

## シバクロンブルー—レシチン逆ミセル溶液による リゾチームの抽出とエマルジョンの乳化安定性

衣笠 巧\* 大森由深\* 鈴木 誠\* 石川 薫\* 高橋浩二郎\* 西井靖博\*

Lysozyme Extraction and Emulsion Stability of Cibacron Blue-Lecithin Reversed Micellar Solution

Takumi KINUGASA\* Yumi OHMORI\* Makoto SUZUKI\* Kaoru ISHIKAWA\*  
Kohjiro TAKAHASHI\* Yasuhiro NISHII\*

The extraction of lysozyme from aqueous solution into CB-lecithin reversed micellar solution was investigated. The extraction ratio of lysozyme into CB-lecithin/hexane solution was increased with CB concentration. Introduction of CB brought about a size increment of reversed micelles and an non-specific interaction with lysozyme. The effect of the concentration of Span80 and CB on the stability of emulsion was studied. The formation of stable W/O emulsion needs high concentration of Span 80 and CB. We found that the CB-lecithin was effective for the formation of reversed micelles, protein extraction, and emulsion stability.

### 1. 緒言

タンパク質は化粧品や洗剤、医薬品、食品などに使われ、私たちの生活に欠かせない物質である。また化成品製造への利用など化学工業にも使われ、工業的に幅広く利用されている。タンパク質を利用するには、培養液や細胞破壊液から分離精製する必要がある。現在、タンパク質の工業的分離精製法として電気泳動や液体クロマトグラフィーによる方法があるが、これらは高い分離精度と効率を得ることができる一方、装置が複雑であり、コストが高い、大型化が困難などの課題がある<sup>[1]</sup>。これに対して著者らは、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<sup>[2-4]</sup>。逆ミセル抽出法は、有機溶媒中に形成される逆ミセルを抽出剤としてタンパク質などの親水的物質を水相中から有機相中に抽出する方法である。乳化液膜法は、界面活性剤を含む油相と内水相を乳化して作成した W/O エマルジョンを外水相中に分散させて W/O/W エマルジョンとし、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である。これらを組み合わせることにより、タンパク質を経済的かつ省エネルギー的に大量連続処理できる分離操作が可能となる。

逆ミセル抽出には、安定な逆ミセルを形成する、タンパク質抽出能力に優れるなどの理由から界面活性剤 AOT が広く用いられてきた。しかし、これまでの研究で AOT を乳化液膜

に応用すると安定したエマルジョンを形成できず、タンパク質抽出能力も低下することがわかっている<sup>[2,3]</sup>。そこで、本研究では AOT に代わる界面活性剤としてレシチンに注目した。レシチンは大豆や卵黄などの食品由来の界面活性剤であり、食品や化粧品の乳化剤として用いられている<sup>[5]</sup>。そのため毒性の心配がほとんどない。レシチンは大豆油、遊離脂肪酸、リン脂質などの混合物であり、リン脂質が界面活性を持っていて逆ミセルを形成すると考えられる。リン脂質の主成分は Fig.1 (a)~(c)に示すホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) であり、これらがタンパク質と相互作用すると考えられる。さらに、リン脂質 (主に PE) にタンパク質と親和性のある色素シバクロンブルー-F-3GA (CB) と結合させることで非特異的相互作用によって抽出能力が高められることがわかっている<sup>[6]</sup>。CB の構造は Fig.1 (d)に示す。

本研究では、CB—レシチンによる逆ミセル形成能力とタンパク質抽出能力を調査し、その最適な条件を検討すること、さらには Span80 を添加した CB—レシチン逆ミセルでのタンパク質の抽出、エマルジョンの乳化安定性を確認することを目的として実験を行った。

### 2. 実験

レシチンは大豆由来のものを使用した。100 kg/m<sup>3</sup> レシチン

平成 28 年 9 月 20 日受付 (Received Sep. 20, 2016)

\* 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)

