逆相ミセル抽出法を利用した粉末蛋白質の可溶化と分離†

久保井亮一・森　義昭・駒沢　勲

大阪大学基礎工学部　化学工学科††

逆相ミセルは，無極性有機溶媒中で自発的に形成されるナノメータースケールの界面活性剤会合コロイドである．逆相ミセル内に可溶化された水は，界面活性剤分子によって外部の有機溶媒からはシールドされているために，蛋白質，酵素等の生体高分子の変性・失活を抑えて抽出させることができる[1,6,7]．逆相ミセル内への蛋白質の溶解法としては，あらかじめ水相に溶解した蛋白質をミセル相に分配させる従来よりの二相分配抽出法および，粉末蛋白質を直接ミセル相に溶解させる粉末直接抽出法などがある[4]．本研究では新規な分離法であると同時に濃縮法としても有望な後者の方法を用いて，逆相ミセルの含水率および粒径分布と粉末蛋白質のミセルへの溶解度の関係を検討し，さらにこれを利用した蛋白質混合物の分離の可能性について実験的に検討した．

1. 実験操作および方法

ミセル相にはアニオン性の界面活性剤 bis(2-ethyl-hexyl) sodium sulfosuccinate(Aerosol OT, 以下AOT) を所定量溶解させ，さらに含水率 W_o(=[H_2O]/[AOT])を調整するために，塩濃度，pHを調整した水を加えた isooctane(試薬特級)を用いた．AOTは和光純薬製，キシダ化学製，花王製をそのまま，あるいは和光純薬製のAOTを benzeneに溶解し水と接触させ水溶性の不純物を除去したものを用いて実験を行った．しかしいずれを用いても得られた結果には大差がなかったので以下は和光純薬製のAOTをそのまま用いた．蛋白質には，Lysozyme，α-Chymotrypsin (和光純薬製)，BSA, Cytochrome-c (SIGMA製) を用いた．粉末蛋白質のミセル相への溶解度の測定には，各粉末蛋白質を上述のように調製したミセル相中に過剰に加え，マグネチックスターラーで10min撹拌し，溶解させた．蛋白質濃度は紫外可視分光光度計UV 265-FW (島津製作所製) を用い，280nm (Cytochrome-c についてはさらに540nm)の吸光度より測定した．また分離実験では，30min撹拌し，蛋白質を溶解させた後，高速液体クロマトグラフLC-6AとUV分光光度計検出器SPD-6AV (島津製作所製) を用いそれぞれの蛋白質を分離検出した．ミセル粒径分布の測定にはダイナミック光散乱光度計DLS-700Ar(大塚電子社製) を用いた．

† 1988年12月9日受理

†† 〒560　豊中市待兼山町1－1

2. 実験結果および考察

2・1 ミセル相の物理的修飾

これまでミセルサイズの測定については，Levashovら[5] Zampieriら[8]により超遠心法に基づいて行われたもの，Zulaufら[9]により動的光散乱法に基づいて行われたもの等が報告されている．しかしいずれの報告もミセル平均径のみを扱ったものであり，また蛋白質を溶解した後のミセルサイズの変化等については統一的な知見は得られていない．本報では動的光散乱法[3]に基づきミセル粒径分布を測定した．さらにZulaufによる既往の実験結果と比較するために，ミセル粒径分布を単分散と仮定したときに得られるミセルの流体力学的平均径 (Stokes径) $\overline{dm}$ を算出した[9]．まず所定量の水を添加して含水率を調整した時（粉末直接抽出法）の有機相中の逆相ミセル粒径分布の測定結果を **Fig. 1** に示す．比較のため塩濃度を調整した水相とAOT濃度を調整した有機相とを撹拌し両相を平衡状態にした時（従来の二相分配抽出法）の有機相中の逆相ミセル粒径分布も，Fig. 1に併せて示した．図より逆相ミセル粒径は比較的シャープな分布をしていることがわかる．二相分配抽出法ではミセルサイズは，水相の塩濃度およびミセル相のAOT濃度によって間接的に制御する必要があるが，これに対して本実験で用いた粉末直接抽出法では所定量の水を添加することでミセルサイズを直接的に制御可能である．また添加する水の塩濃度を増加させると，ミセル相への水の溶解度は二相分配系と同様に減少するが，その溶解度範囲内では，イオン強度と独立にミセルサイズは制御できる．

