- (1981)
- 11) Patterson, G.K.: *PCH Physico. Chem. Hydrodyn.*, **7**, 33-41 (1986)
 - 12) Reid, R.C., J.M. Prausnitz and B.E. Poling: "The Properties of Gases and Liquids", p.598, McGraw-Hill, New York (1988)
 - 13) Takahashi, K.: "Ekitai Kongo Gijutsu" (Japanese translation of Harnby, N., M.F. Ewards and A. W. Ninow (Eds.) "Mixing in Process Industries"), p.48, Nikkan Kogyo Shinbun-sha (1989)
 - 14) Tatterson, G.B.: "Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks", p.226-236, McGrawHill, New-York (1991)
 - 15) Wolfbeis, O.S., E. Furlinger, H. Kroneis and H. Marsonar: *Z. Anal. Chem.*, **314**, 119-124 (1983)
 - 16) Wu, H. and G.K. Patterson: *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 2207-2221 (1989)

Development of a Local Mixing Measurement System Using Fluorescent pH Indicator

Yushi Hirofuji*, Taro Inoue** and Yoichi Nagase

Dept. Chem. Eng., Hiroshima Univ., Higashi-Hiroshima 724

Key Words : Micromixing Measurement, Local Mixing, Fluorescence, pH Indicator, Xenon

A simple system for measurement of resultant micromixing in a solution, in the sense of space average, has been developed. NaOH solution is injected into a solution including fluorescence pH indicator - 8-hydroxy 1, 3, 6-pyrene trisulfonic acid sodium salt (HOPSA) - of which the absorbance and fluorescence spectra bands are completely different from each other. A xenon light source is focused into a light-guide fiber which is introduced to a measurement point. Fluorescence light is detected by a photomultiplier with a pin-hole section. The system was applied to local mixing measurement in the impeller stream from a disc turbine. The response curve showed violent fluctuation with reasonable time delay.

* Fukuoka Industrial Technology Center

** Tokuyama Soda Co., Ltd.

タンパク質を担持したパーフルオロカーボン液滴の調製とタンパク質分離への適用[†]

上平正道・荻野倫明・竹内 寛

名古屋大学工学部 分子化学工学科^{††}

緒 言

タンパク質は、塩や有機溶媒による沈殿法や各種クロマトグラフィーによって精製されている。クロマトグラ

フィー法は分離能が高いためしばしば用いられる手法であるが、スケールアップが容易ではないため、工業規模での分離において有用な分離法は限られているのが現状である。一方、液液抽出法は化学工学の基本的な単位操作で、スケールアップが比較的容易で連続操作も可能であるという利点を持っている。したがって、液液抽出法

[†] 1993年7月12日受理；化学工学会第25回秋季大会（東京，1992年9月）にて発表

^{††} 〒464-01 名古屋市千種区不老町

がタンパク質分離にも適用できれば、有効な工業的分離法となりうる。しかしながらタンパク質は、通常の有機溶媒には溶解しないため、タンパク質の分離に適用可能な液液抽出法は、水性二相分配抽出法¹⁾や逆相ミセル抽出法³⁾に限られている。これらの方法は、分離の特異性に問題があるため、工業規模での分離に適用可能な新しいタイプの分離法の開発が望まれている。

パーフルオロカーボン(PFC)は、炭化水素の水素が高度にフッ素化した化合物であるが、化学的に安定で生体に対して不活性である。また、酸素溶解性の高さを利用して人工血液に用いられており、微生物や動物細胞培養における酸素キャリアーとしても適用が試みられている^{4,7)}。近年、PFCにタンパク質を導入し、PFCを微小液滴にして分離用の担体として用いる分離方法が提案されている^{2,5)}。PFCを分離用の担体として用いる際の利点としては、非特異吸着が比較的少ないこと、疎水性が高く比重が大きいため水系との分離が容易であること、液体の担体であるため固体担体と比べ実際に撹拌などによる剪断応力に強いことなどがあげられる。

本研究では、簡単・迅速に活性を保持したタンパク質を担持したPFC液滴の調製方法を開発し、各種タンパク質の液滴への固定化を検討した。さらに、タンパク質の分離のために、PFC液滴の繰返し使用についても検討を行った。

1. 実験材料および方法

1.1 実験材料

PFCとしてFC-43(住友3M(株)製)を用いた。パーフルオロベンゾイルクロリド(PFBC)は、東京化成工業(株)製を用いた。牛血清アルブミン、パーオキシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、コンカナバリンAおよびヒトIgGは、Sigma Chemical Co.から、プロテインAは、Genzyme Co.から購入した。デキストラン(Dextran T 500)は、Pharmacia Fine Chemical Co.製を使用した。

