報 文

リパーゼの応用 (第2報)

2種リパーゼ剤による米ぬかろうの分解

岩井美枝子・長野則子

日本油脂株式会社尼崎工場油脂研究所 (〒660 尼崎市大浜町 1-56)

Utilization of Lipase. II.

Hydrolysis of Rice Bran Wax Ester by Two Kinds of Commercial Lipases

Mieko IWAI and Noriko NAGANO

Oil & Fats Research Laboratory, Nippon Oil & Fats Co., Ltd.

(1-56, Ohama-cho, Amagasaki-shi)

In the previous study, we found natural wax esters to be hydrolyzed by the particular commercial lipase preparations when an organic solvent was present in the reaction mixture. In all cases of vegetable wax esters, lipase activity required to bring about the same degree of hydrolysis differed significantly according to the enzyme source.

The present study was carried out to clarify the above phenomenon, using a rice bran wax with two lipases from *Candida cylindracea* (Can.) and *Rhizopus chinensis* (Rh.). To obtain reaction products for the same degree (11%) of hydrolysis of a rice bran wax in each case, Can. lipase was required in an amount that would provide 5000 U of lipase activity, while for Rh. lipase, the amount that would give 150 U under the same reaction conditions. An assay of the above reaction products indicated Rh. lipase liberate the saturated longer-chain fatty acids constituting the rice bran wax more than Can. lipase, although no significant difference was observed in alcohol specificity under the reaction conditions tested. Also Can. lipase was inactivated much faster in the reaction mixture with the organic solvent than Rh. lipase which had previously been identified as fairly thermostable. Thus, differences in the degree of hydrolysis of the wax ester caused by both enzymes may primarily arise from those in stability and substrate specificity of the two enzymes.

It is thus concluded that at least three properties of an enzyme, thermostability, stability in the reaction mixture with an organic solvent, and reactivity on long chain monoesters, are critical indexes for the screening of an appropriate enzyme or microorganism producing an enzyme which applicable to the industrial hydrolysis of natural wax esters.

1 結 言

さきにわれわれは、リパーゼの応用研究の一環として固体脂の分解を試み、従来、微生物や酵素により分解されないと考えられてきた¹⁾天然ろうがその存在状態によっては、例えば有機溶剤存在下に、特定の微生物リパーゼ剤によって分解されることを見いだした²⁾。この場合、同一リパーゼによる各種植物ろうの分解のタイムコースは、ろうの種類によって異なり、同一ろうの分解性は、リパーゼ剤の種類により異なることが明らかになった。そこで本報では、上記のような差異の生じる原因を追究

するため、米ぬかろうを対象に *Candida cylindracea* (Can.) リパーゼ剤と *Rhizopus chinensis* (Rh.) リパーゼ剤を用いて実験を行った。

2 実 験

2.1 米ぬかろう

本研究では、工業的に入手可能な天然ろうのうち、エステル純度の最も高い米ぬかろう (野田ワックス産業株式会社製、精製品) を用いた。基準油脂分析法³⁾により測定したそのけん化価は 70.9 であった。

2.2 使用リパーゼ剤ならびにその活性表示

Candida cylindracea (Can.) リパーゼ (名糖産業

K.K. 製, “リパーゼ OF”⁴⁾ 及び *Rhizopus chinensis* (*Rh.*) リパーゼ (ダイキン工業 K.K. 製)⁵⁾ を用いた。それらのリパーゼ活性の測定は, オリブ油を基質として前報²⁾と同様の方法で行い, 活性表示は, 1 min に 1 μ mol の脂肪酸を遊離する活性を 1 単位 (U) と定めた。

