

マイクロチャネルを用いたタンパク質の逆ミセル抽出

西井靖博* 一柳天真* 大麻智也* 衣笠 巧*

Protein Separation Using Reverse Micellar Solution in a Microchannel Reactor

Yasuhiro Nishii* Takamasa Ichiryu* Tomoya Oasa* Takumi Kinugasa*

abstract

We applied microchannel reactor to the reverse micellar extraction as a bioseparation device. Slugs were successfully formed even in the reverse micellar system. Flow rate of aqueous phase affected the deformation of slug shapes, which led the changes of both aqueous slug length and specific interfacial area. These result explained the extraction behavior. In order to compare the effect of materials inside the channel surface, the channels made of PTFE and glass were used in the same experimental conditions. For the case of glass channel, the extraction fraction was drastically decreased due to the small interfacial area caused by the frequent coalescence of slugs in the channel.

1. 緒言

近年、タンパク質や酵素のような生体関連物質の工業的分離技術は医薬、薬学分野において重要な役割を担っている。タンパク質を分離・精製する方法は、液体クロマトグラフィーや電気泳動法などがあるが、これらの方法は一度に少量しか精製できないことやコストが高いという欠点がある。これを解消するために現在研究されている技術のひとつとして逆ミセル抽出法がある。逆ミセル抽出法とは、液液抽出の一種で、有機溶媒中で形成された界面活性剤の集合体からなる逆ミセルを含む油相と、目的物質を含む水相とを接触させることにより、水溶液から逆ミセル中へ目的物質を抽出する方法である。特長としてはスケールアップが容易でありタンパク質などの生理活性物質の分離・精製に適した手法である[1-2]。これまでに数多くの研究がなされており、抽出平衡[3]、抽出速度[4]、さまざまな装置[5-7]の検討もされている。

一方、マイクロリアクターとはマイクロ空間で化学反応を行う装置で、その反応が行われる部分をマイクロチャネルという。マイクロ空間では分子や熱の移動距離が短いため、分子の衝突頻度の増加と速やかな熱の移動が可能であることから、高速混合、高速熱交換、高速拡散、フロー精密制御などができ、その結果、反応の選択性と収率が向上する。現在、マイクロチャネルは医薬品・化粧品連続生産、高温高圧反

応の安全な遂行、不安定物質反応などに利用されており、化学技術・化学産業の発展に期待されている装置である[8]。マイクロリアクターはさまざまな分野で応用されており、均一な滴を作る乳化装置の検討[9]や効率的な酵素反応を行っている[10-13]。我々はマイクロチャネル内で逆ミセル抽出を行うことで、より効率的な装置開発を目指した。単位体積当たりの比表面積が大きく、物質の拡散長が短くなるので、液液抽出にとって非常に有利であり、多くの研究がなされている[14-18]。しかし低界面張力系でタンパク質を抽出の目的物質にしている研究は少ない。

本論文では、マイクロチャネルを用いたタンパク質の逆ミセル抽出を行い、種々の条件での抽出特性、チャネル内滴挙動を調べたので報告する。

2. 実験

2.1 実験装置および方法

Fig. 1 に実験装置を示す。水相は精密ポンプを用い、油相はマイクロフィーダーを用いてそれぞれ流量を調節したのち三方コックに流入させ、もう一方の出口から流出させることでマイクロチャネル内にスラグ流を形成した。チャネルの出口はチャネルの水平高さと差をつけ内圧をかけた。チャネル部分は全管に渡って水平に保った。

マイクロチャネルの材質は、内径 2.0 mm の PTFE チューブ

平成 29 年 11 月 1 日受付 (Received Nov. 1, 2017)

* 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)

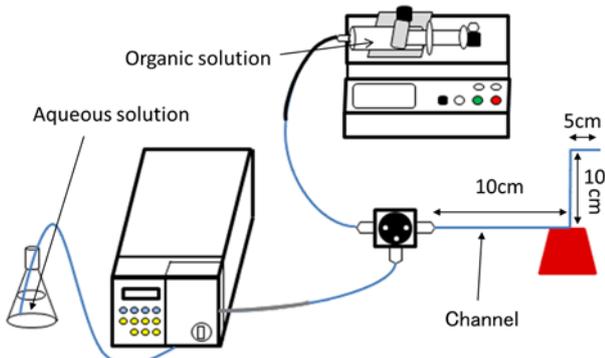


Fig. 1 Illustration of experimental setup

および内径 2.0 mm のガラス管を用いた。なおチャンネル材質比較実験(3.2 節)以外は基本的に PTFE 製チャンネルを用いた。

水相は 0.3 mol/L の KCl 水溶液もしくはそこへリゾチームを 0.5 g/L の濃度で溶解させたものを用いた。油相はエーロゾル OT を 0.05 mol/L になるようにイソオクタン溶液に溶解したものを用いた。

