

オカラを用いた高性能染料吸着材 —吸着特性と吸着機構の解明—

西川章江・増井昭彦・呼子嘉博・藤原信明*

大阪府立産業技術総合研究所化学環境部

High Efficiency Dye-adsorbent Produced from Okara, a By-product of Soy Foods Processing -Adsorption Characteristics and the Elucidation of the Mechanism-

Norie NISHIKAWA, Akihiko MASUI, Yoshihiro YOBICO and Nobuaki FUJIWARA

Technology Research Institute of Osaka Prefecture, Izumi 594-1157

ABSTRACT

Electrophoresis is a preparative and analytical technique broadly used in biological sciences, particularly in protein research. Avoiding background raised by dyestuff, gel staining and destaining are crucial steps in detection of protein bands in the gel electrophoresis. Particularly important is fast and efficient gel destaining. Okara, a by-product obtained during the production of tofu (bean curd) and soymilk, quickly adsorbed Coomassie Brilliant Blue (CBB) stain. Compared to activated carbon and/or carbon fiber adsorption, Okara efficiently adsorbs significantly higher amount of dye. In this research, the characteristics and mechanism of adsorption were examined with the aim to develop an efficient dyestuff adsorption system using Okara. The amount of the saturation dye adsorption, Q_m (mg-dye/g-okara) obtained from the Langmuir adsorption isotherm (25°C) after 24 h at pH 3 was 197. It was found that Okara's adsorption ability is approximately 66 times higher than the ability of activated carbon. There was no significant difference in the adsorption of the dyestuff between defatted sample with n-hexane and intact sample. It was shown that the dyestuff was not adsorbed on the oil body in Okara. The adsorption efficiency of dye increased proportionally to the content of remaining protein in Okara and was influenced by pH. These results show that dye was attached to the residual protein in Okara. The decrease in adsorption capacity, which was influenced by the addition of salt (NaClO_4), was only 30%, however the addition of methanol decreased the adsorption capacity approximately 70%. These results showed that dye adsorption was enhanced by hydrophobic interactions. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 63-68, 2004.

* 〒594-1157 和泉市あゆみ野2-7-1

Key words: okara, dye, coomassie brilliant blue R-250, adsorption, ionic bond, hydrophobic interactions

電気泳動はたん白質の研究にとって不可欠な技術であり、多くの研究室で日常的に行われている。泳動によって分離されたたん白質はCoomassie brilliant blue R-250（以下CBBと略す）により青色のバンドとして検出されるが、染色しなかった染料はゲル中から迅速に除去される必要がある。この操作は脱色液の頻繁な交換が一般的であるが、多くの労力や時間を必要とし、効率的な脱色が望まれている。脱色時間の短縮に活性炭、イオン交換樹脂、セルロース繊維あるいはスポンジなどを用いることもあるが¹⁾、期待するほど効果はあがらない。

一方、豆乳や豆腐製造の際の副産物であるオカラは、日本だけでも年間約80万トン（湿重量）排出されている。オカラの利用方法は種々紹介されており²⁾、古くから食材や家畜の飼料として利用されてきたが、現在ではその大部分が産業廃棄物として処理されているのが現状である。最近、新規な多糖類やたん白質源として食品素材などにも利用されているが³⁻⁵⁾、その用途拡大には非食品分野での新しい利用方法の開発が望まれる。

われわれは今までの研究から、オカラが活性炭や炭素繊維など従来からある吸着材に比べ、染料をはるかに迅速かつ大量に吸着できることを確認しており⁶⁾、この性質を利用すれば高性能な染料吸着処理システムの開発が可能となる。CBBはFig. 1のように、電離基としてスルホン酸基（-SO₃H）を持つC.I. No.42660（C.I. Name Acid Blue 83）の酸性染料である。したがって、オカラに残存しているたん白質のリジン、アルギニン、ヒスチジン残基の側鎖やN末端アミノ基などに染色すると考えられるが、詳細な吸着機構はわかっていない。本研究では、オカラを用いた高性能な染料吸着処理システム開発のための基礎研究として、オカラへのCBBの吸着特性およびその吸着機構について検討した。

