

逆ミセル乳化液膜によるタンパク質抽出速度に 及ぼす操作条件の影響

衣笠 巧* 佐々木彩子* 林 唯* 日和佐杏梨*
多賀根 巧* 渡邊達也* 西井靖博*

Effects of Operating Conditions on Extraction Rate of Protein
in Liquid Surfactant Membrane for Reversed Micellar Extraction

Takumi KINUGASA* Ayako SASAKI* Yui HAYASHI* Anri HIWASA*
Takumi TAGANE* Tatsuya WATANABE* Yasuhiro NISHII*

In order to develop a liquid surfactant membrane for reversed micellar extraction, the effects of operating conditions on the protein extraction were investigated. The equilibrium and kinetics of lysozyme extraction from feed adding GuHCl to reversed micellar organic solution was examined. In lower AOT concentration, the extraction ratio in GuHCl system was higher than that in NaCl or KCl system, but the extraction rate in GuHCl system was lower than that of other system. On the other hand, the increment of Span80 concentration reduced the extraction rate of lysozyme. Moreover the extraction rate to W/O emulsion was one digit smaller than that to organic solution. It was found that the mass transfer resistance of Span80 adsorption layer was absolutely huge.

1. 緒言

タンパク質は、酵素作用をはじめ様々な機能を有する生体高分子であり、洗剤、デンプン工業、食品加工、繊維加工、製紙工程、醸造工業、畜産業、物質生産、医薬などの幅広い分野で利用されている^[1]。例えば本研究で用いたリゾチームは、抗炎症作用をもつため風邪薬や目薬に用いられたり、抗菌作用を利用して日持向上剤として食品等に配合されている。タンパク質は細胞破碎液や発酵培養液から液体クロマトグラフィや電気泳動などによって分離されている^[2]、精密な分離ができる反面、大量処理が難しくコストが高いという欠点がある。そこでこれらに代わる方法として逆ミセル抽出法が注目されている^[3-5]。逆ミセルは、油相中で界面活性剤が疎水基を外側に親水基を内側に向けて自発的に会合する分子集合体である。親水基に囲まれた逆ミセルの内部には微量の水が可溶化され、ウォータープールと呼ばれるナノサイズの微小水滴が形成される。タンパク質は、界面活性剤の親水基との相互作用によってウォータープール内に取り込まれ、油相に抽出される。

著者らは逆ミセル抽出法を乳化液膜法と組み合わせた新しいタンパク質分離法として逆ミセル乳化液膜法を提案している^[6,7]。その概略図を Fig.1 に示す。界面活性剤を含む油相と

内水相を高速攪拌し、W/O エマルションを作成する。この W/O エマルションを外水相中に分散させ、W/O/W エマルションとし、外水相に含まれる目的物質を油相を通して内水相に移動させる方法が乳化液膜法である。同一操作で一度に正抽出と逆抽出が行えるため経済的であること、界面積が大きく膜厚が小さいため抽出速度が非常に速いことなどが期待される。逆ミセル乳化液膜は、乳化液膜の油相に逆ミセルを形成させることにより、タンパク質を外水相から内水相へ輸送する方法である。著者らは、逆ミセル形成のための界面活性剤としてビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム (AOT)、W/O エマルション安定化のための界面活性剤としてソルピタンモノオレエート (Span 80) を用いて逆ミセル乳化液膜法の検討を行ってきた。その結果、AOT と Span80 は異なる性質を持つため、混在することにより互いの特徴を相殺する、すなわち AOT はタンパク質の抽出を促進するけれども液膜を不安定化させ、Span 80 は液膜を安定化させる一方でタンパク質の抽出率を低下させることが課題であることを見出した^[6,7]。

Naoc らは、低濃度の塩酸グアニジン (GuHCl) を水相に添加することで、不溶性凝集物の発生を抑え、低い AOT 濃度でタンパク質の抽出が可能になると報告している^[8]。抽出に必要な AOT 濃度を下げることができれば、Span80 との混在に

平成 27 年 10 月 27 日受付 (Received Oct.27, 2015)

