

ジ(2-エチルヘキシル)リン酸を用いたリゾチームの沈殿分離回収

衣笠 巧* 真鍋梨那* 西井靖博*

Surfactant Precipitation and Recovery of Lysozyme by using Di(2-ethylhexyl) Phosphoric Acid

Takumi KINUGASA* Rina MANABE* Yasuhiro NISHII*

The surfactant precipitation and recovery method using di(2-ethylhexyl) phosphoric acid (DEHPA) was studied as an more efficient and lower-cost technique for protein separation. The protein-surfactant complex precipitated when DEHPA dissolved in aqueous NaOH solution was added to the aqueous lysozyme solution. The precipitate was dissolved in acetone, and lysozyme was reprecipitated when a small amount of aqueous NaCl solution was added. Protein recovery was improved by the addition of aqueous HCl to dissolve the reprecipitate. At this time, the addition of the NaCl solution to acetone could be omitted. The higher the DEHPA concentration, the higher the precipitation ratio and the recovery ratio of lysozyme. Under the optimum conditions of DEHPA concentration 0.010 kmol/m^3 , NaOH concentration 0.015 kmol/m^3 , HCl concentration 0.050 kmol/m^3 , the precipitation ratio reached 99 % or more, and the recovery ratio reached about 90 %.

1. 緒言

今日、酵素を含むタンパク質は医薬、栄養、化粧品、洗剤などの幅広い分野で重要な役割を果たしており、細胞培養や微生物発酵で得られた混合物から目的タンパク質を分離精製する技術の発展はますます重要になっている。液体クロマトグラフィや電気泳動などの従来のタンパク質分離技術は、精製度が高く、高品質の製品を得ることができるが、コストが高い、操作が煩雑である、スケールアップが難しいなどの課題がある^[1,2]。そのため、タンパク質の世界的な市場需要が伸びている現在、高品質を保ちながら、より効率的かつ低コストの分離技術の開発が強く求められている。

従来法に代わるタンパク質分離技術として、最近、リガンドとして界面活性剤を用いたタンパク質の沈殿分離回収法が提案された^[3,4]。これは、逆ミセル抽出法を発展させた方法である。逆ミセル抽出法では、有機相に抽出されたタンパク質の回収が難しく、実用化のネックとなっていた。そこで有機溶媒を用いず、水溶液中でのタンパク質と界面活性剤の結合を利用することで、その問題点を解決し、結果的に界面活性剤の使用量を節約できるなどのメリットが生まれた。沈殿分離回収法は、タンパク質-界面活性剤複合体の沈殿ステップと、極性有機溶媒を用いた沈殿からのタンパク質回収ステップからなる。タンパク質水溶液に界面活性剤水溶液を加え

ると、不溶性のタンパク質-界面活性剤複合体が生成し、水溶液中で沈殿する。この沈殿物はアセトンのような極性有機溶媒に溶解する。これに電解質水溶液を添加すると、タンパク質から界面活性剤が遊離し、タンパク質が再沈殿物としてアセトンから回収される。

これまでに、沈殿分離回収法によってタンパク質混合物の相互分離が可能であること^[5,6]や沈殿からのタンパク質回収のために対イオン界面活性剤を用いる方法^[7]などが報告されている。逆ミセル抽出法では、逆ミセルを形成する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)を用いることが多かったため、沈殿分離回収法でもリガンドとして主にAOTが用いられてきた。一方、ドデシル硫酸ナトリウムなどのイオン性界面活性剤はタンパク質の変性剤としてはたらくことが知られている。したがって、沈殿分離回収法に適用できる界面活性剤には制約がある可能性が高いが、AOT以外の界面活性剤を適用した研究例は少ない。ジ(n-オクチル)リン酸ナトリウムとジ(n-ドデシル)リン酸ナトリウムでは沈殿が生成しなかったが、塩化ジオクチルジメチルアンモニウムを用いるとキシラナーゼが約62%回収されたことが報告されている^[8]。また、環境調和型のバイオサーファクタントとしてラムノリピッドやサポニンを用いるとAOTと同等以上のセルラーゼ回収率を達成できたことも報告されている^[9]。

令和2年12月23日受付 (Received Dec. 23, 2020)