2.3 反応方法及び分解率

ろう 0.5 g をサンプル管 (マルエム社製, No. 7) にとり, ヘキサン^{注1)} 4.5 g を加えて徐々に加温しながら溶解した後, 反応温度 (45°C) に 5 min 保ち, 1 mL の酵素液を加え, 500 rpm の速度でかくはんしながら一定時間, 反応させた。この後, 20 mL のエタノールを加えて反応を止め, 遊離脂肪酸を逆滴定法により定量した。逆滴定法の詳細ならびに空試験値の測定法と分解率の算出は前報²⁾に述べたとおりである。

2.4 反応生成物の分離

酵素反応が進行し, 一定のろう分解率に達したことを確認した後, 2 N HCl で pH を 2.8 として脂肪酸を遊離させ, 水層を分液漏斗で除去した。溶媒層については, 45°C で溶媒を留去し, 残った反応生成物を TLC により分画した。すなわち, Merck 社製, Kieselgel 60 (20 $\times$ 20 cm, 0.5 mm 厚) のプレート上に, 上記の反応生成物の適量のクロロホルム溶液を線状に塗布し, クロロホルムを展開溶媒として 40°C で展開させた後, プレート上の脂肪酸とアルコールの両画分をかきとり, それぞれにクロロホルムを加え, 55°C に加温しながら溶解してシリカゲルを除去し, 濃縮したクロロホルム溶液の適量を GLC 分析に供した。

2.5 GLC による脂肪酸ならびにアルコールの定量

Hitachi 163 型装置を用い FID で検出した。

脂肪酸はメチル化⁶⁾した。カラムは 20% DEGS/Uniport HP (60~80 mesh) を充填したガラスカラム (3 mm ϕ $\times$ 3 m) を用いた。試料注入温度は 280°C, カラム温度は 160°C~210°C まで 2°C/min の速度で上昇させた。

アルコールはシリル化⁷⁾した。カラムは 2% シリコン OV-17/Uniport HPS (60~80 mesh) を充填したガラスカラム (2.5 mm ϕ $\times$ 2 m) を用いた。試料注入温度は 350°C, カラム温度は 130~330°C まで 10°C/min の速度で上昇させた。キャリアーガスは, 脂肪酸, アルコールともにヘリウムを用いた。

2.6 米ぬかアルコールエステルの合成

米ぬかろう 100 g に 2N NaOH エタノール溶液 40 mL

注 1) 前報²⁾のとおり, *Can.* リパーゼ剤について各種溶媒のうち, ヘキサンが最も良好な結果を示した。今回はそれと同方法で *Rh.* リパーゼ剤について, ヘキサン, イソオクタン, ヘプタン, エチレンクロロヒドリン, シクロヘキサン, *m*-キシレン, トルエン, ジオキサン, ベンゼン, 1-ヘプタノール などについて検討した結果, ヘキサン, イソオクタン, シクロヘキサン, ジオキサンなどは同程度により結果を示した。そこで本報の実験はすべてヘキサンを用いて行った。

を加え, 5 h 加熱してけん化した。つぎに, 生じた脂肪酸ナトリウムとアルコール画分を分別するためにソックスレー抽出器を用いてヘキサンを還流させ, アルコール画分をヘキサン層に移行させた。この後, ヘキサンを留去して米ぬかアルコール画分を得た。

C₁₆, C₁₈, 及び C_{18:1} の脂肪酸は日本油脂 (株) 製のもので, それぞれ純度は 96, 97 及び 90% 以上であった。

米ぬかアルコールエステルの合成は, 上記の方法で得た米ぬかアルコールと脂肪酸をそれぞれモル比が 0.9 : 1 となるように混合し, 窒素気流中, 無触媒で 250°C に加熱して脱水縮合によるエステル化を行った。このようにして得た米ぬかアルコールエステルは, 中和価測定の結果, いずれも微量の遊離脂肪酸を含んでいたが, その程度の量ではリパーゼ反応に阻害を与えないことを確認したので, そのまま基質として用いた。

