逆相ミセル抽出における豚膵臓リパーゼの変性・失活[†]

久保井亮一・森 義昭・駒沢 勲

大阪大学基礎工学部 化学工学科^{††}

逆相ミセルによる豚膵臓 Lipase の抽出特性ならびに変性・失活・活性収率について検討した。Lipase は分子量が大きく、また疎水性が大きいため、その抽出特性は、ミセルとの静電的な相互作用より、立体的・疎水的相互作用に強く依存している。ミセル相および水相を、等体積で接触させる二相分配抽出法では、抽出率は最大で約 30% であった。この抽出法による正・逆抽出を通じての Lipase の活性収率は極めて低く、変性・失活に関与する最も大きな要因はアニオン性界面活性剤 AOT である。AOT は Lipase に対して非拮抗型の強い阻害作用を有する。

活性収率を向上させる方法としては、少量かつ高濃度の Lipase 水溶液をミセル溶液に注入することにより、数秒のオーダーでミセル相へ溶解させることが可能な、注入法が適している。また逆抽出過程では、水相にあらかじめ AOT の吸着剤を添加しておくことによって、回収された Lipase の AOT による失活を軽減することができる。

緒 言

逆相ミセルは無極性有機溶媒中で界面活性剤などの両親媒性分子によって形成されるナノメータースケールの会合コロイドであり、ミセル内部には水などの極性溶媒とともに、アミノ酸、酵素、タンパク質等の種々の水溶性物質を可溶化することができる¹⁵⁾。このミセル内水相への各種生理活性物質の可溶化ないし有機相への抽出率に関しては、これまでいくつかの実験的研究^{2,3,4,9,10,13,20)} および半理論的研究^{11,19)} が報告されている。一般に逆相ミセル抽出法では、ミセル相ないし有機溶媒中のミセル内水目とバルク水相間での溶質の分配を利用するため、酵素・タンパク質などの生理活性物質の抽出分離においては、変性・失活を抑えることができると考えられている^{5,14,16)}。一方、逆相ミセルを含む有機溶媒中における Lipase の酵素反応は工業的にも注目されており、有機溶媒、含水率、金属イオン、界面活性剤等が酵素活性、変性・失活に及ぼす効果については報告されている^{7,17)}。しかし、Lipase の逆相ミセルを利用する抽出分離や、ミセル相・水相間の正・逆抽出に伴う酵素活性の変化、活性収率について検討した報告は見当たらない。

そこで本研究では、分離物質として比較的分子量の大きい豚膵臓 Lipase (EC 3.1.1.3) を対象とし、逆相ミセル抽出法による Lipase の抽出特性を調べるとともに、正・

逆抽出過程で生じる変性・失活とこれに及ぼす各種操作因子の効果について検討した。

1. 実 験

ミセル溶液にはアニオン性の界面活性剤、bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinate (Aerosol OT 以下 AOT) を所定量溶解した 50mM イソオクタン (試薬特級、石津製薬製) 溶液を用いた。AOT としては、和光純薬製および Sigma 製の 2 種類を、また豚膵臓 Lipase (分子量 50,000、等電点、pI 5.0) としては、純度の異なる 2 種類、Sigma 製 Type II (35% protein) および Type VI-S (75% protein) を用いた。AOT、Lipase ともに前者を中心に用い、後者は不純物の影響を比較するために使用した。

正抽出は主として二相分配抽出法により、一部は注入法を用いて行った。二相分配抽出法による正抽出では、あらかじめ pH および塩濃度を調整した NaCl 水溶液に Lipase を所定量 (主として 1mg/ml、比活性 33-35U (units)/mg) 溶解した水相 5ml と、ミセル溶液 5ml とをマグネチックスターラー上で平界面を保ちながら、約 200rpm で攪拌した。注入法では、ミセルを含む有機相に均一溶解し得る少量 (ミセル相 1ml 当り 20 μ l) かつ高濃度の Lipase 水溶液 (50mg/ml, pH8-9, 0.1M Glycine-NaOH 緩衝液) を、あらかじめ所定含水率 ($W_0=20$) となるように注入液と同一の緩衝液を溶解させたミセル溶液に注入し、激しく振とう後遠心分離し、透明なミセル溶液を得た。また逆抽出は、二相分配抽出法または注入法で得られた Lipase を溶解したミセル相 5ml と、あらか

[†] 1990年2月8日受理; 化学工学会第54年会(神戸, 1989年4月)にて発表

^{††} 〒560 豊中市待兼山町1-1

じめ pH を 8-9, NaCl 濃度を 1.0 M に調整した 0.1 M Glycine-NaOH 緩衝液 5 ml とを, 正抽出の場合同様マグネチックスターラー上で約 200rpm で撹拌した. 温度は特に記さない限り, すべて 298 K である.

