ミキサーセトラー塔を用いたリゾチームの逆ミセル抽出

西井靖博* 高橋浩二郎* 村上和哉* 衣笠 巧*

Reversed Micellar Extraction of Lysozyme in a Mixer-Settler Column

Yasuhiro NISHII* Koujiro TAKAHASHI* Kazuya MURAKAMI* Takumi KINUGASA*

Application of mixer-settler column to reversed micellar extraction of lysozyme was conducted. Extraction fraction was increased with decreasing of continuous phase velocity and with increasing of dispersed phase velocity and agitation speed. Overall mass transfer capacity coefficient based on continuous phase increased with both dispersed phase velocity and agitation speed, while unchanged with continuous phase velocity. Those results cause the larger residence time of continuous phase, the increase of specific interfacial area by increasing dispersed drops and the production of smaller drops with agitation. Under low and middle agitation condition, the structure of lysozyme in both extract and raffinate did not change. Denaturation of lysozyme in the column did not happen over all range of agitation speed. As increasing agitation speed, the average droplet diameter became small and the breakage of dispersed drops was observed. Specific interfacial area was increased with increasing of dispersed phase velocity and agitation speed. Overall mass transfer coefficient based on continuous phase remained constant in all conditions. This result indicates that the interfacial area is dominant for extraction performance in reversed micellar extraction system.

1. はじめに

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ものとなっている。さらに は化成品製造への利用など化学工業にも使われ、工業的に も利用されている。例として本研究で扱っているリゾチー ムは抗炎症作用や抗菌作用があり、風邪薬や目薬、食品の 日持向上剤として利用されている。

このようにタンパク質は幅広く利用されているがタンパ ク質は高価なものであり、そのコストが問題となってい る。タンパク質が高価である原因の一つとしてタンパク質 製造時の分離・精製コストが挙げられる。

タンパク質はバイオテクノロジーの発展により、遺伝子組 み換え大腸菌を培養することで大量生産が可能になった。 タンパク質は遺伝子組み換え大腸菌を培養し、その培養液 や細胞破壊液から目的タンパク質を分離・精製を行うこと で製造される。現在、タンパク質の分離・精製プロセスは 主にクロマトグラフィーによって行われているが、クロマ トラフィーは装置が複雑で大型化が困難、高価なカラムが 必要という問題があり、タンパク質が高価である原因となっている。そこで近年、タンパク質を安価に、そして大量 に処理できる分離方法として溶媒抽出(液-液抽出)の一つ である逆ミセル抽出法が注目されている。

逆ミセル抽出法は溶媒抽出ゆえに大型化も容易であり、 連続処理も可能である。さらに目的物質を逆ミセル内部の 微小水滴に可溶化するため、タンパク質のような親水性生 体高分子を分離することができる¹⁾。しかし、逆ミセル抽出 法は工業化が進んでおらず、逆ミセル抽出法を適用した装 置の開発はほとんど行われていない。そこで本研究では逆 ミセル抽出法を利用し、連続処理で効率良く、大量にタン パク質を分離する装置の開発を目的とし研究を行った。

逆ミセル抽出法を適用する装置としては充填塔²⁰、多孔板 塔³⁰、ミキサーセトラー塔^{4,5)}が挙げられる。本研究ではこの 中でも高い抽出能力を期待できるミキサーセトラー塔を採 用し、実験室スケールで3段のミキサーセトラー塔を作製し た。ミキサーセトラー塔は各段が撹拌による滴分散を行う ミキサー部と相分離を行うセトラー部からなり、強い撹拌 を行うため大きな界面積が得られる、各段で分散・相分離

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

を行うため滴分散合一による物質移動が促進されるという 特長がある¹⁾。しかし、ミキサーセトラー塔は強い撹拌を行 うため、タンパク質を変性させる恐れがある。

そこで、本研究では逆ミセル抽出法への適応を検証するた めにモデルタンパク質としてリゾチーム、抽出剤として界面 活性剤AOT、分散相の溶媒としてイソオクタンを用いて実験 を行い、塔の性能を明らかにするとともに操作後にタンパク 質の変性、構造変化についても確認を行った。さらに塔内の 様子観察を行うことで塔の性能の定量的な分析を行った。