1.2 PFC液滴の作製方法

直接法 PFC 1cm³に適当量(通常0.001cm³)のPFBCを溶解させ、0.14MNaClを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4; PBS)に通常1g/dm³の濃度のタンパク質溶液1cm³加えてVortex mixerで撹拌し、pHを1MNa₂CO₃溶液で調整しながら2時間反応させアシル化した。PFBCは、PFCに溶解する部分とタンパク質の尿酸基やアミノ基と共有結合的に結合する部分を持っており、タンパク質が適当量のPFBCで修飾されるとPFCと水相の界面に配置しPFCが液滴になると考えられる。生成したPFC液滴相は、PBSで洗浄後使用した。

デキストラン媒介法 PFC 1cm³にPFBCを0.01cm³溶解し、1%デキストラン水溶液を加えてpHを調整しな

Table 1 Introduction of proteins to PFC droplet - phase

Protein	Amount of protein introduced to PFC-phase [g/dm ³ -PFC]	
	Direct method	Dextran mediated method
Bovine serum albumin	1.0	1.0
Peroxidase	1.0 (0.07)*	0.75 (0.07)*
β -Glucosidase	0.78 (0.61)*	0.75 (0.37)*
Protein A	1.0 (0.25)**	0.40 (0.33)**
Concanavalin A	1.0	—

* Activity basis.

** Amount of IgG adsorbed to PFC-phase.

がらVortex mixerで撹拌することによりデキストランを取り込んだPFC液滴を調製した。調製したPFC液滴をPBSで洗浄後、NaIO₄ 20mgを加えて2時間酸化した。PFC液滴は洗浄後、PBSに溶解した1g/dm³のタンパク質溶液1cm³と混合し、撹拌しながら一晚反応させた。調製したPFC液滴相は、洗浄後使用した。

1.3 分析方法

タンパク質濃度は、Lowry法⁶⁾により測定した。パーオキシダーゼ活性は、*o*-フェニレンジアミンと過酸化水素を基質として、 β -グルコシダーゼ活性は、*p*-ニトロフェニルグルコピラノシドを基質として比色法により決定した。

2. 結果および考察

各種タンパク質をPFCへ担持した結果をTable 1に示す。直接法では、タンパク質基準でのPFC相への取込みは、一定量以上のPFBC添加では、添加したタンパク質のほぼ全量を取り込まれた。しかし、0.1-0.2cm³/(dm³-PFC)以下のPFBC添加量では安定なPFC液滴を得ることができなかった。直接法でのタンパク質のPFC液滴相への担持条件の検討の一例として、Fig. 1に β -グルコシダーゼのPFC相取込みにおけるPFBC添加量の影響を示す。PFBC添加量の増加に伴い、PFC相へタンパク質が取り込まれる割合は増加したが、活性基準でみると、PFBC添加量が0.5cm³/(dm³-PFC)より多くなると取込み率が減少した。これはタンパク質が過剰なPFBC修飾により活性を失うためと考えられる。他のタンパク質での結果もあわせて考えて、0.5-1cm³/(dm³-PFC)のPFBC添加量が取込み量と活性の保持のために適当な量であると考えられる。本法は、Eveleighらの方法^{2,5)}と比べ、タンパク質のPFC相への担持に煩雑な操作を必要とせず簡便なため、タンパク質固定化PFCを工業的に利用するための大量調製に向いていると考えられる。

デキストラン媒介法では、直接PFC液滴相にタンパク質が導入されるとタンパク質の活性部位がPFCによって妨害を受ける可能性があるのではないかと考えて、媒介

Fig. 1 Effect of PFBC concentration on protein introduction to PFC phase

Fig. 2 Photograph of PFC droplets introduced protein

物を介してタンパク質をPFC液滴相に担持したものである。Table 1に見られるように、この方法では、タンパク質の取込み量は直接法に比べて概して低い値となった。しかし抗体と特異的な親和性をもつプロテインAのPFC相への担持の場合、担持されたタンパク質量に対する抗体吸着量は、直接法に比べて高い値を示した。このように、タンパク質によってはスペーサー効果が期待できる媒介物を介した固定化が本法でも重要であると考えられる。

Fig. 2に、直接法により調製したPFC液滴の写真を示す。タンパク質の種類、PFBCや担持したタンパク質量によって若干液滴径の分布は異なるが、直径約20–80 μmの液滴が得られた。液滴を微小化することにより、全表面積が大きくなるため液滴に担持されるタンパク質の量は増大できるが、小さい液滴ほど沈降分離に時間を要するため適当な液滴径が存在すると考えられる。また得られた液滴は、緩衝液中で3カ月以上安定であった。

リガンド修飾PFC液滴相を用タンパク質の吸着回収の

Table 2 Recovery of horseradish peroxidase from PFC phase introduced concanavalin A

	Added PFBC [cm³/dm³-PFC]	
	0.5	1.0
Adsorption [mg]	0.286	0.286
Recovery [mg]	0.150	0.133
Yield [%]	52.4	46.4

Concanavalin A-introduced PFC phase: 1cm³.
Eluant: 0.2M α-D-methylmannoside.