方 法

材料および試薬

オカラは、(株)ミスズコーポレーションが調製した乾燥オカラ（成分組成：糖分42%，たん白質20%，繊維質19%，脂肪分10%，灰分3%，水分6%）を、850 μm以上、150～850 μm、150 μm以下の3段階に分級して用いた。吸着実験には特に断らない限り、150～

850 μmを用いた。また、吸着能力の比較のためにセルロース繊維（商品名キムワイプ）、活性炭（顆粒状、和光純薬製）も使用した。CBBは、Fluka AG製を用いた。

n-ヘキサン脱脂オカラの調製

共栓付100 mL容三角フラスコに10 gのオカラを入れ、n-ヘキサン60 mLを3回加えて脂質を抽出し、乾燥後、脱脂オカラとした。

染料の吸着等温線の測定

共栓付100 mL容三角フラスコに吸着材0.080 gを入れ、25%メタノールを含むCBB濃度溶液（25～500 mg/L、酢酸にてpH 3に調整）を50 mL加え、25℃で振とう（120回/分、25 mm振幅、DOUBLE SHAKER NR-150、TAITEC社製）した。24時間後、濾紙（No.2、東洋濾紙）にて濾過してオカラを分離し、濾液のCBB濃度を分光光度計（UV-1200、島津製）で測定した。CBBの初濃度C₀（mg/L）と濾液のCBB残留濃度C（mg/L）から、吸着材単位重量あたりの吸着量q（mg/g）を算出した。Langmuir型の吸着等温線は、 $C/q = 1/(aQ_m) + C/Q_m$ で表される。ここでQ_mは飽和吸着量、aは吸着平衡定数である。Freundlich型の吸着等温線は、 $q = kC^{1/n}$ で表され、kおよび1/nは吸着平衡定数である。

酸および塩基吸着量の測定

酸吸着量は、試料（吸着材）0.10 gに0.05 M HCl水溶液20 mLを加え25℃、4日間振とうの後、濾紙にて各吸着材を濾別し、濾液3 mLを0.05 M（f=0.998）NaOH溶液で滴定した。塩基吸着量は、試料（吸着材）0.10 gに20 mL 0.05 M NaOH水溶液を加え、25℃、4日間振とうの後、濾紙にて各吸着材を濾別し、濾液3 mLを0.05 M（f=1.001）HCl溶液で滴定した。

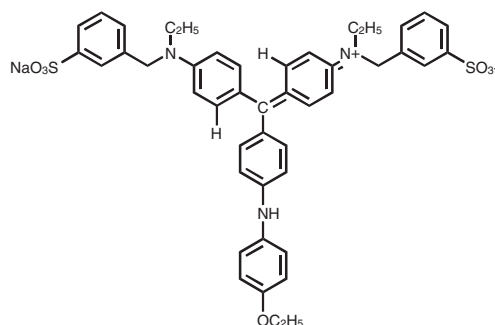


Fig. 1. The structure of Coomassie brilliant blue R-250.

CBBの吸着に及ぼすpHの影響

酢酸にて初期pHを2～4.35に調整した。この調整溶液に濃度が25 mg/LとなるようにCBBを溶解し染料液とした。染料液（25%メタノールを含む）50 mLにオカラ0.50 gを加え、25℃で振とうした。1時間後、濾液の染料残留濃度を測定し、オカラ1 gあたりのCBB吸着量 (mg/g-okara) を求めた。

CBBの吸着に及ぼす塩 (NaClO₄) の影響

共栓付100 mL容三角フラスコにオカラ0.080 gを入れ、0.1 M過塩素酸ナトリウム (NaClO₄) を添加した25%メタノールを含むCBB溶液（25～500 mg/L、酢酸にてpH 3に調整）を50 mL加え、25℃で振とうした。24時間後、濾紙 (No. 2) にてオカラを濾別して、濾液のCBB濃度を分光光度計で測定した。また、対照区としてNaClO₄無添加のCBB吸着等温線も求めた。

