

固液界面における牛血清アルブミンの吸着形態と洗浄性

Conformation of Adsorbed Bovine Serum Albumin at Solid-Liquid Interfaces and Its Relevance to Cleanability

福崎智司・浦野博水・高橋和宏・竹原淳彦・山田貞子*

Satoshi FUKUZAKI, Hiromi URANO, Kazuhiro TAKAHASHI, Atsuhiko TAKEHARA, and Sadako YAMADA*

キーワード 固液界面／タンパク質の吸着／吸着形態／洗浄性

KEY WORDS Solid-liquid interface／Protein adsorption／Conformation／Cleanability

要 旨

アルミナ粒子に対する牛血清アルブミン(BSA)の吸着形態と洗浄脱離性について、BSAの表面被覆率(θ)を関数として検討した。BSAの吸着等温線及び種々の θ におけるBSA吸着アルミナ粒子の見掛けの零電荷点を測定した結果、BSAの吸着形態が $\theta=0.8$ 付近において側面配向から直立配向に不連続に変化することが示唆された。アルカリ洗浄(0.05 M NaOH)におけるアルミナ表面からのBSA脱着曲線(洗浄時間 vs 残存BSAの対数値)を速度論的に解析した結果、脱着曲線は見掛け上異なる傾きを持つ2つの直線(速い脱着分子と遅い脱着分子)の和として表すことができた。速い脱着分子の一次脱着速度定数は $\theta=0.13\sim 0.70$ の範囲ではほぼ一定値を示したが、 $\theta>0.7$ では著しく増加することが示された。NaOH溶液への Na_3PO_4 の添加は、遅い脱着分子種の脱着を促進させた。以上の結果から、アルミナに吸着したBSA分子の表面密度の増加と吸着相互作用力の変化ならびに脱着機構について考察した。

1 はじめに

タンパク質の固体表面への吸着は、汚れの吸着や洗浄と深く結びついた重要な現象である^{1, 2)}。タンパク質等の高分子物質が吸着する場合、分子鎖のどこか一つのセグメントの吸着が分子全体の吸着を意味するので、多用な吸着形態をとることができる。一般に、ランダムコイルの高分子は、複数のセグメントで固体表面に吸着し、残りの分子鎖を溶液側に伸長する形態をとると考えられている。また、回転楕円体のタンパク質も、側面配向や直立配向の吸着形態をとると考えられている。各セグメントの結合形態や結合に関与するセグメント数により、1分子当たりの吸着相互作用は大きく変化する。したがって、タンパク質の吸着形態は洗浄工程における脱着挙動と密接に関係していると考えられる。

アルカリ(OH⁻)は、タンパク質、多糖類、油脂等の広範囲の有機物汚れに対して優れた溶解力、加水分解反応、または鹼化反応を示すことから、食品製造機器の洗浄では重要な洗浄力要素である。一般に、アルカリ剤としては水酸化ナトリウムが汎用されており、これに各種の助剤が添加された形で使用されている³⁾。可溶性リン酸塩は、アルカリ剤(OH⁻の供給源)としても使用されているが、それ以外にもイオン封鎖作用、緩衝作用、汚れの分散作用、吸着置換作用、腐食抑制作用、臨界ミセル濃度低下作用などの優れた洗浄特性上の機能

*岡山県産業振興財団

を有している^{3, 4)}。

本研究では、難溶性酸化物であるアルミナ(Al_2O_3)粒子表面に不可逆吸着した牛血清アルブミン(BSA)をモデル対象として、電位差滴定法によるアルミナ表面上のBSAの吸着形態の変化、BSAの吸着形態とアルカリ洗浄特性の関係、アルカリ洗浄に及ぼす可溶性リン酸塩の添加効果について検討した。

2 実験方法

2.1 試薬と材料

タンパク質は牛血清アルブミン(BSA[F-V]; カラ行社(株)製)、固体硬質表面として単粒状 α -アルミナの微粒子(住友化学(株)製)を用いた(平均粒径: 4.6 μm ; 比表面積: 0.5 m^2/g)。

2.2 吸着実験

吸着形態を検討するためのBSAの吸着実験は、25ml ガラス製バイアル中に5mlのBSA溶液(0.02 \sim 3g/l, pH5.2, 10^{-3}M KNO_3)と1.0gのアルミナ粒子を入れ、40°Cで2時間振とう保温(140rpm)することにより行った。吸着後、BSA吸着アルミナ粒子を5mlの 10^{-3}M KNO_3 溶液と遠心分離(2,300 $\times g$, 10min)により2回洗浄した。BSA吸着アルミナ粒子を再度回収した後、40°Cで16時間乾燥させて試料とした。

