超臨界二酸化炭素加圧処理による *Candida rugosa* リパーゼの加水分解活性の向上

Hao YAN^{*1}・乗富 秀富^{*1}・長浜 邦雄^{*1}

(受付 2001 年 5 月 23 日・審査終了 2001 年 8 月 5 日)

要 旨 超臨界二酸化炭素加圧処理した *Candida rugosa* リパーゼの加水分解活性の変化を測定した。特に、臨界温度に近い 308.15 K, 19.61 MPa で 1 時間処理した後のリパーゼの活性は、未処理リパーゼより約 2.5 倍高い活性が得られた。*Candida rugosa* リパーゼの活性上昇の原因を調べるために、蛍光スペクトル測定、走査電子顕微鏡観察などを行い、処理前後におけるリパーゼのタンパク質の含有量やリパーゼ粉末状態の変化について検討した。その結果、酵素中の不純物抽出による酵素の高純度化に伴う粒子の微細化が *Candida rugosa* リパーゼの活性増大の主な原因であると考えられた。

1 緒 言

近年、リサイクルしやすく、反応と分離操作が簡略化できるなど利点をもつ超臨界流体を酵素反応の反応溶媒として用いる研究がさかんに行われている^{1)~3)}。特に、超臨界二酸化炭素の場合は、臨界点温度 (304.35 K, 7.38 MPa) が低く、人体に対して安全であり、無臭、不燃性、安価であるため、食品産業における油脂改質などに有効な脂質加水分解への応用に大きな期待が集まってきている。そのため、超臨界二酸化炭素中でのリパーゼの活性と安定性に関するデータが非常に有用になってきた。

1987 年、Taniguchi らはリパーゼを含む各種の酵素に対する、超臨界二酸化炭素の影響を調べた⁴⁾。その結果、5~7 wt% の水分を含有するリパーゼを 35℃, 200 atm の超臨界二酸化炭素で 1 時間処理した後の残存活性は 96% であった。最近になって、Giebauf ら⁵⁾ は *Porcine pancreas* 由来リパーゼを 75℃, 150 bar の超臨界二酸化炭素で 24 時間処理したところ、未処理の酵素より元に 860% も高い活性をもつリパーゼが得られることを報告している。そして、リパーゼ中の不純物の超臨界二酸化炭素抽出が酵素活性上昇の原因であると報告した。そこで、Giebauf らは酵素活性を向上させる新しい方法として超臨界二酸化炭素加圧処理法を提案した。さらに、Bauer ら⁶⁾ も超臨界二酸化炭素処理により *Candida rugosa* 由来リパーゼの活性が増えること (150 bar, 60℃ で, 208%) を報告している。彼らは、蛍光スペクトルにより、超臨界二

酸化炭素処理したリパーゼを分析したが、酵素の構造的な変化は観察されず、したがって、リパーゼの純度向上が酵素活性増加の原因であると推察している。

本研究では魚油の加水分解によりドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸を濃縮するときに有効な *Candida rugosa* リパーゼをモデル酵素として⁷⁾、超臨界二酸化炭素加圧処理によるリパーゼの加水分解活性の変化およびその原因について検討した。

2 実 験

2.1 試薬

Candida rugosa リパーゼ (CRL) として名糖産業 (株) のリパーゼ OF と SIGMA CHEMICAL Co., USA のリパーゼ L-1754 を使った。リパーゼ OF の活性は 360000 u/g-solid (JIS K 0601-1995 Nord-山田, 町田変法) であり、2 種類のタンパク質を含有する粗酵素である ($M_w=53000$, $pI=4.3$; $M_w=56000$, $pI=5.2$)。リパーゼ L-1754 の活性は 724000 u/g-solid である。マグロ油は日本水産 (株) から提供されたものをそのまま使用した。マグロ油中の主な脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA), エイコサペンタエン酸 (EPA) およびオレイン酸の組成はそれぞれ 23.4%, 8.6%, 30% である。また、マグロ油の油脂組成はトリグリセリド (TG) 型であり、酸価は 0.3, けん化価は 185 である。二酸化炭素 (純度 99.9%) はカヤマ酸素 (株) 製である。ほかの化学薬品は関東化学 (株) の特級試薬をそのまま用いた。

本研究では、主にリパーゼ OF を用いて、検討した。

2.2 実験法

すべての超臨界二酸化炭素加圧処理実験は、Fig. 1 に

^{*1} 東京都立大学工学部応用化学研究科 (☎192-0397 八王子市南大沢 1-1)

Fig. 1. Schematic diagram of apparatus for the SCCO₂ treatment of lipase: (a) CO₂ cylinder; (b) cooler; (c) high-pressure pump; (d) air bath; (e) high pressure cell; (f) trap; (g) gas meter; BPR: back-pressure regulator; PI: pressure indicator; TI: temperature indicator; and V: valve.

