

## シリカ粒子へのリゾチームの最大吸着量に静電的な力を与える影響 The effect of electrostatic force on the maximum adsorption mass of lysozymes to silica particles

○山口 敦史\*, 小林 幹佳\*\*

○Atsushi Yamaguchi\*, Motoyoshi Kobayashi\*\*

### 1. 研究の背景

自然環境中には、粘土鉱物や酸化物などの無機コロイドに腐植やタンパク質などの有機物が吸着することで形成される複合体が存在している。複合体の凝集分散挙動や移動特性は、有機物の吸着量に左右される。そのため、環境中の物質移動を予測し制御するためには、有機物の吸着量の決定要因を明らかにする必要がある。とくに、有機物と無機コロイドが異符号に帯電している場合、電気的な力が吸着量に強く影響するため、その影響を定量的に明らかにすることが重要である。

本研究では、有機物と無機コロイドそれぞれの帯電状態が有機物の吸着量に与える影響を明らかにすることを目的とした。そこで、モデル無機コロイドとしてシリカ粒子を、モデル有機物としてリゾチームを採用し、リゾチームのシリカへの吸着量を pH と KCl 濃度を系統的に変化させながら測定した。さらに、それぞれの材料の帯電状態を考慮した理論モデルを用いて解析を行い、材料の帯電状態が吸着量に与える影響について考察した。

### 2. 材料と実験および解析方法

#### 2.1 実験材料

シリカ (シーホースター KE-P30, 日本触媒) は球状の酸化物粒子であり、粒径が  $302 \pm 20$  nm のものを用いた。リゾチーム (L6876-10G, Sigma Aldrich) は長球状のタンパク質であり、大きさは  $3 \times 3 \times 4.5$  nm である。本研究の実験条件である pH 5 および 7 ではシリカは負に、リゾチームは正に帯電している。

#### 2.2 実験方法

シリカ濃度 50 g/L, リゾチームの添加質量とシリカの質量比が 0-0.003 g/g, KCl 濃度 0.1 mM-100 mM の懸濁液を調製した。さらに、KOH または HCl を用いて pH 5 または pH 7 に調整したのち、24 時間おだやかに振とう攪拌した。その後、懸濁液を 12000 rpm で 5 分間遠心分離することで、シリカを沈殿させた。上澄みのリゾチーム濃度を吸光度測定により得た。さらに、リゾチームの添加濃度と上澄みの濃度の差としてリゾチームのシリカへの吸着量を算出した。また、シリカの密度  $2200 \text{ kg/m}^3$  とリゾチームの分子量 14.3 kDa を用いて、吸着量から被覆率を求めた。

#### 2.3 解析手法

シリカ粒子へのリゾチームの最大被覆率の理論値を 3-Body RSA モデル [1] を用いて算出した。このモデルでは、ある有効半径  $a_{\text{eff}}$  をもつ粒子を平板上に重ならないようにランダムに限界まで配置することで、最大被覆率 (ジャミングリミット)  $\theta_{\text{jam}} = 0.547$  を得る。有効

\*筑波大学大学院 生命環境科学研究科 University of Tsukuba \*\*筑波大学 生命環境系 University of Tsukuba

キーワード: コロイド・粘土, 土粒子の物理化学的性質

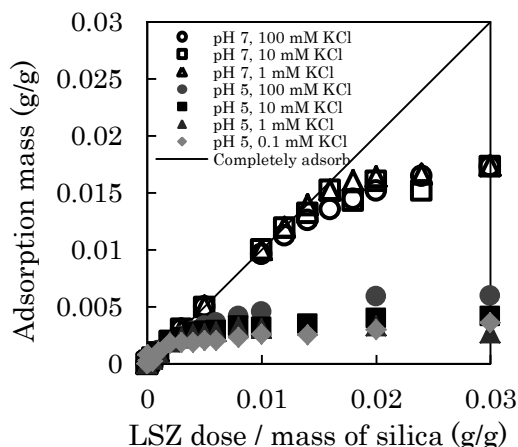
半径は、粒子と平板それぞれの帯電状態を考慮した際の粒子間の電氣的な反発ポテンシャルと熱エネルギーのつり合いによって決める。このとき、半径 $a$ の粒子が実際に覆っている最大被覆率 $\theta_{\max}$ は $\theta_{\max} = (a/a_{\text{eff}})^2 \theta_{\text{jam}}$ として求められる。