2.7 試 薬

各種有機溶剤は, 試薬特級品または GR 品を用い, 各種エステルは, 東京化成工業 (株) または米山薬品工業 (株) より購入したものをを用いた。

3 結果及び考察

3.1 至適 pH ならびに至適温度

前項, 2.3 の反応方法で, 水-ヘキサン系での米ぬかろうの分解における 2 種リパーゼ剤の至適反応 pH ならびに至適反応温度について検討した。

至適 pH については, 反応液を Fig.-1-A に示す各種の pH に保つために, それぞれの pH の 0.1 M Mc Ilvain 緩衝液または 0.1 M トリス HCl 緩衝液でリパーゼ剤を溶解したものを前項 2.3 の酵素水溶液の代わりに用いた。おのおのの pH での米ぬかろう分解値を最高活性を 100 とする相対値でプロットすると Fig.-1-A のようになる。すなわち, pH 8 以上では使用緩衝液の種類により分解値に大きな差異がみられたが, 両酵素剤ともに至適 pH は, ほぼ 7 付近とみられた。酵素水溶

Fig.-1 Optimum reaction condition for hydrolysis of rice bran wax ester by two lipases in hexane-water system.

液を調製するときに用いる純水の pH が 6 付近であり、ろう分解過程での脂肪酸の遊離に伴う反応液の pH の変化はほとんどみられないことから、以後の実験では、すべて緩衝液の代わりに純水を用いることとした。

至適温度については、前項 2・3 方法により 30°C~50°C のろう分解値を測定した結果、Fig. 1-B のように、2 種リパーゼともに、各温度での値に大差がなかった。とくに 45°C の米ぬかろうのエマルジョン状態がよく、ろう分解値の誤差が最小であったので、以後の実験はすべて 45°C で行うこととした。

なお、以上の結果を水系でのオリブ油分解にみられる pH 活性曲線ならびに温度活性曲線と比べると一致しなかったが、その主な理由としては、水-ヘキサン系の米ぬかろうの各 pH あるいは各温度での物理的状態と、水系でのオリブ油の各 pH あるいは各温度での状態とが全く異なる故と考えられる。この際、反応時の pH や温度によって酵素分子の安定性や活性発現度は強く支配されるが、とくに油脂のような水に不溶の基質を含む不均一反応系では、各 pH や各温度での基質の物理的状態が多様に異なるので、その多様さが酵素反応にも影響して、液状油と固体脂との温度活性曲線や pH 活性曲線が一致しない結果をもたらすものと考察される。

なお、基質の反応液中でのエマルジョン状態の改善を意図して各種乳化剤の添加を試み、あるいはまた、酵素の安定性を保持するためにカゼインやグリセリンを添加した実験では、*Can.* リパーゼ剤については前報²⁾のように、米ぬかろうの分解においては、とくに効果は認められなかった。

3・2 水-ヘキサン系のリパーゼ活性の変化

ろう分解中、有機溶媒存在下での酵素タンパクの変性失活が懸念されたので、前項 (2・3) の条件で水-ヘキサン系での 2 種リパーゼの活性の変化を追究した。

Fig. 2 Changes in two lipase activities during rice bran wax hydrolysis in hexane-water system. (500 rpm, 45°C)

すなわち、個々の反応容器に、米ぬかろうをひょう取し、水 (対照) または ヘキサンを加え、Fig. 2 に示す種々の濃度のリパーゼ水溶液 (*Can.* リパーゼは 30 U~9000 U, *Rh.* リパーゼは 10 U~200 U) を加えた。おのおのの反応容器を 45°C, 500 rpm でインキュベートし、図中に示す各時間にオリブ油 1 g を加えてさらに 1 h 保ち、リパーゼ剤のオリブ油分解力を調べた。なお、このとき、インキュベーションの各時間においてオリブ油を加えない別容器の反応液について、ろうからの遊離酸量を測定し、これを空試験値として差し引いた値をオリブ油分解活性とした。

