

## ジ(2-エチルヘキシル)リン酸逆ミセル溶液を用いた リゾチームの抽出・逆抽出

衣笠 巧\* 十亀香菜\* 西井靖博\*

### Forward and Backward Extraction of Lysozyme by using Di(2-ethylhexyl) Phosphoric Acid Reversed Micellar Solution

Takumi KINUGASA\* Kana SOGAME\* Yasuhiro NISHII\*

The extraction of lysozyme from aqueous solution into DEHPA reversed micellar solution was investigated. In lower pH than  $pK_a$  of DEHPA, lysozyme was not extracted into the DEHPA solution, because DEHPA was undissociated and then was not attracted to lysozyme. The extraction ratio of lysozyme increased with increasing pH beyond  $pK_a$  of DEHPA by the electrostatic attraction between lysozyme and DEHPA. At pH 5-6, the insoluble aggregates were formed, and therefore we could conclude that the extraction should be carried out at pH above 6. There was no effect of salt species (KCl, NaCl) and its concentration on the extraction ratio of lysozyme, except for the condition at lower KCl concentration. About 40 % of the back extraction ratio of lysozyme from the DEHPA reversed micellar solution could be achieved at pH 3.4.

#### 1. 緒言

逆ミセル抽出法は、界面活性剤が有機溶媒中で自発的に形成する逆ミセルをホストとして、その内核水相中に親水性物質を可溶化することを利用する溶媒抽出法である。1980年代にタンパク質などの生体高分子の分離精製法として研究が開始され<sup>[1,2]</sup>、その後、分離対象がアミノ酸<sup>[3,4]</sup>や金属イオン<sup>[5,6]</sup>などに拡大され、酵素反応や金属微粒子生成など分離工学以外の分野にも応用されてきた。逆ミセルを形成する界面活性剤には、ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム(AOT)を用いることが多く、我々の研究室でもAOT逆ミセルによるタンパク質の抽出を中心に検討してきた<sup>[7,8]</sup>。AOT逆ミセルは容易に逆ミセルを形成することができ、比較的低分子量のタンパク質の抽出には非常に有効であるが、高分子量のタンパク質の抽出が難しい、逆抽出の効率があまり高くない、操作中に変性するタンパク質があるなどの課題が指摘されている。これを解決するために、種々の界面活性剤系が提案された。我々の研究室でもAOTとジ(2-エチルヘキシル)リン酸(DEHPA)の混合系も提案し、高分子量のタンパク質の抽出が可能になることを報告した<sup>[9]</sup>。さらに、染料を分離対象としてAOT逆ミセルとAOT-DEHPA混合逆ミセルによる抽出・逆抽出が可能であることを見出した<sup>[10,11]</sup>。

DEHPAは弱酸性の界面活性剤であり、金属イオンの抽出

剤として広く用いられている。金属イオンの抽出は主に酸性条件で操作するので問題にされないが、DEHPAは中性あるいは塩基性条件では第三相を形成する。この第三相はバイコンティニューアスな相であると考えられ、界面張力が小さく、操作性の悪化や抽出効率の低下を招くため、DEHPA逆ミセルは中性条件で利用できないとされてきた。我々は、第三相生成の原因がDEHPAの水相への漏出にあることを明らかにし、有機相への2-エチル-1-ヘキサノールの添加によって解決して、中性条件での染料の抽出を可能にした<sup>[12]</sup>。

そこで本研究では、DEHPA逆ミセル溶液がタンパク質の抽出に適用できるかどうかを調査した。これまでにDEHPAを利用したタンパク質の抽出は、AOT-DEHPA混合系<sup>[10]</sup>やDEHPA-リン酸トリブチル混合系<sup>[13]</sup>のような例がわずかにあるだけで、DEHPA単独系の報告は見られない。DEHPAによる染料の抽出操作では、pH変化によってほぼ100%の逆抽出率が可能であったため、AOT逆ミセルの課題のひとつである低い逆抽出率を克服できる可能性がある。ここでは、タンパク質としてリゾチームを用い、pHや添加塩の種類や濃度が抽出率および逆抽出率に及ぼす影響を検討した。

