

逆ミセル系におけるタンパク質の抽出
および抽出装置に関する研究

西井靖博

名古屋大学図書



11473847

报告编号	乙第 6269	号
------	---------	---

目次

第1章 序論	
1.1 緒言	1
1.2 逆ミセル抽出について	4
1.2.1 逆ミセルとは	
1.2.2 逆ミセルによるタンパク質抽出	
1.2.3 逆ミセルによるタンパク質抽出のこれまでと今後の研究	
1.3 本論文の概要	10
第2章 逆ミセルによるリゾチーム抽出における油水界面特性	
2.1 緒言	16
2.2 実験	17
2.2.1 界面張力	
2.2.2 リゾチームの物質移動係数	
2.3 結果及び考察	19
2.3.1 滴重法	
2.3.2 懸滴法	
2.3.3 リゾチームの総括物質移動係数	
2.4 結言	30
第3章 粘度測定に基づいた AOT-SDEHP 混合ミセル径の推算	
3.1 緒言	33
3.2 理論	34
3.3 実験	36
3.4 結果及び考察	37
3.4.1 AOT 系	
3.4.2 AOT-SDEHP 系	
3.5 結言	45
第4章 逆ミセル液膜を通してのタンパク質透過挙動	
4.1 緒言	49
4.2 実験	50
4.3 結果及び考察	50
4.3.1 カチオン移動	
4.3.1.1 KCl-KCl 系	

4.3.1.2	NaCl-KCl 系	
4.3.1.3	KCl-BaCl ₂ 系	
4.3.2	水分量	
4.3.3	タンパク質輸送	
4.3.3.1	KCl-KCl 系	
4.3.3.2	NaCl-KCl 系	
4.3.3.3	KCl-BaCl ₂ 系	
4.3.4	透過機構	
4.4	結言	74
第5章 充填塔を用いたタンパク質の逆ミセル抽出		
5.1	緒言	77
5.2	実験	78
5.3	結果及び考察	79
5.3.1	界面を通るタンパク質移動の物質移動係数	
5.3.2	充填塔によるタンパク質抽出	
5.3.2.1	抽出率	
5.3.2.2	総括容量係数と分散相ホールドアップ	
5.3.2.3	界面積に及ぼす充填物材質の影響	
5.3.2.4	タンパク質活性	
5.4	結言	90
第6章 多孔板塔を用いたリゾチームの逆ミセル抽出		
6.1	緒言	94
6.2	実験	95
6.3	結果及び考察	96
6.3.1	リゾチーム抽出	
6.3.2	二相流動特性	
6.3.3	界面積と物質移動係数	
6.3.4	他の抽出塔との比較	
6.3.5	リゾチームの活性変化	
6.4	結言	108
第7章 AOT 逆ミセル系における滴合一挙動に及ぼす流動状態及び塩の影響		
7.1	緒言	111
7.2	実験	111

7.3 結果及び考察	114
7.3.1 相互飽和の有無と合一時間の関係	
7.3.2 滴の流動と塩濃度の影響	
7.3.3 AOT 濃度の影響	
7.3.4 合一時間分布	
7.4 結言	125
第8章 逆ミセルを用いたタンパク質の抽出におけるカチオン種と pH の影響	
8.1 緒言	130
8.2 実験	131
8.2.1 抽出平衡実験	
8.2.2 リゾチームの活性測定	
8.3 結果及び考察	132
8.3.1 KCl 系における抽出率に及ぼす pH の影響	
8.3.2 BaCl ₂ 系	
8.3.3 CaCl ₂ 系	
8.3.4 抽出及び逆抽出における活性変化	
8.4 結言	143
第9章 総括	145
本研究に関する発表論文リスト	149
謝辞	152

第1章 序論

1.1 緒言

1953年のワトソンとクリックによるDNAの2重らせん構造の革命的発見からちょうど半世紀経った現在、ヒトゲノム解析計画が完了し今後の最も重要な課題として、ゲノム情報によって創り出されるタンパク質の構造や機能を解明しようとする研究(プロテオミクス)分野が急速に発展しつつある。例えばプロテオミクスによってガンやアルツハイマー病などの遺伝子に関する病気の予測や予防、個々に適応したオーダーメイド医薬品の合成が可能になるといわれている。またDNAチップの開発によって、遺伝子の異変やわずかな塩基配列の違いが遺伝子情報のはたらきに及ぼす影響を捉えることができるようになった。さらに未知なるタンパク質試料をプロテインバイオチップを用いて処理すればチップに結合されたタンパク質の種類や濃度を測定でき、タンパク質の構造だけでなくタンパク質同士がどのように連携して生体内で働くか、またタンパク質と糖及びペプチドがどのように結合し相互作用を及ぼし合うかを調べることができる(竹内,2002)。

このようなポストゲノムの時代において、アップストリームプロセッシングで合成され培養された培養混合液中の有用タンパク質を効率よく安価に分離・精製する必要性は益々増大している。一方、現状では分離精製コストは製品コストの過半数を占めるといわれておりこのダウンストリームプロセスを効率化すれば全コストを大幅に軽減することができる。しかしその実現は容易なことではなく、特に生化学物質分離においては以下に示す問題を含んでいる。

- ①粗原料中の目的物質の濃度が低い。
- ②粗原料中に目的物質と分子構造、配列のわずかな差をもつ物質が含まれ難分離混合液となっている。
- ③目的物質の機能は生体の穏和な条件下で発現するものが多く、激しい処理環境は用いることが出来ない。
- ④目的物質はヒトへの投与など生命に関わるものが多いため有害物質の完全な除去が求められる。

上記課題を解決すべく様々な生化学物質分離法が今までに提案されてきた。

Table 1-1 に生化学物質分離に用いられる単位操作を一括して示す。それらに分類されるいくつかのダウンストリームプロセッシングにおける分離法について利点と欠点をまとめて記述する。

超臨界流体抽出は天然香油の抽出、タバコの脱ニコチン、コーヒー豆の脱カフェインなどに利用されている。超臨界流体は気体と液体の両方の性質を持っており溶解度は気体より大きく、物質移動速度は液体のそれより 100 倍大きい。しかし系の圧力調整のための耐圧装置が必要となり、スケールアップには相当のコストがかかると予測される。

液液分配法のひとつである水性二相分配は高分子水溶液と塩水溶液のような二つの水相を用いて目的物質を二相間に分配させる分離法である。有機溶媒を用いないことから生体物質の抽出に適しているが両相の密度差が小さいため分相性が悪く連続大量処理を行う際、操作面で問題が生じる(佐田、砂本,1997)。

限外濾過法は細孔をもつ膜あるいは多孔質薄層を用いてタンパク質、多糖、核酸などの生体高分子やコロイド粒子を混合溶液から分離する方法である。分子ふるい効果を利用した方法であることから操作も装置も簡便という利点がある。ただ細孔の大きさが十分に制御されて調製されているとはいえ、必ず細孔

Table 1-1 生化学物質分離に用いられる単位操作

単一過程	熱力学的平衡	均一相から異相の生成	気-液 気-固 液-固 液-固(液)	蒸発, 凝縮 昇華, 凝固(結晶化) 晶析(光学分割), 結晶化 沈殿, 凝集沈殿, 分別沈殿, 塩析
		2相以上の接触, 平衡	気-液 液-液 液-固	蒸留, 分別蒸留, 減圧蒸留, 水蒸気蒸留, 分子蒸留 液液抽出, 分配, 向流分配, 溶媒分画, 分配クロマトグラフィー 吸着, 収着, イオン交換, 吸着クロマトグラフィー, 固液抽出, 超臨界流体抽出, 脱着, 溶離, 溶出
	移動過程	中間層(膜)	液-液 液-固	膜分離, 液体膜分離 分級, 濾過, 精密濾過, 圧密, 圧搾
		重力, 遠心力	液-固	遠心分離, 密度勾配遠心分離, 超遠心分離, 沈降
		電気力	液-荷電粒子	電気泳動
	複合過程	濃度勾配, さえぎり		透析, ゲルクロマトグラフィー
圧力勾配, さえぎり		膜外濾過, 逆浸透		
電気力, さえぎり		電気透析, イオン交換透析, イオン交換クロマトグラフィー, ゲル電気泳動		
疎水性相互作用, さえぎり		疎水性クロマトグラフィー		
重力, 電気力		二次元電気泳動		
電気力, 生物学的親和力		セルソーター		
さえぎり, 生物学的親和力		アフィニティークロマトグラフィー, アフィニティー溶出		
さえぎり, 電気力, 濃度差(pH)		イオン交換クロマト勾配溶出, クロマトフォーカシング, ディスクゲル電気泳動, ゲル等電点電気泳動, 等速電気泳動		

バイオ・ケミカルエンジニアリング

佐田榮三・砂本順三著, 丸善(1997), p71, 表3.1より引用

径に分布をもつため分画は精密なものにはならない。

電気泳動分離は、タンパク質などの荷電した溶質を電場に置くことによって電気泳動度の差を利用して分離する方法である。問題点としては系に直流電流を流すためジュール熱の発生による対流の発生と温度上昇によるタンパク質の変性が挙げられる。また電極の巨大化、感電などの安全性の問題からもスケールアップは容易でない。

クロマトグラフィー分離法は、分離剤粒子をカラムに充填した層(固定相)と溶離展開液(移動相)によって移動相に含まれる成分を分離剤粒子との相互作用の強弱により層内で移動速度差を生じさせ、カラム出口から流出液を時間差で分取することによって目的成分を得る方法である。アフィニティークロマトグラフィーは現在最も高度で精密な選択分離が可能と考えられている。しかしタンパク質吸着用カラムが高価なことやその大型化はコストの面から非現実的であること、溶液処理能力が絶対的に小さいことが欠点として挙げられる。

いずれのタンパク質分離法も分離能力については有意と考えられるが、大量処理装置へのスケールアップに伴う装置コスト、操作性の点で問題がある。

1.2 逆ミセル抽出について

前節にてバイオセパレーションに適用されている分離法を列記してきたが、ここでは本論文のテーマである逆ミセル抽出法を取り上げて詳しく説明する。

1.2.1 逆ミセルとは

ある種の界面活性剤を有機相に溶解することによって逆ミセルを形成することができる。Fig.1-1 に逆ミセルの概念図と逆ミセルを形成する代表的な界面活

性剤エーロゾル OT (AOT)の構造式を示す。一般に嵩高い炭化水素鎖を複数有する界面活性剤は、有機相中でその親水基を内側に向け疎水基を外側に向けた球形の分子集合体を形成しやすい。親水基が集まった中心部分には水を保持することができナノメートルサイズの水環境が形成される。つまり有機相に界面活性剤を溶解することによって、例えばタンパク質などの親水性物質を可溶化する微小水相を有機相中につくり出すことができる。

1.2.2 逆ミセルによるタンパク質抽出

このナノメートルサイズの微小水相は、金属微粒子の生成や酵素反応場などにも利用されているが本論文ではタンパク質の液液抽出への利用に着目する。上記利用例でも予想されるように逆ミセルは有機相中で安定に存在し、各種条件を変化させることによりミセルサイズの調節や様々な親水物質の可溶化が可能である。タンパク質の抽出原理としては、表面電荷を有するタンパク質と界面活性剤の親水基との静電的相互作用が主な推進力となりタンパク質が界面に接近し、界面活性剤層を変形しながら有機相中へ移動し、取り囲まれた界面活性剤により逆ミセルを形成して有機バルク相へ拡散する。逆ミセル抽出の生化学物質への適用における主な利点は以下の通りである(長浜ら,2002)。

①タンパク質などの生体高分子は、通常の液液抽出では有機溶媒との接触により変性失活するが、逆ミセル抽出では界面活性剤により保護されて有機相へ抽出されるので、変性せずに分離することができる。

②液液抽出分野において古くから蓄積、確立してきた手法や知識をほとんどすべて応用することができるので実験室規模の基礎実験を経て工業規模へのスケールアップが容易であり、加えて液液抽出で用いられてきた多くの抽出装置の適用が可能である。

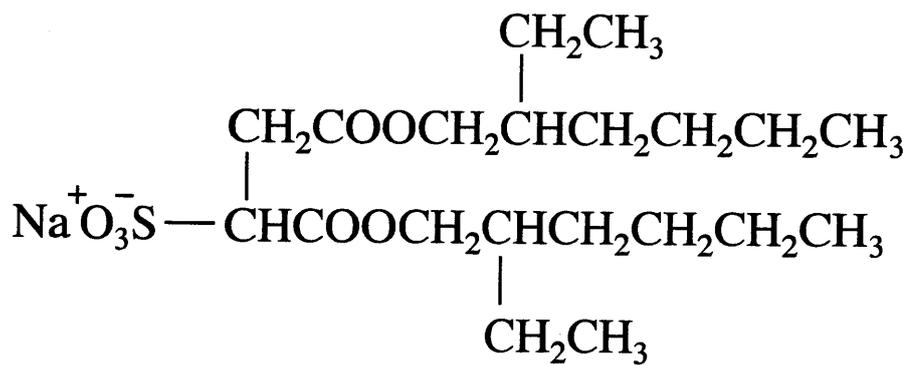
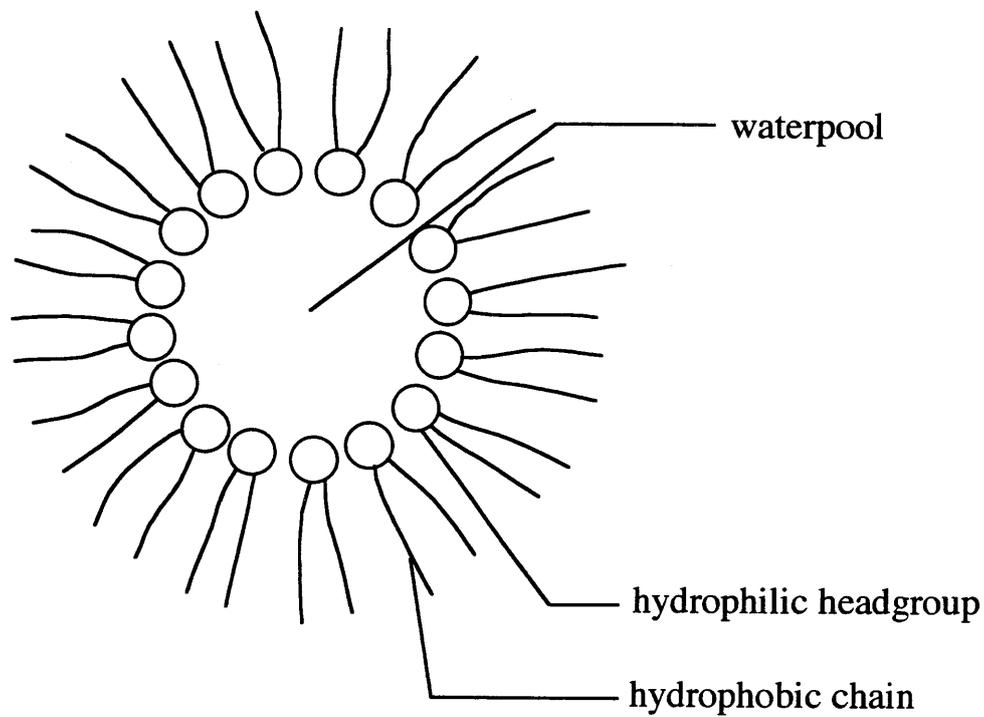


Fig. 1-1 Schematic representation of reversed micelle and structure of Aerosol-OT

③基本的に溶質の二相間の分配の差を利用した分離法なので特別な処理や動力、装置を必要としない省エネルギー的な分離法である。

④水相条件(pH、イオン強度など)や油相条件(界面活性剤の種類、複数の界面活性剤の混合、リガンドの導入、アルコールの添加など)を変えることにより、選択的なタンパク質の油相への取り込み、油相からの取り出しが可能である。

以上の利点を踏まえ、本論文では逆ミセル抽出を生体物質の分離精製におけるダウンストリームプロセッシングとして用いることを前提に研究を進めた。

1.2.3 逆ミセルによるタンパク質抽出のこれまでと今後の研究

歴史的には 1978 年ソビエトの Martinek らが陰イオン性界面活性剤を用いてキモトリプシンやペルオキシダーゼを有機相に可溶化したのが逆ミセルによるタンパク質抽出の最初とされる。翌 1979 年 Luisi を中心としたスイスの研究グループがカチオン性界面活性剤を用いた逆ミセルによりキモトリプシンなど種々のタンパク質を抽出、逆抽出するのに成功している。1985 年マサチューセッツ工科大学の Göklen and Hatton はチトクローム c の AOT 逆ミセル抽出を行い様々な溶液条件での結果を発表した。この当時から盛んになってきた遺伝子組み替えや細胞融合技術などのバイオテクノロジーの発展とともに、世界中で逆ミセルによるタンパク質抽出技術の開発、研究が行われるようになってきた。

現在まで 20 数年にわたり逆ミセルによるタンパク質抽出に関する研究が行われ様々な知識が蓄積されてきた。多くの研究者が正抽出に比べ逆抽出が困難であることを示している(Göklen and Hatton, 1985; Dungan *et al.*, 1991; Bausch *et al.*, 1992; Lye *et al.*, 1994; Nishiki *et al.*, 1996; Pires *et al.*, 1996)。タンパク質の種類によって抽出挙動、逆ミセルにおける抽出位置が変化することがタンパク質の表面特性などにより説明されている(Luisi *et al.*, 1979, 1985, 1988; Adachi and

Harada, 1993; Ichikawa *et al.*, 1996; Naoe *et al.*, 1997; Jarudilokkul *et al.*, 1999; Shiomori *et al.*, 1998a, 2000)。また逆ミセルによる可溶化機構は水、アミノ酸、タンパク質で異なることが分かってきた(Nitsch and Plucinski, 1989; Dungun *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1995)。

ミセル内部でタンパク質の3次構造は変化するが逆抽出過程でリフォルディングされること(Hagen *et al.*, 1990; Kinugasa *et al.*, 1992b; Naoe *et al.*, 1996; Goto *et al.*, 1999)、逆ミセルから回収されたタンパク質の方が原料よりも活性が高くなること(Goto *et al.*, 1996, 1999)など機能を持った逆ミセルの利用が報告されている。逆抽出に関して逆ミセル相にアルコールを添加することによって逆抽出が促進されることも多く報告されている(Pires and Cabral, 1993; Chen and Jen, 1994; Nishiki, 1996; Hong *et al.*, 1997; Hong and Kuboi, 1999)。

非イオン性界面活性剤でもアフィニティリガンドを共用することによりタンパク質の選択的抽出の可能性が示唆されている(Hatton 1989; Chen and Jen, 1994; Shioi *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1998; Adachi *et al.*, 1999)。様々な界面活性剤を用いた混合ミセルによって高分子量タンパク質の抽出が可能であること(Kinugasa *et al.*, 1994; Goto *et al.*, 1996; Shioi *et al.*, 1996; Rong *et al.*, 1998; Shiomori *et al.*, 1999)が多く研究者によって確かめられている。Goto *et al.*(1997)はさまざまなアルキル鎖を有するスルホコハク酸ナトリウムやリン酸系の界面活性剤を合成し抽出特性を調べている。

タンパク質の逆ミセルへの可溶化メカニズムについては、界面変形メカニズム(Dekker *et al.*, 1990; Dungun *et al.*, 1991; Kinugasa *et al.*, 1996)と、界面活性剤がタンパク質表面に結合し疎水性が増すことによって有機相へ可溶化するメカニズム(Paradkar and Dordick, 1994; Adachi and Harada, 1993; Kinugasa *et al.*, 1999)が提案されており、実験結果や解析を基に今なお議論されている。

逆ミセル溶液のパーコレーション挙動を調べることによって逆ミセル間相互作用や逆抽出機構、逆抽出の促進を検討している論文もある(Cassin *et al.*, 1994; Ichikawa *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1997; Hong and Kuboi, 1999)。

速度論的な研究として正抽出速度は水相拡散律速とする報告が多くある(Plucinski and Nitsch, 1989; Dekker *et al.*, 1990; Kinugasa *et al.*, 1991; Nishiki *et al.*, 1998)。これに対して界面可溶化律速(Adachi *et al.*, 1995; Nishiki *et al.*, 1996)や、pH やイオン強度などの溶液条件によって律速段階が決まる(Dungun *et al.*, 1991; Kinugasa *et al.*, 1996)とする報告もある。一方、逆抽出速度は逆ミセルの界面との融合が律速段階とするのが定説となっている(Dekker *et al.*, 1990; Bausch *et al.*, 1992; Nishiki *et al.*, 1998)。

タンパク質抽出挙動に及ぼす水溶液中カチオンの影響についていくつかの論文があるが界面での界面活性剤とカチオンの存在状態や相互作用によって界面特性がどのように変化するかなど詳細な議論はなされていない(Nishiki *et al.*, 1993; Andrews and Haywood, 1994; Shiomori *et al.*, 1998(a), (b); Hamada *et al.*, 2001)。

またタンパク質の逆ミセル抽出に対する装置的な検討として、Dekker *et al.*(1986)のミキサーセトラ、Poppenborg *et al.*(1999)の Graesser contactor、非分散接触装置として Dahuron and Cussler(1988)、Dekker *et al.*(1991)、Prazeres *et al.*(1993)の膜抽出、Luisi(1979)、Armstrong and Li(1988)、Kuboi *et al.*(1990)、Kinugasa *et al.*(1992a)の逆ミセル液膜、塔型抽出装置として Han *et al.*(1994)、Lye *et al.*(1996)のスプレー塔、Carneiro-da-cunha *et al.*(1994)、Tong and Furusaki(1995, 1997)の RDC が報告されているが実用レベルに達していない。

そこで本論文では現在の逆ミセルによるタンパク質抽出の研究状況を基に以下の課題に取り組む。

①工業化を目的とした、逆ミセルを用いたタンパク質の抽出装置の開発

②装置設計に必要な抽出、逆抽出過程に及ぼす各種因子の更なる解明と抽出、逆抽出過程促進のための研究

1.3 本論文の概要

本研究では生体物質の分離法として逆ミセル抽出を採用し、その抽出機構の解明及び抽出装置の開発を行った。本論文は9つの章からなり各章の内容を簡単に説明する。

第1章ではバイオテクノロジーの隆盛から二十年近く経った後のプロテオシクス分野の確立によって、益々生体関連物質の分離・精製の重要性が増している現状と、液液抽出法の利点を継承する逆ミセル抽出がタンパク質分離に適していることを述べた。今までに得られた知見とそこから引き出される利点と欠点を整理することによってタンパク質の逆ミセル抽出特性や抽出機構のより詳細な解析、抽出装置の開発の必要性を示した。

第2章では逆ミセル抽出における界面特性のタンパク質抽出速度への影響について述べる。リゾチーム存在、非存在系での界面張力変化及び水溶液に溶解したカチオン種、濃度の界面張力への影響を検討する。またリゾチームの油相への物質移動速度を測定し界面を特徴づけている界面張力との相関を試みる。

第3章ではタンパク質の選択性、酵素活性、粒子径を決定するために重要な因子である逆ミセルサイズに着目する。以前の研究でAOTとDEHPAのナトリウム塩を用いた混合ミセル系で高分子量タンパク質を可溶化できたため、この混合ミセルの特性を明らかにする。また溶液の粘度測定から混合ミセル径の推算を検討する。

第4章では正抽出、逆抽出が一段プロセスで可能な液膜操作に、キャリアと

して逆ミセルを採用した逆ミセル液膜装置を開発した。各水相に含まれるカチオン種とタンパク質透過挙動の関係を界面活性剤とカチオン種による相互作用の違いから議論する。また液膜操作に最適な溶液条件を模索する。

第5章では大量連続処理を念頭に置き、塔型抽出塔である充填塔への逆ミセル抽出法の適用を試みる。タンパク質は生体内で機能するため機械的剪断力に弱く強い攪拌を用いる装置は避けるべきである。液液充填塔では穏和な混合条件下で抽出され、また分散滴の界面積や接触時間を大きく取れる特長がある。様々な流動条件でタンパク質抽出を行い抽出後のリゾチームの活性変化を測定し、タンパク質分離装置としての適用性を検討する。

第6章では塔型抽出装置として多孔板塔を採用し、タンパク質抽出特性を調べる。多段の多孔板塔では各段で分散滴の分散・合一が繰り返され物質移動が増大することが期待される。また機械的動力部を持たないのでタンパク質に対して穏和で、省エネルギー的な装置である。充填塔、スプレー塔と性能比較することにより、多孔板塔の有用性を論じる。

第7章では液液抽出操作で重要な因子とされる分散滴の合一挙動を AOT 逆ミセル系で測定した。水溶液には価数の異なるカチオンを溶解し、油相には界面活性剤を含む典型的なタンパク質の逆ミセル抽出系で行った。この系では低界面張力系であること、塩を含むことから通常の液液抽出での挙動とは異なると予測される。また第6章で検討した多孔板塔内部を模倣した装置を用いて分散滴が流れ場に存在する時の合一特性を検討する。ここで得た知見から多孔板塔の改良を目指す。

第8章ではタンパク質抽出挙動に及ぼす水相中カチオン種と pH の影響を調べた。一価、二価のカチオンを用い、広い範囲の pH にて抽出率を調べた。界面での界面活性剤とカチオンとの相互作用の形態を模式的に示し、抽出挙動を

議論した。高 pH で抽出されたタンパク質の失活の有無を調べ、抽出条件への適応性を調べた。

第9章では本研究結果を総括する。

References

佐田榮三, 砂本順三編, バイオケミカル・エンジニアリング, 丸善株式会社, pp69-104 (1997)

竹内均編, Newton 別冊図解ヒトゲノム, 株式会社ニュートンプレス (2001. 4)

長浜邦雄, 加藤覚, 乗富秀富, 新しい抽出技術 超臨界・液膜・逆ミセル, 化学工学会監修, 培風館 (2002. 5)

Adachi, M. and M. Harada, *J. Phys. Chem.*, 97, 3631-3640 (1993)

Adachi, M., M. Harada, R. Nishita and A. Shioi, *J. Phys. Chem.*, 99, 8722-8729 (1995)

Adachi, M., M. Harada, A. Shioi and S. Katoh, Proc. ISEC'99, pp107-112 (1999)

Andrews, B. A. and K. Haywood, *J. Chromato. A*, 668, 55-60 (1994)

Armstrong, D. W. and W. Li, *Anal. Chem.*, 60, 86-88 (1988)

Bausch, T. E., P. K. Plucinski and W. Nitsch, *J. Colloid Interface Sci.*, 150, 226-234 (1992)

Carneiro-da-Cunha, M. G., M. R. Aires-Barros, E. B. Tambourgi and J. M. S. Cabral, *Biotech. Tech.*, 8, 413-418 (1994)

Cassin, G., S. Illy and M. P. Pileni, *Chem. Phys. Lett.*, 221, 205-212 (1994)

Chen, J. and J. Jen, *Sep. Sci. Tech.*, 29, 1115-1132 (1994)

Choe, J., V. A. VanderNoot, R. J. Linhardt and J. S. Dordick, *AIChE J.*, 44, 2542-2548 (1998)

Dahuron, L. and E. L. Cussler, *AIChE J.*, 34, 130-136 (1988)

- Dekker, M., K. V. Riet and S. R. Weijers, *Chem. Eng. J.*, 33, B27-B33 (1986)
- Dekker, M., K. V. Riet, B. H. Bijsterbosch, P. Fijneman and R. Hilhorst, *Chem. Eng. Sci.*, 45, 2949-2957 (1990)
- Dekker, M., P. H. M. Koenen and K. Van't Riet, *Trans. IChemE*, 69(PART C), 54-58 (1991)
- Dungan, S. R., T. Bausch, T. A. Hatton, P. Plucinski and W. Nitsch, *J. Colloid. Int. Sci.*, 145, 33-50 (1991)
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton, *Biotechnology Progress*, 1, 69-74 (1985)
- Goto, M., F. Nakashio and T. A. Hatton, Proc. ISEC'96, pp1411-1416 (1996)
- Goto, M., T. Ono, F. Nakashio, T. A. Hatton, *Biotech. Bioeng.*, 54, 26-32 (1997)
- Goto, M., S. Furusaki, T. A. Hatton, Proc. ISEC'99, pp83-88 (1999)
- Hagen, A. J., T. A. Hatton and D. C. Wang,, *Biotech. Bioeng.*, 35, 955-965 (1990)
- Hamada, K., T. Ikeda, T. Kawai and K. Kan-No, *J. Colloid Interface Sci.*, 233, 166-170 (2001)
- Han, D. H., S. Y. Lee and W. H. Hong, *Biotech. Tech.*, 8, 105-110 (1994)
- Hatton, T. A., Surfactant-based Separation, 33, pp55-90 (1989)
- Hong, D., R. Kuboi and I. Komasaawa, *Korean J. Chem. Eng.*, 14, 334-340 (1997)
- Hong, D. and R. Kuboi, *Biochem. Eng. J.*, 4, 23-29 (1999)
- Ichikawa, S., N. Hattori and S. Furusaki, Proc. ISEC'96, pp1423-1428 (1996)
- Jarudilokkul, S., L. H. Poppenborg and D. C. Stuckey, Proc. ISEC'99, pp113-118 (1999)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 2470-2476 (1991)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi, K. Takahashi, H. Takeuchi, Proc. ISEC'90, pp1839-1844

- (1992a)
- Kinugasa, T., K. Watanabe and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 31, 1827-1829
- (1992b)
- Kinugasa, T., A. Hisamatsu, K. Watanabe and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 27, 557-562 (1994)
- Kinugasa, T., Y. Okuda, N. Koishi, K. Kawajiri, K. Nishioka, K. Watanabe and H. Takeuchi, Proc. ISEC'96, pp1417-1422 (1996)
- Kinugasa, T., K. Sanagi, K. Watanabe and H. Takeuchi, Proc. ISEC'99, pp89-94 (1999)
- Kuboi, R., K. Hashimoto and I. Komasa, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 16, 335-342 (1990)
- Luisi, P. L., F. J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wiget and R. Wolf, *Helvetica Chimica Acta*, 62, 740-753 (1979)
- Luisi, P. L., *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.*, 24, 439-450 (1985)
- Luisi, P. L., M. Giomoni, M. P. Pileni and B. H. Robinson, *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 209-246 (1988)
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle, *Chem. Eng. Sci.*, 49, 3195-3204 (1994)
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle, *AIChE J.*, 42, 713-726 (1996)
- Naoe, K., M. Imai and M. Shimizu, *Trans IChemE*, 74, C3, 163-170 (1996)
- Naoe, K., M. Tamai, M. Kawagoe, M. Imai and M. Shimizu, *Trans IChemE*, 75, C2, 143-147 (1997)
- Nishiki, T., I. Sato and T. Kataoka, *Biotech. Bioeng.*, 42, 596-600 (1993)
- Nishiki, T., A. Muto and T. Kataoka, Proc. ISEC'96, pp1435-1440 (1996)
- Nishiki, T., I. Sato, A. Muto and T. Kataoka, *Biochem. Eng. J.*, 1, 91-97 (1998)
- Nitsch, W. and P. Plucinski, *J. Colloid Interface Sci.*, 136, 338-351 (1990)

- Paradkar, V. M. and J. S. Dordick, *Biotech. Bioeng.*, 43, 529-540 (1994)
- Pires, M. J., M. R. Aires-Barros and J. M. S. Cabral, *Biotechnology Progress*, 12 290-301 (1996)
- Pires, M. J., J. M. S. Cabral, *Biotechnology Progress*, 9, 647-650 (1993)
- Plucinski, P. and W. Nitsch, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 93, 994-997, 1989
- Poppenborg, L. H., S. Jarudilokkul and D. C. Stuckey, Proc. ISEC'99, pp101-106 (1999)
- Prazeres, D. M. F., F. A. P. Garcia and J. M. S. Cabral, *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 761-770 (1993)
- Rong, L., T. Yamane and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 31, 434-439 (1998)
- Shioi, A., M. Harada, H. Takahashi and M. Adachi, Proc. ISEC'96, pp1381-1386 (1996)
- Shiomori, K., Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa, *Adv. Biosep. Eng.* 1996-7, 103-107 (1998a)
- Shiomori, K., N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa, *J. Ferm. Bioeng.*, 86, 581-587 (1998b)
- Shiomori, K., Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 32, 177-183 (1999)
- Shiomori, K., Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 33, 800-804 (2000)
- Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 28, 582-589 (1995)
- Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 30, 79-85 (1997)

第2章

逆ミセルによるリゾチーム抽出における油水界面特性

2.1 緒言

逆ミセル抽出を用いることによってタンパク質やアミノ酸を発酵液から有機相へ分離し、抽出されたタンパク質を回収水相と接触することにより有機相から逆抽出することができる。液体クロマトグラフィに比べて逆ミセル抽出法はスケールアップ、プロセス設計が容易であるという利点がある。逆ミセル抽出に関する研究は抽出平衡(Dekker *et al.*, 1986; Kinugasa *et al.*, 1991)、抽出機構(Adachi *et al.*, 1993, Paradkar and Dordick, 1994; Goto *et al.*, 1997)、装置(Dahuron and Cussler, 1988; Han *et al.*, 1994; Lye *et al.*, 1996; Tong and Furusaki, 1997; Nishii *et al.*, 1999)について広く行われている。

しかしタンパク質の界面移動速度についてはほとんど議論されていないのが現状である。Dungan *et al.* (1991)はタンパク質と界面間の静電相互作用による界面変形が油相へのタンパク質移動を促進すると考えた。Nitsch and Plucinski (1990)は逆ミセルの形成・破壊が起こる場である界面を特徴づけている界面張力を測定した。彼らは水、メチレンブルー、電解質の油相への抽出速度の結果を基に2つの異なる界面過程を考えた。水及びメチレンブルーの場合は局所的な負の界面張力により自発的な逆ミセル形成を生じると考えた。また電解質の場合は非常に遅い界面抵抗を含んだプロセスで移動が進行するとした。しかしながら界面張力がタンパク質を含まない系での結果であるため、タンパク質及びカチオンがどの程度界面特性に影響を与えるかは明らかにしていない。

本章ではリゾチームが存在する系としない系での界面張力を測定し、界面特性に及ぼすカチオン種及びリゾチームの影響を調べた。さらに平界面攪拌槽を用いて界面張力測定と同じ塩水溶液系でリゾチームの総括物質移動係数を測定し、界面張力と総括物質移動係数との相関関係を調べた。

2.2 実験

2.2.1 界面張力

ビス 2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム(AOT)は Nacalai Teque Co. Ltd.から購入し精製せずに使用した。有機溶液は AOT を 2,2,4-トリメチルペンタン(イソオクタン)に溶解して調製した。水溶液は所定量の KCl、NaCl、CaCl₂ を蒸留水に溶解して調製した。溶液 pH はそれぞれ KOH、NaOH、Ca(OH)₂ の希釈溶液で 7 に調節した。タンパク質としては Sigma Chemical Co.から購入したリゾチーム(ニワトリ卵白由来、分子量 14,300、等電点 pI=11.0)を用いた。他の試薬は特級試薬を使用した。

水-油間の界面張力は滴重法及び懸滴法により測定した(Ono and Sasaki, 1956, Paddy and Matijevic, 1969)。滴重法^{註1)}では水溶液をガラス製ノズルを通じて油相へ連続的に供給することにより 1 滴の質量とノズル半径から界面張力が得られる。水相を $8.61 \times 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{s}$ の一定流量で供給することによって次の滴が出来るまでの時間間隔から滴体積を容易に知ることが出来る。脱イオン水/イソオクタン系の界面張力で較正したノズル径は 0.88 mm であった。

懸滴法^{註2)}では界面張力は単一滴径の形状を特徴づける最大径と滴先端から最大径の長さ分上方における滴の弦の長さから決定した。ノズル先端に懸滴を維持するために水相供給を一時的に止め、拡大写真を撮影することにより滴の形

と大きさを測定した。ノズル径は脱イオン水/イソオクタン系で較正され、0.72、0.83、0.99 mm であった。両方法において 3 測定以上の平均値として界面張力値を計算した。

2.2.2 リゾチームの物質移動係数

直径 40 mm、高さ 82 mm の攪拌槽をリゾチームの物質移動係数測定に用いた。水相と油相が平界面で接触するようにし、4mm 幅の 4 枚のバツフルを攪拌槽の壁面に取り付けた。等量(50 cm³)の水相、油相を攪拌槽に入れそれぞれの相の中央部に位置する 6 枚タービン翼で攪拌した。攪拌速度は 2.5 s⁻¹とした。10 分間隔で所定量の油相をサンプリングし紫外可視吸光光度計(Shimadzu UV-1200)を使用して 280nm での吸光度からタンパク質濃度を決定した。水相リゾチーム濃度は物質収支から算出した。溶質の正抽出速度は次式のように表される。

$$r_p = -V_w/A (dC_{p,w}/dt) = K_p(C_{p,w} - C_{p,o}/H). \quad (2-1)$$

ここで K_p は総括物質移動係数である。タンパク質の分配係数 H は正抽出条件では大きく、初期油相中タンパク質濃度は小さいので $C_{p,o}/H$ の項は無視できる。式(2-1)を積分して以下の式を得る。

$$\ln(C_{p,w}/C_{p,w0}) = \ln\{(C_{p,w0} - C_{p,o})/C_{p,w0}\} = -(A/V_w)K_p t \quad (2-2)$$

$\ln(C_{p,w}/C_{p,w0})$ 対時間のプロットを結んだ直線の傾きからタンパク質の総括物質移動係数を求めた。

2.3 結果及び考察

2.3.1 滴重法

Fig. 2-1 に 5 種類の KCl 濃度における界面張力対 AOT 濃度のプロットを示す。界面張力測定においてノズルから油相への水相注入速度は小さいので界面の拡張速度は逆ミセル形成速度に比べて十分に遅いため観測された界面張力値は静的界面張力と見なすことができる。水相への KCl の添加により界面張力が大きく減少した原因は、水相中カリウムイオンが解離 AOT 同士の静電反発力を減少させ、界面に吸着する AOT を急激に増加させた結果と考えられる。界面張力は AOT 濃度増加につれてある AOT 濃度で一定になるまで減少した。

AOT の臨界ミセル濃度(cmc)は Figs. 2-1 と 2-2 にプロットした曲線の屈曲点から求めた。図中の矢印はそれぞれの塩濃度での cmc の値である。他のほとんどのイオン性界面活性剤系と同様に cmc は塩濃度と共に減少した。これは周辺のカチオン濃度増加による界面活性剤のヘッドグループ間の静電的反発力の減少(Kondo, 1970)と、塩析効果による AOT の水相から界面への移動が原因と考えられる。

筆者はタンパク質抽出において一般的に採用されている AOT 濃度 0.05 kmol/m^3 を選んだ。すべての塩濃度において AOT 濃度が cmc より大きいということは逆ミセルが油相に存在していることを示している。Figs. 2-1 と 2-2 に示されるように cmc 以上の AOT 濃度において塩濃度の増加と共に界面張力も増加している。この挙動を詳細に調べるために懸滴法を用いて界面張力を測定し直した。その結果は 2.3.2 節で述べる。

Fig. 2-2 に示す NaCl 系では NaCl 濃度 0.4 kmol/m^3 以下で非常に低い界面張力が観測された。AOT 濃度 0.05 kmol/m^3 の溶液と NaCl 濃度 0.1 、 0.4 kmol/m^3 の溶