正抽出時および逆抽出後の, 水相における Lipase 活性の測定は, 298 K の恒温槽内で, Lipase が最大活性を示す pH 8 において, tributyrine (Sigma 製) を基質とする pH スタット法⁸⁾により行った. Lipase 濃度の測定は, 紫外可視分光光度計 (島津製作所製 UV-265FW, 以下 UV) を用い, 280nm での吸光度を測定することにより行った. また AOT は, 220nm 付近に紫外吸収域が存在するため, Lipase などこの付近で吸収域を持つものが存在しない限り, 紫外可視分光光度計を用い 220nm の吸光度から濃度の測定が可能である. ここでは, Lipase の存在の有無に関わらず AOT 濃度は変化しないと仮定し, Lipase を除いて pH, 塩濃度など他の実験条件を一定にし, 対照実験を行うことにより測定した. ミセル相における含水率の測定はカールフィッシャー水分計 (京都電子社製 MKS-1) により行った. タンパク質やミセルの粒径分布および平均径の測定は, 大塚電子社製 DLS700-Ar を用いた動的分散法により行った^{9,11)}

AOT による Lipase の高次構造変化は, 差スペクトル法¹²⁾により検討した. すなわち, *n*-propanol の添加に伴う Lipase 水溶液の 290nm における差スペクトルの変化を UV で測定して, Lipase 分子中に存在する Trp 残基の表面露出状態を評価し, AOT の存在によるその差異を解析した. また AOT により失活した Lipase の賦活法として, Lipase 水溶液を吸着剤 polystyrene-divinylbenzene (Bio-Rad 社, Bio-Beads SM-2) 2ml を充填したカラム (Bio-Rad 社, Detergent Removal Kit) に通し, AOT の吸着除去を試みた.

2. 結 果

2.1 二相分配抽出法による Lipase の抽出特性

ミセル相の AOT 濃度を 50 mM, 水相の pH を等電点 pI 付近の 5-6 とし, 水相中の塩濃度がミセル平均径 $\bar{d}_m$, 含水率 W_0 , および濃度基準の抽出率 E (仕込水相中よりミセル相中へ抽出された Lipase の分率) に及ぼす影響を, Fig. 1 に示す. 塩濃度の増加とともに, W_0 および $\bar{d}_m$ は減少し, これに伴って E も減少している. これは塩濃度の増加に伴う静電遮蔽効果により, AOT 分子間の静電的な反発力が抑えられ, ミセルサイズが減少し, それに伴いミセルの Lipase に対する立体的な排除効果が増加したためである^{10,11,16)}.

次にミセル相の AOT 濃度を 50 mM, 水相の塩濃度を 0.1 M とし, pH を変化させたときの E の変化を Fig. 2 に

Fig. 1 Effect of NaCl concentration on average diameter of reverse micelles, molar ratio of H₂O to AOT and fraction extracted. Dotted lines are predictions based on the correlations in the previous work¹¹⁾

示す. $\bar{d}_m$ および W_0 は, Fig. 1 に示した pH 5-6 の場合の測定値と変わらない. E は pH を増加させるとともに減少する. これは E が他のタンパク質と同様に, アニオン性の AOT 逆相ミセルと Lipase 間の静電的な相互作用によって影響されているためである^{10,14,16)}. すなわち Lipase が正に帯電している $pH < pI$ では, Lipase とミセル間に静電的な引力が生じ, 逆に負に帯電する $pH < pI$ では, pH の増加とともにミセルとの斥力が増加する.

