

9806 多孔性膜に多層吸着させた食品タンパク質をNaCl水溶液を使って高濃縮率かつ高速で溶出させる手法の開発

助成研究者：斎藤 恭一 (千葉大学 工学部)

血液や培養液のような多成分溶液に含まれるタンパク質の精製法として、多孔性中空糸膜を用いた対流支援型のタンパク質回収方法が有効である。

本研究では、食品加工原料として広く使用されている鶏卵卵白中のタンパク質回収のモデルとして、卵白タンパク質の3.4%を占めるリゾチーム(分子量 14,000, 等電点 10.7)の回収をおこなった。カチオン交換基としてスルホン酸基を有する高分子鎖を接ぎ木(グラフト)した多孔性中空糸膜を使用した。グラフト高分子鎖同士が多孔性膜の膜面から孔の中心方向へ伸長して、液の透過流束を減少させるのを防ぐために、 Mg^{2+} で高分子鎖を予めイオン架橋した。こうして得られたイオン架橋膜のリゾチームの吸着および溶出特性を調べた。

まず、ポリエチレン製多孔性中空糸膜に、グリシジルメタクリレート(GMA)を放射線グラフト重合した。つぎに、GMAグラフト膜に、亜硫酸ナトリウム溶液を反応させて、スルホン酸基を導入した。さらに残りのエポキシ基に水を付加してジオール基にした。得られた膜をSS-Diol膜と名付ける。

SS-Diol膜を Mg^{2+} でイオン架橋した膜に、リゾチーム溶液を膜の内面から外面に一定圧力で透過させた。流出液中のリゾチームおよび Mg^{2+} を定量した。破過曲線(横軸：(流出液量)/(膜体積)、縦軸：(流出液濃度)/(供給液濃度))を描き、リゾチームの吸着量および吸着積層数を算出した。

スルホン酸基に対して Mg^{2+} がモル比2:1でイオン架橋すると仮定して計算されるイオン架橋率は54%となった。SS-Diol膜の純水透過流束は0.10 m/h(透過圧力0.06 MPa, 室温)であったのに対して、 Mg^{2+} イオン架橋によって膜の透過流束は1.5 m/hまで増加させることができた。

イオン架橋されたSS-Diol膜へのリゾチーム吸着量および吸着積層数は、それぞれ0.42 g/g, 38層となった。多層吸着したリゾチームを、NaCl水溶液を膜に透過させることによって高濃縮率で溶出できることを示した。

9806 多孔性膜に多層吸着させた食品タンパク質をNaCl水溶液を使って高濃縮率かつ高速で溶出させる手法の開発

助成研究者：斎藤 恭一 (千葉大学 工学部)

1. 研究目的

鶏卵卵白はそれ自体が生命体であるため、その構成成分であるタンパク質は生命活動を営むための生理活性をもっている。卵白中のタンパク質を分離・精製して、優れた素材として利用することができる。なかでも、リゾチーム(分子量:14,000, 等電点:10.7)は、細菌の細胞壁を溶菌したり、ウイルスを不活性化したりする作用をもっている。そのため、食品の静菌剤および風邪薬の成分として利用されている¹⁾。

鶏卵卵白からのリゾチームの回収は、卵白原液中にカチオン交換樹脂ビーズを投入し、攪拌することによって吸着回収されている。この方法にはつぎの2つの欠点がある。(1) 粘度の高い卵白中でリゾチームのビーズ表面および内部への拡散移動抵抗が大きい。(2) ビーズに卵白成分が付着しやすい。こうした欠点を克服するために、本研究では、カチオン交換多孔性中空糸膜を用いた卵白中からのリゾチームの吸着回収法を提案する。この新しい方法の利点は、リゾチームのイオン交換基近傍までの輸送方式が対流であるために拡散移動抵抗を無視できること²⁻⁴⁾、また、クロスフロー方式によって膜に卵白を供給することによって膜面への卵白成分の付着を防げることである。さらに、この方法ではNaCl水溶液を膜に透過させることによって、拡散移動抵抗を最小にして膜に吸着したリゾチームを溶出できる。そのため、高速しかも高濃縮率でリゾチームの溶出を実現できる。

