AOTとタウロデオキシコール酸を用いるリパーゼの 逆相ミセル抽出[†]

久保井亮一・山田泰司・森 義昭・駒沢 勲

大阪大学基礎工学部 化学工学科^{††}

AOTとタウロデオキシコール酸 (TDCA) を用いて、逆相ミセルによる lipase (Chromobacterium viscosum lipase) の正・逆抽出を行った。AOTとTDCAは、イソオクタン中で安定な混合ミセルを形成した。混合ミセルは、AOTミセルより優れた選択性・活性収率を示した。ミセルサイズは、50mMAOTではTDCAの濃度 (0-4mM) によらず、AOTミセルとほぼ等しい。ミセル界面でTDCA 1分子の占める面積は、AOT6.2分子に相当する。混合ミセルは、 α -chymotrypsin や papain とは対照的に、lipase に対して選択的に分配係数を8倍程度まで増加させ、微量注入法を用いなくても、二相抽出法や液膜抽出法によって活性収率を改善できる。

緒 言

逆相ミセルによる各種タンパク質の抽出や分離・精製に関しては、これまで比較的多くの研究が報告されている^{1,5,8,10,11,15)}。しかし、正・逆抽出過程における選択性の改善 (アフィニティ抽出) や、酵素の活性収率について検討した報告は限られている^{9,14)}。またいずれの場合も主として、アニオン性界面活性剤 AOT を用いているが、通常の二相抽出法では酵素の変性・失活が大きいため、殆どが正抽出に微量注入法を用いており^{4,11,12)}、実用的・連続操作には適していない。また豚膵臓 lipase の逆相ミセル抽出に関する先の実験結果によれば⁹⁾、二相抽出法・注入法のいずれを用いるにしても、逆抽出過程における酵素の変性・失活が大きく、したがって逆相ミセルを用いる酵素・タンパク質の分離・精製法を工業化する上で、抽出率・選択性ととも活性収率の改善が大きな問題となっている。

工業化を目指した逆相ミセル抽出における酵素の活性収率の改善法としては、1) レシチン等、AOTに代わる界面活性剤を利用する方法^{3,11)}、2) アフィニティリガンドにより酵素活性部位を保護して選択的に抽出する方法¹⁴⁾、3) 両親媒性第三成分の添加により、バルク水相-有機相界面およびミセル界面より AOT 分子を排除・希釈する方法が考えられる。本研究では、主として2), 3) の観点から、lipase に対する両親媒性の生体内界面活性剤であるタウロデオキシコール酸 (TDCA) の添加による混合ミセル抽出法について実験的に検討した。

1. 実 験

1.1 酵素・試薬

実験に使用した酵素、Chromobacterium viscosum lipase (EC 3.1.1.3, 東洋醸造製、以下 lipase (CVL)), α -chymotrypsin (porcine pancreas, 和光純薬製) および papain (papaya latex, Sigma 製) の分子量 (*M. W.*), 等電点 (pI), 表面疎水性を表すパラメータ (*HFS*), pH 8.0 の水相中での酵素単位量あたりの活性に相当する比活性 (*S. A.*) を Table 1 に示す。なお *HFS* の値は、前報⁷⁾ の測定法により実測した。これが大きいほど酵素の表面疎水性が高いことを意味するが⁷⁾、界面吸着性の lipase の表面疎水性が他の2種の酵素に比べ著しく大きいことがわかる。本実験で用いた高活性の lipase は、分子量、等電点の異なる2種類の lipase の混合物であるが、限外濾過膜で lipase を分画し活性を測定することにより、分子量が大きい方の lipase は、量的にも少なく (ca. 10wt%), 活性にはほとんど影響を及ぼさないことを確認した。

両親媒性の添加剤としては、タウロデオキシコール酸 (TDCA, taurodeoxycholic acid, Sigma 製) を用いた。有機相にはアニオン性界面活性剤、AOT (bis(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate, Aerosol OT, 和光純薬製) 50 mM を溶解したイソオクタン (試薬特級, 石津製薬製) に添加剤を所定量溶解させて用いた。