ミセルおよびタンパク質間の立体的および静電的相互作用の抽出率に及ぼす効果については, 立体的相互作用の強さを表す指標として等電点における抽出率 E_{pI} を, 一方静電的相互作用の強さを表す指標として, 低塩濃度 (NaCl 0.1 M) の条件で pH を減少させたとき得られる抽出率の最大値 E_{max} と等電点における抽出率の比 E_{max}/E_{pI} を求めた. これら両者を蛋白質平均径とミセル平均径の比 $\bar{d}_p/\bar{d}_m$ に対してプロットし, 前報¹¹⁾の結果と併せて Fig. 3 に示す. Fig. 3(a)で, 実線は各蛋白質の E_{pI} の平均値を示す¹¹⁾. Lipase も他のタンパク質と同様, ミセル径が減少し, $\bar{d}_p/\bar{d}_m$ が大きくなるにつれ, ミセルのタンパク質に対する立体的な排除効果を増加し, E_{pI} は減少している. ここで Lipase の E_{pI} を, 他のタンパク質, 例えば α -Chymotrypsin

Fig. 2 Effect of pH on fraction extracted

と比較すると、Lipaseはその分子量が大きいため、 E_{pl} の最大値は小さいが、同一の $\bar{d}_p/\bar{d}_m$ で比較すると約30%以上も大きく、等電点においてミセル相に比較的良好に溶解することが分かる。一方、Fig.3(b)で E_{max}/E_{pl} が1.1程度であることから、静電的相互作用の抽出率に及ぼす効果は、他のタンパク質に比べて小さいことが分かる。これはLipaseが、 α -Chymotrypsin等と比較してはるかに疎水性の大きい蛋白質であること¹⁾と対応している。

以上より、AOT逆相ミセルによるLipaseの抽出は、前報で検討した他のタンパク質と比較して、その等電点が低く分子量が大きいため不利であると考えられていたが、その疎水性が大きいためにミセル相への抽出が充分可能であることが分かった。すなわち、Lipaseのミセル相への抽出は、ミセルとの静電的な相互作用より、立体的・疎水的相互作用に強く依存していることが明らかとなった。

2・2 Lipaseの活性安定性に対する操作因子の効果

水相中(酵素濃度0.2mg/ml)におけるLipase比活性のpH依存性をFig. 4に示す。これより、用いた豚膵臓LipaseはpH 8-9において最大活性をもつことが分かる。一方、各pHで約30min放置した後、再びpHを8付近に戻すと活性は一部回復するが、このときの残存比活性(pH安定性曲線)を図中に併せて示す。これより、pH<5またはpH>10では不可逆変性が顕著となるが、pH5-10においては、pHの変化による活性の低下は可逆的であり、pHの変化による抽出分離操作は問題ないことが分かる。

次に、水相中(pH 8-9, 0.2mg/ml)のLipase活性に対する各種操作因子の効果をFig. 5に示す。Lipase水溶液に単に攪拌(200, 400rpm)を加えた場合、等量のisooctaneを加えて攪拌(200rpm)した場合、また水相中に2.5mMの濃度でAOTを溶解して攪拌(200rpm)した場合のそれぞれについて、仕込時のLipase比活性(約33-35U/mg)を基準とした相対比活性RSAの経時変化を示した。

Fig. 3 Effect of the size ratio of protein and micelle on (a) the fraction extracted at isoelectric points and on (b) the ratio of maximum fraction and the fraction extracted at isoelectric points.

The data except for lipase are cited from previous work¹⁾

比較のために、 α -ChymotrypsinについてもRSAの経時変化に対する各因子の影響をFig. 5に併せて示す。これより、AOT/isooctane系逆相ミセルによってLipaseの抽出を行うとき、本実験で使用した程度の攪拌(200rpm)やisooctaneのLipase活性に及ぼす影響は小さく、最も大きな要因は水相中のAOTによるものであることが分かる。一方、 α -Chymotrypsinは、攪拌、isooctane、AOTいずれの個別因子に対しても安定であった。両酵素はともにセリンヒドロラーゼであるが、2.1で述べたように、その高次構造における静電的・疎水的特性には差があり、これが抽出特性のみならず酵素活性の安定性にも影響するものと推測される。

Fig. 4 Effect of pH on activity and stability

2.3 正・逆抽出過程における失活

二相分配抽出法による正抽出では、ミセル相と平衡にある水相中でのLipaseの残存比活性は急激に低下し、1時間後には10%以下に低下した。このとき水相中のAOT濃度は、水相の塩濃度に依存するが、NaCl 0.1-1Mの範囲では2-3 mMであり、Fig. 5(a)によれば水相中のLipaseを失活させるのに十分な濃度である。このようなLipaseの失活は、Sigma製のAOTでも、また純度の高いLipase (Type VI-S)についても同様の結果が得られた。したがって、これはAOTやcrude Lipase中に含まれる不純物の影響ではなく、AOT自身の作用によるものと推測される。