示した実験装置で行った。0.5 g のリパーゼ粉末を 50 mL の高圧セル (e) に入れ、冷却した液化二酸化炭素を高圧ポンプ (c) で高圧セルに仕込み、所定温度および圧力に到達させた後、一定時間その状態を保持した。その後、背圧弁 (BPR) により圧力を開放し、セル内の圧力を常圧に戻した後、高圧セル中のリパーゼを回収した。それから、未処理の酵素および回収した酵素を用いて常圧下のマグロ油の加水分解反応を行った。それにより、処理前後におけるリパーゼの相対的な加水分解活性を求めた。また紫外吸収法 (UV 法)⁸⁾ により処理前後のリパーゼ中のタンパク質含有量を測定した。さらに、蛍光分光分析法を用いて超臨界二酸化炭素処理前後のリパーゼの構造的な変化の有無を評価した。さらに、走査電子顕微鏡 (SEM) により、処理前後でのリパーゼ粉末の粒子形状や大きさについて観察した。一方、回収器 (f) にリパーゼからの抽出物を回収して、抽出物の重量を測定し、さらに、抽出物中の脂質を薄層クロマトグラフィー法 (TLC) で分析した。

2. 3 酵素の分析

2. 3. 1 加水分解率および酵素活性 本研究ではマグロ油の加水分解反応を行うことにより、超臨界二酸化炭素処理前後のリパーゼの加水分解活性変化を評価した。加水分解反応は、密閉栓つきガラス容器に 5 g のマグロ油と 5 mL のリン酸緩衝液 (0.1 M, pH=6.8) の混合物を入れ、40℃ に保温し、マグネチックスターラーでかくはんしながら (700 rpm), 0.4 mL 酵素水溶液 (酵素濃度: 0.025 g/mL) を加えることにより、加水分解反応を開始した。反応開始後 8 分が経過したときに、2 mL のエタノールを添加することにより反応を停止させた。他方、マグロ油と緩衝液の混合物を 40℃ でかくはんし、同様に 8 分後にエタノールを加えて、さらに 0.4 mL の酵素水溶液を入れ参照実験としてブランク値を測定した。反応後の酵素水溶液をフェノールフタレインの 0.1% エタノール液を指示薬として、0.5 N 水酸化カリウムエ

タノール溶液で滴定することにより、酸価を求めてマグロ油の加水分解率およびリパーゼの相対活性をそれぞれ次式により決定した。

加水分解率 (%)

$$= [(\text{酸価} - \text{ブランク値}) / \text{けん化価}] \times 100$$

リパーゼの相対活性 (%)

$$= [\text{処理リパーゼの加水分解率}(\%) / \text{未処理リパーゼの加水分解率}(\%)] \times 100$$

2. 3. 2 タンパク質含有量の変化 超臨界二酸化炭素処理前後の酵素粉末中のタンパク質含有量の変化を検討した。リパーゼの 1 wt% の上澄み溶液を調製して、紫外可視分光光度計 (JACSO, Ubest-55) で芳香族側鎖をもつアミノ酸残基と核酸の吸光度 ($A_{280\text{nm}}$ と $A_{260\text{nm}}$) をそれぞれ測定した。もし A_{280}/A_{260} が 1.5 以下であれば酵素に不純物である核酸が共存するものと判断した。この場合、以下の式⁹⁾ でタンパク質の含有量を求めた。