リゾチームの抽出率 E の算出は以下の式(1)により行った。

$$E = \frac{C_o Q_o}{C_{w0} Q_w} \times 100 [\%] \quad (1)$$

ここで C_{w0} 、 C_o はそれぞれ初期水相中および出口の油相中のリゾチーム濃度を、 Q_w 、 Q_o はそれぞれ水相および油相の体積流量を示す。チャンネル出口から水相と油相の混合液を試験管に取り分相後、それぞれの溶液の 280 nm における吸光度を測定しリゾチーム濃度を決定した。

さらにチャンネル内の水相、油相が交互に流れることによって形成されるスラグ形成状態を観察するためにビデオカメラにてチャンネル正面から撮影し、動画を解析した。写真 1 に水相を赤く着色した時のスラグパターンの一例を示す。水相、油相が交互に流れスラグ流が生成していることが分かる。

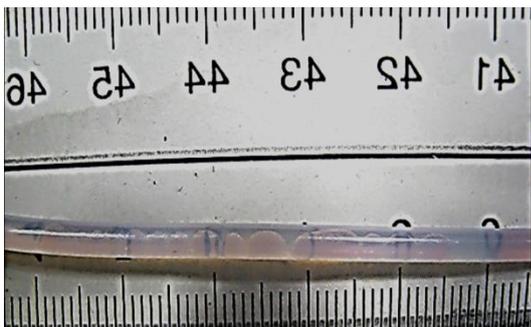


写真 1 チャンネル内スラグパターン
(見やすくするための画像処理済み)

3. 結果と考察

3.1 抽出率に及ぼす水相・油相流量の影響

Fig. 2 にタンパク質の抽出率に及ぼす水相流量 Q_w の影響を示す。油相流量 Q_o は 1.2 ml/min で一定とした。チャンネルは PTFE 製を用いた。 Q_w が小さいときは抽出率は 100% であるが、 Q_w が大きくなるにつれ抽出率は下がった。撮影した

ビデオを解析すると Q_w とともにスラグパターンが変化していた。

Fig. 2 に示すように $Q_w=0.6$ ml/min において非常に低い抽出率となった。この流量条件において水滴径が 1.5 mm ほど小さく分相しにくくなり沈殿も生じやすくなった。それゆえに正確なタンパク質濃度を測定できなかった可能性がある。

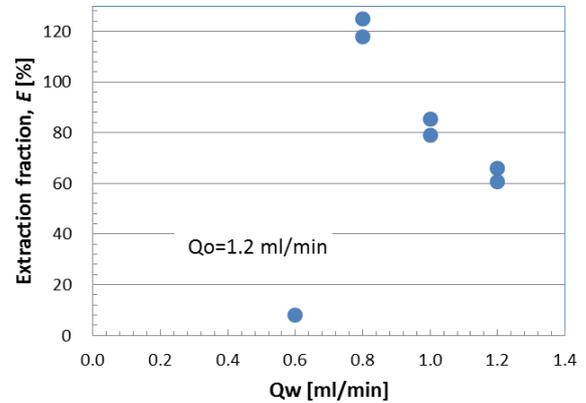
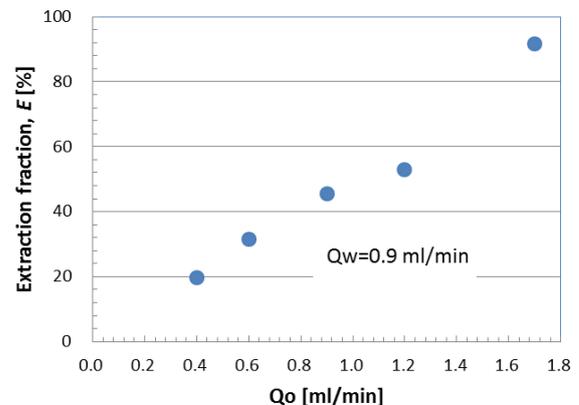
Fig. 2 Effect of flow rate, Q_w on Extraction fraction

