Stabilization Property of Proteins Adsorbed onto Biomass Charcoal Powder Prepared at Low Temperatures

研究代表者

乗富 秀富(Noritomi, Hidetaka)

首都大学東京・都市環境科学研究科・助教

研究者番号：20237895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギーや機能性材料へのバイオマスの利活用は、循環型社会を構築していくための重要な挑戦の一つである。植物バイオマス廃棄物から低温熱分解・炭化処理により調製されたバイオマス炭が、タンパク質の耐熱化担体として大変有効であることを見出した。バイオマス炭はタンパク質を効果的に吸着することができた。バイオマス炭吸着タンパク質の熱安定性は遊離タンパク質よりはるかに高く、また水溶液pHやイオン強度、温度などの吸着条件に強く依存した。さらに、タンパク質構造の観点から耐熱化のメカニズムも明らかにした。他方、タンパク質変性剤である有機溶媒中においてもバイオマス炭はタンパク質の変性を抑えることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The utilization of biomass for energies and functional materials is one of the most important challenges to establish a recycling society. We have found out that biomass charcoal powder (BCP), which is prepared from plant biomass waste by pyrolysis at low temperatures, is very useful as a carrier for the thermal stabilization of proteins. Proteins were effectively adsorbed onto BCP. The thermal stability of proteins adsorbed onto BCP was much greater than that of free proteins, and was strongly dependent upon the adsorption conditions such as solution pH, ionic strength, and temperature. Moreover, we have revealed the heat-resistant mechanism on the basis of the structure of proteins. On the other hand, the denaturation of proteins was efficiently inhibited in an organic solvent, which worked as a denaturant, by the adsorption of proteins onto BCP.

研究分野：酵素工学

キーワード：低温創製バイオマス炭 タンパク質 熱安定化 吸着 固定化 残存活性 リゾチーム -キモトリプシン

1. 研究開始当初の背景

エネルギーや機能性材料へのバイオマスの利活用は、循環型社会を構築していくための重要な挑戦の一つである。しかしながら、特に植物バイオマス廃棄物の機能性材料としての利用は十分に行われておらず、新規の高付加価値な用途開発が望まれている。

他方、タンパク質は優れた生物活性機能を発揮することから各方面での応用が期待されているが、複雑な高次構造を有するため種々の原因で変性・失活してしまう。特に、タンパク質の貯蔵や酵素反応、バイオセンサ、タンパク質製剤創製、食品添加物調製過程などにおいて、熱によるタンパク質の変性および変性タンパク質の凝集体形成による不活性化や不溶化が問題となる。我々は、植物バイオマス廃棄物から窒素雰囲気下低温熱分解・炭化処理により調製されたバイオマス炭にタンパク質を吸着することによりタンパク質の熱変性や凝集を著しく改善することができることを見出した(乗富ら 特願 2008-327007, 乗富ら 特願 2010-189425, Noritomi et al. NCSS2010, 2011, Noritomi et al. J. Biomedical Sci. Eng., 2011)。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用の幅広い産業応用を目指すための基盤技術を確立するために、以下の研究を推進した。

- (1) 低温創製バイオマス炭によるタンパク質の吸着によりタンパク質の熱安定性が促進されるので、まず低温創製バイオマス炭のタンパク質吸着挙動について研究を行った。
- (2) 低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用と低温創製バイオマス炭へのタンパク質吸着条件との関連性を詳細に検討した。
- (3) 低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用に対する一般性の評価を行

うために、タンパク質の種類を広げて低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化能に関して調査した。

3. 研究の方法

(1) 低温創製バイオマス炭のタンパク質吸着挙動

北海道産規格外廃棄小豆や廃棄竹材などから調製された低温創製バイオマス炭へのタンパク質の吸着量を、吸着操作時のタンパク質の仕込量や低温創製バイオマス炭の仕込量、温度、水溶液条件(pH、塩濃度)を変えて測定した。