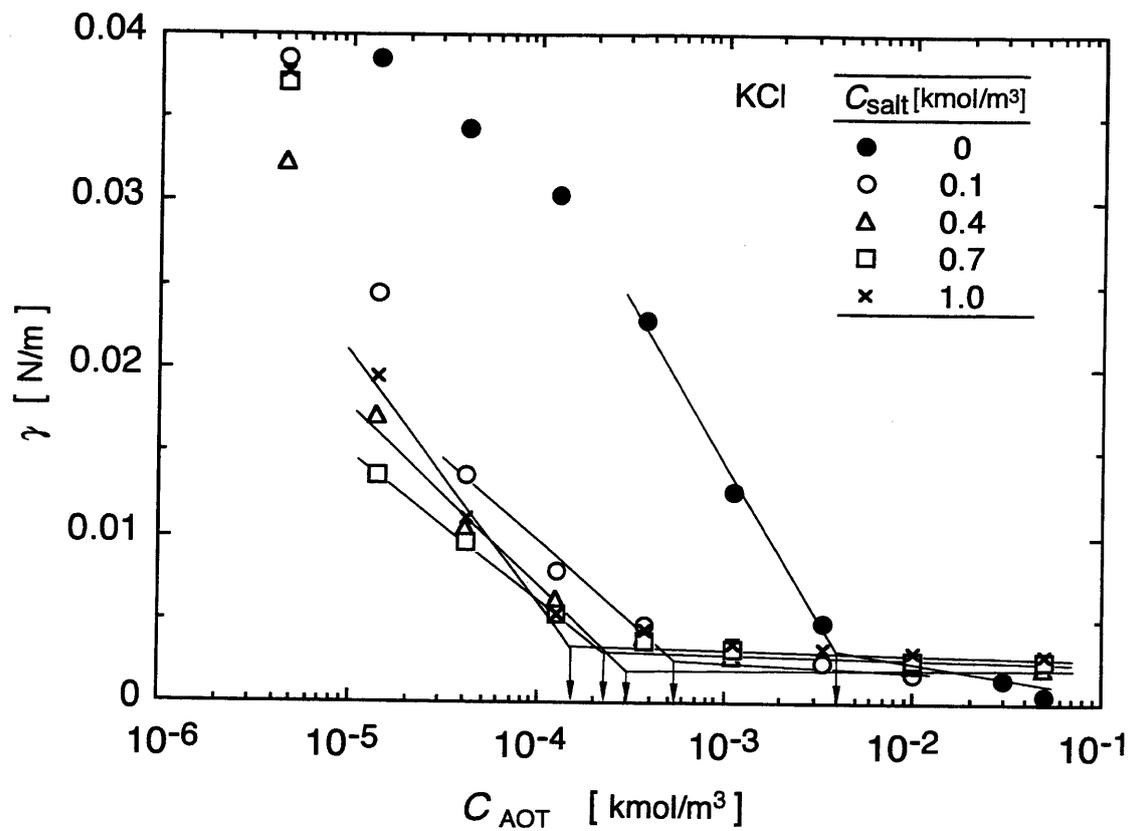


Fig. 2-1 Effect of surfactant concentration on interfacial tension between isooctane and KCl aqueous solution

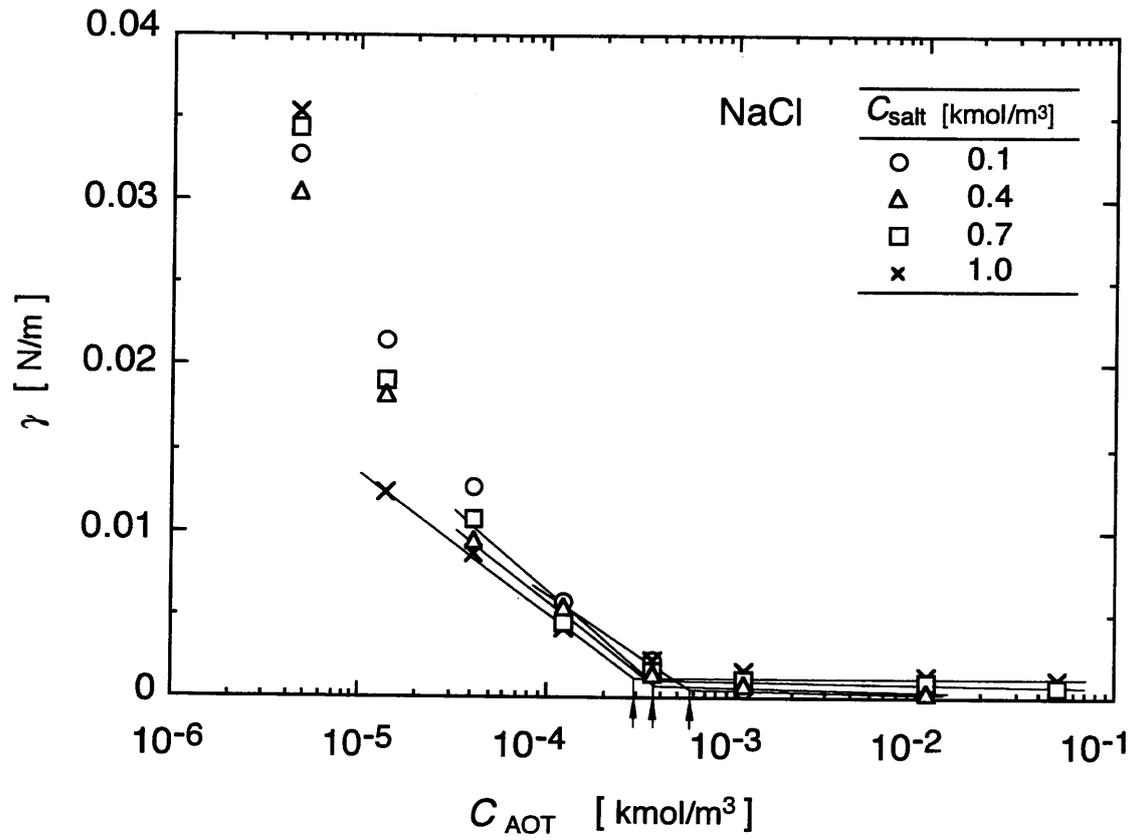


Fig. 2-2 Effect of surfactant concentration on interfacial tension between isooctane and NaCl aqueous solution

液からなる系では滴が小さく不規則な時間間隔で落下した。これは NaCl 系で形成される界面が KCl 系よりも柔軟性が高いことを示す。

リゾチームは界面活性剤と同様に疎水基と親水基の両方を持っているので水相に溶解したリゾチームも界面に吸着すると考えられる。Fig. 2-3 にリゾチーム存在時の KCl 系での界面張力を示す。測定したすべての AOT 濃度範囲にわたって Fig. 2-1 に示されるリゾチームを含まない KCl の系に比べ界面張力は小さくなった。さらに cmc 値はリゾチームの添加によってさらに低くなっている。これはタンパク質が界面を不安定化し逆ミセル形成を促進することを示す。次の2つの観点から界面近傍でのリゾチームの存在位置が予測される。1つはリゾチームが界面活性剤層の中へ挿入され界面活性剤のように作用するモデル、もう1つはリゾチームは水相側界面近傍に存在し界面活性剤層を変形させるモデル(Dungan *et al.*(1991))で、本研究では後者のモデルを採用する。

2.3.2 懸滴法

本実験で用いた装置による滴重法では系の界面張力が小さくなるほど測定誤差が大きくなる。非常に低い界面張力では界面が水相の連続供給による乱れの影響が大きく、また滴は概してノズル径より小さいものが形成される。そこで低い界面張力を測定するために滴の形状から求めることができる懸滴法を適用した。Fig. 2-4 に KCl、NaCl、CaCl₂ の塩濃度に対する界面張力をプロットした。滴重法による KCl 系で観測された結果と同様に3つの系の界面張力は塩濃度の増加と共に増加した。クローズドキーは平衡状態で測定した同じ塩の系でのスピニングドロップ法によって得られた Nitsch and Plucinski (1990)の測定結果である。これらは懸滴法の結果に比べて20~30%程度小さくなっているが、塩の種類による差あるいは塩濃度による界面張力の変化は同様である。

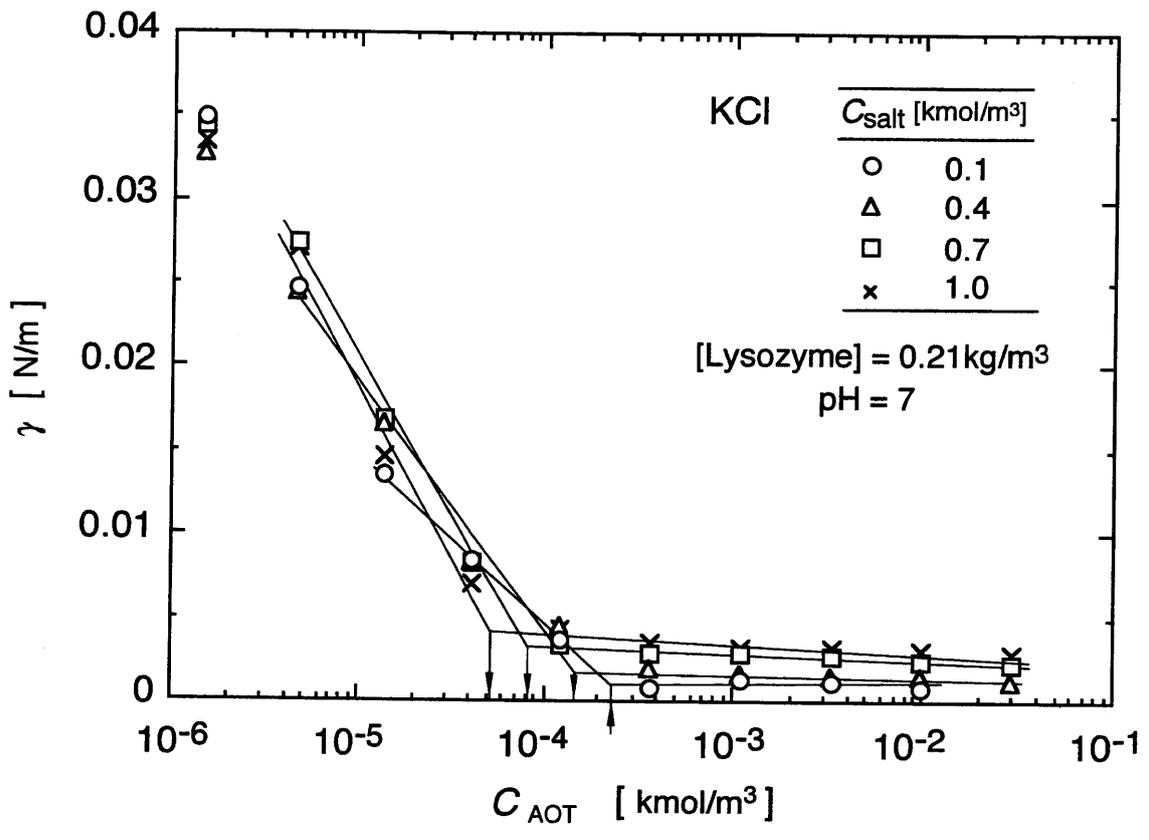


Fig. 2-3 Effect of surfactant concentration on interfacial tension between isooctane and protein aqueous solution

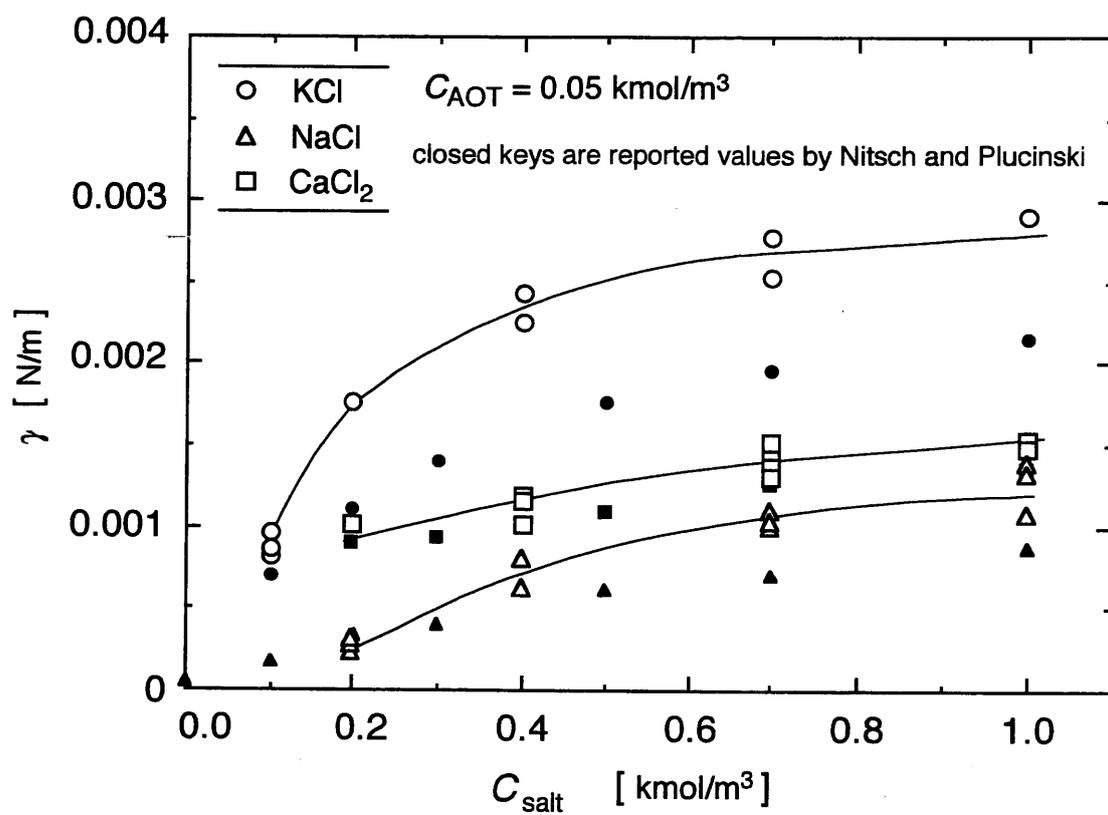


Fig. 2-4 Effect of salt concentration on interfacial tension

界面張力に及ぼす塩濃度の影響は界面-逆ミセル間のカチオンと AOT の平衡の観点から説明することが出来る。AOT 濃度は cmc より高いので油相中に逆ミセルは必ず存在する。



ここで E^+ はカチオン、 S は界面に吸着した AOT、 $(E_m^+ S_m^-)$ は m 個のカチオンと m 個の AOT から成る逆ミセルを示す。カチオン濃度増加によって AOT はカチオンと結合し安定な逆ミセルを形成するため AOT の油相濃度は減少しその結果として界面張力は増加する。

測定した塩濃度の範囲では KCl 系での界面張力は NaCl 系より大きかった。この差はカリウムとナトリウムの水和数の差に起因すると考えられる。界面近傍で AOT と会合しているカチオンはバルク水相中の他のカチオンと簡単に交換可能である。またそのカチオンは水相のカチオンと同様に界面でも水和していると考えられる。イオンの水和数を Robinson and Stokes (1959)の方法に従ってストークス半径から算出した。ここでストークス半径は極限当量伝導度から求めた。Kawaizumi and Miyahara(1967)に報告されている値と同様にカリウム、ナトリウム、カルシウムでそれぞれ 3、5、10 であった。価数を考慮に入れるとカルシウムの水和数はほぼナトリウムと同じになる。

この結果から界面に吸着した AOT の状態を予測した。AOT に会合したカチオンの水和は水相への AOT 会合体の親和性を増加させる。この効果によって界面はより不安定になり、より多くの AOT が界面に吸着できるようになる。このように界面張力は界面の変形しやすさを示す尺度と言える。今回の界面張力測定結果ではカリウム系よりもナトリウム系の方がより柔軟な界面を持って

いることを示している。カルシウム系の界面はナトリウムとカリウムの中間の柔軟性を有していると考えられる。

Fig. 2-5 にリゾチームが水相に存在する系での界面張力を示す。Fig. 2-4 のリゾチームの含まない系と比較して KCl 系のみ大きく変化した。1.0 kmol/m³を除いて他の塩濃度はリゾチームの正抽出条件の範囲にある。KCl 系ではタンパク質の存在によって明らかに界面張力が小さくなっている。これは抽出の際リゾチームがどの程度界面を変形しやすくさせているかを定量的に示した初めての結果と言える。NaCl 及び CaCl₂ 系においてはリゾチーム添加によってほとんど界面張力変化は認められなかった。これはリゾチームを含まない系においてもすでに界面張力が非常に小さく、リゾチーム添加効果が界面張力変化としてほとんど観測されなかったためと考えられる。

2.3.3 リゾチームの総括物質移動係数

Fig. 2-6 に正抽出におけるリゾチームの総括物質移動係数 K_p を示す。カリウム、カルシウムの 0.3kmol/m³ 未満の低い塩濃度域に於いて一定の K_p 値が観測された。これはリゾチームの移動速度が水相境膜での拡散律速であることを示している(Kinugasa *et al.*, 1991)。すべての塩の系で K_p は塩濃度と共に減少した。低い NaCl 濃度では界面張力は非常に小さいのでリゾチーム移動による界面攪乱が K_p の増加をもたらしたと考えられる。界面張力が低い系では K_p が大きくなる、つまり界面がより変形しやすいほどより大きな K_p になると考えられる。

界面過程はリゾチームの可溶化に重要な役割を果たしているので、塩の種類によらず総括物質移動係数 K_p は界面張力と何らかの関係を持つはずである。そこで界面張力に対して K_p をプロットした結果を Fig. 2-7 に示す。すべてのデータが一つの曲線上に載ったことから、リゾチーム濃度と攪拌速度が一定の条件

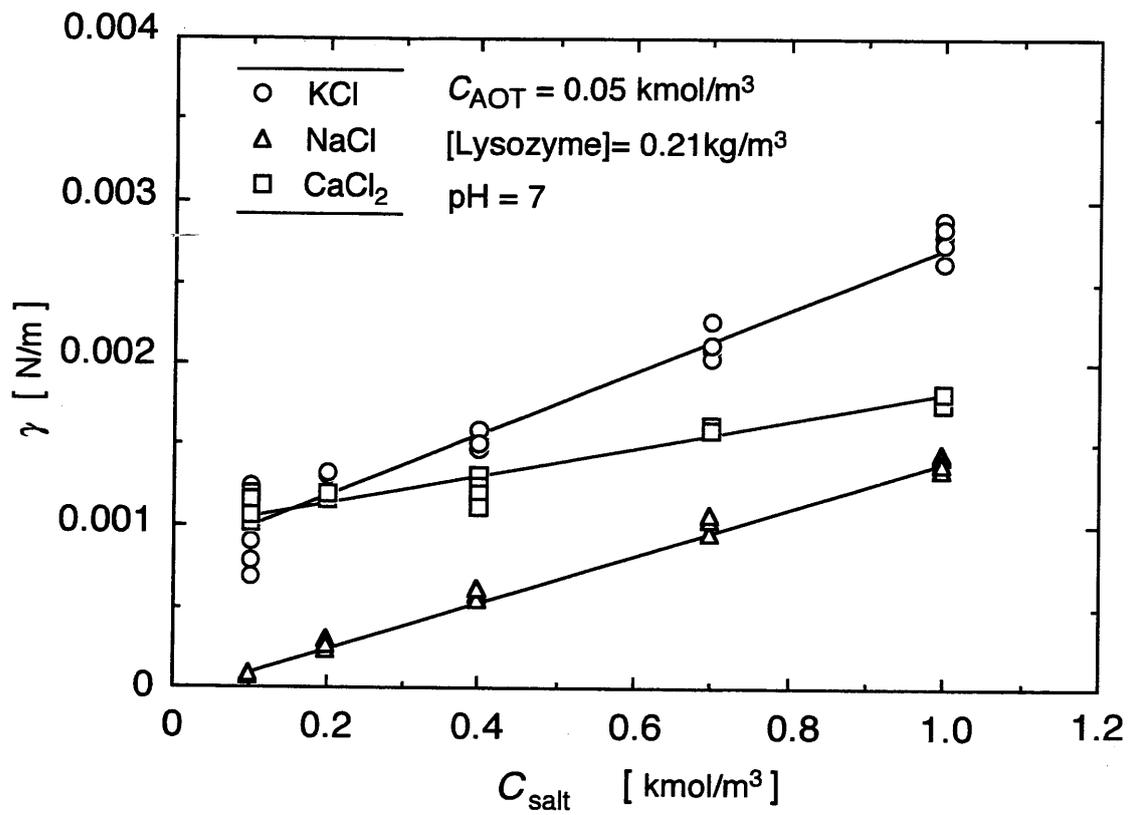


Fig. 2-5 Effect of salt concentration on interfacial tension between isooctane and protein aqueous solution

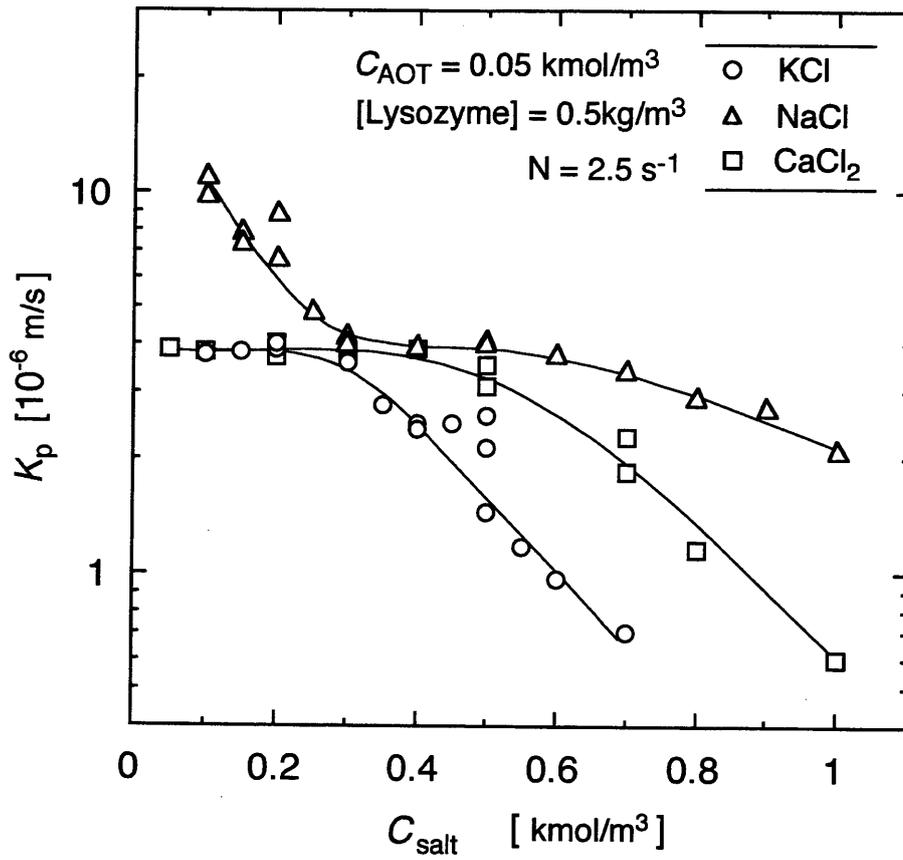


Fig. 2-6 Effect of salt concentration on overall protein mass-transfer coefficient

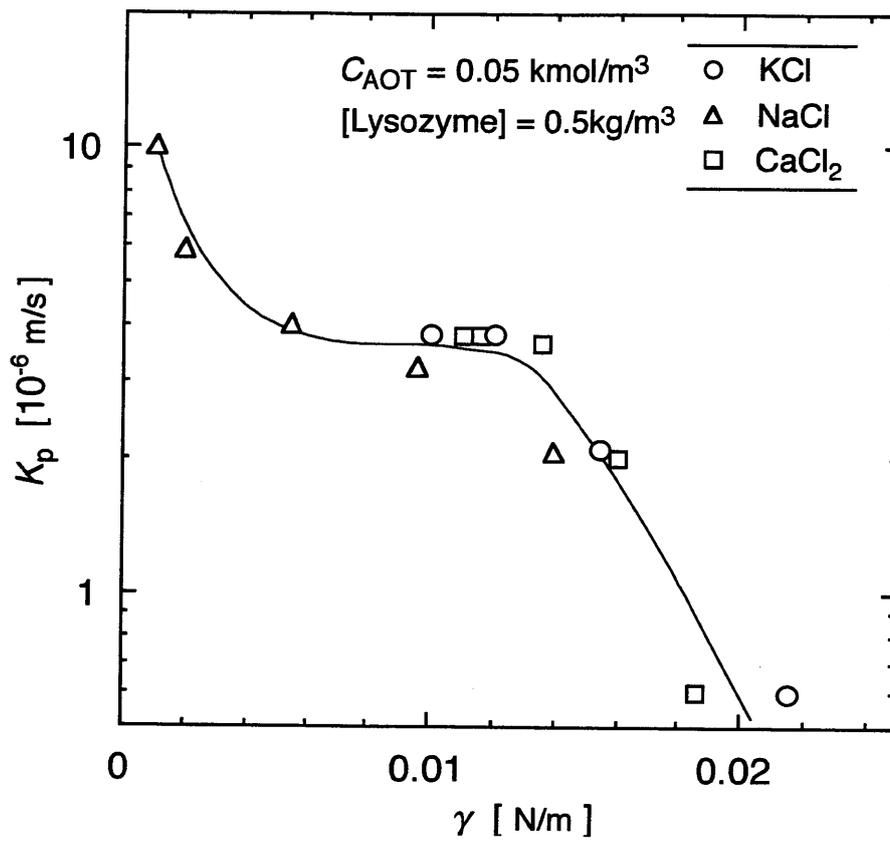


Fig. 2-7 Interfacial tension versus overall protein mass-transfer coefficient

において K_p は各塩の系における界面張力と相関関係を持つことが示された。

2.4 結言

AOT 逆ミセル系での界面張力をリゾチームが水相に存在する場合と存在しない場合で滴重法及び懸滴法を用いて測定した。界面張力に及ぼす塩濃度の影響は界面-逆ミセル間におけるカチオンと AOT の相互作用によって説明された。同じイオン強度では AOT の親水基と結合するカチオンの水和数の違いによって界面張力が変化した。3つの塩における系の界面柔軟性の順序は $\text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{KCl}$ であった。リゾチームの総括物質移動係数は系の界面張力減少と共に増加した。リゾチームの総括物質移動係数と界面張力を一本の曲線で相関することができた。

Nomenclature

<i>A</i>	= interfacial area	[m ²]
<i>C</i>	= concentration	[kmol/m ³]
<i>E</i>	= cation	
<i>H</i>	= distribution ratio of the protein	[-]
<i>K</i>	= overall mass transfer coefficient	[m/s]
<i>S</i>	= surfactant (AOT)	
<i>r</i>	= forward transfer rate	[kmol/(m ² s)]
<i>t</i>	= time	[s]
<i>V</i>	= liquid volume	[m ³]

<Greek>

γ = interfacial tension [N/m]

<Subscript>

E = electrolyte

P = protein

O = organic phase

W = aqueous phase

0 = initial

Appendix

1) 滴重法：ノズルから生成した 1 滴の質量 M とノズル半径 r を用いて次の式から界面張力 γ が計算できる。

$$\gamma = \frac{Mg}{r} F \quad (2-4)$$

補正係数 F は V/r^3 (V は 1 滴の体積) の関数として与えられる。

2) 懸滴法：滴がノズルから垂れた状態の滴径 d_s と滴先端から滴径分上方での滴の弦長 d_c を用いて以下の式から界面張力が計算できる。

$$\gamma = \frac{\rho g d_s^2}{H} \quad (2-5)$$

ここで $1/H$ は d_s/d_c の関数として与えられる。

References

- Adachi, M. and M. Harada, *J. Phys. Chem.*, **97**, 3631-3640 (1993)
- Dahuron, L. and E. L. Cussler, *AIChE J.*, **34**, 130-136 (1988)
- Dekker, M., K. Van't Riet, S. R. Weijers, J. A. Baltussen, C. Laane and B. H. Bijsterbosch, *Chem. Eng. J.*, **33**, B27-B33 (1986)
- Dungan, S. R., T. Bausch, T. A. Hatton, P. Plucinski and W. Nitsch, *J. Colloid Interface Sci.*, **145**, 33-50 (1991)
- Goto, M., T. Ono, F. Nakashio, T. A. Hatton, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 26-32 (1997)
- Han, D. H., S. Y. Lee and W. H. Hong, *Biotechnology Techniques*, **8**, 105-110 (1994)
- Kawaizumi, H. and Y. Miyahara, *Nippon Kagaku Zasshi*, **88**, 937-939 (1967)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 2470-2476 (1991)
- Kondo, T., *Kaimen Kagaku*, Sankyo, p81 (1970)
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. J. Pyle, *AIChE J.*, **42**, 713-726 (1996)
- Nishii, Y., S. Nii, K. Takahashi and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **32**, 211-216 (1999)
- Nitsch, W. and P. Plucinski, *J. Colloid Interface Sci.*, **136**, 338-351 (1990)
- Ono, T. and T. Sasaki, *Jikken Kagaku Kouza vol.7*, Kaimenkagaku, Maruzen, p1 (1956)
- Padday, J. F. and E. Matijevic, *Surface and Colloid Science*, Wiley-Interscience, p39 (1969)
- Paradkar, V. M. and J.S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 529-540 (1994)
- Robinson, R. A. and R.H. Stokes, *Electrolyte Solutions*, 2nd Edition, Butterworth Scientific Publications, p125, p463 (1959)
- Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **30**, 79-85 (1997)

第3章

粘度測定に基づいた AOT-SDEHP 混合ミセル径の推算

3.1 緒言

逆ミセルは非極性溶媒中で形成される界面活性剤分子の自発的凝集体であり、ナノメートルサイズのウォータープールで形成される極性殻に比較的多量の水を可溶化することができる。逆ミセル溶液はタンパク質分離、酵素反応、ナノ粒子調製などに広く応用され研究がなされている。逆ミセルのサイズはタンパク質の選択性、酵素活性、粒子径を決定するために非常に重要な因子である。

AOT は安定な逆ミセルを形成し、その凝集特性が詳細に調べられているもっとも一般的な界面活性剤である。AOT 逆ミセル径の測定は一般に動的光散乱(DLS)や小角 X 線散乱または中性子散乱(SAXS または SANS)を用いて行われており(Zulauf and Eicke, 1979, Kotlarchyk *et al.*, 1982, Pileni *et al.*, 1985)、その値は有機相中における界面活性剤に対する水の濃度比 W_0 に依存することが示されている。しかし AOT 以外の界面活性剤で形成される逆ミセルのサイズ測定に関する報告は少ない。Schurtenberger *et al.* (1993)はレクチン逆ミセルのサイズを DLS によって決定し、同じ W_0 においてレクチン逆ミセルと AOT 逆ミセルではほとんど大きさに差がないことを示した。Nonaka *et al.* (1995)は sodium dioleoyl phosphate で形成される逆ミセルで上記と同じ結果を観測した。非イオン性界面活性剤 Tween 85 で形成される逆ミセルは同じ W_0 で AOT 逆ミセルより小さかった(Komives *et al.*, 1994)。Shioi *et al.* (1991)は sodium di (2-ethylhexyl) phosphate (SDEHP)では W_0 値が 2 から 8 の範囲で円筒状の逆ミセルを形成することを示し

ている。

Kinugasa *et al.*(1994)は AOT と di (2-ethylhexyl) phosphate acid (DEHPA)を混合させることによりタンパク質抽出のための新しい混合ミセル系を開発した。比較的大きな分子量を有し AOT 逆ミセルでは抽出されないヘモグロビンは AOT-DEHPA 混合ミセルによって可溶化される。これはいわゆるサイズ排除効果、つまり混合系での W_0 は同じ条件の AOT 系の W_0 より大きいことが原因と考えられるが、混合ミセルの実際のサイズは明らかでない。本章では AOT 及び AOT-SDEHPA (DEHPA のナトリウム塩)で形成される逆ミセルサイズの決定を逆ミセル溶液の粘度測定に基づいて行った。

3.2 理論

剛体球が懸濁している溶液の粘度は実験データに基づいた以下の式によって懸濁粒子の体積分率と関係づけられる(Cheng and Schachman, 1955)。

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = 2.5\phi + 14.1\phi^2 \quad (0 < \phi < 0.07, 0 < \eta_{sp} < 0.26) \quad (3-1)$$

ここで η_{sp} は溶液の比粘性率、 η と η_0 はそれぞれ溶液及び純溶媒の粘度、 ϕ は溶液中の分散粒子の体積分率を示し、何れも適用範囲内にあった。逆ミセル抽出で逆ミセルを分散粒子とし会合数 n_{ag} を一定とすると次式を導くことができる。

$$\phi = N_A V_m C_m = \frac{N_A V_m C_s}{n_{ag}} \quad (3-2)$$

ここで V_m は逆ミセル1個の体積、 C_m と C_s は逆ミセル及び界面活性剤濃度、 N_A はアボガドロ数である。 V_m と1個の逆ミセルのウォータープール体積 V_{wp} はミセル径 d_m とウォータープールの直径 d_{wp} から以下のように表される。

$$V_m = \frac{\pi d_m^3}{6} \quad (3-3)$$

$$V_{wp} = \frac{\pi d_{wp}^3}{6} \quad (3-4)$$

$$d_m = d_{wp} + 2L_s \quad (3-5)$$

ここで L_s は界面活性剤の長さである。式(3-3)~(3-5)から以下を得る。

$$V_m = \frac{\pi \left[\left(6V_{wp} / \pi \right)^{1/3} + 2L_s \right]^3}{6} \quad (3-6)$$

V_{wp} は水分子1個の体積 V_w と水濃度 C_w に基づいて表される。

$$V_{wp} = \frac{V_w C_w}{C_m} = \frac{V_w C_w n_{ag}}{C_s} \quad (3-7)$$

従って式(3-2)は式(3-6)、(3-7)を用いて

$$\phi = \frac{\pi N_A C_s}{6 n_{ag}} \left[\left(\frac{6 V_w C_w n_{ag}}{\pi C_s} \right)^{1/3} + 2L_s \right]^3 \quad (3-8)$$

となる。また式(3-4)に式(3-7)を代入して整理すると次式を得る。

$$d_{wp} = \left(\frac{6V_w C_w n_{ag}}{\pi C_s} \right)^{1/3} \quad (3-9)$$

ウォータープールの直径と会合数については粘度測定によって式(3-1)から ϕ を求め、式(3-8)から n_{ag} を、式(3-9)から d_{wp} が求められる。ここで L_s はAOTでは 1.2×10^{-9} m、SDEHPでは 1.0×10^{-9} mを用いた(Bonner *et al.*, 1980, Shioi *et al.*, 1991)。混合ミセル系の場合は界面活性剤組成に基づいた平均の L_s が使用できると考えられる。

3.3 実験

陰イオン性界面活性剤としてAOTとSDEHPを使用した。SDEHPは次のように調製した。Daiichi Chemical Ind. Co.から購入したDEHPAを6M塩酸と蒸留水でそれぞれ液を3度交換して洗浄精製した後、メタノールに溶解した水酸化ナトリウムで中和し、得られたSDEHPを真空乾燥機で乾燥した。本研究ではタンパク質としてリゾチームを使用した。

逆ミセル溶液は注入法により調製した。界面活性剤溶液はイソオクタンにAOTとSDEHPを溶解することにより調製し、適量の水をマイクロシリンジで加え、攪拌して透明な溶液を得た。また全界面活性剤に対するSDEHPのモル分率を X_s と定義した。

$$X_s = \frac{SDEHP}{AOT + SDEHP} \quad (3-10)$$

有機相水分量はカールフィッシャー滴定装置により測定し、界面活性剤に対する水の濃度比 W_0 を以下に定義した。

$$W_0 = \frac{C_w}{C_s} \quad (3-11)$$

ここで C_s 、 C_w は有機相中の全界面活性剤濃度及び水濃度である。水分量は水の添加量で調整することができる。

逆ミセル溶液の動粘度は $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保たれた恒温槽中でオストワルド粘度計によって測定し、粘度の算出にはゲイリュサックピクノメーターで測定した溶液の密度を使用した。

3.4 結果及び考察

3.4.1 AOT 系

Fig. 3-1 に注入法でさまざまな水分量 W_0 に調製された AOT 逆ミセル溶液の粘度を示す。粘度は $W_0 = 2$ 以下で一定となった。このことから非常に低い水分量では界面活性剤は逆ミセルを形成しておらず、また添加した水は界面活性剤の親水基に水和されたと考えられる。この結果は次の文献によっても支持される。Manabe *et al.* (1995) は AOT/水/ドデカン系で水の量が少ないとイオン化しない水和物 $\text{AOT}(\text{H}_2\text{O})_2$ が形成され、さらに水を添加すると逆ミセルになることを電気伝導度及び部分モル体積の測定から確証した。Hauser *et al.* (1898) と Goto *et al.* (1992) はそれぞれ NMR 及び熱量測定法の結果に基づいて AOT 分子には 2 つの水分子が強く結合していることを報告している。

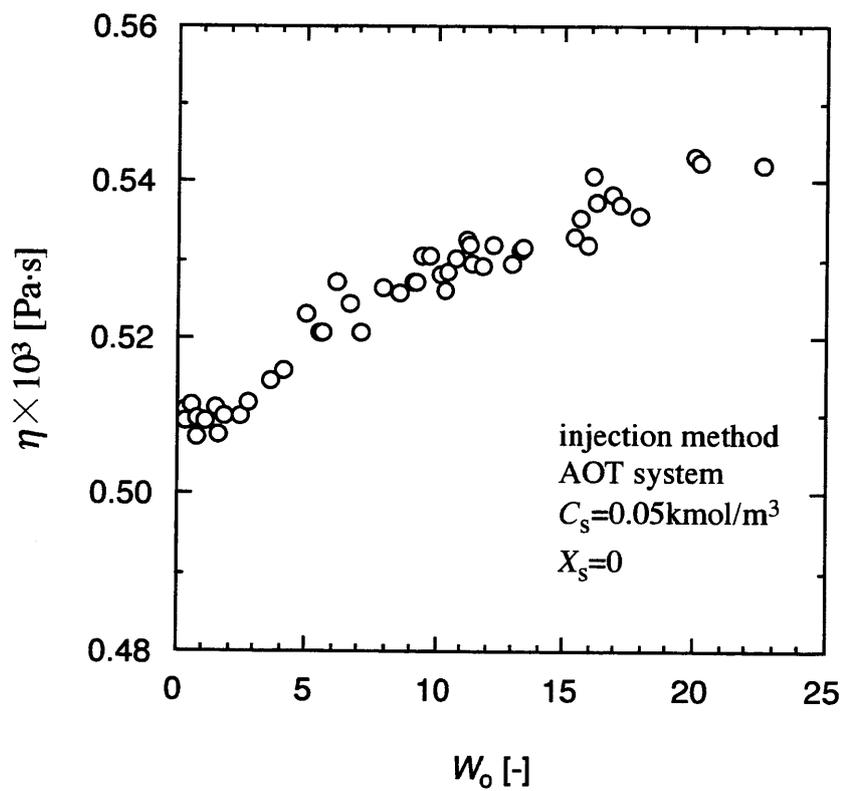


Fig. 3-1 Viscosity of AOT reversed micellar solution prepared by injection method

Fig. 3-2 に粘度から推算したウォータープール直径 d_{wp} と W_o との関係を示す。ここで $W_o < 2$ のデータは逆ミセルが形成されていないと考えられるため除いた。 $C_s = 0.01$ 及び 0.05 M の場合逆ミセル径は次式のように W_o に対して直線的に増加した。

$$d_{wp} = 0.29W_o + 1.1 \quad (2 < W_o < 20) \quad (\text{nm}) \quad (3-12)$$

Fig. 3-2 の実線は式(3-12)による計算値であり、光子相間分光分析(Zulauf and Eicke, 1979)、遠心分離法(Levashov *et al.*, 1982)、時間分解蛍光分析(Zulauf and Eicke, 1979)、NMR(Maitra, 1984)によって以前に報告されている値と良く一致した。 $C_s = 0.2$ M における逆ミセルサイズは C_s が低い濃度時より小さかった。これは逆ミセルの数密度が大きくなることによって逆ミセル同士に生じた相互作用により粘度が大きくなったことが原因と考えられる。強い分子間力によって大きくなった粘度により見かけ上 ϕ が大きくなり n_{ag} や d_{wp} が計算上減少したと考えられる。

逆ミセルの会合数 n_{ag} が W_o の増加と共に増加した結果を Fig. 3-3(a)に示す。図中の実線は静的光散乱測定(Matzke *et al.*, 1992)から求めた n_{ag} を示し、広い W_o 範囲で本実験結果と一致した。

