高吸水性ゲル粒子を利用した2成分系タンパク質溶液の 分画と濃縮の同時操作

Simultaneous Operations of Fractionation and Concentration of Binary Protein Mixtures with Particles of Superabsorbent Hydrogels

入谷 英司, 向井 康人, 植木 千里, 片桐 誠之

Eiji Iritani, Yasuhito Mukai, Chisato Ueki, Nobuyuki Katagiri

Received 27 September 2002 ; Accepted 18 November 2002

A new technique has been developed for separating target protein selectively from protein mixtures using superabsorbent crosslinked hydrogels which have a drastic change in volume by absorbing water. In the process, the gel particles swell by absorbing water in an aqueous solution of complex solutions of BSA and myoglobin, and these proteins are simultaneously fractionated by the principle of polyelectrolyte precipitation resulting from electrostatic interactions between the oppositely charged protein and the gel. The experimental data clearly demonstrated that the concentration ratio of BSA markedly increases with the dosage of the gel, while that of myoglobin decreases, resulting in a high degree of fractionation of BSA and myoglobin with the hydrogels. In addition, the variation over time of the concentration ratio of BSA was successfully evaluated by using the equation of motion of the gel network on the basis of the kinetics of swelling of the spherical gel.

Keywords : Gel particle, Protein solution, Fractionation, Concentration, Binary mixture

1. 緒 言

タンパク質溶液の濃縮や分画は、医療や医薬品工業、食品工業、バイオインダストリーなどの広範な分野において重要な操作となっており、これまでに多数の濃縮および分画技術が開発され、それらが利用されている。特に、多成分からなるタンパク質溶液の分離操作は、例えば、血しょう分画をはじめ、タンパク質の精製において不可欠な操作であり、現在もなお、より効率的な分離手法の開発が切望されている。多くの分離手法の中で、膜濾過法は極めて有望な分離法の一つと考えられ、限外濾過や精密濾過操作で生じる膜ファウリングの課題^{1~4)}や、多成分系タンパク質の分画特性^{5~10)}に関して、近年活発な研究が行われており、多くの知見が得られている。

一方、高分子ゲルが有する架橋構造と膨潤性による吸液機能を利用すると、溶液やスラリーの濃縮が可能

となることが知られており、これまで多くの報告がなされてきた^{11~14)}。この場合、ゲルの膨潤過程において、ゲルと分離対象のバルク溶液との間に発生する浸透圧差を推進力として、溶液がゲル内部に移動するが、溶質の大きさがゲルの高分子網目のサイズより大きければ溶質のみがゲルの表面で阻止され、分離膜と同様の篩い機能により溶液が濃縮される。ゲルを利用した分離操作は、蒸発法のように熱を用いることがなく、また膜濾過のようにポンプ等を使用することもなく、これらの分離法と比較して非常に穏和な条件下で操作を行うことができるため、特に、タンパク質のような変性しやすい高分子溶液の分離・濃縮に適している。最近では、通常のゲルに比べ水をより多量に吸収し、自重の数百倍もの水を保持し得る、いわゆる高吸水性ゲルが開発され、この粒状物を使用すると大きな吸水速度も得られるため、タンパク質溶液の効率的な濃縮が可能となることが明らかにされている^{15, 16)}。また、高吸水性ゲルの分離操作への応用として、タンパク質を含む低分子電解質溶液を対象としたタンパク質の濃縮・脱塩法も提案されている¹⁷⁾。

本研究では、高吸水性球状ゲルの篩い効果だけでな

名古屋大学大学院工学研究科分子化学工学専攻
(〒464-8603 名古屋市千種区不老町) TEL 052-789-3374
Department of Chemical Engineering, Nagoya University
(Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603)

く、荷電効果にも着目し、2成分系タンパク質溶液を濃縮すると同時に分画を行う新規分離手法を提案する。すなわち、2成分系タンパク質溶液中に高吸水性ゲル粒子を添加すると、ゲルの網目の分離膜としての機能により溶媒のみがゲル内に吸収され、溶液中に存在するタンパク質が濃縮される。さらに、ゲル粒子のもつ荷電を利用すると、溶液環境の調整によりゲル粒子と反対荷電をもつタンパク質との間で静電的相互作用により可逆凝集が生じて、そのタンパク質はゲル粒子表面上に捕捉され、濃縮と同時にタンパク質の分画も可能となる。