1.2 操作

二相分配実験は、前報⁹⁾と同様に298Kの恒温槽中で、有機相5mlと各種のNaCl濃度の水相5mlを接触させ、マグネチックスターラーにより250rpmで3時間攪拌後、5000rpmで10分間遠心分離をして行った。

[†] 1990年9月7日受理

^{††} 〒560 豊中市待兼山町1-1

Table 1 Properties of proteins used (*M.W.*= molecular weight, *pI*= isoelectric point, *HFS*= hydrophobic factor of solutes defined in reference (7), *S.A.*= specific activity of enzyme)

Protein	<i>M.W.</i>	<i>pI</i>	<i>HFS</i> [kJ/mol]	<i>S.A.</i> [U/mg]
α -Chymotrypsin	25000	9.7	-85.0	—
Papain	23400	8.8	43.7	—
Chromobacterium	30000	7.3	135	384
viscosum lipase	120000	3.7		

タンパク質の濃度は、紫外可視分光光度計UV-265FW（島津製作所製）により波長280nmの吸光度より測定した。TDCAの濃度は島津製作所製高速液体クロマトグラフLC-6AV、カラムSTR ODS-Mを用いて測定した。有機相の含水率 W_o ($=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$) は、京都電子社製Karl-Fischer水分計MKS-1により測定した。ミセル粒径分布・平均径の測定は、前報⁸⁾と同様大塚電子社製ダイナミック光散乱光度計DLS-700Arを用いた。

水相中でのlipaseの活性測定はJIS K0601に従った。有機相でのlipaseの活性測定は5%オリーブオイルを基質とし、生成脂肪酸をLowry法により定量することによって行った。lipaseの高次構造は、日本分光製J-500Aを用いて、CDスペクトル（分子楕円率 θ ）を測定し評価した。

またバルク液膜による正・逆抽出実験では、前報⁶⁾で用いたものと同じガラス製バルク液膜装置を用い、298Kの恒温槽中で約500rpmで14時間撹拌を行った。

2. 結果および考察

2.1 タウロデオキシコール酸 (TDCA) の添加効果

1) 混合ミセルの形成

両親媒性のTDCAとAOTを併用する逆相ミセル抽出法を、タンパク質の抽出に適用するために、先ずTDCAの有機相（ミセル相）中への溶解について検討した。TDCAは、生体内でlipaseの加水分解反応等に協同的に作用する胆汁酸の一種である。本lipaseとの相互作用の機構の詳細はまだ明かではないが、バルキーで疎水的な炭素環部分を内側に向けて、水相中で単独に、あるいはレシチン等と協同的にミセルを形成することが知られている¹³⁾。

TDCAの主な溶解状態として次の4つが考えられる：

- ミセルとは無関係にイソオクタンに溶解する、b) AOTミセルとは無関係にTDCAだけのミセルを形成して溶解する、c) AOTミセルの水相中に溶解する、d) cosurfactantとしてAOT分子とともに混合ミセルを形成する。

そこで二相分配系にタンパク質を添加せず、TDCAの

みを分配した結果、TDCAの有機相への溶解量はAOTを添加しない場合には無視小であり、ほとんどが水相中に溶解した。しかし、AOTを添加すると抽出率は急激に増大し、AOT 30mMではTDCA 2mMの95%以上が有機相に抽出された。これより、TDCAはAOTとの相互作用によって、c) ないし d) の機構で有機相に溶解するものと考えられる。