### 3. 結果と考察

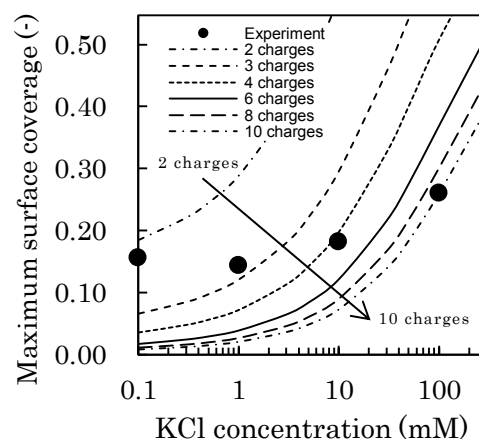
Figure 1 にリゾチームの添加量とシリカへの吸着量の関係を示す。図から pH 7 と 5 いずれにおいても、リゾチームの添加量が少ない条件では添加したリゾチームがすべて吸着し、添加量が最大吸着量付近に達すると吸着量が変化しなくなることがわかる。最大吸着量は pH 7 のときの方が pH 5 のときに比べ大きい。これは、pH 7 のときの方が pH 5 のときに比べリゾチームの荷電量が小さく、シリカ粒子の電荷密度が大きいため、リゾチーム同士が近づいて密に吸着することができたためだと考えられる。

Figure 2 に pH 5 における最大吸着量の実験値と 3-Body RSA モデルによる理論値を KCl 濃度に対してプロットしたグラフを示す。実験値は、KCl 濃度の増加に伴い最大吸着量が増加している。この傾向はモデルにより定性的に予測できている。このことから、KCl 濃度の増加に伴い、拡散電気二重層が圧縮されリゾチーム間の反発力が減少したために、最大吸着量が増加したと考えられる。既往研究において電位差的により得られたリゾチームの電荷の数は 1-100 mM KCl で 8-10 個である。0.1-10 mM KCl において吸着量から算出された電荷の数は 2-4 個であり、電位差滴定の結果に比べ少ない。これは、対イオンの吸着によるリゾチームの有効荷電の減少、およびリゾチーム表面上のモザイク荷電の影響によると考えられる。また、100 mM KCl においては、二重層の圧縮によりリゾチーム同士が接近できるようになり、分子の構造や分子の存在によるシリカ表面の凹凸が吸着の障害に影響したために、モデルから算出される電荷の数が見掛け上多くなったことが考えられる。

pH 7 においては吸着量の実験値から得られた最大被覆率が 0.75 付近であり、リゾチームの有効半径が実際の半径と等しいときのジャミングリミット $\theta_{\text{jam}} = 0.547$  に比べ大きい。この結果は、pH 7 においてリゾチームがシリカ表面上で、3-Body RSA モデルで仮定したランダムな配置ではなく、より規則的な配置を取っていることを示唆している。



**Fig. 1** Adsorption mass of lysozymes to silica particles. Symbols denote experimental values and the line represents the adsorption mass when added lysozymes completely adsorb.



**Fig. 2** Maximum surface coverage of lysozymes on silica particles at pH 5. Symbols denote experimental values and lines are calculated value by using 3-Body RSA model with various charge number of lysozyme.

#### 参考文献

- [1] B.P. Cahill, G. Papastavrou, G.J.M. Koper, M. Borkovec, Langmuir. 24 (2008) 465–73..