

## 泡沫分離法によるタンパク質の分離濃縮

松本 茂野\*・小川 一幸\*\*  
芝田 隼次\*

## Separation and Recovery of Protein from Dilute Solution by Foam Fractionation

Shigeno MATSUMOTO, Kazuyuki OGAWA  
and Junji SHIBATA

From the point of view of the protection of our circumstances and recycling of materials, it is important to separate and recover proteins economically and in an industrial scale. Protein is easily affected by heat, pH, solvent and so on, by which it changes the chemical properties. In this work, the effect of several factors on the separation and recovery of protein, especially albumin and hemoglobin was investigated using a foam fractionation method. Also we measured the stability of the froth and foaming ability of protein solution. We tried to express them quantitatively into the grade.

At the low flow rate of gas, both proteins can be separated from the solution at high percentage. Also, the highest recovery was obtained at pH of the point of zero charge. It is another way to add some salts in the solution which have influence to the improvement of the recovery. Compared with the life span of the froth between albumin and hemoglobin, albumin is superior to hemoglobin. The life of the froth of albumin is considerably affected by pH value of the solution. On the contrary, that of hemoglobin strongly depends on the concentration in stead of pH. We can get the high concentration ratio only by using the higher froth layer, namely the higher column length.

We achieved a selective separation between albumin and hemoglobin at the concentration ratio of 10 : 1 at the pH of point of zero charge of albumin; moreover by using a surface active agent, e.g. Tween 20, the separation ratio was improved up to 43 : 1.

## 1. 緒 言

泡沫分離法は、水溶液中に溶存する物質をそれらの界面活性の差異により気泡表面に選択的に吸着させて、泡沫層として除去あるいは分離濃縮する方法である。この分離法は、操作が簡便であること、大量の試料を処理することが可能であること、低コストで操業ができるといったメリットの他に、環境保全の観点からも価値の高い分離法の1つである<sup>1,2)</sup>。

環境問題や資源のリサイクルへの意識が高まる中、我々はプラスチックの分離回収に対して泡沫分離法の1つである浮選法の適用を試み、エンジニアリングプラスチックを含む4種類のプラスチックの分離方法を確立し、

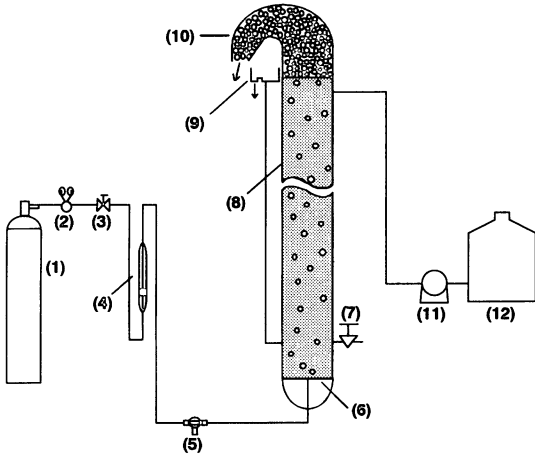
すでに報告している<sup>3~5)</sup>。

タンパク質は医薬品、食品製造の原料として用いられており<sup>6)</sup>、工業的な規模で分離精製することが要求されている。また、産業廃水や生活廃水中にもタンパク質は含まれており、タンパク質を除去することなしに自然界に廃水を放流すると河川を汚染する原因となる。従来、タンパク質の分離精製には、凝集沈澱法、限外濾過法、電気泳動法、逆ミセル抽出法やクロマトグラフィ法が用いられてきたが<sup>7)</sup>、いずれも工業的な規模で展開することは処理量の点で困難である。しかもタンパク質は熱や溶媒など溶液環境の変化で容易に変性、失活する。これらのことから、泡沫分離法は工業規模でタンパク質を分離濃縮するための方法として大いに期待できる。