簡単な幾何学モデルに従って、ウォータープール直径は界面活性剤が界面を占める表面積 A_s によって与えられる(Pileni *et al.*, 1985)。

$$d_{wp} = \frac{6V_w W_o}{A_s} \quad (3-13)$$

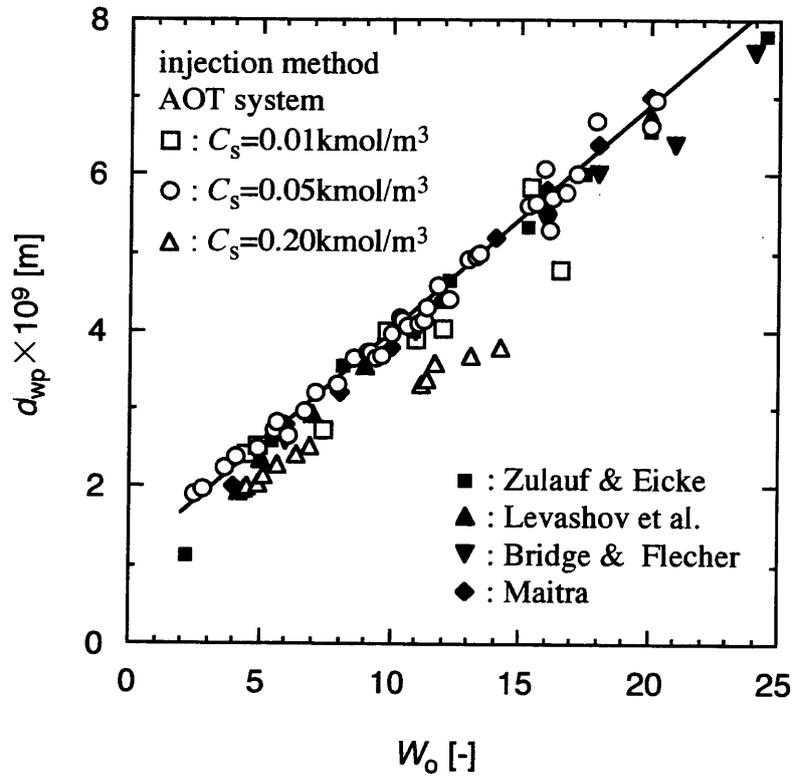


Fig. 3-2 Effect of molar ratio of water to surfactant, W_o , on waterpool size of AOT reverse micelles prepared by injection method. Closed keys are the literature values and solid line shows value calculated from Eq. (3-12)

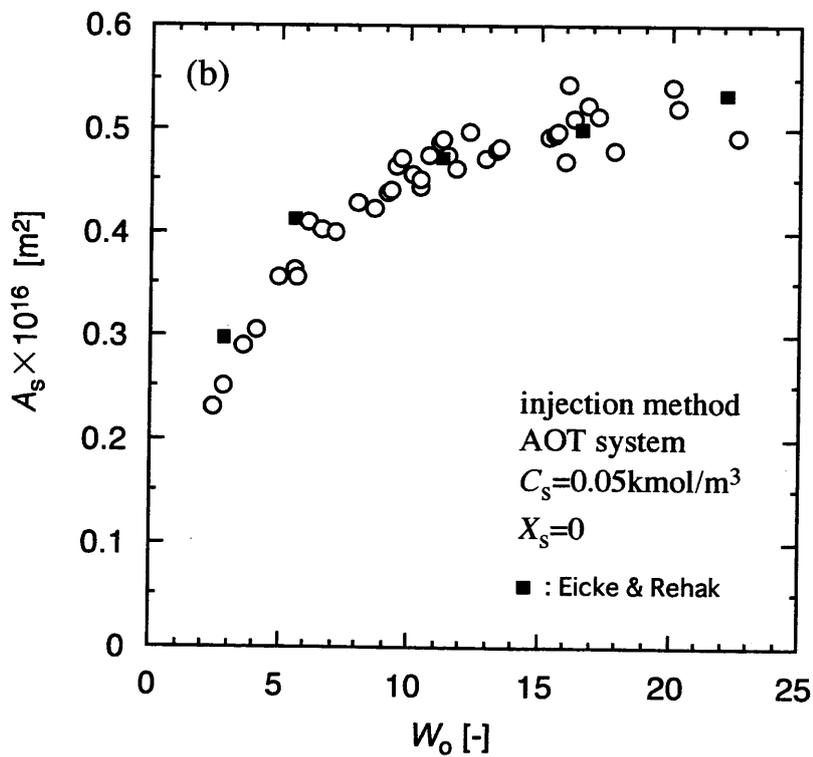
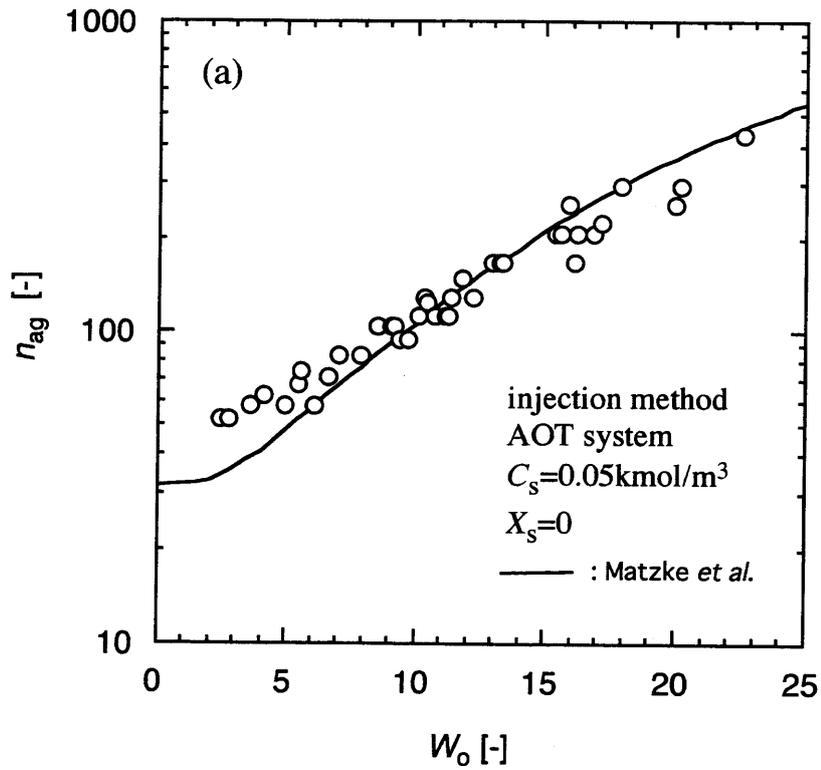


Fig. 3-3 Effect of molar ratio of water to surfactant, W_o , on (a) aggregation number of reverse micelle, n_{ag} , and (b) surface area occupied at micellar interface by surfactant molecule, A_s

式(3-13)から推算された A_s を W_0 に対してプロットし Fig. 3-3(b)に示す。中性子散乱と遠心分離法(Eicke and Rehak, 1976)を組み合わせた方法で得られた文献値と良好な一致を示した。

3.4.2 AOT-SDEHP 系

SDEHP で形成される逆ミセルは円筒形になりやすい(Shioi *et al.*, 1991)。従って AOT-SDEHP 混合界面活性剤で形成される逆ミセルは球形ではないと考えられる。 $W_0=10.5$ の条件で AOT、SDEHP 及び水($=N_A V_w$)のモル体積はそれぞれ $0.390 \text{ m}^3/\text{kmol}$ (Kunrumada *et al.*, 1996)、 $0.310 \text{ m}^3/\text{kmol}$ (Shioi *et al.*, 1991)及び $18 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kmol}$ である。これらの値を用いて Fig. 3-4(a)に全界面活性剤濃度を変化させた場合の逆ミセルの体積分率 ϕ に対する比粘度 η_{sp} の実測結果を種々の SDEHP のモル分率 X_s について示す。逆ミセルが球形である場合に実験データは式(3-1)から求めた計算線と一致することになる。実測値と計算値の一致は $X_s=0$ (AOT のみ)において観測されたが、 X_s の増加と共に実線からのずれが増した。これは以下に記述するように AOT-SDEHP 混合ミセルが非球形であることを示している。

懸濁粒子を含む溶液の固有粘性率は粒子形状に大きく影響される。そこで逆ミセルの非回転軸長に対する回転軸長の比 J の関数として楕円粒子を含む溶液の極限粘性率 $[\eta]$ を表す以下の式を用いた(Eastoe *et al.*, 1993)。

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{sp}}{\phi} \right)_{\phi \rightarrow 0} = 2.5 + 0.4075(J - 1)^{1.508} \quad (3-14)$$

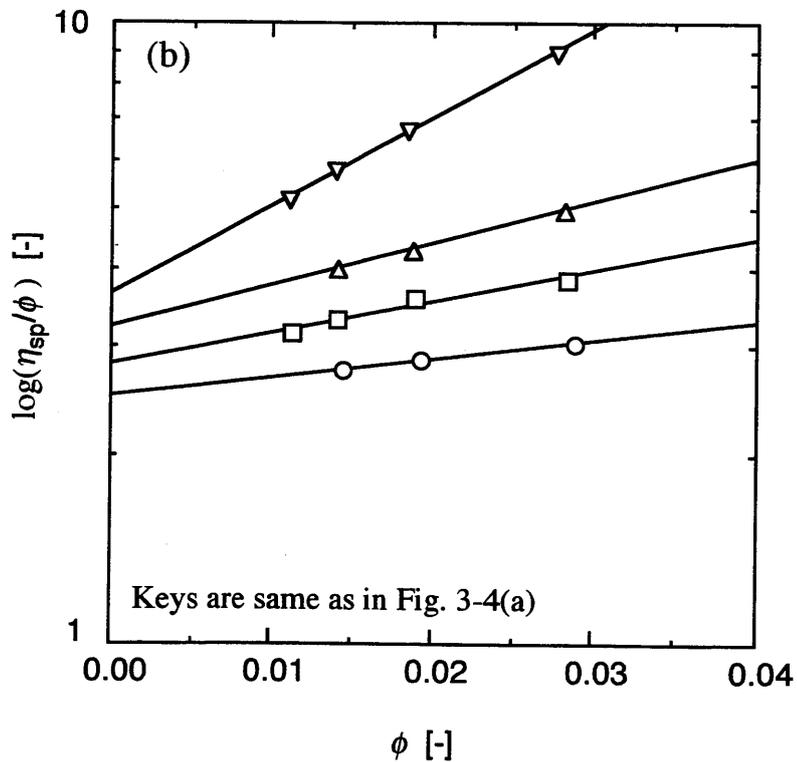
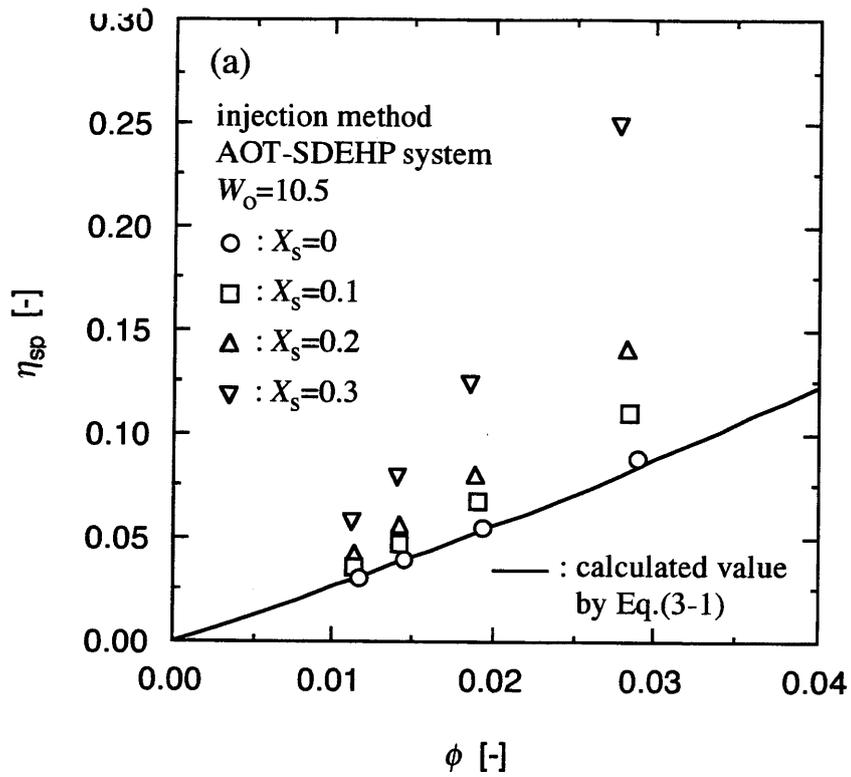


Fig. 3-4 Effect of volume fraction of dispersed drop, ϕ , on (a) specific viscosity, η_{sp} , and (b) relative viscosity, η_{sp}/ϕ , of AOT-SDEHP reversed micellar solution.

Fig. 3-4(b)に ϕ に対する還元粘度の対数值 $\log(\eta_{sp}/\phi)$ の変化を示す。ここで $\phi = 0$ に対する外挿値は限界粘度 $[\eta]$ として定義される。Fig. 3-4(b)でのプロットに直線を引き $\phi=0$ における値から得られた $[\eta]$ と式(3-14)から推算された J を Table 3-1 に示した。AOT-SDEHP 混合ミセルの形状は X_s が大きくなるにつれて球形から楕円形へと変化したことが分かる。

Table 3-1 Shape change of AOT-SDEHP reverse micelles

X_s [-]	$[\eta]$ [-]	J [-]
0	2.5	1.0
0.1	2.8	1.8
0.2	3.2	2.4
0.3	3.6	2.9

球形逆ミセルに対する式(3-8)と(3-9)は楕円形ミセルに対して次のように修正される。

$$\phi = \frac{\pi N_A C_s}{6 J n_{ag}} \left[\left(\frac{6 V_w C_w n_{ag}}{\pi J' C_s} \right)^{1/3} + 2 L_s \right]^3 \quad (3-15)$$

$$L_{wpl} = \left(\frac{6 V_w C_w n_{ag}}{\pi J' C_s} \right)^{1/3} \quad (3-16)$$

ここで L_{wpl} はウォータープールの短軸長、 J' はウォータープールの短軸長に対する長軸長の比を示し、以下のような関係がある。

$$J' = J + \frac{2 L_s (J - 1)}{L_{wpl}} \quad (3-17)$$

ウォータープールの非回転軸長と回転軸長の比は W_0 に依存しないと仮定し Table 3-1 の J から式(3-15)、(3-16)を用いて L_{wp1} 、 L_{wp2} を計算し Fig. 3-5 に示した。逆ミセルサイズは W_0 の増加に対して増大し、 X_s の増加に対して減少した。

3.5 結言

イソオクタン中で AOT 単独系及び AOT-SDEHP 混合界面活性剤によって形成される逆ミセルのサイズ及び形状を粘度測定から決定した。その結果以下の知見を得た。

1. AOT は $W_0 < 2$ ではミセル形成せず、その場合水は AOT の親水基と水和している。粘度法により求められた AOT 逆ミセルのウォータープール直径は文献値と良く一致した。
2. AOT-SDEHP 混合逆ミセルの構造は SDEHP のモル分率増加と共に球形から楕円体に変化した。混合ミセルのウォータープールサイズを粘度測定に基づいて決定することができた。

Nomenclature

A_s	= surface area of occupied by surfactant	[m ²]
C	= solute concentration	[kmol/m ³]
d	= diameter	[m]
J	= ratio of major to minor axis length of reversed micelle	[-]
J'	= ratio of major to minor axis length of waterpool	[-]
L_s	= length of a surfactant	[m]
L_{wp1}	= minor axis length of waterpool	[m]

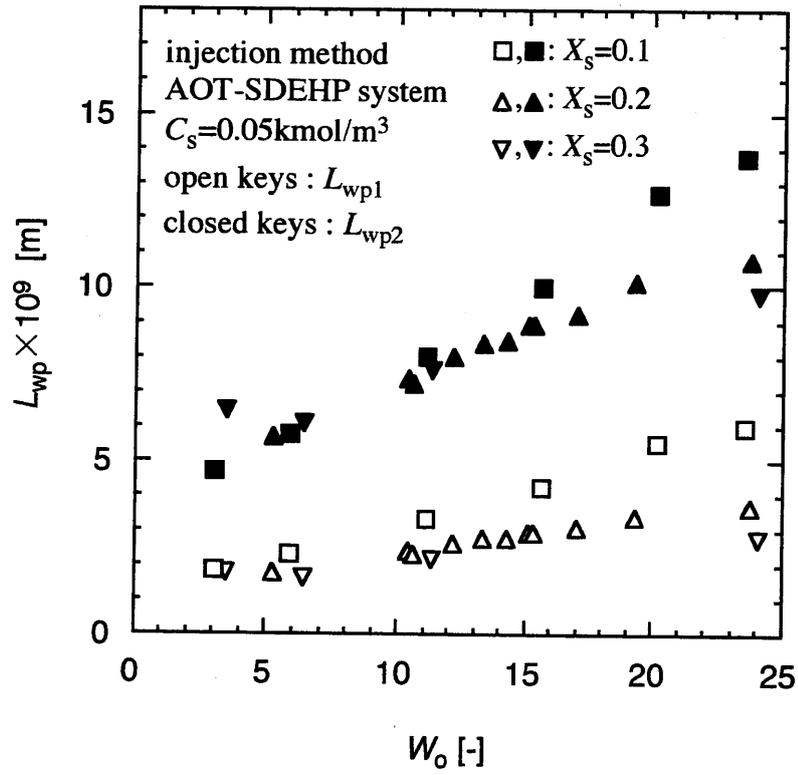


Fig. 3-5 Length of minor axis, L_{wp1} , and major axis, L_{wp2} , of waterpool formed by AOT-SDEHP reverse micelle.

L_{wp2}	= major axis length of waterpool	
N_A	= Avogadro's number	[-]
n_{ag}	= aggregation number	[-]
V_{rm}	= volume of a reversed micelle	[m ³]
V_w	= volume of a water	[m ³]
V_{wp}	= volume of a waterpool	[m ³]
W_o	= water content of organic phase	[-]
X_s	= molar fraction of SDEHP	[-]
ϕ	= volume fraction of dispersed sphere	[-]
η	= viscosity of solution	[Pa•s]
η_0	= viscosity of solvent	[Pa•s]
η_{sp}	= specific viscosity	[-]
$[\eta]$	= intrinsic viscosity	[-]

<subscript>

rm	= reversed micelle
w	= water
s	= surfactant

References

- Bonner, F. J., R. Wolf, P. L. Luisi, *J. Solid-Phase Biochem.*, **5**, 255-268 (1980)
- Cheng, P. Y., H. K. Schachman, *J. Polym. Sci.*, **16**, 19-30 (1955)
- Eastoe, J., T. F. Towey, B. H. Robinson, J. Williams, R. K. Heenan, *J. Phys. Chem.*, **97**, 1459-1463 (1993)

- Eicke, H. F., J. Rehak, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 2883-2891 (1976)
- Goto, A., H. Yoshioka, H. Kishimoto, T. Fujita, *Langmuir*, **8**, 441-445 (1992)
- Hauser, H., G. Haering, A. Pande, P. L. Luisi, *J. Phys. Chem.*, **93**, 7869-7876 (1989)
- Kinugasa, T., A. Hisamatsu, K. Watanabe, H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **27**, 557-562 (1994)
- Komives, C. F., D. E. Osborne, A. J. Russel, *J. Phys. Chem.*, **98**, 369-376 (1994)
- Kotlarchyk, M., S. H. Chen, J. S. Huang, *J. Phys. Chem.*, **86**, 3273-3276 (1982)
- Kurumada, K., A. Shioi, M. Harada, *J. Phys. Chem.*, **100**, 1020-1026 (1996)
- Levashov, A. V., Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, V. Y. Chernyak, K. Marinek, *J. Coll. Interf. Sci.*, **88**, 444-457 (1982)
- Maitra, A., *J. Phys. Chem.*, **88**, 5122-5125 (1984)
- Manabe, M., T. Ito, H. Kawamura, T. Kinugasa, Y. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 775-781 (1995)
- Matzke, S. F., A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. M. Prausnitz, H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 91-102 (1992)
- Nonaka, G., M. Harada, A. Shioi, M. Goto, F. Nakashio, *J. Colloid Interface Sci.*, **176**, 1-6 (1995)
- Pileni, M. P., T. Zemb, C. Petit, *Chem. Phys. Lett.*, **118**, 414-420 (1985)
- Schurtenberger, P., Q. Peng, M. E. Leser, P. L. Luisi, *J. Colloid Interface Sci.*, **156**, 43-51 (1993)
- Shioi, A., M. Harada, K. Matsumoto, *J. Phys. Chem.*, **95**, 7495-7502 (1991)
- Zulauf, M., H. F. Eicke, *J. Phys. Chem.*, **83**, 480-486 (1979)

第4章

逆ミセル液膜を通してのタンパク質透過挙動

4.1 緒言

生体物質の分離・精製プロセスは生化学工業において重要な役割を果たしている。逆ミセル抽出は効率的で選択性を有する手法として注目されている。この方法によるとタンパク質の連続分離・濃縮が可能で、容易にスケールアップが出来るという利点を持っている。今までにタンパク質抽出平衡(Dekker *et al.*, 1989, Kinugasa, *et al.*, 1991)、抽出速度(Kinugasa, *et al.*, 1991, Dekker *et al.*, 1990)、抽出機構(Dungan *et al.*, 1991, Kinugasa *et al.*, 1996)、逆抽出機構(Nishiki, *et al.*, 1996)など逆ミセル抽出法に関する数多くの研究が行われている。しかしながら逆ミセル抽出法を用いた装置に関する研究は少ない(Dekker *et al.*, 1986, Tong and Furusaki, 1995; 1997, Lye *et al.*, 1996, Nishii *et al.*, 1999)。逆ミセルをタンパク質のキャリアとして用いる液膜は溶液の大量処理に適用されている(Armstrong and Li, 1988, Kuboi *et al.*, 1990a, Kinugasa *et al.*, 1992)。その液膜中の逆ミセルはタンパク質だけでなくカチオンをも輸送することが予想される。したがってタンパク質の油水間の分配平衡は水相のカチオン種によって影響を受けると考えられる。それゆえに水相、膜相間のカチオン交換挙動は膜を通るタンパク質輸送の挙動に何らかの変化を生じさせると考えられる。本研究では逆ミセルをキャリアとした液膜を通るタンパク質の透過挙動を3種類のカチオン実験系で検討した。さらに各相へのカチオン移動を調べることによってタンパク質透過機構を提案した。

4.2 実験

Fig. 4-1 に使用した液膜透過セルを示す。フィード及び回収水相の容積はいずれも 22 cm^3 であった。両相をマグネティックスターラーにて 1300 rpm で攪拌した。界面積は両方とも 7.4 cm^2 であった。膜相 25 cm^3 を脈動ポンプ (Masterflex, Cole-Parmer Ins. Co.) で $27 \text{ cm}^3/\text{min}$ の流量で循環させた。本実験で検討した実験系を Table 4-1 にまとめる。フィード溶液にはモデルタンパク質として 0.5 kg/m^3 の濃度でリゾチームを溶解させた。フィード溶液のイオン強度を KCl または NaCl を用いて 0.3 kmol/m^3 に調節した。フィード溶液の pH は HCl、KOH、NaOH 水溶液を用いて KCl 溶液の場合は 6.8、NaCl 溶液の場合は 8.0 に調節した。これらのイオン強度、pH はリゾチームが逆ミセルへ正抽出されるのに適した条件である。回収水溶液には KCl または BaCl_2 を 1.0 kmol/m^3 の濃度で溶解し、pH を KOH または $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水溶液で 12 に調節した。この pH はリゾチームの逆抽出に適した条件である。膜溶液は AOT を 0.05 kmol/m^3 になるようにイソオクタンに溶解して調製した。KCl-KCl 系では膜液として AOT イソオクタン溶液を前処理せずに使用した。一方、NaCl-KCl 系、KCl- BaCl_2 系では膜液を予めタンパク質を含まないフィード溶液と 24 時間接触させることによって水相のカチオンと AOT の対イオンとをイオン交換させた。各相のタンパク質濃度は紫外可視吸光光度計 (Shimadzu UV-160) を用いて 280nm の吸光度から決定した。各相のカチオン濃度は蛍光分光分析機 (Shimadzu AA-6400F) 及び ICP (Thermo Jarrel Ash IRIS) により測定した。膜相中の水分量はカールフィッシャー滴定装置 (HIRANUMA AQV-5S) により測定した。

4.3 結果及び考察

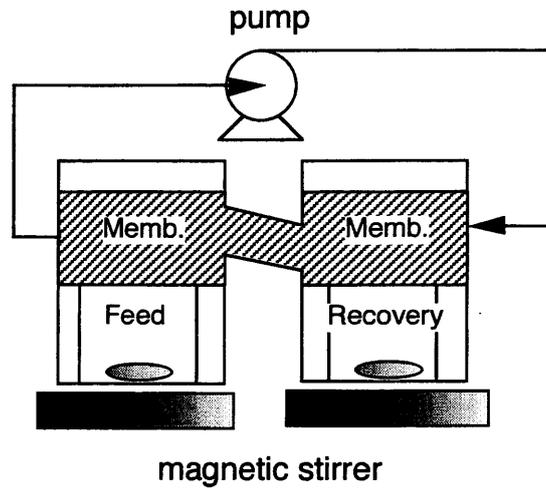


Fig. 4-1 Schematic diagram of permeation cell

Table 4-1 Experimental conditions for three systems

phase	KCl-KCl system	NaCl-KCl system	KCl-BaCl ₂ system
Feed	0.3kmol/m ³ KCl 0.5kg/m ³ lysozyme pH=6.8	0.3kmol/m ³ NaCl 0.5kg/m ³ lysozyme pH=8.0	0.3kmol/m ³ KCl 0.5kg/m ³ lysozyme pH=6.8
Membrane	0.05kmol/m ³ AOT	0.05kmol/m ³ AOT presaturated with feed soln.	0.05kmol/m ³ AOT presaturated with feed soln.
Recovery	1.0kmol/m ³ KCl pH=12.0	1.0kmol/m ³ KCl pH=12.0	1.0kmol/m ³ BaCl ₂ pH=12.0

4.3.1 カチオン移動

カチオン移動は Fig. 4.2 に示すようにイオン交換と水交換の2つの要因から起こる。イオン交換は水相側界面における水相中カチオンと AOT 対イオンの交換として定義される。あるカチオン種は界面で水相から油相へ AOT 対イオンとして輸送され、あるカチオン種はその逆方向に輸送される。水交換は逆ミセル内核水とバルク水相との交換と定義される。ミセルが界面で壊れる時、内核水はバルク水相へ放出され、界面でミセルが形成される時、バルク水相がミセル中へ取り込まれる。水交換過程に於いてカチオンもまた溶解したイオンとして一緒に輸送される。

4.3.1.1 KCl-KCl 系

Fig. 4-3(a)は KCl-KCl 系におけるフィード水相、膜相、回収水相でのカチオン濃度の経時変化を示す。初期にはナトリウムイオンは AOT 対イオンとして膜中にしか存在しない。膜中ナトリウム濃度はフィード相及び回収水相界面でのイオン交換によって減少した。それに伴ってフィード相と回収水相のナトリウム濃度は膜中カリウム濃度と共に増加を示した。イオン交換速度が膜中ナトリウム濃度に比例すると仮定すると、膜相、フィード相、回収水相中イオンの物質収支は次のように与えられる。

$$-\frac{V_M}{A} \frac{dC_{Na,M}}{dt} = (k_F + k_R) C_{Na,M} \quad (4-1)$$

$$\frac{V_F}{A} \frac{dC_{Na,F}}{dt} = k_F C_{Na,M} \quad (4-2)$$

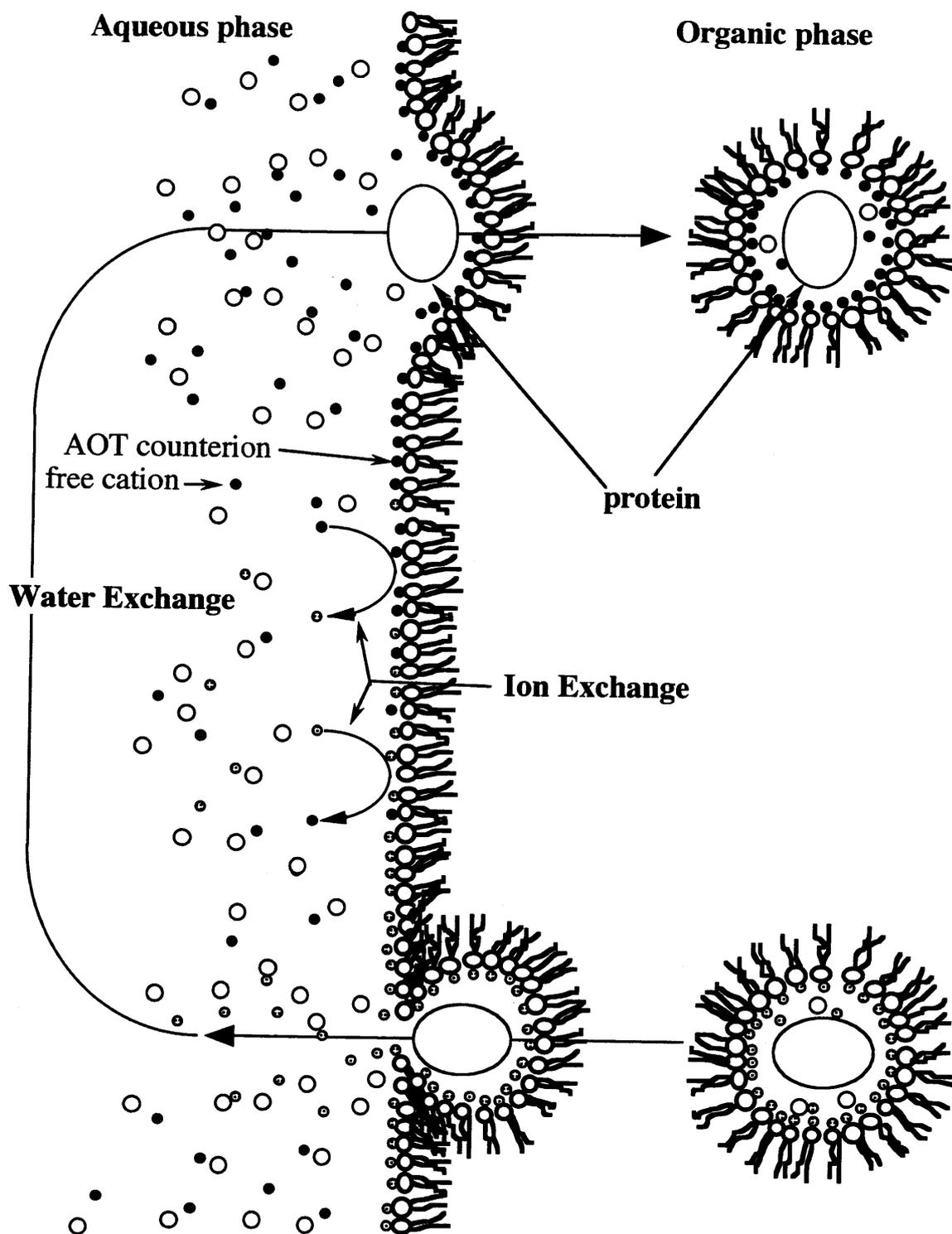


Fig. 4-2 Scheme of cation transfer in the presence of protein transfer

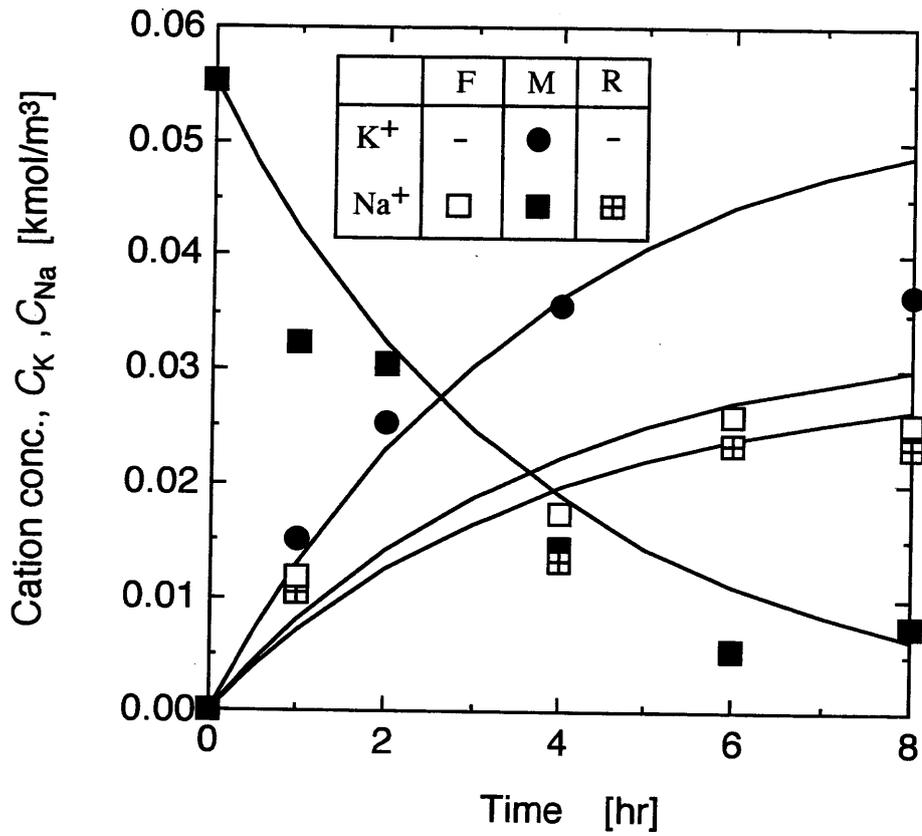


Fig. 4-3(a) Time course of cation concentration for KCl-KCl system
: Solid curves are values calculated by Eq. (4-5)-(4-8)

$$\frac{V_R}{A} \frac{dC_{Na,R}}{dt} = k_R C_{Na,M} \quad (4-3)$$

ここで V は相体積、添字 M 、 F 、 R はそれぞれ膜相、フィード相、回収水相を示す。 A は界面積でフィード側、回収側で同じである。 C は濃度、 k_F 及び k_R はフィード相及び回収水相界面におけるイオン交換速度定数である。ナトリウムイオンとカリウムイオンのイオン交換は 1 対 1 で起こるので膜中カリウム濃度は次のようになる。

$$C_{K,M} = C_{Na,M,0} - C_{Na,M} \quad (4-4)$$

式(4-1)~(4-3)は初期条件($t=0$ 、 $C_{Na,M}=C_{Na,M,0}$)を用いて積分できる。

$$C_{Na,M} = C_{Na,M,0} \exp(-Pt) \quad (4-5)$$

$$C_{Na,F} = \frac{k_F A}{V_F} \left[-\frac{1}{P} \{ \exp(-Pt) - 1 \} \right] C_{Na,M,0} \quad (4-6)$$

$$C_{Na,R} = \frac{k_R A}{V_R} \left[-\frac{1}{P} \{ \exp(-Pt) - 1 \} \right] C_{Na,M,0} \quad (4-7)$$

$$C_{K,M} = \{ 1 - \exp(-Pt) \} C_{Na,M,0} \quad (4-8)$$

ここで

$$P = \frac{A}{V_M} (k_F + k_R).$$

Fig. 4-3(a)の実線は式(4-5)~(4-8)による計算値である。フィード相側及び回収水相側のイオン交換速度定数はフィッティングによりそれぞれ $k_F=1.3 \times 10^{-6}$ m/s 及び $k_R=1.2 \times 10^{-6}$ m/s であった。これはフィード相界面でのミセル破壊速度が回収水相側より僅かに大きいことを示している。膜中の $C_{K,M}$ の増加と $C_{Na,M}$ の減少はカリウムイオンとナトリウムイオンで AOT 対イオンの交換が起こったことを示している。ここでほとんどのカチオン移動が AOT 対イオンのイオン交換で起こり、水交換による変化は重要でないことを示す。もしすべて水交換でカリウムイオンが移動したと仮定し、 $t=6\text{hr}$ での含水率 $9[-]$ (Fig.4-5(a))とフィード相、回収相のカリウムイオン濃度の平均値 $(0.3+1.0)/2=0.65\text{mol/l}$ から換算すると最大油相カリウムイオン濃度は 0.0053mol/l となり実測値の約 $1/7$ になる。よってほとんどのカリウムイオンの移動は界面でのイオン交換であると考えた。以降他の系においても同様のことが言えると考えられる。

タンパク質が存在しない場合、タンパク質存在下に比べ両水相におけるナトリウム濃度変化は約半分であった(データは示していない)。この結果はタンパク質の存在によって Na-K 間イオン交換速度が促進されるためであると考えられる。これはタンパク質が AOT 吸着界面を不安定化することを示し、ミセル形成や破壊を促進させると考えられる。Dungan *et al.* (1991)は AOT 吸着界面の変形はタンパク質の界面への接近によって起こり、それがミセル形成を助けていることを指摘している。タンパク質を含んだミセルの界面特性は単なる油-水界面特性とは異なると予測される。このように界面が不安定になることによって界面でミセルが形成され易くなると考えられる。

4.3.1.2 NaCl-KCl 系

Fig. 4-3(b)は NaCl-KCl 系における各相のカチオン濃度の経時変化を示す。

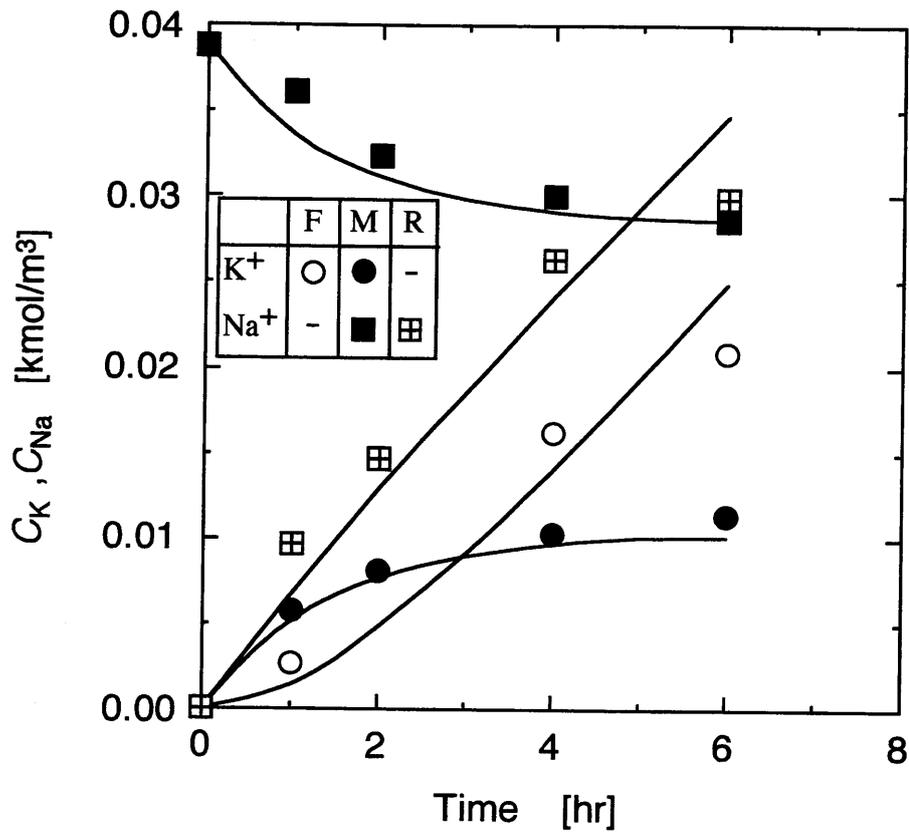


Fig. 4-3(b) Time course of cation concentration for NaCl-KCl system : Solid curves are values calculated from Eqs. (4-12)-(4-15)