また、低温創製バイオマス炭の物理的及び化学的特性を検討するために、バイオマス炭の SEM 観察や比表面積、細孔分布、電位、ラマンスペクトル、固体 CP/MAS ^{13}C -NMR、X線光電子分光の測定を行った。

(2) 低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用と低温創製バイオマス炭へのタンパク質吸着条件との関連性

異なった吸着条件により調製された低温創製バイオマス炭吸着タンパク質の熱安定化特性を検討した。タンパク質の熱安定化特性として、加熱処理(90、30分間:完熟卵のできる条件)前におけるタンパク質の活性に対する加熱処理後のタンパク質の活性の割合である残存活性を指標とした。なお、モデルタンパク質である卵白リゾチームの活性は、グラム陽性菌である *Micrococcus lysodeikticus* の溶菌速度の測定により算出した。

(3) 低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用に対する一般性の評価

低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化因子を抽出して低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用のメカニズムを解明するために、吸着前後におけるタンパク質の円偏光二色性スペクトル測定や赤外吸収スペクトル測定を行った。得られた知見に基づいて、さらにタンパク質の種類を広げて低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定

化作用の一般的特性を明らかにするために、新たなモデルタンパク質として γ -キモトリプシンを用いて熱変性曲線と熱失活曲線を評価した。

4. 研究成果

(1)北海道産規格外廃棄小豆ならびに廃棄竹材などから窒素雰囲気下、450℃以下の低温で熱分解・炭化処理を行うことにより得られた低温創製バイオマス炭への卵白リゾチームや γ -キモトリプシンの吸着に関して検討した結果、以下の知見が得られた。

タンパク質の吸着量は低温創製バイオマス炭の種類に依存し、リゾチームと γ -キモトリプシンは小豆炭及びバガス炭でそれぞれ最も高い吸着量を示した。

低温創製バイオマス炭へのリゾチーム及び γ -キモトリプシンの吸着は Freundlich 型吸着等温式で相関できた。

低温創製バイオマス炭へのリゾチーム及び γ -キモトリプシンの吸着量は溶液 pH に強く依存し、リゾチームと γ -キモトリプシンの最大吸着量は中性付近及び弱酸性付近でそれぞれ得られた。

低温創製バイオマス炭へのリゾチーム及び γ -キモトリプシンの吸着量は溶液含有塩濃度(イオン強度)の影響を受け、塩濃度上昇とともに吸着量は減少した。

低温創製バイオマス炭へのリゾチーム及び γ -キモトリプシンの吸着量は吸着温度に強く依存し、25℃付近で最大吸着量が得られた。

(2)低温創製小豆炭吸着リゾチームの活性や安定性に関して検討を行った結果、以下の知見が得られた。

低温創製小豆炭吸着リゾチームの最適活性は、小豆炭の表面電荷に起因して生のリゾチームに比べてアルカリ側にシフトした。

低温創製小豆炭吸着リゾチームは生のリゾチームに比べて低温保存安定性が

優れていることを見出した。

低温創製小豆炭吸着リゾチームの熱安定性は吸着量にほとんど依存しないことを明らかにした。

90℃における低温創製小豆炭吸着リゾチームの熱失活曲線から得られた半減期は生のリゾチームに比べて7倍大きい値を示した。

(3)低温創製バイオマス炭の物理化学的特性を検討した結果、以下の知見が得られた。

SEM 観察より、低温創製バイオマス炭の表面形状は、種類に強く依存することが明らかとなった。

ラマンスペクトル測定の結果より、低温創製バイオマス炭はアモルファスカーボンであることがわかった。

低温創製バイオマス炭の電位や固体 CP/MAS ^{13}C -NMR、X線光電子分光を測定した結果、低温創製バイオマス炭表面で含酸素官能基の存在が確認できた。したがって、吸着特性は主にタンパク質と低温創製バイオマス炭表面間の静電相互作用に起因すると考えられる。

