

平成21年6月12日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18560727
 研究課題名（和文） ナノ分子集合体をキャリアとする乳化液膜法によるタンパク質の抽出
 研究課題名（英文） Protein Extraction by Liquid Surfactant Membrane Using Nano-Order Molecular Aggregates as Carrier
 研究代表者
 衣笠 巧 (KINUGASA TAKUMI)
 新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授
 研究者番号 10195323

研究成果の概要：ナノ分子集合体である逆ミセルをキャリアとする乳化液膜によるタンパク質の抽出方法の開発を検討した。逆ミセル形成のための界面活性剤 AOT を加えると乳化液膜の安定性は低下した。そこで抽出能力を維持したまま AOT 濃度を低下させるために、塩酸グアニジンの添加効果を検討し、低 AOT 濃度でも高い抽出率を得る条件を探索できた。また、乳化液膜の安定性を高めるために乳化剤 Span80 を加えると抽出速度が低下することから、乳化液膜操作に適切な操作条件を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：分離工学、抽出、ナノテクノロジー、逆ミセル、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

非極性溶媒中で界面活性剤が形成する逆ミセルと呼ばれるナノ分子集合体は、その内部にナノスケールの微小水滴を形成し親水性生体高分子を可溶化できることから、タンパク質の分離場への適用が可能であるとして注目されてきた。一方、乳化液膜法は、W/O/W エマルションの有機相にキャリアを添加し、溶質を外部水相から内部水相へ選択的に能動輸送する分離法であって、固体膜に比べて作成が容易で輸送速度が大きいことから広く研究が進められてきた。本研究は、

この2つの方法を組み合わせた逆ミセル乳化液膜法の構築を目的としており、迅速かつ経済的で大量処理可能なタンパク質の高選択的能動輸送の実現が期待される。

逆ミセル抽出法と乳化液膜法の組み合わせはアイデアとしては以前から提唱されていたが、実際には Stobbe ら (1997) が最初に試み、西機ら (1998) もアミノ酸をターゲットに若干の検討を行っているのみである。しかも、液膜の膨潤や安定性の問題からそれ以上の研究は報告されていない。また、この系における抽出速度に関する知見はまったく

報告されていない。

本研究室には、これまでに液膜の膨潤度と安定性に関する研究データが蓄積されており、欠点とされるこれらの点を克服することで逆ミセル乳化液膜法の構築を目指して研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、逆ミセル抽出法と乳化液膜法を組み合わせる、すなわち乳化液膜のキャリアとしてナノ分子集合体である逆ミセルを用いることにより、タンパク質の高選択的能動輸送を実現できる新規分離システム（以下、逆ミセル乳化液膜法と呼ぶ。図1参照）の開発を目的とする。

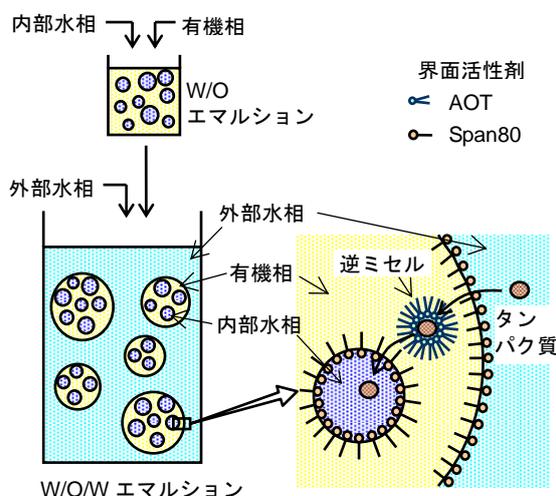


図1 逆ミセル乳化液膜法の概略

従来の乳化液膜法は、内部水滴（直径数十 μm ）を含む W/O エマルジョン滴（直径数 mm ）を外部水相中に分散させ、外部水相中の溶質を有機相に抽出、さらに内部水相に逆抽出する過程を経て、物質輸送を実現する手法である。逆ミセル乳化液膜法では、溶質を輸送するキャリアとして、ナノオーダーの分子集合体、逆ミセルを利用する方法で、タンパク質をより効率よく分離・濃縮する操作として期待できる。

これまでの研究で、逆ミセルを形成するための界面活性剤 AOT と乳化液膜を安定に保つための界面活性剤 Span80 とを混合した有機相を用いることにより、逆ミセルの形成、タンパク質の抽出、W/O エマルジョンの安定性、液膜の破壊などに影響があることがわかっているが、一部はまだ定性的にしか明らかにされていない。そこで、本研究では、この逆ミセル乳化液膜法によるタンパク質分離システムの構築を目的とし、特にエマルジョン滴の安定性とタンパク質の抽出速度に焦点をおいて検討した。