タンパク質の含有量 (mg/mL)

$$= 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$$

処理前のリパーゼのタンパク質含有量を基準 (100%) として、処理後のリパーゼの相対的なタンパク質含有量 (%) を計算した。

2. 3. 3 超臨界二酸化炭素加圧処理前後におけるリパーゼ粉末の重量変化および抽出物の分析 0.5 g のリパーゼ粉末を濾紙に包み、高圧セルに入れ、308.15 K, 19.61 MPa の条件で 1 時間処理した後、圧力を開放した。そして、リパーゼ酵素粉末を入れた濾紙の重量変化と回収器内のリパーゼの回収量を測定した。

また、抽出物の脂質の有無を TLC 法で分析した。マグロ油 (トリグリセリド約 100%) と加水分解されたマグロ油 (トリグリセリド, ジグリセリド, モノグリセリドと遊離脂肪酸を含有する) を標準油脂として TLC 分析を行い、抽出物の組成を検討した。実験はヘキサン: ジエチルエーテル: 酢酸=70:30:1 (v/v) の組成溶媒で展開した TLC プレート (Merck 社製 Silica gel 60 F 254) を *p*-アニスアルデヒドで発色させた。

2. 3. 4 蛍光スペクトル測定 タンパク質の構造的な変化を調べる目的で蛍光分析を行った。

0.025 mg/mL のリパーゼ水溶液を調製し、室温で蛍光光度計 (DATA RECORDER DR-3, SHIMADZU) を用いて、二酸化炭素処理前後のリパーゼの蛍光スペクトルを測定した。測定条件は、励起波長: 280 nm, 測定範囲: 288~500 nm, 励起/発光スリット: 5 nm/5 nm である。

2. 3. 5 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察 SEM (WEY-SEM, Akashi, WS-250) を用いて、超臨界二酸化炭素加圧処理前後のリパーゼ粉末の形状を調べた。また、粉末形状に対する酵素純度の影響を調べるために、リパー

ゼ OF の 2 倍の活性をもつ SIGMA CHEMICAL Co., USA のリパーゼ L-1754 を用いて超臨界二酸化炭素処理を行い、その粒子の形状の変化を SEM で観察した。SEM の観察条件は 15 kV, 2000 倍の倍率で行った。

3 結果および考察

3.1 加水分解活性およびタンパク質含有量の変化

3.1.1 圧力の影響 5 g のリパーゼ粉末を温度 313.15 K, 7.85~19.6 MPa の圧力下で 1 時間加压処理した。Fig. 2 に示すように、圧力が 7.85~14.7 MPa の処理条件下ではリパーゼ OF の相対活性はあまり変化しないが、19.6 MPa において、リパーゼ OF の相対活性の顕著な増加が見いだされた。

3.1.2 温度依存性 圧力 19.6 MPa の一定の条件下で 298.15~353.15 K の各温度で 1 時間加压処理したリパーゼ OF の相対活性を Fig. 3 に示す。処理したリパーゼの活性変化は処理温度に強く依存することがわかる。特に、臨界温度に近い 308.15 K の場合では、加水分解活性が急に上昇し、最高で未処理リパーゼの 2.5 倍の高い活性が得られた。また、313.15 K から 343.15 K の温度範囲では活性が高く保持されたが、353.15 K になると、リパーゼ OF の活性は減少した。

3.1.3 処理時間の影響 リパーゼ OF に対する超臨界二酸化炭素処理時間の影響を調べた。19.6 MPa, 308.15 K で 1~16 h 処理した酵素の相対活性を Fig. 4 に示した。処理時間ゼロは未処理状態のリパーゼの活性を表す。加压処理操作が 1 時間から 4 時間の間ではリパーゼの活性が上昇したが、その後は変化がなかった。また、リパーゼは 16 時間の超臨界二酸化炭素処理 ($P=19.6$ MPa, $T=308.15$ K) 下においても、高い活性を保持していた。

なお、UV 吸光度変化から、Fig. 2~4 に示した処理条件下において得られたリパーゼ OF のタンパク質の含有量には、顕著な変化は見られなかった。つまり、超臨界二酸化炭素加压処理によりリパーゼ OF の活性の劇的な増加の原因は酵素中のタンパク質含有量の変化が主な原因ではないことが示唆される。

3.2 処理前後のリパーゼ粉末の重量変化と抽出物の分析

超臨界二酸化炭素加压処理により、仕込みリパーゼ量の 0.7~1.6 wt% が回収器に回収された。それらの物質は原料リパーゼに存在する不純物が超臨界二酸化炭素に溶解・抽出され、圧力開放の際に超臨界二酸化炭素とともに高圧セルから流出したものである。また、超臨界二酸化炭素処理前後のリパーゼの重量変化と回収器の重量測定から、マスバランスを調べた。Table 1 に示した通り、3 回の実験では、0.7~2.4 mg つまり 0.5% 以内でバランスがとれており、実験の再現性は十分であることがわかった。さらに重量損失分はリパーゼから抽出され

Fig. 2. Pressure dependence of lipase activity and protein content (SCCO₂ treatment at 313.15 K for 1 h).