膜中ナトリウム濃度の減少は KCl-KCl 系に比べて小さかった。これはナトリウムイオンがフィード相から供給されるからだと考えられる。また膜中ナトリウム濃度の減少量は膜中カリウム濃度の増加量に対応している。KCl-KCl 系に比べ膜中ナトリウム濃度は高いために回収水相のナトリウム濃度の増加速度が大きくなったと考えられる。膜中ナトリウムイオンの物質収支から次式が得られる。

$$-\frac{V_M}{A} \frac{dC_{Na,M}}{dt} = k_{Na-K} C_{Na,M} - k_{K-Na} C_{K,M} \quad (4-9)$$

ここで k_{K-Na} はフィード相界面での AOT 対イオンのカリウムとフィード相中ナトリウムとのイオン交換速度定数で、 k_{Na-K} は回収水相界面での AOT 対イオンのナトリウムと回収水相中カリウムとのイオン交換速度定数である。フィード相のカリウムと回収水相のナトリウムの物質収支から以下の式が得られる。

$$\frac{V_F}{A} \frac{dC_{K,F}}{dt} = k_{K-Na} C_{K,M} \quad (4-10)$$

$$\frac{V_R}{A} \frac{dC_{Na,R}}{dt} = k_{Na-K} C_{Na,M} \quad (4-11)$$

式(4-9)~(4-11)は式(4-4)を用いれば初期条件($t=0$, $C_{Na,M}=C_{Na,M,0}$)により積分される。

$$C_{Na,M} = \frac{1 + \alpha e^{Pt}}{(1 + \alpha) e^{Pt}} C_{Na,M,0} \quad (4-12)$$

$$C_{\text{Na,R}} = k_{\text{Na-K}} \frac{A}{V_{\text{R}}} \left\{ -\frac{1}{P} (e^{-Pt} - 1) + \alpha \right\} \frac{C_{\text{Na,M,0}}}{1 + \alpha} \quad (4-13)$$

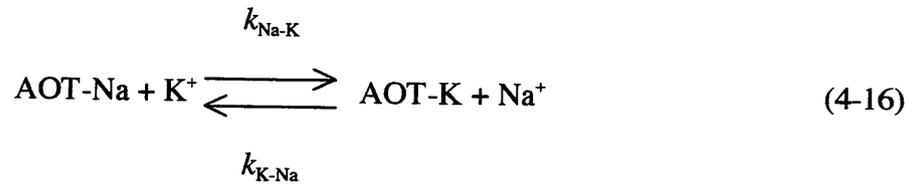
$$C_{\text{K,F}} = k_{\text{K-Na}} \frac{A}{V_{\text{F}}} \left[t - \frac{1}{1 + \alpha} \left\{ -\frac{1}{P} (e^{-Pt} - 1) \right\} \right] C_{\text{Na,M,0}} \quad (4-14)$$

$$C_{\text{K,M}} = \frac{e^{Pt} - 1}{(1 + \alpha)e^{Pt}} C_{\text{Na,M,0}} \quad (4-15)$$

ここで

$$P = \frac{A}{V_{\text{M}}} (k_{\text{K-Na}} + k_{\text{Na-K}}), \quad \alpha = \frac{k_{\text{K-Na}}}{k_{\text{Na-K}}}$$

Fig. 4-3(b)の実線は式(4-12)~(4-15)による計算値である。イオン交換速度定数はそれぞれ $k_{\text{K-Na}} = 4.13 \times 10^{-6}$ m/s、 $k_{\text{Na-K}} = 1.49 \times 10^{-6}$ m/s であった。これらの値は AOT 対イオン-バルク水相カチオン間のイオン交換速度を表している。



イオン交換速度定数 $k_{\text{Na-K}}$ は KCl-KCl 系の k_{R} に相当すると考えられる。しかし $k_{\text{Na-K}}$ は k_{R} の 1.24 倍であった。これはミセルの開閉速度が KCl-KCl 系より NaCl-KCl 系の方が大きいことを示している。NaCl-KCl 系では KCl-KCl 系とは異なりミセル界面にある大部分の AOT が Na-AOT の形で存在している。またフィード相界面においても AOT は Na-AOT の形で存在している。おそらくこれらの理由によって $k_{\text{Na-K}}$ が大きくなったと考えられる。

4.3.1.3 KCl-BaCl₂系

Fig. 4-3(c)に KCl-BaCl₂ 系についての結果を示す。膜中のバリウムイオン濃度 $C_{Ba,M}$ は時間と共に増加したがフィード相中 $C_{Ba,F}$ はほとんど観測されなかった。Takahashi *et al.* (1989)はイオン交換サイトと結合した二価カチオンの結合速度は一価カチオンと同じだが、脱離速度は二価カチオンの方が遅いことを報告している。よって回収水相側ではバリウムイオンは、カリウムイオンの代わりに AOT の親水基と結合し、両界面で AOT から脱離しないと考えられる。Fig. 4-3(c)において3時間で $C_{Ba,M}$ は AOT 当量以上の濃度になっている。そこでバリウムイオンがミセル中で以下の2つの状態で存在することを仮定し考察した。1つは内核水にイオンとして溶解する。もう1つは AOT 対イオンとして存在する。後に述べるようにこの系での油相中水分濃度は AOT 濃度の約6倍なので 1.0 kmol/m^3 BaCl₂ 溶液が内核水に直接入っていると考えると油相中バリウム濃度は AOT 濃度の約 1/10、つまり最大 0.005 kmol/m^3 となる[†]。従ってほとんどのバリウムイオンは AOT 対イオンとして油相中に存在している計算になる。

[†]油相体積を $V [l]$ とすると $[AOT]=0.05 \text{ [mol/l]}$ と $W_o=6 [-]$ より $[H_2O]_o=0.3 \text{ [mol/l]}$ で H_2O は $0.3V \text{ [mol]}$ 存在する。

水相中の H_2O 濃度は約 55 [mol/l] なので油相中の全内核水の合計は $0.3V/55=0.005V [l]$ に換算される。 $0.005V [l]$ の 1.0 [mol/l] BaCl₂ が油相に入っているため油相中濃度は最大 $[BaCl_2]_o=0.005 \text{ [mol/l]}$ となる。

Fig. 4-4(a)に示すように AOT とバリウムイオンが2対1で結合するとしたら、油相バリウム濃度 $C_{Ba,M}=0.025 \text{ kmol/m}^3$ の時すべての AOT は消費される。バリウム濃度がこの濃度以上の時 Fig. 4-4(b)のように1対1で AOT と結合する。さらに油相中カリウム濃度はバリウム濃度増加によりわずかにしか減少していない。これは Fig. 4-4(c)に示すように AOT-Ba-K という結合を形成するためと考え

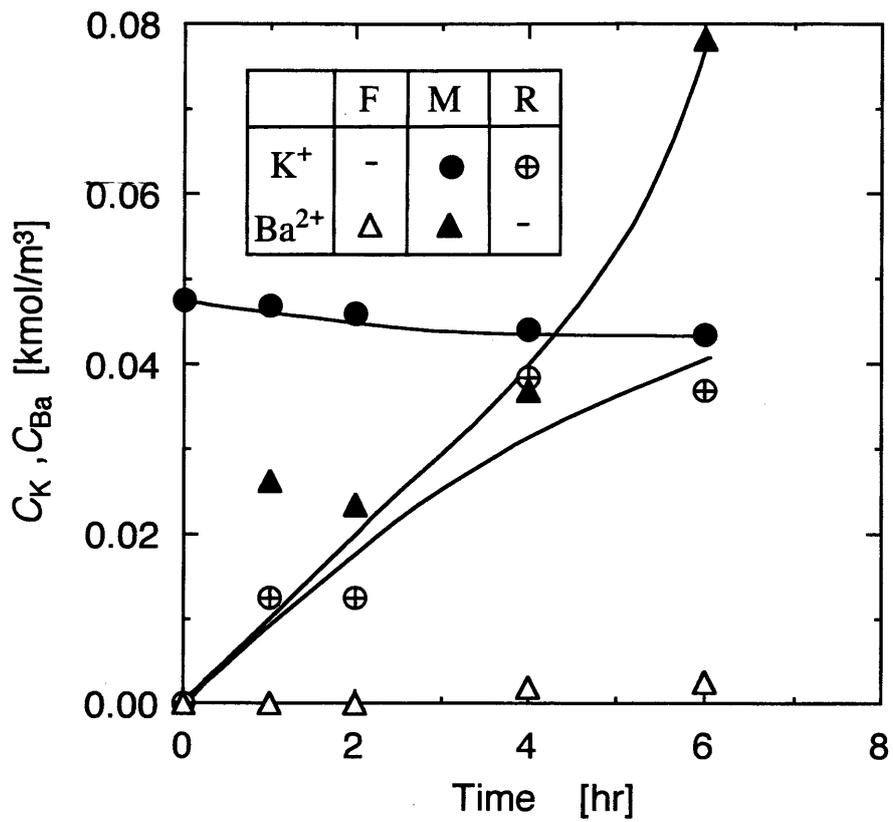


Fig. 4-3(c) Time course of cation concentration for KCl-BaCl₂ system

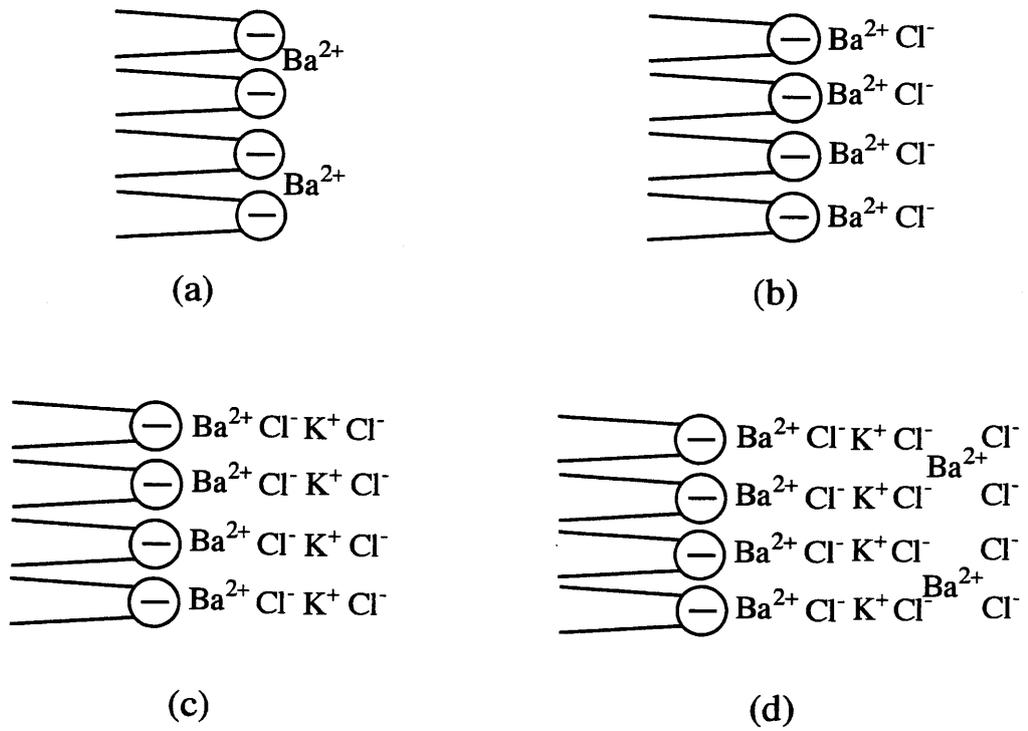


Fig. 4-4 Schematic representation of Combinations of AOT with ions in the micelle

られる。6時間後には AOT 当量の約 4 倍のカチオンが存在している。これは Fig. 4-4(d)に示すように AOT-Ba-K-Ba 層が形成されていることを示している。時間と共に $C_{K,R}$ が増加したのはカリウムイオンのフィード相から回収水相への透過を意味する。おそらくカリウムイオンは AOT とは直接結合せずバリウム層から比較的脱離し易いと考えられる。また $C_{K,M}$ の減少はフィード相からカリウムが供給されるためわずかであった。全体としてのイオン移動は後に議論する(Fig. 4-7 参照)。

4.3.2 水分量

KCl-KCl 系での油相中水分量の経時変化を Fig. 4-5(a)に示す。 W_o は AOT 1 分子に対する水分子の割合を表し、油相中の水濃度と AOT 濃度の比として定義される。 W_o はフィード相側、回収水相側で逆ミセルが形成されるため 4 時間経過するまで増加した。4 時間に於いて膜相は塩水溶液に対応した定常状態に達した。Fig. 4-5(b)に NaCl-KCl 系及び KCl-BaCl₂ 系での結果を示す。いずれの系も膜相を予めフィード相で飽和しているため W_o の初期値は高かった。ナトリウムを含むミセルはもっとも大きな W_o を示し、次にカリウム、もっとも小さいのがバリウムだった。NaCl-KCl 系において時間と共に W_o が減少するのはカリウムを含むミセルが増加するからである。カリウムを含むミセルがナトリウムを含むミセルより小さいことは文献に報告されている(Kinugasa *et al.*, 1991, Kuboi *et al.*, 1990a)。KCl-BaCl₂ 系で時間と共に W_o が減少したのは膜中にバリウムを含む小さいミセルが形成されたことを示している。すべての系における W_o は 4 時間後のフィード相、回収水相を別々に油相と平衡到達させた場合の平均値 $W_{o,av}=(W_{o,F}+W_{o,R})/2$ と等しくなっている。以上の結果から逆ミセルのサイズは KCl-BaCl₂ < KCl-KCl < NaCl-KCl の順で大きくなることが分かつ

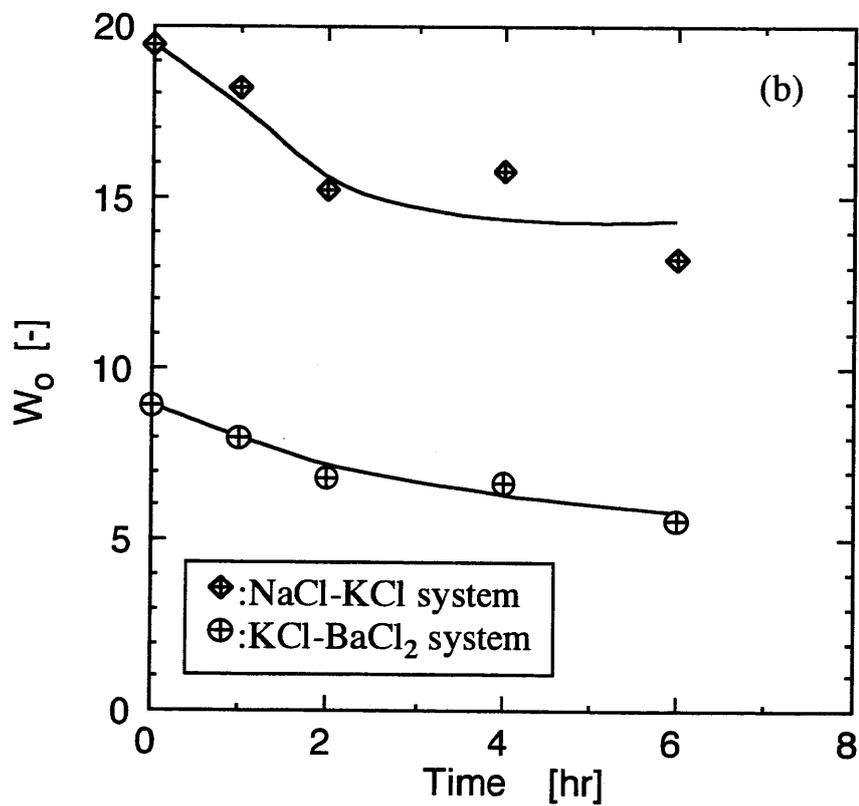
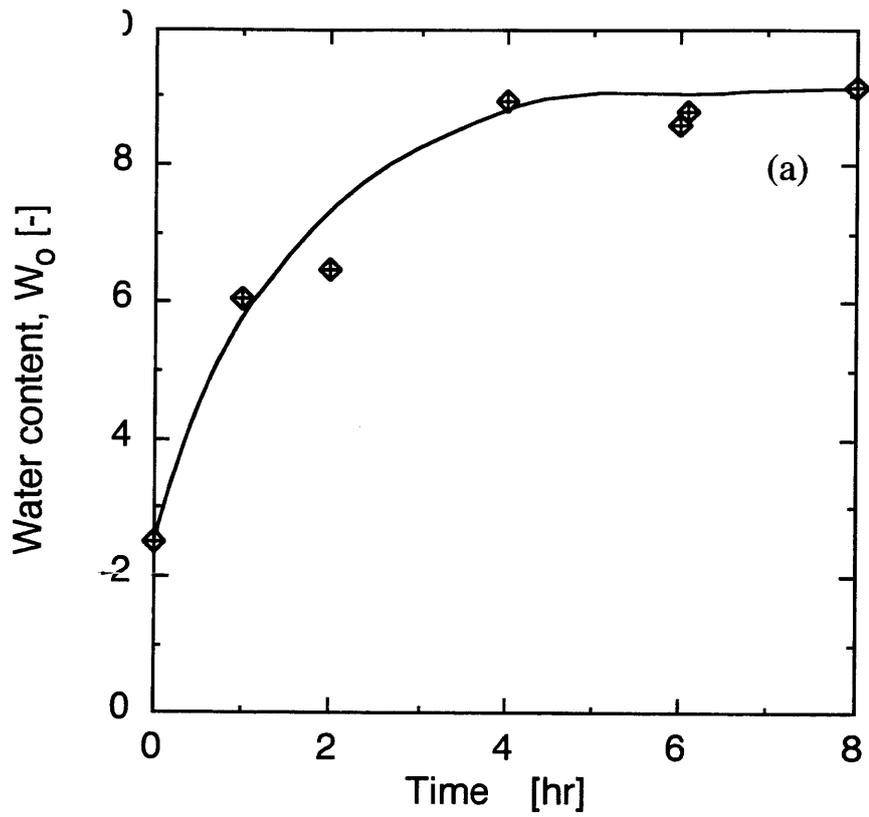


Fig. 4-5 Time course of water concentration for KCl-KCl system (a), for NaCl-KCl and KCl-BaCl₂ systems (b)

た。

4.3.3 タンパク質輸送

4.3.3.1 KCl-KCl 系

Fig. 4-6(a)に KCl-KCl 系における各相のタンパク質濃度の経時変化を示す。フィード相のタンパク質濃度は膜相への抽出の結果として減少し、回収水相濃度は膜相からのタンパク質の放出によって増加した。フィード相、膜相、回収水相のタンパク質の物質収支は以下のように表せる。

$$-\frac{V_F}{A} \frac{dC_F}{dt} = k_{PF}(C_F - C_F^*) \quad (4-17)$$

$$\frac{V_M}{A} \frac{dC_M}{dt} = k_{PF}(C_F - C_F^*) - k_{PR}C_M \quad (4-18)$$

$$\frac{V_R}{A} \frac{dC_R}{dt} = k_{PR}C_M \quad (4-19)$$

ここで C はタンパク質濃度を、添字はそれぞれの相を、 k_{PF} 、 k_{PR} はそれぞれフィード相側、回収水相側のタンパク質総括物質移動係数を表す。式(4-17)~(4-19)は初期条件($t=0$, $C_F=C_{F,0}$, $C_M=C_{M,0}$)と $C_F^* \approx 0$ を用いて以下のように積分できる。

$$C_F = C_{F,0} \exp\left(-\frac{k_{PF}A}{V_F} t\right) \quad (4-20)$$

$$C_M = \exp\left(-\frac{V_R}{V_M} P_R t\right) \left\{ \left(\frac{V_F P_F C_{F,0}}{V_R P_R - V_M P_F} \right) \left\{ \exp\left[\left(\frac{V_R}{V_M} P_R - P_F\right) t\right] - 1 \right\} + C_{M,0} \right\} \quad (4-21)$$

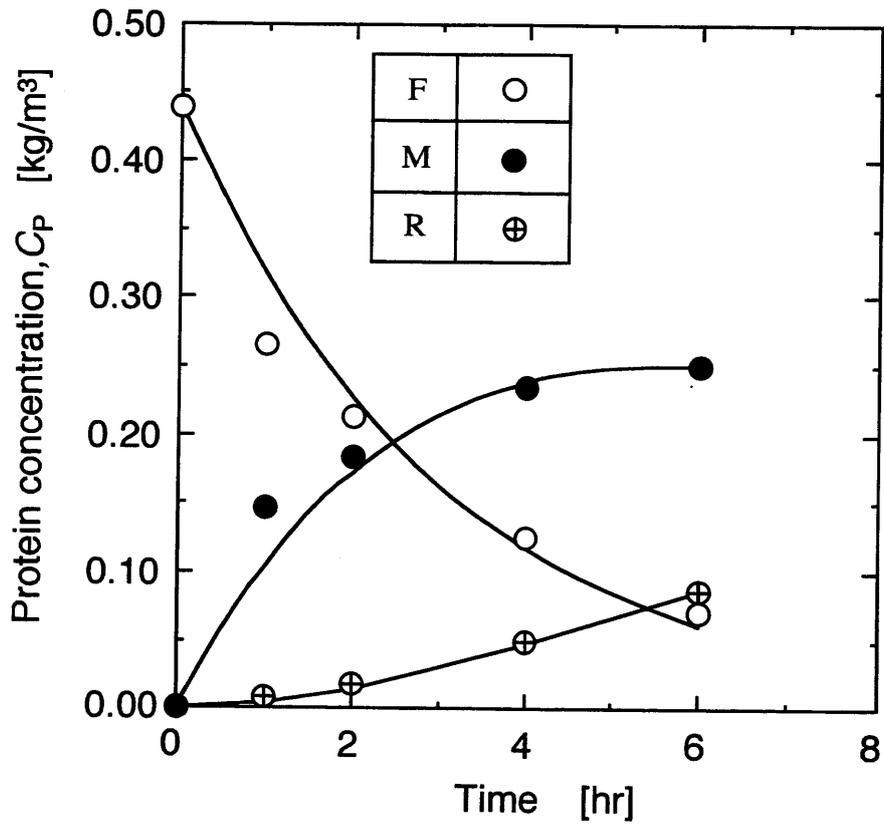


Fig. 4-6(a) Time course of protein concentration for KCl-KCl system
: Solid curves are values calculated by Eq. (4-20)-(4-22)

$$C_R = \frac{1}{V_R} (C_{F,0}V_F - C_F V_F - C_M V_M). \quad (4-22)$$

ここで

$$P_F = \frac{A}{V_F} k_{PF}, P_R = \frac{A}{V_R} k_{PR}.$$

式(4-20)~(4-22)による計算値を Fig. 4-6(a)に実線で示す。 k_{PF} 、 k_{PR} の値はそれぞれ 2.7×10^{-6} m/s、 6.3×10^{-7} m/s であった。タンパク質放出速度はタンパク質取り込み速度よりずっと小さい。それゆえに膜相へのタンパク質の蓄積が起こった。これは液膜を用いたタンパク質分離における不利な点のひとつであるが、Fig. 4-6(a)に示されるようにある程度は液膜を通してタンパク質透過が起こっている。

4.3.3.2 NaCl-KCl 系

Fig. 4-6(b)に NaCl-KCl 系での結果を示す。 k_{PF} の値は 4.61×10^{-6} m/s で初期の3つの実験点から式(4-20)を用いて求めた。この値は KCl-KCl 系より大きくなった。NaCl 水溶液/AOT イソオクタンで形成される界面は KCl 水溶液/AOT イソオクタンでの界面より柔軟性があることを示している。 C_{PF} は急速に減少しているが C_{PR} はほとんど増加しなかった。 C_{PM} を物質収支より求め破線に示した。また実測値の C_{PM} は4時間で顕著に小さくなった。この時膜中に大きな凝集物が目視で観察された。これは NaCl-KCl 系の膜相中ではミセルが不安定になることを示している。

4.3.3.3 KCl-BaCl₂ 系

Fig. 4-6(c)に KCl-BaCl₂系での結果を示す。式(4-20)より算出された k_{PF} は 2.56

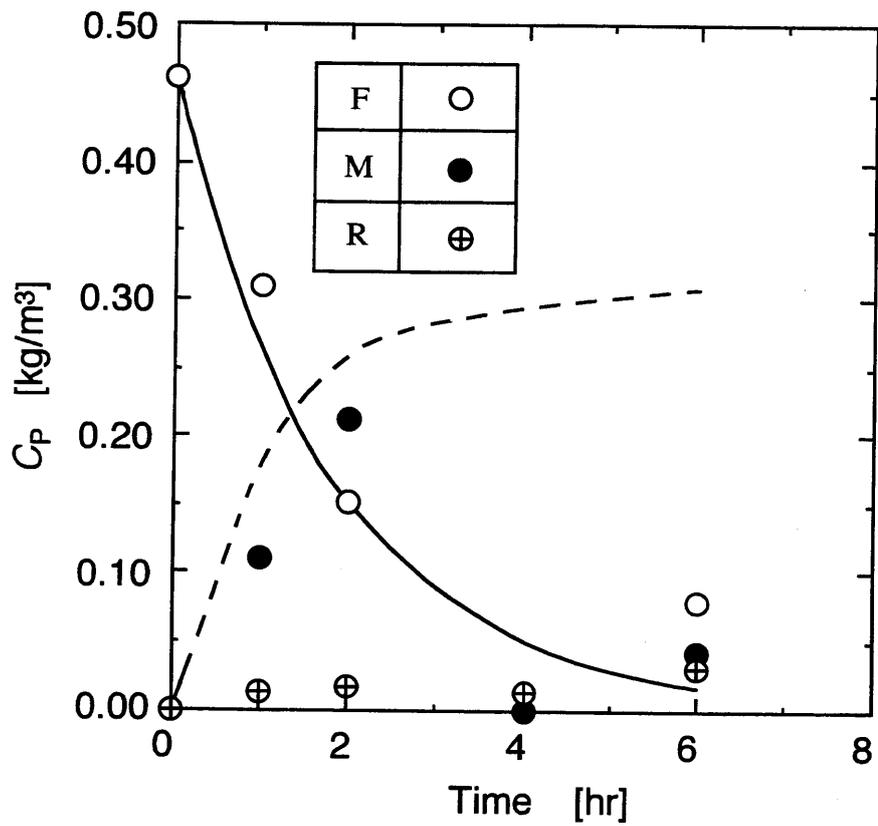


Fig. 4-6(b) Time course of protein concentration for NaCl-KCl system
: Dashed curve is obtained from mass balance.

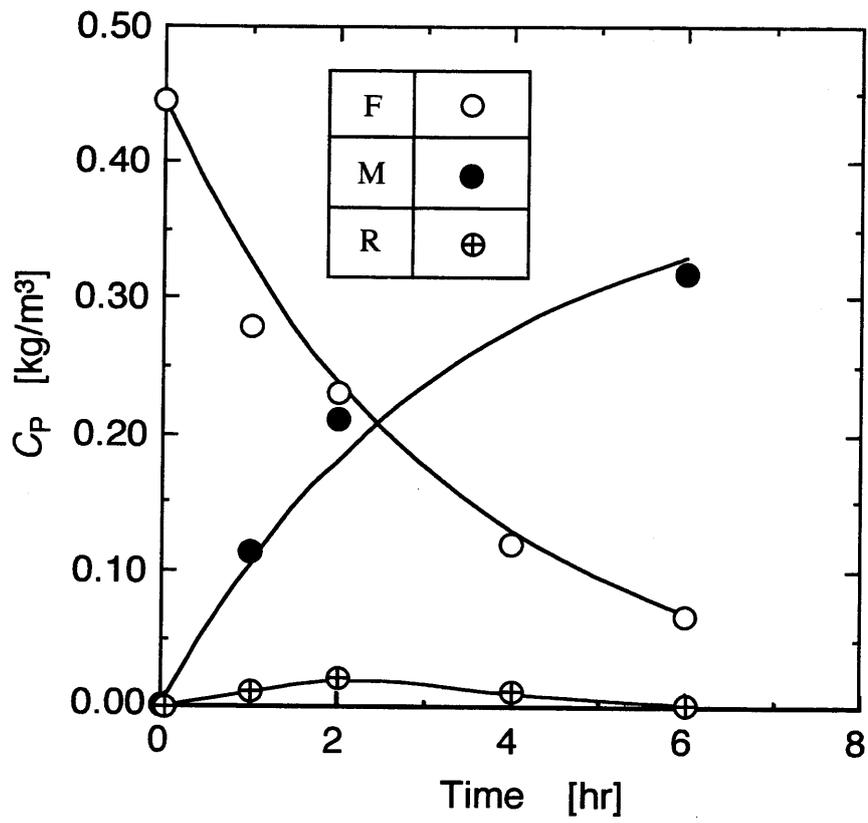


Fig. 4-6(c) Time course of protein concentration for KCl-BaCl₂ system

$\times 10^6$ m/s で KCl-KCl 系とほぼ同じであった。回収水相にほとんどタンパク質が観測されなかったので膜中タンパク質濃度は次の物質収支から計算できる。

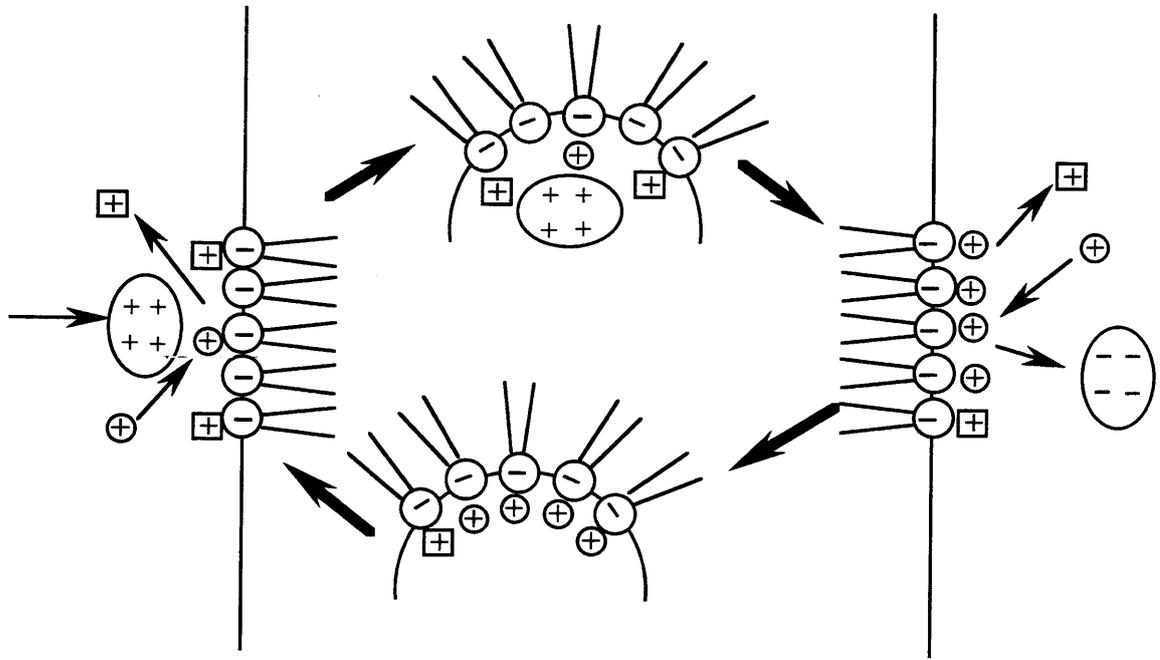
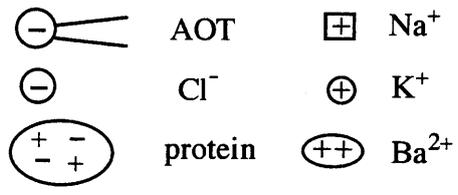
$$C_M = \frac{V_E}{V_M}(C_{F,0} - C_F) \quad (4-23)$$

タンパク質はフィード相から膜相へカリウムイオンと塩化物イオンを伴って移動する。二価カチオンはイオン交換サイトからの脱離速度が遅いので(Takahashi *et al.*, 1989)、バリウムは膜中でカリウムの代わりに AOT と直接結合していると考えられる。ミセルがフィード相側から回収水相側界面まで移動し、カリウムイオンとタンパク質が放出される。そして回収水相側で負に帯電しているタンパク質がバリウムイオン及び AOT と相互作用し再びミセルへ取り込まれたと考えられる。

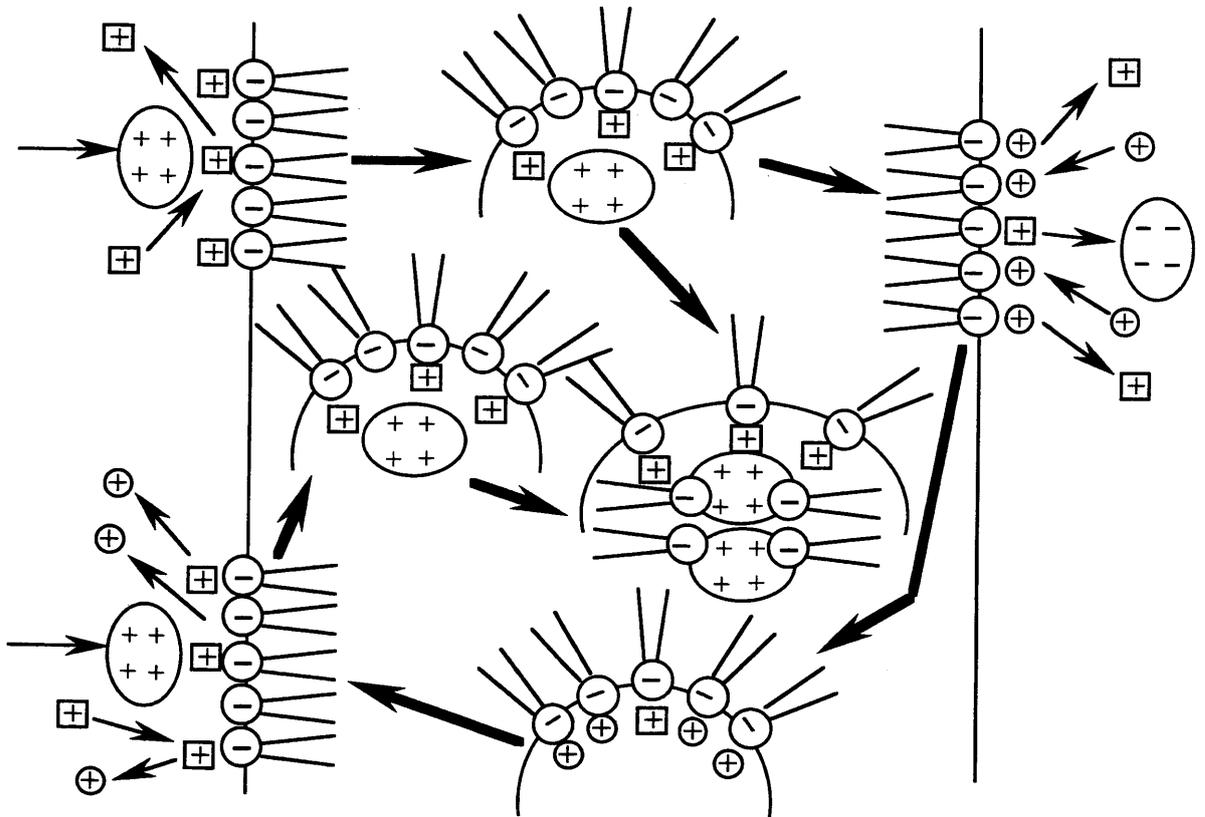
4.3.4 透過機構

3つの実験系での結果から推測される逆ミセルを含む液膜を通してのタンパク質透過機構を Fig. 4-7 に図示して提案する。

Fig.4-7(a)に示すように KCl-KCl 系では、まずタンパク質が正抽出界面に接近し逆ミセルを形成して油相へ取り込まれる。その際、界面では AOT 対イオンのナトリウムイオンとフィード水相中のカリウムイオンとのイオン交換が起こり、AOT 対イオンとしてカリウムイオンが油相へ移動する。そのミセルが回収側界面へ到達しタンパク質を放出する。この時、AOT 対イオンとして残っていたナトリウムイオンが回収水相中のカリウムイオンとイオン交換し、再びミセルを形成して油相へ移動する。ミセル間内容物交換及びミセル-界面間の AOT

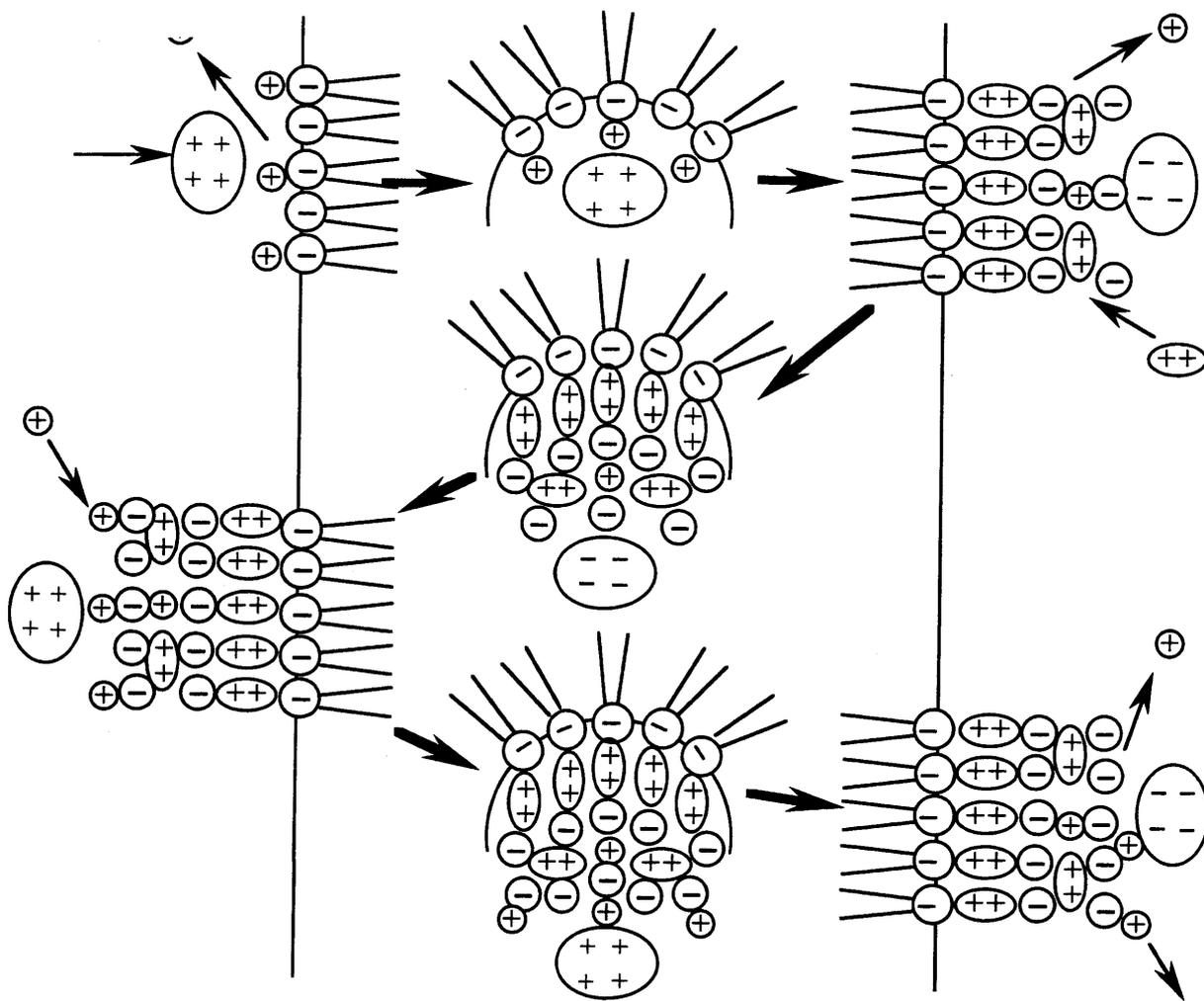


(a) KCl-KCl system



(b) NaCl-KCl system

Fig. 4-7 Transfer mechanism through liquid membrane



(c) KCl-BaCl₂ system

Fig. 4-7 (continued)