洗浄実験のためのBSA吸着アルミナ粒子の調製は、50ml ポリプロピレン製チューブ中に25mlの

BSA 溶液(0.02~3g/l, pH5.2, 10^{-3} M KNO_3)と 5.0g のアルミナ粒子を入れ、40°Cで 2 時間振とう保温(140rpm)することにより行った。吸着後、BSA 吸着アルミナ粒子を 25ml の 10^{-3} M KNO_3 溶液と遠心分離(2,300×g, 10min)により 2 回洗浄した後、40°Cで 16 時間乾燥させて試料とした。

BSA の表面被覆率(θ)は、飽和吸着量に対する各吸着量の相対値(0~1.0)と定義する。

2.3 洗浄実験

BSA が吸着したアルミナ粒子 1g をステンレス鋼製カラム(内径 4mm×長さ 50mm)に充填した後、カラムオープン内(40°C)に垂直に設置した。

まず最初に、カラムの底部から 10^{-3} M KNO_3 溶液(pH5.2)を HPLC 用低流量ポンプで 0.25ml/min の流速(空間時間 1.5min)で 2 時間供給してリンス洗浄した。次に、0.05M NaOH 溶液を 0.25 ml/min の流速で供給した(120~200min)。出口の洗浄液を経時的に分取し、各分画中の BSA を定量した。

著者らは、吸着 BSA 分子の脱着が速度論的に 2 種類の機構(独立かつ同時に進行する速い脱着と遅い脱着⁵⁾)で起こっていると仮定し、以下の脱着モデルを誘導した：

$$\ln \Gamma = \ln \{ \exp(\ln \Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln \Gamma_0^s - k^s t) \} \quad (1)$$

ここで、 t は洗浄時間、 Γ は時間 t での BSA の残存量、 Γ_0 は $t = 0$ での初発 BSA 濃度、 k は Γ に関する一次脱着速度定数、添え字 f と s は各々速い脱着分子(BSA^f)と遅い脱着分子(BSA^s)を意味する。ただし、遅い脱着分子は、実験に用いた洗浄力及び洗浄時間では脱着しない分子も含んでいる。

2.4 分析方法

BSA の定量は、Lowry-Folin 法を用いた。BSA、アルミナ粒子及び BSA 吸着アルミナ粒子の見掛けの表面電荷密度(σ_{app})と酸塩基等量点(見掛けの零電荷点： pzc_{app})は、電位差滴定法で測定した(支持電解質： 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M KNO_3)。

3 結果と考察

3.1 吸着等温線

図 1 に、pH 5.2 (BSA の pzc_{app})におけるアルミナ粒子($\sigma_{\text{app}} = +0.10$ C/m²)に対する BSA の吸着等温線(40°C)を示す。等温線は、平衡 BSA 濃度(c_{BSA})がきわめて低い領域で吸着量(Γ_{BSA})が急激に増加する形の飽和曲線を示した。飽和吸着量は 4.4 mg/m²であった。各 θ での BSA 吸着アルミナ粒子を 10^{-3} M KNO_3 溶液(pH5.2)でリンスしても、吸着 BSA の脱着は起こらなかった。すなわち、BSA はアルミナ表面に不可逆吸着していると考えられた。一般に、BSA の等温線は他の酸化物やラ

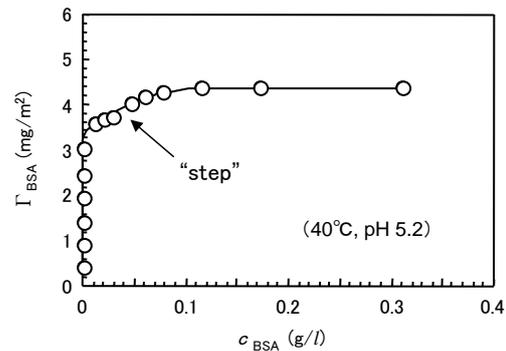


図1 アルミナ粒子に対するBSAの吸着等温線(40°C, pH 5.2)