3. 研究の方法

1) エマルジョン滴の安定性

乳化液膜として操作するためには、W/O エマルジョンを水中に分散させた滴の安定性が重要である。そこで、W/O エマルジョン滴の破壊率を測定し、エマルジョン形成条件（界面活性剤濃度、相体積比、有機溶媒の種類など）やエマルジョン分散のための攪拌速度などの影響を検討した。

W/O エマルジョン滴の安定性は、内部水相に加えたトレーサーが外部水相に漏出する量から破壊率を決定することで検討した。トレーサーとしては AOT や Span80 と相互作用を持たないヘキサシアノ鉄(III)酸イオンを用い、原子吸光光度法により鉄イオンを定量した。

2) タンパク質の抽出平衡

エマルジョン滴の安定性を高めるためには AOT 濃度を低減する必要がある。そのため低い AOT 濃度でもタンパク質の抽出が可能な系の探索を行った。

AOT と Span80 を含む逆ミセル溶液によるタンパク質の抽出能力を試験した。界面活性剤溶液とタンパク質水溶液を接触振盪させて相間移動法で平衡に到達させ、抽出されるタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度は紫外可視分光光度計を用い、Lowry 法によって決定した。

3) タンパク質の抽出速度

逆ミセル乳化液膜によるタンパク質抽出の予備実験として、水相から逆ミセル溶液あるいは W/O エマルジョン溶液へのタンパク質抽出速度を、平界面接触攪拌槽を用いて行い、抽出速度を検討した。タンパク質濃度の経時変化から物質移動係数を求め、添加塩濃度や界面活性剤濃度をパラメータとしてその影響を検討し、乳化液膜として適切な条件を探索した。

4. 研究成果

1) エマルジョン滴の安定性

W/O エマルジョンを水相中に分散させて、分散滴の安定性を調べた。図2に示すように、界面活性剤 Span80 は乳化剤としてはたらくため、濃度が高い方が破壊率は低下した。しかし、AOT 濃度が高くなると破壊率は急激に増大した。破壊率が大きいと抽出した成分が漏出して効率が悪くなるため、1%程度にとどめる必要があるとされる。

そこで、有機溶媒としてイソオクタン、*n*-オクタン、*n*-ドデカンを用い、その粘度増加の効果を調べた。しかし、分散滴の破壊率にほとんど影響はみられなかった。また、W/O/W エマルジョン中の W/O エマルジョンの体積比

を大きくして、分散状態のエマルジョンの粘性を高め、安定化を図ったが、図3に示すように破壊率への効果は見られなかった。

AOTを含まずSpan80だけで安定化した乳化液膜の場合は、有機溶媒の粘性やW/O/Wエマルジョンの粘性は分散滴の破壊率に大きな影響を与えたことから、AOTを加えることにより、Span80との界面への競争吸着による分散滴不安定化の効果の方が、粘性増加による安定化の効果より強かったためと考えられる。そのため、目標の破壊率1%以下には到達できなかった。

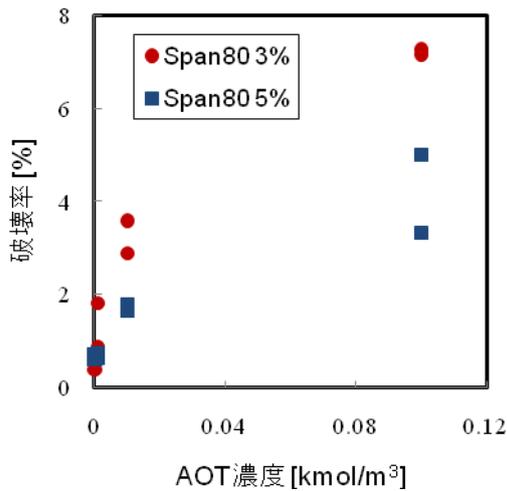


図2 膜破壊率に及ぼす界面活性剤濃度の影響

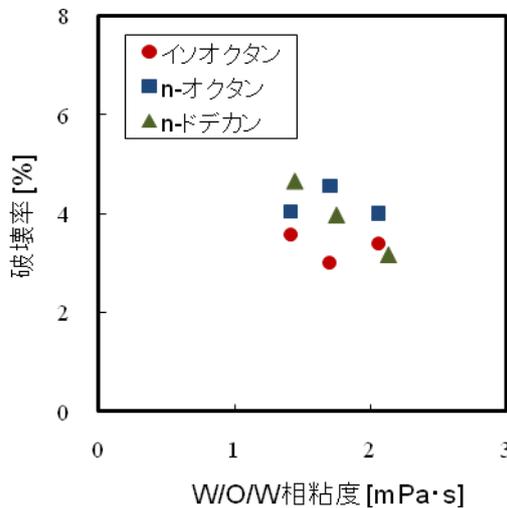


図3 エマルジョン粘度と膜破壊率

2) 塩酸グアニジンの添加効果

AOT濃度が高いとエマルジョン滴が不安定化することから、AOT濃度を減少させるための方策として水相への塩酸グアニジンの添加を試みた。その結果、図4のように従来よく用