次に有機相 (50mM AOT) に所定量のTDCAを溶解し、水相 (0.5M NaCl) と接触させたときの、有機相TDCA濃度、含水率 W_o 、ミセル平均粒径 $\bar{d}_m$ の変化をFig. 1に併せて示す。図より、TDCAは供給濃度 (1-3mM) によらず約96%が有機相に存在し、その増加に比例して、 W_o ($=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$) は直線的に増加するが、 $\bar{d}_m$ はほぼ一定であることがわかる。この結果は、 $\bar{d}_m$ が W_o に比例して増加するというAOTミセルに関する従来の報告^{8,10)}とは一致しない。また $\bar{d}_m$ が一定で、TDCA濃度に比例して、 W_o すなわち水の抽出率が増加することはミセル濃度の増加を示唆している。以上より、TDCAはc) ミセル内に溶解するのではなく、d) cosurfactantとしてAOTとともにミセルの界面に組み込まれ、混合ミセルを形成すると結論できる。

Fig. 3 およびミセル粒径分布の測定結果に基づき、有機相中の水の全体積と全ミセル界面積から、TDCA 1分子がミセル界面に占める面積を、前報⁸⁾と同様の計算により求めた。これより、本実験条件ではAOT 6.2分子相当の界面積を占めることが判明した。そこでAOT-TDCA混合ミセルに対する含水率を次のように補正し、Fig. 1に併せて示した。

$$W_o' = [\text{H}_2\text{O}] / ([\text{AOT}] + 6.2[\text{TDCA}])$$

上式は、AOTミセルにも適用できる ($[\text{TDCA}] = 0$ で $W_o' = W_o$)。図より、TDCA濃度によらず W_o' は $\bar{d}_m$ と同様ほぼ一定となり、AOTミセルの結果^{8,10)}と一致する。以後、含水率としてはこの W_o' を用いる。

2) lipase の抽出に及ぼす W_o' の効果

有機相 (AOT 50mM) にTDCA 2mMを添加し、pH 6.5付近で水相中のNaCl濃度を変化させたときの、lipaseの

Fig. 1 Variation of solubilized TDCA (taurodeoxycholic acid) concentration in organic phase, average reverse micellar diameter, $\bar{d}_m$, water content, W_o , and corrected water content, W_o' , with feed concentration of TDCA

分配係数 K_p の含水率 W_o' に対する依存性を Fig. 2 に示す。図には、TDCA を添加しない場合の K_p , $\bar{d}_m$ および CD スペクトルより求めた波長 222nm における分子橢円率 θ も併せて示した。また TDCA のみでは ($[AOT]=0$), lipase は抽出されないことを確認した。図より, θ は W_o' が 8~16 付近で低い値をとり, したがって, この付近で lipase の高次構造中に含まれる α -helix 含量が高く (lipase がコンパクトにまとまり)²⁾, native に近い構造を保持していると推測される。

K_p に対する TDCA の添加効果は, W_o' が 13~16 付近でのみ顕著に現れている。これは, θ の変化とほぼ対応しており, lipase が native に近い構造をとる含水率域で, TDCA ないし混合ミセルとの相互作用も強いことを示唆している。また, この含水率域では native な lipase のサイズとミセルの内水相径がほぼ一致しており, lipase はミセル内に安定に保持されていると考えられる。

高含水率域 ($W_o' > 16$, $[NaCl] < 0.5M$) では, $\bar{d}_m$ が大きく, lipase とミセルとの立体的相互作用は有利に作用するが, 同時に TDCA のミセル界面に占める割合も低下する。また低塩濃度であるため, 疎水的相互作用は弱まり, 一方 AOT との静電的相互作用が優勢となって, lipase のコンフォメーション変化を生じやすくなると考

Fig. 2 Variation of partition coefficient of lipase (CVL), K_p , average reverse micellar diameter, $\bar{d}_m$, and CD ellipticity at 222nm, θ , with corrected water content, W_o' . $\circ$: no ligand, ∇ : with 2mM TDCA