Fig. 3 に抽出率に及ぼす油相流量 Q_o の影響を示す。 Q_o の増加とともに抽出率は増加した。この場合も Q_o の増加に伴ってスラグパターンは大きく変化しており、録画したビデオの解析を行い考察を行った。

Fig. 3 Effect of Q_o on Extraction fraction

3.2 スラグ長さに及ぼす水相・油相流量の影響

両相流量の変化に伴い水滴の長さを変化していた。この水滴の長さをスラグ長と定義した。Fig. 4 にスラグ長 L_s に及ぼす Q_w の影響を示す。スラグ長はそれぞれの流動条件におけるビデオ画像を静止した画像からノギスを用いて測定し約 50 点の観測を行い平均値として求めた。水滴は円柱型や球形に変化した。Fig. 4 を見て分かるように Q_w が小さいときは 1.5 mm 付近にありマイクロチャンネルの内径が 2 mm であることを考えると、ほぼ球形になっていると考えられる。 Q_w が大きいと横長の円柱状に変わっていくことが分かった。写真 1 に示したように水滴が油相中に流れるようになるため、水相流量 Q_w が大きいと水相が優先的に入り込み長い水滴になったのではと考えられる。

Fig. 5 にスラグ長 L_s に及ぼす Q_o の影響を示す。 Q_o の増

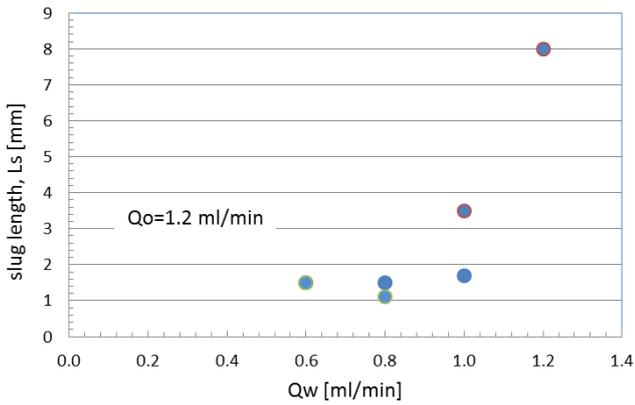


Fig. 4 Effect of Qw on slug length

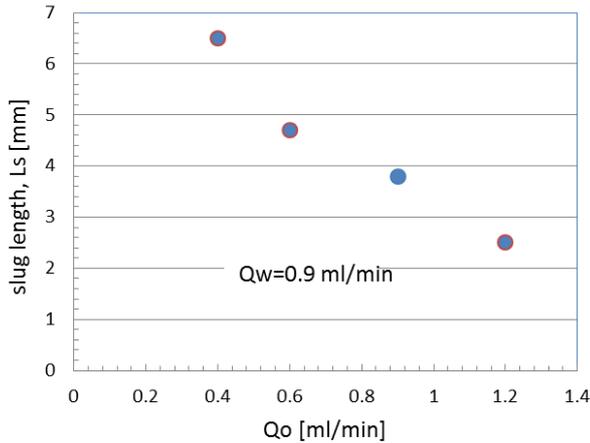


Fig. 5 Effect of Qo on slug length

加と共に L_s は減少した。Fig. 4 の結果とは逆に Q_0 が小さいと円柱状に、大きいと球形に近づいていった。油相流量 Q_0 が大きくなると三方コック部にて油相が水相を切るような作用が起こり球形に近づいたのではと考えられる。

3. 3 比界面積に及ぼす水相、油相流量の影響

比界面積 A_I は以下の式より算出した。

$$n = \frac{L_c}{L_s} \quad (2)$$

$$A_I = \frac{n(2 \times \frac{\pi}{4} d_c^2 + \pi d_c L_s)}{\frac{\pi}{4} d_c^2 L_c} = \frac{2}{L_s} + \frac{4L_s}{d_c} \quad (L_s > d_c) \quad (3)$$

$$A_I = \frac{n' \times \pi L_s^2}{\frac{\pi}{4} d_c^2 L_c} = \frac{4n'}{L_c} \left(\frac{L_s}{d_c}\right)^2 \quad (L_s < d_c) \quad (4)$$