交換を通じて全体として水相へナトリウムイオンが、油相へカリウムイオンが移動し、その間のタンパク質の透過には大きく影響を及ぼさず、タンパク質は首尾よくフィード水相から回収水相へ移動する。

Fig.4-7(b)に示すように NaCl-KCl 系では、まずタンパク質が界面に接近し AOT 対イオンはナトリウムのまま逆ミセルを形成し油相へ入る。一部のミセルは回収側界面でタンパク質を放出し、その際回収水相のカリウムイオンを対イオンとした AOT を含むミセルができる。ミセル-界面間の AOT 交換が行われ、フィード側界面でカリウムイオンとナトリウムイオンがイオン交換し、カリウムイオンはフィード水相へ移動する。ナトリウムイオンを含むミセルは大きく界面張力が非常に小さい(第 2 章参照)ことから、ミセルが変形や融合しやすく 2 つ以上のミセルが結合し巨大ミセルになり油相は白濁し不可逆的なタンパク質-AOT 複合体を形成してしまう。よってタンパク質は油相に蓄積し変性を起こし透過しなくなる。

Fig.4-7(c)に示すように KCl-BaCl₂ 系では、タンパク質がフィード側界面に接近し抽出される。この時カリウムイオンを対イオンとした AOT から成る逆ミセルしか存在しない。そのミセルが回収側界面へ接近しタンパク質を放出する。この時、回収水相のバリウムイオンが AOT に優先的に相互作用しイオンの層を形成する。その時カリウムイオンは回収水相へ放出されるが一部はバリウムイオン、塩化物イオンとともにイオン層を形成する。このイオン層は結果的に正の電荷を持ち、高 pH にて負に帯電したタンパク質は界面へ接近し再び油相へ抽出される。さらにフィード側界面でカリウムイオンと相互作用し、油相へ移動する。このプロセスにより油相には多量のバリウムイオン、カリウムイオンが存在し、タンパク質は両界面で再抽出されることにより油相へ蓄積される。

4.4 結言

3つの異なる実験系、KCl-KCl系、NaCl-KCl系、KCl-BaCl₂系において逆ミセル液膜を通るタンパク質透過挙動を調べた。KCl-KCl系、NaCl-KCl系での相間のカチオン移動を測定し、速度式を定義することによってAOT対イオン-バルク水相間のイオン交換速度を決定できた。またその値を比較することによってミセル開閉速度とミセル形成のしやすさとの関係を定量的に説明できた。KCl-BaCl₂系ではAOTと2価カチオンの相互作用の形態から界面付近とミセル内の状態とタンパク質の再抽出の機構を提案した。ミセル系として適度な大きさを持ちAOTとの相互作用の強さも適当であることによって、KCl-KCl系においてタンパク質は首尾よく一連の抽出、逆抽出を起こし透過することが明らかになった。

Nomenclature

C	= solute concentration	[kmol/m ³]
V	= phase volume	[m ³]
W_o	= water content (= [H ₂ O]/[AOT])	[-]

<Subscript>

av	= average
Ba	= barium ion
F	= feed phase
K	= potassium ion
M	= membrane phase

Na	= sodium ion
P	= protein
R	= recovery phase
<Superscript>	
*	= equilibrium state

References

- Armstrong, D. W. and W. Li, *Anal. Chem.*, **60**, 88-90 (1988)
- Dekker, M., K. Van't Riet and S. R. Weijers, *Chem. Eng. J.*, **33**, B27-B33 (1986)
- Dekker, M., R. Hilhorst and C. Laane, *Anal. Biochem.*, **178**, 217-226 (1989)
- Dekker, M., K. Van't Riet, B. H. Bijsterbosch, P. Fijneman and R. Hilhorst, *Chem. Eng. Sci.*, **45**, 2949-2957 (1990)
- Dungan, S. R., T. Bausch, T. A. Hatton, P. Plucinski and W. Nitsch, *J. Colloid Interface Sci.*, **145**, 33-50 (1991)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 2470-2476 (1991)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi, K. Takahashi and H. Takeuchi, Proc. ISEC'90, p.1839-1844 (1992)
- Kinugasa, T., Y. Okuda, N. Koishi, K. Kawajiri, K. Nishioka, K. Watanabe and H. Takeuchi, Proc. ISEC'96, 1417-1422 (1996)
- Kuboi, R., K. Hashimoto and I. Komasa, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **16**, 335-342 (1990a)
- Kuboi, R., Y. Mori and I. Komasa, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **16**, 763-771 (1990b)
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle, *AIChE J.*, **42**, 713-726 (1996)

Nishii, Y., S. Nii, K. Takahashi and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **32**, 211-216
(1999)

Nishiki, T., A. Muto and T. Kataoka, Proc. ISEC'96, 1435-1440 (1996)

Takahashi, K., K. Tsuboi and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 352-357 (1989)

Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **28**, 582-589 (1995)

Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **30**, 79-85 (1997)

第5章

充填塔を用いたタンパク質の逆ミセル抽出

5.1 緒言

従来の溶媒抽出での蓄積されてきた情報は逆ミセル抽出を用いた装置の開発に有用と考えられるが、逆ミセル抽出法では有機相に界面活性剤が含まれること、生体物質の活性をできるだけ高く保たなければならないという決定的要因がある。それゆえ激しい攪拌は避け穏和な混合によりエマルション化やタンパク質の変性失活を防ぐ必要がある。先駆的な装置開発として Dekker *et al.*(1986) はミキサーセトラを用いて α -アミラーゼを分離している。非分散接触装置として Dahuron and Cussler(1988)、Dekker *et al.*, (1991)、Prazeres *et al.*(1993)によって膜抽出が検討されている。逆ミセルをキャリアとした液膜操作は Armstrong and Li(1988)、Kuboi *et al.*(1990)、Kinugasa *et al.*(1992)、さらに第4章に紹介した著者らの研究もある。塔型装置としては、スプレー塔(Han *et al.*, 1994、Lye *et al.*, 1996)や回転円板接触塔(RDC) (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994、Tong and Furusaki, 1995、1997)の抽出特性が調べられているが、逆ミセル抽出系へ充填塔を適用した研究は今までにない。充填塔は平界面攪拌槽や回転円板接触塔に比べ溶質に与える塔内でのせん断力が小さく、また接触界面積をスプレー塔よりも大きくできることからタンパク質抽出に適しており、加えて安定な向流操作が幅広い流量範囲で可能と考えられる。

本研究では充填塔によるタンパク質の逆ミセル抽出特性を調べた。平界面攪拌槽を用いて水相及び油相境膜物質移動と界面での可溶化速度を調べた後、充

填塔を用いてタンパク質の抽出率を様々な操作条件下で調べた。その結果、総括物質移動係数と抽出率は両相流速と分散相ホールドアップについて得られた相関式から予測できた。フィード相、抽残相、抽出相から回収した水相内のタンパク質活性測定からフィード相の活性に対する各相の活性の比を求め、変性・失活の有無を確かめた。

5.2 実験

逆ミセル溶液(分散相)にはイソオクタンに 0.1 kmol/m^3 になるよう AOT を溶解したものをリゾチームを含まないフィード水溶液と接触させ、予め平衡に到達させたものを用いた。フィード溶液(連続相)は蒸留水に 0.1 kg/m^3 になるようにリゾチームを溶解させて調製した。水相イオン強度は塩化カリウムで 0.3 kmol/m^3 に調製した。pH はコルホフバッファ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$)を用いて 6.8 に調節した。境膜物質移動係数の測定では *p*-ニトロフェノールと酢酸を溶質として使用した。

Fig. 5-1 に平界面攪拌装置の概略図を示す。界面積は 7.4 cm^2 である。水相と油相は所定流速で循環し、水相はマグネチックスターラーで 1300 rpm で攪拌した。境膜物質移動係数測定のために採用した 3 種の抽出実験系を Table 5-1 に示す。油相物質移動抵抗を評価するために酢酸の油相から水相への移動速度を、水相物質移動抵抗については *p*-ニトロフェノールの水相から油相への移動速度を測定した。水相酢酸濃度は滴定によって、油相 *p*-ニトロフェノール濃度は紫外可視吸光光度計によって決定した。

使用した充填塔装置の概略図を Fig. 5-2 に示す。称呼寸法 4 mm のラシヒリングを内径 0.035 m、高さ 0.2 または 0.3 m のガラス管に不規則充填した。ラシ

ヒリングは磁製、ガラス製、PTFE 製を用いた。充填層の空隙率と充填物の比表面積を Table 5-2 に示す。連続相は塔頂に取り付けられた三又ガラス管より供給し、分散相は塔底より PTFE 製の 5 つのノズル(外径 0.002 m、長さ 0.01 m)を有する分配器を通して供給した。塔容積の 2 倍以上の連続相を流通させた状態を定常状態と見なした。すべての実験は 298K の室温で行った。連続相と分散相をそれぞれ塔頂及び塔底の出口より採取し、両相のタンパク質濃度を紫外可視吸光光度計(Shimadzu UV-160)を用いて 280nm の吸光度を測定することにより決定した。抽出実験後、油相に抽出されたタンパク質を pH12、1.0 kmol/m³ の KCl 水溶液へ二相分配法により逆抽出した。フィード相と抽残相、逆抽出水相のリゾチーム活性を Imoto and Yagishita(1971)の方法で決定した。

5.3 結果及び考察

5.3.1 界面を通るタンパク質移動における物質移動係数

逆ミセルによるタンパク質移動において二重境膜理論が成立することを仮定する。Kinugasa *et al.*(1991)は総括物質移動速度は水相境膜でのリゾチームの拡散速度が支配的であることを報告している。また著者は第 2 章では水相塩濃度 KCl 0.3kmol/m³ 未満で水相境膜律速となることを示している。一方逆ミセルへのタンパク質可溶化抵抗がタンパク質抽出に於いて重要な役割を果たしているという研究もある(Nishiki *et al.*, 1996)。さらにフィード水溶液の塩濃度、pH 領域により律速段階が変化するという議論もなされている(Dungun *et al.*, 1991; Kinugasa *et al.*, 1996)。そこで我々は Fig. 5-1 に示す実験装置で逆ミセルへのタンパク質抽出速度を調べ、総括物質移動係数に及ぼす水相攪拌速度と油相循環速度の影響は小さいという結果を得た。つまり本実験条件では可溶化過程がタ

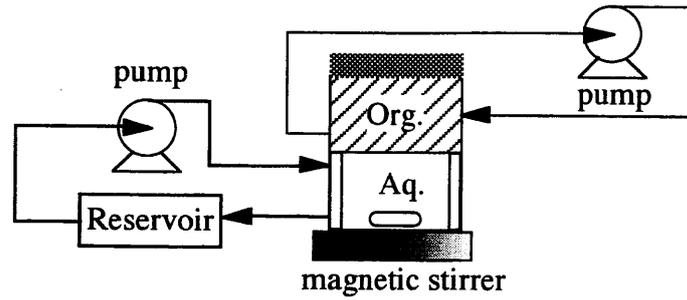


Fig. 5-1 Experimental setup for measurement of mass transfer coefficients

Table 5-1 Experimental conditions for measurement of mass transfer coefficients

system(org/aq)	solute	$C_{aq,0}$ [kmol/m ³]	V_{aq} [cm ³]	V_{org} [cm ³]	Q_{org} [cm ³ /min]	m [-]
isooctane/water	acetic acid	0.1	50	30	17	0.01
n-heptanone/water	<i>p</i> -nitrophenol	1.0×10^{-4}	60	35	17	400
AOT+isooctane /0.1MKCl,pH6.8	Lysozyme	3.5×10^{-5}	300	25	28	21

Table 5-2 Properties of packed bed

Packing	Porcelain	Glass	PTFE
Void fraction, ε [-]	0.69	0.67	0.60
Packing surface area, a_t [m ² /m ³]	896	1040	974

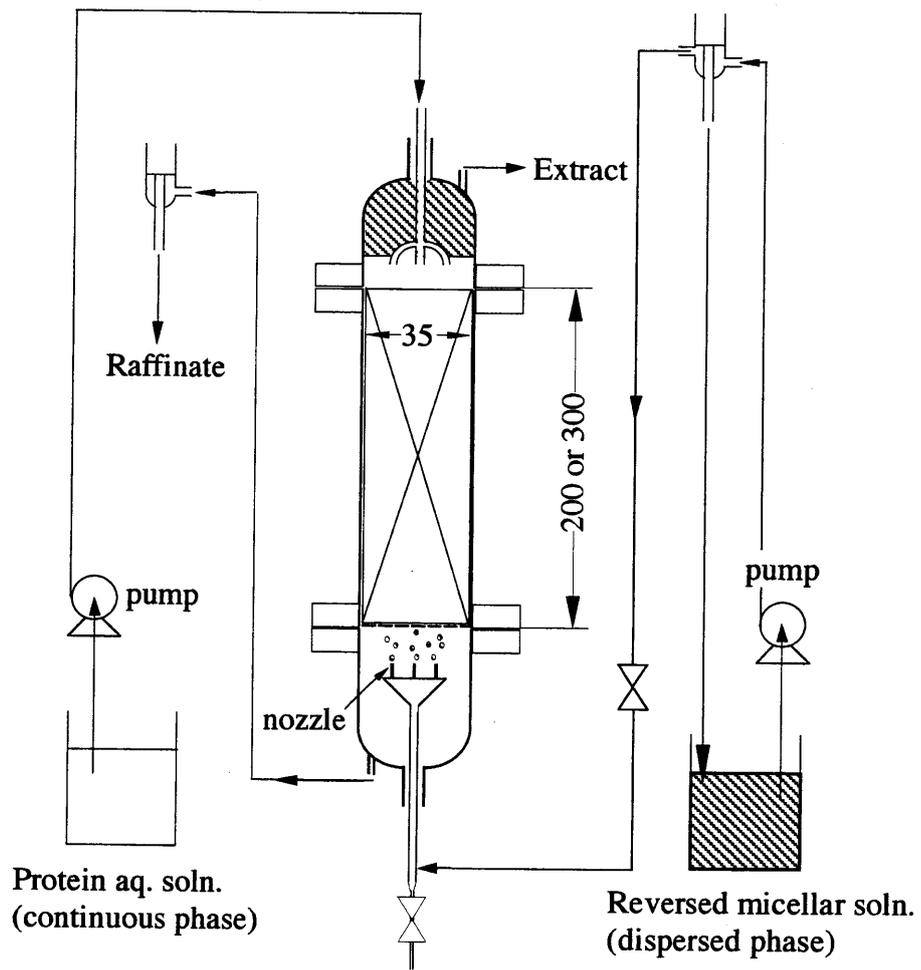


Fig. 5-2 Schematic diagram of experimental setup

ンパク質移動の律速段階ではないかと推測した。総括物質移動係数 K_c は分散相側物質移動係数 k_d 、連続相側物質移動係数 k_c 及び可溶化速度係数 k_s を用いて以下のように表現される。

$$1/K_c = 1/k_c + 1/(mk_d) + 1/k_s \quad (5-1)$$

k_d と k_c の値は上述の平界面攪拌槽を用い Table 5-1 に示される実験条件で測定した。イソオクタン/酢酸/水系での酢酸の油相への分配係数 m は十分に小さいので油相側物質移動係数 k_o は総括物質移動係数 K_c と等しいと仮定することができる。 $k_{o,ace}$ の測定値は 1.25×10^{-5} m/s であった。また n -ヘプタノン/ p -ニトロフェノール/水系において p -ニトロフェノールの油相への分配係数は非常に大きいので油相での物質移動抵抗は無視でき、水相側物質移動係数を得ることができる。 $k_{w,nitro}$ の測定値は 3.40×10^{-5} m/s であった。Asai *et al.*(1983)に報告されている相関を用いて水相、油相でのタンパク質の物質移動係数を以下のように換算した。

$$k_w = k_{w,nitro} (D_w / D_{nitro})^{2/3} = 9.35 \times 10^{-6} \text{ m/s} (=k_c) \quad (5-2)$$

$$k_o = k_{o,ace} (D_{RM} / D_{ace})^{2/3} = 1.55 \times 10^{-6} \text{ m/s} (=k_d) \quad (5-3)$$

ここで D_w 、 D_{nitro} 、 D_{RM} 、 D_{ace} はそれぞれ水中リゾチーム、水中 p -ニトロフェノール、イソオクタン中の逆ミセル、イソオクタン中の酢酸の拡散係数を示す。 D_w 、 D_{RM} の値は Kinugasa *et al.* (1991)によって報告されており、それぞれ 1.11×10^{-10} m/s、 1.16×10^{-10} m/s である。 D_{nitro} と D_{ace} の値は Wilke and Chang (1955)の式から推算した。攪拌槽で得られたリゾチームの総括物質移動係数の値を用いて式(5-

1)より式(5-2)及び(5-3)の境膜物質移動係数を使って可溶化速度定数を算出したところ $k_s=2.97 \times 10^{-6}$ m/s が得られた。本実験条件下で、この値は k_w や mk_o に比べ十分小さい。全抵抗に対する可溶化抵抗の比率は $(1/k_s)/(1/K_o)=(3.37 \times 10^5)/(4.76 \times 10^5)=0.71$ であった。これは本実験条件では律速段階が逆ミセルへのタンパク質の可溶化であることを示している。

5.3.2 充填塔によるタンパク質の逆ミセル抽出

5.3.2.1 抽出率

Fig. 5-3 に充填塔でのリゾチーム抽出率をスプレー塔での結果と共に示す。充填物として磁器製ラシヒリングを用いた。抽出率 E は分散相流速 V_d の増加と共に増大し、連続相流速 V_c の増加と共に減少した。同じ V_c においてスプレー塔の約3倍の抽出率を得た。分散滴は充填層でほとんど分裂・合一をしないことと上述の可溶化律速を考え合わせると抽出率の増加は分散相ホールドアップの増加が原因と考えられる。

5.3.2.2 総括容量係数と分散相ホールドアップ

タンパク質抽出実験から、総括容量係数 $K_o a$ は以下のように計算される。充填塔微小高さ dz に対する物質収支式は

$$K_o a(C_c - C_d/m)dz = V_c dC_c \quad (5-4)$$

と記述できる。ここで C_c 、 C_d はそれぞれ水相、油相濃度、 V_c は連続相流速である。任意の $K_o a$ を仮定すればルンゲークッタ法により実験条件 $C_{c,in}$ 、 $C_{d,out}$ 、 V_c を用いて式(5-4)を解くことができ、塔頂から塔底にわたる塔内濃度プロファイ

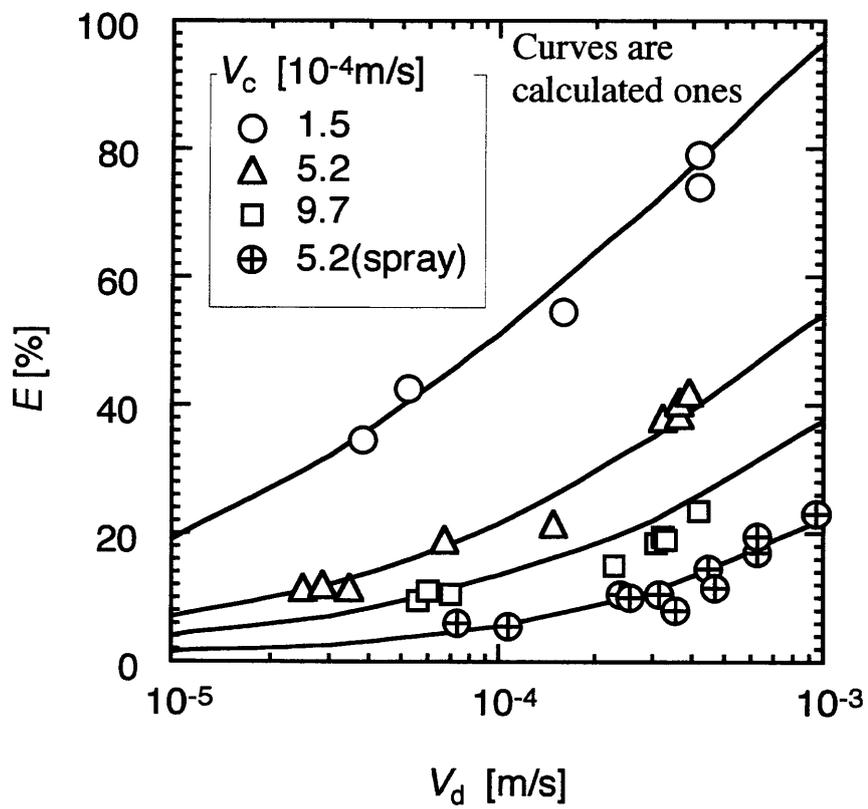


Fig. 5-3 Extracted fraction of lysozyme

ルを決定することができる。水相出口濃度の計算値と実測値とを比較し誤差が許容範囲内になるまで仮定 $K_c a$ 値を修正して再計算する。Fig. 5-4 は充填塔とスプレー塔での $K_c a$ に及ぼす V_d および V_c の影響を示す。 $K_c a$ 値は V_d の増加と共に増加したが $K_c a$ に及ぼす V_c の影響は少なかった。リゾチームの輸送速度は前述したように界面での可溶化律速であるので K_c 値は境膜抵抗によってほとんど変化しない。つまり K_c は V_d と V_c に依存しないと考えられる。 k_s が K_c と等しいと仮定すると界面積は $K_c a$ から計算される。実測した平均分散滴径は 1.5×10^{-3} m で両相流速に影響されなかった。滴径は Otake and Fujita(1949)によって報告されているノズルからの単一滴形成についての式、

$$d_p/d_N = 1.62(\sigma/d_N^2 g \Delta\rho)^{0.35} \quad (5-5)$$

より求められる。ここで d_p と d_N はそれぞれ滴及びノズルの直径である。 σ と $\Delta\rho$ は本実験系ではそれぞれ 2×10^{-3} N/m と 307 kg/m³ であった。分散相として AOT イソオクタン溶液を、ノズル材質として PTFE を用いておりノズル先端は油相に濡れやすいので d_N はノズル外径を用いた。界面張力が低いため滴は1滴ずつ生成し、時間間隔は1秒以上であった。式(5-5)から求めた d_p 値は 1.7×10^{-3} m で実測値と近い。滴の分裂・合一が塔内で観測されなかったので比界面積 a は分散相ホールドアップの変化に依存する。ホールドアップ X は以下の式より計算される。

$$X = ad_p/6\varepsilon \quad (5-6)$$

スプレー塔の空隙率 ε は 1 とした。 X の値は $K_c a$ から得られた a を用いて式(5-6)

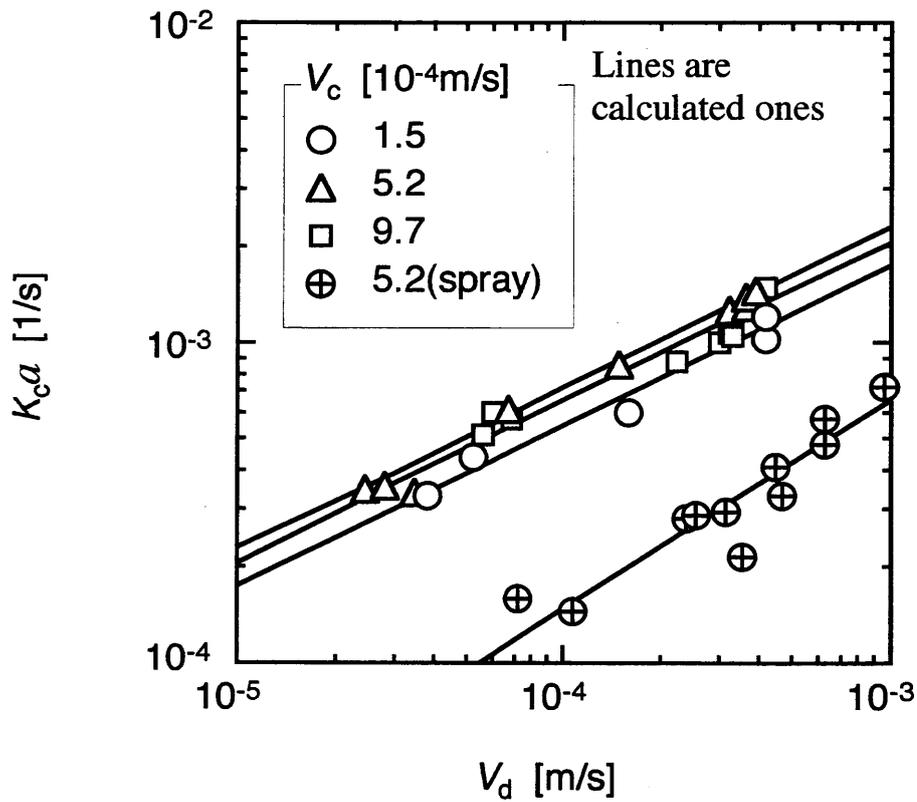


Fig. 5-4 Effect of V_d and V_c on $K_c a$

より算出した。 V_d の分散相ホールドアップへの影響を Fig. 5-5 に示す。実験した V_c の範囲で、 V_d に対する依存性は強く V_c に対する依存性は弱かった。充填塔、スプレー塔に対して得られた相関を以下に示す。

$$X=25V_d^{0.50}V_c^{0.15} \quad (1.5 \times 10^{-4} < V_c < 9.7 \times 10^{-4} \text{ m/s for packed column}) \quad (5-7)$$

$$X=4.8V_d^{0.65} \quad (V_c=5.2 \times 10^{-4} \text{ m/s for spray column}) \quad (5-8)$$

充填塔よりスプレー塔の方がホールドアップに及ぼす V_d の依存性が大きいのはスプレー塔では向流の連続相流れにより逆混合が起きやすく分散滴の上昇速度が低下しホールドアップが大きくなりやすいと考えられる。逆に充填塔の場合、充填物により逆混合が起きにくいためと考えられる。上記結果を基に $K_c a$ 値は可溶化速度定数としての K_c と、実測の滴径と式(5-6)~(5-8)から決定される a 値から計算できる。 $K_c a$ の計算値を Fig. 5-4 に実線として示し、推算値としての抽出率も Fig. 5-3 に実線として示した。

5.3.2.3 界面積に及ぼす充填物の影響

充填層に磁器製ラシヒリングを入れた場合、分散相は滴の状態で流れたが界面積と分散相の流動特性は充填物の分散相による濡れやすさの違いにより変化すると予測される。Fig. 5-6 に磁製、PTFE 製、ガラス製の充填物を用いた場合の界面積 a の変化を示す。その結果充填物によりほとんど a の違いは観測されなかった。分散相に濡れやすい PTFE 製を含めすべての充填物で分散滴は球状であることが観測された。この挙動は界面活性剤を含む逆ミセル系に特有の現象であると考えられる。

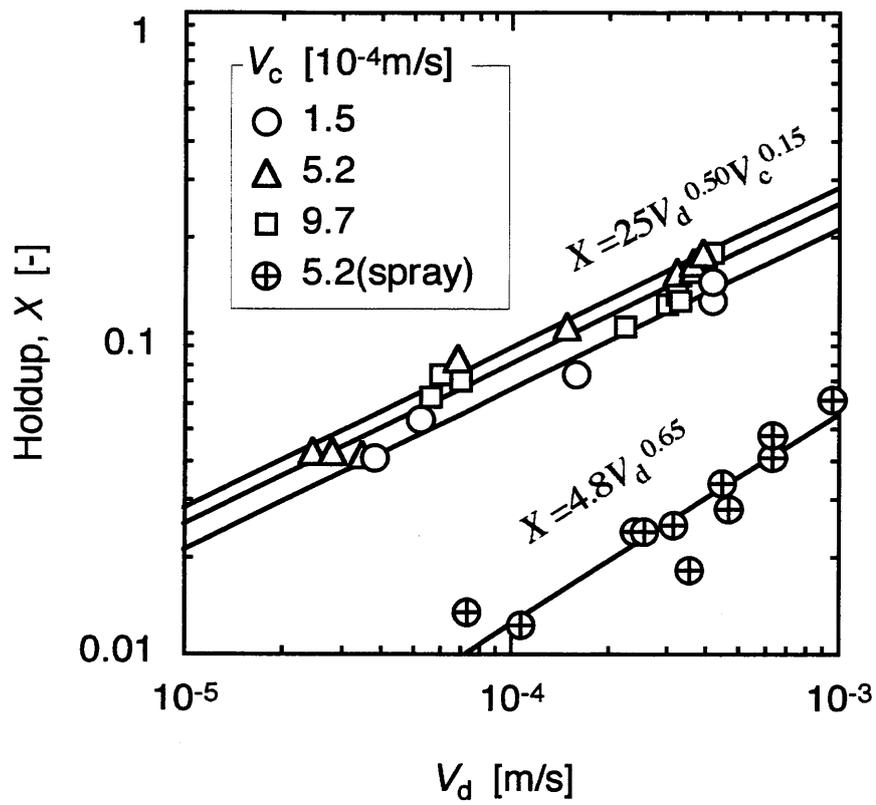


Fig. 5-5 Correlation of holdup

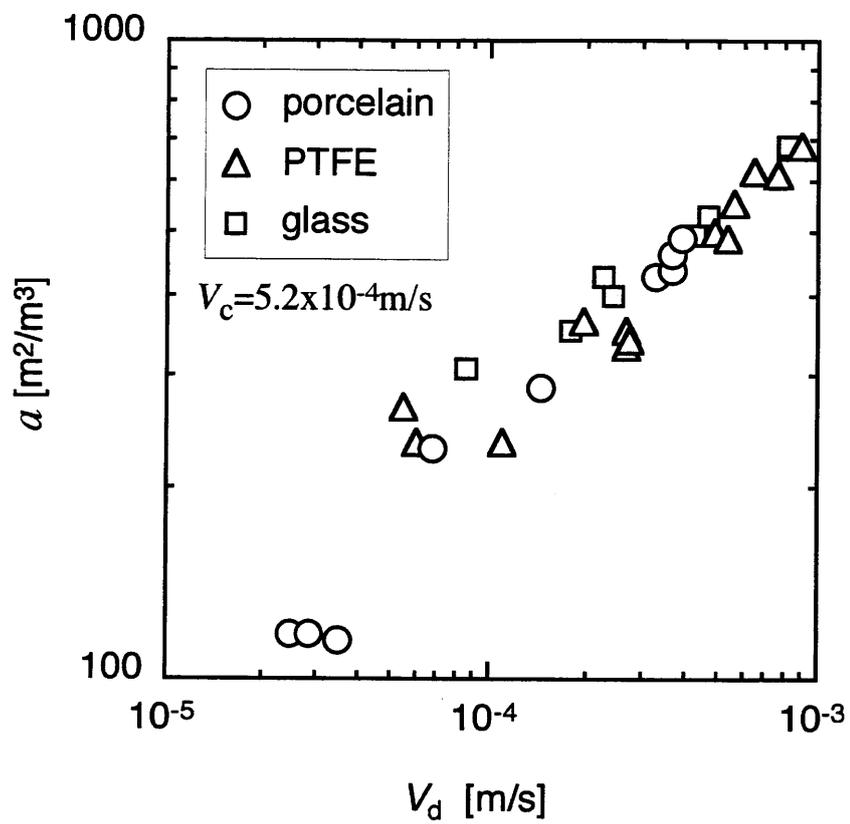


Fig. 5-6 Effect of packing material on a

5.3.2.4 タンパク質活性

フィード相と抽残相、回収水相のタンパク質活性を $V_c=3 \times 10^{-4}$ m/s、 $V_d=2 \times 10^{-4}$ m/s の場合に測定した。タンパク質の活性回収率は(活性)×(回収率)／(初期活性)と定義した。結果は抽残相で 0.70、回収相で 0.28 であった。抽残相中タンパク質分率は 0.72、回収相中は 0.28 で活性回収率とほぼ同じになり、両相でタンパク質活性が損なわれていないことを示している。回転円板接触塔(R.D.C.)操作におけるタンパク質活性変化が Carneiro-da-Cunha *et al.* (1994)によって報告されているので比較してみると 10 分の操作後抽残相中のクチナーゼの活性回収率は 0.37 まで下がり本研究の充填塔の結果の半分近くまで活性が落ちている。また著者の修士論文(西井、1996)では攪拌槽を用いてリゾチームを抽出した結果、攪拌回転数 400~800rpm で約 23%の活性が失われた。以上のことから充填塔では R.D.C.よりも穏やかな混合状態で抽出できることが示され、充填塔は水相、油相両相でのタンパク質活性保持に適した抽出塔であることが確かめられた。

5.4 結言

逆ミセル溶液を用いたリゾチームの抽出挙動を充填塔で調べた。逆ミセル溶液を分散相に用いたことにより分散相は合一・分裂を起こさず滴の状態のまま充填層内を流れた。 $K_c a$ 値は V_d に大きく依存したが V_c に対しては依存性は小さかった。滴径及びタンパク質の総括物質移動係数が一定であると仮定することにより分散相ホールドアップを算出し、 V_d 、 V_c に対する相関式を得た。この相関によって $K_c a$ 及び抽出率を推算したところ実測値と良好な一致を示した。充填物材質の界面積への影響はほとんど観測されなかった。充填塔操作では抽残相、回収相の両相に於いてタンパク質活性が高く保たれ、穏和な混合状態で

抽出できることが示された。

Nomenclature

a	=	interfacial area per unit volume	[m ² /m ³]
a_t	=	packing surface area per unit volume	[m ² /m ³]
C	=	protein concentration	[kmol/m ³]
D	=	diffusion coefficient	[m ² /s]
d_p	=	drop diameter	[m]
g	=	gravitational acceleration	[m/s ²]
K	=	overall mass-transfer coefficient	[m/s]
k	=	mass-transfer coefficient	[m/s]
k_o	=	organic phase film coefficient	[m/s]
k_s	=	protein solubilization rate coefficient	[m/s]
k_w	=	aqueous phase film coefficient	[m/s]
m	=	distribution ratio	[-]
V	=	superficial velocity of phases	[m/s]
X	=	holdup of dispersed phase	[-]
z	=	height of packed bed	[m]
<Greeks>			
σ	=	interfacial tension	[N/m]
ε	=	void fraction of packed bed	[-]
ρ	=	liquid density	[kg/m ³]
<Subscripts>			
c	=	continuous phase	

d = dispersed phase

in = inlet

out = outlet

References

西井靖博, 修士論文, 名古屋大学大学院工学研究科 (1996.3)

Armstrong, D. W. and W. Li, *Anal. Chem.*, **60**, 88-90 (1988)

Asai, S., J. Hatanaka and Y. Uekawa, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **16**, 463-469 (1983)

Carneiro-da-Cunha, M. G., M. R. Aires-Barros, E. B. Tambourgi and J. M. S. Cabral,
Biotechnology Techniques, **8**, 413-418 (1994)

Dahuron, L. and E. L. Cussler, *AIChE J.*, **34**, 130-136 (1988)

Dekker, M., , K. Van't Riet, S. R. Weijers and J. W. A. Baltussen, C. Laane and B. H.
Bijsterbosch, *Chem. Eng. J.*, **33**, B27-B33 (1986)

Dekker, M., P. H. M. Koenen and K. Van't Riet, *Trans. IChemE*, **69**(PART C), 54-58
(1991)

Dungun, S. R., T. Bausch, T. A. Hatton, P. Plucinski and W. Nitsch, *J. Colloid and
Interface Science*, **145**, 33-50 (1991)

Han, D. H., S. Y. Lee and W. H. Hong, *Biotechnology Techniques*, **8**, 105-110 (1994)

Imoto, T. and K. Yagishita, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156 (1971)

Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 2470-2476
(1991)

Kinugasa, T., K. Takahashi and H. Takeuchi, Proc. ISEC'90, p.1839-1844 (1992)

Kinugasa, T., Y. Okuda, N. Koishi, K. Kawajiri, K. Nishioka, K. Watanabe and H.
Takeuchi, Proc. ISEC'96, p.1417-1422, Univ. of Melbourne, Melbourne, Australia

(1996)

Kuboi, R., K. Hashimoto and I. Komazawa, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **16**, 335-342

(1990)

Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle, *AIChE J.*, **42**, 713-726 (1996)

Otake, H. and S. Fujita, *Kagaku Kikai*, **16**, 199-200 (1949)

Prazeres, D. M. F., F. A. P. Garcia and J. M. S. Cabral, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 761-770 (1993)

Tong, J., and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **28**, 582-589 (1995)

Tong, J., and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **30**, 79-85 (1997)

Wilke, C. R. and P. Chang, *AIChE J.*, **1**, 264-270 (1955)

第6章

多孔板塔を用いたリゾチームの逆ミセル抽出

6.1 緒言

逆ミセル抽出は生理活性物質の新しい分離技術として1980年代から注目されている。Luisi *et al.* (1979)、Göklen and Hatton (1985)、Dekker *et al.* (1986)による先駆的研究の後、タンパク質の抽出平衡、正抽出・逆抽出速度、抽出機構を解明するために盛んに研究が行われている。また生物利用産業の急速な発展に伴って、生体物質分離のための効率的なプロセスの開発が急務になってきた。逆ミセル抽出技術は溶液の大量処理に非常に優れている。逆ミセル抽出法と従来の液液抽出法とでは界面活性剤を含む低界面張力系であるなどその特性が異なるため逆ミセル抽出を用いた装置の設計は特別な配慮が必要となる。また逆ミセル抽出法を適用した塔型接触装置についての研究は数少ない。

Lye *et al.* (1996)はスプレー塔においてタンパク質の各境膜物質移動係数を報告している。著者は第5章で記述したように充填塔を用いて、リゾチームの逆ミセル抽出を行い有機相に濡れやすいPTFE (polytetrafluoroethylene)製充填物を使用した場合でも分散相は分裂や合一を起こさず、滴状で充填層内を流動することを報告した(Nishii *et al.*, 1999)。この流動挙動は逆ミセル系で特有な現象である。また充填塔操作前後でリゾチーム活性は高く保たれることが分かった。回転円板接触塔を用いた場合、非常に大きい分散相ホールドアップを得ることが出来るが同時に大きなせん断力によってタンパク質活性の損失が生じる(Tong and Furusaki, 1995)。本章ではさまざまな抽出プロセスで一般に大量処理に用いられている多孔

板塔に注目した。実験室スケールの装置を用い流動特性及び物質移動特性を調べ、他の抽出塔とその性能を比較した。

6.2 実験

分散相としては AOT をイソオクタンに 0.05 kmol/m^3 になるように溶解し調製したものをを用いた。連続相としてはリゾチームを 0.3 kmol/m^3 の KCl 水溶液に溶解したものを使用した。供給連続相のリゾチーム濃度は 0.1 kg/m^3 で pH は KOH、HCl 水溶液により約 7 に調節した。有機溶液は予めタンパク質を含まない塩水溶液で飽和させリゾチーム抽出に及ぼす有機相への水及び塩移動の影響を軽減した。連続相、分散相の物性を Table 6-1 に示す。

Table 6-1 Physical properties(25°C)

	density [kg/m^3]	viscosity [Pa s]	interfacial tension [N/m]
contiuous phase	997	0.90×10^{-3}	0.002
dispersed phase	688	0.48×10^{-3}	

Fig. 6-1 に多孔板塔の概略図を示す。内径 28 mm、長さ 210 mm のガラス管の内側に自作した 7 段の PTFE 製多孔板を 25 mm の間隔で取り付けた。多孔板材質に有機溶媒に優先的に濡れる PTFE を選択し、有機滴の合一・形成が促進されるようにした。多孔板は円形板の一部を弦に沿って下方へ折り曲げることによってダウンカマーとしての空間を作った。内径 0.9mm の孔を板の水平部分に 27 個空けた。多孔板の詳細を Fig. 6-2 及び Table 6-2 に示す。