次にミセル相の含水率 W_o とミセル平均径 $\overline{dm}$ の関係を **Fig. 2** に示す．併せてZulaufら，Zampieriらの実験結果およびZulaufらの同心球殻モデルから算出される計算値（ただし，AOT分子長＝1.2nm）をFig. 2に示す．図より本実験データは，$W_o=10$ で $\overline{dm}$=3.5-5.5nm，$W_o=25$ で $\overline{dm}$=7-10.5nm 程度のばらつきがあり，全体として，Zulaufらの実測値と類似の傾向を示しているが，絶対値は $W_o<30$ で，約40％小さくなっていることが分かる．また蛋白質濃度が最大40 μm程度の本実験条件下では蛋白質の溶解によりミセルサイズはほとんど影響されず，一方，含水率 W_o も殆ど変化しなかった．これは見かけ上，$W_o<11.6$ の条件下でも蛋白質の可溶化によってミ

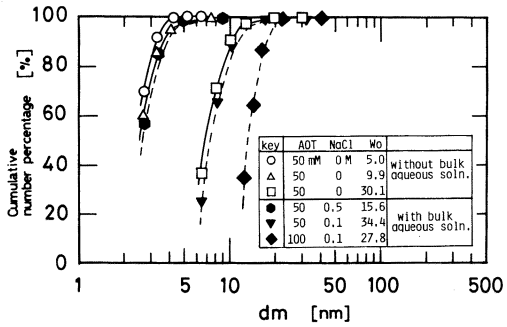

Fig. 1 Reverse micelle size distribution

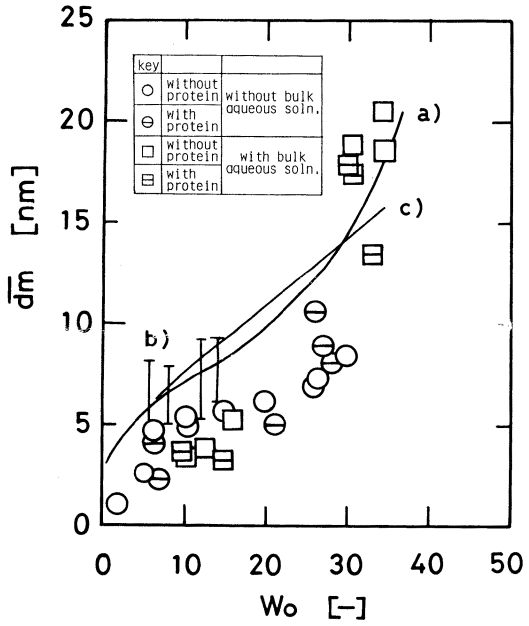

Fig. 2 Average diameter of reverse micelle as a function of ratio of water and AOT molecules (Protein used: α-Chymotrypsin, Lysozyme.)
a) observed value by M. Zulauf et al.[9]
b) observed value by G.G. Zampieri et al.[8]
c) calculated value by the equipartition model of M.Zulauf et al.[9] (The length of AOT : 1.2 nm)

セル平均径は変化しないという先のLevashovらの報告と対応している．Levashovらの結果は，平均径のみに基づいているために，蛋白質の可溶化機構や蛋白質の可溶化によって，ミセルサイズや含水率 W_o が殆ど変化しないという結果を合理的に説明することが困難である．しかし，ミセル粒径分布に関する本実験結果によれば，その分布はシャープであるが，$W_o < 11.6$ の様な条件下においても，蛋白質に比べて大きな内水相をもつ逆相ミセル($dm > \overline{dp} + 2.4$，ただし，AOT分子長＝1.2nm）が充分な数存在しており，このような大きさのミセルは蛋