／ヘキサン溶液 100 cm<sup>3</sup> を分液漏斗に入れ、pH 8.0 リン酸緩衝溶液 (0.01 kmol/m<sup>3</sup>) 約 50 cm<sup>3</sup> で 3 回洗浄した。レシチン／ヘキサン溶液を三角フラスコに移し、0.2 kmol/m<sup>3</sup> NaOH と 0.2 kmol/m<sup>3</sup> NaCl を含む 10 kg/m<sup>3</sup> CB 水溶液を 10 cm<sup>3</sup> 加えた。反応速度を高めるため、さらに 85% リン酸を 1 cm<sup>3</sup> 加えた。ホットスターラーにより 35°C、攪拌速度 170 rpm で 24 時間攪拌した。30 分静置し、水相を取り除いた後、未反応の CB を除去するために pH 8.0 リン酸緩衝溶液 (0.01 kmol/m<sup>3</sup>) 約 50 cm<sup>3</sup> で洗浄する操作を 3~5 回繰り返した。洗浄後、640 nm の吸光度を測定して CB 濃度を定量した。

タンパク質は卵白リゾチームを用いた。タンパク質水溶液とレシチン／ヘキサン溶液または CB-レシチン／ヘキサン溶液の等量を三角フラスコに仕込み、298 K の恒温水槽中で 1 時間振盪し、抽出平衡に到達させた。平衡に達した溶液を遠心分離で二相に分相し、水相中のタンパク質濃度は Lowry 法によって決定した。抽出率  $E$  は次のように定義した。

$$E = \frac{C_{org,1}V_{org,1}}{C_{aq,0}V_{aq,0}} = \frac{C_{aq,0}V_{aq,0} - C_{aq,1}V_{aq,1}}{C_{aq,0}V_{aq,0}}$$

ここで  $C$  はタンパク質濃度、 $V$  は体積、添字  $aq$  は水相、 $org$  は有機相、0 は初期、1 は抽出後である。本実験では振盪前後で水相と有機相の体積変化は無視できるとした。また、油相中の水分量をカールフィッシャー滴定法により測定した。

乳化実験は乳化剤として Span80 を用いて行った。CB-レシチン／ヘキサン溶液に Span80 を添加して調製した有機相を氷冷した 50 cm<sup>3</sup> トールビーカーに入れ、ホモジナイザーで攪拌しているところに純水または NaCl 濃度 0.2 kmol/m<sup>3</sup> の水相を注いだ。5 分後に攪拌を止め、静置して乳化状態を観察した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 レシチン逆ミセルによる抽出

レシチン／ヘキサン溶液の有機相可溶化水分量に対するレシチン濃度の影響を Fig.2 に示す。レシチン濃度が 0.2 kg/m<sup>3</sup> までは水分量はほぼ一定で、レシチンを含まないときと同程度であったことから、レシチン濃度 0.2 kg/m<sup>3</sup> 以下の水分はヘキサンへの物理的溶解によると考えられる。一方、ヘキサン濃度 0.2 kg/m<sup>3</sup> 以上で水分量の直線的な増加が見られ、逆ミセルを形成して水を可溶化していることが示唆される。すなわち、ヘキサン中のレシチンの臨界ミセル濃度は 0.2 kg/m<sup>3</sup> である。逆ミセル内に可溶化された水はナノメートルサイズの微小水滴となり、その大きさは逆ミセルを形成する界面活性剤に対する可溶化された水のモル比と強い相関がある。Fig.2 において、水分量の増加はレシチン濃度に比例しており、レシチンに対する可溶化された水分量の比は一定であることから、この濃度範囲での逆ミセル微小水滴のサイズはほぼ一定であると推測される。

従来タンパク質抽出に用いられてきた AOT は 0.05 kmol/m<sup>3</sup> 程度で使用されることが多く、これを 0.05 kmol/m<sup>3</sup> の NaCl 水溶液と接触させたときの平衡水分量は 1 kmol/m<sup>3</sup> 程度であ

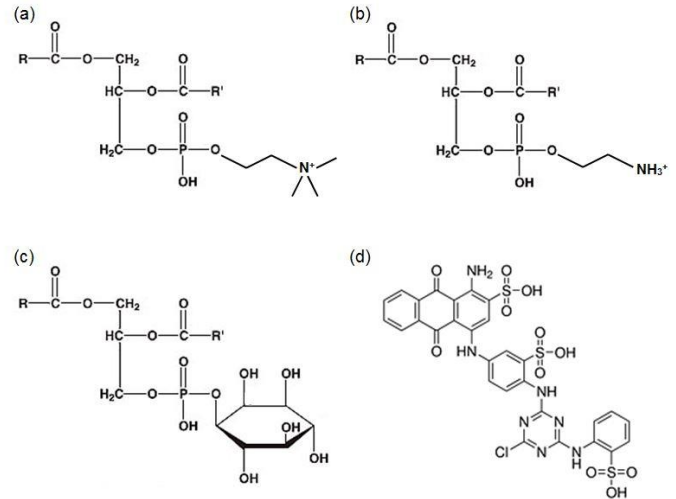


Fig.1 Chemical structure of (a) phosphatidylcholine (PC), (b) phosphatidylethanolamine (PE), (c) phosphatidylinositol (PI), and Cibacron Blue F-3GA (CB).