テックス粒子への吸着においても同様な飽和曲線を示す^{7, 8)}。BSA の分子量(69,000)と水溶液中での分子サイズ(140×38×38 Å)を考慮すると⁹⁾、図 1 で得られた飽和吸着量は、単分子吸着量の理論値(約 2~8 mg/m²)の範囲内にある。 $\Gamma_{\text{BSA}} = 3.1$ mg/m²以下の吸着系では、 c_{BSA} はほぼ 0 に近い値であり、溶液中の BSA がほとんど吸着したことを意味している。すなわち、アルミナ表面上の吸着部位を求めて BSA 分子間で起こる拮抗が少ない状態である。一方、 $\Gamma_{\text{BSA}} = 3.6$ mg/m² 付近($\theta = 0.82$)に、わずかな階段状の増加(step)が見られた。BSA は回転楕円体の球状タンパク質であり、固体表面に対して側面配向や直立配向の吸着形態を起こすと考えられている。このような“step”は、第 2 層目の吸着と考えるよりも、BSA 分子の表面濃度の増加にともなう分子配向の変化が起こる結果と解釈できる⁹⁻¹¹⁾。

3.2 BSA の吸着形態の推察

図 1 で得られた BSA 吸着アルミナ粒子($\theta = 0.13 \sim 1.0$)の電位差滴定曲線を測定することにより、吸着 BSA 分子の吸着官能基の変化を検討した。

図 2 に、BSA 吸着アルミナ粒子の pzc_{app} と θ の関係を示す。ここで、BSA の pzc_{app} は 5.2、アルミナの pzc_{app} は 5.6 である。アルミナ粒子の pzc_{app} ($\theta = 0$) と比較すると、BSA 吸着アルミナ粒

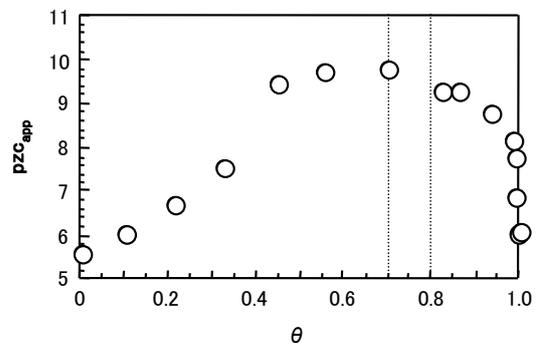


図2 BSA吸着アルミナ粒子の pzc_{app} と θ の関係

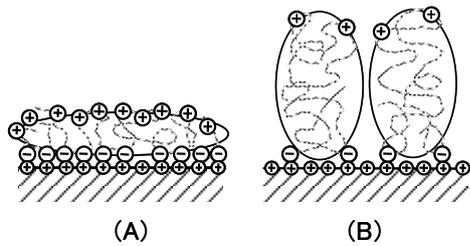


図3 正電荷を帯びたアルミナ表面上でのBSAの吸着形態のモデル図
(A)表面濃度が低い領域($\theta < 0.7$)での側面配向の吸着
(B)密な吸着層($\theta > 0.8$)での直立配向の吸着

子の pzc_{app} は全てアルカリ側の pH 値に位置する結果となった。これは、BSA 分子鎖の酸性アミノ酸残基（主としてカルボキシル基： $-COO^-$ ）が吸着に関与するため、BSA 分子内の酸性 (H^+ を放出する) 官能基の相対数が減少するためと考えられる。 $0.1 < \theta < 0.7$ の範囲では、BSA 吸着アルミナ粒子の pzc_{app} は θ の増加とともに 6.1 から 9.8 まで増加した。すなわち、吸着分子数の増加と共に、全体量として吸着に関与するカルボキシル基数が増加していることを意味する。一方、 $0.8 < \theta < 1.0$ の範囲においては pzc_{app} のシフト度が θ の増加とともに徐々に減少し、BSA の pzc_{app} 値に近づく現象が見られた。これは、BSA の表面濃度が飽和状態に近づくにつれて、一分子あたりの吸着官能基（カルボキシル基）数が減少することを示唆している。 pzc_{app} のシフト度が減少し始める $\theta = 0.7 \sim 0.8$ は、吸着等温線に“step”が見られた点 ($\theta = 0.82$) とほぼ一致する。以上の結果から、 θ が小さい（アルミナ表面の吸着部位に対する拮抗がない）領域では吸着サイト数の多い側面配向で吸着し、飽和吸着に近い表面濃度では吸着サイト数の限られた直立配向の吸着形態をとるのではないかと推測された（図3）。