そこで、AOTの吸着剤を供給水相中に共存させることによって、失活の軽減ないし抑制が可能か否かを検討した。正抽出時に、吸着剤(polystyrene-divinylbenzene)を下相1ml当り40mg添加した場合と添加しない場合の結果を、Fig. 6に示す。吸着剤を共存させることによって、水相中のAOT濃度を1/2に抑制でき、抽出率は低下するが、水相中の残存比活性は向上し、1時間後で初期の約25%となることが分かる。一方、水相中の1時間後の残存比活性は、供給Lipase濃度が1mg/mlでは10%であったのに対し、これを2.5mg/mlと増加させると、それぞれ20%、30%と増加したが、失活の顕著な抑制は困難であった。また、以上で得られたいずれのミセル相から逆抽出しても、水相中に回収されたLipaseは、その活性が測定不可能なほど小さかった。

2.4 失活したLipaseの賦活

逆抽出したLipase水溶液をさらに吸着剤(polystyrene-divinylbenzene)を2ml充填したカラムに通し、AOTの吸着除去によるLipaseの賦活を試みた。この吸着剤によ

(a) Lipase

(b) α-Chymotrypsin

Fig. 5 Effect of standing, stirring, isooctane and AOT on activity

って、水相中のAOT濃度(2mM)の約7割が除去可能であることが分かった。しかし、AOTを吸着除去する前後のLipase活性の変化を測定したところ、活性に変化は見られず、賦活は困難であった。これは後述するようにAOTの阻害効果が強く(阻害定数10-20 μM)、用いた吸着剤によるAOTの除去能力の限界によるものと考えられる。

2.5 注入法による抽出

以上より、Lipaseを安定にミセル相に溶解するには、供給水相にできるだけ高濃度のLipaseを用いるとともに、水相中へのAOTの溶解を極力抑え、できるだけ速やかに、Lipaseをミセル相に溶解させる必要がある。そこで、あらかじめpH、 W_0 を調整したミセル相1ml当り20 μlのLipase水溶液(pH 8-9, 50mg/ml)を注入し、激しく振とうして均一溶解させる注入法を用いた。この注入法では、Lipaseのミセル相への溶解は極めて速く、数秒のオーダーであった。この注入法で得られたミセル相(pH 8

Fig. 6 Effect of adsorbents on activity, AOT concentration in water phase and fraction extracted for forward-extraction in two-phase extraction system

Fig. 7 Effect of adsorbents on activity, AOT concentration in water phase and fraction extracted for stripping, where each initial micelle phase was prepared by the injection method

9. $W_0 = 20$, 0.6mg/ml-micellar phase)からの逆抽出は、二相分配抽出法と同一の方法で行った。この結果を Fig. 7 に示す。逆抽出液にAOT吸着剤を共存させない場合、逆抽出液中のLipaseの供給液に対する相対比活性は、2時間で22%である。このとき抽出率（逆抽出率）と相対比活性との積として表される。（供給液に対する）活性収率は約4%である。吸着剤を逆抽出液1ml当り40mg共存させると、逆抽出液中のAOT濃度は、共存させない場合の1/2程度に抑えられ、2時間後で相対比活性は27.5%であった。注入法による最適抽出条件についてはさらに検討を要するが、本条件での逆抽出率は約20%、活性収率は約5.5%であった。同様の実験を温度283Kでも行ったが、これ以上の活性収率の向上は見られなかった。

3. 考 察

3.1 Lipase高次構造に対するAOTの効果

Lipaseの高次構造の変化は、*n*-propanolの添加という環境変化に伴う、Trp残基のUVスペクトルの変化から検討した¹²⁾。溶媒によるLipaseの290nmにおける吸光度の変化 $\Delta \text{ABS}(290\text{nm})$ を、Fig. 8に示す。LipaseはTrp残基を7個含むが、AOTによる図中の直線の傾きの変化が、Trp残基の露出率すなわちLipase高次構造の変化に対応