* 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 (KOSEN), Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan)

我々は、アニオン性界面活性剤としてジ(2-エチルヘキシル)リン酸 (DEHPA) を用いたリゾチームの沈殿回収挙動を検討した。DEHPA はレアアースなどの重金属イオンのための最もよく使われる酸性抽出剤のひとつであり^[10,11]、AOT と同様にタンパク質の逆ミセル抽出にも利用されている^[12,13]。また、DEHPA はこれまでに用いられた界面活性剤と異なり、pH によって解離・非解離を制御できることから、タンパク質の沈殿分離回収法の新展開が見込まれる。すなわち、等電点以下で正の電荷をもったタンパク質に対して、解離して負の電荷をもった DEHPA は静電的相互作用により結合するが、非解離の DEHPA は結合しないと考えられるため、沈殿生成の程度を変化させられることが期待できる。そこで、本稿では DEHPA を用いたリゾチームの沈殿分離回収の実験結果について報告する。

2. 実験

タンパク質として、ニワトリ卵白リゾチーム(分子量 14,300、等電点 11) が用いられた。界面活性剤として、大八化学社製のジ(2-エチルヘキシル)リン酸 (DEHPA) が、6 kmol/m³塩酸と蒸留水で3回交互に洗浄して使用された。他の化合物はすべて試薬級であった。

界面活性剤を用いた沈殿分離回収法は次の手順で行われた。DEHPA 水溶液 0.5 cm³を 0.5 kg/m³リゾチーム水溶液 5.0 cm³の入った試験管に加え、5 秒間振り混ぜた。しばらく静置するとタンパク質-界面活性剤複合体の沈殿物が得られた。4,000 rpm で10分間遠心分離して沈殿物と上澄み液に分離し、沈殿物を蒸留水で洗浄した。沈殿物にアセトン 5.0 cm³を加えて溶解させた。溶解しないままの沈殿物は試験管中に残した。アセトンに電解質水溶液 0.01 cm³を加えると、タンパク質の再沈殿物が得られた。4,000 rpm で10分間遠心分離して再沈殿物を分離し、アセトンで2回洗浄した。室温でアセトンを風乾させて完全に除去した後、回収水溶液 5.0 cm³を加えて溶解し、回収タンパク質水溶液を得た。

各水溶液のタンパク質濃度 C_P は紫外分光光度計 (島津 UV-1600) で測定された。沈殿生成率 P 、タンパク質回収率 R はそれぞれ次式で定義した。

$$P = 1 - \frac{C_{P,sup} V_{sup}}{C_{P,ini} V_{ini}} \quad (1)$$

$$R = \frac{C_{P,rec} V_{rec}}{C_{P,ini} V_{ini}} \quad (2)$$

ただし、 V は溶液の体積、添字 ini は原料タンパク質水溶液、 sup は沈殿生成後の上澄み液、 rec は再沈殿物を溶解した回収水溶液を示す。

3. 結果と考察

3-1 沈殿生成率

DEHPA は水への溶解度が低いため、NaOH 水溶液を溶媒として用いた。予備実験より、0.010 kmol/m³ DEHPA 水溶液を

調製するためには、NaOH 濃度を 0.015 kmol/m³以上にする必要があることがわかった。そこで、0.015~0.10 kmol/m³の NaOH 水溶液を DEHPA の溶媒として、リゾチームの沈殿分離回収をおこなった。DEHPA 濃度 0.010 kmol/m³の場合、タンパク質-界面活性剤複合体の沈殿は NaOH 濃度 0.015 kmol/m³のときのみ生成した。このとき、DEHPA 水溶液をリゾチーム水溶液に加えた混合液の pH は 10.8 であった。リゾチームの等電点は 11 であり、DEHPA の pK_a は 5.7 である。NaOH 濃度が 0.015 kmol/m³を超えて pH 11 以上になると、リゾチームの表面電荷は負に傾き、負の電荷をもつ DEHPA の結合が起こらなくなったためと考えられる。AOT を用いた逆ミセル抽出においても、pH 11 付近からリゾチームの抽出率が低下し、リゾチームの正味の電荷が負に転じたためであると報告されている^[14]。一方、NaOH 濃度 0.015 kmol/m³では pH 10.8 であり、等電点に非常に近い。そのため、等電点沈殿が起こった可能性もある。そこで、DEHPA を含まない 0.015~0.10 kmol/m³の NaOH 水溶液をリゾチーム水溶液に添加したところ、pH 10.3~11.6 の範囲で沈殿は生成しなかった。これより、等電点沈殿ではなく、DEHPA との結合による沈殿生成であることが明らかになった。