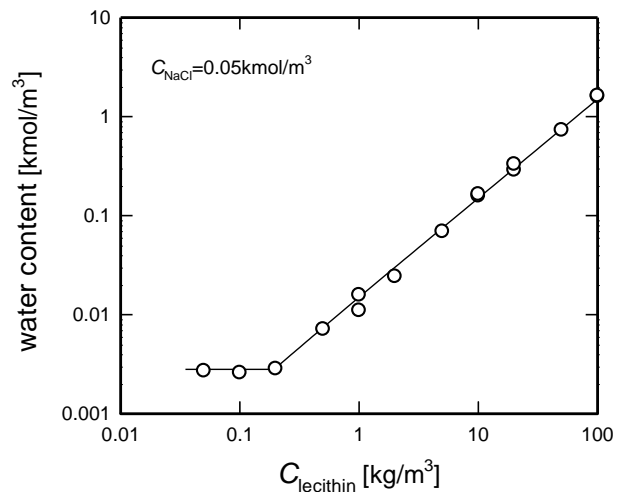


Fig.2 Water content in lecithin/hexane solution.

る。タンパク質の抽出のために同程度の水分量が必要であると考えれば、Fig.2 より、レシチン濃度は 100 kg/m<sup>3</sup> 程度が適当である。したがって、以下の実験はレシチン濃度 100 kg/m<sup>3</sup> で行った。レシチンの平均分子量は 780 程度であり<sup>[5]</sup>、100 kg/m<sup>3</sup> レシチンのモル濃度は 0.13 kmol/m<sup>3</sup> となる。レシチンのうち逆ミセル形成に関わると考えられるリン脂質の比率は 50~60% 程度であることから、その濃度は 0.07~0.08 kmol/m<sup>3</sup> であり、物質質量基準で AOT の約 1.5 倍必要であることがわかる。

Fig.3 にレシチンによるリゾチームの抽出率を示す。レシチン濃度が高くなると抽出率は向上し、レシチンが抽出剤として機能していることがわかる。しかし、レシチン濃度 100 kg/m<sup>3</sup> でも、抽出率は 20% 程度に過ぎなかった。リゾチームの等電点は 11 なので、pH 9.0 の水溶液中で正電荷を帯びている。したがって、抽出の推進力としてレシチンのリン酸基の負電荷との静電的相互作用が考えられる。従来の AOT 逆ミセルによるタンパク質の抽出も、AOT のスルホ基との静電的引

力が主な推進力であった。しかし、レシチンの場合、PCのコリン基やPEのアミノ基は正電荷を持つため、これによって抽出が阻害されたのかもしれない。また、前述したようにレシチン逆ミセルはAOT逆ミセルに比べて小さいと推定されており、これもリゾチームの抽出率が低くなった一因と考えられる。

### 3-2 CB-レシチン逆ミセルによる抽出

レシチン系ではタンパク質の抽出率が低かったため、タンパク質と非特異的な親和力をもつCBを結合した系について検討した。CB-レシチンが調製できているか確認するためにCB濃度を640 nmの吸光度測定によって定量したところ、 $0.42 \text{ mol/m}^3$ であった。CBはPEと結合すると考えられている。レシチン中のPEの含有量はおよそ10%であることから、CBはPEの約3%と結合していることになる。文献の報告値もほぼ同様であった<sup>6)</sup>。水分量  $1 \text{ kmol/m}^3$  のAOT逆ミセルの会合数は350個程度と見積もられる<sup>7)</sup>。レシチンは混合物であり、AOTと構造が異なるので推定は困難であるが、CB-レシチン逆ミセルがリン脂質で構成され、AOTと同じ会合数であると考えれば、逆ミセル1個当たりPEは50~60個、CBはおよそ2個と推定される。この程度のCBによってタンパク質の抽出が促進されるかどうかが本研究の注目点である。