3.3 BSA の吸着形態と脱着速度

図4に、図1と図2で得られた θ の異なる BSA 吸着アルミナ粒子を、0.05M NaOH 溶液を用いて洗浄したときの典型的な脱着曲線を示す。速やかな脱着が起こり始めるまでの誘導期の時間は、 θ に依存して増加する傾向があった。この脱着誘導期は、吸着 BSA 分子の濡れや膨潤に要する期間に相当するものと考えられる。洗浄初期において急速な脱着が起こる領域では、高 θ ($= 0.72, 0.97$) の場合に脱着速度が大きくなる傾向が見られた。そして、洗浄中期の緩やかな脱着が起こる領域では、 θ に関係なくほぼ同じような速度で脱着が進行した。約 120 分間の洗浄後の残存量は、 θ に依存して増加したが、 $\theta > 0.4$ ではほぼ一定値となった。

図5に、(1)式を用いて各脱着曲線を解析した

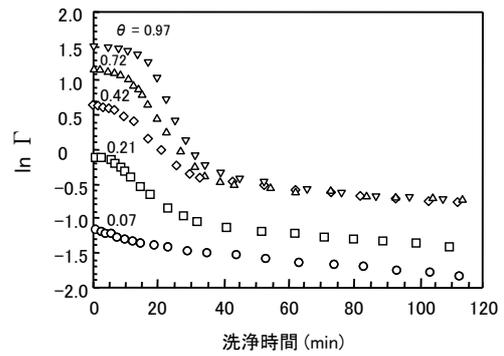


図4 被覆率(θ)の異なるBSA吸着アルミナ粒子を対象とした0.05M NaOH洗浄におけるBSAの脱着曲線

結果得られた一次脱着速度定数 (k^f, k^s) と θ の関係を示す。 k^f は $0.1 < \theta < 0.7$ では $0.11 \sim 0.13 \text{ min}^{-1}$ の範囲でほぼ同等の値を示したが、 $0.7 < \theta < 1.0$ では θ の増加とともに 0.19 min^{-1} まで急激に増加した。一方、 k^s は $0.1 < \theta < 1.0$ で $0.003 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ とほぼ一定の値を示し、 k^f と比較すると $1/25 \sim 1/100$ に相当する低い値となった。このように、速い脱着分子 (BSA^f) の脱着速度は、 $\theta > 0.7$ の領域で θ 依存性を示すことがわかった。同様の実験系にて、 $\theta = 0.1 \sim 1.0$ の BSA 吸着アルミナ粒子をクエン酸緩衝液やリン酸緩衝液で洗浄すると、 $\theta > 0.8$ の領域においてのみ、 θ に依存して BSA と緩衝液中の陰イオンとの間に吸着置換反応が起こる現象が確認されている¹²⁾。これらの挙動は、図3で示したように、分子密度の高い吸着層 ($\theta > 0.8$) において、吸着力の弱い BSA 分子が出現することを支持するものである。

図6に、(1)式を用いた解析の結果得られた Γ_0^f および Γ_0^s と θ の関係を示す。 $0.05 < \theta < 0.07$ の範囲では、 Γ_0^s は全体の約 80% を占めており、 BSA^s が主要な吸着分子種であった。これは、アルミナ