低温創製バイオマス炭の比表面積は数百 m^2/g のオーダーであった。

低温創製バイオマス炭の細孔径ピークは 2.6 nm 未満であった。一方、リゾチームや γ -キモトリプシンの大きさは細孔径ピークよりはるかに大きい。したがって、タンパク質は主にバイオマス炭表面付近に吸着されると考えられる。

(4)低温創製竹炭吸着リゾチームの熱安定化特性における吸着条件の効果に関して検討を行った結果、以下の知見が得られた。

90℃加熱処理後の低温創製竹炭吸着リゾチームの残存活性は、吸着操作時における水溶液 pH に強く依存した。

90℃加熱処理後の低温創製竹炭吸着リゾチームの残存活性は、吸着操作時における塩濃度により影響され、塩濃度の増

加にともない減少傾向にあった。

90 加熱処理後の低温創製竹炭吸着リゾチームの残存活性は吸着操作時における温度が低温ほど向上した。

(5)低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化因子を抽出してタンパク質熱安定化作用のメカニズムを解明するために、竹炭吸着前後におけるリゾチームの円偏光二色性スペクトルと赤外吸収スペクトル測定を行い、リゾチームの立体構造と残存活性との関係を検討した結果、以下の知見が得られた。

吸着条件は吸着されたリゾチームの立体構造に強く影響を与えた。

吸着されたリゾチームの立体構造が天然構造に近いほど、より高い熱安定化能が発揮されることが判明した。

吸着されたリゾチームの立体構造が同様の場合、リゾチームと竹炭表面間の静電相互作用が大きいほど熱安定化に優れていた。

(6)低温創製バイオマス炭のタンパク質熱安定化作用の一般的特性を明らかにするために、モデルタンパク質として α -キモトリプシンを用いて、低温創製竹炭吸着 α -キモトリプシンの熱変性曲線や熱失活曲線などを調査した。その結果、以下の知見が得られた。

低温創製竹炭吸着 α -キモトリプシンの熱変性曲線は生の α -キモトリプシンに比べて高温側にシフトした。

90 における低温創製竹炭吸着 α -キモトリプシンの熱失活曲線から得られた半減期は生の α -キモトリプシンに比べて2.6倍大きい値を示した。

リゾチームと同様に α -キモトリプシンにおいても、吸着条件(水溶液 pH、塩濃度、温度)を調整することにより熱安定化能を向上させることに成功した。

(7)低温創製バイオマス炭への吸着は α -キモトリプシンに有機溶媒耐性を賦与することができることを見出した。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hidetaka Noritomi, Shunichi Kurihara, Nobuyuki Endo and Satoru Kato, Heat-resistant properties of α -chymotrypsin adsorbed onto biomass charcoal powder, *J. Biomaterials Nanobiotechnol.*, 査読有, 5(3), 2014, pp.179-185.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbnb.2014.53021>

Hidetaka Noritomi, Keito Hishinuma, Shyunichi Kurihara, Jumpei Nishigami, Tetsuya Takemoto, Nobuyuki Endo and Satoru Kato, Adsorption of α -chymotrypsin on plant biomass charcoal, *J. Surf. Eng. Mater. Adv. Technol.*, 査読有, 3(4), 2013, pp.269-274.

<http://dx.doi.org/10.4236/jsemat.2013.24036>

Hidetaka Noritomi, Daiki Iwai, Ryotaro Kai, Masahiko Tanaka, and Satoru Kato, Adsorption of lysozyme on biomass charcoal powder prepared from plant biomass wastes, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 査読有, 46(3), 2013, pp.196-200.

DOI: 10.1252/jcej.12we182

Hidetaka Noritomi, Reona Ishiyama, Ryotaro Kai, Daiki Iwai, Masahiko Tanaka and Satoru Kato, Immobilization of lysozyme on biomass charcoal powder prepared from plant biomass wastes, *J. Biomaterials Nanobiotechnol.*, 査読有, 3(4), 446-451 (2012).