塔操作として初めに連続相溶液を塔頂よりゆっくりと供給し、液面が塔頂付近の所定の位置まで達した後に、分散相を塔底の分配器を通して供給した。両相の

流量はボールフローメータにより確認しながら所定の値に調節し、塔頂部で水／油界面が一定位置に保たれるように連続相出口レベラーを調整した。塔容積の 5 倍以上の連続相を流通し定常状態に達した後両相試料をそれぞれの出口より採取した。各相のリゾチーム濃度は紫外可視吸光光度計(Shimadzu UV-1600)によって 280 nm の吸光度を測定して決定した。分散滴径はデジタルビデオカメラで撮影した拡大画像を用いて決定した。段上下における二相の流動挙動をデジタルビデオカメラによって撮影した。定常状態において両相の流れを同時に停止し、その際に変化した水／油界面の高さにより塔内の分散相体積を求め、塔全体の容積に対する油相体積を分散相ホールドアップとした。多孔板塔と比較するためにスプレー塔を用いた実験もまた行った。抽出液、抽残液中リゾチーム活性を Imoto and Yagishita (1971)の方法により測定した。

6.3 結果及び考察

6.3.1 リゾチーム抽出

Fig. 6-3 に抽出率 E を分散相流速 V_d に対してプロットした。 V_d の増加と共に抽出率は大きくなり、その挙動は $V_c=2.9 \times 10^{-4}$ および $6.1 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ の場合は同じで、抽出率は連続相流速の増加につれて減少した。連続相流速が $9.1 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ の場合は V_d による抽出率の増大速度が $V_d=8 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ あたりで急激に大きくなった。後述するように連続相流れが分散滴上昇速度に影響を及ぼしていると考えられる。

塔全体にわたってマーフリー段効率が一定であると仮定すると連続相濃度に基づいて作図的に段効率を求めることが出来る。

Fig. 6-4 にマーフリー段効率 E_{∞} を示す。得られた段効率は 20% 以下となり比較的低かった。これは連続相中と分散相中のタンパク質濃度が本実験条件では平

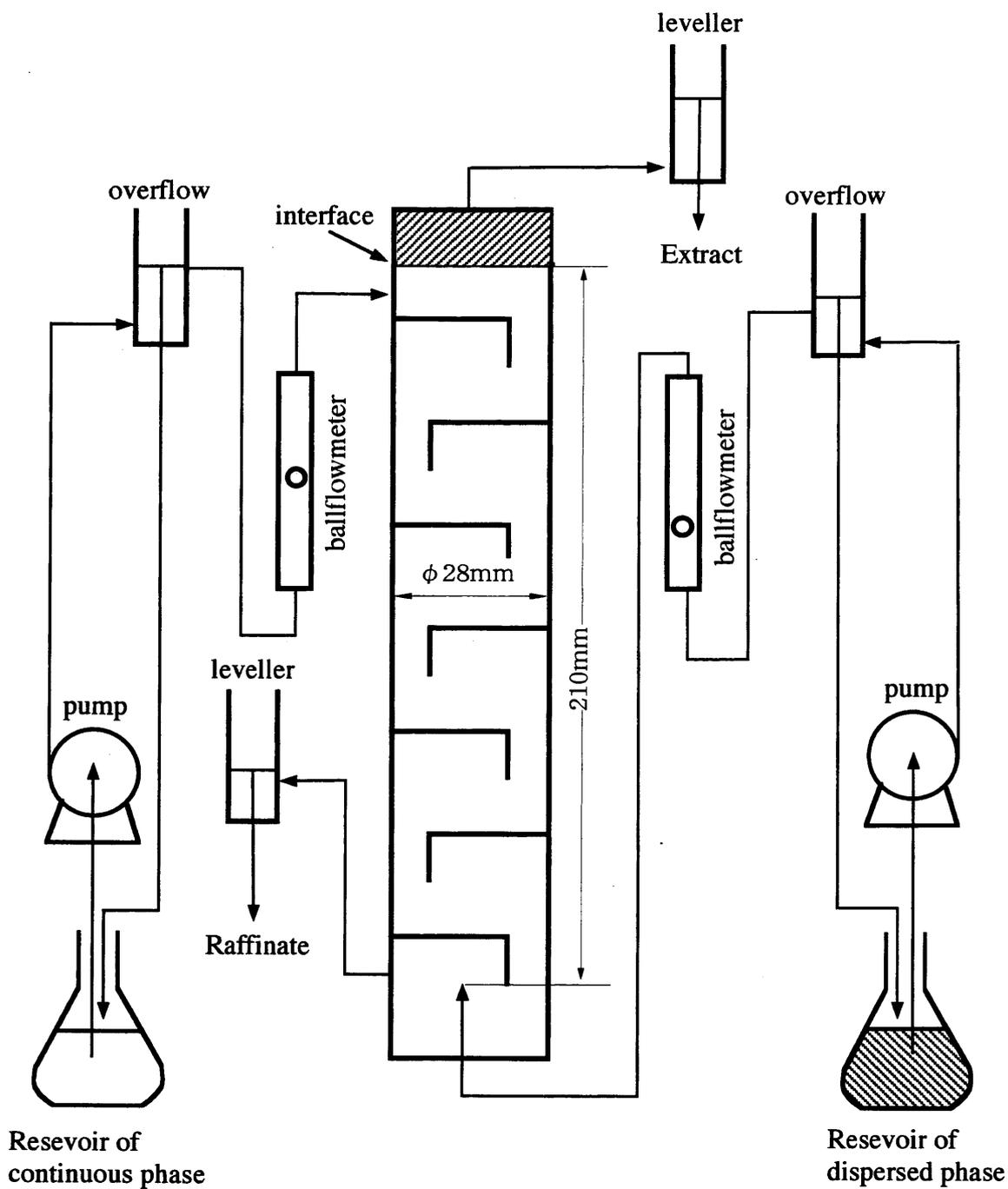


Fig. 6-1 Schematic diagram of the experimental setup

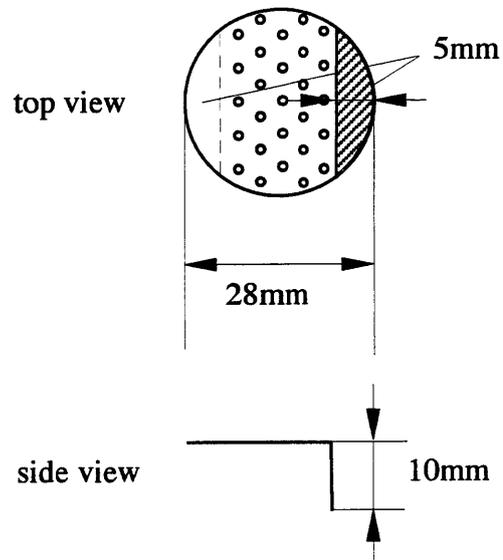


Fig. 6-2 Schematic diagram of tray

Table 6-2 Tray description

hole diameter	0.9mm
number of holes	27
hole arrangement	triangular
hole pitch	4.0mm
equivalent downcomer diameter	9.7mm
downcomer length	10mm

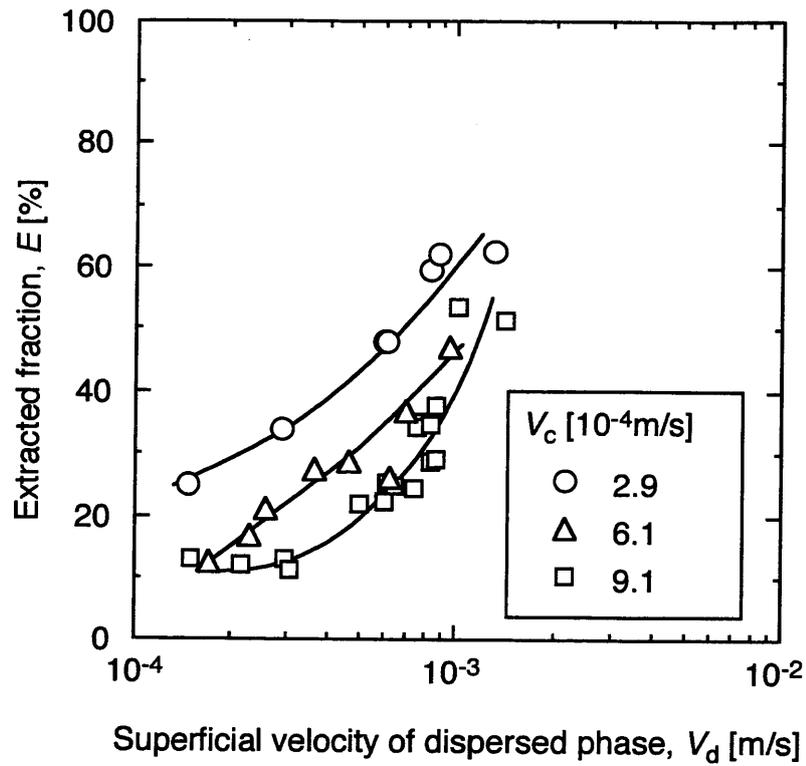


Fig. 6-3 Extracted fraction

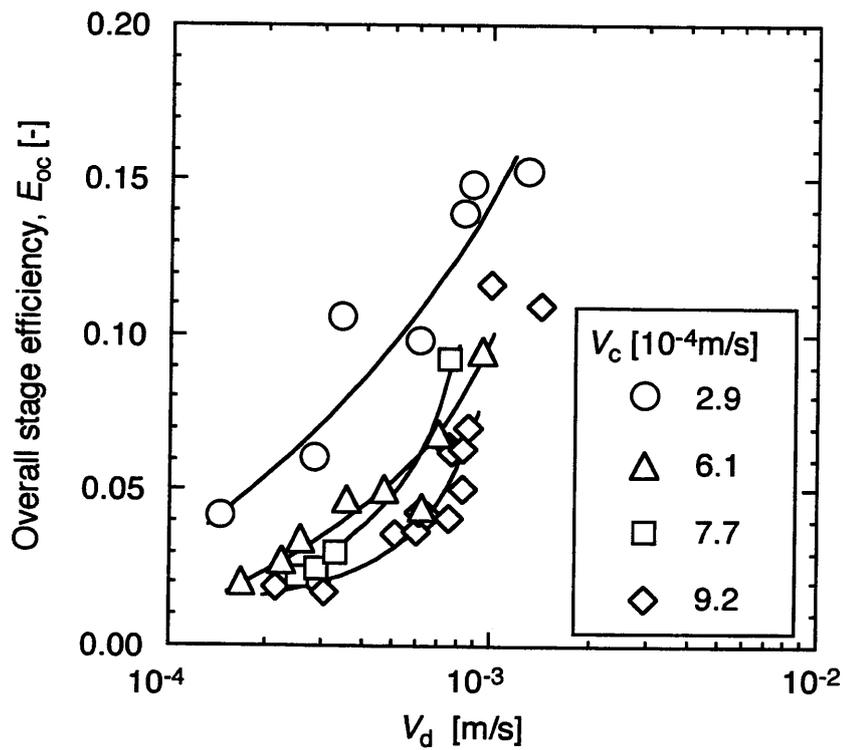


Fig. 6-4 Overall stage efficiency

衝から大きく離れていることを示している。抽出率 E と同様に連続相が大きくなると V_d による E_{∞} の増大速度が大きくなっている。

6.3.2 二相流動特性

塔内の観察から Fig. 6-5 の概略図に示すように分散滴は多孔板の特定の位置から生成されていた。合一した分散滴は上段の下の蓄積均一層に蓄積する。合一していない滴も蓄積均一層の下に別の層、すなわち滴蓄積層を形成する。分散相ホールドアップはこの滴蓄積層厚みと共に増加すると考えられる。この2つの蓄積層の下で連続相が循環していることがビデオに撮影された液滴の運動から観察された。この連続相循環流れは分散滴の上昇によって起こると考えられ、物質移動や滴合一に影響を与えることが推測される。この循環流れはダウンカマーからの連続相流れと衝突するので循環速度は連続相流速 V_c に大きく影響される。 V_c によって循環流れが遅くなると滴合一速度も減少し、その結果滴蓄積層厚みは増加すると考えられる。

3種の V_c における V_d 増加による滴上昇速度 U_d の変化を Fig. 6-6 に示す。測定したすべての流速で同じ滴径が観測されたので (Fig. 6-8 参照) U_d の変化は循環速度に起因すると解釈できる。 V_d の増加は循環流速を増大させ、 V_d の一番小さい場合を除けば、ほぼ V_c の増加は循環流速を減少させている。

Fig. 6-7 に滴蓄積層厚み h_2 に及ぼす V_c の影響を示す。滴の上昇速度と合一速度のバランスによってこの厚みは決まる。Fig. 6-5 に示すように滴は楕円形に変形し蓄積均一層に部分的に沈み込んでいるのですべての条件で h_2 は d_p より小さかった。 h_2 は両相流速 V_c 、 V_d の増加と共に増大した。 h_2 に及ぼす V_d の影響は単調増加であった。 V_c の増加は循環速度を減少させ、滴蓄積層にある滴の流動を抑制する。その結果、 V_c の増加によって合一速度が低下するため蓄積液滴が増え h_2 が増大した

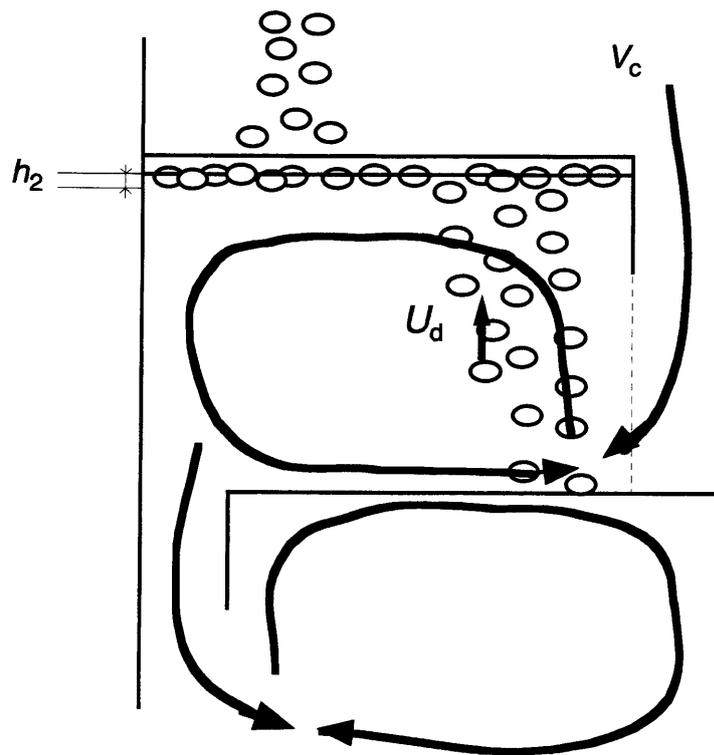


Fig. 6-5 Flow pattern above a tray

と考えられる。滴の界面での流動と合一速度については第7章で詳しく述べる。

6.3.3 界面積と物質移動係数

分散滴の平均滴径 d_p は滴形状が楕円体であったため長軸、短軸径を測定し同じ表面積を有する球の直径として与えた。100 個以上の滴について計算した。滴径に及ぼす流速の影響を Fig. 6-8 に示す。滴径は 2.5mm で V_c 及び V_d に依存しなかった。

有機相は主に滴状で存在するので界面積は、単位塔容積当たりの滴表面積を求めればよいから、ホールドアップ ϕ を実測すれば以下の式から計算できる。

$$a = \frac{6\phi}{d_p} \quad (6-1)$$

Fig. 6-9 に界面積 a を種々の V_c について V_d に対してプロットした。 d_p は本実験条件では一定だったので界面積は分散相ホールドアップに比例する。上述のように V_c の増加によってホールドアップが増加するので a は V_c の増加と共に増加する。界面積が決定されれば総括物質移動係数 K_c は $K_c a$ から分離することができる。

両相が完全混合であるとき総括容量係数 $K_c a$ と段効率 E_{oc} の間には次の関係がある。

$$E_{oc} = \frac{K_c a z}{V_c + K_c a z} \quad (6-2)$$

そこで $K_c a$ について整理すると以下の式を得る。

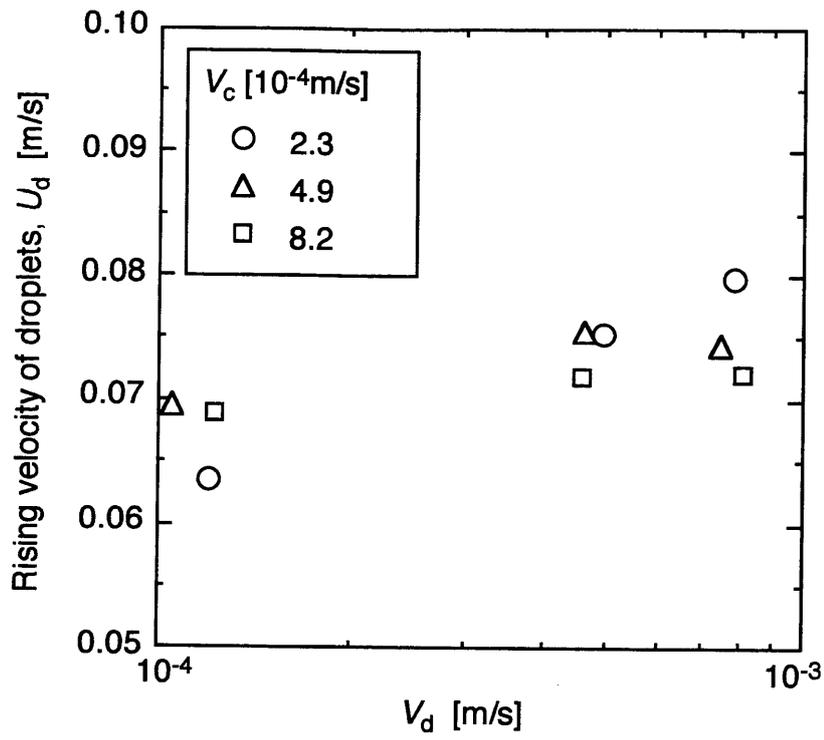


Fig. 6-6 Rising velocity of droplets

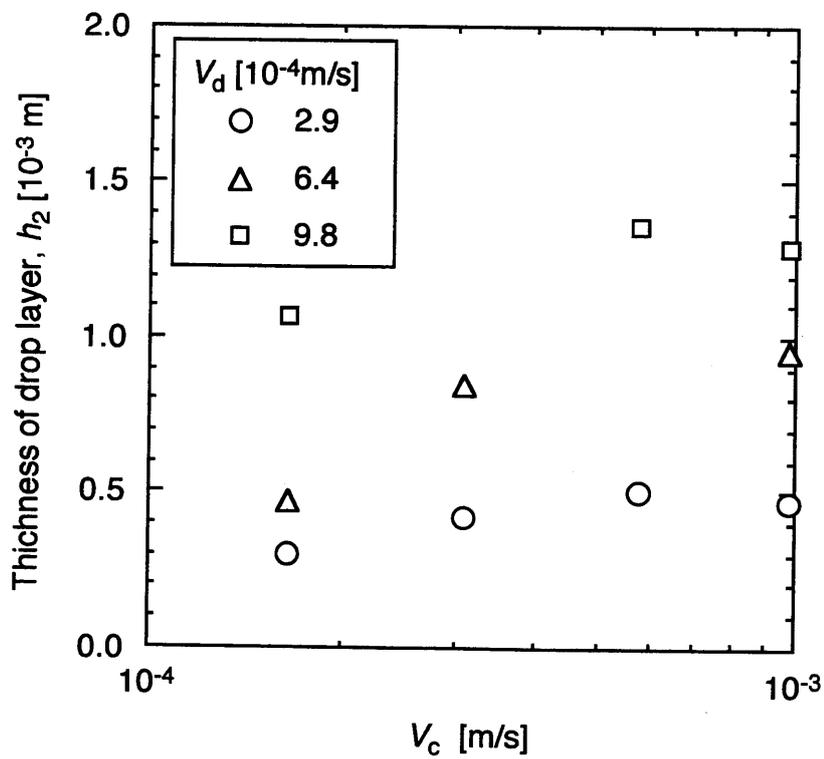


Fig. 6-7 Thickness of layer of accumulated droplets

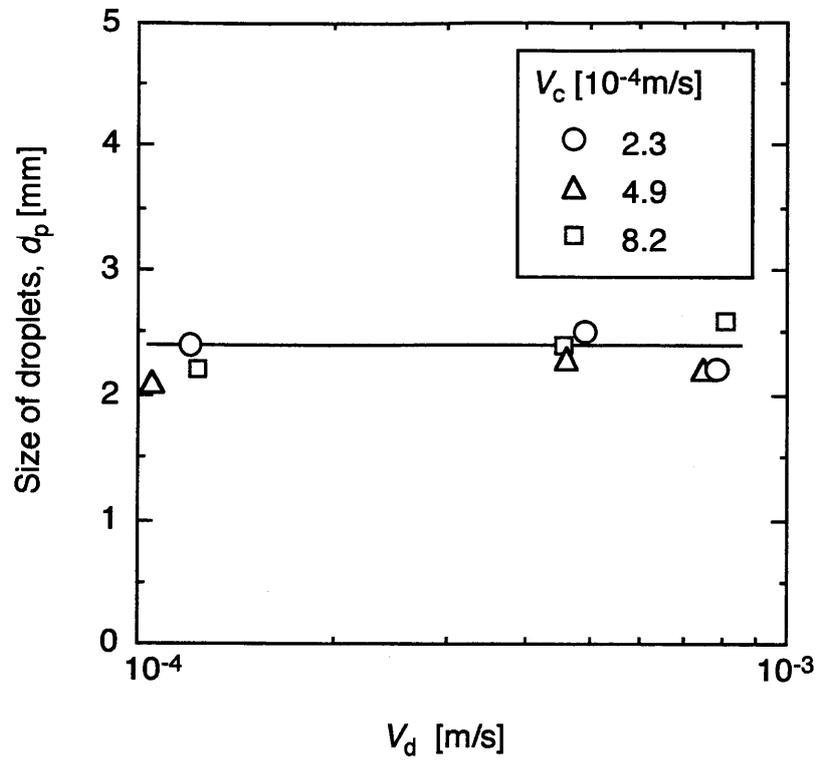


Fig. 6-8 Size of droplets

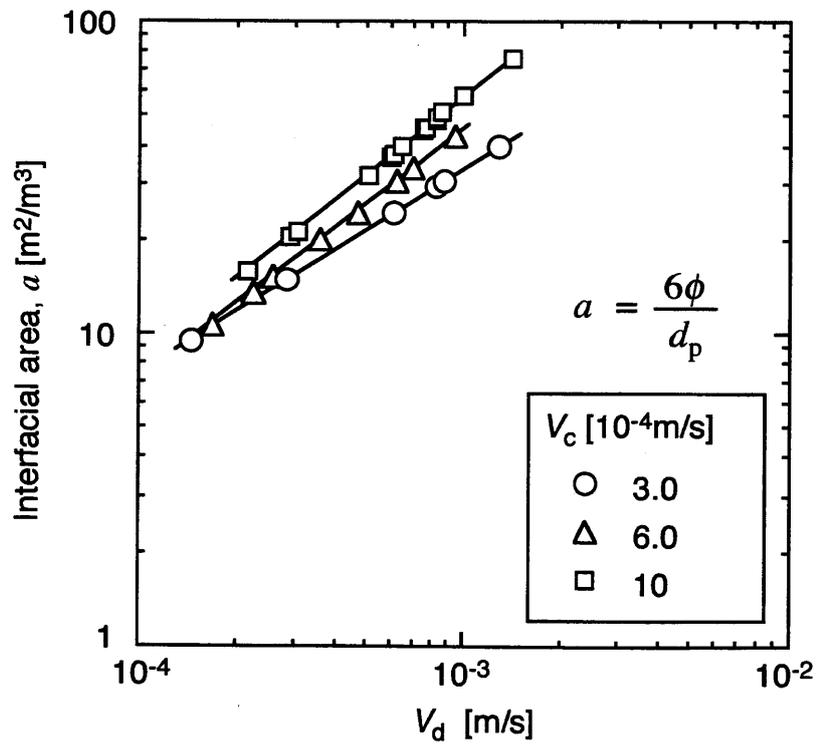


Fig. 6-9 Interfacial area

$$K_c a = \frac{E_{oc} V_c}{z(1 - E_{oc})} \quad (6-3)$$

E_{oc} は連続相濃度基準の段効率で、 z は段間隔である。Fig. 6-10に $K_c a$ の V_d に対するプロットを示す。この総括容量係数 $K_c a$ の値を前出の界面積 a で除して総括物質移動係数 K_c を求めた。

総括物質移動係数 K_c をFig. 6-11に示す。 K_c は V_c 及び V_d に対してほぼ一定だった。これはリゾチームの物質移動係数が流動条件に依存せず可溶化律速であることを示している。その値は第5章の充填塔で得られた可溶化速度定数の10倍大きく、界面の変形の程度が抽出速度に大きく影響を及ぼす逆ミセル系において、分散滴界面が分散合一の繰り返しにより激しく伸縮を起こしたことが原因と考えられる。興味深いことに K_c はミキサーセトラーでの金属イオン抽出で得られた値と同じオーダーであり、ミキサーセトラーでの値も強力な攪拌下でのさまざまな流速変化に対して本実験結果と同様にほとんど一定であった(Nii *et al.*, 1997)。これらの結果は物質移動係数の変化よりも、界面積の変化が塔装置における抽出速度を支配していることを示している。

6.3.4 他の抽出塔との比較

多孔板塔の性能を理論段相当高さ(HETS)に関してスプレー塔及び充填塔と比較した。HETSが小さい装置が高性能装置である。これら3つの塔はほぼ同じ高さと同直径を有している。スプレー塔の寸法は多孔板塔と全く同じで、一方充填塔の直径は35 mm、充填高さは200 mmであった。

Fig. 6-12に総処理量 $V_t (=V_c + V_d)$ に対するHETS値を示す。多孔板塔では大きな V_t において比較的小さいHETSが得られた。充填塔は小さい V_t 範囲でもっとも良

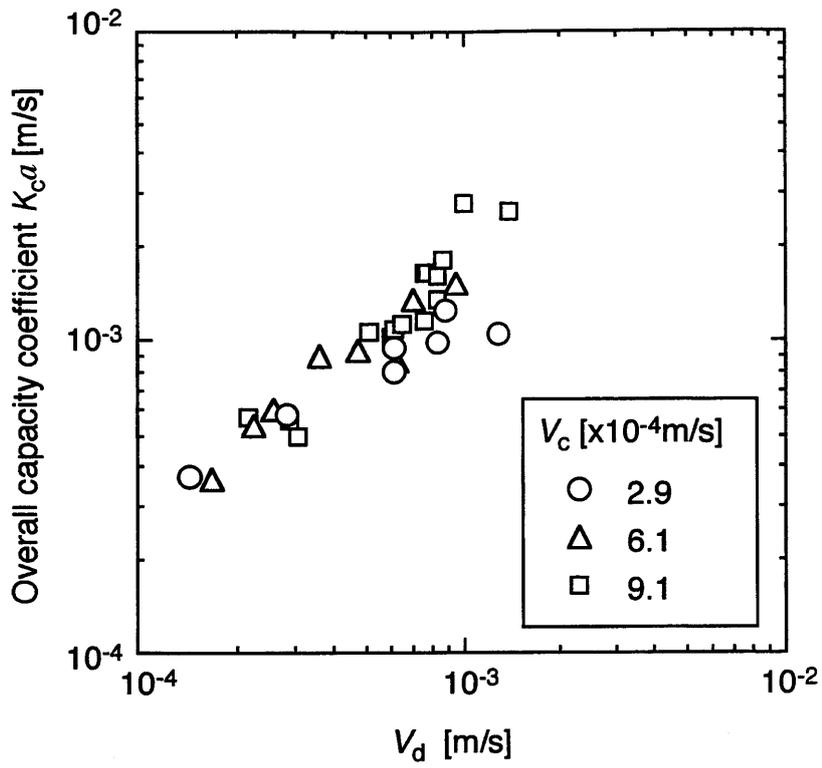


Fig. 6-10 Overall capacity coefficient

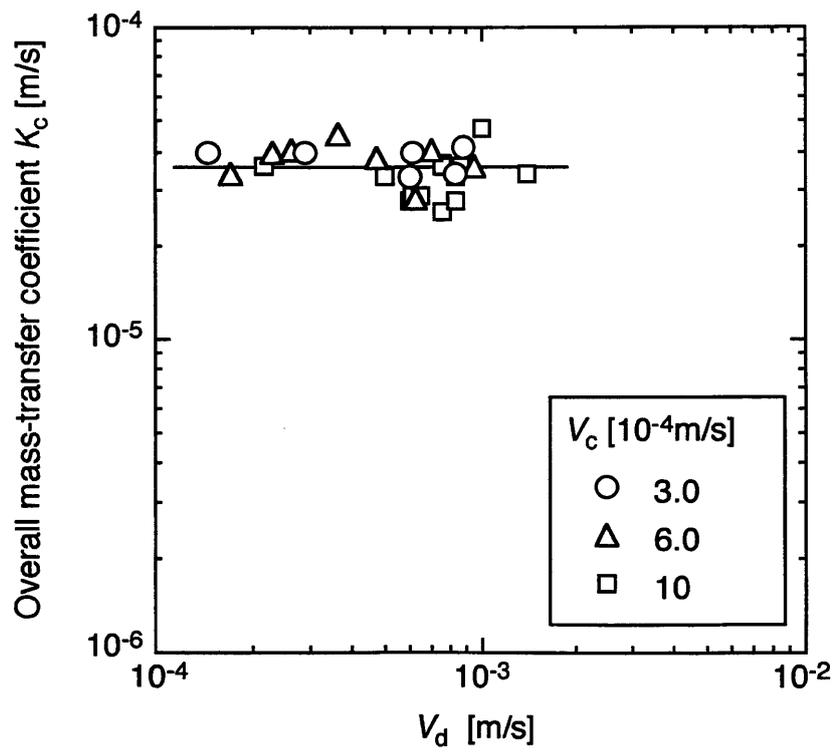


Fig. 6-11 Overall mass-transfer coefficient

い性能を示したが処理量の増加と共に HETS は大きくなり性能は悪くなった。以上から多孔板塔は大量処理における使用が望ましいことが示された。

6.3.5 リゾチームの活性変化

抽出液及び抽残液中のリゾチームの相対比活性を Table 6-3 に示す。実験操作の前後に於いてリゾチーム活性の変化は認められなかった。多孔板塔での穏やかな混合状態ではリゾチームは失活することなく逆ミセルへ抽出されることが示された。また滴の連続的な合一や再分散によってタンパク質活性は影響を受けないことが分かった。

Table 6-3 Relative activity of lysozyme

	V_c [m/s] V_d [m/s]	relative activity [%]
Extract*	5.8×10^{-4} 9.4×10^{-4}	99
Raffinate	5.7×10^{-4} 2.6×10^{-4}	108

*Lysozyme was back-extracted from the extract into an aqueous solution

6.4 結言

多孔板塔でのリゾチーム抽出を種々の操作条件で調べ、塔性能を他の抽出塔と比較した。塔内で連続相の循環流れが存在することが確認され、それは分散滴上昇速度、合一速度に影響を与えることが分かった。その結果分散相ホールドアップは増加し、抽出率、段効率が高連続相流速で急激に増加する結果を説明できた。

実測の分散相ホールドアップで界面積を求め、総括容量係数を除することにより総括物質移動係数を分離できた。その値は両相流速に依存せず塔内で可溶化律速であることが示された。多孔板塔の性能を HETS を用いて同等の寸法を持つスプレー塔及び充填塔と比較したところ大量処理に於いて有効であることが示された。抽出操作前後でのリゾチーム活性は変化せず、滴の分散・合一の繰り返しによって多孔板塔内でタンパク質は変性・失活しないことが分かった。

Nomenclature

a = interfacial area per unit volume	[m ² /m ³]
C = lysozyme concentration	[kg/m ³]
E_{oc} = overall stage efficiency	[-]
d_p = drop diameter	[m]
h_2 = thickness of accumulated layer	[m]
K = overall mass-transfer coefficient	[m/s]
U_d = rising velocity of droplets	[m/s]
V = superficial velocity of phases	[m/s]
z = stage clearance	[m]
ϕ = holdup of dispersed phase	[-]

<Subscripts>

c = continuous phase

d = dispersed phase

t = total

References

- Dekker, M., K. V. Riet and S. R. Weijers, *Chem. Eng. J.*, 33, B27-B33 (1986)
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton, *Biotechnology Progress*, 1, 69-74 (1985)
- Imoto, T. and K. Yagishita, *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1154-1156 (1971)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 2470-2476 (1991)
- Luisi, P. L., F. J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wiget and R. Wolf, *Helvetica Chimica Acta*, 62, 740-753 (1979)
- Lye, G. J., J. A. Asenjo and D. L. Pyle, *AIChE J.*, 42, 713-726 (1996)
- Nishii, Y., S. Nii, K. Takahashi and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 32, 211-216 (1999)
- Nii, S., J. Suzuki, K. Tani and K. Takahashi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 30, 1083-1089 (1997)
- Tong, J. and S. Furusaki, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 28, 582-589 (1995)

第7章

AOT 逆ミセル系における滴合一挙動に及ぼす流動状態及び塩の影響

7.1 緒言

液液分散及び合一は抽出装置の設計において重要な因子である(Stevens *et al.*, 1989, Li *et al.*, 2000, Ban *et al.*, 2000; 2001)。分散・合一の繰り返しは抽出塔での物質移動を大きく促進する(Treybal 1990)。第6章(Nishii *et al.*, 2002b)において多孔板塔を用いた逆ミセル系でのリゾチーム抽出挙動を議論し、段上の分散特性及び段下の合一特性は段効率、物質移動係数に影響を与えることが示された。また段下の合一挙動は多孔板塔設計に必要不可欠であることが確められた。

平界面との油滴合一は次の3つの段階で進行する(Stevens *et al.*, 1989)。第一段階は滴の平界面への接近である。この段階は水相及び油相の流動力学に支配される。第二段階は滴と界面の間の薄膜液の排除である。これは薄膜液の流動力学及び滴と界面の表面特性によって支配される(Deshiikan and Papadopoulos, 1995, Chen *et al.*, 1998)。最後の段階では表面不安定性によって薄膜が破裂する。これは他の二つの段階に比べて速いと考えられている。本章では油滴の平界面との合一挙動に及ぼす表面特性の影響を明らかにするために、逆ミセル系において滴合一に及ぼす水相中の塩の種類及び濃度の影響を調べた。さらに合一時間への連続相流動の影響を、多孔板塔内の状態を模倣した実験装置を作製することによって調べた。

7.2 実験

Fig. 7-1 に実験装置の概略図を示す。合一モジュールはガラス管と FEP (tetrafluoroethylene-hexafluoropropylene copolymer) 管で作成されており、モジュール内の滴を半透明の壁を通して観察することができる。界面に浮遊し移動する滴を観察できる部分は長さ 245 mm で、平界面を保ちモジュールの壁に滴を付着させないために FEP 管で作られている。この部分の内径は 18 mm である。水相として所定濃度で様々な塩を溶解した水溶液を 300 ml 用いた。使用した塩は NaCl、KCl、BaCl₂、CaCl₂ である。AOT 濃度の影響を調べる実験を除いたすべての実験において、油相として 50 mol/m³ AOT イソオクタン溶液 120 ml を用いた。この水相、油相を 500 ml 三角フラスコに入れ予め 25℃の恒温槽で二時間振盪し相互飽和させ、静置し相分離させた。水相、油相を相互に飽和させていない実験も別途行った。ここで飽和状態では、AOT が界面に並びその対イオンのナトリウムイオンを水相へ放出し、水相のカチオンは油相へ移動し平衡に到達している。

操作手順としては水相(連続相)をポンプで合一モジュールとリザーバとで循環させた後、30 ml の油相を油相入口よりゆっくりとモジュールへ流し込んだ。油水界面が一定位に保たれるように水相レベラーを調節し、水相流速を水相バルブによって一定に調節した。油滴は内径 0.85 mm のガラス製毛细管から生成させ一定間隔で界面に向けて吐出させた。本実験系での滴径は 0.98~1.8 mm の範囲であったが、0.1 kmol/m³ の非飽和 NaCl 系では 0.22 mm と小さかった。毛细管先端と界面の距離は 5 mm である。すべての実験は室温で行い、滴が生成し合一するまでの滴合一挙動をデジタルビデオカメラ(NV-MG3、Panasonic)を用いて録画した。それぞれの実験条件で 30 滴以上測定し、合一時間、滴流動速度及び滴径を 25 インチモニターで拡大したビデオ画像から決定した。合一時間と滴流動速度の頻度分布からメディアン値を求め、それぞれの代表値 t_c 及

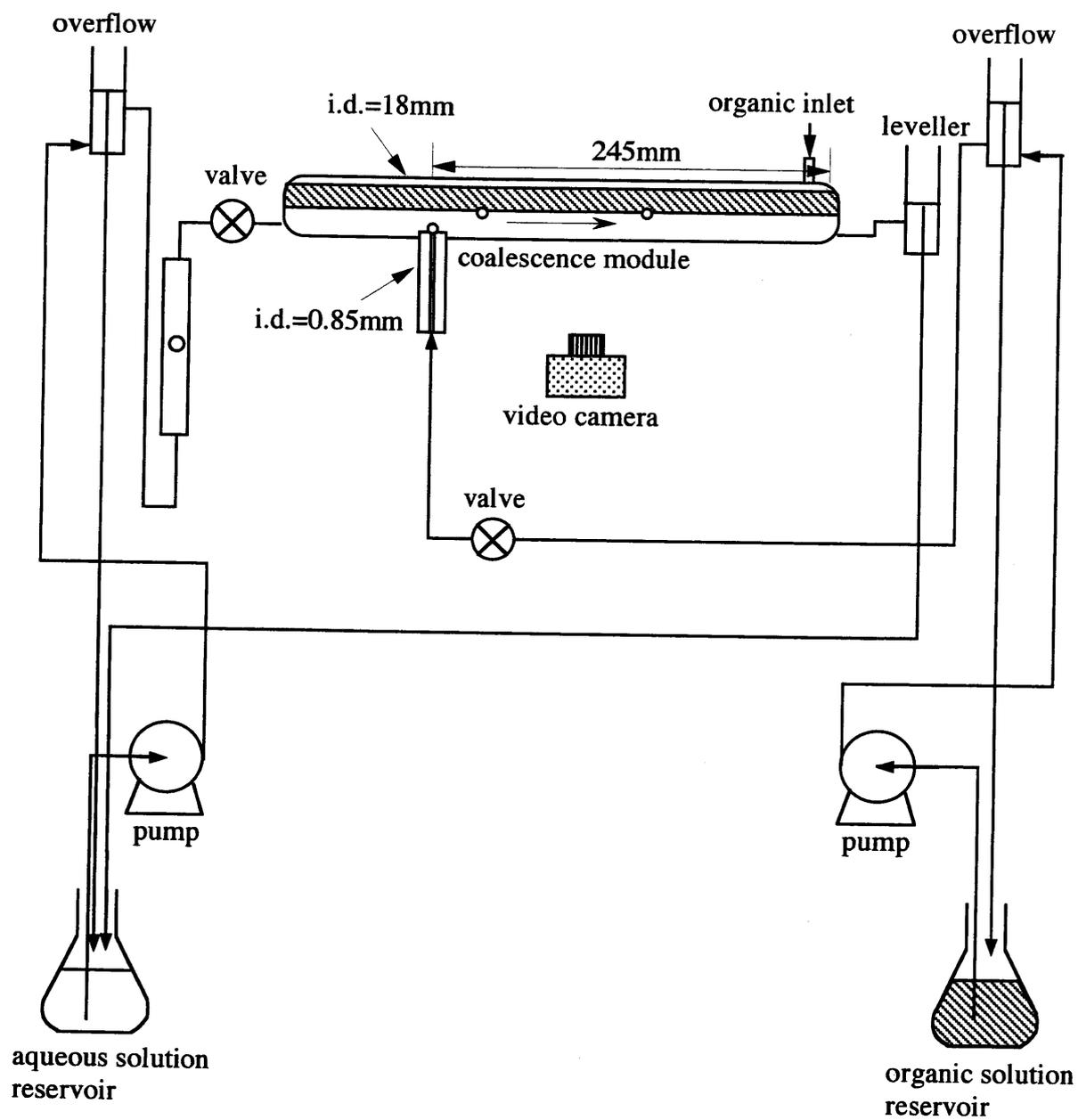


Fig. 7-1 Schematic diagram of experimental setup

び V_D とした。

7.3 結果及び考察

7.3.1 相互飽和の有無と合一時間の関係

油相と水相を相互飽和させていない系での滴合一時間を Fig. 7-2 に示し、相互飽和させた系での結果を Fig. 7-3 に示す。これらの実験では連続相は流さず滴は静止状態である。相互飽和させない系で NaCl 濃度 0.1 kmol/m^3 の場合は滴が 10 分以上合一しなかった。この場合を除いてすべての塩水溶液における合一時間は非飽和系より飽和系の方が大きくなった。その原因を次のように推論する。両相が相互に飽和されているとき油相中の AOT はほとんど逆ミセルの界面に存在している。界面の AOT イオンは水和したカチオンと相互作用しながら電離しており界面は負に帯電している。一方非飽和系の AOT は油相中に AOT-Na の形で溶解しており AOT-Na 塩で覆われた新しい界面が逆ミセルの形成に伴って連続的に形成されている。新しくできた界面の電荷は中性の AOT-Na 塩によって覆われているため小さい。つまり非飽和系での界面の方が、飽和系での荷電した界面より界面同士が接近しやすいため速く合一すると考えられる。

NaCl 溶液での合一時間は Fig. 7-2 及び 7-3 に示されるように非飽和、飽和のいずれの場合も他の塩水溶液系より大きかった。合一時間が長くなるのは以下の 2 つの理由があると考えられる。1 つ目は第 2 章で述べたように NaCl 水溶液系での滴径が他の系より小さいことである(Okada *et al.*, 2001)。界面張力の違いにより飽和の NaCl 系では約 1 mm で、KCl、CaCl₂、BaCl₂ では 1.5~1.8 mm であった。この場合、滴径減少によって浮力が約 6 分の 1 まで小さくなるので界面一滴間の薄膜排除は遅くなる。特に非飽和系での NaCl 濃度 0.1 kmol/m^3 の

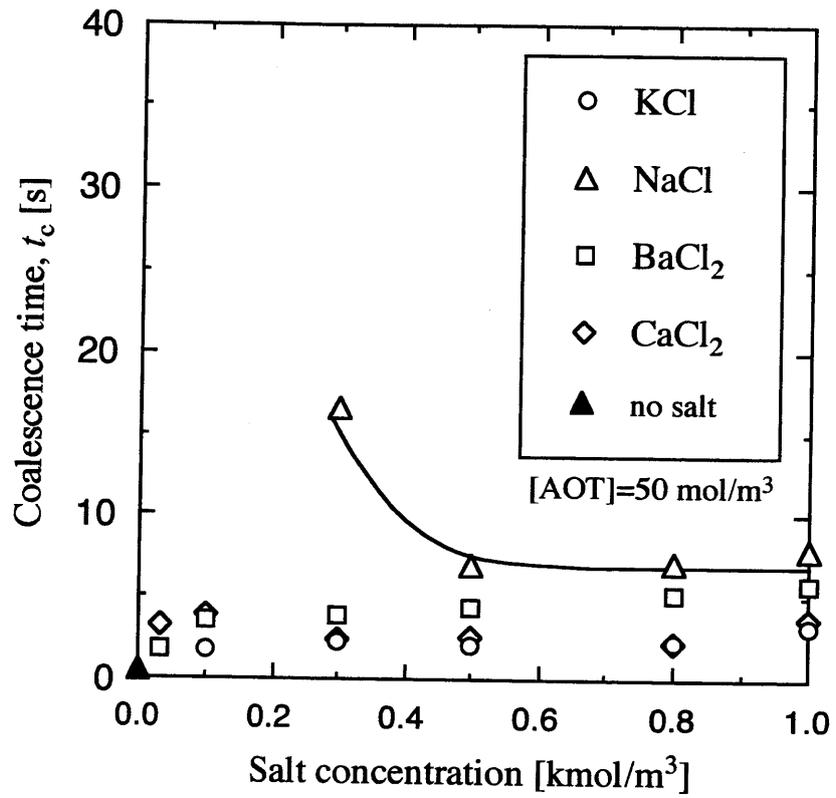


Fig. 7-2 Change in coalescence time with salt concentration in unsaturated solution without flow. (No drop coalescence was observed for 0.1 kmol/m³ NaCl system.)

