

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870783

研究課題名(和文)抽出法によるアミノ酸製造における新規タンパク質分解法の開発

研究課題名(英文)Development of novel protein hydrolysis method in the amino acid production

研究代表者

角田 雄亮 (KAKUTA, Yusuke)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：50459856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質からアミノ酸を製造するため環境負荷を低減させた分解方法の確立が求められている。そこで、羊毛の可溶化および陽イオン交換樹脂を用いた加水分解を組み合わせたプロセスの構築を試みた。その結果、過分解を抑制した可溶化には半流通式反応装置を利用すること、効率的な加水分解を行うためには固定床式反応装置を利用することが有効であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a method which decreases environment load is needed to produce of an amino acid from a protein. Then, we proposed the process including wool solubilization process and hydrolysis process using the cation exchange resin. As a result, it was suggested that adaption of the semi-batch reactor was effective for solubilization without overcracking and adaption of the fixed bed reactor was effective for the protein hydrolysis with the cation exchange resin.

研究分野：資源環境工学

キーワード：加水分解 タンパク質 イオン交換樹脂

1. 研究開始当初の背景

一般にアミノ酸は発酵法、酵素法、合成法、抽出法により製造されているが、工業的には発酵法が最も効率が良い製造法であり、安価かつ大量生産が可能である。ただし、アミノ酸の種類によっては発酵法が開発されていないため非効率な製造を強いられている。特に、抽出法は高濃度の塩酸を触媒として長時間タンパク質を加水分解させるため環境負荷が高いことが問題となっている。抽出法が主な製造法となっているシステインはタウリンの原料ともなることから需要が高まっており、環境負荷を低減させた分解方法の確立が求められている。

システイン抽出法の原料は羽毛や羊毛など獣毛が用いられており、プロセスの収益性を考慮すると羊毛等を主成分とする廃棄物を利用することは重要である。特に、繊維廃棄物の有効利用率は約 20 % と低いことから、循環型社会形成の一環として羊毛を主成分とする繊維廃棄物を原料とし、新規抽出法の開発を試みた。ただし、廃棄物であるため化学繊維の混入が懸念される。そこで、前処理として羊毛を一旦可溶化させ、固体である化学繊維を固液分離により除去し、その後加水分解させるプロセスを考案した。本申請の対象となる研究の中心は、タンパク質の加水分解において塩酸濃度を低減させるため陽イオン交換樹脂を添加した新規抽出法の開発であるが、実機化を目指して全体プロセスの構築も目指す。

2. 研究の目的

陽イオン交換樹脂を利用した新規タンパク質分解法の反応機構を明らかにするとともに本プロセスの効率化に関する検討を行い、実機化に向けたプロセスフローを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 羊毛の可溶化

2 mm 以下に裁断した羊毛 1.5 g および蒸留水 150 g を内容積 200 ml の電磁誘導攪拌式オートクレーブに装入し、窒素ガスで内部を置換した後、0.7 MPa 充填した。内容を 200 rpm で水平攪拌しながら外部電気炉にて所定温度まで加熱し、所定時間温度を保持した。処理後は直ちに室温まで空冷した。その後、ガスはテドラバックにて回収し、ガスクロマトグラフィーを用いて組成分析を行った。内容は直接回収後、ろ過により固相と液相に分離した。また、繰り返し反応を行う場合は、反応終了後の固相に蒸留水 150 g を添加し、上記と同様の操作で 180 °C に達した後すぐに空冷、この操作を 4 回行った。なお、羊毛中の窒素原子量当たりの液相中のアンモニア量の割合を脱窒素率 D、脱窒素率あたりの可溶化率の割合を S/D とした。なお、S/D は過分解の指標として利用し、この値が高いほど可溶化効率が良いと考えられる。