本研究では、分離対象物質として水溶性タンパク質である牛血清アルブミン、ヘモグロビンを選択して、泡沫分離法を回分操作および連続操作で適用し、分離性にと

\* 関西大学工学部化学工学科

\*\* 東洋ゴム工業株式会社  
平成9年4月16日受理



- (1) 窒素ガスボンベ
- (2) 圧力ゲージ
- (3) ニードルバルブ
- (4) 流量計
- (5) コック
- (6) ガラスフィルター
- (7) 採取口
- (8) ガラスカラム
- (9) オーバーフロー
- (10) 泡捕集器
- (11) ポンプ
- (12) 原料供給タンク

第1図 回分式および連続式泡沫分離の装置図

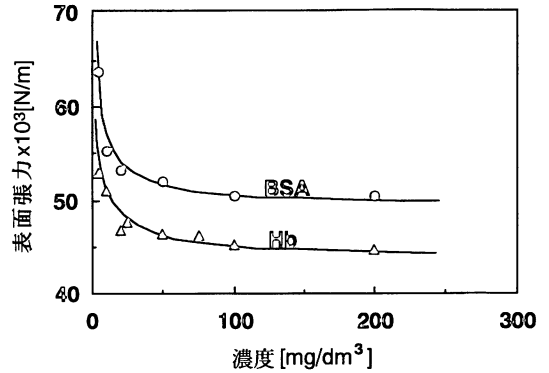
えるガス流量, 溶液pH, 塩添加効果を検討した。加えて, 泡沫の寿命について評価を行い, タンパク質の分離性との関係を検討した。

## 2. 実験方法<sup>8,9)</sup>

本研究で用いた装置図を第1図に示す。ガラスカラムの内径は 50 mm, 高さは 500 mm または 1000 mm である。回分操作では, アルブミン (以下 BSA と略記) およびヘモグロビン (以下 Hb と略記) 水溶液をカラムに入れて, カラム底部よりガラスフィルター (No. 3) を通して窒素ガスを通気した。一定時間ごとにカラム底部の採取口から注射器を用いて試料溶液を採取し, タンパク質濃度の変化を測定した。連続操作では, BSA と Hb を含む 2 成分溶液をガラスフィルターの 340 mm (カラム高さ 500 mm のとき) または 660 mm (カラム高さ 1000 mm のとき) 上部よりマイクロチューブポンプ (PST-100 岩城硝子株式会社) を用いて供給し, 処理液を最下部より連続的に排出した。カラム内の液面高さは, 図に示すようなオーバーフロータンクの位置を変えることによって調節した。BSA, Hb の濃度は可視紫外分光光度計 (UV-2100, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。

## 3. 実験結果および考察

泡沫分離法を適用して効果的にタンパク質の分離・濃縮を行うために, 種々の濃度の BSA および Hb 水溶液の表面張力を表面張力計 (CBVP-Z, 協和界面科学株式会社) を用いて測定した。溶液 pH 無調整 (pH≒5.6) のとき