#### 2. 実験

タンパク質としてリゾチーム(ニワトリ卵白由来)、界面

活性剤として DEHPA、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)、助溶媒として 2-エチル-1-ヘキサノールを用いた。DEHPA は、大八化学製 DP-8R を  $6 \text{ kmol/m}^3$  塩酸と蒸留水で交互に 3 回洗浄し、十分に遠心分離して精製したものをを用いた。水溶液は、バッファで pH、NaCl または KCl で塩濃度  $C_E$  を調節した溶液にリゾチームを溶解して調製した。有機溶液は、1 wt% 2-エチル-1-ヘキサノールを含むイソオクタンに DEHPA を濃度  $C_S$  になるよう溶解して調製した。

水溶液と有機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、水相中および有機相のリゾチーム濃度を紫外可視分光光度計 (島津 UV-1600) で 280 nm の吸光度から決定した。水相濃度基準の抽出率  $E_{(w)}$  と有機相濃度基準抽出率  $E_{(o)}$  を次のように定義した。

$$E_{(w)} = \frac{C_{aq,0}V_{aq,0} - C_{aq,1}V_{aq,1}}{C_{aq,0}V_{aq,0}} \quad (1)$$

$$E_{(o)} = \frac{C_{org,1}V_{org,1}}{C_{aq,0}V_{aq,0}} \quad (2)$$

ここで  $C$  はリゾチーム濃度、 $V$  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。

リゾチームを抽出した有機相は、pH と KCl 濃度を調節した等量の新しい水溶液とともに三角フラスコに仕込み、同様に 1 時間振盪して逆抽出を行った。平衡到達後、二相に遠心分離し、水相中の MB 濃度を決定して次式で定義される逆抽出率  $E_B$  を求めた。

$$E_B = \frac{C_{aq,2}V_{aq,2}}{C_{org,1}V_{org,1}} \quad (3)$$

ここで添字 2 は逆抽出後を示す。なお、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。

水相の pH は pH メータ (堀場 F-52)、有機相中の水分量はカールフィッシャー水分測定装置 (平沼 AQV-7) を用いて測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 リゾチームの抽出率に及ぼす pH の影響

DEHPA 逆ミセルを用いたリゾチームの抽出に及ぼす pH の影響を調べた実験の結果を Figs.1, 2 に示す。Fig.1 は KCl 系、Fig.2 は NaCl 系の結果であり、それぞれ(a)は水相濃度基準の抽出率  $E_{(w)}$ 、(b)は有機相濃度基準の抽出率  $E_{(o)}$  である。いずれの結果も pH が 3~4 の範囲ではほとんど抽出が起こらず、pH 5 付近で急激に抽出率が增大している。リゾチームの等電点は 11 であるので、本研究の実験条件では正の電荷を帯びている。DEHPA の  $pK_a$  は 5.7 であるので<sup>9)</sup>、pH が 5.7 より十分小さければ DEHPA は解離せず、リゾチームとの静電的引力が生じないため、抽出されない。しかし、pH が 5.7 に近づくとつれて DEHPA が解離して負電荷を持ち始め、リゾチームの抽出率が高くなる。このことより、抽出の推進力がリゾチームと DEHPA の静電的相互作用であることが確認できた。