(2) 加水分解

作成した液相 100 g および触媒としてスルホ基を有する H 形樹脂所定量内容積 200 ml のセパラブルフラスコに装入した。使用した H 形樹脂の物性を Table 1 に、樹脂 B の添加量と水溶性タンパク質量を変更した際の添加量条件を Table 2 に示す。セパラブルフラスコに攪拌子を投入し、ゴムロート冷却器、アルコール温度計および共栓を取り付けた。内容を 200 rpm で水平攪拌を行いながらマグネチックスターラーで 95 °C まで加熱し、12 時間温度を保持して反応させた。反応終了後直ちに室温まで空冷し、ろ過により樹脂と液相に分離した。液相に対して分光光度計を用いて Lowry 法に準拠したタンパク質の定量分析、TNBS 法に準拠したアミノ基末端定量分析、高速アミノ酸分析計を用いたアミノ酸の定量分析を行った。樹脂はろ過後、樹脂吸着物を脱離させるためアンモニア水溶液による抽出を行った。抽出後の液相に対してロータリーエバポレーターを用いてアンモニア水溶液の除去を行い、得られたアルカリ可溶分を 0.02 M 塩酸で希釈して、上記と同様の方法でタンパク質の定量分析、アミノ酸の定量分析を行った。なお、水溶性タンパク質量あたりの樹脂添加量の割合を R/P とした。

Table 1 陽イオン交換樹脂の物性

	樹脂A	樹脂B
母材	スチレン - ジビニルベンゼン	
架橋度 [%]	8	2
粒径 [mesh]	200 ~ 400	
イオン形	H ⁺	
総交換容量 [meq/mL]	1.7	0.6

Table 2 水溶性タンパク質と樹脂の添加量条件

水溶性タンパク質 [mg]	樹脂添加量 [mL]
120	15
239	15
478	10
478	15
478	30

(3) 分析方法

タンパク質の定量

測定試料 0.2 ml に Modified Lowry Protein Assay Reagent 1.0ml を添加して、攪拌後 10 分間静置した。2N Folin-Ciocalteu Reagent を 2 倍希釈し、1N Folin-Ciocalteu Reagent (Folin 試薬) を作成した。静置後に 1N Folin 試薬 0.1 ml を添加して、攪拌後に暗所に室温で 30 分静置した。静置後、分光光度計にて 750 nm で測定を行った。なお、検量線は Albumin Standard Ampules を用いて作成した。

アミノ基末端の定量

測定試料 0.5 ml に呈色用緩衝液 2.0 ml、0.01 M 亜硫酸溶液 0.5 ml、TNBS 溶液 0.5 ml を加え、振とうした。37 °C で 60 分間反応させた

後、分光光度計にて 420 nm で測定を行った。なお、検量線はアミノ酸混合標準液を用いて作成した。

アミノ酸およびアンモニアの定量

0.02 M 塩酸で希釈した測定試料 4.5 ml に 10 wt% トリクロロ酢酸水溶液を添加して 5 ml にメスアップし、攪拌後に静置してタンパク質を析出させた。静置後に液を採取し、0.45 μm のメンブレンフィルターにてろ過を行い、析出したタンパク質を除去した。これをバイアル瓶に入れ、高速アミノ酸分析計によりアミノ酸の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 陽イオン交換樹脂によるタンパク質の加水分解機構の解明

樹脂 A または塩酸添加時の液相中の水溶性タンパク質量の変化を Fig. 1 に、塩酸添加時のアミノ酸とアミノ基末端増加量の経時変化を Fig. 2 に、樹脂 A 添加時のアミノ酸とアミノ基末端増加量の経時変化を Fig. 3 に示す。