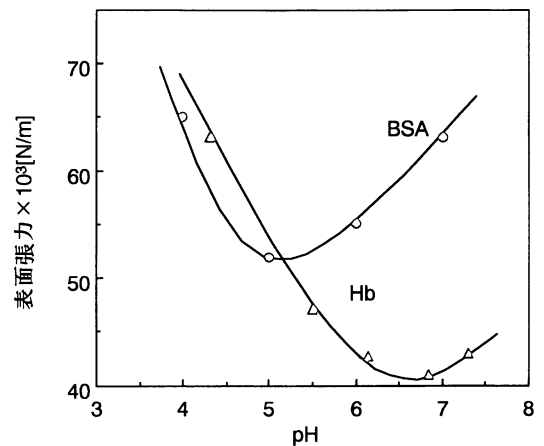


第2図 BSA および Hb 水溶液の表面張力

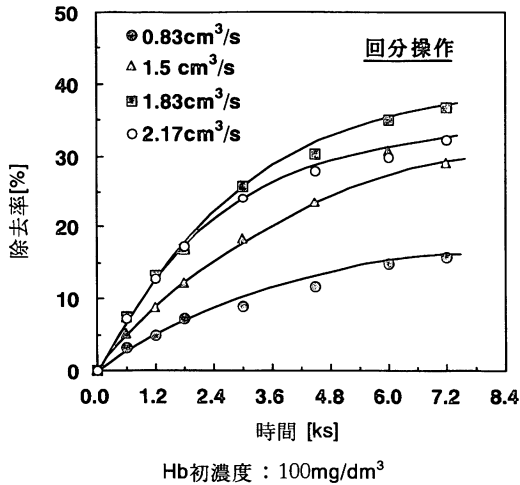
の実験結果を第2図に示す。タンパク質濃度の増加とともに表面張力は低下した。BSA よりも Hb の方が表面張力の低下の程度が大きいことから, pH 5.6 付近では Hb の方が強い界面活性を持つことがわかる。第3図は, 濃度 50 mg/dm<sup>3</sup> のときの BSA および Hb 水溶液の表面張力の変化を pH の関数として表したものである。タンパク質水溶液の表面張力は pH の影響を大きく受ける。各々の等電点 (BSA: pH 4.8~4.9, Hb: pH 6.79~6.83) に相当する pH 付近で表面張力の低下の程度が最も大きいことから, タンパク質はその等電点付近において界面活性が最も強いことが確認された。

まず, 回分操作で泡沫分離実験を行い, 水溶液中からの BSA および Hb の除去におよぼす窒素ガス流量の影響について調べた。Hb の除去率と窒素ガス流量の関係を第4図に示す。除去率 R (%) および濃縮比 C<sub>R</sub> は次式によって算出した。

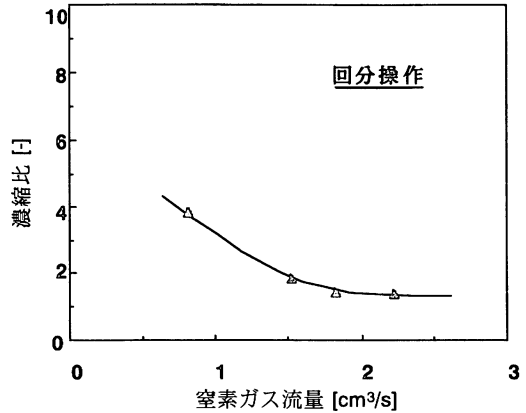
$$\text{除去率 (\%)} R = (C_i - C) / C_i \times 100$$



