

タンパク質吸着メソポーラス材料の開発

山口 敏弘¹・中尾 俊章¹・西田 淑男^{2*}

¹愛知県産業技術研究所, ²愛知県産業技術研究所食品工業技術センター

(2009年4月2日受付 2009年6月1日受理)

Development of Mesoporous Pillared-Clay Composite and Its Application to Protein Adsorbent

Toshihiro Yamaguchi¹, Toshiaki Nakao¹, and Yoshio Nishida^{2*} (*Aichi Industrial Technology Institute, 1-157-1 Onda-cho, Kariya 448-0003*¹; *Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute, 2-1-1 Shimpukujicho, Nishi-ku, Nagoya 451-0083*²) *Seibutsu-kogaku* **87**: 314-318, 2009.

Mesoporous composites with pores of approximately 10 nm have been synthesized from aqueous mixtures of hecrite clay mineral and polyvinyl alcohol (PVA) by a melt intercalation of aluminum salt and fatty acid. The mixed solution was stirred and dried, followed by a heat treatment in air at 600°C for 4 h to remove the organic residues and oxidize the aluminum salt into alumina. Specific surface area and pore size distribution of the resulting pillared-clay composite, estimated by BET and Barrett-Joyner-Halenda (BJH) techniques, varied considerably depending on the alumina/clay ratio but less with the carbon chain length of fatty acid used. Protein adsorption behavior of the composite was investigated by two different ways; one was to immerse a fixed amount of the composite into an increasing amount of a protein solution. The other was to drop the protein solution into a vertical column reactor filled with the composite. Both the methods gave very similar values for the ultimate protein adsorption (~15mg per 1 g of the composite), demonstrating a rapid adsorption of protein molecules to the nano-sized pores of the composite.

[**Key words:** pillared-clay, protein adsorbent]

ナノレベルで原子・分子を制御しその物質の特性を活かすナノ技術は、従来限界とされていた技術開発の進展や新素材の開発を可能とする技術である。このナノ技術の応用範囲のひとつとして、ナノレベルの構造をもつポーラス材料が、環境・エネルギー・エレクトロニクス、医療、バイオなど幅広い分野に及ぶことが期待されている。ポーラス材料の一つである層間架橋粘土多孔体は、膨潤性粘土の層間に無機物を挿入して固定化することで得られる多孔体で、耐熱性、耐薬品性に優れており、ろ過材、吸着材、酵素担体、吸湿材や触媒などの幅広い分野への応用が期待されている¹⁾。層間への無機物の挿入と固定化は、ポリカチオンゼルやアルコキシドなどを陽イオン交換反応によって層間に挿入後、焼成することでなされている²⁾。

著者らは今までの研究で、層状のホスト化合物である粘土鉱物とゲストであるポリ塩化アルミニウムおよび脂

肪酸の複合化により、粘土の層間隔を10 nm程度に広げることが可能にし、ナノサイズの細孔をもつピラー化粘土メソ多孔体を合成する技術を開発してきたが³⁾、1回あたりの製造量が0.1~1 g程度と非常に少なかったため、合成されたメソポーラス材料の利用への検討が行われてこなかった。

一方、清酒、発酵調味料、みりんなどの液状食品中のタンパク質などは製品の保管・流通過程において滓となって、不良品の原因となることがある。現在、これら不純物の除去方法のため加熱、柿渋やゼラチンなどによる滓下げとろ過が行われている。滓下げ剤(ゼラチン)はBSE(牛海綿状脳症)やアレルギー物質の表示の問題から使用しない方向にある。また、使用するセライト、活性炭などによるろ過が、新たに製品の異臭や廃棄物の発生の問題を生じ、環境浄化、ISO14000への対応の観点からデメリットになっている。これらの問題を解決す

*連絡先 〒451-0083 名古屋市西区新福寺町2丁目1番の1
TEL. 052-521-9316 FAX. 052-521-5791 E-mail: yoshio_nishida@pref.aichi.lg.jp

る技術の開発を目的とし、酵素固定化セラミック担体を利用し、液状食品中のタンパク質の吸着・除去に関する検討も行っている。

そこで、本研究では、粘土を用いたメソ多孔体の細孔径制御方法の確立を目的とし、ポリ塩化アルミニウムと脂肪酸を粘土架橋材料として粘土層間に挿入し、そのアルミナ成分添加量および脂肪酸の炭素鎖長が細孔径に及ぼす影響を調べた。このナノレベルの孔を制御することで、さまざまなナノサイズ物質を吸着分離できるポーラス材料を開発することができると考えられ、タンパク質吸着材としての多孔体再生試験を含めた性能について検討を行った。