本研究では、まず、カチオン交換基としてスルホン酸基(-SO₃H)をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜を作成する。つぎに、スルホン酸基を有するグラフト高分子鎖同士が静電的な反発によって、多孔性膜の膜面から孔の中心方向へ伸長して液の流れを減少させるのを防ぐために、卵白中に含まれる2価の金属イオン(マグネシウムイオンMg²⁺)を使ってグラフト高分子鎖を架橋する工夫(イオン架橋^{5,6)})をする。さらに、こうして得られたイオン架橋膜にリゾチーム溶液を透過させ、リゾチームの吸着操作およびそれに続く溶出操作での特性を調べ、優れた分離精製手法であることを示す。

2. 研究方法

2.1 スルホン酸型イオン交換多孔性中空糸膜の作成

強酸性カチオン交換基としてスルホン酸基を有するイオン交換多孔性中空糸膜を作成した。放射線前照射グラフト重合およびイオン交換基導入による膜の作成経路を

Fig. 1 に示す. 基材として, ポリエチレン製多孔性中空糸膜 (旭化成工業株式会社製) を用いた. この膜の内径, 外径はそれぞれ 1.9 mm, 3.2 mm, また, 空孔率は 70%, 平均孔径は 0.5 μm である. エポキシ基を有するビニルモノマーであるグリシジルメタクリレート (GMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$) を東京化成工業株式会社から購入してそのまま用いた.

まず, 窒素雰囲気下, 室温で基材に電子線を 200 kGy 照射した. つぎに, 照射基材を 10% (v/v) GMA/メタノール溶液に 313 K, 15 分間浸した. これによって GMA グラフト高分子鎖は, 基材の重量の 2.2 倍分, 接ぎ木された. さらに, 亜硫酸ナトリウム溶液 (重量比で亜硫酸ナトリウム/イソプロピルアルコール/水=10/15/75) 中での反応により, GMA グラフト高分子鎖中のエポキシ基の一部を強酸性カチオン交換基であるスルホン酸基に変換した⁷⁾. 最後に, 0.5 M 硫酸中での反応によって, 残存するエポキシ基を 2 つの並んだ水酸基 (ジオール基) に変換した⁸⁾. 得られた中空糸膜を SS-Diol 膜と名付ける. 比較のため, スルホン酸基を導入せずにジオール基のみを導入した膜を作成し, Diol 膜と名付ける.

膜厚方向のスルホン酸基の導入量の分布を調べるために, SS-Diol 膜を乾燥させ, X線マイクロアナライザーを使って膜厚方向のイオウの X線強度を測定した.

2.2 マグネシウムイオンを含む溶液の透過

中空糸膜の透過流束, すなわち単位時間, 単位内面積あたりの液量を測定するための実験装置を Fig. 2 に示す. SS-Diol 膜, Diol 膜および基材膜に, つぎの 5 種類の液を透過させた. 純水, 0.005 M NaCl, 0.005 M KCl, 0.005 M CaCl_2 , および 0.005 M MgCl_2 . 透過圧力を 0.06 MPa とした.

卵白の pH と同程度の pH 9 である 0.05 M $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ buffer に, 卵白中に含まれるマグネシウム (Mg) と同程度の濃度 0.005 M になるように MgCl_2 を溶解させた. この液を, SS-Diol 膜の内面から外面に, 一定透過圧力 (0.06 MPa) の下で透過させた. 膜外面からの流出液を連続的に採取して, その液中の Mg^{2+} 濃度をキレート滴定法に従って定量した. 流出液の Mg^{2+} 濃度が供給液の Mg^{2+} 濃度と等しくなったところで吸着操作を終えた. 流出液中のリゾチームの濃度変化, すなわち破過曲線 (横軸: $\text{DEV} [-] = (\text{流出液量}) / (\text{中空部分を含めた膜体積})$, 縦軸: $C/C_0 [-] = (\text{流出液濃度}) / (\text{供給液濃度})$) を描いた.

X線マイクロアナライザーを使って, 吸着操作を終えた膜の膜厚方向のマグネシウムの X線強度を測定した.