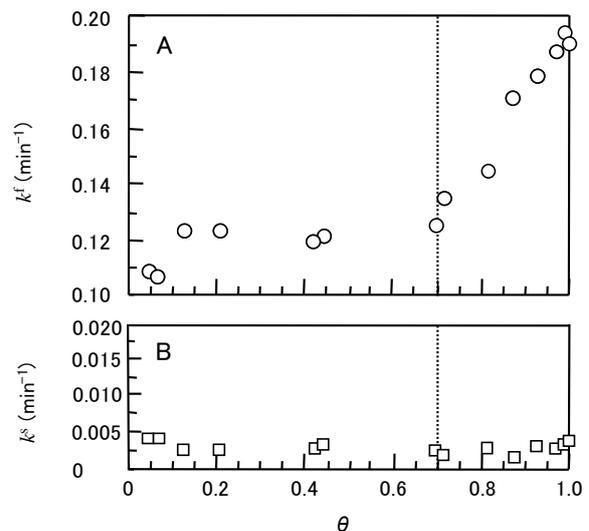


図5 0.05M NaOH洗浄で得られた脱着速度定数と θ の関係

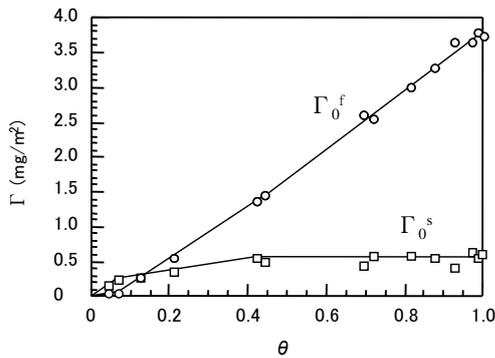


図6 0.05M NaOH洗浄で得られた Γ_0^f および Γ_0^s と θ の関係

表面上の吸着部位に対する BSA 分子間の拮抗がないことに起因しているものと考えられる。 Γ_0^s は θ の増加とともに徐々に増加し、 $\theta > 0.4$ でほぼ一定の値(0.55 ± 0.08 mg/m²)に達した。各 θ における Γ_0^s 値は、図4での最終残存量の値と相関していることがわかる。このように、 θ に依存することなくほぼ一定量の遅い脱着分子(BSA^s)がアルミナ表面に存在することが推察できる。一方、 Γ_0^f は $\theta > 0.07$ の範囲では θ に比例して0.3 mg/m²から3.8 mg/m²まで増加し、 $\theta = 1.0$ では全体の87%を占めた。

3.4 オルトリン酸塩の洗浄効果

図7に、0.05M NaOH溶液にオルトリン酸塩(5mM Na₃PO₄)を添加してBSA吸着アルミナ粒子を洗浄したときの、BSAの脱着の促進効果を示す。実線は、(1)式を用いた解析の結果である。0.05M NaOH溶液を用いた単一洗浄と比較すると、リン酸塩の添加は洗浄初期の脱着(BSA^fの脱着)には影響を及ぼさなかったが、洗浄後期の脱着(BSA^sの脱着)を促進し、洗浄終了時の残存量を低減させる効果を示した。リン酸塩は、BSA^sの脱着を促進させる洗浄要素の一つとして興味深い。

図8に、 θ の異なるBSA吸着アルミナ粒子を5mMのNa₃PO₄を含有する0.05M NaOH溶液を用い

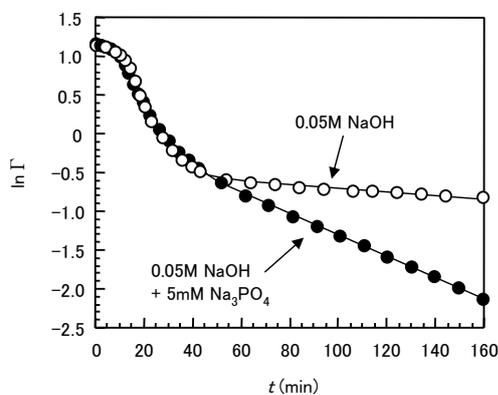


図7 0.05M NaOH洗浄におけるアルミナ粒子($\theta = 0.72$)からのBSAの脱着に及ぼすリン酸塩(5mM Na₃PO₄)の添加効果

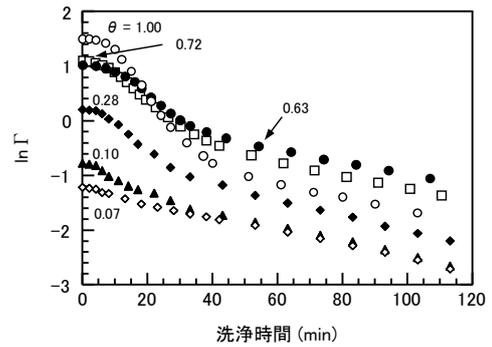


図8 被覆率(θ)の異なるBSA吸着アルミナ粒子を対象としたNa₃PO₄含有0.05M NaOH溶液を用いた洗浄におけるBSAの脱着曲線

て洗浄したときの脱着曲線を示す。脱着誘導期の時間は、0.05M NaOH溶液を用いた単一洗浄と同等であり、リン酸塩添加による短縮効果はみられなかった。急速な脱着領域での速度は、一見すると θ が高くなるほど大きくなるように見えた。洗浄後期の緩やかな脱着は、 θ に関係なくほぼ一定の速度で進行していた。0.05M NaOH溶液単独洗浄(図4)と比較すると、いずれの θ においても洗浄後期の脱着速度が大きいことである。洗浄終了時の残存量は、 $\theta = 0.6$ 付近で最も高くなっており、 $\theta > 0.6$ では θ の増加とともに減少する傾向が見られた。