その結果、両リパーゼ共、水系では活性低下がみられないのに対して、水-ヘキサンでは経時的に活性が減少することが分かった。いずれのリパーゼ剤についても、濃度が低いほど、活性低下は速やかで、酵素濃度と活性低下率との関係については、リパーゼの種類により著しく異なることが分かった。すなわち、*Rh.* リパーゼ剤は、*Can.* リパーゼ剤の 1/45 の活性値でも、4 h になお 60% の活性が残存していた。この *Rh.* リパーゼ剤はさきに強い耐熱性を示す新奇のリパーゼとして開発された²⁾ものであるが、本実験条件で溶剤存在下でもかなりの安定であるとみなされる。Fig. 2 にみられる 2 種リパーゼの安定性の相違は、主として、おのおののリパーゼ剤の耐熱性と耐溶剤性の差異に基づくものと考えられる。

3・3 2 種リパーゼ剤による米ぬかろう分解生成物の比較

米ぬかろうを *Can.* リパーゼ剤ならびに *Rh.* リパーゼ剤で分解し、いずれも分解率が 11% に達した段階で生成した脂肪酸とアルコールを GLC で定量した。

3・3・1 遊離脂肪酸の生成比

米ぬかろうの分解前の構成脂肪酸ならびに分解後の遊離脂肪酸の GLC による定量的結果は Fig. 3 のとおりである。

分解前と分解後の比較から、このろうの主要な構成脂肪酸である C_{22} 飽和酸ならびに C_{24} 飽和酸がいずれの

Fig. 3 GLC of fatty acids liberated from rice bran wax ester by two lipases.

Table-1 Difference in fatty acids liberated from rice bran wax ester by two lipases (by GLC). (area %)

Fatty acid	Constitutive and free acids of rice bran wax ester	Liberated by lipases from	
		<i>Can. cylindracea</i>	<i>Rh. chinensis</i>
14:0	0.33	1.76	0.13
14:1	0.14	0.73	1.05
16:0	4.92	14.09	10.60
16:1	0.19	1.58	2.20
18:0	1.77	8.44	7.46
18:1	1.94	12.47	7.79
18:2	0.24	0.32	0.60
20:0	1.04	1.26	1.09
20:1	0.90	0.89	1.13
22:0	21.15	9.65	8.25
22:1	1.69	2.97	1.84

リパーゼ剤によっても遊離されたことが明らかである。この事実は、両リパーゼ剤がトリグリセリドのみならず、かなり長鎖のモノエステル（ワックスエステル）をも分解することを実証するものである。ちなみにワックスエステルのリパーゼによる分解についての研究⁸⁾は、動物リパーゼすなわち、ブタすい臓酵素やアンチョビなどの魚の腸液を用いて行われ、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 、 $C_{20:4}$ 、ならびに $C_{20:5}$ のような不飽和酸のメチルエステル、及びオレイン酸オレイルが分解された事実が報告されているが、常温で固体のワックスエステルの分解については調べられていない。*Can.* リパーゼならびに *Rh.* リパーゼによる C_{16} 、 C_{18} 、 $C_{18:1}$ の酸の遊離を数値で示すと **Table-1** のようになり、上記の 3 種の脂肪酸の比はそれぞれ *Can.* リパーゼでは 3.3:2:3、*Rh.* リパーゼでは 3:2:2 となり、*Rh.* リパーゼが C_{18} 酸を飽和・不飽和の別なく切り離す点で、*Can.* リパーゼと異なることが認められた。

Table-2 Fatty alcohols liberated from rice bran wax ester by two lipases (by GLC). (area %)

Fatty alcohol	Constitutive and free alcohols of rice bran wax ester	Liberated by lipases from	
		<i>Can. cylindracea</i>	<i>Rh. chinensis</i>
C_{24}	4.06	2.95	2.27
C_{26}	5.65	3.94	4.04
C_{28}	13.96	11.29	11.96
C_{30}	26.98	25.52	26.78
C_{32}	20.24	23.51	23.23
C_{34}	16.48	19.52	19.64
C_{36}	9.36	10.79	10.03
C_{38}	3.26	2.49	2.06
Total	100	100	100