している。*n*-propanol濃度が20%を越えるとLipaseが変性するため、20%以内で、nativeなLipase(1mg/ml)と、2.5mM AOTと共存したLipaseについて直線の傾きを比べる。AOTと共存したLipaseは、nativeなLipaseに比べ直線の傾きが約2.5倍に増加している。したがって、nativeな状態でLipase分子中にマスクされていた6個のTrp残基の一部(1.5個)がAOTによって露出(nativeな場合の(2.5/1)倍が表面に露出)し、高次構造に変化が生じているものと推測される。また、Lipaseの平均径(ストークス径) $\bar{d}_p$ の、AOTによる変化を調べたところ、pH8付近のnativeな状態では $\bar{d}_p$ が5nm程度であったが、5mM AOT水溶液中では2倍の10nm程度まで膨潤していた。これからもAOTによりLipaseの高次構造に変化が生じているものと推測される。

LipaseとAOT間の相互作用として、疎水的相互作用が支配的ならば、温度を下げることによって、一方静電的相互作用が支配的であれば、塩の添加によって失活の軽減が可能と考えられる。そこで、均一水溶液中(pH 8-9, 0.2mg/ml)におけるLipaseのAOTによる失活について、共存塩濃度および温度の影響を調べると、NaCl

Fig. 8 Effect of *n*-propanol concentration on absorbance at 290 nm

濃度を0.1M から1.0M に増加し、あるいは温度を298 K から283 K に低下させることにより、残存比活性が50 %程度改善されることが判明した。したがってLipaseとAOTとの間には、静電的および疎水的相互作用のいずれもが関与しているものと考えられる。

3・2 Lipase反応に対するAOTの阻害効果

Lipase の tributyrine 分解に対するAOTの阻害形式を調べるために、Lineweaver-Burkプロット¹⁸⁾を行った結果、水相中のAOT濃度を变化させて得られる直線が、ほとんど水平軸上で交差することより、AOTはLipaseに対して非拮抗型の阻害作用を有すると推測される。また、得られたAOTとLipaseの阻害定数は10-20 μ M程度であった。変性・失活機構についてはさらに検討を要するが、本抽出条件における水相中AOT濃度(2-3mM)を考慮すると、以上の結果はAOTが正・逆抽出過程においてLipaseの変性・失活を引き起こす可能性を示唆している。O'Connorらは、Human Milk Lipaseが同様に水相中でAOTにより阻害されることを報告している¹⁷⁾。この場合の阻害定数は125 μ Mであり、本研究の結果と比べると10倍程度大きい値である。またカチオン性界面活性剤CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)も2mM以上では豚膵臓Lipaseを変性させることが報告されている⁷⁾。本研究で得たAOTの豚膵臓Lipaseに対する阻害定数は、セリンヒドロラーゼに対する強い阻害剤として知られるフェニルホウ酸の阻害定数⁶⁾と同程度であり、AOTによるLipaseの阻害がかなり強いことを示している。

結 言

AOT/isooctane系逆相ミセルによる豚膵臓Lipaseの抽出特性および、正・逆抽出過程で生じる変性・失活とこれに及ぼす各種操作因子の効果について検討し、以下の結果を得た。

1) Lipaseの抽出特性に及ぼす塩濃度、pHの効果は、他の蛋白質と同様であるが、Lipaseは分子量が大きく、疎水性が大きいため、その抽出特性はミセルとの静電的な相互作用より、立体的・疎水の相互作用に強く依存しており、抽出率は最大で約30%であった。

2) 正・逆抽出を通じてのLipaseの活性収率は極めて低く、変性・失活に関与する最も大きい要因は、AOTによるものである。AOTはLipaseに対して強い非拮抗型の阻害作用を有する。

3) Lipaseの変性・失活を最小限に抑えて分離回収するためには、正抽出過程では、供給水相に高濃度のLipase水溶液を用い、また水相へのAOTの溶解を抑えて、溶質を数秒程度でミセル相へ溶解可能な注入法が適している。また逆抽出過程で、AOTの吸着剤を水相に添加しておくことによって、5%程度までの活性収率の改善が可能である。

[謝 辞] 本研究に対して、文部省科学研究費(試験研究 63850189)の援助を受けた。本研究は、日本学術振興会の国際共同研究事業「機能性反応に基づく新規な分離・精製プロセス」の一環として行った。Lipaseの変性・失活に関しては、Prof. P.L. Luisi, Dr. P. Walde (Swiss, ETH) に種々有益な討論を頂いた。記して謝意を表する。