本手法の有効性を明らかにするため、牛血清アルブミン (BSA) とミオグロビンを混合した2成分系タンパク質溶液を対象として、pHの調整によりこれらタンパク質の荷電状態を制御しつつ高吸水性ゲル粒子を添加して、2成分系溶液の濃縮および分画特性を検討した。ゲル粒子の膨潤過程の考察から、ゲルから排除されたタンパク質である BSA の濃縮過程の定量的な解析を行った。さらに、荷電効果によりゲル粒子表面上に凝集・析出したタンパク質のミオグロビンを、再度 pH を調整することにより可逆的に再分散させ、その分離回収特性についても検討した。

2. 実験

2.1 実験試料

使用した高吸水性ゲルは、球状粒子のポリアクリル酸塩架橋体 (三菱化学 (株) 製、ダイヤウエット A III) であり、負電荷をもつ。このゲル粒子を振動ふるい器によって分級し、拡大投影器で粒度分布を測定した。実験には、収縮時の面積平均径が $230\mu\text{m}$ のゲル粒子を使用した。モデルタンパク質試料には、分子量 MW 67,000、等電点 pI 4.9 の BSA (片山化学工業 (株) 製、Fraction V) と MW 17,000、pI 7.0 のミオグロビン (シグマ (株) 製) を用いた。純水には、水道水を Milli-RO 60 逆浸透純水装置とそれに引き続き Milli-Q SP UF 超純水装置 (いずれもミリポア (株) 製) に通して得た超純水を用いた。各タンパク質を超純水に溶解させ単成分系タンパク質溶液を用意した後、それらを混合して各々 5×10^{-4} の質量分率をもつ混合溶液を調製した。また、pH の調整は、 1mol/l HCl または 1mol/l NaOH を添加して行った。

2.2 実験装置と方法

一連の2成分系タンパク質溶液の濃縮・分画操作の概要を Fig. 1 に模式化した。試料溶液 100g を 200ml ビーカーに入れ、乾燥ゲル粒子を $0.1\sim 0.5\text{g}$ の種々の

Fig. 1 Schematic diagram of fractionation and concentration process

範囲で添加した。ジャーテストにより 1s^{-1} の回転数で攪拌しつつ、ゲル粒子を膨潤させた。この時の溶液の pH は、BSA が負、ミオグロビンが正の電荷をもつ pH6 に調整した。ゲル粒子は負の電荷をもつため、負電荷の BSA 分子との間には反発力が作用し、ゲルの網目により効果的に排除され、その一方でゲルは溶媒を吸収するため、BSA の濃縮が次第に進行する。また、正電荷のミオグロビン分子は、荷電効果により負電荷のゲル粒子の表面上に選択的に析出してヘテロ凝集が起こり、BSA 分子から分離される。なお、タンパク質は一般に親水コロイドのため、その立体障害的作用により、BSA とミオグロビンとは凝集しない¹⁸⁾。所定の時間が経過した後、42 メッシュの市販ふるいを用いてバルク溶液から膨潤ゲル粒子を分離した。ゲル粒子の製造工程で混入した若干のゲルの破砕物を除去するため、ふるいを通した濃縮液を、セルロースアセテート製で公称孔径 $0.45\mu\text{m}$ のシリンジフィルター (アドバンテック東洋 (株) 製) で濾過した。2 波長における吸光度測定による 2 成分物質の同時定量法¹⁹⁾ に基づき、 280nm と 410nm の 2 波長での濾液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線を用いて濾液中の BSA とミオグロビンの濃度を算出した。また、膨潤ゲルの質量を測定し、収縮時のゲル質量との差からゲルの吸液質量を求めた。なお、ゲルの膨潤による分離過程の速度論的な考察を行うため、ゲルの膨潤時間は種々に変化させた。

次に、ゲル粒子からミオグロビンを回収するため、ミオグロビンが析出・付着した膨潤ゲルを 42 メッシュで直径 5cm の円筒状の特製ふるいに入れ、これを pH8 に調整した溶媒中に浸漬させた。pH6 から pH8 への溶液環境の変化により、ミオグロビンの電荷は正から負に変化し、このため、ミオグロビンは負の電荷

Fig. 2 Effect of gel dosage on concentration ratio of BSA and myoglobin

をもつゲル粒子表面から可逆的に剥離し、溶媒中に再分散する。時間が充分経過した後、溶液をシリンジフィルターで濾過して濾液の吸光度を測定し、ミオグロビン濃度を求め、その回収率を計算した。