えられる⁹⁾。

3) lipase の抽出に及ぼす pH の効果

水相の NaCl 濃度を 0.5M ($W_o' = 13-15$) として, pH を変化させたときの lipase 分配係数 K_p , および有機相における比活性 S.A. を, TDCA 濃度をパラメータとして Fig. 3 に示す。TDCA を添加しない場合の K_p の pH 依存性は, 従来の他のタンパク質と同様であり静電効果により $pH < pI$ で増加しているが, その絶対値は小さく, 立体的相互作用が大きいことを示している。しかし TDCA を添加した場合は, $pH > pI$ の領域でも K_p の増加がみられ, また pI より少し低い pH 6 付近でその添加効果が最大となることより, lipase-混合ミセル間の相互作用として, 疎水的・静電的効果の両者が重要であることがわかる。

一方, K_p と比活性 S.A. の pH 依存性を比較すると, いずれも低 pH 域で減少しているが, K_p の方が急激に減少することがわかる。また低 pH 域では水相が白濁することより, 有機相-バルク水相間界面付近で, lipase は AOT との静電的相互作用により変性・凝集し, この結果ミセル内に溶解しにくくなると考えられる。

lipase のオリーブオイル加水分解反応に対する TDCA の効果に関して, Lineweaver-Burk plot による検討を行った結果, lipase に対する AOT の阻害効果⁹⁾とは異なり, TDCA はむしろ比活性を高めることから, TDCA に

Fig. 3 Effect of pH on K_p and specific activity of extracted lipase (CVL), S.A., with and without TDCA

○: no ligand, ▽: with 2 mM TDCA

よる変性・凝集は小さいと考えられる。これはTDCAが非常にバルキーなアニオンであることと対応している。

4) lipase の抽出に及ぼすTDCA濃度の効果

水相のNaCl濃度を0.5M, pH 6.1-6.5として, TDCA濃度を4mMまで増加させたときの, K_p , S.A.の結果をFig. 4に示す。なお, AOT濃度50mMでは, TDCAは有機相に4mM以上溶解しない。TDCA濃度の増加にともなって K_p , S.A.が増加するのは, ミセル1個あたりに含まれるTDCA分子数が増加するとともに, バルキーなTDCA分子の吸着によって, 有機相-バルク水相界面付近のAOT分子の濃度, および電荷密度が減少し, この結果AOTによるlipaseの静電効果による変性・凝集・失活も低減するためと考えられる。因みに, 50mM AOT/イソオクタン系にTDCA 2mMを添加した場合, Wo' が10~15の範囲ではミセル1個当りAOT 35~55分子, TDCA 1.5~2分子が会合しており, ミセル濃度は約24%増加する。

また本lipaseは, Table #1(HFS)に示すように, きわめて疎水性の高いタンパク質であり, TDCAとともに有機相-水相間バルク界面に吸着してAOTを排除するとともに, TDCAの疎水的な炭素環部分と疎水の相互作用を, また解離基とは弱い静電的相互作用を生じると考えられる。

以上より, AOT-TDCA混合ミセルを用いることによって, lipaseの分配係数は7.9倍に, また有機相の全活

Fig. 4 Effect of TDCA concentration on K_p and S.A. of lipase (CVL)

性と供給水相の全活性の比で定義した活性収率は5.7倍にまで改善することができた。

2.2 α -chymotrypsin, papain の抽出

AOT-TDCA混合ミセル(AOT 50mM/TDCA 2mM)を用いて, papain, α -chymotrypsinを各々の等電点で抽出した結果(K_p vs Wo')を, AOTミセルの結果と併せてFig. 5に示す。図より, lipaseに次いで疎水性の高いpapainの場合, α -chymotrypsinより K_p の絶対値は大きい, いずれの酵素に対しても, TDCAの添加効果はlipaseに比べるとわずかである。またTDCAの添加によるこの程度の K_p の増加は, 単にミセル濃度の増加に起因するものと考えられる。そこで実際に, 前報の抽出モデル⁹⁾でミセル濃度を補正して求めた計算結果は, lipaseを除き実験結果と一致した。これらの結果は, さらに検討するが, AOT-TDCA混合ミセルによるlipaseの高選択的な抽出, 分離・精製の可能性を示している。