また、有機相濃度基準の抽出率より水相濃度基準の抽出率の方が高い。水相基準の抽出率は水相からのタンパク質除去率を、有機相基準の抽出率は有機相へのタンパク質移動率を意味する。この 2 つの抽出率に差が生じるのは、水相から取り除かれたが、有機相に移動せず不溶性の凝集物となったリゾチームが存在するためである。いずれの場合も pH 5~6 の範囲での差が大きく、すなわち凝集物の生成が多いようである。また、KCl 濃度  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  のときは、pH 7 でも凝集物が多く生成している。このような凝集物の生成は、AOT によるリゾチームの抽出において、AOT 濃度や塩濃度が低いときによく見られた現象で、タンパク質と AOT の結合は強いけれども、AOT が不足して有機相に溶解するだけの疎水性を獲得できないために起こると考えられる<sup>14)</sup>。本研究でも pH が高くなって DEHPA が解離し始め、リゾチームに結合して疎水性を帯び始めるが、解離した DEHPA が不足しているために凝集物となったものと考えられる。したがって、凝集物の生じない pH 6 以上での抽出操作が望ましい。本研究では、リゾチームの回収を目的とするため、これ以降は有機相濃度基準の抽出率で考える。

#### 3-2 リゾチームの抽出率に及ぼす塩濃度の影響

DEHPA 逆ミセルを用いたリゾチームの抽出に及ぼす塩の種類および塩濃度の影響を検討した。Fig.1 (b)より、KCl 濃度  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  のときは pH 5 以上でも抽出率は 20 % 以下の低い値を示した。これは前述した通り、凝集物を生成しやすい条件であったためと考えられる。それ以外の KCl 濃度では抽出率の差がほとんど見られない。Fig.2 (b)を見ると、NaCl 系では NaCl 濃度  $0.2 \text{ kmol/m}^3$  と  $0.5 \text{ kmol/m}^3$  とで抽出率はほとんど同じであった。さらに、KCl 系と NaCl 系を比較すると塩濃度  $0.2 \text{ kmol/m}^3$  以上では塩の種類による抽出率の違いは見られなかった。

AOT による逆ミセル抽出においては、添加塩として NaCl を用いた場合の方が KCl のときよりもタンパク質や染料の抽出率が高くなること、さらに塩濃度が高くなるとタンパク質や染料の抽出率が低下することが報告されている<sup>18,10)</sup>。これは、添加した塩による静電遮蔽効果のために、タンパク質と AOT との静電的相互作用が弱められることに起因する、と説明されている。また、タンパク質のような高分子の抽出に対しては、サイズ排除効果がはたらくともいわれている<sup>7)</sup>。逆ミセルを形成する界面活性剤の親水基が同符号であることから、隣り合う親水基間には静電的反発力がはたらいっている。塩濃度が高くなるとこの反発力が弱められることから親水基間の距離が小さくなり、逆ミセルが小さくなる。その結果、タンパク質が取り込まれにくくなり、抽出率が低下する。

そこで、DEHPA 逆ミセルのサイズが、塩濃度によってどのように変化するかを、有機相中の水分濃度測定により確認した。一般に、有機相中の水分量が多いほど逆ミセルの内核水相は大きいとされる。測定結果を Fig.3 に示す。DEHPA は pH によって逆ミセルサイズが変わると考えられるので、pH 7 において測定した。DEHPA 逆ミセルは AOT 逆ミセルよ