Fig.4 (a)は、総レシチン濃度  $100 \text{ kg/m}^3$  でCB導入濃度を変えたときの有機相水分量を表す。CB濃度が高くなると、 $0.2 \text{ mol/m}^3$ まで水分量はほぼ一定だったが、それ以上でわずかに増加した。これはCB濃度  $0.2 \text{ mol/m}^3$ 以上で逆ミセルサイズが大きくなったことを示唆する。CBの分子量は840であり、かなり嵩高い構造をしており、さらにスルホ基による静電的な反発力が働くことから、CBの導入につれて逆ミセルサイズが大きくなったと考えられる。ただし、会合数350個の逆ミセルに2個のCBが導入されたくらいで水分量が25%も増加するとは考えにくいので、CBは逆ミセル溶液中に偏在している可能性が高い。

Fig.4 (b)はCB濃度に対するリゾチーム抽出率の影響を示す。抽出率はCB濃度の増加とともに向上し、レシチンのみの場合の約3倍に改善された。CBは静電的相互作用と疎水的相互作用の両方の効果によってタンパク質との親和性を高める機能がある<sup>8)</sup>。特にリゾチームとは強く相互作用することが知られており、本実験でもそれを支持する結果を得た。CB濃度  $0.4 \text{ mol/m}^3$ のときのリゾチームの抽出率は60%であり、CBなしのときに比べて増加したリゾチームの抽出量はおよそ  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$ になる。これはリゾチーム1分子あたりCBが約80分子必要であったことを意味する。Denizliらは、CBを導入した高分子膜へのリゾチームの吸着平衡を調べ、リゾチーム1分子に対して114分子のCBが吸着に関わっていると報告した<sup>9)</sup>。CBは、膜面吸着よりも逆ミセル抽出の方が効率よくリゾチームとのリガンドとして機能していることがわかった。この結果もCBが逆ミセル溶液中で偏在していることを支持する。

Fig.5 (a)は、CB-レシチン/ヘキサン溶液の有機相水分量

に及ぼす水相NaCl濃度の影響を表す。NaCl濃度の増加とともに水分量は若干低下した。レシチンの主成分であるPCとPEは両性イオン、PIはアニオンであり、さらにCBもスルホ基を有しているため、塩濃度の増加とともに親水基間の静電

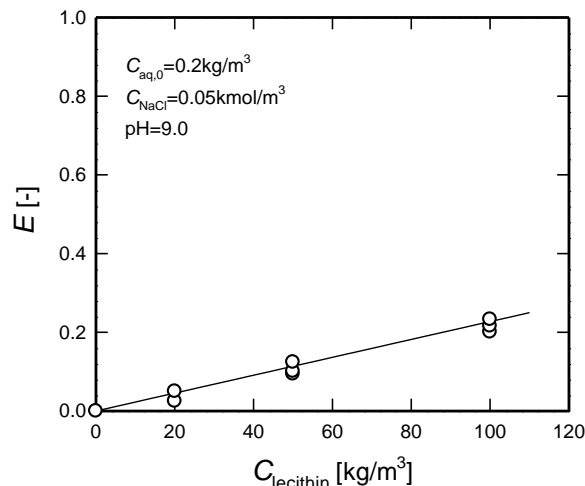


Fig.3 Effect of lecithin concentration on extraction ratio of lysozyme into lecithin/hexane solution.