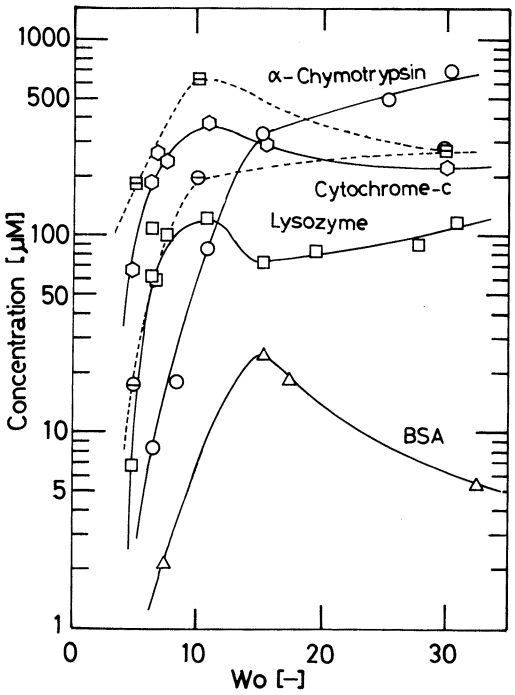

Fig. 3 Solubilization of Lysozyme, α-Chymotrypsin and BSA in 50mM AOT/isooctane reverse micell. ⊟,⊖ Concentration of micelles available for solubilization of respective Lysozyme and α-Chymotrypsin estimated from micelle size distribution

白質を可溶化してもその大きさの変化は小さいと考えられる．また，ミセル粒径分布の測定結果より計算すると(Appendix)，$W_o = 10$ において α-Chymotrypsin で飽和されたミセル相では，α-Chymotrypsinをトラップしたミセルの個数は全ミセル個数の約1.5％であり，また内水相体積では約15％にしか過ぎない．したがって，蛋白質の可溶化によっても平均径や，粒径分布および含水率に大きな変化のないことが矛盾なく説明できる．このように，蛋白質の可溶化によってミセル粒径分布や含水率が殆ど変化しないために，これを蛋白質の大きさによる分画に利用できると考えられる．

2・2 粉末蛋白質のミセル相への溶解特性

純水を用いてあらかじめ含水率 W_o を調整したミセル相への粉末蛋白質の溶解度を **Fig. 3** に示す．さらに各 W_o でFig. 1のミセル粒径分布をもとに計算されたLysozyme, α-Chymotrypsin を溶解しうるのに充分な大きさを持つミセル(dm-2.4 $> \overline{dp}$)の濃度（個数密度）(Appendix) を示した．実測した溶解度の含水率依存性は，Lesozyme, Cytochrome-c, BSA のように比較的低含水率において極大値を持つ場合と，α-Chymotrypsinのように含水率の増加に伴い溶解度も増加する場合がみられる．

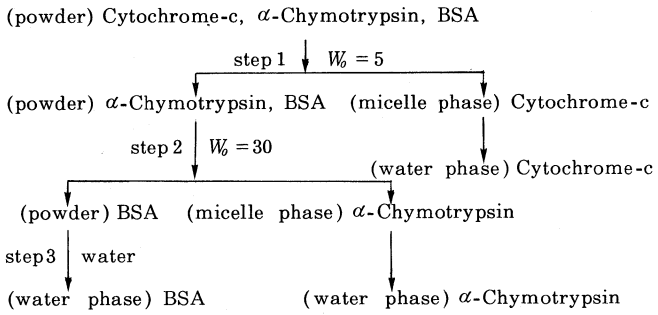

Fig. 4 Procedure for separation of Cytochrome-c, α-Chymotrypsin and BSA

Table 1 Comparison of observed absorption and calculated for each separation step (Cyto. = Cytochrome-c, α-Chy. = α-Chymotrypsin)