3. 結果と考察

3.1 ゲル粒子の添加量の影響

Fig. 2 には、ゲル添加前の BSA およびミオグロビンの初期濃度 s_{b0} , s_{m0} に対するゲル膨潤後の各溶質の濃度 s_b , s_m の比 r_b , r_m を、試料溶液量に対する乾燥ゲル粒子の添加量の質量分率 s_g に対してプロットした。プロットは、いずれもゲル粒子を添加してから 20 分経過後の値であり、後述するように、このときゲル粒子は膨潤平衡に達している。BSA については、ゲル添加率 s_g の増加とともに濃縮率 r_b はほぼ直線的に増大する傾向を示した。一方、ゲル粒子を添加するとミオグロビンの濃縮率 r_m は初期濃度の場合の 1.0 より小さくなり、 s_g の増加とともにその値は次第に溶液中にミオグロビンが含まれない状態の値である 0 に近づく傾向を示した。これは、本実験の pH6 の環境下で正に帯電したミオグロビン分子が、負電荷をもつゲル粒子の表面上にヘテロ凝集の機構により析出したためであり^{20, 21)}、実際、実験後のゲル粒子表面は白濁したミオグロビンの凝集体に覆われているのが観察された。なお、図中には、ゲル粒子の吸液質量の実験結果に基づき、ゲル粒子が溶媒だけを吸うと仮定して算出された溶質成分の濃縮率もプロットされている。これらの値は吸光度の測定により求められた BSA の濃縮率の結果とほぼ一致する傾向を示した。この結果は、BSA 分子がゲル粒子の網目の篩い効果

Fig. 3 Dependence of mass of water absorbed by gel and mass of myoglobin precipitated on gel on mass of dry gel

によりゲル表面から排除され、溶液中に存在し続けていることを意味する。なお、ゲル粒子の吸液質量の結果に基づいた場合には、ゲル粒子表面や粒子間にわずかに濃縮液が残存するため、特に、ゲル粒子の濃度 s_g が大きくなるとその影響は顕著となり、吸光度の測定に基づく値より大きな値を示した。以上より、ゲル粒子により脱水された分だけ BSA が濃縮され、また、ミオグロビンはゲル粒子に付着するので、溶液中では濃縮と分画が同時に生じることとなる。

単位乾燥ゲル添加量あたりの吸液質量 (W_w/W_g) および析出ミオグロビン質量 (W_m/W_g) を、添加した乾燥ゲルの質量 W_g に対して Fig. 3 にプロットした。吸液質量については、測定値のほか、吸光度に基づく BSA の濃縮率を用いて、BSA がゲル粒子の表面から完全に排除されるという仮定のもとに計算した値も併せて示した。両者は良好な一致を示すことがわかる。いずれのゲル添加量においても、 W_w/W_g はおよそ 100 以上の値を示していることから、本実験の範囲内でゲル粒子は自重の 100 倍以上の水を保持できることがわかる。また、ゲル添加量の増大とともに、 W_w/W_g は減少する傾向を示した。これは、ビーカー内でゲル粒子同士がより密着するようになり、ゲル粒子の吸液能力が低下するためであると推察される。このため、Fig. 2 に示すように、ゲル粒子の濃度 s_g が大きくなるにつれ、BSA の濃縮率 r_b が極端に増加するという結果は得られなかった。一方、ゲル粒子によるミオグロビンの付着能についても、ゲル添加量の増大とともに次第に低下する傾向を示した。

3.2 溶質の濃縮率の経時変化

ゲル粒子の膨潤に伴う溶液の濃縮過程の動的挙動を

Fig. 4 Time-dependent behavior of concentration ratio of BSA and myoglobin

定量的に検討することは、最適な処理時間を決定するための重要な課題となる。

Fig. 4 には、一例として、ゲル粒子の濃度 s_g が 5×10^{-3} の場合に、ゲル粒子の膨潤に伴う BSA およびミオグロビンの濃縮率 r_b , r_m の経時変化をそれぞれプロットした。BSA の濃縮率は時間の経過とともに次第に増大し、約 15 分でほぼ一定値を示し、ゲル粒子の膨潤平衡に達したのと考えられる。一方、ミオグロビンの濃縮率はゲル添加直後に著しく減少し、やがて約 0.13 の一定値を示した。すなわち、ゲル粒子表面へのミオグロビンの析出がゲルの膨潤の比較的早い段階で生じていることがわかる。