ここで、 L_c 、 L_s はチャンネルおよびスラグ長を示す。 n はチャンネル内に一度に形成される水滴数、 d_c はチャンネル内径である。 n' は目視で確認したスラグ数である。ここで水滴が円筒状の場合 ($L_s > d_c$)、界面積は円筒の表面積として計算できる。また水滴が球状の場合 ($L_s < d_c$) は球の表面積として計算した。Fig. 4 と 5 に示すように水滴が円筒形や球形に変化する。円

筒形になる場合は、ほとんど隙間がなく連続的に形成されたため式(2)にて円筒状水滴の個数を計算し、式(3)に適用した。一方球形になる場合は、球が細かく密集していたため、式(4)にあるように、目視観測した実際的水滴の数を n' として計算した。

Fig. 6 に比界面積 A_I に及ぼす Q_w の影響を示す。 A_I は Q_w の増加とともに減少した。式(3)において $4L_s/d_c$ の項は分子と分母がほぼ同じオーダーになることから $2/L_s$ の項が支配的になる。一方、式(4)では球が密集した状態になり n' が非常に大きな値となった。これらのことにより Q_w の減少とともに A_I は大きくなったと考えられる。

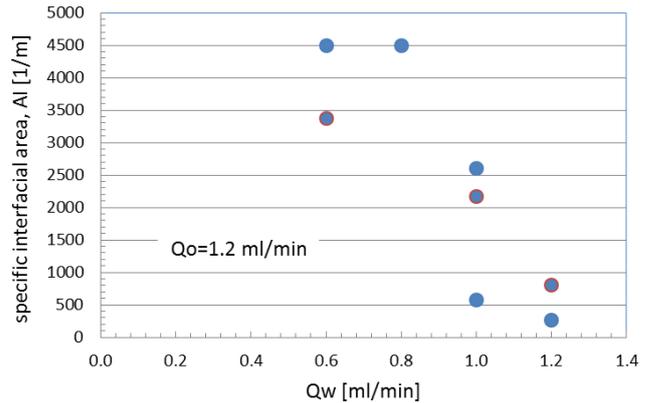


Fig. 6 Effect of Qw on specific interfacial area

Fig. 7 には比界面積 A_I に及ぼす Q_0 の影響を示す。これについても Fig. 5 に示すように Q_0 の増加とともに球形の水滴になり界面積および単位チャンネル長さ当たりの水滴数が増加したことで比界面積が増加したと考えられる。

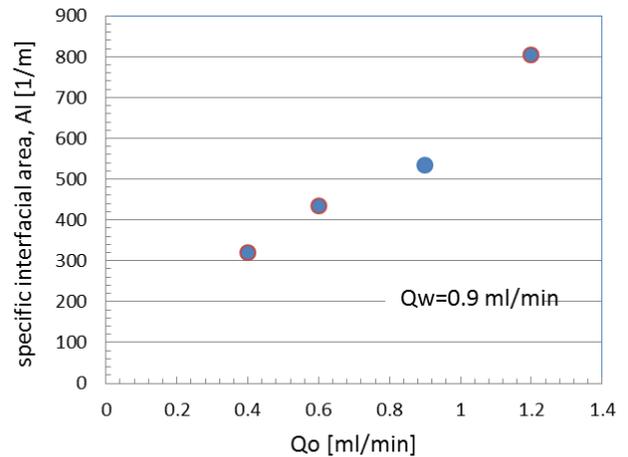


Fig. 7 Effect of Qo on specific interfacial area

以上のスラグ形状変化が比界面積に影響を与えその結果として水相と油相の有効接触面積が増加することで Fig. 2 と 3 に示した抽出率の結果となったと考えられる。