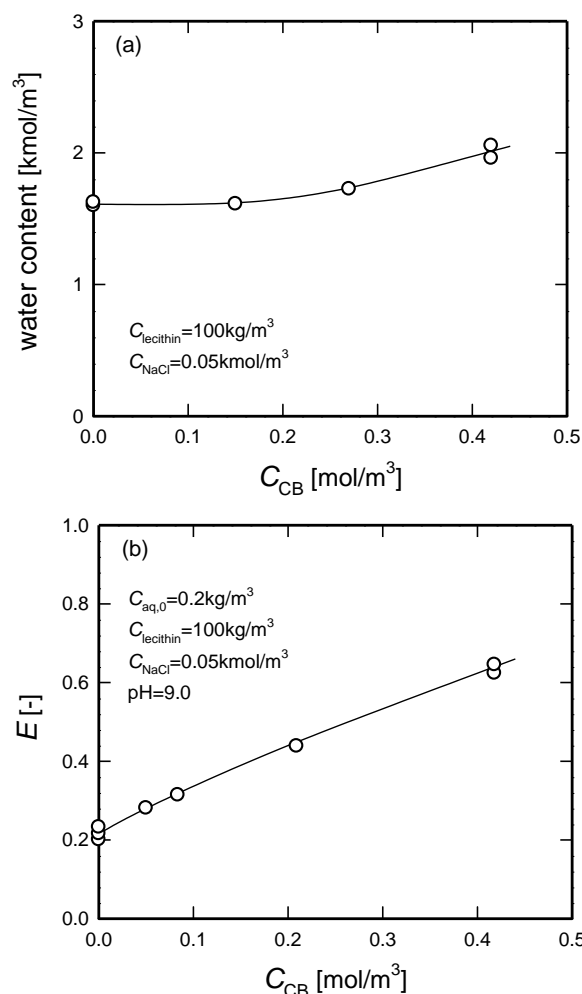


Fig.4 Effect of CB concentration on (a) water content and (b) extraction ratio of lysozyme in CB-lecithin/hexane solution.

遮蔽効果が強くなり、逆ミセルサイズが減少したと考えられる。ただし、水分量減少の程度は AOT 系に比べるとそれほど顕著ではない<sup>[10]</sup>。

リゾチームの抽出率に及ぼす NaCl 濃度の影響を Fig.5 (b) に示す。抽出率は NaCl 濃度  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  のときが最大であった。塩濃度が高いと静電遮蔽効果によりリゾチームと CB との静電的相互作用が低下したためと考えられる。一方、NaCl 濃度を  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  以下にすると抽出率は低下した。この原因は定かではない。

Fig.6 はリゾチームの抽出に及ぼす pH の影響を示す。pH 8 ~ 10 の範囲で最も抽出率が高く、それ以上でもそれ以下でも抽出率は急激に減少した。CB 導入高分子膜へのリゾチームの吸着では pH 7 でピークになり、その理由は明確ではないが、疎水的作用や静電的作用、水素結合などが複合的に働いたためと報告している<sup>[9]</sup>。本研究ではレシチンが共存しているため、最適 pH に差異が生じたと考えられるが、詳細は不明である。

3-3 乳化剤の抽出および乳化安定性への影響

CB-レシチンを逆ミセル乳化液膜に適用するためには、乳化剤 Span80 の添加による影響を調べる必要がある。Fig.7 は

リゾチームの抽出率に及ぼす Span80 濃度の影響を示す。Span 80 濃度が高くなると抽出率は低下した。Span80 は非イオン性の界面活性剤であり、レシチンとともに逆ミセルの形成に寄与すると考えられる。しかし、リゾチームとの相互作用はほとんどないため、希釈効果によって CB によるリゾチームの抽出能力を阻害したと考えられる。同様の結果は AOT 系でも確認されている<sup>[2]</sup>。

CB-レシチンが乳化液膜として利用できるかを確認するために、レシチン濃度  $100 \text{ kg/m}^3$  で乳化実験を行った。その結果を Table 1 に示す。まず CB 濃度  $0.42 \text{ mol/m}^3$ 、Span80 濃度 5 wt% で油相と水相の体積比の影響を調べた。体積比 1:1 では、乳化後すぐに W/O エマルジョンから油相が分離し始め、1 時間後には油相の 30% 程度が分離した。これは油相が過剰であることを示しているため、油相と水相の体積比を 1:2 に変えたところ、1 時間後でも安定したエマルジョンを得ることができた。水相として純水を用いた場合と  $0.2 \text{ kmol/m}^3$  NaCl 水溶液を用いた場合では、分相の程度は同程度であったが、純水するときの方は油相が濁っていたのに対して、NaCl 水溶液で