2.3 リゾチームの吸着および溶出

リゾチームは SIGMA 社 (L-6876) から購入した. pH 9.0 の緩衝液 (0.005 M MgCl_2 を含む 0.05 M $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ buffer) にリゾチームを溶かして濃度を 0.5 g/L と

した。

SS-Diol 膜の内面から外面へ向かって、一定操作圧力(0.06 MPa)の下でつぎの溶液を順に透過させた。(1) 平衡操作: buffer, (2) 架橋操作: 0.005 M $MgCl_2$ /buffer, (3) 洗浄操作: 蒸留水, (4) 吸着操作: 0.5 g/L リゾチーム /buffer, (5) 洗浄操作: buffer, (6) 溶出操作: 0.5 M NaCl /buffer. 連続的に流出液を採取し、流出液中の Mg^{2+} をキレート滴定法に従って定量し、また流出液の吸光度(280 nm) を測定してリゾチームを定量した。一連の操作中の透過流束を測定した。

3. 研究結果と考察

3.1 スルホン酸型イオン交換多孔性膜の性質

スルホン酸型イオン交換多孔性膜(SS-Diol 膜)の物性を Table 1 に示す。グラフト重合およびそれに続くスルホン酸基導入反応に伴って、基材の膜厚 0.65 mm に比べて、SS-Diol 膜の膜厚は 0.9 mm に増加した。SS-Diol 膜の膜厚方向でのイオウ原子の XMA プロファイルを図 3 に示す。SS 膜の膜厚方向に一様にスルホン酸基($-SO_3H$)が導入されていることがわかった。

3.2 グラフト高分子鎖のイオン架橋

多孔性中空糸膜に 5 種類の液を透過させたときの透過流束を表 2 に示す。SS-Diol 膜は、スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖同士の荷電反発によってグラフト高分子鎖が孔の中心方向に伸長し、純水が流れにくくなった。1 価のイオン(0.005 M NaCl および 0.005 M KCl) を透過させたとき透過流束は、純水に比べて 2 倍程度しか増加しなかったのに対して、2 価のイオン(0.005 M $CaCl_2$ および 0.005 M $MgCl_2$) を透過させたときには、純水に比べて 10 倍以上も増加した。グラフト高分子鎖をイオン架橋することによって、透過流束を増加させることができた。

SS-Diol 膜に、 $MgCl_2$ /buffer を透過させたときの破過曲線を、Fig. 4 に示す。この曲線から算出される SS 膜への Mg^{2+} の吸着量から、スルホン酸基がイオン架橋されている割合を調べた。モル比でスルホン酸基 2 対して、 Mg^{2+} が 1 結合するとして、イオン架橋率 [%] をつぎに示す式で算出した。

イオン架橋率 [%]

$$= 100 (2 \times (\text{吸着した } Mg^{2+} \text{ 量 [mol]}) / (\text{スルホン酸基量 [mol]}))$$

イオン架橋率は 54% となった。スルホン酸基の半分程度が Mg^{2+} でイオン架橋されていることになる。さらに、XMA プロファイル (Fig. 3) から、スルホン酸基が Mg^{2+} によって膜厚方向に一様にイオン架橋されていることがわかった。

3.3 リゾチームの吸着および溶出

SS-Diol 膜に、 $MgCl_2$ /buffer, リゾチーム溶液, 洗浄液, および溶出液を順に透

過させた。中空糸膜外面からの流出液中のリゾチームの濃度変化(破過溶出曲線)を Fig. 5 に示す。吸着操作によって、SS-Diol 膜へのリゾチームの吸着量は、0.42 g/g と算出された。溶出液として 0.5 M NaCl /buffer を膜に透過させることにより、膜吸着したリゾチームを溶出率 100% で溶出することができた。また、Fig. 5 から溶出曲線にテーリングがなく、リゾチームを高濃縮できることが示された。これは、溶出液が透過流(対流)に乗って輸送されるため、スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖から溶出液へのリゾチームの拡散移動抵抗が無視できるからである。

多孔性膜の孔表面に、リゾチーム(楕円球状: 4.5 × 3.0 × 3.0 nm) が end-on 状に最密充填で単層吸着したとして計算される理論単層吸着量は 0.011 g/g である。実験で得られたリゾチーム吸着量を理論単層吸着量で割ることにより、リゾチームの吸着積層数を算出したところ 38 層となった。スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜の孔表面へリゾチームが多層で吸着することがわかった。

一連の操作(イオン架橋、洗浄、吸着、洗浄、および溶出操作)に伴う透過流束の変化を Fig. 6 に示す。まず、リゾチームが吸着するにつれて透過流束が増加し、吸着が飽和に達すると透過流束は一定になった。このとき Mg^{2+} でイオン架橋したときの 1.7 倍の透過流束になった。これは、リゾチームが Mg^{2+} と置き換わって、スルホン酸基と多点で吸着し、より強くグラフト高分子鎖が架橋されたためである。つぎに、洗浄操作では透過流束が維持された。その後、溶出操作では Mg^{2+} でイオン架橋したときの 1.5 倍の透過流束になった。これは、0.5 M NaCl すなわち高イオン強度の下でグラフト高分子鎖の有効電荷が遮蔽されグラフト高分子鎖が縮むからである。