Table 3 Amount of horseradish peroxidase adsorbed to PFC phase introduced concanavalin A during reuse

	Adsorbed POD [g/dm³-PFC]			
Cycle	Added PFBC [cm³/dm³-PFC]			
	0.5	1.0	5.0	10.0
1	0.274	0.357	0.015	0.017
2	0.286	0.286	—	—
3	0.235	0.263	—	—

Concanavalin A-introduced PFC phase: 1cm³.

可能性を検討するため、糖タンパク質に群特異的に親和性を持つコンカナバリンA (Con A)を取り込んだPFC液滴を直接法により調製し、西洋わさび由来のパーオキシダーゼ(POD)の吸着分離を行った。この場合もConA取込みにおけるPFBC添加量の最適量が存在する。すなわち、0.5–1 cm³/(dm³-PFC)が適量であり、それ以上ではConAは全量PFC相に取り込まれたが、POD吸着量は急激に低下した。

1g/dm³の濃度のPOD溶液1cm³と約1g/(dm³-PFC)の濃度でConAを担持したPFC液滴1cm³とを接触させてPODの吸着分離を試みたところ、加えたPODの約60%がPFC液滴相に分配された。PFC液滴相を洗浄後、0.2M α-D-メチルマンノシドを溶出剤として用いて水相に回収した(Table 2)。いずれの条件でもPFC液滴に吸着したPOD量の約50%を回収することができた。Table 3は、ConA修飾PFC液滴の繰返し使用におけるPOD吸着量の変化を示している。繰返し使用によって若干POD吸着量が低下していくものの、ここで調製したPFC液滴はPODの吸着分離に対し繰返し使用することが可能であった。

以上のように、本研究で開発した方法によってタンパク質の活性を維持した状態で液滴としてPFCにタンパク質を簡単・迅速に取り込ませることが可能であった。モデル系としてConAを取り込ませたPFC液滴を用いて、西洋わさび由来のPODの吸着回収に繰返し使用できることを示した。

〔謝 辞〕 本研究は文部省科学研究費奨励研究 A (04750771) の援助を受けました。また、FC-43 は住友 3M (株) より提供していただきました。ここに深く感謝いたします。

Literature cited

- 1) Albertsson, P.-Å.: Partition of cell particles and macromolecules, 3rd ed., Wiley, New York (1986)
- 2) Boedeker, A.R. and A.M. Lenhoff: *Biotechnol. Prog.*, **5**, 132-135 (1989)
- 3) Goklen, K.E. and T.A. Hatton: *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 831-841 (1987)
- 4) Hamamoto, K., M. Tokashiki, Y. Ichikawa and H. Murakami: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3415-3416 (1987)
- 5) Kobos, R.K., J.W. Eveleigh and R.A. Arentzen: *Trends Biotechnol.*, **7**, 101-105 (1989)
- 6) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 7) Mattiasson, B. and P. Adlercreutz: *Trends Biotechnol.*, **5**, 250-254 (1987)

Preparation of Perfluorocarbon Droplets Containing Proteins and Their Application to Protein Separation

Masamichi Kamihira, Noriaki Ogino and Hiroshi Takeuchi

Dept. of Chem. Eng., Nagoya Univ., Nagoya 464-01

Key Words : Biochemical Engineering, Separation Technique, Protein Separation, Perfluorocarbon, Affinity Ligand

Perfluorocarbon (PFC) droplets containing proteins were prepared by using perfluorobenzoyl chloride (PFBC) as a modifier. Two procedures for introducing proteins to PFC phase were examined. One was that proteins were directly modified with PFBC to partition the protein to PFC phase (direct method). The other was that dextran was first introduced to PFC droplets by the direct method and then proteins were immobilized through the dextran by using a NaIO_4 oxidization method (dextran-mediated method). In the direct method, there was an optimal concentration of PFBC to obtain maximal activity of the protein introduced. PFC droplets introduced concanavalin A were used for adsorption and separation of horseradish peroxidase (POD). The PFC droplets could adsorb 60% of POD added and 50% of POD adsorbed was recovered from the PFC phase. Moreover, the PFC droplets could be repeatedly used for adsorption and elution of POD.

~~~~~