* 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology, Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan)

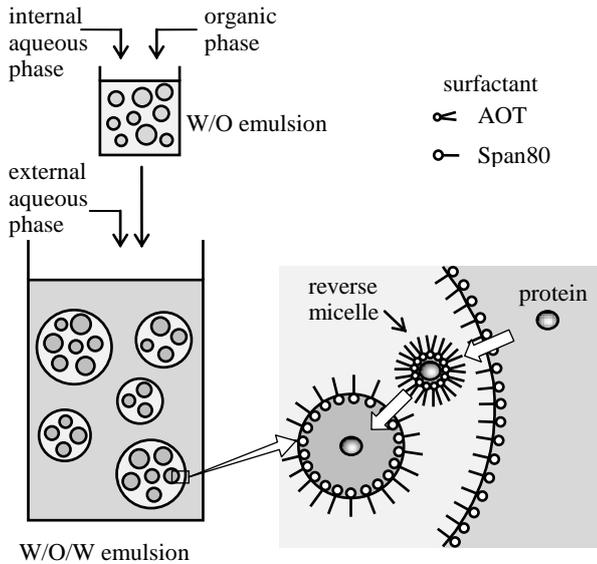


Fig.1 Scheme of reversed micellar extraction with liquid surfactant membrane.

よる性能低下を改善できる可能性がある。そこで本研究では、水相への GuHCl の添加がタンパク質の抽出平衡に及ぼす影響を調べ、従来用いてきた NaCl や KCl との違いについて論じる。また、抽出速度の測定により総括物質移動係数を求め、添加塩をはじめとする操作条件が物質移動過程に及ぼす影響を検討した。

2. 実験

逆ミセル形成のための界面活性剤として AOT、W/O エマルジョン安定化のための界面活性剤として Span80、有機溶媒として 2,2,4-トリメチルペンタン (イソオクタン)、タンパク質としてニワトリ卵白リゾチームを用いた。

抽出平衡実験は、リゾチームを含む水相と界面活性剤を含む油相を 10 cm³ ずつ三角フラスコに仕込み、298 K の恒温水槽中で 2 時間振盪することで行った。水相には KCl、NaCl あるいは GuHCl を添加した。平衡到達後、遠心分離で二相に分け、水相中のリゾチーム濃度を紫外可視分光光度計による 280 nm の吸光度測定により求めた。抽出率 E は次のように定義した。

$$E = C_{PW} / C_{PW}^0 \tag{1}$$

ここで C_{PW}^0 は初期の水相タンパク質濃度、 C_{PW} は平衡後の水相タンパク質濃度である。

抽出速度実験は、内径 40 mm ガラス製攪拌槽 (幅 4.0 mm の 4 枚邪魔板付) を用いて行った。攪拌槽に水相と油相を 50 cm³ ずつ静かに注ぎ込み、直径 20 mm の 6 枚羽根タービン翼により各相を 250 rpm で攪拌することによりリゾチームの抽出を開始した。リゾチームの水相初濃度は 0.50 kg/m³ とし、所定時間毎に水相をサンプリングしてそのリゾチーム濃度 C_{PW} を紫外可視分光光度計で決定した。リゾチームの抽出速度 r_p は次式で定義される。

$$r_p = \frac{V_W}{A} \cdot \frac{dC_{PW}}{dt} = K_p C_{PW} \tag{2}$$

ここで V_W は水相体積、 A は界面積、 K_p はリゾチームの総括物質移動係数である。これをタンパク質初濃度 C_{PW}^0 として積分すると次式を得る。

$$\ln \frac{C_{PW}}{C_{PW}^0} = - \frac{A}{V_W} K_p t \tag{3}$$

左辺を攪拌時間 t に対してプロットすると直線になり、その傾きから総括物質移動係数 K_p を求めることができる。

水相から乳化相への抽出速度実験では、油相の代わりに乳化相を攪拌槽に注いで同様の手順で実験した。乳化相は、Span80 を含む油相と 0.50 kmol/m³ 炭酸ナトリウム水溶液の等量をディスペンサーで高速攪拌して W/O エマルジョンを形成させることで調製した。炭酸ナトリウムは、内水相の pH を高くしてリゾチームの逆抽出を促進させるために添加する。