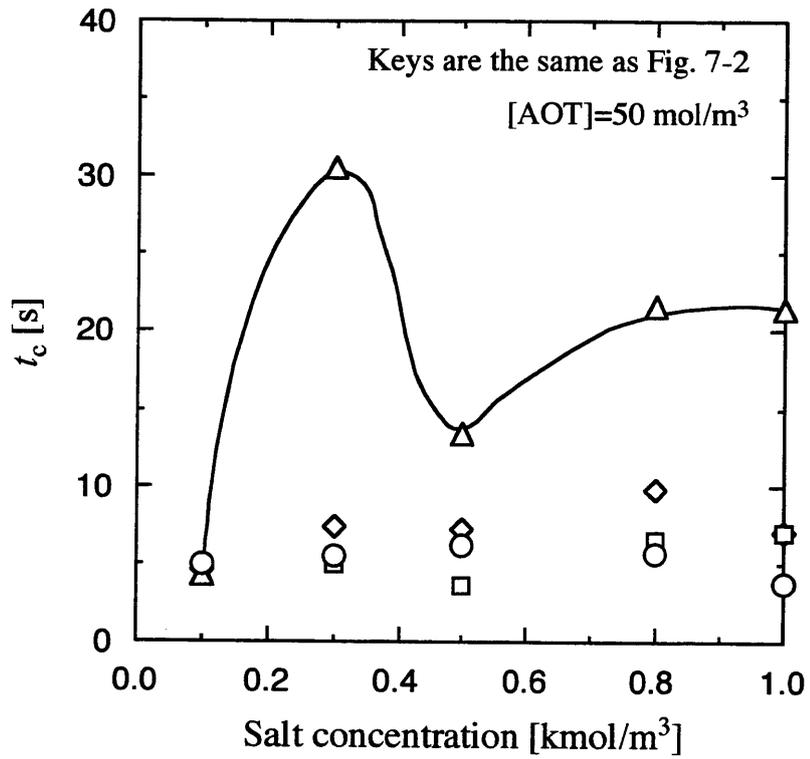


Fig. 7-3 Change in coalescence time with salt concentration in saturated solution without flow

場合滴径は非常に小さく(0.22 mm)滴は合一しなかった。2つ目にナトリウムの水和数 2.7 がカリウムの 1.7(活動度による値、化学便覧昭和 41 年度版, 1966)に比べ大きいことが原因と考えられる。カチオンと AOT イオンの相互作用はカチオンの水和数の増加と共に立体障害が起こるため弱くなる。つまり AOT イオンによって生じる界面負電荷は、カチオンと AOT との相互作用の減少と共に増加する。その結果 NaCl 系で形成される界面は電氣的に滴界面を反発し合一を抑制すると考えられる。Fig. 7-2 で示されるように NaCl 濃度増加と共に静電的反発力が減少するため合一時間は減少している。Fig. 7-2 に示した塩を含まない系の合一時間は非常に小さかった。水相に塩を含まない対照実験として AOT イソオクタン溶液を蒸留水に注ぐ実験を行ったところあらゆる場所で界面の伸縮が起こり、強いマランゴニ効果が目視で観察された。これは大きな界面攪乱が生じていることを示す。また同時に水相が白濁したことから油相中 AOT が蒸留水へ大量に溶解することが分かった。その逆に油滴中の AOT も水相へ溶解しているとも考えられる。上記 2つの現象は油水界面を不明瞭にし、滴合一を起しやすくさせる。Fig. 7-3 に示された NaCl の低濃度域と高濃度域での合一挙動については明らかではない。二価カチオンは一価カチオンより AOT と強く相互作用するので水和数が多いにもかかわらず二価カチオン(Ba では 4.2, Ca では 5.9)での合一時間は NaCl 系より小さくなった。

7.3.2 滴の流動と塩濃度の影響

一価カチオンを用いた場合の合一時間 t_c に及ぼす滴流動速度 V_D の影響を Fig. 7-4 に示す。水相、油相は予め相互飽和させたものを用いた。[NaCl]=0.8~1.0 kmol/m³ で t_c は滴が流れている場合には減少が見られた。また[NaCl]=0.8~1.0 kmol/m³ での結果を除いて t_c に及ぼす塩濃度の影響は Fig. 7-3 の結果と同じであ

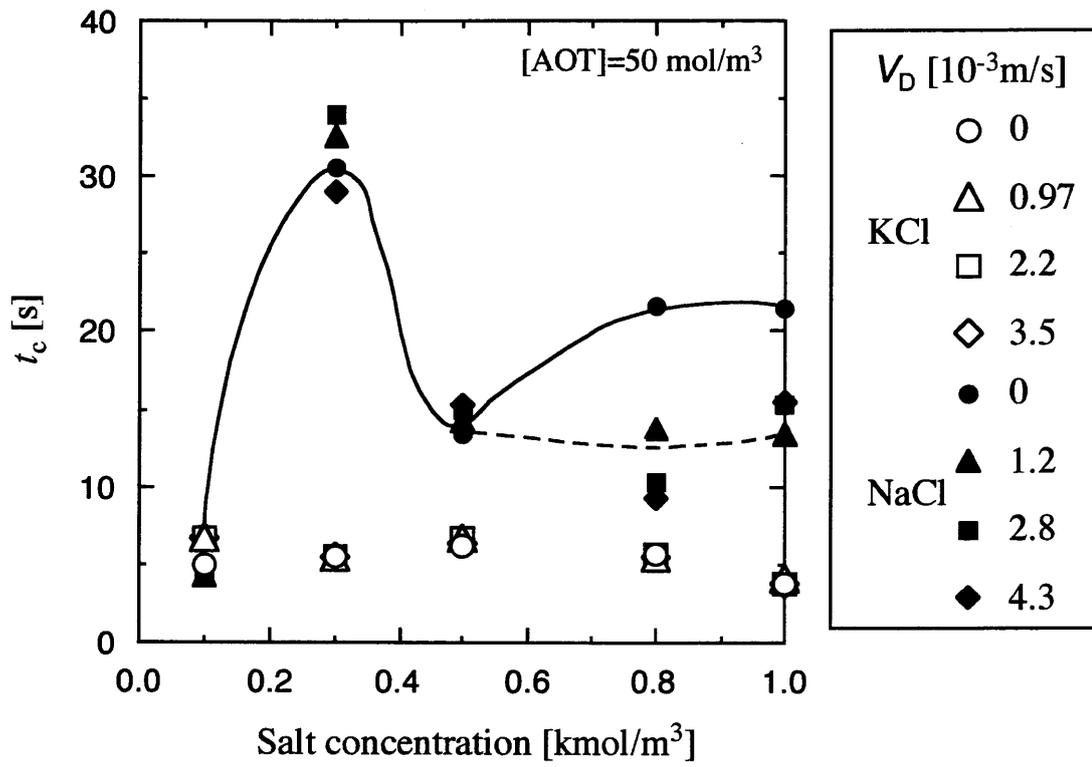


Fig. 7-4 Effect of salt concentration on t_c for NaCl and KCl systems

った。KCl 系の場合、合一時間は滴流動によってほとんど変化しなかった。この結果は第 6 章での滴流動が合一時間に影響を与えるという結果とは相容れないものであった。

Fig. 7-5 に二価カチオンを用いた場合の結果を示す。データが分散していて滴流動との明確な関連性は認められない。BaCl₂系において t_c は BaCl₂ 濃度と共に増加した。この t_c 増加の原因の 1 つは AOT イオンとバリウムイオンの相互作用形態の変化によるものではないかと考えられる。

Fig. 7-6 に二価カチオンと AOT との相互作用状態の概念図を示し Fig. 7-5 の特異的な挙動について説明する。比較的低い二価カチオン濃度ではバリウムイオンは Fig. 7-6(a)のように AOT と相互作用する。ここでバリウムイオンと AOT は 1 対 2 の割合である。第 4 章(Nishii *et al.*, 2002a)にて、著者らは AOT 逆ミセル形成に伴って油相へ入るカチオン量を測定し、バリウムイオン量が AOT 当量の 3 倍まで増加することを見いだした。この結果は Fig. 7-6(b)または(c)の相互作用形態で説明される。

水相 BaCl₂ 濃度が小さいときは、おそらく Fig. 7-6(a)に示されるように 1 つのバリウムイオンは 2 つの AOT イオンと相互作用し、二価カチオンと AOT イオンは界面で強く相互作用するので界面は電氣的に中性であろう。従って低濃度の BaCl₂ では滴合一は静電的反発力に影響されない。Fig. 7-6(b)に示されるように高い BaCl₂ 濃度になり 1 つのバリウムイオンが 1 つの AOT イオンと相互作用するとき塩化物イオンが水相側界面でバリウムイオンと相互作用する。塩化物イオンとバリウムイオンとの相互作用は弱いので離れやすく界面は正に荷電しやすくなる。その結果高い BaCl₂ 濃度では滴合一は静電的反発力によって抑制される。

CaCl₂ の場合、滴合一時間は低い濃度域では濃度と共に増加し 1.0kmol/m³ の

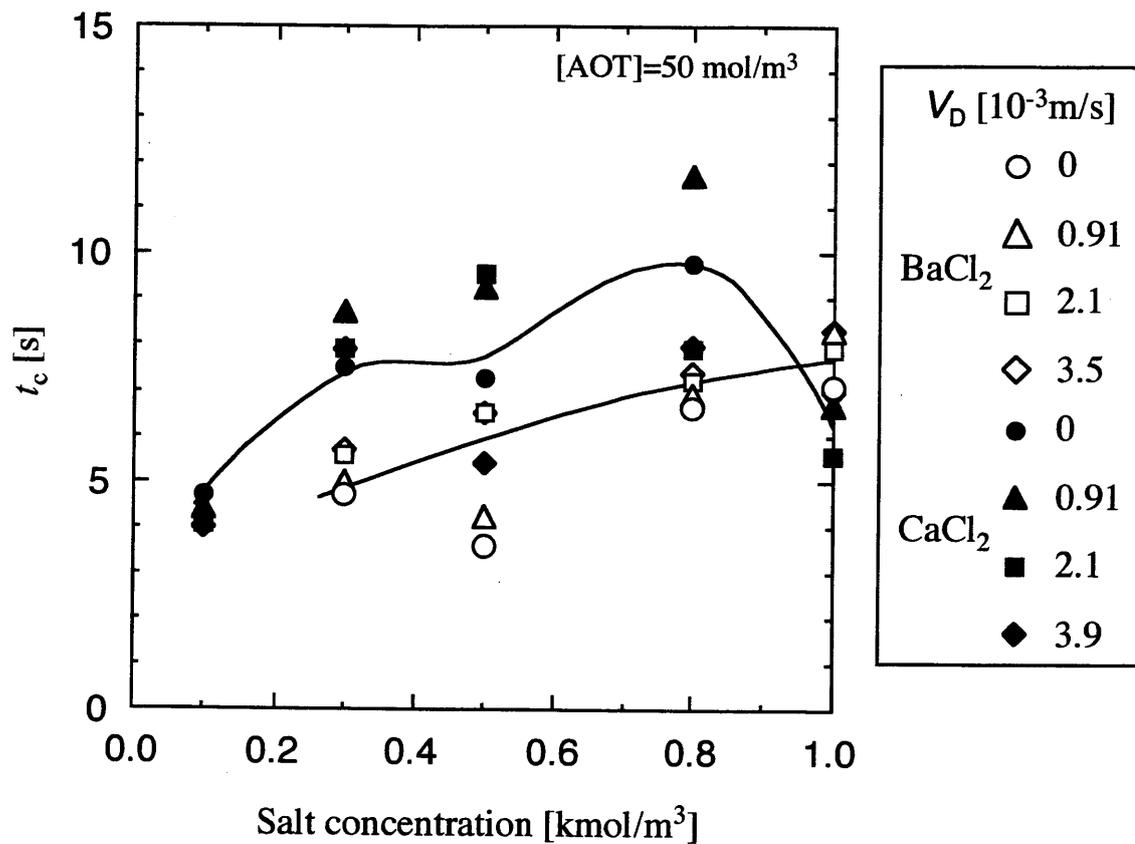


Fig. 7-5 Effect of salt concentration on t_c for BaCl₂ and CaCl₂ systems

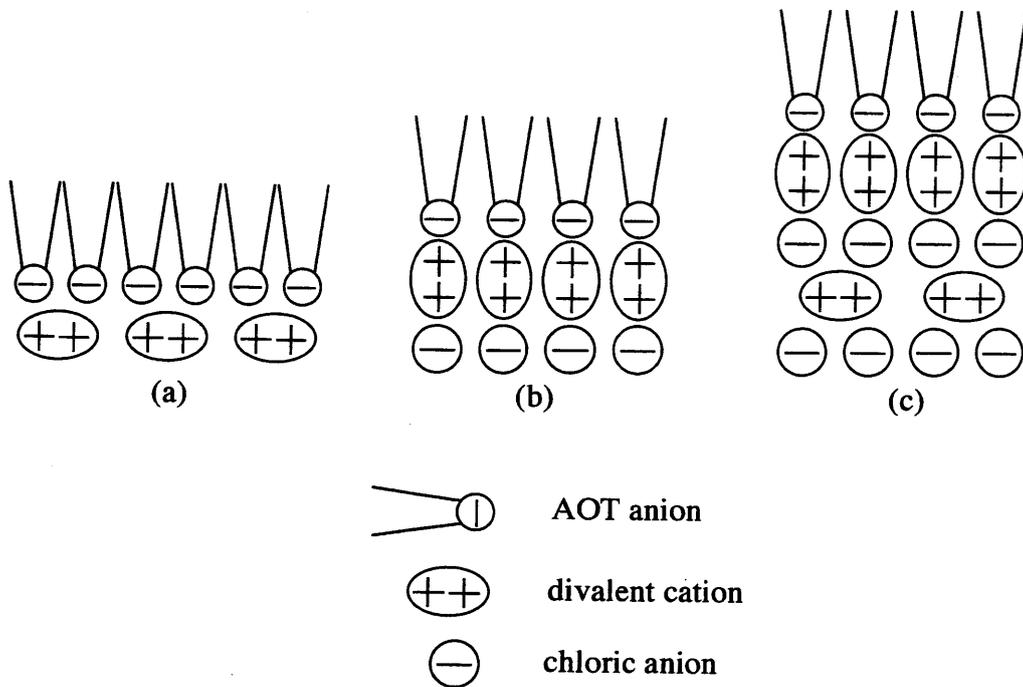


Fig. 7-6 Interaction form of divalent cation to AOT ion

場合を除きその値は BaCl_2 の場合より大きかった。カルシウムイオンの水和数は 5.9 で、バリウムイオンの 4.2 より大きい、つまりカルシウムイオンと AOT イオンとの相互作用は比較的小さい。その結果低い濃度域で Fig. 7-6 の(a)から(b)に相互作用形態が移行し、合一時間は長くなったと考えられる。水和数はカルシウムイオンと塩化物イオンとの相互作用にも影響を与え CaCl_2 系での界面の正電荷は BaCl_2 系でのそれより強いと考えられる。

7.3.3 AOT 濃度の影響

水相 KCl 濃度 0.3 kmol/m^3 における t_c に及ぼす AOT 濃度の影響を Fig. 7-7 に示す。合一時間は $[\text{AOT}] = 0.01 \sim 0.05 \text{ mol/m}^3$ の範囲を除き AOT 濃度の増加と共に減少した。滴の浮力と界面への衝突によって滴-界面間の薄膜液排除は起こる。高い AOT 濃度に於いて、薄膜液排除によって生じた最接近界面とその周辺での AOT 濃度勾配は、滴内部からの AOT 補給によって小さくなるので薄膜液排除がスムーズに起き合一時間は短くなる。AOT 濃度の減少と共に、滴内部からの界面への AOT 補給速度が減少し滴界面での濃度勾配が大きいままになりマランゴニ膜安定効果が生じ、膜液排除と逆方向に界面が動くため薄膜は薄くなるのを抑制され、AOT 濃度減少と共に t_c は増加する。Fig. 7-7 の矢印で表した AOT 逆ミセル系での cmc (臨界ミセル濃度、本実験条件では約 0.5 mol/m^3) より低い AOT 濃度 0.05 mol/m^3 においても依然マランゴニ効果は大きく、連続相流速が増加すると、滴下部の連続相流れは Fig.7-8 に示すように滴界面での AOT 濃度勾配を大きくする。ここで界面の AOT 濃度勾配を均一にするように働くマランゴニ安定効果は薄膜液排除と逆方向に界面を動かすため(Fig. 7-8 の太い矢印)、膜液排除が抑制される。 $[\text{AOT}] = 0.01 \text{ mol/m}^3$ のようなさらに低い濃度域では、滴界面にほとんど AOT が存在せず AOT 濃度勾配によって生じるマ

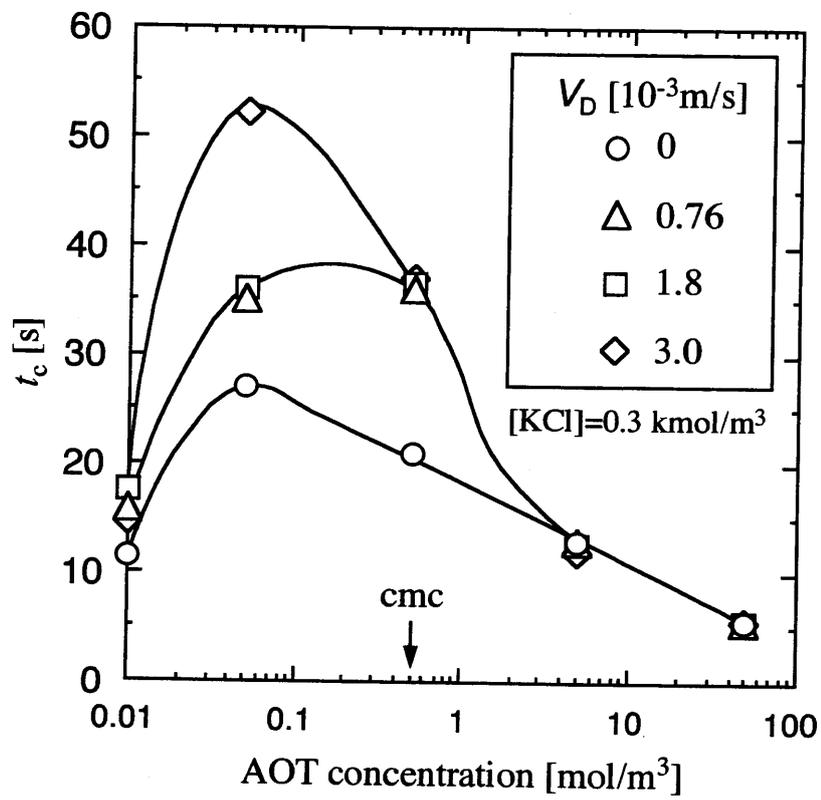


Fig. 7-7 Effect of AOT concentration on t_c for KCl system

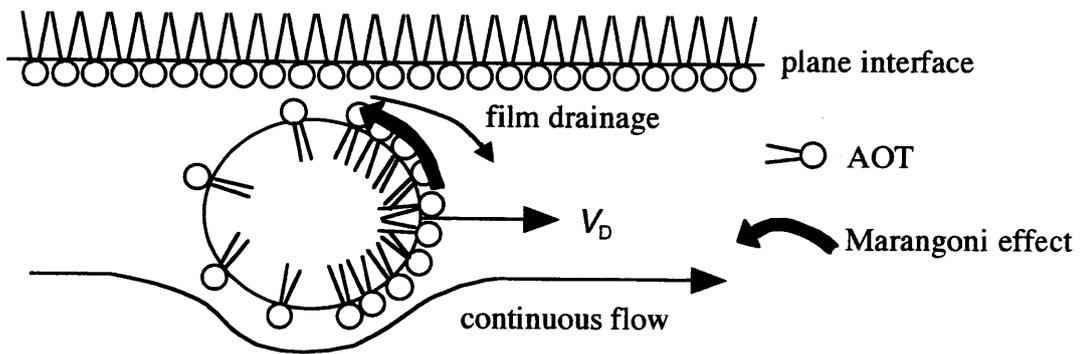


Fig. 7-8 Movement of AOT at drop interface by surrounding flow

ランゴニ効果は非常に小さいため薄膜液排除抑制効果は低減し、滴合一はスムーズに進行し t_c は小さくなったと考えられる。

7.3.4 合一時間分布

飽和系の NaCl、BaCl₂ での合一時間の積算分布を例として Fig. 7-9 に示す。○と□のキーはそれぞれ静止している滴、最大流速で流れている滴での結果を示している。△のキーは非飽和の塩を含んでいない系での結果である。曲線が急な変化を持っているほどデータの分散が小さいことを示す。Table 7-1(a)-(f)にすべての系について合一時間の標準偏差(SD)を計算した結果を示す。非飽和の静止滴の結果(a)における SD は小さいが低塩濃度における SD は特に NaCl、CaCl₂ 系で大きかった。すべての飽和塩系(b)-(f)で流動滴の SD が静止滴より小さくなった。これは流動している条件では滴と油相の間の薄膜における不安定性の発生する確率が高いことを示している。NaCl 系の SD は他の塩系に比べて大きい。合一時間も他の塩系に比べて大きく、相対的標準偏差は同程度である。AOT 濃度の影響を調べた場合(f)についても合一時間の SD は Fig. 7-7 に示す合一時間が大きいほど SD が大きかった。[AOT]=0.05 mol/m³ の SD の値は大きく F の値による変化は小さい。しかし合一時間は F の増加とともに大きくなるので、相対的標準偏差は滴が流動することにより小さくなる。このことは(b)-(e)の結果と一致している。

7.4 結言

多孔板塔での滴合一挙動を詳しく検討するために、逆ミセル系での滴合一時間を塩の種類、濃度、滴流動速度の関数として測定した。連続水相と分散油滴

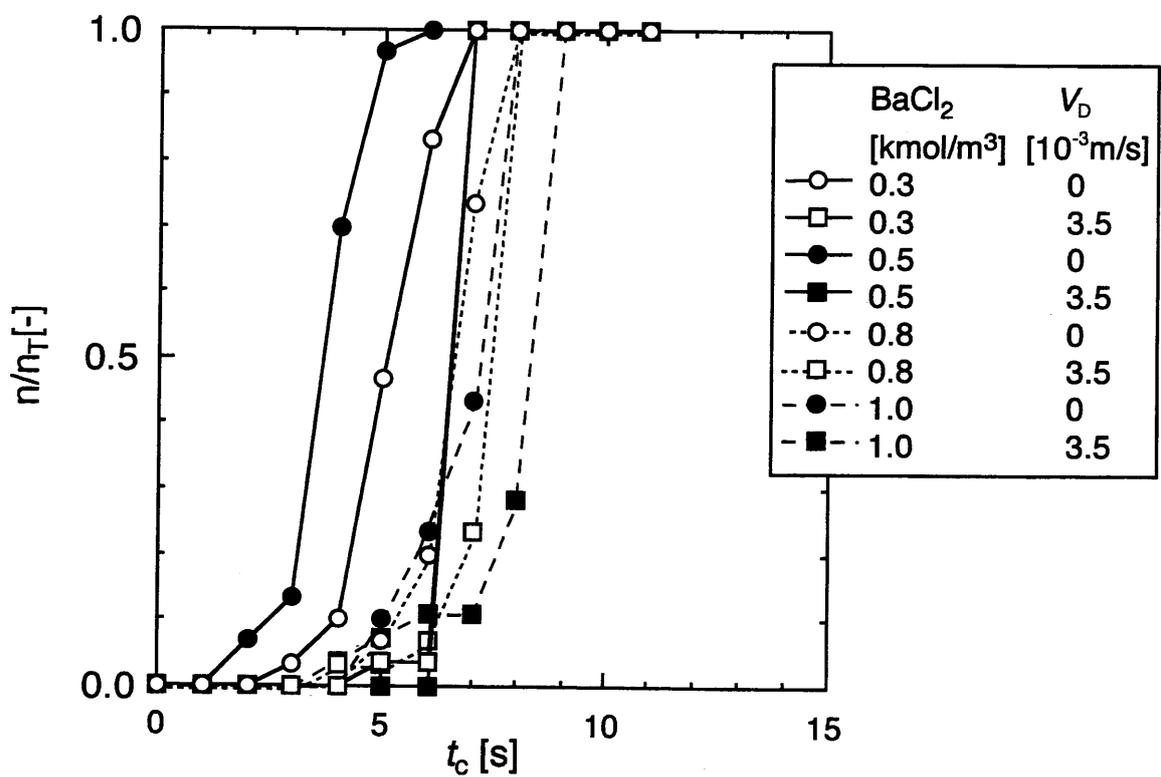
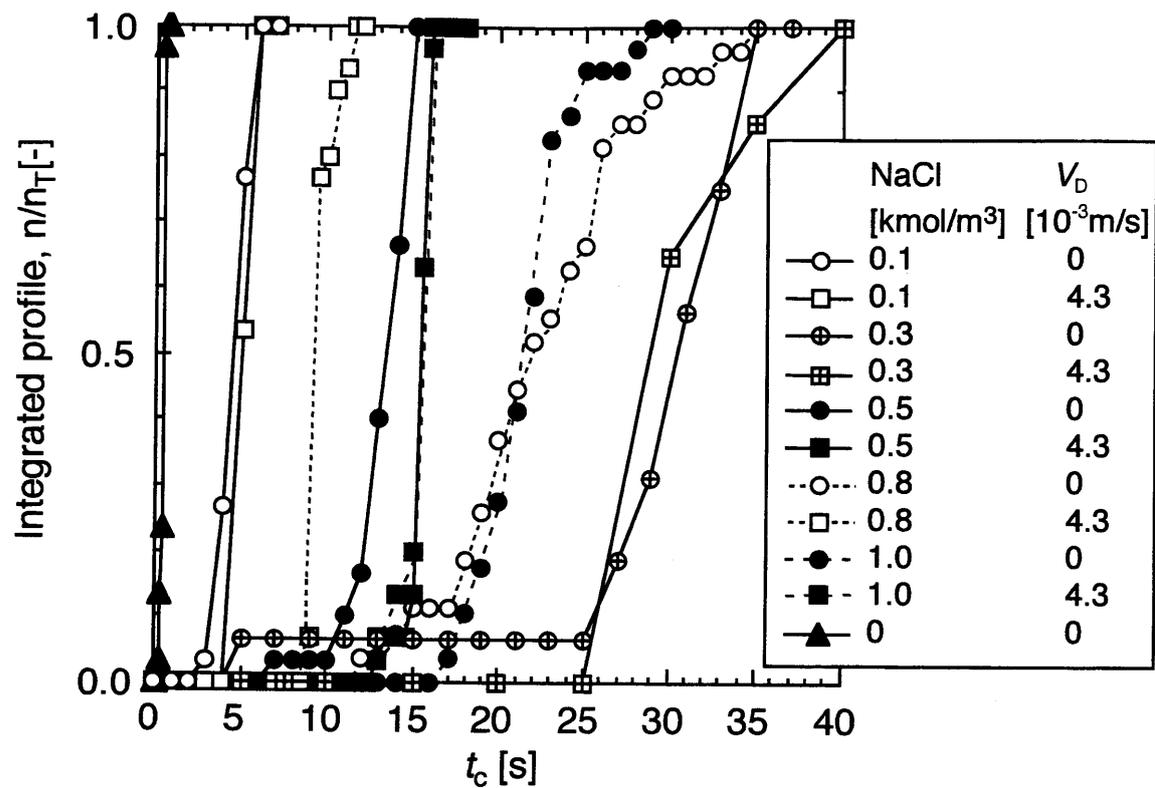


Fig. 7-9 Integrated profile for drop coalescence time in NaCl and BaCl₂ systems

Table 7-1 Standard deviations for drop coalescence time

(a) salt type	salt concentration [kmol/m ³]						
	0	0.03	0.1	0.3	0.5	0.8	1.0
KCl	0.1		0.4	0.7	0.7	0.7	0.8
NaCl	0.1			4.6	1.3	1.7	2.9
CaCl ₂	0.1	0.2	0.7	0.5	0.8	0.8	0.5
BaCl ₂	0.1	1.9	1.8	1.3	0.9	1.4	1.2

*drop flow rate, $F=0$ for unsaturated system

(b) KCl[kmol/m ³]	V_D [x10 ⁻³ m/s]			
	0	0.97	2.2	3.5
0.1	2.5	0.6	0.6	0.5
0.3	0.8	0.6	0.2	0.3
0.5	0.4	0.3	0.2	0.3
0.8	0.8	0.8	0.7	0.4
1.0	0.1	0.4	0.0	0.1

*for saturated system

(c) NaCl[kmol/m ³]	V_D [x10 ⁻³ m/s]			
	0	1.2	2.8	4.3
0.1	0.8	0.6	0.5	0.5
0.3	7.0	7.6	4.6	3.7
0.5	1.8	1.3	0.5	0.8
0.8	5.3	2.4	0.6	0.6
1.0	2.7	3.9	1.0	1.0

*for saturated system

(d) CaCl ₂ [kmol/m ³]	V_D [x10 ⁻³ m/s]			
	0	0.91	2.1	3.9
0.1	0.1	0.1	0.0	0.2
0.3	0.3	0.2	0.1	0.1
0.5	1.9	1.1	0.7	0.4
0.8	1.1	0.9	0.5	0.3
1.0	0.8	0.7	0.3	0.5

*for saturated system

(e) BaCl ₂ [kmol/m ³]	V_D [x10 ⁻³ m/s]			
	0	0.91	2.1	3.5
0.3	1.0	1.4	0.2	0.4
0.5	0.8	1.0	0.3	0.0
0.8	0.8	0.9	1.0	0.8
1.0	1.0	1.0	0.8	1.3

*for saturated system

(f) AOT[mol/m ³]	V_D [x10 ⁻³ m/s]			
	0	0.76	1.8	3.0
0.01	5.3	5.1	3.8	3.5
0.05	19.0	16.0	19.0	20.0
0.5	7.3	6.8	4.2	5.9
5	0.7	1.1	0.4	0.8
50	0.8	0.6	0.2	0.3

*presaturated with aqueous solution of 0.3kmol/m³ KCl

を相互飽和すると界面の AOT がイオン化し電气的反発を起こし合一時間は長くなった。一方、飽和しない場合、ナトリウムイオンが AOT から解離している割合が比較的小さいことから電气的な反発は小さく合一は速かった。また NaCl を用いた場合は低界面張力系のため小さい滴を形成し、滴の浮力が小さいことから特に合一時間は長くなった。同じ価数のカチオンにおいては、その水和数が多いほど AOT から解離しやすく合一時間が長くなる結果を示した。二価のカチオン系では界面での AOT との相互作用形態がカチオン濃度により変化し、そのことが合一時間に影響を及ぼした。AOT 濃度の合一時間への影響を調べたところ、低い AOT 濃度ではマランゴニ効果が大きく膜液排除を阻害し合一時間は長くなり、連続相流れがある場合、滴界面での AOT 濃度勾配増大によってより合一しにくくなった。ごく低い AOT 濃度では十分なマランゴニ対流は生じず合一しやすかった。

References

- Ban, T., F. Kawaizumi, S. Nii and K. Takahashi, *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 5385-5391 (2000)
- Ban, T., F. Kawaizumi, S. Nii and K. Takahashi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **34**, 1461-1465 (2001)
- Chen, C., J. Maa, Y. Yang and C. Chang, *Surface Sci.*, **406**, 167-177 (1998)
- Deshiikan, S. R. and K. D. Papadopoulos, *J. Colloid Interface Sci.*, **174**, 313-318 (1995)
- Li, H. B., G. S. Luo, W. Y. Fei and J. D. Wang, *Chem. Eng. J.*, **78**, 225-229 (2000)
- Nishii, Y., T. Kinugasa, S. Nii and K. Takahashi, *J. Memb. Sci.*, **195**, 11-21 (2002a)
- Nishii, Y., C. Hara, T. Kinugasa, S. Nii and K. Takahashi, *Solv. Extr. Res. Dev., Jpn.*, **9**, 111-119 (2002b)

Okada, K., Y. Nishii, S. Nii and K. Takahashi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **34**, 501-505 (2001)

Stevens, G. W., H. R. C. Pratt and D. R. Tai, *J. Colloid Interface Sci.*, **136**, 470-485
(1989)

Treybal, R. E., *Mass-Transfer Operations*, 3rd ed., pp531-541, McGraw-Hill,
Kogakusha (1990)

第8章

逆ミセルを用いたタンパク質の抽出におけるカチオン種と pH の影響

8.1 緒言

タンパク質が AOT 逆ミセルによって内核水に可溶化されることはよく知られている(Luisi *et al.*, 1979, Luisi, 1985)。その抽出挙動についての研究が多く行われており(Goklen and Hatton, 1985, Dekker *et. al.*, 1989, Kinugasa *et. al.*, 1991)、タンパク質抽出を制御するパラメータが解明されつつある。タンパク質は電荷を持った比較的大きな分子であるので、タンパク質と界面活性剤分子間の静電的相互作用、疎水的相互作用に影響を受ける。著者らは第4章において液膜を通るリゾチームの透過挙動(Nishii *et al.*, 2001)を調べ、供給相、回収相の両相のカチオン種が透過挙動に影響を与えるという結果を得た。カチオンはリゾチームとともに輸送されるので、カチオン-界面活性剤分子間の相互作用は逆ミセルの安定性を変化させると考えられる。また相互作用の形態はカチオン種や価数によって変わる。

Hamada *et al.*(2001)は AOT 逆ミセル内核水の可溶化状態に及ぼす NaCl、NaNO₃、MgCl₂、AlCl₃ のイオン強度の影響を調べたところ、その依存性の大きさの順番はホフマイスター系列と一致した。これは逆ミセル系の抽出挙動を議論する上でイオンの水和が重要であることを示している。

本章では、KCl、BaCl₂、CaCl₂ の3つの塩の系で、水相の pH を広く変化させてリゾチームの抽出率を調べた。二価カチオン系での抽出挙動を界面におけるカチオン、界面活性剤及びリゾチーム間の相互作用から考察した。BaCl₂、CaCl₂

での挙動の違いは水和数の違いによって議論した。また高 pH 条件下においてリゾチーム活性が維持されるかどうかを確かめた。

8.2 実験

一価カチオンの塩化物としては KCl、二価としては CaCl₂、BaCl₂ を用いた。いずれの試薬も精製せずにそのまま使用した。有機相は 0.05 kmol/m³ になるように AOT をイソオクタンに溶解して調製した。水相にはリゾチームを様々な pH の塩水溶液に溶解し調製した。pH 調節においては、塩酸と水相に使用した塩の水酸化物を用いることによって他の金属イオンの混入を防いだ。

8.2.1 抽出平衡実験

10 ml のリゾチーム及び塩を含む水相と同体積の油相とを 50 ml 三角フラスコに仕込み、297 K の恒温槽で 2 時間振盪した。界面または両バルク相においてリゾチームの沈殿は起こらなかった。静置し相分離させた後、水相リゾチーム濃度を UV-Vis 吸光光度計(Shimadzu UV-1600)で 280 nm の吸光度を測定することにより決定した。水相 pH 値は相接触の前後に pH メーター(HM-20P、TOA Electronics)によって測定した。