第3図 pH の関数として表した BSA, Hb 水溶液 (50 mg/dm<sup>3</sup>) の表面張力



a) Hbの除去率



b) Hbの濃縮比

第4図 Hb除去におよぼす窒素ガス流量の影響

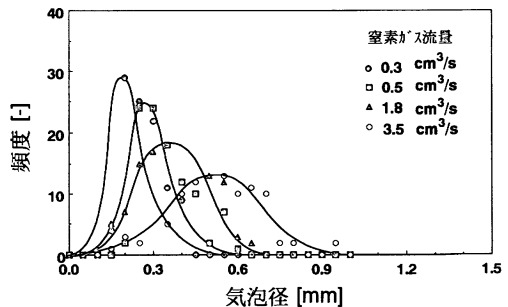
濃縮比  $C_R = C_F / C_i$

ここで、 $C$  は一定時間後のタンパク質濃度 ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ),  $C_i$  はタンパク質初濃度 ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ),  $C_F$  は泡沫層中のタンパク質濃度 ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) である。窒素ガス流量が  $1.83 \text{ cm}^3/\text{s}$  までは、ガス流量の増加とともに除去率は増加したが、それ以上のガス流量では除去率は低下する傾向を示した。BSA についても Hb と同様の挙動を示した。一方、濃縮比はガス流量の増加とともに低下する傾向を示した。種々のガス流量での気泡の大きさと挙動を写真撮影して観察し、その結果を表面張力と気泡径の関数として第5図に示した。低い窒素ガス流量の領域では、ガス流量にあまり関係せず同程度の大きさの気泡が安定して発生しており、ガス流量が増加するとカラム内の気泡径が増加するとともに気泡が不均一および乱流状態となり、気泡同士の合いが起こることがわかった。すなわち、高いガス流量では気泡の単位体積あたりの界面積が減少するため、気泡に吸着し除去されるタンパク質の量が減少すると思われる。Hb および BSA の除去を目的とした場合の窒素ガス流量は、 $1.8 \text{ cm}^3/\text{s}$  程度 (線速度  $9.2 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ ) が適当であると考えられる。

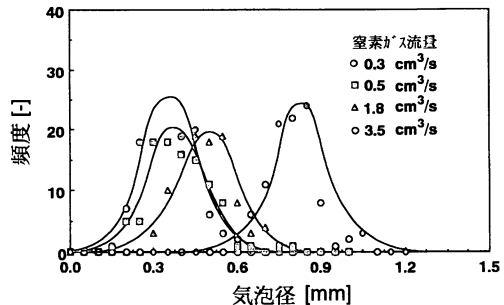
回分操作でのタンパク質の除去に対する溶液 pH の影響を第6図に示す。それぞれの等電点の pH で除去率が最大となった。BSA の等電点である pH 4.9 付近で、両者の除去率の差が最大であることから、この pH で両者の効果的な分離が可能であると考えられる。

第7図に Hb の除去に与える硫酸の添加効果を示す。硫酸濃度を増加させることにより Hb の除去率は増加するが、逆に濃縮比は低下した。硫酸がイオン化して生

じた  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  に水分子が水和してタンパク質をとりまく水分子が除去されるという、いわゆる塩析効果によるものと考えられる。濃縮比の低下は、Hb の除去が進むにつれて泡沫層とともにカラム外に放出される液量が増加するためである。タンパク質水溶液に塩類を添加することは除去を目的とするならば有効であるが、高濃