図9に、(1)式を用いた解析で得られた k^f および k^s と θ の関係を示す。 $\theta = 0.07 \sim 1.0$ の範囲において、 k^f は 0.12 ± 0.01 min⁻¹、 k^s は 0.012 ± 0.002 min⁻¹と、いずれもほぼ一定の値を示した。0.05M NaOH溶液の単一洗浄で得られた定数と比較すると(図5)、 k^s 値は平均で4倍高い値であった。一方、 k^f 値はリン酸塩の添加による変化はほとんど見られなかった。さらに、図5において見られた $\theta > 0.7$ の領域での θ に依存した k^f の増

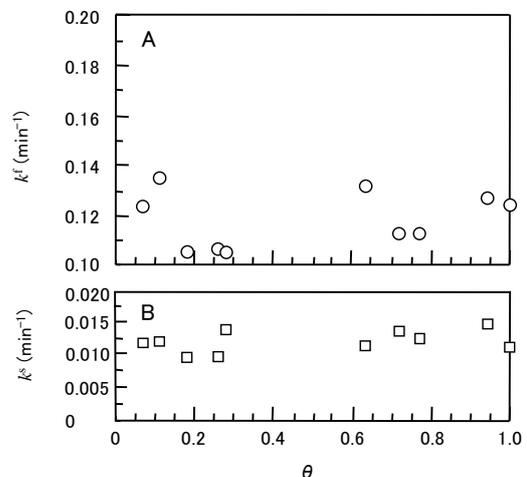


図9 Na₃PO₄含有0.05M NaOH溶液の洗浄で得られた脱着速度定数と θ の関係

加は、リン酸塩の添加により起こらなかった。この理由については現在も検討中であるが、おそらく、リン酸塩の存在が、BSA^f に対する OH⁻ の脱着推進力（水和、膨潤、溶解、分散）を弱める方向に働くのではないかと推測された。

図 10 に、(1)式を用いた解析の結果得られた Γ_0^f および Γ_0^s と θ の関係を示す。0.07 < θ < 0.1 の範囲では、 Γ_0^s は全体の 72~88% を占めており、BSA^s が主要な吸着分子種であった。 Γ_0^s は 0.1 < θ < 0.6 の範囲において θ の増加とともに徐々に増加したが、 $\theta > 0.6$ で徐々に低下し、 $\theta = 1.0$ では 0.05 M NaOH 溶液の単一洗浄での Γ_0^s と同等の値 (0.55 mg/m²) になった。各 θ における Γ_0^s 値の変動は、BSA 吸着アルミナ粒子の pzc_{app} の θ 依存性と類似しており、図 8 での最終残存量の値とも相関していることがわかる。

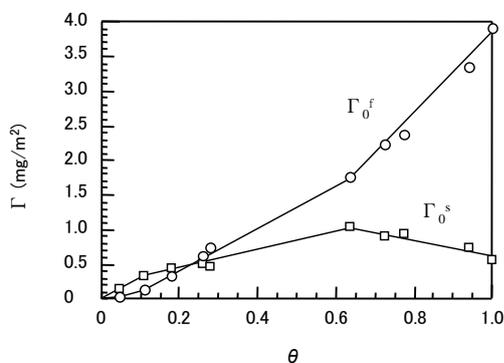


図10 リン酸塩含有0.05M NaOH溶液の洗浄で得られた Γ_0^f および Γ_0^s と θ の関係

上記の実験系において、洗浄後期の過程で 0.05 M NaOH 溶液と Na₃PO₄ 含有 0.05 M NaOH 溶液を切り替えると、BSA の脱着速度が変化する現象が見られた。図 11A は、最初に NaOH 溶液で洗浄を開始し、洗浄後期にさしかかった時点（図中の矢印）で Na₃PO₄ 含有 NaOH 溶液に切り替えたときの結果である。切り替え後、BSA の脱着速度は明らかに大きくなった。一方、最初に Na₃PO₄ 含有 NaOH 溶液で洗浄を開始し、その後 NaOH 溶液に切り替えると、BSA の脱着速度は小さくなった（図 11B）。これらの結果は、Na₃PO₄ の添加が BSA^s の脱着を促進させる効果を発揮することを明確に示す事実である。

リン酸塩の洗浄促進効果について、アルミナ表面へのリン酸イオンの特異吸着と、吸着 BSA との間で起こる吸着置換反応が要因であると考えた。固液界面での洗剤の役割は、洗剤成分が、汚れおよび固体表面に吸着して汚れ-固体間の吸着力を最小にすることであり、洗剤成分が汚れと置き換わって固体表面に吸着する置換反応が主要な洗浄メカニズムの一つであると考えられている⁴⁾。