3. 結果と考察

3-1 リゾチームの抽出率

Fig.2 にリゾチームの抽出率に及ぼす添加塩濃度の影響を示す。いずれの塩の場合も塩濃度が高くなるにつれて抽出率は低下した。これは添加塩による静電遮蔽効果が原因であることがよく知られている^[4,9]。すなわち、逆ミセルによるタンパク質抽出の主な推進力はタンパク質のアミノ酸残基と界面活性剤の親水基の間の静電的相互作用であり、塩濃度が増加するとこの相互作用が弱まるためタンパク質の抽出が起こりにくくなる。また、NaCl 系の方が KCl 系よりも塩濃度の影響を受けにくく、KCl 系が 0.6 kmol/m³ 以上で抽出率が低下したのに対して NaCl 系では 0.9 kmol/m³ まで 90% 以上の抽出率を示した。GuHCl 系は NaCl 系に近く 0.8 kmol/m³ 以上で抽出率の低下が認められた。なお、Naoe らはリゾチームとオボアル

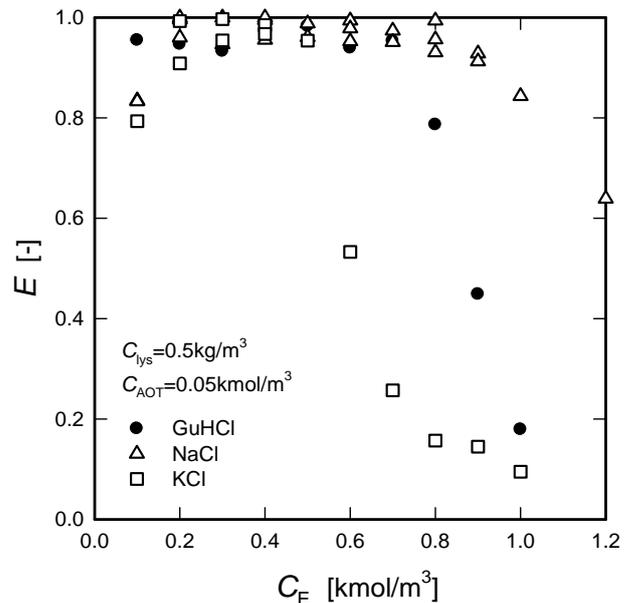


Fig.2 Effect of salt concentration, C_{salt} , on extraction ratio of lyszyme, E .

ブミンを含む水溶液からのリゾチームの抽出において、GuHCl 濃度が 0.06 kmol/m^3 程度のときに最も高い抽出率を得ている^[8]。

アルカリ金属イオンの場合、カチオン種による抽出率の違いは、カチオンの周囲の水構造によって議論されている^[4]。Na⁺のような水構造形成イオンは原子番号が小さいほど水和力が大きく、周囲に水分子を強くひきつけるために静電遮蔽効果の及ぶ領域が狭くなり、抽出率の低下が抑制されたと考えられる。これに対してグアニジウムイオン (GuH⁺) はカオトロピック試薬であり水構造を破壊する性質を持っているため静電遮蔽効果は大きいと考えられる。一方、その高高い構造のせいで電荷密度が小さいため静電遮蔽効果が小さくなる可能性もある。これらの複合的な作用のため、Na⁺や K⁺の中間的な抽出率になったと推定される。

Fig.3 にリゾチームの抽出率に及ぼす AOT 濃度の影響を示す。AOT 濃度が高くなるほど逆ミセルの数が増えるため抽出率は高くなっている。GuHCl 系は、NaCl 系や KCl 系に比べて低い AOT 濃度でも高い抽出率を示しており、AOT 濃度 0.003 kmol/m^3 でも 100 %の抽出が可能であった。この傾向は Naoe らの結果^[8]と一致した。