Table 1 に示すように、0.015 kmol/m³ NaOH 水溶液を用いたときの沈殿生成率は 85.1 % であった。沈殿生成率は比較的高い値を得られたが、沈殿生成時に上澄み液の白濁が観察されることがあった。また、アセトンに添加する電解質水溶液として 0.20 kmol/m³の NaCl 水溶液、回収水溶液として水を用いた場合、タンパク質回収率は 49.6 % であった。再沈殿を溶解させる時に回収リゾチームが完全には回収水溶液に溶解しないことが多く、これがタンパク質回収率が低かった原因と考えられた。

遠心分離は沈殿物および再沈殿物を分離回収するために行っているが、温度調節機能のない遠心分離機を用いた場合、水溶液の温度上昇が観測された。沈殿生成後の水溶液の温度を変化させると、DEHPA 濃度 0.010 kmol/m³のときは 25°C 以上、0.005 kmol/m³のときは 35°C 以上で上澄み液の白濁が観察された。温度上昇により白濁する理由は定かではないが、今後は白濁を避けるために高速冷却遠心機 (久保田、7780II) を用いて、4°C に設定して実験した。その結果は Table 1 に示す通り、上澄み液は白濁しなくなり、DEHPA 濃度 0.010 kmol/m³のときの沈殿生成率は 99.3 %、DEHPA 濃度 0.005 kmol/m³のときは 99.4 % にまで向上した。ただし、タンパク質回収率はかえって若干低下した。

Table 1 Effect of temperature control at centrifugation on the precipitation ratio and recovery ratio of lysozyme.

C_{DEHPA} [kmol/m ³]	0.010	0.010	0.005
temp. control	not available	available	available
P [-]	0.851	0.993	0.994
R [-]	0.496	0.379	0.403

Table 2 Effect of electrolyte solution and recovery solution on the precipitation ratio and recovery ratio of lysozyme.

electrolyte solution (0.20 kmol/m ³)	NaCl	NaCl	NaCl	HCl	HCl	water	water
recovery solution (0.20 kmol/m ³)	NaCl	HCl	water	HCl	water	HCl	water
<i>P</i> [-]	0.993	0.990	0.995	0.995	0.988	0.994	0.993
<i>R</i> [-]	0.379	0.510	0.136	0.686	0.523	0.720	0.146

3-2 タンパク質回収率

再沈殿したタンパク質が回収水溶液に溶解しにくいのは、DEHPA がリゾチームから完全に脱離していないことが原因である可能性が高い。DEHPA の脱離は、アセトンに電解質水溶液を添加することで、リゾチームと DEHPA の静電的引力を静電遮蔽効果により弱めることによってなされる。界面活性剤として AOT を用いた沈殿分離回収法では、電解質水溶液として 0.20 kmol/m³ の NaCl 水溶液により十分タンパク質の回収が可能であることが報告されている^[4]。しかし、DEHPA の場合にはこの条件が適当でなかったと推測される。そこで、DEHPA の脱離を促進するために 0.20 kmol/m³ HCl 水溶液の添加を試みた。また、同様の目的で回収水溶液に 0.20 kmol/m³ HCl 水溶液を用いる実験も行った。DEHPA 濃度 0.010 kmol/m³ の場合の結果を Table 2 に示す。

沈殿生成率はいずれの場合も 99 % 程度の高い値を得た。タンパク質回収率が最も高かったのは、電解質水溶液として水、回収水溶液として HCl 水溶液を用いたときの 72.0 % であった。電解質水溶液と回収水溶液のいずれにも HCl を含まない場合、タンパク質回収率は 40 % に満たなかった。同じ電解質水溶液のときは、回収水溶液として HCl 水溶液を用いた方がタンパク質回収率は高くなった。電解質水溶液または回収水溶液に HCl を含むことで酸性条件になって DEHPA が非解離状態になり、リゾチームとの静電的相互作用がなくなるために、DEHPA の脱離が促進されたと考えられる。以上の結果から、電解質水溶液の添加は必ずしも必要ではなく、回収水溶液として HCl 水溶液を用いることでリゾチームの回収率を改善できることがわかった。