DOI: 10.4236/jbnb.2012.34045

〔学会発表〕(計 22 件)

Hidetaka Noritomi, Shunichi Kurihara, Nobuyuki Endo, Satoru Kato and Katsumi

Uchiyama, Effect of adsorption condition on thermal stability of proteins adsorbed onto biomass charcoal powder, SEE-Mie2015, (November 19, 2015)Mie, Mie Center Palace Miyako Hotel.

乗富 秀富, 栗原 駿一, 遠藤 信行, 加藤 覚, 内山 一美, 低温創製竹炭吸着リゾチームの耐熱性に対する吸着条件の効果, 分離技術会年会 2015, S3-2, 2015年5月30日, 川崎, 明治大学.

Junpei Nishigami, Hidetaka Noritomi, Nobuyuki Endo, and Satoru Kato, Catalytic activity of protease immobilized onto biomass charcoal prepared at low temperatures in nonaqueous solvents, Active Enzyme Molecule 2014, P-8(December 18, 2014)Toyama, Toyama International Conference Center.

Shunichi Kurihara, Hidetaka Noritomi, Nobuyuki Endo, and Satoru Kato, Thermal stability of enzymes adsorbed on plant biomass charcoal, Active Enzyme Molecule 2014, P-9(December 17, 2014)Toyama, Toyama International Conference Center.

Shunichi Kurihara, Hidetaka Noritomi, Nobuyuki Endo, and Satoru Kato, Optimization of adsorption condition for thermal stabilization of protein adsorbed on plant biomass charcoal, ICSST14, GP-22(November 1, 2014)Nara, Nara Prefectural New Public Hall.

Junpei Nishigami, Hidetaka Noritomi, Nobuyuki Endo, and Satoru Kato, Solvent effect on the activity of protease immobilized onto bamboo charcoal prepared at low temperatures,

ICSST14,GP-23(November 1, 2014)Nara, Nara Prefectural New Public Hall.

栗原 駿一, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, バイオマス炭吸着タンパク質の熱安定性における吸着条件の最適化, 第4回CSJ化学フェスタ2014 P1-097, 2014年10月14日, 東京, タワーホール船堀.

西上 純平, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, 低温創製竹炭に固定化されたプロテアーゼの活性に対する溶媒効果, 第4回CSJ化学フェスタ2014, P2-112, 2014年10月14日, 東京, タワーホール船堀.

乗富 秀富, 栗原 駿一, 遠藤 信行, 加藤 覚, バイオマス炭吸着プロテアーゼの耐熱性, 第65回コロイドおよび界面化学討論会, P158, 2014年9月5日, 東京, 東京理科大学.

乗富 秀富, 西上 純平, 遠藤 信行, 加藤 覚, バイオマス炭吸着プロテアーゼの有機溶媒耐性, 第65回コロイドおよび界面化学討論会, P159, 2014年9月5日, 東京, 東京理科大学.

栗原 駿一, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, 竹炭への固定化による -キモトリプシンの熱安定化, 第3回CSJ化学フェスタ2013, P2-84, 2013年10月21日, 東京, タワーホール船堀.

西上 純平, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, 竹炭への固定化による -キモトリプシンの非水媒体中における触媒活性の向上, 第3回CSJ化学フェスタ2013, P2-81, 2013年10月21日, 東京, タワーホール船堀.

Hidetaka Noritomi, Reona Ishiyawa, Daiki Iwai, Nobuyuki Endo, and Satoru Kato, Activity and stability of HEWL adsorbed onto plant biomass charcoal, Enzyme Engineering XXII, Poster Number 69 (September 23, 2013)Toyama,

Toyama International Conference Center.