	Conc. (cal.) [μM]			ABS (cal.)		ABS (obs.)	
	Cyto.	α-Chy.	BSA	540 nm	280 nm	540 nm	280 nm
step 1	20.1	3.0	1.0	0.160	0.544	0.162	0.401
step 2	0.0	17.0	0.5	0.000	0.809	0.007	1.074
step 3	0.0	0.0	18.5	0.000	0.596	0.000	0.809

Lysozymeとα-Chymotrypsinについての溶解度と含水率の関係についてはLeserら[4]によっても同様の結果が報告されている．この差異について彼らは，ミセル内の水にはミセル内壁に束縛された水と，バルクのフリーな水とに大別され，Lysozymeの溶解は主として前者によるものであり，α-Chymotrypsinは後者によるものと説明している．しかしFig.3に示されたLysozyme，α-Chymotrypsinを溶解しうるのに充分な大きさを持つミセルの濃度を見ると，Lysozyme ($\overline{dp}$=2.0nm[2]) については W_o = 10程度で極大値をもち，α-Chymotrypsin ($\overline{dp}$ = 3.0nm) については W_o の増加とともに増加する傾向がみられ，これらは絶対値こそ異なるものの先の両蛋白質のミセル相への溶解度の含水率依存性とよく対応している．したがってLysozymeについてもα-Chymotrypsinについても，ミセル内への溶解はミセル－蛋白質間の立体的な効果が支配的であり，両蛋白質のミセル内への可溶化の割合の違いは蛋白質の大きさの差に依存しているものと考えることもできる．しかし，BSAのような蛋白質については，このような考え方だけでは説明できない場合もあるので，より一般的には粉末蛋白質のミセル相への溶解には複数の異なる機構が存在しており，蛋白質の大きさや高次構造，ミセル内の水相の特異性が深く関わっているものと考えられる．これに対しては，今後さらに検討が必要と考えられる．

2・3 粉末直接抽出法を用いた蛋白質混合物の分離

粉末蛋白質のミセル相への溶解度の差を利用する蛋白質分離法が考えられる．ここでは一例としてChytochrome-c，α-Chymotrypsin，BSA各20μMを混合した系における模擬分離実験を，**Fig. 4**のスキームに従って行った．まずstep 1では W_o = 5でChytochrome-cのみを選択的にミセル相に溶解させることが期待される．続くstep 2では W_o = 30とし，step 1でミセル相へ溶解せずに残ったα-ChymotrypsinとBSAのうち前者のみを選択的にミセル相に溶解させ，結局これら3種の蛋白質の分離が可能であると期待される．分離実験の結果として，各ステップで得られたミセル相または水相のUVの280nmにおける吸光度，およびここで用いた3種類の蛋白質のうちでCytochrome-cについてのみ特異な吸収を示す540nmにおける吸光度の実測値を**Table 1**に示す．併せてFig. 3で示された溶解度までは各蛋白質いずれも溶解すると考えた時に得られる吸光度の計算値を比較のためTable 1に示す．またstep 1とstep 2で得られたミセル相から蛋白質を逆抽出した後の水相およびstep 3で得られた水相は高速液体クロマトグラフで分析し，Fig. 4に示されたように分離されていることを確認した．まず，step 1ではTable 1に示した540nmにおける吸光度およびクロマトグラムより，予想通りCytrochrome-cのみがミセル相に溶解し他の2種類の蛋白質と分離されていることがわかる．次にstep 2ではTable 1に示した280nmに

おける吸光度およびクロマトグラムより，α-Chymotrypsinのみがミセル相に溶解し予想通りBSAと分離されていることがわかる．step 3で得られた水相をHPLCで分析した結果では予想通りのピークは得られなかったが，これはBSAが非常に変性しやすいため，分離過程で有機溶媒や界面活性剤と接することにより変性したためと考えられる．以上の結果より，BSAについては分離回収されてはいるものの変性しているが，他の2種類の蛋白質についてほぼ予想通りの分離が可能であることが判明した．