4. まとめ

卵白タンパク質の一つであるリゾチームを回収するためのカチオン交換多孔性中空糸膜の開発をおこない、リゾチーム溶液を膜に透過させて、膜の性能を調べた。

(1) ポリエチレン製の多孔性中空糸膜に、放射線グラフト重合法を適用して、エポキシ基をもつグラフト高分子鎖を導入し、グラフト高分子鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換して、スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜(SS-Diol 膜)を作成した。

(2) スルホン酸基をもつグラフト高分子鎖同士の静電的な反発によって、グラフト高分子鎖が孔の中心方向に伸長して SS-Diol 膜の透過流束が減少した。そこで、卵白中に含まれる金属の1つである Mg^{2+} を含む溶液を透過させることによってグラフト高分子鎖をイオン架橋した。これによって、透過流束を基材のその半分までに増加させることができた。

(3) イオン架橋された SS-Diol 膜にリゾチーム溶液を透過させた。膜へのリゾチーム吸着量、吸着積層数はそれぞれ 0.42 g/g、38 層となった。多層吸着したリゾチームを、NaCl 水溶液を膜に透過させることによって高濃縮率で溶出できることを示した。

5. 文献

- 1) 林勝哉, 井上泰治, リゾチーム, 南江堂 (1974).
- 2) S. Tsuneda, K. Saito, S. Furusaki and T. Sugo, *J. Chromatogr. A*, 689(1995) 211-218.
- 3) J. Thommes and M.-R. Kula, *Biotechnol. Prog.*, 11(1995) 357-367.
- 4) K. H. Gebauer, J. Thommes and M.-R. Kula, *Chem. Eng. Sci.*, 52(1997) 405-419.
- 5) Y. Wei and R. Y. M. Huang, *J. Appl. Polym. Sci.*, 53(1994) 179-185.
- 6) K. Sekiguchi, K. Serizawa, S. Konishi, K. Saito, S. Furusaki and T. Sugo, *Reactive Polym.*, 23(1994) 141-145.
- 7) S. Tsuneda, H. Shinano, K. Saito, S. Furusaki and T. Sugo, *Biotechnol. Prog.*, 10(1994) 76-81.
- 8) M. Kim, J. Kojima K. Saito, S. Furusaki and T. Sugo, *Biotechnol. Prog.*, 10(1994) 114-120.