2. 実験装置および試薬

2-1 ミキサーセトラー塔

Fig. 1に作製したミキサーセトラー塔の一段の内部構造と 各パーツを示す。図のようにミキサーセトラー塔は各段がミ キサー部とセトラー部で構成されており、内径35 mmのガラ ス管を用いている。各段のミキサー部の高さは60 mm、セト ラー部の高さは40 mmである。ミキサー部中央に設置されて いるディスクタービンは6枚翼であり、材料は灰色のPPシー ト(厚み0.5 mm)である。また、段中のナフロンシート(厚み3.0 mm)で作られたミキサー部とセトラー部の仕切り板はドーナ ツ型になっており、表面にセトラー部で相分離するように網 目状のテフロンコーティング合一材が張り付けてある。両脇 には連続相が下降するための内径4.0 mmのガラスノズルが 付いている。各段の仕切り板(素材はナフロンシート、厚み3.0 mm)は中央付近に分散相を滴にするための内径2.0 mmのテフ ロンノズルが2本ついている。このノズルは下段のセトラー 部で相分離した分散相が合一し、溜まるように板より下へ10 mm伸ばして設置してある。また中央の回転軸がスムーズに 回転できるように板と回転軸が接触するところに軸受を設 置している。仕切り板の端には連続相が下降するためのノズ ルが下段のミキサー部まで通っている。回転には攪拌モータ ー(アズワンSM-103)を用いた。装置は実験室スケールで3段で 作製した。

この装置は向流接触型であり、目的タンパク質を含む水相 は連続相として塔頂からミキサー部へ供給され、分散滴と撹 拌接触し、セトラー部へ流入、セトラー部から下の段のミキ サー部へ流入をくり返し、最終的に塔底から抽残液として流



Fig.1 ミキサーセトラー塔の概略図

出される。抽出剤として界面活性剤を含む有機相は分散相と しては塔底から供給され、各段のミキサー部で分散、セトラ ー部で合一と相分離をくり返し、塔頂から抽出液として流出 される。

2-2 使用薬品と調製

連続相として、0.3 kmol/m³のKCl水溶液にリゾチームを0.1 kg/m³になるように溶解したものを用いた。水相pHは調整しな かったがおよそpH7.0であった。リゾチームは、卵白由来生化 学用のものを和光純薬より購入した。分散相として、陰イオ ン性界面活性剤であるAOTを0.05 kmol/m³になるように2,2,4-トリメチルペンタン(イソオクタン)に溶解したものを用いた。 AOTはジ(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウムの商 品名であり、ナカライテスクより購入した。またタンパク質 活性測定のために、エチレングリコールキチン、炭酸ナトリ ウム、フェリシアン化カリウムを用いた。エチレングリコー ルキチンは和光純薬より生化学用を購入した。その他の薬品 については和光純薬の特級試薬を用いた。

3. 実験方法

3-1 ミキサーセトラー塔によるリゾチームの抽出

塔内を連続相で満たしてから撹拌、次に分散相の供給を 開始し、抽出操作を行った。抽出操作は定常状態に達する まで続けた。操作終了後、連続相原液、抽出液、抽残液の 280 nmでの吸光度を紫外可視吸光光度計(Shimadzu UV-1600) で測定し、リゾチーム濃度を決定した。決定したリゾチー ム濃度より、式(1)と式(2)を用いて抽出率E[%]、連続相基準 総括物質移動容量係数K_a [1/s]を算出した。

$$E = \frac{(C_{c0} - C_c)U_c}{C_{c0}U_c} \times 100$$
 (1)

$$K_{c}a = \frac{U_{c}}{Z} \frac{C_{T} - C_{B}}{(C_{T} - C_{T}^{*}) - (C_{B} - C_{B}^{*})} ln \frac{C_{T} - C_{T}^{*}}{C_{B} - C_{B}^{*}}$$
(2)