Fig. 1 より、塩酸を添加した場合は時間経過に伴い水溶性タンパク質量が徐々に減少するのに対し、樹脂 A を添加すると昇温時間の間に水溶性タンパク質量が著しく減少することがわかる。Fig. 2 より、塩酸を添加した場合はアミノ基末端に比べてアミノ酸増加量が少ないことがわかる。Fig. 3 より、樹脂 A を添加するとアミノ酸およびアミノ基末端の増加傾向がほぼ一致することがわかる。これらのことから、樹脂添加後、早い段階で水溶性タンパク質のアミノ基末端と樹脂のプロトンがイオン交換して吸着したと考えられる。また、塩酸を添加すると水溶性タンパク質にプロトンがランダムに作用するため、アミノ基末端が増加してもアミノ酸が生成しない場合と考えられる。しかし、樹脂を添加するとプロトンが水溶性タンパク質の末端付近のペプチド結合に作用して加水分解するため、アミノ酸とアミノ基末端の生成が同時に進行すると考えられる。

以上より、樹脂を添加すると水溶性タンパク質の末端からアミノ酸が生成することが判明した。

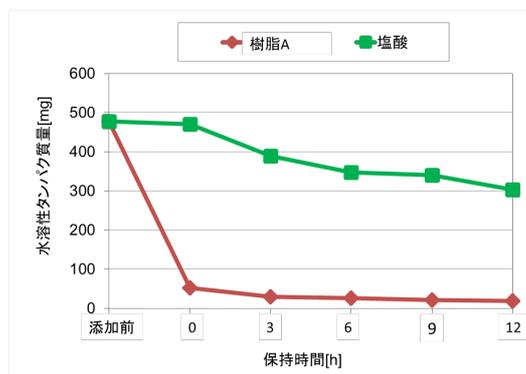


Fig. 1 液相中の水溶性タンパク質量の変化

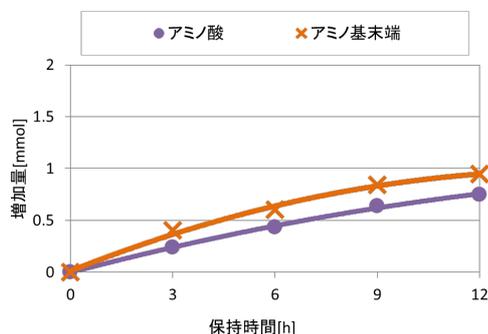


Fig. 2 アミノ酸とアミノ基末端増加量の経時変化(塩酸)

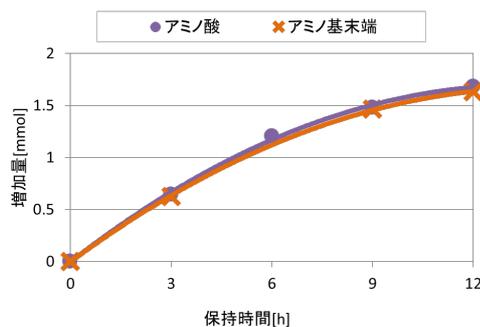


Fig. 3 アミノ酸とアミノ基末端増加量の経時変化(樹脂A)

(2) 羊毛の過分解を抑制した可溶性条件

可溶性においてアミノ酸収率が低かった要因として可溶性におけるタンパク質の過分解が懸念される。そこで、処理温度を変更した際の可溶化率、脱窒素率および脱窒素率あたりの可溶化率 (S/D) を Table 3 に、処理時間を変更した際の可溶化率、脱窒素率および S/D を Table 4 に示す。

Table 3 より、処理温度を低下させると S/D が上昇するが、可溶化率は低下することがわかる。Table 4 より、処理時間を短縮すると S/D が上昇するが、可溶化率は低下することがわかる。これらのことから、反応器内の成分に熱履歴を掛け続けると羊毛の可溶化が進行するが、過分解も生起することが判明した。ただし、過分解を抑制するため羊毛に掛かる熱履歴を低減させると可溶化が進行し

Table 3 処理温度を変更した際の可溶化率と脱窒素率

処理温度 [°C]	処理時間 [h]	可溶化率 [wt%]	脱窒素率 [mo%]	S/D [-]
150		47.8	2.5	19.4
160	2	70.3	5.5	12.9
170		88.2	8.7	10.2
180		93.6	12.0	7.8