3.3.2 遊離アルコールの生成比

前項 2.5 に示した条件で GLC により求めた米ぬかろうの構成アルコールの組成比ならびに 2 種リパーゼによる分解後に遊離されたアルコールの組成比は **Table-2** のとおりである。

すなわち、米ぬかろうの主要な構成アルコール ($C_{24} \sim 38$) のモノエステルを、2 種のリパーゼのいずれも分解しうることが **Table-2** の結果から明らかである。なお、この場合のアルコール鎖長に対する 2 種リパーゼの特異性の相異については、本実験条件ではとくにみられなかった。

3.4 2 種リパーゼによるモノエステルの分解

前項 3.3 の実験において、2 種リパーゼによる米ぬかろうの分解が一定の分解率に達するために要した活性は、両者において著しく異なり、*Can.* リパーゼは *Rh.* リパーゼの約 30 倍を要した。この原因として、両者の耐熱性や耐溶剤性の相違（前項 3.1.2）によることのほかに、基質特異性の相違が考えられ、この相違については、前項 3.3 の両酵素剤による遊離脂肪酸の組成比の比較からも裏づけられた。そこでこの点をさらに確認するために、前項 2.5 の方法により得た米ぬかアルコール画分と、前項 3.3 の実験結果から 2 種リパーゼによる生成比に相違を示した 3 種の脂肪酸 (C_{16} 、 C_{18} 、 $C_{18:1}$) とのエステルを化学合成し、これらのエステルに対する 2 種リパーゼの反応性を比較した。

3.4.1 米ぬかアルコールエステルの分解

まず、対照として、米ぬかろうの分解の初期の 2 段階で、ほぼ等モルの脂肪酸を切り離す活性は、**Fig-4** のように、*Can.* リパーゼでは 5000 U、*Rh.* リパーゼで

Fig-4 Hydrolysis of rice bran wax alcohol esters of fatty acids (C_{16} , C_{18} , and $C_{18:1}$) and rice bran wax ester by two lipases.

Table-3 Comparison of two lipase activities on various monoesters.

Ester	Lipase		Time	
	<i>Can. cylindracea</i> (5000U)		<i>Rh. chinensis</i> (150U)	
	3h	6h	3h	6h
	[Free fatty acid (μ mol)]			
Methyl oleate	82.0	117.6	64.2	76.6
Oleyl oleate	16.6	16.5	17.8	21.4
Methyl stearate	39.2	58.8	23.2	73.1
Lauryl stearate	0	1.1	3.0	28.5
RBWA-palmitate	16.9	19.6	19.6	21.4
RBWA-stearate	3.0	3.0	19.6	21.4
RBWA-oleate	8.0	8.9	21.4	21.4

RBWA: Rice bran wax alcohol

は 150 U と著しく異なった。つぎに上記と同じリパーゼ量を 3 種の脂肪酸の米ぬかアルコールエステルに作用させたときの脂肪酸遊離のタイムコースは Fig-4 のとおりで、2 種リパーゼともに米ぬかろう分解のそれに比べて、はるかに低かった。なお、本実験結果は、前項の米ぬかろう分解における結果とよく符号し、*Can.* リパーゼは C_{18} の飽和酸と不飽和酸を識別して不飽和酸をより多く遊離するのに対し、*Rh.* リパーゼは、飽和酸、不飽和酸を差別なく切り離すことが分かった。

3.4.2 各種モノエステルの分解

2 種リパーゼのモノエステルに対する特異性を比較するために、アルコール鎖長の相違あるいは脂肪酸鎖長の相違による反応性の差異を追究した。

すなわち、*Can.* リパーゼは 5000 U、*Rh.* リパーゼは 150 U をそれぞれのモノエステルに対して、前項 2.3 の方法で作用させ、分解値を比較すると Table-3 のとおりである。

