

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500565

研究課題名 (和文) もみがら抽出粗酵素を用いた色素の退色反応と反応活性化

研究課題名 (英文) Dicoloration reaction characteristic and reactive activation of dye using enzyme extracted from rice-full.

研究代表者

森田 みゆき (MORITA MIYUKI)

北海道教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10174434

研究成果の概要：もみがらから粗酵素 (RPO) の抽出精製、濃縮の検討を行った。初期の濃縮は、イソプルパノールを用いると簡便ではあるが収率が低くなるため、硫酸を用いることとした。精製は硫酸分画、イオンクロマト、ゲルろ過の 3 段階処理を行うことで、比活性が増大することが分かった。また、色素の退色反応特性や反応の活性化について検討を行い、退色反応の際、RPO 単独では有色の反応生成物が退色反応後に残存するのに対して RPO-過炭酸ナトリウムでは可視光領域の吸収が全て消失し、可視光に吸収を有する反応生成物が残存しないことが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：生活環境工学

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：酵素反応, バイオマス, 色素, 退色, 環境材料

1. 研究開始当初の背景

水溶液系の染料の分解は衣類の洗浄における漂白剤や、染色化学工業における排水処理の分野で広く検討されている。我々は西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ (POD) を触媒とした過酸化水素を用いる色素の退

色反応が中性かつ室温で進行することに注目し、速度論的な研究からアゾ色素の移染防止反応への応用を試みてきた (以下引用文献参照)。その結果、エネルギーコストも低く、環境負荷の低い漂白剤の可能性が示唆された。

しかし、実用化のためには西洋ワサビは生産量そのものが少なく原料コストが高く、また酵素を抽出したあとの利用法は難しい。一方、農林水産省を中心としてバイオマス資源の循環をめざした検討が行われており、米のもみからは、平成 12 年にバイオマス資源に指定され、年間 208 万トン発生し、この廃棄物は、ケイ酸質であるため固く破碎が難しいため、効率のよい利用法や処理法の開発が求められている。

もみがりには主成分のケイ酸質の他に POD も含まれているが、利用法の検討はなされていなかったため、基盤研究 (C) (2) (平成 15 年度～平成 16 年度)「バイオマスを利用した環境負荷低減型のモミガラ由来酵素系漂白剤の開発」で、酵素系漂白剤としての基礎的検討として、もみガラ由来 POD のオレンジ II の退色反応を検討し、原料コストを抑えた環境負荷低減型の漂白剤を開発を試みた。その結果、粗酵素の抽出法の再検討、濃縮法の検討、または反応条件の再構築の必要性が明かとなった。

引用文献 例えば

・森田みゆき、山口江利子、小松恵美子、伊藤理恵、上館民夫、渡辺寛人、西洋ワサビペルオキシダーゼを触媒とするオレンジ II の退色機構、日本油化学会誌、vol. 48, No. 8, pp. 793-800 (1999)

・上館民夫、柴田剛典、渡辺寛人、森田みゆき、ペルオキシダーゼ-過酸化水素漂白剤系に及ぼすアゾ色素の酸化電位の影響、日本油化学会誌、vol. 48, No. 5, pp. 497-499 (1999)

・上館民夫、柴田剛典、渡辺寛人、森田みゆき、p-ヨードフェノールを活性化剤とするペルオキシダーゼ-過酸化水素漂白剤系によるアゾ色素の退色反応、日本油化学会誌、vol. 47, No. 2, pp. 1345-1350 (1998)

2. 研究の目的

背景で述べた手がかりを基に研究を進展させ、今日的課題であるバイオマスの一つであるイネモミガラに含まれるモミガラ由来 POD の利用方法として、環境負荷低減型の酵素系漂白剤を開発することは極めて意義のあることである。これは、国際的観点から言えば、バイオマスの有効利活用は「地球温暖化防止」「循環型社会の形成」「農業の活性化」など大いに日本に期待される研究課題でもある。

本研究では、現状で課題となっている粗酵素の抽出法の再検討、濃縮法の検討、反応条件の再構築等を検討し、実用化の可能性の糸口とすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下のことについて、POD 活性はグアヤコール法、色素の退色反応は主にオレンジ II を用いて、速度論的に検討を行った。

(1) POD の抽出

- ・抽出粗酵素の品種間の影響
- ・イネモミガラの鮮度が抽出粗酵素の活性に及ぼす影響
- ・抽出粗酵素の精製分離方法による活性
- ・抽出粗酵素の濃縮方法の検討

(2) 抽出した粗酵素による色素の退色反応

- ・色素の退色反応に及ぼす抽出粗酵素の純度は影響

(3) 退色反応の活性化

- ・イネモミガラからの抽出粗酵素を用いた色素の退色反応に及ぼす共存物質の影響

4. 研究成果

(1) 粗酵素の抽出

- ・効率的にモミガラ由来 POD を得るために、抽出粗酵素の活性の品種間差異を調べ

た。イネモミガラ の鮮度を統一するために、同一地域（北海道）の異なる品種と同一品種で異なる産地のイネモミガラを入手し、抽出粗酵素をグアヤコール法で比較検討下結果、ななつぼしからの抽出酵素が最も活性が高かった。今後もさらに検討する必要がある。