いられてきた塩化ナトリウムや塩化カリウムの代わりに塩酸グアニジンを使うことで、低いAOT濃度でリゾチームの抽出が可能となることがわかった。

塩酸グアニジンを添加した場合、有機相の可溶化水分量から比較的小さなサイズの逆ミセルを形成することが示唆された。界面活性剤に対する水のモル比は逆ミセルサイズと関連が深く、これに対してリゾチームの抽出率をプロットすると図5のようになった。いずれの塩の場合でも水分量が増えると急激に抽出率が増加しているが、塩酸グアニジンはモル比5程度でも抽出率が100%に達している。これは、塩酸グアニジンを用いた場合は、塩化ナトリウムや塩化カリウムなどを添加した場合に比べて、小さな逆ミセルサイズのときでもタンパク質の抽出を引き起こすことを示唆している。

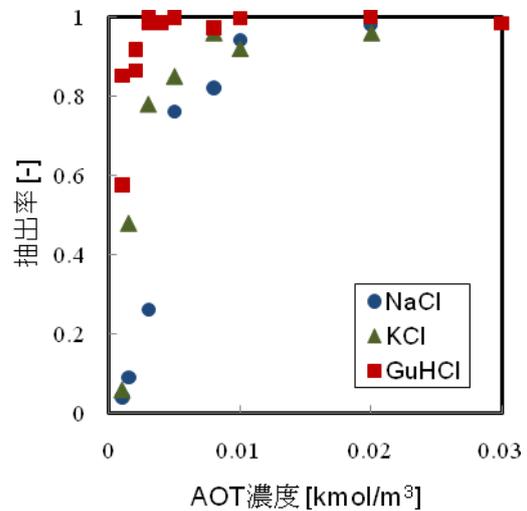


図4 タンパク質の抽出率に及ぼす界面活性剤濃度の影響

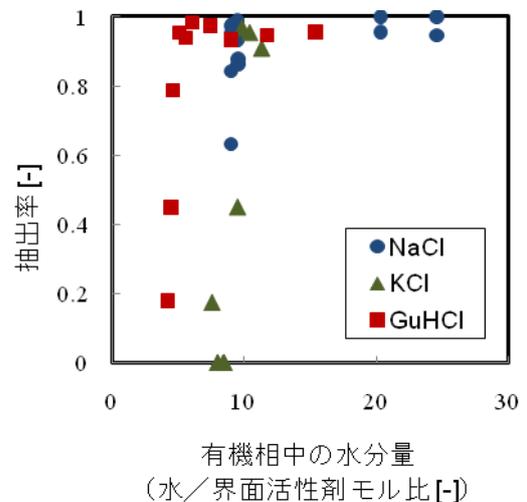


図5 タンパク質の抽出率と有機相水分量の関係

3) タンパク質の抽出速度

平界面接触型攪拌槽を用いて、水溶液から逆ミセル溶液へのリゾチームの抽出速度測定実験を行った。図6に示す通り、リゾチームの抽出速度は AOT 濃度の増加とともに大きくなり、Span80 濃度の増加とともに小さくなった。陰イオン性界面活性剤の AOT は、等電点以下の pH で正に帯電したタンパク質と引きあうことから、その濃度の増加とともに抽出速度が大きくなったと思われる。一方、非イオン性の Span80 は、AOT 逆ミセルとタンパク質との静電的相互作用を弱めることにより、抽出速度が低下したと考えられる。

次に、W/Oエマルション溶液へのリゾチームの抽出速度を検討した。抽出速度は、図7に示す通り、逆ミセル溶液への抽出速度に比べて1桁小さくなった、また、乳化剤 Span80濃度の増加とともに低下し、界面活性剤 AOT濃度の増加につれて向上した。これは逆ミセル溶液への抽出速度と同様な傾向であった。しかし、攪拌速度が抽出速度に及ぼす影響は小さく、エマルション化による粘度増大の効果はほとんどないことがわかった。また、内水相に逆抽出剤として用いた炭酸ナトリウムの濃度条件も抽出速度に影響はなく、逆抽出段階も律速ではないことが示唆された。