CBBの脱着に及ぼすメタノール添加の影響

0.50 gのオカラに50 mL CBB溶液（初濃度25 mg/L、pH 3）を加え、25℃で1時間振とうさせ、CBBを吸着させた。その後、濾紙により濾液と分離した。CBBを吸着させたオカラに50 mLのメタノールを加え、25℃で1時間振とうした。吸着CBB濃度（初期CBB濃度から吸着1時間後の濾液の残留CBB濃度を引いた値、mg/L）と脱着CBB濃度 (mg/L) から脱着率を求めた。なお、実験は、0.1 M過塩素酸ナトリウム (NaClO₄) を添加した場合と塩を添加しない場合の2通りについて行った。

結果と考察

オカラのCBB吸着能力

3種類のオカラ（150 μm以下、150～850 μm、850 μm以上の分級品）を用いて、バッチ法によりCBB濃度を変えて吸着能力を測定した。吸着材単位質量当た

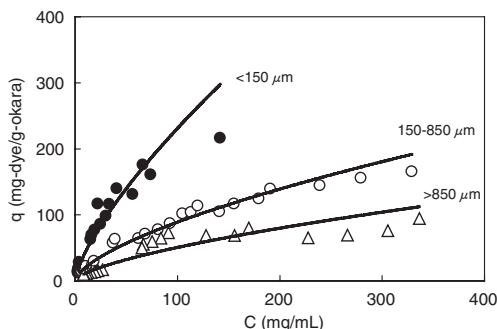


Fig. 2. Adsorption isotherms of CBB on Okara at 25°C.
●, <150 μm; ○, 150-850 μm; △, >850 μm

りの吸着量は、次式の物質収支式から算出される。

$$q = (C_0 - C)V/W \dots \dots \dots (1)$$

ここで、 q (mg/g) は吸着材単位質量あたりの吸着量、 C_0 (mg/L) はCBBの初濃度、 C (mg/L) は溶液中のCBB残留濃度（平衡濃度）、 V (L) は液量、 W (g) はオカラ量を示す。Fig. 2に各オカラにおけるCBBの吸着等温線を示す。

吸着等温線ではLangmuirの理論がよく用いられるが、これは吸着材の表面の吸着サイトに吸着質分子が単分子層吸着するとき成立する。その場合Langmuir式は、次のように表される。

$$q = aQ_m C / (1 + aC) \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 a は吸着平衡定数、 Q_m は飽和吸着量である。

$$(2) \text{式から、} 1/q = (1/aQ_m)(1/C) + 1/Q_m \dots \dots (3)$$

式(3)を導くことができ、 $1/q$ を $1/C$ に対してプロットするとFig. 3Aのように相関性のある直線が得られる。ここでは、150～850 μmのオカラについてだけを示したが、150 μm以下、あるいは850 μm以上のオカラについても同様の結果が得られている。飽和吸着量 Q_m (mg/g) はこの直線の切片から求めることができる。

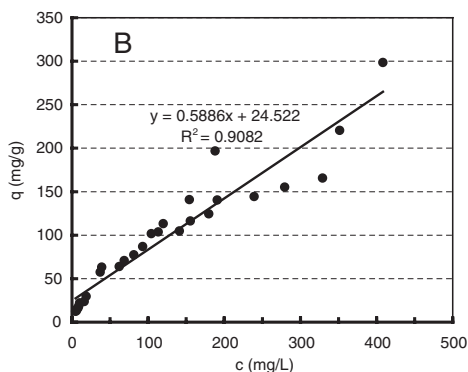
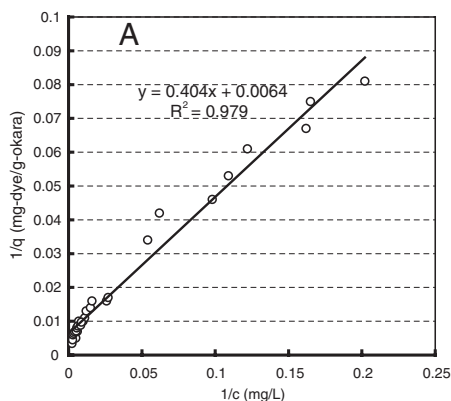


Fig. 3. Langmuir plot (A) and Freundlich plot (B) for CBB adsorption on Okara.