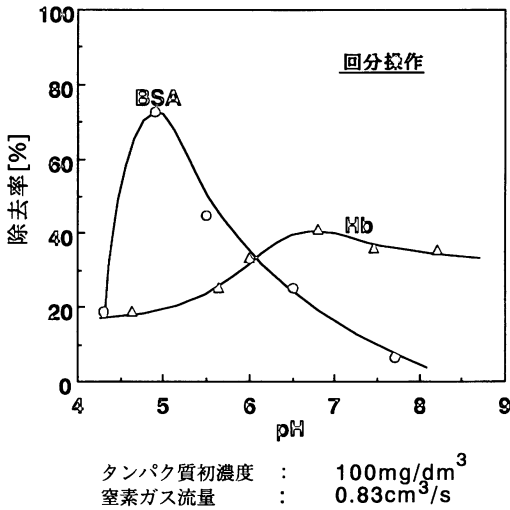


a) エタノール濃度 15wt%  $\gamma = 40 \times 10^{-3} \text{ N/m}$

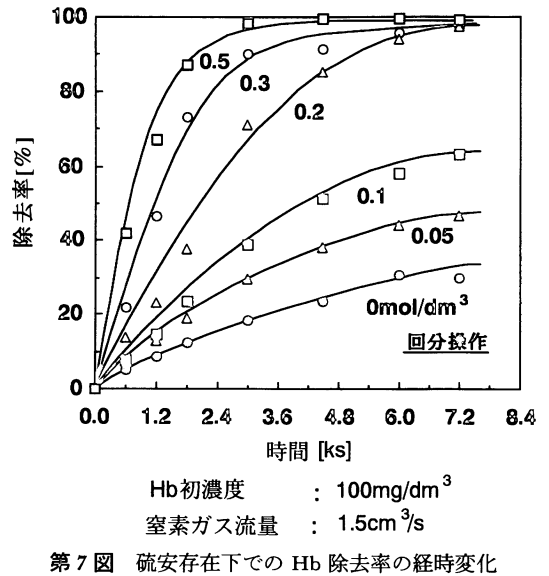


b) エタノール濃度 30wt%  $\gamma = 32 \times 10^{-3} \text{ N/m}$

第5図 表面張力と気泡径の関係



第6図 回分操作によるタンパク質除去におよぼす pH の影響

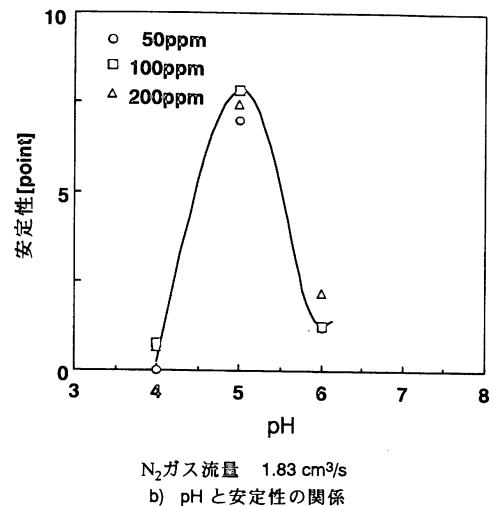
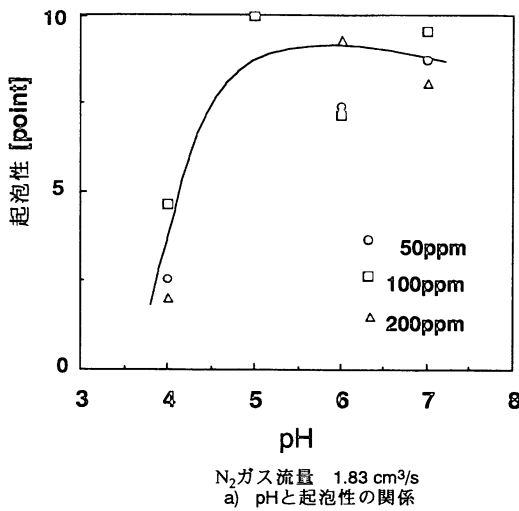


第7図 硫酸存在下での Hb 除去率の経時変化

度回収には適切ではないと思われる。Hb 除去に与える NaCl と CaCl<sub>2</sub> の添加効果を調べたところ、NaCl よりも水和分子数の多い CaCl<sub>2</sub> を添加すると、約半分の操作時間で同程度の除去率を得ることが可能であった。

泡沫分離法を用いたタンパク質の除去率および濃縮比に与えるもう1つの因子として、泡沫の寿命、すなわち起泡性や泡沫の安定性が考えられる。pH 4~7 に調整した 50~200 ppm の BSA, Hb 水溶液の起泡性および泡沫の安定性の評価を行った。回分操作と同様の方法で、泡沫層を生成させた。泡沫層高さが最大値(ただし、液面からカラム出口までは 160 mm である)を示すまで、窒素ガスを通しながら1分ごとに生成する泡沫層の高

さを測定して、起泡性を評価した。泡沫の安定性については、泡沫層高さが最大となった時点で窒素ガスの通気を中止し、1分ごとに泡沫層高さの変化を測定した。この測定結果を点数化して、起泡性や泡沫の安定性を表現する新しい方法を提案した。起泡性の点数化は、泡沫層高さ 160 mm を10点、泡沫層高さ 0 mm を0点としてその間を比例配分することによって決定した。泡沫の安定性については最大泡沫層高さ 160 mm を10点、0 mm を0点として比例配分によって点数化を行った。BSA の場合の溶液 pH と起泡性との関係と溶液 pH と泡沫の安定性との関係を第8図に示す。図より、BSA は起泡性、泡沫の安定性ともに溶液濃度の影響はほとんど受