Table 4 処理時間を変更した際の可溶化率と脱窒素率

処理温度 [°C]	処理時間 [h]	可溶化率 [wt%]	脱窒素率 [mo%]	S/D [-]
	0	19.3	1.0	19.6
170	2	88.2	8.7	10.2
	4	93.2	11.8	7.9

	0	31.7	1.6	19.4
180	2	88.7	8.5	10.5
	4	93.6	12.0	7.8

ないことが考えられる。そこで、反応器内に滞留する水溶性成分を順次排出し、反応器内に残存する羊毛のみに熱履歴を掛け続けることで、水溶性成分の過分解を抑制できることが推察される。

そこで、上記の方法で過分解を抑制することが可能であるか確認するため、可溶化の繰り返し反応を行った。

繰り返し反応を行った際の可溶化率、脱窒素率および S/D の積算値を Table 5 に示す。

Table 5 より、繰り返し回数の増加に伴い可溶化率と S/D が上昇することがわかる。このとき、繰り返し反応の S/D は単回反応比べて上昇した。これらのことから、水溶性成分を排出しながら可溶化を行うと反応器内成分の過分解が軽減されることが判明した。

Table 5 繰り返し反応時の可溶化率と脱窒素率(積算値)

回数 [times]	可溶化率 [wt%]	脱窒素率 [mol%]	S/D [-]
1	31.7	1.6	19.4
2	50.0	2.3	21.7
3	63.9	2.7	23.6
4	74.1	3.0	25.0

(3) 加水分解効率の向上条件の策定

樹脂 A および B のアミノ酸収率の経時変化を Fig. 4 に、水溶性タンパク質量および樹脂 B の添加量を変更した際の水溶性タンパク質量あたりの樹脂添加量 (R/P) とアミノ酸収率の関係を Fig. 5 に示す。

Fig. 4 より、いずれの処理時間においてもイオン交換容量の高い樹脂 B を用いて加水分解を行うと樹脂 A に比べてアミノ酸収率が高いことがわかる。このことから、イオン交換容量の高い樹脂では酸密度が高く、イオン交換容量の低い樹脂に比べて水溶性タンパク質付近に酸点が多く存在するためイオン交換反応が進行し、加水分解が促進されると考えられる。

一方、Fig. 5 より水溶性タンパク質量を変更して R/P を変更してもアミノ酸収率は上昇しないが、樹脂添加量を変更して R/P を変更するとアミノ酸収率が上昇することがわかる。水溶性タンパク質量を変更して R/P を増加させた場合は、樹脂添加量が過剰であったため水溶性タンパク質の吸着割合が一定であり、イオン交換反応は樹脂の酸密度に依存したと考えられる。一方、樹脂添加量を変更して R/P を増加させた場合は、樹脂間の酸点距離が近くなるため樹脂間でも水溶性タンパク質とプロトンのイオン交換反応が進行し、加水分解が促進されたと推察される。これらのことから、加水分解効率を向上させるためにはイオン交換容量の高い樹脂を用い、反応系内の樹脂濃度を高くすることが有効であると示唆された。

