

温度上昇が引き起こす AOT および SDEHP 逆ミセル溶液の電気的パーコレーション現象

衣笠 巧* 伊藤美佳* 柚山千世美* 壺内 海* 西井靖博*

Temperature-Induced Electric Percolation Phenomena in AOT and SDEHP Reversed Micellar Solution

Takumi KINUGASA* Mika ITOH* Chiyomi YUYAMA*
Kai TSUBOUCHI* Yasuhiro NISHII*

Electric percolation phenomena in AOT and SDEHP reversed micellar (RM) solution was investigated to improve back-extraction process of protein. In AOT RM solution, the percolation temperature was decreased by increasing the water content and AOT concentration in RM solution. In AOT-SDEHP mixed RM solution, the increase in ratio of SDEHP brought about the reduction of the percolation temperature. It was suggested that the addition of hydrophilic alcohol to AOT RM solution results in enhancement of interaction between RMs and the addition of hydrophobic alcohol results in suppression of the interaction.

1. 緒言

近年のタンパク質医薬品の市場の広がりに伴い、大腸菌などの宿主細胞で発現させた組み換えタンパク質を工業的に分離、濃縮、精製するための効率的な方法の開発が期待されている。従来の液体クロマトグラフィーでは、大容量の試料を分離精製する場合、巨大な分離カラムが必要であり、設備コストが大きな障害となる。また試料をいくつかに分けて操作を繰り返すことも可能だが、操作時間が分割の回数に比例するため多大な処理時間を要することが大きな障害となる。これに対して逆ミセル抽出法は、操作が容易な点や低コストで大量連続処理できるという利点から、新規なタンパク質分離法として注目されている^[1-3]。

逆ミセルとは、無極性溶媒中で界面活性剤分子が親水基を内側に、疎水基を外側に向けて形成する分子集合体である。その中心部は親水性であり、水を可溶化して微小水相を形成する。ここにタンパク質などの親水性化合物を取りこむことで、有機溶媒に親水性の物質を可溶化することができる。逆ミセル抽出法とは、水相中のタンパク質を変性させずに逆ミセル含む有機相中に抽出する分離方法である。

これまでの研究で、タンパク質の逆抽出は正抽出に比べて速度が非常に遅く、その鍵となるのが逆ミセルの界面への衝突・融合過程であることがわかってきた^[4]。逆抽出ではタン

パク質を含んだ逆ミセルが界面と衝突・融合することによって逆ミセル内の微小水相とバルク水相がつながり、タンパク質の放出、いわゆる逆抽出が起こると推測される。逆ミセルは有機相中で激しく合一・分散を繰り返しており、それに伴う逆ミセル間の物質交換はパーコレーションの起こりやすさと関係すると考えられる^[5]。パーコレーションとは、大域的な流通度の転移現象に関する確率論的な問題である。逆ミセル溶液の電導度の場合、溶媒は非電導性であるのに対して微小水相は高濃度電解質溶液であるため、微小水相の体積分率を増加させていくとある臨界点で急激に電導度が増加する。逆ミセル溶液の温度を上昇させることによって、同様の変化が認められる^[6]。この現象が電気的パーコレーションであり、逆ミセルがクラスタを形成することによって生じるとされている。すなわち、逆ミセル同士が相互作用によってクラスタを形成しやすくなって電導の確率が高まり、ある臨界点を超えると電導路ができるために急激に電導度が上昇する。

そこで本研究は、逆ミセル抽出法におけるタンパク質逆抽出のメカニズムに関する知見を得、逆抽出速度を改善する方策を見出すことを目的として、温度上昇による逆ミセル溶液の電気的パーコレーション現象の基礎データを集めた上で、添加物として両親媒性化合物がパーコレーションに与える影響について調べた。

平成 30 年 10 月 1 日受付 (Received October 1, 2018)

* 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)

2. 実験

陰イオン性界面活性剤を含むイソオクタン溶液に微量の水を加えて逆ミセル溶液を調製する。陰イオン性界面活性剤としてはビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム(AOT)とジ(2-エチルヘキシル)リン酸ナトリウム(SDEHP)を用いた。SDEHPは、ジ(2-エチルヘキシル)リン酸を塩酸と蒸留水で洗浄して精製した後、水酸化ナトリウムで中和してナトリウム塩とした。また、添加物として種々のアルコールを加えた。

調製した逆ミセル溶液を試験管に入れ、加熱器(タイテック DTU-1B)で温度を $0.5 \sim 2.0^\circ\text{C}$ ずつ上昇させながら電気伝導率計(東亜電波 CM-40V)で電導度 κ を測定した。電極(東亜電波 CT-54101C)の電導度測定範囲は $5 \times 10^{-6} \sim 1 \text{ S/m}$ である。