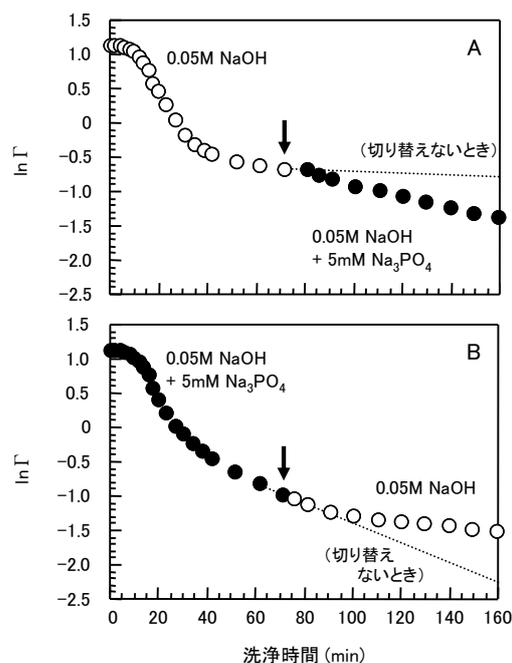
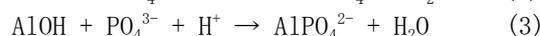
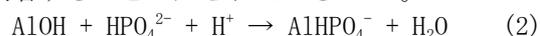


図11 洗浄液の切り替えにもなうNa₃PO₄による洗浄促進効果の発現(A)と消失(B)

NaOH 溶液の洗浄力は、OH⁻ の洗浄作用に基づく。OH⁻ 濃度が高い条件下では、タンパク質や親水性酸化物表面への OH⁻ の吸着（H⁺ の脱着）が著しくなり、各々の表面電荷が共に大きな負電荷を帯びるようになる。それに伴い、BSA 分子の水和と膨潤が促進されると同時に、BSA とアルミナ表面との静電的斥力により吸着力が消失すると考えられる。同様な吸着現象は、リン酸イオンでも起こると考えた。

図 12 に、アルミナ粒子を 0.05 M NaOH 溶液および 5mM の Na₃PO₄ を含有する 0.05 M NaOH 溶液で洗浄処理した後、電位差滴定法にて各々の粒子のプロトン相対吸着量曲線（[$\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}$]）を測定した結果を示す。NaOH 溶液で洗浄したアルミナ粒子と比較すると、Na₃PO₄ 含有 NaOH 溶液で洗浄したアルミナ粒子の pzc_{app} は酸性側の pH 値に位置しており、正の [$\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}$] 値も大きく減少していた。これは、0.05 M NaOH (pH 12.7) 溶液中においてもリン酸イオン (HPO₄²⁻ と PO₄³⁻) がアルミナ表面に吸着・残留していることを示している。HPO₄²⁻ と PO₄³⁻ は、アルカリ性の pH 領域においても、アルミナ最表面の塩基性水酸基を除去して Al³⁺ イオンと直接配位結合を形成（内圏錯体の形成）して吸着することが知られている^{13, 14)}。



HPO₄²⁻ と PO₄³⁻ は、BSA 分子鎖のカルボキシル基よりもはるかに強い塩基であることから、(2) 式および (3) 式にしたがって静電的相互作用（外圏

4 まとめ

ここでは、アルミナ粒子に不可逆吸着した牛血清アルブミン(BSA)の吸着形態を中心に吸着相互作用と洗浄性について考察した。一方、強固な吸着(遅い脱着)を示す分子の存在には、酸化物表面の物理化学的な不均一性も影響を及ぼすのではないかと考えられる。不均一性は、吸着反応や触媒作用等にも強い反応性(結合力)に寄与することが知られている。表面の不均一性と洗浄性の関係を定量化する研究も今後の課題である。