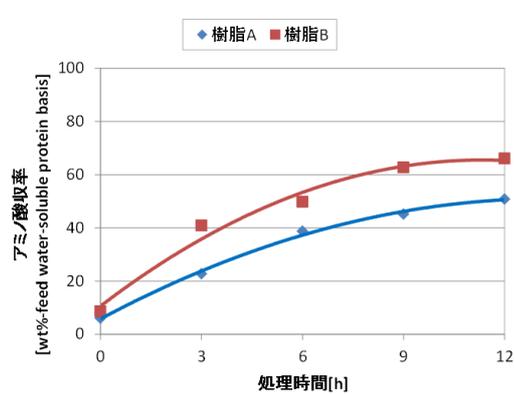


Fig. 4 樹脂 A, B のアミノ酸収率の経時変化

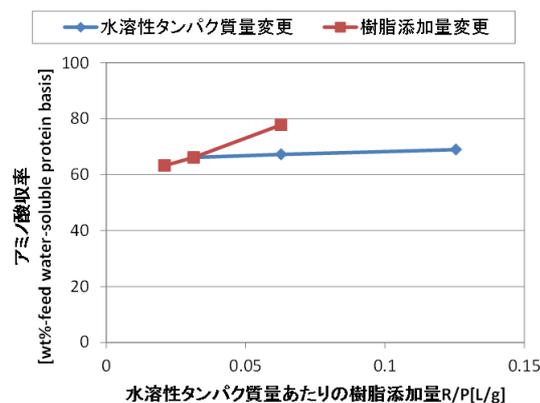


Fig. 5 R/P とアミノ酸収率の関係

(4) 反応装置の基本概念設計

加水分解反応装置の基本概念設計を Fig. 6 に示す。可溶化においては、水溶性成分を順次排出し反応器内に残存する羊毛のみに熱履歴を掛け続けることのできる半流通式反応装置を用いることにより、羊毛の過分解を抑制して可溶化することができると考えられる。ただし、水溶性タンパク質が樹脂に吸着して反応させなければならない。そこで、樹脂 B を添加した際の水溶性タンパク質吸着率の経時変化を Fig. 7 に示す。Fig. 7 より、いずれの時間においても水溶性タンパク質吸着率が高く、水溶性タンパク質は樹脂に即座に吸着することがわかる。このことから、固定床式反応装置を用いて加水分解しても水溶性タンパク質は樹脂に吸着、保持されることが確認された。一方、加水分解においては、反応系内の樹脂濃度を上昇させるため、樹脂を充填することのできる固定床式反応装置を用いて加水分解することが望ましいと考えられる。

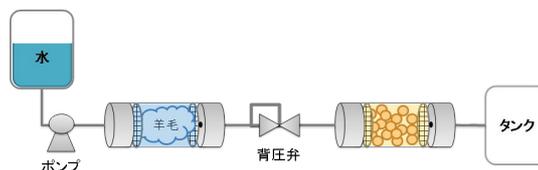


Fig.6 加水分解反応装置の基本概念設計の概念図

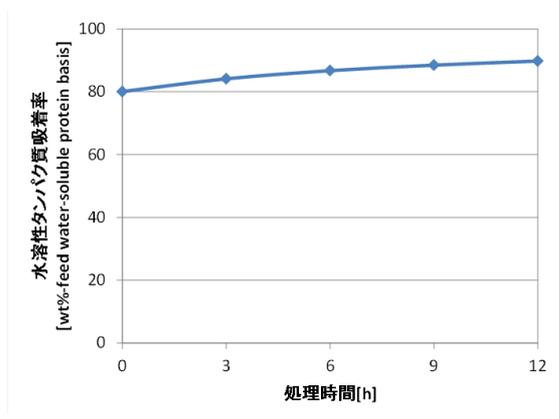


Fig.7 水溶性タンパク質吸着率の経時変化

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

岡真菜美、小西祐人、野口しおり、**角田雄亮**、平野勝巳、ゼオライト触媒を用いた羊毛タンパク質の加水分解に関する検討、第94日本化学会年会、平成26年3月29日、名古屋大学(名古屋)

Yusuke Kakuta, Manami Oka, Katsumi Hirano, Production of Amino Acids from Wool Textile Waste with a Solid Catalyst, 1st 3R International Scientific Conference on Material Cycles and Waste Management (3RINCs) 2014.3.11, Kyoto University (Kyoto Japan)

(Excellent Research Award for Poster Presentation を受賞)

6. 研究組織

研究代表者

角田 雄亮 (KAKUTA, Yusuke)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：50459856