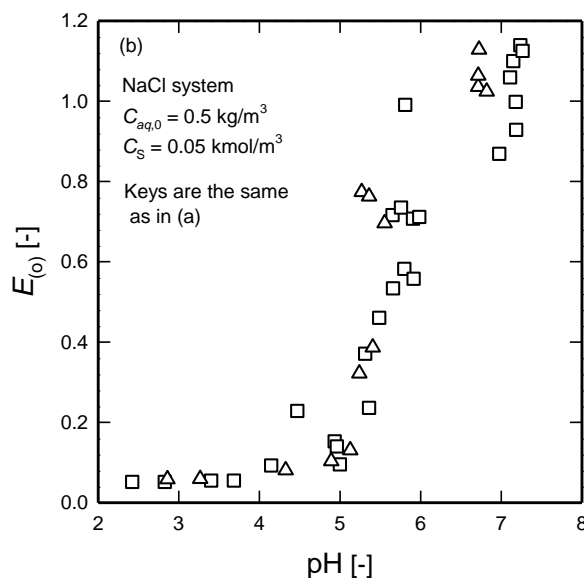
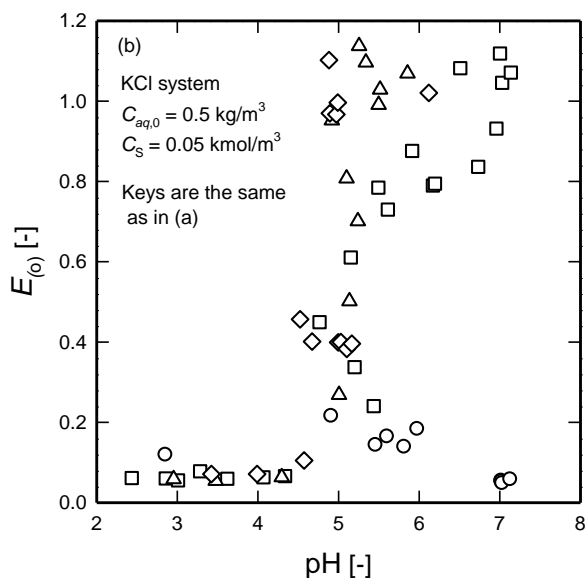
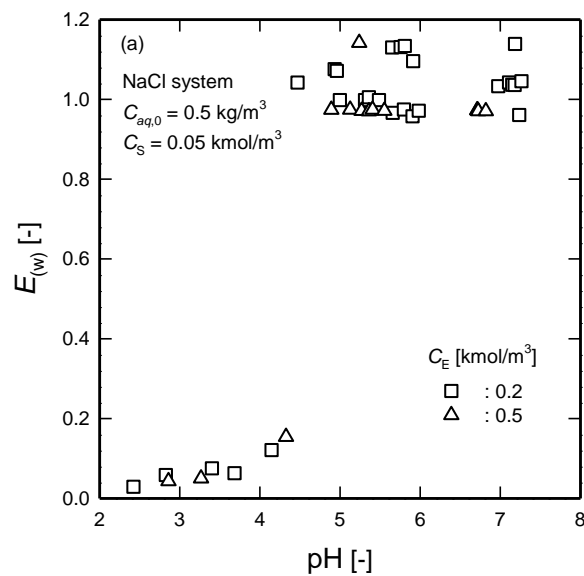
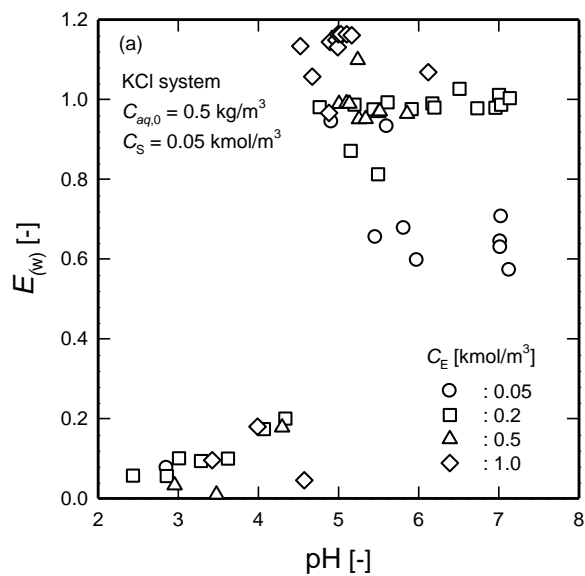


Fig.1 Effect of pH and salt concentration on extraction ratio of lysozyme from KCl solution. (a)  $E_{(w)}$ : based on aqueous phase concentration. (b)  $E_{(o)}$ : based on aqueous phase concentration.

Fig.2 Effect of pH and salt concentration on extraction ratio of lysozyme from NaCl solution. (a)  $E_{(w)}$ : based on aqueous phase concentration. (b)  $E_{(o)}$ : based on aqueous phase concentration.