回収水溶液として HCl の適用が有効であることがわかったので、その最適濃度を検討した。その結果を Fig.1 に示す。HCl 濃度 0.010 kmol/m³ 以下では回収水溶液に再沈殿物が一部溶解しなかった。HCl 濃度が高いときにタンパク質回収率が低くなった原因は不明だが、高濃度の酸はタンパク質変性の恐れがあるので、あまり好ましくない。以上の結果より、回収水溶液の HCl 最適濃度は 0.050 kmol/m³ であり、そのときのタンパク質回収率は 87.5 % であった。

3-3 DEHPA 濃度の影響

DEHPA 濃度が沈殿生成率とタンパク質回収率に及ぼす影響を調べた結果を Fig.2 に示す。沈殿生成率もタンパク質回収率も DEHPA 濃度が高くなるにつれて増加した。界面活性剤として AOT を用いた場合も同様に AOT 濃度が増加すると沈殿生成率とタンパク質回収率が高くなったが、AOT 濃度 0.005 kmol/m³ でいずれもほぼ 100 % を達成した。DEHPA は

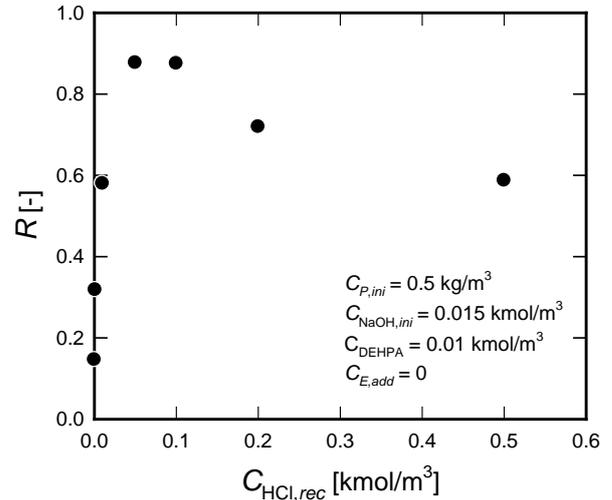


Fig.1 Effect of HCl concentration in recovery solution on the precipitation ratio of lysozyme.

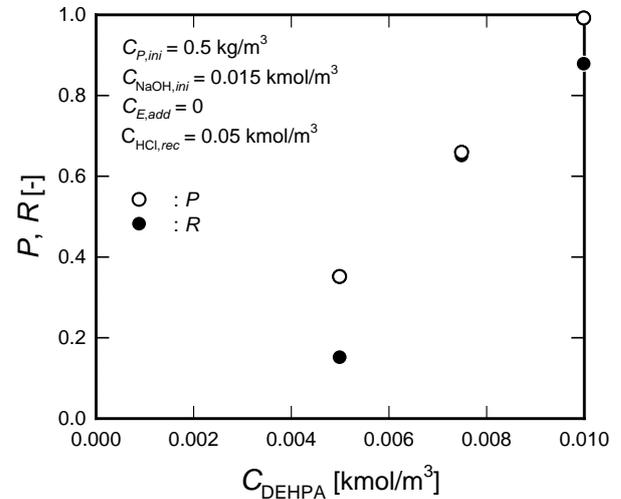


Fig.2 Effect of DEHPA concentration on precipitation ratio and recovery ratio of lysozyme.