逆ミセル溶液中の水分量は、カールフィッシャー式水分自動測定装置(平沼 AQV-7)を使って実験前後に測定した平均値を採用した。有機相中の界面活性剤に対する水のモル比を W_o [-] と定義した。

$$W_o = C_w / C_s \quad (1)$$

ここで C_s [kmol/m^3] は全界面活性剤濃度、 C_w [kmol/m^3] は有機相水分濃度である。AOT と SDEHP との混合系では AOT 濃度 C_{s1} [kmol/m^3] と SDEHP 濃度 C_{s2} [kmol/m^3] の和を C_s とした。この場合の界面活性剤組成 X_s [-] は次式で定義した。

$$X_s = C_{s2} / C_s \quad (2)$$

3. 結果と考察

3-1 AOT 逆ミセルのパーコレーション

Fig.1 (a) に、 W_o 値の異なる AOT 逆ミセル溶液の温度 T [K] と電導度 κ [S/m] の関係を示す。電導度は始め少しずつ増加していき、ある温度で急激に 4 オーダーほど増加した。この現象を逆ミセルのパーコレーションという。パーコレーションが起こる温度をパーコレーション温度と呼び、定量的な検討を行うためにはその値を求める必要があるが、電導度の増加は広い温度範囲で生じるためパーコレーション温度の定義は様々である。本研究では、電導度の変化率の最も大きい点をパーコレーション温度とした。すなわち、Fig.1 (a) の 2 点間の傾き $\Delta(\log \kappa) / \Delta T$ [1/K] を平均温度 T_{av} [K] に対してプロットした結果が Fig.1 (b) であり、最も傾きの大きいピーク値の温度をパーコレーション温度 T_P [K] とした。Fig.2 (a) は、 W_o 値に対するパーコレーション温度 T_P の変化である。 W_o 値が大きくなるほど T_P 値が低下し、パーコレーションが起こりやすくなることがわかる。 W_o 値は逆ミセル径と比例関係にあることから^[7]、逆ミセル径が大きいほどパーコレーションが起こりやすいと推測される。

Fig.1 (a) において、パーコレーションが始まるより低い温度の電導度を比較すると、 W_o 値が大きいほど電導度は低いことがわかる。そこで Fig.3 に 300 K における逆ミセル溶液の電導度を W_o 値に対してプロットしたところ、電導度は W_o 値の

-1.8 乗に比例することがわかった。これは電荷のキャリアである逆ミセルの大きさの変化が影響したためと思われる。溶媒 B 中の溶質 A の拡散係数 D_{AB} [m^2/s] は次の Wilke-Chang の式^[8]で与えられる。

$$D_{AB} = 1.17 \times 10^{-16} \frac{(\xi M_B)^{1/2} T}{\mu_B v_{mA}^{0.6}} \quad (3)$$

ここで ξ [-]、 M_B [-]、 μ_B [$\text{Pa}\cdot\text{s}$] はそれぞれ溶媒 B の会合定数、分子量、粘度、 v_{mA} [m^3/kmol] は溶質 A のモル体積である。したがって、同一溶媒であれば拡散係数 D_{AB} は溶質のモル体積 v_{mA} の 0.6 乗に反比例する。逆ミセルのモル体積はその直径の 3 乗に比例すると考えられ、 W_o 値が逆ミセル径と比例することを踏まえると、拡散係数は W_o 値の 1.8 乗に反比例することになる。これは Fig.3 に示す実験結果とよく一致する。したがって、パーコレーション温度以下の逆ミセル溶液では、逆ミセル径が電導度に大きく影響することが確かめられた。

Fig.2 (b) は W_o 値を一定として、種々の AOT 濃度 C_{s1} でパーコレーション温度 T_P を求めた結果を示す。AOT 濃度が高いほど T_P 値は小さくなった。AOT 濃度が高くなるほど逆ミセル濃度が増加するため、この結果から逆ミセル濃度の増加によってパーコレーションが起こりやすくなることが示唆され