第8図 BSA 水溶液から生じる泡沫層の寿命

けず、pH 依存性が大きいことがわかる。図には示していないが、Hb については起泡性、泡沫の安定性ともに pH よりも Hb 濃度によって大きく影響されること、Hb よりも BSA の方が泡沫の寿命が長いことが確認された。いずれのタンパク質も泡沫に関する性状、寿命については、それぞれの等電点で最大の値を示すことが明らかとなった。

回分操作による除去実験で、泡沫層として回収されるタンパク質の濃縮比について BSA と Hb の比較を行った。Hb よりも BSA の方が高い濃縮比を示したが、いずれのタンパク質も窒素ガス流量を増加させると泡沫層としてカラム外に持ち出される液量が増加するため濃縮比は低下した。濃縮比もまた泡沫の安定性の影響を大きく受けると思われる。泡沫にはある厚みを持った液膜が存在する。泡沫が上昇していく間に気泡または泡沫の液膜を形成している水は、重力の作用でプレートボードを通して流下していくために液膜が薄くなる。この過程が限界薄膜になるまで続き、生成した泡沫はやがて破壊するが、泡沫が高い安定性を持つならばカラム外に放出されるまでに境界膜内の溶液量が減少して、タンパク質が泡沫に濃縮され、なおかつ泡沫が破壊することなくカラム外に放出される。BSA の方が Hb よりも高い泡沫安定性を持つので、両者の濃縮比にも大きな差が生じたと考えられる。

BSA と Hb の混合溶液の pH を変化させて連続操作で分離実験を行った結果を第 9 図に示した。気液界面における界面過剰量  $\Gamma$  (g/cm<sup>2</sup>) および回収率  $\epsilon$  (%) はそれぞれ次式により算出した。

界面過剰量 (g/cm<sup>2</sup>)

$$\Gamma = Q_F(C_F - C_e) \times d / 6G \times 10^{-7}$$

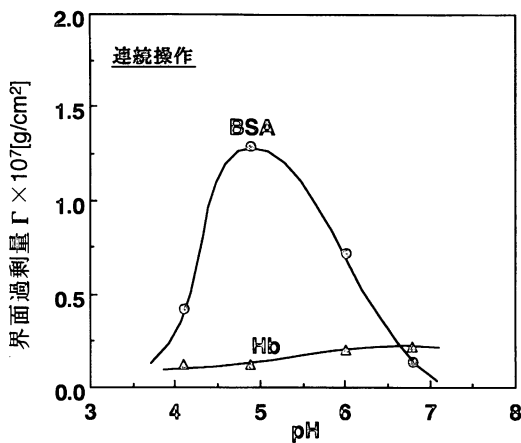
回収率 (%)