Fig. 3. Temperature dependence of lipase activity and protein content (SCCO₂ treatment at 19.6 MPa for 1 h).

Fig. 4. Time dependence of lipase activity and protein content (SCCO₂ treatment at 19.6 MPa and 308.15 K).

Table 1. Mass balance of lipase OF by supercritical CO₂ treatment^{a)}

Run	Weight of lipase OF before SCCO ₂ treatment (mg)	Weight of lipase OF after SCCO ₂ treatment (mg)	Extract from lipase OF (mg)	Ratio of extract (wt %)	Weight loss (mg)
I	518.6	512.5	3.7	0.71	2.4
II	514.3	509.8	3	0.58	1.5
III	510.5	501.8	8	1.57	0.7

^{a)} Treatment condition : 308.15 K, 19.6 MPa, 1 h.

たものが二酸化炭素とともに外部に一部流出したか、また超臨界二酸化炭素処理実験装置の配管内に残っているものと考え。しかしながら、その重量損失分と回収物の総和は、仕込んだリパーゼの量の 2 wt% 以下であり、非常に微量であることがわかった。この結果は超臨界二酸化炭素が一般にタンパク質を抽出することができない事実を改めて示したものとも言える。

ガスクロマトグラフィー (GC) 法によって、二酸化炭素処理によって得られた *Porcine pancreas* 由来リパーゼの抽出物中に微量な脂質と水分の含有が確認されたことが報告されている⁵⁾。そこで、Table 1 に示した回収・抽出物 3 回分 (Table 1) を合わせて、ヘキサンに溶解して、TLC 法で抽出物中の油脂成分の有無を検討した。TLC 展開図を Fig. 5 に示した。抽出物中には、ごく微量であるが、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドおよび遊離脂肪酸の含有することがわかった。つまり、リパーゼ中にはこれらの脂質が不純物として含まれていることが示された。

3.4 蛍光スペクトル測定

処理前後のリパーゼ OF の蛍光分光分析を行ったところ、従来の文献⁵⁾と同じように酵素の構造的な変化は見られなかった。この結果から酵素の構造変化が超臨界二酸化炭素処理によるリパーゼ活性増加の原因ではないことが示唆された。

3.5 SEM 観察

未処理リパーゼ OF 粒子 (a) とその 2.5 倍の活性をもつ 308.15 K, 19.61 MPa で 1 時間二酸化炭素処理したリパーゼ OF 粒子 (b) の SEM 写真を比較した (Fig. 6)。処理前のリパーゼ OF 粒子は大きく、針状結晶が少なく、また凝集した粒子が多いことがわかる。一方、(b) に示した処理後のリパーゼ OF は針状結晶が多くなり、粒径は処理前の数分の 1 以下となり、分散性のすぐれた状態に変化している。これらの結果から、超臨界二酸化炭素加圧処理によって、リパーゼ粒子の形状や大きさが変化した、これが酵素活性の上昇の原因であると考えられる。すなわち、超臨界二酸化炭素加圧処理により、リパーゼ酵素粒子間に存在する脂質のような不純物が二酸化炭素

Fig. 5. The TLC analysis of extract from lipase OF by SCCO₂ treatment (1) Extract from lipase OF (2) Tuna oil (reference) (3) Hydrolyzed tuna oil by lipase OF (reference).

Fig. 6. SEM photographs of *Candida rugosa* lipase before and after SCCO₂ treatment ; (a) Untreated lipase OF ; (b) 19.6 MPa, 308.15 K, 1 h, treated lipase OF ; (c) Untreated L-1754 lipase ; (d) 19.6 MPa, 308.15 K, 1 h, treated L-1754 lipase.