拡大投影器を用いて測定されたゲル粒子 1 個の直径

Fig. 5 Variation over time of diameter of gel particle during swelling process

d_p の経時変化を Fig. 5 にプロットした。pH 調整したタンパク質溶液 (pH6), pH 調整したタンパク質フリーの水溶液 (pH6), pH 調整を行わない純水 (pH 7.2) のそれぞれについて、ゲルの膨潤特性を比較した。ゲルの吸液特性は、溶存するタンパク質にはほとんど影響されないが、溶液の pH 環境に大きく影響されることがわかる。

ここで、ゲル粒子の膨潤に伴う BSA の濃縮の動的挙動を定量化するため、ゲル粒子の膨潤について考察する。球状ゲルの膨潤過程は、田中ら²²⁾によってよく検討されており、膨潤過程におけるゲル半径の経時変化は、次式で表されることが知られている。

$$\frac{\Delta a(\theta)}{\Delta a_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} n^{-2} \exp\left(-\frac{n^2 \theta}{\theta_s}\right) \quad (1)$$

ここに、 $\Delta a(\theta)$ は時間 θ から膨潤平衡時までのゲル粒子の半径の増加量、 Δa_0 は膨潤の全過程におけるゲル粒子の半径の増加量、 θ_s は次式で定義できる膨潤時間係数である。

$$\theta_s = a^2 / D \quad (2)$$

ここに、 a は平衡時における膨潤ゲルの半径、 D はゲルの拡散係数であり、高分子網目と溶媒の摩擦粘性係数に対する網目の弾性率の比として定義される。Eq. (2) によれば、小さなゲルほど速く膨潤し、濃縮操作に要する時間を短縮できることがわかる。

本研究のように、ゲル粒子の集合体の膨潤特性についての議論が必要となる場合には、Eq. (1) で表されるゲル粒子 1 個の半径の変化の記述より、ゲル粒子の総質量の変化の記述を利用する方が、評価が容易となる。この観点より、Eq. (1) をゲル質量の経時変化に換算すると、 $(\Delta W_0 - \Delta W(\theta)) \gg W_{g0}$ の条件下で、次式を得る²³⁾。

$$\frac{(\Delta W_0)^{1/3} - (\Delta W_0 - \Delta W(\theta))^{1/3}}{(\Delta W_0)^{1/3} - (\rho W_{g0} / \rho_g)^{1/3}} (=M) = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} n^{-2} \exp\left(-\frac{n^2 \theta}{\theta_s}\right) \quad (3)$$

ここに、 $\Delta W(\theta)$ は時間 θ から膨潤平衡時までの吸液質量、 ΔW_0 は膨潤の全過程における吸液質量、 ρ は水の密度、 ρ_g は収縮時のゲル粒子の密度である。

Fig. 4 における吸光度から計算した BSA の濃縮率の測定結果に基づき、ゲルの吸液量の経時変化を算出し、 M として表した Eq. (3) の左辺と膨潤時間 θ との片対数プロットを Fig. 6 に示した。併せて、Fig. 5

Fig. 6 Plot based upon Eq. (3)

に示したゲル粒子の直径の経時変化のデータに基づき、Eq. (1) から求めた M の値も図中にプロットした。ゲル粒子径に基づく結果は、ゲルの吸液量に基づく結果と比較的良好な一致を示した。図中の実線は、吸光度に基づく実験結果を Eq. (3) でフィッティングさせた計算値である。この計算値は、 $\theta/\theta_s > 0.25$ の場合には片対数紙上で直線関係を示し、図の破線のように次式で近似できる。

$$M = \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\theta}{\theta_s}\right) \quad (4)$$

ここに示したゲルの膨潤モデルは、ゲルの半径の変化が2倍を越えないような場合に適用できると言われていたが⁽²²⁾、Eqs. (1), (3), (4) のいずれも、極めて大きな膨潤度をもつ高吸水性ゲル粒子の膨潤過程を精度良く記述できることが明らかとなった。図中の破線の直線勾配から Eq. (4) に基づき θ_s を決定できるので、このようにして求めた θ_s の値を用いて、Eq. (3) の関係式からゲル粒子の膨潤度の経時変化を計算し、それに基づき BSA の濃縮率の経時変化を推定した結果を、Fig. 4 に実線として示した。計算値は実測値と良好な一致を示すことから、Eq. (3) の利用により、BSA の濃縮過程を精度良く記述できることがわかった。