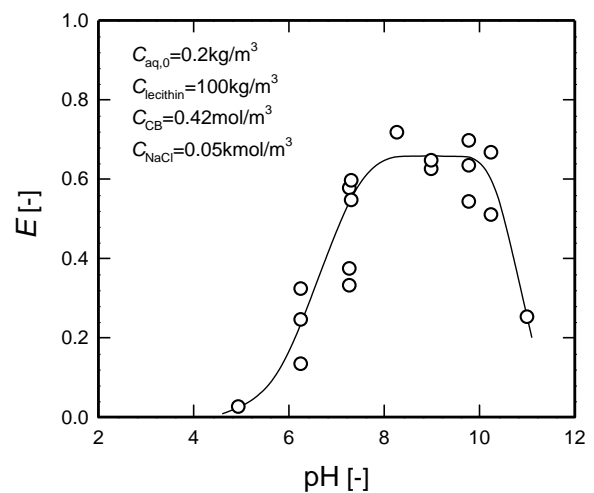
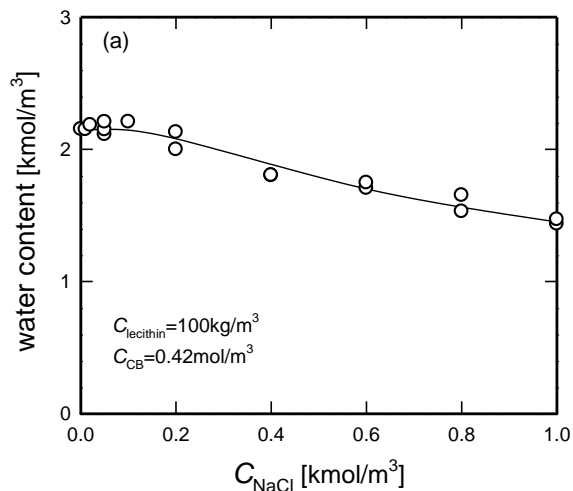


Fig.6 Effect of pH on extraction ratio of lysozyme into CB-lecithin/hexane solution.

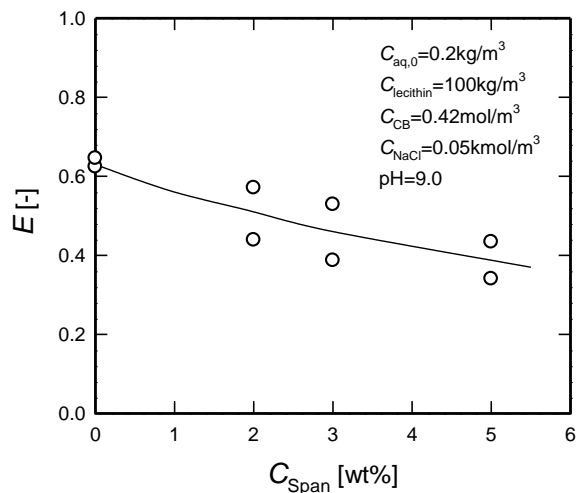
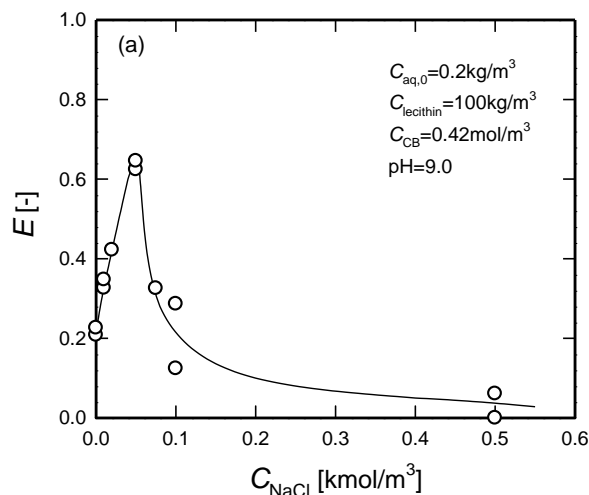


Fig.7 Effect of Span80 concentration on extraction ratio of lysozyme into CB-lecithin/hexane solution.

Fig.5 Effect of NaCl concentration on (a) water content and (b) extraction ratio of lysozyme in CB-lecithin/hexane solution.