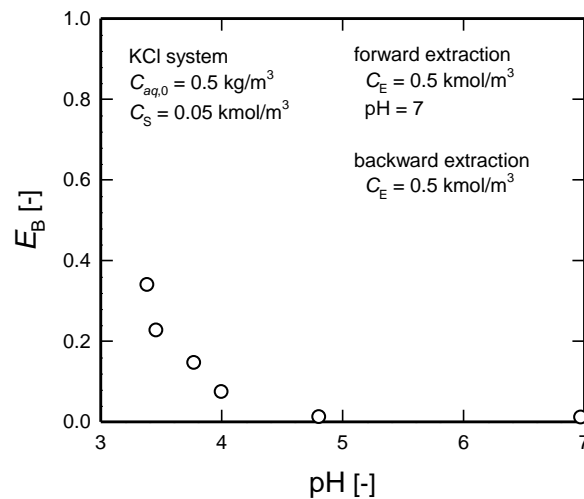
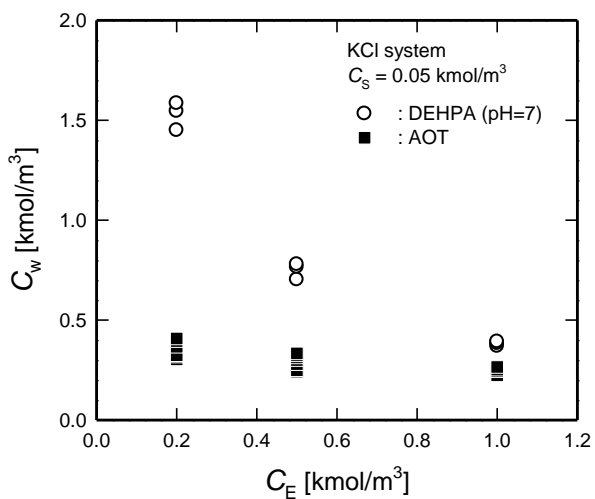


Fig.3 Effect of salt concentration on water content in DEHPA and AOT reversed micellar solution.

Fig.4 Effect of pH on backward extraction ratio of lysozyme from DEHPA reversed micellar solution.

りも水分濃度  $C_w$  が高く、しかも塩濃度が高くなると急激に水分濃度が低下した。これより、DEHPA 逆ミセルの方が AOT 逆ミセルよりも大きなサイズをもち、塩濃度によって敏感にサイズが変化することがわかる。したがって、塩濃度によって抽出率に差が見られなかった結果をサイズ排除効果から説明することはできない。DEHPA と AOT は親水基がリン酸基であるか、スルホ基であるかの違い以外はよく似た構造をしている。タンパク質や染料と静電的相互作用するのは親水基であるので、その構造の違いによって塩の影響の受け方が異なったのであろうと推測できる。しかし現段階では、その原因を明らかにすることができなかった。

### 3-3 リゾチームの逆抽出

Fig.1, 2 の結果より、pH 変化によってリゾチームの抽出挙動を制御できることから、DEHPA 逆ミセルからの逆抽出が可能であると予想される。そこで、種々の pH の逆抽出水溶液を用いてリゾチームを逆抽出した結果を Fig.4 に示す。予想通り、逆抽出水溶液の pH が低いときにリゾチームを逆抽出することができた。pH が低くなると DEHPA が非解離型になり、リゾチームとの静電的引力が弱められた結果、水相に逆抽出されたと考えられる。しかし、抽出率がほぼ 0 になる pH 3~4 の条件でも逆抽出率はそれほど高くなく、pH 3.4 のときでも 40% に達していない。DEHPA 逆ミセルによるリゾチームの抽出と逆抽出にはヒステリシスがあり、一度逆ミセルに取り込まれたリゾチームは容易には放出されないと考えられる。これは AOT 逆ミセルでも見られるタンパク質特有の現象である。残念ながら、DEHPA による逆抽出率の改善は期待通りにならなかった。