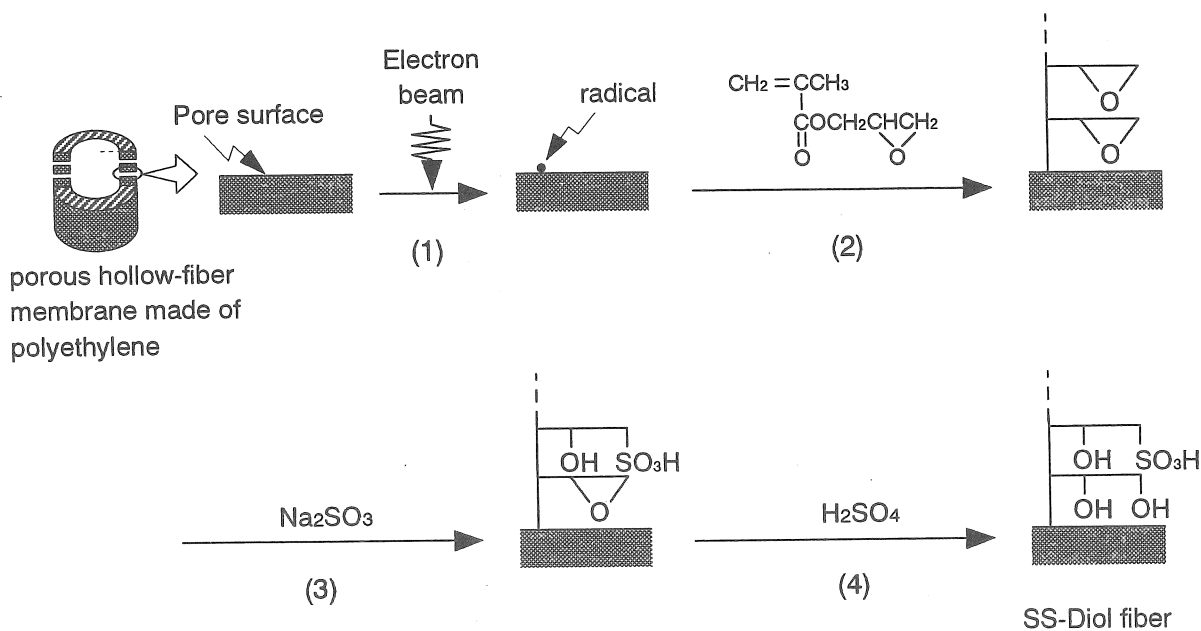


Fig. 1. Preparation scheme of graft chains containing sulfonic acid group.

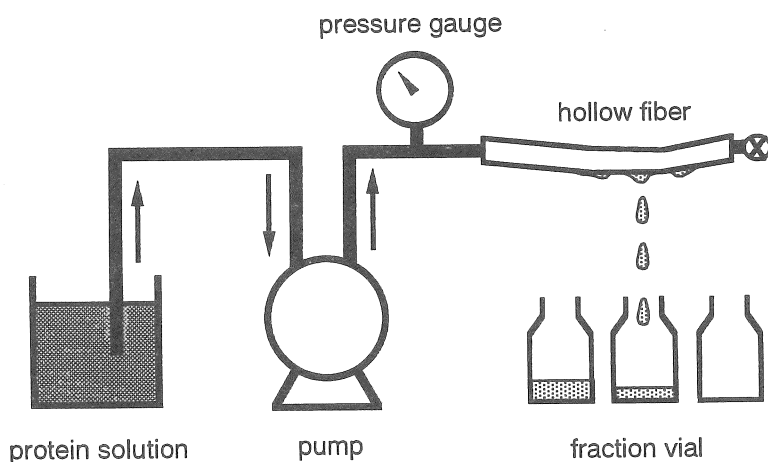


Fig. 2. Experimental apparatus for determination of permeation flux and amount of protein adsorbed.

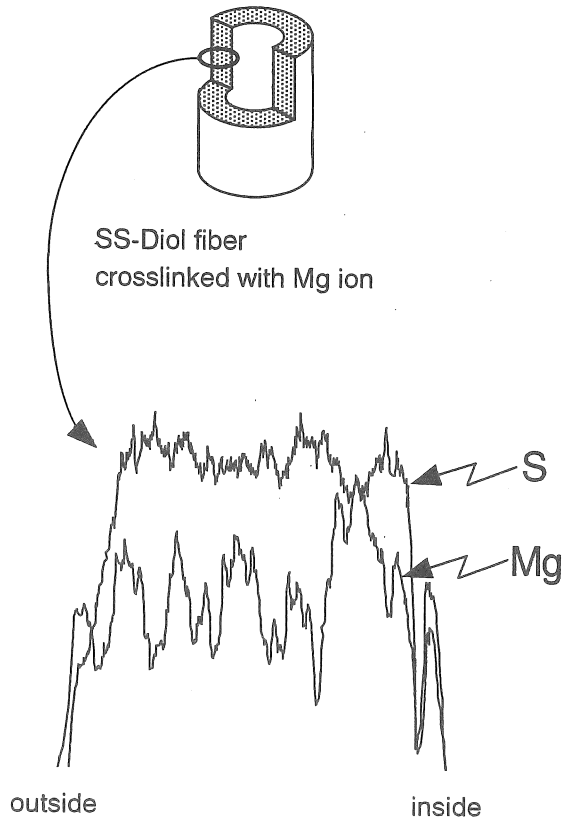


Fig. 3. Distribution of SO_3H group and adsorbed Mg ion across the membrane thickness.