Appendix

蛋白質を溶解できるミセル濃度（個数密度）の算出法

Fig. 1に示されたミセル粒径の個数分布確率を$f(dm_i)$，ミセル相での水の全体積をV_w（Karl-Fischer滴定法により測定），ミセル総数をN_{tot}とし，またミセルおよびミセル内水相を同心球殻モデルで近似しミセル内水相の径をdm_i-2.4と考えたとき次式が成り立つ．

$$V_w = \Sigma\{(\pi/6)\cdot(dm_i-2.4)^3 N_{tot}\cdot f(dm_i)\}\Delta(dm)$$

これより

$$N_{tot} = V_w/\Sigma\{(\pi/6)\cdot(dm_i-2.4)^3\cdot f(dm_i)\}\Delta(dm)$$

また各蛋白質を溶解し得るのに充分な大きさを持つミセルは，ミセル内水相の径$(dm-2.4) > \overline{dp}$を満たすと考えたとき，そのようなミセル内水相の全体積$V_{w,eff}$およびミセル個数N_{eff}は，次の様に表される．

$$V_{w,eff} = \sum_{dm>\overline{dp}+2.4}\{(\pi/6)\cdot(dm_i-2.4)^3\cdot N_{tot}\cdot f(dm_i)\}\Delta(dm)$$

$$N_{eff} = \sum_{dm>\overline{dp}+2.4}\{N_{tot}\cdot f(dm_i)\}\Delta(dm)$$

［謝　辞］　本研究に対して，文部省科学研究費（試験研究63850189）の援助を受けた．実験にあたりAOTの提供始め，種々ご協力頂いた花王㈱佐々嘉正氏，また実験に御協力頂いた浦山孝氏（(現) 住友電工㈱）に感謝します．

Nomenclature

dm = diameter of reverse micelles [nm]
$\overline{dm}$ = Stokes diameter of reverse micelles [nm]
dp = diameter of protein [nm]
$\overline{dp}$ = average diameter of protein [nm]
$f(dm)$ = probability density of diameter of reverse micelles, dm [−]
N_{eff} = number of reverse micelles effective for protein solubilization [−]
N_{tot} = total number of reverse micelles [−]
V_w = volume of water in reverse micelle phase [nm^3]
$V_{w,eff}$ = volume of reverse micells effective for protein solubilization [nm^3]
W_o (=[H_2O]/[AOT]) = molecular ratio of H_2O to AOT [−]

Literature cited

1) Goklen, K.E. and T.A. Hatton: Proceedings of ISEC' 86, Ⅲ p-587, Sept. 11-16, München (1986)
2) Imahori, K. and T. Yamakawa: "Seikagaku Jiten", p. 1333, Tokyo Kagakudojin, Tokyo (1984)
3) Kanbara, S.: "Kobunshi Jikkengaku", **11**, p.446, Kyoritsu Shuppan, Tokyo (1982)
4) Leser, M.E., G. Wei, P.L. Luisi and M. Maestro: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 629 (1986)
5) Levashov, A.V., Y.L. Khmelnitsky, N.L. Klyachko, V.Y. Chernyak and K. Martinek: *J. Colloid Interface Sci.*, **88**, 444 (1982)
6) Luisi, P.L.: *Angew. Chem.*, **24**, 439 (1985)
7) Mori, Y., R. Kuboi, and I. Komasawa: Preprint of Hiroshima Research Meeting, SA23, The Society of Chemical Engineering Japan, Hiroshima (1988)
8) Zampieri, G.G., H. Jackle and P.L. Luisi: *J. Phys. Chem.*, **90**, 1849 (1986)
9) Zulauf, M and H. -F. Eicke: *J. Phys. Chem.*, **83**, 480 (1979)

Solubilization and Separation of Powder Protein by Reverse Micelles Extraction

Ryoichi Kuboi, Yoshiaki Mori and Isao Komasawa

Department of Chem. Eng., Faculty of Eng. Sci., Osaka University, Toyonaka 560

Key Words : Reverse Micelles, Solubilization, Separation, Concentration, Protein, Micelle Size Distribution

A tailored reverse micelle solution was prepared by adding a fixed amount of pure or salt water to a mixture of isooctane and Aerosol OT. The water content and size

of the resulting micelle could be controlled independently of the concentration of salt and AOT.