実験方法

粘土多孔体の合成 合成ヘクトライト 10.0 g (トピー工業製 NHT-70B, イオン交換容量 0.7 meq/g) を蒸留水 140.0 g に加え、3 時間攪拌後、3 日間静置して粘土懸濁液を調製した。ポリビニルアルコール (PVA) 5.0 g (和光純薬工業製, 完全けん化型, 重合度 1000) を蒸留水 45.0 g に加え、90°C で 3 時間加熱攪拌後、室温まで自然冷却して PVA 溶液を調製した。上記の粘土懸濁液と PVA 溶液を混合し、3 時間攪拌後、3 日間静置して、粘土混合液 200 g を得た。

この粘土-PVA 混合溶液を 1 l ガラスビーカーに入れ、Al として 1 mol/l に希釈したポリ塩化アルミニウム溶液 105.0, 157.5, 210.0, 420.0 g (多木化学製 タキバイン #1500) を加え、1.5 時間攪拌後、80°C で 40 時間保持した。なお、このポリ塩化アルミニウム溶液量は、合成完了時には Al_2O_3 換算で粘土に対する重量比 ($Al_2O_3/Clay$) が 0.50, 0.75, 1.00, 2.00 となる。その後、5N 水酸化ナトリウム溶液 18.2 ml を滴下し、1.5 時間攪拌後、4.7 g の脂肪酸ナトリウム塩を温水 50 ml で溶解した液を混合後、1.5 時間攪拌し、80°C で 20 時間保持した。なお、脂肪酸はカプリル酸、ラウリン酸、ステアリン酸の 3 種類を使用した。これをろ過して得られた脱水物を、目開き 1 mm の篩を通し、室温で数日間自然乾燥させた。これを 320°C で 4 時間、600°C で 4 時間熱処理し、添加有機物の焼失とアルミニウムの酸化を行って粘土多孔体を得た。

上記検討では、粘土 10.0 g を出発原料として、固形分濃度 3% の溶液攪拌で多孔体の合成を行った。これに対し、ポリ塩化アルミニウムおよび脂肪酸の粘土に対する添加比率は変更せず、出発原料の粘土を 100.0 g とし、固形分濃度を 6% まで高め、混練によって合成を行うことも検討した。

粘土多孔体の細孔特性評価 粘土多孔体の比表面積と細孔分布は、Quantachrome 社製 Autosorb-AG1 で測定

した窒素吸脱着等温線から、BET 法と BJH (Barrett-Joyner-Halenda) 法から求めた。また、FE-SEM による微構造観察を行った。

モデルタンパク質溶液による吸着量試験 吸着材として、アルミナ/粘土比が 1 で細孔径が約 10 nm の多孔体をタンパク質吸着試験に用いた。また、モデルタンパク質溶液としては塩化リゾチーム溶液 (濃度 1 mg/ml 0.1M リン酸バッファー pH 6.8) を用いた。多孔体 1 g あたりの吸着量測定として、粘土多孔体 1 g を 5, 10, 20, 40, 80 ml の各量のモデルタンパク質溶液に入れ、2 時間振とうして処理し、多孔体による除去率を紫外線 (280 nm) 吸光度の減少量で評価した (バッチ処理)。標準溶液として用いた塩化リゾチーム溶液の 280 nm での吸光度は約 2.45 であった。また、多孔体をカラムに充填して通過処理することで、処理液のタンパク質吸着除去試験を行った。カラム径は $\phi 15$ mm, 充填した多孔体量は 10 g で、充填した多孔体高さは 90 mm である。モデルタンパク質溶液をカラム上部より加えて、通過処理液について 280 nm の吸光度測定を行い、タンパク質除去率を求めた。

粘土多孔体の再生試験 粘土多孔体 1 g を 20 ml のモデルタンパク質溶液に入れ、30 分間振とうして処理し、タンパク質の除去率を求めた。モデルタンパク質を吸着した粘土多孔体を、蒸留水または有効塩素濃度が 0.1% になるように調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml に入れ、30 分間振とうして処理した後、数回蒸留水で洗浄した。この吸着から洗浄までを 1 サイクルとし、25, 50 サイクル後のタンパク質除去率を測定した。