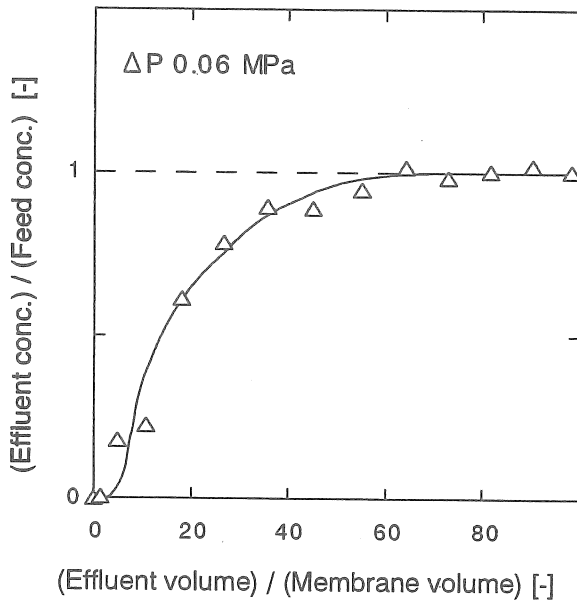


Fig. 4. Concentration change during permeation of MgCl_2 solution through the pores.

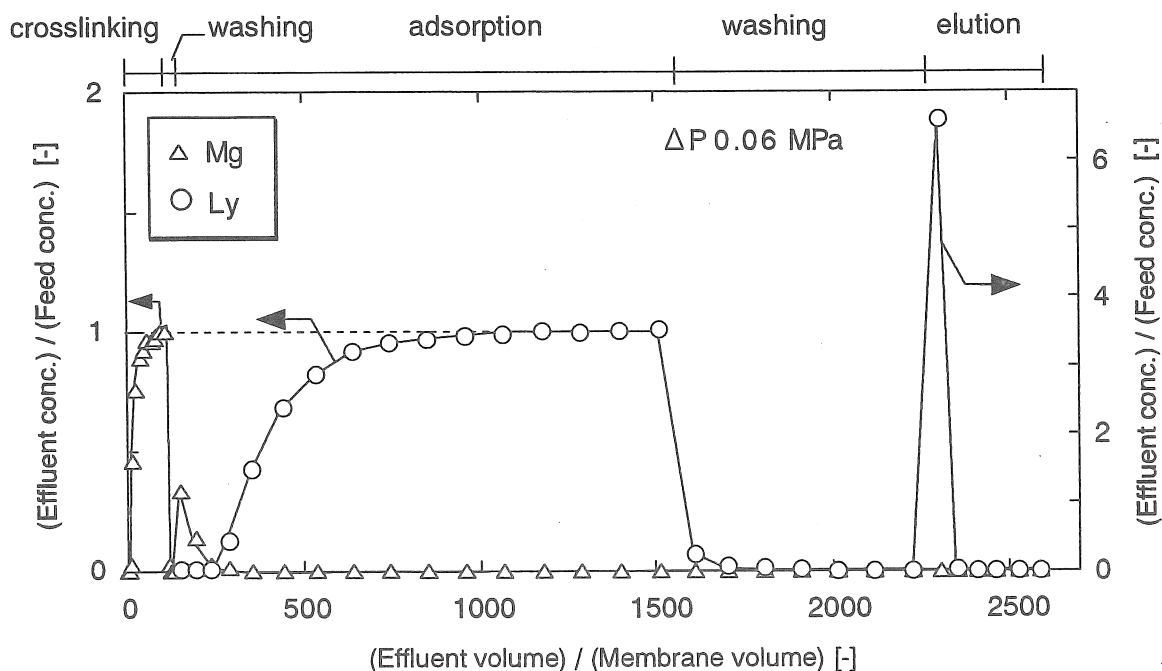


Fig. 5. Breakthrough and elution curves of lysozyme for SO₃H-group-containing porous membrane (SS-Diol fiber).