## 4. 結論

DEHPA 逆ミセル溶液を用いたリゾチーム抽出・逆抽出を行い、以下の結論を得た。

- (1) DEHPA の  $pK_a = 5.7$  より十分低い pH では、DEHPA が解離せず、リゾチームはほとんど抽出されなかった。 $pK_a$  に近い pH になると、解離した DEHPA との静電的引力によってリゾチームの抽出率は急激に増加した。また、pH 5~6 の範囲では凝集物の生成が起りやすかったので、抽出操作は pH 6 以上が望ましいことがわかった。
- (2) DEHPA によるリゾチームの抽出率は、添加塩の種類や濃度にほとんど影響されなかった。ただし、KCl 濃度が低いときは、pH 7 付近でも抽出率は低かった。
- (3) DEHPA 逆ミセルからのリゾチームの逆抽出は、DEHPA の  $pK_a$  より低い pH 溶液を用いることで可能であったが、最大 40% 程度にしか達しなかった。

## 引用文献

[1] T.A.Hatton: "Reversed micellar extraction of proteins", in "Surfactant-based separations", ed. by J.F.Scamehorn, J.H.

Harwell, Marcel Dekker Inc., New York, pp.55-90 (1989)

- [2] P.L.Luisi, M.Giomini, M.P.Pileni, B.H.Robinson: "Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules", *Biochim. Biophys.Acta*, Vol.947, pp.209-246 (1988)
- [3] E.B.Leodidis, T.A.Hatton: "Amino acids in AOT reversed micelles. 1. Determination of interfacial partition coefficients using the phase-transfer method", *J.Phys.Chem.*, Vol.94, pp.6400-6411 (1990)
- [4] X.Fu, J.Li, Y.Ma, Z.Li, D.Wang, Z.Hu: "Amino acid extraction with AOT reverse micelle", *Colloid Surf. A: Physicochem.Eng. Asp.*, Vol.179, pp.1-10 (2001)
- [5] M.Harada, N.Shinbara, M.Adachi, Y.Miyake: "Liquid membrane operation with aid of microemulsion - Separation of metal ions-", *J.Chem.Eng.Jpn.*, Vol.23, pp.50-57 (1990)
- [6] M.Caselli, A.Mangone, T.Pellegrino, A.Traini: "Selective transition metal extraction by reverse micelles", *Ann.Chim.*, Vol.94, pp.33-43 (2004)
- [7] 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)
- [8] 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", *Separ.Purif.Technol.*, Vol.31, pp.251-259 (2003)
- [9] T.Kinugasa, A.Hisamatsu, K.Watanabe, H.Takeuchi: "A reversed micellar system using mixed surfactants of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate and di(2-ethylhexyl)phosphoric acid for extraction of proteins", *J.Chem.Eng.Jpn.*, Vol.27, pp.557-562 (1994)
- [10] T.Kinugasa, H.Kashima, S.Kumeno, S.Tanaka, Y.Nishii: "Forward and backward extraction of methylene blue by using AOT/isooctane reversed micellar solution", *Separ.Sci.Technol.*, Vol.47, pp.1957-1962 (2012)
- [11] 衣笠 巧, 青木メイ, 吉本慎吾, 西井靖博: 「AOT-DEHPA 混合逆ミセル溶液を用いたメチレンブルーの抽出」, 新居浜工業高等専門学校紀要, 第 46 巻, pp.19-22 (2016)
- [12] T.Kinugasa, T.Hashimoto, Y.Nishii: "Reversed micellar extraction of methylene blue by using di(2-ethylhexyl) phosphoric acid", *Solv.Extr.Res.Dev.*, Jpn., Vol.22, pp.169- 176 (2015)
- [13] Z.Hu, E.Gulari: "Protein extraction using the sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) reverse micellar system", *Biotechnol.Bioeng.*, Vol.50, pp.203-206 (1996)
- [14] 衣笠 巧, 白川裕梨, 高橋涼子, 石川貴子, 秦 麻美, 西井靖博: 「逆ミセル抽出によるタンパク質の最大抽出量と可溶化水分量」, 新居浜工業高等専門学校紀要, 第 46 巻, pp.33-38 (2010)