・イネモミガラ の鮮度が抽出粗酵素の活性に及ぼす影響を調べるために、収穫直後からのイネモミガラ の保存方法等による抽出粗酵素の活性を継続して測定した。屋外（外気温）保存で活性が大幅（80%）に減少しているのに対し、冷凍保存後のイネモミガラからの抽出粗酵素の活性の減少は少なかった。しかしながら、冷凍保存でも、6ヶ月でおよそ40%減少した。イネモミガラでの冷凍保存はスペース上問題があり、抽出液による冷凍保存の可能性を探る必要がある。従って、効率的にPODを抽出するためには、収穫後の鮮度の高いモミガラを用いる必要がある。

・効率的な抽出粗酵素の精製分離方法の検討を行った。精製操作としては、硫安分画、ゲルろ過による処理などを行った。硫安分画はその後の透析処理が必須となるため、高効率を得られにくい。また、ゲルろ過でも共存物質の除去が十分でなかったため、イオンクロマトなどを併用する必要があることがわかった。

・粗酵素溶液の濃縮方法の検討を行った。

もみがら由来ペルオキシダーゼ (RPO) の有機溶媒特性を調べた。イソプロパノール、メタノール、エタノール共存下で RPO の安定性を検討したところ、20%イソプロパノールでは48時間安定であった。

粗酵素抽出液の段階で、イソプロパノールを用いて濃縮し、得られた抽出酵素の比活性で純度を求め、収率なども加味して最

適処理方法を検討したところ、イソプロパノールによる濃縮は簡便であるが、収率は低い結果となった。一方、粗酵素抽出液の段階で硫安を用いた濃縮を行うと高い収率が得られた。

(2) 抽出した粗酵素による色素の退色反応

抽出した粗酵素を用いての酵素純度が色素の退色反応および化学発光反応に及ぼす影響を速度論的に検討した結果、市販（精製）酵素と比較して同濃度の酵素溶液でありながら化学発光反応よりも色素の退色反応の進行が遅くなった。これは、共存物質が色素の退色反応に影響を与えたことによるものと推察される。粗酵素中の共存タンパク質が色素の退色反応の反応速度に影響を与えることから、ゲルろ過およびイオンクロマトの併用による精製酵素が望ましい。

(3) 退色反応の活性化

RPO による色素の退色反応をより活性化するための検討として、RPO を用いた色素の退色反応に及ぼす共存物質の影響を調べた。すなわち、種々の衣料用洗剤に含有されているが反応における pH や温度の点で課題を有する過炭酸ナトリウム漂白と、色素の分解選択性で課題を有する RPO 漂白をカップリングした。そして、高効率な退色反応システムを探るために、色素の退色速度定数および退色率への影響について検討した。

色素の効率的な退色を探るために、RPO 単独系と、RPO と酸素系漂白剤の過炭酸ナトリウムを添加した系、過炭酸ナトリウムの単独系の三種を比較した。色素にオレンジ II を用いた場合、RPO-過炭酸ナトリウムのオレンジ II 初期退色速度定数は RPO 単独と比較すると、退色速度定数が 2.2 倍

に増大し、100%の退色率を示した。また、過炭酸ナトリウムでは退色反応が進行しない難分解性の Reactive Blue 2 も、RPO-過炭酸ナトリウムを用いた場合は RPO 単独の 6 倍の退色速度定数を有し、退色反応が効率的に進行することを見いだした。この RPO-過炭酸ナトリウム退色反応においては、過酸化水素の濃度が優位的に関与し、過炭酸ナトリウム単独系で最適とされる炭酸ナトリウムと過酸化水素の比率とは異なることを確認した。

さらに、退色反応の際、RPO 単独では有色の反応生成物が退色反応後に残存するのに対して RPO-過炭酸ナトリウムでは可視光領域の吸収が全て消失し、可視光に吸収を有する反応生成物が残存しないことが明らかになった。

以上のことから、RPO の精製方法はほぼ確立できた。今後は、より効率的な手法の開発が望まれる。また、RPO の色素退色反応は、過炭酸ナトリウムを共存させることで、反応速度の増大はもとより、反応中間生成物を含む有色物質は完全に分解することがあきらかとなったことから、実際系への応用研究をすすめることで、界面活性剤の削減などが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

①森田みゆき，もみがらから抽出したペルオキシダーゼの精製と活性，日本繊維学会平成 19 年度年次大会研究発表会，2008 年 6 月 20 日，東京

②森田みゆき，もみがら抽出酵素の精製と

ペルオキシダーゼ活性，日本分析化学会北海道支部 2008 年冬季研究発表会，2008 年 1 月 29 日，札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 みゆき (MORITA MIYUKI)
北海道教育大学・教育学部・教授
研究者番号：1 0 1 7 4 4 3 4

(2)研究分担者

森崎 真奈美 (MORISAKI MANAMI)
弘前大学・教育学部・講師
研究者番号：0 0 4 3 5 3 0 6

(3)連携研究者