$$\epsilon = C_F \cdot Q_F / C_i \cdot Q_i \times 100$$

$$= (C_i \cdot Q_i - C_e \cdot Q_b) / C_i \cdot Q_i \times 100$$

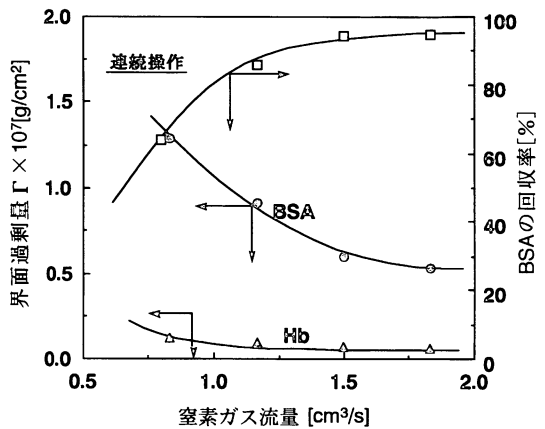
ここで、 $C_e$  はカラム内のタンパク質平衡濃度 (mg/dm<sup>3</sup>)、 $C_F$  は泡沫層中のタンパク質濃度 (mg/dm<sup>3</sup>)、 $C_i$  はタンパク質初濃度 (mg/dm<sup>3</sup>)、 $d$  は気泡径 (mm)、 $G$  はガス流量 (cm<sup>3</sup>/s)、 $Q_i$  は供給液流量 (cm<sup>3</sup>/s)、 $Q_b$  はオーバーフロー流量 (cm<sup>3</sup>/s)、 $Q_F$  は泡沫層流量 (cm<sup>3</sup>/s) である。いずれのタンパク質も溶液 pH によって界面過剰量は変化する。特に BSA は回分操作による除去実験と同様に、pH によって大きく変化し、等電点付近において界面過剰量が最大となった。BSA の等電点である pH 4.9 付近において BSA、Hb の界面過剰量の差が最大となり、BSA、Hb は約 10:1 の割合で泡沫層中に分離される。BSA の方が Hb よりも界面過剰量が多いのは起泡性と泡沫の安定性に起因すると思われる。

連続操作による BSA の除去率に対するカラム長さの影響を調べた。実験条件は、窒素ガス流量 0.83 cm<sup>3</sup>/s、供給液濃度 100 mg/dm<sup>3</sup>、供給液流量 0.098 cm<sup>3</sup>/s、pH 4.9 であった。カラム長さ 500 mm のときと 1000 mm のときについて除去率の経時変化を比較した。除去率はカラム長さが 500 mm では約 35% で定常状態となるが、カラム長さを 1000 mm にすると 50% の除去率を達成することができる。連続操作による泡沫層高さ と BSA の濃縮比との関係を調べた。泡沫層高さが 5, 10, 15, 20,



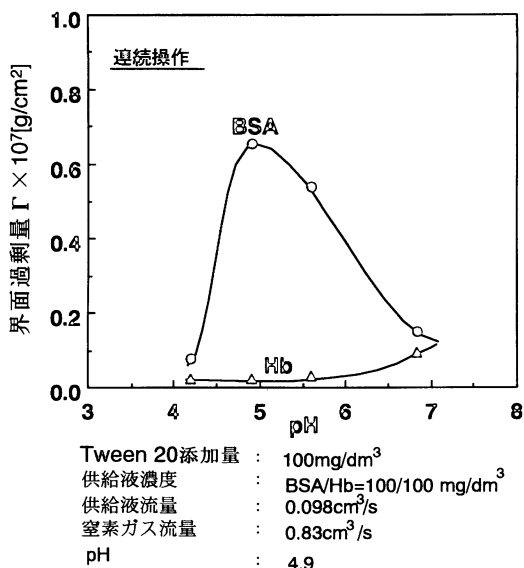
供給液濃度 : BSA/Hb=100/100mg/dm<sup>3</sup>  
 供給液流量 : 0.098cm<sup>3</sup>/s  
 窒素ガス流量 : 0.83cm<sup>3</sup>/s

第 9 図 連続操作による分離性におよぼす pH の影響



供給液濃度 : BSA/Hb=100/100 mg/dm<sup>3</sup>  
 供給液流量 : 0.098cm<sup>3</sup>/s  
 pH : 4.9

第 10 図 連続操作による分離性におよぼす窒素ガス流量の影響



第11図 Tween 20 存在下でのタンパク質の分離

25 cm のときの濃縮比はそれぞれ2.5, 5.5, 9.5, 13.8, 19.3と増加した。タンパク質が気泡に吸着して泡沫が生成される際に境膜に水溶液が同伴されてカラム外に持ち出されるが、カラム長さが長いとき、すなわち泡沫層が高いとき境膜の水溶液がプラトーボーダーを通してカラムに戻るの泡沫は十分に濃縮されると考察される。他の条件を変えずにカラム長さを長くしたり、泡沫層高さを高くすることにより、濃縮比を制御することが可能である。