結果および考察

粘土多孔体の合成 種々の試行錯誤の結果、今回の合成方法により、収量が 20 g 程度になった。これは今までの収量の 10~100 倍であり、これにより多孔体の性質や用途の検討が可能になったと考えられた。

アルミナ添加量と脂肪酸炭素鎖長の影響 脂肪酸としてラウリン酸を使用し、ピラー成分のアルミナ量の異なる粘土系メソ多孔体の細孔径分布を Fig. 1 に示した。アルミナ量が粘土に対して重量で 0.5 の調合の場合、細孔直径は約 2 nm でアルミナ量が増えるにしたがって細孔直径は大きくなるほうにシフトし、粘土に対してアルミナ量が 2 倍の調合では 10 nm まで細孔直径が拡大した。これらの結果は粘土層間にアルミナ成分がインターカレーションし、粘土層間がそのアルミナ量にしたがって拡大して固定化され、粘土層間に細孔が形成されたことを示唆していると考えられた。また SEM 観察でもアルミナのインターカレーション反応および 600°C の焼成後も、粘土由来の層状構造を保持していることが明らかに

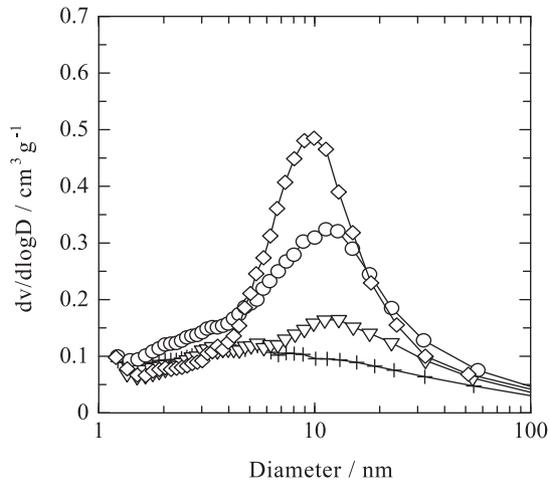


Fig. 1. Pore size distribution of pillared clay composites synthesized in lauric fatty acid with different weight ratios of alumina to clay. Alumina/Clay: +, 0.50; ▽, 0.75; ○, 1.00; ◇, 2.00.

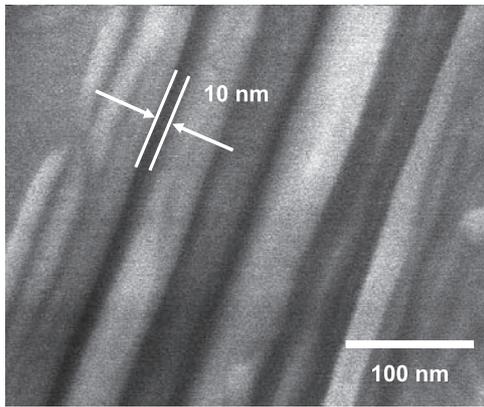


Fig. 2. FE-SEM image of a pillared clay composite synthesized in lauric fatty acid with an alumina/clay weight ratio of 1.0.

なった (Fig. 2). またその層間に 10 nm 程度の空間が観察され、粘土層間にナノレベルの空間を形成していることがわかった。また、それぞれの結果を Table 1 に示した。その結果、比表面積と細孔容積は、細孔の形成とともに増加していることが確認された。

Fig. 3 にアルミナ/粘土比 1 に固定して脂肪酸炭素鎖長を変化させた粘土系メソ多孔体の細孔径分布を示した。その結果、脂肪酸の炭素鎖長によらず粘土層間が拡大しており、いずれも 10 nm をピークとする細孔を形成した。また、それぞれの比表面積と細孔容積の結果を Table 2 に示した。その結果、約 200 ~ 300 m²/g と 0.30 ~ 0.45 cm³/g であり、脂肪酸の炭素鎖長による変化は見られなかった。

粘土多孔体の大量合成の検討 上記までの検討では、粘土 10.0 g を出発原料として、固形分濃度 3% の溶液攪拌で多孔体の合成を行ったが (収量 20 g)、粘土 100.0 g で同 6% まで高め、混練によって合成を行うことで、収

Table 1. The specific surface area and pore volume of the mesoporous composites synthesized with different weight ratios of alumina to clay.

Alumina/Clay	Specific surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)
0.50	150	0.17
0.75	157	0.21
1.00	223	0.32
2.00	216	0.35

The mesoporous composites synthesized by using sodium laurate.