3.3 析出したミオグロビンの回収

2成分系タンパク質溶液中でゲル粒子を膨潤させ、BSA を濃縮させた後、ミオグロビンが析出したゲル粒子を、pH 環境を調整した溶液中に投入することに

Fig. 7 Recovery of myoglobin at different gel dosages

よって再分散させ、一連の分画・濃縮プロセスが終了する。溶液中のミオグロビン濃度を測定することにより、ミオグロビンの回収率が評価できる。膨潤ゲル粒子の表面に析出したミオグロビンの総質量に対する再分散してゲルから分離したミオグロビンの質量の比 R を、種々のゲル添加率 s_g に対して Fig. 7 に示した。ゲル粒子を pH8 の溶媒に浸すことにより、ゲル表面上に析出したミオグロビンはゲル粒子と同じ負の電荷をもつことになり、およそ 40~50 % 程度のミオグロビンがゲル粒子から剥離して可逆的に再分散するという結果が得られた。タンパク質の変性やゲルの極度の収縮が生じない範囲で pH をより高めて、ミオグロビンの負電荷量を増大させるなど、さらに再分散を促進させる手法の開発が、本研究の今後の展開のキー・ポイントとなろう。

4. 結 言

荷電をもつ高吸水性ゲルを利用した2成分系タンパク質溶液の新規濃縮・分画法を提案し、BSA とミオグロビンからなる混合溶液を試料に用いて、その有効性を検証した。負電荷をもつゲル粒子の膨潤により、BSA が負、ミオグロビンが正の電荷をもつ溶媒環境のもとで、BSA はゲル粒子から排除されて濃縮率が増大する一方、ミオグロビンはゲル粒子の表面で凝集・析出して濃縮率が原液の状態より低下し、その傾向はゲル粒子の添加量の増大とともに顕著となることを見出した。また、析出したミオグロビンは溶液環境の調整により再分散させ、回収可能なことも明らかにした。以上より、本手法は穏和な条件下での2成分系タンパク質溶液の濃縮・分画法として極めて有効と考

えられる。さらに、ゲル粒子の膨潤過程に伴うゲルの質量変化を表す動的モデルに立脚して、操作中におけ

る BSA 溶液の濃縮率の経時変化を定量的に記述できることを明らかにした。

Nomenclature

a	: final radius of gel sphere in equilibrium with surrounding solvent (m)	$\Delta a(\theta)$	: increase in radius of gel from time θ to equilibrium (m)
D	: diffusion coefficient of gel (m^2/s)	ΔW_0	: total increase in mass of gel in entire process of swelling (kg)
d_p	: diameter of gel (m)	$\Delta W(\theta)$	: increase in mass of gel from time θ to equilibrium (kg)
M	: value defined in Eq. (3) (—)	θ	: time (s)
R	: recovery of myoglobin (—)	θ_s	: characteristic time of swelling (s)
r	: concentration ratio (—)	ρ	: density of solvent (kg/m^3)
s_b	: mass fraction of BSA in solution (—)	ρ_g	: apparent density of dry gel (kg/m^3)
s_g	: mass fraction of dry gel added to solution (—)		
s_m	: mass fraction of myoglobin in solution (—)		
W_g	: mass of dry gel added to solution (kg)	Subscript	
W_m	: mass of myoglobin precipitated on gel (kg)	0	: initial value
W_w	: mass of water absorbed by gel (kg)	b	: BSA
Δa_0	: total increase in radius of gel in entire process of swelling (m)	m	: myoglobin