参考文献

- 1) McGuire, J., and Krisdhasima, V.: Food Technol., 45, 92 (1991)
- 2) Wahlgren, M., and Arnebrant, T.: Trends in Biotechnol., 9, 201 (1991)
- 3) Twomey, A.: New Zealand J. Dairy Technol., 3, 150 (1968)
- 4) Jennings, W. G.: Advances in Food Research, vol. 14, p. 325-458. (Chichester, C. O. and Mark, E. M. eds.), Academic Press, Inc., New York. (1965)
- 5) Bourne, M. C. and Jennings, W. G.: Nature, 197, 1003 (1963)
- 6) Urano, H. and Fukuzaki, S.: *J. Colloid Interface Sci.*, 252, 284 (2002).
- 7) Norde, W., MacRitchie, Nowicka, G., and Lyklema, L.: *J. Colloid Interface Sci.*, 112, 447 (1983)
- 8) Koutsoukos, P. G., Norde, W. and Lyklema, J.: *J. Colloid Interface Sci.*, 95, 385 (1983)
- 9) Fair, B. D. and Jamieson, A. M.: *J. Colloid Interface Sci.*, 77, 525 (1980)
- 10) Elgersma, A. V., Zsom, R. L. J., Norde, W., and Lyklema, J.: *J. Colloid Interface Sci.*, 138, 145 (1990)
- 11) Norde, W. and Lyklema, J.: *J. Colloid Interface Sci.*, 66, 257 (1978)
- 12) Urano, H. and Fukuzaki, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 261 (1997).
- 13) He, L. M., Zelazny, L. W., Baligar, V. C., Ritchey, K. D., and Martens, D. C.: *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 61, 784 (1997)
- 14) Hingston, F. J., Posner, A. M., and Quirk, J. P.: *J. Soil Sci.*, 23, 177 (1972)
- 15) Sarkar, D. and Chattorai, D. K.: *J. Colloid Interface Sci.*, 178, 606 (1996)

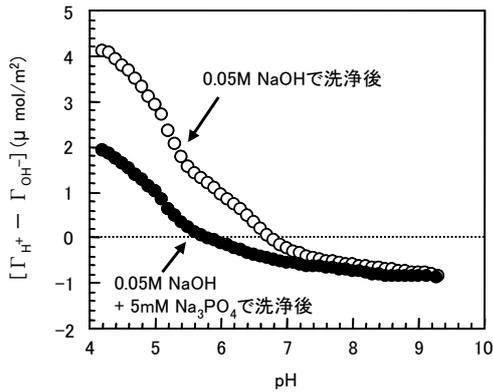


図12 Na₃PO₄含有0.05M NaOH溶液で洗浄後のアルミナ粒子の酸塩基等量点の変化(リン酸イオンの特異吸着)

錯体)で吸着している BSA 分子鎖のカルボキシル基を優先吸着により置換したのではないかと推測される。リン酸イオンによる置換反応は、吸・脱着メカニズムで進行するため、OH⁻の作用による BSA^f の速やかな脱着過程と比較すると、平衡に至るまでに比較的長い時間が必要とされる。そのため、リン酸塩の添加効果は、BSA^f の脱着挙動には反映されなかったと考えられる。また、(1)式を誘導する基となる仮定は、「独立かつ同時に進行する速い脱着分子(直立配向)と遅い脱着分子(側面配向)の存在」であった。しかし、実際には洗浄の過程において、BSA 分子の脱着にともなってきた空間部に、直立配向で吸着した残存 BSA 分子が側面配向に移行することにより遅い脱着挙動を示すようになるとも考えられる¹⁵⁾。リン酸イオン(HPO₄²⁻, PO₄³⁻)が空いたアルミナ表面に吸着していくことにより、直立配向の BSA 分子が側面配向の多点吸着に移行することを妨げ、さらに脱着 BSA 分子の再付着を抑制するのかもしれない。図 13 に、上述のリン酸塩による洗浄メカニズムの模式図を示してまとめとする。

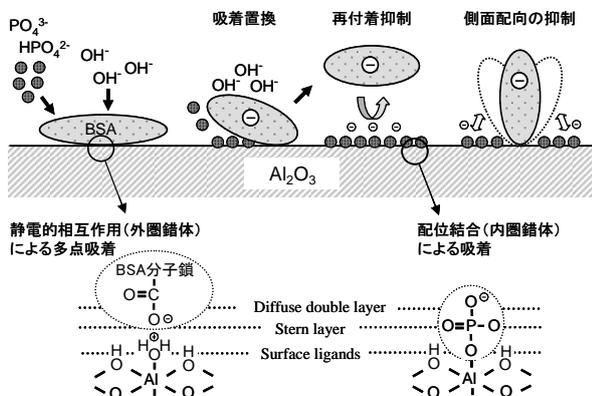


図13 アルカリ洗浄過程におけるアルミナ-水界面でのリン酸イオンの洗浄メカニズムの予測モデル図