ここでColt連続相原液のリゾチーム濃度、Colt抽残液リ ゾチーム濃度、Uolt連続相流速、Zは塔の有効接触高さ、Cr は塔頂から供給される連続相のリゾチーム濃度(連続相原液 リゾチーム濃度)、CBは塔底から流出される連続相のリゾチ ーム濃度(抽残液リゾチーム濃度)、Cr*は塔頂より流出され る分散相リゾチーム濃度(抽出液リゾチーム濃度)と平衡な リゾチーム濃度、CB*は塔底より供給される分散相リゾチー ム濃度と平衡なリゾチーム濃度である。

この操作を分散相流速U_d、連続相流速U_c、攪拌速度Nを変化させて繰り返し行った。

3-2 リゾチームの構造変化

ミキサーセトラー塔による抽出操作でリゾチームが構造 変化していないか確認するために連続相原液、抽残液、抽出 液のCDスペクトルの測定を行い、式(3)を用いてリゾチーム のα-ヘリックス含量を求めた。

$$MRE = \frac{\theta}{10mC_p l} [deg \cdot cm^2/decimol]$$
(3)

ここでMREは平均残基楕円率、 θ は222 nmにおけるCDスペクトルの極小値としての楕円率[mdeg]、mはアミノ酸残基数、 C_p はリゾチーム濃度[mol/L]、lは測定に用いたセルの厚さ[cm]である。

3-3 リゾチームの活性測定

ミキサーセトラー塔による抽出操作によりリゾチームが 失活していないか確認するために抽残液および抽出液中の リゾチームの活性測定をImoto-Yagishitaの方法を用いて行 った。まず、抽出液の場合は活性測定を行う前にpH12、1.0 kmol/m³ KClの逆抽出用水相を調製し、この水相と抽出液を2 時間振とうし、逆抽出を行い、リゾチームを水相に取り出し た。検量線用のリゾチーム標準溶液として逆抽出用水相にリ ゾチームを加え、0.1~0.3 kg/m³の濃度に調製した。抽残液の 場合は抽残液をそのままサンプルとして用い、検量線用のリ ゾチーム標準溶液として0.3 kmol/m³ KCl水溶液にリゾチーム を加え、0.1~0.3 kg/m³の濃度に調製した。反応基質として 0.05%エチレングリコールキチン水溶液を調製し、基質溶液 とした。色素溶液として0.5 kmol/m³ Na₂CO₃水溶液に0.5 kg/m³ となるようにフェリシアン化カリウムを加えたものを調製 した。それぞれの標準リゾチーム溶液及びサンプル1.0 mLに 対して基質溶液を2.0 mLずつ加えた。その後40℃の恒温槽で 30分間の酵素分解反応を行った。次に色素溶液を4.0 mLずつ 加え100℃で15分間の還元反応を行った。常温まで冷却後、紫 外可視吸光光度計にて420 nmにおける吸光度の値を読み取 った。

3-4 塔内の様子観察

1段の半回分式のミキサーセトラー塔を用いて塔内の様子 観察を行った。まず、連続相として0.3 kmol/m³ KCl水溶液 を、分散相としてメチレンブルーで着色した0.05 kmol/m³ AOT/イソオクタンを調製した。塔内に連続相を仕込み、塔 底から界面までの高さhを測定した。その後、攪拌、分散相 の供給を始め、定常状態に達したのち、攪拌と分散相供給 を止めた。静置し完全に分相した後、分散滴の体積によっ て上昇した界面の高さの変化量Δhを測定し、式(4)を用いる ことで分散相ホールドアップ**Φ**iを算出した。

$$\Phi_d = \frac{V_d}{V_c} = \frac{\frac{\hbar}{4}D^2\Delta h}{\frac{\pi}{4}D^2h} = \frac{\Delta h}{h} \quad [-] \qquad (4)$$