以上より、W/Oエマルション滴表面における抽出過程が律速段階であり、AOTによる逆ミセルがタンパク質を可溶化するのを Span80が阻害していると推測される。しかも、エマルション化により物質移動係数が1桁低下したことは、単に Span80による静電的相互作用の減少だけではなく、水相とエマルション相の界面における界面活性剤の配列が抽出速度に大きく影響していることが推測された。

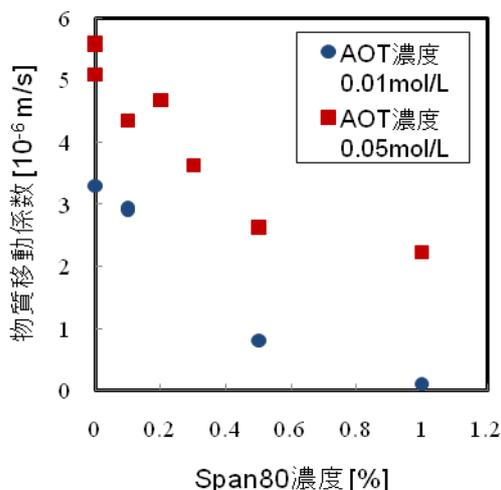


図6 逆ミセル溶液へのタンパク質の抽出速度と界面活性剤濃度の関係

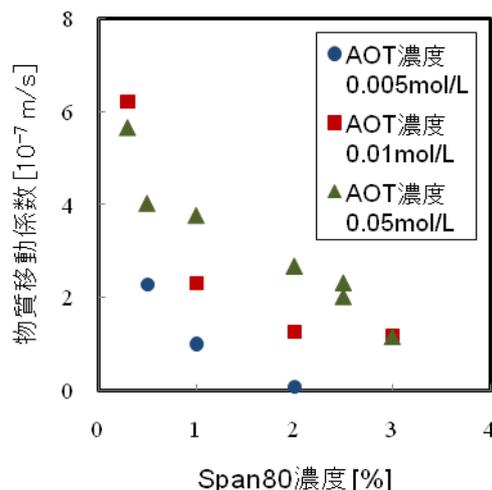


図7 W/Oエマルションへのタンパク質の抽出速度と界面活性剤濃度の関係

以上より、AOTは液膜を不安定化する反面、抽出速度の増大をもたらすことがわかった。これまでのところ、AOT濃度が低すぎると抽出速度が低下し、ほとんどタンパク質の抽出が起こらなくなるため、ある程度以上の濃度の AOTが必要であるが、その条件では破壊率を1%以下に低下させることはできなかった。しかし、塩酸グアニジンの添加によって AOT濃度を低下させてもタンパク質の抽出が起こる可能性が示唆された。したがって、今後、塩酸グアニジンを含む系での操作設計を検討することにより、逆ミセル乳化液膜の問題解決につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) 衣笠 巧, 西井靖博:「界面活性剤を利用したタンパク質の分離」, 化学工学, Vol. 71, No. 6, 371-373 (2007), 査読なし

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 宮脇和宏, 西井靖博, 衣笠 巧:「塩酸グアニジンを用いたリゾチームの逆ミセル抽出における溶液条件の検討」, 第13回高専シンポジウム, 2008年1月, 久留米
- (2) 白石竜二, 西井靖博, 衣笠 巧:「タンパク質の逆ミセル抽出に及ぼす多孔板塔構造の影響」, 第13回高専シンポジウム, 2008年1月, 久留米
- (3) 石川圭太, 西井靖博, 衣笠 巧:「界面活性剤-タンパク質複合体の沈殿生成を

利用したタンパク質の分離」, 第 12 回高専シンポジウム, 2007 年 1 月, 三島

(4) 白石竜二、西井靖博、衣笠 巧:「逆ミセル抽出に及ぼす多孔板塔構造の影響」, 第 12 回高専シンポジウム, 2007 年 1 月, 三島

(5) 宮脇和宏、西井靖博、衣笠 巧:「多孔板塔を用いたリゾチームの逆ミセル抽出における溶液条件の検討」, 第 12 回高専シンポジウム, 2007 年 1 月, 三島

(6) 鎌田将行、西井靖博、衣笠 巧:「脈動多孔板塔を用いた逆ミセルからのリゾチームの逆抽出」, 第 12 回高専シンポジウム, 2007 年 1 月, 三島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

衣笠 巧 (KINUGASA TAKUMI)

新居浜工業高等専門学校・

生物応用化学科・准教授

研究者番号: 10195323

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

西井 靖博 (NISHII YASUHIRO)

新居浜工業高等専門学校・

生物応用化学科・講師

研究者番号: 90321504