によって抽出され、それが粒子と粒子の間の粘着力を弱め、リパーゼ OF 粒子が微細化し、結果的に比表面積が増加することによって酵素活性が大きく上昇したものと推察される。

リパーゼ OF と比べて純度が高い SIGMA CHEMICAL Co., USA のリパーゼ L-1754 の未処理および加圧処理後の粒子の SEM 写真を Fig. 5 の (c), (d) にそれぞれ示す。この場合、加圧処理によって多少微細化しているが、酵素粒子の形状はあまり変わらず、また顕著な活性の増加は見られなかった。なお、L-1754 は $P=19.6$ MPa, $T=308.15$ K, 1 時間で処理し、未処理の L-1754 に比べその相対活性は 114% であった。

4 結 論

超臨界二酸化炭素加圧処理によって、*Candida rugosa* リパーゼの活性の変化について検討した結果、以下のような知見が得られた。

1. 超臨界二酸化炭素処理により、リパーゼ OF の加水分解活性が増加することがわかった。特に、臨界点に近い条件 ($T=308.15$ K, $P=19.6$ MPa) で処理することにより、リパーゼ OF の活性が約 2.5 倍増加した。しかしながら、いずれの処理条件においてもリパーゼ OF のタンパク質含有量の大きな変化はなく、また蛍光分析結果により処理前後におけるリパーゼ OF のタンパク質の構造的な変化も観察されなかった。

2. マスバランス実験結果によって、圧力開放操作とともに、リパーゼ OF から微量な物質が抽出された。抽

出物の分析によって、抽出物の中に微量な脂質が含まれていることがわかった。

3. またリパーゼの粒子形態の変化を SEM によって観察したところ、超臨界二酸化炭素加圧処理後にリパーゼ粉末の微細化が見られた。

以上の結果より、超臨界二酸化炭素処理によるリパーゼ OF の活性増大の主な原因は、脂質分の抽出による酵素の高純度化とそれに伴う粒子の微細化による比表面積の増加ならびに反応時における分散状態の改善によるものと考えられる。

謝 辞 本研究を行うに当たり、マグロ油およびリパーゼについて日本水産(株)中央研究所の大変なご協力を得た。ここに研究に対するご協力に感謝する。

文 献

- 1) T. W. Randolph, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, and D. R. Wilke, *Biotechnol. Lett.*, **7** (5), 325 (1985).
- 2) D. A. Miller, H. W. Blanch, and J. M. Prausnitz, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **613** (enzyme Eng. 10), 534 (1999).
- 3) Z. Knez, M. Habulin, and V. Krmelj, *J. Supercrit. Fluids*, **14**, 17 (1998).
- 4) M. Taniguchi, M. Kamihira, and T. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, **51** (2), 593 (1987).
- 5) A. Giebauf and T. Gamse, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **9**, 57 (2000).
- 6) C. Bauer, D.-J. Steinberger, G. Schlauer, T. Gamse, and R. Marr, *J. Supercrit. Fluids*, **19**, 79 (2000).
- 7) H. Yan, 乗富秀富, 長浜邦雄, 化学工学論文集, 投稿中.
- 8) 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫, “生物化学実験のてびき 2 タンパク質の分離分析法”, 化学同人, 京都 (1986), p. 49.

A Rise in the Hydrolysis Activity of *Candida rugosa* Lipase Caused by Pressurized Treatment with Supercritical Carbon Dioxide

Hao YAN,*¹ Hidetaka NORITOMI,*¹ and Kunio NAGAHAMA*¹

*¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo Metropolitan University (Minami-osawa Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan)

The hydrolysis activity of *Candida rugosa* lipase (lipase OF) treated with supercritical CO₂ was measured. The activity of the lipase, which was treated for one hour at 308.15 K and 19.61 MPa, is approximately 2.5 times higher than that of the untreated lipase. Changes in the content of proteins in the lipase and also in the size of the lipase particle after treatment were investigated through fluorescence emission spectra meter and scanning electron microscopy respectively. The size reduction of particles and the purification of the enzyme might be the main reasons for the increase in *Candida rugosa* lipase's activity.

KEY WORDS *Candida rugosa* Lipase / Supercritical Carbon Dioxide / Hydrolysis Activity /

(Received May 23, 2001; Accepted August 5, 2001)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **58** (12), 674—678 (2001)]