ここでV。は連続相体積、Vaは分散相体積、Dは塔の内径で ある。この操作をミキサー部にのみ連続相を仕込んだ場 合、ミキサー部とセトラー部に仕込んだ場合について行 い、塔全体の分散相ホールドアップ**D**aとミキサー部の分散 相ホールドアップ**D**amからセトラー部の分散相ホールドアッ プ**D**ate式(5)を用いて算出した。

$$\mathcal{P}_{d} = \mathcal{P}_{dm} + \mathcal{P}_{ds}$$

また、塔内の様子を動画撮影できるデジタルビデオ(Casio EXILIM EX-F1)で撮影し、分散滴の滴径の測定を行った。まず、撮影したビデオ内の分散滴50個の縦と横の径*p、q*を測定し、縮尺を合わせてから式(6)を用いて等体積相当径*d*nとして滴径を求め、それぞれの条件におけるミキサー部及びセトラー部の滴径分布を作成した。

$$d_n = \sqrt[3]{6V_p/\pi} = \sqrt[3]{6(pq^2\pi/6)/\pi} = \sqrt[3]{pq^2} \quad (6)$$

ここでVpは滴1個の体積である。そして算術平均により平均 滴径d1を算出した。滴径の測定はそれぞれミキサー部(dnm)と セトラー部(dns)について行った。

算出した分散相ホールドアップのと平均滴径diを用いて式 (7)から式(12)を用いて比界面積aを算出した。

$$n_m = \frac{V_{dm}}{V_{p1m}} = \frac{V_{cm} \Phi_{dm}}{V_{p1m}} \quad [-]$$
(7)

$$n_{s} = \frac{V_{ds}}{V_{p1s}} = \frac{V_{cm,s}\Phi_{ds}}{V_{p1s}} \quad [-]$$
(8)

$$S_m = n_m S_{1m} [m^2]$$
 (9)

$$S_s = n_s S_{1s} [m^2]$$
 (10)

$$S_n = S_m + S_s \left[m^2 \right] \tag{11}$$

$$a = \frac{S_n}{V} \quad [m^2/m^3] \tag{12}$$

ここでV_{dm}はミキサー部の分散相体積、V_dはセトラー部の 分散相体積、V_{plm}はミキサー部の平均分散滴径算出した滴一 個の体積、V_{pls}はセトラー部の平均分散滴体積、V_{cm}はミキサ ー部の連続相体積、V_sはセトラー部の連続相体積、N_mはミキ サー部の分散滴数、N_sはセトラー部の分散滴数、S_{lm}はセトラ ー部の平均滴径より算出した滴一個の界面積、S_{ls}はセトラー 部の平均分散滴界面積、S_mはミキサー部総界面積、S_sはセトラ ラー部総界面積、S_nは塔内の総界面積、Viは塔体積である。さ らに連続相基準総括物質移動容量係数K_caを用いて連続相基 準総括物質移動係数K_cを算出した。

4. 結果および考察

4-1 E、Kaに対する両相流速の影響

Fig. 2に抽出率Eに及ぼす両相流速の影響を示す。EはU_dが 大きくなるにつれ、またU_cが小さくなるにつれ、向上する 傾向が見られた。これはU_dが大きくなると ϕ_{d} が増加し、aが 大きくなったため、また、U_cが小さくなると塔内の連続相 の滞留時間が長くなり、連続相と分散相の接触時間が長く なったためと考えられる。

Fig. 3にKcaに及ぼす両相流速の影響を示す。KcaはUaが大きくなると値は増加する傾向が見られたが、Ucの影響はあまり



Fig. 4 抽出率に及ぼす攪拌速度の影響

見られなかった。逆ミセル抽出系は境膜律速ではないことが 分かっており³、Kcaはaの影響が大きいと考えられている。そ のため、Udが大きくなるとΦaの増加に伴い、aが増大し、Kca は値が大きくなったと考えられる。Ucはaに影響を及ぼさな いのでKcaには影響しなかったと考えられる。しかし、Uc、Ud 共に大きくするとKcaは大幅に大きくなった。これは両相の 流速を大きくしたことでセトラー部に「非合一層」ができて しまいフラッディング状態となってしまったためと考えら れる。ここで非合一層とは分散相が合一せずに連続相と混ざ り合った相と定義した。非合一層ができるとaが格段に増加 する。そのため、Kcaの値が大きくなり、一見塔の性能が良く なったように見えるが、非合一層ができると連続相と分散相 の逆流や分相しにくくなるなどの問題を招き、フラッディン グ状態となって正常な操作を行うことができなくなるため、 好ましい状態とはいえない。低~中域の流速では連続相と分 散相はきれいに分相しているが、流速を大きくしすぎると連 続相と分散相が分相せず、正常な操作が行えないことから、 最適な流量を設定する必要があることが分かった。