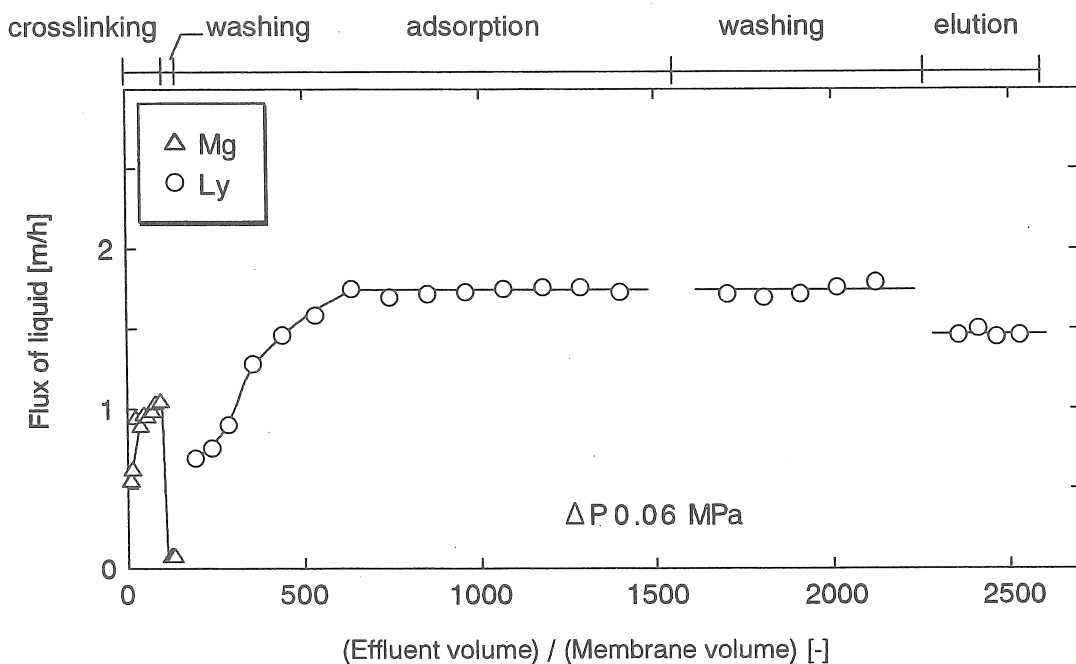


Fig. 6. Flux changes during adsorption-washing-elution of lysozyme.

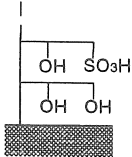
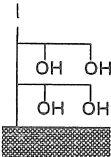

Table 1
Properties of SO₃H-group-containing porous membrane of a hollow-fiber form (SS-Diol fiber)

size (mm)	inner diameter	2.7
	outer diameter	4.5
SO ₃ H group density (mmol/g ^a)		1.2
specific surface area (m ² /g)		3.7
pure water flux ^b (m/h)		0.10

^a Grams of dry state of SS-Diol fiber

^b $\Delta P = 0.06$ MPa

Table 2
Flux of various liquids for hollow-fiber membranes (298 K, 0.06 MPa)

liquid	SS-Diol fiber	Diol fiber	PE fiber
			
water	0.10	1.9	3.1
0.005M NaCl	0.19	2.0	3.1
0.005M KCl	0.16	2.0	3.1
0.005M CaCl ₂	1.5	2.0	3.1
0.005M MgCl ₂	1.2	2.0	3.1

Development of High-Performance Elution of Proteins Adsorbed in Multilayer onto Porous Hollow-Fiber Membrane with NaCl Aqueous Solution

Kyoichi Saito

Department of Materials Technology, Faculty of Engineering
Chiba University

Summary

Both membrane chromatography and perfusion chromatography are based on similar principles that convective flow of a protein solution through the pores of a porous membrane and a porous bead, respectively, can minimize the diffusional mass-transfer path to the ligands immobilized on the pore surface. The membranes and beads have pore diameters ranging from 0.1 to 1 μ m.

In this study, the recovery of egg-white lysozyme at a high capacity was examined using cation-exchange porous membranes of a hollow-fiber form. Ionizable polymer chains grafted onto a porous hollow-fiber membrane are applicable to protein recovery based on electrostatic interaction. However, increasing the density of the ionizable group, e.g., sulfonic acid group, will enhance the extension of the graft chain from the pore surface toward the pore interior, resulting in the lowering of permeability. Ionic crosslinking of the graft chains by bivalent cations, e.g., Mg^{2+} , led to recovery of the permeability to overcome the trade-off between higher protein capacity and lower liquid permeability. The SO_3H -group-containing hollow-fiber membrane prepared here exhibited an equilibrium lysozyme capacity of 0.42 g per g of fiber, and an elution percentage of 100%. Since egg white originally contains Mg and Ca at a concentration of 0.005 and 0.015 M, respectively, ionic crosslinking by permeating egg white is applicable to purification of egg-white proteins.

We dealt with lysozyme dissolved in a buffer solution as a model solution of actual egg white. The egg white exhibits a viscosity of about fourfold that of the model solution. Therefore, in processing the egg-white protein using the modified porous hollow-fiber membrane, the operation in the crossflow mode is necessary so as not to reduce the permeability.