3-2 リゾチームの抽出速度

Fig.4 に、総括物質移動係数 K_p に及ぼす AOT 濃度の影響を示す。AOT 濃度 0.02 kmol/m^3 までは AOT 濃度の増加とともに K_p 値も増加したが、それ以上の AOT 濃度ではほぼ一定値に達した。タンパク質は、水相境膜を拡散した後、界面で逆ミセルに取り込まれ、油相境膜を拡散して抽出される^[9]。AOT 濃度が低いと界面で逆ミセルがタンパク質を取り込む速度が遅くなるため K_p 値が低下したが、ある程度以上の AOT 濃度になると境膜拡散過程が律速となるため、一定の K_p 値に収束したと考えられる。

AOT 濃度 0.02 kmol/m^3 以下の範囲では NaCl 系と KCl 系の

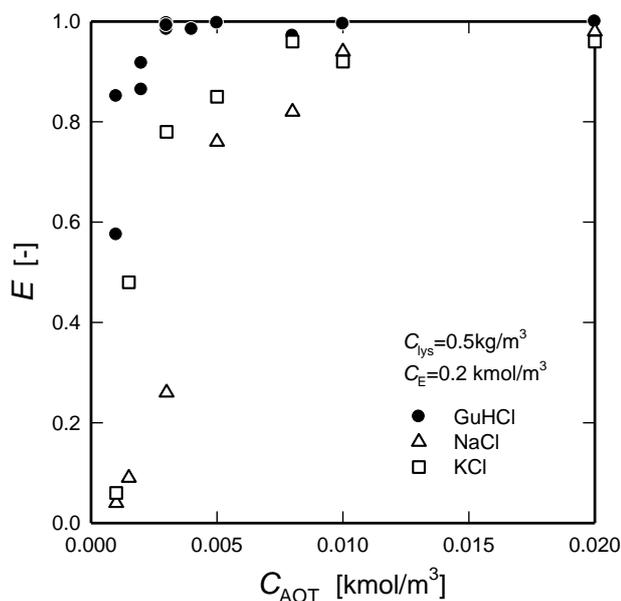


Fig.3 Effect of AOT concentration, C_{AOT} , on extraction ratio of lysozyme, E .

K_p 値はほぼ同じ結果になり、GuHCl 系の K_p 値はこれらよりも小さくなった。低 AOT 濃度における抽出率は GuHCl 系の方が高かったのに対して、抽出速度は逆の結果を示したことになる。界面での可溶化過程が律速になるとき、界面に吸着した界面活性剤層がタンパク質の接近によって変形する速度が問題になる^[10]。GuH⁺は Na⁺や K⁺に比べて AOT との相互作用が強く、界面活性剤吸着層に結合して界面変形を抑制したのかもしれない。

Fig.5 に、 K_p 値に及ぼす Span80 濃度の影響を示す。 K_p 値は添加塩の種類に依らず Span80 濃度の増加とともに減少していることがわかる。Span80 は AOT とともに混合逆ミセルを形成すると考えられている^[6]。タンパク質は AOT のスルホ基との静電的引力によって逆ミセル内に抽出されるが、非イオ

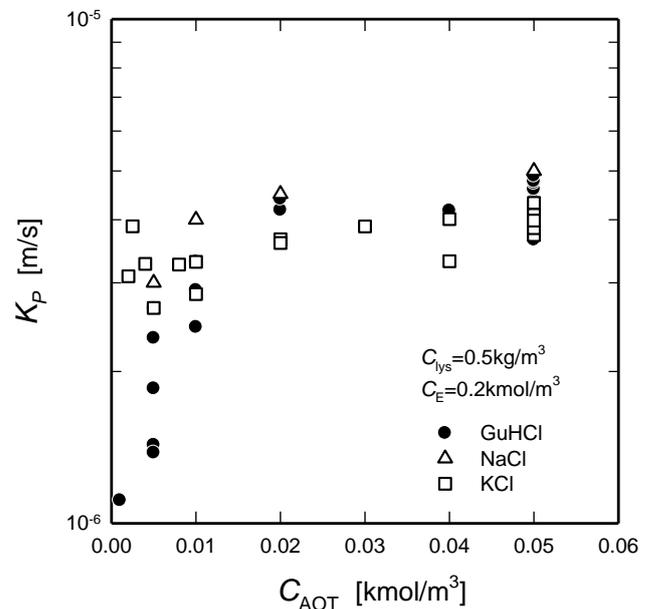


Fig.4 Effect of AOT concentration, C_{AOT} , on mass transfer coefficients of lysozyme, K_p .