アルコール基の異なる同一脂肪酸エステル（オレイン酸メチルとオレイン酸オレイル、ならびにステアリン酸メチルとステアリン酸ラウリル）では、いずれのリパーゼも同様に、より短鎖のアルコールのエステルによく作用した。他方、同一アルコールのモノエステル（オレイン酸メチルとステアリン酸メチル）の分解においては、*Can.* リパーゼは飽和酸より不飽和酸を多く遊離し、*Rh.* リパーゼは両者を差別なく切り離すものとみなされた。この事実は前述の米ぬかろうの分解ならびに米ぬかアルコールエステルの分解の結果からも裏づけられた。さらに注目すべき事実として、ステアリン酸ラウリルのようなかなり長鎖のエステル（固体脂）に対して、*Can.* リパーゼはほとんど作用しないが、*Rh.* リパーゼはよく作用した。

以上の実験事実は、*Can.* リパーゼ剤に比べて、*Rh.* リパーゼ剤のモノエステルに対する特異性がかなり広いことを示唆し、このような両リパーゼ剤の特異性の相違

が米ぬかろうならびにその他の植物ろうの分解²⁾において、タイムコースの差異や、使用酵素量の著しい差異となって表れるものと推測される。

4 総 括

天然ろうの酵素による分解性が酵素剤の種類により異なる原因を追究し、長鎖脂肪酸 ($C_{14} \sim C_{28}$) と長鎖アルコール ($C_{24} \sim C_{38}$) のモノエステルである米ぬかろうの 2 種のリパーゼ剤 (*Candida cylindracea* ならびに *Rhizopus chinensis* に由来する) による分解にみられる差異は、それぞれの酵素剤の耐熱性、耐溶剤性及び基質特異性に基づくことを明らかにした。

この結果から、かなり長鎖 (C_{20} 以上) の脂肪酸とアルコールから構成される固体脂を酵素法により分解し、全成分のうちから特定の脂肪酸あるいは特定のアルコールのみを選択的に生産することを意図する研究においては、それぞれの目標に適應する酵素剤の選択あるいは新奇酵素生産菌を検索する段階で、上記の 3 つの因子が研究の指標となるものと考えられる。なお、この場合、分解率は上記の目標に対する酵素選択の基準となり得ず、酵素の至適反応条件を検討する際の便宜上の目安に過ぎない。

なお、本研究では、使用酵素として現時点で工業的に入手可能なリパーゼ剤を用いた。したがって、これらの標品に含まれる真のリパーゼ (EC 3.1.1.3) や狭義のエステラーゼ (EC 3.1.1.1.) の組成が不明であり、本実験結果にみられる長鎖モノエステルの分解が、真のリパーゼによるものか、あるいは酵素剤中の狭義のエステラーゼによるのかについては言及できない。

謝 辞

本研究に使用した *Rhizopus chinensis* リパーゼ剤を提供していただいたダイキン工業株式会社、生化学部、中西克己氏に深謝致します。また反応生成物の GLC 分析に関して協力をいただいた当研究所森岡憲祐氏に感謝致します。

(昭和 62 年 5 月 13 日受理)

文 献

- 1) 日本生化学会編、生化学実験講座 3 “脂質の化学”，東京化学同人 (1981) p. 245
- 2) 岩井美枝子，長野則子，油化学，**36**，46 (1987)
- 3) 日本油化学協会編，“基準油脂分析試験法” (1971)，2.4，3.2-71
- 4) 町田晴夫，油化学，**33**，691 (1984)
- 5) 岩井美枝子，富永嘉男，中西克己，公開特許，昭 59-156，282
- 6) L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961)
- 7) 小島次雄，岡 恒，工化，**70**，448 (1967)
- 8) J.S. Patton, J.C. Nevenzel, A.A. Benson, *Lipids*, **10**, 575 (1975)