2.3 逆相ミセル液膜によるlipaseの正・逆抽出

逆相ミセルを含む有機相をバルク液膜として利用すると, 一方の水相から他方の水相へ特定の生理活性物質を選択的に分離できること⁶⁾, また豚膵臓lipaseの場合には, 二相抽出法・注入法のいずれでも, 逆抽出過程における酵素の変性・失活が大きく, 活性収率の改善が極めて困難であること⁹⁾を先に報告した。そこで, 前報⁶⁾と

Table 2 Phase transfer of lipase(CVL) from aqueous phase 1 (AP1, 10m*l*) to 2(AP2, 10m*l*) through reverse micellar bulk liquid membrane phase (M, 5m*l*, 50mM AOT); a) without taurodeoxycholic acid (TDCA), b) with 3mM TDCA in M

(a)		Feed conditions			After Extraction	
Phase	NaCl [M]	pH	Lipase conc. [mg/m <i>l</i>]	Taurodeoxycholic acid conc. [mM]	% Extracted	S. A. (pH 8.0) [U/mg]
AP 1	0.5	6.4	3	0	(94.0)	(380)
M	—	—	0	0	4.4	—
AP 2	1.5	9.5	0	0	1.6	0

(b)		Feed conditions			After Extraction	
Phase	NaCl [M]	pH	Lipase conc. [mg/m <i>l</i>]	Taurodeoxycholic acid conc. [mM]	% Extracted	S. A. (pH 8.0) [U/mg]
AP 1	0.5	6.4	3	0	(67.3)	(380)
M	—	—	0	3	9.7	—
AP 2	1.5	11.0	0	0	23.0	200

同じガラス製バルク液膜装置を用いて, lipaseを水相 1 (AP1)から, 50mM AOTを含む液膜相(M)を経て水相 2(AP2)へ, 連続的に正・逆抽出を行った結果を, 実験条件とともに **Table 2** に示す. 逆相ミセル液膜にTDCAを添加しない場合 (Table 2(a))は, lipaseは供給量の1.6%しか逆抽出できず, また従来の結果⁹⁾と同様, 完全に失活している. しかし逆相ミセル液膜にTDCA 3mMを添加することにより, 正・逆抽出率が改善され (Table 2 (b)), 回収率 (正抽出率×逆抽出率)は23%まで向上し, また lipaseの (初期供給全活性に対する) 活性収率は, 従来の0から12%まで向上した.

従来の逆相ミセル抽出法や, 選択性の向上を目指したアフィニティ抽出法に共通する大きな問題点は, AOTやアフィニティリガンドと酵素との強い相互作用のために, 逆抽出における活性収率が低く, 実用的な連続操作が困難な点にある. AOT-TDCA混合ミセルを利用する本抽出法は, 微量注入法等の特殊な方法によらず, 通常の二相分配抽出法を用いて, 抽出率・選択性とともに活性収率の改善が可能であり, 逆相ミセルを用いる酵素・タンパク質の分離・精製法を工業化する上で有望と考えられる.

結 言

Chromobacterium viscosum lipaseを分離対象とし, AOT/isooctane系逆相ミセルを用いる抽出分離を行った. 抽出率, 選択性, 活性収率の改善を目的として, 両親媒性のタウロデオキシコール酸 (TDCA)の添加による混合ミセル抽出法について実験的に検討し, 以下の結果を得

Fig. 5 Variation of partition coefficients of α -chymotrypsin and papain (at pH=pl), K_p , with W_o' , with and without TDCA
○: no ligand, ∇ : with 2mM TDCA

た.

1) TDCAはAOTとともにミセルの界面に組み込まれ, 安定な混合ミセルを形成する. 本実験条件で, ミセル平均粒径は, TDCAの濃度によらずAOTミセルと同程度でありミセル界面でTDCA 1分子の占める面積は, AOT約6.2分子に相当する.