3. 4 スラグ形成に及ぼすチャンネル材質の影響

チャンネル内のスラグパターン挙動にチャンネルの材質が関係しているか調べるために、PTFE 製と比較のためにガラス製のチャンネルを用い同様の実験を行った。

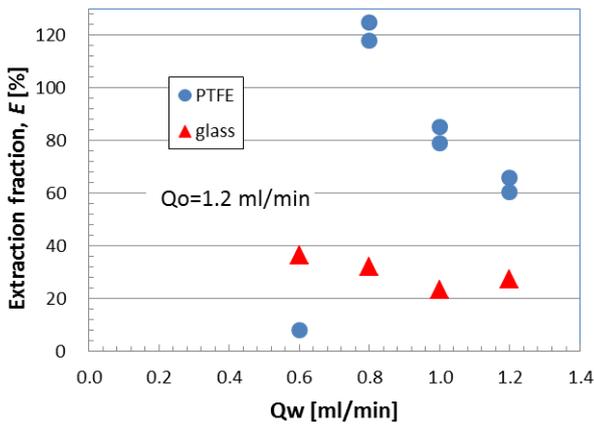


Fig. 8 Effect of channel material on Extraction fraction

Fig. 8 にチャンネル素材の違いによる抽出率の変化を示す。PTFE 製では大きく変化しているのに対してガラス製を用いた場合は実験した流量範囲に渡って値も変化も小さかった。この結果について、スラグ長、比界面積の結果を基に考察していく。

Fig. 9 にスラグ長変化に及ぼすチャンネル素材の違いを示す。ガラス製を用いた場合は、実験した水相流量全体にわたって長い水滴が形成された。また Q_w の増加に従いスラグ長は急激に長くなった。ガラス製の方が PTFE 製より親水的な表面を持つことから、水相の流れに油相が入り込みにくく長い水滴ができたと考えられる。また PTFE 時に比べ水滴同士の合

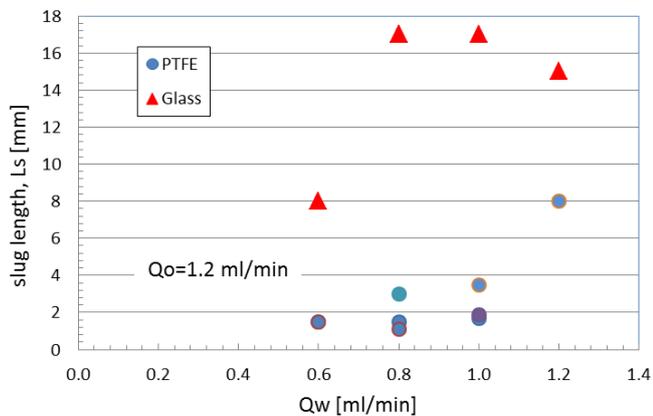


Fig. 9 Effect of channel material on slug length

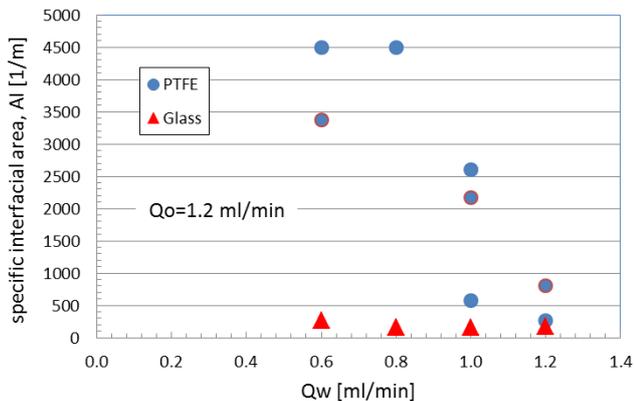


Fig. 10 Effect of channel material on specific interfacial area

一が頻繁に起こっていることも観測された。ガラス表面が親水性ということが影響しているのかもしれない。

Fig. 10 に比界面積変化に及ぼすチャンネル素材の違いを示す。ガラス製を用いた場合の比界面積は PTFE 製の場合と比べて最大 16 倍の差があった。Fig. 9 で示されるようにスラグ長はガラスチャンネル直径 2 mm を上回っておりすべて円筒型の水滴となっていた。つまり比界面積は式(3)にて算出される。チャンネル長さ当たりの水滴個数は PTFE 製の場合に比べ極端に少なく比界面積も小さくなった。このことが大きく抽出率にも影響を与えたと考えられる。

4. 結論

マイクロチャンネル流路を用いてタンパク質の逆ミセル抽出を行う試みを行い以下の知見を得た。マイクロチャンネルを用い低界面張力の逆ミセル系でもスラグを形成することができた。水相流量が変化することで、スラグパターンが変化し、スラグ長及び比界面積に影響を及ぼした。またこれらのことから抽出挙動を説明することができた。チャンネル材質の影響を調べるために PTFE 及びガラス製のチャンネルを用いて実験したところ、ガラス製ではその表面が親水的であるという性質から水滴が合一しやすく極端に比界面積が小さくなり抽出率低下という結果となった。