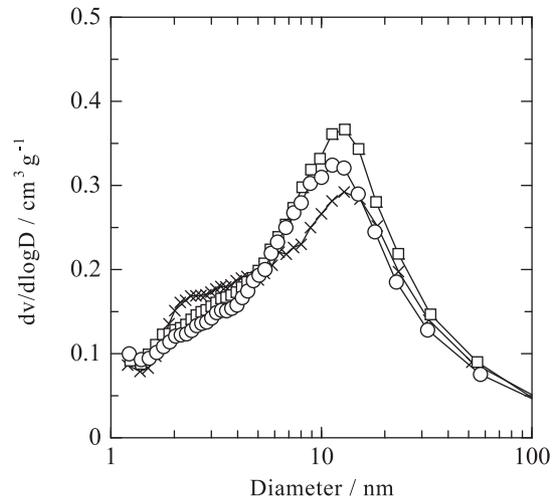


Fig. 3. Pore size distribution of pillared clay composites synthesized in various fatty acids with an alumina/clay weight ratio of 1.0. Symbol in parentheses stands for the number of carbon chain of fatty acid used. Symbols: ×, caprylic acid (C8); ○, lauric acid (C12); □, stearic acid (C18).

量が 200 g 程度になることも確認した。Al₂O₃/Clay 比 1.00、ラウリン酸を使用して大量合成した粘土系メソ多孔体の比表面積と細孔容積の結果を Table 3 に示した。その結果、比表面積と細孔容積は減少する傾向が認められたが、細孔直径のピーク位置は 10 nm であり (Fig. 4)、大量合成の可能性が示唆された。

タンパク質吸着試験 多孔体 1 g を 5, 10, 20, 40, 80 ml のモデルタンパク質溶液に入れて 2 時間振とう後、処理液を 280 nm の吸光度測定でリゾチームの除去率を調べた (Fig. 5, 左 Y 軸)。多孔体 1 g に対してモデルタンパク質溶液 5 ml は相対的に少ないが、除去量は 4.9 mg で除去率では 98% となった。処理溶液が多孔体に対して増えると除去率は減少し、多孔体 1 g あたりの吸着量は約 14 mg で飽和していることが分かった (Fig. 5, 右 Y 軸)。

Fig. 6 に、カラムに充填した多孔体による処理液のタンパク質吸着除去試験を行った結果を示した。処理液 60

Table 2. The specific surface area and pore volume of the mesoporous composites synthesized with an alumina/clay ratio of 1.0 and various fatty acids.

Fatty acid	Specific surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)
Caprylic acid (C8)	221	0.33
Lauric acid (C12)	223	0.32
Stearic acid (C18)	240	0.36

Table 3. A comparison of the specific surface area and pore volume between mesoporous composites synthesized from a small (10 g) and a large (100 g) amount of the starting clay mineral.

Scale	Specific surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)
Small	223	0.32
Larger	174	0.23

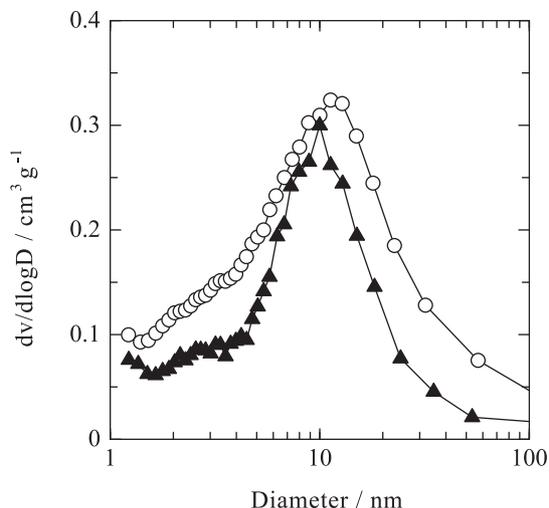


Fig. 4. Pore size distribution of pillared clay composites synthesized from a small (○: 10 g) and a large (▲: 100 g) amount of the starting clay mineral.

mlまで100%の除去性能を示し、以降は吸着能力が低下した。300 mlのモデルタンパク質溶液を通過処理し、除去率とカラム通過量からタンパク質吸着量を求めると約174 mgで、多孔体1 gあたりでは約17 mgの吸着量になった。バッチ処理による吸着試験結果も考慮した結果、この多孔体に対するモデルタンパク質の吸着量は14～17 mg/gと考えられた。また、バッチ処理に比べてカラム処理は処理液と多孔体の接触時間が相当短いと思われるが、両方でタンパク質吸着量に差が見られないことから、タンパク質吸着には時間を要せず、カラム法でも吸着材として十分に応用できることが分かった。