一方、Langmuir式とともによく用いられる吸着式に、次式(4)のようなFreundlich式がある。

$$q = kC^{1/n} \dots \dots \dots (4)$$

ここで、 k 、 $1/n$ は吸着定数および吸着指数である。各オカラにおけるCBBの吸着等温線、すなわち吸着量(q)とCBB濃度(C)の関係を両辺の対数プロットで表すと、Fig. 3Bのように直線関係が得られた。Freundlichの吸着等温線において算出した k 値は、 $150 \mu\text{m}$ 以下 $>150 \sim 850 \mu\text{m}$ $>850 \mu\text{m}$ 以上のオカラの順に大きい値を示し、ここでも粒度の細かいものほどCBBの吸着能が大きいことが判った。

Langmuirプロットから求めた各粒度のオカラの飽和吸着量は、Fig. 4で示すように $150 \mu\text{m}$ 以下では 333 mg/g 、 $150 \sim 850 \mu\text{m}$ では 197 mg/g 、 $850 \mu\text{m}$ 以上では 91 mg/g と、粒度が細くなるほど染料吸着量は大きくなった。一方、活性炭の飽和吸着量は3であり、オカラは活性炭の30～110倍の吸着能力を持つことがわかった。

脱脂オカラのCBB吸着、酸および塩基の吸着能の比較

CBBはゲル電気泳動においてたん白質バンドの染色やたん白質の定量に用いられることから、染料はたん白質に染色すると考える。しかしながら、オカラには脂質であるオイルボディーも残存しており⁷⁾、この部分に吸着することも考えられる。そこで、 n -ヘキサンで脂質分を抽出した脱脂オカラを用いてCBBの吸着量および酸・塩基の吸着量から、オイルボディーへのCBB吸着の可能性について検討した。無処理オカラおよび脱脂オカラについてCBBの吸着等温線から求めた吸着平衡定数、および酸・塩基吸着量をTable 1に示す。Langmuirプロットから求めた脱脂オカラのCBB

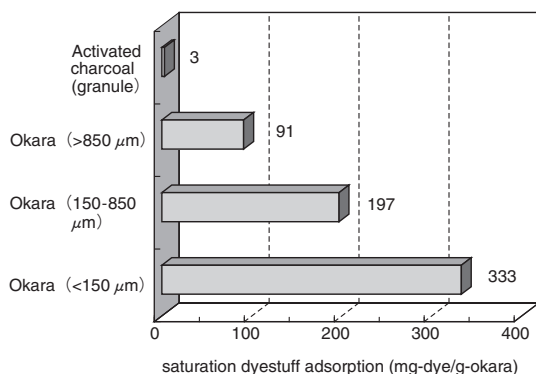


Fig. 4. The amount of the saturation dye adsorption of various okara and activated charcoal. Q_m (mg-dye/g-okara) obtained from the Langmuir adsorption isotherm (25°C) after 24 h at pH 3.

吸着量 (Q_m) は 278 mg/g であり、一方、無処理オカラの Q_m は 263 mg/g であった。また、酸吸着量および塩基吸着量も無処理オカラと脱脂オカラに大きな差はなかった。染料吸着量、酸吸着量、塩基吸着量ともに、わずかながら脱脂オカラの方が高い値を示したが、これは脱脂されたことによりオカラ中のたん白質含量が相対的に増大し、CBBの吸着量が増加したことによると考える。また酸や塩基吸着量はカルボキシル基やフェノール水酸基数を表すが、その増加は脱脂によって脂肪酸のカルボキシル基が減少したことによると考える。いずれにせよ、染料吸着量だけでなく酸および塩基吸着量についても、脱脂による差はほとんど認められないことから、オイルボディーへの染料吸着はないと結論した。

たんぱく質含量とCBB吸着の関係

脱脂オカラと無処理オカラの染料吸着量の比較結果 (Table 1) から、染料はオカラ中に残存するオイルボディーに吸着するのではないことがわかった。そこで、次にたん白質含量の異なるオカラを用いて、たん白質含量とCBB吸着量の関係からたん白質への染料吸着について検討した。オカラのたん白質含量は、無処理のオカラのたん白質含量から種々の抽出処理によって溶出したたん白質を差し引いて求めた。オカラに残存するたん白質量とCBB吸着量は、Fig. 5で示すように直線関係にあり、たん白質への染料吸着を示唆するような結果が得られた。また、Fig. 6のようにアミノ基数を示す酸吸着量もCBB吸着量と相関関係が高く、これらの結果からCBBはオカラに残存しているたん白質に吸着すると考える。