The micelle size distributions were measured by the dynamic light scattering method. The solubilities of several powdered proteins of different size were measured and found to be related to the size of the protein and the water-pool containing the protein. Separation of α-Chymotrypsin, Cytochrome-c and BSA by the selective solubilization was successfully carried out, although BSA was denatured in the process.

超臨界二酸化炭素によるポリカーボネートからの塩化メチレンの脱揮†

山本浩司・中江　貢

出光石油化学(株)　樹脂研究所††

近年，超臨界流体を利用した分離技術に関する研究開発が活発に行われてきており，工業的に応用されている例は少なくない[7]．しかしながら，ポリマーの脱揮工程において，超臨界流体を乾燥媒体として利用した報告例は少ないようである[5]．

高分子産業において，近年ますます高付加価値化が望まれている今日では，今後超臨界流体を利用した脱揮技術が，有用な単位操作の一つになると考えられる．本研究では，超臨界流体のポリマーの脱揮操作（超臨界乾燥）への適用の試みとして，超臨界二酸化炭素によるポリカーボネート(PC)からの塩化メチレン(MC)の脱揮実験を行った．

1. 実　験

1）実験装置　流通式実験装置を**Fig. 1**に示す．脱揮セルは恒温槽内で温度一定に保たれており，圧力は自動圧力調節弁（日本分光(株)製880-81）により制御される．その際，温度の制御範囲は±0.1°C，圧力の制御範囲は±0.1MPa以内であった．二酸化炭素は，臨界圧力以上の液体状態で供給され，臨界温度以上に保たれた恒温槽内で超臨界状態となる．

2）ポリマー試料の調整　試料ポリマーとして，ビスフェノールAタイプのポリカーボネートを使用した〔出光石油化学(株)製：タフロンA-2200（M_v=21600），A-3000（M_v=28100）〕．PCペレットを塩化メチレン（和光純薬(株)製特級試薬）に溶かし30wt％の溶液とする．これを二軸混錬機[3]（L/D=10）に供給し，ジャケット温度40°C，圧力53.3kPaの条件下で濃縮粉末化を行う．この塩化メチレンを含んだ粒状体を，試験篩（飯田製作所(株)製）にて粒径14～28メッシュのものを篩分け，実験試料とした．なお，粒状物の代表粒径は，メッシュの目開きの算術平均とした．

3）連続脱揮実験　円筒状脱揮セル（内径：8mmφ，容積：1ml）内にPC試料を400mg入れ，超臨界二酸化炭素を連続的に流す．所定時間経過した後セルを脱圧し，サンプル中の塩化メチレンの濃度を測定することにより，残留溶剤濃度の経時変化を求めた．濃度の定量は，サンプルをジクロロエタンに溶解させ，ガスクロマトグラフィーを用いた絶対検量線法により行った．測定値のばらつきは，5％程度の誤差範囲で一致し，再現性は良好であった．今回の実験においては，流量，圧力，温度，さらにはポリマー分子量の脱揮効率に与える影響について調べた．

2. 結果と考察

1）CO_2流量の影響　**Fig. 2**に液換算（T=−20°C，P=20MPa）のCO_2流量と，1h脱揮後の残留溶媒濃度の関係を示した．脱揮効率はCO_2流量に影響を受けていないことから，本実験範囲内においては，脱気速度に対する流量の影響は少ないと考えられ，ポリマー内部の溶剤の移動が律速であると推定される．今回の一連の実験は，二酸化炭素流量を5.0ml/minで行った．

2）圧力および温度の影響　圧力の脱揮効率に与える影響を，**Fig. 3**に示した．図に示されるように，20MPaの条件下では，ガラス転移温度（T_g=155°C）より低い温度領域においても，3時間でほぼ100％近い溶剤除去が可能である．

† 1988年9月27日受理；化学工学協会第53年会（仙台，1988年4月）にて発表

†† 〒299-01　市原市姉崎海岸1−1