は透明であった。

次に Span80 濃度の影響を調べた。Span80 濃度を 2 wt% に下げると 1 時間後には、純水では約 80% が、NaCl 水溶液ではほぼ完全に水相と油相に分離し、エマルションはほとんど観察されなかった。Span80 濃度 3 wt% では、純水の場合は安定なエマルションは形成されるが、NaCl 水溶液では油相の 10% 程度が分離した。したがって、水相に NaCl を含む方がエマルションは不安定になることがわかった。

CB 濃度の影響は純水の場合についてのみ調べた。CB 濃度 0.03 mol/m<sup>3</sup> では、乳化操作直後でも安定したエマルションが形成できず、エマルション内に水滴があり、時間が経つと油相と水相に完全に分離した。CB 濃度 0.08 mol/m<sup>3</sup> では、乳化操作直後は安定なエマルションを形成していたが、時間が経つとほとんど水相と油相に分離した。CB 濃度 0.15 mol/m<sup>3</sup> では、時間が経つにつれてエマルションから一部濁った油相が分離した。CB 濃度 0.42 mol/m<sup>3</sup> で安定なエマルションが形成されたことも合わせて、CB 濃度が高くなるとエマルションの安定性が増すことがわかった。

#### 4. 結論

CB-レシチンを界面活性剤、Span80 を乳化剤とした逆ミセル乳化液膜の開発を目的として、リゾチームの抽出率とエマルションの乳化安定性を検討し、以下の結論を得た。

- (1) CB-レシチン逆ミセルは、CB 濃度の増加とともに可溶性水分量が増加し、逆ミセルサイズが大きくなった。
- (2) CB-レシチンによるリゾチームの抽出率は、CB を導入することで 3 倍程度まで高めることができた。
- (3) CB 導入量が高いほど、W/O エマルションの乳化安定性が高いことがわかった。

以上の結果から、CB-レシチンは逆ミセル乳化液膜操作のために有効な界面活性剤であることが明らかになった。

#### 引用文献

- [1] 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)
- [2] 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)
- [3] 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)
- [4] 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：「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」，新居浜工業高等専門学校紀要，第 52 巻，pp.23-26 (2016)
- [5] 菰田衛：「レシチン その基礎と応用」，幸書房 (1991)

Table 1 Effect of Span80 and CB concentration on emulsion stabilization.

| org./aq. volume ratio [-]                                | Span80 conc. [wt%] | CB conc. [mol/m <sup>3</sup> ] | emulsion stabilization       |
|--|--------------------|--------------------------------|------------------------------|
| aq. phase : water  |                    |                                |                              |
| 1 / 1  | 5                  | 0.42                           | 30 % org. phase separation   |
| 1 / 2  | 5                  | 0.42                           | stable W/O emulsion          |
| 1 / 2  | 2                  | 0.42                           | 80 % two phase separation    |
| 1 / 2  | 3                  | 0.42                           | stable W/O emulsion          |
| 1 / 2  | 3                  | 0.03                           | perfect two phase separation |
| 1 / 2  | 3                  | 0.08                           | perfect two phase separation |
| 1 / 2  | 3                  | 0.15                           | 10 % org. phase separation   |
| aq. phase : 0.2 kmol/m <sup>3</sup> NaCl <sub>aq</sub> . |                    |                                |                              |
| 1 / 1  | 5                  | 0.42                           | 30 % org. phase separation   |
| 1 / 2  | 5                  | 0.42                           | stable W/O emulsion          |
| 1 / 2  | 2                  | 0.42                           | perfect two phase separation |
| 1 / 2  | 3                  | 0.42                           | 10 % org. phase separation   |

- [6] Y. Sun, S. Ichikawa, S. Sugiura, S. Furusaki: "Affinity extraction of proteins with a reversed micellar system composed of Cibacron Blue-modified lecithin", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.58, pp.58-64 (1998)
- [7] T. Kinugasa, A. Kondo, S. Nishimura, Y. Miyauchi, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi: "Estimation for size of reverse micelles formed by AOT and SDEHP based on viscosity measurement", *Colloids Surf., A*, Vol.204, pp.193- 199 (2002)
- [8] S. Zhang, Y. Sun: "A predictive model for salt effects on the dye-ligand affinity adsorption", *Sep. Purif. Technol.*, Vol.31, pp.251-259 (2003)
- [9] A. Denizli, S. Senel, M.Y. Arica: "Cibacron blue F3GA and Cu(II) derived poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for lysozyme adsorption", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, Vol.11, pp.113-122 (1998)
- [10] T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi: "Effect of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution", *Sep. Purif. Technol.*, Vol.31, pp.251-259 (2003)