4-2 E、Kaに対する攪拌速度Nの影響

Fig.4にEに及ぼす攪拌速度の影響を示す。EはNが大きく なると値が向上した。これはNを大きくすることで分散滴の 細分化が進み、aが増大しためと考えられる。また、Nが5.0

Fig. 5 K_a に及ぼす攪拌速度の影響

s⁻¹になるとEは格段に大きくなった。これは分散滴の細分化 に加えてミキサー部内での滴の循環流が発生して分散滴の 滞留時間が長くなり、のが増加したためと考えられる。低 攪拌速度においてEが異常に大きくなっているプロットは非 合一層ができた条件である。

Fig. 5にKcaに及ぼす攪拌速度の影響を示す。KcaはNが大き くなるにつれて値が増加した。これは上述のとおり、Nが大 きくなることで分散滴の細分化が促進されてaが大きくなっ たため、さらに5.0 s⁻¹では分散滴の循環流により のが増加し ためと考えられる。

4-3 リゾチームの構造変化

Fig. 6に各撹拌速度における抽出操作後の抽出液および抽 残液中リゾチームの平均残基楕円率MREを示す。抽出操作 前の連続相原液中のnativeリゾチームの平均残基楕円率に対 し、抽残液中リゾチームの平均残基楕円率は3.3 s⁻¹までは変 化せず、構造変化は確認されなかった。しかし5.0 s⁻¹では平 均残基楕円率の変化がみられ、強い撹拌により構造が変化 した可能性が示唆された。

一方、抽出液中リゾチームの平均残基楕円率はFig.6の×の キーで示した。抽出液中リゾチームには撹拌速度5.0 s-1の場合



Fig.6 平均残基楕円率に及ぼす攪拌速度の影響

でも平均残基楕円率に変化が見られなかった。このことより、 強い撹拌を行った場合でも逆ミセル内に取り込まれたリゾ チームは正常な構造を保持しており、5.0s⁻¹でも問題なくリゾ チームの抽出を行えていると考えられる。

4-4 リゾチームの活性測定

Fig. 7に抽残液および抽出液中リゾチームの各撹拌速度に おける活性測定結果を示す。縦軸は、nativeのリゾチームの 基質分解能力に対するそれぞれの液の分解能力を百分率で 表したものであり、活性保持率と定義する。なお抽残液で の低攪拌速度における活性値は非常に薄い濃度により誤差 が大きかったためプロットから除いた。図より抽残液、抽 出液中のどちらのリゾチームもどの条件においても100%付 近にあり活性の低下は見られなかった。Fig. 6の構造変化の 結果と合わせて、今回作製したミキサーセトラー塔を用い てもリゾチームの活性を損なわず、構造変化せず抽出を問 題なく行えることが示された。



Fig. 7 活性保持率に及ぼす攪拌速度の影響

4-5 *Ф*aに対する*U*a、*N*の影響

Fig. 8に ϕ_{d} に対する U_{d} とNの影響を示す。 ϕ_{d} は U_{d} が大きくなる につれ、値が増加した。また、 $3.3 s^{-1}$ まではNの影響はあまり 見られなかったが5.0 s^{-1} で ϕ_{d} は急激に増加した。このことよ り、5.0 s^{-1} において分散滴の循環流発生による ϕ_{d} の増加が確 認できた。



4-6 ミキサー部の分散滴滴径分布及び平均滴径d_{im}に対 するU_d、Nの影響

Fig. 9にN=0 s⁻¹におけるミキサー部の分散滴径dmmの分布を 示す。0 s⁻¹ではUdが小さいと分散滴の分布は2.5 mm付近の滴 径のものが多くあり、ある程度滴径が制御されていた。し かし、Udが大きくなると分布はブロードになり、様々な滴 径のものが見られた。0 s⁻¹の場合は攪拌による滴の細分化は なく、ノズルから流出された分散相は固定された攪拌翼に ぶつかり、分裂するため、滴径に対してUdの影響が大き い。そのため、Udが小さい場合は攪拌翼にゆっくりとぶつ かるため分散滴の滴径はある程度制御されており、Udが大 きいと分散相が攪拌翼にぶつかる速度が速いため滴径が制