引用・参考文献

- [1] Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution, Pier Luigi Luisi, *Angewandte Chemie*, Vol. 24, Issue 6,(1985), pp. 439-450
- [2] Protein Extraction Using Reverse Micelles, Kent E. Coklen, T. Alex Hatton, *Biotechnology Progress*, Vol. 1, Issue 1,(1985), pp. 69-74
- [3] Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: distribution equilibrium and extraction rates, Takumi Kinugasa, Shinichiro Tanahashi, Hiroshi Takeuchi, *Industrial and Engineering Chemical Research*, 1991, 30 (11), pp. 2470-2476
- [4] Partitioning behavior and enrichment of proteins with reversed micellar extraction: I. Forward extraction of proteins from aqueous to reversed micellar phase, Tadaaki Nishiki, Ikuto Sato, Takeshi Kataoka, Daisaburo Kato, *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 42, Issue 5(1993), pp. 596-600
- [5] Reverse micellar mass-transfer processes: Spray column extraction of lysozyme, Gary J. Lye, Juan A. Asenjo, D. Leo Pyle, *AIChE Journal*, Vol. 42, Issue 3,(1996), pp. 713-726
- [6] Extraction of Proteins by Reversed Micellar Solution in a Packed Column, Yasuhiro Nishii, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi, Hiroshi Takeuchi, *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, Vol. 32 (1999) No. 2, pp. 211-216
- [7] Reversed Micellar Extraction of Lysozyme in A Sieve-Tray Column, Yasuhiro Nishii, Chiemi Hara, Takumi Kinugasa, *Solvent Extraction Research and Development*, Japan 9, pp.

- 111-119, 2002
- [8] Bioanalysis in microfluidic devices, Julia Khandurina, Andra's Guttman, *Journal of Chromatography A*, Vol. 943, pp. 159-183 (2002)
- [9] Preparation of Monodispersed Solid Lipid Microspheres Using a Microchannel Emulsification Technique, Shinji Sugiura, Mitsutoshi Nakajima, Jihong Tong, Hiroshi Nabetani, and Minoru Seki, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 227, pp. 95-103 (2000)
- [10] Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies, Pawel L. Urban, David M. Goodall, Neil C. Bruce, *Biotechnology advances*, Vol 24, pp. 42-57 (2006)
- [11] Enzyme-Immobilized Microfluidic Process Reactors, Yuya Asanomi, Hiroshi Yamaguchi, Masaya Miyazaki, and Hideaki Maeda, *Molecules*, Vol. 16, pp. 6041-6059 (2011)
- [12] Immobilization of multi-enzyme microreactors inside microfluidic devices, *Sensors actuators B*, Vol. 106, pp. 335-342 (2005)
- [13] Microchannel enzyme reactors and their applications for processing, Masaya Miyazaki and Hideaki Maeda, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 24, No. 10, pp. 463-470 (2006)
- [14] Microfluidic Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction, Pascaline Mary, Vincent Studer, and Patrick Tabeling, *Analytical Chemistry*, Vol. 80, No. 8, pp. 2680-2687 (2008)
- [15] Microfluidic extraction of copper from particle-laden solutions, Craig Priest, Jingfang Zhou, Rossen Sedev, John Ralston, Arata Aota, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori, *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 98, pp. 168-173 (2011)
- [16] Microfluidic Extraction of Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester: Comparison between Slug Flow and Emulsion, Eiji Kamio, Yu Seike, Hidekazu Yoshizawa, Hideto Matsuyama, and Tsutomu Ono, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol. 50, pp. 6915-6924 (2011)
- [17] Microfluidic solvent extraction of rare earth elements from a mixed oxide concentrate leach solution using Cyanex 572, Elisabeth Kolar, Rik P.R. Catthoor, Frederik H. Kriel, Rossen Sedev, Scott Middlemas, Eric Klier, Gareth Hatch, Craig Priest, *Chemical Engineering Science*, Vol. 148, pp. 212-218 (2016)
- [18] Microfluidic supported liquid membrane extraction, Xiaoyan Wang, Chutarat Saridara, Somenath Mitra, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 543, pp. 92-98 (2005)