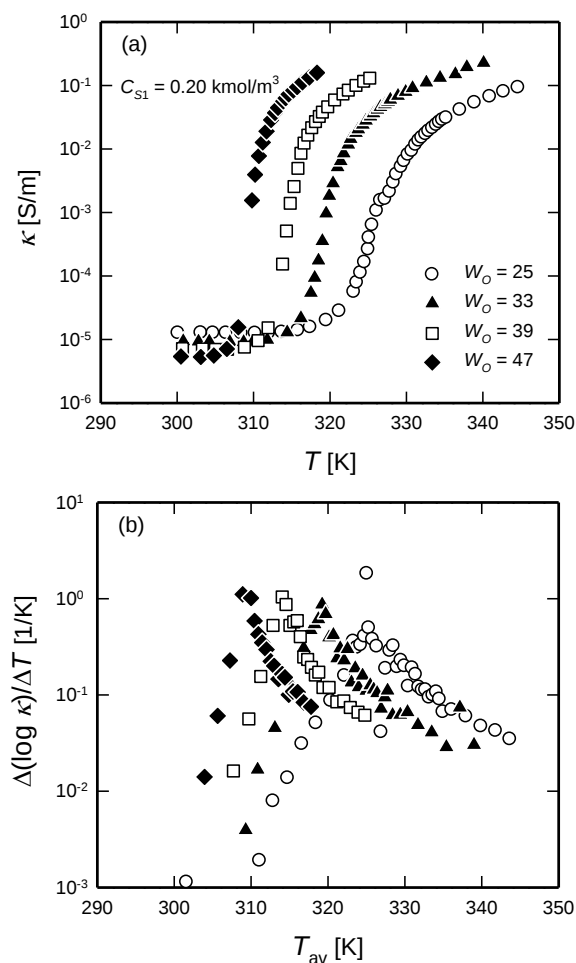


Fig.1 (a) Electric conductivity, κ , and (b) differential electric conductivity, $\Delta(\log \kappa) / \Delta T$, of AOT reversed micellar solution in various W_o values.

る。また、このときの 300 K における電導度は AOT 濃度によらずに一定であった。AOT 濃度が変わっても逆ミセル径は変化せず、拡散には影響しなかったと考えられる。

パーコレーションは、逆ミセル溶液に微量の水を徐々に添加して逆ミセル滴の体積分率 ϕ_{RM} [-] を増加させることによって起きる^[5]。 W_o 値や AOT 濃度の増加は逆ミセルの体積分率の増加をもたらすので、次式によって ϕ_{RM} 値を求め、 T_P 値との関係を Fig.4 に示した。

$$\phi_{RM} = v_{m,S1}C_{S1} + v_{m,S2}C_{S2} + v_{m,W}C_W \quad (4)$$

ここで $v_{m,S1}$ ($= 0.390 \text{ m}^3/\text{kmol}$)、 $v_{m,S2}$ ($= 0.310 \text{ m}^3/\text{kmol}$)、 $v_{m,W}$ ($= 0.018 \text{ m}^3/\text{kmol}$) はそれぞれ AOT、SDEHP、水のモル体積である^[7]。パーコレーション温度 T_P は、 W_o 値を変化させたときの方が AOT 濃度を変化させたときよりも、逆ミセルの体積分率 ϕ_{RM} の影響を強く受けることがわかった。このことから、逆ミセル濃度よりも逆ミセル径の方がパーコレーションに強い影響を持ち、逆ミセル間相互作用を大きく変化させることが示唆される。ただし、定量的な評価のためには、さらなる実験データの取得と検討が必要となる。

3-2 AOT-SDEHP 混合逆ミセルのパーコレーション

Fig.5 に、AOT-SDEHP 混合逆ミセルのパーコレーション温度 T_P を、界面活性剤組成 X_S に対してプロットした。 X_S が大きくなり、SDEHP の割合が増えるにつれてパーコレーションが起りやすくなり、ついには室温でも起こるほどであった。AOT-SDEHP 混合逆ミセルは、 X_S が大きくなると球形

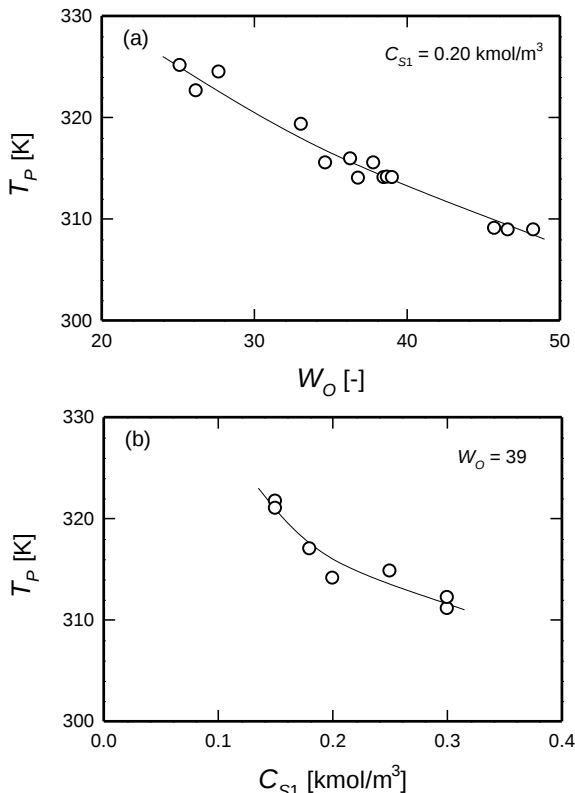


Fig.2 Percolation temperature, T_P , of AOT reversed micellar solution in (a) various W_o values and (b) various AOT concentrations.