8.2.2 リゾチームの活性測定

様々な pH に調節した 0.3 kmol/m³ CaCl₂ 水溶液から油相へ抽出されたリゾチームを 1.0 kmol/m³ KCl、pH=12 の逆抽出水相へ移動させた後、水相中のリゾチーム活性を Imoto and Yagishita (1971)の方法で測定した。

8.3 結果及び考察

8.3.1 KCl 系における抽出率に及ぼす pH の影響

タンパク質の逆ミセル抽出は主に KCl を含むタンパク質水溶液を用いて行われている。また正抽出には比較的低い KCl 濃度が適していることが分かっている(Dekker *et al.*, 1989、Kinugasa *et al.*, 1991、Hatton, 1989)。Fig. 8-1 に KCl 系での平衡抽出率 E に及ぼす pH の影響を示す。pH 増加とともに抽出率は減少し、リゾチームと界面の AOT 間の静電的引力が重要であることが示された。KCl 濃度の増加と共に抽出率は急激に減少し 0 に近づいた。リゾチームの等電点 $pI=11.0$ では静電遮蔽効果及びタンパク質表面正電荷の減少に伴う界面活性剤との引力減少によりすべての KCl 濃度において抽出率は 0 になった。1.0 kmol/m³ KCl では全く抽出は起こらずタンパク質-界面活性剤間の引力が存在しないことを示している。

8.3.2 BaCl₂系

Fig. 8-2(a)および(b)に BaCl₂系での結果を示す。高塩濃度での結果は低塩濃度での結果と大きく異なることから別の図に分けてプロットした。Fig. 8-2(a)に見られるように抽出率は pH の増加と共に減少し pI において最小値に達し、 pI より高い pH において急激に増加した。Fig. 8-2(b)で示す 0.6kmol/m³ 以上の濃度では低い濃度での挙動と全く異なる挙動が観測された。 pI 以上の pH で抽出率は急激に増加し、塩濃度上昇による違いは観測されなかった。

pI よりも小さい pH での塩濃度の抽出率変化への影響を考えると、0.3~0.5 kmol/m³ で抽出率は広いピークを持ち 0.6 kmol/m³ で急激に抽出率は低下しそれ以上の塩濃度では一定となっている。この特異的な挙動はすでに第 4 章、

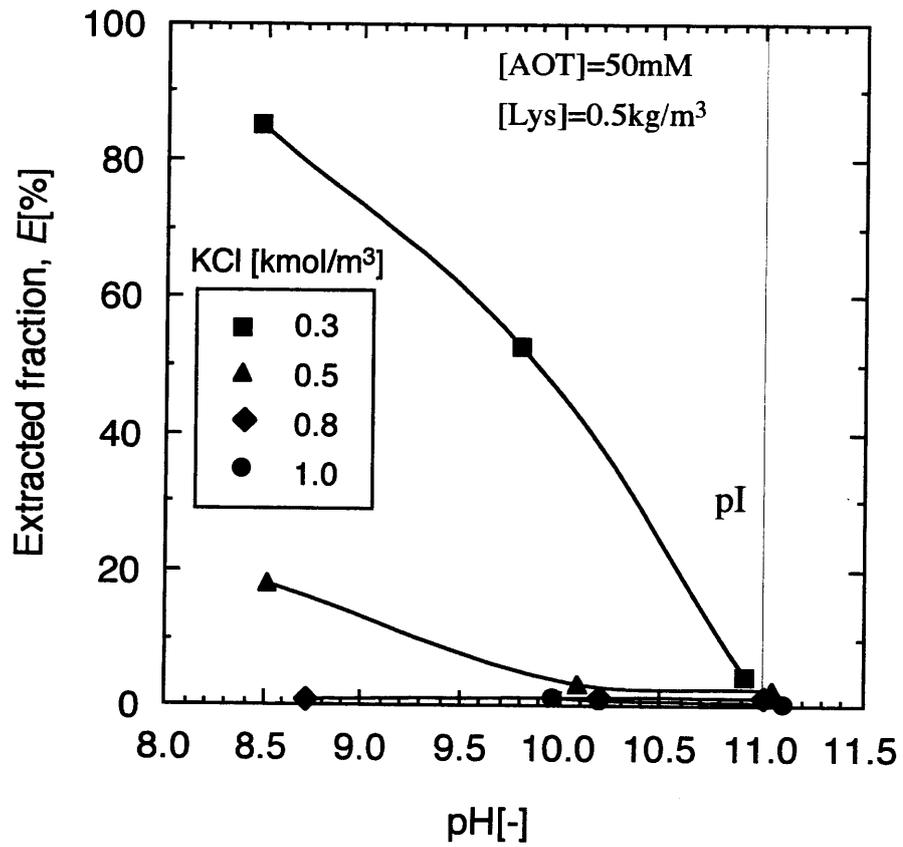


Fig.8-1 Effect of pH on extracted fraction of lysozyme in KCl system

第7章で議論したように Figs. 8-3 に模式的に示した界面状態によって説明される。Fig. 8-3(a)に示すように低い BaCl_2 濃度では1つのバリウムイオンは2つの AOT イオンと界面で結合している。AOT は陰イオン界面活性剤なので、界面はイオン交換サイトと考えることができる。Takahashi *et al.* (1989)はカチオン交換膜を通してのイオン交換についての研究から二価カチオンのイオン交換サイトへの結合速度は一価カチオンと同程度だがイオン交換サイトからの脱離速度は二価カチオンの方が遅いことを報告している。バリウムイオンと2つの AOT が強い架け橋状に結合している場合バリウムイオンとリゾチームとの交換が頻繁には起こりにくい。また Dungan *et al.*(1991)が提案しているように、リゾチームが逆ミセルに入り込むのは界面変形によって起こる。これも考慮に入れるとバリウムイオンと AOT との間に強い相互作用が生じている場合、界面が柔軟性を失ったことも抽出率が低下した要因と考えられる。

BaCl_2 濃度の増加と共に界面に到達可能なバリウムイオンの数も増加する。第4章で示したように著者ら(Nishii *et al.*, 2001)は塩化物イオンのバリウムイオンへの相互作用によって AOT- Ba^{2+} -Cl⁻の結合を生じると提案している(Fig. 8-3(b) 参照)。塩濃度の増加と共に AOT 及び塩化物イオンと相互作用するバリウムイオンが存在し始める。AOT と 1 : 1 で結合したバリウムイオンは AOT から離れ易いのでこのタイプの相互作用形態が増加するとバリウムイオンとリゾチームとのイオン交換が界面で起こりやすくなる。 BaCl_2 濃度が $0.3\sim 0.5 \text{ kmol/m}^3$ でリゾチームの高い抽出率が得られたのはバリウムイオンと AOT との相互作用の形態が変化し界面が柔軟になったことも1つの原因と考えられる。

BaCl_2 濃度が非常に大きいとき、AOT 及び塩化物イオンと相互作用するバリウムイオン数は Fig. 8-3(c)に示されるように顕著に増加する。バリウムイオン量がリゾチームよりずっと多いので、正に帯電した高分子であるリゾチームは

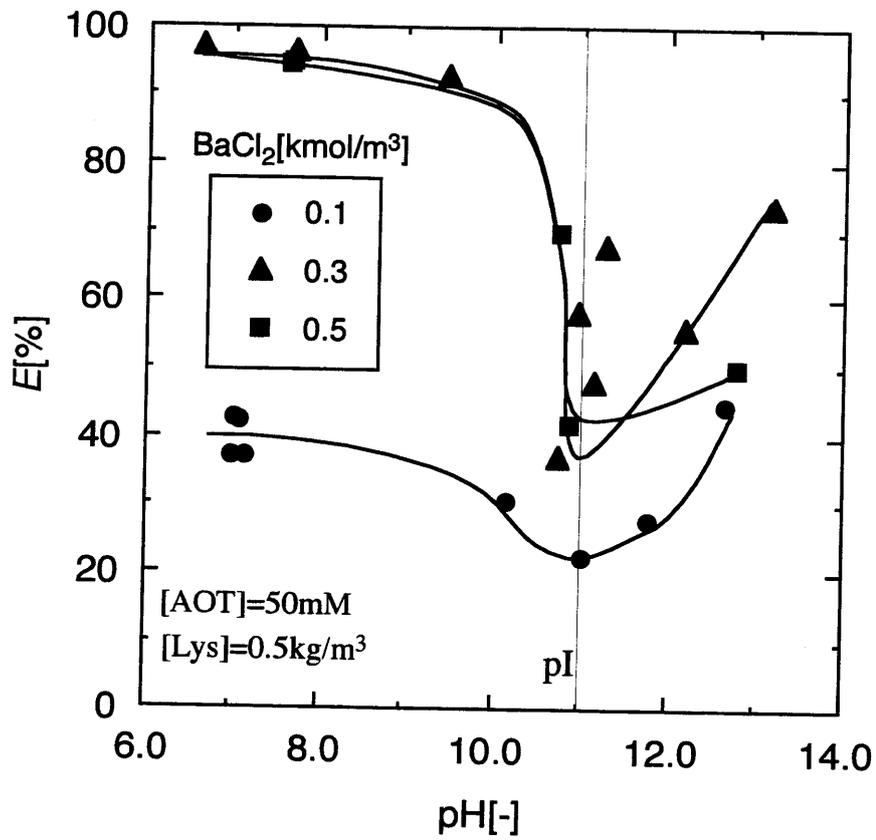


Fig.8-2(a) Extracted fraction of lysozyme in $BaCl_2$ system for lower salt concentrations

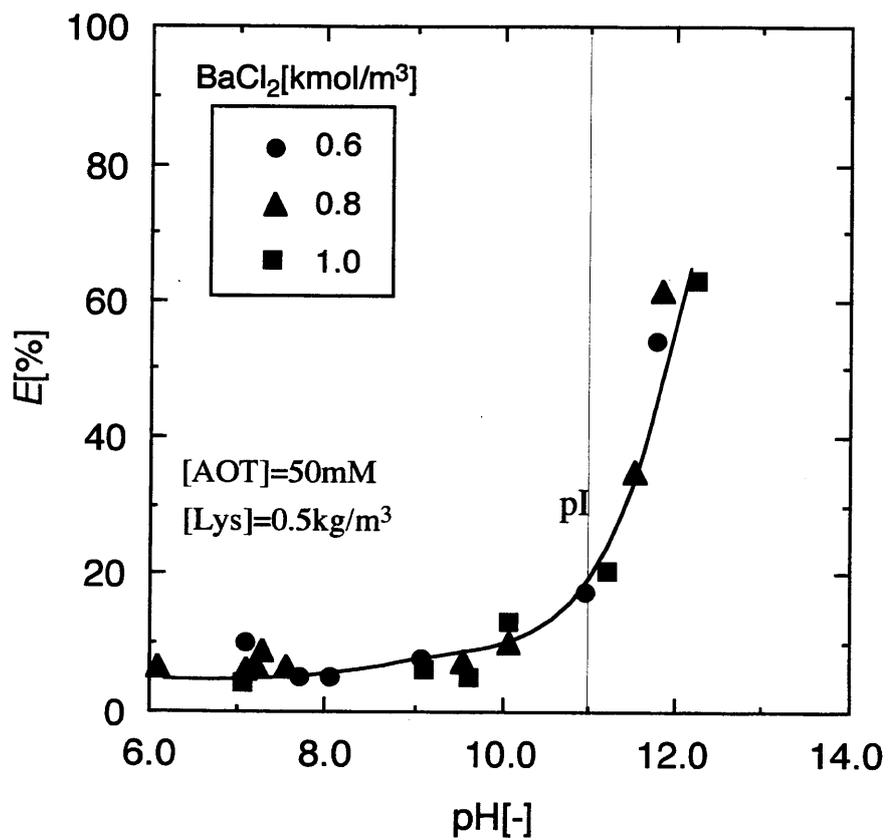


Fig.8-2(b) Extracted fraction of lysozyme in $BaCl_2$ system for higher salt concentrations

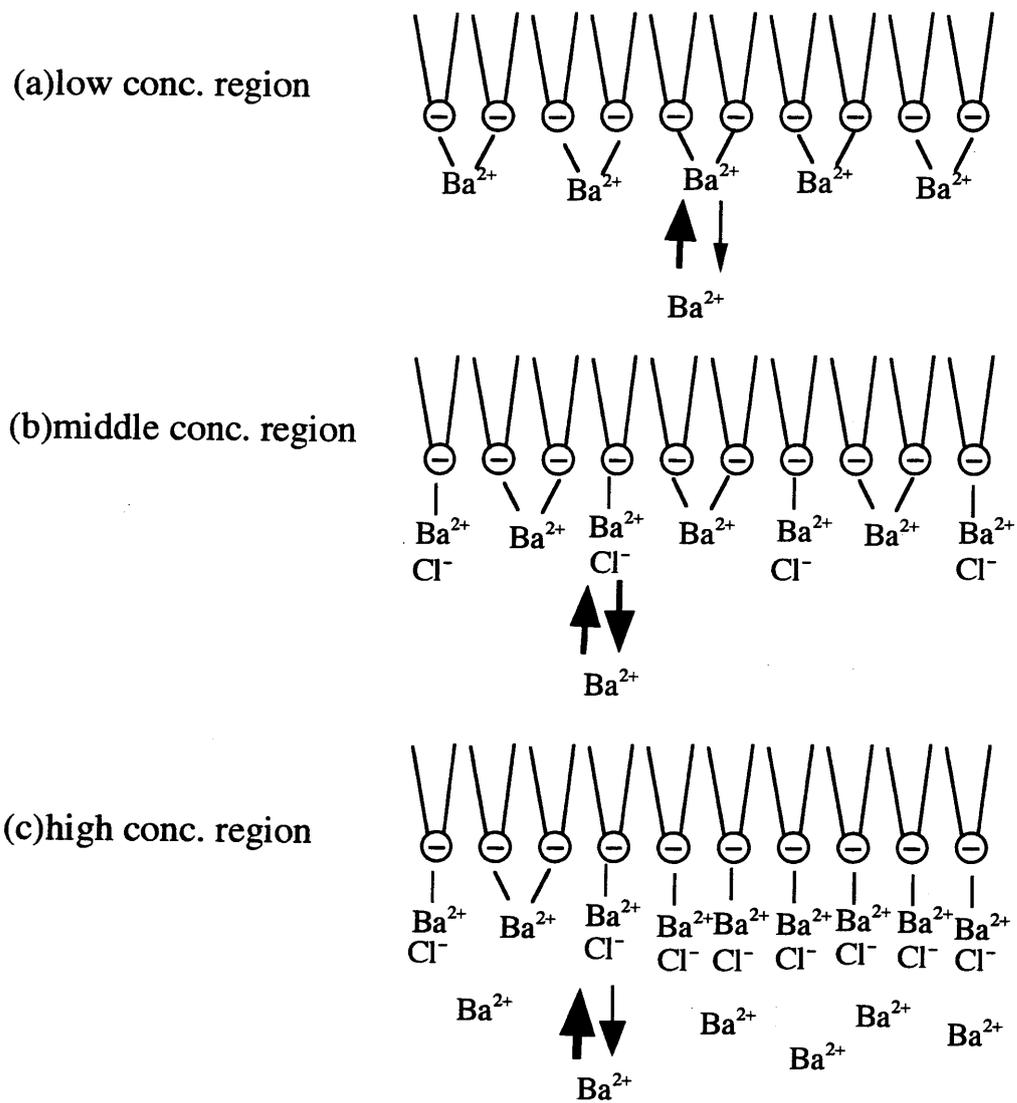


Fig.8-3 Schematic view of combinations of AOT with ions

小さいカチオンとの競合の結果、界面に接近できない。一方 pH が pI より大きいときリゾチームは負に帯電するので、リゾチームはバリウムイオンと結合している界面近傍の塩化物イオンとイオン交換可能なので抽出されると考えられる。

8.3.3 CaCl₂系

Fig. 8-4 に CaCl₂系での結果を示す。抽出率は CaCl₂濃度の増加と共に減少した。0.5 kmol/m³以上の塩濃度において、pI より低い pH で抽出率は最小値を持った。KCl や BaCl₂の系ではこのような pI シフトは観測されなかった。リゾチームの逆ミセル抽出ではリゾチームと AOT との静電的相互作用がその主な推進力なので、抽出率が最小値を示す pH においてタンパク質が正味電荷 0 になっていることを示す。これはカルシウムイオンとリゾチームとの間に特異的な相互作用があることを示す。KCl 系で Tanford and Wagner (1954)はリゾチームの pI はイオン強度に依存しないことを報告している。カルシウムイオンとリゾチームとの相互作用を議論するために、平衡到達の前後での水溶液の pH つまり水素イオン濃度変化を調べた。Fig. 8-5 に溶液の初期 pH に対する放出された水素イオン濃度のプロットを示す。リゾチームの pI である pH11 において CaCl₂の系では BaCl₂の系に比べ 300 倍の水素イオンが放出された。これはカルシウムイオンと分子内のプロトンとのイオン交換が多く起こっていることを示し、カルシウムのリゾチームへの強い親和性によってリゾチーム等電点の低 pH へのシフトが起こったと考えられる。

CaCl₂系の抽出率を BaCl₂の場合と比較すると CaCl₂での抽出率は同じ濃度の BaCl₂の場合と比べて非常に大きいことが分かる。Fig. 8-2(a)と Fig. 8-4 の結果を比較すると低い塩濃度域において大きな違いが認められる。この差異はカチ

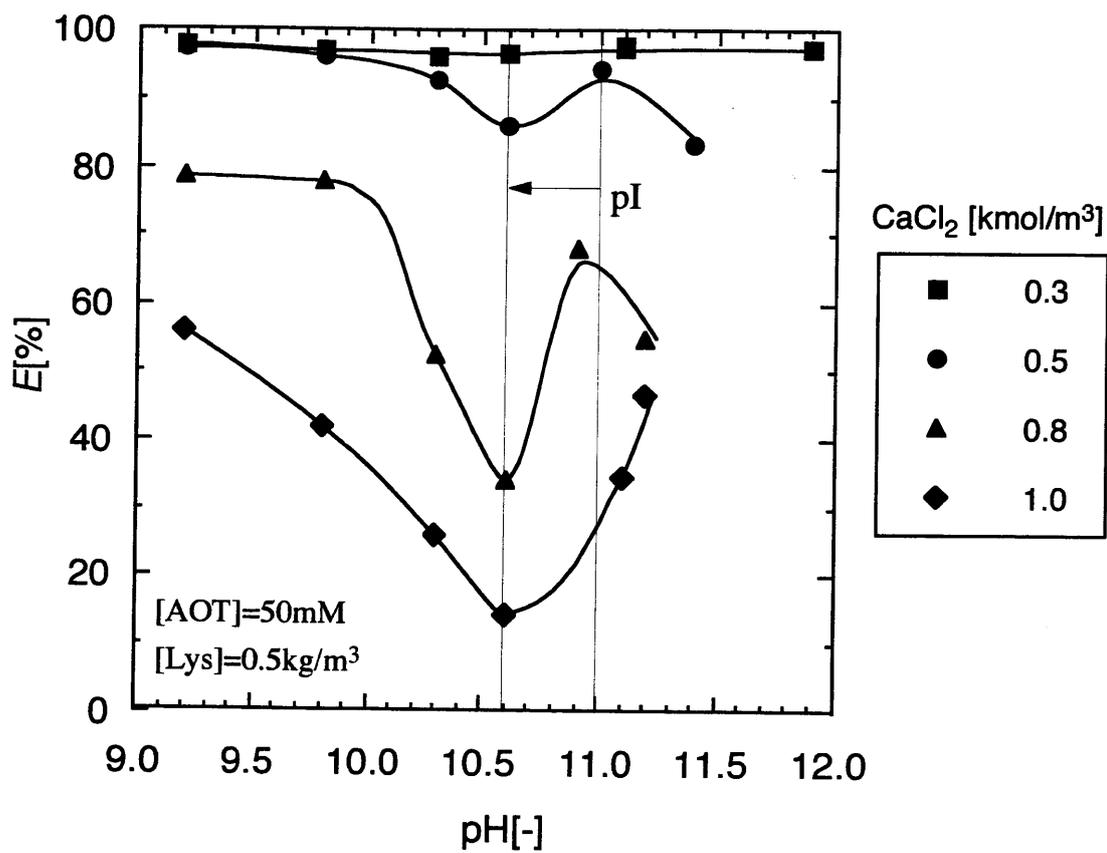


Fig.8-4 Extracted fraction of lysozyme in CaCl₂ system

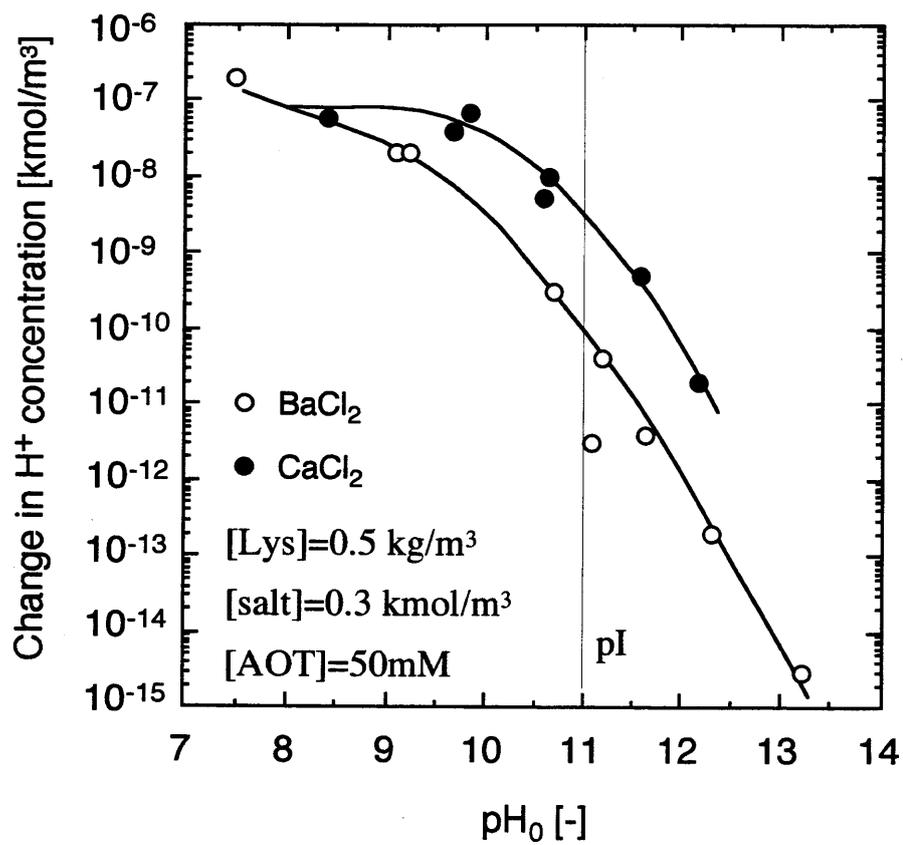


Fig.8-5 Concentration change of H⁺ before and after reaching equilibrium

オン交換速度の違いが原因と考えられる。Fig. 8-3(b)に示されるように中濃度域では AOT-二価カチオン-アニオンという相互作用形態が多くなり、カチオンの交換が起こりやすくなる。水相中のカチオンは水和しており水和数はカチオン種により違いがあるので、イオン交換頻度はカルシウムイオン、バリウムイオンで違わずである。活動度に基づいた BaCl_2 、 CaCl_2 の水和数はそれぞれ 4.2 と 5.9 である(化学便覧 1993)。カルシウムイオンの方が水和数が大きいのでカルシウムイオンと AOT との相互作用はバリウムイオンのそれより弱く、バリウムイオンよりもバルク水相のカチオンとも交換し易いと考えられる。一価カチオンでは、第2章において著者ら(Okada *et al.*, 2001)は AOT 界面の柔軟性はカチオン種の水和数の違いによって変化することを示している。このことからカルシウムイオンの交換頻度はバリウムイオンより大きいと考えられる。

Fig. 8-4 に示されるように CaCl_2 濃度が 0.3 kmol/m^3 の時、実験した pH 領域でほぼ 100%のリゾチームが抽出された。Shiomori *et al.* (1998)は CaCl_2 濃度 0.1 kmol/m^3 において同様の結果を報告している。これは低い塩濃度では静電遮蔽効果が小さいことから説明できる。タンパク質はたとえ pI においても正と負の電荷分布を持っており AOT はカルシウムイオンの助けを借りて負荷電部分と相互作用する。それがタンパク質- Ca^{2+} -AOT 結合を生じさせる。このような AOT のリゾチームへの吸着によってすべての pH 範囲で抽出が促進されたと考えられる。

8.3.4 抽出及び逆抽出における活性変化

Fig. 8-6 に 1.0 kmol/m^3 KCl、pH=12 の水相へ逆抽出した後のリゾチーム活性変化と正抽出時の pH の関係を示す。pH7~12 のすべての pH において 90%以上の活性が保たれた。pI 以上においても活性変化は観測されなかった。この結

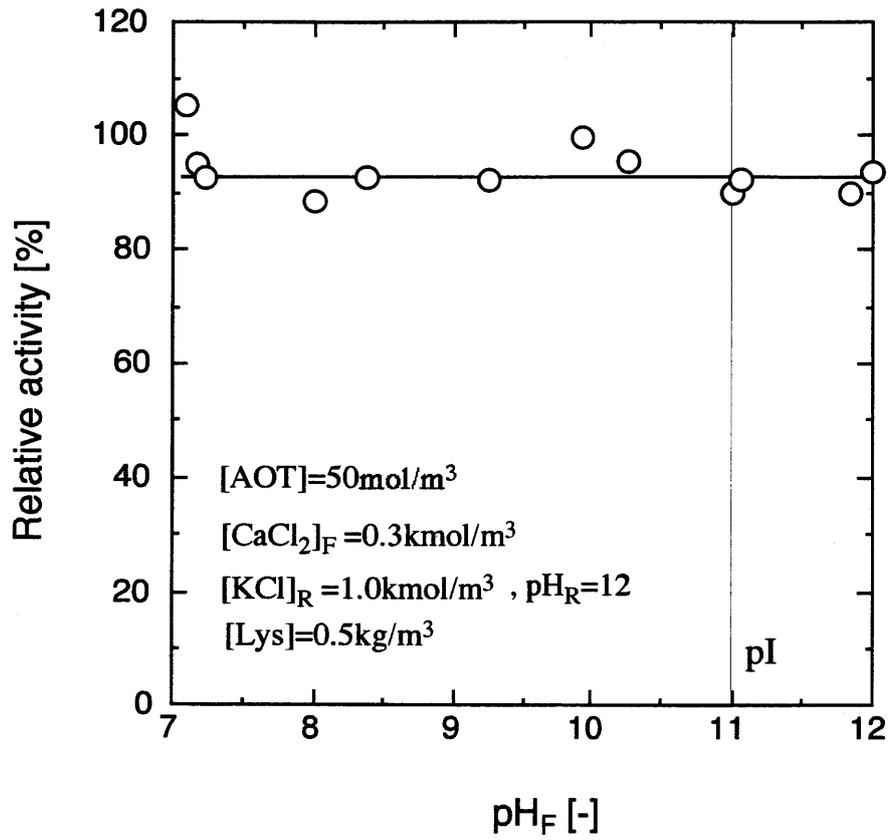


Fig.8-6 Effect of pH in the feed aqueous solution on lysozyme activity

果は本逆ミセル抽出系において、高い pH でも活性を損なうことなく抽出、逆抽出されることを示している。

8.4 結言

AOT 逆ミセル抽出系におけるリゾチームの抽出平衡に及ぼすカチオン種の影響を KCl、BaCl₂、CaCl₂ 系で調べた。BaCl₂ と CaCl₂ 系において特異的な抽出挙動が観測され、これは AOT と二価カチオンとの相互作用形態によって説明された。AOT と二価カチオンとの相互作用形態はイオン強度によって変化した。BaCl₂ 系と CaCl₂ 系の違いは水和数によって解釈された。すなわちカルシウムイオンの水和数はバリウムより大きいので界面の柔軟性が増しカチオン交換頻度が大きくなったことが要因と考えられる。また CaCl₂ 系において 7~12 の広い pH 範囲で正抽出した結果リゾチームの活性変化は起こらず原液の活性を保った。

References

- Dekker, M., R. Hilhorst and C. Laane, *Analytical Biochemistry*, **178**, 217-226 (1989)
- Goklen, K. E. and T. A. Hatton, *Biotechnology Progress*, **1**, 69-74 (1985)
- Hamada, K., T. Ikeda, T. Kawai and K. Kon-No, *J. Colloid Interface Sci.*, **233**, 166-170 (2001)
- Imoto, T. and K. Yagishita, *Agricultural Biological Chemistry*, **35**, 1154-1156 (1971)
- Kagaku-binran, 4th Ed., fundamental II-278, Maruzen, The Chemical Society of Japan (1993)
- Kinugasa, T., S. Tanahashi and H. Takeuchi, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 2470-2476

(1991)

Kinugasa, T., K. Sanagi, K. Watanabe, H. Takeuchi, *Solvent Extraction for the 21st Century*, **1**, p.89-93 (2001)

Luisi, P. L., F. J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wiget and R. Wolf, *Helvetica Chimica Acta*, **62**, 740-753 (1979)

Luisi, P. L., *Angewandte Chemie International Edition in English*, **24**, 439-528 (1985)

Nishii, Y., T. Kinugasa, S. Nii, K. Takahashi, *J. Memb. Sci.*, **195**(1), 13-23 (2001)

Nishiki, T., I. Sato and T. Kataoka, *Biotech. Bioeng.*, **42**, 596-600 (1993)

Nishiki, T., I. Sato, A. Muto, T. Kataoka, *Biochem. Eng. J.*, **1**, 91-97 (1998)

Shiomori, K., Y. Kawano, R. Kuboi, I. Komasaawa, *Advances in Bioseparation Engineering 1996-1997*, 103-107 (1998)

Shiomori, K., Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasaawa, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **33**(5), 800-804 (2000)

Takahashi, K., K. Tsuboi and H. Takeuchi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 352-357 (1989)

Tanford, C. and M. L. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3331-3336 (1954)

第9章 総括

ポストゲノム時代に対応してタンパク質生産が益々盛んになるであろう将来において、タンパク質分離技術の更なる効率化は急務である。本論文では溶媒抽出の一つである逆ミセル抽出法を用いてタンパク質分離を行い、その抽出機構の解明、さらに新しい抽出装置の開発を目指した。

第2章では界面変化のしやすさと逆ミセル抽出速度との関係を調べるために AOT 逆ミセル系の界面張力に及ぼす水相条件を調べた。

1. リゾチームはそれ自体界面活性を持ち、界面を不安定にし逆ミセル形成を促進することが分かった。
2. 3つの塩系の界面柔軟性は $\text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{KCl}$ であることが分かった。
3. 界面の柔軟性が高いほどリゾチームは抽出しやすくなることが分かった。

第3章では逆ミセル溶液の粘度を測定することによって AOT 系及び AOT-SDEHPA 混合系逆ミセルの特性を詳しく調べた。

1. AOT 系において、粘度から求めたミセル径と油相含水率は直線関係を持つことが分かった。
2. AOT 会合数、AOT の界面占有面積を粘度測定より計算し、文献値と良好な一致を示した。
3. AOT-SDEHP 系逆ミセルは SDEHP のモル分率の増加と共に楕円形になることが分かった。

第4章では液膜のキャリアとして逆ミセルを用いてタンパク質の透過挙動を調べた。

1. 水相と油相間のイオン交換速度及びミセルの開閉速度を求めることができた。
2. バリウムイオンは界面の AOT と特異的に相互作用しミセル界面の性質を大きく変化させ、タンパク質を再抽出させることが分かった。
3. 両水相に KCl を溶解した系では膜液中にタンパク質が蓄積するものの、液膜操作という観点からは最もリゾチーム透過に適した系であることが分かった。
4. カチオン移動、含水率変化、タンパク質移動の結果よりそれぞれの3つの系でのタンパク質透過機構を提案した。

第5章では塔型抽出装置として充填塔を採用し、逆ミセルによるタンパク質の連続抽出装置の開発を行った。

1. 本実験条件ではタンパク質移動が可溶化律速であることを示した。
2. 充填塔操作では抽出率、総括物質移動係数ともスプレー塔より約3倍大きかった。
3. 充填物材質の界面積への影響は小さく、塔内で分散滴はほとんど変形・分裂しないことが示された。
4. 操作前後のタンパク質活性は変化せず、充填塔はタンパク質に対して穏和な条件で抽出できる抽出塔であることが示された。

第6章では分散接触且つ塔型の抽出塔として多孔板塔をタンパク質逆ミセル抽出へ適用し抽出性能を調べた。

1. 段間で連続相の循環流れが分散滴上昇速度の減少及びホールドアップの増加をもたらすことが分かった。
2. 総括物質移動係数は充填塔での値より 10 倍大きく、多孔板塔内の分散、合一現象が界面での抽出速度に大きく影響することが分かった。
3. 充填塔及びスプレー塔との性能を比較したところ、多孔板塔は大量処理に有効であることが示された。
4. 操作前後のリゾチーム活性を測定した結果、活性損失がなかったことからタンパク質抽出に適した抽出塔であることが示された。

第 7 章では液液抽出装置設計の重要な因子である液滴合一挙動を AOT 逆ミセル系で測定した。

1. 界面での電荷状態が薄膜液排除過程に大きく影響していることが分かった。
2. 滴の界面への衝突速度及び水相に含まれるカチオンの水和数によって合一挙動が変化することが分かった。
3. 二価カチオンでの挙動は界面での AOT との相互作用形態によって説明された。
4. AOT 濃度による合一時間の変化は界面でのマランゴニ効果が影響していることが分かった。

第 8 章では水相に含まれるカチオン種のタンパク質抽出挙動への影響を広く水相 pH を変化させて調べた。

1. 二価カチオンを用いると等電点以上でも抽出され、これは界面での界面活性剤との相互作用の形態から説明できた。

2. バリウムイオンとカルシウムイオンでの挙動の違いは水和数の違いから説明できた。

全体として、界面の性質及び状態、界面活性剤と水相内容物との相互作用がミセルの形成しやすさ、ミセルの開閉挙動及びタンパク質の界面への接近挙動に影響を及ぼすことが明らかになった。逆ミセルを用いたタンパク質の抽出装置の検討として、平界面でのバルク液膜によるタンパク質の透過実験を行い透過機構を解明することができた。充填塔、多孔板塔ではより実用的な装置を提案し、界面積増大が重要であること、界面の変形を促す分散・合一は大幅な移動速度の増大をもたらすことが分かった。しかし、本研究の目標であった、より効率的な抽出、逆抽出方法に関する知見、逆ミセル抽出法の工業的装置への適用は実現しなかった。今後、本研究成果を踏まえてより実用に結びつく研究を遂行していきたい。

本研究に関連した公表論文

1. 学会誌等

1. "Extraction of Proteins by Reversed Micellar Solution in a Packed Column"
Yasuhiro Nishii, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi and Hiroshi Takeuchi : *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **32**, 211-216 (1999)

2. "Interfacial properties between Aqueous and Organic Phases in AOT Reversed Micellar System for Lysozyme Extraction"
Kazuhisa Okada, Yasuhiro Nishii, Susumu Nii, Takumi Kinugasa and Katsuroku Takahashi : *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **34**, 501-505 (2001)

3. "Transport behavior of protein in bulk liquid membrane using reversed micelles"
Yasuhiro Nishii, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : *Journal of Membrane Science*, **195**, 11-21 (2002)

4. "Estimation for size of reverse micelles formed by AOT and SDEHP based on viscosity measurement"
Takumi Kinugasa, Aki Kondo, Satsuki Nishimura, Yoshiki Miyauchi, Yasuhiro Nishii, Kunio Watanabe, Hiroshi Takeuchi : *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **204**, 193-199 (2002)

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

6. "Effect of Flow and Salt on Drop Coalescence in AOT Reversed Micellar System"
Yasuhiro Nishii, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, **10**, 65-78 (2003)

7. "Effect of Cation Species on Equilibrium of Reversed Micellar Extraction of Lysozyme"

Yasuhiro Nishii, Yusuke Kishi, Megumi Ito, Yoko Morita, Ayumi Kanoh, Masahiro Shintani, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : *Separation and Purification Technology*, (accepted)

II. 国際会議

1. "Effect of cation exchange on the transfer rate of protein by reverse micelles through bulk liquid membrane"

Yasuhiro Nishii, Susumu Nii and Hiroshi Takeuchi : *The 4th Sino-Japanese Symposium on Liquid Membranes*, 1998.4, pp68-71, East China University of Science and Technology in Shanghai)

2. "Transport behavior of protein in bulk liquid membrane using reversed micelles"

Yasuhiro Nishii, Susumu Nii and Katsuroku Takahashi : *The fifth international symposium on separation technology between Korea and Japan*, 1999.8, pp941-944, Yonsei University in Seoul)

3. "EXTRACTION OF LYSOZYME BY REVERSED MICELLAR SOLUTION IN A SIEVE-TRAY COLUMN"

Yasuhiro Nishii, Chiemi Hara, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : *International Solvent Extraction Conference 2002*, 2002.3, pp656-661, Holiday inn Cape Town in Cape Town)

4. "APPLICATION OF REVERSED MICELLAR EXTRACTION TO A SIEVE-TRAY COLUMN"

Yasuhiro Nishii, Chiemi Hara, Takumi Kinugasa, Susumu Nii, Katsuroku Takahashi : *The sixth international symposium on separation technology between Japan and Korea*, 2002.10, pp735-738, Waseda University in Japan)

III. その他

1. 充填塔を用いたタンパク質の逆ミセル抽出

西井靖博, 二井晋, 竹内寛 : 化学工学シンポジウムシリーズ 63, 液膜及び分子認識材料利用技術の基礎と応用, 1998.2, pp 207-212)

2. 多孔板塔を用いたリゾチームの逆ミセル抽出

西井靖博, 原智恵美, 衣笠巧, 二井晋, 高橋勝六 : 化学工学シンポジウムシリーズ 76, 高機能界面・分子集合体の基礎構築と応用分野の新展開, 2001.6, pp 101-108)

謝辞

博士課程後期課程を2年間で退学し、学位を取らずして高等専門学校へ就職する道を選んだのは5年前のことでした。振り返ると周りの人々に支えられ続けてここまでたどり着いたというのが正直な感想です。

退官された竹内先生に代わって博士課程2年から高橋勝六先生が快く指導教官を引き継いで下さいました。新居浜一名古屋間の遠隔なやりとりを通じて「頑張ったら応えてくれる、困難にぶつかったら手を差し延べてくれる」そんな信頼関係が築き上げられた気がします。辛抱強く励ましの言葉をかけてくださり何とか一つの大きな目標を達成できそうです。学生時代を含め約10年間本当に有り難うございました。

竹内寛先生には逆ミセルとの運命的出会いをつくっていただきました。私が今の道を歩んでいるのも学部から博士課程1年まで心優しく忍耐強く指導していただいた結果だと思えます。

川泉文男先生との関わりによって教育の重要性と難しさを勉強することが出来たと思えます。物理化学の授業のT.A.での経験は現在大いに役立っています。有り難うございました。

博士課程に進もうと決心したきっかけは二井先生にありました。研究に息詰まっていた正月三が日まで実験にずっと付き合ってくださいました。あのいつも忙しそうな背中を見て「自分もこうりたい」と強く思いました。そして今の自分があるように思います。本当に有り難うございました。

衣笠巧先生を始め新居浜高専生物応用化学科教官の方々には感謝し尽くしきれません。新居浜高専就職後、博士号を早く取れるようにとずっと支援、激励していただきました。誠に有り難うございました。

名古屋大学工学部分子化学工学科第四講座に配属されて一緒に研究室での時を過ごした先輩、同輩、後輩は刺激であり、楽しみであり、励まし合い慰め合った仲間でした。その一人一人との出会いが今の自分の道をつくってくれている気がします。本当に感謝しています。

平日の帰りは遅く休日にも出勤する私に対して、いつも明るい笑顔を提供して疲れを癒してくれた妻と娘二人に心から感謝します。

最後に、名古屋の両親の惜しみない励まし、支援に心から感謝します。

2003年夏 西井靖博