乗富 秀富, 石山 玲央奈, 岩井 大輝, 遠藤 信行, 加藤 覚, 卵白リゾチームの触媒特性に及ぼすバイオマス炭界面の影響, 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会, P152, 2013 年 9 月 20 日, 名古屋, 名古屋工業大学.

西上 純平, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, 有機溶媒中における低温創製バイオマス炭吸着 -キモトリプシンの触媒活性, 分離技術会年会 2013, S4-P3, 2013 年 5 月 24 日, 千葉, 日本大学.

栗原 駿一, 乗富 秀富, 遠藤 信行, 加藤 覚, 水溶液中における低温創製バイオマス炭吸着 -キモトリプシンの触媒特性, 分離技術会年会 2013, S4-P2, 2013 年 5 月 24 日, 千葉, 日本大学.

乗富 秀富, 岩井 大輝, 菱沼 慶人, 遠藤 信行, 加藤 覚, 低温創製バイオマス炭の構造と酵素タンパク質の吸着挙動, 分離技術会年会 2013, S4-P1, 2013 年 5 月 24 日, 千葉, 日本大学.

乗富 秀富, 岩井 大輝, 田中 正彦, 加藤 覚, 植物バイオマス廃棄物を原料とした低温創製炭の構造とタンパク質の吸着特性, 第 26 回日本吸着学会研究発表会, 2-22, 2012 年 11 月 15 日, つくば, 産業技術総合研究所.

Hidetaka Noritomi, Ryotaro Kai, Masahiko Tanaka, and Satoru Kato, Thermostability of lysozyme immobilized on biomass charcoal powder, ISSUE2012, 27 (November 2, 2012) Tokyo, Tokyo Metropolitan University.

乗富 秀富, 内田 雄, 栗原 駿一, 西上 純平, 甲斐 龍太郎, 田中 正彦, 加藤 覚, 低温創製バイオマス炭吸着リゾチームの熱安定性, 酵素工学研究会第 68 回講

演会, C2, 2012 年 10 月 5 日, 東京, 東京大学.

⑲ 乗富 秀富, 岩井 大輝, 田中 正彦, 加藤 覚, 低温熱分解によるバイオマス炭の創製とタンパク質の吸着, 化学工学会横浜大会 B116, 2012 年 8 月 30 日, 横浜, 横浜国立大学.

⑳ Hidetaka Noritomi, Ryotaro Kai, Masahiko Tanaka, and Satoru Kato, Thermostability of lysozyme immobilized on biomass charcoal powder, 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, P11-12 (May 30, 2012) Kanazawa, Kanazawa Excel Hotel Tokyo.

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: タンパク質の熱安定化方法および熱安定化されたタンパク質溶液

発明者: 乗富 秀富, 佐藤 邦道, 田中 正彦

権利者: 首都大学東京, 株式会社 EEN

種類: 特許

番号: 特許 5241474 号

出願年月日: 平成 20 年 12 月 24 日

取得年月日: 平成 25 年 4 月 12 日

国内外の別: 日本

〔その他〕

乗富 秀富, バイオマス炭のたんぱく質担体への応用について, 化学工業日報, 2013 年 11 月 22 日金曜日版 5 面.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乗富 秀富 (NORITOMI, Hidetaka)

首都大学東京・都市環境科学研究科・助教
研究者番号: 20237895

(2) 研究協力者

石山 玲央奈 (ISHIYAMA, Reona)

岩井 大輝 (IWAJ, Daiki)

遠藤 信行 (ENDO, Nobuyuki)

甲斐 龍太郎 (KAI, Ryotaro)

加藤 覚 (KATO, Satoru)

栗原 駿一 (KURIHARA, Shunichi)

佐藤 邦道 (SATO, Kunimichi)

竹本 哲也 (TAKEMOTO, Tetsuya)

田中 正彦 (TANAKA, Masahiko)

西上 純平 (NISHIGAMI, Junpei)

菱沼 慶人 (HISHINUMA, Keito)