References

- 1) Suki, A., A. G. Fane and C. J. D. Fell: "Flux Decline in Protein Ultrafiltration", *J. Membrane Sci.*, **21**, 269-282 (1984)
- 2) Robertson, B. C. and A. L. Zydney: "Protein Adsorption in Asymmetric Ultrafiltration Membranes with Highly Constricted Pores", *J. Colloid Interface Sci.*, **134**, 563-575 (1990)
- 3) Iritani, E., S. Tachi and T. Murase: "Influence of Protein Adsorption on Flow Resistance of Microfiltration Membrane", *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **89**, 15-22 (1994)
- 4) Iritani, E., Y. Mukai, Y. Tanaka and T. Murase: "Flux Decline Behavior in Dead-End Microfiltration of Protein Solutions", *J. Membrane Sci.*, **103**, 181-191 (1995)
- 5) Legallais, C., M. Y. Jaffrin and J. Wojcicki: "The Effect of Protein Adsorption on ApoB Removal and Selectivity in Plasma Fractionation by Membrane", *J. Membrane Sci.*, **91**, 97-110 (1994)
- 6) Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Upward Dead-End Ultrafiltration of Binary Protein Mixtures", *Sep. Sci. Technol.*, **30**, 369-382 (1995)
- 7) Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Separation of Binary Protein Mixtures by Ultrafiltration", *Filtration & Separation*, **34**, 967-973 (1997)
- 8) Mukai, Y., E. Iritani and T. Murase: "Fractionation Characteristics of Binary Protein Mixtures by Ultrafiltration", *Sep. Sci. Technol.*, **33**, 169-185 (1998)
- 9) Ghosh, R., Q. Li and Z. Cui: "Fractionation of BSA and Lysozyme Using Ultrafiltration: Effect of Gas Sparging", *AIChE J.*, **44**, 61-67 (1998)
- 10) Rabiller-Baudry, M., B. Chaufer, D. Lucas and F. Michel: "Ultrafiltration of Mixed Protein Solutions of Lysozyme and Lactoferrin: Role of Modified Inorganic Membranes and Ionic Strength on the Selectivity", *J. Membrane Sci.*, **184**, 137-148 (2001)
- 11) Flodin, P., B. Gelotte and J. Porath: "A Method for Concentrating Solutes of High Molecular Weight", *Nature*, **188**, 493-494 (1960)
- 12) Cussler, E. L., M. R. Stokar and J. E. Varberg: "Gels as Size Selective Extraction Solvents", *AIChE J.*, **30**, 578-582 (1984)
- 13) Huang, X., H. Unno, T. Akehata and O. Hirasu: "Application of Temperature-Sensitive Water-Absorbing Hydrogel (Polyvinylmethylether Gel) to Dewatering of Sludges", *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **13**, 518-521 (1987)
- 14) Park, C. H. and I. Orozco-Avila: "Concentration Cellulase Using a Temperature-Sensitive Hydrogel: Effect of Gel Particle Size and Geometry", *Biotechnol. Prog.*, **9**, 640-646 (1993)
- 15) Badiger, M. V., M. G. Kulkarni and R. A. Mashelkar: "Concentration of Macromolecules from Aqueous Solutions: A New Swellex Process", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 3-9 (1992)
- 16) Iritani, E., M. Iwata and T. Murase: "Concentration of Proteinaceous Solutions with Superabsorbent Hydrogels", *Sep. Sci. Technol.*, **28**, 1819-1836 (1993)
- 17) Iritani, E., Y. Mukai and C. Ueki: "Concentration and Desalination of Protein Solutions with Superabsorbent Hydrogels", *J. Soc. Powder Technol., Japan*, **38**, 555-561 (2001)
- 18) Iritani, E., Y. Mukai and Y. Toyoda: "Properties of a Filter Cake Formed in Dead-End Microfiltration of Binary Particulate Mixtures", *J. Chem. Eng. Japan*,

- 35, 226-233 (2002)
- 19) Takeuchi, Y., T. Wasai and S. Suginaka : "Fixed-Bed Breakthrough Curves in Binary and Ternary Trace Component Adsorption from Aqueous Solutions", *J. Chem. Eng. Japan*, **11**, 458-464 (1978)
- 20) Clark, K. M. and C. E. Glatz : "A Binding Model for the Precipitation of Proteins by Carboxymethyl Cellulose", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 215-224 (1992)
- 21) Chen, W., S. Walker and J. C. Berg : "Mechanism of Floc Formation in Protein Precipitation by Polyelectrolytes", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 1039-1045 (1992)
- 22) Tanaka, T. and D. J. Fillmore : "Kinetics of Swelling of Gels", *J. Chem. Phys.*, **70**, 1214-1218 (1979)
- 23) Sambuichi, M., H. Nakakura and K. Osasa : Preprint of 21th Autumn Meeting, Soc. of Chemical Engineers, Japan, p. 532, Fukuoka (1982)