吸着に及ぼすpHの影響

CBBの吸着量はFig. 7のようにpH 3付近で最大値を示し、その値を外れると吸着量は減少した。Fig. 5と6の結果からCBBはたん白質のアミノ基に結合すると推測したが、Fig. 7の結果もまた、CBBはスルホン酸基を介してオカラに残存するたん白質のアミノ基とイオンの結合していることを支持している。

CBB吸着に及ぼす中性塩の影響

CBBの吸着が、オカラに残存するたん白質のアミノ基とCBBのスルホン酸基間のイオン結合であれば、

Table 1. Langmuir equation parameters, acid and base adsorptions of intact okara and defatted okara

	Q_m (mg-dye/g-sample)	Acid (mmole/g-sample)	Base (mmole/g-sample)
Intact okara	263	0.61	1.16
Defatted okara	278	0.64	1.08

中性塩の添加によって中性塩のアニオンは染料のアニオンと吸着座席 ($-\text{NH}_3^+$) を競い合い、結果的にCBBの吸着は阻害されると考える。そこで、吸着等温線に及ぼす中性塩の添加の影響について検討した。ここでは中性塩として、有機溶媒に溶解しやすく、染料の析出が起こりにくい NaClO_4 を用いた。得られたオカラのCBB飽和吸着量は、塩無添加の場合244 mg/g、0.1 M NaClO_4 添加の場合178 mg/gであり、中性塩の添加によって飽和吸着量は低下した。ただし、その減少は30%程度であり、大きな低下は見られなかった。この結果は、CBBの吸着がオカラに残存するたん白質のアミノ基とCBBのスルホン酸基間のイオン結合によるものの、その寄与は小さくイオン結合以外がその吸着に大きく関与していることを示唆している。

CBB脱着に及ぼすメタノールの影響

染料吸着への中性塩の添加実験からCBBはオカラ中

のたん白質にイオンの結合で吸着するものの、その寄与は小さく他の結合の関与が大きいことを示していた (Fig. 7)。そこで、疎水的な相互作用の寄与を有機溶媒の添加実験から検討した。CBB吸着オカラから染料の脱離・溶出は、Fig. 8で示すように脱染色液のメタノール濃度が高くなると大きくなり、メタノール濃度70～90% (v/v) では約80%の染料がオカラから脱離した。 NaClO_4 を添加すると脱着率はさらに上昇し95%以上となった。これらの結果は、オカラへのCBBの吸着はイオン結合以外に疎水性相互作用の寄与が大きいことを示している。ただ、染料のオカラへの吸着はたん白質だけでなく、セルロースなど繊維質への吸着なども考えられ、またその結合様式もここで推測したイオン結合や疎水的な相互作用だけで吸着機構を言い切ることはできず、今後、他の関わりについての検討が必要である。

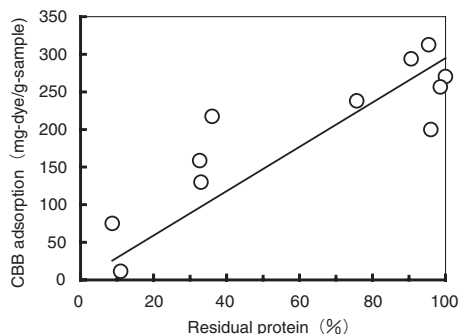


Fig. 5. Relationship of residual protein and CBB adsorption. Residual protein was obtained by subtracting soluble protein from the protein of intact okara.

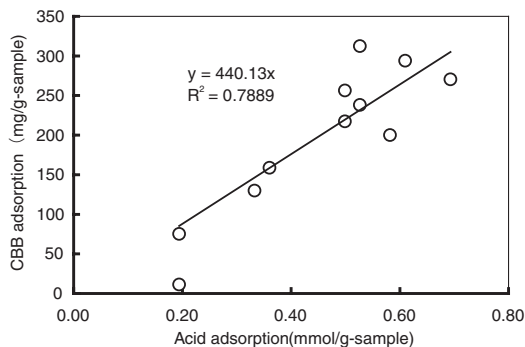


Fig. 6. Relationship between acid adsorption and CBB adsorption on okara.