100 % の沈殿生成率とタンパク質回収率を得るために AOT の 2 倍程度の濃度が必要であることがわかった。AOT で沈殿生成率 100 % を達成したのは中性条件であるが、DEHPA は塩基性条件で沈殿生成を行っている。リゾチームの表面電荷は、pH が高くなると負に傾くため、DEHPA の結合が起りにくくなり、より多くの DEHPA を必要とするためではないかと考えられる。

4. 結論

DEHPA を用いたリゾチームの沈殿分離回収法について検討し、以下の結論を得た。

- (1) DEHPA は 0.015 kmol/m^3 以上の NaOH 水溶液に溶解し、NaOH 濃度 0.015 kmol/m^3 のときリゾチーム沈殿のリガンドとしてはたつき、沈殿生成とタンパク質回収を実現できた。
- (2) リゾチーム-DEHPA 複合体の凝集物は温度が高いと水溶液中で白濁するため、低温に保つ必要があることがわかった。
- (3) 回収水溶液として HCl 水溶液を用いることで、アセトンへ添加する電解質水溶液がなくても、高いタンパク質回収率を達成できることがわかった。回収水溶液の HCl 濃度は 0.050 kmol/m^3 が最適であった。
- (4) DEHPA 濃度が高くなるほど沈殿生成率もタンパク質回収率も増加した。ただし、AOT に比べると DEHPA は 2 倍程度の濃度が必要であった。

以上により、DEHPA 濃度 0.010 kmol/m^3 、NaOH 濃度 0.015 kmol/m^3 、HCl 濃度 0.050 kmol/m^3 の最適条件で、99%以上の沈殿生成率と約 90%のタンパク質回収率を達成できた。これは pH による DEHPA の解離・非解離を利用して、DEHPA の水への溶解やリゾチームからの DEHPA の脱離を制御できた結果であり、当初の目的を果たすことができた。ただし、AOT に比べて、条件設定がシビアであり、必要な界面活性剤濃度も高いなどの課題があることがわかった。

引用文献

- [1] J. C. Janson: "Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications, third ed.", John Wiley & Sons, New Jersey (2011)
- [2] P. Booner: "Protein purification, second ed.", CRC Press, Boca Raton (2018)
- [3] Y. O. Shin, M. E. Weber, J. H. Vera: "Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate", *Biotechnol. Prog.*, Vol.19, pp.928-935 (2003)
- [4] T. Kinugasa, K. Okabe, K. Jinno, K. Uchida, Y. Nishii: "Improvement of lysozyme recovery method from precipitate of protein-anionic surfactant complexes", *Sep. Sci. Technol.*, Vol.52, pp.2918-2925 (2017)
- [5] Y. O. Shin, E. Rodil, J. H. Vera: "Surfactant precipitation and polar solvent recovery of α -chymotrypsin and ribonuclease-A", *Biochem. Eng. J.*, Vol.17, pp.91-97 (2004)
- [6] Y. O. Shin, E. Rodil, J. H. Vera: "Precipitation and recovery of cytochrome c and hemoglobin using AOT and acetone", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.86, pp.698-705 (2004)
- [7] S. I. Cheng, D. C. Stuckey: "Protein separation mechanism in surfactant precipitation system", *Sep. Sci. Technol.*, Vol.51, pp.181-191 (2016)
- [8] X. Z. Yuan, X. Peng, H. J. Huang, H. Wang, Y. J. Ma, S. Bao, H. Liu, L. J. Leng, K. L. Cui, G. M. Zeng: "Precipitation and recovery of cellulase using biosurfactant", *Sep. Sci. Technol.*, Vol.49, pp.2249-2254 (2014)
- [9] Y. O. Shin, D. Wahnon, M. E. Weber, J. H. Vera: "Selective precipitation and recovery of xylanase using surfactant and organic solvent", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.86, pp.698-705 (2004)
- [10] T. Sato: "Liquid-liquid extraction of rare-earth elements from aqueous acid solutions by acid organophosphorus compounds", *Hydrometallurgy*, Vol.22, pp.121-140 (1989)
- [11] R. D. Abreu, C. A. Morais: "Study on separation of heavy rare earth elements by solvent extraction with organophosphorus acids and amine reagents", *Minerals Eng.*, Vol.61, pp.82-87 (2014)
- [12] Z. Hu, E. Gulari: "Protein extraction using the sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) reverse micellar solution", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.50, pp.203-206 (1996)
- [13] K. Shiomori, K. Ejima, S. Kiyoyama, T. Sana: "Formation and extraction ability of reverse micelle by intermolecular interaction between di(2-ethylhexyl) phosphoric acid and ethanolamines", *Proc. Int. Solvent Extr. Conf.* 2014, P7.10 (2014)
- [14] 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)