御できず、分布がブロードになったと考えられる。

Fig. 10にN=5.0 s⁻¹におけるdnmの分布を示す。5.0 s⁻¹ではどのUaでも分布はほぼ同じになり、1 mm付近の滴径のものが多くなった。このことより、高速攪拌の条件では滴径に対してNの影響が支配的になっており、攪拌によって滴径がある程度制御されていることが分かった。

Fig. 11にミキサー部の平均滴径d_{1m}に対するU_d、Nの影響を示す。d_{im}はNが大きくなるに伴って小さくなっており、攪拌による分散滴の細分化が確認できた。



Fig. 11 平均滴径に及ぼす攪拌速度の影響

4-7 *a*及び*K*に対する*U*_d、*N*の影響

Fig. 12に比界面積aに及ぼすU_d、Nの影響を示す。aはU_d、 Nが大きくなることに伴う分散滴の細分化と**a**_lの増加によ り、値が増大した。Fig. 13にK_cに及ぼす両相流速と攪拌速度 Nの影響を示す。なお、非合一層ができた条件については特 殊な条件のため、除いてある。K_cはどの条件でもほぼ一定 値を示した。このことより逆ミセル抽出系は境膜律速では なく、逆ミセル抽出系における抽出性能は界面積の影響が 支配的であることが確認できた³⁾。





5. 結言

リゾチームの逆ミセル抽出へのミキサーセトラー塔の適 用した。抽出率は連続相流速が小さくなるにつれ、また分散 相流速、攪拌速度が大きくなるにつれて値が向上する傾向が 見られた。連続相基準総括物質移動容量係数は分散相流速と 攪拌速度が大きくなるにつれて値が向上する傾向が見られ たが、連続相流速の影響は見られなかった。これらの結果は、



連続相の滞留時間増加、分散滴の増加による比界面積の増加、 攪拌による分散滴の細分化に伴う比界面積の増加が原因と 考えられる。低~中攪拌速度の条件において抽出液および抽 残液中のリゾチームの構造変化は見られなかった。どの攪拌 速度においてもリゾチームの活性の低下は見られなかった。 攪拌速度が大きくなるにつれてミキサー部での平均分散滴 径は小さくなっており、攪拌による分散滴の細分化が確認で きた。比界面積は分散相流速、攪拌速度が大きくなるにつれ て値が増大した。連続相基準総括物質移動係数はどの条件で もほぼ一定の値を示し、このことから逆ミセル抽出系におけ る抽出性能は界面積の影響が支配的であることが確認でき た。

6. 参考文献

1. Takumi Kinugasa, Shin-Ichiro Tanahashi, Hiroshi Takeuchi : Extraction of Lysozyme Using Reverse Micellar Solution: Distribution Equilibrium and Extraction Rates, Industrial and Engineering Chemistry Research, 30, 2470-2476 (1991)

2. Yasuhiro Nishii, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi, Hiroshi Takeuchi : Extraction of Proteins by Reversed Micellar Solution in a Packed Column, Journal of Chemical Engineering of Japan, 30(2), 211-216 (1999)

3. Yasuhiro Nishii, Chiemi Hara, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : Reversed Micellar Extraction of Lysozyme in A Sieve-Tray Column, Solvent Extraction Research and Development, Japan, 9, 111-119 (2002)

4. Susumu Nii, Junichiro Suzuki, Koji Tani, Katsuroku Takahashi : Mass Transfer Coefficients in Mixer-Settler Extraction Column, Journal of Chemical Engineering of Japan, 30(6) 1083-1089 (1997)

5. Susumu Nii, Junichiro Suzuki, Koji Tani, Katsuroku Takahashi : Effects of Internal Structure on Throughput of Mixer-Settler Extraction Column, Journal of Chemical Engineering of Japan, 30(2) 253-259 (1997)