2) 混合ミセルは、 α -chymotrypsin や papain に対しては、AOTミセルと同様に作用するが、lipase に対しては選択的に分配係数を8倍程度まで増加させ、また通常の二相分配抽出法や逆相ミセル液膜法でも活性収率を改善することができる。

〔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 (CVL) は東洋醸造㈱より提供を受けた。また lipase の変性・失活については、Prof. P.L. Luisi, Dr. P. Walde (Swiss, ETH) に種々有益な助言を頂いた。記して謝意を表する。

Nomenclature

$\overline{dm}$ = average diameter of reverse micelle [nm]

Kp = protein partition coefficient [-]

Wo = $[H_2O]/[AOT]$ = water content, molar ratio of H_2O to AOT [-]

Wo' = $[H_2O]/\{[AOT] + 6.2[TDCA]\}$ = molar ratio of H_2O to AOT and TDCA (taurodeoxycholic acid), corrected water content [-]

θ = CD ellipticity at 222nm [deg-cm²/dmol]

Literature cited

- 1) Dekker, M., K.V. Riet, B.H. Bijsterbosche, R.B.G. Wolbertand and R. Hilhorst: Conference papers of ISEC'88, **8-22**, p.390, Moscow (1988)
- 2) Freifelder, D.: "Physical Biochemistry", p.445, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1976)
- 3) Goto, N., K. Kondo and F. Nakashio: *J. Chem. Eng. Japan*, **23**, 513 (1990)
- 4) Han, D. and J.S. Rhee: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1250 (1986)
- 5) Hatton, T.A.: "Surfactant-Based Separation Processes", p.55, Marcel Dekker Inc. (1989)
- 6) Kuboi, R., K. Hashimoto and I. Komasaawa: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **16**, 335 (1990)
- 7) Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasaawa: *ibid.*, **16**, 755 (1990)
- 8) Kuboi, R., Y. Mori and I. Komasaawa: *ibid.*, **16**, 763 (1990)
- 9) idem: *ibid.*, **16**, 1060 (1990)
- 10) Levashov, A.V., Y.L. Khmel'nitsky, N.L. Klyachko, V.Y. Chernyak and K. Martinek: *J. Colloid and Interface Sci.*, **88**, 444 (1982)
- 11) Luisi, P.L.: *Angew. Chem.*, **24**, 439 (1985)
- 12) O'Connor, C.J., I.C. Stockley and P. Walde: *Aust. J. Chem.*, **39**, 2037 (1986)
- 13) Small, D.M., S.A. Penkett and D. Chapman: *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 178 (1969)
- 14) Woll, J.M., T.A. Hatton and M.L. Yarmush: *Biotech. Progr.*, **5**, 2 (1989)
- 15) Zampieri, G.G., H. Jackle and P.L. Luisi: *J. Phys. Chem.*, **90**, 1849 (1986)

Reverse Micelle Extraction of Lipase Using AOT and Taurodeoxycholic Acid

Ryoichi Kuboi, Yasushi Yamada, Yoshiaki Mori
and Isao Komasaawa

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

Key Words : Extraction, Reverse Micelle, Lipase, AOT, Taurodeoxycholic Acid, Activity, Mixed Micelle, Bulk Liquid Membrane

Forward and backward liquid-liquid extraction of *Chromobacterium viscosum* lipase were successfully carried out using reverse micellar systems. The reverse micellar system prepared by dissolving both AOT and taurodeoxycholic acid (TDCA) in iso-octane was found to form a stable mixed micelle showing distinct advantages in both activity yield and selectivity for lipase over the conventional AOT reverse micellar system.

The sizes of mixed micelles measured by using a dynamic light-scattering method were not different from those of AOT micelles (50mM AOT) and did not vary with TDCA concentration in the range of 0–4 mM. Nearly 6.2 molecules of AOT were replaced with a TDCA molecule at the micellar interface. The partition coefficient of lipase was selectively improved up to eight-fold in contrast to α -chymotrypsin and papain. Its activity yield was also improved by using a simple phase transfer or liquid membrane extraction method.