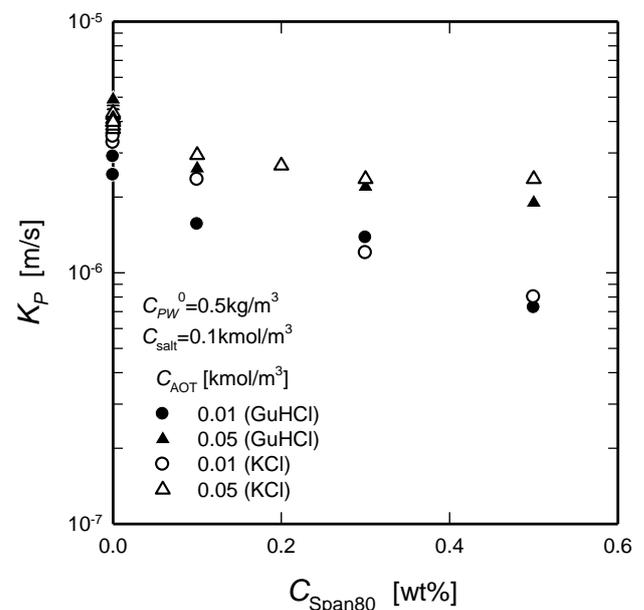


Fig.5 Effect of Span80 concentration, C_{Span80} , on mass transfer coefficients of lysozyme, K_p .

性の Span80 が混在することで静電的相互作用が弱められる。また、Span80 が界面活性剤吸着層の変形を抑制する効果も考えられ、これらの結果として K_p 値が減少したと推測される。また、GuHCl 系と KCl 系では K_p 値に差が見られなかったことから、界面変形抑制に与える Span80 の効果の方が GuH^+ の影響よりも支配的であったと思われる。

以上より、GuHCl 系は抽出速度を向上させる効果が見られなかったため、乳化相への抽出実験は KCl 系のみで行った。Fig.6 は、水相から乳化相への K_p 値を示している。 K_p 値は油相への移動の場合よりも 1 桁小さなオーダーとなった。乳化系では W/O エマルションの形成によって界面積が増大し、AOT の吸着量が大きくなって逆ミセルを形成するフリーな AOT が減少したことが原因と推定される。また、乳化相の粘性は油相よりもはるかに高く、これが K_p 値の低下に影響した可能性もある。粘性は乳化相での拡散速度に影響するので、乳化相の攪拌速度を 180~300 rpm の間で変化させて K_p 値を求めた。しかし、 K_p 値は攪拌速度にほとんど依存しなかったため、律速段階は界面過程であって粘性の影響は無視できることがわかった。

4. 結論

逆ミセル乳化液膜によるタンパク質リゾチームの抽出率と抽出速度の検討を行い、以下の結論を得た。

- (1) 水相への添加塩として GuHCl を用いたときのリゾチームの抽出率は NaCl 添加系より小さく、KCl 添加系より大きな値を示した。
- (2) GuHCl 添加系では、NaCl 添加系や KCl 添加系に比べて低い AOT 濃度におけるリゾチームの抽出率が高くなった。
- (3) GuHCl 添加系では、KCl 添加系に比べて、低い AOT 濃度におけるリゾチームの抽出速度が小さくなった。
- (4) リゾチームの抽出速度は Span80 濃度の増加とともに低下した。Span80 は非イオン性であり、逆ミセルとリゾチームの静電的引力を抑制する効果を持つためと考えられる。
- (5) 水相から乳化相への抽出の物質移動係数は、油相への物質移動係数より 1 桁小さくなった。乳化によって抽出に有効にはたらく AOT が減少したためと考えられる。