から楕円体形に変形し、その長軸と短軸の比は $X_S = 0.2$ で 2.4 に達することが報告されている^[7]。このことから X_S の増加によるパーコレーション温度 T_P の低下は、楕円体形になることで電導路が生じやすくなったためと考えられる。

また、 X_S が高いほどパーコレーション前の電導度は低かった。AOT-SDEHP 混合逆ミセルは、 X_S が大きくなり、球形から楕円体形に変形すると、溶液粘度が高くなる。粘性の増大は逆ミセルの拡散速度の低下につながり、その結果、電導度が低くなったと考えられる。

3-3 アルコール添加の影響

逆ミセル溶液にアルコールを添加することで逆抽出が促進されることが報告されている^[9]。そこで、アルコール添加とパーコレーション現象の関係を調べるために、AOT 逆ミセル溶液に、添加物としてメタノールから 1-オクタノールまでの直鎖アルコールを加えてパーコレーション温度 T_P を測定した。その結果を Fig.6 に示す。アルコール濃度 C_A が高くなると直線的に T_P 値は変化した。

メタノールから 1-プロパノールまでは C_A の増加に伴って T_P 値は低下した。これらは水と任意に混合する親水性の高いアルコールであり、逆ミセルの微小水相により分配しやすい

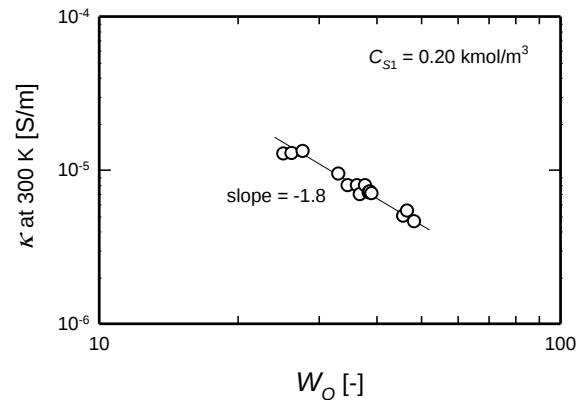


Fig.3 Electric conductivity, κ , below percolation temperature of AOT reversed micellar solution (at 300 K) in various W_o values.

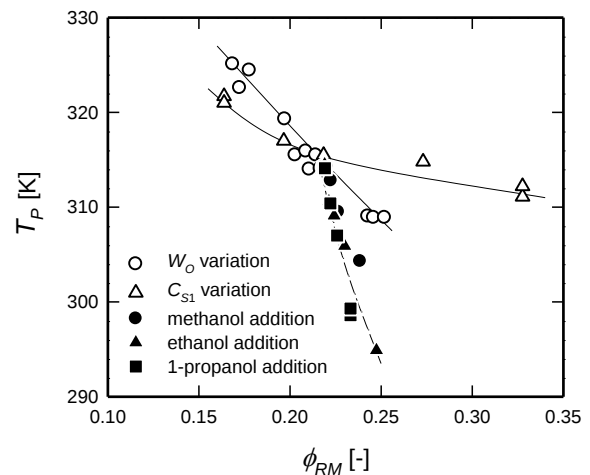


Fig.4 Effect of volume ratio of reversed micelles, ϕ_{RM} , on percolation temperature, T_P , in various conditions.

と考えられる。そこで添加したアルコールがすべて微小水相に分配したと仮定して逆ミセルの体積分率 ϕ_{RM} を求めて Fig.4 にプロットした。親水性アルコールの添加による T_P 値の低下は、体積分率の増加から予測されるよりも大きかった。したがって、親水性アルコールは微小水相の体積分率を増加させるだけでなく、逆ミセルを形成する AOT 層にも入り込んで、逆ミセル間相互作用を強くする効果をもつと推測される。