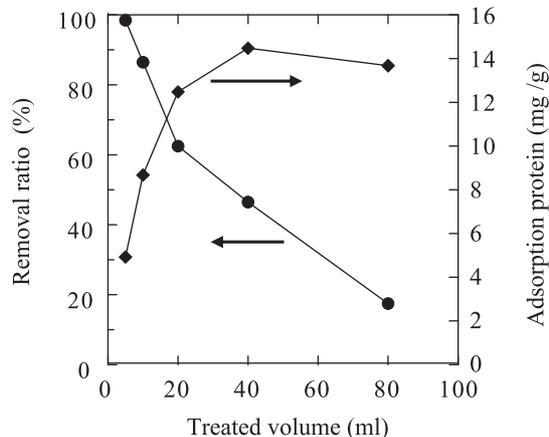


Fig. 5. Protein removal ratio and the ultimate adsorbed protein for a 1 g of the composite as a function of the amount of protein solution immersed for 2 h.

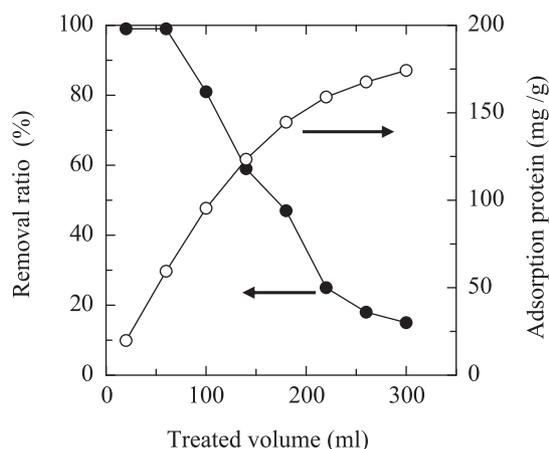


Fig. 6. Protein removal ratio and the ultimate adsorbed protein for a 1 g of the composite as a function of the amount of protein solution using the column processing.

再生試験 多孔体1 gをモデルタンパク質溶液20 mlに入れて、30分間振とう後、処理液を280 nmの吸光度測定でリゾチームの除去率を調べたところ85%が吸着により除去されたことが確認できた。それらを洗浄なしで再びモデルタンパク質溶液に浸漬した場合、リゾチーム液のタンパク質成分に減少がまったく見られなかった。また一度タンパク質吸着後の多孔体を蒸留水および次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間振とうし、数回蒸留水で洗浄した後、再びモデルタンパク質溶液に浸漬した場合は、蒸留水洗浄のみで56%、次亜塩素酸ナトリウム溶液で73%の吸着除去性能を示した。次亜塩素酸ナトリウム溶液で再生試験を繰り返し行った結果をTable 4に示した、25回再生後および50回再生後の除去性能はいずれも70%以上であり、多孔体の再生利用が可能と考えられた。これらの結果は、実際の液状食品中のタンパク質

Table 4. Protein removal attained at the repeated number of cycles (25 and 50) of the adsorption/regeneration test.

Cycles	Protein removed (%)
25	70
50	73

やアレルギーの除去への応用が可能と考えられた。

要 約

粘土層間にアルミナ架橋成分と脂肪酸を挿入し、そのアルミナ量および脂肪酸炭素鎖長によって3～10 nmの範囲で細孔径を制御できるメソ多孔体合成方法を確立した。液状食品中の不要タンパク質除去材としての適用性

をモデルタンパク質溶液で検討したところ、多孔体グラム当たり14～17 mgのタンパク質を細孔に吸着することができた。その吸着方法もバッチ法とカラム法どちらでも変わらず、多孔体へのタンパク質吸着速度が充分速いことがわかった。また次亜塩素酸ナトリウム溶液による再生が50回以上可能であることを確認した。

文 献

- 1) 黒田一幸ら：セラミックス, **36**, 902-948 (2001).
- 2) 山中昭司, 服部 信：表面, **27**, 290-301 (1989).
- 3) 山口敏弘, 中尾俊章：愛知県産業技術研究所研究報告 **5**, 2-5 (2006).
- 4) 西田淑男, 鳥居貴佳, 深谷伊和男：愛知県産業技術研究所研究報告 **2**, 136-137 (2003).