窒素ガス流量を変化させて分離実験を行い、その結果を第10図に示した。窒素ガス流量を増加させると、いずれのタンパク質も界面過剰量は低下したが、分離性の低下は見られなかった。回収率に関しては、窒素ガス流量を増加させると増加して、窒素ガス流量 1.5 cm<sup>3</sup>/s (線速度  $7.7 \times 10^{-2}$  cm/s) では、回収率は90%以上であった。

界面活性剤である Tween 20 をタンパク質水溶液に添加して、タンパク質の疎水性を変化させることによって分離の改善について検討した。2成分混合水溶液に Tween 20 を添加して、溶液 pH を変化させて分離実験を行い、その結果を第11図に示した。Tween 20 を添加すると、添加しない場合に比べていずれのタンパク質も界面過剰量は約半分程度になる。これは Tween 20 がタンパク質に吸着して、タンパク質の表面は Tween 20 の親水基を外側に向けた構造を呈して、タンパク質自身の

疎水性が減少したためであると思われる。BSA よりも Hb の方が界面過剰量の低下の程度が大きいために、Tween 20 を添加することによって、BSA と Hb は約 43:1 の割合で選択的に分離され、分離性の向上が認められた。このように、界面活性剤を添加することによりタンパク質表面の性質を変化させて、気泡への吸着量を制御することが可能であることが明らかとなった。

Tween 20 の添加量を変化させて、両者の界面過剰量の差が最大であった pH 4.9 で分離を行った。Tween 20 を添加すると、いずれのタンパク質も界面過剰量は低下し、添加量を増加させるとともに界面過剰量は低下した。特に、Hb は Tween 20 の添加の影響を大きく受け、添加量 25 mg/dm<sup>3</sup> の時には、Hb は気泡にほとんど吸着されず、BSA は極めて高い純度で回収された。

#### 4. 結 言

本研究では、泡沫分離法を用いてタンパク質の分離濃縮を試みた。種々の条件を変化させて、回分操作および連続操作により水溶液中の BSA, Hb の除去に対する影響を調べた。起泡性および泡沫安定性の評価も加えて行い、除去率との関係を検討した。

ガス流量、pH やカラム長さなどの条件設定により、界面活性、起泡性や泡沫の安定性の異なる BSA と Hb の分離濃縮が比較的容易に達成される。さらに、塩類や界面活性剤の添加も両者の分離に対して効果的である。

#### 参 考 文 献

- 1) 矢沢 彬, 江口元徳: 湿式製錬と廃水処理, 共立出版
- 2) 久保田宏, 松田 智: 廃棄物工学, 培風館
- 3) 芝田隼次, 松本茂野, 山本秀樹, 日下英史: 資源と素材, vol. 112, No. 3, pp. 117-184, (1996)
- 4) J. Shibata, S. Matsumoto, H. Yamamoto, E. Kusaka and Pradip: International Journal of Mineral Processing, vol. 48, pp. 127-134, (1996)
- 5) 芝田隼次: エコインダストリー, vol. 1, No. 5, pp. 15-28 (1996)
- 6) 京極好正, 勝部幸輝, 中川八郎, 高木俊夫, 崎山文夫: タンパク質Ⅲ 生物編, 東京化学同人
- 7) 妹尾 学, 高木 誠, 武田邦彦, 寺本正明: 分離科学ハンドブック, 共立出版
- 8) 小川一幸, 松本茂野, 山本秀樹, 芝田隼次: 化学工学61年会研究発表講演要旨集, p 147, (1996)
- 9) 芝田隼次, 松本茂野, 山本秀樹: ケミカルエンジニアリング, vol. 4, No. 8, pp. 604-609, (1996)