一方、1-ブタノールから 1-オクタノールまでは水への溶解度が小さく、微小水相にはほとんど分配しないと考えられる。1-ブタノールの添加はわずかに T_P 値を低下させたが、1-ヘキサノールと 1-オクタノールは C_A の増加に伴って T_P 値は上昇した。これより、疎水性アルコールは逆ミセル間相互作用を弱くするはたらきをもつことがわかった。以上より、添加するアルコールの鎖長を変えることで逆ミセル間相互作用を制御できることが示唆される。

4. 結論

逆ミセル溶液の電気的パーコレーション現象を種々の条件で検討し、以下の結論を得た。

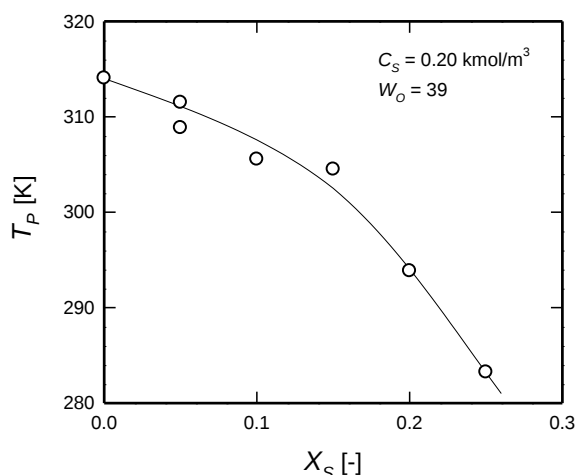


Fig.5 Percolation temperature, T_P , of AOT-SDEHP mixed reversed micellar solution.

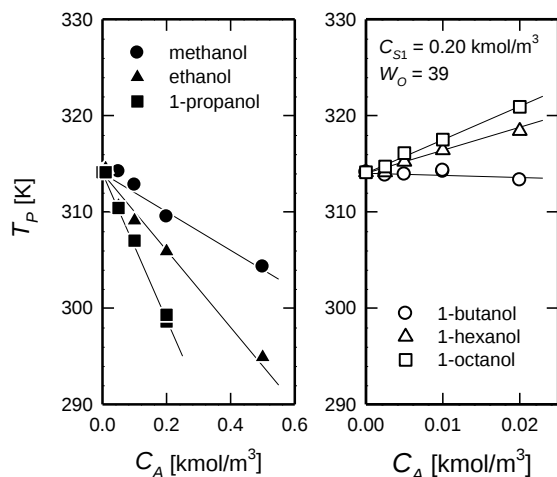


Fig.6 Effect of alcohol addition on percolation temperature, T_P , of AOT reversed micellar solution.

(1) AOT 逆ミセルは W_O 値や AOT 濃度の増加によってパーコレーションが起こりやすくなり、特に逆ミセル径の増加の効果が大きいことが示唆された。

(2) AOT-SDEHP 混合逆ミセルは、SDEHP の割合が高くなるほど T_P 値が低下した。その原因は、逆ミセルの形状の変化によって説明された。

(3) AOT 逆ミセルへの親水性アルコールの添加は逆ミセル間相互作用を強め、疎水性アルコールの添加は逆ミセル間相互作用を弱める効果があることが示唆された。

以上、逆ミセルからのタンパク質の逆抽出現象を分析し、逆抽出の効率や速度を改善する方策を検討するための知見が得られた。

参考文献

- [1] 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)
- [2] 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)
- [3] L. Chen, J. Dong, X. Guo: "Extraction of bovine serum albumin with reverse micelles from glucosylammonium and lactosylammonium surfactants", Process Biochem., Vol.61, pp.108-114 (2017)
- [4] T. Kinugasa, K. Sanagi, K. Watanabe, H. Takeuchi: "Effect of interaction between protein and surfactant in aqueous phase on extraction rate of protein into reversed micellar solution", Society of Chemical Industry, "Solvent Extraction for the 21st Century", Vol.1, pp.656-661 (2001)
- [5] S. Lee, K. Hwang, B. Lee, D. Hong, R. Kuboi: "Interaction between reverse micelles as a key factor governing back-extraction of proteins and its control systems", Korean J. Chem. Eng., Vol.22, pp.611-616 (2005)
- [6] M. Guettari, A. E. L. Afeni, T. Tajouri: "Effect of micellar collisions and polyvinylpyrrolidone confinement on the electrical conductivity percolation parameters of water/AOT/isooctane reverse micelles", J. Mol. Struct., Vol.1149, pp.712-719 (2017)
- [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] C. R. Wilke, P. Chang: "Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions", AIChE J., Vol.1, pp.264-270 (1955)
- [9] A. Carlson, R. Nagarajan: "Release and recovery of porcine and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition", Biotechnol. Prog., Vol.8, pp.85-90 (1992)