Nomenclature

ABS = absorbance	[-]
$\bar{d}_m$ = average diameter of reverse micelles	[nm]
$\bar{d}_p$ = average diameter of protein	[nm]
E = fraction extracted of feed protein	[-]
E_{max} = maximum fraction extracted	[-]
E_{pI} = fraction extracted at isoelectric point	[-]
RSA = relative specific activity based on feed SA	[-]
SA = specific activity	[units/mg]
W_0 (= $[H_2O]/[AOT]$) = molar ratio of H_2O to AOT	[-]

Literature cited

- 1) Bigelow, C.C.: *J. Theoret. Biol.*, **16**, 187 (1967)
- 2) Bonner, F.J., R. Wolf and P.L. Luisi: *J. Solid-Phase Biochem.*, **5**, 255 (1980)

- 3) Caselli, M., P.L. Luisi, M. Maestro and R. Roselli: *J. Phys. Chem.*, **92**, 3899 (1988)
- 4) Chatenay, D., W. Urbach, A.M. Cazabat, M. Vacher and M. Waks: *Biophys. J.*, **48**, 893 (1985)
- 5) Dekker, M., K.V. Riet, B.H. Bijsterbosche, R.B.G. Wolbertand and R. Hilhorst: Conferene papers of ISEC' 88, 8-22, p390, Moscow (1988)
- 6) Garner, G.W.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 5064 (1980)
- 7) Han, D. and J.S. Rhee: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1250 (1986)
- 8) Imahori, K. et al. (ed.), : "Koso Kenkyuhou (Research Method for Enzymes)", p73, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo (1975)
- 9) Kuboi, R., Y. Mori and I. Komasaawa: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **15**, 669 (1989)
- 10) Kuboi, R., K. Hashimoto and I. Komasaawa: *ibid.*, **16**, 335 (1990)
- 11) Kuboi, R., Y. Mori and I. Komasaawa: *ibid.*, **16**, 763 (1990)
- 12) Kubota, T.: "Seitaibusshitsu no Yukikagaku (Organic Chemistry of Bio-Compounds)", p82, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo (1978)
- 13) Lavashov, A.V., Y.L. Khmel'nitsky, N.L. Klyachoko, V.Y. Chernyak and K. Martinek: *J. Colloid and Interface Sci.*, **88**, 444 (1982)
- 14) Luisi, P.L.: *Angew. Chem.*, **24**, 439 (1985)
- 15) Luisi, P.L. and B.E. Straub: "Reverse Micelles", p323, Plenum Press, New York (1987)
- 16) Mori, Y., R. Kuboi and I. Komasaawa: Preprint of Hiroshima Research Meeting, SA23, The Soc. of Chem. Eng. Japan, Hiroshima (1988)
- 17) O'connor, C.J., I.C. Stockley and P. Walde: *Aust. J. Chem.*, **39**, 2037 (1986)
- 18) Ohnishi, M.: "Koso Kagaku no Kiso (Fundamentals for Enzyme Chemistry)", p65, Wiley Japan Inc., Tokyo (1982)
- 19) Scamehohu, J.F., and J.H. Harwell: "Surfactant Based Separation Process", p68, Marcel Dekker Inc. (1989)
- 20) Zampieri, G.G., H. Jackle and P.L. Luisi: *J. Phys. Chem.*, **90**, 1849 (1986)

Denaturation and Deactivation of Porcine Pancreas Lipase in Reverse Micelle Extraction

Ryoichi Kuboi, Yoshiaki Mori and Isao Komasaawa

Dept. of Chem. Eng., Osaka Univ., Toyonaka 560

Key Words : Separation, Extraction, Reverse Micelle, Lipase, AOT, Denaturation, Deactivation, Inhibitor, Hydrophobic Interaction, Exclusion Effect

Reverse micelle extraction of porcine pancreas lipase was studied, focusing on activity yield or denaturation of the lipase as well as its fraction extracted. On the fraction extracted of the lipase, the effect of size exclusion and hydrophobic interaction are more important than that of electrostatic interaction due to the relatively high molecular weight and strong hydrophobicity of the lipase. The lipase can be solubilized into micellar phase up to 30% in a two-phase extraction system in which two bulk solutions contact through a flat interface. The activity yield is, however, found to be very poor in this extraction system. This is related to a noncompetitive strong interaction between the lipase and anionic detergent AOT in the extraction and stripping processes.

A feasible extraction system is the injection method, in which a small volume of concentrated lipase solution is mixed vigorously with micellar solution and the extraction is completed in a few seconds. An addition of adsorbents for AOT into stripping solution can be used for the stripping to reduce the inevitable interaction between the lipase and AOT.