以上より、逆ミセル乳化液膜におけるタンパク質の抽出速度は W/O エマルション滴表面の Span80 吸着層の移動抵抗が支配的で、抽出速度を大きくするにはこの吸着層への AOT の導入率を高めることが課題であることがわかった。

引用文献

- [1] 上島孝之：「産業用酵素」，丸善 (1995)
- [2] 化学工学会生物分離工学特別研究会編：「バイオセパレーションプロセス便覧」，共立出版 (1996)
- [3] 化学工学会監修，長浜邦雄，加藤寛，乗富秀富：「新しい抽出技術—超臨界・液膜・逆ミセル」，培風館，pp.99-125 (2002)

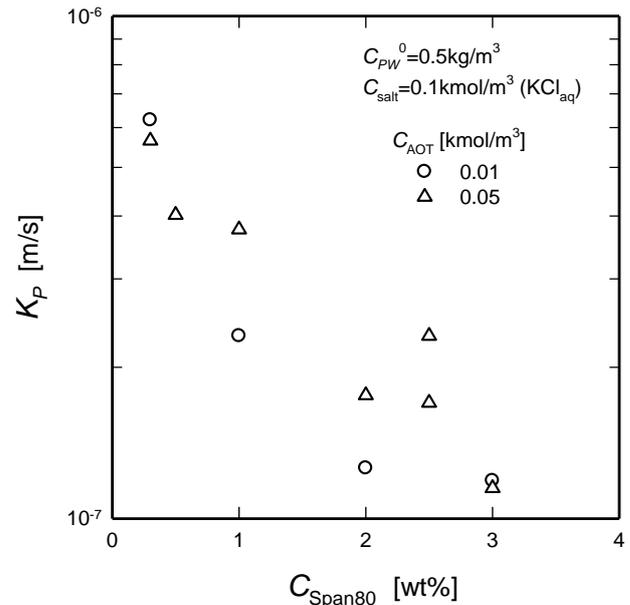


Fig.6 Mass transfer coefficients of lysozyme, K_p , from aqueous phase to emulsified phase by Span80.

- [4] T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi: "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution", Sep. Purif. Technol., Vol.31, pp.251-259 (2003)
- [5] Y. Liu, X. Dong, Y. Sun: "New development of reverse micelles and applications in protein separation and refolding", Chin. J. Chem. Eng., Vol.16, pp.949-955 (2008)
- [6] T. Kinugasa, Y. Miyauchi, C. Nakano, K. Itoh, Y. Nishii: "A basic study of reversed micellar extraction of protein with a liquid surfactant membrane", Solv. Extr. Res. Dev. Japan, Vol. 12, pp.159-167 (2005)
- [7] 衣笠巧, 今村誠, 藤原加苗, 南香誉子, 金丸真希, 神野朋美, 西井靖博: 「逆ミセル乳化液膜の安定性に及ぼす操作条件の影響」, 新居浜工業高等専門学校紀要, 第47巻, pp.31-36 (2011)
- [8] K. Naoe, Y. Shintaku, Y. Mawatari, M. Kawagoe, M. Imai: "Novel function of guanidine hydrochloride in reverse micellar extraction of lysozyme from chicken egg white", Biotechnol. Bioeng., Vol.48, pp.333-340 (1995)
- [9] T. Kinugasa, S. Tanahashi, H. Takeuchi: "Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: Distribution equilibrium and extraction rates", Ind. Eng. Chem. Res., Vol.30, pp.2470-2476 (1991)
- [10] 衣笠巧, 高橋典子, 佐藤喜美子, 渡部国雄, 竹内寛: 「逆ミセル溶液によるタンパク質の抽出過程」, 化学工学シンポジウムシリーズ 63 「液膜及び分子認識材料利用技術の基礎と応用」, 化学工学会「液膜及び分子認識液体利用プロセス」特別研究会編, pp.189-196 (1998)