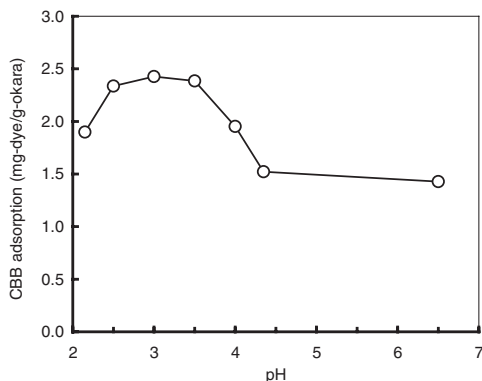


Fig. 7. Effects of pH on CBB adsorption.

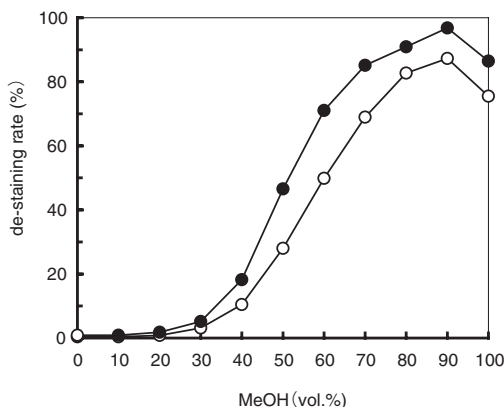


Fig. 8. Effects of methanol and NaClO_4 on de-staining. $\circ$, 0 M NaClO_4 ; $\bullet$, 0.1 M NaClO_4 .

要 約

電気泳動分析は、たん白質研究に不可欠の技術であり、その中で迅速な脱色が求められている。豆腐や豆乳製造の際の副産物であるオカラが、活性炭や炭素繊維よりも迅速かつ大量にこのCBBを吸着することを認めており、オカラを用いた染料吸着システム開発のための基礎的な研究として、染料の吸着特性とその機構について検討した。オカラのCBB等温染料吸着線はLangmuir式で表すことができ、それらから求めた飽和染料吸着量 Q_m (mg-dye/g-okara) は197と、活性炭に比べ約66倍 (150~850 μ mのオカラの場合) の高い吸着量を持っていた。n-ヘキサンで脱脂した試料と無処理のオカラの間に染料吸着量の差がないことから、オイルボディーへの染料の吸着はない。一方、染料の吸着はオカラに残存するたん白質含量に比例し、また酸吸着と相関関係があり、かつpHに影響されることから、染料はたん白質に結合している。その吸着機構としては、塩類の添加による染料吸着量の低下が約30%であるのに対し、メタノール添加による低下は約70%と大きく、オカラへの染料の吸着はイオン結合よりも疎水結合によるもの大きいことがわかった。電気泳動で用いる脱色液は7%の酢酸と25%のメタノールを含む水溶液であり、染料を吸着材で除去すれば従来、廃棄していた脱色液の再利用が可能となり、染料吸着へのオカラの利用はたん白質研究への支援だけでなく、環境保全にも寄与する。

文 献

- 1) 大藤道衛 (2001): バイオ実験超基本Q & A, 194頁.
- 2) O'Toole (1999): Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production-A review, *J Agric Food Chem*, **47**, 363-371.
- 3) 財団法人大阪産業機構: 「新規生物系材料およびその製造方法」, 特開2003-189812.
- 4) 清水洋史 (2002): おからを原料にした大豆多糖類の生産. *Foods Food Ingredients J Jpn*, **201**, 58-63.
- 5) 古田均, 前田裕一 (2003): 大豆多糖類. *Foods Food Ingredients J Jpn*, **208**, 781-790.
- 6) 大阪府: 「染料及び色素吸着剤及び処理方法」 特開2001-269571.
- 7) 笠井尚哉, 村田 葵, 乾 博, 阪本龍司, M. Rokibul Isra Kahn (2002): 平成14年度日本生物工学会大会講演要旨集, 139頁.